

農薬の毒性試験と安全性

財団法人残留農薬研究所 **真 いた けい ぞう**
板 敬 三

最近、写真専門の週刊誌に、信濃川下流域の住民に胆のう腫瘍の発生が多くその原因が農薬である、との記事が載っていた。最近ではマスコミも少しはわかってきたのかと思っていたが、どうも種は尽きないようである。日本人は薬が好きなくせに一種のおそれのようなものを持っていて、それが医薬となると救いの神となり、農薬となると忌むべきものになるらしい。医薬であれば、風邪引きを一日でも早く治そうと1日2粒で良い薬を4粒も飲むくせに、pptレベルの残留農薬を目の敵にする。世の人は医薬品と農薬とは全く別なもので、構成元素から化学構造まで地球と月ほど違っていると思っているらしい。これはとんでもない話でして、農薬だって亀の甲のベンゼン環がたくさんあるし、メチル基やエチル基はいっぱいついていて。たまたま、除草効果が高かったり、殺虫殺菌効果に優れていたにすぎず、ひょっとすると良く調べれば水虫への効果が抜群であったり、血圧を下げる働きがあるかもわからない。毒性というのは化学物質が生体に対しいかなる悪い影響を及ぼすかを調べることである。生体は化学物質を医薬品とか農薬とかを一つ一つ区別して処理せず、食物・ビタミン・ホルモン・プロスタグランジン等の生体内活性物質・その他の物質を代謝する系統の一部を上手に利用して代謝している。農薬が代謝されずにたまるということは絶対にない。問題は生体に入る量、特に1回にどれだけ多量に入るかである。多量であれば処理しきれずに悪影響がでる。したがって、アルコールの一气飲み、風邪薬の倍量飲みは慎んだほうが良い。

医薬品は通常 mg の単位で投薬されるのに対し、農薬の摂取量はその数万分の1以下である。現在農薬の毒性試験の内容は医薬品と同様であり、人間における実際の暴露量から考えると随分過酷な条件と思われる。しかし、化学物質全体に共通した考えとして、用途は考慮せず物質の毒性をまず把握し、次の段階として使用形態、すなわち医薬・農薬・食品添加物等の実用に即して人への危険度合いを評価する、という姿勢が主流である。

本稿では農薬の登録申請に必要な毒性試験と各試験のもつ意義・問題点を解説する。

Toxicity Testings and Safety Evaluation of Pesticides.
By Keizo MAITA

I GLPとガイドライン

毒性試験は動物、微生物といった生き物を媒体として化学物質の影響を調べるため、育成条件、飼育環境、試験方法により結果がかなり左右されることが少なくない。また、症状・病変観察のごとく多分に個人の判断、経験の差に依存する部分が評価の枢要にかかわることも多い。その一方で農薬の国際化に伴い、毒性試験成績も各国で要求されているが、一つの国で作出されたものが他国で使えないのは時間、経済的に大変不便である。このような点から、試験施設に設備・機器、運営方法及び人的配置に一定の基準を設けるGLP(毒性試験適正実施規範)と、試験方法を統一したガイドラインを設け、国内のみならず国際的にも毒性試験成績の均一化を図っている。GLPの特徴の一つは施設内に内部査察機構「QA」を設けたことで、それがお目付け役となり毒性試験のハード・ソフト両面について適正実施に向け目を配っている。

II 農薬の毒性試験

農薬の毒性試験には水棲生物に及ぼす影響を調べる試験と、人への影響を推測する試験とがある。これらの試験を表-1に示す。

1 魚毒性試験

農薬が環境へ及ぼす影響を調べる試験の一環として実施され、水棲生物のうちエビ等の甲殻類の代表にはミジンコ、魚類にはコイ等が用いられる。魚毒性の強さはコイの半数が48時間以内に死ぬ溶液濃度(TLm)により判

表-1 農薬の毒性試験

水棲生物への影響	
魚毒性試験	
人への影響	
急性毒性試験(経口, 経皮, 吸入)	
眼一次刺激性試験	皮膚一次刺激性試験
皮膚感受性試験	(急性遅発性神経毒性)
亜急性経口毒性試験	慢性経口毒性試験
変異原性試験	発癌性試験
催奇形性試験	繁殖試験
生体内運命に関する試験(代謝試験)	
生体機能に及ぼす影響に関する試験	(薬理試験)

