

資料 9

化学物質の発達神経毒性評価手法に 関する情報収集調査報告

平成 21 年 6 月 12 日

食品安全委員会農薬専門調査会幹事会
(第52回)

財団法人 残留農薬研究所

調査の概要

1. 米国環境保護庁 (EPA) の発達神経毒性試験ガイドラインの翻訳
2. 経済協力開発機構 (OECD) の発達神経毒性試験ガイドラインの翻訳
3. EPAとOECDの発達神経毒性試験ガイドラインの比較
4. 米国EPAでの発達神経毒性試験に関する現地調査
5. 化学物質による発達神経毒性に関する疫学的文献調査

発達神経毒性試験(DNT試験)に関する歴史的背景

1974	日本厚生省(医薬): 発達神経毒性(生殖・発生毒性試験)
1975	英国(医薬): 同上
1981	OECD オリジナルTG(農薬): 遅発性神経毒性
1982	EPA オリジナルTG Subdivision F(農薬): 同上
1985	日本農水 オリジナルTG農蚕4200(農薬): 同上
1986	WHO(医薬/化学物質): 発達神経毒性評価法(案) EPA(環境化学物質): 発達神経毒性試験プロトコール(案)
1989	EPA Workshop: 陽性物質の発達神経毒性(ヒトと動物モデルの比較)
1991	EPA 農薬TGの改定 (Subdivision F): 神経毒性(修正、追加)
1993	全米科学アカデミー報告: 食物中残留農薬の乳幼児・子供への健康影響
1996	米国食品品質保護法 FQPA (Food Quality Protection Act) の制定 EPA: 既存の農薬毒性データの見直し開始
1998	EPA: 発達神経毒性試験ガイドライン(OPPTS 870.6300) の導入 OECD 新TG#426草案: 発達神経毒性試験
2000	日本農水 新TG農産8147(農薬): 遅発性神経毒性、神経毒性
2007	OECD: 発達神経毒性試験ガイドライン (TG #426) の導入

米国EPAでのDNT試験の実施基準*

1. 繁殖毒性試験: 新生児に神経機能的異常あるいは脳重量の有意な変化が認められた場合
2. 催奇形性試験: 胎児の神経組織に奇形が認められた場合
3. 成獣を用いた毒性試験: 神経機能学的あるいは神経病理学的異常が観察された場合
4. 既知の発達神経毒性物質と類似した作用機序を示す化学物質
5. 疫学的調査により化学物質の曝露と子供の発達障害に関連性が示唆された場合

*上記の変化が投与に関連して認められた場合に実施
(EPA: Pesticides; Data Requirements for Conventional Chemicals,2007)

米国EPAの発達神経毒性試験 ガイドライン

OPPTS 870.6300 (1998)

DNT試験概要：EPA OPPTS 870.6300 (1998)

ステージ	日	
妊娠期間	0	妊娠母動物 (各群20腹以上)
	6	投与期間: 妊娠6日～出産後10日まで (経口投与) 出産日は投与なし
	21	観察項目: 詳細な臨床症状: 妊娠期2回, 授乳期2回, 10匹/群 体重: 週1回+出産日, 出産後11日, 21日 剖検: 出産後21日 (離乳時), 着床痕の数, 標的・異常部位の固定
出産	22	児動物の観察
授乳期間	0	体重 (全動物): 出生時, 生後4, 11, 17, 21日及びその後2週に1回
	4	詳細な臨床症状 (生後4, 11, 21, 35, 45, 60日): 10匹/性/群
	6	同腹仔の調整 (生後4日): 各腹雄4, 雌4 (80匹/性/群)
	10	発達指標の確認 (離乳前の適切な時期): 全動物
	20	自発運動量 (生後13, 17, 21, 60日): 10匹/性/群
離乳	21	
離乳後	22	聴覚性驚愕 (生後22日, 60日): 10匹/性/群 学習・記憶 (生後22日, 60日): 10匹/性/群 性成熟の確認 (離乳後の適切な時期): 20匹/性/群
		剖検・脳重量 (生後11日, 60~70日): 10匹/性/群 病理組織検査 (含計測病理): 2回 生後11日 6匹/性/群 (浸漬固定) 生後60~70日 6匹/性/群 (灌流固定)
	10週齢	70

OECDの発達神経毒性試験

ガイドライン

TG 426 (2007)

DNT試験概要: OECD TG426 (2007)

