

フルジオキシニルの食品健康影響評価に係る補足資料の提出について
(事業者提出資料)

補足資料要求 1

食品添加物としてフルジオキシニルがヒトに摂取された場合において耐性菌が選択されるリスクに関し、特に次の事項について調査・整理した上で、フルジオキシニルの暴露量及び体内動態も踏まえて考察すること。

- (1) 腸内細菌叢への影響の観点から、真菌以外の微生物（細菌等）に対するフルジオキシニルの作用の有無について調査すること。
- (2) ヒト真菌症に係る真菌、特にアスペルギルス属、カンジダ属、クリプトコッカス属等の真菌に対するフルジオキシニルの作用の有無とその程度（最小発育阻止濃度（MIC）等）を調査すること。なお、フルジオキシニルのリード化合物であるピロールニトリンに関する情報も参考にできる。
- (3) 細菌間でみられるような耐性の伝達が、真菌間においては起きないのかどうか調査すること。

<回答>

フルジオキシニルは、ピロールニトリンが有するフェニルピロール骨格を有する化合物群の合成探索から見出され、農業等における植物病害防除のために最適化された化合物である。ピロールニトリンは土中生息菌 *Pseudomonas pyrocinia* から発見された抗生物質で、抗真菌作用を有する。ピロールニトリンは現在医薬品としても使用されており、主に白癬菌皮膚感染症（水虫症など）の治療に外用の一般医薬品として広く使用されている。一方、フルジオキシニルの使用は農業用分野のみに限定されているが、フルジオキシニルおよびピロールニトリンの作用機序および生物活性には共通点が多いと考える。表 1 は、ピロールニトリンとフルジオキシニルの抗真菌活性を示したものである。両剤の活性は極めて類似していることが確認されている。

表 1 ピロールニトリンとフルジオキシニルの各種真菌に対する活性

菌名	MIC (µg/mL)	
	ピロールニトリン	フルジオキシニル
<i>Neurospora crassa</i>	0.006	0.013
<i>Botrytis cinerea</i>	0.025	0.025
<i>Fusarium oxysporum</i>	0.1	0.1
<i>Fusarium solani</i>	0.1	0.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	0.1	0.1
<i>Magnaporthe grisea</i>	10	25
<i>Pythium ultimum</i>	10	>25
<i>Phytophthora capsici</i>	25	>25
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25	>25

文献 1 の Table 1 より引用

また、同様にフルジオキシニルに人為的に耐性を獲得させた変異株はピロールニトリンにも交叉耐性を示すことも確認されている（表 2）。

表 2 ピロールニトリンとフルジオキシニルの *Neurospora crassa* 野生株および変異株に対する活性

系統（遺伝子座）	対応する蛋白	MIC (µg/mL)	
		ピロールニトリン	フルジオキシニル
野生型	—	0.006	0.013
<i>os-1</i> (NM233t)	Histidine kinase	6.1	>25
<i>os-4</i> (Y256M223)	MAPKK kinase	25 - 6.1	>25
<i>os-5</i> (NM216o)	MAPK kinase	6.1	>25
<i>os-2</i> (ALS10)	MAP kinase	6.1	>25

文献 1 の Table 2 より引用

現在、フェニルピロール系の抗真菌作用を有する化合物として日本国内で市販されているものは、ピロールニトリンおよびフルジオキシニルだけである。以下に現在まで得られている両化合物の知見をまとめ、食品添加物としてフルジオキシニルがヒトに摂取された場合において耐性菌が選択されるリスクに関し考察する。

- (1) 腸内細菌叢への影響の観点から、真菌以外の微生物（細菌等）に対するフルジオキシニルの作用の有無について調査すること

フルジオキシニルは、当初より植物病原菌のうち糸状菌に対する活性を期待され、農薬としての使用を目的に開発されたため、糸状菌に対する資料としてフルジオキシニル食品添加物指定要請の添付資料概要の添付資料 3-1 に示した通り、糸状菌である各種植物病原体については活性が高いことが判明している。