定され、弱い段階 A から C 及び指定農薬の 4 段階に分類されている。しかし、指定農薬の一般での使用は厳しく規制されており、実際的には C の農薬が要注意である。この分類は農薬原体の魚毒性試験の成績を基に分類したもので、有効成分としての魚毒性の目安を示すものであり、使用に際しては個々の製剤ラベルを見て行う必要がある。魚毒性を用途別農薬について調べた結果は、次の急性毒性試験の項で、普通物、劇物、毒物の分類とともに示してある。魚毒性は殺虫剤、殺菌剤にやや強いものが多い。農薬には水に溶けにくいものも少なくないところから、ネズミでの急性毒性は強いが魚毒性は低いという物質もある。

2 急性毒性試験

薬物が大量かつ急激に摂取されたときに何が起るかを知らることが目的である。この摂取形態は作業者に最も起こり得るため、原体、製剤の両方に要求される試験である。農薬の主たる摂取経路は、口、皮膚、呼吸器のため動物への投与も経口、経皮、吸入が選ばれる。

急性経口毒性試験は人の最も主要な摂取経路であるところから 2 種類の動物、マウスとラットで実施される。化学物質は経口投与の LD 50 値により普通物、劇物、毒物に分けられるが、農薬におけるそれらの品数を表-2 に示す。殺虫剤、殺菌剤という直接生命活動を停止させるような農薬は急性毒性・魚毒性もやや強いようである。毒物・劇物といういかにも危険というイメージになる

が、それは大量に飲めば危険だということである。農薬は作物が順調に育つために開発されるのであり、人が飲むことを前提に考えていない。それでも急性毒性の強い農薬については薬の小分けの単位を小さくする、異臭をつける、催吐剤を入れる、といった工夫をしている。このような対策を講じても自殺を目的として何本もの製剤を飲まれてはどうしようもない。きわめてまれであるが農薬による自殺者がいて、それが農薬は怖いという印象を一般に与えてしまうことは何とも残念である。

近年、鼻・喉とか肺から多くの薬物が吸収され毒性を示すことが明らかにされつつあり、農薬の吸入毒性試験の重要性が増している。吸入方法には全身暴露法と鼻部暴露法がある。前者はより野外の農薬散布の実態に近いのだが、動物は粉まみれ、濡れネズミになり身づくろいのため表面の農薬をなめてしまい、吸入毒性を調べるはずが経口毒性試験になることも少なくない。このあたりが動物試験の難しいところである。

有機リン剤やカルバメイト剤の一部に急性遅発性神経毒性という言葉が使われ、いかにも突然に神経が侵される印象を与えている。実際は神経障害は四肢の末端より始まっているのだが、ひざ、ひじのレベルに達すると初めて臨床症状として運動障害が発現する。このため、“遅発性”という用語が使われるのである。この毒性は 2 本足で歩くニワトリで良く検出できる。

3 刺激・感作性試験

農薬に対する苦情には、眼や皮膚への刺激が指摘されることも少なくない。また、アレルギー源としても疑われることがある。これらの変化の有無、程度を調べることも農薬の毒性試験としては大切で、特に製剤を対象に実施されている。

眼一次刺激性試験では、ウサギの片側の眼の下眼瞼を引き離しポケット状にし、そこに薬物を直接入れ刺激性を調べる。刺激性がかなり強い場合ウサギの眼は相当に悲惨な状態になるため動物愛護の点から非難が多い。発育鶏卵、培養細胞等々の代替法が考案されているが、反応が鈍かったり、鋭敏すぎたりで有用には程遠い状態である。

皮膚一次刺激性試験でもウサギが使われる。背中をきれいにそり上げそこにペースト状にした薬物を塗布し、ガーゼパッチでしっかり覆った後さらに外科用プラスチックカバーで保定する。これも動物にとっては大変なストレスらしく動物が興奮し大暴れることもある。

