

## II. 試験結果概要

フロニカミドのピリジル環 3 位の炭素を  $^{14}\text{C}$  で標識したもの ( $^{14}\text{C}$ -フロニカミド) を用いて各種試験が実施された。放射能濃度及び代謝物濃度は特に断りがない場合はフロニカミドに換算した。

代謝物/分解物及び検査値等の略称は、別紙 1 及び 2 に示した。

### 1. ラットにおける動物体内運命試験

#### (1) 薬物動態

$^{14}\text{C}$ -フロニカミドを低用量及び高用量で単回経口投与 (2mg/kg 体重、400mg/kg 体重) し、フロニカミドの SD ラットを用いた薬物動態試験が実施された。

血漿中放射能濃度推移は表 1 に示すとおりであった。 $T_{\text{max}}$  は、低用量では投与後 20～40 分、高用量の雌では投与後 20 分～1 時間であった。高用量の雄では、投与後 30 分以内に  $C_{\text{max}}$  に近い値に達したが、実際の最高濃度が認められた時間は投与後 2～4 時間であった。(参照 2)

表 1 血漿中放射能濃度推移

投与量	低用量 (2mg/kg 体重)		高用量 (400mg/kg 体重)	
	雄	雌	雄	雌
$T_{\text{max}}$ (hr)*	0.4	0.4	0.9	0.5
$C_{\text{max}}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) *	2.07	2.11	250	368
$T_{1/2}$ (hr) *	5.20	4.48	11.6	6.79

※ $T_{\text{max}}$  : 血漿中放射能最高濃度到達時間、 $C_{\text{max}}$  : 血漿中放射能最高濃度、 $T_{1/2}$  : 半減期  
 $T_{\text{max}}$  は薬物動態ソフトウェア"Win Nonlin®"を用いて算出した。

#### (2) 排泄・分布 (単回投与)

$^{14}\text{C}$ -フロニカミドを低用量及び高用量で単回経口投与 (2mg/kg 体重、400mg/kg 体重) し、フロニカミドの SD ラットを用いた排泄・分布試験が実施された。

24 時間後の尿 (ケージ洗浄液を含む) 及び糞中排泄率は、両投与群で投与放射能 (TAR) の 74% 以上、168 時間後の組織中残存率は 2.1% TAR 未満とわずかであった。主要排泄経路は両投与群とも尿中であり、168 時間後の尿中排泄率は低用量投与群で 90～93% TAR、高用量で 87～94% TAR であった。

単回投与における組織分布は、表 2 に示すとおりであった。

全血中の半減期は高用量の雄で 10.4 時間、その他は 6.1～7.6 時間と短く、各組織中の半減期も全血中の半減期と同程度であり、蓄積性は認められなかった。(参照 3)

表 2 主要組織の残留放射能濃度

投与条件		$T_{\text{max}}$ 時付近*	168 時間後概要
単回経口 低用量	雄	消化管(7.46), 副腎(5.07), 甲状腺(4.02), 肝臓(2.55), 腎臓(2.35), 脾臓(2.08), 心臓(2.01)	全ての組織で 0.06 未満

	雌	副腎(6.52), 消化管(4.54), 甲状腺(4.26), 卵巣(3.77), 腎臓(2.67), 肝臓(2.50), 脾臓(2.44), 子宮(2.36)	全ての組織で 0.05 未満
単回経口 高用量	雄	消化管(1720), 副腎(672), 甲状腺(652), 肝臓(442), 腎臓(311), 脾臓(302), 膵臓(300)	全ての組織で 7.0 未満
	雌	消化管(2280), 甲状腺(782), 副腎(689), 腎臓(359), 脾臓(344), 肝臓(325)	全ての組織で 4.60 未満

※低用量：投与 0.5 時間後(雌雄)、高用量：3 時間後(雄)、1 時間後(雌)

注) 残留放射能濃度はフロニカミド換算濃度 ( $\mu\text{g/g}$ )

### (3) 排泄・分布 (反復経口)

$^{14}\text{C}$ -フロニカミドを反復経口投与 (14 日間非標識体を  $2\text{mg/kg}$  体重の用量で単回経口投与した後、15 日目に  $^{14}\text{C}$ -フロニカミドを  $2\text{mg/kg}$  体重の用量で単回経口投与) し、フロニカミドの SD ラットを用いた排泄・分布試験が実施された。

24 時間後の尿 (ケージ洗浄液を含む) 及び糞中排泄率は、両投与群で投与放射能(TAR)の 87%以上、168 時間後の組織中残存率は 2.0%TAR 以下とわずかであった。両投与群ともに主要排泄経路は尿中であり、168 時間後の尿中排泄率は 88%TAR であった。

反復経口投与における組織分布は、表 3 に示すとおりであった。

全血中の半減期は 4.6~6.5 時間と短く、各組織中の半減期も全血中の半減期と同程度で蓄積性はなく、単回投与の場合との差は認められなかった。(参照 4)

表 3 主要組織の残留放射能濃度

投与条件		Tmax 時付近*	168 時間後
反復経口 2.0mg/kg 体重	雄	肺(2.69), 甲状腺(2.69), 腎臓(2.55), 副腎(2.54), 肝臓(2.39), 脾臓(2.11), 胸腺(2.00)	全ての組織で 0.05 未満
	雌	甲状腺(3.49), 卵巣(2.71), 腎臓(2.54), 肝臓(2.51), 副腎(2.41), 脾臓(2.32), 胸腺(2.23), 子宮(2.22), 肺(2.19), 心臓(2.12)	全ての組織で 0.05 未満

※雌雄：投与 0.5 時間後

注) 残留放射能濃度はフロニカミド換算濃度 ( $\mu\text{g/g}$ )

### (4) 胆汁排泄

$^{14}\text{C}$ -フロニカミドを単回経口投与 (低用量： $2\text{mg/kg}$  体重、高用量： $400\text{mg/kg}$  体重) し、フロニカミドの SD ラット (胆管処理) を用いた胆汁排泄試験が実施された。

投与 48 時間後の胆汁、尿及び糞中排泄率は表 4 に示すとおりであった。(参照 5)

表4 投与48時間後の胆汁、尿及び糞中排泄率(%TAR)

	低用量投与群	高用量投与群
胆汁	3.7~4.1	4.4~4.6
尿*	86~87	80~83
糞	3.5~5.1	3.8

\*ケージ洗浄液を含む

#### (5) 代謝物同定・定量

<sup>14</sup>C-フロニカミドのSDラットを用いた単回投与(低用量:2mg/kg体重、高用量:400mg/kg体重)(1(2))、反復投与(低用量:2mg/kg体重)(1(3))、胆汁排泄(低用量:2mg/kg体重、高用量:400mg/kg体重)(1(4))の各試験において、尿、糞、胆汁及び肝臓中におけるフロニカミドの代謝物同定・定量試験が実施された。なお、肝臓中における代謝物の同定及び定量は、胆汁試験においては実施されなかった。試験結果は表5に示すとおりであった。

