

第17回日本毒科学会学術年会 プログラム・要旨集

平成2年6月13日(水)、14日(木)

ホテルキャッスルプラザ

1990 名古屋

会 長	龜 山 勉	(名城大・薬・薬品作用)
実行委員	伊 東 信 行	(名古屋市大・医・第一病理)
	遠 藤 仁	(東京大・医・第二薬理)
	龜 山 義 郎	(中津川市民病院)
	佐 藤 哲 男	(千葉大・薬・薬物)
	高 仲 正	(国立衛試・薬理)
	鍋 島 俊 隆	(名古屋大・医・薬剤部)
	渡 辺 稔	(名古屋市大・薬・薬品作用)
事務担当委員	鶴 飼 良	(名城大・薬・薬品作用)
	平 松 正 行	(名城大・薬・薬品作用)

事務局

〒468 名古屋市天白区天白町八事裏山15
 名城大学薬学部薬品作用学教室
 TEL (052) 832-1781 内線 342, 343, 344
 FAX (052) 834-8780

第2回日韓毒科学シンポジウムの御案内

日本毒科学会会員各位

第2回日韓毒科学シンポジウム実行委員会

下記により第2回日韓毒科学シンポジウムを開催致しますので、多数の会員の先生方の御参加をお待ち申し上げます。

記

1. 開催日：1990年6月15日（金）
2. 会場：ホテル キャッスルプラザ （〒450 名古屋市中村区名駅 4-3-25、Tel 052-582-2121）
3. プログラム：6テーマを取り上げ、各セッション日韓各1名のスピーカーと、主として日本から1～2名の discussant をおく（詳細は英文のプログラムを御参照下さい）。
4. 参加費：日本毒科学会学術年会参加者は無料（本シンポジウムのみの参加 3,000円）。

PROGRAMME OF SECOND KOREA-JAPAN TOXICOLOGY SYMPOSIUM

Sponsors: Japanese Society of Toxicological Sciences,
Korean Science and Engineering Foundation,
Korean Society of Toxicology

9:00 Opening address: Prof. F. Sakai (JSPS)

9:05 Session 1: Neurotoxicology

Chairpersons: Prof. C.-W. Park (Seoul Natl. Univ.)
Prof. T. Yanagita (Preclinical Res. Labs.)

Speakers:

Prof. S.-S. Lee (Seoul Natl. Univ.)
"Neurotoxicity and long-lasting analgesia induced by capsaicinoids"

Prof. Y. Komiya (Gunma Univ.)
"Axonal transport of cytoskeletal proteins in chemically induced neuropathies"

Discussant: Prof. T. Nabeshima (Nagoya Univ.)

10:00 Session 2: Neuroteratology

Chairpersons: Prof. K.-S. Lee (Chung Ang Univ.)
Prof. T. Tanimura (Kinki Univ.)

Speakers:

Prof. K. Kameyama (Nagoya Univ.)
"Sensitive phases for teratogen-induced developmental defects in the brain"

Dr. K. Chin (Korean Natl. Inst. Safety Res.)
"Teratological and behavioral studies on perinatal effects of subcutaneously administered methamphetamine to pregnant rats"

Discussants: Dr. P.-Y. Kim (Korean Natl. Inst. Safety Res.)
Prof. T. Fujii (Teikyo Univ.)

11:00 - 11:15 coffee break

11:15 Session 3: Carcinogenesis

Chairpersons: Dr. T.-K. Yun (Korea Cancer Center Hosp.)
Dr. Y. Kurokawa (Natl. Inst. Hygi. Sci.)

Speakers:

Dr. T.-K. Yun (Korea Cancer Center Hosp.)

"Usefulness of medium-term bioassay system employing development of pulmonary adenoma in new born mice"

Prof. S. Manabe (Univ. of Tokyo)

"Carcinogenic tryptophan pyrolysis products in the environment"

Discussant: Prof. H. Tsuda (Fujita-Gakuen Health Univ.)

12:15 - 13:30 Lunch

13:30 Session 4: Mutagenesis

Chairpersons: Prof. S.-D. Park (Seoul Natl. Univ.)

Dr. Y. Shirasu (Inst. Envir. Toxicol.)

Speakers:

Prof. S.-D. Park (Seoul Natl. Univ.)

"DNA-repair mechanism in relation to mutagenesis and carcinogenesis"

Dr. M. Ishidate (Natl. Inst. Hygi. Sci.)

"Quantitative evaluation on the genotoxic potency of chemicals"

Discussant: Prof. Y. Kawazoe (Nagoya City Univ.)

14:30 Session 5: Molecular Toxicology

Chairpersons: Prof. S.-S. Lee (Seoul Natl. Univ.)

Prof. R. Kato (Keio Univ.)

Speakers:

Prof. M.-H. Chung (Seoul Natl. Univ.)

"8-Hydroxyguanine, a DNA adduct formed by oxygen radicals: Its implications on oxygen radical involved mutagenesis, carcinogenesis and DNA repair mechanisms"

Prof. T. Kamataki (Hokkaido Univ.)

"Molecular toxicology on cytochrome P-450 in human fatal livers"

Discussant: Dr. Y. Yamazoe (Keio Univ.)

15:30 - 15:45 coffee break

15:45 Session 6: Hepatotoxicity

Chairpersons: Prof. Y.-N. Cha (Inha Univ.)

Prof. H. Endou (Univ. of Tokyo)

Speakers:

Prof. Y.-N. Cha (Inha Univ.)

"Alteration of aflatoxin-B1 metabolic profiles and reduction of aflatoxin B1 mutagenicity by hepatic microsomes of rats fed butylated hydroxyanisole (BHA)"

Prof. T. Satoh (Chiba Univ.)

"Release of liver microsomal β -glucuronidase from hepatocytes in vitro and in vivo by organophosphates and hepatotoxic agents"

Discussant: Dr. Y. Ohno (Natl. Inst. Hygi. Sci.)

16:45 Closing Address: Prof. T. Yanagita (Preclinical Res. Labs.)

平成2年6月1日

第17回日本毒科学会学術年会予約参加者各位

第17回日本毒科学会学術年会
会 長 亀 山 勉

拜啓

時下、皆様御健勝で御活躍のこととお慶び申し上げます。

さて、毒科学会学術年会まであとわずかとなり、プログラム・要旨集の発行が大変遅れ御迷惑をお掛けしておりましたが、やっとお届け出来ることになりました。参加費の振込みのお済みの方には、参加費（および懇親会費）の領収書および会場での参加章（ネームカード）を同封致しました。6月1日までに参加費の振込みのお済みでない方には、参加費（および懇親会費）の領収書および会場での参加章（ネームカード）を同封してありません。御面倒でも総合受付までお越し下さいますようお願い申し上げます。

名古屋でお会いできますことを楽しみにお待ちしております。

敬 具

事務局 ☎ 4 6 8 名古屋市天白区天白町

八事裏山15

名城大学薬学部薬品作用学教室

Tel. (052) 832-1781 内 343

Fax. (052) 834-8780

正 誤 表

	誤	正
P. 4	休憩室 梓の間 展示室 茜の間	休憩室 茜の間 展示室 梓の間
P. 26 1. 22	Magnesson	Magnusson
P. 31 1. 24	批評する	批判する
P. 40 1. 24	HOP 細胞	LSC 細胞
裏表紙	サノフィ明治株式会社	明治サノフィ株式会社

前回〔案内(1)(2)〕にご案内した理事会、評議員会、懇親会の日時が変更されております。学術年会は、案内(3)およびプログラム・要旨集に沿って執り行われますの宜しくお願い申し上げます。

W1-2 ワークショップ(1)「薬物アレルギー」

2. 薬物アレルギーの臨床 皮膚科医の立場から

早川律子

名古屋大学医学部附属病院分院皮膚科

はじめに

皮膚科診療の場で経験される薬物アレルギーは薬疹と接触皮膚炎に大別される。

1. 薬疹

i. 発症機序

薬剤アレルギーの発症機序には不明の部分が多いが、①T細胞伝達性アレルギー反応、②IgE伝達性アレルギー反応に大きく分類できる。①には T_{DH} 細胞による delayed hypersensitivity (DH)と T_c 細胞に誘導される cytotoxicity (CT)型反応 (GVHR型)がある。また、薬剤アレルギーの誘導あるいは反応の過程で自己トレランスの破綻が生じ、それにより自己抗体の産生が誘導されて自己免疫型 (AI) 反応が生じる可能性もある。②にはIgE抗体による脱顆粒反応、補体の活性化、自己抗体による AI 型反応などがある。

ii. 形態学的分類

発疹の形態により薬疹は以下の10型に分類される。(1) 蕁麻疹型 (IgE抗体を介したI型アレルギー)、(2) 汎発型 (紅斑型、DH型反応)、(3) 濕疹型 (紅色丘疹・漿液性丘疹型、全身性接触型皮膚炎反応)、(4) 多形滲出性紅斑型 (EM型、CT型反応?)、(5) 中毒性表皮壊死型 (TEN 型、EMの重症型)、(6) 苔癬型 (慢性 GVHR 型?あるいはDH + CT?)、(7) 固定疹型 (慢性 GVHR 型?あるいはantibody-dependent cell-mediated cytotoxicity?)、(8) 光線過敏型(光アレルギー性)、(9) 紫斑型 (immune complex (IC)の血管壁への沈着による Arthus 型反応)、(10)自己免疫 (天疱瘡、類天疱瘡、SLE)型 (薬剤と自己蛋白の結合が自己抗体の産生を誘導するとする説と、素因+増悪作用とする両説あり)。

2. 薬物経皮アレルギー

i. 発症機序

経皮吸収されたハプテンが表皮の細胞蛋白と結合して抗原性を獲得し、感作リンパ球を誘導して接触アレルギーを発症する。光のエネルギーが抗原性獲得に必要な場合を光アレルギー性皮膚炎という。光アレルギーの発症機序は、はっきりとは解明されていないが、1)物質が光のエネルギーに

よって変性し抗原性を獲得する、2)物質と細胞蛋白と結合したものが光のエネルギーによって抗原性を獲得する、3)光のエネルギーによって皮膚の蛋白が変性して物質と結合しやすくなる、などの機序が考えられている。

接触蕁麻疹は物質の接触後20～30分後に膨疹が生ずる現象をいい、発症機序は 1) アレルギー反応、2)非アレルギー反応、3)機序不明に分類されている。

全身性接触型皮膚炎は経皮感作された個体に同一抗原が全身投与された場合に湿疹型薬疹の形で発症する。

ii. 原因薬剤

1)コルチコステロイド

従来コルチコステロイドによる経皮感作は稀であるといわれていたが、報告例は決して少なくない。化学構造の類似したコルチコステロイド間の交差反応がみられる。

2)非ステロイド

接触アレルギー、光接触アレルギーの報告がある。

3)抗真菌剤

イミダゾール系抗真菌剤間の交差反応の報告が多い。

4)抗生物質

ネオマイシンが最も多く報告されている。その他ゲンタマイシン、リファマイシン、カナマイシン、クロラムフェニコールなどの報告がある。抗生物質間の交差反応も多い。

5)その他

抗ウイルス剤、抗菌剤、瘡瘍用剤、抗癌剤、 β ブロッカー、局所麻酔剤、止痒剤、消毒剤、ヨードホルムなど

6)外用剤基剤成分

ラノリン、プロピレングリコール、セチルアルコール、ステアリールアルコール、ウイテップゾール、防腐剤（ホルムアルデヒド、パラベン、クロクレゾール）、乳化剤、安定剤、抗酸化剤、コロホニーなど

7)職業性経皮薬物アレルギー

塩酸ラニティジン（ザンタック）の製造過程の第2ステージでできる中間物質のジアミノ化合物（5-[(2-aminoethyl)thiomethyl]N,N-dimethyl-2-furanmethanamine）による工場従業員の職業性経皮感作例が報告されている。

医師、歯科医、獣医、看護婦などで、消毒剤、ホルムアルデヒド、プロカイン、ベンゾカイン、ペニシリン、ストレプトマイシン、ホウ酸などの感作例が報告されている。

目 次

日程および座長一覧	2
お知らせとお願い	4
交通および会場案内	6

プログラム

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

要旨

特別講演	19
ワークショップ(1)	21
ワークショップ(2)	30
シンポジウム(1)	43
シンポジウム(2)	52
一般演題(A会場)	58
一般演題(B会場)	74

日程および座長一覧

6月13日(水)

	A 会場 (鳳凰の間 北)	B 会場 (鳳凰の間 南)
9:00	一般演題 (A-1~A-5) 座長 山本郁男 福田英臣	一般演題 (B-1~B-5) 座長 上野芳夫 飯家公夫
10:00	ワークショップ(1)「薬物アレルギー」 (W1-1~W1-4) 座長 末次 勲 永井博式	一般演題 (B-6~B-10) 座長 伊東信行 菅野盛夫 一般演題 (B-11~B-15) 座長 玄番宗一 戸部満寿夫
12:00	評議員会 (3階孔雀の間)	
13:15	総会 (4階鳳凰の間)	
14:00	シンポジウム(1)「行動毒性」 (S1-1~S1-5) 座長 亀山義郎 高仲 正	
16:30	休 憩	
16:45	特別講演 Ing K. Ho 教授 座長 亀山 勉	
17:45		
18:00	懇 親 会 (3階孔雀の間)	

6月14日(木)

	A 会場 (鳳凰の間 北)	B 会場 (鳳凰の間 南)
9:00	<p>ワークショップ(2)「新しい毒性試験法へのアプローチ:in vivoとin vitro試験法の接点」 (W2-1~W2-6) 座長 大山昭夫 遠藤 仁</p>	<p>一般演題 (B-16~B-20) 座長 唐木英明 宇高奎二 一般演題 (B-21~B-25) 座長 柳田知司 黒川雄二 一般演題 (B-26~B-30) 座長 粕谷 豊 前川昭彦</p>
12:00	昼 休 み	
13:00	<p>一般演題 (A-6~A-10) 座長 吐山豊秋 谷村 孝 一般演題 (A-11~A-15) 座長 小野 宏 高島英伍</p>	<p>一般演題 (B-31~B-35) 座長 榎本 眞 白須泰彦 一般演題 (B-36~B-40) 座長 黒岩幸雄 堀口俊一</p>
15:10	休 憩	
15:20	<p>シンポジウム(2) "Environmental Toxicology" (S2-1~S2-5) 座長 佐藤哲男 L. W. Chang</p>	
17:00		

お知らせとお願い

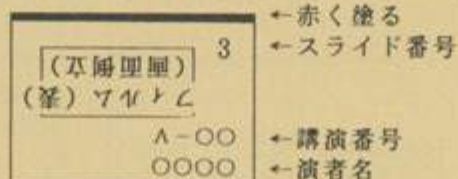
1. 年会参加者の皆様へ

- 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、受付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(5,000円)をお支払いの上、「参加章(ネームカード)」および「プログラム・要旨集」をお受け取り下さい。
- 3) 学会受付は、午前8時30分から行います。
- 4) 会場にご入場の際は、必ず「参加章(ネームカード)」を上着に付けて下さい。総合受付にピン付の名札入れも用意致しますのでご利用下さい。
- 5) 会場内は禁煙です。喫煙は灰皿の備えてある所でお願ひします。
- 6) 追加発言や討論の採択、時間の調整など、会場内での進行については、座長または司会の指示に従って下さい。
- 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) 口演中の写真撮影はご遠慮下さい。

2. 演者の皆様へ

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) スライドは一演題10枚以内でお願ひします。
- 3) 発表の中止、演者の変更などは、なるべく早めに年会事務局(会期中は各会場受付)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(早朝は15分前)までに各会場の受付にお渡しいただき、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下さい。発表後はお渡しいただいた同じ受付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付にご提出願ひします。
- 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。

ワークショップ・シンポジウム

- 1) 口演時間は座長の指示に従って、時間厳守願います。
- 2) スライドの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願います。
- 3) その他は一般演題の4)～9)に準じます。

3. 座長・司会者の皆様へ

- 1) 当日は、ご担当予定時刻の20分前（早朝は10分前）までに、各会場の座長受付で到着の旨をご登録願います。
- 2) 次座長は早めに次座長席にお着き下さい。
- 3) ワorkshop・シンポジウムの座長の方は、各演者に受持ち口演時間をご指示下さい。

4. 評議員会について

6月13日（水）12：00より、3階の孔雀の間にて開催致します。

5. 総会について

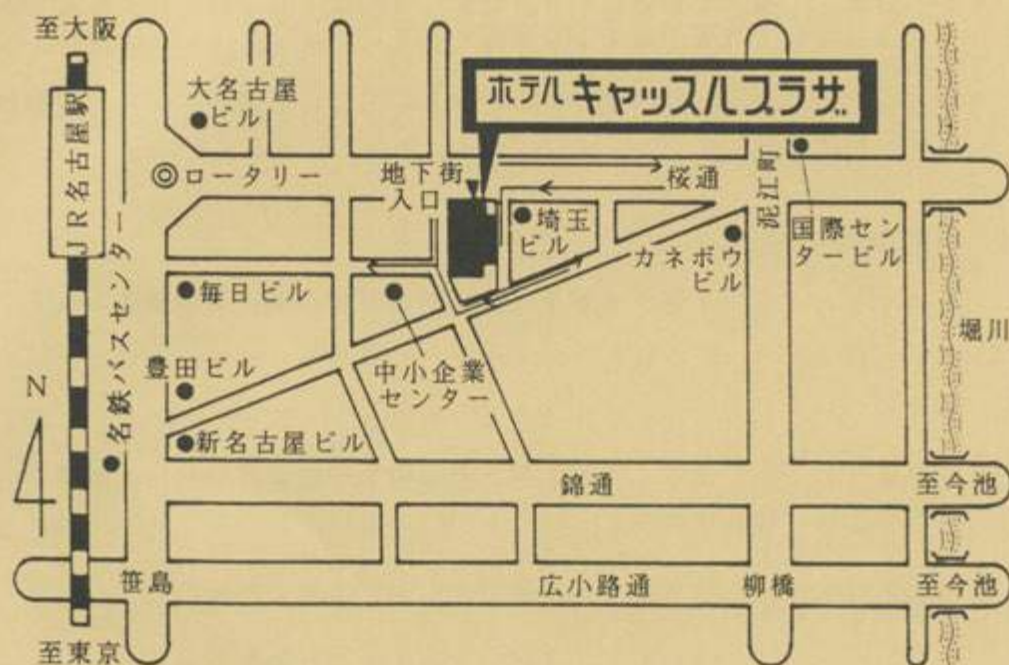
6月13日（水）13：15より、鳳凰の間（年会会場）にて開催致します。

6. 懇親会について

6月13日（水）18：00より、3階の孔雀の間にて開催致します。
当日の申し込み（会費7,000円）も受け付けます。準備の都合上、なるべく早めに総合受付でご予約下さい。

交通案内

- JR名古屋駅より 徒歩5～7分
 (ユニモール地下街経由でも可)
- 東名名古屋インターより 車で40～60分
- 名古屋空港より タクシーで40～50分
 (3,000～4,000円)
 名鉄バスで50～60分
 (名鉄バスセンター行き)
 (620円)

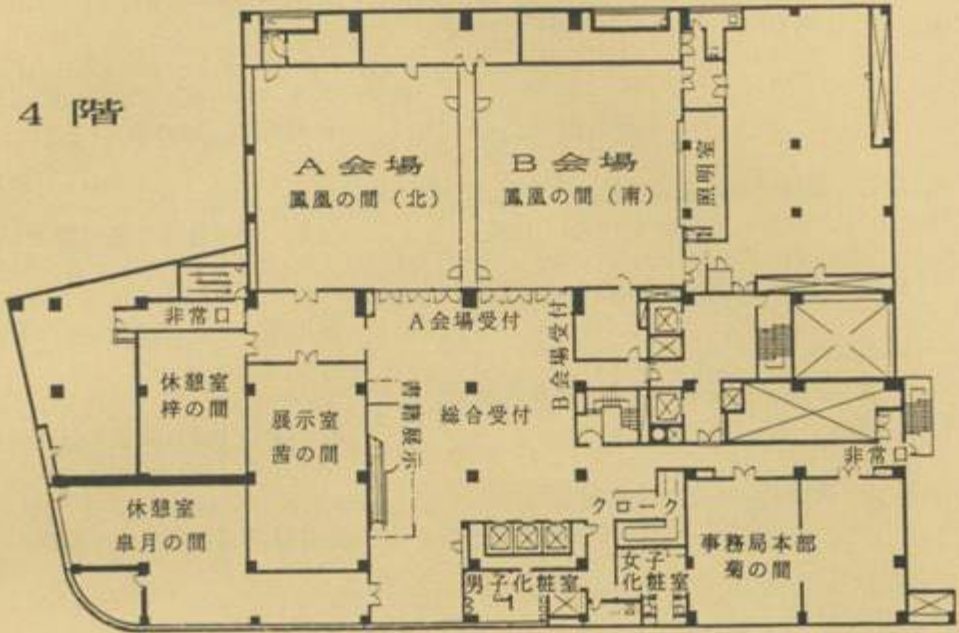


ホテルキャッスルプラザ

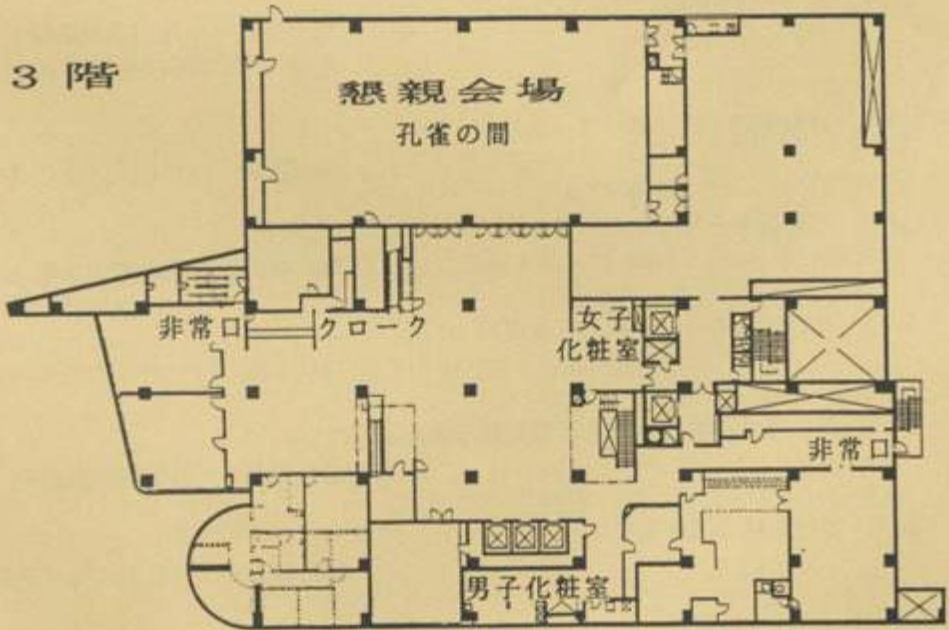
☎ 450 名古屋市中村区名駅四丁目3番25号
 ☎ (052) 582-2121
 FAX (052) 582-8666

会場案内図

4 階



3 階



ワークショップ (1)

6月13日(水) 10:00~12:00

「薬物アレルギー」

座長 末次 勳 (藤田学園保衛大・医)
永井博式 (岐阜薬大)

W1-1. 薬物アレルギーの臨床 内科の立場から

佐賀 務 (藤田学園保衛大・医・内科)

W1-2. 薬物アレルギーの臨床 皮膚科の立場から

早川律子 (名古屋大・医・皮膚科)

W1-3. 薬物アレルギー試験の現状と展望

牧 栄二 (萬有製薬・開発研)

W1-4. 薬物アレルギーの基礎

永井博式 (岐阜薬大・薬理)

シンポジウム (1)

6月13日(水) 14:00~16:30

「行動毒性」

座長 亀山義郎 (中津川市民病院)
高仲 正 (国立衛試)

S1-1. 行動学的手法の毒性学への応用

重田定義 (東海大・医・衛生)

S1-2. 行動毒性と神経伝達物質

鍋島俊隆 (名古屋大・医・
薬剤部・医療薬学)

S1-3. 犬の行動の日内変動と行動毒性

樽見千利 (三共・安全性研)

S1-4. 発生毒性試験における行動観察手技の適用について

田巻義孝 (信州大・教育)

S1-5. 薬物の胎仔機能毒性

藤井憐子 (帝京大・医・薬理)

特別講演

6月13日(水) 16:45~17:45

"Gamma-Aminobutyric Acid in Neurotoxicity"

「神経毒性と γ -アミノ酪酸」

Professor & Chairman, Ing K. Ho (Univ. of Mississippi Med. Ctr.,
Dept. of Pharmacol. Toxicol., U. S. A.)

座長 亀山 勉 (名城大・薬)

ワークショップ(2)

6月14日(木) 9:00~12:00

「新しい毒性試験法へのアプローチ：
in vivoとin vitro試験法の接点」

座長 大山昭夫 (関西医大)
遠藤 仁 (東京大・医)

- W2-1. 総論：毒性評価は将来どうなるであろうか？
田辺恒義 (東日本学園大・薬・毒理)
- W2-2. 新しい発痛試験法へのアプローチ
伊東信行 (名古屋市大・医・病理)
- W2-3. In vitro試験における可能性と限界
佐藤哲男 (千葉大・薬・薬物)
- W2-4. 整形外科領域で使用する生体材料の臨床および評価法における問題点
琴浦良彦 (京都大・医・整形外科)
- W2-5. バイオマテリアルのin vitro毒性試験の実情
佐藤温重 (東京医歯大・歯・理工)
- W2-6. 追加発言：日本毒科学会会員として今後に望むこと
村野 匡 (和歌山医大・薬理)

シンポジウム (2)

June 14 (Thu.) 15:20~17:00

"Environmental Toxicology"

Chaired by T. Satoh (Chiba Univ.)

