

Fig. 1. Effects of exposure to BPA on maternal body weight during gestation (A) and lactation (B) Each point represents the mean.

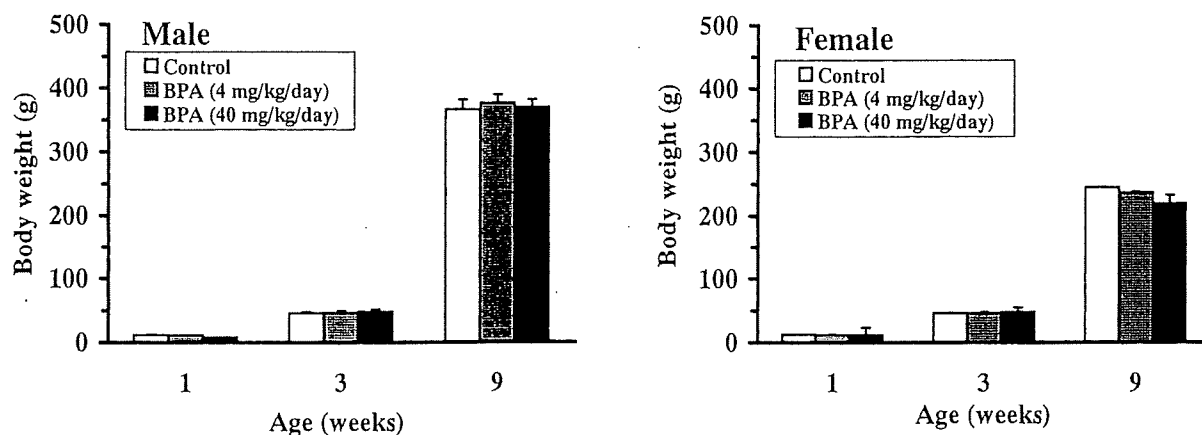


Fig. 2. Effects of maternal exposure to BPA on postnatal body weight of F₁ offspring at 1, 3 and 9 weeks of age Each column and vertical bar represent the mean and SEM, respectively. There were no significant differences among groups.

analysis. The cause of death of these dams was not identified.

Maternal body weights during gestation are shown in Fig. 1A. The 400 mg/kg/day BPA group showed a marked reduction in body weight as compared with the control group, especially, in the third trimester of gestation. Maternal body weights during lactation are shown in Fig. 1B. The body weight changes in the various groups exhibited a similar pattern, although in the 40 mg/kg/day BPA group there was a transient reduction after delivery. There were no statistically significant differences among groups in the number of surviving offspring on PND 1 (Table 1).

In male offspring, there were no statistically significant differences in body weights among groups due to BPA exposure at 1, 3 or 9 weeks of age (Fig. 2). In female

offspring, no statistically significant differences were observed in body weight, although the mean value for the 40 mg/kg/day dose group was slightly decreased at 9 weeks of age. There were no statistically significant effects on liver, kidney or testes (male) weights caused by BPA exposure at 4 or 40 mg/kg/day at 9 weeks of age (Table 2). Both in male and female offsprings, AGD were not significantly affected by BPA at 1, 3 or 9 weeks of age (Fig. 3). No treatment-related change was observed in AGD/BW or AGD/BW^{1/3} ratios in male and female offspring at 1, 3 or 9 weeks of age (Figs. 4 and 5).

The fact that 4 dams out of 6 in the 400 mg/kg/day group died during the gestation period indicated that very high level exposure to BPA cause severe toxicity in pregnant rats.

Table 2. Liver, kidney and testes weights of offspring at 9 weeks of age

Organ	Sex	Dose of BPA (mg/kg/day)		
		0	4	40
Liver (g)	Male	17.52 ± 1.01	17.02 ± 0.70	17.10 ± 0.49
	Female	10.79 ± 0.71	10.41 ± 0.33	9.44 ± 0.64
Kidneys (g)	Male	3.22 ± 0.16	3.40 ± 0.20	3.28 ± 0.17
	Female	2.02 ± 0.16	2.12 ± 0.13	1.96 ± 0.13
Testes (g)	Male	2.78 ± 0.08	2.82 ± 0.18	2.90 ± 0.12

Values are the mean ± SEM. There were no significant differences for any groups.

Such maternal toxicity (reduction in maternal weight gain during gestation) was previously reported in rats exposed to BPA by gastric intubation at 160, 320 and 640 mg/kg/day¹³. They observed no dose-related maternal mortality in 160, 320 or 640 mg/kg/day groups, although they found a high mortality rate in the 1280 mg/kg/day group. The difference in the toxic effect of BPA observed in the two studies could be attributable to the difference in the purity of BPA (>95% vs. >99.8%). The duration of administration (GD 6–15 vs. GD 6–PND 20) and the preparation of the BPA (suspension in corn oil vs. solution in corn oil) also could be the causes of the discrepancy.

Testosterone from fetal testis develops Wolffian ducts and external genitalia with age, and AGD in males then exhibits a marked increase compared to that in females. AGD has therefore been used as a common index of reproductive and developmental toxicity, sensitively reflecting the status of the genital system and function in rodents. Vandenberg *et al.* used the AGD/BW × 100 value as an adjusted AGD index for BW or body size¹⁴. Gallavan *et al.* proposed to use the ratio of AGD to the cube root of BW as a better measure to evaluate the AGD, because body weight increases in a three dimensional manner whereas AGD increases in a linear manner¹⁵. Although we evaluated AGD including both of the adjusted measures, no differences were detected among treatment groups in any of the AGD indices (Fig. 3, 4, 5).

It was also demonstrated that low-dose BPA increased AGD after birth in CD-1 mice¹⁶ and ICR mice¹⁷. The discrepancy between their studies and ours could be due to differences in the route and doses of chemicals, and animal species.

Cagen *et al.*¹⁰ reported a study to confirm the effects of BPA in CF-1 mice, trying to replicate the experiments by Nagel *et al.*⁷ and vom Saal *et al.*⁹. They carried out animal experiments under the almost same design with a larger number of groups, each consisting of a larger number of dams, with a wider range of doses (0.2–200 µg/kg/day) from

GD 11 through GD 17. As a result, they found no effect of maternal exposure to BPA on F₁ mouse offspring, and concluded that BPA is not a selective toxic substance under their conditions. Evaluations of BPA effects at low doses have been performed in a multigeneration reproductive toxicity study. Tyl *et al.* examined the effects of exposure to BPA at dietary concentrations of 0, 0.015, 0.3, 4.5, 75, 750 and 7500 ppm (equivalent to 0, 0.001, 0.02, 0.3, 5, 50 and 500 mg/kg/day, respectively) on reproduction and development for three generations in rats. They concluded that there were no treatment-related low-dose effects and no evidence of a non-monotonic dose response on any adult or offspring parameters (including AGD) at concentrations of 0.015, 0.3, 4.5 and 75 ppm¹⁸. Ema *et al.* also reported negative results on the low-dose effects of BPA in a two-generation reproduction study. Rats were given BPA at 0.2, 2, 20 or 200 µg/kg/day by gastric intubation throughout the study beginning at the onset of a 10- and 2-week pre-mating period, in F₀ males and females, respectively, and continuing through the mating, gestation, and lactation periods, for two generations. They observed no compound-related changes in clinical growth and signs, main organ weights including liver, kidney, testes or AGD/BW¹³ under their conditions¹⁹. Furthermore, Kwon *et al.*¹² showed that high-dose exposure at 320 mg/kg/day from GD 11 through PND 20 resulted in no apparent change in male and female pubertal development and reproductive function in SD rats.

