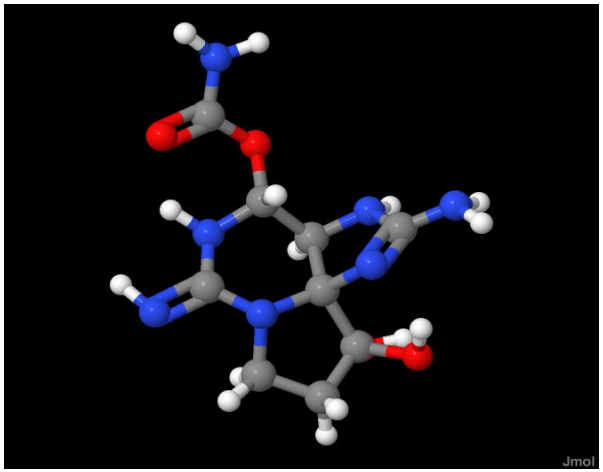
毒性学（toxicology）入門

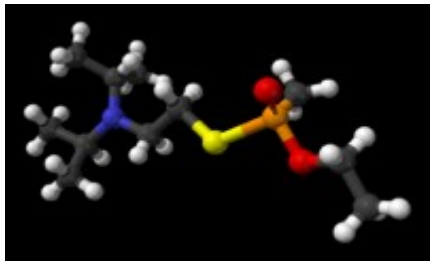
- 紀元前 1500 年頃古代エジプトで書かれた『エーベルス・パピルス』に，様々な毒の記載がある。古代ギリシャでもホメロスが『オデュッセウス』で矢に毒を塗る話を書いている。
- 中世末になって，医師・錬金術師で「毒性学の父」と呼ばれるパラケルスス（ *Philippus Aureolus Theophrastus Bombastus von Hohenheim-Paracelsus,* 1493–1541 ）が「物質にはすべて毒性がある：毒性のないものはない。物質を毒にするのは量」 *"Alle Ding sind Gift und nichts ohn Gift; alein die Dosis macht daß ein Ding kein Gift ist"* ("All substances are poisons; there is none which is not a poison. The right dose differentiates poison from a remedy.") と書いた。
- 医薬品や化学物質のヒトへの安全性を科学的に解明する学問を毒性学 (toxicology) という。1960 年代初頭に認知された新しい学問。食物生産や医薬品製造の産業化に伴い重要度が上がり，活発に研究が行われている
  - Hartung T (2009) Toxicology for the twenty-first century. *Nature*, 460, 208-212. https://www.nature.com/articles/460208a
- 医薬品では，薬効と副作用のバランスと個人差は重要な問題。
  - 服用者の 10% に肝障害を起こす風邪薬や，1000 人当たり1人がガンになる食品添加物（保存料など）は有効でも許されない
  - 80% の患者に有効な新しい抗がん剤は，弱い肝障害や腎障害が起こっても使われる。ある種の白血病にはヒ素製剤を使用。

様々な物質の半数致死量（LD50）

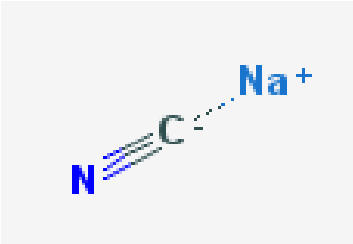
- LD50 は化学物質をラット，モルモットなどの実験動物に投与し，その実験動物の半数が試験期間内に死亡する用量 (dose) 。通常，投与した動物の 50 %が死亡する用量を**体重当たりの量** (mg/kg) で表す（同じ投与量でもサイズが小さな動物では影響が大きい）
- 化学物質の**急性毒性**の強さの代表的指標
  - EIC ネット https://www.eic.or.jp/ecoterm/?act=view&serial=252
  - 麻痺性貝毒 https://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/poison/animal_det_09.html



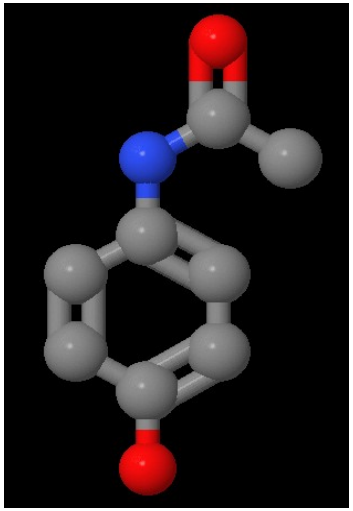
0.01 mg/kg （マウス腹腔内，麻痺性貝毒の一種，サキシトキシン）



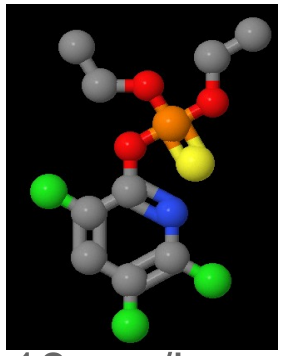
1 mg/kg
（ラット呼気で 0.015mg/kg ）
VX 神経ガス（化学兵器）



