

11) わが国における単回投与毒性試験（急性毒性試験）代替法の研究

山中すみへ

東京歯科大学・衛生学教室

1. はじめに

わが国における単回投与毒性試験（急性毒性試験）の代替法に関する研究は、以前から「毒物及び劇物取締法」の整備の面から行われてきたが、ヨーロッパにおける動物愛護の動きや国際的整合化の動向を踏まえ、急性毒性試験の簡易法の研究テーマで厚生科学研究班がスタートしたのは昭和60年（1985年）であった。折しもこの前年（1984年）に、OECDの新ガイドラインの基となる西独案（ATC法）および英国案（固定用量法）が発表された。そこでこの両方法を参考にして、さらにわが国の毒物・劇物の判定に対応した試験法として急性毒性試験の簡易スクリーニング法が検討された。わが国の毒物・劇物の判定規準は、以下の内規として定められている。

わが国における毒物・劇物の判定基準（内規）

(1) 動物実験における知見

①急性毒性

(a) 経口 毒物：LD₅₀ が30mg/kg 以下のもの

劇物：LD₅₀ が30mg/kg を超え300mg/kg 以下のもの

(b) 経皮 毒物：LD₅₀ が100mg/kg 以下のもの

劇物：LD₅₀ が100mg/kg を超え1000mg/kg 以下のもの

(c) 吸入 毒物：LC₅₀ が200ppm (1hr) 以下のもの

劇物：LC₅₀ が200ppm を超え2000ppm (1hr) 以下のもの
(ただしこの吸入による判定基準はガス体に限る)

②皮膚・粘膜に対する刺激性

劇物：硫酸、水酸化ナトリウム、フェノールなどと同等度以上の刺激性を有するもの

上記の他、次の項目に関する知見が得られている場合は、参考にする。

(イ) 中毒症状の発現時間、重篤度ならびに器官・組織における障害の性質と程度

(ロ) 吸収、分布、代謝、排泄動態、蓄積性および生物学的半減期

(ハ) 生体内代謝物の毒性と他の物質との相互作用

(ニ) 感作の程度

(ホ) その他

(2) ヒトにおける知見

ヒトの事故例等を参考として、毒性を検討し判定する。

(3) 動物およびヒトにおける知見以外にも、次の項目の知見も考慮

(イ) 物性（蒸気圧、溶解度等）

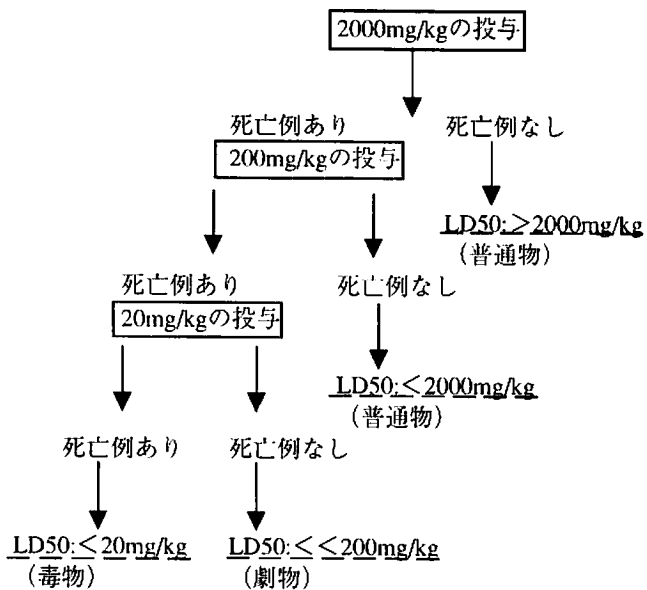
(ロ) 解毒法の有無

(ハ) 通常の使用頻度、範囲および量

(ニ) 製品形態

この毒物・劇物判定基準のうち、動物実験における知見、とくに急性毒性と皮膚・粘膜に対する刺激性について毒性情報が得られるスクリーニング法を目的として、今回の簡易スクリーニング法が検討された。すなわち、経口、経皮での概略LD₅₀ 値と皮膚刺激性、吸入での概略LC₅₀ 値で毒物・劇物を判定・分類できる試験法を目的として簡易スクリーニング法を提案し、実際の化学物質について4研究機関で毒性評価を行うことによって試験法の妥当性について検討してきたのでその成果を報告する。

