化学物質の安全管理

9月号の特集として、化学物質の安全管理というテーマを企画しました。私たちの周りの環境水系を汚染する様々な化学物質について、いかに安全性を確認し、どのように対応していけばよいのかを整理することを目指しています。安全性に関する動物実験データからどのような手法と論理でヒトの場合の規制値を導いていくかについて、執筆者それぞれの専門分野から論じてもらいました。また、具体的な対応例として、環境中の化学汚染物質のモニタリングと、改正化審法について取り上げ、それぞれの経緯を明らかにしてもらいました。会員諸氏にとって研究進展の参考になればと考える次第です。

(担当 工藤一郎*)

化学物質の毒性試験方法**

大 野 泰 雄

1. はじめに

科学技術の発展は多くの新規化学物質を提供または生産し、我々に福利をもたらした。しかし、その中にはヒトに危害を及ぼし得るような化学物質も多く存在する。これらの化学物質による危険を防止し、安全な使用を促進するためには動物を用いた各種の毒性試験を行うとともに、化学物質の使用目的、使用量、使用形態、分解性等の物理化学的性質、動物・植物等への

蓄積性及びそれらへの影響も含め、総合的に評価する必要がある。

農薬及び医薬品の製造・販売に関する申請に必要な毒性試験を統一に行うために、化学物質の使用形態に応じた毒性試験法指針（ガイドライン）が作成された¹⁾²⁾。現在のところ、一般の化学物質に関するわが国独自のガイドラインといえるものはないが、経済協力開発機構（Organization of Economic Cooperation and Development : OECD）の作成したガイドラインに依拠するよう OECD により勧告されている³⁾。

毒性試験法は化学物質、農薬、医薬品のそれぞれで若干異なるが、ここでは OECD および農林水産省のガイドラインを中心に説明する。これらのガイドラインの基本的な考えは試験法の基準を確立することにより、客観的な評価に耐えうる資料を確保し、同種試験の繰り返しをなくし、国際的な相互交換と利用を可能にすることにある。使用する動物種、匹数、投与方法、投与期間、病理解剖検査に関する事項等に至るまで具体的・詳細に記述されている。ただし、ガイドラインはあくまで最低の要求項目であり、実験の追加やそれぞれの検体に応じた合理的な改変を妨げるものではない

Yasuo Ohno

昭和51年 東京大学薬系大学院博士課程修了

同年 国立衛生試験所

57年 スウェーデン、カロリンスカ研究所へ留学

～58年 カ研究所へ留学

薬学博士

〔趣味〕 草野球

* Ichiro Kudo, 東京大学薬学部, 本誌編集企画委員

** Outlines of Toxicological Methods for Chemicals, 昭和61年6月24日受理

い。

一方、申請データが適切に行われた試験の結果であり、信憑性のあるものであることを保証するために、安全性試験の実施に関する基準（Good Laboratory Practice : GLP）が作成され、試験実施機関の組織及び職員の資質、教育、社内査察による信頼性保証組織（Quality Assurance Unit : QAU）、試験操作手順、データの保管等のソフト面から施設の構造や試験機器等のハード面まで規定された。行政機関による試験実施機関の査察も行われる。

化学物質に関する OECD のガイドラインでは急性の経口、経皮、吸入毒性試験、眼および皮膚刺激試験、皮膚感作試験、14～28日間の反復投与試験、変異原性試験が市販前の試験成績最少資料セット（Minimum Pre-marketing Set of Data : MPD）として求められている。ただし、毒性をさらに明確に示すために、あるいは未知の毒性を高感度に検出するために、他のより長期の毒性試験や特殊な試験を行うことが望まれている。残留性の農薬では MPD で挙げられた項目以外に亜急性毒性、慢性毒性試験、発癌性試験、繁殖試験、催奇形性試験、急性遅発性神経毒性試験（主に有機リン剤を対象に考えられた試験であり、ニワトリの行動及び神経病理学的観察から神経毒性を調べる方法）、生体内運命に関する試験、及び生体の機能に及ぼす影響（主に急性中毒反応の解析のために行うものであり、中枢神経系、呼吸・循環器系、自律神経系、消化器、骨格筋及び血液に対する作用を検討する）に関する試験が求められる。ただし、残留性の問題がない時は、慢性毒性試験、発癌性試験、繁殖試験の結果は必ずしも提出する必要はない。

