

VICH GL33 (SAFETY: GENERAL APPROACH)
October 2002
For implementation at Step 7 - Final

**STUDIES TO EVALUATE
THE SAFETY OF RESIDUES OF
VETERINARY DRUGS IN HUMAN
FOOD:
GENERAL APPROACH
TO TESTING**

Recommended for Implementation
on October 2002
by the VICH Steering Committee

THIS GUIDELINE HAS BEEN DEVELOPED BY THE APPROPRIATE VICH EXPERT WORKING GROUP AND WAS SUBJECT TO CONSULTATION BY THE PARTIES, IN ACCORDANCE WITH THE VICH PROCESS. AT STEP 7 OF THE PROCESS THE FINAL DRAFT IS RECOMMENDED FOR ADOPTION TO THE REGULATORY BODIES OF THE EUROPEAN UNION, JAPAN AND USA.

GENERAL APPROACH TO TESTING

TABLE OF CONTENTS

1. INTRODUCTION

- 1.1 Objective of the guideline
- 1.2. Background
- 1.3. Scope of the guideline

2. GUIDELINES

2.1. Basic tests

- 2.1.1 Repeat-dose toxicity testing
- 2.1.2 Reproduction toxicity testing
- 2.1.3 Developmental toxicity testing
- 2.1.4 Genotoxicity testing

2.2. Additional tests

- 2.2.1. Testing for effects on the human intestinal microflora
- 2.2.2. Pharmacological effects testing
- 2.2.3. Immunotoxicity testing
- 2.2.4. Neurotoxicity testing
- 2.2.5 Carcinogenicity testing

2.3. Special tests

3. REFERENCES

1. INTRODUCTION

1.1. Objective of the guideline

This guideline outlines a testing approach to assure the safety of human food derived from animals treated with veterinary drugs. The tests should provide an adequate amount of toxicological data to ensure human food safety, while reducing the number of animals used in testing and conserving resources. Whenever possible, flexibility, minimum number of animals, as well as alternative *in vivo* and *in vitro* tests have been recommended.

1.2. Background

The hazards associated with the consumption of food containing residues of veterinary drugs are generally assessed in laboratory animals treated with the drugs. International harmonization of testing requirements aims to assure that the development and registration of valuable animal drugs is achieved with maximum efficiency. The efficiency of the approval process has an impact on the expenditure of resources, time from discovery to new product approval, and the introduction of innovative drugs into the market.

The current toxicological testing requirements for veterinary drugs are based on the toxicological tests for human medicines, food additives and pesticides. This guideline indicates those tests particularly relevant to the identification of a no-observed adverse effect level (NOAEL) for veterinary drugs.

The appropriateness of a test for the purpose of assessing human food safety is determined by its ability to predict an adverse effect in humans. The selection of concise

and appropriate tests was of major concern and a regimen was selected based on a minimum number of tests after consideration of extensive historical data and a review of widely accepted protocols. To increase the chance of identifying a potential adverse effect, both rodent and non-rodent models are included in the testing approach. Additional studies, such as tests for effects on human intestinal flora, may be used to evaluate compound specific endpoints. A testing approach is designed to determine a dose that causes an adverse effect and a dose that can be identified as the NOAEL. A NOAEL is used to establish a human acceptable daily intake (ADI), which represents the amount of drug that can be safely consumed by a person on a daily basis for a lifetime.

1.3. Scope of the guideline

The scope of this guideline includes: 1) basic tests required for all new animal drugs used in food-producing animals in order to assess the safety of drug residues present in human food, 2) additional tests that may be required depending on specific toxicological concerns such as those associated with the structure, class, and mode of action of the drug, and 3) special tests which might assist in the interpretation of data obtained in the basic or additional tests.

Guidance on the design of protocols for basic and selected additional tests will be provided in separate VICH guidelines. Selection and protocol design of special tests and any other tests will be left to the discretion of the various regulatory authorities and/or drug sponsors.