図1 経口急性毒性評価のための簡易スクリーニング法



1. 実験動物としてラットおよびマウスの雌雄3匹ずつを用いる
2. 14日間の観察とする

表1 簡易スクリーニング法による経口急性毒性試験における死亡率——研究機関の違い

No	投与量	ラット								マウス							
		♂				♀				♂				♀			
		A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1	200	3/3	3/3	—	—	3/3	3/3	—	—	3/3	3/3	—	3/3	3/3	3/3	—	—
	20	—	—	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	25	—	—	3/3	3/3	—	—	3/3	3/3	—	—	3/3	—	—	—	3/3	—
2	200	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	20	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	2/3	2/3	2/3	3/3	2/3	0/3	1/3	2/3
	25	—	—	0/3	1/3	—	—	0/3	0/3	—	—	3/3	2/3	—	—	2/3	3/3
3	200	0/3	2/3	0/3	3/3	0/3	1/3	1/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	20	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	25	—	—	—	0/3	—	—	0/3	0/3	—	—	0/3	—	—	—	0/3	—
4	200	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	20	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3
	25	—	—	0/3	1/3	—	—	0/3	0/3	—	—	2/3	—	—	—	0/3	—
5	200	2/3	3/3	3/3	3/3	0/3	2/3	3/3	2/3	2/3	2/3	1/3	3/3	2/3	2/3	2/3	3/3
	20	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	25	—	—	0/3	0/3	—	—	0/3	0/3	—	—	0/3	—	—	—	0/3	—
6	2000	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	—	3/3	3/3	3/3	—	3/3
	200	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3
	20	0/3	—	0/3	0/3	0/3	—	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
7	2000	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	200	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	2/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3
	20	0/3	—	0/3	0/3	0/3	—	0/3	0/3	0/3	—	2/3	0/3	0/3	—	2/3	0/3
8	2000	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	2/3	0/3	2/3	1/3
	200	0/3	—	0/3	0/3	0/3	—	0/3	0/3	0/3	—	2/3	0/3	0/3	—	2/3	0/3
	20	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
9	2000	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	200	0/3	—	—	0/3	0/3	—	—	0/3	0/3	—	—	0/3	0/3	—	—	0/3
	20	3/3	2/3	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
10	2000	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3
	200	—	—	0/3	0/3	—	—	0/3	0/3	—	—	0/3	0/3	—	—	—	0/3
	25	—	—	0/3	0/3	—	—	0/3	0/3	—	—	0/3	0/3	—	—	—	0/3

差がみられた結果を太字で示した

表2 簡易スクリーニング法での経口急性毒性判別の4研究機関での差異

化学物質	A	B	C	D	ATC法での判別	毒劇法での指定
1. Potassium cyanide	毒物	毒物	毒物	毒物	Very toxic	毒物
2. Indomethacin	毒物	毒物	毒物	毒物	Very toxic	--
3. Phenylthiourea	劇物	劇物	劇物	劇物	Toxic	--
4. Sodium arsenite	毒物	劇物	劇物	劇物	Toxic	毒物
5. Cadmium chloride	劇物	劇物	劇物	劇物	Toxic	劇物
6. Caffein	普通物	普通物	劇物	普通物	Harmful	--
7. Aniline	普通物	普通物	劇物	普通物	Harmful	劇物
8. O-phenylphenol	普通物	普通物	劇物	普通物	Harmful	--
9. Ethylene glycol	普通物	普通物	普通物	普通物	Unclassified	--
10. Allyl alcohol	劇物	劇物	毒物	劇物	Toxic	--