Our results were closely accordant with the findings of Kwon *et al.* The BW, liver weight, kidney weight, testes weight, AGD and AGD indices in BPA-exposed rats were not obviously changed by relatively larger amount of BPA exposure. The present study failed to find obvious effects on the somatic growth and reproductive development of the offspring due to maternal exposure to BPA at 4–40 mg/kg/day from GD 6 through PND 20, although the number of parameters used for evaluation in our experiment was smaller than those in other papers^{9–12}. Some other indices are also

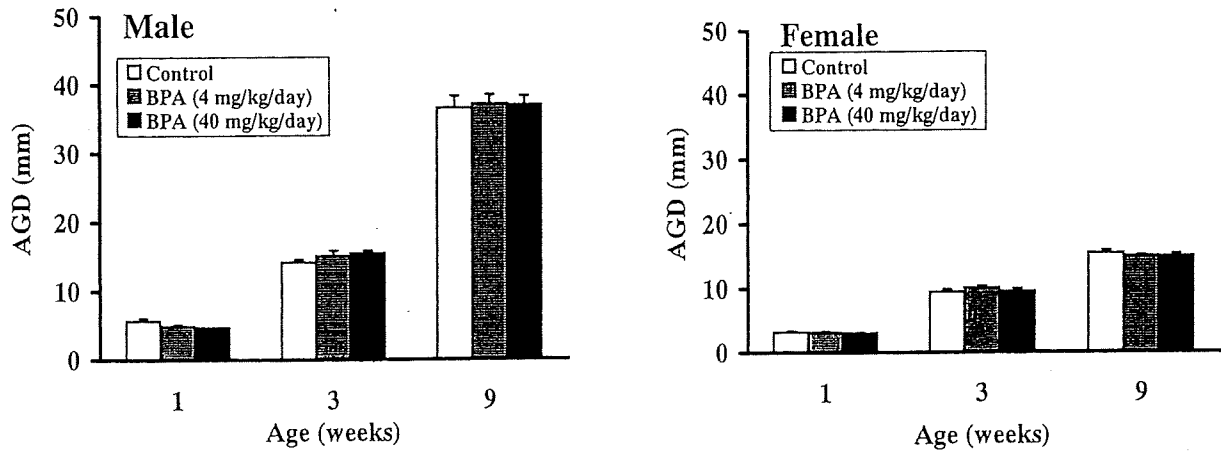


Fig. 3. Effects of maternal exposure to BPA on postnatal anogenital distance (AGD) of F₁ offspring at 1, 3 and 9 weeks of age. Each column and vertical bar represent the mean and SEM, respectively. There were no significant differences among groups.

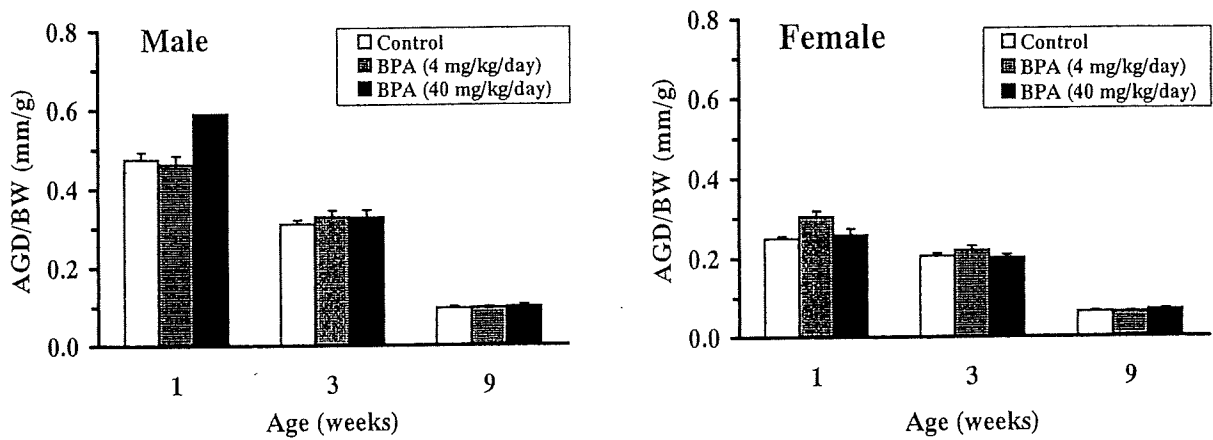


Fig. 4. Effects of maternal exposure to BPA on postnatal anogenital distance/body weight (AGD/BW) of F₁ offspring at 1, 3 and 9 weeks of age. Each column and vertical bar represent the mean and SEM, respectively. There were no significant differences among groups.

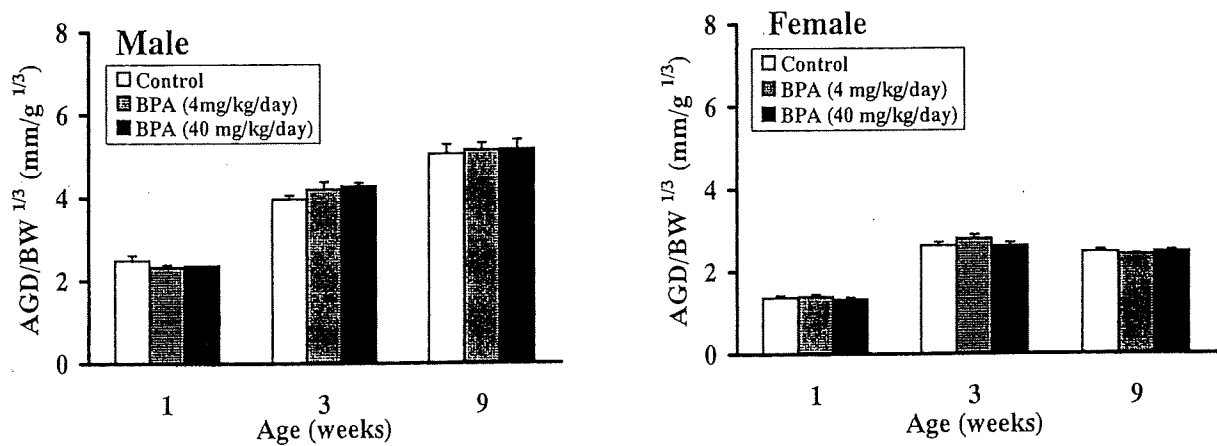


Fig. 5. Effects of maternal exposure to BPA on postnatal anogenital distance/cube root of body weight (AGD/BW^{1/3}) of F₁ offspring at 1, 3 and 9 weeks of age. Each column and vertical bar represent the mean and SEM, respectively. There were no significant differences among groups.

available to detect altered reproductive functions. In our previous papers, changes in the estrous cycle and ovulation have been shown to indicate disorders in the reproductive functions of female rats²⁰⁻²². More extensive or detailed examination may result in finding some effects of perinatal exposure to BPA.

