

私家版 生殖・発生毒性試験 概論

宇佐見誠[#], 満長克祥^{*}

A private edition of an introduction to reproductive and developmental toxicity studies

Makoto Usami[#], Katsuyoshi Mitsunaga^{*}

Here, we express our opinions on reproductive and developmental toxicity studies with respect to test guidelines, data property, study preciseness, study reliability, and a future observation system. This is based on our experiences in working in research, and as study personnel, study director, GLP inspector, GLP evaluation committee member, and expert examination committee member. Developmental toxicity testing guidelines with prolonged administration periods are problematic. Some data characteristics of reproductive and developmental toxicity studies, such as birth index, should be treated according to their properties. The preciseness of some reproductive and developmental toxicity study data can be improved in simple ways. During the evaluation of reproductive and developmental toxicity studies, it should be considered that GLP assures study reliability as far as final reports. A rapid and reliable fetal-observation system will be devised in the near future.

Keywords: Reproductive and developmental toxicity, GLP, test guideline, reproductive index

1. はじめに

生殖・発生毒性試験は、農薬、医薬品および工業化学物質などの国への届け出の際に必要となる、ヒトの生殖および発生に及ぼす影響を評価するための試験の総称であり、基本的にGLP対応で実施される。筆者は、30年以上にわたり、農薬、医薬品および工業化学物質の分野において、試験担当者、試験責任者、GLP査察官、GLP評価委員、調査会専門委員および研究者として生殖・発生毒性試験に関わってきた。近年の本邦における研究環境を考えると、これからの研究者が、筆者のようにGLP対応生殖・発生毒性試験の実施から評価までを経験することは難しいと思われる。そこで、定年退職に当たり、筆者の経験に基づく考えを残すことは、今後の本邦における生殖・発生毒性関連分野の発展に、少しは寄与するのではないかと思い、本稿を寄せることにした。なお、本稿の内容は、筆者個人の考えであり、所属機関等の見解

を示すものではない。

2. 生殖・発生毒性試験ガイドライン

GLP対応試験において用いられることの多い、化審法および農薬の発生毒性試験（催奇形性試験）ガイドラインについては、初期のガイドラインに比べて妊娠末期まで投与期間が延長されている¹⁻³⁾(Fig. 1A)。この変更により、妊娠後期における胎児に及ぼす影響の検出性が高まることが期待されている。しかしながら、筆者はこの変更により発生毒性の検出感度は低下していると思う。これは、胚・胎児の発生毒性物質に対する感受性については、その時期が限られていること、および閾値が存在することによる⁴⁻⁶⁾(Fig. 1Bおよび1C)。発生毒性が発現するためには、母動物における被験物質の血中濃度が、感受性のある時期に発生毒性の閾値を超えることが必要であるが、投与量設定の根拠となる母動物に及ぼす影響については、一般的にはより低い閾値をもつとともに投与期間に応じて強くなる。そのため、母動物において同程度の毒性影響を示す投与量を用いた場合に、短期間投与では血中濃度が発生毒性の閾値を超えるにも関わらず、長期間投与では閾値を超えないということが起こりうる (Fig. 1D)。このようなことは初期のガイドラインを用いた試験でも起こりうるが、母動物に及ぼす影響

[#]To whom correspondence should be addressed:

Makoto Usami; Division of Pharmacology, National Institute of Health Sciences, 3-25-26, Tonomachi, Kawasaki, Kanagawa, 210-9501, Japan. Tel: +81-44-270-6600 ext.2840; E-mail:usami@nih.go.jp

