

# 作り出したものは安全ですか？

加藤 泰彦<sup>1,2\*</sup>・渡邊 肇<sup>1</sup>

## はじめに

より快適な社会のためには、適切なものづくりが重要な位置を占めている。ここで「適切な」と書いたのは、つくったものが単に目的の機能を果たすだけでなく、目的外の観点からはその安全性が担保されているということの意味している。これは新たな機能を持つ化学物質をつくりだすときにも当てはまるが、新規に開発される化学物質の数は指数関数的に増加している。新たに作りだされる化学物質のすべてを網羅することは困難であるが、およその動きはCAS (Chemical Abstracts Service) に登録されている化学物質の数から推定可能である。この登録数は1975年には300万件だったのに対して、15年後の1990年には3倍の1000万件、2005年には2500万件、2015年には実に1億件に達しており、10年間で実に4倍に増えていることになる(図1)<sup>1)</sup>。この莫大な数の化学物質を安全に利用するためには、いわゆる安全性の担保、すなわち毒性の評価が重要となる。ところが、この毒性評価のエンドポイントと手法は近年になって大きく変化して来ている。たとえば、従来の毒性評価はあくまでもヒトが最終的な対象であり、ヒトに対しての影響を推定するための試験法が確立されてきていたのに対して、近年では持続可能な発展を念頭におき、環境影響、環境毒性への試験も重視されてきている。また毒性評価のための手法も従来は動物実験が主流であったのに対して、動物を使わない試験法へと大きく変化してきている。ここでは、これらの変化の概略について紹介したい。

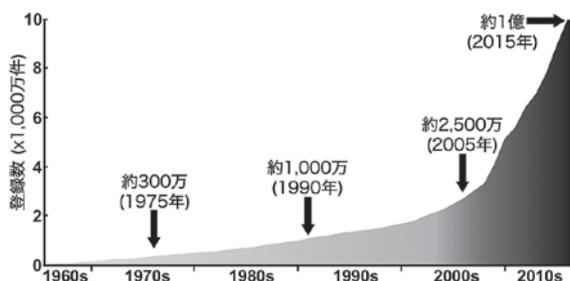


図1. CAS登録数の経年変化 (文献1を改変)

## 目的外の影響が問題になった化学物質

たとえば、今でもその処理が問題となっているPCB (Poly Chlorinated Biphenyl, 図2)などは、その安価な製造コスト、高い安定性から優良な絶縁体として大量に生産・利用されてきていた。しかし、劣化しない絶縁体としては理想的なPCBもひとたび環境に放出され生体内にとりこまれると、その安定性から生物はこれを分解することができずに生体内で蓄積し、食物連鎖によってより高位の生物に高濃度で蓄積しダイオキシンと類似の毒性を示すことが明らかになってきた<sup>2)</sup>。これらは、①環境中で分解しにくい(難分解性)、②食物連鎖などにより生体内に濃縮され蓄積されやすい(高蓄積性)、③大気循環、海流、生物の移動などにより長距離を移動して、極地などに蓄積しやすい(長距離移動性)、④人の健康や生態系に対し有害性がある(毒性)、といった性質を持っており、残留性有機汚染物質 (Persistent Organic Pollutants: POPs) と総称され<sup>3)</sup>、現在では規制対象になっている。また殺虫剤として知られていたDDT (Dichlorodiphenyltrichloroethane, 図2)も POPsの一つであり、やはりその安価な製造コストと殺虫効果の高さから長く使われていたが、やはり生体内で分解されず蓄積性のあること、ホルモン受容体に作用しいわゆる内分泌かく乱作用を示すことが明らかになり<sup>4)</sup>、その使用が原則禁止されるに至っている。

近年では、医薬品が環境中に放出された場合の影響なども懸念されている。そもそも医薬品は生体内で安定的に機能するように設計されているために、環境中に出て分解されにくく、これらの医薬品が河川を中心として

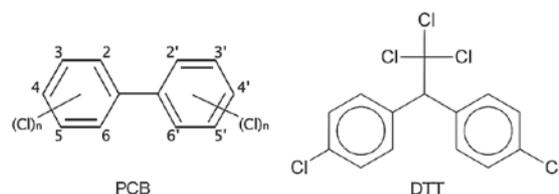


図2. PCBとDDTの構造

\* 著者紹介 大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻 (助教) E-mail: kato\_yasuhiko@bio.eng.osaka-u.ac.jp