L. W. Chang (Univ. of Arkansas)

S2-1 Neurotoxicity of organometallic compounds

Louis W. Chang (University of Arkansas Medical School ·
Department of Pathology, Pharmacology and Toxicology)

S2-2 Biological reactive intermediates of bisfuranoid mycotoxins

Dennis P. H. Hsieh (University of California, Davis ·
Department of Environmental Toxicology)

S2-3 Dopamine in organophosphate-induced neurotoxicity

Ing K. Ho (University of Mississippi Medical Center ·
Department of Pharmacology and Toxicology)

S2-4 Risk assessment of chemical contaminants in drinking water

Anna M. Fan (California Department of Health Services)

S2-5 Practical considerations for the development and risk assessment of pesticides

Peter Chan (Rohm and Haas Company · Toxicology Department)

一般演題 (口演)

第1日 (6月13日)

神経系

9:00~10:00

A会場

座長 山本郁男(北陸大・薬)
福田英臣(日本大・薬)

- 9:00 A-1. クロルデコンの神経機能障害の発現機序—PC12細胞を用いての電気生理学的検討
○中沢憲一、井上和秀、小濱とも子、藤森観之助、高仲 正
(国立衛試・薬理)
- 9:12 A-2. 新キノロン系合成抗菌剤と非ステロイド系抗炎症剤併用時のラット網膜電位図(ERG)への影響
○山田昌男、坂元由香、大野広志、野村 護
(第一製薬・中央研)
- 9:24 A-3. 大麻含窒素成分の薬理毒性—第2報—新規成分feruloyl tyramineの薬理毒性
松永民秀、渡辺和人、○山本郁男、吉村英敏¹⁾
(北陸大・薬・衛生化学、¹⁾九州大・薬・衛生化学・裁判化学)
- 9:36 A-4. カンナビノイドによるカタレプシー陽性マウスの脳組織コリン作動性神経活性
○小林晴男、佐藤千秋、加茂佳苗、宮田真智子、湯山 章、D. E. Moss¹⁾
(岩手大・農・家畜薬理、¹⁾Univ. Texas, El Paso, U. S. A.)
- 9:48 A-5. 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDMA)により惹起される常同行動と脳内神経伝達物質含量の変化
○平松正行^{1, 2)}、前田洋子^{1, 2)}、鍋島俊隆^{1, 2)}、亀山 勉¹⁾、長 研司²⁾
(¹⁾名城大・薬・薬品作用、²⁾カルフォルニア大・医・薬理、³⁾名古屋大・医・薬剤部・医療薬学)

座長 上野芳夫(東京理大・薬)
仮家公夫(神戸学院大・薬)

- 9:00 B-1. アントラキノン系化合物による8-ヒドロキシデオキシグアノシンの生成
○阿久沢忍、宮坂直樹、上野芳夫
(東京理大・薬・毒性・微生物化学)
- 9:12 B-2. ジエチルニトロソアミンに高感受性を示す肝カルボキシルエステラーゼA
イソザイムの同定
○米沢 誠、佐藤哲男
(千葉大・薬・薬物)
- 9:24 B-3. 正常ビーグル犬の肝臓に存在するPiクラスーグルタチオンS-トランスフ
ェラーゼの性質
○五十嵐隆、小原厚行、佐藤哲男
(千葉大・薬・薬物)
- 9:36 B-4. 肝毒性物質によるグルタチオントランスフェラーゼの遊離: 培養肝細胞系
における検討
○奥村 裕、李 英培、仮家公夫
(神戸学院大・薬・薬理)
- 9:48 B-5. 初代培養肝細胞を用いた肝障害性試験における種差および性差の検討
○仁藤新治、野口通重、有行史男、岡庭 梓
(田辺製薬・安全性)

座長 伊東信行(名古屋市大・医)
菅野盛夫(北海道大・医)

- 10:00 B-6. 中期発癌性試験による発癌抑制物質の検索
○加藤俊男、立松正衛、長谷川良平、倉田 靖、福島昭治
(名古屋市大・医・第一病理)
- 10:12 B-7. ラット肝中期発癌試験法による2-AAF の用量作用相関とその細胞増殖能の
解析
○長谷川良平、小川久美子、白井智之、玉野静光、伊東信行
(名古屋市大・医・第一病理)

- 10:24 B-8. 虚血-再循環による実験的肝障害
○江頭 亨、永井敬之
(大分医大・薬理)
- 10:36 B-9. デジタル化ビデオ顕微鏡法を用いた単一肝細胞のホルモン反応性へのミトコンドリア機能阻害剤の影響研究
○川西 徹、高仲 正、L. Blank¹⁾、M.T. Smith¹⁾、R.Y. Tsien¹⁾
(国立衛試・薬理、¹⁾Univ. of California, Berkeley)
- 10:48 B-10. セファロリジンによる腎障害機序 -In vitroにおける脂質過酸化と活性酸素の生成-
○鈴木義裕、鈴江俊彦、須藤純一、田辺恒義
(東日本学園大・薬・毒理)
- 座長 玄番宗一 (大阪薬大)
戸部満寿夫 (国立衛試)
- 11:00 B-11. シスプラチンによる尿中酵素活性の変動に対する腎グルタチオン減少および抗酸化剤の影響
○亀山悦子、松下智哉、藤沢知寿子、山口達也、玄番宗一
(大阪薬大・第二薬理)
- 11:12 B-12. Angiotensin II による腎近位尿細管細胞内遊離カルシウムの上昇に及ぼすmercury chloride の作用
○鄭 圭鎔、遠藤 仁
(東京大・医・第二薬理)
- 11:24 B-13. 6-Benzylaminopurine の腎に及ぼす影響の動物種差に関する一考察
○村田共治、菅井象一郎、北垣忠温
(クミアイ化学工業・生物科学研)
- 11:36 B-14. ラットの膀胱内投与における膀胱炎の検討
○吉田貢由、古濱和久、加藤道幸、高山 敏
(第一製薬・中央研)
- 11:48 B-15. 微量 paraquat および chlorpromazine 前処置における paraquat 急性毒性：血清 ceruloplasmin、血清 AICB および肺 hydroxyproline の変化
○政岡俊夫、新井成之、赤堀文昭
(麻布大・獣医・薬理)

一般演題 (口演)

第2日 (6月14日)

毒性発現機序 9:00~12:00 B会場

座長 唐木英明 (東京大・農)
宇高奎二 (日本ロッシュ研)

- 9:00 B-16. 精製FAD-monoxygenase による含チッ素薬物のN-酸化について
○吉村英敏、湯野幸一郎、大隅豊美、山田英之、小栗一太
(九州大・薬・衛生化学・裁判化学)
- 9:12 B-17. ラットにおけるジブチルヒドロキシトルエン(BHT)の胃内停滞と吸収遅延
○高橋 省
(東京都立衛生研・毒性)
- 9:24 B-18. 3-Amino-1, 2, 4-triazoleの甲状腺ペルオキシダーゼ阻害作用に対する5位置換基の影響
○高岡雅哉、宮腰利宏、加藤佐和子、松沼尚史、増田 裕
(三共・安全性研)
- 9:36 B-19. 脱リン酸化酵素阻害剤による細胞障害
○唐木英明、三井みのり、石原宏朗、尾崎 博、矢間 太¹⁾、
林 良博¹⁾、西田隆雄¹⁾、加藤裕子²⁾、伏谷伸宏²⁾
(東京大・農・獣医薬理、¹⁾獣医解剖、²⁾水産化学)
- 9:48 B-20. Ferretを用いた嘔吐の研究—抗癌剤誘起性嘔吐と硫酸銅誘起性嘔吐
○遠藤 泰、南 勝、門間芳夫、齋藤秀哉¹⁾、竹内雅也²⁾
(東日本学園大・薬・薬理、¹⁾北海道大・医・第一薬理、
²⁾札幌総合病理研)

座長 柳田知司 (実験動物中央研)
黒川雄二 (国立衛試)

- 10:00 B-21. 長期反復投与毒性試験における投与期間と毒性所見の発現時期
○幸嶋祥亘
(日本製薬工業協会基礎研究会、スミスクライン・ビーチャム製薬)
- 10:12 B-22. Chlorpyrifosのラットにおける28日間反復経口投与毒性試験とコリンエステラーゼ活性阻害について
○小川幸男、鈴木幸子、鎌田栄一、斉藤 実、梅村隆志、内田雄幸、
金子豊蔵、黒川雄二
(国立衛試・毒性)

- 10:24 B-23. Kanamycin投与によるラット仔の聴覚障害性
○鳥田 信、渡辺敏樹、持田一夫、古濱和久、高山 敏
(第一製薬・中央研)
- 10:36 B-24. ラットにおける薬物の痙攣誘発法の検討
○赤羽一美、加藤道幸、柿畑耕司、高山 敏
(第一製薬・中央研)
- 10:48 B-25. β -ラクタム系抗生物質のモルモットにおける抗原性比較試験と臨床でのアレルギー性副作用頻度の関係について
○服部浩之、和賀井信彦、山口文恵、小島弘幸、俵 克彦
(第一製薬・中央研)
- 座長 柏谷 豊(星薬大)
前川昭彦(国立衛試)
- 11:00 B-26. ラット多重痛モデルによる発痛および発痛修飾物質の低濃度複合投与効果の検討
○萩原昭裕、柴田雅朗、広瀬雅雄、高橋 智、伊東信行
(名古屋市大・医・第一病理)
- 11:12 B-27. 凝固系亢進ラットにおけるendotoxin による毒性の増強
○相良奈美、西澤理江、柿畑耕司、古濱和久、高山 敏
(第一製薬・中央研)
- 11:24 B-28. アドリアマイシンのリボソーム製剤化による毒性軽減効果
○神藤敏正、山田昌男、東條宏子、菊地典子、野村 護
(第一製薬・中央研)
- 11:36 B-29. 臨床第1相試験に入るために必要な前臨床試験に関する実態調査報告
○五十嵐俊二
(日本製薬工業協会基礎研究会、エーザイ・安全性研)
- 11:48 B-30. 必須元素の臓器分布に関する研究(第1報)
○鈴木幸子、小川幸男、鎌田栄一、金子豊蔵、黒川雄二
(国立衛試・毒性)

生殖毒性

13:00~15:00

A会場

座長 吐山豊秋 (東京農工大・農)
谷村 孝 (近畿大・医)

13:00 A-6. Bis(tributyltin)phthalateのラット胎児発生に及ぼす影響
○川島邦夫、宇佐見誠、中浦植介¹⁾、田中 悟、高仲 正
(国立衛試・薬理、¹⁾食品農医薬品安全性評価センター)

13:12 A-7. Ca拮抗薬である NB-818 のウサギ乳腺に及ぼす作用について
○小松哲郎、小西玲子、花見正幸、藤井孝朗、白居敏仁
(萬有製薬・開発研)

13:24 A-8. カフェインによって誘発された鶏胚の心血管奇形
○黒川あかね、子林孝司、西田敦之、有行史男、岡庭 梓
(田辺製薬・安全性研)

13:36 A-9. ラットのピリメタミン奇形に対する葉酸の影響
○城塚康毅、常松邦俊、下田 実、小久江栄一、吐山豊秋
(東京農工大・農・家畜薬理)

13:48 A-10. MTT による精巣毒性における FSH・LHの変動
○石嶋隆守、原田 寧、高木英利、古川泰雄、若林克己¹⁾
(日本レダリー・生物研、¹⁾群馬大・内分泌研)

座長 小野 宏 (食品薬品安全センター)
高島英伍 (摂南大・薬)

14:00 A-11. ビリドキシン大量投与によるラットの精巣障害
○森 晃爾、海道昌宣¹⁾、藤代一也、井上尚英
(産業医大・産生研・環境中毒、¹⁾医・第二病理)

14:12 A-12. 利尿剤投与によって誘発されるマウス次世代仔水腎
○赤池雅司、重柄幹夫、小林孝好
(ヘキストジャパン・医薬総合研)

14:24 A-13. 周産期の絶食及び制限食による母動物及び出生仔への影響
○永尾仁美、中村公章
(科研製薬・安全性研)

- 14:36 A-14. 培養胎仔におけるメトトレキサートの影響 -人工培養液を用いて-
 ○秋田正治、横山 篤¹⁾、石橋正彦
 (麻布大・生物科学総合研、¹⁾東京医歯大・歯・顎研発生)
- 14:48 A-15. 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(3) シクロホスファミドの in vitro 及び in vivo胎芽の発育への影響
 ○中浦楨介、田中 悟¹⁾、宇佐見誠¹⁾、川島邦夫¹⁾、高仲 正¹⁾、
 萩田孝一¹⁾、小林和雄、榎本 眞
 (食品農医薬品安全性評価センター、¹⁾国立衛試・薬理)

毒性試験法

13:00~15:00

B会場

座長 榎本 眞 (食品農医薬品安全性)
 白須泰彦 (残留農薬研)

- 13:00 B-31. 固定用量法急性毒性試験法の多機関共同研究
 ○勝村英夫、小野 宏、今井 清 ;加藤正信、武田量雄、高橋 要¹⁾ ;
 井上博之、山本利男、大庭耕輔²⁾ ;西森司雄、谷口雄三、古川茂典³⁾ ;
 山田宏彦、甲田 彰、廣森壽彦⁴⁾ ;山本武人、山根重孝、今田中伸哉⁵⁾
 (食品薬品安全センター秦野研、¹⁾三菱化成安全科学研、
²⁾食品農医薬品安全性評価センター、³⁾環境生物科学研、
⁴⁾住友化学工業安全性研、⁵⁾化学品検査協会日田研)
- 13:12 B-32. 固定用量法急性毒性試験法の意義-英国毒性学会提案の方法に基づく国際共同研究の成績による考察
 ○小野 宏
 (食品薬品安全センター秦野研)
- 13:24 B-33. フローサイトメトリーによる血液学検査の毒性試験への活用
 ○井上博之、杉山 豊、渡 修明、榎本 眞
 (食品農医薬品安全性評価センター)
- 13:36 B-34. 長期飼育した実験動物の血液学および生化学背景データ
 ○渡 修明、村越令子、中嶋 圓、井上博之
 (食品農医薬品安全性評価センター)
- 13:48 B-35. 遠心分析方式の測定機を用いた実験動物の血液生化学検査について
 ○笠間菊子、小島幸一
 (食品薬品安全センター秦野研)

座長 黒岩幸雄（昭和大・薬）
堀口俊一（大阪市大・医）

- 14:00 B-36. 総合血液学検査装置 (THMS)H・1 の毒性試験への適用に関する基礎的検討
○高野享治、東山 昇、村岡義博、吉崎敏夫、平田雅春
(塩野義製薬研)
- 14:12 B-37. カニクイザルを用いた ICG・PSP 同時測定法の検討
○本田多間、中間和浩、飯母清孝、鮫島秀暢、岡崎啓幸、永田良一
(新日本科学・安全性研)
- 14:24 B-38. 実験動物における尿中酵素測定法に関する検討：測定条件および保存条件
の測定値への影響
○松下直子、清宮健一、川音晴夫、浅岡宏康、川村研治
(明治製菓・安全性研)
- 14:36 B-39. ラットの脾細胞定量化の検討
○島田晴美、稲毛富士郎、加藤道幸、高山 敏
(第一製薬・中央研)
- 14:48 B-40. 妊娠カニクイザルを用いた無麻酔下における子宮収縮作用の測定技術
○船戸 護、鮫島秀暢、岡崎啓幸、永田良一、古謝武志¹⁾
(新日本科学・安全性研、¹⁾薬理研)

特 別 講 演

6月13日(水) 16:45~17:45

"Gamma-Aminobutyric Acid in Neuro-
toxicity"

「神経毒性とγ-アミノ酪酸」

Professor & Chairman, Ing K. Ho

(Univ. of Mississippi, Medical Center,

Department of Pharmacology and Toxicology, U.S.A.)

座長 亀山 勉(名城大・薬)

特別講演 GAMMA-AMINOBTYRIC ACID IN NEUROTOXICITY

Ing K. Ho, Ph.D.

Department of Pharmacology and Toxicology,
University of Mississippi Medical Center, Jackson,
Mississippi 39216-4505, U.S.A.

γ -Aminobutyric acid (GABA) is a major inhibitory neurotransmitter in the mammalian central nervous system. A number of natural products, e.g., bicuculline, picrotoxin, anisatin, muscimol, etc., are neurotoxins which directly act on one of the components of GABA_A receptor complex. The GABA_A receptor is a membrane bound complex which consists of the GABA binding site, the benzodiazepine binding site, the barbiturate/picrotoxin or t-butylbicyclophosphorothionate (TBPS) binding site and the Cl⁻ ion channel. Although most insecticides are also neurotoxins which are known to inhibit cholinesterase at synapses or to disrupt sodium channels on neuron or muscle cell membranes, some insecticides, e.g., cyclodienes, hexachlorocyclohexanes, lindane, toxaphene, type 2 pyrethroids, appear to act by other mechanisms. Evidence has suggested that these insecticides may inhibit GABA-transmission by acting as noncompetitive GABA_A receptor antagonists at the TBPS binding site. Further evidence also indicated that the pyrethroid binding site may be closely related to the convulsant benzodiazepine site of action. Other neurotoxins (organophosphates and heavy metals) also appear to affect the GABA system. This presentation summarizes the evidence available as to how the GABA system is involved in the mechanism of action of these neurotoxins. (DA 04480)

ワークショップ（１）

「薬物アレルギー」

6月13日（水） 10:00～12:00

座長 末次 勸（藤田学國保衛大・医）
永井博式（岐阜薬大）

W 1 - 1 ワークショップ(1)「薬物アレルギー」

1. 薬物アレルギーの臨床 内科の立場から

佐賀 務

藤田学園保健衛生大学医学部内科

薬物アレルギーとはペニシリンやピリン系アレルギーのように薬物それ自体では抗原性はないが、蛋白と結合したハプテンあるいは重合体として抗原性を獲得し、免疫学的機序により生体に異常な反応を起す場合をいう。しかし、免疫学的機序以外にも、造影剤(ヨード)過敏反応のように直接肥満細胞を活性化し、皮疹やアナフィラキシー・ショックを生ずる場合や、アスピリン過敏症のようにアスピリンを代表とする酸性非ステロイド系抗炎症剤のほとんどに、恐らくはアラキドン酸代謝系を介して、鼻炎や気管支喘息、あるいは蕁麻疹などの即時型アレルギーの類似反応を起す場合がある。広義の意味ではこれら過敏反応も薬物アレルギーに含めているのが現実と思われる。今回は、内科の立場として、主にアナフィラキシー・ショックと気管支喘息について述べることにする。ペニシリン・アレルギーでは、ペニシリンの95%はbenzylpenicilloyl基を形成している β -ラクタム環を介して蛋白と結合しており、この基はmajor antigenic determinantと呼ばれている。ペニシリンの5%以下は代謝され、minor antigenic determinant mixturesと呼ばれる基も形成され、即時型反応に関与していると考えられている。造影剤(ヨード)過敏症は、アナフィラキシー様反応を5~10%の頻度で生ずるといわれるが、感作されていない初回でも生じること、再現性が悪いこと、抗体が検出されないことなどから、免疫学的機序の関与は否定的とされている。われわれは、アスピリン過敏症、特にアスピリン喘息について長年検討している。アスピリン喘息は①中年発症内因型の気管支喘息患者、②鼻茸、③アスピリンをはじめとする酸性非ステロイド系抗炎症剤で喘息の大発作を生ずることを三主徴とする疾患である。その発症仮説として、アスピリンなどのサイクロオキシゲナーゼ阻害により、

①アラキドン酸がロイコトリエン系へシャントすると考える説、②拡張性のプロスタグランジンが除去されると考える説がこれまで挙げられている。われわれはさらに、作用機序は不明であるが、ヒスタミンの関与、すなわち肥満細胞も関与している可能性を検討中である。薬物過敏症は、単にアレルギー学的機序のみならず、非アレルギー学的機序が結果的にアレルギー類似反応を引き起こすことを考える必要がある。

W 1 - 2 ワークショップ(1)「薬物アレルギー」
2. 薬物アレルギーの臨床 皮膚科の立場から

早川律子

名古屋大学医学部皮膚科

W 1 - 3 ワークショップ(1)「薬物アレルギー」

3. 薬物アレルギー試験の現状と展望

牧 栄二

萬有製薬開発研究所

薬物アレルギー試験は、その試験を臨床使用時に認められた薬物の異常反応の究明のために行う場合と、新医薬品開発時の安全性試験の一環として行う場合とがあり、それぞれに使用される方法は若干異なる。演者は後者について、その現状と展望について述べる。本邦では開発医薬品の安全性試験の一環として、そのアレルギー性、すなわち抗原性を検討することが義務付けられている。しかし、その実施に際しての具体的なガイドラインは、経皮製剤や点眼剤などの外用剤に関する皮膚感作性試験および皮膚光感作性試験のガイドライン以外はまだ制定されていない。その原因として、諸外国における開発医薬品の抗原性試験に関する考え方が本邦におけるそれと異なり、harmonization できないところに起因するものと考えられる。しかしながら、諸外国において抗原性試験が全く実施されていない訳ではない。抗生物質、生物製剤あるいは蛋白との結合性の強い注射用製剤などについては独自の判断で試験が実施されている。彼らは、薬物の皮膚感作能を調べるために実施されているモルモットでの Maximization 試験 (Magnesson & Kligman 試験) については、ヒトにおける予知性の上で高く評価しているが、本邦で薬物の抗原性を調べるために使用されている方法については、臨床において低頻度で、かつ非常に重篤な過敏症反応を誘発する薬物の抗原性を正しく予知しえないとの見地から、そのガイドライン化については今一つ踏み切れないと聞く。しかしながら、上述したように特別な薬物についてはその抗原性試験が実施されている。諸外国でのこのような現況下において、本邦での抗原性試験の実施状況を見てみると、全ての医薬品開発企業ならびに関連施設では医薬品製造指針の抗原性に関する条項に従い、独自の考えに基づいて試験系を設定し、実施しているのが現状であ

る。現在各企業で実施されている試験のうち高頻度に使用されている試験をあげて見ると、*in vivo*系の試験では能動的全身性アナフィラキシー試験、受身皮膚アナフィラキシー試験、IgE型抗体産生試験、Arthus型皮膚反応試験、遅延型皮膚反応試験などであり、*in vitro*系の試験では赤血球凝集反応試験、沈降反応試験、交叉抗原性試験、Schultz-Dale反応試験、クームス反応試験などである。しかし、試験担当者は試験実施に際し、臨床使用時における薬物アレルギー発生の有無を予知するための最高の条件を設定するために常日頃頭を悩ませているのも現状である。今回、これら試験の実施において、現在どのような問題が散在し、また今後この薬物アレルギー試験はどのように進められて行くべきかなどについて私見を述べてみたい。

W 1 - 4 ワークショップ(1)「薬物アレルギー」

4. 薬物アレルギーの基礎

永井博式

岐阜薬科大学薬理学教室

薬物アレルギーは、医薬品の開発が増加するとともにその発症頻度も上昇する傾向を示している。薬物アレルギーの予知のために非常に多くの研究が成されているが、確実に臨床での発症を知ることは困難である。本シンポジウムでは臨床における薬物アレルギーの現状と問題点を内科と皮膚科の立場からお話いただき、我々基礎の研究者は何を成すべきかを考えてみたい。私に与えられたテーマは「薬物アレルギーの基礎」についてであるのでここではこれまでに分かっている薬物アレルギー発症機序の基礎的な知識について述べる事とする。薬物アレルギーの発症は通常3段階に大別して考えることが出来る。すなわち、その第一段階は薬物の抗原性の獲得の段階である。また、第二段階は薬物に対する抗体あるいは effector T cell 産生段階である。さらに、最終段階としては抗原抗体反応によるアレルギー反応の発現段階である。まず、第一段階の薬物の抗原性の獲得についてその要因を述べる。通常、抗原性は抗原構造の剛直性および1万以上の分子量を必要とする。しかし、一般の医薬品は分子量が1万以下であり生体蛋白との結合も一定の法則は見られない。したがって、薬物アレルギーの発症には分子量が1万以上になり薬物との結合が強固な生体蛋白質が必要である。この生体蛋白は一般的には薬物のキャリアーであるアルブミンが疑われるが薬物の生体内分布を考慮して血球成分あるいは臓器特異蛋白を考える必要がある。この点についてはいまだ明確な実験的研究が成されておらず今後の重要な課題であると思われる。次に、第二段階の抗体もしくは effector T cell 産生の要因について述べる。この場合は産生に関与するアジュバントおよび活性化される抗体産生系の種類が問題となる。アジュバントとしては併用する薬物、食物あるいは併発する感染症の菌体成分などが関

与するようである。一般的には Freund's complete adjuvant やアラムが汎用されるがこれらの基礎的な問題についても検討がほとんど成されていない。今回は、この点についても文献的な考察を中心に若干のデータについて述べてみたい。最後にアレルギー症状の発現についての問題点を述べる。薬物の代謝や生体内運命から腎や肝で薬物が高濃度に濃縮されるのは理解できる。しかし、なぜ臓器特異的なアレルギー症状が発現するのであろうか、この点について統計的に分かっていることを中心に述べる事とする。以上、薬物アレルギーの発症機序の基礎的な点についてこれまでにわかっていることを整理して述べる。

