

globulin (TBG) を遺伝的に欠損しており、肝臓での代謝亢進により血中のT4量が減少すると、フィードバック的に甲状腺刺激ホルモン (Thyroid gland-stimulating hormone: TSH) の分泌が亢進、その結果として甲状腺機能亢進・濾胞細胞の増殖・腫瘍化を起こす。したがって、甲状腺の腫瘍化はラットに特異的なものであり、fipronilのヒトに対する健康影響評価の際にキーとなる毒性は中枢神経毒性となる。いずれの毒性試験においても中枢神経毒性に関して無毒性量 (NOAEL) が設定されており、最も小さな値を示したラット慢性毒性・発癌性併合試験のNOAELは、中枢神経毒性を基準に設定されている。各国で設定されたfipronilのADIは、いずれもこのNOAELを基準に算出されたものであるため、fipronilの中枢神経毒性に対する安全性は、このADIによって十分に確保されていると考えることができる。

本稿では、fipronilの国内外農薬登録に用いられた毒性試験結果を基に、その毒性プロファイルを示すとともに、ヒトに対する健康影響評価に重要なADIの設定に関して紹介する。

1. 殺虫剤 fipronil とは？

fipronilは、日本の水稲用殺虫剤プリンスやイヌ・ネコのノミ・ダニ退治薬フロント・ラインの主成分原体であり、フェニルピラゾールに属する合成殺虫剤である。このほか、アメリカ、アフリカおよびオーストラリアにおいても、ゴキブリ、シロアリおよびイナゴの駆除に用いられるなど、1993年以降、世界中のさまざまな地域で使用されている用途の幅広い殺虫剤である¹⁻³⁾。

ピレスロイド剤や有機リン剤と同様に、fipronilもまた神経伝達系に作用するが、その作用機作は他の剤と大きく異なり、Resistant to Dieldrin (RDL)/ γ -amino butyric acid (GABA)受容体を標的分子としている (図1)³⁻⁵⁾。さらに、RDL/GABA受容体群と分類されるもののなかでも、「Ligand-gated ion channel: GABA A受容体」と呼ばれるものが重要であり³⁻⁵⁾、fipronil抵抗性昆虫の遺伝子解析やGABA A受容体の立体構造解析から、GABA A受容体におけるfipronilの結合部位 (第2膜貫通領域)⁶⁾や結合モチーフ (第2膜貫通領域内)⁷⁾が明らかにされている (図1)。GABA A受容体として、哺乳動物では $\alpha \cdot \beta \cdot \gamma$ subunitが存在し、さらにそれぞれのsubunitに複数のisotypeが単離されている。これら3種類のsubunitが図1に示すような中心部にporeを有する五量体を形成し、リガンドであるGABAの刺激により細胞外のCl⁻を細胞内に取り込むことでGABA作動性神経細胞の神経伝達を制御している。fipronilはGABA A受容体に結合することでGABAとGABA A受容体の結合を抑制し、GABA作動性神経細胞の神経活動を阻害している。構造解析から明らかとなったfipronil結合モチーフは、 β subunitにのみ完全に保存されており、また結合モチーフを含む同

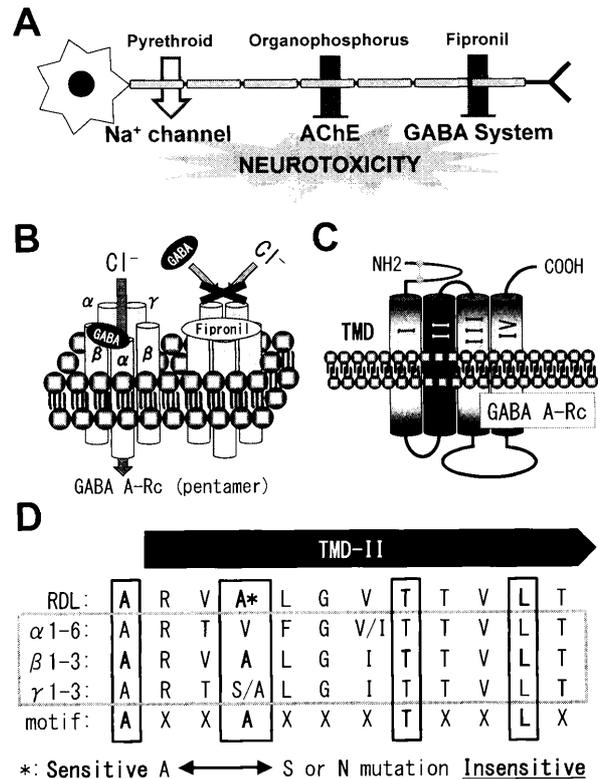


Fig. 1. Mechanism for the action of fipronil. (A) Mechanism of insecticide-induced neurotoxicity is schematically drawn. On neuronal cells, pyrethroid accelerates an opening of Na⁺ channel, organophosphorus suppresses an enzymatic activity of acetyl choline esterase (AChE), and fipronil interrupts GABA system by binding to a GABA receptor. According to such mechanism, neuronal transmission is dysregulated and the neuronal toxicity is appeared. (B) Mechanism of fipronil-interrupted GABAergic action. Upon the stimulation with GABA, the GABA receptor (pentameric GABA A receptor: GABA A-Rc) accelerates Cl⁻ incorporation into neuronal cells (left model). Fipronil interrupts the GABA system by binding to GABA A-Rc (right model). Thus, pharmacological activity of fipronil is caused by its antagonistic action against GABA A-Rc. (C) Molecular structure of GABA A-Rc is schematically drawn. GABA A-Rc has 4-repeated transmembrane domains (TMD: boxes) in the molecule. Among the 4 TMDs, the 2nd TMD (TMD-II: closed box) is necessary for the fipronil action, since the genetic alteration has been identified in the fipronil-insensitive insects. (D) Amino acid sequence comparison of TMD-II on GABA A-Rc subunits. RDL: *Drosophila* GABA A-Rc; α - γ : human GABA A-Rc subunits (gray box); motif: fipronil-interactive motif which was identified through the structural study of fipronil and human GABA A-Rc β subunit complex. As shown by the amino acid sequence comparison, fipronil-interactive motif is completely conserved in RDL and human GABA A-Rc β subunit (black box). Asterisk shows the position of genetic alteration site; fipronil-insensitive insects exhibited a conversion of Ala (A) to Ser (S)/Asn (N) by the genetic alteration.

領域は昆虫からヒトまで高い相同性が認められている。さらに近年では、グリシン受容体やGlucose-stimulated anion channel (ただし、これは無脊椎動物に特異的な標的分子)もfipronilの標的分子として報告されている^{5,8)}。

このように fipronil は、農薬、動物薬および害虫駆除剤として、長年にわたり幅広い分野で使用されており、その主薬理作用が神経伝達系阻害であることから、農薬登録に際しては、同様の薬理作用を有するピレスロイド剤や有機リン剤と同様に、使用者や消費者に対する安全性確保のためにさまざまな毒性試験が行われている。

2. fipronil の毒性プロファイル

fipronil の農薬登録に関し、そのヒト健康影響評価が JMPR (1997年)⁹⁾、残留農薬安全性評価委員会 (PFC: 2001年)¹⁰⁾、European Commission (2006年)¹¹⁾ およびアメリカ EPA (2011年)¹²⁾ で行われており、その評価結果は既に公表されている。これらの評価をふまえ、fipronil の毒性プロファイルについて紹介する。なお、本稿では知的所有権のため各試験の詳細は示さず、結果の概要を記載する。したがって、より詳細な結果の解釈は、上記機関が発行する評価書を参照されたい。また、各試験の実施施設は、各試験の概要表に併記している。

