

10) 単回投与毒性試験－OECD 試験法ガイドラインにおける 急性毒性試験代替法の展開－

小野 宏

食品薬品安全センター 秦野研究所

1. 急性毒性試験の意義と代替法開発の経緯

急性毒性試験(単回投与毒性試験)は、現在 OECD において動物実験代替法が公式に承認されてガイドラインとなっている唯一の試験である。すなわち、OECD 試験法ガイドライン No.401「急性経口毒性試験」に対する代替法 No.420「急性経口毒性試験：固定用量法」、No.423「急性経口毒性等級法」および No.425「急性経口毒性試験：上げ下げ法」である。代替法の validation(有用性確認)の作業が実際に行われたのもこの試験が初めてであった。ただし、これらの代替法は使用動物数の削減は実現したもの、実験動物の全くの非使用を可能にしたものではない。また、毒性観察の簡略化は必ずしも試験手順の簡略化を意味しないこともこれらの代替法は明らかにした。

毒性試験の簡略化が種々の理由から各方面で要望されている。毒性試験の多大の経費の低減、煩雑な操作の簡略化、簡易化、標準化などの企図から求められるのである。毒性試験は、主として行政規制によって要求されて、化学物質の取扱いの安全性のために実施を義務づけられており、行うべき作業の内容についても規定されている。動物の消費数を決定するものも行政の要求すなわちガイドラインの如何である。

欧米における動物愛護運動は 1970 年代に入って高まり、動物実験批判が強力に行われるようになった。批判の的は、まず動物に外科的侵襲を加える実験、次に多数の動物を消費し、それらを死に至らせる急性毒性試験、そして眼や皮膚の刺激性試験であった。かつて急性毒性試験は、半数致死量 (LD_{50}) を求めることに固執して行われ、「 LD_{50} 試験」と呼ばれることもあった。 LD_{50} は実験結果(各用量における死亡率)を基

にしてプロビット法で計算して信頼限界値つきで報告される。その値を正確に求めようとして、多数の動物を使用する傾向があった。これを「古典的」急性毒性試験という。

このような急性毒性試験は毒性の検査法として有用性が低いという批判がなされた。それは LD_{50} 算定に固執したためである。 LD_{50} は化学物質の毒性を代理するほどのパラメータであるが、薬物治療における安全性では実際上有用性がなく、また生物学的数値であるから変動があつて、不動の数値として信頼することが出来ない。 LD_{50} を求める実験においては、多数の実験動物を消費し、単に死亡数を数えるのみの作業が要求される。つまり、要求する行政の側にも、実施する研究者側にも、経済的負担をする側にも、なんらかの問題意識があり、動物愛護の側からも強い反対がなされた。急性毒性試験の代替法はこのような背景で開発されてきた。

公的な試験法ガイドラインは、安全性評価のための要求を残しながら、動物愛護の趨勢に対応してきた。厚生省医薬品毒性試験ガイドラインでも、1983年の通知による急性毒性試験では、動物種として齧歯類 2 種と非齧歯類 1 種について、動物数は 1 群あたり齧歯類は 5 匹以上、非齧歯類は 2 匹以上を用い、 LD_{50} 算定に必要な群構成とし、投与経路は、経口投与のほか 2 種類の非経口経路で試験することとされていたが、1989年の改定では、齧歯類 1 種と非齧歯類 1 種について、動物数は齧歯類が 1 群 5 匹以上、非齧歯類 2 匹以上と変わらないが、群構成は、概略の致死量 (Approximate LD_{50} ; ALD) を求めるに必要な数となつて、投与経路も経口投与のほか、臨床投与経路が非経口投与である場合にその経路を用いて試験する、また用量の限度として 2000 mg/kg と

いう値が示された。これはOECDにおける急性経口毒性試験(No.401)の改定ともほぼ一致している。

元来、LD₅₀算定を含む急性毒性試験が行われた目的には、

- (1) 物質の毒性に関する基礎資料を得ること、
- (2) 長期毒性試験・臨床試験の用量決定の資料とすること、
- (3) LD₅₀を物質の危険度分類、取扱注意の根拠とすること、
- (4) 急性曝露による中毒の対策の資料とすること、
- (5) 類似化学物質間の比較の資料とすること、
- (6) 生物検定・製品規格の項目となること、

