

別紙

令和元～4年度 食品健康影響評価技術研究 研究成果報告書（終了時）

研究課題名 (研究項目名)	国際動向に立脚した農薬代謝物の新たなリスク評価手法に関する研究（課題番号：1906） （2：農薬の使用により生成される代謝物の評価方法に関する研究）
主任研究者	研究者名：小野 敦 所属機関：国立大学法人 岡山大学

I 研究期間及び研究目的等

1 研究期間

令和元年度～令和4年度（4年間）

2 研究目的

農薬の食品健康影響評価においては、有効成分（親化合物）のみではなく植物や動物体内において生じる代謝物の評価も重要である。近年、JMPR（FAO/WHO合同残留農薬専門家会合）やEFSA（欧州食品安全機関）では、原則、全ての代謝物について安全性の評価を行うという考え方にに基づき *in silico* の評価技術を始めとした新しい評価手法を活用した評価が進められている。さらに、現在OECDでは新たな評価手法を取り入れた残留物評価ガイダンスの改訂が進められている。本研究では、国際機関等における農薬代謝物の評価方法や考え方及び評価事例の調査を行うとともに、OECDにおけるガイダンス検討ワーキンググループに参画し、海外評価機関等で取り入れられている新たな評価手法の我が国における農薬評価への適用について検討し、得られた成果をもとに我が国における新たな評価の考え方を提案することを目的とした研究を行った。

3 研究体制

研究項目名	個別課題名	研究担当者（所属機関）
海外評価機関における農薬代謝物評価手法の調査	海外評価機関における農薬代謝物の安全性評価手法の調査	小野 敦（所属機関名：岡山大学）、本間正充、古濱 彩子（国立医薬品食品衛生研究所）、清家 伸康（農業・食品産業技術総合研究機構）
	海外評価機関における農薬代謝物の評価事例の調査と我が国における評価との比較	小野 敦（所属機関名：岡山大学）、本間正充、古濱 彩子（国立医薬品食品衛生研究

		所)、清家 伸康(農業・食品産業技術総合研究機構)
	実際の評価資料をもとにしたケーススタディの実施とインシリコ評価手法の適用に関する検討	小野 敦(所属機関名:岡山大学)、古濱彩子(国立医薬品食品衛生研究所)、清家伸康(農業・食品産業技術総合研究機構)
我が国における農薬代謝物の評価スキームの作成と提案	我が国における農薬代謝物の評価スキームの作成と提案	小野 敦(所属機関名:岡山大学)、古濱彩子(国立医薬品食品衛生研究所)、清家伸康(農業・食品産業技術総合研究機構)
	OECDケーススタディをもとにした課題抽出	小野 敦(所属機関名:岡山大学)、古濱彩子(国立医薬品食品衛生研究所)、清家伸康(農業・食品産業技術総合研究機構)

4 倫理面への配慮について

本研究では、人を対象とした研究や遺伝子解析、疫学研究及び動物試験を実施する予定はない。

II 研究内容及び成果等

1 研究項目：海外評価機関における農薬代謝物評価手法の調査

(1) 個別課題：海外評価機関における農薬代謝物の安全性評価手法の調査（研究担当者：小野 敦（所属機関名：岡山大学）、本間 正充、古濱 彩子（国立医薬品食品衛生研究所）、清家 伸康（農業・食品産業技術総合研究機構））

1. 海外評価機関と我が国の農薬代謝物の安全性評価手法の比較

1-1. EFSAガイダンスと食品安全委員会における評価との比較解析

本研究では、海外評価機関における農薬代謝物の安全性評価手法として、EFSAガイダンス（Panel on Plant Protection Products and their Residues (2016) : Guidance on the establishment of the residue definition for dietary risk assessment. EFSA Journal, 14(12), 4549）について調査を行い、食品安全委員会における評価との違いについて解析を行った。

1-1-1 食品安全委員会の評価の流れ¹⁾

農薬代謝物の安全性評価のうち、考慮すべき代謝物等の暴露量を検討するための試験成績は動物代謝試験（ラット、マウス等）、家畜代謝試験（ヤギ、ウシ、ニワトリ等）、植物代謝試験、作物残留試験（後作物残留試験を含む）、そして、畜産物残留試験又は乳汁移行試験である。一方、考慮すべき代謝物等の毒性を検討するための試験成績は、急性毒性試験（経口）、遺伝毒性試験、そして、その他毒性試験（実施されている場合）である。これらの試験成績を用い、図1-1-1のフローに基づいて暴露量、毒性そして、ADI/ARfD設定の3ステップで農産物および畜産物中の暴露評価対象物質が決定される。

暴露量のステップでは、農産物について、①植物代謝試験において可食部の総残留放射能（TRR）が10%を超え、作物残留試験でも相当量検出される代謝物等、②植物体内運命試験で10%TRRを超え、作物残留試験で家畜等の飼料として利用される部位（稲わら、麦わら、とうもろこし茎葉など）において相当量検出される代謝物等、が暴露評価対象物質の検討対象となる。一方、畜産物については、①家畜代謝試験において、乳汁、卵、筋肉等食品として摂取する部位で10%TRRを超え、畜産物残留試験でも相当量検出される代謝物等、②家畜で特異的又は多量に生成される代謝物等、が暴露評価対象物質の検討対象となる。なお、農産物と畜産物いずれも、ラット、マウス等の動物代謝試験で検出される代謝物等については、毒性試験において親化合物総体として評価できることから、検討の対象から除外することができる。

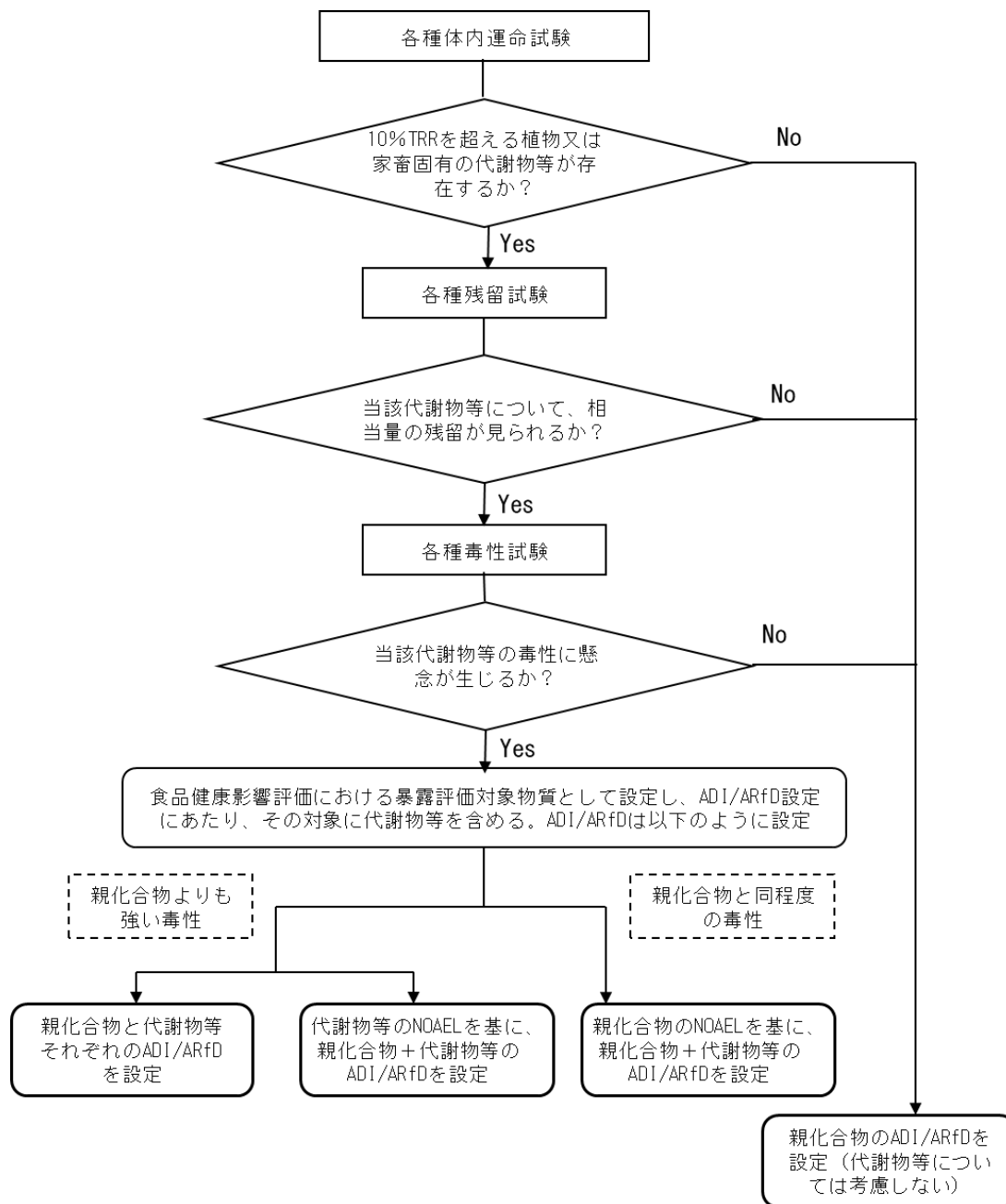


図1-1-1 食品安全委員会における暴露評価対象物質の決定フロー

毒性評価のステップでは、代謝物等の毒性は、親化合物の毒性との相対的な強さ、（ア）代謝物等の毒性が親化合物よりも強い、（イ）代謝物等の毒性が親化合物と同等、（ウ）代謝物等の毒性が親化合物よりも弱い、で評価する。代謝物等の毒性が親化合物と同等と判断された場合であっても、親化合物の急性毒性試験においてLD₅₀が2,000mg/kg体重を超える低毒性物質である（健康影響がほとんどないと判断される）場合は、原則として毒性面からは代謝物等を検討しない。また、代謝物等と親化合物のLD₅₀を比較した結果、毒性が親化合物よりも弱い場合には、原則として代謝物等の取扱いを検討する必要はない。ただし、親化合物自体が強い毒性を有する物質であって、代謝物等の毒性も強い場合にはその取扱いを検討する。

ADI/ARfD設定のステップでは、代謝物等が親化合物よりも毒性が強い場合（特に、代謝物等が活性本体である場合）や親化合物と代謝物等の毒性の特徴（プロファイル又はエンドポイント）が異なる場合は、親化合物とは別に、当該代謝物等についてADI/ARfDを設定、又は代謝物等のNOAELを基に、親化合物＋代謝物等のADI/ARfDを設定する。また、代謝物等の毒性が親化合物と同等と判断された場合は、親化合物のNOAELを基に、親化合物総体として代謝物等を含めたADI/ARfDを設定する。

ただし、以下の3点の場合は、慎重に対応するとしている。①残留が特定の作物や特定の部位に限定される場合。②親化合物、代謝物等ともに毒性が低く、毒性面からは代謝物等について検討する必要がないと判断されても、代謝物等が親化合物より多量に検出される（遺伝子組換え作物で特有に生成される代謝物等を含む）場合。③いずれの体内運命試験で10%TRR未満であっても、代謝物等の化学構造から毒性が親化合物より強い若しくは蓄積性が高い場合、又は毒性が極めて強い親化合物から生成する代謝物等である場合など、代謝物等による健康への影響が予測される場合。

上記①～③は稀な例であり、通常は、暴露量、毒性そして、ADI/ARfD設定の3ステップで、農産物および畜産物中の暴露評価対象物質が決定される。

1-1-2 EFSAガイダンスの概要²⁾

EFSAでは、遺伝毒性評価（モジュール1）、一般毒性評価（モジュール2）、暴露量評価（モジュール3）の3ステップで農産物および畜産物中の暴露評価対象物質が決定される（図1-1-2）。以下に各モジュールの概要を示す。

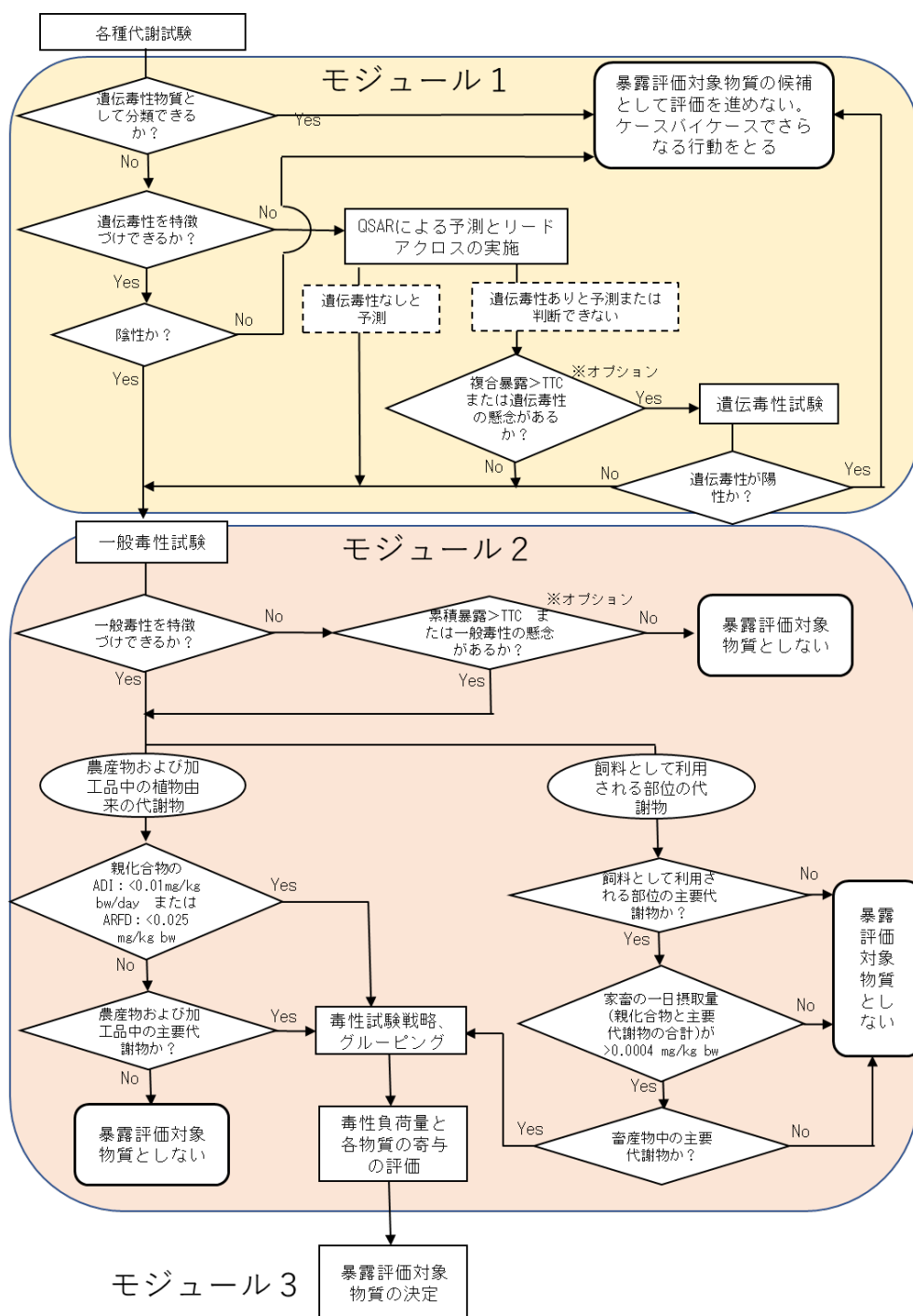


図1-1-2 EFSAにおける暴露評価対象物質の決定フロー

モジュール1における、遺伝毒性評価のステップでは、原則として動植物で生じた全ての代謝物について遺伝毒性の検討を行う。すなわち、植物代謝試験、後作物代謝試験、家畜代謝試験等で検出された代謝物が評価対象になりえる。しかし、代謝物のうち、糖または生体高分子といった毒性学的な懸念のない化合物は評価から除外される。モジュール1は1-9のステップで構成されており各ステップの詳細は以下のとおりである。

モジュール1：遺伝毒性の否定（1-9ステップ）

すべての代謝物について、遺伝毒性を否定するため遺伝毒性の可能性について評価する必要がある（モジュール1、図1-1-3）。遺伝毒性評価はあらゆるレベルでの代謝物の同定から開始されます。評価は、特に懸念のない代謝産物、例えば 砂糖またはリグニン（決定スキームのステップ2）を除き続けられます。ステップ3では、規則（EC）1272/20089に従って分類された遺伝毒性化合物のスクリーニングを行う必要があります。特に懸念事項が特定されない場合は、ステップ4に進みます。

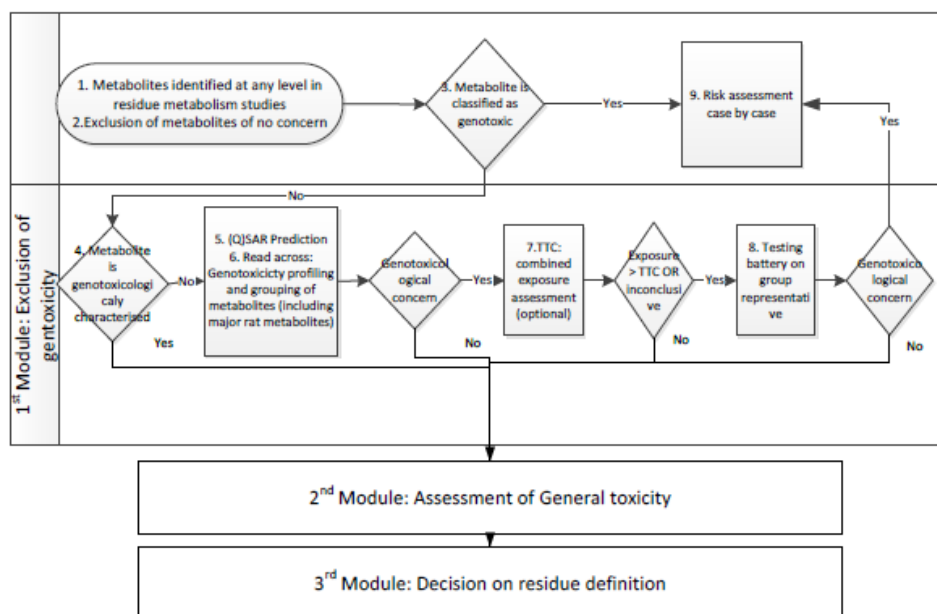


図1-1-3 EFSAにおける農薬代謝物評価スキームのモジュール1

ステップ4：代謝産物の同定

親物質で実施された毒性試験で評価された代謝物については、親物質の遺伝毒性特性に関する結論がこれらの代謝物にも当てはまり、さらなる試験は不要です（図1のステップ4）。さらに代謝物が親との毒物学的研究によって特徴付けられていないが、別の活性物質に共通であり、この活性物質の毒性学的特性によってカバーされていることが判明した場合は、代謝物の評価にこの活性物質の遺伝毒性特性を利用し当て結論づけることができます。

ステップ5,6：（Q）SARとリードアクロスの利用

ステップ5での遺伝毒性の評価は、（Q）SAR（ステップ6）、およびリードアクロス（ステップ6）を利用します。遺伝毒性の予測のための（Q）SARは、単一のモデルのみに基づくのではなく、予測の感度と特異性を最大化するために、知識ベースと統計ベースの2つの独立した（Q）SARモデル（異なるトレーニングセットやアルゴリズムに基づく）を適用する必要があります。ステップ6では（Q）SAR予測の偽陰性および偽陽性の可能性に対処するためにリードアクロスを行います。使用される（Q）SARモデルは、REACH規制のガイダンスに基づき使用されているもの、OECDの（Q）SAR評価原則に従っている必要があります。

ステップ7：遺伝毒性評価でのTTCの利用

遺伝毒性の評価は、(Q) SAR、リードアクロスだけでなく閾値に対する暴露を考慮（図1のステップ7）する必要があります。これは、遺伝毒性に関する毒性学的懸念の閾値（TTC）（ $0.0025 \mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$ ）である。(Q) SARとリードアクロスにより遺伝毒性の懸念があると見なされる物質で、 $0.0025 \mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$ の累積暴露を超えている場合は、ステップ8に進みます。

ステップ8：遺伝毒性の評価のためのバッテリーのテスト

必要に応じて遺代謝物のプロファイリングとグループ化を行い、グループごとに少なくとも1つの代表的な代謝物についてin vitro試験を実行する必要があります。代表的な代謝物の選択に関しては暴露または技術的要因（試験の実施可能性）を考慮する必要があります。試験バッテリーには、遺伝子変異、構造的および数値的染色体変化の3つすべての遺伝的エンドポイントをカバーする最低2つのin vitroテストを含める必要があります。In vivoでのフォローアップ試験の必要性は、ケースバイケースで、in vitroで観察された遺伝毒性結果の程度、トキシコキネティクス、バイオアベイラビリティ、および潜在的な標的臓器のデータを考慮する必要があります。遺伝毒性試験のバッテリーで陰性を示し、代謝産物に遺伝毒性の懸念がないと見なされた場合は、評価決定ツリーの次のステップに進みます（モジュール2）。

ステップ9：遺伝毒性の懸念

ステップ3で遺伝毒性の懸念があると特定されたすべての化合物、および予測と実試験（ステップ4または8）で陽性を示し、遺伝毒性を否定できないすべての代謝物については、ケースバイケースの評価が必要です。これらの代謝物は、このガイダンス文書の範囲内の残留物定義に含めるためのプロセスをさらに進めるための適切な候補ではありません。代わりに、リスク評価者とリスク管理者は、消費者の許容できないリスクを排除するために、さらなる措置を講じる必要があります（例：暴露の詳細評価、緩和策の提案、規制製品における既知の遺伝毒性物質の許容性に関する管理決定）。

遺伝毒性が陽性と判断された場合には、暴露評価対象物質の候補として評価を進めず、ケースバイケースでさらなる評価を行う。

代謝物の遺伝毒性が陰性と判断された場合には、モジュール2において一般毒性の特徴づけを行う。個々の代謝物について代謝試験（ADME）において10%以上の尿中排泄率が認められる代謝物については、親物質の毒性試験により定量的に評価が行われていると判断してさらなる毒性試験を実施せずに親物質の毒性参照値を当てはめて評価を行う。親物質の毒性試験結果から毒性評価が行えない代謝物については、TTC評価を行うことも可能である。ただし、TTCアプローチはあくまでオプションであり、信頼性が高く堅牢な暴露量の推定が可能な場合に限定される。TTCの適用においては、各代謝物の暴露と対応するCramer Class TTCの比率を合計して、1未満の場合、それ以上の評価は不要と判断される。一方、合計が1以上の場合、さらなるリスク評価が要求される。TTC評価に用いられるTTC値は 抗コリンエステラーゼ活性を有する有機リン酸塩およびカルバメートの場合、 $0.3 \mu\text{g}/\text{kg体重}/\text{日}$ 、CramerクラスIIIおよびCramerクラスIIに分類される代謝物については、 $1.5 \mu\text{g}/\text{kg体重}/\text{日}$ およ

びCramerクラスIに分類される代謝物については、30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日が適用される。さらに、必要であれば急性影響評価についても慢性影響と同様にTTC評価を実施する。急性TTCの評価においては、アドホック値として神経毒性アラートを有する代謝物の場合、0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日、CramerクラスIIIおよびCramerクラスIIに分類される代謝物については、5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日およびCramerクラスIに分類される代謝物については、30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日が適用される。

TTC評価が適用出来ない場合、もしくはさらなるリスク評価が必要とされた場合、農産物および加工品中の植物由来の代謝物については、親化合物（もしくは代謝物）のADI（0.01mg/kg bw/day）以下またはARfDが（0.025 mg/kg bw）以下には、主要代謝物であるか否かに関わらず毒性試験が要求される。なお、これら毒性試験が要求されるADI、ARfDの値は、それぞれ270、195農薬のADI、ARfDの分布の下側25%タイル値である。親化合物の毒性が強くない（ADI（0.01mg/kg bw/day）以下、ARfDが（0.025 mg/kg bw）以下ではない）場合には、農産物および加工品中の植物由来の代謝物については、主要代謝物か否か（農産物（TRR $\geq$ 10% かつ $\geq$ 0.01 mg/kg または（TRR が 10%以下でも $\geq$ 0.05 mg/kg）および加工品（TRR $\geq$ 10%））を確認し、暴露評価対象物質となりえるかを判断する。一方、飼料として利用される部位の代謝物は、主要代謝物か否か（TRR $\geq$ 10% かつ $\geq$ 0.01 mg/kg）および、家畜の一日摂取量（親化合物と主要代謝物の合計）が0.0004 mg/kg bwより多いか否かの評価、そして畜産物中の主要代謝物か（TRR $\geq$ 10%）を評価し、暴露評価対象物質となりえるかを判断する。農産物および加工品中および飼料として利用される部位の代謝物について、追加の毒性試験の必要性をケースバイケースで判断する。毒性試験を要求する場合、親物質の毒性プロファイルから特定の有害性について考慮する必要がある。代謝物の毒性プロファイルが親物質の毒性プロファイルと質的に同じと判断される場合、親物質と代謝物のNOAEL（もしくはLOAELやベンチマークドーズ）の比から各代謝物のRPF（Relative Potency Factors）を求める。代謝物の毒性プロファイルが親物質と質的に異なる場合、代謝物に特定の参照値を設定する。特定の参照値を設定する場合、投与期間を考慮した追加の不確実性係数（UF）の適用を検討する。

親物質と代謝物について得られたRPFもしくは参照値をもとに、次式により毒性学的負荷量を算出する。

$$\text{毒性学的負荷量} = (\sum \text{RPF}_i \times \% \text{TRR}_i \times \text{RRV}_i)$$

ここで、RPF（Relative Potency Factors、親化合物の毒性を1とした時の相対値）、TRR（Total Radioactive residue、各種代謝試験により得られる数値）、RRV（Ratio of Reference Values、親化合物の毒性プロファイルが異なる代謝物グループとの毒性の相対値。親化合物の毒性プロファイルのグループを1とする）である。

次いで、毒性学的負荷量を100%に換算し、寄与率の合計が75% 以上となる親化合物と寄与率の高い代謝物を暴露評価対象物質として決定する。

1-1-3 食品安全委員会とEFSAの相違点

主な相違点を列挙する。

① 評価する代謝物

食品安全委員会では農産物、畜産物において10%TRRを超える代謝物および作物残留試験等で相当量検出される代謝物を評価対象として検討を進めていくのに対し、EFSAでは、原則として農産物、畜産

物で生じた全ての代謝物を評価対象として検討を進める。

② 暴露評価対象物質の候補を選択する最初のトリガー

食品安全委員会では農産物、畜産物において10%TRRを超える代謝物が存在するか否か、EFSAでは遺伝毒性の有無である。

③ インシリコ評価手法の適用

食品安全委員会では実際の試験データのみで評価を行っている。しかしEFSAでは、遺伝毒性を評価する際には、実際の試験データだけではなく、QSARおよびリードアクロースでの評価、毒性学的懸念の閾値（TTC）を適用して判断している。一般毒性についてもTTCを適用して判断する場合がある。

④ 暴露評価対象物質の決定方法（毒性）

食品安全委員会では、毒性の観点について、代謝物が親化合物よりも毒性が強い、同等、弱いに分け、急性毒性や遺伝毒性を加味し、代謝物を暴露評価対象物質に含めるか否か決定している。しかしEFSAでは、毒性学的負荷量を算出し、毒性学的負荷量への寄与率の合計が75%以上となる親化合物と寄与率の高い代謝物を暴露評価対象物質としている。

⑤ 暴露評価対象物質の決定方法（暴露量）

食品安全委員会では、暴露量の観点について、農産物、畜産物から相当量検出される代謝物は暴露評価対象物質になりうるが、EFSAでは、農産物は $TRR \geq 10\%$ かつ 0.01 mg/kg 以上の残留濃度の場合または $TRR \leq 10\%$ でも 0.05 mg/kg 以上の残留濃度の場合、飼料として利用される部位の代謝物は、 $TRR \geq 10\%$ かつ 0.01 mg/kg 以上の残留濃度の場合、暴露評価対象物質になりうる。すなわち残留濃度について数値基準を示している。

1-1-4 今後必要なデータと検討項目

食品安全委員会が評価で使用しているデータをそのままEFSAでの評価手法に適用できると仮定すると、次のデータおよび検討が必要になる。

① 後作物代謝試験

② 加工品の代謝試験及び残留試験

③ QSAR、リードアクロースでの評価およびTTCを適用するためのデータ

④ 毒性学的負荷量を用いて暴露評価対象物質を決定する際に必要なRPFとRRVの算出方法

これらのうち、③については本研究で検討し、新たなデータの必要の有無が明らかになる。④については、毒性学的負荷量を用いた暴露評価対象物質の決定法を採用すると判断した場合、RPFとRRVの算出法とその妥当性を確認する必要がある。①および②については、農林水産省のテストガイドライン³⁾では要求されていない。特に後作物代謝試験については諸外国と様相が異なる。すなわち、諸外国では大規模農園でのクロップローテーションを想定しており、通常、年1作程度を想定している。しかし我が国では、小規模農場での多品目栽培が主流で、年4作以上を行う場合もあり、後作物として何が栽培されるかの特定が難しい。したがって、OECDテストガイドライン等の諸外国の手法をそのまま適用することは不適である、後作物代謝試験にどの作物を供試すべきかから検討した上で、試験条件を決定しガイドライン化を行わないとならないだろう。

EFSAガイダンスの調査にあわせてWHO JMPRにおける代謝物のリスク評価スキームについても、現在、調査を進めている。WHOでは暴露評価および評価対象物質の設定は、FAOが担当していることから

、今後、FAOによる暴露評価対象物質設定の考え方について調査を行う予定をしている。

1-2. 遺伝毒性の評価に用いる既存のツールの適用性に関する調査

遺伝毒性の評価に用いる既存ツールの農薬代謝物の評価への適用性について、上述のEFSAガイダンスの調査とは別に、FESAにおけるグループ化および類推の促進のための農薬の遺伝毒性の予測および農薬の遺伝毒性に関する類似性分析における既存の（Q）SARモデルの適用可能性評価（EFSA SCIENTIFIC REPORT APPROVED by 12 MARCH 2019）について調査を行った。

FESAにおけるグループ化および類推の促進のための農薬の遺伝毒性の予測および農薬の遺伝毒性に関する類似性分析における既存の（Q）SARモデルの適用可能性評価（EFSA SCIENTIFIC REPORT APPROVED by 12 MARCH 2019）

<要旨>

食品リスク評価のための残留物の定義に関する指針の実用的施行を促進するため、EFSAは、遺伝毒性に対する代謝構造変化の影響の分析を含め、農薬およびその代謝物の遺伝毒性を予測するための既存の*in silico*モデルの適用可能性評価を体系化した。*in vitro*および*in vivo*試験における（Q）SARの予測能について評価が行われた。Ames試験については、すべての（Q）SARモデルで、Ames試験の実験上の変動と同等な、統計的に有意な予測が得られた。しかしながら、Ames試験以外の試験・評価項目については、（Q）SARモデルの信頼性は最適さとは全くかけ離れていると結論づけている。

次に、Ames試験の変異原性、および*in vitro*染色体異常を予測するため、新しいリードアクロス法の適用を試みている。リードアクロスでは、Ames試験結果の予測には概ね成功したが、*in vitro*染色体異常の予測についてははるかに劣っていた。Ames試験以外の評価項目において結果が不良であったのは、試験方法および結果の評価基準が複数回にわたって改定されたことにより、データベースが質的に不均一化されてモデリングに適さないものになったためであると考察している。

第3のアプローチとして、代謝または分解過程の結果として生じる構造変化が、対象物質の潜在的遺伝毒性に及ぼす影響について評価した。Ames試験における変異原性に対して変化を生じる可能性があるか、または可能性がないかを評価するため、親物質と代謝物の構造的差異（既知の構造アラートを超える）について特定し、分類を行った。さらに、専門家により構造アラート分析を適用したところ、遺伝毒性パターンの変化の大部分について論理的な説明が可能となった。今回の研究によって得られた知見は、証拠の重み付け評価および段階的評価の手順へ取り入れられるのに適していると結論づけた。とりわけ、専門家の知識の重要性が特に強調された。

<報告書要約>

食用および飼料作物に農薬を使用すると、植物または畜産物の可食部に残留する可能性があり、その結果、消費者が、有効成分および／またはその代謝物、分解産物、反応生成物などの化合物の混合物へ曝露されることになる。リスク評価の際には、食品および飼料製品中の農薬有効成分の最終残留物について考慮すべきであり、委員会規則（EU）No 283／2013の要件に従って適切に特定する必要がある。有効成分については毒性に関する包括的書類が作成されているが、その代謝物の毒性学的特性については情報が全くないか、限られた情報しかない場合が多い。この理由により、またPPRパネル

の科学的見解に基づく勧告に従い、残留物の定義手順の第1段階として、すべての代謝物の遺伝毒性評価に、(定量的)構造活性相関 ((Quantitative) Structure-Activity Relationship : (Q) SAR) モデルと類推の利用を提案する。

これを目的として、EFSAは、農薬の有効成分とその代謝物の遺伝毒性を予測するための *in silico* モデルの利用について、そのさまざまな側面を評価するための調達手続きに入った。その作業の結果をここに報告する。

最初に、文献検索と、農薬の遺伝毒性に関するEFSAの新規データベースへのモデルの適用を基に (Q) SARモデルの評価を行った。この評価では、比較予測作業、ならびにQSARモデルの組み合わせ、予測に対する「適用領域」の影響およびモデルと専門知識の統合など、より具体的なテーマを含む、非常に豊富な文献の存在が示唆された。しかし、文献中のほぼすべての研究はAmes試験のモデル化に焦点を当てており、その他の遺伝毒性試験や評価項目についてはほとんどみられなかった。

最近の文献 (2010年~2016年) によれば、Ames試験の変異原性を予測するソフトウェアツールの性能は、既報の評価と同等であった。公共データセット中のAmes試験の変異原性結果の予測にそのシステムを適用した場合、感度は0.72~0.96、特異度は0.65~0.86であった (レトロフィッティング。試験対象物質は、規定はあるものの変動のある割合にてモデルのトレーニングセットにもある)。同時に、異なる外部試験セットを用いてバリデーションを行った場合、(Q) SARはかなり高い変動を示した。以上の結果から、QSAR技術は既存のデータの修正に十分であることが示唆されるが、化学空間の対象範囲や表象にはさらなる改善を要する。他の研究では、モデルの「適用領域」内外の予測性の差異が検討されている。入手可能なエビデンスは、「適用領域」内の性能改善が極めて限定的であることを示唆していると思われる。したがって、適用範囲外の予測を有意でないものとして棄却すべきではない。ツールの組み合わせについては文献分析の結果から、感度は顕著に上昇するが、その代償として特異度は低下することが示唆された。

本研究では、文献検索と並行して大規模な比較予測作業が展開された。最近公開された農薬とその代謝物に関するEFSAの遺伝毒性データベースに対し、市販および公表されている広範な (Q) SARモデルを適用した。この作業では、5つの試験法を選択した。すなわち、細菌復帰突然変異試験 (Ames試験)、哺乳類骨髄染色体異常試験、哺乳類赤血球小核試験、哺乳類の *in vitro* 染色体異常試験、哺乳類細胞の *in vitro* 遺伝子突然変異試験である。

比較予測作業の結果から総じて、Ames試験の予測性能とその他の試験法の予測性能に大きな差異があることが示唆された。Ames試験では、すべての (Q) SARモデルで統計的に有意な予測値が得られた。感度は46%~71%、特異度は66%~98%であった。これらのEFSA遺伝毒性データベースによって得られた結果は、過去の文献の研究で報告された統計的に有意な予測値を裏付けるものである。上記の予測値は、Ames試験のデータ固有の実験上の変動と同等であり、Ames試験について (Q) SARモデルが十分な水準にあることが示唆される。

対照的に、*in vitro*細菌変異原性試験 (Ames試験) 以外の試験・評価項目については、依然として (Q) SARモデルの信頼性は最適さと全くはかけ離れていると思われる。実際、予測のROCグラフを調べたところ、ほとんどのモデルはランダム応答を示す対角線に近い傾向にあることが示された。広範な文献検索を行っても同様の予測研究は得られなかったため、農薬および代謝物のデータベースから得られたこれらの結果を、過去の文献の研究と比較できる可能性はない。したがって、このEFSAプロ

ジェクトにより、細菌における変異原性以外の遺伝毒性の評価項目について、QSARの予測性の研究に独自の情報を提供することができる。

EFSAによる農薬の遺伝毒性結果を基にしたQSAR予測を組み合わせることによって、文献上のエビデンスが確認された。一般的な傾向として、QSARを組み合わせることによって感度は高まるが、特異度が代償となる。一方、モデルの「適用領域」内外の予測は大きく変わらないと考えられる。

QSARは長年にわたって多くの性能評価を受けてきており、特に比較予測作業に重点を置かれてきたが、リードアクロスに関する文献にはこれに類似したものは見当たらない。文献には一般的なワークフローや基準に関する提案は豊富に載っているが、公表されている応用例は、非常に詳細な内容が書かれている場合が多いものの例数は限られているため、提案されているワークフローの予測に関する実価を評価するには十分な資料ではない。

EFSAの遺伝毒性データベースを用いて、親農薬に関する情報から代謝物の遺伝毒性を予測することを目的として、リードアクロスの試行を約60件行った。有効成分の特性については、規制当局に提出された書類に体系的に記載されているため、その代謝物におけるリードアクロスの基礎となる主要な情報源となる。必要に応じて、より広範囲の類縁物質に関する情報も利用した。

2つの新規戦略を用いてさまざまな手法により、異なる情報群を統合してAmes試験と*in vitro*染色体異常試験の両方にリードアクロスを適用した。共通の結果としては、リードアクロスがAmes試験結果の予測に概ね成功すると思われるということである。2つの戦略の性能については、*in vitro*染色体異常では差異が認められる部分もあったが、Ames試験で得られた性能と比較した場合、総体的に劣っていた。

一方、Ames試験とその他の試験・評価項目とで適用の相違が認められたことは、(Q) SARの評価で得られた結果と一致している。用いた構造活性手法は全く同じであるため、非Ames試験データにおける性能不良は、生物学的データの種類および質の違いによるものと仮定される。Ames試験とは異なり、他の*in vitro*遺伝毒性試験は人為的な陽性反応の影響を受ける可能性があり、これを科学界が認識したことによってプロトコルおよび基準の改定が幾度か行われた。このため、これらの試験におけるQSARおよびリードアクロスの検討に利用可能な実験結果のデータベースは、Ames試験のデータベースよりも著しく小さいだけでなく、異なる期間に異なる条件下で得られたデータを含むため、質も低いと思われる。

今回の研究の第3の側面は、代謝または分解過程の結果として生じる構造変化が、対象物質の遺伝毒性に及ぼす影響について評価することであった。ある研究では、構造アラートのパターン変化に集中的に取り組まれていた。構造アラートに関する情報は、自動的に適用されてはいなかったが、専門家の知識を用いてフィルタリングがなされた。これにより、親物質と（一部の）代謝物でAmes試験結果が異なる物質のサブグループにおいて、遺伝毒性パターンの大部分について論理的な説明が可能となった。実際、専門家が監視することにより、規則の自動適用に関して予測性能が向上した。さらに、既知の構造アラートを超える「親物質・代謝物」の構造的差異について、ケモインフォマティクスツールを用いて広範な解析を実施した。その結果、Ames試験における変異原性の変化に関連する構造変化に分類されるものと、その観点では中間に位置するその他の構造変化のリストが作成された。これらの構造因子に関する知識は、構造アラートに関する知識を補完するものであり、代謝物の遺伝毒性の評価に併用されうる。

今回のプロジェクトにより、持ち帰るべき重要な教訓が提示された。とりわけ、Ames試験以外の試験・評価項目のQSARのモデル可能性について初めて設けられた比較の機会であり、データのキュレーションの改善など、さらに開発する必要があることが示唆された。また「適用領域」およびモデルの組み合わせも改善を要する重要な領域である。特にリードアクロス法については、QSARでみられることと同様に、より客観的な予測基準を開発する必要がある。

実験と*in silico*法はいずれも本質的に確率論的であることから、統合試験戦略内の多様なツールを組み合わせることで用いることによって、評価の信頼性と確実性が向上する。今回のプロジェクトでは、代謝物の毒性評価に利用可能な複数の種類のエビデンス（QSAR、構造アラート、リードアクロス、構造因子、化学的類似性）について評価を行った。個々の農薬および代謝物について結論を得るためには、最善の専門家の判断に基づいてエビデンスの統合を行わなければならない。本研究では、化学物質の分類決定（潜在的に陰性、潜在的に陽性、不明またはボーダーラインなど）における上記の因子の組み合わせ方の例として、（a）段階的アプローチなどにより、多くの化学物質を効率的に評価して優先順位をつける組み合わせ、（b）化学物質を個別に評価できるような組み合わせ（必要に応じて、より詳細な評価にも適している）を挙げる。

最後に、突出した結果として、（Q）SAR（構造アラートを含む）予測と専門知識との統合は、より良好な予測が得られる方法であるということである。専門家の知識の監督的役割については、あらゆる評価において甚だ強調されなければならない。

1-3. FAOマニュアル（各種代謝試験）とFAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR)のガイダンス（毒性評価）と食品安全委員会における評価との比較解析

本研究では、FAOマニュアル（各種代謝試験）とFAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR)のガイダンス（毒性評価）について調査を行い、食品安全委員会における評価との違いについて解析を行った。

1-3-1 各種代謝試験（FAOマニュアル）¹⁾

本マニュアルは推奨される農薬のMRLsと消費者の暴露量を評価することを目的としている。FAOでは、作物および家畜の代謝試験は、Residue Definition（暴露評価対象物質の定義）の裏付けとなる基本的な証拠として位置づけられている。要求される資料は、植物代謝試験、後作物試験（代謝・残留）、家畜・動物代謝試験、環境中運命試験（土壌中運命試験、水中運命試験）である。後作物試験は土壌から作物への移行に関する試験と換言できるため、土壌中運命試験と若干関連性があるが、暴露評価対象物質の決定という観点では関連性が低いため、ここでは環境中運命については省略する。

FAOでは、代謝物に関して暴露評価対象物質の候補となりえるトリガー（食品安全委員会では10%T_{RR}以上か？）を明確に示していない。しかし、植物・家畜代謝試験結果に対して以下の対応が求められている（表1-3-1）。

表1-3-1 作物の代謝から抽出可能な残留物の同定と特性化のための戦略

Relative	Concentrat	Required Action
----------	------------	-----------------

amount (%)	ion (mg/kg)	
< 10	< 0.01	毒物学的懸念がなければ、何の行動も起こさない
< 10	0.01 - 0.05	特性化。簡単な場合にのみ、同一性の確認を試みてください。たとえば、参照化合物が利用できる場合、または以前の研究から同定がわかっている場合のみです
< 10	> 0.05	特性評価/識別は、識別された量を考慮して、ケースバイケースで決定する必要があります。
> 10	< 0.01	特性化。簡単な場合にのみ、同一性の確認を試みてください。たとえば、参照化合物が利用できる場合、または以前の研究から同定がわかっている場合のみです。
> 10	0.01 - 0.05	特に経路を確立する必要がある場合は、特定するための重要な試みを行う必要があります、最終的には特性評価が受け入れられる可能性があります。
> 10	> 0.05	すべての可能な手段を使用して同定します。
> 10	> 0.05 unextracted radiolabel	抽出された固形物を分析し、未抽出の放射性標識画分に放射能がトリガー値0.05 mg / kgまたはTRRの10%のいずれか大きい方まで存在する場合は、放射能の放出を試みてさらに特定する必要があります。 抽出された固形物の処理は、順次または並行して実施することができる。提案されている処理の種類には、37° Cでの希酸とアルカリの添加、界面活性剤、酵素、および逆流を伴う6N酸および/または10Nアルカリの使用が含まれます。より穏やかな手順は、放出された代謝物構造のより正確な割り当てを提供することに留意する必要があります。酸/アルカリ逆流などの徹底的な抽出は、おそらく最終的な加水分解生成物として部分を放出し、元の抽出されていない放射性標識とはほとんど構造的な関係がない可能性があります

植物・家畜ともに10% TRRまたは 0.05 mg/kgより大きい代謝物はすべて同定（特性化する）ことが要求されていることから、トリガーではないものの注視すべき代謝物か否かの境界線と言えるだろう。

植物代謝試験の特徴として、使用が予定されている作物グループの種類（表1-3-2）ごとに、代謝試験結果を提出することが要求されている。この点はEFSAも同様である。

表1-3-2 作物グループと具体的な作物種

作物グループ	作物種
根菜類	根菜と塊茎野菜、球根野菜
葉物野菜	アブラナ属の野菜、葉物野菜、茎野菜、ホップ
果物	柑橘系の果物、ナシ状果、核果の小さな果物、ベリー、ブドウ、バナナ、ナッツ、柿、果菜類
豆類と油糧種子	豆類野菜、豆類、油糧種子、ピーナッツ、豆類飼料作物、カカオ豆、コーヒー豆
穀物	穀物、草、飼料作物

作物グループ内の1作物の代謝試験は、グループ内の作物代謝試験の代表として使用できる。また、農薬の代謝をすべての作物グループに外挿するために、少なくとも3つの代表的な作物（5つの異なる作物カテゴリーから）の代謝試験を実施する必要がある。これらの3つの試験結果が同等の代謝経路を示している場合、他の2つのカテゴリーの作物について追加試験は必要とされない。3つの代表的な作物に加えて、許可された使用が作物および/またはその成長条件の点で独特であり、代謝研究が必要となる状況がある。すなわち、水稻に用途がある場合は、他の利用可能な代謝研究に関係なく、水稻の代謝研究を提出する必要がある。遺伝子組換え作物について、農薬代謝による有効成分耐性を伝達する遺伝子を挿入した場合は、遺伝子組み換え作物が属する作物グループごとに作物代謝研究を実施する必要がある。ただし、従来の作物と同様の代謝を示している場合は、追加の試験は必要なく、異なる代謝経路が観察された場合は、2つの追加試験を提出する必要がある。なお、我が国およびFAOでは植物代謝試験は、OECDテストNo. 501に従ってデータ要求されているため、両者に大きな違いはない。

後作物代謝試験については、輪作における食品または家畜飼料に使用される農薬及びその代謝物の性質と摂取量を決定するために実施される。後作物試験は輪作を想定しているため、永久または半永久作物（アスパラガス、アボカド、バナナ、ベリー作物グループ、柑橘類果実作物グループ、ココナッツ、クランベリー、イチジク、ジンセン、グローブアーティチョーク、ブドウ、グアバ、キウイフルーツ、マンゴー、マッシュルーム、オリーブ、パパイア、パッションフルーツ、パイナップル、オオバコ、ポメフルーツ作物グループ、ルバーブ、核果作物グループ）に対し農薬が使用される場合は、試験が要求されない。後作物代謝試験では、次の3つのグループの代表作物を供試する（表1-3-3）。

表1-3-3 作物グループと具体的な作物種

作物グループ	作物種
グループ1	大根、ビート、ニンジンなどの根と塊茎の野菜
グループ2	小粒（小麦、大麦、オート麦、ライ麦など）
グループ3	ほうれん草やレタスなどの葉物野菜

後作物代謝試験での試験設計において輪作間隔（Plant Back Interval、PBI）、すなわち、前作における農薬の最終散布から次作の作付けまでの期間を考慮しなければならない。具体的には、密接に輪作された作物の状況を評価する場合は7～30日、前作の収穫後の典型的な輪作を反映する場合は60～270日、1年おきの場合は270-365日になる。選択するPBIは、農薬の予想される農業用途と典型的な輪作慣行に基づいている必要がある。

現在、我が国では後作物残留試験はデータ要求されているが、後作物代謝試験は要求されていない。また上記の試験設計は、欧米における広大な農地での輪作を想定しているが、我が国では小規模農場での多品目栽培が主流で、年4作以上も栽培する場合もあり、後作物として何が栽培されるかの特定が難しい。後作物代謝試験を実施することになった場合は、FAOやEFSAあるいはOECDの方式をそのまま受け入れるか？、我が国独自の供試作物とPBIをガイドラインに明示するのか？の判断が必要である。

後作物残留試験は、後作物代謝試験で検出された代謝物や分解物が野外条件下で見つかるかどうか、またどのレベルで見つかるかを検証するために行われる。得られたデータは、後作物のMRLが必要かどうかの判断、または国レベルで適切な輪作制限を設けるために使用されます。後作物残留は通常、低濃度のさまざまな代謝物で構成されており、それらは一般にLOQを下回っており、それ以上のアクションをする必要はない。

