内閣府食品安全委員会事務局
平成20年度食品安全確保総合調査報告書

化学物質の発生毒性（催奇形性）試験に関する調査

報告書

平成21年3月

株式会社三菱総合研究所

（目　次）

1.　調査目的 1
2.　作業内容 1
3.　ガイドライン、文献等の収集検索 2
4.　ガイドライン、文献等の整理・分析 5
4.1　塩田教授による 2008 年 10 月の食品安全委員会殿におけるプレゼンテーションのポイントの整理 5
4.2　発生毒性学における用語の整理 12
4.2.1　事務局殿の指示により収集した文献 12
4.2.2　事務局殿が収集した文献 15
4.3　農薬等の化学物質の食品健康影響評価を実施するために必要な催奇形性の評価に関する文献調査 52
4.3.1　事務局殿が収集した文献 52
4.3.2　塩田教授が調査対象として推薦した文献 96
5.　化学物質の発生毒性（催奇形性）試験の実施とデータの解釈における留意事項 174
5.1　実験動物とヒトの発生毒性データの対応関係 174
5.1.1　発生毒性とは 174
5.1.2　実験動物における催奇形性とヒトにおける催奇形性 175
5.1.3 発生毒性試験のヒトへの外挿の手順 175
5.2　種差の原因と考えられる要因 178
5.2.1　生殖と妊娠に関する系統発生的差異 178
5.2.2　外因に対する胎児組織の感受性の違い 179
5.2.3　母体―胎盤―胎児における薬物動態の違い 180
5.3　動物試験結果の判定法 183
5.3.1　発生毒性学における分類用語の調和 183
5.3.2　ベンチマーク用量等にもとづく実験データの解析 183
5.4　まとめ 184
6.　まとめ 186

参考資料
［参考１］塩田浩平教授による 2008 年 10 月の食品安全委員会殿におけるプレゼンテーション「生殖発生毒性に関する動物実験データのヒトへの外挿」資料一式

1.　調査目的

農薬等の化学物質の食品健康影響評価において、当該物質の催奇形性の評価は重要なポイントである。また、催奇形性の評価を行う上で、動物試験結果をヒトへ外挿する際の妥当性の検討は非常に重要である。

このため、催奇形性の評価に関するガイドライン等を収集するとともに、最新の研究成果等を踏まえ、発生毒性試験結果の評価とヒトへの外挿性に関する知見を取りまとめ、発生毒性試験の評価手法の検討に活用することを目的とする。

2.　作業内容

本調査では、農薬等の化学物質の食品健康影響評価を実施するために必要な催奇形性の評価に関する文献等を以下の項目について調査した。

・実験動物とヒトの発生毒性データの対応関係

・種差の原因と考えられる以下の要因

(a) 生殖と妊娠に関する系統発生的差異

(b) 外因に対する胎児組織の感受性の違い

(c) 母体－胎盤－胎児における薬物動態の違い

・動物試験結果の判定方法

具体的には、次の作業を実施した。

（１）ガイドライン、文献等の収集検索

（２）ガイドライン、文献等の整理・分析

（３）専門家の意見の聴取

（４）成果物の作成

なお、「（２）ガイドライン、文献等の整理・分析」では、催奇形性に係る用語の整理も行った。

3. ガイドライン、文献等の収集検索

食品安全委員会事務局（以下、「事務局」と言う）殿と協議したところ、事務局殿において、発生毒性試験方法に関するガイドラインを入手済みであるため、試験方法に関するガイドラインは、今回の調査対象から除外することとなった。ただし、試験結果の評価や判断に関するガイドラインがあれば収集及び調査対象とすることとなったが、存在しなかったため、結果としてガイドラインは収集しなかった。

また、事務局殿と協議の結果、事務局殿が指示した文献を収集・調査対象とするとともに、事務局殿が収集した文献を調査対象とした。さらに、事務局殿と協議の上で、発生毒性（催奇形性）分野における専門家である、塩田浩平教授（京都大学理事、日本先天異常学界理事長）が調査対象として推薦する文献を収集・調査するとともに、塩田教授が 2008 年 10 月に食品安全委員会殿にて実施したプレゼンテーション資料一式を入手した。

収集した文献等を以下に示す。また、収集した文献等の内容を 4 章に示す。

（１）事務局殿の指示により収集した文献

1-1.　谷村孝責任編集、「毒性試験講座 11　発生毒性」、地人書館、1993

（２）事務局殿が収集した文献

2-1. Chahoud I, et al., “Classification terms in developmental toxicology: need for harmonisation. Report of the Second Workshop on the Terminology in Developmental Toxicology Berlin, 27-28 August 1998.”, Reproductive Toxicology 1999 Jan-Feb; **13**(1):77-82.

2-2. Solecki R, et al., “Harmonisation of rat fetal skeletal terminology and classification. Report of the Third Workshop on the Terminology in Developmental Toxicology. Berlin, 14-16 September 2000.”, Reproductive Toxicology 2001 Nov-Dec; **15**(6):713-21.

2-3. Solecki R, et al., “Harmonization of rat fetal external and visceral terminology and classification. Report of the Fourth Workshop on the Terminology in Developmental Toxicology, Berlin, 18-20 April 2002.”, Reproductive Toxicology 2003 Sep-Oct; **17**(5):625-37.

2-4. Hass U, “The need for developmental neurotoxicity studies in risk assessment for developmental toxicity.”, Reproductive Toxicology 2006 Aug; **22**(2):148-56.

2-5. Buschmann J., “Critical aspects in reproductive and developmental toxicity testing of environmental chemicals.”, Reproductive Toxicology 2006 Aug; **22**(2):157-63.

2-6. Janer G, et al., “A retrospective analysis of the added value of the rat

two-generation reproductive toxicity study versus the rat subchronic toxicity study.", Reproductive Toxicology 2007 Jul; **24**(1):103-13.

2-7. Janer G, et al., "A retrospective analysis of the two-generation study: what is the added value of the second generation?", Reproductive Toxicology 2007 Jul; **24**(1):97-102.

（３）塩田教授が調査対象として推薦した文献

3-1. Nau H., "Species differences in pharmacokinetics and drug teratogenesis.", Environ Health Perspect. 1986 Dec;**70**:113-29. Erratum in: Environ Health Perspect 1988 Apr;77:following 156.

3-2. Nau H., "Pharmacokinetic considerations in the design and interpretation of developmental toxicity studies.", Fundam Appl Toxicol. 1991 Feb;**16**(2):219-21.

3-3. Gaylor DW., "Quantitative risk analysis for quantal reproductive and developmental effects.", Environ Health Perspect. 1989 Feb;**79**:243-6.

3-4. Becking GC., "Use of mechanistic information in risk assessment for toxic chemicals.", Toxicol Lett. 1995 May;**77**(1-3):15-24.

3-5. Goddard MJ, Krewski D., "The future of mechanistic research in risk assessment: where are we going and can we get there from here?", Toxicology. 1995 Sep 1;**102**(1-2):53-70.

3-6. Welsch F, Blumenthal GM, Conolly RB., "Physiologically based pharmacokinetic models applicable to organogenesis: extrapolation between species and potential use in prenatal toxicity risk assessments.", Toxicol Lett. 1995 Dec;**82-83**:539-47.

3-7. Kavlock RJ, Setzer RW., "The road to embryologically based dose-response models.", Environ Health Perspect. 1996 Mar;**104** Suppl 1:107-21.

3-8. Ashby J., "Scientific issues associated with the validation of *in vitro* and *in vivo* methods for assessing endocrine disrupting chemicals.", Toxicology. 2002 Dec 27;**181-182**:389-97.

3-9. Piersma AH, Janer G, Wolterink G, Bessems JG, Hakkert BC, Slob W., "Quantitative extrapolation of *in vitro* whole embryo culture embryotoxicity data to developmental toxicity *in vivo* using the benchmark dose approach.", Toxicol Sci. 2008 Jan;**101**(1):91-100. Epub 2007 Sep 27.

3-10. Yoon M, Barton HA., "Predicting maternal rat and pup exposures: how different are they?", Toxicol Sci. 2008 Mar;**102**(1):15-32. Epub 2007 Nov 17.

3-11. McCarver DG., "Applicability of the principles of developmental pharmacology to the study of environmental toxicants.", Pediatrics. 2004 Apr;**113**(4 Suppl):969-72.

3-12. Nau H., "Chemical structure--teratogenicity relationships, toxicokinetics and

metabolism in risk assessment of retinoids.", Toxicol Lett. 1995 Dec;**82-83**:975-9.

3-13. Nau H., "Teratogenicity of isotretinoin revisited: species variation and the role of all-*trans*-retinoic acid.", J Am Acad Dermatol. 2001 Nov;**45**(5):S183-7.

3-14. Binkerd PE, Rowland JM, Nau H, Hendrickx AG., "Evaluation of valproic acid (VPA) developmental toxicity and pharmacokinetics in Sprague-Dawley rats.", Fundam Appl Toxicol. 1988 Oct;**11**(3):485-93.

3-15. Nau H, Tzimas G, Mondry M, Plum C, Spohr HL., "Antiepileptic drugs alter endogenous retinoid concentrations: a possible mechanism of teratogenesis of anticonvulsant therapy.", Life Sci. 1995;**57**(1):53-60.

3-16. Scott WJ Jr, Collins MD, Nau H., "Pharmacokinetic determinants of embryotoxicity in rats associated with organic acids.", Environ Health Perspect. 1994 Dec;**102** Suppl 11:97-101.

3-17. Nau H, Hauck RS, Ehlers K., "Valproic acid-induced neural tube defects in mouse and human: aspects of chirality, alternative drug development, pharmacokinetics and possible mechanisms.", Pharmacol Toxicol. 1991 Nov;**69**(5):310-21.

（４）塩田浩平教授による 2008 年 10 月の食品安全委員会殿におけるプレゼンテーション資料一式

4. ガイドライン、文献等の整理・分析

収集したガイドライン、文献等に基づいて、次の作業を実施した。

（１）塩田教授のプレゼンテーションのポイントの整理

（２）発生毒性学における用語の整理

（３）農薬等の化学物質の食品健康影響評価を実施するために必要な催奇形性の評価に関する文献調査

本章では、これらの作業結果をまとめた。

4.1 塩田教授による 2008 年 10 月の食品安全委員会殿におけるプレゼンテーションのポイントの整理

塩田浩平教授（京都大学理事、日本先天異常学界理事長）が、食品安全委員会殿において 2008 年（平成 20 年）10 月に実施されたプレゼンテーション「生殖発生毒性に関する動物実験データのヒトへの外挿」資料を、電子ファイル（MicrosoftPowerPoint ファイル）の形で入手した。入手した資料一式を参考 1 に示す。

以下に、塩田教授によるプレゼンテーションのポイントを示す。

（１）ヒトの催奇形要因の同定の歴史

古くは 1920 年代には放射線で、1930 年代には地方病性クレチン症（Endemic cretinism）催奇形性が生じることが明らかとなっていた。1980 年代以降に明らかとなった要因と催奇形の例を表 4.1-1 に示す。

表 4.1-1 1980 年代以降に見つかったヒトの催奇形要因

要因	催奇形
非ステロイド系抗炎症薬	動脈管早期閉鎖、生後の胎児循環持続症
ACE 阻害薬	Fetal hypotension、胎児低血圧、胎児乏尿→羊水過少症、子宮内発育不全、頭蓋骨形成不全、四肢拘縮
レチノイン酸	頭部顔面奇形、二分脊椎
Parvovirus B19	胎児水腫
HIV 感染	先天性 HIV 感染

いずれかの動物種で発生毒性を示す物質は 2000 種類以上が明らかになっているが、そのうち、ヒトで発生毒性が認められたものは数十種類にとどまっている。ヒトの催奇形要因は、少数の臨床例の観察によって見付かったものが少なくない。

そこで、動物実験の結果からヒトの発生毒性を予知できるかどうかが重要である。

そのためには、①実験動物とヒトにおける発生毒性データの対応関係を明確にした上で、②発生毒性に関する種差の原因を考慮して、③発生毒性の実験データを評価して実験結果をヒトへ外挿することが必要である。以下で、これらの各項目の要点を示す。

（2）実験動物とヒトにおける発生毒性データの対応関係

主要な実験動物 5 種（マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、サル）について、ヒトと実験動物における催奇形性データを比較した結果を表 4.1-2 に示す。また、ヒトについて催奇形因子であるとされた物質について、実験動物における催奇形性の有無及び内容を表 4.1-3 に示す。

表 4.1-2 ヒトと実験動物における催奇形性データの比較

表 2.4.1 ヒトと実験動物における催奇形性データの比較[2)]

ヒトで催奇形性があるもの（N=38）		ヒトで催奇形性が認められていないもの（N=165）	
動物種	催奇形性陽性（正しい陽性）	動物種	催奇形性陰性（正しい陰性）
マウス	85 %	マウス	35 %
ラット	80 %	ラット	50 %
ウサギ	60 %	ウサギ	70 %
ハムスター	45 %	ハムスター	35 %
サル	30 %	サル	80 %
2 種以上の動物種	80 %	2 種以上の動物種	50 %
いずれかの動物種	97 %	全ての動物種	28 %

表 4.1-3 主要なヒトの催奇形因子の実験動物における催奇形性

表 2.4.2 主要なヒトの催奇形因子の実験動物における催奇形性

催奇形因子	ヒトで誘発される主な異常	動物種					
		マウス	ラット	モルモット	ハムスター	ウサギ	サル
アルコール	頭部顔面奇形，心臓血管奇形	++	+	+		+	++
アミノプテリン	骨格奇形	+	++			—	—
男性化ホルモン	女児仮性半陰陽	++	++	++	++	++	++
抗甲状腺剤	甲状腺機能低下	++	++			++	+
クマリン	鼻低形成，骨格奇形	—	—			—	
ジエチルスチルベストロール	子宮奇形	++	++		—	—	+
メチル水銀	小頭症，神経症状	++	++		+	—	+
ストレプトマイシン	内耳異常	—	++	—		—	
バルプロ酸	神経管奇形，顔面奇形，骨格奇形	++	+	+	+	+	+
サリドマイド	四肢減形成奇形	+	+	—	+	++	++

—：催奇形性陰性，＋：催奇形性陽性，++：ヒトと類似の異常が誘発される．

ヒトと同様の催奇形を示す場合でも、催奇形用量はヒトと実験動物によって大きく異なる。表 4.1-4 に示した催奇形因子のうち、X 線以外の因子は、動物実験において催奇形を示す用量よりも少ない用量で、ヒトに催奇形が発現することを示している。

表 4.1-4 ヒトと実験動物における催奇形用量の比較

表 2.4.3 ヒトと実験動物における催奇形用量の比較

催奇形因子	催奇形用量 (mg/kg/day)				
	ヒト	マウス	ラット	ウサギ	サル
アルコール	400		1500		
アミノプテリン	0.02	0.15	0.15		
ジエチルスチルベストロール	0.02				0.2
メチル水銀	0.005	2	0.25		
サリドマイド	1			150	5
トリメサジオン	12-24	600			60
X 線	25-50R	200R	36R		250R

R：レントゲン

以上のことから、動物実験の結果からヒトの発生毒性を予知する際には、発生毒性に関して種差が生じる原因を考慮する必要がある。

（3）発生毒性に関する種差の原因

誘発奇形の頻度、型、重症度は、表 4.1-5 に示す条件に左右される。

表 4.1-5 誘発奇形の頻度、型、重症度が左右される条件

（1）影響を受けた時の胚・胎児の胎齢（発生段階）
（2）投与量（曝露量）
（3）催奇形作用の閾値
（4）胎児の遺伝子型（種差、系統差、個体差）
（5）薬物の胎盤透過
（6）母体と胎児における薬物代謝

これらを整理すると、発生毒性に関する種差の原因としては、大きく次の 3 種類が考えられる。

a.生殖と妊娠に関する系統発生的差異

b.外因に対する胎児組織の感受性の違い

c.母体－胎盤－胎児における薬物動態（吸収、分布、代謝、排泄）の違い

このうち、a.について、ヒトと実験動物における主要な発生現象の長さを表 4.1-6 に、また、b.について、数種の動物に対する“Equivalent time”を表 4.1-7 に、それぞれ示す。

表 4.1-6 ヒトと実験動物における主要な発生現象の長さ

ヒトと実験動物における主要な発生現象の長さ

発生現象	マウス	ウサギ	ヒ　ヒ	ヒ　ト	マウスとヒトの相対比
受精～着床	5日	6日	9日	6日	1：1.2
器官形成期	1週	2週	5週	6週	1：6
妊娠期間	3週	4.5週	25週	38週	1：13
出生～離乳	3週	4～5週	3～8月	1年	1：17
出生～性成熟	6週	6月	2年	12年	1：100
寿　命	2年	7年	15年	80年	1：40

表 4.1-7 数種の動物に対する“Equivalent time”

数種の動物に対する“Equivalent time”

(DEDRICK, 1970)

動物種	平均体重 (g)	体重$^{1/4}$ ($g^{1/4}$)	Equivalent time (分)
マウス	22	2.16	0.13
ラット	160	3.56	0.22
サル	4,000	7.95	0.49
イヌ	5,000	8.42	0.52
ヒト	70,000	16.3	1.00

図 4.1-1 に、霊長類とげっ歯類における胎盤構造と機能の差を示す。卵黄嚢胎盤は、胎盤が完成するまでの間、胚に栄養を供給する機能をもつが、ヒトでは胎児成長期に機能を停止する。このように、催奇形性物質に対するヒトの反応を予測するために用いられるげっ歯類やウサギが、哺乳動物のなかでは、初期の胎盤輸送が反転卵黄包胎盤に依存しているという

特徴がある。

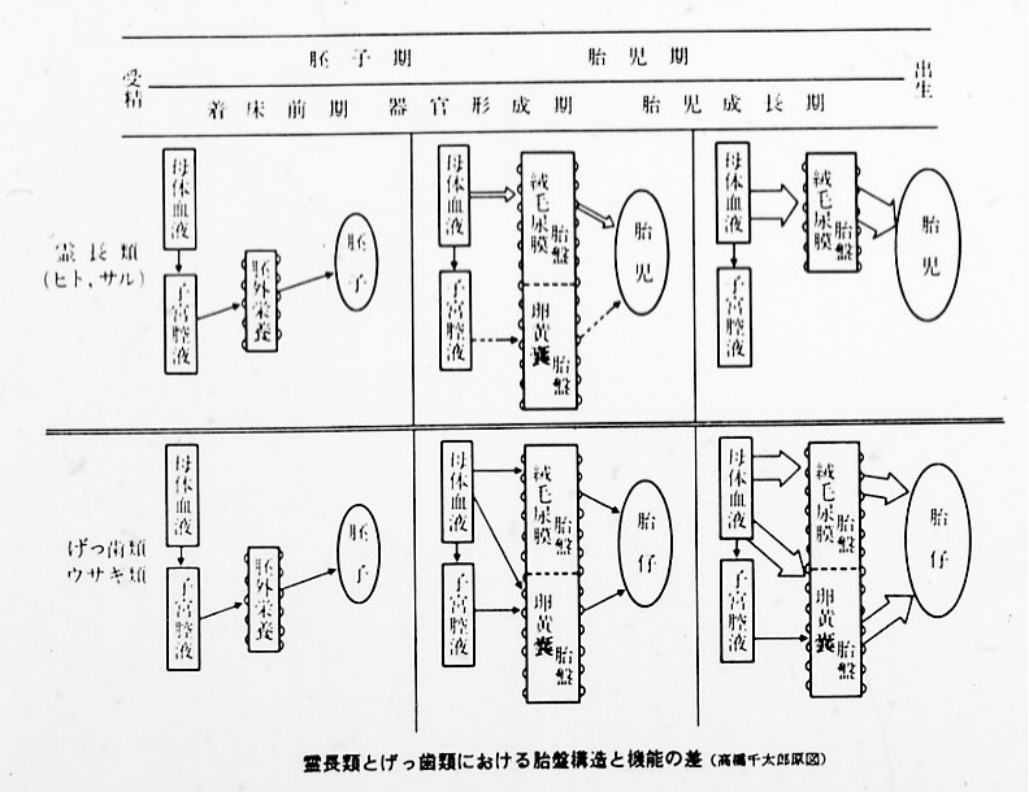


図 4.1-1　霊長類と齧歯類等における胎盤構造と機能の違い

様々な種におけるカフェインの薬物動態学を表 4.1-8 に、各動物種における薬剤の半減期（時間）を表 4.1-9 にそれぞれ示す。

表 4.1-8 様々な種におけるカフェインの薬物動態学

PHARMACOKINETICS OF CAFFEINE IN VARIOUS SPECIES[a]

Species	Dose (mg/kg)	$t_{1/2}$ (hr)	V_d (ℓ/kg)	Cl (mℓ/min/kg)
Mouse	1	0.7	0.76	12
Rat	2.5	0.8	0.92	13
Rabbit	1	1.6	0.78	5.9
Monkey	2.5	3.2	0.83	3.1
Man	1	4.2	0.73	2.0

[a] Data from Bonati, M., et al.[32]

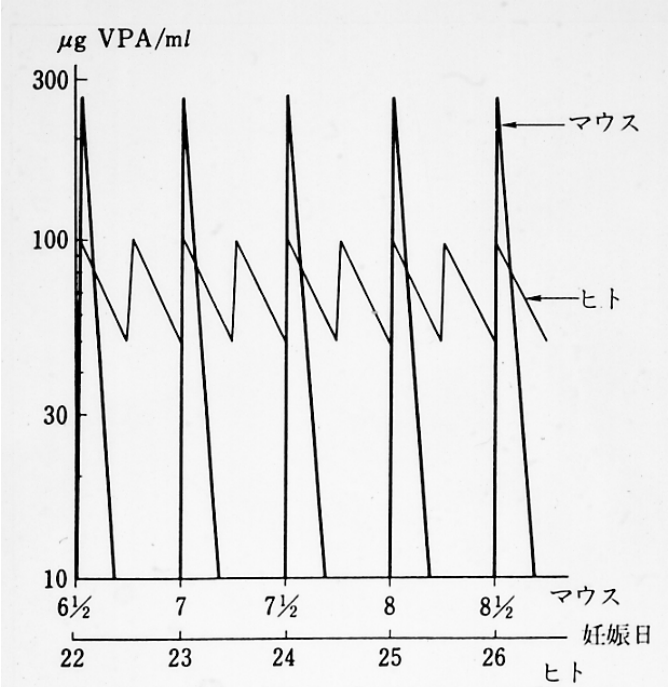
Dose（mg/kg）：用量、$t_{1/2}$（hr）：半減期（時間）、Vd（l/kg）：薬剤分布量、Cl（ml/min/kg）：血漿クリアランス

表 4.1-9 各動物種における薬剤の半減期（時間）

表 2.4.6　各動物種における薬剤の半減期（時間）[23]

薬　　剤	マウス	ラット	ハムスター	モルモット	ウサギ	サル	ヒト
フェニトイン		3～5				10～15	10～60
プリミドン	1～3	1.7			2～3	10	3～17
トリメサジオン	0.7	1.5～2.6	1		1～2		20～24
バルプロ酸	0.8	0.3		1		0.7～3	12
ジアゼパム	1	1		2.4	3		20～50
13－シス－レチノン酸	0.3	1					10～30
シクロホスファミド	0.2	0.7	0.2			0.7	4
カフェイン	0.7	0.8			1.6	3.2	4.2
フェニルブタゾン		6	1～5		0.5～3	1～8	72

薬剤の代謝に関して、図 4.1-2 に、マウスとヒトにおけるパルプロ酸の血中濃度の比較を示す。マウスでは、体内の薬物の濃度のピークは高く尖っているのに対し、ヒトではより低く、治療域レベルが長時間保たれている。



マウスで外脳症を10％誘発する投与条件（1日2回投与）の血中濃度をヒトの臨床例におけるそれと対比してある

図 2.4.3　マウスとヒトにおけるバルプロ酸の血中濃度の比較

図 4.1-2 マウスとヒトにおけるパルプロ酸の血中濃度の比較

（4）発生毒性の実験データの評価とヒトへの外挿

以上のように、ヒトと実験動物とで種差を生じるさまざまな原因が存在することから、動物実験結果から生殖発生毒性データを正しく評価するためには、次のことが必要である。

・科学的で正確なデータ
・適切で正しいデータ解析
・薬物動態・催奇形機序に関する実験データ
・正常および異常形態形成に関する発生学的知識
・ヒトへの外挿とリスクアセスメントに関する理論

また、動物実験データを外挿して、ヒトのリスク評価を行うために、次の係数等を用いる外挿方法が提案されている。

・安全係数（safety factor）
・母体 LD_{50} / 催奇形用量　比
・胎児致死量 / 催奇形用量　比
・催奇形用量 / 臨床用量　比
・無影響量（NOEL）/ 臨床用量　比
・母体毒性用量 / 催奇形用量　比（母体毒性／発生毒性（A/D）比、発生障害指数（最低母体毒性量と最低発生毒性量の比またはその対数）、相対的催奇形指数（LD01/tD05））

など。

そして、外因の催奇形性を立証するためには、以下の要件を満たすことが必要である。

①その要因に曝露されたヒトの集団で、特定の異常の頻度が上昇している。
②特定の異常をもつ人のうち、胎生期にその要因に曝露された者の割合が、正常人の集団に比べて有意に高い。
③その要因によって、ヒトの異常に類似した異常が実験動物で誘発される。
④疑われる要因と異常発生の間に、用量ー効果関係が認められる。
⑤臨界期や異常発生の発現機序が、生物学的に矛盾なく説明できる。

最後に、発生毒性の評価にあたって、必要となる観点を以下にまとめる。

①その毒性は 2 種類以上の動物種で見られているか。
②その外因に特異的な異常が誘発されるか。
③発生毒性は親動物に対する毒性よりもかなり低い用量で起こっているか。
④その毒性には用量ー効果関係が見られるか。
⑤用量ー効果関係の傾斜はどれほどか。
⑥発生毒性試験が最も適切な動物種においてヒトでの適用経路を用いて行われているか。
⑦発生毒性の閾値と無影響量（NOEL）はどれほどか。

⑧発生毒性用量とヒトの臨床用量との間にどれほどの差があるか。
⑨その異常がヒトに起こった場合に生命や生体機能に重大な障害を及ぼすか。
⑩どのような集団がリスクを受ける可能性があるか。

4.2　発生毒性学における用語の整理

4.2.1　事務局殿の指示により収集した文献

事務局殿の指示により収集した文献は、「毒性試験講座 11　発生毒性」（谷村孝責任編集、地人書館、1993）である。同文献では、

・先天異常（congenital anomalities）
・先天奇形（congenital malformations）
・催奇形性（teratogenicity）
・胎児毒性（embryotoxicity, fetotoxicity）

を定義しており、「先天異常」および「先天奇形」の定義の中で、米国環境保護庁（EPA）における次の用語の定義を紹介している。

・形態異常（structural abnormalities）
・奇形（malformation）
・変異（variation）

以下に、「毒性試験講座 11　発生毒性」における上記の用語に関する定義を引用する。

［以下、「毒性試験講座 11　発生毒性」（谷村孝責任編集、地人書館、1993）より引用］
○先天異常 congenital anomalities と先天奇形 congenital malformations

先天異常とは、正常の範囲の変異を越えた発生のひずみで、出生前にその出現が方向づけられているものと定義される。より具体的には、胎生期の死亡や発育遅滞、先天奇形、機能・知能の障害、不妊等の生殖障害、免疫低下等による罹病性、腫瘍発生、短命など、受精以後その個体の死に至るまでの全過程中に示される不可逆的ないし継続的な発生異常を広く指す。そのうち、先天奇形 congenital malformations は通常、出生時に存在する（認められるか、又は潜在する）肉眼形態的発生異常を指し、先天異常のうち最も重視されており、その研究の歴史も長い。なお、先天異常を示す用語として birth defects が従来学術書でもよく使われていたが、やや通俗的であるとして、今日ではあまり使われなくなった。

先天性（con=ともに、genital=出産の）ということは元来、出生とともにあるという現象論的なものであったが、その成り立ちが出生前であるという成因論的立場にたつようになってきている。従って、先天性は必ずしも遺伝性を意味しないが、遺伝性は先天性ということができる。

なお、形態異常 structural abnormalities を奇形 malformation と変異 variation に分け、奇形は生存、発育あるいは機能に悪影響を及ぼしうる永久的構造変化、変異は構造に関し通常範囲を越えた変化で生存や健康に悪影響を及ぼさないものと EPA（米国環境保護庁）で

は定義している[1]。しかし、ヒトと実験動物で同じように分類することは困難である。ヒトでは美容など精神的苦悩を来すものは機能上の障害がなくても奇形に入れられる。ある形態異常をこの二つのどれに分類するかは、現在のところ、各研究者に委ねられているが、その標準化の試みも重要な課題の一つである[2]。

○催奇形性 teratogenicity

環境要因が先天異常を惹起する能力のうち、胎生期（妊娠中すなわち受精後出生まで）に作用した場合で、胎生期死亡や発育遅滞を除いて、形態的ないし機能的な発生障害を来す能力をいう。催奇形性を示す環境因子を、催奇形因子（物質）teratogen という。催奇形性の原義は器官形成期に作用した場合、先天奇形を惹起する能力であったが、この定義は今日では狭すぎるものと考えられる。催奇形因子の定義について近年 Teratology 誌で論争された[3]。

○胎児毒性 embryotoxicity, fetotoxicity

広義には、胎生期に作用した場合、先天異常（胎生期死亡、発育遅滞、先天奇形、機能発達異常）を来す能力をさす。催奇形性と対比して、胎生期死亡のみ、あるいはそれと発育遅滞を来す能力のみを指すことは本来誤りである。又、胎生期死亡を来す能力を、胎児致死作用 embryolethality, fetal lethality という。又、出生前子宮内発生は、通常、受精卵、胚（子）又は胎芽 embryo、胎児 fetus と分けられ、従って胚子期に作用した場合は胚（胎芽）毒性 embryotoxicity、胎児期に作用した場合は胎児毒性 fetotoxicity と区別されているが、広義には出生前の個体を一括して胎児と呼ぶので、embryotoxicity も胎児毒性と訳される場合も多い。

なお、embryo は胚（子）と胎芽の 2 訳があるが、日本解剖学会の発生学用語では胚（子）を先にしているので、本書ではこれを採用した。又、動物の fetus の日本語は、実験動物関連領域では慣例的に従来仔（シ）がよく用いられていた。しかし、近年は医学のみならず動物学でも胎児（ジ）とされており（文部省学術用語動物学編、1988 年）、ここでは胎児を採用した。ちなみに、実験動物学用語集、1988 年では胎児、胎仔が併記されており、”家畜解剖用語”、3 版（1987）では胎仔を胎子と改訂している。

○発生毒性 developmental toxicity と生殖毒性 reproductive toxicity

発生毒性とは、環境要因が生殖細胞の形成から、受精、子宮内発育、出生、成熟から死に至る一連の発生過程のいずれかの時期に作用して、早期死亡、発育遅滞、形態的あるいは機能的発生異常を誘発する能力を指す。やや狭義には、性成熟期までの環境要因の暴露による

---

[1] US Environmental Protection Agency: Federal Register: **56**, 63798 (1991)
[2] HOOD, R. D.：“*Developmental Toxicology: Risk Assessment and the Future*”, p.177 (HOOD, R. D. ed., Van Nostrand Reinhold) 1990.
[3] NELSON, B. K.：*Teratology*, **36**, 399 (1987)

発生障害を指す（例えば EPA[1]）。これは、従来の催奇形性の概念が、要因の及んだ時期と誘発される発生異常の型の二面で拡大されたものである。発生毒性を来す環境因子を、発生毒性因子（物質）developmental toxicant という。

発生毒性という用語を最初に提唱したのは WILSON で 1973 年のことと考えられるが、EPA は上記の embryotoxicity の概念がまちまちなので、その代わりにこの発生毒性を用いるようになり、今日一般的に広く用いられるようになった。

生殖毒性 reproductive toxicity は、親世代を中心にみて、環境要因による不妊や次世代の発生障害を指すもので、次世代を中心にみた発生毒性とほぼ同義であるが、やや狭く、生まれた児が離乳して、親より独立したあとに及んだ環境要因の毒性については関与しない。生殖毒性を来す環境因子を、生殖毒性因子（物質）reproductive toxicant という。

しかしながら、生殖毒性の定義は研究者によって異なる。米国では、生殖器及び関連内分泌系統の障害として狭くとらえられることが多く、一方ヨーロッパでは生殖毒性を広くとり、上記の発生毒性のように理解されることが多い。そこで、近年これらの混乱を避けるため、両者を一緒にして生殖・発生毒性 reproductive and developmental toxicity と称するようになり、本書も基本的にはそれに従っている。これら生殖・発生毒性を検索する試験を生殖・発生毒性試験 reproductive and developmental toxicity studies という。従来より簡単なために生殖試験 reproduction studies あるいは teratology studies という語が用いられてきたが、混乱の可能性がありあまり薦められない。

先天異常学 teratology と生殖・発生毒性学 reproductive and developmental toxicology の基本的な違いについて、蛇足ながら説明しておく。先天異常の成因は、環境が主役のものよりは遺伝が主役のものの方が多い。又、先天性（出生前）であり出生後は直接関与しない。これに対し、生殖・発生毒性学は、環境因子によるもので、その暴露は出生前のみならず出生後も関与することである。このように出生前の環境因子暴露による発生障害という面では両者は同じで重なり合っているが、そのでない面もある。

最後に参考のために米国 EPA の発生毒性と（雌、雄）生殖毒性の定義を原語のまま掲げておく。

Developmental toxicology[1] – The study of adverse effects on the developing organism that may result from exposure prior to conception (either parent), during prenatal development, or postnatally to the time of sexual maturation. Adverse developmental effects may be detected at any point in the life span of the organism. The major manifestations of developmental toxicity include: (1) Death of the developing organism, (2) structural abnormality, (3) altered growth, and (4) functional deficiency.

Female reproductive toxicity[4] – Adverse effects observed in the female reproductive

[4] US Environmental Protection Agency: *Federal Register*: **53**, 24834 (1988)

system that may result from exposure to chemical or physical agents. Female reproductive toxicity includes, but is not limited to, adverse effects observed in sexual behavior, onset of puberty, fertility, gestation, parturition, lactation, or premature reproductive senescence.

Male reproductive toxicity[5] – The occurrence of adverse effects on the male reproductive system that may result from exposure to environmental agents. The toxicity may be expressed as alterations to the male reproductive organs and/or the related endocrine system. The manifestation of such toxicity may include alteration in sexual behavior, fertility, pregnancy outcomes, or modifications in other functions that are dependent on the integrity of the male reproductive system.

［以上、「毒性試験講座 11　発生毒性」（谷村孝責任編集、地人書館、1993）より引用］

4.2.2　事務局殿が収集した文献

事務局殿が収集した、3 章（２）で記述した 7 つの論文のうち、最初の 3 編が、発生毒性学用語に関するワークショップに関する報告書であり、発生毒性学における用語の定義を行なっている。これらの文献の内容を調査した。

なお、発生毒性（催奇形性）分野における専門家である、塩田浩平教授（京都大学理事、日本先天異常学界理事長）からは、このワークショップについて以下の情報が得られた。

- このワークショップはベルリンのグループが主催したものであり、この会議で日米欧 3 極で共同の用語集を作ることで合意された。
- その後、米国の Teratology Society の時にシンポジウムをしたり、１０回以上の電話会議を行い、現在最終のドラフトがほぼ出来上がっている。日本からは、塩田教授と堀本 政夫氏（前ファイザー）、藤原道夫氏（アステラス製薬）が代表で討論に参加した。
- 最終案は、Birth Defects (part A), Reproductive Toxicology, Congenital Anomalies の 3 誌の 2009 年前半に並行して出版することになっている。その後、日本語版の作成を行う予定である。

以下に、発生毒性学用語に関するワークショップに関する報告書での要点を示す。

4.2.2.1　「発生毒性学における分類用語：調和の必要性

1998 年 8 月 27～28 日にベルリンで開催された発生毒性学用語の第 2 回ワークショッ

[5] US Environmental Protection Agency: *Federal Register*: **53**, 24850 (1988)

プに関する報告書」[6]

本ワークショップは Federal Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine, Berlin, Germany と Institute of Clinical Pharmacology and Toxicology, Department of Toxcology, Freie Universitaet Berlin の共催によるものである。本報告書に示した見解および結論は本ワークショップの参加者のものであり、必ずしも所属機関の見解を反映していない。

4.2.2.1.1　序論

本ワークショップの目的は、胎児所見の分類に関する指針を示すための代替法を 1 つ以上提案することであった。所見を表すためならびに結果を分類・評価するために使用する用語の相違は、化学物質の公衆健康評価に関与する行政機関の意思決定者にとって難題となっている。これらの相違は、公衆に提示する安全性情報にも明らかな統一性のなさを生み出している。用語の調和のプロセスを分類の領域に敷衍することによって、本ワークショップが現在の不明確さを軽減して発生毒性データの裏付けの基礎をより確実にすることに貢献するものと期待された。本ワークショップの結果を発生毒性試験の評価に関する国際指針を公式に提案する基礎とすることが我々の意図である。

（1）発生異常の分類

6 つの短報において発生異常の分類に関する問題が提示された。よく使用される 6 つの分類用語（奇形（malformation）、異常（anomaly）、変異（variation）、遅延（retardation）、重大（major）、および軽微（minor））の起源について 2 つの論文で論じられた。最初の論文では、広いカテゴリーにおける用語の分類によって得られる目的が存在するかどうかという問題についても論じている。

分類に反対するポイント：

- 臨床状況において分類はほとんど意味を持たないと考えられる。
- 催奇形性作用は反応の連続であるため、分類カテゴリーが明確ではない。
- 異常所見が変異と分類される場合、より高い用量や高い感受性における胚発生の障害の重要なマーカーとして軽視されるおそれがある。

分類を支持するポイント：

- 規制目的では、観察された変化の相対的重要性を示すための有用なツールとなる。
- 異常所見の発生率の用量に関連した上昇は、物質が所見の分類とは無関係に最小作用量

[6] Chahoud I, et al., “Classification terms in developmental toxicology: need for harmonisation. Report of the Second Workshop on the Terminology in Developmental Toxicology Berlin, 27-28 August 1998.”, Reproductive Toxicology 1999 Jan-Feb; **13**(1):77-82.

で発生毒性を示すこと（したがって控えめなリスク評価が得られること）を意味すると考えられる。また、個別所見の提示はより明確なコミュニケーションの形態であり誤解の可能性が低いと考えられる。しかし、分類を行わないことの欠点は、長いデータ表を提示し各所見を個別に挙げる必要があることであり、より具体的な奇形学用語に詳しくない行政機関の意思決定者にとって困難が生じる。

3 番目の演者は、可逆性、有害性、および潜在的メカニズムの違いに基づく相互排他的な分類カテゴリーの可能性について発表した（表 4.2.2.1-1）。

表 4.2.2.1-1　構造上の異常に関する分類の提案（相互排他的な分類カテゴリーに基づく）

Table 1. Proposal of a classificatory scheme for structural abnormalities detected at term [Based on mutually-exclusive categories]

Characteristic	Reversibility	Spontaneous incidence	Harmfulness
Retardation	+	+	−/+
Variation	−	+	−
Malformation			
Minor	−	+	−
Major	−	−	+

4 番目の論文では、胎児所見の分類体系および業界で使用されている化学物質の表示のための分類について発表された。

5 番目の論文は、多くの異なる施設で実施された毒性試験で観察された発生作用のヒトおよび動物の健康に対する重要性を評価する必要があるときに必ず規制評価担当者が直面するジレンマについて述べている。科学的および行政的な障害が多く存在する（異なる行政機関の見解／立場の相違、異なるメーカー／研究施設が使用しているデータベースの互換性のなさなど）。

発生作用を OECD ガイドラインに従って分類するためには、以下のことが緊急に必要である：

－用語の調和

－胎児所見の分類体系の調和

－歴史対照データのデータベース

IFTS の指導下で用語の調和について最近ある程度の進歩があったが、分類については対処されていない。

発生作用の分類体系が提案された。カテゴリーは

奇形（malformation）（重大（major）および軽微（minor））

変異（variation）／遅延（retardation）、及び

および「グレーゾーン異常」（gray zone anomaly）と同定された。カテゴリーの定義は有害性（生存率を含む）、自然頻度、および可逆性に基づいて決定された。ヒト健康に対する影響の評価のために有害性が最も重要であることが強調された。また、変異（variation）と軽微な奇形（minor malformation）の識別は一般的に実験動物における自然頻度に基づいているが、この識別はヒト健康にとっては常に重要とはいえない。

最後の論文においては、胎児所見の分類のためのシンプルなアプローチが提案された。

発生毒性試験における異常（abnormality）の評価は本質的に以下の 4 段階のプロセスである：

（i）異なる形態の所見

（ii）所見の記述

（iii）所見タイプの決定（「分類」）

（iv）治療関係の評価

提案された分類法（第 3 段階）は、構造が永久的に変化しているかどうかの生物学的検討に基づく。定量的データの検討は物質関連の作用の決定を行う後期段階まで後ろ倒しにする。有害性の検討は危険度同定段階まで後ろ倒しにする。

正常（normality）からの逸脱は、不可逆的（癒合（fused）、裂（cleft）、または構造の不在（absent structure）を含む）と可逆的（骨化差（ossification difference）などの変異（variation）を含む）の 2 つのカテゴリーのいずれかに割り当てられる。プロセスのこの段階で生じやすい重要な問題は、一部の所見（波状肋骨（wavy rib）、椎骨中心のダンベル状骨化（dumb-bell ossification of vertebral centra）など）の正確な分類を行う十分な知識がないことである。

物質関連の作用の決定（第 4 段階）には、動物種および系統の正常な特徴の検討（自然頻度データ）と定量的な胎児所見データの評価（予想される対照値を超える発生率の評価、用量反応性の有無など）が必要である。この段階における問題は、国際的な対照データベースのある値の比較が種間差によって不可能なことである。

4.2.2.1.2　議論

（1）奇形（malformation）の定義

演者によって提示された定義のサマリーの後に、奇形（malformation）のよりよい定義についての議論が始まった。奇形（malformation）の定義に「生存」という語を入れる必要性があるかどうかという質問について議論がなされた。発生または機能に対する有害作用を特定すれば十分であるという意見があった。また、誤解の可能性が指摘された。正確な定義がないと、生存は出生時、離乳時、成体期、または他のあらゆる期間を意味すると受け取られる。結論としては、生存の障害は有害性を示唆することから生存を定義に入れるべきと

いうことになった。しかし、時期の定義に関して誤解の可能性があるという問題を文書に記載すべきであるという合意も得られた。

奇形（malformation）には理論上は 2 つの異なる定義があり、それぞれが評価プロセスの異なる段階に適用されるという点が指摘された。第 1 に生物学的な奇形（biologic malformation）である。この名称は胎児所見段階の分類から発生したものであり、「正常」な動物との違いを反映している。第 2 に規制的な奇形（regulatory malformation）である。この名称はリスク評価段階の分類から発生したものであり、一般的に有害性の程度を反映している。リスク評価段階について別の語を作る可能性は否定されなかった。

奇形（malformation）を「形態形成の欠陥の結果」と定義し、もともと正常であった構造の損傷から生じた変化」を表す別の分類用語、変形（deformation）を追加するという意見は採り入れられなかった。この違いの決定には機械論的な知識が必要であり、安全性評価を実施する人物は一般的にこのような知識を持っていない。

合意された奇形（malformation）の定義は以下のとおりである：奇形（malformation）は評価対象種の生存や健康に有害な作用を与えると思われる永久的な構造変化である。

（2）変異（variation）の定義

異なる論文で提示された定義のサマリーの後に、変異（variation）の共通の定義についての議論が始まった。有害性に関する問題については合意が得られた。自然頻度および永久性／可逆性に関する問題はやや不明確であった。

多数派の意見は、変異（variation）は対照に規則的に生じる所見であるというものであった。この種の事象の予想頻度についてはある程度の議論があったが、それが「比較的高い」と思われるという点で合意が得られた。過去に一部の研究者が任意の値を設定したが、この種の客観的基準について合意を得ることは困難であり、このカテゴリーと重症度の低い（「軽微」（minor））な奇形（malformation）との境界は「グレーエリア」である。

演者の中で変異（variation）が「可逆的な事象」であるか「永久的な構造変化」であるかについて相反する意見が出された。ワークショップグループのコンセンサスは、どちらの可能性も否定できないというものであった。自然頻度の基準と同様に、（永久的な）変異（variation）と重症度の低い奇形（malformation）との境界は「グレーエリア」である。

正確性のポイントとして、発生中の生物に関して非永久的な事象を定義するために「可逆性」（reversible）ではなく「一過性」（transient）を用いるべきである。

遅延（retardation）を個別の分類カテゴリーとして扱うべきであるという強い意見がグループ内で出された。しかし、これは結局以下の 2 点で割り引かれることとなった。

(i) 多くの所見（側（脳）室または腎盂のわずかな拡大（slight dilatation of lateral (brain) ventricles or renal pelves）、椎骨中心のダンベル状骨化（dumb-bell ossification of vertebral centra）など）については正確なカテゴリー（遅延（retardation）または変異（variation））を決定することは現実的に困難である。

（ii）遅延（retardation）という語は診断的であり単一の胎児所見に適用すべきではないという意見があった。

決定事項は、変異（variation）の定義に成長や形態形成の遅れの考慮を促す記述を追加するということであった。

演者が指摘されたポイントから、遅延（retardation）が永久的でも有害でもないという一般的な意見の正確性に関して若干の議論が起こった。合理的な推定を行うためには生後事象に関する我々の現在の知識が不十分であるような例が数多く存在するという点で合意が得られた。この領域について実験的研究と公表文献の調査の両面からさらに研究を進める必要があるとされた。

合意された変異（variation）の定義は以下のとおりである：変異（variation）は評価対象の正常な集団内に起こる変化であり、生存や健康に有害な作用を与えるとは思われない。これには成長や形態形成の遅れが含まれるが、その後は正常な発生パターンが認められる。

（３）合意された奇形（malformation）および変異（variation）の定義を IFTS 用語集に記載された用語に適用するための実習

上記の定義に従った所見の分類の実現可能性を検証するために、ワークショップグループは IFTS 用語集の 1 ページを簡単に勉強し、各用語の分類を試みた。この実習の結果を表 4.2.2.1-2 に示す。

表 4.2.2.1-2　ワークショップで議論された分類に従ったラット胎児の先天性異常と変異の例

Table 2. Examples of malformations and variations of a rat foetus at term according to the classification scheme discussed at the Workshop

Skeletal abnormality	Code No.	M	V	U	N
Malpositioned metacarpal	10597	X			
Misshapenned metacarpal	10598	X			
Small metacarpal	10599		X		
Supernumerary metacarpal	10600	X			
Unossified metacarpal	10601		X		
Absent phalanx	10602	X			
Fused phalanx	10603	X			
Incomplete ossification of phalanx	10604		X		
Malpositioned phalanx	10605	X			
Misshapenned phalanx	10606	X			
Small phalanx	10607	X			
Supernumerary phalanx	10608	X			
Thickened phalanx	10609		X		
Unossified phalanx	10610		X		
Absent sternebra	10611	X			
Bipartite ossification of sternebra	10612		X		
Extra sternebral ossification site	10613		X		
Fused sternebra	10614			X	
Incomplete ossification of sternebra	10615		X		
Malpositioned sternebra	10616	X			
Misaligned sternebra	10617			X	
Misshapenned sternebra	10618			X	
Sternochisis	10619	X			
Unossified sternebra	10620		X		

The participants were asked to classify either as a malformation or as a variation the skeletal abnormalities (IFTS terminology) listed below. M = malformation; V = variation; U = can't decide between 'M' and 'V'; and N = term not known/not used in the laboratory. Only in three cases (U) was no consensus reached among participants.

以下に示す実習の結果として、実際には奇形（malformation）および変異（variation）のメインカテゴリーに入らない所見を入れる第 3 の（「グレーエリア」）分類の必要性があることが明らかになった。リスク評価の観点から、これらのグレーエリア所見の頻度はケースバイケースに扱わなければならないことが強調された。

この後、以下のように実習をさらに進める必要があると合意された。ワークショップグループの全メンバーに用語集の修正コピーを送付し、以下のスキームに従って記載されたすべての所見をコード化するように要請する。

M＝奇形（malformation）

V＝変異（variation）

U＝M と V のどちらにも分類できない

N＝未知／不使用

より大規模なフィージビリティ試験として、本ワークショップが作成した出版物で読者を招いて同様の実習を実施することに合意した。

4.2.2.2　「ワークショップ報告

ラット胎児骨格用語および分類に関するハーモナイゼーション

発生毒性学における用語に関する第３回ワークショップ報告

２０００年９月 14 日～16 日、ベルリン」[7]

4.2.2.2.1　序文

発生毒性学の研究で異形を記述するために使用される用語に曖昧さと不一致があることが依然規制上の決定を行う妨げとなっている。この問題は農薬の評価について特に明らかである。近年、該当するEU（ヨーロッパ連合）指令のAnnex I の活性物質に含めることを目的とした農薬の生殖有毒性の再評価には多くの問題がある。評価プロセスの異なるすべてのレベルにおいて、分類および表示についての提案が不一致であることにより、数多くの活性物資のリスクアセスメントが妨げられてきた。表示段階に関して懸念がある、というのは先天性異常が数多く発生することによって、考慮すべきその他の事項にかかわらず、R61の表示（「１またはそれ以上の動物種で悪影響があるという明らかな証拠」を示唆する）という結果になりうるからである。これらの不確かさは「グレーゾーンの異形」、すなわち、２つのカテゴリー（先天性異常または変異）のうちの１つに直ちには組み入れられない異常性に関する主な議論の基盤であった。かかる異常性は胎児への毒性の評価に大きな影響を与えることがありうるが、発生毒性の分野における研究者の間ではその重要性に関し意見の相違または不確かさがある。

異形を分類するプロセスで最も大きな困難が生じる。ある観察は特定の種のみに適用でき、したがってその観察は１つの種における形態異常であって他の種におけるものではないと考えることができる。例えば、胆のうの欠如または脛骨への腓骨の癒合の欠如はウサギにおいては恐らく形態異常と考えられるが、ラットでは正常である。他の例としては、ラットまたはマウスと比較した場合のモルモットにおける尾の欠如またはブタにおける鎖骨の欠如があげられる。さらに、ある種の所見は他の種または血統にくらべ動物の１つの種または血統で顕著により多く見られる。加えて、様々な重篤度の範囲で発生する異常性があり、これらは低い重篤度で発生した場合には変異として分類され、高い重篤度で発生した場合には先天性異常分類されることがあり、後者の例としては拡張した脳室および胸骨分節の癒合が挙げられる。発生と処置の関係が明らかである限り発生頻度の問題を無視し、影響の重篤度にしたがって分類することが可能である。

同じ異常性でも異なる種または血統の動物では非常に異なる生物学的関連性を有するため、さらなる解明が必要である。例えばいくつかのタイプの「正しい位置にない」骨格または胸骨分節における変化が挙げられる。加えて、新しいガイドラインの要求事項が、軟骨染色で見られる「新しい」軟骨性異常のような今まで見られなかった異常を明らかにする可能性のある、さらなる検査方法のきっかけとなりうる。事実、アリザリン染色を行った試料（最近まで殆どの研究所で唯一の骨格情報源であった）を使用した場合、軟骨に関する所見には

[7] Solecki R, et al., “Harmonisation of rat fetal skeletal terminology and classification. Report of the Third Workshop on the Terminology in Developmental Toxicology. Berlin, 14-16 September 2000.”, Reproductive Toxicology 2001 Nov-Dec; 15(6):713-21.

あまり考慮が払われなかったものと思われる。最後に、胎児の評価に関与したスタッフの交代により「新しい」異常が記録されることがある。このような所見の例としては、底ちょう形骨の尾側縁に頭蓋咽頭管を結合している亀裂の発見であった。

生殖毒性における用語のハーモナイゼーションについての国際化学物質安全性計画(IPCS)の主な役割は、化学物質の安全使用について科学的な健康・環境リスクアセスメントの基盤を確立し、化学物質安全性に対する国力を強化することである。ハーモナイゼーションはこの計画の範囲内にある全研究分野の重大な側面である。ハーモナイゼーションには、様々な国々および組織で使用されている方法および実践の理解を深め、異なるアプローチを用いた評価への信頼およびこれの受け入れを発展させることが含まれる。分類および表示などの分野における国際的ハーモナイゼーションが情報の共有、重複の削減およびより大きい科学的完全性を促進することが望まれる。ベルリンワークショップの組織への関与はこの活動の一部として取り組まれている多くの課題の１つであった。

発生毒性学の分野において用語を標準化しようという連邦消費者健康保護・獣医学研究所(BgVV)およびベルリン自由大学の最初の取組みは1995年に始まった。国際先天異常学会連盟(IFTS)と IPCSが使用している用語を調和させる手順への取り組みが行われた。1998年８月の第２回ワークショップの主な目的は、 IFTS の提案に基づく先天性異常および変異の分類計画を作成することであった。第３回ベルリンワークショップの目的はそれ以前に行われた骨格異常に対する分類調査の結果を、調査が行われた中で低レベルでの一致があった異常を特に重視して、検討することであった。所見の解釈に関する問題およびある物質が「催奇形性」があると考えるべきかどうかは該調査またはワークショップの懸案事項ではなかった。

4.2.2.2.2　調査の手順

調査は生殖／発生毒性学の分野の国際的な専門家によって行われ、その目的は第２回ワークショップで合意された定義の範囲内で、IFTS用語集にリストされた骨格異常を分類する実行可能性をテストすることであった。よそでも定義がなされ発表されている[1] *先天性異常*および*変異*という言葉の分類に加え、調査ではさらに２つのカテゴリーが使用された。すなわち、「*先天性異常と変異の区別ができない*（U）」および「*本研究所では知られていない／使われていない用語*（N）」である。各参加者は少なくとも１つの実験動物種について調査を完成させるよう依頼された。全部で13人の専門家が回答を行い、提出された回答はすべてラットに基づいていた。結果は最初に運営委員会で議論された。

使用されたフォーマットを表4.2.2.2-１に示す。一致指数（IA）を算出するため以下の式が考案された：

$$IA = [(M - V)/(M + V + U)] \times 100$$

略語は表4.2.2.2-１に示された通りである。

表4.2.2.2-1　調査書式

No.	Region	Code	Anomaly	Alternative term	M[%]	N[%]	U	N
1.	Skull, General	10402	Acrania		100.00	0.00		
2.		10403	Craniofenestria		100.00	0.00		
3.		10404	Craniostenoisis (狭頭蓋症)		100.00	0.00		
4.		10405	Enlarged fontanel (巨大泉門)		9.09	90.91		
5.		10406	Extra ossification site	Additional, Bone island, Fontanellar bone, Suture bone	0.00	100.00		
6.	Alisphenoid (翼蝶形骨)	10407	Absent alisphenoid	Agenesis, Aplastiv	100.00	0.00		

（注）M：奇形（malformation）として分類された異常の数
V：変異（variation）として分類された異常の数
U：奇形とも変異とも区別がつかないとされた異常の数

一致の最大のスコアは先天性異常については＋100、変異については－100であった。これらのスコアは、回答者全員が異常について知っており、全員が同じ分類を選択したことを示す。一致の最小のスコア（すなわち、不一致の最大のスコア）は０であった。このスコアは２つのカテゴリー（M または V）の１つを選ぶ上で優位性がなかったことを示す。IAが＞75の場合には調査における優れた一致が示され、したがってワークショップではその項目についての詳細な議論は行われなかった。IAが＜75の場合は調査において一致が不十分であることが示され、ワークショップの参加者の間での議論が必要であった。一致が中程度（IAが75～25）であった他のすべての異形もワークショップで議論された。これらの異形についての議論の結果は本ワークショップ報告に含められている。

4.2.2.2.3　調査の結果

（１）一般的用語

一般に、関与する構造のいかんにかかわらず、*欠如*、*癒合した*、*位置異常*、*短い*および*変形した*という用語は先天性異常を表現するということでかなりの一致があった。*小さい*についての定義の問題が持ち出された。特に、どのくらい小さいのが*小さい*かである。分離された骨格で*小さい*と記録されたものは周囲の骨格構造と不釣り合いであったに違いないと考えられた。また、このような変化は一時的な骨化要因ではなく永久的なものと考えられることが強調された。*過剰骨*という用語は先天性異常を示すという全体的な合意がワークショップ参加者の間にあった。

このような変化の評価は非常に難しいことが指摘された;問題は分類ではなく検出であることが多い。軟骨の染色はこれらの変化を検出する上で特に有用である。*不完全な骨化*という用語はアリザリンレッド染色の取り込みにおいて以下の変化として観察される３種の異なるタイプの骨化：染色された領域の均一性の相違（「斑状」効果）、染色密度の一般的な減少（全体にわたり薄い色の着色／拡散した外観）および染色された領域のサイズの減少を包含していることが指摘された。これら３つの異なる条件の出生後の影響は非常に異なることがありうる。ラットでは*不完全な骨化*は、影響を受ける構造にかかわりなく、通常遅延（このことはウサギなどの他の種では必ずしもそうではない）によると推測されていることが指摘された。しかし、この推測は危険でありうる。というのは、単一の構造の不完全な骨化は残りの構造が正常に骨化されている場合には、低体重または骨格全体にわたる未成熟の兆候が伴う不完全な骨化に比べ、重要である可能性が高いからである。四肢骨が冒されている場合、この骨化プロセスと残りの骨格との同期性は特に重要であるという懸念が若干あった。さらに、正常な成長曲線を想定した場合、成長後期における骨化の遅延は前期における遅延より重要である可能性が高い。というのは後期では遅れの取り戻しは不可能と思われるからである。最後に、*不完全な骨化*の出生後の影響については筆者らは実際に何も知らない。

*不骨性の*という用語に関する調査への回答は非常に不均一であった。また観察が理論的性質を有していることがその一つの理由であろうという指摘がなされた。

*肥厚性の*という観察の重篤度に関する議論が若干あった。調査における分類の相違は認識レベルが異なることを反映しているものと思われた。一連の影響がある場合、変異が先天性異常となる時期を決定するのは困難でありうる。次のような提案が１つあった：厚みが予想の150%以下であり、形状が本質的に正常である場合には変異と分類されるべきであり、厚みが予想の150%以上である場合には先天性異常と分類されるべきである。形状も異常である場合にはそのような先天性異常には*変形した（misshapened）*という用語がよりあてはまるであろう。

（２）前肢および後肢（表4.2.2.2-2および4.2.2.2-3）

欠如、*癒合した*、*位置異常*、*短い*および*変形した*という用語は一致指数が高いのと対照的に、*湾曲した肩甲骨*および*湾曲した鎖骨*に関する結果はやや明瞭性に欠けていた。しかし、会議の参加者の間での大多数の意見は先天性異常であった。*湾曲した*についてやや不確実性が高いのは異なる重篤度に対する選択肢がないことを反映しているのであろう。また、解釈の問題もありえ、人によっては*湾曲した*という用語と*変形した*という用語を同義語的に考えていることも考えられる。しかし、IFTSの定義では*変形した*は*湾曲した*より重篤度が大きいというニュアンスであろう。*湾曲した*および*変形した*の用語にやや一致性が低い前肢構造（特に胸帯）とは対照的に、後肢についてはこれらの用語は不確かさの原因が少なかった。

アリザリンで染色したラットの試料では、*正しい位置にない*恥骨は骨盤の変化が他になければ、評価するのが非常に難しいことがあると指摘された。ワークショップ参加者の多くは

*正しい位置にない*という用語は十分に正確というわけではないと感じていた。参加者の多くは*位置異常*の方により満足した。重篤度の問題がありえた。参加者の多くは*位置異常*構造を先天性異常と呼びたがったが、*正しい位置にない*の方が影響が少ないと考え、したがって分類については確信が持てなかった。

表4.2.2.2-2　前肢での合意状況

Table 2
Indices of agreement for forelimbs

Bone	Absent	Fused	Malpositioned	Short	Bent	Misshapened	Small	Supernumerary	Incomplete ossification	Unossified	Thickened
Clavicle	100				38.5	76.9	53.8		−84.6	−30.8	−61.5
Scapula	100				46.2	69.2			−84.6	−7.7	−61.5
Humerus	100	100	84.6	100	75.0	84.6			−69.2	−7.7	−50.0
Radius	100	100	84.6	100	75.0	84.6			−69.2	−15.4	−50.0
Ulna	100	100	84.6	100	75.0	84.6			−69.2	−15.4	−50.0
Carpal bone	100	100	83.3			66.7	30.8	38.5	−80.0	−40.0	
Metacarpal	100	100	75.0			66.7	41.7	69.2	−84.6	−53.8	
Phalanx	84.6	84.6	75.0			83.3	66.7	84.6	−84.6	−69.2	−50.0

表4.2.2.2-3　後肢での合意状況

Bone	Absent	Fused	Malpositioned	Short	Bent	Misshapened	Small	Misaligned	Supernumerary	Incomplete ossification	Unossified	Thickened
Ilium	100	83.3	100		75.0	83.3	91.7			−83.3	−41.7	−50.0
Ischium	100	83.3	100		75.0	83.3	91.7			−83.3	−41.7	−50.0
Pubis	100		100		91.7	83.3	91.7	66.7		−83.3	−41.7	−50.0
Femur	100	100	83.3	100	75.0	83.3				−58.3	−18.2	−50.0
Fibula	100	100	83.3	100	75.0	83.3				−66.7	−16.7	−50.0
Tibia	100	83.3	83.3	100	75.0	81.8				−66.7	−16.7	−50.0
Calcaneus	100	100	83.3			83.3	75.0			−80.0	−30.0	
Talus	100	100	83.3			83.3	75.0			−80.0	−30.0	−40.0
Tarsal bone	100	100	81.8			83.3	75.0		50.0	−80.0	−40.0	−40.0
Metatarsal	100	100	81.8			83.3	75.0		66.7	83.3	50.0	
Phalanx	83.3	83.3	63.6			83.3	66.7		83.3	−83.3	−66.7	−50.0

（３）胸骨分節および椎骨（表4.2.2.2-4）

尾椎および尾側弓（caudal arches）を除くすべての構造で、*欠如（absent）*という用語を先天性異常と分類することに高い一致性があった。尾椎は以下の点で難しいと考えられた。単一の尾椎の欠如を検出するのは困難であろう。多くの研究所では尾側のエレメントの各々をカウントしていず（ラット／マウスについては軟骨染色をしなければこれは実際に不可能である）、単に尾の長さ、尾が真っ直ぐであること、および近位領域から末端領域までの椎骨のサイズグラデーションが正常と思われるかどうかを決定しているだけである。第２回のワークショップで、*欠如*は永久的な変化であり、それ自体で先天性異常と考えるべきであることに合意がなされた。一方、尾椎の欠如は、特にそれが遠位端にある場合には、生存または健康に悪影響を及ぼす見込みはない。また、ある骨が研究中の種の現在の進化段階にもはや機能的役割を持たないことがある場合、影響は非常に軽微でありえる。したがって、そのような骨の欠如は変異と考えることができよう。上記の推測にもかかわらず、異なる試験動物についての出生後の影響は分かっていないのを忘れないことが重要である。例えば、進化の早期段階で物をつかむために尾を使ったラットでは、影響はウサギにおけるよりずっと深

刻でありえる。肉眼的検査（剖検で）を参照するのは意思決定プロセスの役に立つであろう。尾が著しく短い（おそらく１つ以上の椎骨が欠如）、ねじれているまたはその他の肉眼的な異常性を示す場合、先天性異常と分類するのがより適切と思われる。最後に、人類にとっての重要性が分かっていないので決定は困難である。尾側弓（caudal arches）の問題は、１つの尾側弓の欠如は問題が尾の近位領域または中間部分にあることを必然的に暗示する（ラットでは末端の尾椎には椎弓がないので）ので、もっと明瞭であり、この変性は末梢エレメントの欠如というよりは悪影響を及ぼす可能性が高い。同様に、弓の１つが欠如していると尾が真っ直ぐでない（すなわち、ねじれ）ことがありうる。*癒合した*という用語に関しては、尾側構造の問題は尾側構造の*欠如*について報告された問題と同様である。重篤度（癒合の程度および影響を受けた構造の数という点で）および尾での癒合の位置が重要な検討材料である。また、人類における出生後の影響および重篤度は不確かである。ケースバイケースでの評価がベストと思われる。肋軟骨との比較で*癒合した*肋骨についての調査結果における相違を説明するのは困難であった。これはアリザリンで染色された試料（最近まで、ほとんどの研究所における唯一の骨格情報源であった）では軟骨に関する所見はあまり重大に考えられなかったことと関係があろう。ワークショップ参加者が到達したコンセンサスは、*癒合*は*先天性異常*であるというものであった。主な議論は*癒合した胸骨分節*に関するものであった。ある範囲の異なる条件があるため、重篤度がここでの問題であった。重篤度は胸骨分節間のスペース（胸骨分節間の軟骨）の短縮の程度および癒合物の厚さによって判断することができる。より顕著な場合には、正常な胸骨の発育および呼吸が危険にさらされることがある；余り顕著でない場合の影響は分かっておらず、ごくわずかであると思われる。尾側弓および尾椎を除き、*位置異常*の構造を先天性異常と分類することの一致性が高かった。*欠如*および*癒合した*に関する尾側構造について以前に報告した問題は、*位置異常*にも当てはめることができる。同様に、*正しい位置にない*および*変形した*について以前に述べたことは胸骨分節、肋骨および椎骨にも適用できる。どちらのケースについても分類は不確かでありえ、所見（特に、重篤度についての情報）をさらに明確化しおよび／または写真を含めると役に立つであろう。

専門家の大多数が*不骨化*骨（*unossified*）を変異として分類した。この分類は*不骨化*についてのIFTSの定義と一致している。*不骨化*とは、同じ歳の対照群で通常少なくとも部分的に骨化されている部位に骨化が欠如している（アリザリンレッドの取り込みで評価した場合）ことである。IFTSの定義では*不骨化*は*不完全な骨化*の極端な形態であることを示唆している。

調査では、*半椎*を、仙椎および尾椎を除くすべての構造における先天性異常と分類する広範な一致があった。尾側構造についての問題は*欠如*および*癒合した*について以前に報告された問題と同様であったが、ワークショップの参加者の全体的コンセンサスは背柱の領域とは関係なく先天性異常とすることであった。

*過剰椎*がどの部位で生じるかの判定が可能である場合は、これを常に記録することが重要

であるという指摘がなされた。頸部で生じた場合、位置は通常明らかである。胸腰部では、特に椎骨のプロセスが十分に骨化していない胎児のラットでは、位置はさらに不確かである。さらにもう１つの椎骨が存在することを検出するのは可能であるが、椎骨の識別（胸部の椎骨か腰部の椎骨か）は確実性が少ないことがある。仙尾部でも不確かさがありうる。ここでの問題はおそらく検出に関するものであろう。というのは、椎骨のカウントを常に行っているわけではなく、仙椎と尾椎の境界を識別するのもまた困難だからである。胸腰部でのさらにもう１つの椎骨（通常、余分の腰椎骨）はラットでは通常先天性異常と考えられることはなく、またウサギでは非常に頻繁に生じる。尾側部では、分類に関する問題は*欠如*に関して以前に報告されたものと同様である。

ヘミセントリック（*hemicentric*）および*分割*に関する調査で観察された不確かさの理由はこれらの用語の解釈違いであると考えられた。これらの用語はそれぞれ骨前駆体が不足しているか、または骨化部位が２つの別個の部分にあるという意味合いを含んでおり、先天性異常に分類される結果となった。さらに、*片側性の（軟骨）*は現状では重複である。意味は*ヘミセントリック*と同じである。

調査結果は、多くの研究所で*二分された（骨化）*を長年にわたり誤使用してきたことを反映したものと思われる。この用語は骨化が２つの別々の区域で進んできた事実のみを意味することが強調された。骨の前駆体は二分されていないと推測されている。骨化異常性は出生後、特に２つの骨化中心部に広い間隔がある場合に存続する可能性があることを示唆する、出生後の証拠がいくつかあることが指摘されるべきである。状況が、*二分された*および*二分された骨化*の状況と同様であるため、*ダンベル*の用語はより正しくは*ダンベル型骨化*としてリストされるという前提で調査は明確に完了した。*ダンベル*の用語は骨前駆体ならびに骨化部位が影響を受け、変化は永久的でありうるという意味合いを持つ。したがって、この条件によりダンベルは先天性異常と分類されることとなった。*ダンベル型骨化*は骨化部位のみが異常な形をしていることを示唆するであろう。また、*二分化された骨化*と同様、この変化も変異として分類されることになるであろう。*二分化された骨化*と同様、骨化の異常性は出生後、特に骨化部位が同様に広がっている場合に存続する可能性があることを示唆する、出生後の証拠がいくつかあることが指摘されるべきである。

*胸骨分節*における*余分な骨化部位*の位置を記録すべきであるという指摘がなされた。このアドバイスがなされたメモをIFTS用語集に含めることができた。*胸骨分節*および*sternochisis*という議論のポイントに関し、先天性異常ということでワークショップの参加者の間に100%近い一致があった。

表4.2.2.2-4　胸骨分節および椎骨での合意状況

Indices of agreement for sternebrae and vertebrae

Bone	Absent	Fused	Malpositioned	Misaligned	Misshapened	Incomplete ossification	Unossified	Small	Hemivertebra	Supernumerary	Hemicentric	Split cartilage	Unilateral cartilage	Bipartite ossification	Dumbbell
Sternebra	84.6	15.4	76.9	−50.0	−15.4	−84.6	−84.6							−66.7	
Vertebra	100									23.1					
Cervical arch	100	92.3	100	−8.3	61.5	−84.6	−53.8	58.3		61.5					
Cervical Ct.	100	92.3		8.3	7.7	−84.6	−46.2			69.2	27.3	23.1	41.7	−53.8	−58.3
Cerv. Ct. Cart.		75.0													−58.3
Cervical Vert.	100		83.3						83.3	46.2					
Thoracic arch	100	84.6	75.0	7.7	15.4	−84.6	−46.2	38.5		61.5					
Thoracic Ct.	100	84.6		8.3	15.4	−84.6	−53.8			61.5	16.7	23.1	33.3	−53.8	−58.3
Thor. Ct. Cart.		69.2													−63.6
Thoracic Vert.	100		66.7						83.3	23.1					
Lumbar arch	100	84.6	83.3	0.0	15.4	−84.6	−46.2	30.8		61.5					
Lumbar Ct.	100	84.6		0.0	0.0	−84.6	−46.2			61.5	36.4	23.1	23.1	−53.8	−58.3
Lumb. Ct. Cart.		83.3													−58.3
Lumbar Vert.	100		83.3						83.3	23.1					
Sacral arch	100	100.0	83.3	−8.3	15.4	−84.6	−46.2	41.7		61.5					
Sacral Ct.	100	84.6		0.0	0.0	−84.6	−46.2			61.5	16.7	33.3	23.1	−53.8	−58.3
Sac. Ct. Cart.		69.2													−58.3
Sacral Vert.	100		83.3						66.7	23.1					
Caudal arch	58.3	41.7	50.0	10.0	18.2	−83.3	−45.5	36.4			0.0			−54.5	
Caudal Ct.	83.3	36.4		0.0	0.0	−81.8	−45.5								−54.5
Caudal Vert.	33.3		36.4						33.3	−36.4					

Ct, centrum; Cerv, cervical; Vert, vertebra; Thor, thoracic; Cart, cartilage; Sac, Sacral.

