

第16回日本毒科学会学術年会 プログラム・要旨集

会期 1989年6月13日(火)、14日(水)

会場 ホリデイ・イン横浜 ☎045(681)3311

会長 柳 田 知 司 (実中研・前臨床研)

会 長	柳田 知司 (実験動物中央研究所付属前臨床医学研究所)
プログラム委員	遠藤 仁 (東京大学・医・薬理)
	大森 義仁 (東京慈恵会医科大学・薬理)
	加藤 隆一 (慶応義塾大学・医・薬理)
	林 裕造 (国立衛生試験場安全性研究センター・病理)
実行委員	野村 岳之 (実中研・前臨床研・毒性)
	佐藤 哲男 (千葉大学・薬・薬理)
	高仲 正 (国立衛生試験所安全性研究センター・薬理)
	山添 康 (慶応義塾大学・医・薬理)
	飯塚 宏美 (実中研・前臨床研・薬理)
	小泉 治子 (実中研・前臨床研・実験病理)
	谷本 義文 (実中研・前臨床研・血液化学)
	森田 晴夫 (実中研・前臨床研・毒性)
	若狭 芳男 (実中研・前臨床研・精神薬理)

事務局

〒213 神奈川県川崎市宮前区野川 1433
 実験動物中央研究所付属前臨床医学研究所
 毒性部 ☎ 044(754)4441

- ◎ 理事会は 6月12日 15:00 より
 ホリデイ・イン横浜 10F ウイルソンの間で行ないます。
- ◎ 評議員会は 6月13日 12:15~13:00 に
 B会場(2F)で行ないます。
- ◎ 総会は 6月14日 13:00~14:00 に
 A会場(2F)で行ないます。

目 次

日程および座長一覧	2
お知らせとお願い	4
会場案内	7

プログラム

特別講演	8
シンポジウム	8
ワークショップ（1）	9
ワークショップ（2）	10
一般演題	11

要旨

特別講演	17
シンポジウム	23
ワークショップ（1）	37
ワークショップ（2）	51
一般演題	65

日程および座長一覧

6月13日

	A 会場 (鶴の間 中、西) 2F	B 会場 (鶴の間 東) 2F
9:00	開 会 の 辞	
9:10	<p style="text-align: center;">一 般 演 題 (口 演) (A-01~07)</p> <p>A-01~03 血液 座長：戸部満寿夫 村岡 義博</p> <p>A-04~07 肝臓 座長：江頭 亨 亀山 勉</p>	<p style="text-align: center;">一 般 演 題 (口 演) (B-01~07)</p> <p>B-01~03 毒性試験法 座長：和田 攻 鍋島 俊隆</p> <p>B-04~07 神経・筋 座長：矢ヶ崎 修 山本 郁男</p>
10:34 11:00	<p>特 別 講 演 G.Zbinden 教授</p> <p>座 長： 柳 田 知 司</p>	
12:00	<p>12:15</p> <p>昼 休 み</p> <p>13:00</p>	<p>評 議 員 会</p>
13:30	<p>シ ン ポ ジ ウ ム</p> <p>「毒性評価における 種特異性の問題点」</p> <p>座 長： 林 裕 造 加 藤 隆 一</p> <p>(S-1~5)</p>	
16:00		
17:30	<p>懇 親 会</p>	
19:30		

6月14日

	A会場 (鶴・中、西) 2F	B会場 (鶴・東) 2F	C会場 (橋、檜の間) 3F
9:00	<p>一般演題 (口演) (A-08~21)</p> <p>A-08~11 特殊毒性 座長: 福田 英臣 宇高 奎二</p> <p>A-12~14 解毒・排泄 座長: 中井 健五 高仲 正</p> <p>A-15~18 毒性発現機序 座長: 池田 正之 福島 昭治</p> <p>A-19~21 In vitro 座長: 上野 芳夫 堀 眞一郎</p>		<p>9:30 展示準備</p> <p>-----</p> <p>一般演題 (ポスター) (C-01~17)</p> <p>展示</p> <p>11:00 -----</p> <p>質疑</p>
11:48	昼 休 み		
13:00	総 会		
14:00	<p>ワークショップ (1)</p> <p>「毒性試験技術の 最近の進歩」</p> <p>座長: 大森 義仁 黒川 雄二</p> <p>(W1-1~5)</p>	<p>ワークショップ (2)</p> <p>「毒性試験代替法の 最近の進歩」</p> <p>座長: 遠藤 仁 佐藤 哲男</p> <p>(W2-1~5)</p>	
16:30	閉 会 の 辞		
16:40			

お知らせとお願い

1. 年会参加者の皆様へ

- 1) 事前登録をされた方は、お送りした参加章（ネームカード）に所属・氏名をご記入下さい。
- 2) 当日参加の方は、受け付けに備え付けの年会当日申し込みカードに必要事項を記入し、参加費（5000円）をお支払いの上、「参加章」および「プログラム・要旨集」をお受け取り下さい。
- 3) 学会受け付けは、8:15 より開始します。
- 4) 会場に入場の際は、必ず参加章を上着に付けて下さい。
- 5) 会場内は禁煙です。喫煙は灰皿の備えてある所をお願いします。
- 6) 会場内の進行は、司会または座長の指示にしたがって下さい。
- 7) 昼食はホテル内または周辺のレストランをご利用下さい。
- 8) 口演中のストロボ撮影はご遠慮下さい。
- 9) 懇親会（会費7000円）は当日申し込みも受け付けます。早めに受け付けにお申し出下さい。
- 10) 特別講演に同時通訳はありませんが、スライドには日本語が併記されます。

2. 演者の皆様へ

口演：一般演題

- 1) 口演時間は8分、追加発言・質疑応答は4分です。時間を厳守して下さい。
- 2) スライドは10枚以内をお願いします。
- 3) 発表の中止または演者の変更は、なるべく早めに年会事務局（会期中は会場受け付け）にお申し出下さい。
- 4) プロジェクターは1会場1台です。同一スライドを繰り返して使用される場合は、映写回数分の枚数をご用意下さい。
- 5) スライドは、35mmフィルム（枠 50mm×50mm）を使用して下さい。
- 6) スライドには演題番号と演者名を明記して下さい。
- 7) スライドは口演の30分前までに各会場の受け付けにお渡しいた

だき、備え付けのプロジェクターで映写状態をご自身でご確認いただきます。発表後はお渡しいただいた同じ受け付けでスライドをお早めにお受け取り下さい。

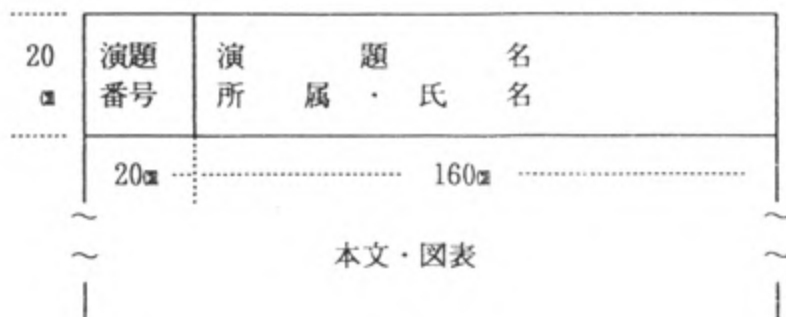
- 8) スライドをお渡し時に J.Toxicol.Sci. に掲載する英文抄録を受け付けにご提出願います。
- 9) 次演者は発表の10分前には最前列の次演者席にお着き下さい。

口演：シンポジウム・ワークショップ

- 1) 口演時間は20分で、討論は5分です。時間を厳守願います。
- 2) スライド枚数は特に制限はありませんが、多過ぎないようにご注意ください。
- 3) その他は一般演題の4)～9)に同じです。

ポスター：

- 1) ポスターは、9時30分までに準備し、9時30分より展示して下さい。主発表者は11時より11時48分までは必ずポスターの前に待機し、討論・質問に応じて下さい。
- 2) ポスター掲示面のスペースは縦180cm、横180cmです。ただし、このうちの上段には、縦20cm、横160cmの白紙(下図)に演題名と所属・氏名(主発表者に○印)を黒字で記入したものををご用意下さい。縦20、横20cmの演題番号と画鋲は当方で用意いたします。
- 3) 本文・図表などのスペースは残りの縦160cm、横180cmのスペースをご自由にお使い下さい。ただし、図・文字の大きさは2～3m離れた所から明瞭に判読出来るものとして下さい。



交通案内

数字は所要時間(分)

関内・石川町まで

東京から 1) J R 京浜東北線・根岸線直通(45分)
石川町下車

2) J R 東海道本線(27分)か横須賀線
(31分)で横浜→J R 根岸線乗換

渋谷から 東横線で横浜(急行33分)か桜木町
(同37分)→J R 根岸線乗換

新幹線新横浜から

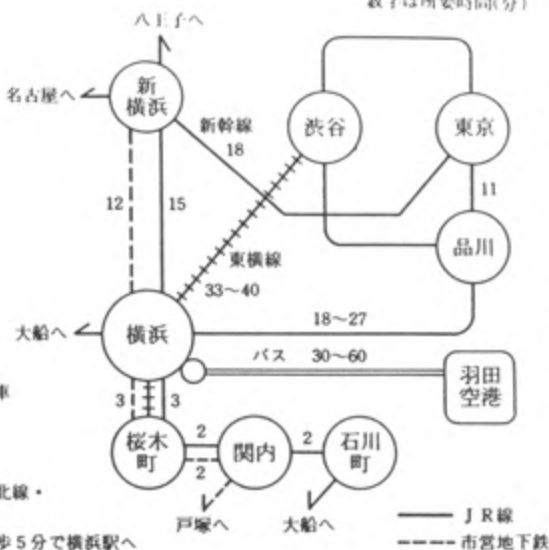
1) 横浜市営地下鉄(17分)関内下車

2) J R 横浜線(10分)で東神奈川→
京浜東北線・根岸線乗換(12分)石川町下車
〔J R 横浜線・根岸線直通あり(22分)〕

羽田空港から

1) 東京モノレール(17分)で浜松町→J R 京浜東北線・
根岸線直通(40分)石川町下車

2) バス(30~60分, 朝・夕渋滞)で横浜駅東口, 徒歩5分で横浜駅へ



会場 ホリデイ・イン横浜への順路

- 1) 石川町下車(J R 根岸線北口)徒歩10分
- 2) 関内下車(J R 根岸線南口または市営地下鉄①番出口)徒歩15分
- 3) バス: 桜木町下車, バスのりば②番より8分「中華街入口」下車徒歩3分
- 4) 車: 横浜駅東口より10分, 桜木町より5分

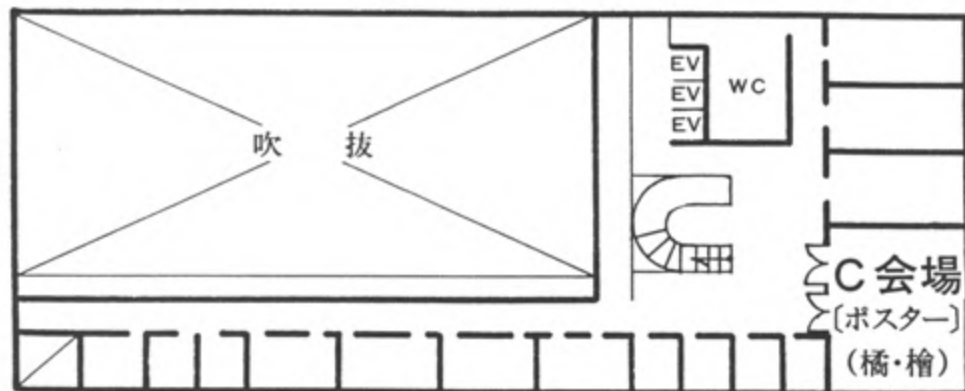


ホリデイ・イン横浜: 〒231 横浜市中区山下町77番地 ☎045(681)3311

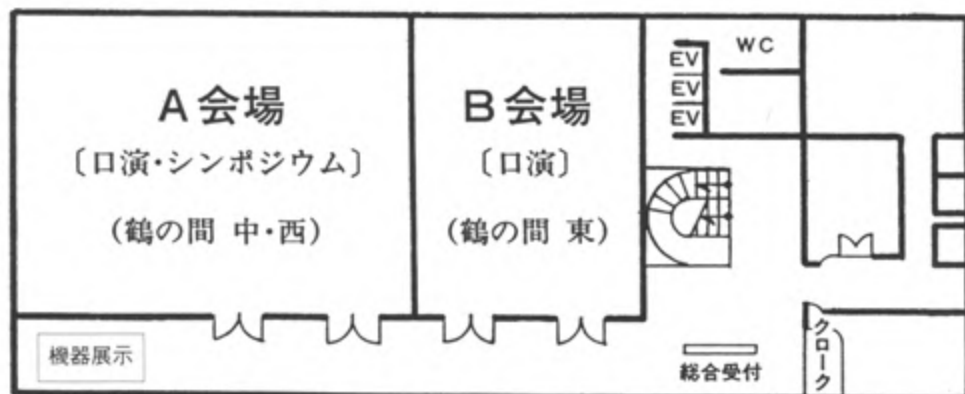
会場案内図

EV:エレベーター

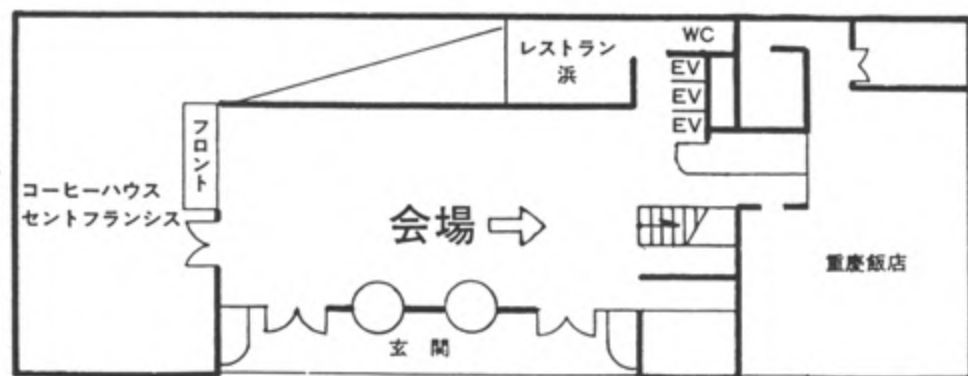
3階



2階



1階



(注) 事務局本部は 祿の間 (4F) 間、会議室は 寿 (4F) の間です。

特 別 演 題

6月13日(火), 11:00~12:00

A会場(鶴の間 中、西)

“Improvement of Predictability of Subchronic and
Chronic Toxicity Studies”

Prof. G. Zbinden (チューリッヒ大・スイス)

座長 : 柳田 知司(実中研・前臨床研)

シンポジウム

6月13日(水), 13:30~16:00

A会場(鶴の間 中、西)

「毒性評価における種特異性の問題点」

座長 : 林 裕造 (国立衛試・病理)
加藤 隆一 (慶応大・医学部)

- | | | |
|-----------------|-------|--------------|
| 1. ラットを中心に | 宮脇 宏彰 | (武田薬品工業・中研) |
| 2. イヌを中心に | 渡辺 満利 | (持田製薬・安研) |
| 3. サルを中心に | 小泉 治子 | (実中研・前臨床研) |
| 4. 機能面からみた種特異性 | 小野 宏 | (食薬センター・秦野研) |
| 5. 薬物動態からみた種特異性 | 山添 康 | (慶応大・医学部) |

ワークショップ (1) ♪

6月14日, 14:00~16:30

A会場 (鶴の間 中、西)

「毒性試験技術の最近の進歩」

座長 : 大森 義仁 (慈恵医大・薬理)
黒川 雄二 (国立衛試験・毒性)

1. 画像処理装置について 今井田克巳 (国立衛試・病理)
2. 一般毒性試験機器について 松本 清司 (国立衛試・毒性)
3. 循環機能検査について 西木 克侑 (日本レダリー・生物研)
4. 感覚機能検査について 暮部 勝 (明治製菓・安研)
5. 薬剤の調製と適用について 山田 秀雄 (塩野義・研)

ワークショップ (2)

6月14日, 14:00~16:30

B会場 (鶴の間 東)

「毒性試験代替法の最近の進歩」

座長 : 遠藤 仁 (東大・医)
佐藤 哲男 (千葉大・薬)

1. 毒性試験代替法の意義 遠藤 仁 (東大・医)
2. 哺乳類全胚培養法について 江藤 一洋 (医歯大・歯)
3. 初代培養肝細胞の毒性試験代替法への応用
小平 輝朋、中村 敏一 (九大・理)
4. 培養腎上皮細胞について 玄番 宗一 (大阪薬大)
5. The Reduction of Conjugation Capacity in Isolated Perfused
Livers as A Method of In Vitro Toxicity Testing.
Young-Nam Cha (Inha 大・医)

一般演題 (口演)

第 1 日 (6月13日) A 会場 (2F鶴の間・中、西)

- 9:10~ 9:46 血液 座長: 戸部満寿夫 (国立衛試)
村岡 義博 (塩野義製薬)
- 9:10 A-01 ラットにおける連続採血による血液性状への影響
○伊原 誉子、小倉 一見、瀧 豊彦、五十嵐俊二
(エーザイ・安全性研究部)
- 9:22 A-02 シクロオキシゲナーゼ阻害作用を有する薬剤のビーグル犬多核白血球機能に及ぼす影響
○早川 和宏、塩野谷 博、見上 孝、五十嵐俊二
(エーザイ・安全性研究部)
- 9:34 A-03 白金錯体化合物のマウス血小板数および骨髄巨核球数に対する作用
○東山 昇、森山 哲郎、佐藤 一美、村岡 義博
(塩野義製薬研究所・神崎川分室)
- 9:46~10:34 肝臓 座長: 江頭 亨 (大分医大)
亀山 勉 (名城大・薬)
- 9:46 A-04 毒性試験における飢餓の影響
○都留 清志、中川 一平、畔柳 努、佐藤 祐子、
佐山 典子、小川由美子、永田美由紀、前田 明利
(杏林製薬・中央研究所)
- 9:58 A-05 肝虚血による Monoamine Oxidase の逸脱
○小畑 俊男、金島 良一¹⁾、後藤 茂¹⁾、川野 克則¹⁾
永井 敬之、山中 康光
(大分医大・薬理、¹⁾第一外科)
- 10:10 A-06 脳機能改善薬 Bifemelane の肝組織中の脂質過酸化反応に対する効果
○永井 敬之、高野 律子、金馬 義平、江頭 亨、
山中 康光
(大分医大・薬理)
- 10:22 A-07 ラット肝臓の前癌病変を指標とした中期発癌検索法による酸化染毛剤の発癌修飾作用
○萩原 昭裕、玉野 静光、柴田 雅朗、津田 洋幸
(名市大・医・第一病理)

一般演題 (口演)

第 1 日 (6月13日) B会場 (2F鶴の間・東)

- 9:10~ 9:46 毒性試験法 座長: 和田 攻 (東大・医)
鍋島 俊隆 (名城大・薬)
- 9:10 B-01 ウサギ生殖試験における人工授精の検討
○下村 和裕、飯塚 壮 (実中研・前臨床研・毒性部)
- 9:22 B-02 モルモットにおける遅延型アレルギー (DTH) 検出法の検討
- 白血球遊走阻止試験法 -
○服部 浩之、山口 文恵、依 克彦 (第一製薬・中央研究所)
- 9:34 B-03 連続回避試験における新指標の導入
○小野 哲、和田 攻¹⁾ (東京都立立川短大公衆衛生、¹⁾ 東大医学部衛生)
- 9:46~10:34 神経・筋 座長: 矢ヶ崎 修 (大阪府大・農)
山本 郁男 (北陸大・薬)
- 9:46 B-04 キノホルムの毒性発現に対する遺伝的素因 -ラットを用いて-
○堀 眞一郎、大谷 幸子、田邊 等¹⁾、小滝 一²⁾
(財・東京都神経研、神経生化学、¹⁾ 都立神経病院、²⁾ 東大医・病院薬剤部)
- 9:58 B-05 大麻含窒素成分 p-coumaryltyramine の薬理毒性
- カタレプシー 惹起作用 -
○松永 民秀、小林 弘枝、渡辺 和人、山本 郁男¹⁾、
吉村 英敏²⁾ (北陸大・薬・衛生化学、²⁾ 九大・薬・衛生化学裁判化学)
- 10:10 B-06 運動神経伝達物質の放出に及ぼすサルチル酸ナトリウムの影響
○西村 昌数、栗野 秀人、矢ヶ崎 修 (大阪府大・農・家畜薬理)
- 10:22 B-07 骨格筋における Na ポンプの阻害と Na-Ca 交換反応
○長谷川哲也、栗野 秀人、西村 昌数、矢ヶ崎 修、
伊藤 勝昭¹⁾ (大阪府大・農・家畜薬理、¹⁾ 宮崎大・農・家畜薬理)

一般演題 (口演)

第 2 日 (6月14日) A 会場 (2F鶴の間・中、西)

9:00~ 9:48 特殊毒性 座長: 福田 英臣 (日大・薬)
宇高 奎二 (日本ロシュ研)

9:00 A-08 妊娠中単回投与 nimustine あるいは azathioprine のラット胎仔脳機能への影響

○藤井 儔子、中西 均

(帝京大学医学部薬理学教室)

9:12 A-09 2, 4-Dinitrochlorobenzene の皮膚塗布回数によるアミロイド症の発生と臓器分布の比較

○山本 博昭、藤代 光一

(財・河野臨床医学研究所、病理)

9:24 A-10 ラットにおける FURTULON, 5-FU, Cyclosporin A, Ubenimex の免疫毒性的検討

○川島 明、井上 智彰、千葉 章子、西藤 岳彦、
堀井 郁夫、宇高 奎二

(日本ロシュ研究所、毒性病理部)

9:36 A-11 F344ラットを用いた N-methyl-N-nitrosourea (MNU)多重癌モデルにおける Beraprost sodium の修飾作用

○田中 光、倉田 靖、玉野 静光、萩原 昭裕、
福島 昭治

(名市大・医、第一病理)

