

Raimo Pohjanvirta ja Selma Mahiout

Kemikaalien riskinarviointi ja lainsäädäntö muutosten kourissa

Chemical risk assessment and legislation undergoing major changes

YHTEENVETO

Kemikaalien myrkyllisyyden ja ihmisille aiheuttamien terveysriskien tieteellinen arviointi on perinteisesti pohjautunut kokeisiin, joissa koe-eläimiä on altistettu suurille kemikaalipitoisuuksille. Menetelmistä, joita on käytetty eläinkokeiden tulosten ekstrapolaatioon ihmisten riskinarvioinnissa, on heikkouksia ja ne ovat muutosten alaisia. Samanaikaisesti on toksikologian keskeinen periaate, monotoniset annos-vastesuhteet kaikilla altistustasoilla, asetettu kyseenalaiseksi. EU:ssa on REACH-asetuksen toimeenpanon myötä alkamassa uusi aikakausi kuluttajien ja ympäristön suojelussa kemikaalien haittavaikutuksilta. REACH-asetus lisää osaltaan vaatimuksia kehittää eläinkokeille vaihtoehtoisia toksisuuden testausmenetelmiä. Muutaman viimeksi kuluneen vuoden aikana onkin otettu huomattavia edistysaskelia tässä suhteessa, erityisesti mikroelinmallien kohdalla, mutta nämä menetelmät vaativat vielä lisää validointia.

SUMMARY

Scientific evaluation of the toxicity of chemicals and the health risks they pose to humans has traditionally been based on data acquired from studies in laboratory animals exposed to high concentrations of chemical substances. The methods used to extrapolate the findings to human risk assessment have flaws and are at present facing major changes. Simultaneously, the fundamental principle in toxicology, monotonous dose-response relationships across all exposure levels, has been questioned. In the EU, a new era is dawning in the protection of consumers and the environment from the adverse impacts of chemicals with the implementation of the REACH regulation. One of its repercussions is an increasing demand to develop alternative methods to animal toxicity tests. During the last couple of years, substantial steps have indeed been taken to this end, especially in the form of miniature human organs-on-a-chip systems, but the novel methodology still requires further validation.

Emme voi välttää altistumasta päivittäin monille synteettisille ja luonnollisille kemikaaleille. Niitä on ruoassa, ilmassa, vaatteissa ja materiaaleissa, joita koskettelemme. Kemikaalien terveysvaikutukset ovat kiinnostuksen ja huolen aiheita.

Kemikaalien toksikologinen riskinarviointi pohjautuu vaaran tunnistamiseen ja annos-vastesuhteen sekä altistumisen arviointiin. Vaaran tunnistamisvaiheessa pyritään löytämään ja kuvaamaan aineen aiheuttamat terveyshaitat. Näiden riippuvuus altistusannoksesta (esimerkiksi mitkä vaikutuk-

sista ilmenevät jo pienillä, mitkä taas vasta hyvin suurilla annoksilla) ja yksilöiden väliset herkkyserot kuuluvat annos-vastesuhteen arviointiin. Kolmas keskeinen tuki pilari riskinarvioinnin analysointi- ja yhteenvetovaiheessa (riskin luonnehdinta), on mahdollisimman oikea käsitys ihmisten altistumistavoista, -tasoista ja -kestoista. Tieto kemikaalien aiheuttamista haittavaikutuksista on saatu pääasiassa koe-eläimillä tehdyistä toksisuustutkimuksista, joiden toteuttamisesta on laadittu useita ohjeistoja. Yksi käytetyimmistä on kansainvälinen OECD:n ohjeis-

YDINKOHDAT:

- Monet kemikaalien myrkyllisyyden riskinarvioinnin periaatteet ovat kokeneet tai käymässä läpi huomattavia muutoksia ja uudelleenarviointeja EU:ssa.
- Kemikaaleilta vaadittavat turvallisuustutkimusvaatimukset ja vastuu aineiden turvallisuudesta ovat muuttuneet REACH-asetuksen myötä.
- Uudet in vitro -menetelmät saattavat tulevaisuudessa vähentää eläinkokeiden merkitystä riskinarvioinnin perustana tai jopa syrjäyttää ne.

Artikkeli saatu toimitukseen 18.6.2014.

to. Keskeisimpiä tutkimuksia on taulukossa 1. Koe-eläinten käyttö vaaran tunnistamisessa perustuu oletukseen, että kemikaalit saavat aikaan kvalitatiivisesti samantyyppisiä vaikutuksia eri lajeilla, mutta herkkyys vaikutuksille voi vaihdella lajien välillä. Lähtökohtaisesti kemikaalien oletetaan noudattavan monotonista annos-vastesuhdetta, jossa altistumistasen noustessa haittavaikutusten ilmenevyys populaatiotasolla ja vakavuus yksilötasolla lisääntyvät. Jotta kokeiden kustannukset pysyisivät siedettävänä, eläimiä altistetaan tavallisesti huomattavasti suuremmille tutkittavan aineen pitoisuuksille, kuin ihmiset normaalioloissa kohtaavat. Tämä lähestymistapa on perusteltu, mutta se lisää samalla epävarmuutta tuloksia ihmisryhmiin sovellettaessa.

Riskinarviointimallit

Laajimmin käytetty malli siedettävien altistumistasojen määrittämiseksi ihmisille on NOAEL-metodi (No Adverse Effect Level), jota on sovellettu käytännössä kaikkiin kemikaalien toksisiin haittavaikutuksiin lukuun ottamatta genotoksisia karsinogeneeneja. NOAEL-menetelmässä haetaan eläinkokeiden suurin annos, jolla herkintä haitalliseksi luokiteltua vaikutusta (kuvassa 1 painonkehityksen jälkeenjäänti) ei ilmene tilastollisesti merkitsevästi. Kun tämä kerrotaan turvakertoimella (tavallisesti 100), minkä tarkoituksena on kattaa lajien ja ihmisyksilöiden väliset herkkyys- ja toksikokinetiikkaerot, saadaan suurin tutkittavan aineen pitoisuus, jolle ihmiset voivat siedettävästi altistua päivittäin koko elinikänsä ajan. Tästä käytetään nimitystä ADI (Acceptable Daily Intake) puhuttaessa esimerkiksi elintarvikkeiden lisäaineista tai torjunta-aineista ja TDI (Tolerable Daily Intake) ympäristön haittakeemikaalien osalta.

