



Japanese Society of Toxicological Sciences

The Proceedings
of
The 14th Annual Meeting
of Japanese Society
of Toxicological Sciences

第14回日本毒科学会学術年会記録

昭和62年7月23日(木), 24日(金)

産業医科大学 ラマツィーニホール

北九州

(会長 土屋 健三郎)

御挨拶

謹啓 今年もあと旬日を残すばかりとなり、何か心に慌ただしさを感じる頃となりなした。先生にはますますご清祥のこととお慶び申し上げます。

さて、去る七月二十三、二十四日の両日にわたり開催致しました第十四回日本毒科学会学術年会に際しましては種々のご協力ならびにご配慮を賜り、まことに有難うございました。皆様方の絶大なご協力によって私共が当初考えていた三百人余りを大幅に上回る五百五十人の参加者を得て、学術年会を盛大かつ成功裡に終了することが出来ました。お陰様で大変好評を博し、実行委員一同感謝に耐えません。重ねて心より御礼申し上げます。

今学術年会の全内容は、日本毒科学会編集部のご好意で第十二巻第四号に印刷収録され、数日前、日本毒科学会の全会員他に発送されました。

本日、同編集部から当方へその別冊が送られてきましたので甚だ小部数で恐縮ですが、お送りさせて頂きます。何かご参考の一助となれば幸甚に存じます。

末筆乍ら向寒の折御自体御自愛賜りますようお願い申し上げます。

敬具

昭和六十二年十二月十四日

第十四回日本毒科学会学術年会

会長 土屋 健三郎

山田澄治

先生

第14回日本毒科学会学術年会記録

Proceedings
of
The 14th Annual Meeting
of Japanese Society of Toxicological Sciences.

昭和62年7月23日(木), 24日(金)

産業医科大学ラマツィーニホール

会 長 土 屋 健三郎

(産業医科大学学長)

はじめに

第14回日本毒科学会学術年会
会長 土屋 健三郎

昨年7月開催の第13回日本毒科学会学術年会ならびに第4回国際毒科学会議が非常に盛会であり、毒科学会の設立準備に参加した一人としてこの学会の成長を非常に嬉しく思った。ところが、私事に亘って恐縮であるが昨年4月、5月の2ヶ月間に亘って胆石から敗血症を起こし、手術を含む大病をしたために、第14回日本毒科学会学術年会の準備をすることができず、できればどなたかにピンチヒッターとして第14回の学術年会会長をお願いしたいと酒井文徳理事長に御相談申し上げた。しかし、当然のことながら今更そんなことはできないということとなり、8月の夏休みを利用して、一年弱のまさに一夜漬けに近い状態で準備を開始した。

何しろ産業医科大学は北九州にあり、交通、宿泊等東京に比べるとハンディキャップが大き過ぎるので、第1に参加者が充分にあるのかどうかを案じながら準備を始めた。そこで、長崎大学の金戸洋教授や九州大学の吉村英敏教授及び石西伸教授に顧問になっていただき、いろいろな面から議論した結果、昨年は『急性毒性試験』をメインテーマとして行なわれたので、第14回年会では『長期毒性』を取り上げることにし、シンポジウムとして『長期毒性—その考え方と評価』、更にワークショップとして『長期毒性評価とその問題点』を議論していくこととした。前者では長崎大学の金戸洋教授、産業医科大学の井上尚英教授に司会をお願いし、いろいろな立場から6人の先生方に講演をしていただいた。また、ワークショップでは国立衛生試験所の林裕造先生、東京大学の遠藤仁先生に司会をお願いし、4人の講師の方々にお話をしていただいた。そして、一般演題47題の他に、教育講演として、タフツ大学のラザーニヤ教授に

”Predicting Human Drug Safety from Animal Studies: Current Issues”という題で、中央大学の経済学部藤野志朗教授には「経済学からみた医薬品開発」という題で二つの講演をお願いした。

結果的には、皆様方の絶大な協力によって私共が当初考えていた300人余りを大幅に上回る550人の参加者を得て、第14回日本毒科学会学術年会を盛大にかつ成功裡に終了したことを私をはじめ、実行委員長として多大の労を惜しまなかった薬剤部長野田浩司教授ならびにその他の実行委員は誇りを感じると同時に、皆様方に心から感謝する次第である。

第14回学術年会を開催するに当たり、上に述べた学外の先生方、そして経済面のほか種々にわたり御面倒いただいた日本製薬工業協会、その他多くの製薬業界等の皆様方に心から深謝すると同時に、この学会が学問的にも、また実際的にも大変に有益であったという評価をいただいていることを報告する次第である。

また、今回のシンポジウム、ワークショップ、教育講演等については The Journal of Toxicological Sciences に詳細な内容を掲載して、御出席になれなかった方々への便宜にも供したいと思っている。

最後になったが、酒井文徳理事長以下日本毒科学会役員の方々の御協力と御配慮に深謝する次第である。

目 次

教育講演

司会：土屋健三郎

- L1. Predicting Human Drug Safety from Animal Studies: Current Issues.
Dr. Louis Lasagna 439
- L2. 経済学からみた医薬品開発
藤野志朗 451

シンポジウム

〈テーマ：長期毒性……その考え方と評価〉

司会：金戸 洋，井上尚英

- はじめに：金戸 洋 459
- S1. 長期毒性検索の方法論的展望
柳田知司 460
- S2. 薬理学的立場から
高仲 正 471
- S3. 病理学的立場から
伊東信行 481
- S4. 臨床の立場から
上田豊史 493
- S5. 産業医学の立場から
児玉 泰 501
- S6. メーカーの立場から
高垣善男 511
- 総括：土屋健三郎 519

ワークショップ

〈テーマ：長期毒性評価とその問題点〉

司会：林 裕造，遠藤 仁

- はじめに：林 裕造 525

W 1. 長期毒性と加齢による非特異的病変 真板敬三	526
W 2. 薬物代謝と長期毒性評価 佐藤哲男	538
W 3. 短期試験法による長期毒性の予測 石館 基	546
W 4. 次世代に及ぼす長期毒性の評価法 藤井儔子	558
総括：遠藤 仁	567
一般演題	
47題	571

教育講演

PREDICTING HUMAN DRUG SAFETY FROM ANIMAL STUDIES:
CURRENT ISSUES

Louis LASAGNA, M.D.

Center for the Study of Drug Development
and
Sackler School of Graduate Biomedical Sciences
Tufts University

Boston, Massachusetts 02111
U.S.A.

There is no disagreement about the desirability of minimizing hazards to human health deriving from chemicals, be they pharmaceutical, industrial, or agricultural chemicals. With the exception of some animal lovers who would prefer harm to humans over harm to subhuman species, most people would be pleased if human toxicity could be prevented by appropriate animal testing.

The sad reality is that at least at present, such a goal is not attainable, not because of a lack of public will or shortage of resources, but simply because our scientific wisdom is not as yet adequate to the challenge.

One way to appreciate our limitations is to consider the current situation with regard to the prediction of fetal damage by drugs taken by women during pregnancy.

Twenty-five years ago, the regulatory approach to marketed drugs was changed for all time by the realization that the generally accepted standards for evaluating medicines were inadequate for predicting and preventing fetal damage. Chemicals had, to be sure, long been known to be teratogenic for experimental animals, but this fact was important primarily because it allowed such chemicals to be used as tools to alter embryonic development in attempts to achieve better understanding of normal and abnormal maturation.

Some pharmaceutical companies were, to be sure, testing new drugs for teratogenicity, but such testing was not standard operating procedure. This failure to test routinely for fetal damage was not the result of a calculated rejection of the utility of such toxicological screening so much as a reflection of a general failure to appreciate the need for such tests.

With the thalidomide tragedy came widespread concern about possible fetal damage from other drugs taken by pregnant women. While thalidomide had never been approved for marketing in the United States, a considerable number of women had ingested the sedative-hypnotic in pre-marketing studies. In many other countries, the drug was marketed and quickly became popular. No one in the regulatory agencies,

the medical profession, the pharmaceutical industry, or the lay public wished a repetition of the thalidomide disaster. How could one guarantee that such horrors would not occur in the future?

Not surprisingly, many scientists went to work to see whether testing in non-human species could have predicted thalidomide's teratogenic potential. Ultimately partial success crowned these efforts, but there were also many failures. Thalidomide is a teratogen in a few rabbit breeds and seven species of primates. It is not a teratogen in at least ten rat strains, fifteen mice strains, eleven rabbit breeds, two dog breeds, three hamster strains and eight species of primates — not a reassuring state of affairs.

Nevertheless, everyone felt the need to do something. As a result, reproductive studies were devised and labeling to warn physicians and other health professionals about the need to be cautious in administering drugs (and vaccines) to pregnant women became the order of the day.

Tuchmann-Duplessis, a respected figure in this field, has elaborated the important principles accepted by teratologists for the impact of chemicals on embryonic development. The embryo, one of the most dynamic biological systems, is characterized by continuous cellular changes, and represents the most sensitive period of the life cycle in regard to harm from the environment. The embryo depends on nutrients received from its mother through the placenta, an organ which represents less a barrier than a sieve, since most drugs ingested by the mother have access to the fetus.

Experimentally, scientists have discovered hundreds of dysmorphogenic agents. The list includes X-rays, anoxia, viruses, endotoxins, and a large variety of poisons, therapeutic drugs, and industrial and agricultural chemicals. The medicines implicated range from hormones to cytotoxic antineoplastic drugs. But despite this imposing list of laboratory dysmorphogens, proof of such effects on the human embryo has been possible for only a few chemicals. The list of "proven" human dysmorphogens varies from expert to expert. Among pharmaceutical drugs, some teratologists list only thalidomide, androgens, virilizing progestogens and certain cytotoxic drugs. Others add anti-thyroid drugs and certain anti-convulsants. The list of "suspected" teratogens is much longer and includes oral hypoglycemics, salicylates, quinine and lithium, among others.

Why the striking discrepancy between the laboratory and the clinic? "Species difference" is always posited and is as true as it is unilluminating as an explanation. Another factor is the considerable difference between animals and humans with regard to daily dose of drug as well as route and duration of administration. A third factor is the imprecision of the epidemiologic method. Even thalidomide, which produced dramatic and unusual congenital anomalies with some frequency when taken at certain specific moments in early pregnancy, was not recognized promptly as a terato-

gen. The problem is clearly magnified when one considers very rare anomalies that are not dramatically noticeable. Such anomalies not only have to be dissected out from the "natural background of incidence" of 2-3% but then linked correctly to the cause, a process not helped by the propensity of pregnant women to take a significant number of prescription and proprietary medicines. One also has to be as precise as possible about the dates of exposure to a given chemical, since only those women exposed at the precise time when the embryo is genetically susceptible can be expected to give birth to deformed babies; all others exposed to the chemical merely dilute the data. It also does not help that a variety of teratogens may produce the same malformation, that a variety of malformations may be produced by the same teratogen, and that a teratogenic agent need not be deleterious to the maternal organism.

Furthermore, to all intents and purposes, dysmorphogens affect embryonic development in the first two months of pregnancy, during most of which time the woman does not even know she is pregnant, and hence is less likely both to be careful about drug intake and to remember it.

One must also avoid being misled into focusing exclusively on one drug, whereas other drugs may be the true villains (or at least pharmacologic co-conspirators). Such "non-drugs" as alcoholic beverages and cigarettes can harm the fetus in a variety of ways. So can exposure in the workplace to anesthetics or lead, or to food additives in the diet, or to toxic chemicals in the environment. Appropriate control populations, chosen and interviewed without bias, are also crucial to the validity of epidemiologic studies.

These latter problems can be exemplified by considering the difficulties in incriminating, as a teratogen, an anti-epileptic drug. It is not uncommon for severe epileptics to have their convulsions poorly controlled even while being treated with several different drugs simultaneously. There is thus not only the possibility of confusion as to the toxicologic cause if such a patient gives birth to a deformed child, but the chance that the anomaly may be the result of either inherent embryonic fault or damage subsequent to uncontrolled convulsions. What one would clearly like to have for controls are pregnant women equally epileptic but untreated with anticonvulsants, but such a group is impossible to find. Similar reasoning would apply to a child born to a woman treated for a severe infection or malignant hypertension during pregnancy.

Dysmorphogenesis is of course not the only reproductive hazard from drugs. Drugs can affect the ability to conceive and may cause abortion, premature birth, low birth weight, perinatal mortality and morbidity, cancer and functional effects. Diethylstilbestrol exposure in utero may show up as vaginal adenocarcinoma (or male reproductive abnormalities) many years later.

After the 9th week of pregnancy, embryogenesis is over,

but exposure to noxious factors can affect histogenesis, functional maturation, and growth. Indeed, even after birth, chemicals can have an impact on structural and functional maturation, especially of the central nervous, immune, endocrine, reproductive and drug detoxification systems. This has obvious implications for drug treatment of both the infant and the suckling mother.

While ordinary toxicologic evaluation of drugs in animals is generally thought to be in reasonably good shape, there is less agreement about teratogenic tests. The latter are usually performed on mammals, ordinarily rodents, but at times primates. Two species are considered minimal.

Phase I toxicologic testing addresses general reproduction and involves exposure of both males and females prior to mating, plus dosage of inseminated females during gestation and weaning.

Phase II involves treatment of pregnant animals during the period of organogenesis of gestation. Fetuses are delivered by cesarean section just prior to parturition.

Phase III emphasizes effects on later gestation and postnatal development. Pregnant females are exposed during the last third of gestation and through weaning. This phase addresses such problems as labor, delivery, lactation, neonatal viability, and development of both fetus and newborn.

In addition, some countries (like the United Kingdom, France and I believe Japan) have guidelines for special procedures to evaluate "behavioral teratology", i.e., postnatal behavior.

Continuous three generation reproduction tests, involving treated males and females, as well as treated males and untreated females, and vice versa, are also used, as are so-called "dominant lethal assays", in which male rodents are treated, then mated, and the number of dead or absorbed embryos that result from the pregnancy counted. This is considered to be in fact a test for mutagenicity.

Selecting the several dose levels to use in one's teratogenic battery of tests is not always easy. Too high doses will render the test useless by killing animals. Too low doses will not satisfy the regulatory agencies. Demonstrating dose-response relationships is important but not always achievable, and selecting a "safe" or "threshold" dose after the data are collected and analyzed is difficult even if one is philosophically convinced that straight-line relationships down to zero levels of drug intake are not inevitable.

False positives and false negatives abound. Once one has established that a drug is teratogen for man, it is usually possible to find, retrospectively, a suitable animal model. But trying to predict human toxicity---which is after all the purpose of screening---is quite another matter. Cortisone is a potent dysmorphogen in the rabbit and mouse, but does not produce malformations in the rat. Azathioprine is not a teratogen in the rat, but is highly dysmorphogenic in the rabbit. Carbutamide produces malformations in the eyes

of rats and mice but facial and visceral malformations in rabbits.

Furthermore, there may be no clear relationship between either chemical class or pharmacologic class and specific effects on the embryo. One hypoglycemic sulfonyleurea may cause a high percentage of malformations in animals while other drugs in this class have little or no dysmorphogenic activity. The same applies to antiemetic and cytotoxic drugs.

Even when the "right" species has been found to show concordance with humans, there is never concordance of dose. Humans are often twice to fifty times as sensitive, on a dose per weight basis, as experimental animals.

The data on testing of chemicals "known not to be teratogens in man" are discouraging. Of 165 such chemicals tested, only 28% were negative in all species tested, and 41% were "positive" in more than one animal species! These false positives included drugs like penicillin and cortisone. Even if one grants that some of these 165 might in fact be unappreciated low level teratogens in man, clearly there are a lot of false positives. This suggests that rejection of an innocent drug for spurious dysmorphogenicity can occur with some frequency.

For reasons both ethical and related to litigation, purposeful testing of new drugs on pregnant women is rare prior to marketing. In the U.S., one commonly sees, in the labeling instructions for health professionals, that the effects of the drug on fetal development are unknown. Therefore one is admonished either to avoid use of the drug in women known to be pregnant, or to use the drug only when the expected benefits outweigh the (unforeseeable) risks. This is not satisfying advice, because it does not really provide much guidance for the physician.

My own recommendation to pregnant patients is to avoid whenever possible exposure to known hazards (including alcohol and cigarettes) and indeed to chemicals of all sorts, incriminated or not. But when illness supervenes, why should a pregnant woman not be treated? Even with cytotoxic drugs, treatment after the first trimester is reasonably safe for the fetus, and it is unfair both to the mother and the child-to-be to let all pregnant women with (for example) Hodgkin's Disease go untreated until the end of the pregnancy or be aborted after cytotoxic treatment is given. Clomiphene therapy carries some risk of multiple pregnancy and of harm to the fetus, but the risks may seem tolerable to many women desperately eager to conceive. Quantitatively, maternal exposure to alcohol and to tobacco smoke seem far more serious risks to the fetus than exposure to therapeutic drugs. Some balance and perspective are needed by both physicians and their patients, so that a rational risk-benefit calculus can be constructed and utilized. An approach that deprives pregnant women of needed therapy is not in the public interest.

Let me now take up the more traditional forms of toxicologic testing. These are, as you know, required before the first human testing occurs. Whatever the limitations of animal testing, I do not at present foresee any likelihood that pharmacologists and toxicologists will forsake their usual rational approach, i.e., to identify some pharmacologic effect that is thought to be potentially beneficial in humans and then to see whether such a desirable effect is attainable at doses considerably below doses that are seriously toxic in animals.

The limitations on the utility of routine toxicity testing are not trivial. To begin with, no animal species is ever truly indistinguishable from the human. This is true for all sorts of reasons, including the fact that the human species, not being inbred, is very heterogeneous. Truly rare side effects in man cannot be predicted in animals even if there are no species differences unless high dosage levels in animal toxicity tests bring out adverse effects that will be seen only very rarely at low levels of dosing, a situation which does not invariably obtain.

Economic reality limits the number of species and animals to be used in preclinical studies, and it should also limit the duration of testing. Walker and some Swiss and German colleagues have, e.g., retrospectively surveyed data from chronic toxicity studies carried out on 40 pharmaceutical compounds by 19 pharmaceutical companies. No new salient toxicological effects were observed in tests of more than 3 to 6 months duration, with the exception of carcinogenic studies. Since no additional information was identified by dosing animals continuously for 12 to 18 months, as is so commonly done now, such long-term toxicity tests are difficult to justify.

As Zbinden has suggested, animal toxicity testing should be flexible, not rigid, and should focus on devising non-standard tests suggested by theory, chemical or pharmacologic class, or by feedback from preliminary animal or human studies. This distinguished toxicologist has also long advocated a cessation of traditional LD50 tests, arguing that such tests were a needless sacrifice of animal life, and did not add unique information. There is now finally a tendency to agree with this point of view, in part because of the pressure of animal welfare groups. The power of such groups in some countries is growing very strong, and must not be underestimated. They are capable of violence and physical harm to scientists and institutions. Some of their positions are valid and praiseworthy, but others are not, and if adopted would cripple scientific programs. It is desirable to ask what in vitro tests can be used to supplant animal tests, and no one can defend animal testing that is cruel, but it is foolish to suggest that we should avoid all use of animals in research.

The conventional animal toxicity tests tend to be similar in different countries, relying for the most part on re-

peated-dose toxicity in two species, usually rat and dog, with at least three dose levels, at least one level of which must cause toxicity. Despite their undisputed acceptance, one can question their ability to predict some human toxic reactions of great concern, e.g., such severe acute cardiovascular, nervous, hematologic and bronchopulmonary effects as anaphylaxis, hallucinations, asthma, and aplastic anemia.

The limitations in animal testing are reflected in the uncertainty as to how to estimate the starting dose in the first human volunteers to receive a new drug candidate. Surveys of clinical investigators reveal no unanimity in the method for picking this initial dose, although it is usually based on a fraction of the highest dose free of significant toxicity in the most sensitive subhuman species. There is also disagreement about the formula to be used for escalating the dose in these early human studies to ascertain the dose at which significant side effects are first seen. There is further disagreement about whether to use healthy volunteers or patients in such studies, how many subjects to use at each dose level studied, whether to use subjects only once or repeatedly, and what laboratory tests to use to monitor toxicity.

The cost of clinical testing and the time required to carry out such studies requires sponsors to select congeners carefully for human study, since it is usually necessary to narrow the family of compounds to one or two candidates. Subacute toxicity testing is generally adequate to allow these choices to be made, but once a drug has been found to have effects that are medically useful, and future application for registration is envisaged, chronic toxicity testing is of course required. I have already referred to the questionable utility of lifetime tests in rodents, both because little additional information is gained after 6 months, and because as the animals age, they begin to manifest diseases which are part of senescence rather than drug-related, but may be confused with the latter.

A special problem is posed by the fear of carcinogenesis, which has an irrational aspect that in many ways is out of all proportion to reality. Attempts to predict carcinogenicity by short-term, inexpensive tests for mutagenicity (such as the bacterial Ames test) are controversial, but insofar as I can tell the pharmaceutical industry in the US performs these tests as crude screens which are not necessarily predictive of carcinogenicity in humans but if positive tend to discourage further assessment of the chemical. It might be a serious loss if this approach killed for all time whole families of compounds, but the toxicologists and pathologists I have consulted tell me that usually some members of a chemical family can be found that are free of the stigmatization of a positive Ames test, and therefore these drugs are pursued rather than the related ones found capable of bacterial mutagenesis. In this connection, it is of interest that Ames himself has recently stressed that even the

production of cancers in animals cannot be used to predict absolute human risks, although such tests may be used to indicate that some chemicals might be of greater concern than others. Higginson has also recently commented on the public fear of carcinogens and reminds us that in practice the identification of definite carcinogenic risks for humans is dependent on epidemiologic studies. He states: "It is reasonable to accept that all animal carcinogens are not necessarily human carcinogens... and that levels of exposure exist below which the risk is trivial." It seems a pity that for something like hepatotoxicity or nephrotoxicity we are willing to accept safety margins but for something like carcinogenesis many tend to want guarantees of absolute safety.

Carcinogenicity testing also suffers from a failure to consider the logical statistical consequences of lifetime studies in animals known to develop cancers spontaneously. Control Swiss-Webster mice, for example, have been reported in three separate 14-month studies to show tumors in 15 to 26% of animals. The majority of these tumors were malignant. The incidence of tumors went up to 28 and 37% in three separate 24-month studies. Salsburg has analyzed the implications of such data. Let me quote him:

[In recent years] both new and old drugs have been subjected to a toxicology 'screen' involving a procedure which has never been fully evaluated to determine its relevance to man, which has a high probability of producing false positive results, and which adds about a quarter of a million dollars to the cost of a drug's development and up to three years of additional time on to that development. Not only is the procedure expensive and of unknown value, it also violates fundamental principles of good biological experimentation and it can easily produce results which cannot be analyzed without serious statistical bias and a resulting confusion between direct carcinogenesis and extraneous biological events.

This procedure has cast suspicion onto such marketed drugs as a widely used sedative (phenobarbital), the first line of defense in the treatment of tuberculosis (isoniazid), a standard treatment for trichomoniasis (metronidazole), a potent diuretic (spironolactone), and a whole class of psychotherapeutic agents (the phenothiazines). A poll taken at the Biopharmaceutical subsection of the American Statistical Association meetings in 1976 indicated that, up to that time, at least 10 new drugs had been withdrawn from investigation in the U.S. due to findings from such studies against less than 30 such studies completed.

Using a Monte Carlo computer simulation technique, Salsburg has calculated that 20-month feeding experiments in mice will yield false positive conclusions about carcinogenicity at least 50% of the time, as will two-year studies

in male rats.

Wilson and his colleagues at Harvard University last year reviewed the literature on dose-response relationships for carcinogens and concluded that very few epidemiologic data gave any useful information concerning this relationship. In large scale laboratory experiments (400 to 20,000 animals), different relationships have been shown for different tumors but the data are "necessarily limited in deciding between extrapolation formulae for use below 1% incidence." To quote these workers: "It is still an open question whether some, or most, of the known animal carcinogens produce cancer as a secondary result of their... non-carcinogenic toxic effects...."

Von Wittenau has recently asked the following three questions:

1. Is the (carcinogenic) dose within the pharmacokinetic range relevant to man?

If at low doses metabolic pathways are different from those at high doses, then at different doses different chemicals are tested. Which situation is relevant to man?

2. Does the dose provide a stimulus not likely to be exerted in man under foreseeable conditions of use?

As a variety of stimuli/mechanisms can elicit apparent tumor formation, the model becomes invalid once the animal experiences effects humans do not (excessive pharmacologic activity, toxicity, hormonal imbalance, etc.)

3. At what dose is the physiology of the medicated animals altered to such an extent that they can no longer be legitimately compared to the control animals? In testing an antibiotic, gnotobiotic animals are compared to those with a normal intestinal flora. Each population has its own background incidence of tumors. Which tumors reflect the altered physiological condition, and which result from chemical carcinogenesis?

It is of interest that the cooperative studies performed by the Japanese Ministry of Health and Welfare on the development of short-term tests for carcinogenicity concluded that only 20 to 30% of mutagens appeared to be carcinogens.

It is extremely important that we not be misled by mindless infatuation with the analysis of data in carcinogenicity experiments. I remember some years ago when I was asked to consult on the animal toxicity data in regard to a beta-blocker which in clinical trials had been definitely effective, even in some life-threatening situations. Meanwhile, the long-term carcinogenicity data began to be analyzed. There was a statistically significant increase in some kinds of tumors, a statistically significant decrease in other kinds of tumors, overall no change in total number of tumors, and a prolongation of life in the treated animals

as compared to the controls. The regulatory authorities considered the drug to be a carcinogen! Surely this is an example of silly statistics triumphing over common sense.

A special problem arises when an experiment ends with an incidence of tumors in the controls that is much higher or much lower than seen in past controls. Many investigators believe that the only proper comparison in an experiment is a comparison of the treated groups with concurrent controls. It seems, however, foolish to ignore historical data, especially when a certain tumor type has shown a wide variation in a given rodent strain and sex under the same conditions.

Let me now address some additional reasons why human adverse reactions to drugs are difficult to predict by animal tests, no matter how well done or interpreted. Some harm from drugs is clearly related to genetic factors. Canadian workers, e.g., have identified a human genetic defect in the detoxification of arene oxide metabolites of phenytoin that predisposes to the hepatotoxicity, bone marrow aplasia, and skin reactions that can occur in patients taking this medicine. The toxicity of D-penicillamine or gold treatment seems related to specific human leukocyte antigen (HLA) configuration. The development of proteinuria during D-penicillamine therapy, e.g., correlates significantly with the presence of antigens DR3 and B8, whereas DR2 appears to protect against this side effect. Thrombocytopenia appears to be associated with antigens A1 and DR4.

But there are many other reasons why human toxicity can only partially be predicted from animal testing. Allergic and dermatologic reactions are traditionally missed in animal testing. The interaction of disease with drugs, or of one drug with another, cannot be readily studied in the laboratory. Some human toxicity is related to materials other than the drug itself, such as dyes or excipients. Some drugs are formulated with 1 or 2 dozen excipients added. Lockey has reported that the drug product Premarin, which in addition to the estrogens contains at least 28 other chemicals, of which 6 are potential sensitizers.

In evaluating cause-effect relations for adverse drug effects in humans, problems abound. In controlled trials with placebo controls, there is the same opportunity as in animal experiments to distinguish between spontaneous or psychologically induced events and those related to the chemical. But much of the reported toxicity arises from clinical observations in uncontrolled conditions. Since it is almost impossible to think of a drug-related adverse effect that cannot be mimicked by spontaneous disease, the opportunities for confusion are evident. Sometimes one can be relatively certain, as in so-called "dechallenge-rechallenge" studies, where the suspected drug is stopped and then restarted, but such procedures are invoked in only the minority of reported cases.

It is for these reasons that even experienced clinical pharmacologists, faced with a given patient, may disagree

considerably as to whether an adverse drug effect has occurred at all, let alone what drug (of the many often being taken simultaneously) was the culprit. Several groups (including my own) have proposed algorithms for assessing such suspected cases, but these algorithms are primarily useful in providing check lists of factors to be kept in mind when making a judgment.

Furthermore, even when the fact has been established that a specific adverse effect can be produced by a drug, we often do not know the quantitative dimension, which is the information we really need. To practice medicine optimally, we need to know with reasonable precision not only the risks of the disease, but the risks associated with the several therapeutic options available. To acquire this information requires good pharmacoepidemiologic data, and it is my strong belief that we need such data in advance of any adverse publicity, since a handful of clinical reports may be enough to start a political or media attack on a drug which may prevent (or at least make difficult) sober judgments.

There may be new problems ahead for us as we develop new biotechnology products, since small amounts of immunogenic material may be difficult to detect, yet may be of clinical importance.

It should also be remembered that experts often disagree, even when given the same data base. A case in point is the Depo Provera story. This injectable progestational agent has for years been licensed for sale in many countries. But in the US and the UK the drug had not, until recent years, been considered for approval as a long-acting contraceptive. In the UK and the US, expert panels of inquiry were set up to advise their respective governments on this point. With exactly the same data base, and with systems of medicine remarkably similar in quality and philosophy, diametrically opposite conclusions were reached by the two countries' expert panels. The British panel concluded that there was no evidence that the medicine was a carcinogen under conditions of use in humans, and therefore should be registered for contraceptive use, whereas the American panel concluded that such approval would have to wait until data could be accumulated proving it was not a carcinogen in humans. I believe that these opposing conclusions are primarily related to the differing regulatory philosophies in the two countries; the British tend to consider a drug innocent until proven guilty, whereas Americans tend to consider a drug guilty until proven innocent. Logically, of course, the British are on firmer ground, since it is impossible ever to guarantee that a drug is not, in some patients, capable of being a carcinogen, or a teratogen, or a hepatotoxic, etc., etc.

Let me close with a few general remarks:

1. The goal of risk assessment and risk management should

not only be to minimize harm but to maximize benefit.

2. In assessing risks, we need to keep clearly in mind what is fact and what is speculation or value judgment.

3. If scientists look at the same data and come to different conclusions, we need to try to explain (or at least analyze) the disagreement.

4. Laboratory studies that cannot be replicated must not suffice to stigmatize a chemical for all time.

5. Epidemiologic data, while admittedly on average less precise than laboratory data, are usually more relevant to the question of human risk. Furthermore animal models unvalidated by human data are only models whose utility remains questionable.

6. Trying to estimate "zero risk" levels of exposure to toxic chemicals is both scientifically difficult and intellectually unsatisfying. No technique can establish the guaranteed absence of toxic effect.

7. In banning a pharmaceutical compound or an industrial chemical that is not yet in use and for which other chemical candidates for the same putative use are readily available, it may well be socially desirable to err on the side of avoiding toxic hazard and assume that the animal data are predictive of human toxicity. When considering a ban on a chemical in use and of demonstrated social value, it should be mandatory to compare estimates of putative harm with facts about actual benefit.

8. The field of toxicologic prediction, like the field of drug regulation, is not static, but constantly evolving. We must therefore periodically reexamine even the most dearly held and respected principles of our science, so that we can revise our standards and our scientific posture if the facts demand such a change.

経済学からみた医薬品開発

藤野志朗

中央大学・経済学部

§ 1. 医薬品産業と研究開発

医薬品の問題を考える場合、その研究開発を含め医薬品産業を取りまく諸条件（基礎条件）、医薬品産業の市場構造、その市場行動及びその成果を検討しておく必要がある。

まず、医薬品産業の基礎条件であるが、これにはわが国の経済水準や社会的諸構造、さらには薬事法や健康保険法などの諸法律、また、医療の仕組みや医療行政（とくに医療費抑制政策）などがある。実際、これらの基礎条件を構成する諸要因のどれか1つが変化すると、それが医薬品産業の構造や行動に影響を与え、ひいては医薬品の研究開発に影響を与えることになる。

医薬品産業の基礎条件として、この外に注目しておかねばならないことは、医薬品という製品の特性である。医薬品の製品特性が他の製品の場合と著しく異なるということが、医薬品産業の行動等に深くかかわっている。これについては後述する。

医薬品産業を取りまく基礎条件の中で、医薬品産業の姿（市場構造）がおのずから決ってくる。医薬品を製造するという視点からのみ見れば、医薬品は必ずしも大企業の巨大設備を必要とせず、中小零細企業でも十分生産することができる。これが1500社とも2000社ともいわれる多数の企業が存在する理由であり、企業数が多いということは、それだけ競争が激しいことを意味し、それだけ大手企業の集中度も低いことを意味している。実際、わが国の医薬品産業では大手上位10社の売上高集中度は約37%にすぎない。ちなみに合成繊維産業ではそれは約88%であり、カメラでは98%である。そして、これらのことは、この産業へ他からの新規参入が容易であることを

示している。大小又新旧の多くの企業が激しい競争を行なっているのがこの産業の市場構造である。この競争的市場構造をもつということは、それだけ製品のライフ・サイクルを短くすることになる。これは又医療費抑制政策で薬価基準が大幅にカットされる状況のもとで、企業が薬価の下がった製品から、マイナーなモデルチェンジをしたいわゆる新製品へと製品構成を変化させることによって起こっている。

このような基礎条件と市場構造の結果が新薬開発（R&D）に大きく影響することは当然である。これはいわゆる企業の市場行動への基礎条件と市場構造がもたらす影響である。市場行動は大きくわけると、製品政策、販売政策および研究開発政策の3つである。

この3つの政策のうち、ここでは研究開発政策をとりあげる。医薬品産業が競争的市場構造をしていることが、研究開発に大きく影響している。良い意味では企業の自由な創意工夫で新薬開発を行ない、それが健康に寄与することであろう。しかし、市場が競争的であるが故に、マイナーなモデルチェンジを目標とする研究開発をも刺激していることは事実である。

この研究開発には医薬品産業の基礎条件の幾つかが直接影響を与えている面も大きい。

薬事法による種々の規制、又、ダブルブラインドテストやフェーズIからIVまでの治験、更には申請手続、承認に至るまでの期間、薬価基準収載までの期間、等々が医薬品の研究開発に大きく影響をもっている。

このような市場構造の結果として、医薬品産業の成果が生じる。産業の成果は通常、利潤率やときには成長率等で評価される。しかし、医薬品産業の場合、その成果をこのような経済学的基準によって評価はできず、それに更に、医学的薬学的基準を必要とする。これが他の産業と異なるところといえよう。

§ 2. 医薬品の特性とその研究開発

医薬品産業は技術集約型産業である。それは、mg単位の製品の中

に大変大きな情報が入っていて、そのような製品をつくる産業は技術集約型、知識集約型産業とよばれるにふさわしい。

さて、医薬品は体内に投与されたとき、疾患部のみに選択的に作用して他の細胞や臓器には何らの作用もせず、中立的であるということとはありえない。これが医薬品の特性である。このことは医薬品の評価としての有効性と安全性という概念にむつかしい問題をなげかけるものである。

この両規準を満たす新薬の開発が望まれるとしても、もともと安全性という概念が明確でないのであるから、医薬品の研究開発は著しく困難であって、大変リスクである。

研究の着想の段階から、計画、実施治験、販売にいたるプロセスにおいて周到で慎重な意志決定を必要とする。そしてその成功には偶然ともいえる幸運にめぐまれる必要がある。換言すると、膨大な費用と長期間の研究開発を必要とする医薬品の成功率はきわめて低いということである。

このような状況のもとで、医薬品の研究開発にインセンティブを与えるものは成功報酬として利潤であろう。これに関連するものの1つは特許であり、他の1つはわが国では薬価基準制度である。医薬品の場合、研究開発の期間が長く、特許を申請してからそれが実際の製品として市場に投入される期間が長引く可能性が大きい。また、新薬の価格は原則として比較薬効主義をとっているので、その対照薬の価格が、薬価規準制度のもとで、その新薬が日の目を見る数年先には下落している危険性が高い。わが国では、これらの問題について国が幾つかの対策を実施している。たとえば、1つは発売後の6年間の副作用調査期間であり、また1つには新薬の価格決定におけるメリット方式である。

真に有効な（コスト・エフェクティブな）新薬の開発は、逼迫する国家財政と目前に迫る高齢化社会を迎えて、その緊要性はますます高まっているし、それは又資源の効率的利用の視点からも望まれるところである。

§ 3. 医薬品とレギュレーション

医薬品に対する規制は諸々のものがある。たとえば、GMPやGLPもその1つであり、ダブルブラインドテストもそうである。また、医薬品の処方に関する諸々の規制（投与方法、投与量、投与期間等）もある。副作用モニタリングシステムも広い意味では規制と考えられよう。

ここでは諸々の規制を含め、若干漠然とはしているが、レギュレーションという言葉を使うことにしよう。

レギュレーションの強化は医薬品が本来的に人体に対してもつリスクのレベルを下げるのであろうか。リスクのレベルを規制するようなレギュレーションの存在は、本来リスクは少なければ少ない程よいのに、その許容レベルまでリスクを高めてもよいということになるのではなかろうか。また、どの程度のリスクなら認め、どの程度のリスクなら認めないといったことを科学的に立言することは極めて困難ではなかろうか。そうはいつてもレギュレーションの必要性は認めざるをえないであろうが、その場合、何か問題が発生したとき、レギュレーションの存在自体が、国や企業のエキスキューズになる可能性もあるのではないか。

レギュレーションが困難であるのであれば、企業がある程度の経営上のリスクを覚悟して新薬の研究開発と販売に当り、もしそれに成功すれば、国民もその企業も共に便益を享受し、もし逆になんらかの作用の高い医薬品を開発した場合は損失というペナルティを企業が負担する。即ち、レギュレーションをある程度ゆるめ、企業の自己責任にある程度まかせるという方向は考えられないものであろうか。それらの医薬品を実際に患者に投与する医師も自己責任を負うことになるが、いずれの場合も、企業のエシックス、医師のエシックスの確立が必要である。

レギュレーションの強化か、提供者のエシックスの強化か、いずれがよりよく効率的に国民の健康に寄与しうるのかの検討が必要である。

THE R & D OF PHARMACEUTICALS FROM THE ECONOMIC POINT OF VIEW:
Shiro FUJINO (Faculty of Economics, Chuo University, 742-1
Higashinakano, Hachioji-shi, Tokyo 192-03)

(1) Considering on the R & D in the pharmaceutical industry from the economic point of view, the basic conditions and the market structure of the industry must be clarified. One of the major factors among the basic conditions has been the cost containment policy, resulting in cutting down the "Yakkakijun" (the NHI price of drug). This has been influenced the behavior of the enterprise about the R & D.

The market structure has been so competitive that the share of sales of top three and/or ten companies has been declining for these twenty years or so. The severe competitiveness makes the enterprises to invest large sum of money to the R & D for their survival. On the other hand, the R & D in case of pharmaceuticals is believed to be very risky.

(2) The main reason comes from the characteristics of pharmaceuticals themselves. Pharmaceuticals, once they are given into the human body, have some effects to the part of disease. Could they be neutral to the other part of the body? The answer is "no". No enterprise can find new compound which has some favorable effects to some part and, at the same time, has little effects to other part of the body.

(3) Then, these characteristics of pharmaceuticals raise other issue, namely, the way of government regulation on pharmaceuticals and the drug industry. There are lots of regulation on pharmaceuticals. Does regulation contribute completely to produce medicines which are effective and safe? There might be possibility that once the government has set the level of risk, the enterprise and/or the government are apt to use the regulation as an excuse when some unfavorable effects of medicines appear. There needs a lot of discussion on the balance between the regulation of the government and the decision making of the enterprise on effectiveness and safety of pharmaceuticals.