ラット及びマウスで毒性がもっとも強く現れた結果を採用 (異なる結果を太字で示した)

2. 経口急性毒性試験のための簡易スクリーニング法¹⁾

OECDの用量固定法を応用し、わが国の毒物・劇物の判定規準と照らし合わせた試験法として、図1に示すようなラットおよびマウスの雌雄3匹ずつを用いた簡易スクリーニング法を提案した。これまでに経口急性毒性試験を行った化学物質290品目の結果を考察し、LD₅₀値と最大無死亡量(MNLD: Maximum non lethal dose)の関係を求めたところ、LD₅₀値は最大無死亡量の平均で2~2.5倍であった。このことから20mg/kgおよび200mg/kgで死亡がみられない場合にはLD₅₀値は30mg/kgおよび300mg/kg以上であることが推察され、わが国の毒物・劇物の判別に対応できる。このスクリーニング法に従い、上限投与量としての2000mg/kg、さらに200mg/kg、20mg/kgを順次投与し、毒物・劇物が判定しうることになる。すなわち200mg/kgで死亡例がない場合はLD₅₀値は300mg/kg以上であることから、毒物・劇物には相当せず、また20mg/kgで死亡例が1匹でもあれば、LD₅₀値が30mg/kg以下であると推察され毒物に判定される。

このスクリーニング法を用いて、10化学物質について4研究機関で実際に毒性試験を行った結果を表1に示し、またラットおよびマウスの雌雄で最も強い毒性評価で判定した結果を表2に示した。OECDの新ガイドラインのATC法(Acute Toxic Class Method)による評価も行うために用量25mg/kgも投与して、それによる評価も併せて示

した。LD₅₀値が20mg/kgや200mg/kg、2000mg/kgから遠い化学物質では比較的一致した結果が得られたが、No.4(Sodium arsenite)やNo.6(Caffein)、No.7(Aniline)、No.10(Allyl alcohol)で、経口急性毒性での死亡率や判別結果で差異がみられた。これらの物質は、固定用量の20mg/kgや200mg/kgに比較的近いLD₅₀値を有しており、固定用量法の共通の課題として、固定用量付近にLD₅₀値を有する物質の評価で差が生じると考えられる。

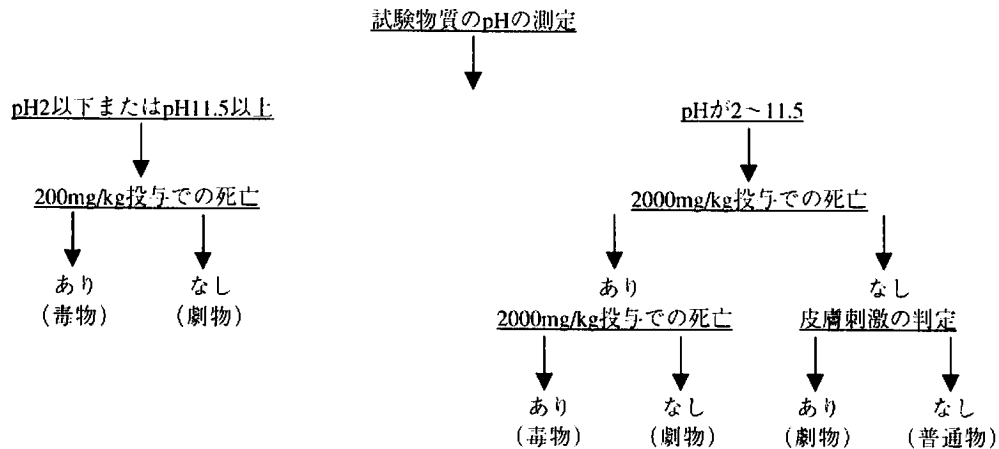
また実験動物の3匹のうちの1匹の死亡の評価に際して、ATC法では0/3と同じである(1/3と0/3を同じ評価)のに対して、本法では1匹でも死亡があるかないかで判別する(1/3、2/3、3/3を同じ評価)。1匹の死亡の評価では、ATC法での扱いの方が判別結果の差が少なくなるように思われた。