が挙げられる。これらのさまざまな目的のために、行政、企業および学問的に急性毒性試験またはLD₅₀値が用いられてきた。

このような急性毒性試験の代替のためには、目的別に方策を考える必要がある。

- (1) 毒性の基礎資料としてLD₅₀を用いることは廃止してもよい。それよりむしろ、毒性検査を充実し、単回(大量)投与による毒性の症状観察を十分に行うのがよい。
- (2) 次の段階の試験の用量決定は、概略の致死量で代替できるであろう。あるいは、他の毒性指標を活用することがよいであろう。
- (3) 化学物質の危険度分類、表示の根拠としてLD₅₀を用いる方式は、広く採用されていたものであるが、現時点ではこのために開発され、有用性確認も行われた代替法で行うことが適当であろう。ただし、他の毒性指標も考慮すべきであろう。
- (4) 急性中毒対策の資料としては、急性毒性試験の症状観察の情報は必要であり、分類表示のための代替法では代用できないものもある。毒性検査を充実して少数の実験動物から効率的に毒性情報を採取すべきである。他の方法による毒性情報も考慮すべきである。
- (5) 構造類似物質の毒性の比較のためにLD₅₀を用いることは廃止するしかな

い。

- (6) 生物検定や製品規格の項目としてのLD₅₀の必要性は、規格の改定がなされない限り当分なくなる。その改定には、対象物質がきわめて多く、個別の対応を必要とするので、相当の時間を要し、これを進めるには強力な推進力が必要であろう。公定書の生物検定法は、可能なものは化学的あるいは免疫学的測定法に置き換えられつつある。

2. OECD 試験法ガイドラインにおける急性毒性試験の代替法

(1) 固定用量法 (Fixed Dose Procedure; FDP. OECD TG No.420)

1988年に、急性経口毒性試験(No.401)の代替法として英国がOECDに提案した固定用量法(英国毒性学会=BTS=法)は、LD₅₀の算定を省き、動物の苦痛を伴う致死量の観察は行わず、試験する用量をあらかじめ固定しておき、方法を簡略化するとともに使用動物数を減らす効果を上げるという方法である。その手順は図のように、雌雄各5匹を1群とするラットを用いた単回経口投与試験を5, 50, 500 および2000 mg/kgの固定用量から選んだ用量で段階的に行い、「明白な毒性 evident toxicity」を現す用量を以て毒性の強さを分類する方法である。明白な毒性とは、それより上の用量では死亡が起こると予想される毒性と定義されている。(図1)

このFDPは、国際的共同研究によって有用性確認試験が行われ、その結果を基にして提案され、承認され、1993年7月OECD試験法ガイドラインNo.420として収載された。

(2) 急性毒性等級法 (Acute Toxic Class Method; ATC)

1990年からドイツ厚生省(BGA)の提案で、急性経口毒性試験の別の代替法である急性毒性等級法の国際共同研究が行われた。これは、25, 200, 2000 mg/kgの固定用量について1用量1性3匹ずつのラットを用いて単回経口投与毒性試験を行い、死亡率に応じ、図式に従って性および用量を変えて段

図1.

