

## 研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	日本における農薬等の急性参照用量設定のためのガイダンス作成に関する研究（課題番号：1105） （研究期間：平成23年度～平成24年度）
主任研究者名	研究者名：吉田 緑 所属機関：国立医薬品食品衛生研究所

日本における農薬等の急性参照用量 (ARfD) 設定のガイダンス案を作成するため、過去 8 年間に食品安全委員会で評価し公開された 201 農薬の評価書を用いて ARfD の設定のシミュレーションを実施し、その結果をもとに基本的指針および注意すべき点をまとめた。設定のための基本的概念は Solecki ら (2005) の報告にしたがった。また数剤の農薬について単回投与試験を実施し、有用性について検討した。

このシミュレーションの結果、201 農薬中 90% の農薬について ARfD を設定することができた。ARfD 設定根拠試験は、多い順に発生毒性試験、急性神経毒性試験、薬理試験であった。約 30% の農薬について ARfD 設定の必要がないと評価した。評価にあたり評価書に記載された毒性が単回暴露・反復毒性のいずれによる影響なのか区別が難しいケースがあった。14 農薬については十分なデータがないために ARfD を設定できなかった。単回投与実験の結果より、メトヘモグロビンは ARfD のエンドポイントとして有用なことが確認されたほか、非妊娠動物と妊娠動物あるいは溶媒による毒性発現の違いに注意すべきことが明らかとなった。現在の評価書が長期暴露影響である 1 日摂取許容量 (ADI) 設定を目的として記述されたものであることから、改良点として評価書の記載を ARfD 設定も考慮したものに改善する必要がある。

さらに上記の 201 農薬の ADI および ARfD を構造別、作用機序別に解析した結果、構造・作用により ADI および ARfD の値に特徴が認められた。

今回実施したシミュレーションの結果および単回投与毒性試験結果より、作成した以下の基本指針は、日本における農薬の ARfD 設定の基本指針になりうると考えられた。

- (1) ヒトが農薬等を 24 時間以内に経口摂取した場合の急性影響の指標とする。
- (2) ARfD の評価における急性影響とは単回投与で発現する毒性を指す。
- (3) ARfD の評価は全ての農薬を対象とする。
- (4) カットオフ値以上であれば ARfD 設定の必要はないと判定すべきである。
- (5) 基本的には全ての人を対象とする。
- (6) 得られるすべての試験のデータから、ARfD の設定根拠となる試験を選択し、そのうち、最も低い無毒性量に基づき ARfD を設定すべきである。
- (7) 発達期における臨界期に留意すべきである。
- (8) 安全係数は慢性暴露影響指標である一日摂取許容量と同様とする。
- (9) ヒトのデータがある場合にはそのデータを重視すべきである。

## 研究成果報告書（本体）

研究課題名	日本における農薬等の急性参照用量設定のためのガイダンス作成に関する研究（研究期間：平成23年度～平成24年度）
主任研究者名	所属：吉田 緑 氏名：国立医薬品食品衛生研究所（研究課題番号：1105）

### I 研究の期間及び研究目標等

1 研究期間 平成23年度～平成24年度（2年間）

#### 2 研究目的

本研究は、農薬動物薬等（以下農薬等）の短期間且つ大量暴露に起因するヒト急性健康影響を評価する日本における新しい基準として、急性参照用量（Acute Reference Dose, ARfD）を設定するための評価手順を記載したガイダンスを作成し、公表することを目的とする。

#### 3 研究体制

研究項目名	個別課題名	研究担当者名（所属機関名）
農薬における急性参照用量の設定のシミュレーションと問題点	農薬における急性参照用量の設定のシミュレーションと問題点	吉田緑（国立衛研） 研究協力者 井上薫、高橋美和（国立衛研） 松本清司（信州大）、 代田真理子（麻布大）、 小野敦（国立衛研）
	単回投与毒性試験の実施および評価（一般毒性を中心として）	吉田緑（国立衛研）、 小野敦（国立衛研） 研究協力者 井上薫、高橋美和（国立衛研）
単回投与毒性試験の実施と評価	単回投与毒性試験の実施および評価（一般毒性・免疫・血液毒性を中心として）	松本清司（信州大）
	単回投与毒性試験の実施および評価（一般毒性・生殖発生毒性を中心として）	代田真理子（麻布大）
	単回投与毒性試験の評価の総括	吉田緑（国立衛研）