アレルギー反応の有無を調べるのは皮膚感作性試験で、動物はモルモットを用いる。薬物を肩甲部に皮内投与し、7 日後にさらに同部位に薬物を染み込ませたガー

表-2 農薬の経口急性毒性と魚毒性

農薬の種類	品数	経口急性毒性			魚毒性		
		普通物 ^a	劇物 ^b	毒物 ^c	A ^d	B ^e	C ^f
殺虫剤	118	52	59	7	28	67	23
殺菌剤	102	89	12	1	56	33	13
除草剤	116	108	6	2	66	49	1
植物成長調整剤	34	33	1	0	29	5	0
殺鼠剤	10	3	5	2	8	1	1
誘引・忌避剤、その他	28	28	0	0	22	6	0
計	408	313	83	12	209	161	38

農薬要覧(1991年)(日本植物防疫協会発行)より抜粋

a: LD 50 値, 300 mg/kg を超えるもの

b: LD 50 値, 30 mg/kg を超え 300 mg/kg 以下のもの

c: LD 50 値, 30 mg/kg 以下のもの

d: TLm 値, コイ(48時間)10 ppm, ミジンコ(3時間)0.5 ppm 以上のもの

e: TLm 値, コイ 10~0.5 ppm, また, コイに対し 10 ppm 以上でもミジンコに対し 0.5 ppm 以下のもの

f: TLm 値, コイ 0.5 ppm 以下のもの

ぜを48時間貼付して感作を確実にする。21日後に今度は脇腹をそり薬物の染み込んだガーゼを貼付する。適用した薬物にアレルギーじゃっ起作用があると脇腹のガーゼを当てた部分に発赤・腫脹がみられる。人でのアレルギーの種類は多い。食品、ホコリ、花粉、草木の香り、化粧品、薬品、虫さされ、化学繊維等々、これらは物質として発生源が同定できるが、これが紫外線とか寒さになると自分の体の成分がアレルギー物質に変化するので何とも厄介である。これほどアレルギー物質が多いところから、うちの子のゼンソクは食品中の残留農薬だと言われても、そういうこともあるだろうと言わざるを得ない。世の中ですべての人間にアレルギー性を持たない物質はまことに数が少ないであろう。だが、アレルギーとはまず相当量の物質に感作されなくてはならない。農薬の場合、食品中に残留するのはppbの単位、すなわち5合炊きの電子ジャーのご飯の中に木綿針の先でつついた程度の量である。この量で感作されるとは考えにくい。ただ、農薬の散布者の場合には農薬により感作される可能性は大いにあり得るであろう。

4 亜急性・慢性毒性試験

農薬は食物に残留するので人は一生微量の農薬を摂取し続けることになる。そのときどんな悪影響があるのか？ このような疑問に答えるのが本試験である。動物は通常ラットとイヌを使い、薬物は飼料に混入し投与する。投与期間は亜急性毒性試験は90日である。慢性毒性試験では通常ラットが2年間で、人に当てはめると10歳から65歳程度の間試験していることになり、老化に及ぼす農薬の影響も検査できる。イヌは1年間である。こちらは6か月齢で投与を開始するところから、動物の老化過程に影響されない純粋な毒性変化を調べることになる。毎週1回、体重、飼料摂取量を測るとともに、眼検査、尿検査、血液の臨床検査を人間ドックと同じように行い、解剖後は詳細な病理学的検査を肝臓、腎臓、肺を含め30以上の臓器について実施する。この顕微鏡検査は細胞の変性・壊死や癌、前癌病変を調べるため特に重要な検査であるが、一般には獣医師出身の病理学者が担当している。混餌投与方法で困るのは、動物はにおいと刺激に敏感で好まない飼料は絶対に食べず、場合によっては餓死しても食べないことである。その場合は仕方ないので胃チューブによる強制経口投与になる。イヌはそれでも吐いて薬物を出してしまうこともあるが、ラット・マウスは吐く行為ができない、気の毒なところもある。あまり大量の薬物を飼料に混入するとそれだけで栄養失調になるので、最大の混入濃度は5%で良いことになっている。それにしても、薬物で相当ジャリジャリした食

