

第19回 日本毒科学会学術年会  
プログラム・要旨集

平成4年7月23日(木)・24日(金)

昭和大学

1992 東京

第19回 日本毒科学会学術年会  
プログラム・要旨集

平成4年7月23日(木)・24日(金)

昭和大学

1992 東京

## 目 次

御挨拶	1
お知らせとお願い	2
会場案内	4
日程および座長一覧	6
<b>プログラム</b>	
特別講演	8
シンポジウム	8
ワークショップ(1)	9
ワークショップ(2) 特別委員会	10
一般演題	11
<b>要旨</b>	
特別講演	29
シンポジウム	41
ワークショップ(1)	59
ワークショップ(2) 特別委員会	77
一般演題	107

会長 黒岩 幸雄 (昭和大学薬学部毒物学教室)

組織委員 遠藤 仁 (東京大学医学部)  
井村 伸正 (北里大学薬学部)  
小野寺 威 (第一製薬)  
菊池 康基 (武田薬品工業)  
佐藤 哲男 (千葉大学薬学部)  
高仲 正 (国立衛生試験所)  
安原 一 (昭和大学医学部)  
吉田 武美 (昭和大学薬学部)

集会委員 宇高 奎二 (日本ロシュ)  
遠藤 仁 (東京大学医学部)  
佐藤 哲男 (千葉大学薬学部)  
林 裕造 (国立衛生試験所)

事務局所在地 〒142 東京都品川区旗の台1-5-8  
昭和大学薬学部毒物学教室  
TEL 03-3784-8205~7  
FAX 03-3784-8246

## 御 挨 拶

日本毒科学会は、現在千四百名余の会員を数え、我が国における医薬品、農薬、食品添加物等の安全性評価をはじめとする毒性学の分野を代表する国際的な学会であります。

日本毒科学会は、今回で第19回を迎えておりますが、その間、毒性試験法、安全性評価法、毒性試験代替法等に関して多くのワークショップやシンポジウムをはじめ会員各位の御発表を通してこの分野の研究開発や発展を通して教育啓蒙活動に大きく貢献してきております。

今年2月下旬にシアトルで開催されたアメリカ毒科学会(SOT)第31年会に出席しました。各分野からの参加者が多いこと、発表演題が1700題を越え研究の幅の広さ、深さとも、日本毒科学会に比較して大きな差があることを改めて認識せざるを得ませんでした。この差が一体何に起因するのか、会員一同考えなければならない点ですが、平成4年度は日本毒科学会の新たな展開を期待して初めての試みであるサテライトシンポジウムも開催致しました。第19回日本毒科学会学術年会および第1回サテライトシンポジウムが日本におけるこの分野の学問的向上に大きく貢献出来て、日米間の差の解消に役立てればと考えております。そのこともふまえ、御参加頂いた皆様方の活発な研究発表と討論を期待致す次第です。

第19回日本毒科学会学術年会

会 長 黒岩 幸雄

## お知らせとお願い

受付 ・学会受付は午前 8 時 30 分より行います。

(会場の扉は午前 8 時 30 分に開きます)

ネームプレート (参加章)

- ・ネームプレートには必要事項を記入し、会場内では必ずご着用下さい。
- ・事前登録された方は同封のネームプレートをご持参下さい。  
再発行は致しません。
- ・当日参加の方は参加申込書をご記入の上、受付にて参加費を納入し、ネームプレートと「プログラム・要旨集」をお受け取り下さい。

\*参加費は下記の通りです。

A ¥10,000 (正会員大会参加費及び懇親会費)

B ¥11,000 (当日会員、非会員大会参加費及び懇親会費)

C ¥6,000 (大会参加費のみ)

会場内の進行については、座長または司会の指示に従って下さい。

口演中の写真撮影はご遠慮下さい。

会場内での飲食・喫煙は所定の場所でお願ひします。

## 2. 演者の皆様へ

一般演題 (口演)

スライド ・口演の 30 分前までに各会場のスライド受付で、ご自身で試写・確認の上お渡し下さい。

- ・口演後はすみやかに引き取り下さい。
- ・スライドは 35 mm フィルム (枠 50 mm x 50 mm) を使用して下さい。
- ・一般演題のスライドは 10 枚以内でお願ひします。
- ・スライドには演題番号・演者名を明記して下さい。
- ・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。

一般演題の口演時間は 12 分、討論 3 分です。時間厳守を願ひます。

J. Toxicol. Sci. に掲載する英文抄録は、スライドをお渡しの際に受付にご提出願ひます。

次演者の方は発表の 10 分前までに最前列の次演者席にお着き下さい。

## シンポジウム・ワークショップ

- スライド ・口演の30分前までに各会場のスライド受付で、ご自身で試写・確認の上お渡し下さい。
- ・口演後はすみやかにお引き取り下さい。
  - ・スライドは35mmフィルム(枠50mm x 50mm)を使用して下さい。
  - ・シンポジウム・ワークショップのスライドの枚数は特に制限はありませんが、多すぎないようにお願いします。
  - ・スライドには演題番号・演者名を明記して下さい。
  - ・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。

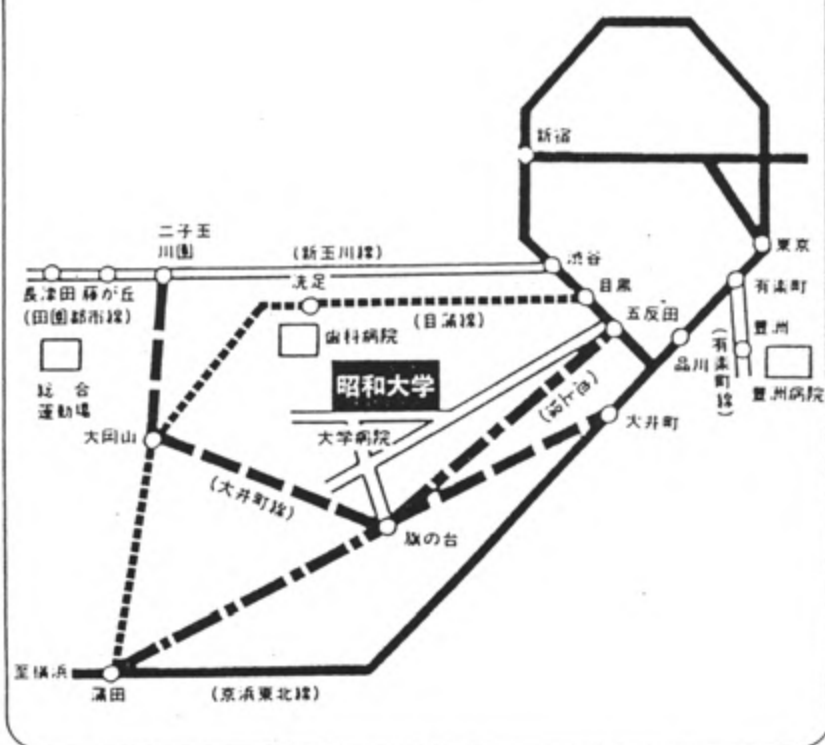
口演時間は座長の指示に従って、時間厳守を願います。

J. Toxicol. Sci. に掲載する英文抄録は、スライドをお渡しの際に受付にご提出願います。

3. 評議員会 7月23日(木) 12時30分より、4号館600号(第2会場)にて開催致します。
4. 総 会 7月24日(金) 13時30分より、上條講堂(第1会場)にて開催致します。
5. 懇親会 7月23日(木) 18時より、50周年記念館(7号館)にて開催いたします。当日の申し込みも受け付けます。準備の都合上、なるべく早めに総合受付でご予約下さい。

## 《交通案内図》

昭和大学/旗の台駅下車 徒歩5分



学会会場：昭和大学 上條講堂 他  
〒142 東京都品川区旗の台1-5-8  
TEL 03-3784-8081

交通：・東急池上線（JR五反田乗り換え）旗の台下車 徒歩5分  
・東急大井町線（JR大井町乗り換え） “ “

駐車場は病院との共用につき、なるべく車でのご来校はご遠慮下さい。





講演会場：上條講堂，4号館 600，502，402号室

休憩所：4号館 402号室

総会：上條講堂

評議員会：4号館 600号室

懇親会：7号館（50周年記念館）

第19回日本毒科学会学術年会  
日程および座長一覧・7月23日

地下1F=生協

第一会場 上條講堂	第二会場 600号	第三会場 502号	第四会場 402号
--------------	--------------	--------------	--------------

8:30 総合受付開始 (上條講堂および600号にて)

9:30

10:00

ワークショップ  
「複合臓器障害」  
  
座長 江頭 亨仁  
遠藤 仁

毒性発現機序  
毒性試験法  
座長  
201-204  
暮部 勝  
205-208  
小野 宏  
209-211  
高橋道人

金属・腎  
座長  
301-304  
玄番 宗一  
305-307  
杉谷幸男  
308-311  
安原 一

生殖毒性  
座長  
401-404  
小野寺威  
405-408  
平井正直  
409-411  
田内清憲

12:15

12:30

昼食休憩

評議員会

13:30

特別講演  
W. J. Waddell

14:30

シンポジウム  
「生殖発生毒性  
試験の国際和」  
  
座長 谷村 孝  
大森義仁

休憩室  
談話室

17:30

18:00 懇親会 (昭和大学50周年記念館7号館)

第19回日本毒科学会学術年会  
日程および座長一覧・7月24日

	第一会場 上條講堂	第二会場 600号	第三会場 502号	第四会場 402号
9:00	医薬品  座長 101-104 増田 裕 105-109 中根貞夫	毒性発現機序 毒性試験法 座長 212-215 菊地康基 216-220 松沼尚史	その他器官 特殊毒性 座長 312-315 堀井郁夫 316-320 上野光一	休憩室 談話室
11:15				
11:30	特別講演 J. Doull			
12:30	昼食休憩			
13:30	総会			
14:15				
14:30	ワークショップ 「組織培養法を 応用した臓器毒 性試験法の新しい 評価法の現状 と将来」  座長 戸部満寿夫 佐藤 温重	毒性発現機序 毒性試験法 座長 221-224 高山 敏 225-228 五十嵐俊二 229-233 野口英世	肝臓 座長 321-324 鎌滝哲也 325-328 藤田正一 329-332 山添 康	休憩室 談話室
17:30				

特別講演 第 1 会場 7月23日(木) 13:30-14:30

[Human Risk Factors to Naturally Occurring Carcinogens]

Professor and Chairman, William J. Waddell

(ルイビル大学・医・アメリカ)

座長 黒岩 幸雄 (昭和大学・薬)

特別講演 第 1 会場 7月24日(金) 11:30-12:30

[Extrapolation of Animal Results to Man]

Professor, John Doull (カンサス大学・医・アメリカ)

座長 白井 敏仁 (萬有製薬・開発研)

シンポジウム 第 1 会場 7月23日(木) 14:30-17:30

「生殖発生毒性試験の国際調和」

座長 谷村 孝 (近畿大学・医・解剖)

大森 義仁 (昭和大・薬・毒物)

1. European View towards the International Harmonization of Reproductive and Developmental Toxicity Studies

Rolf Bass (Institut Arzneimittel des Bundesgesundheitsamtes, Germany)

2. An American Scientist's Impression of Internationally Harmonized Guidelines for Reproductive and Developmental Toxicity Studies

James L. Schardein (Intern. Res. Develop. Corp., USA)

3. 日本の医薬品の生殖・発生毒性試験法ガイドライン  
—その基本的考え方と特徴—

田中 悟 (国立衛試・安全性生物試験研究センター)

4. 基礎研究の立場から見た生殖・発生毒性試験の国際調和

塩田 浩平<sup>1)</sup>・谷村 孝<sup>2)</sup>

(京都大学・医・解剖<sup>1)</sup>、近畿大学・医・解剖<sup>2)</sup>)

5. 薬物の生殖発生毒性試験のハーモナイゼーションに関する産業界からの考察

高山 敏 (第一製薬・開発研)

## 「複合臓器障害」

座長 江頭 亨 (大分医科大学・薬理)  
遠藤 仁 (東京大学・医・薬理)

1. 複合臓器障害とは 吉川 敏一 (京都府立医科大学・第1内科)
2. ライソゾーム酵素と臓器障害 小川 龍 (日本医科大学・麻酔科)
3. エンドトキシンと臓器障害 矢島 義昭 (仙台市立病院)  
森 和夫 (仙台血液疾患クリニック)
4. 虚血-再循環と複合臓器障害- 工藤 欣邦 (大分医科大学・薬理)  
江頭 亨 (                    )
5. 総合討論

「組織培養法を応用した臓器毒性試験法の新しい評価法の現状と将来」

座長 戸部 満寿夫 (日本公定書)

佐藤 温重 (東京医歯大)

1) 神経毒性

1. 神経毒性研究の現状と問題点 三森 国敏 (国立衛試)

2. 培養上顎神経節による神経毒作用機序の研究

堀 真一郎 (都神経研)

3. glioma細胞を用いたメチル水銀の毒性発現機序の研究

三浦 郷子 (和光大・経)

井村 伸正 (北里大・薬)

4. 巨大神経軸を用いた神経系殺虫剤の電気生理学的パラメーターと殺虫毒性

西村 勁一郎 (京都大・農)

藤田 稔男 ( )

2) 皮膚毒性

1. 組織培養法による皮膚毒性研究の現状と問題点

佐藤 温重 (東京医歯大)

2. ヒト皮膚モデルによる皮膚毒性の予知

S. R. Slivka

(Advanced Tissue Sciences

(formerly Marrow-Tech) U.S.A)

3. ヒトケラチノサイトの培養

黒木登志夫 (東大医科研)

3) 総合討論

9:30~10:30

座長 暮部 勝 (大阪府立大・農・獣医)

9:30 201 胆汁うっ滞を誘発する各種薬剤を遺伝性高ビリルビンラット(EHBR)に投与した際の  
影響について

#2370 ○見上 孝、園田 二朗

(エーザイ・安全研)

9:45 202 タバコ煙抽出物の変異原物質への活性化は P-450 2D サブファミリーが触媒する

#2262V ○藤田 正一<sup>1)</sup>、奴久妻 智代子<sup>2)</sup>、升田 真木彦<sup>1)</sup>、数坂 昭夫<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup> 北大・獣医・毒性学, <sup>2)</sup> RIC応医研)

10:00 203 アトロピン投与によるラットハーダー腺のポルフィリン量変化

○岩井 久和、玉置 文一、田川 義章、浅野 謙司、早坂 郁夫  
小出 政光

(三和化学研・安全研)

10:15 204 ラットにプロピルチオウラシルを投与した際の甲状腺刺激ホルモンの上昇と肝機能との  
関連について

○須藤 武、見上 孝、山津 清實

(エーザイ・安全研)

10:30~11:30

座長 上野 光一 (千葉大・薬・薬物)

10:30 205 単離肝細胞におけるイオノマイシンによる細胞死の研究

—単一細胞レベルの解析—

○川西 徹<sup>1)</sup>、畠山 智香子<sup>1)</sup>、豊田 和弘<sup>1)</sup>、朝生 裕樹<sup>2)</sup>、  
高橋 道人<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup> 国立衛試・病理部, <sup>2)</sup> 昭和大・薬・薬理学)

10:45 206 アドリアマイシンの培養腎細胞への移行および細胞内分布におよぼすCa<sup>2+</sup> channel  
modifiers の影響

○角崎 英志、清宮 健一、松尾 三郎、暮部 勝

(大阪府立大・農・獣医・毒性学)

11:00 207 癌細胞および正常細胞におけるアスコルビン酸の細胞膜透過性とその毒作用の細胞特  
異性との関係

○清宮 健一、松尾 三郎、暮部 勝

(大阪府立大・農・獣医・毒性学)

11:15 208 ラット肝臓に及ぼすデヒドロエピアンドロステロン(DHEA)の長期間投与の影響

○田村 浩<sup>1)</sup>、林 文彦<sup>1)</sup>、山田 純司<sup>1)</sup>、岩館 克治<sup>2)</sup>、  
酒井 孝範<sup>3)</sup>、粟田 則男<sup>3)</sup>、須賀 哲弥<sup>1)</sup>  
(<sup>1)</sup> 東京薬大, <sup>2)</sup> 新薬開発研・病理, <sup>3)</sup> 鐘紡・薬品開発研)

11:30~12:15

座長 高橋 道人 (国立衛試・病理部)

11:30 209 造血幹細胞培養法を用いてのラット血液毒性の評価

○相良 奈美、宮本 恵美、山口 文恵、古濱 和久、高山 敏  
(第一製薬・開発研・安全研)

11:45 210 Bromodeoxyuridine を用いた骨髓毒性検索法の検討

○小倉 剛<sup>1)</sup>、野口 規子<sup>1)</sup>、久保田 薫<sup>1)</sup>、小倉 昌子<sup>1)</sup>、  
鈴木 雅実<sup>1)</sup>、田村 博志<sup>1)</sup>、松本 清司<sup>2)</sup>  
(<sup>1)</sup> 中外製薬・安全研, <sup>2)</sup> 信州大・医)

12:00 211 長期毒性試験の血液学及び血液生化学的検査におけるヒストグラム及びレーダーグラムの有用性について

○野口 孝義、伊川 直樹、石川 寛明、武 信、中山 栄基、  
松島 泰次郎  
(日本バイオアッセイ研)



9:30~10:30

座長 玄番 宗一 (大阪薬大・第二薬理学)

9:30 301  $MnCl_2$  によるラット肝毒性発現と肝中 Mn 濃度との関連性

○榎田 陽子、高橋 裕詞、西澤 理江、古濱 和久、高山 敏

(第一製薬・開発研・安全研)

9:45 302 塩化カドミウムが卵巣摘出ラットの血液および尿検査値に及ぼす影響

○豊田 直人<sup>1)</sup>、勝田 修<sup>1)</sup>、平塚 秀明<sup>1)</sup>、松本 順子<sup>1)</sup>、  
梅村 孝司<sup>2)</sup>

(1) 三菱化成・安科研, 2) 鳥取大)

10:00 303 鉛投与による尿中ポルフィリン関連物質排泄動態の種属差

○友国 勝磨

(佐賀医大・地域保健科学)

10:15 304 昇汞によるラット十二指腸粘膜、腎皮質の酵素系急性阻害と DMPS による改善

○鈴木 史郎<sup>1)</sup>、丹羽 修<sup>2)</sup>、高村 省三<sup>1)</sup>、杉木 圭吾<sup>1)</sup>、  
今井 昌夫<sup>1)</sup>(金沢医科大・<sup>1)</sup>薬理学, <sup>2)</sup>薬剤部)

10:30~11:15

座長 杉谷 幸男 (臨床医科学研)

10:30 305 カドミウム結合メタロチオネインの血小板減少作用について

○林 泰司、鈴江 敏彦、曾山 桃子、照井 潤、深田 真、須藤 純一  
田辺 恒義

(東日本学園大・薬・毒理学)

10:45 306 ユーロピウム及びガドリニウムのラットにおける28日間反復経口投与毒性試験について (La-Yとの比較)

○小川 幸男、鈴木 幸子、内藤 克司、齊藤 実、広瀬 明彦、  
金子 豊蔵、黒川 雄二

(国立衛試・安全性生物試験研・毒性部)

11:00 307 金属化合物による in vivo 遺伝子突然変異誘発作用

ートランスジェニックマウスを用いた検討ー

○伊東 悟、服部 千春、松浦 由美子、鳥田 弘康

(第一製薬・開発研・安全研)

11:15~12:15

座長 安原 一 (昭和大・医・第二薬理学)

11:15 308 ラットにおける尿分析値の性差について

(1) 成長に伴う分析値の変化と去勢による影響

山田久陽、○杉浦 正幸、村上 美穂子、大津 結美子、大島 隆

中根 貞雄

(大正製薬・総合研・安全研)

11:30 309 培養腎上皮細胞株におけるシスプラチン障害の感受性と作用様式

○玄番 宗一、中田 文代、藤田 恵子、福石 信之

(大阪薬大・第二薬理学)

11:45 310 ラットにおけるアデニン短期間投与による腎障害の検討

○肥後 伸一郎<sup>1)</sup>、鈴木 雅実<sup>1)</sup>、松下 智哉<sup>1)</sup>、萬 啓悟<sup>2)</sup>、

渡辺 利彦<sup>2)</sup>、田村 博志<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup> 中外製薬・安全研, <sup>2)</sup> C S K リサーチパーク)

12:00 311 メトキシフルレンによる急性腎不全の機序

○車 碩鎬、細山田 真、遠藤 仁

(東大・医・薬理学)

9:30~10:30

座長 小野寺 威 (第一製薬・開発研)

9:30 401 生殖・発生毒性試験における生後行動検査に関する論文調査結果

- 成田 裕保<sup>1)</sup>、赤池 雅司<sup>2)</sup>、植村 昌平<sup>3)</sup>、佐藤 利和<sup>4)</sup>、  
早川 政兼<sup>5)</sup>、高山 敏<sup>6)</sup>；日本製薬工業協会 基礎研究部会  
(<sup>1)</sup> 日本レダリー, <sup>2)</sup> ヘキストジャパン, <sup>3)</sup> スミスクラインピーチャム  
<sup>4)</sup> 大鵬薬品, <sup>5)</sup> 三井製薬, <sup>6)</sup> 第一製薬)

9:45 402 カニクイザルを用いた催奇形性試験における超音波診断装置の使用経験

- 尾根田 暁、伊原 敏夫、池水 智博、福田 浩一、永田 良一  
(新日本科学)

10:00 403 Indomethacin の毒作用と卵巣機能障害 (Hypogonadism)

- 田中 政巳、増淵 美子、渡辺 実、平井 正直  
(聖マリアンナ医大・薬理学)

10:15 404 Ketoconazole の androgen 産生抑制作用と顎下腺摘出の影響

- 渡辺 実、増淵 美子、田中 政巳、平井 正直  
(聖マリアンナ医大・薬理学)

10:30~11:30

座長 平井 正直 (聖マリアンナ医大・薬理学)

10:30 405 各種ジブチルスズ化合物の単回投与による催奇形作用の比較

- 野田 勉、仲村 智子、森田 茂  
(大阪市立環境科学研)

10:45 406 培養ラット胎児における吸収 (死亡) 胚の発生機序について

- サリチル酸 Na および EGTA の比較—  
○横山 篤<sup>1)</sup>、秋田 正治<sup>2)</sup>、黒田 行昭<sup>3)</sup>  
(<sup>1)</sup> 日本たばこ, <sup>2)</sup> 鎌倉女子大, <sup>3)</sup> 麻布大・生物研)

11:00 407 各種癌化学療法剤のラットにおける排卵数増加作用

- 佐々木 哲哉、島田 信、原田 滋雄、渡辺 敏樹、俵 克彦、  
高山 敏  
(第一製薬・開発研・安全研)

11:15 408 ウサギ全胚培養法の発生毒性検出系としての有用性

- 納屋 聖人、紀藤 美江、出口 隆志  
(協和安全研)

11:30~12:15

座長 田内 清憲 (動物繁殖研)

11:30 409 催奇形作用検出指標としてのマウス口蓋ヒダの変異

○安田 峯生、大屋 亮治、佐藤 利夫、井上 尚彦

(広島大・医・第一解剖学)

11:45 410 器官形成後期ラット胎児培養法の開発

○秋田 正治<sup>1)</sup>、横山 篤<sup>1)</sup>、黒田 行昭<sup>2)</sup>

(<sup>1)</sup> 鎌倉女子大, <sup>2)</sup> 麻布大・生物科学総合研)

12:00 411 MNU 投与により誘発された小頭症動物の、Biel 型複式 T 型水迷路試験成績の背景成績との比較

○高島 宏昌、清水 ゆり、橋本 豊、水谷 正寛

(食薬安全センター・秦野研)

9:00~10:15

座長 増田 裕 (三共・安全研)

9:00 101 Z-103 反復投与による生体内金属(亜鉛、銅、鉄)含量の変動

山口 格、○増淵 弘子、柴田 桂三、武井 峰男、米良 幸典  
松田 和夫

(ゼリア新薬・中央研)

9:15 102 F344 ラット肝臓に対する clofibric acid の作用

-加齢に伴う感受性の変化-

○矢本 敬<sup>1)</sup>、佐藤 里子<sup>1)</sup>、大橋 芳彦<sup>1)</sup>、高岡 雅哉<sup>1)</sup>、  
寺西 宗広<sup>1)</sup>、真鍋 淳<sup>1)</sup>、松沼 尚史<sup>1)</sup>、牧田 登之<sup>2)</sup><sup>(1)</sup> 三共・安全研, <sup>(2)</sup> 山口大・農)

9:30 103 血漿CKおよびLDHアイソエンザイムの臨床的有用性

-Isoproterenol, adriamycin 心筋障害ラットを用いた検討-

○佐藤 誠孝、川原 潤一、黒澤 晴美、和田 通恵、天野 健次

(キリンビール・安全研)

10:00 104 脳機能改善薬、DM-9384 のラットを用いた依存形成能の検討

○藤川 香津子、秋山 義広、高山 敏

(第一製薬・開発研・安全研)

10:15~11:30

座長 中根 貞雄 (大正製薬・安全研)

10:15 105 Muramyl dipeptide 誘導体 MDP-Lys(L18)およびアジュバントによるラット関節炎の比較

○菅原 正喜、加藤 道幸、古濱 和久、高田 早苗、高山 敏

(第一製薬・開発研・安全研)

10:30 106 新規カンプトテシン誘導体、CPT-11 のラット下痢誘発作用

○笠井 義男、高砂 浄、碓井 千春、北野 裕、広橋 正章、高山 敏

(第一製薬・開発研・安全研)

10:45 107 8位置換フルオロキノロン系抗菌剤の光毒性

○丸谷 清<sup>1)</sup>、永牟田 雅弘<sup>1)</sup>、小田部 陽子<sup>1)</sup>、田中 公一<sup>1)</sup>、  
松本 雅彦<sup>2)</sup>、松原 秀三<sup>3)</sup>

(中外製薬<sup>1)</sup> 安全研, <sup>2)</sup> 探索第五研, <sup>3)</sup> 学術第一部)

11:00 108 HCT116, WiDr 担癌および非担癌ヌードマウスを用いたインターフェロン

(IFN)  $\alpha$  A/Dおよびフルツロン(5'-DFUR)併用投与における反復投与毒性試験

○進藤 英俊、小林 和子、千葉 章子、今村 いづる、堀井 郁夫

(日本ロシュ研・毒性・病理)

11:15 109 キノロン薬の幼若ラット膝関節腔内投与による関節軟骨病変の検討

○高田 早苗、加藤 道幸、高山 敏

(第一製薬・開発研・安全研)

9:30~10:00

座長 菊池 康基 (武田薬品・研究開発部)

9:00 212 脳組織コリン作動性神経活性に及ぼすアンチモン化合物の影響

○小林 晴男、中川 暁美、鈴木 忠彦、小野 菜穂子、茂木 朗、  
笠嶋 快周

(岩手大・農・家畜薬理学)

9:15 213 フェレットにおける薬物誘起性嘔吐時の組織セロトニン(5-HT)含量の上昇について

○遠藤 泰<sup>1)</sup>、高橋 美紀<sup>1)</sup>、浜上 尚也<sup>1)</sup>、門間 芳夫<sup>1)</sup>、南 勝<sup>1)</sup>、  
富樫 広子<sup>2)</sup>、吉岡 充弘<sup>2)</sup>、齊藤 秀哉<sup>2)</sup>( <sup>1)</sup> 東日本学園大・薬・薬理学, <sup>2)</sup> 北大・医・第一薬理学)9:30 214 Effects of Cocaine hydrochloride on Dopaminergic System of the  
Brain in Rats○Dae Hyun Cho、Se Jin Hwang、Tae Gu Kang、Jin Tae Hong、  
Pu Young Kim、Kang Chin

(NISR, Seoul, Korea)

9:45 215 Butylated hydroxytoluene(BHT)の反復投与による薬物代謝酵素誘導と小葉辺縁性壊死  
病巣の出現○真鍋 淳、大橋 芳彦、高岡 雅哉、矢本 敬、五十嵐 功、  
山下 和男、木村 邦男、宮腰 昶 宏、松沼 尚史

(三共・安全研)

10:00~11:15

座長 松沼 尚史 (三共・安全研)

10:00 216 EIA法、FPIA法による甲状腺ホルモン濃度測定の実用への応用

○小林 章男、菅井 恵子、守屋 直美、宮川 義史、滝沢 春雄

(日本たばこ・安全研)

10:15 217 rhIL-6を持続的に産生する形質転換BHK-21細胞を移植したヌードマウスに認められ  
た諸変化○芹沢 功<sup>1)</sup>、柳田 誠<sup>1)</sup>、伊藤 綾子<sup>1)</sup>、加藤 尚志<sup>2)</sup>、  
大橋 秀哉<sup>2)</sup>、三箇山 俊文<sup>2)</sup>、西 信介<sup>2)</sup>、井上 英男<sup>2)</sup>、  
天野 健次<sup>1)</sup>(キリンビール・<sup>1)</sup>安全研, <sup>2)</sup> 医薬開発研)

- 10:30 218 マウス赤血球の非浸透圧性試験管内溶血について (続報)  
○金津赫生、望月雅裕  
(筑波大・医療技術短大, ポゾリサーチセンター)
- 10:45 219 カニクイザルにおける血液学的検査に及ぼす採血の影響  
○鮫島 秀暢、岡崎 啓幸、池田 浩明、中間 和浩、永田良一  
(新日本科学)
- 11:00 220 ラット血漿における異型性CK アイソエンザイムの出現機序について  
○川原 潤一、佐藤 誠孝、黒澤 晴美、和田 通恵、天野 健次  
(キリンビール・安全研)



14:15~15:15

座長 高山 敏 (第一製薬・開発研)

14:15 221 マウス化学肺腫瘍発生の修飾に関与する要因について

○矢野 友啓<sup>1)</sup>、石川 学<sup>2)</sup>、市川 富夫<sup>1)</sup>( <sup>1)</sup> 国立健康・栄養研・応用食品, <sup>2)</sup> 日大・農獣医・食品化学)

14:30 222 HCO-60 における種特異的毒性発現

○久富 晃彦、木村 守、前田 雅志、松本 正博、小原 要、  
野口 英世

(藤沢薬品工業・安全研)

14:45 223 多臓器中期発癌性試験法を用いた肝発癌物質および天然酸化防止剤の発癌修飾作用の  
検討○田中 光<sup>1)</sup>、玉野 静光<sup>1)</sup>、阿部 真弓<sup>1)</sup>、佐野 真士<sup>1)</sup>、  
福島 昭治<sup>2)</sup>、白井 智之<sup>1)</sup>( <sup>1)</sup> 名古屋市立大・医・第一病理学, <sup>2)</sup> 大阪市立大・医・第一病理学)

15:00 224 Morphine 依存カニクイザルの退薬症候

○福崎 好一郎<sup>1)</sup>、北原 光一<sup>1)</sup>、古謝 武志<sup>1)</sup>、永田 良一<sup>1)</sup>、  
深瀬 広幸<sup>1)</sup> <sup>2)</sup>、S. E. Lukas<sup>2)</sup>( <sup>1)</sup> 新日本科学・薬理研, <sup>2)</sup> ADARC, McLean Hospital/  
Harvard Medical School)

15:15~16:15

座長 五十嵐 俊二 (エーザイ・研開発情報部)

15:15 225 総合血液学検査装置テクニコンH-1の動物血液に対する適用の基礎的検討

○中山 由美子、堀井 和成、田中 裕子、奥野 泰由、吉武 彬

(住友化学工業・生物環境科学研)

15:30 226 イヌの長時間心電図検査に関する検討

○清水 憲次<sup>1)</sup>、仲澤 政雄<sup>1)</sup>、日下部 憲道<sup>2)</sup>、神園 健<sup>3)</sup>、  
福田 久夫<sup>3)</sup>、鹿野 りえ<sup>4)</sup>、内野 富弥<sup>4)</sup>、小山 秀一<sup>5)</sup>、  
本好 茂一<sup>5)</sup>( <sup>1)</sup> 富士生物科学研, <sup>2)</sup> エムイー・ラボシステム, <sup>3)</sup> フクダ・エムイー工業<sup>4)</sup> 動物 ME 診断リサーチセンター, <sup>5)</sup> 日本獣医畜産大)

- 15:45 227 ラット血清中のC3たんぱく質の測定  
○安達 智子、堀口 恵子、柳田 由起、笠間 菊子、小島 幸一  
(食薬安全センター・秦野研・生化学研)
- 16:00 228 キノホルム毒性に対して、感受性の強いラットと弱いラットの近交系化について  
○堀 眞一郎<sup>1)</sup>、大谷 幸子<sup>1)</sup>、小滝 一<sup>2)</sup>、藤井 智子<sup>1)</sup>  
(<sup>1)</sup> 東京都神経研・神経生化学, <sup>2)</sup> 東大病院・薬剤部)
- 16:15~17:30 座長 野口 英世 (藤沢薬品・安全研)
- 16:15 229 毒性試験における多項目検査成績解析法(レーダー診断図)の開発  
○五十嵐 功、小林 直美、古山 佳子、茨田 享子、田内 清憲  
(動物繁殖研)
- 16:30 230 毒性試験に関わるデータの統合処理環境《TS-1/SAS》  
○北山 英太、田村 博信、中沢 素邦、山下 康弘、安達 孝治  
木谷 睦、稲垣 利明、寺坂 眞紀子、河口 和寛、鷺見 信好  
(日本新薬・安全研)
- 16:45 231 変異原性試験、分配係数及び急性毒性の多変量解析(数量化理論2類)による化学物質の発癌性の判別  
○高木 篤也、佐井 君江、長谷川 隆一、黒川 雄二  
(国立衛試・毒性部)
- 17:00 232 安全性評価に用いられる毒性試験の曝露期間と無作用量に関する検討  
○曾田 喜崇、鎌田 栄一、中館 正弘  
(国立衛試・安全センター・総合評価研)
- 17:15 233 長期反復投与毒性試験に12ヶ月の投薬期間が必要か?  
-投薬期間の長さと発現する毒性の文献調査結果-  
○五十嵐 俊二  
(エーザイ・研開情報部)

9:00~10:00

座長 堀井 郁夫 (日本ロシユ・毒性・病理)

9:00 312 *Listeria monocytogenes* 感染実験系を使用した化学物質の免疫毒性に関する研究○井上 智<sup>1)</sup>、水谷 秋子<sup>2)</sup>、中村 恒彰<sup>2)</sup>、増田 光輝<sup>2)</sup>、  
森田 千春<sup>1)</sup>、小野 宏<sup>3)</sup>( <sup>1)</sup> 国立予防衛生研・獣疫, <sup>2)</sup> ライオン・安全性評価,  
<sup>3)</sup> 食薬センター・秦野研)

9:15 313 医療材料ポリウレタン (Pu) のラット皮下への長期埋植による組織反応

○川崎 靖<sup>1)</sup>、高田 幸一<sup>1)</sup>、中路 幸男<sup>1)</sup>、津田 充寿<sup>1)</sup>、  
黒川 雄二<sup>1)</sup>、中村 晃忠<sup>2)</sup>、小嶋 茂雄<sup>3)</sup>、佐藤 道夫<sup>2)</sup>、  
伊佐間 和郎<sup>2)</sup>( 国立衛試・<sup>1)</sup> 毒性部, <sup>2)</sup> 療品部, <sup>3)</sup> 環境衛生化学部)

9:30 314 遅延型アレルギー反応(1) 5種類のメタクリル酸誘導体の反応性の検討

○金澤 由基子、山脇 智予、小島 幸一

(食薬安全センター・秦野研・免疫毒性)

9:45 315 モルモット全身性アナフィラキシー反応感作時のアジュバントの検討

○佐藤 康一、服部 浩之、山口 文恵、古濱 和久、高山 敏

(第一製薬・開発研・安全研)

10:00~11:15

座長 上野 光一 (千葉大・薬・薬物)

10:00 316 N<sup>4</sup>-Trimethoxybenzoyl-5'-deoxy-5-fluorocytidine (Neofurtulon)と 5'-  
deoxy-5-fluorouridine (Furtulon) の BDF1マウスにおける免疫毒性学的評価

○井上 智彰、堀井 郁夫

(日本ロシユ・毒性・病理)

10:15 317 末梢リンパ節検査における金属アレルギーに対するリンパ球増殖反応の種差

○五十嵐 良明<sup>1)</sup>、大野 圭子<sup>2)</sup>、土屋 利江<sup>1)</sup>、中村 晃忠<sup>1)</sup>( 国立衛試・<sup>1)</sup> 療品部, <sup>2)</sup> 毒性部)

- 10:30 318 癌原性物質 DMBA の長期塗布によるマウスおよびラットの皮膚腫瘍発生  
○大庭 和彦<sup>1)</sup>、小林 和宏<sup>1)</sup>、山田 雅彦<sup>1)</sup>、坂巻 政次<sup>1)</sup>、  
小佐妻 恒夫<sup>1)</sup>、杉谷 幸男<sup>1)</sup>、竹内 雅也<sup>2)</sup>、西方 ゆかり<sup>3)</sup>、  
津久井 誠<sup>3)</sup>、橋本 有<sup>4)</sup>、黒木 登志夫<sup>4)</sup>  
(<sup>1)</sup> 臨床医科学研, <sup>2)</sup> 札幌総合病理研,  
<sup>3)</sup> 武田薬品・アグロ事業・農薬開発部, <sup>4)</sup> 東大・医科学研)
- 10:45 319 白色蛍光灯照射および紫外線照射のアルビノマウス眼球に及ぼす影響  
○下田 耕司、加藤 道幸、和賀井 信彦、高山 敏  
(第一製薬・開発研・安全研)
- 11:00 320 眼毒性試験における眼圧計およびリフラクトメーターの使用経験について  
○岡崎 啓幸、加島 政利、鬼丸 俊夫、伊原 敏夫、永田 良一  
(新日本科学)

14:15~15:15

座長 鎌滝 哲也 (北大・薬・薬品分析)

14:15 321 ビーグル犬における部分肝切除後の血液・血液生化学的検査値および肝臓内薬物代謝酵素活性

○岡元 智文、樽見 千利、永田 健一、安田 充也、大橋 芳彦、  
末綱 かおり、山下 和男、真鍋 淳、増田 裕

(三共・安全研)

14:30 322 化学物質によるラット肝臓中 7-alkoxycoumarin 0-dealkylase 活性誘導プロフィールとチトクローム P-450 ファミリーとの関係

○大橋 芳彦、真鍋 淳、長谷川 貴江、杉浦 智美、五十嵐 功、  
松沼 尚史

(三共・安全研)

14:45 323 各種誘導剤によるチトクローム P-450 の肝小葉内誘導部位

○五十嵐 功、真鍋 淳、大橋 芳彦、高岡 雅哉、矢本 敬  
寺西 宗広、松沼 尚史

(三共・安全研)

15:00 324 イヌの肝臓における薬物代謝酵素の誘導

—肝部分切除および Phenobarbital 投与に対する反応—

○菅野 昭永、真鍋 淳、大橋 芳彦、矢本 敬、高岡 雅哉、  
岡本 智文、樽見 千利、松沼 尚史

(三共・安全研)

15:15~16:15

座長 藤田 正一 (北大・獣医・毒性学)

15:15 325 中期発癌性試験法を用いた Heterocyclic amine の低濃度複合投与によるラット肝発癌相乗作用の検討

○浅川 恵美子、萩原 昭裕、柴田 雅朗、小川 久美子、伊東 信行

(名古屋市立大・医・第一病理学)

15:30 326 肝薬物酸化能評価法—カフェインとトリメタジオンを指標薬として—

○田中 栄之介<sup>1)</sup>、石川 詔雄<sup>2)</sup>、三澤 章吾<sup>1)</sup>

(筑波大<sup>1)</sup> 社会医学系, <sup>2)</sup> 臨床医学系)

15:45 327 アリールアミンの代謝に関与するハムスターアセチルトランスフェラーゼ、AT-IとAT-IIの一次構造とその比較

○山添康、永田清、小沢正吾、島田美樹、宮田昌明、  
Medhat Abu-Zeid、加藤隆一

(慶応大・医・薬理学)

16:00 328 スンクス肝可溶性画分の2-アミノフルオレン変異原活性能：スンクスにおける0-アセチルトランスフェラーゼの欠失

○名倉弘哲<sup>1)</sup>、伊東進<sup>1)</sup>、北村龍司<sup>1)</sup>、沢田稔<sup>1)</sup>、草野尚<sup>2)</sup>、  
石曾根博之<sup>2)</sup>、出口武夫<sup>3)</sup>、横井毅<sup>1)</sup>、鎌滝哲也<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup> 北大・薬, <sup>2)</sup> 浅田館本舗堀内伊太郎商店, <sup>3)</sup> 都神経研)

16:15~17:15

座長 山添 康 (慶応大・医・薬理学)

16:15 329 ラット肝細胞スフェロイド培養法を用いた新しい実験的肝障害モデルの作製

○遠藤健一<sup>1)</sup>、上野光一<sup>1)</sup>、宮下愛次<sup>1)</sup>、竹澤俊明<sup>2)</sup>  
森有一<sup>2)</sup>、佐藤哲男<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup> 千葉大・薬・薬物, <sup>2)</sup> グレース・日本中央研)

16:30 330 サル初代培養肝細胞を用いた肝細胞障害性試験

○川島明、堀井郁夫

(日本ロシユ・毒性・病理部)

16:45 331 ラット肝 cytosol 中に含まれる Monoamine Oxidase の性質

○小畑俊男<sup>1)</sup>、波沢庸一<sup>2)</sup>、伊東洋一郎<sup>2)</sup>、山中康光<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup> 大分医大・薬理学, <sup>2)</sup> 米国LBC,NHLBI,NIH)

17:00 332 ラットにおける Bromodichloromethane 誘発 cholangiofibrosis の細胞増殖活性について

○安原加壽雄<sup>1)</sup>、会田喜崇<sup>2)</sup>、三森国敏<sup>1)</sup>、黒川雄二<sup>3)</sup>、  
高橋道人<sup>1)</sup>

(国立衛試・<sup>1)</sup> 病理部, <sup>2)</sup> 総合評価研, <sup>3)</sup> 毒性部)

# 特別講演

平成4年7月23日(木) 13:30~14:30

第1会場

「Human Risk Factor to Naturally  
Occuring Carcinogens」

William J. Waddell (レイビル大・医・アメリカ)

座長 黒岩幸雄 (昭和大・薬)

特別講演 Human Risk Factors to Naturally Occurring Carcinogens:  
Thresholds, Inhibitors and Inducers

William J. Waddell, M.D.

