

## 二世代生殖毒性試験に代わる 拡張一世代生殖毒性試験の妥当性

太田亮

### はじめに

現在、動物用医薬品のための毒性試験法ガイドラインのうち、食品中に残留する可能性のある動物用医薬品については、安全性を評価するための生殖毒性試験としてOECDテストガイドライン416<sup>1)</sup>(二世代生殖毒性試験、以下「二世代試験」と略す)が利用されている。

一方、農薬の安全性評価のために二世代試験の代替として開発されたOECDテストガイドライン443<sup>2)</sup>(拡張一世代生殖毒性試験、以下「EOGRTS」と略す)が、生殖毒性試験の試験法ガイドラインとして2012年に最終化された。

本稿では試験を実施する立場から、二世代試験がEOGRTSに置き換わる場合の問題点について解説するが、EOGRTSの具体的な試験方法および二世代試験との違いについては、独)農林水産消費安全技術センターの勝山ら<sup>3)</sup>が詳しく解説しているため、そちらを参照されたい。

### これまでの経緯

現在、動物用医薬品の生殖毒性試験として日本と米国は二世代試験を標準的な試験法としているが、欧州連合はEOGRTSを推奨している。二世代試験とEOGRTSのメリットおよびデメリットについて議論された経緯を要約すると以下のとおりとなる。

Piersmaら<sup>4)</sup>は、過去に実施された498件のラットを用いた多世代生殖毒性試験を分析し、F1世代の交配とF2世代の評価に限定した毒性影響はほとんどなかったことを報告した。すなわち、生殖毒性試験の評価は親世代とF1世代のみの一世代試験で十分であり、規制リスク評価のための試験としてEOGRTSの採用を推奨した。また、Rorijeら<sup>5)</sup>も多世代生殖毒性試験で毒性を示

した50物質について解析し、Piersmaら<sup>4)</sup>の報告と同様の結論を導き出した。これらの著者は、EOGRTSの利点を明確にし、当局の規制ツールとしての二世代試験の置き換えを強く支持した。

OECDは、EOGRTSの実運用を想定して、ガイダンス文書117「拡張一世代生殖毒性試験の試験ガイドラインTG433における内部トリガーの実施」<sup>6)</sup>を作成した。タイトルに示されているように、この文書では、米国環境保護庁とカナダの害虫駆除規制機関が、F1世代の交配とF2世代の評価をいかなる場合に実施すべきかを「トリガー」という言葉を用いて解説している。また、OECDは、ガイダンス文書150を改訂し<sup>7)</sup>、内分泌かく乱化学物質の評価を支援する枠組みのうち、レベル5の試験、すなわち内分泌関連エンドポイントへの有害作用に関する包括的なデータを提供する*in vivo*試験として、二世代試験とEOGRTSの利用方法を紹介している。

現在のEOGRTSに置き換えるための最も重要な推進力は、動物数の削減であり、置き換えによって動物数は最大40%減少するといわれている。一方、現在の二世代試験を支持する国の規制当局が抱いているEOGRTSに対する最も重要な懸念点は、交配前の投与期間が短いこと、作業量が膨大であること、F2世代の評価の重要性などである。

なお、日米EU(三極)の規制当局および企業代表をフルメンバーとした「動物用医薬品の承認審査資料の調和に関する国際協力(VICH)」においても、二世代試験をEOGRTSに置き換えることが提案され、2013年から日本の農林水産省がEMA(欧州医薬品庁)やFDA(アメリカ食品医薬品局)と協力して議論を継続している。しかし、現在までのところ、二世代試験をEOGRTSに置き換えることの合意には至っていない。

