

第22回 日本毒科学会学術年会
プログラム・要旨集

平成7年7月18日(火)・19日(水)

帝京大学医学部

1995 東京

第22回日本毒科学会学術年会

会期：平成7年7月18日（火）～19日（水）

会場：シェーンバッハ・サボア（千代田区平河町2-7-5）

会 長 藤 井 儔 子

第22回日本毒科学会学術年会組織委員会

井村 伸正	北里大学薬学部
遠藤 仁	杏林大学医学部
黒岩 幸雄	昭和大学薬学部
黒川 雄二	国立衛生試験所
佐藤 温重	東京医科歯科大学歯学部
高山 敏	埼玉第一製薬（株）
堀井 郁夫	日本ロシュ（株）
山添 康	東北大学薬学部

事務局：富士野行男、稲津教久
事務局住所：〒173 板橋区加賀2-11-1
帝京大学医学部薬理学教室
電話：03-3964-1211 内線2248
FAX：03-3964-0602

ご挨拶

平成7年を迎えてから阪神大震災、サリン事件と不安の多い日々が続いておりますが、皆様それぞれの領域でご活躍のことと拝察いたします。2年前、第22回日本毒科学会学術年会の会長を仰せつかりました時、予想を遥かに超えて進歩する科学とそれを反映して変動する社会、世界の中で、先を見通した主題をシンポジウム、ワークショップに選ぶことの難しさを感じました。幸い組織委員の先生方のご協力により、今後の研究にもお役に立つと考える主題のシンポジウム、ワークショップをもつことが出来ました。

本学会は創薬と、その応用、さらに、その結果の評価をつねに行きついでゆくのを支える学会としての役割をもつのが特色と考えます。中でも上記いずれにも関連する技術面の進歩を支える点で特異性を有すると考えます。秋に横浜で開催されますICH-3(第3回日・米・欧三極医薬品承認審査ハーモナイゼーション国際会議)のプログラムに謳われております主な題目には本学会と直接の関連を有するテーマとして癌原性試験あるいは生殖・毒性の中の発生毒性試験の雄授精能評価法などがあります。この年会組織委員会に、すでに2年前に提案されたのが、今回ワークショップとなりました「癌原性試験の設計と解釈」です。また、例年は学術研究推進委員会提案のシンポジウムあるいはワークショップが予定されるのですが、今回は一般口演からミニシンポジウムを編成いたしました。早くに学会誌を通じてご案内を致しましてからすぐに申し出を頂いたのがミニシンポジウム2の「雄授精能評価方法確立のための研究」です。今回はミニシンポジウム1「眼刺激性試験代替法のバリデーションと現状」に関連した演題が多数提出されましたので、その一部がミニシンポジウムとなりました。ミニシンポジウム3は毒性試験において常に問題となる基礎的事項に関連した演題の一部を纏めまして「毒性試験における血液学的検査評価の問題」としました。

シンポジウム「免疫系と神経-内分泌系相関からみた免疫抑制薬、免疫調整薬の作用と副作用」は本来の生体が有するホメオスターシス機能の解明に伴い解釈も変化する領域の1つとして取り上げました。薬物投与に対して全身が反応することを改めて認識する一助になればとの考えです。学術年会前日のサテライトシンポジウムで取り上げました遅発性毒性(副作用)も今回は生体全身への影響を意識する主題ですが、こちらへもご参加いただきたいと願っております。招待講演者のGoldberg教授は、動物実験代替法の領域におけるベテランとして、Sharp教授は生体の広い領域でその関与が認められるストレス蛋白が薬物毒性とどのように関わるかの研究に取り組まれている数少ない研究者の1人としてお願い致しました。

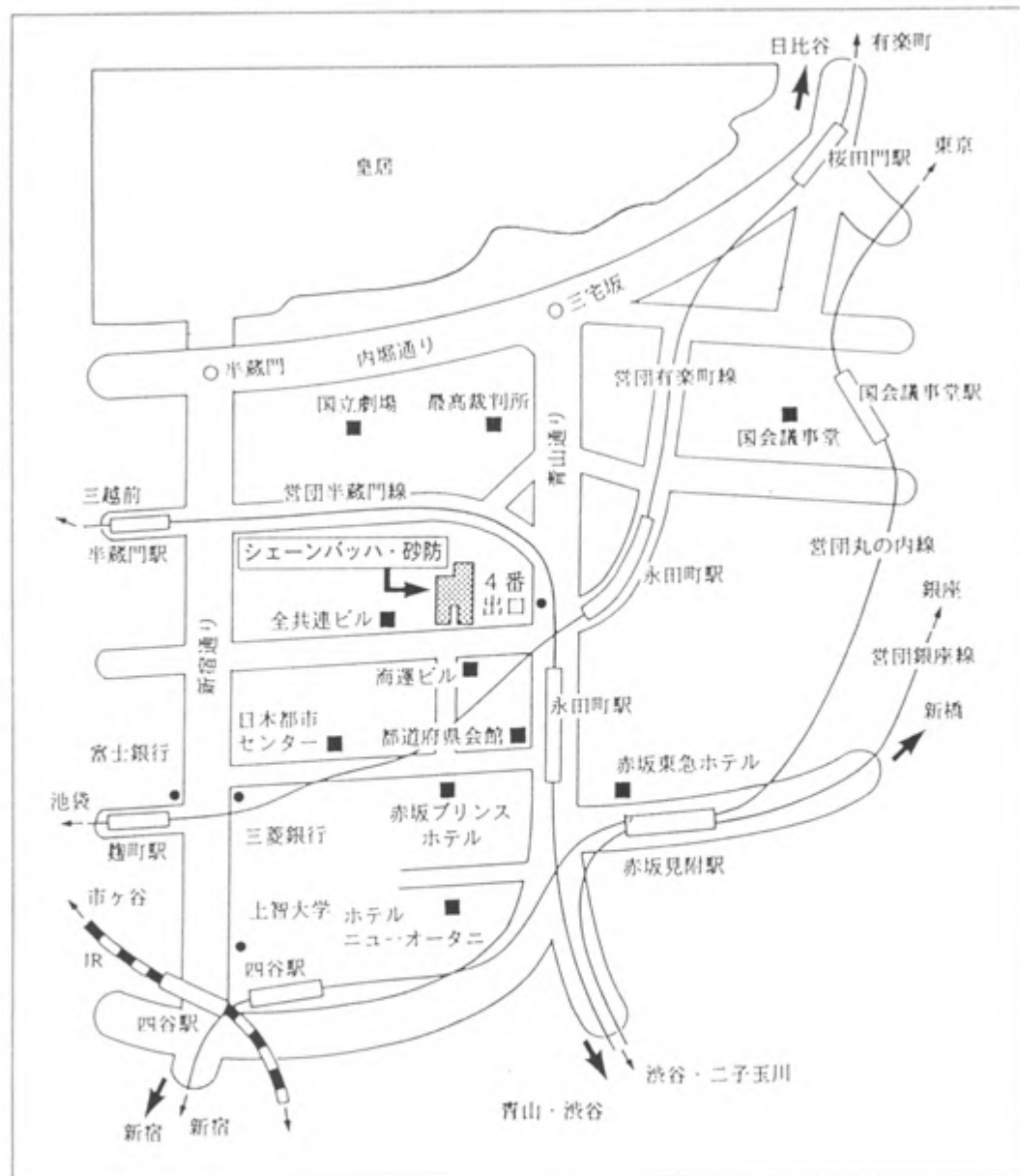
今回はシアトルにおける国際毒科学会議が7月2-6日と、この年会の10日前に終了という条件のため、一般演題がどの位集まるか予想が難しいところでしたが、幸い111題を頂きお手元の講演要旨集ができました。今年度の学術年会は全般の演題からICHを意識したものが多いとの印象が少々強いかもしれませんが時代を反映するともいえます。今後、本学会はますます多くの関連領域に活躍の場が広がるものと考えますし、そうありたいと願っております。活発な討論が展開され実り多い会となることを念じております。

藤井 儔子 (平成7年5月20日)

目 次

会場案内.....	5
お知らせとお願い.....	8
集会日程.....	10
プログラム.....	12
招待講演.....	33
ワークショップ.....	44
シンポジウム.....	55
ミニシンポジウム.....	66
一般口演.....	85
索引.....	183
協賛企業および団体御芳名.....	193

会場案内図



◆交通のご案内

地下鉄<有楽町線><半蔵門線>永田町駅・4番出口より徒歩1分

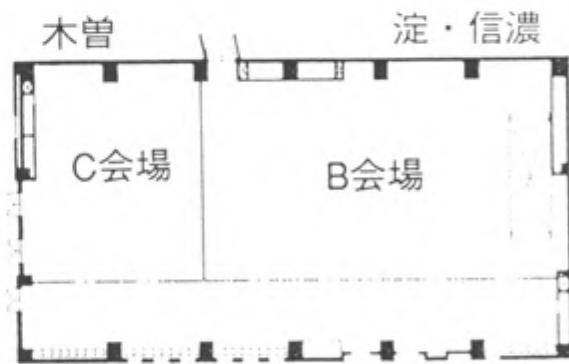
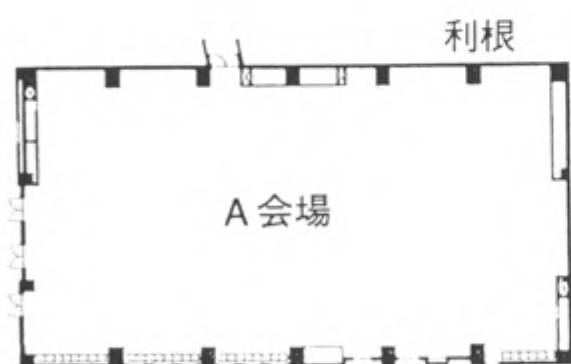
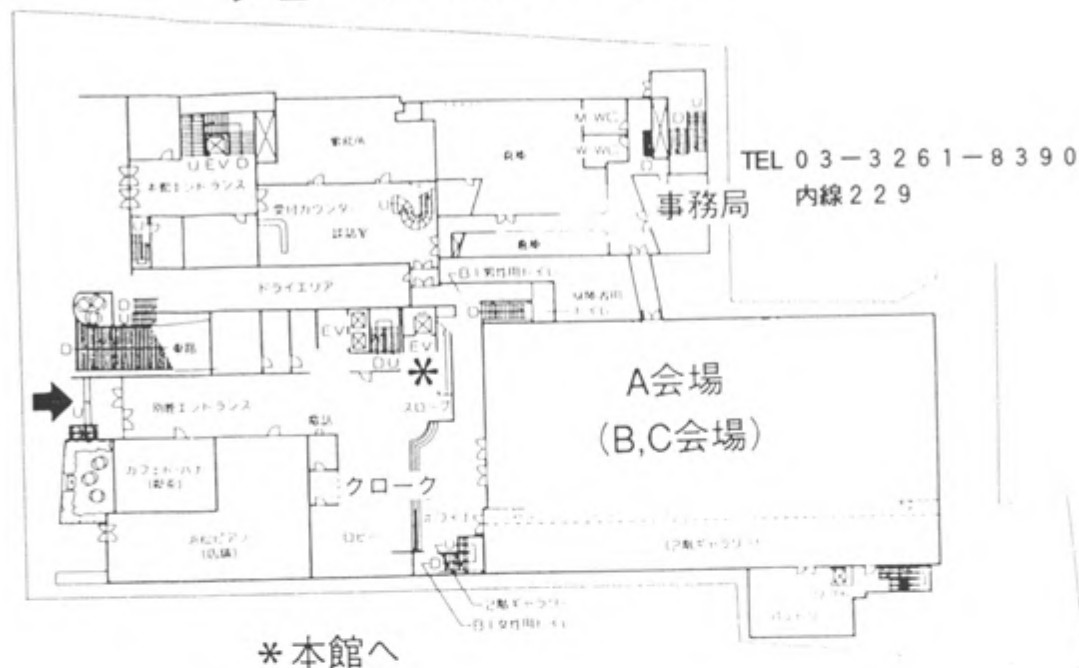
地下鉄<銀座線><丸の内線>赤坂見附駅より徒歩5分

地下鉄<有楽町線>麹町駅より徒歩10分

JR<中央線><総武線>四谷駅より徒歩20分

1階

シェーンバッハ・サボア



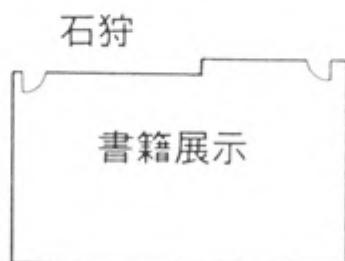
注意

A会場（利根）は7月18日（火）のみ使用します。
B会場（淀・信濃）およびC会場（木曾）は7月
19日（水）にA会場を仕切って使用します。

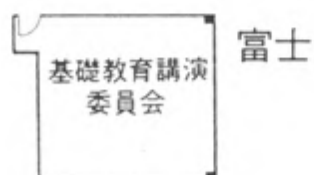
3階



2階 (本館)



地下1階 (本館)



お知らせとお願い

◆参加者の方へ

1. 受付：7月18日(火)から7月19日(水)まで午前9時00分から受付を会場入口にて行います。
事前登録されている方は受付を行いません。会場では、必ず参加章を胸ポケットにつけて下さい。胸ポケットのない方には、受付でクリップをお渡し致します。当日参加の方、および参加章を紛失・お忘れになった方は受付にお申し出下さい。
2. 参加費：(正会員、非会員、当日会員とも)
(1)年回のみ参加の場合：8,000円
(2)サテライトシンポジウムにも参加の場合：上記の金額に3,000円追加
(3)サテライトシンポジウムのみ参加の場合：6,000円
3. 呼び出し：会場内に伝言板をご用意致します。緊急の場合で場内呼び出しが必要な時は、年会受付あるいは年会事務局までお申し出下さい。
4. 喫煙：所定の場所をお願い致します。
5. 駐車場：利用できませんので、会場までは所定の駅から徒歩あるいはタクシーをご利用下さい。
6. 年会事務局：年会期間中は下記のとおりです。
シェーンバッハ・サボア TEL 03-3261-8390 内線229

◆演者の方へ

口演発表についての一般的な注意とお願い

1. 発表：一般演題の口演時間は1題12分(発表9分、討論3分)です。
口演者は口演開始12分前までに次演者席にお着きください。
口演変更は原則として出来ません。やむを得ぬ理由により口演の取り消し、演者の変更が生じた場合は、直ちに年会事務局へ申し出て下さい。
シンポジウム、ワークショップについては予めオーガナイザーと打ち合わせをしておいて下さい。
2. スライド：スライドはライカ判(35mm判)に限ります。
プロジェクターは1会場1台です。2回以上使用するスライドは映写数と同じ枚数をご用意下さい。一般演題では1演題10枚以内とします。
スライド受付は各会場入り口にあります。スライドは講演1時間前(午前10時以前の口演については20分前)までに各スライド受付にご提出願います。口演者は、口演終了後30分以内にスライド返却を受けて下さい。
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。