（4）肋骨での所見（表4.2.2.2-5）

*分岐した肋骨*及び*分岐した肋軟骨*についての調査結果における相違は説明が困難であった。この困難さはアリザリンで染色した試料での軟骨に関する所見にあまり考慮が払われていないことに関係するものと思われる。

*頚肋*という用語の分類は不確かさの領域であった。ヒトでは*頚肋*が存在することは健康への著しい悪影響の原因となりえるが、四肢動物におけるこの状態の臨床的関連性は分かっていないことが十分文書で証明されている。同様に、ラットでは出生後の影響は知られておらず、軽微であると推測されている。付加構造の長さという点での問題がある。頚肋が非常に短いままであれば、これが長いまたは後に長くなるよりは有害性が少ないと思われる。

*脱離した肋骨*に関しては、上方の肋骨であれば先天性異常というのが唯一の妥当な分類であろうという指摘がなされた。下方の肋骨については、特に過剰構造の場合はあまり明瞭ではない。*脱離した*肋骨と*浮遊*肋骨の混同の可能性（後者は胸骨との結合がないことを意味し、下方胸郭では正常な状態である）が繰り返し述べられた。*discontinuous rib（不連続の肋骨）*という用語をリストするのがより正確であろうという前提で調査は明確に完了し、*不連続の骨化（discontinuous ossification）*と訂正された。*不連続の*という用語は*短い*と同じであり、それ自体先天性異常として分類されるべきであり、IFTS用語集の範囲内では重複である。胸骨分節に関連して*癒合*という用語が幅広く議論された。*癒合した肋軟骨*（一致性に乏しい）と比較した場合の*癒合した肋骨*（一致性が高い）について調査における相違を説明するのは困難であった。ここでも、この相違はアリザリンのみで染色を行った試料における軟骨質の変化にあまり重大な考慮が払われていないことを反映しているものと思われた。

議論において、出生後に骨折となった*瘤状肋骨*（*knobby ribs*）の例が説明された。この情報を考慮して、これを変異と記載するというワークショップの参加者による当初の合意は

あまり確実でなくなった。

調査の回答において不確実であった理由の１つとして、*不完全に骨化された肋骨*と*短肋骨*を混同する可能性が挙げられるであろう。構造の長さを判断する場合、肋骨のアリザリンで染色された部分と軟骨（染色されない）部分の両方を説明するについても問題がある。上部肋骨（胸骨と結合しているもの）の場合、個々の短肋骨は胸骨を引きつけおよび／または胸郭の変形を引き起こすことがある。上部肋骨の多くが短い場合、胸郭が不釣り合いに小さい（相互的影響）か、または胸骨が内側に位置しない（一方性の影響）ことがある。下部肋骨の場合、肋骨の骨性部分および軟骨性部分を考慮にいれて、隣接した構造および／または他の同様の大きさの胎児と比較することにより相違を検出すべきであった。

*一般的用語*の項目で注記したと同様に、重篤度の問題は*厚さ*（*厚さ*についての上記の注記を参照）および*波状肋骨*について考慮されるべきである；ただし、波状肋骨は殆どの場合可逆的所見として考えられている。

表4.2.2.2-5　肋骨での所見

Table 5
Rib findings

Finding	Index of agreement
Rib, absent	92.3
Rib, bent	−15.4
Rib, branched	61.5
Rib cartilage, branched	−15.4
Ribs cartilage, fused	−7.7
Rib, cervical	−61.5
Rib, detached	80.0
Rib, discontinuous	−41.7
Rib, fused	84.6
Rib, incomplete ossification	−69.2
Rib, intercostal	72.7
Rib, knobby	−66.7
Rib, malpositioned	100
Rib, misaligned	−9.1
Rib, misshapened	61.5
Ribs, short	38.5
Ribs, thickened	−83.3
Ribs, unossified	−30.8
Ribs, wavy	−76.9
Ribs, supernumerary, full	−84.6
Ribs, supernumerary, short	−100

（５）頭蓋骨（表4.2.2.2-6）

頭蓋構造の*欠如*を変異として報告する問題は、対照での頻度が高い場合、若干の意見の不一致点であった。*癒合した*を先天性異常の方向へ推し進めることになる懸念があったが、これは未知の出生後の影響およびヒトにおける未知の重要性と関係していた。*変形した*という用語は十分に正確というわけではないという懸念があり、重篤度という問題も論点であった。この観察は永久的な変化と考えられ、したがって先天性異常として分類するのがもっとも適切であろうという指摘がなされた。*変形した*は前駆構造の異常という意味合いを含んでおり、単なる骨化の要因ではないことが強調された。*小さい*、*不骨化*および*穴*という用語については到達した一致のレベルは一般に低かった。*小さい*についてはこの用語の解釈に相違があるものと思われ、また部分的発生不全（前駆体が不完全）と不完全な骨化（前駆体は正常）とで混同がありえる。部分的発生不全の場合、重篤度に関する問題もありえる。対照群での頻度が高い場合に*小さい*構造を変異と報告する問題には若干の意見の不一致があった。*不骨化*の観察は「理論的」と考えられ、不骨化した頭蓋骨は孤立しては起こりそうにない。このことは調査の回答者の中に確信がないとする回答者があった理由の１つと考えられ、ワークショップの参加者にとっても問題となった。*不骨化*構造は、状態が一時的であると推測されるため、通常変異として分類される。ただし、頭蓋については、*不骨化*構造が孤立して観察される場合には、先天性異常としての分類の方が適切であろう。このタイプの観察はすべて、適合する妊娠日についての正常な骨化という枠組みに照らして慎重に考慮すべきである。特定の妊娠日に頭蓋構造のあるものは十分骨化され、別のあるものは骨化がそれほど十分でなく、他のものは全く骨化されていないこともあろう。*穴*についても一致度は低かったが、これはこの用語の解釈が異なったためであろう。部分的発生不全（前駆体中の穴）と不骨化区域（前駆体は正常）とで混同がありえる。穴のサイズも不確実さの原因であろう。穴が非常に小さく、数がわずかで、プロービングにより貫通できない場合、分類は変異であろう。ある構造で穴が大きくまたは小さい穴が数多くある場合は先天性異常として分類されることがある。*二分骨化*（*bipartite ossification*）は*二分*（*bipartite*）とは著しくことなることが指摘された。前者の用語が使用される場合、正常な骨前駆体が存在し、変化は単に一時的な骨化の遅延（変異）のためであると推測される。後者の用語が使用される場合、前駆体もまた二分されている（すなわち、前構造が二分されている）と推測され、生存／健康に永久的な悪影響を及ぼす（先天性異常）。

表4.2.2.2-6　頭蓋骨での所見

Indices of agreement for cranial bones

Bone	Absent	Fused	Small	Misshapened	Split	Unossified	Hole	Incomplete ossification	Bipartite	Bent
Alisphenoid	100	83.3	66.7	83.3		−11.1	−10.0	−55.6		
Auditory oss.	100	100		100		−33.3				
Basioccipital	100	84.6	53.8	69.2		−30.8	−27.3	−84.6		
Basisphenoid	100	100	66.7	83.3		−25.0	−10.0	−83.3		
Exoccipital	100	100	53.8	69.2		−30.8	−25.0	−84.6		
Frontal	100	50.0	53.8	83.3		−16.7	−18.2	−83.3		
Hyoid	100		33.3	23.1		−63.6		−100		−23.1
Interparietal	100	69.2	53.8	76.9		−41.7	−18.2	−84.6	−76.9	
Lacrimal	100	92.3	40.0	70.0		−40.0		−80.0		
Mandible	100	92.3	76.9	84.6				−84.6		
Maxilla	100	100	76.9	84.6		−7.7		−84.6		
Nasal	100	80.0	69.2	84.6		−7.7	−20.0	−76.9		
Palatine	100	100	61.5	84.6	100	−46.2		−69.2		
Parietal	100	100	53.8	84.6		−15.4	−33.3	−84.6		
Premaxilla	100	100	75.0	83.3		−16.7	−20.0	−83.3		
Presphenoid	100	100	55.6	83.3		−50.0	−71.4	−77.8		
Squamosal	100	100	66.7	69.2		−38.5	−83.3	−84.6		
Supraoccipital	100	100	66.7	83.3		−25.0	−30.0	−83.3	−75.0	
Tympanic ann	100	100	41.7	83.3		−50.0		−83.3		
Vomer	100	100	41.7	75.0		−33.3		−77.8		
Zygomatic	100	100	38.5	84.6		−46.2		−84.6		

4.2.2.2.4　分類についての議論の成果及び結果

「グレーゾーン」の形態異常は完全に消滅することは決してないが、議論の過程で緩和させることができた。先天性異常または変異の評価については、重篤度および／または観察の頻度が決め手となるであろう。ただし、観察のあるもの、例えば、*欠如*、*癒合した*および*変形した*、は頻度にかかわらず先天性異常のカテゴリーに割り当てるべきである。用語および分類の更なるハーモナイゼーションのため、またこれらの形態異常を異なる位置での写真と関連付けるため、ジョイントIPCS/IFTSプロジェクトが提案された。写真を集め、IFTS用語集に含める提言がなされた。Harmonisation of Approaches for Assessment of Risks from Exposure to Chemicals（化学物質への暴露のリスクアセスメントに対する取り組みのハーモナイゼーション）に関するIPCSプロジェクトの運営委員会はこの仕事を優先させるよう要請されるであろう。また軟組織および外観上の所見について同様の調査を行うことが提言された。これらの調査の結果は2002年のベルリンでのIPCS/IFTSのジョイントワークショップで議論されるべきである。クリアリングハウス・システムを確立する必要性について一致に至った。生殖研究から得られたデータに基づいて行われた規制プロセスにおける決定を調和させ、その質を改善するため、独立した生殖毒性のリファレンスセンターに相談して原初の胎児を再評価し、または不確かな所見の解明のため形態異常の電子写真にアクセスすることができればこれらの当局にとって役に立つであろう。かかるリファレンスセンターまたはクリアリングハウスはIPCSの傘下で研究を行うべきであり、これらは登録過程で問題が生じた場合に規制当局が、登録過程以前に疑問を解明するため企業が、また発生毒性に関与する科学者がコンタクトすることもあり得る。かかるリファレンスセンターはデータバンクを設立し、これを維持するため試験研究所からの歴史的対照データをプールする機能を持つこともあり得る。

参考文献 1　Chahoud I, et al. Classification terms in developmental toxicology: need for harmonization. Reproductive Toxicology 1993; **13**: 77-82.

4.2.2.3　「会議概要
ラット胎児の外表および内臓所見の用語および分類の調和：第 4 回発生毒性学に関するワークショップの報告書（ベルリン、2002 年 4 月 18～20 日）」[8]

本ワークショップは International Program on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva, Switzerland、Federal Institute for Risk Assessment, Berlin, Germany（旧 Federal Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine）、および Institute of Clinical Pharmacology and Toxicology, Department of Toxicology, Free University Berlin, Germany の共催によるものである。本報告書に示した見解および結論は参加者のものであり、必ずしも所属機関の見解を反映していない。

4.2.2.3.1　序文

1995 年の発生毒性学用語に関する第 1 回ベルリン・ワークショップでは、用語内の不明確性および不整合性に対処するための努力として IFTS 用語について議論するフォーラムが開催された。1998 年の第 2 回ワークショップでは、胎児所見ならびに「奇形」（malformation）および「変異」（variation）の定義のための分類体系を用いる利点について議論した。奇形（malformation）は「評価対象種の生存や健康に有害な作用を与えると思われる永久的な構造変化である」と定義される。変異（variation）は「評価対象の正常な集団内に起こる変化であり、生存や健康に有害な作用を与えるとは思われない」と定義される。

第 2 回ベルリン・ワークショップで合意された分類体系を用いた 1997 年用語集に記載されている骨格異常の分類に関する議論が 2000 年の第 3 回ワークショップで行われた。第 4 回ワークショップの目的は、胎児の外表および内臓所見の分類に関する指針を示すことである。これらのガイドラインは、特に合意が困難な異常と比較して専門家間の合意が可能な異常に関して外表および内臓異常の過去の実施された分類調査の結果に基づくものである。したがって、本稿の意図するところは、実験動物の胎児異常分類を向上させ、この分野に関わる読者および学会に適切なリソースを供給することである。

これらの活動は、ベルリンの Federal Institute for Risk Assessment（BfR）によって開始された *Dev*Tox Project（www.devtox.org）によるサポートを最近受け、IPCS の指導下

[8] Solecki R, et al., “Harmonization of rat fetal external and visceral terminology and classification. Report of the Fourth Workshop on the Terminology in Developmental Toxicology, Berlin, 18-20 April 2002.”, Reproductive Toxicology 2003 Sep-Oct; **17**(5):625-37.

で German Federal Ministry of the Environment, Nature Conservation and Nuclear Safety（Environmental Research Plan）によって主催された。繁殖毒性および発生毒性の分野の参加者に、1997 年用語集に記載されている外表および内臓所見を分類するように要請した。ユーザーが経験した共通の困難は一部の重要な所見の重症度を表す適切なカテゴリーが存在しないことを反映している。また、重症度の記録のための構造的アプローチの不在、脊椎および指構造のナンバリング、ならびに「理論的」と考えられ孤立的には発生しないと思われる一部の用語の存在によってさらに困難が生じる。

ワークショップの最初のセッションでは、最近の状況を概説して発生毒性の分野で使用される用語の調和のための最近の進歩および国際的努力を総括したいくつかの発表が行われた。ワークショップの第 2 日には、評価者間での一致度を高めて「グレーゾーン」を減らすための方法について、特に内臓所見に重点を置いて議論が行われた。

この第 4 回ワークショップを含むベルリン・ワークショップの達成事項は IPCS Harmonization Project への貢献となる。IPCS プロジェクトの目標は、化学物質のリスク評価を向上させ、持続可能な発展の枠組み内でヒト環境および環境の保護を促進する管理を実践することである。

4.2.2.3.2　発表

（1）規制目的での発生毒性用語の調和

植物保護製品の活性物質の評価に関する Commission to the European Parliament and the Council からの最近の報告書（植物保護製品の市場導入時に Council Directive 91/414/EEC の Article 8(2)に従って提出された報告書）では、Directive の機能を向上させるべき問題のある領域が強調され、将来の修正において対処すべき問題が同定された。Directive 91/414/EEC の Annex I の Inclusion of Active Substances における農薬の生殖作用の評価には多くの問題と不整合性がある。多くの活性物質のリスク評価によって評価プロセスの様々なレベルで分類および表示について一様でない提案がなされた。そのため、表示段階に関して若干の懸念が生じた。それは、奇形（malformation）が多く発生すると他の事項とは無関係に R61 表示（「1 つ以上の動物種における明確な有害作用の証拠」を示唆する表示）が課せられるからである。これらの不確定性から、2 つのカテゴリー（奇形（malformation）または変異（variation））のどちらにも入れがたい異常（anomaly）に基づく農薬の分類および表示に関して大きな議論が起こった。

現時点では、この領域における主な問題は以下のとおりである。

- IFTS 内で統一された基準および有用な命名法が開発されているにもかかわらず、すべての試験施設が同じ診断基準を用いているわけではない。
- 大半の試験施設では十分な歴史対照が存在せず、歴史データが十分に共有されていない。
- 現時点では、繁殖データの統一された取り扱い（日常的に使用されるデータ入力システ

ムからのデータ転送、登録または通知プロセスにおける報告など）のための適切なソフトウェアが存在しない。

したがって、農薬、殺生物剤、動物用医薬品、医薬品、ならびに新規物質および既存物質についての異なる管理決定を防ぐために奇形（malformation）および変異（variation）の評価の調和が緊急に必要である。

科学的評価に関して、奇形（malformation）および変異（variation）の分類のための調和のとれたアプローチが緊急に必要である。一貫性のない管理決定をもたらす異なる物質タイプ（農薬、工業用化学物質など）の間での試験結果の解釈の不一致を避けるために、奇形（malformation）および変異（variation）の評価のための調和のとれたアプローチが緊急に必要である。これは、たとえば一部の物質が多用途に使用されるため重要である。

（２）所見の分類における一致度を高めるための補助情報

評価者間の一致度の向上とグレーゾーン異常（gray zone anomaly）の数の減少が達成されるような方法について議論が集中した。一致度が低いことの主な理由は、生後影響についての情報の欠如、重症度の評価の困難ならびに評価者が利用できる記述的データの欠如であると思われた。生後影響についての情報の欠如は、動物の将来の健康および生存に対する影響に関して有害性の評価がしばしば困難であることを意味している。この点については今後の研究によって対処すべきであるが、この種の作業を完了するために要する時間はかなり長い。現在の記述的データがまだ不十分であると思われる箇所に図を増やしたり記述的用語（重症度レベルなど）を追加したりすることによって 1997 年用語集を改善することは可能と思われる。このことは、生後情報がない場合に所見の正確な性質や重症度に基づいてより情報を得た状態で決定を下すことができることを意味している。

1997 年用語集に関して、改善を要する 2 つの主な領域が指摘された。第 1 に、重症度段階評価体系の採用を強く推す意見があった（これは 1997 年用語集の序論ですでに言及されていた）。縮小（small）、短縮（short）、拡張（dilated）、狭窄（narrow）、巨大（macro）、微小（micro）などの語は重症度（軽微（minimal）、moderate（中等度）、顕著（marked）など）によって検証すれば動物に対する影響に関してもっと明確になるはずである。「縮小はどれくらいの縮小か（how small is small）」、「短縮はどれくらいの短縮か（how short is short）」という質問には評価者の記述によって回答すべきである。この種の検証は将来的に調和を必要とする。これは、まず施設特異的なものとして確立し、したがって施設ごとに手順書によって記述すべきものである。

第 2 に、詳細な解剖学的情報の欠如および不正確な記述的用語の採用に関する懸念について対処する必要がある。どの身体構造が影響を受けているかをより正確に知るために有用であると思われる例がある（影響を受けているのは 1 つの肺葉のみか複数の肺葉か？ いずれの場合も我々はどの肺葉が関与しているかを知る必要がある）。また、「異常な形」（misshapen）などの語は不正確であり、詳細な記述（「曲がり」（bent）、「キンク」（kinked）

などのより正確な用語の使用など）が望ましい。

内臓所見の評価者間での一致度の低さが 1997 年用語集による記述の欠如にどれくらい起因するかを評価するために、グレーゾーン異常（gray zone anomaly）をよりよく表すための図を利用して新しい調査を実施すべきであると指摘された。

（３）分類のための他の検討事項

分類に関する我々の決定に影響を与える事項が他にもいくつか存在する。重症度を除けば、最も重要な問題は知覚有害性（perceived adversity）（特定の条件が動物にどれだけの有害性を与えうるか）であると思われる。知覚有害性を決定する重要な要因は影響を受ける構造および作用の性質である。たとえば、心臓に影響を与える条件は胸腺に影響を与える同様の条件より「奇形」（malformation）と分類されやすい。また、構造や構造の一部の欠如を伴う条件は同じ構造のサイズの減少を伴う条件より「奇形」（malformation）と分類されやすい。

我々の決定に影響を与えうる他の要因としては、成獣や成人における異常（anomaly）の発生率に関する我々の知識、メカニズムあるいは既知のまたは予想される機能影響に関する我々の知識、感情要因（我々は頭／顔や四肢などの一部の身体構造に感受性が高い）、異常（anomaly）を記述するために用いる用語（長く複雑な語は有害性の大きさを表しているように思われやすい）などがある。

（４）「有害性」に基づく内臓所見の分類

グレーゾーン異常（gray zone anomaly）に当てはめた場合の有害性に基づく分類の欠点について議論した。合意された定義は以下の特徴を持っていた。奇形（malformation）については、変化は永久的であり、生存や健康に有害な影響を与える。変異（variation）については、変化は一過性であり、有害ではなく孤立的に発生する。理論上は、動物への有害性に関する知識はグレーゾーン異常（gray zone anomaly）に関する不確定性を減らすために必要な最も重要な情報である。ほぼすべての例において、この情報を持っていれば最良の分類に関するよりよい同意が得られる。明確に有害な作用の肯定的な例は、後肢麻痺を伴う二分脊椎（spina bifida）、機能障害を伴う（血管、胆管などの）閉鎖（atresia）および頚部の柔軟性の低下を伴う頚肋（cervical rib）である。一方、大半の軟組織異常（soft tissue anomaly）は否定的な例である。それは、成獣の生理に対する影響の評価が困難であるからである。したがって、有害性の評価がグレーゾーン異常（gray zone anomaly）の分類に真に有用であるかどうかという疑問が生じる。しかし、大半のグレーゾーン異常（gray zone anomaly）によって生じる有害性の性質に関する情報を我々が持っていないことこそがグレーゾーンである理由である。実際には、我々は他の要因（特に変化の重症度）に頼らなければならない。後者に関しては、より正確な記述および写真の提示が観察する変化の性質を伝えるための重要な補助材料である。

（５）奇形（malformation）および変異（variation）の定義は内蔵所見と一致するか？

内臓所見の分類のために合意された奇形（malformation）および変異（variation）の定義の適切性について議論した。分類体系は提示された情報を複雑化するのではなく明確化するものであることが重要であり、この種の体系の調和のための指針の作成においては我々は規則を課すのではなく理解の向上を促進することを目指すべきである。

第 2 回ベルリン・ワークショップで合意された定義では、分類プロセスの重要な決定因子として有害性（adversity）および重症度（severity）を同定している。これらの基準は内臓変化の解析用に非常に適したツールであると思われる。

内臓所見の分類における重要な検討事項の例は以下のとおりである。動物への有害性（adversity）の程度は重要な要因であり、これはしばしば影響を受ける器官によって決定される。有害性を検討する場合、ペアの構造（腎臓、卵巣など）の他方や葉構造（肺、肝臓など）の他の葉による代償を考慮に入れる必要がある。重症度（severity）も「奇形」（malformation）および「変異」（variation）の重要な決定因子であるが、これについては明確に定義する必要がある。同じ構造および所見について、より激しく影響を受けた個体は奇形（malformation）と分類され、あまり激しい影響を受けなかった個体は変異（variation）と分類される。重症度のレベルおよびある種のグレーゾーン異常（gray zone anomaly）に付随する問題（動物の系統、実験室環境など）の調和が有用であると思われる。

永久的な変化は異常なプロセスの結果であり、評価対象種に対する有害な作用の証拠がない場合でもヒトへの外挿に関して警告とみなすべきである。

（６）胎児および仔における背景発生率

内臓所見の分類の手助けとしてラット胎児および仔（生後 4 または 21 日目）における所見の背景発生率を比較した。この種の比較は生後影響を明らかにするうえで非常に有用である。データはいくつかの興味深い傾向を示した。一部の所見（腎盂または尿管の拡張など）については胎児における発生率が仔を上回っていた。一部の所見（横隔膜ヘルニアなど）についてはその逆であった（仔における発生率が胎児を上回っていた）。一部の所見（無眼など）については（罹患児の）発生率が胎児と仔で同程度であり、別の所見（脳室の拡張など）については発生率は胎児と仔で同程度であったが、作用の重症度は仔のほうが高かった。

腎盂および尿管の拡張に関するデータは、これらの変化が一過性で変異（variation）とみなすべきであるという文献における見解を裏付けている。横隔膜ヘルニアに関するデータも非常に興味深い。それは、仔における発生率が胎児より高いことは、一部の研究施設で胎児に認められた横隔膜内の薄い領域が後にヘルニアに発達する可能性があることを示唆しているからである。脳室拡張に関するデータは、内水頭の発生が段階的である（体液の段階的な蓄積による）という見解を裏付けている。分娩後エビデンスは 4 およびまたは 21 日目に屠殺した仔に限定されていたが、この種の比較データが生後影響の解明において有用であ

ることを示す明確な証拠が得られた。

4.2.2.3.3　調査の方法

「骨格異常（skeletal anomaly）の分類」に関する調査と同様に、繁殖／発生毒性の分野の国際的な専門家がこの調査を実施した。目的は、第 2 回ワークショップで合意された定義内で1997年用語集に記載されている外表および内臓異常を分類することの実現可能性を検証することである。結果はまず運営委員会で議論された。各参加者に少なくとも 1 つの実験動物種について調査を完了するように要請した。合計 20 名の専門家が回答した。

前回調査と同様に、分類の選択肢は「M」（奇形（malformation））、「V」（変異（variation））、「U」（判定不能（undetermined）、すなわち M と V のどちらにも分類できない）および「N」（未知／不使用（not known/not used in the laboratory））であった。また、一致率（IA）を得るために用いた式は前回調査に使用したものと同じであった。

IA＝（M－V / M＋V＋U）×100

一致度の最大スコアは、奇形（malformation）について＋100%、変異（variation）について－100%であった、一致度の最小スコア（不一致度の最大スコア）は 0 であった。IA≧75%の場合に良好な一致度とした。IA≦25%の場合に不良な一致度とした。

4.2.2.3.4　調査の結果

（1）全般

1997 年用語集に記載されている外表所見の大半について、調査の回答者とワークショップの参加者のいずれにおいてもそれらを奇形（malformation）と分類する高い一致度が認められた。したがって、それ以上の議論は不要であった。胎児外表所見のうち、明確な変異（すなわち≧－75%）が同定されなかった点に注目すべきである。内臓所見については、状況はより不明確であった。多くの異常（anomaly）が低い一致率を示し、これにはいくつかの理由があると思われた。多くの「N」回答があり、その結果一致率に含まれる回答の数が減り、解析が弱められた。また、第 3 回ベルリン・ワークショップでの骨格所見の解析において確認されたように、多くの所見を明確化するために補助的な記述が必要であると思われた。特に、一部の変化の重症度を示す段階評価体系は有用である。

（2）胎児外表所見の分類に関する議論

以下の所見に関する状況はより不明確であった。

２－１）所見：縮小（small）

客観的基準の欠如がこの所見についての不明確な回答の原因であると考えられた。サイズの縮小が永久的なもので有害な作用を引き起こすかどうかを明らかにするために重症度の段階評価が有用である。構造のサイズの変化に関する判断を同じ胎児内の他の身体構造のサイズとの比較において下すことも重要である。「縮小」（small）は、それが健康に有害な影響を与える不可逆的で重度の変化である場合にのみ奇形（malformation）と定義すべきである。（表 4.2.2.3-1 及び表 4.2.2.3-2）

表 4.2.2.3-1　所見：縮小（small）

Code	異常	IA(%)	分類	必要となる最小の情報
10035	小さな眼膨隆	58.82	Gray zone/M	S
10045	小さな鼻	72.22	Gray zone/M	S
10089	小さな爪	58.82	Gray zone/M	S
10090	小さな前足	83.33	Gray zone/M	S
10118	小さな肛門	64.29	Gray zone/M	S
10119	小さな生殖結節	58.82	Gray zone/M	S

S: 重篤度

表 4.2.2.3-2　胎児の外見の観察に対する低い IA

Code	異常	IA(%)	分類	必要となる最小の情報
10006	羊水過少	5.56	Gray zone/M	-
10007	羊水過多	5.56	Gray zone/M	-
10064	口蓋襞の奇形	-6.25	Gray zone/M	HCD
10063	口蓋襞の不揃い	-17.65	Gray zone/M	HCD
10086	前足過伸展	5.56	Gray zone/M	S/HCD
10112	肛門性器間距離増加	15.79	Gray zone/M	S/HCD
10107	肛門性器間距離減少	21.05		S/HCD

HCD:歴史的な対照データ、S: 重篤度

２－２）所見：羊水過少および羊水過多（oligohydramnios and polyhydramnios）

これらの変化は機能障害の結果であると考えられる。したがって、この種の所見は厳密には発生異常（developmental anomaly）とはみなされないが、発生中の子孫への健康影響を考慮に入れなければならないという理由から変異（variation）より重度であると考えるべきである。「奇形以外」（分類せず）（Not Malformation（Unclassified））という分類が提案された（内臓異常については他章も参照のこと）。

２－３）所見：異常な形の口蓋襞（misshapen palate rugae）

この異常は骨格検査に割り当てられた胎児の外表検査中にまれに認められた。この所見をグレーゾーン異常（gray zone anomaly）と分類することに一致が得られた。適切な歴史対

照データが存在することに基づいて、研究施設ごとに奇形（malformation）または変異（variation）に分類する決定を下すべきである。

２－４）所見：足過伸展（paw hyperextension）

この所見は種特異的である傾向があった。これはウサギなどの胎児が大型の種によく観察される。これはグレーゾーン異常（gray zone anomaly）と分類された。適切な歴史対照データが存在することに基づいて、研究施設ごとに奇形（malformation）（変化が重度で不可逆的と考えられる場合）または変異（variation）（軽微である場合）に分類する決定を下すべきである。

２－５）所見：肛門性器間距離の延長（increased anogenital distance）

肛門性器間距離の延長（increased anogenital distance）という所見は主に研究施設の方針に依存している。客観的でよく規定された基準の欠如がこれらのカテゴリーについての不明確な回答の原因であると考えられた。したがって、重症度の段階評価が有用である。グレーゾーン異常（gray zone anomaly）としての分類に一致が得られた。適切な歴史対照データが存在することに基づいて、自由奇形（freedom malformation）（変化が重度である場合）または変異（variation）（軽微である場合）に分類すべきである。

２－６）胎児内臓所見の分類に関する議論

M または V についての一致度が非常に低い場合（M と V と回答した回答者数がほぼ同数の場合）あるいは 3 分の 1 を上回る回答者（＞7 名）が U または N と回答した場合の所見について議論した。奇形（malformation）および変異（variation）についての規則に関するコンセンサスを得るために、所見を以下のように分類した。

1. 数	不在、過剰構造、二重構造、分葉
2. 形状	異常な形、欠損、嚢胞およびその他の異常な形
3. 位置	位置異常およびその他の特別な位置
4. サイズ	縮小、拡大、拡張、狭窄、延長、膨張、短縮、閉鎖
5. 色	変色、蒼白、出血性

（３）数

３－１）数の所見１：不在（absent）

一般的に構造の不在（absence）は、健康への影響とは無関係な異常プロセスの明確な結果である。ヒトへの外挿の目的で、この異常プロセスは警告とみなすべきである。器官／構造の不在（absent）の大半について奇形（malformation）としての分類に一致が得られた。これは、調査およびワークショップでの議論において不明確な結果を示した奇静脈の不在（absent azygos vein）および腎乳頭の不在（absent renal papilla）という語についても当

てはまる。腎盂の不在（absent renal pelvis）の場合には、発生の遅延の可能性を排除するために病理組織検査による確認を行うことが望ましい（表 4.2.2.3-3）。

1997 年用語集に欠落していた無名動脈の不在（absent innominate artery）の分類は他の不在（absence）の場合とは異なる。これは、大動脈弓から出る動脈の配列の小さな変化を反映している。この変化を無名動脈の不在（absent innominate artery）として報告することは、この語が実際に存在するより重篤な状態を示唆していることから誤りである。これに変わる語として「頚動脈分岐の変異」（carotid artery variation）が提案された。また、これを変異（variation）と分類することに一致が得られた。

鎖骨下動脈の不在（absent subclavian artery）に関して 2 つの交絡因子について議論した。第 1 に、重篤な骨格異常がない場合には代償性血管構造がなければならない。第 2 に、真の異常（anomaly）が後食道性鎖骨下動脈である場合には鎖骨下動脈の不在（absent subclavian artery）という報告は誤りである。これらの事項が調査に対する回答を不明確にしていた可能性がある。しかし、他の器官の不在（absent）と同様に鎖骨下動脈の不在（absent subclavian artery）は奇形（malformation）としてのみ報告すべきである。したがって、これは奇形（malformation）と分類すべきである。

構造の不在（absence）が異常プロセスの結果であることを指摘するために、1 対の器官の不在（absence）はそれがヒト/動物の健康に影響を与えるかまたは生存に有害な影響を与えるかにかかわらず常に奇形（malformation）であると合意された。これは、性腺の不在（absent gonad）および肺の不在（absent lung）という語にも当てはまる（後者は常に片葉の不在を意味する）。

考えられる交絡因子は対側構造の存在（片側の精巣の存在など）または葉構造（肺など）のカバーによる代償の可能性である。肺の不在（lung absence）の場合にはどの葉がないかをデータで示す必要がある。この異常（anomaly）は異常な肺分葉（abnormal lung lobation）や葉融合（lobe fusion）である可能性があるため、この C は初期分類として奇形（malformation）を伴うグレーゾーン異常（gray zone anomaly）と分類することに一致が得られた。変異（variation）として分類するためには歴史対照データによる裏付けが必要である。例外として、肺尾状葉の不在（absence of the caudate lung lobe）は一部の系統のウサギに非常によく観察され、変異（variation）として分類できる。

表 4.2.2.3-3　所見：不在

Code	異常	IA(%)	分類	必要となる最小の情報
10262	奇静脈の不在	78.95	M	-
	無名動脈の不在		V（頚動脈枝分かれ）	-
10236	鎖骨下動脈の不在	100.00	M	-
10250	肺の不在	100.00	M/gray zone	どの部分か/ HCD
10327	腎乳頭の不在	40.00	M	-
10362	性腺（精巣）の不在	90.00	M	-

HCD:歴史的な対照データ

３－２）数の所見２：過剰構造および二重構造（supernumerary and doubled structure）

一般的に、付加的な構造の存在は健康への影響にかかわらず異常プロセスの明確な結果である。ヒトへの外挿の目的で、この異常プロセスは警告とみなすべきである。これは初期分類として奇形（malformation）を伴うグレーゾーン異常（gray zone anomaly）と分類することに一致が得られた。変異（variation）として分類するためには研究施設の歴史対照データによる裏付けが必要である。たとえば、二葉性の胆嚢（bilobed gallbladder）は変異（variation）と分類できるか？ 2 本の胆管を持つ二重胆嚢（doubled gallbladder）は奇形（malformation）と分類できるか？（表 4.2.2.3-4）

初期分類規則の例外として、過剰奇静脈（supernumerary azygos vein）が挙げられる。これは一部の系統のマウスに非常によく観察され歴史データに基づいて系統および種特異的とみなされるため、変異（variation）と分類される。

表 4.2.2.3-4　所見：過剰構造および二重構造

Code	異常	IA(%)	分類	必要となる最小の情報
10164	過剰胸腺	22.22	Gray zone/M	HCD
10260	過剰肺葉	-15.00	Gray zone/V	どの部分か/S/HCD
10272	過剰奇静脈	0.00	種依存/株依存	HCD
10297	過剰胆嚢	35.71	Gray zone/M	HCD
10308	過剰膵臓	56.25	Gray zone/M	HCD
10317	過剰脾臓	36.84	Gray zone/M	HCD
10342	過剰腎臓	61.11	Gray zone/M	HCD
10351	過剰腎上体	50.00	Gray zone/M	HCD
10365	過剰性腺	83.33	Gray zone/M	HCD
10372	過剰精巣	63.16	Gray zone/M	HCD
10389	過剰卵巣	63.16	Gray zone/M	HCD
10287	過剰肝葉	-30.00	Gray zone/V	どの部分か/S/HCD
10202	二重大動脈	90.00	Gray zone/M	HCD
10359	二重尿管	78.95	Gray zone/M	HCD
10290	二葉性の胆嚢	20.00	Gray zone/V	HCD

HCD:歴史的な対照データ、S: 重篤度

３－３）数の所見３：過剰肺葉または過剰肝葉（supernumerary lung or liver lobes）

変化が孤立的に発生する場合は過剰肺葉または過剰肝葉（supernumerary lung or liver lobes）を初期分類として変異（variation）を伴うグレーゾーン異常（gray zone anomaly）と分類することに一致が得られた。1 つの例外は、器官のサイズの全体的な変化が観察される場合である。

３－４）数の所見４：肺または肝臓の異常分葉（abnormal lobation of lung or liver）

器官の全体的なサイズの変化がない場合には初期分類として変異（variation）を伴うグ

レーゾーン異常（gray zone anomaly）と分類することに一致が得られた（表 4.2.2.3-5）。

初期分類規則の 2 つの例外は、葉融合（fused lobes）または単葉性の肺（unilobular lung）である（ラットでは右肺は 4 個ではなく 1 個の葉からなる）。これらの変化は健康への影響とは無関係な異常プロセスの明確な結果である。

表 4.2.2.3-5　所見：異常分葉

Code	異常	IA(%)	分類	必要となる最小の情報
10249	肺の異常分葉	15.79	Gray zone/V	P
10277	肝臓の異常分葉	-5.26	Gray zone/V	P

P: 画像

（4）形状

4－1）形状の所見 1：異常な形（misshapen）

異常な形（misshapen）（胸腺、肺、肝臓、脾臓など）は非常に不正確な語であるため潜在的有害性の評価が困難であることが確認された。重症度の段階評価またはより記述的な表現（円形（rounded）、点形（pointed）など）が有用であるが、図を提示すればさらによい。初期分類として奇形（malformation）を伴うグレーゾーン異常（gray zone anomaly）と分類することに一致が得られた。変異（variation）として分類するためには変化が軽微で機能的影響がないという証拠を示し歴史対照データを示すことによって正当化する必要がある。初期分類規則の 1 つの例外は胸腺である。一方または両方の角が残存している場合には変異（variation）として分類することが適切と思われる。「異常な形の心臓」（misshapen heart）が 1997 年用語集に欠落していたことが確認された（表 4.2.2.3-6）。

表 4.2.2.3-6　所見：異常な形

Code	異常	IA(%)	分類	必要となる最小の情報
10161	胸腺の異常な形	5.26	Gray zone/V	P/S/D
10257	肺の異常な形	42.11	Gray zone/M	P/S/D
10284	肝臓の異常な形	26.32	Gray zone/M	P/S/D
10294	胆嚢の異常な形	13.33	Gray zone/M	P/S/D
10313	脾臓の異常な形	42.11	Gray zone/M	P/S/D
	心臓の異常な形			P/S/D

P: 画像、S: 重篤度、D: 記述

4－2）形状の所見 2：欠損、嚢胞およびその他の異常な形（defect, cyst and other misshapen）

欠損（defect）は奇形（malformation）と分類することに高い一致が得られた。

客観的基準の欠如が嚢胞（cyst）の分類についての不明確な回答の原因であると考えられ

た。サイズを表す重症度の段階評価が有用である。脾臓、膀胱、卵巣および卵管に嚢胞（cyst）が発生することは非永久的な変化であると考えられたため、変異（variation）と分類することに一致が得られた。1 つの例外は、永久的な変化を反映した腎臓の嚢胞（cyst）である（表 4.2.2.3-7 も参照のこと）。その他の異常な形（misshapen）の器官／構造（腸、食道または胃の憩室、水頭、心膜水腫、前／後大静脈の断絶など）は良好な一致度を示し、曲尿管（convoluted ureter）および分離胸腺（split thymus）を例外として奇形（malformation）として分類された（表 4.2.2.3-7）。これらの後者の変化はどちらも一過性と思われるため、変異（variation）として分類することに一致が得られた。

表 4.2.2.3-7　所見：欠損、嚢胞およびその他の異常な形

Code	異常	IA(%)	分類	必要となる最小の情報
10171	心房中隔欠損	100.00	M	-
10175	心室中隔欠損	100.00	M	-
10187	膜質心室中隔欠損	89.47	M	-
10193	筋心室中隔欠損	89.47	M	-
10222	大動脈肺動脈中隔欠損	95.00	M	-
10310	脾臓での嚢胞	-31.58	V	S
10328	腎臓での嚢胞	-35.00	Gray zone/V	S
10353	膀胱での嚢胞	-25.00	V	S
10383	卵巣での嚢胞	-35.00	V	S
10391	輸卵管での嚢胞	-27.78	V	S
10320	腸の憩室	66.67	M	-
10246	食道の憩室	84.21	M	-
10301	胃の憩室	83.33	M	-
10131	水頭	100.00	M	-
10185	心嚢水症	38.89	M	-
10266	前大静脈の断絶	88.89	M	-
10267	後大静脈の断絶	77.78	M	-
10163	分離胸腺	0.00	V	-
10357	曲尿管	-44.44	V	-

S: 重篤度

（5）位置

段階評価および客観的基準の欠如がこれらのカテゴリーについての不明確な回答の原因であると考えられた。重症度の段階評価および成獣影響への外挿が有用であるが、全体としてグレーゾーン異常（gray zone anomaly）と分類することに一致が得られた。各研究施設に図および歴史データに裏付けられた適切な記述が存在することに基づいて、奇形（malformation）（ずれ（displacement）が重度で健康に影響を与える不可逆的変化に相当する場合）または変異（variation）（軽微である場合）と分類すべきである。

５－１）位置の所見１：位置異常（malpositioned）

ずれ（displacement）（大動脈、腎臓、精巣など）の程度を表す重症度の段階評価が有用である。異常プロセスの警告とみなされることから初期分類として奇形（malformation）を伴うグレーゾーン異常（gray zone anomaly）と分類することに一致が得られた。変異（variation）として分類するためには歴史対照データによる裏付けが必要である（表 4.2.2.3-8）。

デフォルト規則の 1 つの例外は、二次動脈および静脈の大半が影響を受けている場合である。それは、この種のずれは実験動物に極めて一般的であり健康に影響を与えないからである。ずれ（displacement）が重度でない場合には変異（variation）と分類することが適切と思われる。

表 4.2.2.3-8　所見：位置異常

Code	異常	IA(%)	分類	必要となる最小の情報
10157	甲状腺の位置異常	20.00	Gray zone/V	S
10160	胸腺の位置異常	15.00	Gray zone/V	S
10186	心臓の位置異常	70.00	Gray zone/M	S
10203	大動脈の位置異常	73.68	Gray zone/M	S
10214	頸動脈の分岐の位置異常	-11.76	Gray zone/V	S
10219	動脈管の位置異常	68.75	Gray zone/M	S
10227	無名部分の位置異常	5.88	Gray zone/V	S
10230	肺動脈分岐の位置異常	58.82	Gray zone/M	S
10238	鎖骨下分岐の位置異常	17.65	Gray zone/V	S
10336	腎臓の位置異常	52.63	Gray zone/V	S
10369	精巣の位置異常	57.89	Gray zone/V	S
10273	移行された奇静脈（静脈）	21.43	Gray zone/M	HCD
10361	下大静脈後尿管	21.43	Gray zone	HCD

HCD:歴史的な対照データ、S: 重篤度

５－２）位置の所見２：転位奇静脈（transposed azygos vein）

この変化の発生率は種または系統に依存することが確認された。初期分類として奇形（malformation）を伴うグレーゾーン異常（gray zone anomaly）と分類することに一致が得られた。変異（variation）として分類するためには歴史対照データによる裏付けが必要である（表 4.2.2.3-8 を参照）。

５－３）位置の所見３：下大静脈後尿管（retrocaval ureter）

この変化は異常プロセスの結果であるが（したがって変異（variation）ではない）、動物の健康に有害な影響を与えないと思われる。グレーゾーン異常（gray zone anomaly）と分類することが提案された。適切な歴史対照データが存在することに基づいて、奇形（malformation）または変異（variation）に分類する決定を下すべきである（表 4.2.2.3-8

を参照)。

（６）サイズ

６－１）サイズの所見１：器官／構造のサイズに関する所見

客観的基準の欠如がこれらのカテゴリーについての不明確な回答の原因であると考えられた。重症度の段階評価が有用であるが、全体としてグレーゾーン異常（gray zone anomaly）と分類することに一致が得られた。適切な歴史対照データおよび研究施設の方針に従った段階評価の記述が存在することに基づいて、奇形（malformation）（変化が重度で健康に影響を与える不可逆的変化に相当する場合）または変異（variation）（軽微であるか実験動物系統に一般的な場合）と分類すべきである。

６－２）サイズの所見２：縮小／拡大（small/enlarged）

縮小した（small）実質器官（眼、脾臓、腎臓、精巣など）が影響を受けた場合、これは機能的影響を伴わない可逆的所見を表していることがある。しかし、そのようなケースでも、小型化が不可逆的で異常プロセスの結果とみなされる場合には奇形と分類すべきである。不可逆的変化と成長の遅延を識別するためには病理組織検査がしばしば有用である。いずれにせよ、縮小／拡大した（small/enlarged）実質器官（心臓、眼、肝臓、脾臓、腎臓、精巣、卵巣、肺、副腎など）についての全体的な傾向は奇形（malformation）であった（表 4.2.2.3-9 を参照)。

拡大／縮小した（enlarged or small）中空器官（鼻腔、胆嚢、胃など）については、この所見をグレーゾーン異常（gray zone anomaly）と分類することに一致が得られた。変異（variation）としての分類のほうが可能性が高いと思われた。それは、これらの所見は特に変化が軽微で孤立的に発生する場合には死亡時の活動状態を反映していると考えられるからである。重度のケースのみを奇形（malformation）と分類することが適切である（表 4.2.2.3-10 を参照)。

表 4.2.2.3-9　所見：縮小／拡大した臓器

Code	異常	IA(%)	分類	必要となる最小の情報
縮小した臓器				
10143	小眼球症		Gray zone/M	S/HCD
10188	小心症		Gray zone/M	S/HCD
10195	縮小した大動脈弁		Gray zone/M	S/HCD
10196	縮小した左房室弁		Gray zone/M	S/HCD
10197	縮小した肺動脈弁		Gray zone/M	S/HCD
10198	縮小した右房室弁		Gray zone/M	S/HCD
10199	縮小した心室		Gray zone/M	S/HCD
10286	縮小した肝臓		Gray zone/M	S/HCD
10315	縮小した脾臓		Gray zone/M	S/HCD
10339	縮小した腎臓		Gray zone/M	S/HCD
10371	縮小した精巣		Gray zone/M	S/HCD
10388	縮小した卵巣		Gray zone/M	S/HCD
拡大した臓器				
10141	巨大眼球症		Gray zone/M	S/HCD
10172	心肥大		Gray zone/M	S/HCD
10177	拡大した大動脈弁		Gray zone/M	S/HCD
10180	拡大した左房室弁		Gray zone/M	S/HCD
10181	拡大した肺動脈弁		Gray zone/M	S/HCD
10182	拡大した右房室弁		Gray zone/M	S/HCD
10183	拡大した心室		Gray zone/M	S/HCD
10281	肝肥大		Gray zone/M	S/HCD
10316	巨脾症		Gray zone/M	S/HCD
10331	拡大した腎臓		Gray zone/M	S/HCD
10367	拡大した精巣		Gray zone/M	S/HCD
10384	拡大した卵巣		Gray zone/M	S/HCD

HCD:歴史的な対照データ、S: 重篤度

表 4.2.2.3-10　所見：縮小／拡大／膨張した中空器官

Code	異常	IA(%)	分類	必要となる最小の情報
縮小／拡大した中空器官				
10153	縮小した鼻腔	-10.00	Gray zone/V	S
10296	縮小した胆嚢	-33.33	Gray zone/V	S
10305	縮小した胃	15.79	Gray zone/V	S
10150	拡大した鼻腔	-42.11	Gray zone/V	S
10292	拡大した胆嚢	-46.67	Gray zone/V	S
10302	拡大した胃	-29.41	Gray zone/V	S
膨張した中空器官				
10300	膨張した胃	-44.44	Gray zone/V	S
10354	膨張した膀胱	-68.42	Gray zone/V	S

S: 重篤度

６－３）サイズの所見３：狭窄／拡張（narrowed/dilated）

拡張（dilated）および狭窄（narrowed）（脳室、血管、腎盂など）に関しては、変化の重症度に加えて分類では影響を受けた部位および様々な機能的影響を考慮に入れる必要があることが明らかになった。したがって、分類は歴史対照発生率、影響を受けた器官の性質および重症度に基づいて行うべきである。脳室、大血管および器官に影響を与える変化は奇形（malformation）と分類される場合が多いのに対し、二次動脈、消化管、腎盂および尿管に影響を与える変化は変異（variation）と分類される場合が多い（表 4.2.2.3-11 を参照）。

表 4.2.2.3-11　所見：拡張／狭窄した器官

Code	異常	IA(%)	分類	必要となる最小の情報
拡張した中空器官				
10128	拡張した脳室	20.00	Gray zone/M	S/RA
10201	拡張した大動脈	5.26	Gray zone/M	S/RA
10207	拡張した大動脈弓	5.00	Gray zone/M	S/RA
10213	拡張した頸動脈	-47.37	Gray zone/V	S/RA
10218	拡張した動脈管	0.00	Gray zone	S/RA
10225	拡張した無名部分	-41.18	Gray zone/V	S/RA
10231	拡張した肺動脈	5.56	Gray zone	S/RA
10237	拡張した鎖骨下部	-47.37	Gray zone/V	S/RA
10264	拡張した前部大静脈	-27.78	Gray zone/V	S/RA
10265	拡張した後部大静脈	-27.78	Gray zone/V	S/RA
10329	拡張した腎盤	-75.00	Gray zone/V	S/RA
狭窄した器官				
10204	狭窄した大動脈	45.00	Gray zone/M	S/RA
10209	狭窄した大動脈弓	31.58	Gray zone/M	S/RA
10215	狭窄した頸動脈	0.00	Gray zone	S/RA
10220	狭窄した動脈管	-36.84	Gray zone/V	S/RA
10228	狭窄した無名部分	-22.22	Gray zone/V	S/RA
10232	狭窄した肺動脈	30.00	Gray zone/M	S/RA
10239	狭窄した鎖骨下部	21.05	Gray zone/V	S/RA
10242	狭窄した気管	23.53	Gray zone/M	S/RA
10248	狭窄した食堂	5.56	Gray zone	S/RA
10270	狭窄した前部大静脈	11.11	Gray zone	S/RA
10271	狭窄した後部大静脈	11.11	Gray zone	S/RA

S: 重篤度、RA: 影響を受ける領域

６－４）サイズの所見４：延長／膨張／短縮（elongated/distended/short）

胆管または無名動脈の延長（elongated bile duct or innominate artery）ならびに胃または膀胱の膨張（distended stomach or bladder）については、延長（elongation）および膨張（distension）は永久的ではない場合が多いことから初期分類として変異（variation）を伴うグレーゾーン異常（gray zone anomaly）と分類することに一致が得られた。奇形

（malformation）としての分類は重症度が高く不可逆的な影響があるケースにのみ当てはまる。たとえば、無名動脈の延長（elongated innominate artery）は右鎖骨下動脈分岐の角度が変化するような長さの場合には奇形（malformation）と分類される。

また、構造（無名動脈、胆管など）の短縮は初期分類として変異（variation）を伴うグレーゾーン異常（gray zone anomaly）と分類することに一致が得られた。調査において、これらの語の定義が不正確で重症度が疑わしいことから回答の 3 分の 1 が不明確であった。腸、精巣上体、輸精管および卵管の短縮（short intestine, epididymis, vas deferens and oviduct）は用語集には記載されているが、大半の研究施設には記録されていない（表 4.2.2.3-12 を参照）。それは、これらの構造の一部が小動物において検出できるかどうか疑わしいからである。

表 4.2.2.3-12　所見：延長／短縮した器官

Code	異常	IA(%)	分類	必要となる最小の情報
延長した器官／組織				
10226	延長した無名部分	-52.94	Gray zone/V	S
10291	拡大した胆管	-71.43	Gray zone/V	S
短縮した器官／組織				
10229	短縮した無名部分	-64.71	Gray zone/V	S
10295	短縮した胆管	-61.54	Gray zone/V	S
10325	短縮した腸	16.67	これらの組織が小さな実験動物で見つかることの疑問がある。	
10376	短縮した精巣上体副睾丸	0.00		
10381	短縮した精管	0.00		
10396	短縮した輸卵管	13.33	Gray zone/V	

S: 重篤度

（7）色

7－1）色の所見 1：機能障害の結果としての所見

一般的に器官の色の変化は異常（anomaly）に相当しないが、それは機能障害の結果であることが多い。同様に、出血性（hemorragic）、蒼白（pale）、変色（discolored）などの肉眼所見は機能障害の結果を反映していることが多く、厳密には発生異常（developmental anomaly）ではない。「奇形以外」（分類せず）（Not Malformation（Unclassified））という新しい分類が提案された。この新しいカテゴリーは、この種の所見が狭義の奇形（malformation）ではなく機能障害によるものであり変異（variation）には分類できないことを示している（表 4.2.2.3-13）。

梗塞（infarct）（肝臓、腎臓、肺など）や fluid filled abdomen などの病理学的変化も機能障害の結果を反映していると考えられた。したがって、この種の所見は厳密には発生異常

（developmental anomaly）とはみなされず、変異（variation）より重度のものとみなすべきである。また、発生毒性試験において化学物質処理によって生じた場合には発生中の子孫に対する健康影響を考慮に入れなければならない。

表 4.2.2.3-13　機能障害の結果としての所見

Code	異常	IA(%)	分類	必要となる最小の情報
10126	流体が満たされた腹部	-35.00	Not Mal-formation/ Unclassified	-
変色した／蒼白な器官				
10252	変色した肺	-63.16	Not Mal-formation/ Un-classified	-
10279	変色した肝臓	-77.78		-
10311	変色した脾臓	-66.67		-
10330	変色した腎臓	-78.95		-
10258	蒼白な肺	-73.68		-
10285	蒼白な肝臓	-77.78		-
10314	蒼白な脾臓	-75.00		-
10338	蒼白な腎臓	-75.00		-
梗塞				
10255	肺	15.38	Not Mal-formation/ Unclassified	-
10282	肝臓	15.38		-
10335	腎臓	15.38		-
出血性				
10129	小脳	-15.00	Not Mal-formation/ Unclassified	-
10130	大脳	-15.00		-
10140	眼	-30.00		-
10159	胸腺	-25.00		-
10254	肺	-26.32		-
10280	肝臓	-36.84		-
10333	腎臓	-42.11		-
10347	腎上体	-42.11		-
10368	精巣	-36.84		-
10374	精巣上体副睾丸	-36.84		-
10385	卵巣	-42.11		-
10393	輸卵管	-31.25		-
10399	子宮	-33.33		-

S: 重篤度

4.2.2.3.5　結論

今回および過去のワークショップに参加した研究機関、規制機関および産業界の専門家は、試験データの解釈および規制評価に用いる構造異常（structural anomaly）の分類の用語の

調和を提案してきた。解釈には評価対象物質にかかわらず調和が必要であり、工業用化学物質、農薬、殺生物剤、医薬品としての使用に依存せず、食品中の使用または存在によるものではない。

（1）総合結論

- 重症度に基づくと、変化は健康に有害な作用を与える場合とそうでない場合がある。したがって、少なくとも各「グレーゾーン」異常（'gray zone' anomaly）について重症度を記録し、奇形（malformation）または変異（variation）への分類をサポートするために使用すべきである。
- グレーゾーン異常（gray zone anomaly）は研究施設の歴史対照データに従って定義すべきである。
- 歴史対照データは同様の条件下で飼育した同じ種および系統から得られたものであり、同時試験から得られたものである必要がある。
- 永久的な構造変化および機能変化は、評価対象種の成獣の健康および生存に明確な有害作用がない場合でも、ヒトへの潜在的影響の警告とみなすべきである。
- この種の予防原理に基づくと、まれな不可逆的異常プロセスは奇形（malformation）と分類することが望ましい。
- 成獣における胎児異常の影響に関する知識を向上させるために、生後影響をさらに検討するための補助研究が緊急に必要である。

（2）外表異常についての結論

- 大半の所見を奇形（malformation）と分類することに高い一致が得られた。
- 一部の「一致度が低い」所見はグレーゾーン（gray zone）とし、以下の基準に従ってそれらを奇形（malformation）または変異（variation）に分類する。
  - 重症度
  - 歴史対照データ
  - 孤立的発生率
  - 異常プロセスと関係があるかどうか決定が困難

  これらの所見について、変異（variation）の選択は適切な歴史対照データによって正当化する必要がある。
- 異常（anomaly）が直接的な異常プロセスの結果ではなく有害な作用が変異（variation）より強い場合の機能的変化について、「奇形以外」（分類せず）（Not Malformation（Unclassified））という新しいカテゴリーが提案された。

（3）内臓所見

- 内臓の奇形（malformation）および変異（variation）（少数の所見についてのみ）に関

する回答において高い一致度が得られた。

- 「一致度が低い」所見はグレーゾーン（gray zone）とし、以下の基準に従ってそれらを奇形（malformation）または変異（variation）に分類する。
  - 重症度
  - 歴史対照データ
  - 孤立的発生率
  - 異常プロセスと関係があるかどうか決定が困難

  これらの所見は主に異常な形状、位置、サイズまたは色に関係している。これらの所見について、「変異」（variation）のカテゴリーの選択は適切な歴史対照データによって正当化する必要がある。

  内蔵の機能的変化について、「奇形以外」（分類せず）（Not Malformation（Unclassified））という新しいカテゴリーが提案された。

4.3　農薬等の化学物質の食品健康影響評価を実施するために必要な催奇形性の評価に関する文献調査

4.3.1　事務局殿が収集した文献

事務局殿が収集した、3 章（2）で記述した 7 つの論文のうち、後半の 4 つの論文が該当する。以下のこれらの論文の概要を示す。

4.3.1.1　「発生毒性のリスク評価における発生神経毒性試験の必要性」[9]

4.3.1.1.1　序文

発達中の中枢神経系は、毒物に特に感受性が高いと考えられ、成人よりも低いレベルの暴露で神経毒性に至る機能的変化が現われるという証拠がある。

発生神経毒性研究の重要な動機づけは、エタノールの影響の発見であった。例えば、1970 年代中頃の胎児性アルコール症候群。過去 10 年間に、ヒトに対するそれ以外の神経毒性物質が同定されている。例えば、水俣におけるメチル水銀、ポリ塩化ビフェニル PCB、無機鉛。ヒトが職業上または民生で広く被曝するいくつかの化学物質、例えば、有機溶媒、いくつかの重金属、いくつかの環境ホルモンおよび殺虫剤が、動物において発生神経毒性を引き起こしたことが認められている。

発生神経毒物のいくつかは、構造的催奇形物質でもある、しかし構造的欠陥よりも行動機能障害の方がより深刻となり得る。研究者らは本研究で、ある条件下で、小児における神経行動機能障害が、先天性異常（エタノール）または先天性異常が全くない場合（PCB）よ

[9] Hass U, “The need for developmental neurotoxicity studies in risk assessment for developmental toxicity.”, Reproductive Toxicology 2006 Aug; **22**(2):148-56.

