

発達神経毒性の欧米での評価状況及び *in vitro* 発達神経毒性試験の検討状況調査

藤原愛仁

独)農林水産消費安全技術センター 農薬検査部

発達神経毒性試験は 1998 年に米国でテストガイドラインが導入されて以降、農薬の評価に活用されるようになり、2007 年には OECD からガイドライン「TG426」が発出されています。我が国では 30 消安第 6278 号農林水産省消費・安全局長通知の発行に伴い、2019 年度より農薬の登録申請において要求条件を満たした場合に提出すべき資料として位置づけられています。TG426 は主にラットを用いる *in vivo* 試験ですが、近年、国際的に、毒性試験全体をとおして、可能な限り *in vivo* 試験を *in vitro* 試験で代替しようとする機運が高まっています。そうしたなか、2017 年から EFSA を中心に DNT の *in vitro* 試験法の開発及び *in vitro* 試験を用いた評価法の確立に向けた検討が進められています。

先行して発達神経毒性の評価を導入している欧米における評価状況を、神経毒性作用を有する化学物質を対象を絞って調査・分析した結果、その評価の難しさが明らかになりました。また、*in vitro* 試験の検討状況について調査・分析した結果、現在の発達神経毒性の評価にはいくつかの課題があること、その課題解決の具体策がヒト由来細胞を用いた *in vitro* 発達神経毒性試験法の開発であること、その開発は有害性発現経路の解明を重要視しつつ統合的毒性評価のアプローチに基づき進められていること、及び、ヒト由来細胞を用いた *in vitro* 発達神経毒性試験法の確立・活用が間近であることが明らかとなりました。

Keywords ; 発達神経毒性, DNT, IATA, AOP, *in vitro*, 試験バッテリー

緒言

胎児・乳幼児・子供の神経発達に関するリスク評価を導入・実行するにあたり、既に評価法が導入されている欧米の状況を把握することが重要です。そこで本調査では、まず大まかな全体像を把握するため、農薬の評価を行っている欧米当局のウェブサイトにて公表されている評価書の情報から、発達神経毒性試験の評価状況を調査しました。次に、ヒト由来細胞を用いた *in vitro* 試験バッテリーの内容を調査しました。

1. はじめに

1.1. 発達神経毒性の概要

DNT (Developmental Neurotoxicity ; 発達神経毒性) とは、重金属や化学物質等の暴露による、胎児期あるいは生後発達期の神経系の構造及び機能に対する有害影響と定義されています。メチル水銀による胎児性水俣病やエタノールによる発達障害は、その例としてよく知られています。最近、LD (学習障害)、ADHD (注意欠陥・多動性障害)、自閉症等の疾病を有する児童が増加していると報告されています。また、子供のいじめ、ひきこもり、自殺等の心の問題は社会問題となっています。これらの原因については明らかにならず、その原因のひとつに身の回りの化学物質の暴露による DNT が疑われています。

1.2. 欧米における規制状況

米国では、FQPA (Food Quality Protection Act of 1996 ; 食品品質保護法) に基づき食品中の残留農薬の幼児・子供への健康影響を配慮し、出生前出生後の影響がないという信頼できる完全なデータがない場合には通常の安全係数 100 に対してさらに 10 倍の安全率を適用する等の措置をとることとしています。欧州においては、規則 No 1107/2009 の Annex II にて脆弱な特定グループの保護、及び、DNT のような重大な影響に対する追加の安全率適用の必要性を明記しています。このように、DNT が重要な課題のひとつとして捉えられていることがうかがえます。

そのため、農薬の DNT に関するテストガイドラインとして、1998 年に米国 EPA (Environmental Protection Agency ; 環境保護庁) により OPPTS 876.6300 が制定されました。2007 年には、OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development ; 経済協力開発機構) により TG426 が制定されています。ともに、実験動物を用いる *in vivo* 試験です。

OECD TG426 は、基本的に OPPTS 876.6300 を踏襲していますが、投与期間延長、新生児に対する各検査項目のサンプル数増加等、細部にわたり改善が加えられています。概要を表 1 に示します。

表1. OECD TG426 の概要

動物種	ラットが望ましい
暴露期間	妊娠および授乳期間中
評価項目	妊娠期間および出産結果. 身体的および機能的成熟. 中枢および末梢神経系の作用による行動変化. 脳重量および神経病理学的検査.

OPPTS 870.6300 又は OECD TG 426 に準拠して DNT 試験が実施された農薬のうち、その試験成績が審査当局に提出されたものは、米国において 2006 年段階で 69 有効成分²⁾、欧州において 2020 年段階で 35 有効成分³⁾であると報告されています。なお、米国における 2008 年段階での承認農薬数は約 1150 有効成分[†]、欧州においては 2020 年段階で 479 有効成分³⁾とのことです。DNT 試験が網羅的に実施されていない理由は各当局の要求条件 (表 2) にありますが、「1.3. DNT 試験法の課題」で述べるように DNT 試験の実施ハードルは相当高く、これも一因となっているかもしれません。

表 2. 欧米の DNT 要求条件

米国	
根拠	40CFR Part158.500
条件	① 成獣動物を用いた試験で、投与に関連する神経学的影響 (例えば、神経毒性症状、神経病理学的所見、機能又は行動影響) が認められる場合 ② 出生前又は出生後の暴露により、発達中の動物に投与に関連する神経学的影響 (例えば、神経系の奇形、神経障害、脳重量変化、機能又は行動変化) が認められる場合 ③ ヒトの疫学的研究において、暴露と神経学的悪影響との間に因果関係が認められる場合 ④ 神経系の発達に悪影響を及ぼすメカニズムを有すると考えられる場合 (既知の神経毒性物質との構造活性相関)
欧州	
根拠	規則 No 283/2013 PartA 5.6.2
条件	他の試験での観察又は作用機序から、発達神経毒性に関する補足試験又は情報が要求される場合がある。

† Cumulative Assessment of Risk from Pesticides
<https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/cumulative-assessment-risk-pesticides>

1.3. DNT 試験法の課題

DNT 試験法の課題として、以下の指摘がなされています。

- ・試験方法が複雑であり、煩雑な側面を有し、試験実施機関の現場にとっては多大な労力が要求される²⁾。
- ・化学物質の高濃度暴露による中毒だけが子供たちの脳発達に対する懸念を引き起こすのではなく、特に化学物質の混合物の低濃度暴露もまた、現在観察される神経発達上の障害の発病率増加に貢献していると考えられている。そのため、より多くの農業及び化学物質に対して DNT 試験を実施すべきであるが、以下の理由のために現在の DNT ガイドライン試験ではその実行性は乏しい³⁾。

