

化学物質の安全性確保と実験動物

松本 清司

信州大学ヒト環境科学研究支援センター：長野県松本市旭 3-1-1 (〒 390-8621)

キーワード 安全性試験, 血液検査, 実験動物

身のまわりの化学物質

私たちの身のまわりにはさまざまな化学物質が存在している。現在、その登録数は5千万種を超えており、我が国の産業界で一般に使用されている化学物質（合成化学品）は5万～10万といわれている。これらはいずれも日常生活や産業活動の中に広く組み込まれ、生活において不可欠な存在となっている（表1）。そして毎年500～600種類の化学物質が新たに開発・導入されているという。

化学物質に関する内閣府の調査（平成22年）では、化学物質の印象について尋ねたところ、危ない（69.7%）、生活になくてはならない（25.5%）、難しいもの（23.4%）、便利なもの（16.6%）と回答されている。また、日常生活の何に含まれる化学物質に関心があるかについては、農薬・殺虫剤（61.9%）、

飲み水・食品（59.3%）、工場からの排水、排ガス（54.2%）、家の内装建築材料（52.7%）となっている。この調査結果は、化学物質の日常生活における利便性、必要性を理解しつつも気になる点があるということ、恐らく次のような日本の歴史背景によるのであろう。

明治以前のわが国において化学物質は毒矢、火薬、諸工業、生薬、染料、添加物など、比較的限られた場所で、しかも限定された用途に使われていたと考えられる。しかし、明治維新後の急速な産業発展に伴って飛躍的に化学物質の開発と利用が拡大し、この生産活動の活発化の過程で使用されて生じる有害な化学物質が市民生活に直接、無秩序に浸透する事態が起きた。我が国で最初に社会問題化したのは1878年の足尾銅山の鉱害であり、その後も水俣病（1932年）など社会的災害が続いた。特に、第二次

表1. 身のまわりの化学物質

化粧品	: 石鹸・シャンプー、クリームなど
食品	: 保存料、調味料、甘味・着色料、増粘剤・香料など
工作・塗装	: 塗料、接着剤、シンナー、糊
衣類、家具	: 染料、防腐剤
洗濯	: 洗剤、ドライクリーニング用洗剤、柔軟剤
自動車など	: ガソリン、重油、オイル、排ガス
医薬品・農薬（殺虫剤）	
掃除	: 洗剤、トイレ用洗剤、消臭剤
その他	: さまざまな生産活動で生じるもの

世界大戦後の産業の復興期には生活や社会環境に入り込む化学物質は質・量ともに飛躍的に増大し、大気汚染ならびに身近な食品や医薬品に起因するさまざまな事故が起きた。例えば、薬物乱用（モルヒネ、覚醒剤など）、ペニシリンショック、サリドマイド事件、四日市ぜんそく、イタイイタイ病などで、公害や薬害という言葉が使われるようになったのもこの頃からである。化学物質の恩恵によって便利で快適な生活を享受できるようになった反面、ヒトや生態系への悪影響が問題になる場合があり、化学物質の“有用性”と“安全性”を両立させる社会制度が重要と次第に認識されるようになった。当時、食品や医薬品などの規制については、食品衛生法（1947年）、薬事法（1960年）、化審法（1973年）などが存在したが、十分に機能しているとはいえなかった。現在のように新規の化学物質に対して信頼性が確保された適正な動物実験データによる事前評価が義務付けられ、有害化学物質の排除および量的規制によって安全な生活のできる体制が確立されたのは、1983年のいわゆる GLP 規制（医薬品の安全性試験の実施