2.1. 単回投与による影響：急性毒性・刺激性・感作性試験

ラットおよびウサギを用いた急性毒性試験結果の概要を Table 1 に示す。ラットに対し fipronil を強制経口投与する

と、活動低下や痙攣をはじめとするさまざまな中枢神経毒性所見が認められ、80 mg/kg 以上の投与で死亡が認められた。ラットの経皮投与では、死亡も一般状態変化（中枢神経毒性を含む）も認められなかったが、ウサギでは 250 mg/kg 以上の投与で死亡や中枢神経毒性所見を含むさまざまな一般状態変化が認められた。またラットに対する鼻部吸入では、0.33 mg/l 以上で死亡や振戦などの中枢神経毒性所見が認められた。fipronil の急性曝露における LD₅₀ は、経口で 97 mg/kg (ラット)、経皮で >2000 mg/kg (ラット) および 354 mg/kg (ウサギ)、吸入での LD₅₀ は 0.39 mg/L (ラット) であった。

ウサギやモルモットを用いた刺激性試験（眼および皮膚）および皮膚感作性試験から、fipronil は刺激性も皮膚感作性も有さないことが示されている。

上述の急性毒性試験では、fipronil の投与により痙攣や振戦などの中枢神経毒性所見が認められており、fipronil の主薬理作用を考慮すると必然ともいえる毒性である。この中枢神経毒性をより詳細に検証するため、急性神経毒性試験が行われている (Table 2)。ラットに 0, 0.5, 5 および 50 mg/kg の fipronil を投与すると、死亡率の増加（雌雄 15 匹中雄 5 匹および雌 1 匹が投与後 2-6 日に死亡した）および体重減少（投与後 7 および 14 日）が 50 mg/kg 投与群で認められた。ま

Table 1. Acute toxicity, skin irritation, eye irritation, and skin sensitization

Animal lab/year	Route	Dose (fipronil purity)	Result	Animals per group	Observations
Acute toxicity for LD ₅₀ (mg/kg)					
CD rat HRC/1988	Oral	50, 80, 126, 200 mg/kg (93%)	97 (♂♀)	♂♀ 5	Death ≥ 80 mg/kg Diarrhoea ≥ 50 mg/kg Lethargy ≥ 80 mg/kg Convulsion ≥ 200 mg/kg
CD rat HRC/1988	Dermal	2000 mg/kg (93%)	>2000	♂♀ 5	Neither death nor clinical symptoms
NZW rabbit BRRC/1992		100, 250, 500, 1000, 2000 mg/kg (96.7%)	354 (♂♀)	♂♀ 5	Death ≥ 250 mg/kg Convulsion ≥ 250 (♀) and 500 (♂) mg/kg
Acute toxicity for LC ₅₀ (mg/L)					
SD rat BRRC/1995	Inhalation nose: 4 hr	0.33, 0.52, 0.72 mg/L (96.72%)	0.39 (♂♀)	♂♀ 5	Death ≥ 0.52 (♀) and 0.33 (♂) mg/L Tremor ≥ 0.33 mg/L
Irritation					
NZW rabbit HRC/1988	Skin	0.5 g (93%)	Negative	♂ 3	
	Eye	82 mg (93%)			
Skin sensitization					
Dunkin-Hartley guinea pig PLSR/1993	Buehler Maximization	(95.4%)	Negative	♂♀ 10	

NZW: New Zealand White; HRC: Huntingdon Research Center; BRRC: Bushy Run Research Center; PLSR: Pharmaco-LSR.

た同群では、投与後7-8時間で痙攣、振戦、後肢開脚幅減少および自発運動低下などの中枢神経毒性所見が認められており、機能的行動解析 (FOB検査) から、雌よりも雄でより重篤であることが明らかとなった。また、後肢開脚幅減少は、5 mg/kgでも認められている (ただし、いずれの投与用量でも神経病理組織学的異常所見は認められていない)。ラットにおける急性神経毒性は、0, 2.5, 7.5および25 mg/kgを投与した別試験でも評価されている。この試験では、頭鼻部および生殖器周囲の被毛の汚れ (25 mg/kg) や体重および摂餌量の減少 (7.5および25 mg/kg) が認められており、さらに神経毒性所見 (25 mg/kgで投与後7時間以内) および後肢開脚幅減少 (7.5および25 mg/kg) も認められているが、いずれの投与用量でも神経病理組織学的異常所見は認められていない。著者らは、これら2試験の結果から、ラット急性神経毒性のNOAELは、2.5 mg/kgであると判断した。

fipronilの急性毒性をまとめると、fipronilは中枢神経毒性を有し、特にラットにおいては、経口または吸入曝露で、中枢神経毒性を伴う死亡が認められた。fipronilは、哺乳類の神経伝達システムに重要なGABAシステムを抑制することから、一連の毒性試験で認められた中枢毒性症状は、fipronilの主薬理作用による毒性であると考えられる。したがって、fipronilのヒト健康影響評価には、中枢神経毒性が非常に重要な鍵であり、その主薬理作用を十分に理解することがリスク・マネージメントに重要であるといえる。

2.2. 反復投与による影響：亜急性毒性試験

fipronilの反復投与による影響がラットおよびイヌ (ビーグル犬) を用いた亜急性毒性試験により調べられている (Table 3)。

ビーグル犬の90日間亜急性毒性試験の予備試験として、20 mg/kg/dayのfipronilが経口投与された。この試験では、投与されたビーグル犬が神経毒性症状を呈するまで (最大13日間) 投与を行い、その後28日間の回復期間が設定されている。fipronil 20 mg/kg/day投与後5, 7および13日に振戦、痙攣および運動失調が認められ、投与終了後も2-10日間、これらの症状が持続したが、死亡は認められなかった。

また、体重および摂餌量の減少が認められたが、一過性のものであり回復期間中に回復した。FOB検査から、fipronilによる感覚・運動神経への影響 (踏み直し反射や姿勢・歩行異常など) が示唆されたが、神経病理組織学的異常は認められなかった。これらの結果から、90日間亜急性毒性試験の最高用量を10 mg/kg/dayとした。

ビーグル犬の90日間亜急性毒性試験 (用量設定0, 0.5, 2, 10 mg/kg/day) では、10 mg/kg/day群で食欲不振、体重減少、体重増加抑制および摂餌量低下が認められた (雌では2 mg/kg/day群でも認められた)。これらの所見は、投与期間の早期に一過性に認められたが、雄1匹および雌3匹が症状悪化により人道的見地から切迫屠殺された。また同用量群では、神経病理組織学的異常所見を伴わない中枢神経毒性所見 (痙攣や振戦) が認められた。これらの結果から、ビーグル犬に対する90日間亜急性毒性のNOAELは、中枢神経毒性、体重増加抑制および摂餌量低下に基づき、雄で2 mg/kg/day、雌で0.5 mg/kg/dayとなる。

CDラットを用いた90日間亜急性毒性試験 (0, 1, 5, 30, 300 ppm) では、最高投与量の300 ppm群で以下のさまざまな毒性所見が認められた。(1) 投与1週目における体重および摂餌量の減少、(2) 主に雌で認められる赤血球毒性、(3) 血液生化学的検査値異常 (総タンパク・グロブリン値の増加およびA/G比の減少)、(4) 甲状腺および肝臓での病理学的異常所見 (臓器重量の有意な増加、甲状腺の濾胞細胞肥大 [雌]、濾胞細胞過形成および汎小葉性肝細胞脂肪性空胞化 [雄])。これらの所見のうち、血液生化学的検査値の変動および肝重量増加は、30 ppm群でも認められた。したがって、ラット90日間亜急性毒性試験のNOAELは、5 ppm (雄: 0.33 mg/kg/dayおよび雌: 0.37 mg/kg/day) となる。