10 mg/kg
青酸ナトリウム



500 mg/kg
アセトアミノフェン
（犬や猫ではごく微量で死亡）

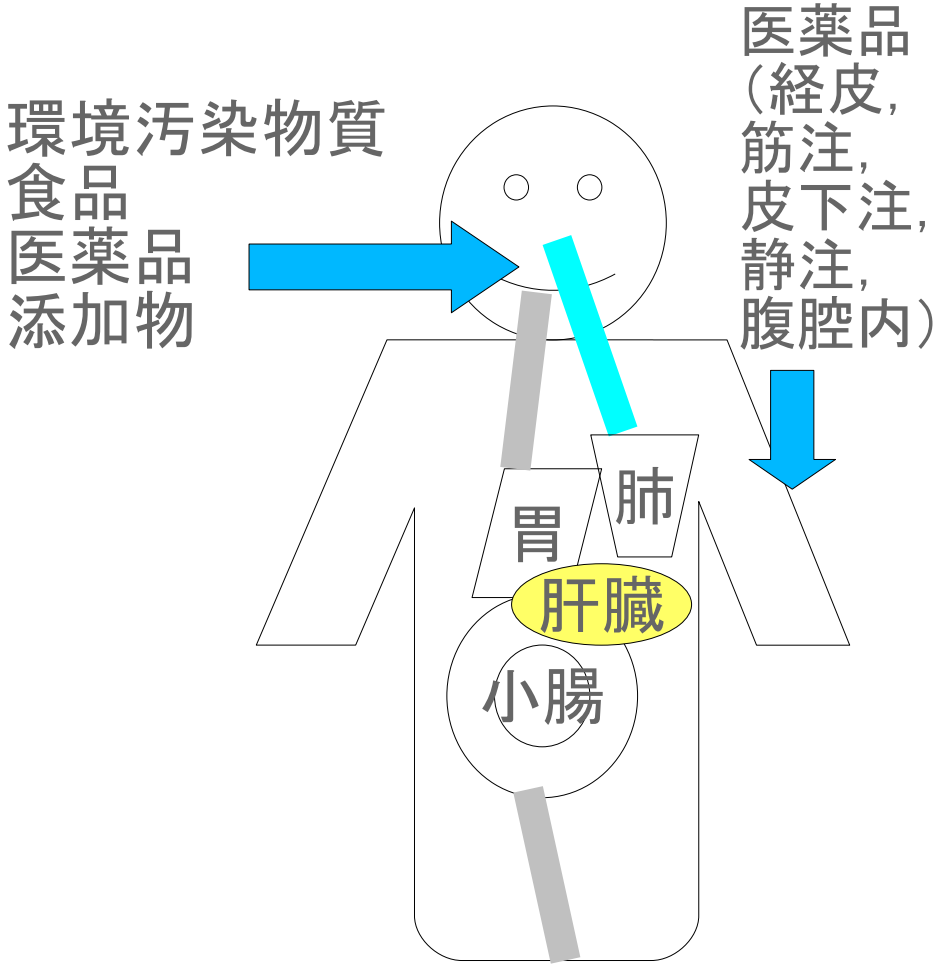


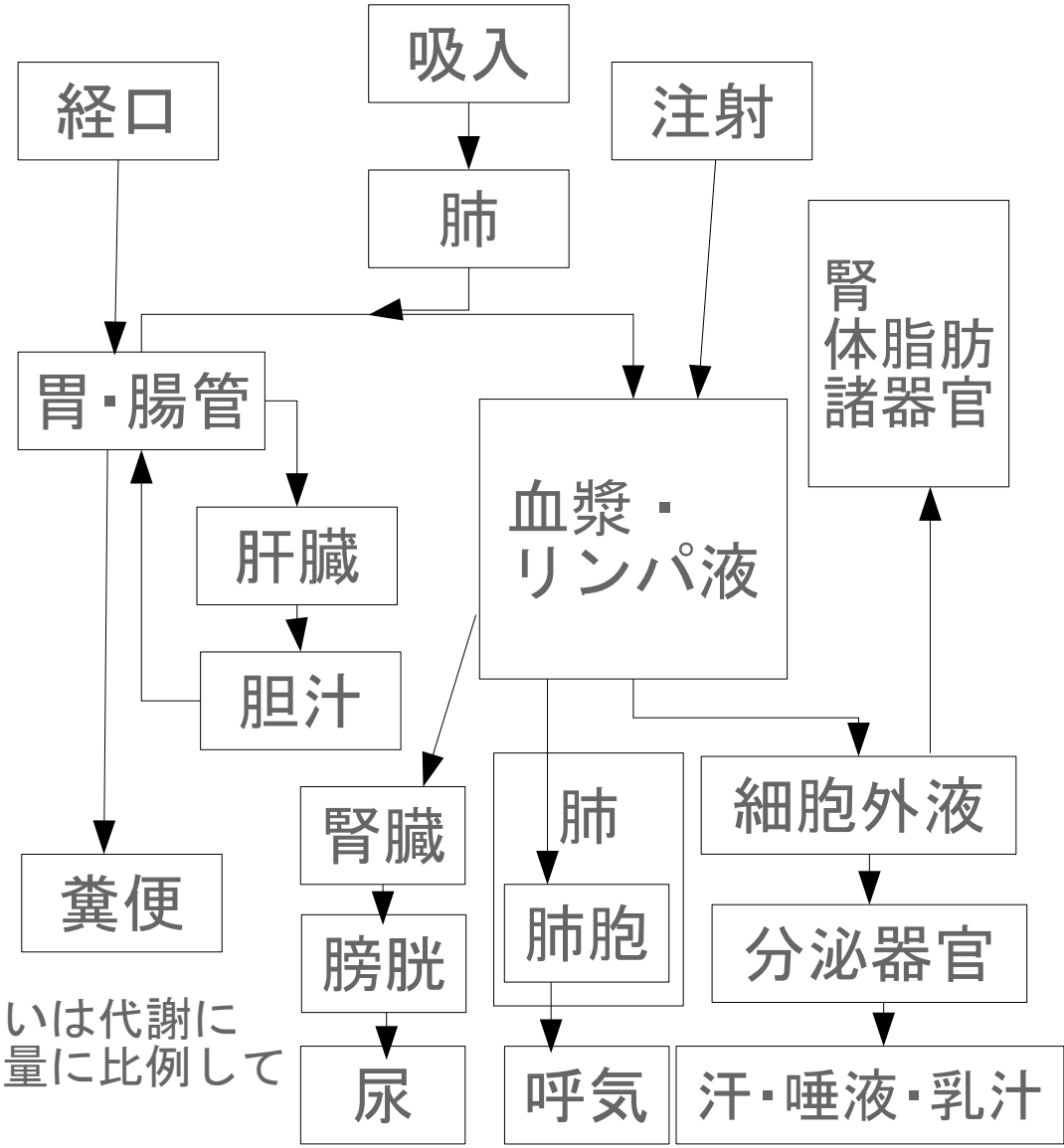
118 mg/kg
クロルピリフォス

2,400 mg/kg
塩化ナトリウム

（注）白：水素，青：窒素，赤：酸素，灰：炭素，黄：硫黄，橙：リン，緑：塩素

化学物質や医薬品の吸収・排泄と生体内コンパートメント間での移行

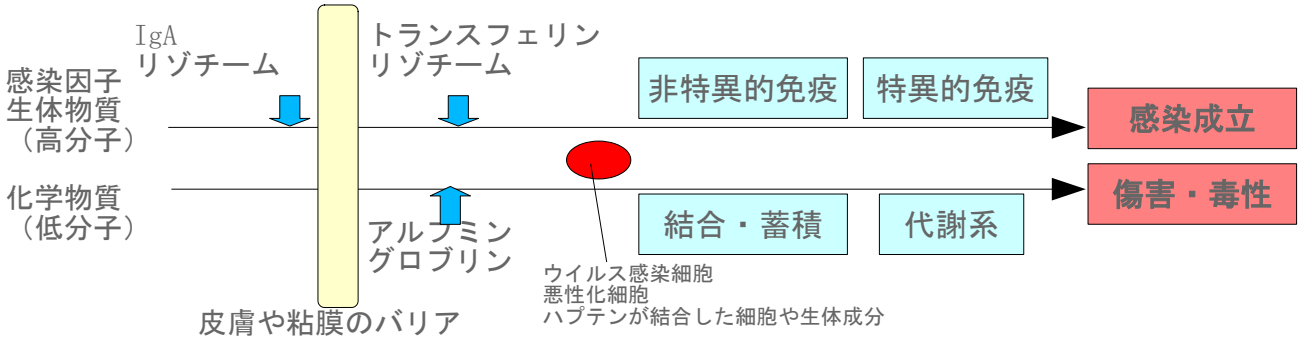


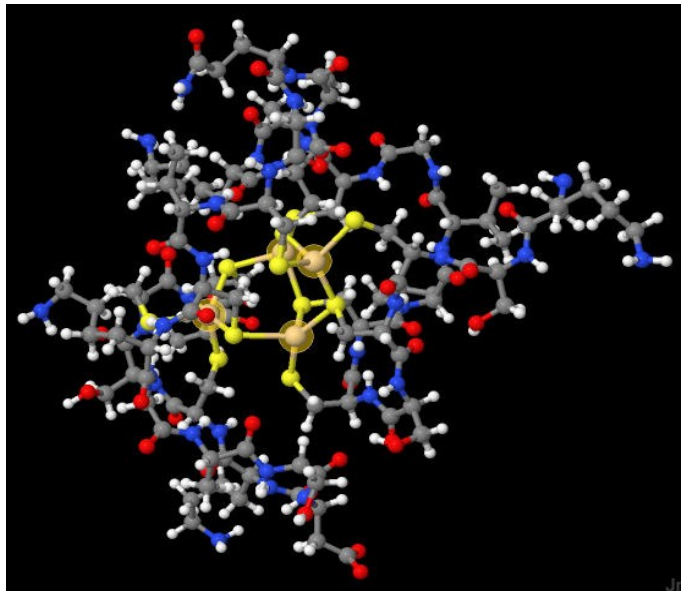


生物学的半減期：体内に取り込まれた物質が排出あるいは代謝によって減少し，そのときの減少速度がその物質の体内量に比例している場合，最初にあった量が半分になるまでの時間

生体防御機構

- 免疫系を介する生体防御
  - 非特異的：食作用（好中球，単球，マクロファージ），がん細胞やウイルス感染細胞への攻撃（ NK 細胞），インターフェロンによるウイルス複製阻害，補体免疫反応，自然抗体（ IgM 中心）等
  - 特異的：自己と非自己の識別による生体防御。非自己のマーカとしての抗原を認識する液性免疫，非自己により活性化されたマクロファージ等による細胞性免疫