に関する基準）の施行と 1984 年の毒性試験法ガイドライン（薬審第 118 号）の通知以降である。

化学物質の安全性確保

医薬品、農薬、殺虫剤、食品添加物など新規の化学物質は、市場化の前に毒性試験（非臨床試験[#]）を実施して、ヒトに対する安全性を十分確認しておく必要がある。例えば、医薬品については、1990 年頃から ICH（日米 EU 医薬品規制調和国際会議）による非臨床および臨床試験の実施方法の標準化が進められ、現在では国際的ハーモナイゼーションの体制が確立され運用されるようになっている。農薬を含む多くの化学物質については OECD のテストガイドラインをベースに安全性関連試験が実施されている。これらの試験は、表 2 のような短期、長期的かつ多角的な毒性検索のための試験がラット、ウサギ、イヌ、サルなどの実験動物を用いて行われている。これら毒性試験法の具体的内容について、農薬を例に少し触れる。

表 2. 毒性試験（非臨床試験）の種類

単回投与毒性試験（急性毒性試験）
反復投与毒性試験（1, 3, 6, 9, 12 か月間以上の亜急性・慢性毒性試験）
がん原性試験
生殖発生毒性試験
遺伝毒性試験（細菌の復帰突然変異・ほ乳類培養細胞染色体異常・小核の各試験）
抗原性試験
局所刺激性試験（皮膚・眼粘膜・血管・筋肉など）
感作性試験（皮膚・光感作性）
薬理試験（薬効・薬理試験など）
薬物動態試験（薬物の吸収、分布、代謝、排泄）

この他、必要に応じて、依存性、抗原性、免疫毒性試験等が実施される。

[#]：医薬品の場合は、実際にヒトに適用する臨床試験が行われるが、その前に動物実験で薬効や毒性が調べられる。動物実験が臨床試験の前に行われることが多いので、前臨床試験とも呼ばれた。

1. 急性毒性試験

a) 急性経口毒性試験

化学物質の毒性を評価する第一段階で、単回（短期間・大量）暴露によって起こり得る健康障害に関する科学的知見を得ることを目的とする。続いて実施される反復投与毒性試験などの用量設定に有用である。試験は通常1群1～5匹程度のラットが用いられ、14日間一般状態を観察し、必要に応じて病理組織検査を行う。経口試験のほかに次のようなものがある。

b) 急性吸入毒性試験

全身／鼻部暴露試験が行われる。

c) 皮膚刺激性試験

皮膚に対する刺激性／腐食性に関する知見を得るため、ウサギの背部皮膚でパッチテストが行われる。

d) 眼刺激性試験

眼および眼粘膜への刺激性／腐食性に関する知見を得る試験で、ウサギの角膜、虹彩、結膜などを観察する。

e) 皮膚感作性試験

皮膚感作性に関する知見を得る試験で、モルモットでGPM：Guinea-pig Maximization Testなどが行われる。

f) 急性神経毒性試験

神経系に対する毒性の特徴を明らかにする試験で、通常ラット1群10匹3用量程度の規模で行われる。一般状態に加えて、体位、姿勢、自律神経系機能、運動協調性、刺激に対する反応、探索行動、歩行、異常行動、学習能および病理組織学的検査が実施される。

g) 急性遅発性神経毒性試験

遅発性神経毒性が懸念される物質について、ニワトリで実施される。脳神経系から末梢神経まで病理組織学的に検討される。

2. 亜急性毒性試験

亜急性試験の投与期間は通常21～90日間である。

90日間反復経口投与毒性試験

この試験は被験物質を90日間以上反復投与した時に生じる毒性変化および無毒性量の科学的知見を得るための試験で、発がん性や長期毒性試験の用量設定に関わる情報を得るために行われる。供試動物は、げっ歯類（通常ラット）および非げっ歯類（通常イヌ）で、一般状態の検査に加えて、機能検査（聴覚・視覚および自発運動量）、血液および尿検査（表3）、

表3. 血液および尿検査の項目

血液検査	
血液学的検査	: RBC, WBC および Diff., Hb, Ht, Plt, Reticulo, PT, APTT など 貧血などを認める場合は、造血能（骨髄検査）を調べる
臨床生化学的検査	: TP, Alb, A/G, Glu, Chol, TG, Bil, BUN, CRN, AST, ALT, ALP, GGT, Na, Ca, Cl, K, iP, など
尿検査	: 尿量, pH, 蛋白, 糖, ケトン体, ビリルビン, ウロビリノーゲン, 潜血, 沈渣, 比重など