りも少ない用量で検出され得ることを実証する。

科学者らおよび一般市民は、数十年にわたって、環境中の化学物質や薬品の発生神経毒性の可能性に懸念を抱いてきた。この懸念は、ヒトにおいて認められる神経発達障害の比較的高い推定頻度（約 12%といわれる）、並びにヒトおよび動物における研究によって、発達中に化学物質に被曝すると発達中の神経系に有害な影響を与え得ることが実証されたことに基づいている。従って、環境上および産業関連の化学物質の発生神経毒性試験に関する法制化の必要性が、長年にわたって叫ばれてきた。

発生神経毒性を評価するために特に意図して策定された最初の指針が、米環境保護庁によって 1991 年に作成かつ施行され、後に改正されている。

経済協力開発機構（OECD）は、1995 年コペンハーゲンで開催された生殖および発生毒性に関する OECD ワーキンググループの提言に基づいて、発生神経毒性指針（TG426）の開発を開始した。1996 年の専門家会議（Expert Consultation Meeting）を受けて最初のドラフトが作成された。発生神経毒性試験の設計に当たり、US EPA の発生神経毒性指針を基礎にしつつ、そのドラフトでは、数多くの重要課題に取り組み、1996 年の専門家会議で提言された改善点を取り入れた。Draft TG426 が、1998 年に、コメントを求めるためにナショナルコーディネーターに配布され、そのコメントにおける重要な技術課題について、2003 年ワシントンの専門家会議で議論された。続いて、改正ドラフトが、見直しとコメントを求めるため、専門家に配布された。加盟国から提出されたコメントについて、2005 年東京の専門家会議で検討された。TG 426 DNT が、OECD 加盟国によって 2006 年以内に採択されることを期待したい。

この総括書の目的は、OECD が提案する発生神経毒性（DNT：developmental neurotoxicity ）試験指針（TG）開発の必要性と科学的背景、リスク評価のための DNT データの価値および化学物質の DNT 試験のための法的要求事項に真剣に取り組むことにある。

4.3.1.1.2　ヒトに発生する神経発達障害の頻度

神経発達障害、例えば、自閉症、失読症、注意欠陥過活動性障害、知能低下および精神遅滞は、米国内で毎年生まれる 4 百万人の小児の約 3-8%に影響を与えている。さらに、全米科学アカデミーは、米国の 18 歳未満の小児の 12%は 1 つ以上の精神障害を患っており、生後毒性物質の被ばくが、これらの障害に対する感受性を高くする危険因子の 1 つであると特定した。

神経発達障害罹患率の正確な数字を求めるのは、困難である。北欧諸国および米国の罹患率を表 4.3.1.1-1 に示した。

表 4.3.1.1-1　北欧諸国および米国の罹患率

Table 1
Estimated prevalences of neurodevelopmental disorders in children generally and in children born premature or with low birth weight

Neurodevelopmental effects	All children (%)	Premature or low birth weight[a] (%)	Reference
Brain damage (marked)	0.7	?	[17]
Brain damage (symptoms)	1.7	6.9	[18]
Learning disorders	5–10	?	[19,20]
Attention-deficit hyperactivity disorder (minimal brain dysfunction)	5 10	?	[20,21]
Motor retardation	5–8	20–25	[18,20]
Mental retardation		12	[18]
Mild (IQ 50–70)	1.5		[20]
Severe (IQ < 50)	0.5		[20]

[a] Premature, born before 37 weeks; low birth weight, birth weight less than 2500 g.

注意欠陥過活動性障害は、以前は微細脳機能障害と呼ばれていたが、最も一般的な行動症状の 1 つであり、小児の推定罹患率は 5-10%である。この障害は、過活動、集中力持続時間低下、学習困難、知覚障害および衝動性を特徴とする。この障害は、女性よりも男性に 5 倍多く見られる。その理由は不明であるが、出生時の未熟 CNS は男児に多いことが示唆されている。ほとんどの子供では、思春期に過活動は消失するが、集中力持続時間低下と情緒障害は消失しない。

未熟児（37 週未満）and/or 低出生体重（2500g 未満）においては、神経発達障害のリスクは一般的に増加している（表 4.3.1.1-1 参照）。また、発育遅延の症状を持つヒト幼児の 33-50%は、学習障害の可能性がある。

発達障害が小児の障害および機能障害に寄与する程度は、明確に確立されてはいない。原因因子として可能性があるのは、遺伝因子、神経生物学的因子、神経毒因子および心理社会的因子であろう。全米科学アカデミーの報告によれば、すべての主要な発達障害（神経障害に加えて、心臓やそれ以外の構造欠陥も含めて）の約 28%は、すべてまたは部分的に環境暴露に起因する。環境暴露が、広範囲の神経発達障害に寄与する程度は不明である。

4.3.1.1.3　ヒトおよび動物に現われる発生神経毒性

1950 年代の水俣湾におけるヒトにおけるメチル水銀中毒の悲劇は、一般的神経毒性およびメチル水銀が胎児に与える影響に関する動物研究につながった。その結果は、胎児（embryo/foetus）は、生育した動物よりも暴露に対する感受性が高く、暴露された動物はヒトに現われる障害と類似の障害を示した。

発生神経毒性研究を勇気づけるもう 1 つの出来事は、1970 年代中期のエタノールの影響に関する発見である。胎児性アルコール症候群の最も顕著な特徴は、ヒト幼児の過活動性、運動発達遅延および知能発育不全によって特徴づけられる行動機能障害および知的障害である。エタノールは、ヒトの知能発育不全を最も回避可能な原因であると主張する研究もある。

動物による実験的研究、発生毒性（低酸素症に付随して起こる出産時外傷のような一般的原因を除外して）の疫学的研究および臨床的証拠に基づいて、いくつかの化学物質が、発生

神経毒性物質の可能性ありまたは疑いありとして分類された。これらは、1990 年代に制定されたものだが。これらの化学物質は、表 4.3.1.1-2 に示した。

表 4.3.1.1-2　発生神経毒性物質の例

Table 2
Developmental neurotoxicants (examples)

Established	Probable	Suspected
Ethanol	Nicotine	Anxiolytics (e.g. diazepam)
Organic mercury	Narcotics (e.g. methadone, morphine and cocaine)	Antidepressants (e.g. imipramine)
Inorganic lead	Several hormones (e.g. steroids)	Anaesthetics (e.g. halothane and nitrous oxide)
PCBs		Aspirin (e.g. acetylsalicylic acid)
Several anticonvulsants		Neuroleptics (e.g. chlorpromazine)
Vitamin A		Thalidomide
		Heavy metals (e.g. cadmium and organotins)
		Insecticides
		Some industrial solvents

Modified from refs. [7–9].

「確定欄」の物質は、専門家による審査を受けた研究論文に発表された動物およびヒトにおける証拠があり、「可能性あり」欄の物質は、動物においては強力な証拠があるがヒトにおける証拠は乏しい。「疑いあり」欄の物質は、通常動物実験から発生毒性を示唆するのみである。それ以外の化学物質で、より最近のデータに基づいてほぼ確実に追加されるものがある。例えば、甲状腺機能に影響する環境ホルモン（外因性内分泌かく乱物質）である。甲状腺ホルモンは、出生前および後ともに、ヒトの脳の正常な発達に必須物質である。ラットの甲状腺機能を妨害する多数の環境化学物質が知られている。さらに、甲状腺ホルモン不足と脳発達の間の密接な関係が、実験動物（最初はラット）およびヒトで観察されている。

4.3.1.1.4　発生神経毒性調査の方法

（1）ヒトにおける研究

化学物質のヒトに及ぼす影響の究極の証拠はヒトのデータに依存するものであるから、関心の中心は、勿論ヒト発生神経毒性物質である。その研究は、ヒトの健康に与える化学物質の影響に関する証拠の重要な要素であるが、極めて制限が大きい。

先ず、疫学的研究への依存は、ヒトに関するデータは入手可能ということを意味する。つまり、現象が既にヒトに発生したことを示す。従って、このことは、胎児や小児の化学物質被ばくを防止する化学物質安全制度や規制制度がないことにつながる。さらに、市場における新化学物質について、そのようなデータは入手不可能である。

現実的に、疫学的研究は非常に広大で、前向き研究には数十年を要する。最も重要なのは、暴露状態が無作為割り当てになっていないので、これらの研究は実験計画法に基づくものではない。その結果、これらの研究は、種々の偏りを受けることになる（例えば、選択の偏り、交絡の偏り）。

ヒトに関する研究が一般的に有する倫理的および現実的問題に加えて、発生神経毒性はそ

れ自体が特有の問題に直面する。ヒトの行動は、全生涯を通じて成熟し、変化する。発達中に起こるまたは始まる行動障害は、出生時には明白には分からない、数年後にその特定の行動が成熟してから現われる、例えば、就学年齢における読書能力など。機能の通常の衰えが起こる老齢期にさえ、ある行動機能が急速な衰えを見せることもある。例えば、それ以外の点では健康的な高齢者における原因不明の早期の記憶障害が、発生効果に起因していることがある。

発達過程での被ばくの疑いとそのずっと後の行動欠陥の診断との間の因果関係を確立する仕事は、その期間の間に起こる膨大な出来事のために非常に困難である。また、個々のケースそれぞれがまれなものであり、個々の化学物質の被ばくの頻度はたまにあるだけである。上記のとおり、疫学的研究によって、特定の部門、職場または化学物質のあるグループに関する情報は得られるが、決して特定の化学物質に関する情報ではない。

上記の理由から、動物実験による化学物質の発生神経毒性に関するデータに対する強い必要性がある。動物実験によれば、ヒトの場合に比べて、適切な管理が容易に確立でき、暴露がはっきり定義でき、かつ動物の寿命はずっと短い。

（２）動物による研究

発生毒性は、生殖毒性の試験と評価に関する OECD ドラフト指針書で以下のとおり定義されている。

「出生の前または後に、受胎産物の正常な発達を妨げるあらゆる効果であり、かつ受胎前の親のどちらかの被ばくまたは胎児が性的成熟に至るまでの発達中に、発生中の子の被ばく若しくは出生後の被ばくに起因するもの。これらの効果は、その生物の生涯のいかなる時点においても明示することができるものである。発生毒性の主要な明示は、発生中の個体の死亡、成長の変化および機能的欠陥を含む。」。

発生中に誘発される効果の評価を含む数多くの OECD 試験指針が作成されている（表 4.3.1.1-3 参照）。これらには以下のものがある、出生前の発生毒性研究（TG414）、一世代生殖毒性研究（TG415）、二世代生殖毒性研究（TG416）、生殖/発生毒性スクリーニング試験（TG421 and TG422）、発生神経毒性研究の提案（draft TG426）。これらの試験指針の中で、発生神経毒性試験のみが、神経系が発生中の出生前および出生後の重要な時期に受ける被ばくに起因し得る有害な機能的影響を、修正なしに適正にスクリーンすることができる。しかし、発生神経毒性（DNT）試験は、そうでなければ離乳時に捨てられるかもしれない子を用いた二世代研究への付加物として含まれ得るものである。この手法は、実験動物の数が減少している場合に用いられる。

発生神経毒性試験は、神経系の発達および機能に出生前および出生後の被ばくが与える機能有害影響の可能性を調査する特殊なタイプの発生毒性試験である。OECD DNT 指針において提案されている検体は、妊娠中および授乳中の動物（典型的にはラット）に行われる。雌親は、妊娠中および授乳中の母親における影響を評価するため並びに母親の子に対する毒

性学的一般的行動に関する情報を得るために試験される。子孫集団は、ランダムに対照から選択され、同腹の子を、出生後の発育中および成体期間中の全体的な神経的異常および行動異常を評価するために提供される。これらは、身体の発育、初期行動発達、運動活性、運動機能、感覚機能、学習、記憶、脳重量の死後評価および神経病理学を含む。行動のエンドポイントは、出生後の発育中および成体期間中の各年齢において評価される（表 4.3.1.1-4 参照）。

表 4.3.1.1-3　OECD 試験指針における発生毒性のエンドポイント

Table 3
Developmental toxicity endpoints in OECD Test Guidelines for reproductive toxicity testing and possibility for assessment of developmental neurotoxicity (DNT)

Test	Exposure period	Endpoints in offspring	DNT testing?
TG 414: pre-natal developmental study	From implantation to the day before birth	Structural abnormalities, death and altered growth in the foetus	Not possible as the offspring are killed the day before birth
TG 415: one-generation study TG 416:two-generation study	From 10 weeks before mating until weaning of first or second generation offspring	Growth, development and viability; TG 416: sexual maturation, fertility, oestrus cyclist, sperm quality and histopathology of sex organs and target organs	Possible and recommended in the TG 416 if relevant
Reproduction/developmental toxicity screening tests, TG 421 and 422	From 2 weeks prior to mating until day 3 post-natally	Foetal and pup growth and survival until day 3	Possible with an extension of the exposure and observation period, but limited group size leads to very low sensitivity
Developmental neurotoxicity study, TG 426 (proposal)	During pregnancy and lactation	Physical and functional maturation, behavioural effects, brain weights and neuropathology	Yes

表 4.3.1.1-4　OECDTG426 発生神経毒性研究における行動のエンドポイント

Table 4
Behavioural endpoints at different age periods in the draft OECD TG 426 developmental neurotoxicity study (OECD 1999)

Age periods endpoints	Pre-weaning before PND 21	Adolescence PND 21–35	Young adults PND 60–75
Motor activity (including habituation)	Once	Once	Once
Motor and sensory function	–	Once	Once
Learning and memory	–	Once	Once

PND, post-natal day.

4.3.1.1.5　DNT 指針開発の科学的背景

DNT 試験の設計は、長年の共同研究と法的考察の成果である。そのプロセスへの参加者には、各種専門家、例えば、神経毒性科学、発生毒性科学、数多くのそれ以外の専門分野の専門家、多様な観点（学究的世界、産業界、政府、非政府組織（NGO）、一般市民）の代表者が含まれていた。DNT 指針開発の歴史にとりわけ重要な影響を与えたのは、行動先天異常学共同研究（CBTS）並びにヒトおよび動物の発生神経毒性の定性的および定量的比較可能性に関する US EPA 学会である。

（1）DNT エンドポイントの感度および信頼性

初期の発生神経毒性研究で開発されたさまざまの試験手順は、研究室間の広範囲の取り組みである行動先天異常学共同研究（CBTS）による検証を受けた。CBTS には、6 研究所が

関与して、発生神経毒性を持つ既知の 2 物質への暴露の影響を調査するための標準化された行動テストバッテリーを使用した。つまり、メチル水銀とアンフェタミンである。CBTS の研究結果によって、慎重に標準化された手順は、研究所間の行動反応のパターンの再現性を保証することが実証された。また、CBTS は、行動試験の感度の推定に関して貴重なデータをもたらした。動物 16 匹のグループにおいて、検出係数は以下のとおりであった。与えられたアルファ（0.05）を用いて有意の変化を検出するのに必要な変化率は、聴覚性驚愕馴化に対して 7-23%、オペラント条件付け手法に対して 2-26%、複合水迷路手順に対して 13-20%であった。これらの結果は、生きている動物に関する行動評価は、標準化された条件下で実施したものはどれも、他の科学的評価と同等に正確であるということを示している。

神経行動スクリーニング方法論（DNT 試験および成体神経毒性試験に用いられる）に関する試験所間の評価は、国際化学物質安全性計画（International Programme on Chemical Safety （IPCS））で始められた。合計 8 試験所がその試験に参加した。その試験では、以下のメス成体ラットの神経毒性陽性化学物質を用いた（トリエチル・スズ、アクリル･アミド、パラチオン、p,p'-DDT、 トルエン、 N,N'-メチレン 2-アクリルアミド及び酢酸鉛）。

（３）種横断的妥当性の予測

種横断的妥当性とは、動物種で実施した試験がヒトの神経毒性をどれだけ正確に予測するかということを意味する。これらの予測は非常に重要であるが、良いデータがいつも得られるとは限らない。なぜなら、動物試験でスクリーニングがうまく行われていても、ヒトの被ばくは非常に限られているからである。

1989 年、US EPA は「ヒトと動物の発生神経毒性の定性的かつ定量的同等性」と題してワークショップを開催した。その目的は、科学的データを DNT 協定に追加し、リスク評価に使用する妥当性を評価することであった。政府、産業界、一般関係者および学究界から参加した専門家が、何種類かの薬物（大麻、コカイン、メサドン及びフェンシクリジン） 乱用、メチル水銀、鎮痙性のフェニトイン、鉛、エタノール、ポリ塩化ビフェニール及びイオン化した放射線に関するデータを再検討した。そこで、ヒトと動物実験データ間の定性的かつ定量的同等性の程度が評価された。定性的比較のために、以下の機能が評価された：運動発達および運動機能、認知機能、自主的行動/自己喚起行動、感覚機能および社会的行動。

そのワークショップの主要な結論は、DNT 協定はそのワークショップに提示された各物質を発生神経毒性物質の可能性ありとして確認した。

種横断的同等性に関して数多くの制限が確認されたが、同等性の程度は注目に値するものであった。例えば、成長中のヒト、マカク（猿）およびげっ歯類のメチル水銀被ばくの影響は、種横断的一貫性のある行動エンドポイントおよび神経病理学的エンドポイントに対して、明らかな用量応答関係を示した。影響は、脳組織濃度によって定義されている以下の用量にわたって調査された：低濃度（<3ppm）、中濃度（3-11ppm）、高濃度（12-20ppm）。行動には以下のとおり用量依存の影響が現われた：低濃度で認知障害または発育遅延、中濃度で

認知および感覚における電気生理学的効果、高濃度で重度の感覚、認知および運動における異常と発作。

エンドポイントと用量の関係に基づいて、この時点で決定的な定量的比較をすることはできないと考えられたが、議論の対象になった化学物質のいくつかについては、認知機能が最も影響を受けやすい区分に入ると考えられた。

投与された用量の比較によって、種間に広範囲の差異が見られた。一方、用量の内部測定（例：血液や脳内濃度）を用いた比較は、顕著な相互関係を示した：(一般的に、1 ないし 2 倍の差)。しかし、用量依存データは、多くの場合（特にヒトの場合）限られたものであった。

このワークショップにおける研究結果は、以下の仮説を強く支持する。つまり、発生毒性の他のエンドポイントに関しては、発生神経毒性の動物試験における影響が化学物質はヒトの発育に影響する可能性があるということを示している。

4.3.1.1.6　発生神経毒性試験のデータをヒトのリスク評価に使用する

（1）ヒトおよび実験動物における中枢神経系の発育

もしも動物における影響を、ヒトにとっての重要性の観点から解釈するなら、脳発育の種間の相違に関する知識を用いなければならない。ヒトとラットの神経系の発育の要旨を表 4.3.1.1-5 に示す。ここには、主要な発育過程だけであり、完全なものは示されていない。示されているのはおよその時間であり、ラットについて±半日以下、ヒトについて±半週以下の変動を考慮する必要があると考えられる。

表 4.3.1.1-5　ヒトとラットの神経系の正常な発育における主要なイベント

Table 5
Some major event in the normal development of the nervous system in human and rat

	Human	Rat
The neural plate appears	3 week pc	Day 8–9 pc
The neural crest is formed	3.5 week pc	Day 9–10 pc
Three brain vesicles present	3.5 week pc	Day 10–11 pc
Closure of neurophores	3.5–4 week pc	Day 11–12 pc
Cerebral hemispheres present	4.5 week pc	Day 12–13 pc
Cerebellum	5 week pc	Day 13–14 pc
Brain growth spurt period	6 months pc–18 months pn	Day 0–30 pn
Cessation of cell proliferation in whole brains	6–8 months pn	Day 17–20 pn

Based on refs. [41–44]; pc, post coitus; pn, postnatally.

一般に、新生ラットの脳発育は、妊娠第 2 期末期のヒト胎児のそれに相当し、一方、生後 6-10 日のラットは、ヒトの 0 歳終了時に相当する。従って、妊娠第 3 週期間のラットの脳の中で起こっている発育は、妊娠第 3 期のヒト胎児のそれとは同じではない。ヒトの妊

娠後期（つまり第 3 期）に起こる成熟過程は、ラットの出生後第 1 週のそれに相当する。出生前後の脳発育タイミングに上記の差異があるので、ラットとヒトの被ばくは、同じ発育時間枠中では違いがあることを考慮する必要がある。例えば、第 3 期ヒト胎児の被ばくは経胎盤であり、ラット幼児の被ばくは間接的に母乳経由である。これらの相違は、識別および発育中の脳に達する試験物質の量に影響を与える。げっ歯類とヒトでは、発育に関して出生のタイミングの違いがあるが､脳発育中に起こる出来事の順序は同じであることを念頭に置くことは重要である。

（2）投与の量

実験において投与する量は、ヒトが被ばくするであろう量よりも、通常多い。それは種々の理由による。

先ず、1 グループ当たりの動物の数が限られているので、疫学的研究に比べて試験感度に限度がある。第 2 に、ヒトの被ばく期間は長期にわたるであろうと考えられるが、実験動物の場合はるかに短期間である。第 3 に、ヒトは、実験動物よりもずっと感受性が高いと考えられる。リスク評価過程は通常、適正な安全係数の必要性だけでなく、多量の投与は少量の投与と違った作用をする可能性（例えば飽和速度のために）を考慮する必要がある。

（3）リスク評価に DNT 試験の指針を使用する

ほとんどの DNT 試験の指針が、規制影響を継続的に分析している US EPA 農薬プログラム部に提出されている。9 件の殺虫剤および 3 件の溶媒の発生神経毒性試験 12 件の検討が 1998 年に提出された。殺虫剤 9 件のうち 8 件は、胎児発生神経毒性試験により、発生神経毒性の影響が観察されないレベル（NOEL）は胎児 NOEL より低く、かつ残りの 1 件に相当するものであった。発生神経毒性試験の子 NOEL は、殺虫剤 9 件のうち 6 件の生殖試験の子 NOEL よりも低く、かつそれに相当するものであった。重要なことは、殺虫剤 9 件のうち 2 件について、発生神経毒性の NOEL が、胎児発生、生殖または神経毒性試験で得られたどの成体または子エンドポイントより低いか等しいことである。当時得られた数少ない規制 DNT 試験に制限されていたが、試験結果は以下のことを反映している。つまり、DNT 協定は、他のいかなる標準毒性試験協定においても調査されない独自のエンドポイントを有している。

1998 年以来、US EPA に提出される規制 DNT 試験の数が約 70 件に増加しており、これらの試験は EPA 指針または OECD TG426 で提案された方法に基づいている。リスク評価におけるこれらの試験方法の使用に関する公式の統計はまだ発表されていない。しかし、リスク評価における DNT 試験の使用に関する予備的調査が 2004 年に実施された。毒物学データベースの証拠の重み再調査で、DNT 試験が検討されていた殺虫剤 19 件のうち 5 件について DNT 試験が実施された（私信 2004 年 Makris）。ここで決定的な意味を持つ事実は、これらの DNT 試験 5 件の内 4 件について、行動評価と神経病理学的評価に関する重大

な影響が検出されたが、他の試験方法ではこれを検出できなかったことである。

危険有害性物質の特定に対する子の神経行動試験の貢献度を評価するために、1990 年以降、米国、ヨーロッパおよび日本の産業研究所で実施された 174 試験の調査が実施された。化学物質の内訳は、調合薬（81%）、農薬（7%）、工業用化学薬品（1%）、不明（10%）であった。試験全体を通じて、行動パラメーターの評価は多数発見されることはなく、従ってその影響も少なかった。しかし、他の発生パラメーターと同伴の行動パラメーター、特に離乳前体重、が 113 件中 17 件（15%）において影響が観察されないレベル（NOEL）が定義された。また、行動的影響が単独で NOEL を定義したのは 3/113（2.6%）であった。このことは以下のことを示している。つまり、毒性がもっと高い投与レベルで定義されたであろう、またはこれらのパラメーターの存在がなければ完全に見過ごされたであろうということである。行動パラメーターは、測定するや否や毒性作用を検出するということはないが、例：離乳前体重、毒性の他の標準的試験方法によって提供されない発達中の子の特殊機能に与える影響に関する情報を提供した。このように子の神経行動学的評価を取り込むことが、神経が発達中に化学物質に被ばくすることによる神経行動毒性を検出することに対する独特の貢献をすると共に、リスク評価プロセスに価値を高めた。

1998 年の再調査、2004 年以降の予備的調査および 2003 年の調査の結果は一貫して、神経発達有害影響を特定するための DNT 試験の必要性およびヒトの健康リスク評価のための DNT データの重要性を実証している。

4.3.1.1.7　化学物質の DNT 試験規制上の要件

現在、殺虫剤または環境化学物質の登録および使用に先立って試験しなければならないという一般的要求事項は存在しない。その代わり、EU および US における試験戦略は、試験が望ましい場合は、測定のための証拠の重さ手法に頼っている。

最近 US EPA は、多数の神経毒性殺虫剤の発生毒性試験を実施するよう登録者に要求した。

EU では、食品科学委員会（Scientific Committee for Food (SCF)）が、いつ発生神経毒性試験が必要になるかを決定するための基準を設けるために、適切な専門家がこの課題に取り組むよう提言した。

改訂リスク評価のための技術指針文書（Technical Guidance Document for Risk Assessment (EU-TGD)）は 2001 年に、新規および既存の物質および殺生物剤のための試験戦略に OECD draft TG426 を含めた。新物質、既存物質および殺生物剤のための生殖毒性試験に対するデータ重要要件は、一般的に以下に基づいて確認される：二世代試験（OECD TG416）および二生物種胎児発生毒性試験（OECD TG414）。しかし、これらのデータ重要要件を以下のように修正することが可能である：軽減試験、加速試験および拡張試験。発生神経毒性試験の必要性を決定する場合、証拠の重さ手法を用いる必要がある。入手可能なあらゆる毒性試験データおよびヒト被ばく可能性の情報を検討しなければならない。

発生神経毒性試験は、他の試験で観察された神経学的影響をさらに明らかにするために実施されなければならない、そしてもしも他の試験でその物質が CNS の神経毒性または構造的異常を引き起こすことが示されるかまたは神経伝達経路若しくは神経内分泌経路（甲状腺ホルモン、下垂体ホルモン、循環性ホルモン）を CNS レベルで阻害することが疑われるなら、発生神経毒性試験は実施されなければならない。

発生毒性試験の上記 EU-TGD の基準または誘因は、US で使用されているものに類似しており、これらの基準が十分か否か、US EPA の経験に基づいて問題を投げかけられている。

誘因を見ると、毒性情報の必要性は明らかである。例えば、成体神経毒性に関する情報は、反復投与毒性試験に由来するものであろう。しかし、成体の特異な神経毒性試験は、ある限られた範囲内でおよびある化学物質についてのみ実施されることになる。従って、このことに関してはここで言及の限りではない。

CNS の構造的異常に関する関連データは、胎児発生毒性試験によってのみ入手できる。この試験は、EU-TGD のデータ重要要件の一部であるが、二世代試験が最初の生殖試験として推奨されている。また、発生神経毒性試験を二世代試験に追加として実施することが推奨される、この時、そうでなければ離乳時に廃棄される子を使用するのがよい、そうすればさらなる動物グループを使用しなくてもよいから。従って、発生神経毒性評価を取り込む必要性は、二世代試験の計画段階で検討されなければならない、つまり、胎児発生毒性試験が実施される前の段階に検討すること。従って、発生神経毒性試験を誘発するのに必要な関連データは入手できないこともある。

ある有機溶媒の神経行動先天異常試験によって、低出生体重および機能障害が同じ化学物質によって同じ投与レベルで発生し得ることが実証された。ヒトの場合、低出生体重（<2500g）は、神経発生障害のリスク増加の指標である（表 4.3.1.1-1 参照）。実証研究においても、低出生体重それ自体を、生命の後期に出現するかもしれない機能不全の重要指標として（つまり、DNT 実施の引き金として）見なさなければならないか否かを検討することは重要である。

多数の化学物質が、発生神経毒性試験の既存基準を恐らく満足すると考えられるので、それらの化学物質の発生神経毒性試験はリスク評価の基本の改善を招くことを期待したい。しかし、多くの化学物質からなるデータセットには限界があるということは、発生神経毒性物質かもしれない化学物質の全てを試験するには、誘因の枠組みは不十分である可能性を示している。

最近提案された EU の化学物質規制 REACH（Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals）は、その目的の 1 つは健康の高水準保護を確実にすることと述べている。トンレベルで製造または輸入される化学物質に対して、適合のための情報標準要件および一定のルール（つまりデータ要件と試験戦略）が与えられている。生殖毒性に対する情報要件は、トンレベルおよび試験誘引に応じて、生殖・発生毒性スクリーニング試

験（TG421/422）、胎児発生毒性試験（TG414）and/or 二世代生殖毒性試験（TG416）のデータを含めるか否かである。しかし、現在は、発生神経毒性試験（draft TG426）も DNT エンドポイントを二世代試験に取り込み考慮の妥当性のいずれも含まれていない。従って、REACH が提案する健康の高水準保護の目的は、発達中の脳を全く考慮していない。

できれば、REACH 提案を、発生神経毒性試験を含むように修正できるように、そして提案されている OECD DNT 指針（TG426）を 2006 年中に OECD 加盟国が採用することによって、そのプロセスが進展することを期待したい。

4.3.1.1.8　総括と結論

小児における神経発達障害の推定頻度は比較的高く、約 12%といわれている。発達中の中枢神経系は毒物に特に感受性が高い。過去数十年の間に、発生神経毒性物質のいくつかはヒトで特定されている、例えば、胎児性アルコール症候群におけるエタノール、水俣中毒のメチル水銀、ヒダントイン、PCB および無機鉛。各種の調査によって、ある特定の状況下で、小児の神経行動機能障害が、先天性異常よりも低い投与で、または先天性異常が全く存在せずに発見され得る。いくつかの化学物質は動物に認められた発生神経毒性物質であり、それらは広範囲に及ぶ職業上または消費者被ばくを招いている。

ヒトと実験データ間の定性的かつ定量的同一性の程度は、鉛、メチル水銀、選択された乱用薬剤、フェニトイン、PCB、エタノールおよび電離放射線について評価されている、そして種横断的同等性に数多くの制限が確認されているが、同一性の程度は顕著である。このことは、発生毒性の他のエンドポイントに関しては、動物実験で認められた発生神経毒性がヒトの発達にも影響する可能性があるという仮説を支持している。

生殖毒性化学物質の試験に関する指針、OECD 試験指針計画（OECD Test Guideline Program）は以下の通りである：胎児生殖毒性試験（TG414）、一世代試験（TG415）、二世代試験（TG416）および生殖毒性体内スクリーニング試験（TG421 および 422）。これらの指針はどれも発生神経毒性のための試験を含んでいない。提案されている OECD 発生神経毒性試験（TG426）は独立した試験として使用することが可能であり、そのエンドポイントは、例えば二世代試験に含まれ得る。この指針は、試験物質の発生神経毒性の可能性を評価するために調査される必要のあるヒトの神経系の発達に関連する動領域あるいは形態学的エンドポイントの概要を示している。さらに、この指針は、発生神経毒性学に関して利用可能な最善の科学を示しており、そこで得られるデータはリスク評価に関連しており信頼できるものである。多数の独立した専門家による科学的評価がこの結論を支持している。

OECD 発生神経毒性指針は予定どおり 2006 年内に採択される。できれば、DNT が新しい EU の化学物質規制 REACH の規制要件に取り込まれることを期待したい。現在のところ、DNT 試験は REACH に組み込まれておらず、感受性が高い発達中の脳を保護するために DNT 試験の必要性を認める動きが高まっている。

4.3.1.2 「環境化学物質の生殖発生毒性試験における重要留意事項」[10]

4.3.1.2.1 序文

環境化学物質の毒性試験過程は種々のガイドライン（OECD （経済協力開発機構）、OPPTS（汚染防止農薬有害物質局）その他）の枠組みによって規制されている。これらの指針は医薬品の治験にも適用される多くの方法的側面を持つと同時に、環境化学物質と医薬品のリスク評価の過程には相違点が存在する。これら相違点はこれら２種の化合物それぞれの特異性に由来する面もある。というのは、医薬品は人間に対し意図的に既知の用量が投与されるのに対し、環境化学物質は普遍的に存在し、曝露用量と曝露人口を管理することがはるかに難しいためである。このことは化学物質においては、曝露濃度および対象となる人口といった点での不確定性がはるかに高いことを意味している。本論文は、環境化学物質の生物学的試験の過程を、考え得る表示法といった点に至るまで記述すると共に、これら試験の一連の過程での留意事項に的を絞って記述する。既出あるいは草稿段階の資料で、この分野に関連しインターネットで閲覧可能なものについても概観したい。

4.3.1.2.2 環境化学物質試験—現在の状況

化学物質の試験と登録は連邦法によって管理されている。行われる試験の規模は生産トン数（年間生産量もしくは登録以来の総計）によって決まり、急性毒性試験から発がん性試験といった幅広い範囲に渡る試験が行われる。これらの試験の内で、以下に述べるガイドライン、および草案段階のガイドラインが潜在的発生生殖毒性の評価試験において特に重要である。（ここでは OECD の例を用いているが、US EPA （米国環境保護局）といった他の機関による同様なガイドラインが存在する。）

- 出生前発生毒性試験(OECD 414, 2001)
- 一世代生殖毒性試験(OECD 415, 1983)
- 二世代生殖毒性試験(OECD 416, 2001)
- 生殖・発生毒性スクリーニング検査(OECD 421, 1995)
- 生殖・発生毒性スクリーニング検査を伴う反復投与毒性併合試験（OECD 422, 1996)
- 発生神経毒性試験(OECD 案)

これらの研究から無影響量（NOEL）が決定される。その後、これらの動物試験の結果はヒトへの影響を推定するために用いられる。この過程で安全因子が適用されるが、その値は通常 100 、つまりヒトに通常いかなる有害影響を与えないとされる用量（一日摂取許容量値）の百分の一とされる。この 100 という値は、種間での差異を 10、種内での差異を 10

[10] Buschmann J., “Critical aspects in reproductive and developmental toxicity testing of environmental chemicals.”, Reproductive Toxicology 2006 Aug; **22**(2):157-63.

として数値化仮定すれば安全因子として一般的な初期設定値であるが、双方向への偏差が発生することがある。

これらの定量的な考慮に加え、生殖毒性の場合には、化学物質は 1993 年３月２７日付 93/21/EEG ガイドライン付表 IV に従い分類、表示される。この複合構造の中で、２種のエンドポイントは独立に考慮される。それは、

・ 生殖機能障害因子（R_F）
・ 発生毒性の原因因子（R_D）

である。

分類と表示の目的、および現在までの知見を鑑みて化学物質は３つのカテゴリーに分類される。ある化学物質が無分類であるという選択肢も存在する。

・カテゴリー１
　○ ヒトの生殖機能を害することが知られている化学物質
　○ ヒトで発生毒性を引き起こすことが知られている化学物質
・ カテゴリー２
　○ あたかもヒトの生殖機能を害すると見なされるべき化学物質
　○ あたかもヒトで発生毒性を引き起こすと見なされるべき化学物質
・ カテゴリー３
　○ ヒトの生殖機能に対する懸念を引き起こす化学物質
　○ ヒトにおける発生毒性影響の懸念を引き起こす化学物質
・ 無分類

結果として、カテゴリー１（RF1、RD1）には、ヒトへの生殖毒性ポテンシャルが証明されている化学物質が含まれる。高品質の動物試験で明らかな影響が示されている化学物質はカテゴリー２（RF2、RD2）とし、「あたかも生殖毒性ポテンシャルが証明されるであろう」化学物質として扱われる。カテゴリー３（RF3、RD3）は懸念を喚起する、例えば、動物試験での曖昧な結果から懸念が喚起される化学物質を含める。これまでのデータから生殖毒性ポテンシャルが無いことが示される物質、もしくはデータが無いものなどは無分類とされることがある。

この分類段階は全ての過程の中で最も難しい作業である。というのは「灰色の」データも白黒に分類されなければならないため、そこから問題が生じることがあるからである。

化学物質を上記のカテゴリーに分類した後、これらは以下のリスク警句（risk phrase）で表示されねばならない。

・ カテゴリー１と２
　○ R60　生殖機能を害する恐れがある。

○ R61　胎児に有害である恐れがある。

・ カテゴリー３

○ R62　生殖機能を害するリスクの可能性がある。

○ R63　胎児に有害であるリスクの可能性がある。

これに関連してガイドライン試験タイプが存在しないもう一つのリスク警句がある。つまり、

○ R64　母乳で育てられた乳児に有害である恐れがある。

というリスク警句である。

表示は特定の化合物、あるいはこの化合物を含む混合物の販売、使用に大きな影響を及ぼす。

無分類化学物質にはリスクが無いことを証明する情報が充分にあるものと、情報が得られないものの２種が含まれるという点を除けば、これらの過程は全体を通して論理的である。しかし、実験デザインとデータの評価過程の双方に、いくつかの重要な留意事項が存在する。これらの事項に含まれるものとしては、それが全てではないが、ライフステージの考慮、幼若動物での研究、ADME （吸収、分布、代謝、排泄）試験の役割、母体／父体毒性のデータの考慮、生殖機能試験のデザインとエンドポイント、発達指標（developmental milestone）の使用と解釈、試験デザイン（特殊試験（special studies）対 個別試験(one-study design)）、経胎盤発がん性と早期老化の研究、試験へのトリガーの使用、新規および／あるいは追加エンドポイントの採用、データ評価におけるリスクと potency の考慮などである。

4.3.1.2.3　重要留意事項

（１）実験的試験における重要留意事項

１－１）ライフステージの考慮

ライフステージ毒性試験の目標は、様々な生殖周期、つまり受胎前、胎生期、新生児期、離乳期前、並びに若年成人期、老年期に特異的に発生する潜在的有害影響の評価である。つまり、毒性試験においてライフステージを考慮することの目的は、現在の試験方法では評価が適当ではないライフステージがもしあるとすればそれを見いだすこと、および特定のライフステージでは化学物質の影響に対して感受性が比較的高いという証拠を検討することである。これらの仮定に基づいて、環境保健科学研究所（HESI）からライフステージ白書(Life Stages White Paper）案が最近発表された。第２節に要約されている既存のガイドラインを考慮すると、二世代生殖毒性試験が全てのライフステージを取り上げていることから、全ての（初期）ライフステージには最低一つのガイドラインが提示されていることになると

思われる。しかし、初期の曝露が生活史後期に及ぼす「潜在的」影響についての研究が限られていることが大きな欠点ではある（後述「経胎盤発がん性／早期老化」を参照されたい）。この白書の著者は段階的ライフステージ法（life stages tiered approach）と F1 世代拡張（F1-extended）一世代生殖毒性試験の導入を提唱している。この試験は、異常を検出するために F1 世代のより大きなサブセット（一腹雌雄各３匹）を使用し、包括的な種類のエンドポイントを含むことになるであろう。

１－２）幼若動物での研究

この問題は上述の考慮点の直接的結果として持ち出されるものである。現在主として薬剤治験において、成体生物と比較した場合の幼若生物の感受性についての情報が集められている。幼若生物は単純に「小さい成体生物」とみなすべきではないことは一般的に同意されている。現在米国食品医薬品局（FDA）は、小児科用医薬品の非臨床的安全性評価についての手引を公表している。それに加え、様々な動物種における種々の器官発生に言及している総説も見ることができる。ここから、個体発生は様々な動物種および種々の器官系の間での相違を伴う異時的（heterochronous）過程であることが結論できる。この問題は、例えば示唆される結果を幼児に拡大適用するというように主として医薬品試験に関連しているのだが、化学物質の場合には特殊試験が個別的に望ましいとわかる場合もある。この場合には個体発生過程においての生物学的相違点にも留意することが重要である。結果として標的器官によっては特殊試験を設定する必要がある。次節でその一例について述べる（「ADME 試験」）。

１－３）ADME 試験

ADME（吸収、分布、代謝、排泄）試験は、特定の化合物の作用機構についての情報、およびそのリスクについての重要な情報源である。発生毒性試験との関連で２つの特に重要な問題が挙げられる。ある化合物が胎盤関門を通過するか（そして出生前毒性試験の標的としての胚／胎仔に到達するか）という知見は、このような試験の計画と解釈に非常に重要である。更に、様々な動物種で発生の過程は異時的であることから、出産はこれら異種間で同じライフステージで起こるものではない。この領域での良い例は、齧歯類脳とヒト脳の発生においての「発育急進期（brain growth spurt）」の相違点である。ヒトではこの期間は主として出生前段階に位置しているが、齧歯類では出生後に位置づけられる。この時期は特に重要であることを考慮すると、化合物が胎盤関門を通過するが母乳を通じて摂取されない事例では、投与法における「ギャップ」に行き当たることもあるのである。この例では、モデル動物の重要時期に化合物の投与が有効ではなくなる一方、ヒトでは有効である、といったことが起こりうる。それゆえに、この化合物が胎盤関門を通過することを示すだけでなく、授乳を通じて仔がその化合物を摂取することを確認することは重要である。これに当てはまらない事例でも、仔への直接曝露が考慮されるべきである。我々の研究（未発表）では、分娩後７日から強制経口で、または分娩後１０日からは１日１時間の nose only 吸入により仔

に薬剤投与することが容易に可能であった。これらの手法は仔の体重増加には全く影響せず、その適当性がわかる。

１－４）生殖機能試験

胚・胎仔での検査および、出生前・出生後影響の検査と共に、生殖機能試験が日米ＥＵ医薬品規制調和国際会議（ICH）のガイドライン中三節の一つで特記されている医薬品試験とは対照的に、化学物質試験には特に生殖機能試験が存在しない。これらの検査は一世代あるいは二世代生殖毒性試験の一部として行われる。Ulbrich と Palmer および Takayama 他による論文に基づき、上記の ICH ガイドラインは、最も感度の高い生殖機能障害の指標は生殖腺組織の組織学的検査（精細管上皮細胞の発生段階分類）であると結論づけている。更に Sakai 他の論文に基づき、検査における最も高感度なエンドポイントを用いれば、後尾前の雄（並びに雌）への投与は２週間で充分であると結論している。これを化学物質試験にも応用し、Ｐ世代での投与期間を２週間に短縮できるのではないだろうか（少なくとも次世代の曝露によって全ての精子形成周期を試験したことになる二世代生殖毒性試験では）。このことは化学物質に対しての総説でも支持されており、それによると最も感度の高いパラメーターは、精巣の詳細な組織病理、精子の運動能力並びに精巣、副睾丸、前立腺、精嚢の組織重量の検査であった。

１－５）発達指標（developmental milestones）

ICH ガイドライン S5A : 医薬品の生殖毒性の検出は、「離乳期前発達の最も良い指標は体重であり、耳介の開展、体毛の成長、切歯萌出その他の発達段階への到達は仔の体重と高く相関している」としている。そこからは、通常の一世代および二世代生殖毒性試験の大半では、仔の体重の測定、そして周到な観察、を行えば充分であると結論できる。しかしながら逆に考えると、仔の体重増加はデータの評価過程においてそれなりの重みのある証明とならなければならない。つまり、もし主たるエンドポイントを体重だけにしてしまうと、観察される影響が、「体重への（一時的な）影響に過ぎない」と論じることに意味がなくなるからである。

１－６）特殊試験（special studies）と 個別試験（one-study design）

「ライフステージの考慮」で述べたように、２世代試験は F1 の受胎から F2 の出生まで、少なくとも一世代の生殖周期全体に渡り行われる。結果的に、倫理的および経済的理由から、この試験タイプではできるだけ多くのエンドポイントを調べるべきである。しかしながら、現在行われている二世代生殖毒性試験は既にロジスティックの面で非常に複雑化しており、既存の「広範囲に渡る（broad based)」への「新規の」エンドポイントの追加は、試験遂行の現実性の面から試験全体の有効性を損なう危険をはらんでいる。加えて、現在の形での二世代生殖毒性試験は良好な“apical test”であり、それがゆえにこの試験法は更なる数々の

特殊試験への契機を生み出すことができるのである。ではあるがこれら更なる特殊なエンドポイントは、個別にデザインされたオーダーメイド・アドオン試験を多くの場合必要とするであろう。

１－７）経胎盤発がん性／早期老化

「ライフステージの考慮」で指摘したように、関連試験ガイドラインは全ての初期ライフステージを対象に含んでいるが、通常性成熟期が最後の段階となっている。一方で、慢性毒性試験および／あるいは発がん性試験などを例として、動物の加齢を通じて試験が行われる場合もあるが、これらの試験では動物への投与は離乳期より後に開始される。結果的に化学物質の登録の過程で全ての関連ライフステージは検査の対象となるが、実際には単一の試験で全てのライフステージを検査することはないのである。二世代生殖毒性試験が重要時期の大半を対象としている試験タイプであることは明白であるが、この試験タイプではごく一部の動物（一腹雄雌各一匹であることも多い）が離乳期後のさらなる検査のため選別使用されるのみである。残りの動物は離乳時に人道的に処分される。これら余剰動物に発がん性試験を適用することを考えても良いのではないだろうか。このような試験手法の明らかな利点として、経胎盤性発がん性、出生前・出生後曝露後による早期老化等に関する既存の情報のギャップを解消すると共に、いかなる高度な個別試験に比べてもロジスティックスの面でより容易であることが挙げられる（「特殊試験（special studies）と 個別試験（one-study design)」を参照されたい)。更に、動物の選別はこれら動物各個体の来歴を把握している試験監督の完全な管理下に置かれることになる。この試験手法は一世代生殖毒性拡張試験（「ライフステージの考慮」参照）の構想と一部共通するところを持つが、全てのライフステージに渡って投薬及び試験を行えるという利点がある。一方で試験戦略によっては、二世代生殖毒性試験と発がん性試験それぞれの開始時期の要件により一連の試験操作とロジスティックス面で支障をきたすと、この構想が実現不可能になることもあり得る。いずれにせよ、可能である限り二世代生殖毒性試験の余剰動物を発がん性試験に利用することは真剣に検討されるべきであろう。

１－８）トリガー

トリガーは、与えられた試験を行うべきか、あるいは行わないべきかを正当化するために決定木に対して使われる。典型的な例としては、「発生神経毒性試験は他の試験で観察された神経学的影響の性質を更に解析するために行われ、もしこの物質が成体動物で神経病性もしくは神経毒性を示すならば・・・」といったものが挙げられる。このような言い回しにはいくつかの重要な留意事項が存在する。ガイドラインは適用される手法その他を厳密に記述するべきものであるから、必然的に「性質を更に解析する」といった記述はごく例外的な場合を除き適当ではない。大半の事例においては、良く理にかなっており、個別の事例に応じてデザインされ、更に性質が解析されるべき観察結果の本質を良く考慮したプロトコールが

安全評価の観点からの要求をより満たすことになる。加えて、試験研究に使用される動物数が減少傾向にあることを念頭に置けば、「積極的な」トリガーの採用が特に重要である。加えて、安全評価の観点からは、予備試験あるいは通常の毒性試験のいずれかで規定の一曝露量における影響を調べるだけで充分な場合も多い。この影響結果を他のガイドライン試験で再現ための動物の使用も非常に重要である。

１－９）新規エンドポイント

化学物質試験に対する基本的要件は過去２０年間余り変わっていない。最近では内分泌攪乱物質の複合体が強い変革要因となり、それは既に二世代生殖毒性試験ガイドライン新版の変化に現れている。子宮肥大バイオアッセイや去勢動物を用いた Hershberger アッセイなど更に特殊化した試験ガイドラインが開発されており、草案として発表されている。発生毒性試験に免疫学的エンドポイントを加えることにも正当な理由がある。

最近 Anway 他により、内分泌攪乱物質の後生的な経代作用と雄生殖機能に関するもう一つの興味深い側面が発表された。彼らの研究によれば、ビンクロゾリン（抗アンドロゲン作用物質）やメトキシクロル（エストロゲン作用物質）の胎仔の性分化期間中の妊娠ラットに対する一過性曝露は、精子形成能（精子数と生存率）の低下と雄の不妊の発生率上昇という成体表現型を F1 世代に誘起する。更に、これらの影響は彼らが調査した範囲の子孫 F1-F4 の雄大半に雄生殖細胞を通じて伝わっており、これら生殖への影響は、生殖細胞の DNA メチル化のパターン変化と関連していた、とのことであった。この作用機構が再現性を持って証明されれば、将来の化学物質試験の概念に影響を与えることは必須であろう。

１－１０）試験戦略

現在、試験の計画、実施とその結果の（包括的な）解釈に関するガイダンス文書の集積を進めることで研究者と当局者双方を支援する努力が行われている。さらに詳しい情報については、OECD IPCS（国際化学物質安全性計画）化学物質への曝露による生殖リスク評価の原則、および OECD　生殖毒性試験と評価についてのガイダンス文書案を参照されたい。

（２）データ評価における重要な留意事項

２－１）リスクの考慮

EU の生殖毒性の分類体系（ＥＵ指令 67/548/EEC）は危険性（ハザード）を基にしたものである。つまり、化合物の分類は実際の曝露シナリオ（リスク）よりはむしろその物質の固有特性（ハザード）に基づいて行われる。ある化合物の製造、輸送、および最終的な使用に伴う全ての作業操作を推定することは不可能であることを考えればこれはもっともなことではあるのだが、同時に化合物の（不当に）過剰な表示につながりかねない。この危険性は「通常の取扱と使用」に関する考慮事項を盛り込むことである程度解消されるが、それで

も議論の余地は残るであろう（例としては「母体／父体毒性」節参照）。よって、妥当なリスク評価には現実的な曝露シナリオについてのデータが非常に重要であり、産業界はこれらのデータを提出することが奨励される。

２－２）potency（相対的な毒性の強さ）の考慮

potency は試験研究において、いわゆる最小副作用用量(LOAEL) と呼ばれる毒物反応を引き起こすのに必要な最小用量である。生殖毒性に関しては生殖面での毒性影響のみが考慮される。数学的に表せば、potency は LOAEL に逆比例する。試験ガイドラインが１日あたり 1000mg/kg を最大用量として制限する、といった形で、Potency は既に現在の分類および表示体系にある程度考慮されてはいる。発がん性といった他の分類の毒性については、分類法と調合時上限濃度について potency に基づいたカットオフ値の使用が試みられており、この原則を生殖毒性に応用することが現在論じられている。

２－３）母体／父体毒性

生殖毒性試験では、他の毒性試験に比べさらに、高用量での検討が非常に重要となる。ゆえに、ガイドラインはこの問題を重く扱い「この化学物質の物理化学的性質あるいは生物学的特性に制限されない限り、親への毒性（parental toxicity）（何らかの臨床的症状、体重増加率の減少（10%未満）および／または標的器官での毒性の兆候）を誘起する目的で最高用量を使用した」といった表記が通常見られる。結果として、母体への毒性についての知見は（そしてある程度は父体への知見も）過小投与（underdosing）を防ぐ自然のリミッターとして重要である。それは、高用量の試験さえ行われていればそれ以下の投与量では検出されない影響が観察されているであろうからである。成体と仔での影響を及ぼす投与量の比較もこれら先に述べた影響を総体的に把握する際に有用であろうが、仔に対しては成体に比べより詳細な観察が行われることが多いため直接比較は困難かもしれない。妊娠および／あるいは授乳が試験化合物への感受性に与える影響についての知見を得る際にも有用である。

しかし、投与量が上述の「母体毒性」を引き起こすのに充分な量である場合には、これらの投与量は仔にも何らかの影響を及ぼすことがたびたびある。であるから最も難しいのは、実験者はガイドラインを満たすために高用量を投与しなければならない一方で、そのような高用量で得られた結果を基に化学物質の分類が行われることになるかもしれない点である。そのような（不当な）表示を避ける手段の一つは、母体への影響と仔への影響の因果関係を証明し、仔への影響は母胎への影響からの非特異的二次的結果であることを示すことである。大半の重要な基準はヒトに関したものであるから、ここでの議論は不毛な面があるかもしれない。結果的に、観察された影響が一次的なものか二次的なものかということはではなく、（通常の取扱、使用条件で）同様な影響が人体でも起こりうるかが関係あるのである。この観点からも、適切なリスク評価のためには曝露シナリオに関する知見が重要な情報となるということである（「リスクの考慮」参照）。

4.3.1.2.4　結論

化学物質試験の基本的要件は過去２０年間あまり変わっていない。試験と登録は連邦法と試験ガイドラインの枠組みで管理され、前臨床試験研究が義務づけられている。動物試験から得られたこれらのデータは、ヒトでの試験へと応用される。生殖毒性の場合には、化学物質は２つのカテゴリー、つまり生殖機能障害因子（R_F)と発生毒性の原因因子（R_D)、に分類表示される。この過程で重要な留意事項についての議論が発生する。

新規のエンドポイントの導入並びに試験方法の改善を検討することはリスク評価のプロセスを大きく効率化することになる。化学物質試験におけるライフステージを考慮することにより、現在のガイドラインの欠点は、生活史初期での曝露によって後期に表面化する「潜在的な」影響が充分に検査されていないことであるのがわかる。このエンドポイントを検査するために、二世代生殖毒性試験の余剰動物を発がん性試験に利用することを可能である限り考慮に入れるべきである。化学物質試験への個別的な幼若動物試験の採用も関連した問題である。この関連では、ADME （吸収、分布、代謝、排泄）試験も種々のライフステージでのリスク評価のための重要な手段となる。

医薬品の経験に基づいて（雄の）生殖機能試験でのＰ世代の投与期間の短縮を議論し、それに従って試験エンドポイントを修正するべきである。二世代生殖毒性試験は少なくとも一世代の全生殖周期に渡り行われるが、それは依然として「apical test」であり、それがゆえにこの試験法は更なる数々の特殊試験への契機を生み出すことができる。ではあるが多くの場合、これらの更なる特殊なエンドポイントは個別的に計画されたオーダーメイド・アドオン試験を必要とするであろう。

EU の生殖毒性の分類体系は危険性（ハザード）を基にしたものである。つまり、化学物質の分類は実際の曝露シナリオ（リスク）よりはむしろその固有特性（ハザード）に基づいて行われている。しかし、妥当なリスク評価には現実的な曝露シナリオについてのデータが非常に重要であると思われ、産業界はこれらのデータを提出することが奨励される。このような取り組みは分類表示に際しての母体毒性のデータのより適切な解釈にも有用であろう。

4.3.1.3 「ラット亜慢性毒性試験に対するラット二世代繁殖毒性試験の付加価値についてのレトロスペクティブ解析」[11]

4.3.1.3.1　序文

最新の国際ガイドラインに従った生殖毒性評価には、げっ歯類および非げっ歯類における出生前発生毒性試験、ならびに一世代または二世代繁殖毒性試験が必要である。後者の試験

[11] Janer G, et al., “A retrospective analysis of the added value of the rat two-generation reproductive toxicity study versus the rat subchronic toxicity study.”, Reproductive Toxicology 2007 Jul; **24**(1):103-13.

は多大な費用および時間を要し、比較的多数の動物を必要とする。

欧州連合（EU）は、年間 1 トンを超えて製造される工業用化学物質に関する新しい規則である REACH 規則（registration, evaluation and authorization and restriction of chemicals）を立法化した。この規則は 2007 年 6 月に発効する（ http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/en/oj/2006/l_396/l_39620061230en00010849.pdf)。REACH は、30,000 個以上の既存の物質に関する知識ギャップを埋める大きな期待を持っている。試験の要件は各物質の製造量によって異なる（補遺 A を参照)。REACH の草案に基づいて、評価対象の全物質の 7.5%について二世代試験が必要であり REACH 下の実験動物の 37.5%を使用すると推定された。繁殖毒性試験および発生毒性試験は REACH 下で使用する全実験動物の約 70%を必要とする。これらの化学物質すべてについて完全な繁殖毒性試験プログラムを実施することは困難であるという懸念がすでに表明されており、この観点から簡易化された繁殖毒性試験の開発が強く望まれる。

2 つの異なるエンドポイントである授精・受胎能と発生毒性から生殖毒性の分類が European Dangerous Substances Directive 67/548/EEC によって確立された。ただし、本研究では主に授精・受胎能に対する毒性に注目する。授精・受胎能に対する（潜在的）危険が同定されたら、Directive 67/548/EEC に従って物質を生殖毒性の 3 つのカテゴリーの 1 つに分類する（詳細は補遺 B を参照のこと)。カテゴリー1 および 2 に分類された物質には R60 表示（「授精・受胎能を低下させるおそれがある」）を与え、カテゴリー3 に分類された物質には R62 表示（「授精・受胎能の低下の潜在的リスクがある」）を与える。これらの表示は、物質またはそれを含む混合物の使用に制限を加えることがある。REACH 内で、分類および表示はリスク評価の実施のための誘因となり、一部のケース（カテゴリー1 または 2 生殖毒性物質など）においては承認プロセスの確立のための誘因となる。

リスク評価においては、異なる動物試験からその物質についての NOAEL（無毒性量）を決定する基礎が得られる。この NOAEL は、不確定要因（種間差や種内差など）を考慮することによって DNEL（derived-no-effect-level、REACH で使用される用語）を導く基礎をなす。

20 年以上の化学物質試験の後に多量の毒性データが得られた。将来の規則変更を考慮すると、既存の毒性データを利用してこれまでの試験戦略の効率を評価することは有用である。TERA グループ（toxicology excellence for risk assessment）の最新の報告書では、一連の化学物質についてラット慢性試験とラット二世代試験で得られた NOAEL を比較している。解析の結果、全体的にラット慢性毒性試験のほうがラット繁殖毒性試験より低い NOAEL が得られることが明らかになった。しかし、データベースに含まれている化学物質の大半は繁殖に対する毒性を示さなかった（すなわち、67/548/EEC Appendix A または U.S. California E.P.A.によって繁殖に対する毒性があると分類された物質は 128 個中 9 個にすぎなかった)。本研究では、亜慢性試験（90 日間反復投与毒性試験）に対する二世代繁殖毒性試験の付加価値を評価するために既存のデータをレトロスペクティブに解析する。TERA

報告書とは異なり、繁殖に対する毒性があると分類される物質に特に重点を置く。さらに、導出した NOAEL に対する影響だけでなく授精・受胎能に対する毒性の分類についても評価する。

4.3.1.3.2　方法

（1）データ収集

１－１）生殖毒性物質

我々は、EU Directive 67/548/EEC の 30th Adaptation to Technical Progress of Appendix A までで授精・受胎能（R60 または R62）あるいは発生（R61 :「未出生児に対して害を及ぼすおそれがある」または R63 :「未出生児に対する害の潜在的リスクがある）に対する毒性があると分類された物質、ならびに米国カリフォルニア州環境保護局に従って雄または雌の生殖毒性を引き起こすことが知られている物質に関するラット亜慢性（90 日間）試験およびラット繁殖（二世代）試験のデータベースを構築した。公表されている国内または海外のピアレビュー文献をできる限り使用した（表 4.3.1.3-1）。これらのソース内に特定の物質についてのデータがないまたは不足している場合には、我々は IUCLID ファイル（International Uniform Chemical Information Database; http://ecb.jrc.it/esis/）、オープン文献（Medline）、公表されている European Chemicals Bureau（ECB）会議報告書およびワーキングドキュメント（http://ecb.jrc.it）、ならびに Dutch National Institute of Public Health and the Environment（RIVM）内の分類および表示に使用されている機密評価ファイルを検索した。データの機密性を保持するために、後者の物質名は報告しない。EU Directive 67/548/EEC Appendix A には生殖毒性（授精・受胎能または発生に対する作用）について分類された 181 個の物質が記載されている。これらの物質の一部は密接に関係している（塩化カドミウムとフッ化カドミウムなど）。そのため、我々は以下の 2 つの基準で化学物質をグループ分けすることによって Appendix A 内の物質リストを 140 個まで減らした : 同じ化学物質の異なる塩である、または活性代謝物と親化合物である。解析のために調査したソースは多数であったにもかかわらず、Appendix A に記載されている 140 個のうち 11 個の物質については必要な毒性データ（繁殖毒性試験または少なくとも危険度評価）が見つからなかった。これらのデータは、オランダ以外の EU 加盟国によって分類および表示ならびに新規物質届出のための機密ファイルに保管されている可能性が高い。

我々が毒性データを発見した物質のうち、約 3 分の 1（140 個中 42 個）について二世代ラット試験が行われていた。EU Technical Commission on Classification and Labeling は、他のラット試験（一世代、亜急性、亜慢性試験など）で観察された作用あるいは他の種における試験に基づいて残りの物質の大半を授精・受胎能に対する毒性がある物質と分類した。大半の物質についての発生に対する毒性があるという分類は発生毒性試験に基づいている。

最後に、少数の例では他の分類済み物質との構造の類似に基づいて分類が行われた。

California EPA による生殖毒性を引き起こすことが知られている物質のリストには EU 67/548/EEC Directive Appendix A に存在しない 56 個の物質が含まれていた。これらの物質のうち 35 個は薬剤（医薬品または乱用薬）であった。この種の物質については二世代試験はほとんど実施されておらず、現有のデータは機密である場合が多い。そのため、我々は薬剤をデータベースに収録しなかった。残りの物質のうち、5 個について二世代試験が見つかった。残りの 16 個について、他の試験から生殖毒性が明らかになっている。

まとめると、生殖毒性物質とみなされた 47 個の物質について二世代繁殖試験が見つかった。

表 4.3.1.3-1　使用した国内または海外のピアレビュー文献

Table 1
Peer-reviewed national or international data sources used

Source	Webpage
EU Risk Assessment Reports for Existing Substances (RAR)	http://ecb.jrc.it/esis/
OECD Screening Information Dataset for High Production Volume Substances (SIDS)	http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/OECDSIDS/sidspub.html
Joint Meeting on Pesticides Residues (JMPR)	http://www.inchem.org/pages/jmpr.html
Environmental Health Criteria Monographs (EHC)	http://www.inchem.org/pages/ehc.html
Concise International Chemical Assessments Documents (CICAD)	http://www.inchem.org/pages/cicads.html
US Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR)	http://www.atsdr.cdc.gov/toxpro2.html#bookmark05
US National Toxicology Program—Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction (NTP)	http://cerhr.niehs.nih.gov/reports/index.html
Canadian Pest Management Regulatory Agency (CPMRA)	http://www.pmra-arla.gc.ca/english/pubs/reg-e.html
Health Council of the Netherlands (HCN)	http://www.gr.nl/
German Advisory Committee on Existing Chemicals of Environmental Relevance (BUA)	http://www.hirzel.de/bua-report/download_53_99.html
California EPA Evaluation Reports (California EPA)	http://www.oehha.org/prop65/hazard_ident/hazard_id.html

１－２）非生殖毒性物質

二世代試験があるが授精･受胎能または発生に対する毒性があると分類されなかった物質のサブセットについて、同様のデータベースを作成した（n＝75）。これらの物質についてのデータは分類済み物質と同じソースから得た。

１－３）データの品質

採用した試験の一部が OECD ガイドライン（亜慢性試験については 408 または 413、二世代試験については 416）に完全には従っていなかったことに注意する必要がある。たとえば､使用した動物の数や評価したエンドポイントのタイプがガイドラインから逸脱していた場合があった。試験の品質に関するある程度の情報を提供するために、これらを以下のようにスコア化した：(1) リスク評価報告書に従って OECD ガイドラインの最低要件を満たしていた試験、(2) リスク評価報告書によって OECD ガイドライン遵守の宣言が示されていなかったがガイドラインの最低要件からの逸脱は確認されなかった試験、(3) OECD ガイドラインの最低要件を満たしていなかった試験（表 4.3.1.3-2）。さらに、一部の試験では最低評価用量レベルで作用が認められており､NOAEL の導出が不可能であった（表 4.3.1.3-2）。Technical Guidance Document on Risk Assessment では 3（最低／大半のケース）から 10

（最高／例外的なケース）の間の評価係数を使用することを推奨している。このような場合には我々は LOAEL（最小毒性量）を 3 で除算したものを NOAEL の代用として使用した。しかし、同じ物質についての他の試験で最低用量で作用が観察された場合には、NOAEL を提示していない試験を採用しなかった。作用の重症度から係数 10 の使用が正当化されるようなケースはなかった。最後に、一部の生殖毒性物質について亜慢性試験が存在しなかった。これらの物質については、他の反復投与毒性試験からの NOAEL または二世代試験の P_0 世代における全身毒性についての NOAEL を亜慢性 NOAEL の代用として使用した。代表的で意味のある数の物質を確保するために、OECD ガイドラインの厳守や NOAEL の採用を採用基準とすることはできなかった。しかし、大半の試験はピアレビューによるリスク評価を受けており、したがって十分な品質を有すると考えられた。

表 4.3.1.3-2　OECD ガイドライン 408/413.416 と合致する研究と得られた NOAEL 値

Table 2
Quality of the studies included in the analysis in terms of compliance with OECD guidelines 408/413 and 416, and identification of a NOAEL

Chemical	Source[a]	Two-generations		90 days	
		Score[b]	NOAEL	Score[b]	NOAEL
Acrylamide	RAR	2	Y	2	Y
Amitrole	JMPR	3	N	3	Y
	JMPR			3	N
Benomyl	JMPR	2	Y	2	Y
Benzyl butyl phthalate (BBP)	RAR	2	Y	2	Y
	RAR			2	Y
Bisphenol A	RAR	1	Y	2	Y
Boric acid	IRIS	2	Y	2	Y
1-Bromopropane	NTP	1	Y	1	Y
Cadmium	RAR and Medline[c]	3	Y	3	Y
Carbon disulphide	IRIS and CICAD	2	Y	2	Y
Chlorotoluron	IUCLID	1	Y	1	Y
Chlorsulfuron	IRIS	2	Y	3	Y
Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)	RAR	1	Y	1	Y
	RAR	1	N	1	N
Di-isoheptyl phthalate	SIDS and Medline[d]	1	Y	3	Y
Di-*n*-butyl phthalate (DBP)	RAR	2	N	1	Y
	RAR			2	Y
Dinoseb	IRIS	2	Y	3	N
Ethylenethiourea	JMPR	2	Y	2	N
	JMPR			3	Y
Fenarimol	JMPR	2	N	3	Y
	JMPR	2	Y	3	Y
Fenpropimorph	JMPR	2	Y	2	Y
Fentin hydroxyde	JMPR	2	Y	2	Y
Flumioxazin	California EPA	2	Y	2	Y
Flusilazole	JMPR	2	Y	2	Y
	JMPR	2	Y	2	Y
Hydramethylnon	California EPA	2	Y	2	Y
2-Methoxyethanol	IUCLID	3	Y	2	N
	IUCLID	3	N		
Myclobutanil	JMPR	2	Y	2	Y
	JMPR			2	Y
Nickel	NHC	1	Y	3	Y
	NHC	2	N		
Nitrobenzene	EHC	2	Y	1	N
Nitrofen	JMPR	2	Y	2	Y
	JMPR	2	Y		
Nonylphenol	RAR	1	N	1	Y
Oxydemeton methyl	JMPR	2	Y	3	Y
Piperazine	RAR	1	Y	3	Y
Thiophanate-methyl	JMPR	2	N	3	Y
	JMPR	2	Y		
Toluene	RAR	2	Y	2	Y
Triadimefon	JMPR	3	Y	3	Y
Tridemorph	IUCLID	1	Y	2	Y
Vinclozolin	JMPR	2	Y	2	Y
	JMPR	2	Y		
	JMPR	2	Y		
Chem1	Confidential	2	Y	3	Y

表 4.3.1.3-2 （続き）

Table 2 (*Continued*)

Chemical	Source[a]	Two-generations		90 days	
		Score[b]	NOAEL	Score[b]	NOAEL
Chem2	Confidential	2	Y	3	Y
	Confidential	2	N	3	N
Chem3	Confidential	2	Y	2	N
	Confidential			2	Y
Chem4	Confidential	3	Y	2	Y
	Confidential	2	Y	2	Y
	Confidential	2	Y		
	Confidential	2	Y		
Chem5	Confidential	1	Y	2	Y
	Confidential			2	N
Chem6	Confidential	2	Y	2	Y
	Confidential	2	Y		
	Confidential	2	Y		
Chem7	Confidential	2	Y	2	Y
Chem8	Confidential	1	Y	3	Y
Chem 9	Confidential	1	Y	1	Y
Chem10	Confidential	2	Y	2	Y
Chem11	Confidential	1	Y	2	Y
Chem12	Confidential	2	Y	2	Y
	Confidential			2	Y

[a] See Table 1 for abbreviations.