ワークショップ(2)

「新しい毒性試験法へのアプローチ：
in vivoとin vitro試験法の接点」

6月14日(木) 9:00~12:00

座長 大山昭夫(関西医大)
遠藤 仁(東京大・医)

W 2 - 1 ワークショップ(2) 「新しい毒性試験法へのアプローチ： in vivo と in vitro 試験法の接点」

1. 総論：毒性評価は将来どうなるであろうか？

田辺恒義

東日本学園大学薬学部毒理学教室

19世紀に入ってから生理学は、動物実験によって進歩した面がある。更にBuchheim(1820~1879)はエストニアのドルパート大学に於いて、薬物の生体作用を動物について実験的に確かめる方法を研究した。その教えを受けたドイツのSchmiedeberg教授(1838~1921)は、数多くの優れた門弟を養成し、動物実験方法の開発と薬理作用の解明に急速な進歩をもたらし、近代薬理学の基礎を作った。

20世紀の後半には、実験薬理学の活用と化学技術の発達が相提携し、新薬の爆発的開発が起り、薬理作用と生体に対する安全性試験の為に、数多くの動物が使われるようになった。特に、米国ではFDAの提唱した薬効薬理と安全性評価の方法並びに臨床薬理による評価法が制定され(1962年)、前臨床試験に用いられる動物の飼育管理、使用数及び検査項目等に関する厳しい条件が加えられた。この方式は英国(1968年)や欧州各国並びにわが国に於いて採用された。かくして、前臨床試験に用いられる動物の数は、全世界的には莫大な数に達し、この動物を用いて有用な医薬品が次々と開発されるようになった。

他方、欧米では、動物愛護の心情の深い人達の中には、動物を犠牲にする科学者や業者を厳しく批評するばかりでなく、動物実験そのものを妨害しようとする人が現れたと聞く。動物愛護の精神は、誰でも持っている美しい倫理感に基づいたものであり、科学者もまたこの精神を尊重するのは当然である。わが国では、既に「動物の保護管理」(1973年)及び「実験動物の飼養保管」(1980年)に関する基準が法律として規定され、文部省は「大学等における動物実験」(1987年)について指針を出している。実際に、医学や生物学の研究者達は、真摯な気持ちで動物

実験と取り組み、その成果は生命科学全般の発達に寄与している。人間の平均寿命が著明に伸びた陰には、動物実験から得た生体情報が役立っているのも事実である。動物実験は、一部の人が指摘する「福祉に名を借りた蛮行」では決して有り得ないと信ずる。

田嶋博士は、「動物実験の倫理的妥当性は結局 Russellの言う三つの R (Replacement, Reduction, Refinement) の実施に尽き、この 3 R は代替 Alternative という表現に置き換えることが出来る」と定義している。本来、人類は野性の植物を試食して経験的に薬草を見出した。即ち、数千年に亘る経験の積み重ねの結果の発見であり、その発見は人体についての実験結果と言える。従って動物を使う実験薬理学は、人体の代替として動物を用いることであるとも言える。しかし、今日言うところの代替法とは、丸ごとの動物を使わずに人体に対する安全性を評価する方法を指している。

複雑にして精巧を極める人体機能に対する安全性が、単純系の試験管内実験で果たして代替し得るかどうかは、大いに疑問である。しかし、科学の進歩を辿ると、不可能を可能に導いた実例が多数見受けられる。毒科学に携わる科学者は、夢を懐いて前途不明なジャングルに踏み込み、代替法という幻影を目指して努力すれば、何時の日か誰かが予想を越えた発見に突き当たり、毒性評価に革命的改変をもたらす緒を見出すかもしれない。医学は既に代用臓器の人体内移植の時代に入っており、人工臓器の安全性評価を如何にして成し遂げるかは、焦眉の急となっており、この命題も毒科学者に与えられた重大課題と思われる。これらの問題解明には、やはり先ず動物実験の力に頼らざるを得ないことは言うまでもない。

W 2 - 2 ワークショップ(2)「新しい毒性試験法へのアプローチ： in vivo と in vitro 試験法の接点」

2. 新しい発癌試験法へのアプローチ

伊東信行

名古屋市立大学医学部病理学教室

発癌性を明らかにするには、ラット、ハムスター、マウスなどの動物を用いた2年間にわたる長期の飼育観察と全身諸臓器の検索が必要とされている。従ってそれに対する人的、物的費用は莫大であり、しかも検索可能な施設は世界的にも限定されている。このような現状にもかかわらず検索を必要とする化学物質の数は増加の一途をたどっている。そのため、変異原性試験を中心とした短期発癌性試験法が開発され広く用いられてきた。しかし長期発癌性試験の結果との一致性は充分でなく新たな検索方法の開発が急がれるようになってきた。

我々は以上の様な状況を打破するため新しい発癌試験法の開発を目指してきた。最初、注目したのはいわゆる Solt-Farberモデルと呼ばれているものである。これは、肝における2段階発癌の改良でありいくつかの古くから知られている手法の組合せで短期間に肝の前癌病変を発生させる方法である。これを発展させ新たな発癌性試験法として確立することが出来ればと考えたわけである。しかしそのためには多くの基礎的問題についての解析が必要であった。特に初期投与発癌物質の選択、その投与量の決定、観察期間の問題、肝部分切除の必要性の有無や切除時期の設定、肝部分切除に代わる前癌病変促進法の検討、使用動物、特にラットの系や性、週齢差、さらに肝病変のマーカー酵素の選択、前癌病変の2次元と3次元解析による比較、などが追究された。そして最終的に中期試験と長期発癌試験結果との対比が種々の立場で行われ我々が確立した肝病変を指標とする中期発癌性試験 (DEN-PH法) は新しい発癌性試験法として極めて有用であることが明らかとなった。

現在までに DEN-PH 法で行った 171化合物についての検索結果では肝

発癌物質の場合、変異原性の有無に関わらず約 95 % が陽性であった。またこの DEN-PH 法はラットを使用しているが、長期発癌試験でマウスのみが発癌性を示した物質であっても陽性となるなど注意すべき成果も見出された。

しかしこの DEN-PH 法は肝以外に発癌標的性をもつ物質に対しては検出率が比較的低い。そこで、膀胱、肺、脾などを標的とする物質での検討が進められているが発癌標的性が異なる場合には十分な適応が出来ない欠点を残している。このため我々は最近多重癌モデルと呼んでいる新しい中期発癌試験法を開発し各方面から検討を加えている。これはラットに複数の発癌物質を投与することにより種々の臓器にほぼ同程度の初期変化を完了させ、その後に検索物質を投与してその発癌性を各臓器の前癌病変を指標として判定する方法である。このモデルによりすでに多くの成果が蓄積されその有用性が示されつつある。ただこの多重癌モデルは DEN-PH 法に比しより多くの時間と労力を必要とするなどいくつかの解決すべき問題が残されている。

動物を用いる長期の発癌試験法は今や完全にその見直しが求められている。今後我々の開発した新しい発癌試験法が各方面で利用されそれにより多くの新しい成果の得られることを期待したい。

W 2 - 3 ワークショップ(2)「新しい毒性試験法へのアプローチ：
in vivo と in vitro 試験法の接点」

3. In vitro 試験における可能性と限界

佐藤哲男

千葉大学薬学部薬物学研究室

化学物質の安全性を評価する場合、従来は in vivo系が主流を占めてきた。しかし、この様な丸ごとの動物を用いる試験法は、

1. 莫大な時間、費用、労力が必要である。
2. 動物種間の差が無視できない。
3. 動物での試験結果を人へ外挿することが困難である。
4. 大量の動物を犠牲にすることに対する倫理的問題。

などの点で改良が求められている。そこで、それに代わるものとして in vitro 系での試験法が提案され、一部実施されている。例えば、生きた細胞系としては、最近、培養動物細胞、鶏の受精卵、カエルの胎芽細胞、などが既に実用化されている。

この様な in vivo試験法の代替法の確立についての努力は各国でなされており、わが国においても現在各方面においてその研究が遂行されている。本来、代替「alternative」とは、従来法に比べてよりすぐれていなければならず、単に現行法と置換するのみではならない。従って、代替法は in vivo試験法に比べてより多くの情報をもたらすことが期待される。代替法を考えるに当たっては、それを現行の試験法と全て置き換えることは不可能であり、またその必要はない。むしろ両者は並行して相補的に用いられるべきである。

In vitro試験系の欠点としては次のことが考えられる。

1. 免疫毒性の評価が困難。
2. 慢性毒性や障害からの回復性の評価が困難。
3. ヒト細胞での培養細胞系では、現在の cell lineの系のみでは不十分。
4. ある種の細胞、例えば、筋肉、脾臓、腸などは継代培養することによ

り脱分化し、元の組織を判別する性質を失い、より原始的な細胞に戻る。

一方、*in vitro* 系の利点としては次の事項が挙げられる。

1. ヒト培養細胞を用いる試験では動物とヒト間の差を考えなくても良い。
 2. 試験法の標準化が容易である。
 3. 培養条件を任意に変えることが出来る。
 4. 少量の被験物質で試験が可能である。
 5. 毒性試験に必要な動物数が大幅に削減される。
- などである。

*In vitro*試験法は、使用する臓器により *in vivo*試験との対応が一様ではないので、個々のケースに応じて考える必要がある。現在広く検討されている培養細胞系が全てにおいて最良であるとは限らない。例えば、肝毒性試験の場合、単離肝細胞や培養肝細胞を用いる系は既に実用化されているが、目的によっては、肝スライス、摘出灌流肝を用いる方がより多くの知見が得られることもある。灌流実験については、現在肝臓のみならず、心臓、脳、腸、肺、膵臓などでもその方法が確立されており、実用化が可能である。

さらに、化学物質の生体内動態と毒性との関係を数学やコンピューターにより推定することもある程度は可能であり、トキシコキネティクスの重要性も考慮せねばならない。現段階では一般毒性と被験物質の化学構造との関係を経験的に推定しているが、将来は特定の毒性反応と化学物質との構造-活性相関を数学により決定することも可能となるであろう。

どの様な場合でも、*in vivo* で投与された化学物質は、分子、細胞、個体の順序でその応答を発現することとなる。この場合、分子レベル、細胞レベルでの応答を *in vitro* 系で知ることは可能であるが、個体レベルで integrate された毒性を知るためには *in vivo*系を用いなければならない。この様に、*in vitro*系の限界を認めた上で、その利点を応用すべきである。

本ワークショップでは *in vitro* 系で得られる成績がどこまで *in vivo* 系での従来法に接近出来るか、また、両者が各々の特徴を生かした上で共存させるための条件、などについて例を挙げて述べる予定である。

W 2 - 4 ワークショップ(2)「新しい毒性試験法へのアプローチ： in vivo と in vitro 試験法の接点」

4. 整形外科領域で使用する生体材料の臨床上および評価法に おける問題点

○琴浦良彦、岡 正典、山室隆夫¹⁾

京都大学医用高分子研究センター、¹⁾整形外科教室

近年整形外科領域において、金属、セラミックス、高分子材料より出来た生体材料を使用する機会が頻繁となり、多くの新材料の開発研究が行われている。いままで経験した臨床的な問題としては、高分子材料の摩耗粉の影響で人工関節にゆるみを生じたり、金属摩耗粉の影響で材料周辺の組織が真っ黒に変色し、金属イオンの分析ではニッケルが上昇し、将来発癌の危険性も十分考えられるような症例もみられ、生体材料の選択は従来の基準とは異なり、より厳密さを要求されるようになってきた。先端技術を駆使して新しく開発されつつある材料はもとより、従来から使用されてきた材料についても、その物理学的な性状と共に生体に対する組織毒性や安全性の確認が重要となってきた。

細胞培養を使った生体材料の毒性テスト法については、今までに多くの報告があるが、われわれは、再現性、鋭敏性が高く、結果の判定が容易かつ明瞭な in vitro 実験系として V79細胞の材料表面上でのコロニー形成を指標とした実験法を採用し、整形外科領域で用いられている生体材料の細胞毒性や材料間の相違を生物学的に検討してきた。本法の実験手技と問題点について述べる。

直径 49 mm、厚さ 1 mm の円板及び半円板の滅菌済み試料を、60 mm 径（内径は 50 mm）のプラスチックシャーレに無菌的に入れ、1 シャーレ当たり、8 ccの培養液に 100個の細胞を播種し、炭酸ガス培養器内で1週間静置培養する。1週後、10 %中性ホルマリン液で 30 分間固定、0.1 %メチレンブルー液 5 cc で1時間染色、その後流水中で水洗を十分に行い乾燥させる。判定は各種の円板材料表面上のコロニーを肉眼的に或いは実体顕微鏡を用いて、コロニー数を数え生存率をだす。以上述べた方法と評価基準により整形外科領域で使用されている生体材料および現在開発中の生体材料の安全性や材料の相違を検討してみた。

金属材料として、臨床的に既に古くから使用されているSUS316、Ti、各種 Ti 合金の円板上でのコロニー形成は、その数、形ともコントロールとの間に差はみられなかった。しかし、ニッケルやバナジウムの円板上及び半円板を使った実験ではコロニーの形成は全くみられず V79細胞に毒性を示す物質の溶出が示唆された。動物実験でも組織毒性や発癌性が証明されている。

セラミック材料では、人工関節や人工骨として実績のあるアルミナ・セラミック、骨親和性の高いと言われている水酸アパタイト (HA) 及びTricalcium phosphate (TCP)、京大で開発された A-Wガラスセラミックを対象とした。更に、焼成温度、製造方法等の相違が細胞毒性にどのように影響するかについても検討した。

多結晶アルミナ、水酸アパタイト、A-W ガラスセラミックはコントロールと同様のコロニー形成率を示した。TCP は予想に反して円板、半円板の実験共コロニーは全くみられず、培養液の変化が示唆された。

アルミナ・セラミックは、安定した材料であると考えられてきたが、ポーラスアルミナでは、コロニー形成が全くみられず、同一メーカー、同一組成の材料でも、製造方法が違くと生物学的反応の異なる事があることが判明した。したがって、材料の化学的組成だけで、その生物学的反応を一様に述べる事は危険である。

水酸アパタイトも臨床的に使われているが、同一成分でも焼成温度の違いにより細胞毒性に差がみられる事が判明した。

高分子材料では、人工関節材料として頻繁に使用されているhigh density polyethylene (HDP)、可塑材が問題となっている PVCについて検討した。HDP ではコロニー形成を認めたが PVCではコロニー形成はなく可塑材の影響が示唆された。

細胞培養の結果と動物実験の結果は必ずしも一致しないことがあり、in vitroの結果のみで材料の全体的な評価をすることは現在不可能であるが本法を行うことにより細胞毒性の有無は判定でき、毒性のみられるものについてはその原因を調べ個体に対する影響の程度を種々の方法で検索していくきっかけとなる。In vivo との関連については更に詳しく検討する必要があるが手技が簡単で鋭敏性、再現性にすぐれ、結果の判定も容易である細胞培養法は生体材料の安全性評価の一手段として有用な方法であると考えられる。

W 2 - 5 ワークショップ(2) 「新しい毒性試験法へのアプローチ： in vivo と in vitro 試験法の接点」

5. バイオマテリアルの in vitro 毒性試験の実情

佐藤温重

東京医科歯科大学歯学部第2理工

バイオマテリアルの医療における重要性は近年著しく高まりつつある。バイオマテリアルの安全性評価はその為害作用が局所的のみならず systemic にも認められるという見地にたち広範囲の毒性試験を基にしてなされている。バイオマテリアルの毒性試験法については ASTM (American Society of Testing Materials)、ISO (International Standard Organization)、BS (British Standard Institution)、HIMA (Health Industry Manufactures Association) その他で 1960 年代より検討され、規準となる方法を確立してきた。そして in vitro 培養細胞毒性試験は生体適合性試験の国外における重要な基準に採用され、またわが国でも眼内レンズ承認基準(昭和 60 年 5 月)に加えられている。培養細胞毒性試験は、バイオマテリアルの開発はもとより製造承認審査においても大きな役割を果たしている。

バイオマテリアルの培養細胞毒性試験は 1965 年 Rosenbluth らによりはじめて報告されたが、それが生物学的評価法の一つに加えられた理由は、1) バイオマテリアルの毒性試験として最も感度のよい試験である筋肉内埋入試験と培養細胞毒性試験との並行試験において両者の適合率が 97 % であり (Northup S. J., 1987)、また良好な相関性 (Genova T. P. et al., 1983) があること、2) 試験法の標準化が行われ、同一実験室内での再現性、実験室間での再現性の検証試験で良好な結果を得ていること、3) バイオマテリアルの毒性は溶出するイオンなどの化学的要因と、表面構造など物理的要因が原因となるが、バイオマテリアル溶出物の毒性が感度よく検出可能であり、また細胞とバイオマテリアルの直接接触により界面の適合性の評価が可能であることなどである。

規準に採用されている試験方法として寒天重層法その他がある。寒天重層法における毒性の判定は細胞の形態変化、変性、融解の程度の半定量的評価と標準陽性物質のジブチル錫を含む PVC との相対評価により行われる。

試験細胞の標準化については L-929細胞が有力であるが、WI-38 細胞等を主張する研究者があり、一致をみていない。

細胞培養試験における毒性と移植試験における組織反応の発現過程には類似性があるが、細胞培養法は代謝、排泄系を欠くため感度がよい。しかし、その他の *in vivo* の試験における毒性発現と比較したとき、細胞培養においては、動態学、特に薬物代謝系を欠くため誤った陰性結果をうる可能性がある。肝初代培養細胞と試験細胞の *co-culture* 系を用い代謝活性化を必要とする化学物質の検出が行われている。

In vivo における障害は一連の過程からなりたっているが、寒天重層法における毒性判定は細胞死の段階を調べていることになる。近年、例えば炎症の一連の過程を構成する mediators の放出、代謝変化などの指標をもとにした毒性の評価が行われ、*in vivo* の障害の詳細が *in vitro* で明らかにされている。この種の研究にとって現在汎用されている試験細胞は満足すべきものでなく、分化機能を保有している培養細胞を用いることが必要である。このような細胞を用い毒性指標として機能的指標を採用するならば、臓器毒性の検出、毒性機序の解明が可能となる。分化機能を保有している初代培養細胞は有限増殖であり、試験細胞とすることが困難であるが、近年遺伝子工学的手法により、無限増殖性を与えることが可能となっている。ヒト歯髄細胞に SV40 DNA pMT1-neo 遺伝子を導入し、無限増殖性を獲得し、かつ分化機能を有する HOP 細胞が樹立され、歯髄特異的毒性検出への応用が考えられている。

培養細胞毒性試験は変動が小さいという特徴を有する。

バイオマテリアルに関しては培養細胞毒性試験は動物試験をすべきか否かを決定するのに役立つ、また、細胞-バイオマテリアル界面現象の解析に有用である。

W 2 - 6 ワークショップ(2)「新しい毒性試験法へのアプローチ：
in vivo と in vitro 試験法の接点」

6. 追加発言：日本毒科学会会員として今後に望むこと

村野 匡

和歌山県立医科大学薬理学教室

今回亀山会長のご好意で開催された、このワークショップ開催と日本毒科学会に“新しい毒性試験法開発に向けての”検討委員会の設置が承認されたことは、形式的には一見別個なもののような印象を受けるが、基本的には極めて密接な関係にあると思惟される。

即ち、同検討委員会設立に関する答申書内容にもられている「特定テーマ或いは特定方法術式に関する継続的シンポジウムの開催」の項の実施第一回の性格をもっているものと理解したい。

従って、従来行われたシンポジウムの如く単回で或る主題の総括を以て完了するものとは趣を異にし、定期的且つ継続的に実施されるに違いない。

又、発表内容も毒科学会員のみによる個別的研究成果発表のみに止まらず、学会要望のテーマへの依頼研究も公表されることが予想される。

この事は必然的に本学会会員と他学会会員（非日本毒科学会会員）との共同研究ないしグループ研究が盛んになる筈である。

更には、研究者各位は自己の興味ある自己の選んだテーマ以外の研究依頼を要請されることが多くなるに違いない。

そのためには、政府（文部省、厚生省、科学技術庁等々）、各種研究助成財団、各関連学会からの財政的並びに連带的協力が不可欠となってくる様に思われる。

以上の諸要因は、従来の同一学会内で同会員の了解の下に、了承事項のみにつき審議実施して来た姿勢だけでは解決が得られず、同学会のワクを越えて、関連学界、関連研究機関等への連携化の「まとめ役」を日本毒科学会が担うことを意味している。

この様な重責をはたし得て、始めて「新しい毒性試験法開発が具現化する素地が出来上がるものと思惟される。

私は、一日本毒科学会会員として、この様な壮大な且つ困難なテーマを採択された本学会理事会並びに同評議員会に対し、心から敬意を表すると共に、その実践の第一歩が踏み出される日の一日も早からんことを願うものである。

◎ 総会(B)のPR

シ ン ポ ジ ウ ム (1)

「 行 動 毒 性 」

6月13日(水) 14:00~16:30

座長 亀山義郎(中津川市民病院)
高仲 正(国立衛試)

S 1 - 1 シンポジウム(1)「行動毒性」

1. 行動学的手法の毒性学への応用

重田定義

東海大学医学部衛生学教室

ヒトを含む動物の行動を研究する学問において用いる行動の観察および分析の諸手法を応用して、薬物、工業化学薬品、環境汚染物質等の化学物質の中樞神経系におよぼす毒性の評価を行う学問を、行動毒性学と呼ぶことにする。

化学物質の毒性には、生体に器質的な障害を残すものから、可逆的、機能的変化を生ずるものまで種々の程度がある。前者は解剖学的、病理学的指標により形態的異常としてとらえられ、後者は生化学的、生理学的指標によって機能的変化が測定される。中樞神経系に器質的、形態的障害が生じれば、行動上にも変化が現れるのは当然であろうが、行動毒性学では、中樞神経系に器質的障害が生じる以前の機能的変化をとらえるところに意義がある。したがって、化学物質の作用機序を解明するよりもむしろ、毒性の判定、スクリーニングに行動毒性学の役割があるのではなかろうか。この場合に、毒性評価に用いる各種の行動検査の精度や妥当性などが問題となる。また、評価の際には行動に影響をおよぼす化学物質以外の諸要因についても十分な配慮が必要である。さらに、中樞神経系に障害をおよぼす化学物質のなかには大量に体内に吸収された場合には、中樞神経系のみならず全身状態や他の臓器をも障害し、その結果として二次的に行動に変化が生じる可能性もあることにも留意すべきである。

演者は、主として産業医学の立場から、ヒトおよび動物における行動毒性学の現状および問題点を紹介する。

S 1 - 2 シンポジウム (1) 「行動毒性」

2. 行動毒性と神経伝達物質

鍋島俊隆

名古屋大学医学部 薬剤部・医療薬学

多くの毒物が種々の行動毒性を発現することが知られている。これら毒物の多くは、その作用点が不明であったり、同時に種々の神経系に作用するため行動毒性の発現機序を知ることは非常に難しい。しかし、この中に、数は少ないが、特定神経系の直接または間接的なアゴニストとなることにより行動毒性を惹起するもの、逆に特定神経系の神経毒となり、神経を変性、損傷することにより行動毒性を発現するものがある。このような毒物では、行動毒性と特定神経の機能変化との関連を理解することが可能と思われる。そこで、このような毒物を取りあげて、行動毒性と神経伝達物質およびその伝達物質の関与する神経系との関連について紹介する。

ドバミン作動性神経系：この神経系の直接または間接的なアゴニストのアポモルヒネ、アンフェタミン、メタンフェタミンは常同行動を惹起し、受容体遮断薬のハロペリドールやクロロプロマジン、不動化を惹起することが知られている。また、これらアゴニストを連続投与すると行動上逆耐性現象が観察される。カテコールアミン神経の神経毒、6-OH DAをデシプラミンと併用するとドバミン作動性神経系が主に変性する。このとき、6-OHDAを片側線条体に注入し、上記アゴニストを投与すると回転行動が惹起される。最近になり、神経毒 MPTP は脳内で MPP⁺ に代謝され、これが主に黒質のドバミン神経細胞を消失し、パーキンソン病症状を霊長類やマウスに起こすことが報告されている。

セロトニン (5-HT) 作動性神経系：5-HT 依存性の異常行動として、Straub 挙尾反応、前肢の足踏み、首を左右にゆっくり振る行動、振戦などは、5-HT₁ 受容体のアゴニストの 8-OH-DPAT により惹起されるので、5-HT₁ 受容体を介しており、首や体幹を耳介反射のように急速に振る行

動、後肢伸展などは、5-HT₂ 受容体遮断薬で抑制されるので、5-HT₂ 受容体を介していると考えられている。

アセチルコリン (ACh) 作動性神経系: AF64A は、コリンの取り込みを抑制し、高濃度ではコリンアセチル転移酵素の活性を低下、さらに神経細胞体および神経終末を変性する。海馬や前脳基底核に AF64A を注入すると、受動的回避反応の学習・記憶が障害される。同様に、神経毒イボテン酸を前脳基底核に両側性に注入すると、ACh 神経細胞体を変性し、アルツハイマー病様症状が惹起され、種々の学習・記憶が障害される。

