

4. 我が国の農薬の生殖毒性試験ガイドラインの改定案

DDRP で推奨された内分泌攪乱作用検出のための検査項目、EPA および OECD のガイドライン改定の動向、さらに医薬品 ICH ガイドラインを考慮した上で、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。このなかで内分泌攪乱作用検出を主眼とした項目は下線で示した。

1) 催奇形性試験

- ・動物数：ラット、ウサギとも妊娠動物約 20 匹／群（妊娠動物 16 ～ 20 匹／群を得るために必要な動物数）
- ・用量：公比は 2 ～ 4 が適切。
- ・妊娠 0 日の定義：ラットは膣栓または膣垢中に精子を確認した日。ウサギは交尾確認あるいは人工受精を実施した日。
- ・投与期間：着床から妊娠末期の帝王切開前日まで（妊娠 6 日からの投与が望ましい）。
- ・投与液量の算出基準日：至近日の体重
- ・体重・摂餌量測定：妊娠 0 日、投与期間は少なくとも 3 日間隔、剖検日
- ・妊娠子宮重量測定とそれによる母動物の補正体重変化
- ・非妊娠雌の硫化アンモニウム等による着床の有無の確認
- ・胎児の肛門・生殖結節間距離（AGD）測定：ラットについて測定する。
- ・胎児検査：ラットおよびマウスは約 1/2 の胎児を骨格検査、残りを内臓検査する。ウサギは全例を内臓・骨格検査する。ただし、約半数の胎児の頭部は連続切片法などの適切な方法により、眼球、脳、鼻腔、舌を検査する。内臓検査に際しては生殖器の形態異常をより高感度に検出するため、顕微解剖法などの適切な方法で検査する。また、骨格検査に際しては予備試験あるいは周辺情報から必要があれば硬骨、軟骨の二重染色することが望ましい。検査は対照群と最高用量群について行い、被験物質による異常が認められた場合に順次低用量群を検査する。

2) 繁殖試験

(1) 親動物（F0, F1 の交配に供する動物）

- ・動物数：雌雄とも約 20 匹／群。各世代妊娠動物 16 ～ 20 匹／群を得るために必要な動物数とする。

- ・用量：公比は 3 ～ 5 が適切。
- ・投与期間：交配前 10 週間以上
- ・性周期：交配前 3 週間と交配期間を検査する（平均性周期，正常性周期雌数を算出）。
- ・精子検査：片側精巣または精巣上体尾部の精子数，片側精巣上体尾部または輸精管精子の運動性（前進精子の割合）と形態検査
- ・剖検：全例，雌は着床数と剖検時の性周期ステージ検査
- ・臓器重量：子宮，卵巢，精巣，精巣上体，精のう（凝固腺と内容物含む），前立腺，脳，下垂体，甲状腺，副腎，肝臓，腎臓，胸腺，脾臓，標的臓器
- ・病理組織検査：膣，子宮（卵管，頸部含む），卵巢，精巣（ブアン液または相当液で固定），精巣上体（頭部，体部，尾部の縦断切片を作製），精のう，凝固腺，前立腺，脳，下垂体，甲状腺，副腎，肝臓，腎臓，胸腺，脾臓，標的臓器，肉眼的異常部位を保存する．対照群と最高用量群の無作為に抽出した雌雄各 10 匹／群の採材臓器を検査する．被験物質の影響が認められた場合，両群の残りの動物および低用量群を検査する．さらに，生殖器，性成熟，生殖機能に影響が認められた場合は，必要に応じて精子形成ステージ別の精上皮細胞数，卵巢の片側 2 切片以上の標本の原始卵胞数，胞状卵胞数などの詳細な検査を行う．

(2) 児動物

- ・AGD 測定：少なくとも雌雄 4 匹／腹について，出生日または生後の比較的早い時期（例えば生後 1 または 4 日）に測定する。
- ・児数調整：生後 4 日に無作為に雌雄各 4 匹／腹に調整する（体重による選抜は不適切）．除外した動物は保存し，必要に応じ生殖器の病理組織検査などの詳細な検査を行う．
- ・F1 離乳後検査動物の選択：離乳時に雌雄各 2 匹／腹を選抜し，雌雄とも 1 例は F1 親動物として諸検査に供し，他の 1 例は離乳後の行動検査に供する。
- ・形態分化：生後の発育指標を検査する．検査項目としては生後 4 日までの耳介開展の発現率，切歯萌出，眼瞼開裂の発現日などがある。
- ・反射機能：F1 の離乳前に雌雄 4 匹／腹について検査する．検査項目としては，平面正向反射，聴覚性驚愕反射，背地走性，空中落下正向反射，瞳孔反射などがある．必要に応じ F2 も検査する。