NOAEL-menetelmällä saatu raja-arvo riippuu ryhmäkoosta ja an-

TAULUKKO 1 TABLE

Keskeisimpiä koe-eläimillä tehtäviä toksisuustutkimuksia.

Key toxicity tests conducted in laboratory animals.

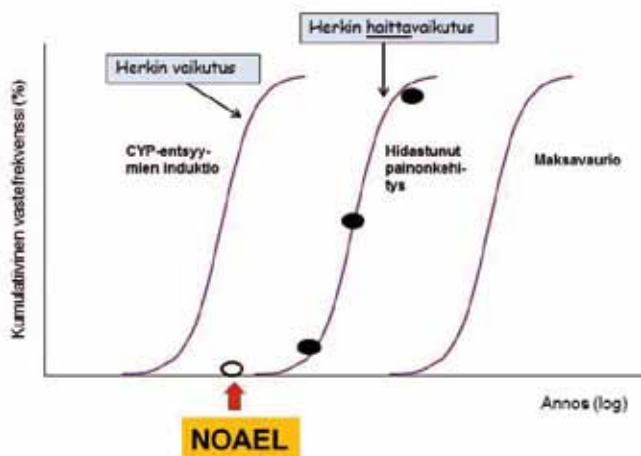
Koetyyppi Type of test	Kokeen kesto Test duration	Tavoite Goal	Hinta (€) ¹ Price (€)
Toksikokinetiikka Toxicokinetics	Päiviä—viikkoja Days—weeks	Kemikaalin käyttäytyminen elimistössä Behaviour of the chemical in the body	100 000
Akuutti oraalinen toksisuus Acute oral toxicity	2 vk 2 weeks	Myrkyllinen kerta-annostaso Toxic single dose level	2 000
Subakuutti oraalinen toksisuus Subacute oral toxicity	4 vk 4 weeks	Annostasot pitkäaikaistutkimuksiin Dose levels for long-term studies	70 000
Subkrooninen oraalinen toksisuus Subchronic oral toxicity	3 kk 3 months	Toksisuuden kohde-elimet Toxicity target organs	190 000
Krooninen oraalinen toksisuus/karsinogeenisuus Chronic oral toxicity/carcinogenicity	2 v 2 years	NOAEL, tumorigenisuus NOAEL, tumorigenicity	1 410 000
Kahden sukupolven reproduktiotoksisuus Two-generation reproduction toxicity	8 kk 8 months	Reproduktio- ja kehitystoksisuus Reproductive and developmental toxicity	510 000

nosvälien laajuudesta eikä hyödynnä annos-vastesuhdetta ja on siten pikemmin kvalitatiivinen kuin kvantitatiivinen riskinarviointimetodi. Tämän vuoksi EU:ssa ollaan ottamassa enenevässä määrin käyttöön BMDL-metodia (Benchmark Dose Lower Confidence Limit).²⁻⁴ Myös siinä haetaan herkin haittavaikutus, mutta pysyttäydytään sen annos-vastekäyrällä hyväksymällä tietty pieni vasteen esiintymisfrekvenssi (esimerkiksi 5 tai 10 %). Tämän vastetaajuuden ja herkimmän haitan annos-vastesuhteen 95 %:n luottamusvälin alemman käyrän leikkauspiste kertoo BMDL-arvon, josta voidaan edelleen johtaa ADI tai TDI turvakertoimen avulla kuten NOAEL-metodissakin. Vaikka NOAEL- ja BMDL-menetelmät eroavat merkittävästi, niiden antamat raja-arvot ovat tavallisesti lähellä toisiaan² (kuva 2), joten aiemmin NOAEL-menetelmällä

saatuja raja-arvoja ei ole pääsääntöisesti tarpeen muuttaa.

Genotoksiset karsinogeenit

Kemialliset aineet tai fysikaaliset tekijät, esimerkiksi radioaktiivinen säteily, jotka aiheuttavat syöpää vaurioittamalla solujen perimäainesta, muodostavat erityisryhmän toksikologisen riskinarvioinnin kannalta. Niiden lähtökohtana on näkemys, että yksittäinenkin vaurio DNA:ssa voi olla kohtalokas ja johtaa syövän kehittymiseen. Tämä juontaa juurensa Nobel-palkitun tutkijan H.J. Mullerin havainnoista 1920-luvulla: röntgensäteily aiheuttaa banaanikarpäsilille mutaatioita ilman näkyvää kynnysarvoa.⁵ Tämän vuoksi NOAEL-menetelmää ei voida käyttää, vaan tavoitteena on laskea altistumistasot mahdollisimman alas. Koska nollatasoa ei esimerkiksi taloudellisista syistä ole mahdollista saavuttaa,



Kuva 1

KUVA 1 FIGURE

NOEL-annoksen määrittäminen. Umpinaiset ympyrät: tilastollisesti merkitsevä ero kontrolliin verrattuna. Avoin ympyrä: ei-merkitsevä ero.

Determination of the NOEL dose. Closed circles: statistically significant difference vs. control. Open circles: non-significant difference.

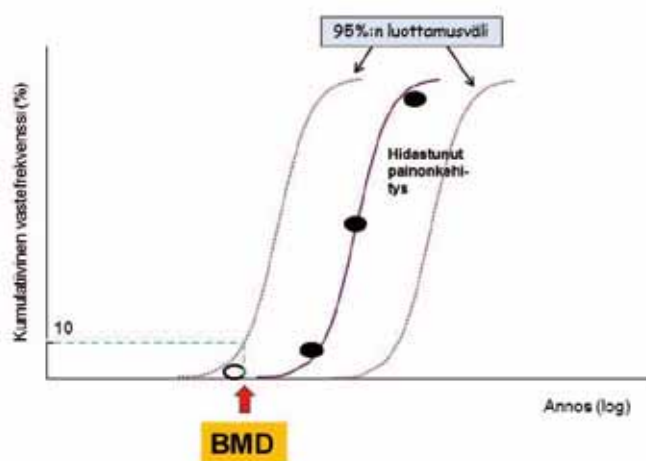
aiemmin on hyväksyttävänä altistumistasona pidetty pitoisuutta, joka log-lineaarisesti eläinkokeiden tuloksista ekstrapoloimalla aiheuttaa yhden lisääntyneen syöpätapauksen miljoonaa altistunutta ihmistä kohden (kuva 3). Tällainen riskinarviointi on ongelmallista erityisesti siksi, että eläinkokeissa vaaditaan tilastollisesti merkitsevään muutokseen syöpäinsidenssissä vähintään 5–10 %:n lisäys kontrollifrekvenssiin nähden. Tällöin arvioinnissa joudutaan hakemaan 5–6 kertaluokkaa pienempää insidenssiä vastaavaa altistumisannosta ilman varmaa tietoa annosvastesuhteesta tällä alueella. Euroopan elintarviketurvallisuusvirasto EFSA onkin äskettäin päättänyt ottamaan käyttöön uuden MOE-menettelyn (Margin of Exposure).^{6,7} Siinä BMDL-menetelmällä eläinkokeista saatua 10 %:n syöpäinsidenssin lisäystä vastaavaa altistumistasoa verrataan ihmisten todelliseen altistumiseen. Jos ero pitoisuuksien välillä on alle 10 000, on syytä ryhtyä korjaaviin