◆座長の方へ

セッションの進行は座長におまかせしますので宜しくお願い致します。一般演題(口演)、シンポジウムおよびワークショップについては、それぞれ決められた時間を厳守願います。

会場のスライド受付にて来場の旨を係員にお伝え下さい。

次座長はセッション開始15分前までに次座長席にご着席下さい。

◆討論される方へ

一般演題(口演)、シンポジウムならびにワークショップとも、質疑、追加討論は座長の指示に従い、所属・氏名を明らかにした上で行って下さい。

◆理事・監事の方へ

理事会は7月17日(月)16時15分より18時40分まで(サテライトシンポジウムの後)シェーンバッハ・サポ-3F 霧島にて開催致します。

◆評議員の方へ

評議員会は7月18日(火)12時15分より13時20分まで1F A会場(利根、シンポジウム会場)で開催致します。昼食は事務局で用意致しますので、昼食代(1,000円)を評議員会受付でお支払い下さい。

◆総会について

総会は7月18日(火)13時30分より14時30分まで1F A会場(利根)で開催致します。

◆懇親会について

懇親会は7月18日(火)18時15分より、会場隣のマツヤサロン(全共連ビル6F)において開催致します。懇親会に出席される方はマークの入った参加章をつけて下さい。なお、懇親会の参加申し込みは、定員に達するまで学会当日も受付にて行っております。

◆クロークについて

会場入口のクロークをご利用下さい。

◆休憩される方は、立山、霧島(3F)に談話室を設けておりますので、ご利用下さい。

◆書籍等展示会

本館石狩にて会期中行います。なお、今回は会場の都合で、機器・試薬等の展示会はありません。

第22回日本毒科学会学術年会スケジュール及び座長一覧

7月18日(火)

	A会場・利根	D会場・穂高
08:50	開会の辞	
09:00	9:00 ~ 12:00	
09:30	ワークショップ	9:30 ~ 11:50
10:00	癌原性試験の設計と解釈	ミニシンポジウム1.
11:00	林 裕造 高山 敏 (埼玉第一製薬)	眼刺激性試験代替法の バリデーションと現状 佐藤温重 (東京医科歯科大・歯) 大野泰雄 (国立衛試)
12:00		
	12:15 ~ 13:20	
13:00	評議員会	
	13:30 ~ 14:30	
14:00	総 会	
	14:45 ~ 15:45	
15:00	招待講演1. A. M. Goldberg 井村伸正 (北里大・薬)	
	15:50 ~ 16:50	
16:00	招待講演2. F. R. Sharp 藤井篤子 (帝京大・医)	
	17:00 ~ 17:45	
17:00	田邊賞受賞講演 (2名)	
	18:00 ~ 20:00	
18:00	懇 親 会	
19:00	於 マツヤサロン (隣の全共連ビル6F)	
20:00		

7月19日(水)

	B会場・信濃・淀	C会場・木曾	D会場・穂高	E会場・六甲
09:00	<p>シンポジウム</p> <p>免疫系と神経-内分泌系 相関からみた免疫抑制薬 免疫調整薬の作用と 副作用(毒性)</p> <p>大沢基保(帝京大・薬) 野馬敏夫 (東女医大・内分泌センター)</p>	9:00 ~ 10:00 毒性試験 - 1 C-01 ~ C-05 江頭 享(大分医大)	9:00 ~ 9:36 発生毒性 D-01 ~ D-03 松本清司(信大・医)	9:00 ~ 10:00 眼刺激性試験・代替法 E-01 ~ E-05 佐藤秀蔵(武田薬品)
10:00		10:00 ~ 11:00 毒性試験 - 2 C-06 ~ C-10 門馬純子(国立衛試)	9:36 ~ 10:24 生殖毒性 - 1 D-04 ~ D-07 堀井郁夫(日本ロシユ)	10:00 ~ 11:00 眼毒性・他 E-06 ~ E-10 板垣 宏(資生堂)
11:00		11:00 ~ 12:00 毒性試験 - 3 C-11 ~ C-15 佐藤哲男(千葉大・薬)	10:24 ~ 11:12 生殖毒性 - 2 D-8 ~ D-11 伊原敏夫(新日本科学)	11:00 ~ 12:00 神経系 E-11 ~ E-15 鈴木 勉(星薬大)
12:00				
13:00	13:00 ~ 14:45 ミニシンポジウム 2. 雄授精能評価方法確立 のための研究 田中 悟(国立衛試) 赤池雅司(ヘネストシヤパン)	13:00 ~ 14:00 抗腫瘍剤 C-16 ~ C-20 真板敬三(残留農薬研)	13:00 ~ 14:00 肝・代謝酵素 - 1 D-16 ~ D-20 渡部 烈(東京薬大・薬)	13:00 ~ 13:48 消化器系 E-16 ~ E-19 唐木英明 (東大・農学生命科研・獣医)
14:00		14:00 ~ 14:48 肝・発癌 C-21 ~ C-24 鎌滝哲也(北大・薬)	14:00 ~ 15:00 肝・代謝酵素 - 2 D-21 ~ D-25 真鍋 淳(三共)	13:48 ~ 14:24 内分泌毒性 E-20 ~ E-22 北浦敬介(大塚製薬)
15:00	14:50 ~ 16:35 ミニシンポジウム 3. 毒性試験における 血液学的検査評価の問題	14:48 ~ 15:48 変異原・他 C-21 ~ C-29 上野芳夫(東京理大・薬)	15:00 ~ 15:48 腎毒性 - 1 D-26 ~ D-29 池本文彦(萬有製薬)	14:24 ~ 15:12 免疫毒性 - 1 E-23 ~ E-26 澤田純一(国立衛試)
16:00	降矢 強(国立衛試) 寺尾恵治(筑波霊長類センター)	15:48 ~ 16:24 骨代謝 C-30 ~ C-32 暮部 勝(大阪府立大・獣医)	15:48 ~ 16:36 腎毒性 - 2 D-30 ~ D-33 遠藤 仁(杏林大・医)	15:12 ~ 16:00 免疫毒性 - 2 E-27 ~ E-30 小栗一太(九大・薬)
17:00				16:00 ~ 16:36 免疫毒性 - 3 E-31 ~ E-33 小野 宏(食薬安全センター)

プログラム

招待講演

7月18日(火) A会場 14:45~16:50

座長：井村 伸正 (北里大・薬・公衆衛生)

SL1. Development of Alternative Methods.

Alan M. Goldberg, Ph.D. (School of Hygiene and
Public Health, Johns Hopkins University)

座長：藤井 儔子 (帝京大・医・薬理)

SL2. Stress Proteins are Sensitive Indicators of Injury in the Brain Produced by
Ischemia and Toxins.

Frank R. Sharp, M.D. (University of California
at San Francisco)

ワークショップ

7月18日(火) A会場 9:00~12:00

「癌原性試験の設計と解釈」

座長：林 裕造

高山 敏 (埼玉第一製薬)

WS-1. 現行癌原性試験の問題点

白居 敏仁 (ヤンセン協和・研究開発本部)

WS-2. 作用機序に基づく癌原性リスクの解析

藤井 登志之 (藤沢薬品工業・安全研)

WS-3. 癌原性試験における用量設定の在り方

堀井 郁夫 (日本ロシュ研究所・毒性病理)

WS-4. 発癌性評価における短期試験の有用性

高橋 道人 (国立衛試・病理)

WS-5. 癌原性評価における新しい科学技術の導入

井上 達 (国立衛試・毒性)

シンポジウム

7月19日(水) B会場 9:00~12:00

「免疫系と神経-内分泌系関連からみた免疫抑制薬、
免疫調整薬の作用と副作用(毒性)」

座長 大沢 基保 (帝京大・薬・環境衛生)

対馬 敏夫 (東女医大・内分泌センター)

S-1. 免疫系と内分泌の相互作用

対馬 敏夫 (東女医大・内分泌センター・内科)

S-2. FK506の作用機序と副作用(毒性)

田村 康一 (藤沢薬品・開発第一研)

S-3. シクロスポリンの作用機序と副作用

高橋 信弘 (東亜燃料工業・総合研)

S-4. Muromonab CD3 (OKT3) の作用機序と副作用

高橋 公太 (新潟大・医・泌尿器科)

S-5. 小児の免疫抑制薬治療とその副作用

稲場 進 (富山医薬大・小児科)

ミニシンポジウム 1.

7月18日(火) D会場 9:30~11:50

「眼刺激性試験代替法のバリデーションと現状」

座長：佐藤 温重 (東京医科歯科大)

大野 泰雄 (国立衛試・薬理)

1. 眼刺激性試験代替法のバリデーションの現状と考え方
小野 宏 (食薬安全センター秦野研)
2. 化粧品原料の安全性評価のための眼刺激性試験代替法のバリデーション
-計画及び経過-
大野 泰雄、他 (国立衛試・薬理)
3. 化粧品原料の安全性評価のための眼粘膜刺激性試験代替法の二次バリデーション
1) インビボ眼刺激性試験結果およびインビボ試験の問題点
金子 豊蔵、他 (国立衛試・毒性、他)
4. 化粧品原料の安全性評価のための眼刺激性試験法の二次バリデーション
2) 有精鶏卵の漿尿膜 (CAM) を用いる方法
萩野 滋延、他 (資生堂、他)
5. 化粧品原料の安全性評価のための眼刺激性試験代替法の二次バリデーション
3) 赤血球試験
岡本 裕子、他 (コーセー、他)
6. 化粧品原料の安全性評価のための眼刺激性試験代替法の二次バリデーション
6) MATREX™ による刺激性試験
大内 淳子、他 (花王、他)
7. 化粧品原料の安全性評価のための眼刺激性試験代替法の二次バリデーション
7) ウサギ角膜初代細胞 (Corne Pack) を用いた細胞毒性試験
内山 貴司、他 (加美乃素、他)
8. 化粧品原料の安全性評価のための眼刺激性試験代替法の二次バリデーション
9) 哺乳類培養細胞株 (HeLa 細胞) を用いた細胞毒性試験
千葉 勝由、他 (ヤクルト、他)
9. 総合討論

ミニシンポジウム 2.

7月19日(水) B会場 13:00~14:45

「雄授精能評価方法確立のための研究」

座長：田中 悟 (国立衛試・毒性)

赤池 雅司 (ヘキストジャパン)

1. 評価項目間の比較 三分一所厚司 (三共・安全研)
2. 精子検査の在り方 川島 邦夫 (国立衛試・薬理)
3. 病理検索での問題点 安原加寿雄 (国立衛試・病理)
4. 投薬期間の妥当性 樋口 敏浩 (住友化学工業・生物環境)
5. 回復性に関して 岸 倉次郎 (塩野義製薬・新薬研)
6. 総合討論

ミニシンポジウム 3.

7月19日(水) B会場 14:50~16:35

「毒性試験における血液学的検査評価の問題」

座長：降矢 強 (国立衛試・安全生物研)

寺尾 恵治 (筑波霊長類センター)

1. 臨床病理検査に関するサンプルサーベイランス
(1) 実施方法と血液学的検査成績
野村 護、他 (第一製薬、他)
2. 臨床病理検査に関するサンプルサーベイランス
(2) 血液化学的検査成績
林 裕、他 (富士レビオ、他)
3. カニクイザルリンパ球の全血法あるいは比重遠心法によるフローサイトメトリー解析
小倉 剛、他 (中外製薬・安全研、他)
4. カニクイザルにおける頻回採血の血液学的検査および血液化学的検査に及ぼす影響
鮫島 秀暢、他 (新日本科学・安全研)
5. 混餌投与試験における血中薬物濃度 —採血ポイントの検討—
近藤 正実、北崎 直 (武田薬品工業・薬剤安全研)
6. 総合討論

7月19日(水)

C会場

9:00-10:00

毒性試験－1

座長：江頭 享（大分医大・薬理）

C-01 マウス混餌投与試験の摂餌推移に関する基礎的検討

○石橋成太良、浜洲泰久、吉田 勝、中沢素邦、安達孝浩、吉川健一、
田村博信、鷺見信好（日本新薬・安全研）

C-02 イヌ血清ALPの由来臓器と絶食の影響について

○井上芳巳、江口文子、榎富直哉、田村 茂、務台 衛（三菱化学横浜
総合研・安全研）

C-03 網状赤血球のRNA含有量は造血機能指標としてなりえるか？

○石島奈美、嘉松望美、高橋裕詞、大野広志、野村 護（第一製薬・開発研・
安全研）

C-04 卵巣摘出ラットにおける臨床検査パラメーターの経時的変化

○安藤理恵子、中山由美子、棚橋清子、中村 純、国松武史、関 高樹、
吉武 彬（住友化工・生物環境科学研）

C-05 コモンマーモセットのX線全身照射による造血機能の変化

○鈴木修三^{1,2}、直 弘^{1,2}、谷岡功邦、日々野 仁³（¹前臨床医学研、²実中研、
³東大医科研・病態薬理）

10:00-11:00

毒性試験－2

座長：門馬純子（国立衛試・毒性・薬理）

C-06 Lipopolysaccharide 腹腔内投与により惹起される血中活性酸素種の動態と
脂質過酸化亢進反応について

○江頭 享、高山房子、山中康光（大分医大・医・薬理）

- C-07 リポ多糖 (LPS) 投与ラットにおける血中及び尿中 $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ の著増と血液細胞数変動との相関について
北嶋 聡、○津田充宥、江下希美、松島裕子、齊藤 実、門馬純子、黒川雄二 (国立衛試・安全センター・毒性・薬理)
- C-08 非ペプチド性 Angiotensin II 拮抗薬のラットでの毒性試験において認められた変動パラメーターの解析
○望月宴交、佐野孝一、山内研司、中岡 農、橋本正晴、峯 靖弘 (藤沢薬品・安全研)
- C-09 キノホルム毒性に感受性の高いラットにおけるキノホルムの体内動態について
○堀 眞一郎、大谷幸子 (東京都神経研・神経生化)
- C-10 顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) は新生児ラットの成長を抑制しなかった
○古坊真一、松本清司、小川幸男*、関田清司*、小野 敦*、降矢 強*、黒川雄二* (信州大・医・動物実験施設、*国立衛試・毒性)

11:00-12:00

毒性試験 - 3

座長：佐藤哲男 (千葉大・薬・薬物)

- C-11 一般毒性試験における機能検査の現況
○田村 茂¹、奈良 博²、吉田 勝³、藤井邦伸⁴、小林孝志⁵、松岡信男⁶、貞永 納⁷、中野雄司⁸、田中暢幸⁹、橋本正晴¹⁰ (日本製薬工業協会基礎研) (1三菱化学、2塩野義製薬、3日本新薬、4日研化学、5森下ルセル、6大日本製薬、7協和発酵、8旭化成工業、9大塚製薬、10藤沢薬品)
- C-12 実験動物血漿を用いた日立自動分析装置736における臨床生化学検査試薬の検討
○平位奈美、坂爪正志、田坂知也、豊田祐司 (山之内製薬・創薬安全研)
- C-13 毒性試験動物代替試験の実施状況-日本製薬工業協会のアンケート調査-
○甲田 彰¹、浅利 晃²、落合敏秋³、重栖幹夫⁴、金城義明⁵、田中 均⁶、田岸荘一郎⁷、中村正平⁸、原田 寧⁹、前田充則¹⁰、橋本正晴¹¹ (日本製薬工業協会基礎研、1住友製薬、2生化学工業、3持田製薬、4ヘキストジャパン、5日本製薬、6ロート製薬、7東京田辺製薬、8京都薬品、9日本レダリー、10日本チバガイギー、11藤沢薬品)