一方、フルジオキシニルの抗細菌活性、特に腸内細菌叢への影響について詳細に調べたデータはない。しかし、フルジオキシニルの細菌に対する活性については、その安全性を確認するために実施された変異原性試験の一つ、細菌を用いた復帰突然変異試験（添付資料 5-21 参照）においてある程度確認ができる。細菌の復帰突然変異性を調べる前に、使用する大腸菌 (*Escherichia coli*) とネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) に対し被験物質に抗細菌作用があるか確認し、適切な添加濃度を決定しなければならない。その結果、フルジオキシニル 5000 µg/mL の濃度でも細菌に対して影響は認められなかった。すなわち、5000 µg/mL の濃度までフルジオキシニルには抗細菌活性は認められなかったことになる。

参考までに、表 3 および表 4 にピロールニトリンの細菌に対する活性を示す。表 3 にはヒト結核菌である *Mycobacterium tuberculosis* を含む人および家畜への病原菌 *Mycobacterium* に対する影響を *in vitro* で調べた値を示す。結核症の治療に用いられる抗生物質ストレプトマイシンおよびイソニアジドと比較すると、ピロールニトリンは結核菌に対する抗細菌活性が低いことがわかる。一方、Vero 細胞に対する毒性

も高く、細胞毒性を起こす濃度で抗細菌活性を示す（文献 2）。フルジオキシソニルについてのデータはないが、ある程度類似した結果であると推察され、抗細菌活性は同様に低いと考えられる。また、表 4 には、文献 3 から引用したピロールニトリンの各種細菌に対する活性を示した。同様に、枯草菌以外の黄色ブドウ球菌および *Mycobacterium* には同様に抗菌活性が低いことがわかる。Tripathi および Gottlieb の報告によると、ピロールニトリンの大腸菌に対する MIC は 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、フルジオキシソニル同様細菌である大腸菌に対する活性が低いことがわかる。また、ピロールニトリン 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度においても大腸菌の蛋白合成に対して阻害あるいは促進作用は認められなかった（文献 4）。

表 3. ピロールニトリンの *Mycobacterium* に対する抗菌活性

被験物質	Vero 細胞に対する毒性 MTD50 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	抗菌活性 MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)				
		<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	<i>Mycobacterium gordonae</i>	<i>Mycobacterium marinum</i>
ピロールニトリン	8	4	8	16	>16	>16
ストレプトマイシン	128	0.50	8	8	16	32
イソニアジド	32	0.25	32	64	32	16

文献 2 の Table 2 より引用

表 4. ピロールニトリンの細菌に対する活性

菌名	抗菌活性 MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
<i>Staphylococcus aureus</i>	50
<i>Mycobacterium</i>	100
<i>Bacillus subtilis</i>	0.78

文献 3 の Table 1 より引用

各種動物を用いた混餌による反復経口投与毒性試験でも、高用量群（混餌による投与で 2000ppm 以上）で下痢や体重増加抑制が認められた以外にはフルジオキシソニルが腸内細菌叢へ影響を与えたことを示唆する症状は認められなかった。フルジオキシソニルの代謝物の一つが青色物質となるため糞の青色化が *in vivo* 毒性試験で認められているが、糞の青色化に伴う下痢などの他の糞の異常は認められなかったため、この代謝物も腸内細菌叢へ影響を与えるとは考えにくい。さらに、いずれの試験でもフルジオキシソニルが腸内細菌叢へ悪影響を及ぼした結果として認められる所見である消化管粘膜上皮細胞の炎症、びらん等が投与により増加した結果は得られていない。

また、フルジオキシソニルの活性により腸内細菌叢に対し影響を及ぼし、その結果、体重増加抑制が起こったと仮定しても、体重増加抑制を起こす用量は 90 日間投与試験では、ラットで 7000ppm 投与群以上、イヌで 10000ppm 投与群以上、マウスで 7000ppm 投与群以上であり、暴露量的にはいずれも体重 1kg あたり 300mg 以上のフルジオキシソニルを毎日摂取したことになる。一方、農薬および食品添加物としてフルジオキシソニルが使用された場合、最大摂取量は体重 53.3kg の国民においては約 1.4mg であり（食品添加物指定要請添付資料概要 49 頁参照）、体重 1kg 当たりの摂取量としては 0.027mg となる。フルジオキシソニルが動物に影響を及ぼす量と人での最大摂取量を比較すると、人での最大摂取量は極めて少ない量であるため、人の腸内細菌叢に影響を及ぼす結果として人の健康に影響するとは考えられない。