また、別途実施した代謝物Eの単回投与(0.5~100mg/kg体重)による試験では、代謝物Fを糞中より0.2~0.5%TAR検出した。

ラットにおける主要代謝経路は、フロニカミドのシアノ基及びカルバモイル基の加水分解を経由し、代謝物Dを生成する経路と考えられた。(参照6、65)

表5 尿、糞、胆汁及び肝臓中における代謝物

投与条件及び排泄箇所		フロニカミド(%TAR)	代謝物(%TAR)
単回経口	尿(48hr後)	46~72	D(18~27)、I、G、B、J、E、E抱合体及びI抱合体(4.0未満)
反復経口	肝臓(0.5~6.0hr後)	0.7~2.4	D、C及びB(1.2未満)
単回経口	糞(24hr後)	0.5~1.2	D、I抱合体、E抱合体、G、B、I、J、E(1.1未満)
胆汁排泄	尿(48hr後)	60~70	D(16~20)、E抱合体、B、I、I抱合体及びJ(1.8未満)
	糞(24hr後)	0.3~2.0	I抱合体+E抱合体、D及びE(1.9未満)
	胆汁(16hr後)	2.5~3.3	B及びD(1.2未満)

注)「E抱合体」については高極性物質を分取し、分析操作中に代謝物Eを生成したものを抱合体と推定したものである。

## 2. 植物体内運命試験

### (1) 小麦

<sup>14</sup>C-フロニカミドを小麦の播種後76日目に100g ai/ha(通常処理区)及び500g ai/ha(5倍処理区)で散布し、検体として散布後21日後に玄麦、籾殻及び麦わらを採取し、フロニカミドの小麦(品種:Kulm)における代謝試験が実施された。

残留放射能は籾殻から最も多く検出された。玄麦中の残留放射能は籾殻の 14~16%であり、籾殻から可食部への浸透移行は少なかった。

各試料中の総残留放射能(TRR)及び代謝物は表 6 に示すとおり。

小麦における主要代謝経路は、フロニカミドのシアノ基及びカルバモイル基の加水分解であると考えられた。小麦における代謝経路は、側鎖のニトリル基の加水分解による B (TFNG-AM) の生成、それに引き続く酸アミドの分解によるカルボン酸 G (TFNG) の生成、さらにアミド結合の開裂による E (TFNA) の生成、あるいは酢酸残基が脱離した D (TFNA-AM) の生成を経て E を生成する。さらに、C 及び D はピリジンの N の酸化により H 及び D を生成する。(参照 7)

表 6 各試料中の総残留放射能(TRR)及び代謝物

処理区	試料	TRR (mg/kg)	フロニカミド (%TRR)	代謝物 (%TRR)
通常処理区	玄麦	0.28	29.9	C(39.4), E(8.1), D(6.2), I(2.7), B (抱合体を含む) と H の合計(3.1)
	籾殻	3.60	40.7	C(16.6), E(5.7), D(2.5), B (抱合体を含む) と H の合計(5.4)
	麦わら	2.03	50.2	C(19.6), E(2.0), D(1.8), B (抱合体を含む) と H の合計(4.5)
5倍処理区	玄麦	1.47	23.9	C(44.1), D(9.5), I(6.1), E(3.7), B (抱合体を含む) と H の合計(5.7)
	籾殻	18.9	46.9	C(18.9), D(3.8), E(3.0), B (抱合体を含む) と H の合計(4.1)
	麦わら	9.28	44.2	C(21.3), E(3.8), D(2.4), B (抱合体を含む) と H の合計(5.6)

## (2) ばれいしょ

<sup>14</sup>C-フロニカミドを収穫 28 日前及び 14 日前の計 2 回、各々 100 g ai/ha (通常処理) 及び 500g ai/ha (過剰処理) でばれいしょに散布し、収穫時に検体として塊茎及び茎葉を採取し、フロニカミドのばれいしょ (品種: Kennebec) における代謝試験が実施された。

塊茎及び茎葉中の総残留放射能は、通常処理区で 0.1mg/kg 及び 1.5mg/kg であり、茎葉から塊茎への放射能の移行は少なかった。塊茎表面に付着している放射エネルギーは少なく、0.5%TRR 以下であった。塊茎中の放射能の 90%以上が抽出された。

各試料中の総残留放射能(TRR)及び代謝物は表 7 に示すとおり。

ばれいしょにおける主要代謝経路は、フロニカミドのシアノ基及びカルバモイル基の加水分解であると考えられた。(参照 8)

表 7 各試料中の総残留放射能 (TRR) 及び代謝物

処理区	試料	表面洗浄の有無	TRR (mg/kg)	フロニカミド (%TRR)	代謝物 (%TRR)
通常処理区	塊茎	有	0.145	11.7	C(35.9),E(31.8),E 抱合体(5.2),PM-3a(3.9),D(1.2),B(1.0)
		無	0.106	5.6	C(39.3), E(34.4), E 抱合体(6.0), D(1.0), B(1.0)
	茎葉	無	1.53	9.8	C(36.4), E(17.3), E 抱合体(5.2), D(4.8), B(4.0), PM-1b(3.6), PM-1a(3.2)
5倍処理区	塊茎	有	0.533	7.7	E(40.1), C(33.7), E 抱合体(4.9), D(1.1), B(1.1)
		無	0.200	19.3	E(33.7), C(25.1), E 抱合体(4.8), PM-3a(1.8), D(1.4), B(1.2)
	茎葉	無	7.68	24.5	C(27.8), E(11.9), D(7.9), E 抱合体(3.9), B(2.8), PM-1b(2.7), PM-1a(2.4)

注)PM-1a、PM-1b、PM-3aは、未同定物質を示す。

### (3) もも

<sup>14</sup>C-フロニカミドを収穫 35 日前及び 21 日前の計 2 回、各々 100 g ai/ha (通常処理) 及び 500g ai/ha (過剰処理) でももの木の上から均等に散布し、収穫時に検体として果実及び葉を採取し、フロニカミドのもも (品種: Elberta) における代謝試験が実施された。

通常処理区および 5 倍処理区の成熟期の果実では、果実全体から検出された放射能はフロニカミド換算で 0.1 mg/kg 及び 0.322mg/kg であった。

通常処理区の果実全体の残留放射能(0.1mg/kg)の主たる化学形態は、フロニカミド及び E (TFNA)でそれぞれ 30.1%及び 49.3%を占めた。5 倍処理区ではそれぞれ 60.7%及び 17.5%を占めた。葉部から 6.2mg/kg 及び 24.2mg/kg の残留放射能を検出した。残留放射能の主たる化学形態は通常処理区及び 5 倍処理区で、フロニカミド、E(TFNA)、C(TFNG)で、それぞれ 33~65%、5~16%、8~19%が検出された。

各試料中の総残留放射能(TRR)及び代謝物は表 8 に示すとおり。

ももにおける主要代謝経路は、フロニカミドのシアノ基及びカルバモイル基の加水分解であると考えられた。(参照 9)