家畜・動物代謝試験は、農薬が家畜や畜舎に使用される場合、または動物飼料、飼料作物、または動物飼料に使用される可能性のある植物部分に使用される作物または商品にかなりの残留物が残る場合は常に必要とされる。本試験は、代謝の程度の違い、観察された残留物の性質の違い、潜在的な毒物学的懸念が知られている構造を持つ代謝物の出現といった視点での評価が必要とされる。通常、最も重要な代謝研究は反芻動物と家禽を含む研究であり、前者は泌乳中のヤギやウシ、後者はニワトリが供試される場合が多い。代謝物のリストアップについては、植物代謝試験で示した表2-1に基づいて行う。本試験は、我が国およびFAOとも、OECDテストNo. 505に従ってデータ要求されているため、両者に大きな違いはない。

1-3-2 毒性評価（JMPRのガイダンス²⁾より）

毒性試験が行われていない代謝物および分解物の毒性を評価するために、毒性学的懸念の閾値（TTC）とリードアクロスを利用するスキームで構成されている（図1-3-1）。

TTCは、食品リスク評価において、関連する毒性データがほとんどまたは全くない農薬代謝物の毒性を評価するための貴重なツールである。潜在的に遺伝毒性のある化合物のTTC値は0.0025 µg/kg体重/日、非遺伝毒性化合物（有機リン酸およびカルバメート化合物の場合は0.3 µg/kg体重/日、CramerクラスIII化合物；1.5 µg/kg体重/日、CramerクラスII化合物；9µg/kg体重/日、CramerクラスI化合物で；30µg/kg体重/日）である。リードアクロスは、構造的類似性があると考えられる化合物の適切な毒物学的情報に基づいて新規化合物を評価するツールである。代謝物を評価する場合、その構造が親化合物と類似しているため、親化合物の毒物学的情報を評価に使用できるかどうか判断される。

図1-3-1に示す評価スキームは、17のステップで構成されている。

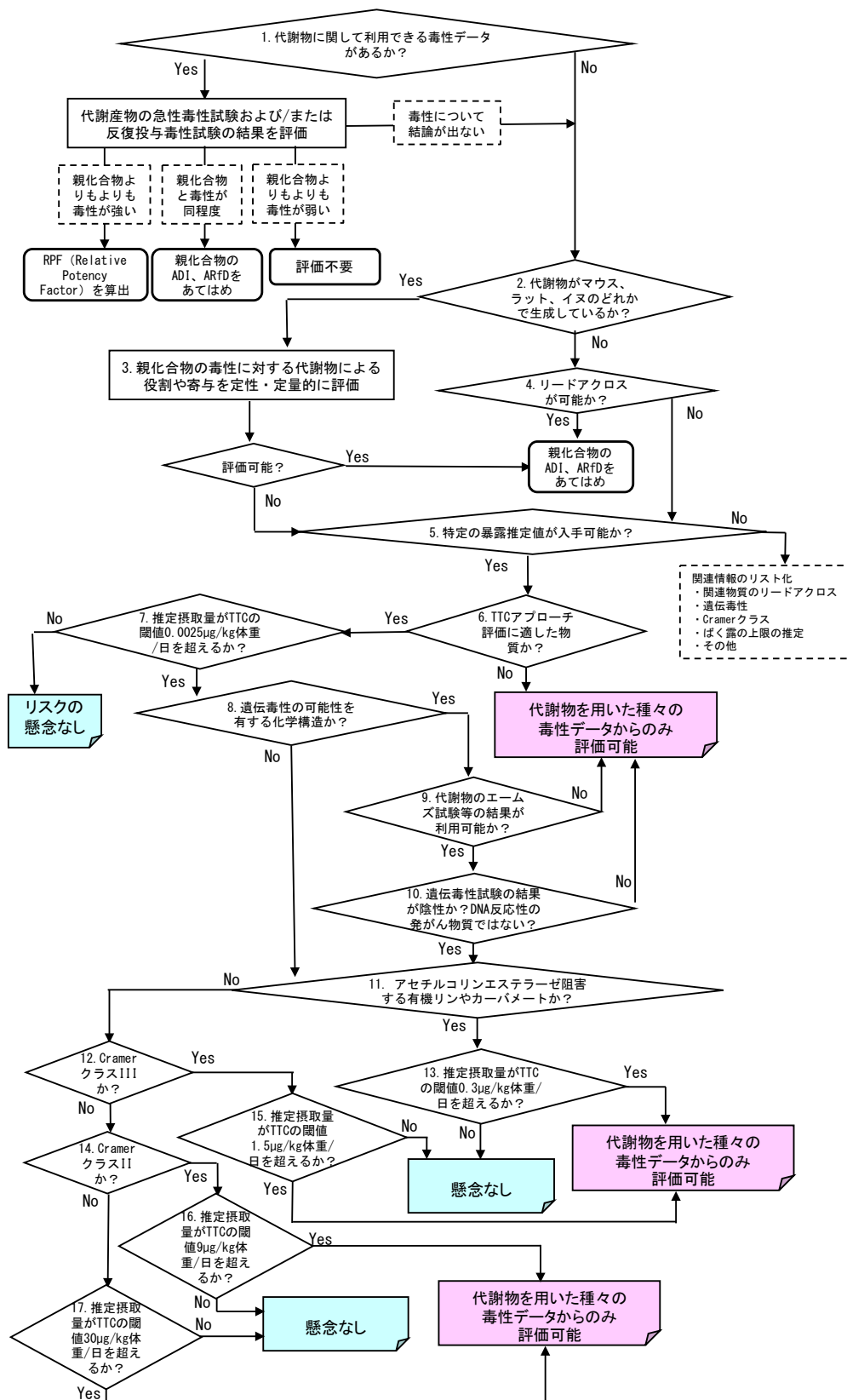


図1-3-1 JMPRにおける暴露評価対象物質の決定（毒性評価部分）フロー

ステップ1：

ここでは、親化合物と代謝物の急性毒性試験および/または反復投与毒性試験の代謝産物の結果を評価する。

1) 親化合物よりも毒性が低い場合、代謝物は毒性学的な懸念はないと判断する。

2) 親化合物に対する毒性が同等の場合、必要に応じて、代謝物に対して化合物と同じADI/ARfDを設定する。

3) 親化合物よりも毒性が強いと思われる場合は、親化合物と代謝物のNOAELの比から各代謝物のRPF (Relative Potency Factors) を求める。RPFは、食品リスク評価を行う際、次式で表せられるのための曝露相当量を計算するために使用される。

$$\text{Occurrence} = [\text{親}] + \text{RPF1} \times [\text{代謝物1}] + \text{RPF2} \times [\text{代謝物2}] + \dots$$

4) 急性および/または反復投与毒性試験で代謝物の毒性に関する結論が得られない場合、ステップ2に進む。

ステップ2：

目的の代謝物がマウスおよび/またはラットおよび/またはイヌで生成されるかどうか、すなわち、親化合物を含めた総体として毒性試験が行われるかどうかを評価する。

ステップ3：

親化合物の毒性における代謝物の役割を評価し、可能な範囲で定性的および定量的な評価を行う。代謝物が少なくとも親化合物の毒性にかなりの程度まで寄与していると結論付けることができる場合、必要に応じて、代謝物に親のADIおよびARfDを使用する。結論を引き出すことができない場合は、ステップ5に進む。

ステップ4：

植物または家畜に固有な代謝物について、リードアクロスアプローチを使用して、十分な構造的類似性があると考えられる化合物の毒物学的情報を評価する。特に、代謝物は構造的に親化合物と類似するケースが多いため、リードアクロスが可能か？を評価することが重要である。この点は専門家の判断が必要であり、会議での議論まで結論を確定することは不可能な場合がある。リードアクロスが可能と考えられる場合、リードアクロスが実行されている化合物の値に基づいて、健康ベースのガイダンス値（必要に応じてADIおよびARfD）を設定する。リードアクロスが不可能と判断された場合は、ステップ5に進む。

ステップ5：

毒物学的評価時に特定の暴露推定値が入手可能かどうかを検討する。次のような利用可能な関連情報をすべてリストする。

- ・ 関連する物質との読み取り
- ・ 遺伝毒性アラート

- Cramerクラス
- 利用可能な場合、曝露の上限の推定
- その他の関連情報

可能であれば、代謝物に潜在的に毒性学的懸念があるかどうかについて結論を出す。特定の暴露推定値が入手できる場合は、手順6に進む。

ステップ6：

TTCアプローチによる評価に適さない物質か否かを判断する。TTCアプローチによる評価に適さない物質は、非必須金属または金属含有化合物、アフラトキシン様、アゾキシ、ベンジジンまたはN-ニトロソ化合物、ピロリジジナルカロイド、ポリハロゲン化ジベンゾジオキシン、ジベンゾフランまたはビフェニル、タンパク質、ステロイド、生体内蓄積することが知られているか予測される化学物質、不溶性ナノ材料、放射性化学物質、または未知の化学構造を含む化学物質の混合物である。

ステップ7：

TTC値は、遺伝毒性的発がん性に関する特定の構造的アラートがあり、発がん性データベースの発がん性データが陽性である化学物質のデータに基づいていますが、ステップ6で特定された最も強力な遺伝毒性的発がん性物質は除外します（アフラトキシン様、アゾキシ、ベンジジンまたはN-ニトロソ化合物およびピロリジジナルカロイド）。この値（0.0025µg/kg体重/日）は、発がん性の効力またはTD50値からの線形外挿によって導出されたため控えめであり、100万分の1を超える推定生涯がんリスクの上限がある各構造アラートを使用している。

ステップ8：

ステップ7では遺伝毒性および遺伝毒性的発がん性の可能性を過大予測する傾向があるため、ここでは構造アラートモデルを使用し評価する。

ステップ9/10：

構造アラートが存在してもDNA反応性のがんが発生しないことを保証するには、適切な*in vitro*および*in vivo*の遺伝毒性データが必要となる。

ステップ11：

代謝物がカルバメート、トリアルキルリン酸、ホスホロチオネート、ホスホネートなどのアセチルコリンエステラーゼ阻害作用を示す可能性があるかどうかを判断する。

ステップ12：

CramerクラスIIIの化学物質を特定する。

ステップ13：

体重1キログラムおよび1人あたりのTTC値を示す（0.3µg/kg体重/日を超えるか？）。

ステップ14：

CramerクラスIIの化学物質を特定する。

ステップ15：

体重1キログラムあたりおよび1人あたりのCramerクラスIII TTC値を示す（1.5μg/kg体重/日を超えるか？）。

ステップ16：

体重1キログラムおよび人ごとに表されるCramerクラスII TTC値を示す（9μg/kg体重/日を超えるか？）。

ステップ17：

体重1キログラムおよび1人あたりのCramerクラスI TTC値を示す（30μg/kg体重/日を超えるか？）。ステップ1～11で評価されていない化学物質はCramerクラスIでなければならない。

JMPR特有の「脂溶性」について説明しておく。「脂溶性」は食品リスク評価ではなく、サンプリングに関係する。すなわち、親化合物と代謝物の筋肉と脂肪への分配を示す指標であり、通常、オクタノール-水分配係数（logPow）が用いられている。脂肪組織/血液分配係数は、脂肪組織と血液中の化学物質濃度または溶解度の比率を指す。脂肪組織または全血への化学物質の溶解度は、これらのマトリックスの脂質および水画分への溶解度の合計に等しくなる。脂肪と筋肉の分配定数kは、Powが脂質と水の分配定数であるPlwと同じ値であると仮定して計算できる。さらに、筋肉に5%の脂質が含まれ、残りが水であり、脂肪が80%の脂質であると仮定すると、次のようになる。

$$Plw = [lipid]/[water] \approx Pow;$$

$$k = [partition\ coefficient\ residues\ in\ fat: blood] / [partition\ coefficient\ of\ residues\ in\ muscle: blood];$$

$$k = Pow\ [fraction\ lipid]_{fat} + [fraction\ water]_{fat} / Pow\ [fraction\ lipid]_{muscle} + [fraction\ water]_{muscle}$$

$$k = [(Pow \times 0.8) + 0.2] / [(Pow \times 0.1) + 0.9]$$

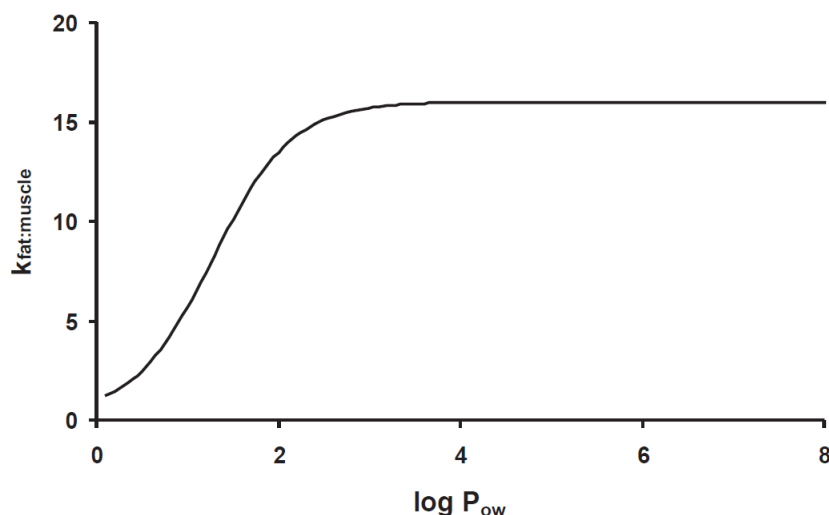


図1-3-2 筋肉と脂肪の間の化合物の分配比とlogPowの関係

k =脂肪/筋肉中の残留物の濃度比

図1-3-2から、log Powが3を超えると「脂溶性」とされる。暴露評価対象物質が親化合物と代謝物の混合物で定義される場合、代謝物の脂溶性が親化合物の脂溶性と異なる可能性があるため、問題が生じる可能性がある。すなわち、混合物内の相対濃度が変化し、その結果、混合物が脂肪に分配される傾向も変化する。JMPRは、明らかに脂溶性でも明らかに水溶性でもない多くの化合物には特別な配慮が必要としている。

1-3-3 食品安全委員会とJMPRの相違点

① 代謝物のADIおよびARfDの設定方法

代謝物において利用できる毒性データがある場合、食品安全委員会とJMPRともそのデータを基にADIおよびARfDを設定する。食品安全委員会とJMPRとも代謝物の毒性が親化合物より弱い、または同等の場合は違いがない。しかし、代謝物の毒性が親化合物より強い場合、食品安全委員会では、親化合物と代謝物のADIおよびARfDをそれぞれ設定、もしくは代謝物のNOAELを基にADIおよびARfDを設定する。一方、JMPRでは、親化合物と代謝物のNOAELの比から各代謝物のRPF (Relative Potency Factors) を算出し、ADIおよびARfDを設定する。RPFはばく露量を基に食品リスク評価を行う際に使用する。ただし、代謝物のADIおよびARfDの設定方法という観点からは、食品安全委員会とJMPRの両者で大きな違いがあるという訳ではない。

② 代謝物に関するトリガー

JMPRでは、代謝物に関して暴露評価対象物質の候補となりえるトリガーを明示していないが、事実上TRR>10%または 0.05 mg/kg以上の場合にはすべて同定（特性化する）ことが要求されている。一方、食品安全委員会では、TRR>10%かつ農産物、畜産物から相当量検出される代謝物は暴露評価対象物質になりうる。ただし、JMPRでは⑥で示すTTCアプローチ等で代謝物の毒性を評価している。

③ 後作物代謝試験

我が国では、テストガイドラインで要求されていないため、輪作で生成する代謝物が評価されていない。

④ ラット等で代謝物が検出されている場合

食品安全委員会では、ラット等の動物代謝試験で検出される代謝物等については、毒性試験において親化合物総体として評価できることもあることから、暴露評価対象物質の検討対象から除外することができる、としている。JMPRでは、親化合物の毒性に対する代謝物による役割や寄与を定性・定量的に評価できた場合（ステップ3）は、親化合物のADIおよびARfDをあてはめる。一方、評価ができない場合は、TTCアプローチによる評価（ステップ6）等を行う必要がある。

⑤ ラット等で代謝物が検出されていない場合

食品安全委員会では、ラット等で代謝物が検出されていない場合についての具体的なスキームは示されておらず、農薬物や家畜中代謝物の%TRRや残留濃度等を基にケースバイケースで判断している。JMPRでは、リードアクロスの適用（ステップ4）やTTCアプローチによる評価（ステップ6）等を行うことになる。

⑥ インシリコ評価手法の適用

食品安全委員会では実際の試験データのみで評価を行っている。しかしJMPRでは、実際の試験データだけではなく、④、⑤で示したようなリードアクロスの適用（ステップ4）やTTCアプローチによる評価（ステップ6）だけではなく、構造アラートモデル（ステップ8）を適用するスキームになっている。

⑦ 代謝物を用いた毒性試験のデータ要求の判断基準

食品安全委員会では代謝物を用いた毒性試験データの要求基準が具体的に示されていない。しかしJMPRでは、TTCの閾値を具体的に示すことで、事実上、申請者への毒性試験データの要求の判断基準となっている。

1-3-4 今後必要なデータと検討項目

食品安全委員会が評価で使用しているデータをそのままJMPRの評価手法に適用できると仮定すると、暴露評価対象物質の決定方法（特に毒性）について、以下のデータおよび検討が必要になる。

① リードアクロス、TTC、QSARを用いて評価するためのデータ

② 暴露評価対象物質を決定する際に必要なRPF決定方法

これらの①、②はEFSAの評価手法を適用する場合と全く同じである。①については本研究で検討し、新たなデータの必要の有無が明らかになる。②については、RPF算出法とその妥当性を確認する必要がある。

③ 後作物代謝試験

農業形態の異なる欧米をベースとしたOECDの方式をそのまま受け入れるか？、我が国独自の供試作物とPBIをガイドラインに明示するのか？等の判断が必要である。

参考文献

1) Submission and evaluation of pesticide residues data for the estimation of maximum residue levels in food and feed. Third edition. FAO PLANT PRODUCTION AND PROTECTION PAPER

225, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2016

2) Pesticide residues in food, WHO Core Assessment Group on Pesticide Residues Guidance, Guidance document for WHO monographers and reviewers, World Health Organization 2015

2. OECD Residue Definitionガイドラフティンググループ (RDWG) におけるOECD Residue Definitionガイドの検討 (小野 敦 (所属機関名: 岡山大学))

OECDでは、OECD Residue Definitionガイドのアップデートの検討が進められている。本研究では、アップデートの検討を行っているOECD Residue Definitionガイドラフティンググループ (RDWG) に参画して、新たなガイドや国際的な評価手法の方向性について我が国の評価に取り入れるべく情報収集を行うとともに、我が国の考え方について必要に応じてOECDガイドへの反映を行うため、各国から参加した専門家と議論を行った。世界的なコロナ禍の影響もあり当初年1回予定された対面会合は研究期間中は中止となり、ガイドのアップデートに関しては、評価スキームにおける暴露評価グループと毒性評価グループそれぞれでおおよそ1回/月のweb会議により議論を行い、さらに1回/月の全体web会議で各グループでの議論の進捗について情報共有を行った。本研究班では、小野 (岡山大学) が毒性グループと全体のweb会議において議論に参加した。OECDガイド改訂案はまだ最終化されてはおらず、現在、内部レビュー対応をほぼ終了し、今後、未完成のappendixを完成して2023年中旬にRGWG最終案としてOECDに提出する予定をしている。以下では、これまでRGWGにおいて行われた議論の概要を示す。

図2-1、2-2には、検討初期の段階で示された暴露評価、毒性評価それぞれ評価スキームの概略を示す。暴露評価 (図2-1) においては、動物 (家畜)・植物での代謝試験結果からの代謝物のリストアップに続き、まずは食品中に $\geq 10\%$ TRR かつ ≥ 0.01 ppm 含まれる代謝物もしくは家畜飼料中に $\geq 10\%$ TRR かつ ≥ 0.05 ppm 含まれる代謝物をさらに検討が必要な代謝物として選択し、これらの代謝物については、次のステップで作物残留試験・家畜飼養試験により残留レベルを確認する。一方、上記とは別に代謝物のうち $< 10\%$ TRR であるが > 0.05 ppmの代謝物については、cGAPにおける作物残留試験もしくは推定家畜負荷量における家畜飼養試験で ≥ 0.05 ppmである場合、さらなる検討の必要性を考慮することとされている。いずれの場合も作物残留試験および家畜飼養試験から、cGAPにおける暴露量の推定を行い、食品中 ≥ 0.01 ppm もしくは家畜飼料中 ≥ 0.05 ppm の代謝物もしくはヒトの食品中濃度が ≥ 0.01 ppm と推定される代謝物について、リスク評価の必要性を検討すべき代謝物として選択し毒性評価の検討を行う。従来の食品安全委員会の暴露評価では、動物 (家畜)・植物での代謝試験結果から $\geq 10\%$ TRRであることを基準として、評価対象代謝物の選択を行っているが、cGAPにおける暴露量の推定により評価対象代謝物の選択を行うという点が提案されている評価スキームと大きく異なっており、OECDガイドを我が国の評価に取り入れるにあたっては、その対応について検討が必要になると考えられた。

一方、暴露評価によりリスク評価対象として選択された代謝物の毒性評価 (図2-2) において、リスク評価対象とされた代謝物については、はじめにリスク評価に利用可能な毒性情報の有無について検討を行い、毒性情報が得られている代謝物の取り扱いは、従来の考え方とほぼ同じである。すなわ

ち得られている毒性情報から毒性学的な有為性つまり毒性の懸念がない場合は、評価は不要と判断する。毒性の懸念がある場合には、他の物質（親物質）との毒性プロファイルの類似性の検討を行い、毒性学的に異なる場合には、個別のガイダンス値（ADIやARfD）の設定を行う。一方、毒性プロファイルが類似と判断された場合は、毒性強度の比較からPotency Factorを利用（適用）すべきか検討を行ったうえでPotency Factorを適用もしくは非適用で評価物質のHGBVsに含めた評価を行う。一方、毒性情報が得られていないリスク評価対象物質については、当該代謝物が毒性試験を実施した動物体内で親物質の毒性試験における投与量で親物質の吸収量の10%以上の生成が認められた場合には、親物質による毒性試験により当該代謝物についても評価が行われていると判断し、評価物質のHGBVsに含めて評価を行う。従来の食品安全委員会での評価では、量的な評価基準はなく毒性試験を実施した動物種での代謝試験で生成が認められていれば、評価対象から除外としている点で大きく異なる。また、毒性グループの会議では吸収量の10%以上の生成に関しては、血清中もしくは尿中代謝物を対象とするが、胆汁中代謝物の場合は、全身暴露を示す結果が得られていることが必要であると議論された。一方、吸収量の10%以上の生成が認められない場合には、被験物質（親物質）との構造類似性の評価を行い、構造類似であり毒性学的にも同等と判断される場合には、評価物質のHGBVsに含めて評価を行い、構造類似とは判断されない場合には、遺伝毒性の有無（*in silico*での推定も含む）により遺伝毒性もしくは一般毒性を対象として被験物質とは別枠での評価（例えばTTC評価）を行うこととされている。従来の食品安全委員会での評価では、化学構造の類似性や遺伝毒性の*in silico*評価、TTC評価などは行われておらず、吸収量の10%以上の生成が認められない場合の評価の進め方については、検討の必要があると考えられた。なお、各ステップにおける新たな評価手法の詳細について、特に構造類似性の判断基準や遺伝毒性の*in silico*評価をどのように行うかなどは、専門家によっても意見が異なり、ガイダンスドラフティンググループでも時間をかけて様々な議論が行われ、ガイダンスには評価の基本的な考え方とともにケーススタディが示される予定であるが、個別の評価における最終的な判断は多くの場合、エキスパートジャッジによると考えられることから、OECDガイダンス改訂案の評価スキームを食品安全委員会における評価に適用した場合の課題となると考察された。

）が必要な代謝物の評価スキームやトリガー基準値を始め評価スキームの各ステップの詳細について議論を行った。植物代謝試験結果からの検出量からの代謝物の区分は、当初、major, minor metaboliteとしていたが、major metaboliteは、rat代謝試験における主要な代謝物の記載と重複することから残留評価ではprincipalを使用することとなり、最終的な区分は、principal, lesser and trace residueの3区分とすることとなった。議論の中で、遺伝毒性については検出された量を問わず全ての代謝物についての評価を検討すべきとの提案があり、いずれの区分に分類された代謝物であっても遺伝毒性について評価を行うこととされ、具体的な評価方法は毒性グループで検討されることとなった。また、principal, lesser and traceとする残留量の区分については遺伝毒性以外の毒性（一般毒性）の強さに応じて変更すべきとされ、親化合物がカーバメート系農薬や有機リン系農薬の場合は毒性が強い物質（Highly toxic）として扱い、それ以外の物質では親物質の反復投与毒性により判定とすることとされ、毒性が強い物質とする基準については毒性評価グループで検討することとなった。また、ガイダンス案として討論されている暴露評価スキームは、リスク評価対象物質選定のためのスキームだが、規制対象（ばく露評価対象物質：RD(Residue Definition)）についてのスキームは必要ないか議論が行われ、現在のスキームで規制のためのRDも判断出来ることから別のスキームは作成しないこととなった。毒性評価においてTTC評価すべきとされた代謝物の取り扱いについて、現在TTCより低い摂取量でも、将来農薬の適用が増えたら、TTCより高くなるかもしれないので、TTCをする必要がある代謝物は、ものによってはRDに含めるべきとの意見も出されたが、ガイダンス案ではTTCを適用した代謝物はRDに含めないとされている。また、Acute TTCの適用についての議論の結果、TTC評価を行う代謝物については、構造的に親化合物と関連がなく毒性がないもしくはごく低いといった情報がないのであれば、Acute TTC approachをとるべきとされた。暴露評価グループでは、上記以外に、代謝物の毒性が強くとLQをもっと低く設定する必要となった場合の扱いやトリガー基準値について異性体、抱合体などの合計をどう判断するか、農薬を動物薬として使用する場合は、飼料から残留する場合とは異なるため、両方の使用を考えるべきであることをガイダンス文書にも盛り込むべきといった議論がなされた。その他、暴露評価グループでは、抱合体およびbound residuesの取り扱い（評価の仕方）、立体異性体の取り扱いなどについて議論され、それぞれについてガイダンス文章が作成された。

毒性評価グループにおける議論では、毒性評価スキームの各ステップの詳細について検討を進めた。残留評価スキームにおいて毒性の強い物質（Highly toxic metabolite）とする判定基準について議論が行われ、Highly toxic metaboliteとするcut-off値については、代謝物の28日間試験もしくは代謝物の試験が得られていない場合は親物質の90日間試験でのNOAEL 1mg/kgbw/day以下もしくは、LOAEL 3mg/kgbw/day以下とすることになった。遺伝毒性については、principal, lesser and traceのいずれの区分であっても少なくともAmes mutagenicityについてQSARでscreeningすることについて同意された。さらにprincipal residueについては、QSARとread-across以外に他の1つの方法で遺伝毒性を評価すべきとの意見が出されたが、その点については、jurisdiction（各国の規制による）ということで合意を得た。principal residueに区分された代謝物のうち毒性情報の得られている代謝物についての評価の考え方は従来と大きく変わるものではない。一方、毒性情報の得られていない代謝物については、これまでの検討から動物体内で吸収量の10%以上認められた代謝物については、親物質投与の毒性試験結果から評価されることについて合意され、10%以上認められず個別に安全性評

価が必要となる代謝物については、構造類似度などをもとにしたリードアクロスや*in silico*ツールを使った評価やTTC評価によるスキームについて検討を行った。TTCを適用する場合には、急性参照用量のTTCについてEFSAが提案する値（5 μ g/kg bw/d）を適用することが合意された。このacute TTC値は、EFSAが2012年に公表したacute TTCのGDに基づくものであり、提案から10年経過しており最近のデータも入れたもので再計算してはどうかという意見もあったが、現在でも十分に保守的であるとの合意を得た。一方、*in silico*評価について遺伝毒性のうちAmes試験によるDNA反応性以外についてのQSAR予測結果は単独では信頼できないとされた。Ames変異原性以外の遺伝毒性や一般毒性エンドポイントについては、親物質など毒性情報が得られている物質との化学構造の類似性からの評価を行うリードアクロスやグルーピング評価が可能な場合は、類推評価を行うことが可能とされ、リードアクロスの考え方について文章を作成することとなった。

ガイダンスの記載について、遺伝毒性や一般毒性については、毒性評価スキームで行われることとなり、残留評価スキーム中での評価と重複しており冗長ではないかとコメントしたが、スキームはあくまでも考え方の流れを示すものであり、実施の評価はスキームの順番に厳密に沿って考えるものではなく、得られている結果をもとにスキームを参考に評価を行えば良いとの意見もあった。ただし、それぞれのステップにおける記載に矛盾が無いよう記載については修正が行われた。その他、変異原性以外のすべての毒性エンドポイントについて、EHC240の定義に従い、ガイダンス案全体を通してgeneral toxicityと記載することとなった。また、毒性学的評価の冒頭部に日本からの提案に基づき代謝物の毒性評価の目的がグルーピングであることが追記された。

全体ミーティングでは、毒性評価を必要とする代謝物のトリガーについて、特に暴露評価グループから提案された遺伝毒性の評価をどの時点で行うかについて議論が行われた。EFSA（EU）では検出された全ての代謝物について遺伝毒性の評価（主に*in silico*）を行っており同様に全ての代謝物についてまず遺伝毒性の評価をすべきとの意見が出された。これに対しては、他の毒性同様にトリガーバリューを超えた代謝物のみについて評価を行えば良いとの意見も出されたが、そのためにはトリガーバリューが高すぎるという意見や*in silico*評価であれば全ての代謝物について実施することも可能であるといった意見が出され、検出された全ての代謝物について遺伝毒性評価（少なくともQSARによるAmes変異原性の評価）を実施するスキームとなった。

一方、新たなガイダンスに従う評価を適用したケーススタディをappendixとして作成することが合意されており、対象物質としてガイダンス案におけるスキーム全体およびスキームの各ステップを可能な限り最もよく示す評価事例について議論を行い、EPAで最近レビューされたfluazaindolizineが候補として提案された。また、親物質とMoAの異なる代謝物の評価においてEPAでは別々のリスクカップを設定し、監視データを使用する場合はリスク評価に対処するために変換係数を使用して評価しており、EPAでの評価において代謝物に対して別々のリスクカップが確立された評価事例としてchlorpropham、asulam、chlorothalonilが挙げられた。ケーススタディについては、提案された剤それぞれについて担当者を決めて検討が進められており、ガイダンス本体のドラフトが完成したのち、本格的な議論を行うこととなっている。

RDWGでは、2022年中旬に、残留評価、毒性評価のスキーム及びガイダンス本文がほぼ完成したことから、これまでの議論の履歴を消去したclean versionを内部レビュー用ドラフトとして作成し、RDWGメンバーを通じて各国のリスク評価機関やリスク管理機関の関係者に回覧して内部レビューを実施

した。内部レビューでは、非常に多くのコメントが出されたことから、暴露評価グループ、毒性評価グループそれぞれの担当部分についてレビューコメントへの対応を進め、2022年度末までにほぼ終了した。今後、ケーススタディの議論を行い、ケーススタディを含む未完成のappendixを完成した後、2023年中旬を目標にRDWG最終案をOECDに提出し、その後、OECDレビューとレビュー対応のための対面会議を経て2024年度にガイダンス成立を目指す予定である。

(2) 個別課題：海外評価機関における農薬代謝物の評価事例の調査と我が国における評価との比較（研究担当者：小野 敦（所属機関名：岡山大学）、本間 正充、古濱 彩子（国立医薬品食品衛生研究所）、清家 伸康（農業・食品産業技術総合研究機構））

1. 遺伝毒性もしくは一般毒性評価への*in silico*評価適用事例の調査

上記課題で評価手法の調査対象としたEFSAおよびWHO JMPRにおいて、近年、評価が実施された農薬のうち、遺伝毒性の評価に*in silico*手法が適用された農薬もしくは、反復投与毒性にTTC評価が適用された評価事例について調査を実施し、その詳細について解析を行った。これまでに、食品安全委員会で評価済みの農薬について調査の結果、EFSAでは13剤、JMPRで9剤について遺伝毒性の*in silico*評価もしくは反復投与毒性へのTTC評価の適用が確認された。なんらかの*in silico*評価手法が適用された毒性エンドポイントについて評価書中の記載の抜粋を表1，2に示した。EFSAで評価が行われた13剤（表1）において*in silico*手法の適用は主に遺伝毒性評価を対象としており、一般毒性に関連する記載は、**etoxazole**評価書において代謝経路についてQSARの検討が行われたとの記載があるもの入手可能な情報が不十分であるとされており、またTTC評価については、thiram評価書において“the concept of threshold of toxicological concern (TTC) was considered a valid approach by the experts; however, it cannot be concluded that there is no concern due to the lack of exposure data”との記載が確認されたのみであった。一方、JMPRで評価が行われた9剤（表1）においては、Quinclorac以外の8剤で特定の代謝物についてTTCアプローチ（いずれもcramer class 3）が適用されており、ChlorfenapyrとFenpicoxamidで遺伝毒性の評価への*in silico*評価の適用が確認された。しかし、いずれも評価書で公開されている情報は限定的であり、多くの評価書では評価手法の詳細（特に遺伝毒性評価に用いられたソフトウェアなど）については示されていない。現在、これら*in silico*評価が適用された代謝物について、食品安全委員会での評価における取り扱いについて調査を行っているが、食品安全委員会の評価書と海外評価機関評価書に示されている代謝物の略称が異なっている剤が多く、そうした剤では対応する代謝物の確認が困難となっている。

表1 近年のEFSA評価において*in silico*評価が適用された評価事例と評価書の記載

評価年	農薬名	<i>in silico</i> 評価が適用された毒性エンドポイント	<i>in silico</i> に関する記載

2018	beta - cyfluthrin	遺伝毒性	For the other metabolites, the limited data available (acute studies or Ames test), and poorly reported QSAR analysis did not allow to conclude about their toxicological profile. (QSAR結果は信用できず利用しなかった)。
2017	bifenazate	遺伝毒性	More robust data to determine the toxicological profile of D3598 (also rat metabolite) should be submitted. Indeed, quantitative structure-activity relationship (QSAR) analysis has been performed but the full output file is not available. (確実な試験データがあるためQSARは評価に利用しなかった)
2018	clodinafopropargyl	遺伝毒性	The QSAR analysis provided was of low reliability overall and no considerations have been provided on the potential impact of the structural differences of the impurities in comparison with the parent (data gap). QSAR結果は信用できず利用しなかった)。
2018	dimethenamid-P	遺伝毒性	EFSA: Due to genotoxicity alerts in quantitative structure-activity relationship (QSAR) analysis, the metabolite M656PH051 was found to be toxicologically relevant if found in groundwater above the parametric value of 0.1 lg/L. (QSARの結果から遺伝毒性が示唆された) JMPR: Models used, were the OECD toolbox, OASIS TIMES, DEREK (partly) and VEGA. (複数のQSARモデルで代謝物の遺伝毒性を評価)

2017	etoxazole	一般毒性	The assumption was based on the results of quantitative structure-activity relationship (QSAR) analysis and the metabolic pathway in rats. The majority of experts considered that the information available is not sufficient and further data on all these metabolites would be needed if required in the section on residues. (QSARでの予測評価を適用、ただし多くの専門家は情報が不十分であると指摘している)
2018	fenpicoxamid	遺伝毒性	For the metabolite X12314005, based on data provided from two quantitative structure-activity relationship (QSAR) models, it can be considered that it is not of concern for genotoxicity. (2つのQSARの結果は代謝物に遺伝毒性の懸念はないとした)
2018	florpyrauxifen-benzyl	遺伝毒性	EFSA: Regarding metabolite X12300837, despite limitations and out of domain predictions of the QSAR analysis, the metabolite is considered unlikely to be genotoxic, while no conclusion on the genotoxicity profile of metabolite X12131932 could be reached as the QSAR prediction were considered not sufficiently reliable. (代謝物 X12300837はQSAR適用外だったが、遺伝毒性の懸念はないとされた。代謝物X12131932はQSARの結果の信用性が問題となり結論づけられなかった) JMPR: These dechlorinated products did not show any structural alerts for genotoxicity in the QSAR analysis that differed from the parent molecules (Please see below for summaries). (Derek、TIMESで評価)

2017	imazosulfuron	遺伝毒性	Toxicity studies with the metabolite IPSA found as a residue (see Section 3) indicated that this metabolite is negative in the Ames test and of low acute oral toxicity to rats. Based on the results of the Ames test, structural similarities with IPSN and the results from quantitative structure-activity relationship (QSAR) analysis the metabolite is considered unlikely to be genotoxic. (Ames試験陰性、QSARでも陰性予測)
2017	mepanipyrim	遺伝毒性	In the mammalian toxicology area, data gaps were identified in relation to the absence of comparative interspecies metabolism study <i>in vitro</i> , need for quantitative structure-activity relationship (QSAR) data and repeated dose toxicity data relevant to consumer exposure for the metabolite M31, and to address the toxicological relevance of two impurities present in the technical specification. (in vivo特異的な代謝があるためQSARと反復毒性試験が重要とされた)
2019	pyriproxyfen	遺伝毒性	For the metabolite PYPAC, a negative results were obtained in <i>in vitro</i> genotoxicity studies. However, taking into account the results of the QSAR analysis, a genotoxic potential can be excluded for all these metabolites. (<i>in vitro</i> 試験では遺伝毒性無し、in vivo代謝物に関してはQSARで遺伝毒性の懸念なし)
2018	spinosad	遺伝毒性	QSAR analysis was conducted on a number of spinosad metabolites (spinosyn K, J, H, J of D, O, Nformyl spinosyn B, N-demethyl spinosyn L and N-demethyl spinosyn D and O) showing that they a

			re unlikely to be genotoxic or clastogenic. (複数の代謝物についてQSARで解析、遺伝毒性の懸念はなし)
2018	thiophanate-methyl	遺伝毒性	Some toxicological studies (QSAR, genotoxicity and acute oral toxicity) were provided on some plant and groundwater metabolites; this information is insufficient to conclude on their genotoxic potential and/or their relevance for consumer exposure, leading to a data gap. (QSAR及び他の毒性試験があるが情報が不十分で遺伝毒性の結論は得られなかった)
2017	thiram	遺伝毒性	Some toxicological data were provided for these metabolites: M1 was negative in genotoxicity studies, M2 had limited mutagenicity data available and showed alerts in QSAR analysis, no data on the genotoxic potential of DMA (M4) were available, and the limited information on M7 and M8 did not allow concluding on their toxicological profile and possible reference values (data gap). (代謝物の遺伝毒性に関して試験もしくはQSRで評価された)

表2 近年のJMPR評価において *in silico* 評価が適用された評価事例と評価書の記載

評価年	農薬名	<i>in silico</i> 評価が適用された毒性エンドポイント	<i>in silico</i> に関する記載

2018	Chlorfenapyr	遺伝毒性	The sponsor provided the results of quantitative structure-activity relationship (QSAR) assessments (Derek Nexis and Organisation for Economic Co-operation and Development [OECD] QSAR Toolbox version 4.2). In both analyses, the metabolites were considered negative for genotoxicity alerts. The OECD QSAR Toolbox identified all six metabolites as Class III according to the Cramer classification method.
		反復投与	Six metabolites were identified in residue studies that were not addressed by previous Meetings and were of potential relevance for the residue definition for risk assessment. These metabolites are CL152837 (M-4), CL325195 (M-5), CL322250 (M-5A), CL152835 (M-6), CL325157 (M-6A) and CL152832 (M-7A). No toxicological data were submitted for these metabolites, but they did not show any alerts for genotoxicity. For chronic toxicity, the threshold of toxicological concern (TTC) approach can be applied (Cramer class III).
2018	Ethiprole	反復投与	N-Glucuronide of RPA 107566 (goat metabolite) The N-glucuronide of RPA 107566 is not found in the rat. RPA 107566 is a minor metabolite in rat, found in faeces at less than 5%. The acute oral LD50 for RPA 107566 is greater than 2000 mg/kg bw (Bigot, 1999b), and RPA 107566 is negative in a screening Ames test (Esdaile, 2002). The Nglucuronide of RPA 107566 is expected to be less toxic than RPA 107566. For chronic toxicity, the threshold of toxicological concern approach (Cramer

			r class III) could be applied to the N-glucuronide of RPA 107566.
2018	Fenpicoxamid	遺伝毒性	Of the metabolites identified as process hydrolysis degradates, X12335723, X12264475 and X12019520 were flagged for possible genotoxic effects. X12335723 and X12264475 were also embedded in the parent. As such, if weight of evidence suggests that the parent is non-genotoxic, the level of concern is also low for hydrolysis degradates.
		反復投与	The acute oral LD50 of X642188, a rat and crop metabolite, was greater than 2000 mg/kg bw (Dalal, 2013). X642188 was negative in the Ames test (Patel, 2012). For chronic toxicity, the threshold of toxicological concern (TTC) approach (Cramer class III) could be applied. No toxicity information was available for any other metabolites and/or degradates. However, based on structure-activity considerations, the TTC approach (Cramer class III) could be applied to X12264475 (animal metabolite and processing product), X12314005 (crop metabolite and processing product) and X12335723 (processing product) for the assessment of chronic toxicity.

2015	Flumioxazin	反復投与	4-OH-flumioxazin and 3-OH-flumioxazin were reported as Cramer class III (modules: Cramer rules; Cramer rules, with extensions), when evaluated with Toxtree (v. 2.6.13; Patlewicz et al., 2008). Acute and chronic exposures to 3-OH-flumioxazin and 4-OH-flumioxazin (up to 9 μg/day) are below the threshold of toxicological concern (TTC) for Cramer class III compounds (90 μg/day). Hence, no safety concern is anticipated.
2015	Flupyradifurone	反復投与	As fewer toxicological data were provided for two of the metabolites, amino-furanone and flupyradifurone-acetic acid, Both of these metabolites were classified as Cramer class III compounds when evaluated with Toxtree (v2.6.13). In addition, negligible levels of these metabolites are present in plant commodities. On this basis, dietary exposures are likely to be well below conservative thresholds of toxicological concern.
2018	Mandestrobin(P)	反復投与	The acute toxicity of the free and conjugated 2-CH₂OH-S-2200 metabolite is considered to be similar to that of the parent compound. For chronic toxicity, the threshold of toxicological concern (TTC) approach could be applied using Cramer class III.
2018	Mandipropamid	反復投与	For the metabolite SYN500003, the ADI for mandipropamid is not applicable, as the metabolite is structurally different from the parent compound and is more acutely toxic. No separate ADI or ARfD can be established for the meta

			bolite, as the database is not sufficient for this purpose. For chronic toxicity, the threshold of toxicological concern (TTC) concept for non-genotoxic substances (Cramer class III) is applicable to this metabolite.
2018	Norflurazon	反復投与	The metabolite NOA-452075 occurs in the rat only at trace concentrations. For chronic toxicity, the threshold of toxicological concern (TTC) approach (Cramer class III) could be applied.
2015	Quinclorac	反復投与	Several quinclorac conjugates were identified as plant metabolites. No specific toxicity data were available on these conjugates, but a SAR analysis identified no alerts that were not also present for quinclorac. The Meeting concluded that these conjugates were likely to be of lower or equivalent toxicity compared with the parent compound, because they are expected to be readily hydrolysed to the parent in the gastrointestinal tract.