γ-アミノ酪酸 (GABA) 作動性神経系: GABA 受容体の直接または間接的な遮断薬のピククリンやピクロトキシンは、けいれんを惹起する。カイニン酸やイボテン酸を脳の実質内へ微量注入すると、神経細胞体を変性する。これらを両側の線条体へ注入すると、ACh および GABA 作動性神経系が変性し、ハンチントン舞踏病モデルができる。このモデルではハンチントン舞踏病の場合に見られる学習・記憶障害が観察される。

グルタミン酸作動性神経系: グルタミン酸受容体の競合的および非競合的遮断薬で種々の学習・記憶が障害され、常同行動が発現する。

オピオイド系: モルヒネを連続投与し、依存性としたマウスに、μ 受容体の遮断薬のナロキソンを投与すると、退薬症状が観察される。

S 1 - 3 シンポジウム (1) 「行動毒性」

3. 犬の行動の日内変動と行動毒性

樽見千利

三共株式会社 安全性研究所

イヌは一般毒性試験で多用されている動物であるにもかかわらず、その行動を行動毒性学的観点からまとめた報告は余りみられない。そこで、ビーグル犬で薬物投与により発現する異常を行動毒性学的に把握することを考えた。まず、基礎的情報として、正常なビーグル犬で、数値表示が可能な非学習行動の日内および日間の変動を観察した。次に、薬物投与によるこれらの行動変化を検討した。

室温 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、照明時間 9 - 17 時に設定された動物室で、アルミ製ケージ (縦、横各 70 cm、奥行き 80 cm) に個別飼育されている健康な雌雄 20 例のビーグル犬を用いた。動物は 1 日 1 回、200 g のイヌ用固型飼料を与え、自由給水条件で維持した。給餌時刻の違いにより、午前 (9 時) および午後 (13 時) 給餌の 2 群を設定した。これらの群に関して、摂餌状況を肉眼的に観察し、糞量を天秤で、摂水量および尿量をメスシリンダーで、自発運動量を万歩計で測定した。測定は、9 - 17 時の間に 1 あるいは 2 時間毎、3 日間連続して行った。その結果、給与した飼料は午後給餌群の 4 例を除く全例で毎日 30 分以内に摂取された。糞および尿の排泄頻度は低く、日内および日間で定型パターンは見られなかった。摂水量は、両群共に摂餌後に高値を示しその後漸次減少する日内変動パターンが認められ、このパターンは日間で同様に繰り返された。自発運動量は、24 時間カウント数で個体差が見られたが、同一個体では日間で同様な値が繰り返された。また、単位時間カウント数の 24 時間カウント数に対する比較値は、動物室の洗浄あるいは給餌時間帯に高値となるパターンが認められた。これらの結果から、数値化できる非学習行動の連続測定が、動物の状態を客観的に把握する方法の一つとして利用できると考えた。

時間毎に観察者が測定する方法は、測定を実施できる時間、すなわち連続性に限界がある。このため、日内変動パターンのみられた摂水量、およびこれに関連の深い尿量を24時間連続して測定するための自動測定装置を作成した。これらの装置によって夜間行動も把握可能となった。

最後に、投薬による行動変化を捕らえる目的で、アロキサン等の薬剤を投与した少数例で非学習行動の変化を検討した。その結果、アロキサン投与後、24時間摂水量、尿量が増加したばかりでなく、摂水、排尿パターンに変化が認められた。また、観察者が対面し観察する方法では、運動量の減少は明確でなかったが、万歩計の24時間カウント数は減少した。

以上のことから、ビーグル犬の非学習行動を指標とした、行動毒性学的観察は動物の生体異常を高精度に補えることに有効であると考えた。

S 1 - 4 シンポジウム(1)「行動毒性」

4. 発生毒性試験における行動観察手技の適用について

田巻義孝

信州大学教育学部

胎児アルコール症候群、メチル水銀、放射線被爆などによって出生児の行動や精神機能が障害を受けるという臨床医学における最近の知見に基づけば、生殖試験において動物の行動を観察し、機能的な脳発達障害の可能性を考察することが求められる。しかし、動物の行動観察法は確立しているといえる段階にない。

その理由としてさまざまなことが考えられるが、当初想定されたほど動物の行動は鋭敏(sensitive)でないことが指摘できる。それでは、動物の行動はなぜ鋭敏でないのか。この問いに対する解答を出すことは難しいが、次のように考えることができる。すなわち、環境に適応するためにあらゆる機能を使って、動物(ラットやマウス)は生き続けようとしている。いいかえれば、その環境下で動物の生存は絶えず脅かされており、この意味において動物の行動は目的追求的である。環境にもし適応できなければ、その個体は「死ななければ」ならないのである。生存にかかわる動物の行動を観察している限り、それは決して鋭敏なものとはなりえない。「当然、劣っているはずである」ことを前提とした検索の目的を見直し、たとえば一過性(transient)の障害に対する理解を深める必要があろう。その上で、「遊び」に類する動物の行動を観察できるように観察手法に思いをめぐらせるべきである。

また、胎仔期に投与され、代謝・排泄されてしまった薬物の影響を、成獣になってから行動を通して検索する時間的な「ズレ」についても考慮しておかなければならない。脳の機能レベルにおける代償性や、「形態-機能」の関連性をどのように考えるのかということも問われている。

非可逆的な形態学的な変化の観察にはみられないこのような難しさを今後どのように克服するかが、動物の鋭敏な行動を観察できるようになる鍵であると思われる。

S 1 - 5 シンポジウム(1)「行動毒性」

5. 薬物の胎仔機能毒性

藤井儔子

帝京大学医学部薬理学教室

妊娠母体投与薬物による胎仔機能発達の異常の指標としては生理機能のすべてを評価することが必要であるが、脳機能障害有無はヒトにおける社会的問題としても大きいために多くの研究が積み重ねられている。その一つとして文献的にも感度の高い指標とされている行動観察を行うことが多い。行動毒性評価の報告は非常に多いが、そこに含まれる問題点は、1) 動物の各種の行動を支配する神経系の把握が明確でないこと、2) 行動の量的変化と障害の程度との関連づけが困難なことである。この点は動物における行動毒性の分析結果をヒトに外挿することを一層困難にしている。

われわれは、臨床に使用される薬物のラット脳機能毒性を評価する一方で、脳機能発達の表現型の一つである行動と脳障害の影響をより正確に理解するために短期間の薬物曝露の影響を検討している。すなわち、従来の文献的資料をもとに中枢神経系の neurogenesis の時期が脳の部位により異なり、しかもラット、マウスでは比較的短期間内に決定されることを利用して、①薬物の投与期間の的を脳の特定の部位の neurogenesis の数日にしぼる、②あるいは妊娠全期間いずれかの日に一回のみ投与する方法で、その影響の有無、変化度の評価を生理的指標に基づいて行う。さらに出生仔の機能評価を、薬物曝露の的にした神経系に比較的特異的に作用する薬物への反応性を応用して行う。

上記①、②の目的に沿い、今回は細胞分裂への影響が大きい抗腫瘍・免疫抑制薬に胎仔を曝露し、その出生仔について検討した成績を中心に述べる。

動物：Wistar-今道ラットを使用。

薬物と投与計画：Cisplatin(以下CPL、ランダ®注、日本化薬) 1 mg/kg、

nimustine (NMS、ニドラン®注、三共) 3 mg/kg を妊娠 6~19日 (膣スミアに精子を認めた日を妊娠 0 日) いずれかの日一回のみ午前11~12時の間に皮下注射。一部の実験では cytarabine (CTB、キロサイド®注、日本新薬) 3, 10 mg/kg を妊娠13, 14, 15日いずれかに腹腔注射、対照妊娠ラットは同じ妊娠日に蒸留水を同量投与した。

出生仔 (F₁) の行動観察：行動観察の目的を 2 つに分けた。①生理的行動発達の比較のため F₁ 乳仔ラットにつきオープンフィールドテストを、②脳障害部位の推測のために、今回は kainic acid 9 mg/kgあるいは12 mg/kgを腹腔内投与し、その行動の wet-dog shakes、scratchingと最終的の痙攣発現を観察、一部は haloperidol 1 mg/kg腹腔投与後のカタレプシー時間を検討した。

上記の観察結果をもとに投与妊娠日に関連した変化の有無、すなわちラット胎仔脳の neurogenesis の各ステージに関連した行動変化の有無の成績につき述べ、この領域の問題点の考察を加える。

シ ン ポ ジ ウ ム (2)

"Environmental Toxicology"

6月14日(木) 15:20~17:00

座長 佐藤哲男(千葉大・薬)

L. W. Chang (Univ. of Arkansas)

Professor Louis W. Chang

Depts. of Pathology, Pharmacology and Toxicology
Univ. of Arkansas Medical School, Little Rock, AR
U.S.A.

Organic compounds of various heavy metals appear to have a particular toxic affinity to the central nervous system. Alkylmercuric compounds, such as methylmercury, have a selective effect on the granule cells of the cerebellum, on the calcarine cortical neurons, and on the sensory neurons in the dorsal root ganglia. The well known Minamata Bay disease was the result of a massive epidemic episode of human exposures to alkylmercury contaminated fishes. Mental retardation and other developmental defects are also known to be consequences of exposure to this toxic metal during development. Organic lead compounds have been used as gasoline additives and for other industrial or agricultural purposes. Unlike its inorganic counterpart, organolead compounds have a more prominent and specific impact on the central nervous system. Pathological changes in the hippocampus and brain stem neurons have been described. Organotin compounds are widely used in industries and in agriculture. Among the various alkyltin compounds, trimethyl and triethyltins are found to be most neurotoxic. Despite the similarities in chemical structures, these two compounds exhibit diversely different toxic properties and effects. While triethyltin is myelinotoxic, producing severe edematous and vacuolar changes in the central myeline (white matters), trimethyltin is a potent neuronotoxicant, producing prominent damages to the neurons mainly in the limbic system (entorhinal cortex, hippocampus, etc.) The factors which determine the selectivity and specificity of neurotoxic impacts by each organometal are still unknown. Certain metal compounds, such as methylmercury, exhibit a direct correlation between tissue accumulation verses the target area of damage. These type of metals may be viewed to exert a direct cellular toxicity to the target neurons. On the other hand, some metal compounds, such as trimethyltin, exhibits no accumulation/damage relationship or correlation. These metal neurotoxicants may represent a class of toxic compounds which produce a functional change (e.g. hyperexcitation) in the nervous system which in turn produces damages to a group of nerve cells at a distant site. Such phenomena will be demonstrated and discussed.

S 2 — 2 Biological Reactive Intermediates of Bisfuranoid Mycotoxins

DENNIS P. H. HSIEH

Department of Environmental Toxicology
University of California, Davis, CA 95616, USA

Bisfuranoid mycotoxins are a family of *Aspergillus* secondary metabolites that contain in their molecules the characteristic dihydrobisfuran ring structure. This structure, upon metabolic activation, forms an electrophilic epoxide capable of covalent binding with nucleic acids to produce biochemical lesions and induce mutagenesis and carcinogenesis in experimental animals. Aflatoxin B₁ (AFB₁) and sterigmatocystin (ST) are members of this family with potent hepatocarcinogenicity, which have been found in moldy foodstuffs. AFB₁ has recently been classified as a human carcinogen by the International Agency of Research on Cancer, on the basis of toxicological and epidemiological findings. In animal cells containing the activity of the cytochrome P-450 associated monooxygenases or prostaglandin H synthetase, AFB₁ is metabolized to form the reactive electrophilic 8,9-oxide, which then reacts exclusively with the guanyl moiety of cellular DNA at the N7 position to form AFB₁-DNA adducts (ADA). A portion of the guanyl-AFB₁ adducts in the modified DNA are removed by a depurination process. The remaining adducts undergo spontaneous conversion to form the repair-resistant formamido-pyrimidyl derivatives (FAPY) of the adducts. The AFB₁-FAPY adducts accumulate and reach different steady state levels in the liver DNA of animals that are continuously exposed to different daily doses of AFB₁. For rat and rainbow trout, linear relationships between daily dose and steady state level of AFB₁-FAPY adducts in liver DNA and between the latter and incidence of liver tumor have been empirically observed. These linear dose-response relationships suggest that AFB₁-FAPY adducts can be a key chemical lesion in the AFB₁-induced hepatocarcinogenesis and a useful biomarker for assessment of cancer risk posed by AFB₁. AFB₁-FAPY adducts have been consistently detected in high percentages of the liver samples taken from liver cancer patients in Czechoslovakia, Taiwan, and Japan. The FAPY adducts of ST have also been identified and characterized in experimental animals dosed with ST. Similar FAPY adducts may be anticipated to be the effective chemical lesions and biomarkers of other bisfuranoid mycotoxins.

I. K. Ho

Dept. Pharmacol. & Toxicol., Univ. Mississippi Med. Ctr., Jackson, MS 39216, USA.

Diisopropylfluorophosphate (DFP) toxicity and tolerance in rats were studied. Acute injection of DFP showed dose-dependent depressions in body weights and in food and water consumption. The animals recovered within 72 hours. Tolerance to DFP in terms of growth rates, food and water consumption occurred. Other behaviors, e.g., tremors, chewing-movements, hind-limb abduction and hypothermia induced by DFP increased in a dose-dependent manner. All, except chewing, subsided after 7 hours. Chronic treatment with DFP for up to one month produced biphasic patterns of change for all the behavioral parameters. Except for chewing, tolerance developed for all these behaviors, but at different rates. The data show dose-dependency of general toxicity during acute and subacute exposure to DFP and of tolerance during subacute exposure.

The effects of acute and subacute administration of DFP to rats on acetylcholinesterase (AChE) activity (in striatum, medulla, diencephalon, cortex and cerebellum) and dopamine (DA) receptor characteristics were investigated. After a single injection of DFP, the striatal region was found to have the highest degree of AChE inhibition. After daily DFP injections all brain regions had the same degree of AChE inhibition. Acute administration of DFP increased the number of DA receptors without affecting the muscarinic receptor characteristics. Whereas subacute administration of DFP for either 4 or 14 days reduced the number of muscarinic sites without affecting their affinity, the DFP treatment caused an increase in the number of DA receptors only after 14 days of treatment. This increase was lower than that observed after the acute treatment.

After acute treatment, striatal DA and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) levels were altered with a trend such that the DOPAC/DA ratios were consistently increased within about the first two hours, suggesting an increased turnover of DA. After subacute treatment, DA and DOPAC levels were both decreased without a change in their ratios. Daily treatment for 28 days, however, had no effect on levels of DA and DOPAC.

The results indicate an involvement of the dopaminergic systems in the action of DFP. It is suggested that the dopaminergic involvement may be a part of a compensatory inhibitory process to counteract the excessive cholinergic activity produced by DFP.

S 2 - 4 Risk assessment of chemical contaminants in drinking water

Anna M. Fan, Ph.D.

California Department of Health Services

The risk assessment of chemical contaminants in drinking water is performed to establish safe concentrations for human exposure through action levels (ALs), maximum contaminant levels (MCLs) and recommended public health levels (RPHLs). These guidance levels or regulating standards are primarily health based, but the MCLs may be risk managed values which also consider economics and technical feasibility and are legally enforced. The assessment involves hazard identification, dose response evaluation, exposure assessment and risk characterization. Carcinogens are evaluated based on tumor incidences and the associated risks estimated by using mathematical modeling for low-dose extrapolation. Non-carcinogens are evaluated to identify the health effects of concern and acceptable daily intakes are developed with the consideration of uncertainty factors and pharmacokinetics when appropriate. Aesthetic effect is also considered for the secondary standard development. Thirty-six contaminants have been evaluated for establishing MCLs. Twenty-four MCLs have been promulgated and 12 proposed (PMCLs). Nine are undergoing evaluation. The industrial chemicals include dichloroethanes, trichloroethanes, tetrachloroethane, Freons 11 and 113, carbon tetrachloride, vinyl chloride, dichloroethylene, trichloroethylene, perchloroethylene, diethylhexylphthalate, 1,4-dichlorobenzene, ethylbenzene, monochlorobenzene, xylenes and benzene. The pesticides include dibromochloropropane, 1,2-dichloropropane, 1,3-dichloropropene, ethylene dibromide, chlordane, heptachlor, carbofuran, atrazine, bentazon, glyphosate, molinate, simazine and thiobencarb. The inorganics include aluminum and uranium. The values for the MCLs and PMCLs will be presented along with the supporting rationales.

PRACTICAL CONSIDERATIONS FOR THE DEVELOPMENT AND RISK ASSESSMENT OF PESTICIDES. Peter Chan, Toxicology Department, Rohm and Haas Company, 727 Norristown Road, Spring House, PA 19477

For decades, pesticides have been used to increase both the quality and the quantity of food supplies. Even with undeniable benefits, the debate over the safety of these chemicals has intensified in the U.S. and other affluent countries where foods are cheap and abundant resulting from the use of these chemicals. Some people heartedly believe the risk of these chemicals is too high even for a starving world, yet others consider that the pesticide debate is just another YUPPIE CAUSE in fashion, and the real risk associated with the uses of pesticides is non-existing and certainly much less than that from many naturally occurring environmental contaminants. But proponents on both sides of the issue generally agree that we have a much better understanding of the toxicity and hazards of most pesticides than other chemicals, mainly because laws and regulations for pesticides are the toughest. Extensive data on mammalian, fish and wildlife toxicity, crop and environmental residues, metabolism and pharmacokinetics, and worker exposure are routinely required. While the generation of these data is somewhat robotic, the interpretation and use of these data is often controversial. Recent emphasis in assessing the risk of pesticides in the U.S. has been placed on estimate of exposure--the part of the risk equation that can be improved with less scientific uncertainties than toxicity, e.g., market basket survey studies for dietary exposure, and field monitoring studies for fish and wildlife exposure. Also increasingly being emphasized are the patterns of exposure for various sectors of the general population, e.g., infants, small children, and agricultural workers. Recognizing the benefits of pesticides and their potential hazards, risk managers are often faced with the dilemma of how to balance the potential risk and benefits. The benefits of pesticides unfortunately are often overshadowed by the emotional consideration of only toxicity, especially those seen at high doses in animal studies.

一 般 演 題

A 会 場

A-1~A-5: 6月13日(水)

A-6~A-15: 6月14日(木)

A - 1 クロルデコンの神経機能障害の発現機序

- PC12細胞を用いての電気生理学的検討

○中沢憲一，井上和秀，小濱とも子，藤森観之助，
高伸 正

国立衛生試験所安全性生物試験センター・薬理部

我々は化学物質の神経機能障害性を検討するためのin vitroの系として培養細胞を用いた研究を進めてきた。今回は，他の有機塩素系殺虫剤と比べ極めて強い神経機能障害性を示すことが知られているクロルデコン(chlordecone, CDC)についてPC12細胞を用いて電気生理学的に検討し，その発現機序として新しい知見を得たので報告する。

<方法> Dulbecco's modified Eagle液中で2-3日培養したPC12細胞を実験に供した。パッチ・クランプ法により細胞を膜電位固定し膜電流測定を行った。

<結果>低濃度(3-10 μM)のCDCは電位依存性Ca電流およびK電流を抑制した。細胞外ATPにより活性化される受容体依存性内向き電流も10 μM CDCで振幅が半減した。高濃度のCDC(30 μM)は細胞膜のリークと思われるイオン選択性の低い電流を惹起した。CDCの類似化合物であり障害性がないとされるマイレックス(mirex)にはこれらの作用は認められなかった。

<考察>今回の結果より，CDCの機能障害はイオン透過性の低下による神経興奮抑制に起因することが示唆された。この作用は低濃度でかつ迅速に起こることから考えて，これまでに報告されている発現機序(細胞外カルシウム流入増大・ATPase系の抑制，など)に先行する機序であると考えられる。

A - 2 新キノロン系合成抗菌剤と非ステロイド系抗炎症剤併用時のラット網膜電位図(ERG)への影響

○山田 昌男、坂元 由香、大野 広志、野村 護

第一製薬株式会社 中央研究所 安全性研究センター

新キノロン系合成抗菌剤には非ステロイド系抗炎症剤との併用により痙攣を誘発するものがあることが知られており、これはGamma-aminobutyric acid(GABA)受容体結合阻害が原因とされている。その際に我々は、網膜電位図(ERG)に変化が起こることを見だし、上記薬剤併用時のERG変化について検討したので報告する。

動物はSlc:SD系ラット7~9週令の雄を使用した。投薬前一夜絶食し、フェンブフェン代謝活性体の4-ピフェニル酢酸(4BAA)投与10分後に各種新キノロン系合成抗菌剤を投与しERGを測定した。測定条件は1時間暗順応後、散瞳させコンタクトレンズ電極を使用し、眼前30cmの距離からキセノンランプによる20Jの光刺激により測定した。各動物のERGは、基本的に事前および併用後2時間で測定し、a波、b波、律動様小波(OP)の潜時および振幅を計測した。

その結果、ノルフロキサシン(NFLX)、シプロフロキサシン(CPFX)、エノキサシン(ENX)およびオフロキサシン(OFLX)と4BAA(50mg/kg)を併用したところERG波形に律動様小波の消失などがみられた。その変化は、痙攣の起こり易さと同様にENXが最も強く、続いてNFLXであり、CPFXおよびOFLXはENXおよびNFLXに比べ明らかに弱かった。また、GABAのアゴニストであるMuscimol前処置(ip)により併用投与による律動様小波の消失が抑制された。さらに、GABAのアンタゴニストのBicucullineを投与(iv)すると併用投与と同様に律動様小波の消失がみられた。これらのことから、新キノロン系合成抗菌剤と非ステロイド系抗炎症剤との併用により生ずるERG波形の変化は、網膜内のGABA受容体の結合阻害がひとつの原因になっていると推察された。

松永民秀、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〕大麻抽出物の複雑多様な薬理作用は、中枢作用本体であるtetrahydrocannabinolあるいはカンナビノイド各単一成分自体では十分説明できず、他の成分あるいは複合成分の作用によることが類推される。先に演者らは、大麻の薬理毒性研究の一環としてtyramine誘導体であるp-coumaroyltyramine(p-CT)にカタレプシー惹起作用、体温下降作用及び自発運動量抑制作用のあることを明らかにし、体温下降作用においてはtyramineの関与を示唆した。そこで今回、p-CTの類似化合物について大麻抽出物の検索を行ったところ、新規成分としてferuloyltyramine(FT)を同定した。本報ではその薬理作用について報告する。

〔方法〕大麻樹脂及び種子のEtOH抽出物を、液液分配及びシリカゲルクロマトにより分離しHPLC（逆相系ZORBAXカラム、CH₃CN/MeOH/H₂O 5:40:55）及びマスクロマトグラムにて分析した。FTは、feruloic acidをクロル化後、tyramineと反応させる方法で合成した。薬理試験は、ddN系雄性マウス(体重23-26g)を用い、FTを1% Tween 80-salineに懸濁、中枢作用を直接評価するため200 μg/mouseを脳内投与した。投与後カタレプシー惹起作用及び直腸内温度を経時的に測定した。

〔結果・考察〕樹脂及び種子のEtOH抽出物をフォトダイオードアレイ検出器付きHPLCにおいてp-CTの直後にferuloic acidと類似したUVスペクトルを示すピークが認められた。そこで、合成によって得られたFTと比較したところ、HPLCの保持時間及びピークのUVスペクトルが完全に一致した。また、種子の抽出物から分離精製した成分のマススペクトルも一致したことよりFTと同定した。カタレプシー惹起作用は、p-CTの場合とは異なり今回行った条件においては全く認められなかった。一方、直腸内温度は、投与30-40分後に有意な低下が認められ、以後200分までその傾向が持続した。しかし、その作用はp-CTと比較してかなり弱いことから、FTは加水分解を受けにくいものと思われる。以上の結果より、大麻の中枢作用におけるFTの寄与はp-CTに比べて弱いものの若干の寄与を有していることが示唆された。

A - 4 カンナビノイドによるカタレプシー陽性マウスの脳組織 コリン作動性神経活性

○小林晴男、佐藤千秋、加茂佳苗、宮田真智子、湯山
章、D. E. Moss*

岩手大、*Univ. Texas El Paso, U.S.A.

