肝細胞肥大の毒性学的特徴の解明に向けた農薬の ラット反復投与毒性試験結果データベースの構築

増田 茜,^a 増田雅美,^a 川野拓歩,^a 橋内陽子,^a 中山晴香,^a 中島宏之,^{a,b} 小島弘幸,^c
北村繁幸,^d 浦丸直人,^d 保坂卓臣,^a 佐々木崇光,^a 吉成浩一^{*,a,b}

Construction of the Database of Rat Repeated-dose Toxicity Tests of Pesticides for the Toxicological Characterization of Hepatocyte Hypertrophy

Akane Masuda,^a Miyabi Masuda,^a Takuya Kawano,^a Yoko Kitsunai,^a Haruka Nakayama,^a
Hiroyuki Nakajima,^{a,b} Hiroyuki Kojima,^c Shigeyuki Kitamura,^d Naoto Uramaru,^d
Takuomi Hosaka,^a Takamitsu Sasaki,^a and Kouichi Yoshinari^{*,a,b}

^aDepartment of Molecular Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka; 52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan; ^bDivision of Drug Metabolism and Molecular Toxicology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University; 6-3 Aramaki-Aoba, Aoba-ku, Sendai 980-8578, Japan; ^cDepartment of Environmental and Health Sciences, Hokkaido Institute of Public Health; Kita-19, Nishi-12, Kita-ku, Sapporo 060-0819, Japan; and ^dDepartment of Health Biosciences, Nihon Pharmaceutical University; 10281 Komuro, Ina-machi, Kitaadachi-gun, Saitama 362-0806, Japan.

(Received November 8, 2016; Accepted December 28, 2016)

Liver and hepatocyte hypertrophy can be induced by exposure to chemical compounds, but the mechanisms and toxicological characteristics of these phenomena have not yet been investigated extensively. In particular, it remains unclear whether the hepatocyte hypertrophy induced by chemical compounds should be judged as an adaptive response or an adverse effect. Thus, understanding of the toxicological characteristics of hepatocyte hypertrophy is of great importance to the safety evaluation of pesticides and other chemical compounds. To this end, we have constructed a database of potentially toxic pesticides. Using risk assessment reports of pesticides that are publicly available from the Food Safety Commission of Japan, we extracted all observations/findings that were based on 90-day subacute toxicity tests and 2-year chronic toxicity and carcinogenicity tests in rats. Analysis of the database revealed that hepatocyte hypertrophy was observed for 37–47% of the pesticides investigated (varying depending on sex and testing period), and that centrilobular hepatocyte hypertrophy was the most frequent among the various types of hepatocyte hypertrophy in both the 90-day and 2-year studies. The database constructed in this study enables us to investigate the relationships between hepatocyte hypertrophy and other toxicological observations/findings, and thus will be useful for characterizing hepatocyte hypertrophy.

Key words—liver hypertrophy; hepatocyte hypertrophy; database; pesticide; chemical safety assessment

緒 論

生体内に取り込まれた化学物質は、しばしば肝肥大（肝重量増加）及び肝細胞肥大を引き起こす。化学物質の安全性評価のために実施される実験動物を用いた毒性試験においても、肝肥大及び肝細胞肥大は最も一般的に認められる影響の1つである。肝細胞

肥大は小葉中心性、小葉中間性、小葉周辺性及び小葉びまん性に認められ、化学物質の種類により発現部位は異なるが、実際には小葉中心性に認められることが多い。代表的な例として、げっ歯動物の肝がんプロモーターで薬物代謝酵素誘導薬である抗てんかん薬フェノバルビタールは、ラットやマウスで小葉中心性の肝細胞肥大を引き起こすことが知られている。^{1,2)}

肝の小葉中心域ではシトクロム P450 (P450) を始めとする薬物代謝酵素の活性が高く、これらの酵素を含む滑面小胞体の含量も多い。また、フェノバ

^a静岡県立大学薬学部衛生分子毒性学分野, ^b東北大学大学院薬学研究科薬物動態学分野, ^c北海道立衛生研究所生活科学部, ^d日本薬科大学薬学部健康生命科学分野
*e-mail: yoshinari@u-shizuoka-ken.ac.jp

ルピタールなどの薬物代謝酵素誘導薬が投与されると、P450の発現亢進とともに滑面小胞体の増加が起こる。³⁻⁵⁾ これらのことから、フェノバルピタールなどによる小葉中心性の肝細胞肥大は、薬物代謝酵素誘導に伴い起こる二次的な変化（適応反応）と考えられている。¹⁾ しかしながら、これは表現型との関連から推察されているに過ぎず、小葉中心性肝細胞肥大の分子レベルでの発現機序は全くわかっていない。

また、肝肥大と肝細胞肥大が化学物質の有害影響であるか否かの判定基準もかならずしも統一されていない。上述のように、一般的には、肝細胞肥大は薬物代謝酵素誘導に伴う適応反応であるとされている。しかし、壊死や炎症、細胞増殖などの明らかな変性を伴う肝肥大は有害作用と考えられている。^{1,5-7)} また、農薬の毒性試験結果の解析においてマウスにおける肝重量増加（50%以上）は肝腫瘍の発生と関連するという研究結果もある。⁸⁾ 以上をふまえ、諸外国では病理組織化学的な変化や壊死等の明らかな毒性を認めない肝細胞肥大は、薬物代謝酵素誘導に伴う二次的な変化（適応反応）の1つであり、毒性影響ではないとされる。^{1,5,6)} 一方わが国では、安全性を優先し、また肝肥大や肝細胞肥大が形態学的及び病理組織的变化であることを考慮して、化学物質の毒性影響であると判断されることがある。