9:48~10:24 解毒・排泄 座長: 中井 健五 (秋田大・医)
高仲 正 (国立衛試・薬理)

9:48 A-12 ビーグルの急性パラコート中毒におけるタウリンの解毒効果

○永田 良一、出水 干二、本屋 敏郎¹⁾、山下 淳一²⁾、
広兼 民徳³⁾、永田 貴久⁴⁾、澤田 祐介³⁾、福田 健夫
(鹿児島大学医学部・薬理学、¹⁾薬剤部、²⁾泌尿器科、³⁾救急部、
⁴⁾新日本科学・毒性部)

10:00 A-13 たばこ主流煙および副流煙による肺・肝グルタチオンの変動とミクロソーム膜の動的変化

○富田 幹雄、藤沢 進、榎本 明美、大宮 彬男、
中井 健五

(秋田大学医学部薬理学教室)

10:12 A-14 数種の有機溶剤のラット呼気からの排泄

○寺本 敬子、脇谷扶美子、田中 英徳、堀口 俊一

(大阪市立大学医学部環境衛生学教室)

10:24~11:12 毒性発現機序 座長： 池田 正之 (京大・医)
福島 昭治 (名市大・医)

10:24 A-15 酸化エチレン吸入暴露による赤血球系への影響
○森 晃爾、藤代 一也、井上 尚英
(産業医科大学・産業生態科学研究所、環境中毒)

10:36 A-16 酸化エチレン吸入暴露による肝シトクローム P-450減少とポルフィリン尿症
○藤代 一也、森 晃爾、井上 尚英
(産業医科大学・産業生態科学研究所、環境中毒)

10:48 A-17 オカダ酸とカリクリン A：海産毒由来のフォスファターゼ阻害剤
○唐木 英明、石原 宏朗、堀 正敏、佐藤 晃一、
尾崎 博、渡部 終五、加藤 裕子、伏谷 伸宏、
橋本 周久、上村 大輔、D.J.Hartshorne
(東京大学農学部、静岡大学教養部、アリゾナ大学筋生理学)

11:00 A-18 ラット多重癌モデルによる発癌促進ないし抑制作用の解析
○山口 修司、長谷川良平、小木曾 正、七野 裕、
福島 昭治、伊東 信行
(名市大・医、第一病理)

11:12~11:48 In vitro 座長： 上野 芳夫 (東京理科大・薬理)
堀 真一郎 (財・東京都神経研)

11:12 A-19 アントラキノン系かび毒ルテオスカイリンによる 8-ヒドロキシデオキシグアニンの生成
○宮坂 直樹、山口 宏明、加藤 珠美、上野 芳夫
(東京理科大学薬学部毒性学、微生物化学教室)

11:24 A-20 プロカインアミドによる薬剤性ループス発現の検討
— マウスのリンパ球機能に及ぼす影響 —
○小島 弘幸、服部 浩之、山口 文恵、俵 克彦
(第一製薬・中央研究所)

11:36 A-21 腎毒性発現における細胞内カルシウムイオンと ATP代謝の関連性
○鄭 圭鎔、V. Chatsudthipong、遠藤 仁
(東京大学医学部第二薬理学)

一般演題 (ポスター)

第 2 日 (6月14日) C会場 (3F橋、檜の間)

9:30~11:48 (9:30~11:00展示、11:00~11:48質疑)

- C-01 ジエチレングリコールモノメチルエーテル、エチレングリコールモノメチルエーテルの臓器重量および薬物代謝酵素に及ぼす影響
○川本 俊弘、児玉 泰
(産業医大、衛生)
- C-02 プレドニゾン単回投与による肝の経時変化について
○岡崎 修三、星谷 達、堀口 浩資、宮岸 昌子、
畠山 和久、沼田 弘明
(株・ボゾリサーチセンター 御殿場研究所)
- C-03 Norethynodrel の男性化作用に対する Mestranol の協力作用
○川島 邦夫、田中 悟、中浦 楓介、高仲 正、
S. Djajalaksana¹⁾、黄 芒莉²⁾
(国立衛生試験所安全性生物試験研究センター薬理部、
¹⁾ National Quality Control Laboratory of Drug and Food, Indonesia、
²⁾ 中国湖北省薬物試験所薬理部)
- C-04 セファロリジンによる腎毒性発現機序：特にグルタチオン酸化還元系の変動について
○鈴木 義裕、漆原 篤、須藤 純一、田辺 恒義
(東日本学園大学 薬学部 毒理学講座)
- C-05 セファロリジン腎毒性に対する生理食塩水の効果
○林 泰司、須藤 純一、田辺 恒義
(東日本学園大学 薬学部 毒理学講座)
- C-06 2-(4-Morpholiniothio)benzothiazole (2-MTBT) のマウスにおける毒性について
○鎌田 栄一、鈴木 幸子、小川 幸男、安原加須雄、
金子 豊蔵、黒川 雄二、戸部満寿夫
(国立衛生試験所安全性生物試験研究センター 毒性部)
- C-07 2-Mercaptobenzothiazole (MBT) のマウスにおける毒性について
○小川 幸男、鎌田 栄一、鈴木 幸子、梅村 隆志、
斉藤 実、金子 豊蔵、黒川 雄二、戸部満寿夫
(国立衛生試験所安全性生物試験研究センター 毒性部)
- C-08 骨髄の赤血球数と粒度分布測定の毒性的意義
○落合 敏秋¹⁾、松本 清司¹⁾、関田 清司¹⁾、降矢 強¹⁾
黒川 雄二¹⁾、戸部満寿夫¹⁾、太田 洋²⁾、菅沢 淳一³⁾
(¹⁾ 国立衛試・毒性、²⁾ 富山医薬大・薬作、³⁾ 日獣大・薬理)

- C-09 カニクイザルにおける凝固線溶系検査値
 ○阿部 俊一、池田 陽一、瀬戸 淳、石塚 寿正、
 小柴 博、鍵谷 昌男
 (株・ミドリ十字、安全性研究所)
- C-10 血小板凝集能におよぼす溶媒の影響
 ○鈴木 修三¹⁾、森 洋子¹⁾、平田真理子¹⁾、島田 暎²⁾
 谷本 義文¹⁾
 (実中研・前臨床研究所・¹⁾血液化学部、²⁾薬理部)
- C-11 市販培地あるいは緩衝液を用いた培養によるラット単離肝細胞の微細形態学的変化
 ○藤村 久子¹⁾、佐々木博之²⁾、鈴木 昭男²⁾、永田 貴久³⁾
 永田 良一³⁾
 (¹⁾新日本科学・東京病理センター、³⁾同・毒性部、
²⁾慈恵医大・医科研・微細形態)
- C-12 ラット胎芽培養法の in vitro 催奇形性試験法としての有用性 (1) サリチル酸ナトリウムの in vitro 及び in vivo 胎芽の発育への影響
 ○中浦 横介、田中 悟、川島 邦夫、高仲 正、
 S. Djajalaksana¹⁾、黄 芒莉²⁾
 (国立衛生試験所安全性生物試験研究センター薬理部、
¹⁾National Quality Control Laboratory of Drug and Food, Indonesia、
²⁾湖北省薬物試験所・中華人民共和国)
- C-13 全胚培養法を用いたメトトレキサートの臓器毒性作用の解析
 ○秋田 正治、横山 篤、江藤 一洋
 (東京医科歯科大学・歯・顎研発生)
- C-14 モルモットを用いた感作性物質の検索法ならびに強度評価
 —黄色綿セーターによる接触皮膚炎の原因物質について—
 ○門馬 純子、中路 幸男、黒川 雄二、小嶋 茂雄¹⁾、
 鹿庭 正昭¹⁾、五十嵐良明¹⁾、中村 見忠¹⁾
 (国立衛生試験所・毒性部、¹⁾療品部)
- C-15 マウス自発行動量のリズムに及ぼす植物微量成分の影響
 —最大エントロピー法によるリズムの解析—
 ○宮崎 良文¹⁾、本橋 豊²⁾、谷田貝光克¹⁾
 (¹⁾農水省・森林総研・生物活性物質、²⁾東医歯大・医・衛生)
- C-16 PCP誘導体により惹起される常同行動
 ○鍋島 俊隆、伊藤 孝一、前田 洋子、亀山 勉、
 古川 宏、A.Cho¹⁾
 (名城大・薬、¹⁾UCLA)
- C-17 ラットにおける各種溶媒の気管内誤投与の影響
 ○吉田 貢由、古濱 和久、菅原 正喜、赤羽 一美、
 島田 晴美、加藤 道幸
 (第一製薬・中央研究所)

特 別 講 演

Improvement of Predictability of Subchronic and Chronic Toxicity Studies

G.Zbinden

Institute of Toxicology, Swiss Federal Institute of Technology
and University of Zurich, Schwerzenbach, Switzerland

The repeated-dose toxicity studies that are routinely used in industry are based on an omnibus procedure, using large groups of animals of two species, and at least three dose levels of which one is selected to induce overt adverse effects. This approach is contrived to detect indices of general toxicity (e.g. body weight gain, food consumption), selected biochemical changes, mainly those related to disturbances of liver and kidney function, hematological abnormalities and morphological lesions detectable by routine light microscopy.

Although it is possible to demonstrate many adverse reactions, it is evident that the standard toxicological test procedures have failed to detect a variety of toxic effects that are relevant for man. In addition, a considerable number of false positive test results are generated. In order to improve the predictability of repeated-dose toxicity studies, the reasons for the inadequate performance of current methods will be analyzed. It will be shown that the usefulness of subchronic and chronic toxicity tests can be improved by addition of supplementary assay methods and by a more careful timing of the laboratory investigations. It will also be shown that a number of tests that are routinely performed can be omitted or drastically reduced without jeopardizing the usefulness of the investigations.

Since current toxicological methods neglect, to a large extent, functional organ changes, it is suggested to include more physiological measurements in the toxicological test procedures. In addition, a more careful consideration of the pharmacokinetic characteristics of the test substances is thought to be of great importance, in particular for the selection of an optimal dosing schedule and for the ultimate risk assessment. Furthermore, new scientific approaches must be developed to detect adverse effects that are due to idiosyncratic or allergic responses of selected human populations.

It is not considered to be advantageous to include too many measurements and assays into routine repeated-dose toxicity studies, since such activities may interfere with the normal development and the health of the laboratory animals. This is particularly the case for investigations that need invasive assay procedures and for interaction studies. For this reason, it is often better to conduct certain investigations of special satellite groups of animals, or to obtain the necessary information in preliminary pilot or screening tests. Such tests can also include *in vitro* assays of various types. Several examples for such screening tests will be given.

亜慢性・慢性毒性試験における予測性の向上

G. Zbinden

スイス国立技術研究所，チューリッヒ大学，毒性研究所

業界において日常的に行われている反復投与毒性試験は、2種の動物の多数からなる群と、1用量は明らかに有害作用を引き起こすように選択された、少なくとも3段階の用量を用いて行われる総括的な方法が基本となっている。この研究方法は例えば増体重や摂餌量といった全体的な毒性の指標や、主に肝および腎機能の障害に関連する特定の生化学的変化や、血液学的異常および通常の顕微鏡検査により観察可能な形態学的病変を検出するように考案されている。

標準的な毒性学的試験方法では、多くの副作用の種類を示すことは可能であるものの、ヒトに関連した多種多様な毒性作用を検出することのできなかつたことは明らかである。加えて、かなりの数の誤った陽性試験結果が生じている。反復投与毒性試験の予測性を向上させるために、現行の方法が不適切に実施されている理由を考察する。亜慢性や慢性毒性試験の有用性は、補足的な分析方法の追加および実験検査の時期をより注意深く選ぶことにより向上しうることを示す。また、研究の有用性を損なうことなく、日常実施されている多くの検査を省略しうること、または徹底的に減らしうることを示す。

現行の毒性学的方法は器官の機能的変化をほとんど看過していることから、毒性試験方法に、もっと多くの生理学的検査を取り入れることが提案される。加えて、被験物質の薬物動態学的特性をより注意深く考慮することが、特に最適な投与計画の選択や最終的なリスク・アセスメントにとって非常に重要であると考えられる。さらに、特定の人間の特異体質やアレルギー性反応を

原因とする副作用を検出するために、新しい科学的研究法が開発されなければならない。

あまりにも多くの測定や分析を日常の反復投与毒性試験に取り入れることには利点がないと考えられる。というのは、そのような検査は実験動物の正常な発達や健康を害する可能性があるからである。これは特に侵襲的な分析方法を必要とする検査や相互作用の研究の場合に問題となる。この理由から、ある一定の検査を特別に用意した群の動物で行うか、あるいは手始めに予備試験やスクリーニング試験で必要な情報を得ることが、多くの場合望ましい。そのような試験にはいろいろな種類の *in vitro* の試験も考えられる。そのようなスクリーニング試験のいくつかの例を提示する。

シンポジウム

シンポジウム「毒性評価における種特異性の問題」

林 裕造 (国立衛生試験所病理部)

加藤隆一 (慶応大学医学部薬理)

毒性研究の究極的目標は対象とする物質のヒトに対する健康影響を評価する事であり、具体的に研究を実施する際のすべての問題点もここに集約されると言える。

この問題の解決には2つの方法が考えられる。第一は、ヒトへの影響がそのまま反映されるような試験系、即ち、動物種を予め選択する事、第二は、動物あるいは他の試験系で得られた知見からヒトへの影響を推定するための論理を確立する事である。前者は技術的に困難であるばかりでなく、一般ヒト集団における各個体が遺伝的に極めて多様である事実を考えると、理論的にも適切ではない。従って、各種化学物質に対する反応の種特異性についての知見に基づいて、種間差の外挿をはかる方法の確立が科学的にみてより適切な道であると判断される。

その意味で本シンポジウムでは、毒性研究の第一線研究者を演者にお招きし、外挿理論の基盤となる種特異性の問題を病理、薬理、代謝の立場から多角的に考察することにした。毒性研究自身が学際領域の科学であり、特に外挿理論は生まれつつある分野である。出席者の活発な討論を期待する。

1. ラットを中心に

宮 嵐 宏 彰

武田薬品・中央研究所

1) はじめに

薬物の安全性評価における動物実験の目的はそこで得られた成績がヒトへどのように外挿されるかを究めることである。近年この分野における実験動物の品質や管理、設備（動物実験室・分析機器・評価機器）などの周辺技術は飛躍的な進歩をとげたが、“動物実験の成績をヒトへ外挿する”という点については十分な科学的データに乏しい。ヒトへの外挿の問題は動物種差の問題でもある。薬物による生体内反応は薬物と生体との相互作用の結果であるから、その薬物の作用機序や生体内運命（吸収・分布・代謝・排泄）および薬物またはその代謝物に対する生体側の反応性（形態、機能、臓器・組織の感受性）を明らかにし、ときには類縁物質の実験成績と比較することによって動物種差を十分に理解することが肝要である。

今回はラットを中心に薬物の毒性評価にみられる動物種差について、よく知られている事象を紹介し、種特異的毒性発現の問題点を考えてみたい。

2) 薬物の毒性発現にみられる動物種差

i) 肝毒性

解熱鎮痛剤のアセトアミノフェンは、動物に過量に投与すると肝中心静脈周辺の肝細胞壊死が発現する。動物種ではハムスターがもっとも感受性で、次いでマウス、モルモット、ラット、ウサギの順である。これはアセトアミノフェンの代謝物の肝ミクロゾーム蛋白への共有結合性および肝グルタチオンの低下における動物種差とよく対応しており、これらが肝毒性にみられる動物種差の原因と考えられる。ほかに、アフラトキシンB₁はウサギ、イヌで高感受性で、マウス、ラットは低感受性である。オロト酸はラットに感受性で、マウス、ウサギ、ハムスター、イヌ、サル類は抵抗性である。プロモベンゼンはマウス、ラットで感受性が高く、ウサギ、ハムスターでは低い。α-ナフチルイソチオシアネイトはラット、マウスに高感受性、モルモット、ウサギ、ハムスター、イヌでは低感受性である。α-アマニチンはマウス、イヌ、モルモット、ウサギ、ハムスター、サル類には感受性であるが、ラットでは抵抗性である。しかし、これらの事実の種差発現の機序については必ずしも十分な説明がなされていない。

ii) 腎毒性

抗生物質のピュロマイシンの誘導體であるアミノヌクレオシドはラットに経口投与するとネフローゼ症候群が発現する。マウス、モルモット、ウサギ、イヌでは発症しない。これは薬物から産生される代謝物の差によると考えられている。

iii) 心毒性

男性ホルモンであるテストステロンプロピオネイトをラットに

投与すると心筋炎が発現する。しかし、モルモット、イヌでは抵抗性である。副腎皮質におけるステロイド合成経路をみると、コレステロールから コルチゾール、コルチコステロン、デヒドロエピアンドロステロンサルフェイトなどが産生されるが、ラット、マウス、ウサギではコルチコステロン産生系が圧倒的に強い。一方、モルモット、イヌではコルチゾール産生経路が強い。コルチコステロンの前駆体であるデオキシコルチコステロンからコルチコステロンへ転換する場合、 11β -ヒドロキシラーゼが必要であるが、テストステロンプロピオネイトはこの酵素活性を阻害する。その結果、ラット、マウス、ウサギではデオキシコルチコステロンが蓄積し、血中に放出される。このデオキシコルチコステロンのミネラルコルチコイド活性によって心筋炎が発現する。

iv) 消化管毒性

インドメタシンは非ステロイド系抗炎症剤であるが、ラットに経口投与すると他種動物より早期に消化管潰瘍が発現する。10mg/kg を経口投与したときの30分後の血漿中の未変化体はラットの45.2 μ g/mlに対してサルでは3.1 μ g/mlであり、このような消化管における吸収率の差が毒性に反映されたと考えられる。この際の吸収メカニズムの差には能動輸送、膜透過性、食作用、飲作用などの機能や消化管内pH、微生物叢、解剖学的な動物種差などの関与が考えられる。

v) 皮膚毒性

コールタール塗布による実験的皮膚癌はウサギ、マウスがもっとも高感受性で、ラット、モルモット、ハムスターは低感受性である。ラットは既知の刺激性因子に対しても抵抗性であるが、角質層の厚さ、血管の分布、汗腺や毛包の発達、皮膚細胞の代謝などが重要な要因と考えられる。

vi) その他

抗甲状腺薬による甲状腺の増殖性変化、異物埋め込みによる皮下腫瘍、膀胱結石による膀胱腫瘍などはいずれもラットが高感受性であるという。これらは動物側の反応性の差と考えられているが、不明な点が多い。

3) 考察

田嶋ら(1979)は実験処置に対する動物の反応Rを次式で表現している。 $R = (A + B + C) \times D + E$ 。A = 動物の種を超える共通の反応、B = 動物の種差または系統差、C = 個体差、D = 環境因子、E = 実験誤差。近年の実験動物の品質の向上やSPF、inbred strainの出現、および飼育環境の飛躍的な向上はC、D、Eの影響を最小限に抑えることを可能にしてきた。今後はBを明らかにすることによって、動物の反応のRを知りA即ち、ヒトへの外挿が容易に予測できるようになることが期待される。また、薬物の毒性発現における動物種差を考えるとき、まずその機序が全く異質であるのか、量が大きく異なるために異質にみえるのか、量・質ともに異なるのかを明らかにしなければならない。このような立場で考えることが第一歩であり、多くの事実とその機序解明のつみ上げが今後とも一層必要であろうと考える。

S-2 シンポジウム 「毒性評価における種特異性の問題点」
2. イヌを中心に

渡 辺 満 利

持田製薬・安全性研究所

実験用動物としてビーグルが開発されてから久しく、その品質も次第に安定して来た。ここでは、イヌをビーグルに限定して話を進める。イヌは、入手が容易であることから、齧歯類以外の動物として毒性試験に多く用いられている。しかし、イヌは種特異的な変化が比較的多く出現する動物のようである。数種の動物を用いた毒性試験においてイヌだけに変化がみられ、その種差を、薬物の血中濃度、代謝、排泄などの薬物動態の差からは説明できないことがあり、そのような種特異的な変化は、毒性評価の上でどのように取り扱えばよいのか苦慮するところとなる。

イヌにおける種特異的な変化が、イヌの解剖学的あるいは組織学的特徴と薬物作用との関連で出現するものがある。その例として、diphenylthiocarbazone、zinc pyridinethione、hydroxy pyridinethione などによる網膜症が挙げられる。これらの薬物による網膜の障害は、ラット、サル、ヒトなどには存在しない網膜の壁紙 tapetum の細胞に薬物が作用して生じるものである。壁紙細胞は Zn を多量に含む細胞で、上記の薬物が Zn とキレート結合し、壁紙の Zn の減少と細胞の萎縮をもたらし、やがて網膜視細胞の障害へと拡がって行く。このようなヒトには存在しない組織に関連して起こる障害は、毒性評価の上ではあまり大きな意味を持たないものと思われる。

薬物による心臓の組織学的変化もイヌでは比較的多く報告されている。hydralazine、diazoxide、minoxidil などの降圧剤およびその他の inotropic vasodilator あるいは theobromine などの短期

間の投与により、心筋の障害がイヌだけに認められている。そのうち hydralazine あるいは minoxidil による変化は右心房を主体として起こることが調べられており、その発生機序に、冠動脈の分布あるいは冠動脈血流量の局所的相違が関与していることが示唆されている。このような変化は、イヌだけに見られるものであるが、心臓という生命に直結した臓器の障害であるだけに、毒性評価の上では極めて難しい問題となろう。

このようないくつかの報告例に加えて、私共が経験した、薬物起因性リン脂質症における脳室脈絡叢の変化と脳脊髄液中の薬物濃度の推移の種差の例を紹介し、イヌにおける組織学的変化を中心に、毒性評価における種特異性の問題を考えてみたい。