シンポジウム

テ ー マ：長期毒性-----その考え方と評価

司 会：金戸 洋（長崎大学薬学部薬物学教室）

井上 尚英（産業医科大学産業生態科学研究所環境中毒学教室）

はじめに：金戸 洋

シンポジウムは「長期毒性---その考え方と評価」という題ですが、これは昨年の本学会において「急性毒性」が一応目安がつけましたので、今回は長期毒性を企画させて頂いた次第です。長期毒性はわからないところが多く、新薬開発のガイドラインによりまして、一般毒性の中に亜急性毒性あるいは慢性毒性があり、その他特殊毒性として、発癌あるいはアレルギー、免疫、依存といったいろんな問題が取り上げられています。また、長期ということが、いわゆる急性とどれだけ違うのかということもはっきりしませんし、そういう背景をふまえて、各方面の先生方に長期毒性というものの考え方をお伺いするというのが、今回の企画であります。

現在、新薬を開発するという以外にも環境中毒や産業医学的毒性といった問題があり、たとえば最近、新聞紙上を賑わわせているアスベストの長期毒性もこれに含まれます。そういったいろんな意味で長期毒性が問題となっています。それらの考え方、また、短期（急性）のものと長期のものをどう考えたらよいのかというだけでなく、長期毒性を短期でみる方法にはどのようなものがあるかについての考えをも聞かせて頂けるものと思っています。

今日のところは、シンポジウムなので考え方をお話頂いて、細かいテクニックについては、明日のワークショップでディスカスして頂きたいと思います。

長期毒性検索の方法論的展望

柳田知司

(財)実験動物中央研究所附属前臨床医学研究所

はじめに

長期毒性とは化学物質を長期間投与したときにみられる毒性である。「長期」の厳密な定義はないが、一般には慢性毒性や発癌性などがこれに該当するものと思われる。しかし、今回のシンポジウムのように、急性毒性もしくは短期毒性という概念にに対比させていう長期毒性の場合には、数週間以上の反復投与によりみられる毒性、たとえば亜慢性毒性なども含めてよいと考えられる。そこで、以下、このような観点から長期毒性検索の方法論を、1) 長期毒性試験の種類、2) 長期毒性の検出方法、3) 長期毒性評価の基本的原則、および4) 長期毒性試験の問題点、の4つのテーマに分けて展望してみたい。

1. 現行長期毒性試験の種類

医薬品などの化学物質の長期毒性の検索にはいろいろな種類の試験が行われている。これらの試験は、主として薬物投与期間、薬物投与経路、および、検索の目的とする毒性の種類から呼称が定められている。

1) 一般毒性試験

投与期間からは、亜急性・亜慢性・慢性・毒性試験などと呼ばれる。この中、亜急性と亜慢性は同義語として用いられる場合が多いようであるが、厳密には亜急性は2回以上数週間（たとえば4週間）までの反復投与、亜慢性は数週間ないし数か月間（たとえば6か月以内）の反復投与を指すものと考えられる。投与経路からは、経口（胃内、強制嚥下、餌・飲用水への混合など）・皮下・筋肉内・

腹腔内・静脈内投与毒性試験、経皮・経粘膜毒性試験、および吸入毒性試験などがある。

2) 特殊毒性試験

毒性の種類別では、一般毒性（全身に対する全般的毒性）試験の他に、これだけでは十分に検出できない毒性として各種の特殊毒性試験がある。これらには、発癌性（癌原性とも呼ばれる）・生殖毒性（催奇形性や繁殖毒性など）試験をはじめ、薬物投与部位に及ぼす影響を調べる局所刺激性試験、薬物に対するIgG、IgE抗体などの産生の有無を調べる抗原性試験、紫外線照射による皮膚刺激性の増強やアレルギー性などを調べる皮膚感作性試験、環境化学物質の自然界の動物などに及ぼす影響をみる神経毒性試験、および中枢神経系に作用する医薬品で問題となる薬物依存性試験などがある。もっとも最後の依存性試験については、筆者はこれを毒性試験とみるよりは、中枢薬理作用試験とみるほうが妥当と考えている。

2. 長期毒性の検出方法

薬物の長期毒性を検出する方法としては、物理的指標の計量、生活状態の観察、生理学的指標の検査、生化学的指標の検査、および形態学的異常の観察などがある。

1) 物理的指標

物理的指標の計量としては、体重、摂餌量、および臓器重量などの測定がある。体重や摂餌量は薬物投与開始前から剖検までの変化が定期的に追跡され、また臓器重量は剖検時に測定される。

2) 生活状態の観察

生活状態の観察は、運動性、食欲、糞尿の性状、体毛の光沢、血色、流涎涙などについて行われ、動物の健康状態あるいは病的兆候が調べられる。また、生殖試験などでは交尾、分娩、哺乳、新生仔の行動などの生活状態も観察される。

3) 生理学的指標

生理学的指標の検査では、心電図や血圧などの循環機能、ERGや聴覚などの感覚機能、血液の性状や凝固機能など、また、特殊な

生理学的指標として免疫機能などが検索される。

4) 生化学的指標

生化学的指標の検査としては、血清臨床生化学検査、尿検査、抗体力価の測定、酵素活性の測定などが行われる。

5) 形態学的指標

形態学的異常の観察としては、投薬期間中の眼底カメラや細隙灯などによる眼検査や臓器のバイオプシーによる組織学的検査をはじめ、剖検時の臓器の肉眼的病理観察、およびその際採取した臓器の光顕・電顕による組織病理学的検査などが行われる。

これら各種の測定・観察・検査によって薬物の長期毒性が検出されるが、その方法は実に広汎多岐にわたり、広い学際領域の専門的知識と技術が必要とされている。

3. 長期毒性評価の基本的原則

長期毒性検索の意義は、いずれの化学物質の場合でも究極的にはそれによってヒトにおける安全性を確認し、または予測することにある。最終的に知りたいことは、

- 1) ヒトでは安全か否か、
- 2) もし安全とすれば摂取量や期間など、どのような条件下で安全といえるか、
- 3) もし危険とすればどのような条件下でどのような危険が考えられるか、
- 4) その危険は生命にかかわったり不治であったりしないか、
- 5) どのような点に注意すれば危険が起こった場合の早期発見が可能か、

というような点である。これらに答える情報としては、

- 1) 動物でみられる毒性の種類および投薬条件と毒性発現の有無強弱の関連性、
- 2) その投薬条件における化学物質の動物体内動態とくに血中濃度、半減期、および主要代謝物と毒性との関連性、
- 3) 毒性および体内動態に関する既知化学物質との比較、
- 4) 毒性および体内動態に関する動物種差、

などがの情報が必要とされ、これに基づいてヒトへの外挿が行われる。

4. 長期毒性試験の問題点

現行の各種長期毒性試験における問題点を表1に掲げる。

A. 試験法に関する問題

試験法に関する問題として、投薬条件の設定、動物の選択、代替法の開発の3点について考えてみたい。

1) 適正な投薬条件の設定

適正な投薬条件の設定は毒性試験における最重要事項の一つである。投薬条件とは、投与経路、用量、投与方法、投与期間や頻度などを指す。原則としては、ヒトに摂取されるのと同じ投与経路、毒性の特性とその発現閾値用量が把握できる用量、およびヒトに摂取される期間の毒性が十分に検出できる投与期間を設定する。しかし、各種の薬物にはそれぞれ、薬理・毒作用特性や物理化学的性状、剤形、吸収性、あるいはヒトへの摂取のされ方などに相違があり、必ずしも画一的な基準では妥当性を欠く場合が少なくない。た

例えば長期毒性試験の用量設定には、すでに実施されている亜急性毒性試験の結果や、もし臨床第一相試験が行われている場合にはヒトの血中濃度との対応を念頭において設定する必要がある。そうでないと、薬物によってはヒトでの実態から著しくかけ離れた非現実的な試験に終わって役に立たないことがある。

長期毒性試験の問題点

A. 試験法に関する問題

1. 適正な投薬条件の設定
2. 適正な種属と動物数の選定
3. 代替試験法の開発
4. 機能障害検索の強化
5. 薬物体内動態の把握

B. 試験成績評価法の問題

1. 特異的、非特異的毒性の判定
2. 種特異的異常反応の評価
3. 動物とヒトの毒性関連性の確立

C. 倫理的問題

1. 不要な試験と動物数の削減
2. 試験の重要性和苛酷性の均衡
3. 不安・苦痛軽減の努力

D. その他

1. 専門家の育成と資格認定
2. ガイドラインの適正な認識
3. 従事者の事務仕事量の軽減

2) 適正な動物種属と使用動物数の選定

次に、適正な動物種属と使用動物数の選定の問題がある。一応の目安はガイドラインに示されているが、これについても最終的にはヒトの薬物体内動態や反応特性を参考にして、ヒトに近似した動物種属を選び、毒性の発現や対照群との差が十分に把握できる数の動物を選ばなければならない。しかし、近似しているといってもなおかつ動物とヒトの間には大きな種差があるので、動物では毒性の定性的評価は大体可能であるとしても定量的評価まではなかなか困難と思われる。このような状況下で毒性発現の確率論から試験にはなるべく多数の動物を用いることが望ましいとする考えには、その外挿上の意義という点から疑問の余地があるとおもわれる。

3) 代替試験法の開発

代替試験法の開発という問題は、今後の毒性評価に課せられた大きな課題である。最近はこの方面の研究はとみに活発になってきたが、未だ長期毒性試験の完全な代替となるほどの有力な方法は開発されていない。しかし、将来は *in vitro* の短期試験の結果を薬物の体内動態などからシミュレーションして少なくとも動物レベルでの長期毒性の予測には十分実用の関に達する方法が確立されて行くものと考えられる。

4) 機能障害の検索

従来の長期毒性の検索では形態的異常に重点が置かれ機能障害の検索は等閑視されがちであった。これは、機能障害検出の技術的な困難さと重篤な病変は形態的变化として捉え易いことによるものであろう。しかしこれからは精神機能の障害などにも目を向けて行くことが必要になると思われる。

5) 体内動態の把握

薬物の毒性の評価に体内動態の把握が重要なことはいうまでもないが、問題は何時の時期にどの程度詳しく調べる必要があるかであろう。医薬品の場合には、一応、薬効の見通しが立って亜急性毒性試験によりまずは安全性の第一関門を通過した頃に、血中濃度の推移と主要代謝物および主排泄経路の概要が把握できれば、ヒトでの第1相単回投与試験の結果と比較して、以後の長期毒性試験や薬

効試験の計画を立てる上に非常に参考となろう。現在のところ、実際にはなかなかここまで手が回らない場合が多いが、将来は優れた簡便な測定技術が開発されて、動物実験そのものに比べると、割合手軽に測定が可能になるのではないかと考えられる。

B. 試験成績評価法の問題

さて、毒性試験によって得られたデータを、どう評価するかという点にも種々の難しい問題がある。

1) 薬物による特異的変化と非特異的変化の鑑別

まず第一に、ある異常な変化がみられた場合にそれを使用した薬物による特異的な毒性変化と、薬物が大量に投与されたため、あるいは薬物の物理化学的性状により起こる非特異的な毒性変化との見分けの問題がある。また、ときには人為的に起こった測定機器の操作の誤りや被験薬と試薬との干渉、あるいは組織標本の作製過程で混入したアーチファクトなど偽りの異常変化もある。通常は、薬物の作用特性や類似薬での知見、あるいはいくつかの指標の変化の関連性および用量相関などから判断されるが、ときにはその判定が極めて困難な場合もある。最近はこの面の研究も目醒ましい進歩を遂げつつあるが、依然として毒性評価の上の大きな問題であることに変わりはない。

2) 動物の種特異的毒性変化

ある薬物の毒性評価の上で最も当惑するのは、ある特別の種族の動物のみに特異的に毒性変化が現れる場合である。このような変化は概してイヌに出やすくサルに出にくい傾向がある。嘔吐、血清アルカリフォスファターゼの上昇、肝細胆管の増生、冠動脈からの出血、ときに角膜や水晶体の混濁など、イヌにだけみられることがある。嘔吐は別としても、その他の変化は軽視できない病変であるだけに評価が非常に難しくなる。イヌやラットだけにみられる変化であるとしても、それがヒトで絶対に起こらないと保証はない。この問題の解決には、次の項で触れるとおり、いろいろな薬物について動物での結果とヒトでの結果との関連について沢山のデータを積み上げていくより他に方法はないであろう。

3) 毒性に関する動物とヒトとの関連性

既述のとおり、少なくとも医薬品の場合には毒性試験実施の最終目的はヒトにおける安全性の予測にある。そこで動物でみられる毒性がヒトではどのような変化として現れるか、その質的ならびに量的関連性を把握する必要がある。外挿の基本原則は、薬物の毒作用に対する生体諸臓器の感受性と薬物体内動態に関する動物間および動物とヒトとの種差を、既知のデータを参考にして予測することにある。一般に、毒作用の標的臓器など臓器感受性については動物とヒトとで類似する場合が多く、一方、薬物の体内動態については一致しない場合が多い。したがって、動物でみられたのと同様の毒性がヒトに発現する条件の予測には、見かけ上の用量ではなく、主要代謝物の質的量的相違および薬物の血中濃度で比較した用量比を考慮することが大切である。毒性に関する動物とヒトとの関連性については、例えば塩基性抗炎症剤やアミノ配糖体抗生物質のごとく、それぞれの種類の薬物についてある程度共通した関連があることが知られているが、これとても全ての薬物にいえるという保証はなく、未だ断片的な知見が得られているに過ぎない。この点について国立衛生試験所の林病理部長はデータバンクを設けて動物にみられる毒性とヒトにみられる毒性との関連性に関する情報の蓄積を提唱しておられるが、これは薬物の毒性研究に課せられた今後の重要課題の一つと考えられる。

C. 倫理的問題

最近動物実験にも倫理的配慮が強く望まれるようになってきた。ヘルシンキ宣言以来、人体実験には厳しい倫理的配慮が必要とされるようになり、さらにGCP (good clinical practice) では新薬治験におけるその一層の強化が目指されている。そのため、動物における毒性試験にはますます高レベルかつ綿密な試験が要求されるようになってきている。しかし、ヒトでの安全性の保証のためなら動物をいくら犠牲にしてもよいという訳にはいかず、動物実験においても動物を扱う上に人間らしい配慮が必要とされ、そこに動物実験の倫理が存する。

1) 不要な試験と動物数の削減

動物実験の倫理の基本は使用動物数の削減と苦痛の軽減にある。

近年、ヒトでの安全性の保証が強く求められるに至り、しばしば不必要に多数の試験が行われ、あるいは多数の動物が用いられる傾向にあることは憂慮さるべき問題である。薬物の製造、登録などの承認や許可に必要とされる毒性試験の種類が、個々の薬物の毒性学的特性とは無関係に定められているために、薬物によっては明らかに不要と思われる試験も行わなければならないことがある。例えば、生物活性が非常に低い物質で亜急性毒性試験でなんらの毒性もみられないような場合の慢性毒性試験などがこれに該当しよう。また、発癌性試験をマウスとラットの両方で行うことが世界の趨勢であるが、多数の小動物を用い二重に試験を行うことが、試験に用いられ非現実的な用量や動物とヒトとの種差の大きさを考えると、ヒトでの安全性の予測にどれほど役に立っているのか疑問を抱かざるを得ない。また、統計学的見地から毒性試験を科学的に行うために多数の動物が必要とされることについては、いくら動物実験のレベルで厳密な科学性が維持されても、その結果のヒトへの外挿に厳密な科学性が確立されない限り、あまりヒトでの安全性の予測には役立つとはいえず、両者の精度のバランスを考慮する必要があるだろう。この好例を従来のLD50試験にみることができる。

2) 試験の重要性和苛酷性のバランス

動物実験の倫理はけっして人体実験の倫理に優先するものではないが、さりとして後者のために前者を無視してよいというものでもない。ある種の薬物安全性の予測には苛酷な実験も避け難い場合があるが、このような実験は必要最小限度にとどめるべきであり、それを実施することがどれだけヒトでの安全性の予測に重要不可欠なものであるかということとの相対的な問題として苛酷の程度に関する倫理的許容性が与えられる。

3) 不安・苦痛軽減の努力

動物を試験に供する際、取り扱い者は常に動物の不安や苦痛を減らすよう配慮する必要がある。例えば、動物にとって不慣れな場所に置く時間はなるべく短くし、また、痛みを伴う操作には、実験に支障を来さない範囲で鎮痛剤や麻酔剤などの投与を考慮する。

D. その他

1) 毒性試験従事者の育成と資格認定

今日では亜急性、慢性、生殖などの各試験で詳細な観察や検査が必要とされているが、薬物の毒性学的特性によってはこのような観察や検査は全く無意味な場合が少なくない。このような無駄は、研究者が個々の化学物質の作用特性をよく把握して、どのような情報が必要かを判断できる力を備えていれば省くことができる。しかし、現行のガイドラインでは研究者の判断に委ねられる余地が少ない。これは世界的にいえる傾向で、それだけ未だ毒性試験従事者のレベルが低いとみなされていることが一因と思われる。このことは、世界各国のGLP規則（または基準）の内容からも窺い知ることができる。したがって毒性試験従事者の養成が急務とされているが、それには、毒性学および毒性試験技術の教育システムを確立すること、知識および技術習得の社会的評価として資格認定制度を設ける必要があると考えられる。資格は研究者と技術者に分け、研究者はさらに毒性病理や毒性薬理あるいは毒性発生学などの専門領域に細分することが考えられる。

2) ガイドラインの適正な認識

毒性試験のガイドラインについては、新薬開発の担当者や行政の関係者あるいは毒性試験従事者の間に誤って認識されていると思われるケースにしばしば遭遇する。ガイドラインはあくまでも指針であって法律でも規則でも基準でもない。しかし、一部の関係者にはこれを動かし難い絶対的なものとして必要条件のよりどころとしている場合が見受けられる。この傾向は諸外国におけるよりも我が国において特に顕著である。確かにガイドラインが絶対的なものでないことは我が国の毒性試験指針の冒頭にもうたわれているが、日本人の規則に従順な国民性の故か、その断りを額面どおりに受け入れる人は少なく、絶対的なものと解釈している人が多い。しかし、このような解釈はガイドラインの適正な運用を欠くものであり、お互いにもう少し柔軟な態度で臨むべきと思われる。ただし、ガイドラインから外れる場合には、その必然性の科学的根拠がなければならぬことは言うまでもない。

3) 試験従事者の事務作業量の軽減

GLPが施行されて以来、試験従事者の事務作業量は著しく増大

し、ときには飼育・実験・検査などに従事する時間よりも書類整備の時間のほうが多いと云っても過言ではないほどになりつつある。限られた人的資源の有効的な利用と毒性試験を魅力ある仕事にする上に大きな弊害となっている事実を見逃すわけにはいかない。事務作業をすることが魅力を無くしているのではなく、あまり意味がないと思われる形式を整えるための作業に多くの時間を費やさなければならぬことにやり甲斐のない空しさを感じられるのである。この点はいずれ将来改善されて行かなければならない実際的に重要な課題と考えられる。

おわりに

以上、長期毒性試験の方法論的展望を試み、併せてそこに見出される問題点について私見を述べた。毒性試験になんらかの拘りを持たれる方々に少しでも参考にしていただければ幸いである。

METHODOLOGICAL CONSIDERATION OF LONG-TERM TOXICITY OF DRUGS
Tomoji YANAGITA (Preclinical Research Laboratories, Central
Institute for Experimental Animals, Nogawa, Kawasaki 213

Drug toxicity is the property of chemical substances to produce adverse effects in the living organism, although identification of the effects can be difficult. Long-term toxicity refers to the toxic effects observable with long-term administration of a drug, where "long-term" usually indicates a period of several months or more. However, when used in contrast to acute toxicity, the toxicity developed by drug administration for several weeks or more may also be implied.

Long-term toxicity is generally assessed by subacute or chronic toxicity testing. In such tests, gross behavior, body weight, and food-intake are observed and examinations of such items as hematology, serum chemistry, urinalysis, eye, ECG, and blood pressure are conducted during drug administration, while at the end of this period, necropsy and organ weight, macroscopic, and microscopic examinations are conducted. These are the basic methods to assess long-term toxicity, but some aspects of the toxicity such as carcinogenicity, reproductive toxicity and teratogenicity, antigenicity, photo-sensitizing effect, and dependence-producing property may not be satisfactorily assessed by such testing alone.

The ultimate purpose of the toxicity assessment is to predict the safety of a drug in human. The questions asked here are: 1) Is the drug safe in human?; 2) If safe, under what conditions?; 3) If dangerous, what toxic effects appear at what dose regimen?; 4) Are the effects life threatening or incurable?; and 5) Are methods of early detection of the toxic effects available? For this sake, such information as follows must be obtained: a) Type of toxicity and relationship of dose to occurrence and severity in animals; b) Pharmacokinetic data, particularly on blood level and half life of the drug; c) Comparative data on above items a) and b) with known reference drugs; and d) Species differences in the toxicity and pharmacokinetics. The safety is evaluated by extrapolating these data to human.

If one reviews various currently used long-term toxicity tests from the above viewpoint, more information on the relationship between toxicity and pharmacokinetics and on species differences may be needed. In contrast, many or all observations and examinations can be avoided for a certain test if the needed information is available elsewhere. For example, when a drug is found to have no observable toxicity at sufficiently large doses in a subacute toxicity test, the chronic toxicity test may be omitted. Likewise, the significance of using both mice and rats in carcinogenicity tests is doubtful. Ideally, selection of the type of test and items to be observed and examined should be made based on the bioactivity characteristics of each drug and by considering what information is needed for the extrapolation. For this purpose, an appropriate extrapolation methodology must be established.

長期毒性—その考え方と評価

薬理学的立場から

高 仲 正

国立衛生試験所・安全性生物試験研究センター・薬理部

はじめに

諸化学物質を長期間にわたって投与し、生体に与える有害作用を生理学的、生化学的、病理学的手法を用いて、形態および機能面から調べ、さらにその作用機序を解明するには、非常に広範囲にわたった検討が必要である。この過程を作用未知の化学物質について考えるとガイドラインに従った毒性試験とその結果をもとにした毒性学的研究に分けられる。

毒性試験法ガイドライン

化学構造およびその作用が全く異なる種々の化学物質について、機能面および形態面からみて多種多様に発現する可能性がある毒性の種類と強さを、全て明らかにし得るような試験項目を網羅した試験法を規定することは困難である。従って、使用目的毎に諸化学物質に対して基本的に必要な共通性のある検索方法が各毒性試験法ガイドラインとしてまとめられており、毒性を解明する上ではスクリーニング試験として位置付けられる。

長期毒性の期間

医薬品、食品添加物、農薬、飼料添加物、化審法による化学物質に関する各試験法ガイドラインに規定されている各試験のうち長期毒性に含まれるものとしては慢性毒性、癌原性および多世代試験があげられる。このうち、癌原性試験の期間については各試験法ガイドラインともほぼ同一の期間を指定しているが、慢性毒性試験は、対象としている化学物質の使われ方により、異なった期間が規定されている。ラットを例にとると、医薬品では予測臨床使用期間により6ヶ月または1年、農薬では24ヶ月、化学物質では12ヶ月以上とされている。このように長期毒性の期間については一定の期間を示すものではなく、試験する化学物質の使用目的によって、6ヶ月から2年の間に定められている。

薬理学的立場からみた慢性毒性試験

医薬品、食品添加物、農薬、飼料添加物、化審法による化学物質に関する各毒性試験法ガイドラインをみると、長期毒性に関する試験は各ガイドラインともほぼ同様な検索項目が示されている。この検索項目を生理学的、生化学的および病理学的検索に分けてみると、類似の方法で広範な変化に対応しうる病理学的検索に重点が置かれていることがわかる。例を医薬品の慢性毒性試験にとると、小動物を用いる試験、大動物を用いる試験とも、その検索方法には血液生化学的検査を除くと生理、生化学的手法を用いる検索は少ない。機能障害に関連するものとしては、一般症状、尿検査、眼科的検

査および「必要があればその他の臨床検査」を行うと述べられているに過ぎない。これについては以下のことが考えられる。

① 各ガイドラインとも、化学構造、生物活性が異なる種々の化学物質についてその毒性を調べる必要から、基本的に必要な共通性のある検索方法を示したものであり、実際に試験を行うに当っては、個々の化学物質について必要と考えられる検索方法を追加することを前提としている。

② 現在の毒性試験にはラット、マウス等の小動物が多く使われているが、これらの動物に対して検査による影響を与えない状態で採取し得るサンプル量は限られており、生化学的諸検査を多項目にわたってある頻度で行うことは難しい。

③ 長期毒性は動物を長期間にわたって良好な状態で飼育することに重点を置いているため、バリヤーシステムの導入等により動物と実験者との接触を出来るだけ少なくする方向で進められている。そのため一般症状を毎日観察する以外は、体重、摂餌量は1～4週間に1回、尿検査、眼科的検査は数ヶ月に1回の間隔で行うほかは、主として屠殺時に行うように定められている。従って、種々の測定機器を用いて生理学的手法によりその影響を調べるような試験は組み込み難い。

しかしながら、長期毒性試験からより多くの情報を得るためには、試験に当って類縁化合物の化学構造や作用機序から推定して予測される作用、殊に機能上の障害を検出し得る生理学的、生化学的検索項目を追加して行う必要がある。

機能障害に関する試験

化学物質によって引き起こされる機能的障害を生理学的手法を用いて調べる試験としては、毒性試験とは別に薬理学的試験が各ガイドラインにあげられている。すなわち、医薬品では「一般薬理」、農業では「生体の機能に及ぼす影響」、化審法による化学物質では「薬理学的試験」がそれであるが、何れも毒性試験に見られるような試験方法の詳細は定められていない。

一般薬理

医薬品における薬理試験は、効力を裏付ける試験と一般薬理に分けられている。このうち一般薬理は多くの場合、図1に示すような範囲の試験が行われており、①毒性薬理的見地からの試験 ②臨床上の副作用、有害作用を予測する試験 ③臨床で認められた副作用に関連した試験を含んでいる。

図 1

一般薬理

中枢神経	腎機能・尿排泄
自律神経・平滑筋	肝機能・胆汁排泄
体性神経・骨格筋	内分泌
呼吸・循環	視覚・聴覚
消化器	局所麻酔
血液	抗炎症

このうち①の試験結果は機能障害性を調べたものとして毒性試験の一部と考えられるが、多くの場合は単回投与または短期間の投与によるもので、長期毒性に対応する試験はほとんど行われていない。以下に図1中の主な項目についてそれぞれどのような試験が行われているかを示す。

中枢神経に関する試験

中枢神経に対する作用を調べる試験としては、図2に示すような試験が多く行われており、これらの項目のうちには長期毒性を調べる試験方法として採用し得る試験方法も多く見られる。

図 2

項目	方 法	動 物 種
一般症状		マウス、ラット、イヌ、サル
自発運動	回転カゴ、アニメックス	マウス、ラット
協調運動	ロータロッド	マウス、ラット
条件回避反応	シャトルボックス、ボールクライミング	ラット
催眠作用		マウス、ラット
睡眠延長作用	ペントバルビタール、ヘキソバルビタール	マウス、ラット
尿液	急性、慢性	ウサギ、ネコ
脊髄反射	単シナプス反射、多シナプス反射、後根反射	ラット、ネコ
筋弛緩作用	懸垂法、傾斜板法	マウス、ラット
痙攣作用		マウス
抗痙攣作用	電気刺激、ペンテトラゾール、ストリキニーネ	マウス
嘔吐作用		イヌ、サル
制吐作用		イヌ、サル
鎮痛作用	酢酸、正、熱板	マウス、ラット
体温（正常、発熱時）	直腸温	マウス、ラット、ウサギ

呼吸・循環に関する試験

呼吸・循環系に対する作用を調べる試験としては図3に示すような試験が多く行われている。これらの項目のうち、動物に外科的侵襲等を与えないでそのまま行えるようなものは、

一部すでに長期毒性試験で行なっているものもある。

図 3

呼吸・循環

項目	動物種
呼吸	ラット, ウサギ, ネコ, イヌ
血圧	ラット, ウサギ, ネコ, イヌ
心拍数	ラット, ウサギ, ネコ, イヌ
心電図	ウサギ, イヌ
摘出心臓	ウサギ, モルモット
摘出心房	モルモット, ラット, ウサギ
末梢血管	ウサギ, ラット, ネコ
血流量	イヌ, ネコ

その他の試験

自律神経・平滑筋、体性神経・骨格筋および消化器に対する作用を調べる試験としては生体位および摘出器官、組織を用いる方法が多く行われており、長期毒性試験に適用するためにはより適切な試験方法の開発が必要である。また、血液、肝、腎機能等に対する試験としては、図4に示すようなものがあり、この中には既に長期毒性試験に組み込まれているものもある。

長期毒性における機能障害試験

今迄に、現行の毒性試験ガイドラインによる長期毒性試験では、薬理学的立場から見て機能障害性を調べる試験が形態的变化を主とする病理学的検索に比べて不十分であることお

図 4

	項 目	動 物 種
血 液	血液凝固	マウス, ラット
	溶 血	ウサギ
腎機能	尿 量	ラット, イヌ
	尿中電解質	ラット, イヌ
	PSP 試験	ラット
肝機能	胆汁分泌	ラット, ウサギ
	BSP 試験	ラット
内分泌	ホルモン測定	ラット, イヌ
視覚・聴覚	耳介反射・網膜電図	ラット, ネコ
局所麻酔	表面・浸潤	モルモット, ウサギ
抗炎症	カラゲニン	ラット

よびその原因について述べ、さらに機能的障害を検索する方法として一般薬理において現在行われている方法の概略を紹介してきた。

一般薬理で用いられている各試験は、主として短期の反応をみるために開発されてきたもので、長期毒性を調べる試験法としては不十分なものも多く、このままでは長期毒性試験に組み込み難い。試験目的に合った適切な方法の確立が必要である。

現行の長期毒性試験の中に機能障害を検索する試験を組み込む場合、以下の方法が考えられる。

- ① 被験物質に必要な方法を選択・開発し、ラット、マウス等の小動物を用いる試験の中に加える。
- ② イヌ、サル等の大動物を用いる試験を整理し、種差を調

べる部分以外は、これを機能的变化を中心に検討するものとし、死に至るまでの変化を多角的に追跡し得るような検索項目を主体とする。

③ ガイドラインの中にある薬理学的試験を充実し、長期投与による機能的变化を充分検索し得るようにする。

①については先にも述べたように、現在バリエーションシステムをとっている所が多く、また動物の大きさ等からみても困難な問題が多い。②はバリエーションシステムをとっている所は少なく、従って動物と実験者との接触を密に出来ること、サンプル量が多く得られることおよび多くの項目について十分な観察・検査が行えることより、今後充分に検討し得るものと考ええる。③については、医薬品等では現在薬理部門で行っており、毒性部門に組み入れるには種々の難しい点を含んでいるように思われる。

非臨床各試験の関連性

医薬品を例にとると、動物を用いる非臨床試験は図5に示すように、薬理、毒性および薬物動態（吸収、分布、代謝、排泄）試験に分けて行われている。しかし、これらの各試験は相互に深い関連性を持っており、各試験結果は相互の関連性の上で評価せねばならない。薬理と毒性はともに被験物質によって引き起される生体の反応を追跡しているものであり、相互の関連性を十分に考察したうえ、同一の基準に従って評価すべきである。また、薬物動態は生体における被験物質等の動態を調べるもので、薬理作用や毒性を考えるうえで非常

LONG-TERM TOXICITY; CONSIDERATION AND EVALUATION, FROM PHARMACOLOGICAL VIEWPOINT: Akira TAKANAKA (Div. of Pharmacology, Biological Safety Research Center, National Institute of Hygienic Sciences, Setagaya-ku, Tokyo 158)

In the established toxicity guide-lines for drugs, pesticides, food additives and commercially available chemicals, there are similar test procedures and test items in the long-term toxicity studies. On the basis of experimental techniques, most of the test items are supported by morphological and pathological examinations, since these are useful and appropriate techniques to detect any unexpected changes produced by the chemical.

In long-term tests for drugs, the guide-line specifies the animal species (rodent and non-rodent) used. But similar test procedures and items are carried out on both species, because the guide-line might be prepared for a wide variety of drugs.

Pharmacological examinations based on physiological techniques are designated as observation of symptoms, urinalysis and ophthalmological test. The reasons of this are as follows:

- 1) The test items have been designated as common and essential ones, since the drugs to be tested may have different chemical structures and a variety of biological activities. Adequate test items for proposed drug use should be added to the procedure.
- 2) In rodents, biochemical examinations are restricted due to limited amount of sample which can be obtained without influencing the animal.
- 3) In long-term tests, care should be taken to prevent animals from infection. Most of the tests are conducted in barrier systems, and the contacts between animals and persons in charge of the test are decreased.

In the evaluation of the data, qualitative and quantitative changes of physiological functions in the animals caused by the test chemicals will provide very important information on the toxicity. Additional test items based on physiological and biochemical techniques must be conducted on the long-term tests in non-rodents or primates to clarify the physiological dysfunctions and how they relate to toxicity in the evaluation of animal data.

Both toxicological and pharmacological data should be evaluated by the same criteria and in the same logical framework. In addition to the evaluation of all pharmacological and toxicological data, results of pharmaco-/toxico-kinetic studies will provide useful and important information on the process. The data will also support the extrapolation of animal data to man.

長期毒性—その考え方と評価 病理学的立場から

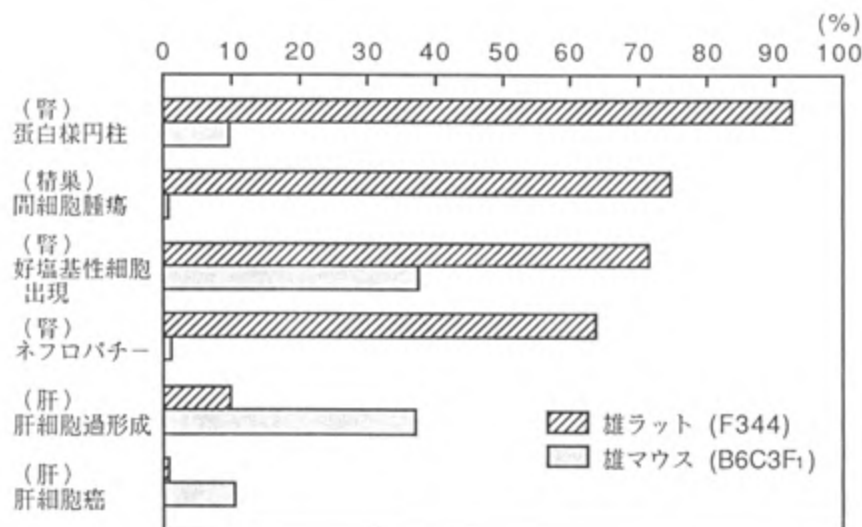
伊東信行

名古屋市立大学医学部第一病理教室

環境中に存在する化合物、特に医薬品、農薬、食品添加物などのヒトにおよぼす毒性を評価するためには主としてラット、マウス、ハムスターなどのげっ歯類を用いた長期毒性試験が不可欠である。そして、その化合物の毒性は発癌性を含めて最終的に病理組織学的検索によって判定されている。長期毒性試験に際しての問題点とそれに対する我々の対応について述べてみたい。

第1には動物の種による変化の差異であろう。例えば、毒性変化の比較的出現しやすい腎では、次ページの表に示す様に、ラットの場合蛋白様円柱のほか、糸球体硬化、色素沈着等がよくみられるのに対し、マウスではこれらの変化は少なく、逆に尿細管の空胞変性がよくみられるようになる。腫瘍性病変としては精巣の間質細胞腫瘍がある系のラットでは高頻度にみられるのに対し、マウスではほとんどの系でみられないなど動物種による差がかなり認められる。このことは長期毒性試験や発癌性試験の際動物種や系の選択が重要であることを意味している。特に発癌性試験の場合、異なった2種

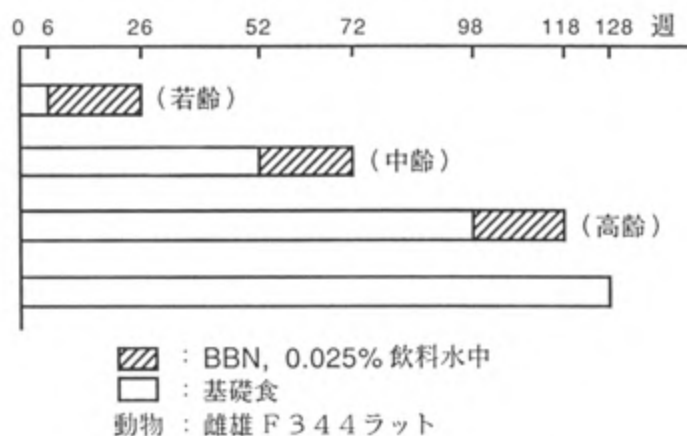
以上の種—例えばラットとマウス—に発癌性が証明されているかどうかはその物質の発癌性評価の際、特に重要視されている。



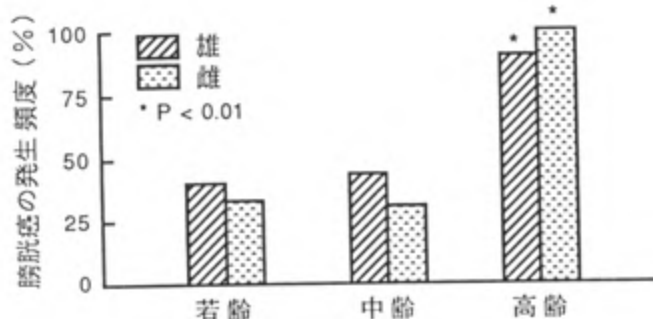
自然発生病変のラットおよびマウスによる種差

第2は、動物即ち宿主側の条件についてである。一般に動物の加齢により被検物質に対する感受性は大きく異なることが知られている。例えば、我々の行った実験（次ページ上段の図）で、6週齢（若齢）、52週齢（中齢）そして98週齢（高齢）のF344雌雄ラットに膀胱発癌物質であるN-Butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN) をそれぞれ20週間づつ経口投与すると、膀胱癌の発生頻度は、雌雄とも若齢ラットや中齢に比べて高齢ラットで明らかに高く（次ページ下段の図）、BBNに対する感受性は高齢ラットの方が高いことがわかる。このように、長期毒性試験を評価する場合は、動物の種、系、さらに加齢など実験に用いられている動物の宿主側の条件

についても十分に検討する必要がある。



ラット膀胱発癌における加齢の影響

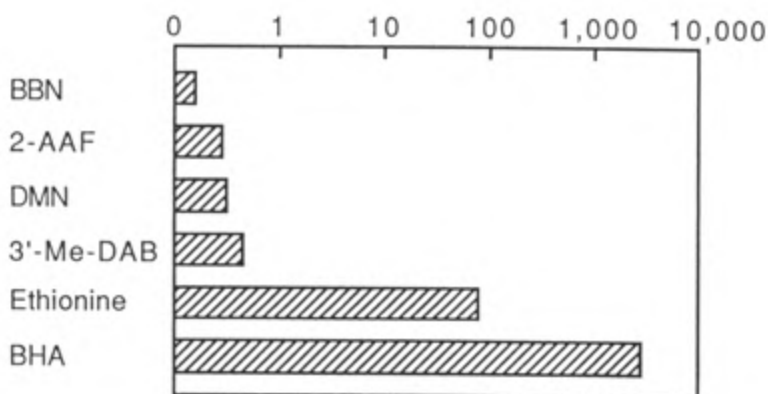


ラット膀胱発癌における加齢の影響

第3は、動物による長期毒性試験、特に発癌性試験の成果が国際的に評価されるための条件であろう。これは次のような条件が満たされていることが要求されている。即ち、1)行われた試験が国際的に確立された長期試験法の指針に依っていること。2)発癌性陽性と

するには次の4つのうち少なくとも1つが満たされていること。(a) 対照群にみられないタイプの癌が実験群に認められる場合。(b) 対照群にもみられる癌であるが、実験群でははるかに高率に認められる場合。(c) 対照群にみられるより多くの臓器や組織に癌が発生する場合。(d) 実験群における癌の発生時期が明らかに早い場合。3) さらに次の基準のいずれかが充分であることも要求される。(a) 複数の動物種で認められること。(b) 複数の系の動物において認められること。(c) 複数の実験において認められること、などである。しかしながら、ここで注意を要する点は腫瘍性病変の可逆性変化についてである。例えば、酸化防止剤であるButylated hydroxyanisole (BHA)をラットに104週間投与すると前胃に扁平上皮癌が発生すが、これを72週間のみの経口投与とすると上方への強い乳頭状の増殖と、基底細胞の真皮への浸潤性増殖がおこるが、BHAの投与後24週間基礎食にもどすとこれらの変化のうち、基底細胞の増殖は残存するが、乳頭状の増生は殆ど消失しする。同様な変化はUracil投与したラットの膀胱上皮でも認められる。Uracilを15週間経口投与すると膀胱結石が多数見られ、膀胱上皮は全体に乳頭状の増生がみられ、いわゆる乳頭腫症の状態となる。しかし、Uracilの投与を中止するとこれらの変化は消失し、ほぼ正常の膀胱上皮にもどる。即ち、BHAやUracilの投与によって生じた乳頭状の細胞増殖の多くは可逆性の病変であったことになる。同様な変化は長期毒性試験の場合もしばしば見られる可能性があり、注意を要する点であろう。

第4に、発癌性試験を評価する場合に、その発癌性の強さを量的に評価する方法としてTD₅₀を用いることがある。これは検索物質を2年間与え続け、50%の動物にその病変を発生させた場合の一日の摂取量のことである。さらに、より正確にその化合物の発癌性を量的に評価するにはVSD (Virtually Safe Dose) が用いられている。これは10万分の1あるいは100万分の1の危険度というきわめて低率での発癌の可能性のある量を意味し、その化合物の危険性を量的に評価する指針として用いられている。VSDをone-hitモデルをもとに算出すると、強力な肝発癌物質であるAflatoxin B₁の発癌性はSodium Saccharinの1億倍の強さを示すことになる(図下参照)。



化学発癌物質の実質安全量 (VSD : 10^{-6})
(One hit modelにより算出)

最後に、長期毒性について問題となるのは、被検物質相互間に認

められる加算効果や相乗効果が認められることであり、これらの作用は多くの物質で証明されており、被検物質の毒性や発癌性を評価する場合、忘れてはならない点であると言えよう。

以上、長期毒性、特に発癌性の評価に際しての問題点を述べてきたが、発癌性の有無を判定するには、変異原性試験などの短期検索法によるスクリーニング法と長期発癌性試験によって最終的に判定されている。しかし、変異原性と発癌性がかならずしも一致せず、問題が残されている。そこで、両者の中間的存在で、より正確に発癌性を早期に予測する中期動物試験法の開発が各方面からの要望となってきた。我々もラット肝の前癌病変を指標とする方法、膀胱や各種臓器の前癌病変や腫瘍性病変を指標とする方法など被検物質の発癌性を早期に推定する方法を開発してきた。その場合、肝の前癌病変の指標酵素としては、胎盤型Glutathione S-transferase (GST-P) を、胃の前癌病変の指標としてPepsinogen isozyme Pg 1 低下幽門腺を免疫組織化学的に検出して用いている。また、膀胱の前癌病変としては乳頭状または結節状過形成などを指標として用いている。中期発癌性試験法として単独投与方法の他、肝の二段階法を応用した種々の方法が試みられている。IARCで動物に対する発癌性が明らかでない65種の化合物の標的臓器を解析すると52%が肝を標的としており、次に多い前胃の23%、乳腺、肺の各22%等と比べて頻度が高く、したがって肝の変化をみれば発癌性の有無判定の大半はカバーできる可能性がある。その点、肝の変化を応用したこれらの試

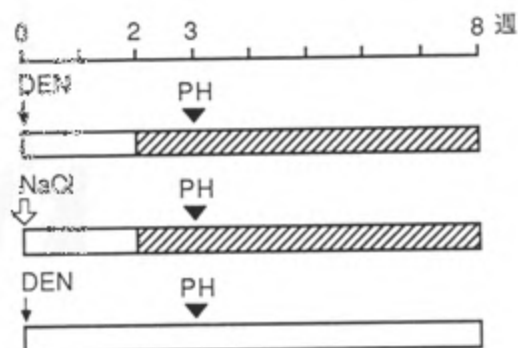
験法は検索法として有利と言えよう。名市大法はそのなかでも期間が8週間と短く、また十分なデータが得られており、中期検索法として確立されつつある。