- C-14 LECラット肝細胞スフェロイドにおける銅蓄積性について
 ○吉沢正純、上野光一、米田信次、佐藤哲男、大道正義*、鈴木和夫
 (千葉大・薬、*千葉市環境保健研)
- C-15 ラット肝細胞スフェロイドを用いた劇症肝炎の発症に関与するサイトカインの検討
 ○小林明子、上野光一、吉沢正純、佐藤哲男 (千葉大・薬・薬物)

13:00-14:00

抗腫瘍剤

座長：真板敬三 (残留農薬研・毒性)

- C-16 新規抗腫瘍剤 Capecitabine (Ro 09-1978, 5'-DFCR 誘導体) の毒作用－毒作用の動物種差と腸管毒性の軽減－
 ○川島 明、小林和子、阿保 敬、今村いづる、堀井郁夫 (日本ロシュ・研究所・毒性病理)
- C-17 新規抗腫瘍剤 Capecitabine (Ro09-1978, 5'-DFCR 誘導体) の毒作用－サル、ラット、マウスにおけるトキシコキネティクス－
 ○進藤英俊、川島 明、田原 整*、堀井郁夫 (日本ロシュ研究所・毒性病理、*薬物動態代謝)
- C-18 アントラサイクリン系制癌剤アドリアマイシンとピラルピシンの作用特異性とそれらの細胞内 Translocator との関係
 ○清宮健一、Guanxun Tian、松尾三郎、暮部 勝 (大阪府立大・獣医・毒性)
- C-19 各種抗癌剤併用投与によるマウス肺毒性の検討
 ○吉田貢由、高田早苗、加藤道幸、野村 護、小野寺 威 (第一製薬・開発研・安全研センター)
- C-20 抗酸化剤1-O-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone (HTHQ) のヘテロサイクリックアミン誘発変異原性およびラット肝前癌病変に対する抑制効果
 ○玉野静光¹、田中 光¹、木村重紀¹、広瀬雅雄¹、三木徳太郎²、白井智之¹、佐藤利夫³ (¹名市大・医・1病理、²日本ハイボックス、³徳島文理大・薬)

14:00-14:48

肝・発癌

座長：鎌滝哲也（北大・薬・代謝）

- C-21 ベルオキシゾーム誘導剤によるラット肝小増殖巣に対するオルニチン脱炭酸酵素の免疫組織化学的検討
○西川秋佳¹、古川文夫¹、池崎信一郎¹、今沢孝喜¹、吉田敏則²、原田孝則²、真板敬三²、高橋道人¹（¹国立衛試・病理、²残農研・毒性）
- C-22 ベルオキシゾーム増殖薬誘発肝癌における核内タンパク質のリン酸化
○田村 浩、雲林弘成、渡辺隆史、須賀哲弥（東京薬大・臨床生化）
- C-23 アフラトキシンB₁の肝発がん性におけるミクロシスチン及びフモニシンの相互作用
○関島 勝^{1,2}、永田諭志⁴、Chen Gang³、Yu Shun-Zhang³、上野芳夫^{2,4}
（¹三菱化学BCL、²東京理大生命研、³上海医科大、⁴東京理大・薬）
- C-24 ラット肝中期発癌性試験法による sodium phenobarbital の肝発癌プロモーション作用と P-450 誘導の用量相関性
○萩原昭裕¹、松田 勉²、北野光昭²、河部真弓¹、佐野真士¹、船江良彦³、福島昭治²、白井智之¹（¹名市大・医・1 病理、²大阪市大・医・²1 病理、³化学）

14:48-15:48

変異原・他

座長：上野芳夫（東京理大・薬・毒性）

- C-25 強変異原 Arylmethyl Sulfate の活性発現における塩素イオンの関与
○奥田晴宏、小倉健一郎、渡部 烈（東京薬大・薬・第二衛生化学）
- C-26 キノロン系合成抗菌剤のマウスリンフォーマ試験における誘発コロニーの解析
○中山志保、島田弘康、野村 護（第一製薬・開発研・安全研センター）
- C-27 天然化学物質ケルセチンおよびフラボノイドのリスクアセスメント
○曾根秀子¹、青木康展²、遠山千春²、米元純三¹（¹国立環境研・地域環境研究グループ化学物質健康リスク評価研、²環境健康部）
- C-28 ハムスターBOP誘発腫瘍病変における血液型A物質の発現
○古川文夫、西川秋佳、池崎信一郎、高橋道人（国立衛試・病理）

- C-29 HL60 細胞株における T-2 toxin による細胞内カルシウムイオン濃度の上昇とアポトーシス誘導
○吉野直人^{1,2}、川村 理¹、滝沢万理³、瀬戸加大⁴、田代文夫⁵、本田三男²、上野芳夫¹ (¹東京理大・薬、²国立予防衛生研・エイズ研究センター、³国立予防衛生研、⁴愛知がんセンター化学療法部、⁵東京理大・基礎工学)

15:48-16:24

骨代謝

座長：暮部 勝（大阪府立大・獣医・毒性）

- C-30 硫酸化多糖体の骨代謝に対する影響
○上杉康夫、東條宏子、中村美穂、梶村哲世、野村 護、高山 敏、小野寺 威（第一製薬・開発研・安全研センター）
- C-31 エンドセリン受容体拮抗剤の3T3-E1培養骨芽細胞に及ぼす効果
○澤田和彦、鈴木弘美、堀井郁夫（日本ロシユ・研究所・毒性病理）
- C-32 斑状歯形成におけるフッ素の毒性機序：分泌期エナメル芽細胞での細胞内輸送阻害におけるG蛋白の関与
○松尾三郎、清宮健一、暮部 勝（大阪府立大・獣医・毒性）

D会場

9:00-9:36

発生毒性

座長：松本清司（信大・医・動物実験施設）

- D-01 Toluene の妊娠ラット吸入暴露による生殖発生毒性 I. 胎児の器官形成期暴露試験
○小野 敦、関田清司、広瀬明彦、小川幸男、斉藤 実、内藤克司、金子豊蔵、降矢 強、松本清司*、田中 悟、黒川雄二（国立衛試・毒性、*信州大・医・動物実験施設）
- D-02 モノブチルスズ、ジブチルスズおよびトリブチルスズのラットにおける発生毒性の比較
○江馬 真、黒坂麗子、天野博夫、小川義之（国立衛試大阪支所・生物試験部）

- D-03 ラット培養胎児における解熱鎮痛剤による口唇裂発現についての一考察
〈サリチル酸の場合〉
秋田正治、○横山 篤（鎌倉女子大・家政・栄養）

9:36-10:24

生殖毒性－1 座長：堀井郁夫（日本ロシュ・研究所・毒性病理）

- D-04 Pyridoxine の雄性生殖能に及ぼす影響
○堤 俊輔、田中俊光、後藤鋼星、赤池雅司（ヘキストジャパン・医薬研究
開発本部）

- D-05 Nefiracetam 投与によるラット雄性生殖毒性
○島田 信、坂口ゆかり、原田滋雄、柿畑耕司、野村 護、高山 敏
（第一製薬・開発研・安全研センター）

- D-06 Estradiol benzoate を用いた雄性生殖能評価法に関する検討
○池川 直、秦 純子、中富一文、菅原茂樹、宇野 洋、伊澤義弘（帝人・
医薬開発研・安全研）

- D-07 白金錯化合物 Compound C のラットにおける雄性生殖能への影響－4 週間
反復投与と 9 週間反復投与の比較－
○津野達也、溝口啓二、田中直美、原 洋明、五十嵐真一（中外製薬・安全研）

10:24-11:12

生殖毒性－2 座長：伊原敏夫（新日本科学・安全研）

- D-08 ラットにおける生存精子の識別法
○加藤真之、木村 均、林 晴美、戸部公子、古橋忠和（日本バイオリサーチ
センター・羽島研）

- D-09 CASA-System (HTM-IVOS) を用いた精子試験 I. α -chlorohydrin
○川島邦夫、門馬純子、高木篤也、北嶋 聡、黒川雄二（国立衛試・
安全性研・毒性）

- D-10 Trimethylphosphate および Omidazole 投与 ラットでの Flow cytometry による精子生存性および精子数の検討
○加藤千明、深津信子、滝沢節子、堀井郁夫（日本ロシュ・研究所・毒性病理）
- D-11 ラットにおける雄性生殖能評価法の検討－1 用手法による精子検査法の検討
○吉崎 宏、北村紀子、平山千束、大島洋次郎、杉谷順康（武田薬品・薬剤安全研）

11:12-12:00

生殖毒性－3

座長：野村 護（第一製薬・開発研・安全研）

- D-12 免疫組織学的染色によるラットの精巣毒性評価法の検討
○岡田洋明、庄司陽子、脇川典子、白石 明、川音晴夫（明治製菓・安全研）
- D-13 精巣の毒性病理学的研究；ジニトロベンゼン投与により誘発された精巣のアポトーシスについて
○守田禎一、吉田一晴、河村泰仁、児玉卓也（富山化学・総合研・安全研）
- D-14 雄ラットの形態分化観察に関する検討－陰茎龟头包皮分離について－
○藤淳一郎、河谷善則、熊田幸浩、鈴木祥太、大島洋次郎（武田薬品・医薬開発本部・薬剤安全研）
- D-15 雄および雌生殖能試験へのカニクイザルの応用
○尾根田暁、鮫島秀暢、山本 隆、福田浩一、伊原敏夫、永田良一（新日本科学・安全研）

13:00-14:00

肝・代謝酵素－1

座長：渡部 烈（東京薬大・薬・衛生化学）

- D-16 ラットの生後発育に伴う肝臓の変化－P450アイソザイムの変動に注目した生化学的、免疫組織学的検討－
○瀬畑信哉、渡辺稔之、五十嵐功、矢本 敬、真鍋 淳（三共・安全研）

- D-17 カニ肝臓異物代謝酵素 CytochromeP450 による環境モニタリング
○石塚真由美¹、星 英之¹、源 宣之²、升田真木彦¹、数坂昭夫¹、藤田正一¹
(¹北大・獣医・環境獣医・毒性、²岐阜大・農・獣医・公衆衛生)
- D-18 ヘテロサイクリックアミンを活性化するヒトCYP1A2のバキュロウイルス
(BmNPV) を用いた発現
○佐久間勉¹、中山佳郁夫¹、稲野恵子¹、Frank J. Gonzalez²、伊東 進¹、
鎌滝哲也¹ (¹北大・薬・代謝、²米国NIH)
- D-19 Phenobarbital による第 I 相肝薬物代謝酵素誘導と細胞間コミュニケーション
減少との関連：投与終了後の回復性に注目して
○五十嵐功、渡辺稔之、大橋芳彦、杉浦智美、木村邦男、田中宏治、
佐藤里子、真鍋 淳 (三共・安全研)
- D-20 殺菌剤 Etridiazole による第 II 相肝薬物代謝酵素誘導と細胞間コミュニケーション
減少との関連
○田中宏治、渡辺稔之、五十嵐功、矢本 敬、大橋芳彦、真鍋 淳 (三共・
安全研)

14:00-15:00

肝・代謝酵素 - 2

座長：真鍋 淳 (三共・安全研)

- D-21 プラスチック可塑剤で誘導されるラット肝カルボキシルエステラーゼの
cDNA クローニングとCOS細胞での発現
○細川正清、甚目敦子、藤澤正枝、中村隆広、佐藤哲男 (千葉大・薬・薬物)
- D-22 Gunn ラットにおける Phenobarbital 誘導性の *p*-Nitrophenol UDP-グルクロン酸
転移酵素の欠損について
○石井祐次、鶴田和興、高見篤子、埴岡伸光*、小栗一太 (九大・薬・衛生・
裁判、*現国立衛試)
- D-23 ラット肝クラス theta Glutathione S-Transferase (GST) の遺伝子構成とその解析
○西山貴仁、平塚 明、小倉健一郎、渡部 烈 (東京薬大・薬・第2衛生化学)

- D-24 発癌活性代謝物アリールメチルサルフェートを解毒する新種のマウス肝
Glutathione S-Transferase m₄
○平塚 明、金澤光徳、奥田晴宏、渡部 烈（東京薬大・薬・第2衛生化学）
- D-25 イヌおよびサル肝可溶性画分のフェノールスルホトランスフェラーゼ：発現と
その諸性質
○小倉健一郎、薩川正広、奥田晴宏、渡部 烈（東京薬大・薬・第2衛生化学）

15:00-15:48

腎毒性 - 1

座長：池本文彦（萬有製薬・開発研）

- D-26 5/6腎部分切除ラットを用いた腎毒性試験の検討-1 -投与時期による腎毒性
物質への反応性の相違について-
○茨田享子¹、中村聡子¹、今井節夫¹、外尾亮治²、五十嵐章之²、吉田 緑³、
前川昭彦³（動物繁殖研¹・安全研、²実験動物研、³佐々木研究所）
- D-27 ゲンタマイシン投与および部分腎摘動物の腎機能に関する基礎的検討
○村上善紀、山崎清美、市村彰俊、坂内なるみ、坂口 弘、田内清憲
（日本レダリー・生物研）
- D-28 過酸化脂質およびESR法を用いたクロム（Cr）による腎障害の検討
○水野章子、車 碩鎬、遠藤 仁（杏林大・医・薬理）
- D-29 Cdによる腎障害機序について
○林 泰司、曾山桃子、照井 潤、高島一哉、須藤純一（北海道医療大・
薬・毒理）

15:48-16:36

腎毒性 - 2

座長：遠藤 仁（杏林大・医・薬理）

- D-30 マレイン酸塩製剤によるイヌにおける急性腎障害
○勝村英夫、笠間菊子、青木道子、吉村慎介、小野 宏（食薬安全センター・
秦野研）

- D-31 ラットにおける尿分析データの性差について（第4報）雄ラットにおける Hexestrol dipropionate の尿分析データに及ぼす影響
○杉浦正幸、山田久陽、村上美穂子、木村正明、樽本保男（大正製薬・開発研・安全研）
- D-32 ラットを用いた腎尿細管障害モデルの尿中 β 2-ミクログロリン排泄量について
○池田尚隆、石丸照美、花見正幸、佐村恵治、松本浩良、池本文彦（萬有製薬・開発研）
- D-33 イヌ腎臓中 glutathione S-transferase 活性－肝臓との相関－
○渡辺稔之、杉浦智美、平野光一、大橋芳彦（三共・安全研）