従って、フルジオキシソニルを食品添加物として使用した場合でも、細菌への活性は糸状菌と比較するとあまり強くないこと、また人で摂取される可能性のある最大摂取量はかなり微量であることからフルジオキシソニルが腸内細菌叢へ悪影響を及ぼす恐れはないと考えられる。

(2) ヒト真菌症に係る真菌、特にアスペルギルス属、カンジダ属、クリプトコッカス属等の真菌に対するフルジオキシニルの作用の有無とその程度（最小発育阻止濃度（MIC）等）を調査すること。

フルジオキシニルは当初より植物病害を防除する農薬の殺菌剤として開発されたため、人の真菌症に係る真菌に対する抗菌活性はシンジェンタ社社内データとしては保有していない。従って、公表されている文献からピロールニトリンおよびフルジオキシニルの結果を抜粋してまとめる。

表5および表6にピロールニトリンの各種ヒト病原性真菌に対する *in vitro* 活性をまとめる。表5の結果から、ピロールニトリンは、調べた真菌中ブラストミセス症の原因菌である *Blastomyces dermatitidis* に対する活性が最も高く、皮膚カンジダ症などを発症させる *Candida albicans* に対する活性が最も低かった（文献5）。また、表7に皮膚白癬菌症の各種原因菌である *Trichophyton*、*Microsporum* および *Epidermophyton* に対する活性もまとめる（文献6）。これらの結果から、ピロールニトリンにも深在性真菌感染症を発生させる *Candida albicans* などにも活性はあるが、臨床的に使用されている皮膚白癬菌感染症の病原菌に対する活性の方がより優れていることがわかる。

表5. ピロールニトリンの抗真菌活性 (1)

菌名	培養総数	MIC 薬量(μg/mL)/阻害数
<i>Candida albicans</i>	5	12.5/2, 25/3
<i>Cryptococcus neoformans</i>	5	0.78/1, 6.25/2, 12.5/1
<i>Sporotrichum schenckii</i>	5	3.12/1, 6.25/3, 12.5/1
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	5	<0.78/5
<i>Histoplasma capsulatum</i>	5	0.156/5

文献5のTable 1より引用

表6. ピロールニトリンの抗真菌活性 (2)

菌名	MIC (μg/mL)
<i>Candida albicans</i>	10
<i>Aspergillus niger</i>	12.5
<i>Trichophyton rubrum</i>	1.0

文献3のTable 1より引用

表7. ピロールニトリンの抗真菌活性 (3)

菌名	MIC (μg/mL) (中央値)
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<0.05 - 0.10 (0.10)
<i>Trichophyton rubrum</i>	0.10 - 0.39 (0.10)
<i>Trichophyton tonsurans</i>	<0.05 - 3.13 (0.10)
<i>Trichophyton schoenleini</i>	<0.05 - 0.39 (0.20)
<i>Trichophyton verrucosum</i>	0.39
<i>Trichophyton violaceum</i>	0.10
<i>Trichophyton concentricum</i>	<0.05
<i>Microsporum canis</i>	<0.05 - 0.20 (0.10)
<i>Microsporum fulvum</i>	0.20 - 0.39
<i>Microsporum gypseum</i>	<0.05 - 0.10 (0.10)
<i>Microsporum ferrugineum</i>	1.56
<i>Epidermophyton floccosum</i>	<0.05

文献6のTable 4および5より引用

フルジオキシニルのヒト病原性真菌に対する *in vitro* 活性に関する情報は限られてはいるが報告されている。2006年のKimらの報告には、フルジオキシニル 50 μ mol/L (1.24 μ g/mL) の用量では、ヒト病原菌 *Aspergillus fumigatus* の生育をほぼ完全に阻止している (文献7のFigure 3参照)。また、同グループの別の報告にも、フルジオキシニル 50 μ mol/L (1.24 μ g/mL) の用量では、*Aspergillus fumigatus* の生育が100%阻止されたことが報告されている (文献8のFigure 2参照)。東洋大学の藤村教授のグループによる報告では、フルジオキシニル 1.6 μ g/mL でも *Candida albicans* の生育を抑制したことが示されており、*in vitro* での活性が示されている (文献9のFigure 2参照)。