In conclusion, the results obtained in the present experiment suggest that prenatal and postnatal exposure to BPA does not affect the somatic growth and AGD of F₁ generation either in males or females. The effects of BPA exposure are, however, still incompletely understood and further work should be done to confirm the reproductive and/or developmental toxicity of BPA in rats.

Acknowledgments

We thank Mr. T. Murase for his helpful assistance and valuable advice. This study was conducted as a part of the contract research with the Ministry of Health, Labour and Welfare, which was supported by funds from the Ministry of the Environment.

References

- 1) Brotons JA, Olea-Serrano MF, Villalobos M, Pedraza V, Olea N (1995) Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ Health Perspect* **103**, 608-12.
- 2) Olea N, Pulgar R, Perez P, Olea-Serrano F, Rivas A, Novillo-Fertrell A, Pedraza V, Soto AM, Sonnenschein C (1996) Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect* **104**, 298-305.
- 3) Krishnan AV, Stathis P, Permuth SF, Tokes L, Feldman D (1993) Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* **132**, 2279-86.
- 4) Steinmetz R, Brown NG, Allen DL, Bigsby RM, Ben-Jonathan N (1997) The environmental estrogen bisphenol A stimulates prolactin release *in vitro* and *in vivo*. *Endocrinology* **138**, 1780-6.
- 5) Chun TY, Gorski J (2000) High concentrations of bisphenol A induce cell growth and prolactin secretion in an estrogen-responsive pituitary tumor cell line. *Toxicol Appl Pharmacol* **162**, 161-5.
- 6) Goloubkova T, Ribeiro MF, Rodrigues LP, Cecconello AL, Spritzer PM (2000) Effects of xenoestrogen bisphenol A on uterine and pituitary weight, serum prolactin levels and immunoreactive prolactin cells in ovariectomized Wistar rats. *Arch Toxicol* **74**, 92-8.
- 7) Nagel SC, vom Saal FS, Thayer KA, Dhar MG, Boechler M, Welshons WV (1997) Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative *in vivo* bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environ Health Perspect* **105**, 70-6.
- 8) vom Saal FS, Cooke PS, Buchanan DL, Palanza P, Thayer KA, Nagel SC, Parmigiani S, Welshons WV (1998) A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol Ind Health* **14** (1/2), 239-60.
- 9) Ashby J, Tinwell H, Haseman J (1999) Lack of effects for low dose levels of bisphenol A and diethylstilbestrol on the prostate gland of CF1 mice exposed *in utero*. *Regul Toxicol Pharmacol* **30**, 156-66.
- 10) Cagen SZ, Waechter JM Jr, Dimond SS, Breslin WJ, Butala JH, Jekat FW, Joiner RL, Shiotsuka RN, Veenstra GE, Harris LR (1999) Normal reproductive organ development in CF-1 mice following prenatal exposure to bisphenol A. *Toxicol Sci* **50**, 36-44.
- 11) Cagen SZ, Waechter JM Jr, Dimond SS, Breslin WJ, Butala JH, Jekat FW, Joiner RL, Shiotsuka RN, Veenstra GE, Harris LR (1999) Normal reproductive organ development in Wistar rats exposed to bisphenol A in the drinking water. *Regul Toxicol Pharmacol* **30**, 130-9.
- 12) Kwon S, Stedman DB, Elswick RC, Cattey RC, Welsch F (2000) Pubertal development and reproductive functions of Crl: CD BR Sprague-Dawley rats exposed to bisphenol A during prenatal and postnatal development. *Toxicol Sci* **55**, 399-406.
- 13) Morrissey RE, George JD, Price CJ, Tyl RW, Marr MC, Kimmel CA (1987) The developmental toxicity of bisphenol A in rats and mice. *Fundam Appl Toxicol* **8**, 571-82.
- 14) Vandenberg JG, Huggett CL (1995) The anogenital distance index, a predictor of the intrauterine position effects on reproduction in female house mice. *Lab Anim Sci* **45**, 567-73.
- 15) Gallavan RH Jr, Holson JF, Stump DG, Knapp JF, Reynolds VL (1999) Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. *Reprod Toxicol* **13**, 383-90.
- 16) Gupta C (2000) Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals. *Proc Soc Exp Biol Med* **224**, 61-8.

- 17) Honma S, Suzuki A, Buchanan DL, Katsu Y, Watanabe H, Iguchi T (2002) Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. *Reprod Toxicol* **16**, 117–22.
- 18) Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Thomas BF, Keimowitz AR, Brine DR, Veselica MM, Fail PA, Chang TY, Seely JC, Joiner RL, Butala JH, Dimond SS, Cagen SZ, Shiotsuka RN, Stropp GD, Waechter JM (2002) Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci* **68**, 121–46.
- 19) Ema M, Fujii S, Fukuhara M, Kiguchi M, Ikka T, Harazono A (2001) Rat two-generation responsive toxicity study of bisphenol A. *Reprod Toxicol* **15**, 505–23.
- 20) Sekiguchi S, Honma T (1998) Influence of 2-bromopropane on ovulation in mice. *Ind Health* **36**, 297–9.
- 21) Sekiguchi S, Asano G, Suda M, Honma T (2001) Influence of 2-bromopropane on reproductive system—Short-term administration of 2-bromopropane inhibits ovulation in F344 rats. *Toxicol Ind Health* **16**, 277–83.
- 22) Sekiguchi S, Suda M, Zhai Y-L, Honma T (2002) Effects of 1-bromopropane, 2-bromopropane, and 1,2-dichloropropane on the estrous cycle and ovulation in F344 rats. *Toxicol Lett* **126**, 41–9.

**ARCHIVES OF COMPLEX ENVIRONMENTAL
STUDIES®**

Volume 14 Number 3-4 2002

SYNERGIC EFFECTS OF EXPOSURE TO CHLORINATED ORGANIC COMPOUNDS ON RAT HEPATOTOXICITY

Honma T, Suda M, Miyagawa M

Department of Health Effects Research, National Institute of Industrial Health, Kawasaki, Kanagawa 214-8585, Japan

Abstract

We investigated changes in the liver and in markers of tissue injury in rats exposed to chloroform and carbon tetrachloride. Changes in plasma lipoproteins were very sensitive compared with traditional hepatotoxicity markers such as GOT (ALT) and GPT (AST). Plasma lipoproteins seemed to be useful biomarkers of hepatotoxicity induced by chlorinated organic chemicals. We estimated liver damage according to liver weight, lipid accumulation and lipid peroxide levels in rats that had inhaled both chemicals simultaneously for six hours. Increases in GOT, GPT, and LDH activity and decreases in plasma lipoproteins were measured as hepatotoxicity markers. Liver damage and changes in markers were significantly more serious than after exposure to either chemical alone. We found that simple criteria can discriminate synergistic from additive effects of inhalation exposure. (*Archives of Complex Environmental Studies* 14(3-4) 2002)

Key words: Carbon tetrachloride - Chloroform - Combined exposure - Hepatotoxicity - Synergism - Rats.

