

参考資料

- 我が国で策定すべき内分泌攪乱作用を含む生殖毒性ガイドライン -
(平成9年度環境庁委託業務結果報告書より抜粋)

我が国で策定すべき内分泌攪乱作用を含む生殖毒性ガイドライン
(平成9年度環境庁委託業務結果報告書より抜粋)

第2部 我が国で策定すべき内分泌攪乱作用を
含む生殖毒性試験ガイドライン

1. 要約

我が国の農薬の内分泌攪乱作用の検出も含めた生殖毒性試験ガイドライン改定のための情報に資することを目的とし、OECD Draft Detailed Review Paper (以下 DDRP)¹⁾を参考に、現行の生殖毒性試験ガイドラインへの追加が妥当と考えられる検査項目について検討した。検討にあたっては、近年 EPA および OECD から提示された生殖毒性試験ガイドライン改定案²⁾、さらに医薬品 ICH ガイドライン³⁾も参考にした。

1) OECD 推奨の内分泌攪乱作用関連項目で現行ガイドラインへの追加が妥当な項目

- ・生殖器、副生殖器の臓器重量と病理組織学的検査
- ・児動物の病理検査
- ・精子形成および精子に関する詳細な検査
- ・発情サイクルのモニタリング
- ・児動物における成長、行動の発達、学習・記憶能に関する検査

2) 我が国の農薬の生殖毒性試験ガイドラインへの追加を検討すべき項目

DDRP および国外のガイドライン改定の動向を考慮した上で、我が国の農薬の生殖毒性試験ガイドラインへの追加あるいは変更を検討すべきと考えられる主な項目を以下に示す。このうち下線で示したものは内分泌攪乱作用関連項目である。

(1) 催奇形性試験

- ・母動物：妊娠0日の定義、投与液量算出日の変更、用量設定に関する記載、投与期間の着床から妊娠末期までの延長、妊娠子宮重量の測定。
- ・胎児：内部生殖器形態の顕微解剖法などによる詳細な検査、ラット胎児の肛門・生殖結節間距離 (AGD) 測定、ウサギ胎児の頭部の連続切片法による詳細な検査。

(2) 繁殖試験

- ・親動物：投与期間、交配期間の変更、用量設定、投与開始週齢、投与限界量に関する記載、摂餌効率の算出、性周期検査、精子検査、生殖器・内分泌系臓器の重量測定および組織検査（必要に応じ精上皮細胞数、原始卵胞数などの配偶子

形成の定量的評価) , 剖検時の性周期検査。

- ・ 児動物：児数調整に関する記載，AGD 測定，形態分化，反射機能，行動機能（情動性，運動機能，学習・記憶能），性成熟（膻開口，陰茎亀頭包皮分離），離乳児の生殖器・内分泌系臓器の保存および必要に応じた組織検査。

なお，DDRP では内分泌攪乱作用を検出するための現状で最も効果的な方法として，亜慢性毒性試験への追加を最初に検討すべきとしている。この方策は，検査の重複を避けるとともに，続いて行われる試験の設計に有用な情報が得られることから，安全性評価を効率的に進める上で妥当と考えられる。したがって，現行ガイドラインへの検査項目の追加は，生殖毒性試験以外の安全性試験も含めて包括的に検討した上で，内分泌攪乱作用を含めた安全性の総合評価のための最も合理的な試験ガイドラインを策定すべきであろう。

2. OECD において現行ガイドラインへの追加を推奨された項目に対する考察

OECD の DDRP で推奨された内分泌攪乱作用検出のための検査項目を以下に示す。

- ・生殖器，副生殖器の臓器重量と病理組織学的検査
- ・児動物の病理検査
- ・性ホルモンの血中濃度測定
- ・副生殖器の分泌物産生検査
- ・精子形成および精子に関する詳細な検査
- ・発情サイクルのモニタリング
- ・児動物における成長，行動の発達，学習・記憶能に関する検査の追加

本項では，これらの項目の農薬の生殖毒性試験ガイドラインへの追加について考察する。なお，DDRP でも記載しているように，反復投与毒性試験への追加の検討が第一であるのは妥当と考えられる。したがって，反復投与毒性試験に追加された項目については，農薬の生殖毒性試験の F0 親動物では一部の検査を省略できるであろう。今回はその点は考慮せずに述べる。

1) 生殖器，副生殖器の臓器重量と病理組織学的検査

生殖器および副生殖器の病理組織学的検査は現行のガイドラインにも含まれている。また，これらの臓器重量は性ホルモンの変動に鋭敏に反応することから，内分泌攪乱作用検出の指標としてガイドラインに追加すべき項目である。この他に，性ホルモン以外の内分泌攪乱作用の検出の指標として，甲状腺の臓器重量測定および病理組織学的検査も追加した方が良いと思われる。なお，医薬品ガイドラインでは標本作製時の注意点として，精巣はブアン液あるいはそれに相当する固定液で固定すべきであること，精巣上体は頭部，体部，尾部の検査のため，縦断切片を作製することが望ましい旨が記載されている。

2) 児動物の病理検査

児動物の病理組織学的検査が全ての試験で必要とは思われないが，内分泌攪乱作用が疑われる変化が認められた場合，児動物の生殖器あるいは他の内分泌系臓器の病理検査が結果の解析に貢献する場合は多いと考えられる。したがって，これらの臓器は後の検査のため，代表例について標本として保存しておくべきであろう。