^{*}School of Pharmaceutical Sciences, Toho University

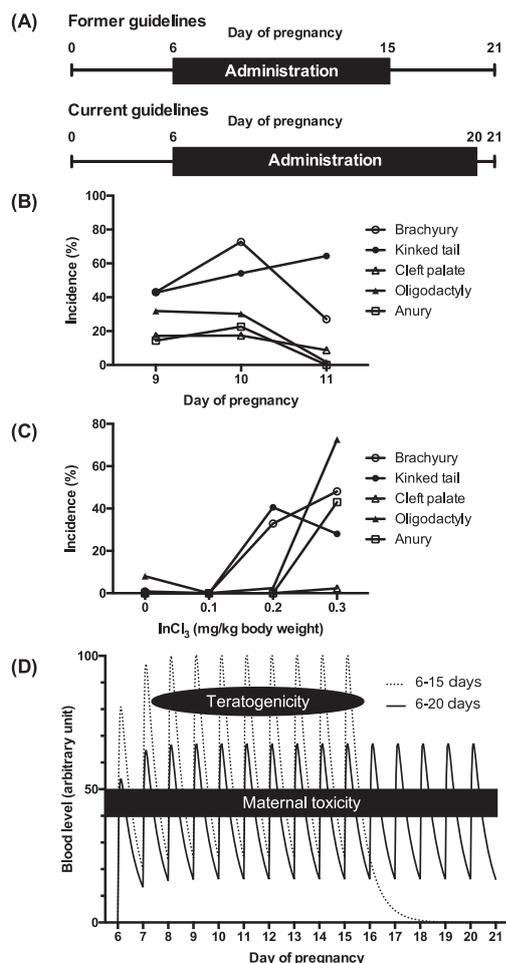


Fig. 1. Problematic extended administration period in developmental toxicity studies

(A) Administration periods in developmental toxicity testing guidelines in rats. (B) The incidence of indium-caused fetal malformations showing susceptibility to developmental toxicants during pregnancy. Indium (0.4 mg/kg body weight) was injected into rats at pregnancy day 9, 10, or 11, and their fetuses were examined at day 20. (C) Incidence of indium-caused fetal malformations showing the threshold of teratogenicity. Indium was intravenously injected into pregnant rats at day 10 and their fetuses were examined at day 20. (D) A simplified image of the relationship between blood level and toxic thresholds in developmental toxicity studies. An equal amount of an imaginary test chemical was administered once daily during the administration period in accordance with the guidelines. Threshold and susceptibility to maternal toxicity (rectangle) and teratogenicity (ellipse) are indicated.

がより発現しやすい現在のガイドラインを用いた試験において、より起こりやすくなっている。ガイドラインに従った発生毒性試験成績の評価においては、このような影響を考慮しなければならないが、試験の実施経験がなければ気づかないと思われる。

さらに、この妊娠末期までの投与期間の延長は、胚および胎児の主要な器官原基の形成期において被験物質に暴露するという、発生毒性試験の特徴を損なっていると思う。すなわち、投与期間の延長による着床から妊娠末期までの投与は、胚・胎児にとってはほぼ全期間にわたる暴露であることから、反復投与毒性・生殖毒性併合試験および簡易生殖・発生毒性試験などの他の生殖・発生毒性試験ガイドラインとの違いがないので、発生毒性試験ガイドラインを選択する意味が少なくなっている。

3. 生殖・発生毒性試験のデータ

これまでにも指摘したことがあるが、生殖・発生毒性試験の評価において用いられる生殖・発生の指標には独特の定義があることに加えて、試験施設により定義が異なるので注意が必要である^{7,8)}。例えば、出生率という指標については、国語辞典による一般的な定義では、「人口に対する出生数の割合」(三省堂、スーパー大辞林)であるが、生殖・発生毒性試験においては、出産生児数/着床数×100である場合と、出産生児数/出産生児数×100である場合とがある。前者は、着床した胚のうち、生存児として生まれた児動物の割合であるのに対して、後者は、娩出された児動物のうちの生存児の割合であるので、両者の意味は全く異なる。さらに、英語名では、live birth indexおよびbirth indexという二通りがあり、定義の確認を難しくしている。これらの生殖・発生毒性試験における指標を統一することは、試験施設におけるGLP対応のコンピューターシステム上の定義となっていることおよび過去の試験データとの一貫性のため、現実的には不可能なようである。