中期発癌性試験

(観察期間)

I. 単独投与法		
(1)	マウス皮膚塗布法	10～50週
(2)	A系マウス肺腫瘍法	24週
(3)	SDラット乳腺腫瘍法	40週
(4)	皮下投与法	20～40週
II. 二段階法(肝)		
(1)	Lans 法	20週
(2)	Pitot 法	32週
(3)	Williams 法	34週
(4)	Peraino 法	39週
(5)	名市大法	8週
III. 多臓器標的法		
(1)	MNU法	20週～36週

次ページの図上は名市大法を示す。実験法としては6週齢の雄F344ラットを用い、Diethylnitrosamine (DEN) 200mg/kg を腹腔内投与し、2週目より6週間検索物質を投与する。途中実験開始3週目に2/3 肝部分切除を行う。DENを投与しない群、検索物質を投与しない群を対照群とし、いずれも8週間で屠殺剖検し、肝を免疫組織化学的にGST-P 染色し、発生したGST-P 陽性細胞巢を画像解析装置をもちいて計測後、単位面積当たりの個数ならびに面積を算出し、対照群と比較検討する。これまでに得られた結果を次ページの表下



6週令雄F344ラット

↓ DEN; 200 mg/kg 体重, 腹腔内注射

↓ NaCl; 生理食塩水, 腹腔内注射

▼ PH; 肝部分切除

■ ; 検索物質

中期発癌物質検索システム (名市大法)

名市大肝二段階法で検索された112化合物の陽性率 (%)

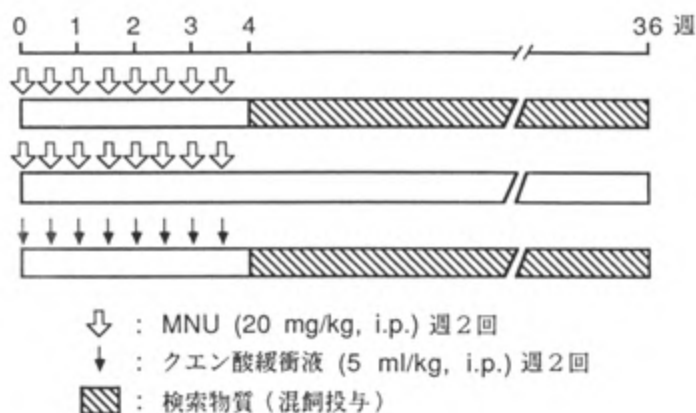
検索物質	変異原性			合計
	+	-	?	
肝発癌物質	10 / 11 (90.9)	11 / 13 (84.6)	0 / 0 (0)	21/24 (87.5)
発癌物質 (肝以外)	1 / 10 (10)	1 / 6 (16.7)	0 / 1 (0)	2/17 (11.8)
非発癌物質	0 / 5 (0)	0 / 16 (0)	0 / 2 (0)	0/23 (0)
未知物質	1 / 6 (16.7)	5 / 23 (21.7)	4 / 19 (21.1)	10/48 (20.8)

* Diaminodiphenylmethane (DDPM)

** Clofibrate, Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)

に示す。肝発癌物質は変異原性の有無にかかわらず87.5%の化合物が陽性となった。前述のように発癌物質のうち肝発癌物質はその約52%を占めており、そのほとんどを検出できるこのシステムは実際面での応用が可能であると言える。また、非発癌物質について陽

性を示した化合物はなく、偽陽性は皆無であり、この点は検索法として究めて重要な点であるといえる。しかし、肝以外の臓器に標的性を示す発癌物質の陽性率は約11%であり、このような発癌物質を検出するシステムとしては改良の余地があろう。そこで肝など単一の臓器を指標とした方法ではなく、肝、膀胱、舌、前胃、腺胃、小腸、大腸、肺、甲状腺など広範囲な臓器に変異細胞を発生させ得るN-methyl-N-nitrosourea(MNU)を用いて、多臓器病変を指標としたシステムを開発している。この方法を下の図に示す。その結果、名市大の肝二段階法では陽性とならなかった発癌物質、特に肝以外に標的性を示すような発癌物質も陽性となり、より広範な発癌物質の検出に応用が可能となろう。



多臓器病変を指標とした名市大法

このような中期発癌テストは次ページの表にあげるような利点があるが、特により多量の物質での発癌性の検索が可能となる点は重

中期発癌テストの利点

1. 長期発癌実験の結果を短期間に予測出来る。
2. 発癌性が示された場合その発癌量を想定しうる。
3. 前癌病変を指標とするため偽陽性や偽陰性例が極めて少ない。
4. 検索物質が少量ですむ。
5. 発癌性検索に必要な動物数を少なくする事が可能になる。
6. 費用、時間とスペースの節約が出来るため、より多数の物質での検索が可能となる。

要であろう。検索を必要とする化学物質は著しく増加しており、それに要する動物の数は膨大なものとなっている。また、その施設にも限界があり、より多くの化合物の発癌性を検索するためには、最終判定までに三年近くかかる長期発癌性試験での限界は明らかである。従って、中期発癌試験法の開発は必須の事項であり、名市大法にさらに改良を加え、より良い発癌性検索法となるよう、開発を急いでいる。

EVALUATION OF TOXICOLOGY OF LONG-TERM ANIMAL EXPERIMENT:
PATHOLOGICAL ASPECTS: Nobuyuki ITO (Dept. of Pathology,
Nagoya City University Medical School, 1 Kawasumi, Mizuho-
cho, Mizuho-ku, Nagoya, 467)

Long-term animal toxic studies of environmental chemicals, especially drugs, agricultural chemicals and food additives, are required for the evaluation of toxicity to human by those chemicals. This evaluation, including that of the carcinogenicity of the compound, is done by pathological study. It is very important that there is species differences in spontaneous pathological changes. For example, in the kidney, that is often seen the toxic changes by a compound, proteinaceous casts, sclerosis of glomeruli and deposition by pigment are often observed in aged rats. However, these changes are not often seen in aged mice, and the vacuolations of tubules are seen in the kidney of mice. Among neoplastic lesions, interstitial cell tumors are common in rats, but in mice, those tumors are very rare. So there are big species differences in the spontaneous changes. Furthermore, same changes are seen in different strains, even in the same species. These findings show that the selection of animals, i.e. species and strains, is very important for the evaluation of toxicity by a compound. It is important for evaluation of carcinogenicity of a compound that there are two different carcinogenic studies using two different species, i.e. rats and mice.

The next important factor for the evaluation of long term toxicity is the selection of dose. If dose related study is required, at least 3 different doses are necessary. For the decision of the maximum dose, the dose is chosen that does not show severe toxic effects, but shows biological effects by that compound, and is less than 5% in the diet. Another choice of a dose is MTD, that is maximum tolerable dose. There is not established period of the animal experiment for toxicity study, i.e. 1 year, 2 years, 24 to 30 months or until the time when the survival animals become 20%.

In order to internationally recognize, the results of a long-term toxicity study, especially of a carcinogenic study, the following items should be clear: 1) the study was done by using international standard procedures, 2) in order to show the carcinogenicity of a compound, at least one thing from following items should be matched, a) unique neoplasias are observed in experimental group that is not seen in control group, b) significantly higher incidence, c) more variations are seen in different organs, d) tumors in experimental group are observed earlier, 3) furthermore, if one of next items is observed, the result is more reliable: 1) tumors are seen in different species, 2) in different strains, 3) in different experiments.

For the qualitative evaluation of toxic and/or carcinogenic effect of a compound, TD50 is sometimes used. It is the dose that is one day intake volume that induces tumors

in 50% animals after 2 years administration. For more precise presentation, VSD, virtually safe dose, is used. This is a dose that induces tumors in 1 per 100,000 or 1,000,000 animals. According to VSD, Aflatoxin B1, that is potent liver carcinogen, has 100,000,000 times stronger activity than that of sodium saccharin.

Another factors for evaluating toxicity are summational and synergistic effects by compounds each other. And aging of animals is also important factor for evaluation. So is necessary to discuss about animal conditions as well as the effects by chemicals.

Finally, short-term in vivo bioassay system, that can be predictable the result of long-term animal experiment, is required. These short-term systems have been establishing in our laboratory, that are using preneoplastic changes of liver, bladder and other organs. The merit using these short-term systems, that can be predictable the long-term animal study, will be discussed.

長期毒性—その考え方と評価— 臨床の立場から

上田豊史

九州大学医学部泌尿器科

一般臨床の場合において、化学物質による長期毒性は、医学的、社会的に多くの問題を含んでいるが、臨床の一部門である泌尿器科という立場より次の2点について述べてみる。

1. 尿路性器癌化学療法における慢性毒性と“匙加減”

基礎的研究の結果、慢性毒性の発生が予測される薬剤を治療上使用せざるをえない場合、その毒性をいかに予防しながら、治療効果をあげるかということが、臨床上重要な問題となる。尿路性器癌化学療法にたずさわっている臨床家にとって、制癌剤は癌細胞に対する効果とともに、正常組織に対しても強い毒性を有していることが大切である。このような点からも、尿路性器癌化学療法において、慢性毒性の発生を最小限におさえ、擁腫瘍効果をいかにあげるかという、薬剤投与時における“匙加減”が重要である。

通常、癌化学療法において制癌剤が投与される場合、正常の腎機能あるいは肝機能を持ったものとして、投与量、投与間隔が説明されている。しかし、実際の臨床の場合において、たとえば、腎毒性を有する制癌剤を腎機能が障害されている患者に対しても、使用せざるをえない場合があり、その際、薬剤がどのような薬理動態を示し、体外へ排泄されるかを熟知し、患者の腎機能を十分に考慮して制癌剤を投与することが必要である。

近年、開発された制癌剤であるシスプラチンは泌尿器科をはじめ各科領域で広く使用されているが、本剤は腎毒性がdose limiting factorとして指摘されており、本薬剤をモデルとして、これ

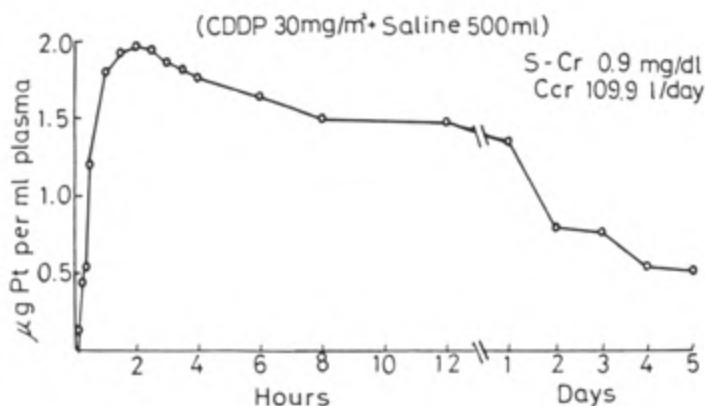


図1 血中Pt濃度の推移

らの点につき臨床成績を示す。正常腎機能者における、シスプラチン $30\text{mg}/\text{m}^2$ を1回投与時の血中濃度の推移では、投与5日後においても血中に残存しており、その減少はゆるやかであり、反復長期投与時において注意すべき点である(図1)。また正常腎機能者における、シスプラチン $20\text{mg}/\text{m}^2$ を5日間連続投与時の血中濃度の推移では、経日的に上昇しており、さらに3週間後の2コース投与時には、1コース投与時に比較して、若干の上昇傾向を示していた。一方 $\text{Cr}1.4\text{mg}/\text{dl}$ 、 $\text{Ccr}68\text{l}/\text{day}$ と軽度腎機能障害者における、シスプラチン $10\text{mg}/\text{m}^2$ の5日間連続投与時の血中濃度の推移では、あきらかに経日的に上昇しており、薬剤の体内蓄積による慢性毒性の発生の危険性を示唆していた(図2)。このような成績からみても、腎毒性を有する薬剤を臨床的に使用する際、その薬理動態を十分に知った上で、投与量、投与間隔を決定することが重要である。

次に、実際に臨床の場においてシスプラチンを反復投与する際の投与総量と腎機能の変化を血中PSP濃度の推移を示す。

PSP_{60} とはPSP静注60分後の血中PSP濃度であるが、これは採尿を必要とせず、 Ccr および尿中PSP排泄15分値と相関する腎機能検査法で、正常値は $100\mu\text{g}/\text{dl}$ 以下である。臨床的には、正常シスプラチンの1回投与量は $30\sim 50\text{mg}/\text{m}^2$ であるが、総投与量の増加とともに、腎機能は低下する傾向を示しており、この結果からも、長期投与による腎毒性の発生の危険性が示唆された(図3)。

次に、腎機能障害者に対し、シスプラチン投与時の腎機能の推移を示す。 $\text{Ccr}40\sim 80\text{l}/\text{day}$ と軽度腎機能障害を有する4例に対し、シスプラチン $15\sim 30\text{mg}/\text{m}^2$ と投与量を減らし、週1回、

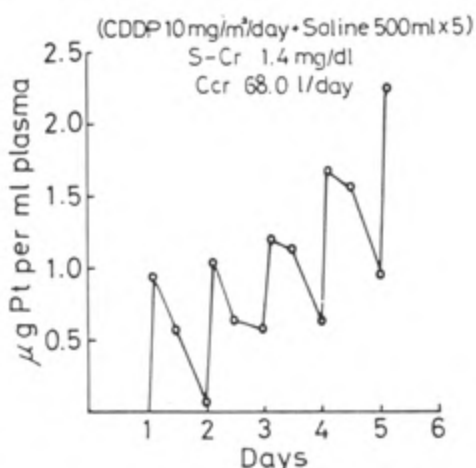


図2 血中Pt濃度の推移

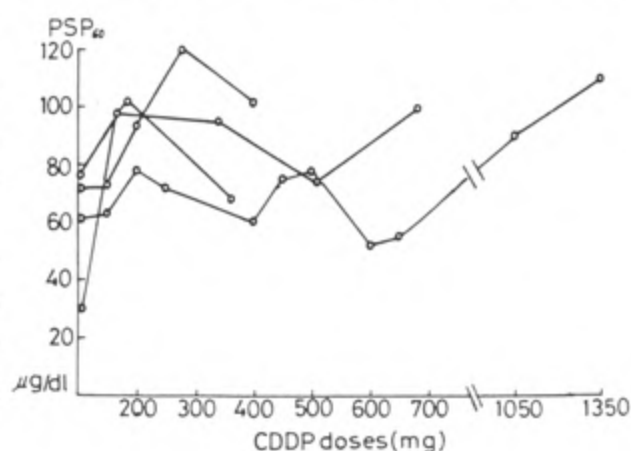


図3 CDDP投与量と PSP_{60} の推移

最高10回まで反復投与した際のCcrの推移をみると、1例が10回目にCcr25l/dayと低下しているが、他は投与前と変化はみられなかった(図4)。一方Ccr50~80l/dayと軽度腎機能障害を有する2例に対し、シスプラチン10mg/m²と減量し、5日間連続投与を3週間毎、3回投与した場合のCcrの推移をみると、一過性に低下がみられたが、可逆性であり、投与前後において差はみられなかった(図5)。このように腎機能障害者に対して、投与量を減らし、投与間隔を考えたながら、慎重な腎機能の評価を行ない慢性毒性の発症予防をすることが必要である。

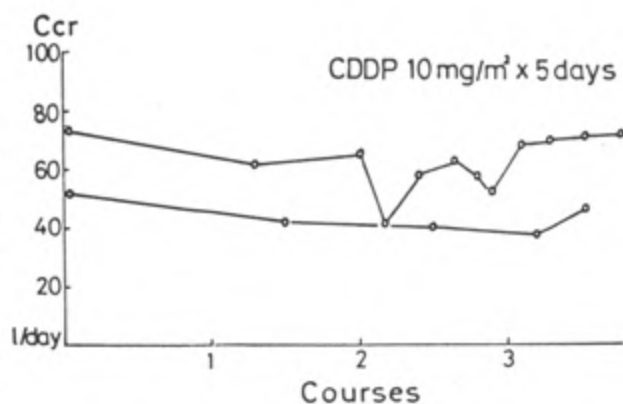


図4 CDDP投与回数とCcrの推移

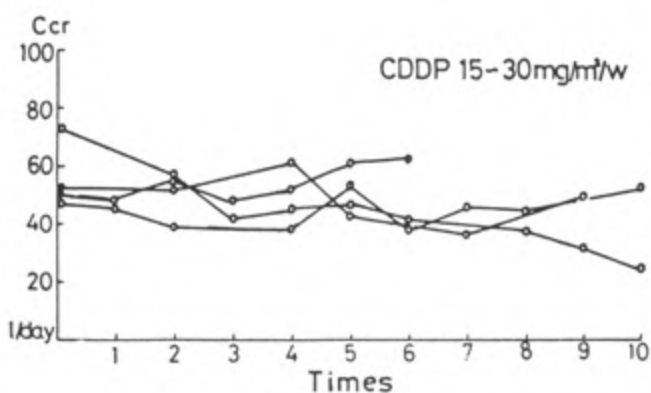


図5 CDDP投与回数とCcrの推移

以上、腎毒性を有する制癌剤であるシスプラチンをモデルとして、臨床的立場

より、慢性毒性の発生の危険性とその評価について、述べてきたが、臨床の場においては、患者によって各々病態が異なっており、使用薬剤の薬理動態の基本を理解した上で、各患者別に、薬剤投与の“増減”を決定し、慎重な検査を施行しながら、慢性毒性の発症を予防することが肝要である。

2. 化学薬品による尿路における発癌性と臨床的対応

長期毒性の予測が不可能な化学物質の曝露により、発癌性が出現した場合に如何に早期に診断し、適切な治療により対処するかということも、臨床的に重要な課題である。この点について、泌尿器科領域における芳香族アミン化合物の長期曝露による尿路上皮腫瘍の発症について、臨床的に如何に評価し、対応しているか、次に3点について述べる。

1) 疫学的背景

発癌物質を取り扱う職場における癌多発の問題は、内外ですでに広く論じられ、その因果関係について言及した論文も多く報告されているが、我々が臨床的に関係した対象者の疫学的背景について述べる。

対象集団は、某化学工場とその関連工場において、昭和11年より昭和46年までに芳香族アミン化合物に曝露した既往を持つ430名である。なお観察期間は昭和24年1月より昭和61年12月までである。

発病率は、全体では450名中65名(15.1%)であるが、化学物質別ではBenzidine sulfateが261名中53名(20.3%)と最も高かった(表1)。曝露期間別発病率は、5年未満では、8.4%であるが、5年以上ではいずれも20%以上であり、曝露期間の延長とともに発病率も上昇しており、統計学的にも有意差を認めた(表2)。発病者における化学物質の接触開始より発病までの平均潜伏期間は24年3ヶ月と非常に長期で

表1 化学物質別発病率
(昭和24年1月～昭和61年12月)

化学物質	被曝者数	発病者数	発病率(%)
B S	261	53	20.3
β N	94	10	10.6
α N	53	0	0
D S	2	0	0
Mixed	20	2	10.0
計	430	65	15.1

BS: Benzidine sulfate、 β N: 2-Naphthylamine
 α N: 1-Naphthylamine、DS: Dianisidine

表2 曝露期間別発病率

	曝露期間(年)				
	< 5	5-9	10-14	15-19	> 20
被曝者数	225	120	61	13	11
発病者数	19	25	13	4	4
発病率(%)	8.4	20.8	21.3	30.8	36.4

U-Test: Z = 3.772 p = 0.0002

あり、化学物質による発癌の社会的、臨床的問題を提起している。尿路における発癌部位では、65例中50例(76.9%)は膀胱のみであるが、15例は上部尿路にも発生している。しかも15例中9例は両側の上部尿路に発生しており、早期診断、治療という点で非常に大きな臨床的問題を提起している。

2) 定期検査と早期診断

430名の発癌性化学物質の被曝者に対して、どのようにfollow-upし、早期診断のための努力をしているかについて述べる。

基本的には、表

3に示すごとく、非発病者と発病者

に大別し、検尿、尿細胞診、膀胱鏡、

腎盂造影により、定期健診を施行し

ている。患者に対し、侵襲がなく、

確立されたスクリーニング検査法とし

て、尿細胞診があるが、初発時にお

けるその有用性をみると、46例中24

例(52.2%)が陽性、6例(13.0%)

が疑陽性であり、両者をあわせると

65.2%の確診率であり(表4)。し

かし、逆に34.8%は陰性であるとい

う事実も早期診断という点では真剣

に考えなければならぬ。

3) 治療法の選択と予後

発病した患者に対して、生活の質を考慮し、どのような治療の選択を行ない、予後の向上を計るかは、臨床において非常に大きな問題である。

基本的には、表5に示すように、尿路機能を保存しつつ、いかに再発を防止するかということの主眼としつつ、患者の予後という点を考慮し、根治的治療も積極的に施

表3 被曝者に対する定期検査

1) 非発病者	(1) 検尿・尿細胞診 2～3ヶ月毎
2) 発病既往者	(1) 検尿・尿細胞診 (2) 膀胱鏡 術後6ヶ月間は1ヶ月毎、その後 2年間は3ヶ月毎、以後6ヶ月毎 (3) 腎盂造影 1年毎

表4 尿細胞診による診断

初発時		
尿細胞診	例数	頻度(%)
陽性	24	52.2
疑陽性	6	13.0
陰性	16	34.8
計	46	100

行している。膀胱原発の表在癌に対して、経尿道的電気切除術(TUR)と術後制癌剤膀胱注を施行しているが、その努力にもかかわらず、表6に示すように、実に73.8%が少なくとも1回以上再発しており、さらに5回以上の再発例が10.8%にあることを考えると、長期follow-upの必要とともに、患者における精神的および肉体的苦痛は大変なものと思われる。治療上の大きな問題点の1つとして、両側性の上部尿路腫瘍発生例に

表5 治療法の選択

<u>膀胱腫瘍</u>	1) 表在癌 TUR → 再発予防膀胱注
	2) 浸潤癌、上皮内癌 膀胱尿道全摘、骨盤部リンパ節郭清
<u>上部尿路腫瘍</u>	1) 片側例 腎尿管全摘
	2) 両側例

表6 再発回数

回数	例数	頻度(%)
0	17	26.2
1	21	32.3
2	9	13.9
3	5	7.7
4	6	3.1
>5	7	10.8
	65	100

に対する治療法の選択がある。表7のごとく、現在まで9例を経験しているが、いずれも非同時発生であり、その間隔は3ヶ月から13年1ヶ月にわたっている。片側は全例腎尿管全摘を受け、単腎の状態において、他側の上部尿路に発生しており、我々は、患者の生活の質を考え、なるべく尿路の保存を目的とした治療を選択している。尿管発生例では、尿管切除と、回腸による代用尿管形成を施行しているが、腎盂発生例では、尿路を保存した根治手術は不可能であり、姑息的な治療しか出来ないのが現状である。生存はわずかに3名であり、そのうちdisease freeは症例6、9の2例のみである。

最後に、発病者65名の長期予後を見ると、5年生存率92%、10年生存率84%、20年生存率73%と良好な結果であった(図6)。これは、我々の早期診断と積極的治療の努力によるものと思われるが、一方20年以上経過して、癌死する症例が存在するとい

表7 両側性上部尿路上皮腫瘍症例の治療と予後

症例	初発年齢	発生部位	間隔	治療	予後
1	30	膀胱・両腎盂尿管	3ヶ月	尿管部分切除+尿管皮膚瘻	癌死(13年)
2	33	膀胱・右尿管・左腎盂	2年2ヶ月	腎盂腫瘍切除+腎瘻	癌死(18年6ヶ月)
3	46	膀胱・右腎盂・左尿管	2年2ヶ月	尿管全摘+腎盂回腸膀胱吻合	他因死(24年3ヶ月)
4	46	膀胱・両腎盂	7年	免疫・化学療法	生存(23年8ヶ月)
5	40	両腎盂尿管	13年1ヶ月	尿管部分切除+尿管・回腸・膀胱吻合	癌死(18年4ヶ月)
6	41	右尿管・左腎盂	14年	尿管部分切除+尿管膀胱再吻合	生存(21年2ヶ月)
7	36	膀胱・両尿管	1年3ヶ月	尿管部分切除+腎瘻	癌死(12年7ヶ月)
8	56	膀胱・両尿管	5ヶ月	尿管全摘+腎盂・回腸・膀胱吻合	癌死(6年9ヶ月)
9	45	両尿管	6年11ヶ月	尿管部分切除+尿管・回腸・膀胱吻合	生存(10年6ヶ月)

う事実は、長期毒性における発癌の大きな臨床的課題であり、息の長い、臨床的対応が必要であることを痛感させられる。

以上、長期毒性と臨床という立場より、慢性毒性としての制癌剤による腎毒

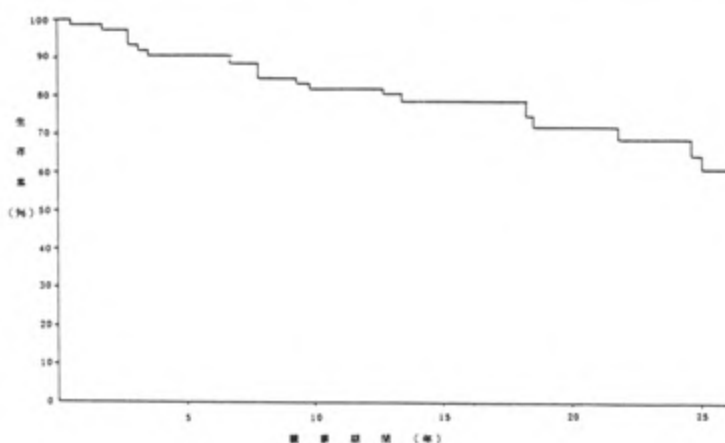


図6 尿路上皮腫瘍症例の生存率 (Kaplan-Meier)

性の予測と臨床的評価、芳香族アミン化合物による尿路上皮の発癌に対する臨床的対応とその問題点につき報告したが、種々の化学物質による長期毒性に対する基礎的研究の成果をもとに、我々臨床家が、臨床の場において、慢性毒性、発癌という危険性を常に頭に入れ、これに慎重に対処していくことの重要性を強調したい。

CLINICAL EVALUATION OF LONG TERM TOXICITY-CLINICAL EVALUATION
OF URINARY TRACT TUMORS RELATED TO EXPOSURE TO SOME AROMATIC
AMINES: Toyofumi UEDA (Depts. of Urology, Fac. of Medicine,
Kyushu Univ. 812 Fukuoka, Japan)

From the toxicologic aspects in urological fields it is clinically important that hepatotoxicity and nephrotoxicity due to antibiotics for the treatment of urinary tract infections, and myelotoxicity and nephrotoxicity due to anticancerous drugs for the treatment of urogenital cancers. However, there are no problems concerning the long term toxicity due to those drugs because of careful use of those drugs.

On the other hand, there is an important problem of long term toxicity, that is, the occurrence of urinary tract tumors related to exposure to some aromatic amines in urological fields. In this time, as main thema of clinical long term toxicity we studied the clinical evaluation of these problems.

Clinical and statistical observation were made on a group of 430 persons who had worked with aromatic amines (benzidine sulfate, 2-naphthylamine, 1-naphthylamine and dianisidine), with reference to the carcinogenic properties of these compounds in the urinary tract. Urinary tract tumors occurred in 57 workers in this group, with an average latent period of 19.9 years. In these 57 cases, upper urinary tract tumors were found in 14 cases, 7 of these having bilateral lesions. The rate of recurrence was 70.2%, but the 5-year-survival rate was 88.7%, showing a good prognosis. The incidence of tumors was significantly higher in worker who were in contact with the amines for more than 5 years than in those with a shorter contact period. According to the data of the clinical examinations which were documented, there was a significant correlation between urine cytology and cystoscopic findings, implying that urine cytology is a feasible screening test. As the treatment for urinary bladder tumors transurethral resection (TUR) were performed in almost patients and total cystectomy were done in selected patients diffuse or invase recurrent tumors.

As the important clinical thema of long term toxicity in urological fields we would like to study carefully the urinary tract tumors related to exposure to aromatic amines in the future.

長期毒性——その考え方と評価

産業医学の立場から

児 玉 泰

産業医科大学・衛生学教室

今日、我々の生活環境や労働環境中には、数多くの化学物質が存在し、また化学産業の発達に伴ない各種の新しい化学物質が生産されている。これらの化学物質と生体とのかかわりに関する医学的立場からの報告は、古くから数多くなされてきている。例えば、鉛中毒は今日でも、産業現場では問題となるが、すでに西暦紀元前4000年頃より鉛製造がおこなわれていたという記録がある。このことは同時に精錬、加工等に従事する作業者が居たことを意味し、中毒も発生したと推測される。事実、ヒポクラテスは紀元前300年に鉛中毒を最初に報告し、ラマツィーニも彼の著書の中に陶器工や画家の鉛中毒を述べている。その他、鉛は長期毒性に関して産業医学の面からも問題とすべき点が多かったことが考えられる。産業現場での化学物質への暴露を考えた場合に、一般の日常生活では遭遇することがないような特殊な化学物質への暴露があったり、またその暴露の程度も生活環境におけるよりも高度である場合が少なくない。これらの物質が、そこで働く人達への健康に及ぼす影響を正確に把握し、疾病の発生を予防することは、今日産業医学における重要な課題の一つである。労働者の健康を保持、増進する上での基本的な柱として環境管理、作業管理及び健康管理が挙げられ強力に推進されているところであるが、産業現場における化学物質への暴露の上では短期毒性はもちろんのこと、特に長期毒性が重視されなければならない。産業医学領域においては、このような長期暴露の観点から各種化学物質についての許容濃度が定められている。我国では、昭和30年代後半よりこの問題が日本産業衛生学会で取り上げられ始めたが、アメリカ、ドイツではさらに古い歴史を持っている。この許容濃度は、動物実験における短期及び長期毒性試験等によって量-影響関係、量-反応関係を明らかにするとともに、一つの基準に基づいた安全量の推定を行ない、それに一定の安全率を掛けることによって人の安全量を求める。また、一方では過去における人の中毒事例等を参照して安全量の推定を行ないそれを人にあてはめるようにとするものである。このような人への外挿を行なう際の毒性試験法は、現在

OECD、EC、WHO や医薬品に対する厚生省のガイドライン等での試験法と共通するものであるが、これはこれらの化学物質の動物に対する毒性の発現と人の場合とに関連性があるということが前提となっている。したがって、職場における環境空気中の有害物質による健康障害を予防するための許容濃度は日本産業衛生学会では次のように定義されている。すなわち”許容濃度は、労働者が有害物質に暴露される場合に、当該物質の空气中濃度がこの数値以下であれば、ほとんどすべての労働者に健康上の悪い影響がみられないと判断される濃度である。”しかし人集団に発生する疾病が特定の化学物質への長期暴露による結果と考えられるにもかかわらず、それが動物の長期実験で認められなかったり、逆に動物を用いた反復暴露実験で認められる影響が人集団に認められないこともあり、医学領域において長期毒性を評価することは、必ずしも容易ではない。産業現場における化学物質への暴露形態としては、経気道、経口、経皮があり、特に経気道性の侵入が重要である。しかしながら動物を用いた化学物質の経気道性の長期毒性試験は、技術的な困難性もあって今日まで殆んど行われていないが、産業医大では新しく開発した暴露装置を用いて粉じんの長期暴露実験を継続している。

しかし、このような手間のかかる長期吸入暴露実験でも今述べたような動物とヒトとの discrepancy が認められる場合も起りうる。例えば、ニッケル精錬作業には呼吸器癌や鼻腔癌の多発することが疫学的には証明されているが、各種のニッケル化合物をラットに長期吸入させた我々の実験では、容易にそれを証明することが出来ない。また産業現場における化学物質の経口的摂取は比較的少ないとは言っても、衛生教育の徹底しない段階では問題となりうる。我国でも過去に印刷業の鉛中毒などで、そのような例は多く認められ、また今日では工業化を急速に進めている国々では問題となっている。そこで金属の長期経口毒性の一例として現在継続中のカドミウムの実験を紹介し、長期毒性に関する2、3の問題を提起しようとする。

ビーグル犬を用いたカドミウム経口投与実験

産業現場に認められるカドミウムの慢性毒性としては、肺気腫、腎障害、低分子タンパクの尿中排泄などが挙げられ、これらは動物実験でも認められている。一方我国では、神通川流域の住民に骨変化を伴う患者の発生があり、当地区ではカドミウムによる汚染もあったことより、行政的に公害病として認定

された。それ以来カドミウムの長期毒性影響が注目されることとなった。小動物を用いた数多くの実験結果が報告されているが、我々はこれら小動物に認められない新しい知見や人で疑われているカドミウムによる骨変化が得られるか否かを中動物で確認する目的で、ビーグル犬を用いたカドミウム長期毒性試験を開始した。

カドミウム投与量は、図1のごとく玄米中の安全基準1.0ppmに米摂取量、体重、安全係数を考慮して最低投与量1mg/10kg/dayを決定し、図2のごとく投与をおこなった。検査は図3に示す項目について行なったが、血液及び尿検査は当初2カ月は2週ごと、以後は4週ごとに実施した。雌雄間に量的差異は認められるが、変動傾向は共通なのでここでは雄群を例に金属濃度の変動を中心に述べることとする。血中カドミウム濃度は図4に示す通り各投与量に応じた変化が認められ、100mg 投与犬では200週以降もやや増加傾向がみられるが50、30、10、1mg 投与犬では200週頃よりほぼ定常状態に達している。尿中カドミウムの排泄量は図5にみられる通り100mg、50mg投与犬で70~80週頃より増加傾向が現われ始め、その後急増して300週では200~250 $\mu\text{g/day}$ に達している。この変化は高濃度投与犬の尿量増加と関連があり100mg 投与犬では1.5~2.0 l/day である。尿中低分子タンパクのスクリーニングにSDS ポリアクリルアミドによる電気泳動を行なったが50mg、100mg 投与犬、特に雄ではコントロール犬に比べて高値を示した。 β_2 -マイクログロブリン定量結果は図6に示す通りで130週頃より漏出増大が認められた。金属に関してはメタルチオネインとの関連で亜鉛及び銅などを追跡しているが図7、8にみられるごとく50mg、100mg 投与犬で100週頃より血中濃度の増加が認められ低濃度投与犬及びコントロール犬との間に明らかな差が認められている。図9は100mg 投与犬の血中カドミウム濃度と尿中カドミウム排泄量との関係を表わしているが血中カドミウムが80 $\mu\text{g/l}$ に達した時点で尿中カドミウム量との間に相関が認められる。また血中カドミウムと血中亜鉛及び血中銅との関係においても、血中カドミウム濃度が80 $\mu\text{g/l}$ 以上では、両者間に相関が認められる。

以上述べたごとく、%TRPの低下、クレアチニンクリアランス値の低下、低分子タンパク尿出現など、カドミウムの腎への影響はビーグル犬に対しても認められている。しかし、上・下肢部、頭部、腰椎部、骨盤部の5部位の骨X線撮影では、カドミウム投与犬と対照犬との間に骨変化の顕著な差は認められていない。カドミウムが発症になんらかのかかわりを持っているのではないかと疑われているイタイイタイ病患者に認められる骨の変化が、塩化カドミウム単独

で低濃度から高濃度まで、しかも7年という長年月に渡ってビーグル犬に投与した実験では認められなかった。またカドミウムを使用する産業現場において2、3の例外はあるとしても、腎性骨軟化症が容易には発症せず、カドミウムによって骨変化が起こる場合は、その他の要因が重要な役割を果たすと考えられる。このように、長期毒性実験には多くの難しい面があることを我々の実験例で示したが、そのような人と動物実験との不一致がみられる例があるにしても、産業現場で取扱われる化学物質の安全性評価の上では長期毒性試験は不可欠であり、又それなりの役割を果たしている場合が大部分である。産業医学の上では、最初述べたごとく長期影響を考慮した許容濃度を基本とした考え方が用いられており、これは行政的には、有機溶剤中毒予防規則、特定化学物質等障害予防規則や鉛中毒予防規則の中に考えが活かされている。また最近では暴露濃度よりも現実的な面で評価しやすい職場環境の管理濃度の概念が出され、職場環境濃度の測定データをもとに職場における化学物質の長期影響から、労働者の健康を守ることも考えられている。しかしながら、我々の実験で示したように、用いる動物、種差、投与化学物質の化学形、投与期間、観察項目、さらに人への外挿法等産業医学的立場から長期毒性に関して検討すべき点も少なくない。

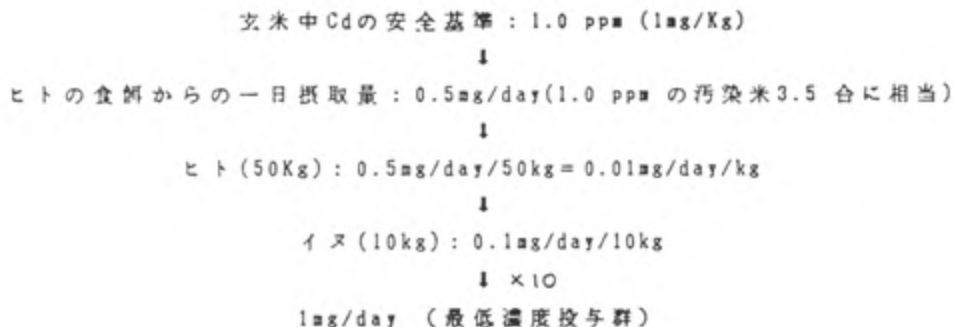


図1 投与量の決定法

- 実験動物：ビーグル犬14匹 (♂7, ♀7)
 購入時月齢 6-8ヶ月
- 化学形：CdCl₂
- 投与方法：少量のドッグフードとCdCl₂を混ぜてCd入りのペレットとし、食餌(ドッグフード)と共に与える。
- 濃度：1群を♂1匹♀1匹とし、7群に分け、その内の2群を対照群とした。(♂2♀2)

	1日投与全量	食餌中のCd濃度
I 群	1 mg / day	3.3 ppm
II 群	3 mg / day	10 ppm
III 群	10 mg / day	33 ppm
IV 群	50 mg / day	165 ppm
V 群	100 mg / day	333 ppm

※ 1日食事量：約300g

採血・採尿：1回/4週 (ただし、投与開始後2ヶ月は
 1回/2週)

図2 実験方法

- 一般 : 外觀, 体重 (1回/週)
 血液学的検査 : Hb量, HCT, 赤白血球数
 生化学的検査 : 血清酵素 (GOT, GPT等7項目)
 一血液一 : 血清総蛋白, 血清アルブミン, A/G比
 βリポ蛋白, 中性脂肪, 血糖
 非蛋白性窒素 (BUN, クレアチニン, 尿酸)
 総ビリルビン, 総コレステロール
 無機リン,
 血清中金属 (Na, K, Ca)
 血中Cd, Cu, Zn濃度
 尿検査 : 一般性状 (色調, 尿量)
 定性 (PH, ブドウ糖等5項目)
 定量 (無機リン-%TRP, 蛋白
 クレアチニン-Ccr)
 蛋白分画
 尿中Cd, Cu, Zn濃度・排泄量
 糞中Cd濃度 (1回/3ヶ月)
 糞検査 : 腎機能精密検査 (RBF等)
 実験期間 : 臓器中Cd濃度
 終了時検査 : 組織病理学的検査

図3 検査項目

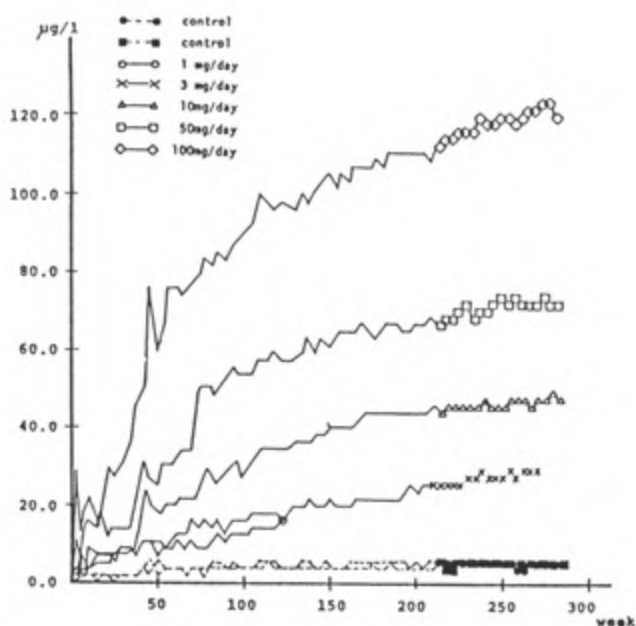
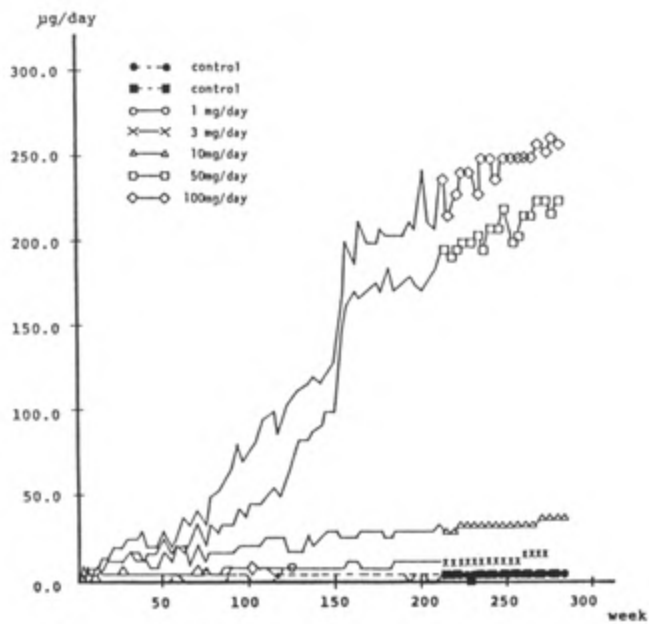
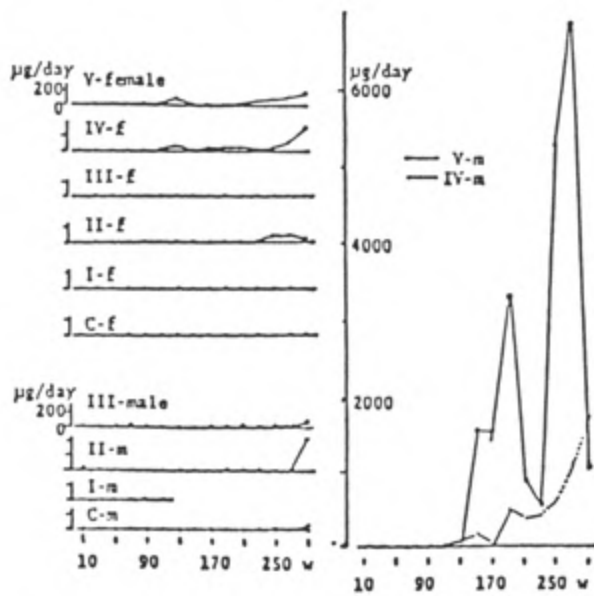