わが国における食品中の化学物質（食品添加物や農薬、微生物、環境汚染物質等）のリスク評価は内閣府食品安全委員会により行われ、各種毒性（安全性）試験結果に基づいて最大無毒性量（no observed adverse effect level; NOAEL）及び1日許容摂取量（acceptable daily intake; ADI）が設定されている。しかしながら、肝肥大や肝細胞肥大を化学物質の毒性影響とみなすか否かに関するわが国と諸外国間での認識の違いが、NOAEL及びADIの設定値に国際的なずれを生じさせることがある。このことは、食のグローバル化が進む現代において、経済上の不利益だけでなく、農薬を始めとする化学物質の摂取リスクに対する国民の認識に影響を与える可能性がある。

以上のことより、肝肥大及び肝細胞肥大の毒性学的特徴や発現機序の解明が、化学物質の安全性評価においてレギュラトリーサイエンスやリスクコミュニケーションの観点から必要であると考えられる。

現在使用されている多くの農薬に関しては、動物を用いた毒性試験結果が食品安全委員会から農薬評価書として公開されており、⁹⁾ これら情報の有効利用は上記問題の解決に有用と考えられる。そこで本研究では、農薬評価書を利用したラット反復投与毒性試験結果のデータベース構築を行った。

方 法

1. データベースの構築

1-1. 農薬評価書の収集 農薬評価書（低分子有機化合物のみ）は、2014年10月1日時点で内閣府食品安全委員会のウェブサイト⁹⁾において公開されていたものをすべて（266ファイル）入手し、本研究の資料として用いた。全農薬に農薬名（英名）のアルファベット順で3桁のコード番号（001-266）を付し、ラット90日間亜急性毒性試験及びラット2年間慢性毒性・発がん性併合試験（又は個別の反復投与毒性試験と発がん性試験）の結果が適切に記載されているものを本研究のデータとして採用した（90日間試験：195農薬、2年間試験：173農薬）。採用した農薬には、さらに5桁のコード番号（90日間試験：3M001-3M195、2年間試験：2Y001-2Y173）を付与した。

1-2. 毒性所見の抽出 1-1.で採用した各農薬について、農薬評価書に記載されているラット90日間亜急性毒性試験及びラット2年間慢性毒性・発がん性併合試験の全毒性所見（日本語表記）を、農薬名（和名）、コード番号、投与量、雌雄と併せてMicrosoft Excelのワークシートに入力した。1種類の農薬について複数の試験結果が記載されている場合には、毒性の所見数、肝毒性の有無、投与量の大小、試験の詳細な記載の有無などを参考に、各農薬について1つの試験結果のみを入力した。

1-3. 毒性所見のグループ化及びコード番号の付与 抽出した全毒性所見は、同一及び類似所見についてグループ化を行い、3階層のカテゴリーで分類した（Supplementary Tables 1-42）。具体的には、第1カテゴリー（臓器/組織、血液学、血液生化学、尿/便、外観/行動、腫瘍/がん等）、第2カテゴリー（所見/徴候、検査項目等）、第3カテゴリー（部位/細胞、毒性学的特徴等）の3階層とした。分類した各毒性所見に7桁のコード番号を付け、1-3桁目で第1カテゴリー、4-5桁目で第2カテゴリー、

6 桁目で第3 カテゴリーを表現した。7 桁目はさらに細分化する際の予備とした（現時点では7 桁目はすべて0 である）。なお、カテゴリーの分類方法やグループ化は、文献^{10,11)}を参考にして行った。毒性所見のコード番号は、ラット 90 日間亜急性毒性試験とラット 2 年間慢性毒性・発がん性試験で得られたすべての毒性所見で共通とした。

1-4. データシートの作成 Microsoft Excel のワークシート上で、全農薬（1 行目）と全毒性所見（A 列）のマトリクス表を作成した（Supplementary Fig. 1）。この表の各セルに、対応する毒性所見が認められた場合には1、認められなかった場合には0を入力した。データシートは雌雄別に作成した。

2. 統計的データ解析 1-4. で作成したデータシートを利用して、Microsoft Excel 上で統計解析を行った。

結果及び考察

1. データベースの構築 本研究を開始した時点で公開されていた 266 種類のすべての農薬評価書入手し、全農薬に3 桁のコード番号（001-266）を付した。これらのうち、試験期間が90 日間（13 週間）あるいは2 年間以外、毒性所見の記載が不明瞭、ラットの系統や雌雄が不明確なものを評価対象農薬から除外した。最終的にラット 90 日間亜急性毒性試験では195 種類、ラット 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験では173 種類の農薬評価書から毒性所見データの抽出を行った。同一の農薬評価書から90 日間及び2 年間の両試験結果を採用したものは149 種類であった。データ抽出の結果、重複したものを除いた総所見数は1702 種類となった。なお、90 日間及び2 年間試験に採用した農薬にそれぞれ3M001-3M195 及び2Y001-2Y173 のコード番号を付与した。