表 8 各試料中の総残留放射能 (TRR) 及び代謝物

処理区	試料	TRR (mg/kg)	試料内分布	(%TRR)	フロニカミド (%TRR)	代謝物 (%TRR)
通常処	果実	0.100	果汁	73.2	20.3	E(39.9), C(5.0), B, D(各々 1.5 未満)
			絞り粕	21.1	7.1	E(9.0), C, B, D(各々 1.0 未満)

理 区			表面 洗浄液	5.6	2.7	E, C, B, D (各々0.5 未満)
	葉	6.25	—	—	32.9	C(19.3), E(15.8), B, D(各々5.0 未満)
5 倍 処 理 区	果実	0.322	果汁	63.7	40.2	E(12.9), C(3.0), B, D,(各々2.0 未満)
			絞り粕	21.0	11.8	E(4.2), C, B, D (各々1.0 未満)
			表面 洗浄液	15.3	8.6	E, C, B, D(各々1.0 未満)
	葉	24.2	—	—	64.9	C(8.5), E(5.3), D(2.0), B(1.6)

### 3. 土壌中運命試験

#### (1) 好氣的土壌

好氣的土壌(壤質砂土 (米)) に  $^{14}\text{C}$  フロニカミドを乾土あたり  $0.1\text{mg/kg}$  となるように添加し、 $20\pm 1^\circ\text{C}$  の暗条件下で 30 日間インキュベートし、フロニカミドの好氣的土壌運命試験が実施された。

抽出放射能は処理直後で 101% TAR であったが、30 日後には 13.7% TAR に減衰し、抽出残渣は処理直後で 0.7% TAR であったが、30 日後には 35.2% TAR と増加した。30 日後までの累積  $\text{CO}_2$  は 47% TAR であった。半減期は 1.0 日、 $\text{DT}_{90}$  は 3.4 日であった。

主要分解物は E 及び F であり、E は 3 日後に 36.4% TRR、F は 7 日後に 20.2% TRR に達し、その後減衰し 14 日後には 2.0% TAR 未満となった。その他の分解物として B、D 及び C が認められたが、30 日後には全て 2.0% TAR 未満であった。

土壌中における主要代謝経路は、フロニカミドのシアノ基及びカルバモイル基の加水分解による E(TFNA) の生成と、それに続くピリジン環 6 位の水酸化の結果として F(TFNA-OH) の生成であり、中間体として C(TFNG)、B(TFNG-AM)、D(TFNA-AM) が生成した。これらを経て最終的に  $\text{CO}_2$  まで無機化されると考えられた。(参照 10)

#### (2) 土壌吸脱着試験

6 種類の国内及び国外土壌(壤質砂土(独)、シルト質埴壤土(仏)、埴土(スイス)、砂壤土(スイス)、埴壤土(英)、壤土(日)) を用いてフロニカミドの土壌吸脱着試験が実施された。

$K_{\text{ads}}=0.083\sim 0.558$ 、 $K_{\text{adsOC}}=5\sim 12$  であり、Freundlich の吸着等温式を用いた場合は、 $K_{\text{Fads}}=0.072\sim 0.603$ 、 $K_{\text{FadsOC}}=5\sim 11$ 、脱着等温式を用いた場合は  $K_{\text{Fdes}}=0.138\sim 1.401$ 、 $K_{\text{FdesOC}}=8\sim 21$  であった。(参照 11)

### 4. 水中運命試験

#### (1) 加水分解試験

$^{14}\text{C}$ -フロニカミドを pH4、5、7 及び 9 の各緩衝液に  $1\text{mg/L}$  となるように加えた後、

25±1°C(pH5、7及び9)、50±1°C (pH4、5、7及び9) 及び 40±1°C (pH9) の暗条件下でインキュベートし、フロニカミドの加水分解試験が実施された。

フロニカミドは pH5 及び 7、25°C 及び pH4 及び 5、50°C の条件下で加水分解は認められず、pH7 及び 9、50°C における半減期はそれぞれ 578 日、9.0 日であった。また、pH9 の 40°C 及び 25°C ではそれぞれ 17.1 日及び 204 日であった。主要分解物として B 及び C が認められ、pH9、50°C では 120 日後にはフロニカミドは認められず、B 及び C が、それぞれ 11% 及び 85% 生成した。(参照 12)

## (2) 水中光分解試験

<sup>14</sup>C-フロニカミドを滅菌緩衝液 (pH7) に 1mg/L となるように加えた後、23±2°C で 15 日間キセノン照射(290nm 未満除去) (10.6W/m<sup>2</sup>、測定波長 290~348nm) し、フロニカミドの水中光分解試験が実施された。

半減期は光照射区において 267 日、春期における東京(北緯 35°)の太陽光換算で 1330 日であり、光分解に対して安定であった。(参照 13)

## (3) 水中光分解試験(蒸留水、河川水)

<sup>14</sup>C-フロニカミドを滅菌蒸留水及び河川水(利根川より採取)に 5mg/L となるように加えた後、25°C で 30 日間キセノン照射(290nm 未満除去) (300~400nm 35.7W/m<sup>2</sup>、300~800nm 285W/m<sup>2</sup>) し、フロニカミドの蒸留水及び河川水における水中光分解試験が実施された。

半減期は蒸留水で 495 日、河川水で 198 日、春期における東京(北緯 35°)の太陽光換算でそれぞれ 2270 日及び 909 日であり、光分解に対して安定であった。(参照 14)

## 5. 作物残留試験

果樹、野菜、茶等を用いて、フロニカミド、代謝物 C 及び E を分析対象化合物とした作物残留試験が実施された。分析法はメタノール抽出した試料を精製後、GC/MS 法及び LC/MS/MS 法で定量するものであった。

その結果は別紙 3 のとおりであり、フロニカミド、代謝物 C 及び E の合計値の最高は 100g ai/ha で 7 日目に収穫した茶(荒茶)の 20.4mg/kg であったが、14 日目、21 日目には、それぞれ 8.36 mg/kg、3.13 mg/kg と減衰した。代謝物 C 又は E は、ばれいしょ、ナス、きゅうり、メロン及びウメを用いた試験でフロニカミドを上回る場合があった。(参照 15~17)

上記の作物残留試験結果を用いて、フロニカミド、代謝物 C 及び E を暴露評価対象物質として農産物から摂取される推定摂取量を表 9 に示した。

なお、本推定摂取量の算定は、予想される使用方法からフロニカミド、代謝物 C 及び E が最大の残留を示す使用条件で、全ての適用作物に使用され、加工・調理による残留農薬の増減が全くないとの仮定の下に行った。