また、これらの生殖・発生の指標の処理においては、試験データの特徴を考えた処理が必要である。例えば、出生率(出産生児数/着床数×100)は、着床数よりも多い出生児が得られることはあり得ないので、通常のラットおよびマウスでは、100%以下で、100%に近い値を示す。そこで、単純に正規分布を仮定した群ごとの平均値と標準偏差を求めると、Fig. 2Aに示したように出生率が100%を超える親動物が存在するように分布することになる。これは明らかに間違っているので、ポアソン分布を仮定できるように、100%との差分を着床後胚・胎児死亡率として求めて、ノンパラメトリックな統計解析法を用いるのがよいと思われる(Fig. 2B)。出生率でデータを示してもよいが、標準偏差を示すとすれ

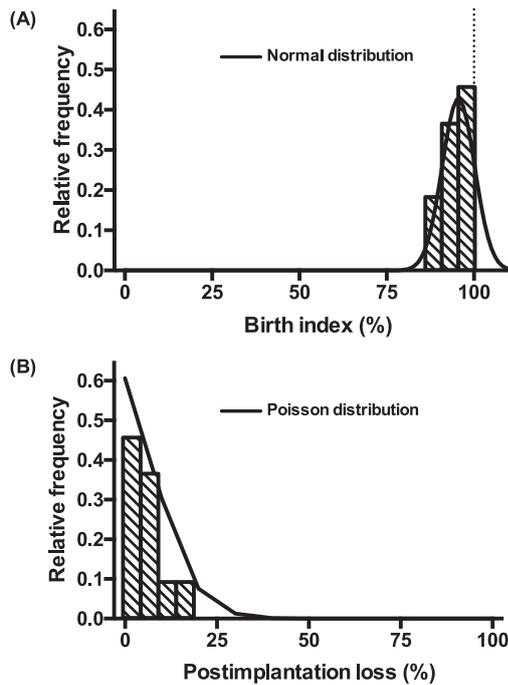


Fig. 2. Analysis of birth index

Data from the same single litter are presented as birth index (number of live newborns/number of implantation sites \times 100) and postimplantation loss (100 - birth index). (A) Histogram of birth index and its corresponding normal distribution. (B) Histogram of postimplantation loss and its corresponding Poisson distribution.

ば、着床後胚・胎児死亡率の平均値の平方根が適当であろう。しかしながら、現実的にはパラメトリックな分散分析法などで解析されていることがあるようである。さらに、データの統計解析にはGLP対応のコンピューターシステムが関わっているので、明らかに問題となる場合を除いて、そのまま評価しているようである。

さらに、最近では殆どないようであるが、生殖・発生毒性試験における特徴的な試験データである児動物の性比が、一腹を標本単位として群平均が算出されている場合がある。これは、一腹または親動物を標本単位とすることをガイドラインにおいて定めていることに対応していると思われる。しかしながら、児動物の性比は、生物集団において確率的に雄と雌の比率がおよそ1:1になるものであり、親動物の形質ではないので、試験群毎の合計児動物数で比較するべきである。

4. 生殖・発生毒性試験の精度

児動物の出生時体重のばらつきが他のデータに比べて大きいことは、生殖・発生毒性試験データの一つの特徴であると思う。これは、分娩から出生児観察までの間隔

に差があることによる。すなわち、分娩完了直後に観察が行われる動物と、分娩予定日の観察時には分娩が完了しなくて翌日に観察が行われる動物とでは、分娩から出生時観察までの間隔に最大で24時間を観察回数で分割した時間の差が生じるためである。試験データの解析におけるこの差による影響は、親動物を無作為に試験群に振り分けることで無視できるように思えるが、分娩後24時間における飲乳量が出生児の体重と比較して著しく多いために、実際には無視できないばらつきを生じる。対応策として、出産予定日における出生時観察の回数を増やすことにより、試験担当者の負担が増えるが、このばらつきを著しく減らすことが出来る。しかしながら、競争入札による安価な委託費で試験担当者を酷使している現状を考えると、出生時観察の回数を増やすことにより、他の試験項目の精度が悪くなるのが危惧される。

