

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍：

なし

雑誌：

発表者氏名	論文 タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Mayumi M, Hamada H, Yoshikawa H, et al.	Discordance in Pena-Shokeir phenotype/fetal akinesia deformation sequence in a monoamniotic twin.	J Obstet Gynaecol Res,	39(1)	344-346	2013
吉川裕之	EBMとガイドライン	産科婦人科疾患最新の治療 2013-2015		1-4	2013
吉川裕之	産婦人科診療ガイドライン産科編の理解にあたって	周産期医学	43(10)	1207-1210	2013
Ema M, et al.	Developmental toxicity of diesel exhaust: a review of studies in experimental animals.	Reprod Toxicol	42	1-17	2013
Abe K, Hamada H, Minakami H, Yoshikawa H, et al	Impact of planning of pregnancy in women with epilepsy on seizure control during pregnancy and on maternal and neonatal outcomes.	Seizure	23(2)	112-116	2014
村島温子	エビデンスに基づいた妊婦と授乳婦の薬の選択と使いかた	Medecal Practice	30(9)	1500-1506	2013
永川明香、 村島温子	妊産婦と薬剤	小児科診療	76(12)	1967-1973	2013
Saito S, Minakami H, et al.	Outcome of infants exposed to oseltamivir or zanamivir in utero 2 during pandemic (H1N1) 2009.	Am J Obstet Gynecol	209(2)	e1-9	2013
Minakami H, et al.	Causes of a nationwide rubella outbreak in Japan, 2012-2013.	J Infect	68(1)	99-101	2014
Suzuki M, Minakami H, et al.	Radioactive cesium ( $^{134}\text{Cs}$ and $^{137}\text{Cs}$ ) content in human placenta after the Fukushima nuclear power plant accident.	J Obstet Gynaecol Res	39(9)	1406-1410	2013

# Discordance in Pena–Shokeir phenotype/fetal akinesia deformation sequence in a monoamniotic twin

Miyuki Mayumi<sup>1</sup>, Mana Obata-Yasuoka<sup>1</sup>, Tsuyoshi Ogura<sup>1</sup>, Hiromi Hamada<sup>1</sup>,  
Yayoi Miyazono<sup>2</sup> and Hiroyuki Yoshikawa<sup>1</sup>

Departments of <sup>1</sup>Obstetrics & Gynecology and <sup>2</sup>Pediatrics, Faculty of Medicine, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, Japan

## Abstract

We here report the first case of discordant Pena–Shokeir phenotype observed in monoamniotic twins. A 34-year-old woman, pregnant with twins, was referred at 10 weeks' gestation because one of the twins had increased nuchal translucency. Serial ultrasonographic examinations suggested that twin A may have had several other abnormalities, including pleural effusion at 21 weeks' gestation, decreased movement and contracted limbs at 24 weeks, and fetal growth restriction at 26 weeks. No abnormalities were observed in twin B. At 34 weeks of gestation, the twins were delivered by cesarean section. There were cord entanglements, and although the resuscitation of twin A was attempted, it proved difficult due to lockjaw. Twin A died during the second hour of life, and autopsy findings were consistent with the diagnosis of Pena–Shokeir phenotype. We suggest that cord entanglement during early gestation is a possible cause for the occurrence of Pena–Shokeir phenotype through an anoxic-ischemic mechanism.

**Key words:** fetal akinesia deformation sequence, fetal cord entanglement, identical twins, increased nuchal translucency, Pena–Shokeir syndrome.

## Introduction

Pena–Shokeir phenotype/fetal akinesia deformation sequence (PSP/FADS) is a lethal condition first described in 1974 by Pena and Shokeir.<sup>1</sup> It is characterized by lack of fetal movement, fetal growth restriction, craniofacial anomalies, multiple contractures (arthrogryposis), polyhydramnios, and pulmonary hypoplasia. The incidence of PSP/FADS has been estimated to be 1:15 000 in a retrospective population-based study.<sup>2</sup> Although there have been five previous reports describing monozygotic twins affected with PSP/FADS,<sup>3–5</sup> this is the first report of discordance in the Pena–Shokeir phenotype in monoamniotic twins. We further suggest a possible cause for the development of this phenotype.

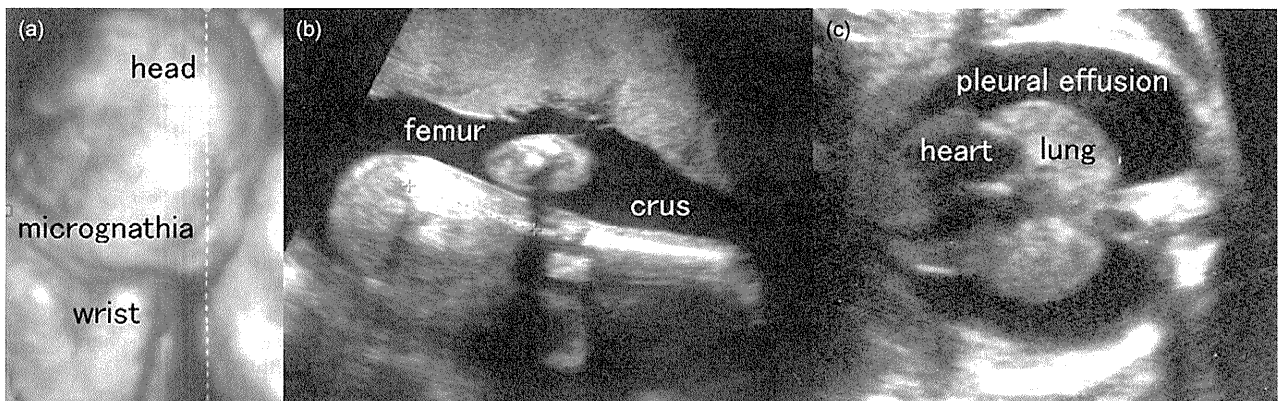
## Case Report

A 34-year-old woman, gravida 0, para 0, pregnant with monozygotic twins was referred to our institution at 10 weeks' gestation because one of the twins had increased nuchal translucency. The twins were evaluated to be monozygotic monoamniotic by ultrasonographic findings. In gestational week 15, amniocentesis was performed for karyotyping, and chromosomal analysis of amniotic cells revealed a 46, XX karyotype. At 21 weeks' gestation, pleural effusion was observed in the twin with increased nuchal translucency (twin A). The findings of serial ultrasonographic examinations also indicated that twin A may have had many other abnormalities, including pleural effusion at 21 weeks of gestation, micrognathia, low-set ears, decreased

Received: December 9 2011.

Accepted: March 27 2012.

Reprint request to: Dr Mana Obata-Yasuoka, Department of Obstetrics & Gynecology, Faculty of Medicine, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8575, Japan. Email: manobata@md.tsukuba.ac.jp



**Figure 1** Ultrasonographic images of the twin A fetus showing (a) severe micrognathia and flexed wrists, (b) extended legs, and (c) pleural effusions.

movement and contracted limbs (flexed elbows and wrists, and extended legs) at 24 weeks of gestation, and fetal growth restriction at 26 weeks of gestation (Fig. 1). All of these abnormalities are compatible with the Pena-Shokeir phenotype. In contrast, twin B showed normal growth and had no abnormalities.

At 34<sup>+2</sup> weeks of gestation, the twins were delivered by cesarean section for the indication of monoamniotic twin delivery. Twin A was a girl weighing 1405 g with Apgar scores of 1 at both 1 min and 5 min. Twin A also exhibited craniofacial anomalies (prominent bridge of the nose, hypertelorism, low-set ears, micrognathia and cleft palate), multiple contractures, and a lack of palmar dermatoglyphics. At parental request, an attempt was made by neonatologists to intubate immediately after birth; however, this was difficult due to her lockjaw and she died during the second hour of life. Twin B weighed 2331 g at birth and had no abnormalities, with Apgar scores of 8 at 1 min, and 9 at 5 min.

An autopsy of twin A revealed bilateral pleural effusion and pulmonary hypoplasia with a lung/body weight ratio of 0.0018, which is one-tenth of the normal ratio. Histological observation showed a disuse atrophy pattern in respiratory muscles, as well as the loss of anterior horn cells in the thoracic spinal cord. As a result of maceration, the brain was not suitable for histological evaluation. All of these findings are consistent with a diagnosis of discordance in PSP/FADS. Furthermore, cord entanglements were observed in the monochorionic monoamniotic placenta.

## Discussion

The pathogenesis of PSP/FADS is attributable to familial muscle dystrophy or anoxic-ischemic etiology;<sup>3</sup> however

the details of how it develops have yet to be revealed. The majority of anomalies observed in PSP/FADS occur secondary to decreases in, or lack of, fetal movement.<sup>1,6</sup> For instance, arthrogyriposis is caused by the lack of movement of the extremities, while hypoplastic lung results from the lack of movement of the breathing muscles. Polyhydramnios and facial anomaly occur in response to a lack of swallowing. In the present case, prenatal ultrasonographic findings consistent with PSP/FADS were observed as early as 21 weeks of gestation. Additionally, it was revealed on autopsy that the brain of the affected twin was macerated more severely than would be expected on the first day of death. We therefore believe that the ischemic event that influenced the brain of the affected twin may have occurred during early gestation. Due to the discordance of PSP/FADS in monozygotic twins, it is unlikely in the present case that the cause of PSP/FADS is hereditary. We therefore hypothesize that a cord entanglement during early gestation may have resulted in the development of PSP/FADS of ischemic origin in only one twin in this case.

Monoamniotic pregnancies, which account for only approximately 1% of monozygotic twin pregnancies, have recently been reported to have a mortality rate of approximately 10%.<sup>7-9</sup> The incidence of cord entanglement at the time of delivery has been estimated to occur in between 66.2% and 96.2% of cases involving monoamniotic twins.<sup>8</sup> Although in some cases cord entanglement causes no harmful effects, in others it can lead to various complications, including the death of both twins or discordant weights between twins. In our case, an anoxic-ischemic change due to cord entanglement may have affected one twin, resulting in PSP/FADS.

Five case reports of monochorionic twins with PSP/FADS have previously been published (Table 1).<sup>3-5</sup> In

**Table 1** Case reports of monochorionic twins with Pena–Shokeir phenotype/fetal akinesia deformation sequences

Case Reference	Delivery	Chorionicity/amnionicity	Twin A	Twin B	Pathogenesis
1	21 weeks	MD	201 g*	151 g*	Myogenic
Ho <sup>3</sup>	Vaginal		TTTS	TTTS	
2	26 weeks	Monochorionic/unknown	555 g*	590 g*	Myogenic
Ho <sup>3</sup>	Vaginal		Stillbirth	Stillbirth	
3	32 weeks	MD	980 g*	730 g*	Ischemic
Perlman <i>et al.</i> <sup>4</sup>	CS		Died (day 0)	Died (day 0)	
4	18 weeks	MD	12.5 g*	26.5 g	Ischemic
Konstantinidou <i>et al.</i> <sup>5</sup>	Vaginal		IUFD	IUFD	
5	36 weeks	Monochorionic/unknown	1860 g*	2200 g	Ischemic
Ho <sup>3</sup>	CS		Died (day 16)	Healthy	
Present case	34 weeks	MM	1405 g*	2331 g	Ischemic
	CS		Died (day 0)	Healthy	

\*Affected twin. CS, cesarean section; IUFD, intrauterine fetal death; MD, monochorionic diamniotic twins; MM, monochorionic monoamniotic twins; TTTS, twin-to-twin transfusion syndrome.

case 1 and case 2,<sup>3</sup> both twins were affected, and atrophic muscle fibers and normal numbers of anterior horn cells were observed in all twins. The cause in these cases was determined to be of myogenic origin. In contrast, the anoxic-ischemic damage of the brains and spinal cords of both twins in case 3 was found to result in the PSP/FADS phenotype.<sup>4</sup> In both case 4<sup>5</sup> and 5,<sup>3</sup> one twin demonstrated normal development, while the other was affected by PSP/FADS. An autopsy of the affected twin in case 5 also revealed evidence of ischemic damage to the brain, kidneys, thymus, and adrenal glands, while the histological evaluation of skeletal muscle demonstrated neurogenic atrophy. In case 5, the PSP/FADS was determined to have occurred in response to intrauterine anoxic-ischemic damage. Similarly, as only one of the monoamniotic twins in our study was affected by PSP/FADS, we have attributed the cause to anoxic-ischemic damage resulting from cord entanglement. The brain or spinal ischemia of one twin may have led to a decrement in fetal movement, which induced the present phenotype. Further, this case, which is the first involving the discordant prenatal diagnosis of PSP/FADS in monoamniotic twins, has led us to advocate a novel cause for this pathology, whereby an anoxic-ischemic event initiated by cord entanglement can lead to PSP/FADS in one monoamniotic twin.