このように、ビーグル犬と異なり、ラットでは300 ppm (雄: 20 mg/kg/dayおよび雌: 24 mg/kg/day) の投与でも体重増加抑制や摂餌量減少が投与初期に認められたのみで、痙攣や振戦などの中枢神経毒性所見は認められなかった。しかし、前述のように中枢神経毒性は、fipronilの薬理作用に起因すると考えられる重要な毒性であることから、より詳細に中枢神経系への影響を検討するため、さらにSDラットを用

Table 2. Acute neurotoxicity

Animal lab/year	Route	Dose (fipronil purity)	NOAEL		Animals per group	Test item
			Male	Female		
SD rat BRRC/1993	Oral	0, 0.5, 5, 50 mg/kg (96.7%)	0.5 mg/kg		♂ ♀ 15	CS, BW, FOB, MS, HP
CD rat HLS/1997	Oral	0, 2.5, 7.5, 25 mg/kg (97.9%)	2.5 mg/kg		♂ ♀ 10	CS, BW, BWG, FI, FE, FOB, BM, HP

CS: clinical signs; BW: body weight; BWG: body weight gain; FI: food intake; FE: food efficiency; FOB: functional observation battery; BM: brain-morphology; MS: macroscopical analysis; HP: histopathology; BRRC: Bushy Run Research Center; HLS: Huntingdon Life Sciences Limited.

Table 3. 90 days administration

Animal lab/year	Route	Dose (fipronil purity)	NOAEL		Animals per group	Test item
			Male	Female		
90 days subacute toxicity						
Beagle dog LSR/1993	Oral	0, 0.5, 2, 10 mg/kg (95.4%)	2 mg/kg/day	0.5 mg/kg/day	♂ ♀ 4	CS, BW, BWG, FI, FOB, HA, CC, UT, OA, OW, MS, HP
CD rat LSR/1991	Dietary	0, 1, 5, 30, 300 ppm (95.4%)	5 ppm		♂ ♀ 10	CS, BW, BWG, FI, FE, FOB, HA, CC, UT, OA, OW, MS, HP
		0, 0.07, 0.33, 1.9, 20 mg/kg for male	0.33 mg/kg/day	0.37 mg/kg/day		
		0, 0.07, 0.37, 2.3, 24 mg/kg for female				
90 days subacute neurotoxicity						
SD rat BRRRC/1993	Dietary	0, 0.5, 5, 150 ppm (96.7%)	Systematic toxicity: 5 ppm		♂ ♀ 15	CS, BW, BWG, FI, FE, FOB, MS, HP
		0, 0.030, 0.30, 8.9 mg/kg for male	0.3 mg/kg/day	0.35 mg/kg/day		
		0, 0.036, 0.35, 10.8 mg/kg for female	Neuronal toxicity: 150 ppm			
			8.9 mg/kg/day	10.8 mg/kg/day		

CS: clinical signs; BW: body weight; BWG: body weight gain; FI: food intake; FE: food efficiency; FOB: functional observation battery; HA: hematological analysis; CC: clinical chemistry; UT: urinary test; OA: ophthalmological analysis; OW: organ weight; MS: macroscopical analysis; HP: histopathology; LSR: Life Science Research; BRRRC: Bushy Run Research Center.

いた亜急性神経毒性試験 (0, 0.5, 5, 150 ppm) を行った。150 ppm 群では、投与開始後の1週間で体重増加抑制および摂餌量減少が雌雄で認められ、体重増加抑制は2週後も雄で認められた。また、FOB検査を投与前および投与後4, 9および13週に実施したところ、4週後の検査で排尿過多、聴覚過敏および痛覚過敏が認められた。これらは、投与後4週目のみの一過性の変化であり、病理組織学的異常所見も認められなかったため、2006年のEUおよび2001年の日本での評価では検体投与とは関連性のない所見とされたが、1997年のJMPRおよび2011年のEPA評価では検体投与に関連性があると判断されている。本所見がfipronil投与によるか否かは、同試験の用量間隔が大きく(所見の認められた150 ppmの次濃度が5 ppmと1/30の濃度である)、容易に判断はできない。ただし、fipronilの主薬理作用を考慮すると、fipronilの投与により抑制性ニューロンであるGABA作動性神経細胞の細胞活動が抑制され、結果として恒常的な神経細胞の興奮状態が誘起され、これが音や痛みといった外部刺激に対して過剰な反応(過敏)を起こしている可能性も十分に考えられる。したがって著者らは、150 ppmで認められた行動異常の所見を投与関連性と考え、全身毒性と併せ、NOAELを5 ppm (雄: 0.30 mg/kg/day および雌: 0.35 mg/kg/day) と判断した。

以上の亜急性毒性試験結果から、急性毒性試験で明らかとなった中枢神経に加え、ラットの肝臓および甲状腺もfipronilの標的臓器であることが明らかになった。

2.3. 長期間曝露による影響：慢性毒性・発癌性試験

fipronilの長期曝露による影響、特に標的臓器である中枢神経、肝臓および甲状腺に注目し、慢性毒性・発癌性試験がイヌ、マウスおよびラットを用いて実施されている (Table 4)。

ビーグル犬に、fipronil (0, 0.075, 0.3, 1および3 mg/kg/day) が52週間経口投与(カプセル)された。最高投与用量は、当初3 mg/kg/dayが設定されていたが、雌1匹が重篤な状態不良(歩行異常や虚脱など)を呈したため投与後32日に切迫屠殺し、2 mg/kg/dayに減量後、以降の試験を継続した。したがって本稿では、最高投与量を2 mg/kg/dayと表記している。投与期間中、2 mg/kg/day群では(死亡例を除く)雄3匹および雌1匹で、1 mg/kg/day群では雌2匹で痙攣や振戦、四肢硬直などの中枢神経毒性所見が散発的に認められた。そのほかに投与に関連する毒性所見が認められなかったため、NOAELは0.3 mg/kg/dayとなる。

ICRマウスを用いた発癌性試験として、fipronil (0, 0.1, 0.5, 10および30 ppm) を78週間投与した。当初、60 ppm

Table 4. Chronic toxicity and oncogenicity

Animal lab/year	Route	Dose (fipronil purity)	NOAEL		Animals per group	Test item
			Male	Female		
Beagle dog LSR/1993	Oral	0, 0.075, 0.3, 1, 2 mg/kg (96.8%)	0.3 mg/kg/day		♂ ♀ 5	CS, BW, BWG, FI, FOB, HA, CC, UT, OA, OW, MS, HP
ICR mouse LSR/1993	Dietary	0, 0.1, 0.5, 10, 30 ppm (94.5-96.5%)	0.5 ppm		♂ ♀ MG: 52	CS, BW, BWG, FI, FE, HA, OW, MS, HP
		0, 0.011, 0.055, 1.2, 3.4 mg/kg for male 0, 0.012, 0.063, 1.2, 3.6 mg/kg for female	0.055 mg/kg/day	0.063 mg/kg/day	SG: 20	
SD rat LSR/1993	Dietary	0, 0.5, 1.5, 30, 300 ppm (95.4%)	0.5 ppm		♂ ♀ MG: 50	CS, BW, BWG, FI, FE, HA, CC, UT, OA, OW, MS, HP
		0, 0.019, 0.06, 1.3, 13 mg/kg for male	0.019 mg/kg/day	0.025 mg/kg/day	SG: 15	
		0, 0.025, 0.08, 1.6, 17 mg/kg for female			RG: 15	

MG: main group (oncogenicity); SG: satellite group (chronic toxicity); RG: recovery group; CS: clinical signs; BW: body weight; BWG: body weight gain; FI: food intake; FE: food efficiency; HA: hematological analysis; CC: clinical chemistry; UT: urinary test; OA: ophthalmological analysis; OW: organ weight; MS: macroscopical analysis; HP: histopathology; LSR: Life Science Research.