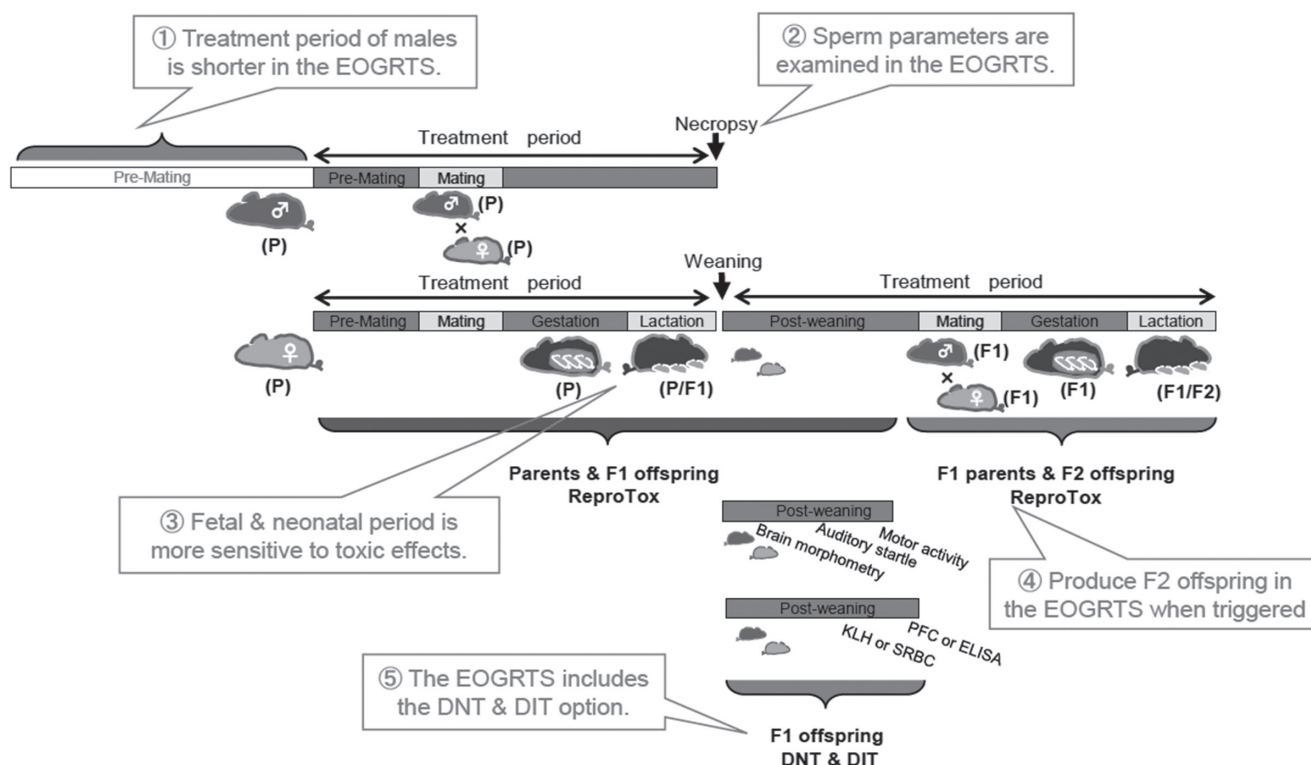


図1 EOGRTSの特徴と問題点

## 置き換えの問題点

**投与期間：**二世世代試験では交配前10週間だった雄親の投与期間が、EOGRTSでは交配前2週間となる(図1-①)。これには精巣の病理組織検査の方が交配検査よりも感度が優れているというコンセプトがあり、90日反復投与毒性試験などで精巣の病理組織に関する情報があれば、交配前2週間の投与で十分と考えられている。したがって、EOGRTSに置き換える場合は、精巣の病理検査等の結果が必要だが、得られていない場合であっても交配後の雄親の投与を継続することで、精巣の病理組織検査や精子検査に供することができる(図1-②)。

**作業量：**二世世代試験での親世代の検査は、精子検査と生殖器を中心とした病理組織検査であったが、EOGRTSでの親世代の検査には、血液学的検査、血液生化学検査、ホルモン測定、尿検査が加わり、病理組織検査は全臓器が対象となる。さらに、F1世代についてもEOGRTSでは、肛門・生殖突起間距離(AGD)の計測、血液学的検査、血液生化学検査、ホルモン測定、全臓器の病理組織検査が追加となる。これらの作業には膨大な労力がかかり、試験のコスト増加と失敗リスクが高

まることが予想される。これら検査の全てが、動物用医薬品の安全性評価に必要な精査するべきであろう。

**トリガー：**Piersmaら<sup>4)</sup>が498件の多世代生殖毒性試験を分析した結果、最小毒性量(LOAEL)または最小影響量(LOEL)を求める際に、F1/F2世代のデータは不可欠であることを示した。F2世代の毒性に対する感受性は、F1世代の感受性に比べて必ずしも高くないことには賛同できる。実際に、F1世代で何も影響がなかった場合に、F2世代で新たに毒性が検出された例は少ない。しかし、F2世代の産児数、生存率および成長は、F1世代の繁殖能への影響を反映するものである。有害物質に脆弱な胎児期や乳児期(図1-③)の投与を受けていない親世代のデータを指標に、F1/F2世代の評価を行うことを判断するEOGRTSのトリガー(図1-④)では、胎児期や乳児期に投与されたF1世代の繁殖能への影響を調べる機会を失う可能性がある。規制当局は、この点について十分に考慮の上、トリガーの利用を判断すべきである。