大麻成分、 Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) および合成カンナビノイドの一種、levonantradol (Levo) は中枢コリン作動性神経系及びドパミン作動性神経系などに作用することが報告されている。今回、THCおよびLevo投与によってカタレプシー発現下のマウス脳組織コリン作動性神経活性、並びにdopamine receptor遮断薬、fluphenazine (FLU) 併用の影響を検討した。

[方法] 成熟ICR系雌マウスを用い、Levoは3 mg/kg (皮下)、THCは8 mg/kg (腹腔内)、FLUは0.1 mg/kg (皮下)を投与した。カタレプシー陽性を基準に、Levoでは投与後10 min、THCでは3 hr、またFLU併用では、FLU投与後約16 hrにLevoまたはTHCを投与後上記時間に屠殺して、線条体、海馬、大脳皮質を摘出した。

[結果] 脳組織ACh含量はLevo (3 mg/kg) 投与によりすべての脳部位で増加したが、FLUの併用によって線条体でやや減少した。THC及びFLU投与では、単独及び併用群ともに影響は認められなかった。acetylcholinesterase、choline acetyltransferase活性及び $[^3\text{H}]$ -QNB結合能はLevo、THC、FLUおよびFLUとの併用によって、いずれの脳部位も変化は認められなかった。高親和性コリン取り込みは、Levo及びTHC投与によりいずれの脳部位も減少傾向を示したが、併用群では対照群の値に類似した。各脳部位ホモジネートからの30 mM KCl誘発ACh遊離は、いずれの投与群も対照群より促進傾向がみられた。併用群では、その促進傾向が減弱した。

LevoとTHCの作用は、カタレプシー等の惹起作用では類似したが、cholinergic parameterへの作用はLevoが顕著であった。

A - 5 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDMA) により惹起される常同行動と脳内神経伝達物質含量の変化

○平松正行^{1) 2)}、前田洋子^{1) 3)}、鍋島俊隆^{1) 3)}、亀山 勉¹⁾、
長 研司²⁾

¹⁾名城大・薬、²⁾カルフォルニア大・医、³⁾名大・医・薬剤部

〔目的〕 MDMAは mescaline様作用と amphetamine様作用を合わせ持つ乱用薬で、日本においても1989年12月に麻薬に指定された。高用量のMDMAを動物に投与すると、脳内のserotonin (5-HT)やその代謝産物である5-HIAA含量が著明に減少し、また、線条体、大脳皮質、海馬などの5-HT神経終末部位を選択的に破壊する。また、この神経毒作用は(+)isomerにおいてのみ観察される。p-Chloroamphetamine (PCA) が5-HT神経に対し同様の作用を有し、また、head-weavingやturningなどの常同行動を惹起することから、MDMAの作用をPCAと比較検討した。

〔方法〕 体重200-300gのS. D.系雄性ラットを用いた。薬物は皮下投与し、投与後常同行動を観察した。また、線条体にmicrodialysis probeを挿入し、dialysate中の神経伝達物質含量をHPLC-ECで測定した。

〔結果および考察〕 (+)MDMA、(-)MDMA、(+)-MDAを皮下投与すると、PCAにより惹起されるものと類似した、sniffing、head-weaving、turningやbackpedallingなどの常同行動が惹起された。(+)MDMAにより惹起される行動変化は、(-)MDMAのそれと比較し著明であった。MDMAやPCAは5-HT神経系ばかりでなくdopamine神経系にも作用することが知られている。そこで脳内のdopamine代謝を脳内microdialysis法を用いて検討したところ、(+)-MDMAおよびPCAにより線条体のdopamine遊離が著明に増加したが(-)MDMAではこのような作用は認められなかった。Dopamine代謝産物であるDOPACおよびHVA含量は、薬物投与後著明に減少した。薬物投与初期における脳内5-HT神経伝達物質に対する作用は、dopamine神経系のそれと比較し弱く、立体選択性も認められなかった。以上のことより、(+)-MDMAおよびPCAによる5-HT神経毒作用には、一部dopamine神経系が関与している可能性が示唆された。

A - 6 Bis(tributhyltin)phthalateのラット胎児発生に及ぼす影響

川島邦夫, 宇佐見誠, 中浦慎介¹⁾, 田中 悟, 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

¹⁾ 食品農医薬品安全性評価センター

近年, 有機錫化合物による環境汚染が問題になっている。今回, 我々は防霉防黴剤として使用されている Bis(tributhyltin)phthalate (TBTP) の胎児発生に及ぼす影響を調べたので, その成績を報告する。

妊娠ラットを得るために, 未経産ウイスター系ラット雌を雄と終夜同居させ, 翌朝膣垢中に精子が認められた雌を実験に用い, この日を妊娠0日として起算した。TBTPは0.36% ゴマ油溶液を調整し, 4, 8, および16mg/kg を妊娠7日~17日の11日間, 経口投与した。妊娠20日目に胎児を摘出し, 胎児発生に及ぼす影響を調べた。

妊娠母体に及ぼす影響として, 16mg/kg 群では投与の翌日から鼻孔および口角周囲への凝血塊様物質の付着, 立毛などが観察され, 体重増加抑制および摂餌量の低下が観察されたが死亡例は観察されなかった。

胎児に及ぼす影響として, 16mg/kg 群では生存胎児数の減少傾向, 胎児体重の有意な低下および胎児死亡数の増加傾向が認められた。8および16mg/kg 群では奇形の発現が認められ, その発現率は8mg/kg群で0.67%, 16mg/kg群で3.45% であった。8mg/kg群では内反足と無尾を合併した胎児が1例(0.33%), 口蓋裂の胎児が1例(0.33%)観察された。16mg/kg 群では髄膜留の胎児が7例(2.74%), 口蓋裂の胎児が2例(0.68%)観察された。これら16mg/kg 群に観察された奇形は5匹の妊娠ラットから得られており, TBTPの影響は否定できないものと考えられる。

以上, TBTPは妊娠ラットに対して立毛, 摂餌量の減少などの毒性徴候を発現する用量では, 胎児体重の減少などの胎児毒性を示すことが認められた。

A - 7 Ca拮抗薬であるNB-818のウサギ乳腺に及ぼす作用について

小松哲郎・小西玲子・花見正幸・藤井孝朗・白居敏仁

萬有製薬株式会社 開発研究所

NB-818は新しく開発された1,4-dihydropyridine系のCa拮抗薬である。本薬物の生殖毒性試験をウサギ(KBL:JW系)を用いて実施したところ、薬物投与に関連した乳腺の肥大が非妊娠および妊娠動物に観察された。組織学的には非妊娠雌では主に細乳管および間質の細胞増殖を特徴とし、一方妊娠動物ではこれらの変化に加え腺房細胞数の増加が併せて観察された。乳腺の肥大は非妊娠ウサギの場合(13日間経口投与)、60mg/kg/day以上の用量で初めて惹起されたが、妊娠動物では(妊娠6日より18日まで投与)5mg/kg/dayの用量でも発現し、30mg/kg/day以上の用量ではすべての動物が肥大を呈した。

そこで乳腺の肥大がNB-818固有の性質により生じるのか、あるいは他の1,4-dihydropyridine系Ca拮抗薬でも惹起されるか否かを明確にする目的で、nifedipineおよびnicardipineを用いてウサギ乳腺に及ぼす作用の有無を比較検討した。さらに同じ薬理作用を有するが1,4-dihydropyridine系誘導体薬物とは異なる化学構造をもつverapamilおよびdiltiazemについて同様な評価を行った。その結果nifedipineの30mg/kg/dayあるいは25mg/kg b. i. d.、nicardipineの50mg/kg b. i. d.を妊娠6日より18日まで経口投与すると乳腺の肥大が惹起された。組織学的にはNB-818の場合と比べ質的な差異のない乳腺組織の増殖像が観察された。しかし同期間verapamilあるいはdiltiazemの50mg/kg b. i. d.を投与した動物では乳腺の肥大は認められなかった。

以上の結果より、1,4-dihydropyridine系のCa拮抗薬が共通してもつ作用によりウサギ乳腺組織の増生が生じると考えられた。

A - 8 カフェインによって誘発された鶏胚の心血管奇形

黒川あかね、子林孝司、西田敦之、有行史男、岡庭 梓

田辺製菓 安全性研究所

カフェインは鶏胚に心血管奇形を誘発することが知られているが、発現する奇形の型の時期特異性についての報告はみあたらない。今回、我々は孵卵2～5日の鶏胚にカフェインを投与し、投与時期と発現する心血管奇形の型との関係を調べた。

材料と方法：近隣の生産場から入手した有精卵を、十分に湿度を保った温度37-38℃の孵卵器内で孵卵した。孵卵2～5日に卵殻に窓を開け、胚の発生段階（以下St.；Hamburger & Hamilton, 1951）を判定し、生理食塩液に溶解したカフェイン2.5 mg/0.2 mlを胚（St. 14-28）直上の卵黄膜に滴下した。対照には0.2 mlの生理食塩液を投与した。胚は孵卵12日に取り出し、ブアン液に固定して観察した。

結果：心血管奇形は投与したSt. 14-28すべての時期の胚にみられ、特にSt. 22-24の胚での奇形率が高かった。奇形は心室中隔欠損（VSD）ならびに大血管奇形である肺動脈形成不全、腕頭動脈欠損および左第4大動脈弓遺残などであった。VSDは、すべての時期の胚にみられ、主に前半の投与では大血管奇形を伴っていた。VSDの部位に注目すると、St. 16-20では筋性部に多く、St. 22-27では大動脈弁直下に多い傾向がみられた。肺動脈形成不全はSt. 18-23で多くみられたが、前半では右側、後半では左側と、左右で感受期にずれがあった。腕頭動脈欠損はSt. 15-19でみられた。左第4大動脈弓遺残の感受期はSt. 16とSt. 27との二相性を示した。

このように、カフェインは投与したすべての時期の胚に奇形を誘発した。また、奇形発現は各器官の分化の時期と投与時期とが対応した様相を示した。

A - 9 ラットのピリメタミン奇形に対する葉酸の影響

城塚康毅, 常松邦俊, 下田実, 小久江栄一, 吐山豊秋

東京農工大学農学部

葉酸拮抗薬ピリメタミン(PYR)は, ラットにおいて催奇形作用を持つことが知られている。ヒトでは, PYRの長期服用による貧血の予防・治療に葉酸やロイコボリン(ホルミル四水素葉酸)の投与が推奨されている。そこで, PYRの催奇形作用に対する葉酸併用の効果をラットで調べた。一方血漿中の5-メチル四水素葉酸(5MF)は活性型葉酸の体内移動型であり, 葉酸欠乏の際には最も早期に低下するといわれている。そこで, 非妊娠ラットでPYRと葉酸の投与後に血漿中5MF濃度を測定し, 奇形発生と葉酸代謝異常との関連を検討した。

妊娠ラットに器官形成期後半の5日間に薬物を混餌投与した。妊娠20日目に母体を帝王切開して胎子を取り出し, その外表奇形を検索した(表)。PYRの投与によって, 用量依存性に奇形が発生した。PYR 1.6 mg/kg/day(最大無作用量)に対して葉酸を同時添加すると, 添加した葉酸の用量に依存して奇形が発生し, 葉酸 50 mg/kg/day 添加では100%に奇形が発生した。葉酸 50 mg/kg/day 単独投与では, 奇形は全く起こらなかった。

次に, 非妊娠ラットに薬物を5日間混餌投与し, 最終投与10時間後の血漿中5MF濃度を測定した(表)。PYRの投与によって用量依存性に血漿中5MF濃度が低下し, PYRと葉酸を同時投与すると5MF濃度はPYR単独時よりもさらに低下した。この低下は添加した葉酸の用量に依存する傾向がみられた。葉酸 50 mg/kg/day 単独投与では, 5MF濃度が上昇した。これらの結果から, PYRの催奇形性と血漿中5MF濃度との間には, 何らかの関係があるように思われる。

PYR奇形に対する葉酸同時投与の影響

PYR (mg/kg/day)	葉酸	奇形発生率 (%)	血漿5MF濃度 (ng/ml)
-	-	0	46.3
1.6	-	0	17.9
2.4	-	4.8	13.2
3.6	-	100	10.7
1.6	0.5	18.9	
1.6	5	72.1	10.4
1.6	50	100	7.7
2.4	50	100	5.3
-	50	0	132.3

石嶋隆守、原田 寧、高木英利、古川泰雄、*若林克己

日本レダリー(株)生物研究所、*群馬大学内分泌研究所

セフェム系抗生物質のうち、3位の側鎖としてmethylthiotetrazole (MTT)をもつものの副作用として血液凝固抑制作用、ジスルフィラム様作用などがよく知られているが、近年さらに、幼若動物における精巣毒性が注目されている。しかしながら、成獣では精巣毒性は報告されていない。

我々は以前の研究で、幼若動物においてMTTは精子形成及び血液精巣関門の形成を、明らかに阻害すると報告している。これは、MTTの酵素阻害作用により精巣でのプラスミンの不活性化がおきないため、第一次精母細胞の精細管内腔への侵入に際しセルトリ細胞間結合が解離したままとなり、精細管内腔環境が破壊されることによると考えられる。

この仮説をさらに検討するために、MTTを投与された幼若ラットの血清中のLH、FSHをRIA法により測定したところ、FSHのみ対照群に比べ約3分の1に有意に低下していた。さらに、幼若ラットにおけるMTTのFSH低下作用が既に述べたような精巣毒性の影響により発現するものなのか、または直接中枢に作用してFSHを低下させるものなのかを明らかにするために成獣雄ラットの精巣を除去し、血液中のLH、FSHの濃度を上昇させることにより試験系の感度を上げ、MTTによる影響を調べた。その結果血清中および下垂体中のLH、FSHに変動は見られなかった。以上の結果から考えられるメカニズムとしてMTTの精細管内腔環境の破壊によりインヒピンが血液中に流出し、FSHの放出が抑えられたと考えられる。

A-11 ピリドキシン大量投与によるラットの精巣障害

○森 晃爾¹⁾、海道昌宣²⁾、藤代一也²⁾、井上尚英²⁾

1)産業医大・産生研・環境中毒、2)同・医・第二病理

〔目的〕水溶性ビタミンであるピリドキシン（ビタミンB6）の大量投与は、欧米で、月経困難症、ホモシスチン尿症や手根管症候群などに行われているが、このような症例に末梢神経障害の発生が報告され、その過剰投与時の毒性が注目されている。しかし、末梢神経障害以外の毒性についてはほとんど知られていない。今回、ラットに対し、塩酸ピリドキシンを大量投与し、生殖系への影響を調べた。

〔方法〕13週令のウイスター系雄性ラットに対し、125mg/kg、250mg/kg、500mg/kgおよび1000mg/kgの塩酸ピリドキシンを1日1回、週5回腹腔内投与し、生殖臓器重量および精巣機能への影響を調べた。

〔結果〕曝露開始6週間後では、500mg/kg以上の大量曝露群では、精巣、精巣上体、精囊および前立腺重量の減少を認めた。またこれらの群では、精巣の成熟精子細胞数および精巣上体の精子数の著明な減少を認めた。血漿テストステロン濃度は、高濃度曝露群で減少傾向を認めたが、有意差はみられなかった。組織学的には、500mg/kg以上の群で、精細管の変性とLeydig細胞の増生を認めた。

〔考察〕今回精巣障害を認めたピリドキシンの投与量は、実際に治療に用いられる量に比べて大量である。しかし、末梢神経障害発生の域値をラットと人で比較すると、ラットでは大量の投与が必要である。今回の実験では、明らかな神経障害が発生する以前に精巣障害が発生しており、人でも同様の精巣障害が発生する可能性が考えられる。

A - 1 2 利尿剤投与によって誘発されるマウス次世代仔水腎

赤池雅司、重栖幹夫、小林孝好

ヘキストジャパン(株) 医薬総合研究所

妊娠動物に利尿剤を投与した時、次世代仔に骨格異常のみられることは既に知られている。しかしながら、薬理作用の発現臓器である腎臓への影響を次世代仔について検討した報告はみられない。

今回マウスの妊娠あるいは授乳期に利尿剤を投与し、腎臓異常の有無について調べた。

Bumetanide(60, 100 mg/kg), Furosemide(60, 100, 200mg/kg), Acetazolamide(200, 500, 1000mg/kg)をJcl:ICRマウスの①妊娠11日目から分娩後20日目、②妊娠11日目から18日目まで、③分娩0日目から20日目まで母獣にi. v. し、離乳仔を剖検し腎臓異常の有無を調べた。④Furosemide(200mg/kg), Acetazolamide(1000mg/kg)を出生日に雄性仔6に間引きした母獣の分娩0日から20日目までi. v. した。また、⑤仔の体重の約10%に相当する生理食塩液を仔に同期間i. p. し生後3、10週目に仔を剖検し腎臓異常の有無を調べた。

いずれの利尿剤投与でも投与量に関連して水腎の発生率が増加し雄性仔に多くみられた。水腎の出現率は妊娠中のみの投与で最も低かった。また、生後10週目においても高頻度に水腎がみられた。結石等は観察されなかった。

以上の事から、次世代仔にみられた水腎は利尿剤の作用機序に関係なく、非可逆的なものであり、生理食塩液投与によっても水腎が認められたことは利尿剤特有のものではないことを示唆している。妊娠期よりも授乳期投与で高頻度にみられたことは、尿の生成・排泄機能との関連性が疑われ興味深い。

A - 1 3 周産期の絶食及び制限食による母動物及び出生仔への影響

○永尾仁美, 中村公章

科研製薬(株) 安全性研究所 安全性評価第3グループ

母動物の周産期における摂餌量の低下による分娩・哺育状態及び出生仔の発育への影響を知っておくことは妊娠期における医薬品の安全性を評価する上で必要なことであると考えられる。そこで本実験ではJcl:WistarとSlc:SDの2系統のラットを用い母動物の周産期(妊娠17~21日)にその最悪の条件と考えられる絶食と80%制限食を行う群を設け、母動物及び出生仔の成長・行動発達に及ぼす影響を検討したのでその結果を報告する。

材料及び方法: 動物はJcl:Wistar系とSlc:SD系妊娠ラット(12週齢)を用い1群6~7匹とし、絶食群と80%制限食(約4g給餌)群、対照として自由摂食群を設けた。動物は自然分娩させ、分娩後21日まで哺育させた。母動物は、体重・摂餌量及び摂水量を測定し、分娩及び哺育状態の観察を行い、出生仔については、体重測定を行い、身体発育(切歯萌出、眼瞼開裂)及び反射機能(正向、把握、断崖回避、自由落下、視覚性置き直し)の観察を行った。

成績: 母動物において、摂食制限中に体重の減少・増加抑制及び摂水量の抑制がみられ、絶食群では哺育期間中にもその影響が認められた。さらに絶食群において、分娩後4日までに哺育仔を全例死亡させた動物が多数みられ、哺育能力の低下が認められた。出生仔においては、制限食群のSlc:SDで出生時にJcl:Wistarで7日齢時まで体重の低下がみられ、絶食群のSlc:SDで離乳時まで体重の抑制傾向がJcl:Wistarで抑制が認められた。また、身体発育及び反射機能において絶食群の両系統で切歯萌出の遅延がみられ、さらにJcl:Wistarで自由落下・視覚性置き直し反射に遅延が、他の項目についても遅延の傾向がみられた。なお、絶食群では母動物及び出生仔の成長・行動発達にJcl:Wistarの方が感受性が高いように思われた。

A-14 培養胎仔におけるメトトレキサートの影響 -人工培養液を用いて-

○¹⁾秋田正治・²⁾横山 篤・¹⁾石橋正彦

麻布大・獣医¹⁾，東京医歯大²⁾

【目的】 我々は、昨年の第16回日本毒科学会学術年会において、代謝拮抗剤として作用するメトトレキサート（MTX）の培養胎仔における臓器毒性作用について報告した。しかし前回の実験では、培養液にラット血清を用い、その中にMTXを処理したが、MTXとラット血清中に含まれている薬物結合蛋白質との関係は考慮しなかった。そこで今回は、人工培養液を用いて培養を行っている胎仔にMTXを処理し、培養胎仔に及ぼす影響をラット血清を用いた場合と比較したので報告する。

【方法】 人工培養液で培養可能な時期である、ICR系マウス胎齢11日目の胎仔を、人工培養液（ASF301）を使用して24時間培養を行った（第36回日本実験動物学会にて報告済）。MTXは250、500ug/mlを培養液中に、培養開始2時間後より培養終了時まで処理した。そして培養終了時の胎仔をそれぞれ対照群と比較し、ラット血清を用いて同様のMTX処理を行った胎仔とも併せて検討した。

【結果・考察】 ①ラット血清で培養を行った試験群・・両MTX処理群とも対照群（ラット血清群）に比べて、心拍動数、頂殿長、総体節数、血液体循環、及び外表形態において差は認められなかった。②人工培養液で培養を行った試験群・・対照群（ASF301群）と比較して、MTX 250ug/ml処理群には変化は認められなかった。しかしMTX 500ug/ml処理群は対照群に対して、頂殿長は平均8%、総蛋白量は平均19%の有意な低下を示し、さらに血液体循環においても、20%の胎仔に低下が認められた。

これらの結果から、ラット血清よりも人工培養液で培養を行った試験群に比べ、人工培養液を用いた試験群は、MTXに対する影響が強く発現していると考えられ、培養液中に薬物処理を行う実験系においては、薬物結合蛋白質の存在を十分考慮する必要があると示唆された。

A-15 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(3) シクロホスファミドのin vitro及び in vivo胎芽の発育への影響

中浦 横介¹⁾, 田中 悟²⁾, 宇佐見 誠²⁾, 川島 邦夫²⁾, 高仲 正²⁾,
萩田 孝一¹⁾, 小林 和雄¹⁾, 榎本 真¹⁾

¹⁾ (財)食品農医薬品安全性評価センター

²⁾ 国立衛生試験所 安全性生物試験研究センター 薬理部

我々は、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について検討している。これまでに、代表的な催奇形物質であるサリチル酸ナトリウムおよびエチレンチオウレアのin vitro胎芽の発育及び形態に及ぼす影響は in vivoの結果を良好に反映し、ラット胎芽培養法は催奇形性を簡便に予測しうる有用なin vitro試験法であることを報告した(第16回本学会、第29回日本先天異常学会)。今回は、代謝されて催奇形性を示すといわれているシクロホスファミド(CPA)について、in vitro及びin vivo胎芽の発育及び形態に及ぼす影響を調べ、ラット胎芽培養法の有用性についてさらに検討した。

[実験方法] in vitro実験は、胎齢 9.5日のラット胎芽をCPA(0, 1.25, 2.5, 5.0及び10.0 µg/ml)、ラット肝ホモジネート(S9)及びco-factorsを添加した血清中で48時間培養し、胎芽の発育及び形態について調べた。in vivo実験は、妊娠9日~11日の3日間、CPA(0, 1.25, 2.5, 5及び10 mg/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] 卵黄嚢径、頭腎長、体節数および蛋白量は、in vitro及びin vivo 実験ともCPAの濃度に依存した低下を認めた。形態異常の発生率は、両実験とも濃度に依存した増加を認めた。形態異常は両実験とも頭部の発育遅延、前脳部および中脳部の出血、体節の形成不全及び縮小、尾部の出血及びねじれ等であった。なお、形態異常はサリチル酸ナトリウム及びエチレンチオウレアで観察された異常とは異なるものであった。

[結論] 今回の成績から、ラット胎芽培養法は、体内で代謝されて催奇形性を示す化学物質についても応用可能なin vitro試験法であると考えられる。

一 般 演 題

B 会 場

B-1~B-15: 6月13日(水)

B-16~B-40: 6月14日(木)

B - 1 アントラキノン系化合物による

8-ハイドロキシデオキシグアノシンの生成

○阿久沢忍、宮坂直樹、上野芳夫

東京理科大学薬学部毒性学・微性物化学教室

8-Hydroxydeoxyguanosine(8-OH-dG)は、ハイドロキシラジカル($\cdot OH$)を介するDNA修飾反応の一指標であり突然変異誘発に関連していることが示唆されている。我々は、すでに真菌Penicillium islandicum Soppの生成する肝発癌性 bis-anthraquinone 系マイコトキシンであるluteoskyrin (LS)も、マウスに投与した際、肝DNAの8-OH-dG量が増加することを報告してきた(第16回毒科学会、横浜)。今回、アントラキノン系化合物による8-OH-dGの生成と活性相関を解明すべく、培養細胞系で検討した。

Reuber肝癌細胞(H4-II-E)を100mm plateに播種し、飽和状態になるまで培養した。その後培地替えを行い、種々の濃度のアントラキノン系化合物を培地中に添加し、6~48時間処理し、細胞よりDNAを抽出した。さらにDNAをメクレアーゼP1及びアルカリホスファターゼでヌクレオシドに分解し、ODSを充填剤としたHPLCで分離し、ECD及びUV290nmで8-OH-dGレベルを検出、定量した。

その結果、培養細胞のDNA中の8-OH-dG量がLS処理により1 $\mu g/ml$ まで濃度依存的に上昇し、時間依存的にも上昇する傾向が見られた。8-OH-dGに対するアントラキノン系化合物の構造活性相関も併せて報告する。

B - 2 ジエチルニトロソアミンに高感受性を示す肝カルボキシルエステラーゼアイソザイムの同定

米沢 誠、佐藤 哲男

千葉大学薬学部薬物学研究室

著者らはすでにラット肝カルボキシルエステラーゼには、3種の主要なアイソザイム (RH 1, RL 1, RL 2) が存在し、中でもRH 1は種を超えて動物およびヒト肝に共通に存在する事を報告した。そこで今回は、発癌性物質であるジエチルニトロソアミン (以下DEN) が、これらのエステラーゼに影響するか否かについて検討した。【方法】6週齢のSD系雄性ラットに、DEN 200mg/Kgを腹腔内投与し、投与後、経日的に肝ミクロゾーム画分を調製した。次に、ミクロゾーム画分を用いてカルボキシルエステラーゼの5種類の基質 (Acetanilide, Isocarboxazid, Butanilicaine, Malathion, p-nitrophenylacetate) の水解活性を測定した。また、 α -naphthylacetate を基質とした活性染色法やWestern blotting による検討も行った。さらに、in vitroでDENを添加した系でのエステラーゼ活性を測定し、DENのカルボキシルエステラーゼに及ぼす影響を検討した。【結果、考察】DEN投与後、RH 1の特異的基質である Butanilicaine の水解活性が、3日目に最低値まで低下し、その後徐々に回復した。しかし、他の基質を用いた活性測定では、著しい変化は見られなかった。また、活性染色の結果からも、RH 1の活性の減少、回復の過程が特異的基質Butanilicaine を用いた水解活性の変化を支持する成績を得た。さらに、抗RH 1抗体を用いたWestern blottingの結果でも3日目までにタンパク量が減少し、その後回復傾向が見られた。一方、in vitroでも Butanilicaine の水解活性が、DENの添加により濃度依存的に低下した。以上の成績からDENはRH 1 isozymeを特異的に阻害する事が示唆された。