- ①試験コストが膨大である (1 年/化合物、最高で €1.000.000)。
 - ②1 つの化合物を試験するために約 140 匹の雌親と 1000 匹の児動物が必要とされるため倫理的に疑わしい。
 - ③方法論、評価および規制において不確実性がある。
 - ④ヒトと齧歯動物との間の発達のタイミングや薬理/毒性動力学の違いのため、ヒトの脳の防御に対する予測性は疑わしい。
- ・子供たちの脳を保護するため、ヒトに関連し、より速く、より安く、正確な DNT 評価を可能とする試験法が、現在の DNT ガイドライン試験の代わりに必要である³⁾。

このような状況のなか、2017 年より、OECD においてヒト由来細胞を用いた DNT *in vitro* 試験バッテリー開発プロジェクトが EFSA (European Food Safety Authority; 欧州食品安全機関) を中心に進行しています。

2. DNT 試験の欧米における評価状況

2.1. 調査対象

大まかな全体像を把握するため、神経毒性作用を有する化学物質を対象を絞って調査しました。具体的には、IRAC (Insecticide Resistance Action Committee; 殺虫剤抵抗性対策委員会) の作用機構分類体系⁴⁾に基づき、有機リン系、カーバメート系、有機塩素系、ピレスロイド系、フェンピラゾール系、DDT、ネオニコチノイド系、スピノシン系、アベルメクチン系、ネライストキシシン類縁体、ジアミド系及びその他の 174 有効成分を調査しました。

2.2. 調査結果

米国で評価書が公表されている 95 有効成分のうち、毒性参照用量の設定根拠になっているものは 6 有効成分、不確実係数の追加等の根拠になっているものは 22

有効成分、他の試験に比べて毒性が弱い又は DNT なしと結論付けられたものは 34 有効成分、審査当局に DNT 試験が提出されていないものは 33 有効成分でした⁹⁾。

欧州で評価書が公表されている 67 有効成分のうち、毒性参照用量の設定根拠になっているものは 8 有効成分、不確実係数の追加等の根拠になっているものは 5 有効成分、他の試験に比べて毒性が弱い又は DNT なしと結論付けられたものは 15 有効成分、審査当局に DNT 試験が提出されていないものは 39 有効成分でした⁹⁾ (図 1)。

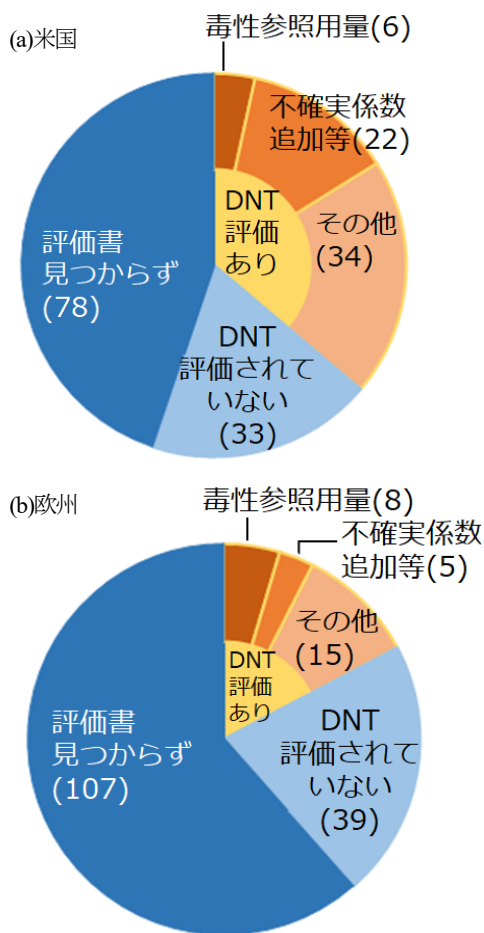


図 1.174 有効成分の欧米の DNT 評価状況。
括弧内の数字は有効成分の数を示す。

公表されている評価書の具体的な内訳を表 3 にまとめました。

表 3. 評価書が発見できた有効成分と分類

米国	
分類	有効成分名
毒性参照用量の設定根拠になっているもの	(有機リン系) クロルピリホス
	(ネオニコチノイド系) アセタミプリド, チアメトキサム
	(ジアミド系) フルベンジアミド
	(その他) ピメトロジン, スルホキサフル
不確実係数の追加等の根拠になっているもの	(有機リン系) アセフェート, クロルエトキシホス, クロルピリホスメチル, クマホス, ダイアジノン, ジクロルボス, ジクロトホス, ジメトエート, エトプロホス, フェニトロチオン, イソフェンホス, マラチオン, メビンホス, ナレド, ホレート, ホスメット, ピリミホスメチル, プロフェノホス, テブピリムホス, レトラクロルピンホス, トリクロルホン
	(その他) アミトラズ
他の試験に比べて毒性が弱い又は DNT なしと結論付けられたもの	(有機リン系) アジンホスメチル, ジスルホトン, EPN, フェナミホス, メタミドホス, パラチオンメチル, テルブホス
	(カーバメート系) アルジカルブ, カルバリル, カルボフラン
	(フェンピラゾール系) フィプロニル
	(ピレスロイド系) アレスリン, α -シペルメトリン, β -シフルトリン, ビフェントリン, シフルトリン, シペルメトリン, デルタメトリン, エトフェンプロックス, フェンプロパトリン, フルメトリン, γ -シハロトリン, λ -シハロトリン, トランスフルトリン, ζ -シペルメトリン
	(DDT) DDT
	(ネオニコチノイド系) クロチアニジン, ジノテフラン, イミダクロプリド, チアクロプリド

	(アルベメクチン系) アバメクチン, エマメクチン
	(その他) フルピラジフロン, インドキサカルブ, メタフルミゾン
審査当局にDNT試験が提出されていないもの	(有機リン系) ホスチアゼート, メチダチオン, オキシジメトンメチル, ホサロン, プロペタムホス, テメホス
	(カーバメート系) メチオカルブ, メソミル, オキサミル, プロポキスル, チオジカルブ
	(フェンピラゾール系) エチプロール
	(ピレスロイド系) シフェノトリン, エスフェンバレレート, イミプロトリン, ペルメトリン, フェノトリン, プラレトリン, ピレトリン, レスメトリン, ϵ -フルバリネート, テフルトリン, テトラメトリン, トラルロメトリン
	(スピノシン系) スピネトラム
	(ジアミド系) クロラントラニリプロール, シアントラニリプロール, シクラニリプロール, テトラニリプロール
	(その他) アフィドピロベン, プロフラニリド, フロニカミド, ピリフルキナズン
欧州	
分類	有効成分名
毒性参照用量の設定根拠になっているもの	(フェンピラゾール系) フィプロニル
	(ピレスロイド系) α -シペルメトリン, β -シペルメトリン, シペルメトリン
	(ネオニコチノイド系) アセタミプリド, イミダクロプリド
	(アベルメクチン系) アバメクチン
	(ジアミド系) フルベンジアミド