- 非免疫系の生体防御
  - 異物代謝酵素：脂溶性異物を水溶性に代謝し体外へ排泄
  - メタロチオネイン： Cu, Zn, Cd 等により誘導される，重金属を取り込み体外に排泄されやすくする分子（ -SH 基を多くもち，MW6000-7000 ）
  - 活性酸素消去系： SOD , カタラーゼ，GPx など
  - DNA 修復酵素系：複製時のミスマッチ修復系





黄色の SH 基で囲まれた Cd 原子をもつメタロチオネイン

吸収経路

- 消化管経由：口腔粘膜, 舌表面, 直腸下部を除き門脈経由で肝臓に運ばれ代謝される。胃では脂溶性物質と弱酸性物質が吸収されやすい。
- 肺経由：大気汚染物質等が肺胞から吸収される。水銀などは液体として消化管から吸収されるより, 蒸気として肺胞から吸収される方が効率が高い
- 皮膚経由：単純拡散によるので, 消化管や肺に比べて吸収効率が低く問題にならない物質が多いが, 四塩化炭素, パラコート, パラチオン, サリンなど例外あり
  - 米国陸軍のデータによると, サリンの致死量は, 気体として肺で 0.1 g-min/m^3 , 皮膚で 15 g-min/m^3 , 液体として皮膚で 1.7 g-min/m^3

体内動態