- ・ 行動・学習機能：F1 の行動検査用として選抜した動物の少なくとも雌雄各 10 匹／群について情動性，運動機能，学習・記憶機能を検査する．
- ・ 性成熟：F1 の交配動物について，膣開口，陰茎亀頭包皮分離の発現日（発現日の体重も測定）
- ・ 剖検：離乳後検査に選抜されなかった F1 動物，全ての F2 動物を離乳後 3 ～ 4 週齢に剖検する．離乳後の行動検査用 F1 動物は検査終了後に剖検する．
- ・ 臓器重量：F1，F2 の離乳後の剖検例のうち，雌雄各 1 匹／腹の脳，脾臓，胸腺を測定する．F1 と F2 の測定日は統一する．
- ・ 病理組織検査：肉眼的異常部位は保存する．また，離乳後の F1，F2 の臓器重量測定動物の膣，子宮，卵巣，精巣，精巣上体，精のう，前立腺，脳，下垂体，甲状腺，副腎，胸腺，脾臓を保存する．被験物質による異常が疑われる器官・組織および諸検査から必要と思われる器官・組織について対照群と最高用量群を検査する．被験物質の影響が認められた場合は順次低用量群を検査する．さらに，生殖器，性成熟，生殖機能に影響が認められた場合は，必要に応じて親動物と同様に生殖器の詳細な検査を行う．

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な選択である．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．

表2 農薬の生殖毒性試験ガイドライン改定案

1. 催奇形性試験

項 目		現行ガイドライン (1985)	ガイドライン改定案 (下線は内分泌攪乱作用関連項目)
母動物	動物数	妊娠動物 ラット：20 匹以上/群 ウサギ：12 匹以上/群	ラット、ウサギとも妊娠動物約 20 匹/群 (妊娠動物 16 ～ 20 匹/群が得られる匹数)
	馴化期間		5 日以上
	妊娠 0 日の定義	膣栓または膣垢中に精子を確認した日を妊娠 0 日とする。ただし、交尾観察、人工受精を行った場合は当該日の翌日を妊娠 0 日とする	ラットでは膣栓または膣垢中に精子を確認した日、ウサギでは受精日を妊娠 0 日とする。
	投与	経路	強制経口投与
		用量	最低 3 用量群 + 対照群 最高用量は体重減少など被験物質に由来する明らかな毒性兆候が母獣に現れる量、低用量は毒性徴候がない量、中間用量は最高用量と最低用量の等比中項
		限界用量	1000 mg/kg
		限界試験	1000 mg/kg 投与で胎児毒性、催奇形性がなければ、それ以外の群での試験は不要
		期間	ラットは妊娠 6 ～ 15 日又は 7 ～ 17 日、ウサギは妊娠 6 ～ 18 日 (交尾確認日、人工授精日を 0 日とした場合は 7 ～ 19 日になる) 投与期間を分娩予定日の前日まで延長しても良い
		液量	投与開始日または至近日の体重に基づいて算出
		一般状態	少なくとも 1 回/日
		体重	投与前、投与中、投与終了後を含む
		摂餌量	投与前、投与中、投与終了後を含む
		子宮重量	妊娠子宮 (頭部含む) を測定する (子宮重量補正の体重変化を算出)。
胚・胎児	帝王切開	胚	生存胎児数、必要に応じて黄体数
		胎児	性別、胎児体重、外表異常
	胎児検査		ラットは 1/3 ～ 1/2 を骨格検査、残りを内臓検査。 ウサギは全例を内臓検査の後、骨格検査。