2. 暴露評価対象物質設定に係る海外評価機関における評価事例の調査 1

上記、遺伝毒性もしくは一般毒性評価への *in silico* 評価適用事例の調査において *in silico* 手法の適用が確認されたEFSAの評価事例における暴露評価対象物質設定について我が国の評価との相違について解析を行った。以下に当初調査を行った3剤の評価事例を示す。

2-1 エポキシコナゾール

(本物質のEFSAの評価事例は、EFSAガイダンスに示されたケーススタディであり、実際の評価書を参照したものではない。)

食品安全委員会⁴⁾ では、農産物及び畜産物中の暴露評価対象物質をエポキシコナゾール（親化合物のみ）と設定した。経緯は以下のとおりである。

植物体内運命試験の結果、コーヒー豆ではDd (M49) が19%TRR検出された。畜産動物を用いた体内運命試験の結果、10%TRR を超えて検出された代謝物は、BB (M27、最大25.3%TRR、ヤギの腎臓)、CC (M04、M28、最大12.9%TRR、ヤギの肝臓) 及びG (M07、最大19.6%TRR、ニワトリの筋肉) であり、Dd

(M49)、BB (M27)、CC (M04、M28) 及びG (M7) を暴露評価対象物質の候補とした。代謝物Dd (M49) の急性経口毒性も弱い (参照57) こと、代謝物BB (M27) 及びCC (M04、M28) はいずれも抱合体でありエポキシコナゾールよりも毒性が強くなるとは考えにくいこと、代謝物G (M7) はラットにおけるエポキシコナゾールの代謝過程でも生成しうると考えられることを総合的に勘案し、これらの代謝物は暴露評価対象物質に含めないこととした。なお、代謝物を用いた急性毒性試験および遺伝毒性試験は行われていないが、Dd (M49) の急性毒性はトリアゾール共通代謝物の値⁵⁾ を引用した。

一方、EFSA²⁾ では、農作物のうち穀類は親化合物、M61/63 (未確定)、M49、M50およびM51、根菜は親化合物、果物類は親化合物を暴露評価対象物質とした。また畜産物 (家きん) は親化合物、M07、M01とM13、畜産物 (反すう動物) は親化合物、M04、M06、M27とM52を暴露評価対象物質とした。経緯は以下のとおりである。親化合物および約50種の代謝物を対象としてQSARやTTCを適用して遺伝毒性が検討された。その結果、M21やM63等の代謝物について遺伝毒性試験が必要とされた。

一般毒性のTTCアプローチは、家畜の暴露に起因する不確実性および未同定代謝物があることから適用不可とされた。

次いで行った毒性評価によりM02、M04、M05、M06、M07、M11、M13、M15、M26、M27、M28、M30、M53、M54、M55、M56、M60、M61/ M63 (及びトリアゾール共通代謝物: M52、M49、M50、M51) は暴露評価対象物質の候補とされた。農産物中の主要代謝物か否かが判断されM61/63 (未確定)、M49、M50およびM51 (トリアゾール共通代謝物)、根菜は親化合物、果物類は親化合物を暴露評価対象物質とした。畜産物中の主要代謝物か否かについて判断され、畜産物 (家きん) では、親化合物、M02、M04、M05、M06、M07、M11、M13、M15、M26、M27、M28、M30、M52、M53、M54、M55、M56、M60が次の評価が必要となった。次いで毒性学的負荷量が計算され、各代謝物の寄与率から親化合物、M07、M01とM13、畜産物 (反すう動物) は親化合物、M04、M06、M27 とM52を暴露評価対象物質とした。

ここではEFSAのガイダンスに掲載されたケーススタディーのデータを利用しており、EFSAもトリアゾール共通代謝物 (M52、M49、M50、M51) については別途、評価を行う必要があるとしており、ここでは除外する。畜産物の暴露評価対象物質 (代謝物のみ) を比較すると、食品安全委員会 (10%TRR以上で毒性や代謝経路を考慮して暴露評価対象物質から除外した代謝物) ではM04、M07、M27およびM28、EFSAではM01、M04、M06、M07、M13、M27であり、両者はおおむね一致している。

2-2 ジメテナミド

食品安全委員会⁶⁾ では、農産物及び畜産物中の暴露評価対象物質をジメテナミド (親化合物のみ) と設定した。経緯は以下のとおりである。

植物体内運命試験の結果、10%TRR を超えて検出された代謝物はM23、M27、M30 及びM31であった。また、後作物における植物体内運命試験の結果、代謝物M27 及びM30が10%TRR を超えて検出された。また、畜産動物を用いた体内運命試験の結果、10%TRR を超えて検出された代謝物はM7、M17 及びM25であり、M7、M17、M23、M25、M27、M30 及びM31を暴露評価対象物質の候補とした。しかし、これらの代謝物はラットにおいても検出されたため、評価の対象から除外し、暴露評価対象物質をジメテナミド (親化合物のみ) と設定した。なお、M23 及びM27については急性経口毒性試験が行われ、いずれもLD50が2,000mg/kg体重以上であった。また、M23、M27およびM32については遺伝毒性試験が行われすべて陰性であった。

一方、EFSA⁷⁾では、農作物、加工品中の暴露評価対象物質をジメテナミド、M26及びM30（ジメテナミド-Pと表示）とし、畜産物（反すう動物）中の暴露評価対象物質をM26及びM30（ジメテナミド-Pと表示）と設定した。畜産物（家きん）についてはデータ要求が必要なため暴露評価対象物質を設定していない。経緯は以下のとおりである。まず、ジメテナミドとジメテナミド-Pについて同等の用量レベルで両者は同様の毒性プロファイルを示すことを確認した。また、代謝物の化学構造の類似性を使用して一部の代謝物の毒性プロファイルを特性化し、最終的にQSAR分析で個々の代謝物の遺伝毒性を特性化し、ジメテナミド-Pの毒性参照値は、M3、M11、M26、M30、M32、M40、およびM81に、M23、M27、M31、M45、M47、M54、およびM62については、親化合物より毒性が弱い親化合物の毒性参照値を適用できることを確認した。次いで、ADIが 0.02 mg/kg 体重/日、ARfDが 0.25 mg/kg 体重であることを確認するとともに、農作物中の主要代謝物としてM30が存在することを確認するとともに、M26が保管および植物代謝下でM30に変換される可能性があるため、暴露評価対象物質に両者を含めた。なお、親化合物と比較して毒性が低いためM23およびM27を暴露評価対象物質に含めなかった。畜産物（反すう動物）にはでは、M30およびM26が主要代謝物として存在するため、暴露評価対象物質に両者を含めた。

以上のことから、M26及びM30（ジメテナミド-Pと表示）が暴露評価対象物質として設定される点が食品安全委員会とEFSAの主な相違点である。これは、食品安全委員会ではラットにおいて検出された代謝物を評価から除外していること、M26が保管および植物代謝下でM30に変換される可能性を考慮して、EFSAではM26を暴露評価対象物質としたことが原因として考えられた。

2-3 エトキサゾール

食品安全委員会⁸⁾では、農産物及び畜産物中の暴露評価対象物質をエトキサゾール（親化合物のみ）と設定した。経緯は以下のとおりである。

植物体内運命試験の結果、10%TRR を超えて検出された代謝物はDFB（わた種子）及びR3であった。一方、畜産動物（ヤギ及び鶏）を用いた体内運命試験の結果、10%TRR を超えて検出された代謝物は、R2、R7、R16、R20、Met1 及びMet4 であり、DFB、R2、R3、R7、R16、R20、Met1 及びMet4 を候補とした。しかし、代謝物R2、R3、R7、R16、Met1 及びMet4 はラットにおいても検出されたため、評価の対象から除外した。代謝物R20 はヤギの肝臓で認められたが、泌乳牛を用いた家畜残留試験において検出限界未満であること、代謝物DFB はわた種子で検出されたが、残留量は僅かであり、R20とDFBは相当量検出されないと判断した。なお、R3、R7、R8、R10、R11 及びR14については急性経口毒性試験が行われ、R3、R7、R10、R11 及びR14についてはLD50が2,000mg/kg体重以上であり、R8は791～943 mg/kg体重であった。また、R3、R7、R8、R10、R11 及びR14については遺伝毒性試験が行われすべて陰性であった。

一方、EFSA⁹⁾では、毒性学的負荷量を用いた暴露評価対象物質の決定がなされておらず最終版ではないが、暫定的に農作物の暴露評価対象物質をエトキサゾール（親化合物のみ）としている。経緯は以下のとおりである。農作物についてはR4とR7が検出されなかった。一方、畜産物、後作物、加工品ではR4とR7が暴露評価対象物質の候補になりえる可能性があるが、R4とR7の両者とも光学異性体であり光学異性体比の変化についてデータ要求している段階である。また、QSAR分析と代謝経路を解析することによりR1、R4、R16とR20の毒性プロファイルが親化合物と同様かを検討したが、入手可能な情

報では不十分であり、毒性データについて要求している段階であることが主な理由である。したがって、それらが検出される可能性があるに畜産物、後作物、加工品ではついては評価を中断している。

以上のことから、食品安全委員会とEFSAでは、農作物中の暴露評価対象物質をエトキサゾール（親化合物のみ）とし、両者とも一致したが、畜産物では判断できなかった。

今回は3剤の比較ではあるが、食品安全委員会に比べEFSAでは代謝物がより多く暴露評価対象物質に設定される傾向にあった。その理由として、食品安全委員会ではラットから検出された代謝物を全て暴露評価対象物質の候補から除外していること、暴露評価対象物質の決定方法（EFSAでは、農産物や畜産物中の主要な代謝物か否かを具体的な数値基準で判断している点、毒性学的負荷量を基に代謝物を選択している点）、10%TRR以上であっても残留濃度以外の理由で候補から除外していること、が考えられた。この点を明らかにするため、さらに調査を行った。

- 1) 食品安全委員会：農薬の食品健康影響評価における暴露評価対象物質に関する考え方
（平成25年6月27日農薬専門調査会決定）最終改正：平成29年3月29日
- 2) EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues (2016) : Guidance on the establishment of the residue definition for dietary risk assessment. EFSA Journal, 14(12), 4549
- 3) 農薬登録申請に係る試験成績について（平成12年11月24日付け12農産第8147号農林水産省農産園芸局長通知）最終改正：平成30年3月29日
- 4) 食品安全委員会農薬専門調査会（2014）：農薬評価書 エポキシコナゾール
- 5) 食品安全委員会農薬専門調査会（2012）：農薬評価書 トリアゾール共通代謝物
- 6) 食品安全委員会農薬専門調査会（2017）：農薬評価書 ジメテナミド（第2版）
- 7) EFSA (2018) : Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance dimethenamid-P. EFSA Journal, 16(4), 5211
- 8) 食品安全委員会農薬専門調査会（2018）：農薬・動物用医薬品評価書 エトキサゾール（第5版）
- 9) EFSA (2017) : Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance etoxazole. EFSA Journal, 15(10), 4988

3. 暴露評価対象物質設定に係る海外評価機関における評価事例の調査 2

遺伝毒性もしくは一般毒性評価への*in silico*評価適用事例の調査において、*in silico*手法の適用が確認された評価事例における暴露評価対象物質設定について、我が国の評価との相違について解析を行った。以下に追加で調査を行った11剤の評価事例を示す。

3-1 ビフェナゼート

食品安全委員会¹⁾では、農産物及び畜産物中の暴露評価対象物質をビフェナゼート（親化合物のみ）と設定した。経緯は以下のとおりである。

植物体内運命試験の結果、10%TRR を超える代謝物としてB、I 及びU が認められ、畜産動物を用いた体内運命試験の結果、10%TRR を超える代謝物としてB、D、E 及びU が認められた。代謝物B、D、E

及びU はラットで認められていること及び代謝物I はラットで認められていないものの、10%TRR を超えて認められたのはトウモロコシの茎葉部のみであったことから、農産物及び畜産物中の暴露評価対象物質をビフェナゼート（親化合物のみ）と設定した。

一方、EFSA²⁾ では、暫定的に（ビフェナゼートと代謝物Bの毒性学的RRV（Ratio of Reference Values）が明確になるまでは）、農作物の暴露評価対象物質をビフェナゼート（親化合物と代謝物Bとの合量）とし、代謝物I 及びUについては、毒性データが提出されるまで評価を中断することになっている。経緯は以下のとおりである。

植物体内運命試験の結果、ほとんどの作物においてビフェナゼートが主要な成分であり（34～79% TRR）、一部ハツカダイコンで代謝物Bが最大40%TRRであることが確認された。トウモロコシの茎葉部で代謝物としてB、I 及びU が10%TRR を超えて認められた。代謝物Bについては急性毒性と遺伝毒性についてデータが存在するものの毒性学的RRVを算出するには至っていない。代謝物I とUについては、毒性データが存在しないため、その提出を求められている。後作物からは重要な代謝物が検出されなかった。保存安定性についてはビフェナゼートのみが有効データとされ、その他の代謝物は実施されていない。

なお、QSARについては、代謝物Bの毒物学的RRVを決定するためQSAR分析が行われたが、利用できる結果が得られなかった。

以上のことから、食品安全委員会とEFSAでは、農産物中の暴露評価対象物質をビフェナゼート（親化合物のみ）としているが、EFSAでは代謝物Bが含まれている点（親化合物との合量としている点）、食品安全委員会ではラットで認められていることを理由に除外した代謝物I とUについては、EFSAでは判断保留にしている点が両者の違いである。

3-2 フェンピコキサミド

食品安全委員会³⁾ では、農産物及び畜産物中の暴露評価対象物質をフェンピコキサミド（親化合物のみ）と設定した。経緯は以下のとおりである。

植物体内運命試験及び畜産動物を用いた体内運命試験の結果、10%TRR を超える代謝物として、植物でM、畜産動物の可食部でB、E、H/W、K、N 及びU が認められた。代謝物E 及びN はラットにおいて認められ、代謝物B、H/W、K 及びU はラットにおいて認められなかったが、畜産動物を用いた体内運命試験において残留量はいずれも0.01 µg/g 以下と僅かであった。代謝物M はラットにおいて認められなかったが、成熟キャベツ全体以外の試料では10%TRR 未満であった。以上のことから、農産物及び畜産物中の暴露評価対象物質をフェンピコキサミド（親化合物のみ）と設定した。

EFSA⁴⁾ では、農産物ではフェンピコキサミド（親化合物のみ）、畜産物（反芻動物）ではフェンピコキサミド（親化合物）と代謝物Nが暴露評価対象物質となった。家きんでは代謝物については判断保留となった。経緯は以下のとおりである。

フェンピコキサミド（親化合物）は、調査したすべての農作物の主要成分であり、穀物では38%TRR、トマト果実では最大95%TRR、キャベツでは最大96%TRRを占めていた。代謝物Cは、麦わらで最大0.08 mg / kg、キャベツで0.015 mg / kgで検出されました。さらに、代謝物Mはキャベツで最大13%TRR認められた。しかし、代謝物Cは非常に低濃度であること、代謝物Mは葉物野菜には適用がないため、フェンピコキサミド（親化合物）のみが暴露評価対象物質となった。一方、畜産動物（反芻動

物、家きん）の可食部（肝臓、腎臓、卵）で代謝物B、E、H/W、K、N 及びU が認められた。反芻動物では代謝物Nが親化合物の毒性と同等とみなされたため、フェンピコキサミド（親化合物）と代謝物Nが暴露評価対象物質となった。家きんでは代謝物H/Wの分離ができなかったこと等により判断保留とされた。

なお、代謝物Mは、2つの定量的構造活性相関（QSAR）モデルから提供されたデータに基づいて、遺伝毒性の懸念はないと考えられた。代謝物I、Kについては、いくつかの肯定的なQSARアラートが確認された。

以上のことから、農産物、畜産物（反芻動物）ともにフェンピコキサミドが主要な残留物であるため、食品安全委員会とEFSAでは暴露評価対象物質がほぼ同じである（家きんを除く）。すなわち、代謝物濃度が低い場合、ラットにおいて認められなくても暴露評価対象物質とはならないことを意味している。

3-3 フロルピラウキシフェンベンジル

食品安全委員会⁵⁾では、農産物及び畜産物中の暴露評価対象物質をフロルピラウキシフェンベンジル並びに代謝物A 及びBと設定した。経緯は以下のとおりである。

植物体内運命試験及び畜産動物を用いた体内運命試験の結果、10%TRR を超える代謝物として、植物では家畜の飼料として供される部位においてA、B（抱合体を含む。）及びH（抱合体を含む。）が、畜産動物では可食部においてA、B 及びL が認められた。代謝物A 及びB はラットにおいて認められたが、植物及び畜産動物を用いた体内運命試験においてフロルピラウキシフェンベンジルよりも残留値が高い又は同程度であったこと、並びに代謝物H 及びL はラットにおいて認められないが、いずれも可食部における残留量は僅かであり、極性が高いと考えられることから、農産物及び畜産物中の暴露評価対象物質をフロルピラウキシフェンベンジル並びに代謝物A 及びB と設定した。

EFSA⁶⁾では、農産物、畜産物ともに暴露評価対象物質をフロルピラウキシフェンベンジル並びに代謝物A 及びBとした。経緯は以下のとおりである。

植物体内運命試験の結果、フロルピラウキシフェンベンジル並びに代謝物A 及びBは未熟米の58%TRRを占めていた。畜産動物を用いた体内運命試験では、97%TRRが排泄されたため、供試動物中の総放射能は極めて低かった。中でも、代謝物A 及びBは、肝臓および腎臓において最大45%TRRを占めていた。なお、代謝物H 及びLについては、代謝物Hは天然（通常の植物中）で存在し、そのHのグリシン抱合体により代謝物L が生成することから、暴露評価対象物質の検討から外している。

なお、代謝物Aは、主要なラット代謝物であるため、親のRPFが適用された。代謝物Bに関しては、QSAR適用外だったが遺伝毒性の懸念はないとされた、代謝物FについてはQSARの結果の信用性が問題となり結論づけられなかった。

以上のことから、食品安全委員会とEFSAの両者は暴露評価対象物質が一致し、フロルピラウキシフェンベンジル並びに代謝物A 及びBとしている。これは、農産物、畜産物中のA、B以外の代謝物の種類、その量が極めて少ないことに起因している。

3-4 メパニピリム

食品安全委員会⁷⁾では、農産物中の暴露評価対象物質をメパニピリム（親化合物のみ）とした。経

緯は以下のとおりである。

植物体内運命試験の結果、10%TRR を超える代謝物としてM31 が認められた。代謝物M31 はラットで認められていないが、ラットにおける代謝物M6 からM36 への代謝過程で生成しうると考えられることから、農産物中の暴露評価対象物質をメパニピリム（親化合物のみ）と設定した。

EFSA⁸⁾ では、農産物中の暴露評価対象物質をメパニピリムとM31（M31は暫定）とした。経緯は以下のとおりである。

植物体内運命試験において、残留放射能中の主な成分はメパニピリム（23～70%TRR）であった。しかしブドウからM31が20～30%TRRで確認されたが、トマトとリンゴでは非常に低かった（≤1%TRR）。他の微量代謝産物（M33およびM36）も特定されたが、調査した作物では低レベル（<3%TRR）であった。M31、M33、およびM36の毒性プロファイルについて議論され、これらの遺伝毒性の可能性は、親と代謝物M11によってカバーされるとされた。ただし、他の毒性エンドポイントには適用されないため、親化合物の参照値をM31に適用することはできず、代謝物M31について、QSARデータと反復投与毒性データを提供する必要があるとされた。

以上のことから、代謝物M31を暴露評価対象物質に含めるか否かがポイントであり、食品安全委員会ではラットでの代謝過程で生成すると判断し、暴露評価対象物質から除外した。EFSAでは暴露評価対象物質に含めるが、毒性の強さについて判断できないため（親化合物と同等かなど）、暫定とされた。

3-5 ピリプロキシフェン

食品安全委員会⁹⁾ では、農産物中の暴露評価対象物質をピリプロキシフェン（親化合物のみ）とした。経緯は以下のとおりである。

植物体内運命試験の結果、10%TRR を超える代謝物としてB、H 及びM（いずれも抱合体を含む。）が認められた。代謝物B 及びH はラットで認められ、代謝物M はラットで認められていないが、代謝物M が酸化された代謝物F が動物体内運命試験において認められることから、農産物中の暴露評価対象物質をピリプロキシフェン（親化合物のみ）と設定した。

EFSA¹⁰⁾ では農産物（葉面処理の果物と豆類/油糧種子のみ）および畜産物中の暴露評価対象物質をピリプロキシフェン（親化合物のみ）と設定した。

植物体内運命試験の結果、大部分は未変化のピリプロキシフェンであったが、キュウリと果実で代謝物B 及びH（いずれも抱合体含む）が、リンゴ果実では代謝物B 及びMが 10%TRRを超えて認められた。他の代謝物は10%TRR未満かつ<0.01 mg eq / kgであった。代謝物Fについては、低い急性経口毒性が観察され、*in vitro*遺伝毒性試験で負の結果が得られた。その反復投与毒性に関する情報は入手できなかった。代謝物B（抱合体含む）、L、HおよびN（抱合体含む）およびMはラットでの主要な代謝物とは言えないため、ピリプロキシフェンの毒性試験でカバーされているとは言えない。しかし、QSAR分析の結果からこれらすべての代謝物について遺伝毒性はないと判断した。

畜産動物を用いた体内運命試験については、ピリプロキシフェン適用作物から判断し反芻動物が主に調査された。ピリプロキシフェンは牛乳、肝臓、腎臓で広範囲に分布し（<1～15%TRR）、これらの媒体では代謝物B（遊離および硫酸抱合体）が18～53%TRR認められた。牛乳中のL（抱合体含む）は30%TRR、肝臓中のMは16%TRR、腎臓中のN（硫酸抱合体含む）が36%TRRであった。親化合物と代謝

物B（遊離および硫酸抱合）は、筋肉（それぞれ44%と22%TRR）と脂肪（それぞれ79%TRRと30%TRR）であった。しかし、濃度換算すると重要ではなかった（ $<0.01 \text{ mg / kg}$ ）。以上のことから畜産物中の暴露評価対象物質をピリプロキシフェン（親化合物のみ）と設定した。

以上のように、食品安全委員会ではラットで検出されたことを理由に除外された代謝物B、M、Hは、EFSAではQSAR分析の結果からこれらすべての代謝物について遺伝毒性はないことを理由に暴露評価対象物質から除外されている。

3-6 スピノサド

食品安全委員会¹¹⁾では、農産物及び畜産物中の暴露評価対象物質をスピノシンA及びスピノシンDと設定した。経緯は以下のとおりである。

スピノサドを用いた植物体内運命試験の結果、主要成分は未変化のスピノシンA及びスピノシンDであり、10%TRRを超える代謝物としてB及びEが認められた。畜産動物を用いた体内運命試験の結果、山羊の乳汁及び臓器中の主な成分はスピノシンA及びスピノシンDで、10%TRRを超える代謝物としてB、E、Met A-Li-3a、Met A-Li-4 (5a) / (5b) 及びMet D-Li-3bが認められた。また、鶏の卵及び臓器中の主な成分はスピノシンA及びスピノシンDであり、10%TRRを超える代謝物としてB、E、K/AH of D 及びDP-4が認められた。代謝物B及びE以外の代謝物はラットでは認められなかったが、代謝物K/AH of DはスピノシンDの*o*-脱メチル体、DP-4は*o*-脱メチル及び*N*-脱メチル体、Met D-Li-3bは水酸化体であり、スピノシンAの代謝経路を踏まえると、スピノシンDを投与したラットで認められると考えられた。また、代謝物Met A-Li-3a及びMet D-Li-3bはスピノシンA又はD、代謝物Met A-Li-4 (5a) / (5b)はスピノシンAの*N*-脱メチル体のマクロライド環が水酸化された代謝物でありいずれも水溶性が高いと考えられることから、農産物及び畜産物中の暴露評価対象物質をスピノシンA及びスピノシンDと設定した。

なお、代謝物B及びKのマウス用いた急性経口毒性試験 代謝物BのLD50は雌雄とも3,160mg/kg体重、Kは雌雄とも5,000mg/kg体重以上であった。代謝物B及びK（動物及び植物由来）に関して細菌を用いた復帰突然変異試験が実施された結果、全て陰性であった。

EFSA¹²⁾では、農産物中の暴露評価対象物質スピノシンA、スピノシンD、B、K（暫定）、暫定的に暴露評価対象物質を家禽：スピノシンA、スピノシンD、B、Eの合計、反すう動物：スピノシンA、スピノシンD、B、EおよびMET A-Li-4 (5b)とした。経緯は以下のとおりである。

スピノシンAを用いた植物体内運命試験の結果、大部分は未変化のスピノシンAであったが、代謝物スピノシンB / K（分離されていない）はブドウの房とリンゴの皮で最大11%TRRまで回収され、代謝物B（スピノシンB） / K（スピノシンK）（分離されていない）がブドウの房とリンゴの皮において最大11%TRRで確認された。スピノシンDを用いた植物体内運命試験の結果、大部分は未変化のスピノシンD（48%TRRから85%TRR）であった。代謝物Eは、キャベツの葉（最大19%TRR）とカブの葉および根で最大16%TRR確認されたが、ブドウでは*o*-デメチルスピノシンDと一緒に回収（24%TRR）されるなど、代謝物の特徴づけ/同定が不十分と判断され、追加データが要求されている。

畜産動物を用いた体内運命試験では、家禽の場合、大部分は未変化のスピノシンAおよびスピノシンD（脂肪81%TRR、筋肉55%TRRおよび卵34%TRRであった。さらに、代謝物Bは肝臓、筋肉、卵で最大12%のTRRが回収され、代謝物Eは筋肉で最大15%のTRR、肝臓で最大21%、卵の最大25%のTRRを占

めていました。反すう動物でも、大部分は未変化のスピノシンAおよびスピノシンDあった（それぞれ最大86%TRRおよび85%TRR）。代謝物B、MET A-Li-4（5b）、EおよびMET D-Li-3bなどの他の代謝産物も、10%以上のTRRレベルで確認されました。MET A-Li-4（5b）が肝臓において16%TRRで確認されたため、オープンマクロライドの構造をさらに解明する必要があるとされた。

なお、いくつかのスピノサド代謝産物（K、J、H、E、S、I等）についてQSAR分析が行われ、遺伝毒性がありそうにないまたは染色体異常誘発とされた。代謝物BおよびKは追加の毒物学データ（反復投与毒性試験）が求められている。代謝物MET A-Li-4（5b）は化学構造が特定されるか遺伝毒性データが必要とされた。さらに、スピノシンAの代謝産物プソイドアグリコンpsKについて、その遺伝毒性の可能性の明確化を含む毒性学的データ（反復投与毒性研究）が必要とされた。

以上のことから、食品安全委員会とEFSAでは、候補となりえる暴露評価対象物質はほぼ同じであるが、EFSAでは代謝物B、Kのように追加で毒性データが提出されるまでは暫定的に暴露評価対象物質に加えておく、といった措置が取られている。

3-7 イマゾスルフロン

食品安全委員会では、イマゾスルフロンについて食品健康影響評価は行われていない。

EFSA¹³⁾では、農産物中の暴露評価対象物質をイマゾスルフロン（親化合物のみ）とした。経緯は以下のとおりである。

小麦を用いて植物体内運命試験が行われたが、回収された総放射能が少なく（0.001～0.0026 mg eq / kg）、収穫時のわらでも0.019～0.022 mg eq / kgにすぎなかった。親化合物は未成熟植物でも収穫時のわらでも検出されなかった。登録の20倍量での試験において代謝物IPSA（＜11.6%TRR；＜0.0178 mg eq / kg）およびADNG（ADPMのグルコースコンジュゲート、＜6%TRR；＜0.0089 mg eq / kg）が確認され、スルホニル尿素橋の開裂が生じていた。代謝物IPSAはAmes試験で陰性であり、ラットに対する急性経口毒性が低いことが示されました。Ames試験の結果と定量的構造活性相関（QSAR）分析の結果に基づいて、代謝産物は遺伝毒性である可能性は低いと考えた。代謝物ADPMは、Ames試験で陰性であった。以上のことから、成熟した小麦では、回収された総放射能が少なく、個々の成分が0.01 mg eq / kgを超えるレベルで存在するとは考えられないため、暴露評価対象物質をイマゾスルフロン（親化合物のみ）とした。家畜代謝試験についてはデータが提出されなかった。

3-8 チオファネートメチル

食品安全委員会では、チオファネートメチルについて食品健康影響評価は行われていない。

EFSA¹³⁾では、農産物中の暴露評価対象物質をチオファネートメチル、2-AB、FH-432、DX-105およびカルベンダジム（暫定）とした。畜産物中の暴露評価対象物質は、反すう動物はチオファネートメチル、4-OH-MBC、5-OH-MBC、5-OH-MBC-Sおよびカルベンダジム、家禽は暫定的にチオファネートメチル、4OH-チオファネート（抱合体含む）、5-OH-MBC、5-OH-MBC-Sおよびカルベンダジム（暫定）とした。経緯は以下のとおりである。

果実、根菜類、豆類、油糧/種子を用いチオファネートメチルの植物体内運命試験の結果、カルベンダジムがチオファネートメチルの主要代謝物であった。代謝物2-ABとFH-432は、主に葉の多い作物の部分と根の主要代謝物であり、他のすべての商品でも確認されました。代謝物DX-105も低い割合で

存在する可能性があるが、分析法上チオフアネートメチルから常に明確に分離されているとは限らないため、DX-105が主要代謝物であるかどうかを明確に結論付けることはできなかった。このことから、暫定的に暴露評価対象物質をチオフアネートメチル、2-AB、FH-432、DX-105およびカルベンダジムとした。最終的な確定は、すべての化合物の毒性が確認された後に行う。

畜産動物を用いた体内運命試験では、反すう動物および家禽で検討された。植物代謝で確認されたカルベンダジムと2-ABは動物でも確認されたが、FH-432とDX-105確認できなかった。カルベンダジムは動物の摂餌により摂取されるため、カルベンダジムを投与する試験は、動物体内での挙動をより広い視野で確認できるためデータが必要である。入手可能な情報からを考慮して、反すう動物のリスク評価の露評価対象物質を、暫定的にチオフアネートメチル、4-OH-MBC、5-OH-MBC、5-OH-MBC-Sおよびカルベンダジムとした。家禽は暫定的にチオフアネートメチル、40H-チオフアネート（抱合体含む）、5-OH-MBC、5-OH-MBC-Sおよびカルベンダジムとした。

なお、代謝物に関するいくつかの毒物データ（QSAR、遺伝毒性および急性経口毒性）が提出されたが、遺伝毒性や曝露評価を行うには不十分であった。

3-9 チウラム（チラム）

食品安全委員会では、チウラムについて食品健康影響評価は行われていない。

EFSA¹⁵⁾ では、農産物中の暴露評価対象物質をチウラム、M1とした。畜産物中の暴露評価対象物質はチウラム（親化合物のみ）とした。経緯は以下のとおりである。

果実（リンゴ、ブドウ）、根菜（テンサイ）、穀類（小麦）およびパルス/油糧種子（大豆）作物を用いた植物体内運命試験の結果、表面洗浄面分を除きチウラムは検出されず、極性化合物に分解されることが示された。葉面処理されたリンゴ、ブドウでは、代謝物M1が果物で確認され（0.05-0.13mg / kg）、ジメチルジチオカルバメートグルコシド（DDC-グルコシド）のみがブドウ果汁で確認された。また、小麦と大豆ではM1が同定され、麦わら、穀粒と大豆でそれぞれ32%TRRと7%TRR、11%TRRであった。DDC-グルコシド化合物は小麦飼料（26.5%TRR）でも同定されましたが、すべての大豆植物部分で非常に低い割合（<1%TRR）で回収されました。代謝物DDC-グルコシドの正確な構造が不明であるため、データが要求された。

畜産動物を用いたチウラムの体内運命試験は、産卵鶏および泌乳中のヤギが供試され、チウラムは検出されず、他の代謝物も非常に低かった。しかし、飼料中のチウラムの代謝により生成した代謝物M1にばく露される可能性がある。そこでリンゴで確認された残留量を基にM1の摂取量を計算したところ、すべての家畜種で1日あたり0.001 mg / kg体重となり、摂取量のごくわずかであった。

なお代謝物の毒性評価について、主要なラット代謝物である代謝物M3については、親によってカバーされていると考えることができます。他の代謝物（M1、M2、M4、M7、およびM8）については、毒性的懸念の閾値（TTC）の概念が専門家によって有効なアプローチと見なされました。しかし、暴露データがないために懸念がないと結論付けることはできなかった。これらの代謝物についていくつかの毒性データが提供された：M1は遺伝毒性試験で陰性であり、M2は利用可能な変異原性データに限られており、QSAR分析でアラートを示し、DMA（M4）の遺伝毒性の可能性に関するデータはなく、M7とM8では、毒物学的プロファイルと可能な参照値（データギャップ）について結論を出すことはできなかった。

3-10 β -シフルトリン

食品安全委員会では、 β -シフルトリンについて食品健康影響評価は行われていない。

EFSA¹⁶⁾ では、農産物および畜産物中の暴露評価対象物質をシフルトリン（異性体の含量）とした。経緯は以下のとおりである。

果菜（トマトとリンゴ）、根菜（ジャガイモとテンサイ）、穀物（小麦）および豆類/油糧種子（大豆と綿）で、テンサイ（種子処理）を用いた植物体内運命試験の結果、大部分（50%TRR以上）は未変化の親化合物であった。多くの代謝物（FPB、FPBアルデヒド、FPB酸、FPBアルコール、4-OH-FPB酸、Me-FPB酸、FPBアミド、シフルトリン酸（COOHシフルトリン）、Me-シフルトリン、およびDCVA）も確認されたが、いずれも10%TRR未満であった。これらの試験はGLもしくはガイドラインに準拠していなかったが、植物代謝を明らかにすることが可能な資料と判断された。

畜産動物を用いたチウラムの体内運命試験は、家禽、反すう動物が検討された。家禽の研究では、シフルトリンが主要な成分（12~75%TRR）であり、代謝物としてFPB酸と4-OH-FPB酸（それぞれ最大26%TRRと20%TRR）が確認された。反すう動物では、GLP非準拠の牛の試験において、シフルトリンが主要な成分（56-99%TRR）であり、代謝物としてFPBアルデヒド（14%TRR）およびFPBアルコール（43%TRR）が確認された。最近のヤギの試験では、TRRは肝臓、腎臓、筋肉で0.01 mg / kg未満であり、シフルトリンが主要な成分として特定された。

なお、主要なラット代謝物であるDCVA、FPB酸（およびその前駆体FBPアルデヒド）および4-OH-FPB酸は、 β -シフルトリンの毒性プロファイル（および参照値）によってカバーされていると見なされました。他の代謝物（FPBアルコール、FPBアミド、Me-FPB酸、FPB、シフルトリン酸（COOHシフルトリン）およびMe-シフルトリン）については、入手可能なデータが限られており（急性試験またはエームス試験）、QSAR分析を行っても毒性プロファイルについて結論を出すことができませんでした。シフルトリンとベータシフルトリンの間の許容可能なリードアクロス（例えば、長期および生殖毒性）、および短期および発達研究における両方の化合物の同様の毒性プロファイルを考慮すると、 β -シフルトリンのADIとARfDの設定根拠となった4週ラットの試験は、シフルトリンの毒物学的プロファイルもカバーしていると判断した。

3-11 クロジナホップ

食品安全委員会では、クロジナホップについて食品健康影響評価は行われていない。

EFSA¹⁷⁾ では、農産物および畜産物中の暴露評価対象物質をクロジナホップ、そのS異性体、それらの塩、エステルおよび複合体の含量とした。経緯は以下のとおりである。

植物体内運命試験の結果、クロジナホップ、クロジナホッププロパルギル、代謝物CGA 193468（M1）、CGA 144462（M3）、CGA 214111（M4）、およびII2が、牧草、飼料、穀物で認められた。酵素的または酸加水分解後のクロジナホップ、M1、M3、II2およびCGA302371の有意な増加は、これらの抱合体も存在することを示した。ピリジニルラベル固有の代謝物であるCGA302371は、主に葉の多い植物の部分（飼料/飼料およびわら、総放射性残留物（TRR）の6~17%）で検出されました。すべての研究にわたって、さまざまな商品におけるTRRの個々の構成要素の比率は異なりました。成熟した小麦粒とわらでは、クロジナホッププロパルギルは、ごくわずかに認められた（<10%TRR）。クロジナホ

ップは穀物の最大21%のTRRを占めました。飼料では、II2とクロジナホップが最大17%TRR認められた。植物や動物でのR異性体の異性化によるS異性体の生成についてはデータ要求されている。

畜産動物（ヤギ）を用いたクロジナホッププロパルギルの体内運命試験は、クロジナホップが主要な成分であった（腎臓57%TRR、肝臓46%TRR、筋肉21%TRR、および脂肪31%TRR）。家さんの代謝の研究では、追加の化合物CGA 214111（遊離および抱合体）が、鶏の肝臓のクロジナホップと同じレベルで存在しました（12%TRR）。

なお、QSARについては原体混在物について検討されたが、提出されたQSAR分析結果は全体的に信頼性が低いため考慮されなかった。

評価事例の調査1，2で調査した計14剤について食品安全委員会の評価とEFSAの評価を比較すると

、
① 食品安全委員会に比べEFSAではより多くの代謝物が暴露評価対象物質に設定される傾向にある。

その理由として、

- ・食品安全委員会ではラットから検出された代謝物を暴露評価対象物質の候補から除外している場合が多い

- ・暴露評価対象物質の決定方法（EFSAでは、農産物や畜産物中の主要な代謝物か否かを具体的な数値基準で判断している、毒性学的負荷量を基に代謝物を選択している）

- ・食品安全委員会では10%TRR以上であっても残留濃度や水溶性といった理由で候補から除外している

② EFSAでは、ガイダンスフローに従って毒性評価を行うと、暴露評価対象物質に代謝物が含まれる場合、暫定となる場合が多く、特に毒性データが追加で要求されている（チオファネートメチル、スピノサド、メパニピリム、フェンピコキサミド、ビフェナゼート、エポキシコナゾール、エトキサゾール）。

③ EFSAでは、計8剤が*in silico*手法が暴露評価対象物質の決定に活用された（明確に文章に記載）

。

- ・QSAR；イマゾスルフロン、スピノサド、ピリプロキシフェン、フェンピコキサミド、ジメテナミド

- ・TTC；チウラム（有効だが暴露量に関するデータがないために懸念がないと結論付けることはできなかった）

- ・リードアクロス； β -シフルトリン

④ 生成する代謝物が少ない、あるいは生成しても残留濃度が低い場合は食品安全委員会とEFSAの暴露評価対象物質はほぼ一致する。逆に言えば生成する代謝物が多いと、食品安全委員会とEFSAの暴露評価対象物質が異なる場合が多くなる。

参考文献

1) 食品安全委員会農薬専門調査会（2018）：農薬評価書 ビフェナゼート（第5版）

2) EFSA（2017）：Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance bif enazate. EFSA Journal, 15(1), 4693

- 3) 食品安全委員会農薬専門調査会（2019）：農薬評価書 フェンピコキサミド
- 4) EFSA (2018) : Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance fenpicoxamid (XDE-777). EFSA Journal, 16(1), 5146
- 5) 食品安全委員会農薬専門調査会（2019）：農薬評価書 フロルピラウキシフェンベンジル
- 6) EFSA (2018) : Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance fenpicoxamid (XDE-777). EFSA Journal, 16(1), 5146
- 7) 食品安全委員会農薬専門調査会（2015）：農薬評価書 メパニピリム
- 8) EFSA (2017) : Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance mepanipyrim. EFSA Journal, 15(6), 4852
- 9) 食品安全委員会農薬専門調査会（2019）：農薬評価書 ピリプロキシフェン（第4版）
- 10) EFSA (2019) : Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance pyriproxyfen. EFSA Journal, 19(7), 5732
- 11) 食品安全委員会農薬専門調査会（2018）：農薬・動物用医薬品評価書 スピノサド（第3版）
- 12) EFSA (2018) : Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance spinosad. EFSA Journal, 16(5), 5252
- 13) EFSA (2017) : Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance imazosulfuron. EFSA Journal, 15(2), 4695
- 14) EFSA (2018) : Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance thiophanate-methyl. EFSA Journal, 16(1), 5133
- 15) EFSA (2017) : Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance thiamiram. EFSA Journal, 15(7), 4700
- 16) EFSA (2018) : Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance beta-cyfluthrin. EFSA Journal, 16(9), 5405
- 17) EFSA (2018) : Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance beta-clodinafop (variant evaluated clodinafop-propargyl). EFSA Journal, 16(11), 5467

4. EFSAガイドンスの農薬代謝物評価ケーススタディの解析

本研究課題では、海外評価機関の評価事例の調査を行い、我が国の評価との違いについて解析を進めているが、EFSAやJMPRの評価書には、特に*in silico*評価が適用された代謝物について実際にどんなデータをもとにどのように*in silico*評価が行われたのか、その詳細が記載されていないことから、本検討では、EFSA ガイドンスに記載がある農薬代謝物評価のケーススタディの解析を行った。EFSA ガイドンスには、ケーススタディとしてイソプロチュロン、スピロキサミン、エポキシコナゾールの農薬3剤の記載があるが、特にイソプロチュロンの遺伝毒性のQSAR・リードアクロス部分（「EFSAにおける暴露評価対象物質の決定フロー」のモジュール1のステップ5・6）に着目して解析を行った。スピロキサミン、エポキシコナゾールのケーススタディでの評価概要も赤字で記載する。EFSAの文書の解析や補足事項に該当する部分は青字で記載する。

なお、イソプロチュロン、スピロキサミンについては、該当する食品安全委員会の農薬評価書は存在しない。トリアゾール系殺菌剤のエポキシコナゾールのみ食品安全委員会の農薬評価書（2014年1

月）が存在する。エポキシコナゾールの農薬評価書では、原体（親化合物）の遺伝毒性試験概要のほかに参考として「トリアゾール系農薬の暴露評価対象物質の検討において参考資料となるトリアゾール共通代謝物」の資料が添付されており、1,2,4-トリアゾール、トリアゾールアラニン及びトリアゾール酢酸の遺伝毒性試験結果が記載されている。これら共通代謝物3剤についてはいずれの遺伝試験においても陰性を示した。

更にエポキシコナゾールについては、昨年度報告書の「暴露評価対象物質設定に係る評価事例の調査」として本ケーススタディと農薬評価書の比較について既に報告済である。

ステップ0：（データの定義：ケーススタディにはステップ0は存在しない）

<http://dar.efsa.europa.eu/dar-web/provision> からダウンロード可能な2014年のRenewal Assessment Report (RAR)の情報を基に実施する。以下、評価（既存情報の確認と評価）をモジュールのステップ毎に進めていく。

ステップ1：全てのレベルでの残留物の性質に関する研究で同定された化合物

表B1の通り

ステップ2：除外する代謝物：なし

ステップ3：遺伝毒性による代謝物の評価：情報なし

ステップ4：代謝物の遺伝毒性学的な分類：表B1の通り

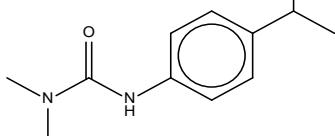
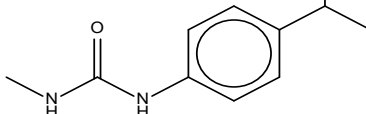
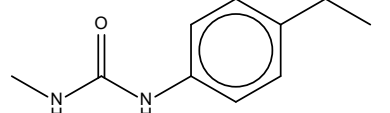
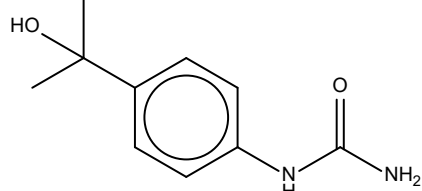
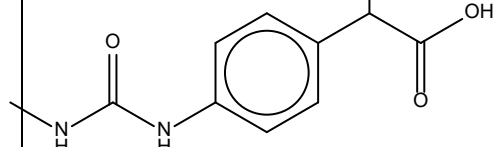
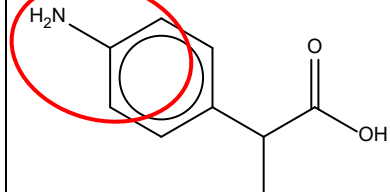
ステップ4では、親物質で実施された毒性試験で評価された代謝物（主要なラット代謝物M03 M04 M10 M13 表B1参照）については、親物質の遺伝毒性特性に関する調査研究の結論がこれらの代謝物にも当てはまり、さらなる試験は不要である。さらに代謝物が親との毒物学的研究によって特徴付けられていないが、別の活性物質に共通であり、この活性物質の毒性学的特性によってカバーされていることが判明した場合は、代謝物の評価にこの活性物質の遺伝毒性特性を利用し当て結論づけることができる。

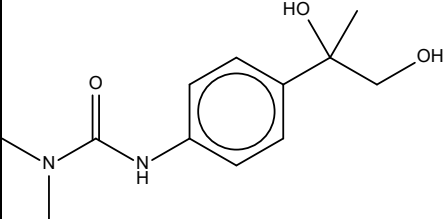
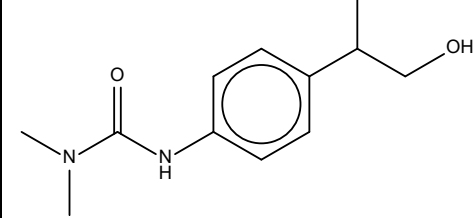
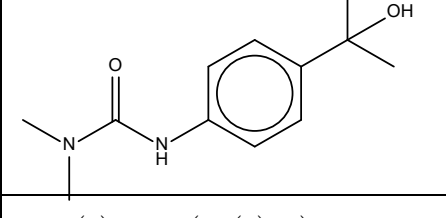
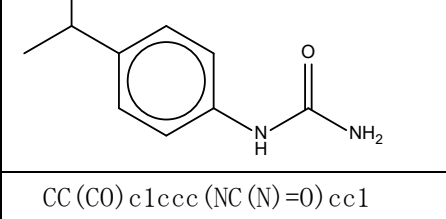
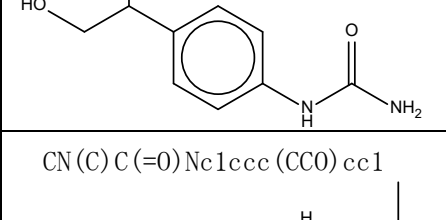
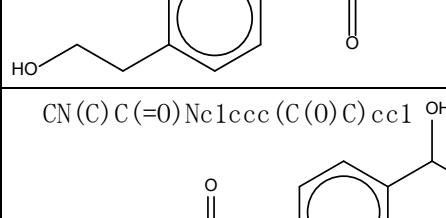
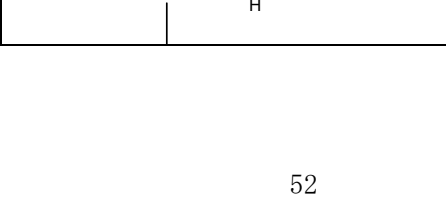
総括すると、毒性学的な性質が親化合物や特定の研究でカバーされていないと考えられる全ての化合物（表B1の右端Noの代謝物、薄黄色の枠）に対し、遺伝毒性評価（モジュール1のステップ5-9）を進めることとする。

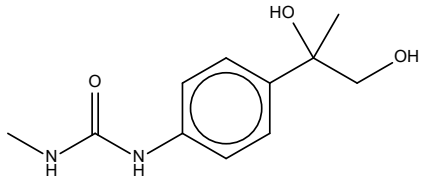
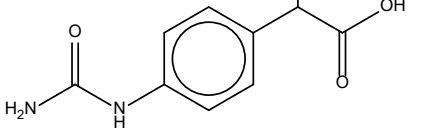
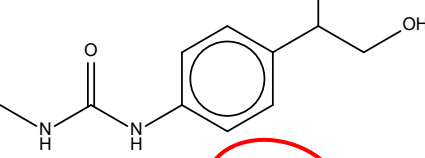
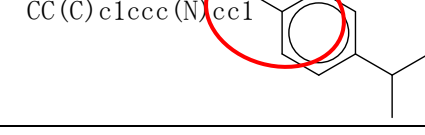
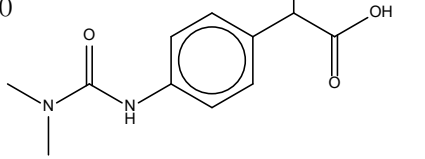
親化合物や主要なラット代謝物は評価対象ではないが、リードアクロス解析における他の代謝物に対する評価に活用しており、リードアクロス解析で活用されることとなる。

表B1 同定された残留物代謝物化合物と毒性学的データでカバーされる残余化合物*

化合物の同定	レポートや評価中名称	構造とSMILES	ラット代謝Occurrence (%投与量)	毒性学的性質が親化合物又は特定の化合物の
--------	------------	-----------	------------------------	----------------------

				調査研究でカバーされる？
親化合物	イソプロチュロン	<chem>CC(C)c1ccc(NC(=O)N(C)C)cc1</chem> 	<1	Yes
M02	AE F064145 Monodesmethyl イソプロチュロン	<chem>CC(C)c1ccc(NC(=O)NC)cc1</chem> 	1	No (細菌の変異原性研究あるが情報不十分)
M03	RPA 415044 Hydroxy-mono-desmethyl	<chem>CC(C)(O)c1ccc(NC(=O)NC)cc1</chem> 	24	Yes (>10% 投与量)
M04	RPA 410365 Hydroxy-didesmethyl	<chem>CC(C)(O)c1ccc(NC(=O)N)cc1</chem> 	51	Yes (>10% 投与量)
M05	RPA 409656	<chem>CC(c1ccc(NC(=O)NC)cc1)C(=O)O</chem> 	8	No
M06	RPA 410198	<chem>CC(C(=O)O)c1ccc(N)cc1</chem> 	—	No

M07	RPA 410226, isomersの和	<chem>CC(O)(CO)c1ccc(NC(=O)N(C)C)cc1</chem> 	6	No
M08	M08 RPA 409 658 1-OH-イソ プロチュロン	<chem>CC(CO)c1ccc(NC(=O)N(C)C)cc1</chem> 	3	No
M09	BD4236D7 Hy droxypropyl イソプロチュ ロン	<chem>CC(C)(O)c1ccc(NC(=O)N(C)C)cc1</chem> 	3	No
M10	LS 730334 D idesmethyl イ ソプロチュロ ン	<chem>CC(C)c1ccc(NC(N)=O)cc1</chem> 	15	Yes(>10% 投与量)
M11	BD4236D3, R PA 409660	<chem>CC(CO)c1ccc(NC(N)=O)cc1</chem> 	6	No
M12	BD4236D4	<chem>CN(C)C(=O)Nc1ccc(CCO)cc1</chem> 	—	No
		<chem>CN(C)C(=O)Nc1ccc(C(O)C)cc1</chem> 		

M13	BD4236D	<chem>CC(O)(CO)c1ccc(NC(=O)NC)cc1</chem> 	11	Yes (>10% 投与量)
M14	RPA 409657	<chem>CC(c1ccc(NC(N)=O)cc1)C(=O)O</chem> 	2	No
M15	RPA 409659	<chem>CC(CO)c1ccc(NC(=O)NC)cc1</chem> 	3	No
M16	RPA 710989	<chem>CC(C)c1ccc(N)cc1</chem> 	—	No
M18	RPA 409394 Propanoic acid イソプロチ ュロン	<chem>CC(c1ccc(NC(=O)N(C)C)cc1)C(=O)O</chem> 	2	No

*ガイダンスドキュメントのケーススタディTables B. 1, B. 2を改変。リードアクロス解析で芳香族第1級アミンのアラートが発せられる要因の部分構造を赤丸で示す。

イソプロチュロンでは親化合物と16の代謝物がリストされ、うち12代謝物(13構造だが、M12の異性体は同一のQSAR・リードアクロス解析結果だと推察)が遺伝毒性評価対象である。

スピロキサミンは親化合物と28の代謝物がリストされ、うち26代謝物(26構造)が遺伝毒性評価対象である。エポキシコナゾールは31代謝物(構造異性体を含め46物質)が遺伝毒性評価対象である。

ステップ5: 遺伝毒性(Q)SAR予測

ステップ5-1. (Q)SAR予測の戦略

前頁の表B 1 に対応可能なものを除いた同定されたイソプロチュロン代謝物に対し遺伝毒性の可能性(遺伝子突然変異と染色体異常)を4つモデルで予測する: CAESAR 変異原性モデル(Ames/(Q)SAR) v. 2. 1. 12 (VEGA v. 1. 0. 8ソフトウェア); 遺伝子突然変異予測のDEREK Nexus 変異原性モデル(Ames/(Q)SAR) v. 4. 0. 6; Toxtree v. 2. 6. 6の小核(MN)のアラート構造のルールベースモデル; 染色体異常予測のためのDEREK Nexus染色体損傷モデルv. 4. 0. 6。QSAR予測とは別にステップ6でこれらの代謝物はリードアクロス解析の対象としていた。

医薬品不純物に対するICH/M7(潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中DNA反応性(変異原性)不純物の評価及び管理)ガイドラインではインビトロ変異原性エームス予測の統計ベースとルール(知識)ベースのQSARを対象としているのと同様、本評価においても、インビボ小核やインビボ/インビトロ染色体損傷の予測結果も遺伝毒性QSAR評価の対象として組みこんでいる。CAESARは統計ベースとアラート構造のルールベースを組み合わせた方法であり、DEREK NexusとToxtreeはともにルールベースのモデルである。つまり、ステップ5での要件を満たす**知識ベースと統計ベースの2つの独立した(Q) SARモデル(異なるトレーニングセットやアルゴリズムに基づく)**の適用を行っている。

ケーススタディで用いられたCAESAR変異原性モデルの予測ソフトウェアは、現時点ではVEGA HUB (Virtual models for property Evaluation of chemicals within a Global Architecture) <https://www.vegahub.eu/>からVEGA QSARとして無償でダウンロード可能である(2020/12/24アクセス)。