急性参照用量設定のためのガイダンスの作成	急性参照用量設定のためのガイダンスの作成	吉田緑（国立衛研）、 松本清司（信州大）、 代田真理子（麻布大）、 小野敦(国立衛研)、 研究協力者 井上薫、高橋美和（国立衛研）
----------------------	----------------------	--

#### 4 倫理面への配慮について

本研究では、海外および日本から収集可能な最大限の情報を基におこない、動物を用いた単回投与毒性試験は最小限となるように努めた。本研究における実験動物の使用は、動物の愛護及び管理に関する法律(昭和48年法律第105号、平成17年法律第68号一部改正)等、関連法令などを遵守して行った。主任研究者は、国立医薬品食品衛生研究所 動物実験の適正な実施に関する規程および分担研究者も所属する機関の動物実験委員会の規程を遵守し承認された実験を行った。

## II 研究内容及び成果等

### 1 研究内容及び方法

#### (1) 研究項目名：急性参照用量設定のためのガイダンスの作成

(研究担当者名：吉田緑（国立衛研）、松本清司（信州大）、代田真理子（麻布大）、小野敦（国立衛研）、研究協力者（井上薫、高橋美和）（国立衛研）)

##### 1) 個別課題名：急性参照用量設定のためのガイダンスの作成

平成23年度に行った食品安全委員会の農薬公表データから得られた急性参照用量のシミュレーションの結果および単回投与毒性試験から得られた急性参照用量の実験データを総合的に解析し、Solecki et al. (2005) の考えを参考とした日本における急性参照用量設定のための基本的な考え方を決定しガイダンスを作成した。

#### (2) 単回投与毒性試験の実施と評価

##### 1) 個別課題 単回投与毒性試験の評価の総括

(研究担当者名：吉田緑（国立衛研）)

シミュレーションにおいて生殖発生毒性で急性期影響が明らかでなかった農薬のうち入手可能な農薬について、単回毒性試験を実施し評価を行った。動物実験は大方平成23年度に終了し、解析を平成24年度に実施した。

##### 2) 個別課題 単回投与毒性試験の実施および評価（一般毒性を中心として）

(研究担当者名：吉田緑（国立衛研）、小野敦（国立衛研）、研究協力者（井上薫、高橋美和）（国立衛研）)

- 急性経口毒性が低く(雌で356 mg/kg体重(信頼限界 166から765 mg/kg体重))ARf

Dが設定できなかったオリサスロビンを選択した。

- ヒアリングにて要請のあったグリホサートを選択した。
- これらの剤についてラットを用いた単回投与毒性試験を実施した。投与量はARfD設定のカットオフ値である500 mg/kg体重を最高用量とした。

### 3) 個別課題 単回投与毒性試験の実施および評価(一般毒性・免疫毒性を中心として) (研究担当者名：松本清司(信州大))

- 農薬評価書等(約200剤)について血液毒性の有無について検索したところ、MetHb及びハイツ小体の増加は7%の農薬に、貧血等の血液系への影響は39%に認められた。
- 上記の農薬についてARfD設定のシミュレーションを行ったところ、MetHbが設定根拠となったのは2剤であった。
- MetHb増加が認められる農薬から、ピコリナフェン、メフェナセツ、インドキサカルブについて単回経口投与試験を行い、主にMetHb形成について経時的に観察した。ピコリナフェンについては、血液形態学的及び臨床化学的検査を実施し、陽性対照としてアニリン系のフェニルヒドラジン(PHZ)を用いた。

### 4) 個別課題 単回投与毒性試験の実施および評価(一般毒性・生殖発生毒性を中心として) (研究担当者名：代田真理子(麻布大))

- 発生毒性試験で溶血性貧血が認められているピコリナフェンならびに非妊娠動物より顕著に低い用量で母毒性が認められているインドキサカルブについて単回投与毒性試験を行い急性毒性への感受性を知り、また、このような影響を及ぼす剤の母動物への単回投与が妊娠の維持並びに胎児の発育に及ぼす影響を知ることは意義深いと考えられるので、平成23年度に、入手可能であったインドキサカルブMPをモデル化合物とした。
- 妊娠ラットにおける単回投与毒性試験を行った。投与用量は発生毒性試験で死亡が認められた100および500 mg/kgとし、投与時期は妊娠ラットに生理的貧血が認められる妊娠14日とした。また、同時に9週齢の非妊娠雌ラットにも500 mg/kgを単回経口投与し急性毒性試験を行った。これらの動物は、投与24時間後に採血して剖検し、器官重量を測定した。また、妊娠20日に帝王切開を行い、着床状態、胎児の発育を観察し、生存胎児の骨格検査を行った。