Introduction

Chlorinated organic compounds such as carbon tetrachloride, chloroform, trichloroethylene, tetrachloroethylene and 1,1,1-trichloroethane frequently cause environmental pollution. Since such pollutants are often present as mixtures, the hazards associated with them should be determined. Test chemicals have often been

administered to animals through the oral route and as intraperitoneal injections. However, to obtain hazard data from inhalation exposure to mixed gases is particularly important because the toxicity of chlorinated organic compounds differs between injection and inhalation. We developed a method with which to evaluate the hazards of mixed air pollutants. Our results showed that plasma lipoproteins are useful biomarkers of hepatotoxicity caused by a combination of chlorinated organic chemicals.

We propose simple criteria with which to discriminate toxic synergism from additiveness. Threshold limit values (TLVs) are set for workplaces where various industrial chemicals are inhaled. If synergism exists in such situations, the TLVs might need to be reconsidered. Simple criteria will benefit the identification of toxic synergism due to combined exposure to industrial chemicals in the workplace.

Material and methods

Animals

Male Fischer 344 rats, 14 weeks old (Japan Charles River), were acclimatized and grouped with no differences in mean body weight. Groups of animals were housed in cages made with stainless steel wire net and provided with ready access to food (CE-2, Nihon Clea, Japan) and water under a 12:12 hr light:dark cycle with lights being turned on at 8:00 a.m. before testing. The room was maintained at 23±1°C and at 55±5% relative humidity. The rats were all aged within 2 days of each other. This investigation was performed in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki, and followed the guidelines approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the National Institute of Industrial Health.

Inhalation exposure

Rats inhaled chloroform and carbon tetrachloride in stainless steel chambers (Sibata, Inc., Tokyo) as described (Tsuga and Honma 2000; Sekiguchi et al. 2002) for 6 h between 0:00 and 6:00 p.m. then were

starved from 10:00 p.m. until sacrifice. However, tap water was allowed ad libitum. Control rats were exposed to clean air. At 10:00 a.m. on the next day (19 h after the midpoint of exposure), the rats were exsanguinated via the abdominal vein under light anesthesia with diethylether, and the liver was removed. The exposure concentration was monitored by gas chromatography (Shimadzu GC-7A, Japan) and maintained at the target value $\pm 5\%$ throughout the study.

Biochemical Analysis

Blood plasma containing 1 mg of EDTA/ml was separated by centrifugation. Lipids in the plasma and liver were analyzed by enzymatic procedures, as soon after collection as possible. Plasma GOT (AST), GPT (ALT), and LDH activity were determined using Monotest GOT®, Monotest GPT® and Monotest LDH® Kits (Boehringer Mannheim), respectively. Triglyceride was measured using Determiner TG-S555® (Kyowa Medex, Japan) kits. Liver malondialdehyde (MDA) was confirmed as an indicator of lipid peroxide formation using the colorimetric assay developed by Yagi (1976). Lipoproteins were prepared and measured as described (Honma 1990).

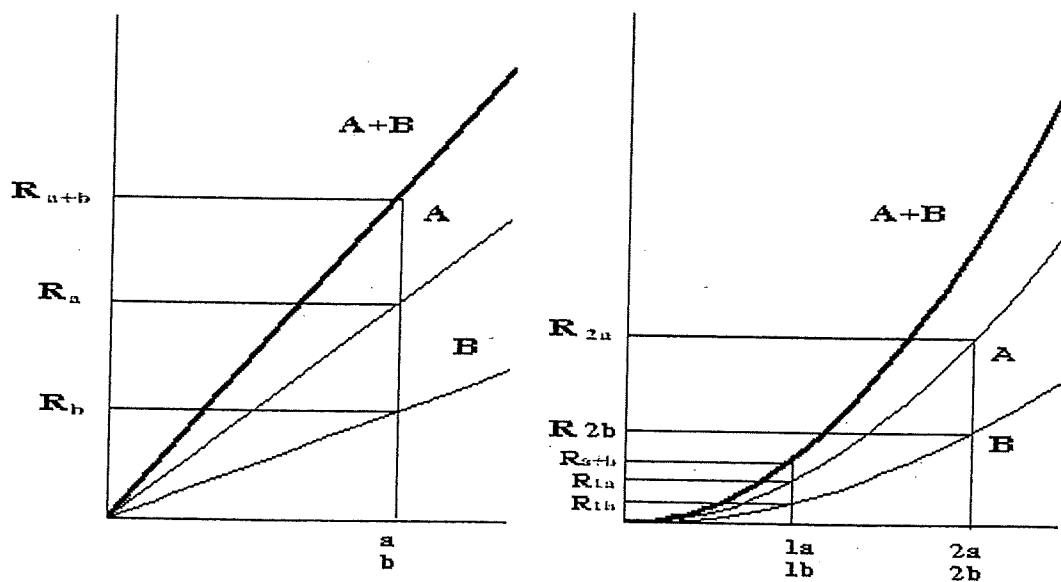


Fig. 1. a (right) and b (left). Schematic model of dose-response curves. Marker values increase according to exposure concentration and dose-responses (R) are linear (1a) or non-linear (1b).

Statistical Analysis

Differences among three or four groups were analyzed by the analysis of variance (F-test). Dunnett's multiple t-test also compared controls and groups exposed to solvents. A p-value of <0.05 indicates significance.

Results and Discussion

Exposure to chlorinated organic solvents such as carbon tetrachloride or chloroform induces liver damage. Blood markers such as GOT, GPT, and LDH increase due to chemical hepatotoxicity according to the dose and duration of exposure. Factory workers can be exposed to various types of chemicals. Exposure limit values such as TLVs have been determined for individual chemicals and toxicity additiveness has been assumed for combined exposure. However, exposure limit values should be lowered when potent synergism is likely and the degree of toxicity of combinations of chemicals must be estimated. A combination of carbon tetrachloride and chloroform produces synergistic hepatotoxicity (Steup et al 1991). Simple synergism can be identified when the amount of toxicity caused by exposure to a combination of substances (A) and (B) is more potent than the predicted values of additive toxicity. When the dose-effect relationships for substances (A) and (B) are linear (Fig 1a), the predicted values of toxicity markers in the additive situation are calculated as effect of (dose a) + effect of (dose b). Toxicity is synergistic when effect of (dose a + dose b) is larger than the sum of effect (dose a) + effect (dose b). In actual fact, dose-effect relationships are often non-linear (Fig 1b). Under these conditions, the effects of many doses must be measured to determine precise dose-effect relationships.