黄体数、死亡胚・胎児数、生存胎児数、吸収胚の程度 (早期、後期：死亡時期推定のため)
非妊娠雌は硫化アンモニウム等で着床を確認。

性別、胎児体重、外表異常
ラットについては肛門・生殖結節間距離 (AGD) を測定

ラットおよびマウスは約 1/2 の胎児を骨格検査、残りを内臓検査する。ウサギは全例を内臓・骨格検査する。ただし、約半数の胎児の頭部は連続切片法などの適切な方法により、眼球、脳、鼻腔、舌を検査する。いずれも腹部の内臓検査に際しては生殖器の形態異常をより高感度に検出するため、顕微解剖法などの適切な方法で検査する。また、骨格検査に際しては予備試験あるいは周辺情報から必要があれば硬骨、軟骨の二重染色することが望ましい。
胎児検査は対照群と最高用量群を検査し、被験物質の影響が認められた場合は順次低用量群を検査する。

2. 繁殖力直試試験

	項 目	現行ガイドライン (1985)	ガイドライン改定案 (下線は内分泌攪乱作用関連項目)
親動物	親動物数	F0 雄: 20 匹以上/群 雌: 妊娠動物 20 匹以上/群	雌雄各 20 匹以上/群 (F1, F2 とも妊娠動物 16 ~ 20 匹/群が得られる匹数)
		F1 離乳時にできるだけ多くの腹から無作為に雌雄各 1 匹/腹を選抜	離乳時に雌雄各 2 匹/腹を選抜し、雌雄とも 1 例は F1 親動物として諸検査に供し、他の 1 例は離乳後の行動検査に供する。
	馴化期間	1 週間以上	5 日以上
	経路	経口投与 (混餌) 強制経口投与の場合は、各週の体重に基づき液量算出 (妊娠期の母動物は妊娠 0 日と 6 日の体重でも可)	経口投与 (混餌) 強制経口投与の場合は、各週の体重に基づき液量算出。刺激性物質を除き、一定容量が望ましい。
	投与	用量 最低 3 用量群 + 対照群 高用量は母動物に毒性徴候を示し、死亡がない量、中用量は僅かな毒性徴候が出る量、低用量は母動物、児動物とも毒性徴候がない量	最低 3 用量群 + 対照群 最高用量は親動物に毒性徴候を示し、10%以上の死亡がない量、以下用量依存性を示す用量の設定が望ましく、低用量は親動物、児動物とも毒性がない量とする。公比は 3 ~ 5 が適切で、10 以上と大きくするよりは第 4 用量の追加が望ましい。
	限界用量	(50000 ppm)	強制経口は 1000 mg/kg 混餌は 20000 ppm
	限界試験		限界用量で毒性がない場合又は類似物質のデータから影響がないと予測される場合は、3 用量での試験は不要
	投与開始	F0 は離乳後間もない時期から、 F1 は離乳時から	F0 は馴化後 6 ~ 9 週齢から F1 は離乳時から
	期間	交配前 8 週間以上、離乳まで	交配前 10 週間以上
	一般状態	1 回以上/日	1 回以上/日 ケージサイド観察, 1 回/週は詳細観察
	体重	投与開始日、その後 1 回以上/週	投与開始日、その後 1 回以上/週, 妊娠 0, 7, 14, 21 日, 哺育 0, 4, 7, 14, 21 日
	摂餌量		1 回以上/週, 摂餌効率も算出
	性周期		<u>交配前 3 週間と交配期間を検査 (正常性周期の雌数, 平均性周期算出)</u>
	交配	3 週間を限度。未交尾動物は原因を調査 (生殖器の組織学的検査, 再交配, 発情, 精子形成周期などの検査)	2 週間または 3 回の性周期を含む期間 (交尾所要日数, 交尾までの発情期回数算出)。 未交尾動物は原因を調査 (生殖器の組織学的検査, 再交配, 発情, 精子形成周期などの検査)。
	精子検査		<u>精巣又は精巣上体尾部の精子数, 精巣上体尾部又は輸精管精子の形態, 運動性</u>
	剖検	屠殺例は全例を剖検	交配のために選抜した動物は全例剖検 (雌は着床数, <u>剖検時の性周期ステージ</u> を検査)
	臓器重量		<u>子宮, 卵巣, 精巣, 精巣上体, 精のう (凝固腺と内容物含む), 前立腺, 脳, 下垂体, 甲状腺, 副腎, 肝臓, 腎臓, 胸腺, 脾臓, 標的臓器</u>
	病理組織検査	脳, 子宮, 卵巣, 精巣, 精巣上体, 精囊, 前立腺, 下垂体, 肉眼的異常部位 病理組織検査は対照と最高用量群を検査し、影響を認めた場合は他の群を検査	<u>脳, 子宮 (卵管, 頸部含む), 卵巣, 精巣 (ブアン液又は相当液で固定), 精巣上体 (頭部, 尾部, 尾部の縦断切片を作製), 精のう, 凝固腺, 前立腺, 脳, 下垂体, 甲状腺, 副腎, 肝臓, 腎臓, 胸腺, 脾臓, 標的臓器, 肉眼的異常部位</u> 病理組織検査は対照と最高用量群の無作為に抽出した雌雄各 10 例/群を検査し、影響を認めた場合は両群の残りの動物と他の群を検査。生殖器, 性成熟, 生殖機能に影響が認められた場合は、精子形成ステージ別の精上皮細胞数, 卵巣は片側 2 切片以上の標本について原始卵胞数, 卵状卵胞数などの詳細な検査を考慮する。