2. GUIDELINE

Testing includes an assessment of systemic toxicity, reproduction toxicity, developmental toxicity, genotoxicity, carcinogenicity, and effects on the human intestinal flora. In general, oral administration is the route of choice for *in vivo* tests. The guidelines do not preclude the possibility of alternative approaches that may offer an equivalent assurance of safety, including scientifically based reasons as to why such data may not need to be provided. Testing described in this guideline is subject to national standards and/or compliance with Good Laboratory Practice.

2.1. Basic tests

2.1.1. Repeat-dose toxicity testing (VICH GL31 and VICH GL (tbd))

Repeat-dose toxicity testing is performed to define (1) toxic effects based on repeated and/or cumulative exposures to the compound and/or its metabolites, (2) the incidence and severity of the effect in relation to dose and/or duration of exposure, (3) doses associated with toxic and biological responses, and (4) a NOAEL.

2.1.2. Reproduction toxicity testing (VICH GL22)

Multigeneration reproduction studies are designed to detect any effect on mammalian reproduction. These include effects on male and female fertility, mating, conception, implantation, ability to maintain pregnancy to term, parturition, lactation, survival, growth

and development of the offspring from birth through to weaning, sexual maturity and the subsequent reproductive function of the offspring as adults.

2.1.3. Developmental toxicity testing (VICH GL32)

The aim of developmental toxicity testing is to detect any adverse effects on the pregnant female and development of the embryo and fetus consequent to exposure of the female from implantation through the entire period of gestation to the day before caesarean section. Such adverse effects include enhanced toxicity relative to that observed in non-pregnant females, embryo-fetal death, altered fetal growth, and structural changes to the fetus.

2.1.4. Genotoxicity testing (VICH GL23)

A battery of genotoxicity tests is used to identify substances that have the capacity to damage the genetic information within cells. Substances that are considered to be genotoxic are regarded as potential carcinogens. Those that cause genetic damage in germ cells also have the potential to cause reproductive/developmental effects.

2.2. Additional tests

These tests are required to address safety concerns such as those based on compound structure, class, and mode of action. Some examples of these studies are:

2.2.1. Testing for effects on the human intestinal flora (VICH GL (tbd))

For compounds with antibacterial properties, information to determine the effects of residues of the drug on the human intestinal flora is required.

2.2.2. Pharmacological effects testing

Some veterinary drugs produce pharmacological effects in the absence of a toxic response or at doses lower than those required to elicit toxicity. The pharmacological NOAEL should be identified and taken into account in the setting of the ADI for the drug.

2.2.3. Immunotoxicity testing

For some classes of drugs such as beta-lactam antibiotics, the potential for the drug to elicit an allergic reaction in sensitive individuals should be investigated. Immunotoxicity testing may be required for other veterinary drugs when the results from other tests indicate a potential immunological hazard.

2.2.4. Neurotoxicity testing

Evidence of a neurotoxic potential may be identified in repeat-dose tests which may trigger further testing, such as that recommended in OECD Test Guideline 424 "Neurotoxicity Study in Rodents".

2.2.5. Carcinogenicity testing (VICH GL28)

For compounds that are suspected to have carcinogenic potential, carcinogenicity testing by the oral route is required. The decision to require carcinogenicity testing is based on all available data including results of genotoxicity testing, structure activity relationship (SAR) information and results of repeat-dose and mechanistic studies. It is recommended that carcinogenicity testing be performed using a carcinogenicity bioassay. However, information derived from a combined assay for carcinogenicity and chronic toxicity would also be acceptable.

2.3. Special tests

These are tests performed to understand the mode of action of the drug and used to aid in the interpretation of, or the assessment of the relevance of the data obtained in the basic and/or additional tests.

3. REFERENCES

OECD. 1997. Test Guideline 424. Neurotoxicity Study in Rodents. In: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Organization for Economic Cooperation & Development, Paris.

VICH (2002). VICH Harmonized Tripartite Guideline GL31. Studies to Evaluate the Safety of Residues of Veterinary Drugs in Human Food: Repeat-Dose (90-Day) Toxicity Testing. International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products.