筆者が当然のこととして考えていたことがされていない試験施設を査察した経験から、生殖・発生毒性試験に限らず、GLP対応試験においては、被験物質の投与に使用した注射筒の容量および材質を記録するべきであると思う。これは、適切な容量および材質の注射筒を選択しなければ、被験物質投与量の精度が悪くなるからである。例えば、単純計算では、1 mlの液量を投与する場合に1 mlではなく5 mlの注射筒を使った場合の誤差は5倍になる。精度の点において、ガラス製の注射筒はプラスチック製の注射筒に比べて劣るが、脂溶性の高い被験物質の場合は選択枝となる。脂溶性が高い被験物質の場合にプラスチック製の注射筒を用いると、筒とピストン間の潤滑剤の投与液への溶出が無作為に生じるので、被験物質の吸収率の変化などの点から、試験の精度に影響を及ぼす可能性があるからである。GLP対応は毒性試験の品質を完全に保証するものではないが、これらの記録を残そうという意識が、毒性試験における投与量の精度を保証することにつながると思う。

5. 生殖・発生毒性試験の信頼性

GLP対応試験の信頼性が保証されるのは、最終報告書までである (Fig. 3)。このことは、いずれのGLP基準を見ても明らかであるが、評価する側では意外に理解されていないようである。GLP対応試験の結果から、公表論文および要約などの二次的資料を作成する場合、転記ミスなどの発生率は非GLP対応試験と同じである。したがって、食品添加物などの安全性評価のために集められる二次的資料および医薬品の承認審査におけるCTDの要約等については、転記された試験成績の信頼性は保証されていないことに留意するべきである。最終報告書を参照できない場合は、転記ミスなどを見つけることは不可能である。

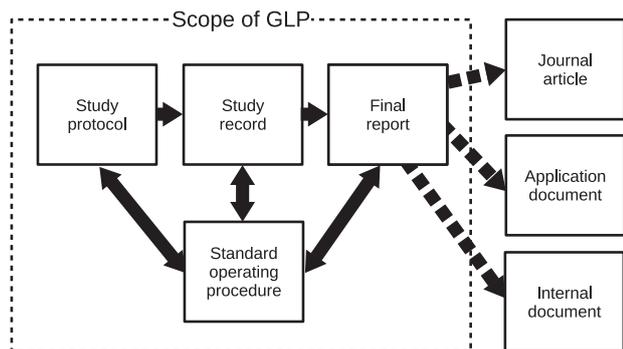


Fig. 3. Scope of study documents assured by GLP
Arrows indicate the flow of information. Dashed lines indicate that quality is not assured by GLP.

GLPは対応試験の品質を完全に保証するものではない、ということも評価する側では意外に理解されていないようである。極端な場合、SOPを逸脱して測定出来なかった項目がある場合でも、当該逸脱が記録されて承認されればGLP対応試験として成立する。結果的に、当該項目は評価できないことになるので、試験としての品質が下がることになる。特に、誤投与（ここでは動物への投与作業自体の失敗）には注意が必要である。誤投与による動物の死亡が多い場合は、生存動物においても誤投与が起きている可能性が高いため、動物数が減少すること、および誤投与による影響の両方により、試験の品質が悪くなる。本邦では誤投与は極めてまれであるが、そうではない海外のGLP対応施設では、一試験当たりの誤投与発生率がバックグラウンドデータとして集計されているようである。この様な記録が二次的資料に反映されない場合、逸脱自体がなかったようにもなり得る。一般的に、本邦の試験施設によるGLP対応試験データの信頼性は高いが、そうではない海外のGLP対応試験データが存在するようである。