- 化学物質の毒性発現の有無は, 生体側のその物質に対する感受性と, その物質（あるいはその代謝産物）の作用部位での濃度に依存
  - 濃度は, 吸収 (Absorption) , 分布 (Distribution) , 代謝 (Metabolism) , 排泄 (Excretion) の4因子からなる体内動態 (ADME) により規定される
- 化学物質がある組織に障害を与える濃度の下限を臨界濃度という
- 最初に臨界濃度に達する組織（器官）を標的組織（標的器官 ; target organ ）という
- 感受性も組織により差があるので, 標的組織が最も高濃度とは限らない

分布

- 体内の濃度分布は物質によって異なる
  - DDT（殺虫剤の一種）やチオペンタール（鎮静催眠薬）は脂肪組織に蓄積する
  - 無機水銀は腎臓に最多で肝臓や脾臓にも分布するが，メチル水銀は各臓器間の分布差が小さく，脳や胎児にも蓄積しやすい
  - カドミウムは肝臓や腎臓に蓄積する
- 分布が物質によって異なる原因
  - 生体側の要因：各組織への血流量や血液脳関門 (BBB)，血液胎盤関門 (BPB) といった組織関門
  - 物質側の要因：分子の大きさ，脂溶性の程度，血液成分や組織細胞成分との結合性
    - 脂肪組織に蓄積する物質は生物学的半減期が長い