VICH (2001). VICH Harmonized Tripartite Guideline GL22. Studies to Evaluate the Safety of Residues of Veterinary Drugs in Human Food: Reproduction Toxicity Testing. International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products.

VICH (2002). VICH Harmonized Tripartite Guideline GL32. Studies to Evaluate the Safety of Residues of Veterinary Drugs in Human Food: Developmental Toxicity Testing. International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products.

VICH (2001). VICH Harmonized Tripartite Guideline GL23. Studies to Evaluate the Safety of Residues of Veterinary Drugs in Human Food: Genotoxicity Testing. International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products.

VICH (2002). VICH Harmonized Tripartite Guideline GL28. Studies to Evaluate the Safety of Residues of Veterinary Drugs in Human Food: Carcinogenicity Testing. International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products.

(参考)国立水俣病総合研究センターでの総水銀及びメチル水銀の検査結果

		T-Hg, $\mu\text{g/g wet wt}$	MeHg, $\mu\text{g/g wet wt}$	(MeHg/T-Hg) $\times 100$
1	本マグロ蓄養、大とろ	1.2432	1.1045	88.8
2	本マグロ蓄養、赤身	0.5958	0.5955	100.0
3	メバチマグロ	1.2185	1.1775	96.6
4	本マグロ、赤身	0.7005	0.6660	95.1
5	インドマグロ、赤身	0.9835	0.9370	95.3
6	キハダマグロ、生	1.2500	1.2360	98.9
7	カジキ	0.9778	0.8595	87.9
8	メカジキ	1.2374	1.1346	91.7
9	バチマグロ	1.7332	1.5289	88.2
10	黄ハダマグロ	0.5362	0.4931	92.0
11	子本マグロ(一本買いの体長 25cm)	0.0469	0.0473	100.9
12	沖縄近海メバチマグロ	0.5088	0.5032	98.9
13	太平洋キバタマグロ	0.0600	0.0580	96.7
14	太平洋キバタマグロ	0.0923	0.0894	96.9
15	インド洋キバタマグロ	0.3677	0.3521	95.8
16	インド洋キバタマグロ	0.2934	0.2864	97.6
17	本マグロ・赤身	0.7372	0.7502	101.8
18	本マグロ・赤身	0.6688	0.4641	69.4
19	本マグロ・中トロ	1.0446	0.8931	85.5
20	インドマグロ・大トロ/中-B	0.7607	0.6181	81.3
21	インドマグロ・大トロ/A	1.3348	1.1457	85.8
22	本マグロ・大トロ/下	0.4405	0.4501	102.2
23	本マグロ・大トロ/下	0.4828	0.4688	97.1
24	インドマグロ・大トロ/上-B	0.3532	0.3504	99.2
25	インドマグロ・大トロ/上-B	1.0383	0.8278	79.7
26	インドマグロ・大トロ/上-A	1.0276	0.7806	76.0
27	本マグロ・大トロ/上	0.4736	0.4568	96.4
28	インドマグロ・大トロ/中-A	1.3024	1.1302	86.8
29	インドマグロ・大トロ/下-A	1.3226	1.2857	97.2
30	本マグロ・大トロ	0.6831	0.6560	96.0
31	本マグロ・大トロ/中	0.5855	0.5519	94.3
32	インドマグロ・大トロ/下-B	1.3101	1.1212	85.6
33	本マグロ・大トロ/上	0.5256	0.4930	93.8
34	カマトロ	0.5046	0.4887	96.9
	平均	0.7777	0.7059	92.5294