眼科的検査，病理学的検査（全器官・臓器並びに主要臓器の重量測定）が実施される（表4）。この検査で神経系，免疫系，内分泌系に対する影響が認められた場合はこれらについても詳細に検討される。

この他，必要に応じてウサギの反復経口投与，ラットの90日間反復吸入，反復神経毒性試験，28日間反復投与遅発性神経毒性試験などが実施される。

3. 慢性毒性試験

1年間反復経口投与試験

この試験は被験物質を長期間にわたって反復投与した時に生じる毒性変化および毒性変化の認められない最高用量（無毒性量：NOAEL）についての科学的知見を得るための試験である。供試動物は，げっ歯類（通常ラットで1群雌雄各20匹以上）および非げっ歯類（通常イヌで1群雌雄各4匹以上）で，投与期間は1年間以上である。検査項目は，亜急性試験とほぼ同じである。

4. 発がん性試験

この試験は被験物質を反復投与した時の発がん性の有無を調べるもので，動物はげっ歯類2種以上（通常ラットとマウス）が用いられる。1群雌雄各50匹以上で，投与期間はラットで24～30ヵ月，マウスでは18～24ヵ月である。一般状態，血液検査など

に加えて詳細な病理検査が全動物で実施される。

1年間反復経口投与毒性／発がん性併合試験は慢性毒性と発がん性試験を組み合わせたもので，供試動物，試験期間は各試験と同じであるが1群20匹の衛星群が追加設定される。

5. 生殖発生毒性試験

この試験は被験物質を二世代にわたって反復投与し，発情周期，交尾，受胎，分娩，哺乳などの生殖機能および妊娠中の母動物が被験物質に暴露された場合の胎児の発生，発育に及ぼす影響を調べる。ラットで実施されることが多く，一般状態，性周期，交尾率，受胎率，出産率，離乳率などに加えて精子検査が行われ，不妊動物についてはその原因を調べる。児動物については，産児数，生存数，外表異常，体重，生存率など並びに病理組織学的検査（臓器重量測定を含む）並びに催奇形性試験を実施する。

生殖発生毒性試験では，新生児，胎児，妊娠動物などのいわゆる高感受性とされる個体への影響が調べられるので，農薬のように食品を介して日常的に摂取する可能性がある化学物質の毒性評価において特に重要である。動物は，げっ歯類（通常ラット）および非げっ歯類（通常ウサギ）の計2種以上を用い，投与期間は少なくとも着床から分娩予定の前々日までとされる。

表4. 毒性試験の病理組織検査

病理学的検査

肉眼（所見）検査

臓器重量測定（下線の臓器について，実重量・体重比重量・脳比重量）

病理組織学的検査

皮膚，乳腺，リンパ節（頸部，腸間膜リンパ節など），大動脈，唾液腺，胸骨，骨および骨髄（胸骨，大腿骨），胸腺，気管，肺および気管支，心臓，甲状腺および上皮小体，舌，食道，胃，小腸（十二指腸，空腸，回腸），大腸（盲腸，結腸，直腸），肝臓（胆嚢），膵臓，脾臓，腎臓，副腎，膀胱，精囊・凝固腺，前立腺，精巢・精巢上体，卵巣，子宮，腔，下垂体，坐骨神経，骨格筋，脊髄（頸部，胸部，腰部），眼球およびその付属器，鼻腔，その他肉眼的に変化が見られた器官・組織

母動物について一般状態、体重、妊娠状態（流産、早産）を観察し、分娩予定の前日に子宮を摘出、剖検し着床痕や黄体数などを検査する。胎児については、胚死亡、胎児死亡の有無を調べ、生存胎児について体重、性別、外表および骨格異常、内臓異常の有無など詳細に検査する。