さらに、ATC法では4等級に判別されるのに対して、わが国の毒劇法では3分類であるために200mg/kgの投与で死亡があれば毒物・劇物ではあるが、死亡例がなければ普通物に分類されることになり、2000mg/kg投与での死亡の有無が評価・分類3に関わらないという問題点がある。上限投与量の2000mg/kgの結果を組み入れた分類も考慮されるべきであり、今後「毒劇法」の整備も含め、検討すべき課題であろう。

3. 皮膚刺激性および経皮急性毒性評価のための簡易スクリーニング法²⁾

皮膚刺激性と経皮急性毒性試験とを兼ねた簡易な試験法として、図2に示すスク

図2 経皮急性毒性および皮膚刺激性試験のための簡易スクリーニング法



経皮毒性試験は、closed patchで24時間保持した後、その部位を蒸留水にて洗浄
 経皮毒性試験の過程で皮膚刺激性も観察
 実験動物としてラット雌雄3匹ずつ

表3 簡易スクリーニング法による経皮急性毒性試験における死亡率——研究機関の差異

No.	投与量	♂				♀			
		A	B	C	D	A	B	C	D
1	200	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	2000	—	—	—	—	—	—	—	—
2	200	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	2000	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
3	200	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	2000	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3
4	200	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	2000	—	—	—	—	—	—	—	—
5	200	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	2000	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
6	200	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3
	2000	3/3	—	3/3	2/3	3/3	—	—	2/3
7	200	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	2000	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
8	200	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	2000	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
9	200	2/3	0/3	3/3	0/3	2/3	0/3	3/3	0/3
	2000	3/3	3/3	—	3/3	3/3	3/3	—	3/3
10	200	1/3	3/3	3/3	1/3	1/3	3/3	3/3	1/3
	2000	—	—	—	3/3	—	—	—	3/3

差がみられた結果を太字で示した

リーニング法を提案した。動物実験に入る前に物理化学的試験としてpHの測定を行い、硫酸のような強酸性物質および水酸化ナトリウムに匹敵する強アルカリ物質を判別する。これらの強酸・強アルカリ物質は、経皮毒性の有無にかかわらず劇物であることから、200mg/kgでの経皮投与での死亡率

から毒物を判別することになる。強酸・強アルカリでない物質については、2000mg/kgでの経皮急性毒性試験とともに皮膚刺激性を判定する。実際の10化学物質について4研究機関で毒性試験を行った結果を表3,4に、また判別結果を表5に示した。化学物質No. 1、2、4、7、10では、その評価が一

表4 簡易スクリーニング法による皮膚刺激性の判定——研究機関による差異

No.	投与量	♂				♀			
		A	B	C	D	A	B	C	D
1	200	+	---	+	+	-	---	+	+
	2000	---	---	---	---	---	---	---	---
2	200	-	---	-	-	-	---	-	-
	2000	±	-	-	-	±	-	-	-
3	200	-	---	±	±	-	---	±	±
	2000	+	+	+	+	+	+	+	+
4	200	-	---	+	+	-	---	+	+
	2000	---	---	---	---	---	---	---	---
5	200	-	---	-	-	-	---	-	-
	2000	±	-	+	±	±	-	+	±
6	200	±	---	+	+	±	---	+	+
	2000	+	---	---	+	+	---	---	+
7	200	-	---	-	-	-	---	-	-
	2000	-	-	---	-	-	-	---	-
8	200	-	---	-	-	-	---	-	-
	2000	-	+	+	+	-	+	+	+
9	200	+	---	+	+	+	---	+	+
	2000	+	+	---	+	+	+	---	+
10	200	±	---	+	±	±	---	+	±
	2000	---	---	---	---	---	---	---	---