代謝

- 異物代謝は, 基本的には, 物質の極性を増大させることにより排泄を促す反応
- 解毒機構だが, 物質によっては代謝産物の方が毒性が大きい場合がある →代謝的活性化
- 代謝反応の段階
  - 第 I 相反応：酸化, 還元, 加水分解による官能基導入。生体内の多くの臓器で行われるが, 肝臓が最も活発。肝臓ミクロソーム中の **cytochrome P450** というヘムタンパクが各種酸化反応を触媒し重要。アルコールの酸化は P450 よりも ADH によりアルデヒドに, さらに ALDH によりカルボン酸へ代謝される経路が主
  - 第 II 相反応：グルクロン酸抱合, 硫酸抱合, アセチル抱合など, 内因性物質との抱合により排泄されやすくなる

代謝酵素の遺伝的多型

異物代謝酵素	遺伝的多型がみられる分子種	基質となる異物	欠損（または低活性型）頻度	欠損の影響
Cytochrome P450	CYP2C19	抗てんかん薬メフェニトインなど	白人で 3%，日本人で約 20%	代謝される薬物の副作用出現頻度が高い
アルコール脱水素酵素	ADH1	エタノール	白人で 4-20% 日本人で 90%	肝臓におけるアルコール代謝能に影響し多くのアセトアルデヒド産生
アルデヒド脱水素酵素	ALDH2	アセトアルデヒド	白人は稀 日本人約 40%	アセトアルデヒドが蓄積し顔面紅潮が起こりやすい（フラッシャー）
N- アセチル転移酵素	NAT2	抗結核薬イソニアジド等	白人で約 60% 日本人約 12%	薬物の副作用が起こりやすい（多発性神経炎など）
グルタチオン S- 転移酵素	GSTM1 GSTT1 GSTP1	発がん性芳香族炭化水素エポキシド	GSTM1 は 50%，GSTT1 は約 38%	喫煙による発がん誘発の可能性上昇
UDP- グルクロン酸転移酵素	UGT1A1	ビリルビン	？	Crigier-Najjar 症候群（核黄疸）や Gilbert 症候群
チオプリンメチル転移酵素	TPMT	抗白血病薬，免疫抑制薬	白人では欠損ホモ 0.2-0.3%	代謝される薬物の骨髄抑制などの強い副作用

排泄

- 排泄器官は腎臓, 肝臓が主
- 尿中への排泄：腎臓での糸球体濾過（血液の 25 %が糸球体に達し, そのうち 20 %が濾過される。MW 6万以下は通過）, 尿細管での再吸収, 能動輸送による尿細管への分泌（陰イオン性異物は有機アニオントランスポータ, 陽イオン性異物は有機カチオントランスポータによる）と再吸収（グルコース等の栄養成分だけでなく, 脂溶性物質は異物でも再吸収されやすい）
- 胆汁への排泄：肝臓から胆汁酸塩などとともに胆管を通って十二指腸内へ排泄される。極性が高い物質はそのまま糞便中に排泄されるが, 極性が低い物質は小腸で再吸収（腸肝循環。メチル水銀など）。グルタチオン抱合やグルクロン酸抱合した異物は有機アニオントランスポータ MRP2 を中心としたトランスポータ群により能動的に胆汁へ排泄される（第 III 相反応）
- 他：腸管（ジゴキシンなど一部の薬物, PCB , DDT 等）, 乳汁中（脂溶性物質）, 呼気中（揮発性有機溶剤）, 皮膚, 唾液, 涙

毒性の分類

- 一般毒性＝毒性発現までの期間による分類
  - 急性毒性：１回曝露で短期間に発現。LD50 や LC50 で評価
  - 亜急性毒性：反復投与により１～3ヶ月間曝露で発現
  - 慢性毒性：数ヶ月～１年以上の曝露で発現
  - 経世代影響：次世代に発現（生殖毒性とも重複）
- 特殊毒性＝毒性発現の種類による分類
  - 発がん性：がんを誘発する性質
    - イニシエーション：DNA 障害が固定され変異細胞生成
    - プロモーション：変異細胞が増殖しがん細胞化
  - 変異原性：遺伝性の変異を誘発する性質。遺伝子毒性
    - 催奇形性：器官形成期の曝露によって奇形を起こす作用
  - 他, 生殖毒性, 神経毒性, 免疫毒性, 内分泌攪乱など