以下に代表的な毒性試験方法について概略を述べるが、その詳細はそれぞれのガイドラインおよび成書を参照されたい。

2. 急性毒性試験

急性毒性試験では経口及び非経口的に比較的高用量の被験物質を動物に一回投与することによる影響を14日間にわたって観察することにより毒性の性格を知り、死亡の見られる場合には50%致死量（LD₅₀：統計学的に被験動物の50%を死亡させると推定される化学物質の用量）を決定するとともに、死因を追求する。この試験により、薬物の生物作用に対する予備的知見が得られ、以後の亜急性・慢性毒性試験の計画に反映される。また、他の毒性既知の薬物との比較がなされる。

薬物による毒性発現には種差、系統差、性差の存在することが知られている（表1）。そこで表2に示した

表1 TCDDの急性毒性における種差

種	LD ₅₀ (μ g/kg)
モルモット	0.6～19
ラット	22～60
サル	<70
ウサギ	115, 275
マウス	114, >450
ハムスター	1155, >3000
ニワトリ	25～50

TCDD: Tetrachloro dibenzo-*p*-dioxine

表2 農薬に関する一般毒性試験法の比較

	種数	群数	匹/群	投与期間(観察期間)
急性毒性試験				
経口投与	≥ 2	= 5	≥ 5	1回(14日以上観察)
経皮投与	≥ 1	≥ 3	≥ 5	1回(14日以上観察)
吸入投与	≥ 1	n*	≥ 5	4時間以上(14日以上観察)
亜急性毒性試験				
経口投与	≥ 2	≥ 4	≥ 10	90日
経皮投与	≥ 1	≥ 4	≥ 5	21日
吸入投与	≥ 1	≥ 4	≥ 10	13週
慢性毒性試験**				
げっ歯類	≥ 1	≥ 4	≥ 20	24ヵ月(ラット) 18ヵ月(マウス)
非げっ歯類	≥ 1	≥ 4	≥ 4	12ヵ月(イヌ)

雌雄いずれについても上記の試験が求められる。

* LD₅₀の計算に十分な群数

** 飼料に混ぜて投与する。

ように農薬の経口投与試験では2種以上の哺乳動物の雌雄を用いることが規定されている。いずれの場合もマウス・ラット等のげっ歯類ではLD₅₀を求めるのに十分な用量、群数および動物数で行うことが求められている。また、投与方法による差も存在するため、化学物質・農薬とも強制経口投与(注射器に先端の丸くなった金属製あるいはゴム製のチューブを取りつけ、直接胃内に試料を投与する方法)、経皮投与(試料を繰り返し皮膚に塗布したり、皮膚に密閉できる容器を接着剤等で取りつけ、その中に試料を入れ皮膚から吸収させる方法)、吸入投与(特別の密閉型のケージに動物を入れ、試料をガス状またはエアロゾル状にして空気に混ぜ、吸気とともに動物に吸入させる方法)の3種類の投与方法で検討する。

LD₅₀値の信頼性及び有用性については議論が存在し、動物愛護の立場からの批判もあるが⁹⁾、劇物・毒物等の区別を行うのに必要な資料である。また、他の試験ではこれほどの高用量を用いた試験は行われず、結果は貴重である。

3. 亜急性・慢性毒性試験

亜急性・慢性毒性試験とは被験物質を長期間連続して動物に投与し、中毒症状が現れる用量(確実中毒量)と、なんら中毒症状の認められない用量(最大無作用量)を見出すことを主目的とするものである。この結果をもとにしてADI値(acceptable daily intake:長期間にわたり毎日摂取しても生体になんら影響を及ぼさないと判定される一日当たりの摂取量)が決められる。

農薬の亜急性毒性試験では経口、経皮、吸入投与により、21日～91日にわたり、毎日投与することによる影響を検討する(表2)。なお、3段階以上の用量を用いるが最高用量は毒性徴候はでるが有効な評価ができなくなるほど死亡しない量を、また、最低用量は無作用量の検討ができる量を選ぶ。試験期間中の摂取量、体重を記録し、途中死亡例については解剖し、器官・組織の肉眼的観察を行い、臓器の鬱血、変成、肥大、萎縮、及び腫瘍の有無等について検査する。肝、腎、副腎、精巣、甲状腺、その他の主要臓器重量を測定する。通常、肉眼的病変部、標的臓器、肺、肝臓、および腎臓について、顕微鏡下で病理組織学的検索を行い、腫瘍が良性であるか悪性であるかの判断、または組織、細胞レベルでの病変の有無について検討する。他の臓器についても必要に応じて病理組織学的検査ができるように肉眼的病変部と指定された器官、臓器を保存する。また、試験終了時に赤血球、白血球、血小板等の血液学的検査及びGOT、GPT、 γ -GTP、その他の血清酵素等について血液生化学的検査を行う。必要に応じて、尿検査、眼科的検査も行う。