不確実係数の追加等の根拠になっているもの	(有機リン系) クロルピリホス, クロルピリホスメチル, ジメトエート, エトプロホス
	(カーバメート系) メチオカルブ
他の試験に比べて毒性が弱い又はDNTなしと結論付けられたもの	(有機リン系) フェナミホス, マラチオン, メタミドホス
	(カーバメート系) カルバリル
	(ピレスロイド系) β -シフルトリン, ビフェントリン, エトフェンプロックス, λ -シハロトリン, ζ -シペルメトリン
	(ネオニコチノイド系) クロチアニジン, チアクロプリド
	(アルベメクチン系) エマメクチン
	(その他) フルピラジフロン, インドキサカルブ, メタフルミゾン
審査当局にDNT試験が提出されていないもの	(有機リン系) カズサホス, ダイアジノン, ジクロロボス, フェニトロチオン, フェンチオン, ホスチアゼート, オキシジメトンメチル, パラチオン, パラチオンメチル, ホサロン, ホスメット, ピリミホスメチル, テブピリムホス, トリクロルホン
	(カーバメート系) ベンフラカルブ, カルボフラン, カルボスルファン, ホルメタネート, メソミル, オキサミル, ピリミカーブ, チオジカルブ
	(有機塩素系) エンドスルファン
	(ピレスロイド系) アクリナトリン, シフルトリン, デルタメトリン, エスフェンバレレート, γ -シハロトリン, ペルメトリン, ピレスリン, ϵ -フルバリネート, テフルトリン
	(ネオニコチノイド系) チアメトキサム
	(スピノシン系) スピネトラム

(ジアミド系) クロラントラニプロール, シアン トラニプロール, シクラニプロ ール
(その他) フロニカミド, ピメトロジン

本調査により、米国と欧州とで評価結果は一致しておらず、DNT 評価に対するアプローチの段階からすでに明白な差異が現れているものもある、ということがわかりました。また、不確実性を残していることから不確実係数を追加しているものも散見されました。このことについて以下にまとめます。

① 有機リン系

EPA では、2015 年に有機リン系農薬の疫学調査の文献レビューを行った結果を公表しており、胎児や子供に発達神経学的影響が認められることを示唆していると結論付け、種差 10、個体差 10 による安全係数 100 に加えて FQPA からの 10 倍の不確実係数を追加する、と決定されました⁷⁾。また、本調査時点で、DNT 試験により FQPA からの追加の不確実係数 10 倍が見直された事例はありませんでした。よって、疫学調査の文献レビュー及び DNT 試験の両視点から不確実性を残している状態です。

EFSA においては、EPA のような包括的な検討はなされていません。例えば、2018 年、エトプロホスの再評価ではその不確実性から 2 倍の不確実係数が追加されました。2019 年、クロルピリホスの再評価においては証拠不足により安全性を担保できないと結論付けられ、後に登録失効となっています。

② カーバメート系

EPA では、2007 年に提出されている 3 つの N-メチルカーバメート系農薬（アルジカルブ、カルバリル、カルボフラン）の DNT 試験と CCA (comparative cholinesterase assay; 比較コリンエステラーゼ分析) のレビューを行った結果を公表しており、CCA が DNT 試験よりも感度が 10～100 倍高い、と決定されました⁸⁾。そのため、メチオカルブ、メソミル、オキサミル、プロボキスル、チオジカルブの再評価において、CCA が要求されており、DNT 試験は要求されていません。なお、カーバメート系や有機リン系農薬の DNT 試験では、コリンエステラーゼ活性阻害が有力な指標として評価されていますが、その他の農薬においては自発運動量、学習・記憶能力、聴覚性驚愕、脳重量、脳計測病理など様々です²⁾。

EFSA においては、EPA のような包括的な検討はなされていません。カルバリル及びメチオカルブのみ DNT の評価が行われています。2006 年、カルバリルにおいては発達神経毒性はないとの結論である一方、2018 年、メチオカルブの再評価においては DNT に関する情報不足をカバーするために 10 倍の不確実係数が追加されました。

③ ピレスロイド系

EPA では、2010 年に提出されている 6 つのピレスロイド系農薬（ビフェントリン、シフルトリン、シハロトリン、シベルメトリン、フェンプロパトリン、デルタメトリン）の DNT 試験のレビューを行った結果を公表しており、DNT はピレスロイド系農薬のリスク評価において感度の高いエンドポイントではなく、同様の影響は他のガイドライン試験でも認められること、また 6 つの DNT 試験で結果が類似しており、これらの DNT 試験から得られた結論は他のピレスロイド系農薬にも適用できる十分な情報があるとみなせるため、他のピレスロイド系農薬について DNT 試験を実施する価値はほとんどない、と決定されました⁹⁾。この決定後、ピレスロイド系農薬には DNT 試験は要求されていません（この決定前に実施された上記 6 有効成分以外の DNT 試験は存在します）。

EFSA においては、DNT の可能性を確かめる試験が行われるべきとの姿勢がとられています。例えば、2018 年、シベルメトリンの再評価では DNT 試験を評価し、DNT 試験を根拠に ADI, ARfD, AOEL が下方修正されました。

④ ネオニコチノイド系

EPA では、申請された有効成分はすべてにおいて DNT 試験が評価されています。そのうち、2017 年、アセタミプリド、チアメトキサムの再評価では DNT 試験を根拠に aRfD が設定されています。

EFSA においては、2012 年に「アセタミプリドおよびイミダクロプリドは、発達過程のヒトの脳に悪影響を与える可能性がある」とする論文¹⁰⁾が公表されたことを受け、2013 年に既存 DNT 試験を改めて精査し、ヒトの神経系への影響を再評価しました。発端となった論文は規制決定のためには証拠不十分としつつも、既存 DNT 試験の再評価により毒性参照用量を下方修正すべきと結論付けられました¹¹⁾。

⑤ 個別具体例

・アバメクチン

EPA では、2017 年の再評価の際、ラットで DNT 影響が観察されたがこれは出生後 28 日まで P-グリコブ

ロテインが十分に発達しないことによる影響であり、ヒトは胎児期に P-グロブリンが十分に発達するため、ヒトにおいては DNT の影響は予期されないと評価されました。

EFSA においては、2020 年の再評価の際、DNT LOAEL を 0.12 mg/kg bw/day と評価し、これを根拠に ADI, ARfD, AOEL が下方修正されました。