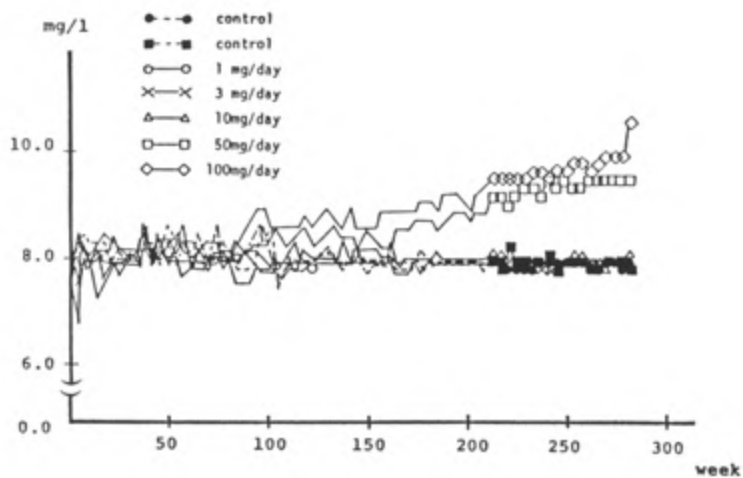
図4 Cadmium concentration in blood (male)



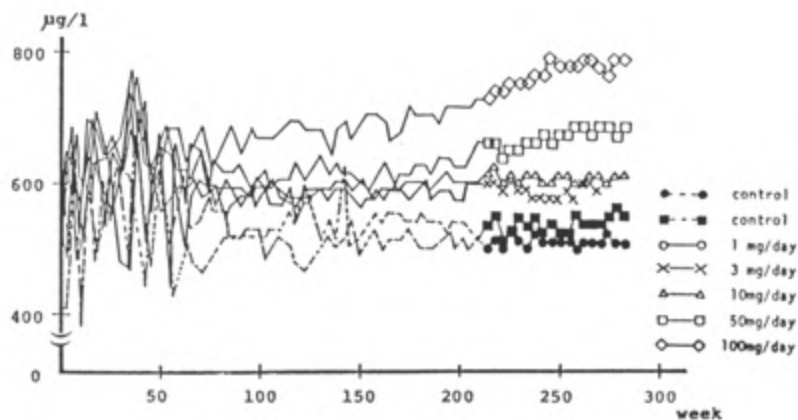
⊠ 5 Cadmium excretion in urine (male)



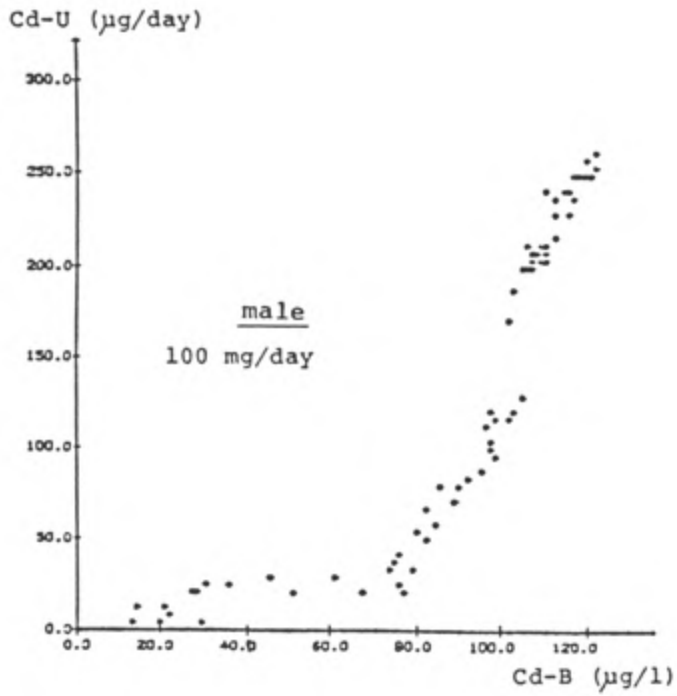
⊠ 6 β_2 - Microglobulin concentration in urine



☒ 7 Zinc concentration in blood (male)



☒ 8 Copper concentration in blood (male)



9 Relationship between cadmium concentration in blood (Cd-B) and cadmium excretion in urine (Cd-U).

EVALUATION OF LONG TERM TOXICITY IN THE FIELD OF OCCUPATIONAL HEALTH: Yasushi KODAMA (Dept. of Environmental Health, University of Occupational and Environmental Health, Japan. 1-1 Iseigaoka, Yahatanishi-ku, Kitakyushu 807)

In order to prevent chemical hazards and promote the health of workers, the evaluation of long term toxicity of chemicals is a matter of special importance. Many developed countries have their own threshold limit values for chemicals used in the work places. The values are derived from acute and chronic animal experiments including carcinogenic tests, mutagenic tests, and epidemiological surveys for the workers. It is very important to extrapolate the results obtained from long term toxicity for animals to the workers. Therefore, the meaning of values is the safety exposure levels at which the workers are exposed to chemicals for 8 hours per day for all the working period. In this paper, the importance of the evaluation of long term toxicity of chemicals in the working environment, and the discrepancies between animal experiments and epidemiological observations are explained. Namely, the high incidence of nasopharyngeal and lung cancer among nickel workers has been reported, but we can not produce cancer at these sites in rats by the inhalation experiment of nickel compounds. An outbreak of "Itai-itai disease" in a certain district in Japan, roused public attention to environmental pollution by cadmium (Cd). The sufferers of this disease had the symptoms of renal dysfunction and osteomalacia. The disease is suspected of being connected with the ingestion of Cd polluted foods. We have conducted long term administration of Cd to beagle dogs. In this experiment the minimum dose of Cd to the experimental animals, 1 mg/day, was determined on the basis of the estimated human exposure to Cd in the district as well as the Japanese daily rice consumption and the difference of body weight between the two species. Fourteen dogs were divided into 6 experimental group; 1, 3, 10, 50 and 100 mg/day and control group. The dogs that received 50 and 100 mg/day of Cd for 7 years show renal dysfunction, that is, polyuria and proteinuria, and decreases of %TRP and creatinine clearance. There are no remarkable differences on the X-ray photographs taken of bones after 250 weeks exposure to 100 mg/day Cd when compared to that of control. As shown in this presentation, the discrepancies between animal experiments and epidemiological studies in workers are occasionally observed. However, it goes without saying that the long term animal experiment and extrapolation of the results to workers are very important for preventing occupational diseases.

長期毒性－その考え方と評価： メーカーの立場から

高垣 善男

中外製薬株式会社 開発研究所

医薬品，農薬などの製造または登録の許認可などに係わる安全性検討として，長期毒性試験を行う場合には，毒性試験ガイドラインあるいはGLP基準などの規制をうけるのはいうまでもなく，それらの内容を十分考慮したうえで計画，実施し，評価を行わなければならない。しかし，その検討，評価を科学的に行うのにメーカーだからということで，特別なことをする必要はないように思う。むしろ対象となる物質の特性に応じて，検討方法が違えられることこそ重要である。そのためには，ガイドラインなどで原則的なことだけがきめられておる方が好都合であり，必要に応じて種々の検討が行われればよいのではなかろうか。

評価の前提となる実験の重要性とその評価

毒性を適正評価するには，関連する諸試験が適正に実施され，必要なデータが得られておらねばならないのはいうまでもなく，とくに長期毒性試験については，後述するような理由から，まず下記の点に留意して実施したうえで，適正なデータを得ておくべきと考える。①綿密な実験計画を立てること，②計画内容を実験関係者に対して周知徹底するとともに，計画変更への対応を忘れてはならない。③実施に当たっては計画に忠実であること。④感染防御体制の整った施設，設備（バリア施設）を利用し，⑤良質の健康な動物（SPF動物）を導入・供試すること。⑥試験中も含めて

微生物モニタリングを行い、万一の感染にそなえること。⑦日常の飼育管理を適正に行うこと。⑧指定どおりの投薬または実験処置を行い、⑨観察、検査を適切な方法で行い、データを得ること。⑩各種の記録、標本は適切に保管し、必要に応じて役立てられるようにしておく。

長期毒性試験は一般に期間が長いだけに、全期間を通して同一の設定条件下で完璧に実施するのは難しい。それだけでなく、動物実験の成績に影響を及ぼす要因は多岐にわたるといわれており（表1）、短期ほどには計画どおりに行えない。しかし、長時間を費やし多くの経費をかけて行うのだから失敗は許されない。簡単に再実験するわけにもいかない。

なかでも、動物を長期飼育する必要性とそのための感染防御体制の確立が大切で、前述のようにSPF動物とバリア施設の利用により実現可能である。しかし、動物を老齢時まで適正に飼育するための栄養学的検討（飼料成分と給与基準など）をはじめ、未解決の課題が多く残されており、完全に行える段階には至っていない。

以上のような背景のなかで長期毒性試験の成績評価を行わねばならず、多くの配慮が必要とされるのはいうまでもない。たとえば、ラット、マウスが1.5～2年齢に達すると、自然発癌など加齢や老化に伴う異常が現れるが、必ずしも適確に把握しきれているわけではなく、それらと投与による変化と見誤ることのないように注意せねばならない。また、感染する機会も多いわけだから感染死したり、感染死しないまでも各種検査値に影響が及ぶので、データの読み取りを誤ることのないように努めねばならない。長期間に及べば及ぶほど、感染以外のトラブルも発生しやすく、時に実験操作および飼育管理に不手際が生じたり、被験物質の保証、管理が適正

に行われなかったりする。飼料、水および床敷などに由来する微量汚染物質による影響も見逃せない。

長期毒性または長期毒性試験とは

マウス、ラットおよびハムスター類を用いて行われる癌原性試験では寿命と関連づけて投与期間が設定されており、それぞれの寿命に相当する期間近くまで連続投与が行われる。一方、各動物種を用いて行われる慢性毒性試験は、繰り返し投与される回数あるいは期間を決めて行われるもの（連日投与が一般的だが、日曜休業とか、隔日投与など間けつ投与もあり得る）で、6、12、あるいは18ヵ月間に及ぶ。これらを長期毒性試験の範疇に入れるについては、まず異論はないとして、投与期間が多少短い亜急性毒性試験（1または3ヵ月間投与）については論議をよびそうだが、繰り返し投与の点を寄りどころとするならば、これも入れてよいのではなかろうか。すなわち、長期毒性は急性毒性（1回投与）に対応して用いられる用語として理解し、動物に繰り返し投与することによって検討され、得られるものと考えてよく、当該物質を繰り返し投与すると危険性があるのか、またどの程度安全なのか、どのような時期にどのような変化が現れ、経過するのか、回復の可能性があるのか、などが明らかにされねばならない。

長期毒性（一般毒性の場合）の評価のために必要な投与期間について

1ヵ月投与の亜急性毒性試験で検出されなかった毒性指標が3ヵ月投与あるいはそれ以上の期間の投与の試験でとらえられるケースは比較的多く、日常よく経験するところである。しかし、6ヵ月投与までの試験で確認されたもの以外の指標が12ヵ月あるいは18ヵ月の投与で新たに確認されることは極くまれであるといわれている。LUMLEY & WALKER による英国での調査

(13企業, 32薬剤, ラット, イヌまたはサルでの6ヵ月および6ヵ月未満の試験とそれ以上の一般毒性試験との比較)では, 比較可能であった45の事例に関する限り, 6ヵ月をこえての投与によって新たな毒性反応はみつからない(表2)。一方, 6ヵ月以上の投与で初めてみつかることを示唆する報告もあるが, 長期に見合う成果が期待されねばならないことを考えるとそれに費やされる6ヵ月をこえての時間はあまりにも長いといえる。事実, 製品開発の障害となっていることも否定できない。供試動物種を増やすとか, 観察・検査の内容を充実するとか, 種々の工夫をこらすことにより短期間で現在の長期投与に相当する, またはそれ以上の成果をあげる試みが必要と考える。

長期毒性に係わる諸問題(まとめに代えて)

最近では, バイオ関連物質など高分子化合物の長期毒性の評価方法(シミュレーション実験も含めて)が話題となっており, 安定剤などとして用いられる異種蛋白, その他の抗原性ととも長期にわたる繰り返し投与が行えないなどの障害が起きている。その他にも, たとえば刺激性のある物質は投与時刺激による二次反応のために, 繰り返し投与が困難または不可能といった事態をまねくこともある。二次反応にまどわされて本来の毒性指標を見誤ることもよくある。長期間にわたる経口投与は, 通常, 飼料に被験物質を混合して摂取させる方法によって行われているが, 動物が摂食忌避をしたり, 摂餌量が減少したりして適正な投与ができないこともある。混餌投与と強制投与とでは吸収などにも差が生ずる可能性があり, 必ずしも同一の成績が得られるとは限らず, われわれの経験でも細かい点では差が認められている。最近, 1年以上のマウスやラットの試験が強制経

口投与によって行われるように変わってきているが、技術的に未熟な場合には投与失宜が起きやすく、死亡事例も時にみられるが、十分評価できるデータが得られる段階にすでに至っている。

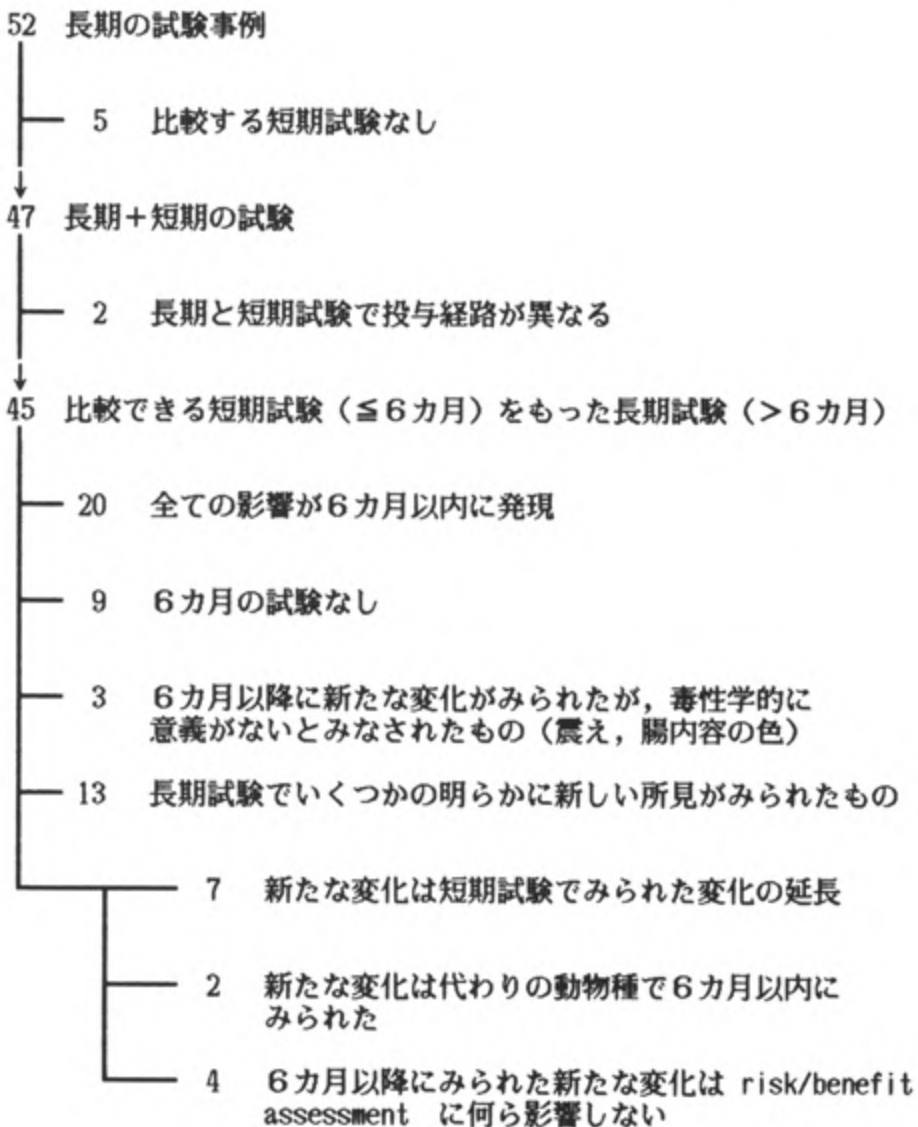
多くの長期毒性試験では離乳期後比較的若い年齢の時期から投与が開始され、マウス、ラットの1～2年の試験などは一生にわたる投与ということになる。一方、イヌでの同じくらいの期間の投与だと老齢の時期だけに投与することも可能である。しかし、一般には成長期を含む時期が選ばれている。動物での期間と人での期間との相関（動物種間も含めて）についてまで、現在必ずしも十分配慮されて試験が行われているとは思えない。臨床で長期使用される薬剤だから長期毒性の検討が必要であることには異論はないが、使われ方にあまりとらわれず、本来その物質が有する毒性の一環として長期毒性が検討・評価されて然るべきと考える。

表1. 動物実験成績に影響を及ぼす主要な因子とそれらの統御

<u>動物種</u>	<u>生理</u>	<u>馴化</u>	<u>栄養</u>	<u>飼料</u>
系統		選択		給餌方法
由来		取り扱い		水
性				給水方法
年齢				
体重				<u>投薬など実験処置</u>
<u>住居</u>	<u>密度</u>	<u>空調</u>	<u>温度</u>	<u>検査</u>
	ケージ		湿度	サンプル採取法
	清掃		換気	検査法
	床敷		照明	<u>病気・異常</u>

表2. 長期試験 (>6 カ月) で何が得られるか: 長期試験と短期試験 (≤6 カ月) との比較

(FUNDAMENTAL AND APPLIED TOXICOLOGY 5, 1007-1024, 1985 より引用)



LONG-TERM TOXICITY STUDY; ITS RATIONALE AND DATA ANALYSIS:
Yoshio TAKAGAKI (Drug Development Labs., Chugai Pharm. Co.,
Ltd.), 41-8, Takada 3 chome, Toshima-ku, Tokyo 171)

How to conduct and how to analyse a long-term toxicity study are not easy to answer. Long duration of the test itself can create additional troubles that are not expected in short-term studies. Recent technological development enabled long-term breeding of laboratory animals. Various defensive measures against infection has now been successfully taken by, for a instance, using SPF animals or well-equipped animal facilities with appropriate barrier systems.

Being able to breed animals for a long period of time is important and necessary condition for a long-term study, but not sufficient. A good long-term toxicity study has to be accompanied with best efforts to keep consistency of factors that could affect the data during the period and sufficient background data of the animal bred under such a condition. Consideration for aging of the animals during the test period should be given to the data analysis.

Some appreciate a long-term toxicity study not only because it reveals chronic toxicity of the test compound but also it shows the effect of life-long treatment of the compound. A dominating idea in this area has been the longer the test period, the better. Is it always true?

It is often difficult to decide whether or not the changes observed in a life-long study is attributable to the treatment. Thus, it is possible that too-long term of a test hampers the data analysis. There should be an appropriate duration for each study. Isn't this high time to liberate ourselves from the longer, the better?

We have to be noted that in any case GLP compliance is essential for a long-term study; that is, the test conductor has to be equipped with a well-established protocol, sufficient knowledges of handling test articles and countermeasures to be taken at any deviation from the protocol, and appropriate storage of records and samples.

総括：土屋健三郎

私の感想を一言で申しますと、まず第一に長期の毒性、特にその方法論に関する問題点がかなり整理されてきたと思いますが、2、3の問題を申し上げたいと思います。私は産業中毒を主としてやってきましたが、terminologyの点において、慢性中毒とか亜急性中毒あるいは亜慢性中毒という言葉がたくさん出てきました。この問題は1974年に私共のICOH(International Commission on Occupational Health)のSub-Committee of Toxicology of Metalsという委員会を東京で開催したときにそれが問題になりました。例えば、chronicとかacuteとかいう言葉を使うのをやめよう。つまり非常に混同があるわけです。私共は、長い間一酸化炭素による慢性中毒がいったいあるのかないのかという議論をしてきました。結局、大部分の意見は、一酸化炭素へのshort termでわりあい高濃度の暴露の繰り返しによって、慢性中毒と思われるような影響や後遺症が発現するのであって、少なくとも実験で使う言葉としては、例えば、long-termのlow dose exposureあるいはshort-termのhigh dose exposureというような使い分けをしようということを私共は申し合わせたわけでありませう。

もう一つは発癌のことです。これはシンポジウムであまり触れたくないと思っていました。というのは、long-termで実験をやって、もし毒性がでたらそれは発癌の実験としては失敗ですから、毒性がでないで、long-termでやってそのlife spanの間に発癌するかどうかの問題になるのです。したがって、本来余り発癌のことは触れたくないとは思っていたのですが、長期毒性というどうしても発癌の問題がおこってしまう。ただ、先ほどからお話がありましたように、もし発癌---これは毒性の場合も同じですが---、薬理学・薬品における問題と食品添加物、それから産業における問題は、毒性の試験方法そのものについては、かなり共通な面もありますが、prac-

tical な面においては全く違ってくると思います。つまり一例をあげますと、先ほど上田先生がお話になったbenzidine とか β -naphthylamine は膀胱に対する発癌性が非常に強い。したがって労働行政としてはそういうものを使用，製造及び輸入の全部を認めないという禁止物質にしてしまったのです。benzidineについては代替品が存在します。ただ，一番問題になりましたのは，塩ビモノマーですけれど，塩ビモノマーの場合には，元来非常に発癌性が強い。動物実験では，だいたい25ppmぐらいで肝血管sarcomaをおこしますので，人間の場合どうしたらいいかということが非常に問題になります。できるだけ少量に controlする必要があります。しかし，それを禁止品目にできない。なぜならば，社会的有用性が非常に高いということで，1ppmぐらいにcontrolすれば何十年も暴露しなければ発癌しない計算になります。先ほど石西教授から Lasagna先生への質問がありました。仮に量反応関係が直線関係にあるとしても，数十年暴露するということは，まずありえないだろうということで1ppmという値を許容濃度として採用したのです。しかし，産業の場合は暴露を controlすればすむのですが，食品の場合には，少しでも発癌の疑いがあれば一切食品の添加物としては用いることができない。強制的に食べさせられる危険があるからです。薬品につきましては，更に問題は複雑になります。つまりeffectiveness ということを考えて，非常にeffective であるとします。それで，長期に使った場合のみ毒性がおこるとなると，benefit が非常に大きければ，短期に使うならば差し支えないことになります。したがって，私は毒性試験そのものも問題ですが，実際の場面において，その評価と使い方，どういう処理をするかということが大きな問題として今後残るだろうと感じました。

それからもう一つは，動物実験結果の人への外挿の問題です。これも明日おそらくワークショップででてくると思いますが，先ほど児玉教授が話しましたように，カドミウム実験でなぜ今ごろこんなことをやっているかと申しますと，現在でもまだ，イタイイタイ病

の原因がカドミウムかどうかという議論が続いています。私は、実は昭和43年から20数年に亘って、それに関する委員会の委員長をさせられ、喧々がくがくで、なかなかconsensus が得られないで困っています。話すとき非常に長くなりますので、一言だけ申し上げますが、いろいろな動物でやってみて、少なくとも腎性骨軟化症は、カドミウム単独ではどうしても起こらないのです。しかし、カドミウムが原因であるといっている人達は「動物と人間は違う」と主張される。もう一つは、年齢と性差です。ご承知のように、イタイイタイ病の大部分の患者（男性が一人いるとかいないとか言われます）は、女性です。長期といっても人間のように life spanが非常に長いといろいろな問題が起こってきます。犬の実験から考えると、人の場合で1ppmを多少超すカドミウムに汚染されたお米や水を飲んでいただけでも、事実、汚染地域ではtubular changeがおこっている人が非常に多いのです。したがって、その辺の関係の解明がまだ非常に難しいと思っています。

最後に申し上げたいことは、特に長期毒性の場合に、これは上田先生でしたか、ちょっとお触れになったと思うのですが、疫学がもう少しやれないかということに対してです。ある薬品を投与したとき、その患者さんを follow upして疫学的データ、つまり臨床疫学をもう少しできないかということを考えております。それからrisk benefit とcost benefitの問題です。産業あるいは薬品というところで、一応問題になるのはrisk benefitの問題であると思います。

いずれにいたしましても、本日、長期毒性はある意味で、問題点がかなり整理されたといってもいいと思います。

ワークショップ

テ ー マ：長期毒性評価とその問題点

司 会：林 裕造（国立衛生試験所安全性生物研究センター病理部）

遠藤 仁（東京大学医学部薬理学教室）

はじめに：林 裕造

今回のワークショップの課題は「長期毒性評価とその問題点」ですが、ある濃度の化学物質の長期暴露によって人体におこり得る障害を予知するためにどんな実験を行なったらよいか、その実験結果をどのように評価したらいいか、あるいは、このようなプロセスの中にどのような技術的問題があるかということが話題なのではないかと思います。

昨日のシンポジウムでおわかりになりましたように長期毒性は、一筋縄では行きません。例えば、長期毒性と一口でいいましても、その中には、短期投与によって見つけられないような僅かな変化の蓄積によって現われるもの、反復投与によって発現確立が高くなったため現われるもの、反復投与によって障害が繰り返し発現してそれが質的に異なった別の変化を二次的に誘導するようなもの、体内動態の変化にともなって短期投与とは量的に質的に異なった形が現われるものと様々なものがありますし、あるいは、その組合せもある。

このワークショップでは、広範な長期毒性評価の問題点を4人の先生方にそれぞれ専門の立場から具体的に話して頂いて、その後、各先生方に各お一人のコメンテーターが簡単に追加発言をして頂くということにして進めたいと思います。

長期毒性試験と加齢による非特異性病変

真板敬三

残留農業研究所・毒性部

発癌性試験を含む長期毒性試験の病理組織学的検索に際しては、加齢による非特異性病変と毒性変化とを区別することが肝要である。したがって、用いた動物の加齢性病変の種類、重症度の程度、頻度等を把握することが、病理担当者にとり重要であり、かつ、相当期間の経験が要求されるものである。一般にマウス・ラットでは、一部の病変を除き試験開始後60週間程度までは、それほど多くの加齢性病変に遭遇することはないが、それを過ぎると急速に病変の種類が多くなる。腫瘍性病変については、発癌性の観点から、ラット・マウスの多くの系統について詳細な報告がなされている(1-7)。一方、非腫瘍性病変に関する報告は比較的少ない(1)。しかし、組織障害の立場から毒性変化を評価する場合に、それとの鑑別が重要となる。加齢による非腫瘍性病変は詳細に調べれば体の全組織に少なからず存在しているものである。したがって、これらの病変の記録には腫瘍性病変の場合とはまた異なった難しさがある。どの組織の、どの病変を、どのように Gradeづけし表現するか問題になる。煩雑すぎる記載も毒性試験の報告としては妥当性を欠くであろうし、また、化学物質による標的臓器の病変のみを記録するのは、動物の生理的状态を知る情報としては不十分であろう。

本編では、F344 ラットと CD-1 マウスの2年間慢性毒性・発癌性試験に認められた、非腫瘍性病変の主なものを呈示した。

飼育条件

ケージ： 金網床，マウス 4匹/ケージ
 ラット 5匹/ケージ
飼料： 粉末飼料M (オリエンタル酵母工業KK)
照明： 5～19時

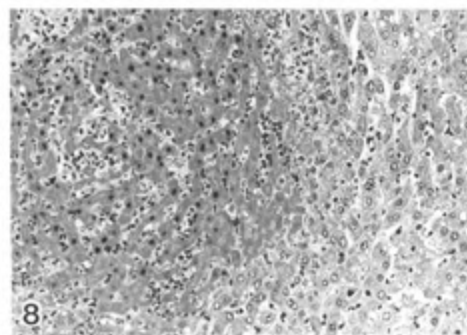
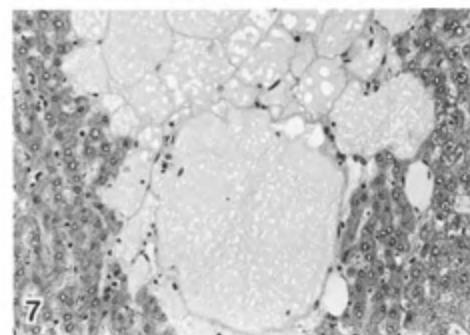
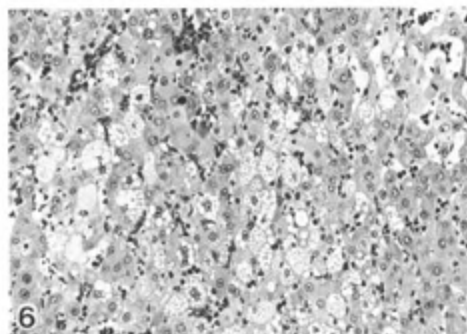
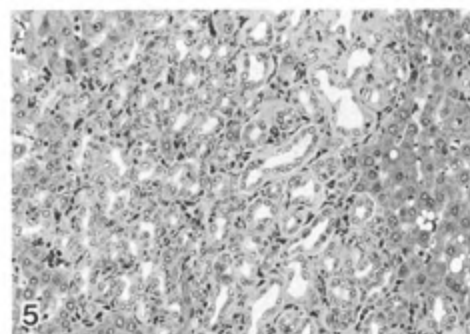
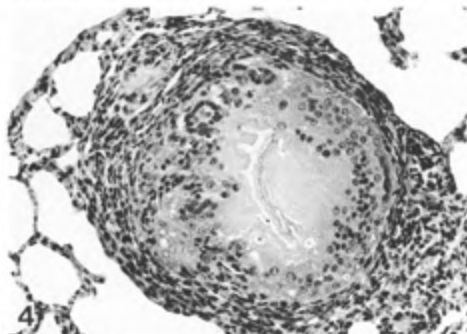
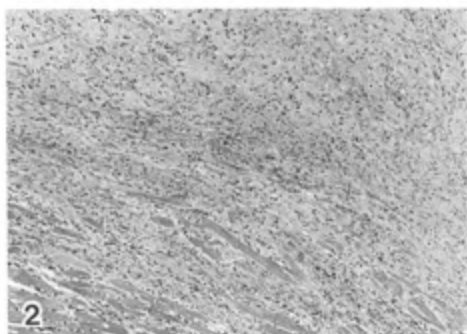
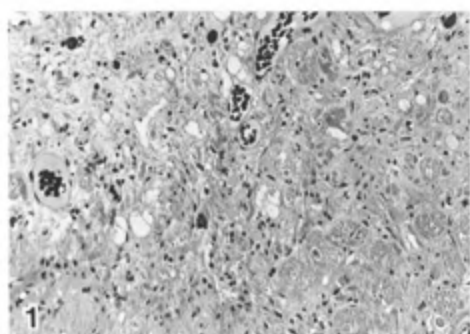
参考文献

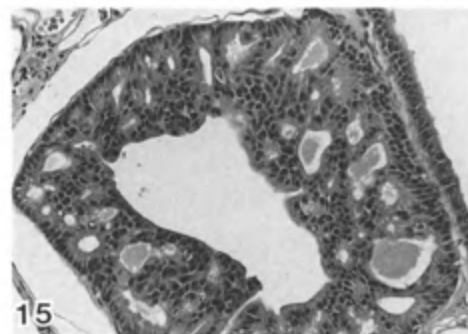
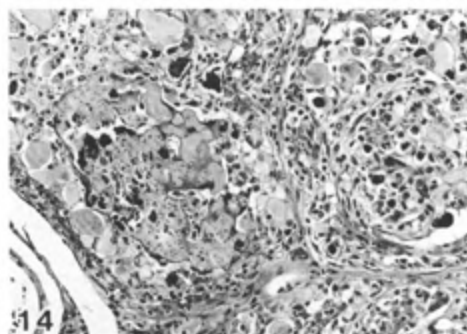
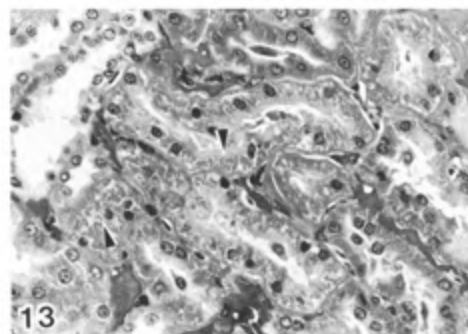
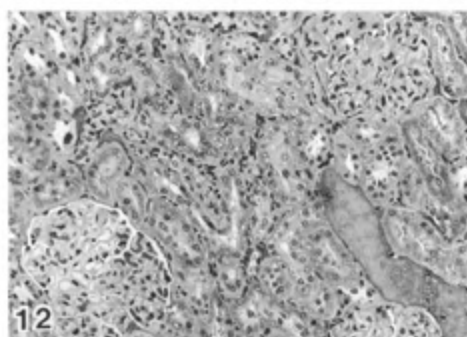
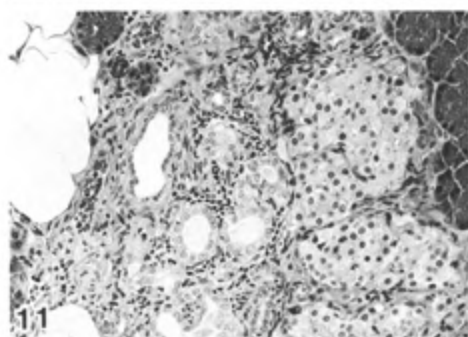
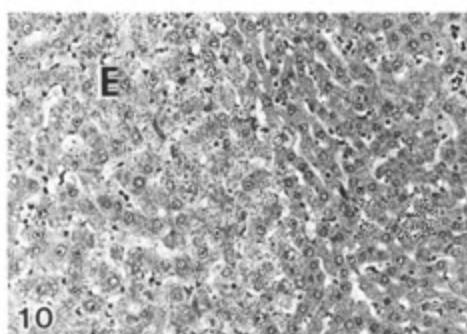
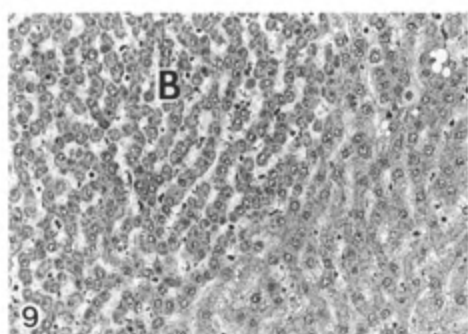
1. Glaister, J.R. The aging mouse In Principles of Toxicological Pathology. Taylor&Francis, London and Philadelphia, 1986.
2. Haseman, J.K., et al. Toxicol. Pathol., 12, 125-135, 1984.
3. Homburger, A., et al. J. Natl. Cancer Inst., 55, 37-45, 1975.
4. Maekawa, A., et al. Gann, 74, 365-372, 1983.
5. Percy, D.H. and Jonas, A.M. J. Natl. Cancer Inst., 46, 1045-1065, 1971.
6. Sher, S.P., et al. Toxicol. Letters, 11, 103-110, 1982.
7. Sollveld, H.A., et al. J. Natl. Cancer Inst., 72, 929-940, 1984.