toimenpiteisiin. Tällöin ei tarvitse valita, onko lineaarinen vai jokin muu matemaattinen malli oikea tapa ekstrapoloida eläinkokeen tulokset ihmisyyteeseen. Uusi käytäntö myös yhtenäistää eri terveyshaittojen arviointimenetelmiä ja mahdollistamalla turvamarginaalien vertailun eri kemikaalien välillä auttaa suuntaamaan toimenpiteet merkittävimpiin riskitekijöihin. MOE ei sinänsä mittaa riskin suuruutta, vaan kertoo siitä, kuinka vakavaan huolestumiseen kemiallinen tekijä antaa aihetta.⁷

Poikkeavat annosvasteet

Vaikka suurin osa kemikaalien aiheuttamista haittavaikutuksista näyttää noudattavan monotonista annosvasteisuutta, tosin sanoen ne voimistuvat annoksen kasvaessa, on kauan tiedostettu, että poikkeuksen tähän sääntöön tekevät aineet, jotka ovat välttämättömiä (esimerkiksi hivenaineet ja vitamiinit). Niillä optimitaso on vaihtelevan laajuinen, tavallisesti varsin kapea pitoisuusväli ja poikkeamat

tästä kumpaan suuntaan hyvänsä ovat haitallisia, joskin yleensä eri vaikutuksin. Viime vuosina on kertynyt näyttöä siitä, että klassisessa annosvasteessa esiintyy myös muuntumattomia poikkeamia. Useiden haitallisina pidettyjen kemikaalien on pienillä, alle kynnyksarvotason jäävillä, altistusannoksilla havaittu paradoksaalisesti vähentävän sairastuvuutta. Kemikaalien haittavaikutukset kehityshäiriöiden ja syöpäinsidenssin lisääntymisestä entsyymiaktiivisuuksien ja vastaainetuotannon heikentymiseen ovat osoittaneet käänteistä taipumusta altistusten jälkeen. Ilmiöstä käytetään nimitystä hormeesi. Hormeesi ei kuitenkaan koske yksinomaan kemiallisia aineita, vaan se voidaan ymmärtää kohentuneena vastustuskykyä monentyyppisille stressitekijöille, kemikaalien ohella esimerkiksi radioaktiiviselle säteilylle.⁸ Myös lievien lämpöshokkien on havaittu voivan pidentää eri eläimien elinikää.⁹ Hormeesi näyttää olevan riippumaton biologisesta mallista (solu, kudokse, yksilö, laji: kasvi vai nisäkä), mitattavasta haittavaikutuksesta ja kemiallisesta tai fysikaalisesta aiheuttaja-agenssista. Se on ällistytävän yleinen: tähän saakka analysoiduista yli 9000 annosvasteesta se ilmeni suurimmassa osassa.¹⁰ Hyöty on sinänsä melko pieni, tavallisesti maksimissaan 30–60 % verrattuna altistumattomiin verrokkeihin, ja saavuttaa huippunsa keskimäärin viisi kertaa NOEL:ä pienemmällä pitoisuudella.¹¹ Hormeesin todennäköisenä selityksenä pidetään lievien stressitekijöiden aiheuttamaa stimulaatiota tai ylikompensaatiota. Mielenkiintoinen yksityiskohta on, että vaikka happiradikaalien aiheuttamaa oksidatiivista stressiä pidetään keskeisenä syynä ikääntymiseen liittyvään elintoimintojen rappeutumiseen, sillä voi myös olla avainrooli energiavajauksen elinikää pidentävässä vaikutuksessa mitokondrioiden tehostuneen toiminnan kautta.¹²



Kuva 2

KUVA 2 FIGURE

Referenssiannoksen (BMD) määrittäminen BMDL-menetelmällä saman eläinkokeen tuloksista kuin kuvassa 1.

Determination of the reference dose (BMD) by the BMDL method from the same data as in Fig. 1.

Hormeesin ohella toinen viime aikoina vilkkaan tutkimuksen kohteena ollut poikkeuksellinen annosvasteisuus koskee hormonihäiriöitä eli aineita, jotka käyttäytyvät elimistössä jonkin hormonin tavoin tai häiritsevät muutoin elimistön endokriinistä järjestelmää. Tutkituimpia ovat dioksiinit, PCB-aineet, brominoidut palontorjunta-aineet, muovin pehmentimet (kuten ftalaatit ja bisfenoli-A) sekä eräät torjunta-aineet. Tavallisin hormonaalinen vaikutustapa on estrogeenisuus (tai joskus antiandrogeenisuus). Hormonihäiriöiden annosvasteikäyrä saattaa muistuttaa kolmannen asteen funktion kuvaajaa, joskin ilmiö on edelleen kiistanalainen. Hormonaalisen vaikutuksen huippu (paikallinen maksimi) saavutettaisiin tällöin jo varsinaisten toksisten vaikutusten kynnyksarvoa pienemmällä altistumistasoilla ("low-dose toxicity"). Hormonihäiriöt voivat olla häiriöitä myös toksikologisen riskinarvioinnin kannalta, sillä perinteinen NOAEL-arviointimenettely ei niitä kata, koska siinä käytettävät

annokset ovat liian suuria, eikä lineaarinen ekstrapolaatio niihin sovi.¹³ Osa hormonihäiriöiden vaikutuksista voi olla vaikeasti todettavia, kuten hermoston lievät kehityshäiriöt ja käyttäytymismuutokset¹⁴ samoin kuin vaikutukset, jotka in utero -altistuksen jälkeen ilmenevät vasta aikuisiällä.¹⁵ Lisäksi rajanveto vähäisen adaptiivisen muutoksen ja todellisen haittavaikutuksen välillä on monesti pulmallista.¹⁵ Erityisesti estrogeenin kaltaiset aineet ovat ongelmallisia, koska niitä esiintyy erittäin yleisesti niin ympäristön vierasaineina (ksenoestrogeenit) kuin ravintokasveissakin (fytoestrogeenit). Kun edellisiä on pidetty pelkästään haitta-aineina, jälkimmäisten on nähty olevan terveydelle suotuisia. Fytoestrogeenien mahdollisiin terveysriskeihin on alettu kiinnittää huomiota.¹⁶