Department of Pharmacology and Toxicology  
University of Louisville School of Medicine  
Louisville, Kentucky 40292, USA

There is a great deal of concern today about the possible carcinogenic risk to humans from some synthetic chemicals which are being released into the environment. There are very large uncertainties encountered when extrapolating from the results in experimental animals to humans and when extrapolating from maximum tolerated doses to the minuscule doses of these chemicals encountered by humans in the environment. One way to evaluate the carcinogenic risk to human synthetic chemicals is to examine the carcinogenic risk from naturally occurring chemicals. This also will place such risks in perspective; in addition, factors such as thresholds, inhibitors and inducers can be considered for comparison.

This presentation will examine data on three naturally occurring carcinogens: benzene, ethyl carbamate and nitrosamines. This will induce the likelihood of thresholds, the background dose for humans of each and factors expected to be encountered in the possible stimulation and inhibition of the carcinogenic action of these chemicals.

Benzene is known to cause acute myelogenous leukemia in humans and is present in foods, cigarette smoke and gasoline at levels which represent exposures to humans. However, it is doubtful whether these exposures are significant when considered relative to the background level of benzene produced from natural sources even in the most pristine environment. The background concentration in rural air is about 15 ppt; although this may seem low, this level results in an adult inhaling about 7 quadrillion



molecules per day. When considered on a molecular dose basis, the percentage change is small from background level to leukemogenic levels. The only logical interpretation is that there is a threshold below which benzene does not cause leukemia. Consideration of data on rates of industrial production and release into air, and level of benzene in air allows one to conclude that industrial release is about 22% of the total benzene released into the atmosphere. However, the industrially produced benzene released into atmosphere may be decomposed about as fast as it is released. The two conclusions from this analysis is that manmade benzene is a minor fraction of the total benzene in the air and that there is a threshold below which there should be no concern for human exposure.

Ethyl carbamate (urethane) is a byproduct of yeast metabolism and consequently is found in many foods. It was once used as an anesthetic in humans until it was discovered to be an animal carcinogen. No epidemiological studies exist. Because of its presence in higher concentrations in some alcoholic beverages, there recently has been some increased concern; estimates have been made by several groups of the "safe dose" of ethyl carbamate for humans. These estimates of the "safe dose" range over several orders of magnitude and illustrate the very arbitrary procedures used to make such calculations. The limit on the daily intake proposed in California ( which is the most conservative) is below the amount normally consumed in an average human diet even though alcoholic beverages. However, ethyl carbamate is activated by P450IIE1 in a two-step process to the proximal carcinogen, vinyl carbamate epoxide; this conversion by P450IIE1 is competitively inhibited by ethanol which is a substrate for the same enzyme. Data on concurrent administration of ethyl carbamate and ethanol in mice clearly show inhibition of metabolism of ethyl carbamate. The effect of concurrent administration on carcinogenicity, however, is dependent on dose and relative dosing schedules. The conclusions are that more studies need to be done to clarify the possible carcinogenicity of ethyl carbamate in humans and that the interaction with alcohol

and other substrates for its activation could be very important.

Nitrosamines are widely distributed in nature and are commonly present in many foods, and in cigarette smoke; many are potent in experimental animals and are considered to be carcinogens in humans. Perhaps because the compounds are so ubiquitous, few regulations and estimates of "safe doses" have been made. The FDA has set a 10 ppb limit on nitrosamines in rubber nipples for baby bottles and a 5 ppb limit on dimethylnitrosamine in malt beverages and 10 ppb in barley malt. The lifetime cancer risk for N-nitrosopyrrolidine at  $10^{-5}$  has been estimated by the EPA method at 0.11 ug/l in drinking water based on induction of liver cancer in rats. Although few estimates of the actual contribution of nitrosamines to the incidence of human cancer have been made, the compounds are considered to be a significant factor in this disease; consideration of the mechanism of nitrosamine carcinogenesis is important.

Benzene, ethyl carbamate, and nitrosamines are activated to their proximal carcinogens by P450IIE1; inhibition of the localization of covalently bound metabolites of ethyl carbamate and nitrosamines by ethanol in tissues has been demonstrated. The inhibition and induction of P450IIE1 by a variety of substances apparently may have a significant effect on the carcinogenicity of these carcinogens. Among the compounds or conditions that can induce and/or inhibit P450IIE1 are ethanol, acetone, fasting, unsaturated lipids (corn or menhaden oil), obesity, diallyl sulfide, ellagic acid, isothiocyanates, and thiamine deficiency. The details of the interactions between these substances or conditions with P450IIE1 and the activation of carcinogens appears increasingly to be of great importance. Thresholds, "safe doses", and even the definition of a human chemical carcinogen may not be complete until we have a more thorough understanding of these interactions.

特 別 講 演

平成4年7月24日(金) 11:30~12:30

第1会場

「Extrapolation of Animal Results to Man」

John Doull (カンサス大・医・アメリカ)

座長 白井敏仁 (萬有製薬・開発研究)

## 特別講演

### Extrapolation in Animal Results to Man

John Doull M.D., Ph.D.

Prof. Pharmacology & Toxicology

University of Kansas Medical Center

Kansas City, KS 66103

Although we define toxicology as the study of the adverse effects of chemicals on biological systems, toxicology is more than just the identification and characterization of adverse effects. Toxicology, like medicine, is both a science and an art and it is the art or the predictive aspect of toxicology which is responsible for its major role in public health. Toxicologic predictions are traditionally based on information concerning the chemical and its adverse effects, the dose and/or exposure conditions and the target or exposure subjects. These three endpoints, type of adverse effect, exposure scenario and susceptibility of the exposed population are the basis for setting exposure limits for chemicals in the workplace, in our food, water, air, soil and elsewhere.

When we do not have sufficient information about one or more of these endpoints, we often use surrogate data and extrapolate these results to develop the prediction or set an exposure limit. Thus we might use data on a chemical or group of chemicals (SAR) which closely resemble the target chemical in terms of its chemical and biologic properties as a basis for a prediction or use one adverse effect such as genotoxicity to predict carcinogenicity or some other adverse effect. Similarly we might use inhalation toxicity data to predict ingestion effects (route to

route), 90-day data to predict chronic effects (duration to duration), high dose effects to predict low dose effects (dose to dose) or other dose/exposure surrogates, The use of animal data as a surrogate for human exposure (species to species) is one of the most important types of extrapolation used in risk assessment and it is this area that I will focus on in this presentation.

The first step in what is traditionally referred to in toxicology as hazard evaluation is to identify all of the adverse effects that can be produced by either acute or chronic exposure to the chemical and the second step is to establish dose-response relationships for each of these adverse effects. Ideally, these studies would also provide information on the effects of administration by different routes, by different rates and duration of exposure and information on other test species. This information together with data on the chemical and physical-chemical properties of the chemical, kinetic data in various species, gene-tox studies, teratology, reproduction and other types of end-organ damage and the mechanistic information constitute the tox-data-base for the chemical. The next step is to determine whether this information is relevant to the target species. In those cases where the information is appropriate and where there is a threshold or no-effect-level (NOEL), then the final step is to divide the NOEL by an appropriate safety factor to assess risk and establish the exposure limit. In those cases where a threshold cannot be established, an alternative approach is needed such as the quantitative risk assessment (QRA) method used by EPA and others to estimate the risk for non-threshold carcinogens. However the focus in the models currently used in this approach is on high to low dose extrapolation rather than on the species to species comparison.

The process of establishing exposure limits for workers, military personnel and other population groups that are exposed to chemicals is the major real-world application of what is currently referred to as risk assessment. Groups such as the ACGIH TLV Committee and the NAS/NRC Committee on Toxicology have been engaged in this effort for nearly 50 years and the FDA has used essentially the same process for setting tolerances for drugs, pesticides, food additives and other chemicals for an even longer period. The basic elements of this process are the priority of human over animal data, the case by case approach, the use of the threshold approach and the use of weight of evidence or biologically based judgement rather than rigid protocols or guidelines to achieve the optimal balance between benefits and risk.

# シンポジウム

平成4年7月23日(木) 14:30~17:30

第1会場

## 「生殖発生毒性試験の国際調和」

座長 谷村 孝 (近畿大・医・解剖)

大森 義仁 (昭和大・薬・毒物)

S-1 European View towards the International Harmonization of Reproductive and Developmental Toxicity Studies

Rolf Bass

(Institut für Arzneimittel des Bundesgesundheitsamtes,  
Germany)

S-2 An American Scientist's Impression of Internationally Harmonized Guidelines for Reproductive and Developmental Toxicity Studies

James L. Schardein (Intern. Res. Develop. Corp., USA)

S-3 日本の医薬品の生殖・発生毒性試験法ガイドライン

—その基本的な考え方と特徴—

田中 悟 (国立衛試・安全性生物試験研究センター)

S-4 基礎研究の立場から見た生殖・発生毒性試験の国際調和

塩田 浩平 (京都大・医・解剖)

谷村 孝 (近畿大・医・解剖)

S-5 薬物の生殖発生毒性試験のハーモナイゼーションに関する産業側からの考察

高山 敏 (第一製薬・開発研)

## S 司会の言葉

谷村 孝, 大森 義仁

近畿大学・医学部・解剖学教室, 昭和大学・薬学部・毒物学教室

1961年のサリドマイド事件を契機として、医薬品を始めとする化学物質の生殖発生毒性を哺乳動物で検索する公的指針が各国で出された。

医薬品については、1966年のFDAの3節試験を基本にした試験法がほとんどの国で採用されているが、日本と欧米の医薬品の生殖発生毒性試験指針には、その成立の過程において基本的な考え方の相異（日本は催奇形試験を、米国は世代試験を基盤）がある。さらに日本と外国との間に問題が起こっている第二の理由は、生殖発生毒性試験と言うものがそれまでは適切な指導要項がなくて、急にかなり細かい案内、規制を持った指針が出来た事で、指針の表現の差違について非常に重箱の隅の末梢に拘るような配慮が関係者にあった事であろう。

一方、農業、食品添加物や一般化学物質の指針は、原則的に多世代試験と催奇形性試験からなり、各国の指針もそう大きく異ならず、またOECDの指針もあり、国際的な紛争は比較的少ない。

医薬品について、欧米の指針と日本あるいはスカンジナビアの指針との違いを要約すると日本の指針は第1, 2, 3節と生殖・発生の時期を三つにきっちりと割って、各々の試験から総合的に評価するものである。例えると、三両連結の列車あるいは三軒長屋である。これに対して、FDAを中心とする欧米の指針は、土台に一般的な生殖能試験があって、その上に特殊な器官形成期投与試験、周産期・授乳期投与試験あるいは受胎能試験が乗っている。いわば二階建バスあるいは二階建の家のようなものである。どちらが良いかと言う事は、



実際には決めがたい事であり、試験の対象となる薬そのものの性質と使い方によって一方がより論理的な場合もあるし、他方の方が良い場合もあると思われる。

各国が出している指針に非常に固執すると、他の国に申請する時に試験を繰り返さなければならない、また実験動物の愛護の面からも問題であることから、国際調和が1980年代の後半から言われるようになった。1989年の10月にECが医薬品の生殖発生毒性試験指針案の第1版を発表した。1991年5月ロンドンでCenter for Medicines Research (CMR)の会が催され一つの案が提示された。それを受けて、同年6月にECが第11版を作り、国際先天異常学会連盟会議の討論を経て、指針案第12版が作成された。CMR提案とEC第12版はAdverse Drug Reactions and Toxicological Review誌10巻1991年にそれぞれ公表された。さらに、1991年の11月にICHと言う日、米、欧3極の行政と企業関係者からなる薬事規制の調和に関する第1回の国際会議がブリュッセルで開かれ、本問題も討議された。これには今後学会からの公平で科学的な意見をぜひ反映させる必要がある。

1989年9月11日に厚生省の指針検討の生殖試験小委員会の報告書が出された。そこでは国際的な整合性は早急な解決が困難であるので、まずは、医薬品の特性や臨床適用から見て、我が国の要求と同じ程度にヒトの生殖・発生に関する安全性が判断されたとする資料を申請者が提供すれば、外国の指針に基づいたデータでも審査の対象になる事を公示するのが適切であるとしており、これは既に実行に移されている。さらに、報告書は今後の問題として、医薬品の生

殖発生毒性を評価するために必要な試験基準と検査項目について、非政治的国際的学術組織による比較共同試験結果に基づく国際的討議が必要であると述べている。この報告書が現在の日本の厚生省及び審査にあずかる学者の基本姿勢である。

医薬品の生殖発生毒性試験指針の国際調和は、このようにEC案を中心に今後進展していくことが予想される。ECの第12版は、柔軟性を強調するとともに、most probable、つまり最も有り得る方法として、短期第1節試験と第2節+第3節複合試験をあげている。第13版以降の改正にむけて、全世界の科学者が積極的に意見を交換する必要がある。

本シンポジウムは、以上のごとき経過を踏まえて、医薬品を中心に、生殖発生毒性試験法の国際調和にむけて、日本毒科学会として学問的討議を行うべく企画されたものである。わが国では、政府機関として国立衛生試験所の田中悟博士、アカデミックな立場から京都大学の塩田浩平博士および企業から第一製薬の高山敏博士に、それぞれの立場から国際調和についての意見をお聞きすることとした。また、EC案の最高責任者であるドイツ IAB の Bass 博士と米国で生殖発生毒性試験を幅広く行っておられる IRDC の Schardein 博士をお迎えし、国際的に本問題を論じようと企画した。

本シンポジウムでは、有害生殖発生毒性物質を認定、排除して、人類の健康と福祉に貢献することを最高目標に、生殖発生毒性試験の国際調和にむけて、政治的ではなく、学際的かつ学問的で自由な討論を期待する。

S — 1 European View Towards the International Harmonization  
of Reproductive and Developmental Toxicity Studies

Rolf Bass

Bundesgesundheitsamt (Federal Health Administration)

Institut für Arzneimittel (Institute for Drugs)

Seestr. 10

D-1000 Berlin 65, Germany

European Community (EC) approaches towards harmonization of any approval standard for medicinal products can be seen as a forerunner of the current international harmonization : many, partially deviating opinions are scrutinized by international expert groups for their suitability as "building blocks" of a common guideline. Such procedures have been developed and employed by the Member States of the EC over the past decades; the experience gained and the results thus achieved have been positive. From this experience Europe is of the opinion that equally positive results can be achieved internationally through the "International Congress of Harmonization" (ICH) procedure.

Why are we of the opinion that harmonization is necessary for defining the test conditions and requirements for reproduction and developmental toxicity testing; in the past the testing for toxicity for reproduction during development and for approval for marketing of medicinal products has involved a great deal of duplication of studies in order to satisfy guidelines from different countries/regions - albeit the quite harmonized opinions of the international scientific community on how testing should really be performed. The scientific approach and touch may have been lost, case by case, between the differing guidelines and their fulfilment. Mutual recognition of results obtained from guidelines other than those valid at home, therefore, can only be considered as a first step towards documented international harmonization.

Those participating in the development and approval for marketing of medicinal products agree that none of the existing guidelines is superior to others in all cases. The resulting redundancy in testing is considered unnecessary and a waste of resources and animals. The scientific ideas of a flexible case by case approach to testing are the same all over the world. This would allow the selection of suitable study combinations, which will collectively cover the entire reproductive cycle, and independent on local requirements and guidelines.

To form the written basis for this scientific agreement a draft guideline has been developed in Europe, but with the international cooperation of experts in the field (Bass et al., *Adverse Drug React. Toxicol. Rev.* (1991) 9, 127-141). In general, this draft attempts to make use of the best and most suitable ideas for testing from Japanese, US-American, and European guidelines. Following publication and presentation at the first ICH meeting in Brussels (November 1991) a great number of very important comments and proposals from Teratology Societies, trade associations, and teratology experts has been received. As a consequence we have started to adapt the draft guideline. The idea of the "most probable option" as being expected suitable for appropriate testing in many cases has been kept in this draft: 3 segments, in principle, i.e.:

- one segment to study effects on fertility and early embryonic development (where the length of the male pre-treatment period needs to be deliberated and developed from repeated dose toxicity studies, and which otherwise resembles the "old Japanese" segment 1 study);
- one segment to study effects on embryonic development (which resembles the "old" embryotoxicity study);
- one segment to study effects (which combines the "old" segment 2 and 3 studies in treatment).

Other possible combinations of studies will also be described and reasoned in the draft guideline. Explanations concerning many additional details are necessary to comprehend the draft. They cannot be described in this abstract. Many of them will be made available, however, in the new draft document in the format or appended "notes". This allows to keep the guideline itself relatively short.

Following discussion of the new draft guideline in Japan, the USA, in Europe, and else where it is hoped that the text can be finalized and submitted to the ICH process for recommendation for acceptance.

S - 2      An American Scientist's Impression of Internationally  
Harmonized Guidelines for Reproductive and  
Developmental Toxicity Studies

James L. Schardein

Reproductive and Developmental Toxicology Division,  
International Research and Development Corporation  
Mattawan, Michigan, USA

The Draft 12 EC document of July 1991 promulgated as harmonized international reproductive and developmental toxicity guidelines has been critically evaluated. The need for harmonized guidelines has been obvious since a spate of nationalistic regulation/guidelines for reproduction and teratology issued following the thalidomide disaster in the 1960s. The guidelines in this field really emanate from three primary venues: the United States FDA, The E.C. Commission, and the Japan Ministry of Health and Welfare, and it is from these sources that the EC proposal is derived.

The present practice of drug manufacturers marketing drugs internationally has led to uncertainties concerning which tests to assess reproductive and developmental toxicity in laboratory safety evaluation and the attendant risk of not obtaining regulatory approval globally.

Futile attempts to harmonize regulations have ensued for many years, but it is the current protocols under review only in the last 2-3 years that lay the groundwork for successful harmonization, and it appears probable that the proposed protocol will be universally acceptable to all regulatory agencies concerned within the next few months. In fact, it has already been acknowledged in the United States that FDA will accept studies conducted under consensus-harmonized regulations.

The main aspects of the proposed protocols for testing notable to this reviewer are eliminating the redundancy of behavioral testing in all but one of the segmented tests, reduction of the pre-mating treatment interval in the reproduction/fertility segment, an

economic consideration since less complex and costly testing will generally suffice, and tacit acceptance by the ultimate regulating authorities that any of a variety of protocols may be used, on a case-by-case basis, allowing flexibility on the part of scientists to design protocols for specific drugs. These changes will result in marked improvements without appreciable loss of sensitivity.

Although many options exist in the proposed testing protocols, I personally favor combined testing by the short version of the Segment I protocol but with limited F1 behavioral and reproductive phase and with continued treatment throughout plus the standard western Segment II (teratology) protocol. This opinion is based on experience gained since the 1960s using a wide variety of testing protocols. This view satisfies the intent of the Commission in that all phases of the reproductive process can be evaluated, with no gaps in treatment phases. Further, this design will in my opinion be fully capable of assessing reproductive and developmental toxicity in animal models and provide sufficient hazard assessment for extrapolation to the human, the real aim of safety testing.

## S-3 日本の医薬品の生殖・発生毒性試験法ガイドライン

### — その基本的考え方と特徴 —

田 中 悟

国立衛生試験所 安全性生物試験研究センター毒性部

新医薬品の生殖発生毒性は、ヒトでの情報が極めて求め難いことから、ほとんどの場合動物試験から得られた情報に基づいて評価される。そのため、世界の先進諸国は新医薬品の生殖発生毒性に関する情報を得るための標準的な動物試験法をガイドライン（指針）として提示している。しかしながら、これらの指針についてみると、ヒトの安全性の評価に資するという目的は同じであるにもかかわらず、試験法は日本<sup>1)</sup>とアメリカ<sup>2)</sup>やEC<sup>3)</sup>との間において違いが認められる。わが国の新医薬品を対象とした生殖・発生毒性試験法指針の歴史の変遷、基本的考え方及び特徴について述べる。

#### 1) 歴史の変遷

わが国では、1961年のサリドマイド禍を契機として標準的な動物試験法について検討が始められ、1963年に厚生省から「医薬品の胎児に及ぼす影響に関する動物試験法」の指針が公表された<sup>4)</sup>。この指針は催奇形性の検索を主体としたいわゆる胎児試験であったが、一部の動物について出生後観察を行うことも付記されていた。その後厚生省は1975年に世界的趨勢と対応して、この胎児試験を包含した3節からなる新しい指針「医薬品の生殖に及ぼす影響に関する動物試験法」を公表した<sup>5)</sup>。その後1984年と1989年に国際調和などを考慮して見直しが行われ、一部変更されたが、現在まで基本的な改正は行われていない。なお、1989年の見直しに際して、厚生省は研究班を組織し、国内外の研究者の意見を求め、それらを参考にして討議を行った。その内容は「研究班の検討報告書」として公表されている<sup>6)</sup>。

一方、アメリカではサリドマイド禍以前にすでに多世代生殖毒性試験法の指針が発表されていた<sup>7)</sup>。そして1966年に3節からなる現行の指針が発表されている。



## 2) 基本的考え方

わが国の指針は、親動物の妊娠前から妊娠期や授乳期を経て出生児の離乳までの生殖発生過程の期間を3区分して、それぞれを被験物質の投与期間として3節の試験 (Seg. I、II、III) を実施し、総合的に生殖発生毒性を評価する方式である、したがって、各節試験の名称は投与時期に関連したものとなっている。わが国の指針が生殖発生の時期に対応した3節試験法を採用している理由は、一般に医薬品などの生殖発生毒性は個体の発生の時期に対応した障害を現わすということに基づいているものと考えられる。なお、わが国と同様な3節試験法はNordic諸国の指針に認められる<sup>9)</sup>。

一方、アメリカやECなどの指針は、まず、生殖発生の全過程を通して被験物質を投与する試験 (Seg. I) を実施して受胎能や一般生殖能に対する影響を調べ、ついで、奇形発現や分娩の障害など特定の障害を調べるために2種類の試験 (Seg. II、III) を行って生殖発生毒性を評価する方式である。

## 3) 特徴

わが国の指針の主な特徴としては次の2点があげられる。

第一は、生殖発生過程の期間を3区分し、それぞれを投与期間とした3節の試験法であることである。この方式では、どの発生時期の投与によってどのような障害が現われるかに関する情報が比較的容易に得られる。また、被験物質の投与期間が3分割されていることから、比較的高用量の投与による情報も得られよう。しかし一方、生殖発生の全過程を通して被験物質を長期間投与した場合の情報を得ることは困難である。

第二は、Seg. IIのげっ歯類の試験で出生後観察が求められていることである。これは肉眼形態的発生障害のみならず機能的発生障害に関する情報も重視されているためと考えられる。出生後観察を行うことによって、出生前では検出が困難な機能的発生障害や出生後に現われるかも知れない遅発的発生障害に関する情報が得られる。

以上、わが国とアメリカやECとの間では指針の違いが認められるが、その原因の一つとして、歴史的背景の差異に由来した生殖発生毒性の評価に関する考え方の違いが考えられる。しかし、それぞれの指針には長所も短所もあり、どちらの指針がより妥当であるかについて科学的にしかも早期に判断することは極めて困難と考えら

れる。また、全ての医薬品について一律に同じ形式の検定試験を実施することは必ずしも適切ではないと考えられる。したがって、生殖発生毒性試験の目的を十分理解し、医薬品の特性や適応などを考慮して、それぞれの場合に最も適切な動物試験法を自ら工夫計画する努力が大切と考えられる。

#### 参考文献

- 1) 厚生省(1989): 医薬品の製造(輸入)承認申請に必要な動物試験のガイドラインについて、医薬品毒性試験法ガイドライン—生殖発生毒性試験。薬審I第24号
- 2) US, FDA(1966): Guidelines for reproduction studies for safety evaluation of drugs for human use.
- 3) EC(1989): The rules governing medicinal products in EC, vol. III, Guidelines on the quality, safety and efficacy of medicinal products for human use.
- 4) 厚生省(1963): 医薬品の安全確保対策について、医薬品の胎児に及ぼす影響に関する動物試験法。薬製第120号
- 5) 厚生省(1975): 医薬品の生殖に及ぼす影響に関する動物試験法について。薬審第529号
- 6) 厚生省医薬品毒性試験ガイドラインに関する研究班・生殖試験分科会(1991): 医薬品の生殖に及ぼす影響に関する試験法指針の見直しに関する検討報告書。医薬品非臨床試験ガイドライン解説1991, p.144 薬事日報社
- 7) Fizhugh, O.G.(1959): Appraisal of the safety of chemicals in foods, drugs and cosmetics., p.36, Association of Food and Drug Officials of the United States.

## S-4 基礎研究の立場から見た生殖・発生毒性試験の国際調和

塩田浩平<sup>1)</sup>、谷村 孝<sup>2)</sup>

京都大学医学部解剖学教室<sup>1)</sup>、近畿大学医学部解剖学教室<sup>2)</sup>

医薬品の毒性試験の国際調和は、現在までのところ、主として政治的・経済的理由と倫理的理由（動物実験を少なくする）からその必要性が論じられてきた。本来、このような問題は、科学的事実や原理にもとづいて各ガイドラインの適否が論じられなければならないが、現実にはそれは不可能に近い。その理由としては、（1）各国のガイドラインは一定の理念（principle）にもとづいて作成されており、それぞれに正当性を有している、（2）動物試験の結果とヒトで観察された発生毒性との間には不一致があり、ヒトのリスクについて、動物試験は100%の予知性をもたない、（3）多くの化学物質の薬物動態が十分明らかでなく、生殖発生毒性の発現メカニズムに関しては特に不明の点が多い、などを挙げることができる。

一般に、生殖・発生毒性試験の予知性を高めるためには、使用動物種を多くすること、毒性評価の指標を多くとりその評価方法を確立すること、特に胎児期と生後における機能発達を評価項目にとり入れること、母動物と胎児における薬物動態と毒性発現の関係とそれらに関する種差を明らかにすることなどが考えられるが、実際の毒性試験の実施に当っては、コストや時間、効率などの要因とのバランスをも考慮しなければならないという難点がある。

現行の生殖発生毒性試験ガイドラインには、日・米・欧の間でいくつかの相違点があり、それらは主として各国の理念の違いによっているところが大きい。特に、Seg. I 試験の投与期間と観

察方法、Seg. II 試験の観察方法、中でも行動試験の評価に関して、ガイドライン間の差違が大きい。また、生殖・発生毒性試験における薬物動態、特に母動物の血中濃度、胎児移行、乳汁移行などの意義づけについても、今後解決されなければならない問題である。

本シンポジウムでは、厚生省ガイドライン研究班の生殖・発生毒性試験分科会（谷村孝座長）において、国際調和に関する討議の過程で出された論点をふまえて、国際調和の作業と統一ガイドライン案に対する基礎研究の立場からの見解を述べる。

薬物の生殖発生毒性試験のハーモナイゼーション  
に関する産業側からの考察

高山 敏

第一製薬株式会社開発研究所 安全性研究センター

近年、医薬品の薬事規制のハーモナイゼーションに関する活動が活発に行われている。優れた医薬品は人類共通の財産であるが、各国の規制が異なることにより可及的速やかに優れた医薬品を患者に供給できない場合があり、またハーモナイゼーションにより、世界共通の評価を受けることが可能になり、無駄な繰り返し試験が避けられるなどの効果も期待できる。しかしながら、残念なことであるが、繰り返し試験が実施されてきた最たる試験が生殖・発生毒性試験であり、かつ繰り返し試験を行ってきた代表国が日本である。なぜ繰り返し試験が行われてきたかについては、多くの理由があるが、ガイドラインの相違が主たる原因と考えられる。昨年ブラッセルで開催された第一回のICHを契機として、日・米・欧間で薬事規制のハーモナイゼーションについて話し合いが行われ、具体的な成果が得られつつあるが、解決しなければならない問題が山積している。

生殖・発生毒性試験についてみると、世界中に20のガイドラインが現存しているが、全く同じものは存在しない。これらの内、医薬品の主たる原産国である日・米・欧のガイドラインが多く使用され、その内容を見ると共通点が多いが相違点も存在する。しかし、いずれのガイドラインに従っても試験成績に大きな隔たりをもたらしていない。すなわち、ECが提案したガイドラインを国際統一ガイドラインとして制定する作業が進められているが、未だ多くの討論と期間を要すると予想され、その間、日・米・欧の規制当局は他国のガイドラインに従って実施された試験成績をフレキシブルに受け入れることが第一回のICHで約束された。

統一ガイドラインの作成は現行のガイドラインの利点を生かし、欠点

を補い、科学的根拠に基づき、議論を重ねる絶好の機会である。特に、議論を呼んでいる問題として、雄の授精能の評価法、行動試験、トキシコキネティクスなどが上げられる。先ず、雄の授精能の評価であるが、現行の Segment 1 試験は動物からヒトへの外挿、ヒトから動物への相関をみるとせいぜい10%程度の相関しか得られていない。すなわち、ヒトでの副作用を殆ど予知できない試験を長年行ってきたことになる。これは、ヒトでの薬物による雄授精能の障害が把握し難いこともあるが、ラットの交尾行動および授精成立に至る内分泌支配がヒトと大きく異なることなどが考えられる。一方、反復毒性試験は生殖・発生毒性試験と比較して歴史が浅いことが災いして、反復毒性試験の精巣の変化と Segment 1 試験の関連性について注意が払われて来なかったが、精巣毒性を評価するには Segment 1 試験より反復毒性試験における精巣の病理学的評価の方がより感度が良好な場合が多い。

次に、行動試験についてみると、20か国の内8か国で要求されている。特に日本では1975年から行動試験が要求され、主としてラットを用いて行動試験を行ってきた。しかし、長年の努力に拘わらず信頼性の高い評価法が確立していない。邦文投稿論文671報を解析したところ、薬物群あるいは信頼性の高い検査法を特定することは困難であったが、行動検査で何らかの変化がみられる場合、必ず他の新生児毒性が出現していたことが特筆される。

毒性の機作を解析し、ヒトへの外挿性を高める上でトキシコキネティクスが重要なことは論を待たないが、生殖・発生毒性のごとく、複雑な過程を経て毒性が発現する場合には薬物の体内動態は毒性発現の解析に

無力な場合が多く、寧ろ内分泌的な解析が役立つ場合が多い。研究者の判断に委ねたケースバイケースの対応が要求されるところである。

臨床試験に先立って日本のガイドライン案だけ Segment 1 試験が要求されているが、試験自体の信頼性の問題もあり、その必要性の有無については、雄授精能の評価法の確立とともに今後の検討を必要とするところである。

以上のごとく、産業側からみた生殖・発生毒性試験のハーモナイゼーションの背景、問題点、さらに一部ではあるが対応策につき私見を述べる。

# ワークショップ(1)

平成4年7月23日(木) 10:30~12:15

第1会場

## 「複合臓器障害」

座長 江頭 亨 (大分医科大・薬理)

遠藤 仁 (東京大・医)

W-1 複合臓器障害とは 吉川 敏一 (京都府立医大・第一内科)

W-2 ライソゾーム酵素と臓器障害 小川 龍 (日本医科大・麻酔)

W-3 エンドトキシンと臓器障害 矢島 義昭 (仙台市立病院)  
森 和夫 (仙台血液疾患クリニック)

W-4 虚血一再循環と複合臓器障害一 工藤 欽邦 (大分医科大・薬理)  
江頭 亨 (大分医科大・薬理)

総合討論



## W-1 複合臓器障害とは

吉川 敏一

京都府立医科大学第一内科学教室

複合臓器障害は、近年多臓器不全 (multiple organ failure: MOF) と呼称されるようになり、「肺、肝、腎、消化管、中枢神経、凝固等の複数の臓器もしくは系統が、同時あるいは短時間内に機能不全に陥る状態」と定義される。MOFは種々の原因に基づくショック、重篤な感染症、外傷や熱傷、外科手術等に引続き発生することが多く、集中治療室における死因の多くを占めるため、臨床家の注目を集めている。Gorisらは、zymosanの腹腔内投与によりMOFの実験モデルを作成しているが<sup>(1)</sup>、我々は、エンドトキシンの静脈内投与により、ショックとARDSに引続き、多臓器不全が惹起されることを見いだした<sup>(2)</sup>。今回は、MOFを活性酸素・フリーラジカルの関与を中心に述べる。

大量のエンドトキシンをラットに静脈内投与することにより、血圧低下、脈拍増加、肺および小腸の出血性病変が早期より観察されるが、後に肝、腎機能障害、膵酵素の上昇なども加わり、多臓器・多系統の機能不全が惹起される。

このモデルでは、血清ライソゾーム酵素の上昇に先立ち、血清と臓器の過酸化脂質が上昇する。脂質過酸化が全身の臓器や血管内で開始し、多臓器不全の増悪に関与しているものと考えられる。Superoxide dismutase(SOD)やcatalaseはこれらの病態の増悪や、血清及び重要臓器における過酸化脂質の上昇を抑制することから、スーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシルラジカルなどの活性酸素はこれらの病態の増悪と脂質過酸化の進行に重要な役割を演じているものと考えられる。

我々のモデルにおける活性酸素の発生源としては、組織における虚血再血流や不完全虚血により活性化されるヒポキサンチンキサンチンオキシダーゼ系とともに、食細胞のNADPH oxidase系が重要と思われる。この病態は好中球を減少させたラットにおいて軽減されることから、好中球が活性酸素発生源として重

要な役割を演じていることが示唆される。好中球は、まず肺血管内に著明に集積し、肺微小循環を傷害し、いわゆるARDSの状態を形成し、その後、多臓器不全へと進行する。また、肺胞マクロファージの活性酸素産生能も亢進している。

各臓器における抗酸化酵素の変動を調べると、傷害と好中球集積の著しい肺ではSOD活性は低下し、障害の目だつ小腸でもSOD活性は有意な変化を示さないのに対し、障害が殆ど観察されない胃においてはSOD活性は逆に上昇が観察される。臓器の被障害性と、抗酸化酵素の逆相関は非常に興味深い。

#### 文献

- 1) Goris RJA, Boekholtz WKF, Bebbler IPT, et al : Multiple organ failure and sepsis without bacteria. Arch Surg 121: 897-902, 1986
- 2) 吉川 敏一, 高野裕久, 近藤元治: エンドトキシンショック・MOFとフリーラジカル, 日本Shock学会雑誌 6 : 24-33, 1991

## W-2 ライソソーム酵素と臓器障害

小川 龍

### 日本医科大学麻酔科学教室

細胞に物理的剌激、虚血、炎症、栄養基質の供給低下、放射線、薬物などの侵襲が細胞に強く加えられると、自己食液細胞が増加する事が知られている。この現象は細胞内の部分的障害部位を排除するためである。このような現象には細胞内小器官であるライソソーム (Lysosome) が重要な役割を果たしている。しかしながらライソソームの機能が過剰に発揮されると、細胞内諸器官の機能と構造が早期に損傷される可能性がある。また内含するライソソーム酵素群 (以下ラソ素と略す) が細胞内外に再分布すると、細胞内のみならず遠隔地の臓器機能を抑制する可能性が指摘されている。

現在までにラソ素は臓器不全の化学的メディエータの有力候補の一つと考えられている。そこで多臓器不全の発生病序に於ける役割を中心に、組織と食液球のラソ素の役割を述べる。

#### 1、細胞損傷とライソソームの形態的变化

Trumpらは虚血臓器での細胞内微細構造の変化から、7段階に区分している。第1段階では核クロマチンの収縮、第2段階では小胞体の拡張と細胞質の膨化、第3段階ではミトコンドリアの収縮、第4段階ではミトコンドリアの膨張、第5段階ではミトコンドリアの1層の膨張、内部構造の乱れ、第6段階では細胞膜の破綻と残余小体、第7段階では細胞内構造の消失、である。ライソソームの変化をみると、初期 (第1、2段階) には軽度膨化、中期 (第3、4段階) では二次性ライソソームへの変化、不可逆期 (第5段階) では液胞の形成、末期 (第6段階) では残余体の形成が見られる。出血性ショックのモデル (イヌ、平均血圧 30 mm Hg) では、ショッ