ステップ5-2. 予測モデルに関する文書

4つのモデルについて以下の情報が提供された。情報が得られない場合は not availableの表記になる。

- 1) 利用したモデル(モデルの表題、著者、参考文献)
- 2) エンドポイント情報(エンドポイント、実験プロトコル)
- 3) 使用したトレーニングセット(物質数、トレーニングセット化学物質の化学的な多様性の情報)
- 4) モデル構築に使用したアルゴリズムと分子記述子の方法(名称と使用した記述子の種類、記述子の生成の選択に使用したソフトウェア)
- 5) 内部検証の統計量(トレーニングセット化学物質に対するモデルのパフォーマンス)つまり、適合度、頑健性、予測性
- 6) 可能ならば外部検証の統計量
- 7) 適用範囲の情報(モデルの適用範囲の記述と適用範囲を評価するために用いた手法)
- 8) モデルの機序的な解釈
- 9) 実験データと物質の可能な構造類似物の予測の記述(ソフトウェアが提供か利用者が選択)
- 10) モデルから提供されたほかの情報。例えば、示唆された作用機序や不確実性

VEGAソフトウェア以外の3モデルの情報はQMRF(QSAR Model Reporting Formatモデルリポートフォーマット)のQMRF JRCデータベース<http://qsardb.jrc.it/qmrf/>(2020年12月時点ではJRC QSAR Model Databaseであり、URLは<http://data.europa.eu/89h/e4ef8d13-d743-4524-a6eb-80e18b58cba4>に変更され、Derekの2モデルは2017年に更新された内容が最新版として登録されている)でモデル情報の参照が可能である。OECDのQSARバリデーション原則<http://www.oecd.org/env/ehs/risk-assessment/37849783.pdf>([エンドポイントの定義],[曖昧さのないアルゴリズム],[適用範囲の定義],[適合度、頑健性、予測性の適切な評価],[可能ならば、メカニズムに関する解釈])に付随する内容が記載されている。

ステップ5-3. 遺伝毒性予測の結果と解析そして適用範囲

表B2 主要なラット代謝物(表B1右端Yes)を除くイソプロクロン残余代謝物の遺伝毒性予測*

代謝物	CAESAR遺伝子突然変異予測(適用範囲)	DEREK Nexus遺伝子突然変異予測(適用範囲情報なし)	Toxtree インビボ小核予測(適用範囲情報なし)	DEREK Nexus インビボ/インビトロ染色体損傷予測(ヒトと哺乳類)
親化合物	QSAR予測適用せず	適用せず	適用せず	適用せず
M02	陰性 (could be out)	陰性	陰性	Nothing to report
M05	陰性 (could be out)	陰性	陰性	Nothing to report
M06	陰性 (out)	陰性	陽性 alert	Equivocal
M07	陰性 (in)	陰性	陽性 alert	Nothing to report
M08	陰性 (could be out)	陰性	陰性	Nothing to report
M09	陰性 (in)	陰性	陰性	Nothing to report
M11	陰性 (in)	陰性	陰性	Nothing to report
M12	陽性 (could be out)	陰性	陰性	Nothing to report
M14	陰性 (could be out)	陰性	陰性	Nothing to report
M15	陰性 (in)	陰性	陰性	Nothing to report
M16	陽性 (could be out)	陰性	陽性 alert	Equivocal
M18	陰性 (in)	陰性	陰性	Nothing to report

*ガイダンスドキュメントのケーススタディTable B.3を改変

スピロキサミンのケーススタディではソフトウェアCAESARとOASISの遺伝子突然変異（エームス）予測、ソフトウェアToxtreeのインビボ染色体異常予測、OASISの染色体異常予測モデルによる評価を行っている。

エポキシコナゾールではソフトウェアOASISとDerekのエームス予測、Derekのインビボ/インビトロ染色体損傷予測、OASISの染色体異常予測モデルによる評価を行っている。

全てのケーススタディにおいて、Ames/(Q) SAR予測2件、インビボ・インビトロの小核または染色体異常のモデル2件、合計4件の結果によるバッテリーアプローチであり、変異原性以外のエンドポイントのインシリコ評価を行っている。

CARSER: 代謝物M12 M16が予測適用範囲外だが変異原性の懸念がある。トレーニングセットとM16の間で最も隣接している6物質に対しての追加解析により、類似性similarityは0.952~0.929の範囲であった。この6物質は全て、第1級芳香族アミンでメチルまたはエチル側鎖が芳香環に結合した構造である。うち5物質は、実験データが陽性であり、陽性予測の追加確信データとなっていた。トレーニングセットとM12の間で最も隣接している6物質に対する追加の解析より類似性は0.896~0.854の範囲であり、M16よりは低いが依然として高類似性。しかしながら、類似物のうち芳香族アミン1物質を除いた6物質の非変異原性であり、M12を陽性予測とすることに疑念が残る。

DEREK Nexus 遺伝子突然変異: すべて陰性

Toxtree: 代謝物M06 M07 M16は少なくとも1つの小核アッセイの陽性アラートを有する陽性である。M06 M16の構造アラートは第1級芳香族アミン、ヒドロキシルアミンそしてその派生エステル（制限あり）に同定されている。これは、小核アッセイ陽性で知られている潜在的なDNA反応エージェントに関連している。M07はH-acceptor-path3-H-acceptorとして同定された。モデル開発者によるとこのアラートはタンパク質又はDNAと非共有結合性相互作用で説明可能な分子フレームワークである。このような相互作用はDNA相互作用や結合溝の様に潜在的に遺伝毒性がある。しかしながら、このアラートの陽性予測はモデル開発者によると34%と低い（Benigni R, Bossa C and Worth A, (2010) Mutagenesis 25(4) 335-341）。

DEREK Nexus インビトロ ヒトと哺乳類染色体損傷: 代謝物M06 M16でアルキルアニリンの部分構造に起因してequivocal

QSARを適用するとともにCARSER（現在のVEGA）やToxtreeでは、結果のレポートを基にリードアクロス（アナログアプローチ）や作用機序に関連する考察を行っている。単にQSARを適用して陽性・陰性を確認するのではなく、専門家判断に資する結果の解析情報も記載があった。

ステップ5-4. (Q) SAR予測の結論

(Q) SAR評価により代謝物M06 M07 M12 M16が遺伝毒性を誘発する懸念を示した。他の8代謝物は全モデルで陰性である。すべての代謝物は次のステップリードアクロスに進む。

ケーススタディでは、4モデルのQSARで懸念が無い代謝物もリードアクロスに進める方向であった。しかし、親化合物や主要なラット代謝物に関するQSAR評価については評価書の結果の比較などの記載がなかった。

ステップ6: OECDツールボックスを用いた遺伝毒性予測のためのリードアクロス

ガイダンスドキュメントのケーススタディ中に記載があったOECD QSARツールボックスのURL <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/theoecdqsartoolbox.htm>は2020年12月現在リンク切れ。QSARツールボックスURLは、<http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/oecd-qsar-toolbox.htm> または<https://qsartoolbox.org/>（2020/12/3アクセス）

ステップ6-1. リードアクロスによる評価

「遺伝子変異と染色体異常両方のエンドポイントについてすべての代謝物に対してリードアクロス

で評価しなくてはならない」としている

ステップ6-1-1. 遺伝毒性プロファイリング

遺伝毒性評価に関連するMIE(対象とする有害性の誘因となる化学物質と生体分子との作用)はDNAそして/またはタンパク質との相互作用である。ツールボックスに含まれる関連する機序プロファイル(アラート構造を検出するモデル)はOASIS v1.3のDNA結合性とタンパク結合性、OECDのDNA結合性とタンパク結合性であり、エンドポイント特異的なプロファイルはOASIS v1.3のエームス、小核、遺伝子突然変異のDNAアラート、ISSのインビトロ変異原性(エームス試験)アラートとインビボ変異原性(小核)アラートそしてOASIS v1.1の遺伝子突然変異のためのタンパク結合性アラートである。このプロファイルの確認は(QSARの場合とは異なり)表B1に記載されたすべての代謝物について実施した。更に、構造の類似性を評価するため、有機官能基のプロファイルを適用し、電子的または構造的な影響に起因する構造アラートを導入しました。

なおタンパク結合性のアラートは親化合物、すべての評価した代謝物で現れなかった。他のアラートについては以下の表B3にまとめる。

表B3 遺伝毒性のプロファイルの10のAlertおよび7の有機官能基^{*1}

	Alert ^{*2}				Alkyl ar enes	Is o-pr opyl	Al -coh ol	Carbo xylic acid	A aryl	Urea deriv ates	A ni- lin e
	1, 2, 5 -8, 10	3	4	9						(SA)	
親化合物		X	X	X	X	X			X	X	
M02			X	X	X	X			X	X	
M03			X	X			X		X	X	
M04			X	X			X		X	X	
M05			X	X				X	X	X	
M06	X							X	X		X
M07		X	X	X			X		X	X	
M08		X	X	X			X		X	X	
M09		X	X	X			X		X	X	
M10			X	X	X	X			X	X	
M11			X	X			X		X	X	
M12		X	X	X			X		X	X	
M13			X	X			X		X	X	
M14			X	X				X	X	X	
M15			X	X			X		X	X	
M16	X				X	X			X		X

M18		X	X	X				X	X	X	
-----	--	---	---	---	--	--	--	---	---	---	--

*¹表B3は、ガイドンスドキュメントのTable B.4: Genotoxicity profiling of isoproturon metabolites by OECD Toolboxを改変QSARツールボックスでのプロファイラ・部分構造の有無の一覧に相当する。代謝物M03 M04 M10 M13は親化合物の調査で遺伝毒性学的性質についてカバーされた（＝主要なラットの代謝物に該当）。代謝物M06 M07 M12 M16はいずれかのAmes/(Q) SARモデルで潜在的に変異原性があると予測されたか、染色体異常で潜在的に陽性と予測された物質。*²Alert 1 2 5-8 10は第1級芳香族アミン（アニリン）で、いずれのプロファイラにも含まれおり、活性酸素形成や代謝活性化後求核剤（Nitrenium ion）形成などの機序を持つ。Alert 3 4はOECDのDNA結合性のSN1反応（脂肪族3級アミンと芳香族フェニルウレア）、Alert 9はISSの小核H-acceptor-path3-H-acceptorのプロファイラ。

ステップ6-1-2. リードアクロス解析

Alert 4 9は、表B3の水色で示した主要なラットの代謝物すべてに対して存在する。代謝物M08 M09 M18と親化合物にはAlert 3が存在する。よって、Alert 3 4 9は全ての実験研究をカバーしており、遺伝毒性のある代謝物に関連していないといえる。M08 M09 M18にはこれら以外の遺伝毒性プロファイラのアラートは存在しなかった。

有機官能基のプロファイラは、methylureaの脱メチル化（M02 M05 M11 M14 M15）または/かつ水酸化（M02 M08 M09 M11 M15）または第4位のアルキル側鎖のカルボキシル化（M05 M14 M18）に関連している。脱メチル化と水酸化は主要なラットの代謝物に存在しているため、M02 M08 M09 M11 M14は親化合物と主要なラットの代謝物にしていると考えられ、遺伝毒性的な懸念がないと考えられる。カルボニル基は主要なラットの代謝物に存在しないが遺伝毒性の構造アラートと認識されないしうえ、遺伝毒性の構造アラートからは外れているため（methylurea基）、構造アラートを活性化するものではなくM05 M14 M18は遺伝毒性的な懸念がないと考えられる。

Alert 3 4 9 は親化合物と主要なラット代謝物にて同定されるが代謝物M07とM12でも同定され、ほかのアラートは同定されない。親化合物と比較すると第4位のアルキル側鎖の代謝により水酸基が存在している。代謝物M07とM12で見つかる水酸基（アルコール）は親化合物では見つからないが、主要なラットの代謝物であるM03とM04では存在する。リードアクロス解析に基づき、代謝物M07とM12は親化合物やその主要なラット代謝物にとっても似ているといえ、遺伝毒性的懸念が無いと結論付けることができる。

Alert 3 4 9 は代謝物M06とM16では存在しないが、ほとんどすべての遺伝毒性のプロファイラに存在する第1級芳香族アミン（アニリン）のアラートが同定される。第1級芳香族アミンのアラートは、親化合物や主要なラット代謝物には存在しないし、遺伝毒性の潜在性を排除できないという(Q) SARモデルの予測に従っている。潜在的に遺伝毒性のある代謝物の受け入れられない食事のリスクを除くと、曝露の見積と毒性学的懸念の閾値TTCの比較をステップ7で実施するかステップ8でM06とM16の試験を実施する必要がある。

以上の様に、ケーススタディのリードアクロス解析では、調査された親化合物や主要なラット代謝物との官能基の有無レベルでの類似構造やアラートの有無、代謝部位の特徴を考察するした。その結果、アニリン骨格を持つ物質以外では遺伝毒性の懸念が無いとし、アニリン骨格を含む物質では次の

ステップ以降でリスク評価を進めることとしている。フィンガープリントでの類似度の測定などで、親化合物や主要なラット代謝物以外の物質との比較によるリードアクロス解析は実施していない。

ステップ6-2. リードアクロス解析の結論

代謝物M02 M05 M08 M09 M11 M14 M15 M18は代謝物の遺伝毒性の懸念なし。

M12は2つのうち1つのAmes/ (Q) SARモデルで陽性であり、M07は2つのうち1つの (Q) SARモデルで染色体異常の陽性であるが、リードアクロス解析で遺伝毒性の懸念なし。

M06はインビボ小核陽性で染色体異常equivocalの予測であり、M16は2つのうち1つのAmes/ (Q) SARモデルで陽性かつインビボ小核陽性でインビトロ染色体異常equivocalの予測である。そして、代謝物M12 M07はリードアクロス解析でインビボ小核とインビトロ染色体異常のエンドポイントで遺伝毒性の懸念を除くことができないため、ステップ7の遺伝即製のTTCまたは/かつステップ8の試験を考えないといけない。

スピロキサミンは26代謝物が遺伝毒性評価対象であったが、QSARやリードアクロス解析で懸念が示唆されのは、7代謝物 (M28-M31 M35 M36 M37) であった。

エポキシコナゾールは31代謝物 (構造異性体を含め46物質) が遺伝毒性評価対象だが、QSARやリードアクロス解析で懸念が示唆されのは、21代謝物 (M05 M06 M07 M08 M09 M12 M13 M15 M16 M18 M19 M20 M21 M23 M49 M50 M51 M52 M56 M62 M63) であった。

ステップ7: 遺伝毒性を査定するための毒性学的懸念の閾値TTC評価 (任意)

TTC評価での曝露は「穀物類 (小麦、大麦、ライ麦、ライ小麦) における、植物の生物季節学成長段階を同定するスケールに成長段階が00-32、番号1, ヘクタール辺りの有効成分1.5gで収穫前間隔 (農薬が散布されてから収穫されるまでの間隔) とは関係が無い」を考慮して評価する。規制当局の決定ははっきり限定されていることから、定量的曝露の見積は農業生産工程管理GAPの条件を考えたものに限られる。

TTC評価の結論としては、前もって潜在的な遺伝毒性の懸念を除外できない全代謝物に対する複合曝露評価により、 $0.0025 \mu\text{g/kg bw per day}$ の遺伝毒性の許容TTCを超えるものを明確にした。代謝物M16は消費者曝露の寄与が無かった。なぜなら、存在が穀類飼料中に限られおり、動物の食物には含まれないからである。これ以上の他の食物での外挿による評価は不要であり、M16の試験は必要としない。しかしながら、代謝物M06は急性の消費データ同様に慢性で遺伝毒性の閾値を超えて、ステップ8の試験が必要である (複合曝露>TTC)。

スピロキサミンは懸念が示唆された7代謝物は全て複合曝露>TTCに該当し、追加試験の検討が必要である。

エポキシコナゾールも懸念が示唆された21代謝物は全て複合曝露>TTCに該当した。ただし、M49 M50 M51 M52についてはトリアゾール派生代謝物TDMに該当し、多くの物質に共通する代謝物であるため、TDMとして特定のケースにしてリスク評価することが非常に推奨される。

農薬評価書では、ケーススタディで推奨するTDMの個別評価の資料を参考として提示している。ここで、エポキシコナゾールM49はトリアゾールアラニン、M50はトリアゾールヒドロキシプロピオン酸

、M51はトリアゾール酢酸。M52はトリアゾールに該当する。トリアゾールヒドロキシプロピオン酸以外は食品安全委員会・農薬評価書の参考に記載されていた評価物質と合致する。

ステップ 8: 遺伝毒性試験

代謝物M06に対する試験結果情報はない、QSAR予測結果が示したインビボ小核とインビトロ染色体異常の懸念を受けると、OECD テストガイドライン478のインビトロの構造的・数的な染色体異常の試験が推奨される。加えて、点変異（Ames/(Q)SARの予測結果）でM06が陰性であったとしても、（表B2で示したAmes/(Q)SARの結果は）適用範囲外の解析であり、リードアクロス解析で陽性のアラートが存在したことからOECDテストガイドライン471のエームス試験の実施も推奨される。

スピロキサミンではM28はM28-M31の代表としてOECDテストガイドライン471のエームス試験とOECDテストガイドライン487インビトロ小核アッセイをすべきであり、M37も同様であり、代謝物M35やM36のグループに属するものも似たような戦略等で実施すべきである。

エポキシコナゾールはM21、M63、M12（M12とM18の代表）、M06とM09（M06とM07とM08とM09の代表）、M05（M05とM13とM15とM56の代表）についてOECDテストガイドライン471のエームス試験とOECDテストガイドライン487インビトロ小核アッセイをすべきである。家禽類の代謝物M16 M19 M20 M23はM05のグループにてカバーされる。

（トリアゾール派生代謝物TDMの4代謝物についてはステップ 8 での記載はなかった。）

ケーススタディでは、エポキシコナゾール・スピロキサミンの様に複数の代謝物で「複合曝露>TTC」に該当した場合、すべての代謝物に対して試験を奨励するのではなく、グループ化の概念を用いて代表選手のみにエームス試験とインビトロ小核アッセイの実施を示唆している。

ステップ 9: 遺伝毒性の懸念

M06に関する追加情報が必要

ケーススタディでは、スピロキサミンでは「なし（M28, M35, M36, M37の追加情報がペンディング）」、エポキシコナゾールではStep 8 で取り上げたいいくつかの物質について追加情報が必要であると記載されていた。

ケーススタディの段階では、実際に試験をするわけではないため、ステップ 9 の記載・位置づけがあいまいであり、実際の評価では、記載方法を統一することが望まれるだろう。

以上ステップ 1～9までが、モジュール 1 における遺伝毒性評価のステップに該当する。

遺伝毒性が陰性の場合に、モジュール 2 のステップ10~18の一般毒性の評価、モジュール3のステップ19の農薬代謝物の評価へと進んでいく。ケーススタディでは実際に遺伝毒性試験を実施せず、RARの情報を基に進めていくため、文書内では以下ステップのモジュール 2・モジュール 3へと進んでいる。

モジュール 2

ステップ10: 代謝物の一般毒性の特徴づけは？

ステップ11: 一般毒性を査定するための毒性学的懸念の閾値TTC評価（任意）

ステップ12: 懸念の考慮

ステップ13: 食品中の食物代謝物の評価
ステップ14: 飼料中の食物代謝物の評価
ステップ15: 飼料から家畜への残留物の移行
ステップ16: 動物由来の食品中の食物代謝物の評価
ステップ17: 代謝物に対する試験による毒性評価の戦略
ステップ18: 消費者に対する毒性負担量の評価

モジュール3

ステップ19: リスク評価のための残留物の定義

参考文献

EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues (2016) : Guidance on the establishment of the residue definition for dietary risk assessment. EFSA Journal, 14(12), 4549

食品安全委員会農薬専門調査会 (2014) : 農薬評価書 エポキシコナゾール

食品安全委員会農薬専門調査会 (2012) : 農薬評価書 トリアゾール共通代謝物

(3) 個別課題：実際の評価資料をもとにしたケーススタディの実施とインシリコ評価手法の適用に関する検討（研究担当者：小野 敦（所属機関名：岡山大学）、古濱 彩子（国立医薬品食品衛生研究所）、清家 伸康（農業・食品産業技術総合研究機構））

本研究項目では、海外評価事例の調査で*in silico*手法が評価に適用された剤を対象として食品安全委員会において海外評価機関における評価と同様の*in silico*評価を含むべく露対象物質設定スキームでの評価が可能であることを確認するため、各農薬の代謝物について*in silico*評価を適用するために必要な化学構造について海外評価機関の評価書等の調査を行い、情報の得られた代謝物構造について*in silico*評価を適用可能な化学構造フォーマットでの整理を進め、反復投与毒性およびAmes変異原性それぞれについて*in silico*解析を行った。また、各代謝物について実施された毒性試験情報については食品安全委員会評価書に記載されている情報をもとに解析を行った。

一方、QSARモデルのAmes変異原性の予測性の向上のための検討では、予測モデルのケミカルスペース拡大のため、異なるQSARモデルで予測結果が異なる計15化合物について実際にAmes試験を実施して、予測モデルの改良を行った。

3-1 反復投与毒性情報の得られていない代謝物の*in silico*評価の検討

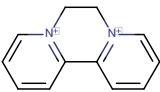
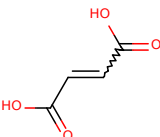
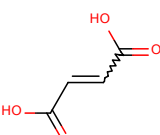
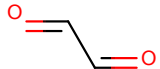
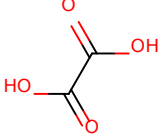
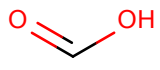
EFSA、JMPRにおける代謝物の毒性評価スキームの調査から、反復投与毒性情報の得られていない代謝物についての一般毒性の評価には、いずれの評価機関においてもTTCアプローチが適用されていた。特に遺伝毒性（変異原性）の懸念のない代謝物の一般毒性についてはcramer分類に基づくTTC値（適用が確認できた例では、いずれもcramerクラス3のTTC値が適用されていた）が適用されていたことから、本研究では食品安全委員会ですでに評価済みの剤の代謝物についてcramer分類に基づくTTCアプローチ適用の検討を行った。

代謝物の評価に先立って、食品安全委員会ですべての評価が行われた農薬のうちcramer分類が可能な化学構造情報が入手出来た約300剤の親化合物について、toxtree2.6を用いてcramer分類を実施した。その結果、検討を行った全ての農薬親化合物はcramerクラス3に分類された（データは省略）。この結果から、農薬の親化合物については基本的にクラス3であり、クラス1や2に分類される剤は無いと考えて良いと考察された。

続いて海外評価事例の調査においてEFSAもしくはJMPRでの評価において代謝物の遺伝毒性もしくは一般毒性評価への*in silico*評価の適用が確認された剤のうち、本研究で代謝物構造情報を海外評価書等から入手し、SMILES構造として整理できた24剤の代謝物について、親物質とその代謝物のcramer分類を実施した。いずれの剤についても、ほとんどの代謝物はクラス3に分類されたが、10剤の計21代謝物がクラス1もしくは2に分類された。表3-1-1～3-1-5には、クラス1もしくは2に分類された代謝物の構造を親化合物の構造とともに示した。Cramer tree resultのカラムは、最終的にcramerの判断樹のどの枝においてそれぞれのクラスに分類されたかを示しており、同じResultの代謝物は同じ判断樹の枝に分類されたことを示す。Diquat, fenpicoxamid, fenpyroximate, tioxazafen でそれぞれ5, 6, 4, 2代謝物が、fluazinam, propamocarb, pyraclostrobin, sulfoxaflor では、各1代謝物が、クラス1（一部はクラス2）に分類された。クラス1もしくは2に分類された代謝物は、いずれもかなり低分子化した代謝物であった。そこで次にクラス1もしくは2に分類された代謝物について、cramer分類の妥当性についてそれぞれ検討を行った。

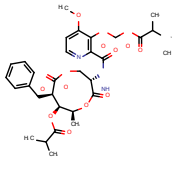
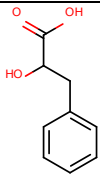
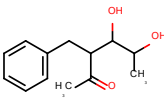
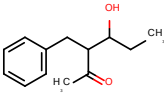
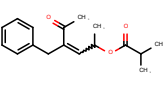
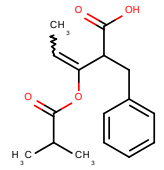
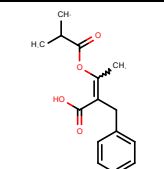
表3-1-1に示したクラス1もしくは2に分類されたdiquat代謝物は、シュウ酸およびその類似物質であった。シュウ酸は、Munroらによるcramer分類の検証に用いられた物質にも含まれており、Munroらのデータセットでは、慢性毒性のNOELは840mg/kg/dayとされている。他の代謝物について毒性試験情報を見つけることは出来なかったが、いずれもその単純な化学構造から食品への残留による健康影響の懸念はないと考えられる。

表3-1-1 クラス1もしくは2に分類されたdiquat代謝物

parent	parent structure	metabolite structure	Cramer rules, with extensions	CramerTreeResult
diquat			Low (Class I)	1Y
			Low (Class I)	1Y
			Intermediate (Class II)	1N,2N,3N,43N,5N,6N,42N,7N,16N,17N,19Y,20Y,21N,44N,18Y
			Low (Class I)	1N,2N,3N,43N,5N,6N,42N,7N,16N,17N,19Y,20Y,21N,44N,18N
			Low (Class I)	1Y

fenpicoxamidでは、6代謝物がクラス1もしくはクラス2に分類された（表3-1-2）。いずれも親化合物の構造との比較から、ベンゼン環の結合した大きなリングが開裂した代謝物であった。これらの代謝物については、本研究で調べた限りでは、いずれについても毒性情報は見つけることは出来ず、また毒性情報の入手可能な類似物質も見つけることは出来なかった。しかし、最も単純な構造はフェニルアラニンアナログであり、健康影響の懸念は低いと想定される。また、他の代謝物についても、いずれも類似物質であることから同様に健康影響の懸念は低いと想定される。

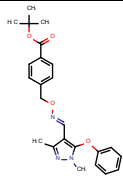
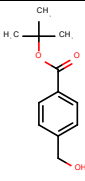
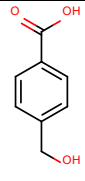
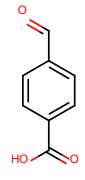
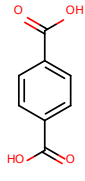
表3-1-2 クラス1もしくは2に分類されたfenpicoxamid代謝物

parent	parent structure	metabolite structure	Cramer rules, with extensions	CramerTreeResult
fenpicoxamid			Low (Class I)	1N,2N,3N,43N,5N,6N,42N,7N,16N,17N,19N,23Y,27Y,28N,30N,18N
			Intermediate (Class II)	1N,2N,3N,43N,5N,6N,42N,7N,16N,17N,19N,23Y,27Y,28N,30Y,31N,32Y
			Intermediate (Class II)	1N,2N,3N,43N,5N,6N,42N,7N,16N,17N,19N,23Y,27Y,28N,30Y,31N,32Y
			Intermediate (Class II)	1N,2N,3N,43N,5N,6N,42N,7N,16N,17N,19N,23Y,27Y,28N,30Y(31N,32Y)(31N,32Y)
			Low (Class I)	1N,2N,3N,43N,5N,6N,42N,7N,16N,17N,19N,23Y,27Y,28N,30N,18N
			Low (Class I)	1N,2N,3N,43N,5N,6N,42N,7N,16N,17N,19N,23Y,27Y,28N,30N,18N

fenpyroximateについては、4代謝物がクラス1に分類された（表3-1-3）。いずれも類似物質であり、うち1物質のテレフタル酸については、90日間混餌投与で125 mg/kg bw/dayとの報告がある。他の3物質について情報は得られなかったが、いずれも類似物質であり、毒性強度については同程度である

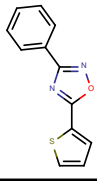
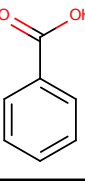
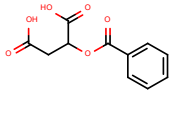
と想定される。

表3-1-3 クラス1に分類されたfenpyroximate代謝物

parent	parent structure	metabolite structure	Cramer rules, with extensions	CramerTreeResult
fenpyroximate			Low (Class I)	1N,2N,3N,43N,5N,6N,42N,7N,16N,17N,19N,23Y,27Y,28N,30N,18N
			Low (Class I)	1N,2N,3N,43N,5N,6N,42N,7N,16N,17N,19N,23Y,27Y,28N,30N,18N
			Low (Class I)	1N,2N,3N,43N,5N,6N,42N,7N,16N,17N,19N,23Y,27Y,28N,30N,18N
			Low (Class I)	1N,2N,3N,43N,5N,6N,42N,7N,16N,17N,19N,23Y,27Y,28N,30N,18N

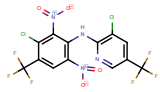
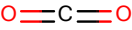
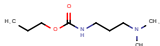
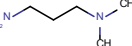
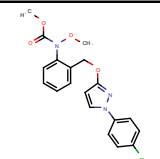
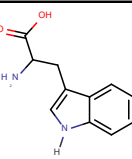
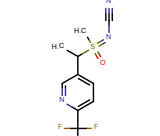
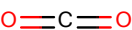
tioxazafenでは2つの代謝物がクラス1に分類され、うち1物質は安息香酸であった（表3-1-4）。もう1物質についての情報は得られなかったが、安息香酸にリンゴ酸が結合した構造であり健康影響の懸念は低いと考えられる。

表3-1-4 クラス1に分類されたtioxazafen代謝物

parent	parent structure	metabolite structure	Cramer rules, with extensions	CramerTreeResult
tioxazafen			Low (Class I)	1N,2N,3N,43N,5N,6N,42N,7N,16N,17N,19N,23Y,27Y,28N,30N,18N
			Low (Class I)	1N,2N,3N,43N,5N,6N,42N,7N,16N,17N,19N,23Y,27Y,28N,30N,18N

fluazinam、sulfoxaflor、pyraclostrobin、propamocarbの4剤については、それぞれ1つの代謝物のみがクラス1に分類された（表3-1-5）。それぞれクラス1に分類された代謝物は、fluazinam、sulfoxaflorでは2酸化炭素、pyraclostrobinではトリプトファンであり、残留による健康影響の懸念がないことは明らかである。一方、propamocarb代謝物のうちクラス1に分類された物質は、N,N-Dimethyl-1,3-propanediamine（RN: 109-55-7）であり、QSAR Toolboxでの検索結果から、28日間反復投与試験において、NOAEL=50mg/kg/dayが得られており、クラス1の TTC値を適用しても十分に安全は担保できると考えられた。

表3-1-5 クラス1に分類されたfluazinam、sulfoxaflor、pyraclostrobin、propamocarb代謝物

parent	parent structure	metabolite structure	Cramer rules, with extensions	CramerTreeResult
fluazinam			Low (Class I)	1Y
propamocarb			Low (Class I)	1N,2N,3N,43N,5N,6N,42N,7N,16N,17N,19Y,20Y,21N,44N,18N
pyraclostrobin			Low (Class I)	1Y
sulfoxaflor			Low (Class I)	1Y

上記に示したクラス1もしくは2に分類された代謝物は、それぞれの剤で認められた代謝物のごく一部であり、ほとんどの代謝物はクラス3に分類された。特に親物質の構造に近い代謝物でクラス3以外に分類された代謝物はないことからリスク評価対象物質とされた代謝物で毒性試験情報が得られていない代謝物については、デフォルトでクラス3のTTC値を適用しても問題はないとも考えられる。一方、リスク評価対象物質が本解析で示したような代謝が進んで低分子化した代謝物では、クラス3のTTC値は過度に厳しい規制に繋がる可能性がある。そうした物質ではcramer分類の実施や類似物質の毒性データベースの探索を行うことで、より信頼性の高い評価が行える可能性がある。

一方、今回の解析では有機リン系およびカルバメート系の剤は含まれていない。これらのコリンエステラーゼ阻害活性を有する化合物については、cramerクラス3のTTC値では、不十分であることが示されておりEFSAのガイダンスにおいても、コリンエステラーゼ阻害活性を有する化合物に対して神経毒性のTTC値0.3 μg/kg/dayが適用されている。神経毒性を作用機序とする剤として今回の解析対象の剤のうちではSulfoxaflorは、ニコチン性アセチルコリン受容体に作用する殺虫剤であるが、食品安

全委員会を設定されたADIは0.042mg/kg/dayであり、cramerクラス3のTTC値1.5 μ g/kg/dayの28倍であり、その代謝物にクラス3のTTC値を適用したとしても十分に安全を担保できると考えられる。

本研究では、個々の代謝物がリスク評価対象物質であるかどうかによらず植物代謝試験等で認められた全ての代謝物を対象としてcramer分類による評価を実施した。化学構造がSMILES等の形式で整理されていれば分類そのものは短時間で実施可能である。上述のとおり代謝が進んで低分子化した一部の代謝物では、cramer分類により毒性の懸念が無いことを示唆するエビデンスとして有用であるケースも想定されることから、実際の評価においては、ばく露の観点からリスク評価対象物質とされた物質については、cramer分類の実施は評価の方針の検討において有用であると考察された。

3-2 農薬代謝物の*in silico*変異原性評価の検討

1. はじめに

本検討では、海外評価事例の調査においてEFSAもしくはJMPRでの評価において遺伝毒性もしくは一般毒性評価への*in silico*評価の適用が確認された剤を対象として、Ames 変異原性について*in silico*評価の検討を行った。本研究で小野（岡山大学）により海外評価書等から入手出来た代謝物構造情報（SMILESと構造式の画像）を整理したリストの提供を受け、SMILES表記で整理した代謝物構造についてQSAR解析を行うための精査を行い、予測手法の異なる2種のAmes予測QSARソフトウェアを用いた農薬代謝物のAmes変異原性の評価を実施した。代謝物構造の情報は、2回に分けて提供されたため、評価はそれぞれ別々実施した。

2. 評価1回目：方法

- a. 最初に提供を受けた24剤の代謝物構造情報（SMILESと構造式の画像）に対し、QSARソフトウェアでの解析に必要な加筆・修正を行い、農薬ごとに代謝物のSMILESリストをテキスト形式で作成した。
- b. 化学構造ファイルフォーマット変換ソフトウェアOpenBabel http://openbabel.org/wiki/Main_Pageで農薬ごとにその代謝物の構造SDFファイルをaで加筆修正したSMILESリストを基に作成した。ファイル名には英語の農薬名称（表3-2-1）を付け、以後の予測・結果の解析では農薬の英語名を基に整理を行った。
- c. SDFファイルの構造に対し、QSARソフトウェア（表3-2-2）でAmes予測を実施した。
- d. 予測結果の概要を整理し、陽性予測結果の割合、構造重複の有無を確認した。実際のAmes試験で結果を検証する候補物質の選定材料を収集に結び付けるとともに、QSARによる代謝物予測における課題を整理した。なお、Derek Nexusで陽性と定義したのは表3-2-3の通りであった。

表3-2-1 代謝物の構造リストの提供を受けた農薬名称

日本語	英語名称	提供を受けた構造図（構造式）のセル数
アベルメクチン	avermectin	19
イソフェタミド	isofetamid	18
オキサチアピプロリン	oxathiapiprolin	64
クレソキシムメチル	kresoxim-methyl	37
シアゾファミド	cyazofamid	17
シアントラニリプロール	cyantraniliprole	20
ジクワット	diquat	16
シプロジニル	cyprodinil	37
スルホキサフロル	sulfoxaflo	11
チオキサザフェン	tioxazafen	40
ピジフルメトフェン	pydiflumetofen	29
ピラクロストロビン	pyraclostrobin	43
ピリオフェノン	pyriofenone	12
フェンピコキサミド	fenpicoxamid	25
フェンピロキシメート	fenpyroximate	23
フルアジナム	fluazinam	15
フルオピラム	fluopyram	44
フルキサピロキサド	fluxapyroxad	74
フルジオキシニル	fludioxonil	29
プロパモカルブ	propamocarb	10
プロピコナゾール	propiconazole	28
プロフェノホス	profenofos	13
ベンゾビンジフルピル	benzovindiflupyr	36
ルフェヌロン	lufenuron	9

表3-2-2 Ames予測QSARソフトウェア

ソフトウェア	バージョン・モデル	備考
CASE Ultra	1.8.0.1 GT1_BMUT OECD 471 Bacterial mutagenicity model (version1.7.0.3.13514.500)	Statistically based
Derek Nexus	6.0.1, Nexus 2.2.1	Expert-rule based

MultiCASE Inc., CASE Ultra: <http://www.multicase.com/case-ultra>

Lhasa Limited, Derek Nexus: <https://www.lhasalimited.org/products/derek-nexus.htm>

表3-2-3 Derek Nexus 2.2.1で陽性と判断した判定と陰性とした判定

ソフトウェア	陽性	陰性
Derek Nexus	Certain Probable Plausible Equivocal	Inactive

3. 評価1回目：結果

i. SMILESリストの精査

提供されたSMILESリストの修正点・留意点はいくつか存在する。SMILESへの立ち上げが不可能でSMILES情報がぬけていた物質として、図3-2-1に示すような置換基の位置に任意性がある物質が代表的である。また、1つの構造図セルに対し、複数のSMILES(.で連結された構造及び部分構造)が存在する表記もみられた。このような代謝物については、構造式の画像情報を参照してすべての考えられる異性体構造を描画し、SMILESに変換する作業が必要であった。さらに、略称が明確に定義されていない物質（図3-2-1左）やSMILES中でカルボン酸がコバルト（Co）に誤変換されていた物質（図3-2-1右）の構造についてはPubChemなどでの部分構造の確認の実施および手作業によるSMILESの修正作業が必要になった。さらに、置換基の位置に任意性がある代謝物では、置換基の付き方により同じ構造を形成して重複を生じうる。手作業で重複を削除しても予測結果の整理時に重複が残る場合もあった。加えて、代謝物の記号が異なるが、構造・名称が同一の物質もリストアップされており、予測の重複につながった。このようなことから、表3-2-1でエクセルに記載された構造図の数と実際の予測物質数に乖離が生じた。

なお、代謝物リストには光学異性体の区別を含めて構造のリスト化がなされていた。Ames予測においては、区別が困難なため予測結果の重複につながった。光学異性体の予測の実施は現時点のAmes予測QSARソフトウェアでは不要だと考えられる。そして、提供を受けた代謝物構造情報には、塩やイオンなどの構造はないため、予測の前処理としての脱塩修正作業などは不要であった。

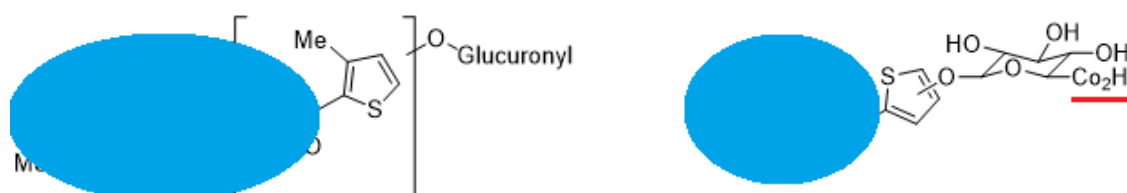


図3-2-1 置換基の位置に任意性がある代謝物の例

構造以外の留意点として、代謝物の記号のつけ方が農薬ごとに異なることが挙げられる。例えばアルファベット順に並べているものもあれば、代謝物の抱合体に対しては数値や‘をつけて記号化しているリストも存在した。代謝物の記号についても統一したルールがあるほうが望ましい。ひとつの記

号で代謝物の芳香族の置換基位置の違いも明確になることが理想である。

Ii. QSARソフトウェアによるAmes予測結果

表3-2-4にDerek NexusおよびCASE Ultraで農薬代謝物のAmes予測した結果の概要を示す。24農薬の代謝物（親化合物を含む）のうちいずれかのソフトウェアでAmes陽性予測を含む農薬が12物質（CASE Ultraで陽性か陰性かの判断がつかないinconclusiveの予測結果を含む）存在した。なお、両方のソフトウェアで陽性の予測結果を示したのは、diquatの代謝物一物質（Derek NexusでPROBABLE、CASE UltraでKnown Positive）だけであった。PROBABLEの物質の既存物質で陽性の試験結果が存在するレポートであった。しかしながら、対象とした農薬のうち半数においてAmes陽性の懸念を呈する構造を有する結果が現れたことから、本来ならば試験を実施するのが理想的である。しかしながら、代謝物は安定に市販試薬として存在するものは少なくAmes試験の実施の項で述べるように実際に試験を行うことができた代謝物は1種類にすぎなかった（3-4「農薬代謝物評価のための変異原性（Ames試験）QSARモデル改良の検討（令和元年度結果と令和2年度実施方針）参照」）。

表3-2-4 各代謝物のAmes予測結果の概要*

Name	Derek Nexus		CASE Ultra		陽性を含む**
	Results	数	Results	数	
avermectin	陰性	16	陰性	16	
benzovindiflupyr	陰性	63	陰性	63	
cyantraniliprole	陰性	18	陰性	20	★
	陽性	2	陰性		
cyazofamid	陰性	16	陰性	4	★
	陽性	1	陽性	7	
cyprodinil	陰性	39	陰性	39	
diquat	陰性	14	陰性	10	★
	陽性	1	陽性	3	
fenpicoxamid	陰性	23	陰性	22	
fenpyroximate	陰性	20	陰性	18	★
	陽性	1			
fluazinam	陰性	6	陰性	14	★
	陽性	9			
fludioxonil	陰性	29	陰性	23	
fluopyram	陰性	117	陰性	116	★
			陽性	1	
fluxapyroxad	陰性	731	陰性	726	☆
isofetamid	陰性	32	陰性	32	
kresoxim-methyl	陰性	28	陰性	32	★
	陽性	5			
lufenuron	陰性	8	陰性	8	★
	陽性	1	陽性	1	
oxathiapiprolin	陰性	42	陰性	42	
profenofos	陰性	12	陰性	11	★
	陽性	1			
propamocarb	陰性	10	陰性	10	
propiconazole	陰性	38	陰性	38	
pydiflumetofen	陰性	26	陰性	26	
pyraclostrobin	陰性	132	陰性	148	★
	陽性	21	陽性	3	
pyriofenone	陰性	12	陰性	12	
sulfoxaflor	陰性	11	陰性	10	

*本予測結果は、後述する令和2年度Ames試験候補物質選定の判断に利用した。

**★：Derek NexusまたはCASE Ultraで陽性代謝物が存在。☆：CASE UltraでInconclusive（陽性か陰性の判定がつかない）代謝物が存在

4. 評価1回目：考察

農薬代謝物の遺伝毒性評価を行う場合、代謝物の合成や安定性の観点から、医薬品不純物の評価と同様にAmes予測QSARソフトウェアを用いた評価は有効であると考えられる。

適切にQSARによる予測・評価を行うためには、合成経路を基準にして代謝物リストファイルから、結合情報が明確で重複構造を含まない構造SMILESリストを作成することが予測入力ファイルを作成するうえで重要である。結合が不明確なため、二つの構造を、（ドット）で結ぶSMILESが存在する場合、QSARソフトウェアの予測でエラーを生じ、修正作業に時間を要し、正確な予測評価を行うことができないため、留意が必要である。

予測結果の評価については、今回の評価では簡便に陽性・陰性の予測結果のみを議論した。両方のソフトウェアで陽性になった物質は、既存データで陽性の報告があり、多数存在する代謝物に対し既存陽性データの存在を確認する道具としても、QSARソフトウェアによる予測実施は有効である。Derek Nexus、CASE Ultraいずれかのソフトウェアで陽性になった場合には、予測結果レポートやKnown Positiveの根拠論文を確認して、遺伝毒性の懸念につながるのかを専門家により判断することも重要である。なぜなら、その代謝物が安定に存在する保証はなく、多くの場合、代謝物自体の入手や合成が困難であると考えられることから実際のAmes試験の実施は容易ではなくコストと時間が膨大にかかる懸念がある。懸念がある代謝物の*in silico*による評価方法として、他の*in vivo*や*in vitro*の遺伝毒性エンドポイントに対するQSARモデルでの予測を参考情報として参照する選択肢としてありうる。その他、懸念がある代謝物に対しQSAR Toolbox <https://qsartoolbox.org/>などのDerek NexusやCASE Ultraとは別の手段を用いて類似物質によるRead-Acrossを用いたAmes評価を実施し、総合的に判断する選択肢もありうる。これらの懸念がある代謝物に対し、人体内での動態・分解性について*in silico*予測などで確認可能ならば確認し、ヒト健康への懸念も検討すべき項目として挙げられる。

5. 評価2回目：方法

a. 追加で提供を受けた16剤の代謝物構造情報（SMILESと構造式の画像）に対し、QSARソフトウェアでの解析に必要な加筆・修正を行い、農薬ごとに親化合物と代謝分解物のSMILESリストをテキスト形式で作成した。さらに、JChem for Excel version 21.4.0.834を用いてSMILESに対して構造SDFファイルを親化合物ごとに作成した。ファイル名には英語の農薬名を付け、以後の予測、結果の解析では英語名を用いて整理を行った。修正した物質数は表3-2-5の記載のとおりである。

b. SDFファイルからAmes変異原性予測QSARソフトウェア（表3-2-6）でAmes予測を実施した。CASE UltraやDerek Nexusでエラーが出ないSMILESに修正した。

d. 親物質ごとに予測結果の概要を整理し、陽性予測結果の割合を確認した。陽性・陰性の定義は表3-2-7の通りである。

表3-2-5 代謝物の構造リストの提供を受けた農薬名称

日本語	英語名称	提供を受けた構造式数（うち要修正） →構造修正後の物質数 →QSARに供した物質数*
エチプロール	Ethiprole	20（1）→20→ 20
エトキサゾール	Etoxazole	20（1）→21→ 21
キンクロラック	Quinclorac	13（9+追加1—削除1）→50→ 50
クロルフェナピル	Chlorfenapyr	15（1）→16→ 16
シフルトリン	Cyphenothrin	15（2）→17→ 17
ジメテナミド	Dimethenamid	89（20）→93→ 71
スピノサド	Spinosad	23（9）→27→ 26
ビフェナゼート	Bifenazate	27（4）→24→ 24
ピリプロキシフェン	Pyriproxyfen	14（0）→14→ 14
フルピラジフロネ	Flupyradifurone	38（10）→52→ 52
フルミオキサジン	Flumioxazin	22（0）→22→ 21
フロルピラウキシフェン ベンジル	Florpyrauxifen-benzyl	17（0）→17→ 17
マンジプロパミド	Mandipropamid	24（0）→24→ 24
マンデストロビン	Mandestrobin	23（0）→23→ 21
メパニピリム	Mepanipirim	37（0）→37→ 37

*二酸化炭素CO₂は除く。「QSARに供した物質」は、CASE UltraやDerek Nexusでエラーが出ないSMILES（構造式）に修正後の構造数。

表3-2-6 解析に用いたAmes変異原性予測QSARソフトウェア

ソフトウェア	バージョン・モデル
CASE Ultra	1.8.0.5 GT1_BMUT OECD 471 Bacterial mutagenicity model (version1.8.0.1.11 479.500)
Derek Nexus	v.6.1.0, Nexus 2.3.0

CASE Ultra: <http://www.multicase.com/case-ultra>

Derek Nexus: <https://www.lhasalimited.org/products/derek-nexus.htm>

（令和3年7月12日現在で最新のバージョン）

表3-2-7 予測結果の陽性・陰性の定義

ソフトウェア	陽性	陰性	その他
CASE Ultra	Known Positive Positive	Known Negative Negative	陽性か陰性の判定がつかない : Inconclusive 適用範囲外: Out of Domain
Derek Nexus	Certain Probable Plausible Equivocal	Inactive	Inactiveにおいてcontains misclassified featuresまたはcontains unclassified featuresを示すものは注を付ける

6. 評価2回目:結果および考察

表3-2-8に親化合物の予測結果をした。QuincloracおよびBifenazateで陽性の予測結果が見られた。キンクロラック農薬評価書[1]において、*Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) *Escherichia coli* (WP2uvrA 株) による復帰突然変異試験は陰性の記載であった。ヒト末梢血リンパ球による染色体異常試験でのみ代謝活性化系非存在下-S9 における強い細胞毒性のみられる濃度で陽性を示したが、「*in vivo* 小核試験を含むその他の試験結果は全て陰性であったことから、キンクロラックに生体において問題となる遺伝毒性はないものと考えられた」とあった。ビフェナゼート農薬評価書[2]において、*Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) *Escherichia coli* (WP2uvrA 株) による復帰突然変異試験は陰性の記載であった。そのほか遺伝毒性試験の結果は、「全て陰性であったことから、ビフェナゼートに遺伝毒性はないものと考えられた。」とあった。陽性予測であっても、試験により陰性の報告がなされていることが確認可能であった。Quincloracは芳香族環のキノリン骨格部分(図3-2-2aの赤丸)、そしてBifenazateは窒素同士を結ぶヒドラジン(図3-2-2bの赤丸)がAmes陽性に寄与する構造として経験的に知られているため、陽性予測に結びついたと考察できる。