**動物数：**EOGRTSと二世世代試験の使用動物数の比較は、勝山ら<sup>3)</sup>が詳しく解説している。彼ら

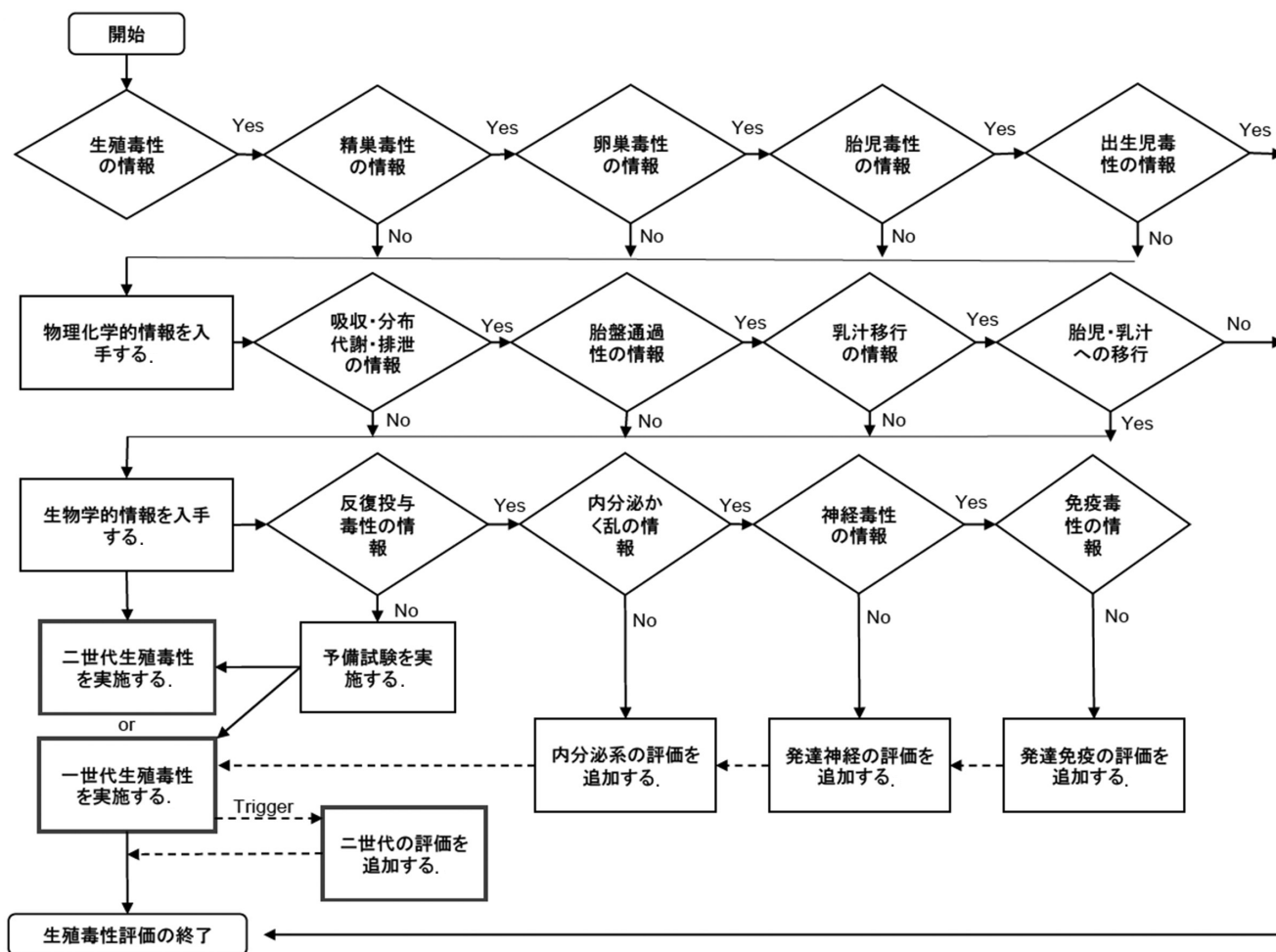


図2 EOGRTSを実施する前のリスク評価

の試算によると、二世代試験をEOGRTSに置き換えると、使用する動物数は2,240匹から1,200匹に減るが、F1/F2世代の評価を行う場合は二世代試験と同等であると述べている。しかし、発達免疫毒性(DIT)や発達神経毒性(DNT)の評価をEOGRTSに組み込むことで(図1-⑤)、それぞれ単独の試験として実施するよりも動物数を抑えることが可能となるのは確かである。