[b] Scores ranging from 1 to 3 were assigned to each study as follows: (1) studies that, according to the risk assessment reports, met the minimal requirements of OECD guidelines; (2) studies for which the risk assessment reports did not explicitly mention compliance with the OECD TG 416 guideline, but did not provide any indication of deviations from the requirements of the guideline; (3) for studies that did not meet the minimal requirements of OECD guidelines and/or for substances for which the NOAEL from the P_0 toxicity of the two-generation study or a repeated dose study other than the standard subchronic were used as an estimate of the NOAEL from the 90-day study. Only substances classified as toxic to reproduction (R60, R61, R62, and R63 substances) are shown here.

[c] Nagymajtényi et al. [6].

[d] Gaunt et al. [7].

１－４）データ解析

亜慢性試験から我々は、最高評価用量、臨界作用ならびに生殖器官および関連する腺について報告されている作用についての NOAEL および LOAEL、そしてこれらの作用の性質に関する詳細を収集した。二世代試験から我々は、親世代（P_0）に対する作用、授精・受胎能および仔の発生に対する作用（F_1 および F_1）、または第一世代成獣に対する作用（F_1）についての NOAEL および LOAEL を収集した。同じ物質について複数の試験が存在する場合には、OECD ガイドラインに従っていないものを除外し、残りの試験について NOAEL の幾何平均を求めた。

47 個の生殖毒性物質のうち 7 個について亜慢性試験があった。後者のケースでは、他の反復投与毒性試験から得られた NOAEL（亜急性試験、6 ヶ月試験、または慢性試験を 3 個に使用）、あるいは二世代試験の P_0 世代における全身毒性についての NOAEL（4 個）を亜慢性 NOAEL の推定値として使用した。

R61 または R63（発生毒性がある）と分類されるが R60 または R62（授精・受胎能に対する毒性がある）と分類されない物質は、分類および表示に対する二世代試験の影響の評価には採用しなかった。しかし、一部のケースでは、二世代試験によって発生毒性が示され、発生毒性についての分類は通常は発生試験に基づいて行った。

4.3.1.3.3　結果

（1）授精・受胎能についての分類および表示に対する二世代試験の影響

表 4.3.1.3-3 は、授精・受胎能に対する毒性があると分類された 30 個の物質についての 90 日間試験において観察された生殖器官への作用をまとめたものである。これらの物質のうち 13 個については、生殖器官または関連する内分泌腺に対する明確な作用が観察された。他の 6 個については、90 日間試験は授精・受胎能に対する毒性の明確な指標ではない生殖器官への影響を示したが、これはアラートとみなすことができた。様々な亜慢性試験があった物質の一部については生殖毒性作用またはアラートがある試験では認められ別の試験では認められなかった（DBP など）。最後に、13 個の物質については、最高評価用量で生殖器官に対する作用が観察されなかった。特筆すべき点として、これら 13 個のうち 3 個については二世代試験における授精・受胎能に対する作用も観察されなかった。

90 日間試験において授精・受胎能に対する毒性についての明確な作用またはアラートを示した試験 20 報のうち 12 報については、これらの作用は試験の LOAEL で観察された。他の 8 報では試験の LOAEL より 2～27 倍高い用量で生殖器官に対する作用が観察された。生殖器官に対するアラート／有害作用を示さなかった 90 日間試験については、最高評価用量はその LOAEL より 2～8 倍高く、フェナリモルおよび二硫化炭素を除けば二世代毒性試験における LOAEL より最高 6 倍高かった。

授精･受胎能に対する毒性があると分類されなかった化学物質についての亜慢性試験の約 3 分の 1 がアラートとみなすことができる作用（性腺重量のわずかな変化、甲状腺作用など）を示したが、二世代試験では授精・受胎能に対する明確な毒性を示さなかった。授精・受胎能に対する毒性があると分類されなかった化学物質についての亜慢性試験はいずれも授精・受胎能に対する明確な作用を示さなかった。

表 4.3.1.3-3　90 日間試験において観察された生殖器官への作用

Table 3
Effects on reproductive or associated organs observed in subchronic studies

Substance	Fertility effect observed in the subchronic study	H[a]	$LOAEL_{fertility\text{-}90\,days}$/ $LOAEL_{overall\text{-}90\,days}$	$LOAEL_{fertility\text{-}90\,days}$/ $LOAEL_{fertility\text{-}two\text{-}gen}$
Subchronic study showed clear effects associated to reproductive toxicity (13 compounds, 14 studies)				
Acrylamide	Testes atrophy	Y	4	4
DBP (1)	Degeneration of germinal epithelium	Y	2	14
	↓ in testicular weight and sperm parameters		4	28
Boric acid	Partial testes atrophy (1/10)	Y	1	0.5
	Complete testes atrophy (10/10)		3	1.5
Vinclozulin	Leydig-cell hyperplasia, vacuolization of lutea cells in ovaries, hypertrophy of adrenal cortex	Y	3	2
Chem9	Large, small or discoloured testes, degeneration/atrophy of seminiferous tubules	Y	1.7	9
Chem3	Ovarian stromal and adrenal cortical cell vacuolation	?	2	4
DEHP (1)	Sertoli cell vacuolation (7/10)	Y	1	0.3–2.7[b]
	↓ abs. and rel. testes weight; seminiferous tubule atrophy; sertoli cell vacuolation (9/10)		10[c]	3–27[b]
DEHP (2)	↓ in testis and epididymides weights, atrophy of testes and epididymal aspermia	Y	27[e]	15–123[b]
Dinoseb	↓ sperm count and abnormal sperm shape	?	1	n.a.[d]
2-Methoxyethanol	Testes degeneration	Y	1	4–9[b]
Chem11	↓ testes weight (50%); bilateral testicular degeneration	Y	4	2
Nitrobenzene	Degeneration seminiferous epithelium and ↓ of sperm in epididymis	Y	10[c]	1.25
Oxydemeton-methyl	↓ testes weight, vacuolation of epidydimis, ↓ corpora lutea in ovaries	Y	1	1
Hydramethylnon	↓ testicular weight and testicular atrophy	Y	1	1.25
Subchronic study showed effects that can be considered alerts for reproductive toxicity (6 chemicals, 6 studies)				
Nonylphenol	Slight ↓ in ovary weight	Y	1	2.8
Bisphenol A	↑ in testes weight	Y	1	0.07
DBP (2)	↓ in T3	Y	1	14
Chem5 (1)	↓ abs. and rel. adrenal weight	N	1	1.7
Chem12	↓ ovary weight	Y	1[e]	1.4
Thiphanate-methyl	↑ thyroid weight and histopathological effects	?	1	12–40[b]
Subchronic study did not show alerts or effects associated to reproductive toxicity (13 chemicals, 16 studies)				
BBP (1)	No effect at the highest dose tested	Y	2	6
BBP (2)	No effect at the highest dose tested	Y	3	4
Benomyl	No effect at the highest dose tested	Y	1	0.8
Fenarimol (1)	No effect at the highest dose tested	Y	4	16
Fenarimol (2)	No effect at the highest dose tested	Y	2.5	14
Chem6	No effect at the highest dose tested	?	1	3
Chem4 (1)	No effect at the highest dose tested	?	3	n.a.[d]
Chem4 (2)	No effect at the highest dose tested	Y	5	n.a.[d]
Cadmium	No effect at the highest dose tested	N	2	n.a.[d]
Chem5 (2)	No effect at the highest dose tested	?	8[c]	3
Piperazine	No effect at the highest dose tested	?	3	1.7
Chem7	No effect at the highest dose tested	?	1.7	n.a.[d]
1-Bromopropane	No effect at the highest dose tested	Y	1.5	2
Carbon disulphide	No effect at the highest dose tested	?	3	25
Chlorosulfuron	No effect at the highest dose tested	?	1	0.2
Triadimefon	No effect at the highest dose tested	?	1	1.1

The fourth column provides the ratio between the dose at which specified reproductive toxicity effects were observed (the highest tested dose when no effects were observed) and the overall LOAEL in the subchronic study. The fifth column provides the same ratio, but now with denominator the LOAEL for toxicity to fertility in the two-generation study.

[a] H: Histopathological evaluation of reproductive organs; Y: performed; N: not performed; ?: unknown.
[b] A range is provided because more than one two-generation study was available for these substances.
[c] One or more intermediate doses were tested between the LOAEL for fertility and the overall LOAEL of the subchronic study.
[d] No effects on fertility were observed in the two-generation studies for these substances.
[e] The highest dose tested showed only a marginal effect and was considered the NOAEL of the study.

（2）NOAEL に対する二世代試験の影響

図 4.3.1.3-1A および B は、47 個の分類済み物質ならびに 75 個の未分類物質についての亜慢性試験から得られた NOAEL と二世代試験から得られた NOAEL のプロットを示したものである。これらの図は両試験から得られた NOAEL が非常に強く相関していることを示している。表 4.3.1.3-4 は、90 日間 NOAEL／二世代 NOAEL の比の分布を示す集計統計の表である。これらの比の幾何平均は、分類済み物質については 1.9 であり、未分類物質については 1.3 であった。分類済み物質についての幾何平均の信頼区間には 1 が含まれておらず、全体的に二世代試験のほうが亜慢性試験より感度が高いことが示唆された。しかし、幾何平均が示すように、差の程度は小さい。大半の物質については比が 10 以下であった。こ

の図は全（NOAEL）用量範囲にわたって一定している。

NOAEL は実験的に決定するものであり、いくつかの誤差が生じる。それらは各用量群を対照群と比較して統計検定することによって決定されるため、試験デザイン（用量の選択やサンプルサイズなど）ならびに観察された反応の統計誤差（ばらつき）に依存する。

NOAEL において予想される変動（上述の誤差による変動）を推定する試みとして、特定の物質についての異なる二世代試験または異なる亜慢性試験で得られた NOAEL を図 4.3.1.3-2 に示す。この解析では、NOAEL と LOAEL の両方が得られている試験のみを使用した。観察された変動は図 4.3.1.3-1 で観察されたものと同程度である。これらの差は、用量間隔が異なること、評価したエンドポイントのセットが異なること、使用した系統が異なること、または偶然（統計検定に関連した偶然）によって生じると思われる。したがって、図 4.3.1.3-2 で観察された変動はこのタイプの試験から導出した NOAEL に固有の不確定性（「imprecision」）を反映している。

図 4.3.1.3-1 および 4.3.1.3-2 または TERA 報告書のどちらかで亜慢性試験と二世代試験の間の最大の差を示した物質に関する詳細を表 4.3.1.3-5 および 4.3.1.3-6 に示す。TERA 報告書に収録されている物質の一部については、我々は TERA と同様に他の NOAEL がある試験を使用した。試験の選択に用いられている基準が異なることからこれらの差が説明される。たとえば、コリンエステラーゼ阻害を報告している試験は TERA 報告書では検討されていなかった。また、一部の物質についてのラット生殖毒性 NOAEL は TERA 報告書のスタンダード二世代試験以外の試験から得られたものであった（Gadagbui, personal communication）。

NOAEL の差が 10 倍以上であった少数のケースでは、二世代試験に大きな用量間隔があった。一部の例では、二世代試験の LOAEL で P_0 動物における作用が認められた。上述の例を除外した後、1 個の物質（エチドロン酸）について二世代試験の NOAEL が亜慢性試験の NOAEL より 10 倍以上低い値を示し、2 個の物質（ハロキシホップメチル、アベルメクチン B1）について慢性試験の NOAEL より低い値を示した。

図 4.3.1.3-1 におけるばらつきが図 4.3.1.3-2 と同様であることから、それを二世代 NOAEL と亜慢性 NOAEL の比較における意味のある情報とみなす理由は存在しない。これら 2 つの NOAEL の平均パターンのみが以上のある情報を提供する。全体的に、授精・受胎能（n＝30）または発生（n＝37）に対する毒性があるとみなされる物質についても差は 2 倍以下に過ぎない。

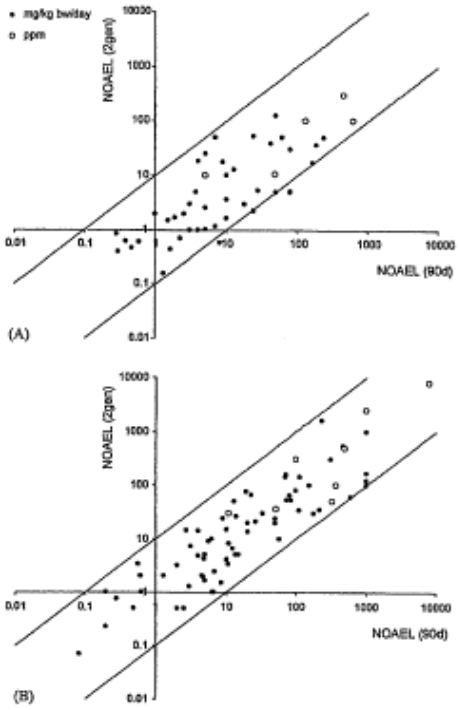


Fig. 1. NOAEL for 90-day studies vs. NOAEL for two-generation studies for (A) substances classified as toxic to fertility and/or development and (B) substances not classified as toxic to fertility or development. Filled symbols: oral studies; N: 42 and 67 for classified and not-classified substances, respectively. Non-filled symbols: inhalation studies; N: 5 and 8 for classified and not-classified substances, respectively.

図 4.3.1.3-1　47 個の分類済み物質ならびに 75 個の未分類物質についての亜慢性試験から得られた NOAEL と二世代試験から得られた NOAEL のプロット図

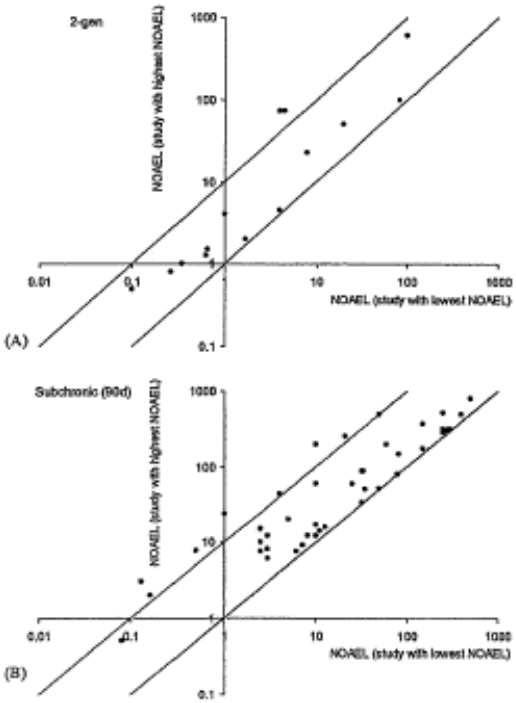


Fig. 2. NOAELs obtained for a given substance in different two-generation studies (A) and 90-day studies (B). Data for both classified and not-classified substances is included. N: 12 and 36 substances (25 and 77 studies) for (A) and (B), respectively.

図 4.3.1.3-2　特定の物質についての異なる二世代試験または異なる亜慢性試験で得られた NOAEL 値

表 4.3.1.3-4　90 日間 NOAEL／二世代 NOAEL の比の分布

Table 4
Summary statistics for the ratio between the 90-day study NOAEL and the two-generation study NOAEL

	Substances considered to be reproductive toxic	Substances considered not to be reproductive toxic
Geometric mean (95% confidence interval)	1.9 (1.3, 2.7)	1.3 (1.0, 1.6)
Coefficient of variation	0.6	0.5
Minimum	0.1	0.1
Maximum	16	10
90 percentile	10	5.9
95 percentile	13	6.5

表 4.3.1.3-5　慢性試験と二世代試験の間の最大の差を示した物質に関する詳細

Table 5
Some details on substances found to have large differences (>10-fold) between the NOAEL derived from the subchronic and the two-generation study

Chemical (Source[a])	Route	Rat subchronic study		Rat two-generation study		$NOAEL_{subchronic}/NOAEL_{two-gen}$	
		NOAEL	Effects at LOAEL	NOAEL	Effects at LOAEL	Ratio	Comment
Triadimefon (JMPR)	Diet	80	Redness and swelling in the glandula mucosa of the stomach at 200	5	↓ growth and fertility (P_0) and ↓ pup viability at 180	16	Large dose spacing in the two-generation study
Thiophanate-methyl (JMPR)	Diet	80	Histopathological effects on thyroid at 400	8	↓ litter size and weight and ↓ pup viability at 32	10	
				NA	Hepatocyte and thyroid hypertrophy in P_0 males at 10	24	Effects in parental animals define the LOAEL of the study
Flusilazole (JMPR)	Diet	9	Mild bladder urothelial hyperplasia and elevated cholesterol levels at 27	1	↑ stillborn pups and ↓ viability index in F_2 offspring at 5	7–9	
	Diet	7	Liver hypertrophy at 22	0.3	Hepatic lesions in P_0 males and females at 3.5	23–30	Effects in parental animals define the LOAEL of the study
Chem9 (Confidential)						11	Although fivefold difference between LOAELs
Nonylphenol (RAR)	Diet	50	↓ bw gain, food consumption; morfological changes in liver and kidneys at 140	NA	Kidney histopathology in P_0 males at 15	10	Effects in parental animals define the LOAEL of the study
Etidronic acid (IUCLID)	Diet	600	↓ bw gain and food consumption; spleen histopathology; hematology and ↓ liver weight at 1800	60	↓ number of pups at 300	10	
Sodium docussate (IUCLID)	Diet	1000	↓ bw (not significant); haematological changes; reduced liver weight at 1000	100	↓ bw in P_0 males and in offspring at 500	10	Effects in the parental animals at the LOAEL

Doses are expressed in mg/kg bw/day, except when otherwise indicated.
[a] See Table 1 for abbreviations.

表 4.3.1.3-6　亜慢性試験と二世代試験の間の最大の差を示した物質に関する詳細

Table 6
Some details on substances previously reported (in the TERA report) to have large differences (>10-fold) between the NOAEL derived from the chronic and the two-generation study

Chemical (source[a])	Route	Rat chronic study		Rat two-generation study		$NOAEL_{chronic}/NOAEL_{two-gen}$	
		NOAEL	Effects at LOAEL	NOAEL	Effects at LOAEL	Ratio	Comment
Acifluorfen, sodium (IRIS)	Diet	25	Kidney lesions at 125	1.25	Mortality and kidney lesions in parental animals; ↓ viability and kidney lesions in offspring at 25	20	20-fold dose spacing in two-gen study
Acrylonitrile (CICADs and WHO Food Additive Series)	Drinking water	3.4	Hyperplasia and hyperkeratosis of forestomach epithelium at 8.5	**14**	↓ food water cons and bw in P_0; pup mortality and ↓ bw at 70	0.2[b]	Different study or endpoint
Acrylonitrile (IRIS)	Inhalation	20 ppm	Focal gliosis and perivascular cuffind in the brain at 80 ppm. Respiratory and carcinogenic effects already at 20 ppm	105 ppm	↓ viability and lactation indices in all generations at 522 ppm	0.2[b]	Inhalation studies were not included in the TERA report
Benomyl (JMPR)	Diet	128	Highest dose tested	**37**	Atrophy and degeneration of seminiferous tubules; ↓ testicular sperm count of rats at 210 (P_0 and F_1)	3.5[b]	Different study or endpoint
Boric acid (IRIS)	Diet	17.5	Testicular atrophy at 59	**17.5**	Lack of spermatozoa in atrophied testes; ↓ ovulation	1[b]	Different study or endpoint
Diazinon (JMPR)	Diet	**0.07**	AChE inhibition	**0.5**	↓ parental bw gain at 5 (F_1; F_0 was at 25); ↓ viability (F_1 pups) and pup w (F_0 pups) at 5	0.1[b]	Different study or endpoint
Disulfoton (JMPR)	Diet	**0.06**	Cystic degeneration of the Harderian gland at 0.22	**0.06**	Gestation index, viability index and mean w at 0.18 (F2b), other litters at 0.5	1.0[b]	Different study or endpoint
Disulfoton (JMPR)	Diet	**0.08**	Optic nerve degeneration at 0.33			1.3[b]	Different study or endpoint
Avermectin B1 (IRIS)	Diet (chronic); Gavage (two-gen)	1.5	Treatment induced tremors at 2	0.12	Retinal folds in weanlings, inc dead pups at birth, ↓ viability and lactation, ↓ pup bw at 0.4	12.5	
Haloxyfop-methyl (IRIS)	Diet	0.065	↓ in abs. and rel. kidney w and inc. in renal pigmentation at 1	0.65	↓ weanling w at 1	0.1[b]	Large dose spacing in the chronic study
Haloxyfop-methyl (IRIS)	Diet			0.005	↓ fertility indices in the F2b generation at 0.05	13	Three-generation test, effects at F2b
Lactofen (IRIS)	Diet	25	↑ kidney and liver pigmentation, ↑ incidence of proliferative nodules and foci of cellular alteration at 50	2.5	↓ pup w; ↑ rel. and abs. w of several organs; brown pigment in liver; extramedullary hematopoeisis, hyperplasia of spleen at 25	10.0	Large dose spacing in the two-gen study
Methoxychlor (IRIS)	Diet	**5**	No information available	**10**	↓ fertility index, ↓ litter size and viability index at 50	0.5[b]	Different study or endpoint
	Diet	**10**	No information available			1[b]	Different study or endpoint

Doses are expressed in mg/kg bw/day, except when otherwise indicated. Bolded values indicate discrepancies with the values reported in the TERA report (see text for possible reasons of the differences).
[a] See Table 1 for abbreviations.
[b] Ratios higher than 10 were concluded in the TERA report.

4.3.1.3.4　考察

（1）授精・受胎能に関する分類および表示

ラット亜慢性試験における生殖器官に対する毒性の明確な指標（精巣萎縮など）は授精・受胎能に対する毒性に関する分類に十分である。したがって、この状況では二世代試験において授精・受胎能に対する毒性を確認する必要はない。

一方、物質に授精・受胎能に対する毒性があると考えられる指標があるがカテゴリー2 に分類するために十分な証拠がない場合には(亜慢性試験におけるアラートまたは不確定作用、構造アラートによって確認される作用、*in vitro* データなど)、二世代試験の実施を検討すべきである。

最後に、亜慢性試験において生殖器官に対するアラートまたは有害作用を示さない物質についても二世代試験が必要であるかどうかについては疑問が残る。我々は、（授精・受胎能に対する毒性がある物質 30 個のうち）10 個の物質に対応する 13 報の試験を同定した。これらの物質については、亜慢性試験からは授精・受胎能に対する毒性の指標が得られなかったが二世代試験からは得られた。

亜慢性試験は、適切にデザインされていればこれらの物質の少なくとも一部について授精・受胎能に対する毒性の指標を示したはずであると考えられる。たとえば、これらの亜慢性試験の一部では生殖器官の病理組織学的評価が行われていなかった。雄の授精能が影響を受けた場合、生殖器官の病理組織検査は非常に感受性の高いエンドポイントになる場合が多い。他の亜慢性試験では、二世代試験で授精・受胎能に対する作用を引き起こす用量より低い用量で評価を行っていた。しかし、2 個の化学物質（BBP およびフェナリモル）は、亜慢性試験で性腺の病理組織検査を行い二世代試験で作用を引き起こす用量より（4～16 倍）高い用量で評価を行った場合にも亜慢性試験では作用を示さなかった。これらの物質の生殖毒性作用が（適切にデザインされた）亜慢性試験で検出可能であるかまたは他の（代替）試験で検出可能であるかを明らかにするためにはさらなる研究が必要である。一般的に、二世代試験では繁殖の機能を一意に評価し、亜慢性試験では評価が不可能ないくつかの授精・受胎能エンドポイント（授精・受胎率や着床前死亡など）の評価を行う。作用が亜慢性試験ですでに検出可能であるかどうか結論するためには、授精・受胎能に対する毒性を引き起こすすべての作用機序を完全に理解することが必要である。特に精巣毒性以外の作用機序に関しては現在の知識は限られている。したがって、「理想的に」デザインされた亜慢性試験であってもおそらく二世代試験で検出されるすべての生殖毒性物質を同定することはできないと考えられる。

亜慢性試験における用量選択は生殖毒性作用を同定する能力に関する重要な要因である。いくつかの亜慢性試験（比較的大きな用量範囲を採用した試験）において、同じ試験の LOAEL とりはるかに高い用量で生殖器官に対する作用が認められなかった（一部の例については表 4.3.1.3-3 を参照のこと）。OECD ガイドラインでは 2～4 倍ずつ離れた 3 つの用量

レベルの採用を推奨している。これらのガイドラインに従えば、試験の LOAEL が中用量または高用量(多くのケース)で評価され、生殖器官に対する作用が看過される場合がある。したがって、より広い用量範囲をカバーし生殖器官の病理組織検査（精子パラメータ、セルトリ細胞または黄体細胞の空胞化などの感受性の高いパラメータを含む）を行えば、亜慢性試験で生殖毒性をより高度に同定できると考えられる。一方、他の毒性作用よりはるかに高い用量で授精・受胎能に対する作用が観察された場合には、これらが生殖器官に対する直接的な毒性作用であるか全身毒性の間接的な結果として生じたものであるかを明らかにすることが必要である。この識別が不可能な場合には、亜慢性試験で観察された生殖関連の作用自体では授精・受胎能に関する分類を行わず、分類が可能な特異的生殖毒性を明らかにする二世代試験を実施する必要がある。

OECD 28 日間毒性試験（TG 407）の延長が現在検討中であり、これらの結果から利益が得られると考えられる。

（2）NOAEL の導出

我々の解析から、ラット二世代試験とラット亜慢性試験の間で NOAEL の差がまったくまたはほとんど存在しないことが明らかになった。全体的に差は 2 倍以下であった。各化合物についての差は約 10 倍に達する場合があるが、このサイズの差は亜慢性試験の（同じ化合物についての）NOAEL の間にも認められる。これは、二世代試験では低い NOAEL が得られる場合があるが亜慢性試験の繰り返しによって生じる場合もあることを示唆している（図 4.3.1.3-2 を参照)。したがって、調査した二世代試験（過去 25 年間に得られた現有データの大半に相当する）に関して、試験は亜慢性（または慢性）試験からすでに得られている NOAEL の変化にほとんど影響を与えていない。

我々は、二世代試験において（亜）慢性試験より 10 倍以上低い NOAEL を示した少数の化学物質（本研究における 111 個中 7 個および TERA 報告書における 128 個中 10 個）についてさらに検討した。これらの化学物質についての詳細な解析の結果、これらの差が両試験（二世代試験と（亜）慢性試験）の間の感度の真の差によるものではなく用量選択や偶然によるものであることが明らかになった（表 4.3.1.3-5 および 4.3.1.3-6)。

亜慢性試験と二世代試験から得られた NOAEL の差がごく小さいものであったことから、曝露期間の延長および二世代試験で評価する生殖毒性の特定のパラメータは亜慢性試験で評価するより多くのエンドポイント（臨床化学検査など）と釣り合うと思われる。

（3）REACH への影響

生殖毒性に関する物質の分類および表示は、表示に直接従う物質の使用に関する制限を別にすれば、REACH 内で重要な影響を持つ。第 1 に、危険な物質（Directive 67/548/EEC の Appendix A の基準を満たす物質）は完全なリスク評価の対象となる。また第 2 に、REACH は懸念が非常に高い物質（カテゴリー1 および 2 の生殖毒性物質など）についての

承認制度を定めている。

REACH 下で、亜慢性試験で明確な生殖作用を示す化合物は授精・受胎能に対する作用がある物質として扱われる場合がある。この状況では、作用を確認するために二世代試験は必要とされない。これはすでに広く実践されている。Appendix A に記載されている多くの物質は、亜急性または（亜）慢性試験で認められた生殖器官に対する毒性作用に基づいて授精・受胎能に対する毒性がある物質と分類されている。また、亜慢性試験で観察された授精・受胎能に対する有害作用が二世代試験で観察された作用よりカテゴリー2 への分類において重要度が低いと考える理由はない。カテゴリー2 および 3 への分類によって生じる様々な規制面の影響を考えるとこれは重要である（後者のカテゴリーについては化合物が残存性で生物濃縮を生じる場合にのみ承認プロセスが適用される http://europa.eu.int/eur-lex/lex/JOHtml.do?uri=OJ:L:2006:396:SOM:EN:HTML を参照）。さらに、90 日間試験から得られた NOAEL（または現有試験の下限）は DNEL を導出するための基準点として使用することができる。二世代試験を追加しても、別の亜慢性試験の実施によって予想される値の変化以上には DNEL に影響を与えないと考えられる。

（4）最終的な検討事項

提示したデータの解釈において、いくつかの検討事項を考慮する必要がある。我々が二世代または多世代試験を発見した生殖毒性に関して分類された物質の数は限られている（162 個中 47 個、薬剤を除く）。また、一部の二世代試験は OECD ガイドラインに従っておらず（n＝4 個）、残りの試験の大半はこのガイドラインの 2001 年改訂版に従っていなかった。

亜慢性試験と二世代試験の感度の比較に関する結論は、ヒト曝露限界を導出するための基準点として NOAEL を使用する現在の方法に基づいている。NOAEL はある種の（有害）作用が統計学的に有意でなくなる用量である。言い換えると、工業用化学物質に関する現在のリスク評価の枠組みは異なる試験における LOAEL で認められる異なる有害作用の性質を（明示的に）考慮しない。ベンチマーク用量（BMD）を使用すれば NOAEL より正確な異なる試験間の比較が可能になると考えられる。BMD は NOAEL より実験条件（用量間隔、サンプルサイズおよび実験誤差）への依存度が低い。また、BMD は明示的に規定された効果サイズに関連しており、様々な試験から得られた BMD 間の比較がより意味のあるものになる。BMD アプローチは、試験の総サイズを増やさずにより多くの用量群を評価できる方法であると言うこともできる。後者は、授精・受胎能に対する作用を発見しやすくする目的で総用量範囲を拡大することによって亜慢性試験デザインを補正するために有用である。

4.3.1.3.5　補遺

（1）補遺 A. REACH によって要求される生殖毒性に関する毒性試験

REACH では、年間 10 および 100 トンのレベルでの化合物の生殖毒性スクリーニング試験または比較情報を最低限要求している。100 トン以上のレベルではすべての化合物につい

て最低 1 つの発生毒性試験が必須である。最初の発生毒性試験の結果から 2 番目の種で発生毒性試験を実施する必要があるかどうかを判断する。年間 100 トン以上では、反復投与毒性試験から潜在的生殖毒性の指標が得られた場合には二世代試験が必要である。潜在的生殖毒性の指標が得られなかった場合には、1000 トン以上の量で製造または輸出される物質についてのみ二世代試験が必要である。

（2）補遺 B. 生殖毒性に関する分類および表示。Directive 67/548/EEC およびその改訂版に準拠したカテゴリー1～3 分類の基礎。

「授精・受胎能に対する作用に関して物質をカテゴリー1 に分類することは、疫学的データに基づいて行う。」（中略）「カテゴリー2 または 3 への分類は主に動物データに基づいて行う。授精・受胎能の低下に関して物質をカテゴリー2 に分類するためには、通常 1 つの動物種で明確な証拠が得られなければならず、作用メカニズムまたは作用部位に関する証拠、あるいはヒトで作用が認められると考えられるという結論を導いた他の既知の授精･受胎能抑制物質との科学的関係またはヒトからの他の情報による裏付けがなければならない。1 つの種のみにおける試験が存在し他の重要な裏付けとなる証拠がない場合にはカテゴリー3 への分類が適切である」。

カテゴリー1：ヒトにおいて授精・受胎能を低下させることが知られている物質。基準：「物質へのヒト曝露と授精・受胎能の低下の間に因果関係を確立するために十分な証拠がある」。

カテゴリー2：ヒトにおいて授精・受胎能を低下させるように思われる物質。基準：「毒性作用の非存在下で授精・受胎能を低下させるという動物試験における明確な証拠がある、あるいは他の毒性作用とほぼ同じ用量レベルで授精・受胎能の低下が起こるがそれが他の毒性作用の二次的な非特異的影響ではないという証拠がある」。

カテゴリー3：ヒト授精・受胎能に関して懸念を生じる物質。基準：「毒性作用の非存在下で授精・受胎能を低下させるという強い疑いを生むに十分な証拠を示す適切な動物試験の結果がある、あるいは他の毒性作用とほぼ同じ用量レベルで授精・受胎能の低下が起こるがそれが他の毒性作用の+二次的な非特異的影響ではないという証拠がある」。

4.3.1.4 「二世代繁殖毒性試験のレトロスペクティブ解析：第二世代の付加価値は何か？」[12]

[12] Janer G, et al., “A retrospective analysis of the two-generation study: what is the added value of the second generation?”, Reproductive Toxicology 2007 Jul; **24**(1):97-102.

4.3.1.4.1　序文

現行の国際ガイドラインの大半では農薬および工業用化学物質の生殖毒性を評価するための二世代繁殖毒性試験を要求している。二世代試験は多大な費用および時間を要し、多数の動物を必要とする。

欧州連合（EU）は最近、年間 1 トンを超えて製造されるすべての工業用化学物質を規制する Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals（REACH）と呼ばれる新しい規則を立法化した（http://ecb.jrc.it/REACH/）。すべての物質の 7.5%について二世代試験が必要であり、REACH 下の実験動物の約 40%（約 100 万匹）を使用すると推定された。

二世代試験を一世代試験に置き換えるよう求める一部の利害関係者による圧力が高まっている。二世代試験の代わりに一世代試験を用いれば、動物数およびこれらの長期試験に関わる他の費用が大幅に削減されると考えられる。

二世代試験を実施することの古典的な根拠は、F_2 世代のみが生殖細胞発生時から曝露され F_2 世代が完全な生涯曝露後の第一世代の生殖能力を評価するために必要であることである。本研究の目的は、二世代試験を一世代試験で置き換えることによるリスク評価ならびに分類および表示の影響を評価することである。この目的のために我々は、既存の多世代試験をレトロスペクティブに解析し、作用のタイプならびに有効用量に関して第一世代と第二世代の間に観察される作用の潜在的な差を評価した。F_1 および F_2 子孫に注目すること以外に、我々は一世代試験において F_1 世代を成獣期まで維持すべきかどうかを明らかにするために P_0 動物と F_1 成獣に観察される作用の比較も行った。我々は、Directive 67/548/EEC Annex 1 で生殖毒性について分類された物質（カテゴリーI および II、表示 R60：「授精・受胎能を損なうおそれがある」または R61：「未出生児に対して害を及ぼすおそれがある」、カテゴリーIII、表示 R62「授精・受胎能の低下の潜在的リスクがある」または R63「未出生児に対する害の潜在的リスクがある」）に特に注意を払って、工業用化学物質と農薬の両方を採用した。

4.3.1.4.2　データの記述

Directive 92/32/EEC（30th ATP of Annex 1 まで）によって生殖毒性について分類された、あるいは California EPA によって授精・受胎能に対する毒性があると判定された合計 46 個の物質について、観察された作用に関する（簡単な）情報を含む二世代または多世代試験の総括報告書が見つかった。公表されている国内または海外のピアレビュー文献を使用した（表 4.3.1.4-1）。これらのソースが特定の物質について十分なデータを提供していない場合には、我々は IUCLID ファイル、オープン文献（Medline）、公表されている ECB 会議報告書およびワーキングドキュメント、ならびに RIVM 内の分類および表示に使用されている機密評価ファイルを検索した。これらのデータの機密性を保持するために、後者の物質名は本稿に示さない。また、生殖毒性について分類されていない合計 102 個の物質につ

いて二世代または多世代試験を収集した。重要な試験についての情報は表 4.3.1.4-1 に示したソースから得られたものである。一部の物質については複数の試験が見つかった。合計で 148 個の物質についての 176 件の多世代試験を本解析に採用した。大半の物質についてはリスク評価報告書に試験が OECD 416 ガイドラインを遵守していたかどうかが記載されておらず、この問題について結論するために十分な詳細が提示されていなかった。しかし、提示された情報はこのガイドラインの要件と一致していた。OECD 416 ガイドラインに従っていなかった試験は、生殖毒性物質と判定された物質に関する試験を除き、我々のデータベースには採用しなかった（表 4.3.1.4-2）。ガイドラインからの逸脱は、評価したエンドポイントの数の不足、動物数の不足、または評価用量の不足（2 用量のみ）であった。大半の試験は 2001 年に採択された OECD 416 の改訂以前に実施されたことに注意する必要がある。したがって、OECD 416 の遵守は 1983 年に採択されたガイドラインに関するものである。

各試験における各世代について、観察された作用および関連用量を記録した。2 つの異なる解析を実施した。第 1 に、二世代試験の総合転帰における第二世代の影響を、導出した NOAEL および同定された生殖作用のタイプ（発生または授精・受胎能に対する作用）に関して評価した。各世代の多数の連続同腹仔の結果あるいは三世代以上の結果を報告している試験については、二世代試験における標準同腹仔と比較した過剰同腹仔の影響についても評価した。第 2 に、試験について報告されたすべての作用を考慮して、第一世代と第二世代の間の感度の差を評価した。

試験デザイン以外に試験の解釈基準についても検討すべきである。一世代のみに観察される結果は被験化合物に関係しない偶然の結果と解釈されている場合が多く、したがって試験の評価においては検討しない。本研究を通じて我々は、物質の危険度分類（Joint Meeting on Pesticide Residues や EU Risk Assessment Reports など）において検討された作用のみを採用した。

表 4.3.1.4-1　使用した国内または海外のピアレビュー文献

Table 1
Peer-reviewed national or international data sources used

EU Risk Assessment Reports for Existing Substances
OECD Screening Information Dataset for High Production Volume Substances
Joint Meeting on Pesticide Residues
Environmental Health Criteria Monographs
Concise International Chemical Assessments Documents
US Agency for Toxic Substances and Disease Registry
US National Toxicology Program-Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction
Canadian Pest Management Regulatory Agency
Health Council of the Netherlands
German Advisory Committee on Existing Chemicals of Environmental Relevance
California EPA Evaluation Reports

表 4.3.1.4-2　OECD 416 ガイドラインに従って研究で考慮された物質

Table 2
Substances included in the analysis and quality of the studies in terms of compliance with OECD test guideline 416

Certainly met the minimal OECD TG 416 requirements	Probably met the minimal OECD TG 416 requirements[a]				Certainly did not meet the minimal OECD TG 416 requirements
Acrylic acid	Acephate (2)	DIDP (2)	Imidazil	Pyrethrins	Amitrole
Bisphenol A	Acetylglufosinate	Dimethipin	Lindane	Pyriproxifen	Cadmium[b]
Bitertanol	Acrylamide	Dimethoate	Maleic hydrazide	Quintozene (2)	2-Methoxyethanol[b] (2)
1-Bromopropane	AMPA	Dinoseb (2)	Mancozeb	Tebuconazole	Triadimefon
Chloromethane	Amitraz	DINP	Maneb	Tebufenozide (2)	
Chlorotoluron[b]	BBP (2)	Diquat	Mentiram	Tecnazene	
Chlorpropham	Benomyl	Dodine	Methamidophos (2)	Terbufos	
Chlorpyrifos	Benzene alkyl derivatives	Endosulfan	Methylbromide	Thiodicarb	
DEHP (2)	BHT-cresol	Ethephon	Mevinphos	Thiophanate-methyl (2)	
Dichlorobenzene	Boric acid	Ethoprophos (2)	Myclobutanil	Thiram	
DIHP[b]	Bromopropylate	Ethylenediamine	Nickel	Toluene	
Esfenvalerate	Caprolactam	Ethylenethiourea	Nitrobenzene	Tolyfluanid (3)	
Famoxadone	Carbaryl	Etofenprox	Nitrofen (2)	Triadimefon	
Flutolanil	Carbon disulphide	Fenamiphos	Oxamyl (2)	Triazophos	
Hexamethylene	Carbosulfan	Fenarimol (2)	Oxydemeton methyl	Trichlorobenzene	
Hydroquinone	Chlorfenvinphos	Fenbuconazole	Paraquat (3)	TNPP	
Metalaxyl	1-Chloro-4-nitrobenzene	Fenithrothion (3)	Parathion-methyl (2)	Vinclozolin	
Methoxyfenozide	Chlormequat	Fenpropimorph	Permethrin	Ziram	
PGME	Chlorpyrifos	Fenpyroximate	Phenylenediamine	Chem 1	
Nonylphenol	Clethodim	Fentin hydroxyde	2-Phenylphenol (2)	Chem 2	
Piperazine	m-Cresol	Fipronil	Phorate	Chem 3	
Spinosad	Cypronidil	Fluorescent bright	Phosalone	Chem 4 (2)	
TBBP-A	DBP	Flumethrin	Phosmet	Chem 5	
Tridemorph[a]	Deltamethrin	Flumioxazin	Piperonyl butoxide	Chem 6 (3)	
Chem 5	Diazinon	Flusilazole (2)	Piraclostrobin	Chem 7	
Chem 8	Dibenzuron	Folpet (2)	Prochloraz	Chem 10	
Chem 9	Dichlorobenzene	Glutaraldehyde	2-Propanol	Chem 12	
Chem 11	HCFC-141b	1,6-Hexanediamine	Propargite		
	2,4-D	Hydramethylnon	Propham		
	2,4-DB	Imidaclopid	Pyrazophos		

The numbers in brackets indicate the number of studies for the substance under a given category (note that some substances appear in the first and the second column because several studies were found for these substances). Data for these substances was obtained from the sources detailed in Table 1, except otherwise indicated. Substances for which confidential data were used are assigned an alias-name (e.g., chem 1). Abbreviations: DEHP: di(2-ethylhexyl)phthalate, DIHP: di-isoheptyl phthalate, PGME: 1-methoxy-2-propanol, TBBP-A: tetrabromobisphenol A, AMPA: aminomethylphosphonic acid, BBP: butylbenzyl phthalate, BHT-cresol: 2,6-di-tert-butyl-p-cresol, DBP: di-butyl phthalate, HCFC-141b: 1,1-Dichloro-1-fluoroethane, 2,4-D: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-DB: 4-(2,4-dichlorophenoxy)butyric acid, DIDP: di-isodecyl phthalate, DINP: di-isononyl phthalate, TNPP: tris(nonylphenyl)phosphite.

[a] The risk assessment reports did not explicitly mention compliance with the OECD TG 416 guideline, but did not provide any indication that the studies did not follow this guideline.

[b] Data for these substances were obtained from IUCLID files (chlorotoluron and 2-methoxyethanol) or public literature (di-isoheptyl phthalate [3] and cadmium [4]).

4.3.1.4.3　結果および考察

（1）NOAEL に対する影響

176 件中 2 件の試験では、F_2 子孫に観察された作用から導出した NOAEL が F_1 子孫に基づいて導出した NOAEL を下回っていた。これらの試験の詳細を表 4.3.1.4-3 に示す。どちらのケースでも NOAEL の変化の大きさは 6 倍であった（これは用量間隔でもある）。これらのうち 1 件（トリアジメホン）では、作用（仔の体重増加量の減少）が第二世代子孫には観察されたが第三世代には観察されなかった。他の 1 件（ビンクロゾリン）では、F_2 仔における精巣上体重量の減少が Joint Meeting on Pesticide Residues 評価におけるわずかな作用（marginal effect）と判定され、次の用量レベルでは P_0 における全身毒性の徴候（肝臓重量の増加、貧血のわずかな徴候、水晶体変性）および F_1 における発生毒性の徴候（前

立腺および凝固腺のわずかな機能低下、精巣上体重量の減少）が観察された。

6 件の他の試験では、F_1 成獣に観察された作用によって試験の NOAEL が規定されていた（表 4.3.1.4-3）。これらの NOAEL と P_0 成獣から導出した NOAEL の差は 2～10 倍の範囲であった。

表 4.3.1.4-3　F_2 子孫に観察された作用から導出した NOAEL が F_1 子孫に基づいて導出した NOAEL を下回っていた試験、あるいは F_1 子孫に基づいて導出した NOAEL が P_0 よりも低かった試験の詳細

Table 3
Studies where the NOAEL from F_2 offspring was lower than from F_1 offspring, or where NOAEL from F_1 adults was lower than from P_0 adults

	Critical effects occurred in F_2 offspring	Difference compared to NOAEL in F_1 offspring
Triadimefon	Reduced F_2 pup body weight gain (no effects in F_3 pups)	6
Vinclozolin	Reduced epididymal weight in F_2 pups (considered a 'marginal effect level' in the JMPR evaluation)	6
	Critical effects occurred in F_1 adults	**Difference compared to NOAEL in P_0 adults**
DEHP	Aplastic testes, epididymis and seminal vesicles, small testes and epididymis	10
Ethephon	Decrease in body weight and body weight gain	10
Chem 7	Increase in white blood cell count in females	5
2-Propanol	Microscopic findings in kidneys	5
Diquat	Low incidence of cataract formation in females	5
Acrylic acid	Reduced food and water consumption	2

（2）生殖毒性についての分類に対する影響

176 件の試験（それらのうち 58 件は生殖毒性物質と分類された物質に関する試験）のうち 3 件では、第二世代で生殖毒性が同定されたが第一世代では同定されなかった（表 4.3.1.4-4）。しかし、これらの試験のうち 2 件は生殖毒性物質と分類されなかった化学物質（メビンホスおよび DIDP）に関するものであった。メビンホスに関しては、分類について検討すれば、観察された作用は全身毒性の間接的な結果とみなされる（表 4.3.1.4-4 を参照）。DIDP に関する EU Risk Assessment Report は、現有の試験（表 4.3.1.4-4 中の試験を含む）で観察された発生作用はそれを生殖毒性物質と分類するために十分重度ではなかったと判定している。フェナリモルについて表 4.3.1.4-4 中の試験のみがあった場合にはおそらくそれが結論であると思われる。フェナリモルに授精・受胎能に対する毒性があるという分類は、おそらく他の二世代試験（より高い用量を使用して第一世代ですでに授精・受胎能に対する影響を明確に示した試験）の結果に基づくものである。事実、表 4.3.1.4-4 中の試験は NOAEL を確立するためのこの他のフェナリモル試験の後に実施された。

表 4.3.1.4-4　第二世代で生殖毒性が同定されたが第一世代では同定されなかった試験

Table 4
Studies for which the second generation, but not the first generation, showed reproductive toxicity (fertility or developmental toxicity)

Chemical	Reproductive toxic effects	General toxicity in the second generation	Dose at which they occur
Fenarimol	Reduced fertility index; reduction in the proportion of females with copulatory plugs	Death of one female during parturition and signs of dystocia in another female, slight reduction in male body weight gain	Highest tested
Mevinphos	Reduced mating and fertility indices; reduced absolute testes and epididymides weight and reduced relative ovarian weight; absent corpora lutea	Ataxia, tremors, oral discharge, reduced growth, and brain cholinesterase inhibition	Highest tested
DIDP	Reduced survival index at PND1 and PND4 (85–95% vs. 98–99% in controls) and increased cannibalization of pups by a few females	Increased liver and kidney absolute weights effects and increased incidence of dilated renal pelves	Medium and highest tested

（３）世代間の作用に対する感度の比較

特定の作用が評価した世代の一方のみに観察されることは珍しくなかった。作用が評価した最後の世代のみに認められる場合には、後の世代のほうが感度が高いと考えることもできる。しかし、特定の作用が第一世代に観察されるが第二世代には観察されない場合、あるいは第二世代に観察されるが第三世代には観察されない場合もある。これは、統計学的な理由によって作用が消える場合があるという事実によって説明される。作用が統計学的有意差の境界にある場合には、基礎をなす生物学的作用が同じであってもあるデータセットでは検出されるが他のデータセットでは検出されない可能性がある。したがって、偶然によって作用が一世代で検出されて他の世代では検出されない場合がある。P_0成獣に作用を示して F_1成獣には作用を示さなかった化学物質、あるいは F_1子孫に作用を示して F_2子孫には作用を示さなかった化学物質の例の一部を表 4.3.1.4-5 に示す。これらの作用が一方の世代のみに観察されることが「偶然」によって説明されるという我々の仮説は、同じ試験で観察された他の作用によって裏付けられる（表 4.3.1.4-5）。

作用が後の世代で観察されるが前の世代では観察されない場合には、これが偶然の結果であったか後の世代における感度の上昇の結果であったかを評価するのは困難である。観察された作用の程度が高く、一連の関連パラメータにも作用が観察された場合には、これは第二世代における感度の上昇を意味している。F_1親が P_0より高い感度を明確に示した少数の化学物質（その大半はフタル酸塩）が同定された（表 4.3.1.4-6）。他の少数の化学物質は F_2子孫で F_1子孫より低い用量で作用を示したが、これらのいずれにおいても F_2子孫が F_1子孫より実際に感度が高かったと結論するために十分なまたは関連パラメータにおける作用と一致した大きな差は認められなかった。

もちろん、動物数、曝露期間、世代数または評価パラメータに関して試験を拡大すれば、より低い用量での有害事象の同定やより多くの有害作用の検出が可能になる。たとえば、第三世代を追加したり同じ世代に第 2 の同腹仔を追加したりすれば試験の感度が向上する（表 4.3.1.4-7）。これは、統計学的検出力の向上や第 I 種過誤率（通常は $P=0.05$）を補正する多重（統計）検定によるものである。

表 4.3.1.4-5　P_0成獣に作用を示してF_1成獣には作用を示さなかった化学物質、あるいはF_1子孫に作用を示してF_2子孫には作用を示さなかった化学物質の例

Table 5
Examples of chemicals that showed effects (in italics) on the P_0 adults but not in the F_1 adults, or in the F_1 offspring but not in the F_2 offspring at a particular dose

Chemical	Effects on P_0/F_1 offspring and dose at which they were observed		Effects on P_1 adults/F_2 offspring and dose at which they were observed	
Piperazine	↓ *Number of implantation sites*; ↓ litter size	300	↓ Litter size	300
Fentin	↓ *Litter size* ↓ pup weight	≥1.5 4	↓ Pup weight	≥1.5
Flumioxazin	↓ *Viability index*	≥10	↓ Viability index	30
Fenpropimorph	↑ *Percentage of stillborn pups*; retarded development	1.25	Retarded development	1.25
2-Methoxyethanol	↓ *Fertility index*; ↓ number of pups born alive, *survival index and pup weight*	23	↓ Number of pups born alive	23
Nonylphenol	*Histopathological changes in the kidneys*	15	Histopathological changes in the kidneys	50

Effects on related endpoints at the same or similar doses are included as complementary information. Doses are expressed as mg/kg bw/day.

表 4.3.1.4-6　F_1親がP_0より高い感度を明確に示した化学物質

Table 6
Substances for which the first-generation adults (F_1) were clearly more sensitive than the parental generation (P_0)

Chemical	Effects on P_0	Dose	Effects on F_1	Dose
DBP	Increased epididymis weight	509	Absent or poorly developed epididymis Testicular atrophy; degeneration of seminiferous tubules Reduced pregnancy and fertility indices; reduced sperm count	≥52 ≥256 509
BBP	No effect comparable to that mentioned under "F_1"	750	Reduced mating and fertility; reduced reproductive organ weights; reproductive tract malformations and histopathology	750
BBP	No effect comparable to that mentioned under "F_1"	500	Decrease in reproductive organs weight; atrophy of seminiferous tubules	500
DEHP	Decrease of sperm parameters	592	Aplastic testes, epididymis and seminal vesicles Decrease of sperm parameters No offspring produced	≥7.9 ≥77 592
Chem 12	No effect comparable to that mentioned under "F_1"	8620	Estrous cycle disturbances and decreased number of animals that mated and produced litters	≥6160
DIHP	No effect comparable to that mentioned under "F_1"	750	Reduced male and female mating and fertility indices (40–60% vs. 80–97% in controls)	750

Effects supporting these differences in sensitivity are presented. Doses are expressed in mg/kg bw/day, except for Chem 12 which is expressed in mg/m^3 (inhalation exposure).

表 4.3.1.4-7　同腹仔を追加して試験の感度が向上する化学物質

Table 7
Substances with multi-generation studies where the critical effect was observed only in litters other than those included in the standard two-generation study (OECD 416)

Chemical	Litter	Effect
Fenarimol	F_{2b}	Increase in stillbirth
Thiophanate-methyl	F_{2b}	Reduced pup body weight gain (although no effect on average pup weight)
Quintozene	F_{2b}	Reduced body weight in adult females
Cadmium	F_3	Reduced open field exploration

（4）リスク評価の結果

レトロスペクティブに見て、二世代試験の第二世代は NOAEL にも観察された重大な作用にも影響を与えず、またリスク評価にも分類および表示にも影響を与えていなかった。し

たがって、繁殖毒性試験に第二世代を採用しなかったとしても、リスク評価ならびに分類および表示は我々が検討した物質について基本的に同じであったと考えられる。

いくつかの物質は、P_0と比較してF_1成獣で感度の向上を明確に示した。したがって、第一世代を成獣期まで維持しない繁殖毒性試験では重要な作用が看過されることになる。しかし、これらの物質はいずれも（1 個の例外を除き）フタル酸塩であった。

これらの結論は我々が評価した試験に基づくものである。他のパラメータを評価した場合に第二世代が第一世代より感度が高いことが明らかになったかもしれないという可能性は否定できない。繁殖毒性試験に関する現行の標準ガイドラインは OECD TG 416 である。本レビューに採用した試験の多くはこのガイドラインの 2001 年改訂以前に実施された。他の変更に加えて、この改訂では発情周期、精子パラメータ、膣開口、包皮分離、肛門性器間距離など、評価すべきエンドポイントがいくつか追加された。しかし、これらの追加エンドポイントの大半はF_2子孫には要求されず、F_1子孫あるいはP_0およびF_1成獣に要求されている。肛門性器間距離の測定はF_2子孫に要求されているが、それはF_1性比または性成熟のタイミングに変化があった場合に限られる。したがって、評価すべきエンドポイントに関してすべての試験がこのガイドラインに従っていたとしても、本レビューで異なる結論が得られた可能性は低い。

繁殖毒性スクリーニング試験（OECD 421 および 422）では生後 4 日目で仔の屠殺および観察を行う。したがって、これらのスクリーニング試験ではF_1成獣に重大な作用を引き起こす物質（表 4.3.1.4-6 に示す物質など）の生殖毒性を検出することはできない。これらの試験亜他の作用を検出する感度も低い。スクリーニング試験と定義されているため、二世代試験または拡大一世代試験より使用動物数が少なく、交尾前期間が短く、評価するエンドポイントが少ない。

我々の結果は、現行の二世代試験を性成熟期までF_1を観察する拡大一世代試験で置き換えることを支持している。ILSI Health and Environmental Sciences Institute（HESI）の Agricultural Chemical Safety Assessment（ACSA）Technical Committee は最近、拡大一世代試験の提案を紹介した。彼らが提案した試験では、交尾前および交尾中に雄親に 4 週間、雌親に 2 週間投与を行い、妊娠中および授乳中の雌親にも投与を行う。選択したF_1世代の仔には PND 70 まで連続投与を行い、発生神経毒性および発生免疫毒性を含む追加エンドポイントを加えて二世代試験と同じ観察を実施する。さらに、観察された作用に基づいて第二世代を追加するかどうかを決定する。

ACSA-HESI の提案は拡大一世代試験についてのガイドラインを作成する出発点となる。しかし、特定のプロトコールの詳細についてはさらなる議論が必要である。たとえば、生殖器官および発情周期の変化の評価を可能にするためにF_1子孫の曝露期間をどれだけ長くすべきか？ どんな誘因によって第二世代への拡大を検討するか？ 我々の解析に基づくと、第二世代への拡大は第一世代で疑わしい作用が観察された場合またはこの拡大が作用メカニズムに関するデータを収集するためにデザインされた場合に正当化される。しかし、我々の

解析において世代間で感度に明確な差は観察されなかった。さらに、拡大一世代試験では現行の二世代試験より包括的な第一世代（特に F_1 成獣）の評価を行うことになる。したがって、第一世代ですでに明確な作用が観察される場合には、第二世代への拡大によってさらなる情報が得られる可能性は低い。

4.3.2　塩田教授が調査対象として推薦した文献

発生毒性（催奇形性）分野における専門家である、塩田浩平教授（京都大学理事、日本先天異常学界理事長）が調査対象として推薦した文献の調査を実施した。以下に文献の概要を示す。

4.3.2.1　「Species differences in pharmacokinetics and drug teratogenesis」[13]

薬剤の催奇形性に関する種間の相違は、胚における重大な濃度と時間との関連性を決定する薬物動態プロセスの相違に起因するといえる。薬剤の母体における吸収は分布と同様、通常は大きな種差を示さない。経口投与後の初回通過効果はしばしばヒトよりも動物においてより顕著である(例：バルプロ酸、13-シスレチノイン酸)が、場合によっては逆の現象もみられる(例：バルプロミドの加水分解)。現存する相違は、投与経路の適切な選択と薬物濃度測定によって調節できる。多くの変数が、発生段階、胎盤のタイプ、本剤の特性などによる胎盤における薬剤移行を決定する。レチノイドなどの近縁薬であっても、胎盤における移行は大幅に異なるとみなされている。母体血漿における遊離濃度は、器官形成の間、胚との平衡化が可能であるため、母体におけるタンパク質結合は、胎盤移行の重要な決定因子である。本パラメータは種間でとても異なり、例えばバルプロ酸では、サルやヒトと比べてマウスとハムスターにおける遊離濃度は 5 倍高い。代謝パターンの種間相違の主要因は、これまで証明されていなかった。しかしながら、フェニトインとサリドマイドに関する最近の見解は、幾つかの種間の相違はその活性化あるいは不活性化経路の相違に起因するものであるという仮説を支持するものである。通常、実験動物における薬剤排出率はヒトよりも大いに高い。動物における催奇形性試験の間、薬物濃度の急激な変動がみられたが、 ヒトにおける治療では同程度の現象はみられなかった。したがって、例えばバルプロ酸やカフェインなどのピーク濃度あるいは曲線下面積（AUC)におけるシクロフォスファミドとレチノイドの催奇形性反応との関連性の有無について調査が行われる必要があり、異種間比較を可能とするための合理的かつ科学的基盤となる。動物実験に基づくヒトでの応答予測は、適切な薬物動態を決定する要素の考察によって、その改善が可能であると結論づけられる。

---

[13] Nau H., “Species differences in pharmacokinetics and drug teratogenesis.”, Environ Health Perspect. 1986 Dec;**70**:113-29. Erratum in: Environ Health Perspect 1988 Apr;77:following 156.