事であろう。残留農薬が5合炊きのジャーの中で木綿針の先でつついた程に比べると随分過酷な条件を動物に課すものである。残留農薬のレベルではそれが千倍になったところで、人体の代謝工場からすれば一顧だにされない程度のものである。毒性試験とは毒性学の延長線上にある。毒性学では、ある化学物質の使用形態、人体への摂取量、環境への残留量といったことは考慮せず、その物質としてどの量まで動物に投与すれば害作用があるか？ を調べる。したがって、農薬の毒性試験で明らかにされた毒性が、そのまま消費者に対する脅威になることはあり得ない。毒性量と残留量との開きが十分に大きいことが大切で、そのために動物試験での無影響量(最大無作用量)に最低100の安全係数を掛けたADI, 1日許容摂取量が定められ、安全の上にさらに保険が掛けられているのである。

5 発癌性試験

化学物質による発癌の脅威が一般の人々のすぐそばにあることが認識されつつある。ヘキサクロロベンゼンの汚染食品による肝臓発癌等のように、化学工場からの廃棄物の場合、動物試験における毒性発現量で環境全体が汚染されることがあり、その影響は深刻である。農薬も環境化学物質の一つと解釈されるところから、その発癌性を調べることは必要であろう。

動物にはマウス・ラットを用いる。マウスの寿命は2年程度、ラットは2年半である。通常発癌は動物の自然発生腫瘍の頻度が高くなる形で現れることが多いため、寿命の短い動物を使う利点がある。使用匹数は1群雌雄50匹、4群以上を設け投与経路は原則として混餌法である。発癌試験の評価には癌そのものに加えて前癌病変や細胞のわずかな異常に注意する必要がある。このため病理組織学的検査がきわめて重要である。投与量の最大量には亜急性経口毒性試験において体重が5~10%ほど低下するか、二つ以上の検査で毒性所見が明りょうに現れた量をとることが多い。これは動物にとり大変な負担で人間だと例えば酒飲みが毎日二日酔いで肝臓をはらし、10歳~65歳位まで生活することに等しい条件になる。人間でもこんなべら棒な生活をするのはきわめて少数であろう。このように大量の薬物を与え続けると、正常の代謝経路を離れた反応が出るおそれがある。第一動物虐待ではないか、等々の批判がある。しかし、動物試験の結果を人間に外挿するためには、動物が日ごろ使わない系統の反応も含め、隠された代謝経路をこじ開けてやる必要があり、大量投与が不可欠になる。

発癌はどうして生じるのか少し考えてみよう。筆者の研究の大きなテーマの一つに環境汚染物質の発癌性を

調べることがある。当初は農薬を含む化学物質、産業廃棄物に注目していたが、調べていくと我々の周囲のほとんどのものに発癌性があり、我々の生活そのものが発癌を助長していることも明らかになってきた。東京大学の黒木教授は暮しの手帖(平成2年4,5月号)で発癌要因として第一に普通の食べ物、次いでタバコ、ウイルス、性生活・出産を挙げている。タバコはその煙中に多くの発癌物質を含む以外に、タール成分が慢性炎症をじゃっ起し、炎症細胞による活性酸素の放出と壊死細胞の再生、すなわち細胞分裂が盛んになる。分裂中の細胞は活性酸素による攻撃に弱く、核酸の変化に続く遺伝子の突然変異が生じやすくなり、結果的に発癌の危険度が増大する。ウイルス感染では、ウイルス自体が核に入りこんで通常の遺伝情報を混乱させると同時に、細胞を壊すことで再生が促進される。性生活・出産では特に出産が癌化の誘引になる場合が多い。妊娠・出産により乳腺や子宮の組織は猛烈に増殖するが、その過程で突然変異の起きるチャンスが増すのである。チャンスが増すのであって妊娠・出産すると癌になるとは思わないでいただきたい。外に出れば交通事故に遭うチャンスが増える、という程度のことである。普通の食べ物が第一の原因に挙げられているのには驚かれた読者も多いと思う。魚や肉を焼くと強い発癌物質であるジメチルニトロサミン等が作られる。調理により多数の発癌物質が作られるが、天然の食物自体にも多量の発癌物質があることを忘れてはならない。表-3に食物中に含まれる発癌物質の種類と量を示す。