差がみられた結果を太字で示した

表3 簡易スクリーニング法による経皮急性毒性及び皮膚刺激性の判別の差異

化学物質	A	B	C	D	毒劇法での指定
1. Ammonia	劇物	劇物	劇物	劇物	劇物
2. <i>p</i> -Dioxane	普通物	普通物	普通物	普通物	---
3. Formaldehyde	劇物	劇物	劇物	劇物	劇物
4. Formic acid	劇物	劇物	劇物	劇物	劇物
5. Hydrogen peroxide	劇物	普通物	劇物	劇物	---
6. Pentachlorophenol-Na	劇物	毒物	毒物	劇物	劇物
7. Aminopyrine	普通物	普通物	普通物	普通物	---
8. Phenol	劇物	劇物	劇物	劇物	劇物
9. Mercuric chloride	毒物	劇物	毒物	劇物	毒物
10. Potassium cyanide	毒物	毒物	毒物	毒物	毒物

毒性の強い方の結果を採用し、差があるものを太字で示した

致していたが、No.3(Formaldehyde)や、No.5(Hydrogen peroxide)のような揮発性物質、No.6(Pentachlorophenol-Na)のような難溶解性物質、さらにNo.9(Mercuric chloride)のように経皮LD₅₀値が固定用量の200mg/kgに近い物質で、研究機関による差がみられた。揮発性や難溶解性の物質では、経皮毒性や皮膚刺激性の試験の皮膚塗布の過程で、差が生じるものと考えられる。また固定用量付近にLD₅₀値を有する物質での差異は、経

口急性毒性試験の場合と同様に固定用量法の限界と考えられた。しかし動物実験の前にpH測定を行い、強酸、強アルカリ物質をスクリーニングすることによって、使用する動物数を減らすことができた。またOECDのガイドラインでは、皮膚刺激性試験に家兎やモルモットを用いることになっているが、今回簡易法ということでラットを用いており、明らかな皮膚刺激性物質を分類するには十分な方法であった。

図 3. 吸入急性毒性試験のための簡易スクリーニング法
(ラットの雌雄 3 匹ずつを用いて、3 時間暴露で行う)