## Acknowledgments

We have not received any financial support for this study.

## Disclosure

None declared.

## References

1. Pena SD, Shokeir MH. Syndrome of camptodactyly, multiple ankyloses, facial anomalies, and pulmonary hypoplasia: A lethal condition. *J Pediatr* 1974; **85**: 373–375.
2. Bayat A, Petersen A, Moller M, Andersen G, Ebbesen F. Incidence of fetal akinesia-hypokinesia deformation sequence: A population-based study. *Acta Paediatr* 2009; **98**: 3–4.
3. Ho NC. Monozygotic twins with fetal akinesia: The importance of clinicopathological work-up in predicting risks of recurrence. *Neuropediatrics* 2000; **31**: 252–256.
4. Perlman JM, Burns DK, Twickler DM, Weinberg AG. Fetal hypokinesia syndrome in the monochorionic pair of a triplet pregnancy secondary to severe disruptive cerebral injury. *Pediatrics* 1995; **96**: 521–523.
5. Konstantinidou AE, Agapitos EV, Pavlopoulos PM, Davaris PS. Fetal akinesia deformation sequence in a highly developed acardius twin. *Clin Dysmorphol* 1997; **6**: 359–363.
6. Hall JG. Pena-Shokeir phenotype (fetal akinesia deformation sequence) revisited. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2009; **85**: 677–694.
7. Allen VM, Windrim R, Barrett J, Ohlsson A. Management of monoamniotic twin pregnancies: A case series and systematic review of the literature. *BJOG* 2001; **108**: 931–936.
8. Roque H, Gillen-Goldstein J, Funai E, Young BK, Lockwood CJ. Perinatal outcomes in monoamniotic gestations. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2003; **13**: 414–421.
9. Hack KE, Derks JB, Schaap AH *et al.* Perinatal outcome of monoamniotic twin pregnancies. *Obstet Gynecol* 2009; **113**: 353–360.

## 1 EBM とガイドライン

吉川裕之

診療ガイドライン (practice guideline) に基づく医療は、EBM (evidence-based medicine) とは異なるものである。EBM とは、科学的根拠に基づいて行う医療であるが、経験だけに基づいて行うものと対比的に存在する。具体的には、ランダム化比較試験 (randomized controlled trial : RCT) やそれを集めたメタアナリシスで立証された医療を実践することをいう。EBM では、エビデンスを吟味する力が要求され、EBM を実践することは必ずしも容易ではない。診療ガイドラインは、もとは1960年代に保険会社が医療費を削減するために作成したことに始まる。保険会社は、同じ効果の抗生物質ならば安いほうを使ってもらいたいし、効果が明らかでない手術にお金を払いたくない。その当時から、ガイドラインにはエビデンスだけでなく、臨床医学の常識や臨床医のコンセンサスを含めている。

### 1 診療ガイドラインと標準医療

ガイドラインを evidence-based guideline と consensus-based guideline に分けることがあるが、エビデンスだけで作られるガイドラインもコンセンサスだけで作られるガイドラインも存在しない。エビデンス以外は医学常識や臨床医のコンセンサスが重要になる。

わが国では「標準」という言葉の誤解が非常に多い。「ガイドライン医療」=「標準医療」であるが、この「標準」は、「standard」の翻訳である。よく「標準」という言葉を平均的とか並と勘違いする。しかし標準医療は、平均的医療とはまったく違い、むしろ「規範となる医療」「最良の医療」「最適の医療」「チャンピオン医療」を意味している。standard time とか gold standard というのがこの standard なのである。この標準医療という言葉をもっと理解していないと、さまざまな誤解が生じる。

RCT の勝者が標準医療になるが、これはボクシングのタイトルマッチと似ている。エビデンスのある標準医療は、それまでの標準医療に試験医療が勝った結果、新標準医療として認められるのである。RCT が行われたことがない領域で RCT を行う場合がある。その場合、コントロールにあたる現在の標準医療はコンセンサスで決める。たとえば、子宮頸がんのリンパ節転移例に術後放射線治療をすることに高いレベルのエビデンスはないが、もしも術後化学療法という新治療を確立したいのならば、「(暫定) 標準医療」としての「術後放射線治療」をコントロールにした RCT を行う。コントロールの決め方は、ボクシングで急にチャンピオン不在になったときに暫定チャンピオンを決めることに類似している。ガイドラインでの標準医療はエビデンスに基づく標準医療とコンセンサスに基づく (暫定) 標準医療からなっている。一般には、後者は前者に替わることが期待されるが、RCT が不可能な場合や不適切な場合もある。

### 2 EBM の実践

ガイドラインが利用できる時代でも、自ら EBM を実践できることが望ましい。PubMed で論文を検索するだけで EBM を実践する能力があると勘違いしてはならない。エビデンスを吟味できる能力が必須なのだが、なかなかむずかしいのである。RCT を自分で実施するような者しか本当の吟味はできない。ガイドラインでは作成委員が代わりにエビデンスを吟味している。個人的な EBM 実践では、一つの研究の解釈が世界中で真二つに分かれることが起こりうる。エビデンスの解釈の誤りによって、間違った医療が正当化される危険がある。また、EBM 実践には膨大な労力や時間を要するので、臨床医にとって効率的でもない。

EBMの実践には、RCTを理解する必要がある。RCTでは統計的有意差と臨床的有意差が問題になる。エビデンスも人為的な面があることを知っておくべきである。RCTでは、主要評価項目(primary endpoint)がある。たとえば、全生存期間を主要評価項目にして「5年生存で10%上回ったら、臨床的に差がある」と判断できる場合、10%上回った場合に統計的有意差が出るようなサンプル数を定める。「20%上回ったら、臨床的に差がある」と考えるのと「5%の差でも臨床的に差がある」と考えるのでは、まったくサンプル数が変わる。治療効果に統計的有意差が出るかどうかは、臨床的有意差をどう考えるか、つまり、サンプル数の設定という人為的前提が大きく影響する。試験治療の侵襲性も臨床的有意差決定に関係する。治療Aが治療Bに統計的に有意に勝った場合、臨床的有意差も合致するように仕組まれている。副次評価項目(secondary endpoint)だけで統計的有意差が出て、多くは臨床的有意差を意味する根拠はない。

「産婦人科診療ガイドライン—産科編2011」作成時に問題になった2つのエビデンスを紹介する。1つ目は、過期妊娠の問題で、妊娠41週に分娩誘発するか、妊娠42週まで待機して分娩誘発するかというRCTである。妊娠41週で誘発するほうが勝ち、妊娠41週で誘発することがエビデンスだと世界中の多くの人が誤解した。実は副次評価項目である帝王切開率で有意差(21.3% vs 24.5%,  $p=0.03$ )が出たのだが、主要評価項目(perinatal mortality と neonatal morbidity で、サンプルサイズは5分後Apgar scoreで決定)はまったく差がなかったため、本当はネガティブデータだったのである。2つ目は、予防的頸管縫縮術について行われた1,292人のRCTで、「ごく一部の患者に対してしか、この手術をやる価値がない」という結論を導いている。ところが主要評価項目は妊娠33週未満の早産予防で、頸管縫縮群が有意にまさっていたのである。対象は頸管無力症の傾向のある人(典型例は除外)で、縫縮するかしないかというRCTで、妊娠33週未満の早産は「縫縮あり」で13%、「縫縮なし」で17%であった( $p=0.03$ )。しかし、著者は、4%しか差がないためこの手術は25人に1人しか利益がなく、手術をしたほうに発熱が増えたなどの症状

があるため、「早産既往が3回以上あるような場合にのみにやるべき」という結論にしたのである。この解釈の混乱は、実はサンプル数の決め方に原因があり、1,292人が多すぎたのである。侵襲性のある頸管縫縮術をする以上、「妊娠33週までの早産率が何%低下したら、頸管縫縮術をするべきか」という臨床的有意差(たとえば10%)の検討が臨床試験開始前にあるべきであった。もしも、10%の差を期待する研究だったら有意差は出なかったため、頸管縫縮術は侵襲に見合う効果はないという結論になったはずである。統計的有意差が出ているのに、それを否定するという結論には無理がある。

### 3 カイトラインの危険性を最小限に

コンセンサスで決められるガイドライン医療、標準医療は、正式なステップを踏まないと、根拠も妥当性もない医療が正当化される危険がある。そのため、コンセンサスを得る過程が重要視される。ガイドラインでコンセンサスを得る際、作成委員会、評価委員会、コンセンサスミーティングでの議論、発刊前に開示された案に対する意見聴取など、複数のステップを踏むことが必要である。それでもコンセンサスを得るステップが不足しているという批判は出る。まったく欠点がないガイドラインを作ることはむずかしいが、理想に近いものを作る努力が大切である。「産婦人科診療ガイドライン」は3年ごとに改訂することでガイドラインの有効期限を決めている。ガイドラインの作成委員長や作成委員が定期的に替わることも必要であり、産科編の作成委員は2011年度はじめに約半数が交替した。産科編作成委員長は2014年版発刊直後に交替することが決まっている。2014年版のガイドラインでは、婦人科外来編、産科編ともに、エビデンスとなる論文の構造化抄録をホームページに公開する予定である。今後、がん治療関連のガイドラインなどの評価に用いられている「AGREE共同計画」のチェックリストに基づいて、厳しく自己評価していくことも計画している。

#### 4 ガイドラインには多くの役割がある

ガイドラインの目的には、「証拠に基づいた診療を明確にする」あるいは「最高の診療を患者や専門家に教育すること」だけでなく、医療者の役割をはっきりさせることも含まれる。産科編のガイドラインでは、分娩監視をする際、「医師、助産師、もしくはよく訓練された看護師」が定期的に行うとしている。つまり、よく訓練された看護師あるいは助産師であれば、医師でなくてもよいと明確に記載している。これは米国のガイドラインを参考にしている。

ガイドラインが大好きなのは役人と保険会社といわれている。逆にEBMの専門家と臨床医はガイドラインが嫌いだとされる。最初は保険会社の資金で作られたガイドラインが、医療経済、医療情報開示、過剰な情報の整理、医療訴訟での適切な判断、社会資源の有効利用などにも役立ち、患者、医師、行政、法律家などに広く受け入れられたといえる。EBMの専門家はコンセンサスで決められる標準医療を認めたくないという考えをもちやすく、臨床医はガイドラインによって診療が縛られることに不満をもちやすい。

#### 5 ガイドラインと医療訴訟

「産婦人科診療ガイドライン」（婦人科外来編、産科編）の特徴の一つとして、「アクション」つまり、「何々をする」「何々を行う」という形でほとんど書いてあることがあげられる。他のガイドラインでは、「手術Aの治療的意義は確立していない」などに見解だけを述べる場合もよくあるが、見解は医療を制約しないが、かわりに、医療者を守ってくれることもないのである。