注意していただきたいのは毒物の含量である。残留農薬がせいぜい ppb のレベルなのに、すべて ppm の単位で含まれ、からし中には1万 ppm 以上の発癌物質があることになる。表-3をみると発癌の最短コースは、カレーライスを1週間に数回食べ、デザートにはハーブ入りアイスクリームを、そして最後はコーヒーを飲んでいただくことになる。このほかにも発癌物質は家庭内に無数にある。米国のエームス博士によると家庭内の塗料や防菌・難燃剤から放出されるホルムアルデヒドによる発癌性は、何と日本酒1.5合の晩酌の危険度の200倍だそうである。こんな話をすると今にも体中がゴブだらけになる印象を与えるが、そうたやすく癌はできない。特に若年齢での発癌は非常に少ない。それは、我々の体内には膨大な能力を持つ修復機構があり、突然変異を上手に処理している。ところが中年を過ぎるころからその修復機能の低下が顕著になり、そのため個人差は大きいものの一般的には老年期における発癌の確率が高まるのである。よく人類は天然の毒物に対しては進化の過程で抵抗

表-3 食物中天然の毒物

食 物	発癌物質	含有量(ppm)
セロリ	5-,8-methoxypsoralen	25
キャベツ	allyl isothiocyanate	35-590
芽キャベツ	同 上	110-1,560
からし	同 上	16,000-72,000
バジル	estragole	3,800
ういきょう	同 上	3,000
にくずく	safrole	10,000
りんご, プラム, にんじん, ジャがいも	caffeic acid	50-200
タイム, バジル, アニス, サルビア, デイル, ローズマリー, コーヒー	同 上	1,000 以上

Med. Oncol. Tumor Pharmacoth. 7, 69, 1990

力をつけたと言われるが、それは急性中毒に対することだけらしく、残念ながら生殖年齢を過ぎた個体での発癌には当てはまらないようである。

6 繁殖試験

農薬は数世代にわたり使用されることがある。もし、その農薬により我々の体に突然変異が起こり、それが世代間にわたって遺伝することがあると大変である。無論、自然界において突然変異は様々な形で生じ、生物の進化に寄与している。しかし、化学物質により人類に突然変異を起こすことは、たとえそれが良いものであっても絶対に許してはならない。本試験はその意味で大変重要な試験である。

動物はラットを使用し親・子・孫の三代にわたり農薬を混じた飼料を食べさせ、孫が成年に達するまで観察を続ける。仔動物及び孫動物は、乳汁を通して薬物を摂取し、さらに、離乳期より薬物の入った飼料を食べることから、幼若動物における薬物投与の影響を検査できる利点も備えている。なお、余談になるが哺育中の動物はイヌやネコであれ非常に神経質になり、ある状況下では仔動物を自分で殺してしまうこともある。ラットの場合その傾向がより強く、わずかな内外の環境の変化で哺育を止めてしまうことが多い。したがって、農薬を投与することで親動物の情緒に異常があると、その影響がすぐに仔動物に現れる。このように本試験では、なかなか動物試験では把握しにくい情緒への農薬の影響も調べることができる。

7 催奇形性試験

サリドマイドによる“アザラシ奇形”の発生が、今日の毒性学の進歩に大きなインパクトを与えたことは紛れもない事実である。二度とそのような惨事を引き起こさ

ないためにも、本試験は毒性試験の重要な柱の一つになっている。

動物には薬物代謝の種差を考慮し、ラットとウサギの2種が必須である。ラットの妊娠期間は21日、ウサギは30日が標準で、妊娠の何日目にもどの臓器が形成されるかが詳細に調べられている。そのため手足とか内臓が形成されるちょうどその時期に薬物を投与すれば、薬物に奇形をつくる作用があるかないか容易に判定できる。ラットでは妊娠6~15日、ウサギは6~18日がある期間にあたっている。薬物を投与後分娩前日に帝王切開により胎仔を取り出し異常を調べるが、これは死産であったり、重度の奇形があると親動物が食べてしまうことが多いためである。奇形は臓器の分化異常により生じるが程度が軽いと修復機構により容易に修正されてしまう。したがって、催奇形性にも明りょうな投与量との相関が認められ、サリドマイド禍をもたらした睡眠薬のごとく、かなりの量の薬物を直接体内に摂取しないと現実的な脅威にはなり得ない。