4.3.2.1.1　序論

催奇形物質への応答性における種差は､大きく 2 つの理由によるものと考えられている。1 つ目は(a)発達途中の組織に固有の感受性（intrinsic sensitivities)、例えば、ヒト以外の霊長類における神経管においては非常に希少であるが、ヒトを含む他の種では頻繁（prominence）であるもの；2 つ目は(b)妊娠中、感受性が高い時期にある胚への暴露量の違い、である。

薬物動態試験においては一般的に(a)が重視されているが、このレビュー論文では、主に(b)について検討を行う。胚の潜在的な感受性は、暴露レベルの比較のみで評価できるためである。

薬品、または他の化学物質への応答性の種差は、胚に対する暴露濃度及び暴露時間により決定されると考えられる。従って、薬物動態の様々なパラメータは胚における薬物暴露の重要な決定因子となる。これらの因子は種により異なっており、胚における薬物濃度、催奇形性応答が種によって大きく違うことは当然のことである。しかしながら、種差は薬物排泄率や母体血漿中のタンパク質結合率､胎盤通過が特にこの要因となっていると示されると考えられる。期間形成期は、催奇形性に最も関連がある期間であると考えられる。

4.3.2.1.2　母性由来の吸収、投与経路、一次通過効果（Maternal Absorption, Administration Route, First-Pass Effect）

吸収率や吸収量は種、投与ルート、使われる薬剤の形によって異なる。薬剤の吸収は主に小腸で起こるため、胃が空になる時間（半分を消化するのに、マウスとラットでは 10 分、ウサギでは 30 分、イヌ及びヒトでは 1～2 時間）が重要となる。上記のように、げっ歯類ではヒトに比べ吸収が早い。実際、液状のバルプロ酸ナトリウムを経口投与した場合、血漿中のバルプロ酸の濃度は、マウスでは投与後 10 分から 30 分の間に最大となるが（図 4.3.2.1-1 左図）ヒトでは 1 時間から 3 時間の間に最大となる。酸抵抗性のカプセルをヒトに投与した場合は、吸収はさらに数時間遅くなる。

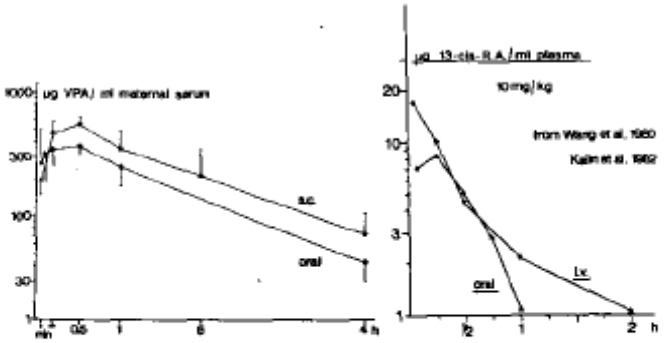


FIGURE 1. Concentration-time curves of valproic acid after oral and SC administration in pregnant mice (left) (*17,35*) and 13-*cis*-retinoic acid after oral and IV administration in nonpregnant mice (right); the data for the construction of the right panel were taken from Wang et al. (*37*) and Kalin et al. (*36*). Note the lowered bioavailability of both drugs after oral administration.

図 4.3.2.1-1　液状のバルプロ酸ナトリウムを経口投与した場合の、血漿中のバルプロ酸の濃度（左：マウス、右：ヒト）

吸収に注目してみると、胃や腸管をめぐる血液は、まず肝臓を流れる。そこでは、肝臓における代謝により解毒が行われる（「最初の通過効果」(first-pass effect)または「全身に巡る前のクリアランス」(presystemic clearance)）。肝臓における代謝は、実験動物においてはヒトを上回ることがある。「最初の通過効果」により、実験動物に投与された画分は著しく減少する。図 4.3.2.1-1 は、バルプロ酸をマウスに経口投与した場合、皮下に投与した場合に比べて 50%程度薬量が減少するということを示したものである（図 4.3.2.1-1、左側）。ヒトに経口投与した場合、薬品の生物活性はほぼ 100%である。経口投与されたイソトレチノイン（13-シス-レチノイン酸）の濃度-時間曲線の下部（the area under the concentration-time curve; AUC）領域（AUC 値は薬物の全身循環量の適切なパラメーターである）は IV の場合に比べ 5 分の 1 程度に低下している（図 4.3.2.1-1 右図）トレチノイン（all-シス-レチノイン酸）では、AUC（I.V.）に比べて AUC（経口投与）における循環量が低下する。マウスにおいてトレチノインに比べイソトレチノインの催奇形性能が低いのは、全身に循環するイソトレチノインの量が 1 ドースのうちの 20%程度であるためだと考えられる（表 4.3.2.1-1）。他方、マウスにおいては、イソトレチノインの胎盤通過が劇的に低いという重要な要因が近年発見された。

表 4.3.2.1-1　動物種において催奇形性を示すレチノインの用量

Table 2. Teratogenic doses of retinoids in several species.[a]

Species	Lowest teratogenic dose, mg/kg/day			
	All-*trans*-retinoic acid	13-*cis*-Retinoic acid	Etretinate	Etretin
Man	?	0.5–1.5	0.5–1	?
Monkey	7.5–40	?	?	?
Rabbit	6	10	2	0.6
Hamster	7	12	3	?
Rat	6	150	2	15
Mouse	3	100	4	3

[a]Data from refs. *19–31*.

しかしながら、ヒトにおいては、実験動物に比べより顕著な「最初の通過効果」を示すことがある。ヒトへの経口投与後、バルプロマイドは迅速に水和され、胃、腸管、肝臓に循環する際には既にバルプロ酸となっていると思われる。この「最初の通過効果」により、全身に循環するバルプロマイドは非常に少なく、ヒトの体内においてはバルプロ酸として作用するものと考えられる。他方、バルプロマイドはマウス、イヌの血漿中では主要な薬剤構成要素である。

ほとんどのケースで、血漿レベルの減少曲線はフェーズα（薬剤が排出され、組織に拡散する段階）とフェーズβ（純粋に、血漿と組織で平衡状態にある段階）の 2 つの段階に別れる。このときの分布量 $V_{\alpha,\beta}$ は下記のように示される。

$$V_{(\alpha、\beta)}=\frac{D}{[(AUC)k_e]}$$

体重に応じて薬物投与量が決定された場合、一般的に、薬剤分布量における種差はない（図 4.3.2.1-2）。多くの薬剤において、薬剤の吸収や分布プロセスを経たことによる最大濃度（Cmax）は多くの種で同様である。

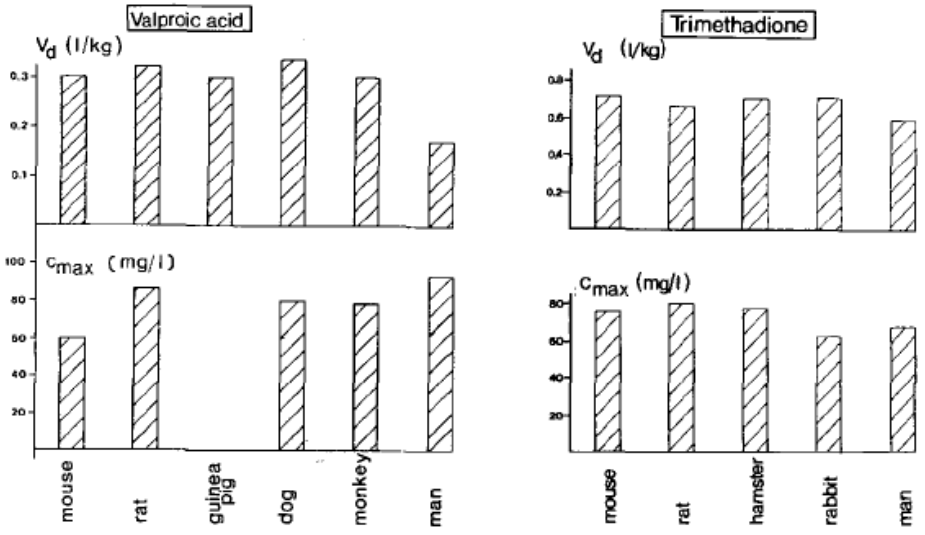


FIGURE 3. Volume of distribution V_d and maximal concentrations C_{max} of (left) valproic acid (*46,47*) and (right) trimethadione (*48*) in various species. *An oral dose of 50 mg/kg was used for valproic acid (except in man, 25 mg/kg), and an IV dose of 50 mg/kg for trimethadione* (except in man, oral). Note the relatively small interspecies variation of V_d and C_{max}, except for the relatively low V_d of valproic acid in man because of extensive plasma protein binding in this species (Fig. 7). A full listing of pharmacokinetic parameters of these two teratogens is given elsewhere (*46–48*).

図 4.3.2.1-2 体重に応じて薬物投与量が決定された場合の、薬剤分布量における種差

4.3.2.1.3　薬剤の胎盤移行（Placental Transfer of Drugs）

胚や胎児への薬剤の移行は、他の薬剤移行とは明確に区別される。それは、2 つの異なる因子が 2 種類の薬物動態を定義づけるためである（表 4.3.2.1-2）。高い脂肪親和性を持ち、イオン化しにくく、分子量 1000 以下であるという性質を持つ薬剤においては、非常に早く胎盤を通過するということが一般的に知られている。活発な移行の原因ははっきりとわかっていないが、胚や胎児の血液の pH が酸性、または塩基性の薬剤の移行に重要であると考えられている。胎児の血液は、母体の血液よりも pH が低いことが示されており[14]、バルプロ酸のような酸性の薬剤において、同様であることが予想される。塩基性の薬剤においては、その逆である。

初期胚においては、その pH は母体の血漿よりも高いため、胚の器官形成のステージで酸性薬剤は胚に蓄積され、催奇形の原因となる[15,16]。胚における内因性の感度は種によって大きく異なる。例えばサルでは、methotrexate と hydroxyurea に対してラットよりも低い感度を示す。ラットでは、胚での薬剤濃度がサルよりも低いにもかかわらず催奇形が観察される。

---

[14] Mirkin B. L., and Shingh, S. Placental transfer of pharmacologically active molecules. In: Perinatal Pharmacology and Therapeutics (B. L. Markin Ed.), Academic Press, New York-San Francisco- London, 1976, pp.1-69.
[15] Nau, H., and Scott, W. J. Weak acids as teratogens: drug accumulation in the basic milieu of the early mammalian embryo. Nature 323: 276-278(1986).
[16] Scott, W. J., and Nau, H. Weak acids as human teratogens: accumulation in the young mammalian embryo. Teratology 31: 25A (1985).

表 4.3.2.1-2 薬物の胎盤を通じた移行に影響を与える要因

Table 3. Parameters determining the rate and extent of drug transfer to the embryo.[a]

Drug transfer	Parameters
Rate	Lipid solubility of drugs[b]
	Molecular weight of drugs[b]
	Placental blood flow
	Placental structure and function
	Active transport of drugs
Extent	PK_a of the drug
	Maternal/embryonic pH gradient
	Protein binding of drugs
	Active transport of drugs

[a]Adapted from Mirkin and Singh (*51*).
[b]And other physicochemical characteristics determining the diffusion constants of drugs.

4.3.2.1.4 母体由来の血漿結合タンパク及び胎盤移行（Maternal Plasma Protein Binding and Placental Transfer）

胎盤における薬剤移行及び催奇形において、タンパク質結合の程度が重要な決定因子となっている（タンパク質と結合していないフリーの薬剤のみが胚と平衡状態になる）可能性があり、非常に興味深いがまだ解明されていない（図 4.3.2.1-3）。

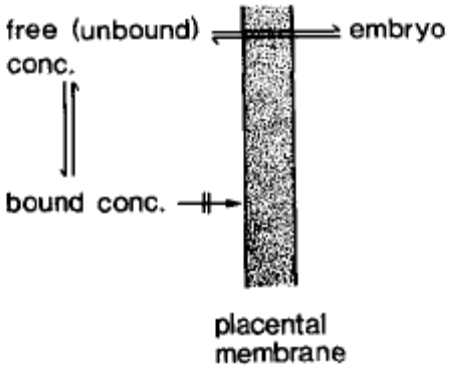


FIGURE 6. Schematic representation of the influence of maternal plasma protein binding on the embryonic drug exposure. Only the free plasma concentration is expected to equilibrate with embryonic tissue.

図 4.3.2.1-3 胎盤における薬剤移行及び催奇形における、タンパク質結合の程度の影響

血液または血漿（一般的に血漿タンパク結合と呼ばれる）または組織中の高分子への薬剤の結合は、薬剤分布の主要なファクターである。血漿タンパク結合は種により大きく異なる一方で、組織タンパク結合は種によりほぼ同じであることが知られている。薬剤の血漿タンパクへの結合は、例えば図 4.3.2.1-4 のバルプロ酸に示されるように、実験動物においてヒトよりも低い。近年の研究で、血漿タンパク結合は、胎盤移行及び催奇形性を決定づけるメジャーかつ重要な因子であることが示されている。ジアゼパム，バルプロ酸、サリチル酸や

いくつかの麻酔剤のヒト胎児における母体／胎児タンパク質結合の割合を表 4.3.2.1-3 に示した。

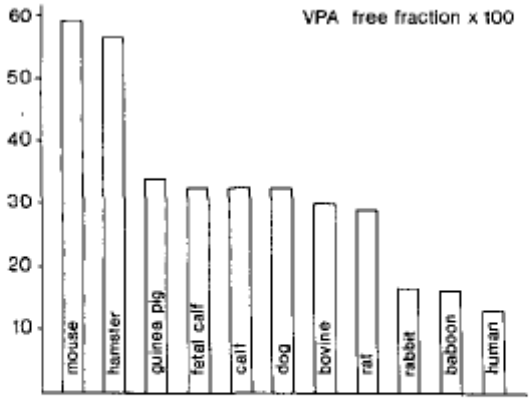


FIGURE 7. Protein binding (expressed as free fractions × 100) of valproic acid in serum (reconstituted from lyophilized material commercially available) of various species. Added total concentration was 100 μg/mL. Note the much higher free fractions in mouse and hamster serum as compared to primate serum. From Nau (47).

図 4.3.2.1-4 薬剤の血漿タンパクへの結合

表 4.3.2.1-3 いくつかの麻酔剤のヒト胎児における母体／胎児タンパク質結合の割合

Table 4. Transfer of drugs during fetal development in the human.

Fetal/maternal plasma concentration ratio	Drug	Reference
> 1	Diazepam	(66,67)
	Valproic acid	(54,68)
	Salicylic acid	(69,70)
	Nalidixic acid	(71)
0.5–1	Most drugs	
< 1	Dicloxacillin	(72)
	Erythromycin	(73)
	Chlorthalidone	(74)
	Lidocaine, bupivacaine	(55)
	Tubocurarine, suxamethonium	(75)
	Cimetidine	(76)

4.3.2.1.5　薬剤排出の割合（Rates of Drug Elimination）

実験動物においては、ヒトよりも迅速に薬剤の排出が起こることが明らかになりつつある。実験用の小動物は、ヒトに比べ体表面積／体重の比が大きい（表 4.3.2.1-4）。体表面積が大きいと、体温を調節するのに必要な代謝機能がより多く必要になる。呼吸速度、腎臓及び肝臓の大きさ、心拍数、血流速度などの生物学的機能の多くは、体重というよりも体表面積に関連するものである。

このようなコンセプトは、代謝されない抗がん剤の毒性の比較に活用できる。表 4.3.2.1-4

に、いくつかの種の、単位面積当たりの重量を示した。マウスではヒトの 12 倍、ラットでは 6 倍、アカゲザルは 3 倍というのが効果的な投与量となることになる。

表 4.3.2.1-4　体表面積／体重の比

Table 8. Body weights, surface areas and conversion factors of dosing from mg/kg into mg/m².

Species	Body weight, kg	Surface area, m²	Conversion factor[a,b]	Dose equivalent/ kg[c]
Mouse	0.02	0.0066	3.0	12.0
Rat	0.15	0.025	5.9	6.0
Dog	8	0.40	20	1.7
Monkey	3	0.24	12	3.0
Humans				
Child	20	0.80	25	1.5
Adult	60	1.60	37	1.0

[a] Literature data (*114,115*).
[b] To convert a mg/kg dose in a given species into an equivalent mg/m² dose, multiply the dose by the conversion factor.
[c] Dose equivalent for the adult human is set as 1.0.

4.3.2.1.6　クリアランス及び半減期というパラメーター（Clearance and Half-life as Parameters）

血漿クリアランス（Cl）は、薬剤排出においてもっとも重要なパラメーターである。これは、以下の式により算出される。なお、D は薬剤投与量、F は吸収された薬剤、AUC は濃度-時間曲線の下部領域である。

$$\mathrm{Cl}=\frac{DF}{AUC}$$

また、半減期（t1/2）は薬剤排出量に加え、薬剤分布量（Vd）にも依存する。

$$t_{1/2}=0.69\frac{V_d}{Cl}$$ （血漿減少フェーズが 1 段階である場合）

$$t_{1/2,\beta}=0.69\frac{V_{\alpha,\beta}}{Cl}$$ （血漿減少フェーズが 2 段階である場合）

4.3.2.1.7　催奇形におけるピーク値と AUC 値（Peak Levels vs. AUC Values as Teratological Correlates）

ほとんどの薬剤において、動物の体内での半減期はヒトにおける半減期よりも短い。実験動物では、体内の薬物の濃度のピークは高くとがった形を示すのに対し、ヒトにおいては、

より低く、治療域レベルに保たれている。図 4.3.2.1-5 で、ヒトにおける治療投与をマウスにおける催奇形投与と比較した結果を示した。図 4.3.2.1-5 及び表 4.3.2.1-5 に示した値から、マウスの催奇形性レベルは、ヒトにおける治療ピークレベルよりも高いことが分かる。

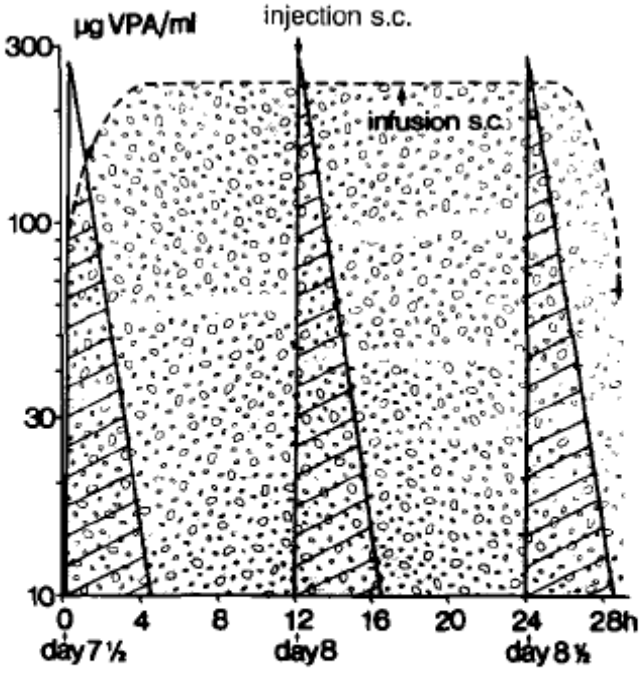


FIGURE 9. Simulated plasma concentration-time curves of valproic acid following a teratogenic drug administration regimen in the mouse (resulting in 10% exencephaly formation) as compared to a therapeutic drug administration schedule in man. Note the much more drastic drug concentration fluctuations in the mouse as compared to man. The time periods on the abscissa correspond to the length of the organogenesis period sensitive to interference with neural tube defect formations. From Nau (47).

図 4.3.2.1-5　ヒトとマウスにおける薬物濃度の時間変化の違い

表 4.3.2.1-5　ヒトとマウスにおける薬物濃度のパラメータの違い

Table 9. Comparison of pharmacokinetic parameters of valproic acid in mouse (teratogenic dose) with man (therapeutic dose).

Parameters	Mouse[a]	Man[a]
Teratogenic dose	180[b] (4 ×/24 hr)	30 (per 24 hr)
Cl (mL/hr × kg)[c]	1000	10
AUC (µg/mL × hr)[d]	720	3000
C_{max} (µg/mL)		
Total drug	230	100–150
Free drug	120	10–20

[a]Literature data (*14,16,46,47,50*).
[b]In this regimen SC doses were used which resulted in a significant formation of exencephaly (10% of live fetuses).
[c]Plasma clearance.
[d]Area under plasma concentration-time curve.
[e]Maximal concentration.

4.3.2.1.8　まとめ

薬剤の代謝や排出を検討する際、どの薬物動態パラメーターが催奇形性に関与するのかを判断する必要がある。AUC 値が決定因子である場合、毒性が薬剤クリアランスに逆に関連する。他方、薬剤レベルのピークが催奇形性に関与する場合、毒性応答が薬剤の吸収と分布に関与する。もし、比較のためにどのパラメーターを用いたらよいのか分からない場合、結果のミスリーディングが起こる可能性がある（表 4.3.2.1-5）。

4.3.2.2　「Pharmacokinetic considerations in the design and interpretation of developmental toxicity studies.」[17]

直接的な催奇形性作用は、妊娠の感受性期における、胎盤－胎児区画内での、薬剤あるいはその活性代謝産物の濃度－時間関係に依存する。したがって、特に、以下のテーマの観点において、催奇形性実験の解釈及び設計の両方にとって、薬物動態学的な研究が重要である。

・種差
・胎盤移動
・代謝活性
・構造活性

（1）種差

発生する先天性異常（malformation）と催奇形性用量レベルは、大きな種差を示す可能性がある。主要因は、発達途中の組織の内因性感受性と、妊娠の感受性期における胎児の暴露における違いの二点である。薬物動態の主要なパラメータ（吸収、分布、（代謝、）排泄）のうちで、薬剤排泄（代謝による排泄と、排出による排泄の両方）が、最も大きな種差を示す。多くの場合、薬剤の半減期は、実験動物では、ヒトよりも一桁短い。実験動物を用いた、従来の催奇形性試験では、濃度－時間曲線が高くて鋭いピークを示すことが多いが、排出速度が高いからである。この高いピークは、急速に、問題とならないレベルまで落ち込み、投与間隔の間で「薬剤の休止期間」が持続する。一方、ヒトは、より持続的な薬剤濃度に暴露される（特に医薬品の場合）が、これは薬剤の半減期が動物よりも長いからである。したがって、濃度を最大にするか、それとも濃度－時間曲線の面積（Area under the concentration-time curves, AUC）を最大にするかが、決定的な因子である。

初回通過効果は、多くの場合、ヒトよりも動物の方がずっと大きい。吸収における種差は、大抵の場合、調整可能である。分布量における種差は、多くの薬剤で主要な問題ではない。

母体における血漿タンパク結合は大きな種差を示し、実験動物の血漿中の結合よりも、ヒトの血漿中の結合がずっと大きいことが多い。これは、分布量が比較的小さな医薬品（多く

[17] Nau H., “Pharmacokinetic considerations in the design and interpretation of developmental toxicity studies.”, Fundam Appl Toxicol. 1991 Feb;**16**(2):219-21.

の酸性薬）では特に重要であるが、その理由は、身体にかかる負荷の大部分が、血漿タンパク結合の変化によって影響されるからである。

催奇形性の観点での種差にとって、薬剤の代謝パターンが重要であると広く考えられているが、その仮説に対する明確な事例はまだない。レチノイドによる催奇形性の理由にはなるが、この場合は、解毒作用経路と、毒作用経路の両方が重要となっている。

特定の発達過程における感受性期間は、ヒトよりも実験動物の方が数倍短いことが多い。したがって、特定の発達過程の研究では、従来の毎日の投与飼育と比べると、決められた期間中に複数の投与を行う飼育の方が、より有用である。また、ヒトにおける長期間の暴露は、実験動物では薬剤の注入によりもっとも正確に再現される。これは、催奇形性の影響が、胎児に達する AUC に関連する、レチノイドのような薬剤で、もっとも重要である。催奇形性の影響を類似の薬物動態学（異種間における生物学的等価性）と比較する時には、種による違いはそれほど問題にはならない。

（２）胎盤移動

細胞膜内の受動拡散が最も重要な通過機構であることから、親油性が高く、イオン化の程度が低く、分子量が比較的小さく（1000 未満）、血漿結合が低い薬剤は、胎盤を急速に、大量に通過する、と一般化されることが多い。しかし、これには例外が多いので、このような一般化は有用ではない。例えば、生理的な pH で高くイオン化されている薬剤は、急速に通過することが多い。胎児への暴露の度合いは、胎児の血漿と母親の血漿の間の pH 勾配及び結合勾配に依存する。さらに、初期の器官形成期には、胎児の pH が比較的高いため、酸性薬が蓄積する可能性がある。結合性の高い薬剤が胎盤を通過する度合いは、母体の血漿よりも胎児内の結合に依存する。全トランス型レチノイン酸は、13-シスレチノイン酸よりも遥かに、胎児の細胞のレチノイン酸と結合する。

対照的に、催奇形性能力が低い類似体は胎児区画に容易に接近するが、バルプロ酸類似体の催奇形性能力は、経胎盤性動態とは関連がない。

（３）代謝活性

シクロフォスファミドは、本質的には催奇形性がない薬剤の典型であるが、活性化すると催奇形性を持つ代謝産物になる。逆に、バルプロ酸は親薬剤としては催奇形性がある。一方、代謝産物は催奇形性がなく、活性も示さない（4-en-VPA）。レチノイン酸の催奇形性には、代謝が重要な役割を果たしており、全トランス型レチノイン酸は、13-シスレチノイン酸の催奇形性の観点からも、レチノール（ビタミン A）の催奇形性の観点からも重要である。

（４）構造活性

多くの化合物では、催奇形性は構造と強く関連する（すなわち構造特異性がある）。上述した 13-シス-レチノイド酸のように、母体の動態と胎児の暴露に関係する場合もある。構

造特異性は､鏡像異性体の立体選択的な催奇形性に関して観察される差異で最もうまく示される。サリドマイド同族体 EM-12 の鏡像異性体と、4-en-VPA 及び 2-エチルヘキサン酸の鏡像異性体は、催奇形性力の観点で異なることが示されているが、このことは、催奇形性の機構には、化合物と胎児内の鏡像異性体分子（原文注：タンパク質か？）の間で立体選択的な相互作用があることを示している。

4.3.2.3 「Quantitative risk analysis for quantal reproductive and developmental effects.」[18]

通常、動物実験は、生殖あるいは発生への影響に対するわずかな変化を誘発する目的で、予測されるヒトへの投与レベルよりも高用量にて、比較的少数の動物で行われる。

動物データに基づき、通常の規制方式では、毒性影響に対する無影響量（no-observed-effect level, NOEL）が必要とされ､ヒトにおける許容量を確立するために、この値を、通常 100 の、安全係数で割っている。さまざまな著者が NOEL を使用する欠点を議論し、例えば、動物の 1%が副作用を受ける用量のような生物実験データにフィットさせた用量反応曲線から決定された推定作用レベルの使用を提案し､低用量におけるリスク管理のために保守的な、低用量の外挿をするいくつかの数式を用いてきた。本論文では、胎児死亡率あるいは異常に関する、10 組の生物実験データを用いて、NOEL の 100 分の 1 において推定したリスクの上限値と､胚組織あるいは胎児の 1%が影響を及ぼす用量の 95%信頼限界の下限値の 100 分の 1（LED01/100）を比較した。後者の用量は、結果として 10^{-4} よりも低いリスク(影響を受けた比率)となると予想された。NOEL/100 に関するリスク上限の推定値は、10 組のデータにおいて 2×10^{-4} から 6×10^{-4} であった。

4.3.2.3.1 序論

限られた動物で、毒性影響の可能性を検出するために、実験では、予想されるヒトへの暴露レベルよりも高い用量を投与することが普通である。そこで、高用量から低用量への外挿が必要となる。発生毒性データの外挿に関する以下の議論は、それ以下ではリスクが存在しなくなる、生物学的な閾値の可能性を割り引くものではない。

発生毒性の許容レベルの設定に用いられる手法の一つが、安全係数（不確実さ係数）の使用である。複数（通常は 3 種類以上）の用量で実施した生物学的実験結果から、無影響量（NOEL）を安全係数で割ることにより、ヒトに対する安全用量を推定する方法である。Lehman と Fitzhugh は安全係数として 100 を提案した。実験動物とヒトとの違いについて安全係数 10 を適用し、個体の感受性の差について安全係数 10 を適用している。死亡あるいは先天性異常（malformation）のような不可逆的な影響については、さらに安全係数 10

[18] Gaylor DW., “Quantitative risk analysis for quantal reproductive and developmental effects.”, Environ Health Perspect. 1989 Feb;**79**:243-6.

を考慮することが提案されている。安全係数 100 は、応答における種差あるいは同じ種の中の個体差を説明するには充分であっても、これが必ずしもリスクがない用量に帰着するわけではない。NOEL は、試験された実験室内の動物にとっての安全用量を意味するとは限らない。それは、わずかな毒性影響を検出するには実験の検出力が不十分かもしれないからである。つまり、NOEL は不十分なものかもしれない。また、安全係数は、やや恣意的であり、平均としてみれば適切であっても、特定のケースについては不適切かもしれない。さらに、Gaylor 及び Crump は、貧弱な実験により高い NOEL が得られて、その結果として許容レベルが高くなった問題点を指摘している。

ヒトに対する許容レベル（リスクが識別されないと推定されるレベル）を設定する場合には、ある動物種における毒性影響を表す NOEL に、決まった大きさの安全係数を機械的に適用するよりも、すべての用量－応答曲線のデータを使用するべきである。動物実験による用量－応答曲線から推定されるリスクの信頼限界の上限値に基づけば、実験動物種に対するあるレベル以下のリスクを低減するための安全係数を決定することが可能である。

実験データをフィッティングするために、いくつかの数学的な、用量－応答モデルが用いられてきた。

例えば、再吸収される組織の割合や先天性異常（malformation）のある生き物の割合といった、定量的な応答について自発的なバックグラウンドよりも、1%未満から 10%程度超えるリスクを、用いるモデルによらず、標準的な発生毒性研究から正確に推定することは困難である。

Kimmel and Gaylor は、ED_{10}（超過リスク 10%に対応する有効用量）に基づいて低用量リスクを制御する手順を提案した。影響を受ける割合上に、実験データに対応して、用量－応答曲線をフィッティングする。この曲線を用いると、実験した用量の範囲で、低いレベルのリスクをもたらす用量（例えば、ED_{10}（超過リスク 10%に対応する有効用量））を推定することができる。こうして、10%リスクをもたらす用量の信頼区間の下限（LED_{10}）が得られる。安全係数を F とすると、LED_{10}/F の用量では、低用量領域のリスクは、0.1/F よりも小さいと評価される。この手順は、用量－応答曲線が上に凸の場合には、安全の観点から、保守的である。生物学的な閾値が存在するならば、LED_{10}/F がその閾値の用量よりも小さい場合には、リスクの下限は 0 となる。この手順は、動物を対象とした研究で収集した用量－応答データを、大いに利用しているが、NOEL に基づく現在の手順では、たった一点のデータしか利用していない。安全係数を NOEL に適用すると、NOEL における潜在的なリスクを考慮していないことからさまざまなリスクが得られるのに対して、安全係数を LED_{10} あるいはその他の用量に適用することの利点は、リスクの上限が評価可能である点である。

催奇形性の研究の多くは、発生率が 10%異常の疾患を検出することが可能である。そこで、NOEL は、通常、リスクが 10%未満である用量を表す。NOEL を若干、外挿することで、ED_{01} を推定することができる。通常、ED_{01} は NOEL の用量範囲内にあるので、

LED_{01}/100 と NOEL/100 を比較することは興味深い。通常は、普通の催奇形性研究で ED_{01} を直接測定することはできないので、実験データから何らかの内挿あるいは外挿が必要である。どのようなモデルを用いようと、ED_{01} の推定値への影響は大してない。許容レベルを設定するために、実験の設計によってかなり変化する NOEL/100 を用いるよりも、ED_{01} の下限値（LED_{01}）をある係数（この場合は 100）で割る方法の方が一貫した手法である。低用量領域で、用量－応答曲線が上に凸であるならば、LED_{01}/100 の用量におけるリスクは 10^{-4} よりも小さいと推定される。もしも LED_{01}/100 が閾値（閾値がもしあれば）となる用量よりも小さい場合には、リスクはゼロである。

4.3.2.3.2　手法

表 4.3.2.3-1 に示す、用量と、生殖毒性あるいは発生毒性を持つ胎児の割合の 10 組のデータを用いて、LED_{01}/100 と NOEL/100 を比較した。一般的には同腹仔ベースのデータを用いることが好ましいが、同腹仔ごとのデータは報告されていないので、同腹仔ごとの死亡胎児あるいは異常胎児の割合に関する用量－応答曲線はなく、胎児の全体についての割合を用いた。

各組のデータについて、次の多項式をフィッティングした。

$$P = 1 - \exp\{-(b_0 + b_1 d + b_2 d^2 + \cdots + b_k d^k)\}$$

ここで、P は影響を受けた胎児の割合、d は用量、b は Howe and Crump の手順を用いてデータから得られた値をそれぞれ表す。こうして得られた S 字型の用量－応答曲線を用いて、LED_{01} の推定値を算出した。

低用量リスクの推定値における保守的な上限は、LED_{01} 以下において、用量の勾配として 0.01/ LED_{01} を用いると、上に凸の用量－応答曲線では

$$\text{推定リスク} \leq \frac{0.01}{\mathrm{LED}_{01}} \times \text{用量}$$

となる。

したがって、LED_{01}/100 の用量におけるリスクは 10^{-4}（$= \frac{0.01}{LED_{01}} \times \frac{LED_{01}}{100}$）よりも小さいと評価される。NOEL/100 の用量におけるリスクは、10^{-4}×NOEL/ LED_{01} よりも小さいと評価される。

4.3.2.3.3　結果と議論

表 4.3.2.3-2 に、10 組のデータについて NOEL と LED_{01} を比較して示す。NOEL は LED_{01} の約 2 倍から 6 倍であり、LED_{01}/100 の用量におけるリスクの上限の推定値である 10^{-4} と比べて、NOEL /100 の用量におけるリスクの上限値の推定値は 2 倍から 6 倍高い。同腹仔に関するデータの詳細は不明なので、同腹仔の影響については言及することができない。

本論文で示した、LED_{01}に基づいてリスクを低用量領域に外挿する手法は、用量－応答データを考慮に入れている。そのため、低用量レベルでのリスクを推定する際に、より強力な根拠を提供している。適切な用量－応答モデルを構築するためにはさらなる研究が必要である。統計的に改良された手順を用いて実験データを曲線にフィットすれば、より良い、LED_{01}の推定値が得られる。本研究では、生殖及び発生に与える影響では、NOEL に適用する安全係数を 100 倍として、リスクの推定値が 6×10^{-4}未満となった。LED_{01}/100 の用量における生殖及び発生に関するリスクは、10^{-4}未満と推定された。このように、許容可能な用量レベルを設定するには、NOEL /100 よりも LED_{01}/100 を用いることで低いレベルのリスクが得られる。

表 4.3.2.3-1　実験で得られた、影響を受けた動物の割合（定量データ）

Compound	Species	Effect	Doses	Number
Ethylenethiourea (*11*)	Rats	Fetal anomalies	0 mg/kg	0/167
			5	0/132
			10[a]	1/138
			20	14/81
			40	142/178
			80	24/24
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (*12*)	Rats	Intestinal anomalies	0 μg/kg	0/24
			0.125	0/33
			0.250[a]	1/33
			0.500	3/31
			1.00	3/10
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (*13*)	Rats	Fetal mortality	0 μg/kg/day	22/318
			0.001[a]	16/224
			0.010	17/100
Calcium valproate (*14*)	Rabbits	Skeletal malformations	0 mg/kg	3/93
			50	7/136
			150[a]	2/95
			350	35/83
Ametantrone (*15*)	Rabbits	Malformations	0 mg/kg	3/92
			0.2[a]	2/55
			0.4	6/66
			0.8	8/68
Linamarin (*16*)	Hamsters	Skeletal defects	0 mg/kg	1/67
			70[a]	0/55
			100	5/56
			120	10/54
			140	14/63
Solanidine (*17*)	Hamsters	Resorbed fetuses	< 1 mg/kg	90/1054
			22	26/312
			66[a]	43/464
			110	70/235
Paraxanthine (*18*)	Mice	Limb anomalies	0 mg/kg	0/114
			175[a]	2/87
			300	32/91
		Palate anomalies	0	0/114
			175[a]	1/87
			300	30/91
		Eye anomalies	0	0/114
			175[a]	0/87
			300	9/91

[a]NOEL.

表 4.3.2.3-2　NOEL/100 の用量における、生殖毒性あるいは発生毒性リスクの上限値の推定値

Chemical	Species	End point	$LED_{01}/100^{a}$	NOEL/100	Estimated risk at NOEL/100
Ethylenethiourea	Rat	Anomalies	0.062	0.100	$< 1.6 \times 10^{-4}$
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin	Rat	Intestinal	0.0004	0.0025	$< 6.2 \times 10^{-4}$
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin	Rat	Mortality	5.4×10^{-6}	10.0×10^{-6}	$< 1.9 \times 10^{-4}$
Valproate	Rabbit	Skeletal	0.41	1.50	$< 3.7 \times 10^{-4}$
Ametantrone	Rabbit	Malformations	0.0005	0.0020	$< 4.0 \times 10^{-4}$
Linamarin	Hamster	Skeletal	0.20	0.70	$< 3.5 \times 10^{-4}$
Solanidine	Hamster	Resorptions	0.25	0.66	$< 2.6 \times 10^{-4}$
Paraxanthine	Mouse	Limb	0.29	1.75	$< 6.0 \times 10^{-4}$
		Palate	0.32	1.75	$< 5.5 \times 10^{-4}$
		Eye	0.46	1.75	$< 3.8 \times 10^{-4}$

[a]Estimated risk at the $LED_{01}/100$ is 10^{-4}.

4.3.2.4　「Use of mechanistic information in risk assessment for toxic chemicals.」[19]

有毒化学物質のリスク評価（RA）は、入手可能な科学的知見に基づき、適切な外挿法を組み合わせて、可能な限り確実性と定量性を高めて評価する手法である。図 4.3.2.4-1 は、リスク評価における 4 つのステップを示したものであり、それぞれ、危険有害性物質の特定（hazard identification）、用量反応評価（dose-response assesment）、曝露評価（exposure (dose) assesment）、リスクの特性化（risk characterization）に分類される。これらステップに基づく評価において、作用機構に関する情報（mechanistic information）を用いることで、評価結果の確実性を増すことができる。

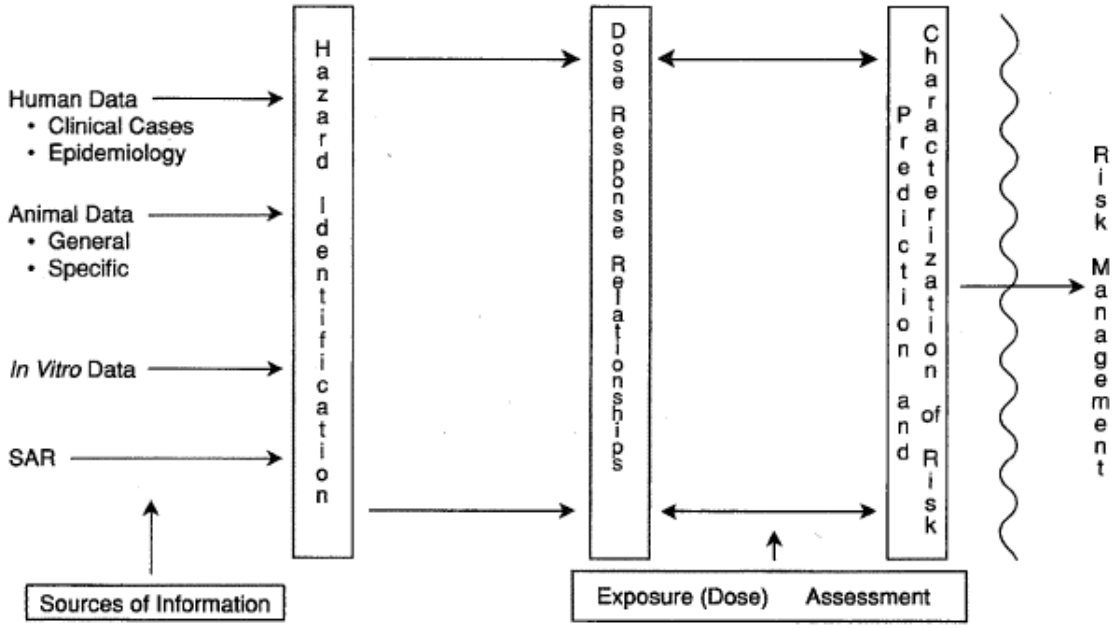


Fig. 1. Major elements in the assessment of risk to human health associated with exposure to chemicals.

図 4.3.2.4- 1 化学物質のリスク評価における一般的な 4 つのステップ

[19] Becking GC., “Use of mechanistic information in risk assessment for toxic chemicals.”, Toxicol Lett. 1995 May;**77**(1-3):15-24.

作用機構に関する情報とは、生体内作用（プロセス）及び各作用（プロセス）間の相互作用を制御する要因に関する情報である。作用機構に関する情報を用いることで、全身的作用、発生／生殖影響、神経毒性影響等のリスク評価において、許容限界、最大無毒性量(NOAEL)、不確実係数といったこれまでの評価方法から脱却することができる。薬物動態学と薬理学には重複する部分があるが（図 4.3.2.4-2）、作用機構に関する情報を用いることでその関係性を示すことが可能である。

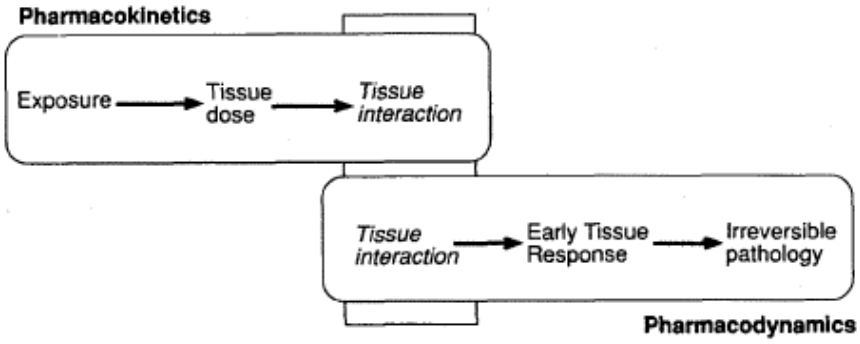


Fig. 2. Overlap between pharmacokinetics and pharmacodynamics when using a biologically based description for risk assessment. Cited from [6].

図 4.3.2.4-2 薬物動態学と薬理学の重複

発がん性物質のリスク評価には、3 つのサブモデルで構成される「作用機序に基づく定量的ばく露反応モデル」が用いられる（図 4.3.2.4-3）。組織における線量測定モデルは生理学的薬物動態学（PBPK）に基づき、初期組織反応は薬理学に基づく。

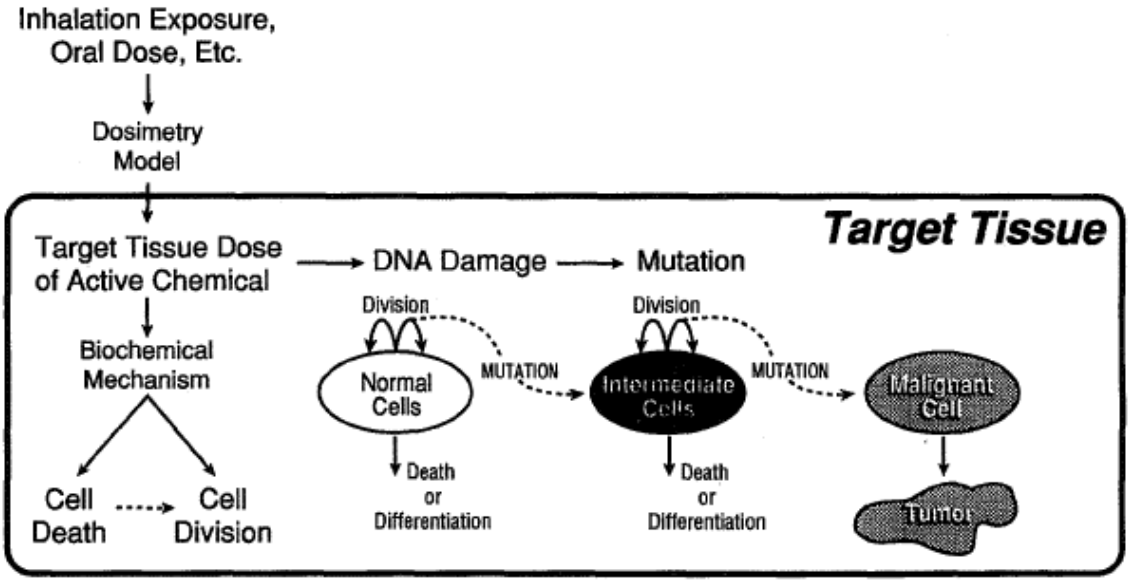


Fig. 3. A generic quantitative, mechanism-based exposure-response model for chemical carcinogens. Cited from [7].

図 4.3.2.4-3 化学物質の作用機序に基づく定量的ばく露反応モデル

生理学的薬物動態学（PBPK）と薬力学（PBPD）モデル、代謝モデル、及び組織結合（受容体）モデル等を利用したがんリスク評価から得られる知見は、がん以外のリスク評価へ適用可能である。クロロホルムの肝毒性に関して、PBPK モデルの適用するのは良い例である。表 4.3.2.4-1 は、がん以外の健康影響に関するリスク評価で想定される要件だが、がんリスク評価のように、生物学的データによって置き換えられると、異種データの外挿に伴う不確実性が少なくなる。

表 4.3.2.4-1 がん以外の健康影響に関するリスク評価に必要な要件

Table 1
Assumptions underlying risk assessments for non-cancer health effects

1. A threshold dose exists for non-cancer endpoints.
2. NOAEL/LOAEL UF approaches are reasonable.
3. Variability in the toxic response to the chemical exposure is not due to a heterogeneous population response.
4. Average dose or total dose is a reasonable measure of exposure when doses are not equivalent in time, rate, or route of administration and the average (or total) dose is proportional to adverse effect.
5. The mechanism of action is the same at all doses for all species.

Modified from Sheehan et al., 1989 [48].

組織線量測定と応答データに関する情報の組み合わせもまた、集団内変動の推定に役立つ。これは、現在の一般的な方法論では不可能であり、適切なリスクの確定に必須である。
がんの研究領域と異なり、多数のがん以外のエンドポイントへの作用機構に関しては、単一の仮説は存在しない。

4.3.2.5 「The future of mechanistic research in risk assessment: where are we going and can we get there from here?」[20]

4.3.2.5.1 概要

定量的なヒトの健康リスク評価は、しばしば実験データあるいは疫学データと一致する数理モデルに基づく。近年、リスクアセスメントにおいて、作用機構モデルを使用する傾向が強まっている。これらのモデルによって、データをより生物学的に解釈することが可能になるとともに、オリジナルのデータが得られた条件範囲を越えて外挿を行う際の、より強固な

[20] Goddard MJ, Krewski D., “The future of mechanistic research in risk assessment: where are we going and can we get there from here?”, Toxicology. 1995 Sep 1; **102**(1-2):53-70.

科学的裏付けが得られる。この論文では、変異原性、発がん性および発達毒性の生物学的モデルの開発について、近年の進歩を概説する。作用機構モデルを用いたリスク評価におけるファーマコキネティクスおよび受容体結合モデルとそれらの役割についても議論する。作用機構モデルの構築に必要なデータを得るためのより精密な実験の必要性など、作用機構モデルの今後の研究のありかたについても検討する。

（注）本文献では、変異原性、発がん性の評価についても論述しているが、以下の要約では、催奇形性に関連する部分を紹介する。

4.3.2.5.2　発生毒性に関する数理モデルの構築

催奇形性の研究の基本的な目標は、薬物への曝露を奇形の発生頻度と関連づけることである。用量－反応関係の研究のために多項式モデルが提出されている。そのスキームは図4.3.2.5-1の通りである。奇形をもって生まれる産仔数（ｙ）と死産数（ｒ）が重要になる。これらの多値データの分析においては、しばしば、各母獣における着床数ｍを次数とする多項分布が用いられる。多項分布は、下式のように、それ自体が二項分布又は多項分布にしたがう成分同士の積で表される。

$$P(y,r,m) = P(y,r|m)\,P(m)$$

ここで、P（y,r,m）は、奇形の産仔、死産、着床数がそれぞれｙ、ｒ、ｍ観察される確率である。P（m）は着床数がｍとなる確率であるが、曝露は交尾後に起こるため、これは用量とは無関係であり、毒性学的な情報は含まない。P（y,r|m）はさらに次のように表せる。

$$P(y,r|m) = P(y|r,m)\,P(r|m)$$

ここで、着床数がｍの時の死産数ｒ及びｒ、ｍが与えられた時の奇形の産仔数ｙは調べることが可能である。実用的には、産仔数ｓが与えられた時の奇形の発生確率π_1と着床数ｍが与えられた時のπ_2をパラメータとしてモデル化するのが簡単である。

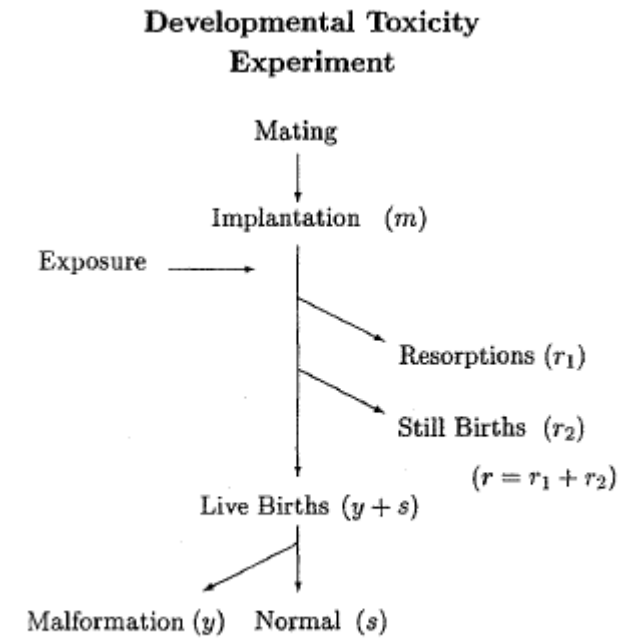


Fig. 4. Schematic representation of possible outcomes from a developmental toxicity assay.

図 4.3.2.5-1 用量－反応関係の多項式モデル

同産仔内での相関（intralitter correlation）を考慮するためには、多項分布のパラメータがディリクレ分布に従うと仮定することが行われる。このように多項分布以外の分散要因を考慮することは、エームズ試験において、ポアソン分布の強度に関するパラメータがγ分布に従うと仮定することに似ている。したがって、ディリクレ分布を取り入れることは、エームズ試験で負の二項分布を使用することに相当する。

同産仔内での相関については、一般化推計方程式（GEE）や Rao-Scott 変換を用いた研究も行われている。

用量－反応特性の解析には、π_1とπ_2がワイブル分布にしたがうとのモデル化が行われる。

$$\pi_1(d) = 1 - \exp[-(a_1 + c_1 m + b_1 d^{v1})\}$$
$$\pi_2(d) = 1 - \exp[-(a_2 + c_2 m + b_2 d^{v2})\}$$

ここで、$1 - \exp(-a_k)$は奇形が発生するバックグラウンドの確率であり、v_kは用量－反応曲線の形状を決めるパラメータである。２つのパラメータのセット（a_1,b_1,c_1）、（a_2,b_2,c_2）は機能的に独立している。

この方法を用いて、エチレングリコールジエチルエーテル（EGDE）、エチレングリコー

ル（EG）のデータを分析した結果を図 4.3.2.5-2 に示す。これは、ラットとマウスに EGDE、EG を与えた時のデータに上記のモデルを当てはめたものである。一番上の段と二段目の図はそれぞれ、胎児の奇形、出生前死亡の発生率を表し、三段目の図は総合毒性（overall toxicity）π_3（＝１－［１－π_1（d)］［１－π_2（d)］）である。

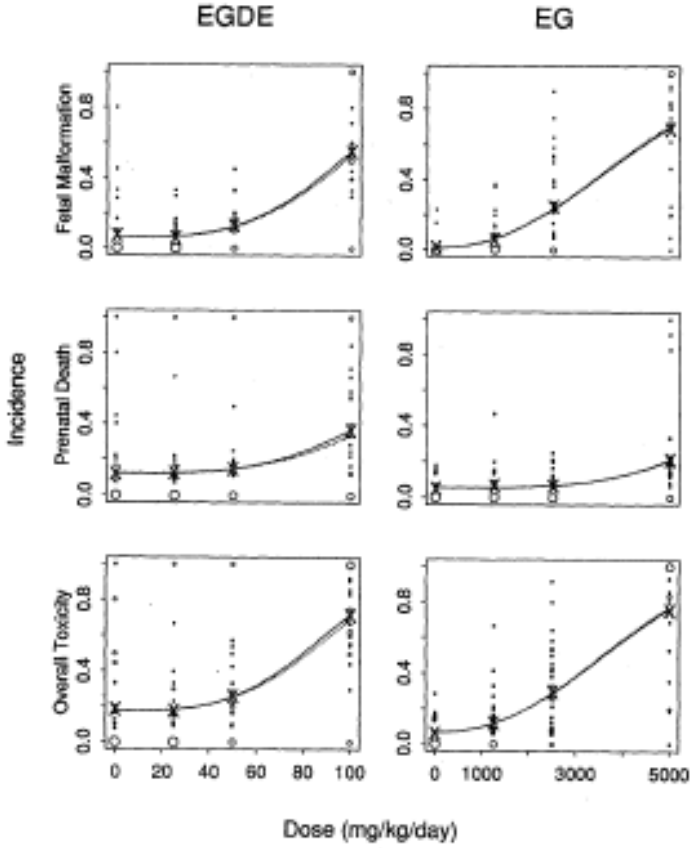


Fig. 5. Dose-response curves for fetal malformations and prenatal death for mice and rats exposed to ethylene glycol diethyl ether (EGDE) and ethylene glycol (EG).

図 4.3.2.5-2 エチレングリコールジエチルエーテル（EGDE）、エチレングリコール（EG）のデータを分析した結果

実線と点線はそれぞれ、一般化推計方程式（GEE）と Rao-Scott 変換を用いたフィッティングである。ここでは Rao-Scott 変換を用いたフィッティングの結果が、一般化推計方程式を用いたフィッティング結果と非常に近くなっている。この結果から、より単純な Rao-Scott 変換を用いることで、一般化推計方程式を用いる時の複雑さを回避できることが示唆される。

これらのモデルの有効な応用例がベンチマーク用量（benchmark dose, BMD）である。α％での BMD はリスクがバックグラウンドからα％増加する時の毒物の用量のことを言う。

上記のワイブルモデルでは、$d_\alpha = (-\log(1-\alpha) / b_k)^{1/v_k}$ で表される。

Krewski と Zhu は 11 種類の発生毒性をもつ化学物質について、奇形や死産、全体的な毒性の発生数のデータを分析している。

4.3.2.5.3　まとめ

上述した通り、発生毒性についても生物学的なモデルの構築が始まっている。ワイブル分布を用いた用量－反応モデルは BMD の決定に用いることが可能であり、最終的にはヒトの曝露の指針を決める際の基礎となるかもしれない。しかし、これらのモデルは、変異原性や発がん性のモデルに比べると生物学的な作用機構には踏み込んでおらず、生物学的なモデルと言うよりは統計学的なモデルである。したがって、発生毒性における複雑で多様なメカニズムをより詳細に反映したモデルを開発する必要がある。こうしたアプローチの 1 つが、発がんの二段階モデルのように、細胞の増殖と変性を考慮したモデルである。

4.3.2.6　「Physiologically based pharmacokinetic models applicable to organogenesis: extrapolation between species and potential use in prenatal toxicity risk assessments.」[21]

妊娠中のげっ歯類において 2-methoxyacetic acid(2-MAA、エチレングリコールエーテル、2-methoxyethanol の酸化により誘導される)の処理を記述する生理学的薬物動態モデル(PBPK)を開発した。

このモデルは、主要器官形成中の雌親と胚の薬物動態学的データを用いて検証された。続いて、ヒトの妊娠生理モデルを PBPK モデルと組み合わせて、発達段階に依存して 2 つの母体区画と単体あるいは多数の胎児区画を持つ、経験的 2-MAA PK モデルと連結された。

本アプローチは、不確定因子を用いて基準用量算出を洗練させることによって、より現実的なヒトにおける妊娠リスク評価を可能とすることを目的とする。

ここで述べた生理学的薬物動態モデルを使用した場合、2-メトキシエタノールリスク評価において、異種間外挿における不確実因子を一桁低減することが可能である。

4.3.2.6.1　序論及び問題点

化学物質で誘発される出生前の副作用リスクについて、高用量の結果から低用量の結果を外挿し、あるいは異種間でのリスクを外挿するために、一般的に許容されている定量モデルはない。そのため、リスク評価はより定性的になり、米国環境保護庁（United States Environmental Protection Agency, US EPA）が実施しているように、同庁が発行した、発生毒性及び生殖毒性が疑われるリスクのガイドラインに従っている。

---

[21] Welsch F, Blumenthal GM, Conolly RB., “Physiologically based pharmacokinetic models applicable to organogenesis: extrapolation between species and potential use in prenatal toxicity risk assessments.”, Toxicol Lett. 1995 Dec;82-83:539-47.

実験動物における化学物質の処理を正確に予測するような、作用機構に基づく定量的な用量決定モデルを開発することは、暴露－応答評価を改良するために重要である。生理学的薬物動態モデル（physiologically based pharmacokinetic, PBPK）では、区画（compartment）が器官の物理的な構成を表す。O'Flaherty らは、げっ歯類の妊娠について、母体及び胎児の成長と加齢を組み込む PBPK モデルを開発した。そのモデルでは、妊娠で誘発される、母体組織量や血流の変化と、胎児の成長が、受胎から出産まで記述されている。妊娠中のげっ歯類における化学物質の処理を記述する PBPK モデルの開発は、ヒトを含むその他の種での開発にとって必要な先駆けとなる。

マウスの発達において、一日の、2-methoxyacetic acid（2-MAA：2-methoxyethanol（2-ME）の一次代謝産物であり、近縁の毒物である）の用量計測を記述する PBPK モデルが開発された。妊娠モデルがテンプレートとなり、その上に妊娠 CD-1 マウスにおける 2-ME/2-MAA 薬物動態（PK）を記述した。こうして得られた PBPK モデルは、妊娠 11 日の、母体血漿、胎児及び胚外羊水（EAF）をうまく記述できた。別の妊娠期間について薬物動態データベースを拡張することにより、異なる発生段階における 2-MAA の処理をシミュレーションする本モデルが検証されてきた。

以下では、初期、中期及び後期におけるマウス器官形成期（妊娠 8 日、11 日及び 13 日）における化学物質による催奇形性の処理及び数学的なモデルによるシミュレーションについて示す。拡張した 2-MAA PK データベースは、胎児発生の異なる時期で構築された。この PBPK モデルは、生物学的データの説明方法に関して、いくつかの仮定を用いた。能動輸送と可逆的な結合を記述したモデルは、妊娠 11 日と 13 日で、化学物質の処理について最良のシミュレーション結果を示した。「能動輸送モデル」は、化学物質の処理についてポンプの機構を達成し、PK データと整合性がある、2-MAA 流の非対称性という結果が得られた。「可逆的結合モデル」は、結合最大化と乖離定数で特徴づけることで、胎児区画内及び羊水区画内における結合を記述した。妊娠 11 日と 13 日における 2-MAA の PK は、これらのモデルで正確に模擬された。このことは、マウス妊娠におけるこれらの時期で 2-MAA の動的な振舞いにおいて、能動輸送及び／あるいは可逆的な結合が重要な役割を果たしていることが示唆された。この知見は、現在、実験的に確認されているところである。

4.3.2.6.2　結果と議論

各シミュレーション結果には、母体及び胎児の時間経過、暴露経路、区画の組織について適切な情報を含めた。生物学的なデータを模擬することが可能かどうかを、次のモデルで評価した。

（1）流量制限、一区画モデル

妊娠 8 日では、本モデル（図 4.3.2.6-1A）が、母体血漿と胎児データの両方を、合理的に正確に模擬している（図 4.3.2.6-2A 及び図 4.3.2.6-2B）。

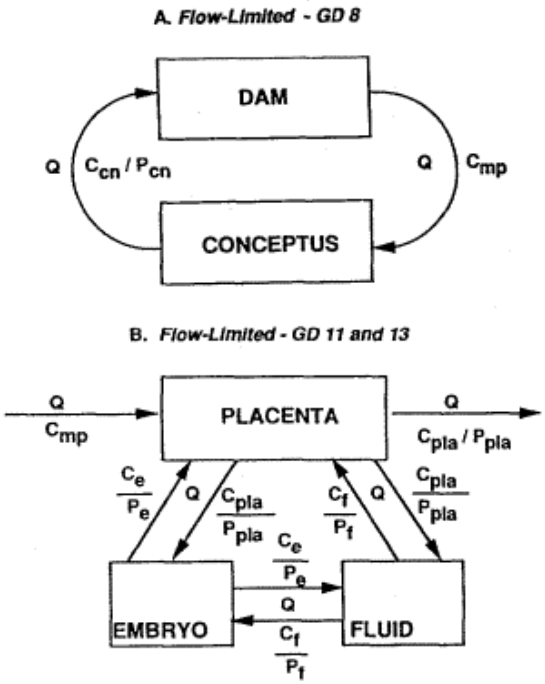


Fig. 1. Model variants for mouse gestation PBPK model. (A) Flow-limited – GD 8 compartmental model for 2-MAA. The dam is represented by a non-physiological compartment characterized by a volume of distribution for 2-MAA. The blood flow rate Q to the conceptus is the placental blood flow rate determined by the physiological model for pregnancy. The conceptus compartment, representing the lumped decidua, placenta, embryo, and extraembryonic fluid, has a volume defined by the physiological pregnancy model. C_{mp}, concentration (mmol/l) of 2-MAA in the dam; C_{cn}, concentration (mmol/l) of 2-MAA in the conceptus; P_{cn}, conceptus:blood partition coefficient. (B) Flow-limited – GD 11 and 13 model for 2-MAA. Volumes of placenta, embryo, and fluid are determined by the physiological pregnancy model. Flows between compartments (Q) are the same as blood flow to placenta (Q). C_e, C_f and C_{pla}, concentrations (mmol/l) of 2-MAA in embryo, extraembryonic fluid and placenta, respectively. P_e, P_f and P_{pla}, tissue:blood partition coefficients for embryo, extraembryonic fluid and placenta, respectively.

図 4.3.2.6-1 流量制限、一区画モデル

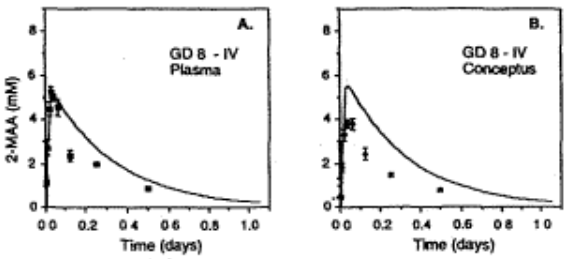


Fig. 2. Single compartment model for the GD 8 conceptus. 'Flow-Limited Model' simulations (solid lines) of 2-MAA PK data points (±S.E.M.) for the maternal plasma (A) and conceptus (B) following IV injection of 2-ME.