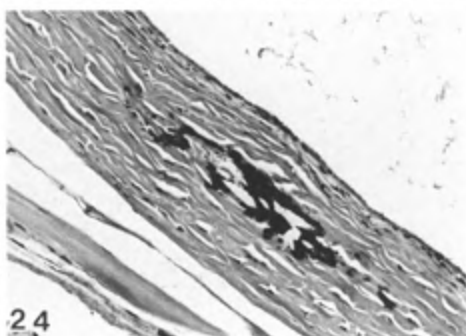
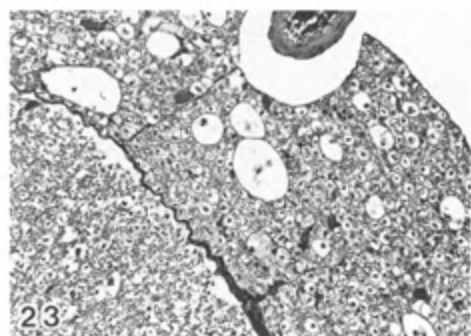
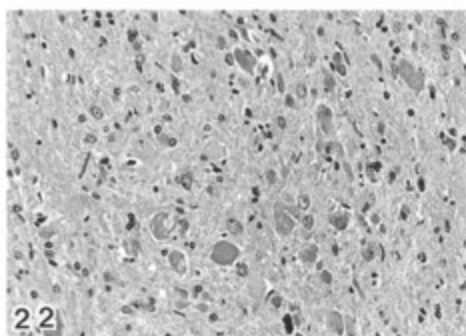
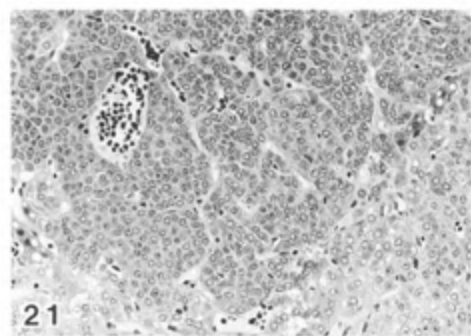
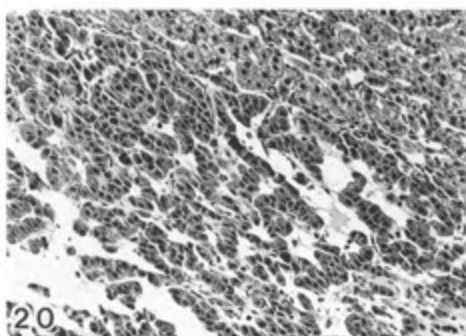
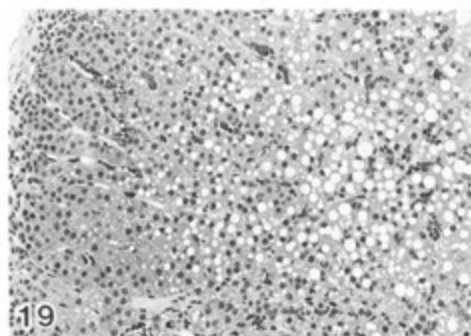
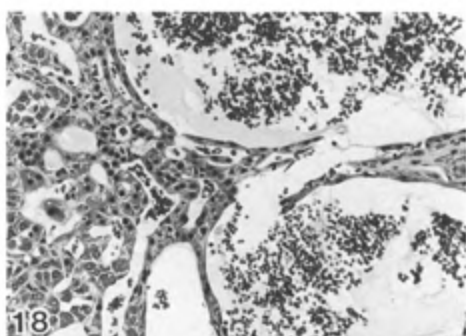
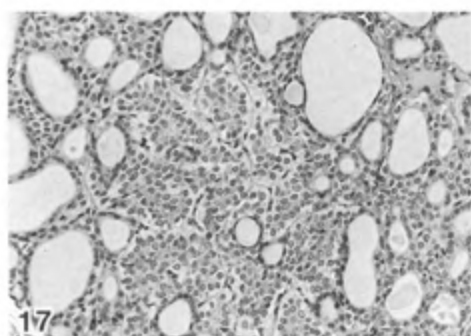
図版説明

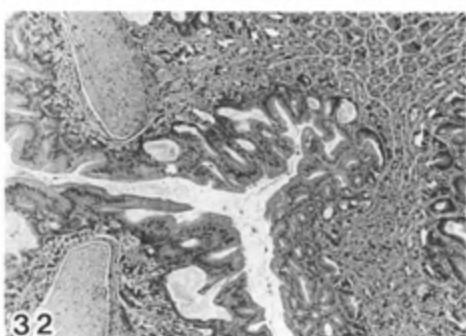
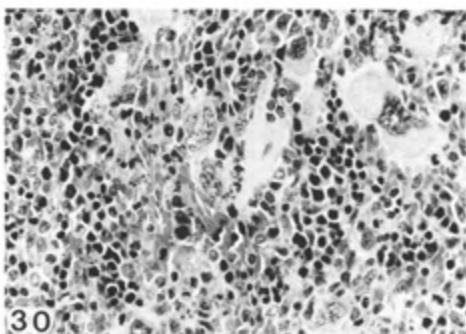
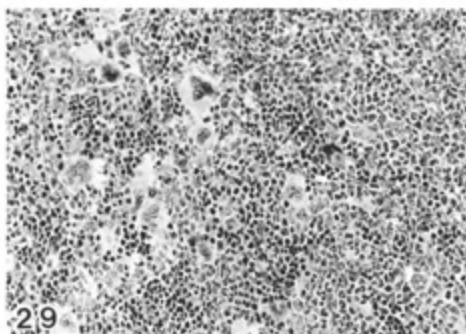
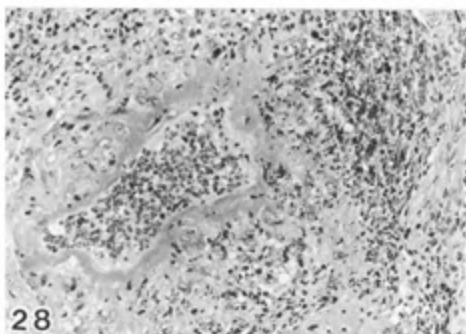
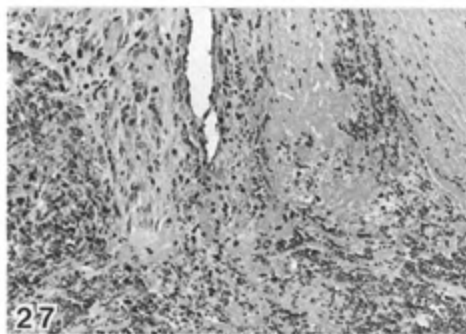
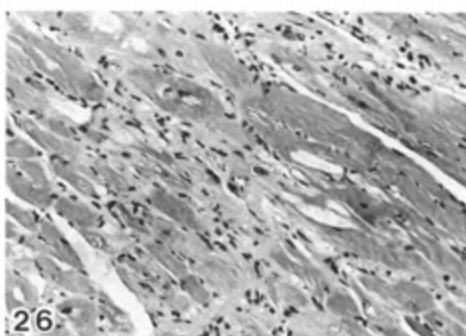
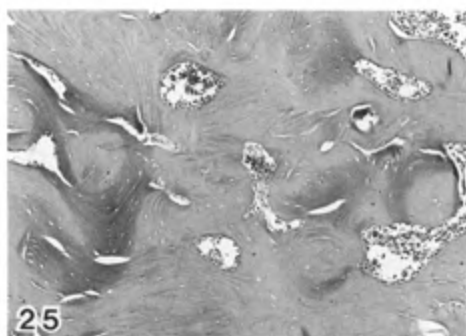
- 図1： ラット雄，心臓，左心室乳頭筋近傍における心筋萎縮線維化。
図2： ラット雄，心臓，心尖部における広範な線維化。
図3： ラット雌，食道，著しい壁の弛緩と内腔の拡張。
図4： 図3と同一動物，肉芽腫性肺炎。肉芽腫の中央に誤蒸された線維が認められる。
図5： ラット雄，肝臓，胆管増生。
図6： ラット雌，肝臓，肝細胞脂肪化。
図7： ラット雄，肝臓，Spongiosis hepatis (Itoh細胞の変性or類洞拡張といわれている)。
図8： ラット雄，肝臓，肝細胞壊死 (写真中央より左側)。
図9： ラット雌，肝臓，肝細胞小増殖巣 (好塩基性，写真Bの部分)。
図10： ラット雌，肝臓，肝細胞小増殖巣 (好酸性，写真Eの部分)。
図11： ラット雄，脾臓，実質の一部の変性・萎縮・線維化。
図12： ラット雄，腎臓，軽度の腎症 (F344ラットでは重度の腎症はまれである)。
図13： ラット雌，腎臓，近位尿細管上皮細胞における好酸性顆粒 (矢頭に示す)。
図14： ラット雄，前立腺，陳旧性化膿性前立腺炎。
図15： ラット雄，前立腺，上皮細胞過形成。
図16： ラット雌，下垂体，全葉のう胞 (ラトケの由来)。
図17： ラット雌，甲状腺，明細胞 (C-cell) 過形成。
図18： ラット雄，副腎，皮質洞拡張 (Peliosis adrenalis)。
図19： ラット雄，副腎，皮質脂肪化。
図20： ラット雄，副腎，皮質過形成。
図21： ラット雄，副腎，髓質過形成。
図22： ラット雌，延髄薄束核における Spheroid 沈着。
図23： ラット雄，脊髄腰部神経根，軸索腔の拡張。
図24： ラット雌，眼球，強膜石灰沈着。
図25： ラット雌，胸骨，骨質増生。
図26： マウス雄，心臓，左心室心内膜下心筋萎縮線維化。
図27： マウス雌，心臓，左心耳血栓。
図28： マウス雌，卵巣，動脈炎。
図29： マウス雄，脾臓，髓外造血亢進。
図30： マウス雄，脾臓，褐色色素沈着増加 (多くがヘモジデリン，リポフスチン)。
図31： マウス雌，腸間膜リンパ節，リンパ球系細胞過形成と洞拡張。
図32： マウス雄，腺胃，粘膜上皮過形成，一部は筋層をこえ漿膜面に増殖。
図33： マウス雄，肝臓，肝細胞腫大。
図34： マウス雄，肝臓，肝細胞脂肪化。
図35： マウス雌，肝臓，静脈壁の小肉芽腫。
図36： マウス雌，肝臓，巣状肝細胞壊死。
図37： マウス雌，腎臓，糸球体硬化症。
図38： マウス雄，腎臓，糸球体メサンギウム肥厚。
図39： マウス雌，腎臓，癒痕部の骨形成。

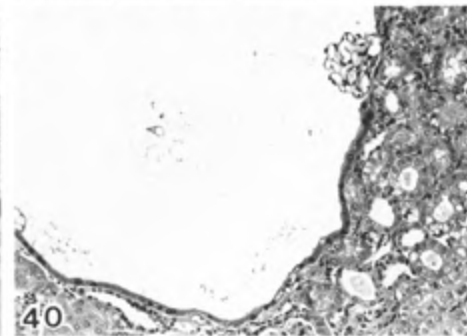
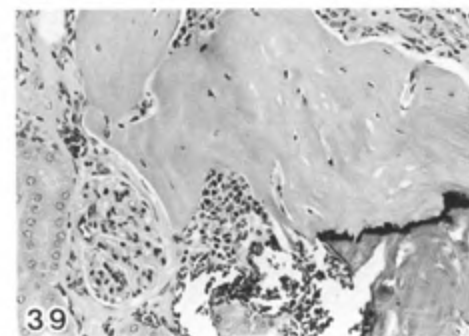
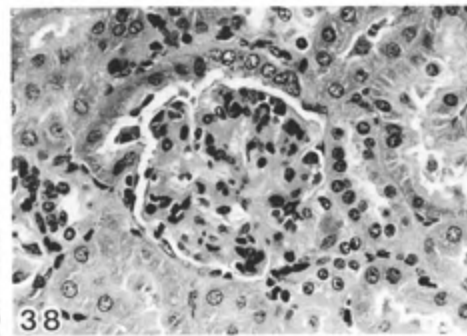
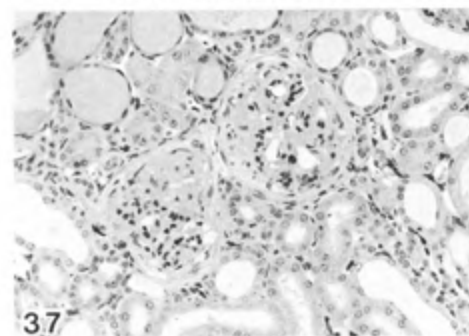
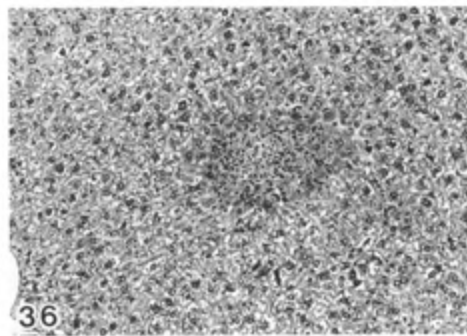
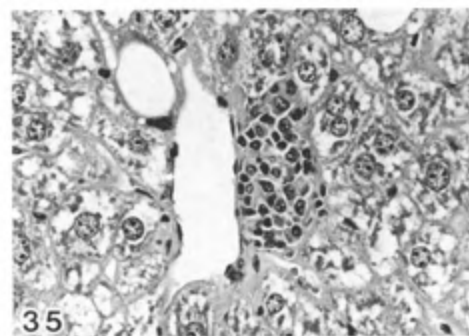
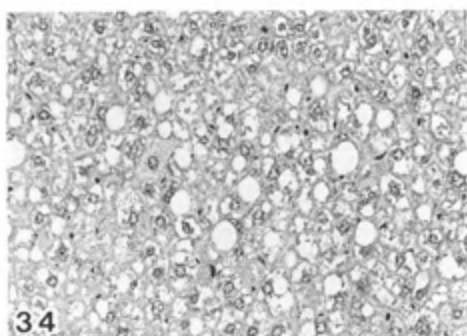
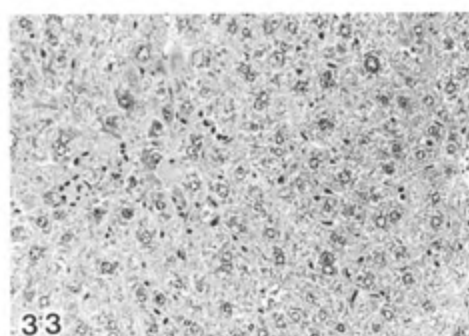
- 図40： マウス雄，腎臓，ボーマンのう拡張。
- 図41： マウス雄，精のう，分泌物うっ滞。
- 図42： マウス雄，尿道，プラグ様物の栓塞。
- 図43： マウス雌，卵巣，のう胞。
- 図44： マウス雌，子宮，内膜過形成。
- 図45： マウス雄，甲状腺，ろ胞拡張。
- 図46： マウス雌，副腎，皮膜下細胞増生。
- 図47： マウス雄，脊髄腰部神経根，ミエリン変性とコレステリン沈着。
- 図48： マウス雄，坐骨神経，神経線維変性。
- 図50： マウス雌，眼球，硝子体の変性・融解（白内障）。
- 図51： マウス雄，眼球，毛様体石灰沈着。
- 図52： マウス雄，膝関節，軟骨増生。
- 図53： マウス雄，皮膚，皮膚炎。
- 図54： マウス雌，回腸，アミロイド沈着（CD-1マウスでは1980年以後頻度が激減し，現在は1%程度の発生率）。
- 図55： マウス雄，ハーダー腺，腺上皮細胞過形成。

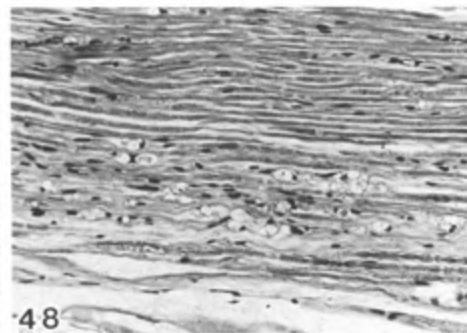
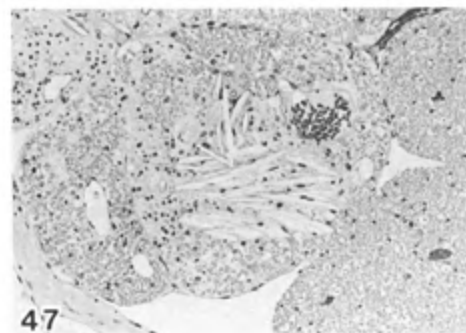
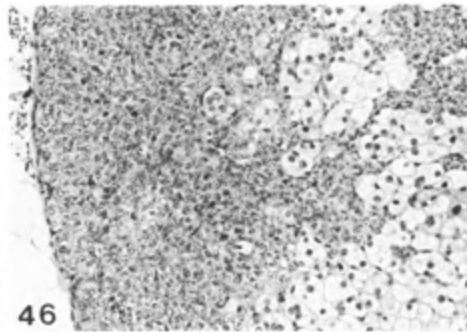
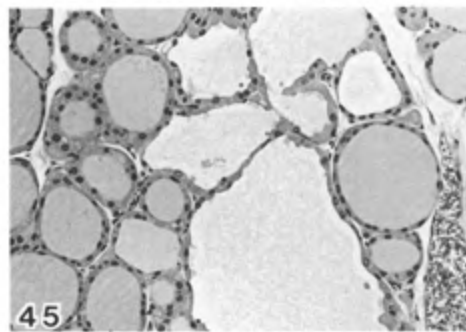
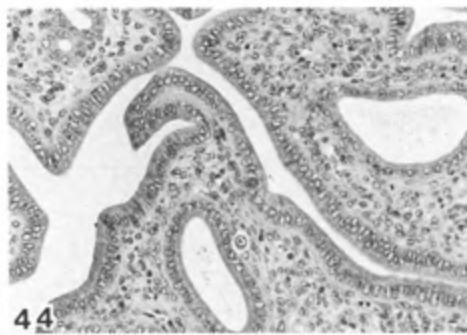
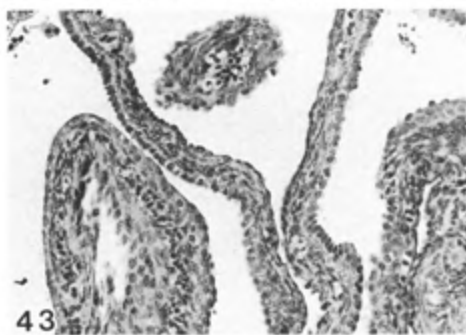
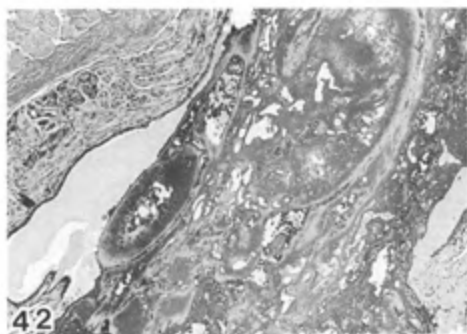
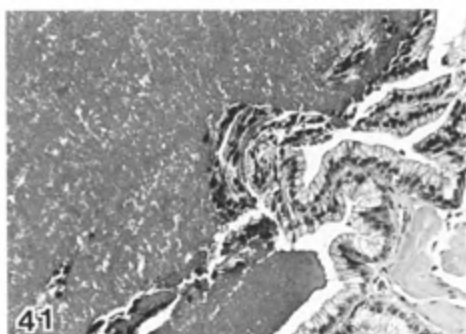


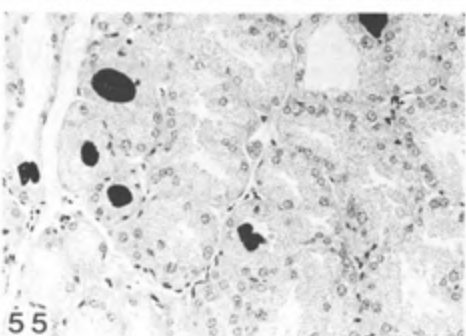
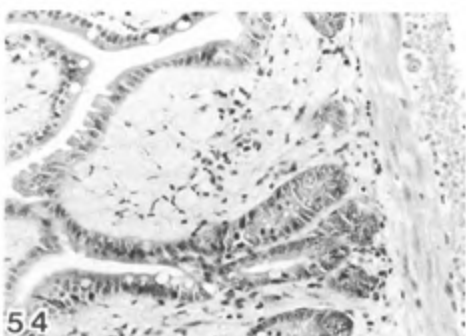
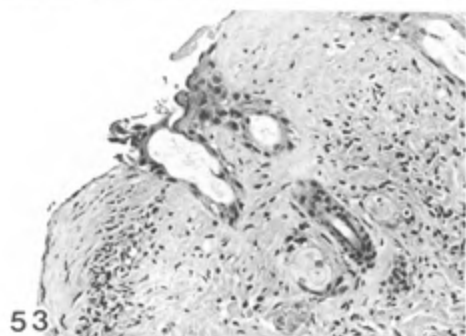
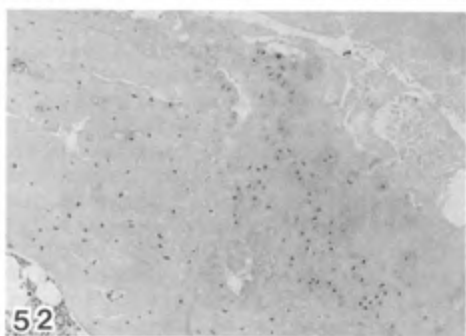
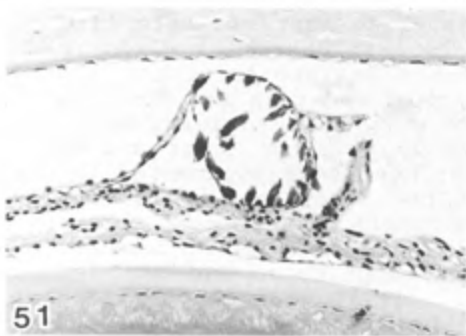
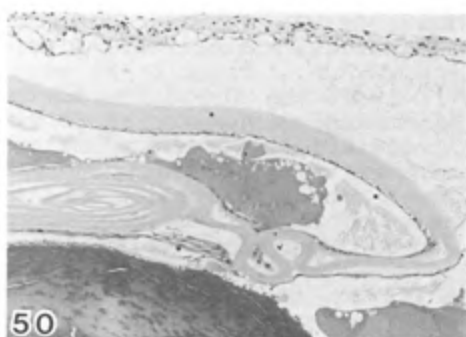
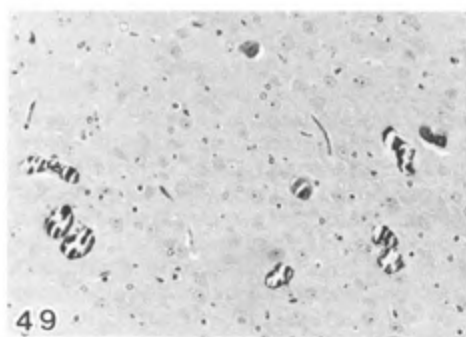












NON-SPECIFIC SENILE LESIONS AND LONG TERM TOXICITY STUDIES:
Keizo MAITA (Toxicology Division, Institute of Environmental
Toxicology. Suzuki-cho, Kodaira, Tokyo, 187)

When the aim of the histopathology in a long term toxicity study is considered to investigate chronic toxic lesions specific to a certain chemical, the treatment should be terminated before reaching senescence of the animals in order to avoid the modification of the lesions by the influence of aging process. However, from a point of view that chemicals can be regarded as toxic agents being possibly harmful to the internal or external environment of human beings, the critical point of the investigation will be focused to detect the combined effects of toxicities by the chemical treatment and aging changes. In the latter case the duration of the treatment should be set as long as covering most of whole life of the animals so that the pathologists in charge of slide reading have to be aware of the senile lesions occurring in the aged animals used in the study. Mice and rats are the historical species of animals in the long term toxicity studies. Among the senile lesions in these animals the types and incidences of neoplastic lesions have been well documented in the literatures and major concern in the investigation is usually concentrated on the diagnostic criteria between real tumor and hyperplasia. The description of non-neoplastic lesions is also important and sometimes more complicated and troublesome than that of neoplastic lesions. It is well recognized that the occurrence of non-neoplastic lesions is more influenced by the change of food, water, bedding stuff, and other factors in animal handling than that of neoplastic lesions. As senile changes, in general, can occur in all types of tissues or organs in the body, every component of a certain tissue has some changes of aging so that detailed description of these changes in each animal will be needed a lot of sheets of paper. However, it would be rather inappropriate as the report of a toxicity study to give too much informations of histopathology which might not be so essential for the evaluation of the toxicity or the understanding of the physiological status of the animal. On the contrary, the limited reports on only the changes of the target organs will be also inadequate to know the history of the animals exposed to the chemical for long days. To be aware of individual difference between animals is also important. Aging process seems to enhance the individual difference in response to the chemical treatment. Therefore, the investigation of representative animals of small size in a group may sometimes fail to show the overview of the chronic effects of the chemical. The strain difference may create a big problem especially concerning the evaluation of severity of the lesions. For an instance, the degree of chronic progressive nephropathy is much severer in Wistar rats than in F344 rats, and grade (+) lesion for Wistar is almost equivalent to grade (+++) for F344. Another important factor is diagnostic criteria of the pathologists. The last one may be the most critical point in the investigation of non-neoplastic lesions. It is considerably easy to have a common agreement in diagnosis for neoplastic lesions among pathologists. Whereas, as for non-neoplastic lesions, it would be a kind of endless struggle to set up a standard diagnostic

criteria. To select which type of lesions from which kind of tissues as the lesions in the report of a toxicity study, and to give which grade of severity to the lesion are principally depended upon the philosophy of the pathologist. In conclusion, when the histopathological data in the long-term toxicity studies are evaluated, it should be taken into consideration that the expression of chronic toxicity effects by the chemical could be modified by non-specific senile changes, especially by non-neoplastic lesions, and that the types, incidences, and grading of non-neoplastic lesions would be more influenced by various factors including animals strain, handling conditions, and diagnostic criteria of the pathologist than those of neoplastic lesions.

薬物代謝と長期毒性評価

佐藤哲男

東京薬科大学第一薬理学

はじめに

一般に、異物が体内に取り込まれた場合、主として肝臓において処理された後、排泄される。しかし、連続投与の場合はその事情がかなり異なり、予測しない結果をもたらすことが少なくない。例えば、薬物療法において同一薬物が長期連続投与されたとき、薬効が次第に減弱することがある。その原因としては、当該薬物の作用部位における感受性の低下と末梢における薬物代謝酵素活性の増加による代謝促進が考えられる。

一方、薬物によっては薬物代謝酵素活性を増加せず、逆に阻害するものもある。さらには、投与経路・用量・期間などにより、同一薬物でも薬物代謝活性を増加(induction)したり、阻害(inhibition)したりすることがある。本ワークショップは長期投与時にみられる毒性の評価を主題としているが、私は特に長期にはこだわらずに、連続投与時にみられる酵素誘導および酵素阻害について毒性学の立場から述べたい。

1. 異物の代謝的活性化と組織傷害

一般的に、化学物質は体内で代謝を受け、ある物質は不活性代謝物となって抱合・排泄される。しかし、他の物質では代謝的に活性化されて活性代謝物を生成する。同一物質でも不活性型・活性型の両代謝物に変換されるものもある(図1)。この様にし



図1. 異物の代謝的活性化と組織傷害

て生成した活性代謝物は生体構成高分子(核酸・蛋白質・脂肪)と強固な共有結合を形成し、それが引金になって細胞傷害にまで発展する例は少なくない。この場合、当該化学物質またはその代謝物が酵素誘導能または酵素阻害作用を有する場合には事情は一層複雑となる。以下にそれらについて述べる。

2. 酵素誘導 Enzyme Induction

薬物を連続投与することにより、薬物代謝酵素活性が投与量や投与期間に依存して増加することがある。一般に酵素誘導能の有無を知る場合の目安としては、最終投与後24時間以上経過してから酵素活性を測定した方がよい。その理由は、体内に残存している薬物による酵素の競合的抑制が見られることがあるからである。

酵素誘導剤を投与した場合、薬物代謝酵素活性のみならず生体常在成分の代謝系をも亢進することがある(図2)。従って、化学物質による酵素誘導現象は単に薬物代謝の異常のみに留まらず、生体の恒常

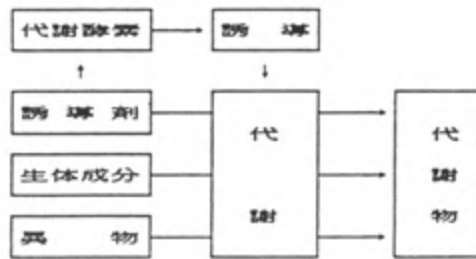


図2. 酵素誘導剤の薬物代謝への影響

性にまで影響することがあることに留意すべきである。酵素誘導剤の特性としては、①生理的pHで脂溶性が大きい、②組織内に長時間・高濃度で貯留する、③化学構造上の共通点はない、等を挙げることが出来る。しかし、速やかに代謝を受け排泄される物質でも繰り返し投与すれば酵素誘導を起こすことがある。

1) 酵素誘導の可逆性

酵素誘導剤が連続投与された時に現われる組織への影響は、その物質の排泄速度によりかなり変動する。例えば、図3に示した3種の物質の中で、投与中止により誘導された酵素活性が短時間の内に投与開始前まで回復する場合(①の例)は、組織傷害の程度は比較的少なくて済むものと考えてよい。つまり、組織の修復が極めて早いからである。それに反して、③の例では投与を中止したにもかかわらず酵素活性は高いレベルに維持さ

れたまま推移する。これは当該物質またはその代謝物が体内、特に脂肪組織などに蓄積し、長い年月にわたり組織に傷害を与える場合である。PCBやDDTなどがその

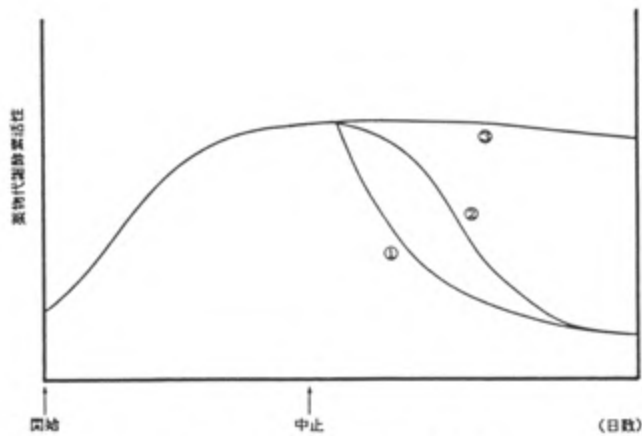


図3. 酵素誘導作用の可逆性

一例である。この様に、誘導剤といっても全てが重篤な状態をもたらすとは限らない。

また、同一物質を投与した場合でも誘導を受ける程度が酵素の種類により異なる。これには、各酵素の代謝回転速度が大きな変動因子となる。図4に示したように、 E_0 から E_0' まで到達するに要する時間は代謝回転速度の早い酵素Aの方がBに比べて短い。

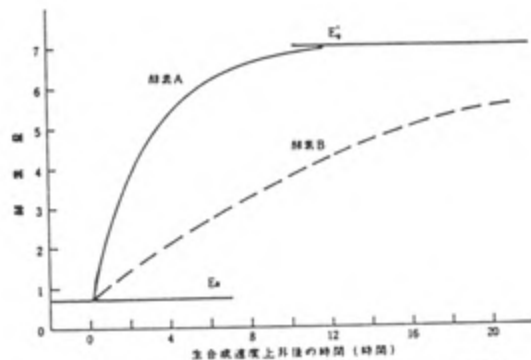


図4. 酵素の代謝回転速度と酵素誘導との関連性

代謝半減期が2時間の酵素Aと、代謝半減期が酵素Aより5倍長い10時間である酵素Bとが、いずれも時間0で生成速度が10倍に上昇したとする。酵素量はいずれも誘導前の値 E_0 から、その10倍の E_0' まで増加していくが、代謝半減期が短い酵素Aの方がはるかに早く E_0' の水準に到達する。

文献1から引用

2) 酵素誘導と細胞機能

酵素誘導は環境の変化に対する細胞の適応現象の一つであり、細胞の正常な機能が異物の受け入れによって大きく攪乱されないような方向へ細胞機能を変化させるものである。もし酵素誘導によって高まった薬物代謝活性が肝細胞内の常在成分の代謝と直接の関係がなく、薬物代謝により生成した中間体あ

るいは最終生成物が細胞の機能に何等影響を与えないのであれば、薬物代謝酵素の誘導は細胞に何ら有害な影響を及ぼすことはない。しかし、実際には薬物代謝酵素の誘導は肝細胞の正常な代謝にまで影響を与える可能性があるし、その上薬物の活性代謝物が細胞毒性を示すことも少なくない。その様な細胞への影響が、結果として個体レベルでの薬物の毒性として現われることとなる。

3) 誘導機構

酵素誘導は主として肝小胞体の異常発達に関連し、また、活性化アミノ酸から蛋白質への真のde novo合成の促進を意味している。

誘導において最初の2~3時間は核内のRNAポリメラーゼ活性がかなり増加する結果、転写が亢進し、より多くの細胞内RNAが生成する(図5)。しかし、最近では誘導機構が転写(transcription)の促進に

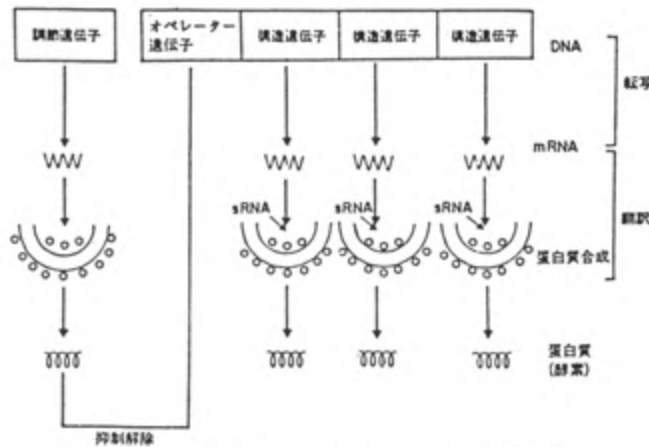


図5. 動物における遺伝子表現の簡略模式図
文献 2 から引用

より説明されない場合もあり、いわゆる“posttranscriptional regulation”も知られている。誘導時には小胞体膜に存在するリボヌクレアーゼ活性が著しく減少する。これはmRNAの分解の阻止を説明するものであり、同時に蛋白合成の亢進に寄与することを意味している。

4) 酵素誘導例

誘導能を有する物質は200種以上知られており、長期投与により他の化合物の代謝を促進するのみならず、それ自身の代謝をも亢進する(自己誘導)結果、薬効・毒性に影響を及ぼすものもある。代表的な物質としては、①フェノバルビタール、②多環

芳香族炭化水素, ③塩素含有化合物, ④アルコール, ⑤その他, がある。

表1はテレピン油(Turpentine) 300ppmを含む空気をラットに1日6時間, 1週5日, 8週間吸入させた時の肝薬物代謝酵素活性の変動を示したものである(表中の数値は対照群を100とした相対値)。これから明かな様に、誘導の程度が酵素に

表1. Turpentine の肝薬物代謝酵素への影響

曝露期間 (週)	NADPH-チトクロームc 還元酵素	チトクローム P-450 ^a	7-エトキシクマリン 脱エチル化酵素 ^a	エポキシド 水分解酵素 ^a	UDP-グルクロニル トランスフェラーゼ ^a
4	139***	126***	135*	148*	179**
5	133**	119*	162***	161***	159*
6	118	134*	143***	150**	160***
7	126	117	138***	150**	127*
8	113	113	123*	158***	149**

* : nmole/mg protein/min. ^a : nmole/mg protein.

注) Turpentine 300ppm を含む空気を1日6時間, 1週5日, 8週間吸入。値は対照群を100とした相対値。

* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001.

Turpentine (テレピン油) は pinene や camphene その他のテルペンの混合物である

文献 3 から引用

よりかなり異なる。また、表2にはラット, ハムスター, モルモットに種々の酵素誘導剤を投与した時に見られる肝ミクロゾームのカルボキシルエステラーゼ活性の変動を示している。ラットの場合、3種のアイソザイム(RL1, RH1, RL2)のうちRL2は比較

表2. 肝ミクロソームカルボキシルエステラーゼの
誘導における種差

Inducer	Rat			Hamster	Guinea Pig
	RL1	RL2	RH1		
PB	-	***	***	+	-
3-MC	-	-	-	-	-
TSO	-	+	-	-	-
PCB	-	+	-	-	-
AM	***	***	-	-	-
CPIB	**	**	***	+	-

PB, phenobarbital(80 mg/kg, i.p.); 3-MC, 3-methylcholanthrene (40 mg/kg, i.p.); TSO, trans-stilben oxide(150 mg/kg, i.p.); PCB, aroclor 1254(500 mg/kg, i.p.); AM, aminopyrine(600 mg/kg, p.o.); CPIB, clofibrate(300 mg/kg, p.o.)

的誘導を受け易いが、RL1とRH1は特定の誘導剤にのみ感受性がある。また、ハムスターやモルモットはラットに比べて誘導剤に対する反応性が極めて小さい。この様に、動物の種属や、同一

酵素でもアイソザイムの種類により誘導剤に対する感受性には差がみられる。

3. 酵素阻害 (Enzyme Inhibition)

一般に薬物代謝反応は基質特異性の低い酵素反応であるため、複数の薬物を同時あるいは時間を前後して与えると、相互に阻害することにより単独投与の時よりも代謝が阻害されることがある。

1) 阻害機構

狭義の薬物代謝酵素であるチトクロム P-450 (P-450と略) の場合、代謝反応にはP-450と基質との結合が必要であるので、結合部位における競合が考えられる。P-450には疎水結合部位とヘム鉄部位の2種があるとされているので、当然のことながら親和性の大きい基質は小さい基質を追い出すことにより結果的に親和性の小さい基質は代謝が遅れることになる。また、P-450依存性薬物代謝系においては、電子伝達系の阻害やフラビン酵素 (fp₁, fp₂) の活性低下による代謝阻害がある。さらには、ヘム並びにアポ蛋白の合成阻害や分解促進が考えられる。ヘム量の増減は直接的に体内のヘムのプールの動態を変えるためP-450やチトクロム b₅量に影響する。

2) 酵素阻害例

従来知られている多くの阻害剤は上述の何れかに分類され

ると考えられ、薬物を長期に投与した場合、これらの機構により阻害が現われることが多い。よく知られている代謝酵素阻害剤としては、①SKF 525-A, ②methyrapone, ③imidazole類, ④methylenedioxy benzeneとその誘導体, ⑤蛋白合成阻害剤, ⑥Disulfiram, ⑦有機リン化合物等がある。図6

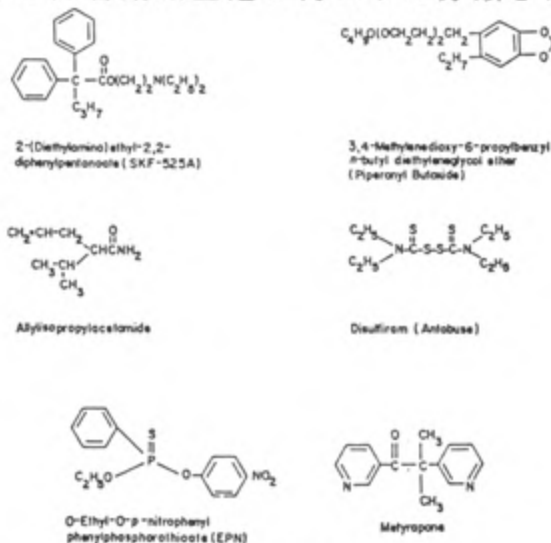


図6. 異物代謝酵素の一般的阻害剤

には薬物代謝酵素阻害剤の中でよく知られているものを例示した。中でもDisulfiramはアルデヒド脱水素酵素の阻害剤として異物の代謝のみならず脳内インドールアセトアルデヒドの代謝も阻害し、脳内レベルを増加することにより5HT代謝を攪乱することが知られている。この様なアルデヒド脱水素酵素阻害はアンタビュース様作用と呼ばれ、ある種のセフェム系抗生物質の副作用としても知られている。従ってこの種の抗生物質を服用する場合は酒類は控えねばならない。また、EPNは有機リン剤であることからエステラーゼの強力な阻害剤である。同様の有機リン剤であってもその分子内にClが4箇入ったTetrachlorvinphosの場合は、*in vitro*ではエステラーゼ阻害であるが、*in vivo*で繰り返し投与することによりClによる酵素誘導が現われる。この様に同一の薬物でも投与期間や投与量により阻害と誘導の相反する作用を示すことがある。

おわりに

薬物代謝からみた長期毒性について概説したが、これらの中で重要な事項を要約すると次のようになる。

1. 異物投与による薬物代謝酵素(広義)活性の変動(誘導, 阻害)はその可逆性の有無や大小により組織阻害に大きな影響をもたらす。
2. 投与物質またはその活性代謝物の体内貯留時間により毒性が大きく変動する。
3. 活性代謝物-組織間の共有結合や、組織の脂質過酸化など、活性代謝物と生体構成成分との相互作用が毒性に大きく影響する。

文献

1. 大村恒雄: 酵素誘導 - 薬物代謝を中心に - (高島英伍, 佐藤哲男 監修), p3, 清至書院, 1985
2. 本山直樹: 毒性生化学 - 分子レベルからみた毒性の解析 - (佐藤哲男, 本山直樹 監訳), P148, ソフトサイエンス社, 昭57
3. 有吉敏彦: 酵素誘導 - 薬物代謝を中心に - (高島英伍, 佐藤哲男 監修), P60, 清至書院, 1985

MODULATION OF METABOLISM AND TOXICITY OF XENOBIOTICS IN LONG-TERM TESTING: Tetsuo SATOH (Dept. of Pharmacol. and Toxicol., Tokyo College of Pharmacy, Horinouchi, Hachioji, Tokyo, 192-03).

Long-term toxicity can be produced by two mechanisms. Toxicity may be caused by the gradual accumulation of a toxic material in a target tissue; in other cases, the chemical agent or one or more of its metabolites may cause an acute effect, which in turn occasions a cascading series of tissue changes which ultimately become clinically or histopathologically apparent. In long-term toxicity testing, time-dose interactions should be mentioned. In general, large doses produce earlier and more severe lesions which may, in some instances, differ considerably from lesions caused by lower doses administered over longer period of time. From the viewpoint of biochemical toxicology, induction and inhibition of the enzymes involved in drug metabolism by xenobiotics administered should be mainly focused.

1. Enzyme induction. The phenomenon, which came to be known as induction has been studied extensively. In its broadest sense, it is an adaptive phenomenon providing increased capacity, which occurs in all species from bacteria to mammals. In cases of hepatotoxicants, effective xenobiotics must be soluble, and apparently able to enter and bind the smooth-ER. The induction process consists of increased synthesis of liver microsomal protein, and the synthesis of increased protein is apparently at the level of transcription involving increased production of mRNA. In addition,

phospholipid synthesis is also increased, which in turn causes the increased production of phosphatidylcholine-containing increased amounts of polysaturated acyl side chain. Up to now, more than 200 compounds have been found to lead to enzyme induction. These include barbiturates and other drugs, polycyclic hydrocarbons, steroids, chlorinated insecticides and herbicides.

2. Enzyme inhibition. A number of agents and manipulation can inhibit metabolism of xenobiotics by interfering with various steps or components of the drug metabolizing enzymes. It is important to note that just as induction of enzyme systems can shift metabolism from a major pathway, so can inhibition of a metabolizing pathway alter the pattern as well as the rate of metabolism. The multiple changes may also occur in time-related sequences. Modification of phospholipids may represent early stages, followed later by impairment or enhancement of drug metabolism and subsequent morphological alterations. The ultimate outcome of these changes may be related to molecular alterations of the site of membrane activity represented by the interactions of the phospholipids with proteins.

In summary, the most useful variation for study of mechanisms and as potent determinants of toxicity are imposed by chemical induction or inhibition and by species effects.