表9 食品中より摂取されるフロニカミド、代謝物C及びEの代謝物の推定摂取量（単位：μg/人/日）

作物名	残留値 (mg/kg)	国民平均		小児（1～6歳）		妊婦		高齢者（65歳以上）	
		ff (g/人/日)	摂取量 (μg/人/日)	ff (g/人/日)	摂取量 (μg/人/日)	ff (g/人/日)	摂取量 (μg/人/日)	ff (g/人/日)	摂取量 (μg/人/日)
ばいしょ	0.09	36.6	3.29	21.3	1.92	39.8	3.58	27	2.43
ナス	0.91	4	3.64	0.9	0.82	3.3	3.00	5.7	5.19
きゅうり	0.39	16.3	6.36	8.2	3.20	10.1	3.94	16.6	6.47
メロン類	0.58	0.4	0.23	0.3	0.17	0.1	0.06	0.3	0.17
りんご	0.15	35.3	5.30	36.2	5.43	30	4.50	35.6	5.34
日本なし	0.12	5.1	0.61	4.4	0.53	5.3	0.64	5.1	0.61
もも	0.55	0.5	0.28	0.7	0.39	4	2.20	0.1	0.06
ウメ	0.69	1.1	0.76	0.3	0.21	1.4	0.97	1.1	0.76
イチゴ	0.31	0.3	0.09	0.4	0.12	0.1	0.03	0.3	0.09
茶	20.4	3	61.2	1.4	28.6	3.5	71.4	4.3	87.7
合計			81.8		41.4		90.3		109

注) ・残留値は、予想される使用時期・使用回数のうちフロニカミド、代謝物C及びEの合計の最大になる試験区の平均残留値を用いた（参照 別紙3）。

- ・「ff」：平成10年～12年の国民栄養調査（参照67～69）の結果に基づく農産物摂取量（g/人/日）
- ・「摂取量」：残留値及び農産物摂取量から求めたフロニカミド、代謝物C及びEの合計の推定摂取量（μg/人/日）

## 6. 土壌残留試験

火山灰軽埴土及び沖積灰褐色系壤土を用いて、フロニカミド及びフロニカミドと分解物（B、C、D、E及びF）を分析対象とした土壌残留試験（容器内及び圃場）が実施された。

推定半減期は表10のとおりであり、フロニカミドとして0.8～3.5日、フロニカミドと分解物としては、1.3～5.9日であった。（参照18）

表10 土壌残留試験成績（推定半減期）

試験	濃度*	土壌	フロニカミド	フロニカミド 及び分解物
容器内試験	0.3mg/kg	火山灰軽埴土	1.2日	2.0日
		沖積灰褐色系壤土	0.8日	1.3日
圃場試験	300g ai/ha	火山灰軽埴土	3.5日	5.9日
		沖積灰褐色系壤土	2.7日	2.8日

\*容器内試験で純品、圃場試験で顆粒水和剤を使用



## 7. 一般薬理試験

マウス、ラットを用いた一般薬理試験が実施された。結果は表 11 に示すとおり。

(参照 19)

表 11 一般薬理試験

試験の種類	動物種	動物数 匹/群	投与量 mg/kg 体重	無作用量 mg/kg 体重	作用量 mg/kg 体重	結果の概要	
中枢神経系	一般状態	マウス	雄 3 雌 3	0, 128, 320, 800, 2000	128	320	800mg/kg 体重群以上の雌雄では全例死亡、320mg/kg 体重群の雌で2/3例死亡、320mg/kg 体重群以上では認知力、運動性、中枢神経興奮、姿勢運動失調、反射、興奮性症状及び抑制症状。
		ラット	雄 5	0, 320, 800, 2000, 5000	2000	5000	5000mg/kg 体重群の雄で 2/5 例死亡、自発運動能低下、腹這い、流涎、横臥、あえぎ呼吸、呼吸数の減少、口周囲の血による汚れ、よろめき歩調。
	睡眠時間延長 ヘキソバルビタール睡眠	マウス	雄 8	0, 20.5, 51.2, 128, 320, 800	51.2	128	800mg/kg 体重群では死亡、128mg/kg 体重群以上で用量に依存した睡眠時間の延長、320mg/kg 体重群では対照の約 3.5 倍。
呼吸循環器系	血圧・心拍数	ラット	雄 5	0, 800, 2000, 5000	800	2000	5000mg/kg 体重群で 4/5 例死亡、2000mg/kg 体重群以上で血圧低下、500mg/kg 体重群で心拍数減少。
自律神経系	体温、瞳孔径	ラット	雄 5	0, 320, 800, 2000, 5000	800	2000	5000mg/kg 体重群で 2/5 例死亡、2000mg/kg 体重群以上で体温低下及び縮瞳。
消化器系	小腸炭末輸送	マウス	雄 8	0, 20.5, 51.2, 128, 320, 800	320	800	800mg/kg 体重群で死亡、320mg/kg 体重群以下では投与による影響なし。
骨格筋	握力	ラット	雄 5	0, 320, 800, 2000, 5000	5000	—	5000mg/kg 体重群で 2/5 死亡。投与による影響なし。
腎臓	腎機能	ラット	雄 5	0, 51.2, 128, 320, 800, 2000, 5000	320	800	5000mg/kg 体重群で pH 減少及びケトン体増加、2000mg/kg 体重群以上でグルコース増加、800mg/kg 体重群以上で Cl 減少、800 又は 2000 mg/kg 体重群で尿量、Na、K の排泄量減少、浸透圧と蛋白質増加。320mg/kg 体重群以下では影響なし。潜血は全群で影響なし。

・検体はフロニカミド原体をポリソルベート 80(1%)に懸濁したものをラットについて単回経口投与し、マウスについては腹腔内投与した。

## 8. 急性毒性試験

### (1) 急性毒性試験

フロニカミドのSDラットを用いた急性経口毒性試験、急性経皮毒性試験及び急性吸入毒性試験が実施された。

急性経口LD<sub>50</sub>は雄で884mg/kg体重、雌で1770mg/kg体重、経皮LD<sub>50</sub>は雌雄で5000mg/kg体重超、吸入LC<sub>50</sub>は雌雄で4.90mg/L超であった。(参照20~22)

代謝物C、E、D及びFについてWistラットを用いた急性経口毒性試験が実施された。

急性経口LD<sub>50</sub>は実施された代謝物全てにおいて、雌雄で2000mg/kg体重超であった。(参照23~26)

### (2) 急性神経毒性試験(ラット)

SDラット(一群雌雄各10匹)を用いた強制単回経口(原体:0、100、300、600(雄のみ)、1000mg/kg体重)投与による14日間の急性神経毒性試験が実施された。

1000mg/kg体重投与群の雌雄で投与30~60分後の観察で着地時後肢開脚距離の増加、雄で投与30~60分後の観察で歩行移動距離の減少が認められた。

なお、1000mg/kg体重投与群の雄一匹が投与翌日に死後発見された。

本試験における無毒性量は、雄で600mg/kg体重、雌で300mg/kg体重であると考えられた。(参照27)

## 9. 眼・皮膚に対する刺激性及び皮膚感作性

ニュージーランド白色ウサギを用いた眼一次刺激性試験及び皮膚一次刺激性試験が実施されており、フロニカミド原体は皮膚に対する刺激性は認められず、眼に軽度の刺激性が認められた。(参照28~29)