ク開始30分ですすでに肝細胞に広範な液胞が観察され、6時間後には残余体が見られた。

## 2、ライソソーム酵素の動向

実験的モデルではショックの進行に連れて血中濃度に上昇するが臨床例では複雑である。血漿β-グルクロニダーゼの活性をフィッシュマン原法で測定すると健康成人では $133 \pm 59$  (平均±標準偏差) 単位であった。ショック患者61名の値は $525 \pm 218$  (平均±標準偏差) 単位であり、両者の間では有意 ( $P < 0.05$ ) な差がみられた。しかしながら正常値の上限 (平均+2×標準偏差) である251単位を越えた症例は25名 (41%) であり、β-グルクロニダーゼの上昇がショック患者に普遍的に見られる現象とは言にくい。しかし血中β-グルクロニダーゼが上昇するにつれ、死亡例の割合が増えている。

ショック類似の病態としては体外循環が良く知られている。体外循環でのライソソーム酵素の変化を観察すると、体外循環時間が延長するにつれ、血中濃度の上昇がみられた。貧血球は多核白血球と単球マクロファージからなるが、細菌の貧血のためには好中球はレスピラトリバーストを起こし、多量のラ糖素を遊離する。これにはリゾチーム、ラクトフェリン、エラスターゼ、ミエロペプチダーゼ、などが含まれる。重症感染症患者の血中からは高い濃度のエラスターゼが証明される。

## 3、ライソソーム破壊の機序

細胞の酸素分圧が低下すると、エネルギー産生能が低下する。また乳酸が蓄積して細胞内のアシドーシスが進行する。ショックや虚血の下に置かれた臓器では、ATPなどの高エネルギー磷酸結合が著しく減少する。細胞内アシドーシスはラ糖素の活動を盛んにする。細胞外からのCaの過剰流入が生ずると、ライソソームの安定性が失われる。Caはカルモジュリン類似糖素を賦活し、蛋白分解糖素や脂質分解糖素 (phospholipase-A<sub>2</sub>) の活性を高めて、膜の安定性を失わせる。Ignaroraは細胞内cycli

c 3', 5' - AMP (cAMP) と cyclic 3', 5' GMP (cGMP) の比がライソソーム膜の安定性を決定すると考えた。彼によればカテコールアミンはライソソームを安定化する方向に、コリン作動性物質はライソソームを破壊する方向に作用する。

外界と接する肺の毛細血管内にはには多数の好中球が存在し、血管内皮と接している。侵襲が加えられると肺筋のマクロファージは化学遊走物質を出し、好中球を血管外へ引き付ける。刺激された好中球から分泌されるプロテアーゼを中心とする酵素群は、細菌などを攻撃し破壊する。ショックでは血流の停滞と粘着性の亢進により、多数の白血球が肺の毛細血管床へ沈着するため、白血球が刺激され内含酵素を放出し、酵素作用を発揮する。

### 3、臓器不全のメカニズム

血中へ遊離した酵素が循環系を抑制する。ショック時には虚血臓器のミトコンドリアが機能的、形態学的変化を示すが、この機序にもラシラ素関与している。ラシラ素を含む溶液を用いて動物の肺を遊流すると、対照群と比較して肺水分量の蓄積が進んだ。一度血液中へ遊離された lysosomal enzymes は細網内皮系によって補足除去される。その結果として、大量に血中内へ遊離されれば細網内皮系を抑制する。

通常血中や組織においては豊富に存在する阻害物質のため、好中球由来のプロテアーゼは周辺組織を損傷することはない。しかし、ショック状態では酸素遊離基などが阻害物質である  $\alpha_1$ -アンチトリプシンを不活性化し、エラスターゼの作用が表面に現れる。この現象が明らかとなったのは肺においてである。

### 4、ライソソーム酵素からみた治療

侵襲の下においてもライソソームの安定性を増すことができれば臓器不全の発生を予防することが可能となる。ワークショップにおいてはその可能性を含めて述べる。

### 参考文献

- 1) Trump BF, Mergner WJ, Kahug MW,

- Saladino AJ. :Studies on the subcellular pathophysiology of ischemia. *Circulation* 53 (Suppl. 1)17-22, 1976
- 2)Ignaro LJ, Krassikoff N, Slywka J. :Release of enzymes from a rat liver lysosome fraction:Inhibition by catecholamines and cyclic 3',5'-adenosine monophosphate, stimulation by cholinergic agents and cyclic 3',5'-guanosine monophosphate. *J Pharm Exp Ther* 186:86-96, 1973
- 3)Ogawa R, Isizaki K. :The effect of phosphodiesterase inhibitor theophylline on lysosomal stability in shock. *Hiroshima J Anesth* 22:113-120, 1986
- 4)Janoff A, Feinstein G. :Granulocyte elastase:Isolation and characterization. in Hayneman K, Janoff A(Eds). *Neutral Protease of Human Polymorphonuclear Leucocytes*. Urban and Schwarzenberg. Baltimore-Munich, p102-113, 1978
- 5)Gazzaniga AB, Conner NE. :Effect of intravenous infusion of autologous kidney lysosomal enzymes in the dogs. *Ann Surg* 172:804-812, 1970
- 6)Glenn TM, Lefer AM, Beardley A C, et al:Circulatory responses to splanchnic lysosomal hydrolases in the dogs. *Ann Surg* 176:120-127, 1972
- 7)Idell S, Kuchich U, Fein A, Kueppers F, James HL, Walsh PN, Weinbaum J, Colman R, Cohen AN. :Neutrophil elastase-releasing factors in bronchoalveolar lavage from patients with adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Res Dis* 132: 1098-1105, 1985
- 8)Kudo S, Onai H, Ogawa R. :Response of blood cells to hemorrhagic shock in the dog. *J Anesth* 1:51-61, 1987

## W-3

エンドトキシンと臓器障害（臨床的観点より）

矢島義昭，森 和夫\*

仙台市立病院消化器科，仙台血液疾患クリニック\*

演者は肝臓病学を専門とする内科医で，血中エンドトキシンの検出法の改良とエンドトキシン血症の臨床的意義の解明を研究テーマとしている。今回の発表に際しては，東北大学第三内科，仙台市立病院および付属救急救命センターの症例を用いた。

### I エンドトキシン血症の検出

グラム陰性菌の外膜に存在するリポ多糖（LPS）は多彩な生物活性を有しており，細菌の外部に分泌される蛋白毒物である exotoxin と区別して endotoxin と呼ばれる。一般に，生体内にあっては毒性を発揮して，DIC や endotoxin shock のような重篤な症状を引き起こす。

临床上，エンドトキシンの生物活性（毒性）が問題となるのは，エンドトキシン血症においてである。血中エンドトキシンの測定法としては，Levinら<sup>1)</sup>によって開発されたリムルス法が専ら用いられてきた。この方法はカプトガニの血球成分より作られた一種の bioassay 法である。この他に LPS 抗体を用いた immunoassay 法も報告されているが，広く普及するには至っていない。リムルス法はエンドトキシンに特異的であると信じられてきたので，従来のエンドトキシン血症に関する報告の殆どはリムルス法によって行なわれてきた。しかし，岩永らによってリムルス法に2つの進歩がもたらされた。

第一に，合成基質法の開発であり，血中エンドトキシンを pg/ml の単位で定量的に測定することが可能になった<sup>2)</sup>。

第二に，リムルス法に  $\beta$ -glucan による偽陽性反応が存在することが明らかにされ， $\beta$ -glucan 感受性因子を反応系より選択的に除去して構成され

たエンドトキシン特異テストが開発されたことである<sup>3)</sup>。この結果、従来のリムルス法による陽性例は図1の3群に分類されることになった<sup>4)</sup>。従って、エンドトキシン特異テスト出現前の報告については再検討される必要がある。今回の検討において用いたエンドトキシン特異テストは、生化学工業製のEndospecy と和光純薬製のLAL-ESを用いた比濁時間分析法である。

## II エンドトキシン血症の臨床像

複合臓器不全(MOF)は、元来、外科領域より提唱された概念である。多発外傷や消化管手術後に合併した感染症が制御できなかった場合の終末像としてMOFは発生する。この場合の感染症はグラム陰性菌によるとは限らないが、グラム陰性菌が最も重要である。手術に伴うMOF例では、手術侵襲や種々の薬剤の影響が考えられ、グラム陰性菌敗血症=エンドトキシン血症の病態を解析する上で困難を伴うことがある。一方、内科領域においてエンドトキシン血症を引き起こす基礎疾患としては、悪性腫瘍末期状態、急性腹症、糖尿病、肝不全、等があげられる。いずれにしても、生体防御能が低下しており、易感染性が認められる。

エンドトキシン血症に伴う病態としては、Shock, DIC, Cholestasis, ARDS等が知られている。このうちDICはエンドトキシン血症に必発で、Shock, Cholestasisがこれに続く。ARDSの合併は稀であった。一般に、死亡例に血中エンドトキシン値は高い傾向がみられたが、予後を左右する最重要因子は基礎疾患であった(図2)。

MOFの診断基準として多くのものが公にされているが、年々厳しくなっているようである。特に、肝不全に関してこの傾向は著しい。当初より、総ビリルビン値とトランスアミナーゼ値で定義されてきたが、最近ではプロトロンビン活性が加味される傾向にある。元来、肝臓病学において肝不全(特に、急性肝不全)は明確に定義されてきた。‘全般的な肝の代謝不全’の指標として、肝性脳症の出現と、プロトロンビン活性 $\leq 40\%$ を共に満たすことが必要とされてきた。一般に敗血症時には、グラム陰性、陽性を問わず、黄疸が出現することが古くから知られてい



た。黄疸の原因は肝内胆汁うっ滞であり、実験動物にエンドトキシンを注入することによって再現することができる。この endotoxin-induced cholestasis の機序としては、肝細胞膜に存在する Na, K-ATPase の働きをエンドトキシンが阻害することが想定されている<sup>5)</sup>。

自験例より、エンドトキシン血症時の MOF の機序について以下のように考えたい。エンドトキシン血症が成立する結果、まず DIC が惹起される。この時 Shock を伴う場合とそうでない場合があるが、恐らくはエンドトキシンの血中への出現が比較的緩徐であったかどうか、あるいはある種のサイトカイン (ex. TNF) の関与の仕方の違いによるものであろう。Cholestasis が出現するには、ある一定期間以上、エンドトキシン血症が持続する必要があるようである。ARDS が発生するためには更に特殊な条件が必要である。尤も、人工呼吸器の必要はないまでも、単なる低酸素状態 ( $\text{PaO}_2 < 60 \text{ mmHg}$ ) は高頻度に見られる。その他の臓器不全や病態は 2 次的に、または臓器相関の結果生起するものと考えられる。

### Ⅲ 今後の課題

リムルス法の進歩によって、エンドトキシン血症を定量的に評価することができるようになった。今後さまざまな病態においてエンドトキシン血症を正確に記述することによって、エンドトキシン血症の臨床的意義が明らかになるであろう。一方、動物実験モデルを用いて、endotoxin shock 発現時のサイトカインの役割<sup>6)</sup>や、ARDS における内皮細胞、好中球、マクロファージの相互作用や、エンドトキシン処理時の Kupffer 細胞と肝細胞の相互作用、等の問題が解明されていくであろう。

### 文 献

- 1) Levin J, et al: Detection of endotoxin in human blood and demonstration of an inhibitor. J Lab Clin Med 75:903-911, 1970.
- 2) Iwanaga S, et al: Chromogenic substrates for horseshoe crab clotting enzyme: Its application for the assay of bacterial endotoxins. Haemostasis 7:183-188, 1978.

- 3) Obayashi T, et al: A new chromogenic endotoxin-specific assay using recombined limulus coagulation enzymes and its clinical applications. Clinica Chimica Acta 149:55-65, 1985.
- 4) Yajima Y, et al: Non-septic endotoxemia in cirrhotic patients. Gastroenterol Jpn 24: 262-269, 1989.
- 5) Utili R, et al: Inhibition of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATP ase by endotoxin: A possible mechanism for endotoxin-induced cholestasis. J Infect Dis 136:583-587, 1977.
- 6) Tracey KJ, et al: Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. Science 234:470-473, 1986.

表1 従来のリムルス法陽性例の分類

	従来の 合成基質法	エンドトキシン 特異テスト	
① Septic endotoxemia	+	+	グラム陰性菌敗血症
② $\beta$ (1→3) glucan による偽陽性反応	+	-	カンジダ菌血症 セルロース系透析膜 $\beta$ (1→3) glucan系のBRM レンチナン シゾフィラン
③ Non-septic endotoxemia or BGLA (s/o ある種の生体内反応物質)	+	-	肝不全 侵襲の大きな手術 肝切除 食道再建術後

表2 エンドトキシン血症に発生する各種病態の合併状況

診断	血培	E t (pg/ml)	DIC	shock	chole- stasis	ARDS	予後
悪性腫瘍末期	<i>Pseudomonas</i>	2025	+	+			死亡
悪性腫瘍末期	<i>Citrobacter</i>	1251	+	+	+		死亡
悪性腫瘍ope後	(-)	674	+	+	+	+	死亡
悪性腫瘍末期	<i>Serratia</i>	662	+	+			死亡
急性化膿性胆管炎	<i>Klebsiella</i>	185	+	+			死亡
悪性腫瘍末期	<i>Bacteroides</i>	39	+	+			死亡
悪性腫瘍末期	<i>E.coli</i>	36	+	+			死亡
悪性腫瘍末期	(-)	27	+	+			死亡
肝不全	(-)	26	+	+	+		死亡
悪性腫瘍末期	(-)	24	+	+			死亡
小腸穿孔ope後	<i>Enterobacter</i>	205	+	+	+	+	救命
肝破裂ope後	<i>Enterobacter</i>	142	+		+		救命
肝膿瘍	<i>Klebsiella</i>	80	+	+			救命
DM	<i>E.coli</i>	46	+	+			救命
悪性腫瘍ope後	<i>Enterobacter</i>	35	+		+		救命
肝膿瘍	<i>Klebsiella</i>	35	+		+	+	救命
DM	<i>E.coli</i>	32	+	+			救命
白血病	(-)	20	+		+		救命

## W-4 虚血-再循環と複合臓器障害

工藤欣邦 江頭 亨 高山房子 山中康光

大分医科大学薬理学教室

近年、ショック時の臓器障害や移植時の臓器保存の問題から、臓器の虚血-再循環障害が注目されている。虚血自身は組織障害や細胞壊死を最終的にもたらずが、再循環時、組織に酸素が供給されることによって生ずる活性酸素種やフリーラジカルおよび脂質過酸化反応によってさらに重大な障害をもたらさう。また、多臓器不全においても、フリーラジカルは重要な役割を担っていると考えられている。エンドトキシンショックにおいて、エンドトキシンは組織の脂質過酸化反応を促進させると同時に、好中球からのスーパーオキサイド産生も促進し、臓器障害をさらに増悪させることが知られている。今回われわれは、ラットを用いて独自の肝臓の虚血-再循環モデルを作製し、虚血による肝障害、特に血流再開後の活性酸素生成による肝細胞障害を生化学的、病理組織学的に検討し、さらに肝の虚血-再循環障害が、他の臓器に与える影響を調べる目的で、腎、肺、脳についても同様の検討を行なった。

実験動物として、7週齢のWistar系雄性ラットを用いた。肝臓の虚血-再循環モデルは以下のようにして作製した。すなわち、ラットをエーテル麻酔下に開腹し、左門脈および左肝動脈をクリップにて閉塞し、肝の左葉と中葉の虚血を行った。一定時間虚血状態にした後、クリップを開放して血流を再開し、腸管の鬱血を避けるために温存しておいた右葉および尾状葉を切離し、再循環状態とした。一定時間再循環状態にした後、下大静脈より血液を採取し、速やかに肝臓、腎臓、肺および脳を摘出した。コントロールとして、虚血-再循環を行わず、右葉および尾状葉の切離のみを行った sham ope

群を作製し比較検討を行なった。肝障害の指標として血清GOT、GPTおよびLDHを測定した。また、虚血時間の違いによるラットの生存率を比較検討した。肝の虚血—再循環により他の臓器に影響を与えると考えられる物質として、血清中の脂質過酸化物の指標としてphosphatidylcholine hydroperoxide (PCOOH)を、また血清ライソゾーム酵素活性および血中エンドトキシン濃度を測定し、さらに、虚血—再循環による白血球の増加を検討した。また、諸臓器の変化を調べる目的で、脂質過酸化の指標として、肝、腎、肺および脳組織中のTBA反応物質を測定し、光顕および電顕による組織学的検討も行なった。

肝臓に虚血—再循環処置を施すと、sham ope群と比較して、血清GOT、GPT、LDHはいずれも著しい上昇がみられ、肝組織中TBA反応物質も高値を示した。また、虚血のみの群と比較して、再循環処置を施した場合、これらはいずれも高値を示した。さらに再循環時間を60分と固定した場合、虚血時間が延長するにつれ、これらの値は高値を示した。組織学的検索では、肝に虚血—再循環処置を施した場合、光顕的にはZone 1~2を中心とする領域に鬱血が見られ、細胞の腫大、肝細胞索の配列の乱れも観察された。これらの所見は虚血時間が長くなるほど、著しい傾向を示した。また電顕による観察では、大部分のミトコンドリアにおいて膨化、内部のマトリックスのdensityの低下およびクリステの崩壊が見られた。また細胞質には空胞が目立ち、小胞体や核も破壊していた。しかし、類洞の内皮細胞は比較的良好に保たれていた。再循環後の生存率は30分虚血では全例のラットが2日目以降も生存したが、60分虚血では、約60%のラットが2日以内に死亡し、90分虚血では、2日以内に全例死亡した。また、虚血—再循環肝障害の他の臓器への影響を検討する目的で、肝に60分虚血—12時間再循環という強い虚血—再循環モデルを作製した場合、腎において、肝と同様にTBA反応物質の増加がみられた。さらに、組織学的検索では、光顕的には腎皮質においては、糸球体の変化は認められなかったが、近位尿細管上

皮が部分的に脱落し、遠位尿細管には管腔の拡大とそれに伴う上皮の扁平化、および管腔内にエオジン好性の顆粒状物質が見られた。髓質では集合管に遠位尿細管と同様の変化が見られたが、顆粒状物質は遠位尿細管で見られた以上の頻度で観察された。電顕的観察では、尿細管周囲の毛細血管の著しい拡張や間質の浮腫がみられた。また管腔内には上皮細胞の破壊されたものが観察され、これは光顕でみられた顆粒状物質に匹敵するものと考えられた。これらの所見は、劇症肝炎時における腎障害で報告されているような急性尿細管壊死の像に類似していた。尚、sham ope群は、肝、腎双方とも組織学的に異常を認めなかった。60分間肝虚血を行った後、HPLC-C L法で血清PCOOHを測定したところ、再循環後、sham ope群と比較して上昇することが認められた。また血清ライソゾーム酵素の1つである $\beta$ -glucuronidase 活性は、sham ope群と比較して、再循環後3時間をピークにして著しく上昇した。さらに、血中エンドトキシン濃度も、虚血-再循環群ではsham ope群に比べ、再循環後いずれの時間においても高値を示した。末梢血液中の白血球も、肝の虚血-再循環により増加傾向がみられた。

虚血-再循環肝障害モデルを作製すると、肝組織中脂質過酸化反応の促進に基づく著しい肝障害が惹起された。同時に腎組織中の脂質過酸化レベルも上昇し、組織学的にも急性尿細管壊死に類似した異常所見が観察された。Nishigakiら<sup>1)</sup>は、ラットの皮膚に熱傷を生じさせると、熱傷部位の過酸化脂質が増加すると同時に、血清中および肝臓、腎臓、脾臓など多臓器の過酸化脂質レベルも増加し、さらに、臓器由来の逸脱酵素も上昇したと報告し、これは、皮膚に生じた過酸化脂質が循環血液中に流入し、他の臓器に障害を与えたとしている。Janoffら<sup>2)</sup>は、臓器が虚血状態になると、ライソゾーム膜は容易に破綻し、ライソゾーム酵素は循環血液中に遊離されると報告している。また、小川<sup>3)</sup>は、ひとたびライソゾーム膜が破綻しライソゾーム酵素が細胞内外へ再分布すると、細胞機能の障害や死のみならず、遠隔部の臓器機能を障害すると述べている。また、

Wilkinson ら<sup>4)~8)</sup> は、劇症肝炎の約80%に腎障害が併発し、その組織像は、急性尿細管壊死であると報告している。さらに、彼らはその原因として、重篤な肝障害による肝網内系機能の低下に基づく血中エンドトキシンの増加をあげている。またKawasakiら<sup>9)</sup> は、エンドトキシンは、補体系やPlatelet activating factor (PAF) などのchemical mediator を活性化させ、好中球からのスーパーオキシドの産生を促し、組織障害を引き起こすと報告している。

これらの報告より、われわれが用いている肝の虚血—再循環モデルで、肝臓自体の障害が惹起されるのは当然であるが、肝の虚血—再循環障害が他の臓器障害を惹起する原因の1つとして、肝の虚血—再循環に基づく血中脂質過酸化物の増加や血清ライソゾーム酵素活性の上昇、血中エンドトキシン濃度の増加、さらに白血球の増加が関与している可能性が示唆された。

#### 参考文献

- 1) I. Nishigaki et al. : Biochem. Med., 24 : 185, 1980.
- 2) A. Janoff et al. : J. Exp. Med., 116 : 451, 1962.
- 3) 小川 龍 : 救急医学 5(3) : 271, 1981.
- 4) S. P. Wilkinson et al. : Gut, 17 : 501, 1976.
- 5) S. P. Wilkinson et al. : J. Clin. Pathol., 31 : 101, 1978.
- 6) S. P. Wilkinson et al. : Lancet, 30 : 521, 1974.
- 7) S. P. Wilkinson et al. : J. Clin. Pathol., 30 : 141, 1977.
- 8) S. P. Wilkinson et al. : Brit. Med. J., 2 : 186, 1974.
- 9) T. Kawasaki et al. : Biomedical and clinical aspects of coenzyme Q, vol. 5, p. 145. 1986.

# ワークショップ(2) 特別委員会

平成4年7月24日(金) 14:30~17:00

第1会場

## 「組織培養法を応用した臓器毒性試験法の 新しい評価法の現状と将来」

座長 戸部 満寿夫(大分医科大・薬理)

佐藤 温重(東京医歯大)

### 1) 神経毒性

#### SW-1 神経毒性研究の現状と問題点

三森 国敏(国立衛試)

#### SW-2 培養上頭神経節による神経毒作用機序の研究

堀 眞一郎(都神経研)

#### W-3 glioma細胞を用いたメチル水銀の毒性発現機序の研究

三浦 郷子(和光大・経)

井村 伸正(北里大・薬)

#### W-4 巨大神経軸を用いた神経系殺虫剤の電気生理学的パラメーターと殺虫毒性

西村 勁一郎(京都大・農)

藤田 稔男( " )



三 森 国 敏

国立衛生試験所 安全性生物試験研究センター 病理部

脳神経系は生体の中で最も複雑な組織であり、その複雑な機能および構築のため、多くの化学物質が種々の神経毒性作用を惹起する。これらの神経毒性を検出する試験法としては、機能学的行動試験、電気生理学的検査、生化学的検査および神経病理学的検査法等が古くから開発されている。これらの多くは実験動物を用いた試験法であるが、毒性試験ガイドラインとして標準化されているものは少ない。本ワークショップでは、ガイドラインとして公表されている神経毒性試験法についての現状と問題点について、またこれらの問題点に対する *in vitro* 試験法の有用性について述べる。

現行のガイドラインの中では、遅発性神経毒性試験法が最もよく知られている。その他の試験法としては、近年、米国やOECDにおいて哺乳動物を用いた神経毒性スクリーニング総合検査法(Neurotoxicity Screening Battery)、強化スケジュール制御オペラント行動試験法(scheduled-controlled operant behavior)、自発運動量検査法、末梢神経機能検査法、神経病理学的検査法が公表されている。

遅発性神経毒性試験法：有機リン化合物のような化学物質の遅発性神経毒性誘発能の有無を検出する試験法であり、動物として成熟雌ニワトリを用いることが規定されている。現行のガイドラインでは、急性試験において何ら神経毒性が発現しない場合はそれに続く亜慢性試験の実施は必要ないとされているが、亜慢性試験で初めて神経毒性が発現する化合物もある。この種の神経毒性を誘発する化学物質の殆どはneurotoxic esterase (NTE)を70%以上抑制することが知られており、このNTEの測定が遅発性神経毒性物質検出のためのスクリーニング法として提案されている。しかし、この測定法は *in vivo* 試験で得られた脳組織を用いなければならず、また神経毒性誘

発能の予測には未だ不十分なところがある。

神経毒性スクリーニング総合検査法：米国FIFRA(連邦農薬法)やOECDで最近公表された肉眼的機能異常を検出するスクリーニング法であり、通常の臨床観察に加えて前後肢の握力測定や感覚機能試験が組み込まれている。しかし、この検査法では機能異常の検出に限界があり、また認められた機能異常が神経組織への直接作用あるいは間接作用によるものなのか鑑別することが困難である。

末梢神経機能検査法：電気生理学的実験手法を用いて神経伝導速度、振幅や時値等を測定し誘発された神経系の神経生理学的変化を検出する検査法であり、米国のTSCA(有害物質規制法)とFIFRAのみがこの検査法を規定している。問題点としては、検査機器類が高価であり、また検査方法が著しく複雑である。

神経病理学的検査法：誘発された神経系における毒性変化を形態学的に検索する検査法である。光学顕微鏡下では発現した形態変化を見逃すことがあり、電子顕微鏡や免疫組織化学的観察が必要な場合もある。しかし、これらの手法は時間がかかる上に、標的部位を採取することが困難なことが多い。また、組織学的検索部位はガイドラインに指定されているが、そのみでは誘発病変の病理発生を探求できない場合がある。

以上のように、現行のガイドラインでは、神経毒性を検出するには莫大な設備や労力と長い時間を要する反面、必ずしも全ての神経毒性物質を検出できる訳ではない。生体の神経系における機能や構築とほぼ同様な条件の*in vitro*の試験系を作成することは困難であるが、近年、試験管内に取り出した神経組織や培養細胞を用いた*in vitro*検出系が開発され、一次スクリーニング法として利用できることが示されている。また、現行のガイドラインでは、発現した神経毒性の作用機序を解明することは困難である。一方、*in vitro*系では、血液-脳関門の関与が除去されていることや代謝産物の神経毒性を検出できない問題点はあるが、電気生理学的実験や生化学的実験が容易であり、作用機序の解明が可能である。神経毒性予知の向上および毒性発現機序解明のために現行のガイドラインに加えて適切な*in vitro*試験系の導入が必要である。

## SW-2

### 培養上頸神経節による神経毒作用機序の研究

堀 眞一郎

(財) 東京都神経科学総合研究所、神経生化学部門

培養系によって毒性の作用機序を研究する際、神経細胞の解剖学的生化学的特性を考慮しなければならない。殊に、神経細胞には再生能がないこと、血液脳関門が存在し、その選択的透過性は神経組織の部位によって異なっていること、神経細胞は樹状突起、軸索突起を持っており、核周辺体とよばれる神経細胞の本体と神経終末部とは軸索流によって動的に連絡していること、これらの特性の他に、最近、神経細胞の機能を維持している液性因子の存在が明らかになってきた(1,2)。私達は、交感神経節の一部である上頸神経節の神経細胞がこの種の液性因子の一種である神経成長因子の作用によって機能維持されていることを用いて、その原因物質であるキノリン(以下Cfと略す)の神経毒性の機序を研究してきた。

実験方法：生後5日、20日及び90日令のWistar系ラットの上頸神経節(以下SCGと略す)および節状神経節(以下NGと略す)を摘出し、BGJb液中で $[^3\text{H}]$ -uridineと共に95% $\text{O}_2$ -5% $\text{CO}_2$ 下で、37°C、20-24時間インキュベートし、生合成RNAを $[^3\text{H}]$ ラベルした。RNAの合成量はインキュベート終了後、直ちに神経節をTCA液にホモゲナイズし、遠心後、沈殿に回収された放射エネルギーから推定した。RNAの分画に際しては、インキュベーション終了後、直ちに神経節を4Mguanidine-isothiocyanate液にPolytron homogenizerで懸濁した。遠心後、上清をhydroxyapatite(東燃)による高速液体クロマトグラフィー(3)にかけて、神経節中のRNAを分離した。SCGおよびNG共にI、IIおよびIIIの3つの фракに分離された。 фракIはt-RNA、 фракIIは5S-および5.8S-RNA、 фракIIIは18S-および28S-RNAであった(3)。各分画の生合成RNA量は $[^3\text{H}]$ の放射エネルギーから、総RNA量は260nmの吸光

度から推定した。神経節中の過酸化脂質の定量はOhkawa等(4)のTBA法によった。

CfによるRNA合成抑制の特異性：神経毒として知られているメチル水銀(CH<sub>3</sub>HgCl)、4-hydroxyaminoquinoline-N-oxide(以下4HAQ-Oと略す)はSCGのRNA合成を添加濃度に依存して、NGFの有無にかかわらず抑制したのに対し、CfはNGFによって賦活された状態におけるSCGの

EFFECTS OF Cf AND OTHER NEUROTOXIC AGENTS ON RNA SYNTHESIS IN NEONATAL RAT SCG

Tested substance	Incorporation (%) of [3H]-uridine into TCA-insoluble fraction	
	NGF (-)	NGF (+)
none	100	263
Cf	10μM	67
	100μM	81
4HAQ-O	10μM	26
	100μM	4
CH <sub>3</sub> HgCl	10μM	84
	100μM	10

表 2 RNA SYNTHESIS IN SCG AND NG

	NGF(1μg/ml)	Cf(5μM)	Incorporation (%) of [3H]-uridine into TCA-insoluble fraction
SCG	-	-	100
	-	+	77
	+	-	269
	+	+	150
NG	-	-	100
	-	+	68
	+	-	109
	+	+	77

RNA合成をより強く抑制した(表1)(5)。このことはNGFに対して感受性のない副交感神経系のNGでの結果と比較することで確認された。即ち、NGのRNA合成の抑制に比べ、NGF存在下でのSCGのRNA合成の方がよ

り強く抑制された(表2)(6)。

Cfの金属キレートとしての性質との関連：表3に示すように、Cfの7+αである8-hydroxyquinoline(8-HQ)及びその硫酸抱合体にはCfにみられる様なRNA合成の抑制作用はなかったが、8-HQのαケトン化誘導体

表3 EFFECTS OF Cf, ITS ANALOGS AND OTHER METAL-CHELATING AGENTS ON RNA SYNTHESIS IN SCG

		Incorporation (%) of [ <sup>3</sup> H]-uridine into TCA-insoluble fraction	
		NGF (-)	NGF (+)
none		100	319
Cf	10μM	60	87
	100μM	79	99
5-chloro-8-HQ	10μM	58	82
	100μM	72	123
5,7-dichloro-8HQ	10μM	59	104
	100μM	93	104
8-HQ	10μM	76	205
	100μM	87	131
8-HQ-5-sulfonic acid	10μM	135	315
	100μM	100	238
quinoline	10μM	108	298
	100μM	106	273
4-HQ	10μM	113	290
	100μM	125	261
EDTA	10μM	118	265
	100μM	109	335
alizarine	10μM	82	237
	100μM	90	154
alizarine sulfate	10μM	106	199
	100μM	97	194
O-phenanthroline	10μM	63	102
	100μM	45	65
β,β'-dipyridyl	10μM	94	234
	100μM	70	169

である5-chloro-8-hydroxyquinoline(5-chloro-8-HQ)、5,7-dichloro-8-hydroxyquinoline(5,7-dichloro-8HQ)はCfと同様なRNA合成抑制効果を示した。また、構造の異なる他の金属キレートと比較したところ、EDTA, alizarineはRNA合成に対して無効であった。o-phenanthroline及びα, α'-dipyridylはRNA合

成を抑制したが、Cfに特長的であるNGFによって賦活化された状態でのRNA合成を殊に強く抑制するというものではなかった。これらの結果から、CfのRNA合成抑制効果には金属キレートとしての性質以外の作用が示唆される(7)。

Cfの効果はRNAの分解促進ではないか？：この疑問に対して、前もってSCGを[<sup>3</sup>H]-uridineと共にインキュベートして、ラベルされたRNAの分解速度を調べたところ、Cfによる分解促進は認められなかった(7)。

Cfの効果は基質であるuridineの取り込みの抑制ではないか？：SCG

内への uridine の取り込みは Cf によって抑制されなかった (7)。

Cf の効果は可逆的か、不可逆的か? : SCG を Cf と共に 12 時間培養すると Cf を洗い除いても NGF による RNA 合成の促進はみられなくなった。即ち、Cf の効果は不可逆的である (7)。以上のことから、Cf は SCG の NGF に感受性をもった神経細胞における RNA 合成に対し強い作用をもっていると推論される。また、神経節への uridine の取り込み、神経節内で合成された RNA の分解についての解析から、Cf の作用は RNA の合成過程にあることが解った。

神経節の RNA の抽出分離による解析 : SCG 及び NG の RNA 量は t- 及び ribosomal RNA においても Cf 及び NGF によって影響を受けなかった (表 4 A, B)。一方、NGF は SCG の t- 及び ribosomal RNA の生合成も一様に (40-60%) に促進したが、NG の RNA 生合成には効果がなかった (表 5

表 4 AMOUNT OF RIBOSOMAL RNA

A) 20 day old Rat SCG

Cf ( $\mu$ M)		0	5	10	20
		NGF (1 $\mu$ g/ml)			
Peak I	-	2.74 $\pm$ 0.188 (10)	2.54 $\pm$ 0.267 (4)	2.67 $\pm$ 0.209 (3)	2.39 $\pm$ 0.492 (3)
	+	2.84 $\pm$ 0.161 (10)	2.73 $\pm$ 0.426 (4)	2.50 $\pm$ 0.310 (3)	2.40 $\pm$ 0.388 (3)
Peak II	-	5.68 $\pm$ 0.489 (10)	3.75 $\pm$ 1.072 (4)	5.69 $\pm$ 1.064 (3)	3.41 $\pm$ 1.009 (3)
	+	6.28 $\pm$ 0.565 (10)	6.07 $\pm$ 1.064 (4)	5.82 $\pm$ 0.423 (3)	3.93 $\pm$ 1.065 (3)
Peak III	-	13.65 $\pm$ 1.997 (10)	8.77 $\pm$ 1.178 (4)	14.88 $\pm$ 4.694 (3)	15.73 $\pm$ 2.344 (3)
	+	15.31 $\pm$ 2.520 (10)	10.32 $\pm$ 1.069 (4)	17.54 $\pm$ 3.374 (3)	18.10 $\pm$ 2.566 (3)

B) 20 day old Rat NG

Cf ( $\mu$ M)		0	5	10	20
		NGF (1 $\mu$ g/ml)			
Peak I	-	1.88 $\pm$ 0.083 (10)	1.62 $\pm$ 0.120 (4)	1.30 $\pm$ 0.068 (3)	0.92 $\pm$ 0.254 (2)
	+	1.72 $\pm$ 0.068 (10)	1.65 $\pm$ 0.075 (4)	1.65 $\pm$ 0.216 (3)	1.41 $\pm$ 0.276 (3)
Peak II	-	4.66 $\pm$ 0.332 (10)	3.44 $\pm$ 0.366 (4)	3.12 $\pm$ 0.277 (3)	2.60 $\pm$ 0.210 (2)
	+	4.77 $\pm$ 0.273 (10)	4.22 $\pm$ 0.118 (3)	4.10 $\pm$ 0.245 (3)	3.35 $\pm$ 0.022 (3)
Peak III	-	10.79 $\pm$ 0.570 (9)	8.94 $\pm$ 1.485 (4)	9.09 $\pm$ 2.062 (3)	8.83
	+	9.90 $\pm$ 1.506 (9)	8.85 $\pm$ 2.664 (3)	9.84 $\pm$ 3.908 (3)	8.67 $\pm$ 0.015 (2)

Peak I; tRNA, peak II; 5S & 5.8S RNA, peak III; 18S & 28S RNA. Value;  $\times 10^{-3}$  AU $\cdot$ ml/5 ganglia  $\pm$  SE (number of experiments).

A, B)。Cfはt-及び18S, 28S RNAをNGFの存在の有無に関わりなくCfの濃度に依存して抑制したが、5S, 5.8S RNAに対してはNGFの存在下の方がより強く抑制した。NGFにより賦活された状態での5Sあるいは5.8S RNAの生合成を殊に強く抑制することにCfのRNA生合成抑制にお

表 5 AMOUNT OF RIBOSOMAL RNA SYNTHESIS

A) 20 day old Rat SCG

Cf ( $\mu$ M)		0	5	10	20
		NGF (1 $\mu$ g/ml)			
Peak I	-	1037.3 $\pm$ 80.9 (10)	851.5 $\pm$ 92.2 (4)	624.0 $\pm$ 116.5 (3)	554.7 $\pm$ 62.4 (3)
	+	1477.5 $\pm$ 142.3 (10)	1183.8 $\pm$ 202.3 (4)	677.5 $\pm$ 259.3 (3)	689.8 $\pm$ 49.3 (3)
Peak II	-	1972.3 $\pm$ 137.8 (10)	1525.8 $\pm$ 341.7 (4)	1511.3 $\pm$ 164.3 (3)	849.8 $\pm$ 257.7 (3)
	+	3316.5 $\pm$ 227.4 (10)	3337.2 $\pm$ 669.3 (4)	1794.7 $\pm$ 256.0 (3)	1111.8 $\pm$ 447.0 (3)
Peak III	-	1944.8 $\pm$ 272.7 (10)	1083.4 $\pm$ 251.4 (4)	1055.1 $\pm$ 272.8 (3)	762.1 $\pm$ 54.1 (3)
	+	2804.4 $\pm$ 468.8 (10)	1625.6 $\pm$ 118.0 (4)	1441.0 $\pm$ 357.7 (3)	1321.4 $\pm$ 294.4 (3)

B) 20 day old Rat NG

Cf ( $\mu$ M)		0	5	10	20
		NGF (1 $\mu$ g/ml)			
Peak I	-	916.3 $\pm$ 63.0 (10)	471.1 $\pm$ 223.4 (4)	351.8 $\pm$ 50.4 (3)	360.1 $\pm$ 82.7 (2)
	+	918.5 $\pm$ 81.4 (10)	659.0 $\pm$ 174.9 (4)	452.5 $\pm$ 78.0 (3)	384.5 $\pm$ 50.2 (3)
Peak II	-	2424.7 $\pm$ 124.4 (10)	1697.4 $\pm$ 404.3 (4)	1135.0 $\pm$ 149.4 (3)	1140.0 $\pm$ 124.1 (2)
	+	2717.2 $\pm$ 191.1 (10)	1939.4 $\pm$ 323.3 (4)	1515.7 $\pm$ 259.1 (3)	1177.8 $\pm$ 94.4 (3)
Peak III	-	2033.1 $\pm$ 114.5 (9)	718.8 $\pm$ 58.6 (3)	564.3 $\pm$ 126.6 (3)	390.8
	+	1638.1 $\pm$ 287.7 (9)	727.9 $\pm$ 55.9 (3)	576.1 $\pm$ 179.0 (3)	549.3 $\pm$ 116.4 (2)

Peak I; tRNA, peak II; 5S & 5.8S RNA, peak III; 18S & 28S RNA. Value; cpm/5 ganglia  $\pm$  SE (number of experiments).