<sup>1</sup>大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻,

<sup>2</sup>大阪大学大学院工学研究科附属オープンイノベーション教育研究センター

生態系を構成する生物におよぼす影響が数多く報告されてきている<sup>5)</sup>。

これらの知見は、化学物質の適切な毒性評価が困難であることを意味しているだけでなく、化学物質の毒性に対する考え方が大きく変わるきっかけともなっている。POPsの問題は、化学物質の製造、利用や消費、廃棄について地球規模で考える必要性を提起し、1992年に開かれた地球サミット（国連環境開発会議）においてはアジェンダ21が採択されている。アジェンダ21では持続可能な発展が骨子となっており、有害廃棄物の適正な管理が求められ、これをふまえて日本ではPRTR法（化学物質排出把握管理促進法）が成立している。PRTR法ではヒトや生態系への有害性が懸念される対象化学物質（第一種指定化学物質）について環境中への排出量や廃棄量を届け出ることになっている。

これら一連の動きからもわかるように、かつては化学物質の毒性という人が主たる対象であったのに対して、現在では環境や生態系への影響、負荷も評価する必要が出てきている。つまり化学物質の安全性を評価するためには、かつてはヒトを念頭においた試験をすれば十分であったのに対して、現在では生態系を意識した試験が必要になってきており、生態毒性の評価も重要な項目となっている。こうした化学物質は輸出入の対象となることから、OECD（経済協力開発機構）がテストガイドライン（TG）を制定しており、評価法についても国際的な共通化がはかられている。

### 生態毒性

上記のように持続可能な発展を考慮した場合には生態系を構成する生物についての影響を配慮する必要がある。多様な生物種で構成されている複雑な生態系における化学物質影響を評価することは困難であるが、一連の生態毒性試験の手法が開発されてきている。これらの試験法では生態系を構成する生物種のなかから代表的なものがいくつか選択され、再現性の高い試験の実施が可能であることを確認した後に試験法が確立している。OECDの生態影響試験法であげられている生物種としては、藻類、魚類、ミジンコ、鳥類、ミミズ、ミツバチ、ユスリカ、ヒメミミズ、ウズラや陸生植物などがあげられる。特に食物連鎖で重要な藻類、ミジンコ、魚類に属する生物の試験が国際的によく用いられており、環境省の実施する化学物質の生態影響試験においても藻類（*Pseudokirchneriella subcapitata*）、ミジンコ（*Daphnia magna*）、ヒメダカ（*Oryzias latipes*）、ユスリカに対する試験が優良試験所基準（GLP）に適合した試験施設

において実施されてきている。

### 動物を用いた毒性試験

新たな利便性を有する化学物質が作り出された場合、それを利用する人間に負の影響を及ぼすか否かは基本的な問題であり、ヒトを念頭においた試験としてさまざまな評価法が確立されてきた。人間に直接曝露を行い、試験を行うことは倫理上許されることではなく、毒性の低い化学物質について報告があるものの普遍的な試験とはならない。このために長く使われてきたのがヒトに系統的に近い動物を用いた試験である。ラット、ウサギ、ビーグル犬やカニクイザルなど哺乳類を用いた試験が代表的なもので、表1に示すような毒性試験がなされてきた。

これらの試験は一般的な毒性試験法として確立されていたものの、動物を使用することに対する批判は以前から存在しており、特に近年の社会的な意識の大きな変化に伴い毒性試験法も大きく変わってきている。

### 動物を用いた毒性試験

実験動物を使用するうえで一つの重要な概念は動物福祉（animal welfare）である。この言葉はまだ聴きなれないかもしれないが、いわゆる社会福祉などの医療や介護の福祉とは異なり、動物の幸福を実現するための考えであり、これが動物実験においても基本的な理念となっている。動物福祉の考えは1965年にイギリスで家畜を対象に提案され現在では動物が得られるべき自由として5つの自由が提唱されており、家畜だけでなく実験動物やペット、野生動物までを対象としている<sup>6)</sup>。