B - 3 正常ビーグル犬の肝臓に存在するPiクラス-グルタチオン S-トランスフェラーゼの性質

五十嵐隆、小原厚行、佐藤哲男

千葉大学薬学部薬物学研究室

グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) には多くのアイソザイムの存在が知られているが、それらは構成サブユニットの特性に基づき種属を超えてAlpha, Mu, Piの3クラスに分類される。この中でPiクラスGSTはラット等の肝臓において通常極めて低い活性しか認められない。所が我々は最近、ビーグル犬の肝臓で、このPiクラスGST活性がかなり高く、また主要アイソザイムであることを見出だした(Biochem. Pharmacol. 37, 4713 (1988))。今回我々はこのPiクラスGSTを分離精製し、その性質を検討したので報告する。

【方法】 動物としては雄性の成熟ビーグル犬(体重10-16kg)を用いた。GSTアイソザイムの分離精製はアフィニティカラム、Mono P-HPLCおよびHypatite Cカラムを用いて行った。GST活性は常法により測定した。

【結果・考察】 肝CytosolをGSH affinity カラムにかけ、得られたGST活性画分をMono P-HPLCにより5つのGST活性ピーク(I-V)に分離した。Fr. Iは塩基性アイソザイムであるが、他のfr. はすべて中性もしくは酸性アイソザイムであった。PiクラスサブユニットのYd1(NW, 26K)はfr. IIからVの4 fr. に認められた。この中ではfr. IIがmajor fractionで次いでfr. IV, V, IIIの順であった。Fr. IIおよびfr. VからHypatite CカラムによりそれぞれYd1-Yd1のホモダイマーを分離精製した。それらのII-HP(Yd1-Yd1)とV-HP(Yd1-Yd1)はpIおよび溶出条件において全く異なっていた。これらYd1サブユニットから成るアイソザイム間の基質特異性、免疫交差性、阻害剤に対する感受性などにおける異同についても併せて報告する。

B - 4 肝毒性物質によるグルタチオントランスフェラーゼの遊離：培養肝細胞系における検討

○奥村 裕、李 英培、仮家公夫

神戸学院大学薬学部薬理学講座

[目的]

グルタチオン (GSH) トランスフェラーゼは、数種のアイソザイムから構成される酵素系であり、特に解毒に関与すると考えられている。ラット初代培養肝細胞系は、生化学的にはもちろん毒性学的な検討に有用であることが示されている。すでに私どもは、培養肝細胞系におけるGSHトランスフェラーゼ活性が、培養後数日にわたり良好に維持することや、肝毒性発現時に本酵素が遊離することを明らかにした。今回は、肝毒性発現時におけるGSHトランスフェラーゼの役割を解明する一端として、種々の肝毒性物質によるGSHトランスフェラーゼの放出を培養肝細胞系において検討した。

[方法]

肝細胞は、コラーゲナーゼ灌流法により単離し、単層培養した。GSHトランスフェラーゼ活性は既報の方法により測定した。GSHトランスフェラーゼサブユニットはS-ヘキシルGSHアフィニティークロマトグラフィーの後、逆相HPLCにより分離した。細胞内GSHは比色定量した。肝毒性は、乳酸脱水素酵素 (LDH) の放出を指標にした。

[結果・考察]

①細胞内チオール基を酸化することにより細胞毒性を誘発させるシスタミンは、細胞内GSHトランスフェラーゼ活性を低下させた。同様に、酸化ストレスを生じさせるメナジオンも本酵素活性を減少させた。これらの化合物によるGSH抱合活性の低下は、細胞毒性の発現に平行していた。

②肝毒性を誘発させるアセトアミノフェンやD-ガラクトサミンは、培養24時間後に著明な培養液中へLDHを放出させ、これに伴い細胞内GSHトランスフェラーゼ活性が低下した。

③肝毒性物質による細胞内GSHトランスフェラーゼ活性の低下は培養液中への本酵素の放出によるものであった。

④肝障害を誘発させる四塩化炭素もGSHトランスフェラーゼを放出させたが、放出されたサブユニットは3と4であった。

以上の結果は、肝毒性物質による障害時には特定のGSHトランスフェラーゼサブユニットが放出されることを示すものである。

B - 5 初代培養肝細胞を用いた肝障害性試験における種差 および性差の検討

○仁藤 新治、野口 通重、有行 史男、岡庭 梓

田辺製薬・安全性研究所

近年、初代培養肝細胞を用いた化学物質の肝障害性スクリーニングや毒性作用のメカニズムの研究が行なわれるようになってきた。この試験系で用いられる肝実質細胞は一般的に雄ラットから分離されており、用いる動物の種差や性差について比較検討した報告は見られていない。今回、我々はラット、ハムスター、モルモットおよびマウスの雌雄それぞれから分離した肝実質細胞を用い、肝細胞障害性における種差および性差について検討した。

方法：雌雄のラット、ハムスター、モルモットおよびマウスの肝実質細胞はコラゲナーゼ灌流法により分離し、1日間の培養後、細胞を肝障害作用を有する四塩化炭素（ CCl_4 ；2 - 6 mM）およびデオキシコール酸（ DCA ；0.5 - 1.5 mM）で処理し、培養上澄中に逸脱した GOT 、 GPT および $L DH$ の各酵素活性を経時的に測定した。

結果： CCl_4 誘発の肝細胞障害性においてはハムスターがいずれの酵素においても高い活性を示し、 DCA においてはラットおよびハムスターが高い酵素活性を示した。一方、マウスとモルモットは CCl_4 および DCA のいずれに対しても低い酵素活性を示した。また性差については、 DCA 誘発の肝細胞障害性でラットに差が認められ、雄の酵素活性が高かったものの、他の種や CCl_4 誘発の肝細胞障害性においては認められなかった。

これらの種差および性差は、各動物の肝実質細胞のもつ酵素の絶対量および細胞膜の安定性に起因するものと推測される。

B - 6 中期発癌性試験による発癌抑制物質の検索

加藤俊男, 立松正衛, 長谷川良平, 倉田靖, 福島昭治

名古屋市大・医・第一病理

我々は、発癌物質の検索の短期化を目的とした8週間の中期発癌性試験を行い、今までに161種類に及ぶ化学物質の発癌性を検索してきた。そこで今回、検索した化学物質中、抑制作用を示した物質について、その詳細を報告する。

【実験方法】

実験は、6週齢のF344雄ラットを使用し、diethylnitrosamine (DEN) をイニシエーターとして投与後、2週後より被験物質を混餌投与し、第3週に2/3肝部分切除を行った。8週で屠殺剖検し、肝切片に glutathione S-transferase placental form (GST-P) 免疫染色を行い、定量的に検索した。

【実験結果】

8週間の中期発癌性試験で、抑制を示す化学物質が以下の23種類存在することが明らかになった。即ち、carcinogenでは、BHA など4種の抗酸化剤と、2種のペロキシゾーム増生物質の6物質、non-carcinogenでは、5種の抗酸化剤と、acetaminophen, diphenyl, ethyl alcohol の8物質、及びcarcinogenicityが未判定の物質では、3種の抗酸化剤と、harman, linolic acid hydroperoxide A 及び B, o-aminophenol, indomethacin, methyltestosterone の9物質であった。

【まとめ】

8週間の中期発癌性試験は、発癌物質の検索のみならず、抑制作用を示す化学物質の検索にも非常に有効であることが、明らかになった。またその抑制物質の多くは抗酸化剤であった。

B - 7 ラット肝中期発癌試験法による2-AAF の用量作用 相関とその細胞増殖能の解析

長谷川良平, 小川久美子, 白井智之, 玉野静光, 伊東信行

名古屋市大・医・第一病理

ラット肝前癌病変を指標とした中期発癌試験法を用い、2-acetylaminofluorene (2-AAF) の前癌病変発生および細胞増殖率における用量作用関係を検索した。なお、用量は米国NCTRが実施したマウス発癌実験(ED01試験)に準じて設定した。

方法：6週齢雄 F344 ラット265匹を用い、diethylnitrosamine (DEN, 200mg/kg) 腹腔内投与2週後より2-AAFを150, 100, 60, 45, 35, および30ppmの濃度で6週間混餌投与し、第3週に2/3肝部分切除(PH)した。動物は0, 1, 2, 3, 4, 8, 10, 16週、およびDENならびにPH後24, 48時間に5匹ずつ屠殺した。各屠殺1時間前に、BrdU (100mg/kg) を腹腔内投与し、GST-P 陽性細胞巢の数と面積を測定するとともに陽性巢内外の細胞増殖率を算出した。

結果：GST-P 陽性巢の面積は用量に依存して経時的に増加し、8週の結果はED01試験での肝発癌率と極めてよく相関した。一方、陽性巢の数は高用量群で細胞巢の融合のため4または8週をピークに減少傾向を示した。細胞増殖はPH後急激に増加したが、高用量群ほど陽性巢内が周辺部より高値で内外較差が顕著となり、またピークの出現は遅れる傾向がみられた。高用量群の陽性巢では2-AAF中止後も高い増殖率を持続していた。

考察：2-AAFによる前癌病変の増大は陽性巢内外の増殖能の差異に依存し、また高用量ほど量的ばかりでなく質的に変異した前癌病変の出現が示唆された。これらデータの発癌の数理モデルを用いた解析により、投与中止後の発癌率の予測や低用量発癌リスク評価が可能であり、本試験法が発癌性の予知に有効であることが示された。

B - 8 虚血-再循環による実験的肝障害

○江頭 亨, 永井 敬之

大分医科大学・薬理学教室

生体におけるフリーラジカルの生成と反応、生体への影響、フリーラジカルにより生じる疾病およびその防止など、近年極めて注目され世界中で精力的に研究されている。このフリーラジカルのうち活性酸素が種々の臓器における組織障害の原因と考えられ、特に各種臓器の虚血再開通時に見られる臓器障害に関与しているとされている。今回、ラットを用い肝臓の虚血-再循環処置における肝障害を生化学的に検討した。

エーテル麻酔下に開腹し、左側門脈と左肝動脈をクリップで止め不完全肝虚血を行った。その後、左葉と中葉に血流を再開し、右葉と尾状葉を切除した。虚血時間に伴い肝の脂質過酸化物は増加し、再循環 60 分後では著明に増加していた。この傾向は血液生化学的指標にも認められ、GOT, GPT 及び LDH 値は 15 分虚血-再循環で正常値の 10 倍以上に増加し、60 分虚血では 100 倍以上の高値を示した。肝ミクロソームの蛋白量も減少し、cyt.P-450 含量は虚血 60 分頃から減少したが、cyt.b₅ 含量は反対に増加した。このモデルによる生存率は虚血時間に反比例し、術後 2 日目において、虚血 30 分で全例生存したが、虚血 60 分で約 40 % 生存し、虚血 90 分では全例死亡した。30 分虚血後の各再循環時間における肝障害の程度を検討した。LDH 値は再循環の時間経過とともに減少したが、GOT, GPT 値は再循環 12 時間目に最高値を示し、4 日後に正常値に戻った。cyt.P-450, NADPH cyt. c reductase も 12 時間目に低下した。一方、cyt.b₅, heme oxygenase はそれぞれ 1, 12 時間後に正常値に比べ高値を示したが、これも 4 日後に正常値に戻った。

B - 9 デジタル化ビデオ顕微鏡法を用いた単一肝細胞のホルモン反応性へのミトコンドリア機能阻害剤の影響研究

川西 徹, 高仲 正, L Blank¹, MT Smith¹, RY Tsien¹

国立衛試・薬理, ¹U. of California, Berkeley

近年のエレクトロニクスの発達を背景としたデジタル化ビデオ顕微鏡法と新しい蛍光性指示薬を利用して、細胞内の微細な生化学的変化を細胞レベルで解析する方法が考案されてきている。本実験ではこの方法を使って、細胞内 Ca^{2+} のホルモン応答性へのミトコンドリア機能阻害剤の影響を単一細胞レベルで検討した。

〔方法〕ラット単離肝細胞はコラゲナーゼ還流法により得た。肝細胞を fura-2-AM ($2 \mu M$) と室温で 40 分間インキュベートし fura-2 を細胞内へ導入し、ポリリジンコートしたカバーガラス上に接着させ、細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) をデジタル化ビデオ顕微鏡法で測定した (J. Biol. Chem. 264, 12859-12866 (1989))。

〔結果〕ほとんどの肝細胞では $[Ca^{2+}]_i$ はフェニレフリンやバソプレシンの刺激により上昇した。その変化は多くの細胞では周期的なスパイク状の変化 (カルシウムオッシレーション) として観察され、その頻度は細胞外 Ca^{2+} 濃度に依存していた。一方スパイクの振幅は細胞外 Ca^{2+} 濃度に影響されなかった。高 K^+ 溶液中あるいはグラミシジン D を用いて細胞膜を脱分極させた場合、その頻度は減少した。フェニレフリン刺激によるカルシウムオッシレーションへの FCCP, オリゴマイシン, ナイジェリシン, バリノマイシン等のミトコンドリア機能阻害剤の影響を調べたところ、これらミトコンドリア機能阻害剤すべてがカルシウムオッシレーションを止めた。この結果からミトコンドリアの機能がカルシウムオッシレーションの機構に密接に関係していることが示唆された。

B - 10 セファロリジンによる腎障害機序-In vitroにおける脂質過酸化と活性酸素の生成

○鈴木義裕, 鈴江俊彦, 須藤純一, 田辺恒義

東日本学園大学 薬学部 毒理学教室

【目的】 セファロsporin系抗生物質であるセファロリジン（以下 CER と略）はヒトや実験動物に強い腎障害を惹起し、その障害の発現機序としては、腎の脂質過酸化の増加が重要な役割をしていること、その脂質過酸化の増加には活性酸素が関与している可能性があることを第15ならびに16回本会において報告した。今回、CERによる腎障害への活性酸素の関与を明らかにするためにin vitroの実験系を用いて、活性酸素の生成とそれに基づく脂質過酸化について検討したので報告する。

【方法】 実験には体重200-220 gの雄性ウィスター系ラットを用いた。腎は生理食塩液で灌流した後に採取し、腎皮質部を常法にしたがって遠心分離し、ミクロゾームを調製した。ミクロゾームを100%酸素、NADPH再生系およびCERの存在下でインキュベートし、生成されたスーパーオキシドアニオンラジカル(O_2^-)、過酸化水素(H_2O_2)および過酸化脂質をそれぞれアセチル化チトクロームCの還元、アンモニウムフェロチオシアネートの酸化およびマロンジアルデヒドの生成量を指標として測定した。また、反応系に種々の活性酸素消去剤や抗酸化物質を添加し、CERによる脂質の過酸化の増加に関与する活性酸素の種の同定を間接的に検討した。

【結果】 腎皮質ミクロゾームにCERを添加してNADPH再生系でインキュベートすると、ミクロゾーム、CERの各濃度の増加ならびにインキュベーション時間に依存して O_2^- 、 H_2O_2 および過酸化脂質の生成量の増加が観察された。また、CERによる脂質過酸化の増加をスーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼならびにヒドロキシルラジカル($\cdot OH$)の消去剤である(+)-シアニダノール-3, マンニトール, 安息香酸ナトリウムおよびN-アセチルトリプトファンが抑制した。一重項酸素(1O_2)の消去剤である α -トコフェロールおよびN, N'-ジフェニル-P-フェニレンジアミンもCERによる脂質過酸化の促進を抑制した。

【考察】 CERはミクロゾームの薬物代謝系の酵素の触媒によって O_2^- や H_2O_2 、さらに $\cdot OH$ や 1O_2 などを生成すると考えられ、そして生成したそれらの活性酸素が細胞膜脂質を過酸化し、腎の生理学的ならびに生化学的機能障害を惹き起こすものと推察された。

B - 1 1 シスプラチンによる尿中酵素活性の変動に対する腎グルタチオン減少および抗酸化剤の影響

亀山悦子, 松下智哉, 藤沢知寿子, 山口達也, 玄番宗一

大阪薬科大学第2薬理学教室

第14回の本学会年会において、シスプラチンによりラット尿中酵素 N-acetyl- β -D-glucosaminidase(NAG)や γ -glutamyltrans-peptidase(γ -GTP)の活性が増大し、これらの増大が抗酸化剤N,N'-diphenyl-P-phenylenediamineで軽減されることから、シスプラチン腎障害にフリーラジカルが関与することを報告した。今回フリーラジカルに対する生体内防御因子としてのグルタチオン(GSH)の腎内含量を減少させ、シスプラチン腎障害への影響を調べ、併せて抗酸化剤 N,N'-dimethylthiourea(DMTU)の作用を検討した。

SD 系雄性ラットにシスプラチン(5 mg/kg, i. p.)を投与した。GSH depletorとしてD,L-buthionine-(S,R)-sulfoximine(50 mg/kg, i. p.)およびdiethylmaleate(0.25 ml/kg, i. p.) (BSO + DEM)をシスプラチン投与の前後に腹腔内投与した。抗酸化剤DMTU(250mg/kg, i. p.)をシスプラチン投与前に3日間処置した。シスプラチン投与後経日的に腎GSH含量および尿中酵素(LDH, NAG, γ -GTP)活性を測定した。

腎組織GSH含量は、シスプラチンで増大した。(BSO + DEM)で腎GSH含量を減少させるとシスプラチンによる尿中LDHおよびNAGの増大が促進された。抗酸化剤DMTUは(BSO + DEM)併用による尿中LDHおよびNAG活性増大を抑制した。

シスプラチンが腎組織グルタチオン代謝に影響したが、このことの腎障害への関与は今回の結果からは不明である。腎組織中GSH減少によるシスプラチン腎障害の増大、および抗酸化剤によるその軽減効果は、この腎障害にフリーラジカルが関与するという考えを支持する。

B-12 Angiotensin II による腎近位尿細管細胞内遊離カルシウムの上昇に及ぼす mercury chloride の作用

鄭 圭銘、 遠藤 仁

東京大学医学部第二薬理学

細胞機能の維持、調節においての細胞内遊離カルシウムの重要性はよく知られた事実であり、細胞の毒性発現時にも細胞内遊離カルシウムの上昇が認められている。他方、細胞内遊離カルシウムを上昇させる毒性物質の中には生体に対するホルモン作用に異常を起すことが考えられる。そこで今回、angiotensin II (AII) による細胞内遊離カルシウムの上昇に及ぼす mercury chloride (MC) の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 で灌流し、近位尿細管起始部 (S₁) を単離した。細胞内遊離カルシウムは fura-2 を用いて測定した。

MC (10^{-10} - 10^{-8} M) は AII (10^{-11} M 及び 10^{-7} M) による細胞内遊離カルシウムの上昇を濃度依存性に上昇させた。Methylmercury chloride (10^{-10} - 10^{-8} M) でも同様の効果が認められた。MC (10^{-9} M) の共存によって促進された 10^{-7} M AII による細胞内遊離カルシウムの上昇はカルシウム抑制薬である verapamil (10^{-5} M) によって有意に抑制された。Protein kinase C の抑制薬である sphingosine (10^{-5} M) によっても MC による促進は有意な抑制が認められた。さらに、phospholipase の抑制薬である propranolol (10^{-4} M) は AII 誘発カルシウム上昇に対する MC (10^{-9} M) の促進効果を完全に阻止した。

以上の結果より低濃度の MC は細胞膜の phospholipase を活性化させることにより、AII の細胞内遊離カルシウムの上昇を更に促進させるものと考えられる。

B-13 6-Benzylaminopurineの腎に及ぼす影響の動物種差に関する一考察

村田共治、菅井象一郎、北垣忠温

クミアイ化学工業（株） 生物科学研究所

6-Benzylaminopurine(BAP)はadenine誘導体の植物成長調節剤である。BAPのラット90日亜急性毒性および2年慢性毒性試験では投与に起因する腎障害は認めなかった。イヌ2年慢性毒性試験の最高用量群(100mg/kg/day)で雄雌全頭が腎盂内結石、尿細管内黄色結晶沈着を主病変とする腎障害によって切迫屠殺または死亡した。BAP誘発腎障害の動物種差の原因を解明する目的でラットとイヌにおける尿中代謝物の比較および腎障害イヌより採取した腎結石の分析を行い、興味ある知見を得たので報告する。

ラットに ^{14}C -BAP(Purine環-8- ^{14}C)の低用量(10mg/kg)および高用量(200mg/kg)を単回経口投与し、尿中代謝物をHPLCとTLC分析した。主要代謝物として8-hydroxy-BAP(8H-BAP)、その他allantoinを含有する極性物質(PA)と微量の2,8-dihydroxy-BAP(2,8DH-BAP)が同定された。イヌに ^{14}C -BAPの低用量(5mg/kg)および高用量(100mg/kg)を単回経口投与した時の尿中代謝物は、低用量群では主要代謝物として2,8DH-BAP、その他PAと8H-BAP、高用量群では2,8DH-BAPと8H-BAPが同程度検出された。

腎障害イヌより採取した腎結石を酢酸抽出し、核磁気共鳴(NMR)で分析した。腎結石抽出物中には2,8DH-BAPと8H-BAPが含有され、両者の混合比はシグナル強度比より各々83および17%と推定された。

以上の結果から、BAP誘発腎障害の動物種差は、腎結石中に多量に含有されていた水難溶性物質2,8DH-BAPの生成量がイヌで多かったことに起因すると考えた。

B - 1 4 ラットの膀胱内投与における膀胱炎の検討

○吉田 貢由、古濱 和久、加藤 道幸、高山 敏

第一製薬 中央研究所

我々はラットの膀胱炎モデルを作製するために、投与方法について基礎的検討を行うと同時に、種々の起炎剤あるいは異物の膀胱に対する影響を検討した。

実験には 8~9週齢のSlc:SD系雌ラットを用いた。エーテル麻酔下で、シリコン製チューブ(外径0.94mm)を外尿道口より挿入後、膀胱内に投与液を注入(0.25 ~ 1ml/rat)し、一定時間滞留させた。ラットは経時的に屠殺し、血液検査および膀胱の組織学的検査を行った。まず投与液の量、pH、浸透圧、膀胱内滞留時間について検討した。次いで膀胱炎モデルの検討のためには、0.5%CMC、1N NaOH、酢酸(0.25~6%)、瞬間接着剤(セメダイン3000ゴールド)、1.6%カゼイン、10%p-nitroso-n-dimethylaniline(NADM)、1.6%カオリンおよび1.6%ザイモサンを用いた。

生理食塩水を用いた基礎的検討の結果、投与液量は1.0mlでは膀胱粘膜固有層に軽度の出血、水腫および細胞浸潤が認められ、0.5 ml以下では変化が出ないことが示された。また溶液の浸透圧は1200 mOsm/kg H₂Oで末梢血液の白血球数増加を伴う明らかな膀胱炎が見られた。一方、膀胱炎モデルの検討により、酢酸は0.5%以上で膀胱炎が発現し、高濃度になるに従って病変が強くなり、さらに腎髓質の壊死も観察された。またNaOH、瞬間接着剤およびNADMも膀胱粘膜の障害を起こしたが、全般的に変化が強くなるに従って炎症反応を伴わない膀胱粘膜の壊死が惹起された。なお、今回用いた他の化合物では膀胱炎は起こらなかった。

B - 1 5 微量ParaquatおよびChlorpromazine前処置における Paraquat急性毒性：血清Ceruloplasmin,血清AICE および肺Hydroxyprolineの変化

○政岡俊夫・新井成之・赤堀文昭

麻布大学 獣医学部 薬理学教室

除草剤Paraquat(PQ)毒性の軽減については、Chlorpromazine(CPZ)のPQ肺蓄積への抑制作用¹⁾、脂質過酸化抑制作用²⁾によるPQ解毒への期待などがある。また、PQ低用量の投与では肺胞上皮Ⅱ型細胞の増加から、生体内でのPQ処理にこの細胞の関与を推測する報告³⁾などがあるが十分検討されていない。そこで、今回は微量のPQあるいはCPZ前処置により、推定致死量(大量)のPQ投与による毒性がどのように変化するか、血清Ceruloplasmin(Cp)、血清Angiotensin I Converting Enzyme(AICE)および肺Hydroxyproline(Hyp)の変動を指標として検討した。

方法：実験にはSD系ラット144匹(雄)を6群に無作為に分け、ⅠとⅡ群には前処置として生理食塩水0.5ml/100gを5日間連続皮下投与した。Ⅲ群にはCPZ 3mg/kgを5日間連続皮下注射した。Ⅳ、ⅤおよびⅥ群には微量PQ(Ⅳ群0.5mg/kg, Ⅴ群2.0mg/kgを5日間連続皮下投与、Ⅵ群2.0mg/kgを2日毎に3回皮下投与)で前処置をおこなった。最後の前処置終了24時間後にⅡ～Ⅵ群にはPQ40mg/kgを1回皮下投与した。Ⅰ群には同様に生食10ml/kgを投与した。投与後1,3,6,9および30日目にエンフルラン麻酔下で試料を採取した。しかし、大量PQ投与によりいずれも(Ⅱ～Ⅵ群)6日目までに死の転帰をとったため、その後の試料採取はできなかった。

結果：血清Cpは大量PQ投与後1日目よりいずれの群も上昇を示した。血清AICEはPQ大量投与後より6日目まで減少する傾向を認めた。全個体がPQ毒性の急性期に斃死し、肺Hypの増加は認められなかった。このように、PQの微量およびCPZによる前処置はPQ急性毒性を軽減することはなかった。

(1) Derew, R. et al. Toxicol. Appl. Pharmacol., 49, 473-478. (1979)