ける特長があるのかもしれない(8)。ともあれ神経節に取り込まれた uridineが磷酸化されRNAにまで合成される過程のどの段階で強く作用しているのかを明らかにすることは今後の課題である。

Cfによる過酸化脂質の産生能: Cfの毒性発現機序として過酸化脂質産生説(1)がある。しかし、表6に示すようにSCG, NGの過酸化脂質量はFeCl<sub>3</sub>の存在下でもCfによっては増加しなかった。

結語: NGFがSCGの神経細胞の機能を維持賦活することは形態学的に明確であるが、神経細胞の形態の変化に際しての生化学的作用機序

表 6 EFFECTS OF Cf AND FeCl<sub>3</sub> ON LIPOPEROXIDATION

	SCG	NG
none	11.6 ± 1.91(6)	18.6 ± 9.61(6)
Cf 10μM	17.0 ± 5.91(6)	18.2 ± 6.20(6)
FeCl <sub>3</sub> 0.1mM	15.2 ± 2.08(6)	13.3 ± 1.58(6)
Cf 10μM + FeCl <sub>3</sub> 0.1mM	15.9 ± 3.42(6)	13.3 ± 3.35(6)

Value; pmoles/ganglion ± SE(number of experiments).

は多様である。NGFの作用の多様性とCfの作用の間にはいかなる接点があるのか、あるいはCfによって神経細胞が障害された

結果としてNGFに対する反応性が失われているという可能性を否定できるのか。これらは今後明らかにしなければならない問題点として残っている。更に、Cfの神経毒性を発現するに際して、NGFに抑制効果があるのか否かを実証するには適切な動物を使つての発症実験によらざるを得ない。

#### 文献

- 1) 堀眞一郎：神経細胞の変性と中毒 神経眼科 4: 379-384, 1987.
- 2) 細胞トキシコロジー試験法、日本組織培養学会編、朝倉書店
- 3) Hori S, Ohtani S, Miyasaka K, Ishikawa T & Tanabe H: Separation of high-molecular mass RNAs by high-performace liquid chromatography on hydroxyapatite. J Chromatography 515: 611-619, 1990.
- 4) Ohkawa H, Ohishi N et al: Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem. 95: 351, 1979.
- 5) Hori S, Kayanuma K, Ohtani S, Sugiura H & Tsubaki T: 5-Chloro-7-iodo-8-hydroxyquinoline (clioquinol) inhibits the nerve growth factor-induced stimulation of RNA synthesis in neonatal rat superior cervical ganglion, in vitro. J Toxicol. Sci. 12: 97-109, 1987.
- 6) 椿忠雄、堀眞一郎、大谷幸子、杉浦弘子：神経節におけるRNA合成に対するキノリンの抑制効果について。厚生省特定疾患メソ調査研究班研究報告書（昭和61年度）p.50-54、1987.



- 7) Hori S, Kayanuma K, Ohtani S, Sugiura H, Kotaki H & Tsubaki T: Effectsof 5-Chloro-7-iodo-8-hydroxy-quinoline (clioquinol) and nerve growth factor on DNA, RNA and protein syntheses in neonatal rat superior cervical ganglia. *Pharmacology & Toxicology* 63: 225-232, 1988.
- 8) 田邊等、堀眞一郎、大谷幸子:ヒドロキシアハタイトカラムクロマトグラフィーを用いた新しい高分子RNA分離法による神経節RNA生合成に対するキノキサリンの抑制効果の解析。厚生省特定疾患メソ調査研究班平成2年度研究報告書 p.56-60、1990.

三浦郷子<sup>1,2</sup>、井村伸正<sup>2</sup><sup>1</sup>和光大、経、環境科学、<sup>2</sup>北里大、薬、公衆衛生

水俣病の原因物質として知られ、自然界に広く分布することが明らかとなっているメチル水銀化合物の神経障害惹起機構を解明するための一つの方法として、神経組織由来の培養細胞を用いて一連の実験をおこなった<sup>1-7)</sup>

目標は、メチル水銀の細胞に対する作用の第一義的な標的部位を決定すること、及び、その作用を無機水銀を含む種々の重金属化合物の作用と比較することにより、メチル水銀の作用の特異性を明かにすることである。

### 1、細胞の培養

神経組織由来の mouse neuroblastoma と mouse glioma 細胞を、それぞれ、Dulbecco's modified Eagle's medium (D.MEM), および Eagle minimum essential medium (E.MEM) 培地に、10% fetal bovine serum (FBS) を添加して継代培養した。水銀化合物の影響は、FBS を含む培地で単層培養した対数増殖期の細胞に、水銀化合物を添加し検討した。水銀化合物として、塩化メチル水銀 ( $\text{CH}_3\text{HgCl}$ ) と塩化第二水銀 ( $\text{HgCl}_2$ ) を用いた。

### 2、細胞増殖に対するメチル水銀及び無機水銀の影響

単層培養した細胞に種々の濃度の水銀化合物を添加し、48時間後における細胞数を測定した。mouse neuroblastoma および glioma 細胞において、50%増殖抑制濃度は両細胞種ともにメチル水銀が  $2 \mu\text{M}$ 、無機水銀が  $10-15 \mu\text{M}$  であり、100%増殖抑制濃度はそれぞれ  $5 \mu\text{M}$  と  $50 \mu\text{M}$  であった<sup>3,4)</sup>。すなわち、増殖抑制に要する濃度はメチル水銀で無機水銀の約  $1/10$  であることからメチル水銀の毒性の強さが示された。

細胞増殖に対するメチル水銀と無機水銀の作用の差を明らかにするた

め、両水銀化合物により増殖が抑制されている細胞の微細構造の変化を電子顕微鏡観察により行った。メチル水銀で4時間処理した細胞では微小管が特異的に消失した分裂期細胞の増加が観察された。この時の glioma 細胞の分裂指数 (mitotic index) は処理3時間で約2倍、6時間で約3倍に増加していることが観察された。このことから、メチル水銀は分裂装置を構成する微小管を破壊し、M期からG1期への移行を阻害することにより増殖を抑制すると結論された。

一方、増殖抑制濃度の無機水銀処理細胞では電顕観察により多種類の細胞内小器官に顕著な変性が認められること、および、分裂指数の増加も認められないことから、無機水銀による glioma 細胞の増殖抑制はメチル水銀と異なる作用機作によることが示唆された。また、neuroblastoma 細胞においても類似の結果がえられた。

### 3 生体高分子合成活性に対するメチル水銀および無機水銀の影響

単層培養した細胞 ( $6-9 \times 10^5$  細胞) を  $^3\text{H}$  標識した thymidine, uridine あるいは leucine を含む E.MEM (+10% FBS) 培地中で、種々の濃度の水銀化合物存在下  $36.5^\circ\text{C}$  で1時間反応させ、DNA, RNA および蛋白質合成活性に対する水銀化合物の影響を検討した。

DNA 合成は  $30-40 \mu\text{M}$  で50%、 $50 \mu\text{M}$  でほぼ完全に抑制された。RNA 合成および蛋白質合成はともに  $20-50 \mu\text{M}$  以上の両水銀化合物により抑制された<sup>1,2)</sup>。なを、メチル水銀および無機水銀によるこれら高分子合成の前駆物質の細胞内への取り込み抑制は、いずれも合成抑制の割合よりも低いことから、合成抑制が前駆物質の細胞内への取り込みの抑制による二次的現象ではないことが確かめられた。これらの結果から、mouse glioma 細胞の高分子合成活性の抑制に関してはメチル水銀と無機水銀の間に顕著な差はないことが示された。

この事実は、メチル水銀と無機水銀間で、その抑制効果に顕著な差が認められた細胞増殖に対する影響と対照的である。即ち、増殖抑制は高分子合成活性に何等影響を与えない低濃度域のメチル水銀により引き起こされていることから、メチル水銀の場合、高分子合成活性の抑制が、増殖抑制の原因とはなり得ないことが示された。

#### 4 *in vitro*における tubulin 重合に対する水銀化合物及び他の重金属化合物の影響

これまでの結果により、微小管がメチル水銀に対し特に感受性が高い可能性が示されたので、豚脳より精製した tubulin の *in vitro* 再構成系に両水銀化合物を作用させ tubulin の重合に対する影響を比較検討した。その結果、無機水銀は用いた水銀化合物中で tubulin 重合抑制効果が最も強く、かつ、50% 重合抑制濃度はメチル水銀の 1/2 であった。同時に測定した、カドミウム、銅および三価クロムの 50% tubulin 重合抑制濃度はそれぞれ、0.2, 0.3 および 0.1 mM であり、*in vitro* の系では種々の金属化合物が tubulin 重合を阻害することが示された。そこで、これらの金属化合物につき mouse glioma 細胞の増殖抑制濃度を求め、増殖が抑制されている細胞の微小管ネットワークを、tubulin 抗体を用いた間接蛍光抗体法で観察した<sup>5,6)</sup>。増殖抑制濃度のメチル水銀処理細胞では、1 時間以内に微小管ネットワークが完全に消失したのに対し、無機水銀を含む他の金属化合物 1 時間処理では、微小管ネットワークに変化が認められなかった。これらの結果から増殖抑制濃度のこれら金属化合物を培地に添加した場合、メチル水銀のみが細胞内微小管をすみやかに破壊することが明らかとなった。

#### 5 水銀化合物の細胞内取り込みと膜への影響

水銀化合物の細胞内への取り込みは、両水銀共に、培地の水銀濃度に依存して、その取り込み量が増大するが、メチル水銀は無機水銀より低い濃度で、より多量に取り込まれた。このメチル水銀の細胞への取り込みは、細胞内 ATP レベルおよび温度により影響されることからエネルギーに依存した取り込み機構が示された。しかし、無機水銀ではそれらの影響を受けず、両水銀化合物の細胞への取り込み機構に差があることが示唆された<sup>7)</sup>。一方、予め細胞内へ取り込ませた [<sup>3</sup>H] 2-deoxyglucose の遊離を指標にして水銀化合物の膜にたいする作用を見ると、両水銀化合物ともに、10-20  $\mu$ M の濃度より deoxyglucose の遊離が認められ、濃度の上昇に従い遊離量も増加した。10-20  $\mu$ M という濃度は、無機水銀の場合は細胞増殖抑制が始まる濃度であることから、膜の barrier 能の変化が、

直接、細胞増殖抑制と関係している可能性が示された。それに対し、メチル水銀は、膜の barrier 能が何等影響を受けない濃度領域で、すみやかに細胞内へ取り込まれ、増殖を抑制した。さらにこの増殖抑制濃度のメチル水銀では、DNA, RNA および蛋白質合成活性は、殆ど影響を受けないが、微小管は1時間以内に完全消失することから、増殖抑制における微小管破壊の重要性が浮き彫りにされた。

## 6 メチル水銀による微小管脱重合の tubulin 合成に及ぼす影響

近年、微小管蛋白質である tubulin 遺伝子発現に関する研究が進み、tubulin 合成が細胞内の未重合 tubulin 濃度によって制御されていることが、微小管の脱重合剤であるコルヒチンなどを用いた実験により証明された<sup>9)</sup>。即ち、脱重合剤処理により細胞内未重合 tubulin 濃度が高まると、tubulin 合成が抑制され、逆に、重合安定剤処理により細胞内未重合 tubulin 濃度が低下すると tubulin 合成が促進される。そこで、メチル水銀による微小管脱重合で増加した未重合 tubulin が tubulin 合成に影響を及ぼすか否かを検討した。

細胞増殖抑制濃度のメチル水銀 ( $5\mu\text{M}$ ) で glioma 細胞を3時間処理した後、15分間 [ $^{35}\text{S}$ ] -methionine でパルスラベルし、二次元電気泳動で tubulin 蛋白質合成に対する影響をみた。その結果、総蛋白質合成の抑制は、10% 以下に留まったのに対し、tubulin 合成は約 50% 抑制された<sup>9)</sup>。この tubulin 合成の特異的阻害は neuroblastoma 細胞においても確認された。また mouse 肝細胞の DNA ライブラリーからクローニングした  $\beta_5$ -tubulin cDNA をプローブとして測定した tubulin mRNA 量は、同じ条件下の細胞で約 50% 低下した。それに対し、単離核を用いて測定した tubulin 遺伝子の翻訳速度には変化が認められないことから、tubulin 合成の抑制は、コルヒチンの場合と同様に post transcriptional に生じていることが確認された。

以上の結果から、培地に加えられた増殖抑制濃度のメチル水銀は、単に細胞内微小管の脱重合を引き起こすだけでなく、コルヒチンと同様に、微小管脱重合によって細胞内未重合 tubulin 濃度を増加させることにより post transcriptional に tubulin 合成をも阻害することが明かとなった。

## 7 まとめ

mouse glioma および neuroblastoma 細胞を用いて行われたメチル水銀の細胞機能と形態に及ぼす影響に関する一連の実験は、その細胞内標的が微小管であることを強く示唆した。

微小管は、有糸分裂、細胞形態の維持、細胞運動、細胞内の物質輸送および細胞膜の流動性を初めとする膜機能など多くの機能に関与している。この様な多岐に亘たる機能から推し量れば、メチル水銀による特異的な微小管破壊が細胞機能に及ぼす影響は、いろいろな形で現れてくる可能性がある。一つの例として最近、発生の初期段階における神経細胞分裂阻害が *in vivo* の系で、Rodier ら<sup>10)</sup> および Sager ら<sup>11)</sup> により mouse を使って証明された。一方、分化した神経細胞では、特に軸索流および刺激の伝達への影響が問題になるがこの点に関しては未だ明らかにされていない。その様な意味に於いても微小管の脱重合とそれに続く tubulin 合成阻害が、どの様に神経系の機能に影響するかは、今後明らかにされなければならない重要な問題であると考えられる。

## 引用文献

- 1) Nakada, S. & Imura, N. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 53, 24, 1980.
- 2) Nakada, S. et al., *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 4, 184, 1980.
- 3) Miura, K. et al., *Environ. Res.*, 17, 453, 1978.
- 4) Miura, K. et al., *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 3, 352, 1979.
- 5) Imura, N. et al., *Toxicology*, 17, 241, 1980.
- 6) Miura, K. et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 73, 218, 1984.
- 7) Nakada, S. & Imura, N. *Neurotoxicology*, 3, 249, 1982.
- 8) Ben Ze'ev, A. et al., *Cell*, 17, 319, 1979.
- 9) Miura, K. & Imura, N. *Biol. Trace. Element Res.*, 21, 313, 1989.
- 10) Rodier, P. M., et al., *Neurobehav. Toxicol.*, 6, 379, 1984.
- 11) Sager, P. R., et al., *Develop. Brain Res.*, 12, 1, 1984.

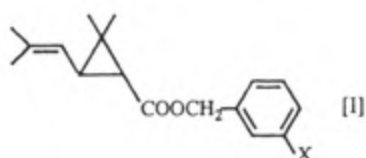
# SW-4 巨大神経軸索を用いた神経作用性殺虫剤の電気生理学的パラメーターと殺虫毒性

西村 勲一郎、藤田 稔夫

京都大学農学部農芸化学科

除虫菊の殺虫成分であるピレスリン類は古くより衛生害虫の防除に使われてきた。ピレスリン類に適度な安定性を付与したうえ、高い殺虫活性をもつ化合物の発見のために構造改変が精力的になされてきた。これらの化合物はピレスロイドと総称される。エステル結合をもつピレスリン類の酸側やアルコール側の構造を改変した化合物ばかりでなく、最近ではエステル結合さえ欠く化合物にも高活性を有するものが発見された。そしてそれらの中から、自然条件にもある程度安定な化合物が農業用殺虫剤として開発された。このように、化学構造の飛躍的な変換がなされてきたとはいえ、天然ピレスリン類の酸部分構造の一つである菊酸のエステル類は、依然として基準物質としての地位を保持している。

ピレスロイドの作用点は、昆虫の神経系にあるといわれている。提案されている作用機構のうち、Na 電流を長時間にわたって持続する効果がそれらの主な作用であるとする考えが多くの支持を得ている。<sup>1)</sup> 本発表では、菊酸エステルの一種であるフェノスリン(図1: X = OPh)の OPh 基を変換した誘導体(図1)の殺虫活性における



X; H, halogen, alkyl, alkoxy,  
OPh, OCH<sub>2</sub>Ph, etc.

図1. 供試化合物

神経活性の意義を、定量的方法を用いて解析して考察する。<sup>2)</sup>

## 1. 殺虫活性

殺虫試験にはワモンゴキブリの雄成虫を用い、薬量（モル単位）が log スケールで 0.1 間隔になるように設定した。化合物固有の殺虫活性を測定するために薬剤を注射法で投与し、活性値に及ぼす昆虫表皮への薬剤の透過の要因を除いた。薬剤の投与に先だって代謝阻害剤を注射投与し、殺虫活性に対する代謝の要因をできるだけ除くようにした。薬剤投与の一定時間後に、ゴキブリを致死またはまひさせるのに必要な最小薬量（MLD）を求め、 $\log(1/MLD)$  を殺虫活性を表す指標とした。殺虫活性は、最も低い *m*-CN 誘導体 (5.73) から最も高い *m*-O<sub>2</sub>Ph 誘導体 (9.49) の間に分布した。

## 2. Na 電流活性

神経膜におけるイオン電流は、ザリガニ巨大神経軸索をしょ糖隔絶法で電位固定して測定した。イオン電流（K 電流 + Na 電流）のうち K 電流は、軸索標本の内部還流液の K イオンを Cs イオンで置換することによって除去し、Na 電流のみを測定できるようにした。薬剤の投与は、軸索の内部還流液に含めて行った。

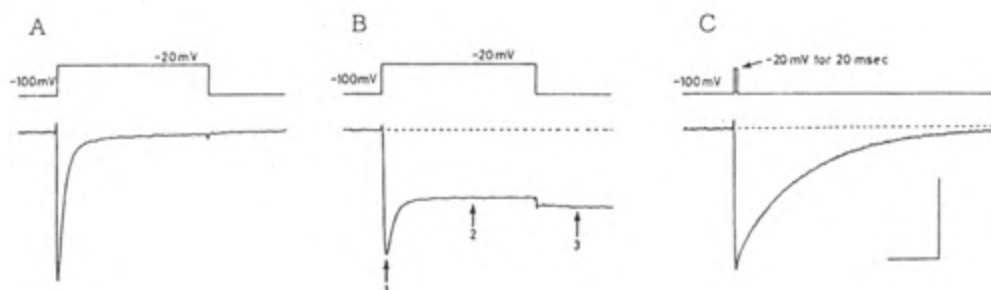


図 2. 脱分極パルス（上）と Na 電流（下）。A：薬剤処理前、  
B：*m*-CH<sub>2</sub>Ph 誘導体 ( $1 \times 10^{-4}$  M) と 30 分処理後、  
C：同 24 分処理後。右下に示したスケールの縦線は  
A と B では  $1.2 \mu\text{A}$ 、C では  $0.5 \mu\text{A}$ 、横線は A と B  
では 10 msec、C では 1.5 sec を示す。



軸索標本を化合物 (図 1, X = CH<sub>2</sub>Ph) で処理すると residual 電流 (図 2 B, 矢印 2) と tail 電流 (図 2 B, 矢印 3) の増大がみられた。図 2 B の記録をもっと長時間にわたって記録したのが図 2 C であり、tail 電流が非常にゆっくりした速度で減衰することがわかった。この記録を片対数プロットし直すことにより図 3 を得た。

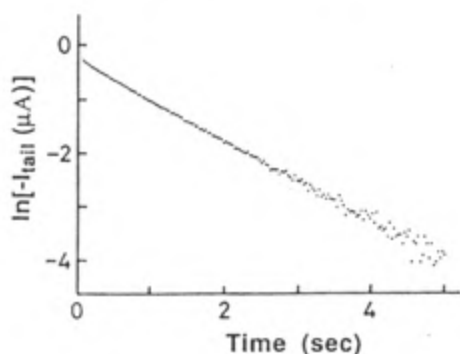


図 3.  
Tail 電流の経時的減衰。

図 3 を直線関係とみなすことにより、tail 電流の減衰における時定数  $\tau$  を式 1 によって定義した。

$$\ln(-I_{tail}) = -t/\tau + \text{const.} \quad \text{式 1}$$

この値を化合物ごとに求め、 $\log \tau$  を tail 電流の減衰過程を表す活性パラメーターとして解析に用いた。 $\log \tau$  の値は化合物に固有のものであった。この値は最も低い m-F 誘導体 (1.02) から、最も高い m-COPh 誘導体 (3.43) の間に分布した。

### 3. 殺虫活性と tail 電流活性との関係

これら 2 種類の活性値を求められた 29 化合物について、それぞれの値をパラメーターとして用いて定量的に解析することにより式 2 が得られた。

$$\log(1/MLD) = -6.87 + 1.07(\log \tau) + 3.61(\log P) - 0.26(\log P)^2$$

$$n = 29, s = 0.291, r = 0.955 \quad \text{式 2}$$

ここで  $n$  は化合物数、 $s$  は標準偏差、 $r$  は相関係数を表す。 $P$  は  $n$ -オクタノール/水系における分配係数で、 $\log P$  は化合物の疎水性を表すパラメーターである。式 2 は、化合物の疎水性の効果を別途考慮すると、tail 電流活性が高いほど殺虫活性が高くなることを示している。 $\log P$  の項は、化合物が投与された部位から作用点であるナトリウムチャンネルへ輸送される際に受ける分配の効果を反映していると考えられ、この効果には  $\log P$  に関して最適値(6.9)の存在することが示唆された。この結果は、ピレスロイドについていろいろ提案されている昆虫神経系における作用点のうち、第一次作用点がナトリウムチャンネルであるという考えを支持するものである。

#### 参考文献

- 1) D. S. Sattelle and D. Yamamoto, Molecular targets of pyrethroid insecticides, in "Advances in Insect Physiology, vol. 20," Eds. P. D. Evans and V. B. Wigglesworth, Academic Press, London, pp.147-213, 1988.
- 2) K. Nishimura, T. Kobayashi, and T. Fujita, Quantitative structure-activity studies of pyrethroids. 23. Substituted benzyl chrysanthemates and pyrethrates and the rate of decrease in sodium tail currents in crayfish giant axons, Pestic. Biochem. Physiol. 40, 99-110 (1991).
- 3) K. Nishimura and T. Fujita, Insecticidal and sodium-current activities of pyrethroids and their quantitative structure-activity relationships, in "Pesticides and the Future: Toxicological Studies of Risks and Benefits," Eds. E. Hodgson, R. M. Roe, and N. Motoyama, North Carolina State University, Raleigh, pp.219-228, 1991.

# ワークショップ(2) 特別委員会

平成4年7月24日(金) 14:30~17:00

第1会場

## 「組織培養法を応用した臓器毒性試験法の 新しい評価法の現状と将来」

座長 戸部 満寿夫(大分医科大・薬理)

佐藤 温重(東京医歯大)

### 2) 皮膚毒性

SW-5 組織培養法による皮膚毒性研究と問題点

佐藤温重(東京医歯大)

SW-2 Prediction of Skin Toxicity and Irritancy Using Dermal and Dermal  
/Epidermal Skin Models

Sandra R. Slivka

(Advanced Tissue Sciences (formerly  
Marrow-Tech) U.S.A.)

W-3 ケラチノサイトと線維芽細胞の再構成による

ヒト表皮細胞の三次元培養とその応用

黒木 登志夫(東大・医科研)

### 3) 総合楼論

佐藤 温重

東京医科歯科大学歯学部歯科理工学第二講座

化学物質に起因する皮膚障害には、化学物質の直接接触によって生ずる急性障害として刺激性皮膚炎、アレルギー性皮膚炎、毛嚢炎、知覚異常が、また慢性障害として皮膚腫瘍などがある。この他吸収毒性による皮膚障害として薬疹、また臓器障害の2次作用として皮膚ポルフィリン症などがあり、多様である。

組織培養法による皮膚毒性の検索は主として急性の直接接触毒性の評価であり、皮膚毒物のスクリーニング法や、動物を用いる皮膚毒性試験の補充試験、あるいは置換試験として有用性が認められつつある。組織培養法による皮膚毒性の検出の特性は、皮膚障害発症の過程を構成する各段階を階段別に評価する点であり、一つの試験法で皮膚障害の全体像を明らかにすることは不可能である。

皮膚刺激に対する初期変化は炎症媒介物質および炎症誘導因子の遊離である。初代培養のラット腹水肥満細胞のヒスタミン遊離能を指標とした試験において、界面活性剤によるヒスタミン遊離活性と家兎の皮内注射試験における毛細管透過性亢進活性は相関する。ラット肺胞マクロファージを用いたロイコトリエン、 $\alpha$ -TNF遊離を指標とする方法や、マウスのリンパ球とランゲルハンス細胞の共培養を用い、リンパ球芽球化を指標とした方法は接触感作、光感作の評価に応用されている。刺激に対する細胞の反応は膜障害、機能障害、細胞死といった一般経過を経る。膜障害は色素の透過性を利用して検索され、ニュートラルレッドの取り込みによる生細胞の、また、FDAとPIの二重蛍光色素標識法による、生細胞と死細胞の分別が行われている。膜破壊による、あらかじめ標識した $^{51}\text{Cr}$ の遊離や細胞内

酵素（LDH）の遊離を指標に致死毒性の検出が行われている。

標的細胞としての株化線維芽細胞が汎用されていたが、培養技法の進歩によって、最近ヒト皮膚由来の正常ケラチノサイトで継代数の少ない細胞系が毒性試験に利用できるようになった。また、単層培養系から三次元培養系、さらに線維芽細胞との共培養系が開発され、*in vitro*のヒト皮膚モデルとして毒性試験に応用されている。*in vitro*皮膚モデルを用いることによって、被検化学物質の曝露形態を*in vivo*のそれに近づけ、皮膚毒性のみならず経皮吸収、薬物代謝、さらに標的器官における毒性発現機序の研究に応用されている。

組織培養法による皮膚毒性試験法の標準化は重要な課題であり、試験細胞、培養法、毒性指標、その他試験に影響する要因についての研究が行われている。一方、施設内、施設間の再現性確認について国内外の研究者による研究が進行中である。

皮膚刺激試験、眼粘膜刺激試験における動物実験の代替として*in vitro*試験の有用性は否定できないが、有用性確認の毒性学的基盤は未だ十分に確立していない。この基盤の確立とともに*in vitro*試験を加えた皮膚毒性試験体系の構築が必要である。

SW-6 Prediction of Skin Toxicity and Irritancy Using  
Dermal and Dermal/Epidermal Skin Models

Sandra R. Slivka

Advanced Tissue Sciences , Inc. (formerly Marrow-Tech)  
La Jolla, CA, 92037, USA

Three dimensional in vitro dermal and dermal/epidermal skin models have been developed, characterized, and used to test the cytotoxicity and irritancy of a number of compounds. The dermal model consists of metabolically active fibroblasts grown into a dermis-like structure. These fibroblasts respond to growth factors and regulators of collagen synthesis and deposition. Using a standard series of compounds designated by the Economic European Community (EEC) and a mitochondrial reductase activity as a measure of fibroblast viability, good correlation between in vitro and in vivo toxicity was obtained. A dermal/epidermal model was prepared by seeding cultured keratinocytes onto a dermal model and growing this composite culture until an epidermis with basal, spinous, granular and stratum corneum layers was formed. The epidermis of this model has differentiation markers (K1 keratin, filaggrin, involucrin, and ceramide lipids), barrier function and metabolic capabilities (testosterone metabolism) which are similar to skin in vivo. This model has been used to topically test the EEC compounds, consumer products, and petrochemicals. A number of endpoints has been used to develop methods with which this model can be used to predict in vivo cytotoxicity and irritancy.

## SW-7 ケラチノサイトと線維芽細胞の再構成によるヒト表皮細胞の三次元培養とその応用

黒木登志夫<sup>1</sup>, 常長 誠<sup>1, 2</sup>, 堀井和泉<sup>1, 2</sup>, 河野葉子<sup>1, 3</sup>,

(<sup>1</sup>東大・医科研・癌細胞, <sup>2</sup>資生堂研, <sup>3</sup>昭和大・歯・病理)

プラスチック・ディッシュを用いた通常の単層培養法は、生体内の環境と大きく異なっている。このため細胞の形態、増殖、分化などは、必ずしも生体内の生理的条件を反映していない。われわれは細胞の増殖、分化の調節メカニズムを解析するために、より生体に近い培養法として、線維芽細胞を含むコラーゲンゲル上にケラチノサイトを培養することによるヒト皮膚の三次元培養法を確立した。

### 〔方法〕

方法の概略を図1に示した。

- ①ヒト線維芽細胞をタイプIコラーゲンゲル内に $10^5/\text{ml}$ の濃度で培養する。
- ②ゲルをディッシュ表面より剥し、直径1.5cmまで収縮させる。
- ③収縮したゲルをグリッドの上に置き、その上にガラスリングをのせる。
- ④リング内にヒトケラチノサイトを $1.5 - 2.0 \times 10^4/\text{cm}^2$ にまく。
- ⑤数日後リングを除き、さらに1~2週間培養する。培養の表面は常に空気に触れる状態に保つ。
- ⑥培地：線維芽細胞には10% FCS添加DMEM；ケラチノサイトには、KGM培地を用いた。三次元培養のときは、両者の1:1混合培地を用いた。

### 〔結果〕

図2に示すように、再構成された細胞は正常の生体内皮膚と極めて類似した構造をとる。

- ①DNA合成細胞は、コラーゲンゲルに接した基底細胞層に存在す

る。

- ②ケラチノサイトは多層を形成し、角化層へと分化する。
  - ③角化に伴って filaggrin, involucrinなどの分化マーカーが発現する。
  - ④基底細胞とコラーゲンゲル間にはIV型コラーゲンが分泌される。
- 正常ケラチノサイトに代えてSV40, HPV によって不死化、トランスフォーメーションした細胞を用いると、ゲル内への浸潤、角化不形成など悪性細胞の特徴を示す(図3, 4)。

[応用]

この培養法は次のような研究に応用されるであろう。

- ①皮膚の構造形成と機能維持のメカニズムの解析
- ②トランスフォーム細胞の判定と分析
- ③皮膚毒性アッセイ系

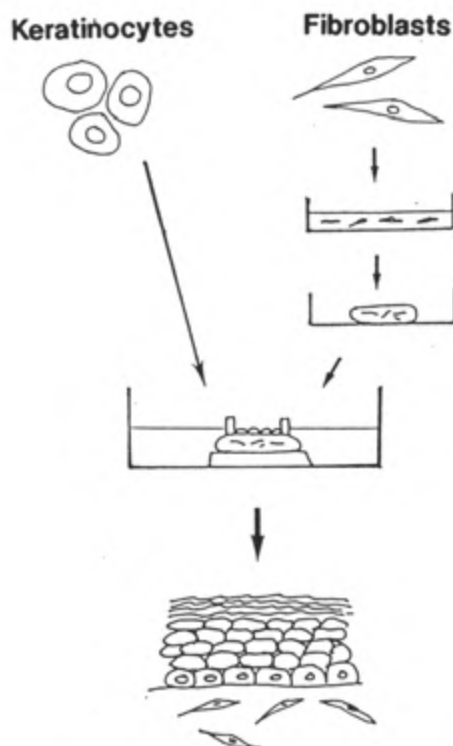


図1：培養法の概略．線維芽細胞を含む収縮コラーゲンゲル上にケラチノサイトを培養する。





図 2 : 正常ヒト・ケラチノサイトの三次元培養。  
ケラチノサイトはコラーゲンゲル上で多層化を形成し、  
角化する。

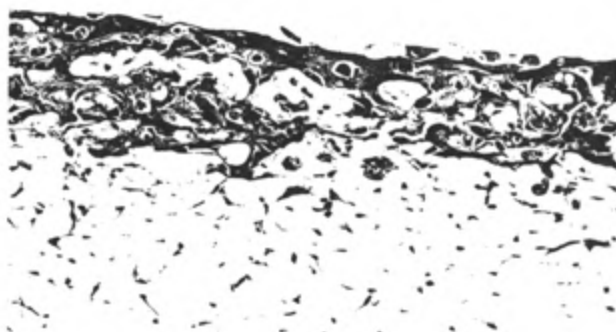


図 3 : SV40でトランスフォームしたヒト・ケラチノサイト  
の三次元培養。角化せずゲル内への浸潤傾向を示す。

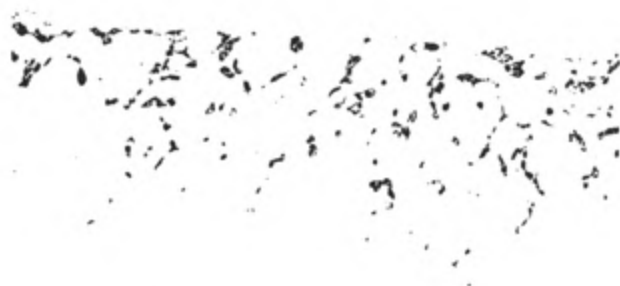


図 4 : HPV でトランスフォームしたヒト・ケラチノサイト  
の三次元培養。細胞はゲル内に侵入する。

[文献]

1. Asselineau, D., Bernard, B.A., Bailly, C., Darmon, M. and Pruniéras, M.: Human epidermis reconstructed by culture: Is it "Normal" ? J. Invest. Dermatol., **86**, 181-186, 1986.
2. Lillie, J.H., MacCallum, D.K. and Jepsen, A.: Growth of stratified squamous epithelium on reconstituted extracellular matrices: Long-term culture. J. Invest. Dermatol., **90**, 100-109, 1988.
3. Blanton, R.A., Perez-Reyes, N., Merrick, D.T. and McDougall, J.K.: Epithelial cells immortalized by human papillomaviruses have premalignant characteristics in organotypic culture. Am. J. Pathol., **138**, 673-685, 1991.

一般演題

平成4年7月23日(木)

第2会場

演題番号201-211

胆汁うっ滞を誘発する各種薬剤を遺伝性高ビリルビン  
ラット (E H B R) に投与した際の影響について

見上 孝、園田二郎

エーザイ (株) 安全性研究部

E H B R は、1983年にエーザイ (株) で発見し継代している新しいミュータントでその特徴は、高濃度の抱合型ビリルビンが血中と尿中に存在することにより黄疸を呈し常染色体劣性遺伝する。この高ビリルビン血症の原因は、肝細胞から毛細胆管側へのビリルビン輸送障害が最も有力視されている。

今回、胆汁うっ滞をラットに誘発することで知られているリファンピシンの10と50mg/kg (R F)、コルヒチンの0.3と0.6mg/kg (C H) および17 $\alpha$ -エチニールエストラジオールの0.5と5mg/kg (E E) を雌雄のE H B R (8-9週齢) に経口あるいは腹腔にて3日間連投し、血中ビリルビンの変動を中心とし影響を調べた。

その結果、E H B R のホモ個体ではR F とE E およびC H のいずれも血中の抱合型ビリルビン濃度を上昇させたが、E H B R のヘテロ個体では3薬剤ともビリルビン濃度に変動を与えなかった。

R F はビリルビンの肝への取り込みと肝細胞から毛細胆管への排泄の両者を、C H は肝細胞内のMicrotubulesを、またE E は肝細胞から毛細胆管への排泄を障害すると報告されている。今回の実験では3薬剤とも血中の抱合ビリルビンを上昇させたことから、薬剤が抱合後のビリルビン輸送に作用し、E H B R の持っている障害でその作用はさらに増強されたものと考えられる。

タバコ煙抽出物の変異原物質への活性化はP-450 2Dサブファミリーが触媒する。

藤田正一、奴久妻智代子\*、升田真木彦、数坂昭夫

北大獣医・毒性学 \*RIC応医研

〔目的〕 Ayeshら(1984)及びCaporasoら(1990)は疫学的調査から喫煙による肺がんの発生率がdebrisoquine(DB)代謝のextensive-metabolizerに比べ、poor-metabolizerで顕著に低いことを報告している。そこで我々は、DB poor-metabolizerに欠損しているP-450分子種(2D サブファミリー)がタバコ煙中の発がん物質を代謝的に活性化しているため、poor-metabolizerでは活性化が起こらず、発がんが回避されるという作業仮説を立てた。このことを明らかにするため、DB poor-metabolizerのモデル動物であるDBラットの肝S-9を用いてタバコ煙抽出物の代謝的活性化をAmes testにより調べ、Wistarラット(extensive metabolizer)のそれと比較した。また、SDラットよりbunitrolol 4位水酸化活性を指標に精製したP-450 2D サブファミリーのP-450 BTLに対する抗体を用いてWistarラットの肝S-9による代謝的活性化へのP-450 BTLの寄与を調べた。

〔方法〕 タバコ(マイルドセブン)煙より酢エチ抽出したタール分の変異原性はWistar及びDAラットの肝S-9とのプレインキュベーションを併用したAmes試験法で調べた。菌株としてTA98とTA100を用いた。P-450 BTLのDAラットでの欠損は抗P-450 BTLウサギ抗血清を用いたWestern blot法により確認した。

〔結果〕 1) Wistarラット肝S-9によるタバコ煙抽出物の代謝的活性化による変異原性の増強はTA98で顕著であったが、TA100では検出できなかった。2) DB poor-metabolizerのモデル動物であるDAラットの肝S-9によるタバコ煙抽出物の代謝的活性化能はWistarラットのそれよりも顕著に低かった。3) Western blot法によりDAラット肝にはP-450 BTLが欠損していることが確認された。4) Wistarラット肝S-9によるタバコ煙抽出物の変異原活性化は抗P-450 BTL抗血清添加で、Control血清を添加したものよりも顕著に(up to 98%)低かった。

〔考察〕 以上の結果はDB poor-metabolizerに欠損しているP-450分子種がタバコ煙中の発がん物質を代謝的に活性化しているという我々の仮説を支持するものである。

## アトロピン投与によるラットハーダー腺の ポルフィリン量変化

岩井久和、玉置文一、田川義章、浅野謙司、早坂郁夫、  
小出政光

三和化学研究所 安全性研究所

代表的な抗ムスカリン剤である硫酸アトロピンをラットに13週間反復投与すると、ハーダー腺の拡張および上皮の変性が生じることを既に報告した。今回我々は、この病変がハーダー腺のポルフィリン量の変化によるのではないかと考え、アトロピン投与後のポルフィリン含量の検討を行った。

6週齢のSlc:SD系雄性ラット(1群5匹)に硫酸アトロピンの250mg/kg/day(10ml/kg)を強制的に単回経口投与し、投与2、6、12、18、24、30、36、42および48時間後に放血屠殺した。その後両側のハーダー腺を摘出し、重量測定後ポルフィリンの含量を測定するとともに、病理組織学的に検索した。また連続投与した際の変化をみるため、同量のアトロピンを3日間連続投与し、その24時間後に単回投与と同様の方法にてハーダー腺を検索した。なおポルフィリンの測定は、蛍光法(励起波長407nm、検出波長605nm)にて行った。

組織単位当りのポルフィリン量については、単回投与後2時間目より徐々に増加し、36時間目にピーク(2600 $\mu$ g/g、対照群;400 $\mu$ g/g)に達し、その後減少を示した。3日間の連続投与においてのポルフィリン量は、単回投与後のそれよりも高値(3700 $\mu$ g/g)を示した。単回投与および3日間の連続投与とも病理組織学的にハーダー腺では腺腔の拡張が認められ、拡張の程度はポルフィリン含量と相関していた。