毒性の標的器官

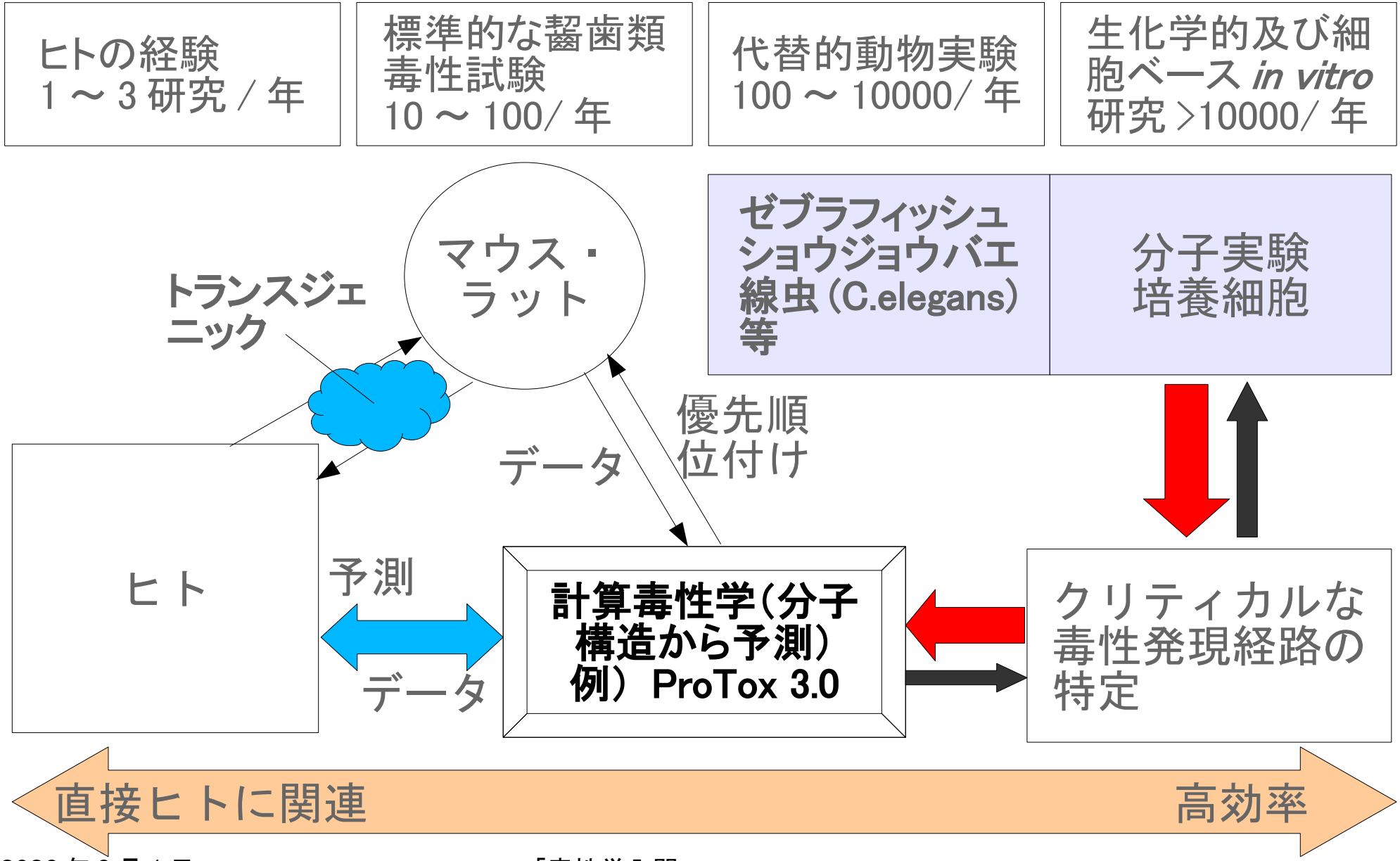
- その物質の生体内での分布の偏りや感受性の違いにより, 毒性発現が最初に強く起こる器官を標的器官という
- カドミウムの場合, 慢性曝露ではイタイイタイ病を起こすので骨にも影響はあるが, 体内に吸収されたカドミウムの多くはまず肝臓に蓄積し, その後徐々に腎臓に移行するので, 急性毒性が発現するのは肝臓, 慢性毒性が発現するのは腎臓の近位尿細管)であり, これらが標的器官といえる。
- 無機鉛の標的組織が造血組織(ヘム合成系)であることや, パラコート(除草剤の一種)の標的器官が肺であることは, よく知られている。
  - 鉛中毒では大球性低色素性貧血が起こるが, 鉄欠乏と症状としては似ている。網状赤血球が増えることが特徴的
- 無機ヒ素 (As) は変異原性がないけれども発がん性がある。おそらく免疫抑制(マクロファージや NK 細胞の活性を下げる)