Yhteisvaikutukset

Nykyvaatimuksien mukaan kukin kemikaali on tutkittava erikseen. Esimerkiksi torjunta-aineiden tehoaineista on perinteisesti edellytetty

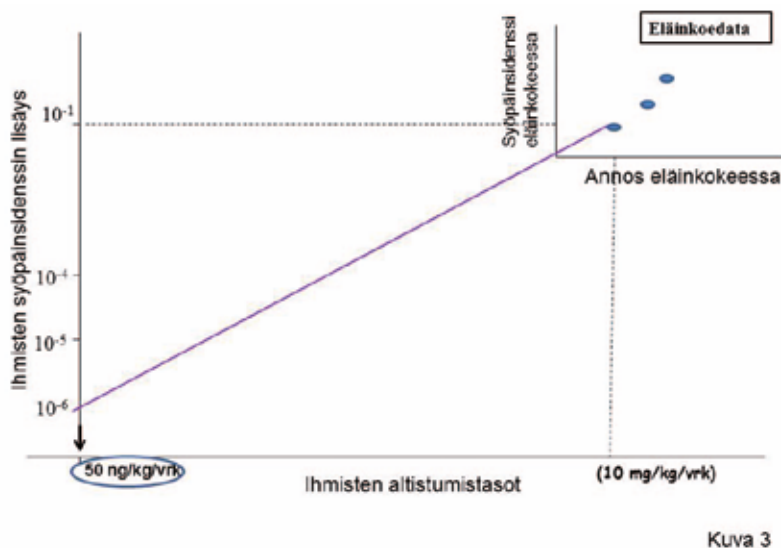
kattavan monipuolisia toksisuustutkimuksia mutta itse valmisteista vain joitakin lyhytaikaistestejä. Kemikaalien tutkiminen pelkästään yksilöllisesti helpottaa tulosten tulkintaa ja vähentää kustannuksia, mutta heikentää tulosten sovellettavuutta ja yleistettävyyttä, sillä käytännössä ihmiset altistuvat tavallisesti useiden aineiden seoksille. Seosvaikutukset ovatkin nousseet viime vuosina toksikologisessa riskinarvioinnissa esille Euroopan komission asiantuntijaelimissä¹⁷ ja EFSA:ssa.¹⁸

Yhteisaltistuksessa kemikaaleilla voi ilmetä annos- tai vasteadditiivisuutta, synergismia, potentiaatiota tai antagonismia. Riskinarvioinnin kannalta huolestuttavin yhteisvaikutuksen muoto on synergismi (ja sen erikoistapaus potentiaatio). Tällöin yhdistelmä on myrkyllisempi kuin komponenttien pohjalta voidaan ennustaa. Onneksi synergismi näyttää olevan melko harvinaista ja ilmenevän usein vasta suurilla altistuksilla. Sen tuotama kokonaisvaikutus on lisäksi harvoin yli 10 kertaa suurempi kuin additiivisuuden (summavaikutuksen) perusteella on odotettavissa.¹⁹ Lisää tutkimuksia aiheesta tarvitaan.

Kemikaalilainsäädännön uudistus EU:ssa: REACH

Koska kemikaalien haittavaikutusten tutkiminen on kallista ja aikaavievää, viranomaisvalvonta kohdistui aiemmin pääasiassa vain keskeisimmiksi katsottuihin kemikaaliryhmiin, kuten lääke- ja torjunta-aineisiin sekä elintarvikkeiden lisäaineisiin. Ennen vuotta 1981 ehti markkinoille tulla noin 100 000 kemiallista ainetta, joille ei ollut asetettu ennakkotutkimusvaatimuksia. Vuoden 1981 ja 2000-luvun alun välissä kehitetyiltä noin 3800 kemikaalilta testaamista vaadittiin, mikä lisäsi niiden tuotantokustannuksia ja väärästi kilpailua.

EU:ssa siirryttiin uuteen vaiheeseen 2007, jolloin astui voimaan



KUVA 3 FIGURE

Esimerkki hyväksyttävän ihmisten altistumispitoisuuden ekstrapolaatiosta eläinkokeen syöpäinsidenssituloksista, kun kyse on genotoksisesta karsinogeenista.

An example of the extrapolation of an acceptable human exposure level from animal cancer incidence data in the case of a genotoxic carcinogen.

kemikaalien rekisteröintiä, arviointia, lupamenettelyä ja rajoituksia koskeva asetus REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of CHemicals; [EY] 1907/2006). Siinä vastuu kemikaalien turvallisuudesta siirrettiin viranomaisilta valmistajille ja maahantuojille. REACH:ssä noudatetaan varovaisuusperiaatetta, jonka mukaan kemikaaleilla on lähtökohtaisesti riskimahdollisuus ja kemikaalien tuottajilla on velvollisuus osoittaa niiden turvallisuus. Jo käytössä olevista kemikaaleista kaikki yli 1000 kg vuodessa tuotettavat tai EU-alueelle tuotavat aineet on rekisteröitävä, ja rekisteröinnin kiireellisyys riippuu porrastetusti tuotantomäärästä. Vuoden 2018 toukokuun loppuun mennessä tulee myös vähiten kiireellisten, 1–100 t vuodessa tuotettavien kemikaalien, olla rekisteröityjä. Kaiken kaikkiaan rekisteriin odotetaan päätyvän noin 30 000 ”vanhaa” kemikaalia. Lisäksi kaikki

uudet aineet on rekisteröitävä, ennen kuin niitä saadaan valmiina, tuoda markkinoille tai käyttää. Rekisteröinnin tarkoituksena on kerätä tietoa kemiallisten aineiden ominaisuuksista ja varmistaa turvallinen käyttö.