児動物	観察	新生児数, 死産児数, 生存児数, 外表異常	出産児数, 性別, 死亡児数, 生存児数, 外表異常, <u>少なくとも雌雄 4 匹/腹の AGD を出生日から生後 4 日までに測定。</u>
	体重	生後 0, 4, (7), 14, 21 日	生後 0 (又はその後早い時期), 4, 7, 14, 21 日, 最終体重
	児数調整	生後 4 日に無作為に雌雄各 4 匹/腹に調整, 間引き児は異常の検査	生後 4 日に無作為に雌雄各 4 匹/腹に調整 (体重による選抜は不可)。間引き児は安楽死後保存し、必要に応じ生殖器の病理組織検査などの詳細な検査を行う。
	形態分化		F1 の耳介開展, 切歯萌出, 眼瞼開裂等の <u>発育指標を検査</u> する (必要なら F2 も)。
	反射機能		F1 の平面正向反射, 聴覚性驚愕反射, 背地走性, 空中落下正向反射, 瞳孔反射等の <u>反射機能を検査</u> する (必要なら F2 も)。
	行動機能		離乳後に F1 の各腹の行動検査用動物の少なくとも雌雄各 10 匹/群について, <u>情動性, 運動機能, 学習・記憶能を検査</u> する。
	性成熟		<u>F1 の交配動物は陰開口, 包皮分離の発現日を検査</u> (発現日の体重を測定)。
	剖検	屠殺例は全例を剖検 (間引き児含む)	離乳後検査しない F1 と F2 全例を 3 ~ 4 週齢に剖検。死亡児は保存し、必要に応じ異常, 死因検索。離乳後の行動検査用 F1 動物は検査終了後に剖検。
	臓器重量		F1, F2 剖検例の雌雄各 1 匹/腹の <u>脳, 脾臓, 胸腺</u> を測定する (測定日は統一する)。
	病理組織検査		肉眼的異常部位, F1, F2 の臓器重量測定動物の <u>脳, 子宮, 卵巣, 精巣, 精巣上体, 精のう, 前立腺, 脳, 下垂体, 甲状腺, 副腎, 脾臓, 胸腺</u> を保存する。組織検査が評価に貢献すると考えられる場合は実施する。

5. 参考文献

- 1) OECD Environment Directorate (1997): Draft detailed review paper: appraisal of test methods for sex-hormone disrupting chemicals. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, Paris.
- 2) U.S. Environmental Protection Agency (1996): OPPTS harmonized test guideline 870.3700: Prenatal developmental toxicity study (draft).
- 3) U.S. Environmental Protection Agency (1996): OPPTS harmonized test guideline 870.3800: Reproduction and fertility effects (draft).
- 4) U.S. Environmental Protection Agency (1997): Toxic Substances Control Act test guidelines: prenatal developmental toxicity study (final rule).
- 5) U.S. Environmental Protection Agency (1997): Toxic Substances Control Act test guidelines: Reproduction and fertility effects (final rule).
- 6) Organization for Economic Cooperation and Development (1996): Guidelines for testing chemicals No. 414: Prenatal developmental toxicity study (draft).
- 7) Organization for Economic Cooperation and Development (1996): Guidelines for testing chemicals No. 416: Two-generation reproduction toxicity study (draft).
- 8) 厚生省薬務局(1997): 医薬品毒性試験法ガイドライン, [3]生殖発生毒性試験.