6. 変異原性に関する試験

被験物質の遺伝子突然変異、染色体構造異常および数的異常の誘発性の有無を検索する。復帰突然変異試験（ネズミチフス菌 TA98, 100, 1535, 大腸菌 WP2 などを用い復帰変異コロニー数を計測）、染色体異常試験（チャイニーズハムスター線維芽細胞株、ヒト末梢血リンパ球を用いて染色体（構造）異常の有無を検査）および小核試験（マウス、ラットの末梢血および骨髓赤血球で小核を持つ細胞数を測定）などが実施される。

実験動物の血液検査と血液学的特徴

血液は全身を隈なく循環するので、その成分を調べることで身体の状態を示すさまざまな情報が得られる。病院で行われる臨床検査は正に病気発見のための第一段階であり、診断において非常に重要である。安

全性試験でも、同様に実験動物に被験物質を投与して1～3ヵ月毎の定期的に血液検査が実施される。安全性試験における血液検査は内容的にはヒト臨床検査に類似するが、その目的と評価法が若干異なる。ヒト臨床検査では、健常（正常）かどうかおよび治療対象となる病気（病態）が存在するかの診断が主目的であるので、比較の物差しとして“基準値”や過去（カルテ）の測定値などが診断や比較の基準となる。一方、安全性試験では化学物質の生体影響の有無、すなわち測定結果が“毒性”と判断されるかどうかが重要になる。また、汎用されるラットの体重は200～500g程度で小さく採血量が限られるので、同じ個体から経時的に採血することは難しい。そのため、測定値の比較は数匹～10匹程度の群毎に処理して統計学的有意差の有無および実験施設毎のバックグランド値と比較しながら毒性評価をすることになる。

実験動物の各検査値は、雌雄、年齢（週齢）、系統の差以外にもさまざまな実験条件が測定値に反映される（表5）。そのため、実験動物の管理においてはできるだけ“一定の条件下”で実験することが求められる。なお、ヒト臨床と動物実験で一番異なるのは、イヌなどを除いて採血や検査時に安静にするなど、動物側からの協力を得にくい点である。

表5. 測定値に影響する可能性のある要因

採血部位	: 頸静脈, 後大静脈, 腹部大動脈, 尾静脈など
測定機器	: メーカー・機種, 分析ソフトウェア, 抗凝固剤
動物の飼育環境	: 水・飼料, 温度, 湿度, 照明時間, 清浄度など
麻酔薬	: 吸入薬, 注射薬 (投与経路)

次に、実験動物の血液検査値とその特徴について略記する。血球数は動物種によってさまざまであるが、概ね赤血球数は500～1000万/μL程度で、ヘマトクリット値は約40～45%である。大雑把に表現すると体格が大きい動物種ほど赤血球数は少なく、赤血球サイズ(MCV)は大きい(表6)。

白血球数は4,000～10,000/μL、血小板数は30～100万/μL程度である。白血球数は動物そのものと

飼育環境の清浄度によって差がみられる。特定の感染性微生物等を持たないSPF動物をクリーンな環境(HEPAフィルター)下で飼育すると白血球数は4,000/μL前後で低値である。血小板数は一般に大型動物ほど少ない傾向がある。赤血球の寿命は、ヒトが120日、犬やサルが80～100日、ラットが45日、マウスが20日程度で、小型の動物ほど寿命が短い。骨髄細胞数(単位容積あたりの有核細胞数)

表6. 実験動物の血球形態学的特徴(数字は直径: μm, スピナー標本)