ヒト病原性真菌以外のアスペルギルス属、およびムコール属に対するフルジオキシニルの活性については表8に示す社内データがある。フルジオキシニルは以下のアスペルギルス属、ムコール属の真菌については活性が高いことがわかる。

表8. フルジオキシニルの抗真菌活性

菌名	EC50 (ppm)
<i>Aspergillus versicolor</i>	0.29
<i>Aspergillus niger</i>	0.02
<i>Aspergillus carbonarius</i>	0.18
<i>Mucor indicus</i>	0.062

シンジェンタ社内データ

以上の各結果から推察すると、フルジオキシニルは、ヒト真菌症に係る真菌、特にアスペルギルス属、カンジダ属、クリプトコッカス属等の真菌に対して *in vitro* 活性がある可能性が考えられる。

上記はいずれも *in vitro* でのフルジオキシニル (あるいはピロールニトリン) の抗真菌活性の結果をまとめたものである。すなわち、ピロールニトリンのように直接暴露されると、フルジオキシニルにも各種ヒト病原性真菌に対し活性があると推測されるため、耐性菌が選択されるリスクがないとはいえない。一方、食品添加物として使用されるフルジオキシニルの場合、食品に含まれるフルジオキシニルが食品とともに体内に経口摂取される。従って、フルジオキシニルが体内に経口摂取された場合に、耐性菌が選択されるリスクを考慮する必要がある。

フルジオキシニルを経口投与して、体内での抗真菌活性を調べたデータはないが、ピロールニトリンを経口投与し、その活性を確認した報告がある。Gordee および Matthews らによる1969年の報告によると (文献5)、ピロールニトリンはマウスおよびヒトの血清存在下では、その *Neurospora crassa* に対する活性はそれぞれ90.8%および86.6%も低下する。また、病原性真菌を静脈内投与して人工的に感染させたマウスにピロールニトリンを経口あるいは皮下投与し、既知の抗真菌治療剤とその効果を比較した。いずれも、投与後臓器を摘出し、真菌細胞数を測定し、その抑制効果を確認したものである。その結果を表9に抜粋する。ピロールニトリンを経口あるいは皮下投与しても、いずれの真菌の抑制程度は既知の抗真菌剤と比較するとかなり低いことが確認された。対照剤は1日1回の投与で効果がみられたのに対し、ピロールニトリンの場合、1日複数回投与しても効果は低く、これらの真菌感染症については、全身投与による治療効果は期待できないと結論されている。

ピロールニトリンの実験結果から、フルジオキシニルについても同様の効果が考えられ、局所的な抗真菌活性はあるが、動物に全身的に投与されても、感染した真菌への活性はあまり高くないと推察される。

フルジオキシニルは、経口投与された場合、投与量の7割以上が体内に吸収される（添付資料5-50）。しかし、フルジオキシニルが農薬および食品添加物として使用された場合でも、その食品中の残留基準値から算出したフルジオキシニルの摂取量は、体重53.3kgの国民においては約1.4mgであり（食品添加物指定要請添付資料概要49頁参照）、その7割が体内に吸収されると考えると、最大で約1mgのフルジオキシニルが体内に吸収されると考えられる。体重1kg当たりの最大摂取量は0.027mgとなり、体重1kg当たり約0.02mgが腸管から体内へ吸収されると考えられる。従って、ピロールニトリンで治療を期待された用量（皮下投与で10mg/kg以上）と比較しても、フルジオキシニルが食品添加物として使用され体内に吸収される可能性のある量は薬効を及ぼす用量とはかけ離れて少ない量である。

以上から、フルジオキシニルを食品添加物として用いた場合、体内への吸収量の観点から、また血清存在下での不安定な活性の観点から、体内に存在する病原菌に効果を及ぼし、その耐性を選択させる効果はないと考えられる。