Kemikaaleilta vaadittavat toksisuustutkimukset on porrastettu käyttömäärien mukaisesti. Suurin osa tutkimuksista on edelleen eläinkokeita, vaikka REACH:n yhtenä tavoitteena on vähentää selkärangaisilla tehtäviä testejä. Testaukseen tarvittavien eläinten määrää pyritään kuitenkin vähentämään. Kemikaalien päällekkäistämisen välttämiseksi on perustettu rekisteröijien tietojenvaihtofoorumi, jossa samaa ainetta valmistavien yritysten on saatettava toistensa tiedoksi olemassa olevat tutkimukset ja sovittava uusista tutkimuksista. Kemikaaleilla ei saa tehdä uusia selkärangastestejä, ennen kuin testaus suunnitelma on hyväksytty. Tällä pyritään vält-

tämään turhia ja huonosti suunniteltuja selkärangaiskokeita sekä maksimoimaan jokaisesta uudesta kokeesta saatava tieto.

Oman erityisryhmänsä muodostavat ihmisten terveydelle ja ympäristölle erityistä huolta aiheuttavat aineet. Edellisiä ovat karsinogeeniset, mutageeniset ja reproduktiotoksiset aineet, jälkimmäisiä hitaasti hajoavat, biokertyvät ja myrkylliset aineet. Jälkimmäisistä on erotettu omaksi ryhmäkseen erittäin hitaasti hajoavat ja erittäin voimakkaasti bioakkumuloituvat aineet. Erityistä huolta aiheuttaviksi aineiksi voidaan tunnistaa myös aineita, joiden muunlaisista todennäköisistä, vakavista vaikutuksista ihmisten terveyteen tai ympäristöön on tieteellisiä todisteita. Nämä vaaralliset kemikaalit liitetään luvanvaraisten aineiden kandidaattilistaan, jonka tavoitteena on kannustaa korvaamaan listalla olevia aineita vähemmän haitallisilla aineilla tai tekniikoilla, jos sellaisia on tiedossa. Kandidaattilistan aineita saa edelleen käyttää, mutta niitä voidaan myös siirtää lupamenettelyn piiriin, jos katsotaan, että niiden aiheuttamien terveys- tai ympäristöriskien hallinta vaatii erityistä huomiota. Lupamenettelyn piirissä olevia aineita ei saa käyttää ilman lupaa, joka voidaan kuitenkin myöntää käyttötapakohtaisesti hyöty–haitta-arvioinnin perusteella.

Kemikaalien rekisteröintiasiakirjat arvioi Helsingissä sijaitseva Euroopan Kemikaalivirasto ECHA, joka käy läpi vähintään 5 % kaikista rekisteröintihakemuksista ja varmistaa, että ne ovat vaatimusten mukaisia. EU:n jäsenmaat puolestaan tekevät riskinarvioita valitsemistaan aineista joko kokonaisuudessaan tai vain tiettyjen ominaisuuksien kuten syöpävaarallisuuden osalta. ECHA:n tai jäsenmaan perustellusta esityksestä aineen valmistusta, markkinoille saattamista ja käyttöä voidaan rajoittaa, jos on aihetta epäillä sen

voivan aiheuttaa ihmisten terveydelle tai ympäristölle riskin, joka ei ole riittävän hyvin hallinnassa.

REACH ei koske sellaisia kemikaaliryhmiä, jotka on säädelty erikseen (esimerkiksi kasvinsuojeluaineet, biosidit, lääkkeitä ja eläinlääkkeet, elintarvikkeiden lisä- ja aromiaineet, rehujen lisäaineet, radioaktiiviset aineet, geneettisesti muunnellut organismit). Se ei myöskään koske valmiita tuotteita, vaan niiden ainesosia mukaan lukien lisäaineet ja epäpuhtaudet.

Eläinkokeiden uudistaminen

Eläinkokeisiin tukeutuva toksisuuden riskinarviointimenettely pohjautuu näkemykseen, että selkärangaiset ja eritoten nisäkkäät ovat evolutionaarisesti samankaltaisia. Tätä tukee selvitys 150 uuden lääkeaineen toksisuustutkimuksista. Prekliinisissä testeissä havaittu elintoksisuus oli yhtäpitävää koe-eläimen ja ihmisen välillä valtaosassa tapauksista.²⁰ Kun kaikki lajit otettiin huomioon, positiivisten löydösten yhtenevyys oli 71 %, jyrksijöillä yksin tosin vain 43 %. Yhtäpitävyys oli suurinta hematologisten, gastrointestinaalisten ja kardiovaskulaaristen haittojen osalta (80–95 %), vähäisintä ihotoksisuuden osalta (35 %). Tamaki ym.²¹ totesivat, että 48 % haitallisista lääkeainereaktioista on ennakoitavissa kattavan prekliinisen turvallisuusarvioinnin perusteella. Yhdenmukaisuus oli vahvin applikaatiokohdan reaktion, hematologisten ja okulaaristen haittavaikutusten suhteen (72–86 %), heikoin lihaksiston tai luuston sekä neurologisten haittojen osalta (8–26 %). Schardein ym.²² testasivat 51 ihmiselle kehityshäiriöitä aiheuttavaa ainetta eri eläinlajien välillä: yli 90 % aineista aiheutti vastaavan vaikutuksen myös rotalla ja/tai hiirellä. Tutkimukset osoittavat, että eläinkokeiden herkkyys haittavaikutusten mittaamisessa on usein hyvä. Esimerkiksi kaikki tunnetut ihmiselle karsinogeeniset

aineet ovat sitä myös yhdelle tai useammalle koe-eläinlajille.^{23,24} Eläinkokeiden ennustavuus kuitenkin vaihtelee, sillä suuri herkkyys voi tuottaa virhepositiivisia tuloksia. Eri koe-eläinlajeilta tunnetaankin vain niille ominaisia tai muuten ihmiselle epärelevantteja syövän syntymekanismeja, jotka riskinarvioinnissa tulee ottaa huomioon.²⁵ Toisaalta ainakin kehitystoksisuuden osalta tulokset ovat vakuuttavia: laajassa meta-analyysissä eläinkokeen ennustavuus oli positiivisissa tapauksissa 75–100 % ja negatiivisissa 64–91%.²⁶