佐藤先生 説明用資料

胎児期メチル水銀曝露と生後の発達への影響---研究の流れと現状での評価

1. 水俣病における胎児性水俣病

胎児の高感受性を示唆、脳性麻痺様症状・知的障害等

2. イラクの水銀中毒における胎児期曝露の影響

妊婦の毛髪中水銀濃度から量-反応関係の算出、神経学的な症状

3. WHO/EHC (1990)

イラクのデータの評価から、10-20 $\mu\text{g/g}$ で5%のリスクの増加

4. さらに低濃度での影響の探索

New Zealand→資料 4-2, ¹⁴⁷13ページ右

Faroe Islands→資料 4-2, ¹⁴⁷17ページ右 ¹⁴⁸18ページ左

Seychelles→資料 4-2, ¹⁵⁶16ページ右 ¹⁵⁸18ページ左

→資料 4-4, Lancetの論文

- ・影響は、発達心理学・電気生理学・認知行動学の検査等で検知
- ・胎児性水俣病の症状とは異質の影響

5. アメリカEPAの評価とRfD

追加資料→公衆衛生トピックス

- ・ベンチマークドース (毛髪中水銀濃度11 $\mu\text{g/g}$) から、RfDを算出
- ・不確定係数10を使用
- ・RfD = 0.1 $\mu\text{g/kg/day}$

6. 日本における現状--毛髪中水銀濃度と推定摂取量

Yastake et al. (2003)

- ・女性の毛髪中水銀濃度の幾何平均は、1.2-2.3 $\mu\text{g/g}$
 - ・毛髪中水銀濃度1 $\mu\text{g/g}$ を超える女性 (15-49歳) は、66%
- 食事頻度調査からの推定では、EPAのRfDを越える人が90%以上

メチル水銀の基準摂取量のゆくえ

村田勝敬¹⁾、嶽石美和子²⁾、佐藤 洋³⁾

米国環境保護庁 (U.S. Environmental Protection Agency, EPA) は、メチル水銀に感受性の高い小集団 (特に、妊娠中に曝露を受けた胎児) の健康への影響を防止する目的で、メチル水銀の基準摂取量 (毎日摂取しても人体に影響を及ぼさないとされる量、RfD) を 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ と 1995 年に定めた。現在、EPA はこの RfD の改訂作業を行っている。日本ではどのようにして算出されたのかよく理解されないまま、この数値が一人歩きしているように思われるので、算出の経緯とどのような意味を持つのかについて解説する。

リスク評価のための集団

水俣病で代表されるメチル水銀中毒は、日本では工場排水を、またイラクでは食品汚染を介して集団発生した。日本の水俣病研究では、発生当時の曝露評価が行われていなかったため、メチル水銀の人体影響に関する量-反応関係を検討することができなかった。これに対し、イラクのメチル水銀中毒禍は、発生直後より米国の研究者が曝露および影響評価を行っていた。1980年代半ばには、幾つかのメチル水銀に関する前向き疫学調査が研究の途についたばかりであった。このため、EPA は RfD を決定するに当たり、イラクの研究を採用したのである。

- 1) 秋田大学医学部環境保健学教授
- 2) 同大学院生
- 3) 東北大学大学院医学系環境保健医学教授

イラクの研究では、妊娠中にメチル水銀で処理された小麦から作ったパンを摂取した女性から生まれた子どもの神経発達異常 (18 ヶ月児の歩行および 24 ヶ月児の言語の遅れ)、脳性麻痺、深部腱反射異常等が二人の神経内科医によって調べられた。また、母親の頭髪は X 線蛍光分光光度計で分析され、水銀濃度は 1 ~ 674 $\mu\text{g}/\text{g}$ (ppm) であった。これらの母子 81 組のデータを用いて、メチル水銀曝露による量-反応関係が検討された。

毛髪-血中濃度比率の算出

頭髪の水銀濃度はその毛が生成されるときに血中メチル水銀濃度を反映する。頭髪の長さは 1 月に 1 cm 伸びるとされ、またイラク女性の髪は非常に長かったので、妊娠期間中の水銀濃度を遡って推定することが可能であった。頭髪水銀濃度と同時期の血中水銀濃度の関係については多数の報告があり、250 : 1 (頭髪水銀 $\mu\text{g}/\text{g}$: 血中水銀 $\mu\text{g}/\text{ml}$) が採用されている。これにより、妊娠中の母体の血中濃度は、頭髪水銀濃度から算出される。