3. サルを中心に

小泉治子

(財) 実験動物中央研究所付属前臨床医学研究所

毒性試験において、非齧歯類の動物を用いる場合、イヌかサルが多く利用されている。イヌの場合は、ビーグル犬が実験動物として確立されており、入手が容易で扱いやすいなど利点がある。反面、イヌは種々な反応が他の動物種と異なり、特異的であるという問題もある。一方、サルは霊長類でありヒトとの類似性が高いということから、近年用いられることが多くなってきた。しかし現時点では、国外産のサルを使用しているため、大量の入手が困難であること、何らかの病原体を持ったものが多く発病する可能性も高いこと、扱いもそれほど簡単ではないことなど欠点も多い。このような問題はあっても、イヌよりサルを毒性試験に用いる傾向は徐々に高まっている。そこで今回は、薬物の毒性評価を行なう上でサルの特異性とは何かを、毒性試験に用いられることの多いアカゲザルとカニクイザルを中心に考えてみたい。

まず始めに、サルの一般的な特長としては、薬物に対する反応および薬物動態の面で、他の動物種よりもヒトに近いことが認められている。また血液学的および血清生化学的検査値がヒトに近い値を示す項目が多く、ヒトとの比較に適している。さらに形態的にはヒトとの類似性が高い臓器が多く、特に心臓、腎臓および脾臓などはイヌの場合よりヒトに類似している。一方、感染の統御はほとんどなされておらず、中でも腸結節虫、肺ダニ、フィラリアなどの寄生がしばしばみられ、また、赤痢および結核の罹患も時折みられる。このような動物を用いての毒性試験の評価には、十分注意を払う必要がある。

毒性についてみると、動物種によって薬物の吸収、排泄の差による毒性の出現臓器が異なる場合がある。非ステロイド性抗炎症剤では、消化管毒性および腎毒性を惹き起こすことはよく知られているが、種によって消化管毒性

が強く出る動物、腎毒性が強く出る動物とに分かれるようである。たとえばケトプロフェンを経口的に投与すると、ラットやイヌでは比較的低用量で消化管潰瘍が形成されるが、サルではその10倍以上の量を投与しても、消化管に変化はなく、本剤の体内動態の相違が、毒性の発現に反映されるものと考えられる。サルでは尿中排泄が他の動物に比べ高く、消化管障害が出ない量を投与しても、腎臓の乳頭壊死を惹き起こす。この変化はヒトの副作用としても知られており、ヒトにおけるケトプロフェンの排泄は尿中に高いことも知られている。

ベンゾジアゼピン系の薬物の1つであるニトラゼパムの場合、精巣萎縮がラット及びサルで起こるが、イヌでは明らかではない。しかしイヌで起こる肝障害は、ラットやサルでは起こらない。一方、その機序は明らかではないが、他の種では起こらない腎障害が、サルで起きるといふ知見も得られている。

これら薬物のサルへの影響を紹介するとともに、サルを用いて毒性試験を行なった場合のいくつかの例をあげ、病理学的にみたサルの種特異性について考えてみたい。また、毒性試験を行なう際のサルの背景病変についても言及したい。

4. 機能面からみた種特異性

小野 宏

(財) 食品薬品安全センター 秦野研究所

臓器機能に対する毒性の問題は、形態学的な毒性評価の方法に対置して言われるが、従来の病理検査を中心とする毒性試験でも、常に機能への影響を考えながら評価が進められている筈なので、ここではもっと限定した話として、機能毒性試験の問題を取り上げる。機能毒性とは、ここでは毒性試験に関わって行われる機能検査によって検出される毒性を言うこととする。

機能毒性試験として現在とくに整備確立が要望されているものは、心肺機能、腎機能、感覚機能などの試験であり、それらの中で現在実現の見込みがあるものは、心電図、腎機能と一部の感覚機能の検査である。

さて、毒性試験における種特異性の真の問題は、単に種または系統によって正常値が異なるとか、毒性の現われかたが違ふとかいった、比較生理学や比較薬理学の問題ではない。毒性試験が化学物質のヒトにおける安全性を確保するためのものであるからには、ヒトと動物との種差が肝要である。すなわち、ヒトにおける毒性を毒性試験で予見することを妨げるような種差はあるか、ということが問題なのである。さらに、機能検査の技術的な困難さがヒトと動物との「種差」を生じることもある。

心電図検査は、他の方法では知り得ない心臓の電気的活動の病変を検出することができるので重要である。技術的には、各種実験動物で無麻酔半拘束の状態検査が可能であるが、麻酔が必要のこともある。ラットなど小動物の心電図は周波数の高い成分があり、通常的心電計では十分に追従できないという問題がある。根本的に重要な種差として、体形・姿勢の相違による心臓の正常の位置の差を反映する電気軸の正常値と変位との種差があり、また心筋の構造の差異に基づく興奮過程の差がある。ラットの心臓では、興奮が心室全体に伝播する前に一部では再分極が始まるため、ST部分が平坦でない

のが正常である。従って、たとえば心筋の虚血性変化を心電図STの変形によって評価することはできない。SからTにかけての部分の波形がある種の処置によって変化することは認められ、なんらかの評価は行われているが、ヒトと同等とは言えない。

腎機能に関しては、尿検査が現在常用されているが、毒性評価の十分な資料とするためには、さらに充実が必要である。腎障害の初期変化である濃縮能および希釈能の異常の検査は有用であり、それに糸球体濾過値の測定が加えられればよいと考える。測定条件にはやはり技術的な制約がある。腎クリアランスを短時間で測定することは、尿量と採血量の問題から、イヌ以外ではかなり困難であり、イヌでも多数例について同時に測定することは困難である。試験排泄物質を投与して一定血中濃度を維持する操作は煩雑なので、内因性クレアチンクリアランスの測定が推奨できるが、ラットではクレアチニンの尿細管排泄が行われることや、測定を妨害するクロモゲンの存在などの難点がある。濃縮希釈試験も絶水や水負荷などを毒性試験そのものに影響しない条件で加えることが要請される。

毒作用の現われ方における種差は、機能毒性においても問題である。その成因としては、単なる薬物代謝機構の種差だけでなく、受容体の感受性やそれに連動する細胞内情報伝達機構の種差が関係していると考えられる。動物種差は、先験的には量的な差異と思われ、毒性の把握は楽観的に考えてよいようでもあるが、もしほとんど質的に相違すると考えるべき種差が存在するとなれば、毒性試験の動物種を選択は重大である。量的な差異ではあっても動物種によって数百倍の感受性の差が薬理試験で認められる例も知られている。いずれにせよ、機能毒性の種差については現在十分な知識の集積がないので標準的な化学物質に対する各種動物の反応の基礎的な資料を整備していくことが必要である。

5. 薬物動態からみた種特異性

山添 康

慶応義塾大学 医学部

一般に体内に取り込まれた有機化合物はそのままの形で排泄されず、肝あるいはその他の組織で、より排泄され易い代謝物になった後体外に排泄される。このような代謝的変換反応はおもに薬物代謝酵素系により行われるが、実際には非常に多くの酵素系が関与しており各酵素系の関与の程度は薬物の構造および官能基の違いによって異なっている。薬物の動態に動物種間で著しい差異のあることは古くからよく知られており、薬物の吸収、分布、代謝、排泄のうち代謝における差異が主に薬物の動態の種差の原因であることが多くの例で明らかにされている。代謝反応の種差は官能基の形成(酸化/還元)と抱合/脱エステル化の両反応において認められており、例えば前者ではクマリンの水酸化を行うチトクロームP-450の活性はマウスとヒトで高いが、ラットではほとんど検出されないこと、後者ではアセチルトランスフェラーゼの活性がイヌで欠損していることが知られている。

最近、遺伝子工学の発達によりDNAあるいはRNAレベルで種間の差異を比較することが可能になって来ている。例えばチトクロームP-450では比較的多くのP-450分子種についてアミノ酸配列の相同性が種間を越えて保持されていることが明らかになって来ている。これらの方法は従来の免疫学的交差性による方法よりも動

物種間での差異をより詳しく比較出来る。またヒトの薬物代謝酵素の遺伝子を導入したイーストや培養細胞系を用いることによって実験動物で得られた結果、すなわち毒性の発現に関与する代謝活性化反応がヒトのチトクロームP-450によっても起きるかを*in vitro*系ではあるが調べる事が可能になって来ている。このように実験動物種で得られたデータからヒトや他の実験動物種での代謝反応を定性的に予測することは可能となって来たが、薬物動態の種特異性を定量的に予想することは未だ難かしい。実験動物種、ことにラットやマウスでは肝薬物代謝酵素の発現調節に成長ホルモンが深く関与しているが、その他の実験動物種およびヒトにおける調節メカニズムはよくわかっていない。今後これらの種特異性を研究することによってより明確に薬物動態の種特異性を明らかにすると共にヒトへの外挿が可能になるものと考えられる。

ワークショップ

(1)

ワークショップ（１） 「毒性試験技術の最近の進歩」
はじめに

座長： 大森義仁¹⁾，黒川雄二²⁾

1：慈恵医大・第一薬理， 2：国立衛生試験所・毒性部

毒性学とその関連学際領域にみられる近年における基礎研究の著しい発展と充実，ならびに新しい諸種の技術・機器類の開発と利用は，GLPの適用とともに，全生体・器官・組織・細胞・細胞下レベルでの毒性発現機構の解明やヒトへの外挿性の向上とリスク評価に大きな成果を挙げてきている。

毒性の発現には，試験系ならびに環境などの内外の諸因子が大きな変動要因となって左右される。今回はとくに試験の実施にあたり毒性試験・研究の結果と評価に影響を与える薬物側の変動要因となる被験物質の調製と適用の問題をとり上げた。

毒性の判定にあたり，従来の定性的方法から，機器類を利用したより定量的手法が重視されるようになり，その結果としてデータの推計学的処理や比較検討が容易となり，さらに毒性の客観的評価が可能な段階になりつつある。この問題では一般毒性試験関係と画像解析に関するテーマを採り上げた。

全生体を用いる毒性試験の代替法の開発が強く求められており，この手技は受容体の局在や作用機序の解明に最も利用されているもので，本ワークショップでは循環系の細胞レベルでの新しい検索法を選んだ。

感覚系の毒性の追及は，その生理機能の複雑さから困難な面が多かったが，視・聴覚系の検索手法を中心として考えてみることにした。

1. 画像処理装置について

今井田克己

国立衛生試験所・病理部

画像処理装置はカメラより入力した対象物を取り出し、その面積、線分長、個数、形状など二次元的画像を解析し、さらに、コンピューター処理によりその像の三次元再構築を可能とする装置である。画像処理装置を用いることにより毒性試験の分野でもその生体標本からより広い方面からの追求が行え、より多くの情報が得られる。毒性試験、病理試験の分野においては主として顕微鏡、実体顕微鏡、電子顕微鏡などからの像をカメラから入力しその像の解析を行うことになる。この画像処理装置は大きく1)画像入力機能、2)カラー画像処理機能、3)濃淡画像処理機能、4)2値化像処理機能、5)計測機能、6)三次元再構築機能、7)統計処理機能などに分けて考えることができる。

生物分野において画像処理装置が使われるものとして、まず二次元の画像処理があげられる。即ち、計測したい二次元像をディスプレイ上に取り込み、その像の拡大、縮小、塗りつぶし、穴埋め、反転、消去、スムージングなどの輪郭修正機能などの2値化データの処理を行った後、個々の対照物の面積、個数、最大長、周囲長など種々の線分長、縦横比など種々の比率、ヒストグラムの作成などの2値化像の計測が画像処理上で行える。二次元の画像処理の例としてラット肝の酵素変異巢の計測があり、肝の胎盤型glutathione S-transferase(GST-P)陽性細胞巢もそのひとつである。肝のGST-P陽性細胞巢の個数および面積をこの画像処理装置を用いて計測し、肝の単位面積当たりの個数および面積を算出することにより被験物質の発癌促進ならびに抑制など発癌修飾作用を数値化することが可能

となっている。その他、各種組織の基底膜の長さ、粘膜の高さおよびそれらの病変部に占める割合を計測することができる。近年、特に免疫組織化学や粘液組織化学の普及とあいまって、それらの特殊染色により得られた病変部の計測も今後重要になっていくものと思われる。

その他の画像処理装置の重要な機能として三次元再構築機能がある。これは連続切片の組織像を連続入力する事により、立体像即ち三次元像に再構築することができるものである。得られた像はx,y,z軸中心に、必要とする部位をもっとも見やすい位置に回転させることができ、一枚の組織切片では表現できない病変の実体像の把握が可能で、その体積、表面積などの数学的データも得られる。さらに重要な利点として、微細器官の相互の位置関係を把握することも可能となる。ラット肝のGST-P陽性細胞巣の三次元再構築像はこの例である。この立体像の観察から、GST-P陽性細胞巣のうち比較的小さいものは球形を示しているが、ある程度以上の大きさのものには複雑に枝分かかれし、球状ではないものがあることが明らかにされた。また、ラット肝病変部周辺の細胆管と門脈との関係についても研究されている。二次元の計測データは種々の換算式を用いることにより容易に三次元のデータに換算することができる。しかし、この場合はその換算式を満足させるような種々の仮定が満たされていることが必要であり、原則的にはその確認が必要である。そのような場合にも画像処理装置による三次元再構築像は有用である。このように三次元画像処理装置は今後新たな手法として用いられていくものと思われる。

最近の科学技術の進歩に伴って、より高速なコンピューターを利用することにより、その処理速度に飛躍的な向上が得られ、二次元データ、三次元データともに数多くの処理が可能となるばかりでなく、さらに複雑で詳細な観察も可能となり、今後ますます画像処理装置を用いた新たな研究分野が得られるものと期待されている。

2. 一般毒性試験機器について

松本清司

国立衛生試験所・毒性部

近年の科学技術の進歩はめざましく、現在では一般毒性試験の分野にも多くの機器が導入されており、主なものとしては、血液形態学的検査として血球計数器及び血球分類器、生化学的検査として血液生化学分析装置、臓器重量検査として重量測定システム並びに生体内金属等の分析装置があり、更に毒性試験全体をコンピュータ化した毒性試験システムも実用化されている。また、細胞分別装置や蛍光X線元素マッピング法を用いた生体中無機元素分析装置の如く、毒性試験とは異なる分野で開発利用されていた機器でも、その応用により有用なものがある。最近開発されている機器の特徴としては、多機能性と全自動化および試料必要量の微量化があり、これらの機器の使用目的及び効用として再現性(正確度および精密度)を得ることと、短時間内に多項目の測定あるいは複雑な分析を行なう省力化があげられる。

今回、一般毒性試験検査機器の内、演者のこれまでの使用経験をふまえて以下に示すような主に血液検査に関連する機器を取り上げ、その使用における問題点を述べる。

1) 多項目自動血球計数器: 赤血球、白血球及び血小板数の測定に際し留意すべき点として、溶血剤の効果、有核細胞の存在ならびに域値の設定があるが、白血球数測定プログラムの域値を変更し骨髓検査に応用すると細胞分布パターンを示すことが可能である。

2) 自動血球分類装置: 白血球分別及び網状赤血球数を測定する機器で、スクリーニングとして十分な成績が得られるが、画像解析結果の数値のみで細胞を判定するため誤認識を生じる場合がある。

3) 細胞分別装置(cell sorter): モノクローナル抗体等を用いて血球分別をするもので二重染色が可能であり、リンパ球の膜抗原による分類等の免疫学的解析に有用である。

4) 細胞遠心塗抹装置 (サイトスピン) : 従来のWedge標本でよく見られる細胞と核の崩壊を少なくすることができ、骨髄細胞の標本作製上有用である。

5) プラズマ発光分析装置 : 主に水中金属の定量分析のため開発されたものであるが、最近生体成分中の金属分析に応用され、蓄積性並びに生体内金属の相互作用検討に有用である。

毒性試験の周辺には多くの機器があり、それらは測定あるいは分析速度において非常に大きな効力を発揮しその有用性も高い。しかし、毒性試験検査では実験動物が対象となるが、通常市販されている医用機器は、ヒトの臨床検査を対象として開発されたものが多い。また、測定項目によってはヒトと動物あるいは動物種間に明らかな量的または質的差異を認めることがある。例えば白血球数測定の場合、溶血剤は一部の多染性赤血球に対して効果がなく多染性赤血球増加例では異常な白血球数高値を示すし、赤芽球増加の場合、白血球下限域値設定が不能となり正確な細胞数が得られない。また、ゲッ歯類の赤血球数はヒトの2倍程度あるため計測部の同時通過という点も問題となる。従って、機器を実験動物の毒性試験で用いるためには、機器自体、測定プログラムあるいは試薬等の一部に変更を加えて利用することが重要である。

現在、機器は全自動化の傾向にあり、実験者が標本や試料をよく観察せず機器にセットし測定結果のみを得ることがある。例えば自動血球分類装置では、機器が判定し得なかった少数の細胞を実験者が判断するだけで計測が終了するので、細胞を直接観察する機会が少なくなり、微妙な形態的变化を見落とす可能性がある。このように、自動化したがためと思われる問題点も見受けられ、機器は使用方法を誤るとその有用性をそこなうのみならず、安全性評価の点で不都合な結果をもたらす可能性をもつとも考えられる。

以上のように機器から再現性ある測定結果を得るためには、まず機器の長・短所を熟知し、何らかの手段で欠点を補うこと、並びに他の検査結果との対比を行ないそのデータの正確度を判断することが重要であると考えられる。

ワークショップ(1) 「毒性試験技術の最近の進歩」

3. 循環機能検査について

—細胞レベルの機能測定を中心にして—

西木克侑

日本レダリー (株) 生物研究所

最近の科学技術の進歩にともなって薬物を毒性学的観点から評価する場合にあっても多面的に形態・機能を測定・定量化することがルーチン・ワークとなりつつある。

本報告ではそのような科学的潮流の中で近年注目を集めている活性酸素による毒性発現に話題をしぼって、毒性発現をモニターするための鋭敏なインジケータとして何を用いるかについて述べる。さらに、抗腫瘍剤アドレアマイシンを摘出心臓の灌流液中に添加した後に観察された上記インジケータの推移を他の細胞内パラメータ・心臓機能の変化と同時に記録した結果について報告する。

(1) 活性酸素毒を検知するための生化学的インジケータ

ある物質の毒性の発現はその供給とそれを排除あるいは無毒化する細胞の機能とのバランスに依存している。従来はともすると機能変化あるいは形態変化が認められた要素を毒性インジケータとしてきたように思われる。したがって、毒性を予知することは不可能であった。本報告では、細胞がその無毒化機構を活性化しつつ、正常状態を維持していることを知らせる、いわば毒性予知インジケータとして酸化型グルタチオン(GSSG)を候補にあげた。

高圧酸素下では細胞内で O_2^- や H_2O_2 が上昇し過酸化脂質(LP)生成が抗進する。このLPは下記の①グルタチオン過酸化酵素(GP)反応と②グルタチオン還元酵素(GR)反応に示される共役反応で無毒化される。すなわち、活性化酸素がLPを生成し、その後は；



の反応過程が進行する。NADPHは in situ臓器においても表面蛍光を測定し、その推移を連続記録することができる。また、GSHの酸化により生じたGSSGはほぼ定量的に細胞外に漏出されてくるので、所定の時刻に臓器灌流液をサンプリングし定量することが可能である。したがって、上記反応過程から推論されるように、この蛍光の減少と共に還元型グルタチオン(GSH)の酸化が抗進するときはLP生成が増加している場合であるといえる。

(2) 心臓機能と細胞内生化学反応を測定するための装置

灌流心臓の機能の変化を細胞レベルでモニターするために、次のような測定系を使用した。ランゲンドルフ灌流心臓標本(ラット)に直径1mmφの光ファイバーを左心室側より刺入し右心室内壁まで進め、他端を光源に連結した。右心室外壁に受光用光ファイバー先端を接触させ光電子増倍管に導いた。587 - 620, 605 - 620nmの2波長ペアで心室壁の吸光変化を測定し、前者でミオグロビン、後者でチトクロームaa3の酸素化をモニターした。さらに、左心室壁に22Gの注射針を刺入しポリエチレン・チューブを介してストレンゲージ血圧計に接続して左心室内圧を測定した。これら3種類のパラメータをブラウン管オシロスコープ上に同時に表示した。一方、灌流液をフラクションコレクターで分取し、各サンプルについてGSSGを定量した。また、別の試験系で同一灌流心臓標本を用いて、臓器表面蛍光測定法(励起光 366nm; 蛍光 460nm)で還元型ニコチナデニンヌクレオチドを測定し、上記と同様にGSSGを定量した。抗腫瘍剤アドレマイシン(50, 100 μ M)を灌流液に加えた所、GSSG濃度の上昇と共にNADPH由来の蛍光強度の減少が他のパラメータよりも早期に発現した。

これらの事実より、アドレマイシンによる心毒性発現の初期的段階に少なくとも過酸化脂質の生成が関与していることが確認されたといえる。

4. 感覚機能検査について

暮部 勝

明治製菓(株) 薬理安全性研究所

医薬品の臨床試験の結果から、非臨床試験で予測出来なかった副作用のために開発が中止になった医薬品は多数あり、その副作用の中でヒトの自覚症状から初めて判明した副作用も数多くある。実験動物を用いた感覚機能の適確な評価法が確立されれば臨床での自覚症状による副作用は事前に予測出来、また市販の陽性対照薬との比較試験で、感覚器毒性の性質と程度が予測し易くなる。即ち、実験動物を用いた安全性試験で感覚機能検査法がルーチン化され、バックグランドデータが累増すれば、医薬品の感覚器毒性の結果がヒトに外挿し易くなる。従って、安全性試験の現状に適合した感覚機能検査法を再考することは有意義なことと考え、ここに二、三の話題を提供する。感覚機能としては視覚、聴覚、嗅覚、皮膚感覚(温・触・圧・痛覚)、内臓感覚、振動感覚、深部感覚、平衡感覚、味覚、口腔感覚等があり、それら機能の検査法が多数報告されている。一般毒性試験や生殖試験等で採用されている検査法としては動物に損傷を与えない簡単な方法が行われているが、各種の感覚毒性試験では種々の特殊な検査法も採用されているので、以下で感覚毒性試験に実際に用いられている具体例を示す。

1. 視覚毒性試験

被験物質はマウス、ラット、ウサギ、犬、サル等に臨床適用経路に準じて単回又は連続投与され、局所適用される場合もある。一般には陽性対照薬として被験物質の作用点と類似した薬物が選択される。