次に、全1702 種類の毒性所見を3 階層のカテゴリーで分類した。まず、臓器/組織レベルや血液学、血液生化学、腫瘍/がん等の大きなレベルで42 種類に分類した（第1 カテゴリー）（Table 1）。続いて、所見/兆候、検査項目などのレベル（第2 カテゴリー）、さらに部位/細胞レベル（第3 カテゴリー）で細分化し、同一の病理所見と考えられるが評価書上の表記が微妙に異なるものを整理した。その結果、第2 カテゴリーは445 種類、第3 カテゴリーは872 種類となり、総分類数は1101 種類となった。

Table 1. The List of 1st Categories

Code#	Category name	Code#	Category name
101	Liver/Gallbladder	122	Lymph node
102	Lung	123	Spleen
103	Laryngopharynx	124	Thymus
104	Nasal cavity	125	Thyroid gland
105	Tooth	126	Parathyroid gland
106	Salivary gland	127	Adrenal
107	Stomach	128	Eye
108	Small intestine	129	Harderian gland
109	Large intestine	130	Ear
110	Pancreas	131	Skeletal muscle
111	Blood vessel	132	Bone/Articulation
112	Heart	133	Thoracic cavity
113	Kidney	134	Skin/Subcutis/Hair
114	Urinary bladder/Ureter/Urethra	135	Mammary gland
115	Testis/Seminal vesicle/Epididymis	136	Adipose tissue
116	Other male sex organs	201	Hematology
117	Ovary/Uterus	202	Blood biochemistry
118	Other female sex organs	203	Urine/Feces
119	Central nerve	301	Body weight
120	Peripheral nerve	302	Appearance/Behavior
121	Bone marrow	401	Tumor/Cancer

りーは872 種類となり、総分類数は1101 種類となった。Table 2 に、「肝臓（第1 カテゴリー）」において認められた毒性所見（第2 及び第3 カテゴリー）と、試験期間別、雌雄別のカテゴリー陽性数のリストを示した。重量増加、肝細胞肥大は多くの農薬で認められたが、細胞死や細胞増殖は少なかった。また、肝細胞肥大との関連が示唆されている甲状腺及び血液生化学の所見リストをそれぞれ Table 3 及び Table 4 に示した。甲状腺については、重量増加と肥大/過形成が比較的多くの農薬で認められたが、その他の所見が認められた農薬数は少なかった（Table 3）。血液生化学ではコレステロール増加が多くの農薬で認められた（Table 4）。

2. 統計解析 試験期間別及び雌雄別に、第1 カテゴリー毎の検出された所見数を算出した（Tables 5 and 6）。90 日間試験では、雌雄ともに血液生化学で最も多く、ついで血液学、肝臓/胆嚢、外観/行動、腎臓、体重、甲状腺、脾臓、尿/便、副腎で、また雄性ラットでは精巣/精嚢/精巣上体においても所見陽性数が多かった。一方、2 年間試験では、雌雄ともに肝臓/胆嚢、血液学、血液生化学において特に多く、ついで腎臓、外観/行動、体重、

Table 2. Findings/Observations in the Category of Liver/Gallbladder (101)

1st category	2nd category	3rd category	Code#	Number of positive pesticides			
				Male		Female	
				90-day	2-year	90-day	2-year
Liver/Gallbladder	Weight gain	Total	1010100	121	89	124	84
		Absolute weight	1010110	70	61	82	52
		Relative weight	1010120	116	85	120	79
		Others	1010190	10	7	11	2
	Weight loss	Total	1010200	5	5	3	1
		Absolute weight	1010210	4	4	2	1
		Relative weight	1010220	3	4	1	0
	Hepatomegaly	Liver	1010310	19	10	15	5
	Hepatocyte hypertrophy	Total	1010400	94	67	87	64
		Centrilobular	1010410	54	44	50	41
		Midzonal	1010420	1	1	1	1
		Perilobular	1010430	6	6	5	5
		Diffuse	1010440	37	24	36	23
	Fatty change/vacuolation	Total	1010500	21	27	14	24
		Centrilobular	1010510	3	6	2	4
		Midzonal	1010520	1	1	1	2
		Perilobular	1010530	5	2	7	2
		Diffuse	1010540	0	6	0	6
		Focal	1010550	0	1	0	0
		Loss	1010560	2	0	0	0
		Others	1010590	11	12	5	12
	Cell death	Total	1010600	16	7	13	10
		Apoptosis	1010610	0	0	0	1
		Single cell	1010620	9	2	8	3
		Centrilobular	1010630	1	1	1	2
		Focal	1010640	4	3	2	3
		Others	1010690	4	1	2	1
	Proliferation/hyperplasia	Total	1010700	8	14	8	16
		Hepatocyte	1010710	3	5	2	4
		Kupffer's cell	1010720	1	1	1	1
		Bile duct	1010730	7	9	5	11
		Others	1010790	2	0	0	0
	Degeneration	Total	1010800	9	24	5	7
		Centrilobular	1010810	0	1	1	1
		Midzonal	1010820	0	1	0	0
		Perilobular	1010830	2	4	0	1
		Diffuse	1010840	0	1	0	1
		Focal	1010850	1	2	0	1
		Spongy degeneration	1010860	0	15	0	0
		Inclusion body	1010870	2	2	0	0
		Others	1010890	4	4	4	4
	Pigment deposition	Total	1010900	12	10	13	19
		Centrilobular	1010910	0	1	0	1
		Diffuse	1010920	0	1	0	1
		Kupffer's cell	1010930	5	3	5	9
		Others	1010990	7	6	8	10