を最高用量として設定したが、投与後9週間で雄14匹および雌7匹（うち雄1匹で痙攣を伴った）が死亡したため、60 ppm群の全動物を10週後に屠殺し、30 ppmを最高用量とした。また同試験では、1群雌雄各20匹を、慢性毒性群（53週間投与）としている。10および30 ppmで摂餌量の低下および体重増加抑制が雌雄で認められた。病理学的検査では、10および30 ppmの雌雄で肝重量の増加、肥大および細葉周囲性微小空胞（雌では30 ppmのみ）が認められたが、腫瘍化は認められなかった。したがって、これらの所見に基づき、NOAELは0.5 ppm（雄：0.055 mg/kg/dayおよび雌：0.063 mg/kg/day）となる。

SDラットの慢性毒性・発癌性併合試験の概要は以下の通りである。ラットにfipronil（0, 0.5, 1.5, 30および300 ppm）を52週間（慢性毒性試験群）、89週間（発癌性試験群雄）および91週間（発癌性試験群雌）投与した。各群間の死亡率に有意な差は認められなかったが、1.5 ppm以上の用量で重篤な痙攣が認められ、痙攣発症後に死亡した動物も散見された。また、300 ppm群では摂餌量低下や体重増加抑制が認められ、投与開始1週後（雌雄）および最終体重増加量（雌）で有意な低値が認められた。雌30 ppmの体重増加量は、対照群に対して28%抑制されていた。血液学的検査では、300 ppm群でヘマトクリット値やヘモグロビン濃度の低下など赤血球毒性を示唆する所見が認められた。また、同様の所見は1.5および30 ppm群でも認めら

れたが、極めて軽微な変化であった。また血液生化学的検査でも300 ppm群でグロブリン量増加、A/G比・コレステロール値・カルシウム量・総タンパク量の低下が認められた。病理学的検査では、甲状腺（雌雄）、肝臓（雌雄）および腎臓（雄）において、肥大を伴う臓器重量の増加が30および300 ppm群で認められた。腎病変（慢性腎症）に関しては、発癌性群300 ppmの雄（44/50）が対照群（26/50）と比べて有意に（Fischer: $p < 0.001$ ）高かった。腫瘍性所見では、甲状腺癌（悪性腫瘍）が0, 0.5, 1.5, 30および300 ppm群の雄で0/49, 0/48, 0/50, 0/50, 5/50匹、雌で0/50, 1/50, 0/50, 1/50, 2/50匹に認められ、甲状腺濾胞腺腫（良性腫瘍）が同様に雄で0/49, 1/48, 5/50, 3/50, 12/50匹、雌で0/50, 0/50, 0/50, 0/50, 8/50匹に認められた。対照群の甲状腺腫瘍の発生頻度は、背景データ（雄甲状腺癌：4/359；雌甲状腺癌：6/365；雄甲状腺腺腫：22/359；雌甲状腺腺腫：5/365）より大幅に低かったため、良性および悪性腫瘍を合わせた発症頻度が1.5 ppm（雄）と300 ppm（雌雄）群で統計学的に有意（Fisherの直接確率検定）に高くなったが、背景データを超えたのは300 ppm群のみであった。したがって、300 ppm群の腫瘍のみが投与に関連する毒性影響である。この腫瘍化は後述のTSHの持続的刺激に起因するものであり、そのようなメカニズムはすでに広く認知されたものである。本併合試験では、血中の甲状腺ホルモン量が投与後2, 5, 13, 25および51週に測定されており、投与

期間を通したT4の有意 ($p < 0.01$) な減少が1.5, 30および300 ppmで認められているが, Triiodothyronin (T3)に変化は認められなかった. さらに25週目では0.5 ppmでもT4の有意な減少が認められたが, 有意レベルは $p < 0.05$ と測定誤差の範囲内である可能性を含む値であり, なおかつ25週目のみの単発的なものであったため, fipronilによるT4の減少は1.5 ppm以上で誘起されるものである. 甲状腺からのホルモン分泌や甲状腺濾胞細胞の増殖はTSHによって刺激されるが, TSHの有意な増加が投与期間を通じて300 ppm群で認められ, 30 ppmでも投与開始初期の雄で認められた. 一般的に血中の甲状腺ホルモン量は, フィードバック・システムによる制御下にある¹³⁾. したがって, 今回認められたようなT4 (フィードバック・システムの末梢プローブ) の減少がTSHの増加を引き起こしたと考えられる. この場合, fipronilがどのようにT4の減少を引き起こすのかが問題であり, このメカニズムを解明するための試験が行われている. これらの試験の結果は, fipronilが陽性対照として用いたphenobarbitalと同様に, 肝細胞内のミクロソーム系酵素を活性化し, その結果としてT4のクリアランスを亢進している可能性を強く示唆するものであった. T4のクリアランス亢進によるTSHの分泌促進および過剰TSHによる甲状腺濾胞細胞過形成 (または腫瘍化) は, 多くの薬剤で認められる現象である¹⁴⁾. また一連のfipronil毒性試験では, 甲状腺ホルモンの変動および腫瘍化はラットにおいてのみ認められた. ラットは遺伝的にTBGを欠損しており¹⁵⁾, 血中のT4の半減期も非常に短く, このような現象はラット特異的であると言える.

これらを総括するとfipronilは確かにラットにおいて甲状腺の腫瘍化を促進するが, そのメカニズムはラット特異的なものであり, ヒトの健康影響評価に影響しないと考え

られる. したがって, ラットを用いた慢性毒性・発癌性併合試験のNOAELは, 中枢神経毒性所見 (痙攣) に基づき, 0.5 ppm (雄: 0.019 mg/kg/day および雌: 0.025 mg/kg/day) となる.

fipronilの長期曝露影響が, 中枢神経 (イヌ, マウス, ラット), 肝臓 (マウス, ラット) および甲状腺 (ラット) に認められた. ラットでは肝臓の腫瘍化は認められなかったが, 甲状腺では濾胞細胞の腫瘍に有意な増加が認められた. しかし, 甲状腺の腫瘍化はラット特異的なものであるため, 長期曝露においても, 最も注意すべきfipronilの毒性は中枢神経毒性である. ラットの試験で得られたNOAEL (0.019 mg/kg/day) は中枢神経毒性を考慮して設定されたものであり, fipronilの安全性はこのNOAELによって十分に評価・確保されるものと考えられる.

2.4. 妊娠・繁殖能に対する影響: 2世代繁殖毒性試験

fipronilの毒性が, 中枢神経, 甲状腺および肝臓に認められる. これらは成熟した個体を用いた毒性試験から得られた知見であり, ヒト健康影響評価のためには, さらに妊娠動物や胎児に対する影響を明らかにする必要がある. 次に, 繁殖能や妊娠中胎児に対する影響を調べた2世代繁殖毒性試験の結果を紹介する (Table 5).