産婦人科医は「裁量権」という言葉をよく用いる。筆者自身も医療訴訟で被告や鑑定人を務めたことがあるが、「裁量権」は裁判では一切通用しない。「医師の裁量権」は「患者に対して最適の医療を提供する義務」であり、義務を行使する権利のようなものである。危険な感染症や精神疾患で強制的に入院させる権限などはまさに「医師の裁量権」だが、これは例外的である。医師の裁量権を制限するものは2つある。「医療水準」と「患

者の自己決定権」であり、「医師の裁量権」はその範囲の中のものである。つまり、裁判においては、裁量権はまったく議論されず、医療水準に達しているかどうかだけが議論される。

標準医療と医療水準との違いについては、標準医療は医療水準とは次元が違う。医療水準も、最適の医療という意味ではほぼ同義に解釈できる面もあるが、必要最小限のレベルで、ベストでなくてもよいようなニュアンスもある。標準医療というのは、ベストでありチャンピオンであり、これを上回る診療は存在しない。先端医療というのは実験的医療なので、標準医療を上回るとはいえない。ガイドライン医療を守った医師を弁護士が訴えにくい理由はここにある。治療の結果が悪い場合でも、標準医療はチャンピオン医療なので、悪い結果だけで責任を問うことはできない。もちろん個々の患者にガイドライン医療が適切かどうかを判断する義務、裁量権という義務がある。今までの裁判では、多くの産科医が濡れ衣ともいえるようなことで敗訴することもあったが、それは医療水準に教科書、解説書、原著論文、果ては厚生労働省の班研究報告書などが用いられたからである。裁判官や患者側の弁護士がつくる医療水準を下回ったとして、注意義務違反ありとされてきたのである。ガイドラインがなければ、好き勝手に設定される医療水準を放置することになる。最適な医療をしていても、結果が悪かったら裁判に負けるような錯覚から脱却すべきである。ガイドラインが医療水準に使われたとしても、正当かつ実行可能で、かつ認識可能・予測可能な医療水準の形成につながると思う。ガイドラインを作ることによって、医療訴訟が増えるとか裁判で不利になるという意見もあるが、そうではない。米国でも産婦人科の医療訴訟は減少しつつある。

#### 6 ガイドライン医療以外を行うとき

医師の裁量権を制限するのは「医療水準」以外に「患者の自己決定権」がある。「産婦人科診療ガイドライン」では実行可能性を検証している。少なくとも8割以上の施設でできるようなもの以外、推奨レベルAにはしない。現場の医療では、ガイドラインに従わないほうがよい状況は有り得

る。ただ、その場合は患者にガイドラインに従わない理由を説明し、納得してもらうことが医師にとって安全である。離島などでは、遠くに送るよりも自施設でガイドラインとは別だがそこでのベストの医療を行うのが妥当だということは十分に有り得る。そのときに、患者が納得していれば構わない。ただし、自己決定権の尊重だから患者が了解していれば何でもよいかというとそうでもない。間違った説明では医師は免責されない。正しい説明をして、患者が自己決定して納得してくれば、標準医療と違うことを行ってもよいし、むしろより適切であることが多い。例外的なことは常にあるという認識は必要である。ただし、迷う状況ではガイドライン医療に従うのが確実である。

## 7 ガイドラインの教育・普及

ガイドラインの普及のために、全国的な指導者講習会、各地域での教育セミナーが行われている。熱心な医師は講師にかなり細かいところまで質問して理解を深めている。勤務医と開業医で細かくガイドラインをチェックし合って、順守に努めている。これが患者に安全な医療を提供し、かつ自分たちの身を守るということを理解している。ガイドラインは広く用いられないと存在意義がない。頒布数は産科編 2011 年版で 13,000 部を超え、婦人科外来編で 11,000 部を超えている。分娩に関与する産婦人科医は 8,000 人弱なので、法律家、助産師など、さまざまな人が購入しているということになる。

## 8 ガイドライン使用にあたって

米国ではガイドライン作成者が訴えられたことがある。NCCN ガイドラインには「作成者は治療結果に一切責任を取らない」ということを明記している。これはガイドライン作成者が裁判に巻き込まれないための予防策である。また「あなたの目の前にいる患者に行う治療は、ガイドライン治療がベストとは限りません」つまり「ベストの

治療は何かということ判断するのは、あなたです」と書いてある。つまり、「ガイドラインどおりに治療したのだから私の責任ではない」と弁解することは、医師には許されない。ただ、迷ったらガイドライン医療を行うのが原則である。

2011 年版でも、「産婦人科診療ガイドライン—産科編」の目的には、「いずれの産科医療施設においても適正な標準的医療が確保される」「産科医療安全性の向上」「人的ならびに経済的負担の軽減」「医療従事者・患者の相互理解助長」の 4 点が書かれている。これは婦人科外来編も同じである。1 次施設、2 次施設、3 次施設別の推奨は一切行っていないというのが「産婦人科診療ガイドライン—産科編 2011」の特徴である。また、「記述内容に関しては学会と医会が責任を負う」が、「この推奨を実際に実践するか否かの最終判断は利用者が行うべきものである」ということや、「したがって、治療結果に対する責任は利用者に帰属する」ということも、このガイドラインに書いてある。

また、推奨レベル A, B, C とあるが、これは先ほどの 1 次、2 次、3 次施設で、ガイドラインの内容を区別しない。要するに、ベストの医療はどこでも同じだという判断である。ただ、それぞれの施設には役割があり、その施設で治療することが適切でないとか、治療ができないということは当然ある。その際は患者にきちんと説明して、高次の施設に相談、紹介、搬送するということと同時に、この A, B, C という基準は含んでいると明確に書いている。おそらく、このようなことが書いてあるガイドラインは他にない。産科だからこそ書いておく必要がある。

### ●文 献

- 1) 日本産科婦人科学会ほか(編)：産婦人科診療ガイドライン—産科編 2011, 2011 [http://www.jsog.or.jp/activity/pdf/gl\\_sanka\\_2011.pdf](http://www.jsog.or.jp/activity/pdf/gl_sanka_2011.pdf) (最終アクセス 2013 年 3 月 15 日)
- 2) 日本産科婦人科学会ほか(編)：産婦人科診療ガイドライン—婦人科外来編 2011, 2011 [http://www.jsog.or.jp/activity/pdf/gl\\_fujinka\\_2011.pdf](http://www.jsog.or.jp/activity/pdf/gl_fujinka_2011.pdf) (最終アクセス 2013 年 3 月 15 日)



## 産婦人科診療ガイドライン産科編の理解にあたって

吉川 裕之

### EBM とガイドライン医療

診療ガイドライン(practice guideline)に基づく医療は、EBM(evidence-based medicine)とは異なるものである。EBMとは科学的根拠に基づいて行う医療であるが、経験だけに基づいて行うものと対比的に存在する。具体的には、ランダム化比較試験(randomized controlled trial: RCT)やそれを集めたメタアナリシスで立証された医療を実践することをいう。EBMではエビデンスを吟味する力が要求され、EBMを実践することは必ずしも容易ではない。診療ガイドラインは、もとは1960年代に保険会社が医療費を削減するために作成したことに始まる。保険会社は、同じ効果の抗菌薬なら安いほうを使ってもらいたいし、効果が明らかでない手術にお金を払いたくない。その当時から、ガイドラインにはエビデンスだけでなく、臨床医学の常識や臨床医のコンセンサスを含めている。

### 診療ガイドラインと標準医療

ガイドラインを、evidence-based guidelineとconsensus-based guidelineに分けることがあるが、エビデンスだけで作られるガイドラインもコンセンサスだけで作られたガイドラインも存在しない。エビデンス以外は医学常識や臨床医のコンセンサスが重要になる。

日本では「標準」という言葉の誤解が非常に多い。「ガイドライン医療」=「標準医療」であるが、この「標準」は「standard」の翻訳である。よく「標

よしかわ ひろゆき 筑波大学医学医療系産科婦人科学  
〒305-8575 茨城県つくば市天王台1-1-1  
E-mail address: hyoshi@md.tsukuba.ac.jp

準」という言葉を、平均的とか並と勘違いする。しかし、標準医療は平均的医療とは全く違い、むしろ「規範となる医療」「最良の医療」「最適の医療」「チャンピオン医療」を意味している。Standard timeとかgold standardというのが、このstandardなのである。この標準医療という言葉をも十分理解しないと、いろいろな誤解を生じる。

RCTの勝者は標準医療になるが、これはボクシングのタイトルマッチと似ている。エビデンスのある標準医療は、それまでの標準医療に試験医療が勝った結果、新標準医療として認められたのである。RCTが行われたことがない領域でRCTを行う場合がある。その場合、コントロールにあたる現在の標準医療はコンセンサスで決める。例えば、子宮頸癌のリンパ節転移例に術後放射線治療をすることには高いレベルのエビデンスはないが、もし術後化学療法という新治療を確立したいのなら、「(暫定)標準医療」としての「術後放射線治療」をコントロールにしたRCTを行う。コントロールの決め方は、ボクシングで急にチャンピオン不在になった時に暫定チャンピオンを決めることに類似している。ガイドラインでの標準医療は、エビデンスに基づく標準医療とコンセンサスに基づく(暫定)標準医療からなっているともいえる。一般には、後者は前者に替わることが期待されるが、RCTが不可能な場合や不適切な場合もある。

### EBM の実践

ガイドラインが利用できる時代でも、自らEBMを実践できることは望ましい。刻々と新たなエビデンスが出現している可能性があるからである。

しかし、PubMedで論文を検索するだけでEBMを実践する能力があると勘違いしてはならない。エビデンスを吟味できる能力が必須なのだが、なかなか難しいのである。RCTを自分でやるような人しか、本当の吟味はできない。ガイドラインでは作成委員が代わりにエビデンスを吟味している。個人的なEBM実践では、一つの研究の解釈が世界中で真二つに分かれることが起こり得る。エビデンスの解釈の誤りによって、間違った医療が正当化される危険がある。また、EBM実践には膨大な労力や時間を要するので、臨床医にとって効率的でもない。

EBMの実践には、RCTを理解する必要がある。RCTでは、統計的有意差と臨床的有意差が問題になる。エビデンスも人為的な面があることを知っておくべきである。RCTには主要評価項目(primary endpoint)がある。例えば、全生存期間を主要評価項目にして「5年生存で10%上回ったら、臨床的に差がある」と判断できる場合、10%上回った場合に統計的有意差が出るようなサンプル数を決める。「20%上回ったら、臨床的に差がある」と考えるのと、「5%の差でも臨床的に差がある」と考えるのでは、全くサンプル数が変わる。治療効果に統計的有意差が出るかどうかは、臨床的有意差をどう考えるか、つまりサンプル数の設定という人為的前提が大きく影響する。試験治療の侵襲性も臨床的有意差決定に関係する。治療Aが治療Bに統計的に有意に勝った場合、臨床的有意差も合致するように仕組まれている。副次評価項目(secondary endpoint)だけで統計的有意差が出て、多くは臨床的有意差を意味する根拠はない。

産婦人科診療ガイドライン産科編作成時に問題になった、二つのエビデンスを紹介する。一つ目は過期妊娠の問題で、妊娠41週に分娩誘発するか、妊娠42週まで待機して分娩誘発するかというRCTである。妊娠41週で誘発するほうが勝ち、妊娠41週で誘発することがエビデンスだと世界中の多くの人が誤解した。実は、副次評価項目である帝王切開率で有意差(21.3% vs. 24.5%,  $p=0.03$ )が出たのだが、主要評価項目(perinatal mortalityと neonatal morbidityで、サンプルサイズは5分後Apgar scoreで決定)は全く差がなかったの