化学物質の亜急性毒性試験も農薬とはほぼ同様に行われるが、血液学的および臨床生化学的検査は試験開始時、終了時、及び1ヵ月ごとまたは試験中間期に行うことが求められている。また、病理組織学的検索はより多くの器官・臓器について行うよう規定されている。

農薬及び化学物質の慢性毒性試験ではげっ歯類(ラット等)及び非げっ歯類(イヌ等)をそれぞれ1種以上用いる(表2)。げっ歯類では離乳後まもなくから(通常6週齢以前)はぼその一生に相当する期間、原則として被験物質を飼料に混合して、毎日投与し、亜急性毒性試験の場合とはほぼ同様な観察を行うものである。用量は亜急性毒性試験と同様に設定する。

4. 繁殖試験

マイトマイシンCやエチルメタンスルフォネート等の薬剤は生殖細胞に作用し、精子や卵の形成、受精また受精後の個体発生を阻害し、結果として繁殖率を

低下させる。このような毒性を検出するために行うのが繁殖試験である。具体的には、まず親世代動物(F_0)に8週齢頃から検体を8週以上連日投与したのち交配し、次世代動物(F_1)を得、離乳後 F_0 を屠殺し、 F_1 は検体を8週以上投与した後に同腹仔でない F_1 を交配させ第2世代(F_2)を得、離乳期に F_1 、 F_2 を屠殺する、というものである(図1)。この二世代之間、一般状態、死亡の有無、体重及び摂餌量、交尾率、受胎率、出産率、内部器官の観察、出生仔の数、生死、性別、体重、外表の検査、その成長、形態及び機能の発達を観察する。なお、検体は原則として飼料に添加して投与する。農薬では必要に応じて3世代にわたる試験が望まれている。

図1 OECDの指針による二世世代繁殖試験の概略(なお、残留性農薬では F_1 及び F_2 について胎仔の観察を行い、 F_2 は成熟後に屠殺する。)

5. 催奇形性試験

催奇形性試験は手の短縮したあざらし症の子供がサリドマイドという睡眠薬を飲んだ妊婦から大勢生まれた事件への反省から生まれた試験である。この試験では妊娠動物を用い、胎仔の器官形成期を含む期間(ラットでは妊娠6～14日)化学物質を投与し、胎仔の成長、生死、骨格、内臓などの発育への影響を主に肉眼的に観察するものである。この試験では2種以上の動物、一般にはラット及びウサギを用いる。前者では1群20匹以上、後者では1群12匹以上の妊娠動物を用いる。ラット等のげっ歯類では妊娠末期に屠殺後その1/3～1/2を胎仔の骨格異常の検査に、残りを内臓異常の検査にあてる。ウサギでは各胎仔を解剖し内臓異常を調べたのち骨格異常の検査を行う。妊娠の成立、胎仔の死亡、また生存胎仔についてはその体重や形態の検査を行う(写真1に骨格異常の例を示した)。

6. 変異原性試験

遺伝子に対する作用を検討するために行われるもので、農薬では、1)細菌を用いる復帰変異試験、2)哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験、3)細菌を用いるDNA修復試験、の実施が求められる。なお、医薬品では3)は規定されておらず、本来細胞核の存在しないげっ歯類の赤血球中への核様物質の出現を検討する、小核試験が求められている。ここでは紙面の都合もあり1)についてのみ説明する。

a) 第6頸椎が短小であるがその他はほぼ正常

b) 肋骨及び脊椎の癒合、変形など広範囲にわたる骨格異常が生じている。

写真1 サリチル酸投与により生じた骨格異常の例

細菌を用いる復帰変異試験とはいわゆるエームス試験で代表されるものであり、突然変異を起こし最小栄養培地で生育できなくなったヒスチジン要求性のサルモネラ菌やトリプトファンあるいはアルギニン要求性の*大腸菌*が化学物質の作用により再び突然変異を起こし、最小栄養培地で成育できるようになった菌の数から、突然変異誘発能を検討するものである。化学物質の中にはそのままの形で変異原性を持つものが多いが、生体内で酵素的に酸化・還元を受けた後に変異原性を現すようになる(代謝的活性化)物質も多い。このような物質も検出するために、哺乳動物(主にPCBで前処置したハムスター)の肝臓ホモジネートを遠心分離し核とミトコンドリアを除いた分画(S9)と酵素反応に必要なNADPH等の共役因子を被験物質とともに微生物懸濁液に加える方法も平行して行われる。