Table 2. (Continued)

1st category	2nd category	3rd category	Code#	Number of positive pesticides			
				Male		Female	
				90-day	2-year	90-day	2-year
Liver/Gallbladder	Inflammation/cell infiltration	Total	1011000	7	9	4	14
		Monocyte	1011010	1	0	2	1
		Foam cell	1011020	1	1	1	3
		Inflammation	1011030	2	5	0	5
		Fibrosis	1011040	0	1	0	2
		Others	1011090	4	3	2	5
	Appearance	Total	1011100	14	13	15	11
		Discoloration (bleaching)	1011110	0	3	0	2
		Darkening	1011120	10	5	13	5
		Accentuated lobule	1011130	3	1	2	3
		Spot	1011140	0	2	0	0
		Surface	1011150	0	1	0	1
		Others	1011190	2	2	1	2
	Altered foci	Total	1011200	0	35	0	24
		Eosinophilic	1011210	0	21	0	17
		Basophilic	1011220	0	8	0	6
		Clear cell	1011230	0	7	0	3
		Others	1011290	0	10	0	3
	Altered bile duct	Dilatation	1011310	1	2	1	7
	Congestion	Total	1011400	0	3	0	4
		Sinusoidal dilatation	1011410	0	2	0	3
		Congestion	1011420	0	1	0	0
		Peliosis	1011430	0	0	0	1
	Enzyme	Total	1011500	2	1	1	1
		Increase, EH	1011510	0	1	0	1
		Increase, UGT	1011520	0	1	0	1
		Increase, GST	1011530	0	1	0	1
		Increase, P450	1011540	1	0	0	0
		Increase, GGT	1011550	1	0	1	0
	Abnormality of nucleus	Total	1011600	4	0	2	0
		Numerical	1011610	1	0	0	2
		Morphological	1011620	3	0	2	0
		Others	1011690	1	0	1	0
	Miscellaneous		1019910	3	1	2	2

甲状腺、尿/便、腫瘍/がんで所見陽性数が多かった。また、90日間試験と同様に、雄性ラットでは多くの農薬において精巣/精嚢/精巣上体の所見が認められた。観察された所見に、試験期間の違いによる大きな差は認められなかった。

試験期間別及び雌雄別に、第3カテゴリーの各所見及び第2カテゴリー 1010400 (Liver/hepatocyte hypertrophy) の陽性農薬数を算出し、解析した全農薬数 (90日間では 195 農薬、2年間では 173 農薬)

のうち 20% (90 日間では 39 農薬、2 年間では 35 農薬) 以上で認められた所見を、多いものから順に並べた (Tables 7 and 8)。90 日間試験では、雌雄ともに最も多く認められたのは体重増加抑制 (3010120) であり、肝比重量増加 (1010120)、肝細胞肥大 (1010400, 1010410) など肝臓の所見や、ヘモグロビン濃度減少 (2010520) やヘマトクリット値減少 (2010620) など貧血の指標となる所見のほか、肝機能異常を表す γ -glutamyl transpeptidase

Table 3. Findings/Observations in the Category of Thyroid Gland (125)

1st category	2nd category	3rd category	Code#	Number of positive pesticides			
				Male		Female	
				90-day	2-year	90-day	2-year
Thyroid gland	Weight gain	Total	1250100	22	19	16	16
		Absolute weight	1250110	19	15	14	11
		Relative weight	1250120	21	16	16	16
		Others	1250190	1	0	0	0
	Weight loss	Total	1250200	0	2	0	1
		Absolute weight	1250210	0	1	0	1
		Relative weight	1250220	0	1	0	0
	Hormone level change	Total	1250300	12	7	11	5
		Increase, T3	1250310	4	1	4	1
		Decrease, T3	1250320	5	2	3	2
		Increase, T4	1250330	3	0	2	0
		Decrease, T4	1250340	8	4	6	3
		Increase, T4 binding capacity	1250350	1	1	1	1
		Decrease, T4 binding potential	1250360	1	0	1	0
		Increase, TSH	1250370	8	2	7	3
	Hypertrophy/hyperplasia	Total	1250400	29	26	26	26
		Thyroid gland	1250410	5	6	5	1
		Follicular epithelial cell hypertrophy	1250420	23	12	20	13
		Follicle increase/hypertrophy	1250430	5	1	5	1
		Follicular epithelial cell hyperplasia	1250440	7	14	5	12
		Parafollicular cell hyperplasia	1250450	0	3	0	2
		Follicular cyst	1250460	1	4	0	5
	Vacuolation	Follicular cell	1250510	2	2	2	2
	Cell death/inflammation	Total	1250600	0	1	0	1
		Inflammation	1250610	0	1	0	1
		Necrosis	1250620	0	0	0	1
	Colloiddegeneration	Total	1250700	3	11	3	11
		Basification	1250710	0	1	0	1
		Aggregation	1250720	2	1	1	1
		Deficiency	1250730	1	1	2	1
		Others	1250790	0	8	0	8
	Pigment deposition	Total	1250800	0	4	0	3
		Thyroid gland	1250810	1	1	1	1
		Follicular cell	1250820	0	3	0	2
	Color tone change	Total	1250900	1	2	1	1
		Darkening	1250910	0	2	0	1
		Discoloration	1250920	1	0	1	0
	Mineralization	Total	1251000	0	3	0	4
		Follicular cell	1251010	0	1	0	2
		Colloid	1251020	0	2	0	2
	Miscellaneous	Total	1259900	1	0	1	1
		Thyroid gland	1259910	0	0	0	1
		Blood vessel	1259920	1	0	1	0