で、本当はネガティブデータだったのである。二つ目は予防的頸管縫縮術について行われた1,293名のRCTで、「ごく一部の患者に対してしかこの手術をやる価値がない」という結論を導いている。ところが、主要評価項目は妊娠33週未満の早産予防で、頸管縫縮群が有意に優っていたのである。対象は頸管無力症の傾向のある人(典型例は除外)で、縫縮するかしないかというRCTで、妊娠33週未満の早産は「縫縮あり」で13%、「縫縮なし」で17%であった( $p=0.03$ )。しかし著者は、4%しか差がないためこの手術は25人に1人しか利益がなく、手術をしたほうに発熱が増えたこと等があるため、「早産既往が3回以上あるような場合にだけやりなさい」という結論にしたのである。この解釈の混乱は、実はサンプル数の決め方に原因があり、1,292例が多すぎたのである。侵襲性のある頸管縫縮術をする以上、「妊娠33週までの早産率が何%低下したら、頸管縫縮術をするべきか」という臨床的有意差(例えば10%)の検討を臨床試験開始前にするべきであった。もし、10%の差を期待する研究だったら有意差は出なかったもので、頸管縫縮術は侵襲に見合う効果はないという結論になったはずである。統計的有意差が出ているのに、それを否定するという結論には無理がある。

---

### ガイドラインの危険性を最小限に

---

コンセンサスで決められるガイドライン医療、標準医療は正式なステップを踏まないと、根拠も妥当性もない医療が正当化される危険がある。そのため、コンセンサスを得る過程が重要視される。ガイドラインでコンセンサスを得る際、作成委員会、評価委員会、コンセンサスミーティングでの議論、発刊前に開示された案に対する意見聴取など、複数のステップを踏むことが必要である。それでもコンセンサスを得るステップが不足しているという批判は出る。全く欠点がないガイドラインを作ることは難しいが、理想に近いものを作る努力が大切である。3年ごとに改訂することでガイドラインの有効期限を決めている。ガイドラインの作成委員長や作成委員が定期的に替わ

ることも必要であり、産科編の作成委員は平成23年度初めに約半数が交替した。産科編作成委員長は、2014年版発刊直後に交替することが決まっている。2014年版のガイドラインでは、婦人科外来編、産科編ともに、エビデンスとなる論文の構造化抄録をホームページに公開する予定である。今後、癌治療関連のガイドラインの評価に用いられる「AGREE 共同計画」のチェックリストに基づいて、厳しく自己評価してゆくことも計画している。

---

### ガイドラインには多くの役割がある

---

ガイドラインの目的には、「証拠に基づいた診療を明確にする」あるいは「最高の診療を患者や専門家に教育すること」だけでなく、医療者の役割をはっきりさせることも含まれる。産科編のガイドラインでは、分娩監視をする際、「医師、助産師、もしくはよく訓練された看護師」が定期的に行うとしています。つまりよく訓練された看護師あるいは助産師であれば、医師でなくてもよいと明確に記載している。これはアメリカのガイドラインを参考にしている。

ガイドラインが大好きなのは役人と保険会社といわれている。逆に、EBMの専門家と臨床医はガイドラインが嫌いだといわれる。最初は保険会社の資金で作られたガイドラインが、医療経済、医療情報開示、過剰な情報の整理、医療訴訟での適切な判断、社会資源の有効利用などにも役立ち、患者、医師、行政、法律家などに広く受け入れられたといえる。EBMの専門家はコンセンサスで決められる標準医療を認めたくないという考えをもちやすく、臨床医はガイドラインによって診療が縛られることに不満をもちやすい。

---

### ガイドラインと医療訴訟

---

産婦人科診療ガイドライン(婦人科外来編、産科編)の特徴の一つとして、「アクション」つまり、「何々をする」「何々を行う」という行動指針でほとんど書いてある。ほかのガイドラインでは、「手術Aの治療的意義は確立していない」などと見解だけを述べる場合もよくあるが、見解は医療を制約

しないが、かわりに医療者を守ってくれることもないのである。

産婦人科医は「裁量権」という言葉をよく用いる。筆者自身も医療訴訟で被告や鑑定人を務めたことがあるが、「裁量権」は裁判では一切通用しない。「医師の裁量権」は「患者に対して最適の医療を提供する義務」であり、義務を行使する権利のようなものである。危険な感染症や精神疾患で強制的に入院させる権限は、まさに「医師の裁量権」だが、これは例外的である。医師の裁量権を制限するものは二つある。「医療水準」と「患者の自己決定権」であり、「医師の裁量権」はその範囲の中のものである。つまり、裁判においては、裁量権は全く議論されず、医療水準を下回っているかどうかだけが議論される。

標準医療と医療水準との違いについては、標準医療は医療水準とは次元が違う。医療水準も、最適の医療という意味ではほぼ同義に解釈できる面もあるが、必要最小限のレベルで、ベストでなくてもよいようなニュアンスもある。標準医療というのは、ベストでありチャンピオンであり、これを上回る診療は存在しない。先端医療の多くは実験的医療なので、標準医療を上回るとはいえない。ガイドライン医療を守った医師を弁護士が訴えにくい理由は、ここにある。治療の結果が悪い場合でも、標準医療はチャンピオン医療なので、悪い結果だけで責任を問うことはできない。もちろん、個々の患者にガイドライン医療が適切かどうかを判断する義務、裁量権という義務がある。今までの裁判では、多くの産科医が濡れ衣ともいえるようなことで負けることもあったが、それは医療水準に教科書、解説書、原著論文、果ては厚生労働省の班研究報告書などが用いられたからである。裁判官や患者側の弁護士が作る医療水準を下回ったとして、注意義務違反ありとされてきたのである。ガイドラインがなければ、好き勝手に設定される医療水準を放置することになる。最適な医療をしても、結果が悪かったら裁判に負けるような錯覚から脱却すべきである。ガイドラインが医療水準に使われたとしても、正当かつ実行可能で、かつ認識可能・予測可能な医療水準の形成につながると考える。ガイドラインを作るこ

とで、医療訴訟が増えるとか裁判で不利になるという意見もあるが、そうではない。我が国でも産婦人科の医療訴訟は減少しつつある。

### ガイドライン医療以外を行う時

医師の裁量権を制限するのは「医療水準」以外に「患者の自己決定権」がある。産婦人科診療ガイドラインでは実行可能性を検証している。少なくとも8割以上の施設でできるようなもの以外、推奨レベルAにはしない。現場の医療では、ガイドラインに従わないほうがよい状況はあり得る。ただ、その場合は患者にガイドラインに従わない理由を説明し、納得してもらうことが医師にとって安全である。離島などでは、遠くに送るよりも自分の所で、ガイドラインとは別だがそこでのベストの医療を行うのが妥当だということは十分にあり得る。その時に、患者が納得していれば全然構わない。自己決定権の尊重だから、患者が了解していれば何でもいいかという、そうでもない。間違った説明では医師は免責されない。正しい説明をして、患者が自己決定して納得してくれれば、標準医療と違うことを行ってもよいし、むしろより適切であることもある。例外的なことは常にあるという認識は必要である。ただし、迷う状況では、ガイドライン医療に従うのが確実である。

### ガイドラインの教育・普及

ガイドラインの普及のために、全国的な指導者講習会、各地域での教育セミナーが行われている。熱心な医師は、講師にかなり細かいところまで質問して、理解を深めている。勤務医と開業医で細かくガイドラインをチェックし合って、遵守に努めている。これが患者に安全な医療を提供し、かつ、自分たちの身を守るということを理解している。ガイドラインは広く用いられないと存在意義がない。頒布数は、産科編2011年版で15,000部を超え、婦人科外来編で12,000部を超えている。分娩に関与する産婦人科医は8,000人弱なので、法律家、助産師など、いろいろな人が

購入しているということになる。

### ガイドライン使用にあたって

アメリカではガイドライン作成者が訴えられたことがある。NCCNガイドラインには「作成者は治療結果に一切責任をとらない」ということを明記している。これはガイドライン作成者が裁判に巻き込まれないための予防策である。また「あなたの目の前にいる患者に行う治療は、ガイドライン治療がベストとは限りません」、つまり「ベストの治療は何かということを判断するのは、あなたです」と書いてある。つまり、「ガイドライン通りに治療したのだから私の責任じゃない」と弁解することは、医師には許されない。ただ、迷ったら、ガイドライン医療を行うのが原則である。

2011年版でも、産婦人科診療ガイドライン産科編の目的には、「いずれの産科医療施設においても適正な標準的医療が確保される」「産科医療安全性の向上」「人的ならびに経済的負担の軽減」「医療従事者・患者の相互理解助長」というようなことが書かれている。これは婦人科外来編も同じである。それと、「記述内容については学会と医会が責任をもつ」が、「この推奨を実際に実践するか否かの最終判断は利用者が行うべきである」ということや、「したがって、治療結果に対する責任は利用者に帰属する」ということも、このガイドラインに書いてある。

推奨レベルA, B, Cとあるが、1次施設、2次施設、3次施設別に推奨レベルを変えるようなことは行っていない。要するに、ベストの医療はどこでも同じであり、どの診療機関を選択しても受けることができるという判断である。ただ、それぞれの施設には役割があり、その施設で治療することが適切でないとか、治療ができないということは当然あり得る。その際は、患者にきちんと説明して、高次の施設に相談、紹介、搬送するということを前提として、このA, B, Cという推奨レベルを書いている。恐らく、こんなことが書いてあるガイドラインはない。産科の診療ガイドラインだからこそ、書いておく必要がある。



## Review

## Developmental toxicity of diesel exhaust: A review of studies in experimental animals

Makoto Ema<sup>a,\*</sup>, Masato Naya<sup>a</sup>, Masao Horimoto<sup>b</sup>, Haruhisa Kato<sup>c</sup><sup>a</sup> Research Institute of Science for Safety and Sustainability, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 16-1 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8569, Japan<sup>b</sup> Faculty of Risk and Crisis Management, Chiba Institute of Science, 15-8 Shiomi-cho, Choshi, Chiba 288-0025, Japan<sup>c</sup> National Metrology Institute of Japan, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8565, Japan

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 14 November 2012

Received in revised form 22 May 2013

Accepted 25 June 2013

Available online xxx

## Keywords:

Diesel exhaust

Diesel exhaust particles

Carbon black

Nanoparticles

Developmental toxicity

Reproductive toxicity

Testicular toxicity

Reproductive system

## ABSTRACT

Diesel exhaust (DE) is a complex mixture of combustion products of diesel fuel, including gases and diesel exhaust particles (DEPs), commonly known as soot, that contains many toxic air contaminants. Studies of pre- and postnatal exposure to DE or DEPs have revealed changes in growth, sexual development, hormone levels, spermatogenesis, weights of the reproductive and accessory organs, behavior, monoaminergic system, expression of immune-related genes, histopathology of the testes and brain, susceptibility to allergies, and inflammatory and genotoxic endpoints in rodent offspring. Changes in gene expression for gonadal development were also observed after exposure to DE. As for the causative agent for the developmental toxicity of DE, DEPs and the gaseous phase, conflicting findings were reported. Although this paper provides initial information on the potential developmental toxicity of DE including the gaseous phase and DEPs, further studies using relevant concentrations closely reflecting expected levels of human exposure are needed.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

## Contents

1. Introduction.....	1
2. The literature on developmental toxicity of diesel exhaust (DE), diesel exhaust particles (DEPs), and carbon black (CB).....	2
2.1. Effects of diesel exhaust (DE) and diesel exhaust particles (DEPs) on general development and female reproductive system in offspring.....	2
2.2. Effects of diesel exhaust (DE) and diesel exhaust particles (DEPs) on male reproductive system in offspring.....	4
2.3. Effects of diesel exhaust (DE) and diesel exhaust particles (DEPs) on central nervous system in offspring.....	7
2.4. Effects of diesel exhaust (DE) and diesel exhaust particles (DEPs) on inflammatory response and immunological systems in offspring.....	9
2.5. Effects of diesel exhaust (DE) and diesel exhaust particles (DEPs) on genotoxicity in offspring.....	11
2.6. Developmental toxicity of carbon black (CB).....	12
3. Discussion and conclusions.....	12
Conflict of interest.....	15
References.....	15

## 1. Introduction

Diesel engines are one of many sources of ambient particulate matter and gaseous air pollutants [1]. Diesel exhaust (DE) is a complex mixture of particles, commonly known as soot, and gases and

contains more than one hundred different organic and inorganic compounds including many chemicals that have been designated as air pollutants [2]. The particles present in DE (i.e., diesel exhaust particles (DEPs) or diesel particulate matter) are composed of a center core of elemental carbon and absorbed organic and inorganic compounds [3]. DEPs and gases are suspended in the air, and exposure to these pollutants occurs whenever a person breaths air that contains these substances. DEPs are usually the most

\* Corresponding author. Tel.: +81 29 861 8021; fax: +81 29 861 8904.