なお、変異原性試験で陽性となったものの多くは発癌試験でも陽性となることが多いが、発癌性の知られているエストロジェンのようなホルモン剤、プリン誘導体のような免疫抑制剤、有機塩素化合物等のプロモーターでは変異原性が陽性とならない。

7. 発癌性試験

試験動物が生涯の大半にわたり特定の化学物質に暴された場合の発癌性の有無について調べることを目的とする。農薬における癌原性試験では2種以上の動物を用い、その雌雄それぞれについて3段階以上の用量及び対照群について、各群50匹以上の動物を用いる。被験物質は飼料または飲料水に添加し、離乳後まもなくから、ラットの場合は24~30カ月間、マウスでは18~24カ月間投与する。一般状態を毎日観察し、腫瘍の発生時期、発生部位、大きさ、進行を記録する。途中死亡例または死期の迫ったものについては屠殺、剖検し、器官・組織の肉眼的観察及び病理組織学的観察を行う。また、試験開始後12カ月、18カ月及び試験終了時に血液を採取し、赤血球及び白血球数を測定するとともに、塗抹標本を作成し、白血球百分比を測定する。投与終了後1~3カ月以内に動物を屠殺し、慢性毒性試験の場合と同様の検索を行う。

化学物質の発癌性試験もほぼ同様に行われる。ただし、農薬では病変が見られた部位を中心に病理組織学的検査を行うのに対し、化学物質ではより多くの器官・臓器について検査する。

8. 生体内運命に関する試験

被験物質の動物体内での挙動を解明するために行われる。通常はラットまたはイヌを用い、放射性同位元

素で標識した被験物質を経口投与、または必要に応じて静脈内投与を行い、消化管からの吸収、主要臓器への分布及び尿・糞・呼気中への排泄を検討する(図2)。農薬では原則として一回投与し、排泄は7日間または投与量の90%が排泄されるまで測定し、主要臓器への分布は複数の時点で測定される。蓄積性が予想される場合には連続投与試験も行う。主要な代謝物を同定し、代謝経路を明らかにするとともに、蛋白質やDNA、RNA等の生体高分子との共有結合性も検討する。なお、特定臓器や特定細胞への薬剤の蓄積、結合を評価するためには全身あるいは組織レベルでのオートラジオグラフィ(放射性同位元素で標識した化学物質を動

図2 尿、糞及び呼気を集めるための代謝ケージ

図3 脂肪組織および肝臓におけるγ-クロルデンの分布 (○; 50 μg/kg, ●; 10 mg/kg: それぞれ経口投与した。)

物に投与したのち、動物を薄い膜状に切断し、これを放射線で感光するフィルムに重ねることにより、化学物質の蓄積した臓器や細胞を明らかにする技術)が有効である。代謝経路の測定は *in vivo* だけでなく、還流臓器、遊離肝細胞、及び細胞下レベルでも行われる。

これらの結果は長期毒性試験の用量の設定や毒性の標的臓器の予想、毒性発現機構の解明及び毒性試験結果をヒトに外挿する上で貴重である。一方、脂溶性薬剤を静脈内投与する方法はまだ確立されておらず、消化管からの吸収率、血中半減期、分布容積(投与量を血中濃度で割ったもので組織への分布を知る目安となる)などのパラメーター測定を困難にしている。また、PCB (poly-chlorinated biphenyl) やクロルデンのような有機塩素系化合物の皮膚や肝臓、脂肪組織中での半減期は比較的長く、7日間以上にわたり測定することが必要である(図3)。比較的高用量で行われる生体内運命に関する試験の結果が実際の汚染レベルでも妥当であるか否かの問題もあるが、γ-クロルデンでは用量を200倍変化させても影響は少なかった(表3)。なお、農薬では植物体内における運命及び土壤中における運命も検討されねばならない。

9. その他の問題点

現在の毒性試験法により多くの化学物質についてその毒性を感度良く検出し、評価に役立てることができると思われる。しかし、それに要する労力、費用、動物は多大なものであり、より経済的な試験法の開発が必要であろう。また、表1で示した TCDD (tetrachloro dibenzo-*p*-dioxine) のように極端に強い毒性を有するものを従来の方