・アセタミプリド

EPA では、2017 年の再評価の際、DNT NOAEL を 10 mg/kg bw/day と評価しました。

EFSA においては、2016 年の再評価の際、DNT NOAEL を 2.5 mg/kg bw/day と評価しました。

・ピフェントリン

EPA では、2020 年の再評価の際、DNT NOAEL を 3.6 mg/kg bw/day と評価しました。

EFSA においては、2011 年の再評価の際、DNT はないと評価しました。

2.3. 考察

以上の調査結果は、DNT 試験を適切に実施すること、及び、得られたデータを適切に評価することが非常に難しいことを示すとともに、DNT 評価において十分な信頼性を有した評価体系が構築されていないことも示していると考えます。OECD TG426 内においても、試験デザイン、統計解析およびデータの生物学的意義が相互に複雑に関連しているため、DNT データの適切な解釈には専門的判断が必要である、と言及されています。また、先述のとおり、既存の DNT 試験は申請される有効成分において網羅的に実施されておらず、今回の調査対象以外を含めた有効成分総数に対して換算すると、既存の DNT 試験の実施割合は小さいです。言い換えますと、その事例が少ない。これもまた既存の DNT 試験データの解釈を困難にしている要因と考えられます。これらから、「既存の DNT 試験」のみに基づく DNT 評価には大きな不確実性があるのではないかと考えられます。

3. DNT *in vitro* 試験の検討状況

3.1. 背景

EFSA の PPR パネル (Panel on Plant Protection Products and their residues ; 植物保護製剤及びそれらの残留物に関する科学パネル) は、アセタミプリドの再評価において、DNT 試験には不確実性が残っており、この不確実性をはっきりさせるべきである、と強調しました。さらに、OECD TG426 に含まれる *in vivo* 分析と相補的に統合された *in vitro* 神経毒性試験戦略の開発を推奨

しました¹¹⁾。また、近年、国際的に、毒性試験全体をとおして、可能な限り *in vivo* 試験を *in vitro* 試験で代替しようとする機運が高まっています。このような状況のなか、2017 年より、OECD の WNT (Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines; テストガイドラインプログラム各国調整官作業グループ) において、DNT *in vitro* 試験バッテリー開発プロジェクトが EFSA を中心に進められています¹²⁾。

3.2. IATA アプローチ

DNT *in vitro* 試験法の開発・検討について調査した結果、IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment; 試験及び評価のための統合的手法) 及び AOP (Adverse Outcome Pathway ; 有害性発現経路) の概念を積極的に取り入れていることがわかりました。

IATA とは、化学物質の毒性等を総合的に評価するために使われるアプローチです。より具体的に表現すると、ハザード及びリスクに関する規制上の意思決定に必要な情報を得るために、複数の情報源 (物理化学的性状、*in silico*、グループ化と類推、*in vitro*、*in vivo*、ヒトのデータ) からのデータの組み合わせに基づき、全ての関連する既存の証拠の統合及び重み付けにより反復的に評価を行うアプローチと説明でき、必要な場合には、新たに生成すべきデータの絞り込みにも役立てることができます¹³⁾。

AOP とは、化学物質の曝露によって引き起こされる分子レベルの反応から最終的な有害性発現に至るまでの経路であり、毒性発現メカニズム解明の基礎となります。AOP の概念は、以下のことを可能とします。

- 利用可能な既存の情報の体系的な評価を行うこと
によって、既存の情報からハザードに関して結論付ける可能性がある。
- 特定のハザードの根拠に関して信頼レベルを上昇させるためにどのようなタイプの情報が必要か同定して、作成する。
- 繰り返しプロセスの中で、規制決定のためにどの情報が必要かを示唆する。

そのため、AOP/IATA を発展させる枠組みに適用できると考えられています¹⁴⁾。

AOP を適用した IATA の枠組みを図 2 に示します。

in vitro 試験法が開発されることで AOP 情報が更新され、証拠の重みが増し、IATA の枠組みにおける評価の信頼性が向上することが期待されます。これを実現することが *in vitro* 試験法開発の目的である、と捉えることができます。

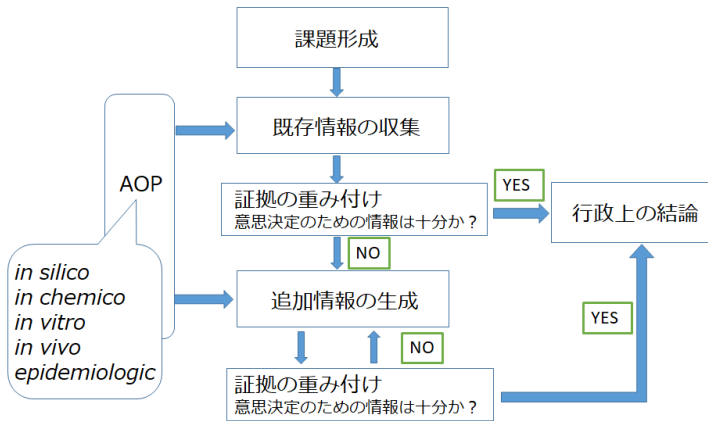


図2. AOP を適用した IATA の枠組み (引用文献 14 掲載の図を基に作成)

3.3. DNT *in vitro* 試験バッテリー

2017 年から OECD の WNT にてヒト由来細胞を用いた *in vitro* 試験のガイドライン化の検討が進められており、(2020 年時点からみて) 数年以内にガイダンスが発出される予定です。また、検討の進捗の都度、報告書が公開されています。本調査時点においては、哺乳類の胎児期と出生後の脳発達にとって不可欠な鍵となる神経発達上のプロセスを調べることができる、信頼性の確認された 8 種類の *in vitro* 試験をバッテリー (一連の試験) として組み合わせて実施することで神経発達過程への影響を評価できるとの想定が公開されています³⁾。具体的には増殖のプロセスへの影響を確認するための NPC1、移動のプロセスへの影響を確認するための NPC2 と UKN2、分化のプロセスへの影響を確認するための NPC3 と NPC5、神経突起伸長のプロセスへの影響を確認するための NPC4 と UKN4 と UKN5 の組み合わせが紹介されます。概略を図 3 に示します。

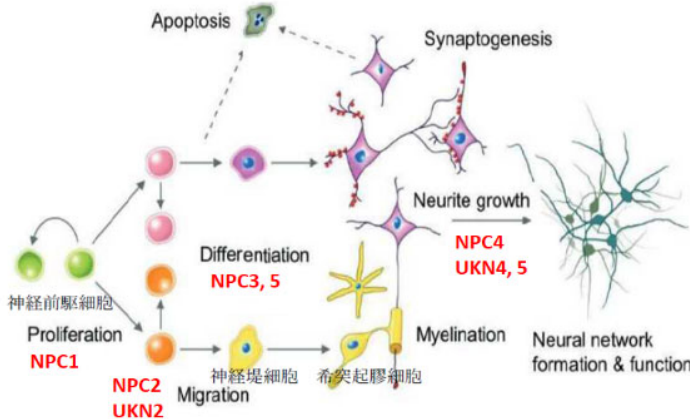


図3. DNT *in vitro* 試験バッテリーの概略 (引用文献 15 掲載の図を基に作成)