E-mail addresses: [ema-makoto@aist.go.jp](mailto:ema-makoto@aist.go.jp), [emamakoto@gmail.com](mailto:emamakoto@gmail.com) (M. Ema).

common combustion-derived nanoparticles in urban environmental air and in environmental particulate air pollution in conurbations [4].

DEPs consist of fine particles, <2.5  $\mu\text{m}$  in diameter, including a subgroup with a large number of ultrafine particles (UFPs), <0.1  $\mu\text{m}$  in diameter, and approximately 50–90% of the particles in DEs are in the ultrafine size range, with the majority of diesel particles ranging in size from 5 to 50 nm and the mode at about 20 nm [3]. Small particles have a large surface area which makes them an excellent medium for absorbing organics, and their small size makes them highly respirable and able to reach deep in to the lung. The surface and interface of particles are particularly important components of small particles. Small size particles, especially nanoparticles, have an increased surface area: the mass ratio thereby greatly enhancing their chemical/catalytic reactivity compared to normal-sized forms of the same substance. The introduction of nanoparticles into the environment requires safety evaluations as well as an understanding of the potential impact on human health, because the unique properties and size of nanoparticles may also result in new health risks, which cannot be predicted from the toxicological effects of larger substances of the same composition [5]. The possibility of chemicals, including nanoparticles, entering biological systems is of great concern to the public with regard to possible health effects.

In recent years, reproductive and developmental toxicity has increasingly become recognized as an important part of overall toxicology research. Adverse effects of environmental chemicals on the reproductive success of wildlife populations have been noted [6]. Exposure to air pollution including particulate matter impacted on birth outcomes in humans [7–9] and exposure to traffic-derived pollutants adversely affected human male fertility [10].

Although the health effects, especially carcinogenicity, of DE have been extensively reviewed [2,3,11–14], the effects of DE including DEPs on reproduction and development are not well understood. In this review paper, we summarize the findings of developmental toxicity studies of pre- and postnatal exposure to DE, DEPs, and carbon black (CB), as a model for DE particles without adhered chemicals and metals [15], published as openly available scientific literature.

## 2. The literature on developmental toxicity of diesel exhaust (DE), diesel exhaust particles (DEPs), and carbon black (CB)

Online databases, scanned reference lists, and journals were searched for potentially eligible studies. Notably, the literature on the developmental toxicity of DE, DEPs, and CB was searched using Toxline and PubMed, and Google Scholar through March 2013 with the following keywords; DE, DEPs, CB, nanoparticles, reproductive toxicity, developmental toxicity, teratogenicity, testicular toxicity, pregnancy, embryo/fetus, and fetal anomaly. We only included original articles, excluding abstracts, concerning the developmental effects of pre- and postnatal exposure to DE, DEPs, or CB in experimental animals. A total of 39 articles were considered to be eligible for inclusion in this review. In this paper, statistically significant effects are summarized unless otherwise noted.

### 2.1. Effects of diesel exhaust (DE) and diesel exhaust particles (DEPs) on general development and female reproductive system in offspring

Several studies are available on the effects of pre- and postnatal exposure to DE and DEPs on the general development of offspring and development of the female reproductive system (Table 1).

Time-mated female SD rats (20 rats/group) [16,17] and New Zealand White (NZW) rabbits (21 rabbits/group) [17,18] inhaled 10% DE and 90% clean air or 100% clean air for 8 h/day, 7 days/week. The concentration of DEPs was 6 mg/m<sup>3</sup>. Female rats were exposed on gestational days (GDs) 6–15, and fetuses were examined on GD 20. Female rabbits were exposed on GDs 6–18, and fetuses were examined on GD 29. In either rats or rabbits, no maternal toxicity of DE was observed. Exposure to DE did not cause any changes in numbers of corpora lutea, implantations, resorptions, live fetuses, or dead fetuses. The sex ratio, number, and weight of fetuses were not altered in DE-exposed groups. No teratogenic effect of DE was detected. No detailed information on the characterization of DE was available.

To examine the potential effects of DE on reproduction, CD-1 mice (25 male and female mice/group) inhaled DE containing DEPs at 12 mg/m<sup>3</sup> over 3 generations [17]. Exposure to DE did not affect fertility data including gestation length, fertility rate, litter size, or survival of offspring. An increased weight of the lungs accompanied by anthracosis was observed in DE-exposed mice. The authors of this study noted that exposure to DE did not affect reproduction. Detailed information on experimental conditions including exposure or characterization of DE, or study results was not available.

Pregnant F344/DuCrj rats (24 rats/group) inhaled total DE containing 5.63 mg/m<sup>3</sup> DEPs, 4.10 ppm NO<sub>2</sub>, and 8.10 ppm NO, High Efficiency Particulate Air (HEPA) filtered-DE, or clean air (control) daily for 6 h on GDs 7–20 [19]. In this study, 99.9998% of particles measuring 50 nm or more were eliminated after filtration. Fetuses were examined on GD 20. There were no effects of total DE or HEPA-filtered DE on maternal body weight gain, litter size, or the sex ratio of fetuses. No fetal malformations were observed in either DE-exposed group. In these groups, the body weight of female fetuses and anogenital distance (AGD) of male and female fetuses were increased and the thymus weight of male and female fetuses was decreased. Differentiation of the fetal testis, ovary, and thymus was delayed in both DE-exposed groups. Increased serum testosterone levels and decreased serum progesterone levels were noted in dams of both groups. Serum adrenocorticotrophic hormone levels and urinary excretion of 17-hydroxycorticosteroid, which has been used clinically as a marker of cortisol secretion from the adrenal cortex, did not change in both DE-exposed groups. No differences in these changes were found between the groups. The authors of this study suggested that a deficiency of aromatase caused by NO resulted in the accumulation of testosterone, masculinization of fetuses, and interference with the differentiation of the testis, ovary, and thymus, and that the gaseous phase must include the relevant toxicant.

Female C57BL/6N mice inhaled DE, which was diluted to 0.3, 1.0, or 3.0 mg/m<sup>3</sup> (0.3-DE, 1.0-DE, or 3.0-DE), or filtered clean air (control) for 4 months (12 h/day, 7 days/week) [20]. Females (15 mice/group) were mated with unexposed males at the end of the exposure period, and pregnant females (10–12 mice/group) were allowed to deliver spontaneously. Male and female pups were reared until postnatal day (PND) 70. Clean air and DE contained particles with a mass median aerodynamic diameter (MMAD) of 0.4  $\mu\text{m}$ . The clean air contained 0.01 mg/m<sup>3</sup> of particulate matter, 0.06 ppm NO<sub>2</sub>, 0.10 ppm NO, 0.02 ppm SO<sub>2</sub>, 527 ppm CO<sub>2</sub>, and 0.27 ppm CO. The 0.3-DE contained 0.30 mg/m<sup>3</sup> of particulate matter, 0.53 ppm NO<sub>2</sub>, 3.83 ppm NO, 0.09 ppm SO<sub>2</sub>, 1003 ppm CO<sub>2</sub>, and 1.62 ppm CO. The 1.0-DE contained 1.0 mg/m<sup>3</sup> of particulate matter, 1.74 ppm NO<sub>2</sub>, 11.4 ppm NO, 0.20 ppm SO<sub>2</sub>, 2014 ppm CO<sub>2</sub>, and 6.13 ppm CO. The 3.0-DE contained 3.0 mg/m<sup>3</sup> of particulate matter, 4.19 ppm NO<sub>2</sub>, 25.3 ppm NO, 0.36 ppm SO<sub>2</sub>, 3380 ppm CO<sub>2</sub>, and 14.3 ppm CO. The rate at which delivered dams constructed a good nest was reduced in the 3.0-DE group. On PND 70, body weights of male and female offspring and AGD in male offspring were decreased in the 3.0-DE group. Crown-rump length

**Table 1**  
Effects of diesel exhaust (DE) and diesel exhaust particles (DEPs) on general development and female reproductive system in offspring.

Animals	Test materials/concentration	Exposure		Developmental effects	References
		Method (no. pregnant animals)	Duration (time)		
SD rats	10% DE (6 mg/m <sup>3</sup> DEPs)	Inhalation (20/group)	GDs 6–15 (8 h/day, 7 days/week)	No maternal toxicity No effects on reproductive parameters No effects on fetal survival or development	US EPA [16], Pepelko and Peirano [17]
NZW rabbits	10% DE (6 mg/m <sup>3</sup> DEPs)	Inhalation (21/group)	GDs 6–18 (8 h/day, 7 days/week)	No maternal toxicity No effects on reproductive parameters No effects on fetal survival or development	Pepelko and Peirano [17], US EPA [18]
CD-1 mice	DE (12 mg/m <sup>3</sup> DEPs)	Inhalation (25 males and females/group)	Over 3 generations	↑ Lung weight accompanied by anthracosis No effects on reproduction	Pepelko and Peirano [17]
F344 rats	Total DE (5.63 mg/m <sup>3</sup> particulate matter, 4.1 ppm NO <sub>2</sub> , 8.10 ppm NO) HEPA-filtered DE (99.9998% of particles measuring 50 nm or more were eliminated)	Inhalation (24/group)	GDs 7–20 (6 h/day, 7 days/week)	In both DE groups ↑ Maternal serum testosterone levels ↓ Maternal serum progesterone levels ↑ Fetal body weight of females and AGD of both sexes ↓ Fetal thymus weight of both sexes ↓ Differentiation of fetal testis, ovary, and thymus	Watanabe and Kurita [19]
C57BL/6N mice	Clean air (0.01 mg/m <sup>3</sup> particles with diameter of 0.4 μm) DE (0.3, 1.0, or 3.0 mg/m <sup>3</sup> particles with diameter of 0.4 μm)	Inhalation (10–12/group)	For 4 months before pregnancy (12 h/day, 7 days/week)	↓ Dams made good nest at 3.0 mg/m <sup>3</sup> ↓ Body weight of offspring of both sexes at 3.0 mg/m <sup>3</sup> ↓ AGD of male offspring at 3.0 mg/m <sup>3</sup> ↓ CRL of female offspring at 1.0 and 3.0 mg/m <sup>3</sup>	Tsukue et al. [20]
ICR mice	DE (0.1 mg/m <sup>3</sup> particles, 2.2 ppm NO, 2.5 ppm NO <sub>x</sub> , 9.8 ppm CO, 0.1 ppm > SO <sub>2</sub> )	Inhalation (22/group)	GDs 2–13, except for GDs 4, 5, 11, and 12 (8 h/day)	↓ Expression of BMP-15 in female fetuses	Tsukue et al. [21]
SD rats	DE (HEPA and charcoal filtered, 1.0 mg/m <sup>3</sup> DEPs)	Inhalation (4/group)	GD 2-PNW 7 (7 h/day, 5 days/week)	↑ Stroma proliferative lesions in endometriosis model ↓ Body weight of female offspring ↑ Serum MCP-1 in offspring	Umezawa et al. [23]
SD rats	DE (1.0 mg/m <sup>3</sup> DEPs, 2.67% CO, 0.23 ppm NO <sub>2</sub> , <0.01 ppm SO <sub>2</sub> )	Inhalation (4/group)	GD 2-PNW 7 (7 h/day, 5 days/week)	↑ Chronic activation of mast cells and continual deposition of collagen fiber in endometriosis model ↓ Body weight of female offspring	Umezawa et al. [24]
F344 rats	Clean air (HEPA and charcoal filtered) NR-DE (0.149 mg/m <sup>3</sup> particles, 1.83 × 10 <sup>6</sup> particles/cm <sup>3</sup> ) F-DE (0.003 mg/m <sup>3</sup> particles, 2.66 particles/cm <sup>3</sup> )	Inhalation (6/group)	GDs 1–19 (5 h/day, 7 days/week)	In NR-DE and F-DE groups ↓ Relative weight of maternal liver and spleen, maternal serum progesterone, and CRL of male and female fetuses ↑ Maternal serum LH and corticosterone, expression of P450scc, 3β-HSD and LHR mRNA in corpora lutea, and body weight of male and females fetuses In F-DE group ↑ Maternal serum estradiol-17β	Li et al. [25]

(CRL) in females was shortened in the 1.0- and 3.0-DE groups. The authors of this study noted that DE might have had a prolonged after-effect on the female reproductive system. DEPs that attached to and accumulated in the walls of the lungs and airways contained large quantities of chemicals and these chemicals were gradually released and delivered via the blood or lymphatics during pregnancy.