SDラットにfipronil (0, 3, 30および300 ppm) を2世代にわたって混餌経口投与した. 300 ppm群では, 両世代において, 親動物および児動物で痙攣や体重減少が認められた. さらに親動物では, F0世代で摂餌量の減少が, F0/F1世代で死亡率の増加が認められ, 児動物では分娩後4日の生存率の低下が認められた. 病理学的検査では, 300 ppm群の肝臓で脂肪変性や甲状腺の濾胞細胞過形成を伴う重量増加が認められ, これら臓器重量増加や死亡率の増加は30 ppm群

Table 5. Two-generation reproductive toxicity

SD rat LSR/1992	Route	Dose (fipronil purity)	NOAEL		Animals per group	Test item	
			Male	Female			
Dam	Dietary	0, 3, 30, 300 ppm (95.4%)			♂ ♀ 30	CS, BW, BWG, FI, RA, OW, MS, HP	
		F0 male; 0, 0.25, 2.54, 24.74	F0	0.25 mg/kg/day			0.28 mg/kg/day
		F1	0.24 mg/kg/day	0.26 mg/kg/day			
Pup		F0 female; 0, 0.28, 2.77, 27.51		30 ppm		Number of pups, sex ratio, SR, development, MS	
		F1 male; 0, 0.24, 2.54, 27.32	F1	2.54 mg/kg/day	2.71 mg/kg/day		
		F2	2.54 mg/kg/day	2.71 mg/kg/day			
		F1 female; 0, 0.26, 2.71, 29.28 mg/kg/day					

CS: clinical signs; BW: body weight; BWG: body weight gain; FI: food intake; RA: reproductive ability; OW: organ weight; MS: macroscopical analysis; HP: histopathology; SR: survival ratio; LSR: Life Science Research.

でも認められた。しかし、性周期や性比に対する影響は認められず、これらのことから fipronil には内分泌攪乱作用はないと考えられる。これらの毒性所見より、ラットを用いた2世代繁殖毒性試験における親動物のNOAELは3ppm (F0世代雄: 0.25 mg/kg/day, F0世代雌: 0.28 mg/kg/day, F1世代雄: 0.24 mg/kg/day および F1世代雌: 0.26 mg/kg/day), 児動物および繁殖毒性に関するNOAELは30ppm (F1およびF2世代雄: 2.54 mg/kg/day, F1世代雌: 2.71 mg/kg/day) となる。

2.5. 胎児発生に対する影響：催奇形性試験

2世代繁殖毒性試験から、fipronilが、生存率低下や体重減少など胎児に対し毒性を有することが明らかとなった。さらに胎児の個体発生、特に器官形成に対する影響を調べるため催奇形性試験をラットおよびウサギを用いて行っている (Table 6)。

SD系妊娠ラットに、fipronil (0, 1, 4 および 20 mg/kg/day) を妊娠6-15日に強制経口投与した。体重増加抑制が4および20 mg/kg群で認められ、4 mg/kgによる体重増加抑制は投与期間の終了とともに回復したが、20 mg/kg群では投与期間終了後も抑制が認められた。さらに20 mg/kg投与では、妊娠期間を通じた飲水量低下も認められた。しかし、母動物の着床所見 (黄体数・着床数・死亡胚数・生存胎児数など) には異常が認められなかった。一方、胎児に対する影響としては、性比や体重などが調べられたが異常は認められず、催奇形性も認められなかった。したがって、fipronilは母動物に対するNOAELが1 mg/kg/day、胎児に対するNOAELは20 mg/kg/dayであり、ラットに対し催奇形性を有さない。

NZW系妊娠ウサギに fipronil (0, 0.1, 0.2, 0.5 および 1 mg/kg/day) を妊娠6-19日に強制経口投与した。ラット同様、着床所見ではいずれの投与用量にも異常は認められな

かったが、0.2 mg/kg以上の用量で体重減少および体重増加抑制が認められ、0.5および1 mg/kgでは投与終了後もこれらの変化が認められた。0.1 mg/kg投与群でも体重および体重増加量の有意な減少が認められたが、これは妊娠10日のみの一過性のものであった。胎児に対する影響として、性比や体重などが調べられたが異常は認められず、催奇形性も認められなかった。したがって、ウサギに対する催奇形性試験では、母動物に対するNOAELは設定できなかったが (0.1 mg/kgによる体重への影響は極めて一過性のものであったためLOAELと判断)、胎児に対するNOAELは1 mg/kg/dayであり、fipronilはウサギに対しても催奇形性を有さない。

これらの催奇形性試験結果から、fipronilは胎児発生、少なくとも内臓器官形成や骨格形成に関する発生に影響をおよぼさないことが明らかとなった。またウサギを用いた試験で、脳の剖検や病理組織学的検査が行われたが、異常が認められなかったことから、形態学的には神経発生に対しても影響しない可能性が強いと考えられる。ただし、神経発生の異常は必ずしも組織学的異常を伴うとは限らず、さらに、fipronilがGABA A受容体の機能を抑制し、近年ではGABA A受容体と神経発生の関係が報告されていることを考慮すると、行動学的検査を含む、より詳細な試験である発達神経毒性試験を実施し、神経発生影響を精査する必要がある。

2.6. 神経発生に対する影響：発達神経毒性試験

fipronilの神経発生に対する影響を詳細に精査するため、妊娠ラットを用いた発達神経毒性試験を実施した (Table 7)。

SD系妊娠ラットに fipronil (0, 0.5, 10 および 200 ppm) を妊娠6日から分娩後 (哺育) 10日まで混餌投与した。200 ppm投与群で、投与期間を通じた体重減少が認められ、投与開始初期 (妊娠6-10日) には体重増加抑制や摂餌量の

Table 6. Teratogenicity

Animal lab/ year	Route	Dose (fipronil purity)	NOAEL		Animals per group	Test item
			Dam	Embryo		
Pregnant SD rat HRC/1991	Oral pregnant day 6-15	0, 1, 4, 20 mg/kg (93%)	1 mg/kg/day	20 mg/kg/day	♀ 25	Dam CS, BWG, FI, WI, MS, IS, MA Pup SR, BW, Sex ratio, TT
Pregnant NZW rabbit LSR/1990	Oral pregnant day 6-19	0, 0.1, 0.2, 0.5, 1 mg/kg (95.4%)	LOAEL: 0.1 mg/ kg/day	1 mg/kg/day	♀ 22	Dam CS, BWG, FI, MS, IS, MA Pup SR, BW, Sex ratio, TT

CS: clinical signs; BWG: body weight gain; FI: food intake; WI: water intake; MS: macroscopical analysis; IS: implantation signs; MA: maternal ability; SR: survival ratio; TT: teratogenicity test; HRC: Huntingdon Research Center; LSR: Life Sciences Research.

減少も認められた。同群では母動物2匹が死亡したが、死亡前に一般状態および剖検では異常な所見は認められなかった。

児動物の発育に関し、生存率、体重、性比および発育（耳介展開、切歯萌出、臍開口および包皮分離）を検査した。親動物と同様に、200ppm投与群で有意な体重減少が認められ、死産児数の増加や分娩後4日の生存率低下が認められた。体重減少は10ppm群の雌雄でも認められ、0.5ppm群の雌でも一過性の（分娩後4日に行った児動物数の調整後のみ）変化が認められた。発育検査では、200ppm投与群の児動物ですべての項目で遅延が認められた。行動学的検査（聴覚試験、自発運動、遊泳発達および記憶・学習）を生後6-65日にかけて随時行った結果、聴覚検査で200ppm投与による雌雄の聴覚反応遅延（検査項目：平均反応）が認められた。遊泳発達試験では、200ppm投与による分娩後6日での、明確な遊泳発達遅延が認められたが、その後（分娩後8, 10, 12および14日）は遅延の程度は回復し、分娩後14日では対照群と明らかな差は認められなかった。一方、自発運動試験および学習・記憶試験（Y迷路試験）では、いずれの用量でも検体投与に関連する異常は認められなかった。一方、脳重量測定で、生後11日の雌雄に重量増加（対体重値）が認められたが、これは対照群動物の重量が低値（雄：41%減少、雌：24%減少）であったことに起因する変化であり、fipronilによる毒性学的影響ではない。これらの結果から、1997年のJMPPR⁹⁾、2006年のEuropean Commission¹¹⁾および2011年のアメリカEPA¹²⁾では200ppm群での所見を検体投与に起因する毒性とし、この試験における児動物の発育に関する毒性のNOAELを0.5ppm (0.05 mg/kg/day)、母動物と哺育児の発達神経毒性に関するNOAELを10ppm (0.91 mg/kg/day)と判断した。しかし、上述のように200ppm群の雌動物（母動物）では、死亡や体重減少が認められ、生後4日の児動物では、体重や生存率の有意な減少が認められている。このように、fipronilの200ppm混餌投与は、母体に大きな負荷をかけるものであり、これが妊娠・