Table 1. Effects of inhalation of carbon tetrachloride and chloroform alone or in combination on liver damage markers in rat plasma.

Dose	(ppm)	Mean	SE		% change from control
GOT					
Control		100.0	6.7		
CF 400		107.8	13.0	n.s.	+7.8
CTC 200		114.7	16.1	n.s.	+14.7
CF 400	+ CTC 200	628.1	56.5	p<0.05	+528.1
CF 800		352.1	29.9	p<0.05	+252.1
CTC 400		191.5	12.3	n.s.	+91.5
GPT					
Control		100.0	3.5		
CF 400		140.1	15.6	n.s.	+40.1
CTC 200		113.8	5.8	n.s.	+13.8
CF 400	+ CTC 200	1388.0	116.2	p<0.05	+1288.0
CF 800		637.1	76.3	p<0.05	+537.1
CTC 400		352.7	28.5	p<0.05	+252.7
LDH					
Control		100.0	11.3		
CF 400		107.1	18.6	n.s.	+7.1
CTC 200		116.3	23.3	n.s.	+16.3
CF 400	+ CTC 200	251.2	18.3	p<0.05	+151.2
CF 800		218.6	8.2	p<0.05	+118.6
CTC 400		175.2	18.1	p<0.05	+75.2

Synergism can be roughly identified when animal toxicity is induced by many injected doses. However, to obtain a variety of exposure concentrations is difficult in inhalation studies. Thus, doses 2a and 2b can be selected. When the effect (dose a + dose b) is larger than each of effect (dose 2a) and effect (dose 2b), the effect (dose a + dose b) can be considered synergistic (Fig 1b). Assuming that substance (A) is equipotent to substance (B), the additive effect (dose a + dose b) should be equal to effect (dose 2a) or effect (dose 2b). Therefore, synergism can be identified when effect (dose a + dose b) is larger than both of effect (dose 2a) and effect (dose 2b).

Plasma levels of GOT, GPT and LDH from rats that were exposed to carbon tetrachloride together with chloroform are shown in Table 1. The increases in values of all of these markers at carbon tetrachloride 200 ppm + chloroform 400 ppm were greater than those at carbon tetrachloride 400 ppm and those at chloroform 800 ppm. These results indicated that hepatotoxicity caused by co-exposure to carbon tetrachloride and chloroform is synergistic. We investigated the effects in the liver by weighing the liver and by measuring liver triglyceride,

and MDA levels. Carbon tetrachloride at 200 ppm plus chloroform at 400 ppm caused more obvious changes in these parameters than both of carbon tetrachloride at 400 ppm or chloroform at 800 ppm alone (Table 2). These results mean that the combination of these chemicals exerted synergistic toxic effects on the liver.

Chlorinated organic solvents cause more sensitive changes in plasma lipoproteins than in traditional hepatotoxicity markers such as GOT and GPT (Honma, 1990; Honma et al., 1997). Lipoprotein fractions such as VLDL are lowered by carbon tetrachloride and other chlorinated organic solvents.

Table 2. Changes in rat liver after inhalation of carbon tetrachloride and chloroform alone or in combination.

Dose	(ppm)	Mean	SE		% change from control
VLDL					
Control		100.0	9.0		
CF 400		94.5	5.2	n.s.	-5.5
CTC 200		31.9	6.1	p<0.05	-68.1
CF 400	+ CTC 200	14.2	1.1	p<0.05	-85.8
CF 800		46.7	3.4	p<0.05	-53.3
CTC 400		21.1	2.6	p<0.05	-78.9
HDL					
Control		100.0	11.0		
CF 400		88.4	3.4	n.s.	-11.6
CTC 200		39.1	8.3	p<0.05	-60.9
CF 400	+ CTC 200	16.0	0.4	p<0.05	-84.0
CF 800		40.3	3.1	p<0.05	-39.7
CTC 400		29.8	5.7	p<0.05	-70.2

To identify synergism is difficult under these circumstances because the maximal reduction of marker value is limited to 100% of the control value (Fig 2a). However, a synergistic effect can be identified under these conditions when the decrease in marker levels at (dose a + dose b) is greater than the decreases in marker levels at (dose 2a) and those at (dose 2b) (Fig 2b). We also found that plasma VLDL and HDL values were lowered by carbon tetrachloride together with chloroform. The decreases in VLDL and HDL values at carbon tetrachloride 200 ppm + chloroform 400 ppm were greater than those in lipoproteins caused by 400 ppm carbon tetrachloride and 800 ppm chloroform, respectively (Table 3). The synergistic effect of exposure to carbon tetrachloride with chloroform was confirmed by the decreases in lipoprotein levels. In

conclusion, we found simple criteria to discriminate synergistic from additive effects of inhalation exposure. The synergistic hepatotoxicity of carbon tetrachloride and chloroform in rats was easily identified by inhalation exposure experiments using changes in VLDL and HDL values as sensitive markers.