検査法

(1)視診：肉眼、ルーペおよび実体顕微鏡等によって眼瞼、眼球、結膜、眉毛、睫毛、眼窩、角膜、虹彩、瞳孔等の所見 (2)細隙灯顕微鏡や検眼鏡：結膜、瞬膜、涙腺、角膜、前眼房、虹彩、水晶体、硝子体等の所見 (3)眼球運動性：眼球偏位、眼球電図や眼筋EMG等 (4)眼瞼運動性：瞬目反射等 (5)対光反応 (6)眼圧測定 (7)眼底検査または蛍光眼底検査：視神経乳頭、網膜、脈絡膜等

(8)導涙機能検査 (9)網膜電図検査：ERG (ERP, a波, b波, 律動様小波, c波等)を記録し, 光刺激に対する反応 (Scotopic ERG, ERG各波の閾値, Flicker ERG, Photopic ERG, 暗順応 ERG等)によって検査する。(10)視覚誘発電位 (VEP)および微小電極法による活動電位検査：視覚中枢に至るまでの経路における各部位で光刺激による誘発電位を細胞外および細胞内誘導で記録し, 光刺激による反応を指標として検査する。(11)視力検査：一般には動物の精密な視力測定は困難であるので視力を利用したオペラント行動から視力を評価する。(12)病理組織学的検査：眼球, 眼球付属器, 視神経, 視交叉, 視索, 視中枢等について光顕または電顕で検索する。

以上の検査法は目的と被験物質の性質に応じて選択される。また, 視覚毒性機序を解析するために組織培養法が利用されることもある。

II. 聴覚毒性試験

モルモットでは耳介反射の消失周波数とラセン器における有毛細胞の消失部位とがかなり相関し, またバックグランドデータの多いことから, モルモットが一般に繁用されるが, 他の実験動物も目的に応じて使用される。被験物質は全身または局所 (中耳腔) に投与され, 陽性対照薬としてはアミノ配糖体, アルキル化剤, 利尿剤等が使用される。

検査法

(1)耳介反射：オーディオメータによって発生した各種周波数 (200 ~ 20,000 Hz) の音に対する動物の応答から検査する。(2)オペラント行動検査：音に対する条件反射によって検査する。(3)電気生理学的検査：蝸牛電位, 聴神経電位, 聴性脳幹反応 (ABR)等のように聴覚経路における各部位の静止・活動電位を細胞外・細胞内誘導で記録し, 音に対する反応から機能検査する。(4)蝸牛リンパ液または各組織の生化学的検査 (5)病理組織学的検査：ラセン器, ラセン神経節, 前庭器, 前庭神経節, 聴神経, 聴覚領等の聴覚経路における各部位を連続切片法, Surface Preparation 法等によって標本を作成して, 光顕 (組織化学も含めて) および走査または透過電顕等で検索する。

III. その他

嗅覚, 皮膚感覚, 内臓感覚, 振動感覚, 深部感覚, 平衡感覚, 味覚, 口腔感覚等への被験物質の影響を検討する試験法も目的によっては採用されている。

以上のように, 感覚機能検査法について具体例を交えて紹介する予定である。

5. 薬剤の調製と適用について

山田秀雄

塩野義製薬(株)研究所

毒性試験に限らず、一般に動物実験で薬剤を投与する場合、それが生体内の作用部位に到達するまでに多くのプロセスを経ていくことになるが、そこには「落とし穴」とでも言うべき見落とされがちな現象がひそんでいることがあり、思わぬミスをひきおこす心配がある。ここでは、それらの中から2,3の例を取り上げてご参考に供したいと思う。

1. 水溶液の凍結保存中に見られる薬剤の変化

薬物の水溶液を安全に保存するため、分注して冷凍庫に入れ、凍結しておくことがある。これは必要に応じて取り出し、融解して使うことが出来るため大変便利である。しかし薬物によっては、凍結して固体と思われる状態になっていても、徐々に変化が進行していることがあるので気を付けなければならない。

Latamoxef はβ-ラクタム系の注射用抗生物質で、立体異性体であるR体とS体とがほぼ1:1の割合で混合した薬剤である。このものを水溶液として凍結保存し、5日後、10日後、15日後……にRとSの量を測定すると、日数の経過とともにR/S比が増加していく傾向が認められる。この変化は、或る範囲内では凍結温度が低いほど顕著である。しかし-70℃のディープフリーザー中ではR/S比の変化は見られない。薬物によっては凍結保存中のこの種の変化に注意を払う必要がある。

2. 懸濁液の調製中に見られる薬剤の変化

マウス・ラットなど小型の動物に比較的高用量の薬剤を投与する場合、懸濁液として与えることが多い。しかし或る種の化合物は

懸濁液を調製する途中で変化してしまうことがあるので注意を要する。

Benexate・CD (BNX・CD)は胃潰瘍の治療薬で、benexate(BNX)を β -シクロデキストリン(β -CD)によって包接化合物としたものである。これを常法に従って懸濁液にすると、外見上は微細な粒子が均一に分散しており、何ら異常は認められない。また通常の定量法では含量も十分に保証される。しかし特殊な方法で分離定量したところ、大部分がBNX・CDからBNX になっていることが明らかとなった。BNX はBNX・CDに比して非常に溶けにくく、このため生体への作用が間違っって評価される心配がある。この化合物では懸濁液としての投与は適当でないと思われる。

3. 懸濁液皮下注後の吸収

— 異種動物の成績から種差を論ずる場合の注意点 —

動物実験では懸濁液を皮下に注射することがよく行われるが、この場合の吸収に関して注意すべき現象がある。

モデル化合物として色素を用い、懸濁液を調製してラットに皮下注射し、投与部位からの吸収を調べたところ、投与液の薬物濃度が高くなるにつれて、また投与液の量が多くなるにつれて、その吸収速度は遅くなる傾向を示した。従って、体重が大きく異なる動物間の比較では、投与液の濃度や量が違ってくることになり、その結果、或る時間内の吸収率に差を生じるものと予想される。

事実、*o*-aminoazatoluene を懸濁液とし、8.3mg/mlの投与量でマウス(約30g)、ラット(約300g)、ウサギ(約3kg)の背部に皮下注射して、7.5 時間後の吸収率を測定すると、マウス 60.9%、ラット36.9%、ウサギ12.2%であった。

このため、種差を論ずる場合、代謝や感受性など本来的な種差を考えると共に、このような体重に基因する吸収率の差についても考慮する必要があるものと思われる。

ワークショップ

(2)

ワークショップ（２） 「毒性試験代替法の最近の進歩」
はじめに

座長： 遠藤 仁¹⁾，佐藤 哲男²⁾

1：東大・医学部・薬理 ， 2：千葉大・薬学部・薬物学

各種毒性試験は医薬や農薬をはじめ食品添加物、環境汚染物質等の安全性の評価と安全基準の設定において極めて重要であることは多言を要しない。加えて昨今は生物工学の急速な進歩によって、従来は殆ど不可能と考えられていた生理活性物質の遺伝子を培養細胞やバクテリアに注入して大量に産生することが可能となり、新しい”医薬品”として登場してきた。このような諸分野の科学技術の進歩に即応した毒性試験法の変革が求められているのが現在および近未来の状況である。

本学術年会でのワークショップで取り上げた代替法の主要な目的は試験管内（*in vitro*）での毒性試験の有用性とその限界性を明らかにすることである。既に *in vitro* の試験法としては変異原性試験を例にとるまでもなく多くが繁用されているが、本ワークショップでは単に *in vitro* 試験を羅列するのではなく、従来は毒性試験用のために数多くの動物が必要とされていた分野において如何なる改善が可能かに焦点を絞ってみた。即ち、目的とする器官や臓器の外環境を容易にコントロールできて、被験物質の毒作用を鋭敏にしかも再現性良く量的に評価する系の確立ができるか否か、そしてそれらが真の代替法になり得るかを中心的に討論すべき問題点と考える。与えられた時間内に効率良い討議をめざし、今回の企画には全胚培養、肝、腎に限定せざるを得なかった。日本のみならず諸外国の毒性試験においては動物愛護と経済的側面から、代替法の要請は強く望まれている。隣りの韓国の研究者の参加も得て、この代替法の目指している倫理的側面への対処についても討議が深化することを願っている。参加者の活発な発言を切に期待致す次第である。

１．毒性試験代替法の意義

遠 藤 仁

東大・医学部・薬理

実験動物を用いて毒性試験を行うに当っては次の２つの原則を満たす内容であることを常に顧慮する必要がある。即ち、（１）実験動物でみられる化学物質の作用がヒトにも適用できる。（２）実験動物を高用量の毒物に暴露することはヒトでの危険性を発見するのに必要で妥当な方法である。

上述の原則に基づいて、急性、亜急性、亜慢性、慢性の各毒性試験においては基本的に動物（whole body）を用いた試験法が現時点では国際的、国内的に必要とされている。しかしその一部を科学的な裏づけをもったより効果的な、より迅速な、そしてより経済効率のよい代替法で行い得ないか、ということが当面の設定課題である。

先ず代替法が適用され得るのは急性毒性試験である。中でも臓器毒性の評価においては代替法が次の諸点で動物丸ごとを用いる場合よりも有利であると考えられる。

- （１）被検物質の局所濃度をコントロールできる。
- （２）被検物質の使用量が少なくて済む。これは特に微量で高い生物活性を示す物質や使用量が限られる物質の毒性評価にとって重要である。
- （３）当該臓器以外からの修飾因子を除外できる。即ち系が単純なので得られる結果に曖昧さが無い。
- （４）全く同じ条件下で各種異なった毒性物質の数多くの濃度における評価が可能である。

その反面代替法であるが故に新しく生ずる次のような問題点も見逃す訳にはいかない。

- （１）用いる臓器、組織の特異性と反応性。生体に存在する時には血流や神経支配が保たれていた状態から摘出することにより生ずる生物活性や毒物等への反応性の変化。特に培養細胞の場合には培養経過に

おける本来の細胞のもつ形質の変換を考慮する必要がある。

- (2) 毒性物質の biotransformation など、生体内では複数に存在する物質の代謝が摘出臓器の場合には全く異なること。

以上述べた代替法に関する有用性と限界性については各個別の代替毒性試験法によっても自づと程度の差が生ずる。試験法の差はともあれ、毒性試験は、化学物質が安全であるか否かを知るために行われるのではなく、化学物質が如何なる動物に、如何なる部位に、如何なる毒性を示すかを知るために行われなければならない。従って毒性が存在することを前提に、その質と量の評価に専ら焦点は絞られる。選択毒性や臓器毒性は或る特殊な状況では絶対的に存在し得ないことがあるかも知れないが、これは極めて例外的な問題と考えるべきかもしれない。

毒性試験の代替法としては頗る多くが将来的に確立されるものと考えられる。生体をつくる臓器、その臓器をつくる数多くの細胞個々に共通した性質をパラメーターとしての代替法の例を挙げる。

- (1) 細胞内 ATP 量を指標とした毒性評価。各種遊離ないし培養細胞に化学物質を一定時間反応させて細胞内 ATP 量を測定して、毒性を定量評価する。実験条件の適切な選択により鋭敏な毒性試験の代替試験法となり得る。
- (2) 細胞内遊離カルシウムの測定。細胞内外の遊離カルシウム濃度差は正常状態では 1,000~10,000 倍に達する。細胞内のこの低い Ca^{++} 濃度の維持には多くの要素が関与しており、細胞が生きている証である。細胞内遊離 Ca^{++} の増大は即細胞の死への過程を意味し、毒性の良い指標である。

毒性試験の代替法はあくまでも代替であり、動物を用いた毒性試験での最終評価を必要とするが、試験の効率の増大と費用の軽減に加え化学物質の毒性発現機序を解明するための一手段にもなり得る。

ワークショップ（２）「毒性試験代替法の最近の進歩」 2. 哺乳類全胚培養法について

江藤一洋

医歯大・歯学部

代替法の定義は、RussellとBurchの提唱した「3つのR」①Replacement、②Reduction、③Refinementとされている。Reductionについて使用動物を減らす観点からすると、哺乳類全胚培養法の問題点は、培養液として100%ラット血清を用いるため、大量の動物数が必要になることである。この点を改善する方法として考えられていることは3つに大別できる。第1は人工培養液を用いる方法であるが、現在までのところ良好な結果は得られていない。第2は殺傷せずに大量採血可能な大型哺乳類の血清を用いることである。その代表として豚、牛などが考えられるが、豚血清を用いた研究では、豚血清：ラット血清＝1：1の割合で混合した培養液では、ラット血清と同様の培養が可能であったが、豚血清単独での培養は不可能と報告されている。またヒト血清を用いた培養も報告されているが、ラット血清と比較すると良好な結果とはいえない。第3は、一度全胚培養に使用したラット血清を再生処理して使用することであるが、これも短期間のみ代替可能である。それゆえ、培養液の代替については今後さらに多くの検討をかさねていかなければならない。そこで、今回はReductionを精度の高い成績を得るという点から考えて、全胚培養法が生殖毒性試験として、他の方法との組合せでいかなる利点を有するかETU (ethylenethiourea) を用いた例で述べてみたい。

妊娠11日（D11）またはD12のラット母獣にETUの50、100及び

200mg/kgを単回経口投与し、D 20に胎仔の外表形態を検査した。その結果D 11、12投与群で用量に依存して短尾もしくは無尾、口蓋裂、水頭症、小下顎症、前肢芽異常が観察された。さらに、D 11投与群では口唇裂が、D 12投与群では後肢芽異常が投与時期特異的に観察された。

D 11またはD 12ラット母獣に ETUの200mg/kgを単回経口投与し、胎齢12日 (T 12)、13、14日に胎仔を観察した。その結果、D 11投与群ではT 12から短尾が、前脳減形成、中脳領域の浮腫、前肢芽異常、下顎及び外側鼻突起の減形成がT 13から認められた。D 12投与群では、T 13から短尾、前脳減形成、中脳領域の浮腫および下顎減形成が、またT 14には前肢芽及び後肢芽の減形成が認められた。

次に胎齢11日 (T 11) の培養ラット胎仔に ETUの 100及び300 μ g/ml をT 11から17時間 (A) またはT 12から24時間暴露 (B) し、それぞれ培養48時間で外表形態を観察した。A群では、100及び300 μ g/ml とともに培養17時間で短尾が観察され、培養終了時 (培養48時間) では短尾、前脳減形成、前肢芽異常、下顎及び外側鼻突起の減形成が認められた。B群では、培養終了時に短尾、前脳減形成、前肢芽及び後肢芽異常、下顎減形成が認められた。

ETU 処理した培養ラット胎仔を組織学的に検索してみると、ETU 処理群では神経上皮層の発育が悪く薄くなっており、肢芽組織では上皮、間葉共に組織が障害されていた。そこでT 11およびT 12のラット胎仔の中脳領域由来の神経細胞と前肢芽の間葉細胞を Flintの方法により調整して micromass cultureを行い、各 cell island中の、ニューロンもしくは軟骨芽細胞のfociを数えた。その結果、ETUの添加濃度 (30-300 μ g/ml) に依存してfociの数は減少し、神経細胞の方がより強く抑制されていた。

以上の結果より、in vivo と全胚培養胎仔において、ETU 処理により発現した異常の種類および発現過程はよく一致し、密接な関連が認められた。また全胚培養と細胞培養の併用は、胎仔への化学物質の作用機序を解明する有力な手段を提供し得るものと考えられる。

初代培養肝細胞の毒性試験代替法への応用

○小平輝朋、中村敏一

九州大学・理学部・生物学教室

従来の *in vivo* 毒性試験は、個体への毒性の全体像を見るには有益であるが、個体の示す毒性反応には間接的要因が多く計量化が困難である。このような理由から *in vitro* での毒性試験による代替法は、省施設と個体差のない客観的結果が得られる等の利点から多くの研究者の関心を集めている。特に肝臓は解毒代謝や代謝活性化を行う薬物代謝の中心臓器であり、この機能は、その7割を含める肝実質細胞が担っている。このことから肝細胞の初代培養系が、代替法として有力な手段になりうることは想像に難くない。

1匹の成熟ラットより得られる肝細胞は3億個にも達し、 10^6 個ずつ35mmのディッシュに播いたとすると300枚のディッシュが得られる。こうして得られた初代培養肝細胞は、血漿タンパク質の合成、グリコーゲンの合成及び分解、脂質合成、尿素合成やホルモン刺激による酵素誘導など質・量ともに *in vivo* に近い肝特異機能を維持しており、まさに *in vitro* の肝臓とも称することができる。従って、成熟ラット初代培養肝細胞系はこれらの機能を指標にすることにより、非常に有力な代替法の手段となり得る。更に、ヒトより *biopsy* で得られた肝細胞を初代培養することにより、代替法でしか行うことのできないヒトの毒性発現・代謝メカニズムの研究も可能である。その応用例は、肝炎誘因物質スクリーニング、不定期 DNA 合成活性測定による発癌性スクリーニング、化学物質の代謝メカニズムの究明、更には肝炎治療薬のスクリーニングと多岐にわたっている。今回は、これらについての応用例を示しながら初代培養肝細胞の代替法への有効性について解説したい。

W2-4 ワークショップ(2) 「毒性試験代替法の最近の進歩」
培養腎上皮細胞について

玄番宗一

大阪薬科大学・薬理

腎障害について、血液・尿検査及び組織学的検索によるのを *in vivo* での評価法とするのに対して、*in vitro* における評価法がある。そのために、単離灌流腎、腎切片、単離尿細管や培養細胞を用いて腎障害の評価が試みられている。

In vitro 試験系

これらのうちで、動物実験の代替とはならないが、切片の調製及びその実験法が最も容易である。短期間のトレーニング後に実施可能であり、比較的多くの情報を容易に得ることができる。切片を用いる実験においては、尿細管は閉塞していると考えられ、反応液中の成分は刷子縁膜側から細胞に到達し得ないだろうが、基底側細胞膜面へのアクセスは十分に可能である。少なくとも数層の細胞層から構成されるので、95%以上の酸素で充分に通気する必要があるが、中心部の細胞層においては嫌氣的になるかもしれない。

培養細胞を用いる場合、初代培養においては実験動物を使用し、継代が困難であるが、樹立細胞系においてはそれらを解消する。しかし、細胞の正常性については疑義を残している。最もよく使用されている腎上皮の樹立細胞系はブタ腎由来のLLC-PK1およびイヌ腎由来のMDCKである。前者は近位尿細管細胞様の性質を有するが、後者はそれ以外の尿細管細胞様と考えられる。今回、樹立細胞系として、取り扱い易いという観点からラット腎上皮細胞由来であるNRK-52E細胞を試みた。

シスプラチンは優れた制がん効果をもつが、主な有害作用として腎障害を有する。最近、腎毒性の低いシスプラチンの誘導体が開発

されつつある。シスプラチンおよびその誘導体の *in vitro* における腎毒性の評価について、前述の切片法および培養細胞系を用いた試みを以下に示す。

1. 腎切片を用いた *in vitro* 試験

腎臓から切片を調製し、反応液中に好氣的に浮遊させると、パラアミノ馬尿酸 (PAH) の尿細管分泌は切片へのその取り込みとして、糖新生能は切片からのグルコースの遊離として測定することができる。さらに、切片細胞内のNa, KイオンやATPなどの濃度の変化を知ることにもできる。シスプラチンおよびその誘導体 (グリコラト-0, 0')ジアンミン白金 (II)(254-S)を反応液に添加すると、前者は1 mMの濃度で腎皮質切片におけるPAH取り込み、糖新生、KイオンおよびATP濃度を低下させたが、後者は10 mMにおいてもこれらに影響しなかった。

次に、これらの薬物を静脈内に投与したラットの腎皮質から調製した切片をインキュベートした。シスプラチン (5 mg/kg)投与群では、BUNが上昇し、切片におけるPAH取り込みおよび K イオン濃度の低下が見られた。254-S(10 mg/kg)は、BUNに影響なくこれらの低下を生じた。切片を用いることにより、薬物による腎細胞機能への影響を検索可能であり、その用量によっては、血液所見に変化がなくても腎細胞機能障害を示唆するといえる。

2. 培養腎上皮細胞を用いた *in vitro* 試験

培養液中にシスプラチン(1 μ M) を添加 72 hr 後に、NRK-52E細胞から酵素 (LDHやNAGなど) の漏出増大が見られた。比較薬トランスプラチンは、同濃度でこれに影響せず、腎毒性の低いシスプラチン誘導体(254-Sなど)は、さらに高濃度で酵素漏出の増大を生じた。シスプラチンは、NRK-52E細胞のミトコンドリアに形態的な変化を生じ、また、酵素漏出増大に先立って細胞内の過酸化脂質を増加させた。

NRK-52E細胞は、腎毒性の鋭敏な評価系になり得ると思われ、そのメカニズムの究明にも有用であると考えられる。

W2-5

The Reduction of Conjugation Capacity in Isolated Perfused Livers as A Method of In Vitro Toxicity Testing.

Young-Nam Cha

Dept. Pharmacol. & Toxicol., Inha Medical Col, Korea

Using the isolated perfused rat liver system, relationship between the initial mixed function oxidation of 7-ethoxycoumarin (EC) to 7-hydroxycoumarin (HC) and the subsequent conjugation of this metabolite to sulfate and glucuronide esters has been studied. A gm of perfused liver was found to oxidize only up to about 50 nmoles of the infused EC to HC per min and most of this HC metabolite formed in situ was released as sulfate ester. However, as the concentration of EC being infused was increased gradually (from 25 to 200 μ M), there was a dose-dependent shift for increased formation of glucuronide ester. This dose-dependent shift to a more significant glucuronide formation observed upon infusions with increasing doses of EC was not extensive, so that the major portion of metabolite released was always the sulfate form. Alternatively, when preformed HC was infused at high concentrations, there was more extensive shift and the major portion of conjugated HC being released was in the glucuronide form. Upon infusions with increasing concentrations of preformed HC, the maximal rates of sulfation and glucuronidation were found to be 60 nmoles and 120 nmoles of HC conjugated per min per gm liver tissue, respectively. Together, 180 nmol/min/gm of HC conjugates could be formed. Furthermore, the ranges in the types of HC conjugates being produced were divided into several zones; a "sulfate" (at less than 20 nmol/min/gm), a "mixed conjugate" (at rates between 20 to 150 nmol/min/gm) with the "cross-over" for more glucuronides occurring at 80 nmol/min/gm, and a "glucuronide" (at rates between 150 to 180 nmol/min/gm), and finally reaching the "maximal conjugation rate" (at 180 nmol/min/gm), above this maximal capacity only the unconjugated free form of infused HC was released. Thus, when compared to the maximal rates of in situ HC formation rates (50 nmol/min/gm), there remained a large reserve conjugation rate capacity (130 nmol/min/gm).