DE was mixed with clean air that was first passed through a HEPA filter and a charcoal filter [21]. DE contained particles at 0.1 mg/m<sup>3</sup>, NO at 2.2 ppm, NO<sub>x</sub> at 2.5 ppm, CO at 9.8 ppm, and SO<sub>2</sub> at <0.1 ppm. Pregnant Slc:ICR mice (22 mice/group) inhaled the DE or clean air (control) daily for 8 h on GDs 2–13. On GDs 4, 5, 11, and 12, the mice were not exposed to DE. Fetuses and placentas were examined on GD 14. No effects of DE were found on the body weight of dams, pregnancy rate, litter size, fetal weight, or placental weight. The expression levels of mRNA in whole female fetal body for bone morphogenetic protein-15 (BMP-15), but not for steroidogenic factor-1 (AdBP/SF-1) or Müllerian inhibitory substance (MIS), were decreased in the DE-exposed group. The authors of this study indicated that female fetuses prenatally exposed to DE were less sensitive to the expression levels of mRNAs for AdBP/SF-1 and MIS compared with the sensitivity in males previously reported [22] and prenatal DE might affect development of the oocyte because BMP-15 is a member of the transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) superfamily which exerts specific effects on ovarian function.

Inhalation (7 h/day, 5 days/week) of DE was started on GD 2 of pregnant SD rats (4 rats/group) and continued to postnatal week (PNW) 7 of offspring [23]. The DE was mixed with clean air that was passed through a HEPA filter and charcoal filter. The concentration of DEPs was adjusted to approximately 1.0 mg/m<sup>3</sup>. Endometriosis was induced in female offspring at PNW 8 by surgical autotransplantation of uterine tissue to the peritoneum. There was no difference in litter size or the sex ratio of offspring between the DE-exposed group and control (no exposure to DE) group. The body weight of female offspring was reduced on PND 4 and in PNW 8. The extent of stroma proliferative lesions in the endometriosis model was greater in the DE-exposed group. The serum levels of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) were increased in offspring with endometriosis in the DE-exposed group. These findings suggest that exposure to DE aggravates endometriosis. Detailed information on the characterization of DE was not obtained.

Using similar experimental conditions to the above study [23], the pathological changes in the peritoneum that induced endometriotic lesions were examined [24]. DE containing 1.0 mg/m<sup>3</sup> of particulate matter, 2.67 ppm CO, 0.23 ppm NO<sub>2</sub>, and less than 0.01 ppm SO<sub>2</sub> was inhaled by pregnant rats. No effects of DE were observed on litter size or the sex ratio of offspring. Decreased body weight of female offspring was noted at 8 weeks of age. Histopathological examinations revealed that pre- and postnatal exposure to DE enhanced the activation of mast cells and prolonged the persistence of collagen fibers in the induced endometriosis.

Pregnant F344/DuCrj rats (6 rats/group) inhaled air filtered through HEPA and charcoal filters (clean air), nanoparticle-rich DE (NR-DE) containing 0.149 mg/m<sup>3</sup> of particulate matter ( $1.83 \times 10^6$  particles/cm<sup>3</sup>), or filtered DE (F-DE) containing 0.003 mg/m<sup>3</sup> of particulate matter (2.66 particles/cm<sup>3</sup>) daily for 5 h on GDs 1–19 [25]. Pregnant rats were euthanized on GD 20 and fetuses were examined. In the NR-DE and F-DE groups, decreases in relative weight of the liver and spleen were found in maternal rats, and decreased body weight and CRL were observed in male and female fetuses. Decreased levels of serum progesterone and increased levels of serum luteinizing hormone (LH) were observed in maternal rats of both DE-exposed groups. The

maternal serum levels of estradiol-17 $\beta$  were higher in the F-DE group. Expression levels of cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme (P450<sub>sc</sub>), 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (3 $\beta$ -HSD), and luteinizing hormone receptor (LHR) mRNA in the corpora lutea were lowered. The authors of this study described that nanoparticles exerted no significant effects on the function of the corpora lutea and adrenal cortex and toxic chemicals in F-DE might be responsible for the disrupted hormonal regulation.

In summary, pre- and postnatal exposure to DE and DEPs had adverse effects on maternal hormone levels, maternal behavior, growth of offspring, and development of the female reproductive system, but not the morphological development of offspring.

## 2.2. Effects of diesel exhaust (DE) and diesel exhaust particles (DEPs) on male reproductive system in offspring

Studies of the effects of pre- and postnatal exposure to DE and DEPs on the development of the male reproductive system are summarized in Table 2.

Pregnant Slc:ICR mice (10 mice for DE or clean air) inhaled DE or clean air (control) for 8 h/day on GDs 2–13, except on GDs 4, 5, 11, and 12 [22]. The DE was mixed with clean air that was first passed through a HEPA filter and a charcoal filter. The DE contained particles at 0.1 or 3.0 mg/m<sup>3</sup>. Fetuses were examined on GD 14. No adverse effects of exposure to DE were observed on fetal body weight, placental weight, litter size, or the sex ratio of fetuses. In whole male fetal body, levels of mRNA for steroidogenic factor-1 (AdBP/SF-1) and MIS were dose-dependently decreased in both groups exposed to DE. The levels of mRNA for 3 $\beta$ -HSD and aromatase were decreased in the group exposed to DE containing high concentrations of particles. No effects of DE were found on the levels of mRNA for the estrogen receptor (ER) or androgen receptor (AR). It is suggested that prenatal exposure to DE affected male genital development by reducing the expression of genes essential to normal gonadal development.

Pregnant F344/DuCrj rats were divided into five groups (7–14 rats/group): groups that inhaled total DE containing 1.71 mg/m<sup>3</sup> of particulate matter and 0.79 ppm NO<sub>2</sub> (high dose total DE) or 0.17 mg/m<sup>3</sup> of particulate matter and 0.10 ppm NO<sub>2</sub> (low dose total DE); groups that inhaled filtered DE containing 0.79 ppm NO<sub>2</sub> (high dose filtered DE) or 0.10 ppm NO<sub>2</sub> (low dose filtered DE); and a group that inhaled clean air (control) [26]. In this study, most of the diesel-soot particles measuring 0.1–0.2  $\mu$ m or more were removed by filtration of total DE. Rats inhaled each DE from GD 7 to day of delivery for 6 h daily. Male offspring were examined on PND 96. No differences among groups were observed in body weight, epididymis weight, or relative weight of the epididymis or testis. In all DE-exposed groups, the numbers of spermatids and Sertoli cells in the seminiferous tubules and daily sperm production (DSP) were decreased, and the ratio to Sertoli cells was increased among spermatogonia, pachytene spermatocytes, and spermatids. No clear dose-dependent effects were found in these phenomena. The authors of this study speculated that the reduced number of Sertoli cells, and serum levels of follicle stimulating hormone (FSH) in the mature offspring are due to inadequate differentiation of Sertoli cells during late gestation. They noted that the gaseous phase and/or particles measuring less than 0.1–0.2  $\mu$ m might have been the toxicant responsible because almost the same toxicological effects were obtained after exposure to total- and filtered-DE and filtered DE contained the gaseous phase and small particles.

The DE was mixed with clean air and the concentration of DEPs was adjusted to 0.1 mg/m<sup>3</sup> [27]. Pregnant ICR, ddY, and C57BL/6J mice inhaled DE on GDs 2–13, and a gene expression analysis



**Table 2**

Effects of diesel exhaust (DE) and diesel exhaust particles (DEPs) on male reproductive system in offspring.

Animals	Test materials/dose	Exposure		Developmental effects	References
		Method (no. pregnant animals)	Duration (time)		
ICR mice	Low-dose DE (0.1 mg/m <sup>3</sup> particles, 0.04 ppm NO <sub>2</sub> , 0.01 ppm > SO <sub>2</sub> ) High-dose DE (3.0 mg/m <sup>3</sup> particles, 0.7 ppm NO <sub>2</sub> , 0.01 ppm > SO <sub>2</sub> )	Inhalation (10 for DE or clean air)	GDs 2–13, except for GDs 4, 5, 11, and 12 (8 h/day)	↓ Expression of MIS and Ad4BP/SF-1 in male fetuses of both DE-exposed groups ↓ Expression of 3β-HSD and aromatase in male fetuses of high level-DE group	Yoshida et al. [22]
F344 rat	High-dose total DE (1.71 mg/m <sup>3</sup> particles, 0.79 ppm NO <sub>2</sub> ) Low-dose total DE (0.17 mg/m <sup>3</sup> particles, 0.10 ppm NO <sub>2</sub> ) Filtered high-dose DE (0.79 ppm NO <sub>2</sub> ) Filtered low-dose DE (0.10 ppm NO <sub>2</sub> )	Inhalation (7–14/group)	GD 7-day of delivery (6 h/day, 7 day/week)	In all DE groups ↓ DSP ↓ Sertoli cells in seminiferous tubules ↑ Ratios of spermatogonia, pachytene spermatocytes, and spermatids to Sertoli cells	Watanabe [26]
ICR mice, ddY mice, C57BL/6J mice	DE (0.1 mg/m <sup>3</sup> particles)	Inhalation	GDs 2–13	↑ Serum FSH levels ↓ Expression of Ad4BP/SF-1 and MIS in male fetuses of ICR mice ↓ Expression of MIS in male fetuses of C57BL/6J mice	Yoshida et al. [27]
ICR mice	DE (0.3, 1.0, or 3.0 mg/m <sup>3</sup> particles)	Inhalation (20/group)	GDs 2–16 (12 h/day, 7 days/week)	↑ Body weight, weight of testis, epididymis, prostate, and coagulating gland, and serum testosterone at 1.0 and 3.0 mg/m <sup>3</sup>	Yoshida et al. [28]
ICR mice	DE (1.0 mg/m <sup>3</sup> particles, 11.8 ppm NO, 4.6 ppm NO <sub>2</sub> , 0.2 ppm SO <sub>2</sub> , 4922 ppm CO <sub>2</sub> )	Inhalation (20 for DE and clean air)	GDs 2–16	↑ Weight of seminal vesicle at 3.0 mg/m <sup>3</sup> ↓ DSP on PNWs 5 and 12 ↑ Multinucleated giant cells in the seminiferous tubules ↓ Serum testosterone on PNWs 3 and 5 ↑ Serum testosterone on PNW 12 ↑ Expression of FSHR on PNW 5 and StARP on PNW 12	Ono et al. [29]
ICR mice	HEPA-filtered DE (0.004 mg/m <sup>3</sup> particles, 10.2 ppm NO, 4.1 ppm NO <sub>2</sub> , 0.2 ppm SO <sub>2</sub> , 4648 ppm CO <sub>2</sub> )	Inhalation (14/group)	GDs 2–16 (12 h/day, 7 days/week)	↓ DSP on PND 84 and testis weight on PND 16 ↑ Serum testosterone on PND 35 ↑ Expression of LHR on PND 35 and 84, and P450c17 and 17β-HSD on PND 84 ↑ Multinucleated giant cells and vacuolization in testes	Ono et al. [30]
C57BL/6BomTac mice	DEPs (SRM2975, 20 mg/m <sup>3</sup> particles, 1.0 × 10 <sup>6</sup> particles/cm <sup>3</sup> , specific mass median diameter of 240 nm, surface area of 90 mg <sup>2</sup> /g)	Inhalation (20/group)	GDs 7–19 (1 h/day, 7 days/week)	↓ DSP on PND 170	Hemmingsen et al. [31]
F344 rats	Clean air (HEPA and charcoal filtered, 0.005 mg/m <sup>3</sup> particles, 3.28 particles/cm <sup>3</sup> , average mode diameter of 102.6 nm) NR-DE (0.149 mg/m <sup>3</sup> particles, 1.83 × 10 <sup>6</sup> particles/cm <sup>3</sup> , average mode diameter of 26.8 nm) F-DE (0.003 mg/m <sup>3</sup> particles, 2.66 particles/cm <sup>3</sup> , average of mode diameter of 92.6 nm)	Inhalation (5/group)	GDs 1–19 (5 h/day, 7 days/week)	Male offspring in both DE groups ↓ Relative weights of ventral prostate and seminal vesicles plus coagulating glands ↑ Serum immunoreactive-inhibin ↓ Serum FSH, testosterone, and progesterone, FSH, testosterone, and progesterone ↓ Testicular StARP and 17β-HSD ↓ Germ cells in seminiferous tubules	Li et al. [32]
ICR mice	DE (0.17 mg/m <sup>3</sup> particles, 1.25 ppm CO, 0.04 ppm NO <sub>2</sub> , <0.01 ppm SO <sub>2</sub> )	Inhalation (12–14/group)	GD 2-PNW 6 or 12 (8 h/day, 5 days/week)	↑ Degenerative changes in seminiferous tubules ↓ Number of Sertoli cells in seminiferous tubules ↑ Damaged mitochondria in Sertoli cells	Kubo-Irie et al. [33]