臨界濃度の決定

小児に神経発達の影響が現れ始める濃度 (臨界濃度) は、Marsh らが報告した種々の神経影響を全て考慮した発症率と妊娠期間中の母親の頭髪水銀濃度から、ベンチマークドース (BMD) 法

(図)で推定された。EPAが実際に使用した量-反応関係は、 $P(d) = P_0 + (1 - P_0)(1 - \exp[-\beta \cdot d^k])$ で表され、 d は曝露量、 P_0 はバックグラウンド反応率(=0.12468)、 β は勾配(=9.47・10⁻³)、 k は形状母数(=1.000)であった。ここで算出されたBMDは頭髮水銀濃度で11 µg/gであり、換算式により血中水銀濃度44 µg/lとなった。

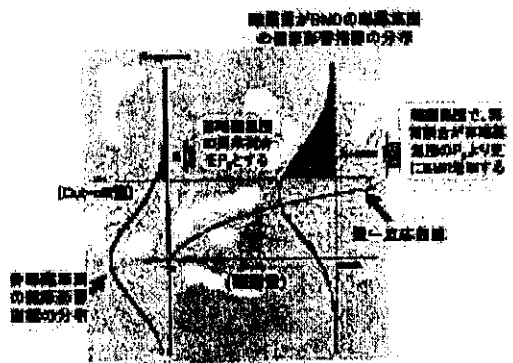


図 BMDの基本的考え方—ベンチマークドース(BMD)は、バックグラウンド反応率(P₀)を超えて一定量の異常増加(これをベンチマークレスポンスと呼ぶ、BMR)をもたらす時の曝露レベルである

RfDの算出

ある血中濃度(C、上述値44 µg/l)に対応する一日当たりのメチル水銀の食事摂取量(d、µg/日)は下式で示される。

$$d = C \cdot b \cdot V / (A \cdot f)$$

ここで用いられた記号は、吸収率(A)、体内総水銀の循環血液中に存在する割合(f)、排泄定数(b)、体内総血液量(V)である。この式の意味は $d \cdot A \cdot f = C \cdot b \cdot V$ と変形すると理解しやすい。すなわち、右辺はメチル水銀が血中に存在する量(C・V)のうち1日に排泄される量を表す。左辺は1日当たりのメチル水銀摂取量のうち体内に取り込まれる量(d・A)が血液中に存在する量を示し、排泄量と維持(摂取)量は平衡状態(血液以外のところにあるメチル水銀量は変化しないと仮定)であれば等しくなる。これらの数

値は、以下の実験・研究により決定された。

(1) 吸収率A 放射性同位元素でラベルした硝酸メチル水銀を水に溶かし、健常ボランティア3名に与えた後の体内への吸収率は95%以上であった。別の研究者による同様の実験でも確認され、これより吸収率は0.95と定められた。

(2) 体内水銀の血中に存在する比率f ヒト体内に吸収されたメチル水銀が循環血液中に存在する割合に関して、幾つかの研究報告がある。ある研究者は、メチル水銀に汚染された鮪を食べた成人男子5名の結果に基づき、吸収量の0.059が総血液の中に存在すると推定した。また、別の研究者は²⁰³Hg-メチル水銀を含む魚を食べた男性9名と女性6名で、曝露後数日で血液1ℓにつき総負荷量の約10%が現れ、その後100日以上経過して約5%になったと報告した。このようにして、血中に存在するメチル水銀割合fとして0.05が採用され、WHOも同じ値を用いている。

(3) 排泄定数b メチル水銀の半減期については、4つの研究で毛髪あるいは血中のメチル水銀濃度の測定から35~189日と推定され、その平均は0.014であった。また、魚に含まれる43~233 µg/日の水銀を3ヵ月間摂取した20名のボランティアから得られた平均も0.014であった。以上よりb値として0.014/日が用いられた。

(4) 体内総血液量V 血液量は通常体重の7%であるといわれているが、妊娠中は血液量が20%から30%増えることがあり、体重当たりの血液量は約8.5~9%になる。イラク女性の体重に関するデータはなかったので、妊娠中の体重を58kg、血液量を9%と仮定すると、血液量は5.22ℓとなる。計算ではV値として5ℓが採用された。