ハートレー系モルモットを用いた皮膚感作性試験(Maximization法)が実施されており、フロニカミド原体に皮膚感作性は認められなかった。(参照30)

## 10. 亜急性毒性試験

### (1) 90日間亜急性毒性試験(マウス)

ICRマウス(一群雌雄各10匹)を用いた混餌(原体:0、100、1000、7000ppm:表12参照)投与による90日間亜急性毒性試験が実施された。

表12 マウス90日間亜急性毒性試験の平均検体摂取量

投与群		100ppm	1000ppm	7000ppm
検体摂取量 (mg/kg体重/日)	雄	15.3	154	1070
	雌	20.1	192	1250

各投与群で認められた主な所見は表13に示すとおり。

本試験において1000ppm以上投与群の雄で小葉中心性肝細胞肥大が、7000ppm投与群の雌で肝及び脾比重量増加等が認められたことから、無毒性量は雄で100ppm

(15.3mg/kg 体重/日)、雌で 1000ppm (192mg/kg 体重/日) であると考えられた。  
(参照 31)

表 13 マウス 90 日間亜急性毒性試験で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
7000ppm	<ul style="list-style-type: none"> <li>・体重増加抑制</li> <li>・自発運動の減少</li> <li>・MCV、MCH 及び網赤血球数増加</li> <li>・赤血球数、Hb、Ht 及び血小板数減少</li> <li>・血清中クレアチニン、総ビリルビン、ナトリウム及びカルシウム増加</li> <li>・血清中カリウム減少</li> <li>・肝及び脾比重量<sup>1</sup>増加</li> <li>・胸骨髄の低形成及び色素沈着亢進</li> <li>・脾の髄外性造血亢進及び色素沈着亢進</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・体重増加抑制</li> <li>・摂餌量減少</li> <li>・自発運動の減少</li> <li>・MCV、MCH 及び網赤血球数増加</li> <li>・赤血球数、Hb 及び Ht 減少</li> <li>・血清中グルコース増加</li> <li>・肝及び脾比重量増加</li> <li>・胸骨髄の低形成及び色素沈着亢進</li> <li>・小葉中心性肝細胞肥大</li> <li>・脾の髄外性造血亢進及び色素沈着亢進</li> </ul>
1000ppm 以上	・小葉中心性肝細胞肥大	1000ppm 以下毒性所見なし
100ppm	毒性所見なし	

(2) 90 日間亜急性毒性試験 (ラット)

Wistar ラット (一群雌雄各 12 匹) を用いた混餌 (原体: 0、50(雄のみ)、200、1000、2000(雄のみ)、5000(雌のみ)ppm : 表 14 参照) 投与による 90 日間亜急性毒性試験が実施された。

表 14 ラット 90 日間亜急性毒性試験の平均検体摂取量

投与群		50ppm	200ppm	1000ppm	2000ppm	5000ppm
検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	3.08	12.1	60.0	119	—
	雌	—	14.5	72.3	—	340

各投与群で認められた主な所見は表 15 に示すとおり。

200ppm 投与群の雄で腎近位尿細管硝子滴沈着が認められたが、この硝子滴は  $\alpha 2u$  グロブリンの沈着であると確認されており、これは雄ラットに特異的な所見であるため、ヒトにおけるリスク評価には外挿されないものと考えた。

本試験において 1000ppm 投与群雄で腎尿細管好塩基性変化及び顆粒状尿円柱等が、5000ppm 投与群雌で腎近位尿細管細胞空胞化等が認められたため、無毒性量は雄で 200ppm (12.1mg/kg 体重/日)、雌で 1000ppm (72.3mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 32)

<sup>1</sup> 体重比重量を比重量という。(以下同じ)

表 15 ラット 90 日間亜急性毒性試験で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
5000ppm		<ul style="list-style-type: none"> <li>・摂餌量減少</li> <li>・MCHC 増加</li> <li>・Ht 減少</li> <li>・血漿中 TG 減少</li> <li>・肝及び腎比重量増加</li> <li>・小葉中心性肝細胞肥大</li> <li>・腎近位尿細管細胞空胞化</li> </ul>
2000ppm		<ul style="list-style-type: none"> <li>・眼周囲赤色物付着</li> <li>・血漿中 TG 減少</li> <li>・腎退色</li> <li>・小葉中心性肝細胞肥大</li> </ul>
1000ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> <li>・腎比重量増加</li> <li>・腎尿細管好塩基性変化及び顆粒状尿円柱</li> </ul>	1000ppm 以下毒性所見なし
200ppm 以下	毒性所見なし*	

※：腎近位尿細管硝子滴沈着が 200ppm 以上の雄で認められているが、 $\alpha 2u$  グロブリンの沈着が確認されており種特異的变化であることから、無毒性量の根拠とはしなかった。

### (3) 代謝物 C の 90 日間亜急性毒性試験 (ラット)

Wistar ラット (一群雌雄各 5 匹) を用いた混餌 (代謝物 C : 雄 : 0、50、2000、雌 : 0、200、5000ppm : 表 16 参照) 投与による 90 日間亜急性毒性試験が実施された。

表 16 代謝物 C のラット 90 日間亜急性毒性試験の平均検体摂取量

投与群		50ppm	200ppm	2000ppm	5000ppm
検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	3.56	—	135	—
	雌	—	16.5	—	411

全ての投与群において、代謝物 C 投与による影響は認められなかった。

本試験における無毒性量は雄で 2000ppm (135mg/kg 体重/日)、雌で 5000ppm (411mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 33)

### (4) 代謝物 E の 90 日間亜急性毒性試験 (ラット)

Wistar ラット (一群雌雄各 5 匹) を用いた混餌 (代謝物 E : 雄 : 0、50、2000、雌 : 0、200、5000ppm : 表 17 参照) 投与による 90 日間亜急性毒性試験が実施された。

表 17 代謝物 E のラット 90 日間亜急性毒性試験の平均検体摂取量

投与群		50ppm	200ppm	2000ppm	5000ppm
検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	3.42	—	136	—
	雌	—	15.9	—	409

全ての投与群において、代謝物 E 投与による影響は認められなかった。  
本試験における無毒性量は雄で 2000ppm (136mg/kg 体重/日)、雌で 5000ppm (409mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 34)

#### (5) 90 日間亜急性毒性試験 (イヌ)

ビーグル犬 (一群雌雄各 4 匹) を用いた強制経口 (原体: 0、3、8、20、50(雌のみ) mg/kg 体重/日) 投与による 90 日間亜急性毒性試験が実施された。

50mg/kg 体重/日投与群の雌で嘔吐、虚脱、疲弊及び痙攣 (1 例は投与 4 週目に切迫屠殺し、投与 9 週目に虚脱、疲弊症状が認められた別の 1 例については投与中止とした)、体重増加抑制、摂餌量減少、赤血球数減少、網状赤血球数増加が、また各一例ずつではあるが腎尿細管空胞化及び回盲弁部の出血が認められた。腓浮腫、胸腺退縮は瀕死期に切迫殺した一例に認められた。