(2) Smith, D. S. et al. Anesthesiology, 53, 186-194. (1980)

(3) Akahori, F. et al. Vet. Hum. Toxicol., 29, 1-7. (1987)

B - 1 6 精製FAD-monoxygenaseによる含チッ素薬物のN-酸化について

○吉村英敏、湯野幸一郎、大隈豊美、山田英之、小栗一太

九州大学 薬学部

【目 的】FAD-monoxygenaseは、哺乳動物の各組織に分布し、多種多様な含チッ素および含硫化合物のヘテロ原子酸化を触媒することが知られている。本酵素の基質、特に含チッ素化合物の中には古くから知られている医薬品も多いが、これらに対する基質特異性は意外によくわかっていない点が多い。そこで本研究では、情報が不足している脂環状アミン類に関する知見を集積することを主な目的として、精製モルモット肝FAD-monoxygenaseを用いて検討を行った。

【方 法】i)モルモット肝FAD-monoxygenaseは、肝ミクロソームをEmulgen 911にて可溶化後、Cibacron blue-Sepharose 4B, 2',5'-ADP-Sepharose 4B、イオン交換およびhydroxyapatiteの各クロマトを行うことにより精製した。ii)薬物酸化活性は、基質依存性のNADPH酸化を測定することにより求めた。

【結果・考察】モルヒネ関連化合物8種について活性を求め、比較した結果、モルヒネ自身はあまり良い基質ではなかった。しかし、モルヒネの3-位水酸基をアルキル置換した構造のコデインやエチルモルヒネでは活性が明らかに上昇した。同様の3-位水酸基修飾効果は、オキシモルフォンとオキシコドンとの間にも観察された。一方、3,6-位にメトキシ基を有するテバインは、調べたモルヒネ類の中では最大の活性を示した。しかし、コデインやエチルモルヒネとテバインとの活性差はそう大きくなく、6-位水酸基の修飾は活性増大に及ぼす効果が小さいものと推定された。このほか、トロパンアルカロイド類の活性についても興味ある知見を得ている。また、非環状脂肪族アミン類に対する基質特異性や、生成物に関する検討も行っている併せて報告する。

B-17 ラットにおけるジブチルヒドロキシトルエン (BHT) の 胃内停滞と吸収遅延

高橋 省

東京都立衛生研究所毒性部

食品、プラスチック、ゴム等の酸化防止剤である BHT は大量投与によりラットに出血致死を来すが、これは BHT の活性代謝物キノンメチド (BHT-QM) が血液凝固因子 II, VII, IX, X の合成を阻害した結果、血液凝固異常を起こしたためである。この因子低下は BHT を一回経口投与した場合にも生じるが、そのときの肝臓中の BHT-QM の濃度は投与後約 1 日目に最大値となる。この遅い BHT-QM 出現の原因を知るため、一回投与後の血漿、胃腸管、脂肪組織中の BHT あるいは BHT-QM を測定し、あわせて胃への影響を見たので報告する。〈方法〉 6 週齢の Jcl:SD 系雄ラットに 800 mg/kg BHT を一回経口投与後、30分～48時間目の上記組織の BHT 等を定量した。また同一処理ラットの胃体積、重量等も測定した。〈結果〉 1. BHT-QM の血漿中の濃度は 18 時間後に最大となった。2. BHT の胃腸管中の量は 30分～12時間まで一定で 18 時間より減少した。3. 脂肪組織中の BHT 濃度は概ね 18 時間に最大となった。4. 胃体積、重量、内容物量は投与群で 4-7 時間に 2-3 倍と大きく、24-27 時間では、差はなかった。〈結論〉 1. BHT あるいはその代謝物の内臓器官への出現の遅れは投与した BHT が胃内に長く停滞したために生じたものである。2. そしてこれは単に投与量が大きく吸収が追いつかないというより BHT が胃機能を 12 時間以上阻害したため起こったものである。3. BHT の大量投与による急性致死、肝毒性、凝血因子低下等の毒性のピークの遅れは本実験の結果からのみ説明可能であり、すでに報告のある低用量 BHT を用いた吸収代謝の実験からは説明できない。

B - 1 8 3-amino-1,2,4-triazole の甲状腺ペルオキシダーゼ阻害作用 に対する 5 位置換基の影響

○高岡雅哉, 宮腰利宏, 加藤佐和子, 松沼尚史, 増田 裕

三共(株)・安全性研究所

〔目的〕 3-Amino-1,2,4-triazole は甲状腺ペルオキシダーゼ (TPO) 阻害作用により甲状腺毒性を発現する。この化合物の 5 位の置換基が異なる化合物を選択し, 甲状腺腫大および TPO 活性阻害作用を比較検討した。

〔材料と方法〕 F344 ラット (日本チャールス・リバー) 雄 10 週齢を使用した。3-Amino-1,2,4-triazole (ATZ) および 5 位の置換基が異なる 3-amino-5-mercapto-1,2,4-triazole (AMTZ), 3-amino-5-methylthio-1,2,4-triazole (AMTTZ), 3,5-diamino-1,2,4-triazole (DTZ), 3-amino-1,2,4-triazole-5-carboxylic acid (ATZ-C) の 5 つの化合物を用いた。

化合物は dimethyl sulfoxide に溶解し, 1.5 mmol/kg の用量でラットに 7 日間連続経口投与して甲状腺を病理組織学的に観察した。また, ラット甲状腺ホモジネイトを用い, 水素供与体として guaiacol を使用して, TPO 活性を測定した。

〔結果および考察〕 ATZ, AMTZ および ATZ-C を投与したラットの甲状腺が腫大し, その程度は $ATZ > AMTZ > ATZ-C$ の順であった。組織学的には甲状腺の機能低下および甲状腺刺激ホルモンの分泌亢進を示唆していた。AMTZ および DTZ には腫大作用はなかった。また, TPO 活性阻害作用は ATZ, AMTZ, ATZ-C および DTZ の順でそれぞれ認められ, AMTTZ にはその作用はなかった。

したがって, AMTZ, ATZ-C には ATZ と同じような抗甲状腺作用があると判断した。これらの結果と化合物の構造を比較検討すると, 3-amino-1,2,4-triazole の抗甲状腺作用は 5 位の置換基で軽減し, その程度は置換基によって異なることが明らかとなった。

B-19 脱燐酸化酵素阻害剤による細胞障害

○唐木英明、三井みの里、石原宏朗、尾崎博、*矢間太、
*林良博、*西田隆雄、**加藤裕子、**伏谷伸宏
東京大学農学部獣医薬理、*獣医解剖、**水産化学

我々は海綿由来の海産毒カリクリンAが蛋白質脱燐酸化酵素活性を阻害することを見出した(J Toxicol Sci 14, 326, 1989)ので、その培養平滑筋細胞(A10、ラット大動脈由来)に対する作用を検討した。【方法】A10細胞はカバーガラス上に単層培養した。細胞内Ca量と形態変化は、fura-2を負荷した細胞で顕微測定システム(CAM-200)を用いて同時に測定した。また微細な形態変化は透過型電顕および走査型電顕で観察した。また細胞浮遊液の透過光の変化を測定し、形態変化の時間経過と程度の指標とした。【結果】Fura-2を負荷した細胞でカリクリンA(0.1-1 μ M)は細胞内Ca量の増加と、形態変化を伴う細胞障害を起こした。Caチャンネルブロッカーのベラパミル(10 μ M)はCa量の増加を抑制したが、形態変化には作用を示さなかった。細胞浮遊液にカリクリンAを投与すると、形態変化に伴う透過光の減少が起こった。この減少は外液Ca不在下でも観察された。透過光の減少は非特異的蛋白質燐酸化酵素阻害薬であるK252a(10 μ M)により抑制された。走査型電顕による観察ではカリクリンAにより細胞質突起は消失し、細胞は縮小し、表面に多数の粒状構造物が認められた。透過型電顕では、膜の裏打ちフィラメントが細胞内に移行し、核周辺に無秩序なフィラメントの走行および集積が認められた。【考察】以上の結果から、蛋白質脱燐酸化酵素阻害剤であるカリクリンAが細胞骨格を破壊し、細胞の形態変化を起こし、基質との接着を失わせ、細胞障害を起こすことが示された。この作用は細胞内Caの上昇に依存せず、蛋白質の燐酸化を介する機構によるものと考えられたが、その詳細は現在検討中である。

遠藤 泰¹⁾、南 勝¹⁾、門間芳夫¹⁾、齋藤秀哉²⁾
竹内雅也³⁾

東日本学園大学・薬・薬理¹⁾、北大・医・第一薬理²⁾
札幌総合病理研究所³⁾

(目的) 抗癌剤の副作用として最も頻発するのが嘔気と嘔吐である。最近この副作用を軽減するために数多くの制吐薬が開発されている。しかしながら前臨床試験あるいは毒性試験において、抗癌剤による催吐作用または制吐薬の効果を正確にスクリーニングすることは難しい。そこで我々は、嘔吐のモデル動物として科学的に評価されたferretを用い抗癌剤により誘起される嘔吐、ならびに末梢作用の強い催吐物質として知られている硫酸銅を用いて嘔吐を誘起させ、薬理学的および病理学的知見を得たので報告する。

(方法) Ferret (*Mustela putorius furo*)はMarshall社(NY)より輸入した体重 0.8~1.5kg の雄性のものを用いた。抗癌剤としてCisplatin (5~10 mg/kg)ならびに Cyclophosphamide(200mg/kg) を使用し、投与は腹腔内投与とした。硫酸銅 (20~40mg/kg)は強制経口投与した。実験はStables (1987)らの方法を改良し6時間にわたって観察した。すなわち retchingあるいは vomitingの有無、retchingあるいはvomitingの発現回数、嘔吐発現までの時間ならびに嘔吐持続時間を測定した。さらに観察終了後に臓器を取り出し病理標本を作成した。また抗癌剤または硫酸銅の作用の強くあらわれている3時間後の胃および回腸部位の5-HTならびにカテコールアミン含量を測定した。

(結果) 抗癌剤cisplatin ならびにcyclophosphamideによってほとんどのferretはretchingおよびvomitingを誘起した。また硫酸銅によっても同様にferretはretchingおよびvomitingを惹起した。cisplatin については用量依存的に嘔吐が観察された。cisplatin ならびにcyclophosphamideの腹腔内投与6時間後の回腸ならびに脾臓に白血球減少などの組織学的変化が認められた。生化学的には、cisplatin 投与群の回腸部位の5-HTおよびNE含量がコントロール群に比し有意に上昇していたがDAは有意な変動を示さなかった。

B - 2 1 長期反復投与毒性試験における投与期間と毒性所見の発現時期

幸 嶋 祥 亘 日本製薬工業協会基礎研究会

スミスクライン・ピーチャム製薬株式会社

反復投与毒性試験において、医薬品の毒性を把握するために適切な投与期間を考察することを目的として、日本製薬工業協会加盟88社にアンケート調査を行った。その結果、50社より 228件の回答（内1件は評価対象より除外）が寄せられ、以下の結論を得た。

結果：ラット、イヌおよびサルを用いた6ヵ月を最長とする慢性毒性試験を実施した例は、それぞれ 71, 28, 4件で、大半の毒性所見は1または3ヵ月で発現していた。すなわち、1ヵ月時点で全ての毒性所見がみられた例は、それぞれ 55(77%), 22(82%), 1(25%)件であり、3ヵ月時点では 7(10%), 3(11%), 2(50%) 件であった。

12ヵ月を最長の慢性毒性試験として実施した例は、ラット、イヌ、サルで 60, 54 および10件で、そのうち6ヵ月以内に全ての毒性所見が検出された例は、それぞれ 49 (82%), 51(94%) および10(100%)であった。6ヵ月目の中間検査がなく3～12ヵ月の間に毒性所見が認められたものがラット、イヌで 8(13%), 2(4%)あり、6～12ヵ月で新たな毒性所見が認められた例はラット、イヌ、サルで 3(5%), 2(4%) および 0 (0%)であった。12ヵ月時点で新たに認められた所見は、軽度な摂餌減少、体重増加抑制、GOT,GPT 上昇であった。

結論：6ヵ月以降の新規毒性発現率はラット、イヌ、サルで 5%, 4%, 0% であり、その新規所見も軽度なもの、あるいは適切な用量設定により6ヵ月時点でも十分把握し得ると考えられる毒性所見であった。Lumleyらも同様の調査結果を得、6ヵ月反復投与毒性試験を行えば全ての重要な毒性所見を得ることができると結論している。

B - 2 2 Chlorpyrifosのラットにおける28日間反復経口投与毒性試験とコリンエステラーゼ活性阻害について

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

有機リン系の殺虫剤であるChlorpyrifos(CP)(o,o-diethyl o-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate)の毒性を明らかにする目的で、28日間反復投与毒性試験を行った。また反復投与と単回投与とのコリンエステラーゼ活性(ChE)阻害の差及び肝臓及び腸管でのChE阻害を明らかにするため、以下の実験を行った。

実験方法：5週齢のWistar系ラット雌雄(体重、雄124~134g、雌100~113g)に0, 0.10, 0.78, 6.25及び50.0 mg/kgを28日間強制経口投与し、血液学、臨床生化学、病理組織学等の一般的な検査を行い、さらに50.0 mg/kg群は14日間の回復期間の後同様の検査を行った。また、同様のラット雌雄にCP(50.0 mg/kg)を単回投与し、経時的に血清・肝臓及び腸管のChEを測定した。

結果：反復投与の結果、著明な変化としてChE阻害作用が認められ、その他AIPの増加、肝臓・腎臓・副腎重量の増加、腎臓の軽度な尿細管の変性が認められた。ChE阻害は、単回投与後血清、肝臓及び腸管で3時間目にすでに現われ、血清は12時間目、肝臓では6時間目、腸管では雄で12時間目、雌で24時間目に最大となった。この血清ChE阻害は14日目には、ほぼ回復を示した。反復投与(50.0 mg/kg群)では、この阻害の程度がやや強く認められたが、投与中止14日後には単回投与と同様の回復を示した。CPの主たる毒性はChE阻害作用で、0.10 mg/kgが無作用量であり、腎臓、肝臓及び副腎にも弱い影響を持つものと考えられた。また、ChE阻害の回復性は、単回投与と反復投与で大きな差がなかった。

B - 2 3 Kanamycin投与によるラット仔の聴覚障害性

○島田 信、渡辺 敏樹、持田 一夫、古濱 和久、高山 敏

第一製薬 中央研究所

アミノ配糖体であるkanamycinをモルモットあるいは成熟ラットに連投すると聴覚障害が誘発されることは広く知られている。しかし、ラット仔の聴覚感受期にkanamycinを直接投与して聴覚障害を調べた報告は少ない。

そこで今回、kanamycinの400mg/kgをラット出生仔の聴覚障害感受期である生後11~12日およびその前後を含めた生後9~15日に直接仔に皮下投与して、audiometerによる聴覚機能検査および走査電子顕微鏡を用いて蝸牛内の内外有毛細胞などの微細構造を観察した。

その結果、生後11~12日の2日間に投与するとラット仔に聴覚障害性がみられ、さらに生後9~15日の7日間連投では強い障害が認められた。即ち、audiometerでは耳介反射閾値の上昇あるいは消失、電顕所見では蝸牛内の内外有毛細胞の消失である。このうち、形態変化が最初に現れる1回転下端部の外有毛細胞が消失した仔は耳介反射閾値の上昇あるいは消失がほぼすべてに認められており、機能異常と形態変化との間にきわめて高い相関関係($r=0.79$)が認められた。

以上のことから、聴覚障害感受期の仔ラットを用いるとkanamycinによる聴覚障害potentialを容易に把握できると思われる。

B - 2 4 ラットにおける薬物の痙攣誘発法の検討

○赤羽 一美、加藤 道幸、柿畑 耕司、高山 敏

第一製薬株式会社・中央研究所

薬物の投与によりヒトで痙攣が偶発的に発現することがあり、生死に関わる重篤な症状であるため、動物実験で薬物の痙攣誘発作用を厳密に検査する必要がある。しかし、動物では痙攣を惹起するためには一般的に大量の薬物を投与しなければならない。そこで、薬物の痙攣誘発作用をラットにおいて検出する方法として、柿畑らが報告した脊髄腔内投与法 (J. Toxicol. Sci. 10:271, 1985) を取り上げ、その有用性を検討した。

実験には、6～7週齢のSlc:SD系の雄ラットを用い、中枢興奮薬あるいはセフェム系抗生物質を腰部の脊髄腔内に、0.5 ml/minの速度で1回投与した。観察された痙攣の程度を5段階に分け、その群平均スコアおよび発生率から各薬物の痙攣誘発作用を比較した。その結果、以下の成績が得られた。

- 1) 中枢興奮薬を用いて、脊髄腔内投与時に用いる各種麻酔薬の痙攣誘発に対する影響を検討した。痙攣の発生率は100%で、エーテル、イナクチン、ペントバルビタールの順に痙攣が強く発現した。しかし、ウレタンでは痙攣は発現しなかった。
- 2) 三種の中枢興奮薬を用いて、麻酔下あるいは無麻酔下での脊髄腔内投与および静脈内持続注入による痙攣誘発作用を比較したところ、無麻酔下での脊髄腔内投与により痙攣が最も強く発現した。また脊髄腔内投与では静脈内投与に比べて、きわめて少量の薬物で痙攣が誘発された。
- 3) 市販のセフェム系抗生物質の痙攣誘発作用を麻酔下脊髄腔内投与で比較したところ、痙攣の強さは cefazolin ≒ cephaloridine > ceftizoxime > cephalothin > cefotaxime の順であり、以前の報告とほぼ一致していた。

以上の成績から、脊髄腔内投与法はラットにおける薬物の痙攣誘発作用の検出に適すると思われる。

B - 2 5 β -ラクタム系抗生物質のモルモットにおける抗原性比較試験と臨床でのアレルギー性副作用頻度の関係について

服部 浩之、和賀井 信彦、山口 文恵、小島 弘幸、俵 克彦

第一製薬(株) 中央研究所

臨床でのアレルギー性副作用を予測する目的で行う抗原性試験は、現在各研究室独自の方法で実施されている。そのため、試験成績を直接比較することはできない。そこで我々は、臨床でアレルギー性副作用が報告されている β -ラクタム系抗生物質(CET, CEZ, CAZ)について、モルモットでの抗原性を同一条件下において比較し、その成績と副作用発現頻度との関係を調べた。

モルモットの感作は各物質の 40 mg/kg をフロイント完全アジュバントとともに 2 週間間隔で 3 回、皮下投与して行った。そして、最終感作後 14 日に全身性アナフィラキシー反応(SA)を、最終感作後 12 日に採取した血清について受身皮膚アナフィラキシー反応(PCA)および酵素抗体法(ELISA)を行った。

その結果、SA では CAZ が陽性反応を示し、PCA では CET 感作群血清が蛋白結合物の誘発により全例陽性反応を示し、抗体産生が認められた。また、ELISA では CET 感作群血清に全例特異抗体が測定され、CAZ および CEZ 感作群血清にも 10 例中それぞれ 1 例で抗体が測定された。これらの成績から、3 薬物の抗原性を比較すると、SA では $CAZ > CET, CEZ$ 、抗体産生では $CET > CAZ \geq CEZ$ であった。一方、3 薬物の臨床におけるアレルギー性副作用の発現頻度を調査すると、CET が 0.6%、CAZ が 1.3% および CEZ が 0.5% であった(上田 泰ら: β -ラクタム系薬、南江堂)。

以上 3 剤のみの検討であるが、抗原性の比較試験は臨床の副作用発現頻度を反映するには至らなかった。現在、他 5 剤について検討中である。

B-26 ラット多重癌モデルによる発癌および発癌修飾物質の低濃度複合投与効果の検討

萩原昭裕、柴田雅朗、広瀬雅雄、高橋 智、伊東信行

名古屋市大・医・第一病理

低濃度の発癌物質並びに発癌修飾物質の複合投与が相互に関連して複数臓器における発癌がどのように修飾されるかを我々の開発した多重癌モデルを用いて総合的に検討した。

6週齢のF344ラット190匹を用い、発癌物質として3種類のニトロソ化合物DEN, MNU, DHPNを4週間内に順次投与後、下記の化合物を通常発癌量の1/10の低濃度で複合投与し、20週後に全身諸臓器の腫瘍性変化を病理組織学的に検索した。実験群は、A群：胃ないし膀胱を標的とする4種の酸化防止剤、H群：肝臓を標的とする5種の化合物、N群：5種のニトロソ化合物、さらにそれらを複合したA+H群、A+N群、H+N群、A+H+N群、および対照群である。

肝臓の過形成結節および癌の発生率は対照群(13%, 0%)と比較してA群(0%, 0%)、H群(40%, 0%)、N群(60%, 0%)、A+H群(15%, 0%)、A+N群(13%, 7%)、H+N群(100%, 86%)、A+H+N群(100%, 43%)であり、HおよびN群では増加、Aを含む群では減少を観察した。膀胱の乳頭腫および癌の発生はN群(33%, 13%)に見られ、更にAまたはHと複合したA+N群(93%, 27%)、H+N群(71%, 14%)、A+H+N群(57%, 36%)で増加を認めた。腺胃のPg 1変異幽門腺出現率は対照群と比較してAまたはN群で増加を示し、それらの複合群では高率に観察された。

以上、ラット多重癌モデルは多数の化合物の低濃度複合投与の効果をもつて、これを個体レベルで明らかに出来ることを示しており、このモデルは発癌因子の検索にも極めて有用であることが確認された。

B - 2 7 凝固系亢進ラットにおける endotoxin による毒性の増強

○相良 奈美、西澤 理江、柿畑 耕司、古濱 和久、
高山 敏

第一製薬(株)中央研究所

ラットでのendotoxin投与による血栓形成あるいは disseminated intravascular coagulation (DIC) 誘発に関し、これまで色々な方法が報告されているが、凝固系亢進下での検討は少ない。そこで種々の凝固系亢進ラットに無麻酔下で endotoxin を点滴静注し、凝固系 parameter への影響と共に主要臓器における血栓形成を組織学的に調べた。

7~10 週齢 の雄 Slc:SD系ラットを restraint ホルダーに保定し、留置針 (ベニユーラS、22G) を介して尾静脈内に組織トロンボプラスチン(1~5 mg/kg)、トロンビン(100~200 U/kg)あるいは乳酸(0.2~0.4 M)を前投与した。10 min 後にinfusion pump (Harvard社)を用いて endotoxin (E. coli 055:B5) 0.1~5 mg/kg を1~3 ml/hr の投与速度で4時間かけて注入した。24時間後に屠殺して血小板(PLT)、プロトロンビン時間(PT)、活性化トロンボプラスチン時間(APTT)、フィブリノーゲン(Fbg)を測定し、腎、肝および肺を組織学的に検索した。

Endotoxin 単独投与では用量依存的に PLT の減少、PT 及びAPTT の延長がみられたが強い血栓形成及び死亡は認められなかった。しかし、ごく軽度の負荷前処置すると各種凝固 parameter が著しく変動し死亡率も上昇した。

以上のことより、これらの方法を用いれば、endotoxin の凝固系への影響を増強して把握でき、また静注剤の血栓 potential を検知できる可能性がある。

B - 2 8 アドリアマイシンのリポソーム製剤化による毒性軽減効果

○神藤敏正、山田昌男、東條宏子、菊地典子、野村 護

第一製薬株式会社 中央研究所

アドリアマイシン(Doxorubicin hydrochloride:ADM)は、アントラサイクリン系抗腫瘍性抗生物質で、臨床的に悪性リンパ腫、肺癌、消化器癌、骨肉腫などに有効性が認められている。一方、ADMには副作用として骨髄障害、消化器障害、脱毛の他に心毒性がよく知られており臨床上いまだ多くの問題が残されている。現在これらの副作用軽減を目的とした製剤化研究が世界的になされており、そのなかでもドラッグデリバリーシステムをもちいたリポソーム製剤が注目されている。そこで我々は、リポソームの膜修飾物質、主薬保持率、荷電およびピークサイズなどの異なる4種(Rp. 25、Rp. 26、Rp. 27、Rp. 28)のADM含有リポソーム製剤(LADM)を作製し毒性学的に比較検討した。

実験には、6週令のSlc:SD系雌ラットを用い、ADMおよび各LADMの3および9mg/kg(アドリアマイシン換算含量)を各群3匹に1ml/minの速度で5日間尾静脈内投与した。各動物の一般観察、心電図検査を投与期間を通じて行い、最終投与後24時間にエーテル麻酔下に採血、屠殺し血液学的検査、血液生化学的検査、病理学的検査をおこなった。

その結果、ADM投与群では下痢、消瘦を認め、9mg/kgの2/3例が死亡した。また、QRS時間の延長、白血球数の減少、血清尿素窒素の高値、ALPの低値がみられ、病理組織学的に心筋の空胞性変化、胸腺、脾臓および骨髄の細胞減数が認められた。一方LADMでは負荷電のRp. 27に薬効損失のない、毒性軽減が認められたが、正荷電あるいは負・正荷電のRp. 26、28では毒性が顕著に軽減したが、薬効の減弱を伴った。また、荷電なしのRp. 25では薬効、毒性軽減ともに明らかでなかった。また、各LADM投与により網内系細胞の腫大増殖がみられ、Rp. 27の高用量では高脂血症がみられた。

以上より、リポソーム製剤化によりアドリアマイシンの持つ毒性が明らかに軽減され致命的な毒性を回避できる可能性が示唆された。また、各々異なった処方で、若干の差が得られ、リポソーム製剤の多様性が示されるとともに有望処方の改良研究の方向性がしめされた。