以上より、硫酸アトロピン投与によるハーダー腺の拡張および上皮の変性は、腺腔内のポルフィリンの著しい貯留に起因していることが強く示唆された。

## ラットにプロピルチオウラシルを投与した際の甲状腺刺激ホルモンの上昇と肝機能との関連について

須藤 武、見上 孝、山津清實

エーザイ（株） 安全性研究部

ある種の酵素誘導剤はラットにおいて、甲状腺ホルモン（TH）の肝での異化・排泄を促進することにより、血中THレベルを低下させ甲状腺刺激ホルモン（TSH）を上昇させることはよく知られている。一方、プロピルチオウラシル（PTU:抗甲状腺薬）をラットに投与すると薬理作用により血中TH低下、TSH上昇が生じることは知られているが、これら血中ホルモン変動と肝機能との関連性について言及した報告は少ない。そこで今回、肝機能との関連性から検討したので報告する。

【材料および方法】SD雄ラットにPTUを12.5および25mg/kgを単回経口投与し、投与3および6時間後に採血を、また12および24時間後に採血・剖検を行い、血中TH（T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>）およびTSH量の測定、ならびに肝酵素誘導（24時間後のみ実施）および肝ホモジュネートによるT<sub>4</sub>の脱ヨード活性の測定を行った。

【結果および考察】血中T<sub>4</sub>値は、著明な変化は認められなかった。T<sub>3</sub>値は、12.5mg/kgの6時間後より有意な低下が認められ、24時間後では約1/2に減少していた。TSH値は、24時間後において12.5mg/kgより増加していた。一方、肝酵素誘導関連の変化に関しては、25mg/kg投与群においてMS蛋白量の軽度な増加が認められたものの酵素活性に変化は認められなかった。しかし、T<sub>4</sub>の脱ヨード活性は12時間後から12.5mg/kgから強く阻害され、24時間後もほとんど回復していなかった。PTU単回経口投与では、酵素誘導が認められず肝でのT<sub>4</sub>脱ヨード活性が阻害され血中T<sub>3</sub>値が低下したため、フィードバックにより血中TSH値が増加したと考えられた。なお、発表時には酵素誘導によるTH, TSHの変動との違いについても報告したい。

川西徹、畝山智香子、豊田和弘、朝生裕樹\*、高橋道人

国立衛生試験所・病理、\*昭和大学・薬学・薬理

化学物質による細胞傷害は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ホメオスタシス異常と密接に関係している可能性が指摘されて久しい。特に細胞質遊離  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) の上昇によって蛋白分解酵素、ホスホリパーゼ等が活性化された結果、細胞表面のプレビングが生じ、やがて細胞死に至るという仮説が提唱されている。この仮説を支持する例として  $\text{Ca}^{2+}$  イオノフォアによる細胞死があげられる。そこで今回  $\text{Ca}^{2+}$  イオノフォアであるイオノマイシンによる細胞死のメカニズムを検討したので報告する。

〔方法〕 コラゲナーゼ還流法によりラット肝細胞を単離し、コラーゲン塗布カバーガラス上で一晚培養した。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  は細胞内に Fura-2 をとり込ませ、その蛍光像を画像解析することによって測定した。

〔結果および考察〕  $10 \mu\text{M}$  のイオノマイシン添加直後に  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  は大きく上昇するが、3、4 分後にやや下降を示した。その後再び上昇し、小さなプレビングが観察されるに従いさらに上昇を示し、50分以内に70%以上の細胞で、細胞死を反映した細胞内 Fura-2 の急速な流出が観察された。一方栄養液に  $20 \text{mM}$  のフルクトースを加え、さらにイオノマイシンと同時に  $5 \mu\text{g/ml}$  のオリゴマイシンを添加すると、ほぼ同様な  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の変化が観察されたが、50分後においても Fura-2 を流出した細胞は20%以下に過ぎなかった。一方栄養液に EGTA を加えて細胞外遊離  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を  $100 \text{nM}$  以下に保ち、イオノマイシンを添加したところ、添加直後に  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の一過性の小さな上昇は観察されたが、その後の上昇および Fura-2 の流出は観察されなかった。以上の結果より、イオノマイシンによる肝細胞死は細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  に依存しているが、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の上昇とは直接関係していない可能性が示唆された。



角崎英志, 清宮健一, 松尾三郎, 暮部 勝

大阪府立大学・農・獣医・毒性

先に演者らは, adriamycin(ADR)によって惹起された腎毒性がBay K 8644(Bay K)によって軽減され, nicardipine(Nic)などのカルシウムアンタゴニストによって増強されることを報告した。今回はこの機序を解析する目的で, 豚近位尿細管上皮由来の株化細胞である LLC-PK<sub>1</sub>細胞を用いて, ADRの細胞内移行および細胞内分布に及ぼす  $Ca^{2+}$  channel modifiers, すなわちBay K, Nic, Verapamil(Ver), Diltiazem(Dil)の影響を調べた。ADR(10  $\mu$ M)添加後30分の細胞内移行を, Nic(10  $\mu$ M)は促進したが, Bay K(10  $\mu$ M), Ver(10  $\mu$ M), Dil(10  $\mu$ M)等の各薬物は顕著に影響しなかった。また, ADRの添加後30分の細胞内分布では, 核面分にtotalの約80%, ミトコンドリア面分に約10%が認められたが, 他の面分には殆ど認められなかった。このADRの細胞内分布に対してBay KおよびNicは顕著に影響しなかった。以上の結果より, ADRを腎細胞に適用した場合には, 核面分だけでなくミトコンドリア面分にもかなり分布し, ミトコンドリアにおける電子供与による活性酸素種産生や脂質過酸化に基づくミトコンドリア障害によってATP減少やLDH遊出などを伴う殺細胞作用が惹起されると考えられる。ADRの細胞内移行がNicの併用によって促進されたが, 他の $Ca^{2+}$  channel modifiersによって影響されなかったことから, ADRの細胞内移行への $Ca^{2+}$ の関与は少ないものと示唆される。また, ADRの細胞内毒作用部位と考えられる核やミトコンドリアへのADRの移行に対してBay KやNicが影響しなかったことから, ADRの腎毒性に対する両薬物の軽減や増強は作用部位へのADRの移行変化からは説明できないものと考えられる。

清宮健一・松尾三郎・暮部 勝

大阪府立大学・農・獣医・毒性

演者等は、アスコルビン酸（AA）には正常細胞よりも癌細胞に対して、特異的な殺細胞作用のあることを報告し、更に、その理由として、AAの受動拡散による細胞内への移行が正常細胞と比較して、癌細胞では非常に高いことに基づくと説明した。今回は、AAの細胞特異性に細胞内移行が原因するか否かについて、更に検討するために、AAより脂溶性が高く、膜透過性が高いと考えられるL-ascorbic acid 6-palmitate (Asc-P) を用いて、癌細胞と正常細胞とで毒作用の細胞特異性について評価し、AAのそれと比較検討した。癌細胞としてマウスリンパ性白血病細胞L1210を、正常細胞としてブタ腎近位尿細管上皮由来の株化細胞LLC-PK<sub>1</sub>を用いた。癌細胞および正常細胞に及ぼすAsc-Pの細胞増殖抑制作用は、細胞生存率低下やLDHの遊離増加を伴う、主として殺細胞作用に起因した。AAは、癌細胞のみに殺細胞作用を惹起した。Asc-Pの殺細胞作用発現濃度は、癌細胞では約5~10 $\mu$ M、正常細胞では約50~100 $\mu$ Mであり、AAと比較して癌細胞では1/10以下の低濃度で殺細胞作用が発現したが、正常細胞に対する殺細胞作用も認められ、癌細胞特異性はAAよりも低かった。Asc-Pの殺細胞作用発現時間は、AAよりも速やかであった。Asc-Pの殺細胞作用は、AAと同様に細胞内活性酸素種産生の亢進を伴わなかった。以上の結果から、AAの殺癌細胞作用の特異性発現には、AAの細胞内移行性が重要な要因であると示唆される。また、AAの殺癌細胞作用には、AAの細胞質への高濃度分布に基づく、AAラジカル形成以外の細胞内作用機序が考えられるので、更に解析する必要がある。

ラット肝臓に及ぼすデヒドロエピアンドロステロン  
(DHEA)の長期間投与の影響田村 浩<sup>1</sup>, 林 文彦<sup>1</sup>, 山田 純司<sup>1</sup>, 岩館 克治<sup>2</sup>, 酒井 孝範<sup>3</sup>,  
粟田 則男<sup>3</sup>, 須賀 哲弥<sup>1</sup><sup>1</sup>東京薬大, <sup>2</sup>新薬開発研究所・病理, <sup>3</sup>鐘紡(株)薬品開発研

【目的】 ペルオキシゾーム増殖薬(PP)は“non-genotoxic”な発肝癌性物質である。この種の薬物には脂質低下薬やプラスチック可塑性など様々な化合物が含まれている。近年、ステロイドホルモンのひとつであるデヒドロエピアンドロステロン(DHEA)がペルオキシゾームの増殖およびペルオキシゾーム関連酵素活性の誘導を引き起こすことが明らかにされ、DHEAは新たなPPとして注目されている。しかし、この化合物を長期間投与したときの肝臓に及ぼす影響はまだよくわかっていない。そこで今回、我々はDHEAを長期間投与したラット肝臓を用いて肝臓に及ぼすDHEAの影響を検討した。

【方法】 F-344雄性ラットを用いてDHEA(0.5, 1%)を30週間まで混餌自由摂食させ、その肝臓を用いてペルオキシゾーム関連酵素活性、グルタチオン関連酵素活性の測定および組織学的な観察を行った。また、DHEA投与時の血清中のGOT, GPTおよびLDHレベルを測定した。

【結果・考察】 DHEAを30週間まで投与したときの血清中のGOT, GPTおよびLDHレベルはいずれの投与群においても増加していなかった。10週間および30週間DHEAを投与した場合に0.5%投与群では肝組織には異常は認められなかったが、1%投与群では肝細胞の変異増殖巣が認められた。またペルオキシゾーム $\beta$ 酸化活性は投与10週間で0.5, 1%それぞれ4倍, 8倍に上昇しており、その活性上昇は30週間投与した場合でも維持されていた。さらにグルタチオン関連酵素活性は著しく低下していた。このことからDHEAは典型的なペルオキシゾーム増殖薬と同様な性質を持っている可能性があると考えられるが、現在さらに長期間の投与実験を進行中である。

○相良 奈美、宮本 恵美、山口 文恵、古濱 和久、高山 敏

第一製薬 (株) 開発研究所 安全性研究センター

従来から血液毒性の評価は、骨髓中の細胞数、myelogram あるいは末梢血中の各種細胞数の測定により行なわれている。しかし、近年ヒトやマウスでは、骨髓機能をより詳細に把握するため、しばしば造血幹細胞の培養法が用いられている。そこで、本法の毒性試験への導入を目的として、ラットでの造血幹細胞培養法を検討したので報告する。

7 週齢の雌 Fischer 344 ラットを使用した。まず、造血幹細胞の顆粒球・マクロファージ系前駆細胞 (CFU-GM) と赤血球系前駆細胞 (CFU-E) の培養法および全ての前駆細胞を含む多能性造血幹細胞 (CFU-S) の測定法の条件を検討した。次に、サイクロフォスマイド (CY : 5 mg/kg PO、単回) による白血球減少あるいは瀉血 (2 ml/rat) による貧血モデルを用いて、経時的 (処置 6 時間から10日間) に採取した骨髓の CFU-GM あるいは CFU-E、myelogram、末梢血中の赤血球数、白血球数および hemogram を測定した。その結果、CFU-GM はラット脾細胞 Con A 刺激上清を CSF として、CFU-E はヒトエリスロポエチンを刺激因子として、メチルセルロース半流動培地上のコロニー数を、また、CFU-S は 800 R の X 線照射したラットに  $2 \times 10^6$  個の骨髓細胞を静脈内投与し、14 日後の脾臓のコロニー数を測定することで可能となった。CY 投与では CFU-GM が投与 6 時間目に顕著に低下し、その後、投与 2 日目をピークに増加した。一方、末梢好中球数は投与 1~2 日目に低下し、CFU-GM の変化が明らかに先行して観察された。瀉血による貧血においては、CFU-E の変化と末梢赤血球数の変化が平行して観察された。

以上の結果、造血幹細胞の培養法はラットにおいても血液毒性の早期評価のよい指標となり、また詳細検討に有用な方法であると考えられた。

小倉剛、野口規子、久保田薫、小倉昌子、鈴木雅実、  
田村博志、松本清司\*

中外製薬(株)・安全性研究所、信州大学・医学部\*

【目的】近年、抗Bromodeoxyuridine(BrdU)モノクローナル抗体を用いて、DNA合成期(S期)にある細胞が容易に同定できるようになった。今回、薬物の骨髄に対する影響を細胞動態の面から詳細に検索する目的で、従来の骨髄検査に本法を加えて骨髄毒性の検討を行った。

【方法】5-FU(100mg/kg, s. c.)、7-チオフラジリン(AZP:100mg/kg, p. o.)あるいはフィロリジン(PHZ:20mg/kg, s. c.)をSlc:SD系雄ラットに1回投与し、0, 1, 2, 4, 7および14日目の剖検前に骨髄細胞動態を検索するため、BrdUを静注した。その後、常法通り骨髄塗抹標本を作製し、抗BrdUモノクローナル抗体を用いたABC法による免疫組織化学的染色を行い、赤芽球と顆粒球系細胞のBrdU Labeling Index(Ebl-LIとGra-LI)の算出を行った。また、同時に血液および骨髄検査を実施した。

【結果と考察】5-FU: 骨髄の抑制時には赤芽球数(Ebl)および顆粒球系細胞数(Gra)が減少し、同時にEbl-LIおよびGra-LIが低下した。回復時には、Ebl-LIとGra-LIの上昇がみられた後にEblとGraの増加が認められた。AZP: EblおよびEbl-LIは5-FUと同様に变化したが、顆粒球系細胞については、Graは減少したがGra-LIの低下はみられなかった。PHZ: Eblの増加がみられたがEbl-LIは変化しなかった。

このように、薬物の作用機序の相違により、各骨髄細胞数とS期細胞比率の増減は必ずしも平行に変動しないこと、ならびにS期細胞比率の低下パターンが赤芽球と顆粒球系細胞で異なることから、両細胞系の薬物に対する細胞動態面での反応が異なることが示された。以上、本法と骨髄検査の同時実施により、細胞動態を含めた詳細な骨髄毒性の検索が可能になると考えられた。

## 長期毒性試験の血液学及び血液生化学的検査におけるヒストグラム及びレーダーグラムの有用性について

野口 孝義、伊川 直樹、石川 寛明、武 信、中山 栄基、  
松島 泰次郎

日本バイオアッセイ研究センター

長期毒性試験の場合、血液学及び血液生化学的検査データは、自然発生的病変等により、対照群のデータにおいてもかなりのばらつきを生じやすく、また大きく外れた値があった場合には平均値も偏差も大きくなってしまい、通常使われている検定法（ $t$ 検定等）では変化を明確に把握することは難しい。

そこで我々は、過去に行なったF344/DuCrj(Fischer)ラット及びCrj:BDF<sub>1</sub>マウスの104週間試験のヒストリカルコントロールデータを集めてヒストグラムを作成し、各ヒストグラムの一番度数の多かった等級を0として、ヒストグラムを等級に置き換えた。

そして、上記の等級を基にして、ラット及びマウスを用いた四塩化炭素の癌原性試験の血液学及び血液生化学的検査の個別データを等級に置き換え、平均値を算出し、一つの表に全群の変化を表わすことができるレーダーグラムを作成した。また、当該試験の血液学及び血液生化学的検査データのヒストグラムも作成し、合せて四塩化炭素の毒性を検索した。

四塩化炭素の毒性については、まず第一に肝臓への影響が考えられるが、ヒストグラムやレーダーグラムからもGOT、GPT、LDH等の活性が上昇していることが一目でわかり、さらに尿素窒素の増加、赤血球パラメータの変化等が見られ、四塩化炭素の肝臓、腎臓や赤血球系への影響等が確認された。

このように、数値データを等級に置き換えて、グラフ化することにより、視覚的にもより明確な情報を得ることができた。

一般演題

平成4年7月23日(木)

第3会場

演題番号301-311

○樫田陽子、高橋裕詞、西澤理江、古濱和久、高山敏

第一製薬株式会社 開発研究所 安全性研究センター

マンガン (Mn) の肝毒性については広く検討されているが、投与経路の違いによる毒性発現と臓器内 Mn 濃度との関連についての報告は少ない。そこでラットに MnCl<sub>2</sub> を静脈内 bolus、点滴投与及び腹腔内投与し、その肝毒性発現と血清及び肝中 Mn 濃度との関連性を調べた。

実験には7週齢の雄 Slc:SD ラットを用い、MnCl<sub>2</sub> の 0.1, 0.2, 0.4 及び 0.8 mmol/20ml saline/kg を尾静脈内 bolus (投与速度 2 ml/min.)、点滴投与 (投与速度 3 ml/hr.) 及び腹腔内投与した。ラットは投与 1-48 時間後まで経時的に屠殺した。肝障害の指標としては、血清生化学的検査及び肝の病理学的検索 (光顕、電顕) を行い、また、得られた血清及び肝組織を前処理 (血清は希釈後濾過、肝は酸・熱分解し希釈後濾過) し、誘導結合プラズマ発光分光分析法にて Mn 濃度を測定した。

静脈内 bolus 投与では、致死量と肝毒性発現用量との範囲が狭く (0.4 mmol/kg 以上の投与により投与直後死亡)、明かな肝毒性を惹起することはできなかった。静脈内点滴投与では 0.4 mmol/kg 群から、投与終了後 6-24 時間後をピークとして血清 GOT 及び GPT の顕著な上昇がみられ、組織学的に肝細胞壊死、炎症性細胞浸潤が観察された。肝中 Mn 濃度は、初期濃度は高いものの急速に減少し、投与 24 時間後にはほぼ正常レベルに復した。腹腔内投与では、0.2 mmol/kg 群から肝障害が観察され、肝 Mn 濃度は緩徐に減少した。特に 0.4 mmol/kg 以上では 48 時間後も高値を示していた。なお血清 Mn 濃度は点滴及び腹腔内投与とも、投与 24 時間後にはほぼ正常レベルまで減少し、肝毒性との関連は明かではなかった。

Mn の肝毒性について、静脈内点滴投与と腹腔内投与を比較すると、腹腔内投与では約 2 倍の肝毒性を誘発し、肝中 Mn もこれと相関して貯留していた。Mn の肝毒性発現には一過性の肝中 Mn 濃度の高値よりも持続的な暴露が関係するものと推測された。



## 塩化カドミウムが卵巣摘出ラットの血液および尿検査値に及ぼす影響

○豊田 直人<sup>1)</sup>, 勝田 修<sup>1)</sup>, 平塚 秀明<sup>1)</sup>, 松本 順子<sup>1)</sup>, 梅村 孝司<sup>2)</sup>( 三菱化成安科研<sup>1)</sup>, 鳥取大<sup>2)</sup> )

カドミウムの長期暴露によって腎尿細管障害を主とした様々な毒性変化が発現することが知られている。我々は、第111回日本獣医学会において卵巣摘出ラットを用いるとカドミウムの腎毒性が増強されることを報告した。今回、この実験モデルを用いて13週間反復投与を行い、カドミウムの血液学的・血液生化学的検査および尿検査値に及ぼす影響について若干の知見を得たので報告する。

<材料および方法> 卵巣摘出ラット54匹を3群に分け、7週齢時から生理食塩水に溶解した塩化カドミウムを尾静脈内に13週間反復投与した。投与量は、1.0および2.0 mg/kgとし、生理食塩水のみを対照群を設けた。投与開始4、8および13週後に各群6匹をペントバルビタール麻酔下で後大静脈より採血し血液検査に供した。また、13週投与終了前に約12時間採尿を行い尿検査に供した。

<結果および考察> 尿検査において、尿中NAGが約2倍、尿中 $\gamma$ -GTが約20倍以上に増加した。また、血液生化学的検査において、投与4週以降GOT, GPT, 投与8週以降 $\gamma$ -GT, ALPの上昇がみられた。さらに、血液学的検査において、投与8週以降RBC, Ht, Hb, MCV, MCHの減少, Retの増加, 赤血球大小不同および奇形赤血球の出現, PLTの増加および形態異常, 白血球分画でSeg(%)の増加, Lym(%)の減少がみられた。

以上の結果より、カドミウムの毒性変化として尿中酵素の増加がみられ、腎尿細管障害に伴うものと考えられた。特に、尿中 $\gamma$ -GTの増加が著しく、この酵素が多く存在する腎皮髄境界部の障害が考えられた。また、血中酵素の上昇から肝障害が示唆された。さらに、血液学的に造血系(骨髄)に対する障害が疑われた。

友国勝磨

佐賀医科大学地域保健科学教室

鉛を投与したラット・マウスにおいて、尿中に排泄される $\delta$ -アミノレブリン酸（ALA）並びにコプロポルフィリン（CP）量に種属差が認められるか否かを検討し、鉛によるポルフィリン代謝異常発現の種属差に関連したデータの蓄積を図る。

方法：およそ15週齢の雄性Wistarラット及びddYマウスに、500 ppmの鉛を含む飲水（酢酸鉛より調製）を4週間自由に摂取させ、その間定期的に採血、採尿を行い、血中鉛（Pb-B）、尿中ALA及び尿中CPを測定し、得られたデータをラット、マウス間で比較した。

結果：鉛の体内吸収量の指標として用いられているPb-Bは、投与1週間目のラットにおいて45-50 ug/dlとなり、このレベルは投与期間中ほぼ一定であった。投与期間中のPb-Bレベルはマウスにおいてもラットと同程度であった。尿中ALAは、投与1週間目のマウスにおいて著明な排泄増加を示し、その値は投与前の8-10倍に達し、投与期間中ほぼこのレベルが維持された。一方、尿中CPについては投与期間中、有意な排泄増加は全く認められなかった。ラットの尿中ALA排泄量は、投与1週間目においてマウスと同様に有意な増加を示したものの、その程度はマウスに比べて極端に小さかった（投与前の2倍程度）。一方、ラットの尿中CPはALAと同様に、投与1週間目において2倍程度の排泄増加を示し、マウスの結果とは異なっていた。この様に、同レベルの鉛暴露を受けてもラットとマウスの間で、尿中ALA及びCPの排泄動態に著明な差があることが判明した。この機序については検討中である。

昇汞によるラット十二指腸粘膜、腎皮質の酵素系急性  
阻害とDMPSによる改善

鈴木史郎、丹羽修\*、高村省三、杉木圭吾、今井昌夫

金沢医科大学薬理学教室、\*同附属病院薬剤部

ラット十二指腸粘膜、腎皮質の細胞質炭酸脱水酵素 (CA)、刷子縁の  $Mg^{2+}$ -依存性、 $HCO_3^-$ -賦活性 ATPase、腎ミクロゾームの  $Na^+$ - $K^+$ -ATPase 活性に及ぼす  $HgCl_2$  ( $Hg$  1-3 mg/kg/day) の急性毒性と 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonate sodium (DMPS) の同時併用による改善効果を調べた。

十二指腸粘膜、腎皮質のホモジネート、細胞質の CA 活性はいずれも  $Hg$  3 日間連続皮下投与により用量依存的に減少し、特に十二指腸粘膜細胞質では 3 mg  $Hg$  投与により対照の 43% となった。刷子縁  $Mg^{2+}$ - $HCO_3^-$ -ATPase 活性は 3 mg  $Hg$  により十二指腸で対照の 51%、腎皮質では 68% に減少した。腎ミクロゾームの  $Na^+$ - $K^+$ -ATPase 活性は 3 mg  $Hg$  で 55% に減少した。動物死亡率は 2 mg  $Hg$  で 16%、3 mg  $Hg$  で 37%、4 mg  $Hg$  で 100% であった。血中尿素窒素 BUN 濃度は 2 mg  $Hg$  で対照の 8 倍であった。

上記の  $Hg$  による酵素阻害は DMPS 20 または 30 mg/kg/day、i.p. 併用投与により用量依存的に改善され、正常レベルに回復した。BUN も 30 mg DMPS で正常に回復した。DMPS の単独投与は上記指標のいずれにも影響しなかった。

DMPS は水溶性で BAL の誘導体である。  $Hg$  との併用による酵素活性の改善はそのキレート作用によるものと考えられる。本実験で調べた酵素に関しては、 $Hg$  に酵素特異性、臓器特異性はなかったが、十二指腸粘膜は腎尿細管よりも  $Hg$  に対しより敏感な組織と考えられる。

林泰司, 鈴江敏彦, 曾山桃子, 照井潤, 深田真, 須藤純一, 田辺恒義

東日本学園大学薬学部毒理学講座

〔目的〕 塩化カドミウム ( $CdCl_2$ ) ならびにカドミウム結合メタロチオネインの血液毒性を調べる目的で、ラットにニヤらの物質を投与し、以下の結果を得た。

〔方法〕  $CdCl_2$  を、7日間、 $3\text{ mg/kg}$  体重で投与したラットより、肝を摘出し、その肝よりMT-IおよびMT-IIを精製した。得られたMT-IおよびMT-IIをCdで飽和し、Cd-MT-IおよびCd-MT-IIを得た。ラットに $CdCl_2$ , Cd-MT-IおよびCd-MT-IIを、0.1, 0.3, ならびに $1.0\text{ mgCd/kg}$  体重で尾静脈より単回投与し、投与後1および5日目に採血し、血液学的検査を行った。

〔結果〕  $CdCl_2$  を投与した群では、投与後1および5日目においては、著しい変化は認められなかった。しかしながら、Cd-MT-IおよびCd-MT-IIを投与した群においては、投与後1日目に白血球の増多および血小板の減少が用量依存的に認められ、投与後5日目ではニヤらの変化が正常値に復するのが認められた。また、赤血球に関する諸検査では、 $CdCl_2$ , Cd-MT-IおよびCd-MT-IIのいずれの群でも、投与後1および5日目ではなんらの変化も認められなかった。

〔考察〕 本実験において認められたCd-MT-IおよびCd-MT-IIによる血小板の減少に関して、それがCd-MT-IおよびCd-MT-IIによる直接作用に依るのか、骨髓での血小板の産生系の抑制に依るのか、あるいは、体内での出血に起因する血小板の消費に依るものなのかに関しては不明であり、また、同時に認められた白血球の増多に関しても、そのメカニズムは不明である。

ユーロピウム及びガドリニウムのラットにおける  
28日間反復経口投与毒性試験について(La・Yとの比較)

○小川幸男, 鈴木幸子, 内藤克司, 齊藤 実, 広瀬明彦  
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

先端技術産業において種々の機能性材料に用いられている希土類元素の, 亜急性毒性についての情報は皆無である. 前回のランタン及びイットリウムに引き続き, ユーロピウム及びガドリニウムを用いて, これらの塩化物の28日間反復経口投与毒性試験を行った.

[実験方法] 5週齢の Slc:Wistarラット雌雄を用いて塩化ユーロピウム6水和物( $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )(Eu)及び塩化ガドリニウム6水和物( $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )(Gd)のそれぞれ, 0(対照群), 40(L群), 200(M群)及び1000(H群) mg/kgを 28日間強制経口投与した. 0及び1000mg/kgの回復群を別に設けた. 臓器中の La, Yおよび必須元素の分析はICP-AES(Thermo-Jarrel Ash)及びICP-MS(横河電機)を用いて行った.

[結果] La・Yの H群及び制限給餌群と同様に, Eu・Gd投与の雌雄のH群で体重増加抑制が認められた. La・Yと同様に, Eu・Gd投与の雌雄のH群で血清のTPの減少, 前胃の過角化症, 粘膜下織に好酸球の浸潤, 雌のH群で血清ChEの減少が認められた. Eu・Gd投与の雌雄のH群で血清のFeの増加が認められた. La投与の雌雄のH群で血清ALT, AsTが増加したが, Yと同様 Eu・Gd投与でこの増加は認められなかった. また, 肝臓に病理学的な変化は認められなかった. 必須元素の分析においても La・Yと同様に, Eu・Gd投与の雌雄の肝臓及び脾臓中のFe及び骨中のBa, Sr濃度の低下が認められた. また Eu, Gdは La, Yと同様に, 投与用量に依存した濃度で肝臓・腎臓・脾臓及び骨中より検出され, Laは肝臓, Yは腎臓及び骨, Eu, Gdは肝臓・腎臓及び骨に多く蓄積し, 3つの異なった蓄積パターンを示した.

本研究の一部は, 環境庁国立機関公害防止等試験研究費で行った.

○伊東 悟、服部 千春、松浦 由美子、島田 弘康

第一製薬株式会社・開発研究所安全性研究センター

金属化合物の中には *in vitro* で変異原性を示すものが多く知られており、動物での発癌性試験あるいはヒトでの疫学的調査からその発癌性が疑われているものも多くある。金属化合物のバクテリアあるいは培養細胞を用いた変異原性試験に関しては多くの報告がなされているが、動物個体を用いた検討に関してはあまり報告されていない。

我々は昨年の学術年会において、クロム ( $K_2CrO_4$ ) およびセレン ( $H_2SeO_3$ ) がマウス骨髄細胞において顕著に小核を誘発し、*in vivo* においても染色体異常誘発作用を示すことを報告した。そこで今回は近年開発されたトランスジェニックマウス (Muta<sup>TM</sup>Mouse) を用いた試験により、両化合物の *in vivo* での遺伝子突然変異誘発作用について検討した。

$K_2CrO_4$  および  $H_2SeO_3$  を雄性 Muta<sup>TM</sup>Mouse (細胞当たり80コピーの  $\lambda$ gt10LacZ 遺伝子を持つ) に24時間間隔で2回腹腔内投与し、最終投与後7日目に各種臓器を採取した。骨髄と肝臓から DNA を抽出し、*in vitro* パッケージング法により  $\lambda$ gt10LacZ 遺伝子をファージ中に回収した。これを *E. coli*/LacZ<sup>-</sup> 株に感染させ、X-Gal とともに培養し、プラークを形成させた。青色の正常プラークに対する無色あるいは薄青色の mutant プラークの出現頻度を求めた。なお、投与されたマウスの骨髄細胞での染色体異常を確認するために、最終投与後24時間目に尾部より微量採血し、末梢血法により小核の出現を観察した。

最終投与後24時間目における末梢血中の小核出現率は、 $K_2CrO_4$  および  $H_2SeO_3$  とともに顕著に上昇しており、両化合物が Muta<sup>TM</sup>Mouse の骨髄細胞に対しても染色体異常誘発作用を示すことが確認された。一方、遺伝子突然変異は、両化合物とも骨髄細胞では自然突然変異頻度と同程度であったが、肝臓では2~3倍程度高い値を示した。両化合物の *in vivo* における染色体異常および遺伝子突然変異誘発作用について考察する。

## (1) 成長に伴う分析値の変化と去勢による影響

山田久陽, ○杉浦正幸, 村上美穂子, 大津結実子  
大島隆, 中根貞雄

大正製薬(株) 総合研究所 安全性研究室

尿定量分析は腎障害検出のための簡便かつ鋭敏な方法と考えられており、薬剤による腎毒性評価法として広く取り入れられている。しかし、我々が毒性試験で用いるラットには尿分析値に性差がみられることが報告されているため、汎用する測定項目について性差を検討することは、尿分析値の評価・解析の上で重要と考えられる。そこで今回、雌雄のWistar系ラットを用いて5～22週齢の期間、経日的に尿を採取し尿分析値を比較した。なお、値は総排泄量と体重当たりの排泄量の双方で比較検討した。また別に雌雄ラットを7週齢時に去勢し、性ホルモン尿分析値に及ぼす影響についても検討した。正常ラットにおいて総排泄量及び体重当たりの排泄量の双方に、顕著な性差がみられたのは、総タンパク、アミノ酸、 $\gamma$ -GTP、LAP及びCaであり、Ca以外の項目は雄で高値を示した。このなかで総タンパク、アミノ酸、 $\gamma$ -GTPならびにLAPは雄の比較的早期(5～9週齢)に急激な増加が認められた。雄における精巣摘出後の分析値の変化は、開腹のみを施した雄と比較して、総タンパク、アミノ酸、グルコース、 $\gamma$ -GTP、LAP、ALP及びLDHに明確な減少が認められ、腎組織においてEosinophilic Bodyの減少も観察された。一方、雌における卵巣摘出後の変化は、総タンパク、アミノ酸で顕著な増加、 $\gamma$ -GTPで減少が認められた。今回の実験から、ラットにおいて総タンパクをはじめとする幾つかの尿分析値に明かな性差が認められた。また、雌雄の去勢により尿分析値に変動が認められたことから、性ホルモン依存性の尿分析値が存在することが明かとなり、毒性試験での尿分析値の評価・解析にあたっては、性差あるいは薬剤の生殖器への影響をも考慮する必要があると考えられた。

○玄番宗一、中田文代、藤田恵子、福石信之

大阪薬科大学 第二薬理

[目的]薬物などの化学物質による腎障害のインビトロ評価系として、培養細胞の有用性が考えられている。制癌剤シスプラチンによる腎細胞障害について、株化された培養腎上皮細胞種を用いて検討した。

[方法]ブタ腎由来のLLC-PK1、イヌ腎由来のMDCK、およびラット腎由来のNRK-52E細胞を用い、細胞からの酵素の遊離などを指標としてシスプラチン障害を調べた。

[結果と考察]ラットが実験動物として繁用されていることや取り扱いの容易さから、まずNRK-52Eを用いた。シスプラチンは、添加後の時間とその濃度に依存して、LDH遊離を増大させた。コンフルエンス後に添加すると、継代時添加の場合よりも10倍以上のシスプラチン濃度を必要としたことから、細胞周期により、シスプラチンに対する感受性が著しく異なるといえる。シスプラチン障害は、SODやアスコルビン酸で軽減されたことから、フリーラジカルの関与が示唆された。シスプラチンによる過酸化脂質の増大は、この示唆を確かにしたが、GSH量も増大した。シスプラチンによるこのようなGSH量の増大と細胞障害の関わりは不明である。次に、細胞株間におけるシスプラチンへの感受性について検討した。シスプラチン障害に対して、LLC-PK1は最も鋭敏であり、次いでNRK-52Eであったが、MDCKは感受性を示さなかった。この感受性の順は、各細胞株へのシスプラチン取り込み量の順と一致した。腎近位尿管様の性質を有するLLC-PK1のシスプラチンに対する易感受性に、その高取り込み能が関与するのかもしれない。



肥後伸一郎，鈴木雅実，松下智哉，萬啓悟\*，渡辺利彦\*  
田村博志

中外製薬(株) 安全性研究所，\* (株) C S K リサーチパーク

プリン塩基であるアデニンは、ラットへの長期間混餌投与において、2,8-ジハイドロキシアデニン結晶の腎尿細管や間質への沈着により慢性腎不全を惹起することが報告されている。今回、腎障害モデルの背景データを得る目的で、短期間投与による腎障害の誘発を試み、さらにその後の推移を経時的に観察した。

【方法】4週齢のSD系ラットに、アデニンの2用量（300，450 mg/kg）を2週間強制経口投与し、投与終了時、投与終了後2，4，6週に尿、血液、血清生化学および病理学的検査を実施した。

【結果および考察】投与終了時には、尿比重の低下を伴う尿量増加、血中Cr、BUNの上昇など腎障害を示す変化が用量依存性に認められ、著しく腫大した腎臓には、尿細管や間質への結晶沈着、尿細管上皮の変性ならびに再生などが組織学的に観察された。この他、血清生化学検査で $\gamma$ -GTP、脂質系パラメータの上昇、血液検査で白血球数の増加、赤血球数の減少が認められた。投与終了後、尿量、血中Cr、BUNは、回復傾向を示したものの高値のまま推移し、腎臓には、結晶沈着と一部に尿細管萎縮を伴う間質結合織の増生などが用量依存性に観察された。また、他のパラメータについては、赤血球数の減少が引き続き認められた以外ほぼ正常に復した。

以上、投与量により腎障害の程度や継続期間に差がみられ、また腎障害を示す変化が比較的長期間継続することより、短期投与によっても投与量の調節により長期間腎障害が継続するモデルを作出できると考えられた。なお長期観察を継続しており、これらの結果も併せて報告する。

車 碩 編、細山田 真、遠藤 仁

東京大学医学部薬理学教室

全身麻酔に用いるハロゲン化エーテル系麻酔薬の中で methoxy-flurane (MF) は多尿を主症状とする急性腎不全が知られており、その作用は MF から遊離されるフッ素イオン ( $F^+$ ) と考えられているが確定的な証拠はない。そこでこの MF の腎作用を解明することを目的に以下の実験を行った。

SD系雄性ラット腎より抗利尿ホルモン受容体の存在する髓質部集合尿管 (OMCT) を単離し、MF存在及び非存在下に arginine vasopressin (AVP) の細胞内遊離カルシウム ( $[Ca^+]_i$ ) の上昇と cyclic AMP (cAMP) の変化をそれぞれ Fura-2AM と RIA法を用いて測定した。

MFは  $10^{-8}M$  単独では  $[Ca^+]_i$  の基礎値をわずかに上昇させるが、その6分後に  $10^{-7}M$  AVP を加えると AVP単独では認められる  $[Ca^+]_i$  の一過性上昇が完全に抑制された。又 AVPや forskolin により OMCT細胞の cAMP は著明に増大するが、MF の前処置によりこの上昇も著しく抑制された。この MF の作用が従来言われている  $F^+$  によるものか否かを確認する為に十分量 ( $10^{-6}M$ ) の  $F^+$  で OMCT を前処置しても AVPによる  $[Ca^+]_i$  の一過性上昇は認められた。又ハロゲン化エーテル系で多尿を生じさせない sevofarane, enflurane 及び isoflurane では MF のような作用が認められなかった。

以上の結果より、MFの多尿は MF から遊離される  $F^+$  により AVP 作用が阻止されるのではなく、MF自体による膜作用、特に adenylate cyclaseの阻害により、AVP 作用が発現できなくなって多尿をきたすものと考えられた。

一般演題

平成4年7月23日(木)

第4会場

演題番号401-411

日本製薬工業協会 基礎研究部会  
○成田裕保<sup>1</sup>、赤池雅司<sup>2</sup>、植村昌平<sup>3</sup>、  
佐藤利和<sup>4</sup>、早川政兼<sup>5</sup>、高山敏<sup>6</sup>

<sup>1</sup>日本レタリー、<sup>2</sup>ヘキストリヤハソ、<sup>3</sup>スミスクライノビークヤム、  
<sup>4</sup>大鵬薬品、<sup>5</sup>三井製薬、<sup>6</sup>第一製薬

日本の生殖・発生毒性試験指針は1975年以降、Seg. II および SEg. III 試験に出生児成長および発達（形態機能および行動）に関する検査が盛り込まれているが、現状では、確立された検出方法がなく、各施設が様々な方法を用いて評価している。今回、日本製薬協基礎研究部会第五分科会は過去約10年間に国内で報告された生殖・発生毒性試験（Seg. II, Seg. III）の次世代児の行動検査と他の検査結果との関連性について調査した。

5雑誌、671報を調査対象とした。何等かの影響が見られた場合の検査法、他の検査では影響が見られたか否か、考察と結論について精査した。

671報中何等かの影響が見られたのは25報であり、抗腫瘍剤9、抗炎症剤4、その他12報であった。陽性の検査結果が得られた検査法としてはOpen field testが最も多く、次いでwater maze test, 反射試験、rota rod test等であった。また、同時にこれらの試験では出生児の発育抑制、新生児死亡、催奇形性がみられていた。

これらの変化について最も多い結論は成長抑制にともなう二次的变化を原因とするものであった。

以上の調査結果は陽性の結果が特定の薬効群に限定されるものではないことを示唆しているが、各著者の結論の多くは生後の成長抑制等が原因であり行動への影響はそれらに基づく二次的なものであると結論づけている点は見逃せない。