	マウス	ラット	ウサギ	イヌ	サル
赤血球	5.0～6.0 稀に小核も	5.5～7.0	5.5～7.5	6.0～8.0	6.5～8.0
好中球	10～12 細胞質が殆ど染まらない [核はリング状から紐状に分節進む]	10～13 淡く染まる(桃～肌色)	11～14 濃橙色に染まる(赤紫顆粒あり)	10～14 比較的顆粒が少ない	12～15 過分節の傾向(5分節<有)
好酸球	11～13 やや不明瞭な橙色の顆粒	11～15 はっきりした橙色の顆粒	12～15 橙色の顆粒(約1μm大)	12～15 顆粒少ない	12～15 明瞭な橙色の顆粒
好塩基球	— 見られない	11～14 僅かにある(系統による)	9～11 顆粒少ない 背景は灰色	11～14 少顆粒のものあり	12～14 背景は灰色 顆粒少ない
リンパ球	7～12 小型は細胞質狭い [稀に分節したものあり]	7～15	9～15	9～15	9～15
単球	12～15 [ドーナツ状, 馬蹄形もあり]	12～15	12～15	12～16 杆状核がある 背景色に注意	14～17

は小型動物ほど多い傾向がある(表7)。これには、血球の寿命と血球の大きさが関係していると考えられる。出生時の骨髄造血能にも動物種差がみられる。例えばマウスやラットは妊娠期間が短い(20日前後)ので骨髄の造血能がほとんどない状態で生まれる(図1)。そのため、幼児期まで肝臓や脾臓における髓外造血が生理的に認められる。

採血部位や採血量も測定値に影響することが分かっている。動脈血と静脈血では血球数において若干の違いがある(表8)。ラットの腹大動脈採血では、採取する量によって血球数などが変動する。例えば、

最初に得られる血液と最後とではリンパ球数の漸次低下やCK, UA値の増加傾向など違いが見られる。これらはいずれもラットやマウスは体が小さいため、多項目を測定する場合は可能な限り多量の血液を採取せざるを得ないことによる。過去によく行われた心臓採血は、動・静脈血の特定が難しい場合があること、心筋層とその周辺に由来する細胞(組織球や肥満細胞)の混入、更に組織破壊によるCPKなどの酵素活性の上昇を来すので血液学的検査としては推奨されないし、眼窩静脈叢採血を含めて動物愛護の観点から麻酔下であっても避けるべき時代になりつつある。

表7. 実験動物の骨髄細胞数(大腿骨)

	検査動物数	骨髄細胞数 ($\times 10^6/\mu\text{L}$)
マウス(ddY)	31	2.67 \pm 0.02
ラット(Wistar)	108	2.12 \pm 0.19
マーモセット	32	1.28 \pm 0.02
ナキウサギ	10	1.20 \pm 0.22
カニクイザル	19	0.64 \pm 0.17
イヌ(Beagle)	11	0.35 \pm 0.15

表8. 静脈血と動脈血の違い(ラット血液)

	静脈血	動脈血
白血球数(WBC: $10^3/\mu\text{L}$)	6.4	3.4
赤血球数(RBC: $10^6/\mu\text{L}$)	9.44	8.91
ヘモグロビン量(Hb: g/dL)	16.9	16.2
ヘマトクリット値(PCV: %)	45.2	42.0