6. これからの生殖・発生毒性試験

GLP対応の生殖・発生毒性試験で用いられる実験手技⁹⁾は、筆者がこの分野に関わるようになってから、全く変わっていない。これは、農薬、医薬品および工業化学物質などの国への届け出に必要な試験データに殆ど変化がないからである。このような状況において生殖・発生毒性試験を発展させるために、筆者は、試験データのより効率的かつ信頼性の高い所見入力システムを考えている。諸般の事情により詳細を記載することは出来ないが、本システムが完成した暁には、担当者の働き過ぎ防止、標本の作製および保存の不要化、並びに全胎児の骨格および内臓観察が可能になる。技術的には、ほぼ既存のもの組み合わせで構成されるシステムであるので、近い将来に完成できると考えている。

7. おわりに

本邦では生殖・発生毒性 (Reproductive and Developmental Toxicity) という語順が一般的であるが、英語圏ではDevelopmental and Reproductive Toxicityという語順が一般的なようである (OECDガイドラインではReproductive/Developmental Toxicityであるが…)。どうでもいいことであるが、欧米との文化の差が反映されていると思う。すなわち、Reproductionという概念は、生殖周期として個体発生の過程も含むので、その後さらにDevelopmentをつけるのは論理的に冗長になってしまうということであろう。一方、日本語で発生・生殖という語順は、「生」の文字が続いてしまい、論理的というよりも、単に語呂が悪いために用いられないと思われる。このように些細なことでも、考えてみると深い意味がありそうに思えたり、思えなかったりする。生殖・発生毒性試験も奥が深く思えたり、思えなかったりする。要するに、生殖・発生毒性試験の奥の深さを決めるのは自分であると思う。それでは、ご機嫌よろしくお願いたします。

謝辞

共同研究者として、長年にわたり筆者の生殖・発生毒性研究を支えていただいた、中島 幹夫 博士 (旭化成ファーマ株式会社) に深謝いたします。

引用文献

- 1) 田中悟: 生殖・発生毒性試験法指針とその国際調和。In: 毒性試験講座11発生毒性。ed. by谷村孝。地人書館、東京、pp. 119-36 (1992)
- 2) OECD: Test No. 414: Prenatal Developmental Toxicity Study. In: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris, (2018)
- 3) 農林水産省: 農薬の登録申請に係る試験成績について。29消安第335号, (2018)
- 4) Nakajima M, Takahashi H, Sasaki M, Kobayashi Y, Ohno Y, Usami M: Comparative developmental toxicity study of indium in rats and mice. *Teratog Carcinog Mutagen*. 2000; 20: 219-27.
- 5) Nakajima M, Takahashi H, Nakazawa K, Usami M: Fetal cartilage malformation by intravenous administration of indium trichloride to pregnant rats. *Reprod Toxicol*. 2007;24:409-13.
- 6) Nakajima M, Usami M, Nakazawa K, Arishima K, Yamamoto M: Developmental toxicity of indium: embryotoxicity and teratogenicity in experimental animals. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2008; 48: 145-50.
- 7) 高伸正, 赤池雅司, 宇佐見誠, 川島邦夫, 小林和雄,

- 水谷正寛, 高山敏, 田中悟, 谷村孝, 玉川実, 藤井孝明: 催奇形性用語. In: 毒性試験用語集. 国立衛生試験所 安全性生物試験研究センター, 東京, pp. 397-488 (1994)
- 8) Usami M, Mitsunaga K, Irie T, Nakajima M: Various definitions of reproductive indices: A proposal for combined use of brief definitions. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2014;54:67-8.
- 9) 水谷正寛: 生殖・発生毒性試験の実際. In: 毒性試験講座11発生毒性. ed. by谷村孝. 地人書館, 東京, pp. 143-67 (1992)