## 2 研究成果、考察、今後の課題

### 結果

#### (1) 研究項目名：急性参照用量設定のためのガイダンスの作成

(研究担当者名：吉田緑(国立衛研)、松本清司(信州大)、代田真理子、小野敦(国立衛研)、研究協力者(井上薫、高橋美和)(国立衛研))

#### 1) 個別課題名：急性参照用量設定のためのガイダンスの作成

ガイドンス作成のための班会議を5月と10月の2回開催した。またガイドンス作成および関連の発表に関する議論をメールベースで断続的に行った。10月に開催した第2回の班会議にて、日本における農薬等の急性参照用量(Acute reference dose, ARfD)設定のガイドンスである「日本における農薬等の急性参照用量(Acute reference dose, ARfD)設定の基本的考え方」の草稿を作成した。

作成したガイドンスに関するシンポジウムを第39回日本毒性学会学術年会の学会等で開催し、分担研究者全員が発表し、主任が座長を務めた。また主任は昨年度実施したテーマについて同学術年会でポスター発表を行った。またガイドンス案を平成24年12月に開催された日本農薬学会レギュラトリーサイエンス部会で発表した。

本ガイドンス案は、題名を「日本における農薬等の急性参照用量(Acute reference dose, ARfD)設定の基本的考え方」として、日本食品衛生学雑誌に投稿した。

## (2) 単回投与毒性試験の実施と評価

### 1) 個別課題 単回投与毒性試験の評価の総括

(研究担当者名：吉田緑(国立衛研))

個々の単回投与毒性試験の結果は以下に記した。

### 2) 個別課題 単回投与毒性試験の実施および評価(一般毒性を中心として)

(研究担当者名：吉田緑(国立衛研)、小野敦(国立衛研)、研究協力者(井上薫、高橋美和)(国立衛研))

- 投与直後からの症状観察だけでなく、投与2週間後までの症状観察において両剤とも異常は認められなかった。
- 体重・摂餌量ともに、異常は認められなかった。
- 投与1日目および14日目に実施した血液検査・血液生化学的検査において投与による異常は認められなかった。
- 投与1日目および14日目に実施した病理組織学的検査において、投与による異常は認められなかった。

### 3) 個別課題 単回投与毒性試験の実施および評価(一般毒性・免疫毒性を中心として)

(研究担当者名：松本清司(信州大))

- ピコリナフェンでは、単回投与後6時間にMetHbが増加し、24時間後に回復した。このMetHbの増加は2及び3日間の連続投与で増強した。血液検査ではRBC、Hb、MCV等の軽度減少が、臨床化学的検査では、肝機能の指標であるALT、ASTの増加が見られた。
- メフェナセットでは、投与後1時間よりMetHbの増加が認められ、24時間後にピークとなり、3日後に回復した。2日後以降でハイツ小体が認められた。インドキ

サカルブはピコリナフェンと同様に、投与後6時間にMetHbの増加が見られ、24時間後に回復した。連投によりMetHbの増加は増強した。

- 陽性対照のPHZでは、投与後30分でMetHbの増加が見られ、2日後に回復した。投与後30分の値は18%（測定値）であり、臨床症状として明らかなチアノーゼが観察された。血液学的には典型的な溶血性貧血の像を示した。増加する網状赤血球については、RNAを高濃度含むHRFが貧血の初期から増加するのに対して、低濃度のLRFが減少した。

#### 4) 個別課題 単回投与毒性試験の実施および評価（一般毒性・生殖発生毒性を中心として）（研究担当者名：代田真理子（麻布大））

- 一般状態、体重推移および摂餌量に急性毒性変化は認められなかった。
- 投与後24時間の剖検では肉眼観察において異常は認められなかった。脾臓重量の比体重値を妊娠および非妊娠の対照群間で比較すると差は認められなかったが、用量間で比較すると、統計学的有意差は認められなかったが、妊娠動物では用量に依存した増加が認められた。
- 血液検査でも統計学的有意差は認められていないが、赤血球数、ヘモグロビン濃度ならびに網状赤血球数は妊娠動物において用量に依存して低下した。このような変化は非妊娠動物には認められなかった。
- 帝王切開では胎児の着床ならびに生存に影響は認められなかった。骨格検査では骨格異常は観察されず、投与に起因すると考えられる骨格変異も認められなかった。骨化仙尾椎数は用量の増加に伴いやや減少したが有意差はなく投与の影響とは認められなかった。