Perinteisessä muodossaan eläinkokeet ovat työläitä, aikaa vieviä ja kalliita, mikä yhdessä koe-eläinten käytön vähentämistavoitteen (3R=replacement, reduction, refinement) kanssa on pakottanut kehittämään pienimuotoisia ja lyhyempiä testejä. Esimerkiksi kahden sukupolven reproduktiotoksisuuskokeen tilalle on esitetty jatkettua yhden sukupolven testiä, ja selvitykset ovat menossa siitä, voiko kaksivuotisen karsinogeenisuuskokeen (joka yleensä on yhdistetty krooniseen toksisuuskokeeseen) korvata 6 kuukauden mittaisella testillä.²⁶ Akuutissa toksisuuskokeessa tarvittava eläinmäärä on myös vähentynyt alle puoleen. Joissakin tapauksissa tutkimuksiin voidaan nisäkkäiden asemesta käyttää alempia selkärangaisia. Niistä suosituimmaksi lajiksi on kohonnut seeprakala, jolla kemikaalien toksisuusprofiilit ovat samankaltaisia kuin nisäkkäillä.²⁷ Toisaalta sillä näyttää esiintyvän runsaasti virhepositiivisia ja -negatiivisia löydöksiä, jotka pitkälti selittyvät toksikokineettisillä tekijöillä.²⁸

Vaihtoehtomenetelmät

OECD:n ohjeiston mukaiset eläinkokeet pyrkivät löytämään tutkittavien aineiden keskeiset haittavaikutukset ja toksisuuden kohde-elimet, mutta ne eivät yleensä paljasta aineiden vaikutustapoja

tai -mekanismeja. Lisäksi niiden eettisyys asetetaan nykyaikana yhä useammin kyseenalaiseksi. Tämän vuoksi on riskinarviointiin pyritty kehittämään korvaavia menetelmiä.

In vitro -menotit ovat potentiaalisesti soveltuvia, sillä jos tutkimukset voitaisiin toteuttaa ihmisluilla tai -kudoksilla, lajienvälisestä ekstrapolaatiosta päästäisiin eroon. Ne olisivat myös ennustavampia sellaisissa tapauksissa, joissa haittakemikaalin metabolia eroaa ihmisellä ja koe-eläinlajeilla tai joissa kyse on ihmispesifistä vaikutuksesta. Toisaalta vaihtoehtoisissa menetelmissä on omat ongelmansa. Perinteinen soluviljelmä ei vastaa elävää kudosta, jossa solutyypit ovat vuorovaikutuksessa keskenään, puhumattakaan kokonaista elimistöä, jossa neuraalinen ja endokriininen säätely ovat tärkeitä. Jatkuvien solulinjojen ongelmana on puutteellinen vierasainemetabolia. Primaarisoluisakin vierasaineita metaboloivien entsyymien pitoisuudet vähenevät vaihtelevasti.²⁹ Parhaimmilla vaikuttavat embryonaaliset tai indusoidut pluripotentit kantasolut, joita voidaan erilaistaa halutuiksi solutyypeiksi ja jotka näyttävät säilyttävän metabolisen kompetensinsa.³⁰

Riskinarvioinnin osa-alueista solutestin hyödyntäminen on edennyt merkittävään asemaan mutaagenisuuden ja genotoksisuuden tutkimisessa. Amesin testi, jossa mitataan kemikaalien vaikutusta takaisinmutaatiofrekvenssiin geenitekologisesti käsitellyillä *Salmonella typhimurium* -kannoilla, kuuluu vaadittaviin toksisuustutkimuksiin. Tätä lähinnä pistemutatioita mittaavaa testiä täydentävät lukuisat DNA:n tai kromosomien vaurioitumista indikoivat in vitro -testit.³¹ Niiden heikkoutena on suuri virhepositiivisten tulosten määrä, minkä vuoksi positiiviset tapaukset on aiemmin verifioitu in vivo -tutkimuksilla. Kosmetiik-

kaan kehiteltävien kemikaalien osalta tämä ei EU:ssa kuitenkaan enää ole mahdollista (asetus [EY] 1223/2009).

Genotoksisuustestien ohella OECD:n ohjeistoon on tähän mennessä hyväksytty eläinkokeita korvaavia, validoituja menetelmiä iho- ja silmä-ärsyttävyyden tai –syövyttävyyden, iholäpäisevyyden sekä valotoksisuuden tutkimiseen. Kemikaalien endokriinisten vaikutusten arviointiin on saatavilla in vitro -testi estrogeeniselle, (anti-) androgeeniselle ja steroidogeneesivaikutukselle nisäkkäillä tai kaloilla. Kilpirauhashormonivaikutukselle sellainen on tulossa.¹⁵ Muita eläinkokeettomia menetelmiä ovat in silico -rakenne-aktiivisuusanalyysit, joissa tavoitteena on todentaa tietokoneohjelmien avulla käyttökelpoisia molekyyliarakenteellisia ”hälytyskelloja” vaaran indikaattoreiksi, ja fysiologia-perustaiset mallit kemikaalien kineettisten vaiheiden ennakoimiseksi sekä in vitro -pitoisuuksien ja in vivo -annostasojen vertailuun.³² Eri ”omiikka”-tekniikat (transkriptomiikka, proteomiikka, lipidomiikka, metabolomiikka) edustavat systeemibiologian suuntausta, jolla voidaan selvittää suuren tulosdatan avulla keskeiset aineenvaihdunta- tai signaalinvälitysreitit, joihin toksisuus kohdistuu. Ne vaativat kuitenkin pitkälle vietyä erityisosaamista ja voivat turhankin herkinä tuottaa epärelevanttia tietoa.³³

Ehkä lupaavin uusi tutkimussuunta perustuu erilaisten solujen ja jopa kudosten fysiologista yhteydenpitoa jäljittelevän vuorovaikutuksen mahdollistavien kolmiulotteisten soluviljelymenetelmien kehitykseen. Yksinkertaisimmillaan erilaisia soluja voidaan viljellä yhdessä niiden vuorovaikutukset säilyttäen. Eri solutypit kasvavat levyillä kukin omissa kaivoissaan, mutta kaivoja yhdistää sama elatusaine.³⁴ Näin saatetaan esimerkiksi altistaa ekstraphepaattisia soluja hepatosyyteissä

muodostuneille kemikaalin metaboliiteille. Tämä ei kuitenkaan vastaa in vivo -tilannetta, jossa hepatosyyttien lisäksi kemikaalin vaikutukset maksassa kohdistuvat (usein vastetta modifioiden) myös muihin soluihin, kuten Kupfferin soluihin, tähti- ja endoteelisoluihin. Aito kudosiselämä säilyttää solujen alkuperäiset asemat toisiinsa nähden, mutta koska ravinteet ja happi siirtyvät sisäkerrokseen vain diffundoitumalla, kudospalojen on oltava hyvin ohuita, ja ne säilyvät hengissä vain vajaan viikon.³⁵