短期試験法による長期毒性の予測

石館 基

国立衛生試験所・安全性生物試験研究センター・変異原性部

長期毒性試験を予測するための短期試験法として種々の試験法が開発されつつある。その理由に長期毒性試験が莫大の費用を要すること、さらに、近年諸外国では、動物愛護運動が盛んとなり、動物実験に代わり得る代替法の開発が強く望まれていることなどが考えられる。各種の動物実験の代替法については、去年の本学会でシンポジウムに取り上げられているので、その詳細については割愛する。今回は、特に、発がん性を予測するために広く用いられている変異原性試験に重点を置き、現在までに得られた結果を総合し、変異原性の強さと発がん性との関連について考察を加えてみたい。

1. 発がん物質の変異原性

発がん物質を予測し得る試験系は、少なくとも既存の発がん物質の殆どすべてのものをもれなく検出し得るものでなければならない。Amesらの手で開発されたサルモネラを用いる復帰突然変異試験 (Amesテスト) は、本邦では、既に、労安法¹⁾、薬事法²⁾、化審法³⁾ および、農薬取締法⁴⁾ の中に採用されている。最近、黒木・松島らの手でまとめられた報告によれば、表1に示す如く、発がん物質の約80%のものが本法で陽性となることが解る。⁵⁾ 本邦の労働省の有害調査の結果によれば、新規化学物質として登録された化学物質の約3%のものに極めて高い変異原活性 (検体mg当りの誘発変異コロニー数) が認められており⁶⁾、これらの化合物は、職業がんを予防するため、取り扱いに十分注意するように勧告されている。

TABLE 1

Validation studies on the Ames test for carcinogens and non-carcinogens

Reported by	Sensitivity Positives/ carcinogens
McCann et al.(1975)	157/175 (89.7%)
Nagao et al. (1978)	136/160 (85.0%)
Purchase et al.(1978)	53/58 (91.4%)
Bartsch et al.(1980)	62/82 (75.6%)

(Kuroki & Matsushima, 1987)

一方、発がん物質のあるものは、Amesテストで検出されにくい、あるいは、全く検出されない。1980年、WHO/IPCS (国際化学物質安全性計画) では、上記問題をとり上げ、国際協力事業 (CSSTT) を開始した。⁷⁾ ここでは、表2に示すような化合物を対照とし、Amesテスト以外の試験法、特に、哺乳類培養細胞を中心とする試験が行なわれた。これらの結果は、既に、単行本として出版されている。⁸⁾

TABLE 2

Carcinogens which were tested in the collaborative study on in vitro short-term test(WHO/IPCS/CSSTT)

Hexamethylphosphoramide (HMPA)	Benzene
o-Toluidine	Acrylonitrile
Diethylhexylphthalate (DEHP)	Phenobarbital
Diethylstilbestrol (DES)	Saftrole

上記事業の結果によれば、Amesテストでは検出されにくい発がん性物質は、培養細胞を用いる試験系、特に、染色体異常を指標とする試験系で容易に検出される可能性が示唆された。Amesテストは遺伝子レベルの変化を指標としているが、後者は染色体レベルの変化を指標としているものであり、この両者の遺伝学的指標は、互に補足し合う関係にある。OECDの遺伝毒性に関する考え方⁹⁾、および、本邦の薬事法その他の変異原性試験ガイドラインに、上記2つの試験系を組み合わせるよう指導されているのもこの理由によっている。

最近、我々の手でまとめた結果によれば、既知発がん物質98種のうち、91種のもの(約93%)は、哺乳類培養細胞に染色体異常を誘発することが解った。¹⁰⁾ 両者の試験で共に陽性となったものは約76%である。

2. 変異原性の定量的評価

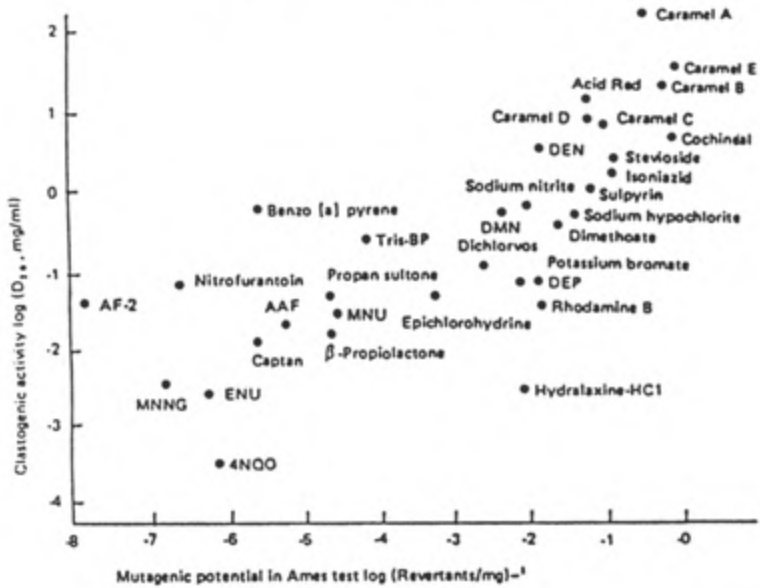
変異原性試験で得られた結果を単に陽性、あるいは陰性という定性的な比較で評価することは危険である。Amesテスト、染色体異常試験で共に陽性となった化合物の活性値を比較すると図1の如くなる。活性値は化合物によって 10^6 倍以上の幅があり、しかも両試験間に良い相関性が見られている。

Amesらは、Amesテストの活性値と動物に対する発がん性の強さ (TD_{50} : 50%の動物にがんを発生させるに要する濃度) との間には相関性が見られるという。我々は、チャイニーズ・ハムスター線維芽細胞 (CHL) に対する染色体異常誘発性の強さ (D_{20} : 20%の中期分裂細胞に異常を誘発せしめる濃度)¹¹⁾ と上記 TD_{50} 値とを比較したところ、図2に示す如く、両者の間に良い相関性が見られた。

(財団法人日本化学物質情報センター・大島輝夫氏の協力による。)

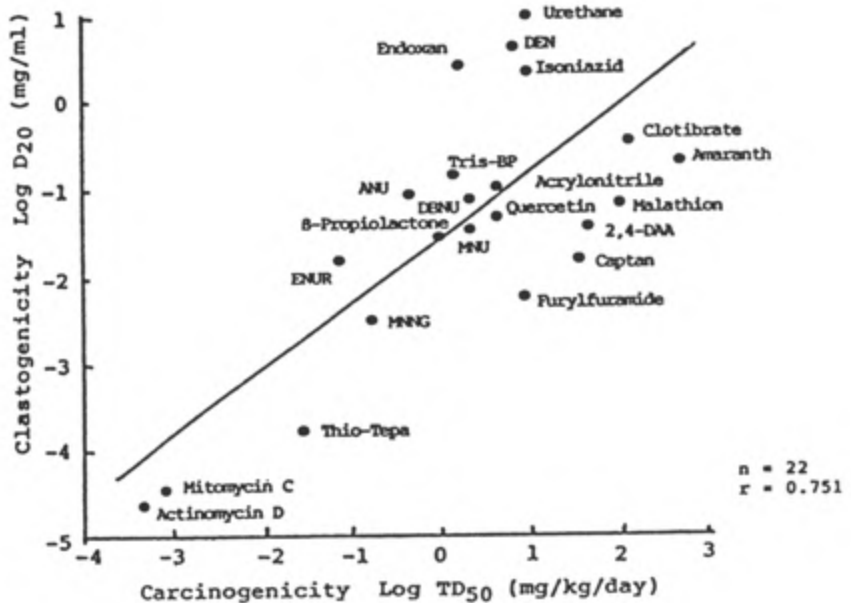
☒ 1

QUANTITATIVE RELATIONSHIP BETWEEN CLASTOGENIC ACTIVITY IN THE CHROMOSOMAL ABERRATION TEST IN VITRO AND MUTAGENIC ACTIVITY IN THE AMES TEST



☒ 2

CORRELATION BETWEEN CLASTOGENIC (D₂₀) AND CARCINOGENIC (TD₅₀) POTENTIAL (Prepared by JETOC, Tokyo, 1987)



3. 変異原性物質の発がん性

発がん物質には変異原性が認められるが、逆に、変異原性のある物質すべてに発がん性があるわけではない。昭和54年より開始された厚生省のがん研究班の結果を見てもそのことは明らかである。同班では、変異原性試験で陽性となった生活関連物質合計25種類について、ラットおよびマウスを用いる発がん性試験を試みた。その結果の要約を表3に示す。即ち、25種類のうち、7種の物質(28%)に発がん性が認められたに過ぎなかった。この数字は一見低いように見えるが、変異原性試験を行わずに発がん実験を行なった場合を想定すれば、その確立は高いものと思われる。

TABLE 3

Carcinogenicity bio-assay on the chemicals which were positive in short-term mutagenicity tests (A National collaborative study, Ministry of Health & Welfare, Japan)

Positive compounds	Negative compounds
Furylfuramide (AF-2)	Acid Red
Barbital	Butylated hydroxytoluene
Butylated hydroxyanisole (BHA)	Caffeine
Hydrogen peroxide	Caramel
Phenacetin	Erythrosine
Potassium bromate	i-Butyl p-hydroxy benzoate
Sulpyrin	Potassium sorbate
	Potassium metabisulfite
	Sodium benzoate
	Sodium nitrate
Aspirin	Sodium nitrite
Acetaminophen	Sodium erythorbate
Nitrofurantoin	Sodium hypochlorite
	Thiram
	Dichlorvos (DDVP)

先に変異原性が確認され、後になって発がん性も実証された例としては、この他、MNNG、Trp-P-1 および、その他の熱分解産物類、captan、hydralazine、8-nitroquinolineなどが知られている。

医薬品として知られる phenacetin は、最初、Amesテストでは検出されなかったが、ラットのS9(ミクロゾーム分画)の代わりに、ハムスターのS9を加えると陽性となる。これは、脱アシル化の活性が、ラットとハムスター間で10倍以上異なるためと思われる。¹²⁾

In vitro系の試験で陽性となったとしても、in vivo系の変異原性試験、例えば、マウスを用いる小核試験などで陽性となるとは限らない。表4にin vitro染色体異常試験の活性値(D₂₀)と小核試験結果の比較例を示す。

TABLE 4

Specific clastogenic activity in vitro (D₂₀ value) and the micronucleus test in mice

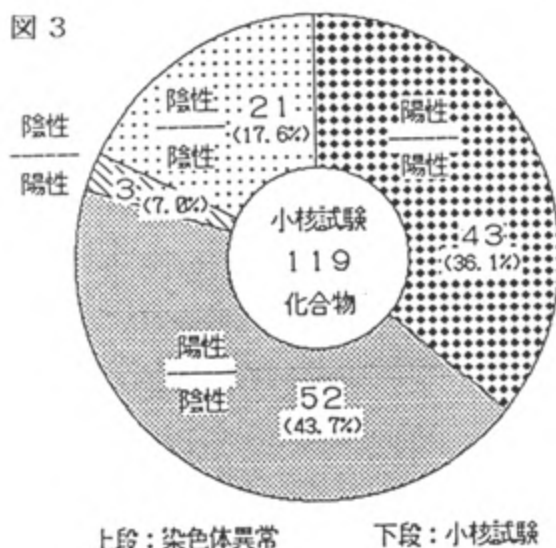
Compound tested	Chromosome test D ₂₀ (mg/ml)		Micronucleus test Dose (mg/kg, i.p.)	
Mitomycin C	0.00001	(+)	3	(+)
4-NQO	0.00032	(+)	80	(+)
5-FU	0.00038	(+)	100	(+)
MNNG	0.0028	(+)	50	(+)
ENU	0.063	(+)	50	(+)
Potassium bromate	0.071	(+)	100	(+)
Sodium nitrite	0.32	(+)	200	(-)
Fast Green FCF(crude)	2.0	(+)	2000	(-)
Potassium bromide	3.7	(+)	500	(-)
Acid Red	4.7	(+)	1600	(-)
Propylene glycol	20.0	(+)	15000	(-)

D₂₀ 値の低い化合物（すなわち、染色体異常試験で活性の高いもの）では、小核試験で陽性となる確立は高いが、D₂₀ 値が高いものはかなり高濃度を投与しても、小核試験で陽性とはならない。小核試験で陰性に終る場合には、例え、in vitro 系試験で陽性であったとしても、生体に及ぼす影響は比較的低いものと判断される。これに反し、in vitro系でもin vivo系でも共に陽性となるような場合には、さらに動物実験を追加し、当該物質の安全性について吟味する必要がある。食品添加物として知られる臭素酸カリウムは、Amesテスト、染色体異常試験、並びに、小核試験で共に陽性となった物質である。長期動物実験の結果、発がん性も疑われ、食添としての使用基準も厳しく規制される結果となった。ベンゼンは、ヒトに対して発がん性が疑われている物質である。Amesテストは陰性であるが、染色体異常を誘発する性質があり、しかも、小核試験でも陽性となることが知られている。

4. 哺乳類 in vivo法による変異原性の確認

本邦の試験法ガイドラインでは、in vitro 試験で陽性結果が得られた場合には、原則として小核試験を実施するよう指導されている。本法では、被験物質を動物に投与した後、適切な時期に骨髓細胞を採取し、多染性血赤球中に出現する小核を観察する。小核は、赤芽球の分化、分裂中に誘発された染色体の損傷あるいは不分離によって形成されるものであるため、本法は一種のin vivo 染色体異常試験に相当する。¹⁹⁾ 現在、哺乳類を用いて遺伝子突然変異を容易に検出し得る手法が確立されていないため、本法が広く用いられるようになった。前記したWHO/IPCSの国際協力事業においても、発がん物質と非発がん物質とを比較的明確

に選別し得る手法として、小核試験の有用性が指摘されている。小核試験を行った119種の化合物と、in vitro 染色体試験との関連性を図3に示す。



通常、小核試験では骨髓の赤血球を対象としている。しかしながら、被験物質の種類によっては、生体内で速やかに代謝され、その代謝産物が骨髓まで到達し得ない場合もあろう。従って、妊娠動物を用い、胎仔の肝臓中の赤血球を対象とする変法も工夫されている。我々は、現在、末梢血中の赤血球を対象とし、レーザー光線によるフローサイトメータを利用することを試みている。例えば、ベンゼン (625 ~ 2500mg/kg) 週一回6週間にわたって経口的に強制連続投与すると、小核を持つ赤血球が末梢血中に蓄積され、しかも、その出現率は4-5週目まで用量依存性をもって増加した。本法によれば、約5万個の赤血球を数分以内で処理することができる。従って今後、ヒトの環境汚染のモニタリングに本法を応用することも可能となろう。

英国ICIのDr. J. Ashbyらは、小核試験で陰性の結果が得られた場合には、さらに、ラットあるいはマウスを用いて、in vivo-in vitro法によるUDS (不定期DNA合成) 試験を追加すべきであるという。¹⁴⁾ すなわち、検体を投与した後、適切な時期に動物を屠殺し、肝臓細胞を採取し、そのDNA傷害の有無を見極めようとするものである。本邦の松島らは、発がん物質の臓器特異性を検索する目的で同様な手法を採用している。彼らによると、MNNG関連化合物の如く、胃がんを発生させるものでは、UDS (あるいは、TDS: DNA合成の総量) は腺胃の粘膜に特異的に誘導されるが、2-AAFあるいはDMNなどでは、胃粘膜では陰性であ

り、肝臓で陽性となる傾向にあるという。¹⁵⁾ 臓器の特異性を見極めるためには、生体内の主要臓器全てについて、探索する必要があるが、今後に残された重要な課題であろう。

5. 今後の問題点

In vitro系は勿論のこと、in vivo 法でも短期試験法によって得られる情報は自ら限界がある。そこで得られた毒性所見が、長期動物実験で必ずしも表現されてこない場合もあろう。発がん性を例にとるならば、変異原性試験で高い活性を示す物質のうちのいくつかは、発がんイニシエーターとして関与する可能性は高い。しかしながら、細胞レベルで生じた突然変異は必ずしも発がん性の方向に向かうとは限らない。あるいは、発がん性と無関係に遺伝毒性として次世代に影響を残す可能性もある。また、細胞の分化に変調を来すとすれば、胎仔の発生に影響を及ぼし、催奇形性につながる可能も否定できない。

米国のGENE-TOXの検索によれば¹⁶⁾、colchicine, phenanthrene, cyclohexylamine, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidineなどは、in vitroの試験系では突然変異を示さないが、in vivo の試験系(例えば、小核試験など)では陽性となっている。また、表5に示すような化合物は、発がん性は知られているが、Amesテストでは検出されにくい。

TABLE 5
Carcinogens which were negative in the Ames test

Polychlorinated aliphatic/aromatic (16/48) 33%	
1) p,p'-DDT	9) 1,1,2,2-Tetrachloroethane
2) Carbon tetrachloride	10) 2,4,6-Trichlorophenol
3) Chlordane	11) Hexachlorobenzene
4) γ -Lindane	12) Tetrachloroethylene
5) Chloro orm	13) Aldrin
6) Hexachloroethane	14) Tetrachloroisnaphthonitrile
7) p,p'-DDE	15) Chlordecone
8) Trichloroethylene	16) Mirex
Carbamates/Amides/ureas (5/48) 10%	
1) Urethane	4) Thiourea
2) Acetamide	5) 1,3-Diethyl-2-thiourea
3) Thioacetamide	
Azo compounds (4/48) 8%	
1) Trypan Blue	4) Ponceau 3R
2) C.I. Direct Blue 6	5) Citrus Red
Vinyl compounds (4/48) 8%	
1) Cinnamoyl anthranilate	3) vinyl acetate
2) Safrole	4) 1'-Hydroxysafrole

(Continued)

Aniline compounds (2/48) 4%	
1) 5-Chloro-o-toluidine	2) Aniline hydrochloride
Hydrazine compounds (2/48) 4%	
1) Procarbazine	2) 1,2-Dimethylhydrazine
Imino compounds (2/48) 4%	
1) Pararosaniline-HCl	2) Benzyl violet
Metals 2/48 4%	
1) Lead acetate	2) Cadmium oxide
Other compounds (11/48) 23%	
1) Diethylstilbestrol	7) C.I. Basic Yellow 2
2) Amitrole	8) Allyl isovalerate
3) Benzene	9) Cycasin
4) Diphenylnitrosamine	10) Ethyl tellurac
5) Succinic anhydride	11) Butylated hydroxyanisole
6) Bis (2-ethylhexylphthalate)	

同様に、化合物の種類によっては、生体内で体細胞を指標とする試験系では検出され易いが生殖細胞を指標とする試験系では検出されない場合、また、その逆の場合も知られている。表6の上段に前者、下段に後者の例を示す。

TABLE 6

Compounds with discordant results between somatic and germ cell assays in vivo (L. Kier, USA, 1987)

Compounds positive in somatic but negative in germ cells

1) Busulfan	7) Diethylnitrosamine
2) Ethylene oxide	8) Vinyl chloride
3) Hycanthone methane sulfonate	9) Nifurpipone
4) Isoniazid	10) Phenylbutazone
5) Benzo(a)pyrene	11) Chrysene
6) Dimethylnitrosamine	12) Nitrofurantoin

Compounds negative in somatic but positive in germ cells

1) Coal liquid A3	4) Saccharin sodium
2) Ethanol	5) Cadmium chloride
3) Triflupromazine	6) acrylamide

種々の化学物質の安全性を評価する際には、まず、その化学物質の構造から、どのような作用が期待されるかを見極める必要がある。このためには、化学物質の構造と薬理作用、あるいは生物活性に関するデータベースを確立することが重要である。次に、なるべく簡便な試験法（短期スクリーニング法）によって、作用機序の検討を付ける。このためには、in vitro系試験が有効であるが、単に細胞毒性のみならず、遺伝子レベル、染色体レベル、あるいはDNAレベルでの変化に注目する必要がある。次に、ここで得られた情報が、果たして生体内でどのように発現されるか、このためには、短期・長期の動物実験を省略するわけには行かない。長期毒性試験を行うに先立って、前記した如く、in vivo-in vitro法

を導入する工夫も必要であろう。長期動物実験には莫大な費用がかかる。あらゆる種類の生活物質について、これらの検索を徹底することは、殆ど不可能と思われる。変異原性試験を含め、あらゆる短期試験法は、長期動物実験を行うべき疑わしき物質を事前に選別するために極めて有効な手段であるのみならず、動物実験で得られた所見について、さらにその機構を解析して行く上で、極めて重要な役割を演ずるものと思われる。

参考文献

- 1) 労働省労働基準局化学物質調査課編：新—微生物を用いる変異原性試験ガイドブック、中央労働災害防止協会（1986）
- 2) 厚生省薬務局審査課監修：GLP 基準および毒性試験法ガイドライン解説、薬事日報社（1984）
- 3) 環境庁（環保業第700号）、厚生省（薬発第1039号）、通産省（61基局第1014号）：「新規化学物質に係る試験の方法について」の一部改正等について（1987年4月）
- 4) 農林水産省（59農蚕第4200号）：「農薬の登録申請に係る毒性試験成績の取扱いについて」、農薬の安全性評価に関する基準（1985年1月）
- 5) Kuroki, T. and Matsushima, T. : Performance of short-term test for detection of human carcinogens, *Mutagenesis*, 2, 33-37 (1987)
- 6) Matsushima, T. : Chemical safety evaluation in Japan, Proc. of Sat. Symp. of Toxicity Industrial Chemicals, Tokyo, July (1986)
- 7) 石館 基：発癌性物質短期スクリーニング法に関する国際協力事業 (CSST/IPC) の活動の現状、トキシコロジーフォーラム, 8, 358-362 (1985)
- 8) Ashby, J. et al. : Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens, Proc. in *Mutation Res.*, 5, Elsevier Sci. Pub., Amsterdam-Oxford-New York (1985)
- 9) OECD : Data Interpretation Guides (DIGS) for initial hazard assessment of chemicals, *Mutagenicity*, DIG 18, pp. 58, Provisional (Paris, May, 1984)
- 10) Ishidate, M. Jr. et al. : A comparative analysis of data on the clastogenicity of 951 chemical substances tested in mammalian cell cultures, *Mutation Res.*, in press (1987)
- 11) Ishidate, M. Jr. (ed) : Data Book of Chromosomal Aberration Test

In Vitro, L. I. C. Inc., Tokyo (1987)

- 1 2) Nohmi, T. et al. : Mechanism of species difference in N-hydroxyphenacetin mutagenicity : The role of deacetylation by rat and hamster liver microsomes, Chem. Pharm. Bull., 32, 4525-4531 (1984)
- 1 3) Schmid, W. : The micronucleus test, Mutation Res., 31, 9-15 (1975)
- 1 4) Ashby, J. : The prospects for a simplified and internationally harmonized approach to the detection of possible human carcinogens and mutagens, Mutagenesis, 1, 3-16 (1986)
- 1 5) 降旗千恵, 松島泰次郎 : In Vivo/In Vitro UDS 法, トキシコロジーフォーラム, 9, 177- 188 (1986)
- 1 6) EPA 主催 : EPA Workshop on the Relationship Between Short-Term Test Information and Carcinogenicity, Williamsburg, Virginia, Jan. 20-23 (1987)

CAN SHORT-TERM MUTAGENICITY TESTS PREDICT THE LONG-TERM TOXICITY IN ANIMALS? : Motoi Ishidate and Toshio Sofuni (Div. of Mutagenesis, Biol. Safety Res. Center, Nat. Inst. of Hygien. Sci., Tokyo 158)

Mutagenicity tests in vitro and in vivo have been utilized as short-term screening tools for the detection of possible mutagens and/or carcinogens in the environment. These assays can also be applied to estimate the potential of food additives, drugs, pesticides and other industrial products to pose a genetic hazard. If the chemical shows a mutagenic effect on somatic cells, germ-cells, or the fetus, carcinogenicity, heritable genetic toxicity, or teratogenicity, respectively, could be expected in animals or man.

The Salmonella/microsomes test (Ames test) is the most widely used system for the detection of gene mutations in prokaryotes. Another genetic endpoint and eukaryotic cells are employed in the in vitro chromosomal aberration test, which has been suggested as a complimentary assay to the Ames test. The mutagenic potency of different chemicals shows a 10 million-fold variation if the number of revertants induced per mg of each chemical is calculated (NR value). The potency of chemicals to induce chromosomal aberrations can be expressed as the dose at which aberrations are induced in 20% of metaphases (D_{20} value, mg/ml). This value also varies widely, but correlates well with the Ames test NR value.

When compounds positive in the chromosome test in vitro were tested in an in vivo micronucleus test in mice, only 36% (43/119) of them were positive, indicating that in vitro test results do not always reflect in vivo toxicity. Only potent clastogens with relatively low D_{20} values appeared to be also clastogenic in vivo. However, 93% (91/98) of well-known carcinogens were positive in the in vitro chromosome test and the majority of them (more than 50 %) was also positive in the micronucleus test. When the carcinogenic potential of different chemicals in animals was calculated as TD_{50} which indicates the dose (mg/kg) at which tumors were developed in 50% of animals, a good correlation ($n=22$, $r=0.751$) was found between the D_{20} and the TD_{50} values.

Micronucleated erythrocytes are found not only in the bone marrow but also in the peripheral blood. A Flow-cytometric analysis can be applied for this purpose. Blood samples were collected from mice treated by gavage with benzene at 6 weekly doses of 625-2500 mg/kg. The positive dose-dependent effects obtained indicate that micronuclei will accumulate in the blood during at least 4 weeks. This technique may also be applied to the monitoring of the people occupationally exposed to hazardous chemicals at the work place.

In conclusion, the long-term toxicity of chemicals may be predicted if a battery of appropriate short-term tests with different genetic endpoints is used and if the test results are carefully evaluated from a quantitative point of view.

REFERENCES

- 1) Ishidate, M., Jr. et al.: A comparative analysis of data on the clastogenicity of 951 chemical substances tested in mammalian cell cultures, *Mutation Res.*, in press (1987)
- 2) Ishidate, M., Jr. (ed): *Data Book of Chromosomal Aberration Test In Vitro*, L.I.C. Inc., Tokyo (1987)
- 3) Ishidate, M., Jr. et al.: Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan, *Fd Chem. Toxic.*, 22, 623-636 (1984)
- 4) Hayashi, M. et al.: High-sensitivity in micronucleus induction of a mouse strain (MS), *Mutation Res.*, 105, 253-256 (1982)
- 5) Hayashi, M. et al.: Micronucleus tests in mice on 39 food additives and 8 miscellaneous chemicals, *Fd Chem. Toxic.*, in preparation (1987)
- 6) Norppa, H. et al.: Micronucleus test by flow-cytometry: Application to mouse peripheral blood, Presented at the Annual Meeting of Environ. Mutagen Soci, Japan, Kyoto (1987)

次世代に及ぼす長期毒性の評価法

藤井儂子

帝京大学医学部薬理学教室

薬物の胎仔（児）毒性に関して機能的異常の評価の重要性が広く認識されるようになったが、ここでは、行動等の異常を認めない場合にも様々な不顕性機能異常が存在することを示す。特にその発見のために薬物への反応性を利用し再現性のある異常を見出した例ならびに、その異常の中には第2世代までも継代される可能性のあることにふれたい。

実験計画概要

実験動物 Wistar 今道系ラット

薬物投与期間 妊娠中 【問題点】 投与量（我々の実験では最大臨床量/Kg）
投与期間（妊娠時期）、ラット等着床から分娩
までの期間の短い動物では時間差にも注意。

評価対象 次世代（F₁）～その子孫（F_n）

【問題点】 里親とすべきか？（我々はエトサクシミドの実験につき里親を利用したがその影響は認められなかった。）

必要な基礎知識 諸機能の胎仔期発達過程（発達毒性）、生後の発達過程、種族差。

評価基準 1. 毒性評価用に投与した薬物の作用部位および作用機序から推測。

2. 生理機能の評価 例 行動、心拍数。

3. 急性投与薬物への反応評価【使用薬物選択基準】

- ・臨床使用薬に対する反応テスト・・・①生理機能（例 睡眠、体温調節等）に関連深い薬物を投与して反応をみる。②ヒトにおける不測の反応異常を推測しうる可能性を有する。
- ・器官（部位）特異性の高い薬物に対する反応をテスト・・・変化部位を推測しうる。
- ・分子レベルでの作用機序の明らかな薬物に対する反応・・・変化の詳細な解析につながる。

【問題点】 テスト時の年齢、各出生仔につき薬物一つのみへの反応をテスト（テストに使用した薬物の影響が残るのを避ける。多くのF₁、F₂ラットが必要となる。）

評価法

A. 生理的発達

備考

1. 体重 ①頻回測定の影響をさけるため週1回、新生仔の保温に注意 ②生後3日目に1腹の出生仔数を揃える (Wistar-今道系は多産なため12~14匹, 可能な限り雌雄同数) ③必要な場合は里親。
2. 開眼, 腔開口 動物の系統, 飼育条件を一定にすると再現性のよい指標である。
3. 自発運動量* 自動記録装置を必要。
4. 行動*play fighting
open field 4~5週令でスコアが高い。
乳仔期から経時的観察が可能な場合は特定の発達過程が評価できる。
*飼育室内での人との接触頻度の影響が現れる。
馴れの現象があるので初回反応か, 繰返しの観察かに注意。
5. 基礎体温 性差発現時期(7~8週令, 雌>雄)の観察も役立つ。
ラットは日内変動が大で午後は低体温であることに注意。
6. 血圧(無麻酔)
心拍数(麻酔下ECG) 無麻酔下での測定可能な機器もある。
7. 血中ホルモンレベル 甲状腺ホルモンレベルは中枢神経系作用薬に曝露されたF₁で変化しやすい。その他特定の代謝物質(Ca, グルコース等)の生理的レベルも参考になる。
8. 臓器重量 必ず同時期に飼育したコントロール群を必要。

B. 急性投与薬物への反応評価(本教室で用いたテスト薬物)

1. Penobarbital (30 mg/kg, i.p.)誘発睡眠時間
2. オープンフィールドテストにおける diazepam (1~2 mg/kg, i.p.) の抑制効果
3. Chlorpromazine (5 mg/kg, i.p.) による体温下降(異常は体温上昇)
4. Thyrotropin Releasing Hormone (TRH, 10 mg/kg, i.p.)による体温上昇
5. Apomorphine (0.3~1 mg/kg, s.c.)投与後の常同行動
6. l-Adrenaline (50 μg/kg, s.c.)あるいは Met-enkephalin (100 μg/kg, s.c.)
の単独または併用時の昇圧反応, 心拍数
7. Kainic acid (12 or 15 mg/kg, i.p.) 投与後の wet-dog shakesとけいれん発現

潜時と頻度

8. Picrotoxin あるいは pentylenetetrazol けいれん閾値
9. 毒性をテストする薬物自体の薬理作用の観察 (例, 抗けいれん薬の胎仔毒性に関しては同じ薬物の抗けいれん作用)
10. LHRH あるいは TRH 刺激に対するホルモン分泌反応 (中枢一視床下部一下垂体一性腺系, 中枢一視床下部一甲状腺系, 等の機能評価)

胎仔毒性をテストした薬物

1. 抗精神病薬: Haloperidol (HAL) 0.1 mg/kg (臨床高用量比1), Chlorpromazine (CPZ) 1 mg/kg (比1)
2. 抗うつ薬: Imipramine (IMI) 5 mg/kg (比2)
3. 抗てんかん薬: Carbamazepine (CBZ) 10 mg/kg (治療量は経口で ~1000 mg/日), Ethosuximide (ESM) 10 mg/kg (治療量は経口で ~1000 mg/日)

HAL, CPZ, IMI は妊娠 1~21 日 (分娩予定前日) の間 1 日 1 回皮下注射。CBZ, ESM は妊娠 5~21 日の間同様に注射。F₀ 世代は同一薬物群につき 3~4 匹ずつとし, 時期を異にして 2~3 回繰返し実験を行なった。HAL, CPZ, IMI 投与群の継世代は同腹仔内の兄妹交配を雄 1:雌 2 で行なった。また, CBZ, ESM 群の継世代は, 異なる腹の雄, 雌の組合せ交配によった。

F₁ ~ F₃ 世代の薬物反応性のテストは原則として, 1 腹 1 回のみとした。

成績 (各指標の評価)

1. 体重

IMI-F₁ 群は体重増加度が対照群より有意に大であることが数回の繰返し実験において認められた。CPZ-, HAL-F₁ の体重も大きい傾向にあった。これに対し IMI-, CPZ-, HAL-F₂ 群の体重は有意に小さい群が多かった。一方, CBZ-F₁, F₂ 群, ESM-F₂ 群の体重は常に対照群より大であった。

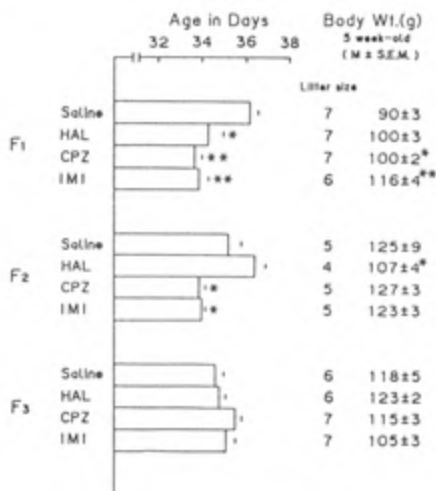


図1. 腔開口日¹⁾

* , P < 0.05; ** , P < 0.01 vs. saline

ぼした薬物はなかった。腔開口期は一般に体重の大きいもののほうが早い、一定条件下で飼育した場合対照群間のばらつきは少ない。

図1に示すようにCPZ, IMI群においてはF₁, F₂ともに腔開口期の有意な促進が認められた。F₂群はいずれも体重に有意な差は認められなかった。

3. 体温

8週令のラットにつき直腸温の測定を午前9時30分～9時45分におこなった場合の基礎体温の値を図2に示した。雄においてのみHAL, CPZ, IMI-F₁の基礎体温は低値であり, CPZおよびIMI群雄はF₂においても基礎体温は対照群

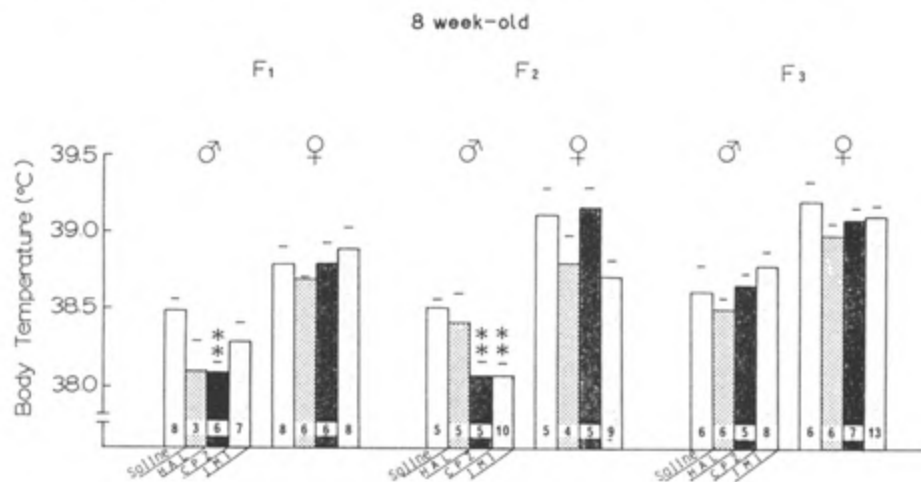


図2. 3世代にわたる基礎体温値¹⁾, **, P<0.01 vs. saline

に比して有意に低値であった。雌の基礎体温は思春期以降は雄より高くなるが, F₁, F₂, F₃いずれの群においてもそれが示された。

4. ペントバルビタール誘発睡眠

ペントバルビタール 30 mg/kg 腹腔注射後の睡眠時間がHAL-およびIMI-F₁雄において短縮を示し, CPZ-F₁雌においては延長を示した(図3)。HALとIMI雄の変化はF₃-群においてはむしろ睡眠時間の延長として現れ, CPZ-F₃の雌ではF₁とは逆に短縮としての変化が現れた(図3)。このF₃における変化の再現性については検討をしていない。

5. Play fighting

4～5週令におけるテストでESM群雌雄ともにF₁, F₂世代ラットの play fight-

ting score が有意に増加を示した。

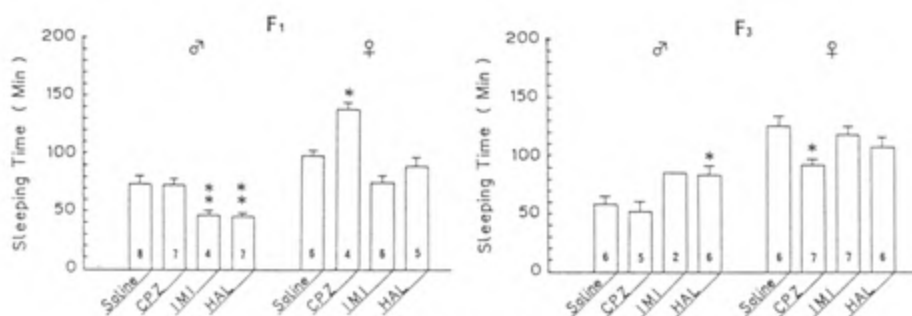


図3. Pentobarbital 誘発睡眠時間¹⁾,
*, P < 0.05; **, P < 0.01 vs. saline

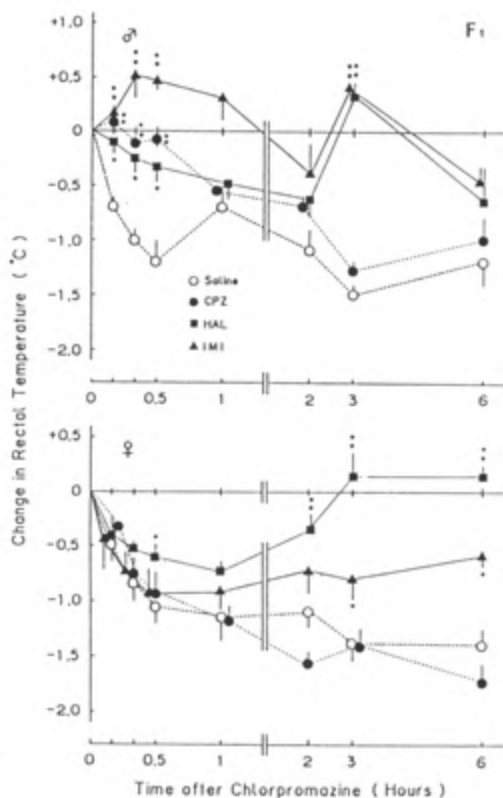
6. Chlorpromazine の体温下降作用

Chlorpromazine の 5 mg/kg 腹腔注射後正常ラットの体温は下降を示す。本実験においても8週令においてテストした際、对照群雄ラットの体温は下降を続けた。これに対しCPZ-, HAL-F₁群いずれも体温の下降度は小さく、IMI-F₁の体温は有意に上昇した(図4)。

ラットの体温は昼ごろから生理的下降を示すが、この時間帯において、HAL-, IMI-F₁雄の体温は上昇を示した。一方、雌においてはHAL-, IMI-F₁群が生理的に体温の低下する午後に体温が高値であり、特にHAL-F₁の体温は上昇を示した(図4)。

図4. Chlorpromazine に対する体温反応^{2, 3)}

*, P < 0.05; **, P < 0.01 vs. saline



F₂においても chlorpromazineによる体温下降度はIMI, CPZ群雄とHAL, IMI雌において小であった(図5)。

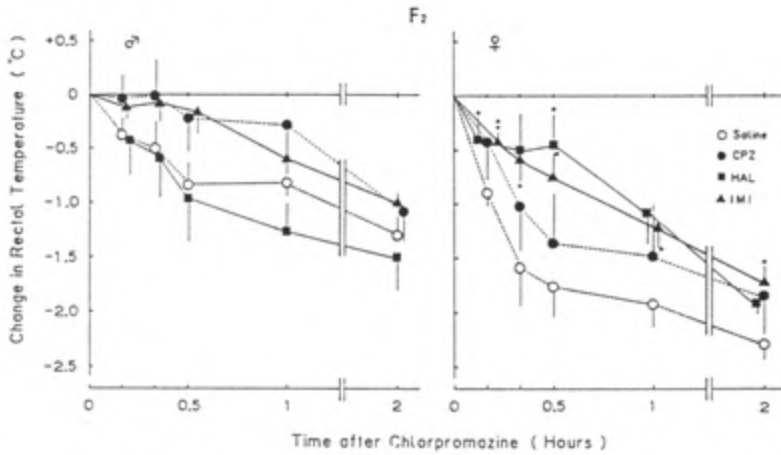


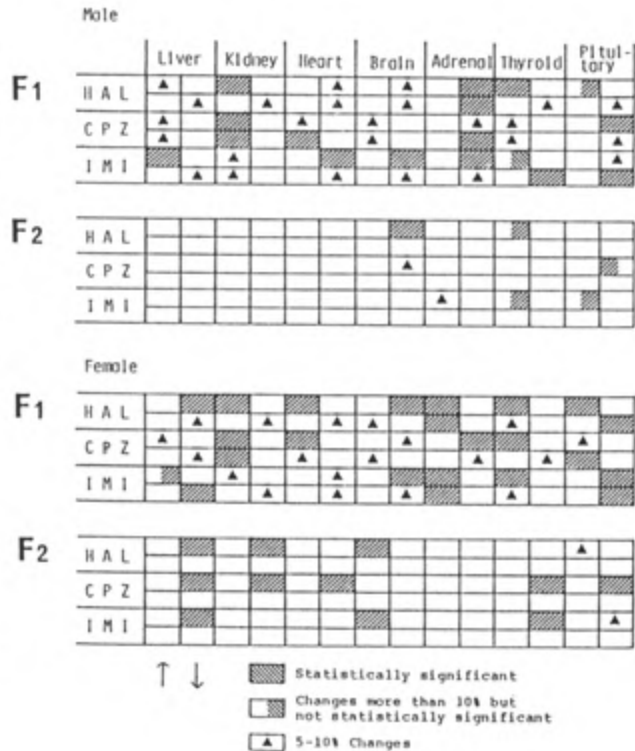
図5. F₂ 世代におけるchlorpromazineに対する体温反応¹⁾

*, P<0.05; **, P<0.01 vs. saline

7. 臓器重量

図6aに明らかなように、機能的に雄よりも異常の少ない雌において臓器重量の変化が比較的多かった。また、F₂群においては明らかに臓器重量の変化が少ないが、雌雄を比較すると雌に変化が残る事が認められた。

図6a. 体重当りの臓器重量をsaline群を100として比較したもの¹⁾



一方、抗てんかん薬群においては臓器重量に殆ど変化を認めなかった(図6b)。

以上は検索事項の一部を示したものであるが、さらに指標を増やす事によりその他の不顕性の変化を把握することも可能であろう。

図7は上記のテストの結果を纏めたものである

が陰影の升目の多い群ほど曝露薬物の胎子への影響が大きい事を示す。他の薬物に比し少なくとも第2世代まで幾つかの指標に変化を示したのがここで示した抗精神病薬H

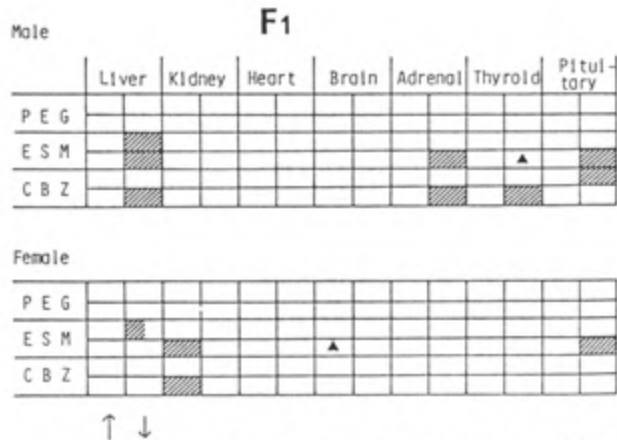


図6b. 体重当りの臓器重量をsaline群を100として比較したもの¹⁾

	HAL			CPZ			IMI			CBZ		ESM	
	M	F		M	F		M	F		M	F	M	F
Sex													
Generation	1 2 3	1 2 3		1 2 3	1 2 3		1 2 3	1 2 3		1 2 1 2	1 2 1 2	1 1 2	1 2
Growth rate	■	■	■	■	■		■	■	■	■	■	■	■
Eye opening													
Vaginal opening													
Locomotor activity	■			■	■		■	■	■			■	■
Rearing activity												■	■
Play fighting	■	■		■	■							■	■
Basal body temperature													
Responses to drugs													
Pentobarbital (Sleeping time)	■	■	■				■	■	■				
Diazepam (Locomotion)													
Chlorpromazine (Body temperature)	■			■	■		■	■	■				
Kainic acid (Wet dog shakes, Seizure onset)				not tested						■	■	■	■

■ Significantly different from controls, P<0.05 or P 0.01
 ▨ Showed some changes but not statistically significant

図7. 成績のまとめ

AL, CPZと抗うつ薬IMI, 抗てんかん薬ESM, CBZである。

十分のテストではないがここで用いた急性投与薬物への反応性の変化から何を推測するかが重要である。例えば, IMI群が示した予想外の変化として chlorpromazine に対する体温上昇反応がある。生理的な体温調節の機序もなお十分に解明されていないので, かなりが推測となるが, セロトニン系ニューロンの変化が考えられる。その理由として, 体温調節系の主なニューロンはセロトニン系であり, また, これにノルアドレナリン系, アセチルコリン系なども関連しているといわれる。一方, IMIの主な作用機序はセロトニン・ニューロンにおけるセロトニンの取込抑制とノルアドレナリン・ニューロンにおけるノルアドレナリンの取込抑制にあり, 特にIMIは前者の作用が強いとされる。また中枢神経系にはIMIのレセプターが見出されている。胎仔期のレセプターの発達については不明であるが, 恐らく, 体温調節中枢の発達時期にIMIに曝露されることが chlorpromazine に対する反応の変化として現れたものと考えられる。

機能異常の評価にはテスト薬物の主作用のほか副作用として認められている点を指標に加えることが重要であろう。例えば, IMI群においては心血管系の薬物反応性をテストする等である。本実験においてもIMI群, CPZ群において基礎血圧の変化を認めている。また, 本来作用点が中枢神経系ではない薬物であっても胎仔期の曝露は予想外の部位に影響を及ぼすものとして, 我々が近頃見出した cyclophosphamide の影響がある。ラットにおける神経堤細胞の移動期である妊娠10日に一回のみ cyclophosphamide を注射した親の仔はカルチトニン細胞の分泌能が変化する。カルチトニンは神経堤細胞が移動して甲状腺のなかに入りC細胞となる。

文献

- 1) Fujii, T., H. Nakanishi, S. Morimoto and N. Hara: Pharmacological assessment of the functional effects of maternal exposure to drugs: Transmission of the effects to the offspring of subsequent generations. In: T. Fujii and Perrie. M. Adams (Eds.) *Functional Teratogenesis* (1987), Teikyo University Press, Tokyo p.159-173.
- 2) Fujii, T. and Y. Ohtaki: Sex-related hyperthermic response to chlorpromazine in the offspring of rats treated with imipramine. *Develop. Pharmacol. Therap.* 8, 364-373 (1985).
- 3) Fujii, T., Y. Ohtaki, H. Nakanishi, S. Morimoto and K. Hayashi: Alterations in the thermic response to chlorpromazine in rats exposed to central nervous system depressants. *Neuropharmacology* 25, 845-851 (1986).