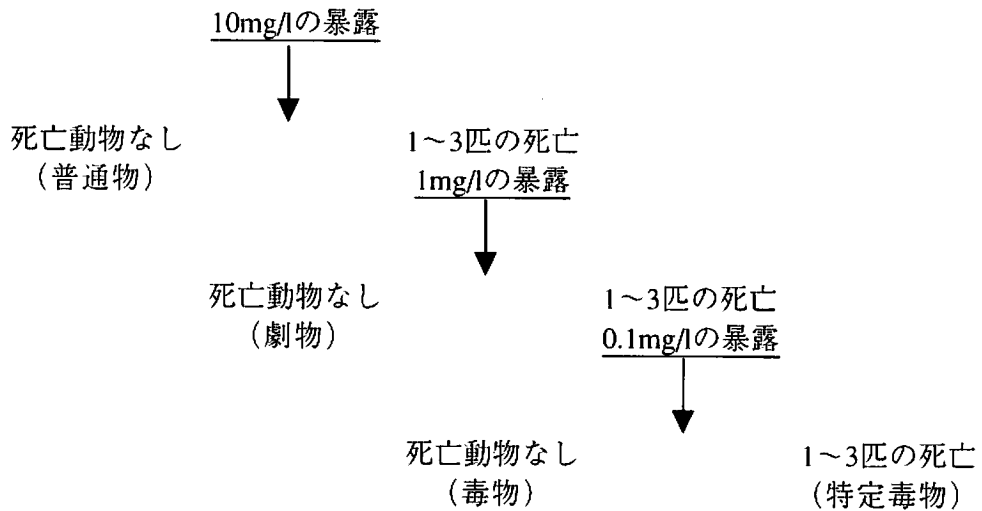


表 6. 簡易スクリーニング法による吸入急性毒性試験の死亡率 研究機関の差異

化学物質 (mg/l)	A		B		C		D		文献上のLC ₅₀ 値
酸化エチレン (10)	3/3	3/3	2/3	3/3	2/3	3/3	3/3	3/3	10.6mg/l
(1)	---	---	---	---	0/3	0/3	---	---	(1hr)
四塩化炭素 (10)	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	25mg/l
(1)	---	---	---	---	0/3	0/3	---	---	(4hr)
クロロホルム (10)	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	28g/l
(1)	---	---	---	---	0/3	0/3	---	---	(4hr)

♂および♀の順に死亡率を示す

4. 吸入急性毒性評価のための簡易スクリーニング法

経口、経皮急性毒性評価の場合と同じく固定用量法を採用した吸入急性毒性評価のために図 3 に示す簡易スクリーニング法を提案した。10mg/l、1mg/l、0.1mg/l の固定用量での 1 時間暴露の方法であるが、物理的性状で爆発など危険を伴う披験物質では、暴露可能な最大濃度で実施するなど注意が必要である。このスクリーニング法により実際の 3 物質について 4 研究機関で吸入急性毒性試験を行った結果が表 6 である。LC₅₀ 値が 10mg/l に近い酸化エチレンでは、死亡率に少々違いがみられたが、四塩化炭素や

クロロホルムでは LC₅₀ 値も離れていることから研究機関での差がみられなかった。本法は、簡易法であることから 1 時間暴露であり、OECD などの 4 時間暴露に対応するためには、1 時間の LC₅₀ 値を 4 で除して求めて比較することとした。毒物・劇物の分類のためには 1 時間暴露での本簡易法が有効であると考えられるが、OECD ガイドラインとの対応は今後の課題である。吸入毒性試験では、固定用量への暴露濃度の設定や暴露量の測定は他の経路（経口、経皮、静注など）による毒性試験よりも容易ではなく、また吸入急性毒性の LC₅₀ 値は経口や経皮、静注の LD₅₀ 値と高い相関関係にあることがわかっている。したがってガス体や揮発性の高い化学物質や吸入薬剤では、急

性吸入毒性試験は必須であるが、その他の化学物質では吸入毒性試験は必ずしも必須ではなく、他の経路の毒性データを参考に代用することも考えていく必要がある。

5. まとめ

今回の経口、経皮および皮膚刺激性、吸入の各急性毒性試験の簡易スクリーニング法は、OECDの固定用量法やATC法を参考にし、さらにわが国の毒物・劇物取締法に対応した試験法として提案されたものであるが、使用する実験動物を大幅に削減することができるものであった。固定用量付近にLD₅₀値を有する化学物質で毒性評価に若干の差異がみられたが、これは固定用量法の限界であり、化学物質の毒性分類のため

の試験法としては十分に有効であろう。1匹の死亡動物の評価や、皮膚刺激性試験でのラットの使用、吸入急性毒性での1時間暴露など、OECDガイドラインとの違いがあるので、わが国の毒物・劇物取締法の整備も含め、今後検討し、動物愛護の観点から国際的な整合化を図っていく必要がある。

6. 文献

- 1) Yamanaka, S., Hashimoto, M., Tobe, M., Kobayashi, K., Sekizawa, J. and Nishimura, M. (1990) A simple method for screening assessment of acute toxicity of chemicals, *Arch. Toxicol.*, 64, 262-268.
- 2) Sekizawa, J., Yasuhara, K., Suyama, Y., Yamanaka, S., Tobe, M., and Nishimura, M. (1994) A simple method for screening assessment of skin and eye irritation, *J. Toxicological Science*, 19, 25-35.