

3. 我が国の農薬のガイドラインと EPA, OECD のガイドライン改定案との比較

我が国の農薬の生殖毒性試験ガイドラインと EPA および OECD の生殖毒性試験ガイドラインの改定案（以下ガイドライン案）の概要を表 1 に示す。表には比較のために医薬品 ICH ガイドライン（以下医薬品ガイドライン）の概要も含めている。表に示すように EPA と OECD のガイドライン案の内容はほとんど一致しており、医薬品同様に規制の国際的ハーモナイゼーションが考慮されているものと思われる。我が国のガイドラインの改定も内分泌攪乱作用に加えて、この点も考慮する必要がある。

以下に EPA および OECD ガイドライン案の主な改定点について述べる。なお、我が国のガイドライン、改正前の EPA および OECD のガイドラインは若干の違いがあるものの、基本的にはほとんどで同じである。したがって、本項では EPA および OECD のガイドライン案の変更点を中心に述べる。また、EPA と OECD ガイドライン案の改定内容はほとんど同じであるため、以後は両ガイドライン案は区別せずに述べる。

1) 催奇形性試験

- ・動物数：現行ガイドラインでは齧歯類、非齧歯類で 1 群の動物数が違っているが、ガイドライン案では動物種によらず「少なくとも剖検時に妊娠動物 20 匹」とされている。また、最近 FINAL 化された EPA の TSCA ガイドラインでは「約 20 匹」と若干の猶予を持った表現に変更されている。一方、医薬品ガイドラインでは 1 群 16 ～ 20 匹とし、この数より多くても統計学的解析への貢献度が増加することはない旨を述べている。化学物質の分野の違いにより例数を変える意義はなく、動物愛護の面からも必要最低限にすべきであろう。
- ・用量：公比について、2 ～ 4 が適切と具体的に記載された。
- ・妊娠 0 日の定義：EPA, OECD ガイドライン案とも変わっておらず、齧歯類、非齧歯類とも交尾確認日を妊娠 0 日としている点は医薬品ガイドラインも同様である。一方、我が国の農薬のガイドラインでは、ウサギについては自然交配あるいは人工授精を行った日の翌日を妊娠 0 日としている。投与開始時期を統一する意味でも EPA, OECD のガイドライン案および医薬品のガイドラインと同様にした方が良いと思われる。
- ・投与液量算出の基準日：強制経口投与の場合の投与液量算出の基準体重について、現行ガイドラインでは投与開始日または至近日の体重と選択枝を持たせているが、

ガイドライン案では至近日の体重を基準にしている。我が国もそれらとの統一を検討すべきであろう。

- ・投与期間：現行ガイドラインでは器官形成期の投与であったが、ガイドライン案では着床後の妊娠期間のほぼ全期間を投与することになっている。内分泌攪乱作用の標的器官である生殖器は他の器官の形成期以降も分化し、臨界期は妊娠末期から生後初期にあり、脳の機能的な性分化もほぼ同様の期間に起こる。したがって、内分泌攪乱作用の検出を考慮した場合、投与期間を妊娠末期まで延長することは適切と考えられる。なお、EPA、OECD ガイドライン案では、予備試験で着床への影響がなければ、交尾確認時期からの全妊娠期間投与を推奨している。着床は性ホルモンが関与している事象であり、着床前からの投与は重要な意義を持つものと考えられる。ただし、催奇形性試験の目的は催奇形作用の有無の評価であるため、予備試験で着床障害が認められ、本試験をそれ以下の用量で実施した場合、用量を下げたことにより被験物質が本来有している催奇形作用が検出されなくなる可能性があることを考慮する必要があるだろう。
- ・帝王切開と胎児検査の盲検：理想的には全ての検査を盲検にするのが望ましい。しかし、帝王切開あるいは胎児検査で評価の対象になる妊娠の判定、黄体数、着床数、胚・胎児死亡の判定、形態異常などは、主観により誤った評価を導いてしまう可能性は少なく、作業の煩雑さに値するほどの盲検の効果はないように思われる。盲検の実施については、生殖毒性試験以外の試験での必要性も合わせて検討すべきと思われる。
- ・齧歯類の胎児骨格検査における軟骨の検査：EPA、OECD ガイドライン案とも硬骨と軟骨の検査を推奨しているが、TSCA のガイドラインでは「望ましくは」との文章が追記された。硬骨と軟骨の二重染色は種々の方法があり、操作が煩雑で、現状ではルーチンの多量の良好な標本作製する方法が必ずしも確立されていないように思われる。実際、我が国では製薬会社を中心になって標本作製法について勉強会を始めたような段階である。齧歯類の胎児は妊娠末期でも骨化は完全ではなく、二重染色により軟骨の異常が精査できる利点があるが、経験的には軟骨染色しなければ骨格異常誘発作用を検出できないものは少ないように思われる。ただし、予備試験あるいは周辺情報から軟骨の形成異常が疑われた場合には、二重染色を実施し、軟骨の異常の有無を精査することが推奨される。