表9. ピロールニトリンを全身性に投与した場合の抗真菌活性

感染させた真菌	被験物質	投与量 (mg/kg)	投与条件	臓器	真菌細胞数	阻害率
<i>Candida albicans</i>	(陰性対照)	0	(溶媒)	腎臓	1.3×10^5	0%
	ピロールニトリン	50	皮下、1日4回 5日間投与		1.3×10^5	0%
	ピロールニトリン	25			8.9×10^4	32%
	ピロールニトリン	12.5			1.0×10^5	23%
	アンフォテリシンB	50			皮下、5日間投与	(記載なし)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	(陰性対照)	0	(溶媒)	脳	15×10^5	0%
	ピロールニトリン	25	経口、1日8回 5日間投与		13×10^5	14%
	ピロールニトリン	12.5			6.6×10^5	56%
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	(陰性対照)	0	(溶媒)	肝臓	1.0×10^4	0%
	ピロールニトリン	50	皮下、1日4回 5日間投与		1.6×10^4	0%
	ピロールニトリン	25			1.9×10^4	0%
	ハマイシン	2	皮下、5日間投与		3.0×10^2	97%
<i>Histoplasma capsulatum</i>	(陰性対照)	0	(溶媒)	肝臓	1.58×10^7	0%
	ピロールニトリン	20	皮下、1日8回 5日間投与		3.6×10^7	0%
	ピロールニトリン	10			1.8×10^7	0%
	サラマイセチン	25	皮下、5日間投与		2.15×10^2	99.9%

文献5のTable 4、5、6および7より引用

(3) 細菌間でみられるような耐性の伝達が、真菌間においては起きないのかどうか調査すること。

真菌におけるプラスミドによる耐性の伝達の知見についてはあまり報告がない。実験的には、細菌の場合は大腸菌とプラスミドを混合し電気ショックを与えることでプラスミドを大腸菌内に効率よく取り込ませることが頻繁に行われている。一方、糸状菌では細胞壁を除きプロトプラスト化しプラスミドを入れておりかなり人為的な操作が必要である。また、糸状菌の場合、細菌のように導入されたプラスミドが菌体内で自己複製するのではなく、プラスミド上のDNAが糸状菌のDNAと相同組換えまたは非同組換えによって染色体中に組み込まれることによって形質転換がおこる。このような形質転換効率は必

ずしも高くないし、形質の維持も一様でない。

以上のことから考えると、糸状菌でのプラスミドによる耐性の伝達は、否定は出来ないが極めて可能性は低いと考えられる。

現在、フルジオキシニル耐性に関与する遺伝子が明確に同定されていないため、フルジオキシニルの耐性がプラスミドにより伝達したという報告はなく、実際に、日本においてフルジオキシニルは現在まで農薬として10年以上の使用歴を持つが、耐性菌が発生したためにその不効が農業分野で問題になったことはない。

以上、食品添加物としてフルジオキシニルがヒトに摂取された場合において耐性菌が選択されるリスクに関する考察をまとめると、食品添加物としてフルジオキシニルがヒトに摂取された場合でも、その作用機序、暴露量あるいは同系統のピロールニトリンのデータから、フルジオキシニルの耐性菌が選択されるリスクは低いと考える。また、ピロールニトリンへの耐性菌については、フルジオキシニルにも交叉耐性を示すと考えられているが、深在性の真菌感染症のため内服による処置が必要な場合でも、ピロールニトリンが第一選択として処置されることは考えにくく、フルジオキシニルの食品添加物としての暴露が深在性の真菌感染症治療で問題を生じるとは考えにくい。