哺育環境の劣悪化、ひいては児動物の体重減少、生存率低下および発達遅延を引き起こしている可能性が強く示唆された。したがって、fipronil投与による発達遅延は母体への影響により誘起される間接的な影響であり、神経細胞に直接作用し発達遅延を引き起こす直接的影響ではないと考えられる。

近年、科学技術の目覚ましい進展により、さまざまな手法を用いた研究が進められ、多くの成果が得られている。培養細胞を用いた*in vitro*実験も、そのような手法の一つであり、実験試料の準備の容易さや単一細胞群を使用することによるデータ収集の容易さから、多くの研究者によりさまざまなモデルが作成・報告されている。実際、著者もrat pheochromocytoma PC12細胞株の神経分化モデルを用い、神経分化や抗腫瘍剤による神経毒性のメカニズムに関する研究を行い、その成果を報告している^{16,17)}。近年、上記PC12細胞株（Nerve growth factor [NGF]による神経突起伸展¹⁸⁾やmouse neuroblastoma N2a細胞株（cyclic adenosine monophosphate [cAMP]誘導体による神経突起伸展¹⁹⁾）を用い、fipronilが各モデルの神経分化誘導を抑制するという報告がなされた²⁰⁻²²⁾。これらの論文では、fipronilが神経分化を抑制することから、「fipronilは発達神経毒性を有する規制対象化合物（ヒトに対するリスクを有する危険な化合物）である」と結論している。この結論は、動物実験の結果と大きくかけ離れるものであるため、その内容について紹介するとともに、fipronilが発達神経毒性に対する危惧があるか否かについて詳細に考察する。

2009年、SlotkinらはPC12細胞株モデルを用い、細胞から抽出した総タンパクに対する膜分画タンパクの比率を指標に神経分化程度を評価し、fipronilが100μMで神経分化誘導を抑制し、30μMではその効果がないと報告した²⁰⁾。次いで2010年、同研究グループは、30および50μMのfipronilを用いて同様の実験を繰り返し、いずれの用量においてもfipronilが神経分化誘導を抑制すると報告した²¹⁾。30μMでの成績は、2010年には陽性、2009年では陰性と結果に再現性がなく、2010年の実験では用量反応相関性も明らかで

Table 7. Developmental neurotoxicity

Animal lab/year	Route	Dose (fipronil purity)	NOAEL			Animals per group	Test item
			Sys	Mat	Dev		
Pregnant SD rat LSR/1995	Dietary pregnant day 6-Post parturition Day 10	0, 0.5, 10, 200 ppm (96.1%) 0, 0.5, 0.91, 15.17 mg/kg/day	0.5 ppm 0.05 mg/kg/day	10 ppm 0.91 mg/kg/day	♀ 30	Dam Pup CS, BW, BWG, FI, MS SR, BW, Sex ratio, MS, DT, BrW, NeuroHP, BT	

Sys: systemic toxicity; Mat: maternal toxicity; Dev: developmental toxicity; CS: clinical sings; BW: body weight; BWG: body weight gain; FI: food intake; MS: macroscopical analysis; SR: survival ratio; DT: developmental test; BrW: brain weight; NeuroHP: neurological histopathology; BT: behavior test.

はなかった。著者らは「fipronilが神経細胞分化を抑制する」という結論について、以下の諸点から慎重に検討する必要があると考える。第一点はその用量設定の妥当性である。fipronilに関し、ヒトでの服用事故（自殺目的を含む）に関する臨床調査結果が公表されており²³⁾、fipronilの血中濃度が $2.3\mu\text{M}$ の患者では神経症状が観察されず、血中濃度が $3.7\mu\text{M}$ またはそれ以上の患者ではてんかん発作や痙攣が認められている。これらの結果から、急性神経症状を呈さないヒトでの限界用量は、血中濃度 $3\mu\text{M}$ 程度を生じる用量であろうと推測される。したがって、ある程度の時間的スパンの中でヒト健康影響について外挿を試みる *in vitro* 実験 (*in vivo* 実験も同様) では、 $3\mu\text{M}$ を超える用量 (*in vivo* 実験では血中濃度) での実験成績は、リスク評価としても実用的な意味がないと考えられる。前述のSlotkinらの実験は、この $3\mu\text{M}$ をはるかに超える用量で実施されたものである。二番目に検討すべき点は、実験手法である。Slotkinらの論文における「神経分化誘導、すなわち神経突起伸展」は、NGFで処理した（分化誘導した）細胞から抽出した総タンパクに対する膜分画タンパクの比率で示されたものである。この指標が「神経突起伸展」と直接相関することや、fipronilによる神経突起伸展抑制が、形態的証拠とともに示されていない。現在、確立されている多くの培養細胞系分化モデルは、培養系であるがゆえに形態観察が容易でかつ再現性も高いため、その多くが形態変化を分化の指標としている。実際にPC12細胞をはじめとする多くの神経分化モデルでは、神経細胞の特徴的な形態である「神経突起伸展」を指標としており、著者も以前に神経突起の伸展を指標として神経分化の程度を評価している^{16,17)}。Slotkinらが指標とした膜タンパクの比率増加は、神経突起に特異的とは考え難く、fipronilが神経細胞分化を抑制するとの結論については、より神経突起特異的な膜タンパクの指標を測定するか、神経突起伸展を引き起こす引き金になっている遺伝子を同定したうえでそのmRNA量を測定するなどでの妥当性を示す必要がある。したがって、現時点ではSlotkinらの結論である「fipronilによる神経分化阻害および発達神経毒性を有する可能性」の信憑性は薄く、これらを基にしてヒト健康影響を評価することは不可能であると言わざるを得ない。

Sidiropoulosらは2011年、マウス神経芽腫由来のN2a細胞株を用いて神経分化誘導に対するfipronilの抑制効果について報告した²²⁾。Slotkinらと異なりSidiropoulosらは、神経分化に関し「形態学的な神経突起の伸展」を指標としており、設定した用量も1, 5および $10\mu\text{M}$ と、少なくとも最低用量である $1\mu\text{M}$ は、ヒト限界用量に基づく用量範囲にあった。この実験では最低用量の $1\mu\text{M}$ でも50%程度の神経分化誘導が阻害されたと報告している。しかし、この実験にはいくつかの疑問点があり、「 $1\mu\text{M}$ での神経分化抑制」について大きな疑問が残る。fipronilを添加しない対照群における神

経分化誘導程度（神経突起長）に大きなばらつきがあり、分化を示さない細胞も非常に多く認められ、実験系として斉一性が欠如している可能性がある。また、Sidiropoulosらは、fipronilによる神経分化阻害のメカニズム研究として、神経突起形成に重要な細胞骨格タンパクやmitogen-activated protein kinase (MAP kinase) (MEK1/2およびErk1/2)のリン酸化を調べるwestern blottingを行い、これらのリン酸化を定量しているが、この標準化にglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を用いているのは問題であり、正確な定量がされているか否か疑わしい。タンパクのリン酸化は、特殊な場合（抗体がないなど）を除き対象となるタンパクの総量（例えばphosphorylated Erk1/2であれば、total Erk1/2）で定量化するのが極めて一般的であり、実際に多くの論文でそのような評価が行われている。また細胞株の選択に関しても疑問がある。現在、神経分化誘導モデルとしては、PC12を用いるのが最も一般的であり確立された手法とされている¹⁸⁾。しかし、PC12細胞株は非神経細胞由来であるため、神経分化誘導モデルにこの細胞を用いることに対する批判があるのも事実である。したがって、腫瘍細胞とはいえ、神経系細胞由来であるN2aを使用したSidiropoulosらの報告は興味深いものではあるが、N2a細胞の分化誘導にはcAMPで細胞を処理する必要がある、このcAMP処理の生理学的意義は不明である。最後に、fipronilの作用を評価するモデル系として、これらの細胞系が適切かという疑問もある。PC12細胞とN2a細胞では、共にGABA A受容体のmRNA発現が認められるものの、そのGABA A受容体は機能を有していないと言われているからである^{24,25)}。fipronilの神経細胞に対する影響を検証するのに、標的分子であるGABA A受容体の機能を有さない細胞を使用することに毒性学的な意義を見出すのは困難であろう。