was performed using whole male fetal bodies on GD 14. Levels of mRNA for AdBP/SF-1 and MIS were decreased in ICR fetuses and levels of mRNA for MIS were reduced in C57BL/6J fetuses, but no changes in the levels of mRNA for AdBP/SF-1 or MIS were observed in ddY fetuses. Although this report showed strain differences in the effects of prenatal exposure to DE on the expression of genes regulating male gonadal differentiation, it did not provide details on the experimental conditions including the number of pregnant mice per group and exposure period.

Pregnant Slc:ICR mice (20 mice/group) inhaled DE or clean air (control) on GDs 2–16 for 12 h daily [28]. The DE contained DEPs at 0.3, 1.0, or 3.0 mg/m<sup>3</sup>. No difference was observed in the sex ratio of live newborns at birth between the DE-treated and control groups. Male offspring were examined on PND 28. Body weight, weight of the testis, epididymis, prostate, and coagulating gland, and serum progesterone levels were increased at 1.0 and 3.0 mg/m<sup>3</sup>. These effects were not dose-dependent. The weight of the seminal vesicle was increased at 3.0 mg/m<sup>3</sup>. Testosterone levels positively correlated with mRNA levels of steroidogenic enzymes, testis weight, and DSP.

Twenty pregnant Slc:ICR mice inhaled DE, which contained particles at a density of 1.0 mg/m<sup>3</sup>, 11.8 ppm of NO, 4.6 ppm of NO<sub>2</sub>, 0.2 ppm of SO<sub>2</sub>, and 4922 ppm of CO<sub>2</sub>, or filtered clean air (control) on GDs 2–16 and were allowed to deliver spontaneously, and male offspring were examined at 8 and 16 days and 3, 5, and 12 weeks of age [29]. In male offspring of dams exposed to DE, no changes were noted in weights of the body, testis, epididymis, or accessory glands at 12 weeks of age. A decreased DSP and histopathological changes, such as multinucleated giant cells in the seminiferous tubules and reduced numbers of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids, were observed at PNWs 5 and 12. Levels of serum testosterone were decreased in PNWs 3 and 5 and increased in PNW 12. The expression of mRNA in testicular tissue was increased for the FSH receptor (FSHR) at PNW 5 and steroidogenesis acute regulatory protein (StARP) in PNW 12. The authors of this study suggested that the fluctuation of serum testosterone levels due to the increases in the mRNA expression of FSHR and StARP reduced the DSP in male offspring of dams exposed to DE.

DE was diluted with clean air to a constant particle density of 10 mg/m<sup>3</sup> [30]. The diluted DE was immediately passed through a HEPA filter. Pregnant Slc:ICR mice (14 mice/group) inhaled the HEPA-filtered DE or clean air (control) daily for 12 h on GDs 2–16 and were allowed to deliver spontaneously. The male offspring were examined postnatally. The HEPA-filtered DE contained 0.004 mg/m<sup>3</sup> of particulate matter which was similar to the level in clean air, but the concentrations of gaseous compounds (10.2 ppm NO, 4.1 ppm NO<sub>2</sub>, 0.2 ppm SO<sub>2</sub>, and 4648 ppm CO<sub>2</sub>) remained unchanged compared with non-filtered DE. In the HEPA-filtered DE group, no effects were observed on maternal survival, number or sex ratio of offspring, or weights of the body or reproductive organs, except for decreased weight of the testis on PND 16. Histopathological examinations revealed multinucleated giant cells and marked vacuolization in Sertoli cells in the testis of mice on PNDs 35 and 84. Decreased DSP on PND 84 and increased serum testosterone levels on PND 35 were also found. The expression of mRNA for LHR on PNDs 35 and 84, and 17 $\alpha$ -hydroxylase/C17-20-lyase (P450c17) and 17 $\beta$ -HSD on PND 84 was increased in the testis. The authors of this study described that adverse effects might have been caused by UFPs and/or gaseous components because particles with a diameter less than 300 nm and gaseous components passed through the HEPA filter.

The DEPs used for the study were Standard Reference Material (SRM)2975 from the National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, MD) with a mass median diameter of 240 nm [31]. Pregnant C57BL/6BomTac mice (20 mice/group) were exposed to DEPs at 20 mg/m<sup>3</sup> (approximately

1  $\times$  10<sup>6</sup> particles/cm<sup>3</sup>) or clean air (control) on GDs 7–19 daily for 1 h by whole body inhalation. Male offspring were euthanized at PND 170 for examination of their reproductive system. There was no difference in body weight, testicular weight, AGD, and plasma levels of estradiol or testosterone between the DEP- and clean air-exposed groups. The DSP was decreased in the DEP-exposed group. No effect of DEPs was observed on the expression of mRNA in the testis for AR, anti-Müllerian hormone, insulin-like growth factor 3, LHR, ER- $\beta$ , aromatase, or aquaporin 7, 8, or 9.

Pregnant F344/DuCrI/CrIi rats (5 rats/group) inhaled air filtered through HEPA and charcoal filters (clean air), NR-DE, or F-DE daily for 5 h on GDs 1–19 [32]. The average concentrations of particles and gaseous components were as follows: clean air contained particles (average diameter of 102 nm) at 0.005 mg/m<sup>3</sup> and 3.28 particles/cm<sup>3</sup>, 0.27 ppm of CO, 0.01 ppm of NO<sub>x</sub>, and 0.06% of CO<sub>2</sub>, NR-DE contained particles (average diameter of 26.8 nm) at 0.149 mg/m<sup>3</sup>, 1.83  $\times$  10<sup>6</sup> particles/cm<sup>3</sup>, 3.4 ppm of CO, 0.009 ppm of SO<sub>2</sub>, 1.46 ppm of NO<sub>x</sub>, 0.53 ppm of NO<sub>2</sub>, 0.93 ppm of NO, and 0.08% of CO<sub>2</sub>, F-DE contained particles (average diameter of 92.6 nm) at 0.003 mg/m<sup>3</sup>, 2.66 particles/cm<sup>3</sup>, 92.6 nm of 3.3 ppm of CO, 0.008 ppm of SO<sub>2</sub>, 1.41 ppm of NO<sub>x</sub>, 0.51 ppm of NO<sub>2</sub>, 0.91 ppm of NO, and 0.08% of CO<sub>2</sub>. Male offspring were examined on PND 28. There were no deaths, or changes in the body weight or sex ratio of offspring at birth related to the DE-exposure. The relative weights of the ventral prostate and seminal vesicles plus coagulating glands were decreased in both DE-exposed groups. In these groups, serum levels of FSH, testosterone, progesterone, and corticosterone were decreased, and serum levels of immunoreactive-inhibin were increased. Testicular levels of mRNA for StARP and 17 $\beta$ -HSD were lowered in both DE-exposed groups. Histopathological examinations revealed a loss of germ cells in the seminiferous tubules after prenatal exposure to DE. Inhibition of StARP and 17 $\beta$ -HSD due to prenatal exposure to NR-DE and F-DE resulted in the decreased production of testosterone and progesterone and caused testicular dysfunction in immature rats. The authors of this study noted that nanoparticles in DE did not contribute to the impairment of testicular function because exposure to NR-DE and F-DE resulted in similar adverse effects.

Effects of pre- and postnatal exposure to DE on male reproductive development were investigated [33]. The DE was diluted with clean air to maintain a constant particle density of 0.171 mg/m<sup>3</sup>. The DE also contained 1.25 ppm CO, 0.04 ppm NO<sub>2</sub>, and <0.01 ppm SO<sub>2</sub>. Pregnant Slc:ICR mice (12–14 mice/group) inhaled (8 h/day, 5 days/week) the DE or clean air (control) from GD 2 and this continued until examination of the offspring at PNW 6 or 12. Although numbers of dams, pups, and male and female pups in the DE-exposed and control groups were exactly the same as those in Suzuki et al. [34], the exposure period was different. It is necessary to clarify the study conditions because the exposure period is critical to the manifestation of developmental effects. In these reports [33,34], a change in the sex ratio of offspring (decreased number of females and increased number of males) was observed, but not in other reports. No effects of the DE were observed on the general condition of dams or offspring, on weights of the testis, epididymis, or accessory glands, on sperm motility, or on DSP in offspring in PNW 6 or 12. In the testes of DE-exposed males, histopathological examination revealed degenerative changes and decreased numbers of Sertoli cells in the seminiferous tubules and ultrastructural analysis showed an increase in damaged mitochondria in Sertoli cells. The authors of this study concluded that the pre- and postnatal exposure to DE, even at a low concentration, caused testicular damage.

To summarize the findings on the effects of pre- and postnatal exposure to DE and DEPs on development of the male reproductive system in offspring, DE and DEPs caused changes in the weight of the testes and accessory reproductive organs, serum hormone

levels, spermatogenesis, and histopathology of the testes. Changes in gene expression for male gonadal development were also observed in offspring of dams exposed to DE.

### 2.3. Effects of diesel exhaust (DE) and diesel exhaust particles (DEPs) on central nervous system in offspring

Studies on the effects of pre- and postnatal exposure to DE and DEPs on development of the central nervous system are summarized in Table 3.