#### 考察

##### (1) 急性参照用量設定のためのガイダンスの作成

（研究担当者名：吉田緑（国立衛研）、松本清司（信州大）、代田真理子（麻布大）、小野敦（国立衛研）、研究協力者（井上薫、高橋美和）（国立衛研））

##### 1) 急性参照用量設定のためのガイダンスの作成

- 日本における急性影響評価のためのARFD設定のためのガイダンスの中には、設定の背景、設定の必要性、設定の基本原則、設定に際しての注意事項、設定(エンドポイントを含む)等を盛り込むことができた。またカットオフ値や不確実係数等諸因子の考え方も明確に示すことができた。投稿については、日本におけるガイダンスなので日本語で投稿すべきであると結論した。
- 急性参照用量設定は、日本における新しいリスク評価基準であるため毒性学など関連分野の研究者への認識、浸透を図るため、単独発表だけでなく、シンポジウムで多くの聴衆にアピールすることができた。
- ガイダンス案をPubMedに掲載されている毒性学の科学誌に日本語で投稿することができた。

- 急性参照用量設定は、日本における新しいリスク評価基準であるため毒性学など関連分野の研究者への認識、浸透を図るため、単独発表だけでなく、シンポジウムなどで効率的な周知を図った。
- 24年12月の日本農薬学会レギュラトリーサイエンスシンポジウムおよび25年3月の米国トキシコロジー学会で発表し、国内外の参加者より、多くの質問をうけることができた。

## (2) 単回投与毒性試験の実施と評価

### 1) 個別課題 単回投与毒性試験の評価の総括（研究担当者名：吉田緑（国立衛研））

個別課題での検査結果より、単回投与毒性試験を実施することにより詳細な観察および血液検査や病理検査項目を追加することができ、急性経口影響を容易に評価することができた。しかし、これらの多くは、通常の毒性試験での記載をより詳細にすること、また投与開始後の観察を詳細に記載することで多くはカバーできると考えられた。投与翌日の検査を追加することにより、得られる情報は多いと考えられた。特にイヌは繰り返しの採血が可能のため推奨される。急性影響の評価に際しては、また、妊娠動物について非妊娠時と異なることから、生理状況を把握する必要があると考えられた。

### 2) 個別課題 単回投与毒性試験の実施および評価（一般毒性を中心として）

（研究担当者名：吉田緑（国立衛研）、小野敦（国立衛研）、研究協力者（井上薫、高橋美和）（国立衛研））

オリサストロビンおよびグリホサートともに、500mg/kg 体重以下での経口による急性影響は認められなかった。オリサストロビンにおける報告データとの違いは溶媒による可能性が一つとして挙げられた。

### 3) 個別課題 単回投与毒性試験の実施および評価（一般毒性・免疫毒性を中心として）

（研究担当者名：松本清司（信州大））

今回の試験において MetHb 増加および貧血が認められたが、いずれも回復像を示した。しかし、MetHb の増加は血球の還元能の枯渇を示唆する変化であること、幼児で感受性が高いことから、ARfD の設定に重要な指標になると考えられる。なお、溶血性貧血が指標になるかどうかは今後の更なる検討を要すると考えられた。

MetHb が増加する場合、続いてハインツ小体を認める場合のあることが知られている。今回の実験では、MetHb の増加が著明であったメフェナセットと PHZ において投与後 2 日以降でハインツ小体が認められた。ハインツ小体は微量の血液で簡単に確認できることから、血液毒性が疑われる場合の追加の測定項目として重要と考えられた。

一般に、網状赤血球については血球中 RNA 量の測定が可能で 3 つに分類した結果 (LRF, MRF, HRF) を容易に得られるようになっている。今回、貧血の経時変動が LRF

の減少と HRF の増加に反映されることが示された。更にデータの蓄積を要するが、貧血の新たな指標になる可能性が示唆された。

シミュレーションにより MetHb が設定根拠になったのは 2 剤であったが、MetHb やハイツ小体を認める農薬は合計 11 剤存在していた。このことは、単回投与試験が追加して実施されれば、ARfD 設定の指標候補になる可能性を示唆していると思われる。

今後、MetHb 関連項目の検査を必要に応じて現行の急性毒性試験に組み入れる、更に新規に単回投与試験を追加できればより実効的な ARfD の設定が可能になると考えられた。