STRATEGIES FOR THE ASSESSMENT OF THE EFFECT OF MATERNAL DRUG EXPOSURE ON THE OFFSPRING: Tomoko FUJII (Dept. of Pharmacology, Teikyo Univ., School of Medicine, Itabashi-ku, Tokyo 173)

Functional effects of maternal exposure to drugs on the first generation offspring and their subsequent generation offsprings were evaluated. Wistar-Imamichi rats were mated and the day on which sperm was present in the vaginal smear was designated as day 0 of pregnancy. Pregnant rats were treated with drugs or vehicle from days 1-21, days 15-21 or days 5-21 of gestation. The F-F rats were tested for their functional development at various ages. Measures utilized were 1) physiological development such as body weight, time of eye opening or vaginal opening, body temperature, play fighting and locomotor activity, and 2) pharmacological responses to several drugs; pentobarbital sleeping time, diazepam-induced sedation, chlorpromazine-induced hypothermia, TRH-induced hyperthermia, haloperidol catalepsy, kainic acid-induced wet dog shakes or seizures and apomorphine-induced stereotypy. As a hormonal end point, serum thyroxine was determined in some experiments. Selected drugs for pharmacological response were 1) drugs frequently used for therapeutic purposes, 2) drugs which possess a rather specific site of action, and 3) drugs whose mechanism of action had been rather clarified at the molecular level. Some results of heritable functional alterations developed in the F-F rats raised from mothers exposed to chlorpromazine, haloperidol imipramine, ethosuximide and carbamazepine are to be presented and the problems involved will be discussed.

総括：遠藤 仁

今回のワークショップでは、先生方が実験室での生のデータとそこに含まれる問題点を非常にクリヤーカットにお示し頂きました。

医薬品の場合、長期毒性はあるのか無いのかというものではなくて、必ずあるんだという前提のもとに、程度は強いのか弱いのか、そういう観点にたって把握する必要があるだろうということが明らかにされてきたと思います。ガイドラインにあるから、あるいはレギュレーションがどうであるということではなくて、学問的な観点からいうと長期毒性の実態がどういうものであるかを知りたいということが重要だと思います。長期毒性試験はstaticなものではなくて、学問の進歩とともにassayあるいは evaluationの方法によって変わって行くのであるということが明らかになりました。また、たくさんの問題点が、practical な観点から出されました。

もう一つの問題である動物実験結果の人への外挿は難しく、問題点は現時点では解決されていないだろうと思います。

また、昨日、terminologyでの長期毒性は、long term, low doseのexposureというように話され、これに対する問題点は明らかにされましたが、解決方法は、まさにlong term でそしてlow dose, すなわち少しづつ解決していくことが長期毒性研究の現状だろうと思います。

一般演題

CHANGES IN PLASMA MONOAMINE CONCENTRATIONS AFTER HEMODIALYSIS IN PATIENTS WITH CHRONIC RENAL FAILURE: Hideya SAITO¹, Masaru MINAMI², Toru ENDO², Machiko MATSUMOTO¹ and Michio KAWAGUCHI³ (¹First Department of Pharmacology, Hokkaido University School of Medicine, ²Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Science, Higashi-Nippon Gakuen University, ³Kawaguchi Renal Clinic, Sapporo 060)

Using a dialyzing membrane, renal hemodialysis was repeatedly performed over a period of about 80 months to eliminate urea nitrogen, creatinine and potassium in patients with renal failure. This study was undertaken to elucidate the effects of renal hemodialysis on plasma catecholamine and serotonin concentrations in renal patients. Catecholamines which were conjugated with sulfate were hydrolyzed with sulfatase (VI type). Conjugated norepinephrine and conjugated dopamine concentrations rose significantly in the hemodialysis patients as compared with the sex and age-matched controls ($p < 0.001$). Single hemodialysis did not completely eliminate conjugated norepinephrine and conjugated dopamine in the blood. Free norepinephrine concentrations did not change after hemodialysis. A decreasing tendency in the plasma serotonin concentrations was demonstrated with the HPLC-ECD method. A major metabolite of serotonin, 5-HIAA, decreased to approximately 50% after hemodialysis ($p < 0.001$). These findings suggest that hemodialyzing membranes not only act in the detoxication of urea nitrogen, creatinine and potassium, but also affect plasma monoamine concentrations in patients with renal failure.

CHEMICALLY INDUCED FRAGMENTATION OF MURINE ERYTHROCYTES : Atsuo KANAZU (College of Medical Technology and Nursing, University of Tsukuba, Sakura-mura, Niihari-gun, Ibaraki 305) and Yujiro KOBAYASHI (Tsumura Research Institute for Pharmacology)

Previous studies demonstrated that spontaneous fragmentation was induced in murine erythrocytes when suspended in phosphate buffer (pH 5.7) or in saline containing 0.8 mM EDTA-2K. The present experiment was designed to delineate the effect of Ca^{++} on fragmentation. Heparinized blood, obtained by cardiocentesis under ether anesthesia from female ICR mice, 6-13 weeks old, was washed 4 times with physiologic saline. 10 μ l of the packed RBC was suspended in 5 ml of various diluents and incubated at 37°C. A drop of suspensions was placed in a hemocytometer sequentially and observed under the phase contrast microscopy (400 X). A light-microscopically detectable fragmentation was noticed when suspended in citrate and phosphate buffer (pH 5.2-5.7) after 30 to 90 minutes of incubation. Fragmented microspheres whose diameters were 0.5-1 μ m, were seen in the later minutes. EDTA-2K (0.8 mM) and EGTA (0.4 mM) in saline whose pH was adjusted less than 5.7, induced fragmentation within 15 minutes. Fragmentation induced by EDTA-2K/EGTA was not prevented by the addition of Ca^{++} and Mg^{++} to 200 mM nor that of K^+ to 150 mM. Fragmentation was also evoked in acetate buffer (pH 5.2-5.6) and in saline (pH maintained less than 5.4 for more than 5 minutes) without EDTA-2K/EGTA. It was concluded that pH rather than Ca^{++} was concerned to fragmentation of murine erythrocytes. Ca^{++} seemed to somehow prevent lysis of fragmented erythrocytes and microspheres.

ENUMERATION OF LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN CYNOMOLGUS MONKEY USING FLOW CYTOMETRY, ANAE STAINING, OR ABC STAINING METHODS : Nami SAGARA, Kazuhisa FURUHAMA, Mamoru NOMURA and Takeshi ONODERA (Drug Safety Research Center, Research Institute, Daiichi Seiyaku Co., Ltd., 1-16-13 Kitakasai, Edogawa-ku, Tokyo 134)

It is important to investigate the fluctuation of T and B lymphocytes in the peripheral blood to evaluate toxicological properties of new drugs such as biological response modifiers. This study was performed to assess the usefulness of flow cytometry, α -naphthyl acetate esterase (ANAE) staining and avidin-biotin peroxidase complex (ABC) staining methods for enumeration of lymphocyte subpopulations in cynomolgus monkeys. Thirty female cynomolgus monkeys weighing 2.5 to 3.5 kg were used through the studies. Blood sample was collected from femoral vein by heparinized syringe and mononuclear cells from blood were prepared by means of discontinuous Percoll density gradient centrifugation. For flow cytometry, use was made of phycoerythrin-conjugated mouse monoclonal antibodies against human T_H, recognized to have the cross reaction with monkey lymphocytes, or FITC-labeled anti-monkey IgG serum. ANAE and ABC stainings were made essentially according to procedures of Knowles et al. and Hsu et al., respectively. The lymphocyte subpopulations in monkeys were 60 - 72% for T cells and 10 - 37% for B cells by flow cytometry, and 40 - 72% for T cells and 10 - 32% for B cells by both ANAE staining and ABC staining methods. In the monkeys receiving cyclophosphamide 20 mg/kg daily for 14 days, all of WBC, lymphocyte, and T and B cells were decreased. On the other hand, the animal treated with MDP-Lys(L18) 1.0 mg/kg daily for 14 days showed higher monocyte and neutrophil counts without any changes in T and B cells. There was a close correlation between T or B cells measured by flow cytometry and other methods.

IN VITRO GRANULOCYTOPENIA ASSAY METHOD USING MYELOPEROXIDASE : Akemi SUMI, Kazuhiko MATSUMOTO and Hiroshi YAMAMOTO (Toxicology Department of Research Laboratories, Toyo Jozo Co., Ltd. 632-1 Mifuku, Ohito-cho, Tagatagun, Shizuoka-ken)

Granulocytopenia is one of the adverse reaction observed at the high frequency in human. However, it is difficult to detect granulocytopenia in rats because of a small number of granulocytes in peripheral blood as compared with human. Then, we investigated a in vitro assay method of granulocytopenia by measuring the IC₅₀ values in drugs to bone marrow myeloperoxidase (MPO) of rats. The IC₅₀ values of Bredinin, 6-Mercaptopurine, and Propylthiouracil (PTU) was 677, 91, and 32 μ M, respectively. The other side, Levamisole and it's S-9 mix sample did not inhibit MPO activity. However, the active metabolite of Levamisole, 2-oxo-3-(mercaptoethyl)-5-phenylimidazolidine (OMPI), showed 10 μ M as the IC₅₀ values. The inhibit pattern of OMPI in MPO activity was the competitive with respect to guaiacol a similar to PTU.

DEACETYLATION OF T-2 TOXIN IN THE HEPATIC MICROSOMES OF VARIOUS ANIMALS AND HUMANS : Jae-Chun RYU, Masakiyo HOSOKAWA*, Tetsuo SATOH* and Yoshio UENO (Dept. of Toxicology and Microbial Chemistry, Fac. of Pharmaceut. Sci., Science Univ. of Tokyo, Ichigaya, Shinjuku-ku, Tokyo, 162. * Dept. of Pharmacology and Toxicology, Tokyo College of Pharmacy, Horinouchi, Hachioji, 192-03)

In an attempt to ascertain more precisely the *in vitro* metabolism of T-2 toxin (T-2) which is one of the most toxic trichothecene mycotoxins, we investigated the metabolic differences and the effects of esterases inhibitors with the hepatic microsomes of various animals and humans by using gas-liquid chromatography.

T-2 was selectively hydrolyzed by the hepatic microsomal esterases at C-4 giving rise to HT-2 as the only metabolite. The hepatic microsomal fraction from rabbit revealed the highest enzymatic activity and followed by hamster > swine > rat > guinea-pig > cow > monkey. No strain differences in the hepatic microsomes of mice were observed. No age differences in the hepatic microsomes of Wistar male rat were also observed. Although the hepatic microsomes of humans revealed some individual differences, the extent of average enzymatic activity of the hepatic microsomes of humans was similar to that of rat and swine among the animals tested. Since the enzymatic hydrolysis of T-2 was inhibited by Bis (p-nitrophenyl) phosphate and eserine, it is suggested that non-specific carboxylesterases [EC 3.1.1. 1.] of microsomal origin participate in this type of selective hydrolysis of T-2. And also, since the toxicity of HT-2 is slightly less toxic than that of T-2 when administered *i.p.* to mice and T-2 is rapidly transformed into HT-2 in various laboratory animals, it is also suggested that the toxic effects of T-2 is exerted by HT-2 mainly and this metabolic change is not considered to be detoxification of T-2.

LOCALIZATION OF CARBONYL REDUCTASE IN RAT OVARY AND ITS PHYSIOLOGICAL ROLE IN OVARIAN FUNCTION : Norihisa INAZU, Nobuhisa IWATA, Niro INABA, Kazuhisa ISHIHARA and Tetsuo SATOH (Dept. of Pharmacol. & Toxicol., Tokyo College of Pharmacy, 1432-1 Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-03)

We have already reported that carbonyl reductase (CR) in rat ovary is NADPH-dependent SH enzyme and reduces carbonyl compounds, such as prostaglandins and steroids. In the present study, localization and physiological role of CR in rat ovary were investigated. Effects of antiestrogens and glucocorticoids on ovarian CR were also examined. In all experiments, Wistar-KY female rats exhibiting the normal 4-day estrous cycle were used. It was demonstrated that CR in rat ovary was localized in both interstitial gland cells and theca folliculi by enzyme immunohistochemical methods using anti-CR serum. Changes in CR activities in ovarian cytosol during estrous cycle showed low level at 4:00 p.m. on the day of proestrus, thereafter increased markedly and then showed higher level at 12:00 p.m. on the day of estrus. However, CR content in the ovary reached maximum level between the day of proestrus and estrus. Antiestrogens and glucocorticoids have inhibitory effects on CR activities and CR content in rat ovary, and caused inhibition of ovulation and decrease in uterine weight. These inhibitory effects of both drugs on CR and ovulation were restored to control level by hCG treatment at 3:00 p.m. on the day of proestrus. These results indicate that CR in rat ovary may play an important role in ovarian function.

IMMUNOCHEMICAL STUDIES ON THE LOCALIZATION OF RAT HEPATIC AND RENAL CARBOXYLESTERASES: Kazuhisa ISHIHARA, Takako MAKI, Masakiyo HOSOKAWA and Tetsuo SATOH(Dept. of Pharmacol. and Toxicol., Tokyo College of Pharmacy, 1432-1 Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-03).

Carboxylesterase catalyze the hydrolysis of a number of xenobiotics including carboxylesters, thioesters and aromatic amides. The enzymes play important role in drug metabolism and lipid metabolism. In the previous paper, we reported the purification and characteristics of rat liver microsomes, and three isozymes named RL1, RL2 and RHI were identified. In the present study, we investigated the localization of carboxylesterase in the liver and kidney. RL1, RL2 and RHI were all found to be around the central vein of the lobules of rat liver by using immunochemical methods. On the renal carboxylesterase, two carboxylesterase isozymes were detected by using antibodies of hepatic carboxylesterases isozymes, RL1 and RHI. One isozyme showed cross reactivity to anti-RL1 antibody and other to anti-RHI antibody. And, these renal carboxylesterase isozymes were different in the localization in kidney, that is, RL1-like isozyme existed at proximal convoluted tubule, while, RHI was mainly at glomerulus. On the other hand, administration of carbon tetrachloride caused significant decrease of immunochemically stained cells of carboxylesterases of rat liver, but not kidney, were clearly induced by aminopyrine or phenobarbital treatment.

ISONIAZID-INDUCED HEPATITIS AND ITS ENHANCEMENT BY RIFAMPICIN-COADMINISTRATION: Atsuko NODA(Dept. of Pharmacy, Fac. of Pharmaceut. Sci., Kyushu Univ., Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka, 812) and Hiroshi NODA (Dept. Hospital Pharm., Univ. of Occupat. Environ. Health, Japan (Sangyo-ikadaigaku), Iseigaoka, Yahatanishi-ku, Kitakyushu, 812)

We have performed the following studies: fate of isoniazid (INH) in man and animals, formation of hydrazine (Hz) from INH, formation mechanism of active metabolic intermediates of Hz in vitro, the histological tests of the hepatic injury, the cytotoxicity tests in isolated rat hepatocytes, the mutagen tests by a modified Ames method and the effect of rifampicin (RMP) on the INH-induced hepatitis.

From these experimental data, it was clarified that Hz is a toxigen of INH-induced hepatitis, and its effective toxins are probably the Hz radical ($\dot{N}H-NH_2$) and/or diimide ($NH-NH$). Further enzymatic examination provided the first evidence for NADPH cytochrome P-450 reductase (fp_2)-catalyzed oxidation of Hz to the Hz radical, since the oxidation was dependent on NADPH and O_2 , stimulated by flavine-adenine dinucleotide (FAD) or methylviologen (MV), and markedly inhibited by superoxide dismutase (SOD) or anti- fp_2 IgG. Although RMP is well-known as an inducer of cytochrome P-450, it was demonstrated by us that the treatment of rats with RMP activated not only INH-amidase but also fp_2 in the liver microsomes of Hz-administered rats.

Thus INH-RMP coadministration can accelerate Hz formation from INH initially, following fp_2 -catalyzed oxidation of Hz to its radical, and further oxidation of the Hz radical to diimide seems to be increased by cytochrome P-450. These processes might be a key factor of INH-induced hepatitis enhanced by RMP in tuberculous patients on INH-RMP treatment.

MONOAMINE OXIDASE (MAO) IN PLASMA OF RATS AFTER HEPATOTOXINS ADMINISTRATION : Toshio OBATA and Toru EGASHIRA (Department of Pharmacology, Medical College of Oita, 1-1506, Idaigaoka, Hazama-cho, Oita 879-56, Japan)

MAO activities in plasma were investigated in male and female rats after pretreatment with the centrilobular hepatotoxin carbon tetrachloride (CCl_4) and the perilobular hepatotoxin allyl formate. MAO activity in plasma elevated at 24 hrs after administration of allyl formate 0.1 ml/kg i.p. to male rats with β -phenylethylamine (β -PEA) as a B-form MAO substrate, but the elevation of MAO activity was not observed with 5-HT as a A-form MAO substrate. When CCl_4 1.2 ml/kg was administered, high MAO activities in plasma were obtained with both β -PEA and 5-HT as substrates at 36 hrs. The K_m values of MAO in plasma of male rats administered CCl_4 were 2 μM and 200 μM toward β -PEA and 5-HT, respectively. While, in case of allyl formate, these K_m values were 1 μM and 50 μM . Almost similar results were obtained using female rats. MAO in plasma of rats administered CCl_4 or allyl formate was inhibited remarkably by deprenyl and clorgyline with β -PEA and 5-HT as substrates, but the complete inhibitions of MAO activity were not observed at the high concentration of these MAO inhibitors. These results indicate the possibility that some MAO enzymes release into plasma by administration of CCl_4 or allyl formate and these MAO are isoenzymes.

PHLEBOTOMY-INDUCED LIVER CELL NECROSIS IN RATS : Toshiharu SAKAI, Hideaki OKAMIYA and Hisao MIKI (Safety Research Laboratories, Product Development Laboratories, Yamanouchi Pharmaceutical Co.,Ltd., Azusawa 1-1-8, Itabashi, Tokyo, 174)

Liver cell necrosis is one of the lesions observed in toxicity studies. It is also wellknown that anemia or ischemia can cause the centrilobular liver cell necrosis. But there are few reports representing the correlation between the degree of anemia and the extend of liver cell necrosis. This study was performed to evaluate the severity of liver cell necrosis by means of clinical parameters such as erythrocyte count and hematocrit value.

Twenty-eight male F344 and SD rats, seven to eleven weeks of age, were phlebotomized almost everyday for 2 weeks via orbital venous plexus. By the end of the study, all animals showed obvious decreases of hematocrit values and erythrocyte counts. Histopathological examination revealed that liver cell necrosis was observed in animals showing below 20 % of hematocrit values. Plasma GOT and GPT values did not increase significantly in the early stage of the liver cell necrosis.

In conclusion, the induction of liver cell necrosis may need the animals to be severe anemic condition.

Ifosfamide-induced urinary bladder lesion and its inhibition: Yoshihiro MURAOKA, Hiroshi WATANABE, Shinji MATSUI, Isao YAHARA, Hiroshi NARA, Hisashi KASAI and Sadao AOYAMA (Shionogi Research Laboratories, Kanzakigawa Laboratory, Toyonaka-shi, Osaka 561)

Ifosfamide (Z4942), an anti-tumor agent, induces urinary bladder lesion (UBL) in experimental animals and humans. We studied the characteristic of Z-4942-induced UBL and its inhibition in rats and dogs. A single iv dose of 50 mg/kg or more of Z4942 induced UBL characterized by an increase in the urinary bladder weight with mucosal hemorrhage and edema within 3 hrs. with a plateau being reached at 1 to 3 days after the administration. Blood toxicity manifested by a decrease of the nucleated bone marrow cells occurred after the UBL. Injection of Z-4942 to ureter-ligated rats did not induce UBL. Also, when Z4942 was infused to one of a pair rats in which the ureters had been crossed, UBL occurred only in the noninjected member of the pair whose bladder received the urine flow from the Z4942-injected rat. These findings show that Z4942-induced UBL is not a systemic effect like blood toxicity or an antitumor effect but a local effect resulting from the urine-borne Z4942 or its metabolite. Direct infusion of 10 mg of Z4942 into the urinary bladder did not cause UBL, but infusion of the metabolites, 14 μ g of acrolein or 78 μ g of chloroacetaldehyde, did. UBL was completely inhibited by SH compounds (Mesna, dimercaptosuccinic acid), aldehyde captures (isoniazid, semicarbazide) and diuretics (furosemide, trichloromethiazide). The combined administration of Z4942 with Mesna or dimercaptosuccinic acid did not lower the antitumor effect or the blood toxicity of Z4942.

URINARY ENZYME EXCRETION IN CISPLATIN NEPHROTOXICITY IN RATS-EFFECT OF ANTIOXIDANT PRETREATMENT: Munekazu GEMBA, Nobuyuki FUKUISHI and Sachiko NAKANO (Div. of Pharmacology, Osaka Univ. of Pharmaceut. Sci., Matsubara, Osaka 580)

The elevations of blood urea nitrogen (BUN) and renal lipid peroxides caused by cisplatin, an anticancer agent, can be attenuated by treatment of rats beforehand with an antioxidant N-N'-diphenyl-p-phenylenediamine (DPPD). In this study, attempt was made to assess the relative importance of urinary enzyme measurements, other nephrotoxic marker, in cisplatin nephrotoxicity and to determine whether DPPD treatment could affect the change in the urinary enzyme excretion caused by this drug. The increase in urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) and γ -glutamyltranspeptidase (γ -GTP) activities occurred 2 days after cisplatin injection while the increase in BUN was demonstrable 3 days after the injection. The increase in the excretion of NAG was more sensitive and persistent for detecting renal damage than that in the excretion of γ -GTP. Alkaline phosphatase activities in urine was not affected by cisplatin injection. The antioxidant DPPD significantly attenuated the increases in these enzyme activities caused by cisplatin. The results of this study suggest that urinary NAG measurements are more sensitive than those of BUN in terms of the development of cisplatin nephrotoxicity. In addition, free radicals may play a role in the increases in the urinary enzyme activities caused by cisplatin.

POSSIBLE MECHANISM RESPONSIBLE FOR ALLOPURINOL-NEPHROTOXICITY: LIPID PEROXIDATION AND SYSTEMS OF PRODUCING- AND SCAVENGING OXYGEN RADICALS: Yoshihiro SUZUKI and Jun-ichi SUDO (Depts. of Toxicology and Clinical Pharmacology, Fac. of Pharmaceut. Sci., Higashi Nippon Gakuen Univ. Ishikari Tobetsu, Hokkaido, 061-02)

In order to elucidate toxic and protective mechanisms responsible for allopurinol-induced nephrotoxicity in rats, we investigated changes in plasma creatinine concentration, in renal lipid peroxidation, and in renal activities of xanthine oxidase, superoxide dismutase and catalase, as enzymatic factors in producing and scavenging oxygen radicals. The rats received subcutaneous injections of allopurinol in a dose of 100 mg/kg body weight, once a day for 3 days. In comparison to the control rats, the following changes were observed in the allopurinol-administered rats: increases in plasma creatinine concentration, in renal contents of malonaldehyde, hypoxanthine and xanthine, and in renal activity of xanthine oxidase, and decreases in renal activities of superoxide dismutase and catalase. Peaks in these changes were observed coincidentally in the third day after the starting of the administration. Afterwards, these all returned to the control levels. These results strongly suggested that the allopurinol nephrotoxicity was attributed to the increase of lipid peroxidation which had been caused both by an increase in the ability of producing the oxygen radicals and by a decrease in the ability of scavenging the radicals.

STUDIES ON THE MECHANISM OF NEPHROTOXICITY OF AMINOGLYCOSIDE ANTIBIOTICS III. EFFECTS ON CULTURED RENAL EPITHELIAL CELLS: Ken-ichi KIYOMIYA, Naoko MATSUSHITA and Masaru KUREBE (Pharmacology & Toxicology Laboratories, Meiji Seika Kaisha, Ltd., Yokohama 222)

We have previously reported that administrations of gentamicin (GM), amikacin (AMK) or streptomycin (SM) to rats for 8 days increase urinary excretion of calcium, glucose, protein, brush border membrane enzymes, cytoplasmic enzymes and lysosomal enzyme and induce histopathological lesions in proximal epithelial cells. This study was performed to investigate on the nephrotoxicity of aminoglycoside antibiotics in cultured LLC-PK₁ cells, pig kidney proximal cell line in comparison with rats.

An addition of GM, AMK or SM (1mM each) into culture medium caused release of enzymes from brush border membrane (alkaline phosphatase, γ -glutamyl transpeptidase), cytoplasm (lactate dehydrogenase) and lysosome (N-acetyl- β -D-glucosaminidase) in LLC-PK₁ cells during cultivation. The treated cells contained lower activity of brush border membrane enzymes and lysosomal enzyme and higher activity of cytoplasmic enzymes than untreated cells. Furthermore, ³H-thymidine incorporation into the acid-insoluble fraction increased in aminoglycoside antibiotic-treated cells. A treatment with aminoglycoside antibiotics also resulted in an increase of total phospholipid content in the cells and an inhibition of ⁴⁵Ca uptake by the cells.

These results lead to the conclusion that intensity and character of nephrotoxicity of aminoglycoside antibiotics in cultured LLC-PK₁ cells are similar to those in rats. The intensity order of nephrotoxicity in these antibiotics was GM > AMK > SM.

EVALUATION OF TOXICITY OF NEPHROTOXIC CHEMICALS IN THE RECONSTRUCTED EPITHELIAL MEMBRANE FORMED BY MDCK CELLS : Kazuko OZAWA, Hiroyuki MORISUE, Yasuhiro KUMEI, Atsushige SATO and Fumiaki MARUMO* (Dept. of Dent. Technol. & Toxicol., Fac. of Dent. Tokyo Medical & Dental Univ., Bunkyo-ku, Tokyo 113 *Dept. Internal Med., Kitasato Univ. Sch. of Med., Sagami-hara, Kanagawa 223)

A reconstructed epithelial membrane formed by kidney epithelial cell line, MDCK has transport and permeability qualities of in vivo transporting epithelia. In this study, the effects of nephrotoxic chemicals on the dome formation and the spontaneous potential differences of monolayers were examined. Cell monolayers were prepared on 1.0 cm diameter collagen coated Millipore membrane filters or in 24 well Linbro plates by seeding at high density followed by growth to confluency in MEM supplemented with 5% (V/V) fetal calf serum. Cell monolayers were mounted in Ussing chambers thermostated at 37°C for measurement of potential differences and short-circuit current (SCC). The dome formation was estimated at 24hrs after additions of chemicals were made. The addition of $5 \times 10^{-5} \text{M}$ ouabain caused disappearance of domes. The number of domes was reduced by addition of 10^{-5}M cadmium chloride. However, sodium chromate, folic acid or gentamicin at the concentration of 10^{-5}M had no effect upon the number of domes. The addition of cadmium chloride ($2 \times 10^{-4} \text{M}$) to the basal bathing solution promptly reduced the SCC of cell monolayers. Sodium chromate ($4 \times 10^{-3} \text{M}$) or folic acid ($1.3 \times 10^{-4} \text{M}$) gradually reduced the SCC from 3 to 2 μA . Gentamicin ($8 \times 10^{-3} \text{M}$) resulted in a pronounced decline in the SCC. The MDCK monolayers are useful for studying the action of nephrotoxic chemicals.

EVALUATION OF BONE MARROW TOXICITY BY HEMATOPOIETIC STEM CELLS (CFU-C AND CFU-S) OF AZATHIOPRINE, BREDININ AND LEVAMISOLE: Kazuhiko MATSUMOTO, Hiroko FUJII and Hiroshi YAMAMOTO (Toyo Jozo Co., Toxicology Dept., Ohito, Tagata, Shizuoka)

Hitherto, bone marrow toxicity study has been performing by hematological and histological tests, but damages of bone marrow function by drugs have to examine the effect on hemato-poietic stem cells. In this study, we investigated the effect of azathioprine (AZ), bredinin (BR) and levamisole (LV) on CFU-C, CFU-S, bone marrow cells and L-5178Y cells.

1. In vitro study: 1) AZ and BR inhibited dose-dependently the colony forming of CFU-C. IC_{50} of BR on CFU-C was $0.22 \mu\text{g}/\text{ml}$, which was 50th as low as that of AZ. 2) AZ and BR inhibited dose-dependently the growth of L-5178Y cells. IC_{50} of BR on L-5178Y cells was $0.57 \mu\text{g}/\text{ml}$, which was 4th as low as that of AZ. LV had no effect in these cells.

2. In vivo study: The effect of drugs on RBC, WBC, bone marrow cell counts, CFU-C, CFU-S and spleen weights in $\text{C}_{57}\text{BL}/6\text{F}_1$ mice treated orally for 4 days was examined. 1) The decrease of RBC, Hb and Ht was seen after treatment with AZ but not with the other drugs. No significant changes were presented in WBC of all drugs. 2) The decrease of bone marrow cells was seen after treatment with AZ and BR but no effect with LV. AZ caused the dose-related decreases in CFU-C, on the contrary, BR caused the increases. LV had no effect in CFU-C. 3) AZ caused the dose-related decreases in spleen weights and CFU-S, on the contrary, BR caused the increases. LV had no effect on spleen weights and CFU-S.

IN VITRO STUDY ON CELL AGEING WITH FOOD CHEMICALS:

Akiko KASAMAKI and Shozo URASAWA (Dept. of Hygiene, Sapporo Medical College, S-1, W-17, Chuo-ku, Sapporo 060)

Previously, we found that the flavoring agents allylisothiocyanate(AI) and cinnamaldehyde (CA) were potential transforming agents for Chinese hamster cells, and that they induced shortening of lifespan in human diploid cells. The process of ageing has been considered to be partly common to that of tumorigenesis. The present study was undertaken to trace various markers for cell ageing during passages of the cells treated with food chemicals, potential causative agents of cell ageing. HAIN-55 cells (human diploid fibroblasts) were treated with AI, CA, aspartame (AS), butylhydroxytoluene (BHT) or zealarenone (ZE), and serially passaged until cell degeneration occurred. During the process, changes in aged cell markers i.e., decreases in saturation density in monolayer cell culture (SD) and in plating efficiency (PE), and heat lability of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) were determined in comparison with those on non-treated cells. In these experiments, the treatment of cells with AI, CA and AS resulted in degeneration of cells accompanying a decrease in SD and PE and an increase in numerical chromosome aberration at relatively early stages of cumulative cell population doublings (CPDs). G6PD activity in both non-treated and treated cells decreased at early phases of cell passages in advance of proliferative decline of cells; the decrease was remarkable in AI-, CA- and AS-treated cells. The heat lability of G6PD increased gradually with the advance of CPDs in all cells irrespective of the treatment, but increased greatly in AI-, CA- and AS-treated cells. These results seem to suggest that food chemicals may be responsible for cell senescence, as indicated by enhanced induction of ageing cell markers by the treatment with the three chemicals.

EFFECTS OF PIG SERUM ON RAT EMBRYO CULTURE: Atsushi YOKOYAMA and Kazuhiro ETO (Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 yushima Bunkyo-ku Tokyo, Japan, 113)

In the present study, we used pig serum as an alternative medium of rat serum on rat embryo culture. They were then cultured either in 100% rat serum, immediately centrifuged, heat-inactivated at 56°C, and supplemented with glucose and antibiotics, or in 50% rat and 50% pig serum or in 100% pig serum similarly prepared. Embryos cultured with 100% pig serum showed the reduction of the protein content, somite number, crown-rump length and yolk sac diameter and then all embryos died within 24 hours of culture from day 11 or 12 of gestation in rats. Embryos were smaller and more frequently malformed when grown in pure pig serum. On the other hand, Embryos growth in 50% rat and 50% pig serum were normal. Rat serum supplemented with 50% pig serum was able to possible the rat embryo culture for 48 hour.

EFFECTS OF METHYLMERCURY ON PROTEIN SYNTHESIS IN RAT SUPERIOR CERVICAL GANGLION, IN VITRO: Shinichiro HORI*, Hiroko SUGIURA*, Sachiko OHTANI*, Tamio HIRABAYASHI**, Mizuho KAWABATA** and Tadao TSUBAKI*** (*Dept.Neurochem., Tokyo Metropol.Inst.for Neurosci., 2-6 Musashidai, Fuchu-city, Tokyo 183, **Inst.Biol.Sci.,Univ.Tsukuba, ***Tokyo Metropol.Neurol.Hosp.)

Protein synthesis is decreased in nervous tissue of the intoxicated animal with methylmercury. In this paper, the effects of methylmercury on protein synthesis was studied by using the organ culture of rat superior cervical ganglion(SCG). The protein synthesis in SCG was estimated from the incorporated amounts of L-[4,5-³H] leucine. 75%-80% of the incorporated leucine was recovered into the acid-insoluble fraction either in the presence or in the absence of methylmercury. Protein synthesis in SCG was inhibited to 25% in the presence of 50 μ M methylmercury. The recoveries of the incorporated leucine into the 0.9% NaCl soluble fraction and the 0.9% NaCl insoluble fraction were 38% and 62%, respectively, in the absence of methylmercury, and 17% and 83%, respectively, in the presence of 50 μ M methylmercury. These results suggest that the synthesis of soluble protein is more effectively inhibited by methylmercury than the synthesis of insoluble protein. By SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE), the syntheses of proteins at MW's 3.5×10^4 and $4.5-5.5 \times 10^4$ were more effectively inhibited, on the contrary, the syntheses of proteins at MW 6.8×10^4 were significantly stimulated. The difference on the inhibitory potency of methylmercury were confirmed by the two dimensional electrophoresis(IEF-SDS-PAGE). Furthermore, some proteins were stimulated their syntheses by 50 μ M methylmercury, even though methylmercury inhibited every protein synthesis at higher concentrations, such as 100 μ M. Relative amounts of stimulated synthesis was estimated by the computer graphic analysis method.

IN VITRO SCREENING FOR TERATOGENS USING RAT EMBRYONIC CELL AND WHOLE EMBRYO CULTURE: Toshie TSUCHIYA, Atsushi TAKAHASHI, Soichiro ASADA*, Fumie TAKAKUBO* and Kazuhiro ETO* (Div. of Medical Chemistry, National Institute of Hygienic Sciences, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo, 158; * Inst. of Stomatognathic Sciences, Tokyo Medical and Dental University, Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo, 113)

The effect of ethylenethiourea (ETU) was investigated on rat (Wistar-imamichi) embryos cultured from day 11 to day 13 of gestation or cultured rat embryonic cells extracted from gestational day 11.

Malformations in cultured embryos were found in head and tail which were severely affected, and also found in limb and primary palate at the concentration of 30 μ g/ml of ETU. Malformations characterized by abnormal head, tail, limb and primary palate were induced in all embryos exposed to 150 and 300 μ g/ml of ETU. Protein contents of the cultured embryos were decreased dose-dependently at the concentrations ranging from 30 to 300 μ g/ml.

From the histological studies of the cultured embryos with ETU, extensive cell death was observed in neuroepithelium and in the mesenchymal tissue of limb bud.

In the embryonic cells extracted from day 11 of gestation, ETU dose-dependently inhibited the differentiation of midbrain cells into neurons and also the differentiation of limb bud cells into chondrocytes at the concentrations ranging from 30 to 300 μ g/ml of ETU. Moreover, ETU inhibited the differentiation of midbrain cells more intensely than that of limb bud cells. These results indicated that there was a good correlation in the teratogenic action by ETU between cultured whole embryos and embryonic cells.

BASAL INVESTIGATION ON THE INTRODUCTION OF DRUG METABOLIZING SYSTEM INTO RAT WHOLE EMBRYO CULTURE SYSTEM : Hiromi KOIDE, Koichi UENO, Akihiro ISHINO, Shigeru OHMORI, Takashi IGARASHI and Haruo KITAGAWA (Laboratory of Biochemical Pharmacology and Biotoxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, 1-33 Yayoi-cho, Chiba 260)

The embryotoxicity of N-acetylaminofluorene (AAF) via bioactivation in 10.5 day rat whole embryo culture has been reported, but only few studies reported the toxicity in the different stages of culture. Therefore, it was much interest to examine the embryotoxicity of AAF on pregnant rats on Day 11.5 of gestation. Day 11.5 embryos were obtained from Wistar-Imamichi pregnant rats (plug day=0) and explanted by the method described by New. For the exogenous enzyme source, postmitochondrial supernatant fractions (S-9) from male rats pretreated with 3-methylcholanthrene were used. After 24 hours culture period with AAF, S-9 and cofactors, viable embryos with heart beats and active yolk sac circulations were evaluated for malformations and measurements were done for following parameters: crown-rump length, head length and somite numbers. Protein and DNA contents were determined following the methods of Lowry and Bradford. In the observation protein and DNA contents were reduced significantly in cultured embryos. But malformations were observed only among few embryos. These results suggest that the absence of significant malformations can be attributed to the differences of the stages in culture system. Therefore, it is the next objective to examine the AAF-mediated teratogenicity in different periods of culture. This time it is also reported about the development of 10.5 day culture system.

OUABAIN INHIBITS TWITCH POTENTIATION BY ANTICHOLINESTERASES IN THE PHRENIC NERVE-DIAPHRAGM MUSCLES OF MICE: Hiroya OHTANI, Masakazu NISHIMURA, and Osamu YAGASAKI (Dept. of Vet. Pharmacology, College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Sakai, Osaka 591).

D-tubocurarine (dTc), hexamethonium (C_6), atropine (ATR), ouabain (OUA), and removal of potassium from the bathing medium were examined for their effects on indirectly evoked twitches (IT) of mouse phrenic nerve-diaphragm muscles in the presence or absence of neostigmine (NTG). NTG increased the amplitude of IT. The twitch potentiation was reduced by dTc and C_6 , but not by ATR, at concentrations that had no inhibitory effect on normal IT. OUA (5 μ M) abolished the twitch potentiation by NTG while having no inhibitory effect on directly evoked twitches in the presence of NTG and dTc together. In a potassium-free bathing solution, the potentiating effect of NTG was less potent and insensitive to OUA. Reincubation of KCl at 2.5 mM restored the interaction between NTG and OUA. This reincubation did not potentiate IT in the absence of NTG. An interaction resembling that between OUA and NTG was obtained between OUA and physostigmine or paraoxon. Both end-plate potentials (EPPs) and miniature EPPs increased in terms of their amplitude and duration in the presence of NTG. OUA did not reduce the enhanced end-plate responses. These results indicate that the potentiation of IT by anticholinesterases may occur via another class of nicotinic receptors which has properties different from those of the end-plate receptors, and that the interaction between anticholinesterases and OUA depends on the presence of K^+ . It is possible that this novel mechanism for facilitation of neuromuscular transmission is supported, at least in part, by a Na^+, K^+ -ATPase.

DEPOLARIZATION, AN EVENT ESSENTIAL FOR THE ACTION OF BOTULINUM TYPE A TOXIN: Masakazu NISHIMURA, Shunji KOZAKI* and Genji SAKAGUCHI* (Depts. of Veterinary Pharmacology and Public Health*, College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Sakai, Osaka 591)

Zinc ions (Zn^{2+}) were found to restore spontaneous transmitter release that had been blocked by botulinum type A toxin (BTX_A). This effect was examined under different conditions. Miniature end-plate potentials (MEPPs) were recorded intracellularly from mouse diaphragm muscles. Zn^{2+} (10-100 μM) elevated the frequency of MEPPs. The effect did not depend on external Ca^{2+} . BTX_A (50 ng/ml) abolished MEPPs almost completely within 30 min. Zn^{2+} (100 μM) restored MEPPs and increased their frequency after they had been abolished by BTX_A in Ca^{2+} -free solutions. The antagonistic effect of Zn^{2+} in the Ca^{2+} -free solution was reduced by exposing preparations to the toxin in the Ca^{2+} -free solutions containing high KCl. These results suggest that the action of BTX_A is probably enhanced by depolarization of the motor nerve terminals. Depolarization of the membrane occurring independently from external Ca^{2+} is probably one of the steps in such a process that leads to transmitter release. Such a step must be essential for the action of BTX_A .