E 会場

9:00-10:00

眼刺激性試験・代替法

座長：佐藤秀蔵（武田薬品・医薬開発）

- E-01 ドレイズ眼刺激性試験代替法の二次バリデーション－Skin²（ZK1100及びZK1200モデル）試験－
○加藤俊則^{1,2}、古本 勉^{1,2}、中沢 晴^{1,2}、杉浦秀次^{1,3}、宇佐見雅仁^{1,3}、柿嶋 博^{1,4}、桑原裕史^{1,4}、大内淳子^{1,5}、笠井 裕^{1,5}、岡本裕子^{1,6}、小島 肇^{1,7}、柴田道男^{1,8}、津田孝也^{1,8}、風間明美⁹、大野泰雄¹⁰（¹日本化粧品工業連合会、²マックスファクター、³ホーユー、⁴鐘紡、⁵花王、⁶コーセー、⁷日本メナード化粧品、⁸資生堂、⁹オリエンタル酵母工業、¹⁰国立衛試・薬理）
- E-02 ドレイズ眼粘膜刺激性試験代替法の二次バリデーション（4）ヘモグロビン変性試験
○畑尾正人、村上賢子^{1,2}、坂本一民、瀧野嘉延、大沼美由紀^{1,3}、柿島 博、小川朋康^{1,4}、松重知保^{1,5}、金子豊蔵、門馬純子、岩淵佳美⁶、小島肇夫^{1,7}、千葉勝由^{1,8}、松川清治、増田邦夫^{1,9}、大野泰雄¹⁰（¹日本化粧品工業連合会、²資生堂、³味の素、⁴鐘紡、⁵牛乳石鹸共進社、⁶国立衛試・毒性、⁷日本メナード化粧品、⁸ヤクルト本社、⁹龍宝堂製薬、¹⁰国立衛試・薬理）

- E-03 化粧品原料の安全性評価のための眼刺激性試験代替法の二次バリデーション
8) ウサギ角膜由来細胞 (SIRC細胞) を用いる試験
○谷 尚子、木下成美^{1,2}、岡本裕子^{1,3}、小谷麻由美^{1,4}、板垣 宏、村上賢子^{1,5}、
杉浦秀次、加藤久美子^{1,6}、小島肇夫^{1,7}、大野忠夫、西條 薫、加藤麻矢子⁸、
大野泰雄⁹ (日本化粧品工業連合会、²ポーラ化成工業、³コーセー、⁴サンスター、
⁵資生堂、⁶ホーユー、⁷日本メナード化粧品、⁸理化学研究所、⁹国立衛試・
薬理)
- E-04 化粧品原料の安全性評価のための眼刺激性試験代替法の二次バリデーション
10) 哺乳類細胞株 (CHL細胞) を用いた細胞毒性試験
○奥村秀信、荒島雅樹^{1,2}、大内淳子、笠井 裕^{1,3}、津雲勝義、柿島 博^{1,4}、
小谷麻由美^{1,5}、小島肇夫^{1,6}、中澤 晴、大澤宏行、加藤俊則^{1,7}、宮島敦子、
大野泰雄⁸ (日本化粧品工業連合会、²ノエビア、³花王、⁴鐘紡、⁵サンスター、
⁶日本メナード化粧品、⁷P & G、⁸国立衛試・薬理)
- E-05 化粧品原料の安全性評価のための眼粘膜刺激試験代替法の二次バリデーション
11) EYTEX[®] を用いる試験
○松川清治、増田邦夫^{1,2}、柿島 博、小川朋康、島 康世^{1,3}、松重知保^{1,4}、
中村恒彰、水谷秋子^{1,5}、新海輝夫⁶、大野泰雄⁷ (日本化粧品工業連合会、
²龍宝堂製薬、³鐘紡、⁴牛乳石鹸共進社、⁵ライオン、⁶In Vitro International Co.、
⁷国立衛試・薬理)

10:00-11:00

眼毒性・他

座長：板垣 宏 (資生堂・安全・分析)

- E-06 トレチノインによりラットF₁産児に惹起された眼科学的異常
○久野博司、小松哲郎、日高正泰、秋元倫代、池田孝則 (萬有製薬・開発研)
- E-07 マウス網膜電図記録法の検討及びそのヨース酸ソーダによる網膜症への応用
○杉本眞次、今若実穂、倉田一之、金丸健一、伊藤隆康、西条武俊、
佐藤秀蔵 (武田薬品・医薬開発・薬剤安全研)
- E-08 老齢 Fischer 344 ラットの視覚障害
○大塚博比古、今井良悦、伊藤昌枝、笹野和憲 (武田薬品・医薬開発・
薬剤安全研)

E-09 カルバメート系農薬のラット糖代謝に及ぼす影響
○黒沢英俊、永松國助、長谷川 明、大野泰雄*（日大・薬・臨床生化、*国立
衛試・薬理）

E-10 雄ウサギにカーバメート殺虫剤 BPMC を静脈内投与した時の循環機能不全
による急性死
○二川治子、北條優子、高橋宏明（残留農薬研）

11:00-12:00

神経系

座長：鈴木 勉（星薬大・薬理）

E-11 抗コリンエステラーゼ薬の反復投与による耐性発現と脳ムスカリン性レセ
プター
柏田景子、大川内真紀、橋本 渉、○小林晴男、松久祐貴、鈴木忠彦、
佐藤 至、松坂尚典（岩手大・農・獣医）

E-12 アコニチンの急性毒性に対する耐性の形成
○島田 瞭、山口和子、柳田知司（前臨床医学研究所）

E-13 キノロン系抗菌剤およびその関連化合物のGABA_A受容体イオンチャネル機能
に及ぼす影響
○伊藤芳久¹、宮坂知宏¹、福田英臣¹、赤羽浩一²、木村陽一²（¹日本大・薬・
薬理、²第一製薬・探索第一研）

E-14 一般薬理研究における循環作用評価に及ぼす麻酔薬の影響
○森 和彦、北野 裕、笠井義男、高砂 浄、広橋正章、野村 護
（第一製薬・開発研・安全研センター）

E-15 レゼルピン投与によるラット副腎髄質のドーパミンβ-水酸化酵素活性上昇
と細胞増殖亢進の相関に関する検討
○吉田信也、久田 茂、飯塚和弘、堀内 敏、鈴木 稔（帝国臓器製薬・
安全研）

13:00-13:48

消化器系

座長：唐木英明（東大・農学生命科研・獣医）

- E-16 ナトリウム塩化合物による胃粘膜障害作用の検討
○三井雅之、清水久美、小林孝志、山崎 誠、吉田順一、谷川廣行（森下ルセル・総合研・安全研）
- E-17 抗凝固薬 DX-9065a のラット盲腸に及ぼす影響
○吉池通晴、小野広志、土屋俊也、野村 護（第一製薬・開発研・安全研）
- E-18 塩酸イリノテカンによるラット遅延性下痢の発症機作の解明
○角 将一¹、尾上正治¹、遠山 清¹、鎌滝哲也²（¹ヤクルト本社・中央研、²北大・薬）
- E-19 Dextran sulfate sodium 誘発ラット潰瘍性大腸炎の回復性の検討
○吉田順一、森瀧あかね、三井雅之、小林孝志、清水久美、谷川廣行（森下ルセル・総合研・安全研）

13:48-14:24

内分泌毒性

座長：北浦敬介（大塚製薬・徳島研・毒性）

- E-20 ラットにおける甲状腺機能低下時の血漿脂質の変動
○森下克美、三谷公互、小倉基裕、北浦敬介、神辺敏実（大塚製薬・徳島研・毒性研）
- E-21 チオウレアの血中甲状腺ホルモン低下作用機序に関する研究
○小野寺博志¹、三森国敏¹、安原加壽雄¹、務台 衛²、北浦敬介³、森下克美³、前川昭彦⁴、高橋道人¹（¹国立衛試、²三菱化学、³大塚製薬、⁴佐々木研）
- E-22 ラットで認められた副腎毒性の発現機序に関する検討
○須藤 武、築館一男、見上 孝（エーザイ・安全研）

14:24-15:12

免疫毒性－1

座長：澤田純一（国立衛試・安全研・毒性）

E-23 ラットを用いた Plaque-forming cell (PFC) assay － 1次免疫応答と2次免疫応答

○中村裕行、杉本武志、中井洋一（武田薬品・医薬開発・薬剤安全研）

E-24 モルモットを用いた抗原性試験におけるキャリア・タンパク質の交叉反応性に関する研究

○井上智彰、志村賢一、鈴木弘美、加藤千明、堀井郁夫（日本ロシュ・研究所・毒性病理部）

E-25 薬物アレルギー発現機序の研究：キャリアー蛋白の検索（第6報）

○絵柳玲子¹、重松秀成、久成由紀子²、石井祐次、小栗一太³（¹第一工大、²第一薬大、³九大・薬）

E-26 モルモット PCA 反応の受身感作時間に関する検討

○桑原 孝、朝波省吾（大塚製薬工場・鳴門研）

15:12-16:00

免疫毒性－2

座長：小栗一太（九大・薬・衛生化学）

E-27 *Listeria monocytogenes* 感染実験系を用いた化学物質の免疫毒性試験法に関する研究

○鈴木幸一、中村恒彰、増田光輝、井上 智¹、小西良子²、熊谷 進²
（ライオン・安全性評価センター、¹予研・獣医、²予研・食品衛生微生物）

E-28 2種の抗癌剤を用いた免疫毒性学的検討

○水戸誠二、渡辺 潔、堀 正樹（田辺製薬・安全研）

E-29 血液生化学検査における免疫学的指標の利用

○安達智子、岸田由紀、堀口恵子、古谷真美、金澤由基子、小島幸一、小野 宏（食薬安全センター・秦野研）

E-30 EIA法による抗原特異的IgE抗体検出法の検討

○福永裕樹、入江弘之、小柴 博、花田秀一、岩井正和（ミドリ十字・中央研・安全研）

16:00-16:36

免疫毒性－3

座長：小野 宏（食薬安全センター・秦野研）

E-31 遅延型アレルギー反応（4）メタクリル酸誘導体の反応性の検討

○金澤由基子、小島幸一、岡田富士桜、横山雄一*、平尾政則*（食品薬品安全センター・秦野研・免疫毒性、*HOYA・ビジョンケア）

E-32 アルデヒド類のモルモットにおける皮膚感作性ならびに交差反応性の構造活性相関について

○門馬純子、北嶋 聡、関口裕巳、伊佐間和郎¹、鹿庭正昭¹、津田充宥、沢田純一²、黒川雄二（国立衛試・安全研・毒性、¹療品、²機能生化学）

E-33 アルデヒド類のモルモット皮膚感作性と物理化学的性質との相関性について

○伊佐間和郎、鹿庭正昭、門馬純子¹、北嶋 聡¹、津田充宥²、黒川雄二¹、中村晃忠（国立衛試・療品、¹安全研・毒性、²薬理）

DEVELOPMENT OF ALTERNATIVE METHODS

Alan M. Gardiner, Ph.D.

Professor, and Director, Center for Alternatives to

Animal Testing

Johns Hopkins University

111 Ross Key, Room 2000-01

Baltimore, Maryland 21205-5709

招待講演

The science of toxicology defines the interactive relationship between physical agents, chemical agents and the consequences of alterations to living tissues, cells, and intact organisms. Toxicology also provides a way to minimize and understand the risk to humans and animals from exposure to either intentional or unintended agents. The consequences of that fall to toxicologists and lawyers. The presentation will explore the need for alternative methods and ways to develop of new test systems and in some cases to develop an overall test strategy to approach to various types of human and animal testing.

Cellular versus Molecular

The early stages of in vivo toxicology have been focused on descriptive and correlative approaches in methodology development. Much of the development has been focused on cell and eye and general toxicity. Key to future progress is the development of test systems that are based on molecular approaches. The scientific community must develop a better understanding of the relationships between molecular biological and toxicology.

Current and Future Methods for the Assessment of

DEVELOPMENT OF ALTERNATIVE METHODS

Alan M. Goldberg, Ph.D.

Professor and Director, Center for Alternatives to
Animal Testing

Johns Hopkins School of Public Health

111 Market Place, Suite 840

Baltimore, Maryland 21202-6709

The science of toxicology defines the interaction between chemical and/or physical agents and the consequences of alterations to living tissues, cells, and intact organisms. Toxicology also provides a way to delineate and understand the risk to humans and animals from exposure, either intentional or accidental, and to prevent the consequences of that biological-agent interaction. This presentation will explore the need for mechanistically based tests, discuss some of the issues one has to consider in developing in vitro methods and present an approach to validation of in vitro methods.

Correlation Versus Mechanism

The early stages of in vitro toxicology have been focused on descriptive and correlative approaches to methodology development. Much of the development has been focused on skin and eye and general toxicity. However, it is becoming increasingly apparent that for the science to advance we must develop mechanistic understandings of the relationships between xenobiotics and biological systems.

Correlative tests generally lead to trivial

understandings and do not provide true predictive knowledge. This is not to say that correlative tests are without merit. These assays have merit and are useful as screens, adjuncts and in attempts to make decisions about chemicals within a class. At this point in the development of the science, correlative tests are being used and used appropriately.

Mechanistically based tests, however, will provide us with true understanding of toxic processes and thus, the ability to predict the consequences of exposure to chemical agents. When we develop mechanistically based tests with multiple endpoints, we will be able to establish acceptable criteria for replacement methodology. As one develops an understanding of mechanism, one recognizes that batteries of tests will be required. Further, a focus on mechanistically based tests will yield false negative results in any one test but the battery will provide true positives.

Use of In Vitro Assays

At a recent meeting of the Office of Technology Assessment - U.S. Congress (OTA, April 24, 1995) participants were requested to examine the "gold standard" assay and determine if it met current needs and to look at short term tests that might evaluate the chemical world we live in. It has become apparent that much of our current focus on in vitro tests, for regulatory consideration, have been in the areas of cytotoxicity, skin, and eye irritation. In many, if not most other systems in vitro assays are used mainly to create a fuller understanding of biological processes and are used only in the last stages of compound

evaluation. However, in the development of drugs, in vitro approaches are used very early in the development of new compounds but this should not be confused with testing practice to meet environmental laws and evaluate safety.

VALIDATION

Background And Significance

The Validation Program of CAAT was implemented in 1989 following a recommendation of the CAAT Advisory Board at its 1988 retreat. CAAT is a likely core for validation activities given its mission and its unique and independent role as a liaison organization between academia, industry and government. The program was initiated with the establishment of the CAAT Committee on Validation and Technology Transfer, co-chaired by Drs. Emil Pfitzer, of Hoffman-LaRoche Inc. and Robert Scala, of Exxon Corp. At its inception, the overall objective of the committee was to catalyze the transfer of alternative testing technology from the research laboratory to practical application. The committee was charged with developing a framework to assess existing programs, coordinate future activities, establish a scientific structure for validation, and maintain strong links with regulatory, academic and industrial institutions.