Pregnant ICR mice (10 mice/group) inhaled DE on GDs 2–16 or clean air (control) and were allowed to deliver spontaneously, and the brain, cerebral cortex and hippocampus of their offspring were light- and electron-microscopically examined at PNW 11 [35]. The concentrations of DEPs were similar to those in the study described above [20]. Numerous cells positive for caspase-3, a common enzymatic biomarker of apoptosis, crescent-shaped spaces, which are suggestive of apoptotic processes, in some cells, signs of apoptosis in granular perithelial (GP) cells, ultrafine DEPs in degenerated GP cytoplasmic granules, and swelling of astrocyte endfoot were observed in the cerebral cortex and hippocampus of offspring of dams exposed to DE. The authors of this study noted that the severity of these changes depended on the concentration of DEPs. No detailed information on experimental conditions or study results was provided in this report.

ICR mice inhaled DE containing  $0.3 \text{ mg/m}^3$  of DEPs on GDs 2–16 and were allowed to deliver spontaneously, and the cerebellum of 10 male and 10 female offspring was light- and electron-microscopically examined at PNW 11 [36]. Only a brief description of the study results and discussion were given. Detailed information on experimental conditions was not available. Diffusely-distributed caspase-3-positive cells, increased numbers of Purkinje cells, and specific features of apoptosis in Purkinje cells were found in the cerebellum in offspring of dams exposed to DE. It was concluded that prenatal exposure to DE has a severe impact on the cerebellum's development and an innate cerebellar deficiency from numerous apoptotic Purkinje cells in offspring of exposed dams.

SRM2975 with a mass median diameter of 240 nm, specific surface area of  $90 \text{ mg}^2/\text{g}$ , and pycnometric density of  $2.1 \text{ g/cm}^3$ , and filtered clean air (control) were inhaled by pregnant C57BL/6BomTac mice (20 mice/group) at approximately  $19.1 \text{ mg/m}^3$  on GDs 7–19 for 1 h/day [37]. Postnatal offspring were examined regarding thyroid hormone levels and behavior. No adverse effects of DEPs were observed in dams. Maternal exposure to DEPs reduced the body weight of weanlings (combined males and females), but not survival of offspring. The body weight of male and female offspring should be presented separately. Although there was a tendency for increased activity and enhanced function in the reversal learning task in female offspring, the authors of this study concluded that cognitive function was generally similar in exposed and control offspring.

Pregnant Slc:ICR mice inhaled DE on GDs 2–17 for 8 h/day, 5 days/week [38]. DE was mixed with clean air. Average concentrations of constituents were as follows:  $1.0 \text{ mg/m}^3$  of particulate matter, 2.67 ppm CO, 0.23 ppm NO<sub>2</sub>, and less than 0.01 ppm SO<sub>2</sub>. In postweaning male offspring of the DE-exposed group, spontaneous locomotor activity during the light phase and concentrations of homovanillic acid, a dopamine metabolite, in the striatum and nucleus accumbens were decreased. Information on the general condition of dams and offspring was not available. The authors of this study noted that prenatal exposure to DE lowered spontaneous motor activity due to a reduction of dopamine turnover in the striatum and nucleus accumbens.

Slc:ICR mice inhaled DE containing similar concentrations of DEPs to a previous study [20] or clean air for 12 h/day, 7 days/week [39]. DE was mixed with clean air. The clean air contained particles at  $0.004 \text{ mg/m}^3$ , 0.12 ppm NO<sub>2</sub>, 0.06 ppm NO, 0.02 ppm SO<sub>2</sub>, and 651 ppm CO<sub>2</sub>. Low-dose DE contained particles at  $0.3 \text{ mg/m}^3$ , 1.34 ppm NO<sub>2</sub>, 3.24 ppm NO, 0.08 ppm SO<sub>2</sub>, 1881 ppm CO<sub>2</sub>, and 0.86 ppm CO. Mid-dose DE contained particles at  $1.0 \text{ mg/m}^3$ , 4.62 ppm NO<sub>2</sub>, 11.75 ppm NO, 0.21 ppm SO<sub>2</sub>, 4922 ppm CO<sub>2</sub>, and 8.59 ppm CO. High-dose DE contained particles at  $3.0 \text{ mg/m}^3$ , 10.52 ppm NO<sub>2</sub>, 27.49 ppm NO, 0.39 ppm SO<sub>2</sub>, 9718 ppm CO<sub>2</sub>, and 24.46 ppm CO. Pregnant mice (5–8 mice/group) inhaled DE on GDs 2–16 (Prenatal exposure group) or dams and pups (15 dams/group) were exposed to DE on PNDs 0–16 (Postnatal exposure group). On PNDs 2, 5, and 16, the expression levels of mRNA for stress-related, steroid hormone-related, and thyroid hormone-related genes in the cerebrums of male and female pups were determined. DE did not affect litter size. Prenatal exposure to DE tended to decrease the body weight of pups whereas postnatal exposure tended to increase it. Prenatal exposure to DE increased the expression of mRNA for cytochrome P450 1A1 (CYP1A1), heme oxygenase-1 (HO-1), metallothionein-1 (MT-1), ER- $\alpha$ , aromatase, and thyroid hormone receptor (TR), and decreased that for MT-1 and neurogranin. Postnatal exposure to DE increased the expression of mRNA for CYP1A1, HO-1, ER- $\alpha$ , and neurogranin, and decreased that for MT-1 and TR. Most of these effects of DE were not dose-dependent. The authors of this study concluded that DE reached the brain of pups of dams prenatally exposed to DE and disrupted the brain's endocrine system.

Average concentrations of constituents of DE diluted with clean air were as follows:  $0.171 \text{ mg/m}^3$  of particulate matter ( $1.06 \times 10^4$  particles/cm<sup>3</sup>), 1.25 ppm CO, 0.04 ppm NO<sub>2</sub>, and  $<0.01$  ppm SO<sub>2</sub> [34]. Pregnant Slc:ICR mice (12–14 mice/group) inhaled the DE on GDs 2–16 for 8 h, 5 days/week and were allowed to deliver spontaneously. The number of female pups in the DE-exposed group was less than half of that in the control group. The determination of spontaneous locomotor activity for 3 continuous days and the neurochemical analysis of the brain and blood were performed using male offspring at PNW 5. In DE-exposed offspring, spontaneous locomotor activity was decreased during the initial 60 min of acclimating to the new environment, during the first 3 h after the lights were turned on, and over the entire test period. Levels of neurotransmitter, dopamine and noradrenaline, and their metabolites were increased in the prefrontal cortex in male offspring at PNW 5. The authors of this study suggested the lowered spontaneous locomotor activity to be due to a transiently facilitated release of dopamine in the prefrontal cortex.

Pregnant Slc:ICR mice inhaled DE on GDs 2–17 for 8 h/day, 5 days/week [40]. Average concentrations of constituents in DE were similar to those in the previous study [38]. The rotating rod test at PNW 5, cliff avoidance test at PNW 6, and brain neurochemical analysis at PNWs 3 and 6 were performed in male offspring. The retention time on the rotating rod and latency to jump off the inverted beaker in cliff avoidance test were decreased in offspring of dams exposed to DE. The concentration of noradrenaline (NA) metabolites and NA turnover were lowered in the cerebellum of offspring in the DE-exposed group. The authors of this study concluded that prenatal exposure to DE altered motor coordination, impulsive behavior, and related monoamine levels in the brain of male offspring.

To summarize the study results on the effects of DE and DEPs on development of the central nervous system of offspring, DE and DEPs affected postnatal behavior, the histopathology of the cerebral cortex and hippocampus, the development of the central dopaminergic system, monoaminergic neurochemistry in the brain, and the expression of steroid hormone-related and thyroid hormone-related genes in the brain.

**Table 3**  
Effects of diesel exhaust (DE) and diesel exhaust particles (DEPs) on central nervous system in offspring.

Animals	Test materials/concentration	Exposure		Developmental effects	References
		Method (no. pregnant animals)	Duration (time)		
ICR mice	DE (0.3, 1.0, or 3.0 mg/m <sup>3</sup> DEPs)	Inhalation (10/group)	GDs 2–16	Numerous caspase-3-positive cells, crescent-shaped space in some cells, signs of apoptosis in GP cells, ultrafine DEPs in the degenerated GP cytoplasmic granules, and swelling of astrocyte endfoot in brain of offspring	Sugamata et al. [35]
ICR mice	DE (0.3 mg/m <sup>3</sup> DEPs)	Inhalation	GDs 2–16	Diffusely-distributed caspase-3-positive cells, increased number of Purkinje cells, and specific feature of apoptosis in Purkinje cells in cerebellum of offspring	Sugamata et al. [36]
C57BL/6BomTac mice	DEPs (SRM2975, 19.1 mg/m <sup>3</sup> particles, ~1 × 10 <sup>6</sup> particles/cm <sup>3</sup> , median diameter of 240 nm, surface area of 90 mg <sup>2</sup> /g)	Inhalation (20/group)	GDs 7–19 (1 h/day)	↓Body weight of weanlings Tendency for increased activity and enhanced function in learning task in female pups	Hougaard et al. [37]
ICR mice	DE (1.0 mg/m <sup>3</sup> particles, 2.67 ppm CO, 0.23 ppm NO <sub>2</sub> , 0.01 ppm > SO <sub>2</sub> )	Inhalation	GDs 2–17 (8 h/day, 5 days/week)	↓ Spontaneous locomotor activity during light phase ↓ Dopamine turnover in the striatum and nucleus accumbens	Yokota et al. [38]
ICR mice	Clean air (0.004 mg/m <sup>3</sup> particles, 0.12 ppm NO <sub>2</sub> , 0.06 ppm NO, 0.02 SO <sub>2</sub> , 651 ppm CO <sub>2</sub> ) Low-dose DE (0.3 mg/m <sup>3</sup> particles, 1.34 ppm NO <sub>2</sub> , 3.24 ppm NO, 0.08 SO <sub>2</sub> , 1881 ppm CO <sub>2</sub> , 0.86 ppm of CO) Mid-dose DE (1.0 mg/m <sup>3</sup> particles, 4.62 ppm NO <sub>2</sub> , 11.75 ppm NO, 0.21 SO <sub>2</sub> , 4922 ppm CO <sub>2</sub> , 8.59 ppm CO) High-dose DE (3.0 mg/m <sup>3</sup> particles, 10.52 ppm NO <sub>2</sub> , 27.49 ppm NO, 0.39 SO <sub>2</sub> , 9718 ppm CO <sub>2</sub> , 24.46 ppm CO)	Inhalation (5–8/group)	GDs 2–16 (12 h/day, 7 days/week)	↑Expression of CYP1A1, MT-1, ER-α, and TR in males ↓Expression of MT-1 in males	Tsukue et al. [39]
		Inhalation (15/group)	PNDs 0–16 (12 h/day, 7 days/week)	↑Expression of CYP1A1, HO-1, ER alpha, aromatase, and TR in females ↓Expression of MT-1 in males and neurogranin in females ↑Expression of HO-1 and neurogranin in males ↓Expression of MT-1 in males ↑Expression of CYP1A1, ER-α, and neurogranin in females ↓Expression of MT-1 in males, and MT-1 and TR in females	
ICR mice	DE (0.171 mg/m <sup>3</sup> particles, 1.06 × 10 <sup>4</sup> particles/cm <sup>3</sup> , 1.25 ppm CO, 0.04 ppm NO <sub>2</sub> , <0.01 ppm SO <sub>2</sub> )	Inhalation (12–14/group)	GDs 2–16 (8 h/day, 5 days/week)	↓ No. of female offspring ↓ Spontaneous motor activity ↑ Dopamine and noradrenaline and their metabolites in prefrontal cortex	Suzuki et al. [34]
ICR mice	DE (1.0 mg/m <sup>3</sup> particles, 2.67 ppm CO, 0.23 ppm NO <sub>2</sub> , 0.01 ppm > SO <sub>2</sub> )	Inhalation (15/group)	GDs 2–17 (8 h/day, 5 days/week)	↓ Retention time in rotating rod test ↓ Latency to jump off in cliff avoidance test ↓ NA metabolites and NA turnover in cerebellum	Yokota et al. [40]