3) 性ホルモンの血中濃度測定

性ホルモンの体内動態は、成熟した雌では性周期に伴い分泌パターンが変化し、母動物および児動物でも発育のステージで微妙に変化することから、周辺情報なしに適切な測定時期を特定するのは困難であり、標準的な検査項目としてガイドラインに含めるのは難しいと思われる。むしろ、周辺情報から測定時期を特定できる場合の検査項目として、あるいは発現した毒性の特徴を明らかにするための手段として用いるのが適切であろう。

4) 副生殖器の分泌物産生検査

副生殖器の分泌物産生検査は、機能異常の指標としては意義がある項目であるが、一般的な検査ではなく、適切な検査項目の選択、検査法の標準化など、ルーチン化のために解決しなければならない問題があり、標準的な検査項目としてガイドラインに含めるには時期尚早と考えられる。

5) 精子形成および精子に関する詳細な検査

精子形成は性ホルモンの依存しており、内分泌攪乱作用検出のための有用な指標であり、精子形成障害の検出に最も感度が高いといわれている生殖器および副生殖器の病理組織検査は現行ガイドラインにも含まれている。また、現行ガイドラインには含まれていないが、精子の検査は精子形成障害を特徴付ける手段として医薬品では実施されており、農薬でもガイドラインに追加すべき項目である。

6) 発情サイクルのモニタリング

性周期の変化はホルモン動態の異常により発現することから、内分泌攪乱作用の指標として有用な検査項目である。また、医薬品では標準的に検査されており、農薬でもガイドラインに追加すべき項目である。

7) 児動物における成長、行動の発達、学習・記憶能に関する検査の追加

これらの検査項目として、雄の陰茎亀頭包皮分離、乳頭発達、雌の膣開口、発情開始時期、正常な性周期の開始時期、内外生殖器の形態、出生時の肛門・生殖結節間距離（AGD）、脳視索前野のサイズ、行動発達、学習・記憶能が挙げられている。これらのうち検査方法が一般化されている以下の項目はガイドラインへの追加を検討すべきであろう。

- ・生後の発育指標：雄の陰茎亀頭包皮分離および雌の膣開口の発現日は、医薬品では標準的な項目として検査されている。いずれも性ホルモンの依存し、種々の内分泌

攪乱作用物質の母動物への投与により児動物でこれらの指標が変化することが知られている。一方、乳頭発達については内分泌攪乱作用の指標であることが報告されているものの、現状では多くの研究機関で検査の経験が少ないと思われる。今後の知見の蓄積によりその有用性が確認されるものと思われる。

- ・ 肛門・生殖結節間距離（AGD）：種々の内分泌攪乱作用物質で児動物の AGD が変化することが報告されている。DDRP では生後の指標としてあげているが、発生の段階を考慮すると、妊娠末期の胎児でも検出可能と考えられ、一部の内分泌攪乱を起こす化学物質では器官形成期投与による胎児の AGD の変化が報告されている。催奇形性試験が農薬の安全性試験のなかでも比較的早く実施される点を考慮すると、内分泌攪乱作用の可能性を早期に検出し、繁殖試験を含めて引き続き実施される他の毒性試験の計画に有用な情報が得られる点でも、催奇形性試験での AGD 測定は検討の余地があるものと思われる。
- ・ 行動の発達、学習・記憶能：生後の行動発達、学習・記憶障害と内分泌攪乱作用との関連は必ずしも明確にされてはいない。しかし、脳の性分化異常による雌雄の行動パターンの変化、甲状腺障害による行動機能の異常など、内分泌攪乱により行動発達に異常が起こるといわれていることから、ガイドラインへの追加を検討すべき項目である。これらの検査は農薬では今まで考慮されていなかったが、次世代の行動異常は重大な障害であり、医薬品では反射反応性、情動性、運動機能、学習機能が検査されていることを考慮すると、農薬でも検査の必要性はあると思われる。一方、脳の視索前野は性行動の雌雄差、雌の性周期の発現に関する gonadotropin 分泌の周期性など、性的な行動に関与する領域であり、そのサイズは雌雄で顕著な差があることが知られている。この発達はアンドロジェン依存性であり、内分泌攪乱によりその領域のサイズが変化するといわれていることから、脳の性分化異常の指標になり得るものと考えられる。しかしながら、検査部位の特定、計測法など、ガイドラインの項目に含めるには解決しなければならない問題点がある。むしろ、交尾率の低下、性周期の変化などの内分泌攪乱を示唆する変化が認められ、脳の性分化異常が疑われる場合に、詳細に検査するための手段として有用であろう。今後の知見の蓄積によりその有用性が確認されるものと思われる。

以上の点を考慮すると、現時点で農薬の生殖毒性試験ガイドラインへ追加することが有用であると考えられる項目は以下のとおりである。その他の項目については、内分泌攪乱作用の指標としての感受性および有用性が確認された上でガイドラインへの追加を検討した方が良いと考えられる。ただし、反復投与毒性試験の結果あるいは化学構造などの周辺情報から、内分泌攪乱作用が疑われる場合は検査項目として試験に含めることを考慮すべきであろう。

(1)現時点でガイドラインに追加することが有用と考えられる項目

- ・生殖器，副生殖器の臓器重量と病理組織学的検査
- ・児動物の病理検査
- ・精子形成および精子に関する詳細な検査
- ・発情サイクルのモニタリング
- ・児動物における成長，行動の発達，学習・記憶能に関する検査の追加

(2)現時点ではガイドラインへの追加は時期尚早と考えられる項目

- ・性ホルモンの血中濃度測定
- ・副生殖器の分泌物産生検査
- ・児動物の乳頭発達，脳の視索前野のサイズ