Coincident with the formation of the Validation Committee, a monograph describing a comprehensive model of validation was published by the OECD in 1990 (Frazier, J.F., Scientific Criteria for Validation of In Vitro Toxicity Tests, OECD Publications, Paris). This

document defined validation as the process by which the credibility (reproductibility and reliability) of a candidate test is established for a specific purpose. He concluded that for in vitro tests to be used as a total replacement for whole animals, they must be mechanistically based, but empirically based tests may be sufficient for screening purposes. The need for mechanistically based validated alternatives has been strongly debated, but was emphatically echoed in a 1992 *ATLA* editorial (Flint, O., In Vitro Test Validation: A House Built on Sand, *ATLA*, 20:196-198).

As a result of the publication of the OECD document, members of the European Research Group for Alternatives in Toxicity Testing (ERGATT) organized a joint workshop with CAAT. The purpose was to conduct extensive discussions on all matters related to the validation of toxicity test procedures and produce an authoritative report. The results of this workshop appeared as a multiauthored article in the journal *ATLA* (Balls, M., Blaauboer, B., Brusick, D., et al Report and Recommendations of the CAAT/ERGATT Workshop on the Validation of Toxicity Test Procedures, *ATLA*, 18: 313-338, 1990) and simultaneously printed as CAAT Technical Report No. 3.

In spite of the importance of the publication of these documents, some observers maintained that they did not provide a design or framework for a validation methodology. Part of the difficulty in establishing such a framework for the validation process is a function of the different needs of individual

industries and government regulators. Thus, the ensuing challenge of the CAAT Validation Committee became one of defining a framework for validation that both established rigorous criteria and yet could be used by multiple industries. The Validation Committee developed its framework for the validation and implementation of in vitro toxicity tests and it was simultaneously published in four different journals in 1993 (*Xenobiotica*, *In Vitro: Cellular and Developmental Biology*, *In Vitro Toxicology* and *Journal of the American College of Toxicology*).

The framework document identifies the administrative requirements to organize, coordinate and evaluate validation activities. It proposes the creation of a Scientific Advisory Board of experts in the various aspects and endpoints of toxicity testing to provide oversight of validation resources, expertise and review of design/conduct of validation programs. Validation resources, in the form of core facilities, would also be established. These resources include chemical banks, data banks, cell and tissue banks and reference laboratories. Most importantly, the document stresses that peer review and publication of scientifically evaluated tests are integral to the process. This document was the first to present criteria for implementation of validation methods.

While these activities were taking place in the USA, the European Union (EU) established the European Center for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) to direct and coordinate validation activities in Europe. With the passage of the EC Cosmetics

Directive banning the sale of animal tested cosmetics/cosmetic ingredients after January 1998, European toxicologists and regulators need to validate non-animal tests for these products. While the NIH Revitalization Act of 1993 mandates the Institutes to develop replacement, reduction and refinement methodologies, there is no comparable government-funded center or organization in the US to direct parallel activities. However, a multi-government agency was created in 1994 to develop criteria for validation.

In 1980, with the development of a laboratory at Rockefeller University followed by the formation of CAAT at Johns Hopkins University in 1981, there was general recognition that it would be necessary to develop a validation methodology for in vitro assays. Many individual companies and trade associations instituted "validation" programs. However, it very quickly became apparent that these pilot studies did not meet rigorous criteria and generally would not result in validating any methodology.

With the development and publication of the framework for validation, a major hurdle has been overcome. However, what remains to be accomplished is the implementation of this framework. There is concern the most scientifically valid tests may not necessarily be the ones which become accepted. CAAT maintains that it is essential for methods to be evaluated using rigorous scientific criteria. A modular approach to validation will be presented (In press, *In Vitro Toxicology*, 1995).

Summary

This presentation will raise specific issues and explore areas that need discussion and development of mechanistically based tests in toxicology. In addition, an approach to validation will be presented that is based on fundamental principles and modeled after actual practice in other areas of methodology acceptance. Further, it is recognized that the validation process is but only one aspect of incorporation of in vitro approaches into safety-evaluation and risk assessment.

Stress Proteins are Sensitive Indicators of Injury in the Brain Produced by Ischemia and Toxins.

Frank R. Sharp

Department of Neurology, University of California and VA Medical Center, San Francisco, California 94121 USA.

Total protein synthesis decreases in all tissues following exposure to heat shock, ischemia, heavy metals and many toxins. This cellular response is associated with the induction of specific proteins which serve to protect the cells against injury. These stress proteins have a variety of functions and can be used to study how the cells have been injured.

HSP70. The hsp70 gene has been cloned in plants, bacteria, rats and man. It consists of a family of genes which are expressed at very low levels in normal cells. It is believed that any type of injury which produces denatured proteins within cells will induce the genes. Following exposure to heat, acid, heavy metals and ischemia the presence of denatured proteins within the cells activates proteins called heat shock factors. These proteins form a trimer which binds to the heat shock elements in heat shock genes including HSP70. This activates transcription of HSP70 leading to massive induction of the protein. It is believed that HSP70 binds to partially denatured proteins within cells, and combined with ATP, serves to prevent the proteins from becoming more denatured.

Ischemia Induction of HSP70 in brain. Both focal and global ischemia induce the HSP70 protein in brain. HSP70 is induced in endothelial cells in areas of brain destined to infarct, whereas HSP70 is not induced in neurons and glia in these regions. HSP70 is induced in neurons and glia in areas surrounding the area of infarction, in an area called the ischemic penumbra. Thus, HSP70 can detect neuronal injury in non-infarcted regions of brain. Following global ischemia, HSP70 is induced in the cells most vulnerable to ischemia, the CA1 pyramidal neurons in hippocampus. With longer durations of ischemia HSP70 is induced in more and more resistant cells. Thus, the temporal induction of HSP70 can

used to confirm the relative sensitivity of cells to ischemic injury in the brain.

Assessing Drug Toxicity in Brain in Using HSP70.

Following administration of the common anesthetic ketamine, many patients have hallucinations and occasionally frank psychosis. Following reports that ketamine, phencyclidine (PCP), and MK801 could damage rodent brain neurons, we examined the HSP70 response in rats administered these drugs. Ketamine, PCP and MK801 have been shown to induce HSP70 in neurons in the posterior cingulate cortex and retrosplenial cortex of adult rats. hsp70 mRNA is induced within a few hours of administration of the drugs. The HSP70 protein response is maximal at 24-48 hours following administration of PCP and MK801. At the electron microscope level neurons in which HSP70 protein is induced appear to have vacuoles within their cytoplasm. Thus these cells have evidence of physical injury as well as biochemical evidence of stress gene induction. The HSP70 protein can be detected for as long as a week following the administration of these drugs and disappears by two weeks.

Other cells injured by phencyclidine include the cerebellar Purkinje cells and cortical and amygdala pyramidal neurons. These cells have other evidence of injury including OX42 positive activated microglia around them. Prior administration of haloperidol and other drugs that would tend to prevent the psychosis caused by PCP, also appear to ameliorate the induction of HSP70 in neurons injured by PCP.

Therefore, the use of probes of hsp70 mRNA and antibodies for HSP70 protein have made it possible to confirm that a certain set of neurons is injured in the brain by these psychomimetic drugs - including PCP. Moreover, these markers of injury can then be used to study how the injury occurs how it might be prevented.

HSC73. This is the hsp70 gene that is normally expressed within all cells at all times. This gene is believed to (a) bind to all newly forming proteins and prevent them from folding abnormally as they are being synthesized on the ribosomes and then to chaperone the protein unfolded to target organelles (b) to serve as

the clathrin uncoating ATPase (c) and to serve other chaperone functions including responding to heat shock.

HSC73 has been of less use for studying toxins and injury to tissue since it is expressed at high levels in normal cells. Moreover, following many types of injury including heat shock the gene is only modestly induced. Global ischemia induces the gene at most two fold even after severe injury. However, it does appear that hsc73 and other constitutive stress genes can be induced by very modest types of injury - degrees of injury not severe enough to induce HSP70. However, since the magnitude of the hsc73 response is very modest as well, it is unclear whether this constitutive stress gene response to modest injury is very important or not.

Glucose Regulated Proteins (GRPs). A class of stress proteins that are not induced by heat shock include the GRPs. These proteins are modestly induced by low glucose within the cell, but are markedly induced by exposure to calcium ionophores. Several known GRPs include GRP78 - located in the endoplasmic reticulum, GRP75 located on the inner mitochondrial membrane, and GLUT1, a glucose transporter at the blood brain barrier. After recently cloning *grp75*, we have shown that *grp75* is induced following focal and global ischemia. Following modest degrees of focal ischemia, *grp75* is induced in the ischemic territory. Following infarction, *grp75* is induced in endothelial cells in the area of infarction and in neurons throughout the cortex on the side of the brain of the infarction. Following global ischemia *grp75* mRNA is markedly induced in CA1 neurons, whereas the GRP75 protein is not induced in the CA1 neurons. This data was interpreted to mean that a translational block for GRP75 as well as many other proteins has occurred in CA1 neurons destined to die.

Hemeoxygenase-1 (HO-1) Heat Shock Protein (32). There are two isoforms of the HO protein which metabolize heme to biliverdin carbon monoxide and iron. The HO-1 protein is heat shock protein which is also induced by hypoxia, oxidative stress, heme and immediate early genes that bind to AP-1 sites in its promoter. Since HO is the only enzyme that normally cleaves heme proteins, it is especially important in all cells with heme proteins and all cells exposed to extracellular heme proteins.

Since the brain is exposed to hemoglobin following subarachnoid hemorrhage, we studied HO-1 following injections of blood and hemoglobin into the subarachnoid space of adult rats. Both whole blood and pure hemoglobin induced HO-1 in microglial cells throughout the rat brain. This data shows that glial throughout the brain are intimately involved in metabolizing exogenous heme proteins introduced into the subarachnoid space. Moreover, focal areas of HO-1 and HSP70 induction have been detected. These are proposed to represent areas of focal ischemia following the experimental subarachnoid hemorrhage and therefore may serve as markers of cerebral vasospasm.

Apoptosis Associated Genes Induced in Adult Brain by Ischemia. A variety of genes have now been cloned in mammals which appear to be the homologues of genes shown to either promote or prevent apoptosis in *C. elegans*. Using oligonucleotide probes for these genes it appears that *bcl2*, *bclx*, and perhaps *ICE* are induced in CA1 pyramidal neurons following global ischemia in brain. This data confirms many reports suggesting that CA1 pyramidal neurons are TUNEL positive following global ischemia indicating that the DNA in these cells has been extensively fragmented which could indicate evidence for activation of endonuclease and possible death related to apoptotic mechanisms.

Our laboratory is devoted to finding molecular markers of injury. This is based upon the belief that these can be used to study and document evidence of injury, and can be used to develop specific treatments for the injury.

癌原性試験の設計と解釈

林 裕造

高山 敏（埼玉第一製薬）

発癌性は新薬が有する毒性として最も重篤な部類に属し、ヒトに現れてはならない副作用であることから、動物を用いた癌原性試験に基づくヒトでのリスク評価が重視されている。ところが、従来行われていた動物を用いての発癌性試験では結果がネガティブであればよしとする試験が皆無であったとは言い難い。しかし、新しい薬物を開発するに際し発癌性試験に携わっている研究者は、どのような試験計画とくに用量を設定したらよいかというような現実的な問題に始まり、もし成績が陽性を示した場合、新薬として開発を続行するか、もし続行するとしたらどのようにして安全性を確保できるかなど、実際的かつ極めて重大な問題に遭遇し、日夜悩む場合が多々ある。しかし、近年の毒性学の進展に伴って癌原性試験も大きく変貌を遂げつつある。とくに、用量設定および動物種選択でのトキシコキネティックスを活用した試験設計段階での科学的妥当性の向上、発癌性のメカニズム研究によるヒトへのリスクの解析、短期発癌性試験を活用した発癌メカニズム研究、分子生物学的手法の応用など枚挙に暇がない。

本日は新薬の開発段階で研究者が現実に悩んでおられる発癌性試験の設計と解釈についての問題を取り上げて、豊富な研究実績をお持ちの著名な5名の先生方に御講演お願いしております。本ワークショップが発癌性試験に携わっておられる方だけでなく、毒性研究さらに新薬開発に参画しておられる様々の分野の方々にお役に立つものと確信致しております。

現行癌原性試験の問題点

臼居 敏仁

ヤンセン協和（株）研究開発本部

化学物質の発癌性を検出する事を目的とした試験法に関しては、ここ数十年間様々の方法が開発され、その試験方法により得られた結果に基づいてヒトへのリスク評価が行われて来ているが、なかでも莫大な時間と労力がかかり、多数の動物資源を必要とするげっ歯類を用いる長期発癌性試験は、環境化学物質、工業化学物質、食品及び食品添加物、医薬品の安全性の確保のため基本的に実施されてきている。その結果は米国のNTPのデータベース、IARCの癌原性のランクのデータを構成している。げっ歯類を用いた癌原性試験で過去約20年間にテストされた数百の試験化合物の約50パーセントが癌原性陽性の成績を示したと報告されているが、この間ヒトに対して発癌性ありと同定された化合物はせいぜい50位

であり、癌原性試験の結果との間に大きな違いがあることがわかってきた。そして近年げっ歯類の癌原性試験の本質についての議論がICHの進展とともに盛んに行われている。このくいちがいの理由として議論の対象となっているのは、げっ歯類の試験での化合物の曝露量がヒトのそれよりも遥かに多いのではないかという事、即ち癌原性試験の投与量を適切にしてfalse positive, negative を可能な限り少なくしなければという命題である。また癌原性刺激に対する感受性というものヒトよりげっ歯類の方が量的にも質的にも高いのではないか、即ち種特異性を問題にしているのである。

化学物質のなかで医薬品は特殊なカテゴリーに属する、即ち薬理学的活性物質として探索され、げっ歯類及びヒトで薬理学的なプロフィールが解っている、即ち大部分の医薬品は非遺伝子毒性物質であり、癌原性試験成績が陽性の結果の場合主として過剰な薬理学的効果に起因していることが予見される事が可能な場合が多く、且つまたthresholdが求め得るものが多い。大量投与による生体のホメオスターシス対応による内分泌環境の変化により誘発される腫瘍に関しては種特異的な機作によるものもありヒトへの外挿が出来ない場合も多い。この分野については他の演者によって詳述される。