ステージ	日	
妊娠期間	0	妊娠母動物 (各群20腹)
	6	投与期間: 妊娠6日～離乳時まで (経口投与) 観察項目: 詳細な臨床症状 (週2回), 体重 (週1回) 母動物の処分: 離乳後に安楽殺・廃棄
	21	
出産	22	児動物の観察
授乳期間	0	詳細な臨床症状/体重 (週1回): 全動物
	4	同腹仔の調整 (生後4日): 各腹雄4, 雌4(80匹/性/群)
	6	行動発達 (生後4日): 20匹/性/群
	20	発達指標の確認 (離乳前の適切な時期): 全動物 自発運動量 (生後13, 17, 21, 35, 60～70日): 20匹/性/群
離乳	21	
離乳後	22	運動・感覚機能 (生後23～27日, 60～70日): 10 or 20匹/性/群 学習・記憶 (生後23～27日, 60～70日): 10 or 20匹/性/群 性成熟の確認 (離乳後の適切な時期): 20匹/性/群
	70	剖検・脳重量 (生後11～22日, 60～70日): 10匹/性/群 病理組織検査 (含計測病理): 生後11～22日 10匹/性/群 (浸漬/灌流固定) 生後60～70日 (70日) 10匹/性/群 (灌流固定)
10週齢	70	

EPAとOECDの発達神経毒性試験 ガイドラインの比較

EPAとOECDのDNT試験ガイドライン比較

項目	EPA	OECD*
制定時期	1998年	2007年
投与期間 (母獣)	妊娠6日～生後10日	妊娠6日～生後21日
検査項目	神経機能・形態変化	同左
検査例数 (新生児)	6～10匹／群 (病理6)	10～20匹／群 (病理10)
病理検査 時期	生後11日、60日 (脳バリエーション大きい)	生後22日、70日 (脳バリエーション小)

*: OECDガイドラインの方がサンプル数が多く、統計学的解析に有利で、試験の信頼性が高い

米国EPAでの発達神経毒性試験に 関する現地調査

DNT試験実施件数*

被験物質の種類	実施試験数
産業化学物質	8
農薬	73
医薬	3
溶媒	7
陽性対照物質	15
その他**	4

*: 米国EPA (OPPTS 870.6300) 及びOECD (TG 426) のDNT試験ガイドラインに準拠して実施された試験数及び被験物質の種類

** : 食品添加物、タバコ煙、制限給餌、母・仔分離飼育

DNT試験の感受性 (2006年)

What's the Benefit?

- Purpose of DNT testing is ostensibly to improve children's health protection
- However, for this assumption to be valid, DNT testing must lead to...
 - ↓ no-effect levels than other toxicity studies
 - ↓ reference dose (RfD) or reference concentration (RfC)
 - ↓ real-world chemical exposures for children
- EPA *Retrospective Analysis of 12 DNT Studies* (Makris et al., 1998)
 - DNT generally **not** the most sensitive endpoint/study
 - No chronic RfD based on DNT
 - Only 3 acute RfDs based on DNT (2 based on **maternal** toxicity)
- EPA retrospective analysis of 50 DNT studies (unpublished)
 - Lower no-effect levels from DNT studies ~20% of the time
 - ↳ ~80% of the time, DNT studies have **not** been more sensitive than existing toxicity studies

農薬の毒性試験におけるDNT試験の感受性

米国EPA (Office of Pesticide Programs)の評価, 2009年

○ DNT試験を含め評価が完了した剤	58剤
○ DNT試験結果がARfDあるいはCRfDに反映された剤	8剤 (14%)
ARfD	6剤 (10%)
CRfD (ADI)	4剤 (7%)
ARfD/CRfD	2剤 (3%)

ARfD: 急性参照量

CRfD: 慢性参照量 (ADI)

DNT試験結果がリスク評価に反映された 農薬8剤の毒性情報

名称	用途	ARfD	CRfD	エンドポイント
Carbaryl (カーバメート)	殺虫剤	Yes	No	FOB・ChE (母獣)
Chlorpyrifos (有機リン)	殺虫剤	No	Yes	ChE
Flufenacet	除草剤	Yes	Yes	BW・脳計測病理
Lindane	殺虫剤	Yes* (経皮)	No	BW・自発運動量
Molinate (チオカーバメート)	除草剤	Yes	No	聴覚驚愕
Spirodiclofen	殺ダニ剤	No	Yes	学習・記憶
Tebuconazole (コナゾール)	殺菌剤	Yes	Yes	BW・脳計測病理・ 自発運動量
Zeta-cypermethrin (合成ピレスロイド)	殺虫剤	Yes* (経皮)	No	BW