以上より、血中水銀濃度44 µg/lを生じる一日当たりのメチル水銀の食事摂取量dを計算することができるが、さらに体重60kg(bw、上の58kgを四捨五入)の人が摂取したと仮定すると、 $d = C \cdot b \cdot V / (A \cdot f \cdot bw)$ となる。この式に前述の数値を当てはめると、 $d = 44 \mu\text{g}/\ell \cdot 0.014/\text{日} \cdot 5 \ell / (0.95 \cdot 0.05 \cdot 60\text{kg})$ であり、血中44 µg/lまたは毛髪中11 µg/gのメチル水銀濃度を維持する一

日当たりの食事摂取量として 1.1 µg/kg/日が導出される。

RfD は、さらに不確実係数 (UF) と修飾係数 (MF) を加味し、以下の式で算出される。

$$\begin{aligned} \text{RfD} &= d / (\text{UF} \cdot \text{MF}) \\ &= (1.1 \text{ } \mu\text{g/kg/日}) / (10 \cdot 1) \\ &= 0.1 \text{ } \mu\text{g/kg/日} \end{aligned}$$

UF の 10 は、① 2 世代間の生殖要因 (母体血から胎児血へのメチル水銀の透過率や胎内での神経毒性影響など) の不確実性、② ヒト集団に内在するバラツキ (特に、メチル水銀の幅広い生物学的半減期や毛髪-血中濃度比率に起因するバラツキ)、③ 長期曝露からの後遺症に関するデータの欠如を考慮しての結果である。また、MF には 1 を使用している。

おわりに

現在、米国国立科学アカデミー (National Academy of Sciences, NAS) が選択したフェロー諸島前向き研究の 7 歳児の結果による BMD (および RfD) の見直し作業とともに、14 歳児における神経影響の解析結果の評価がおこなわれている。このフェロー研究では、母親の出産時の頭髪水銀濃度および臍帯血水銀濃度が測定されており、より直接的な出生前後の“胎児”の血中水銀濃度を測定していることが最大の強みである。

また、追跡調査としての 14 歳児データは、出生後のメチル水銀曝露の影響を評価することもできる。入手可能なデータの中で、メチル水銀に最も感受性の高い影響指標として、胎児期曝露による小児神経発達影響が NAS の委員会では是認さ

れている。しかし、免疫・心血管系への低濃度曝露影響も示唆されており、何を影響指標とするかが今後の検討課題となりそうである。

RfD は 0.1 µg/kg/日と算出されたが、上述の UF は専門家 (NAS) による判断、公衆衛生の目標、EPA の規制勧告等に影響される政策的な係数と考えるべきである。かかる意味で、UF に含まれるヒト集団に内在するバラツキ (b, V, A, f) や胎児の曝露濃度がたとえ正確に算出できるようになっても、米国においては UF > 1 である可能性が高い。

一方、メチル水銀の RfD の改訂は、公衆衛生とともに環境保全に大いに関連する。米国の州機関が水質基準の確立や水銀の大気・水への放出規制の設定に RfD を使用するだろうし、既に 40 州で淡水産魚介類摂取に係わる勧告が出されている。

このように RfD の改訂は、産業界における排出方法やリサイクルの選択肢だけでなく、魚市場や人々の食物選択に影響を及ぼす可能性がある。それゆえ、一層の科学的根拠に基づく RfD の改訂がおこなわれることを EPA に望むとともに、わが国でも、国民の理解の得られる同様の基準値を設定することが緊急の課題であると考えられる。

文献は“US EPA: Mercury Study for Congress. Volume V: Health Effects of Mercury and Mercury Compounds. EPA-452/R-97-007 (1997)” に大半が記載されていますので、関心ある方は <http://www.epa.gov/oar/mercury.html> からダウンロードして下さい。また、関連情報として、日衛誌 57 巻 564-570 頁 (2002) をご参照下さい。