表3-2-8 各代謝物のAmes予測結果の概要（親化合物）

日本語	英語名称	CASE Ultra 予測結果	Derek Nexus 予測結果
エチプロール	Ethiprole	陰性	陰性
エトキサゾール	Etoxazole	陰性	陰性
キンクロラック	Quinclorac	陽性	陰性
クロルフェナピル	Chlorfenapyr	陰性	陰性
シフルトリン	Cyphenothrin	陰性	陰性
ジメテナミド	Dimethenamid	陰性	陰性
スピノサド	Spinosad	陰性	陰性
ビフェナゼート	Bifenazate	陽性	陽性
ピリプロキシフェン	Pyriproxyfen	陰性	陰性
フルピラジフロネ	Flupyradifurone	陰性	陰性
フルミオキサジン	Flumioxazin	陰性	陰性
フロルピラウキシフェンベンジル	Florpyrauxifen-benzyl	陰性	陰性
マンジプロパミド	Mandipropamid	陰性	陰性
マンデストロビン	Mandestrobin	陰性	陰性
メパニピリム	Mepanipirim	陰性	陰性

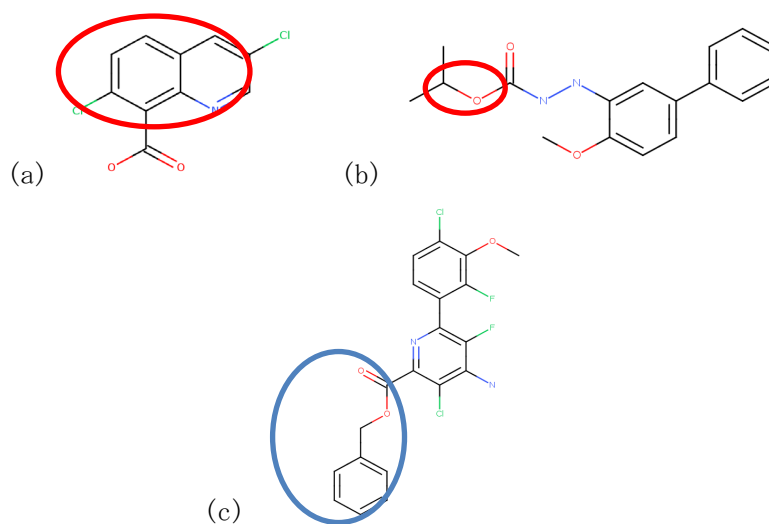


図3-2-2 Quinclorac(a), Bifenazate(b), Florpyrauxifen-benzyl(c)の構造式

表3-2-9には、提供された代謝分解物の予測結果の概要を示した。

親化合物がCASE Ultraの予測で陽性を示したQuincloracでは、48のうち44代謝分解物がCASE Ultra

とDerek Nexusのいずれか陽性又はCASE Ultraで Inconclusive であった。内訳は39代謝分解物がCASE Ultra陽性かつDerek Nexus陰性、5代謝分解物がCASE Ultra InconclusiveかつDerek Nexus陰性の予測結果であった。代謝分解物もキノリン骨格を有することがCASE Ultraで陽性予測の根拠となる部分構造となり、陽性予測をもたらした原因であると推察される。なお、Derek NexusとCASE Ultra両方で陽性になる代謝分解物は1物質だけ存在したが、代謝分解物の構造式が与えられていない独自で起した物質のため、構造情報の信頼性が十分ではない。Quincloracとは芳香族環のキノリン骨格部分が、Bifenazateでは窒素同士を結ぶヒドラジン（図3-2-2）がAmes陽性に寄与する構造として経験的に知られているため、陽性予測に結びついたと考察できる

親化合物がCASE UltraおよびDerek Nexusの予測で陽性を示したBifenazateでは、22のうち14代謝分解物がCASE Ultraで 陽性又はInconclusive であり、6代謝分解物でDerek Nexusで陰性であるがContains unclassified featuresを示し、陰性予測に疑念が残る結果であった。なお、Derek NexusとCASE Ultra両方で(Inconclusiveを含む)陽性になる代謝分解物も6物質存在した。Bifenazateにおいては、ヒドラジン部分がアミノ基に代謝されて芳香族アミンを形成することや、ふたつの窒素が二重結合を形成したアゾ化合物などを形成することが、CASE Ultraだけではなく、Derek Nexusにおいても陽性予測の根拠となる部分構造につながり、陽性予測をもたらした原因であると考察できる。

Quincloracの農薬評価書[1]では代謝分解物の遺伝毒性試験の記載はないが、Bifenazateの農薬評価書[2]では、代謝物（記号）BおよびDの復帰突然変異試験結果が掲載されている。代謝物BではTA98株の代謝活性化系存在下で陽性、代謝物Dは陰性である。代謝物BはCASE Ultra陽性・Derek Nexus陰性（Contains unclassified features；結果の疑念あり）、代謝物DはCASE Ultra Inconclusive・Derek Nexus陰性（No misclassified or unclassified features）である。代謝物Bが陽性の懸念が高い予測となり、試験結果と対応している。

芳香族アミンは、Florpyrauxifen-benzyl（図3-2-2c）の代謝分解物は、Derek Nexusではすべて陰性予測だが、CASE Ultraでは4物質が陽性、2物質がInconclusiveであった。陽性またはInconclusiveの代謝分解物は、アミノ基のオルト位置のクロロ基が水素に置換された骨格がギ酸ベンジルの部分構造（図3-2-2c青丸）が別の構造に置き換わった構造で、このことが活性を強める要因だと考察される。なお、フロルピラウキシフェンベンジル農薬評価書[3]には代謝分解物での遺伝毒性試験結果の記載はない。

その他の親化合物では農薬の代謝分解物のうち8割以上が、CASE UltraおよびDerek Nexusで陰性予測を示した。Etoxazole、SpinosadそしてPyriproxyfenではすべての代謝分解物が陰性予測であった。

表3-2-9 各代謝物のAmes予測結果の概要（代謝分解物）

英語名称	CASE Ultraは陽性かつDerek Nexus陽性	いずれか陽性又はCASE Ultraで Inconclusive	CASE Ultra陰性又はOut of DomainかつDerek Nexus陰性
Ethiprole	0	1	18 (2*)
Etoxazole	0	0	20 (3†)
Quinclorac	1	44	3
Chlorfenapyr	0	3	12
Cyphenothrin	0	2	14
Dimethenamid	0	2	69 (4*)
Spinosad	0	0	25
Bifenazate	6	8 (6*)	8
Pyriproxyfen	0	0	13
Flupyradifurone	0	1	50 (1*)
Flumioxazin	2	2	16 (2*)
Florpyrauxifen-benzyl	0	6	10
Mandipropamid	0	4	19
Mandestrobin	0	3	17
Mepanipyrim	2	2	32

*Derek Nexus : Contains unclassified features数

†Derek Nexus : Contains misclassified features数

7. 評価2回目：参考文献

- [1] 農薬評価書 キンクロラック（第2版）（2016年7月 食品安全委員会）
- [2] 農薬評価書 ビフェナゼート（第5版）（2018年9月 食品安全委員会）
- [3] 農薬評価書 フロルピラウキシフェンベンジル（2019年6月 食品安全委員会）

3-3 農薬代謝物評価に資する*in vitro*変異原性試験（Ames試験）の実施

1. Ames試験の実施について

QSARモデルのAmes変異原性の予測性の向上のためは、異なるQSARモデルで予測結果が異なる化学物質について、実際にAmes試験を行い、予測モデルのケミカルスペースを拡大することが重要である。そこで本研究課題ではAmes試験を実施した。

最初の段階において実施したAmes試験で得られた結果は表3-3-1の通りである。Hansenらの論文[1]におけるAmes試験結果とその試験の引用文献、QSARモデルDerek NexusおよびCASE Ultraでの予測結果も併記した。Ames試験を実施した物質は「Hansenらの論文で陰性だが、Derek NexusでPlausible（陽性）、かつCASE UltraでのProbabilityが60%以上で陽性の予測確率が高い2物質」と「Hansenらの論文で陽性だが、Derek NexusでINACTIVE（陰性）、かつCASE UltraでのProbabilityが20%以下（陰性の予測確率が高い）又はOut of Domain高い4物質」を選択した。また、Hansenの論文の引用元を調べても、Ames試験の詳細な情報は得られなかった物質であった。

表3-3-1 最初に実施したAmes試験実施結果と既知情報との比較

CAS RN	Name	Ames 試験 実施結果	Hansen et. al ^{*1}		Derek NX ^{*3} Results	CASE Ultra GT1_BMUT モデル ^{*3}	
			Ames 結果	Source ^{*2}		Results	Probability (%)
1758-73-2	Thiourea dioxide	陽性	陽性陰性 [†]	VITIC	INACTIVE	Out of Domain	22.9
563-41-7	Carbamyl hydrazine HCl (Semicarbazide Hydrochloride)	陰性	陰性	VITIC	PLAUSIBLE	Known Negative	69.1
79-01-6	Trichloroethylene (with and without epichlorohydrin)	陰性	陰性	VITIC	PLAUSIBLE	Known Negative	78.7
1703-58-8	1,2,3,4-Butanetetracarboxylic acid	陽性	陽性	EPA3	INACTIVE	Known Positive	13.9
150-60-7	Benzyl disulfide	陰性	陽性	EPA1	INACTIVE	Known Positive	12.8
80-13-7	Halazone	陽性	陽性	VITIC	INACTIVE	Known Positive	8.2

^{*1} Hansen, K et. al, J. Chem. Inf. Model. 49: 2077-2081, 2009.

^{*2} VITIC: Judson, PN, et.al, Toxicology 213:117-128, 2005 [Ames試験論文でない (database)]; EPA3: Feng, J, et.al, J. Chem. Inf. Comput. Sci. 43: 1463-1470, 2003[Ames試験論文でない (データセットや記述子の評価)]; EPA1: Kazius, J, et.al, J. Med. Chem. 48: 312-320, 2005 [Ames試験論文でない (4000以上のデータ解析)].

^{*3} Derek Nexus (Derek NX) 2.2.1 (Derek 6.0.1); PLAUSIBLEは陽性、INACTIVEは陰性と判断, CASE Ultra GT1_BMUT model v.1.7.0.x .; Out of Domain以外で既知情報(known Positive/Negative)がない場合、Probabilityが60%以上は陽性(Positive)、40%以下は陰性(Negative)、中間はInconclusiveと出力される。

[†] CAS RN 1758-73-2, Thiourea dioxideはHansenらの論文で陰性であり、以降誤記を訂正。

2. 物質選定と計画

以下の手順で農薬代謝物候補物質1物質を含む9物質を選定し、次の段階の試験実施を計画した。

手順 1

表3-2-1で概要を示した農薬代謝産物の構造リストによるAmes予測で表3-2-2のQSARソフトウェアのどちらかで陽性（Positive）の予測物質をAmes試験実施の候補とした。Ames試験実測結果（CASE UltraのKnown Positive/Negative以外の農薬評価書の親物質、安衛法などの法規制での登録における試験結果）と総合して、候補とするかの判断を行った。なお、農薬評価書に記載された代謝産物のAmes試験の報告結果は考慮していない。Ames試験済の代謝産物リストが整備されていれば、候補選定が効率になるだろうと考えた。

表3-3-2 試験候補物質の入手可否調査

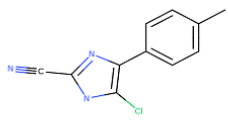
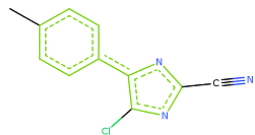
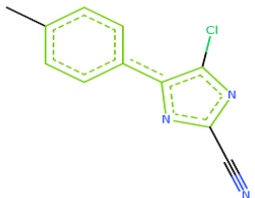
農薬名称	代謝産物 CAS RN	代謝産物名称 (PubchemまたはChemspider)	試薬の有無
cyazofamid	120118-14-1	4-Chloro-5-(<i>p</i> -tolyl)-1H-imidazole-2-carbonitrile	1社で取扱あり。 81,800円/1g
cyazofamid	1287189-45-0	4-Chloro-5-(4-methylphenyl)-1H-imidazole-2-carboxamide	取扱なし
cyazofamid	1287189-46-1	4-Chloro-5-(4-methylphenyl)-1H-imidazole-2-carboxylic acid	1社で取扱あり。 313,000円/1g
cyantraniliprole	NO_CAS	3-Bromo-1-(3-chloro-2-pyridinyl)-N-{4-cyano-2-[(hydroxymethyl) carbamoyl]-6-methylphenyl}-1H-pyrazole-5-carboxamide	取扱なし
cyazofamid	129399-82-2	代謝産物のメチル基が無い類似物 4-Phenyl-5-chloro-1H-imidazole	取扱なし
diquat	35022-72-1	Diquat Dipyridone	3社で取扱あり。2 36,250円～2,050,000円/500mg
diquat	1493798-25-6	3,4-Dihydro-2H-pyrido[1,2-a]pyrazine-1,6-dione	2社で取扱あり。1 60,000円～236,250円/1g。新規製造のため製造失敗の可能性有
fluazinam	NO_CAS	6-(4-Carboxy-3-chloro-2,6-dinitroanilino)-5-chloronicotinic acid	取扱なし

手順 2

Ames試験実施候補に対し、SMILES構造情報を用いて化学物質データベースPubchem <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>> またはChemspider <www.chemspider.com>で物質情報が確認できた8物質（うち

6物質はCAS番号判明、表3-3-2)を市販試薬がありうる物質の候補として抽出し、試薬入手の可否について調査を行った。なお、8物質のうち1物質については芳香環にメチル基の付加が無い代謝産物の類似物質であった。

表3-3-3 互変異性体のAmes予測結果*

構造図	Derek NX	CASE Ultra GT1_BMUT	
	Result	Result	Probability (%)
	INACTIVE	Out of Domain	22.9
	INACTIVE	Positive	60.2
	INACTIVE	Out of Domain	22.9

*Derek Nexus (Derek NX) 2.2.1 (Derek 6.0.1); INACTIVEは陰性と判断, CASE Ultra GT1_BMUT model v.1.7.0.x.; Out of z Domain以外で既知情報(known Positive/Negative)がない場合、Probabilityが60%以上は陽性(Positive)と出力される。

手順3

試薬が入手可能な4物質のうちAmes試験に必要な500mあたりの試薬の金額が20万円以下で、試薬製造失敗の恐れがあると事前通告が無かった、1物質「4-Chloro-5-(p-tolyl)-1H-imidazole-2-carbonitrile」について試験実施候補とした。なお、この1物質は農薬評価書[2]に当該代謝産物のAmes試験陰性結果が報告されていた。EFSAのドキュメント[3]にも同じ代謝産物(CCIM)のAmes Negativeの報告がなされていた。しかし、農薬評価書もEFSAのドキュメントも詳細なAmes試験の内容の記載がないため、試験実施対象に残すこととした。また、この物質は表3-3-3に示す通り、互変異性体の構造の相違により、CASE Ultraでの予測結果がPositiveからOut of Domain変化することから、QSAR予測評価における問題点も含めて、Ames試験の詳細な結果を得ることが重要となると考えた。

手順 4

手順 1～3 を通して、遺伝毒性の懸念のある代謝産物に対し、試薬が存在しうる（合成の困難性が低い）物質を抽出し、かつ妥当な金額で入手することが困難であることから、Ames試験を代謝産物に対し、実施することが難しいことが分かった。

ところで、医薬品不純物と同様に農薬代謝産物を合成し、Ames試験を実施するのはその存在量や安定性から課題が多い。このことから医薬品不純物や農薬代謝産物のQSARによる変異原性評価の改善に有用な情報が得られると期待される化学物質に対しAmes試験を実施することとした。

試験候補物質は、既存のHansenらの論文[1]でAmes予測のQSAR構築に用いられている結果が陽性であるが、Derek NexusでINACTIVE、CASE UltraでKnown Positiveだが、予測のProbability (%)が15%以下の擬陽性の懸念がある表3-3-4のCAS番号に該当する物質を対象とした。1試薬あたりの金額が20万円以下で購入できることも確認した。表3-3-5に示すように、原著論文でのAmes試験情報も十分ではなかった。陽性が懸念される物質に対する知見を充実させるうえでも試験結果の充当が必要であった。

試験途中での不測事態を懸念し、試験は2回以上に分けて実施を計画した。最初に、表3-3-6の6物質の試験を開始する手続きを進めた。表3-3-4の1行目は農薬代謝産物、2～6行目の物質はQSAR精度向上のための物質対象に相当した。更に試験進捗状況を総合的に判断し、表3-3-7の物質の試験実施を進めた。

表3-3-4 9物質のAmes QSAR予測結果*

CAS RN	Derek NX results	CASE Ultra GT1_BMUT Results	CASE Ultra GT1_BMUT Probability (%)
844-26-8	INACTIVE	Known Positive	14.9
70-00-8	INACTIVE	Known Positive	11.3
330-55-2	INACTIVE	Known Positive	13.9
31120-85-1	INACTIVE	Known Positive	12.2
7696-12-0	INACTIVE	Known Positive	14.0
276252-73-4	INACTIVE	Known Positive	15.0
55481-88-4	INACTIVE	Known Positive	8.1
1825-21-4	INACTIVE	Known Positive	6.6

*Derek Nexus (Derek NX) 2.2.1 (Derek 6.0.1); INACTIVEは陰性と判断, CASE Ultra GT1_BMUT model v.1.7.0.x.; Out of Domain以外で既知情報 (known Positive/Negative) がない場合には、Probabilityが60%以上は陽性 (Positive)、40%以下は陰性 (Negative)、中間はInconclusive。

表3-3-5 Ames試験候補物質のHansen et. al論文[3] での引用文献概要

CAS RN	原著論文の調査結果*
844-26-8	EPA1
70-00-8	EPA1
330-55-2	引用文献に当該物質が含まれていない。多環芳香族の Ames 試験の論文; Coombs MM, Dixon C, Kissonerghis AM, Evaluation of the Mutagenicity of Compounds of Known Carcinogenicity, Belonging to the Benz[a]anthracene, Chrysene, and Cyclopenta[a]phenanthrene Series, Using Ames's Test. <i>Cancer Research</i> 1976, 36(12), 4525.
31120-85-1	TA98 と TA100 with/without S9 mixture で 5 用量(最高用量は 1 mg/plate)で試験実施。TA98 で細胞毒性が出現。TA98 with/without S9 mixture で 2 倍以上(最高 2.8 倍)の mutation frequency があり、Positive。TA100 with/without S9 mixture は 2 倍以下である。予備試験・試験の回数の記載はなく、1 回の本試験結果のみと推察。準拠したガイダンスの記載ない。(和文論文); Onodera S, Maeda S and Saitoh T, Mutagenic and Mass Spectrometric characterization Of Oxygen Analogs (P=0) Derivatized From Organothiophosphorus pesticides, <i>Kankyo Kagaku</i> 5(3):617-624, 1995
7696-12-0	EPA1
276252-73-4	EPA1
55481-88-4	TA98 と TA100 with/without S9 mixture で 3 用量(最高用量は 0.3 mg/plate)で試験実施。細胞毒性は出していない。TA100 without S9 mixture で 5 倍以上の mutation frequency があり、Positive。TA98 および TA100 with S9 mixture は Negative。予備試験・試験の回数の記載はなく、1 回の本試験結果のみと推察。準拠したガイダンスの記載ない。(英文論文); Kawasaki Y, Goda Y and Yoshihira K, The Mutagenic Constituents Of <i>rubia Tinctorum</i> , <i>Chem. Pharm. Bull.</i> 40(6):1504-1509,1992.
1825-21-4	VITIC

* 全てAmes試験陰性の報告。EPA1: Kazius, J, et.al, *J. Med. Chem.* 48: 312-320, 2005[Ames試験論文はない(4000以上のデータ解析)]; VITIC: Judson, PN, et.al, *Toxicology* 213:117-128, 2005 [Ames試験論文でない(database)]。

表3-3-6 Ames試験実施物質 第1弾

CAS RN	被験物質名称
120118-14-1	4-Chloro-5-(<i>p</i> -tolyl)-1H-imidazole-2-carbonitrile
844-26-8	6,6'-SULFINYLBIS(2,4-DICHLOROPHENOL)またはBithionol sulfoxide
70-00-8	5-Trifluoromethylthymidineまたは α,α,α -Trifluoromethylthymidine
330-55-2	LINURON
31120-85-1	Isofenphos oxon
7696-12-0	Tetramethrin

表3-3-7 Ames試験実施の候補物質 第2弾

CAS RN	被験物質名称
276252-73-4	<i>trans</i> -2,6-Dimethylmorpholine
55481-88-4	Mollugin
1825-21-4	Pentachloroanisole

3. Ames試験の総括

QSARモデルのAmes変異原性の予測性の向上のためは、異なるQSARモデルで予測結果が異なる化学物質について、実際にAmes試験を行い、予測モデルのケミカルスペースを拡大することが重要である。また、既存のデータベースに収集されているAmes試験結果とQSAR予測結果が一致しない物質の実試験を行いQSARの精度検証と向上に資する情報を収集することが必要である。

本課題では2度に渡り15物質のAmes試験を実施した。Ames試験結果とQSAR予測結果の比較を表3-3-8にAmes試験結果の詳細を表3-3-9に示す。入手可能であった農薬cyazofamid代謝物の構造を有する物質はAmes試験陰性であった。これは、前節で記載した通り、互変異性体構造によってはCASE Ultraで陽性となりうるが、おおむねQSARの結果を支持している。他の14物質はQSARの精度向上のために実施したAmes試験であり、Hansen (Hansen K, et.al. J Chem Inf Model. 2009 ; 49(9) : 2077-81) の論文で陽性の報告がある11物質のうち6物質でAmes陰性、陰性の報告がある3物質のうち1物質でAmes陰性の結果が得られた。

Ames試験を実施することで、14物質のうち半数の7物質について、標準的な5菌株のAmes試験において判定結果が異なることを証明した。既存データベースに存在するAmes試験結果を修正・QSARの精度向上に資する情報が得られた。

表3-3-8 Ames試験結果とQSAR予測結果の比較

ID	名称	CAS 番号	Ames 試験 結果*	Ames 試験 溶媒	Hansen らの論文 の Ames 試験結果	CASE Ultra GT1_BMUT 1.8.0.1Results Probability (%) ^{*2}	Derek NX 6.1 (Nexus 2.3) Results	実施年度
1	Bithionol sulfoxide	844-26-8	陰性	DMSO	陽性	Known Positive 21.4	INACTIVE	令和2年度
2	α,α,α -Trifluoromethylthymidine	70-00-8	陽性	DMSO	陽性	Known Positive 45.8	INACTIVE	令和2年度
3	LINURON	330-55-2	陰性	DMSO	陽性	Known Positive 25.9	INACTIVE	令和2年度
4	Isofenphos oxon	31120-85-1	陰性	DMSO	陽性	Known Positive 11.2	INACTIVE	令和2年度
5	Tetramethrin	7696-12-0	陽性	DMSO	陽性	Known Positive 22.5	INACTIVE	令和2年度
6	<i>trans</i> -2,6-Dimethylmorpholine (Hansen は NoCAS)	276252-73-4	陰性	acetone	陽性	Known Positive 19.0	INACTIVE	令和2年度
7	Mollugin	55481-88-4	陽性	DMSO	陽性	Known Positive 20.9	INACTIVE	令和2年度
8	Pentachloroanisole	1825-21-4	陰性	DMSO	陽性	Known Positive 16.3	INACTIVE	令和2年度
9	4-Chloro-5-(<i>p</i> -tolyl)-1H-imidazole-2-carbonitrile	120118-14-1	陰性	DMSO	cyazofamid 代謝物 のため該当無	Negative 21.4	INACTIVE	令和2年度
10	Formamidinesulfinic Acid (Thiourea dioxide)	1758-73-2	陽性	acetone	陰性	Known Positive 28.0	INACTIVE	令和元年度
11	1,2,3,4-Butanetetracarboxylic acid	1703-58-8	陽性	water	陽性	Negative 14.3	INACTIVE	令和元年度
12	Dibenzyl disulfide (Benzyl di- sulfide)	150-60-7	陰性	DMSO	陽性	Known Positive 18.8	INACTIVE	令和元年度
13	Halazone	80-13-7	陽性	THF (プレート 法)	陽性	Known Positive 13.7	INACTIVE	令和元年度
14	Semicarbazide Hydrochloride (Carbamyl hydrazine HCl)	563-41-7	陰性	water	陰性	Positive 84.6	PLAUSIBLE	令和元年度
15	Trichloroethylene (with and without epichlorohydrin)	79-01-6	陰性	DMSO	陰性	Known Negative 79.3	PLAUSIBLE	令和元年度

*本課題で実施したAmes試験で得られた結果。

^{*2}表3-3-1、表3-3-4のQSARソフトウェアとバージョンがことなるため、結果が一致しないことがありうる。

表3-3-9 Ames試験結果の詳細

ID 名称 CAS 番号 試験結果(陽性・陰性)	Ames 試験結果詳細
ID: 1 Bithionol sulfoxide 844-26-8 陰性	本被験物質は、代謝活性化の有無に関わらずいずれの菌株に対しても復帰変異コロニー数を用量反応的に増加させず、陰性対照と比較して復帰変異コロニー数の2倍以上の増加も示さなかった。被験物質処理の用量あたりの復帰変異コロニー数は、全ての用量において、背景データから算出した陰性対照の変動範囲の上限を超えなかった。また、用量設定試験及び本試験において、試験結果に再現性も得られた。以上の結果より、本試験条件下において遺伝子突然変異誘発性を有さない(陰性)と判断する。
ID: 2 α,α,α -Trifluoromethylthymidine 70-00-8 陽性	本被験物質は、代謝活性化の有無に関わらず <i>Salmonella typhimurium</i> TA100、TA1535 及び <i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i> に対して復帰変異コロニー数を陰性対照の2倍以上に増加させ、用量反応性も認められた。陰性対照と比較して2倍以上の増加を示す用量における復帰変異コロニー数は、全て背景データから算出した陰性対照の変動範囲の上限を超えた。一方、 <i>S. typhimurium</i> TA98 及び TA1537 に対しては、復帰変異コロニー数を用量反応的に増加させず、陰性対照と比較して復帰変異コロニー数の2倍以上の増加も示さなかった。また、用量設定試験及び本試験において、試験結果に再現性も得られた。最大比活性値は、本試験における代謝活性化存在下の <i>S. typhimurium</i> TA100 において、267(625 $\mu\text{g}/\text{plate}$)を示した。以上の結果より、本試験条件下において遺伝子突然変異誘発性を有する(陽性)と判断する。
ID: 3 LINURON 330-55-2 陰性	本被験物質は、代謝活性化の有無に関わらずいずれの菌株に対しても復帰変異コロニー数を用量反応的に増加させず、陰性対照と比較して復帰変異コロニー数の2倍以上の増加も示さなかった。被験物質処理の用量あたりの復帰変異コロニー数は、全ての用量において、背景データから算出した陰性対照の変動範囲の上限を超えなかった。また、用量設定試験及び本試験において、試験結果に再現性も得られた。以上の結果より、本試験条件下において遺伝子突然変異誘発性を有さない(陰性)と判断する。
ID: 4 Isofenphos oxon 31120-85-1 陰性	本試験用量を設定するため、1.22～5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の被験物質処理用量で用量設定試験を実施した。その結果、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての菌株において、生育阻害の認められた最低用量を最高用量として39.1～1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の6用量で本試験を実施した。用量設定試験及び本試験において、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての菌株において、陰性対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。以上の試験結果より、本試験条件下において細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有さない(陰性)と判定した。
ID: 5 Tetramethrin 7696-12-0 陽性	本試験用量を設定するため、1.22～5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の被験物質処理用量で用量設定試験を実施した。その結果、代謝活性化した場合の <i>S. typhimurium</i> TA100 においては、陰性対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加が認められたため、増加の認められた5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ を最高用量とし、低用量での復帰変異コロニー数の増加が確認できるよう156～5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の6用量で本試験を実施した。代謝活性化しない場合のすべての菌株及び代謝活性化した場合の <i>S. typhimurium</i> TA100 以外の菌株においては、復帰変異コロニー数の増加が認められなかったため5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ を最高用量として313～5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の5用量で本試験を実施した。用量設定試験及び本試験において、代謝活性化した場合の <i>S. typhimurium</i> TA100 において、用量依存性を伴う陰性対照値の2倍以上となる増加が認められ再現性を示した。以上の試験結果より、本試験条件下において細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有する(陽性)と判定した。なお、最大比活性値は本試験の代謝活性化した場合の <i>S. typhimurium</i> TA100 での 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ における 2.66x10 (Rev/mg)であった。

ID: 6 trans-2,6-Dimethylmorpho- line (Hansen は NoCAS) 276252-73-4 陰性	本被験物質は、用量設定試験の代謝活性化存在下の <i>Salmonella typhimurium</i> TA100 において、復帰変異コロニー数が背景データから算出した陰性対照の変動範囲の上限を超えた。しかし、本試験において増加傾向は見られるものの、変動範囲の上限を超える増加は認められず、用量設定試験及び本試験のいずれにおいても、代謝活性化の有無に関わらず全ての菌株において、陰性対照と比較して復帰変異コロニー数の 2 倍以上の増加も認められなかった。このことからこの増加は、生物学的に意味のある被験物質による復帰突然変異の誘発に関連する復帰変異コロニー数の増加ではないと判断した。 以上の結果より、本試験条件下において遺伝子突然変異誘発性を有さない(陰性)と判断する。
ID: 7 Mollugin 55481-88-4 陽性	本被験物質は、代謝活性化非存在下の <i>Salmonella typhimurium</i> TA100、TA98 及び代謝活性化存在下の <i>S. typhimurium</i> TA100 に対して復帰変異コロニー数を陰性対照の 2 倍以上に増加させ、用量反応性も認められた。陰性対照と比較して 2 倍以上の増加を示す用量における復帰変異コロニー数は、全て背景データから算出した陰性対照の変動範囲の上限を超えた。一方、その他の菌株に対しては、復帰変異コロニー数を用量反応的に増加させず、陰性対照と比較して復帰変異コロニー数の 2 倍以上の増加も示さなかった。また、用量設定試験及び本試験において、試験結果に再現性も得られた。最大比活性値は、用量設定試験における代謝活性化存在下の <i>S. typhimurium</i> TA100 において、4469 (78.1 µg/plate)を示した。 以上の結果より、本試験条件下において遺伝子突然変異誘発性を有する(陽性)と判断する。
ID: 8 Pentachloroanisole 1825-21-4 陰性	本被験物質は、代謝活性化の有無に関わらずいずれの菌株に対しても復帰変異コロニー数を用量反応的に増加させず、陰性対照と比較して復帰変異コロニー数の 2 倍以上の増加も示さなかった。被験物質処理の用量あたりの復帰変異コロニー数は、全ての用量において、背景データから算出した陰性対照の変動範囲の上限を超えなかった。また、用量設定試験及び本試験において、試験結果に再現性も得られた。 以上の結果より、本試験条件下において遺伝子突然変異誘発性を有さない(陰性)と判断する。
ID: 9 4-Chloro-5-(p-tolyl)-1H-im- idazole-2-carbonitrile 120118-14-1 陰性	本試験用量を設定するため、1.22～5000 µg/plate の被験物質処理用量で用量設定試験を実施した。その結果、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての菌株において、生育阻害の認められた最低用量を最高用量として 39.1～1250 µg/plate の 6 用量で本試験を実施した。 3) 復帰変異コロニー数: 用量設定試験及び本試験において、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての菌株において、陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。 以上の試験結果より、本試験条件下において細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有さない(陰性)と判定した。
ID: 10 Formamidinesulfinic Acid (Thiourea dioxide) 1758-73-2 陽性	本被験物質は代謝活性化非存在下及び存在下の <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535、並びに代謝活性化存在下の <i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i> において、用量あたりの復帰変異コロニー数の平均値が背景データの陰性対照の変動範囲の上限を超え、かつ陰性対照の平均値の 2 倍以上に増加させた。また、その増加に用量反応性が認められ、用量設定試験及び本試験により、試験結果の再現性が確認された。最大比活性値は、用量設定試験における代謝活性化存在下の <i>S. typhimurium</i> TA1535 において、60.8 (1250 µg/plate)を示した。 以上の結果より、本試験条件下において遺伝子突然変異誘発性を有する(陽性)と判断する。

ID: 11 1,2,3,4-Butanetetracarboxylic acid 1703-58-8 陽性	本試験用量を設定するため、5000µg/plate を最高用量として以下公比 4 で 6 段階希釈した用量設定試験を実施した。 本試験の用量段階は、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての菌株において生育阻害が認められなかったため 5000µg/plate を最高用量として以下公比 2 で 4 段階希釈した 5 用量の被験物質処理用量で実施した。なお、代謝活性化しない場合の <i>S. typhimurium</i> TA100、TA98 及び TA1537 においては陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加が認められたため用量反応性が得られる用量段階も兼ねた。 用量設定試験及び本試験共に代謝活性化しない場合の <i>S. typhimurium</i> TA100、TA98 及び TA1537 において、陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加が認められ再現性を示した。また、陰性対照値と比較して、代謝活性化した場合の <i>S. typhimurium</i> TA100 においては約 1.5 倍、TA98 においては約 1.9 倍の復帰変異コロニー数の増加が認められた。代謝活性化の有無にかかわらず <i>S. typhimurium</i> TA1535、<i>E. coli</i> WP2<i>uvrA</i> 及び代謝活性化した場合の <i>S. typhimurium</i> TA1537 においては、陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。 以上の試験結果より、本試験条件下において、細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有する(陽性)と判断した。なお、最大比活性値は、本試験の代謝活性化しない場合の <i>S. typhimurium</i> TA100 の 5000 µg/plate における 2.80×10 (Rev/mg) であった。
ID: 12 Dibenzyl disulfide (Benzyl disulfide) 150-60-7 陰性	本試験用量を設定するため、5000 µg/plate を最高用量として以下公比 4 で 6 段階希釈した用量設定試験を実施した。 本試験の用量段階は、生育阻害が認められた最低用量を最高用量として、代謝活性化する場合の <i>S. typhimurium</i> TA1535 及び TA1537 においては 78.1 µg/plate を最高用量として以下公比 2 で 5 段階希釈した 6 用量、代謝活性化しない場合の <i>S. typhimurium</i> TA98、TA1535、TA1537 及び代謝活性化しない場合の <i>S. typhimurium</i> TA98、TA100 においては 313µg/plate を最高用量として以下公比 2 で 5 段階希釈した 6 用量の被験物質処理用量で実施した。代謝活性化しない場合の <i>S. typhimurium</i> TA 100 及び代謝活性化の有無にかかわらず <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i> においては生育阻害が認められなかったため 313、625、1250、2500、5000µg/plate の被験物質処理用量で実施した。なお、用量設定試験において、代謝活性化した場合の <i>S. typhimurium</i> TA1535 及び TA1537 においては生育阻害が認められない用量数が 4 用量以上得られなかったため、本試験と同一の用量で、追加試験を実施し再現性の確認を実施した。用量設定試験、本試験及び追加試験共に代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。 以上の試験結果より、本試験条件下において細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有さない(陰性)と判定した。

ID: 13 Halazone 80-13-7 陽性	本試験用量を設定するため、5000µg/plate を最高用量とした用量設定試験を実施した。その結果、代謝活性化しない場合においては生育阻害が認められた最低用量を最高用量として、すべての菌株において 78.1µg/plate を最高用量として以下公比 2 で 5 段階希釈した 6 用量での本試験を設定した。 代謝活性化した場合のすべての菌株において 1250µg/plate においては生育阻害により菌の生育がなかったのに対して 5000µg/plate では生育阻害は認められず、<i>S. typhimurium</i> TA100、TA1535 においては陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加が認められ、その他の菌株でも背景データの範囲内の通常程度のコロニー数を示した。代謝活性化した場合の 1250µg/plate で起きた現象が試験操作での何らかの人為的ミスの可能性が考えられたため、同一用量で用量設定試験 2 回目を実施した。その結果、代謝活性化した場合のすべての菌株において 1250µg/plate 以上の用量で生育阻害により菌の生育は認められなかった。そのため 2 回の用量設定試験の結果を考慮して、最高用量は 5000µg/plate として以下公比 2 で 9 段階希釈した 10 用量での試験を設定した。 本試験の結果、代謝活性化した場合の <i>S. typhimurium</i> TA100、TA1535 において、陰性対照値の 2 倍以上となる用量依存的な復帰変異コロニー数の増加を示した。そのため、代謝活性化した場合のみ本試験と同一の用量で確認試験を実施した。その結果、いずれの菌株においても 625µg/plate 以上の用量で生育阻害が認められ、用量設定試験 2 回目の結果と近似するものであった。本試験で認められた結果は用量設定試験 1 回目に近似した結果であることから、本被験物質は、暴露条件により復帰変異コロニー数の増加が起きることが示唆された。そのため、S9Mix 添加後の菌に暴露させるタイミングについて、<i>S. typhimurium</i> TA100 の 5000µg/plate のみ、いくつかの条件を検討した(数値省略)。その結果、被験液に S9Mix を入れた後すぐに菌を暴露させると生育阻害により菌の生育が認められず、また被験液に S9Mix を入れ、1 分後に菌を暴露しても生育阻害により菌の生育が認められないことが分かった。一方で S9Mix 添加後 10 秒程度置いた場合については、生育阻害が認められず、復帰変異コロニー数の増加が認められた。そこで、被験液に S9Mix を入れ約 10 秒後に菌を入れよく攪持した後プレートに重層することとし、用量段階は、本試験と同一の用量による確認試験 2 回目で実施した。 本試験及び確認試験 2 回目において、代謝活性化した場合の <i>S. typhimurium</i> TA100、TA1535 において陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加が認められ、再現性を示した。 以上の試験結果より、本試験条件下において Halazone は、細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有する(陽性)と判定した。なお、最大比活性は、本試験の代謝活性化した場合 <i>S. typhimurium</i> TA100 の 5000µg/plate における 6.54x10 (Rev/mg)であった。 本被験物質は、代謝活性化しない場合及び S9Mix 添加後すぐに暴露させた場合においては強く生育阻害がでていること、また、S9Mix 添加後 1 分置いた後場合においても強く生育阻害がでていることから、代謝される前及び代謝が進んだものについては、菌に対して致死的な影響を与えと考えられる。一方で代謝の過程における中間物質には、菌に対して変異の誘発を示す物質が有ることが示唆される。そのため、代謝前の物質、代謝後の物質の割合が少なく、変異を誘発する中間物質の割合が多い場合のみ、陽性を示すと考えられる。
ID: 14 Semicarbazide Hydrochloride (Carbamyl hydrazine HCl) 563-41-7 陰性	本被験物質は、代謝活性化の有無に関わらずいずれの菌株に対しても復帰変異コロニー数を用量反応的に増加させず、陰性対照と比較して復帰変異コロニー数の 2 倍以上の増加も示さなかった。被験物質処理の用量あたりの復帰変異コロニー数は、用量設定試験の代謝活性化非存在下の <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535 に対して 5000 µg/plate の用量で背景データから算出した陰性対照の変動範囲の上限を超えた。しかし、その増加に用量反応性は認められず、また本試験においても、復帰変異コロニー数の用量反応的な増加及び背景データの変動範囲を超える増加は認められなかった。したがって、用量設定試験において観察された復帰変異コロニー数の増加は、本被験物質の変異の誘発によるものではなく、偶発的な要因により生じたものであると判断した。その他の菌株では、代謝活性化の有無に関わらず復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、用量設定試験及び本試験において、試験結果に再現性も得られた。以上の結果より、本試験条件下において遺伝子突然変異誘発性を有さない(陰性)と判断する。

ID: 15 Trichloroethylene (with and without epichlorohydrin) 79-01-6 陰性	本被験物質は、代謝活性化の有無に関わらずいずれの菌株に対しても復帰変異コロニー数を用量反応的に増加させず、陰性対照と比較して復帰変異コロニー数の2倍以上の増加も示さなかった。被験物質処理の用量あたりの復帰変異コロニー数は、全ての用量において、背景データから算出した陰性対照の変動範囲の上限を超えなかった。また、用量設定試験及び本試験において、試験結果に再現性も得られた。以上の結果より、本試験条件下において遺伝子突然変異誘発性を有さない(陰性)と判断する。
---	--

4. 参考文献

- [1] Hansen, K.; Mika, S.; Schroeter, T.; Sutter, A.; ter Laak, A.; Steger-Hartmann, T.; Heinrich, N.; Müller, K.-R., Benchmark Data Set for in Silico Prediction of Ames Mutagenicity. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49* (9), 2077-2081.
- [2] 食品安全委員会農薬専門委員会 農薬評価書 シアゾファミド (第10版) ; **2017**. 評価書/別紙1 (p.47) 代謝産物B 略称CCIM が4-chloro-5-p-tolylimidazole-2-carbonitrile 【4-Chloro-5-(p-tolyl)-1H-imidazole-2-carbonitrile】.
- [3] Authority, E. F. S., Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance cyazofamid. *EFSA J.* **2016**, *14* (6), e04503.

2 研究項目：我が国における農薬代謝物の評価スキームの作成と提案

（１）個別課題：我が国における農薬代謝物の評価スキームの作成と提案（研究担当者：小野 敦（所属機関名：岡山大学）、古濱 彩子（国立医薬品食品衛生研究所）、清家 伸康（農業・食品産業技術総合研究機構））

本研究項目では、研究項目（１）における検討で得られた結果をもとに、国際的な動向に立脚した食品安全委員会における新たな農薬代謝物（分解物）の評価指針案として提案することを目的としている。評価指針案の作成にあたり、まず始めにリスク評価を行うべき農薬の選択基準や選択された農薬代謝物安全性評価について、研究項目（１）の個別課題１で議論を進めているOECDガイダンスおよび個別課題２で情報収集したFESAやJMPRの評価スキームの情報や個別課題３における検討結果をもとに、我が国における評価に適用可能なスキームの構築に向けた検討を行った。OECD RDWGで議論されている改訂ガイダンス（案）については、本研究期間中には完成に至らず初期ドラフトの段階であったが、RDWGメンバー関係者に公開された内部レビュー段階のバージョンをもとに、食品安全委員会の農薬代謝物の安全性評価手法との相違点や課題について検討を行い、それらの検討結果をもとに、本研究班で提案する評価指針案（添付資料）を作成した。

OECDガイダンス案における残留評価スキームの概要と食品安全委員会の評価手法との比較検討

研究項目（１）においては、食品安全委員会¹⁾、European Food Safety Authority (EFSA) のガイダンス²⁾、FAOマニュアル（各種代謝試験）³⁾とFAO/WHO Joint Meeting on Pesticide Residues (JMPR)のガイダンス（毒性評価）⁴⁾を入手し、農薬代謝物の安全性評価手法について調査してきた。本研究項目では、研究期間中に入手できた内部レビュー段階のOECDガイダンス改訂案〔以下、OECD改訂ガイダンス（案）〕をもとに、その概要を整理するとともに、食品安全委員会の農薬代謝物の安全性評価手法との比較を行い、その相違点およびOECD改訂ガイダンス案をそのまま我が国への導入した場合に生じうる問題点について検討を行った。

1. OECDガイダンス案における農薬代謝物評価スキームの概要

OECD改訂ガイダンス（案）で提案されている、農薬代謝物評価の流れを図１に示す。農薬代謝物評価は、代謝物の同定（ステップ1）、残留レベルの評価（ステップ2）、毒性評価（ステップ3）、そしてResidue Definition（ばく露評価対象物質の決定、ステップ4）の計4つのステップで構成される。これは、現在の食品安全委員会における農薬の食品健康影響評価におけるばく露評価対象物質に関する考え方¹⁾と大きな違いは無い。

ステップ１では、代謝試験結果から、化学名を割り当てることができる化合物（未同定化合物を除く）を対象に、より高い割合でかつより高い濃度で生成する代謝物（主要残留物）、低い割合であるがより高い濃度で生成する（少量残留物）、またはより低い割合とより低い濃度で発生する（微量残留物）に分類する。

ステップ２では、残留（例えば、作物残留試験、畜産物残留試験など）について評価する。このス

テップは、代謝物のばく露量の予測をするためにも重要である。

ステップ 3 では、親化合物と代謝物の毒物学的評価に焦点を当てる。これには、リスク評価のための潜在的な代謝物のグループ化と、そのグループに対する健康基準値（HBGV、ADIと同義）の割り当てが含まれる。また、毒性学的懸念のしきい値（TTC）による評価の可能性が含まれ、どの化合物がリスクをもたらす可能性があるかを判断し、追加の毒性データを特定するのに役立つ。

ステップ 4 では、ステップ 1 から 3 までのすべての考慮事項がまとめられ、リスク評価のためのResidue Definition（ばく露評価対象物質の決定）を行う。

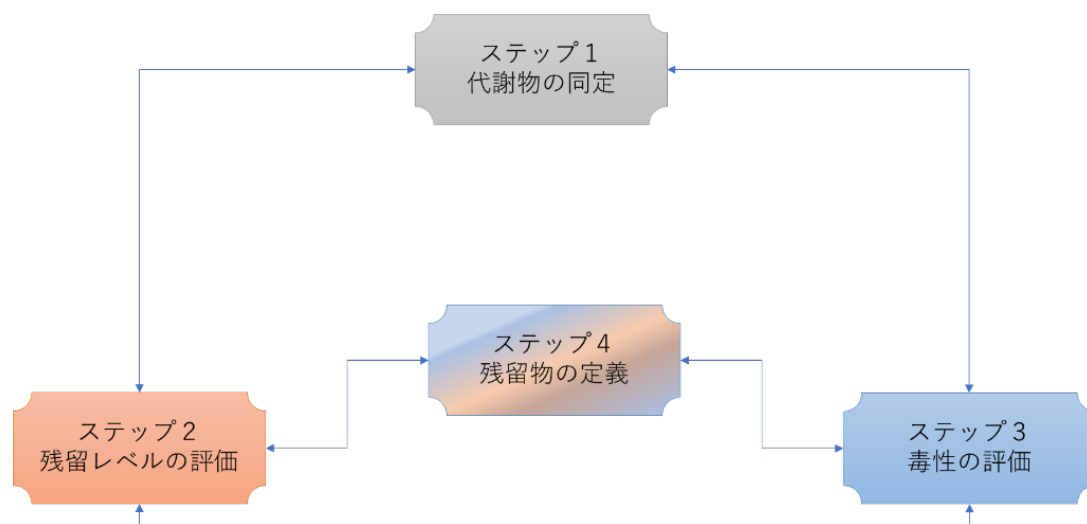


図 1. リスク評価のための残留物定義スキームの概要

以下、評価ステップ毎に説明していく。

1-1. ステップ1 代謝物の特定

代謝物の特徴づけ

代謝物の評価を行うため、各種代謝試験（植物代謝試験、後作物代謝試験、家畜代謝試験、および調理加工試験）を用いる。これらの試験を行う際の代謝物の特徴づけと同定のための放射能閾値（表 1）は、OECD テストガイドライン501等（各種代謝試験）に従う。

表 1 残留放射能（TRR%）と濃度に応じた代謝物の特徴づけと同定

TRR(%)	濃度 (mg/kg)	要求される行動
< 10	< 0.01	毒性学的懸念がない場合は何もしない
< 10	0.01 – 0.05	特徴付けが必要。化学構造が単純な場合にのみ同定を試みる必要あり。たとえば、参照化合物が利用可能であるか、以前の研究から身元がわかっている場合にのみ行ってください。
< 10	> 0.05	特徴付け/同定は、ケースバイケースで決定する。
> 10	< 0.01	特徴付けが必要。化学構造が単純な場合にのみ同定を試みる必要あり。たとえば、参照化合物が利用可能であるか、以前の研究から身元がわかっている場合にのみ行ってください。
> 10	0.01 – 0.05	特徴付けが必要。代謝経路を確立する必要がある場合は、同定を行う必要がる。
> 10	> 0.05	特徴付けが必要。あらゆる手段で同定する

代謝物の分類1

各種代謝試験（植物代謝試験、後作物代謝試験、家畜代謝試験、および調理加工試験）を含む、その時点で利用可能なすべての代謝試験結果に基づいて、全ての同定された代謝物を取りまとめる。その際、カテゴリーⅠからⅢに分類する。

カテゴリーⅠは、植物由来のヒト向けの食品であり、人間の食物と見なされる生および加工された農産物が含まれる（穀物などの飼料として人間と動物の両方が消費する品目も含まれる）。

カテゴリーⅡは 動物飼料であり、人間の食品とは見なされないものである。これには、加工前および加工済みの農産物が含まれる（例：麦わら、ピーナッツ干し草、小麦製粉副産物）。

カテゴリーⅢは動物由来の人間用食品、すなわち畜産物を指す。具体的には、家畜の脂肪、肉/筋肉、肉副産物/内臓、牛乳、および卵が対象となる。

代謝物の分類2

ステップ 2での残留量評価とステップ3での毒性評価に向け、主要残留物、少量残留物および微量残留物に分類する。その決定スキームを、図2に示す。以下、ステップごとに詳述する。