FOB,機能検査; BW, 体重; ChE, コリンエステラーゼ

米国EPAによる安全係数の設定

- 通常は100倍(個体差10倍×種差10倍)
- 有機リン剤などで乳幼児・子供への影響が懸念される場合は通常の100倍に加え不確実係数10倍を加算し1000倍とする
- 但し、乳幼児・子供と成人の間の毒性影響の差が科学的に立証されれば、その程度差に応じた追加係数(1、3、5倍など)に軽減される。

例えば、コリンエステラーゼ活性阻害の程度差が幼若動物と成獣で3倍であれば追加係数は3倍とする(100, 300, 500倍)

乳幼児・子供への影響が懸念される農薬に対し 米国EPAが設定した安全係数の実際例

1. 有機リン系農薬37化合物に対する追加係数(1998年)

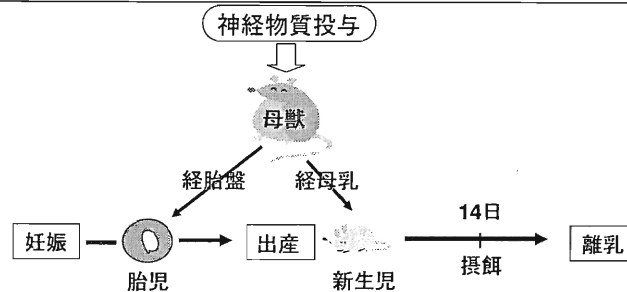
そのままの10倍 (100×10=1000倍)	9剤(24%)	}76%
3倍に軽減 (100×3=300倍)	10剤(27%)	
1倍に軽減 (100×1=100倍)	18剤(49%)	

2. 非有機リン系農薬35剤(1996年以降に登録)

そのままの10倍 (100×10=1000倍)	12剤(34%)	}66%
3倍に軽減 (100×3=300倍)	8剤(23%)	
1倍に軽減 (100×1=100倍)	15剤(43%)	

EPA's HIARC/FQPA Safety Factor Committee
DNT Symposium, Reston, Virginia, 2006

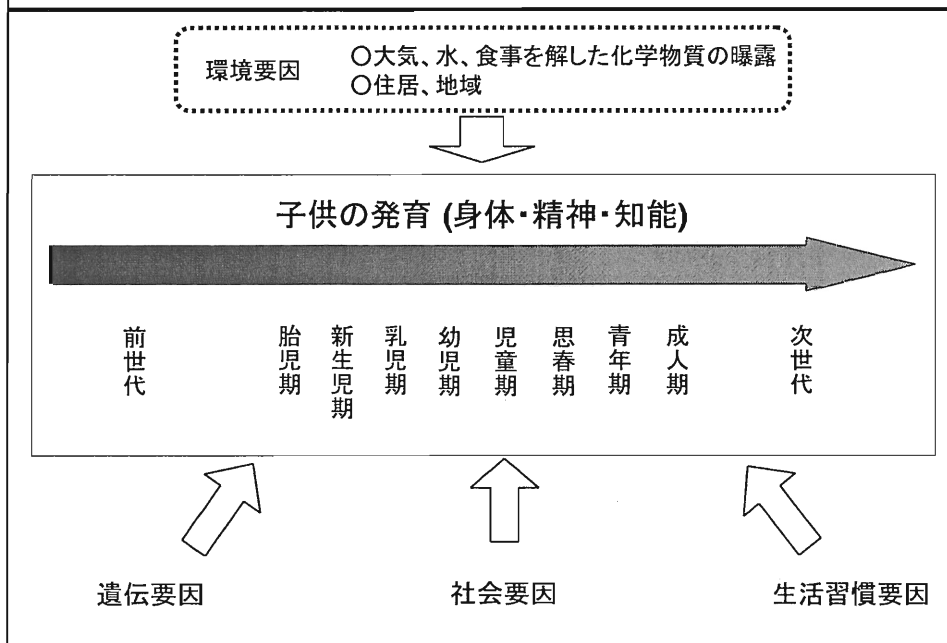
リスク評価におけるDNT試験データの問題点



- 無毒性量(NOEL)は母獣への投与量で決定される(繁殖・催奇形性試験も同様)
- 胎児・新生児への曝露量(新化合物・代謝物)は不明
- 生後14日前後の新生児は経餌曝露の可能性有(混餌投与試験)
- 今後の検討課題: 経胎盤・経母乳曝露量の解明
(被験物質の経胎盤移行量、母乳中濃度、新生児の母乳摂取量の解析)