麻酔下で頸静脈と腹大動脈から同時採血した時の測定値

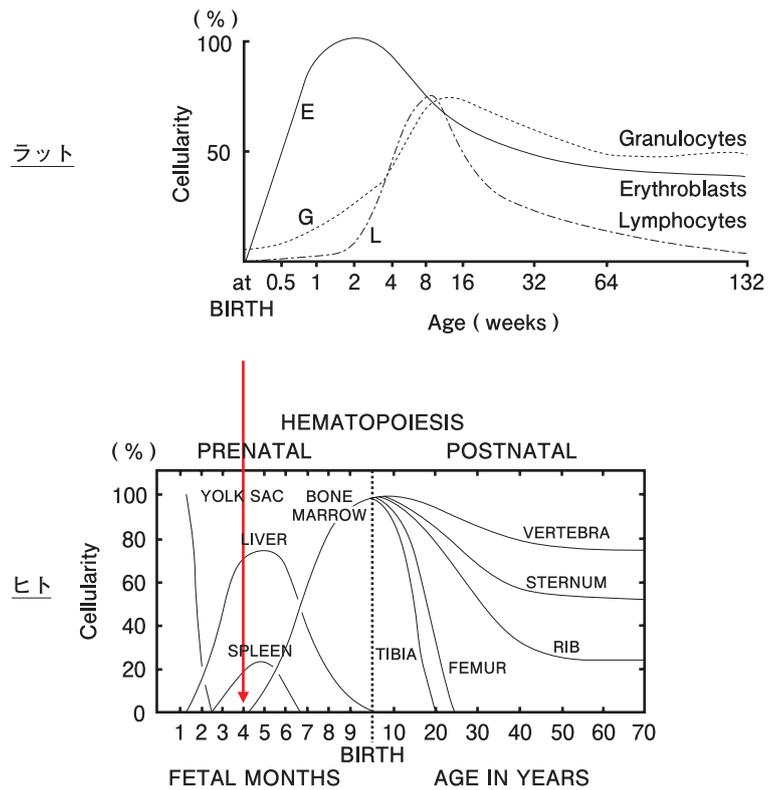


図1. 出生前後の骨髄における造血能の推移(ヒトとラット)

ヒトの図は、Erslev AJ; Bone marrow, In: Pathophysiology of Blood, 3p, Erslev A. J. ed. W. B. Saunders Co., 1979 より引用

参考としてラットの血液学および臨床生化学的検査値を表9に示す。血漿成分では、蛋白量、グルコース、無機質などは動物種間にそれほど差はないが、酵素活性値については代謝機能の異なる動物があり、一般に種差が大きい。動物からの採血では、EDTA（2Kまたは3K）が用いられるが、ヒトに比べて動物の場合凝固が早いので、やや多め（ヒトの約2倍程度）に用いる方が良いとされる。このように、動物を用いる研究にはヒトの臨床と異なる点が多々あるが、実験動物は、遺伝的・微生物的背景が明らかで飼育環境が一定に制御されている条件下では、データのバラツキが小さいという特徴もある。

実験動物の資料を見る場合、動物の系統、生産所、雌雄、齢、室内繁殖／捕獲動物などの違いに注視する必要があるが、特に血液データについては、SPF動物の利用拡大およびバリアシステムが普及した1980年代の前後で測定値がかなり異なることに注意を要する。この80年代を境に国内では動物と飼育環境のクリーン化が進みで白血球数が明らかに減少傾向を示す。そして時期を同じくして血液検査機器が進歩して測定精度が高くなったことも見逃せない。したがって1980年から90年の血液データについては、動物のクリーン度と測定法（機種）を十分調べた上で参考にすることが重要である。

表9. ラットの血液学および臨床生化学検査値

		Male	Female
赤血球	10 ⁶ /μL	8.36±0.43	7.14±0.25
ヘモグロビン	g/dL	15.4±0.9	14.3±0.5
ヘマトクリット	%	45.5±2.4	42.1±1.1
MCV	fL	54.5±1.5	59.0±2.4
MCH	pg	18.4±0.6	20.1±0.8
MCHC	%	33.9±0.4	34.1±0.4
血小板	10 ³ /μL	941±93	1030±60
網赤血球	%	2.6±0.5	2.6±0.8
PT	sec.	16.1±1.9	13.8±0.4
APTT	sec.	22.0±1.4	17.3±0.8
白血球	10 ³ /μL	7.2±1.8	5.2±1.5
リンパ球	%	88.5±5.7	84.5±7.1
好中球	%	11.0±5.3	13.8±6.3
好酸球	%	0.3±0.5	0.8±0.8
単球	%	0.2±0.4	0.8±0.6