Physical dependence to alcohol was induced in rats

and the rates for hepatic oxidation of infused EC to HC and for the subsequent conjugation of HC were measured. The rate of HC formation from the infused EC was increased from 43.5 to 67.3 nmoles per min per gm of liver tissue. With such an increase in the rate of mixed function oxidation, greater amounts of the metabolically produced HC were conjugated not only to glucuronide (from 8.6 to 16.7 nmol/min/gm) but also to sulfate ester (from 30.6 to 48.5 nmol/min/gm). When a high concentration of preformed HC (100 uM) was infused in order to determine the effect of chronic alcohol administration on the maximal conjugation rate, it was found to be significantly decreased (from 181 to 108 nmol/min/gm). Thus, the livers obtained from rats chronically treated with alcohol have increased rates for the initial drug oxidation but reduced rates for maximal conjugation. Under such a condition, the reserve conjugation rate capacity was reduced to only about 40 nmol/min/gm and thus the alcoholic liver faced greater risk for the toxic effects of other environmental chemicals. Therefore, measuring the reserve conjugation rate capacity using the isolated perfused liver system served as a useful model for determining the potential of alcohol in producing toxic effects which goes unrecognized.

一般演題

(口演)

○伊原 蒼子，小倉 一晃，瀧 豊彦，五十嵐 俊二

エーザイ（株） 安全性研究部

【目的】連続採血した際の末梢血液性状に及ぼす影響と，採血中止後の回復性について末梢血液性状の推移および骨髓・肝・脾の組織像を指標として検討した。

【方法】8週齢のSlc:SD雄ラットを使用した。採血は，無麻酔下で外頸静脈より2週間にわたり毎日1mlあるいは2ml採取し，毎日血液検査を実施した。最終採血後1，3，7，14，21，28日に血液検査を実施するとともに動物を屠殺し，骨髓・肝・脾について組織学的検査を実施した。

【結果およびまとめ】2週間の連続採血終了時には赤血球数，Ht，Hbは1ml採血群でpre値のそれぞれ75%，69%，62%に，2ml採血群でpre値のそれぞれ55%，50%，38%に減少し，ラットは採血量に応じた貧血状態を呈した。さらに，赤血球数などの減少と共にMCV，MCH，MCHCの減少と，網赤血球数，血小板数の増加がみられ，この貧血は，Hbの減少を特徴とする小球性低色素性貧血であった。採血中止後14日間で多くの項目はpre値に戻り貧血状態は回復したが，採血中止後28日においてもMCVはさらに減少し，MCHは僅かな回復が認められたのみであった。すなわち，採血中止後28日に赤血球数はpre値の119~125%に増加したが，なお小球性低色素性のままであった。採血終了後の肝・脾の組織像では髄外造血が，骨髓では造血亢進が認められ，その程度は最終採血3日後が最も強く，14日後に髄外造血が，21日後に骨髓の造血亢進像も認められなくなった。

A-02 シクロオキシゲナーゼ阻害作用を有する薬剤の
ビーグル犬多核白血球機能に及ぼす影響

○早川 和宏、塩野谷 博、見上 孝、五十嵐 俊二

エーザイ（株） 安全性研究部

シクロオキシゲナーゼを阻害する薬剤は、*in vitro*において高濃度で好中球等の機能を抑制することが知られているが、*in vivo*との比較で検討した報告は少なく、特にイヌにおける報告はない。今回我々は陽性対照薬としてのIndometacinと新規抗血小板剤E5510を用いて、ビーグル犬多核白血球(PMN)の貪食殺菌能検査を*in vitro*と*in vivo*で比較検討したので報告する。

[方法]*in vitro*貪食能試験： 1×10^5 PMN/ 1.25×10^4 candida/ $50 \mu\text{l}$ に薬物、培地を $50 \mu\text{l}$ 添加後約14時間培養し、貪食されていない菌数を顕微鏡下で算定し貪食能をみた。両薬物とも 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4}M の3濃度にて実施した。*in vivo*試験 1) 貪食能試験：毒性量(潰瘍を生じるが連投可能な量)であるIndometacin 1.5mg/kg (C_{max} が 10^{-5}M に相当)およびE5510 3mg/kg (C_{max} が 10^{-5}M に相当)を雌雄各1例に3週間連続投与し経時的(投与前、投与後1、2、3週)に採血後上記方法で検査(薬物未添加)した。2) 殺菌能試験：1)と同一血液を用いて 5×10^6 PMN/ 5×10^6 candida/mlに調整後、Quieらの方法に準じて殺菌率を求めた。

[結果]*in vitro*試験ではIndometacin 10^{-5} 、 10^{-4}M 、E5510 10^{-4}M の濃度で共にPMN貪食能の低下が認められたが、*in vivo*試験では潰瘍が生じるような毒性量を投与してもPMN貪食殺菌能に影響がみられなかった。

[考察]シクロオキシゲナーゼを阻害する薬剤は*in vitro*でPMN機能を抑制することが知られているが、今回使用した薬物では*in vivo*においてはPMN貪食能低下にもとづく生体防御系への影響はないものと思われた。

東山 昇, 森山哲郎, 佐藤一美, 村岡義博

塩野義製薬研究所・神崎川分室

白金錯体化合物(Pt)の Maus 骨髓抑制は、骨髓有核細胞数(NBMC)減少で如実に示されるが、血中の好中球数や総白血球数には正確に反映されないことを報告した(第15回、毒科学会)。今回は、Mausの巨核球-血小板系に対するPtの影響をみた。また、造血前駆細胞に対するPtの作用を *in vitro* で検討した。

1. 巨核球-血小板系に対する作用：MausにCDDP, CBDCA, CHIP, ℓ -OHP, 254-SまたはNo.237を単回 *iv* 投与し、投与2, 4, 7, 10または14日後に大腿骨骨髓中の巨核球数(MEG), 後大静脈血中の血小板数(PLT)を測定した。その結果、MEGおよびPLTはいずれの検体とも用量に依存して著明に減少し、MEGは投与7日目、PLTは10日目に最低値を示した。投与用量からみた抑制の強さは、MEG, PLTともに ℓ -OHP, No.237, CDDP, 254-S, CHIP, CBDCAの順であり、MEG, 血中PLTの測定は巨核球-血小板系抑制の指標としていずれも有用と考えられる。MEG減少の推移はNBMCと類似することから、両者間に多少の感受性の差はあるが、MEG減少はNBMC抑制の部分的現象として捉えられる。

2. CFU-GMおよびCFU-Mに対する作用：正常Mausより採取した骨髓をCDDP, CBDCAまたは254-Sを含むメディウム中で37℃, 5%CO₂下で60分間インキュベートした。洗浄した細胞を軟寒天法で培養し、CFU-GM, CFU-Mのコロニー形成を観察した。いずれの検体とも濃度依存性にコロニー形成の抑制がみられた。抑制濃度はCDDP, 254-S, CBDCAの順に低かった。この結果は、*in vivo*での骨髓抑制結果と一致した。

毒性試験における飢餓の影響

都留清志、中川一平、畔柳 努、佐藤祐子、佐山典子
小川由美子、永田美由紀、前田明利

杏林製薬（株） 中央研究所

【目的】亜急性、慢性毒性試験などにおいて、摂餌量の著しい減少がしばしば観察される。その機序については、被験物質の薬理作用や高用量投与によるストレスなど様々考えられるが、摂餌量の減少により被験物質本来の毒性作用の発現が歪められていることも予想される。そこで摂餌量の減少が実験動物にどのような影響を及ぼすかを検討することは、薬物の毒性を評価する上で意義あるものと考え、一般毒性試験での諸検査値及び肝薬物代謝酵素系に及ぼす影響を検討したので報告する。

【方法】動物はWistar系ラットを用い、対照群、3日間絶食群、14日間制限給餌（対照群の1/2量）群、28日間制限給餌（対照群の2/3量）群を設定した。検査は、血液学的検査、血液生化学的検査、病理学的検査を実施した。また、肝機能検査として、BSP test、チトクロム P-450、アミノピリン脱メチル化酵素活性、アニリン水酸化酵素活性、UDP-グルクロニルトランスフェラーゼ活性、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ活性などを測定した。

【結果】血液学的検査では、赤血球数及びヘマトクリット値の増加並びに白血球数の減少傾向が各群に共通してみられた。また、血液生化学的検査では、中性脂肪、リン脂質、 β -リポ蛋白、グルコースなどの減少が各群に共通してみられた。病理学的には、肝臓の変化が著明で、肝重量の減少、肝細胞の萎縮、脂肪滴の増加が特徴的で、電顕観察でもこれらの変化を反映する所見が得られた。また、肝薬物代謝酵素系については、飢餓条件により、各種酵素活性の変動パターンに相違が見られた。

A-05 肝虚血によるMonoamine Oxidase の逸脱

○小畑俊男,*金島良一,*後藤 茂,*川野克則,永井敬之,
山中康光

大分医大・薬理,*第一外科

薬物投与および手術時の一時的血流遮断などの虚血による細胞障害はさまざまな病態をつくりだしている。また肝毒物による肝細胞の変性壊死が生じて血漿中へGOTやGPTなどの酵素が逸脱することは周知の通りである。そこで、今回我々はWistar系ラットを用いて肝虚血によって肝臓からMonoamine Oxidase (MAO) が逸脱するか否かについて検討した。ラットをエーテルで麻酔した後、門脈および肝動脈をクランプすることにより全肝虚血をおこなった。一時間虚血した後、下肝下大静脈をクランプし、門脈にcannulationし、0.25 Msucrose入りリン酸bufferで肝臓をwash outし、上肝下大静脈より灌流液を採取した。肝臓のSuperoxide dismutase (SOD)、GOT、GPTおよびLDHを測定したところcontrolに比べてSOD活性は減少しGOT、GPTおよびLDHは高い値を示した。そこで、灌流液中のMAO活性を測定したところA型MAOの基質である5-HTでもB型MAOの基質である β -PEAでもcontrolに比べて高い活性が得られた。ラットに肝毒物を投与すると血漿中への逸脱MAO活性はA型MAO阻害剤であるclorgylineおよびB型MAO阻害剤であるdeprenylでは完全に阻害されなかった。(第15回 日本毒科学会学術年会で発表)しかし、灌流液中のMAO活性はこれら特異的MAO阻害剤で完全に阻害された。また β -PEA基質の K_m 値は $5\mu M$ で肝臓の K_m 値と同じであった。さらにMAO以外のアミン酸化酵素の基質として用いられる $1\mu M$ benzylamineでは活性はみとめられなかった。以上の実験結果よりラットの肝臓を虚血すると血漿中にMAOが逸脱することが分かった。しかしMAO以外のアミン酸化酵素は肝臓中には存在しないことが示唆された。

A-06 脳機能改善薬 Bifemelane の肝組織中の脂質過酸化
反応に対する効果

○永井 敬之, 高野 律子, 金馬 義平, 江頭 亨,
山中 康光
大分医大 薬理

塩酸Bifemelane(BF)は 脳血管障害後遺症に有効性を示す薬物として、現在広く臨床応用されている。我々は BF 投与で肝臓の脂質過酸化物が減少することを認めたが その作用機序は不明である。そこでその作用についてさらに検討した。

10週令の Wistar 系雄性ラットに BF 100mg/kgを3日間経口投与すると肝組織中の脂質過酸化物は生食投与群と比較して約25%減少した。また BF 10mg/kg 7日間経口投与した後、肝の虚血—再還流モデルを作成したところ BF により再還流時の肝組織中の脂質過酸化物の上昇が抑えられた。

そこで BF による脂質過酸化物の減少効果の作用機序を *in vitro* で検討した。フリーラジカルスカベンジャーとしての作用を ESR (電子スピン共鳴)を用いて検討したところ BF は DPPH ラジカルをトラップしなかった。また Superoxide-dismutase 活性に対して何ら変化は認められなかった。Microsome を用いて NADPH 依存型脂質過酸化反応を *in vitro* で検討したところ低濃度の BF で抑制され、この抑制反応は Lineweaver-Burk plot法により NADPHとは非競合的に作用することが示された。一方 BF 100mg/kg 3日間、10mg/kg 7日間投与群ともに NADPH cytochrome P-450 reductase 活性, cytochrome P-450, b₅ 含量には殆ど変化は見られなかった。また BF はラット好中球活性酸素産生能, 血小板凝集能, 赤血球の70%溶血能および血清中の Phospholipase 活性を抑制した。これらの結果から BF による肝組織中の脂質過酸化物を減少させる作用機序の一つとして膜安定化作用が推察された。

A-07 ラット肝臓の前癌病変を指標とした中期発癌検索法による酸化染毛剤の発癌修飾作用

萩原昭裕、玉野静光、柴田雅朗、津田洋幸

名市大・医・第一病理

ラット肝臓の前癌病変である胎盤型glutathione S-transferase陽性細胞巢 (GST-P⁺)の出現を定量的に解析し、被験物質の肝臓発癌ならびに発癌修飾作用を8週間で判定し得る中期発癌検索法が開発されている。この方法では、既知の肝発癌物質の約90%は陽性の結果を示すのに対し、非発癌物質は全く陰性であり、偽陽性を示さないことより、非常に有益な検索法といえる。

今回は、本法を用い酸化染毛剤の主剤として用いられている p-phenylenediamine (p-PD) および 2,2'-[(4-aminophenyl)imine]-bisethanol sulfate (4APE) の検索を行なった。6週齢のF344ラット400匹を用いN-nitrosodiethylamine (DEN)の200mg/kgを1回i.p.投与し、2週後より被験物質のp-PDおよび4APEをそれぞれ1000, 330および110 ppmの飼料中濃度で投与し、第3週に2/3部分肝切除を行ない、8週後に屠殺した。また、陽性対照として既知の肝発癌物質である3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene (3'-Me-DAB)を用いた。その結果、p-PDの1000 ppmでは軽度な体重増加抑制および肝臓重量体重比の増加を認めたが、GST-P⁺の単位面積当たりの個数および面積では対照群と比較して統計学的に差異を認めなかった。また、4APEでは最高濃度の1000 ppm群においても全く著変を認めなかった。なお、3'-Me-DABでは体重増加抑制および肝臓重量体重比の増加を認め、GST-P⁺の単位面積当たりの個数および面積ともに著明な増加を観察した。以上、p-PDは本法で陰性となり、長期発癌性試験と一致した結果が得られた。また、4APEはラット肝臓に対し発癌性を示さない事が強く示唆された。

ウサギ生殖試験における人工授精の検討

下村和裕, 飯塚 壮

(財) 実験動物中央研究所付属前臨床医学研究所

〔目的〕ウサギ生殖試験での妊娠動物作成には、自然交配法および人工授精法がある。従来、自然交配法が広く用いられているが、自然交配法には、オス動物を多数用意する必要がある、また交配期間が長期化するなどの問題点があった。そこで、人工授精法により作成した動物の成績と自然交配による動物の成績とを比較検討した。

〔方法〕動物は3～5カ月齢の日本白色種ウサギ (KBL:JW) を用いた。人工授精は精液採取、精液検査、精液注入、排卵誘起の順序で行った。すなわち、交配用ケージの1つにオス2～3頭を入れ交尾行動をとったオスから、当研究所で作製した電熱式人工膺を用いて採精した。精液は顕微鏡下で観察し、尿などの混入物のあるもの、精子活力の低いもの、精子数の少ないものを除外した。精液注入は膺への挿入が容易に行なえるようにしたガラス製ピペットを用い、原精液 0.2 ml を注入した。排卵誘起には精液注入の直後に HCG 25 I.U. を耳静脈内に投与した。人工授精を行った日を妊娠0日とし、妊娠28日に剖検し、生殖試験の検索項目を調べた。

〔結果および考察〕人工授精による妊娠率は94% (437/465)であった。黄体数、着床数、胎生期死亡率、生存胎仔数、性別、胎仔体重、胎盤重量、胎盤異常、外表異常、内臓異常、骨格異常、骨格変異および化骨遅延に人工授精の影響は認められなかった。また、オス動物が自然交配の場合の半数で足りること、交配期間の短縮、高率の妊娠率など人工授精の利点が確認された。

B-02 モルモットにおける遅延型アレルギー（DTH）検出法の検討
— 白血球遊走阻止試験法 —

○ 服部 浩之、山口 文恵、俵 克彦

第一製薬（株） 中央研究所

〔目的〕モルモットにおけるDTHの *in vitro* 検出法として、白血球遊走阻止試験（LMT）について、皮膚反応およびリンパ球幼若化反応（LPT）と比較検討した。

〔方法〕モルモットの感作：感作は卵白アルブミン（OA）100 μg または対照として生理食塩液をフロインド完全アジュバントとともに1回皮下投与して行い、感作5日後に以下の実験に使用した。LMT：感作動物の脾細胞を、OAの100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とともに24時間培養し、上清を遊走反応に用いた。この培養上清を、モルモットの末梢血より分離した白血球とともにアガロースプレートに各穴に入れ、24時間培養して白血球の遊走を調べた。皮膚反応：感作動物の腹側部にOAの50 μg を皮内投与し、4、24、48および72時間後に皮膚反応を観察した。LPT：感作動物の脾細胞をOAの10および100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とともに66時間培養した。培養終了18時間前に $^3\text{H-TdR}$ の0.5 $\mu\text{Ci}/\text{穴}$ を加え、 $^3\text{H-TdR}$ の取り込みを測定した。

〔成績〕LMT：OA感作脾細胞の培養上清で、白血球遊走阻止率は対照よりも増加した。皮膚反応：OA感作動物の皮膚反応は、投与後24時間をピークとした紅斑と浮腫を主体とする遅延型の反応を示した。一方、対照動物は陰性であった。LPT：OA感作および対照の脾細胞はともに、OA刺激による幼若化反応が認められなかった。

〔結論〕今回の感作条件において、皮膚反応陽性時にLMTで遊走阻止が認められたことから、LMTが *in vitro* 検出法として応用できることが示唆された。

連続回避試験における新指標の導入

小野 哲, 和田 攻*

東京都立立川短大公衆衛生, * 東大医学部衛生

シドマン法の応用範囲を拡大するため、以下の研究を行った。シドマン法にパーソナルコンピュータを導入し、行動制御、行動の記録、行動分析指標の計算を行った。その結果、従来の機器と比較してスキナーボックス当りで考えた場合、安価な装置を導入し得ることになった。さらに、実験から得られる情報量が約2桁増加したため、この増加した情報を利用して新たな行動分析指標を考えることが可能になった。今回新たに用いた分析指標はショック間隔平方和、レバー押し鎖のショック・反応時間について平均値と5秒未満の回数であり、従来の反応率およびショック率を加えて5種類の指標を用いて行動分析を行った。雄性dd系マウスに訓練を行い、訓練に習熟したマウスを用いた。

検討した試料はジアゼパム、食塩、マニトール、低リチウム食などである。ジアゼパム投与の場合、ショック率増加、ショック間隔平方和減少がみられた。食塩投与の場合、反応率やショック率に有意の変化が認められないにもかかわらず、ショック・反応時間の平均値減少、5秒未満の回数増加が観察された。マニトールの場合には反応率増加、ショック間隔平方和増加、ショック・反応時間の平均値増加がみられた。低リチウム食の場合、反応率減少、ショック率増加、ショック間隔平方和減少であった(いずれも $P < 0.05$)。

新指標が反応率やショック率では表現できないレバー押し行動の変化を検出している可能性、および各試料が分析指標に与える変化がそれぞれ異なる点について考察すると共に、新指標導入によるシドマン法の応用方法について考察を加える。

堀 眞一郎、大谷 幸子、田邊 等^{*}、小滝 一^{**}

(財)東京都神経研, 神経生化学,^{*}都立神経病院,

^{**}東大医, 病院薬剤部

[目的] 薬剤の毒性発現に遺伝的素因が関与することは良く知られている。キノホルム(5-chloro-7-iodo-8-hydroxyquinoline, 以下Cfと略す)においてもラットに連続大量投与することにより、歩行障害、四肢の麻痺様症状を呈するものが出現するが、これらの障害の発症過程を、検索する内、Cfの毒性に対し抵抗性の強いラットと弱いラットがいることが分かった。ここではこの抵抗性の強弱の群を遺伝的に純系化できるのか否か、この差が何に依っているのかについて検討した。

[実験方法] 懸濁したCfを生後一日令のWistar系ラットに体重Kg当り240mg皮下投与した。同腹の新生児群の内、雌雄一対を対照とした。Cfの毒性に対する抵抗性の強弱の判定は、投与後7日間のうちに死亡したものを抵抗性の弱いもの、生存したが著しく体重増加の抑制(対照ラットの体重増加に比べ15%以上)されたものを抵抗性の中間のもの、及び体重増加の抑制も軽度もしくは全くなかったものを抵抗性の強いものとした。血漿中のCfとその代謝物のグルクロン酸抱合体と硫酸抱合体、及び組織中のCfはGC/MS法により定量した。血漿及び組織中の過酸化脂質はチオバルビツール法により定量した。

[結果及び考察] 上記の方法により、初代から12代まで継代することにより、Cfの毒性に対して抵抗性の弱い系統及び強い系統を継代化することができることが分かった。血漿、組織中のCf濃度測定により抵抗性の差には解毒機構の差が関与していることが分かった。過酸化脂質の濃度には大差は無かった。これらの結果は薬剤の毒性発現の生化学的機構の研究に有用な毒性に対してより均一な動物群を開発出来ることを示唆している。この種の動物の開発と応用によって、薬剤の安全性の予測もより向上出来るものと思われる。

○ 松永民秀、小林弘枝、渡辺和人、山本郁男*、吉村英敏**

* 北陸大・薬 衛生化学、** 九大・薬 衛生化学裁判化学

[目的] 従来大麻の薬理毒性研究においては、幻覚作用の本体であるtetrahydrocannabinolを中心とするカンナビノイドが注目されているが、含窒素成分にどのような作用があるのか否かの知見はない。そこで今回演者らは、その他の成分として文献既知のp-coumaryltyramine(p-CT)¹⁾の薬理作用-特に中枢作用を中心として検討した。[方法] p-CTは、p-acetoxycinnamic acidをクロル化後、tyramineと反応させる方法で合成した。定量は葉のEtOH抽出物を塩酸酸性下ether抽出し、逆相系ZORBAXカラムを用いたHPLCにより行った。薬理試験は、ddN系雄性マウス(体重23~26g)を用い、p-CTを1%Tween 80-salineに懸濁、中枢作用を直接評価するため188 µg/mouseを脳内投与した。投与後、カタレプシー惹起作用並びに直腸内温度を経時的に測定、pentobarbital(PB)の睡眠作用に及ぼす影響は、p-CT投与200分後にPBの50 mg/kgを腹腔内投与し睡眠時間を測定した。[結果・考察] 葉の抽出物に p-CTに相当するピークが認められ、葉は7 µg/gの p-CTを含有していることが明らかとなった。カタレプシー惹起作用は、p-CT投与160分後から認められ200分後に最大となった。さらに、p-CT投与80分後に対照群と比較し有意な直腸内温度の低下が見られ、投与200分後に最低となった。しかし、PBの睡眠作用には延長傾向を示すものの有意差は認められなかった。以上の結果より、p-CTに中枢作用が認められたが脳内投与にもかかわらずそれらの作用発現はかなり遅いことから、その代謝物が作用本体であることが示唆された。

1) M. A. Elsohly et al., J. Pharm. Sci., 67, 124 (1978).