以下、各試験の詳細を記載します。

① NPC1

英名：Primary hNPC proliferation assay

和訳：初期 hNPC (ヒト神経前駆細胞) 増殖分析試験システム

- Lonza Verviers SPRL (Verviers, Belgium) から購入した 4 人の男性由来 hNPC (Lot no.: 0000391398 (GW19), 0000549062 (GW16), 0000516385 (GW16), 0000553745 (GW16)) を使用。
- 種々増殖因子を加えた増殖媒体 (B27) の中で、ヒト NPC は浮かぶ神経球として培養される。
- 培養は、37°C, 5% CO₂ pH 7.2-7.6 で 72 時間維持される。
- 96 ウェル U-底プレートで、条件毎に 5 つのウェルを用い、7 濃度の連続希釈 (1:3) と溶媒コントロール (SC) で、各化合物は試験される。
- また、以下のコントロールを設ける。
 - 陽性コントロール (PC; 成長因子を除いた B27 媒体)
 - BrdU 背景コントロール (BGBrDU; BrdU 標識化試薬を追加しない B27 媒体)
 - 溶解コントロール (LC; 分析終了の 30 分前に溶解した細胞)
 - 背景コントロール (BG; 細胞を加えない B27 媒体)
- 各球のサイズは、高内容画像形成装置 (ArrayScan VTI; Thermo Fisher Scientific) を用いて brightfield 顕微鏡検査によって毎日測定され、ピクセル領域の増加は、間接的な細胞増殖測定として計算される。
- 56 時間後、BrdU 標識化溶液が加え、細胞増殖の指標として、DNA 合成 (BrdU 結合として) が測定される (Cell Proliferation ELISA)
- 一般的な細胞毒性 (膜完全性) と細胞生存能力 (ミトコンドリア活動) に対する影響を評価するために、72 時間後、乳酸脱水素酵素 (LDH) 分析 (CytoTox-ONE membrane integrity Assay; Promega) 及び alamar blue (CTB) 分析 (CellTiter-Blue Assay; Promega) が、それぞれ実行される。

エンドポイント評価

- 領域による増殖 (NPC1a) : 0h, 24h, 48h と 72h の球サイズ増加 (ピクセル量)
- BrdU による増殖 (NPC1b) : BrdU 結合を化学ルミネセンス信号 (相対的な発光単位) として測定
- 生存能力 : resorufin へと減少した resazurin の量を計ることによるミトコンドリア活動として評価
- 細胞毒性 : resorufin への LDH 依存的 resazurin の減少測定による膜完全性として評価

② NPC2

英名：Primary hNPC migration assay

和訳：初期 hNPC 移動分析

試験システム

- NPCを試験実施前に培養液中に少なくとも3~4週間保つ。
- 直径 0.3mm の球がランダムに選択され試験に用いられる。
- 96 ウェル平底プレートの分化媒体 (N2) の中に入る。
- 72 時間, 37°C, 5%CO₂, pH 7.2~7.6 に保つ。
- NPCs は 5 日間移動して, それによって放射神経膠細胞, ニューロン, 希突起膠細胞及び星状細胞に分化する。
- 条件毎に 5 つのウェルを用い, 各化合物は 7 濃度の連続希釈 (1:3) と溶媒コントロール (SC) で試験される。
- また, 以下のコントロールを設ける。
溶解コントロール (LC; 分析終了の 45 分前に溶解した細胞)
背景コントロール (BG; 細胞を加えない B27 媒体)
- 直径 0.3mm の球がランダムに選択され試験に用いられる。
- 処理 72 時間後, 高内容画像形成装置を用いて brightfield 顕微鏡検査で放射神経膠細胞移動 (NPC2a) を測定。
- 72 時間後, 細胞は, 試験溶液の半分を新たに用意された試験溶液と入れ替える
- 除かれた媒体は, LDH 分析で細胞毒性を評価。
- プレートは, 48 時間, 37°C, 5%CO₂ で維持。
- 120 時間後, 細胞毒性分析と一般的な細胞生存能力に対する影響を評価するための alamar blue (CTB) 分析を実施し, 免疫細胞化学的 (ICC) 染色のために 4%のバラホルムアルデヒドで固定して終了。

エンドポイント評価

- 移動距離放射神経膠 (NPC2a) : 72 時間後, brightfield イメージ上で, 球のコアから放射移動を手動で測定
- 移動距離放射神経膠 (NPC2a) : 120 時間後, 蛍光イメージ上の Hoechst で染色した核の各球の移動領域を自動的に確認することによって評価
- 移動距離ニューロン (NPC2b) : 球のコアの端から各ニューロンの位置へのすべてのニューロンの平均距離
- 移動距離希突起膠細胞 (NPC2c) : 球のコアの端から各希突起膠細胞の位置へのすべての希突起膠細胞の平均距離
- 細胞数※ : 120 時間後の各球からの蛍光イメージ上

で検出された移動エリアの Hoechst 陽性対象の数として測定

- 生存能力 (移動/分化) ※ : マルチプレートリーダーの蛍光信号 (相対的な蛍光単位) として resorufin へと減る resazurin の量を計ることによるミトコンドリア活動として評価
- 細胞毒性 (移動) ※ : マルチプレートリーダーの蛍光信号として, resorufin への resazurin の LDH 依存的な減少を測定することによる膜完全性として評価
- 細胞毒性 (移動/分化) ※ : マルチプレートリーダーの蛍光信号 (相対的な蛍光単位) として, resorufin への resazurin の LDH 依存的な減少を測定することによる膜完全性として評価

③ NPC3

英名：Primary hNPC neuronal differentiation assay

和訳：初期 hNPC 神経細胞分化分析

試験システム

- ②と同じ。

エンドポイント評価

- ニューロン分化 (NPC3) : 分化 120 時間後の移動地域の中の Hoechst 陽性核の量のパーセントで, 全ての TUBB3 陽性細胞数として検出
- ②の※も評価。

④ NPC4

英名：Neuronal morphology (neurite number, average and total neurite length, neurite branching) of young neurons differentiated from fetal hNPC

和訳：ヒト胎児神経前駆細胞から分化した若いニューロンの形態学 (神経突起数, 平均/総神経突起長, 枝分かれ)

試験システム

- ②と同じ。

エンドポイント評価

- 神経突起の長さ (NPC4) : あらかじめ定義された閾値に到達する各ニューロンの骨格化に基づき, μm で神経突起の長さとして評価
- 神経突起エリア (NPC4) : 骨格化された各ニューロンに対するピクセルの量の領域として評価
- ②の※も評価。