また癌原性試験の用量の設定に関する問題点及びICHで討議され決められて来た事についても他の演者によって提議される。

ICHでは数年にわたってヒトの安全性を損なう事なく、これら労多く予測効率のあまり良くない長期癌原性試験の必要度を軽減しより予測性の

高い試験の方策があるか論議されてきた。特に二種の代わりに一種の動物で評価出来るようになれば、かなりの進歩になるものと検討されている。ICHの委員会では医薬品の癌原性試験成績をできるだけ多く集め、世界共通のプロトコールでデータの解析を行っている。現在データベースはIARC、CMR、JPMA、FDA、USPDR 1994、及びオランダのがあり、IARCでは19医薬品がヒトに発癌性ありと報告されているが全部がマウス、ラット両種で試験されておらず、いずれかの種に陽性成績が示されている。この事より一種を使用する事も正当化され得る。CMRでは二種で試験した79医薬品のうち、26がラットのみ16がマウスのみ陽性であった。この16は全て非遺伝子毒性物質で大部分は肝及び、又は肺腫瘍を増加させた。この16医薬品は開発上の支障はなく上市されている。JPMAでは両種で試験された100のうち42が両種いずれの種で陽性、17がラットのみ8がマウスのみ陽性で、このうち5は肝腫瘍を誘発したが、マウスに陽性は上市の支障にはならなかった。FDAでは45がラットに陽性、25がマウスのみ陽性であった、この25のうち12は肝のみに腫瘍を発生し、ほかはホルモン、免疫抑制等の機作のものであった。25のうち1化合物については評価検討がおこなわれた。USPDR、1994のデータベースには両動物種で検討された73医薬品があり、22がラットのみ、11がマウスのみ陽性であった。これらは全て非遺伝子毒性物質で11のうち5は肝のみに、4は既知の薬理作用による機作により、標的組織に腫瘍発生したものでありこの11のマウスcarcinogenは全て上市されている。オランダのも同様で12の非遺伝毒性の医薬品がマウスで発癌性を示したが、規制の対象になったものはなかった。

これらの事から解るように、マウスの長期癌原性試験成績はヒトへのrisk assessmentにおいてredundantな場合が多いので今後常に二種の動物が必要とされるか、あるいは適切な一種で長期試験を行い、比較的短期のより発生機序に重点をおいた試験を組み合わせることで解釈の向上と種間の外挿性を高めてゆくか検討がはじまっている。

作用機序に基づく癌原性リスクの解析

藤井 登志之

藤沢薬品工業株式会社 安全性研究所

全ての新薬ではないが多くの新薬の開発に際し、がん原性試験の実施が義務付けられている。医薬品はその使用目的から考え、種々の薬理活性を有することが予測される。従って、その薬理活性に起因する増殖性変化からの腫瘍発生の可能性は無視出来ない。

マウス、ラットを用いたがん原性試験で発がん性の疑い有りとは判断された場合、通常、非変異原性物質であるとの確認に加えその化合物の発がん機序や発がん閾値などを考慮し、ヒトに対する発がんの危険性を解析することが重要である。

最近、我々はマウス、ラットを用いたがん原性試験の結果、2化合物で腫瘍発生の増加を認めた。これら化合物につき作用機序に基づくがん原性リスクの解析を試みた。

1) マウス肝臓腫瘍の発生頻度の増加を示した化合物

中枢神経系用薬として開発中、雄マウスのみ肝細胞癌の発生頻度の増加を認め、その発生頻度は高用量群に限られていた。また、高用量群の肝臓重量は対照群に比べ明らかな増加を示した。しかし、病理組織学的検査で腫瘍性病変以外には前がん病変と考えられている altered hepatocellular fociの発現頻度にも群間に差違を認めなかった。一方、肝腫瘍発生頻度の増加がみられなかったラットでは肝重量の増加に加え、肝細胞腫大及びeosinophilic cell fociの有意な増加を認めた。

ラットにdiethylnitrosamine (DEN)を前処置した後、本化合物を投与した二段階発がん試験において、肝腫瘍の発生頻度並びにGGT-positive fociの数及び面積の明らかな増加を認めた。更に、薬物代謝酵素 P-450によって代謝されるantipyrineの肝クリアランス率も本化合物の連続投与後に著明な上昇を示した。これらの結果は抗癲癇薬 phenobarbitalによる肝腫瘍性発生機序と同一のものと判断された。即ち、本化合物はtumor promoterとして作用したもので種

差及び性差は肝に異常細胞を誘発する因子として考えられている活性化発がん遺伝子の遺伝的差違によるものと思われる。

以上、酵素誘導作用を有する化合物の発がん性リスクの解析はその化合物がある閾値以下では動物の腫瘍発生に影響しないとする成績とヒトでの暴露レベルを動物のそれと比較すべきと考えられる。

2) ラット胃carcinoid腫瘍の発生を認めた化合物

消化器系用薬として開発中、ラットの腺胃部に腫瘍発生が認められその発生頻度には用量相関性があり、明らかな性差がみられた。腫瘍は消化管ホルモン分泌に関与するenterochromaffin-like(ECL) cellsで構成され、carcinoidと診断されたものであった。

追加検討した試験の結果、化合物投与で胃重量の増加ECL細胞の数の増加並びに血漿中gastrin濃度の上昇に用量相関性がみられた。胃重量、ECL細胞の増生及びgastrinの変動は短期間の反復投与試験でも充分観察可能であり、投与量及び投与期間に依存していた。また、これらの諸変動は化合物の投与中止後速やかに正常状態に復する回復性に富んだものであった。

Gastrinの強制投与は胃重量の増加、腺胃粘膜組織でのhistidine decarboxylase (HDC) activity及びhistamine濃度の上昇並びにECL細胞の増生を惹起した。更に、胃幽門部の摘除や塩酸の投与により、本化合物投与によるECL細胞の増生を明らかに抑制した。即ち、本化合物による胃carcinoidの発生は酸分泌抑制→胃内pHの上昇→gastrin分泌亢進がおこり、gastrinの栄養効果及び酸分泌を刺激すると考えられているhistamineを含んだECL細胞への作用によるものと思われる。また、ECL細胞は高gastrin血症の持続期間に依存して増生、過形成、腫瘍性病変を呈するものと思われる。

高gastrin血症に伴う消化管内分泌細胞の腫瘍はヒトでも報告されているが、腫瘍発生にいたる迄には本化合物のラットで認められたと同様、高gastrin血症の長期間持続が必須である。

以上、高gastrin血症を惹起する化合物の発がん性リスクの解析は高gastrin血症の持続期間と血漿中gastrin値の程度を考慮すべきである。

癌原性試験における用量設定の在り方

堀井郁夫

日本ロシユ研究所 毒性病理部

癌原性試験の用量設定に関して、ICHの活動を中心にその在り方が論議され、特に高用量群の用量設定については、従来のMTD、毒性のendpoint、あるいは推定臨床用量の任意倍数などを基準とする考え方を再検討する必要性が示された。理想的には、癌原性試験の用量域は、(1)臨床暴露量から安全域を考慮した任意倍数用量、(2)明らかな生理機能障害を生じず、かつ生存率を落とさない耐薬用量、(3)薬物の特性や動物への適格性が計られ、動物とヒトの成績から裏付けされる用量、(4)臨床適用時にその成績が外挿し得る用量、であるべきとされている。

通常、高用量設定の度に種々のendpointが考慮されるが、すべてこれらは予備的用量設定試験の結果に基づいてなされ、ICHでその一般的な合意事項は次のように示されている。

- 1) 癌原性試験で腫瘍の自然発生頻度に関する十分な情報のあるラットおよびマウスの系統を用い、一定の動物数で行う。理想的にはできる限りヒトと同じ代謝様式を示す種/系統で試験することが望ましい。
- 2) 用量設定試験は、雌雄両性で行う。
- 3) 用量設定試験は、通常、癌原性試験で用いられる投与経路と投与方法による90日間試験を行う。
- 4) 投与の計画と投与方法の選択は、臨床使用、暴露形式、薬物動態および実際面を考慮して適切に行う。
- 5) 毒性徴候および用量相関性に注目する。一般毒性で認められた発癌性関連変化(前腫瘍性病変、組織に対して特異な増殖性作用や内分泌のホメオスタシスの障害の有無)を考慮する。
- 6) 代謝様式の変化、あるいは代謝酵素活性の変化(誘導または阻害)を考慮に入れる。

高用量選択におけるendpointについて、ICHのExpert Working Groupは、次の5つのendpointを提示した。

1) Pharmacodynamic endpoint

薬動学的なendpointから高用量を設定するには、薬物特異的な、かつ科学的特徴を基本とした用量を設定すべきであるが、生理学的変調やホメオスタシスの変調を来たすような用量を選択すべきではない。

2) Toxicity endpoint

薬物の薬理学的な特徴，毒性学的プロファイルを基礎とし，毒性学的にはMTDに相当する。

3) Pharmacokinetic endpoint

血漿中の薬物および代謝物の濃度より，濃度および停滞時間を考慮したAUCが最も合理的な薬物動態endpointと言える。ヒトと動物とのAUCの比較については薬物動態の観点から，特に以下の基準が適用される。

- ① 癌原性試験に使用する種・系統で，同経路適用時の薬物動態データを用いる。
- ② 経時的な代謝変化をおこすのに十分な期間投与した試験からの薬物動態データを用いる。
- ③ 動物とヒトの被験物質および代謝物暴露の類似性についての記述を必要とする。
- ④ 動物とヒトとの暴露を評価した上で，被験物質，代謝物，代謝物のどのAUCが適したものであるかを判定した科学的根拠。
- ⑤ 異種間によって，蛋白結合性に違いがあることを考慮すること。
- ⑥ ヒトでの薬物動態データは，最大1日投薬量によって得られたものであること。

現在，ヒトでの癌原性リスクを評価する上で，MTD用量で実施された癌原性試験のデータベースの解析から，ヒト血漿薬物/代謝物AUCの少なくとも25倍のAUCに達する用量設定が推奨される。

4) Saturation of absorption

吸収が飽和することを基本にした高用量設定は認められる。中間および低用量は代謝，排泄が飽和することを考慮に入れて決定されるべきである。

5) Maximum feasible dose

中間用量，低用量の設定は，以下の点を考慮する必要がある。

1. 薬物動態におけるリニアリティーおよび代謝経路の飽和
2. ヒトへの暴露および臨床用量
3. 齧歯類における薬物動力的反応
4. 齧歯類の生理的 normal 状態からの変化
5. 作用メカニズムの情報および域値を越えて作用が出現する可能性の増大
6. 短期毒性では予想されなかった毒性増強の可能性

実際例として(1) MTDと生存率低下，(2) 混餌投与と強制経口投与，(3) AUC飽和，(4) MTDと毒作用機序等の例をあげながら癌原性試験の用量設定の多様性と困難さについて述べる。

発癌性評価における短期試験の有用性

高橋道人

国立衛生試験所病理部

化学物質によって動物に腫瘍を発生させる場合、遺伝子を直接傷害する可能性のある物質（遺伝毒性発癌物質）と、そうではない物質（非遺伝毒性発癌物質）に分けられる。前者におけるリスクアセスメントは、化学物質の分子一つがDNAを障害する可能性があるという理論的な理由から閾値がないとする立場で評価が行われる。一方、後者では、直接遺伝子に障害を与えるのではなく、生理的にはない異常反応を介して遺伝子に作用したり、細胞増殖活性を持続的に高めることによりプロモーターとして作用したりして発癌に至る。このような化学物質には明らかに閾値が存在する訳であるから非発癌性物質と同様に閾値を設定して評価することができる。遺伝毒性か非遺伝毒性かは、通常、変異原性試験によって決定されるが絶対的なものではなく、発癌性評価においては、基本的には発癌メカニズムを考慮したものでなければならない。

標的臓器毎に発癌メカニズムを考慮した短期試験が実施される。

1) 肝臓：肝部分切除ラットを用いる方法

本法はラットにDENを腹腔内投与し2週目より被験物質を6週間経口投与する。その間3週目に2/3肝部分切除を行う。実験期間は8週間で肝を採取しGST-P陽性細胞巢の数および面積を算出して対照群と比較する。本法では遺伝毒性の有無に関わらず検出できる。

2) 肝臓：マウスに特異的に肝細胞性腫瘍が発生する場合、チトクロームP-450など薬物代謝酵素誘導が生じ細胞間連絡の阻害を介したプロモーター作用により肝腫瘍が発生する。被験物質を短期間（通常1週間）投与しこれらの酵素誘導をを証明できる。

3) 肝臓：ペルオキシソーム増生を介する発癌はラットやマウスに肝腫瘍を発生させる。短期間被験物質を投与し電顕的にペルオキシソームを証明する。

4) 腎臓： α 2u-グロブリンと被験物質やその代謝物の複合物が尿管上皮に沈着すると、細胞毒性が発現し、細胞増殖活性が誘導され雄ラットに腎腫瘍が発生する。

- 5) 膀胱：結石や結晶あるいは尿pH異常により膀胱腫瘍が発生する。短期間あるいは亜慢性的な被験物質の投与によりこれらを証明する。サッカリン投与による膀胱腫瘍はその典型例である。
- 6) 甲状腺：げっ歯類の甲状腺腫瘍はTSH刺激による二次的な発癌の可能性が高い。種特異的な代謝あるいはキネティックス、種特異的な反応であることを証明する。更に、肝の薬物代謝酵素誘導はT3、T4の代謝を促進し、ネガティブフィードバックによりTSH分泌を増す。またヨード欠乏も促進的に働く。
- 7) 乳腺：向精神薬の投与動物では、血中プロラクチンの上昇により乳腺腫瘍が発生する。血中プロラクチン値やドパミンの変動を検討する。
- 8) 膵：膵腺房細胞はネガティブフィードバックにより機能調節されている。トリプシンインヒビターにより膵腺房細胞腫瘍が発生する。
- 9) 胃：胃酸分泌抑制は幽門腺領域のG細胞からガストリン分泌を促しその刺激によりECL細胞の増殖、そしてカルチノイド腫瘍を発生させる。
- 10) 精巣：下垂体-精巣系に影響を与える内分泌フィードバック機構を障害する物質、例えばLHRH誘導體、抗アンドロゲン製剤、ドーパミン阻害剤、カルシウムチャンネル拮抗薬、ペルオキシソーム増生剤などは精巣間細胞腫瘍を増加させる。短期試験で関与するホルモンの変動を確認する。
- 11) 卵巣間膜腫瘍、 β -アドレナリン受容体刺激剤によってラットに特異的に発生する。
- 12) 副腎：ラットに高カルシウム血症の状態が続くと副腎髄質腫瘍が発生する。しかし血中のカルシウム値の上昇が証明されるとは限らない。

これらの作用を確認するには、各々の病変にみられる適切な指標を短期試験によって確かめると共に、多くの場合、細胞増殖活性を調べることによって総合的に評価し閾値を設定することができる。通常の毒性試験の標本においてはPCNA染色が簡便であるが、増殖活性の著しい組織ではBrdUなど他のマーカーが有用である。

発癌メカニズムが明らかでない場合においても、非遺伝毒性であることが証明されれば、細胞増殖活性の指標は有用である。

癌原性評価における新しい科学技術の導入

井 上 達

国立衛生試験所 安全性生物試験研究センター 毒性部
(前・放射線医学総合研究所生理病理部)

I. はじめに

発癌は、遺伝子の変異にもとづく遺伝子病であり、そうした不可逆性変化を組織幹細胞レベルで生じた幹細胞病である。従ってそこから導き出される研究の中心課題は、発癌刺激によって幹細胞そのもの（細胞一般ではなく）が受ける影響に注目することである。例えば放射線発癌について放射線量とリスクの関係をみると、それは放射線に対する幹細胞の生残率曲線とそのミュレーションの推定頻度曲線に挟まれた領域によって規定されることがわかる。対象動物の加齢影響についてもピット・ホールがあり、細かい点を省いて結論づけると、発癌刺激に対する感受性は加齢とともに上昇するが、幹細胞数は加齢とともに減少する傾向をとるという正反対のモメントが働いている。加齢に伴う発癌性をみる実験の多くの結果がしばしば特定に定まらない傾向をとるのはこうした正負の要因の交錯に基づいていると考えられる。