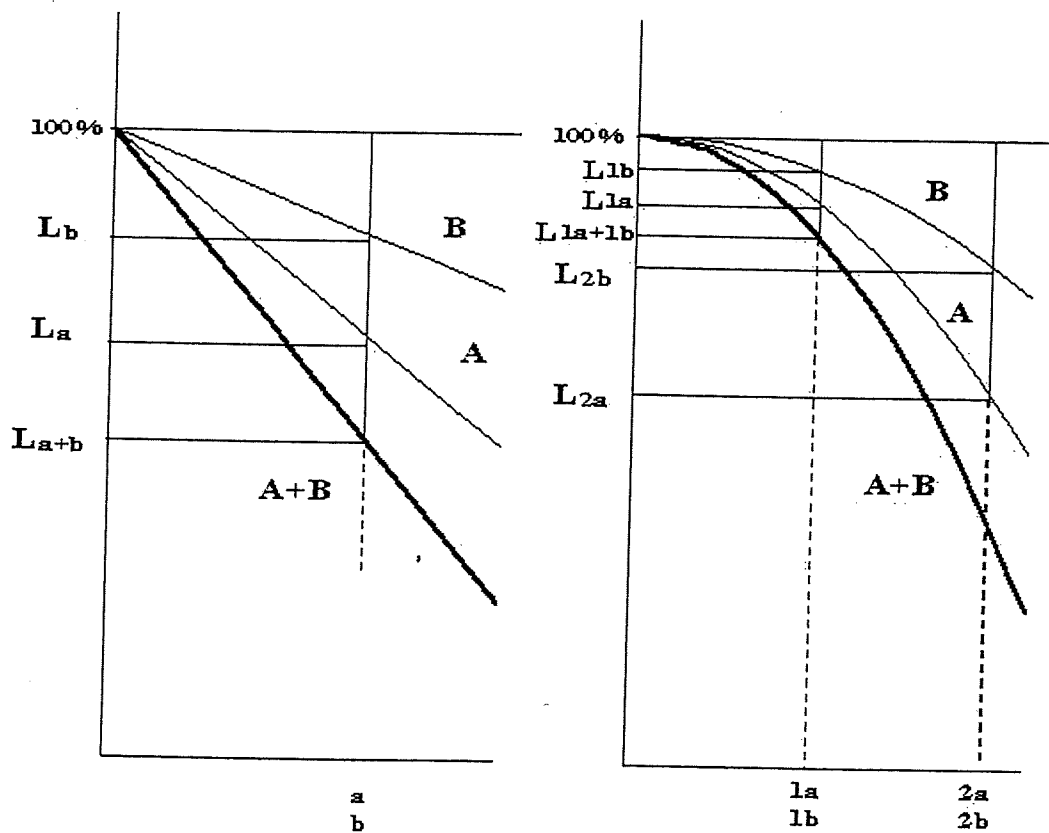


Fig. 2. a (right) and b (left). Schematic model of dose-response curves. Marker values decrease according to exposure concentration and dose-responses are linear (2a) or non-linear (2b).

Table 3. Effects of inhalation of carbon tetrachloride and chloroform alone or in combination on lipoproteins in rat plasma.

Dose	(ppm)	Mean	SE		% change from control
Liver-to-body weight ratio					
Control		100.0	0.4		
CF 400		113.1	0.4	p<0.05	+13.1
CTC 200		112.6	1.9	p<0.05	+12.6
CF 400	+ CTC 200	128.2	1.4	p<0.05	+28.2
CF 800		118.0	0.9	p<0.05	+18.0
CTC 400		120.1	1.9	p<0.05	+20.1
Triglyceride					
Control		100.0	6.1		
CF 400		107.4	10.1	n.s.	+7.4
CTC 200		118.8	10.4	n.s.	+18.8
CF 400	+ CTC 200	142.1	6.5	p<0.05	+42.1
CF 800		119.4	6.4	n.s.	+19.4
CTC 400		122.6	11.6	n.s.	+22.6
MDA					
Control		100.0	4.2		
CF 400		136.8	7.2	n.s.	+36.8
CTC 200		142.4	5.9	n.s.	+42.4
CF 400	+ CTC 200	184.5	15.4	p<0.05	+84.5
CF 800		152.3	20.3	p<0.05	+52.3
CTC 400		183.1	8.0	p<0.05	+83.1

References

- Honma T. Effects of trichloroethylene, 1,1,1-trichloroethane, and carbon tetrachloride on plasma lipoproteins of rats. *Ind Health* 28: 159-174, 1990
- Honma T, Suda M. Changes in plasma lipoproteins as toxicity markers for carbon tetrachloride, chloroform, and dichloromethane. *Ind. Health* 35: 519-531, 1997
- Sekiguchi S, Suda M, Zhai Y-L, Honma T. Effects of 1-bromopropane, 2-bromopropane, and 1,2-dichloropropane on the estrous cycle and ovulation in F344 rats. *Toxicol Lett* 126: 41-49, 2002
- Steup DR., Wiersma D, McMillan DA, Sipes IG. Pretreatment with drinking water solutions containing trichloroethylene or chloroform enhances the hepatotoxicity of carbon tetrachloride in Fischer 344 rats. *Fundam Appl Toxicol* 16: 798-809, 1991
- Tsuga H, Honma T. Effects of short-term toluene exposure on ligand binding to muscarinic acetylcholine receptors in the rat

frontal cortex and hippocampus. *Neurotoxicol Teratol.* 22:
603-606, 2000

- Yagi K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.* 15: 212-216, 1976

化学品の有害性分類表示に関する 国際調和システム

独立行政法人産業医学総合研究所企画調整部

みや がわ むね ゆき
宮 川 宗 之

〈安全工学 第41巻 第2号(2002)別刷〉



化学品の有害性分類表示に関する国際調和システム

みやがわむねゆき
宮川 宗之*

化学物質による健康障害や環境汚染の防止には、化学品の適切な管理・取扱とともに危険性・有害性情報の正確で効率的な記述・伝達が必要となる。そのためには国際的に統一された基準の使用が求められる。危険性・有害性の分類・表示のための国際調和システム（GHS）作成と世界規模での実施に向けた作業が国連、OECD等の国際機関および各国の協力により進展している。OECDが作成した有害性分類基準につき概要を紹介する。

キーワード：OECD，化学物質，国際調和システム（GHS），分類・表示，有害性

1. はじめに

化学物質による健康障害の予防や環境汚染の防止のためには、個々の化学物質のもつ危険性・有害性に応じて適切な取扱・管理を行うことが必要であり、そのためには危険性・有害性情報が必須である。このような情報の伝達のためには、化学物質の容器に適切なラベル表示が行われるとともに、添付される安全性データシート（MSDS—Material Safety Data Sheet—あるいはSDS—Safety Data Sheet—）では、当該物質の危険性・有害性が適切に記載されなければならない。経済の国際化によって多くの化学物質が世界中で移送・取引されていることを考えると、化学物質の適切な取扱・管理に必要な危険性・有害性の記述やラベル表示の基礎として、危険性・有害性に基づいて化学物質を分類するための国際的に統一された基準が求められることとなる。

このような観点から、1992年に開催された国連環境開発会議において、危険性・有害性の分類・表示のための国際調和システム（globally harmonized hazard classification and compatible labelling system：GHS）を作成することが行動計画に採択され、国際的な統一基準の作成作業が国際機関・関係各国の協力により進行してきた。有害性に基づく化学物質の調和分類基準はOECD（経済協力開発機構）に設置された諮問会議が担当して作成作業が行われてきた。筆者は1997年以降この会議に参加するとともに審議の動向を報告¹⁻⁴⁾してきたが、予定の作業がほぼ終了し2001

年に有害性に基づく化学物質の国際調和分類基準を示した文書⁵⁾が「Harmonized Integrated Hazard Classification System for Chemical Substances and Mixtures」というタイトルでOECDから公表・出版された。OECDのホームページ（<http://www1.oecd.org/ehs/test/harmonisedintegrated.pdf>）からも入手可能である。このOECDによって作成された有害性分類基準は、他の国際機関において審議が行われてきたラベル・MSDSの表示・記載方法や物理的危険性に基づく分類基準とともに、化学物質の危険性・有害性の分類・表示のための国際調和システム（GHS）としてまとめられ、国連の枠組みによって世界規模で実施されるべく計画が進行している。このGHSを取りまとめる作業は、WHOやILO等の国際機関が協力・調整して作業を進めるための組織（IOMC—Inter Organisational Programme for the Sound Management of Chemicals）の委員会によって行われており、取りまとめ作業の状況・結果はILO/IOMCのホームページ（<http://www.ilo.org/public/english/protection/safework/ghs/ghsfinal/index.htm>）からGHS案文書⁶⁾として入手可能である。GHSは国連危険物輸送およびGHS委員会・GHS小委員会によって実施されることとなっており、最終的には2003年に国連から正式に公表される予定のようであるが、国連加盟国が参加して開催されるIFCS（Intergovernmental Forum on Chemical Safety）会議では、2008年までに世界規模でGHSを機能させることを目指して準備を進めるとの方針が決議されており、国内でも早急に準備が必要と思われる。以下、本稿ではOECDから公表された有害性に基づく化学物質分類のための国際調和基準について解