8 変異原性試験

発癌性及び催奇形性は体細胞の突然変異と密接に関連している。したがって、薬物の変異原性を調べれば、発癌性や催奇形性の予測が容易になるはずである。突然変異は染色体の上にある遺伝子の変化であるが、遺伝子は核酸(DNA)が一定の順序で並んだものである。したがって、ある薬物がDNAを障害したり遺伝子を変化せしめる場合、また、染色体に形態異常をもたらすときは発癌性あるいは催奇形性を疑うことになる。DNA障害、遺伝子障害及び染色体異常を検出する方法が考案されている。DNA障害の検出法は一般にレック・アッセイと呼ばれている。DNAが障害されると、通常直ちに修復機構が活性化し異常が表面化しない。そこで、枯草菌の一部を放射線照射等で処理し、その修復機構を欠く種類を作っておく。それらはDNA障害が生じると成長できない。この性質を利用して薬物のDNA障害を検出する。

遺伝子障害の検出系は一般にエームス試験と呼ばれている。DNA障害が固定化すると、遺伝子レベルの変化として子孫に伝えられるので、DNA障害のさらに現実化した段階を調べるものである。大腸菌やサルモネラ菌を放射線で処理し、トリプトファンやヒスチジンといったアミノ酸がないと成長できない種類にしておく。この種類が薬物投与により野生種に変化し、栄養状態の悪い条件でも増殖できるようになれば、その遺伝子に変化が起こり、それが子孫に伝えられたことが明らかにできる。この試験は簡便であり、かつ、かなり信頼性が高いため

薬物の開発現場で最も繁用される試験である。

これらのほかに染色体そのものの形態異常を調べる方法、赤血球の脱核不全を指標にした小核試験、ショウジョウバエの眼色の変化を利用した試験等が考案されている。

9 生体内運命に関する試験(代謝試験)

薬物が植物あるいは動物体内でどのように吸収・代謝・体内分布・排せつされるかを調べる試験である。一般に、薬物の構成元素の一つを放射性同位元素で置き換え、それを目印にして代謝経路を探る。薬物代謝と毒性とは密接な関係にあり、薬物の蓄積性を含め毒性のメカニズムを探究する上にも大変重要な試験であり、近年ますますより詳細な成績が要求されている。しかし、放射性同位元素を使うところから、世界的に慢性的な実施施設不足にあり、医薬・農薬を含め薬物開発の深刻なネックになっている。

10 生体の機能に及ぼす影響に関する試験(薬理試験)

本試験は農薬の薬理作用、特にその作用点を明確にして、急性中毒症の治療に役立てようとするものである。これは作業者の安全を確保する上にも大変重要な試験であり、日本ではすべての原体に実施を義務づけているが、欧米では要求されない。本来の目的が急性中毒症の治療にあるところから、急性経口毒性のLD₅₀値が5,000 mg/kg以上の低毒性農薬については、呼吸・心電図・脈拍等への影響を調べるだけで良い。しかし、LD 50 値が5,000 mg/kg以下の場合には、さらに神経系、消化器系、血液、泌尿器系臓器等への影響を検討し、解毒剤の検索も併せて実施することになる。

おわりに

毒性試験結果の評価は、目的とする化学物質がどれだけ人にとり身近にあるか、によるべきである。毒性を火事に例えれば、医薬品の場合は東京駅にいて品川が燃えているようなもので、風が強く水の便が悪ければ延焼の危険がある。一方農薬では残留農薬の量から勘案すると、東京にいて博多の火事を心配することになる。誰が考えても博多の火事が東京に及ぶことはない。ところが、こういう燃え方もある、ああいう燃え方もあるという話をしてしまうと、いつの間にか自分のそばが燃えている錯覚に陥ってしまう方が多い。あげくの果ては火事は火事だろう、ないほうが良いに決まっている、との論議になってしまう。化学物質の毒性と安全性を論ずるとき、この距離感を理解していただくことが最も肝要なのである。