補足資料要求 2

補足資料要求 1 に関連し、評価に有益な資料があれば、併せて整理すること。

<回答>

フルジオキシニルの抗真菌作用の作用機序については、フルジオキシニル食品添加物指定要請の添付資料概要「(3) 有効性に関する資料」に記載された通りであるが、2007年に発行された W. Krämer and U. Schirmer eds 編集の成書「Modern Crop Protection Compounds, Volume 2」の 3.4 Fungicides Acting on Signal Transduction 3.4.1 Biochemistry 3.4.1.1 Mode of action of phenylpyrroles and dicarboximides にまとめられている（文献 10）。古くは、フルジオキシニル高濃度条件下では、呼吸阻害活性があると考えられていた（文献 4）が、現在、フルジオキシニルの主な作用点はグリセロール生合成を司る hyperosmolarity regulatory pathway（HOG pathway）に対する作用と考えられている。フルジオキシニルは HOG pathway の制御タンパク質を活性化された状態に保ち、結果として細胞内にグリセロールが蓄積され、細胞内の浸透圧が高まることにより、細胞の膨潤、あるいは細胞破裂を起こし、細胞死に至らしめると考えられている（文献 11）。近年では、東洋大学の藤村教授がフルジオキシニルの耐性には細胞の浸透圧に関する様々な遺伝子が関与しているとの報告をしている（文献 12）。

しかし、この点以外にも作用機序があると考えられており、フルジオキシニルの作用機序はまだ完全には解明されていないというのが現状である。

引用文献

- 1 Pyrrolnitrin interferes with osmotic signal transduction in *Neurospora crassa*.
Okada A, Banno S, Ichishi A, Kimura M, Yamaguchi I, Fujimura M.
J Pestic Sci. 2005 30(4):378-383
- 2 Pyrrolnitrin and related pyrroles endowed with antibacterial activities against *Mycobacterium tuberculosis*.
Di Santo R, Costi R, Artico M, Massa S, Lampis G, Deidda D, Pompei R.
Bioorg Med Chem Lett. 1998 Oct 20;8(20):2931-6.
- 3 Biosynthesis of pyrrolnitrin and other phenylpyrrole derivatives by bacteria.
van Pée KH, Ligon JM.
Nat Prod Rep. 2000 Apr;17(2):157-64.
- 4 Mechanism of action of the antifungal antibiotic pyrrolnitrin.
Tripathi RK, Gottlieb D.
J Bacteriol. 1969 Oct;100(1):310-8.
- 5 Systemic antifungal activity of pyrrolnitrin.
Gordee RS, Matthews TR.
Appl Microbiol. 1969 May;17(5):690-4.
- 6 In vitro antifungal activity of clotrimazole (Bay b 5097).
Shadomy S.
Infect Immun. 1971 Aug;4(2):143-8.
- 7 Targeting antioxidative signal transduction and stress response system: control of pathogenic *Aspergillus* with phenolics that inhibit mitochondrial function.
Kim JH, Campbell BC, Mahoney N, Chan KL, May GS.
J Appl Microbiol. 2006 Jul;101(1):181-9.
- 8 Enhanced activity of strobilurin and fludioxonil by using berberine and phenolic compounds to target fungal antioxidative stress response.
Kim JH, Campbell BC, Mahoney N, Chan KL, Molyneux RJ, May GS.
Lett Appl Microbiol. 2007 Aug;45(2):134-41.
- 9 Effects of iprodione and fludioxonil on glycerol synthesis and hyphal development in *Candida albicans*.
Ochiai N, Fujimura M, Oshima M, Motoyama T, Ichiishi A, Yamada-Okabe H, Yamaguchi I.
Biosci Biotechnol Biochem. 2002 Oct;66(10):2209-15.
- 10 Modern Crop Protection Compounds, Volume 2, W. Krämer and U. Schirmer eds, Wiley-VCH, 2007
- 11 Calcineurin, Mpk1 and Hog1 MAPK pathways independently control fludioxonil antifungal sensitivity in *Cryptococcus neoformans*.
Kojima K, Bahn YS, Heitman J.

Microbiology. 2006 Mar;152(Pt 3):591-604.

12. ATF-1 transcription factor regulates the expression of *ccg-1* and *cat-1* genes in response to fludioxonil under OS-2 MAP kinase in *Neurospora crassa*.

Yamashita K, Shiozawa A, Watanabe S, Fukumori F, Kimura M, Fujimura M.

Fungal Genet Biol. 2008 Dec;45(12):1562-9. Epub 2008 Oct 10.