* 独立行政法人産業医学総合研究所企画調整部：
〒214-8585 神奈川県川崎市多摩区長尾 6-21-1

説する。

2. 有害性に基づく化学物質の国際調和分類基準

2.1 分類基準の作成作業

OECDの化学品分類・表示の調和に関する諮問会議では、各エンドポイントについて各国で採用されている現行分類システムを調べて文書(Detailed Review Document)としてまとめることから作業を開始し、つぎに国際調和分類基準案を作成するという手続きが採用されている。純粋に科学的な観点から合理的な基準を設定することは難しく、米国とEUの基準が比較検討された上で、両者の妥協点を探ることで最終案にたどり着いたようなものもあり、議論経過を抜きにしては理解しがたい部分もある。

OECDから公表された上述の文書「Harmonized Integrated Hazard Classification System for Chemical Substances and Mixtures」⁹⁾では、part 1で国際調和分類基準作成の経緯や急性毒性、皮膚刺激性等の各エンドポイント(有害性)に共通する基本的考え方が概説されており、part 2では各エンドポイントの定義、当該有害作用ありと分類するための基準が示されて、part 3では単品の化学物質ではなく混合物を対象とする場合の基準が、part 2と同様に各エンドポイントごとに記載されている。エンドポイントとしては、現在のところ急性毒性(acute toxicity)、皮膚刺激/腐食性(skin irritation/corrosion)、眼刺激/腐食性(eye irritation/corrosion)、皮膚・呼吸器感受性(respiratory or skin sensitisation)、変異原性(mutations in germ cells)、癌原性(cancer)、生殖毒性(reproductive toxicity)、単回曝露による標的臓器・全身毒性(target organ oriented systemic toxicity following single exposure)、反復曝露による標的臓器・全身毒性(target organ oriented systemic toxicity following repeated exposure)、水生環境毒性(hazardous for the aquatic environment)の10種類となっている。

2.2 分類に際しての一般原則

分類は、工業用原材料から生活用品等まで種々の化学品(単品および混合物)を対象としている。また、分類基準は、各物質に固有の生体に対する有害性・毒性(ハザード)に基づいたものとなっており、曝露の可能性等を考慮したリスク(健康障害の生起の可能性・確率)に基づいたものとはなっていない。分類にあたっては、ヒトにおけるデータ(疫学研究等)や種々の動物実験の結果を総合的に判断することとなる。有害作用の強度によって下位の分類カテゴリー分けが行われる場合もあれば、当該有害作用有と判断す

る根拠の確からしさの程度に応じて下位カテゴリーへの分類が行われる場合も含まれている。例えば急性毒性では致死作用の強度(LD₅₀値等)によって下位分類が行われるが、癌原性ではヒトに対して癌原性ありと判断する根拠の確からしさに応じて下位分類が行われることとなる。多くのエンドポイントにおいて、下位カテゴリーへの分類基準が設けられているが、分類・表示がどのような場面で使用されるかといった状況を考慮して、分類にあたっては各国・規制当局が下位カテゴリーを使用したり省略したりするという方法(ブロック積み法)が許容されており、必要に応じて適切なサブカテゴリーの選択使用が可能となる。分類に使用される試験データについては、国際的に受容される基準(テストガイドラインやGLP)を満たすことが要求されるが、すでに試験データがある場合には、実験の重複や実験動物の不必要な使用をさけるために、これを適切に利用することとされている。また、実験動物を使用しない代替試験が可能であればより望ましいものと考えられている。

動物実験、疫学研究、症例報告等、毒性評価に使用可能なすべての情報を勘案して総合的評価を行うweight of evidence判定に際しては、ヒトを用いた質の高い研究データがある場合は、他のデータに優先させるべきものとされている。適切に行われた動物実験で陽性の結果が得られた場合は、ヒトでのデータがないからといって否定的に扱う必要はないが、曝露経路、作用メカニズム、代謝等についての情報により、動物実験等の結果からヒトで当該作用ありと判定することに疑問が生じた場合は、より低毒性クラスへの分類が許されるし、また作用メカニズムから明らかにヒトへの当てはめが適切でないと考えられる場合は、当該作用ありとの分類は行わないこととされている。実際の分類作業においては、メカニズムを考慮した分類除外判定等、困難な状況も予想されよう。以下、各エンドポイントごとに分類基準の概要を解説する。一部では分類基準等をまとめた表を引用・呈示してある。

2.3 急性毒性(acute toxicity)

ここでの急性毒性は致死的作用を意味する。通常、致死作用の強さは半数致死量・濃度(LD₅₀・LC₅₀)によって表されるが、急性毒性に基づく分類は表1に示した半数致死量・濃度を基準に行うこととなっている。最も毒性の強いcategory 1から最も毒性の低いcategory 5まで5段階のカテゴリーが設けられている。経口投与におけるcategory 3の基準値が日本の「劇物」の基準と同じ値となっている。また、経口投与、経皮投与、吸入曝露(gas, vapor, dust/mist)といった投与・曝露経路あるいは物質の性状別に基準

表1 急性毒性カテゴリー分類基準 LD₅₀/LC₅₀ (近似) 値

	Category 1	Category 2	Category 3	Category 4	Category 5
Oral (mg/kg)	5	50	300	2 000	5 000 See detailed criteria
Dermal (mg/kg)	50	200	1 000	2 000	
Gases (ppm) see: Note a	100	500	2 500	5 000	
Vapours (mg/l) see: Note a Note b Note c	0.5	2.0	10	20	
Dusts and Mists (mg/l) see: Note a Note d	0.05	0.5	1.0	5	

Notes:

- a: Inhalation cut-off values in the table are based on 4 hour testing exposures. Conversion of existing inhalation toxicity data which has been generated according to 1 hour exposures should be by dividing by a factor of 2 for gases and vapours and 4 for dusts and mists.
- b: It is recognised that saturated vapour concentration may be used as an additional element by some regulatory systems to provide for specific health and safety protection. (e.g. UN Recommendations for the Transport of Dangerous Goods).
- c: For some chemicals the test atmosphere will not just be a vapour but will consist of a mixture of liquid and vapour phases. For other chemicals the test atmosphere may consist of a vapour which is near the gaseous phase. In these latter cases, classification should be based on ppm as follows: Category 1 (100 ppm), Category 2 (500 ppm), Category 3 (2 500 ppm), Category 4 (5 000 ppm). Work in the OECD Test Guidelines Programme should be undertaken to better define the terms "dusts", "mists" and "vapours" in relation to inhalation toxicity testing.
- d: The values for dusts and mists should be reviewed to adapt to any future changes to OECD Test Guidelines with respect to technical limitation in generating, maintaining and measuring dust and mist concentrations in respirable form.