⑤ NPC5

英名：Oligodendrocyte differentiation

和訳：希突起膠細胞の分化

試験システム

- ・②と同じ。

エンドポイント評価

- ・希突起膠細胞分化 (NPC5) : 分化 120 時間後の移動地域の中のすべての Hoechst 陽性核の量のパーセントで、O4 陽性細胞数として検出
- ・②の※も評価。

⑥ UKN2

英名 : The cMINC neural crest cell migration assay

和訳 : cMINC 神経堤細胞移動分析

試験システム

- ・神経堤細胞 (NCCs) は、ヒト誘導多能性幹細胞 (hiPSC) から以下の条件で分化される。
- ・10 μ M Rock 抑制剤と 10ng/ml FGF2 を含んでいる調整された KCM に、20 000 細胞/cm² の密度で、Matrigel をコートした 6-ウェルプレートに hiPSC を再接種することによって、NCCs の生成は分化の 3 日前 (DoD-3) に始められる。
- ・DoD -3 から DoD11 までの細胞は、24h 後、毎日媒体を交換して、37°C、5%CO₂ で培養される。
- ・DoD11 から DoD39 までの細胞は 37°C、5%CO₂ で培養され、毎週の分割によって広げられる。
- ・細胞は更なる使用まで液体窒素中に保管される。
- ・UKN2 分析は以下の条件で実行される。
- ・移動-1 日目 (DoM-1) に解凍されて、96 ウェルプレートのストッパーの周囲へ接種される。
- ・24 時間後、ストッパーは取り外される。
- ・DoM1 において、細胞は被験物質に 24h 暴露される。
- ・DoM2 において、H-33342 と calcein -AM で染色され、高内容画像顕微鏡を用いて生存能力と移動を評価するために画像化される。

エンドポイント評価

- ・移動抑制 : ストッパー除去の 48 時間後と化合物処理開始 24 時間後、無細胞領域へ移動した細胞の数を定量化して評価される。
- ・細胞生存能力 : 同じウェルの移動領域の外側で測定される。

⑦ UKN4

英名 : The NeuroTox neurite outgrowth of CNS neurons test

和訳 : 中枢神経系ニューロンの神経突起伸長試験

試験システム

- ・Lund human mesencephalic (LUHMES)細胞を使用。
- ・分化 0 日目 (DoD0), 分化プロセスを活性化させるために、テトラサイクリンを含有する媒体に交換さ

れる。

- ・DoD2, 細胞は 96 ウェルプレートに接種される。
- ・付着 1 時間後、被験物質を 24 時間暴露。
- ・H-33342 と calcein-AM で染色され、高内容画像顕微鏡によって画像化される。

エンドポイント評価

- ・神経突起伸長 : 被験物質暴露 24 時間後、自動化したアルゴリズムで神経突起領域を特定して評価。
- ・細胞生存能力 : 自動化したアルゴリズムで H-33342 単独にポジティブな細胞 (すべての細胞) に対する H-33342 と calcein にダブルポジティブな細胞 (生存細胞) の数を特定して評価。

⑧ UKN5

英名 : The PeriTox neurite outgrowth of neural crest cell test

和訳 : 神経堤細胞の末梢神経系における神経突起伸長試験

試験システム

- ・hiPSC ライン SBAD2 を知覚ニューロンへ分化させる。
- ・知覚ニューロンへ分化した細胞は、使用まで液体窒素中に保管される。
- ・解凍細胞は、96 ウェルプレートに接種 1 時間後、被験物質に 24 時間暴露される。
- ・H-33342 と calcein-AM で染色されて、高内容画像顕微鏡によって画像化される。

エンドポイント評価

- ・⑦と同じ。

○評価方法

コントロール、生存能力や細胞毒性との比較で、被験物質は「特異的 DNT ヒット」、「非特異的」、「境界線」、「ヒットなし」に分類される。

「特異的 DNT ヒット」: DNT 作用あり。

「非特異的」: DNT 作用はないが、細胞毒性がある。

「境界線」: 上記 2 つのどちらに分類するかがはっきりしない (多くの偽陰性を生み出さないための手段として重要)

「ヒットなし」: 毒性検出されず。

3.4. まとめ

現在開発中のヒト由来細胞を用いた DNT *in vitro* 試験バッテリーは、*in vivo* 試験の神経病理学的検査と相補的であると思われます。また、各試験に重複性はないことが確認されているので、8 種類全ての試験を実施することでより信頼性の高い神経発達過程への影

響評価が可能である、とのことです。さらに、条件検討の結果、DNT ハザードについて十分に特性が明らかにされた化合物で評価した場合、バッテリーの性能は感度が 82.7%、特異性は 88.2%であり、DNT ハザード特定の非常に期待できるアプローチである、と最新の報告書はまとめています³⁾。ただし、*in vitro* 試験濃度を *in vivo* 暴露量へ変換する手法の開発の必要がある等の課題も残されています。

4. 新試験法の活用

ヒト由来細胞を用いた DNT *in vitro* 試験バッテリーをどのように評価に組み込むかは定まっていますが、IATA に基づいて開発すると明記されていることや AOP を適用した IATA の枠組みが OECD で重要視されていることから、以下のような活用例が考察できます。

4.1. Tier 制の評価

Tier 制の評価シナリオの検討が最新の報告書で紹介されています³⁾。

Tier1：毒性動態学モデル

物理的・化学的性状や特定のタンパク質との反応といった情報から、発育中の脳へ暴露するかどうかを判断する。確実に否定できればさらなる考慮の必要はない。確実に否定できない場合は Tier2 へ進む。

Tier2：ヒト *in vitro* 試験バッテリー

ヒト由来細胞を用いた DNT *in vitro* 試験バッテリーを実施して特異的 DNT ヒットを示すかどうかを判断する。確実に否定できれば DNT の懸念はない。確実に否定できない場合は Tier3 へ進む。

Tier3：ラット *in vitro* 試験

Tier2 で最も敏感であった試験を、今度はラット由来細胞を用いて実施し、特異的 DNT ヒットを示すかどうかを判断する。特異的 DNT ヒットを示さなければここまでの情報を根拠として総合的に評価する。特異的 DNT ヒットを示す場合は Tier4 へ進む。

Tier4：ラット *in vivo* 試験

OECD TG426 を実施し、すべての結果を総合的に評価する。

Tier1 及び Tier2 はスクリーニングの意味合いが強いと言えるかもしれません。また、Tier2 のヒト由来細胞を用いた DNT *in vitro* 試験バッテリーを実施することで完全に危険性なしと評価できれば、現状と比べ、ヒトに関連し、より速く、より安く、科学的根拠を基に評価を終了することができます。ヒト由来細胞を用いた DNT *in vitro* 試験バッテリーは強力なスクリーニングツールと言えるのかもしれません。