図 4.3.2.6-2　流量制限、一区画モデルによるシミュレーション結果

（2）オリジナルの仮定：流量制限、胎盤通過

拡張したデータベースを使って妊娠 11 日に対するオリジナルのモデルを評価したところ、妊娠 13 日の 2-MAA 動態を正確に模擬できなかった。

（3）流量制限、複数区画モデル

妊娠 11 日と 13 日で、本モデルは、2-MAA に対する胎児データのすべてについて、少なくとも 40%は少なく予測した（データは示していない）。そこで、生物学的データを説明するためには、別の説明が必要である。

（4）代替モデルの仮定

４－１）pH 捕捉、複数区画モデル

詳細は示さないが、本モデルは、妊娠 11 日と 13 日で、明らかに失敗だった。シミュレーションでは、生理学的な pH 条件下で、胎児及び羊水内に、無視できる程度の化学物質の蓄積を予測した。

４－２）能動輸送、複数区画モデル

本モデル（図 4.3.2.6-3A）は、妊娠 11 日でも 13 日でも、すべての区画で 2-MAA 用量計測をうまく模擬した（図 4.3.2.6-4A から 4.3.2.6-4F）。（流量パラメータの数値は省略する）

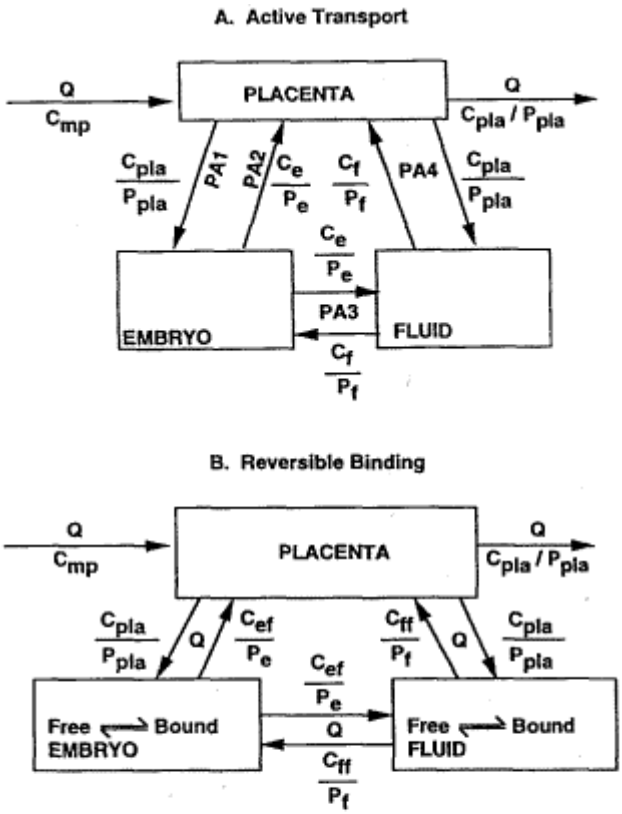


Fig. 3. Alternative model hypotheses. (A) Compartmental model diagram depicting active transport. Blood flow between compartments (Q) is replaced for the embryo and extraembryonic fluid by compartment specific flow parameters, PA1, PA2 and PA4. In the active transport version, these flow parameters (PA values) established asymmetrical 2-MAA movement. (B) Compartmental model diagram depicting reversible binding. In the reversible binding description, chemical transport was flow-limited (Q = Q), but a carrier molecule sequestered 2-MAA such that it existed in 'free' and 'bound' forms. C_{ef} and C_{ff}, concentrations of free 2-MAA in embryo and extraembryonic fluid.

図 4.3.2.6-3　能動輸送、複数区画モデル

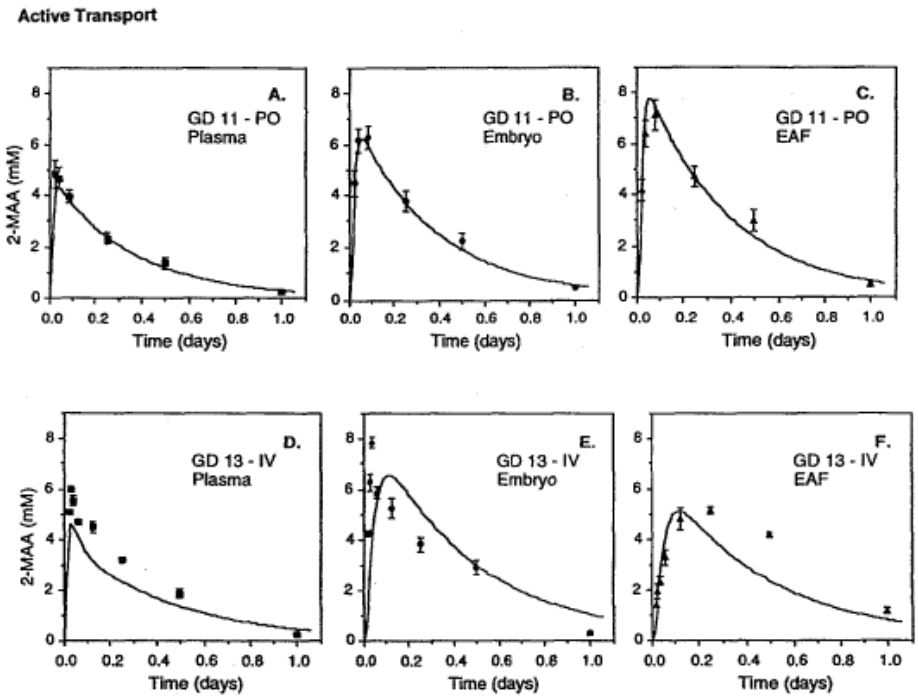


Fig. 4. Evaluation of alternative multi-compartment models. 'Active Transport Model' simulations (solid lines) of 2-MAA PK data points (±S.E.M.) in maternal plasma, embryo, and EAF on GD 11 (A–C) when 2-ME was administered by gavage (PO) and on GD 13 (D–F) when 2-ME was injected IV.

図 4.3.2.6-4　能動輸送、複数区画モデルによるシミュレーション結果

４－３）可逆的結合、複数区画モデル

この修正により（図 4.3.2.6-3B)、妊娠 11 日及び 13 日の、胎児及び流体中の可逆的な 2-MAA 結合がモデル化され、合理的な模擬結果が得られた(図 4.3.2.6-5A から 4.3.2.6-5F)。可逆的結合を記述するモデルで得られた結果は、能動輸送モデルで得られた結果と非常によく似ている（特に、図 4.3.2.6-4D から 4.3.2.6-4F と図 4.3.2.6-5D から 4.3.2.6-5F)。

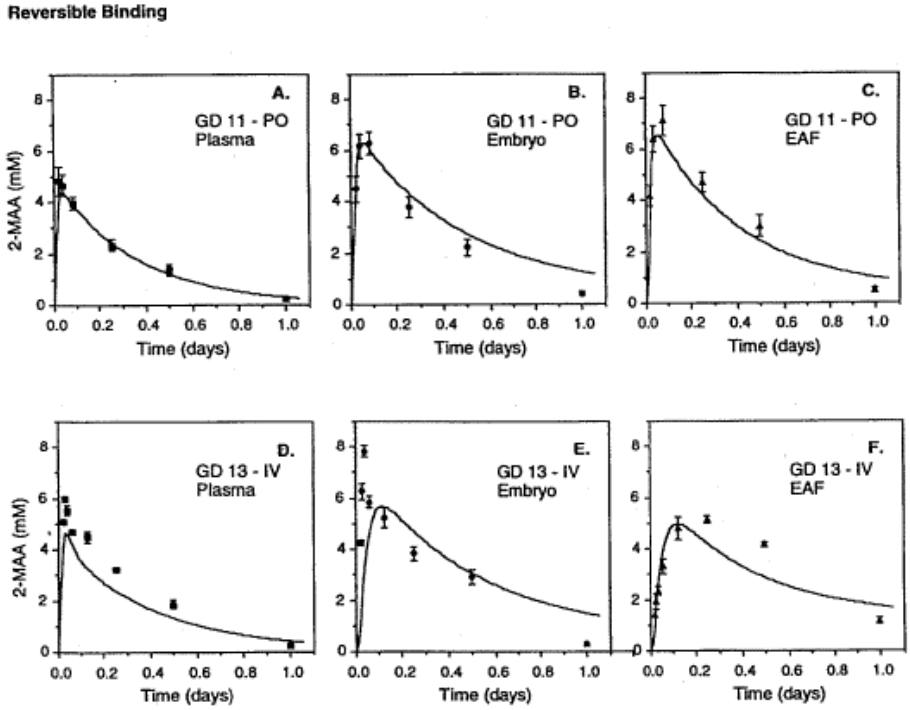


Fig. 5. Evaluation of alternative multi-compartment models. 'Reversible Binding Model' simulations (solid lines) of 2-MAA PK data points (±S.E.M.) in maternal plasma, embryo, and EAF on GD 11 (A–C) when 2-ME was administered by gavage (PO) and on GD 13 (D–F) when 2-ME was injected IV.

図 4.3.2.6-5　可逆的結合、複数区画モデルによるシミュレーション結果

続いて、妊娠ラットの生理学に関するデータを統合することにより、マウスの妊娠 PBPK モデルを、妊娠ラットに外挿した。妊娠 13 日と 15 日に収集した、母体と胎児の 2-MAA の PK についての生理学データを用いて、モデルによる模擬の検証を実施した。ラットのシミュレーションでは、母体区画を 2 つの区画に分割することにより、生理学データと、モデルによる予測が明らかに改良された。区画のうち一つは、十分に灌流した母体の組織で構築されており、もう一つはあまり灌流していない母体の組織で構築されている（図 4.3.2.6-6）。この、母体を二つの区画に分割したモデルを用いてマウスのシミュレーションを繰り返すと、シミュレーションによるフィットは、顕著に改良された（図 4.3.2.6-7A から 4.3.2.6-7C）。母体の 2 区画の修正を数式に組み込むことにより、妊娠ラット及びその胎児における 2-MAA 模擬の傾向は、許容可能なレベルから、非常に満足できるレベルに変わった（図 4.3.2.6-7D から 4.3.2.6-7F）。

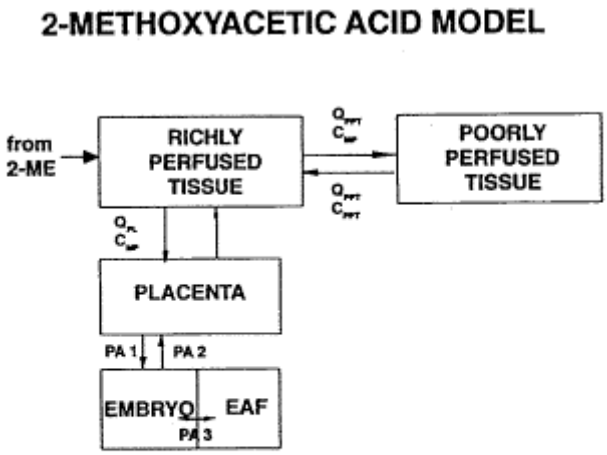


Fig. 6. Revised 2-compartment maternal body configuration. Division into separate poorly and richly perfused tissue components caused significant improvement of the agreement between model simulations and the biological data of 2-MAA disposition in mice and rats.

図 4.3.2.6-6　母体区画を 2 つに分割した可逆的モデル

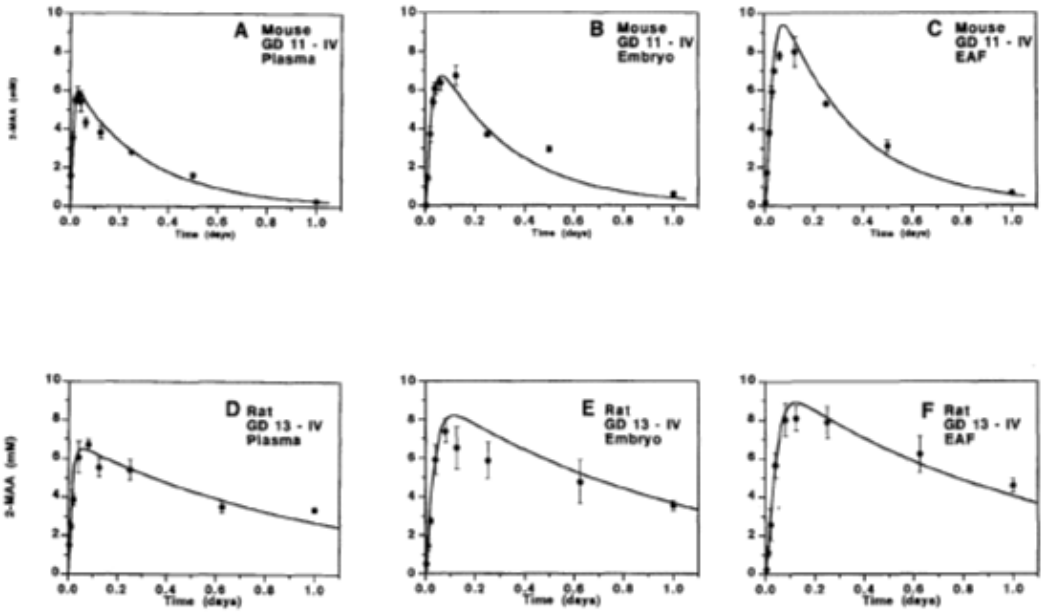


Fig. 7. Model simulations of GD 11 mouse PK data of 2-MAA (A–C) and GD 13 rat data (D–F). The solid lines are the simulations while the symbols represent the biological data points.

図 4.3.2.6-7　母体を 2 つの区画の分割したモデルによるシミュレーション結果

モデル構築の次の段階は、ヒトの妊娠に外挿することである。2 種類のげっ歯類（マウスとラット）で開発して検証した 2-MAA モデルに、（シンシナチ大学の Michelle Andriot 博士と Ellen O'Flaherty 博士から提供いただいた）ヒト妊娠の生理学モデルを結合した。ヒ

トのモデルに組み込んだ生理学的データは、以下のものである。

・ヒトの妊娠中における組織の成長特性

・妊娠中における、胎児を含むさまざまな組織への血流

・*in vitro* な実験で得られた 2-ME から 2-MAA への参加速度

・ヒトについて決定された、2-MAA 除去率定数（約 77 時間）

モデル化では、2-ME がヒト体内に入る経路を、吸入によるものと仮定した。

その結果、PBPK 妊娠モデルは、リスク評価で利用可能なレベルまで、劇的に定量的に改良された。ヒトの妊娠における生理学をモデルに組み込んでおり、異なる種の間での外挿を行う際に、薬力学（pharmacodynamics）の際を説明する不確実さ因子を 3 まで低減することが可能となった。2-MAA の毒作用の機構は未知であるが、本 PBPK モデルは経験的である。ここで示したデータは、ヒトの職業上の 2-ME への暴露に関連するプロトタイプ的な発生毒性に関する毒物として 2-MAA を用いる PBPK 妊娠モデルを用いれば、2-ME 及び関連した化合物による発生毒性に関するヒトのリスク評価を、より現実的に実施できる可能性がある、ということを示している。他の化学物質への幅広い適用に関しては、発生毒性に関する他の毒物の注意深い評価と検証が必要である。

4.3.2.7 「The road to embryologically based dose-response models.」[22]

環境有害物質に関するがん以外のリスク評価のプロセスは、過去 5 年間で大幅な進歩があった。統計学に基づく容量反応モデル（ベンチマーク容量手法）の開発と活用が進み、今後は薬物動態や生理学等の生物学データに基づく容量反応モデル（biologically based dose-response（BBDR））の利用が進むだろう。毒性（異常発達）の評価のためには、正常な発達のメカニズムの更なる解明が求められる。

4.3.2.7.1 容量反応評価の基本的要素

容量反応評価は以下の 3 つのステップからなる。

① 一般的な影響を調べる（実験動物における最大無毒性量（NOAEL）の把握）。

② データの不確実性を調べる（種間と種内の不確実係数（UF、一般的には 10）、その他の修飾係数（MF）の設定）。

③ 下記の式に基づき、上記値から参照容量（RfD）を求める。

[22] Kavlock RJ, Setzer RW., “The road to embryologically based dose-response models.”, Environ Health Perspect. 1996 Mar;**104** Suppl 1:107-21.

$$RfD = \frac{NOAEL_{critical\ effect}}{UF_{interspecies} \times UF_{intraspecies} \times MF}$$

4.3.2.7.2　定性的及び半定量的アプローチ

サッカリンがげっ歯類において引き起こす膀胱腫瘍や、2-マイクログロブリンがオスのラットにおいて引き起こす腎腫瘍などは、ヒトでは発生しない。このように実験動物で毒性を示す物質及びその代謝物が、ヒトにおいて毒性を示さない（または代謝物が発生しない）場合、定性的に外挿しないが、これは極めて限られた例である。

一方で、Institute of Evaluating Health Risks Evaluative Process が実施したリチウムの発生毒性に関する研究の知見から、種間及び種内の不確実係数を 10 から $10^{0.5}$ に減らすことができた。このように生物学的データを活用することで、リスク評価の不確実性を半定量的に減らすこともできる。

4.3.2.7.3　ベンチマーク用量アプローチ

薬物動態や薬理学のデータは不確実係数の精度を上げるために用いられるが、用量反応評価の精度を上げるための、その他のアプローチとして確立された実験手法のデータを用いることがあげられる。

NOAEL は用量反応評価を行うために必要な基本的な値であるが、NOAEL の限界も指摘されており、そのような中でベンチマーク用量（BMD）の概念が示された。ベンチマーク用量とは、用量反応曲線モデル（図 4.3.2.7-1 の実線）の 95%信頼区間の下限（図 4.3.2.7-1 の点線で示される曲線）において、5%の発生率を示す用量である。

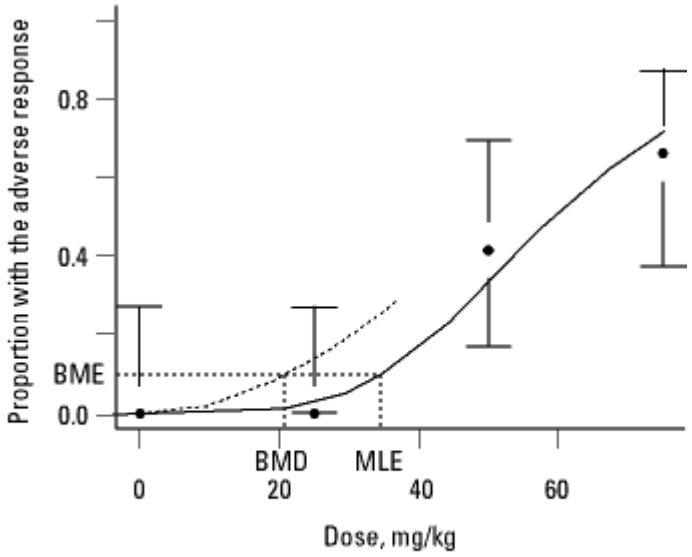


図 4.3.2.7-1 ベンチマーク用量（BMD）の概念

毒性学や発達毒性学のエンドポイントに基づき、幾つかのモデルによってベンチマーク容量が求められ、NOAEL との比較が実施された。特に発達毒性のエンドポイントは、産仔数を考慮するため、quantal エンドポイント（全産仔中 1 仔以上該当するか）と continuous エンドポイント（全産仔数の平均）が用いられた。比較の結果、モデル間で NOAEL との近似に多少の差はあるものの、一般的な毒性評価と発達毒性の評価で大きな差はみられなかった。

4.3.2.7.4　第二世代モデル

上記では基本的に一つのエンドポイントに対して、一つのベンチマーク容量が求められたが、近年、複数の影響に基づく評価モデルの開発が行われている。モデルを簡単にあらわすと、以下の式のようになる。

$$P(d)=1-[1-P_1(d)][1-P_2(d)]$$

P(d)は容量 d のときの異常発生率であり、$P_1(d)$は死亡及び resorption 発生率、$P_2(d)$は奇形や低体重（未熟）の発生率である。モデルは一般化推定方程式（GEE）を用いて、適合化される。

4.3.2.7.5　ベンチマーク用量アプローチで想定される実験計画

BMD を計算する上で、投与群をいくつ作るか、投与量の差、1 群のサンプルサイズが重要となってくる。図 4.3.2.7-2 の上図は 5-フルオロウラシル（5-FU）の奇形発生率（実デー

タ、実線部分）に基づく、シミュレーション結果である。図 4.3.2.7-2 の下図はそのシミュレーション結果から求められる MLE、BMD、NOSTASOT（NOAEL と近似）である。

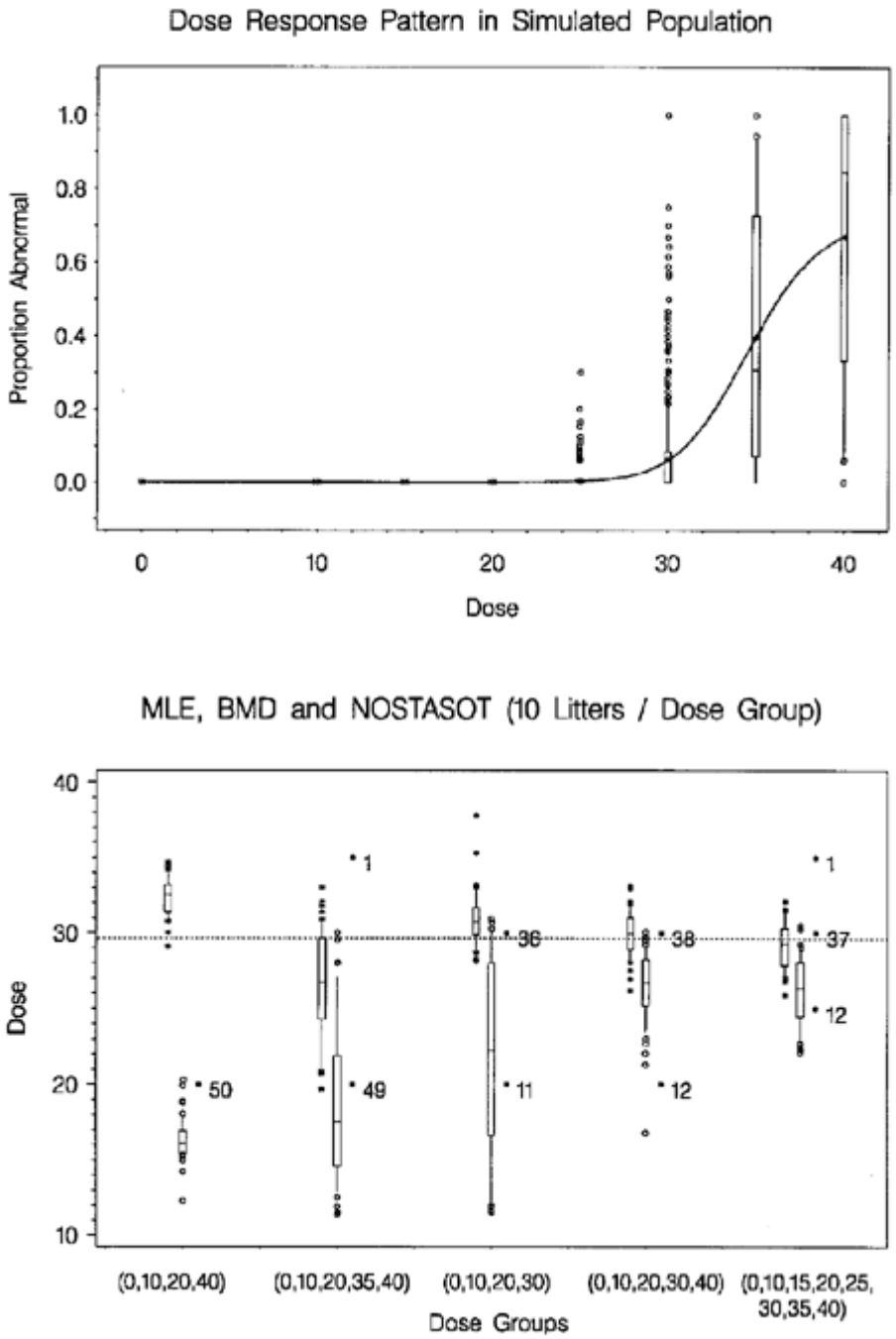


図 4.3.2.7-2　ベンチマーク用量アプローチによる用量ー応答のシミュレーション結果とそれから得られる MLE、BMD、NOSTASOT

これまでに実施されてきた NOAEL に基づく、発達毒性の実験計画は、ベンチマーク容量を計算するのにある程度適しているが、上記シミュレーション結果より、若干の改善余地がみられる。

4.3.2.7.6　生物学的データに基づくアプローチ

（1）*in vivo*

これまで、既存のリスク評価のデータを如何に有効に利用するかを示したが、以下では新たに生物学的データを取り込んで、外挿に伴う不確実性を低減させる方法を示す。

生物学データに基づく用量反応モデル（biologically based dose-response (BBDR)）は、対象となる物質の体内動態に関して、各段階に細分化してその詳細を示すことからはじまる（図 4.3.2.7-3 は 5-FU における BBDR のフレームワーク）。

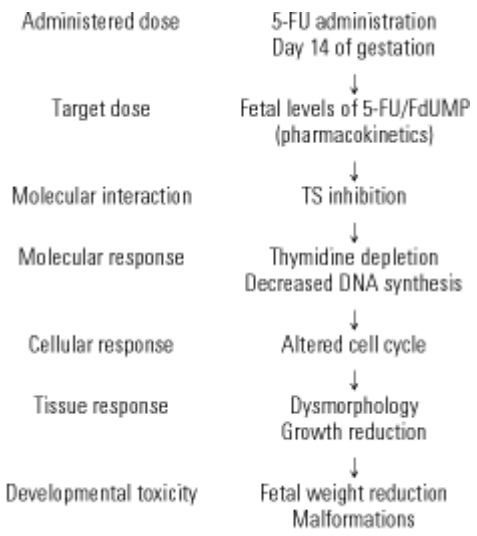


図 4.3.2.7-3 5-FU における BBDR のフレームワーク

その後、それぞれの段階において、生物学的な関係性を説明変数と従属変数の関係式で計算する（図 4.3.2.7-4 は Hill 方程式に基づいて計算した 5-FU 投与によるラット胎仔の後肢奇形）。

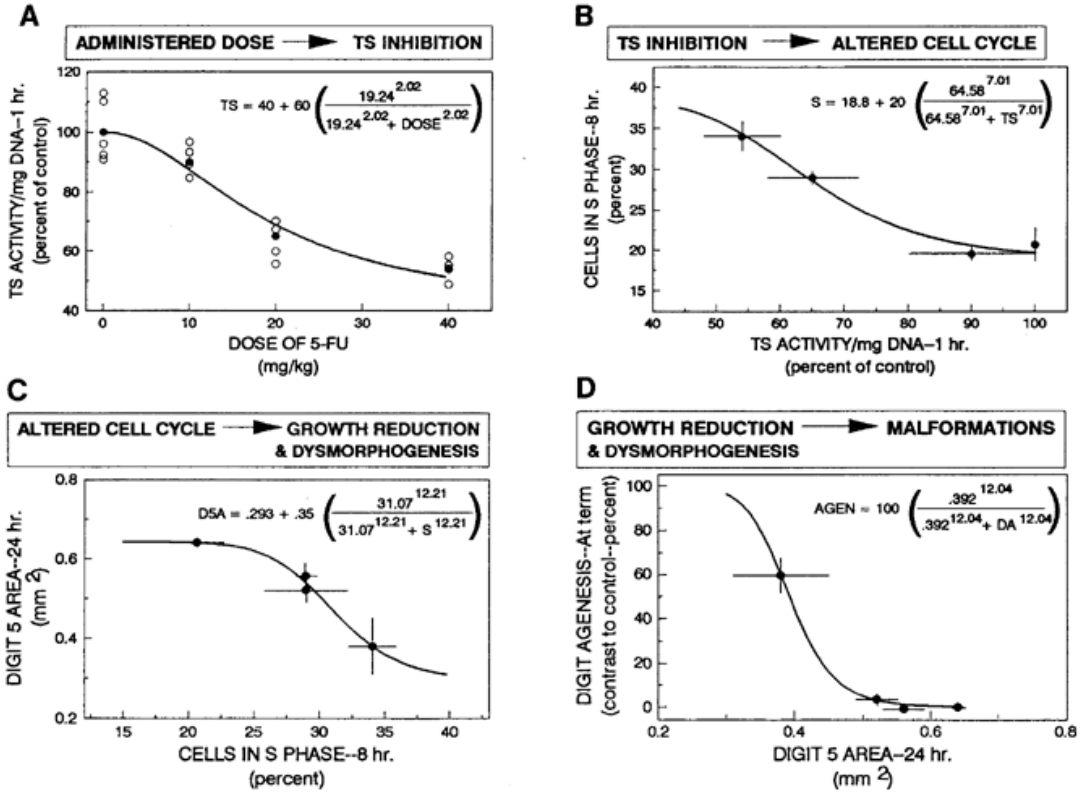


図 4.3.2.7-4　Hill 方程式に基づいて計算した 5-FU 投与によるラット胎仔の後肢奇形

図 4.3.2.7-4 で求めた式を組み合わせ、モンテカルロ法に基づき、用量応答曲線のモデルを求めたものが、図 4.3.2.7-5 となる。▲が実データとなり、モデルでは若干過大評価が実施されている。

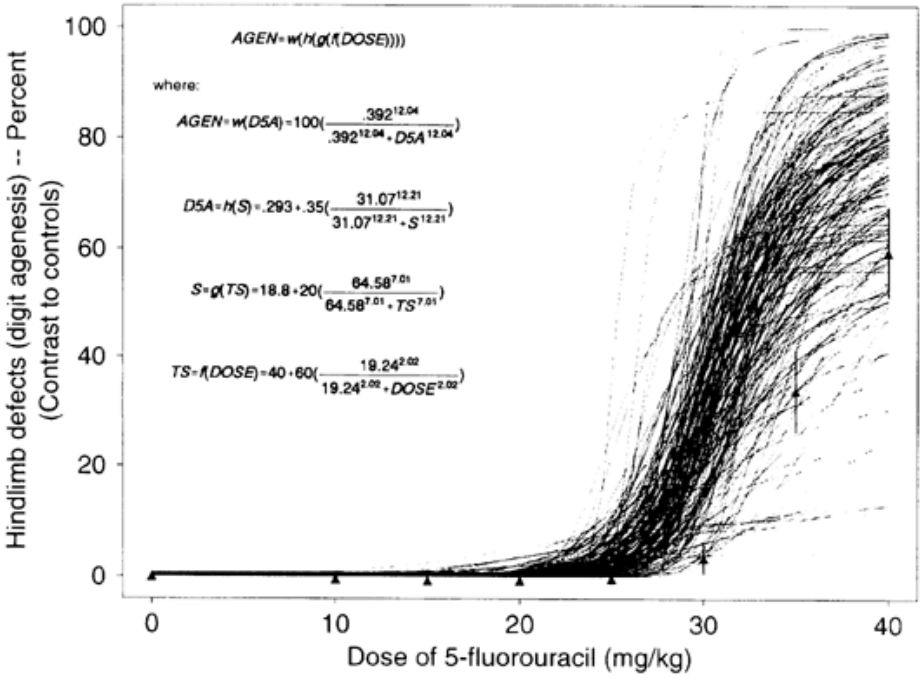


図 4.3.2.7-5 モンテカルロ法で求めた用量-応答曲線

（2）コンピューターシミュレーション

上記で求めた、各段階の関係式は、より高度なモデルに置き換える必要がある。図 4.3.2.7-6 は 5-FU 投与と TS の阻害の関係であるが、モデルによるシミュレーションの結果は、実データと近い結果が得られた。

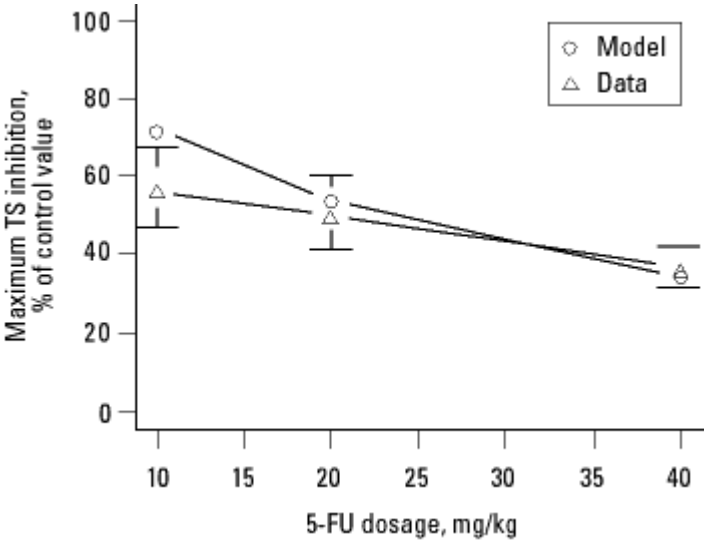


図 4.3.2.7-6 シミュレーション結果と実データの比較

4.3.2.7.7 発生学に基づくアプローチ

上記までのアプローチに加え、発生学に基づく知見を組み込むことで、より高度な推定が可能となる。しかし、現時点では正常な発生のメカニズムの解明がなされていないため、仮説的なアプローチとなる。まずは、上記メカニズムの解明が必要であり、その後各物質が与える影響を見ていく必要がある。

4.3.2.7.8 結論

発達期のリスク評価のエンドポイントに関しては、比較的長い間議論されてこなかったが、近年議論が活発化している。NOAEL や LOAEL の代替手法としてベンチマーク容量の概念が上げられるが、依然として外挿に関しては、NOAEL と同様の課題がある。環境有害物質が、正常な発達をどう阻害するかを、解明しなければ、外挿に伴う問題は解決されない。これは、非常に難しい挑戦であり、発達生物学者と発達毒性学者の相互交流が望まれる。現状では、薬物動態学に基づくモデルを用いることで、不確実係数の精度を上げているが、更に精度の高いモデルの開発が求められる。

4.3.2.8 「Scientific issues associated with the validation of *in vitro* and *in vivo* methods for assessing endocrine disrupting chemicals.」[23]

内分泌撹乱(ED)薬剤として作用する化学物質の可能性評価のために必要とされる測定法

[23] Ashby J., "Scientific issues associated with the validation of *in vitro* and *in vivo* methods for assessing endocrine disrupting chemicals.", Toxicology. 2002 Dec 27;181-182:389-97.

は、実用化されているかもしくは現在開発中である。しかしながら、現在、それらの目的と必要とされる感度を考慮する不確定性および測定パラメータの固有変動の不確定性があるため、これらの測定法の検証と利用は進んでいない。本論文は、多数の鍵となる測定パラメータの不確実性と固有変動性のいくつかの出処を議論する。現在の ED アッセイの使用に関係する不確実性およびげっ歯類に対する影響の、ヒトへの適用は、現在研究中の発生に係わるパラメータのための、広範囲に同意されたげっ歯類対照データベースの欠如に起因し、確立したこれらのパラメータ固有変動性と、試験動物及び試験プロトコルにおける系統/種との間で同様の働きをすると結論づけられる。これらの要因が普遍的に受け入れられ十分に研究され、その制御が可能となれば、信頼性を伴う ED アッセイの利用が可能となり、ヒトに対する影響とアッセイデータとの関連づけができる。

4.3.2.8.1　げっ歯類における内分泌かく乱研究の不確実性及び変動の原因について

化学物質による内分泌かく乱研究は、図 4.3.2.8-1 に示すように様々な方法によって行われているため、難解なものとなっている。近年、げっ歯類における一般的な毒性評価は、比較的日令の浅い成熟した動物を用い、明確な副作用のエンドポイントを経口投与により調べる方法で行われている。しかし、なぜその試験方法を選択したのかの明確な説明が行われないことがほとんどである。化学物質の投与方法によって試験結果が変わることがある（図 4.3.2.8-2）。例えば、ファイトエストロゲンの経口投与試験の結果を、ヒトに投与する場合の通常の方法である皮下注射の結果に関連付けることは困難である。より厳しい結果が出る方法を用いて試験を行ったとしても、その結果をヒトや野生種のリスク評価に関連付けられるわけではない。もう 1 つ、重要なポイントは、試験方法の感受性の違いである。Gray ら（1999 年）の論文では、母親に抗アンドロゲンビンクロゾリンを投与した場合の産仔のアッセイでは、以下のような感受性の違いが見られた。感受性の強い順に、肛門生殖突起間距離、尿道下裂の誘導、異所性精巣であった。

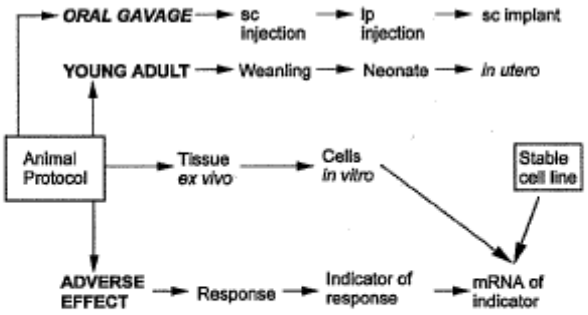


Fig. 2. Example transitions in endocrine disruption study conditions including route of exposure, age of exposure, in vitro versus in vivo assays and the evolving complexity of the effects monitored. The words in bold represent most current study design features, from which changes are made, usually in the absence of supporting rationalisation.

図 4.3.2.8-1 化学物質による内分泌かく乱研究

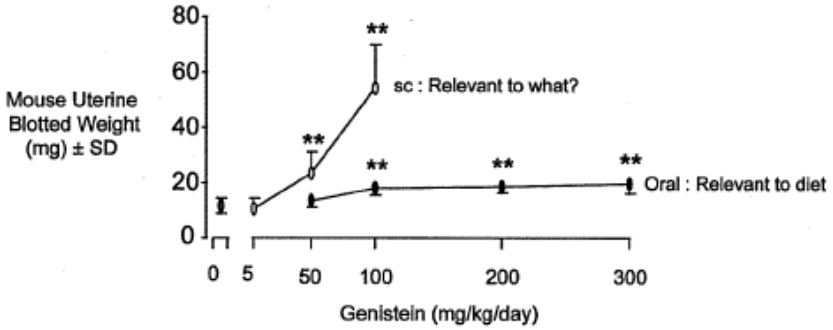


Fig. 3. Dose–response curves for genistein in immature AP mouse uterotrophic assays following exposure by either sc injection or oral gavage in corn oil. The studies were conducted as described earlier with RM1 as diet (Tinwell et al., 2000). $^{**}P < 0.01$.

図 4.3.2.8-2 化学物質の投与方法による試験結果の違い

4.3.2.8.2 食事と内分泌かく乱

ヒトの成熟期において、食事が変化の原因になることは以前から認識されている。しかし、げっ歯類において、エサが内分泌かく乱に影響を与えることが認識されたのは最近になってからである（Thigben ら（1999）、Odum ら(2001)）。Odum らは、ラットの子宮肥大試験を用い、エサが異なるとエストロゲン作用が異なることを見出した。このように、どのエサを用いるかで内分泌かく乱試験結果が大きくことなることが明らかである。

4.3.2.8.3 内分泌かく乱試験における動物の組織重量の変化

内分泌かく乱試験における問題のひとつは、試験のパラメータがわかりにくいことである。Lee ら（1998）が行った実験がその例で、前立腺に対するノニルフェノールの作用を SD ラットで調べたものである（図 4.3.2.8-3）。この実験では多数のプロトコルが使われている

が、どの動物も生後 31 日で処分している。ノニルフェノール投与群では、コントロール群に比べ前立腺の重量が減少しているが、生後 13 日から 30 日に投与した群では、コントロール群との前立腺重量の差が見られない。このことから、Lee らは、ノニルフェノールは生後 13 日から 30 日より前に作用する物質であると結論づけている。しかし、同様に興味深いのは、生後 13 日から 30 日の投与群における前立腺の相対重量の急激な減少であるが、これは Lee らの論文では言及されていない。この減少はコントロール群と比較した場合に有意なものであり、動物の体重の変化によるものではない；だが、前立腺のみの重量は、当該論文では示されていない。このように、相対的な前立腺重量が示されないと、ノニルフェノールによって誘導される現象を解釈することは困難である。同様のことが Sharpe ら（1995）の論文についても言える。これらの例は、化学物質による内分泌かく乱への影響を論じる際、対照試験の詳細なデータが必要であることを示している。

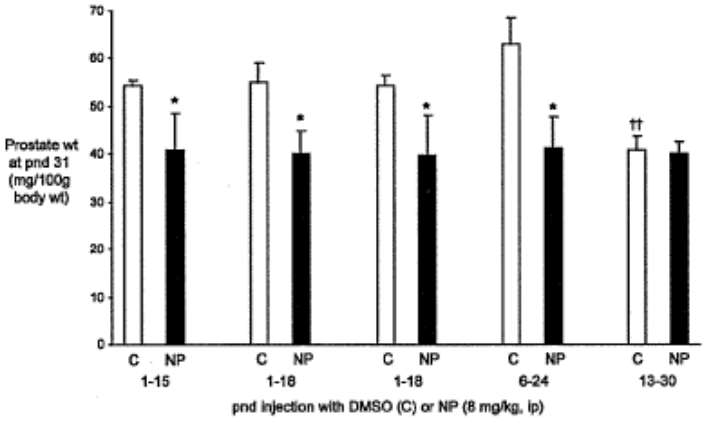


Fig. 4. Prostate weights at post-natal day 31 for control and nonylphenol (NP) treated SD rats. Data taken from Lee (1998). * Statistical significance for NP vs. C ($P < 0.05$) taken from Lee (1998). †† Statistical significance for C (13–20) vs. all other controls ($P < 0.01$), as reported by Odum and Ashby (2000).

図 4.3.2.8-3 前立腺に対するノニルフェノールの作用（Lee ら（1998）による）

4.3.2.8.4 化学物質の内分泌かく乱試験結果に対する動物種の影響

化学物質の内分泌活性は、様々な系統や様々な研究者、様々な時期に研究が進められている。しかし、内分泌かく乱のデータで著しい種特異性がいくつか見られている。恐らく最も系統特異性が高いのは F344 ラット及び SD ラットであり、エストラジオール及び BPA によりプロ楽チン誘導がかかる。しかし、他の研究では、SD ラットは精巣においてエストロゲン及び BPA に感受性があることが示されている。同じ種におけるこのような相違は Long ら（2000）により述べられており、BPA は F344 ラットの膣上皮において DNA 合成の開始因子となるが、SD ラットではそのような作用がない。このような種による感受性の違いは表 4.3.2.8-1 に示すとおり難解である。SD ラットで BPA に感受性を示さないことは、何らかの分子的な相違によるものであることをこれらのデータは示している。

表 4.3.2.8-1 種による感受性の違い

Table 1
Data derived from Long et al. (2000) for the effects of BPA on the vagina of two strains of ovariectomised rats

	F344 rats	SD rats
Vaginal DNA synthesis	ED_{50} 37.5 mg/kg	No effect to 150 mg/kg
Plasma $\frac{1}{2}$ life of BPA (min)	90	90
Vaginal ER levels (nM)	0.13	0.14
Vaginal ER affinity (fmol/mg protein)	266	288
Vaginal c-*fos* expression (ED_{50})	37.5 mg/kg	37.5 mg/kg

4.3.2.8.5 全体のまとめ

化学物質による内分泌かく乱は、非常に有効であり、重要な研究分野である。しかし、この論文では、内分泌かく乱物質への暴露に関するヒトのハザード評価を行う前に、実験デザインやデータの解釈をよく検討する必要があることを強調したい。これらの問題は、内分泌かく乱における食事の役割、研究中のアッセイパラメータの変動性、実験動物の種や系統の影響と用量 - 反応関係の説明を含む。最後に、内分泌活性を持つ化学物質によって野生動物やヒトにもたらされる真のハザードについての研究を進めるためには、十分でない結論を減らし、統合されたデータを増やすことが必要である。

4.3.2.9 「Quantitative extrapolation of *in vitro* whole embryo culture embryotoxicity data to developmental toxicity *in vivo* using the benchmark dose approach.」[24]

ハザードの特性付けとして *in vitro* データが用いられる場合、*in vitro* 濃度の *in vivo* 用量への変換が行われなければならない。我々は、*in vitro* における全胚培養(WEC)試験による用量記述子および *in vivo* における発生毒性試験との間の相関について述べる。我々は、等効力の *in vitro* 濃度(ベンチマーク濃度(BMC))および等効力の *in vivo* 用量(BMD)を決定するために、ベンチマーク用量(BMD)アプローチを適用した。欧州代替試験法評価センター(ECVAM)による妥当性試験により作成されたデータの使用において、我々は、ベンチマーク濃度が実験室間で高度な再現性を保持することを発見した。解析された 3 つのエンドポイント(頭部長、頭殿長、総形態値)は強い相関を示した。明白な *in vitro*-*in vivo* 相関は BMC と BMD との間で見られた。しかし、BMD がこの相関関係を用いて BMC から推定される場合、考慮すべき不確実性は残るだろう。そのような *in vivo* 適用評価における信頼

[24] Piersma AH, Janer G, Wolterink G, Bessems JG, Hakkert BC, Slob W., "Quantitative extrapolation of *in vitro* whole embryo culture embryotoxicity data to developmental toxicity *in vivo* using the benchmark dose approach.", Toxicol Sci. 2008 Jan;**101**(1):91-100. Epub 2007 Sep 27.

区間は数オーダーに及ぶ。*in vitro*-*in vivo* 相関のばらつきの少なくとも一部は、化合物間の毒物動態学的特性で説明された。しかし、利用可能な *in vivo* 実験の設計の不均一性がばらつきの多くの原因となっており、このことが *in vivo* データ予測としての *in vitro* データの検証に対する限界となる。従って、さらなる *in vitro*-*in vivo* 相関解析では、適切かつ類似の研究計画によって産出される高水準の *in vivo* データを必要とする。

4.3.2.9.1　序論

動物実験を減らす目的で、*in vitro* または *in silico* の手法を用いた研究が数多く行われている。現在、これらの研究は化合物のスクリーニングや分類に用いられているが、エンドポイント（PoD）の決定については動物実験が必要である。 *in vitro* の研究結果の *in vivo* のドーズへの変換は困難である。しかし、もしそのような適用ができるのであれば、*in vitro* の研究成果が単独で利用できることになる。

胚毒性を評価する際、*in vivo* のモデルとして用いることのできる *in vitro* 評価システムは、げっ歯類の全胚培養（WEC）である。この実験では胚を利用するが、化合物への暴露は *in vitro* で起こるため、*in vitro* 実験であるということができる。

WEC を用いた検証試験では数多くのデータが得られており、これらにより *in vitro* における用量-反応モデルの適用性が検討できるとともに、*in vivo* データとの比較が可能となる。本研究では、ベンチマーク用量（BMD）を *in vitro* に応用し、*in vivo* との比較を試みた。

4.3.2.9.2　結果

（1）*in vitro* ベンチマーク濃度（*in vitro* BMC）

表 4.3.2.9-1 は *in vitro* ベンチマーク濃度について、4 つの研究室の結果を示したものである。Lab 3 のみ一般的なパターンから外れているが、BMC の値はどの研究室のものもほぼ一致している。なお、lab 3 では、バックグラウンドの値にもばらつきが見られる（図 4.3.2.9-1）。

表 4.3.2.9-1 4 つの研究室における in vitro ベンチマーク濃度の比較

TABLE 1
BMC Values (μg/ml) for CRL, HEAD, and TMS

	Lab 1	Lab 2	Lab 3	Lab 4	GM	GM2	Cat.
Endpoint: CRL							
Methotrexate	0.022	0.0090		0.021	0.016	0.016	3
All-*trans*-Retinoic acid	0.067		0.41	0.076	0.13	0.071	3
6-Aminonicotinamide	0.085	0.075	1.9	0.073	0.17	0.078	3
5-Fluorouracil	0.26	0.037	0.077	0.15	0.11	0.12	3
Methylmercury chloride	3.2	2.4	0.53	3.6	1.9	3.0	3
Hydroxyurea	2.6	5.8		2.3	3.3	3.3	3
Diphenhydramine hydrochloride	5.9	1.4	0.43	5.5	2.1	3.5	1
5-Bromo-2′-deoxyuridine	8.8	4.0	0.087	8.0	2.2	6.6	3
Boric acid	27	16		22	21	21	2
Acrylamide	24	12	3.4	42	14	23	1
Valproic acid		98		58	76	76	2
Salicylic acid sodium salt	129	65	58	136	90	105	2
Lithium chloride	169			78	115	115	2
Pentyl-4-yn-valproic acid	145	122		115	127	127	2
D-(+)-Camphor	300	116	64		130	187	1
Methoxyacetic acid	521	273	5.0	95	91	238	2
Isobutyl-ethyl-valproic acid		284			284	284	1
Dimethylphthalate			1.9	297	24	297	1
Saccharin sodium hydrate			423		423		1
Dimethadione[a]							2
Endpoint: HEAD							
Methotrexate		0.013		0.013	0.013	0.013	3
6-Aminonicotinamide	0.11	0.049	1.2	0.034	0.12	0.056	3
5-Fluorouracil	0.12	0.034	0.057	0.087	0.067	0.071	3
All-*trans*-retinoic acid	0.19		0.23		0.21	0.19	3
Hydroxyurea	1.8	5.4		1.6	2.5	2.5	3
Diphenhydramine hydrochloride	5.6	0.99	1.3	5.0	2.4	3.0	1
Methylmercury chloride	4.5	2.3	0.73	3.7	2.3	3.4	3
5-Bromo-2′-deoxyuridine	6.6	4.9	0.083	15.6	2.6	8.0	3
Boric acid	25	13		37	23	23	2
Acrylamide	22	31	12	50	25	32	1
Pentyl-4-yn-valproic acid	78	102		74	84	84	2
Valproic acid	144	78	50	66	78	91	2
Lithium chloride	169	119	44	49	81	100	2
Methoxyacetic acid	100	191	44	72	88	111	2
D-(+)-Camphor	285	118	38		109	184	1
Salicylic acid sodium salt	413	172	80	159	174	224	2
Isobutyl-ethyl-valproic acid		227			227	227	1
Dimethylphthalate			1.2	264	18	264	1
Dimethadione		280			280	280	2
Saccharin sodium hydrate			430		430		1
Endpoint: TMS							
Methotrexate		0.012	0.014	0.020	0.015	0.015	3
6-Aminonicotinamide	0.14	0.087	38	0.027	0.34	0.069	3
All-*trans*-retinoic acid	0.10		0.27	0.14	0.15	0.11	3
5-Fluorouracil	0.20	0.15	0.15	0.10	0.14	0.15	3
Methylmercury chloride	3.3	2.6	0.18	3.5	1.5	3.1	3
5-Bromo-2′-deoxyuridine	4.0	2.1	0.076	5.7	1.4	3.6	3
Hydroxyurea	9.0	4.8		1.7	4.2	4.2	3
Diphenhydramine hydrochloride	4.8	5.4	0.34	5.5	2.6	5.2	1
Acrylamide	36	44	13	41	30	40	1
Boric acid	30	41	33	61	40	42	2
Lithium chloride	42	100	57	50	59	59	2
Dimethadione		63			63	63	2
D-(+)-Camphor	128	39	48		62	70	1
Pentyl-4-yn-valproic acid	141	140		89	121	121	2
Valproic acid	157	112	78	110	111	125	2

TABLE 1—*Continued*

	Lab 1	Lab 2	Lab 3	Lab 4	GM	GM2	Cat.
Methoxyacetic acid	292	83	19	125	86	145	2
Salicylic acid sodium salt	252	205	78	168	161	205	2
Isobutyl-ethyl-valproic acid		395			395	395	1
Dimethylphthalate	466	578	38	548	274	528	1
Saccharin sodium hydrate	1002		69		263	1002	1

Note. GM = geometric mean over all four laboratories and GM2 = geometric mean omitting lab 3. The GM2 is used for ranking. Categories 1, 2, 3 indicate non-, weak, and strong embryotoxic potency, respectively, according to expert judgment (Brown, 2002).

[a]The concentrations tested did not induce a significant effect on CRL in any of the labs.

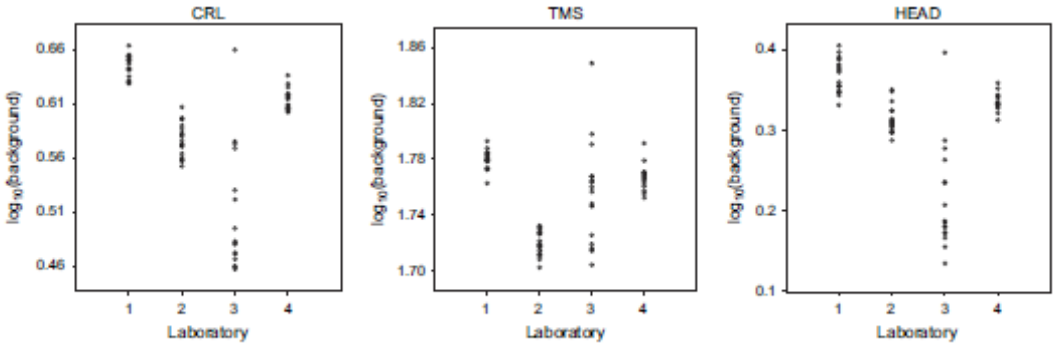


FIG. 2. Estimated background values of the three endpoints for each of the 20 substances plotted against laboratory.

図 4.3.2.9-1 4 つの研究室における in vitro ベンチマーク濃度の比較

（2）*in vivo* ベンチマーク用量（*In vivo* BMDs）

表 4.3.2.9-2 は、各々の物質の BMD を評価するために重要な役割を果たした動物実験結果の詳細である。この実験の目的は、*in vivo* における胚毒性の量を把握することである。そのために、用量は胎児の重量の 10%の減少および／または形成異常において 10%の発生率が見られた場合の値を BMD の概算値として推定した。それらの実験において、エンドポイントは両方とも同じ用量であることがわかった（表 4.3.2.9-2）。

表 4.3.2.9-2 各々の物質の BMD を評価するための動物実験結果の詳細

TABLE 2
Selected *In Vivo* Studies and Derived BMD10 for 19 Substances (Dose Levels in mg/kg bw/day)

Compound	Cat.	Days	Route	Dose levels (mg/kg bw/day)	Reference	$BMD_{fetal\ weight}$	$BMD_{malformations}$
Methotrexate	3	GD9	ip	0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 2.5	Jordan *et al.*, 1976		0.15
6-Aminonicotinamide	3	GD10	ip	0, 4	Sandor *et al.*, 1978		2.4–3.6[a]
All-*trans*-retinoic acid	3	GD10–11	G	0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100	Turton *et al.*, 1992	6	5
5-Fluorouracil	3	GD14	sc	0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40	Shuey *et al.*, 1994	25	25
Methylmercury chloride	3	GD7	G	0, 10, 20, 30	Lee and Han, 1995	9	
5-Bromo-2′-deoxyuridine	3	GD10	ip	0[b], 300, 400, 500	Skalko *et al.*, 1971		300
Hydroxyurea	3	GD6–15	G	0, 50, 150, 300, 450	Aliverti *et al.*, 1980	200	200
Diphenhydramine hydrochloride	1	GD1–21, 16–21	sc	0, 20	Mones *et al.*, 2004; Chiavegatto *et al.*, 1997	> 20 in rat[c]	> 20 in rat[c]
Acrylamide	1	GD6–21	G	5, 10, 15, 20	Wise *et al.*, 1995	No effect, > 20[d]	No effect, > 20[d]
Boric acid	2	GD10	G	100, 250, 500, 750	Hanrouk *et al.*, 2005		600
Lithium carbonate	2	GD6–15	G	50, 100	Marathe and Thomas, 1986	75	
Dimethadione	2	GD6–15	G	0, 54, 216, 433, 541	Buttar *et al.*, 1978	200	200
D-(+)-Camphor	1	GD6–17	G	0, 216, 464, 1000	Leuschner, 1997	> 1000	> 1000
Pentyl-4-yn-valproic acid	2	GD8	ip	0, 200	Bojic *et al.*, 1998	175[e]	105–139[e]
Valproic acid	2	GD7–18	G	0, 150, 200, 300, 400, 600	Vorhees, 1987	200	200
Methoxyacetic acid	2	GD12	G	0, 180, 360	Ritter *et al.*, 1985		58–102[f]
Acetyl salicylic acid[g]	2	GD9–12	G	0, 100, 150, 175, 200	Wilson *et al.*, 1977	125	100
Dimethylphthalate	1	GD14–PND3	G	0, 750	Gray *et al.*, 2000	> 750	> 750
Saccharin	1	GD10	ip	0, 500, 1000, 2000	Dropkin *et al.*, (1985)	> 2000	> 2000

Note. $BMD_{fetal\ weight}$ = dose (mg/kg bw·day^{-1}) at 10% decrease in fetal weight; $BMD_{malformations}$ = dose (mg/kg bw·day^{-1}) at 10% increase in malformations; GD = gestational day; G = gavage; DW = drinking water; ip = intraperitoneal; PND = postnatal day; and sc = subcutaneous.

[a]Estimated from the results in Sandor *et al.* (1978) and the dose–response in Astroff *et al.* (2002).

[b]Uninjected females were used as controls.

[c]Some effects on brain dopamine systems were observed in the offspring at maternally toxic doses.

[d]At doses of ≥ 10 mg/kg bw·day^{-1} marked neurotoxic effects of acrylamide in the dams, resulting in decreased body weight. The increased number of dead pups at birth at 20 mg/kg bw·day^{-1} is considered to be secondary to maternal toxicity.

[e]Estimated from the results for pentyl-4-yn-valproic and the dose–response for hexyl-4-yn-valproic (Bojic *et al.*, 1998).

[f]Estimated from the results for methoxyacetic acid and the dose–response for methoxyacetic acid, 2-methoxyethanol, and di(2-methoxy-ethyl)phthalate (Ritter *et al.*, 1985).

[g]Acetyl salicylic acid is rapidly metabolized to salicylic acid (Wilson *et al.*, 1977), which was the compound used in the WEC test.

（３）*in vitro* と *in vivo* の相関（Correlation *In Vitro* and *In Vivo*）

図 4.3.2.9-2 は、19 の化合物の *in vivo* での BMD の値に対する BMC の値をプロットしたものである。いくつかの物質では、*in vivo* BMD は矢であらわされる。

ばらつきは見られるものの、この図は BMC と BMD がよく相関していることを示している。二重対数的なスケールにおいて、直線の傾きは 0.7 である。

表 4.3.2.9-3 は、毒物動態の 2 つのパラメータである「吸収」と「半減期」についてまとめたものである。全ての複合体で吸収率は高く（40-100%）、半減期は 14 分-3 時間の間におさまったが、いくつかの複合体はそれよりも半減期が非常に長かった（10 日）。BMC と BMD との相関のばらつきを説明するもう 1 つの因子は、*in vivo* 実験での様々な投薬方法である。このような背景から、いくつかの研究で単回投与が行われているが、他の研究では 20 回以上の反復投与が行われている。単回投与と反復投与の結果の比較から、単回投与試験が反復投与試験より高い BMD 値を示す結果になると想定する可能性があるだろう。図 4.3.2.9-3 は、図 4.3.2.9-2 と同様のプロットを行ったものである。ただし、破線は化合物の 2 つの特性（2 回以上の投与または半減期の長さ）をあらわしている。この図は、これらの 2 つの側面を考慮に入れることは、*in vitro* BMC と *in vivo* BMD の間の相関を改善することができることを示している。また、二重対数の検量線の傾きが 1 に近づくことがわかる。これは、プロットされた BMC と BMD の相関関係が、変換されていない場合の濃度／用量スケールにおいて、直線に近づくことを意味している。

表 4.3.2.9-3 複合体における吸収と半減期

TABLE 3
Approximated[a] Values for Absorption and Half-Life in Blood of the Compounds Included in the Study

Compound	Days	Route	Absorption[b] (%)	Reference	Half-life (blood)	Reference
Methotrexate	GD9	ip	High		20 min	Brennes *et al.*, 1989
6-Aminonicotinamide	GD10	ip	High		30 min	Walker *et al.*, 1999
All-*trans*-retinoic acid	GD10–11	G	40	Saadaddin *et al.*, 2004	40 min	Clewell *et al.*, 1997
5-Fluorouracil	GD14	sc	High		14 min	Desgranges *et al.*, 1986
Methylmercury chloride	GD7	G	100	Nielsen and Andersen, 1991a	10 days	Nielsen and Andersen, 1991b
5-Bromo-2′-deoxyuridine	GD10	ip	High		Not found	
Hydroxyurea	GD6–15	G	100	Cited in Yan *et al.*, 2005	3 h	Yan *et al.*, 2005
Diphenhydramine hydrochloride	GD1–21, 16–21	sc	High		1 h	Dresch *et al.*, 1970
Diphenhydramine hydrochloride		G	70	Blyden *et al.*, 1986; Scavone *et al.*, 1990; Spector *et al.*, 1980	1 h	Dresch *et al.*, 1970
Diphenhydramine hydrochloride	GD4–20	DW	70	Blyden *et al.*, 1986; Scavone *et al.*, 1990; Spector *et al.*, 1980	1 h	Dresch *et al.*, 1970
Acrylamide	GD6–21	G	100	Kadry *et al.*, 1999	2 h	Barber *et al.*, 2001
Boric acid	GD10	G	100	Cited in Vaziri *et al.*, 2001	3 h	Vaziri *et al.*, 2001
Lithium carbonate	GD6–15	G	High[c]		> 8 h (due to delayed absorption)	Waring *et al.*, 2002
Dimethadione	GD6–15	G	Not found		3 h	Kurata *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 1985
D-(+)-Camphor	GD6–17	G	Not found		Not found	
Pentyl-4-yn-valproic acid	GD8	ip	High		Not found	
Valproic acid	GD9	sc	High		5 h	Kumar *et al.*, 2000
Valproic acid	GD7–18	G	100	Zaccara *et al.*, 1988	5 h	Kumar *et al.*, 2000
Methoxyacetic acid	GD12	G	Not found		20 h	Aasmoe *et al.*, 1999
Acetyl salicylic acid[d]	GD9–12	G	High[d]		7 h	Yoshikawa *et al.*, 1984
Dimethylphthalate	GD14–PND3	G	40–90 (other phthalates)	Kluwe, 1982	3–48 h (other phthalates)	Fennell *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 1984; Kremer *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 1975
Saccharin	GD10	ip	High		Not found	

Note. DW = drinking water; G = gavage; GD = gestational day; ip = intraperitoneal; PND = postnatal day; and sc = subcutaneous.

[a]Absorption and half-life were obtained from the literature without considering the dose administered. In addition, when no data for rats were found, studies with other species were considered.

[b]Absorption/bioavailability is assumed to be high when administration route is subcutaneous or intraperitoneal as no membranes, such as epidermis or gut lining, have to be passed.

[c]Lithium carbonate and acetyl salicylic acid are drugs administered orally, therefore we assume that their systemic absorption is high.

[d]No data for acetyl salicylic acid were found. As the hydrolysis of the ester to salicylate *in vivo* is very fast (many esterases), the relevant half-life is considered to be the plasma half-life of salicylate, which is presented in the table to be 7 h.

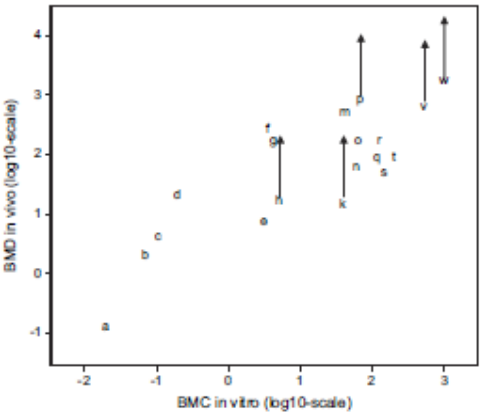


FIG. 4. *In vivo* BMD values plotted against *in vitro* BMC values for the endpoint TMS. A positive arrow indicates that the BMD would have been higher than the highest dose tested, indicated by the base of the arrow. Compounds: (a) methotrexate, (b) 6-aminonicotinamide, (c) all-*trans*-retinoid acid, (d) 5-fluorouracil, (e) methylmercury, (f) 5-bromo-2′-deoxyuridine, (g) hydroxyurea, (h) diphenydramine, (k) acrylamide, (m) boric acid, (n) lithium, (o) dimethadione, (p) D-(+)-camphor, (q) pentyl-4-yn-valproic acid, (r) valproic acid, (s) methoxyacetic acid, (t) salicylic acid, (v) dimethylphthalate, (w) saccharin.