毒性の評価

- 評価手法
  - ヒトを対象：人体実験は不可。臨床中毒学的手法（事故で曝露した中毒の臨床例を集める）や疫学的手法（集団の曝露から有害反応発生頻度と分布，関連要因を調べる）
  - 動物実験や培養細胞実験の知見を応用。
    - USEPA の水生生物への急性毒性評価マニュアル
      https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-08/documents/acute-freshwater-and-marine-wet-manual_2002.pdf
- 毒性試験の種類（ cf. OECD 毒性試験ガイドライン）
  - 急性経口毒性試験：投与後 2W 観察，剖検，LD50 評価
  - 亜急性毒性試験：2 ～ 4W 毎日投与，剖検，NOEL 推定
  - 慢性毒性試験：齧歯類＋非齧歯類，最低 12 ヶ月反復投与，NOEL ，ADI ，TDI を算出
  - その他，慢性毒性／がん原性組合せ試験，催奇形性試験，二世代生殖毒性試験，変異原性試験 (Ames 試験)，染色体異常試験（ in vitro で培養細胞を用いる），スクリーニング毒性試験，生態毒性試験，長期毒性試験，生物モニタリング，等

毒性試験のあり方

(Source: Collins FS, Gray GM, Bucher JR: Toxicology. Transforming Environmental Health Protection. *Science*, **319**: 906-7, 2008. https://doi.org/10.1126/science.1154619)



毒性の指標

- 急性毒性については, 半数致死量 (LD50) や半数致死濃度 (LC50) , 半数影響量 (ED50) などを用いる
- 閾値が存在する場合
  - 低用量域での物質の毒性発現について, 直線関係が成り立つと仮定すると, ある濃度以下では反応率がゼロになるはず。この点が最大無作用量(閾値)
- 閾値が存在しない場合
  - 設定された用量の中で, 影響あるいは毒性が認められなかった最大の用量を, NOEL (No-Observed Effect Level; 無作用量)あるいは NOAEL (No-Observed Adverse Effect Level 無毒性量)と定義
  - 例数を増やしたら反応する個体が出現する可能性が常にあるので, 安全係数あるいは不確実性係数を考慮する
  - 実質安全量 (Virtually Safe Dose: VSD) :受け入れ可能なリスクレベルを設定し, それ以下のリスクしかない用量は実質的に安全と見なす
- 混合物の LD50 はそれぞれの LD50 に対する濃度割合の和で 100 を割る

https://ntp.niehs.nih.gov/sites/default/files/iccvam/meetings/at-wksp-2019/ppt/04-settivari-508.pdf

安全基準 (RfD: Reference Dose)

- ADI (Acceptable Daily Intake)：許容1日摂取量。意図的に利用される物質（農薬や食品添加物）について，ヒトが一生涯摂取しても危険がないと考えられる1日あたりの摂取量
- TDI (Tolerable Daily Intake)：耐容1日摂取量。意図的に摂取するのでない環境汚染物質などについて，ヒトが一生涯摂取しても危険がないと考えられる1日あたりの摂取量
- どちらも単位は mg/kg 体重 / 日。最も感受性が高い実験動物を用いた毒性試験で得られた NOAEL（不明な場合は NOEL または LOAEL=Lowest Observed Adverse Effect Level; 最小毒性量）を，ADI なら安全係数 (safety factor) を，TDI なら不確実係数 (uncertainty factor) で割って得る。
- 係数の根拠は厳密な科学ではなく実用性。一般には動物実験で得た NOAEL から計算するなら，種差に最大 10，個体差に最大 10 で最大 100 を適用。NOEL か LOAEL を使う場合はさらに 10 を掛けて 1000 を適用することが多い

用量反応関係 (dose-response relationship)

- 用量(dose)や血中濃度に応じて標的臓器や個体が反応程度が変化
- 有害物の負荷量としての dose に対する反応割合(response ＝反応した個体数／その dose を受けた総個体数)との関係を集団レベルでみると, S字曲線になることが多い。原因は, 反応(感受性)に個体差があること。通常, 累積対数正規分布で近似される。
- 半数の個体が反応を示す負荷量を半数影響量 (ED50) と呼ぶ。急性毒性試験では半数致死量 (LD50) が良く使われ, 推定にはプロビット分析やロジット分析(ロジット分析では, 対数オッズが用量の線形関数となる)
- 用量も対数軸で見ることも多い