本試験において 50mg/kg 体重/日投与群の雌で網状赤血球数増加等が認められたため、無毒性量は雌雄で 20mg/kg 体重/日であると考えられた。(参照 35)

#### (6) 90 日間亜急性神経毒性試験 (ラット)

SD ラット (一群雌雄各 10 匹) を用いた混餌 (原体: 0、200、1000、10000 ppm : 表 18 参照) 投与による亜急性毒性試験が実施された。

表 18 ラット 90 日間亜急性神経毒性試験の平均検体摂取量

投与群		200ppm	1000ppm	10000ppm
検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	13	67	625
	雌	16	81	722

10000ppm 投与群の雌雄で体重増加抑制、摂餌量減少が認められた。神経毒性は認められない。

本試験において 10000ppm 投与群雌雄で体重増加抑制等が認められたため、無毒性量は雌雄で 1000ppm (雄: 67mg/kg 体重/日、雌: 81mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 36)

### 1.1. 慢性毒性試験及び発がん性試験

#### (1) 1 年間慢性毒性試験 (イヌ)

ビーグル犬 (一群雌雄各 6 匹) を用いた強制経口 (原体: 0、3、8、20mg/kg 体重) 投与による 1 年間の慢性毒性試験が実施された。

20mg/kg 体重/日投与群の雌雄で MCH 及び網状赤血球数増加、雄で MCV 増加、腎比重量増加、雌で体重増加抑制、心及び甲状腺比重量増加が認められた。

本試験において 20mg/kg 体重/日投与群の雌雄で網状赤血球数増加が認められたこと等から、無毒性量は雌雄で 8mg/kg 体重/日であると考えられた。(参照 37)

(2) 104 週間慢性毒性/発がん性併合試験 (ラット)

Wistar ラット (一群雌雄各 52 匹、衛星群 I : 14 匹 (52 週後に 10 匹を中間屠殺)、衛星群 II : 10 匹 (26 週後に中間屠殺)) を用いた混餌 (原体 : 雄 : 0、50、100、200、1000、雌 : 0、200、1000、5000ppm : 表 19 参照) 投与による 104 週間の慢性毒性/発がん性併合試験が実施された。

表 19 ラット 104 週間慢性毒性/発がん性併合試験の平均検体摂取量

投与群		50ppm	100ppm	200ppm	1000ppm	5000ppm
検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	1.84	3.68	7.32	36.5	—
	雌	—	—	8.92	44.1	219

各投与群で認められた主な所見は表 20 に示すとおり。

本試験において 1000ppm 投与群雄又は 5000ppm 投与群雌で慢性腎症が認められたこと等から、無毒性量は雄で 200ppm(7.32mg/kg 体重/日)、雌で 1000ppm (44.1mg/kg 体重/日)であると考えられた。発がん性は認められない。(参照 38)

表 20 ラット 104 週間慢性毒性/発がん性併合試験で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
5000ppm	/	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 体重増加抑制</li> <li>・ 摂餌量減少</li> <li>・ Ht、Hb、MCHC 及び赤血球数減少</li> <li>・ 血漿中 <math>\gamma</math>-GTP 及び総コレステロール増加</li> <li>・ 血漿中 TG 減少</li> <li>・ 尿比重減少</li> <li>・ 肝及び腎比重量増加</li> <li>・ 副腎比重量減少</li> <li>・ 肝暗調化及び小葉像明瞭</li> <li>・ 下腿横紋筋線維萎縮</li> <li>・ 前胃びらん・潰瘍</li> <li>・ 小葉中心性肝細胞肥大、肝細胞小増殖巣 (好酸性細胞)</li> <li>・ 慢性腎症、近位尿細管空胞化及び近位尿細管褐色色素 (リポフスチン) 沈着</li> <li>・ 白内障、網膜萎縮</li> </ul>

1000ppm <sup>*</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・尿比重減少、尿量増加</li> <li>・前胃びらん・潰瘍</li> <li>・腎尿細管好塩基性変化、顆粒状尿円柱及び慢性腎症</li> </ul>	1000ppm 以下毒性所見なし
200ppm 以下	毒性所見なし	

※：腎近位尿細管硝子滴沈着が 1000ppm 以上の雄で認められているが、 $\alpha 2u$  グロブリンの沈着が確認されており種特異的变化であることから、毒性所見から除外した。

### (3) 78 週間発がん性試験 (マウス)

ICR マウス (一群雌雄各 60 匹、衛星群 I : 一群雌雄各 10 匹 (52 週時に中間屠殺)、衛星群 II : 一群雌雄各 10 匹 (26 週時に中間屠殺)) を用いた混餌 (原体 : 0、250、750、2250 ppm : 表 21 参照) 投与による 78 週間の発がん性試験が実施された。

表 21 マウス 78 週間発がん性試験の平均検体摂取量

投与群		250ppm	750ppm	2250ppm
検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	29	88	261
	雌	38	112	334

各投与群で認められた主な所見は表 22 及び 23 に示すとおり。

本試験において肺腫瘍の増加が認められた。雌雄ともに無毒性量は設定されなかった。(参照 39)

表 22 マウス 78 週間発がん性試験で認められた毒性所見 (腫瘍性病変以外)

投与群	雄	雌
2250ppm	<ul style="list-style-type: none"> <li>・腎比重量減少</li> <li>・脾色素沈着</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・肝比重量増加</li> <li>・小葉中心性肝細胞肥大</li> <li>・脾色素沈着</li> <li>・胸骨髄細胞低形成及び色素沈着</li> </ul>
750ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> <li>・肺結節増加</li> <li>・肺胞・細気管支上皮過形成</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・肺血管周囲単核細胞浸潤</li> <li>・胸骨髄細胞低形成</li> </ul>
250ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> <li>・肺終末細気管支上皮細胞肥大</li> <li>・小葉中心性肝細胞肥大</li> <li>・脾髄外性造血亢進</li> <li>・胸骨髄色素沈着</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・肺終末細気管支上皮細胞肥大</li> </ul>

表 23 マウス発がん性試験で認められた肺腫瘍

性別		雄				雌			
投与群 (ppm)		0	250	750	2250	0	250	750	2250
検査動物数		60	60	60	60	60	60	60	60
肺	腺腫	7	25**	25**	33**	9	20*	30**	24**
	腺癌	4	6	12*	12*	0	3	3	7**

Fisher の直接確率計算法 \* : p<0.05、\*\* : p<0.01

(4) 78 週間発がん性試験 -追加試験- (マウス)

ICR マウス (一群雌雄各 50 匹) を用いた混餌 (原体 : 0、10、25、80、250 ppm : 表 24 参照) 投与による 78 週間の発がん性試験が実施された。

表 24 マウス 78 週間発がん性試験 (追試) の平均検体摂取量

投与群		10ppm	25ppm	80ppm	250ppm
検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	1.20	3.14	10.0	30.3
	雌	1.42	3.66	11.8	36.3