○尾根田暁 伊原敏夫 池水智博 福田浩一 永田良一

株式会社 新日本科学

サルは初期の個体発生、胎盤の構造および生殖生理がヒトに近似しており、また、サリドマイドの催奇形作用に対し、高い感受性を示すなど、催奇形性試験における有用性は既に周知の通りである。演者らは、カニクイザルを用いた催奇形性試験において、一般的な早期妊娠診断法であるラット排卵誘起法（以下ROT）を用いたMCGのバイオアッセイに加え、超音波診断装置（以下USD）による妊娠診断および胎児生存確認を実施している。USDによる早期妊娠診断の成績をROTと比較すると共に、胎児発育のモニタリング成績を検討した。

1. 妊娠18日にUSDを実施し、同時に妊娠17～18日の尿を用いてROTを実施した。その結果、ROTに比べUSDでは高い診断率が得られた。
2. USDによる胎児心拍は、妊娠25日ではほぼ100%確認可能であった。
3. 胎児死亡例では、性器出血より以前に胎児心拍停止を確認できた。従って、流産および胎児死亡の有無を判別するのに有効な手段と思われた。
4. USDによる所見と胎児摘出標本とを比較した結果、USDによる胎児の発育状況の検討が可能であった。

以上の結果から、サルを用いた催奇形性試験での超音波診断装置の有用性について発表する。

田中政巳、増渕美子、渡辺 実、平井正直

聖マリアンナ医科大学 薬理学教室

「目的」女性の生殖系に対するindomethacin(Indo)の作用は、prostaglandins(PGS)抑制、排卵抑制および卵巣に対する子宮効果の抑制等が知られている。今回、Indoの毒作用と卵巣機能に対する作用をsteroidogenesisの面から、in vivo、in vitro で調べた。

〔方法〕Wistar雌ラット7～8週齢を用いた。In vivo 実験は、proestrus ラットにIndo(1mg/0.3ml, saline/rat/day)を24時間間隔で4回午前9:30に肩甲間部皮下に投与し、2時間後に断頭した。In vitro 実験は、卵巣を0.01M Tris-HCl buffer(pH7.4)で30分、pre-incubation後、Indo(1mg)を添加、37℃、180分(150 times/min) incubationした。各steroidsはRIA および硫酸蛍光法で定量した。

〔結果〕In vivo 実験；Indo投与群は体重が有意低値、比体重で副腎、脾臓は有意高値、又、胸腺重量およびHematocrit値は有意低値を示した。全動物は断頭時に腔smear がdiestrusを示し、卵管内排卵数は高値傾向、卵巣は貧血様色調を示した。卵巣内estradiol( $E_2$ )、 $\Delta^4$ -androstenedione( $\Delta^4$ -A)有意低値、progesterone(Po)、testosterone(To)に有意変化なかった。Plasma中corticosteroneは有意低値を示した。In vitro実験；Indo添加によるsteroids生合成はTo、 $20\alpha$ -OH-Po有意高値、 $E_2$ 低値傾向、Poに変化なかった。

〔考按と結語〕In vivo でIndo投与ラットはpersistant diestrusを示し、卵巣 $E_2$ 、 $\Delta^4$ -A は有意低値、体重、胸腺、Ht値有意低値、脾、副腎重量有意高値で貧血像が見られた。一方、in vitroでIndo添加はTo、 $20\alpha$ -OH-P 有意高値、 $E_2$ 低値傾向を示した。以上、Indoは毒作用を示し、卵巣機能障害hypogonadism誘発が示唆された。

渡辺 実、増淵美子、田中政巳、平井正直

聖マリアンナ医科大学 薬理学教室

〔目的〕前立腺癌squamous cell carcinomaの発育成長が顎下腺摘出或はketoconazole(Keto)投与で抑制されることを報告した。今回健常ラット(Int)にKeto投与或は顎下腺摘出による前立腺前葉、精巣および内分泌近縁臓器重量と精巣steroidsへの影響を調べた。

〔方法〕Donryu雄ラットを60日齢に顎下腺摘出(Subx)術或はKeto(5mg/0.2 ml, saline, s.c., 毎日28日間)を投与88日齢に断頭した。実験群は、Int、Keto、Subx、Subx+Ketoの4群とした。SteroidsはHPLCで定量、estradiol(E<sub>2</sub>)およびdihydrotestosterone(DHT)はRIAで定量した。前立腺前葉のandrogen receptor assayを行った。

〔結果〕体重はSubx+Ketoが、5日目からIntに比し低値、28日後に他3群に比し有意低値を示した。肝重量はSubx+Ketoが他3群に比し有意低値を示した。Subx+KetoはIntに比し凝固腺重量は有意低値を示したが、前立腺前葉と精のう重量は絶対重量のみ有意低値で、比体重重量に有意差は無かった。精巣内steroidsは、Subx+KetoがIntに比しtestosterone(To)有意低値、 $\Delta^4$ -androstenedione( $\Delta^4$ -A)およびprogesterone(Po)は低値傾向を示した。又、plasma中steroidsは、Subx+KetoがToは他3群に比し有意低値を示したが、 $\Delta^4$ -A、Poは他群と差がなかった。CorticosteroneはSubx+Keto、Keto、SubxいずれもIntに比して有意低値を示した。

〔考按と結語〕Subx或はKeto投与はandrogenを有意低下したが、前立腺前葉のandrogen receptorのB<sub>max</sub>、K<sub>d</sub>に変化なくandrogenを介さない直接作用或は他の因子を介する作用が存在し、副性腺への抑制作用はSubxとKetoの併用によって増強されることを見出した。

○野田 勉、仲村智子、森田 茂

大阪市立環境科学研究所

トリブチルスズは新たな水環境汚染物質として注目をあび、現在では実質的に使用禁止になっている。しかし、ジブチルスズは塩化ビニルの安定剤等としていまなお使用されている一方で環境中ではトリブチルスズの代謝物として検出されている。我々はジブチルスズジアセテートが下顎裂、肋骨癒合等の催奇形作用を有すること、そしてその作用日が妊娠8日であることを明らかにした。今回は各種ジブチルスズ化合物についてそれらの催奇形作用を比較した。

【方法】試験したジブチルスズは次の6種である。①ジアセテート(DBTA)②ジクロライド(DBTC)③ジラウレート(DBTL)④オキサイド(DBTO)⑤マレート(DBTM)⑥マレートポリマー(DBTMP: n=2-4)。投与量はいずれも80 $\mu$ mol/kgとした。これらの化合物を妊娠8日にJcl:Wistar系ラットに強制経口投与し、妊娠20日に帝王切開し胎児の外表観察後、骨格標本を作製して骨格異常の有無を調べた。

【結果と考察】外表奇形については主に下顎裂、下唇裂、舌癒着および外脳が認められた。骨格奇形については主に下顎骨固定不全、頭蓋骨形成不全、肋骨癒合が認められた。奇形発現率については、外表奇形がDBTCとDBTMで比較的低く、骨格奇形もDBTMは低かったが、DBTCでは他の化合物と同程度であった。DBTCは他の化合物と異なり下顎裂、下顎骨固定不全が少なく肋骨癒合の頻度が高かった。観察した全胎児でみると、外表奇形には性差が見られ、雄の発現頻度は雌の約2倍であった。骨格奇形についても同様の性差が見られたが、肋骨癒合に関しては性差はなかった。以上のように化合物によって外表と骨格奇形の発現頻度および種類に若干の差が見られた。



培養ラット胎児における吸収（死亡）胚の発生機序について  
—サリチル酸NaおよびEGTAの比較—

横山 篤、秋田 正治（\*）、黒田 行昭（\*\*）

日本たばこ産業、（\*）鎌倉女子大、（\*\*）麻布大学生物研

通常のラットの生殖発生毒性試験では、妊娠20日目に帝王切開して、吸収死亡胚の形成時期について分類する。しかし妊娠20日目の所見から吸収死亡胚の死因を解析することは困難である。そこで我々はラット器官形成期の培養胎児にサリチル酸Na（SSA）あるいはEGTAを用いて死亡胎児を誘発させ、その死亡に至る過程を解析した。

（実験方法）In vivoで50%の吸収死亡胚を誘発するに相当するSSA1000 $\mu$ g/mlおよびEGTA100 $\mu$ g/mlを回転培養条件下で培養液中に処理して胎齢11日より48時間培養したラット胎児への影響を検討した。

（実験結果及び考察）EGTA処理群では処理後15分で心拍数が低下し始め、培養27時間で心拍動が停止した。実体顕微鏡下で外表を観察した結果、胎盤への影響は認められなかったが、卵黄嚢では血管の破損が重篤で白く変性した。培養16時間で処理群の全例において卵黄嚢膜および羊膜が萎縮し始め、胎児に異常（下顎の形成不全、曲短尾および前頭部の隆起抑制）が認められた。一方SSAでは培養24時間で卵黄嚢が白くなり、血液の循環が顕微鏡下で確認出来なかった。EGTA処理による変化と異なり、胎児膜の萎縮はSSA処理では観察されなかったが、培養26時間で卵黄嚢膜の剥離が全例に認められた。心拍数は対照群に比べて低下したものの、停止はしなかった。以上の結果よりEGTA処理では、最初に培養胎児の心機能が停止した後に胎児膜の萎縮が起こり胎児が死に至り、SSA処理では胎児膜の変性が最初に起こり、続いて胎児が白くなり死に至ることが示唆された。

このように妊娠20日目で吸収死亡胚を誘発する化学物質を用いたモデル実験は、胎児培養系が胎児の死因の解析に有効に利用出来ることを示唆した。

佐々木哲哉, 島田信, 原田滋雄, 渡辺敏樹, 俵克彦, 高山敏

第一製薬(株)開発研究所, 安全性研究センター

癌化学療法剤の cyclophosphamide (CPA), adriamycin (ADR), fluorouracil (5-FU), cisplatin (CDDP) および camptothecin 誘導体である irinotecan hydrochloride (CPT-11) のラットにおける排卵数増加作用の機序解明を目的として, inhibin 産生部位である卵巣内の発育卵胞に及ぼす影響について組織学的に検索した。

材料と方法: 4日の発情周期を示すSlc:SD系の雌ラット(10-13週齢)を使用した。生理食塩液(対照)および各薬剤の各種用量(公比2)を排卵予定日3日前(発情後期)14:00に尾静脈内に投与し, 排卵予定日に卵管を摘出して排卵数を計測した(各群8-11頭)。さらに各薬剤について, 最大の平均排卵数を示した用量を投与し, 投与4, 8および20時間後に卵巣を摘出し, ブアン固定後, HE染色を施した5 $\mu$ m厚の組織標本を作製し検索した(各群3頭)。

結果と考察: 平均排卵数はいずれの薬剤でも一定の用量まで用量依存的に増加し, 最大の平均排卵数は, CPAで18.1, ADRで18.7, 5-FUで19.8, CDDPで19.5, CPT-11で19.5であり, 対照群の13.5-14.1に比べ有意に増加していた。組織学的検索においては, 最大の作用を示す時間等に若干の差異が認められたが, いずれの薬剤も大型の発育卵胞の顆粒層細胞に対し, 核濃縮等の作用を示したことから, これらの卵胞からの inhibin産生量の低下が示唆された。排卵数増加作用の主な機序について考察すると, DNA合成阻害作用等を有するこれらの薬剤は, 増殖能力の高い発育卵胞の顆粒層細胞に比較的強く作用して inhibin産生能を抑制し, その結果, 血中FSH濃度を上昇させ, 排卵に向かう発育卵胞数を増加させるものと推察される。

○納屋 聖人，紀藤 美江，出口 隆志

協和安全性研究所

ラットあるいはマウスを用いる全胚培養法についてはすでに手法が確立し、われわれもこの系を用いて *in vitro* におけるサリドマイドの催奇形作用をすでに報告している。生殖毒性試験ではラットやマウスのほかに非齧歯類としてウサギも多用されているが、現在までのところウサギを用いる全胚培養法についての報告は少ない。生殖毒性試験における齧歯類と非齧歯類の種差を解明するうえで、ウサギ全胚培養法はきわめて有用と考えられるのでわれわれはウサギ全胚培養法を開発し、その発生毒性検出系としての有用性を検討した。

日本白色種ウサギ胎齢10日の胚（交尾確認日＝0日）を麻酔下で母獣より取り出し、100%ウサギ血清ならびに95% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> を使用して、回転培養装置で培養を行なった。培養開始24時間後に卵黄囊および羊膜を開放して更に培養を続け、48時間まで培養を行なった。発生毒性検出系としての有用性を検討するために5-FUあるいはシクロホスファミドを血清に加えて全胚培養を行ない、外表形態や体節数ならびに蛋白量を観察した。本実験系は発生毒性の検出やそのメカニズムの研究に有用な方法と思われる。

安田峯生，大屋亮治，佐藤利夫，井上尚彦

広島大学医学部第一解剖学教室

マウス口蓋の口腔側粘膜には8-9対の横走するヒダがある。この口蓋ヒダには時に断裂，過剰，短小，交差などの変異がみられるが，口蓋裂誘発能をもつ催奇形因子を適用された母体の胎仔では，口蓋は閉鎖していても，口蓋ヒダ変異の頻度が高まるとの報告がある。2,3,7,8四塩化ジベンゾパラジオキシン(以下TCDD)  $40 \mu\text{g}/\text{kg}$ を妊娠12日(腔栓発見日=0日)の Jcl:ICRマウスに経口投与し，胎齢18日胎仔の口蓋を観察したところ，胎仔の93%に口蓋裂が誘発されたが，口蓋裂を免れた胎仔にも，全例に口蓋ヒダ変異が認められた。無処置対照群での変異頻度は20%であった。妊娠7日に塩化カドミウム  $6 \text{mg}/\text{kg}$ を母体腹腔内に投与し，胎仔に外脳を誘発しておいて，妊娠12日にTCDDを投与すると，外脳仔では口蓋裂誘発は完全に阻止されたが，外脳仔の口蓋ヒダには著しい短縮，方向異常，非対称など高度の変形が認められた。これらの所見から，口蓋ヒダの形態は，口蓋形成過程での異常を反映することが示唆された。現在TCDD投与量と口蓋ヒダ変異発現率の関係，TCDD以外の口蓋裂誘発因子としてレチノイン酸，酢酸コーチゾン，6-アミノニコチンアミドを母体に投与した場合の胎仔の口蓋ヒダ変異を検索中である。(文部省科学研究費補助金03202133による。)

秋田正治<sup>1)</sup>、横山 篤<sup>1)</sup>、黒田行昭<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>：鎌倉女子大学 <sup>2)</sup>：麻布大学・生物科学総合研究所

(目的) 現在のラット胎児を用いた培養法において、器官形成後期、妊娠13日目以降の培養は非常に難しいと考えられてきた。われわれは、5年前よりこの発生段階の胎児の培養を検討してきた。そこで現在までの知見をまとめたのでここに報告する。

(方法) 使用動物はWistar系ラット妊娠13日目および、14日目(腔栓確認日=0日)の胎児を無菌的に母体より取りだし、回転型培養装置を用いて24時間培養を行った。培養液は、100%ICラット血清(RS)とラット血清50%+Tyrode液50%(RST)を用い、培養開始から1時間目をRST、そして培養1~3時間目までRSをそれぞれ使用した。さらに培養3~4時間目には1度使用したRSTを孔径0.4 $\mu$ mのフィルターで濾過したものを用い、同様の濾過処理を行ったRSで培養4時間目以降培養を行った。胎齢13日目からの培養は、混合ガス100~125ml/min.、回転数を20rpm、胎齢14日目からの培養は、混合ガス100~125ml/min.、回転数20~25rpmとし、培養24時間後に胎児の総体節数、頂殿長、心拍動数および血液循環の計測を行った。

(結果および考察) 胎齢13日目からの培養：頂殿長は培養前8.6 $\pm$ 0.39mm、培養終了後10.4 $\pm$ 0.83mm、胎児総体節数は培養前55.9 $\pm$ 1.03、培養終了後64.8 $\pm$ 1.49であった。また心拍動数は平均190回/分で安定し、胎児および卵黄囊表面の血液循環も良好であった。

胎齢14日目からの培養：頂殿長は培養前10.4 $\pm$ 0.20mm、培養終了後12.4 $\pm$ 0.40mm、胎児総体節数は培養前67.5 $\pm$ 1.33、培養終了後76.5 $\pm$ 2.72となった。心拍動数、胎児および卵黄囊の血液循環においては、胎齢13日目からの培養と同様の結果が得られた。

以上の結果から胎齢13日目および、14日目より24時間培養は、良好な胎児の成長が観察された。これはin vivoの胎児とほぼ同様の発育状態と認められ、器官形成後期の研究に十分使用できると考えられた。現在さらに長時間の培養を可能にするため、新しい培養液の開発、培養法の改良などを検討中である。

## MNU投与により誘発された小頭症動物の、Biel型複式T型水迷路試験成績の背景成績との比較

○高島宏昌、清水ゆり、橋本豊、水谷正寛

(財) 食品薬品安全センター 秦野研究所

Biel型複式T型水迷路試行を用いた学習能力試験の成績判定の一助とするため、当研究所において過去2年間に、ラット[Crj:CD(SD系)]を用いて実施した生殖・発生毒性試験のうち、T型水迷路を用いて学習能力試験を行った6試験の、対照群(雌雄各計119例)の成績を集計して「背景成績」とした。この成績を、母ラットの妊娠13日にメチルニトロソ尿素(MNU)の5あるいは2 mg/kgを1回投与して得た、小頭症ラットの成績と比較した。いずれの試験もラットは5~6週齢で、6ヵ所の袋路を持つT型水迷路で1日3回、3日間連続試行させた。錯誤は分岐点での左右の選択、袋路内および逆転の3種類について計数し合計して総錯誤数とした。また選択錯誤は、6ヵ所の袋路について個別に発生数を求めた。

その結果、5 mg/kg投与群においては、雌雄とも「背景成績」に比較して未到達例の増加が認められ、試行時間、総錯誤数および選択、袋路内ならびに逆転錯誤数が有意に増加した。袋路の位置と錯誤数の関係ではスタートから3番目の袋路における増加が明確であった。一方、2 mg/kg投与群においても「背景成績」に比較して試行時間、総錯誤数、選択、袋路内ならびに逆転錯誤数、3番目の袋路における錯誤数に有意な増加が認められた。MNU投与実験における無処置対照群(20例)との比較では、2 mg/kg投与群では総錯誤数の有意な増加は認められないことから、複式T型水迷路の成績評価に当たっては、「背景成績」との比較が重要であると考えられる。現在、メチルアゾキシメタノール(MAM)誘発の小頭症についても同様の検討を実施している。

一般演題

平成4年7月24日(金)

第1会場

演題番号101-109

山口 格, ○増渕弘子, 柴田桂三, 武井峰男, 米良幸典,  
松田和夫

ゼリア新薬工業株式会社 中央研究所

亜鉛及びL-カルノシンの錯体であるZ-103において、ラット、イヌおよびサルを用いた反復投与毒性試験の各組織中の亜鉛、銅および鉄含量の変動を観察した。

ラットの13週間反復投与（150, 300, 600, 1200mg/kg）では、300mg/kg群以上で血液、肝臓、腎臓、精巣、肺および脾臓の亜鉛含量の用量依存的な増加がみられたが、銅含量では血液、肝臓、腎臓、精巣、心臓、肺、脾臓および前立腺での用量依存的な減少がみられた。鉄含量では、600mg/kg群以上の心臓において低下がみられた。52週間反復投与（75, 150 mg/kg）では、血液、肝臓および腎臓の亜鉛含量で用量依存的な増加がみられた。

イヌの13週反復投与（50, 120, 300 mg/kg）では、血漿、肝臓、腎臓、心臓、肺および精巣の亜鉛含量の増加がみられ、300mg/kg群では、血漿の銅及び鉄含量の減少、肝臓、脾臓及び前立腺の銅含量の減少が観察された。52週間反復投与（8, 20, 50mg/kg）では、20mg/kg群以上で肝臓、腎臓及び脾臓の亜鉛含量の増加がみられ、50mg/kg群の肝臓の鉄含量の増加がみられた。

サルの13週間反復投与（20, 63, 200mg/kg）では、200mg/kg群で血漿、肝臓及び腎臓の亜鉛含量の増加がみられた。

上記の変化はいずれも休業することにより回復あるいは回復性を示した。



矢本 敬, 佐藤里子, 大橋芳彦, 高岡雅哉, 寺西宗広,  
真鍋 淳, 松沼尚史,\* 牧田登之

三共・安全性研究所, \*山口大・農学部

ペルオキシゾーム増生作用を有する化合物に対する加齢に伴う感受性の変化に関して第7回毒性病理学会, および第47回電子顕微鏡学会で報告した。今回, clofibrate投与で認められた加齢に伴う感受性の変化を確認する目的で, clofibrateの活性代謝物質である clofibric acidを 1群 5匹の雄性 F344ラット (8, 52, 117週齢) に摂取量が 200 mg/kg/dayとなるよう粉末飼料に混合して 14日間経餌投与した。投与終了後, 血液生化学的検査, 肝臓中薬物代謝酵素活性・ペルオキシゾーム $\beta$ -酸化活性の測定, 肝臓の微細形態学的検査を実施した。

その結果, 8, 52週齢の投与群では肝重量の有意な増加, 血清総コレステロールおよびトリグリセリド値の有意な減少, プロボキシクマリン脱プロビル化活性およびペルオキシゾーム $\beta$ -酸化酵素活性の有意な上昇を認めた。また, 8週齢ではチトクロム P-450量の有意な上昇も認められた。117週齢ではペルオキシゾーム $\beta$ -酸化酵素活性の有意な上昇を認めたが, 他の検査項目に有意な変化は認められなかった。微細形態学的検査では 8, 52週齢の投与群で肝細胞の滑面小胞体とペルオキシゾームの増生を認めた。しかし, 117週齢ではペルオキシゾームの軽度の増生を認めたが滑面小胞体の増生は認められなかった。

この結果は clofibric acidに対する雄性 F344ラットの感受性が加齢に伴って変化することを示唆しており, clofibrate投与から得られた結果を支持している。

血漿CKおよびLDHアイソエンザイムの臨床的有用性  
-Isoproterenol, adriamycin心筋障害ラットを用いた検討-

○佐藤誠孝、川原潤一、黒澤晴美、和田通恵、天野健次

キリンビール(株) 安全性研究所

【目的】 Creatine kinase(CK)およびLactate dehydrogenase(LDH)アイソエンザイムは臓器特異性が高く、ヒトにおける臨床的有用性は報告例が多数あるが、ラットを用いた毒性試験では応用例が少ない。そこで我々は、isoproterenolおよびadriamycin心筋障害ラット(ISPおよびADRラット)を用いてCKおよびLDHアイソエンザイムを継時的に調べ、心筋障害時におけるこれらのパラメータの有用性を検討したので報告する。

【方法】 ISPラットはisoproterenol 50、250mg/kgをそれぞれ単回皮下投与、ADRラットはadriamycin 3.0mg/kgを5日間反復静脈内投与し作製した。ISPラットは投与24時間後まで、ADRラットは投与および休薬期間中(5および10日間)に尾静脈から継時的に採血し、血漿中のCK、LDHおよび各アイソエンザイムの測定を行った。アイソエンザイムは電気泳動法(CK:セルロースアセテート膜、LDH:アガロースゲル)で測定した。

【結果およびまとめ】 ISPラット:投与2時間後からCKおよびLDHともに心筋由来と考えられる分画(CK-MB、CK-MM、LD1~3)活性の上昇が認められ、投与6~8時間後まで持続した。その後、CK-MB、CK-MM活性は、ほぼコントロールレベルまで低下したが、LD1~3活性は高値が継続した。投与2~8時間後にCKおよびLDH総活性の上昇が認められたが、他分画(CK-MB、CK-MM、LD1~3)活性に比べ上昇の程度は低かった。

ADRラット:投与開始3~5日後にCK-MM活性、投与開始5~10日後にLD1活性の上昇が認められた。投与開始3~10日後にCKおよびLDH総活性の上昇傾向が認められたが、顕著ではなかった。以上の結果より、CKおよびLDHアイソエンザイムは、心筋障害を検出するパラメータとしてラットでも、その有用性が期待できると考えられる。

脳機能改善薬、DM-9384のラットを用いた  
依存形成能の検討

藤川香津子、秋山義広、高山 敏

第一製薬株式会社 開発研究所 安全性研究センター

中枢神経細胞に作用する脳機能改善薬では非常に弱い依存形成能を有する薬物もある。そこで、今回、pyrrolidone 骨格を有する新規の脳機能改善薬であるDM-9384 の依存形成能の有無について検索するために、5週齢のSD系雌性ラットを用い、DAF法による身体依存性試験ならびに静脈内自己投与による強化効果の検討を行ったので報告する。

1. DAF法による身体依存性試験：DM-9384を1 mg/g foodから18 mg/g food まで漸増適用し、身体依存形成能について検討した。43日間の適用後DM-9384 混入飼料を普通飼料に置き換え、休薬後28時間まで退薬症候の観察および体重測定を行ったところ、退薬症候は全く認められず、身体依存性を示唆する体重減少も認められなかった。一方、陽性対照として用いた codeine群では、休薬により著しい体重減少と明確な退薬症候が認められた。

2. 静脈内自己摂取による強化効果の検討：DM-9384を0.05、0.15、0.45および1.35mg/infusion/rat の用量で適用し、精神依存能について検討した。ラットにDM-9384 を14日間自己摂取させたところ、日時の経過に伴う自己摂取回数の増加は認められなかった。しかし、陽性対照群であるmorphine群やpentobarbital 群では明らかな漸増を示した。

以上のように、ラットを用いた身体依存性試験および強化効果の検討において、DM-9384 の依存性を示す兆候は何ら認められず、DM-9384 は依存能を持たないことが示唆された。

Muramyl dipeptide 誘導体 MDP-Lys(L18) およびアジュバントによるラット関節炎の比較

○菅原正喜、加藤道幸、古濱和久、高田早苗、高山 敏

第一製薬（株） 開発研究所 安全性研究センター

MDP-Lys(L18) は白血球増多剤として臨床で使用されているが、高用量をラットに連続投与すると関節炎を惹起する。今回、私達は MDP-Lys(L18) 関節炎の発症機序を検討するために、アジュバント関節炎(AA)と発症条件を比較した。

材料および方法：MDP-Lys(L18) 関節炎は 4mg/kg を14日間背部皮下投与により、また AA は *Mycobacterium butyricum* を1回足蹠皮内投与により惹起した。両関節炎に対する免疫抑制剤サイクロスポリン(CsA)の影響を、MDP-Lys(L18) 関節炎は SD 系、AA は Lewis系の6週齢雄ラットを用いて検討した。さらに6週齢の胸腺欠損ヌードラットにおける関節炎発症を比較し、MDP-Lys(L18) またはアジュバントで前処理した Lewis 系雄ラットの脾リンパ球の移入による関節炎発症を比較した。関節炎発症の指標として足関節の厚さを測定した。また、MDP-Lys(L18) 投与 SD 系ラットにおける血清中 colony-stimulating factor(CSF) 活性を測定した。

成績：CsA の併用により AA の程度は軽減したが、MDP-Lys(L18) 関節炎は増悪した。AA はヌードラットには発症せず、脾リンパ球移入により発症した。一方、MDP-Lys(L18) 関節炎は AA とは逆の成績を示した。血清中 CSF 活性は MDP-Lys(L18) の1回投与により明らかに上昇した。

MDP-Lys(L18) 関節炎は AA で想定されている遅延型アレルギー反応と異なる機序で発症することが示唆された。また MDP-Lys(L18) 関節炎発症において CSF の関与が疑われた。

新規カンプトテシン誘導体、CPT-11のラット下痢  
誘発作用

○笠井義男、高砂 浄、碓井千春、北野 裕、広橋正章、  
高山 敏

第一製薬（株）開発研究所 安全性研究センター

【目的】CPT-11 は喜樹などの植物に含有されている抗腫瘍性アルカロイドの一種、カンプトテシンの誘導体で肺癌、子宮癌、卵巣癌等に優れた抗腫瘍効果を持つことが認められている。一方、本薬をヒトに投与すると比較的急性期に嘔吐、下痢などの消化器系副作用を惹起することがあり、臨床上の問題とされている。昨年の薬理学会総会において、我々は CPT-11 の嘔吐作用について報告した。今回は下痢作用について検討したので、その成績を報告する。

【方法および結果】Slc:Wistar 系雄性ラットを約 18 時間絶食した後、生理食塩液 (1ml/100g) を負荷した。その 1 時間後に薬物を投与し、24 時間にわたり糞便の形状を観察した。CPT-11 8~80mg/kg 静脈内あるいは 10~100mg/kg 腹腔内投与により、ほぼ用量依存的に下痢が発現し、400mg/kg の経口投与でも全例で下痢が観察された。CPT-11 80mg/kg 静脈内投与による下痢は、GR38032F、clonidine および morphine の 30 分前処置により完全に抑制され、atropine、papaverine あるいは Ectol<sup>®</sup> でも一部抑制された。CPT-11 24mg/kg 静脈内投与により、バルーン法で測定したラット大腸運動は亢進し、ループ法で測定した空腸での水分吸収は減少した。これらの大腸運動の亢進あるいは水分吸収の抑制に対して、GR38032F および atropine はそれぞれ改善効果を示した。

【結論】CPT-11 はラットにおいても下痢を発現させ、その下痢作用には腸管運動の亢進および水分吸収の減少の両者が関与していることが示唆された。また、その下痢には、副交感神経系あるいは  $\delta$ -HT<sub>2</sub> 受容体が一部関与している可能性が考えられた。

丸谷清<sup>1</sup>、永牟田雅弘<sup>1</sup>、小田部陽子<sup>1</sup>、田中公一<sup>1</sup>、松本雅彦<sup>2</sup>、松原秀三<sup>3</sup>

中外製薬株式会社<sup>1</sup>安全性研究所、<sup>2</sup>探索第五研究所、<sup>3</sup>学術第一部

〔目的〕 現在使用されているキノロン系合成抗菌剤のいくつかは光線過敏症を誘発することが知られている。その発現にキノリン環 8 位の置換体が影響する可能性が示唆されたので報告する。

〔方法〕 Q-35はキノリン環 8 位にメトキシ基を有する。その 8 位誘導体としてフルオロ基を持つ 8-F 体と未置換の 8-H 体を合成した。それぞれの 3.125~800mg/kg をマウスに経口投与し、その 30 分後に 40J/cm<sup>2</sup> の長波長紫外線 (UVA) を照射し、経時的に耳翼皮膚の発赤を観察した。また、あらかじめ UVA (0~25J/cm<sup>2</sup>) を照射したこれらの誘導体 (100 μg/ml) をモルモットの背部に 0.1ml/site ずつ皮内投与し、その直後から投与部位に 20J/cm<sup>2</sup> の UVA を照射してそこに発現する発赤の強さを調べた。

〔結果〕 Q-35 を投与したマウスでは光毒性は認められなかったが、8-F 体および 8-H 体投与群では耳翼皮膚の発赤が照射後持続的に観察され、照射 72 時間後の病理検査により炎症性反応が認められ、その程度は 8-F 体でより重篤であった。モルモットを用いた実験では、UVA 未照射の 8-F 体および 8-H 体を皮内投与した部位に発赤が認められたが、Q-35 の投与部位には変化が見られなかった。また、8-F 体、8-H 体ともに、投与前にあらかじめ薬物に照射した UVA の線量の増加に伴って投与部位の発赤の強さは減弱した。以上の結果から、1) キノリン環 8 位をフルオロ化することで光毒性が増強し、メトキシ化により逆に減弱あるいは消失すること、2) UVA 照射産物そのものが起炎性を有するのではなく、投与された薬物が UVA 照射による変化を受ける過程で組織に炎症性反応を誘導する可能性が示唆された。

HCT116, WiDr 担癌および非担癌ヌードマウスを用いた  
インターフェロン(IFN)  $\alpha$  A/Dおよびフルツロン(5'-DFUR)  
併用投与における反復投与毒性試験

○進藤英俊、小林和子、千葉章子、今村いづる、堀井郁夫

日本ロシュ(株)研究所 毒性・病理部

[目的]

インターフェロン  $\alpha$  A/Dとフッ化ピリミジン系抗腫瘍剤の併用投与によりそれぞれの単独投与よりも高い抗腫瘍効果がヒト結腸癌移植ヌードマウスにおいて認められているが、その反面併用投与によって体重減少などの一般的な毒作用が増強される傾向が認められた。そこで今回両薬剤の併用投与における毒作用について詳細に検討したので報告する。

[方法]

ヒト結腸癌HCT116、WiDr担癌ヌードマウス、非担癌ヌードマウス(BALB/c-nu/nu)に対して対照群、IFN  $\alpha$  A/D単独群 ( $2 \times 10^5$  /mouse/day, i. p.)、5'-DFUR単独群 (0.5 mmol/kg/day, p. o.)、両薬剤併用群を設け、4週間連続投与した。投与期間中、体重、摂餌量、腫瘍体積の測定を行なった。投与終了後、血液学的、血液生化学的検査、病理組織学的検査、脾臓のリンパ球サブセットの免疫組織化学的検査を行なった。

[結果]

認められた毒性は担癌、非担癌マウスに共通で、IFN  $\alpha$  A/D単独群では貧血、脾臓の髄外造血の亢進、肝の髄外造血、脾臓の赤脾髄におけるNK細胞の増加、褐色色素沈着が認められた。5'-DFUR単独群では精巣重量の軽度の減少のみが認められた。併用投与群では両薬剤の毒性が併せて認められたが、貧血、脾臓の髄外造血の亢進、肝の髄外造血についてはIFN  $\alpha$  A/D単独群よりも強かった。一方、骨髄においては、IFN  $\alpha$  A/D単独群、併用投与群ともに変化は認められなかった。これらのことから、IFN  $\alpha$  A/Dによって引き起こされた貧血は、脾臓の赤脾髄におけるNK細胞の増加と活性化により赤芽球系細胞が破壊されたことに起因した可能性が推察された。また、骨髄抑制が4週目よりも早い時期に誘導され、骨髄系では既に抑制に対する代償性の反応が生じホメオステシスが保たれていることも考えられた。

## キノロン薬の幼若ラット膝関節腔内投与による 関節軟骨病変の検討

○ 高田 早苗、加藤 道幸、高山 敏

第一製薬、開発研究所、安全性研究センター

キノロン薬は幼若動物に関節軟骨病変を惹起することが良く知られている。しかし、薬物を経口投与した時に、常に一定の四肢関節に病変が発現するとは限らない。そこで、キノロン薬のラット関節腔内投与による病変作製を試み、その病変と経口投与時に現れる病変を比較した。

(材料および方法) キノロン薬の 0.5、1 または 2% 生理食塩水溶液を 3週齢の Crj:CD 系雄ラットの左右の膝関節腔内に、1日おきに 1、3 または 7 回投与 (25  $\mu$ l / 関節)した。対照動物には生理食塩水を投与した。投与終了の 2日後にエーテル麻酔下で動物を屠殺し、大腿骨遠位端を組織学的に観察した。

(成績) 2% 溶液の 1 または 3 回投与後、大腿骨の脛側顆および腓側顆の腹側面で関節軟骨表層および中間層に軟骨細胞の壊死が認められ、その周囲の基質染色性は軽度に低下していた。7 回投与後には、軟骨細胞を含まず、基質染色性を失った軟骨の隆起巣が観察され、時々その中央部に亀裂が形成されていた。1% 溶液でも 7 回投与後、少数例に軟骨の隆起巣がみられたが、0.5% 溶液では変化は認められなかった。

関節腔内投与により惹起された今回の関節軟骨病変は、キノロン薬に特徴的な病変と質的に類似し、発生部位も同じであった。従って、このモデルは関節毒性研究に有用と思われる。



一般演題

平成4年7月24日(金)

第2会場

演題番号212-233

脳組織コリン作動性神経活性に及ぼすアンチモン化合物の影響

○小林晴男, 中川暁美, 鈴木忠彦, 小野菜穂子,  
茂木 朗, 笠嶋快周

岩手大学農学部家畜薬理学教室

アンチモン化合物は緬山羊の脳脊髄糸状虫などに対する駆虫薬として用いられており、中枢神経系への毒性が考えられる。アンチモン(Sb)化合物の一般毒性は3価が5価よりも強いことが知られているが、Sb化合物の中枢神経系への毒性については明らかでない。今回、Sb化合物の中枢神経系に対する影響を調べる目的で、酒石酸カリウムSb(SbⅢ、3価)およびグルコン酸Sbナトリウム(SbⅤ、5価)の脳組織コリナージックパラメータに及ぼす影響をマウス大脳皮質を用いて *in vitro* で検討した。両化合物とも  $10^{-6}$ - $10^{-4}$  Mの濃度ではアセチルコリン(ACh)分解酵素であるアセチルコリンエステラーゼの活性には何ら影響を及ぼさなかった。両Sb化合物はACh合成酵素であるコリンアセチルトランスフェラーゼ活性を阻害したが、その作用はSbⅢがSbⅤよりやや大であった。シナプトソームによるコリンの取り込み機構として、コリン作動性神経に選択的な高親和性コリン取り込みおよび非選択的な低親和性取り込みに対して両Sb化合物は  $10^{-6}$ - $10^{-4}$  Mの濃度において阻害作用を示し、前者に対してSbⅢが、後者に対してSbⅤがやや強い作用を示した。SbⅢおよびSbⅤはいずれも<sup>3</sup>H-quinuclidinyl benzilateのムスカリニック・アセチルコリン(ACh)レセプターへの結合、さらに皮質切片からのK<sup>+</sup>誘発ACh遊離ならびにACh合成に対して顕著な作用を示さなかった。以上より、Sb化合物はコリン作動性神経系に対して、主としてACh合成系を阻害することによって伝達機構を阻害することが考えられるが、その作用は3価が5価より強いと考えられる。

○遠藤 泰、高橋美紀、浜上尚也、門間芳夫、南 勝  
富樫広子\*、吉岡充弘\*、斎藤秀哉\*

東日本学園大・薬・薬理、\* 北大・医・1薬理

(目的) 制癌剤誘起性嘔吐には、5-HT<sub>3</sub>拮抗薬が有効である。薬物による嘔吐について、腸内あるいは嘔吐中枢の5-HT上昇が誘因と考えられている。我々は、5-HT上昇の背景を探るべく、嘔吐のモデル動物フェレットに嘔吐惹起物質を投与し、腸管および嘔吐中枢のモノアミンとその関連酵素活性を同時に測定したので報告する。

(方法) マーシャル社(NY)より輸入した雄性フェレットを使用した。モノアミン合成系の芳香族Lアミノ酸脱炭酸酵素(AADC)活性は永津らの方法に準じ、モノアミン酸化酵素(MAO)活性(MAO-A+B)測定はKramlらの方法を用いて測定した。カテコールアミンならびに幽門より30cmの腸管と延髄最後野(area postrema)の5-HT含量は電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフィーによって測定し、Lowry法により測定したタンパク量によって補正した。

(結果) フェレットはシスプラチンの用量に依存して嘔吐を惹起し10mg/kg(i.p.)では全例が嘔吐を示した。フェレットの腸管5-HT含量は無投薬対照群に比しおよそ2倍の50.6 ng/mg proteinに増加していた。同時に測定した腸管のAADC活性は有意に上昇し、一方、MAO活性は有意に低下していた。硫酸銅経口投与によっても、フェレットの腸管5-HT含量は有意に増加していた。シクロホスファミドによっては、延髄嘔吐中枢の5-HT含量が有意に増加していた。

(結語) フェレットに嘔吐を惹起する薬物は、腸および延髄嘔吐中枢の5-HT含量を有意に上昇させた。シスプラチンによる5-HT上昇の場合、合成系のAADC活性の有意な上昇のみならず、代謝系のMAO活性の有意な低下も関与していることが示唆された。

Dae Hyun Cho, Se Jin Hwang, Tae Gu Kang, Jin Tae Hong,  
Pu Young Kim, Kang Chin

National Institute of Safety Research, Seoul Korea

Cocaine is a well known abused CNS stimulants which acts mainly on dopaminergic system. Effects of cocaine on dopaminergic system in behavioral, quantitative analytical and morphological aspects were investigated. Following injection of either single(20mg/kg) and repeated doses (10mg/kg, twice in a day for 7 consecutive days) of cocaine, alterations in neurological functions were determined by measurement of spontaneous motor activity, quantitative analysis of striatal dopamine and tyrosine hydroxylase(TH) immunochemistry of caudate-putamen, substantia nigra and ventral tegmental area. Spontaneous motor activity and striatal dopamine contents were increased by single dose of cocaine and decreased by repeated doses. TH immunoreactivities were increased at 1 day after repeated doses but significantly decreased at 4 weeks after repeated doses. It is consequently suggested that single dose of cocaine stimulates dopaminergic system but chronic cocaine administration may causes prolonged depression of dopaminergic system in rats.