**発達免疫毒性(DIT)と発達神経毒性(DNT)：**発達免疫毒性は、有害物質に対する感受性が高いとされる胎児期や乳児期に投与して、成長後に起こる免疫抑制、アレルギー反応、炎症不全などの有無を調べる分野である<sup>8)</sup>。一方、発達神経毒性は、胎児期や乳児期に投与されたアルコール類、金属類、PCB類、殺虫剤、医薬品などが成長後の行動、学習、記憶などに影響を及ぼすことが知られるようになり、神経系に対する発生毒性の機能的および形態的評価を追加する形で発展した<sup>9)</sup>。DITと

DNTは、動物用医薬品のための毒性試験法ガイドラインには含まれない項目であるが、環境化学物質という観点から考えると、子どもの健康リスク評価において重要であり、動物用医薬品であっても無視できない項目である。

**結論**

本稿では、動物用医薬品の安全性を評価するための生殖毒性試験としての二世代試験をEOGRTSに置き換えた場合の問題点について議論してきたが、EOGRTSは内分泌かく乱物質の包括的なデータを提供するため徹底して評価するデザインとなっているため、試験スタイルを柔軟に変えることを試験実施側と規制当局側で許容することが必要である。そのためには、EOGRTSを実施する前に被験物質に関する情報を収集し、十分なリスク評価を行った上で、過不足のない試験スタイルを設計することが重要である(図2)。そうするこ

とによって、二世代試験をEOGRTSに置き換える際の問題点が解消されるものと考える。

#### 文献

- 1) OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS. Test No. 416: Two-Generation Reproduction Toxicity Study, Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development, 2001
- 2) OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS. Test No. 443: Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study, Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development, 2012
- 3) 勝山真多, 齊藤陽子, 大森正和: 拡張一世代繁殖毒性試験の試験法の概要および海外評価機関における要求状況の調査. 農薬調査研究報告, 2018; 9: 5-11
- 4) Piersma AH, Rorije E, Beekhuijzen MEW, Cooper R, Dix DJ, Heinrich-Hirsch B, Martin MT, Mendez E, Muller A, Paparella M, Ramsingh D, Reaves E, Ridgway P, Schenk E, Stachiw L, Ulbrich B, Hakkert BC: Combined retrospective analysis of 498 rat multi-generation reproductive toxicity studies: on the impact of parameters related to F1 mating and F2 offspring. *Reprod Toxicol.* 2011; 31: 392-401
- 5) Rorije E, Muller A, Beekhuijzen MEW, Hass U, Heinrich-Hirsch H, Paparella M, Schenk E, Ulbrich B, Hakkert BC, Piersma AH: On the impact of second generation mating and offspring in multi-generation reproductive toxicity studies on classification and labelling of substances in Europe. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2011; 61: 251-260
- 6) GUIDANCE DOCUMENT 117 ON THE CURRENT IMPLEMENTATION OF INTERNAL TRIGGERS IN TEST GUIDELINE 443 FOR AN EXTENDED ONE GENERATION REPRODUCTIVE TOXICITY STUDY, IN THE UNITED STATES AND CANADA, Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development, 2011
- 7) REVISED GUIDANCE DOCUMENT 150 ON STANDARDISED TEST GUIDELINES FOR EVALUATING CHEMICALS FOR ENDOCRINE DISRUPTION, Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development, 2018
- 8) Boverhof DR, Ladics G, Luebke B, Botham J, Corsini E, Evans E, Germolec D, Holsapple M, Loveless SE, Lu H, van der Laan JW, White KL Jr, Yang Y: Approaches and considerations for the assessment of immunotoxicity for environmental chemicals: a workshop summary. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2014; 68: 96-107
- 9) Li AA, Sheets LP, Raffaele K, Moser V, Hofstra A, Hoberman A, Makris SL, Garman R, Bolon B, Kaufmann W, Auer R, Lau E, Vidmar T, Bowers WJ: Recommendations for harmonization of data collection and analysis of developmental neurotoxicity endpoints in regulatory guideline studies: Proceedings of workshops presented at Society of Toxicology and joint Teratology Society and Neurobehavioral Teratology Society meetings. *Neurotoxicol Teratol.* 2017; 63: 24-45