ステップ1A - 植物代謝試験、後作物代謝試験、家畜代謝試験、および調理加工試験の結果から、同定された代謝物をリストアップする。

ステップ1Bと1C- カテゴリー I から III に分類する。

ステップ1D - 総放射性残留物 (TRR) が 10%以上か否かを判断する。

ステップ1E- 総放射性残留物より計算される濃度が0.01 mg/kg 以上か否かを判断し、TRRが10%以上でかつ濃度が0.01 mg/kg 以上の場合は主要残留物と判断される。なお、放射性物質でラベルした親化合物の散布量が実際の散布量よりも多い場合や少ない場合があるため、ここでは、実際の散布量に換算して濃度を算出するほうが好ましい。

ステップ1F - TRR が10%より小さくても、総放射性残留物より計算される残留濃度が0.05 mg/kg 以上（代謝試験での散布量をcGAPの散布量に補正する）の場合は、少量残留物として判断される。

ステップ1G - 残留濃度が0.05 mg/kgより低くても、親化合物がカーバメート系農薬や有機リン系農薬の場合はそもそも毒性が強く、代謝物に変換されても毒性が強い場合がある。例えば、有機リン系農薬のアセフェートから殺虫活性のあるメタミドホスが代謝物として生成される。また、有機リン系農薬の代謝物の一つにP=S基（チオノ基）が毒性の強いP=O基に変換したオキシソン体が生成する場合がある。そこで、親化合物のラット28日間毒性試験における NOAEL が 1 mg/kg 体重/日以下、または LOAEL が 3 mg/kg 体重/日以下である場合、親物質は毒性が高いと見なす。入手できない場合、ガイドラインのラット90日間毒性試験の NOAEL が 1 mg/kg 体重/日以下または LOAEL が 3 mg/kg 体重/日以下である場合、親化合物の毒性が強いとみなす。

ステップ1H - 毒性が強い親化合物の場合でかつ総放射性残留物より計算される残留濃度が0.01 mg/kg 以上の場合は少量残留物として判断され、0.01 mg/kg より低ければ微量残留物として判断される。

ステップ1I - 総放射性残留物 (TRR) が 10%以上か否かを判断する。

ステップ1J - 総放射性残留物より計算される濃度が0.05 mg/kg 以上か否かを判断し、TRRが10%以上でかつ濃度が0.05 mg/kg 以上の場合は主要残留物と判断され、濃度が0.05 mg/kgより低い場合は微量残留物と判断される。

上記の流れで主要残留物や少量残留物、あるいは微量残留物に分類し、次いで変異原性を最小限のQSARやリードアクロス（RA）により評価する。評価方法についてはStep3に記載している。

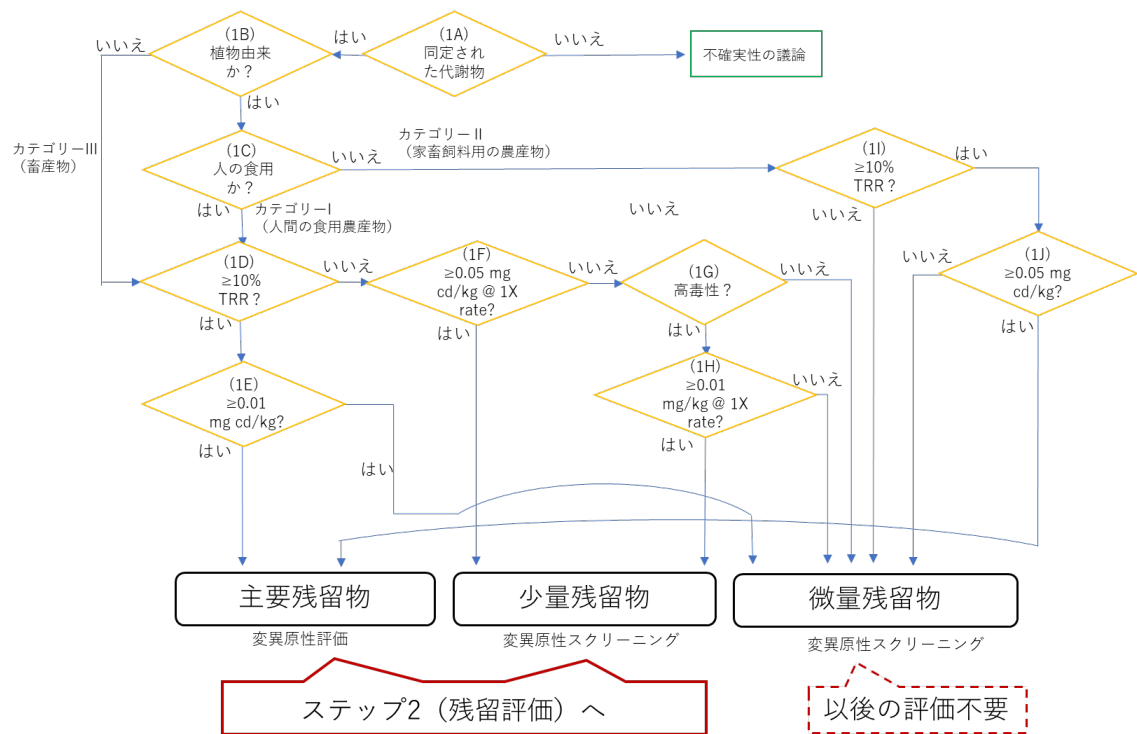


図 2. ステップ1における評価スキーム

1-2. ステップ2 代謝物の残留レベル評価

ステップ 1 で特定された代謝物は、各種残留試験（ほ場で行った作物残留試験や後作物残留試験、あるいは畜産物残留試験等）の結果から残留レベルを検討する（図3）。これらの試験結果で検出されず（または非常に低いレベルで検出され）、親化合物および親化合物を介してのばく露を適切に説明できる場合は、ステップ4のResidue Definitionに含まれる可能性が低くなる。以下、段階ごとに詳述する。

ステップ2A/2B - 主な検討対象は、GAP に基づいた作物残留試験、後作物残留試験、畜産物残留試験等の試験結果である。特に畜産物残留試験の場合は、化合物の予想される負荷量を反映するばく露レベルで給餌試験を行う必要がある。すなわち、ばく露レベルを導き出すには、作物残留試験、後作物残留試験結果を参考にする必要がある。

ステップ2D/2F - 代謝物を用いて作物残留試験、後作物残留試験、畜産物残留試験等を行った場合は、より直接的に残留レベルを評価できる。

ステップ2C/2E - 対象の残留物が 各種残留試験で分析対象となっていない場合、各種代謝試験の結果を利用して、代謝物の残留量を推定することができる。すなわち、各種代謝試験や各種残留試験の代謝物と親化合物の比から代謝物の残留量を推定する。

ステップ2G - 2Dまたは2Eを使用して、飼料中の残留物の残留レベルから、給餌経路での残留物の負荷量を推定する。飼料は様々な原料から構成され、飼料の種類ごとに給餌量がことなるため、結果的に複数の種類の飼料に残留する残留物ごとに、給餌経路での代謝物の負荷量を計算することになる。

ステップ2H - 畜産物（肉、脂肪、内臓、牛乳、卵）の残留レベルを、畜産物残留試験結果および2Gで得られた結果を組み合わせで計算する。

ステップ2I - 農産物および畜産物における残留物の残留レベル推定値は、(1)各種代謝試験結果との比較、(2)毒性評価（ステップ 3）、および (3)ステップ 4でのリスク評価のために懸念される残留物の最終決定を行うための推定ばく露量に使用される。

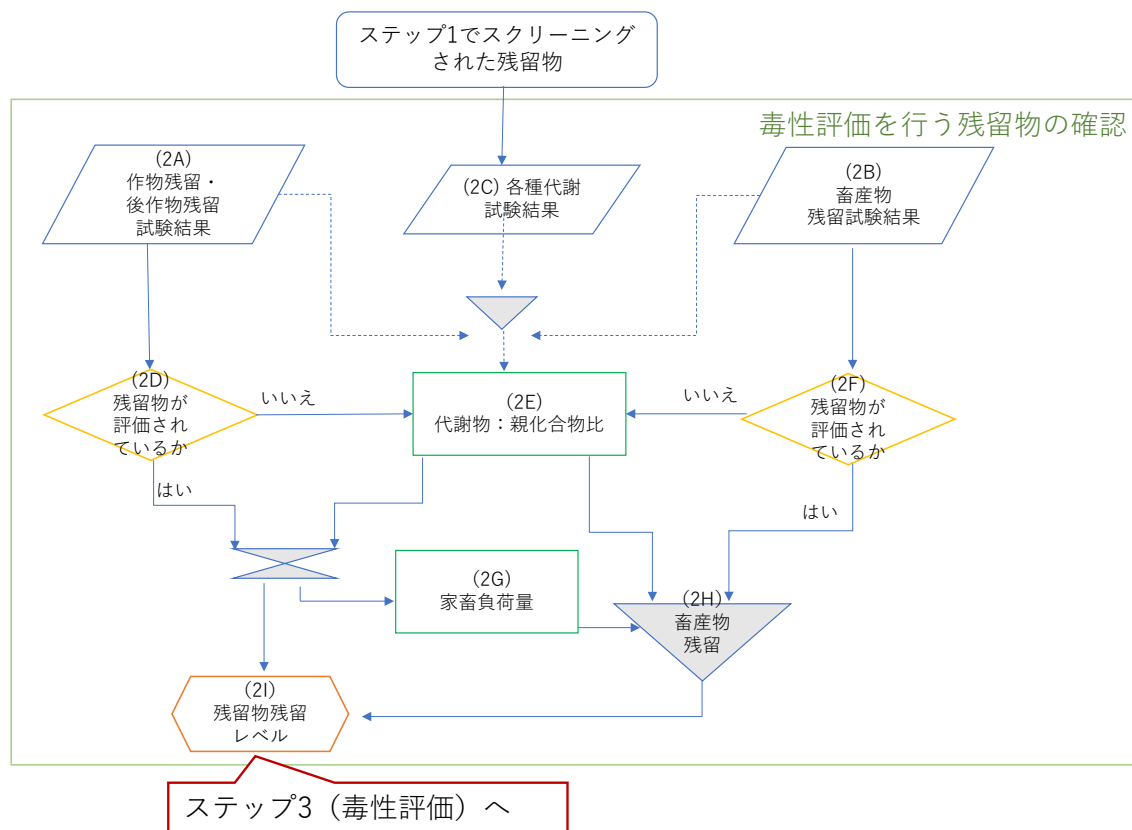


図3. ステップ2における評価スキーム

1-3. ステップ3 代謝物の毒性評価

Step3前段階での遺伝毒性評価

Step1ですべての同定された代謝物は変異原性評価（遺伝毒性評価）を行う評価の流れを、図4に示す。

微量代謝物の遺伝毒性評価

Ames試験が既に利用可能である場合を除けば、Ames変異原性に対するQSARによる予測が十分であると見なされる。微量残留物の変異原性ありの予測結果の場合について、遺伝毒性TTC（ステップ3K）を用いて評価し、追加のデータが必要か決定する。

→遺伝毒性TTCの使用は、すべての管轄区域において受け入れられている訳ではない可能性がある。微量残留物の変異原性ではないと予測される場合、さらなる情報は必要なく、リスク評価のための残留物の定義を定める目的での検討も不要である。

主要代謝物の遺伝毒性評価

QSARによるAmes変異原性の予測を染色体異常誘発性と染色体異数性誘発性の試験データ（例：インビトロ小核試験）により補完する必要がある。データがいったん生成されると、変異原性のためのグループ化のアプローチにおける他の代謝物の類似体として他の代謝物の情報を用いることが可能になる。変異原QSARモデルがさらに開発され、染色体異常誘発性と染色体異数性誘発性についても信頼性が高い予測が可能になれば、試験データは必要ではなくなるだろう。Ames変異原性QSAR解析が陽性予測結果で、それと矛盾する証拠がない場合、代謝物は変異原性ありとみなされるため、染色体異常誘発性と染色体異数性誘発性の評価は必要ない。

少量代謝物の遺伝毒性評価

代謝物プロファイルと、予想される曝露の可能性に依存して評価方法が決まる。少量代謝物が予想される曝露のうち小さな割合を占めている状況では、変異原性の評価を微量代謝物に対して取るアプローチに沿って行い、少量代謝物が占める割合が大きければ主要代謝物のように扱う。代謝物の相対的な曝露についてはステップ4で対処する。

ステップ3における評価

ステップ3で主要代謝物と少量代謝物の毒性評価を行う。

3A: 遺伝毒性を含む毒性データ

代謝物の毒性学的データが存在する場合にその毒性学的プロファイルを特徴付けるのに十分であるかどうかを判断する。

最低でも親化合物（または他の試験物質）について特定されたハザードに対応している必要がある。

規制当局のガイドラインに基づく試験にせよ、公開文献にせよ、それらの情報源から得られた代謝物そのものや潜在的な類似体（親化合物や他の試験物質を含む）に関するインシリコ、インケムコ、

インビトロ、メカニズム的、動態、およびインビボデータを含むすべての情報は、必要に応じて、代謝物の毒性学的な特性評価を実施するためのweight of evidenceアプローチで使用するべきである。新しいアプローチ手法（NAM）が開発されるとこれらも評価に組み込まれる余地がある。残留農薬の定義を確立させる目的で評価する内容を明確にしておくことは重要である。

主要代謝物、そして場合によっては少量代謝物について、遺伝毒性評価として遺伝子突然変異（Ames変異原性）、染色体異常誘発性、染色体異数性誘発性という三つのエンドポイントを検討する。微量代謝物についてはAmes変異原性を評価するだけでよい。しかし、同定したすべての残留物について、遺伝毒性の証拠が手に入る場合は、weight of evidenceアプローチにおいてそれを考慮に入れるべきである。

→情報が不十分である場合は決定スキームの左側にあるステップ3Bに進む。情報が十分手に入る場合は、決定スキームの右側にあるステップ3Dに進む。

決定スキームの右側

3D：利用可能なデータに基づいた変異原性評価

代謝物の変異原性はデータから直接判断できる。使用する試験戦略とデータ要件は管轄区域によって異なる。ただし、一般的に、遺伝子突然変異、染色体異常誘発性、および染色体異数性誘発性のエンドポイントについては、インビトロアッセイから始め、良好な陽性結果が得られればインビボ試験に進むという階層化されたアプローチにより対処する必要がある。

→変異原性であると認められるか、変異原性でないことを実証するための証拠が不十分である代謝物を評価するために用いられるアプローチは、管轄によって異なる。所属するの方針に沿ってこれらの代謝物への曝露によるリスクを評価すべきである。

3G：毒性学的な重要性の評価

専門家の判断に基づき、代謝物の毒性学的特性の評価に利用できるデータが十分にある場合、異なるシナリオが発生する可能性がある。用量制限までの用量を用いたすべての試験において有害性（adverse effect）がない場合、その代謝物は毒性学的に重要ではなく、これ以上検討する必要はないと結論づけられる。

有害性がある場合は、親化合物（または他の試験物質）の相対的な毒性を特徴付けるために、そのプロファイルと代謝物の毒性学的プロファイルの比較が可能になるようなデータを十分に用意する。（ステップ3Hへ）

3H：毒性学的プロファイルとグループ化の評価

代謝物が試験物質と定性的に類似した毒性を示すかどうかを評価する。代謝物の試験結果を、同様の試験デザインの下で試験物質について得られた試験結果（代謝物の短期毒性試験と試験物質の短期毒性試験など）と比較する。さらに、試験物質の主要な毒性作用が代謝物に関する利用可能なデータ

において評価・考慮されていることを保証するために、試験物質の毒性プロファイルも考慮する。

決定スキームの左側

3B - 主要なラットの代謝物

代謝物が主要なラットの尿、胆汁、血漿中に適切な高濃度で存在する場合、全身曝露が有意にあるとみなす。主要なラット代謝物とは、両方の性別において、ADME試験で吸収した用量（AbD）の10%以上の量で一般的にラットの尿から検出される代謝物のことである。

主要なラット代謝物について毒性データが手に入る場合は、以下の検討事項が該当する。代謝物が親化合物よりも毒性が低いことをデータが示している場合、データに基づいて代謝物固有の適切な健康影響に基づく指標値（HBGV）を導出する（決定スキームの右側）よりも、代謝物が試験物質のHBGVにより説明されていると結論づける（決定スキームの左側）方が実用的である可能性がある。

全身曝露が有意でない代謝物の場合はステップ3Cへと進むこと。

3C：試験物質からのリードアクロス

試験物質と代謝物の間におけるリードアクロスは、一連の証拠（line of evidence）に基づいて定義される。一連の証拠とは物理化学的特性（分子量、水溶性、オクタノール/水分配係数など）、分子構造の類似性（Tanimoto係数、Dice係数など）、官能基の分析（OECD QSAR Toolboxの経験的プロファイラ）、トキシコフォア解析（OECD QSAR Toolboxのメカニズムおよびエンドポイント固有のプロファイラやQSARの比較分析など）、代謝およびメカニズムの類似性などである。リードアクロスにおける一連の証拠の一つとして、一般的な毒性エンドポイントと三つの変異原性エンドポイント（Ames変異原性、染色体異常誘発性、染色体異数性誘発性）のQSARの比較分析も許容可能だと考えられる。代謝物が試験物質に類似している、または類似することが予想されるかどうかを定義するために、weight of evidenceアプローチに基づいてこれらの一連の証拠と統合して評価を行う。

試験物質のリードアクロスのために利用可能なデータによっては、毒性に関する一部の面（変異原性など）について十分に評価するためにデータが適切であるものの、他の面（生殖発生毒性など）については適切ではないという可能性がある。したがって、試験物質の利用可能なデータの適切な評価は、検討対象となっている毒性学的エンドポイントごとに行う必要がある。

類似性がないまたは、データが適切または十分ではない場合は、ステップ3E／3Fに進む。

変異原性評価

3E:試験物質からリードアクロスする十分な証拠が得られている場合

試験物質に関する決定に基づいて変異原性の結論を下す。さらなるデータから代謝物が変異原性でないことが示されない限り、遺伝毒性TTC（ステップ3K）を用いて消費者の安全を評価する。

3F：予測的アプローチ（インシリコ）に基づいた変異原性の評価

試験物質のリードアクロスから変異原性について結論が得られない場合は、Ames変異原性のQSAR解析により変異原性が予測できる。Ames変異原性のQSAR解析は、二種類の補完的なQSARモデル（すなわちメカニズムの特徴に対応するルールベース（専門家判断）モデルと統計ベースモデル）を用いて実施する。代謝物の変異原性であるかどうかを確定させるために必要な証拠は情報量、その代謝物の分類（主要、少量、または微量）によって異なる。（詳細は、前述の通り。）

Ames変異原性のQSAR解析において変異原性陽性の可能性が示された場合、変異原性に関して決定的な判断を下すためには、さらなるデータ（Ames試験情報など）が必要である。または、遺伝毒性TTCを用いて代謝物を評価できる。

→遺伝毒性TTCの使用は、すべての管轄区域において受け入れられている訳ではない可能性がある。

3K：TTC評価

TTC評価については、代謝物に対する食事曝露量の推定値を適切なTTC値と比較する。変異原性陽性の代謝物の場合は、曝露量を遺伝毒性TTC値と比較することで評価できる。

→変異原性がある代謝物に対する遺伝毒性TTCの使用は、管轄区域によっては受け入れられない場合があり、リスク管理の担当者によるインプットが必要となる場合がある。

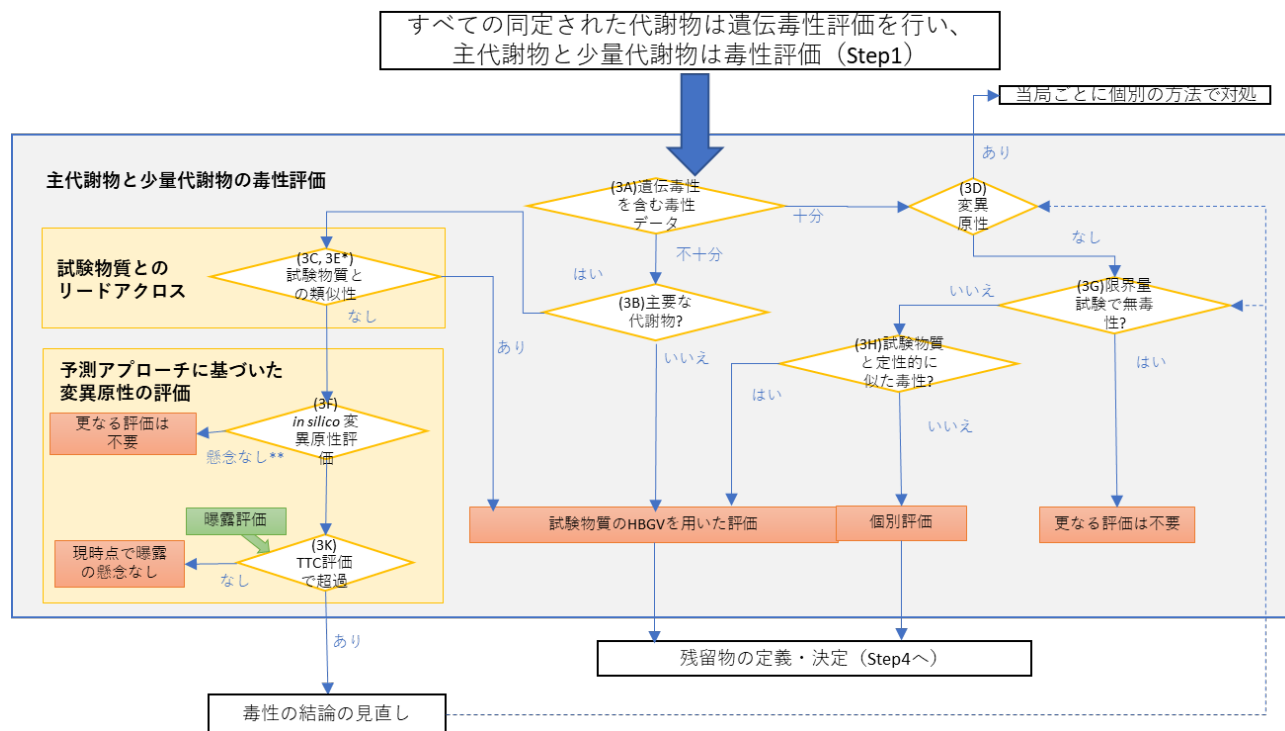
代謝物（主要代謝物または曝露の可能性が高い代謝物のいずれか）が変異原性の可能性を示さず（ステップ3F）、代謝物の毒性プロファイルを作成するためのデータが十分でない場合、代謝物への曝露を汎用TTC値（例えばCramerクラスIIIのTTC値）に対して評価する必要がある。それぞれのTTC値を超える場合、認可が不可能であるか、リスク評価を精緻化するために追加情報が必要である。それぞれのTTC値を超過していない場合、追加検討は不要であり、代謝物は残留物の定義に含まれない。ただし、追加の用途についてはTTC評価を繰り返す必要がある。

→TTCのアプローチを受け入れていない管轄区域では、代謝物の分類（主要、少量、または微量）によっては変異原性と一般毒性のデータを生成する必要が生じる。

代謝物の数と利用可能な毒性学的情報によっては、多くのTTC評価が必要となる可能性がある。複数の産物にわたって代謝物のプロファイルが類似している場合は、代謝物の相対量が相対的な食事曝露の指標となるため、最も高い割合でその代謝物が存在しているものに集中することで、評価の数を減らせるはずである。最も顕著な代謝物の曝露推定値が適切なTTC値未満である場合、その延長として、他の代謝物の曝露も閾値未満になる。食事曝露推定値がTTC値を超える場合、代謝物の毒性学的な特性評価を精緻化するためにデータが一般的に必要となり、そのようなデータは関心対象となっている他の代謝物の毒性評価にも役立つ可能性がある。

このプロセス全体にわたり、曝露や毒性学の専門家の協力が必要不可欠である。

スキームでは、毒性学的な結論の精緻化またはその他の見直しが必要であるという判断に至った場合でも新しいデータを検討する方法を提供しており、残留物の定義を最終的に決定する前にステップ3Dと3Gからスキームに入ることも可能である。



***3E:** 試験物質が変異原性ありの場合は遺伝毒性TTC評価を行い、懸念ある場合は結論の見直しへ進む

****少量代謝物の場合のみ更なる評価は不要。主代謝物は懸念がなしであっても一般毒性のTTC評価が必要。**

図4 食事リスク評価のための残留物の定義を目的とした代謝物の毒物学的な重要性を評価する決定スキーム (Step3)

1.4 ステップ4: Residue Definition

ステップ4は、リスク評価のためのResidue Definitionを導くための最終ステップである(図5)。

ステップ 4A - ステップ 3 の毒物学的評価に続いて、代謝物は毒物学的に重要ではないと判断されるか、HBGV によって評価グループに分類される。

- ・親化合物と定性的に同じ毒性プロファイルを持つ化合物は、の親評価グループに分類。
- ・代謝産物の毒性学的プロファイルが親化合物またはグループリード化合物の毒性プロファイルと質的に異なる場合、代謝産物の特定の参照値がステップ 3Hで決定され、その後、別の評価グループに分類され、各評価グループのリスク評価のResidue Definitionは、別々に（ただし同じ原則に従って）導き出される。

ステップ 4B -ステップ 2 から得られた定量的情報と適切な消費モデルを使用して、慢性ばく露の推定を行う。グループ内の特定の化合物の効力が逸脱している場合は、相対効力係数 (RPF) を使

用して、農・畜産物中濃度または慢性ばく露をリード化合物の同等物に変換する。同様に、代謝物濃度は、親化合物の分子量に換算しリード化合物当量に変換する必要がある。この場合、グループ内のすべての化合物が含まれる場合の評価グループの総慢性ばく露は、毒性学的負荷の 100% として定義される。

ステップ 4C - このステップでは、化合物は、その慢性ばく露推定値に基づいて降順にランク付けされる。

ステップ 4D - 評価グループに親化合物が含まれる場合は、ステップ 4E に進む。評価グループに親化合物が含まれていない場合は、ステップ 4H に進む。

ステップ 4E - 親化合物がすべての各種代謝試験や各種残留試験で完全に存在しない場合は、ステップ 4G に進む。それ以外の場合は、ステップ 4F に進む

ステップ 4F - 親化合物が各種残留試験ですべてのマトリックスに完全に存在しないわけではない場合、親化合物はランク 1 化合物と見なし、次のステップで考慮する。これは、親化合物の人へのばく露への寄与が小さい場合でも、その親化合物がばく露評価対象物質に確実に含まれるようにするためである。

ステップ 4G - 親化合物がすべて代謝試験や各種残留試験で完全に存在しない場合、このグループのばく露評価対象物質に親化合物は含めない。ステップ 4H に進み、このグループで次にランクの高い化合物で評価を開始する。

ステップ 4H - 最上位の化合物をリストに追加して、評価グループに含める代謝物を決定する。

ステップ 4I から 4T - これらのステップには 2 つの反復サイクルが含まれ、評価グループ内の候補化合物は、Residue Definitionの基準が満たされるまで実施する（少なくとも 75% 毒物学的負荷をカバーするようにリストアップする）。最初のサイクル（ステップ 4I から 4L）は、慢性ばく露すなわちADIを、後半（ステップ 4M から 4T）は、評価グループの急性ばく露すなわち、急性参照用量の対象となる化合物を評価する。

ステップ 4I - ばく露評価対象物質が総慢性ばく露の少なくとも 75% をカバーしているかどうかを評価する。最初の反復では、残基の定義はランク 1 の化合物のみで構成される。ばく露評価対象物質が総慢性ばく露の 75% をカバーする場合、ステップ 4M に進む。それ以外の場合は、ステップ 4J に進む。

ステップ 4J - 評価グループで次にランクの高い化合物を選択する。

ステップ 4K - ステップ 4J で選択された化合物への慢性的なばく露を評価して、ばく露評価対象物質に既に含まれている化合物の慢性ばく露推定値と比較して、その重要性を確認する。選択した化合物を含めることで、ステップ 4I からの慢性ばく露推定値が 10% 以上増加する場合は、ステップ 4L に進む。選択した化合物が慢性ばく露推定値を 10% 以上増加させない場合、たとえばばく露評価対象物質が評価グループの総慢性ばく露の 75% 未満をカバーしていても、ステップ 4M に進む。

ステップ 4L - 選択された化合物は相対慢性ばく露を 10% 以上増加させるため、この化合物はこの評価グループのばく露評価対象物質に含める。その後、手順 4I に進み、プロセスを繰り返す。

ステップ 4M - このステップ以降、評価グループ内の化合物の急性ばく露への寄与を検討する。検討中の評価グループに急性 HBGV (ARfD) がない場合は、ステップ 4U に進み、ばく露評価対象物質の提案を確定する。検討中の評価グループに ARfD がある場合は、ステップ 4N に進む。

ステップ 4N - 親/グループの急性 HBGV が確立されている場合は、上記のステップ 4B と同じアプローチに従う必要がある。グループの各化合物について、ステップ 2 から得られる定量的情報と適切な消費モデルを使用して、急性ばく露の推定を行う。グループ内の特定の化合物の効力が逸脱している場合、相対効力係数 (RPF) を使用して、農・畜産物中濃度または急性ばく露をリード化合物の同等物に変換する。

ステップ 4O - このステップでは、ばく露評価対象物質にまだ追加されていない化合物を含め、急性ばく露推定値に基づいて降順でランク付けする。

ステップ 4P - 評価グループのばく露評価対象物質にすでに選択されている化合物（ステップ 4I、4K および 4L で慢性ばく露を評価するために選択されたものを含む）が、予想される総急性ばく露またはそれぞれのばく露の少なくとも 75% をカバーする場合ステップ 4Q に進む。予想される急性ばく露の 75% がまだカバーされていない場合は、ステップ 4R に進む。

ステップ 4Q - 使用される急性ばく露モデルが食事全体に基づいている場合、方法論は、全体的な急性ばく露に対する単一食品の相対的消費量をすでに考慮しており、ステップ 4Q は適用しない。

コモディティベースのモデル (IESI など) の場合、推定急性ばく露は、全体的な急性リスクに対する個々の食品の寄与を考慮していない。めったに消費されない食品（例えば、家禽の肝臓または腎臓）は、特定の代謝物を主要な割合で含む可能性があるが、大量に消費される食品と比較して、総急性食事リスクへの寄与はほとんどないそのような食品の場合、急性 HBGV (ARfD) への化合物の推定急性ばく露の直接比較は、低消費食品のみに見られる代謝産物の不必要な包含を回避するのに役立つ場合がある。したがって、ばく露が単一の商品消費モデルに基づく場合、急性消費量が急性 HBGV の 10% を超える代謝物のみを含めることを推奨する。

ステップ 4R - 残留物の定義が予想される急性ばく露の 75% をカバーしない場合、急性ばく露

の次に高いランクの化合物を選択する必要がある。

ステップ 4S - 選択した化合物（ステップ 4R から）が相対急性ばく露推定値（ステップ 4P）を 10% 以上増加させる場合、ステップ 4Q に進む。選択した化合物が相対急性ばく露推定値を 10% 以上増加させない場合は、ステップ 4U に進む。

ステップ 4T - 単一商品エクスポージャーモデルの検討（ステップ 4Q）の後で化合物が保持される場合、それは残留物の定義に追加される。

ステップ 4U - この最終ステップでは、評価グループごとにリスク評価のためのばく露評価対象物質決定、すなわちResidue Definitionが提案される。グループごとに、コモディティまたはコモディティ タイプ全体でコンパイルされたばく露評価対象物質が比較され、可能であれば結合する。3 つ以上の作物グループがカバーされ、代謝がグループ間で定性的に同等である場合、リスク評価のばく露評価対象物質はすべての作物に外挿できる。家畜については、反芻動物と家禽の両方の代謝データが利用可能で、定性的に類似している場合、リスク評価のためのばく露評価対象物質をすべての動物商品に外挿することができる。それ以外の場合は、調査対象の特定の商品に限定する。例外として、ばく露評価対象物質は特定の商品に限定されるべきである。

特定の活性物質に対して複数の評価グループがある場合、ある評価グループのリスク推定値が常に別の評価グループのリスク推定値よりも大きい場合があることに注意する必要がある（つまり、HBGV が低く、ばく露が高い）。これが発生した場合、「低リスク」評価グループにはリスク評価とばく露評価対象物質の設定は必要ない。

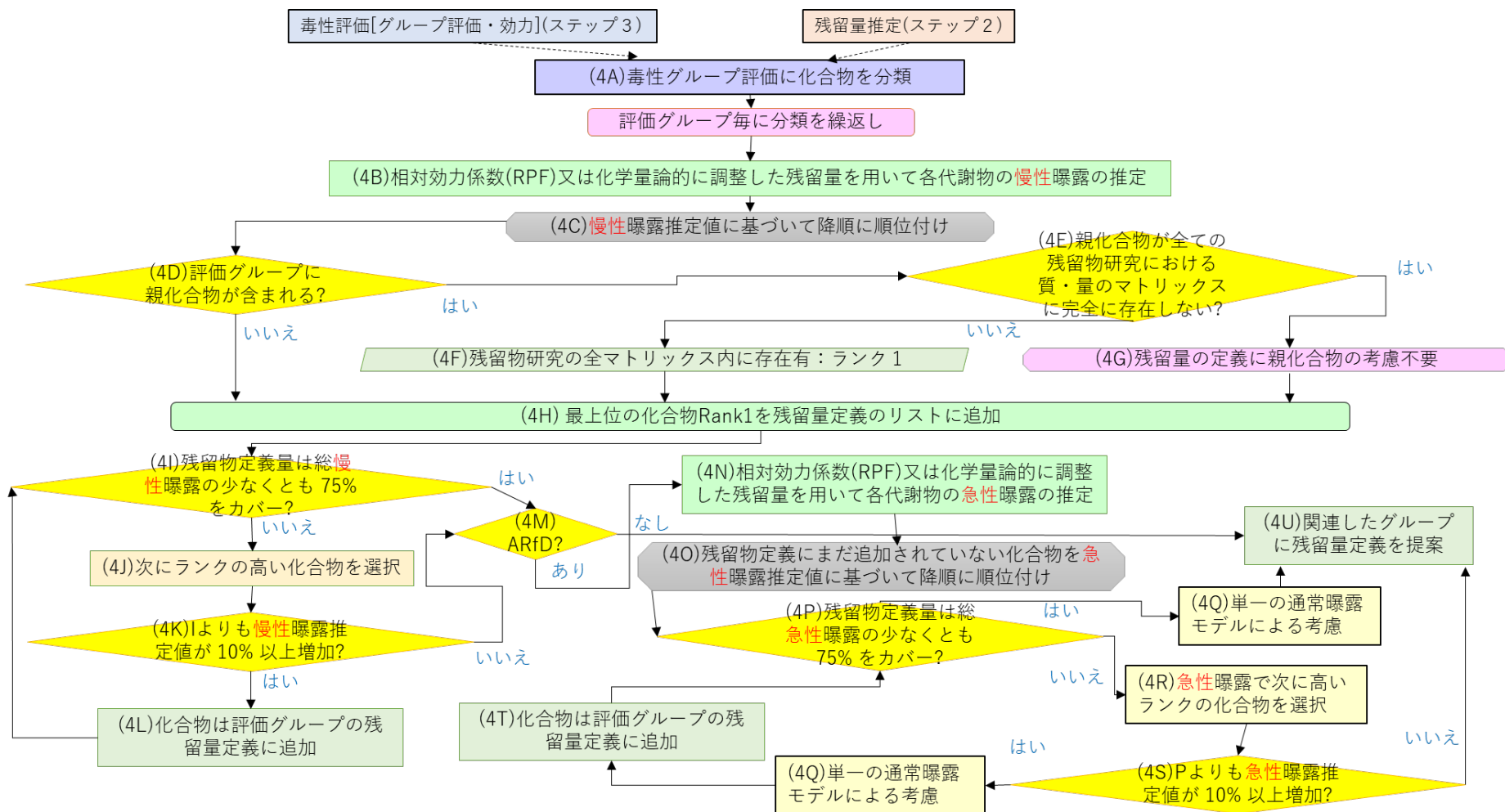


図 5. ステップ4：リスク評価のためのResidue Definitionsを決定するスキーム

1.5 抱合代謝物、結合残留物、未抽出残留物

植物や家畜動物における農薬の代謝により、親化合物やその代謝物が、糖、アミノ酸、およびグルタチオン等の天然成分と抱合する。天然基質に由来する抱合代謝物の部分をエンドコンと呼び、生体異物に由来する部分をエキソコンと呼ぶ。最も頻繁に見られる農薬の抱合体は糖抱合体でありグリコシドと呼ばれる。アグリコン (aglycon) とは、糖抱合体から開裂した遊離エキソコンのことである。他のタイプの抱合体、は硫酸塩（動物において一般的）、アミノ酸、グルタチオン（植物および動物）、マロニルグルコシド（特に植物において形成）、アセチルグルクロニド（特に動物において形成）、および脂肪酸アシル抱合体が挙げられる。

ばく露に関する検討事項

抱合体は代謝中の解毒プロセスにおいて一般的に生成される物質として認識されている。しかし、食料および飼料に含まれる抱合残留物は、それらの摂取後に容易にエキソコン部分とエンドコン部分に開裂する可能性がある。したがって、通常は抱合体を評価し、遊離代謝物やと脱抱合により遊離することが予想される代謝物の残留物（エキソコン、アグリコン）への複合曝露について検討すべきである。エキソコンを開裂できるかどうかを調べるためには、十分な努力が必要である。分析手法により抱合代謝物が共通のエキソコンへと開裂する場合、食事リスク評価ではエキソコンのすべての遊離態および抱合態を含める必要がある可能性が高くなる。

ただし、抱合体が安定していることを示す強力な証拠があり、摂取後にそのまま吸収され、抱合体とエキソコンの毒性学的特性が異なっているという理解が得られている場合、その抱合体について別途曝露評価を実施することが必要または望ましい。そのような場合は、本ガイダンス案のステップ3および4に従い、抱合体をばく露評価対象物質に含めることの是非を判断できる。

抱合体が開裂する可能性が高いかどうかを検討する際には、ヒト又は家畜動物の胃腸管の生理学的環境を模倣した試験条件を重視するべきである。そのような条件で抱合代謝物が開裂する場合、エキソコンは「生体的に到達可能 (bioaccessible)」であり、抱合代謝物はエキソコンのADIを用いて評価すべきである。

毒性に関する検討事項

あるエキソコンに複数の抱合体があり、それらが同じADIで対応できる判断される場合、どの抱合体をばく露評価対象物質に含めるかは、それらを区別する分析手法の能力、それらの普及率、およびステップ4で得られる結果によって決まる。抱合体が摂取後に開裂せず、そのエキソコンとは異なる毒性を有しているという証拠がある場合、その抱合代謝物を、ステップ3と4で得られる結果に従って別の評価群に含めてもよい。

アミノ酸、硫酸塩、グルタチオン抱合体はヒトの中で開裂しない可能性があり、それらが親水性であることにより速やかに排泄され、エキソコンよりも毒性学的関連性が低くなるものもある。しかし、基本的には、抱合代謝物が化学的加水分解または酵素活性により腸内で開裂するという仮定を置くべきである。したがって、リスク評価の精緻化を提案する場合には、様々な抱合代謝物が開裂しない理由を説明する科学的根拠、あるいは抱合体の毒性が低いことを正当化する根拠が必要となる。

逆に、一部の抱合体は毒性や生物学的反応性が高く、特別に検討する必要があることも考えられる。このような場合、エキソコンから抱合体への毒性データの外挿は不可能である。このような特性を持つ抱合体として、アシルグルクロニドが知られている。登録者は、毒性がより高い可能性を考慮

し、必要に応じてフォローアップ調査を行う必要があり、抱合代謝物を用いて試験を実施し、その毒性を評価すべきである。

結合残留物

結合残留物は、植物および動物の組織の高分子マトリックス内における残留物の物理的な包接または共有結合に至る過程により形成される。結合残留物は抱合反応により形成されるが、この種類の残留物は従来の溶媒を用いた抽出においては通常遊離しないため、これらを別途「結合残留物」として分類するのが一般的である。そのため、通常はより徹底的な分析手法を用いない限り同定されず、結合残留物を明確に特徴付けることが全体的に困難である。さらに、結合残留物は、植物または家畜のマトリックスからそれらを分離するために採用される方法によりこれらの残留物の性質が変わってしまう可能性が高いため、確実に同定することが比較的難しい。

1.6 未同定の代謝物

各種代謝試験では、濃度が非常に低い、またはその他の分析法上の限界により（化学名およびその構造が）まだ同定されていない代謝物が発生することがある。代謝試験における同定と特徴づけの目標は最低90% TRRあるため、その代謝物の比較的大きな割合が未同定のままガイドラインに適合した試験となることがある。同定と特徴づけの向上のため以下の2点については、今後の検討の余地がある。

残留物の化学的特性に関する検討事項

未同定代謝物に関しては、幅広い分析手法を用いて対応可能である。現在は、温和な条件（比較的極性の高い溶媒を用いたpH中性抽出など）から厳しい条件（酸性またはアルカリ性の濃縮溶媒系を用いた高温での長時間抽出など）代謝物の同定が試みられている。代謝物の総量が同定のためのトリガー値を超えているかどうかを判断するために、抽出とクロマトグラフィーに関する条件を慎重に選択する必要がある。また、低レベルの代謝物が多く生成される場合や、抽出後の固形物（post-extraction solids: PES）画分の% TRRが高い場合、既知の化合物がエキソコンへと解裂する可能性を検証することに特に注意を払うべきである。放射性残留物の生体分子への自然な取り込みが証明された場合、これらは毒性学的に関連性がないと考えられる。放射性物質が取り込まれる生体分子は広範かつ複雑であるため、自然な取り込みに関連するすべての残留物の特性評価が分析的に不可能である場合が多い。したがって、自然な取り込みが生じている証拠とその他の特性情報を合わせて評価し、リスク評価においてさらに検討する必要のある未同定の残留物の割合を知る必要がある。

毒性学的な検討事項

残留物の化学的特性の検討と併せて、特定の未知代謝物または未知代謝物群が有効成分やその既知の代謝物と毒性学的に関係している可能性が低いことを、ある程度の確実性をもって判断することは可能である。このことは、代謝物が部分的に同定されている場合（基本構造が知られているがその部分の正確な位置が未知であるなど）、またはトキシコフォアが知られており特定の代謝物または代謝物画分に存在していないことが示されている場合（ラベル付けされておりトキシコフォアを含まない分子の部分から生じる代謝物など）に該当する。

1.7 立体異性体

農薬の有効成分やその代謝物に立体異性体が存在する場合、Residue Definition（ばく露評価対象物質の決定）を行う際には、その毒性や分析手法、あるいは代謝も考慮する必要がある。

立体異性体とは同一の構造を持つものの空間における原子の配置が異なる異性体であり、エナンチオマー、ジアステレオマー、またはシス-トランス異性体（E/Z異性体）がある。農薬の有効成分や代謝物には以下のようなケースで立体異性体が存在する可能性がある。

- ・有効成分が立体異性体混合物でありラセミ体である。
- ・有効成分が立体異性体混合物であるがラセミ体ではない。
- ・複数の立体異性体が存在するが、特定の立体異性体のみが有効成分であり、それが100%になるように調合されている
- ・有効成分にはキラル中心がないが、それぞれの代謝物には一つ以上のキラル中心が含まれている。
- ・有効成分にキラル中心が含まれており、それぞれの代謝物に一つ以上のキラル中心が含まれている。

Residue Definitionを行う際には、以下の点を考慮する必要がある。

1. 立体異性体の安定性（化学変換）

Residue Definitionにおいて個々の立体異性体を区別するかどうかは、立体異性体の安定性によって決定される。立体異性体が互いへと化学変換する場合（E/Z異性体が平衡に達するなど）は特定の異性体についてMRLを設定する意味がなく、Residue Definitionは立体異性体の合計が定義される。

2. 立体異性体の存在レベル

植物や家畜において立体異性体の代謝や分解に差があるかどうかや、化学変換が起こった可能性を考慮する必要がある。Residue Definitionにおいて、特定の立体異性体のみ定義するするか否かは、毒性評価や残留試験の評価から判断される。

3. 立体異性体シフト（有効成分は代謝物）

植物や家畜代謝試験において立体異性体比が著しく変化したことが確認された場合、または代謝物においてキラル中心が形成された場合は、立体異性体の毒性評価を十分に行い、Residue Definitionにおいて定義する立体異性体を決定する。

4. 立体異性体の毒性評価

立体異性体において毒性に差異がある可能性がある場合は、追加の不確実係数の設定や毒性試験の要求等が必要である。

1.8 代謝物の残留量およびばく露量の推定

Residue Definitionを行うにあたり、代謝物の残留量やばく露量を推定する必要性が生じる場合がある。

代謝物の残留量の導出

代謝物の残留に関する利用可能なすべてデータを用いて、慢性および急性ばく露の推定に用いる中央値（給餌研究のデータの場合は平均値）および最高残留濃度を、すべての代謝物および曝露シナリオ（主要作物、加工コモディティ、輪作作物、家畜の残留物）についてそれぞれ推定する必要がある。

代謝物の残留濃度を決定する好ましいデータは、主要作物と後作物の場合は圃場試験または家畜残留試験結果である。代謝物について測定されたデータがない場合でも、代謝試験結果を利用できる場合がある。代謝試験結果と圃場で実施された残留試験結果を関連づけるために、目的の代謝物と親化合物の比率（代謝物（metabolite）・親化合物（parent）比 = M:P比）または圃場で測定した残留物データにおける代替的な主要代表成分との比（代謝物・代表代謝物（representative metabolite）比 = M:MR比）を適用できる（このような比率を導出する方法に関する詳細は、下記に示す）。

M:P	代謝物と親化合物の比
M:MR	代謝物と別の主成分／代表代謝物の比

M:P比およびM:MR比の導出と適用に関する原則

GAPに準拠し、様々な収穫間隔を考慮して設計されている残留試験から導出した比率は、代謝研究のみから導出したものよりも優れた推定値である。ただし、合理的に見て良好な一致が見られ（ばらつきが3倍未満）、研究をGAPに従った使用条件に適用できるのであれば、代謝試験や残留試験から導出したM:P（またはM:MR）を一つにまとめてもよい。代謝試験のみを用いて比率を導出する場合は、その適切性を正当化する必要がある（GAPに対する散布パターンの関連性、適切な作物の外挿、感度／十分な比放射能に関する研究の妥当性、分析の品質／信頼できる定量化の手法など）。妥当な比率を導出するために、利用可能なデータパッケージのうち、GAP条件を最もよく反映している研究を優先的に選択すべきである。

代謝試験やと残留試験の間で結果に著しい違いが観察される場合は、特に注意すべきである。評価が複雑であることと、代謝試験の中には散布体制または作物の観点から（圃場試験のように）GAPに類似していない可能性がある場合もある。231. 以下の表では、代謝データが妥当であるかどうか、以下の表2は、代謝試験結果が妥当であるかどうか、また評価にとって信頼に足るものかどうかを決定するためのいくつかの基準を提案している。

表2 代謝データの適切性に関する判断基準

代謝に影響する可能性が高い要因	代謝に影響する可能性が低い要因
十分な感度（比放射能）と分析の品質（高い信頼性を持って定量化する手法）	屋外／屋内（気候条件）：（太陽光の波長分布を含む）気候条件は、研究に用いる人工システムで再現できるが、ここでは関連性は低いと思われる（光分解が重要な代謝経路である場合を除く）
PHI：最後の処理から収穫までの時間	散布量
処理回数	品種（導入遺伝子を除く）
処理間隔（全体的な処理回数により、通常は直近2回分の散布のみが関係する）	製剤：遅効性またはマイクロカプセル化した製剤である場合を除けば限定的な影響）
生育段階	近縁作物（同じ作物群に属しているか、妥

	当に外挿した作物)
散布方法（葉、種子処理、土壌処理など）	

使用する比率の選択については、代謝の動的な過程から得られた固定値を表していることから、慎重に検討する必要がある。M:P（またはM: MR）比は意図する特定のGAPを評価する際に導出されるため、その作物について新しいGAPを評価する際には、以前に確立した比率が適用可能かどうかを検討しなくてはならない。