- ・非齧歯類の頭部の検査法：ウサギでは半数の胎児の頭部を連続切片法で検査する旨が記載された。TSCA のガイドラインも若干表現が変わったが基本的には同じであり、検査法を明記している。なお、胎児の内臓検査法は胎児の横断切片を作製して検査する連続切片法と実体顕微鏡下で解剖する顕微解剖法があるが、腹部については生殖器の形態を詳細に観察できる点で後者がより適切と考えられる。
- ・我が国のガイドラインにないその他の項目：EPA および OECD のガイドラインに挙げられている妊娠子宮重量、補正体重変化は、我が国では一般的には検査の対象にしていない項目である。しかし、母動物の体重増加抑制が認められた場合、それが母体自体の体重増加抑制に起因するものか、胎児の発育抑制によるものかを区別するためには有用な項目であろう。

2) 繁殖試験

- ・動物数：催奇形性試験と同様、ガイドライン案では 1 群につき「少なくとも妊娠動物 20 匹」が TSCA ガイドラインでは「約 20 匹」に変更されたが、前項で述べたように医薬品同様、1 群 16 ～ 20 匹としても良いと思われる。
- ・用量：公比について、2 ～ 4 が適切と具体的に記載された。しかし、繁殖試験で汎用される濃度一定の混餌法では、授乳期間の母動物の摂餌量は通常の 3 倍以上、授乳期間末期は 5 倍近くまで増加するため、公比 2 ～ 4 では実際の被験物質摂取量が上の用量に近くなるか、それを越える場合がある。したがって、群間での被験物質摂取量の交錯を避けるならば、公比は 3 ～ 5 あるいはそれ以上の方が良いように思われる。
- ・投与開始週齢と投与期間：EPA と OECD の現行ガイドラインは投与期間に若干の違いがあったが、ガイドライン案では F0 動物は 5-9 週齢から、F1 動物は離乳時から投与を開始し、いずれも交配前の投与期間を 10 週間以上とすることに統一されている。我が国の現行ガイドラインは交配前の投与期間を 8 週間以上としているが、ラットの精巣における精子形成期間および精巣上体における精子成熟期間を考慮すると、交配前の投与期間は 10 週間以上とするのがより適切であろう。
- ・投与限界濃度：50000 ppm から 20000 ppm に変更されている。20000 ppm は被験物質摂取量に換算すると種々の毒性試験のガイドラインで規定されている投与限界量の 1000 mg/kg に近い用量に相当することから、混餌投与の限界濃度としては妥当と考えられる。

- ・交配期間：2 週間または 3 回の性周期を含む期間とされている。ラットの正常性周期が 4 ～ 5 日間であることを考慮すると妥当な期間であろう。
- ・二次交配：生殖能低下あるいは同腹児数低下があった場合、離乳後 1 ～ 2 週間後に F1b あるいは F2b 動物を得るための再交配を考慮することとされている。ただし、再交配に際しては、F1a あるいは F2a 動物のデータとの区別など、データ解析がやや複雑になることを考慮する必要があるだろう。
- ・児数調整：ガイドライン案では児数調整は基本的に行わず、オプションとしている。また、児数調整を実施する場合は無作為に選抜し、体重を基準に選抜するのは適切でない旨が記載されている。児数調整についてはその良否が議論されているところで、明確な結論はなされていないのが現状である。児数調整を行わない理由としては、調整により低体重あるいは低生存性のものが除外される可能性を考慮しているものと考えられる。しかし、ラットの出生児は 1 腹あたり 15 匹前後であり、児数調整により 1 腹の出生児数が 8 または 10 匹になったとしても半数またはそれ以上の出生児が残ることになり、偶発的に異常動物が除外されたことによって誤った評価を導いてしまう可能性は少ないように思われる。また児数調整の生存性評価への影響についても、生存性が不良な出生児は児数調整が行われる生後 4 日までにほとんどが死亡し、児数調整したために生存性の評価に誤りがでる可能性は少ないものと思われる。同腹児数の多少が出生児の発育に影響するのは良く知られており、出生児の体重が毒性評価の重要なエンドポイントであることを考慮すると、児数調整は実施した方が良いように思われる。この他、OECD ガイドライン案には矮小児も検査項目になっているが、十分な例数があれば体重でも評価可能と思われる。なお、児数調整時に除外された出生児については、被験物質の影響が疑われる死亡率の増加、外表異常、あるいは催奇形性試験で異常が認められた場合は後の検査のため保存すべきであろう。ただし、それらがいない場合は安楽死させても良いと考えられる。
- ・性周期検査：交配前 3 週間および交配期間中を検査するとされている。医薬品ガイドラインでは少なくとも交配期間中は毎日とされているが、一般的には交配開始前 2 週間から性周期検査が行われている。