用量反応関係の反応モデル

- ワンヒットモデル：発がん物質が1回遺伝子に衝突し損傷を与えると，その細胞ががん化する。曝露量 D に対して細胞ががん化する確率 P(D) は，1から1回も衝突しない確率を引いた値として得られ，P(D)=1−h(0)=1−exp(−qD) 。低用量域では発がんリスクが用量に比例。比例定数 q を発がんスロープファクタと呼ぶ。
- 線型多段階モデル：1つの細胞ががん化するために k 段階の反応が一定の順序で起こる必要があり，各段階の反応率が用量の一次式で表されると考えれば，
  P(D)=1−exp(−(q0+q1D+q2D^2+...+qkD^k)) 。
  米国 EPA が用いているのは，このモデルに q1>0 という制約をつけた Crump のモデル。通常は，P(0) によるリスクを除いた曝露量 D での発がんリスク，つまり過剰リスク R(D)={P(D)−P(0)}/{1−P(0)} を考える。このモデルでは D が 0 に近いとき R(D) は近似的に q1D となるので，低用量域では過剰リスクが用量に比例する。

用量反応関係の分析方法

$$\text{Probit}: F^*(X_i) = \Phi(\beta_0 + \beta_1 X_i), \Phi(z) = \int_{-\infty}^{z} \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-x^2/2} dx$$

$$\text{Logit}: F^*(X_i) = \Lambda(\beta_0 + \beta_1 X_i), \Lambda(z) = \frac{e^z}{1+e^z}$$

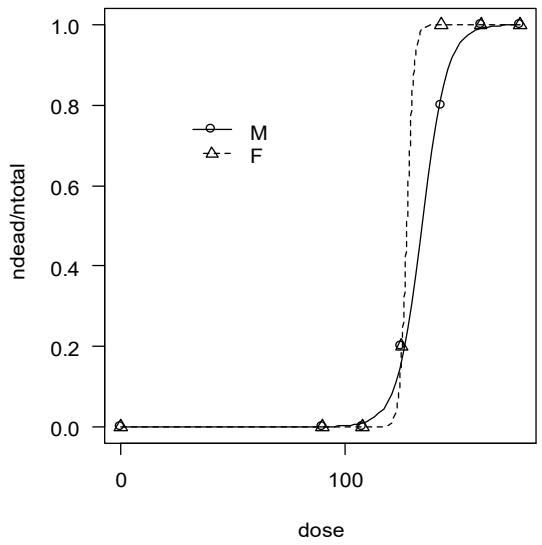
2- メルカプトイミダゾールの毒性試験の例

Table 1　Mortality and LD_{50} value of rats in single dose oral toxicity test of 2-mercaptobenzimidazole

Sex	Group (mg/kg)		Number of males	Hours after administration 0 ~0.5	2	4	6	Days after administration 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Total number of deaths	LD 50 (mg/kg)
Male	Control	0	5	0*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2-mercaptobenzimidazole	79	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2-mercaptobenzimidazole	119	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	218 a)
	2-mercaptobenzimidazole	178	5	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	(166～287)
	2-mercaptobenzimidazole	267	5	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	a)
	2-mercaptobenzimidazole	400	5	0	0	0	0	1	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	b)
	2-mercaptobenzimidazole	600	5	0	0	0	0	1	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	
Female	Control	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2-mercaptobenzimidazole	79	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2-mercaptobenzimidazole	119	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2-mercaptobenzimidazole	178	5	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	208 b)
	2-mercaptobenzimidazole	267	5	0	0	0	0	0	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	
	2-mercaptobenzimidazole	400	5	0	0	0	0	1	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	
	2-mercaptobenzimidazole	600	5	0	0	0	0	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	

*: Number of deaths.　a): Probit method.　b): Behrens-Karber method.
Figures in parenthesis indicate 95% confidence limit.

https://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/home/paper/paper583-39-1a.html

R での分析例(drc パッケージを利用)

```
if (require(drc)==FALSE) { install.packages("drc"); library(drc) }
rats <- data.frame(
 sex = factor(c(rep(1, 7), rep(2, 7)), labels=c("M", "F")),
 dose = rep(c(0, 79, 119, 178, 267, 400, 600), 2),
 ndead = c(0, 0, 0, 1, 4, 5, 5, 0, 0, 0, 1, 5, 5, 5),
 ntotal = rep(5, 14))
mx <- drm(ndead/ntotal ~ dose, curveid=sex, weights=ntotal, data=rats, fct=LL.2(), type="binomial")
summary(mx)                    # ↑ ロジットモデル
ED(mx, 50, interval="delta") # 信頼区間はデルタ法
#       Estimate Std. Error   Lower  Upper
# F:50  186.636     60.373  68.306 304.97
# M:50  218.013     22.809 173.308 262.72
plot(mx, legendPos=c(50, 0.8))
```