データがよく一致していれば異なる研究間のM:P（またはM: MR）比の中央値を導出できる（係数のばらつきが3未満である場合）。比率がよく一致しない（結果が3倍以上の差で異なっている）場合は、中央値ではなく、該当するすべてのデータポイントから導出する「最良推定値」を用いるべきである。意図される用途に対してすべてのデータポイントが同等に適用可能である場合、この「最良推定値」は最も高い比率となる。作物代謝群の範囲よりも広く外挿し、比率が3倍よりも大きく異なる場合は、「最良推定値」の選択を慎重に行う必要がある。ここで、利用可能な比率の違いや、（特に散布方法、収穫前の間隔、作物の観点からの）意図する用途と利用可能な代謝データとの対応を考慮し、最高比率または正当な代替比率の使用を提案することを検討する必要がある。また、正当化できるのであれば、代謝物・代謝物比を導出する可能性も検討してもよい（親化合物が信頼できる規準点ではないと見なす場合など）。

M:P（またはM: MR）比は、作物群、個々の作物、さらには品種間（例えば除草剤耐性品種と非耐性品種）の間で変化する場合がある。後者の場合、耐性と非耐性の両方に対する使用を提案し、代謝の性質または速度における変化により耐性がもたらされる場合は最悪のケースにおける比率を考慮すべきである。

OECD TG 501で定義する作物群内であれば、M:P（またはM: MR）比の外挿を許容できる（例えば小麦から大麦〔穀類〕またはジャガイモからニンジン〔根菜類〕へのM:P（またはM: MR）比の外挿）。代謝研究の対象になっていない作物群に属する作物については、適切性に応じて、利用可能な作物群の研究全体の値から導かれる「最良推定」のM:P（またはM:MR）比を用いて検討を進めることが可能である。作物の選択または散布のタイミングの観点から研究計画の内容がGAPにあまり類似していない場合、「最良推定値」比率を使用できるかどうか、さらには比率をそもそも導出できるかどうかについて、慎重に検討すべきである。

残留試験におけるLOQ未満の残留量へのM:P（またはM: MR）比の適用については、当然ながら代謝物の残留量の上限推定値しか提供できない。圃場試験において「P」（または「MR」）の量がLOQ未満であり、さらにM:P（またはM:MR）比が<1であれば、「M」の残留量もLOQ未満であると結論づけられる。

畜産物における代謝物のばく露推定

畜産物に含まれる代謝物は様々な経路からもたらされていることがある。

I. 親化合物への曝露により発生する代謝物（家畜の直接的な処理、動物の小屋およびその周辺の処理、または親残留物を含む飼料の消費）

II. 家畜の飼料において存在し畜産物に移行する植物で生成した代謝物

親化合物の投与量を含むデータは一般的に手に入り、曝露経路Iに対応できている。そのような研究から、家畜による親類似体由来する代謝物から植物における代謝物濃度の導出まで、動物由来の産物における残留物濃度を導出できる。このような導出は、家畜の給餌研究で分析する場合は直接的に行える。間接的に導出する場合は、家畜の代謝からM:P（またはM:MR）比を導出し、これを家畜の給餌研究で測定した親化合物又は代表代謝物MRに適用することで達成できる。

家畜が飼料を介して植物で生成した代謝物にばく露する場合（曝露経路II）、植物で生成した代謝物の投与に伴う代謝研究や給餌研究が利用可能である場合には、曝露経路Iについて記述した方法に従って残留物の推定値を導出することが可能である。植物で生成した代謝物の投与による代謝研究または給餌研究がない場合、そのような代謝物に関する飼料から畜産物への移行に関する直接的な情報が手に入らないため、それぞれの植物性飼料に含まれる代謝物について家畜飼料中の負荷量を計算し、これに親化合物（または別の代謝物）を代用として実施した家畜研究から得られる移行係数（飼料から畜産物への移行）を乗じることによってのみ畜産物中の代謝物の推定が可能となる。

親化合物と比較して極性が高い代謝物を検討する場合、親化合物よりも排泄が早く、代謝物の移行係数は親化合物の場合よりも低くなる、このようなアプローチでは、畜産物を介した各植物性飼料に含まれる代謝物の曝露推定値の頑健性が低下する。

評価の頑健性と総論

推定した代謝物濃度の頑健性は、GAPにより求められる用途の範囲、代謝研究や圃場試験で研究対象となった作物、研究した時間経過を含む研究の利用可能性、時間の流れに伴う変動に対する代謝物濃度の感度、使用した外挿、研究間における比率の違い（代謝研究と圃場試験など）、意思決定のクリティカリティ（TTCと曝露推定値の近さ）、農薬以外の用途を含めた代謝物の様々な発生源から得られた残留物データの品質と利用可能性など、数々の基準に依存している。

代謝物ばく露量の推定値は、限定的な用途であるか幅広い範囲の用途であるかにかかわらず、農薬の用途に関するGAPによる。M:P（またはM:MR）比の推定値は、完全な代謝データパッケージ（すなわち3つの作物群を扱っているもの）から導出された場合、代謝データパッケージが新たな用途に対応するために適切であると見なされる限り、他の将来の用途に原則として適用すべきである。この場合、適切な外挿や、評価対象となっている用途については厳密には必要でない可能性があるものの申請に含まれている利用可能な追加の作物または家畜のデータを考慮することで、曝露推定値における将来予想される用途について検討することも可能となるはずである。新しい用途や将来の用途を考慮した曝露推定値は、データ生成（残留物や毒性学的データ）に関する意思決定を導ける。

表3 代謝物ばく露量の推定値の頑健性を変動させる要因

頑健性を高める要因	頑健性を低くする要因
試験／給餌研究で測定した分析物について決定した正の残留値（STMRおよびHRの>LOQレベル）へのM:P（またはM:MR）比の適用	作物または家畜の残留物試験において測定した分析物に対して決定したLOQ未満の残留量のみへのM:P（またはM:MR）比の適用（代謝物への曝露について示唆する推定値のみが得られているが、代謝物の上限推定値を提供する上で許容可能である）
M:P（またはM:MR）比を導出するために残留物試験を行った場合、試験の回数が十分であり	圃場試験や給餌研究によるデータがなく、代謝データのみ依存

(最低3回)、特定のPHIに対するM:P (またはM : M _R) 比の導出を可能にする正の結果が得られていること	
変動する時点でデータを取得した代謝研究 (PHI)	- 代謝物生成の時間経過に関する調査を伴わない代謝研究 - 収穫時に近すぎる時期に散布している状況での代謝研究 (代謝物の曝露を過少評価する恐れがある)
代謝物のピーク濃度での生成の評価を可能にする圃場から得られた残留物データ	同じGAPを伴う研究から得られたM:P (またはM : M _R) 比における大きなばらつき (>3倍)
cGAPを厳密に反映した代謝研究 (処理回数、処理間隔、PHI、土壌や葉への散布/種子処理の違い)。	GAPを代表していない代謝研究、代謝研究において用いられたGAPと異なる散布方法 (例えば、種子処理用途のM:P (またはM:MR) 比は、葉面または土壌または輪作作物の代謝データに基づくことはできない)。
さらなる精緻化を目的とした、検討対象となる代謝物への頑健な処理係数の適用	検討対象となる植物性給餌に含まれる代謝物について利用可能な代謝研究または給餌研究の欠如

2. OECDガイダンス案と食品安全委員会の評価手法との比較検討

2-1 農薬代謝物の安全性評価の流れ

食品安全委員会¹⁾では、まず植物又は家畜固有の代謝物の存在を明らかにし、それらの残留量を確認した上で毒性の懸念を評価し、暴露評価対象物質が決定される。一方OECD (案)は、検討が必要な代謝物の選択 (Step 1)、それらの残留量の確認 (Step 2)、最後に毒性について評価 (Step3) する (図7)。この流れは食品安全委員会と同様だが、両者の評価に用いる資料や評価手法等に異なるため、以下概説する。

Step 1 : 検討が必要な代謝物の選択

評価用資料： 各種代謝試験結果

Step 1a 全ての代謝物のリストアップ

Step 1b 毒性に関するスクリーニング

(天然物か？ QSAR等による遺伝毒性の推定など)

Step 1c 代謝物を農産物、家畜飼料、畜産物に分類

Step 1d 生成した代謝物を数値基準で判断

・ $\geq 10\% \text{TRR}$ and $\geq 0.01 \text{ mg/kg}$

・ $\geq 10\% \text{TRR}$ and $\geq 0.05 \text{ mg/kg}$

・ $< 10\% \text{TRR}$ but $\leq 0.05 \text{ mg/kg}$

Step 2 : 代謝物の残留量の評価

評価用資料： 各種残留試験結果

残留データがある場合 (定量下限値以上) . . . Step 1の数値基準でStep 3に進むかを判断

残留データがある場合 (定量下限値未満) . . . Step 3には進まず検討終了

残留データがない場合 . . . 代謝試験で得た代謝物と親化合物 (M : P) または代謝物と別の代表的な代謝物や化合物 (M : MR) の比率を使用して、残留試験結果にあてはめて代謝物の残留濃度を推定

Step 3 : 毒性評価

図7 OECD (案) における農薬代謝物の安全性評価の流れ

表4 Step1で使用する試験データの食品安全委員会とOECD間比較

食品安全委員会	OECD (案)
○植物体内運命試験*	○metabolism and nature of residue in primary plants
○動物体内運命試験*	○metabolism and nature of residue in rotational crops
○家畜体内運命試験*	○metabolism and nature of residue in livestock animals
*現在の我が国の農薬テストガイドラインでは、それぞれ植物代謝試験、家畜代謝試験、動物代謝試験に相当する	○nature of residues in processed products (high temperature hydrolysis)
	○metabolism in rat or other laboratory animals
	△metabolism in fish (and shellfish/prawn)

2-2 安全性評価の具体的内容 (Step1、さらなる検討が必要な代謝物の選択)

Step1では残留・毒性評価を行う代謝物の選択のため、表4に示す各種代謝試験結果を用いる。

食品安全委員会とOECD（案）の大きな違いは2つあり、1つ目は後作物代謝試験の有無である。すなわちOECD、EFSA²⁾ およびJMPR（ここではFAO）^{3, 4)} では後作物代謝試験結果が要求されるが、我が国の農薬テストガイドライン（以後、農薬TGと略記）⁵⁾ では後作物代謝試験が要求されていない。欧米における後作物代謝試験は、広大な農地での年1～2回の輪作（クロップローテーション）を想定している。しかし、我が国では小規模農場での多品目栽培が主流で、年4作以上も栽培する場合もあり、後作物として何が栽培されるかの特定が難しいことが大きな理由である。2つ目は調理加工段階での代謝物（ここでは分解物のほうがより適切な表現である）を評価に含めるという点である。調理加工段階の資料は農薬TGで要求されているが、食品安全委員会では十分に評価できていないのが現状である。

また、OECD（案）では、魚介類の代謝試験結果の要求が検討されている点にも触れておく。ここでは直接ばく露（養殖等を想定）と間接ばく露（河川等への流出など）が考えられている。前者については農薬TGで要求されていない。後者については、水稻栽培が盛んな我が国では、環境大臣が定める水域の生活環境動植物の被害防止に係る農薬登録基準が設定され、これに適合しない場合には農薬登録されない仕組みがある。しかし、農薬登録基準は水産動植物に対する毒性に対する基準であり食品安全の観点ではない。なお、環境省の所掌範囲において、花卉、樹木、芝等の非食用農作物のみに使用される農薬に対する非食用農作物専用農薬安全性評価検討会が設置され、環境省において安全性評価を実施し、暫定的なADIを設定しているが、今回のOECD（案）の範囲外であるため深い言及は避ける。

次に試験方法についてである。食品安全委員会で評価に用いる農薬TGにおける各種代謝試験はOECDテストガイドライン（以後、OECD-TGと略記）に準じて行うこととされていることから、OECD（案）と同じになる。例えば安全性を評価する上で最も重要な、残留放射能と濃度に応じた代謝物の同定と特徴づけは、以下のとおりである（表5）。これらは表現が若干異なるが、農薬TG、FAOおよびEFSAも同様な内容である。

表5 OECD（案）における残留放射能と濃度に応じた代謝物の同定と特徴づけ

Relative amount (%)	Concentration (mg/kg)	Required Action
< 10	< 0.01	No action if no toxicological concern
< 10	0.01 - 0.05	Characterize. Only attempt to confirm identity if straightforward, e.g., a reference compound is available, or the identification is known from a previous study.
< 10	> 0.05	Characterisation/identification needs to be decided on a case-by-case basis taking into account how much has been identified.
> 10	< 0.01	Characterize. Only attempt to confirm identity if straightforward, e.g., a reference compound is available, or the identification is known from a previous study.

		ious study.
> 10	0.01 - 0.05	Significant attempts to identify should be made especially if needed to establish a pathway, ultimately characterisation might be accepted.
> 10	> 0.05	Identify using all possible means.

次に評価方法である。食品安全委員会では原則、植物代謝試験と家畜代謝試験で得られた10%TRRを超える代謝物、もしくは「相当量」検出された代謝物が次の評価に進む。なお、「相当量」検出された代謝物について、代謝試験又は残留試験で得られたものなのか明確な記載はないため、この項でも記載している（1-3項でも記載）。OECD（案）では、原則、10%TRRを超えるか超えないにかかわらず、代謝物を全てリストアップする（Step 1a）。次に代謝物の毒性学的スクリーニングが行われる（Step 1b）。例えば、天然物か否かの評価、ラット代謝試験における検出状況の確認、親化合物の毒性の強弱、代謝物の毒物学的懸念が検討されるとともに、QSARによる遺伝毒性評価等のインシシコ評価が行われ、ここでいくつかの代謝物が除外される。その後代謝物は、農産物、家畜飼料、畜産物に分類され（Step 1c）、 $\geq 10\%TRR$ and ≥ 0.01 mg/kg、 $< 10\%TRR$ but ≥ 0.05 mg/kg、 $\geq 10\%TRR$ and ≥ 0.05 mg/kg（順不同）、というような数値基準に基づいてStep 2に進むかを判断する（Step 1d）。Step 1bで示したQSAR等で遺伝毒性の判定やStep 1dで示した数値基準による判定は、既にEFSAのガイダンスにおいて示されており、今後、OECDでも同様な内容になると思われる。

表6 Step 2で使用する試験データの食品安全委員会とOECD間比較

食品安全委員会	OECD（案）
○作物残留試験（後作物残留試験を含む） ○畜産物残留試験又は乳汁移行試験	○crop field trials (primary crops and rotational crops) ○processing studies ○animal feeding studies ○direct application to animal studies ○residue studies in fish/shellfish △residues in honey

2-3 安全性評価の具体的内容（Step 2、さらなる検討が必要な代謝物の残留量）

Step 2では表6に示す各種残留試験結果を用いて評価する。Step 1と同様Step 2でも、OECD（案）においては調理加工段階での代謝物の残留データの要求が検討されている。これについても農薬TGで要求されているが、食品安全委員会では十分に評価できていないのが現状である。また、OECD（案）では、ハチミツにおける残留が評価対象として検討されている。農薬TGではミツバチに関するデータ要求が始まったばかりであり、食品安全委員会では評価対象としていない。ただし、世界的にミツバチに関心が集まったのは近年であり、我が国のみが遅れているわけではなく、世界的に見てもハチミツにおける残留に関するデータは十分でないのが現状であろう。

次に試験方法についてである。食品安全委員会で評価に用いる農薬TGで要求される各種残留試験は、OECD-TGに準じて行うこととされている。すなわち、実質的にはOECD（案）と同一ものになり、食品のリスクを評価するための残留濃度（Supervised Trial Median ResidueおよびHighest Residue

）が求められている。特に後者は、国が定める農薬使用基準(GAP)のうち残留が最大となる使用基準(cGAP、critical GAP)の条件で実施した作物残留データを意味し、残留基準値設定にも利用される。わが国では農薬TGの作物残留試験は近年に改訂したばかりであり、現状ではcGAPに基づいて得られたデータ(前述のHighest Residueに相当)が少ない、あるいはリスク評価に対応可能な試験例数が不足している場合があると思われる。

次に評価方法である。食品安全委員会では「相当量」検出された代謝物がStep 3に進む。ただし、1-2項で示した通り「相当量」については特段の数値基準がない。また、ラット、マウス等の動物代謝試験で検出される代謝物等については、毒性試験において親化合物総体として評価できることから、以後の検討の対象から除外することができる。一方、OECD(案)では、残留試験結果において実測値が得られていない場合でも可能な限り推定値を得るようにしている。この背景には、各種代謝試験は代謝物の同定に主眼が置かれているが、各種残留試験はコスト等の関係から分析対象とする代謝物を絞って定量しているためである。以後、代謝物の定量値がある場合とそうでない場合の2通りについて説明する。

まず代謝物の定量値がある場合は、Step 1で示した数値基準($\geq 10\% \text{TRR}$ and $\geq 0.01 \text{ mg/kg}$ 、 $< 10\% \text{TRR}$ but $\geq 0.05 \text{ mg/kg}$ 、 $\geq 10\% \text{TRR}$ and $\geq 0.05 \text{ mg/kg}$)に基づき、Step 3に進むかが決められる。定量値が無い場合でも、分析対象となり得られた値が定量下限値以下の場合は、通常Step 3に進むことは無い。一方、分析対象とならず定量値が無い場合は、代謝試験で得た代謝物と親化合物(M:P)または代謝物と別の代表的な代謝物や化合物(M:M_R)の比率を使用して、残留試験結果にあてはめて代謝物の残留濃度を推定する。推定値が定量下限値以下等、定量が期待できないことが示唆された場合、Step 3に進むことは無い。例えば、残留試験で親化合物濃度が定量下限未満、M:P比が<1(親化合物の割合が多い)の場合、対象とする代謝物濃度も定量下限未満である推定される。この場合は、Step 3に進むことは無い。M:PやM:M_Rを用いた濃度推定を行うためには、cGAPの条件で実施した作物残留データの存在が重要になる。畜産物等の農作物以外のカテゴリーも基本的には同様な考え方で代謝物の濃度を推定する。なお、Step 2において、食品安全委員会のように、ラット、マウス等の動物代謝試験で検出される代謝物等の以後の検討の除外、というような事項は示されていない。

参考文献

- 1) 食品安全委員会：農薬の食品健康影響評価における暴露評価対象物質に関する考え方(平成25年6月27日農薬専門調査会決定)最終改正：平成29年3月29日
- 2) EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues (2016) : Guidance on the establishment of the residue definition for dietary risk assessment. EFSA Journal, 14(12), 4549
- 3) Submission and evaluation of pesticide residues data for the estimation of maximum residue levels in food and feed. Third edition. FAO PLANT PRODUCTION AND PROTECTION PAPER 225, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2016
- 4) Pesticide residues in food, WHO Core Assessment Group on Pesticide Residues Guidance, Guidance document for WHO monographers and reviewers, World Health Organization 2015
- 5) 農薬登録申請に係る試験成績について(平成12年11月24日付け12農産第8147号農林水産省農産園芸局長通知)最終改正：令和3年1月5日

3. OECDガイダンス案における評価スキームを我が国への導入する際に検討すべき事項

以下では、OECDガイダンス案で示される農薬代謝物の評価スキームを我が国の評価に適用するにあたり検討すべき事項について整理した。

OECDガイダンス案と現在の我が国の評価スキームとの主な違いは、

- ① 数値基準を明確に示した農薬残留物の選抜
- ② 農薬残留物のばく露量、摂取量を十分に加味した評価
- ③ 農薬残留物の毒性を*in silico* (QSAR、リードアクロス) で評価
- ④ 微量をふくめた全ての農薬残留物にAmes変異原性 (試験実施やQSAR予測) 評価の導入を検討

である。以下、我が国の食品安全委員会における現状 (「農薬の食品健康影響評価におけるばく露評価対象物質に関する考え方」 (2017年6月 食品安全委員会) と新たなガイダンス案を採用するにあたり検討が必要と思われる事項を以下に示す。

①について、我が国では植物代謝試験や家畜代謝試験において、総残留放射能が10%TRRを超え、相当量検出される代謝物等がばく露評価対象物質の候補になりえる。指針案では、総残留放射能のみならず残留濃度についても具体的数値を示した上で選抜し、毒性評価のステップに進む。また、ラットで検出される代謝物のばく露評価対象物質の候補からの除外について、我が国では数値基準が無い。しかし指針案では、尿等に吸収量の10%以上の代謝物が検出された場合、ラットの主要代謝物と評価し、その代謝物は投与された親化合物の毒性データによって「カバーされた」と判断できるようにしている。

②について、我が国では農薬残留物等の摂取量の推定はリスク管理機関が行っている。しかし、ガイダンス案では、農薬残留物等の摂取量と毒性を加味してばく露評価対象物質を決定する。さらに、少量残留物に分類された物質の毒性評価における取り扱い、TTC評価を行う際には農薬残留物等の摂取量は必須の情報であり、速やかに農薬残留物等の摂取量の推定がなされないと審議の中断が起こりうる。したがって、農薬残留物の評価においては、リスク評価機関とリスク管理機関が担う範囲の明確化やきめ細かい連携等が必要になる。

③について、我が国における農薬及び農薬残留物の毒性評価では、*in silico*評価技術は活用されていない。しかし、農薬登録申請者の負担や、近年の動物実験に係わる国際的な倫理動向の変化を考慮すると、実験を伴う毒性試験データの要求は可能な限り抑える必要がある。そこで指針案では、可能な限り*in silico*評価を導入する指針案を構築したが、申請者も評価者も評価に必要な*in silico*予測と評価のノウハウの蓄積がなされていないのが現状である。特にQSAR評価においては、「食品健康影響評価において(Q)SARを活用して変異原性を評価する場合の手引き」 (2021年2月 食品安全委員会) を参考に評価を実施していくことになると思われるが、リードアクロスやグルーピング評価について、我が国では指針等が作成されておらず、OECD等の指針においても明確な判断基準は示されていない。

④について、実試験情報が得られない残留物では③と同様にQSAR評価が必要であり、同様の課題が存在する。加えて、Ames試験情報がそろわないすべての残留物について、QSARに必要な構造情報

を一定のルールに基づいて整備する必要があるが、ノウハウが蓄積されていない現状である。

その他、評価に用いる資料について、OECDガイダンスでは後作物代謝試験を評価資料に含めているが、我が国の農薬テストガイドラインでは後作物代謝試験を要求していない。このように、農薬残留物の評価にどの試験結果を用いるかを決定するには、農薬テストガイドラインの改正も視野に入れる必要がある。

(2) 個別課題：OECDケーススタディをもとにした課題抽出（小野 敦（岡山大学）、古濱 彩子（国立医薬品食品衛生研究所）、清家 伸康（農業・食品産業技術総合研究機構））

本研究課題では、新たなOECDガイダンスで提案される評価スキームを食品安全委員会の評価に取り入れるにあたっての課題や追加で必要となる情報等について整理を行う目的で、OECD RDWGにおける新しいOECDガイダンスを適用した代謝物評価のケーススタディ作成の議論に参画した。

ケーススタディの実施と作成にあたり、まず始めに対象とする農薬についてRDWGメンバーからの提案により選定が行われ、担当者を決めてJMPRなどの評価書をもとに検討を進めることとなった。予備的に実施した解析において、Spiroamineの代謝物(principle metabolites)の毒性評価部分について、ガイダンス案に沿ってGroupingした結果の概要についてドイツ(BfR)のメンバーより報告された。報告では、代謝物を構造的に4つのグループ(親化合物に類似、代謝物M06(Acid、ラットの尿中で>10% absorbed dose検出)、代謝物M13(Cyclo hexanol)に類似、代謝物M28(aminodiol)に類似)に分類し、グループごとに毒性評価スキームに沿ってどのような毒性判断(毒性学的懸念なし、親のADI/ARfDで評価可能、TTC適用等)へ分類されたかが説明された。毒性データが十分でない代謝物については、ガイダンス案に従いphysico-chemical properties (e.g., molecular weight, water solubility and octanol-water coefficient)、Tanimoto or Dice index、OECD toolbox、toxicophore analysis (e.g., DEREK QSAR)などから(構造)類似性の判断が行われたとのことであった。報告された内容では、同じグループ内の代謝物と毒性学的判断は必ずしも一致するものではなく、毒性プロファイルやendpoint等について検討されていなかったことから、報告されたケースでの毒性判断の是非について議論されたものの結論には至らず、本格的な議論は、ガイダンス改訂案完成後に行うこととされた。その後、OECD RDWG会合では、ガイダンス改訂案についてRDWGメンバーを通じて実施した内部レビューにより、非常に多くのコメントが提出され、それへの対応のため、ケーススタディに関する議論は、本研究実施期間中には行われなかった。そのため、本研究班の目的である新たな評価指針案を作成するにあたり、OECDガイダンスに示される評価スキームを我が国の評価に取り入れるにあたっての課題や検討すべき事項については、これまでに本研究班で実施した海外評価機関における評価事例研究の結果もとに検討を行った。

これまでに、OECD RDWGにおける内部レビュー対応がほぼ終了したことから、今後、ケーススタディについて本格的な議論が行われる予定をしており、今後の議論に引き続き注意が必要である。

3 研究全体の成果、考察及び結論

本研究では、農薬の農産物や畜産物において生じる代謝物を始めとした残留物の安全性評価において、近年、海外評価機関等で取り入れられている*in silico*手法を始めとした新たな評価手法の我が国における農薬評価への適用について検討し、得られた成果をもとに我が国における新たな農薬代謝物の安全性評価の考え方を提案することを目的とした研究を行った。

海外評価機関における農薬代謝物の安全性評価手法と我が国（食品安全委員会）の評価手法の違いについて解析を行うため、EFSAガイダンスおよびFAOマニュアル（各種代謝試験）とFAO/WHO Meeting on Pesticide Residues（JMPR）のガイダンス（毒性評価）について解析を行った結果、我が国では農産物、畜産物において10%TRRを超える代謝物のみを評価対象としているのに対して、EFSAでは、原則として農産物、畜産物で生じた全ての代謝物を評価対象としており、さらに暴露評価対象物質の候補を選択する最初のトリガーとして遺伝毒性の有無を用いている点が大きく異なっていた。

また、EFSA、JMPRともに暴露評価対象物質の決定において、残留濃度について数値基準が用いられている点や、我が国ではラットを用いた代謝試験で検出された代謝物を全て暴露評価対象物質の候補から除外しているが、EFSA、JMPRでは数値基準を設定している点に相違が認められた。安全性評価においては、我が国では用いられていないQSARおよびリードアクロスでの*in silico*評価や毒性学的懸念の閾値（TTC）が適用されている点などに違いが認められた。

また、それらの新たな評価手法が実際の評価にどのように適用されているか解析を行うため、近年、EFSAやJMPRで評価が実施された農薬について公開されている評価書をもとに、遺伝毒性もしくは反復投与毒性の評価に*in silico*手法やTTC評価が適用された評価事例について調査を実施した。暴露評価対象物質の設定においては、食品安全委員会に比べEFSAではより多くの代謝物が選択される傾向にあった。これは、暴露評価対象物質の決定方法（EFSAでは、農産物や畜産物中の主要な代謝物か否かを具体的な数値基準で判断している点、毒性学的負荷量を基に代謝物を選択している点）、10%TRR以上であっても残留濃度以外の理由で候補から除外していることによる考えられた。一方、安全性評価においては、EFSAでは13剤、JMPRで9剤について遺伝毒性の*in silico*評価もしくは反復投与毒性へのTTC評価の適用が確認され、近年では、ほとんどの農薬の評価において、その代謝物の評価に新たな評価手法が適用されていることが明らかとなった。しかし、いずれの評価書においても公開されている情報は限定的であり、具体的な評価方法の詳細（例えば遺伝毒性の*in silico*評価に用いられたソフトウェアなど）については示されておらず、我が国で適用するには、さらに検討が必要と考えられた。そのため、海外評価書等から代謝物構造が入手できた農薬代謝物について、実際に*in silico*評価を実施して我が国における評価への適用について検討を行った。EFSAやJMPRの評価書において一般毒性についてはcramer分類に基づくTTC評価の適用が確認され、いずれもクラス3が適用されていた。そこで本研究では、代謝物構造をもとにcramer分類を実施した結果、ほとんどの代謝物はクラス3（強毒性物質）に分類された。クラス1もしくは2に分類された一部の代謝物は、いずれも代謝が進んでかなり低分子化した代謝物であった。このことから、一般毒性のTTC値を適用する際には、クラス分類を実施せずクラス3を適用することも可能と考えられた。一方、遺伝毒性については、評価手法の異なる2種類のQSARモデル（ソフトウェア）を用いたAmes変異原性についてのQSAR解析を実施した。既存データで試験により陽性の報告ある代謝物については、両方のソフトウェアで陽性であったことから、QSAR解析の有用性が示された。一方、いずれかのソフトウェアで陽性になった代謝物や、両方のソフトウェアで陽性であっても試験により陰性の報告がなされている場合も確認されたことから、予測結果の評価には専門家の判断も重要であることが示唆された。

一方、本研究では上述のEFSAやJMPRにおける評価手法および評価事例の調査や*in silico*評価の実施に並行して、OECD Residue Definitionガイダンスドラフティンググループ（RDWG）に参画してOECDで検討が進められているOECD Residue Definitionガイダンスのアップデートの内容について情報収集を行うとともに、我が国の考え方について必要に応じてOECDガイダンスへの反映を行うため、各国から参加した専門家と議論を行った。新たなOECDガイダンスでは、EFSAやJMPRで用いられているQSARおよびリードアクロスでの評価やTTCを適用する方向で議論が進められてきており、本研究班では、0

ECDガイダンス改訂版の成立を待つてOECDガイダンス改訂版をベースとして、我が国における新たな農薬代謝物の安全性評価の考え方を提案する予定であったが、OECDガイダンスの議論が当初予定より遅れていることから、RDWGを通じて実施した内部レビュー用ドラフトをもとに農薬残留物評価指針案（以下「指針案」。添付資料）を作成した。指針案と現在の我が国における評価との違いは、我が国では10%TRRを超える代謝物のみを毒性評価の対象としているのに対し、残留物を残留放射能と残留濃度および親物質の毒性により3区分に分類し、それぞれの区分に応じた毒性評価を行う点、我が国ではラットを用いた代謝試験で検出された代謝物を全て暴露価対象物質の候補から除外しているが、除外基準を明確化（親物質の吸収量の10%以上の生成が認められた場合のみ親物質の毒性試験で評価可能とする）している点、QSAR（Ames試験）やリードアクロス（Ames試験以外）による*in silico*評価やTTC評価の適用などがあげられる。また、指針案を我が国の評価に適用するにあたって検討もしくは注意すべき事項について、RDWGでの議論およびEFSAやJMPRの評価手法や評価事例の調査や本研究で実施した*in silico*解析により得られた知見をもとに検討を行い、指針案に併せて参考資料として示した。今後は、我が国における農薬代謝物の評価に指針案を適用し、国際動向に立脚した最新のリスク評価手法を適用したリスク評価を実施することが重要である。

一方、OECDガイダンス改訂版は本研究期間中に最終化にはいたっておらず、さらにはRDWGでは今後、ケーススタディの議論が行われる予定をしている。ケーススタディは、OECDガイダンス改訂版に添付文章として示される予定をしており、ガイダンス成立まで引き続きRDWGにおける議論の動向に注視する必要がある。

(添付資料)

農薬残留物評価指針案

農薬残留物評価は、評価する残留物の同定（ステップ1）と残留レベルの評価（ステップ2）、毒性評価（ステップ3）、そして、リスク評価のためのばく露評価対象物質の決定（ステップ4）の計4つのステップで構成される。

ステップ 1 では、代謝試験結果から、化学名を割り当てることができる化合物(未同定化合物を除く)を対象に、より高い割合でかつより高い濃度で生成する残留物（主要残留物: Principal residue）、低い割合であるがより高い濃度で生成する（少量残留物: Lesser residue）、またはより低い割合とより低い濃度で生成する（微量残留物: Trace residue）に分類する。

ステップ 2 では、残留(例えば、作物残留試験、畜産物残留試験など)について評価する。このステップは、代謝物のばく露量を予測するためにも重要である。

ステップ 3 では、農薬残留物の毒性評価を行う。さらに、リスク評価のための残留物のグループ化、そのグループに対するHBGV（Health based Guidance Value）¹の割り当ても行ふ。また、毒性学的懸念の閾値（TTC: Threshold of Toxicological Concern）による評価を行う場合があり、どの残留物がリスクをもたらす可能性があるかを判断し、追加の毒性データを特定できる。

ステップ 4 では、ステップ 1 から 3 までのすべての考慮事項がまとめ、リスク評価のためのばく露評価対象物質の決定を行う。

なお、農薬が動植物等の生体内で代謝され生成した物質を“農薬代謝物”、農薬および農薬代謝物が植物体表面等において光等により生成した物質を含める場合は“農薬残留物”とした。

¹ 利用可能な安全性データとその不確実性から消費期間を考慮して、重大な健康リスクをもたらすとは予想されない経口での最大暴露量。我が国の農薬のリスク評価においては、許容一日摂取量（ADI）および急性参照用量（ARfD）が該当する。

第1章 代謝物の分類と残留濃度の評価スキーム（ステップ1とステップ2）

ステップ 1では、主要残留物、少量残留物および微量残留物に分類し、ステップ 2ではそれらの農薬残留物の残留評価を行う。それらの流れを、図1に示す。残留物の同定を行う際には、別添 I～IVを参考にする。

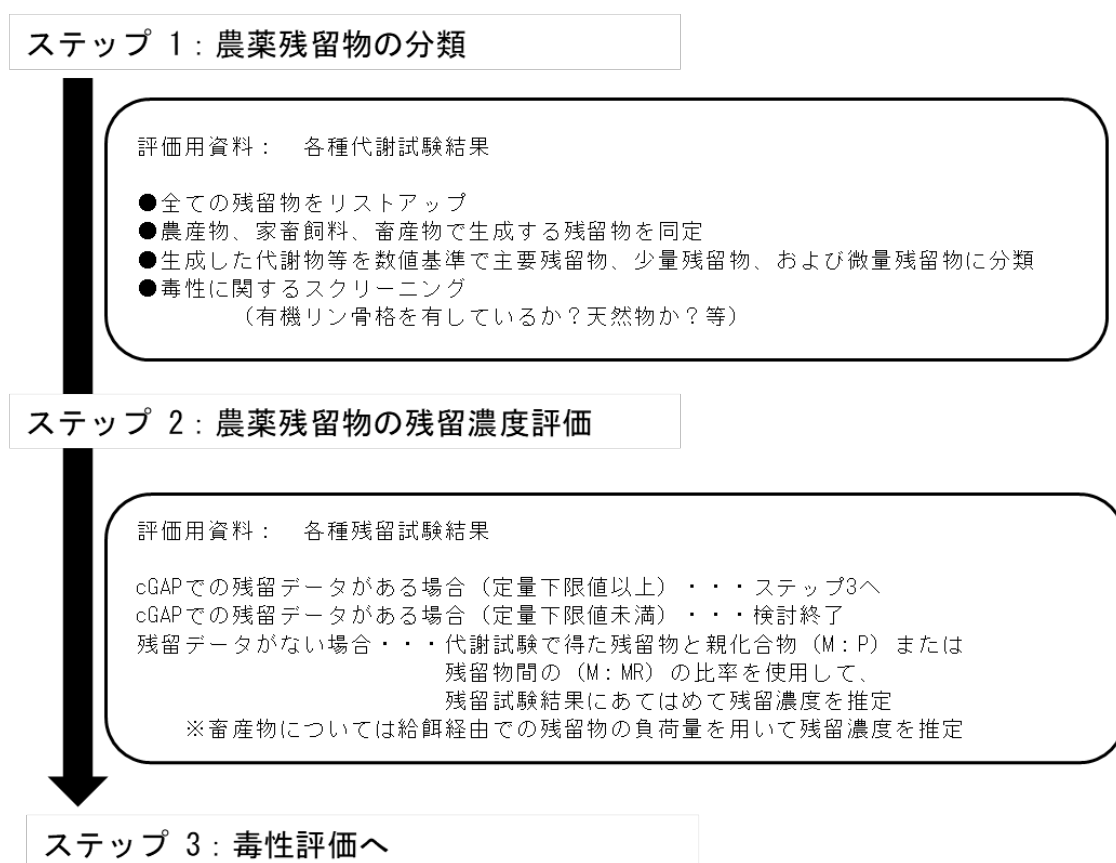


図1 残留物の分類（ステップ1）と残留濃度の評価（ステップ2）の流れ

ステップ 1

植物代謝試験や家畜代謝試験等の結果から、残留物をリストアップする。その際、3つのカテゴリー（農産物、家畜飼料および畜産物）それぞれで生成する残留物を同定する。

総放射性残留物（TRR）が 10%以上か否か、および総放射性残留物より計算される濃度が0.01 mg/kg 以上か等の数値基準（表1）に基づいて、主要残留物、少量残留物および微量残留物に分類する。

表1 ステップ1における残留物の分類のための数値基準

カテゴリー	数値基準	残留物の分類
農産物		
	10%TRR以上 かつ 0.01 mg/kg以上	主要残留物
	10%TRRより小さい かつ 0.05 mg/kg以上	少量残留物
	10%TRRより小さい かつ 毒性強い* 0.01 mg/kg以上	少量残留物
	10%TRRより小さい かつ 毒性強い 0.01 mg/kgより小さい	微量残留物
	10%TRRより小さい かつ 毒性弱い 0.05 mg/kgより小さい	微量残留物
家畜飼料		
	10%TRR以上 かつ 0.05 mg/kg以上	主要残留物
	10%TRR以上 かつ 0.05 mg/kgより小さい	微量残留物
	10%TRRより小さい	微量残留物
畜産物		
	10%TRR以上 かつ 0.01 mg/kg以上	主要残留物
	10%TRRより小さい かつ 0.05 mg/kg以上	少量残留物
	10%TRRより小さい かつ 毒性強い 0.01 mg/kg以上	少量残留物
	10%TRRより小さい かつ 毒性強い 0.01 mg/kgより小さい	微量残留物
	10%TRRより小さい かつ 毒性弱い 0.05 mg/kgより小さい	微量残留物

* 親化合物の毒性により評価する

分類を行う際、以下の点に注意する。

- ・各種代謝試験において、放射性物質でラベルした親化合物の散布量が実際の散布量と一致しない場合があるため、実際の散布量もしくはcGAP²の散布量に換算して濃度を算出する。

- ・ここでの毒性評価は、スクリーニングであり詳細な評価は行わない。親化合物がカーバメート系農薬や有機リン系農薬の場合、そもそも毒性が強く、代謝物に変換されても毒性が強い場合がある。例えば、有機リン系農薬のアセフェートから殺虫活性のあるメタミドホスが代謝物として生成される。また、有機リン系農薬の代謝物の一つにP=S基（チオノ基）が毒性の強いP=O基に変換したオキシソン体が生成する場合がある。そこで、親化合物のラット28日間毒性試験におけるNOAELが1 mg/kg 体重/日以下、またはLOAELが3 mg/kg 体重/日以下である場合、親化合物は毒性が高いとみなす。入手できない場合、ラット90日間毒性試験のNOAELが1 mg/kg 体重/日以下またはLOAELが3 mg/kg 体重/日以下である場合、親化合物の毒性が強いとみなす。

ステップ 2

ステップ 1 で特定された残留物は、各種残留試験（ほ場で行った作物残留試験や後作物残留試験、あるいは畜産物残留試験等）の結果から残留レベルを検討する（図1）。これらの試験結果で検出されない（または非常に低いレベルで検出される）場合は、ばく露評価対象物質の決定から除外できる。

各種残留試験において対象の残留物が分析対象となっていない場合、各種代謝試験の結果を利用して、残留物の残留量を推定する。すなわち、各種代謝試験や各種残留試験の代謝物と親化合物の比から残留レベルを推定する等を行う（別添IV参照）。

畜産物の場合、飼料中の残留物の残留レベルから給餌経由での残留物の負荷量を推定し、それらのデータから残留物の残留レベルを計算する必要がある。

² critical GAP：推奨・登録等され最大残留濃度が想定される使用方法

第2章 代謝物の毒性評価（ステップ3）

ステップ1と2で分類された残留物の分類（微量、少量、主要）に応じて評価を行う（図2）。その際、別添Vと別添VIを参考にする。

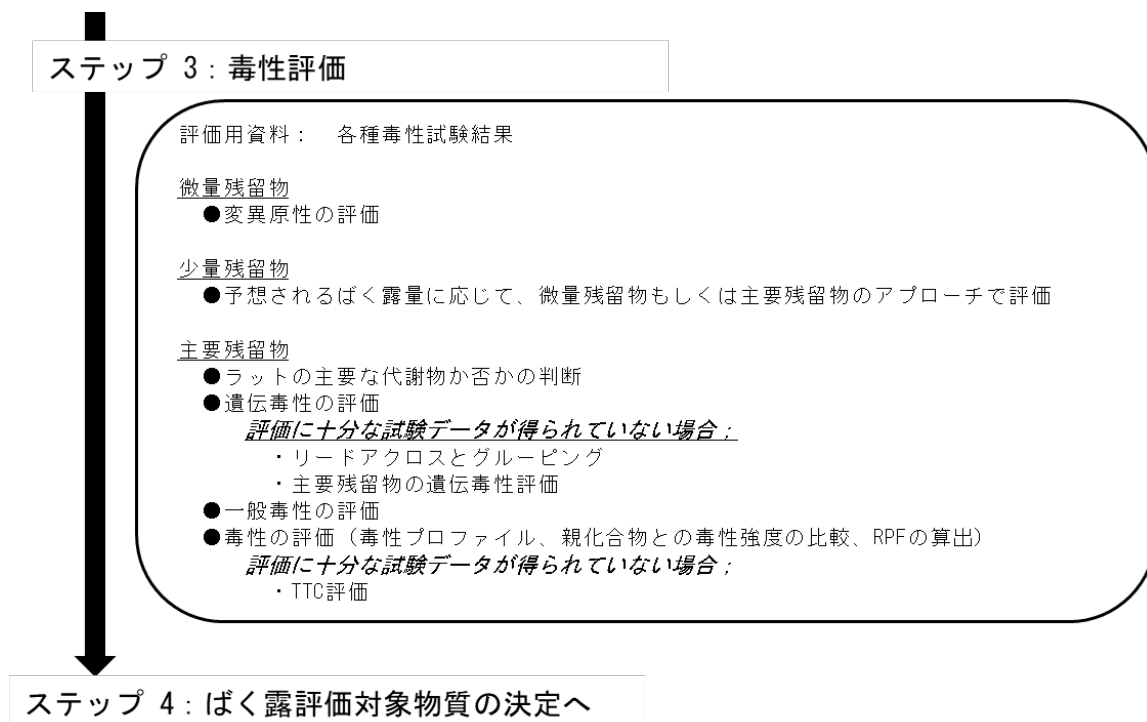


図2 残留物の毒性評価の流れ

ステップ 3

微量残留物の評価

微量残留物については、Ames変異原性試験結果もしくは、Ames変異原性の（定量的）構造活性相関[以下QSARと表記]予測による評価を行う。Ames変異原性のQSARによる評価は、「食品健康影響評価において(Q)SARを活用して変異原性を評価する場合の手引き」（2021年2月 食品安全委員会評価技術企画ワーキンググループ）に従って行う。試験結果やQSAR結果の有無に関わらず、微量残留物の変異原性が否定できない場合は、遺伝毒性TTCの適用が可能である（別添Ⅶ）。変異原性がないと評価された場合、それ以上の評価は不要である（図3）。

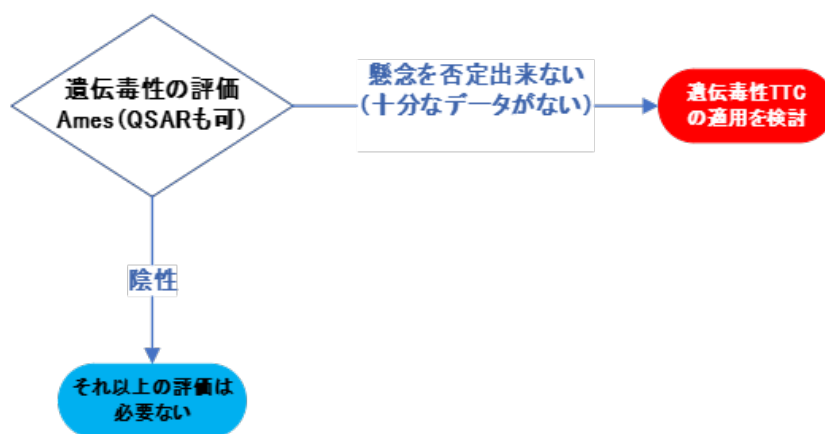


図3 微量残留物（Trace residues）の評価スキーム

少量残留物の評価

ステップ2およびステップ4における解析により、残留物全体のばく露プロファイルに占める割合が小さい場合は微量残留物として、割合が大きい場合は、主要残留物として評価を行う。

主要残留物の評価

ラットの主要な代謝物であるかの判断

評価対象の残留物が毒性試験に用いた動物種（ラット）の主要な代謝物で、親化合物の投与により、代謝物のシステミックなばく露が十分に認められる場合は、遺伝毒性、一般毒性ともに、代謝物の毒性は親化合物の試験結果により評価された（カバーされた）と判断される。

通常、尿、胆汁、および/または血漿中において投与された親化合物の吸収量（absorb

ed dose (AbD)) の10%以上 (≥10% AbDと表記) の代謝物が検出された場合、ラットの主要代謝物と評価する。この10%は厳格な基準ではなく、すべての利用可能な証拠に基づいて解釈される。評価は、別添V「ラットの主要な代謝物の評価を行う際の注意点」に従って行う。

評価対象の残留物が毒性試験に用いた動物種（ラット）の主要な代謝物である場合、親化合物のHBGVを適用できるため、それ以上の評価は不要である。

評価対象の残留物が毒性試験に用いた動物種（ラット）の主要な代謝物でない場合、以下に従い遺伝毒性、一般毒性の評価を行う。

遺伝毒性の評価

評価の考え方は、親化合物と同様である。主要残留物については、Ames変異原性および染色体異常試験が要求される。評価に必要な実試験結果が得られていない場合、Ames変異原性についてはQSARによる評価が適用可能である。一方、染色体異常試験については試験結果の得られている物質（親化合物もしくは試験結果の得られている代謝物）とのリードアクロスやグルーピング（別添VI参照）による評価が適用可能である。ただし、QSARやリードアクロスにより遺伝毒性・変異原性に関する結論を得ることができない場合、実試験結果が要求される。

*in vitro*試験や*in silico*手法による評価で遺伝毒性・変異原性が疑われるもしくは否定出来ない代謝物については、該当する*in vivo*試験による評価が要求される、もしくは遺伝毒性TTCを適用することも出来る（別添VII）。

遺伝毒性・変異原性の懸念がないと評価された場合、一般毒性の評価を行う。

一般毒性の評価

残留物の毒性プロファイルの特定に十分な毒性データの有無の判断

残留物の毒性評価に十分な情報の性質と量は、ケースバイケースで判断する。残留物の毒性プロファイルを親化合物のプロファイルと比較するために、十分なデータが必要である。代謝物について、親化合物の毒性プロファイルを特徴付ける試験と同様の試験デザインのデータを用いて、親化合物との毒性プロファイルや毒性の強さを比較する。

必要に応じて残留物に関するあらゆる情報（ガイドライン試験や学術文献、*in silico*、*in vitro*、メカニズム試験、および親化合物や他の残留物を含む構造類似物質に関する情報）を、ウェイトオブエビデンスにより評価に使用する。

評価に必要な試験データが得られている場合

毒性プロファイルの評価

限度用量を含む投与量範囲で有害影響が認められない場合、その代謝物は毒性学的に重要ではなく、さらなる評価は必要ないと結論付ける。

残留物の主な毒性影響が親化合物（もしくは他の代謝物）と同様である場合、グループ化して評価出来る。代謝物と親化合物のNOAEL/LOAELを等モル基準で比較できる場合、残留物の相対毒性を計算する。

一方、残留物と親化合物（もしくは他の残留物）の毒性プロファイルが異なる場合は、これらの化合物をグループ化出来ない。したがって、利用可能なデータの範囲に応じて、残留物に対して特定の評価値を設定する必要がある。

親化合物との毒性強度の比較

親化合物と同様の毒性を示すが定量的に異なる場合に相対毒性係数（RPF: relative potency factor）を計算する。定量的な情報が限られている場合、作用を引き起こす用量を比較し、「親化合物よりも毒性が高くない」と結論できるか、もしくは「より詳細な情報が必要」か、を判断する。代謝物の主要な毒性が親化合物と質的にも量的にも同等の場合、「親化合物よりも毒性が高くない」と結論できる。

相対毒性係数（RPF）の算出

RPFは、残留物の毒性の評価値（NOAEL、LOAEL、BMDLなど）を、他の試験物質（親化合物）と比較して正規化することによって算出する。残留物と他の試験物質が同程度の反応を示す場合、残留物のNOAELまたはLOAELが他の試験物質の3倍未満で、その差が典型的な毒性試験の用量設定の違いによって説明できる場合、残留物は他の試験物質と同等の毒性を持つと見なす。RPFは、HBGVの調整ではなく、ばく露計算に使用する。RPFの大きさは、代謝物を残留物定義に含めるかどうかの判断に影響を与えることに注意が必要である。RPFの計算は、OECD, 2018³に従う。

評価に必要な試験データが得られていない場合

一般毒性試験結果の得られている物質（親化合物もしくは試験結果の得られている代謝物）とのリードアクロスやグルーピングによる評価を検討する（別添VI参照）。アナログ物質（例えば親化合物）の一般毒性データとのリードアクロスにより残留物の毒性がアナログ物質よりも強くはないと評価出来る場合、残留物の一般毒性をアナログ物質のHBGVを使用して評価する。代謝物の一般毒性をリードアクロス出来るアナログ物質がない場合や残留物の毒性がアナログ物質より弱いと判断出来ない場合は、一般毒性TTCを適用できる（別添VII）。

以上をまとめると、主要残留物に関する毒性評価のスキームは図4になる。

³ OECD 2018, Series on Testing and Assessment No. 296, Considerations for assessing the risks of combined exposure to multiple chemicals.