Uudet mikroelinmallit

Ratkaisun näihin ja useimpiin in vitro -tekniikoita vaivaaviin ongelmiin saattaa tuoda mikrofluidiikka. Soveltamalla samanaikaisesti kännyköiden piirikorttien ja kapillaarielektroforeesin periaatteita biologiaan on kyetty luomaan in vitro -malleja ihmisen elimistä ja jopa elinjärjestelmistä. Niistä käytetään termiä ”organs-on-chips”. Pehmeän litografian avulla mikrofabrikoimalla on voitu tuottaa kriittisten biologisten rajapintojen (esimerkiksi endoteeli, veriaivoeste, suoliepiteeli, iho) toiminnan oikein mallintavia mikropreparaatteja, jotka sallivat kudoksiin kohdistuvien dynaamisten rasitusten (hengitysliikkeiden, peristaltiikan, ihon kiristymisen, verisuonten sisäpinnan hankautumisen ja niin edelleen) vaikutuksen jäljittelemisen ja tutkimisen.³⁶ Esimerkiksi toiminnallinen keuhkomalli saadaan siten, että polydimetyyli-siloksaanista (PDMS) koostuvalle taipuisalle membraanille etsataan mikrokanavia joidenkin mikrometrien välein ja päällystetään ne sopivalla ekstrasellulaarimatriksilla (kuten kollageeni), minkä jälkeen vierekkäisiin kanaviin siirretään kasvamaan ihmisen endoteeli- ja alveolaariepiteelisoluja. Kun kummatkin solut ovat muodostaneet intaktin yksisolukerroksen, kapillaariverkoston kierrätetään keinoverta tietokoneen säätelemällä

virtausnopeudella ja paineella. Alveolipuolelle taas johdetaan ilmaa pumpun avulla, mikä saa preparaatin jäljittelemään hengitysliikkeitä luomalla rytmisen vakuumin suurempiin reunakammioihin. Tämä aiheuttaa mekaanista venymistä ja supistumista solumatoissa, juuri kuten tapahtuu keuhkoissakin. Samalla alveolisolut alkavat tuottaa surfaktanttia ja vahvistavat soluväliliitoksiaan keuhkojen tapaan. Kun alveolilmaan päästetään bakteereja tai pienhiukkasia, suonikanavissa kiertävään nesteeseen lisätyt tulehdussolut reagoivat fysiologisesti tunkeutumalla endoteelin läpi ja erittämällä sytokiineja; keuhkoödeema voidaan puolestaan aiheuttaa interleukiini-2:n avulla.^{36,37}

Vastaavassa munuaissirussa koojatiehyiden epiteelisolut erilaisituvat täydellisesti ja polarisoituvat.³⁸ Ohutsuolimallissa taas nesteen peristalttinen liike indusoi ihmisen kolorektaali-solulinjan solut tuottamaan villuksia ja kryptoja, jolloin niihin myös palautuu niistä hävinnyttä metabolista kapasiteettia,³⁹ ja normaaliin suoliflooraan kuuluvien laktobasillien läsnäolo tehostaa suolen solujen toimintaa.⁴⁰ Sydänpreparaatin lihassolut saadaan sykkimään säännöllisesti heikkojen sähköstimulusten tahdittamina. Tiheästi haaroittuneeksi suunnitellun mikrokanavaverkoston avulla voidaan myös jäljitellä matorauhasen tiehyitä tutkittaessa rintasyövän mekanismeja.³⁸ Haastavin elin on ymmärrettävästi aivot. Kasvattamalla erillään mikrokammioissa eri neuronityyppejä ja päästämällä ne vuorovaikutukseen keskenään taiseisesti kapenevien mikrokanavien kautta (jotka suosivat yksisuuntaista aksonien kasvua) on kuitenkin saatu esimerkiksi kortikaaliset afferentit neuronit kiihdyttämään striatumin neuronien toiminnallista ja morfologista erilaistumista. Tällä tavoin on myös onnistuttu viljelemään yhdessä hippokampuksen neuroneita ja gliasoluja useiden

viikkojen ajan.³⁸

Koska kukin tällainen yksittäinen minielin on kooltaan alle 2 cm, useiden eri kudospreparaattien kytkeminen integroidusti yhteen on toteutettavissa, jolloin lähestytään jo elinjärjestelmää. Ihmissolut pysyvät näissä preparaateissa hengissä ja täysin toiminnallisina parhaimmillaan kuukausia, joten kroonisetkaan kokeet eivät ole poissuljettuja. Kaikki tämä lupaa käänteentekeviä mahdollisuuksia kemikaalien riskinarviointiin. Ennen on kuitenkin ratkaistava oleellisia kysymyksiä, kuten keinoveren koostumus, PDMS:n taipumus sitoa hydrofobisia yhdisteitä, käytetäänkö primäärisoluja, kantasoluja vai solulinjoja, miten kattavasti responssit vastaavat koko elimistön tasolla tapahtuvia ja niin edelleen.

Paradigman muutos?