Butylated hydroxytoluene(BHT) の反復投与による  
薬物代謝酵素誘導と小葉辺縁性壊死病巣の出現

○真鍋淳, 大橋芳彦, 高岡雅哉, 矢本敬, 五十嵐功,  
山下和男, 木村邦男, 宮腰昶宏, 松沼尚史

三共・安全性研究所

[目的および方法] BHT を低量反復投与すると肝小葉辺縁部に壊死が発現する。その病理発生の詳細は不明であった。我々は, phenobarbital で前処置した実験(第113回獣医学会)および低量(500 mg/kg)の反復投与実験(第1回国際毒性病理学会)を行い, 低量の反復投与によって BHT の代謝活性化酵素(P-450IIB1)および解毒に関わる酵素(GST)が誘導されること, およびそれぞれが誘導される小葉内の部位を明らかにした。その結果から, 小葉辺縁部で解毒反応より代謝活性化反応が強い場合に壊死が出現すると推察した。この推察を確かめる目的で, 前処置に BHT を用いる実験を行った。BHT(250 mg/kg)を6日間反復投与し, 7日目に250 mg/kgあるいは500 mg/kgを投与して, 肝臓の薬物代謝酵素と血清トランスアミナーゼ活性測定し, P-450IIB1とGSTの肝小葉内誘導部位と壊死出現部位を検索した。

[結果および考察] 250 mg/kg 群では著明な P-450 量の増加と alkoxy coumarine O-dealkylase の誘導が観察されたが, 肝障害は発現しなかった。500 mg/kg 群では血清トランスアミナーゼの著明な上昇を伴い肝小葉辺縁部の壊死が観察された。さらに, P-450IIB1 は肝小葉の全体に, GST は小葉中心部で誘導されていた。500mg/kg の単回投与は肝障害を発現しない。すなわち, ① BHT の反復投与により BHT の代謝活性化および解毒の両者が誘導される。② 代謝活性化が小葉の全体におよぶことで障害は小葉中心部から小葉の辺縁部に拡大する。③ 解毒反応が小葉の中心部で誘導されるため中心部での障害は軽減される。

○小林章男、菅井恵子、守屋直美、宮川義史、滝沢春雄

日本たばこ産業株式会社 安全性研究所

甲状腺ホルモンの測定は、従来、R I A 法によるものが一般的であり臨床の場合でも甲状腺機能検査に用いられてきた。近年、ヒトの臨床検査用としてE I A 法 ( $T_3$ ,  $FT_3$ ,  $FT_4$ )、F P I A 法 ( $T_4$ ) による自動分析機用の測定キット (ダイナボット社) が開発されたが、これらを動物検体の測定に応用した報告はほとんどない。我々は、E I A 法、F P I A 法による甲状腺ホルモン濃度測定のマツト血漿への応用について検討した。

[実験1] マツトのプール血漿を用いて再現性を、血清を用いてR I A 法との相関を検討した。測定内再現性は全ての項目でC V = 8% 未満 ( $n=17\sim 20$ )、測定間再現性はいずれもC V = 10% 未満 (5回測定)、R I A 法との相関も全ての項目で $r=0.90$ 以上と良好であった。また、0濃度のキャリブレーションを使用して求めた最低検出感度は、 $T_3$  0.23ng/ml,  $T_4$  0.40 $\mu$ g/dl,  $FT_3$  0.96pg/ml,  $FT_4$  0.41ng/dlであった。

[実験2] 無処理の7週齢S Dマツトにおける血漿中の甲状腺ホルモン濃度を測定した。 $T_3$ と $FT_3$ には $r=0.802$ ,  $Y=3.35X+1.76$ 、 $T_4$ と $FT_4$ には $r=0.839$ ,  $Y=0.26X+0.37$ で有意な正の相関性が認められ、測定値はいずれも最低検出感度以上であった。

[まとめ] 1. E I A 法、F P I A 法によるヒト臨床検査用の測定キットは、マツトの血中甲状腺ホルモン濃度測定への応用が可能と考えられた。2. 本法によりマツトの血中 $T_3$ ,  $T_4$ ,  $FT_3$ ,  $FT_4$ 濃度を自動分析機によって簡便かつ迅速に測定できることは、毒性試験における甲状腺機能の評価に有用な手段であると考えられた。

r h I L-6を持続的に産生する形質転換BHK-21細胞を移植したヌードマウスに認められた諸変化

○芹沢 功、柳田 誠、伊藤綾子、加藤尚志\*、大橋秀哉\*、  
三箇山俊文\*、西 信介\*、井上英男\*、天野健次

キリンビール(株) 安全性研究所、医薬開発研究所\*

〔目的〕 遺伝子組換えによりヒト型 I n t e r l e u k i n - 6 (以下、r h I L-6と略)を持続的に発現する形質転換BHK-21細胞(以下、BHK/I L-6細胞と略)を作製、ヌードマウスに移植し、r h I L-6の作用を経時的に検討したので報告する。

〔方法〕 6週齢の雄性BALB/cSlc-nuマウスの皮下に、BHK/I L-6細胞または無処置のBHK-21細胞をそれぞれ $1 \times 10^7$ 個/マウス移植した(以下、前者をI L-6群と略)。移植後3、6、10、13、17、20日目に採血と剖検を行い末梢血の血液学的検査、大腿骨の骨髓像検査ならびに肝臓、腎臓、副腎、脾臓、大腿骨、リンパ節の光顕による病理組織学的検索を行った。

〔結果〕 移植されたBHK-21細胞ならびにBHK/I L-6細胞はヌードマウスの皮下で持続的に増殖し、それに伴いI L-6群においては次のような変化が認められた。血中r h I L-6濃度の上昇、体重増加の抑制、脾臓重量の著しい増加が、血液学的検査では血小板数の増加と著明な好中球数の増加が、骨髓像においても顆粒球系細胞の増加とリンパ球系細胞数の減少がそれぞれ認められた。また、病理組織学的検索では、骨髓、脾臓において、移植後3日目に巨核球の大型化が認められたが、6日目以降は顆粒球系細胞の著しい増殖が優勢となった他、脾臓の動脈周囲リンパ鞘にポリクローナルなプラズマ細胞の浸潤が認められた。リンパ節においても顆粒球系細胞とプラズマ細胞の浸潤が認められた。その他、I L-6群で副腎皮質束状帯における空胞の消失が10日目以降に認められた。

金津 赫生, 望月 雅裕

筑波大学医療技術短期大学部, ポゾ・リサーチセンター

マウス赤血球が pH 7.40, 37 °C のトリス・マレイン酸食塩液中で 3~4 時間の lag time を経て一気に溶血すること, この溶血が MW 66,700 のデキストランにより抑制されることを前回報告した. 演者の一人が同様の方法で追試したところ, 4 時間まで約 10% の溶血にとどまり一気に溶血するに到らなかった. そこで初期条件に検討を加えた. ICR マウス心臓よりヘパリン採血し, 保温生食にて 3 回洗浄, 290 mOsm に調整したトリス・マレイン酸緩衝液 (pH 7.40) 5 ml 中に 10  $\mu$ l 混和し 37 °C に孵置した. 定時的に一部を血球計算板に入れ位相差顕微鏡下で観察した.

赤血球は 15 分程のサイクルで Echinocyte-Discocyte-Spherocyte の形態変化を繰り返すが, Echinocyte および Discocyte の状態の時に計算板に入れられた赤血球は容易に溶血しないが, Spherocyte の状態に入れられた場合は数分の lag time の後, 計算室の辺縁から溶血し始めた. この間, 赤血球容積の膨大は見られず, 後に小球性のゴーストを残した. アデノシンや  $Ca^{2+}$  が溶血を促進したり, 抑制したり不定の作用を示すのはそれぞれ Discocyte や Echinocyte を惹起する働きと関連すると推測される.

マウス赤血球が血漿蛋白を除いた状態で短時間内に球状化する条件・機構について引き続き検討する予定である.



○鮫島秀暢，岡崎啓幸，池田浩明，中間和浩，永田良一

株式会社 新日本科学

バイオ技術による医薬品や中枢神経系作用薬などの開発に伴い，安全性試験におけるサル，特に，カニクイザルの利用が近年増加する傾向にある．また，安全性試験において経時的な血中濃度測定がおこなわれることも少なくなく，採血によるストレスおよび採血量が動物に対して大きな負荷を与える場合もある．その影響を調査することは，試験成績評価の上でも重要であると考えられる．今回，我々は株式会社新日本科学の霊長類研究施設において安全性試験で使用される推定年齢4才前後，体重3～5kg前後の無処置カニクイザル（原産地：インドネシア）を用いて，24時間で一定量（3mlまたは5ml）の血液を5回（0，1，3，6，24時間）採血し，採血量による血液学的検査に関する影響を調べた．その後1，3，4，6，および13日目に0.5mlの血液を採取しその回復状況を調べた．結果は，3mlおよび5mlの採血群とも，赤血球数，ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値が採血3日目頃から軽度に減少し，6日目には網状赤血球の増加が随伴し，13日目にはいずれの値も正常に回復した．

ラット血漿における異型性CKアイソエンザイムの  
出現機序について

○川原潤一、佐藤誠孝、黒澤晴美、和田通恵、天野健次

キリンビール(株) 安全性研究所

【目的】電気泳動法による血漿creatine kinase(CK;EC2.7.3.2.)のアイソエンザイム分析では、既知の3種のアイソエンザイム(BB、MB及びMM)の他に、これらの分画の間に異型性アイソエンザイムが認められる。ヒトにおける異型性アイソエンザイムについては、既にいくつかの報告があるが、実験動物については数少ない。そこで今回、ラット血漿中でBBとMBの間に認められる異型性アイソエンザイム(BB-MB)について検討したので、その成績について報告する。

【方法】動物は7～8週齢の雄性Crj:CD(SD)系ラットを使用した。血漿は、エーテル麻酔下で腹大動脈より採血したヘパリン血漿を使用した。脳粗抽出液は、脳をトリス塩酸緩衝液(20mM、pH8.5、5mM塩化マグネシウム含有)中でホモジネート後、4℃、12,500×g、30分間遠心した上清を用いた。CKアイソエンザイムの測定は、セルロースアセテート膜を用いた電気泳動法、CK活性はNADPH法により測定した。

【結果／考察】(1)ラット血漿中におけるBB-MBは、アルブミンと電気泳動移動度が一致し、活性低下の軽度な4℃保存下で著しく増加した。(2)低温保存下でBB-MB比率の増加とBB比率の減少に高い相関関係が認められた。(3)BB-MBは、脳粗抽出液(BB)単独及びアルブミン添加によって形成されなかったが、血漿添加により形成が認められた。(4)脳粗抽出液中でのBB-MB形成は、熱不活化血漿添加でも認められたが、2-MEおよびEDTA添加により抑制された。

以上の結果より、BB-MBは、BBが血漿中の物質(陽性に荷電し、耐熱性を有する、おそらく2価の陽イオン)と酸化還元反応を介してtransformationしたものと推定された。

矢野友啓<sup>1</sup>、石川学<sup>2</sup>、市川富夫<sup>1</sup>

国立健康・栄養研・応用食品<sup>1</sup>、日大・農獣医・食品化学<sup>2</sup>

4-ニトロキノリン1-オキサイド(4NQO)によって誘発される肺腫瘍発生は、グリセロール同時処理により促進されることが知られている。しかし、その促進要因について詳しく検討されていない。今回、肺腫瘍促進要因の1つとして肺における活性酸素発生能の関与について検討した。実験には、6週齢のddY、BALB/C及びA/J系雄性マウスを用い、森の方法に従って4NQOを10mg/kg体重の用量で実験開始日に1回皮下投与した。グリセロールは5%水溶液として実験期間中自由に摂取させた。肺のミトコンドリア、ミクロソーム及び核画分からの活性酸素発生能の測定は、電子供与体としてNADPH及びNADHを用い、活性酸素の増感剤としてルシゲニンを用いた化学発光法により行なった。

その結果、ddY系マウスの肺から調製した肺ミクロソーム及び核画分のNADPH及びNADHに依存した活性酸素発生能は、グリセロール処理により経時的に増加傾向を示した。それに対して、BALB/C及びA/J系マウスから調製した肺ミクロソーム及び核画分のNADPH及びNADHに依存した活性酸素発生能には、グリセロール処理による増加は認められなかった。この結果は以前に報告されたグリセロールによる肺腫瘍発生促進の系統差の結果と一致した。このことから、グリセロールによるマウス肺腫瘍発生促進に関する要因の1つとして、肺における活性酸素発生能の亢進が関与している可能性が示唆された。

久富晃彦 木村守 前田雅志 松本正博 小原要 野口英世

藤沢薬品工業(株)安全性研究所

非イオン性界面活性剤であるHCO-60をイヌ・サル・ウサギ・モルモットおよびラットに単回静注すると、イヌにのみアナフィラキシー様症状が認められ、それは血漿中ヒスタミン値の上昇を伴った。すなわち、1.25mg/kg以上の用量で投与後10分をピークとする血圧低下、紅潮・腫脹などのアナフィラキシー様症状がみられ、加えて用量依存的に血漿中ヒスタミン値が上昇した。これに対して、サル・ウサギ・モルモットおよびラットでは、50あるいは100mg/kgの用量を投与してもアナフィラキシー様症状はみられず、血漿中ヒスタミン値も変動はなかった。イヌにおけるこれらの症状の発現はH<sub>1</sub>ブロッカーであるジフェンヒドラミン(5mg/kg)の前処置で抑えられたが、H<sub>2</sub>ブロッカーであるシメチジン(5mg/kg)の前処置では、HCO-60による症状発現を抑えることができなかった。したがってイヌにおけるHCO-60のアナフィラキシー様症状発現は、ヒスタミン遊離につづくH<sub>1</sub>レセプターを介して起こることが示唆された。次に、遊離ヒスタミンの由来細胞を探索するためにHCO-60投与後のイヌ肝および皮膚中のマストセルを組織学的に検索したところ肝マストセルは形態学的に正常であったが皮膚のそれは明らかに脱顆粒形状を示し、ヒスタミンの遊離を窺わせた。以上の結果は、HCO-60投与による中毒症状がイヌにより強く現れることを示し、それは皮膚マストセル中のヒスタミン遊離を介して起こるものと推定される。

田中 光<sup>1</sup>，玉野静光<sup>1</sup>，河部真弓<sup>1</sup>，佐野真士<sup>1</sup>，  
福島昭治<sup>2</sup>，白井智之<sup>1</sup>

<sup>1</sup>名市大・医・第一病理，<sup>2</sup>大阪市大・医・第一病理

【目的】臓器標的性の異なる5種類の発癌物質を前処置した多臓器中期発癌性試験法を用い、4種の化合物について全身諸臓器に対する発癌修飾作用を検討した。

【方法】6週齢のF344系雄ラット115匹を用い、複数の臓器に発癌イニシエーションを行う目的で、実験開始後4週間のうちに、DEN(100 mg/kg, i.p. 1回)，MNU(20 mg/kg, i.p. 4回/2週間)，BBN(0.05% 飲料水，2週間)，DMH(40 mg/kg, s.c. 4回/2週間)，DHPN(0.1% 飲料水，2週間)を投与した(DMBDD処置)。5週目からは肝発癌物質2AAF(0.01%)およびethionine(0.25%)、天然の酸化防止剤BHA(2%)およびcatechol(0.8%)をそれぞれ混餌投与した。またDMBDD処置のみの対照群、DMBDD無処置各投与群も設定した。全経過28週で屠殺剖検し、全身諸臓器を病理組織学的に検索した。

【結果】2AAF投与群では、肝臓で小増殖巣および過形成結節の有意な増加が示された。ethionine投与群では、肝臓の小増殖巣の増加が認められた。BHA投与群では、前胃で過形成、乳頭腫および扁平上皮癌が、膀胱でも累積カイ二乗検定により膀胱病変(PN過形成、乳頭腫、癌)の有意な増加がみられた。catechol投与群では、前胃で過形成および乳頭腫の、腺胃においても粘膜下過形成および腺腫の有意な増加が認められた。その他の臓器にも腫瘍性病変が各群で観察されたが、いずれも対照群との差異はなかった。

【結論】今回用いた4種の化合物は個々の標的臓器で発癌促進作用を示し、この試験法により比較的短期間に一頭で標的臓器の異なる被験物質の修飾作用の検索が可能であることを明らかにし得た。

福崎好一郎<sup>1</sup>, 北原光一<sup>1</sup>, 古謝武志<sup>1</sup>, 永田良一<sup>1</sup>, 深瀬広幸<sup>1,2</sup>, Scott E. Lukas<sup>2</sup>

<sup>1</sup>)新日本科学 薬理研, <sup>2</sup>)ADARC, McLean Hospital / Harvard Medical School

Morphine 依存カニクイザルの退薬症候に対する向精神薬および opioide の作用を調べ、カニクイザルを用いた身体依存性試験の有用性を検討した。

試験には体重 3.5~5.5kg の雄性カニクイザルを用いた。依存は 3 mg/kg の morphine hydrochloride を 1 日 4 回、6 ヶ月以上背部皮下に反復投与し作成した。退薬症候は Seevers (1930) の方法を一部改良して評価した。Morphine を 18 時間休薬して、退薬症候が現われているカニクイザルに morphine (3~12mg/kg), naloxone (0.01~0.1mg/kg), haloperidol (0.01~0.1mg/kg), imipramine (2~10mg/kg), chlorpromazine (0.01~2mg/kg), butorphanol (0.01~ 3.2 mg/kg), buprenorphine (3~100 μg/kg) あるいは生理食塩液を皮下投与し、2 時間後まで観察した。

Morphine を休薬すると vocalization, restlessness-pacing, retching および vomiting などの退薬症候が観察された。退薬症候の強さから判断するとカニクイザルの依存の程度はアカゲザルで報告されているのとほぼ同程度であった。

Butorphanol は morphine と同じように退薬症候を用量依存的に抑制した。Buprenorphine は naloxone よりは弱いものの退薬症候を増強させ、imipramine, chlorpromazine および haloperidol は退薬症候の一部の症状を抑制した。上記の実験終了後、依存能を維持するために morphine 7.5 mg/kg を 12 時間毎に 1 日 2 回投与した。この投与条件下での依存の程度は morphine 3 mg/kg を 1 日 4 回投与して依存を形成させた時とほとんど変わらなかった。

これらの結果はアカゲザルでの評価と本質的に同じと考えられ、カニクイザルは opioide 型の身体依存性試験においてアカゲザルに代わる有用な試験系になると思われる。

中山由美子、掘井和成、田中裕子、奥野泰由、吉武彬

住友化学工業株式会社 生物環境科学研究所

ヒト用に開発された総合血液学検査装置テクニコンH・1について、動物血液（ICR系マウス、SD系ラット、ピーグル犬、アカゲザル）に適用可能か否か検討した。合計25項目につき、同時再現性、直線性、従来法との相関性を検討した。

【血球計数】各動物共、赤血球数、白血球数、血小板数などの血球計数13項目について検討を行った。その結果、これらの全ての項目において、同時再現性、直線性ともに良好な結果が得られた。

従来機種（CC-800）との相関性に関しては、血小板数において、平均値でやや高値（約1.2-1.8倍）を示した。本機器ではレーザーを用いてヘモグロピンを含まない細胞を検出しており、小赤血球や大血小板との区別が明確にできるため、細胞の大きさで分別していた従来法に比べ、高値を示したものと考えられる。

【白血球分類】本機器では、白血球分類に細胞の大きさとその酵素活性（ペルオキシダーゼ）を利用して約6000個の細胞を測定している。各動物共、好中球、リンパ球では従来法（目視法、ヘマトラック）との相関、再現性共に良好であった。単球、及び好酸球は分類比が低値を示すため、従来法との相関は悪かった。しかし、再現性は従来法と比べて良好であった。

以上の結果から総合血液学検査装置H・1はマウス、ラット、イヌ、サル動物血液の測定業務に充分使用できると判断した。

○清水憲次、仲澤政雄<sup>1)</sup>、日下部憲道<sup>2)</sup>、神園健、福田久夫<sup>3)</sup>、鹿野りえ、内野富弥<sup>4)</sup>、小山秀一、本好茂一<sup>5)</sup>

(<sup>1)</sup>富士生物科学研究所<sup>1)</sup>、<sup>2)</sup>EM-ラボシステム(株)<sup>2)</sup>、<sup>3)</sup>フクダ EM-イ工業(株)<sup>3)</sup>  
<sup>4)</sup>動物ME診断センター<sup>4)</sup>、<sup>5)</sup>日本獣医畜産大学<sup>5)</sup>

薬理・毒性試験における循環器系の検査として、心電図検査は重要な意義を持っている。しかし、従来は麻酔下の心電図あるいは動物を保定して短時間の心電図を測定することが一般的であり、薬物の評価に当っては麻酔や保定による動物への影響があった。我々はこれらの問題を解決するために、イヌにおける無麻酔、無拘束の長時間心電図検査を確立し、薬理・毒性試験の有用な評価手法とした。今回は、ビーグル心電図の日内および日差変動等の基礎情報ならびに既知の薬物による長時間心電図への影響について報告する。

(方法) 健康なビーグル(富士F-マフ-ム)を、温度 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $50 \pm 10\%$ 、照明時間6時から18時に設定された飼育室に収容し、ステンレス製ケージで個別飼育した。餌は1日300gを午前中に、水は自由に摂取させた。長時間心電図はホルター心電計QR1200(フクダ EM-イ社製)を用いてM-X誘導により測定した。まず、心電図の日内および日差変動の検討としてビーグル 6頭の3日間連続心電図を測定した。次に、少数例にジギタリス製剤を1日1回、2日間連続経口投与し、投薬前日から3日間連続して心電図を測定した。

(結果) 正常なビーグルの心拍数には、深夜から早朝にかけて減少、日中から夕刻に増加する日内リズムがみられた。この日内リズムは3日間ともほぼ同様の傾向を示し、明かな日差変動は認められなかった。不整脈では、イヌで通常みられる洞性不整脈以外に、4頭に心室性期外収縮が、2頭に第II度房室ブロックがみられたがいずれも24時間(総心拍数約12万拍)で5回以内の低頻度の発現であった。また、これらの不整脈に3日間同一傾向は認められなかった。ジギタリス製剤を投与した1例では、投与1日目に明かな異常はみられなかったが、2日目の投与後4および5時間に1時間当たり100回以上の心室性期外収縮が認められた。この期外収縮はいずれも数分間集中して発現しただけで、他の時間帯にはほとんど認められなかったことから、従来の短時間の心電図検査では検出できなかったものと考えられた。また、他の例では長時間心電図と同時に短時間の心電図測定を行い、得られた変化の相違を検討したので合せて報告する。



安達智子 堀口恵子 柳田由紀 笠間菊子 小島幸一

財団法人食品衛生センター 秦野研究所 生化学研究室

補体系は、その反応の基礎的な研究の進歩にもかかわらず、病態や毒性には十分に応用されていない。また近年の医用材料等の生体適合性の論議において、補体系の関与が明らかになってきている。そこで我々は、毒性試験においても補体系の変動を簡便、迅速にとらえるための一方法として、ラット血清中のC3たんぱく質の測定法を確立した。そして、この測定法を用いて成分の異なる飼料を与えたラットにおけるC3たんぱく質の経時的変化の基礎的検討を行った。

【方法】C3たんぱく質は遠心方式生化学自動分析装置を用いた免疫比濁法により測定した。測定値は、正常ラット血清を段階希釈して得られた吸光度の折れ線グラフから、正常血清の $\mu\text{l}$ 数として表す方法をとった。動物はJcl:Wistar雄ラットを用い、市販のCE-2（日本クレア）あるいは精製飼料（AIN-76配合に準じ、たんぱく質を10%とした）で5週齢から11週齢まで飼育した。経時的に尾から採血し、得られた血清について、C3たんぱく質、補体価（CH50：Mayer法）、総たんぱく質（ビュレット法）、アルブミン（免疫比濁法）を測定した。

【結果と考察】ここで確立したC3たんぱく質の測定法は、簡便、迅速かつ再現性が高く、毒性試験へ応用し得る方法であった。また免疫比濁法において、目的物の精製品が入手困難である場合、正常血清の希釈グラフを用いる方法が有効であった。

CE-2および精製飼料を与えたラットにおいては、そのC3たんぱく質の成長に伴う増加は同様であったが、定常状態に達した時点での値には差が認められることが明らかとなった。本法は補体系の変動をとらえる一つの方法として有効であることが示唆された。

キノホルム毒性に対して、感受性の強いラットと弱いラットの近交系化について。

堀 眞一郎<sup>1</sup>、大谷 幸子<sup>1</sup>、小滝 一<sup>2</sup>、藤井 智子<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(財)東京都神経研、神経生化学、<sup>2</sup>東京大学、病院薬剤部

スモンの病因はキノホルム (5-chloro-7-iodo-8-hydroxyquinoline, clioquinol, Cf) という医薬品の副作用による神経障害である。この種の薬害を予知できなかつた一因に、中毒学の進展における未熟さがある。近年、中毒の研究の研究精度を高めるため、杯培養、器官培養、あるいは細胞培養を使用する検討が進められると共に、適切な動物種、動物系統の使用は無論のこと、新たな実験動物の開発が重要課題となっている。先に、私達はCfの毒性に対して遺伝的に感受性の強いラット (CfS) と感受性の弱いラット (CfR) がおり、この性質は継代できることを明らかにした。ここでは、Cfの毒性に対する感受性が兄妹交配によって継代される過程、および近交系化したCfS-ラットとCfR-ラットの血清生化学的性状、Cfの代謝および体内の過酸化脂質量における差異を検討した。

兄妹交配し継代することにより、CfSでは83%、CfRでは95%の確率でそれぞれの性質をもったラットが出生するまで近交系化することが出来た。この近交系化したCfS-ラットとCfR-ラットの血清の生化学的性状はUN、GPT、ALPがCfRで高く、LCHはCfSで高かった。Cfの吸収、代謝では、CfSとCfRの間で、吸収には差がないが、代謝速度はCfRの方が速い傾向を示した。Cfを200mg/Kg体重投与3時間後の過酸化脂質量は脳においてCfSの方が高い傾向が認められた。

毒性試験における多項目検査成績解析法  
(レーダー診断図)の開発

○五十嵐功, 小林直美, 古山佳子, 茨田享子, 田内清憲

財団法人 動物繁殖研究所

長期反復投与による毒性試験は、多大の費用と年月を必要とし、”やり直しのできない試験”とも言われることから、できるだけ多項目を、できるだけ頻繁に行うのが安全である。しかし、個々の検査項目の成績を比較検討することが容易としても、項目数が増えれば増えるほど、それらを総合的に判断することはむずかしくなる。我々は、すでに、多項目の定量的検査成績を視覚に訴えて総合的に判定する簡便法としてレーダー管理図を考案している。そこで、今回、この方法を、毒性試験の血液学および血液化学的検査成績の総合判定法(レーダー診断図法)として利用できるかどうかを、3種の実験的病態モデル動物を用いて検討した。

方法：3種の病態モデル動物(CCL<sub>4</sub>処置肝障害, Gentamicin処置腎障害, Phenylhydrazine Hydrochloride処置溶血性貧血)を、6週齢のWistar-Iwamichiラット、それぞれ雌雄7匹ずつを用いて作成した。この病態モデル動物およびそれぞれに対応する対照動物から、血液を採取し、血液学および血液化学的検査の合わせて32の検査成績を得た。なお、供試ラットは採血前16時間の絶食を行った。得られたデータから、パーソナルコンピューター(NEC PC-9801)を用い、当研究所で開発したプログラムにより、1)多項目のデータを同列に比較するための数値変換(標準化)、2)視覚的に総合判断するためのレーダー診断図の作成をおこなった。

結果：本プログラムで処理を行った結果、3種類の薬剤による病態モデル動物の検査成績を短時間で視覚的に比較することが可能であり、レーダー診断図のパターンから標的器官の推定も可能であった。

毒性試験に関わるデータの統合処理環境

《 TS-1 / SAS 》

○北山英太、田村博信、中沢素邦、山下康弘、安達孝浩、木谷睦、稲垣利明、寺坂真紀子、河口和寛、鷺見信好

日本新薬株式会社 安全性研究所

TS-1<sup>1</sup>は、毒性試験データの入力処理、入力値間の演算処理、SAS<sup>2</sup>による統計処理、SAS処理結果に基づく作表・作図処理を支援するデータ管理システムならびにSASインターフェースとして自社開発したものである。TS-1はパソコンネットワーク上でSASを中核とする統合的なデータ処理環境を提供する。

GLPにシステムバリデーションの観点が導入され、特に統計処理機能の信頼性保証については汎用統計パッケージとして世界中で最も多くのユーザーに使い込まれているSASの利用が有効な解決策だと考えられた。TS-1は、SASをバックエンドの統計処理プロセッサとして毒性試験データのルーチンの処理体系に組み込むためのアプリケーションであり、下記の6項目に配慮し、汎用性の高いデータベース言語 dBASE III plus を用いて開発した。

- ①入力データの2重チェック (verification) 機構を組み込む
- ②アクセスコントロールならびにフローコントロールを行う
- ③処理項目 (例: RAT 肝相対重量) 毎に入出力桁数・演算式・検定手法をマスターテーブルとして管理することにより、入出力制御、演算・統計処理をルーチン化し、またパラメータの変更 (例: t検定→多重比較) によるプログラムの修正を排除する
- ④TS-1とSASとの間のデータファイルならびにSASプログラムファイルの授受を自動化する
- ⑤SAS処理結果を直接用いて高品質の図表を自動的に作成する
- ⑥ネットワークによりデータならびにプログラムを一括管理する

<sup>1</sup> Toxicology · Statistics - System 1

<sup>2</sup> Statistical Analysis System, SAS Institute Inc.

## 変異原性試験、分配係数及び急性毒性の多変量解析（数量化理論2類）による化学物質の発癌性の判別

○高木篤也、佐井君江、長谷川隆一、黒川雄二

国立衛生試験所 毒性部

【目的】化学物質の発癌性予測に各種の変異原性試験が用いられているが予測性は十分とは言えない現状である。一方、疎水性や<sup>1)</sup>、急性毒性と発癌性との間に相関性が認められた<sup>2)</sup>との報告があるが、それぞれ単独では発癌性の予測に十分でない。そこで変異原性試験、分配係数、急性毒性のデータを多変量解析の手法を用いて総合的に評価することによって、発癌性の予測向上が得られるか否かについて既報の発癌性試験データを対象に検討を行った。

【方法】発癌性判別のためのアイテムとして、エームス試験、マウスリンホーマ試験、染色体異常試験、姉妹染色分体交換試験、オクタノール：水分配係数及びLD50値(p.o.)を用い、米国NTPで実施された発癌性試験のデータの中で、これらデータのそろっている53の化学物質について林の数量化理論2類<sup>3)</sup>による発癌性の判別を行った。

【結果】39の発癌性物質(equivocalなものを含む)の内、37物質が発癌陽性と判別され(正答率95%)、14の非発癌性物質の内、10物質が発癌陰性と判別され(同71%)、合わせて53物質の内、47物質が正しく判別された(同89%)。また、各変異原性試験と発癌性との偏相関係数は低く(0.15~0.17)、分配係数(0.53)、LD50値(0.46)が比較的高い値を示した。以上の結果、用いたサンプル数は比較的少ないながら、in vitroの変異原性試験と比較的容易にデータの得られるオクタノール：水分配係数、LD50を用いて数量化理論2類により解析することにより発癌性予測が向上する可能性が示唆された。

1) G. D. McCoy et al., *Carcinogenesis*, 11, 1111-1117, 1990.2) B. Metzger et al., *Risk Analysis*, 9, 169-177, 1989.3) C. Hayashi, *Ann. Ins. Stat. Math.*, 3, 69-98, 1952.

會田喜崇 鎌田栄一 中館正弘

国立衛生試験所 安全センター 総合評価研究室

現在、化学物質の安全性評価に用いられる毒性試験の簡素化及び使用動物数の削減が求められている。安全性評価に用いられる無作用量(NOEL)はラットまたはマウスの長期毒性試験の結果から得られる。しかし、短期暴露の成績から安全性評価が可能となれば使用動物数も削減でき、より多くの化学物質について毒性試験の実施が可能となる。今回、長期暴露と短期暴露の毒性試験で求められる無作用量あるいは最小有害影響量(LOAEL)の関係を既存の情報を用いて検討し、安全性評価の際に適用される安全係数の妥当性および信頼性の高い暴露期間について検討を行った。《研究方法》脂肪族ハロゲン化合物18種類(Chloromethane; 2,4,6-Trichlorophenol; Chloroethane; 1,1,2,2-Tetrachloroethane; Chlorobenzene; Carbon tetrachloride; 1,1-Dichloroethane; Pentachlorophenol; 1,2-Dichloroethane; Hexachlorobenzene; 1,1-Dichloroethylene; Bromodichloromethane; 1,2-Dichloropropane; Dibromochloromethane; 1,1,1-Trichloroethane; Tribromomethane; 1,1,2-Trichloroethane; Chlorodane)の連続投与毒性試験の成績を、米国DHHSが発行しているToxicological Profileシリーズを用いて検索した。ラット及びマウスを用いた経口投与および吸入暴露の成績で、体重、肝、腎、神経、消化管、血液、循環器への影響についてのNOAELおよびLOAELを調べ、同一化合物、同一動物種、同一投与経路で長期暴露(52週以上)の成績と特定の暴露期間(2週、4週、13週、26週)の成績が共に存在する試験系を選び出しそれぞれのNOAELおよびLOAELの関係を検討した。《結果及び考察》上記方法により検討した結果、2週及び4週間暴露の成績では長期暴露のNOAELあるいはLOAELにくらべ10倍以上のひらきのある成績が散見された、しかし13週以上の暴露期間の試験では全ての成績が10倍以下であった。また13週および26週暴露の成績では、長期暴露のNOAELあるいはLOAELに比べ小さい値が多数認められた。今回の検討結果から、2週並びに4週間暴露の成績で長期暴露の有害性評価を行うのは危険であり、13週間暴露の毒性試験では従来の安全係数を用いた評価方法で比較的信頼性の高い評価が出来ると考えられる。また、52週以上の長期暴露ではかえってNOAEL或いはLOAELの値が高くなる場合も多くみられ、特定の影響を評価する場合には加齢の影響で感度が悪くなることも考えられる。

五十嵐俊二

エーザイ株式会社 研開情報部

医薬品の申請に必要な技術的諸問題に関するハーモニゼーション国際会議（ICH、1991、Brussels）で、長期反復投与毒性試験に12カ月の投与が必要か、あるいはECの現行ガイドラインの如く、6カ月投薬で足りるかについて討議された。日本からは製薬協が実施したアンケート調査の結果（第17回毒科学会に発表）とその後実施した雑誌に公表された毒性試験データの解析結果を報告した。1985年以降に日本国内で雑誌に掲載された12カ月以上の長期毒性試験181報（ラットの92、イヌの81、サルの8）、177化合物について、それらに対応する3カ月試験（一部6カ月試験）と対比、調査した。無影響量が3カ月試験との比較において12カ月試験で1/3以下に減少する事例はラットで11/55、イヌで9/52、サルで0/7であった。また3カ月試験で見られなかった新規毒性所見1が2カ月試験で得られた事例はラットで22/92、イヌで7/81、サルでは0/8であった。投薬期間の長期化によって毒性発現が質的、量的に強化されるのは、ラットでは慢性腎症、精巣の萎縮やいくつかの臓器におけるfatty changeやfibrosisなどの加齢に伴う変化の促進が主であった。一方、イヌではベンゾジアゼピン誘導体による痙攣と死亡、フェノチアジン誘導体による水晶体の白濁、Ca拮抗剤による歯肉肥厚など特殊な毒性が認められたが、これらはいずれも試験化合物の薬理作用に関連するものであり、また6カ月投薬により検出可能なものであった。今回の文献調査から、先に報告したアンケート調査と同様に、いずれの試験動物種においても、長期試験の反復投与期間は6カ月で足ると結論した。

一般演題

平成4年7月24日(金)

第3会場

演題番号312-332



*Listeria monocytogenes* 感染実験系を使用した化学物質の  
免疫毒性に関する研究

井上 智、<sup>1)</sup>水谷秋子、<sup>1)</sup>中村恒彰、<sup>1)</sup>増田光輝、森田千春、<sup>2)</sup>小野 宏

予研 (獣疫部)、<sup>1)</sup>ライオン (安全性評価センター)、<sup>2)</sup>食薬セ (秦野研)

環境中の化学物質が生体の免疫機能に異常を引き起こすことが知られるようになり、このような化学物質の生体に対する安全性を評価する試験系 (免疫毒性試験) が必要と考えられる。

感染症は生体の免疫系バランスが崩れた時に起こりやすく、免疫機能の異常を知るパラメーターとして用いることができる。そこで、感染症を利用した免疫毒性評価試験系の確立を試みた。

〔方法〕 免疫機能に影響することが報告されている化学物質 (diethylstilbestrol: DES、cyclophosphamide: CPA) を5週令 BALB/cマウスに5日間連続皮下投与。3日間の休薬後、*L.monocytogenes* を感染させてリステリア感染マウスの病態を7日間観察した。接種菌株はヒト患者由来の Y 1 株を使用した。

〔結果と考察〕 DESは用量依存的にマウスのリステリアに対する感受性を低下させ、CPAはマウスのリステリアに対する感受性を亢進させた。CPAの影響は、今回設定した80mg/kg/day投与群よりも投与量の少ない40mg/kg/day投与群の方で顕著であった。マウスのリステリア感染抵抗性を死亡数、LD50値、肝病変により比較したところ、肝病変の比較が化学物質の感染抵抗性に対する影響を見るのに優れていた。

化学物質の免疫毒性を *L.monocytogenes* 感染実験系により評価するには、今後、感染抵抗性の変化を捉える感度の高い検査方法の確立が望まれた。さらに、使用化学物質の免疫系に対する作用機序と *L.monocytogenes* 感染に対するマウスの防御機構の関係を明らかにしていく必要があると考えられた。