図 4.3.2.9-2 *in vivo* での BMD 値

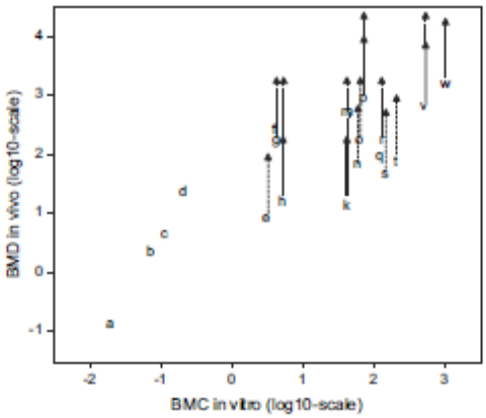


Fig. 5. *In vivo* BMD values plotted against *in vitro* BMC values for the endpoint TMS. A dashed upward arrow is added on compounds that either had a long half-life or were administered in multiple doses. See legend of Figure 4 for explanation of the other arrows and compound identification.

図 4.3.2.9-3 *in vivo* での BMD 値（化合物の特性を考慮した場合）

4.3.2.9.3　考察

WEC データの分析は、特定の *in vitro* 実験が様々な研究室で高い再現性を持っているという以前の結論を裏付けるものである（Genschow ら、2002 ; Piersma ら、2004）。研究室のうち１つでは､他の３つの研究室と比較した場合に違いが観察された｡HEAD, CRL, TMS のエンドポイントには強い相関関係があった。*in vivo* において同じ物質で行った WEC 実験で観察された発達に対する影響の比較では、エンドポイントの相関関係はなかった。これは恐らく、*in vivo* WEC モデルの還元論的な性質、及び／または *in vivo* の状態との暴露状況の違いにより生じるものであると考えられる。例えば、骨形成の遅延のような *in vivo* の発達への影響、例えば水腎症と口蓋裂は、WEC 試験では得点化できない。さらに、様々な組織の相対的な感受性は暴露の時期（ウィンドウ）に依存するが、それは WEC 試験においては比較的狭い範囲である。

これらの *in vitro* 試験結果から生じる胚毒性作用強度の順位は、エキスパート・ジャッジメントにより３つに分類される。しかし、化合物の一部では、BMC はこの分類に当てはまらない。エキスパート・ジャッジメントによる *in vivo* の胚毒性の特性づけは、場合によっては限られたデータベースに基づくものとなる。BMC 値に基づくランキングは、胚に対する有効濃度により決まる。しかし、胚毒性の分類は、*in vivo* 中での有効容量（濃度）だけでなく､胚毒性と母体由来の毒性に基づくものである｡ジフェニルヒドラミンやアクリルアミドのような物質の *in vivo* 実験における投与量は、胚毒性効果には不十分であったり、母体由来の毒性を誘発して発達毒性効果を複雑にしていたりするかもしれない｡一部の研究においては、発達毒性が母体によるものであるかどうかを結論付けるのは重要なことである。*in vivo* の研究とは対照的に、母体由来の影響は WEC 試験に影響しない。このように、母体由来の毒性を誘発する用量で、WEC 検査（*in vivo* の用量から推定されたもの）で有効濃度を比較することは､発達に対する直接の効果を支持するものまたは否定するものとなりうる。

結論として、*in vivo* の動的実験を WEC 試験で代替することはまだ無理である。

4.3.2.10　「Predicting maternal rat and pup exposures: how different are they?」[25]

異種間外挿法に基づく､環境化学物質あるいは医薬品に対する初期での暴露に関するリスク評価及び安全評価は､幼若の個体における化学物質に対する用量反応情報から多大な利益を得る。関連毒性研究には、複数の段階の生活期における暴露が含まれるが、母体の暴露用量はしばしばげっ歯類で得られた毒性知見をヒトに外挿する際に使用され､不確実性の本質的な原因となる｡授乳期間及び早期離乳中で変わる因子の生理学的な情報を用いた区画を用いた薬物動態（PK）モデルが開発された。モデルでは、幼若の個体の化学物質に対する用

[25] Yoon M, Barton HA., “Predicting maternal rat and pup exposures: how different are they?”, Toxicol Sci. 2008 Mar;**102**(1):15-32. Epub 2007 Nov 17.

量予測のために、成体における薬物動態、乳汁分布、関連する産後生物学を用いている。モデルは、毒性研究において使用される 3 つの投薬戦略（胃管栄養法、一定の ppm 濃度の食餌、調整された ppm 濃度の食餌）および、除去率、乳汁分布、子における暴露用量、内部用量測定などの異なる薬物動態学的特性の影響を扱っている。子及び母体の排泄物における化学物質の除去時及び再循環時の発育遅延が評価された。2 つの化学物質に対するデータ比較後、理論上の化学物質に対して特性の範囲内での予測がなされた。より短い半減期、低乳汁伝達、広い分布容積、胃管栄養法による投与では一般に、子の暴露は母体の暴露よりも低かった。 一方、より長い半減期、高乳汁伝達、狭い分布容積、食餌による暴露では、子の暴露は母体の暴露よりも高かった。現存モデルは、子の暴露は必ずしも母体の暴露と対応しないことを示した。モデル予測を用いれば、初期毒性と薬物動態研究の設計を支援し、研究で得られた知見をより良く解釈することが可能となる。

4.3.2.10.1　序論

本研究は、試験化合物の限られた生物学的及び薬物動態的性質を用いて、ラットの仔の用量を予測するとともに、生後初期の期間における毒性研究あるいは薬物動態研究の設計を支援し、これらの研究から得られる知見の理解を支援するためのツールを提供することを目的として行われた。本研究の目的は、生物学的と連携して、成体の薬物動態及びミルク伝達に係るデータを使って、仔の用量を合理的に予言できるかどうかを評価し、また、薬物動態学的特性（排出速度やミルク分配速度など）が仔の（例えばミルクからの）暴露用量や循環濃度にどの程度影響するかを評価することである。従来の区画に区切られた薬物動態モデル手法を採用し、授乳期間中や初期の離乳期間における変動因子（例えば仔の体重増加など）に関する生物学的情報を追加した。毒性研究で採用される 3 種類の投薬戦略（恒常的な ppm 濃度の食餌、調整された ppm 濃度の食餌、胃管栄養法）を模擬し、結果として生じる母体及び新生児の用量を比較した。モデルの性能は、2 種類の化学物質について、以前に報告されている授乳時の暴露データと比較することで評価した。その後、環境化学物質及び／あるいは医薬品でベンチマークされた、さまざまな特性を持つ 16 種類の理論的な化合物について暴露量を模擬した。これらの理論的な試験化合物の特性を表 4.3.2.10-1 に示す。

表 4.3.2.10-1 試験化合物の特性の分類

	Chemical category	Abbreviation	Chemical properties
1	Base case (Vd[a] = 0.7, Pm = 1)	Base	Uniformly distributed throughout the body/approximately distributed to total body water Milk concentration equals the maternal blood concentration
2	Small volume of distribution (Vd = 0.2)	SmVd	Limited distribution to tissues Highly bound to plasma protein
3	Large volume of distribution (Vd = 2.5)	LgVd	Distribution to storage depot
4	High milk transfer (Pm = 10)	HIghPm	Milk concentration greatly exceeds maternal blood level
5	Moderate milk transfer (Pm = 3)	MidPm	Milk concentration is moderately higher than maternal blood level
6	Low milk transfer (Pm = 0.1)	LowPm	Milk concentration is lower than maternal blood level

Note. We evaluated 16 different theoretical test compounds in the present study. Two test compounds were defined for each of the six chemical categories, one with a short half-life and the other with a long half-life. Categories 2–6 include 10 different theoretical compounds, each of which possesses the same chemical properties as the base case except for the one factor varied to the value noted in parentheses. For base case chemicals, the impacts of delayed elimination capacity or excreta recirculation were evaluated for each half-life. Otherwise, prenatal development of elimination and no recirculation were modeled for all the test compounds in categories 2–6. The details of pharmacokinetic parameter values used for each test compounds are listed in Table 3.

[a]Vd represents the body weight–normalized volume of distribution (l/kg) here and in other tables.

試験化合物を、除去率、分配体積、母乳を通じた伝達の違いで 6 つのケースに分類した。一つのケースにつき、2 つの化合物を定義した。一つは半減期が短く、もう一つは半減期が長い。ベースケースについては、さらに、除去が遅れた場合、排泄物の再循環が遅れた場合についても、2 種類の半減期の化合物を定義した。現在のモデルは、母体の化合物についてのみ、母体と仔の薬物動態を模擬する。本モデルは、仔の暴露に影響を与える可能性のある複数の因子を同時に考慮することができるので、その結果としてこれらの因子が幼体時における用量に与える総合的な影響を予測することができる。本モデルによる実験の結果、仔の暴露に関する一般的な知見と異なる性質を持つ化学物質に対する異なる研究設計に関する一般的な知見が得られ始めている。

4.3.2.10.2　手法

（1）モデルの構築

acslXtreme コード（version 2.0.1.7、Aegis 社、ハンツビル、米国アラバマ州）を用いてモデルが構築され、シミュレーションが行なわれた。母体及び仔の化学物質への暴露に関する、生物学に基づく薬物動態学モデルの構造を図 4.3.2.10-1 に示す。

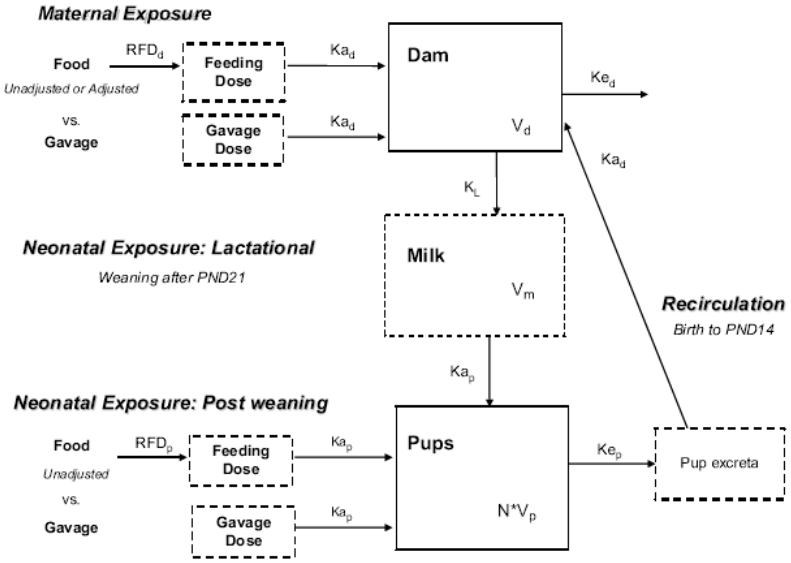


FIG. 1. Schematic representation of BBPK model for chemical exposures during lactation and early postweaning. Abbreviations used in the present model are as follows: Dam (subscript d), the compartment for the mother; Ka_d, first-order absorption constant for the dam (per hour); V_d, volume of distribution of the dam (l); Ke_d, first-order rate constant for chemical elimination from the dam excluding milk secretion (per hour); K_L, rate constant for chemical secretion via milk from the dam (per hour); Milk (subscript, m), the conceptual compartment for milk; V_m, volume of milk secreted from the dam/ingested by the N pups (l/day); Pups (subscript p), the compartment for the pups, as a litter; Ka_p, first-order absorption constant for the pups (per hour); N, the number of pups per litter; V_p, volume of distribution of an individual pup (l); Ke_p, first-order rate constant for chemical elimination from the pups (per hour); RFD_d, rate of feed dosing in the dam (g/h); RFD_p, rate of feed dosing in the pups (g/h). Chemical concentration in each compartment is expressed as C with a subscript for corresponding compartment; C_d, concentration in the dam (mg/l); C_m, concentration in the milk (mg/l); C_p, chemical concentration in the pups (mg/l).

図 4.3.2.10-1　母体及び仔の化学物質への暴露に関する、生物学に基づく薬物動態学モデルの構造

化学物質への暴露に関するシミュレーションは、生後 28 日間について行なわれた。そのうちの最初の 21 日は授乳期間であり、その後の一週間は離乳後である。モデルは、胃管栄養法、恒常的な ppm 濃度の食餌、調整された ppm 濃度の食餌、の 3 種類の暴露について 4 週間に亘り、体重、母乳の生産量及び消費量、食物の消費量の各々の変化を記述している。モデルを記述する記号や略語は、図 4.3.2.10-1 の凡例にまとめた。また、表 4.3.2.10-2 に、シミュレーション期間中で変化するパラメータについての数式を示す。シミュレーション期間中に変化するパラメータのうち、残りの 2 つのパラメータ（BW_d 及び V_m）の値は、acslXtreme コード内に、TABLE 関数を用いて組み込んだ。16 種類の試験化合物に関する、その他の化学的なパラメータ及びシミュレーション条件を表 4.3.2.10-3 に示す。モデルに組み込んだ、生物学的データ（母体の体重、母体の食物消費量、仔の体重、仔の食物消費量）を図 4.3.2.10-2 に示す。

表 4.3.2.10-2　シミュレーション期間中で変化するパラメータについての数式

TABLE 2
Equations Incorporated in the Model to Describe Changing Parameters[a]

	Simulation periods				
	Week1	Week2	Week3	Week4	References
BW_p	$0.0022 + 0.0028 \times PND - 0.00014 \times PND^2 + 0.0000052 \times PND^3$				Doerflinger and Swithers (2004)
$FOOD_d$	$(12 + 82 \times PND)/(8.6 + PND)$		$(65000000 \times e^{(-0.67 \times PND)}) + 17$		Shirley (1984)
$FOOD_p$[b]	0		$(0.569 + (9.74 - 0.569))/((1 + e^{(22 - PND)})/0.9)$		Redman and Sweney (1976)
AJ					
Unadj[c]	1	1	1	1	Shirley (1984)
Adj[d]	FID/121[e]	FID/202	FID/269	1	
R					
Prenatal[f]	1	1	1	1	
Delay[g]	$(1 \times PND)/(PND + 7)$				

Notes. Bw_p, body weight of the pup (kg, individual pup); $FOOD_d$, daily food consumption by the dam (g); $FOOD_p$, daily food consumption by the pup (g, individual pup); AJ feeding dose adjustment factor; R, ratio of Ke_p/Ke_d, defining developmental pattern of elimination capacity in the pup.
[a]These equations were written in DISCRETE block in acslXtreme CSL file.
[b]$FOOD_p$ equation was in effect from PND17 and onward.
[c]"Unadj" represents the unadjusted feeding dosing simulation.
[d]"Adj" represents the adjusted feeding dosing simulation.
[e]FID refers to the reference intake and the numbers represent the food intake by the dam during the indicated simulation week.
[f]"Prenatal" refers to development of adult elimination capability occurring before birth so it modeled as constant after birth.
[g]"Delay" refers to delayed development of elimination capacity simulated in the model. The elimination capacity was modeled to reach the half maximum on PND7.

表 4.3.2.10-3　16 種類の試験化合物に関する、その他の化学的なパラメータ及びシミュレーション条件

TABLE 3
Chemical Parameters and Simulation Conditions for the 16 Theoretical Test Compounds

			Vd (l/kg)			Ka (per hour)		Ke (per hour)		
	Category	Half-life	Dam (Vd_d)	Pup (Vd_p)	Pm	Dam	Pup	Dam	Pup	Recirculation
1	Base	Short	**0.7**	**0.7**	**1**	**2**	**2**	**0.7**[a]	**0.7**[a]	**No**
2		Long						**0.03**[b]	**0.03**[b]	
3	w/Developmental delay	Short	0.7	0.7	1	2	2	0.7	**0.7 × R**	No
4		Long						0.03	**0.03 × R**	
5	w/Recirculation	Short	0.7	0.7	1	2	2	0.7	0.7	**Yes**
6		Long						0.03	0.03	
7	SmVd	Short	**0.2**	**0.2**	1	2	2	0.7	0.7	No
8		Long						0.03	0.03	
9	LgVd	Short	**2.5**	**2.5**	1	2	2	0.7	0.7	No
10		Long						0.03	0.03	
11	HighPm	Short	0.7	0.7	**10**	2	2	0.7	0.7	No
12		Long						0.03	0.03	
13	MidPm	Short	0.7	0.7	**3**	2	2	0.7	0.7	No
14		Long						0.03	0.03	
15	LowPm	Short	0.7	0.7	**0.1**	2	2	0.7	0.7	No
16		Long						0.03	0.03	

Note. Abbreviations used for describing category are from Tables 1 and 2. Values in bold highlight the base case for comparison purposes and the changes in individual parameters defining specific cases.
[a]$t_{1/2} = 1$ h.
[b]$t_{1/2} = 24$ h.

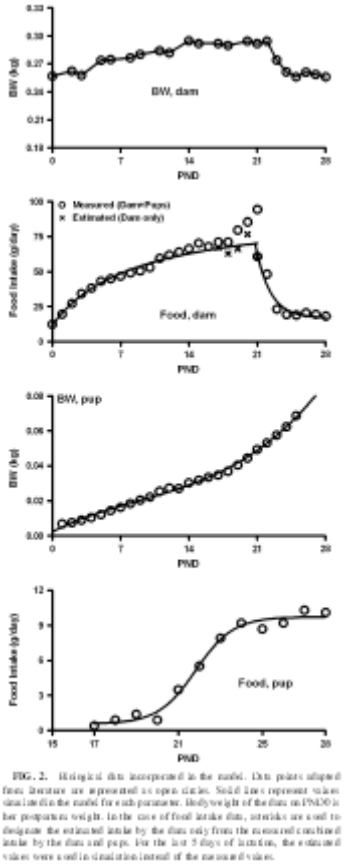


図 4.3.2.10-2　モデルに組み込んだ、生物学的データ（母体の体重、母体の食物消費量、仔の体重、仔の食物消費量）

（２）結果

２－１）モデルの性能評価

2.4-D 及び OTA（オクラトキシン A）について公表されているデータを用いて、モデルの性能評価を実施した。図 4.3.2.10-3 は、報告されている OTA のデータをシミュレーション結果と比較したものである。報告されている C_d（母体における濃度）及び C_m（母乳における濃度）の値は、母体の薬物動態を模擬した濃度範囲内（図 4.3.2.10-3A）、組み込んだ仔の排泄の影響を模擬した濃度範囲内（図 4.3.2.10-3B）に収まった。C_p（仔における濃度）は、生後 14 日の実測値と比較すると、各々のケースで、13%過少評価、20%過大評価されたが、合理的に予測された。

表 4.3.2.10-4 は、異なる V_d に対して生後 16 日における母体、仔、母乳中の 2,4-D 濃度を模擬した結果である。小さい V_d では、高い濃度が模擬され、実測値に近づいていることがわかる。

これらの 2 つの限定的な試験は、本モデルは、母乳の移動データ及び授乳していない母体の動態データが利用可能であれば、仔の暴露量を合理的に近似できることを示している。

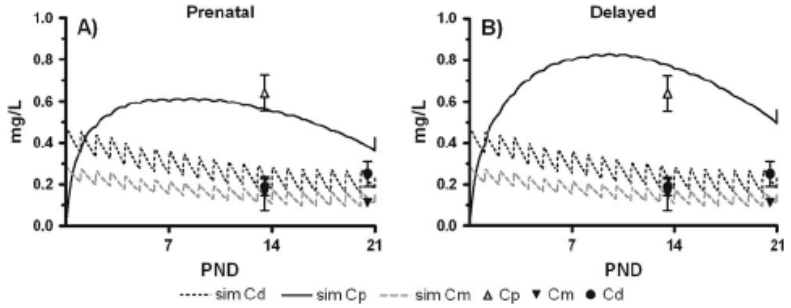


FIG. 4. Simulation of OTA concentration in the dam, pups, and milk. Predicted concentrations in the dam, pup, and milk are indicated as sim C_d, sim C_p, and sim C_m, respectively. The published data points on PNDs14 and 21 are represented with mean ± SD (Hallen *et al.*, 1998). They are plotted in the middle of the corresponding day of measurement. The predictions using prenatal and delayed developmental patterns of elimination are illustrated in A and B, respectively.

図 4.3.2.10-3　OTA の実測値とシミュレーション結果の比較

表 4.3.2.10-4　公表されている 2,4-D データに対するモデルのベンチマーク結果

TABLE 5
Benchmarking the Model to Published 2,4-D Data

	Dam (C_d) (mg/l)	Pup (C_p) (mg/l)	Milk (C_m) (mg/l)
Sturtz *et al.*[a]	26.09 ± 4.24	6.34 ± 1.68	28.92 ± 3.04
Adult female Vd[b]	4.6–9.1	1.5–2.1	5.1–10
SmVd[b,c]	8.0–18	6.6–9.5	8.9–19

[a]Mean ± SE as reported in (Sturtz *et al.*, 2006).
[b]Predicted C_{min}–C_{max} values were reported for each dose metric.
[c]The volume of distribution for 2,4-D was varied to the smaller value reported for this chemical (Timchalk, 2004).

4.3.2.11　「Applicability of the principles of developmental pharmacology to the study of environmental toxicants.」[26]

医薬品以外の化合物（生体異物）は、小児期において環境中から大量に曝露されるものの、これら化合物の小児への影響に関する研究は、薬物に関する研究よりも遅れていた。しかし、後者の研究から幾つかの有用な外挿法が確立することができる。発生薬理学（developmental pharmacology）と発生毒性学（developmental toxicology）は、その生理学的プロセスや原理が同じであるため、発生薬理学のデータを発生毒性学に適用させる事が可能である。ただし、*in vivo* のヒト発生毒性学に関する知見は限られており、特に金属や PCB など生物濃縮する物質に関しては、大人と子供で体内動態がどれだけ異なるかといった情報が不十分であるため、更なる検討が必要である。

近年、小児における、処方量の計算方法は大幅な進歩を見せた。Clark's rule は体重に基づ

[26] McCarver DG., "Applicability of the principles of developmental pharmacology to the study of environmental toxicants.", Pediatrics. 2004 Apr;**113**(4 Suppl):969-72.

き、Von Harnak's and Kegel's normograms は体表面積に基づいて計算される。発達期の体内動態の違いにより、クロラムフェニコール chloramphenicol（抗生物質）は、深刻な神経学的転帰（neurologic outcome）や死を引き起こすことがわかった。一方で、アミノグリコシド aminoglycoside（抗生物質）は、成人において腎臓毒性（nephrotoxicity）を引き起こすものの、小児（特に幼児 infant）は感受性が低く、小児が必ずしも副作用の影響を受けやすいとも限らないことが示された。このように、小児患者は影響されやすい個体群として任意に分類されることはないが、成人と比較した際、明らかに異なる分類となる。

近年の小児薬理学は、小児期において身体組成の変化が非線形的であるという知見に基づいて、説明がなされている。成長パターンは人それぞれであり、成長速度も一定ではない（出産直後と思春期で発達速度が大きくなる）。このため、効能（efficacy）や毒性（toxicity）の違いを、年齢に基づいて一般化することはできない。成長（maturation）が非線形的であることから、薬物の体内動態の変化も非線形的である。なお、歩く直前から歩き始めた頃の幼児（older infants and toddler）が化学物質に対して最も高いクリアランスを示し、例えばジアゼパム diazepam の半減期は infant が最も短く、早産新生児（premature newborns）や高齢者で最も長くなる（最大 7 倍）。

90 年代までは、医薬品の安全性と効能に関して、大人と子供で同じ基準が用いられていた。1997 年に「1994 Pediatric Rule and Congressional passage of the Food and Drug Administration Modernization Act」で大人と子供の違いの医学的重要性を示され、発生生物学や発生生理学、薬理学、動物実験の指標をもとに個別の物質の効能と毒性の調査が進められた。得られたデータは、より良い環境研究計画に対して先験的情報をもたらすが、小児患者における、毒素の評価特異的な体内動態に関する更なる知見が、今後も必要とされる。

小児においても、薬物動態学（pharmacokinetics）と薬力学（pharmacodynamics）の研究は進められている。環境有害物質に関しては、"toxicokinetics" と "toxicodynamics"といった研究分野が定められた。大人と子供の感受性の違いを解明するには、成長期（growth）、発達期（development）、成熟期（maturation）のそれぞれにおいて、生物学的プロセスと、そのインターフェースに与えるインパクト（薬力学的な差）を明らかにする必要があり、薬物動態学の違いを示すだけでは不十分である。生体異物の動態は、生体構造や生理学の多くの違いによる影響を受ける。

発達期における生理学的過程の解明は、大人と子供のメカニズムの違いの理解に役立つ。体組成の変化は薬物の分布と代謝に影響を与えるが、ヒトは生後 5 ヶ月で水分量 80%から 60%へ低下し、脂肪量は 2 倍に増える。これら体組成の違いと生体異物の性質により、体内の分配容量（distribution volume）がわかるため、投与量と濃度の関係が決まる。なお、生体異物の代謝と排出に大きく関わる肝臓と腎臓の体重に対する容量は子供の方が何倍も大きい。身体発育の過程は生体異物の体内動態に直接的にも間接的にも影響を与える。成長ホルモンレベルは新生児期と思春期の成長過程で多くなるが、成長ホルモンは生体異物の作用に関する様々な経路に影響を与える。

生体異物の体内動態には、吸収（absorption）、分配（distribution）、代謝（metabolism）、排出（excretion）といったプロセスがあり、それぞれ様々な要因によって制御されているが、代謝が一番複雑である。この背景として、薬物代謝にかかわる様々な酵素と組織特異的な発現があることが要因として挙げられる。

成長と発達は薬物動態学と薬力学及びその相互関係を複雑にする。小児において、薬物の効能が異なり、副作用に対する感受性も異なるのは、特異的な基質の存在や、個体発生における特異的なプロセスの関与が起因する。このような中、動物実験データのモデル化の重要となってくる。

現在は、複数の生体異物のばく露や、組織特異的な発生、年齢特異的な生体異物のトランスポーター、長期の効能や毒性を測る代替エンドポイント、小児に特異的な症状等の研究が進められている。

このような中、環境有害物質に関する情報は、小児臨床に関する情報に比べて、依然不足している。

4.3.2.12 「Chemical structure--teratogenicity relationships, toxicokinetics and metabolism in risk assessment of retinoids.」[27]

レチノイン酸（ビタミンAの酸化的代謝産物）は胎児の発育を含む多くの生物学的プロセス制御に関与しており、レチノイド欠乏症と同様、その過剰摂取には催奇形性がある。通常の発育におけるレチノイドの影響は、異常な発達と同様、発育期間において特異的な時間的、空間的発現を示すレチノイド受容体の 2 つのメンバーである RARs と RXRs に介在される可能性がある。この複合レチノイド系のいかなる変化についても、催奇形作用と関係する可能性があるという証拠が蓄積された。ここで我々は、代謝と胎盤移行の側面を含むレチノイド催奇形作用強度における毒物動態パラメータの影響を調査する。活性化（レチノイン酸の酸化、複合糖質の加水分解）および非活性化反応（トランス配列からシス配列への異性化、β-グルクロン酸抱合）は奇形発生に関連することが示される。レチノイン酸のβ-グルクロニドは不十分な胎盤転移を示し、母体における存在を長引かせた。抗てんかん薬剤のような非レチノイド化合物は、 内在性レチノイド濃度の変更を通じてそれらの催奇形性の幾つかを発現する可能性がある。

4.3.2.12.1 序論

レチノイン酸はビタミン A の代謝物であり、上皮組織の増殖と分化に関与していることが知られている。レチノイドの受容体として、ステロイド/サイロイドホルモンスーパーファミリーに分類される RARα，β，γ及び RXRα，β，γの 2 つの群がある。

---

[27] Nau H., “Chemical structure--teratogenicity relationships, toxicokinetics and metabolism in risk assessment of retinoids.”, Toxicol Lett. 1995 Dec;82-83:975-9.

ビタミン A が過剰であること及びそれが欠乏していることは、催奇形の原因となる。All-*trans*-レチノイン酸は内因性物質として胚に存在する。レチノイン酸受容体である RAR と RXR ファミリーは、時期・部位特異的に胚の発達に関与する。また、細胞質のレチノール結合タンパク（CRBPs）とレチノイン酸結合タンパク（CRABPs）は胚において非常に特異的な発現パターンを示す。これらのタンパクは、”フリーの”all-*trans*-レチノイン酸の濃度を調節することにより、レチノール及びレチノイン酸の代謝に関与している可能性がある。

我々は、母体由来の血漿及び胚における毒物動態及び代謝パラメーターを検討し、レチノイド投与における催奇形性を研究した。また、抗てんかん薬が血漿中のレチノール及びレチノイン酸群の濃度を調節しうること、それらが催奇形性の原因となりうることを示した。

4.3.2.12.2　結果と考察

（1）レチノイドの胎盤通過

レチノイドの化学構造は、胎盤通過に影響する。all-*trans*-レチノール及び all-*trans*-レチノイン酸は、マウス、ラット及びウサギにおいて広範 extensive に胎盤通過するが、レチノイン酸のシス異性体（9-*cis*, 13-*cis*,9,13-di-*cis*-retinoic acid）はより限定的な胎盤通過を示す（表 4.3.2.12-１）。構造特異的な相違によるこれらの現象はよく説明されておらず、レチノイン酸及びタンパク質が異なった結合親和性により胚の中に存在しているためであると考えられる。興味深いことに、13-*cis*-レチノイン酸の胎盤通過はげっ歯類に比べてサルで起こりやすく、サルとげっ歯類との胎盤の構造の違いがこの原因ではないかと考えられる。

表 4.3.2.12-1 レチノイドの胎盤通過

Table 1
Placental transfer of retinoids
(mouse, rat, rabbit)

Retinoid	Embryo/maternal plasma ratio
RAG	
all-*trans*	0.01–0.03
13-*cis*	0.01–0.03
9-*cis*	0.01–0.03
RA	
9,13-di-*cis*	0.01–0.03
13-*cis*	0.05–0.1
9-*cis*	0.15
all-*trans*	0.5–2

Data from Refs. [11–16].

（2）血漿中での消失及び代謝

13-*cis*-レチノイン酸はサルにおける催奇形物質であり、ヒトではさらに催奇形性が高い物質である。サル胚への（13-*cis*-レチノイン酸の）移行はこの現象において非常に重要である。

サルにおける 13-*cis*-4-oxo-レチノイン酸への代謝経路の進行 proceed は、催奇形性を引き起こすものである。一方、ラット及びマウスでは、血漿の主要な代謝物は 13-*cis*-retinoyl-β-glucuronide であり、これはほとんど胎盤通過せず、催奇形活性もほとんどない。さらに、血漿中の 13-*cis*-レチノイン酸の消失 clearance は、サルよりもマウスやラットで起こりやすい。ラット及びマウスでの 13-*cis*-レチノイン酸による催奇形性の低さは、3 つの要因（表 4.3.2.12-2）により説明できる：限定的な胎盤通過、血漿中の迅速な消失、代謝による解毒作用である。一方、サルにおけるレチノイドの高い催奇形性活性（ヒトにおいても同様）は、広範囲な胎盤移行、血漿におけるゆるやかな消失、活性型 4-oxo-metabolite の広範囲な代謝（表 4.3.2.12-2）によるものと考えられる。

表 4.3.2.12-2　ラット及びマウスでの 13-*cis*-レチノイン酸による催奇形性の低さを説明する 3 つの要素

Table 2
Species variation of 13-*cis*-retinoic acid teratogenesis

Parameter	Mouse/rat	Rabbit	Monkey/human
Clearance	Fast	Slow	Slow
AUC	Low	High	High
Placental transfer	<0.1	<0.1	0.4 (monkey)
Maternal metabolism	Deactivation to β-glucuronides	Activation to 4-oxo-met.	

Data from Refs. [11,12,14–17,19,20].

（3）抗てんかん薬の催奇形性における内因性レチノイドレベルについて

発作をコントロールするための抗てんかん薬として使われる主な薬剤には、妊娠中に投与すると催奇形性作用を持つものがある。ビタミンA及びレチノイドは胚発生における成長、分化、形態形成などの過程をコントロールすると考えられている。これらの仮説を検証するために、抗てんかん薬の催奇形性活性を図る目的で内因性のビタミン A-レチノイドの代謝についての実験を行った。様々な抗てんかん薬を投与した 75 名の子供の血漿を採取し、レチノールとその酸化代謝物（all-*trans*, 13-*cis*, 13-*cis*-oxo-retinoic acid）を測定した。投与群と同様の年齢の、薬剤を投与していない 29 名の子供を対照群とした。レチノイン酸複合物の濃度には年齢との相関は見られなかったが、レチノールの量は年齢とともに増加した。バルプロ酸を単独で投与した若年群では、レチノールの量は増加し、他の患者群においても同様の増加が見られた（表 4.3.2.12-3）。酸化代謝物である 13-*cis* 及び 13-*cis*-4-oxo-レチノイン酸はフェニトイン phenytoin、フェノバービタル phonobarbital、カーバマゼフィン carbamazepine、エトスキミド ethosuximide をバルプロ酸とともに投与したすべての患者群において、劇的に減少した(表 4.3.2.12-4)。バルプロ酸及びエトスキミドを投与した群以外では、all-*trans*-レチノイン酸にわずかながら変化が見られた。バルプロ酸とエトスキミドを投与した群では、レチノイドの量が増加した。この実験により、抗てんかん薬の投与は、内因性のレチノイドの代謝に大きな影響を与えることが示唆された。レチノイドは、胚発生

の段階での決定的な生物学的事象の経路において非常に重要であり、レチノイドの代謝（経路）の選択は抗てんかん薬の催奇形性の重要因子である可能性がある。このような血漿中のレチノイド濃度（の選択）は、組織のレチノイドの量、特にレチノイドが過剰であったり欠乏していたりする場合に影響を受けやすい組織において重要な研究であると考えられる。

表 4.3.2.12-3 レチノールとその酸化代謝物の濃度

Table 3
Plasma concentrations of retinol in infants and children treated with antiepileptic drugs

Group	Age group: retinol plasma conc. (ng/ml; means ±S.D.)		
	0–6 years	>6 years	All subjects
Controls	232 ± 36 (n = 15)	351 ± 62 (n = 12)	285 ± 77 (n = 27)
VPA	312 ± 73 (n = 10)[a]	379 ± 102 (n = 27)	363 ± 99 (n = 39)[b]
VPA + PT	–[e]	393 ± 116 (n = 4)	393 ± 116 (n = 4)[a]
VPA + CM	272/317 (n = 2)[b]	436/544 (n = 2)[b]	392 ± 123 (n = 4)[b]
VPA + PB	357 ± 40 (n = 3)[d]	414 ± 39 (n = 4)	389 ± 47 (n = 7)[a]
VPA + ES	–[e]	431 ± 137 (n = 6)	405 ± 143 (n = 7)[a]
VPA + combination	360 ± 20 (n = 3)[d]	420 ± 77.2 (n = 6)	399 ± 69 (n = 9)[d]

Abbreviations: CM, carbamazepine; ES, ethosuximide; PB, phenobarbital; PT, phenytoin; VPA, valproic acid.
Data from Ref. [10]
Significantly higher than in controls (Student's t-test): [a] $p < 0.005$; [b] $p < 0.05$ [c] $p < 0.01$; [d] $p < 0.0005$; [e] insufficient number of patients.

表 4.3.2.12-4　13-*cis* 及び 13-*cis*-4-oxo-レチノイン酸の濃度

Table 4
Plasma concentrations of polar retinoids in infants and children treated with antiepileptic drugs

Group	Plasma conc. of retinoic acids (RA) (ng/ml; means ± S.D.)			
	n	all-*trans*-RA	13-*cis*-RA	13-*cis*-4-oxo-RA
Controls	29	1.07 ± 0.26	0.97 ± 0.31	2.26 ± 0.93
VPA	40	1.13 ± 0.39	1.19 ± 0.89	2.22 ± 1.82
VPA + PT	5	1.07 ± 0.36	0.30 ± 0.19[a]	0.17 ± 0.38[a]
VPA + CM	4	1.17 ± 0.12	0.34 ± 0.11[b]	0.22 ± 0.44[b]
VPA + PB	7	0.92 ± 0.22	0.35 ± 0.26[a]	0.28 ± 0.48[a]
VPA + ES	8	1.35 ± 0.23[c]	0.58 ± 0.27[c]	1.08 ± 0.71[c]
VPA in comb.[d]	11	0.91 ± 0.31	0.23 ± 0.31[a]	0.14 ± 0.48[a]

n, number of subjects. For abbreviations of antiepileptic drugs see Table 3.
Data from Ref. [10]
Significantly different from corresponding controls (Student's t-test): [a] $p < 0.0001$; [b] $p < 0.001$; [c] $p < 0.01$; [d] Patients treated with VPA and two or three additional antiepileptic drugs.

フェノバービタルとともに投与した場合、血漿中の 13-*cis*-レチノイン酸と 4-oxo-メタボライトのレベルは急激に減少する。フェニトインとカーバマゼフィンはフェノバービタルと同様に、内因性のレチノイドを減少させる作用を示す。抗てんかん薬を投与した患者において、All-*trans*-レチノイン酸レベルがなぜ変化しないのかは非常に興味深い。恐らく、バルプロ酸、これは近年、酵素反応の阻害作用を持つことが示されているが、これとともに投与することで活性が相殺されるためであると考えられる。この仮説は現在検証中である。

（4）薬物動態パラメータ：AUC と Cmax

胚の発生時期における活性型レチノイドの AUC（時間-濃度曲線の下部領域）値は催奇形活性と相関がある。AUC 値の利用により、種間の比較が可能となり、実験結果を用いてヒトへの暴露の推定が可能となる。カフェインやバルプロ酸などの研究により、催奇形性効果は、AUC 値よりも寧ろ最大濃度（Cmax）の値と相関があることが示されている。メソキシアセティック methoxyacetic 酸のような薬剤により引き起こされる特定の効果は AUC 値と相関関係があるが、同じ薬剤による他の効果は Cmax 値と関連がある可能性がある。毒物動態のパラメーターは特定の薬剤によるものではなく、特定の組織や、発達における時期特異性にもよるものである可能性がある。

4.3.2.13 「Teratogenicity of isotretinoin revisited: species variation and the role of all-*trans*-retinoic acid.」[28]

4.3.2.13.1 概要

本論文は、種差、トキシコキネティクス、代謝の側面に関して、イソトレチノインの催奇形性を概説する。特に、イソトレチノイン（13-シス-レチノイン酸）の大部分の作用が、オールトランスレチノイン酸への異性化によるものであるという仮説に重点を置く。この作用モデルは、種差の理解につながるとともに、ヒトへの実験結果の外挿に対する基礎となることから、創薬における改善にもつながる。非感受性種（ラット、マウス）は、β-グルクロニドに対する解毒作用を通じ、急速に薬剤を排出する。また、これらの種では胎盤移行は制限される。一方、高感受性種（霊長類）では、本剤は主に活性のある 13-シス-4-オキソ-レチノイン酸へと代謝される。ここでの胎盤移行の程度はより大きくなる。β-グルクロニドは、試験された全ての種において限定された胎盤移行を示した。これらの代謝産物がたとえ低かったとしても、ヒトにおいて測定可能な濃度である。13-シス-レチノイン酸は、 細胞内のレチノイド結合タンパク質または核内受容体に結合しておらず、低い組織分布と胎盤転移を示すが、その核への移行は顕著である可能性がある。13-シスレチノイン酸の長い半減期のため、13-シスレチノイン酸がオールトランスレチノイン酸に継続的に異性化すると、マウス、サル、ヒトでは、オールトランスレチノイン酸の濃度－時間曲線において有意な面積を占めることになる。形成されるオールトランスレチン酸は、胎盤を移行して広範囲に分布し、これが、13-シス-レチノイン酸の催奇形作用に関与する重要な因子であるかもしれない。異性化は、ラットとウサギにおける 13-シスレチノイン酸の催奇形効果を説明できない。感受性の強い種（ヒト、サル）におけるイソトレチノインの高い催奇形性は、13-シス異性体の緩慢な除去、並びに 4-オキソ誘導剤への代謝や胎盤移行の増加、継続的な異性化、標的組織に対するオールトランスレチン酸の有意な曝露に関連している。さらに、細胞質のレチノイド結合タンパク質との結合が起こらないため、容易に核に移行することも関連がある。

---

[28] Nau H., “Teratogenicity of isotretinoin revisited: species variation and the role of all-*trans*-retinoic acid.”, J Am Acad Dermatol. 2001 Nov;**45**(5):S183-7.

4.3.2.13.2　オールトランスレチノイン酸と 13-シスレチノイン酸との比較

オールトランスレチノイン酸と 13-シスレチノイン酸との比較は表 4.3.2.13-1 の通り。両者の構造の違いはわずかだが、生物学的な影響は大きく異なる。13-シスレチノイン酸は、細胞内のレチノイン酸結合タンパク質や核内の既知のレチノイド受容体にはほとんど結合しない。異性化はどちらの化合物でも起こる。13-シスレチノイン酸は、オールトランスレチノイン酸にくらべて組織における分布と胎盤への移行はずっと少ないが、これは、レチノイン酸結合タンパク質と受容体への結合の違いによるものかもしれない。; 一方、13-シスレチノイン酸の核への移行は顕著である。13-シスレチノイン酸は、血漿タンパク質（アルブミン）に強く結合するため、その半減期はオールトランスレチノイン酸に比べて比較的長い。こうして情報は、実験動物からヒトへの外挿において役に立つ。

表 4.3.2.13-1　オール-トランス-レチノイン酸と 13-*cis*-レチノイン酸との比較

	全-トランス-レチノイン酸	13-*cis*-レチノイン酸
CRABPs との結合	＋	－
レチノイン酸受容体への結合	＋	－
異性化	＋	＋
核への移行	限定的	顕著
組織内での分布	広範	限定的
胎盤への移行	顕著	限定的
半減期（ヒト）	1 時間	16 時間

13-シスレチノイン酸による催奇形性、代謝及びトキシコキネティクスの種差を表 4.3.2.13-2 に示す。13-シスレチノイン酸は、ヒトでは 1mg/kg/日以下で奇形を引き起こすが、サルでは 5mg/kg/日、ラットでは 75mg/kg/日である。ウサギやハムスターはラットよりも感受性が強い。これらの種差の背景は、トキシコキネティクス、胎盤への移行、代謝によるものである。

表 4.3.2.13-2　13-*cis*-レチノイン酸による催奇形性、代謝およびトキシコキネティクス

パラメータ	マウス／ラット	ウサギ	サル	ヒト
クリアランス	速い	遅い	遅い	遅い
AUC，半減期	小	大	大	大
胎盤への移行*1	＜0.1	＜0.1	0.4	？？？？
母体での代謝	β-glucuronide*2	4-oxo*3	4-oxo	4-oxo
低度の催奇形性用量（mg/kg）	75－150	10	2.5－5	0.4－1

＊1：胎児組織/母体の血漿
＊2：13-*cis*-レチノイル-β-グルクロニド
＊3：13-*cis*-4-oxo-レチノイン酸

4.3.2.13.3　イソトレチノインのオールトランスレチノイン酸への異性化

13-シスレチノイン酸のオールトランスレチノイン酸への異性化は、イソトレチノインによる催奇形の重要な要素であるが、実験動物におけるすべての奇形を説明することはできない。マウスでは、13-シスレチノイン酸による奇形はオールトランスレチノイン酸への異性化で大部分説明できるが、ラットとウサギでは説明できない。サルとヒトでは両方の化合物が影響していると考えられる（表 4.3.2.13-3）。

表 4.3.2.13-3　各種の生物における 13-*cis*-レチノイン酸の影響

種	胎児の暴露	
	13-*cis*-レチノイン酸	オール-トランス-レチノイン酸
マウス	－	＋
ラット	＋	－
ウサギ	＋	－
サル	＋	＋
ヒト	＋	＋

出典：" Teratogenicity of isotretinoin revisited：Species variation and the role of all-*trans*-retionic acid ", SUPPORTED BY EDUCATIONAL GRANT FROM ROCHE DERMATOLOGICS INC.，J AM ACAD DERMATOL，Volume 45，Number 5，s183-s187

4.3.2.13.4　結論

13-シスレチノイン酸の大きな種差（ヒト＞サル＞ウサギ＞ラット、マウス）はファーマコキネティクス及び代謝の違いによるものである。ヒトの胎児と胎盤が 13-シスレチノイン酸に特に感受性が高い原因は以下の通りである。

- 13-シスレチノイン酸の排出が遅いこと（解毒）
- 細胞内のレチノイン酸結合タンパク質に結合しないこと（おそらく核へ容易に移行す

る）

- オールトランスレチノイン酸に継続的に異性化すること

したがって、実験動物での結果は、ファーマコキネティクスと代謝を考慮してはじめてヒトに外挿することが可能になる。

4.3.2.14 「Evaluation of valproic acid (VPA) developmental toxicity and pharmacokinetics in Sprague-Dawley rats.」[29]

4.3.2.14.1 概要

本研究は、Sprague-Dawly ラットを用いて、抗てんかん薬であり催奇形性をもつことが知られているバルプロ酸（VPA）の薬物動態とその発達毒性の評価を行った。

妊娠(GD)8～17 日目のメスラットに対して 200～800mg/kg(ヒト治療用量の 5～20 倍)のバルプロ酸を経口投与したところ､バルプロ酸の濃度の上昇とともに母体への毒性も増加し、800mg/kg では 100%の母体死亡率を示した。600mg/kg では、対照群（18±24%）と比較して流産発生率の増加（48±43%）がみられたが、統計学的に有意ではなかった。

妊娠 20 日目に行われた胎児の検査では、中軸骨格および付属肢骨格の骨形成に加え、胎児の体重および体長の減少に示されるように、用量依存的な胎児の成長遅延（0.05 以下の p 値）が明白であった。バルプロ酸の投与量を増加させると、異常な椎骨、肋骨、頭蓋および頭蓋顔面の異形症を含む骨格欠陥症の発生率も増加した。

2 つの最高投与群において観察される心臓の異常は、心室中隔欠損症（VSD）の有無にかかわらず、多数の血管形成異常を示した。泌尿生殖器の欠損はまた、600mg/kg の群で観察された。

妊娠 8 日目におけるバルプロ酸の血漿排出半減期は、200mg/kg では 1.0±0.3 時間、600mg/kg では 2.3±0.7 時間であった。全体および遊離薬物の最大濃度はそれぞれ低用量群では、341±18 μg/ml および 181±11 μg/ml、高用量群では、911±379 μg/ml および 542±224μg/ml であった。10 日間の投与期間にわたり、いずれの投与レベルにおいても、いずれの薬物動態学的パラメータ（t1/2、AUC、Cmax、tmax）にも有意な変化はみられなかった。

4.3.2.14.2 バルプロ酸の発生毒性

妊娠中のメスラットにバルプロ酸を 200-800mg/kg/日（ヒトの治療用の 5～20 倍の投与量）の範囲で投与した場合の母獣と胎児への影響を調べた結果を表 4.3.2.14-1 に示す。中

[29] Binkerd PE, Rowland JM, Nau H, Hendrickx AG., “Evaluation of valproic acid (VPA) developmental toxicity and pharmacokinetics in Sprague-Dawley rats.”, Fundam Appl Toxicol. 1988 Oct;**11**(3):485-93.

程度から重篤な影響が観察され、600mg/kg/日の投与量で母獣のうち二頭が死亡し、800mg/kg/日では三頭すべてが死亡した。また、バルプロ酸の投与量の増加にともなって、母獣の体重増加も減少したが、統計的には有意ではなかった。ただし、600mg/kg/日の投与群では、妊娠 8-17 日目の体重増加（15±16 g）は、対照群（50±11 g）に比べて有意に減少した。また、600mg/kg/日の投与量では、胎児の死亡率も増加したが統計的には有意ではなかった。

本研究で明らかになったバルプロ酸の最も顕著な影響は、胎児の体重減少であった（表 4.3.2.14-2）。すべての投与群（200mg/kg/日ではオスのみ）で有意な体重減少が観察された。また、500mg/kg/日以上では骨の形成不全も観察された。さらに、奇形をもった胎児の割合は 600mg/kg/日以上で有意に増加し、産仔中に奇形をもつ胎児の割合は 500mg/kg/日以上で 100%となった。

表 4.3.2.14-1　器官形成中にバルプロ酸を投与したラットにおける発生への影響

TABLE 1

REPRODUCTIVE OUTCOME IN RATS TREATED WITH VALPROIC ACID DURING ORGANOGENESIS

Dose (mg/kg/day)	Pregnant animals (n)	Maternal deaths (n)	Maternal wt. gain (g)[a] ($\bar{X} \pm$ SD)[b]	Resorptions ($\bar{X}$% ± SD)[b]	Fetal death ($\bar{X}$% ± SD)[b]
0	10	0	25 ± 6	18 ± 24	0
200	10	0	22 ± 7	24 ± 32	0
500	10	0	21 ± 8	7 ± 7	1 ± 2
600	12	2	13 ± 15	48 ± 43	1 ± 3
800	3	3	—	—	—

[a] GD (20 − 8) weight minus gravid uterus.
[b] Values are $\bar{X}$ of litter values ± SD (n = 10 litters/group).

表 4.3.2.14-2　バルプロ酸処理がラットの胎児の発生に与える影響

TABLE 2

EFFECTS OF VALPROIC ACID TREATMENT ON PRENATAL DEVELOPMENT IN RATS

Dose (mg/kg/day)	Fetal weight (g) ($\bar{X}$ ± SD[a])		Fetal crown–rump (cm) ($\bar{X}$ ± SD[a])		Reduced ossification ($\bar{X}$% ± SD)[a]	Malformations	
	Male	Female	Male	Female		Fetuses ($\bar{X}$% ± SD)[a]	Litters (%)
0	3.72 ± 0.27	3.33 ± 0.38	3.6 ± 0.2	3.4 ± 0.2	20.5 ± 24.8	0.8 ± 2.4	10
200	3.27 ± 0.17[b]	3.09 ± 0.21	3.5 ± 0.1	3.3 ± 0.2	28.9 ± 20.1	3.3 ± 7.0	22.2
500	2.77 ± 0.32[b]	2.61 ± 0.34[b]	3.2 ± 0.2[b]	3.1 ± 0.1[b]	77.8 ± 25.3[b]	22.5 ± 22.8	100[b]
600	2.24 ± 0.36[b]	2.03 ± 0.45[b]	3.0 ± 0.3[b]	2.9 ± 0.3[b]	97.8 ± 5.8[b]	57.3 ± 31.9[b]	100[b]

[a] Values are $\bar{X}$ of litter values ± SD.
[b] $p \leq 0.05$.

4.3.2.14.3　バルプロ酸の代謝に関するパラメータ

全バルプロ酸及び遊離のバルプロ酸の血漿濃度を妊娠８日目（表 4.3.2.14-3）と妊娠 17

日目（表 4.3.2.14-4）で調べた。遊離のバルプロ酸濃度は経口投与後、0.5～0.6 時間でピークに達し、24 時間以内に低いレベルに戻った。半減期（t1/2）は全バルプロ酸、遊離のバルプロ酸で大きな違いは見られなかった。、

さらに妊娠８日目と 17 日目で、全バルプロ酸、遊離バルプロ酸 AUC、C_{max}、t_{max} の値には有意な違いはなかった。全バルプロ酸と遊離バルプロ酸の C_{max} の値が違うのは、この濃度範囲ではバルプロ酸の 53-61%が血漿タンパク質に結合するためである。

表 4.3.2.14-3　ラット（妊娠８日目）におけるバルプロ酸の薬理動態パラメータ

TABLE 4

PHARMACOKINETIC PARAMETERS ($\bar{X} \pm$ SD) OF VALPROIC ACID IN THE RAT ON GD 8

Dose (mg/kg/day)		$t\frac{1}{2}$ (hr)	AUC (μg·hr/ml)	C_{max} (μg/ml)	t_{max} (hr)
200	Total	1.0 ± 0.2	1019 ± 769	341 ± 18	0.5 ± 0
	Free	1.0 ± 0.3	425 ± 112	181 ± 11	0.5 ± 0
600	Total	2.3 ± 0.7	6250 ± 3895	911 ± 379	0.8 ± 0.8
	Free	2.0 ± 0.8	3458 ± 1934	542 ± 224	0.6 ± 0.3

表 4.3.2.14-4　ラット（妊娠 17 日目）におけるバルプロ酸の薬理動態パラメータ

TABLE 5

PHARMACOKINETIC PARAMETERS ($\bar{X} \pm$ SD) OF VALPROIC ACID IN THE RAT ON GD 17

Dose (mg/kg/day)		$t\frac{1}{2}$ (hr)	AUC (μg·hr/ml)	C_{max} (μg/ml)	t_{max} (hr)
200	Total	1.1 ± 0.1	707 ± 148	227 ± 92	0.5 ± 0.3
	Free	1.2 ± 0.2	304 ± 103	124 ± 48	0.5 ± 0.3
600	Total	2.2 ± 0.7	5116 ± 1550	792 ± 271	0.9 ± 0.1
	Free	1.9 ± 0	2563 ± 232	490 ± 0	0.6 ± 0.2

バルプロ酸の主要な代謝物である 2-プロピル-ペンテン酸濃度は、妊娠８日目で 5.9μg/ml（200mg/kg/日）、10.4μg/ml（600mg/kg/日）、妊娠 17 日目で 4.9μg/ml（200mg/kg/日）、9.2μg/ml（600mg/kg/日）であった。また、3-ケト-バルプロ酸、2,3'-ジエン-バルプロ酸の濃度は 2-プロピル-ペンテン酸と同程度であった。その他のバルプロ酸代謝物は、さらに低い濃度であった。

4.3.2.14.4　結論

マウスやサルの過去の実験と比較すると、マウスとサルがラットよりもバルプロ酸への感受性が高いのは、活性のある薬物への胎児曝露がより多いこと、胎児の感受性が高いことのいずれか又はその両方であることが考えられる。マウスでの研究では、マウス胎児の組織に

は母獣の血漿中よりも高濃度でバルプロ酸が存在することから、マウスでの高い感受性は、胎児の曝露量が多いことが１つの要因であると示唆される。

発生毒の影響の種差を解釈するためには、いくつかの要因を考慮しなければならない。母体中のファーマコキネティクスと胎盤移行へのデータは、薬物に対する胎児の曝露レベルを評価する上で重要な情報を与える。バルプロ酸の発生毒性の種間の違いを評価するためには、胚に対するバルプロ酸の作用機構を調べるための研究がさらに必要である。

4.3.2.15 「Antiepileptic drugs alter endogenous retinoid concentrations: a possible mechanism of teratogenesis of anticonvulsant therapy.」[30]

4.3.2.15.1 概要

発作の制御に使用される主要な抗てんかん薬は、妊娠中に投与されると発達毒性を誘発する。ビタミンAとレチノイドは、成長、分化、形態形成を含む胎児発育の多数の過程を制御すると考えられている。従って我々は、抗てんかん薬剤の催奇形作用が、内因性ビタミンA（レチノイド代謝）の変化を通じて起こるかどうか調査した。

発作制御のためのさまざまな抗てんかん薬治療を受けた 75 名の乳児、小児および同年齢の 29 名の対照群の血漿で、レチノールとその酸化的代謝産物である all-*trans*-、13-*cis*-、13-シス-4-オキソ-レチノイン酸を測定した。レチノール濃度は年齢とともに増加したが、レチノイン酸化合物の濃度は年齢依存症を示さなかった。バルプロ酸単剤療法は若年群におけるレチノール濃度を増加させ、レチノール濃度の増加傾向は、他の患者群全体にも観察された。酸化性代謝産物 13-シス、13-シス-4-オキソレチノイン酸の血漿レベルは、フェニトイン、フェノバルビタール、カルバマゼピンとエトサクシミドを用いた治療を受けた全患者群では強い減少が見られ、バルプロ酸との併用では、それぞれ対照値に相当する 1/3 および 1/10 以下の水準であった。オールトランスレチノイン酸では、バルプロ酸とエトサクシミドとの併用治療が行われた 1 つの患者群ではレチノイド濃度の増加が見られたが、それ以外はほとんど変化が見られなかった。我々の研究は、抗てんかん作用薬による治療法が内因性レチノイド代謝に顕著な影響を及ぼすことを示す。胎児発育期間の重要な生物学的現象の顕在化に対するレチノイドの重要性を考慮すると、レチノイド代謝の変化は抗てんかん薬の催奇形性発現において非常に重要な可能性がある。

4.3.2.15.2 調査方法

本研究では、104 名の被験者を対象とした。29 名（男子 15 名、女子 14 名）は健康な対照群で、75 名がてんかんの発作のための抗てんかん薬を処方されている患者群（男子 45

---

[30] Nau H, Tzimas G, Mondry M, Plum C, Spohr HL., “Antiepileptic drugs alter endogenous retinoid concentrations: a possible mechanism of teratogenesis of anticonvulsant therapy.”, Life Sci. 1995;**57**(1):53-60.

名、女子 30 名）であった。患者群の臨床データは表 4.3.2.15- 1 の通りである。対照群は、年齢と性別を揃えた。薬物投与の平均期間は、バルプロ酸の単独治療で 3.0 年、二種類以上の薬物（バルプロ酸に加えてフェニトイン、フェノバルビタール、カルバマゼピンとエトサクシミドを服用）で治療を受けている患者は 3.9 年であった。

これらの被験者の血液を採取し、レチノール及び他のレチノイド化合物の血漿中濃度を測定した。

表 4.3.2.15- 1　被験者の臨床データ

TABLE I

Clinical Data of Patients and Controls

Treatment[a]	n	Age (y)	Mean dose [range] mg/kg/day	Seizure type[b]
Controls	12	0 - 6	-	-
	17	> 6	-	-
VPA	9	0 - 6	38[21 - 90]	GM (3), myoclonic (3); infantile spasms (1); LGS (1); absence (1)
	31	> 6	22[10 - 40]	GM (15); absence (10); com. partial (4); LGS (2)
VPA + PHT	-	0 - 6	-	-
	5	> 6	42(VPA); 25(PT)	complex partial (3); GM (2)
VPA + CBZ	2	0 - 6	60(VPA); 23(CBZ)	GM (1); myoclonic (1)
	2	> 6	29(VPA); 20(CBZ)	complex partial (1); LGS (1)
VPA + PB/PMD[c]	3	0 - 6	41(VPA); 5.2(PB); 18(PMD)	GM (2); myoclonic(1) infantile spasms (2)
	4	> 6	34(VPA); 7.0(PB); 19(PMD)	complex partial (1) absence (1)
VPA + ESM	1	0 - 6	38(VPA); 25(ESM)	absence (1);
	7	> 6	23(VPA); 14(ESM)	GM (2); absence (5)
VPA in comb[d]	5	0 - 6	42(VPA)	infantible spasm (2); LGS (3)
	6	> 6	40(VPA)	LGS (4); tonic (2) (drop attacks)

[a] VPA, valproic acid; PHT, phenytoin; CBZ, carbamazepine; PB, phenobarbital; PMD, primidone; ESM, ethosuximide

[b] GM, grand mal epilepsy; LGS, Lennox-Gastaut syndrome

[c] either phenobarbital or primidone was administered

[d] two or three additional antiepileptic drugs

4.3.2.15.3　結果

被験者においては、性別による血漿レチノール濃度の差はなかった。年齢を別にして薬物

治療のみを考慮すると、抗てんかん薬を処方されているすべての患者群は、対照群よりも高い血漿レチノール濃度を示した（表 4.3.2.15-2）。特に 6 歳以下の年齢層において、対照群と患者群の血漿レチノール濃度の違いが大きかった。また、年齢が上がるとレチノール濃度が上昇する傾向が見られた。

表 4.3.2.15-2　抗てんかん薬を投与された幼児と児童における血漿中のレチノール濃度

TABLE II

Plasma Concentrations of Retinol in Infants and Children Treated with Antiepileptic Drugs

	Retinol plasma concentrations (ng/mL; means ± S.D.)		
Group	Age group 0-6 y	Age group > 6 y	All subjects
Controls	232 ± 36 (n = 15)	351 ± 62 (n = 12)	285 ± 77 (n = 27)
VPA	312 ± 73 (n = 10)[a]	379 ± 102 (n = 27)	363 ± 99 (n = 39)[b]
VPA + PHT	-[e]	393 ± 116 (n = 4)	393 ± 116 (n = 4)[a]
VPA + CBZ	272/317 (n = 2)[b]	436/544 (n = 2)[b]	392 ± 123 (n = 4)[b]
VPA + PB	357 ± 40 (n = 3)[d]	414 ± 39 (n = 4)	389 ± 47 (n = 7)[a]
VPA + ESM	-[e]	431 ± 137 (n = 6)	405 ± 143 (n = 7)[a]
VPA in comb.	360 ± 20 (n = 3)[d]	420 ± 77 (n = 6)	399 ± 69 (n = 9)[d]

For abbreviations of antiepileptic drugs see Table I

Significantly higher than in controls (Students's t-test):
[a] $p < 0.005$
[b] $p < 0.05$
[c] $p < 0.01$
[d] $p < 0.0005$

[e] insufficient number of patients

レチノールの酸化的代謝物であるオールトランスレチノイン酸、13-シスレチノイン酸、13-シス-4 オキソ-レチノイン酸の血漿中濃度の測定結果を表 4.3.2.15-3 に示す。これらの内在性のレチノイド化合物については、患者群、対照群いずれも年齢依存性は見られなかった。オールトランスレチノイン酸については、バルプロ酸とエトサクシミドの両方を処方されている患者群（VPA+ESM）で濃度が高かった以外は、対照群との有意な違いはなかった。バルプロ酸のみを投与されている患者群は、いずれのレチノイド化合物についても血漿中濃度の変化はなかった。しかし、バルプロ酸と他の薬剤（フェニトイン、フェノバルビタール、カルバマゼピンとエトサクシミド）を処方されている患者群は、13-シスレチノイン酸と 13-シス-4-オキソ-レチノイン酸の血漿濃度が有意に低かった。対照群と比較すると、多くの患者において、13-シスレチノイン酸と 13-シス-4-オキソ-レチノイン酸の濃度は、それぞれ

1/2～1/3、1/10 以下のレベルであった。

表 4.3.2.15-3　抗てんかん薬を投与された幼児と児童における血漿中のレチノイド誘導体の濃度

TABLE III

Plasma Concentrations of Polar Retinoids in Infants and Children Treated with Antiepileptic Drugs

Group	n[a]	Plasma concentrations (ng/mL; means ± S.D.) of retinoic acids (RA)		
		all-*trans*-RA	13-*cis*-RA	13-*cis*-4-oxo-RA
Controls	29	1.07 ± 0.26	0.97 ± 0.31	2.26 ± 0.93
VPA	40	1.13 ± 0.39	1.19 ± 0.89	2.22 ± 1.82
VPA + PHT	5	1.07 ± 0.36	0.30 ± 0.19[b]	0.17 ± 0.38[b]
VPA + CBZ	4	1.17 ± 0.12	0.34 ± 0.11[c]	0.22 ± 0.44[c]
VPA + PB	7	0.92 ± 0.22	0.35 ± 0.26[b]	0.28 ± 0.48[b]
VPA + ESM	8	1.35 ± 0.23[d]	0.58 ± 0.27[d]	1.08 ± 0.71[d]
VPA in comb.	11	0.91 ± 0.31	0.23 ± 0.31[b]	0.14 ± 0.48[b]

For abbreviations of antiepileptic drugs see Table I

[a] number of subjects

Significantly different from corresponding controls (Student's t-test):
[b] $p < 0.0001$
[c] $p < 0.001$
[d] $p < 0.01$

4.3.2.15.4　考察

本研究により、抗てんかん薬が内在性のレチノイド化合物の代謝に大きな影響を及ぼすことが明らかになった。このような血漿濃度の変化が、組織のレチノイドレベル、特にレチノイドの過剰や不足に最も影響を受ける領域での濃度に与える影響を調べる必要がある。

さらに研究を進めることにより、抗てんかん薬と内在性のレチノイドとの相互作用についての実験モデルを構築する必要がある。また、抗てんかん薬が組織中のレチノイド濃度に与える影響を調べる必要がある。さらに、妊娠中のてんかん患者にも研究を拡張することも考えられる。

4.3.2.16 「Pharmacokinetic determinants of embryotoxicity in rats associated with organic acids.」[31]

4.3.2.16.1 概要

類似の構造をもつ４種の有機酸について､その発達毒性の基礎的な機構について調べた。。バルプロ酸（2-プロピルペンタン酸)、エチルヘキサン酸、オクタン酸は炭素原子８個からなる有機酸の異性体であるが、 それらの催奇形作用は大きく異なる。

バルプロ酸は、妊娠 12 日目のラットに 6.25mmoles/kg で単回経口投与したところ、中等度から重度の奇形を誘発した。その２倍のエチルヘキサン酸（12.5mmoles/kg）を投与した時の影響はもっと少なかった。

オクタン酸は、18.75mmoles/kg の非常に高い投与量でも催奇形性はなかった。後者の結果は疑いの余地なく、オクタン酸の腸管吸収が少ないためである。これは、母性血漿レベルがバルプロ酸とエチルヘキサン酸の測定値の半分にも達しなかったこと、さらに、体血漿中から実際に胚へ移行したのはオクタン酸の一部のみであったことから裏付けられる。

一方､バルプロ酸とエチルヘキサン酸へのピーク濃度と暴露時間は非常に類似していることから、バルプロ酸の強い催奇形性は、バルプロ酸固有の性質によるものと考えられた。

第 4 の薬剤としてメチルヘキサン酸についても調査を行ったが、14.1mmoles/kg 投与では催奇形作用を示さなかった。メチルヘキサン酸の薬物動態を調べた結果、メチルヘキサン酸は母体血漿と胎児において､バルプロ酸はエチルヘキサン酸よりも高いピーク濃度を示したが、暴露時間は短かった。このことから、薬物動態学的パラメータは奇形作用の重要な決定要素であり､これによって構造が類似した化合物であっても異なる作用を示す理由が解明できる。

4.3.2.16.2 各種のＣ７、Ｃ８化合物の催奇形性

妊娠 12 日目の Sprague-Dawley ラットに各種のＣ７、Ｃ８化合物を混餌投与し、20 日目にと殺し、胎児の奇形の有無、性別、体重等を調べた。投与したのはバルプロ酸（VPA)、エチルヘキサン酸（EHXA)、メチルヘキサン酸（MHXA)、オクタン酸（OA）である。VPA、EHA、OA は炭素数が８の有機酸の異性体で、MHXA は炭素数が７の有機酸である。

その結果を表 4.3.2.16-１に示す。表 4.3.2.16-１には、各薬物の濃度、処置をおこなったメスラットの数と生存数、着床数、流産又は死産の割合、奇形の産仔数とその割合、オス／メスの平均体重を示した。

MHXA と OA は、母体への毒性に起因すると思われる胎児の体重減少が見られるが、催奇形性は示さない。一方、VPA と EHXA は死亡率と奇形の増加、胎児の体重減少を引き起

[31] Scott WJ Jr, Collins MD, Nau H., “Pharmacokinetic determinants of embryotoxicity in rats associated with organic acids.”, Environ Health Perspect. 1994 Dec;**102** Suppl 11:97-101.