Table 4. Findings/Observations in the Category of Blood Biochemistry (202)

1st category	2nd category	3rd category	Code#	Number of positive pesticides			
				Male		Female	
				90-day	2-year	90-day	2-year
Blood biochemistry	Total protein	Total	2020100	70	34	55	33
		Increase	2020110	41	22	32	24
		Decrease	2020120	29	12	23	9
	Albumin	Total	2020200	43	20	37	13
		Increase	2020210	31	14	14	8
		Decrease	2020220	12	6	23	5
	Albumin/globulin ratio	Total	2020300	18	12	23	12
		Increase	2020310	13	6	9	3
		Decrease	2020320	5	6	14	9
	Globulin	Total	2020400	42	20	39	24
		Increase	2020410	20	11	25	17
		Decrease	2020420	22	10	14	7
		Decrease, IgA	2020430	1	0	1	0
		Decrease, IgG	2020440	1	0	1	0
	Aspartate aminotransferase	Total	2020500	24	10	20	7
		Increase	2020510	22	9	17	4
		Decrease	2020520	2	1	3	3
	Alanine aminotransferase	Total	2020600	28	13	18	7
		Increase	2020610	26	12	15	6
		Decrease	2020620	2	1	3	1
	Lactate dehydrogenase	Total	2020700	5	1	1	2
		Increase	2020710	3	0	0	1
		Decrease	2020720	2	1	1	1
	Glutamate dehydrogenase	Total	2020800	1	1	0	1
		Decrease	2020810	0	1	0	1
		Increase	2020820	1	0	0	0
	Sorbitol dehydrogenase	Increase	2020910	1	1	1	0
	Alkaline phosphatase	Total	2021000	37	20	34	19
		Increase	2021010	33	16	28	16
		Decrease	2021020	4	4	6	3
	Bilirubin	Total	2021100	20	10	20	11
		Increase	2021110	15	6	14	6
		Decrease	2021120	5	4	6	5
	γ -glutamyl transpeptidase (γ -GPT)	Total	2021200	43	31	52	22
		Increase	2021210	42	31	52	22
		Decrease	2021220	1	0	0	0
	Leucine aminopeptidase	Increase	2021310	0	1	1	1
	Blood urea nitrogen	Total	2021400	36	0	36	0
		Increase	2021410	36	24	35	24
		Decrease	2021420	0	0	1	0
	Creatinine	Total	2021500	18	13	12	13
		Increase	2021510	16	10	8	9
		Decrease	2021520	2	3	4	4

Table 4. (Continued)

1st category	2nd category	3rd category	Code#	Number of positive pesticides			
				Male		Female	
				90-day	2-year	90-day	2-year
Blood biochemistry	Blood glucose	Total	2021600	30	12	34	12
		Increase	2021610	3	3	8	2
		Decrease	2021620	27	9	26	10
	Cholesterol	Total	2021700	77	43	79	59
		Increase	2021710	59	30	70	48
		Decrease	2021720	18	13	9	11
		Increase, free cholesterol	2021730	1	0	1	1
	Triglyceride	Total	2021800	41	20	31	21
		Increase	2021810	6	5	7	8
		Decrease	2021820	35	15	24	13
	Phospholipid	Total	2021900	10	5	10	5
		Increase	2021910	9	4	10	5
		Decrease	2021920	1	1	0	0
	Calcium	Total	2022000	29	9	18	15
		Increase	2022010	20	8	10	12
		Decrease	2022020	9	1	8	3
	Phosphorus	Total	2022100	21	0	22	0
		Increase	2022110	18	10	18	8
		Decrease	2022120	3	0	4	0
	Sodium	Total	2022200	9	1	7	4
		Increase	2022210	5	0	2	3
		Decrease	2022220	4	1	5	1
	Potassium	Total	2022300	19	2	16	3
		Increase	2022310	17	2	13	1
		Decrease	2022320	2	0	3	2
	Chlorine	Total	2022400	20	5	19	6
		Increase	2022410	6	1	4	1
		Decrease	2022420	14	4	15	5
	Magnesium	Increase	2022510	0	0	0	1
	Total iron-binding capacity	Increase	2022610	0	0	0	1
	Free fatty acid	Total	2022700	3	0	0	0
		Increase	2022710	1	0	0	0
		Decrease	2022720	2	0	0	0
	Creatine kinase	Total	2022800	3	0	3	0
		Increase	2022810	2	0	2	0
		Decrease	2022820	1	0	1	0
	Uric acid	Total	2022900	2	0	2	0
		Increase	2022910	1	0	1	0
		Decrease	2022920	1	0	1	0
	Ornithine carbamoyltransferase	Increase	2023010	1	0	1	0
	5'-Nucleotidase	Decrease	2023110	0	0	1	0
	Total bile acid	Decrease	2023210	0	0	1	0
	Cholinesterase	Decrease	2023310	0	0	5	0