250ppm 投与群の雌雄で肺終末細気管支上皮細胞過形成/肥大が、雄では肺腫瘍及び肺腫瘍 (肺腺腫及び肺癌) が認められた。肺腫瘍の頻度については表 25 に示す。

本試験において 250ppm 投与群の雌雄で肺終末細気管支上皮細胞過形成/肥大が、また 250ppm 投与群の雄では肺腺腫及び肺癌が認められたこと等から、無毒性量は雌雄で 80ppm (雄 : 10.0mg/kg 体重/日、雌 : 11.8mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 40)

表 25 マウス発がん性試験で認められた肺腫瘍

性別		雄					雌				
投与群 (ppm)		0	10	25	80	250	0	10	25	80	250
検査動物数		50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
肺	細気管支・ 肺腺腫	8	11	12	11	21**	10	8	11	14	13
	細気管支・ 肺胞癌	3	6	3	4	9	1	4	2	3	3
	腺腫+癌*	11	16	15	14	27**	10	12	12	16	16

Fisher の直接確率計算法 \* : p<0.05、\*\* : p<0.01

※ : 腺腫と癌を併せ持つ個体は重複カウントしていないため、合計値は必ずしも一致しない。

12. 生殖発生毒性試験

(1) 2 世代繁殖試験

Wistar ラット (一群雌雄各 24 匹) を用いた混餌 (原体 : 0、50、300、1800ppm : 表 26 参照) 投与による 2 世代繁殖試験が実施された。



表 26 2 世代繁殖試験における検体摂取量

投与群		50ppm	300ppm	1800ppm	
検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	親 P 雄	児 F <sub>1</sub> 雄	3.07	18.3	109
	親 P 雌	児 F <sub>1</sub> 雌	4.67	28.2	164
	親 F <sub>1</sub> 雄	児 F <sub>2</sub> 雄	3.39	20.7	125
	親 F <sub>1</sub> 雌	児 F <sub>2</sub> 雌	4.95	30.5	177

親動物では 1800ppm 投与群の雌雄で肝 (F<sub>1</sub>) 及び腎(P 雄及び F<sub>1</sub> 雌雄)比重量増加、雄で精囊 (F<sub>1</sub>) 及び甲状腺 (P) 比重量増加、腎退色 (P、F<sub>1</sub>)、尿細管好塩基性化及び顆粒状尿円柱 (P、F<sub>1</sub>)、雌で副腎及び卵巣比重量減少 (P)、近位尿細管空胞化 (P、F<sub>1</sub>)、膣開口遅延(F<sub>1</sub>)が認められた。300ppm 以上投与群の雄で腎近位尿細管硝子滴沈着が認められているが、 $\alpha$ 2u グロブリンの沈着が確認されており種特異的变化であることから、無毒性量の根拠とはしなかった。

児動物では 1800ppm 投与群の雌で子宮比重量減少(F<sub>1</sub>)が認められた。

本試験において 1800ppm 投与群の親動物雌雄で肝及び腎比重量増加が、児動物雌で子宮比重量減少が認められたこと等から、無毒性量は親動物の雌雄で 300ppm(P 雄: 18.3mg/kg 体重/日、P 雌:28.2mg/kg 体重/日、F<sub>1</sub> 雄:20.7mg/kg 体重/日、F<sub>1</sub> 雌:30.5mg/kg 体重/日)、児動物の雄で 1800ppm(F<sub>1</sub> 雄: 109mg/kg 体重/日、F<sub>2</sub> 雄: 125mg/kg 体重/日)、雌で 300ppm(F<sub>1</sub> 雌: 28.2mg/kg 体重/日、F<sub>2</sub> 雌: 30.5mg/kg 体重/日)であると考えられた。(参照 41)

## (2) 発生毒性試験 (ラット)

Wistar ラット (一群雌 24 匹) の妊娠 6~19 日に強制経口 (原体: 0、20、100、500 mg/kg 体重/日) 投与して発生毒性試験が実施された。

母動物では、500mg/kg 体重/日投与群で肝比重量増加、小葉中心性肝細胞腫大、腎尿細管空胞化が認められた。

胎児では 500mg/kg 体重/日投与群で頸肋骨の発現頻度の上昇が認められた。

本試験において 500mg/kg 体重/日投与群の母動物で小葉中心性肝細胞腫大が、胎児で頸肋骨の発現頻度の上昇が認められたこと等から、無毒性量は母動物及び胎児で 100mg/kg 体重/日であると考えられた。催奇形性は認められない。(参照 42)

## (3) 発生毒性試験 (ウサギ)

日本白色ウサギ (一群雌 25 匹) の妊娠 6~27 日に強制経口 (原体: 0、2.5、7.5、25mg/kg 体重/日) 投与して発生毒性試験が実施された。

母動物では、25mg/kg 体重/日で体重増加抑制が認められた。

胎児では投与の影響は認められなかった。

本試験において 25mg/kg 体重/日投与群の母動物で体重増加抑制が認められたことから、無毒性量は、母動物で 7.5mg/kg 体重/日、胎児で 25mg/kg 体重/日であると考えられた。催奇形性は認められない。(参照 43)

### 13. 遺伝毒性試験

フロニカミドの細菌を用いた復帰突然変異試験、マウスリンパ腫細胞を用いた *in vitro* 遺伝子突然変異試験、チャイニーズハムスター肺腺維芽細胞 (CHL) を用いた *in vitro* 染色体異常試験、ラット肝細胞を用いた *in vivo* 不定期 DNA 合成(UDS)試験、マウスを用いた小核試験、マウス結腸、肝及び肺におけるコメットアッセイが実施された。試験結果は全て陰性であった。

従って、フロニカミドに遺伝毒性はないものと考えられた。(表 27) (参照 44~49)

表 27 遺伝毒性試験結果概要 (原体)

試験		対象	投与量・処理濃度	結果
<i>in vitro</i>	復帰突然変異試験 (参照 44)	<i>S. typhimurium</i> TA98,TA100,TA1535, TA1537 株 <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i> 株	61.7~5000 $\mu$ g/7 <sup>レ</sup> ト (+/-S9)	陰性
	遺伝子突然変異試験 (参照 45)	マウスリンパ腫細胞 L5178Y TK <sup>+</sup> /-3.7.2.C	28.3~2290 $\mu$ g/mL (+/-S9)	陰性
	染色体異常試験 (参照 46)	チャイニーズハムスター肺腺維芽細胞(CHL)	573~2290 $\mu$ g/mL (+/-S9)	陰性
<i>in vivo</i> <i>/in vitro</i>	UDS 試験 (参照 47)	SD ラット (肝細胞) (一群雄 6 匹)	0, 600, 2000 mg/kg 体重 (強制単回経口投与)	陰性
<i>in vivo</i>	小核試験 (参照 48)	ICR マウス (一群雌雄各 5 匹)	雄 : 0, 250, 500, 1000 雌 : 0, 125, 250, 500 mg/kg 体重 (24 時間間隔で 2 回)強制経口投与	陰性
	コメットアッセイ (結腸、肝臓、肺) (参照 49)	ddY マウス (一群雄 4 匹)	0, 375, 750, 1500 mg/kg 体重 強制単回経口投与	陰性