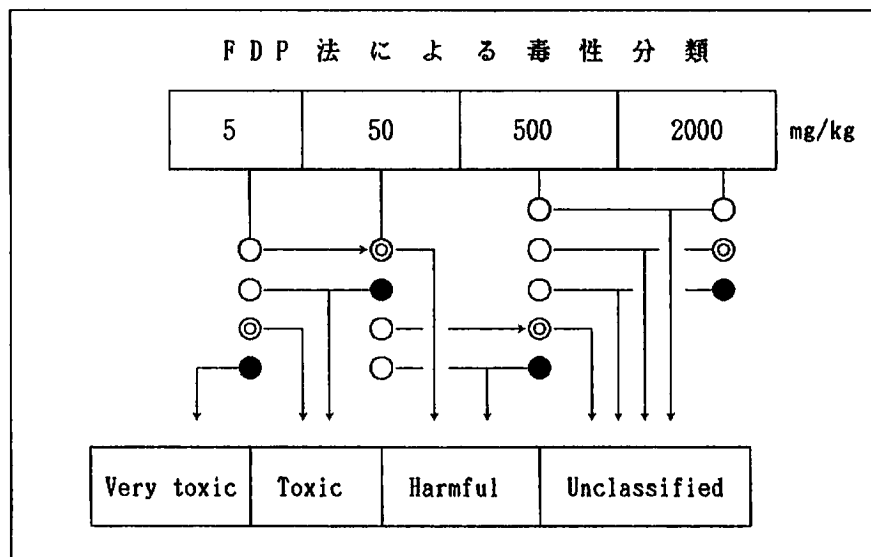
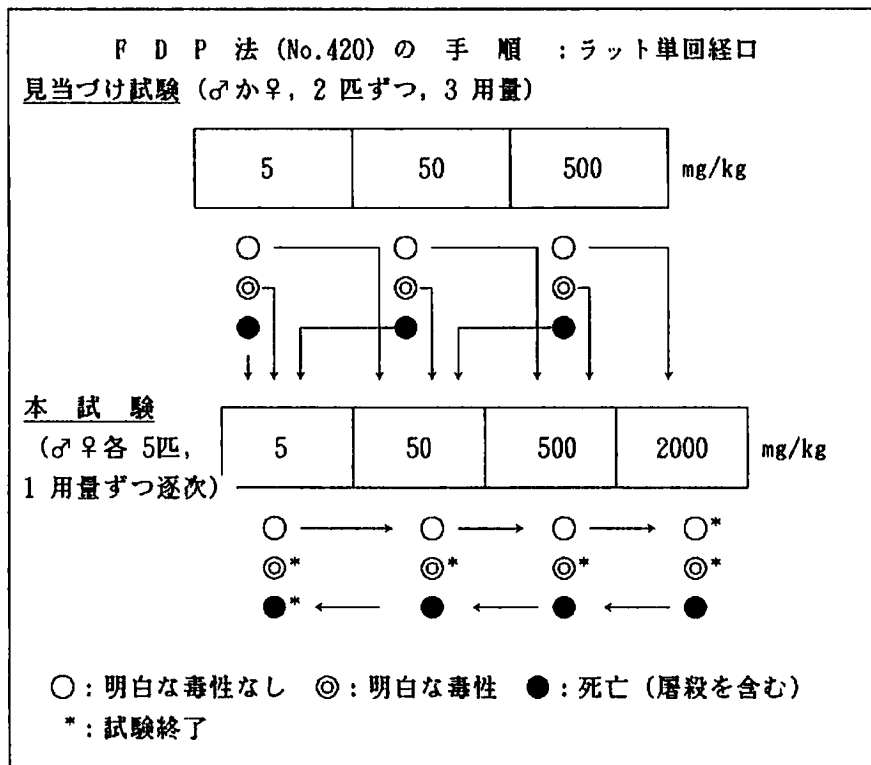
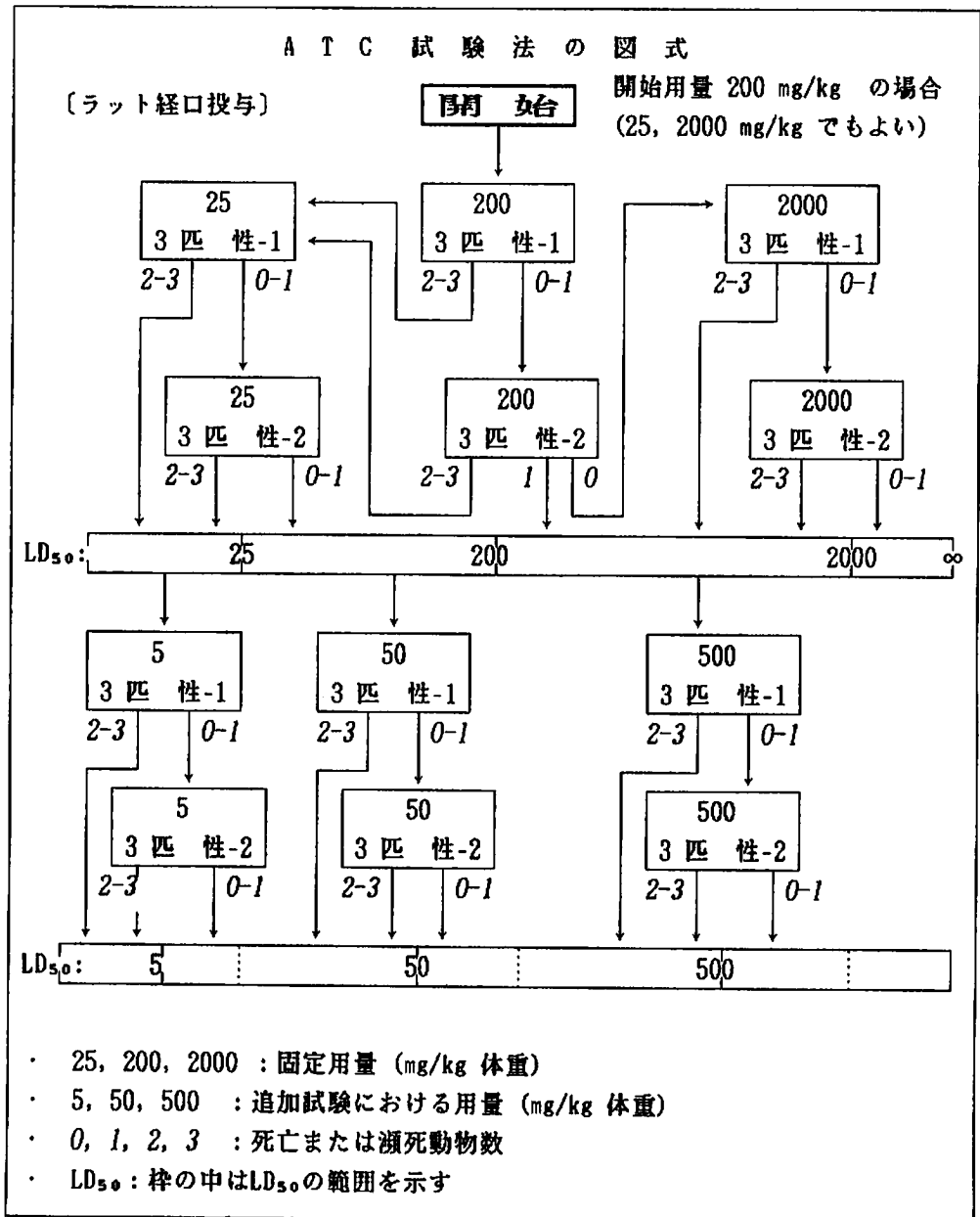