表3 γ-クロルデンの毒力学パラメーターの用量による比較

	低用量(50μg/kg)			高用量(10mg/kg)			CoH/CoL
	CoL	T1/2(a)	T1/2(b)	CoH	T1/2(a)	T1/2(b)	
血液	4.1	時間 9.1	日 6.4	829	時間 8.7	日 5.0	199
脳	25.2	4.8	4.8	5478	4.9	6.6	216
骨格筋	12.4	6.5	8.9	2137	5.2	7.3	172
皮膚	35.4	13.0	7.1	6907	11.8	5.5	194
腎臓	110.2	8.2	4.8	24021	9.2	4.4	217
肝臓	91.2	9.6	5.1	29852	5.9	4.3	327

経口投与後10日間における組織中濃度を2-コンパートメントモデルで解析した結果、CoL、CoHはそれぞれ低用量、および高用量時のデータから計算した初期濃度 (ng eq./g tissue) を示し、T1/2(a)、T1/2(b)はそれぞれ急速低下相およびゆっくり低下していく相における半減期を示す (Ohno *et al.*, *J. Toxicol. Sci.* 11, 111, 1986)。

者への危険を防止するための設備、実験手順等に関する明確な指針を作成する必要があるとともに、動物試験に入る前に少量の被験物質で行える *in vitro* の試験で十分に予備試験を行うべきである。

また、これらの毒性試験は全て健康な動物を用いて行うことになっているが、疾患や加齢、また TCDD のような環境汚染物により免疫機能の低下している場合や、細胞内で毒性防護的に働いているグルタチオン含量を低下させる化学物質と併用した場合には同じ化学物質でもより強く毒性が出ることが容易に予想される。また、フェノバルビタールのようにそれ自身では変異原性を持たないが、他の物質の発癌作用発現に影響するもの (プロモーター) もある。このような、他の化学物質との併用による毒性発現をも考慮する必要がある。

また、表4で示したように PCDD (poly-chlorinated dibenzo-p-dioxine) の毒性は塩素原子の数や位置により大きく異なっている。これは現在使われているクロルデン^{註1)}等の塩素系農薬が多くの同属体の混合物であり、その内には未同定の物が多く含まれていることを考慮した場合、その安全性評価の上で問題を投げかけ

表4 PCDD 分子内での塩素原子のつく位置とその数による急性毒性の変化

塩素のついた位置、数	LD ₅₀ (μg/kg)	
	モルモット	ラット
2,8-	>300,000	—
2,3,7-	29,444	>3,000
2,3,7,8-	2	284
1,2,3,7,8-	3	338
1,2,4,7,8-	1,125	>5,000
1,2,3,4,7,8-	73	825
1,2,3,6,7,8-	70-100	1,250
1,2,3,7,8,9-	60-100	>1,440
1,2,3,4,6,7,8-	>600	—

PCDD: poly-chlorinated dibenzo-p-dioxine
(McConnell *et al.*, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 44, 353, 1978)

るものであろう。

最後に、ガイドラインに示された方法だけで満足することなく、必要に応じて改変、追加することが必要であり、また毒性発現機構解明への努力が、毒性試験結果のヒトとの外挿に有益である。

文 献

- 1) 農林水産省(1985)毒性に関する試験成績を作成するに当たったの指針, 59農蚕第4200号。
- 2) 厚生省 (1984) 医薬品の製造 (輸入) 承認申請に必要な毒性試験のガイドラインについて, 薬審第118号。
- 3) 大森義仁監修 (1981) OECD化学物質毒性試験指針, 化学工業日報社。
- 4) 厚生省 (1983) 医薬品の安全性試験の実施に関する基準について, 薬発第313号。
- 5) 通産省, 基礎産業局化学品安全課監修 (1985) 化審法関係 GLP 制度の概要, よりよき試験施設の運営のために, 通商産業調査会。
- 6) Ed. F. Homburger (1985) Safety Evaluation and Regulation of Chemicals 2, Impact of Regulations-Improvement of Methods, Karger AG.
- 7) 白須泰彦, 吐山豊秋編 (1985) 新毒性試験法—方法と評価—リアライズ社。

注1) PCBと同じ特定化学物質に指定し、一般の使用を実質的に禁止しようとする方針が本年6月28日に決定した。