Table 5. The Number of Positive Findings/Observations for Each 1st Category in 90-Day Repeated-dose Toxicity Tests

Code#	1st category Category name	Number of 3rd categories	Number of positives	
			Male	Female
101	Liver/Gallbladder	80	741	694
102	Lung	14	18	20
103	Laryngopharynx	2	0	0
104	Nasal cavity	12	1	2
105	Tooth	9	5	2
106	Salivary gland	15	11	7
107	Stomach	36	24	28
108	Small intestine	17	10	15
109	Large intestine	12	12	12
110	Pancreas	30	20	11
111	Blood vessel	3	0	0
112	Heart	19	29	27
113	Kidney	85	355	255
114	Urinary bladder/Ureter/ Urethra	16	18	16
115	Testis/Seminal vesicle/ Epididymis	43	116	0
116	Other male accessory sex appendages	9	6	0
117	Ovary/Uterus	44	0	80
118	Other female accessory sex appendages	6	0	3
119	Central nerve	26	49	42
120	Peripheral nerve	6	0	0
121	Bone marrow	25	33	37
122	Lymph node	24	16	16
123	Spleen	26	173	174
124	Thymus	12	23	24
125	Thyroid gland	45	186	153
126	Parathyroid gland	4	8	0
127	Adrenal	31	112	132
128	Eye	51	49	51
129	Harderian gland	6	2	2
130	Ear	1	0	2
131	Skeletal muscle	9	3	4
132	Bone/Articulation	22	3	5
133	Thoracic cavity	2	0	0
134	Skin/Subcutis/Hair	19	29	33
135	Mammary gland	3	1	1
136	Adipose tissue	8	2	3
201	Hematology	85	1027	1032
202	Blood biochemistry	86	1302	1189
203	Urine/Feces	52	166	147
301	Body weight	3	286	278
302	Appearance/Behavior	58	423	452
401	Tumor/Cancer	45	0	0

Table 6. The Number of Positive Findings/Observations for Each 1st Category in 2-Year Repeated-dose Toxicity Tests

Code#	1st category Category name	Number of 3rd categories	Number of positives	
			Male	Female
101	Liver/Gallbladder	80	720	645
102	Lung	14	27	25
103	Laryngopharynx	2	2	2
104	Nasal cavity	12	14	14
105	Tooth	9	20	18
106	Salivary gland	15	1	1
107	Stomach	36	49	51
108	Small intestine	17	9	10
109	Large intestine	12	4	5
110	Pancreas	30	32	26
111	Blood vessel	3	4	2
112	Heart	19	30	27
113	Kidney	85	360	280
114	Urinary bladder/Ureter/ Urethra	16	21	23
115	Testis/Seminal vesicle/ Epididymis	43	110	0
116	Other male accessory sex appendages	9	7	0
117	Ovary/Uterus	44	0	68
118	Other female accessory sex appendages	6	0	4
119	Central nerve	26	32	37
120	Peripheral nerve	6	19	19
121	Bone marrow	25	2	2
122	Lymph node	24	15	20
123	Spleen	26	65	64
124	Thymus	12	2	2
125	Thyroid gland	45	179	163
126	Parathyroid gland	4	11	9
127	Adrenal	31	47	44
128	Eye	51	82	97
129	Harderian gland	6	2	7
130	Ear	1	1	1
131	Skeletal muscle	9	11	19
132	Bone/Articulation	22	20	12
133	Thoracic cavity	2	2	2
134	Skin/Subcutis/Hair	19	27	44
135	Mammary gland	3	2	0
136	Adipose tissue	8	4	4
201	Hematology	85	568	653
202	Blood biochemistry	86	600	613
203	Urine/Feces	52	136	116
301	Body weight	3	262	286
302	Appearance/Behavior	58	320	322
401	Tumor/Cancer	45	119	95

Table 7. The Ranking of Findings/Observations in 90-Day Repeated-dose Toxicity Tests

Sex	Rank	Findings/Observations				Number of positives
		Code#	1st category	2nd category	3rd category	
Male	1	3010120	Body weight	Weight loss	Suppression of gain	141
	2	1010120	Liver/Gallbladder	Weight gain	Relative weight	116
	3	3021020	Appearance/behavior	Food intake	Decrease	97
	4	1010400	Liver/Gallbladder	Hepatocyte hypertrophy	—	94
	5	2010520	Hematology	Hemoglobin concentration	Decrease	71
	6	1010110	Liver/Gallbladder	Weight gain	Absolute weight	70
	7	2010620	Hematology	Hematocrit value	Decrease	62
	8	2021710	Blood biochemistry	Cholesterol	Increase	59
	9	1130120	Kidney	Weight gain	Relative weight	58
	10	1010410	Liver/Gallbladder	Hepatocyte hypertrophy	Centrilobular	54
	10	2010120	Hematology	Red blood cell	Decrease	54
	12	2021210	Blood biochemistry	γ -GTP	Increase	42
Female	1	3010120	Body weight	Weight loss	Suppression of gain	137
	2	1010120	Liver/Gallbladder	Weight gain	Relative weight	120
	3	3021020	Appearance/behavior	Food intake	Decrease	101
	4	1010400	Liver/Gallbladder	Hepatocyte hypertrophy	—	87
	5	1010110	Liver/Gallbladder	Weight gain	Absolute weight	82
	6	2010520	Hematology	Hemoglobin concentration	Decrease	75
	7	2021710	Blood biochemistry	Cholesterol	Increase	70
	7	2010620	Hematology	Hematocrit value	Decrease	70
	9	2021210	Blood biochemistry	γ -GTP	Increase	52
	10	1130120	Kidney	Weight gain	Relative weight	51
	11	1010410	Liver/Gallbladder	Hepatocyte hypertrophy	Centrilobular	50
	11	2010120	Hematology	Red blood cell	Decrease	50