こす。これらの結果は、これまでに他の研究で報告された結果とも一致していた。VPA と EHXA は、心臓血管系の形成異常をはじめとするよく似た奇形のスペクトルを示した。

表 4.3.2.16-１　ラット（妊娠 12 日目）に各種Ｃ７、Ｃ８化合物を経口投与した時の影響

Table 1. Embryotoxicity of C_7 and C_8 organic acids administered orally to Sprague-Dawley rats on day 12 of gestation.

Agent	Dose, mmoles/kg	No. surv. females/no. treated	No. impl. sites	No. res. or dead (%)	No. surv. malf. (%)	Mean fetal wt., M/F
Control	0	10/10	108	6 (6)	1 (1)	3.90/3.71
VPA	4.69	4/4	56	10 (18)	5 (11)	3.39/3.03
VPA	6.25	12/13	115	33 (29)	50 (61)	2.65/2.66
EHXA	12.5	9/9	113	16 (14)	36 (37)	2.82/2.68
EHXA	15.625	7/7	78	47 (60)	31 (100)	2.06/1.93
MHXA	14.1	7/10	81	2 (2)	0 (0)	3.29/3.46
OA	18.75	11/12	131	10 (9)	4 (3)	3.48/3.23

4.3.2.16.3　各物質の代謝

妊娠 12 日目における４種類の薬物の母体血漿及び胎児（ホモジネート）中の濃度の変化を図 4.3.2.16-1 に示す。

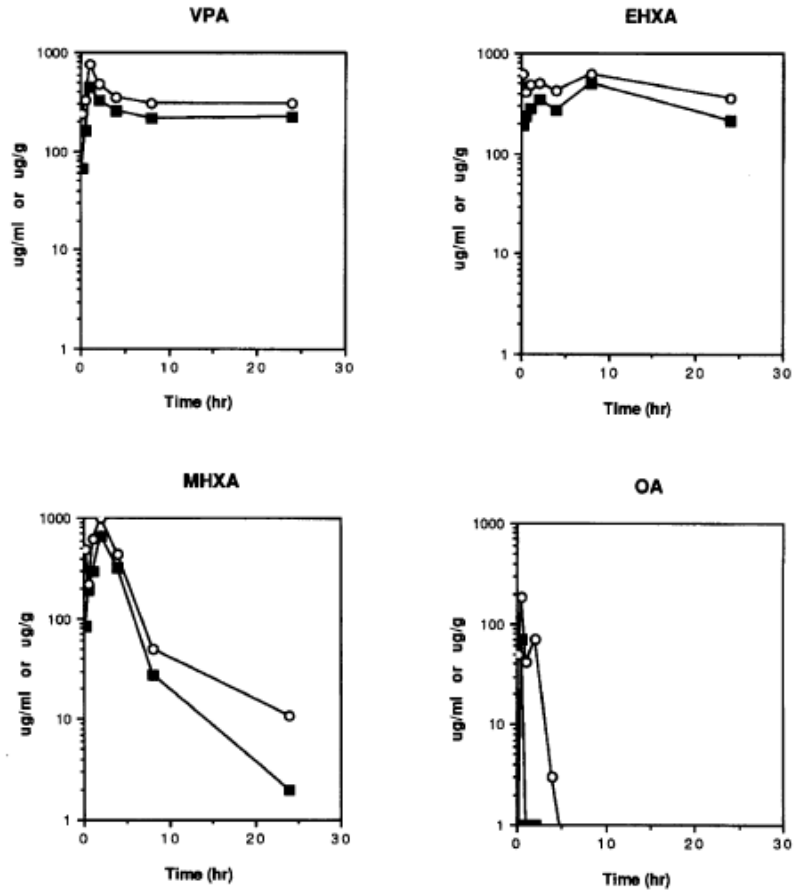


Figure 1. Disposition of four organic acids in maternal plasma (■)-and embryo (○) on day 12 of rat pregnancy.

図 4.3.2.16-1　４種類の化合物の母体中の血漿濃度

OA については、投与された OA の一部しか母体の血液中に移行せず、そのうちのごく一部しか胎児に移行しないことが明らかである。逆に、MHXA は同じように胎児毒性は低いものの、母体血漿中及び胎児中に高濃度で存在する。しかし、その排泄は EHXA や VPA よりもずっと速い。これは MHXA の化学構造が VPA や EHXA とは異なっており、VPA や EHXA でかく乱される細胞内プロセスが MHXA によっては影響を受けないことを示している。

EHXA と VPA を比べると、EHXA は VPA の２倍量を投与したにもかかわらず、母体血漿と胎児における濃度はほぼ等しい。これは、VPA と EHXA の潜在的な催奇形性は同程度であるが、母体におけるファーマコキネティクスの違いにより、VPA の取り込みと輸送の方が効率的に起こることを示している。

4.3.2.16.4　結論

今回の実験によって、化学物質の体内動態に関する因子が、発達毒性に影響することが示唆された。ただし、各物質固有の性質も催奇形性の重要な要素である。実験に用いた４種類の化合物の比較を表 4.3.2.16-2 に示す。MHXA は、標的臓器である胎児に容易に到達するが、VPA や EHXA が重度の奇形をもたらす濃度でも奇形を誘発しない。OA は、母体の血漿中での濃度が低く、胎盤を通じた胎児への移行もほとんど起こらないため、発生毒性を引き起こす可能性は非常に低い。これは、血漿中のタンパク質との結合によるものと考えられる。

この研究からわかることは、ファーマコキネティクスのパラメータは、同種の動物間での影響の違いを説明するのにも役立つということである。VPA の濃度はラットの個体によっても大きく異なるが、これが奇形の発生が大きく変動することの原因と考えられる。

表 4.3.2.16-2　４種類の有機化合物に対する感受性の相対比較

化合物	*In vivo*（生体内）	*In vitro*（試験管内）	説　　明
VPA	＋＋＋＋	＋＋＋＋	・強い催奇形性 ・胎児への曝露大
EHXA	＋＋	＋＋	・中程度の催奇形性 ・胎児への曝露大
MHXA	－	＋	・弱い催奇形性 ・胎児への曝露大
OA	－	＋	・催奇形性あり？ ・胎児への曝露小

4.3.2.17 「Valproic acid-induced neural tube defects in mouse and human: aspects of chirality, alternative drug development, pharmacokinetics and possible mechanisms.」[32]

抗てんかん薬であるバルプロ酸（valproic acid: VPA）には、小児における肝毒性（hepatotoxicity）と、催奇形性（teratogenicity）といった二つの副作用がある。催奇形性は神経管欠損（neural tube defect）であり、妊娠初期に VPA をばく露すると、1-2%の発生率で二分脊椎（spina bifida aperta; myeloschisis）が引き起こされる。

この二分脊椎は、サルでは多少現れるものの、実験動物ではほとんど誘導されない。マウスでは脳脱出（exencephaly）が引き起こされるが、ヒトでは無脳症（anencephaly）は起こらない。ヒトの二分脊椎は後方神経管欠損（posterior neural tube defect）であり、前方神経管欠損（anterior neural tube defect）であるマウスの脳脱出と異なるが、マウスをモデル動物として扱うこととした。その理由として(1)同じ神経管欠損であること、(2)ラットなど他種では神経管欠損は起こりにくいこと、(3)脳脱出にはエンドポイントがあることがあげられる。

このような中、マウスにおいても VPA 投与によって後方神経管欠損が引き起こされるかを調べ、モデル動物として適切かどうか検証した。

表 4.3.2.17-1 マウスとヒトにおいてバルプロ酸で誘発される神経管欠損

Table 1.

Valproic acid-induced neural tube formation in mouse and human.

Parameter	Mouse	Human
Teratogenic dose		
anterior NTD	258 mg/kg × day s.c.[a] (exencephaly)	not increased (anencephaly)
posterior NTD		
spina bifida aperta	3 × 450 mg/kg i.p.[b]	20–30 mg/kg × day p.o.[a]
spina bifida occulta	3 × 300 mg/kg i.p.[b]	unknown
Pharmacokinetic parameters[c]		
C_{max} (μg VPA/ml plasma)		
– total drug –	322	50–100 (114; 184)[d]
– free drug –	193	10–30
$t_{1/2}$(h)	0.7–1.3	8–20
AUC (μg VPA × h/ml plasma)		
–total drug –	470	2000
– free drug –	280	200–400
embryo/maternal plasma concentration ratio[e]	2	?

[a] Daily drug treatments.
[b] Three doses on day 9 of gestation at 8 a.m., 2 p.m. and 8 p.m.
[c] Following drug treatment resulting in a significant incidence of NTD's.
[d] In two patients during the first trimester; major malformations were observed in both cases (Jäger-Roman *et al.* 1986).
[e] Following a single dose.

表 4.3.2.17-1 や図 4.3.2.17-1 で示されるように、マウスにおいても、高濃度の VPA 投与によって後方神経管欠損である腰仙二分脊椎（lumbosacral spina bifida aperta）が引き起こさ

[32] Nau H, Hauck RS, Ehlers K., "Valproic acid-induced neural tube defects in mouse and human: aspects of chirality, alternative drug development, pharmacokinetics and possible mechanisms.", Pharmacol Toxicol. 1991 Nov;**69**(5):310-21.

れた（低発生率）。

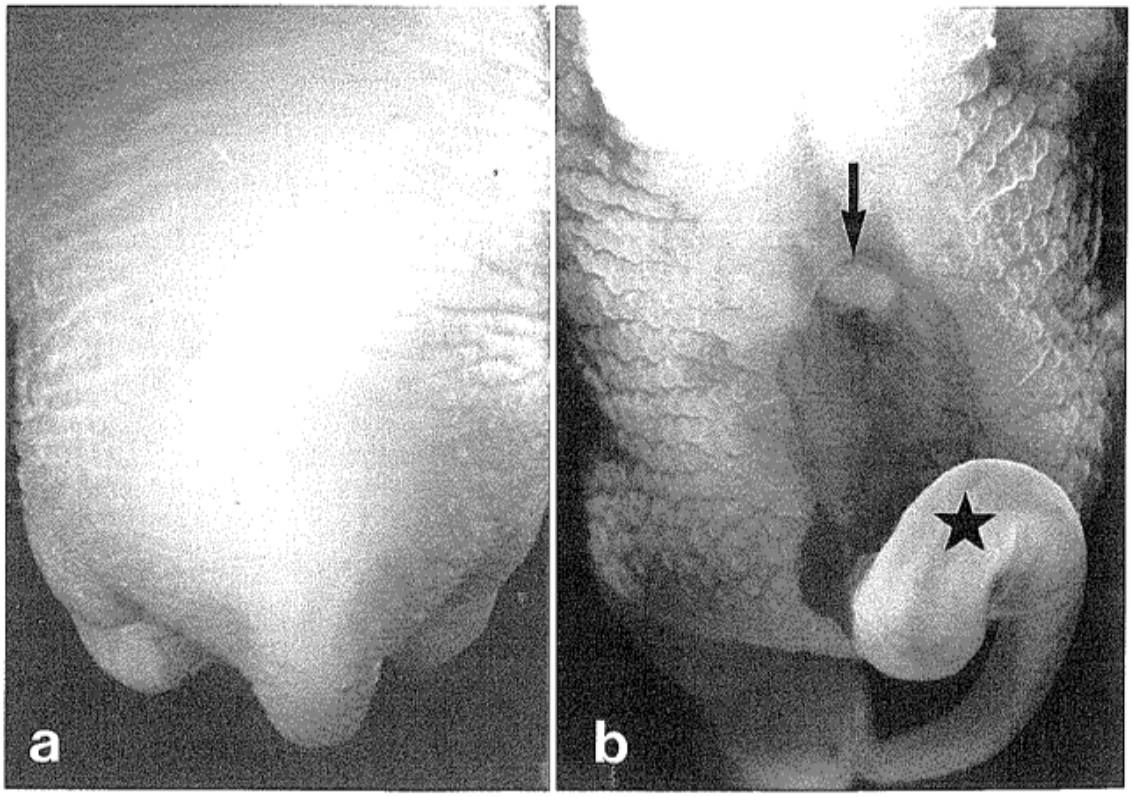


Fig. 1. Mouse foetuses on day 18 of gestation. a) control foetus, magnification × 10. b) foetus exposed to three consecutive doses of 500 mg VPA-Na/kg on day 9 of gestation (at 8 a.m., 2 p.m., 8 p.m.): spina bifida aperta (arrowhead) and curly tail (asterisk), magnification × 12.

図 4.3.2.17-1　高濃度の VPA 投与によって引き起こされた腰仙二分脊椎（マウス）

また、表 4.3.2.17-1 や図 4.3.2.17-2 で示されるように、低濃度の VPA 投与によって前方神経管欠損である潜在性二分脊椎（Spina bifida occulta）が引き起こされた（高発生率）。

一方で、異なる系統のマウスや、VPA の異性体では異なる反応が引き起こされることが示されている。

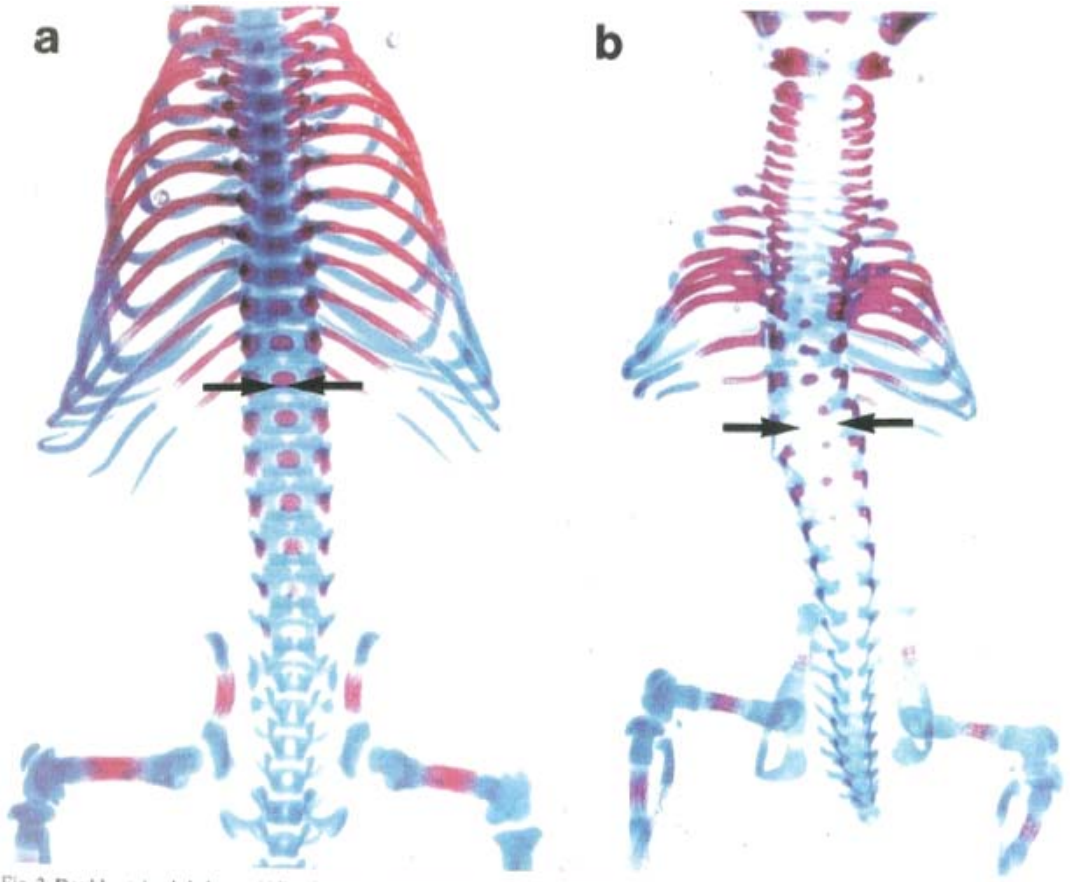


Fig. 2. Double-stained skeletons (Alizarin red, Alcian blue) from day 18 mouse foetuses. a) control foetus, magnification × 10. → ← measured distance between the ends of the vertebral arches. b) foetus exposed to 3 × 500 mg VPA-Na/kg on day 9 of gestation, magnification × 10. → ← distinctly increased distance between the ends of the vertebral arches, indicating spina bifida occulta in the lumbar region.

図 4.3.2.17-2　低濃度の VPA 投与によって引き起こされた潜在性二分脊椎（マウス）

マウス、ラット、サルなどは、ヒトと比べて VPA の半減期が短く、その結果 AUC 値（濃度-時間曲線下面積）も低くなっている。これは、ヒトにおいて、血漿タンパク質と VPA が結合する割合が高いことが上げられる。マウスにおいては、AUC 値（濃度-時間曲線下面積）ではなく、最大濃度（Cmax）が神経管欠損の発生率に関連することが示された。これは血漿タンパク質結合が飽和した後に、遊離の薬物が胎盤へと移行し、標的組織に蓄積することによって、ある程度説明することができる。VPA は母体の血漿よりも、標的組織により長く蓄積する。

VPA には、多くの代謝物が存在することが知られているが、催奇形性の観点では、代謝産物ではなく、親化合物が主たる催奇形因子であると考えられる。

図 4.3.2.17-3 から図 4.3.2.17-5 は、VPA と分子構造が似ている物質の催奇形性を示した図である。

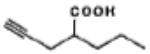
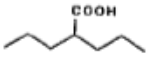
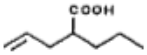
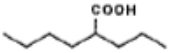
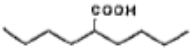
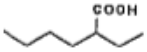
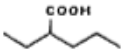
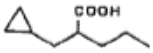
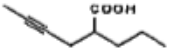
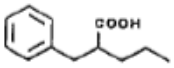
Substance	Reference [1]	Dose [2] (mmol/kg)	Route of administration	Exencephaly [3] (%)	
Group I					
(±)-4-yn-VPA	a	2.47	i.p.	92	
VPA	b	3.00	i.p.	44	
(±)-4-en-VPA	c	3.00	i.p.	35	
Group II					
(±)-2-n-Propylhexanoic acid	d	3.30	s.c.	16	
2-n-Butylhexanoic acid	d	3.10	s.c.	9	
(±)-2-Ethylhexanoic acid	e	3.00	i.p.	5	
(±)-2-Ethylpentanoic acid	d	3.90	s.c.	5	
Group III					
(±)-2-Cyclopropylmethyl-pentanoic acid	c	3.00	i.p.	5	
(±)-2-n-Propyl-4-hexynoic acid	c	3.00	i.p.	3	
(±)-2-Benzylpentanoic acid	c	3.00	i.p.	2	

Fig. 3. Valproic acid and structural analogues (achiral compounds or racemic mixtures) which possess some teratogenic potency to induce exencephaly in the mouse. Group I: VPA and structures with unsaturation in the 4-position with high teratogenic potencies. Group II: Structures with longer or shorter alkyl groups on carbon atom 2 (as compared to the 3 carbon atoms in VPA) possess intermediate teratogenic potencies. Group III: Structures with low teratogenic potencies which mimick in some aspects the 4-unsaturation of 4-en-VPA. [1]a, Hauck & Nau (1989b); b, Trotz *et al.* (1987); c, Hauck & Nau (1990); d, Nau & Löscher (1986); e, Hauck *et al.* (1990). [2]single injection on the morning of day 8 of gestation. [3]in precent of live foetuses.

図 4.3.2.17-3 バルプロ酸と分子構造が似ている物質の催奇形性（その 1）

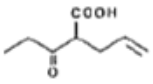
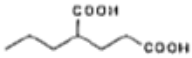
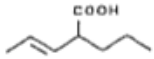
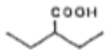
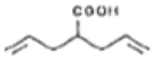
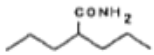
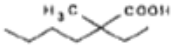
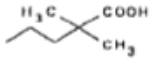
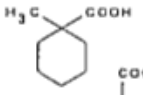
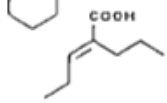
Substance	Reference [1]	Dose [2] [mmol/kg]	Route of administration	Exencephaly [3] [%]	
Group I					
(±)-2-Allyl-3-oxopentanoic acid	a	3.40	s.c.	0	
(±)-2-n-Propylglutaric acid	a	3.10	s.c.	1	
(±)-3-en-VPA	a	3.70	s.c.	1	
Group II					
2-Etylbutanoic acid	a	4.30	s.c.	2	
4,4'-dien-VPA	a	3.70	s.c.	0	
Group III					
Valpromide	a	4.20	s.c.	1	
Group IV					
2-Methyl-2-n-propylpentanoic acid	b	3.00	i.p.	2	
(±)-2-Ethyl-2-methylhexanoic acid	a	3.60	s.c.	0	
2,2-Dimethylpentanoic acid	a	3.90	s.c.	1	
1-Methylcyclohexancarboxylic acid	a	3.70	s.c.	1	
E-2-en-VPA	a	3.70	s.c.	0	
Group V					
4-Pentenoic acid	a	5.70	s.c.	0	
Octanoic acid	a	4.00	s.c.	1	

Fig. 4. Structural analogues (achiral compounds or racemic mixtures) with lack of or very low potencies for induction of exencephaly in the mouse. Group I: Some VPA metabolites. Group II: Structures containing side chains on carbon atom 2 which are both short, or both contain a 4-double bond. Group III: Valpromide where the free carboxyl group of VPA is blocked. Group IV: Structures without an H atom on carbon atom 2. E-2-en-VPA is a metabolite of VPA with potential clinical application because of lacking teratogenic properties and favorable anticonvulsant activity (see text). Group V: Straight-chain structures without branching on C-2. [1]a, Nau & Löscher (1986); b, Hauck & Nau (unpublished results). [2] and [3]as in legend of fig. 1.

図 4.3.2.17-4 バルプロ酸と分子構造が似ている物質の催奇形性（その 2）

HIGH POTENCY Enantiomer	Dose [1] [mmol/kg]	Exencephaly [2] [%]		LOW POTENCY Enantiomer	Dose [1] [mmol/kg]	Exencephaly [2] [%]	
S(-)-4-yn-VPA	1.05	65		R(+)-4-yn-VPA	3.00	1	
S(-)-4-en-VPA	3.00	70		R(+)-4-en-VPA	3.00	17	
R(-)-EHXA	4 x 3.00	59		S(+)-EHXA	4 x 3.00	1	

Fig. 5. Stereoselectivity of exencephaly production as demonstrated by three pairs of enantiomers. The enantiomers were produced by asymmetric synthesis and administered separately by intraperitoneal applications in the mice. Note the low dose of S(-)-4-yn-VPA inducing high rates of exencephaly and the very low potency of R(+)-4-yn-VPA. [1]single intraperitoneal injections of the sodium salts on day 8 of gestation (4-en-VPA and 4-yn-VPA) or four intraperitoneal injections in the morning and evening of days 7 and 8 of gestation (EHXA). [2]in percent of live foetuses. From Hauck & Nau (1989a & 1990) and Hauck *et al.* (1990).

図 4.3.2.17-5 バルプロ酸と分子構造が似ている物質の催奇形性（その 3）

3 つの図から以下の構造上の要件を満たす化合物が、マウスにおいて催奇形性を引き起こすと考えられる。(a)α 炭素原子が sp3 混成軌道を形成し、(b)カルボキシル基があり、(c)水素原子があり、(d)残りの 2 本鎖がアルキル基であり、(e)それぞれのアルキル基の炭素数が 3 であるときに催奇形性が極大化する。

上記の 2 本鎖が異なる場合、4 つの鏡像異性体が発生する。上述のとおり、鏡像異性体間で催奇形性に差がある。図 4.3.2.17-6 の 2 つの図が示すとおり、薬物動態研究によると、各化合物における両鏡像異性体の胚への到達は同程度である。

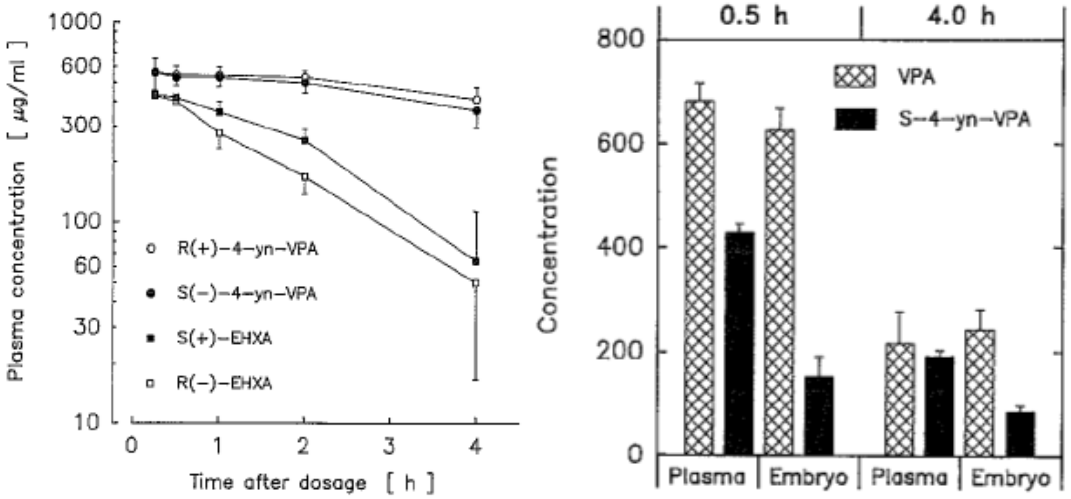


図 4.3.2.17-6 各化合物における両鏡像異性体の胚への到達濃度

従って、鏡像異性体固有の催奇形性があり、胚において、化合物の立体選択的な作用機序

があることが示されたが、その詳細はまだ不明である。

催奇形性作用とは対照的に、この化合物クラスの抗痙攣作用と神経毒性は広範な構造特異性を示す。図 4.3.2.17-7 の二本の矢印に示されるように、VPA の異性体の催奇形性と鎮静効果のスペクトルは異なっている。こうした事実は、2-n-propyl-2-pentenoic acid (2-en-VPA) といった低い催奇形性の新たな抗てんかん薬剤開発の可能性を示す。

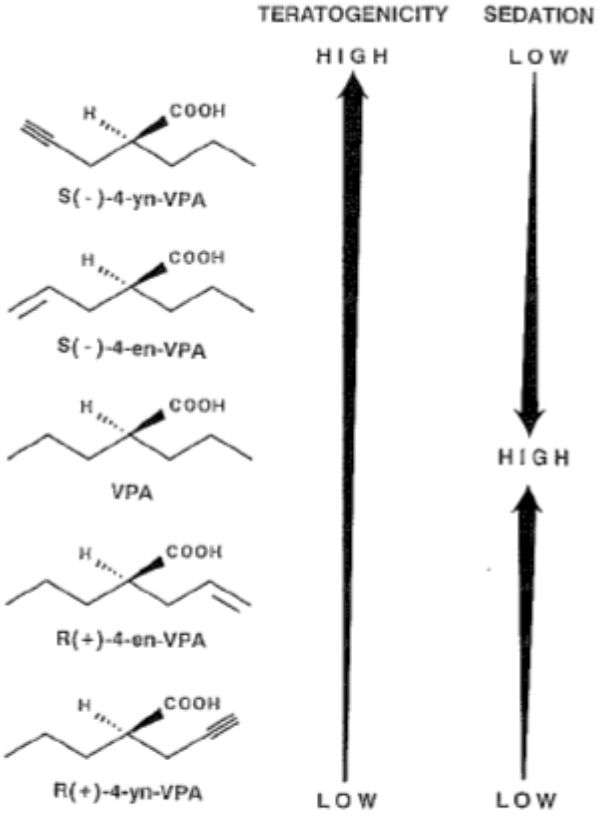


Fig. 7. Dissociation of the teratogenic activity (exencephaly formation) and sedative activity (sleep induction; neurotoxicity) in a series of compounds consisting of enantiomers of 4-en and 4-yn-VPA as well as VPA. Note the low stereoselectivity of the neurotoxicity in the adult animal, and the high stereoselectivity of the teratogenicity.

図 4.3.2.17-7 バルプロ酸の異性体の催奇形性と鎮静効果のスペクトル

5.　化学物質の発生毒性（催奇形性）試験の実施とデータの解釈における留意事項

ここでは、京都大学塩田教授、事務局殿及び弊社で収集した文献の内容を総括して、化学物質の発生毒性(催奇形性)試験の実施及びデータの解釈に当たっての留意事項を整理する。整理に当たっては、試験データの解釈に関する以下の視点からとりまとめた。

＜整理視点＞

- 実験動物とヒトの発生毒性データの対応関係
- 種差の原因と考えられる要因
  - （ａ）生殖と妊娠に関する系統発生的差異
  - （ｂ）外因に対する胎児組織の感受性の違い
  - （ｃ）母体―胎盤―胎児における薬物動態の違い
- 動物試験結果の判定法

5.1　実験動物とヒトの発生毒性データの対応関係

5.1.1　発生毒性とは

発生毒性に関しては、奇形、異常、変異やその程度を示す様々な用語が用いられる。代表的な用語は以下の通りである。

奇形（malformation)、異常（anomaly)、変異（variation)、遅延（retardation)、重大（major)、(minor))

こうした分類関連用語及び個々の奇形等を示す用語については、国際的な議論の中で、調和のための検討が進められている。これまでにベルリンの研究者が中心となって国際ワークショップを開催し、この結果を踏まえて、日米欧 3 極で共同の用語集を作ることが合意された。その後、米国の Teratology Society におけるシンポジウムや電話会議を経て、現在最終のドラフトがほぼ完成し、出版、日本語版の作成を行うこととされている。

上記の６つの用語については、以下のような体系で分類に用いることが決定されている。

奇形（malformation）（重大（major）および軽微（minor))
変異（variation）／遅延（retardation）
および「グレーゾーン異常」(gray zone anomaly)

これらのカテゴリーの定義は有害性（生存率を含む）、自然頻度、および可逆性に基づいて決定された。ヒト健康に対する影響の評価のために有害性が最も重要であることが強調された。また、変異（variation）と軽微な奇形（minor malformation）の識別は一般的に実験動物における自然頻度に基づいているが、この識別はヒト健康にとっては常に重要とはいえない。

その他、個別の所見（心房中隔欠損、肝肥大等）の用語の分類とそのために必要な情報については、4.2.2 の文献を参照されたい。

なお、これらの所見に係る用語の一部については、特定の種のみに適用可能である。例えば、胆のうの欠如または脛骨への腓骨の癒合の欠如はウサギにおいては恐らく形態異常と考えられるが、ラットでは正常である。同様に、ラットまたはマウスと比較した場合のモルモットにおける尾の欠如またはブタにおける鎖骨の欠如があげられる。さらに、ある種の所見は他の種または血統にくらべ動物の 1 つの種または血統で顕著により多く見られる。加えて、様々な重篤度の範囲で発生する異常性があり、これらは低い重篤度で発生した場合には変異として分類され、高い重篤度で発生した場合には先天性異常に分類されることがある。

5.1.2　実験動物における催奇形性とヒトにおける催奇形性

これまでの研究によれば、ラット、マウスなど、いずれかの動物で催奇形性を示す物質は 2000 種類以上と言われているが、このうちヒトで発生毒性が認められたものは数十種類にとどまると言われている（[参考 1] 塩田浩平教授による 2008 年 10 月の食品安全委員会殿におけるプレゼンテーション「生殖発生毒性に関する動物実験データのヒトへの外挿」による）。これらの物質は、ヒトにおける少数の臨床例の観察によって発見されたものが少なくない。したがって、実験動物での催奇形性がヒトにおける催奇形性と必ずしも対応しないことがしばしばある。

実験動物とヒトの発生毒性データとの対応については、これらの点に留意する必要がある。

5.1.3 発生毒性試験のヒトへの外挿の手順

参考文献[33]によれば、発生毒性試験のヒトへの外挿の手順は次のとおりである。

「化学物質の発生毒性試験の評価と外挿の手順としては、①その動物種における試験の科学的真実性を考察し、ついで、②その動物種における発生毒性の機序と薬動力学を検索し、さらに、③他の動物種における所見と比較考察し、最後に、④ヒトにおける可能性の推測、すなわちヒトへの外挿を行うことにある（表 5.1）。化学物質の毒性（安全性）試験では、このように最終的には、ヒトに対する毒性を定量的に考証するのが目的であるので、試験の評価は単に当該試験で得られた成績についてのみの討論に留まるものではなく、必要に応じ追加試験を行い、またそれらの動物実験における化学物質の他の毒性、薬理、代謝などの知

[33] 戸部、堀内編著者、「実験医学のめざす外挿　実験動物からヒトへ」、pp.133-154、清至書院

見と、当該物質もしくは類似化合物でヒトにおいて知られている情報などを総合的に論じるものである。つまりヒトへの外挿は評価の終点であり、それを行うには上記の手順を着実に踏み進むことが必要で、その試験成績のみから直ちにヒトでの可能性を軽々しく判定するものであってはならない。」（以上、参考文献[33]より）

表 5.1　発生毒性試験の評価（出典：参考文献[33]）

試験の科学的真実性
良質の動物種で、発生学と先天異常に関する情報が豊富で、かつヒトの発生毒性因子に感受性のあるもの
用量－反応関係
時期特異性
背景対照データとの対比
誤りの原因の検討
追加試験
母児間移行、最終的発生毒性物質の確認
作用機序
ヒトへの外挿
異常の型と重症度
用量
臨床量との比
動物の母体毒性量、LD_{50}、薬効量、胎児 LD_{50} との比
発生障害指数＝log（母体最小有効量／胚最小有効量）
比較催奇形性指数＝LD_{01}／tD_{05}
母体および胎児組織（作用部位）における最終的発生毒性物質の濃度
薬動力学、他の毒性学および薬理学的類似性
動物で示唆される作用機序のヒトへの適用の可能性
多種の動物種（薬物代謝の類似性）
類縁化合物における情報
有益性と危険性の比

発生毒性試験をヒトへ外挿する場合に考慮すべき点として、同参考文献[33]には、次の記載がある。

「動物での成績をヒトに外挿しようとする際に考慮すべき点として、①作用機序はどうであり、胎児の発生毒性因子に対する感受性の種差はどうかということ、②化学物質およびその代謝産物の母体と胎児における薬動力学の比較があげられる。」

また、同参考文献によれば、発生毒性試験をヒトへ外挿する場合に考慮すべき事項の要点は、前記表 5.1 のとおりである。ヒトへの外挿について考慮すべき事項として、次の記述がある。

［参考文献[33]、Ⅷ．ヒトへの外挿について考慮すべき事項からの引用］

① 示された障害の型と重症度、またその出現頻度。ヒトに対応させるとき、生命や健康維持に支障をきたすような重大な奇形か、小変異かを考慮する。動物では胎児の死亡と奇形はともに重要な発生障害であるが、ヒトでは明らかに奇形の方が医学的にも社会的にもより重要である。ただし、動物実験で、奇形を起こす用量範囲は狭く、また一般に低頻度であり有意の差を生じ難い。より低用量で生じる、より鋭敏な指標である発育遅滞にも注目すべきである。また誘発された障害の回復性も考慮されるべきである。たとえば、胎生末期における腎盂の拡大や波状肋骨については永続でないことが多い。さらに致死作用により催奇形作用がかくされてはいないかも考察する必要がある。なお、奇形を非特異的 nonspecific と特異的 specific に分けて考察しようとするむきがあるが、その概念は提唱者によっても若干異なる。評価について両者間に重みをつけようとする意見にはにわかに賛成はしがたい。

② 胎児への障害量はヒトの臨床量ないしヒトに入りうる量とどれだけかけ離れているか（例えば医薬品では 10 倍以上が望ましく、環境化学物質ではより高いことが必要である）。母体の毒性量が胎児への障害量と離れているほど、また胎児の LD_{50} と胎児の 100%正常な量との比が大きいことより危険と考えられてくる。最近母体毒性との比で、その動物における発生毒性の強さを、同一動物種内での化合物と比較しうるための指数が提案されている。その 1 つは発生障害指数 developmental hazard index で $\log\frac{\text{母体最小有効量}}{\text{胚最小有効量}}$ で示され、もう 1 つは比較催奇形性指数 relative teratogenic index で $\frac{LD_{01}}{tD_{05}}$ で表される（LD は母体の致死量、tD は胚の催奇形量）。後者で LD_{01} と低い値を採用するのは致死反応の用量関係が緩やかなものを考慮したためであるとされる。

③ 量の考察は投与量のみでなく、動物発生毒性投与時の母児と臨床量投与時のヒトの成体（母体）のその物質ないし活性を有する代謝物すなわち最終的発生毒性物質の血中濃度の比較を行い、動物とヒトの間に差が少ないときはより危険と考えるべきである。また、同量－効果関係とともに用量－血中濃度関係も考慮しなければ、高用量の所見を低用量に外挿することはできない。

④ 同時に、その動物種の薬動力学、ほかの毒性面や薬理面の類似性、またその動物で考えられる作用機序がヒトにも適用できるかとの考察が重要である。

⑤ 多種の動物種で障害が示されているか、この際よりヒトに近い、また薬物代謝のヒトによく似た動物で障害が示されているか、逆にいえば使用した動物は不適切な種や系

統ではないかとの検討は極めて重要である。動物種間で発生毒性を示す用量がどのようであるかは、化学物質の種類によって感受性に差が大きいので一概にはいえない。しかし、NTIS の報告では、サリドマイドを含む 8 つのヒトの催奇形因子では、動物での有効量は mg/体重/日で表したとき、すべての場合ヒトよりも大きく、1.8～50 であった。つまり、ヒトはもっとも感受性が高かった。これを mg/体表面積/日で示すと、ヒトと動物での最低有効量の比は 0.3～8 の間となった。これらをより正確に比較するためには、投与の時期、反応の程度、薬動力学、反応の差などをより正確に対比させて考察しなければならない。しかしこれらのことから、ヒトはもっとも感受性の高い実験動物種よりも催奇形性に関し感受性が一般にさらに高いと推定されうる。催奇形性以外の発生毒性の用量比較では、mg/体重/日では比は 0.4 から 25 で、体表面積当りでは 0.06 から 4.5 であった。つまりヒトより感受性が高い動物種もみられている。なお、一般にマウスはラットより催奇形作用に関し感受性が強く、サルはラットより低いとされている。

⑥ 既存の類似化合物で、ヒトと動物で発生毒性に関しどのような情報が得られているかを綿密に考察する。分子構造と催奇形作用との関係は、まだほとんどわかっていないし、また同一の薬理毒性についてもより似た反応を示すことが期待される。

以上のことを要約すると、ヒトと薬物代謝のよく似た多種の動物種で、母体毒性をきたさない低用量で、同じような型の発生毒性を示し、かつ類縁物質にも同じような傾向のあるものはヒトでの危険性がより高いとみなされるであろう。

最後に、その化学物質のヒトにおける意義、その有効性や代替品の有無などを考慮し、利益 benefit/危険性 risk の比について考慮がなされ、危険性の許容度が決められる。その際、危険な集団（たとえば妊婦）が曝露される率や程度の推測が重要である。医薬品については、臨床上の有効性と危険性の可能性のバランスを考慮し、有益（用）性が高いとされれば、使用上の注意を付して使用が許可されるようになっている。

（以上、参考文献[33]より）

5.2　種差の原因と考えられる要因

5.2.1　生殖と妊娠に関する系統発生的差異

ヒトと実験動物では、生殖と妊娠期における発生の過程に違いがある。霊長類と齧歯類、ウサギ類の胎盤構造と機能の違いを図 5.1 に示す。卵黄嚢胎盤は、胎盤が完成するまでの間、胚に栄養を供給する機能をもつが、ヒトでは胎児成長期に機能を停止する。

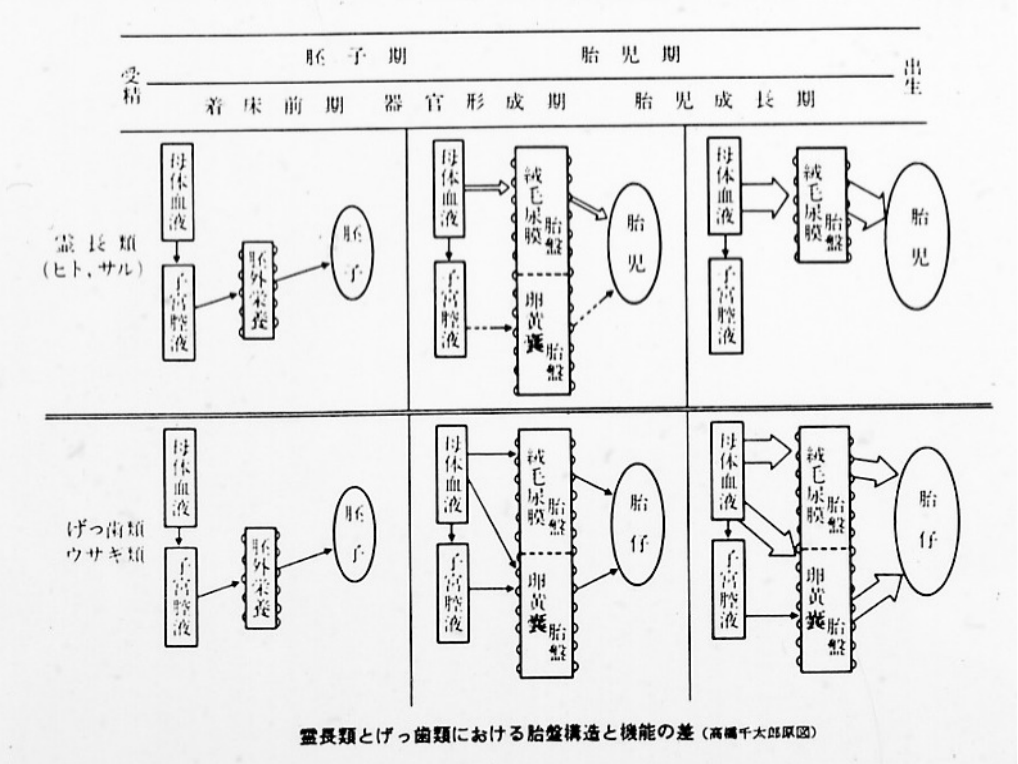


図 5.1　霊長類と齧歯類等における胎盤構造と機能の違い

（参考 1、京都大学塩田教授講演資料による）

このように、催奇形性物質に対するヒトの反応を予測するために用いられるげっ歯類やウサギが、哺乳動物のなかでは、初期の胎盤輸送が反転卵黄包胎盤に依存しているという点で、非常に特異的であることがあげられる[34]。

また、同参考文献[34]には、「発生中のヒトは、一般に、動物モデルよりも外因性化合物を代謝する能力が高いと考えられている（Berry and Barlow[35], 1976）。」「多くの研究者が胎盤での薬物代謝にはかなりの種差がみられることを報告している（Berry and Barlow[35], 1976）。」という記述がある。

5.2.2　外因に対する胎児組織の感受性の違い

外因に対する胎児組織の感受性の違いの一部は、5.2.3 で述べる、母体－胎盤－胎児における薬物動態の違いによる。

この他の違いの例として、催奇形性物質に対するヒトの反応を予測するために用いられるげっ歯類やウサギが、哺乳動物のなかでは、初期の胎盤輸送が反転卵黄包胎盤に依存してい

---

[34] Edward J. Calabrese、”Principles of Animal Extrapolation”、1983.［日本語訳、松岡里、小林定喜監訳：“動物種差と外挿”（ソフトサイエンス社）11 章「奇形の発生:予測モデル」、1984］

[35] Berry, C. L., and Barlow, S. (1976). Some remaining problems in the reproductive toxicity testing of drugs. *Br. Med. Bull.* **32**: 3438.

るという点で、非常に特異的であることがあげられる。

5.2.3　母体―胎盤―胎児における薬物動態の違い

化学物質の催奇形性は、母体－胎盤－胎児における薬物動態によって大きく影響される。この過程における種差については、バルプロ酸及びその類縁化合物で良く研究されている。薬物動態は、吸収、分布、代謝、排泄（ADME）によって決まるが、バルプロ酸等の研究で、これらの過程に影響を与える因子として以下のようなものが知られている（4.3.2.1 参照）。

①母体における吸収、投与経路、一次通過効果（Maternal Absorption, Administration Route, First-Pass Effect）

母体における吸収率や吸収量は種、投与ルート、使われる薬剤の形によって異なる。薬剤の吸収は主に小腸で起こるため、胃が空になる時間（半分を消化するのに、マウスとラットでは 10 分、ウサギでは 30 分、イヌ及びヒトでは 1～2 時間）が重要となる。げっ歯類ではヒトに比べ吸収が早い。

②薬物の胎盤移行（Placental Transfer of Drugs）

薬物の胎盤を通じた移行速度とその移行量に影響を与える因子には表 5.2 のようなものがある。

表 5.2　薬物の胎盤を通じた移行に影響を与える要因

分類	パラメーター
移行速度	・薬物の脂質への溶解度 ・薬物の分子量 ・胎盤の血流 ・胎盤の構造と機能 ・薬物の能動輸送
移行量	・薬物の PKa ・母体／胚の p H 勾配 ・薬物のタンパク質への結合 ・薬物の能動輸送

（出典：「Species differences in pharmacokinetics and drug teratogenesis」[36]

高い脂肪親和性を持ち、イオン化しにくく、分子量 1000 以下の薬物は、非常に速く胎盤

[36] Nau H., “Species differences in pharmacokinetics and drug teratogenesis.”, Environ Health Perspect. 1986 Dec;70:113-29. Erratum in: Environ Health Perspect 1988 Apr;77:following 156.

を通過するということが一般的に知られている。活発な移行の原因ははっきりとわかっていないが、胚や胎児の血液の pH が酸性、または塩基性の薬剤の移行に重要であると考えられている。胎児の血液は、母体の血液よりも pH が低いことが示されており[37]、バルプロ酸のような酸性の薬剤において、同様であることが予想される。塩基性の物質においては、その逆である。

初期胚においては、その pH は母体の血漿よりも高いため、胚の器官形成のステージで酸性薬剤は胚に蓄積され、催奇形の原因となる[38,39]。胚における内因性の感度は種によって大きく異なる。例えばサルでは、methotrexate と hydroxyurea に対してラットよりも低い感度を示す。ラットでは、胚での薬剤濃度がサルよりも低いにもかかわらず催奇形が観察される。

③母体由来の血漿結合タンパク及び胎盤移行（Maternal Plasma Protein Binding and Placental Transfer）

胎盤における薬剤移行及び催奇形において、タンパク質結合の程度が重要な決定因子となっており、タンパク質と結合していないフリーの薬剤のみが胚と平衡状態になる可能性が指摘されている。

血漿タンパク質または組織中の高分子への薬剤の結合は、薬剤分布の主要なファクターである。血漿タンパク質への結合は種により大きく異なる一方で、組織タンパク質への結合は種によりほぼ同じであることが知られている。血漿タンパクへの結合は、例えばバルプロ酸では、実験動物においてヒトよりも低い。

④薬剤排出の割合（Rates of Drug Elimination）

実験動物では、ヒトよりも迅速に薬剤の排出が起こることが明らかになりつつある。実験用の小動物は、ヒトに比べ体表面積／体重の比が大きい。体表面積が大きいと、体温を調節するのに必要な代謝機能がより多く必要になる。呼吸速度、腎臓及び肝臓の大きさ、心拍数、血流速度などの生物学的機能の多くは、体重というよりも体表面積に関連する。

⑤クリアランス及び半減期（Clearance and Half-life as Parameters）

血漿クリアランス（Cl）は、薬剤排出においてもっとも重要なパラメーターである。これは、以下の式により算出される。なお、D は薬剤投与量、F は吸収された薬剤、AUC は濃度-時間曲線の下部領域である。

---

[37] Mirkin B. L., and Shingh, S. Placental transfer of pharmacologically active molecules. In: Perinatal Pharmacology and Therapeutics (B. L. Markin Ed.), Academic Press, New York-San Francisco- London, 1976, pp.1-69.

[38] Nau, H., and Scott, W. J. Weak acids as teratogens: drug accumulation in the basic milieu of the early mammalian embryo. Nature 323: 276-278(1986).

[39] Scott, W. J., and Nau, H. Weak acids as human teratogens: accumulation in the young mammalian embryo. Teratology 31: 25A (1985).

$$Cl=\frac{DF}{AUC}$$

また、半減期（t1/2）は薬剤排出量に加え、薬剤分布量（Vd）にも依存する。

$$t_{1/2}=0.69\frac{V_d}{Cl}$$ （血漿減少フェーズが 1 段階である場合）

$$t_{1/2,\beta}=0.69\frac{V_{\alpha,\beta}}{Cl}$$ （血漿減少フェーズが 2 段階である場合）

⑥ピーク値と AUC 値（Peak Levels vs. AUC Values）

ほとんどの薬剤において、動物の体内での半減期はヒトにおける半減期よりも短い。実験動物では、体内の薬物の濃度のピークは高くとがった形を示すのに対し、ヒトにおいては、より低く、治療域レベルに保たれている。図 5.2 で、ヒトにおける治療投与をマウスにおける催奇形投与と比較した結果を示した。図 5.2 及び表 5.3 に示した値から、マウスの催奇形性レベルは、ヒトにおける治療ピークレベルよりも高いことが分かる。

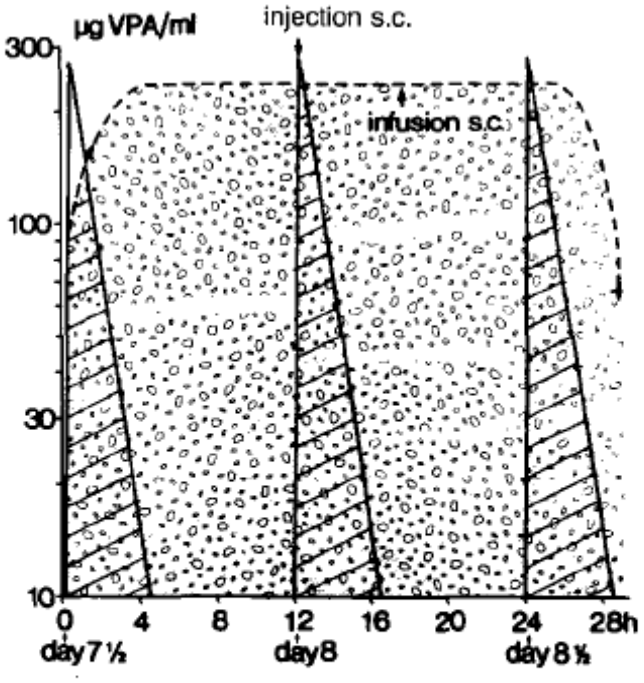


FIGURE 9. Simulated plasma concentration-time curves of valproic acid following a teratogenic drug administration regimen in the mouse (resulting in 10% exencephaly formation) as compared to a therapeutic drug administration schedule in man. Note the much more drastic drug concentration fluctuations in the mouse as compared to man. The time periods on the abscissa correspond to the length of the organogenesis period sensitive to interference with neural tube defect formations. From Nau (47).

図 5.2 ヒトにおける治療投与とマウスにおける催奇形投与との比較結果

表 5.3　バルプロ酸をマウスに催奇形性用量した場合とヒトに治療目的で投与した場合の薬物動態パラメータの比較

Table 9. Comparison of pharmacokinetic parameters of valproic acid in mouse (teratogenic dose) with man (therapeutic dose).

Parameters	Mouse[a]	Man[a]
Teratogenic dose	180[b] (4 ×/24 hr)	30 (per 24 hr)
Cl (mL/hr × kg)[c]	1000	10
AUC (μg/mL × hr)[d]	720	3000
C_{max} (μg/mL)		
Total drug	230	100–150
Free drug	120	10–20

[a]Literature data (*14,16,46,47,50*).
[b]In this regimen SC doses were used which resulted in a significant formation of exencephaly (10% of live fetuses).
[c]Plasma clearance.
[d]Area under plasma concentration-time curve.
[e]Maximal concentration.

現在では、これら①～⑥の要因を考慮した薬物動態モデルが開発され、実験結果のシミュレーションに用いられている。

5.3　動物試験結果の判定法

5.3.1　発生毒性学における分類用語の調和

発生毒性学で用いられる奇形、変異、遅延といったカテゴリーや個々の所見に関する用語については、5.1 で述べた通り、国際的な調和が進められている。動物試験結果の判定においては、これらの調和の動向を考慮する必要がある。

5.3.2　ベンチマーク用量等にもとづく実験データの解析

化学物質による非発がんリスクの評価については、近年統計学に基づく用量反応モデル（ベンチマーク用量手法）の開発と活用が進んでおり、実験データの解析への利用が進んでいる（4.3.2.7 参照）。

従来の用量反応評価は以下の 3 つのステップから構成されていた

・一般的な影響を調べる（実験動物における最大無毒性量（NOAEL）の把握）。
・データの不確実性を調べる（種間と種内の不確実係数（UF、一般的には 10）、その他の修飾係数（MF）の設定）。
・上記の値から参照用量（RfD）を求める。

$$\mathrm{RfD} = \frac{\mathrm{NOAEL}_{\text{critical effect}}}{\mathrm{UF}_{\text{interspecies}} \times \mathrm{UF}_{\text{intraspecies}} \times \mathrm{MF}}$$

NOAEL は用量反応評価を行うために必要な基本的な値であるが、NOAEL の限界も指摘

されており、そのような中でベンチマーク用量（BMD）の概念が提示されている。ベンチマーク用量とは、用量反応曲線モデル（図 5.3 の実線）の 95%信頼区間の下限（図 5.3 の点線で示される曲線）において、5%の発生率を示す用量である。

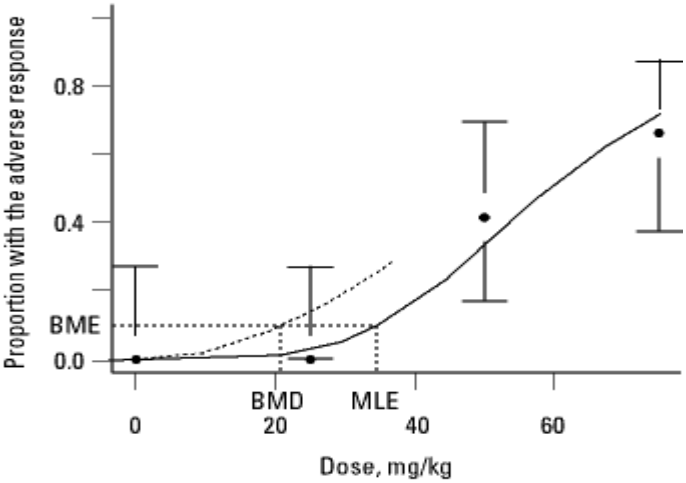


図 5.3　ベンチマーク用量の概念

ベンチマーク用量以外にも、生物学データに基づく用量反応モデル（biologically based dose-response (BBDR)）の研究が進んでいる。

NOAEL や LOAEL の代替手法として最も代表的なのが、ベンチマーク用量であるが、ベンチマーク用量も、依然として外挿に関しては、NOAEL と同様の課題がある。この問題を解決するためには、化学物質が正常な発達をどう阻害するかを解明する必要がある。

5.4　まとめ

以上のことから、発生毒性の評価に当たっては、以下の点に留意して試験データを評価する必要がある。実際には、データの限界から、以下の点すべてについて十分な検討が行えない場合が多いため、実験動物種とヒトの種差等を考慮しながら、合理的な解釈を行う必要がある。

発生毒性の評価のポイント
① その毒性は２種類以上の動物種で見られているか。 ② その外因に特異的な異常が誘発されるか。 ③ 発生毒性は親動物に対する毒性よりもかなり低い濃度で起こっているか。 ④ その毒性には用量－効果関係が見られるか。 ⑤ 用量－効果関係の傾斜はどれほどか。

⑥ 発生毒性試験が最も適切な動物種においてヒトでの適用経路を用いて行われているか。
⑦ 発生毒性の閾値と無影響量（NOEL）はどれほどか。
⑧ 発生毒性用量とヒトの臨床用量との間にどれほどの差があるか。
⑨ その異常がヒトに起こった場合に生命や生体機能に重大な影響を及ぼすか。
⑩ どのような集団がリスクを受ける可能性があるか。

（出典：京都大学塩田教授講演資料（参考１）による）

6. まとめ

本調査では、農薬等の化学物質の食品健康影響評価を実施するために必要な催奇形性の評価に関する文献等を以下の項目について調査した。

・実験動物とヒトの発生毒性データの対応関係

・種差の原因と考えられる以下の要因

(a) 生殖と妊娠に関する系統発生的差異

(b) 外因に対する胎児組織の感受性の違い

(c) 母体－胎盤－胎児における薬物動態の違い

・動物試験結果の判定方法

（１）実験動物とヒトの発生毒性データの対応関係

発生毒性に関しては、奇形、異常、変異やその程度を示す様々な用語が用いられる。こうした分類関連用語及び個々の奇形等を示す用語については、国際的な議論の中で、調和のための検討が進められている。これまでにベルリンの研究者が中心となって国際ワークショップを開催し、この結果を踏まえて、日米欧 3 極で共同の用語集を作ることが合意された。その後、米国の Teratology Society におけるシンポジウムや電話会議を経て、現在最終のドラフトがほぼ完成し、出版、日本語版の作成を行うこととされている。現在、6 つの用語については、以下のような体系で分類に用いることが決定されている。

奇形（malformation）（重大（major）および軽微（minor））

変異（variation）／遅延（retardation）

および「グレーゾーン異常」（gray zone anomaly）

また、これまでの研究によれば、ラット、マウスなど、いずれかの動物で催奇形性を示す物質は 2000 種類以上と言われているが、このうちヒトで発生毒性が認められたものは数十種類にとどまると言われている。これらの物質は、ヒトにおける少数の臨床例の観察によって発見されたものが少なくない。したがって、実験動物での催奇形性がヒトにおける催奇形性と必ずしも対応しないことがしばしばある。

実験動物とヒトの発生毒性データとの対応については、これらの点に留意する必要がある。

（２）種差の原因と考えられる以下の要因

(a) 生殖と妊娠に関する系統発生的差異

催奇形性物質に対するヒトの反応を予測するために用いられるげっ歯類やウサギが、哺乳動物のなかでは、初期の胎盤輸送が反転卵黄包胎盤に依存しているという点で、非常に特異的であることがあげられる。

(b) 外因に対する胎児組織の感受性の違い

外因に対する胎児組織の感受性の違いの一部は、(c)で述べる、母体－胎盤－胎児における薬物動態の違いによる。この他の違いの例として、(a)に記載したように、催奇形性物質に対するヒトの反応を予測するために用いられるげっ歯類やウサギが、哺乳動物のなかでは、初期の胎盤輸送が反転卵黄包胎盤に依存しているという点で、非常に特異的であることがあげられる。

(c) 母体－胎盤－胎児における薬物動態の違い

化学物質の催奇形性は、母体－胎盤－胎児における薬物動態によって大きく影響される。この過程における種差については、バルプロ酸及びその類縁化合物で良く研究されている。薬物動態は、吸収、分布、代謝、排泄（ADME）によって決まるが、バルプロ酸等の研究で、これらの過程に影響を与える因子として以下のようなものが知られていることがわかった。

①母体における吸収、投与経路、一次通過効果
②薬物の胎盤移行
③母体由来の血漿結合タンパク及び胎盤移行
④薬剤排出の割合
⑤クリアランス及び半減期
⑥ピーク値と AUC 値

現在では、これら①～⑥の要因を考慮した薬物動態モデルが開発され、実験結果のシミュレーションに用いられている。

（３）動物試験結果の判定方法

発生毒性学で用いられる奇形、変異、遅延といったカテゴリーや個々の所見に関する用語については、（１）で述べた通り、国際的な調和が進められている。動物試験結果の判定においては、これらの調和の動向を考慮する必要がある。

また、化学物質による非発がんリスクの評価については、近年統計学に基づく用量反応モデル（ベンチマーク用量手法）の開発と活用が進んでおり、実験データの解析への利用が進んでいる。ベンチマーク用量以外にも、生物学データに基づく用量反応モデル（biologically based dose-response (BBDR)）の研究が進んでいる。NOAELやLOAELの代替手法として最も代表的なのが、ベンチマーク用量であるが、ベンチマーク用量も、依然として外挿に関しては、NOAELと同様の課題がある。この問題を解決するためには、化学物質が正常な発達をどう阻害するかを解明する必要がある。

以上の調査により、発生毒性の評価に当たっては、以下の点に留意して試験データを評価する必要があることが明らかとなった。実際には、データの限界から、以下の点すべてにつ

いて十分な検討が行えない場合が多いため、実験動物種とヒトの種差等を考慮しながら、合理的な解釈を行う必要がある。

発生毒性の評価のポイント

① その毒性は２種類以上の動物種で見られているか。
② その外因に特異的な異常が誘発されるか。
③ 発生毒性は親動物に対する毒性よりもかなり低い濃度で起こっているか。
④ その毒性には用量－効果関係が見られるか。
⑤ 用量－効果関係の傾斜はどれほどか。
⑥ 発生毒性試験が最も適切な動物種においてヒトでの適用経路を用いて行われているか。
⑦ 発生毒性の閾値と無影響量（NOEL）はどれほどか。
⑧ 発生毒性用量とヒトの臨床用量との間にどれほどの差があるか。
⑨ その異常がヒトに起こった場合に生命や生体機能に重大な影響を及ぼすか。
⑩ どのような集団がリスクを受ける可能性があるか。

（出典：京都大学塩田教授講演資料（参考１）による）

作業の遂行にあたっては、発生毒性（催奇形性）分野における専門家である、塩田浩平教授（京都大学理事、日本先天異常学界理事長）にご指導をいただいた。