#### 4) 個別課題 単回投与毒性試験の実施および評価（一般毒性・生殖発生毒性を中心として）（研究担当者名：代田真理子（麻布大））

インドキサカルブ MP の単回投与毒性試験において、血液学的パラメーターに軽微ではあるが、用量に依存して、溶血性貧血を示唆する変化が認められた。非妊娠動物にはこのような変化は認められなかったことから、妊娠動物に固有の変化であると考えられる。

Honda らは、妊娠ラットについて血液検査を行い、妊娠中期から妊娠の進行に伴い生理的貧血が進行することを示している。このような時期の造血における予備能は不明であるが、今回の単回投与後の血液学的パラメーターの動向をみると、造血の予備能は非妊娠時より低いことが伺われ、血液毒性物質による急性期影響は、非妊娠動物におけるそれよりも現れ易い可能性が示唆された。

インドキサカルブ MP のラットにおける発生毒性試験では、100 mg/kg 以上の用量により、生存胎児数の減少および胎児体重の低下が報告されているが、単回投与試験では胎児に影響は認められなかった。単回投与試験では母動物に顕著な毒性は認められていないことから、血液パラメーターの軽微な変動では胎児に影響を及ぼさないと考えられた。

以上のように、妊娠中期の動物は非妊娠動物と比べて血液毒性を有する農薬に感受性が高く、単回投与でも血液パラメーターに軽微ではあるが急性影響が認められた。妊娠期は胎児の発育に伴い著しい生理学的変化を遂げる時期であり、血液毒性以外にも妊娠期固有の生理的变化に基づく感受性の増加が考えられる。従って、急性影響の評価に際しては、妊娠動物の生理状況を把握する必要があると考えられる。特に、非妊娠動物における無毒性量と比べて妊娠母動物における無毒性量が著しく低い場合は、妊娠期固有の急性影響の可能性も考慮する必要があると考えられた。

### 結論

#### (1) 急性参照用量設定のためのガイダンスの作成

日本における急性影響評価のための ARfD 設定のためのガイダンス案を作成することができた。



## (2) 単回投与毒性試験の実施と評価

単回投与毒性試験は、ARfD 設定に有用であり、投与翌日の検査を追加することにより、得られる情報は多いと考えられた。特にイヌは繰り返しの採血が可能のため推奨される。急性影響の評価に際しては、また、妊娠動物について非妊娠時と異なることから、生理状況を把握する必要があると考えられた。

## III 本研究を基に発表した論文等

- 1 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト
  - 1) Midori Yoshida, Daisetsu Suzuki, Kiyoshi Matsumoto, Mariko Shirota, Kaoru Inoue, Miwa Takahashi, Takeshi Morita, Atsushi Ono (2013) Simulation of acute reference dose (ARfD) settings for pesticides in Japan. Journal of Toxicologic Sciences 38 (2): 205-214, 2013.
  - 2) 吉田緑、鈴木大節、松本清司、代田真理子、井上薫、高橋美和、森田健、小野敦、資料 日本における農薬等の急性参照用量(Acute reference dose, ARfD)設定の基本的考え方. 食品衛生学雑誌 54(4): 331-3314, 2013
- 2 本研究を基にした学会発表の実績
  - 1) 小野敦、代田真理子、松本清司 (座長 吉田緑) シンポジウム「日本における農薬等の急性期影響評価の必要性」平成24年度第39回毒性学会総会および学術年会(仙台 2012年7月)
  - 2) 吉田緑 ポスター発表「ARfD設定のガイダンスおよびシミュレーション」平成24年度第39回毒性学会総会および学術年会(仙台 2012年7月)
  - 3) 吉田緑. 急性暴露評価の必要性  
ー急性参照用量 (ARfD) の考え方・設定方法と課題ー平成24年度 日本農薬学会レギュラーサイエンス部会(千葉 2012年12月)
  - 4) 吉田緑 Poster presentation: Simulation of acute reference dose (ARfD) settings for pesticides in Japan (2013年3月 米国毒性学会 San Antonio, Texas)
- 3 特許及び特許出願の数と概要  
なし
- 4 その他 (各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等)  
なし

#### IV 主任研究者による研究全体の自己評価

項目	評価結果	評価コメント
1 研究の妥当性	5	短期間で急性参照用量設定に使用できるガイダンス案を作成することができ、妥当な研究内容であると考えます。
2 研究目標の達成度	4	単回投与毒性試験が約半年遅れたため、4としたが、単回投与毒性試験や投与翌日の検査の有用性を確認できた。
3 研究成果の有用性	5	直ちに日本で急性参照用量設定に使用できるガイダンス案を作成することができた。
合計	14	
総合コメント		

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で記述する。