○川崎 靖、高田幸一、中路幸男、津田充宥、黒川雄二  
中村晃忠\*、小嶋茂雄\*\*、佐藤道夫\*、伊佐間和郎\*  
国立衛生試験所 毒性部、\*療品部、\*\*環境衛生化学部

医療材料として種々の高分子化合物が利用されている。実験動物に医療材料を長期間埋植した際に、埋植局所に発生する腫瘍は異物発癌とされ、化学発癌と区別されている。

本報では、PU埋植による腫瘍発生機序として、化学発癌が関与する可能性について検討した。更に、PU埋植物表面構造（平滑状、フォーム状）の腫瘍発生率への影響についても検討した。

一群30匹の Wistar 系雄ラットの背部皮下に種々の条件を備えたPU フィルム（20×10×1 mmサイズ）を埋植し、2年間観察した。実験1：PU、シリコーン（Si）及び両者の1:1ブレンドポリマーフィルムを各一枚埋植した。実験2：表面構造及びオリゴマー含有量の異なる6種フィルムを各一枚埋植した。対照群としてSiフィルムを用いた。実験終了後、埋植物周囲組織の病理組織学的検査を行った。埋植部位に発生した腫瘍は悪性線維性組織球腫が大半であった。腫瘍発生率は、実験1ではPU>1:1ブレンドポリマー>Siの順であった。また、実験2において、表面構造の差による腫瘍発生率は平滑状フィルムがフォーム（有孔）状フィルムより高かった。組織像では、平滑状のものは線維性カプセルに囲まれ、炎症像は見られなかった。フォーム状フィルムは、同様に線維性カプセルに囲まれているが、材料内部にも結合織が侵入し、炎症と血管新生が持続しており、器質化している。一方、オリゴマー含有量の差による腫瘍発生率の差は認められなかった。各種フィルムからの溶出物（オリゴマー及び分解物）による変異原性も認められなかったことから、PUフィルム埋植による腫瘍形成には、化学発癌の要素は少ないと考えられる。

## 遅延型アレルギー反応（1）5種類のメタクリル酸誘導体の反応性の検討

○金澤 由基子 山脇 智予 小島 幸一

食品薬品安全センター 秦野研究所 免疫毒性学研究室

現在、多種類の合成高分子材料が開発され、日常生活はもちろん医用等の特殊な分野も含めて幅広く利用されている。しかし、これらの多くは接触性皮膚炎を起こす可能性があることも知られている。この接触性皮膚炎を反映する動物試験法では、モルモットを用いた Maximization test が最も広く行われており、医薬品毒性試験のガイドラインにも収載されている。

今回我々は、医用領域において有用でありながら、必ずしも反応性が明らかでないメタクリル酸モノマーおよびその誘導体計5種類について用量による反応性の違いと、5種類の物質間の交叉反応性について検討した。また、*in vitro*の試験系であるPFC試験を行い、Maximization testの結果との相関性についても検討を加えたので報告する。

Hartley系雌性モルモット(4週齢、クリーン)を用い、Maximization testを実施した。被験物質として、メタクリル酸、メチルメタクリル酸、2-ヒドロキシエチルメチルメタクリル酸、1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロイソプロピルメタクリル酸および2-トリメトキシシリルプロピルメタクリル酸を用いた。感作用量は、それぞれ一次刺激を示さない最大濃度を最高用量として3用量を設定した。誘発は、一次刺激を示さない最大濃度を用いて行った。PFC試験は各被験物質1用量を選んで実施した。5種類のメタクリル酸誘導体についてMaximization testを行ったところ、物質により反応性に差が認められた。交叉反応性およびPFC試験の結果においても興味深い知見が得られた。それらの関連性についてさらに検討中である。

○佐藤康一，服部浩之，山口文恵，古濱和久，高山 敏

第一製薬（株）開発研究所 安全性研究センター

薬剤の抗原性を増幅して調べるためには感作時にアジュバントを併用するが、従来のフロイント完全アジュバント（FCA）は IgG クラスの抗体産生を、水酸化アルミニウムゲル（Alum）は IgE 抗体産生を促進するとされている。今回、従来のアジュバントの効果を確認する目的で、薬剤あるいは薬剤-蛋白結合物を各アジュバントと共にモルモットに投与し、全身性アナフィラキシー反応（SA）の誘発を比較検討した。

ハートレー系雌性モルモット（6 週齢）に、臨床でのアレルギー性副作用が報告されている  $\beta$ -ラクタム剤 セフメタゾールあるいはセフトジジムの 4 および 40 mg/kg を、FCA との併用群では皮下、Alum との併用群では腹腔内に感作した。感作は 2 週おき 3 回行い、最終感作 14 日後に対応薬剤の 40 mg/kg を静脈内投与して SA を誘発した。また、最終感作 12 日後に採取した血清を用いた同種受身皮膚アナフィラキシー反応（PCA）で、特異的 IgG<sub>1</sub> および IgE 抗体を検出した。その結果、SA の発現頻度は 40 mg/kg 感作群で高く、アジュバント別では FCA 群の陽性率が高かった。PCA で検出された抗体価も共に FCA 群の方が高値を示し、SA の結果が裏付けられた。一方、蛋白結合物を用いた感作（0.02, 0.2, 2 mg/kg）では、アジュバントによる明確な差は認められなかった。

以上、薬剤をそのままアジュバントと共に感作して評価する場合には、Alum よりもむしろ FCA のほうが有用であることが示唆された。

井上 智彰、堀井 郁夫

日本ロシュ(株)、研究所、毒性・病理

### 【目的】

5-Fluorouracil系の抗悪性腫瘍剤である Furtulon とその masked compound である Neofurtulon について免疫系への毒性を評価するために、マウスを用い、免疫系臓器の変化を免疫組織化学的に検索した。

### 【方法】

BDF1系雄マウスに Vehicle、100～900 mg/kg の Furtulon または 300～2700 mg/kgの Neofurtulon を1～7日間連日経口投与し、最終投与翌日に屠殺し、血液学的検査、血中コルチコステロンの測定、免疫系臓器の臓器重量測定及び免疫組織学的検索(Thy1.2, Lyt-2, L3T4, kappa chain, Ia, MAC-1, IL-2レセプター)を行なった。また、摂餌制限動物における免疫毒性に関するパラメータの変化と、本系統薬物との関係についても調べた。

### 【結果】

両薬物共に高用量で摂餌量及び体重がやや低下し、胸腺重量、骨髄有核細胞数白血球数の低下が特徴的であった。これらのパラメータは投与3日目に既に有意に低下しているが、摂餌制限動物でも胸腺重量は低下したことから、医薬品の毒性試験の通常のパラメータでは、薬物に特異的な免疫毒性は検出しにくいと考えられた。胸腺の免疫組織化学的検索では、両薬物の中低用量群で胸腺細胞の過形成が認められ、過形成の部位では Ia 陽性の網状内被細胞を欠き、IL-2レセプター陽性細胞が正常の胸腺被質より少なく認められた。両薬物の高用量群では胸腺皮質の胸腺細胞減少が認められたが、摂餌制限マウスにおいても認められたことから、これらの薬物に特異的な変化ではないと考えられた。これらの結果より、胸腺の免疫組織化学的検索により通常毒性学的パラメータでは検出できなかった変化を捕らえることができることが示された。

五十嵐良明、大野圭子\*、土屋利江、中村晃忠

国立衛生試験所 療品部、\*毒性部

〔緒言〕末梢リンパ節検査は化学物質の接触感作性を予測する試験法である。この試験法は接触アレルギーを塗布すると所属リンパ節リンパ球が増殖するという原理に基づいており、これを *in vitro* で検出する。今回はマウス、ラットおよびモルモットを用いて4種の金属塩を試験し、それぞれの動物種のリンパ球増殖反応を比較した。

〔実験方法〕 $\text{NiSO}_4$ 、 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 、 $\text{CoCl}_2$  および  $\text{FeSO}_4$  を試験した。雌性 BALB/c 系マウス、F344 系ラット（6～8 週齢）および Hartley 系モルモット（300～350g）を1群3匹で用いた。各動物の両耳に試験物質または溶媒のみ（コントロール）を3日間連続で塗布した。最終塗布の翌日、所属リンパ節を取り出した後、リンパ球を遊離して96wellプレートに入れ、 $^3\text{H}$ -thymidine を加えて18時間培養した。液シンによって細胞内に取り込まれた  $^3\text{H}$ -thymidine 量 (cpm) を測定し、各試験群についてコントロール群の cpm に対する比、Stimulation index (SI) を求めた。

〔結果と考察〕感作性がある  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 、 $\text{CoCl}_2$  を塗布すると著しいリンパ球の増殖の促進が認められた。 $\text{NiSO}_4$  ではいずれの動物でも著明な反応が認められなかった。感作性のない  $\text{FeSO}_4$  を塗布してもリンパ球増殖は認めなかった。 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 、 $\text{CoCl}_2$  を塗布すると所属リンパ節重量および総リンパ球数の *in vivo* での増加が認められたが、リンパ球の *in vitro* での増殖率と比較するとその程度は低かった。 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  の場合はラットで最も反応が高く、 $\text{CoCl}_2$  ではマウスが高い反応を示した。モルモットは個体差が大きかった。ラットはマウス同様に末梢リンパ節検査に用いられることが示唆された。

○大庭和彦<sup>1)</sup>、小林和宏<sup>1)</sup>、山田雅彦<sup>1)</sup>、坂巻政次<sup>1)</sup>、小佐妻恒夫<sup>1)</sup>、  
杉谷幸男<sup>1)</sup>、竹内雅也<sup>2)</sup>、西方ゆかり<sup>3)</sup>、津久井誠<sup>3)</sup>、橋本有<sup>4)</sup>、  
黒木登志夫<sup>4)</sup>

1) ㈱臨床医科学研究所、2) ㈱札幌総合病理研究所、

3) 武田薬品工業㈱アグロ事業部農薬開発部、4) 東京大学医科学研究所

〔目的〕皮膚に対する発癌性試験は、通常マウスが使用されており、マウスはラットやハムスターよりも皮膚発癌に対する感受性が高いと言われている。今回、マウスとラットの長期間にわたる皮膚発癌の比較試験を行った。

〔方法〕ICR系雌マウスおよびWistar系ラット雄各20匹を用い、DMBA(7,12-dimethylbenz(a)anthracene)をアセトンに溶解させ、各動物の剪毛した背部皮膚に1匹50 $\mu$ g(200 $\mu$ l)を週2回、マウスは28週間、ラットは49週間塗布し、皮膚腫瘍の発生を観察した。

〔結果〕①マウスでは、塗布部位に2週時から発赤がみられ、その後、浮腫、痂皮へと移行した。9週時以降体重は増加抑制を示し、29週時の生存例は20匹中9例であった。ラットでは、塗布部位に発赤等の変化や体重増加抑制はみられず、50週時に1例が死亡した。②皮膚腫瘍の発生は、マウスでは4週時に19匹中2例(11%)にみられ、平均腫瘍数0.1個であったが、9週時には19匹全例に発生し、平均腫瘍数は4.7個、最終の30週時には9.0個と増加した。ラットでは25週時に20匹中3例(15%)に発生し、平均腫瘍数は4.1個となり、最終の50週時には5.9個と増加した。

③皮膚腫瘍の病理組織所見では、マウスは観察腫瘍総数161個中、乳頭腫129個(80%)、扁平上皮癌31個(19%)、悪性線維性組織球腫1個(0.6%)、またラットは観察腫瘍総数115個中、乳頭腫75個(65%)、扁平上皮癌40個(35%)であった。

○下田 耕司、加藤 道幸、和賀井信彦、高山 敏

第一製薬開発研究所、安全性研究センター

〔目的〕薬剤による光毒性および光アレルギーの発生は臨床で重要な問題となっている。今回、アルビノマウスにおける光照射のみによる眼球の変化を組織学的に観察した。〔材料および方法〕飼育室環境（約30 lux、明暗サイクル12時間）に少なくとも2週間以上馴化させたアルビノマウス（BALB/CRJ、11週齢、雌）に白色蛍光灯（東芝 FL20SW、2600 lux）、UVAランプ（東芝 FL20SBLB、365 nm、1.3 mW/cm<sup>2</sup>）もしくは UVB ランプ（東芝 FL20S-E、315 nm、1.3 mW/cm<sup>2</sup>）を1日12時間ずつ1、3または7日間反復照射し、翌日にエーテル麻酔下で放血屠殺した。眼球は Davidson 液で固定、パラフィンに包埋した後、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、組織学的に観察した。

〔結果〕白色蛍光灯、UVA、UVBともに7日間照射後、眼球に変化が認められた。白色蛍光灯照射で網膜杆錐状体層外節に粗鬆化がみられ、UVA 照射では杆錐状体層外節の粗鬆化がより強く、網膜剥離が高率に認められた。さらに少数例には、外顆粒層配列の波状化が観察された。一方、UVB 照射では角膜および虹彩が壊死に陥り、眼房に細線維状物質の貯溜と軽度の細胞浸潤が認められた。しかし、網膜には変化は認められなかった。

白色蛍光灯および UVAはともに網膜変性を惹起したのに対し、UVB は角膜壊死を起こした。これらの相違は光線の波長、吸収部位の差によると思われる。



## 眼毒性試験における眼圧計およびリフラクトメーターの使用経験について

○岡崎啓幸，加島政利，鬼丸俊夫，伊原敏夫，永田良一

株式会社新日本科学

眼毒性試験での検査項目として今回，眼圧および眼球屈折率を測定する機会があり，バックグランドデータの収集を目的としていくつかの実験条件下における成績を得た．サルを用いた両検査に関する報告が少ないことからその使用経験について発表する．

実験動物には雄性カニクイザル（6才前後，4 kg 前後）を，また，使用機器は空圧圧平式電子眼圧計（ALCON PTG，日本アルコン株式会社）およびオートリフラクトメーター（RM-A6000，トプコン株式会社）を用いた．いずれも測定時には塩酸ケタミン（5-10 mg/kg，I.M.）による麻酔下で，前者は局所麻酔剤（ベノキシール）および粘膜保護剤（スコピゾール）を使用した．一方，後者は暗順応下，あるいは各種散瞳剤を適用後，測定した．

眼圧は左右でそれぞれ  $12.6 \pm 2.23$  あるいは  $11.4 \pm 1.27$  mmHg であり，明らかな左右差はみられなかった．また，異なる日の同じ時間帯に測定した時，左右眼圧の平均でそれぞれ  $11.8 \pm 1.27$  および  $14.3 \pm 2.10$  mmHg と統計学的に有意な差がみられ，日間差は明らかにみられたが，日内変動は無視できると考えられた．

一方，眼球屈折率（Spherical および Cylinder 値）には個体差がみられたが，左右の眼球間には明らかな差はなかった．また，繰り返し測定の結果は特に測定時間による明らかな差はなかった．

そのほか，日内変動および日間差等をさらに検討するとともにアトロピンなどの散瞳剤を点眼して眼圧および眼球屈折率に対する影響を経時的に検討した結果も合わせて報告する．

○岡元智文，樽見千利，永田健一，安田充也，大橋芳彦，  
末綱かおり，山下和男，真鍋淳，増田裕

三共株式会社 安全性研究所

〔緒言〕開腹による肝生検は多量の組織の採取が可能であり薬物の肝臓に及ぼす影響を知る方法の1つとして有用な手段である。今回ビーグル犬を用いて部分肝切除を行い，術後の変化を血液および血液生化学的に追跡した。また肝生検前後における肝臓中の薬物代謝酵素，グリコーゲン量について測定を行った。

〔材料および方法〕ビーグル犬をネンプタールで麻酔した後開腹し，Brenzcockの方法に準じて挫滅法により肝臓外側左葉約6gを採取した。検査は13例について血液学的検査および血液生化学的検査を術前8，5，1日および術後6，12，15，19，22，26，33日に行った。また4例について生検時と解剖時の肝臓中のP-450 content，MCOD (methoxycoumarin O-demethylase)，ECOD (ethoxycoumarin O-deethylase)，PCOD (propoxycoumarin O-depopylase)の活性，およびグリコーゲン量を測定した。

〔結果および考察〕血液学的検査では白血球数が $9.5 \times 10^3/\text{mm}^3$ から $12.2 \times 10^3/\text{mm}^3$ まで増加し，MCH，MCV，PLT，FIB，APTTの高値，RBC，Hb，Ht，MCHCの低値が観察された。血液生化学的検査ではGPTが33 IU/lから107 IU/l，ALPが222 IU/lから424 IU/lに上昇し，TC，UN，IP，TGにおいても高値が認められた。またTB，GLU，ALB，A/G，CREでは低値がみられた。これらの変化のほとんどは術後22日までに認められた。一方，薬物代謝酵素では解剖時にMCOD，ECODの高値が認められた。グリコーゲン量には変化はみられなかった。したがって肝生検後約4週間で良好な回復が認められるが，採取した肝臓は検査項目に注意を要することが示唆された。

○ 大橋芳彦, 真鍋淳, 長谷川貴江, 杉浦智美, 五十嵐功, 松沼尚史

三共株式会社・安全性研究所

3-Methylcholanthrene(3MC),  $\beta$ -naphthoflavone(BNF), isosafrole(ISO), phenobarbital(PB), acetone(AC)および pregnenolone 16 $\alpha$ -carbonitrile(PCN)で処理したラット肝臓を用いてチトクローム P-450 (P450) ファミリーの検出, P450 含量および 7-alkoxycoumarin 0-dealkylase(ACD) 活性を調べ, 各化学物質によって誘導された P450 ファミリーとACD 活性誘導プロフィールとの関係を検討した。

4つの抗ラット P450 ウサギ抗体 (I A1, II B1, II E1, III A1) を用いた免疫ブロッティングでは 3MC, BNF および ISO で P450 I A1, PB で主に P450 II B1, AC で P450 II E1, PCN と PB で P450 III A1 がそれぞれ検出された。P450 含量は PB, 3MC, BNF および PCN で 2.1~2.8倍, ISO と AC で約 1.4 倍にそれぞれ増加した。ACD 活性の 7-methoxycoumarin 0-demethylase活性(MCD)は PB, AC において誘導された。7-ethoxycoumarin 0-deethylase 活性(ECD), 7-propoxycoumarin 0-depropylase 活性(PCD)および 7-butoxycoumarin 0-debutylase 活性(BCD)はすべての化学物質で誘導された。ECD, PCD および BCD は 3MC, BNF, ISO では顕著に, PCN では PCD と BCD が ECD より顕著にそれぞれ誘導された。

Cytochrome P450 family	Chemicals	P450 contents	MCD	ECD	PCD	BCD
I	3MC, BNF	↑↑	→	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑
	ISO	↑	→	↑↑	↑↑↑	↑↑↑
II	PB	↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑
	AC	↑	↑	↑	↑	↑
III	PCN	↑↑	→	↑	↑↑↑	↑↑↑

Induction grade: →:negative, ↑:mild, ↑↑:moderate, ↑↑↑:marked

すなわち, 化学物質によって誘導される P450 ファミリーを ACD 活性の検索で推測できることが明らかになった。

○五十嵐功, 真鍋淳, 大橋芳彦, 高岡雅哉,

矢本敬, 寺西宗広, 松沼尚史

三共・安全性研究所

[目的および方法] チトクローム P-450(P-450) の各アイソザイムが精製されるに伴い, それらの肝小葉内局在に関する知見が集積されて来ている. 本実験では phenobarbital(PB; 60 mg/kg), 3-methylcholanthrene(3-MC; 10 mg/kg),  $\beta$ -naphthoflavone(BNF; 10 mg/kg), pregnenolone 16 $\alpha$ -carbonitrile(PCN; 50 mg/kg), isosafrole(ISO; 150 mg/kg) を 3日連続腹腔内投与あるいは acetone(AT; 5%) を 10日間飲水投与して, ラット肝臓のP-450を誘導した後, 4種のP-450アイソザイム(P-450IA1, IIB1, IIE1, IIIA)に対する抗体を用い, 各誘導剤毎に, 誘導されるアイソザイムの種類と誘導される肝小葉内の部位を免疫組織学的に検索, 整理した.

[結果および考察] 結果を Table 1. に示す. BNF は P-450IA1 を小葉の辺縁部で誘導した. これは Baron et al.(1982) の結果を否定し, Wolf et al.(1984) および Foster et al.(1986) の結果を支持する. ISO は P-450IA1 を小葉の中心部で誘導した. これは, 小葉辺縁部で誘導するとした Wolf et al.(1986) の報告と対照的な結果となった. P-450IA1 および P-450IIB1 に関するその他の結果は従来報告に一致した. P-450IIE1 および P-450IIIA の肝小葉内局在に関してはここに示した結果が最初の報告である.

○菅野昭永, 真鍋淳, 大橋芳彦, 矢本敬, 高岡雅哉,  
岡元智文, 樽見千利, 松沼尚史

三共・安全性研究所

〔目的および方法〕肝部分切除術によりイヌの肝臓の一部(約6g)を採材し, そのチトクローム P-450(P-450)量, methoxycoumarin 0-demethylase(MCOD), ethoxycoumarin 0-deethylase(ECOD)および propoxycoumarin 0-depropylase(PCOD) 活性を測定した。その後, 血清生化学的検査および肝機能検査により肝部分切除の影響が消失したと判断された術後 29 日目から phenobarbital(PB; 10 mg/kg)を 9 日間連続腹腔内投与して肝薬物代謝酵素を誘導した。対照群には生理食塩液を投与した。投与終了後全例を剖検し, 肝臓を摘出して, 前述の生化学的検査を実施した。

〔結果および考察〕対照群の検索結果から, 肝部分切除によりMCODおよび ECOD が誘導されることが明らかとなった。今回実施したような実験手技(肝部分切除)が肝臓の薬物代謝酵素に影響を与えたとの報告はない。一方, PB 処置により P-450 量の増加, MCOD, ECOD および PCOD の誘導が確認された。この反応は PB をラットに投与した場合と類似している。さらに, ラット P-450の各アイソザイム(P-450IA1, IIB1, IIE1, IIIA)に対する抗体を用いて, 本実験で誘導されたイヌ P-450 の免疫学的特異性を検索した結果, イヌで誘導された P-450 はラットの P-450IIIA および P-450IIBI と免疫学的に交差反応を示すことが明らかとなった。

中期発癌試験法を用いた Heterocyclic amine の  
低濃度複合投与によるラット肝発癌相乗作用の検討

浅川恵美子，萩原昭裕，柴田雅朗，小川久美子，伊東信行

名古屋市大・医・第一病理

加熱食品中に含まれている heterocyclic amine のうち、発癌性が示されている 5 種類の化合物を用い、低濃度の複合投与による影響をラット肝中期発癌試験法を用いて検討した。

【方法】6 週齢の雄 F344 ラットを用い、DEN (200mg/kg) の腹腔内投与 2 週後より被験物質を混餌投与した。全例第 3 週に 2/3 肝部分切除を行い、8 週で屠殺剖検して直径 0.1mm 以上の肝 GST-P 陽性細胞巢の数、面積を定量的に解析した。被験物質としては heterocyclic amine である Trp-P-1, Glu-P-2, IQ, MeIQ, MeIQx を各々発癌試験用量とその 1/5, 1/25 の用量で与える群と、5 種類を 1/5, 1/25 の濃度で複合投与する群に分けて検討した。また、被験物質投与群の肝を用いて  $^{32}\text{P}$  ポストラベル法により DNA adduct 形成の程度を検索した。

【結果】5 種類の複合投与群では GST-P 陽性細胞巢の数、面積ともに基礎食群の値を差し引いた各用量単独投与群の加算値より明らかに増加した。特に 1/25 用量では、加算値は  $0.06 \text{ 個}/\text{cm}^2$ ,  $0\text{mm}^2/\text{cm}^2$  であるのに対して、複合投与群では  $6.42 \text{ 個}/\text{cm}^2$ ,  $0.59\text{mm}^2/\text{cm}^2$  と明瞭な相乗効果を認めた。さらに 1/25 用量の単独群は全群とも対照群と有意差はみられなかったが、複合投与群では有意な増加を示した。また、被験物質投与群の adduct 形成量は、前癌病変の発生と同様の増減を示す傾向が認められた。

【考察】加熱調理によって生成される heterocyclic amine は発癌の危険性が極めて少ないと考えられる低濃度でも、複数を同時に摂取することにより相乗的に発癌性が出現する可能性が示唆された。

○田中栄之介<sup>1</sup>、石川詔雄<sup>2</sup>、三澤章吾<sup>1</sup>筑波大・<sup>1</sup>社会医学系、<sup>2</sup>臨床医学系

【目的】カフェイン (CA) はラットやヒトのCYP I A2で主に代謝される事はすでに報告されている。また我々は昨年 of 同学会 でトリメタジオンがラットのCYP II C11 (無処置) や II B1 (誘導時) で主に代謝される事を報告した。そこで、今回我々は肝疾患および酵素誘導モデルラットにこの2つの代謝様式の異なる指標薬を同時投与して肝薬物酸化能がどの様に評価出来るか検討した。

【方法】SD系雄性ラットを用いた。常法に従って肝疾患モデルを作製するためにCCl<sub>4</sub> (0.25ml/kg)、ANIT (40mg/kg) およびGalN (400mg/kg) を使用した。酵素誘導モデルの作製はPB (40・80mg/kg、3日間) およびMC (10・20mg/kg、2日間) を使用した。またCA (10mg/kg) とTMO (4mg/kg) は同時に経口投与した。採血は頸静脈から経時的に行い、血中のCA、TMOおよびそれぞれの代謝物はHPLC/UVとGC/FTD法にて測定した。

【結果】肝疾患群において、CAおよびTMOの代謝は対照群に比較して有意に阻害された。また、それぞれの代謝物も生成が抑制された。この時CAとTMOの総クリアランス (CL) との相関係数は $r=0.99$  ( $P<0.01$ ) であった。一方、酵素誘導群ではCAの代謝はMC前処理で、TMOの代謝はPB前処理でそれぞれ促進された。またCAとTMOのCLは $r=0.97$  ( $P<0.01$ ) の相関を示した。しかし対照群間では $r=0.59$  ( $P<0.05$ ) であった。

【結論】CAとTMOの代謝にはそれぞれ異なるP-450サブファミリーが関与しており、肝障害および酵素誘導時における異なる肝薬物酸化能が評価出来る可能性が示唆された。

山添康, 永田清, 小沢正吾, 島田美樹, 宮田昌明, Medhat Abu-Zeid, 加藤隆一

慶應義塾大学医学部 薬理学教室

アリールアミンは生体内でアセチル化によって代謝される。ヒトおよび幾つかの実験動物種においてアリールアミンのN-アセチル化には著しい個体差があり、これらの差異に遺伝的因子の関与が報告されている。我々はシリアンハムスターの肝から2種のアセチルトランスフェラーゼ、AT-IとAT-IIを単離し、既に両分子種は基質特異性およびアセチル供与体の利用に違いのあることを明らかにしている。AT-IとAT-IIは発現においても違いが認められ、抗体を用いたWesternプロットによりAT-IIはいずれの個体でも検出されるが、AT-IIの含量には個体間で差がある。殊にアミノフルオレンのN-アセチル化の低い(Slow型)個体では検出されない。このような発現の差異の原因を知るため、我々はハムスターのジェノミックライブラリーよりアセチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子の単離を行なった。AT-IをコードするcDNA(AT-101)を用いてスクリーニングした結果、2個の異なった遺伝子(AT-AとAT-B)由来と考えられるクローンを得た。これら遺伝子のコーディング領域について解析したところAT-AはAT-101と調べたエクソン上の配列が完全に一致し、AT-AはAT-I遺伝子であることが明らかとなった。またAT-B遺伝子はAT-101 cDNAと約80%の相同性を示し、類似構造を持つアセチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子であることがわかった。この遺伝子の単一エクソン内にすべてのアミノ酸翻訳領域が含まれていることが予想されたので、この遺伝子の両端の一部を改変し、動物細胞発現ベクターに組み込みCOS-1細胞内にこのタンパクを発現させた。発現タンパクはWesternプロットでAT-IIと同一位置に泳動され、かつAT-IIに特異的な活性であるp-アミノ安息香酸のN-アセチル化を効率良く触媒した。これらの結果からAT-BはAT-II遺伝子であることが明らかとなった。



スunks 肝可溶性画分の 2-アミノフルオレン変異原活性能：  
スunks における O-アセチルトランスフェラーゼの欠失

○名倉弘哲<sup>1</sup>、伊東達<sup>1</sup>、北村龍司<sup>1</sup>、沢田稔<sup>1</sup>、草野尚<sup>2</sup>、石曾根博之<sup>2</sup>、出口武夫<sup>3</sup>、  
横井毅<sup>1</sup>、鎌滝哲也<sup>1</sup>

北大薬<sup>1</sup>、浅田飴本舗堀内伊太郎商店<sup>2</sup>、都神経研<sup>3</sup>

スunks は実験動物として開発中であるが薬物代謝酵素活性に関する研究はほとんどなされていない。そこで演者らはスunks の肝臓における第 I 相及び第 II 相反応を触媒する種々の酵素活性について検討を行なった。実験動物は 7 週令雄性スunks を用い肝可溶性画分、ミクロゾーム (Ms) 画分を試料とし種々の酵素活性を測定した。その結果、調べた全ての活性でラット肝臓と比べ同レベルかまたは非常に低いことが明らかとなった。特にアリルアミン化合物の代謝に深く関与している N-アセチルトランスフェラーゼ (NAT) 活性がスunks では全く認められなかった。さらに Northern blot 解析を行なったところ mRNA も発現していないことが明らかとなった。そこで、スunks に 2-アミノフルオレン (2-AF) を投与し、血中の 2-AF のアセチル体である 2-アセチルアミノフルオレンを測定したがスunks においては全く検出できなかった。これらのことよりスunks には NAT が欠損していることが強く示唆された。

以上の結果からスunks においてはアリルアミン化合物の水酸化体の O-アセチルトランスフェラーゼ (OAT) も欠失していると考えられたので、OAT 欠損株である *Salmonella typhimurium* TA98/1,8-DNP<sub>6</sub> を試験菌株とし、2-AF による変異原性試験 (Ames テスト) によりスunks 及びラットの代謝的活性化能を比較検討した。試験にはスunks、ラットおよび 3-メチルコランスレン (3-MC) 処置ラット肝臓の 9,000 x g 上清 (S-9)、Ms、可溶性画分を用いた。S-9 を酵素源として NADPH 生成系存在下 2-AF の変異原性はラットでは 2-AF 濃度依存的に上昇したがスunks ではラットに比べ非常に低かった。次に 3-MC 処置ラット Ms と未処置スunks 又はラット可溶性画分を加え 2-AF を基質とした Ames テストを行なったところ、スunks の可溶性画分を加えてもラットとは対照的に復帰変異コロニー数の増加はほとんど認められなかった。現在まで NAT 欠損動物としてイヌが知られているがイヌ以外の動物で NAT, OAT 欠損を見いだしたのは今回が初めてである。

ラット肝細胞スフェロイド培養法を用いた新しい  
実験的肝障害モデルの作製

遠藤健一、上野光一、宮下愛次、竹澤俊明\*、森 有一\*  
佐藤哲男

千葉大学・薬・薬物、\*グレース(株)日本中央研

目的. 現在、スフェロイド培養系は多くの実験系の中で、より *in vivo*に近い培養系として、スフェロイド培養系が注目されている。本研究では、ラット肝実質細胞と非実質細胞とから成る細胞凝集塊を温度感受性ポリマーを用いることにより形成し、その肝特異的機能発現について検討を行った。さらに、このスフェロイド培養系の毒性学的応用として *Corynebacterium parvum* (*C. parvum*) と LPS とによって生じる実験的急性肝障害モデルの作製を試みた。

方法. 温度感受性ポリマーであるポリ N イソプロピルアクリルアミドと I 型コラーゲンとの均一混合物基質上にラット肝実質細胞と非実質細胞を接着、伸展させた後、培地温度を下げることで培養皿から一枚の細胞シートとして回収し、その後 10% FBS Williams' E 培地にてさらに培養した。

結果. 回収した細胞シートは培地中で徐々に収縮してスフェロイドを形成し、そのアルブミン分泌能は 60 日以上維持された。

一方、7 日前に *C. parvum* を前投与した同一ラット肝を用いたスフェロイド培養系と単層培養系の培地中に LPS を添加した時、前者では培地中の GOT, LDH 活性が共に増加したが、後者においては GOT 活性はほとんど変化しなかった。

考察. *in vivo* においては *C. parvum* 投与 7 日後に LPS を投与すると、血清中の GOT, LDH 活性は共に顕著に増加したことから、このスフェロイド培養系は単層培養系に比べ、より *in vivo* の挙動を正しく反映する実験系である可能性が示唆された。

○川島 明、堀井 郁夫

日本ロシュ(株)研究所 毒性・病理部

### [目的]

'91年の日本毒科学会学術年会において、ラット初代培養肝細胞を用いた薬物の肝細胞障害性試験について報告した。今回、サル初代培養肝細胞を用いて同様の検討を行い、ラットを用いた結果と比較検討したので報告する。

### [方法]

雄カニクイザルの部分切除肝臓からコラゲナーゼ消化法により肝細胞を分離し、単層培養後、薬物(四塩化炭素(CCl<sub>4</sub>), Acetaminophen, MAO-inhibitors)を添加し、培養上清中と肝細胞内のGOT, GPT, LDH活性を測定した。また、肝細胞内グルタチオン量を増加させるためにL-Cysteine(L-Cys)、減少させるためにBSO(Buthionine sulfoxime) P-450活性を抑制するためにChloramphenicol(CPC)、radicalを除去するためにDPPD(N, N'-diphenyl-p-phenylendiamine)を、それぞれ薬物添加前から添加し、薬物添加に対する影響を検討した。また、ラット及びサルの培養肝細胞内薬物代謝酵素活性を測定した。

### [結果]

サル初代培養肝細胞にCCl<sub>4</sub>を添加すると、細胞障害性が認められ、この変化は、L-Cys, CPC, DPPD前処理によって改善した。また、BSO前処理によって悪化した。MAO-A, MAO-B inhibitorでは、L-Cys, CPC, DPPD, BSO前処理によっても変化は認められなかったことからCCl<sub>4</sub>の細胞障害性とは異なる機序が示唆された。ラットを用いた結果と比較すると、前処理+CCl<sub>4</sub>添加による反応性は、サルの肝細胞の方がin vivoでの反応性を良く反映しているものと考えられた。さらに、培養肝細胞内薬物代謝酵素活性と肝細胞障害性との関連についても言及する。

小畑 俊男, \* 渋谷 庸一, \* 伊東 洋一郎, 山中 康光

大分医大・薬理, \* 米国 LBC, NHLBI, NIH

Monoamine Oxidase(MAO)は大部分の臓器に含まれ生理学的にも薬理的にも重要な役割を果たしている。最近これらMAO 活性を制御していると思われる内因性MAO 阻害物質の存在が確認されている。そこで、我々はラット肝cytosol 中に含まれるMAO と内因性MAO 阻害物質の精製を countercurrent chromatography(CCC) 法により行った。ラットを断頭後すばやく肝臓を摘出しホモジェネートを作製した。200,000×g で遠心分離し、cytosol 分画を集め Sephadex G-25 によりゲル濾過を行った。各フラクションのMAO 活性を A type MAO の基質である 5-HT および B type MAO の基質である  $\beta$ -PEA を用いてチェックした後、高分子分画(cytosolic MAO) と低分子分画(MAO inhibitor) に分けた。

高分子分画を集め PEG(polyethylene glycol)/dextran polymer-phase を用いたCCC 法により分離精製を行った。CCC カラムから2つのピークが得られ solvent front 中の  $M_1$  ピークから  $\beta$ -PEA を基質とした時39%、5-HTを基質とした時20%回収された。

Stationary lighter phase 中の  $M_2$  ピークからは  $\beta$ -PEA を基質とした時11%、5-HT を基質とした時20%回収された。さらに低分子分画を集め n-BuOH/1%TFA を用いたCCC 法により MAO inhibitor の精製を行った。この inhibitor は粗製 cytosolic MAO に対しては  $\beta$ -PEA および 5-HT を基質にした時強い阻害を示したが精製した cytosolic MAO に対しては阻害しなかった。以上の結果よりラット肝 cytosol 中に含まれる内因性MAO 阻害物質は cytosolic MAO に対してはほとんど影響しない事が今回の実験より確認された。

安原加壽雄<sup>1</sup> 会田喜崇<sup>2</sup> 三森国敏<sup>1</sup> 黒川雄二<sup>3</sup> 高橋道人<sup>1</sup>国立衛生試験所 <sup>1</sup>病理部 <sup>2</sup>総合評価研究室 <sup>3</sup>毒性部

ラットにトリハロメタンの1つであるBromodichloromethane (BDCM) を投与すると肝臓にcholangiofibrosis が誘発されることをすでに報告した (J. Toxic. Sci. 1992)。cholangiofibrosisが胆管癌に進展すると言う報告がなされているが、その前癌病変としての意義については明確にされている訳ではない。

そこで BDCM 投与により生じたこの病変を経時的に観察し、さらにPCNA (proliferating cell nuclear antigen) 抗体による免疫組織染色を行い胆管上皮の細胞増殖動態を検討した。

〔方法〕 マイクロカプセル化したBDCMを0.22、0.055および0.014%の濃度で粉末飼料に混合し、雄雌各群40匹の5週齢のWistarラットに自由に摂取させた。投与6、12、18ヶ月目に各群5匹の動物を、また24ヶ月目には全ての生存動物を屠殺・剖検し、肝臓について組織学的検索を行なった。肝臓はH-E染色のほかに抗PCNAモノクローナル抗体 (日科機) による免疫組織化学的検索を行い、胆管上皮のPCNA標識率 (胆管細胞核100個中のPCNA陽性数) を測定した。

〔結果〕 組織学的には、6ヶ月目では異型胆管上皮の過形成の程度が顕著であり、PCNA標識率が最も高かった ( $68.5 \pm 5.2$ )。その後、胆管数はむしろ減少し線維化が高度となり、過形成性胆管のPCNA標識率は24ヶ月目では  $31.5 \pm 5.6$  まで低下した。

〔考察〕 細胞増殖活性の指標からみたcholangiofibrosis における胆管上皮の増殖活性は、投与期間の遷延に伴いむしろ減少したことから、本病変が腫瘍へ移行する可能性は極めて低いと思われた。

---

第19回日本毒科学会学術年会  
プログラム・要旨集

---

発行日 平成4年6月30日  
発行人 黒岩 幸雄  
発行所 昭和大学薬学部毒物学教室  
〒142 品川区旗の台 1-5-8  
TEL 03-3784-8205～7  
FAX 03-3784-8246

平成4年7月13日

拝啓

時下益々御健勝のこととお慶び申し上げます。

7月22日～24日に開催致します第19回日本毒科学会学術年会及び第1回日本毒科学会サテライトシンポジウムにつきましてはご協力頂きありがとうございます。遅くなりまして申し訳ございませんが、学会のプログラム・要旨集をお送り致しますので、御収納下さい。

用件のみではございますが、失礼させていただきます。

敬 具

第19回日本毒科学会学術年会

第1回日本毒科学会

サテライトシンポジウム

事 務 局

昭和大学薬学部毒物学教室

〒142 品川区旗の台1-5-8

tel 03-3784-8205

fax 03-3784-8246