このように、いずれの*in vitro*の報告もfipronilの神経毒性やそのメカニズムを考えるうえでは非常に興味深いものではあるが、結果の解釈は慎重に行うべきであり、これらの結果をもってfipronilの発達神経毒性あるいはヒト健康影響を評価すると誤った解釈を生む可能性が高い。したがって、現時点のfipronilの発達神経毒性に関する影響のヒトへの外挿については、ラットを用いた発達神経毒性試験結果に基づいて評価するのが最も合理的と考える。

2.7. 染色体DNAに対する影響：遺伝毒性試験

発癌性と繁殖能（次世代影響）との関連において、遺伝毒性の有無を検討することは重要であり、fipronilについて種々の検討を行った (Table 8)。

復帰突然変異試験 (*Salmonella typhimurium*: TA1535, TA100, TA1537, TA98および*Escherichia coli*: WP2uvrAを用いたAmes試験；Chinese hamster V79細胞株を用いたhypoxanthin-guanidine phosphoribosyl transferase [HPRT]

試験)では, fipronilは陰性を示し, 突然変異誘発性を有さない可能性が示され, ラット肝細胞での unscheduled DNA synthesis (UDS: 不定期DNA合成) 試験によりDNA損傷性もないことが証明された。また, Chinese hamster lung 細胞株CHLおよびヒトリンパ球を用いた染色体異常試験が行われている。このうち, ヒトリンパ球を用いた試験では fipronilは陰性を示したが, CHL細胞株を用いた試験では6時間のパルス処理後に明らかな染色体異常誘発が認められた。ただし, 24および48時間では認められず, また6時間のパルス処理で陽性が認められた用量では明らかな細胞障害性が認められた。これらを総合的に考慮すると, fipronilには染色体DNAに対する影響はないと考えられ, これはマウス骨髄細胞を用いた小核試験でも明らかにされた。

近年, 魚 (*Rhamdia quelen*: ナマズ) を用いた fipronil の遺伝毒性評価が報告されている²⁶⁾。赤血球の小核発現頻度に異常は認められなかったが, 高用量で核の形態異常が認められ, この核の形態異常は fipronil のDNA損傷誘導に起因するものと結論づけられた。しかし, エラ細胞の comet assay では fipronil のDNA損傷性は認められていない。比較的高感度な comet assay でDNA損傷が認められなかったこと, それが直接 fipronil と接するエラ細胞での結果であったことから, fipronil にはDNA損傷性は無く, 赤血球で認められた高用量での核の形態異常は, fipronil の直接作用によるものではない可能性が考えられる。

3. fipronil の安全性評価: 日本および海外での ADI 設定

fipronil のヒト健康影響評価は, 各地域の登録機関で行わ

れている⁹⁻¹²⁾。Table 9にまとめたように, 評価対象の毒性試験およびその評価には多少の違いはあるが, 基本的には極めて酷似した評価結果となっている。この異なる機関での評価により数試験のNOAELが異なるが, ADI (acceptable daily intake: 一日摂取許容量) 設定の基準となったラット慢性毒性・発癌性併合試験の評価およびNOAELは各機関で共通しており, NOAELを0.02 mg/kg/day (NOAEL 0.019 mg/kg/dayを四捨五入) とし, 安全係数100を負荷した0.0002 mg/kg/dayがADIに設定されている (Table 10)。

一方ADI設定と異なり, AcRD (acute reference dose: 急性参照用量) は各機関で大きく異なる結果となっている。AcRDのうち, 最も高い値が2011年にEPAで提示された0.025 mg/kgであり, これはラット急性神経毒性のNOAELである2.5 mg/kgを基準としている。次いでEUでの0.009 mg/kg (ラット発達神経毒性NOAELである0.91 mg/kgが基準), JMPRでの0.003 mg/kg (ラット亜急性神経毒性NOAELである0.3 mg/kgが基準) となっている。いずれも基準とされた試験が異なり, その結果AcRD値にも大きな違いが認められるが, 安全係数は100と共通している。一方, 日本ではアセタミプリドおよびメタミドホスの2剤についてAcRDが設定されているが, FipronilのAcRDは設定されていない。

4. fipronil のヒト健康影響評価: まとめ

本稿では, 殺虫剤 fipronil の農薬登録に際し, 各国で評価されてきた毒性試験の成績を紹介してきた。fipronil は神経伝達に重要な GABA A 受容体に結合し, その機能を抑制することで GABA 作動性神経細胞の活動を抑制する。この殺

Table 8. Genotoxicity

Examination	Fipronil purity lab/year	Tool	Dose	Result
Ames test	98.3% SAFE PHARMA/1995	<i>Salmonella typhimurium</i> : TA98, TA100, TA1535, TA1537 <i>Escherichia coli</i> : WP2uvrA	0, 50, 150, 500, 1500, 5000 μg/plate	Negative
HPRT test	97.2% LSR/1990	Chinese hamster V79 cell line	0, 0.8, 4, 20, 100, 500 μg/ml	Negative
UDS assay	91.5% BASF/2004	Rat hepatocyte	0, 12.5, 25, 50 mg/kg Oral administration ♂ ♀ 3/ group	Negative
Chromosome aberration test	98.3% SAFE PHARMA/1995	Chinese hamster CHL cell line	0, 7.5, 15, 22.5, 30 μg/mL	Positive at cytotoxic dose
	93.0% MICRO TEST/1988	Human lymphocyte	0, 75, 150, 300 μg/mL	Negative
Micronucleus test	97.2% LSR/1991	Mouse bone marrow cell	0, 1, 5, 25 mg/kg Oral administration ♂ ♀ 5/ group	Negative

HPRT: hypoxanthin-guanidine phosphoribosyl transferase; UDS: unscheduled DNA synthesis; LSR: Life Sciences Research.