運動神経伝達物質の放出におよぼす

B-06

サリチル酸ナトリウムの影響

○西村 昌数・栗野 秀人・矢ヶ崎 修

大阪府大・農・家畜薬理

【目的】Sodium salicylate (SSL)にはミトコンドリアにおける酸化的磷酸化を阻害する作用(Brody, 1956), および脂質膜に結合し表面陰電荷を増加させる作用(McLaughlin, 1973)があり, それらは Ca^{2+} の動態に影響し得る. 神経伝達物質の放出は Ca^{2+} に依存する(Katz & Miledi, 1965)が, その供給源は終末内外に求められている. よってSSLが伝達物質の放出を修飾する可能性を調べた.

【方法】生後10-12週令のddY系雄性マウスから左側横隔膜神経筋標本を作成した. 36°C あるいは 24°C で, 95% O_2 , 5% CO_2 を通気した代用液中において, 細胞内電極法により微小終板電位(mepps)および終板電位(epps)を測定した. meppsは Ca^{2+} を含む等張性10mM KCl溶液により促進しその頻度(F, sec^{-1})として, またeppsは5mM あるいは10mM Mg^{2+} 存在下で誘発し素量(m)として示した.

【成績】 36°C で, SSLはmeppsのFを増加させた. この作用は $[\text{Mg}^{2+}]_i$ を増加させても抑制されず, また $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に依存しなかった. 温度を 24°C に下げることによりこの作用は消失した. 以下の実験は全て 24°C で行なった. 脱分極液中でmeppsのFは $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に依存して増加した. SSLはこの $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の作用を促進した. Fの自然対数値 $\ln(F)$ と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の自然対数値 $\ln([\text{Ca}^{2+}]_i)$ の間には直線関係があり, SSLはこの直線を左方に平行移動した. 5mM Mg^{2+} を含む代用液中において, SSLはeppsのmもその濃度に依存して増加させた. mの自然対数値 $\ln(m)$ と $\ln([\text{Ca}^{2+}]_i)$ の間にも直線関係が得られ, SSLはこの直線を左方に平行移動させた. SSLのこの作用は, $[\text{Mg}^{2+}]_i$ を倍加することにより拮抗された.

【結論】SSLは脱分極時に運動神経伝達物質の放出を促進する $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の作用を増強する. その作用機作として, SSLは脱分極時の Ca^{2+} の流入を促進するか, もしくは流入した Ca^{2+} が調節する過程の感受性をSSLが高めることが考えられる. 細胞表面の陰電荷は Ca^{2+} の供給源として寄与している可能性がある.

○長谷川 哲也・栗野 秀人・西村 昌数・矢ヶ崎 修・伊藤 勝昭

大阪府大・農・家畜薬理、*宮崎大・農・家畜薬理

【目的】 veratridine等によりNa⁺透過性を促進した骨格筋のNa⁺-K⁺-ATPaseを阻害すると、筋線維内に蓄積するNa⁺は筋収縮を抑制するという(Nishimura et al., 1989)。しかし、我々は単にNa⁺-K⁺-ATPaseを阻害するだけでは、Na⁺が筋線維内に蓄積するにもかかわらず、筋収縮はむしろ増強することを認めた。これはNa⁺の抑制作用から筋線維を防禦する機構が作動する可能性を示唆している。この可能性を調べるにNa-Ca交換反応は参考になる。本実験では[K⁺]_o除去下の筋収縮、静止膜電位および筋線維内Na含量等を指標として[Ca²⁺]_iの影響を調べた。

【方法】 生後10-12週令のddY系雄性マウスから横隔膜筋標本を作成した。d-tubocurarine (10 μM) 含有代用液中で筋を直接刺激し(0.4 ms, 0.1 Hz)、単収縮を等尺性に記録した。横隔膜筋に各種処理を行ない、筋組織中のNaおよびKを低温リチウム法により測定した。

【成績】 代用液中の[K⁺]_o (5mM) の除去は30-40分の後単収縮を増強した。2.5mM KClの添加はこの単収縮の増強を抑制した。この抑制作用はouabainの存在下で阻止された。[K⁺]_o および[Ca²⁺]_i (2mM) の同時除去は単収縮を持続的に抑制した。この抑制はCaCl₂の添加により解除された。[K⁺]_o と[Ca²⁺]_i の同時除去により静止膜電位は減少し、CaCl₂の添加により回復した。標準代用液および[K⁺]_o 除去代用液に添加したcaffeine (2mM) は単収縮を増強した。その作用は[K⁺]_o と[Ca²⁺]_i の同時除去により消失した。caffeineの作用はCaCl₂の添加により回復した。[K⁺]_o の除去は筋組織中のNaを増加させた。[K⁺]_o と[Ca²⁺]_i の同時除去はNaをさらに増加させた。筋組織中の増加したNaはCaCl₂の添加により減少した。

【結論】 Na⁺-K⁺-ATPase阻害下のマウスの横隔膜筋において、線維内外のNa⁺勾配の維持は部分的に[Ca²⁺]_i に依存する。この依存はNa-Ca交換反応を意味し、筋線維内Na⁺の除去は膜の興奮性を回復させ、加えて交換反応で増加した[Ca²⁺]_i はCa誘発性Ca放出機構を促進する可能性が高い。

A-08 妊娠中単回投与 nimustine あるいは azathioprine
のラット胎仔脳機能への影響

○藤井 儔子、中西 均

帝京大学医学部薬理学教室

藤井は妊娠ラットにアルキル化作用の強いcyclophosphamideを単回投与するのみで神経冠細胞から分化するカルチニン産生細胞の機能低下が第2世代まで引き起こされることを見出した(日薬理学会)。本研究ではnimustine(NMS)、azathioprine(AZP)単回投与の影響を検討した。方法：Wistar-今道ラットの妊娠13~15日(13d~15d)のいずれかの日に1回のみNMS、AZP各3 mg/kg,溶媒(DW,olive油)いずれかを皮下投与しその出生仔の脳機能を評価した。結果：1)13dNMS-F₁群の乳仔期体重はDW-F₁群に比し有意な増加を、AZP群は14d-F₁雌雄と13d-F₁群の一部において有意な減少を示した。2)Open-field テストを15,21日齢において行なった。13d-,14d-AZP-F₁雌雄ともに中央から移動して最初の区画を横切るまでの潜時が長い傾向を示した。21日齢において自然のwet dog shakes(WDS)の頻度が15d-AZP-F₁雄において増加した。Open-fieldテスト中に排尿するラットが多かった。特にNMS-F₁群に高い頻度で認められた。3)kainic acid誘発WDSの頻度(60分間)が13d-,14d-NMS-F₁雌雄ラットおよび15d-NMS-F₁雌ラットにおいて有意に減少した。4)14d-NMS-F₁群の基礎体温が有意に高かった。5)14d-NMS-F₁群の精巣重量は有意に減少し他の13d-,15d-NMS-F₁群の精巣重量も減少傾向を示した。AZP群は15d-F₁において同じく精巣重量減少を示した。結語：抗腫瘍薬、免疫抑制薬のnimustine, azathioprine は妊娠ラットにおいては比較的少量の単回投与を行なっても胎仔脳機能へ影響を及ぼすことが明かとなった。

A-09 2, 4-Dinitrochlorobenzeneの皮膚塗布回数によるアミロイド症の発生と臓器分布の比較

山本博昭、藤代光一

豊河野臨床医学研究所。病理

2, 4-Dinitrochlorobenzene (DN CB) は接触性アレルギー症の実験的モデルとしてモルモットやマウスに塗布感作すると遅延型アレルギーを起こすことができる。

今回我々はこのDN CBを種々のインターバルでマウスの背部皮膚に連続塗布することによりアミロイド症の発生頻度と各臓器への沈着の様相を検討したので報告する。実験構成はI群: DN CBを6ヶ月間連続塗布、II群: 初めの2ヶ月間DN CBを連続塗布後4ヶ月間未塗布、III群: 初めDN CBを3ヶ月間連続塗布後3ヶ月間未塗布、IV群: 初めDN CBを4ヶ月間連続塗布後2ヶ月間未塗布、V群: 溶媒を12ヶ月間連続塗布の合計5群とした。実験動物はNCマウスの10週齢の雌を用いた。各群の動物数は20匹づつとした。DN CBはアセトン: オリーブオイル(4: 1)に0. 2%溶液として、塗布量は0. 03ml / マウスとして1日1回とした。

その結果、皮膚の種々の変化はDN CB塗布群に顕著にみられ、その所見は表皮の肥厚、錯角化、痂皮形成、潰瘍ないしビラン形成、細胞浸潤、壊死等を主とするいわゆる炎症性の変化であった。この変化はI群が最も顕著であり、DN CBの連続塗布は明らかな皮膚炎を惹起することが示唆された。一方、アミロイド症の発生は必ずしもDN CBの塗布回数ないしその量とは相関せずIII群において最も高率にアミロイドの発生をみ、次ぎにIV群、II群、I群、そしてV群の順であった。これらのアミロイドの沈着臓器は心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、膵臓、胃、小腸、大腸、副腎、卵巣、子宮、リンパ腺、皮膚であった。これらの臓器分布もアミロイド症の発生の高率群に相関して多臓器に分布していた。

以上の結果より、DN CBによるアミロイド症の発生は皮膚炎の程度が慢性的に持続している群において最も高率であった。

A-10 ラットにおけるFURTULON, 5-FU, Cyclosporin A,
Ubenimexの免疫毒性学的検討

○川島明, 井上智彰, 千葉章子, 西藤岳彦, 堀井郁夫,
宇高奎二

日本ロシュ研究所 毒性病理部

抗癌剤のFluoropyrimidine誘導体(FURTULON, 5-FU), 免疫抑制剤のCyclosporin(Cs)A, 及び免疫賦活剤のUbenimexをラットに1週間並びに4週間連続経口投与し, 免疫系に対する影響について比較検討した。投与用量は, FURTULON 200~800mg/kg, 5-FU 15~60mg/kg, Cs A 5~45mg/kg, Ubenimex 1~25mg/kgとし, 投与1ないし4週間後に血液学的検査, 免疫学的機能検査(脾細胞のMitogen response, NK活性等), 免疫系臓器の病理組織学的検査(H.E染色, 免疫組織化学)を実施した。

その結果, FURTULON投与により投与1週間後に白血球数, 骨髓有核細胞数, NK活性の低下, 胸腺(皮質及び髓質)の萎縮が認められたが, 投与後4週間後には回復傾向が認められた。5-FU投与でもFURTULONと同様の変化が認められたが, 投与4週間後の胸腺萎縮回復傾向は認められなかった。Cs A投与1及び4週間後には, 脾細胞のMitogen responseの低下, 胸腺髓質の萎縮, さらに4週間後にはNK活性の上昇と脾臓中心動脈周囲鞘の萎縮(特にTs細胞の減少)が認められた。Ubenimex投与1及び4週間後には, 低用量投与でNK活性の上昇が認められた。

以上の成績から, 免疫学的変化が短期間投与で出現し, 長期間投与で回復する可能性があることから, 免疫毒性を評価する際には, 投与期間及び投与用量の選択とともに, 経時的な検索が必要であることが示された。又, 血液学, 形態学的検索に加えて免疫学的機能検査が有用であること, さらに免疫系臓器の免疫組織化学的検索は形態学的変化と機能的変化を結び付けて考察する上で有用であることが示唆された。

F344ラットを用いた N-methyl-N-nitrosourea (MNU)
多重癌モデルにおける Beraprost sodium の修飾作用

田中 光, 倉田 靖, 玉野静光, 萩原昭裕, 福島昭治

名市大・医・第一病理

Beraprost sodiumは、新規プロスタグランディン I₂ 誘導体である。今回、我々の開発したN-Methyl-N-nitrosourea(MNU) ラット多重癌モデルを用い、beraprost sodiumによる修飾作用の有無を検索したので報告する。

動物は、7週齢のF344系雄ラット（日本チャールス・リバー）を230匹用いた。各群を25～30匹に分け、イニシエーターとしてMNU（20mg/kg 体重、週2回、腹腔内投与）を3週間投与した後、次いでberaprost sodiumを6, 2, 0.7および0.2ppmの濃度で飲料水中に混じ、29週間経口投与した。また、陽性対照群として主に造血器系を標的臓器とする発癌物質であるN-Propyl-N-nitrosourea(PNU)を、beraprost sodiumの代わりに飲料水中濃度200ppmで投与し、比較検討した。

その結果、MNU 処置後のberaprost sodium投与の各濃度群では、MNU の標的臓器に種々の腫瘍性病変の発現を認めたが、MNU 単独の対照群に比較してこれらの発生率に有意な差を認めなかった。また、陽性対照のPNU 投与群では舌、前胃、大腸、外耳道腺および神経系の腫瘍にMNU 単独の対照群に比較して統計学的にも有意な発生率の増加がみられ、重複腫瘍数、総腫瘍数および悪性腫瘍数の増加も明らかに認められた。一方、MNU 無処置で6ppmの beraprost sodiumのみを単独投与した群では腫瘍の発生を全く認めなかったのに対し、PNU 単独投与群では少数例に腫瘍の発生を観察した。

以上、beraprost sodiumはラットの種々の臓器の発癌に対して発癌促進作用を示さず、この物質の安全性が明らかとなった。

ビーグルの急性パラコート中毒におけるタウリンの解毒効果

永田良一, 出水千二, 本屋敏郎¹⁾, 山下淳一²⁾, 広兼民徳³⁾,
永田貴久⁴⁾, 澤田祐介³⁾, 福田健夫

鹿児島大学医学部 薬理学, 薬剤部¹⁾, 泌尿器科²⁾, 救急部³⁾,
新日本科学 毒性部⁴⁾

含硫アミノ酸の一つであるタウリンは一般的に解毒作用を有することが知られている。我々は、第6回日本薬理学会総会において、ビーグルの急性パラコート中毒にタウリンが有効であることを発表した。今回の実験では、血液透析 (CHF) を併用することによって、致死量に相当するパラコートを皮下投与したビーグルを救命したので、その結果について報告する。パラコート20mg/kgをビーグルに投与後、5%タウリンあるいは生理食塩液 (対照) を0.85ml/kg/minで橈側皮静脈内に点滴投与した。その2時間後に大腿静脈内へdouble lumenカテーテルを留置し、血液透析を5時間実施した。この間にも5%タウリンまたは生理食塩液の投与は持続した。パラコートの血中濃度は投与1時間および2時間後に測定した結果、それぞれ、対照例で16および7 $\mu\text{g/ml}$ 、5%タウリン例では23および18 $\mu\text{g/ml}$ を示し、5%タウリン例が明らかに高値を示した。これらの結果は血中のパラコートが組織に移行しにくい状態を反映していると考えられた。また、尿量は、対照例で乏尿が認められたのに対して、5%タウリン例では点滴量に相関した尿量が得られた。その後対照例は数日以内に死亡し、病理学的検査で肺の出血と腎臓における尿細管変性が観察された。一方、5%タウリン例は術後順調な回復を示し、正常に復した。この5%タウリン例における臨床検査 (血液、血清、尿)、腎機能 (PSP) および肝機能 (ICG) 検査に異常は認められなかった。また、約1年後に実施した剖検においても異常は観察されなかった。病理組織学的検査については、電顕を含めて精査中である。これらの結果から、ビーグルの急性パラコート中毒に対して、5%タウリン点滴投与とCHFの併用は救命効果があることが示唆された。

A-13 たばこ主流煙および副流煙による肺・肝グルタチオンの
変動とミクロゾーム膜の動的変化

○富田幹雄、藤沢 進、榎本明美、大宮彬男、中井健五

秋田大学医学部薬理学教室

【目的】たばこ煙は、主流煙と副流煙（吸わずにたちのぼる煙）
とに大別され、副流煙の方が共通の有害物質の種類によってはその
濃度が高い。今回、主流煙と副流煙による肺および肝細胞グルタチ
オンの変動とミクロゾーム膜の流動性変化について検討した。

【方法】ラット肺を摘出後、37℃に保温された肺灌流装置にセッ
トし、主流煙または副流煙を 600 ml/min の速度で気管上部に集め
人工呼吸させながら煙を気管内に送り込んだ。対照群には煙を含ま
ない空気を用いた。灌流速度は 20 ml/min、灌流時間は30分とした。
一方、肺および肝のホモジネート（それぞれ2.5, 25 %）を調製し、
主流煙または副流煙をホモジネート中に吹き込んだ。膜流動性は、
膜脂質部位の情報を与える DPH、膜タンパク質部位の情報を与える
FITC および DNS-Cl の蛍光色素を用いて、これら蛍光色素の蛍光
偏光解消から得られた anisotropy を指標とした。

【結果】灌流後の肺組織内グルタチオン濃度は主流煙および副流
煙により対照群に比べて有意に低下し、同時に DPH anisotropy の
上昇から膜脂質部位の流動性低下がみとめられた。また膜タンパク
質部位の流動性は、主流煙では変化がみられなかったが副流煙によ
り顕著に低下した。一方、肺・肝ホモジネートを用いた場合、副流
煙は主流煙に比べてグルタチオンレベルを著しく低下させた。

【結論】副流煙によるグルタチオンレベルの低下が、膜流動性の
低下を引き起こすものと考えられる。

寺本敬子、脇谷扶美子、田中英徳、堀口俊一

大阪市立大学医学部環境衛生学教室

有機溶剤の生体内運命に関する一連の研究で、生体内に存在する有機溶剤はどの程度呼気から排泄されるか明らかにした。有機溶剤は、アセトン、2-プロパノール（IPA）、スチレン、テトラヒドロフラン（THF）の4種を用いた。合成樹脂工業において有機溶剤として繁用されているものを選んで、実験を行なった。実験動物として成熟雄性ラットを用いた。有機溶剤は0.1 ml 腹腔内へ投与した。投与直後ラットをガラス製の固定器にいれ、頸の付近へ空気を毎分200 ml 送入し、鼻先を通過してから外部へ導いた。この排出口から採取した空気を直接GCにて測定した。得られた値を指数関数にあてはめて、減衰定数から各溶剤の呼気からの半減期を求めた。さらに、初期値、減衰速度、投与量、送入空気量などから投与量に対する全排泄量も求めた。その結果、アセトンは投与量の約40%（n=6）が呼気から排泄され、その半減期は約4時間となった。IPAは約2%（n=11）が排泄され、半減期は約40分であった。ところがIPAは生体内でアセトンに変化して呼気中に検出され、減衰様式はアセトン投与の場合と少し異なったが、IPAが呼気から検出されなくなった後は、半減期は5時間となり、アセトン単独投与時とほぼ同じ値を得た。また、IPA投与量の約40%（n=12）がアセトンとして呼気から排泄された。スチレン投与では約10%（n=7）が呼気から排泄され、半減期は約4時間となった。THF投与では約40%（n=12）が呼気から排泄され、半減期は約2時間となった。今回行なった4種の有機溶剤が未変化体で呼気に排泄されたのは多い順にアセトン、THF、スチレン、IPAであった。

酸化エチレン吸入曝露 による赤血球系への影響

○森 見爾、藤代一也、井上尚英

産業医科大学・産業生態科学研究所・環境中毒

酸化エチレン (EO) は、工業原料としてや滅菌剤などとして、広範な用途を持つ代表的なエポキシ化合物である。これまでにEOにより種々の動物に貧血が生じること、また滅菌した対外循環チューブ内で溶血が生じることが報告されている。今回我々は、EOの赤血球系への影響を調べた。

ウィスター系雄性ラット (8週令) に対して、500ppmの濃度のEOを1日6時間、隔日、週3回、13週間の曝露を行い、得た血液について種々の分析を行った。

曝露群では網状赤血球の増加を伴う、大球性正色素性の貧血の出現を認め、溶血機序の存在が考えられた。ヘキソースリン酸側路の酵素であるglucose-6-phosphate dehydrogenase、6-phosphoglucuronate dehydrogenase、およびグルタチオン酸化還元サイクルの酵素であるglutathione reductase、glutathione peroxidaseの活性を測定したところ、glutathione reductase 活性の低下を認めた。またこの活性の低下は還元型グルタチオンの減少およびグルタチオン安定性試験の異常を伴った。その他溶血を来しうる要因について、解糖系の指標としてATP量の測定を、赤血球膜の変性の指標として浸透圧抵抗性試験を、またヘモグロビン変性の指標として熱変性試験とイソプロパノール沈殿試験を行ったが、いずれも変化を来さなかった。以上より、EOによる貧血の機序として、glutathione reductase活性の低下が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