注) +/-S9 : 代謝活性化系存在下及び非存在下

代謝物 C、D、E 及び F の細菌を用いた復帰突然変異試験が実施されており、試験結果は全て陰性であった。(表 28) (参照 50~53)

表 28 遺伝毒性試験結果概要 (代謝物)

試験		被験物質	対象	処理濃度	結果
<i>in vitro</i>	復帰突然変異試験	代謝物 C	<i>S. typhimurium</i> TA98,TA100,TA1535,	5~5000 $\mu$ g/7 <sup>レ</sup> ト (+/-S9)	陰性

	(参照 50~53)	代謝物 D	TA1537 株 <i>E. coli</i> WP2uvrA 株	33~5000 $\mu$ g/7 $^\circ$ レト (+/-S9)	陰性
		代謝物 E		33~5000 $\mu$ g/7 $^\circ$ レト (+/-S9)	陰性
		代謝物 F		33~5000 $\mu$ g/7 $^\circ$ レト (+/-S9)	陰性

注) +/-S9 : 代謝活性化系存在下及び非存在下

#### 1 4. その他の毒性試験

##### (1) 3日間混餌投与によるマウス肺での細胞分裂解析

ICR マウス (一群雄 5 匹) を用い 3 日間混餌 (原体 : 0、80、250、750、2250ppm、0、12.3、40.9、130、340 mg/kg 体重/日に相当) 投与し、解剖後、肺の組織標本を作製し、BrdU 免疫染色によるマウス肺での細胞分裂解析が実施された。

750ppm 以上投与群で肺細胞気管支上皮細胞の細胞分裂亢進が認められた。80ppm 投与群にはこの作用は認められず、80~250ppm の間にマイトジェン活性の閾値が存在すると考えられた。(参照 54)

##### (2) 3日間混餌投与による肺における細胞分裂のマウスとラット間の種差比較試験

ICR マウス及び Wistar ラット (ともに一群雌 5 匹) を用い 3 日又は 7 日間混餌 (原体 : マウス : 0、2250ppm、ラット : 0、5000ppm、マウス : 0、374~386、ラット : 0、392~403mg/kg 体重/日に相当) 投与し、解剖後、肺の組織標本を作製し、BrdU 免疫染色による肺の細胞分裂解析によりマウスとラット間の種差比較試験が実施された。

マウスでは 3 日及び 7 日間の投与後に 2250ppm 投与群で肺の終末細気管支上皮細胞の細胞分裂亢進が認められたが、ラットでは両投与期間ともに増加は認められなかった。(参照 55)

##### (3) 28日間混餌投与及びその回復試験におけるマウス肺への作用とその回復性

ICR マウス (一群雄 5 匹) を用い 28 日間混餌 (原体 : 0、2250ppm、0、303 mg/kg 体重/日に相当) 投与し、解剖後、肺の組織標本を作製し、光学顕微鏡によるクララ細胞の形態変化や数の変化の観察、BrdU 免疫染色によるマウス肺での細胞分裂解析及び 28 日投与群とその回復群のマウスの肺について電子顕微鏡学的検査が実施された。

28 日間混餌投与した 2250ppm 投与群では肺細胞気管支上皮細胞の細胞分裂亢進、クララ細胞の突出、肥大、細胞質の分泌顆粒増加及び肥大が認められたが、回復群 (1 週間後、2 週間後及び 4 週間後) では BrdU 陽性細胞の増加は認められず、クララ細胞は投与 1 週間後には正常形態に回復した。(参照 56)

##### (4) フロニカミド及びその代謝物 C、D、E を用いた短期間混餌投与試験におけるマウス肺での BrdU による細胞分裂解析

ICR マウス (一群雄 5 匹) を用い 3 日又は 7 日間混餌 (フロニカミド、代謝物 C、D

及び E 各々：0、2250ppm、フロニカミド：0、330～389、代謝物 C：0、318～402、D：0、332～385、E：0、336～364mg/kg 体重/日に相当) 投与し、解剖後、肺の組織標本を作製し、フロニカミド及びその代謝物 C、D、E の BrdU 免疫染色によるマウス肺の細胞分裂解析が実施された。

フロニカミドでは 3 日及び 7 日間の投与後に 2250ppm 投与群で肺の終末細気管支上皮細胞の細胞分裂亢進が認められたが、代謝物では両投与期間ともに増加は認められなかった。(参照 57)

#### (5) フロニカミド及びイソニアジドのマウス 3 系統の 3 日間混餌投与による肺の細胞分裂解析比較試験

ICR マウス (一群雄 5 匹)、B6C3F1 マウス (一群雄 5 匹) 及び C57 マウス (一群雄 5 匹) を用いフロニカミド又はイソニアジドを 3 日混餌 (フロニカミド、イソニアジド各々：0、2250ppm、フロニカミド：0、299～306、イソニアジド：0、290～325mg/kg 体重/日に相当) 投与し、解剖後、肺の組織標本を作製し、BrdU 免疫染色によるマウス肺の細胞分裂解析を行い、フロニカミド及びイソニアジドに対するマウス 3 系統間の比較試験が実施された。

フロニカミドでは ICR マウスの 2250ppm 投与群でのみ肺の終末細気管支上皮細胞の細胞分裂亢進が認められたが、イソニアジドでは 3 系統全てのマウスの 2250ppm 投与群で肺の終末細気管支上皮細胞の細胞分裂亢進が認められ、その増加レベルは ICR>B6C3F1>C57 マウスであった。(参照 58)

#### (6) ラットを用いた繁殖毒性試験におけるメカニズム試験

ラットを用いた繁殖試験 (11. 1) の F<sub>1</sub> 世代で正常分娩したペアーの雌雄各親 8 匹から採取した血清を用いて、血清中の性腺刺激ホルモン及び性ホルモン濃度 (雄：FSH、LH、テストステロン、雌：FSH、LH、エストラジオール、プロゲステロン) に対するフロニカミド投与の影響について確認が行われるとともに、フロニカミドのエストロゲン受容体 ( $\alpha$  及び  $\beta$ ) に対するエストロゲン様活性の影響を確認するためレセプターバインディングアッセイが実施された。

ホルモン測定については、1800ppm 群の雌で FSH 増加、エストラジオールの減少傾向が、300ppm 投与群以上の雌で LH 増加が認められた。

レセプターバインディングアッセイの結果、フロニカミドはエストロゲン受容体  $\alpha$  及び  $\beta$  とエストラジオールとほぼ同等に結合親和力を持つ蛍光リガンドの結合を生物学的に意味のあるレベルで阻害しなかった。

フロニカミド投与により、詳細なメカニズムは明らかではないがエストラジオール生成及び血中濃度が減少するが、エストロゲン受容体へ直接関与するものではなく、その影響と FSH 及び LH が増加するといった正のフィードバック機構には用量相関があると考えられた。(参照 59)