1. 飢えと渇きからの自由
2. 不快からの自由
3. 痛み・傷害・病気からの自由
4. 恐怖や抑圧からの自由
5. 正常な行動を表現する自由

たとえば、動物実験においては基本的にえさや水は自由に摂取できるようにし、1の自由を担保しており、温度・湿度・照明を管理した状態で飼育することによる2、4の自由を担保している。実験動物によって必要な飼育面積についてはNIHなどから推奨されている数値があり、2、4、5の自由を担保していることになる。また基本的にマウス、ラットなどはSPF（specific pathogen-free）とよばれる実験動物自身や人へ感染する病原菌のない動物を使用することにより、3の自由を担保すると同時に実験結果の再現性も担保している。

### 3R

ただ、いくらこうした5つの自由を念頭においても動物実験を行う限り、最終的に動物を実験の目的で殺すことには変わりがない。このため使用する実験動物の数を減らすことも重要な課題となっており、3Rの概念がうまれている。3Rとはreduction（削減）、refinement（改善）、replace（代替）の3つの考えを意味する。

Reductionは動物実験にあたっては使用する動物数を削減させることを意味するが、実験のプロトコルを変更することにより、科学的に信頼性における範囲内で用量の公比を変更したり繰り返し数を変更したりすることで実験動物の必要数を減少させる努力を行っている。

Refinementはできる限り動物に苦痛を与えないことであり、苦痛軽減のための麻酔や安楽死の手法もかつてとは変化してきている。たとえば、ペントバルビタールは長い間利便性の高い麻酔剤として実験動物の麻酔に汎用されていたが、実際には強力な催眠作用によって意識がなくなるだけで鎮痛作用はほとんどないこと、意識喪失の状態が得られる用量が致死量にきわめて近く死亡事故が多発することから、現在では使用が控えられている。

Replacementは動物を使用しない実験方法への代替であり、より下等な動物実験への移行や培養細胞を用いた*in vitro*の実験系が推奨されている。代表的な例の一つとして、エームズ試験による変異原性試験があげられる。これは原核生物であるサルモネラ菌に被験物質を曝露し誘発される遺伝子の変異を評価する手法であるが、発がん性物質の多くが変異原性を有していることから、イニシエーターとしての発がん性を評価するのに用いられている。また近年ではドレイズ試験からの移行があげられる<sup>7)</sup>。ドレイズ試験は1944年に化粧品の評価として開発された手法で、固定したアルビノのウサギの皮膚、または眼に被験物質を最大14日間曝露し、その影響（腫れ、混濁、失明など）を評価するものであり、広く用いられてきた（OECDのTG405）。しかしその試験法、特に眼刺激性試験法が残酷であるという批判が相次ぎ、EUでは段階的に化粧品開発における動物実験が禁止され2013年には完全に禁止されている（動物実験の写真などはここに掲載することもはばかられるが、rabbit, eye toxicityなどで画像を検索していただくと様子をご理解いただけるのではないかと思う）。代替法としては、ウサギ角膜上皮細胞を用いたOECDのTG491やニワトリ摘出眼球を用いた眼刺激性試験法（TG438）などが用いられており、EUでは動物実験を用いて開発された化粧品の販売はなくなっている。ニワトリ摘出眼球の利

表1. 化学物質の毒性試験

毒性試験の種類	毒性試験名称
一般毒性試験	単回投与毒性試験/急性毒性試験 反復投与毒性試験/慢性毒性試験
生殖・発生・胎児に関わる試験	生殖発生毒性試験
遺伝子突然変異に関わる試験	遺伝毒性試験/変異原性試験（代） 発がん性試験/がん原性試験
免疫アレルギーに関わる試験	免疫毒性試験/アレルギー性試験/ 抗原性試験 皮膚感作性試験（代） 光感作性試験
局所刺激性試験に関わる試験	皮膚刺激性試験/眼刺激性試験（代） 光毒性試験

（代）は動物を使用しない代替の実験法を示す。

用は奇異な動物愛護の観点からは奇異な感をあたえるが、実際は処分される部分を試料とすることにより問題を回避している。

この他にも代替法の確立は急務であり、OECDにおいては従来のテストガイドラインに加えて代替法の標準化を進めている（表1）。

動物実験をなるべく避ける動きは広く見られ、創薬の分野においても従来のマウスやラットを用いた実験の代替法としてゼブラフィッシュが注目され、ゼブラフィッシュを用いた創薬研究が急速に発展してきている<sup>8)</sup>。