Vaihtoehtoisten menetelmien nopea kehitys toksisten vaikutusten tutkimuksessa johtaa kysymään, voidaanko eläinkokeet lähitulevaisuudessa kokonaan korvata. Kun Society of Toxicology kokouksen 500 osanottajalle esitettiin tämä kysymys vuosi sitten, vain kymmenkunta vastasi myöntävästi. Paljon on siis tehtävä, ennen kuin kemikaalien riskinarvioinnin perusteet muuttuvat radikaalisti. Silti erityisesti uudet elinsirumenetelmät saanevat pian jalansijaa vähintäänkin elintoksisuuden mekanismien tutkimuksessa.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1. Faustman EM, Omenn GS. Risk assessment. Kirjassa: Klaassen CD, toim. Casarett & Doull's Toxicology. The basic science of poisons. 8. painos, New York: McGraw-Hill, 2013, 123–49.
2. Brandon EF, Bulder AS, van Engelen JG, Mahieu CM, Mennes WC, Pronk ME ym. Does EU legislation allow the use of the Benchmark Dose (BMD) approach for risk assessment? Regul Toxicol Pharmacol. 2013;67:182–8.
3. Crump KS. A new method for determining allowable daily intakes. Fundam Appl Toxicol. 1984;4:854–71.
4. EFSA. Use of the benchmark dose approach in risk assessment. EFSA J. 2009;1150:1–72.
5. Muller HJ. The regionally differential effect of X rays on crossing over in autosomes of *Drosophila*. Genetics 1925;10:470–507.
6. EFSA. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a harmonised approach for risk assessment of substances which are both genotoxic and carcinogenic. EFSA J. 2005;282:1–31.
7. EFSA. Statement on the applicability of the Margin of Exposure approach for the safety assessment of impurities which are both genotoxic and carcinogenic in substances added to food/feed. EFSA J. 2012;10:2578.
8. Yu HS, Liu ZM, Yu XY, Song AQ, Liu N, Wang H. Low-dose radiation induces antitumor effects and erythrocyte system hormesis. Asian Pac J Canc Prev. 2013;14:4121–6.
9. Lagisz M, Hector KL, Nakagawa S. Life extension after heat shock exposure: assessing meta-analytic evidence for hormesis. Ageing Res Rev. 2013;12:653–60.
10. Calabrese EJ, Blain RB. The hormesis database: the occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature. Regul Toxicol Pharmacol. 2011;61:73–81.
11. Calabrese EJ. Biphasic dose responses in biology, toxicology and medicine: accounting for their generalizability and quantitative features. Environ Poll. 2013;182:452–60.
12. Ristow M, Zarse K. How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: The concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis). Exp Gerontol. 2010;45:410–8.
13. Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR Jr, Lee DH ym. Hormones and endocrine disrupting chemicals: Low-dose effects and nonmonotonic dose responses. Endocr Rev. 2012;33:378–455.
14. Kajta M, Wójtowicz AK. Impact of endocrine-disrupting chemicals on neural development and the onset of neurological disorders. Pharmacol Rep. 2013;65:1632–9.
15. EFSA. Scientific Opinion on the hazard assessment of endocrine disruptors: Scientific criteria for identification of endocrine disruptors and appropriateness of existing test methods for assessing effects mediated by these substances on human health and the environment. EFSA J. 2013;11:3132.
16. Yoon K, Kwack SJ, Kim HS, Lee B-M. Estrogenic endocrine-disrupting chemicals: molecular mechanisms of actions on putative human diseases. J Toxicol Environ Health B Crit Rev. 2014;17:127–74.
17. SCHER, SCCS, SCENIHR. Opinion on the toxicity and assessment of chemical mixtures, 2012. http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/environmental_risks/docs/scher_o_155.pdf.
18. EFSA. International frameworks dealing with human risk assessment of combined exposure to multiple chemicals. EFSA J. 2013;11:3313.
19. Cedergreen N. Quantifying synergy: A systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. PLoS One 2014;9:e96580.
20. Olson H, Betton G, Robinson D, Thomas K, Monro A, Kolaja G ym. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. Regul Toxicol Pharmacol. 2000;32:56–67.
21. Tamaki C, Nagayama T, Hashiba M, Fujiyoshi M, Hizue M, Kodaira H ym. Potentials and limitations of nonclinical safety assessment for predicting clinical adverse drug reactions: correlation analysis of 142 approved drugs in Japan. J Toxicol Sci. 2013;4:581–98.
22. Schardein JL, Keller KA. Potential human developmental toxicants and the role of animal testing in their identification and characterization. Crit Rev Toxicol. 1989;19:251–339.
23. Rall D. Laboratory animal toxicity and carcinogenesis testing: Underlying concepts, advantages and constraints. Ann NY Acad Sci. 1988;534:78–83.
24. Rall DP. Laboratory animal tests and human cancer. Drug Metab Rev. 2000;32:119–28.
25. Marone PA, Hall WC, Hayes AW. Reassessing the two-year rodent carcinogenicity bioassay: A review of the applicability to human risk and current perspectives. Regul Toxicol Pharmacol. 2014;68:108–18.
26. Jelovsek FR, Mattison DR, Chen JJ. Prediction of risk for human developmental toxicity: how important are animal studies for hazard identification? Obstet Gynecol. 1989;74:624–36.
27. McGrath P, Li CQ. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. Drug Discov Today 2008;13:394–401.
28. Ahuja V, Sharma S. Drug safety testing paradigm, current progress and future challenges: an overview. J Appl Toxicol. 2014;34:576–94.
29. Zucco F., De Angelis I, Testai E, Stamatii A. Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. Toxicol In Vitro 2004;18:153–63.
30. van Vliet E. Current standing and future prospects for the technologies proposed to transform toxicity testing in the 21st century. ALTEX 2011;28:7–44.
31. Breheny D, Oke O, Faux SP. The use of *in vitro* systems to assess cancer mechanisms and the carcinogenic po-

tential of chemicals. *Altern Lab Anim.* 2011;39:233–55.

32. Blaauboer BJ. The contribution of *in vitro* toxicity data in hazard and risk assessment: Current limitations and future perspectives. *Toxicol Lett.* 2008;180:81–4.

33. EFSA. Modern methodologies and tools for human hazard assessment of chemicals. *EFSA J.* 2014;12:3638.

34. Li AP. *In vitro* evaluation of human xenobiotic toxicity: scientific concepts and the novel integrated discrete multiple cell co-culture (IdMOC) technology. *ALTEX* 2008;25:43–9.

35. van Midwoud PM, Verpoorte E, Groothuis MM. Microfluidic devices for *in vitro* studies on liver drug metabolism and toxicity. *Integr Biol.* 2011;3:509–21.

36. Huh D, Kim HJ, Fraser JP, Shea DE, Khan M, Bahinski A ym. Microfabrication of human organs-on-chips. *Nat Protoc.* 2013;8:2135–57.

37. Huh D, Matthews BD, Mammoto A, Montoya-Zavala M, Hsin HY, Ingber DE. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science* 2010;328:1662–8.

38. Huh D, Torisawa YS, Hamilton GA, Kim HJ, Ingber DE. Microengineered physiological biomimicry: organs-on-chips. *Lab Chip.* 2012;12:2156–64.

39. Kim HJ, Ingber DE. Gut-on-a-Chip microenvironment induces human intestinal cells to undergo villus differentiation. *Integr Biol. (Camb)* 2013;5:1130–40.

40. Kim HJ, Huh D, Hamilton G, Ingber DE. Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow. *Lab Chip.* 2012;12:2165–74.

KIRJOITTAJIEN OSOITTEET

*Raimo Pohjanvirta, Toksikologian
professori, ELT*

*Helsingin yliopisto, elintarvike-
hygienian ja ympäristöterveyden
osasto*

*Mustialankatu 1, 00790 Helsinki
raimo.pohjanvirta@helsinki.fi*

*Selma Mahiout, FM, tohtorikou-
lutettava*

*Helsingin yliopisto, elintarvike-
hygienian ja ympäristöterveyden
osasto*