Findings/observations belonging to 3rd categories except #1010400 (liver-hepatocyte hypertrophy, which belongs to 2nd category) that were positive in 90-day tests were counted and those that were positives for more than 20% of all 195 pesticides are shown.

(γ -GTP) 増加 (2021210) も含まれていた。雌雄で大きな違いは認められなかった。

2 年間試験でも 90 日間試験と同様、体重増加抑制 (3010120) が最も多く認められた。また、肝比重量増加 (1010120)、肝細胞肥大 (1010400) やヘモグロビン濃度減少 (2010520)、ヘマトクリット値減少 (2010620) などが含まれていた。以上の結果から、抽出された各所見に大きな性差は認められず、また 90 日間と 2 年間試験の間にも大きな違いは認められなかった。

試験期間別及び雌雄別に、肝臓の絶対又は相対重量増加が陽性・陰性の場合に分けて、部位別の肝細胞肥大の陽性数を算出した (Table 9)。Total の数字は、それぞれの場合において、いずれかの肝細胞肥大が認められた農薬数を示している。認められた肝細胞肥大の部位が投与量によって異なる農薬があったため、合計の数字は肝細胞肥大の部位毎の陽性数を足したもの (小葉中心性+小葉中間性+小葉

周辺性+小葉びまん性) とは異なっている。なお、部位の記載がない場合には小葉びまん性としてカウントした。

90 日間試験では、小葉中心性肝細胞肥大が最も多く認められ、雄性ラットでは 195 農薬中 54 農薬、雌性ラットでは 50 農薬において認められた。ついで小葉びまん性肝細胞肥大が多く、雄性ラットで 37 農薬、雌性ラットで 36 農薬において認められた。また肝重量増加が陽性の農薬では、約 3 分の 2 の農薬で肝細胞肥大も陽性であった。

2 年間試験における肝細胞肥大についても、90 日間試験の場合と同様に、雄性ラットでは 173 農薬中 44 農薬、雌性ラットでは 41 農薬で認められた小葉中心性肝細胞肥大が最も多く、ついで雄性ラットで 24 農薬、雌性ラットで 23 農薬において認められていた小葉びまん性肝細胞肥大が多かった。また肝重量増加が認められた農薬では、半数以上で肝細胞肥大が認められた。

Table 8. The Ranking of Findings/Observations in 2-Year Repeated-dose Toxicity Tests

Sex	Rank	Findings/Observations				Number of positives
		Code#	1st category	2nd category	3rd category	
Male	1	3010120	Weight	Weight loss	Suppression of gain	127
	2	1010120	Liver/Gallbladder	Weight gain	Relative weight	85
	3	3021020	Appearance/behavior	Food intake	Decrease	70
	4	1010400	Liver/Gallbladder	Hepatocyte hypertrophy	—	67
	5	1010110	Liver/Gallbladder	Weight gain	Absolute weight	61
	6	2010520	Hematology	Hemoglobin concentration	Decrease	48
	7	1010410	Liver/Gallbladder	Hepatocyte hypertrophy	Centrilobular	44
	7	2010620	Hematology	Hematocrit value	Decrease	44
	9	1130120	Kidney	Weight gain	Relative weight	43
Female	1	3010120	Weight	Weight loss	Suppression of gain	140
	2	1010120	Liver/Gallbladder	Weight gain	Relative weight	79
	3	3021020	Appearance/behavior	Food intake	Decrease	75
	4	1010400	Liver/Gallbladder	Hepatocyte hypertrophy	—	64
	5	2010520	Hematology	Hemoglobin concentration	Decrease	57
	6	2010620	Hematology	Hematocrit value	Decrease	56
	7	1010110	Liver/Gallbladder	Weight gain	Absolute weight	52
	8	2021710	Blood biochemistry	Cholesterol	Increase	48
	9	1010410	Liver/Gallbladder	Hepatocyte hypertrophy	Centrilobular	41
	10	2010120	Hematology	Red blood cell	Decrease	40
	11	1130120	Kidney	Weight gain	Relative weight	39
	12	3021040	Appearance/behavior	Food intake	Decrease, food efficiency	35

Findings/observations belonging to 3rd categories except #1010400 (liver-hepatocyte hypertrophy, which belongs to 2nd category) that were positive in 2-year tests were counted and those that were positives for more than 20% of all 173 pesticides are shown.