実験動物のカテゴリーも徐々に広がってきており、日本学術会議の規定する実験動物は哺乳類、鳥類、爬虫類であったが、世界的には両生類や魚類を含み脊椎動物全般が実験動物として認識されつつある。これはアカデミアでも同様で、哺乳類、鳥類、爬虫類を用いた動物実験については、所属機関の審査と承認が必要でこの証拠がないと論文が受理されなくなってきた。こうした動きは今後ますます強くなるものと思われ、いかに動物を使わずに安全性を評価するかが重要な課題となっている。

### ミジンコ

生態毒性試験にも用いられているミジンコ（*Daphnia magna*）の可能性について最後に紹介したい。上記のようにミジンコは生態毒性を評価するための重要な生物種であり、試験法が開発されているが、基本的には曝露後の遊泳阻害や繁殖阻害を評価する試験であり、時間やコストがかかる。近年になってこのミジンコに遺伝子を導入する手法が開発された。化学物質を曝露した際に発現が変動する遺伝子に着目し、遺伝子が変動すると蛍光を発するミジンコを作製することにより、従来の試験法が

簡略化されることが期待される。また、遺伝子の動きに着目することは、毒性のメカニズムにも知見を与えることになり、今後も新たに作られるであろう化学物質の影響を的確に評価することにもつながると期待できる。一方で、ミジンコにヒトの遺伝子を導入する試みも進められている。たとえば、ヒトのエストロゲン受容体とその応答遺伝子のセットをミジンコに導入することにより、エストロゲン様の活性をミジンコで検出できることが報告されている。ヒトにおける化学物質に対する応答システムをミジンコに導入するこうしたアプローチは、単にミジンコが生態影響の評価に利用できるのみならず、動物実験の代替法としても今後利用できる可能性を示している。

### これからの展望

簡単に化学物質の安全をどう考えるか、考えがどのように変化してきたかを紹介したが、莫大な数の化学物質、動物実験の削減などを考慮すると最終的には*in silico*での毒性予測が理想であろう。現在も定量的構造活性相関(QSAR)から毒性を予測する手法は存在している。化学物質の構造や物理化学的な特性からその影響を予測するもので、今までは発がん性の予測に化学物質の求電子性などが用いられてきており、生態毒性予測などにもQSARを用いたアプローチがなされてきているが正確に毒性予測ができる状態には至っていない<sup>9)</sup>。この理由の一つは毒性のエンドポイント(たとえばミジンコでは遊泳阻害など)と曝露する化学物質の物理化学的特性の乖離の可能性が上げられるだろう。化学物質がミジンコを含め生体に作用する場合、化学物質の標的となる遺伝

子産物なり生体分子が明らかにならなければ本当の毒性影響は評価できないはずであるが現在の*in silico*による毒性予測はそこまで踏み込んだ評価ができていないのが現状である。化学物質の生体内における標的を簡便に同定できる手法が確立できれば、構造からの毒性予測がよりの確にできることが期待できる。

一方で、化学物質影響を遺伝子発現の動きから評価する試みがトキシコゲノミクスとして進められており、次世代シーケンサーを用いたRNAシーケンシングによる評価技術も急速に発展している。種々の生物における化学物質曝露による遺伝子変化を大量に処理可能になってきている状況をふまえると、遺伝子の動きから毒性影響を評価することも可能になり、*in silico*による化学物質の毒性予測にもつながることが期待できる。

### 文 献

- 1) CAS, a division of the American Chemical Society: <http://support.cas.org/news/media-releases/100-millionth-substance> (2018/3/9).
- 2) Reymann, S. and Borlak, J.: *BMC Genomics*, **7**, 217 (2006).
- 3) van der Oost, R. *et al.*: *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **13**, 57 (2003).
- 4) Mrema, E. J. *et al.*: *Toxicology*, **307**, 74 (2013).
- 5) Daughton, C. G. and Ternes, T. A.: *Environ. Health Perspect.*, **107**, 907 (1999).
- 6) Animal Welfare Institute: <https://awionline.org/> (2018/3/9).
- 7) Wilhelmus, K. R.: *Surv. Ophthalmol.*, **45**, 493 (2001).
- 8) Fleming, A. and Alderton, W. K.: *Drug Discov. Today Dis. Models*, **10**, e43 (2013).
- 9) Singh, K. P. *et al.*: *Chem. Res. Toxicol.*, **27**, 741 (2014).