II. 幹細胞のアッセイ系とそれらの異常

分裂に伴って自己の再生とともに性質の異なった細胞への分化能を持つ細胞を幹細胞とよび、各組織には固有の組織幹細胞が存在する。造血幹細胞は代表的であるが、表皮の基底細胞や小腸粘膜上皮などの幹細胞は、研究の対象としてよく用いられてきた。プロモテオキシユリジンの取り込みと紫外線照射の組み合わせによる、幹細胞レベルでの細胞周期に関わる変化の把握は、トキシコロジーの領域でも重要な情報となる。さらにこれらの幹細胞系における幹細胞レベルでのアポトーシスの同定なども、今後の課題としては重要な位置を占めるものである。

幹細胞の増殖や分化を制御する遺伝子が数多く見いだされ、それらの個々の役割が明らかになりつつある。c-kitやSCF(kit-ligand)で伝達される増殖性シグナル、TGF β やその受容体で伝達される抑制性シグナル、そうしたものの幹細胞レベルでの役割が急速に明らかになりつつある。幹細胞機能の異常なマウスも見いだされており、例えば、Scidマウスの造血幹細胞は放射線感受性が異常に高い。人為的に幹細胞レベルでサイトカイン受容体を強制発現させたマウスでは、異常な血球産生の亢進が観察された。こうした異常な血球産生系の実験動物は、とりもなおさず薬物や放射線による造血障害に対してしばしば過剰で異なった感受性を持ち、それらの中には毒性試験や癌原性評価

試験の実験モデルに応用可能なものが少なくない。

III. 分子発がん

人類が発がん過程の全貌を解きあかすまでには、まだ少なからぬ時日を必要としようが、そこに関与する分子・遺伝子群が、すでに知られているように数多く同定されている。これら様々の分子・遺伝子の操作による、「分子発癌」とも呼ぶべき新しい発癌実験系の開発が進んだ。ヒト*c-myc*、*v-Ha-ras*、あるいはSV40の*large T*などの遺伝子導入マウスや、*p53*、*APC*などのノックアウト・マウスでは、何れも早期の腫瘍発生が、種々の臓器で観察されている。例えば*p53*欠失マウスでは、ホモ欠失では4～6ヶ月、ヘテロ欠失でも10ヶ月～1年で全例腫瘍死した。この*p53*欠失マウスでは放射線や化学発癌剤を併用した場合、報告によって多少異なるが、概ねより早期の腫瘍発生が観察され、ジメチルニトロサミンを用いたHarveyらの観察では、ヘテロ欠失でも4～8ヶ月へと著しい‘潜伏期’の短縮をみた。

IV. 発癌好発モデル動物としての遺伝子操作動物

このように種々の遺伝子に関する導入操作や欠失操作を行った遺伝子操作動物を、トキシコロジーに用いる機運が高まっている。癌原性の評価にとって*in vivo*試験は、被検物質の個体内での分布、標的臓器の判断の為の基本的な情報を与えてくれる他、早期検出系であればスクリーニングのための短期試験として、あるいは*detailed mechanism of action*を解明する手がかりを与えるなど、諸機能が考えられる。

また、この方面で利用の可能な遺伝子操作マウスの中には、例として上述したような癌遺伝子や抑制遺伝子の操作マウスの他に、DNA傷害の修復に関与する酵素等の遺伝子変異マウスや、勝木らによって開発されたミューテーションの特殊な検出系が対象として注目される。阪大の田中らによって樹立された色素性乾皮症A群遺伝子(XPAC)を欠失させたマウスは、除去修復の欠除といった明瞭な機能欠失を持ち、DMBAによる発癌でパピローマを劇的に多発せしめた。前にも述べたScidマウスは、やはりDNA 2本鎖切断の再結合の際の何らかの修復酵素の欠失をフェノタイプとしているが、そうしたDNA傷害を生ずる物質の*in vivo*検出系として有用と思われる。尚、こうした変異動物では各組織での腫瘍発生がはやいので、*competitive risk*の排除法を確立することが重要となってくる。一方、勝木らがHITEC(*hypersensitive in vivo test of carcinogenicity*)と名付けたマウスは今一つの異なったタイプの体細胞突然変異の*in vivo*検出系である。大腸菌*rpsL*をランダムに挿入し、変異によるストレプトマイシン耐性の獲得を指標として、種々の組織における突然変異頻度を求められるよう工夫がなされている(母集団は、カナマイシン耐性コロニーで求める)。

以上のような要領に従って、それぞれに例をあげて解説したい。

シンポジウム

シンポジウム： 免疫系と神経-内分泌系相関からみた免疫抑制薬、
免疫調整薬の作用と副作用（毒性）

——シンポジウムのはじめに——

大沢 基保

帝京大学・薬学部・環境衛生学教室

近年、免疫学の進歩により免疫系と神経系、内分泌系の諸機能の密接な関連が明らかになり、神経-内分泌-免疫系のトライアングルと称されるそれらの相関関係から、薬物の作用や副作用あるいは化学物質の有害作用をとらえる試みがなされるようになってきた。

その第1段階はコルチコイドやエストロゲンなどのホルモンの免疫機能への影響や、ダイオキシンのようなステロイドホルモン様の作用を示す化学物質の免疫機能への有害影響（免疫毒性）に注目したものであった。第2段階はオピオイドペプチドのような神経ペプチドや、カンナビノイドのような乱用薬物成分の免疫機能への影響の研究へと発展した。免疫系の細胞はこれらの物質に対するレセプターを有することが知られ、神経、内分泌系からみた免疫系との相関の実体が明らかにされつつある。一方、次の段階として免疫系細胞間の情報伝達物質である各種サイトカインがホルモン様の物質として登場し、それらが治療に使われ始めると、発熱や睡眠誘発、精神状態への影響などが副作用として知られ、免疫関連物質が神経内分泌系に与える影響、すなわち、免疫系からみた神経、内分泌系との相関が新たにクローズアップされてきた。

本シンポジウムは、このような研究経過の延長線として、免疫系に働く免疫抑制薬、免疫調整薬をとりあげ、その作用と副作用（毒性）を免疫系と神経-内分泌相関の観点から論じて頂き、その毒性的、臨床的意義を討議する機会として企画されたものです。毒性評価の新しい視点として極めてタイムリーな問題提起であると思います。最初に共同座長の對馬敏夫先生に主題についての基礎と全般的な展望を、ついで田村康一、高橋信弘両先生に代表的な免疫抑制薬を例に安全性を考えるうえでの基礎面を、さらに、高橋公太、稲場 進両先生には臨床面からの具体的事例と研究の状況をお話頂けるものと期待致しております。

免疫系と内分泌系の相互作用

對馬敏夫

東京女子医大内分泌総合医療センター内科

生体のホメオスタシスの維持には神経系、内分泌系及び免疫系相互の密接な関係が不可欠である。神経系はneurotransmitter, 内分泌系ではホルモン、免疫系では各種サイトカインが情報伝達の第一情報伝達物質として使用されるがこれらの情報伝達物質が各々の系に必ずしも特異的ではない。例えば、多くの急性、慢性感染症、自己免疫疾患では副腎系機能の亢進、甲状腺機能や性腺機能の低下、耐糖能の低下などが起こるがこの理由の一つは各種サイトカインが直接に内分泌系細胞の機能に影響を与えるためである。またグルココルチコイドを代表とする幾つかのホルモンが免疫系に大きな影響を与えることは周知である。更に内分泌組織自体が各種サイトカインを産生すること、免疫担当細胞が幾つかのホルモン受容体を有すること、免疫担当細胞がホルモン産生能を有することなどが判明してており、内分泌系と免疫系は非常に密接な関係にあると考えられる。本シンポジウムでは内分泌機能、特に甲状腺機能に対するサイトカインの作用について我々の成績を含め最近の知見を紹介する。

[甲状腺とサイトカイン]

バセドウ病や橋本病は典型的な自己免疫疾患であり、甲状腺細胞に対する各種の自己抗体が患者血清中に存在する。これらの疾患の発症機序の詳細はなお不明であるが、多数のサイトカインの関与が示唆される。近年、肝炎などの治療にインターフェロン(IFN- α , IFN- γ) が使用されているが、治療中に甲状腺疾患を発症する率が高いことが明らかになった。我々の施設でIFN- γ 治療を行ったC型慢性肝炎患者 109例のうち、9例 (男子3例、女子6例) で甲状腺機能障害が出現した。うち、バセドウ病が2例、無痛性甲状腺炎3例、甲状腺機能低下症が4例であった。9例のうち、6例は治療前に甲状腺自己抗体を有していた。IFN は甲状腺細胞にDR抗原を発現させることにより自己免疫性甲状腺疾患を発症させると思われる。インターロイキン (IL)-1, IL-6もまたインビボ、インビトロで甲状腺機能に影響を与える。これらをラット、マウスに投与すると血中 TSH は一過性に抑制され、また甲状腺ホルモン (T3,

T4)濃度も低下する。これらのサイトカインは視床下部TRH mRNA発現、TRH 含量、下垂体TSH- β mRNA 発現、TSH含量には影響を与えなかった。下垂体前葉細胞を用いた検討ではIL-6、IL-1ともTRHによるTSH分泌に影響を与えなかった。ILによるTSH分泌抑制はILによって増加したコーチゾールによると考えられた。一方、培養甲状腺細胞を用いた系ではこれらのサイトカインはいずれもTSHによるヨード取り込み、ヨード有機化、ペルオキシダーゼ(TPO)mRNA発現及び甲状腺ホルモン分泌をcAMP非依存性に抑制した。従ってIL-1、6は一部はTSH分泌抑制を介して、一部は甲状腺細胞に直接作用して甲状腺機能を抑制すると思われる。感染症や自己免疫疾患では血中甲状腺ホルモンが低下することが多い。このような場合、血中IL-6濃度と血中甲状腺ホルモン濃度には負の相関がある。ヒト血中には可溶性のIL-6受容体が存在し、この存在によってIL-6の作用が更に増強されることも判明した。以上、サイトカインは自己免疫性疾患の発症や非甲状腺疾患における甲状腺機能異常に関与することが示唆される。

[副腎とサイトカイン]

サイトカインにより最も影響をうけるのはACTH副腎系である。感染などのストレス時には下垂体ACTH分泌増加を介して副腎から多量のグルココルチコイドが分泌され血中濃度が増加する。これに関与するサイトカインとしてはインターロイキン(IL)-1,IL-6,TNF- α が主たるものである。インビボ(ヒト、ラット)でこれらのサイトカインを投与することによって血中ACTH,コーチゾールは著明に増加する。これらのサイトカインは主として視床下部CRFの産生増加を介するものと考えられる。下垂体に対する直接作用は乏しい。このように分泌されたコーチゾールはストレスに対応すると同時に、免疫担当細胞に作用してその過剰な反応を抑制することが示唆される。すなわち両者の間にネガティブフィードバック機構が存在すると考えられる。

[結語] 以上のように多数のサイトカインが内分泌系に影響を与えることやその作用機序の一部が解明された。サイトカインを治療薬として使用する場合には内分泌機能に対する影響を考慮する必要がある。今後はこれらの各サイトカインにそれぞれ特異的な役割、各内分泌組織に発現しているサイトカインのautocrine/paracrine factorとしての役割が解明されるべき課題である。

FK506の作用機序と副作用（毒性）

田村康一

藤沢薬品・開発第一研究所

FK506は放線菌 *Streptomyces tsukubaensis* から単離された強力な免疫抑制物質であり、類似の薬理メカニズムを持つサイクロスポリン(CsA)に対し、*in vitro*で約100倍、*in vivo*で10-30倍の効力を持つ。また、本剤は臨床的にも臓器移植時の拒絶反応抑制剤として使用されており、その効果は高い評価を受けている。しかしながら、高い有効性を示す反面、本剤は種々の副作用を起こすことが知られている。本講演では、免疫系を中心にFK506の作用機序を紹介するとともにFK506の副作用として現れる高血糖や腎障害の機序に関して報告する。

(1) FK506の作用機序

ヘルパーT細胞が抗原の提示を受けるとPLCが活性化される結果DGとIP₃の生成を引き起こす。DGはPKCの活性化を経て核蛋白質Fos,Junの生成へと導く。IP₃は細胞内Ca²⁺濃度の上昇からCa²⁺/Calmodulin依存性脱リン酸化酵素Calcineurinの活性化によるNF-ATc/pの脱リン酸化を促進し、その核内移行を引き起こす。核内に移行したNF-ATc/pはFos,Jun蛋白質と結合し、IL2をはじめとする種々のサイトカインmRNAの転写を促進する。FK506やCsAは共にCalcineurinの脱リン酸化酵素活性を阻害する結果、これらサイトカインの発現を抑えたとされている。FK506には細胞質内レセプターとして現在までに4種類のFKBP(FKBP-12,13,25,52)が報告されているが、FK506のT細胞免疫抑制の中心を成しているのはFKBP-12であり、FK506/FKBP-12複合体がCalcineurinを阻害することによると考えられている。FK506は、免疫疾患だけでなく他の領域の疾患に対する治療薬としても期待されている。取り分け脳梗塞治療に対する可能性は最近注目を集めているが、これは脳梗塞発症因子の1つであるNOの産生を、FK506がCalcineurinの活性阻害を介して抑制することによると考えられる。

(2) 高血糖の発症機序

臨床の場で比較的多く見られる副作用の一つが高血糖である。そこでFK506による高血糖の発症機序及び可逆性を検討した。FK506はインスリン刺激による横紋筋株化細胞のグルコース取込みには影響を及ぼさなかったが、インスリノーマ細胞からのインスリン産生を抑制した。また、高用量のFK506を投与したラ

ットの膵臓β細胞においてインスリンの産生抑制が起こり、この阻害はインスリンmRNAの転写段階で起こっていることがわかった。しかし、α細胞のグルカゴンや膵房細胞のアミラーゼ産生には影響を及ぼさなかった。さらにFK506はインスリンレセプター数およびその親和性に影響を与えなかった。一方、FK506を休薬すると、インスリンmRNAの転写及びインスリン産生は正常に戻り、FK506による膵臓障害は可逆的であることが判明した。膵臓におけるFKBP-12及びCalcineurinの局在を免疫染色にて解析した結果、β細胞中には両者が局在し、α細胞中ではFKBP-12が少量であった。これに対し膵房細胞中にはFKBP-12及びCalcineurinの何れも検出されなかった。これらの知見より、FK506によるインスリン産生抑制も、T細胞におけるNF-ATの場合と同様、FKBP-12への結合とそれに続いて起こるCalcineurin活性の阻害が、インスリンmRNAの転写に必要な核内因子を不活性化させることによって起こると考えられ、このインスリン産生の低下が高血糖をもたらししている可能性が高い。