一方、ヒト由来細胞を用いた DNT *in vitro* 試験バッテリーを実施した結果、危険性ありとなった場合は、どれだけ時間とコストをかけても、危険性をできる限り詳しく調べないといけないうので、ラットを用いた試験を実施することになります。また、ヒトとラットでは神経の発達のタイミングなどは完全には一致しないこと、薬理的にヒトとラットで同じ悪影響がでるとは限らないことから、*in vivo* 試験を実施するか否かを科学的根拠を基に判断するために Tier3 が設けられています。

なお、毒性動態学モデルの構築、及び、ラット *in vitro* 試験の条件検討は完了しておらず、その進捗が待たれます。概略を図 4 に示します。

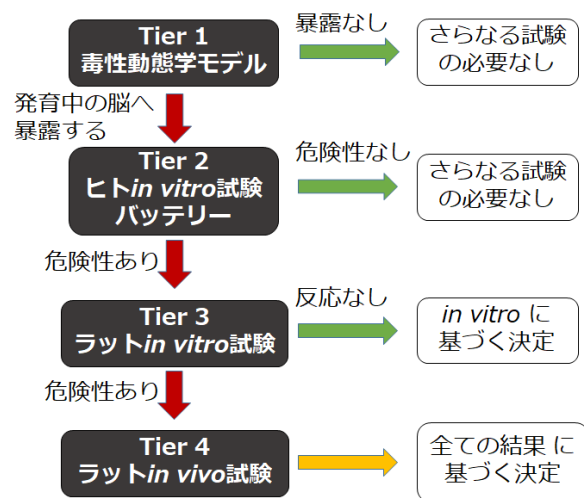


図 4. Tier 制の評価の概略
(引用文献 3 掲載の図を基に作成)

まとめますと、この Tier 制評価を行うことで、複数の情報源を組み合わせ、証拠の重み付けを行い、新たなデータの必要性を決定し、規制上の意思決定に至ることとなります。つまり、IATA に基づいた評価シナリオであると考えられます。

なお、この Tier 制評価はあくまで 2020 年時点において OECD が提案するシナリオの 1 つでしかありません。正式に運用される際には、そのかたちを変えている可能性は十分にあり、また、実際にはケースバイケースで柔軟に評価が行われるだろうと予測できます。例えば、Tier2 ないし Tier3 までの情報を用いて AOP を構築し、場合によっては「リードアクロス (類推)」(後述参照) も用いて十分な証拠の重みを有した信頼性の高い毒性考察を審査当局に提出することが可能となるかもしれません。これにより、ラット DNT *in vivo* 試験を実施することなく評価が完了すれば、評価の信頼性を十分に確保しつつ動物実験の削減及びコストカットも併せて実現するのではないのでしょうか。

また、仮に Tier4 に進んだとしても、*in vitro* 試験で得られたデータも活用することで、闇雲に *in vivo* 試験を実施するよりも、効率的かつより精度の高い評価ができるのではないのでしょうか。具体的には、Tier3 までの情報を基に、ある特定の評価項目にのみ限定した試験設計が可能となるかもしれません。これにより、スケールダウンしたラット DNT *in vivo* 試験の実施が可能となれば、評価の信頼性の向上とともに動物実験の縮小及びコストカットが実現する可能性は高いでしょう。

このように、現時点では様々なケースが想定されますが、ヒト由来細胞を用いた DNT *in vitro* 試験バッテリーの追加によって、評価の信頼性を確保しつつ動物実験の縮小及びコストカットも実現する見込みは確実に得られます。これは特に、「1.3. DNT 試験の課題」で示した「ヒトに関連し、より速く、より安く、正確な DNT 評価を可能とする試験法が、現在の DNT ガイドライン試験の代わりに必要である」という課題の解決策として有効でしょう。

4.2. DNT 試験実施済み有効成分の再評価

「2. DNT 試験の欧米における評価状況」で示したとおり、ラット DNT *in vivo* 試験の DNT データはあるが不確実性を残している農薬有効成分は散見されます。また、ネオニコチノイド系農薬で示したように、公表論文から考慮すべき懸念があると報告されたことをきっかけとして、既存の DNT 試験を再度精査した事例もあります。これら農薬有効成分の再評価の際、ヒト由来細胞を用いた DNT *in vitro* 試験バッテリーの DNT データも追加することで、より適切な結論が導かれることが期待されます。言い換えると、「3.2. IATA アプローチ」で示した評価の信頼性の向上であり、これは特に、「既存の DNT 試験」のみに基づく DNT 評価には大きな不確実性がある、という現状の問題の解決策として有効でしょう。

4.3. DNT 試験を実施していない、または、情報が限定的な物質の有害性予測

未試験化学物質の有害性を類似物質の試験データから予測することを「リードアクロス (類推)」といい、グループ化もその手法のひとつです。化学構造が類似する物質のグループ化は頻繁に行われますが、構造類似性のみを根拠としたグループ化では信頼性は十分とはみなされません。信頼性の高いグループ化を行うアプローチとして AOP に基づくことが推奨されています¹⁶⁾。ヒト由来細胞を用いた DNT *in vitro* 試験バッテリーがガイドライン化されれば、必然的にその実績が積み重なり、DNT に関する AOP 情報の蓄積速度は増加すると考えられます。つまり、グループ化に基づ

くリードアクロスの信頼性を高めるという観点からも、ヒト由来細胞を用いた DNT *in vitro* 試験バッテリーは有効でしょう。グループ化によって、より広範囲の化学物質に対して効率的かつ効果的な DNT 予測を実施できるようになれば、ごく限られた化学物質についてのみ DNT 評価が実施されている現状が改善されます。これは特に、「1.3. DNT 試験の課題」で示した「より多くの農薬及び化学物質に対して DNT 試験を実施すべき」という課題の解決策として有効でしょう。

4.4. DNT 試験要求条件の変更

ヒト由来細胞を用いた DNT *in vitro* 試験バッテリーがガイドライン化されれば、表 2 で示した DNT 試験要求条件が修正されるのは明らかでしょう。そのうえ、AOP 情報の蓄積が進めば、DNT の評価において注目すべき観点がより明確になるのではないかと考えられます。近い将来、新しい観点から DNT 試験が要求・評価されるかもしれません。DNT に関する評価方法が今後どのように変遷するにしても、身の回りの化学物質によって胎児期あるいは生後発達期の神経系が有害影響を受ける可能性がある以上、これを防ぐためのより適切なリスク評価体系の構築が望まれます。