値が定められている。もしも、投与・曝露経路によって該当するカテゴリーが異なるような場合には、最も毒性が強く出た経路の結果を適用しカテゴリー分類を行うこととなる。

ところで、半数致死量を求める生物試験は、従来多数の実験動物を使用して厳密に推定値を求める方法が取られてきた。OECDでは、有害性評価のための生物試験について標準的と考えられる方法をテストガイドラインとして定めており、LD₅₀の点推定法はOECDテストガイドライン(TG)401で定められている。しかし、多くの実験動物を必要とする手法は国際的に敬遠されつつあり、TG401は2002年中に削除される予定である。TG401の削除と入れ換えに、3種類の代替試験法テストガイドラインが改定・導入されるが、OECDのホームページ(<http://www1.oecd.org/ehs/test/health.htm>)から3種類のRevised Draft Guideline⁷⁻⁹⁾が入手可能である。新しいガイドラインでは少数の動物を用いてLD₅₀範囲推定等を行

うこととなるが、当該物質のLD₅₀推定値が調和分類のどのクラスに相当するかが求められるように工夫されている。

混合物の毒性分類基準はPart3にエンドポイントごとに記述されているが、はじめにすべてのエンドポイントに適用される「混合物分類に際しての基本的な考え方・一般原則」が示されている。混合物を分類するとは、種々の化学物質を成分として含む個々の「製品」について分類を行うことを意味し、すべての製品について毒性試験を行えば多数の実験動物を犠牲にし、膨大な費用・労力を費やすこととなる。したがって、混合物の分類を行う場合は、原則として成分として含まれている化学物質や同様の組成をもつ混合物についてのデータから推定を行うこととされている。その際の手続きとしては、1) 当該混合物自体についての(試験)データがある場合は、そのデータに基づき分類、2) 組成の類似した混合物についてのデータがある場合は「つなぎの原則(bridging principles)」と

して示された方法（無毒な成分による希釈や毒性が同等の成分が使用されている等では計算・予測が可能であり、このような場合の推定法の原則が示されている）により推定を行ない分類、3) 組成成分すべてについてデータがある場合には、これを用いて推定（計算）を行い分類、4) データのない成分がある場合は、それに対応した補正を考慮して分類、といった手順が定められている。

急性毒性に基づく混合物の分類も基本的に半数致死量に基づくもので、単品の化学物質と同じ基準値を当てはめて分類を行うこととなる。混合物急性毒性についての記述では、上述したように LD₅₀ に関するテストガイドラインの変更等を考慮して LD₅₀・LC₅₀ に相当する指標値として ATE (Acute Toxicity Estimate) という用語が使用されており、当該混合物の ATE 値によって分類を行う。混合物自体について ATE 値（点推定値あるいは範囲推定値）が得られている場合には、直接分類基準値を当てはめて分類を行う。成分物質の ATE 値から混合物の ATE 値を計算により推定する場合には、つぎの計算式を用いて算出し分類を行うよう規定されている。

$$\frac{100}{ATE_{mix}} = \sum_i \frac{C_i}{ATE_i}$$

C_i=成分 (i) の濃度 [%] ただし、通常 C_i≥1% のものを対象とする。

ATE_i=成分 (i) の ATE 値

ATE_{mix}=混合物の ATE 値

なお、極微量成分すべてについて毒性データを求めることは困難であり、原則として含有量が 1% 以上のものを含有成分と見なして計算を行うこととされている。一方、有害性が未知の成分がある程度以上存在する場合についてであるが、未知成分合計が全体の 10% 以下の場合には、未知成分については有害性がないものと見なして計算を行い、これが全体の 10% を超える場合には、有害性未知成分が既知成分部分と同様の毒性を有すると見なして計算する方法が示されている。

さらに、代替試験法（範囲推定法）導入の結果、成分の ATE 値としては点推定値がない場合が想定される。その場合は、成分物質の ATE 範囲推定（カテゴリー）から混合物の ATE を算出する必要が生じる。これに対応して、各カテゴリーごとに換算値 (Conversion Value) が当該カテゴリーを代表する値として定められており、各成分物質の該当するカテゴリーの「換算値」を当該成分の ATE 点推定値として使用し、上述の計算に当てはめて混合物の ATE 値を算出するといった複雑な方法が採用されている。換算値は

各分類カテゴリー範囲の中央付近の値ではなく下限値あるいはそれに近い値となっている。

2.4 皮膚に対する刺激性・腐食性 (dermal irritation/corrosion) および眼に対する刺激性・腐食性 (eye irritation/corrosion)

皮膚に対する刺激性・腐食性に関する分類は、急性毒性と同様に作用の強さを基準としている。本エンドポイントでは、part 1 に示されている一般原則に従って、1) 刺激性・腐食性に関する既存のデータ（ヒトおよび生物試験等）が存在するかどうか、2) 構造活性相関あるいは pH 値（2 以下や 11.5 以上が基準）といったデータから当該作用が予測されるかどうか、3) 適切な in vitro 試験の結果はどうなっているか、4) 生物試験の結果はどうか、といった手順を踏んで検討を行うこととされており、このための分類判定手順を示した図が記載されている。このような判定法の記載は、動物を用いた試験をなるべく少なくするとの意味が込められているものであるが、カテゴリー分類のための基準は、生物試験結果を判定するための基準値であって、腐食性・刺激性の有無、一定の作用を生じるまでの曝露時間等によってカテゴリー分類の判定を行うこととなっている。

皮膚腐食性を示す物質は表 2 に示した基準で category 1 (corrosive) に分類されるが、曝露による皮膚の壊死・潰瘍・出血等を生じるのに要した曝露時間や、皮膚の変化が観察されるまでに要する時間によって、1 A, 1 B, 1 C の subcategory 分けをすることも可能とされている。皮膚刺激性については、紅斑・浮腫など刺激作用によって生じる症状の程度等によって category 2 (irritant) と category 3 (mild irritant) に分類される。

眼の腐食性・刺激性については、基本的に皮膚と同様の考え方で、既存データから生物試験結果による分類まで判定のための手続きが図示されている。他の方法で判定できない場合にはウサギを用いた生物試験を行うこととなり、角膜の白濁や虹彩炎、結膜の炎症などの程度を表すスコアで分類を行うべく、基準が示されている。非可逆的な重度の眼障害を生ずる物質を eye irritant category 1 (irreversible effects on the eye) に分類し、作用が可逆的な場合には eye irritant category 2 (irritating to eyes) に分類することとなるが、後者はさらに 2 A と 2 B の subcategory に、主として症状回復に要する日数を基準（2 A への分類では 21 日以内、2 B への分類には 7 日以内に完全に回復）として下位の分類が可能となっている。

混合物の皮膚あるいは眼に対する刺激性・腐食性分類は part 3 でまとめて記述がなされており、急性毒