酸化エチレン吸入曝露による

肝シトクロームP-450減少とポルフィリン尿症

○藤代一也、森 晃爾、井上尚英

産業医科大学・産業生態科学研究所・環境中毒

＜目的＞酸化エチレン（EO）は強力な殺菌作用を有し、医療器材の滅菌作業などのガス殺菌剤として広範に使用されている。しかし最近、EOの慢性（亜急性）毒性として末梢神経障害が報告されにわかに注目されている。我々はラットにこのEO500ppmを間歇的に3ヵ月間曝露し、実験的にもヒトと同様の末梢神経障害を作ること初めて成功し、報告したが、さらに我々はこの実験系において肝シトクロームP-450の減少とポルフィリン尿症を呈することを確認したので、曝露期間中のそれらの変化を主体に報告する。

＜方法＞8～9週令のウイスター系雄性ラットに500ppmのEOを1日6時間、隔日週3回、13週間の吸入曝露を行った。対照群には空気を吸入させ食餌量も等量とした。飲水は自由にとらせ、尿は遮光、氷冷下で各群の24時間尿を採取し、尿中コプロフィリンと尿中δ-アミノレブリン酸、尿中クレアチニンの測定に供した。ラットは最終曝露終了40時間後にエーテル麻酔下に屠殺し肝の各分画を定法により得、肝ミクロソーム中のP-450、b₅、プロトヘム量や各種ポルフィリン-ヘム代謝系酵素の活性値を得た。

＜結果＞EO曝露群は曝露開始6週間後頃より失調性歩行を呈した。肝ミクロソームP-450量は2週間後までtime dependentに減少し、以後13週まで約30%の減少を維持した。プロトヘムも同様に動きを示し約20%の減少をみたがb₅量は変化しなかった。尿中コプロポルフィリンは曝露開始後より徐々に増加し2週間後より対照群と有意差を示したが、尿中δ-アミノレブリン酸は有意には変化しなかった。

A-17 オカダ酸とカリクリンA：海産毒由来の
フォスファターゼ阻害剤

唐木英明、石原宏朗、堀正敏、佐藤晃一、尾崎博、渡部終五、
加藤裕子、伏谷伸宏、橋本周久、上村大輔、D.J.Hartshorne
東京大学農学部、静岡大学教養部、アリゾナ大学筋生理学

平滑筋の収縮はカルシウムとカルモジュリンによりミオシン軽鎖キナーゼが活性化され、ミオシン軽鎖が燐酸化されることにより起こり、フォスファターゼによりその脱燐酸化が起こると弛緩する。燐酸化の機構については比較的詳細に知られているのに対して、脱燐酸化の詳細についてはほとんど知られていない。最近我々は海綿から分離したオカダ酸(OA)とカリクリンA(CLA)がフォスファターゼの阻害作用を有することを見出し、その性質を利用してこの問題の検討を行なった。

平滑筋のミオシン軽鎖を燐酸化し、ここに精製した1型および2A型フォスファターゼを加えると脱燐酸化が起こった。この反応はOAおよびCLAにより抑制された。1型に対する50%抑制濃度はCLAが約2nM、OAが数百nMであり、2A型に対するそれはCLA、OAともに約1nMであった。しかし、OAとCLAは酸およびアルカリフォスファターゼ活性は阻害しなかった。つぎに燐酸化したミオシン軽鎖に平滑筋天然アクトミオシン(ミオシンB)から部分精製したフォスファターゼを加えたところ脱燐酸化が起こり、この反応をOAとCLAはともに抑制した。その50%抑制濃度はOAが20nM、CLAが0.3nMであった。摘出平滑筋およびスキンドファイバー標本においてCLAはOAより低濃度でCa非依存性の収縮を起こした。

以上の成績から、平滑筋の弛緩に関与するフォスファターゼは1型であろうと考えられた。

A-18 ラット多重癌モデルによる発癌促進ないし抑制作用の
解析

山口修司、長谷川良平、小木曾 正、七野 裕、
福島昭治、伊東信行

名市大・医・第一病理

複数臓器に標的性をもつ3種類の発癌物質を短期間に連続して投与（多臓器イニシエーション）した後に種々の被験物質を与え、全身諸臓器の腫瘍性病変発生に対する修飾効果を検討した。

6週齢F344雄ラット314匹を用い、多臓器イニシエーション処置としてDEN(100mg/kg b.w.)を1回、その2日後よりMNU(20mg/kg b.w.)を3日間隔で4回、それぞれ腹腔内投与し、次いで0.1% DHPN含有飲料水を2週間投与した。その後、被験物質として2-AAF(0.01%)、3'-Me-DAB(0.06%)、PB(0.05%)、DL-ethionine(0.25%)、DDPM(0.1%)、clofibrate(1%)、B(a)P(0.02%)、3-MC(0.02%)、DMBA(0.01%)、BHA(1%)、catechol(0.8%)およびcaprolactam(1%)を飼料中に、またBBN(0.1%)、MNNG(0.005%)を飲料水中に混合してそれぞれ16週間与えた。全経過20週で屠殺し、全身諸臓器の腫瘍性変化を病理組織学的に検索した。

その結果、発癌性あるいは発癌修飾作用が明らかな物質を投与した群では、肝、肺、甲状腺、前胃、腺胃、膀胱のいずれかの部位において腫瘍性病変の発生がイニシエーションのみの対照群に対して有意に上昇した。一方、被験物質によっては腫瘍性病変の発生に抑制的に作用する場合が認められた。なお非発癌物質のcaprolactamは何らの影響も及ぼさなかった。

以上、複数の発癌物質の組み合わせ投与による多重癌モデルを用いることにより、一動物レベルで種々の臓器に対する化学物質の発癌ないし発癌修飾作用を比較的短期間に検出し得ることが明らかとなった。

アントラキノ系かび毒ルテオスカイリンによる
8-ヒドロシキデオキシグアノシンの生成

○宮坂直樹、山口宏明、加藤珠実、上野芳夫

東京理科大学薬学部毒性学、微生物化学教室

(目的)真菌 Penicillium islandicum Soppの生成する luteoskyrin(LS)は bis-anthraquinone系マイコトキシンで、肝発癌性を有する。しかし、Amesテストなど諸種変異原試験で陰性であった。そこで、アントラキノンであるLSの酸素ラジカル生成の可能性に着目し、マウスおよび培養細胞を用い、酸素ラジカルを介するDNA修飾反応の一指標である8-hydroxydeoxyguanosine(8-OH-dG)を測定し、その発癌機構の解明を試みた。

(結果および考察)①6週令の雄性ddYマウスに、50, 75, または100mg/kgのLSを経口投与し、肝および腎DNAの8-OH-dG量をHPLC-ECDで測定した。その結果、8-OH-dG生成量は投与1~3日まで経時的に増加し、5日後で減少する傾向が見られた。

②LSで処理したBalb3T3細胞のDNAにおいて、8-OH-dG量は増加の傾向を認め、その増加は濃度・時間依存的であった。

③Balb3T3細胞に対するLSの細胞毒性は、 α -tocopherolにより濃度依存的に抑制された。

LS処理により、マウスの肝、腎および培養細胞DNAの8-OH-dG量が増加の傾向が示され、LSの発癌性が酸素ラジカル発生に起因する可能性が示唆された。また、LSの細胞毒性は脂質過酸化反応の抑制能を有する α -tocopherolにより抑制されることから、LSが活性酸素を産出し、細胞膜の脂質を過酸化して細胞毒性を発現している可能性が考えられた。

A-20 プロカインアミドによる薬剤性ループス発現の検討
—マウスのリンパ球機能に及ぼす影響—

○小島弘幸、服部浩之、山口文恵、俵克彦

第一製薬（株） 中央研究所

ヒドララジンやプロカインアミド (PA) など、ある種の薬剤を長期服用すると、抗核抗体 (ANA) 産生を伴った全身性エリテマトーデス様症状を発現することが知られている。我々は、PA を BALB/c 系マウス (♀) 7 週齢より投与したところ、投与 8 週目で血中 ANA の有意な上昇を認めた。そこで、血中 ANA の上昇したマウス脾細胞について幼若化反応および *in vitro* 抗体産生能を血中 ANA の上昇が認められなかったマウスと比較したところ、LPS 刺激による幼若化反応および自発的な抗体産生を亢進し、B cell の活性化を認めた。そこで、PA の免疫系への作用を BALB/c 系正常マウス脾細胞を用いて *in vitro* で検討した。その結果、1) PA $2.5 \times 10^{-4} \text{M}$ 存在下で、PHA および LPS 刺激による幼若化反応は、亢進した。2) PA $2.5 \times 10^{-5} \text{M}$ 存在下、PWM 刺激による抗体産生は、亢進した。3) PA は、PWM 刺激による抗体産生において、Con A による Suppressor T cell (Ts) の誘導には影響を与えなかった。4) PA 代謝物 N-アセチルプロカインアミド (NAPA) は幼若化反応および抗体産生能に何ら影響を与えなかった。

以上の結果より、PA 投与マウスにおける血中 ANA 上昇は、PA による B cell の活性化に伴う抗体産生能の亢進に基づくものと推察された。また、B cell の活性化は、Ts への作用が認められなかったことより、抗体産生を補助する T cell の活性化を介したものと考えられた。一方、NAPA が免疫系への作用を持たないことより、PA 代謝活性の低いときに、PA によるループスが発現し易いという可能性が考えられた。

A-21 腎毒性発現における細胞内カルシウムイオンと
ATP代謝の関連性

鄭 圭銘、 V. Chatsudthipong、 遠藤 仁

東京大学医学部第二薬理学

腎臓は代謝産物の排泄、電解質と体液の恒常性維持のため高い能動輸送機能をもっている。これにはenergy供給源としてATPを利用する。従って腎毒性発現時の細胞内ATP含量の測定は毒性の定量評価としてよい指標と考えられる。他方、毒性発現時には細胞内カルシウムイオンが上昇することは良く知られた事実である。そこで今回、細胞内カルシウムイオンの増加がATP代謝回転に及ぼす影響を単離ネフロン分節を用いて検討した。雄性ラット腎をcollagenaseで溶出し、近位直尿細管(S₂)、髓質部太いヘンレの上行脚(MTAL)、髓質部集合管(MCT)などのネフロン構成成分節を単離した。各分節を37°Cあるいは25°Cで各種条件下に一定時間反応させた後、細胞内ATP含量をchemiluminescence法によって測定した。各分節においてカルシウムionophoreのionomycin(10⁻⁷、10⁻⁶M)は細胞内ATP含量を有意に低下させた(p<0.05、p<0.01)。この反応性はS₂>MTAL>MCTの順序でカルシウムイオン負荷による細胞毒性発現に明確なネフロン内不均一性を示した。3分節でのionomycinによる細胞内カルシウムイオンの増加に続くATP含量の低下は細胞内プロトンポンプ抑制薬のoligomycin(0.5ug/ml)あるいはNaポンプ抑制薬のouabain(1mM)により部分的に回復されたが、oligomycinとouabain両者の存在でS₂とMTALで完全に抑制された。これらの結果から、細胞内カルシウムイオンの増加は細胞内ATP含量を低下させ、この上昇したカルシウムイオンのATPによるsequestration mechanismは各ネフロン分節によって異なることが細胞毒性の発現に関連するものと考えられる。

一般演題

(ポスター)

C-01 ジエチレングリコールモノメチルエーテル、エチレングリコールモノメチルエーテルの臓器重量および薬物代謝酵素に及ぼす影響

川本俊弘、児玉 泰

産業医大 衛生

Glycol ethers には、男性生殖器障害、催奇形性、血液障害等の毒性が報告されているが、それらの毒性の強さは誘導体により異なることが知られている。そこで今回は、多方面にわたり使用されているジエチレングリコールモノメチルエーテル (diEGME) とエチレングリコールモノメチルエーテル (EGME) のふたつの glycol ethers について、各臓器に及ぼす毒性および薬物代謝酵素に及ぼす影響について検討した。

DiEGME, EGME 投与により体重増加が抑制され、胸腺および睪丸の著しい萎縮がみられた。睪丸よりも胸腺重量が早期に減少し、その減少率も大きかった。これらの変化には、量-反応関係が認められた。いずれの場合も EGME の方が diEGME よりも毒性が大きかった。組織学的には、胸腺では皮質のリンパ球が著しく減少し、睪丸では精子形成が抑えられていた。

肝のミクロゾーム酸化酵素に及ぼす影響として、diEGME による cytochrome P-450, cytochrome b₅ の誘導がみられた。EGME 投与群では cytochrome P-450, cytochrome b₅ に変化はなかったが、NADPH-cytochrome c reductase の活性が低下していた。逆に EGME は、サイトゾールのアルコール脱水素酵素およびミクロゾームの r-GTP の活性を上昇させた。以上のことから、DiEGME と EGME では代謝経路に違いがあることが推測された。

プレドニゾロン単回投与による肝の経時変化について

岡崎修三, 星谷 達, 堀口浩資, 宮岸昌子, 高山和久, 沼田弘明

(株)ボゾリサーチセンター 御殿場研究所

第15回の本学会において、プレドニゾロンを反復投与（2週間）することにより、肝ミトコンドリアの大型化と数の減少および肝ミトコンドリア分画におけるチトクロムたん白質量に変化が起ることを報告した。今回、プレドニゾロンの単回投与による肝の変化を経時的に検索したので報告する。プレドニゾロン 200mg/kg をSD系雄性ラット（6週令）の皮下に単回投与し、投与後1, 3, 5, 7および14日目に（約16時間絶食後）屠殺し、コルチコステロンとプレドニゾロンの血中濃度の測定、肝の光顕および電顕的検索と若干の臨床検査を行った。

プレドニゾロンの血中濃度は3日目まで漸減し、5日目以降は検出レベル以下となった。一方コルチコステロンの血中濃度は1日目で全例検出レベル以下の値であったが、その後上昇する傾向を示した。また、末梢血リンパ球数の減少、分節核好中球数の増加のピークは5日目であった。光顕的にみられた変化はグリコーゲンの蓄積であった。この変化は、1日目の小葉周辺帯に始まり、3日目の小葉周辺帯で高度、中心帯で中等度となり、これをピークとして以降は両部位とも漸減傾向を示した。肝重量および血糖値の変化も3日目にピークがみられ、光顕でのグリコーゲン蓄積との関連性がみられた。電顕的には、3日目頃より小葉周辺帯においてミトコンドリアの融合像が散見されはじめ、大きさが増す傾向を示し、7日目頃に大型化が顕著となった。一方小葉中心帯でのミトコンドリアの変化は周辺帯の変化に遅れて発現し、その変化の度合もより軽度なものとどまった。

川島邦夫, 田中 悟, 中浦横介, 高仲 正; S. Djajalaksana¹,
黄 芒莉²

国立衛生試験所安全性生物試験研究センター薬理部,
National Quality Control Laboratory of Drug and
Food (Indonesia)¹, 中国湖北省薬物検査所薬理部²

ほとんどの経口避妊剤は黄体ホルモン剤と卵胞ホルモン剤の配合剤である。経口避妊剤に含有される卵胞ホルモン剤には、黄体ホルモン剤と同様に男性化作用を有するものがあるので、男性化作用に関する黄体ホルモン剤と卵胞ホルモン剤の併用効果について解析を行っている。本実験では Norethynodrel (N), Mestranol (M) 及び N と M の配合剤 (N+M, 98.5%+1.5%) を用い、黄体ホルモン剤の男性化作用に対する卵胞ホルモン剤の影響を、ラット雌胎仔の泌尿生殖器中隔 (UVS) の短縮を指標にして調べた。

Wistar系ラットを同居させ、翌朝腔垢中に精子が認められたラットを実験に用い、この日を妊娠 0 日として妊娠日齢を起算した。N, M 及び N+M はそれぞれ 0.5ml のオリーブ油に溶解し、妊娠 16~19 日までの 4 日間母ラットに経口投与した。妊娠 20 日目に胎仔を摘出し、雌胎仔の連続矢状断切片を作り、1mm を 20 等分したマイクロメータを組み込んだ実体顕微鏡下を用いて UVS の長さを計測した。

N, M 及び N+M のいずれの投与によっても UVS の短縮 (男性化) が観察された。男性化の程度は N+M が最も強くついで M, N の順であった。いずれの薬物とも対数用量に対する反応回帰に直線性が認められ、N 及び N+M の反応回帰直線の間には平行性が成立した。N に対する N+M の相対効力は 1.404 (信頼限界 0.990~1.990) であり、M の添加により N の男性化作用が増強された。この増強作用は相加作用であった。

この成績は、卵胞ホルモン剤が経口避妊剤に使用されている黄体ホルモン剤の男性化作用を増強することを示唆している。

セファロリジンによる腎毒性発現機序：特にグルタチオン酸化還元系の変動について

東日本学園大学 薬学部 毒理学講座

0 鈴木義裕 漆原篤 須藤純一 田辺恒義

【目的】 先に我々は、セファロリジン（以下 CER と略）によって起こる腎障害が過酸化脂質の増加と酸素ラジカル生成系の亢進及び消去系の低下に起因していることを報告した。今回、我々は CER による腎障害のメカニズムをさらに解明するために酸化的損傷から細胞を保護するグルタチオン（以下 GSH と略）とその酸化還元サイクルの変動について検討した。

【方法】 雄性ウイスター系ラットに CER 100 mg/kg および 1,000 mg/kg を単回尾静脈内投与し、0-15 日後に腎臓を採取し、過酸化脂質量とグルタチオンの酸化還元に関与する基質と酵素について、その量及び活性を測定した。

【結果と考察】 CER 1,000 mg/kg 投与群において、投与後 3 時間以内に腎臓内過酸化脂質、酸化型 GSH、NADPH 及び NADP 量の有意な増加と還元型 GSH 量、GSH リダクターゼ活性の減少が観察された。投与 12 時間以降では過酸化脂質量、還元型 GSH 量およびグルコース-6-リン酸 デヒドロゲナーゼ活性の明かな増加と GSH ペルオキシダーゼ、GSH リダクターゼ活性の低下が観察された。CER 100 mg/kg 投与群では、投与後 6 時間においてのみ、過酸化脂質の増加と GSH ペルオキシダーゼ活性の低下が観察されたが、その他のパラメーターには変化は認められなかった。これらの結果から、CER 投与により、初期には GSH リダクターゼ活性の低下に起因した腎臓内還元型 GSH 含量の減少が酸素ラジカルによる腎障害を引き起こす原因の一つとして考えられた。一方後期では、腎臓内に還元型 GSH 含量の蓄積が観察されたことから、腎障害を悪化させる一因として GSH ペルオキシダーゼ活性の低下によって起こる GSH 利用率の低下が推察された。

東日本学園大学 薬学部 毒理学講座

〇 林泰司、 須藤純一、 田辺恒義

〔目的〕 セファロリジン (CER) 1 g/kg 体重を 2 種類の濃度で静脈内に投与して、CER による腎毒性に対する投与時の液量と濃度の影響について検討した。

〔方法〕 雄性ウイスター系ラットに生理食塩水に溶解した CER を総投与量として 1 g/kg とするために、4 %溶液は 25 ml/kg 及び 25 %溶液は 4 ml/kg を単回静脈内投与した。対照群には生理食塩水をそれぞれ同量投与した。投与後、経時的に血中及び尿中の CER、ナトリウム、カリウム及びクロール量、尿中グルコース及び尿量、腎組織中 CER 量を測定した。

〔結果〕 尿量は各々の対照群と比較して CER 投与群が投与 1-5 日後で明らかに増加したが、4 %と 25 % CER 投与群間での差は認められなかった。近位尿管障害障害の指標としての尿中グルコース量は、尿量変化と同様に投与 1-5 日後に両 CER 投与群で排泄量の増加が観察され、特に、投与 2 日後に最も多く認められた。しかしながら、25 %投与群より、4 %投与群の方が排泄量は少なかった。投与 2 時間後での尿中イオン及び CER排泄量を 両 CER 投与群で比較すると CER、ナトリウム、カリウム及び尿量には差は認められず、クロールについてのみ 4 %投与群で多く観察された。血中ナトリウム、カリウム、クロール及び CER 量は両 CER 投与群の間に差は認められなかった。腎組織中 CER 量は 25 %投与群より 4 %投与群の方が減少していた。

〔考察〕 CER を腎組織中に取り込むために必要なナトリウムは腎組織中にクロールを取り込むために消費されるものと考えられた。従って、CER の腎毒性を生理食塩水が減弱させるのはクロールの過剰負荷によるものと推察された。

C-06 2-(4-Morpholiniothio)benzothiazole (2-MTBT)のマウス
における毒性について

○鎌田栄一、鈴木幸子、小川幸男、安原加寿雄

金子豊蔵、黒川雄二、戸部満寿夫

国立衛生試験所 安全性生物試験研究センター 毒性部

スルフェンアミド系化合物で、合成ゴムの遅効性加硫促進剤として用いられている2-(4-Morpholiniothio)benzothiazole (2-MTBT)のSlc:ddYマウスによる毒性試験を行なったので報告する。

雌雄各群10匹に、1回強制経口投与した時のLD₅₀値は、雄 3.15 g/kg、雌 3.00 g/kgであった。

雌雄各群15匹に、2-MTBTを0.012、0.046 および0.75W/W%含む添加飼料を3ヶ月間投与した亜急性試験では、0.75 %群の雌雄に軽度の体重増加抑制、GPT および腎臓重量の軽度の増加が認められた。

雌雄各群50匹に、2-MTBTを0.01、0.10 および1.00W/W%含む添加飼料を21ヶ月間投与した慢性毒性・発癌性試験では、1.00 W/W%群の雌雄に体重増加抑制が認められたが、亜急性毒性試験で認められたGPTや腎臓重量の増加は認められなかった。さらに、組織学的検査でも、肝臓および腎臓の明確な障害を示唆する所見は見られなかった。また、腫瘍発生に関しても、用量に依存する腫瘍の発生あるいは臓器特異性を示す所見は認められなかった。

更に、雌雄各群50匹に、10 W/W%オリーブ油懸濁液を21ヶ月間経皮塗布した発癌性試験でも、体重、血液学的検査、臓器重量および組織学的検査結果で、2-MTBTに起因する変化は認められなかった。

以上のように、2-MTBT投与によりマウスの肝臓および腎臓に極く軽度の障害を示唆する所見が亜急性毒性試験の結果より得られたが、慢性毒性試験では、それらの障害を示唆する所見は得られなかった。また、発癌性を示唆する所見も認められなかった。