5. おわりに

欧米において、ヒトの発達過程の毒性がリスク管理すべき問題として明示され、発達過程の神経毒性に対する評価が実施されています。しかし、適切な評価を妨げるいくつかの課題が存在し、その解決が模索されています。レギュラトリーサイエンスにおいて、試験・評価の方法を絶えず検討・更新することは必然ですが、DNT 評価の課題に対する具体的な対応策は、既存試験法の改良ではなく、ヒト由来細胞を用いた *in vitro* 試験法の開発でした。これは何を意味するのでしょうか。動物愛護のためか、コストカットのためか、メカニズム解明のためか、いずれも間違っていないでしょうが、核心は、それらを包括したうえでのより適切な評価の実現、というのが本調査を通して筆者が感じた結論です。加えて、OECD において従来の動物実験データに基づく毒性評価法そのものの抜本的な見直しが着実に進められている、といった情勢も受け取れるのではないのでしょうか。実際、先行して IATA に基づく評価法が導入されている皮膚又は眼刺激性試験においては、既存のデータを最大限利用し、資源を効率的に使い、動物実験の必要性を最小にする一方でヒトの安全を確保することが理想である、とされています。より具体的には、利用可能な情報および適切に選択した *in vitro* / *ex vivo* 試験方法の戦略的組合せの実施を強調し、さらなるデータが必要と判断される場合であっても、OECD 非採択 *in vitro* 試験法の実施も検討する

こととされており、そして、OECD 採択 *in vivo* 試験法の実施は最終手段として位置づけられています^{17), 18)}。このことから毒性評価法の国際的潮流がみてとれます。今後も国際標準の最新情報を的確に把握することが重要であると考えます。

欧米では1990年代からDNT評価の取り組みが始まっており、そのみならず、新たな評価法による評価開始目前です。一方、我が国においては、2019年3月29日付け30消安第6278号農林水産省消費・安全局長通知が発行されたことにより、要求条件を満たした場合にOECD TG426が要求されているところです。DNT評価に関して先行している欧米から、学ぶべきことや取り入れるべきことは多いと考えます。もっとも、より俯瞰的な「胎児・乳幼児・子供の保護」という観点において、欧米ではその必要性・方向性をFQPAや規則No 1107/2009 Annex IIにて明確にした上で評価を実行している一方、我が国はその必要性・方向性を示していません。この整備も併せて行うことが建設的であると考えます。そうしたなか、本稿の内容が国内における胎児・乳幼児・子供の神経発達に関する農薬のリスク評価の充実化につながれば幸いです。

引用文献

- 1) 化学物質の発達神経毒性：辻 良三 2014
https://www.jstage.jst.go.jp/article/toxpt/41.1/0/41.1_S9-1/_article-char/ja/
- 2) 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書：財団法人 残留農薬研究所 2009
<https://www.fsc.go.jp/fscis/attachedFile/download?retrievalId=cho20090140001&fileId=001>
- 3) Establishment of an a priori protocol for the implementation and interpretation of an in-vitro testing battery for the assessment of developmental neurotoxicity
doi:10.2903/sp.efsa.2020.EN-1938
<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/sp.efsa.2020.EN-1938>
- 4) IRAC作用機構分類体系 IRAC International作用機構作業部会
https://www.jcpa.or.jp/labo/pdf/2020/mechanism_irac02.pdf
- 5) EPA の評価書は下記ウェブサイトより入手可能
<https://www.regulations.gov/>
- 6) EFSA の評価書は下記ウェブサイトより入手可能
<https://www.efsa.europa.eu/en/publications>
- 7) Literature Review on Neurodevelopment Effects & FQPA Safety Factor Determination for the Organophosphate Pesticides EPA-HQ-OPP-2008-0119-0015
<https://www.regulations.gov/document?D=EPA-HQ-OPP-2008-0119-0015>
- 8) Revised N-Methyl Carbamate Cumulative Risk Assessment U.S. Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs
https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/nmc_revised_cra.pdf
- 9) Pyrethroids: Evaluation of Data from Developmental Neurotoxicity Studies and Consideration of Comparative Sensitivity EPA-HQ-OPP-2010-0378-0010
<https://beta.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPP-2010-0378-0010>
- 10) Nicotine-Like Effects of the Neonicotinoid Insecticides Acetamiprid and Imidacloprid on Cerebellar Neurons from Neonatal Rats February 2012 | Volume 7 | Issue 2 | e32432
<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?jsessionid=84D5BC055B379579B3A69609F99A9F0B?doi=10.1.1.272.2329&rep=rep1&type=pdf>
- 11) Scientific Opinion on the developmental neurotoxicity potential of acetamiprid and imidacloprid EFSA Journal 2013;11(12):3471
<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2013.3471>
- 12) 30th Meeting of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme ENV/JM/TG (2018) 25
[https://one.oecd.org/document/ENV/JM/TG\(2018\)25/en/pdf](https://one.oecd.org/document/ENV/JM/TG(2018)25/en/pdf)
- 13) GUIDANCE DOCUMENT ON THE REPORTING OF DEFINED APPROACHES TO BE USED WITHIN INTEGRATED APPROACHES TO TESTING AND ASSESSMENT ENV/JM/MONO(2016)28
[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2016\)28&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2016)28&doclanguage=en)
- 14) GUIDANCE DOCUMENT FOR THE USE OF ADVERSE OUTCOME PATHWAYS IN DEVELOPING INTEGRATED APPROACHES TO TESTING AND ASSESSMENT (IATA) ENV/JM/MONO(2016)67

[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2016\)67&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2016)67&docLanguage=En)

15) Reference compounds for alternative test methods to indicate developmental neurotoxicity (DNT) potential of chemicals: example lists and criteria for their selection and use
doi:10.14573/altex.1604201.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5250586/pdf/nihms822748.pdf>

16) グルーピングの概要 (独) 製品評価技術基盤機構
化学物質管理センター安全審査課

<https://www.nite.go.jp/data/000097924.pdf>

17) NEW GUIDANCE DOCUMENT ON AN INTEGRATED APPROACH ON TESTING AND ASSESSMENT (IATA) FOR SKIN CORROSION AND IRRITATION ENV/JM/MONO(2014)19

<https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264274693-en.pdf?expires=1629875229&id=id&accname=guest&checksum=F841CD4EA42EF1635FA74BE4251A8327>

18) GUIDANCE DOCUMENT NO 263 ON INTEGRATED APPROACHES TO TESTING AND ASSESSMENT (IATA) FOR SERIOUS EYE DAMAGE AND EYE IRRITATION ENV/JM/MONO(2017)15/REV1

[https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2017\)15/REV1&docLanguage=En](https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2017)15/REV1&docLanguage=En)

(全 URL のリンクについての確認は、2021 年 7 月 30 日に実施。)