Table 9. Hepatocyte Hypertrophy and Liver Weight Gain in 90-Day and 2-Year Repeated-dose Toxicity Tests

Sex	Liver/weight gain		Hepatocyte hypertrophy				Total
			Centrilobular	Midzonal	Perilobular	Diffuse	
90-day							
Male	Absolute weight	Positive	28	1	4	23	52 (70)
		Negative	26	0	2	14	42 (125)
	Relative weight	Positive	45	1	6	34	82 (116)
		Negative	9	0	0	3	12 (79)
Female	Absolute weight	Positive	31	1	4	26	57 (82)
		Negative	19	0	1	10	30 (113)
	Relative weight	Positive	46	1	5	34	81 (120)
		Negative	4	0	0	2	6 (75)
2-year							
Male	Absolute weight	Positive	28	0	5	13	42 (61)
		Negative	16	1	1	11	25 (112)
	Relative weight	Positive	33	1	5	17	51 (85)
		Negative	11	0	1	7	16 (88)
Female	Absolute weight	Positive	26	0	2	10	36 (52)
		Negative	15	1	3	13	28 (121)
	Relative weight	Positive	30	1	3	17	48 (79)
		Negative	11	0	2	6	16 (94)

“Total” represents the number of pesticides that were positive in any “hepatocyte hypertrophy” for absolute or relative weight gain-positive or -negative compounds. The numbers in parentheses represent the numbers of pesticides that were positive or negative for each of absolute or relative weight gain in all (195 for 90-day, 173 for 2-year) pesticides.

現在、農薬評価書におけるラット 90 日間及び 2 年間試験では薬物代謝酵素誘導に関する記述はほとんどない。このため、肝細胞肥大と酵素誘導との係わりについて農薬評価書データだけで詳細な考察をすることは困難である。また反復投与毒性試験では様々な毒性機序が複雑に係わり合っており、一面的なアプローチでは発現する毒性所見やその機序の予測・特定は難しい。今回構築したデータベースを用いて、統計学的手法や、酵素誘導に関するインビトロ試験結果を取り入れながら更なる解析を実施することで、肝細胞肥大と酵素誘導の関連性並びに肝細胞肥大の毒性学的特徴づけが可能になると考えている。

結 論

肝細胞肥大の発現機序や毒性学的意義の解明に向けて、本研究では、公開されている毒性試験情報を利用して、ラット 2 年間慢性毒性・発がん性併合試験結果 (173 農薬) 及びラット 90 日間亜急性毒性試験結果 (195 農薬) から合計 1702 の毒性所見を抽出し、雌雄別に毒性試験結果データベースを構築した。そして、全毒性所見を 3 階層のカテゴリーでグループ化し、それぞれにコード番号を付与した。これらにより、既知の膨大な毒性試験結果に基づいて、肝細胞肥大や肝肥大の特徴の解析を効率的に行うことができるようになった。

謝辞 本研究の一部は、内閣府食品安全委員会食品健康影響評価技術研究 (平成 25–26 年度: 課題番号 1302) 及び日本化学工業協会が推進する LRI (Long-range Research Initiative; 化学物質の環境影響および安全性に関する長期自主研究: 課題番号 13_PT01-03-2) の支援を受けて実施された。農薬評価書のデータ入力にご協力頂いた野表知世氏、飯塚 薫氏 (東北大学) 及び中山智恵氏 (静岡県立大学)、並びに英文校閲にご協力頂いた Philip Hawke 氏 (静岡県立大学) に感謝いたします。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

Supplementary materials この論文のオンラインに Supplementary materials (電子付録) を含んでいます。

REFERENCES

- 1) Hall A. P., Elcombe C. R., Foster J. R., Harada T., Kaufmann W., Knipple A., Küttler K., Malarkey D. E., Maronpot R. R., Nishikawa A., Nolte T., Schulte A., Strauss V., York M. J., *Toxicol. Pathol.*, **40**, 971–994 (2012).
- 2) Whysner J., Ross P. M., Williams G. M., *Pharmacol. Ther.*, **71**, 153–191 (1996).
- 3) Okey A. B., *Pharmacol. Ther.*, **45**, 241–298 (1990).
- 4) Handschin C., Meyer U. A., *Pharmacol. Rev.*, **55**, 649–673 (2003).
- 5) Maronpot R. R., Yoshizawa K., Nyska A., Harada T., Flake G., Mueller G., Singh B., Ward J. M., *Toxicol. Pathol.*, **38**, 776–795 (2010).
- 6) Yoshida M., Umemura T., Kojima H., Inoue K., Takahashi M., Uramaru N., Kitamura S., Abe K., Tohkin M., Ozawa S., Yoshinari K., *Food Hyg. Saf. Sci.*, **56**, 42–48 (2015).
- 7) Butler W. H., *Toxicol. Pathol.*, **24**, 484–492 (1996).
- 8) Carmichael N. G., Enzmann H., Pate I., Waechter F., *Environ. Health Perspect.*, **105**, 1196–1203 (1997).
- 9) Cabinet Office, Government of Japan Food Safety Commission. “Risk Assessment.”: <https://www.fsc.go.jp/hyouka/>, cited 16 December, 2016.
- 10) Nishikawa S., Yamashita T., Imai T., Yoshida M., Sakuratani Y., Yamada J., Maekawa A., Hayashi M., *J. Toxicol. Sci.*, **35**, E1–E8 (2010).
- 11) “Ito’s Toxicologic Pathology,” ed. by Takahashi M., Fukushima S., Maruzen Co., Tokyo, 2013.