- ・精子検査：精巣のホモジネーション耐性精子数，精巣上体尾部精子数，精巣上体または輸精管の精子の運動性，形態検査（最低 200 個の精子について検査）が項目として挙げられている．精子検査は内分泌攪乱作用検出の有用な項目であり，医薬品ではすでにオプションとして実施されているため，我が国でルーチ的な検査として実施するのは問題ないであろう．精子数について，ガイドライン案では精巣と精巣上体尾部の両方の検査が必要とされているが，医薬品では精巣上体尾部精子について検査するのが一般的であり，生殖器の組織検査と精巣上体尾部精子の検査を行えば，精子形成障害の検出とその障害の特徴付けも合わせて評価することが可能と考えられる．また，精子の形態検査については判定基準が一般化されてないという問題点があるが，種々の精巣毒性物質で精子の形態異常が報告されており，知見の蓄積によりその有用性が明らかになるものと考えられる．
- ・膣開口と包皮分離検査：これらの検査は医薬品では既に実施されている．なお，TSCA のガイドラインでは発現時の体重測定が追加されているが，これらの指標が生後の発育とも関連していることを考慮すると妥当であろう．
- ・肛門・生殖結節間距離（AGD）測定：ガイドライン案では F1 動物の性比または性成熟に変化が認められた場合，F2 動物について出生時に AGD を測定する旨が記載されている．しかし，性比あるいは性成熟に変化が現れるほどの重篤なケースが頻繁に起こるとは考え難く，種々の内分泌攪乱作用物質で AGD が変化していることを考慮すると，AGD は F1 動物から検査した方が良いように思われる．また，F1 動物で AGD の微妙な変化が発現した場合に，F2 動物でその確認ができる点でも，AGD は F1 動物から検査すべきであろう．
- ・剖検：親動物と児動物の剖検は現行ガイドラインでも記載されているが，ガイドライン案では離乳時の剖検例数が明記され，OECD は全例，EPA は雌雄各 3 匹以上／腹とされている．
- ・臓器重量：現行ガイドラインには含まれていない項目である．
親：子宮（TSCA ガイドラインでは卵管も含むよう追加），卵巢，精巣，精巣上体（全体，尾部），精のう（凝固腺内容も含む），前立腺，脳，肝臓，腎臓，副腎，脾臓，標的臓器とされ，TSCA ガイドラインではこの他に下垂体が追加された．
精巣上体については全体の他に尾部の重量が項目として挙げられているが，尾部重量は精巣上体尾部の精子検査でも測定することになり，尾部重量が変化した場

合は、むしろ精子検査、あるいは病理組織学的検査で何らかの変化を検出できるものと思われるので、特にガイドラインの検査項目として挙げる必要はないように思われる。また、雌の子宮重量については着床痕が含まれるため、実際の有用性は不明である。

児：脳、脾臓、胸腺の重量を測定する。なお、TSCA ガイドラインでは雌雄各 1 匹／腹と明記された。

- ・採材：現行ガイドラインでも記載されているが、ガイドライン案では一部追加された。

親：臍、子宮、卵巢（卵管含む）、精巢（ブアン液または相当液で固定）、精巢上体、精のう、凝固腺、肉眼的異常部位、標的臓器。なお、TSCA ガイドラインでは副腎が追加され、精巢および精巢上体は片側と明記された。

児：肉眼的異常部位、標的臓器。

- ・組織検査：現行ガイドラインでは下垂体と生殖器としているが、一部追加された。

親：全ての採材臓器について検査する（TSCA ガイドラインでは対照と高用量群の雌雄各 10 匹／群を検査し、影響が認められた場合に他の例、他の群を検査する旨が明記された）。また、生殖への影響が認められた場合は中・低用量群の生殖器を検査する。精巢上体は頭部、体部、尾部を検査（縦断切片）する。卵巢は片側につき 5 切片以上を検査し、原始卵胞数を計数する。ただし、TSCA ガイドラインでは通常組織検査で原始卵胞を検査し、組織検査あるいは生殖機能検査で影響が認められた場合には、卵巢の片側につき 10 切片、計 20 切片を検査し、原始卵胞と胞状卵胞を計数することに変更された。

児：肉眼的発達異常臓器。TSCA ガイドラインでは被験物質の影響が認められ、結果の評価への貢献が予想されるときに実施することに変更された。

- ・その他：摂餌効率、雌親動物の剖検時の性周期が追加された。剖検時の性周期は雌の生殖器重量を評価する際の参考としてしばしば検査されるが、繁殖試験では雌親の剖検は授乳終了時に行われるため、実際の有用性については不明である。