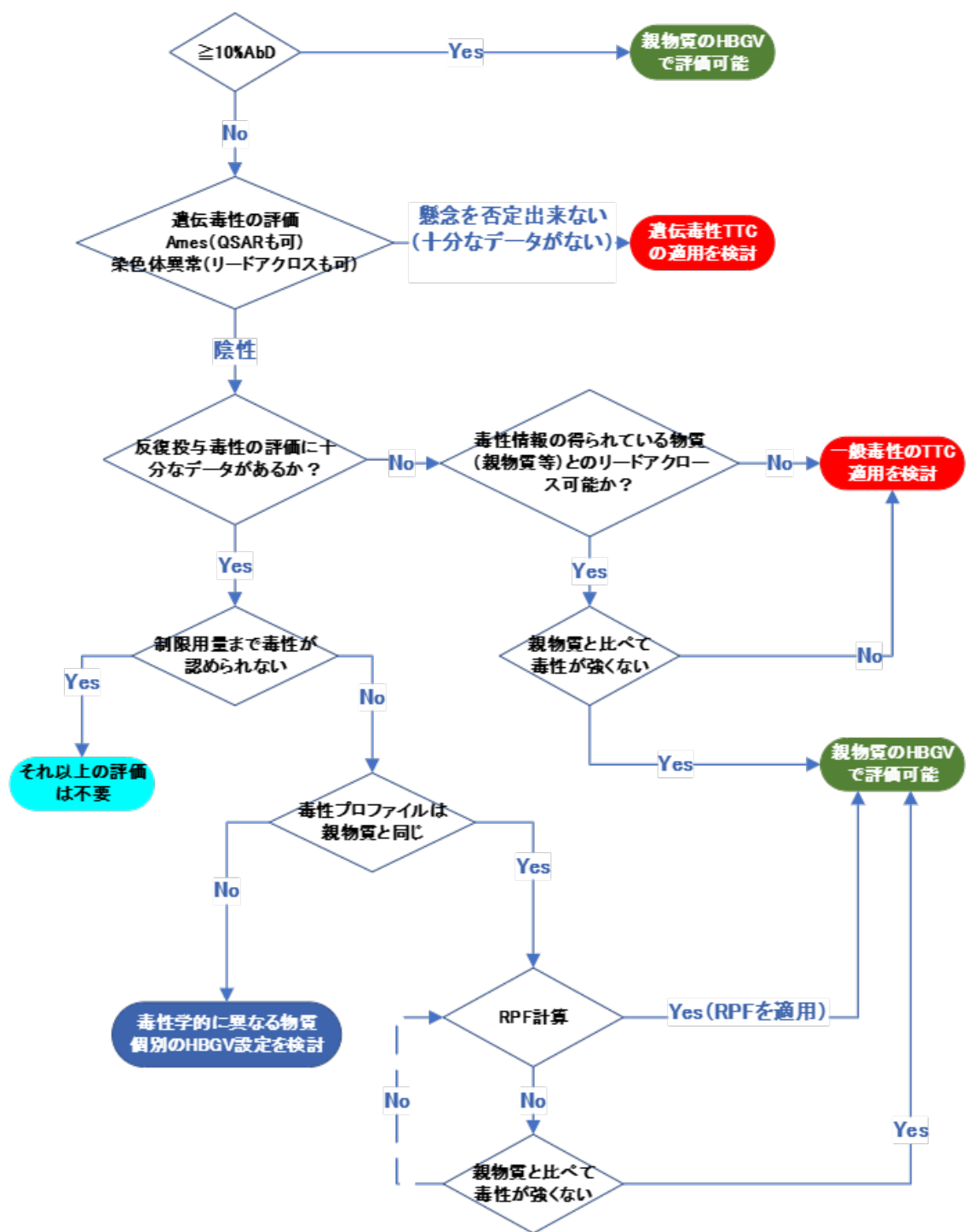


図4 主要残留物 (Principal residues) の評価スキーム

第3章 ばく露評価対象物質の決定（ステップ4）

ステップ 4

この最終ステップでは、ステップ2で得た評価グループごとにリスク評価のためのばく露評価対象物質の決定、すなわち、ばく露評価対象物質決定が提案される（図5）。

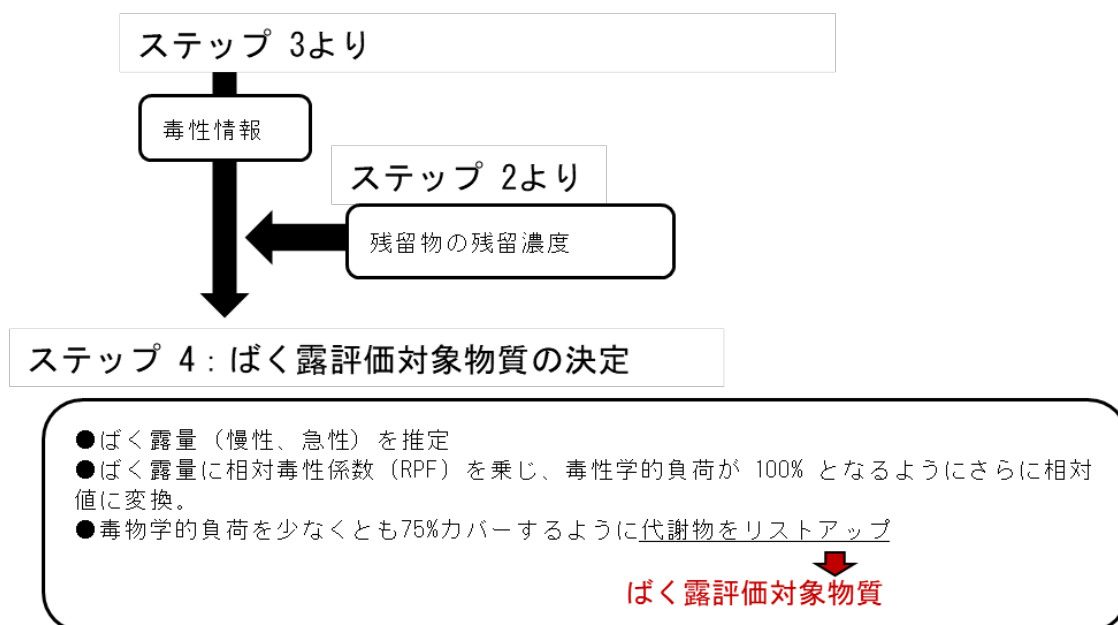


図5 ばく露評価対象物質決定の流れ

親化合物と定性的に同じ毒性プロファイルを持つ化合物は、親化合物評価グループに分類する。残留物の毒性学的プロファイルが親化合物の毒性プロファイルと質的に異なる場合、ステップ3で設定した参照値とともに別の評価グループを設ける。

ステップ 2 から得られた残留物の残留濃度および適切な消費モデルを使用して、慢性ばく露量を推定する。そのばく露量にRPFを乗じて、リード化合物（最も毒性が強い化合物）との相対値に変換する。その際、代謝物濃度は、親化合物の分子量に換算する必要がある。この場合、グループ内のすべての化合物が含まれる場合の評価グループの総慢性ばく露は、毒性学的負荷の100%に再度換算する。

最上位の化合物をリストに追加して、評価グループに含める残留物をリストアップし（毒物学的負荷の75%以上となるように残留物をリストアップする）、慢性ばく露すなわち許容一日摂取量（ADI）と、急性ばく露すなわち急性参照用量（ARfD）の対象となる化合物を評価する。

最後のステップでは、各評価グループについて、カテゴリー（農産物、家畜飼料および畜産物）を対象にばく露評価対象物質の決定を比較し、可能であればまとめる。植物の場合、3つ以上の作物群が代謝研究の対象となり、群間で代謝を定性的に比較できる場合、リスク評価のためのばく露評価対象物質の決定をすべての作物に外挿することができる。家畜の場合、反すう動物と家禽の代謝データが入手可能でありつつ定性的に類似している場合、畜産物としてばく露評価対象物質を決定することができる。

以上、新たに提案する農薬残留物評価指針案の概要について説明してきたが、これを採用しようとする場合に、生じうる問題点を参考資料に示した。

別添Ⅰ 抱合体、結合残留物、未抽出残留物の取り扱い

植物や家畜動物における農薬の代謝により、親化合物やその代謝物が、糖、アミノ酸、およびグルタチオン等の天然成分と抱合する。ここでは、抱合体等の取り扱いについて示す。なお、天然基質に由来する抱合代謝物の部分をエンドコンと呼び、農薬等の生体異物に由来する部分をエキソコンと呼ぶ。アグリコン (aglycon) とは、糖抱合体から開裂した遊離エキソコンである

ばく露に関する検討事項

抱合体は代謝中の解毒プロセスにおいて生成される物質として認識されている。しかし、食料および飼料に含まれる抱合体は、それらの摂取後に容易にエキソコン部分とエンドコン部分に開裂する可能性がある。したがって、通常は抱合体を評価し、遊離代謝物やと脱抱合により遊離することが予想される代謝物の残留物（エキソコン、アグリコン）への複合ばく露について検討すべきである。その際、エキソコンを開裂できるかどうかを調べるためには、十分な努力が必要である。

ただし、抱合体が安定していることを示す証拠があり、摂取後にそのまま吸収され、抱合体とエキソコンの毒性学的特性が異なっているという理解が得られている場合、その抱合体についてばく露評価を実施することが望ましい。そのような場合は、本評価指針案のステップ3および4に従い、抱合体をばく露評価対象物質に含めることの是非を判断する。

抱合体が開裂する可能性が高いかどうかを検討する際には、ヒト又は家畜動物の胃腸管の生理学的環境を模倣した試験条件を重視するべきである。そのような条件で抱合体が開裂する場合、エキソコンは「生体的に到達可能 (bioaccessible)」であり、抱合体はエキソコンのHBGVを用いて評価すべきである。

毒性に関する検討事項

あるエキソコンに複数の抱合体があり、それらが同じHBGVで対応できる判断される場合、どの抱合体をばく露評価対象物質に含めるかは、それらを区別する分析手法の能力、それらの普及率、およびステップ4で得られる結果によって決めることが望ましい。抱合体が摂取後に開裂せず、そのエキソコンとは異なる毒性を有しているという証拠がある場合、その抱合体を、ステップ3と4で得られる結果に従って別の評価群に含めてもよい。

アミノ酸、硫酸塩、グルタチオン抱合体はヒトの中で開裂しない可能性があり、それらが親水性であることにより速やかに排泄され、エキソコンよりも毒性への寄与が低くなるものもある。しかし、基本的には、抱合体が加水分解または酵素活性により腸内で開裂するという仮定を置くべきである。したがって、リスク評価の精緻化を提案する場合には、様々な抱合体が開裂しない理由を説明する科学的根拠、あるいは抱合体の毒性が低いことを示す根拠が必要となりえる。

一方、一部の抱合体は毒性や生物学的反応性が高い場合もある。このような場合、エキソコンから抱合体への毒性データの外挿は不可能である。このような特性を持つ抱合体として、アシルグルクロニドが知られている。登録者は、毒性がより高い可能性を考慮し、必要に応じてフォローアップ調査を行う必要があり、抱合体を用いて試験を実施し、その毒性を評価すべきである。

結合残留物

結合残留物 は、植物および動物の組織の高分子マトリックス内における残留物の物理的な包接または共有結合に至る過程により形成される。結合残留物は抱合反応により形成されるが、この種類の残留物は従来の溶媒を用いた抽出においては通常遊離しないため、これらを別途「結合残留物」として分類するのが一般的である。そのため、通常はより徹底的な分析手法を用いない限り同定されず、結合残留物を明確に特徴付けることが全体的に困難である。さらに、結合残留物は、植物または家畜のマトリックスからそれらを分離するために採用される方法によりこれらの残留物の性質が変わってしまう可能性が高いため、確実に同定することが比較的難しい。

別添Ⅱ 未同定代謝物の取り扱い

各種代謝試験では、濃度が非常に低い、またはその他の分析法上の限界により（化学名およびその構造が）まだ同定されていない代謝物が発生することがある。代謝試験における同定と特徴づけの目標は最低90% TRRあるため、その代謝物の比較的大きな割合が未同定のままガイドラインに適合した試験となることがある。同定と特徴づけの向上のため、以下の2点については今後の検討の余地がある。

残留物の化学的特性に関する検討事項

未同定代謝物に関しては、幅広い分析手法を用いて対応可能である。現在は、温和な条件（比較的極性の高い溶媒を用いたpH中性抽出など）から厳しい条件（酸性またはアルカリ性の濃縮溶媒系を用いた高温での長時間抽出など）で代謝物の同定が行われる。代謝物の総量が同定のためのトリガー値を超えているかどうかを判断するためには、抽出とクロマトグラフィーに関する条件を慎重に検討する必要がある。また、低レベルの代謝物が多く生成される場合や、抽出後の固形物（post-extraction solids: PES）画分の% TRRが高い場合、既知の化合物がエキソコンへと解裂する可能性を検証することに特に注意すべきである。放射性残留物の生体分子への自然な取り込みが証明された場合は、毒性学的に問題がないと考えられる。放射性物質が取り込まれる生体分子は広範かつ複雑であるため、自然な取り込みに関連するすべての残留物の特性評価が分析的に不可能である場合が多い。したがって、自然な取り込みが生じている証拠とその他の特性情報を合わせて評価し、リスク評価においてさらに検討する必要のある未同定の残留物の割合を知る必要がある。

毒性学的な検討事項

残留物の化学的特性の検討と併せて、特定の未知代謝物が有効成分やその既知の代謝物と毒性学的に関係している可能性が低いことを、ある程度の確実性をもって判断することは可能である。このことは、代謝物が部分的に同定されている場合（基本構造が知られているがその部分の正確な位置が未知であるなど）、またはトキシコフォアが知られており特定の代謝物または代謝物画分に存在していないことが示されている場合（ラベル付けされておりトキシコフォアを含まない分子の部分から生じる代謝物など）に該当する。

別添Ⅲ 立体異性体の取り扱い

農薬の有効成分やその残留物に立体異性体が存在する場合、ばく露評価対象物質の決定を行う際には、その毒性や分析手法、あるいは代謝も考慮する必要がある。

立体異性体とは同一の構造を持つものの空間における原子の配置が異なる異性体であり、エナンチオマー、ジアステレオマー、またはシス-トランス異性体（E/Z異性体）がある。農薬の有効成分や残留物には以下のようなケースで立体異性体が存在する可能性がある。

- ・有効成分が立体異性体混合物でありラセミ体である。
- ・有効成分が立体異性体混合物であるがラセミ体ではない。
 - ・複数の立体異性体が存在するが、特定の立体異性体のみが有効成分であり、それが100%になるように調合されている
- ・有効成分にはキラル中心がないが、それぞれの残留物には一つ以上のキラル中心が含まれている。
- ・有効成分にキラル中心が含まれており、それぞれの残留物に一つ以上のキラル中心が含まれている。

ばく露評価対象物質の決定を行う際には、以下の点を考慮する必要がある。

5. 立体異性体の安定性（化学変換）

ばく露評価対象物質の決定において個々の立体異性体を区別するかどうかは、立体異性体の安定性によって決定される。立体異性体が互いへと化学変換する場合（E/Z異性体が平衡に達する等）は、ばく露評価対象物質の決定は立体異性体の合計が定義される。

6. 立体異性体の存在レベル

植物や家畜において立体異性体の代謝や分解に差があるかどうかや、化学変換が起こった可能性を考慮する必要がある。ばく露評価対象物質の決定において、特定の立体異性体のみ定義するするか否かは、毒性評価や残留試験の評価から判断される。

7. 立体異性体シフト（有効成分が代謝物の場合）

植物や家畜代謝試験において立体異性体比が著しく変化したことが確認された場合、または代謝物においてキラル中心が形成された場合は、立体異性体の毒性評価を十分に行い、ばく露評価対象物質として含める立体異性体を決定する。

8. 立体異性体の毒性評価

立体異性体において毒性に差異がある可能性がある場合は、追加の不確実係数の設定や毒性試験の要求等が必要である。

別添IV 残留物濃度およびばく露量の推定

ばく露評価対象物質の決定を行うにあたり、残留物の残留量やばく露量を推定する必要性が生じる。

残留物濃度の導出

残留物の濃度に関する利用可能なすべてデータを用いて、慢性および急性ばく露の推定に用いる中央値（給餌研究のデータの場合は平均値）および最高残留濃度を、すべての代謝物およびばく露シナリオ（主要作物、後作物、飼料、家畜の残留物）についてそれぞれ推定する必要がある。

残留物濃度を決定する好ましいデータは、主要作物と後作物の場合は圃場試験または家畜残留試験結果である。残留物について測定されたデータがない場合でも、代謝試験結果を利用できる場合がある。代謝試験結果と圃場で実施された残留試験結果を関連づけるために、目的の残留物と親化合物の比率（代謝物（metabolite）・親化合物（parent）比 = M:P比）または圃場で測定した残留物間の比（代謝物・代表代謝物（representative metabolite）比 = M:MR比）を適用できる。

M:P比およびM:MR比の導出と適用に関する原則

GAP⁴に準拠し、様々な収穫間隔を考慮して設計されている残留試験から導出した比率は、代謝研究のみから導出したものよりも優れた推定値とみなす。ただし、合理的に見て良好な一致が見られ（ばらつきが3倍未満）、GAPに従った使用条件に適用できるのであれば、代謝試験や残留試験から導出したM:P（またはM:MR）を一つにまとめてもよい。代謝試験のみを用いて比率を導出する場合は、その適切性を検討する必要がある（GAPに対する散布パターンの関連性、適切な作物の外挿、感度／十分な比放射能に関する研究の妥当性、分析の品質／信頼できる定量化の手法など）。妥当な比率を導出するために、利用可能なデータパッケージのうち、GAP条件を最もよく反映している研究を優先的に選択すべきである。

代謝試験やと残留試験の間で結果に著しい違いが観察される場合は、特に注意すべきである。評価が複雑であることと、代謝試験の中には散布体制または作物の観点から（圃場試験のように）GAPに類似していない可能性がある場合もある。別表1では、代謝データが妥当であるかどうか、以下の表は、代謝試験結果が妥当であるかどうか、また評価にとって信頼に足るものかどうかを決定するためのいくつかの基準を提案している。

⁴ Good Agricultural Practices : 農業生産工程管理

別表1 代謝データの適切性に関する判断基準

代謝に影響する可能性が高い要因	代謝に影響する可能性が低い要因
十分な感度（比放射能）と分析の品質（高い信頼性を持って定量化する手法）	屋外／屋内（気候条件）：（太陽光の波長分布を含む）気候条件は、研究に用いる人工システムで再現できるが、ここでは関連性は低いと思われる（光分解が重要な代謝経路である場合を除く）
PHI: 最後の処理から収穫までの時間	散布量
処理回数	品種（導入遺伝子を除く）
処理間隔（全体的な処理回数により、通常は直近2回分の散布のみが関係する）	製剤: 遅効性またはマイクロカプセル化した製剤である場合を除けば限定的な影響）
生育段階	近縁作物（同じ作物群に属しているか、妥当に外挿した作物）
散布方法（葉、種子処理、土壌処理など）	

使用する比率の選択については、代謝の動的な過程から得られた固定値を表していることから、慎重に検討する必要がある。M:P（またはM: MR）比は意図する特定のGAPを評価する際に導出されるため、その作物について新しいGAPを評価する際には、以前に確立した比率が適用可能かどうかを検討しなくてはならない。

データがよく一致していれば異なる研究間のM:P（またはM: MR）比の中央値を導出できる（係数のばらつきが3未満である場合）。比率がよく一致しない（結果が3倍以上の差で異なっている）場合は、中央値ではなく、該当するすべてのデータポイントから導出する「最良推定値」を用いるべきである。意図される用途に対してすべてのデータポイントが同等に適用可能である場合、この「最良推定値」は最も高い比率となる。作物代謝群の範囲よりも広く外挿し、比率が3倍よりも大きく異なる場合は、「最良推定値」の選択を慎重に行う必要がある。ここで、利用可能な比率の違いや、（特に散布方法、収穫前の間隔、作物の観点からの）意図する用途と利用可能な代謝データとの対応を考慮し、最高比率または正当な代替比率の使用を提案することを検討する必要がある。また、正当化できるのであれば、代謝物・代謝物比を導出する可能性も検討してもよい（親化合物が信頼できる規準点ではないと見なす場合など）。

M:P（またはM: MR）比は、作物群、個々の作物、さらには品種間（例えば除草剤耐性

品種と非耐性品種)の間で変化する場合がある。後者の場合、耐性と非耐性の両方に対する使用を提案し、代謝の性質または速度における変化により耐性がもたらされる場合はワーストケースにおける比率を考慮すべきである。

OECD TG 501⁵で定義する作物群内であれば、M:P (またはM: MR) 比の外挿を許容できる (例えば小麦から大麦 [穀類] またはジャガイモからニンジン [根菜類]) へのM:P (またはM: MR) 比の外挿)。代謝試験の対象になっていない作物群に属する作物については、適切性に応じて、利用可能な作物群の研究全体の値から導かれる「最良推定」のM:P (または M:MR) 比を用いて検討を進めることが可能である。

残留試験におけるLOQ未満の残留量へのM:P (またはM: MR) 比の適用については、当然ながら代謝物の残留量の上限推定値しか提供できない。圃場試験において「P」 (または「MR」) の量がLOQ未満であり、さらにM:P (またはM:MR) 比が<1であれば、「M」の残留量もLOQ未満であると結論づけられる。

畜産物に含まれる残留物

畜産物に含まれる残留物は、主に下記2つのばく露経路を経ている。

- I. 家畜が親化合物にばく露し、家畜体内での代謝により生じる代謝物 (家畜の直接的な処理、動物の小屋およびその周辺の処理、または親化合物を含む飼料の消費)
- II. 植物で生成し、家畜飼料に残留、家畜に移行する残留物

ばく露経路Iにおいて通常、親化合物の投与量を含むデータは入手可能である。家畜残留試験で残留物を分析する場合は残留物濃度を算出できる。また、家畜代謝試験結果からM:P (またはM: MR) 比を導出し、これを畜産物残留試験で測定した親化合物又は残留物MRに適用することで濃度推定が可能である。

ばく露経路IIでは、植物で生成した残留物の投与に伴う家畜代謝試験や畜産物残留試験が利用可能である場合には、ばく露経路Iについて記述した方法で残留物濃度を推定することが可能である。植物で生成した残留物の投与に伴う家畜代謝試験や畜産物残留試験がない場合、家畜飼料中の負荷量を推定し、これに親化合物等を代用として実施した家畜代謝試験や畜産物残留試験から得られる移行係数 (飼料から畜産物への移行) を乗じることによってのみ畜産物中の代謝物の推定が可能となる。しかし、親化合物と比較して極性が高い代謝物を検討する場合、親化合物よりも排泄が早く、代謝物の移行係数は親化合物の場合よりも低くなる。したがって、このような場合、ばく露推定値の頑健性が低下する。

⁵ OECD 2007, OECD Guidelines for the testing of chemicals No. 501, Metabolism in Crops.

別添V ラットの主要な代謝物であるか評価を行う際の注意点

代謝試験（ラット）において尿、胆汁、血漿における代謝物が主要な代謝物であるかの評価

尿：動物代謝（ADME：吸収、分布、代謝、排泄）の試験において、雌雄ラットの尿中に吸収量（absorbed dose (AbD)）の10%以上（ $\geq 10\%$ AbDと表記）の代謝物が検出された場合、ラットの主要代謝物と評価する。 $\geq 10\%$ AbDは、投与された(放射性)用量に対して収集時間(通常48時間)にわたって尿中に排泄された代謝物の総量を経口吸収の割合で調整して算出される値から判断する。

経口吸収率= 40%、尿中の代謝物Aが投与量の7%だった場合

→ 尿中の代謝物Aの吸収量に対する割合 = $7/0.4 = 17.5\%$

この10%は厳格な基準ではなく、すべての利用可能な証拠に基づいて解釈される。

親化合物の経口吸収率が特に低い場合（例：20%未満）、代謝物の経口吸収率を、物理化学的特性と分子量を考慮して推定する必要がある。代謝物の経口吸収率が親化合物の吸収率よりもはるかに高いと予測される場合、親化合物のHBGVは代謝物には適用出来ない。

胆汁：代謝物が胆汁中にのみで測定された場合、腸管から吸収され、門脈で肝臓に輸送され、肝臓で代謝され、胆汁中に排泄され、全身循環しておらず全身的なばく露はない可能性がある。ただし、毒性の主要な（最も感受性が高い）標的臓器が肝臓である場合、両性で10%以上の吸収量に相当する代謝物が胆汁中に検出された場合、代謝物の毒性は親化合物の毒性データによって「カバーされた」と判断することが出来る。一方、代謝物が肝臓以外に毒性影響を与える場合は、代謝物の毒性は親化合物によって「カバーされた」とは判断できない可能性がある。

肝臓が毒性（または適応応答）の主要な標的臓器でない場合でも、代謝物の胆汁排泄が遅い時間（経口投与後3-4時間以上）に認められる場合、全身循環していると考えられる。したがって、雌雄とも吸収量の10%以上の代謝物が投与後3-4時間より遅い時間以降に検出された場合、その代謝物は試験物質の毒性データでカバーされていると判断できる。

投与後3-4時間後に胆汁中代謝物の測定が行われていない場合、より遅い時間（例えば6時間）の結果を使用出来る可能性がある。代謝物の経時変化が得られていない場合でも、胆汁中全放射性濃度の経時変化データから外挿することができる可能性がある。

特定の代謝物が肝臓でのみ生成され、全身循環に入らずに投与後の異なる時間帯で胆汁中に排泄された場合、システミックなばく露を支持するには追加の証拠が必要である。

代謝物が初期の尿や血漿中にも同定されている場合、早い時間に胆汁中に排泄された代謝物も全身循環からもたらされたものである可能性がある。

血漿：代謝物が血漿中に存在する場合、全身ばく露は明確である。しかし、通常、代

代謝物の血漿中濃度は、特定の時点での濃度 ($\mu\text{g} / \text{L}$) および投与後の一定期間のAUC (曲線下面積) として示されているため、代謝物の血漿AUCを全放射能の血漿AUCと比較することにより、代謝物の吸収量に対する割合を求める。このレベルが雌雄の動物で10%AbD以上である場合、その代謝物は投与された親化合物の毒性データによって「カバーされた」と判断できる。

ラットの主要な代謝物の前駆体の評価

ラットの主要な代謝物 ($\geq 10\%\text{AbD}$) の前駆体代謝物は、その代謝経路において唯一の代謝物である場合、および直接下流代謝物に速やかに変換される場合は、親化合物/試験物質の毒性試験データによって、その遺伝毒性および一般毒性の評価がカバーされたと判断できる。ただし、主要な代謝物が複数の経路で生成される場合、前駆体への十分な全身ばく露を決定するためには追加のエビデンスが必要である。

植物/家畜残留物そのものが、ラットで検出されない場合でも、裏付けとなる証拠があれば親化合物/試験物質によってカバーされたと評価出来る。家畜や植物でのみ検出された代謝物がある場合には、ラットにおける試験物質の全体的な代謝経路から植物/家畜代謝物が、ラットの主要な代謝物の前駆体であると判断できる場合、植物/家畜代謝物がラットでも生成され、直接的にラットの主要な代謝物に分解されたと推定される。または、*in vitro* または *in vivo* での追加の解析により示すことが可能な場合もある。

特定の代謝物に対するばく露が10%AbDを超えるかどうかは、その特定の代謝物の下流の代謝物を合計することで判断できる。たとえば、 $A \rightarrow B, C, D$ の代謝経路ではB、C、およびDの量を合わせて、Aが10%AbDを超えるかの判断に用いることが出来る。同様に、Aが段階的に異なる分解代謝物 ($A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D$) に変換される場合も同様であり、下流の代謝物B、C、およびDはAの全身ばく露に依存するため、A、B、C、およびDの合計によって前駆体のAのAbDが決定される。

また、植物におけるグリコシド抱合体は、ラットでの対応する抱合体または非抱合体が検出され、かつ、主要なラット代謝物であると判断された場合、親化合物/試験物質によってカバーされたと判断できる。

別添VI リードアクロスおよびグルーピングにおいてエビデンスとして評価すべき事項

リードアクロスおよびグルーピングを行う場合は、リードアクロスフレームワーク (OECD, 2014⁶, ECHA, 2017⁷) に基づいて、以下の項目をエビデンスとして考慮する。

物理化学的性質

一部の物理化学的性質はすでに規制で要求されており、また多くの項目は化学式に基づいて *in silico* で推定できる。

有用な項目として、特定の条件下（例えば生体内）での物質の状態や挙動に関連する蒸気圧、融点、沸点、水溶性などのパラメーターや、ADME特性に関連する分子量、水溶性、オクタノール-水係数、消化管粘膜との反応性に関係する結合タイプや原子エネルギー状態や電荷に関するデータなどが挙げられる。

物理化学的性質を他のエビデンスと併せて分析することで、代謝物とテスト物質の類似度をより正確に見積もることが出来る。

分子構造類似性と毒性に寄与する官能基（毒性アラート）の解析

分子構造の類似性の評価では、化学クラスとサブクラスの共通性、類似した分子骨格、同じ数の炭素原子、主要置換基、構造フラグメント、拡張構造グループなどの共通性が含まれます (Schultz et al., 2015⁸)。

分子構造類似度の指数（例：タニモト指数やDice指数）に加えて、評価対象のエンドポイントに関連する毒性アラートの共通性を評価する。解析にはOECD QSARツールボックス⁹やToxtree¹⁰、米国EPA Chemical Assessment Clustering Engine (ChemACE)¹¹などのソフトウェアが利用出来る。

QSARsまたはその他のツールによる毒性構造（トキシコフォア）解析

農薬の毒性が、特定の化学構造（トキシコフォア）による場合がある。例えば、有機リン剤によるAChE阻害作用を示す剤は、特定のトキシコフォアを含む。親化合物と同じトキシコフォアを含む代謝物は、同じ作用機序により同じ毒性を有する可能性がある。

一部の代謝物は、代謝/分解の結果、親化合物とは異なるトキシコフォアを有したり、親化合物のトキシコフォアを失ったりする場合がある。親化合物と同じ既知のトキシコフォアを含まない代謝物は、親化合物とは定性的および定量的に異なる物質と判断する

⁶ OECD 2014. Guidance on Grouping of Chemicals, second edition Series on Testing and Assessment No. 194.

⁷ ECHA, 2017. Read-Across Assessment Framework (RAAF)

⁸ Schultz T.W. et. al., 2015 Regulatory Toxicology and Pharmacology, 72(3), 586-601.

⁹ <https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/oecd-qsar-toolbox.htm>

¹⁰ <https://toxtree.sourceforge.net/>

¹¹ <https://www.epa.gov/tsca-screening-tools/chemical-assessment-clustering-engine-chemace>

。

トキシコフォアの解析には、QSARソフトウェア（OECD QSARツールボックスなど）が利用出来る。

現時点では、Ames変異原性以外の毒性については、QSARのみで信頼出来る評価が出来るQSARモデルはないが、利用可能なQSARモデルの予測結果をリードアクロスのエビデンスの一部として用いることは可能である。

In vitro作用機序試験

毒性作用機序（MoAs）は、農薬と生物学的標的との相互作用に続く毒性効果に至る主要なステップである。確立された MoA の情報は、OECD Adverse Outcome Pathway Knowledge Base（AOP-KB）で見つけることが出来る。親化合物の毒性MoA が明らかな場合、代謝物も同じ MoA を有するかを*in vitro*メカニズム試験で評価出来る可能性がある。

*In vitro*メカニズム試験により、代謝物が親化合物と同じ MoA を有することが示された場合、代謝物の毒性は類似しており、定量的に比較出来る場合がある。一方、同じMoAの反応を示さない代謝物、または異なる作用機構を介して作用する代謝物は、親化合物とは質的および量的に異なると見なす。

代謝物の ADME

作物および/または家畜の残留物として検出された極性が高い代謝物は、哺乳動物への経口ばく露後にバイオアベイラビリティが低い（吸収率が低い）場合や、吸収された場合、構造的に類似した親化合物と比較してより迅速に排泄される場合がある。

親化合物と構造が類似する代謝物について ADME 研究からバイオアベイラビリティが低く、排泄が速いことが示された場合、親化合物と定性的に類似しており、さらに毒性情報がない場合、親化合物より毒性は強くはないと判断される。

上記のうち評価において考慮した全てのエビデンスを別表2に示す重みに従い、統合的に評価してリードアクロスもしくはグルーピングの妥当性をエキスパートジャッジする。ただし、評価対象のエンドポイントによって重要となるエビデンスの項目は異なる。

別表2 ウェイトオブエビデンス評価における重み

	エビデンス	定性的評価における重み	定量的評価における重み
	物理化学的性質 (実測値)	+	+
<i>In silico</i>			
	物理化学的性質 (計算値)	+	+

	分子構造類似性	++	++
	トキシコフォア解析	++	++
<i>In vitro</i>			
	メカニズム試験	+++	+
<i>In vivo</i>			
	代謝物のADME試験	+++	+++

別添Ⅶ TTC評価

TTC評価を適用する場合、当該残留物の消費者の食事から摂取される推定摂取量（ばく露推定値）と対応するTTC値（別表3）との比較を行う。

変異原性や発がん性が予測される残留物は、遺伝毒性TTC値との比較を行う。変異原性や発がん性の懸念が無いと判断された残留物について一般毒性プロファイルの評価に十分なデータがない場合は、AChE阻害作用のある有機リン系、カーバメート系農薬の代謝物でAChE阻害作用を有する可能性がある場合は、AChE阻害物質のTTC値、それ以外の場合は、一般毒性のTTC値（Cramer Class III TTC値もしくはCramer構造分類を行い該当するCramer ClassのTTC値を適用する）と比較する。

別表3 慢性リスク評価のための各種TTC値¹²

Classification	Chronic TTC value ($\mu\text{g/kg}$ 体重/day)
遺伝毒性TTC：潜在的なDNA反応性物質または発がん性物質	0.0025 ¹³
一般毒性TTC	
AChE阻害物質（有機リン、カーバメート）	0.3 ¹⁴
Cramer Class III	1.5 ¹⁵
Cramer Class II	9.0 ¹⁵
Cramer Class I	30 ¹⁵

これらのTTC値はいずれも慢性ばく露の参照値である。慢性ばく露のTTC評価を行った残留物については、急性の有害作用が懸念されないことを示すデータがある場合を除き、急性ばく露についてもTTC評価も行うことが望ましい。慢性ばく露にCramer Class II, III TTC値を適用した残留物の急性ばく露評価には、5 $\mu\text{g/kg bw/d}$ の急性TTC相当値¹⁶を使用する。一方、慢性ばく露評価において遺伝毒性TTC値やAChE阻害物質のTTC値、Cramer Class IのTTC値を適用した残留物の急性ばく露評価においては、急性摂取量を該当する慢性TTC値と比較する。

推定摂取量が対応するTTC値を超過する場合、リスク評価のためにさらなるデータの作成またはさらなる精緻化が行われない限り、その農薬の承認や認可は不可能である。

推定摂取量が対応するTTC値を超過しない場合、それ以上の検討は必要ない。TTC評価を適用した代謝物には、確定的なHBGVがないため、ばく露評価対象物質には含まない。ただし、TTC評価で使用するばく露推定値は評価時に考慮される農薬の用途に依存し、追加の用途の評価の際には、改めてTTC評価が必要となる。

¹² EFSA Journal, 2012: 10 (7), 2750.

¹³ Kroes R, et.al., 2004. Food and Chemical Toxicology, 42, 65-83.

¹⁴ Kroes R, et.al., 2000. Food and Chemical Toxicology, 38, 255-312.

¹⁵ Munro IC, et.al., 1996. Food and Chemical Toxicology, 34, 829-867.

¹⁶ EFSA Journal 2012;10(07):2799

TTC評価では、残留物の数や毒性情報の入手可能性により、多数の評価が必要になる場合がある。複数の食品において代謝物のプロファイルが類似している場合、最も多く存在する残留物のばく露推定値がTTC値以下であれば、他の残留物のばく露推定値もTTC値以下であると示唆される。

TTC評価を行うためには、ばく露と毒性の専門家が評価プロセス全体で協力することが不可欠である。

参考資料

OECDガイダンスに基づく農薬残留物評価指針案を採用する場合の検討事項

今回提案した農薬残留物評価指針案（以下、指針案）の大きな特徴は、

- ① 数値基準を明確に示した農薬残留物の選抜
- ② 農薬残留物のばく露量、摂取量を十分に加味した評価
- ③ 農薬残留物の毒性を *in silico* (QSAR、リードアクロス) で評価
- ④ 微量をふくめた全ての農薬残留物に Ames 変異原性（試験実施や QSAR 予測）評価の導入を検討

である。以下、我が国の食品安全委員会における現状¹⁷と新たな指針案を採用するにあたり検討が必要と思われる事項を以下に示す。

①について、我が国では植物代謝試験や家畜代謝試験において、総残留放射能が10%T_{RR}を超え、相当量検出される代謝物等がばく露評価対象物質の候補になりえる。指針案では、総残留放射能のみならず残留濃度についても具体的数値を示した上で選抜し、毒性評価のステップに進む。また、ラットで検出される代謝物のばく露評価対象物質の候補からの除外について、我が国では数値基準が無い。しかし指針案では、尿等に吸収量の10%以上の代謝物が検出された場合、ラットの主要代謝物と評価し、その代謝物は投与された親化合物の毒性データによって「カバーされた」と判断できるようにしている。

②について、我が国では農薬残留物等の摂取量の推定はリスク管理機関が行っている。しかし、指針案では、農薬残留物等の摂取量と毒性を加味してばく露評価対象物質を決定する。さらに、少量残留物に分類された物質の毒性評価における取り扱い、TTC評価を行う際には農薬残留物等の摂取量は必須の情報であり、速やかに農薬残留物等の摂取量の推定がなされないと審議の中断が起こりうる。したがって、農薬残留物の評価においては、リスク評価機関とリスク管理機関が担う範囲の明確化やきめ細かい連携等が必要になる。

③について、我が国における農薬及び農薬残留物の毒性評価では、*in silico*評価技術は活用されていない。しかし、農薬登録申請者の負担や、近年の動物実験に係わる国際的な倫理動向の変化を考慮すると、実験を伴う毒性試験データの要求は可能な限り抑える必要がある。そこで指針案では、可能な限り *in silico* 評価を導入する指針案を構築したが、申請者も評価者も評価に必要な *in silico* 予測と評価のノウハウの蓄積がなされていないのが現状である。特にQSAR評価においては、「食品健康影響評価において(Q)SA

¹⁷ 食品安全委員会「農薬の食品健康影響評価におけるばく露評価対象物質に関する考え方」 2017年6月

Rを活用して変異原性を評価する場合の手引き」¹⁸を参考に評価を実施していくことになると思われるが、リードアクロスやグルーピング評価について、我が国では指針等が作成されておらず、OECD等の指針においても明確な判断基準は示されていない。

④について、実試験情報が得られない残留物では③と同様にQSAR評価が必要であり、同様の課題が存在する。加えて、Ames試験情報がそろわないすべての残留物について、QSARに必要となる構造情報を一定のルールに基づいて整備する必要があるが、ノウハウが蓄積されていない現状である。

その他、評価に用いる資料について、今回の指針案では、OECDガイダンスと合わせ後作物代謝試験を評価資料に含めているが、我が国の農薬テストガイドラインでは後作物代謝試験を要求していない。このように、農薬残留物の評価にどの試験結果を用いるかを決定するには、農薬テストガイドラインの改正も視野に入れる必要がある。

¹⁸ 食品安全委員会「食品健康影響評価において(Q)SARを活用して変異原性を評価する場合の手引き」 2021年2月

Ⅲ 本研究を基にした論文等

1 本研究を基にした論文と掲載された雑誌名のリスト

特になし

2 本研究を基にした学会発表の実績

○古濱彩子, 清家伸康, 小野敦:農薬およびその代謝物等に対する変異原性Amesインシリコ評価. 第48回構造活性相関シンポジウム (2020. Dec, Online)

○古濱彩子, 清家伸康, 小野敦:農薬およびその代謝物等に対する変異原性Amesインシリコ評価 (その2) 第8回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム (2022. Aug, Tokyo)

○A. Ono, A. Furuhashi and N. Seike :Evaluation of *in silico* method for Ames mutagenicity of pesticides and their metabolites. *IUTOX XVIth International Congress of Toxicology* (2022. Sep., Maastricht, Netherlands)

3 特許権等の出願・申請等の状況

特になし

4 プログラムの著作物及びデータベースの著作物

特になし

5 その他 (各種受賞、プレスリリース等)

特になし

Ⅳ 研究開始時に申告した達成目標及び研究全体の自己評価

1 達成目標の自己評価

達成目標	評価結果	自己評価コメント
(1) 試験結果の得られていない農薬代謝物の遺伝毒性のインシリコによる評価スキームの構築と提案	5	本研究では、EFSAやJMPR評価書もとにインシリコ評価が適用された事例について調査を行うとともに、実際にインシリコ評価を実施して我が国で実施する際の課題等の検討を行い、検討結果をもとに我が国においてインシリコ評価を行う際に検討すべき事項を評価指針案とともに提案した。
(2) 暴露評価対象物質やADIやARfD設定対象の検討対象となる代謝物の条件の提案	5	本研究では、EFSAの評価ガイダンスやJMPRにおける暴露評価対象物質の考え方について整理を行うとともに評価事例の調査を行い、それらの情報とOECDガイダンス改訂における議論をもとにして我が国における評価指針案における条件を提案した。
(3) ADIやARfD設定対象となった物質の評価に必要となる試験や情報の提案	5	本研究では、EFSAやJMPRにおける評価事例の解析により評価に必要な情報や評価の進め

		方について検討を行うとともに、それらの知見とOECDガイダンス案をもとに評価指針案において評価に必要となる試験や情報について提案した。
(4) 試験データが限られている代謝物の安全性評価に適応可能な評価手法と適用上の留意点の提案	5	本研究班では、EFSAやJMPRの評価書をもとに代謝物の安全性評価に適用された評価手法の解析を実施し、得られた知見とOECDガイダンス案における評価スキームをもとに我が国における評価手法と留意点について提案した。
(5) 上記をもとにした食品安全委員会における農薬代謝物の安全性評価において国際的な動向に立脚した新たなスキームの構築と提案	5	上記(1)～(4)の提案を総括することにより国際動向に立脚した我が国における農薬代謝物の安全性評価スキームを構築して指針案として提案した。

注) 評価結果欄は「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点。

2 研究全体の自己評価

項 目	評価結果	自己評価コメント
(1) 研究目標の達成度	4	研究内容は、概ね研究計画に従って進んだが、本研究班で提案する評価スキームの基礎となるOECDガイダンス改訂案の完成が予定より大幅に遅れたため、研究期間を当初の予定より延長した。研究期間中にOECDガイダンス改訂案は最終化に至らなかったものの、本研究の目的である評価指針案については、ワーキンググループにおける内部レビュー用ドラフトをもとに検討して提案を行った。
(2) 研究成果の有用性	5	本研究で提案する農薬代謝物の評価指針案は、今後、我が国で農薬の再評価が本格化するにあたり特に代謝物の評価に最新の評価手法を適用し、国際整合性のとれた評価を実施するために有用な指針となる。
総合コメント 本研究で提案した農薬代謝物の評価指針案は、最新のOECDガイダンスに従い、我が国の農薬リスク評価における代謝物の評価を国際整合性のとれたものとする指針として非常に有用である。		

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点。

この報告書は、食品安全委員会の委託研究事業の成果について取りまとめたものです。 本報告書で述べられている見解及び結論は研究者個人のものであり、食品安全委員会としての見解を示すものではありません。全ての権利は、食品安全委員会に帰属します。
--

(別添1)

研究成果の概要（和文）

本研究班では、農薬代謝物の安全性評価において、近年、海外評価機関等で取り入れられている新たな評価手法を適用した我が国における新たな農薬代謝物の安全性評価の考え方を提案することを目的とした研究を行った。海外評価機関としてEFSAおよびJMPRにおける農薬代謝物の安全性評価手法の調査を行うとともに各評価機関の評価書をもとに*in silico*手法やTTC評価が適用された評価事例について調査を行い、我が国における評価との違いについて解析を行った。更に*in silico*評価を実施し、適用について検討を行った。一方、OECD Residue Definitionガイダンス改訂の議論に参画し情報収集を行った。最終的に、OECDガイダンス改訂版ドラフトをもとに農薬残留物評価指針案（以下「指針案」。添付資料）を作成した。併せて、指針案を我が国の評価に適用するにあたって検討もしくは注意すべき事項を参考資料として示した。指針案と現在の我が国における評価との主な違いは、毒性評価の対象とする代謝物の選択基準やラットで検出された代謝物の除外基準の明確化、QSARやリードアクロスによる*in silico*評価やTTC評価の適用などがあげられる。指針案の適用し、我が国においても国際動向に立脚した最新のリスク評価手法を適用したリスク評価を実施することが重要である。

(別添2)

研究成果の概要 (英文)

Title of research project	Development of novel risk assessment strategy for pesticide metabolites in consideration with global trends.
Research project number	1906
Research period	FY 2019 - 2022
Name of principal research investigator (PI)	Atsushi Ono

Abstract/Summary

In this study, we conducted research with the aim of proposing a new approach to the risk assessment of pesticide metabolites in Japan, applying a recent risk assessment method that has been adopted by overseas risk assessment agencies other than Japan. We investigated the risk assessment scheme for pesticide metabolites in EFSA and JMPR, international evaluation agencies, and analyzed the differences in evaluation schemes between these agencies and Japan and conducted analysis of actual cases where *in silico* methods and/or TTC were applied based on published evaluation reports by these agencies. In addition, particularly regarding *in silico* methods, we evaluated the metabolites of some pesticides based on their chemical structures and discussed the applicability of *in silico* methods.

Meanwhile, we participated in the discussions on the revision of the OECD Residue Definition Guidance to gather related information. Finally, we developed the draft of the Pesticide Residue Evaluation Guideline in Japan, based on the draft of the revised OECD guidance. Additionally, we provided notes that highlighting considerations or points to be aware of when applying our proposed Guideline in Japan.

The differences between our proposed Guideline and the current evaluation scheme in Japan include the selection criteria for metabolites to be subjected to toxicity evaluation, clarification of exclusion criteria for metabolites detected in rats, and the application of *in silico* methods, such as QSAR, read-across, and TTC evaluation.

By applying our proposed Guideline, it is crucial for Japan to conduct risk assessments using the latest internationally recognized risk assessment methods, in consideration with global trends.

This report provides outcome of the captioned research programme funded by Food Safety Commission Japan (FSCJ). This is not a formal publication of FSCJ and is neither for sale nor for use in conjunction with commercial purpose.

All rights are reserved by FSCJ. The view expressed in this report does not imply any opinion on the part of FSCJ.

1. List of papers published on the basis of this research

none

2. List of presentations based on this research

○A. Furuhami, N. Seike and A. Ono : *in silico* evaluation of Ames mutagenicity for pesticides and their metabolites. *The 48th Symposium on Structure-Activity Relationships* (2020. Dec, Online)

○A. Furuhami, N. Seike and A. Ono : *in silico* evaluation of Ames mutagenicity for pesticides and their metabolites (2nd report). *8th Regulatory Science Forum for Young Leaders of next generation* (2022. Aug, Tokyo)

○A. Ono, A. Furuhami and N. Seike :Evaluation of *in silico* method for Ames mutagenicity of pesticides and their metabolites. *IUTOX XVIth International Congress of Toxicology* (2022. Sep., Maastricht, Netherlands)

3. The number and summary of patents and patent applications

none

4. Others (awards, press releases, software and database construction)

none