C-07 2-Mercaptobenzothiazole(MBT)のマウスにおける
毒性について

○小川幸男，鎌田栄一，鈴木幸子，梅村隆志
齊藤 実，金子豊蔵，黒川雄二，戸部満寿夫
国立衛生試験所 安全性生物試験研究センター 毒性部

2-Mercaptobenzothiazoleはチアゾール系有機ゴム加硫促進剤として用いられ、またスルフェンアミド系の有機ゴム加硫促進剤及び殺菌剤の原料である。このMBTのマウスを用いた急性及び慢性毒性試験を行ったので報告する。

5週齢のSlc:ddYマウスを用い、急性毒性試験では雌雄の各群10匹に5%アラビアゴム溶液及びオリーブ油に各々MBTを20%で懸濁し1回強制経口投与し、溶媒の違いによる急性毒性を比較した。慢性毒性試験では雌雄各群30匹(対照群のみ60匹)とし、MBTを30, 120, 480, 1920 及び0(対照群) ppmの濃度で飼料中に添加し、20か月間自由に摂取させた。6および12か月目に対照群10匹、投与群5匹、20か月目には生存する全動物を屠殺し、血液学的検査、血清生化学的検査、病理学的検査を実施した。

急性毒性試験の結果LD₅₀値は、オリーブ油の雄で3140 mg/kg、雌で3080 mg/kg、アラビアゴムの雄で1558 mg/kg、雌で1490 mg/kgであった。

一方、慢性毒性試験では、雄の1920 ppm群で体重増加抑制が認められた他には、血液学的、血清生化学的及び病理学的検査でMBTによると思われる大きな変化は認められなかった。

○落合敏秋¹⁾、松本清司¹⁾、関田清司¹⁾、降矢 強¹⁾、黒川雄二¹⁾
 戸部満寿夫¹⁾、太田 洋²⁾、菅沢淳一³⁾

1)国立衛試・毒性 2)富山医薬大・薬作 3)日獣大・薬理

骨髓毒性を調べる一手段として、有核細胞数及び細胞分別の測定があるが、この検査では骨髓の一部を占める赤血球の情報を含まないで、骨髓の全体像を把握しにくい側面がある。今回、骨髓の基礎的検討として有核細胞に関する検査結果に赤血球数を反映させること、並びに骨髓細胞分別の自動化を目的とした。

実験方法 動物：Slc:ddY系雄マウス(SPF)、体重、40～50g。薬物及び投与：Phenylhydrazine(PHZ;和光純薬)60mg/kgを3日間経口投与、顆粒球増殖因子(G-CSF;中外製薬より分与)10 μ g/kgを8日間皮下投与、5-Fluorouracil(FU;半井化学)60mg/kgを4日間皮下投与した後、大腿骨骨髓を検索した。骨髓検査：骨髓細胞数及び粒度分布については、Sysmex E4000型のWBC感度を調節し、360fl.まで分布を示せるようにした後計測した。骨髓細胞分別については松本の方法¹⁾により、また同一標本について有核細胞と赤血球の比を求めた。

結果及び考察 塗抹面上の各骨髓細胞の直径を考慮し、赤血球(RBC)の体積を1、同様に多染性赤芽球とリンパ球を2、後骨髓球以後の顆粒球を4、幼若球を含めたその他の細胞を6とし、赤血球を含む骨髓全体をRBC数(総骨髓体積)として表現すると、無処置動物のそれは5200 $\times 10^4$ RBC/大腿骨で、薬物投与においてもFUを除きほぼ一致した。一方、骨髓細胞の粒度分布については、各薬物投与における特異的な細胞分布パターンを示すことが出来た。

以上の如く、骨髓検査結果に赤血球を加味することにより、従来法に比べ骨髓の全体像をより詳しく示し得たと共に、骨髓細胞の粒度分布曲線測定によりスクリーニングとしての骨髓細胞分別の自動化の可能性が示唆された。

¹⁾ Exp. Anim. vol.33, 339 (1984)

阿部俊一、池田陽一、瀬戸淳、石塚寿正、小柴博、
鍵谷昌男

㈱ミドリ十字 安全性研究所

医薬品の安全性評価のための毒性試験用大動物として、最近カニクイザルが多く用いられている。しかし、生理学的、血液学的検査等については多く実施され、その結果が報告されているが、凝固線溶系検査値の報告は少なく、また正常値範囲も明確ではない。我々は過去3年間に実施した毒性試験における凝固線溶系検査のコントロールデータを解析し、諸検査値の変動、他施設の結果との比較、他動物（ラット、ウサギ、イヌ等）の検査値との比較および測定上の問題点等について興味ある知見を得たので報告する。

〔方法〕2～4年齢のフィリピン産カニクイザル (*Macaca fascicularis*) ♂62頭（体重1.7-2.7kg）、♀24頭（体重1.8-2.3kg）を用いて、プロトロンビン時間（PT）、活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）、フィブリノーゲン量（FIB）およびユーグロブリン溶解時間（ELT）を常法に従い測定した。

〔結果〕①各検査値（平均±S.D.）とその分布は、PT (sec.) ; ♂ 11.0 ± 0.5 (10.1 ~ 12.6) ♀ 10.7 ± 0.6 (9.5 ~ 11.6)、APTT (sec.) ; ♂ 22.8 ± 3.3 (17.3 ~ 30.1) ♀ 22.8 ± 1.6 (19.9 ~ 27.5)、FIB (mg/dl) ; ♂ 148 ± 30 (87 ~ 246) ♀ 177 ± 33 (109 ~ 249)、ELT (min.) ; ♂ 90 ± 31 (47 ~ 230) ♀ 109 ± 27 (80 ~ 179)であり、性差は特にみられなかった。②他動物と比較して、ヒトの臨床検査値に近似していた。③検査値の個体内の変動要因として、動物の一般状態（ストレスの有無）、採血条件等が考えられた。なお、プラスミノーゲン、 α_2 -プラスミンインヒビター等の値についても併せて報告する。

血小板凝集能におよぼす溶媒の影響

鈴木修三¹⁾, 森洋子¹⁾, 平田真理子¹⁾, 島田瞭²⁾, 谷本義文¹⁾

実中研・前臨床医学研究所 1)血液化学部, 2)薬理部

目的: 薬物による細胞や組織への直接作用を検索するための *in vitro* の試験系では, 薬物を適当な溶媒に溶解することが必要である。

今回, ラットおよびウサギ血小板を用いて各種溶媒の血小板凝集能におよぼす影響を検討した。

方法: ラット (7~15週齢) およびウサギ (14~16週齢) から採血, 分離して得られた多血小板血漿 (PRP) を実験に供した。血小板凝集惹起物質にはADPおよびコラーゲンを用い, 自動血小板凝集計による凝集能および凝集パターンの解析を行った。検討した溶媒は N,N-Dimethylacetamide (DMA), Dimethyl Sulfoxide (DMSO), Ethanol (Et) およびPolyethylene Glycol #400 (Poly E) の4種類であった。

結果および考察: ラットおよびウサギ血小板凝集能に対し, 各溶媒とも抑制作用が観察された。しかしその程度には大きな差が認められ, 最大凝集能に対する50%抑制濃度 (IC50) を比較するとADP, コラーゲン凝集ともに DMA > Et > DMSO > Poly E の順に強い凝集抑制を示した。また, 溶媒により凝集抑制の様相は異なっており, ラット血小板ではEtによる強い抑制作用がみられるとともに, ラット, ウサギ血小板ともADP凝集に比べてコラーゲン凝集でEtの抑制はより強く認められた。

これら溶媒の作用は基本的には凝集惹起物質による血小板膜を介する凝集反応を抑制した結果と考えられるが, 各種溶媒による凝集抑制機序にはそれぞれ差異があると考えられた。

C-11 市販培地あるいは緩衝液を用いた培養による
ラット単離肝細胞の微細形態学的変化

藤村久子¹、佐々木博之²、鈴木昭男²、
永田貴久³、永田良一³

¹新日本科学・東京病理センター、²同・毒性部
³慈恵医大・医科研・微細形態

浮遊系単離肝細胞（IHC）は種々の分野で用いられているが、これを有効に用いるためには高生存率に加え正常肝細胞に近い代謝活性および微細形態をそなえていることが重要である。しかし、現在広く用いられている単離および培養方法ではIHCに傷害や変性がみられることが多くそれらの改良が必要であると思われる。今回、基礎実験の一つとして市販の無血清培地（GIT、日本製薬）と Krebs-Henseleit緩衝液（K-H buffer）を用いてIHCをいくつかの条件で培養し形態学的変化を比較検討した。（方法）動物はSD系ラットを用いコラゲナーゼ灌流によりえたIHCをGITあるいはK-H bufferで培養し、また気相条件を酸素95%二酸化炭素5%あるいは空気95%二酸化炭素5%に設定した。1, 3, 5, 10時間後に1.2%グルタルアルデヒドにて浸漬固定し、常法に従って電顕用試料を、一部はSEM用試料を作製した。（結果）気相条件による明確な形態学的差異は認められなかった。単離直後のIHCは多面体を呈し、TEM像は肝細胞に特徴的な形態を示していた。K-H buffer、GITとも培養1時間後のIHCは丸みをおび、3および5時間後にはほぼ球形となり各細胞内小器官は良好に保たれていた。10時間後には数個から数十個のIHCから成る細胞魂を作り、細胞間に接着装置と微絨毛様突起がみられ、毛細胆管様の構造を形成していた。一方、培養10時間までの間に細胞表面に多くのblebを有するIHCが出現し、その細胞内小器官は核の周囲に凝集し、bleb内にはsER、ミトコンドリア、ゴルジ装置などが含まれていた。ただしGITで培養した場合、blebを形成しているIHCはK-H bufferに比して少なく、また細胞質のグリコーゲン顆粒が経時的に増加してきた。

C-12 ラット胎芽培養法のin vitro催奇形性試験法としての有用性(1) サリチル酸ナトリウムのin vitro及びin vivo胎芽の発育への影響

○中浦 慎介, 田中 悟, 川島邦夫, 高仲 正
S. Djajalaksana¹, 黄 芒莉², 李 由美³

国立衛試・安全センター・薬理,¹National Quality Control Laboratory of Drug and Food, Indonesia, ²中華人民共和国湖北省薬物試験所,³大韓民国国立保健安全研究院

現行の動物を用いる催奇形性試験法は、ヒトに対する影響を予測するものとして、確立された試験法であるが、広い施設と多数の動物を必要とするうえに、多大な労力と時間を費やすことなどから、さらに簡便で能率的な試験法の開発が望まれる。今回、ラット胎芽培養法のin vitro催奇形性試験としての有用性を調べるために、サリチル酸ナトリウム(Na・S)のin vitro及びin vivo胎芽の発育への影響を比較検討した。

〔実験方法〕in vitro実験は、胎齢9.5日胎芽をNa・S(0、50、100、200及び400 µg/ml)を添加した血清中で48時間培養し、発育及び形態について調べた。in vivo実験は、妊娠9日～11日まで3日間、Na・S(0、75、150及び300mg/kg)を母ラットに経口投与し、最終投与3時間後に摘出した胎芽の発育及び形態について調べた。

〔実験結果〕in vitro実験では、卵黄嚢径、頭臀長、体節数及び蛋白量はNa・Sの濃度に依存した低下を認めた。形態異常の発生率は濃度に依存した増加を認めた。形態異常は菱脳部薄層化膨隆、終脳部の出血、神経管の閉鎖不全、体節の形成不全等が観察された。in vivo実験でも、Na・Sの用量に依存した卵黄嚢径、頭臀長、体節数、蛋白量の低下および形態異常の発生率の増加を認めた。形態異常はin vitro実験で観察された異常と同様であった。

〔結論〕Na・Sのin vitro胎芽の発育及び形態に及ぼす影響はin vivoの結果を反映し、ラット胎芽培養法はin vitroで簡便に催奇形性を予測しうる有用な試験法と考える。

C-13 全胚培養法を用いたメトトレキサートの
臓器毒性作用の解析

○秋田正治、横山 篤、江藤一洋

東京医科歯科大学・歯・顎研発生

【目的】代謝拮抗剤であるメトトレキサート（MTX）は、肝および腎毒性ならびに、胎仔奇形や胎仔死亡などが認められている。今回我々は、マウス胎仔に対するMTXの臓器毒性作用について、全胚培養法を用いて解析を試みたので報告する。

【実験方法】胎齢11日目のICR系マウスの胎仔を回転型培養装置を用い、24時間培養を行った。MTXの処理は5、10、50、250、500、1000ug/mlを培養液中に添加した。臓器毒性の指標としては、培養液中のクレアチニン含量を、Folin-Wu法を用いて測定し比較した。また培養終了後の胎仔の肝及び腎を、組織学的に検索した。

【結果および考察】①培養時の胎仔観察結果：培養中の胎仔心拍動数は、MTX処理6群間で差は認められなかった。胎仔および卵黄囊の血液循環は、MTX 1000ug/ml 処理群のみ対照群に比べ低下したが、他の群で差は認められなかった。②培養終了時点における胎仔観察結果：培養24時間後の胎仔外表形態および頂殿長と総体節数は、対照群とMTX処理6群間で差は認められなかった。③培養液中のクレアチニン含量測定結果：MTX 5ug/ml処理群は、対照群と比べ変化はなかった。一方10、500、1000ug/mlの各処理群では、それぞれ約10、30、35%とクレアチニン含量の有意な上昇が認められた。④臓器の組織学的所見：MTX 250ug/ml処理群までは、対照群と比べ差は認められなかった。現在さらにMTX 500、1000ug/ml 処理群の組織学的検索を行っている。以上の結果より全胚培養下では、胎仔膜を含む培養胎仔自身と培養液成分の分析を行うことにより、胎仔の毒物代謝機構を解析することが可能であることが示唆された。

C-14 モルモットを用いた感作性物質の検索法ならびに強度評価
—黄色綿セーターによる接触皮膚炎の原因物質について—

○門馬純子，中路幸男，黒川雄二，小嶋茂雄*，
鹿庭正昭*，五十嵐良明*，中村晃忠*

国立衛生試験所 毒性部，療品部*

DCブランド黄色綿セーターによる接触皮膚炎事故の原因追究を通して、動物を用いた原因物質究明の方法論の開発並びに有用性を検討した。さらに、判明した原因物質の感作性の強さについても評価を行った。

【実験方法】 抽出物中に含まれるアレルゲンの検索を行うため、まず、Maximization法により、事故品の抽出物で感作したモルモットを作成した。このモルモットに事故品の抽出物の各種の画分をパッチして陽性反応を示す画分を選び出し、次に、陽性画分についてGC-MSによる成分分析を行いアレルゲンの構造を推定した。さらに、推定した化合物を別途合成し、その化合物を感作モルモットにパッチして陽性反応を示すことを確認した。また、判明した原因物質の感作性の強さをMaximization法により検討した。

【実験結果】 陽性画分をGC-MSで分析した結果、この画分に含まれるアレルゲンは、ホスゲン（クロロフェニル）ヒドラゾン類であることが判明した。別途合成したホスゲン（2，5-ジクロロフェニル）ヒドラゾンは抽出物で感作したモルモットに陽性反応を示し、これが事故の原因物質の一つであることが確認された。その感作性の強さをMaximization法により検討したところ、この物質は既知の強感作性物質であるジニトロクロルベンゼンよりも強い感作性を示すことが明らかとなった。

C-15 マウス自発行動量のリズムに及ぼす植物微量成分の影響
—最大エントロピー法によるリズムの解析—

宮崎 良文¹、本橋 豊²、谷田貝 光克¹

¹農水省・森林総研・生物活性物質 ²東医歯大・医・衛生

【はじめに】 木材微量成分は、さまざまな生物活性をもつことが、経験的に古くから知られているが、生体に及ぼす実質的な影響については、十分に解明されていない。今回は、マウスの自発行動量のリズムを指標として、植物微量成分などの生物活性物質の影響を評価する方法について検討したので報告する。 【方法】 実験動物は、ICR系、雄、体重約40gのマウスを用いた。室温は、23℃とし、照明条件は、12時間明暗サイクル(明期:0800-2000;暗期:2000-0800)とした。植物精油成分は、ユーカリ属の主成分である1,8-シネオールとピペリトンを用い、腹腔内にコーンオイルで希釈して投与(300mg/体重)した。自発行動量は、ANIMEXⅢAを用い、15分間隔で測定した。自発行動量のリズムの解析は、1)最大エントロピー法によるスペクトル分析(リズムの周期成分の解析)および2)コサイナー法による特性の分析(振幅、頂点位相、メサーの測定)によって行った。 【結果と考察】 マウスの正常な状態での自発行動量のリズムは、24時間のサーカディアンリズムが最も強く表れており、さらに、12、8、6、4.8時間のウルトラディアンリズムが観察された。また、精油成分の投与によって、頂点位相に変化は認められないが、自発行動量のリズムの周期成分が変動を受けることがわかった。つまり、第1に、ICR系マウスは、正常状態において、サーカディアンリズム以外にいくつかのウルトラディアンリズムをもっていること、第2に、それらは、植物精油成分の投与によって影響を受けること、が認められた。以上の結果から、マウスの自発行動量のリズムの解析によって、植物由来の生物活性物質が生体に及ぼす影響を、評価できる可能性が示唆された。

鍋島俊隆、伊藤孝一、前田洋子、亀山勉、古川宏、A. Cho*

名城大・薬、*UCLA

Phencyclidine (PCP) は、1970年頃からアメリカ社会において最も乱用されている薬物の一つであり、精神分裂病様の症状を惹起することが知られている。PCP の取り締まりが厳しくなるにつれて、PCP の代わりにPCP 誘導体が乱用されるようになった。その中にPCP のピペリジン環を修飾したPCE(N-ethyl-1-phenylcyclohexylamine)とPCDEA(N,N-diethyl-1-phenylcyclohexylamine)がある。一方、PCP 受容体にPCP よりも親和性が強いMK-801 (5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo(a,d)cyclohept-5,10-imine) が最近開発された。

PCP は、ラットに常同行動を惹起することが知られており、この行動は精神分裂病のモデルとも考えられているので、上記誘導体やMK-801により常同行動が惹起されるか否か検討した。

体重150-220gのFischer 系雄性ラットを1 群8 匹として使用して、上記薬物を腹腔内に投与して、常同行動、dopamine依存性行動およびataxiaを測定した。

PCP, PCE, PCDEA, (+)MK-801 および(-)MK-801 全てhead-twitch を惹起したが、PCE, PCDEA および(-)MK-801 の作用は、弱かった。上記薬物は、head-weaving, turning, backpedalling, sniffing およびrearing も惹起したが、backpedalling の発現頻度は低かった。(+)MK-801 が一番強くataxiaを惹起したが、PCDEA は惹起しなかった。

以上の結果から上記薬物は、基本的には、PCP と同様の薬理作用を有しているものと考えられる。また、head-twitch を惹起するにはピペリジン環が大切であるがこの環は、ataxiaの発現には関与していないことが考えられる。

ラットにおける各種溶媒の気管内誤投与の影響

○吉田 貢由、古濱 和久、菅原 正喜、
赤羽 一美、島田 晴美、加藤 道幸
第一製薬(株) 中央研究所

ラットを用いた長期強制経口投与試験において肺への誤投与(誤燕)はまれに経験する事である。しかし、これら誤燕時の肺に対する影響については今だ充分行われているとは言い難い。そこで日常経口投与時に使われている各種溶媒(蒸留水、0.5% carboxymethyl-cellulose(CMC)、5% アラビアゴム、オリーブ油および 0.2% Tween 80)の誤燕時のラット肺に及ぼす影響を検討したので報告する。

実験には 6~8週齢の雄SD系ラットを用い、投与には金属性ゾンデを使用した。気管内投与はラットを脱力した状態で保定し、蒸留水1mlを満たした注射筒に接続した金属性ゾンデを気管内に挿入し、内筒を引き、1~2mlの空気の逆流により気管内に入ったことを確認後、注射筒をはずし、代わりに先端に polyethylene tube(O.D. 0.8 mm、長さ10cm)を付けた注射筒を金属性ゾンデを介して挿入した。その後、注射筒に満たした溶媒を勢いよく気管内に注入した。各溶媒の注入量は0.3, 0.6, 0.9および1.8ml/ratに一定とした。ラットは経時的に屠殺し血液検査および肺病理検査を行った。

その結果、溶媒の種類により死亡率、肺に対する作用あるいは病変の回復性に違いがあることが判明し、肺への誤投与の病態をある程度明らかとすることができた。またこれらの手法に熟達すれば肺誤投与も防止できることが明らかになった。

第16回日本毒科学会学術年会
協賛会社ご芳名

アイ・シー・アイファーマ製薬株式会社	日本シェーリング株式会社
エーザイ株式会社	日本サノフィ株式会社
エッセクス日本株式会社	明治サノフィ薬品株式会社
大塚製薬株式会社	日本シンテックス株式会社
科研製薬株式会社	日本新薬株式会社
協和発酵工業株式会社	日本スクイブ株式会社
グレラン製薬株式会社	日本農薬株式会社
三共株式会社	日本ベーリンガーインゲルハイム
塩野義製薬株式会社	日本メジフィジックス株式会社
スミスクライン・藤沢株式会社	株式会社 日本薬理
住友製薬株式会社	日本ルセル株式会社
ゼリア新薬工業株式会社	日本ロシュ株式会社
第一製薬株式会社	バイエル薬品株式会社
大正製薬株式会社	ビーチャム薬品株式会社
大日本製薬株式会社	藤沢薬品工業株式会社
大鵬薬品工業株式会社	ブリストル・マイヤーズ研究所
武田薬品工業株式会社	ヘキストジャパン株式会社
田辺製薬株式会社	北陸製薬株式会社
株式会社 ツムラ	三井製薬工業株式会社
帝人株式会社	持田製薬株式会社
東洋醸造株式会社	山之内製薬株式会社
日清食品株式会社	ヤンセン協和株式会社
日本化薬株式会社	吉富製薬株式会社
日本クレア株式会社	ローヌ・プーラン薬品株式会社
日本光電南関東株式会社	