		Male	Female
総タンパク	g/dL	5.65±0.22	6.21±0.10
アルブミン	g/dL	2.92±0.14	3.15±0.10
A/G比		1.07	1.03
総ビリルビン	mg/dL	0.11±0.01	0.12±0.01
BUN	mg/dL	14.4±2.3	19.8±3.1
クレアチニン	mg/dL	0.3±0.1	0.4±0.1
血糖	mg/dL	133±14	117±3
総コレステロール	mg/dL	54±14	70±7
トリグリセライド	mg/dL	42±19	31±5
AST	IU/L	86.6±11.1	89.4±18.7
ALT	IU/L	31.8±4.3	24.1±2.9
ALP	IU/L	347±47	207±57
γ-GTP	IU/L	0.20±0.13	0.35±0.23
Na	mEq/L	144±1	141±1
K	mEq/L	4.3±0.3	4.0±0.2
Cl	mEq/L	104±1	105±2
Ca	mEq/L	9.4±0.1	10.2±0.3

SD ラット (SPF) 16 週齢
 雌雄各 6 匹の平均値 ± 標準偏差値
 PT: プロトロンビン時間; APTT: 活性化部分トロンビン時間

おわりに

化学物質と動物を用いる安全性試験そして実験動物の血液学的側面について概略を述べさせていただいた。毒性検索のための動物実験において、人への外挿がどの程度可能だったかについて次のような報告がある。抗腫瘍、抗感染、心血管系および中枢神経系に対する 222 種の薬剤について、毒性試験の結果とヒトの副作用を調べたところ、動物実験の毒性データで非げっ歯類、げっ歯類のいずれかで 71% が予測可能であったと報告している。この中で血液系、心血管系および消化管系の毒性は 80% 以上の一致が見られるが、肝毒性は 50%、皮膚毒性は約 35% で、この副作用の多くが臨床試験で初めて見つかったという。別の生殖発生毒性試験 (51 種の化学物質) のレポートでも、動物実験において何らかの毒性影響が予想できたのは約 80% (動物種により 70 ~ 90%) としている。これらの数字をどのように判断するかは難しいが、動物実験はヒトの健康影響評価のためのスクリーニングとして非常に有用であり、今後の動物実験の進展とこれまでに蓄積されたデータベースを活用することで更に精度が向上すると私は考えている。

近年、化学物質の安全管理にはリスク評価とその管理が重要といわれるようになった。化学物質のリスク評価とは、暴露量 (暴露された濃度と期間) から推定される摂取量において、物質の毒性情報からどのような有害影響が生じるかを評価することである。そして、推定されるリスクが、無視できるレベ

ル (安全) か、容認できないレベルかの評価と判断が重要となる。そして、この中間にあって何らかのリスク軽減策を講じる必要がある場合、具体的にどのように対処すべきか考慮して、適切に対応することがリスク管理といえる。

毒性学のバイブルといわれる Toxicology の巻頭に “What is there that is not poison? All things are poison and nothing (is) without poison. Solely the dose determines that a thing is not a poison.” という Paracelsus (1493 – 1541) のことばがある。食品を含めて “ゼロリスク” は存在しないとの認識から、リスクをどう評価して管理してゆかが現代社会の重要な課題となっている。この原稿を書いている時に東日本大震災が起き、福島原発事故関連のニュースが連日流れている。放射能漏れの収拾のめどが見えないが、正に健康影響などさまざまなリスクを最小限に抑える一致団結した最大の努力と対応が求められていると肌で感じる。震災の被害を受けた皆様に心からお見舞いを申し上げ、安全そしてできるだけ早期の復興を願っている。

参考文献

- 1) Curtis D. Klaassen. Casarett and Doull's Toxicology : The basic Science of Poisons. 7th ed. NY : McGraw-Hill Professional ; 2007. 1280p.
- 2) 日本トキシコロジー学会教育委員会 編. 新版トキシコロジー. 東京 : 朝倉書店 ; 2009. 397p.
- 3) 松本清司 監修. 動物血液アトラス CD-ROM ラット編. 神戸 : シスメックス株式会社 ; 2006.

Assessing Toxicity of Chemicals and Laboratory Animals

Kiyoshi MATSUMOTO

Research Center for Human and Environmental Sciences, Shinsyu University, 3-1-1, Asahi, Matsumoto City 390-8621

Key Words

Safety Study, Hematological Test, Laboratory Animals