A PROCEDURE FOR RECORDING ELECTRORETINOGRAM AND VISUAL EVOKED POTENTIAL IN UNRESTRAINED CATS: Ryoetsu IMAI, Takeshi MIKODA, Shohta SUZUKI, Shuzo SATO and Sukehiro CHIBA (Central Research Division, Takeda Chemical Industries, Ltd., 6-10-1 Himuro-cho, Takatsuki, Osaka 569)

A procedure for recording the electroretinogram (ERG) and the visual evoked potential (VEP) in unrestrained cats was investigated and used to test the visual toxicity of nalidixic acid (NA). The electrodes for recording the ERG and VEP were implanted chronically in the sclera of the eye and on the surface of the visual cortex, respectively. The ERG and VEP were simultaneously recorded from unrestrained cats using a slip ring that allows the cat free movement without twisting the cables. After dark-adaptation for 15 min, 20 responses to repetitive photostimulation with an intensity of 2 joule and a 10-sec interstimulus interval were averaged by means of a minicomputer. The waveforms of the ERG consisted of a negative wave (a-wave), followed by a positive wave (b-wave) with oscillatory potentials on the rising slope. The VEP consisted of initial positive wave (P1 wave), followed by a negative wave (N1 wave) and late positive and negative deflections. The amplitudes and latencies of these components of the ERG and VEP were very stable. Using this technique, the effects of NA, a retinotoxic compound, on the ERG and VEP were studied. NA produced a marked decrease in the amplitudes of the ERG b-wave after a single intravenous injection at a dose of 10 mg/kg. These results indicate that this procedure for recording the ERG and VEP is useful for evaluating the visual toxicity of drugs in unrestrained cats.

THE LONG-TERM TOXICOLOGICAL STUDY OF NIVALENOL IN MICE : Jae-Chun RYU, Hisashi YAMAMURA, Kohichiro OHTSUBO* and Yoshio UENO (Dept. of Toxicology and Microbial Chemistry, Fac. of Pharmaceut. Sci., Science Univ. of Tokyo, Ichigaya, Shinjuku-ku, Tokyo, 162. *Dept. of Clinical Pathology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Sakae-cho, Itabashi-ku, Tokyo, 173)

In an attempt to ascertain more precisely the toxic effects of nivalenol (NIV), a toxic principle isolated from the cultures of *Fusarium nivale* Fn 2B, we conducted an interim study during the carcinogenic study in mice. Growing female C57BL/6CrSlc SPF mice were fed diets containing 0, 6, 12 and 30 ppm (mg/kg) NIV over one year, and were assessed for effects on body weight gain, feed efficiency, terminal organ weights, hematology and histopathology.

The rates of body weight gain and feed efficiency showed a good dose-dependent correlation in all experimental periods. Gross and histopathological evaluation of the liver, thymus, spleen, kidneys, stomach, adrenal glands, pituitary gland, ovaries, sternum, bone marrow, lymph node, brain and small intestines with or without Peyer's patch portion from control and all NIV-exposed mice revealed that these tissues were normal in appearance and in histological architecture. No changes were also observed in the ultrastructural studies on the bone marrow. Dietary NIV did, however, cause dose-dependent decreases of absolute organ weights (mg) and increases of relative organ weights (mg/g body weight) in the terminal organ weights recorded. A significant leukopenia was observed in 30 ppm group at 6 month but in all NIV-treated groups at one year. No marked changes were observed in the other hematological parameters. These results indicated that 6 ppm or more of dietary NIV for one year showed a characteristic toxic effects of trichothecene mycotoxins in mice.

SIX-MONTH TOXICITY STUDY OF MITOMYCIN C IN MARMOSETS: Kiyoshi MATSUMOTO, Toshiaki OCHIAI, Kiyoshi SEKITA, Yasushi KAWASAKI Kazuo YASUHARA, Yukio NAKAJI, Tsuyoshi FURUYA, Yuji KUROKAWA and Masuo TOBE (Div. of Toxicology, National Institute of Hygienic Sciences, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo, 158)

We reported previously that some toxicological changes induced by 4-dimethylaminoazobenzene were more clearly shown in marmosets than in rats. In this study, 0 (C), 0.2 (L), 0.8 (M) or 3.2 (H) mg/kg/day of mitomycin C (MMC) painted on banana was administered to 4 groups, each consisting of 6 male common marmosets, 15 to 20 months of age, 5 times a week for 6 months. Hematological and biochemical examinations were carried out at 1, 3 and 6 months after the start. Bone marrow and histological examinations were performed at the end of experiment. In H group body weights were severely reduced 2 months after the start and vomiting was observed in 3 animals resulting in the discontinuance of administration at 3 months. RBC, Hb, PCV, Plt and WBC values were markedly reduced in H group but not in L and M groups. Significant decreases in T-Pro, PL, T-Gly, LAP and Ca values and increases in CRN and ChE were observed in H group. Weights of testes in M group and spleen, testes and thymus in H group were significantly decreased. Total marrow cell count was reduced in M and H groups and relative decrease in erythroblasts and increases in lymphocytes and monocytes were observed. Hemosiderin deposition in spleen, bone marrow and liver was found. The fact that oral administration of 1 mg/kg/day MMC for 6 months did not cause any remarkable changes may indicate that marmosets have higher sensitivity than rats in the above described changes.

CHRONIC TOXICITY STUDY OF 2-MERCAPTOIMIDAZOLINE (2-MIZ) IN MICE : Toyozo KANEKO, Kazuo YASUHARA, Eiichi KAMATA, Yukio OGAWA, Sachiko SUZUKI and Masuo TOBE (Division of Toxicology, Biological Safety Research Center, National Institute of Hygienic Sciences, Setagaya, Tokyo, Japan)

We have reported the studies on the acute and subacute toxicity and immunotoxicity of 2-MIZ, used as rubber accelerator, at the previous meeting of this Society.

In the present study, the chronic toxicity of 2-MIZ was investigated in 5-week-old male and female ddY:Slc mice by feeding 2-MIZ at levels of 0, 0.005, 0.04 and 0.32% in the diet for 6, 12, 18 and 21 months. As the results, significant decreases in body weight and survival times and increases in serum albumin and total cholesterol levels were observed at 0.32% level in either sex. Pituitary gland adenomas, thyroid follicular adenomas and liver adenomas were observed at about 9 months after the treatment. At 12 months, significant decreases of serum T4 at levels of 0.04% and 0.32% in both sexes was noteworthy. Significant increase in the total incidence of pituitary gland adenomas was found at a level of 0.32% in either sex. Also, the rates of diffuse and adenomatous goiters and follicular adenomas of the thyroid (0.32%, male and female), adenomas of the liver (0.04% and 0.32%, male and female) and hepatocellular carcinomas of the liver (0.04 and 0.32%, male) were significantly elevated.

When pituitary adenomas were implanted sc to the same strain of mice, serum T4 levels were increased after 3 to 24 hr indicating that the pituitary gland adenoma had a TSH secreting activity. We conclude that the mechanism of the carcinogenicity of 2-MIZ can be explained by its antithyroid effect which resulted in the stimulation of TSH from the pituitary gland. Thyroid follicular cell tumors were developed due to the continuous stimulation by TSH on cell proliferation.

SUBCHRONIC TOXICITY STUDY OF VITAMIN P (METHYL HESPERIDIN) IN B6C3F₁ MICE : Tadashi OGISO, Yasushi KURATA, Yoshiaki TAGAWA, Nobuyuki ITO (1st Dept. of Pathology, Nagoya City University Medical School, 1 Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467)

Groups of 10 female and 10 male B6C3F₁ mice, 6-week-old, (Charles River) were fed diets (Oriental MF) containing 5.0, 2.5, 1.25, 0.6, 0.3 and 0% vitamin P for 13 weeks. Then all animals were necropsied for investigation of hematology, clinical chemistry and histopathology. During the 13-week period, mortality was limited to a single male receiving 1.25 or 0.6%. The cause of death showed no relationship to vitamin P treatment. Body weights and food consumption were not different in both sexes of all groups receiving vitamin P from those of the control group. Analysis of blood biochemistry revealed an decrease in glucose in all treatment female groups. Kidneys weight was significantly increased in females received 2.5 or 1.25% vitamin P. Histological examinations were performed on all organs in group of 5.0% and in control group, and on selected organs such as brain, lung, heart, liver, kidneys, spleen and pancreas in other groups. Notisable lesions were nephropathy of the kidneys, subcapsular-cell hyperplasia of the adrenal glands and scab of the skin. Nephropathy were found three males receiving 2.5%, two males receiving 1.25% and one male receiving 0.3%. Subcapsular-cell hyperplasia were found ten females receiving 5.0% and nine females of control. Scab were found four males receiving 5.0% and four males of control. There were no significant differences in the incidences of these lesions between treated and control groups. These results indicate that vitamin P did not exert a subchronic effect in female and male B6C3F₁ mice.

SUBCHRONIC ORAL TOXICITY STUDY WITH CAPTAFOL IN F344 RATS: Yasushi KURATA, Masao HIROSE, Shoji FUKUSHIMA, Mayumi YAMADA and Nobuyuki ITO (1st Dept. of Pathol., Nagoya City Univ. Med. Sch., 1 Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467)

Captafol has been widely used as a fungicide, since it inhibits mycelial growth from germinating fungal spores. We recently demonstrated that captafol has a carcinogenic potential in mice. The present study was performed to decide doses of carcinogenicity study in rats. Captafol was given at levels of 0, 0.075, 0.15, 0.3 and 0.6% in diet to F344 rats in both sexes for 13 weeks. No deaths occurred during the study. Body weight gains showed a dose-dependent reduction in both sexes. Urinalysis showed a presence of bilirubin in the 0.3 and 0.6% groups in both sexes. Serum levels of the total cholesterol and protein decreased in the 0.15% or more in the both sexes. A/G ratio was higher in the 0.15% or more of females and in the 0.6% of males than that of controls. The relative weights of liver and kidneys showed a dose-dependent increase that was statistically significant for the 0.075% and more in the both sexes. The treatment-related histological alterations were observed as the hyperplasia of the forestomach epithelium in the 0.15% or more in the both sexes, the appearance of bizarre and/or atypical cells of the renal tubules in the 0.3 and 0.6% of both sexes. The presence of oval cells were seen in the liver of the female rats given 0.3% and 0.6% admixture. Thus, we have decided doses of 0.075 and 0.15% for carcinogenicity study of captafol in F344 rats.

ACUTE AND SUBACUTE TOXICITIES OF THREE TRIHALOMETHANES IN RATS (I): Yoshitaka AIDA, Koichi TAKADA, Junko MOMMA, Minoru SAITO, Kazuo YASUHARA, Osayuki UCHIDA and Kazuo KOBAYASHI (Division of Toxicology, Biological Safety Research Center, National Institute of Hygienic Sciences, Setagaya, Tokyo, Japan)

Acute and subacute toxicity studies of tribromomethane (TBM), dibromochloromethane (DBCM) and bromodichloromethane (BDCM) were performed in Wistar rats. Groups of 10 males and 10 females were dosed the each halomethane in olive oil solution orally. LD50 values were found as follows, TBM male:2040 and female:2440(mg/kg.bw), DBCM male:370 and female:760, BDCM male:430 and female:510. The main symptom was the depression of the central nervous system and the relative intensity of this depression was ranked, TBM>DBCM>BDCM. In the subacute toxicity study, groups of 10 males and 10 females were administered microcapsulated trihalomethanes by incorporation in the diet. Concentrations of the halomethanes mixed in the diet is shown in the Table. Suppression of the body weight gain, fatty degeneration of the liver, decrease of TG and ChE activities and increase of G6PDH activity in the serum were commonly observed in the treated group. In TBM group, increase of liver weight and decrease of Glucose in the serum were observed. In DBCM group, necrosis of liver cells and decrease of ALP activity in the serum were observed. In BDCM group, necrosis of liver cells, decrease of LDH activity in the serum were observed. There was no signs of apparent nephrotic effect of trihalomethanes under the conditions of this study.

compound	sex	concentration (%)			of G6PDH activity in the serum were commonly observed in the treated group.
		L	M	H	
TBM	male	0.068	0.204	0.612	In TBM group, increase of liver weight and decrease of Glucose in the serum were observed.
	female	0.072	0.217	0.651	
DBCM	male	0.024	0.062	0.185	In DBCM group, necrosis of liver cells and decrease of ALP activity in the serum were observed.
	female	0.038	0.113	0.338	
BDCM	male	0.024	0.072	0.215	In BDCM group, necrosis of liver cells, decrease of LDH activity in the serum were observed.
	female	0.024	0.076	0.227	

NEUROTOXICITY OF METHYL BROMIDE

Takeshi HONMA (National Institute of Industrial Health, Nagao 6-21-1, Tama-ku, Kawasaki, Kanagawa 214)

Male rats of SD strain, 8-12 week old, received a single 8 h exposure to methyl bromide (MB). Inhibition of locomotor activity and hypothermia were observed, and food intake was depressed in rats exposed to 125-250 ppm MB. Dopamine (DA), Norepinephrine (NE) were reduced and their metabolites, HVA and MHPG were increased in five brain areas (striatum, hypothalamus, frontal cortex, midbrain, and medulla oblongata) of exposed rats. MB exposure affected also serotonin and metabolite (5HIAA) contents of rat brain to a much smaller extent. Reduction of DA and NE contents and increase in HVA and MHPG were dependent on MB exposure concentrations. Lineweaver-Burk plots of tyrosine hydroxylase (TH) showed that enzyme inhibition by MB was mixture of noncompetitive and uncompetitive types. TH activity in five brain regions was assayed in vitro and in vivo. Time course of the inhibition of TH activity by MB was well consistent with the fall in catecholamine levels. MB concentration in rat brain reduced rapidly with half life of about 30 min. It seems that reduction of catecholamines was caused by the inhibition of TH activity and the inhibition was caused directly by MB in the brain. Inhibition of catecholamine synthesis (and fall in activity of catecholamine neurons) is likely to be the background of the changes of body temperature and appetite observed in clinical cases and experimental animals.

EFFECTS OF ALCOHOL ON SUBACUTE TOXICITY OF PESTICIDES: Nobuaki NAKASHIMA, Keizo MAITA, Tadashi KOSAKA and Yasuhiko SHIRASU (Toxicology Division, Institute of Environmental Toxicology, Suzuki-cho, Kodaira, Tokyo, 187)

Effects of alcohol on subacute toxicity of two pesticides, 2,4,6-trichlorophenyl 4'-nitrophenyl ether (MO) and 4-chloro-o-tolyloxyacetic acid (MCP), were studied in F344 rats. Following the pretreatment of 2-week administration of alcohol mixed into liquid diet at the concentration of 5%, pulverized diets containing MO at the concentrations of 200 and 2,000 ppm or MCP at the concentrations of 400 and 4,000 ppm were given to the rats for 2 weeks with a drinking water containing 5% alcohol. The groups treated with alcohol in addition to MO or MCP showed lower values of food consumption and body weight compared with those in the groups treated with MO, MCP or alcohol alone. However, there was no enhancement of changes in the liver weight, blood biochemical parameters, and histopathological findings of the liver in these groups as compared with those in the groups treated with MO, MCP or alcohol alone. It was concluded that alcohol did not enhance the subacute toxicity of MO or MCP in this experiment.

COMPARISON OF TOXICITY OF p-DICHLOROBENZENE(p-DCB) GIVEN ORALLY AND BY INHALATION : Takashi UMEMURA, Koichi TAKADA, Yukio NAKAJI, Masami WAKANA, Yukio OGAWA, Eiichi KAMATA, Toyozo KANEKO and Masuo TOBE (Division of Toxicology, Biological Safety Research Center, National Institute of Hygienic Sciences, Setagaya-Ku, Tokyo 158)

The difficulty to conduct toxicity study by inhalation route seems to lie in the need for adequate facilities for exposure of animals and for maintenance of human safety. Therefore it is of importance to ascertain whether the toxicity manifested by the inhalation route can also be demonstrated by oral route. In this study, we compared the organ distribution and the toxicity of p-DCB observed in rats by inhalation and by oral administration. Male F-344 rats were exposed to p-DCB at 2 doses in the whole body chamber(L & H groups) or administered by gavage (PO group). The animals were sacrificed at a certain period of time after treatment.

The concentrations of p-DCB and its metabolite, p-Dichlorophenol were measured in the serum, liver, kidney, and fat tissues. as the results, the ratios of the concentrations of p-DCB(organ/serum) were higher by inhalation than by oral administration. This seems to correspond to the fact that the serum biochemical and histopathological abnormalities were more evident in inhalation groups.

STUDY ON THE TOXICITY OF 2,2'-METHYLENE-bis(4-ETHYL-6-tert-BUTYLPHENOL) IN RAT(NO.1): Atsuya TAKAGI, Junko MOMMA, Yoshitaka AIDA, Sachiko SUZUKI, Koichi TAKADA, Katsusi NAITOH, Yasuo OHNO , Yasuo SUZUKI, Yukio NAKAJI, Yuji KUROKAWA and Masuo TOBE (Div. of Toxicology, Div. of Pharmacology ,Biological Safety Research Center, National Institute of Hygienic Sciences, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158)

Acute and subacute toxicity studies of 2,2'-methylene-bis(4-ethyl-6-tert-butylphenol)(MBEBP) were carried out in 5 week-old Wistar rats.

In the acute toxicity test, MBEBP suspended in olive oil was administered orally or intraperitoneally. In both sexes, no death occurred within 14 days after administration of up to 10g/kg b.w. of MBEBP, therefore the LD50 values of MBEBP were estimated as larger than 10g/kg b.w. (orally and intraperitoneally).

In the subacute toxicity test, Wistar rats (10/sex/group) were fed MBEBP at dietary levels of 0, 0.2, 1.0 or 5.0% for 3 months. At 1 and 3 months, the rats (5/sex/group) were sacrificed for laboratory examinations. No deaths occurred and no abnormal clinical signs were found in each group during 3 months observation period. Depressed body weight gains, decreased TG and CHE, increased AMY in serum and increased liver weights were observed in both sexes, treated with MBEBP. The activities of drug metabolizing enzymes in the liver microsomes were increased, but those of peroxisomal enzymes in the liver were not increased in males killed at 1 month. It is known that the hypolipidemic drugs can induce the proliferation of peroxisomes and the elevation of the activities of peroxisomal enzymes in liver cells of animals. However the present results suggest that MBEBP does not induce peroxisome proliferation in the rat liver.

TRITOQUALINE AND PARAQUAT POISONING: Yohko FURUSE, Fumiaki AKAHORI, Shigeyuki ARAI, Toshio MASAOKA and Kazuko SAKAGUCHI (Dept. of Pharmacology, School of Veterinary Medicine, Azabu University, Fuchinobe, Sagami-hara 229)

The effects of tritoqualine (TRQ) on paraquat (PQ) poisoning was examined using rats as our experimental subjects. Selected at random, 126, six week old, male DONRYU rats were divided into two experimental groups. The composition of these groups was 110 PQ treated rats and 16 saline treated rats (control group). These experimental rats were administered 4.0mg PQ dichloride/kg body weight, s.c., every other day for a period of 20 days. Following this period, PQ was administered daily for a period of 7 to 8 days, as an index for body weight loss. The rats that experienced a loss of body weight, elicited by the PQ administration, were divided, randomly, into four groups; three TRQ treatment groups and a Sesame oil treatment group. The administration of TRQ at dosages 50mg/kg, 100mg/kg and 200mg/kg and Sesame oil (5ml/kg) was initiated on the 29th day of our experimental period and continued for 14 days. During the initial PQ treatment period the serum ceruloplasmin levels were elevated by a factor of 1.8 for the rats that experienced a loss of body weight and elevated by a factor of 1.3 for the rats that did not display a body weight loss when the ceruloplasmin concentration of these rats was compared to the control group. Similar increases, in the serum ceruloplasmin levels, were observed in both the PQ-TRQ and PQ-Sesame oil treatment groups, compared to the Saline-Sesame oil treatment control group (S-S), on day 35, 42 and 49 of our experiment. The plasma fibronectin concentration was also elevated due to the PQ administration. This increase was especially prominent for the PQ-TRQ and PQ-Sesame oil treatment groups on day 35, when compared to the S-S control group. In addition, the lung hydroxyproline concentration of the PQ-TRQ treatment groups and PQ-Sesame oil treatment group was significantly elevated when compared to the S-S control group on day 49. Based upon our findings in this experiment, it appears that TRQ administration was not effective in alleviating the effects of PQ toxicity.

EFFECT OF PRENATAL EXPOSURE OF PARATHION ON HUMORAL IMMUNE FUNCTION IN MICE: Izumi YASUKOUCHI, Koichi UENO, Shigeru OMORI, Takashi IGARASHI and Haruo KITAGAWA (Lab. of Biochemical Pharmacology and Biototoxicology, Fac. of Pharmaceut. Sci., Chiba Univ. 1-33 Yayoi-cho, Chiba-shi, 260)

The effect of prenatal exposure to parathion (PT) on postnatal humoral immune function of offspring was studied using in vivo plaque forming cells (PFC) assays. Maternal ICR mice were dosed by oral administration with 0, 0.25, 1 and 4 mg/kg PT in corn oil.

Dosage schedule was as follows,

- 1) Experiment 1.; Day 7 to 15 of gestation,
- 2) Exp. 2.; from Day 16 of gestation till the Day 0 of parturition,
- 3) Exp. 3.; from Day 10 of gestation to 10th day postpartum.

Postnatal humoral immune function was assessed by measuring the in vivo primary humoral immune response to sheep red blood cell (SRBC) by PFC assay and hemagglutination. At the same time, general toxicologic property was assessed by measuring brain acetylcholinesterase level by thiocholine-DTNB method described by Voss et al.

The tendency of dose-related suppression of humoral immune function was observed in male mice of Exp. 1. at 11-13 weeks of age. In male and female mice of Exp. 2., no change was observed. A significantly potentiation of Exp. 3. Either hemagglutinin titer or brain acetylcholinesterase level were not observed effect of administration of PT.

These results suggest that prenatal exposure of PT at organogenetic period may affect suppression of humoral immune function in mice.

COMPARISON OF WHOLE-BODY VERSUS SNOUT-ONLY EXPOSURE IN INHALATION TOXICITY OF FENTHION: Makoto IWASAKI, Minoru YOSHIDA, Takanori IKEDA, Shuji TSUDA and Yasuhiko SHIRASU (Mitsukaido Laboratories, Institute of Environmental Toxicology. 4321 Uchimoriya, Mitsukaido, Ibaraki 302-02)

In order to compare the acute toxicity of liquid aerosols by whole-body exposure with that by snout-only exposure, male rats divided into two groups were exposed to mists of fenthion (MPP), a liquid organophosphorus insecticide, in a whole-body exposure chamber under the practically same exposure conditions. During the snout-only exposure, each animal was confined in an animal holder. The toxicity of MPP mists based on the 4-hr LC50 was about 8-times higher for the whole-body exposure than for the snout-only exposure. After s.c. administration of MPP, rats restrained in the animal holder for 4 hr showed similar toxic manifestation as that by the snout-only exposure. There was no effect of restraint in the holder on the s.c. toxicity of MPP. Clipping the fur of animals immediately after the whole-body exposure reduced the toxicity. The whole-body exposure caused more marked inhibition of ChE activity of whole blood than the snout-only exposure at the same exposure concentration. The fur clipping after whole-body exposure reduced the inhibition of the ChE activity. After exposure at each LC50, the inhibition of the ChE activity was similar among the whole-body exposure, the snout-only exposure, and the fur clipping after whole-body exposure. It was concluded that there was no effect of restraint in the animal holder on the inhalation toxicity of MPP mists by the snout-only exposure, and that the higher toxicity by the whole-body exposure might be caused by the chemical intake via non-inhalation route(s) during and after the whole-body exposure.

EFFECTS OF CONTINUOUS ALCOHOL INGESTION ON LOCOMOTOR ACTIVITY AND EATING BEHAVIOR: Tadashi KOSAKA, Toru R. SAITO, Keizo MAITA and Yasuhiko SHIRASU (Toxicology Division, Institute of Environmental Toxicology. Suzuki-cho, Kodaira, Tokyo, 187)

We investigated the effects of continuous intake of ethanol on locomotor activity and eating behavior. Male rats of the F344 strain at 5 weeks of age were used. The locomotor activity of each pair was measured for a period of 24 hr at 2 weeks after feeding the liquid diet containing alcohol (5%). For investigating eating behavior, six rats were fed the alcohol diet for 2 weeks following acclimatization to the control liquid diet, and then they were returned to the control diet.

A higher locomotor activity in the control diet group was recorded in the dark period. However, there was no difference of locomotor activity between the dark and light period in the alcohol diet group. A higher activity of eating behavior (about 70% of one day activity) was observed in the dark period before alcohol treatment. In the period when they were fed the alcohol diet, no difference of eating behavior was seen between the dark and light period. The activity of their eating behavior returned to the similar level seen before alcohol ingestion started.

CIRCADIAN ACTIVITY CHANGE DURING EXPOSURE TO CARBON MONOXIDE UNDER CONTINUOUS LIGHT CONDITION IN RATS: Muneyuki MIYAGAWA, Hiromichi HASEGAWA, Mitsuo SATO and Takeshi HONMA (National Institute of Industrial Health, Nagao-6-chome, Tamaku, Kawasaki, 214)

Behavioral effects of subacute exposure to CO were examined to develop the standard test methods for the neurobehavioral toxicity of environmental pollutants. The circadian rhythm of general activity under continuous light condition in rats was selected as the behavioral index for assessing the toxicity of the pollutants.

The rats were continuously exposed to 0, 200, or 300 ppm of CO for 120 h in the exposure chambers. Their general activity was measured individually by using the 4 channel Automex system, and the data were collected every 1 h during the exposure periods. The circadian rhythm was analyzed by using the power spectrum and the cosine least squares spectrum method. Dose dependent changes according to the exposure concentration were revealed in many parameters related to the activity cycle (24 h peak height, amplitude, mesor, period). To study the correlates with the behavioral alterations, the amount of brain glucose, lactate and ATP were measured after the termination of the exposure, but no significant change was obtained.

Circadian rhythms under constant light condition would be available as a sensitive behavioral index for the assessment of subacute effects of environmental pollutants.

EFFECT OF EXPOSURES TO TOLUENE VAPOR ON DRINKING BEHAVIOR AND WATER-ELECTROLYTE METABOLISMS IN RATS: Heihachiro ARITO and Hiroshi TSURUTA (National Institute of Industrial Health, 21-1, Nagao 6-chome, Tama-ku, Kawasaki 214)

In an attempt to elucidate a symptom of thirst which is observed among "glue" sniffers and toluene-exposed workers, male rats of the Sprague-Dawley strain were exposed repeatedly to toluene vapor of 2700 ppm and 900 ppm and air stream at a rate of 8 hrs/day, 5 days/wk and 3-4 weeks and their drinking activities were measured with a drinkometer. The 12-hr drinking activities following the repeated exposures to toluene vapor were found to increase with an increase in the exposure concentration of toluene vapor and number of the repeated exposures. The repeated exposures to toluene vapor produced a dose-related increase not only in water intake but also in intake of 1.8 % (hypertonic) NaCl solution. In another series of the experiment, a dose-related increase in plasma osmolality and plasma sodium concentration with a concomitant decrease in plasma protein concentration was observed in the rats sacrificed at 4 hrs after cessation of the repeated exposures for 3 weeks to toluene vapor. Urine volume increased and urine osmolality decreased without any increase in sodium excretion on Day 1 after cessation of the repeated exposures for 3 weeks to toluene vapor. Mechanisms underlying the increased water intake and sodium appetite induced by the repeated exposures to toluene vapor were discussed in the light of plasma osmolality, plasma sodium and protein concentrations and urinary volume, osmolality and sodium excretion.

EFFECT OF MAGNESIUM SULFATE ON EXPERIMENTAL HYPERCHOLESTEROLEMIA AND CALCINOSIS IN RATS: Hiroaki YAMAMOTO, Koichi FUJISHIRO, Eichi KAYAMA, Ichiro YAMAMOTO and Tamae SUGIYAMA (Depts. of Pathology, Clinical Chemistry, Kohno Clinical Medicine Research Inst., Kitashinagawa Shinagawa, Tokyo, 140, Dept. of Pathology, Kitasato Univ., Kitasato Sagamihara, Kanagawa, 228)

Magnesium is known to have any effect on metabolism of cholesterol and calcium. We obtained the results that experimentally produced atherosclerosis caused high level of lipids and calcium deposition. This study was performed an effect of magnesium on the hypercholesterolemia and/or calcinosis in animals. The male Sprague-Dawley rats of 7 weeks were used. Animals were divided into 8 groups of 10 rats. Experimental design was as follows: group I: cholesterol diet (CHO)+vitamin D₂ (VD), group II: CHO+MgSO₄ (Mg), group III: VD+Mg, group IV: CHO+VD+Mg, group V: normal diet (CE-2)+VD, group VI: CHO+CE-2, group VII: CE-2+Mg and group VIII: CE-2. At the end of 6-week experiment, all the survived rats were sacrificed and necropsied. As clinical examination, serum Na, K, Cl, Ca, Mg and P and tissue Ca, Mg, TC, TG and PL were carried out. Serum calcium contents in any groups were higher in group VII and especially highest in group IV with exception of group III. On the other hand, calcium values in Mg-injection groups were increased in groups VII and IV and were decreased in groups II and III. Calcium contents of aortic tissues in any groups were higher as compared in group IV with exception of decrement in group VII and particularly highest in group V. The correlationship of calcium contents between serum and aortic tissue were reciprocal. Serum total cholesterol and triglyceride were increased in groups I, II, IV and VI and especially highest in group IV. In histological examination, calcification, mainly affected the heart, kidney and aorta, was more frequent in all groups treated with Mg. From above the results, it was suggested that Mg might have a promotive role to calcification.

RELEVANCE OF URINARY Na⁺ AND pH TO TUMOR DEVELOPMENT IN 2-STAGE RAT URINARY BLADDER CARCINOGENESIS: Masa-Aki SHIBATA, Seiko TAMANO, Tsuneo MASUI, Makoto ASAMOTO and Shoji FUKUSHIMA (1st Dept. of Pathology, Nagoya City Univ. Med. Sch., 1 Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467)

Male F344 rats of groups given 0.05% BBN solution for 4 wk and then exposed to 3% NaHCO₃ (group 1), 1% NaCl (group 2) or basal diet (group 3) for the following 32 wk period. Rats of groups 4 to 6 initially received water without BBN and then same treatments as groups 1 to 3. An additional experiment was performed to determine the urinary content of PGE₂ and to compared DNA synthesis in bladder epithelium using BrdU incorporation after administration of NaHCO₃ or NaCl to rats for 4 wk. Urinalysis revealed the natriuresis, alkaline and hypotonic urine in groups 1 and 4. Groups 2 and 5 demonstrated only natriuresis. Investigation of urinary content of PGE₂ did not reveal any significant inter-group differences. DNA synthesis in the urothelium was significantly increased in both NaHCO₃ and NaCl treated animals. Histopathologically, NaHCO₃ (group 1) significantly enhanced the development of preneoplastic and neoplastic lesions of the bladder. Indeed, slight induction of simple hyperplasia was apparent even in the NaHCO₃ alone. No significant differences with regard to incidences of bladder lesions were apparent between NaCl and control groups. Thus, the present study strongly indicated that increased urine alkalinity and a high concentration of Na⁺ may be contributory factors for promotion of urinary bladder tumor development.

VALIDATION OF RAPID BIOASSAY SYSTEM FOR DETECTION OF
INHIBITOR OF CHEMICAL CARCINOGENESIS.

Satoshi UWAGAWA, Katsumi IMAIDA, Hiroyuki TSUDA, Masataka
KAGAWA and Nobuyuki ITO (1st Department of Pathology, Nagoya
City University Medical School, Nagoya, 467)

We developed a short-term (8 weeks) liver bioassay system using male F344 rats for early detection of carcinogenicity of test chemicals. This system is composed of a sequence of single i.p. injection (200 mg/kg) of diethylnitrosamine (DEN) for initiation, and starting 2 weeks later were treated with test chemicals mostly mixed in basal diet for 6 weeks and then sacrificed, all rats being subjected to two-third partial hepatectomy at week 3. Recently glutathione S-transferase P type (GST-P) was shown to be a good positive marker enzyme for detection of putative preneoplastic liver lesions. Therefore GST-P positive foci were quantitatively evaluated using an image analyzer with respect to difference from DEN alone group. A total of 120 chemicals were tested. Twenty two chemicals showed a clear inhibitory effect (antioxidants 11/23(47.8%), analgesic antipyretic and antiinflammatory drugs 3/12(25%), peroxisome proliferating agents 2/2(100%), peroxidation products 2/2(100%), sex hormone 1/4(25%), other 2). Butylated hydroxyanisole(BHA) and α -tocopherol showed dose related inhibitory effects. Results in our system suggests its use as a useful tool for rapid detection of inhibitory agents of mainly hepatocarcinogenesis in addition to environmental hepatocarcinogens.

AVAILABILITY OF TRYPSIN DIGESTION FOR IMMUNOHISTOCHEMICAL EXAMINATION OF FORMALIN-FIXED, PARAFFIN-EMBEDDED TISSUES: Kohsei GOTOH, Mizuho INAZU, Takayoshi KOBAYASHI and Takashi SAKAGUCHI (Pharma Research and Development Division, Hoechst Japan Limited, 1-3-2 Minamidai, Kawagoe, Saitama 350)

Immunohistochemistry is frequently needed for pathological evaluation but it mostly requires specific treatments of specimens according to desired purposes. In the case that the necessity of this examination arises after usual microscopic procedure, there are occasions that immunoreactivity is not fully detected. To improve the detectability of immunoreactivity, Huang et al. have reported a method of trypsin digestion for immunohistochemistry of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues (Lab. Invest. 35: 383, 1976). In this study, optimal conditions for trypsin digestion of IgG, IgM, fibrin and keratin were investigated in normal tissues and lesions from rats and mice. As for IgG, IgM and keratin, comparison was made in their localization between trypsin-treated paraffin sections and unfixed, frozen sections. Results: The trypsin digestion made it possible to stain IgG, IgM, fibrin and keratin in formalin-fixed, paraffin-embedded sections. The optimal concentrations of trypsin for maintenance of tissue form and structure and good stainability were as follows under the conditions of 37°C for 1 hr reaction period: 0.1, 0.1 and 1.0% for rat IgG, keratin and fibrin, respectively, and 0.05% for mouse IgM. The formalin-fixed, paraffin-embedded sections subjected to trypsin digestion showed comparable immunohistochemical results to those in the unfixed, frozen sections, and the former sections were superior to the latter ones for histopathological diagnosis. These results suggest that immunohistochemistry with trypsin-treated paraffin sections is a useful method for histopathological evaluation in safety studies.

DIFFERENTIAL ESTABLISHMENT AND MAINTENANCE OF ORAL ETONITAZENE REINFORCED BEHAVIOR IN LEWIS AND FISCHER₃₄₄ INBRED RATS STRAIN; Tsutomu SUZUKI¹, Frank R. GEORGE² and Richard A. Meisch³ (¹Dept. of Applied Pharmacology, Hoshi Univ. Shinagawa-ku, Tokyo, ²142, ³NIDA Addiction Research Center, Baltimore, MD 21224, ³Dept. of Psychiatry, Univ. of Minnesota, Minneapolis, MN 55455)

Oral etonitazene self-administration was systematically investigated in two inbred strains of rats, Lewis (LEW) and Fischer 344 (F344). For both strains etonitazene maintained higher response rates and was consumed in large volumes than the water vehicle. However, LEW rats drank substantially more etonitazene than F344 rats. The typical inverted U-shaped function between etonitazene concentration and number of responses was observed for the LEW rats, whereas for the F344 rats etonitazene-maintained responding did not consistently exceed that for water. For the LEW strain, as the FR size was increased, the number of responses increased almost in direct proportion to the FR size increase, so that at least at the lower FR values the rats were obtaining similar numbers of deliveries at different FR sizes. Similar results were obtained in F344 rats, but the amount of responding was lower and less consistent. LEW rats showed significantly higher response rates. These results support the conclusion that etonitazene serves as a strong positive reinforcer for LEW rats and as a weak positive reinforcer for F344 rats. The results indicate that genotype is an important determinant of the degree to which etonitazene functions as a reinforcer.

EFFECTS OF LONG-TERM PHENOBARBITAL ADMINISTRATION ON CANINE HEPATIC FUNCTION (A PRELIMINARY STUDY): Atsuko ISHIKAWA, Toshio YOSHIDA, Yoshinori SAWANO, Takanori HANADA, and Hisao MIKI (Safety Research Laboratories, Product Development Laboratories, Yamanouchi Pharmaceutical Co. Ltd., 1-8, 1-Chome Azusawa, Itabashi-ku, Tokyo 174)

This preliminary study is an attempt to find the effects of long-term administration of phenobarbital on plasma biochemical parameters in beagle dogs. Two male and two female dogs were injected iv daily with successively increasing doses of phenobarbital commencing at 5 mg/kg and rising to 80 mg/kg during first 5 weeks. From week 6 through week 26 the dogs received the drug at a constant dosage of 50-60 mg/kg. After week 3 of dosing, plasma alkaline phosphatase was elevated to 2-6 fold of the upper limits of our normal values. Albumin decreased to less than 2 g/dl, cholesterol less than 100 mg/dl. Some dogs showed occasional elevation of plasma GPT. These changes persisted throughout the dosing period of 26 weeks, and no other abnormalities were observed.

Another study was conducted to determine if phenobarbital po doses induce similar changes as in iv administration described above. Phenobarbital was given orally to one male and one female dogs at maximum dosage of 50-60 mg/kg for 13 weeks. An increase of plasma alkaline phosphatase was also observed from week 2, a decrease of albumin from week 2-6, an increase of GPT from week 10.

STUDY ON MOUSE HAIR CYCLE: COMPARISON AMONG DIFFERENT STRAINS:
Yoshifumi MIYAKAWA, Michihito TAKAHASHI* and Yuzo HAYASHI*
(Biol. Res. Center, Japan Tobacco Inc., Nakogi 23, Hatano-shi,
Kanagawa 257, * Dep. of Pathol., Natl. Inst. Hygienic Sci.)

Hair cyclic changes were examined in terms of the thickness of skin during 140 days of life and compared among DBA/2, BALB/c, C57BL/6, ICR and SENCAR mice. They were housed in a barrier-sustained animal room conditioned to $23 \pm 1^\circ\text{C}$, $55 \pm 5\%$ RH and 14 hr of light. Each animal was measured skin thickness at the interscapular and mid-dorsal regions with a caliper twice a week. Six litters were used for each strain. To examine the onset of 2nd (G2) or 3rd (G3) growth phase, 10 male and 10 female mice of each strain were carefully shaved the back with an electron hair clipper at the age of 22 and 52 days.

The pattern of hair cyclic changes was almost same among 5 strains. The 1st growth phase started at the age of 2 days and skin thickness gradually increased till 8 days, then decreased to the lowest value at the age of 18-24 days (1st resting phase). G2 started at the age of 28-37 days, but its onset in the female was 3-4 days later than in male in all the strains. Skin thickness reached the peak at 2-4 days after the start of G2 and then gradually decreased. At the age of 52 days, all the mice were in the 2nd resting phase (R2) in all the strains. R2 lasted comparatively long. The onset of G3 varied both among individuals and among strains. Spotty hair growth was observed in the mice of DBA/2 and C57BL/6 strains.

W1. Non-Specific Senile Lesions and Long Term Toxicity Studies. K. MAITA	526
W2. Modulation of Metabolism and Toxicity of Xenobiotics in Long-Term Testing. T. SATOH	538
W3. Can Short-Term Mutagenicity Tests Predict the Long-Term Toxicity in Animals ? M. ISHIDATE	546
W4. Strategies for the Assessment of the Effect of Maternal Drug Exposure on the Offspring. T. FUJII	558
Closing Address : H. ENDOU	567
Free Communications : 47 papers	571

Contents

Lectures

Chairman : K. TSUCHIYA

- L1. Predicting Human Drug Safety from Animal Studies : Current Issues ;
L. LASAGNA 439
- L2. The R and D of Pharmaceuticals from the Economic Point of View.
S. FUJINO 451

Symposium

Definition and Evaluation of Long Term Toxicity,

Chairmen : H. KANETO, N. INOUE

- Introduction ; H. KANETO 459
- S1. Methodological Consideration of Long-Term Toxicity of Drugs.
T. YANAGITA 460
- S2. Long-Term Toxicity ; Consideration and Evaluation, from Pharmacological
Viewpoint.
A. TAKANAKA 471
- S3. Evaluation of Toxicology of Long-Term Animal Experiment : Pathological
Aspects.
N. ITO 481
- S4. Clinical Evaluation of Long-Term Toxicity—Clinical Evaluation of
Urinary Tract Tumors Related to Exposure to Some Aromatic Amines—.
T. UEDA 493
- S5. Evaluation of Long-Term Toxicity in the Field of Occupational Health.
Y. KODAMA 501
- S6. Long-Term Toxicity Study ; Its Rationale and Data Analysis.
Y. TAKAGAKI 511
- Closing Address : K. TSUCHIYA 519

Workshop

Problems in the Methods for the Estimation of Long Term Toxicity.

Chairmen : Y. HAYASHI, H. ENDOU

- Introduction : Y. HAYASHI 525