化学物質による発達神経毒性に関する疫学的文献調査

子供の発育に影響を及ぼす因子



環境要因

○ 化学物質の曝露

PCB、水銀、鉛、ダイオキシン類、ヒ素、カドミウム、ベンゼン、有機フッ素化合物、内分泌かく乱作用を有する物質、難燃剤、農薬 等

○ 社会的・生活習慣要因

地域 (住所)、住居 (種類、築年数、空調等)
両親の学歴・職業歴・勤務状況・収入
両親の喫煙・飲酒、食事
家庭環境 (兄弟の数、ペット等)
遊び場の環境、学校の環境 等

子供の健康影響の指標 (アウトカム・エンドポイント)

- 身体発達: 出生時体重低下、出生後の身体発育状 等
- 先天異常: 尿道下裂、停留精巣、口唇・口蓋裂、
消化管閉鎖症、心室中隔欠損、ダウン症 等
- 精神神経発達障害:
自閉症、LD (学習障害)、
ADHD (注意欠陥・多動性障害) 等
- 免疫系の異常:
小児アレルギー、アトピー、喘息 等
- 代謝・内分泌系の異常:
甲状腺機能の異常、耐糖能異常、肥満、
生殖器への影響、脳の性分化の異常 等

疫学的調査におけるコホート調査と ケースコントロール調査の比較

	コホート調査	ケースコントロール調査
調査方法	特定の集団を追跡調査し、環境要因とその影響の関係を解析	ある疾患のケース集団と疾患のない対照集団を設定し、過去に遡って要因と疾患(ケース)の関連性を調査
利点	バイアス(偏り)が少なく信頼性が高い	少ない時間と労力で実施可能
欠点	多くの時間と労力が必要	選択バイアス(対照群の設定における偏り)、思い出しバイアス(偏り)等が生じる 要因の解釈が難しい

化学物質による発達神経毒性に関する疫学的文献調査の概要

文献番号	対象物質	研究対象項目	年
1	PCB	胎児・乳幼児の神経行動機能障害	1996
2	PCB	乳幼児の神経発達異常(内分泌系との関連性)	2002
3	PCB/有機水銀	胎生期曝露による神経行動障害	2002
4	PCB/有機水銀	乳幼児・子供の認知発達障害	2003
5	有機水銀	子供の認知・視覚・運動機能への影響	2000
6	有機水銀	子供の発達障害(自閉症)との関連性	2006
7	有機水銀	胎生期曝露の神経行動機能への影響	2006
8	有機水銀	魚介類摂取による胎生期曝露の影響	2007
9	有機水銀	メチル水銀の発達神経毒性	2008

化学物質による発達神経毒性に関する疫学的文献調査の概要(つづき)

文献番号	対象物質	研究対象項目	年
10	有機水銀	魚介類摂取による発達障害	2008
11	鉛	子供の発達障害(メキシコ)	2006
12	ヒ素	森永粉ミルク中毒患者(幼児)の追跡調査	2006
13	カドミウム	子供の運動、知覚、免疫機能への影響	2006
14	有機リン剤	子供の神経行動発達への影響	2008
15	殺虫剤	子供の発達神経への影響(欧州)	2008
16	有機リン剤	経母乳曝露の影響	2009
17	環境汚染物質	乳幼児・子供の行動発達への影響	2005
18	有機リン剤	子供の記憶・運動機能への影響	2004

疫学的調査におけるコホート研究

○近年、欧米先進諸国を中心に有機塩素系化合物(PCB)、有機水銀、鉛、農薬などの環境化学物質の周産期曝露と乳幼児・子供の神経系の発達との関連性についてコホート研究が進み、有機水銀、PCB、鉛については発達神経系への影響(小児の認知機能や思春期の発達障害など)を示唆する所見が得られている。

○農薬においても有機リン剤、カーバメート、ピレスロイドなど殺虫剤を主体に調査が進められ、有機リン剤のパラチオン曝露と子供の記憶や運動機能の低下との関連性が指摘されている。しかしながら、コホート研究における曝露指標(測定項目)は研究間で異なり、また、小児の神経発達指標などアウトカムも研究により違いがあることから、明確な因果関係を示唆する十分な証拠が未だ得られておらず、今後の幅広い緻密な研究が待たれる。