図2.



階的に試験を進める方法である。(図2)

この方法は元来、固定用量法と同じく、欧州共同体の化学物質危険度分類法に対応しており、"very toxic - toxic - harmful - unclassified" の分類に対応して "ATC (Acute Toxic Class) 3 - 2 - 1 - 0" と分類する方法である。この方法の理論的根拠は、LD₅₀ に基づいて分類したときの分類過誤の確率と本法に基づいて行ったときのそれとを比較していることである。

さらに、この方法には、その他の分類法にも利用できるように、第2次試験として 5, 50, 500 mg/kg の固定用量で行う変更が追加された。EC の分類であれば、1次試験で終了し、他の分類をする場合は、2次試験まで進めて分類を進める。

この試験法は、1996年3月に OECD ガイドライン(No.423)に、同年5月に欧州連合(EU)ガイドラインに収載された。

(3) 上げ下げ法 (Up-and-Down Procedure; UDP)

上げ下げ法は急性毒性試験の簡便法あるいは用量の見当づけ法として古くから行わ

れてきたが、いくつかの変報がある。米国は固定用量法や毒性等級法の採用にあまり積極的でなかったが、急性毒性試験 No.401 の代替法としてこの上げ下げ法を OECD ガイドラインとしての提案した。

この上げ下げ法の手順では、24時間ごとに1匹ずつに被験物質を投与する。その結果に従って、次の動物への用量を調整する。動物が生存すれば次の動物への用量は上げ、死亡すれば[次の用量は]下げる。通常、直前の用量に対し 1.3 の係数で次の用量を増減する。最初からの結果の反転したところ、すなわち用量の上昇(または下降)を続けてきたものが、[直前より]低い(または高い)用量で逆転した用量、からさらに、4匹の動物について同様の UDP に従って試験した上で、最尤法に従って LD₅₀ を求める。動物は原則としてラットであるが、ほかの齧歯類でもよい。通常雌動物のみを用いる。一般に雌の方が感受性が高く、しかし雌雄差はあまり生じないからである。

本試験法は1996年 OECD ガイドラインとして採択され、No.425 として収載された。