B - 2 9 臨床第 1 相試験に入るために必要な前臨床試験に関する 実態調査報告

五十嵐俊二

日本製薬工業協会 基礎研究部会 第二分科会

新規化学物質の安全性が動物試験で試され、その薬効が臨床試験で確認されて新医薬品は開発される。ここに、前臨床試験（毒性、薬理、代謝）によって十分なデータが得られた後に臨床試験導入されるべきとの倫理的要求と経済的（費用、時間）および科学的（動物からヒトへの外挿）制約がある。この問題に関して日本製薬工業協会加盟 70 社より寄せられたアンケート結果（昭和 63 年 7 月実施）について報告する。

1. 基本的な姿勢

殆どの企業は臨床導入（第 1 相）までに急性試験、亜急性試験および変異原性試験を終了すべきと考えているが、生殖 Seg.1 と Seg.2 および抗原性試験の場合は約 50% である。大半の企業は生殖 Seg.3 と慢性毒性試験を第 3 相までに、癌原性試験は申請時までにと考えている。各社とも一般薬理の主なものを第 1 相までに終了している。ADME の試験の進行は企業によって著しく異なるが、75% 以上の企業で第 1 相までに単回投与時の R I を用いた血中濃度、組織分布、排泄とコールドの血中濃度測定を終了している。

2. 薬物ごとの事例について

1984 年から 1987 年に臨床導入された 173 品目の事例について解析した。特徴的な年次的変化として毒性試験種のうち、生殖毒性試験 Seg.1 の実施が早期化し、逆に Seg.2 が遅れ、また復帰変異に加えて染色体異常及び小核試験の実施の早期化傾向が窺われる。臨床導入時の毒性試験の充足度は降圧剤や抗菌剤で相対的に高く、抗潰瘍剤で低い。

B - 3 0 必須元素の臓器分布に関する研究 (第1報)

○鈴木幸子, 小川幸男, 鎌田栄一, 金子豊蔵, 黒川雄二

国立衛生試験所 安全性生物試験研究センター 毒性部

毒性試験の一環として生体内微量元素に関する研究を行い、その嚆矢としてラットの臓器(脳・心臓・肺・肝臓・腎臓・脾臓・精巣・胸腺・顎下腺・骨)および血清中の必須元素(Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na, P, S, Zn)の分析を行い、各臓器の必須元素の分布の把握を試みた。

方法: Slc:Wistarラット(雄 5週齢)からエーテル麻酔下で眼窩静脈叢より採血し、頸静脈切断により放血後臓器(脳・心臓・肺・肝臓・腎臓・脾臓・精巣・胸腺・顎下腺・大腿骨)を摘出した。試料をテフロン製の分解容器に入れ、硝酸・過塩素酸を加え、マイクロ波エネルギーを加熱源とする湿式灰化を行った。上記9種の元素をプラズマ発光分光法による多元素同時分析を行った。

結果: 今回測定した必須元素の内Ca, Cu, Fe, Mg, Znの臓器分布を検討した結果、各臓器の元素濃度には違いがあるが、6つのパターンに分かれた。①脳・精巣・胸腺はMgが最も高く、次にCa, Zn, Fe, Cuの順であった。②肺・腎臓はMgが高く、次にCa, Fe, Zn, Cuの順であった。③心臓・脾臓はMgが最も高く、次にFe, Ca, Zn, Cuの順であった。④顎下腺・血清はCaが最も高く、次にMg, Fe, Zn, Cuの順であった。⑤骨はCa, Mgの順に非常に高く、次にZn, Fe, Cuの順であった。⑥肝臓はMgが多く、次にFe, Ca, Cu, Znの順であった。次に上記必須元素の臓器内濃度を見るとCaは骨に非常に多く、次に顎下腺、血清の順であった。Cuは腎臓に多く、次に肝臓、脾臓、心臓、骨、肺の順であった。Feは脾臓が最も高く、次に肝臓、肺、心臓であった。Mgは骨に非常に高く、次が顎下腺であった。Znの分布は骨が高かった。

B - 3 1 固定用量法急性毒性試験法が多機関共同研究

勝村英夫，小野 宏，今井 清¹⁾；加藤正信，武田量雄，高橋 要²⁾；井上博之，山本利男，大庭耕輔³⁾；西森司雄，谷口雄三，古川茂典⁴⁾；山田宏彦，甲田彰，廣森壽彦⁵⁾；山本武人，山根重孝，今田中伸哉⁶⁾

¹⁾ 食品薬品安全センター秦野研究所；²⁾ 三菱化成安全科学研究所；³⁾ 食品農医薬品安全性評価センター；⁴⁾ 環境生物科学研究センター；⁵⁾ 住友化学工業安全性研究所；⁶⁾ 化学品検査協会日田研究所

動物愛護などの理由から急性毒性試験の変更が求められている。この度、1984年に英国毒性学会(BTS)の提案した固定用量法による急性毒性試験の有用性確認のための国際的共同研究が行われ、われわれも国内6機関グループで参加した。英国におかれた運営委員会で20種類の化学物質が選定され、参加機関に同一ロットのものが配付され、BTS原法を若干改変した共通試験計画書による試験が行われた。試験物質はA B Cのコードで示され、目隠して試験が行われた。溶解・懸濁法の指示は送付元から与えられ、試験物質はすべて危険物として扱われた。実験動物はラットと指定され、国内機関では日本チャールスリバー社のCD(SD)とし、5～6週齢で試験に使用した。試験は5, 50, 500 mg/kgの固定用量で行われ、各用量2匹づつの見当づけ試験の結果適当と思われる用量をその3用量または2000 mg/kgのうちから選び、雄雌各5匹づつを用いて1回強制経口投与後14日間観察の急性毒性試験を行った。

国内各機関の結果を持ちより、比較検討した。20物質のうち確実な毒性が認められた用量が2機関で完全に一致したものは12に止まったが、不一致の大部分は一方の機関のみで少数の死亡が起こったもの(人為的屠殺も含む)で、大きな差が認められたものはなかった。本試験法は動物数の削減効果はあり、結果の食い違いは少ないが使用目的は限定されると思われる。

B-32 固定用量法急性毒性試験法の意義 — 英国毒性学会提案の方法に基づく国際共同研究の成績による考察

小野 宏

食品薬品安全センター秦野研究所

急性毒性試験は、種々の目的のために使用されるが、目的に応じた別々の方法が取られてよい。従来化学物質の危険度分類の基準の1つとしてLD₅₀値が用いられ、そのために一般化学物質についてもLD₅₀を含む急性毒性試験が広く行われてきたが、動物愛護などの理由からLD₅₀試験の改訂が求められている。今般英国毒性学会(BTS)の提案した固定用量法のValidationのための国際共同研究に国内6試験機関が協同で参加したので、その全体の結果を報告する。

この共同研究は欧米各国(西独を除く)と日本から31試験機関が参加し、20種の共通試験化学物質を用い、BTS法に基づいた固定用量法で、ラット単回強制経口投与急性毒性試験を行い、物質の危険度分類と表示についての有用性の確認を行うものであった。試験は1988年11月から89年4月にかけて実施され、89年7月にまとめの会議が行われた。1試験機関で同じ試験物質について従来の方法による急性毒性試験が実施され、比較検討された。本法と従来法による危険度分類は82.7%と高い一致率を示した。施設間差異も大きいものは稀であり、有用な試験法と判定された。使用動物数も従来法(限度試験を含めた1群5匹でのLD₅₀試験)に比べて半数近くまで削減できることが示され、また人道的屠殺の導入により、動物の苦痛を減少できることが強調された。ただし、毒性の症状観察結果には著明な施設間差異が認められ、この点に関するなんらかの標準化が必要であった。また、この種の急性毒性試験における病理学的検査には、投与-毒性発現-回復の過程における適切な検査時期の選択を考慮しなければ、その意義が半減することも示唆された。

B - 3 3 フローサイトメトリーによる血液学検査の毒性試験への活用

井上博之，杉山豊，渡修明，榎本眞

(財) 食品農医薬品安全性評価センター

化学物質は生体内に吸収された後、血液循環により全身に運ばれること、その作用部位には骨髄，脾，リンパ節など造血臓器も含まれることから、血液に影響を及ぼす化合物は比較的多く、医薬，農薬を含め化学物質の安全性を評価する場合、血液毒性の検索は重要である。

血液学検査では、自動血球計数装置による血球数，ヘモグロビン量，血小板数の測定の外、塗抹標本を鏡検することによる白血球の分類や異形血球の検出が実施されており、特に鏡検は時間と多大な労力を必要とする検査である。白血球の分類に関しては、画像処理による専用の装置も用いられてはいるが、近年フローサイトメトリーを利用した分析装置が開発され、同様に白血球の分類が迅速に行えるようになった。我々は一昨年、この種の装置の一つである血液自動分析装置 H6000 (テクニコン社) を導入し、一般毒性および癌原性試験で活用している。その結果、従来法では得られない以下の利点が見い出され、安全性試験での有効性が示唆されたので、報告する。

- (1) 赤血球ヒストグラムから貧血のタイプの推定が可能。
- (2) 全白血球を分類するので白血球百分比の精度が向上。
- (3) 白血病のタイプの推定が可能。
- (4) 血液試料の質的良否の判断が可能。

B - 3 4 長期飼育した実験動物の血液学および生化学背景データ

渡修明，村越令子，中嶋圓，井上博之

(財) 食品農医薬品安全性評価センター

実験動物を用いる安全性試験では、同一条件で実施した対照群のデータを背景データとして集積し、毒性発現の閾値の判断基準として利用する場合が多い。背景データは本来、各試験施設で保有するもので、他施設で利用するものではないが、安全性試験がガイドラインにより標準化され、様々なファクターが共通化して来ている現在では、他施設の背景データも利用度は非常に大きい。今日まで、ラット、マウスともに長期飼育したデータとして、腫瘍性病変についての報告は数例あるものの、血液学および生化学背景データは皆無に等しい。そこで今回は、慢性毒性試験や癌原性試験に多く用いられるラット F 3 4 4 / D u C r j (Fischer) およびマウス S l c : B 6 C 3 F₁ の血液学および生化学背景データを示すと共に、週齢変化、性差および種差等についての以下の知見を報告する。

血液学および生化学検査値とも試験ごとの変動は小さく、安定した結果が得られた。

ラットでは、加齢に伴ない好中球比率の増加、リンパ球比率の減少、G O T および G P T 活性の減少、総コレステロールの増加が認められた。これと比較して電解質の変動は小さかった。

マウスでは、加齢に伴ない、H C T、H G B および R B C が減少し、総コレステロールの増加が認められた。好中球比率の増加およびリンパ球比率の減少は、雌で顕著であった。

ラットはマウスに比較して M C V が大きく、G O T および G P T 活性が高かった。

B - 3 5 遠心分析方式の測定機を用いた実験動物の血液生化学検査について

笠間 菊子 小島 幸一

(財) 食品薬品安全センター 秦野研究所 生化学研究室

動物を用いた毒性試験において、その血液生化学的検査はヒトの臨床生化学検査に使用される機器等を使用して行われているのが現状である。当研究所では、従来連続流動方式の測定機(A)を使用してきたが、今回測定機の更新に際していくつかの測定機の中から遠心分析方式の測定機(B)を導入することになった。これに伴い、両者を用いた測定について多少の検討を行い興味深い知見を得たので報告する。

(B)は測定方法や試薬類を比較的自由に選択、設定できる特徴がある。このため、測定法および試薬を選択するために次のことに主眼をおいて検討を行った。すなわち、実験動物の血漿(血清)成分の測定に適していること、また当研究所で数十年にわたり蓄積されてきたバックグラウンドデータを今後も活用できることの2点である。検討に用いる試料はイヌ(ビーグル)およびラット(SD)の血漿とし、検討項目は、比較的頻繁に測定される12項目とした。

総タンパク質、グルコース、尿素窒素の各々の濃度は(A)と(B)で極めて良い相関を示し、カルシウム濃度についても相関係数の値は低くなるもののほぼ満足し得る結果が得られた。

しかし、総コレステロールとアルブミンの濃度の測定には標準物質あるいは標準血漿として用いるものを十分吟味する必要が明らかとなったほか、尿素、クレアチニンについては、試薬によっては(A)の測定値と(B)の測定値が著しく異なる例も見られた。

また、アルカリフォスファターゼ活性や乳酸脱水素酵素活性については、(A)と(B)の測定値を比較する場合、種差や性差を考慮する必要が認められた。

現在までの結果では、いくつかの項目を除き、ヒトで用いられる測定方法がそのまま測定機(B)を用いた動物検体の測定に応用できると考えられるが、さらに検討を重ねている。

B - 3 6 総合血液学検査装置 (THMS) H*1の毒性試験への適用に関する基礎的検討

高野享治 東山昇 村岡義博 吉崎敏夫 平田雅春

塩野義製薬研究所・神崎川分室

THMS H*1は光学的検出法による血球計数と細胞化学的分析による白血球分類を同時に行う自動分析装置であり、臨床検査のスクリーニングテストで有用性が実証されている。しかし毒性試験では実績に乏しいので本システムを毒性試験に適用すべく、実験動物を用いて基礎的検討を行った。

1) 定量性に関して：ラット 5匹、イヌ 5頭の血液を 5回ずつ繰り返して測定し同時再現性を、また同種動物の血漿で希釈して濃度勾配を作成し、血液濃度と測定値との直線性を調べた。従来法との相関性については血球計数をコールターカウンターモデル S で、白血球分類を目視法で測定して検討した。その結果、数の少ない単球、好酸球、好塩基球では定量性の認められない場合もあったが、それ以外の項目では良好な結果が得られた。

2) 薬物投与例について：マウスに白金化合物 CBDCA と CHIP を単回静脈内投与 (60mg/kg) し、投与 2日後に THMS H*1 と目視法で白血球数を測定した。その結果、両測定法とも同じ傾向が認められ、CHIP 投与により好中球比の上昇とリンパ球比、好酸球比、単球比の著しい低下が観察された。また、ラット皮下にフェニールヒドラジン 10 mg/kg を 3日間連続投与した場合、投与 3日後には赤血球数の低下、RDW (赤血球容積分布幅) と HDW (ヘモグロビン濃度分布幅) の上昇が認められ、網赤血球の出現が示唆された。

以上のごとく THMS H*1 は定量性に優れ、白血球分類における目視法との整合性も認められるので、多数の試料を分析する毒性試験での利用価値が高いものと思われる。

本田多聞, 中間和浩, 飯母清孝, 鮫島秀暢, 岡崎啓幸, 永田良一

(株)新日本科学 安全性研究室

近年, 医薬品として生物製剤の開発が活発となり, 当社ではサルを用いた安全性試験を実施する機会が多くなっている。サルはイヌと比較して体重が小さく, 検査を行うための採血に際しては, 採血頻度, 採血量が問題となる。一方, サルを用いた安全性試験でもIndocyanine green (ICG)およびPhenolsulfonphthalein (PSP)を用いた肝腎機能検査を実施する機会が多くなっている。そこで我々はこれらの肝腎機能検査を同時に実施すべく検討した。

インドネシア産のカニクイザルを用い, 同時投与群ではICG・PSP混合液 (ICG 0.83mg/ml およびPSP 5mg/mlを含有) を0.6ml/kg, 単独投与群でICG 5mg/mlを0.5mg/kg, PSP 6mg/mlを3.0 mg/kg前腕静脈内へ投与した。投与後3, 5, 15, 30, 45, 60分後にそれぞれ採血し, 血清を分離した。ICG濃度は蒸留水をブランクとして805nmにおける吸光度 E_0 を測定した。測定後, 次亜塩素酸ナトリウム水溶液を加え, 混和後, 再び蒸留水をブランクとして吸光度 E_1 を測定した。ICG吸光度 ($E_1 - E_0$) を求め検量線よりICG濃度を求めた。PSP濃度は血清 1 に蒸留水 5 を加え, 転倒混和後 2 分した。このうち一本に1 N 塩酸を加えてブランクとし, 他方に1 N 水酸化ナトリウム水溶液を加えた。560nmにおける吸光度を測定し, 検量線よりPSP濃度を求めた。

その結果, 血中の平均 ICG濃度を見ると併用投与および単独投与共に, 投与後 20 分までに減少し, 両投与間に差は認められなかった。その血中半減期は併用投与で 4.1 ± 0.4 分, 単独投与で 3.9 ± 0.7 分であり, 同様であった。一方, 血中の平均 PSP濃度では血中半減期は消失曲線が 2 相性のため, 20 分までは併用投与で 9.6 ± 2.5 分, 単独投与で 13.2 ± 2.0 分, 20 分以後は併用投与で 26.9 ± 1.7 分, 単独投与で 40.4 ± 30.8 分であり, 両者間ではほぼ同様であった。

従って, 併用投与および単独投与ともに血中濃度曲線が同一性を示したので, ICG検査において投与後15分, PSP検査で投与後15分, 45分における測定で検査が可能であると判断した。

なお, 肝腎障害を示したサルを用いて, その肝腎機能検査方法としての有用性を検討したので併せて報告する。

B-38 実験動物における尿中酵素測定法に関する検討：測定条件および保存条件の測定値への影響

○松下直子、清宮健一、川音晴夫、浅岡宏康、川村研治

明治製菓(株) 安全性研究所

尿中に見出される酵素、特に腎尿路系組織に由来する酵素の検索は腎病変の有無ならびにその病態を推定するために有用である。しかしながら、尿中に含まれる種々の物質がその測定系に干渉することが知られている。そこで、演者らは実験動物(ラット)尿を用いて尿中酵素測定上の問題点について若干の検討を行った。

尿中のアルカリ性ホスファターゼ(ALP)、ロイソアミノハフチナーゼ、乳酸脱水素酵素(LDH)などの活性は48時間の室温保存または凍結保存で低下し、特にALP活性の低下は両者の保存条件において顕著であった。また、凍結による上記酵素活性の低下は凍結直後から認められた。一方、48時間までの4℃下保存では、顕著な活性の低下は認められなかった。凍結融解した尿を透析あるいは限外濾過処置しても、活性の低下はなお認められた。原尿を透析あるいは限外濾過処置すると、原尿に比べてALP活性は低下したが、凍結による活性の低下は認められなかった。また、凍結の際、尿へのDMSOの添加(10%, V/V)や液体窒素中にて瞬時に凍結することにより活性の低下は防止された。LDH測定(乳酸基質・トリゾリウム塩法、Wróblewski-La Due法)において、限外濾過液の低分子分画(分子量1万以下)中に正の測定干渉が認められた。

以上の結果から、尿の凍結により酵素活性阻害物質の産生が示唆され、それには冷却過程で生成した氷の結晶化が関与すると考えられる。また、尿中酵素の測定は可及的に速やかに新鮮尿を用いて行うべきであるが、保存が必要な場合には、短期間の保存は4℃で、長期間の保存はDMSOを添加して凍結保存することが望ましく、測定干渉の認められたLDH測定には盲検測定が必要であると結論される。

B - 3 9 ラットの脾細胞定量化の検討

○島田 晴美、稲毛 富士郎、加藤 道幸、高山 敏

第一製薬 中央研究所

脾臓は胸腺と並びリンパ系中枢臓器の1つであり、生体の免疫・造血機能の維持に重要な位置を占めている。毒性試験に最も繁用されるラットにおいて脾臓の検査方法としては、病理組織学的検査が主であり、他の検査はほとんど行われていない。そこで新たに、ラットの脾細胞を定量化する方法を確立し、その有用性を検討した。

実験にはSprague-Dawley系の雄雄ラット(体重150~550g)を用いた。最初に脾細胞の分離操作法、希釈液の組成および脾細胞の保存性について基礎的検討を行い以下の操作法を設定した。即ち、5mlの希釈液(RPMI-1640に正常ラット血清、ウシ胎仔血清または5%ウシ血清アルブミンの等量混合液、細胞の凝集阻止のため0.5%EDTA-2Kを含む)を満たした6cmディッシュ中で、スライドグラスにて100mgの脾臓から実質を分離する。25G針付注射筒で3~5回吸引、射出し細胞を分散後、200メッシュナイロンガーゼで濾過し脾細胞浮遊液を得た。自動血球計数装置(シスメックスE-5000)を用いて有核細胞数を測定すると共に、塗抹標本作製した。上記の操作で調製した脾細胞浮遊液は、6時間後まで4、25、37℃いずれの温度でも細胞数、生存率に大きな変動はなかったが、24時間後には37℃で両者とも明らかに低下した。このことから、調製後25℃以下で、6時間以内に細胞数測定、塗抹標本作製を行えば問題ないものと考えられた。

以上の方法で測定した結果、正常雄ラットでは脾臓1mgに $1.1\sim 1.4\times 10^6$ cellsの有核細胞が含まれ、35~50%がリンパ球系、15~20%が顆粒球系、20~30%が赤芽球系、残り10~15%がその他の細胞であった。またシクロホスファミド(100mg/kg、ip、単回投与)による白血球減少症モデルおよび瀉血による貧血モデルで検討したところ、脾有核細胞数は脾臓の重量に伴って変動するが、両者は必ずしも並行して変動ないことが明らかとなった。以上の成績より、本検査法は脾臓の免疫および造血に果たす機能を定量的に推定する一方法として有用であると考えられた。

B - 4 0 妊娠カニクイザルを用いた無麻酔下における子宮収縮作用の測定技術

船戸 護、蛟島 秀暢、岡崎 啓幸、永田 良一、古謝 武志*

(株)新日本科学 安全性研究室、*薬理研究室

近年 prostaglandin の誘導体が血管拡張薬あるいは消化性潰瘍治療薬として開発されてきた。これらの薬は一般的に広くかつ長期に使用される場合が多く、妊娠婦人への安全性を推測するため、前臨床試験において、流産誘発および子宮収縮作用の有無をよく調べる必要がある。その際、ヒトへの外挿が最も適切と考えられるサルを用い、臨床応用時と同じ投与経路で生体位子宮運動に対する作用を調べるのが最も理想的と考えられる。今回我々は妊娠カニクイザルを用い、無麻酔下で被験物質の経口投与による子宮収縮作用を評価しうる方法を検討したので報告する。

測定方法：超音波画像診断器で妊娠の確認されたカニクイザルを ketamine (30 mg/kg i.m.) 麻酔下に開腹して子宮を露出させ、子宮体の腹側に縦走筋方向の収縮を測定するように生体張力計を縫合した。生体張力計のリード線は皮下を通して背中から出しジャケットのポケットに収容した。覚醒した後、モンキーチェアに坐らせ、子宮の収縮活動をひずみ圧力用アンプを介して、サーマルアレイレコーダに記録した。子宮の自発運動が安定した後、溶媒あるいは蒸留水を胃ゾンデを用いて強制経口投与し、60分間測定した。次に、試験物質を経口投与し、同様に子宮運動を測定した。必要に応じて、prostaglandin F_{2α}(30 μg/kg i.v.) を用い子宮収縮作用を確認した。試験終了後は ketamine 麻酔下に生体張力計を取り外し、腹筋および皮膚を縫合した。

この方法は子宮および胎児に対する影響がほとんどなく、これらの処置のみでは流産を惹起しないので、試験終了後は再び飼育室に戻し、流産の有無を確認できる。また、測定時を除いて、行動を束縛しないので7日間程度の反復投与による影響を調べることも可能である。

第17回日本毒科学会学術年会 協賛会社ご芳名

- | | |
|-------------------|---------------------|
| 荒川長太郎合名会社 | 東洋醸造株式会社 |
| エーザイ株式会社 | 富山化学工業株式会社 |
| 大塚製薬株式会社 | 日研化学株式会社 |
| 株式会社三和化学研究所 | 日本医薬品工業株式会社 |
| 株式会社ツムラ | 日本化薬株式会社 |
| 株式会社日本生物化学センター | 日本ケミファ株式会社 |
| 株式会社日本バイオリサーチセンター | 日本シンテックス株式会社 |
| 鐘紡株式会社 | 日本新薬株式会社 |
| キッセイ薬品工業株式会社 | 日本スクイブ株式会社 |
| 杏林製薬株式会社 | 日本チバガイギー株式会社 |
| 協和醗酵工業株式会社 | 日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社 |
| キリンビール株式会社 | 日本メジフィジックス株式会社 |
| 興和株式会社 | 日本ルセル株式会社 |
| 小玉株式会社 | 日本レダリー株式会社 |
| 三共株式会社 | 日本ロッジュ株式会社 |
| サノフィ明治薬品株式会社 | 萬有製薬株式会社 |
| 参天製薬株式会社 | ファイザー製薬株式会社 |
| サントリー株式会社 | 藤沢薬品株式会社 |
| サンド薬品株式会社 | 富士レビオ株式会社 |
| 塩野義製薬株式会社 | 扶桑薬品工業株式会社 |
| 生化学工業株式会社 | マルコ製薬株式会社 |
| ゼリア新薬工業株式会社 | 三井製薬工業株式会社 |
| 第一製薬株式会社 | 明治製薬株式会社 |
| 大正製薬株式会社 | 持田製薬株式会社 |
| 大日本製薬株式会社 | 山之内製薬株式会社 |
| 大鵬薬品工業株式会社 | ヤンセン協和株式会社 |
| 武田薬品工業株式会社 | 吉富製薬株式会社 |
| 田辺製薬株式会社 | ライオン株式会社 |
| トーアエイヨー株式会社 | ローヌ・プーラン薬品株式会社 |
| 東京田辺製薬株式会社 | 湧永製薬株式会社 |