虫剤としての主薬理作用に起因すると思われる痙攣や振戦などの中枢神経毒性がさまざまな試験で認められた。GABA A受容体は、神経伝達だけでなく神経分化にも重要な因子であるが、fipronilの神経分化に対する影響は認められなかった。したがって、fipronilの標的細胞の一つは、成熟した(分化した)神経細胞であり、分化中の未成熟な神経細胞はfipronilの影響を受けないと考えられる。

神経細胞に加え、甲状腺および肝臓がfipronilの標的であ

ることが明らかとなり、さらに甲状腺では腫瘍化が認められた。甲状腺の腫瘍化に関しては、血中T4の減少およびTSHの増加が認められたが、T4の半減期に深く関わるTBGを先天的に欠損しているラットにおいてのみ認められたものであり、さらにfipronilは肝臓でのマイクローム系酵素誘導を介してT4クリアランスを亢進している可能性が極めて強い。このような腫瘍化メカニズムはラットに特異的なものであり、ヒトへの外挿性は極めて低いものと考えられている。し

Table 9. Comparison of NOAEL evaluation in each region

Animal study	EU/2006		JMPR/1997		EPA/2011		Japan-PFC/2001	
	NOAEL	Basis	NOAEL	Basis	NOAEL	Basis	NOAEL	Basis
Mouse								
90 day tox	—	—	<0.13	HP in Liver	1.3 (10)	BWG ↓	—	—
Oncogenicity	0.055		BWG ↓, weight and vacuolization ↑ in Liver					
Rat								
28 day tox	<3.4 (No NOAEL by JMPR)			Changes in CC Liver weight ↑, TG hypertrophy			—	—
90 day tox	0.33			Liver and TG weight ↑			1.39	BWG ↓, FI ↓ Changes in CC Pathology
Oncogenicity	0.019 (0.02 by FSC)				Convulsion and death (EU and JMPR) Changes in CC, T4 (Additionally by EPA and FSC)			
Repro tox	Parental: 0.25 Reproductive: 2.5 Pup: 26 (JMPR and EPA)			Liver and TG weight ↑ Clinical signs BW ↓, Mating, fertility and survival ↓ Development			0.243	Liver and TG weight ↓ Pathology
Terat	Maternal: 4 Develop: 20			BW ↓			Maternal: 1 Develop: 20	BWG ↓
Acute NT-1	0.5				FOB incidence			
Acute NT-2	2.5 (Not included in JMPR)				BWG ↓ FOB incidence FI ↓ (Additionally by EU and EPA)			
90 day NT	0.3 (NT: 8.9)	BWG ↓	0.3		FOB at 8.9 mg/kg/day		0.3 (NT: 8.9)	FI, BW, BWG ↓
DNT	DNT: 0.91				Auditory startle and swimming deficiency			
	Developmental toxicity: 0.05				Pup weight ↓			
Dog								
90 day tox	0.5				BWG ↓ FI ↓ (Additionally by FSC)			
1 year oral	0.2				Clinical signs, mortality, neurotoxicity			
1 year diet	0.3				Neurotoxicity			
Rabbit								
21 Day Dermal	5	Hyperact BW ↓	—		—		5	Hyperact BW ↓
Terat	Mat: 0.2 Dev: 1	BW and FI ↓	Mat: <0.1 Dev: 1		BW and FI ↓ BWG ↓ (by JMPR)		Mat: 0.1 Dev: 1	BWG ↓

BW: body weight; BWG: body weight gain; CC: clinical chemistry; Dev: developmental; DNT: developmental neurotoxicity; FI: food intake; FOB: functional observation battery; HP: Histopathology; Hyperact: hyperactivity; Japan-PFC: Former authority of FSC; Mat: maternal; NOAEL unit is mg/kg/day; NT: neurotoxicity; Terat: teratogenicity; TG: thyroid gland.

Table 10. Comparison of ADI in each region

		EU/2006	JMPR/1997	EPA/2011	Japan-PFC/2001
ADI	Value	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002
	Based NOAEL from	Rat oncogenicity study			
	Safety factor	100	100	100	100
AcRD	Value	0.009	0.003	0.025	—
	Based NOAEL from	DNT study	Rat 90 day NT study	Rat acute NT study	—
	Safety factor	100	100	100	—

ADI: acceptable daily intake; AcRD: acute reference dose; DNT: developmental neurotoxicity; NT: neurotoxicity; Japan-PFC: Former authority of FSC.

たがって、ヒト健康影響評価における fipronil の最も重要な毒性は中枢神経毒性であると言える。この中枢神経毒性は、各種試験の中で、最も低い値を示したラット慢性毒性・発癌性併合試験のNOAELによって、その安全性が確保されている。したがって、同NOAELを基準に設定されたADI (0.0002 mg/kg/day) の遵守下であれば、fipronil の安全性は十分に担保されている。

謝 辞

本稿は、鈴木勝士博士およびDr. Marcel Leistからの科学的に重要なコメントをもとに作成した。また、本稿作成に関してDr. Naveed Honarvar, Dr. Jean-Pierre Vialaneix, Dr. Adriana M. Doi, Dr. Juergen Alfred Lux, Dr. Damien Fages, Dr. Markus Frericks, Dr. Ivana FegertおよびBASF SE Product Safety Section スタッフからのサポートを受けた。この場を借りて感謝申し上げる。

引用文献

- G. Balanca and M. N. de Visscher: *Crop Prot.* **16**, 553-564 (1997).
- J.-M. R. Postal, P. C. Jeannin and P. J. Consalvi: *Vet. Dermatol.* **6**, 153-158 (1995).
- T. Narahashi: *Mini Rev. Med. Chem.* **2**, 419-432 (2002).
- J. R. Bloomquist: *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **54**, 145-156 (2003).
- T. Narahashi, X. Zhao, T. Ikeda, K. Nagata and J. Z. Yeh: *Hum. Exp. Toxicol.* **26**, 361-366 (2007).
- T. Nakao, A. Kawase, A. Kinoshita, R. Abe, M. Hama, N. Kawahara and K. Hirase: *J. Econ. Entomol.* **104**, 646-652 (2011).
- L. Chen, K. A. Durkin and J. E. Casida: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 5185-5190 (2006).
- R. Islam and J. W. Lynch: *Br. J. Pharmacol.* **156**, 2707-2720 (2012).
- Appeared in INCHEM-Web site as <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v097pr09.htm> (2011年12月28日閲覧)
- Anon: *Shokuhineiseikenkyu* **52**, 90-95 (2002).
- Anon: *EFSA Scientific Report* **65**, 1-110 (2006).
- Appeared in US EPA-Web site as http://www.epa.gov/oppsrrd1/registration_review/fipronil/index.htm (2012年3月11日閲覧)
- R. M. McClain: *Toxicol. Pathol.* **17**, 294-306 (1989).
- C. P. Comer, C. P. Chengelis, S. Levin and F. N. Kotsonis: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **80**, 427-436 (1985).
- D. T. Davies: *Comp. Hemotol. Int.* **3**, 142-152 (1993).
- A. Suzuki: *Exp. Cell Res.* **234**, 507-511 (1997).
- A. Suzuki and Y. Tsutomi: *Brain Res.* **801**, 59-66 (1998).
- A. Levi, J. D. Eldridge and B. M. Paterson: *Science* **229**, 393-395 (1985).
- J. B. Olmsted, K. Carlson, R. Klebe, F. Ruddle and J. Rosenbaum: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **65**, 129-136 (1970).
- T. L. Lassiter, E. A. MacKillop, I. T. Ryde, F. J. Seidler and T. A. Slotkin: *Brain Res. Bull.* **78**, 313-322 (2009).
- T. A. Slotkin and F. J. Seidler: *Neurotoxicol. Teratol.* **32**, 124-131 (2010).
- E. Sidiropoulou, M. Sachana, J. Flakos, W. Harris, A. J. Hargreaves and Z. Woldehiwet: *Toxicol. Lett.* **201**, 86-91 (2011).
- F. Mohamed, L. Senarathna, A. Percy, M. Abeyewardene, G. Eaglesham, R. Cheng, S. Azher, A. Hittarage, W. Dissanayake, M. H. R. Sheriff, W. Davies, N. A. Buckley and M. Eddleston: *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **42**, 955-963 (2004).
- E. F. Kirkness and C. M. Fraser: *J. Biol. Chem.* **268**, 4420-4428 (1993).
- R. F. Tyndale, T. G. Hales, R. W. Olsen and A. J. Tobin: *J. Neurosci.* **14**, 5417-5428 (1994).
- N. C. Ghisi, W. A. Ramsdorf, M. V. M. Ferraro, M. I. M. de Almeida, C. A. O. Ribeiro and M. M. Cestari: *Environ. Monit. Assess.* **180**, 589-599 (2011).