(3) 腎障害の機序

CsAと同様FK506の主要な副作用の一つが腎毒性である。我々は、減Na飼料飼育ラットに高用量のFK506を投与することにより、臨床における腎毒性プロフィールと類似したモデルを再現することができた。すなわち、FK506はBUN,S-Crの増加やCCrの減少など糸球体ろ過機能障害に加え、尿中NAG,AAP量の増加など尿細管障害も起こした。病理組織学的には尿細管の空胞変性や石灰化に加え、CsAの臨床での慢性腎障害の特徴的病理所見である間質の線維化も観察された。これらの腎障害の進行と平行してPlasma中のRenin活性がFK506依存的に上昇していたが、この上昇は糸球体傍細胞におけるRenin mRNAの転写誘導によるものであることが明らかとなった。さらにFK506投与ラットの腎臓切片におけるNO産生酵素の活性染色を行った結果、Macula densaのNO産生酵素活性が顕著に低下していた。これらの事実より、NO産生酵素活性の低下はCalcineurin活性阻害を介したものであろうが、さらに、Reninの高発現とも関連性があるのではないかと推察している。以上、FK506による腎障害は急性と慢性に分類されるが、前者についてはNOの低下やReninの高発現による腎虚血の結果、急性的腎機能障害や尿細管のダメージが誘発されていると考えられ、後者の特徴的な所見である間質の線維化は、Renin-Angiotensin系の促進と、さらに、これらによるTGFβなどの誘導に起因しているものと思われる。

シクロスポリンの作用機序と副作用

高橋信弘

東燃株式会社総合研究所

シクロスポリンA (CsA) は、肺、腎臓、心臓、肝臓、脾臓、骨髄など様々な臓器の同種異系移植の拒絶反応の抑制、あるいは、対宿主性移植片病の抑制に優れた効果を示す。この薬剤は、最近になって、乾癬への適応も認可されたが、他に抗真菌作用、抗マalaria作用、抗住血吸虫作用、ベーチェット病、全身性エリテマトーデス、交換性ブドウ膜炎、タイプ1糖尿病、慢性関節リウマチ、重症筋無力症、喘息、アトピー性皮膚炎あるいは、その他免疫学的機序が関与する血液性疾患での有効性も知られるなど多くの疾患への適用も将来的には期待される。さらに、CsAには、HIV-1 (human immunodeficiency virus type 1)の複製の抑制効果や感染細胞から放出されるウイルス粒子の数を減少させる効果があることが見いだされるなど新たな応用への展開の可能性もある。しかし、副作用があることも事実であり、CsAでは腎毒性が主なものであるが、他に肝臓障害、多毛症、神経系障害、歯茎過形成、口唇肥大、リンパ腫の発生が知られているなど、臨床応用を拡大していくためには解決されるべき問題点も多く残されている。ここ数年の間に、免疫抑制剤の作用機序の解析が進み、CsAの多面的作用を分子レベルで理解する有力な手掛かりが得られつつある。ここでは、CsAの作用機序についての最近の知見と作用機序から考えられる副作用との関連を議論したい。

1. CsAの免疫抑制の作用機序

抗原刺激を受けたT細胞内では、各種蛋白質チロシンキナーゼの活性化、それに続くホスホリパーゼC γ 1の活性化によって、イノシトール3リン酸とジアシルグリセロール (DG) が放出され、それぞれ、イノシトール3リン酸受容体を介した細胞内Ca²⁺の増加とプロテインキナーゼCの活性化を引き起こす。Ca²⁺の増加は、カルモジュリンを介して、蛋白質セリン/スレオニン脱リン酸化酵素であるカルシニューリン (CN) の活性化を引き起こす。CNは、T細胞の細胞質に特異的存在している転写因子NF-ATcの脱リン酸化を行い、これによって、NF-ATcは細胞質から核内へと移行する。そして、NF-ATcが、DGにより活性化されるプロテインキナーゼCを介した経路によって合成されるNF-ATnと核内で会合し、免疫応答の初期に重要な役割を果たすインターロイキン2 (IL-2) 遺伝子の転写が開始される。CsAは、T細胞内でサイクロフィリン (CyPA) との複合体としてCNに結合し、CNの酵素活性を阻害する。これによって、転写因子NF-ATcの核内への移行ができなくなり、結果としてIL-2

遺伝子の転写がされなくなりT細胞の活性化を抑制することになる。

2. CsA作用の多様性とCNの阻害

T細胞は、抗原刺激によりIL-2だけでなく顆粒球コロニー刺激因子（GM-CSF）やIL-3も産生する。GM-CSFとIL-3の産生もまたCsAによって阻害されるが、この阻害は、GM-CSFとIL-3遺伝子のエンハンサー領域へのNF-AT様転写因子の結合を抑えるためであることが示されている。したがって、CsAによるGM-CSFとIL-3の産生阻害もまた、IL-2の場合と同様に、CsA-CyP複合体がCNを阻害しNF-ATの細胞質成分の核への移行を抑えるために現われると推定される。このほかに、CNの阻害によってCsAが効果を現すと考えられる現象としては、肥満細胞のモデルである好塩基性白血病細胞RBI-2H3でのIgE-IgEレセプター結合によって引き起こされる分泌顆粒のエクソサイトーシス、CyPを化学走性因子とする好酸性白血球及び好中性白血球の移動などが知られている。さらに、CsAが、 Ca^{2+} 濃度によって調節される K^+ チャネルの不活性化やミトコンドリアのイオンや低分子量の物質の透過性に影響を与えることが知られているが、これらもCNの阻害を介して現れると考えられる。CsAのミトコンドリアへの作用によって、培養肝細胞では、食欲欠如などによる細胞死が抑えられるとの報告もある。このように、CsAは、CyPとの複合体として Ca^{2+} -カルモジュリン依存性脱リン酸化酵素CNを阻害する。結果としてCNが関与する細胞内情報伝達の制御や膜を介した物質輸送の制御などの生体反応に影響を及ぼし様々な細胞に複合的に働き、その効果を現していると考えられる。

3. CyPの多様性

CsAの結合蛋白質CyPは、プロリンペプチド結合の異性化を促進するペプチジルプロリルシストランスイソメラーゼ（PPIase）活性を持ち、CsAの結合によってPPIase活性は阻害される。そして、CyPには数多くのアイソフォームが知られている。これらは、細胞質だけでなく、ミトコンドリア、小胞体、あるいは細胞膜上にも存在していることが次々と明らかになってきている。同定されたほとんど全てのアイソフォームは、CsAによって、それらの酵素活性がやはり阻害される。CyPは、PPIaseとして単独で視細胞において特定のロドプシンの形成に関与したり、ステロイドホルモンレセプター/熱ショック蛋白質の複合体の成分であったり、蛋白質の高次構造形成の促進や補助因子であるシャペロンの働きも持っている。CsAは、CyPのPPIaseとしてのこれらの働きにも当然のことながら影響をおよぼしているはずである。免疫抑制剤が示す広範な効果は、それらのレセプターの作用の多様性の現われであるに違いない。したがって、CsAの免疫抑制効果および幅作用を理解し、その薬剤としての安全性を知るためにはCyPの生体内での本来の働きが何であるかを明らかにすることが極めて重要であると考えられる。

Muromonab CD3(OKT3)の作用機序と副作用

高橋公太 新潟大学医学部泌尿器科

臓器移植の成績は、ここ十数年飛躍的に向上したが、その要因として ciclosporinやOKT3などの新しい免疫抑制薬の臨床応用によるところが大きい。

この免疫抑制薬をその使用目的から大きく分けると維持免疫抑制薬と拒絶反応治療薬に分類される。OKT3は、後者の範疇に入る薬剤である。

本薬剤は、米国ORTHO社のGoldstein, Kungらが細胞融合法により作成したヒトリンパ球の細胞表面抗原に対するマウス(murine)由来のIgG2aに属するモノクローナル抗体で、ヒトTリンパ球のCD3抗原認識複合体(CD3 antigen recognition complex)に特異的に結合し、Tリンパ球の機能を不活化する働きがある。

I 作用機序

OKT3のTリンパ球の作用機序として(1)lysis (2)opsonizationおよび(3)antigenic modulation(抗原変調)の3通りが上げられるが、このうち(3)が主な作用と考えられている。抗原変調を簡単に説明すると、OKT3がTリンパ球の表面抗原CD3と結合すると、最終的には表面抗原CD3を欠く“blinded Tリンパ球”を誘導するとされている。これら表面抗原を失った細胞は同時に抗原認識構造も失われる。すなわちそれぞれのサブセット(helper, cytotoxic, killer)の機能が同時に喪失することになる。このような理論をうらずける根拠として、CD3抗原を欠いたTリンパ球を8~10時間、37°CでOKT3を含まない培地中で培養すると表面抗原CD3を持つTリンパ球に変わる。

II 適応

(1)移植直後より拒絶反応の予防に使用する。(2)急性拒絶反応の治療に使用する。特に移植直後より3ヶ月以内の急性拒絶反応に即効する。この効果により従来の治療薬では抑制できなかった拒絶反応を寛解できるようになった。

III 副作用

OKT3の副作用は、大きく2つに分けることができる。まず第一に投与数日間に多くみられる“flu-like symptom”、すなわち感冒様症状と呼ばれているもので呼吸困難、発熱、悪寒戦慄、悪心、および下痢などが上げられる。これらの副作用は、初回投与時に多く見られ日毎に少なくなる。これらの発生機序はOKT3投与によりTリンハ球およびmacrophageから放出されるリンホカインが深く係わっていると考えられている。現在これらの副作用の軽減のため対症療法の工夫がなされている。

次に2番目の副作用であるが、OKT3は免疫抑制効果の強い薬剤であるが、他方では40~80%にOKT3に対する抗体が産生される。OKT3に対する抗体としては、抗イデオタイプ抗体と抗イソタイプ抗体ができるが、OKT3の効果を無効にするのはIgGに属する抗イデオ抗体であり、早い症例では投与後1週間以内に産生されOKT3の効果が失活する。

今回はOKT3モノクローナル抗体についてその効果と副作用、さらにそれに対する対処法について述べたい。

小児の免疫抑制薬治療とその副作用

稲場 進

富山医科薬科大学 小児科

小児期にみられる種々の慢性特定疾患において、免疫抑制薬が用いられ治療されている。その効果はかなり期待できる疾患もみられるが、反面薬剤の副作用に十分注意が必要となり、時には中止せざるを得ない場合も少なくない。

小児期腎疾患の中でしばしば経験するネフローゼ症候群の治療においても、ステロイドホルモン剤（以下ス剤）が第一選択剤として使用されている。小児期ネフローゼ症候群の特徴は、そのほとんどの症例がス剤に対して反応性が良好であり、投与後約10日間以内に大量の蛋白尿が消失し、低蛋白血症の改善がみられる。

ネフローゼ症候群におけるス剤の使用方法は、従来より広く検討されてきた。すなわち、きわめて少量のス剤を連日投与し、ついで連日漸減法にて長期間使用する方法が一般的に行われてきたが、しかし、これらの方法では再発例がきわめて多く、かつ副作用も多いため問題があった。1953年Langeらにより、ス剤の3投4休法が発表され、また1965年にSoykaらにより、隔日投与方法が行われるに至り、従来の方法に比較して、これらの方法が画期的な投与方法であることが認められた。さらに1970年に至り、これらの方法を基にして、国際小児腎臓病共同研究班が発足し、班の定めた治療法並びにその成績が世界に紹介された。この初期治療法は、ス剤を $60\text{mg}/\text{m}^2/\text{day}$ （最高 80mg ）連日4週間投与し、さらに $40\text{mg}/\text{m}^2/\text{day}$ に減量して、週3日間投与、週4日間休薬を4週間、計8週間使用する方法である。しかし本治療法による小児期ネフローゼ症候群の反応性をみると、最初80%が反応し蛋白尿が消失するが、以後6カ月間に64%が再発し、さらに39%が頻回再発例になると報告されている。このような結果より、最近では連日投与の後に隔日漸減投与方法が試みられるようになってきている。

ス剤の副作用として、易感染性、糖尿病、高血圧、精神症状、消化性潰瘍、白内障、緑内障、骨粗鬆症、大腿骨頭壊死など多彩であるが、近年の隔日漸減療法が普及されるようになってきて以来、重篤な副作用はきわめて少数となってきた。それでも頻回再発型やス剤依存性ネフローゼ症候群になると、ス剤の投与量も多くなり、これらの副作用の出現がみられることも経験する。このような症例では、ス剤減量の目的で他の免疫抑制剤、例えばcyclophosphamideやchlorambucil、また近年ではciclosporinが併用さ

れている。時にはこれらの併用により、ネフローゼ症候群のコントロールが良好となることもあるが、これらの免疫抑制剤にも重篤な副作用もあり、使用にあたっては十分な注意が必要である。

小児ネフローゼ症候群が再発、寛解を繰り返し、長期間にわたりス剤の投与も持続されると、患児の発育障害、特に低身長が問題となってくる。小児ネフローゼ症候群113例についてス剤の投与量と身長伸び率の関係を検討すると、男女共に、9歳までは標準身長に沿って推移するが、10歳以降で低身長となる傾向がみられている。最終身長は男児が 162.7 ± 7.2 cm、女児が 152.4 ± 6.5 cmであり、それぞれ標準身長と比較すると有意に低値である。そのうち、男児66.7%、女児58.8%、計63.6%が-1SD以下である。特に本来急速な身長の伸びがみられる10歳から13歳の伸びが不良であり、その後のcatch-up growthは十分ではない。この様な結果から身長発育に影響を与えないと考えられるス剤の投与量は、男児では $2.5\text{mg}/\text{m}^2$ 以下、女児では $5\text{mg}/\text{m}^2$ 以下である。

以上、小児ネフローゼ症候群において、ステロイド剤やその他の免疫抑制剤の副作用を中心に、症例呈示を含め報告する。

眼刺激性試験代替法のバリデーシヨンの現状と考え方

小野 宏

財団法人食品薬品安全センター秦野研究所

眼刺激性試験の代替法の開発にはとくに熱心な努力が傾けられ、候補試験法のバリデーシヨンもわが国を含めて数件進行中である。しかし、それぞれ数年以上経過しているが、完了したものはない。EC/UK の主催する国際共同研究によるバリデーシヨン計画は試験が終了し、その評価の完了がまたれている。しかし、バリデーシヨン作業の最終的評価の段階にいたって、評価の基準に大きな問題があることが認識されてきた。

代替試験法のバリデーシヨン（有用性確認）の方法については、Frazier (1990)、Balls ら(1990)の提唱した課程が理論的に優れたものとして支持され、追隨されてきたが、実際にバリデーシヨンを進めていくうち、その方式には問題があることが認められてきた。実行上の問題としては、方式がきわめて煩瑣で、試験全体の管理運営が容易でないことのほか、実際には、試験の計画（全体の目標設定と各試験の計画書）が周到ではなかったこと、試験が必ずしもすべて計画書に忠実には行われなかったこと、試験物質の選定に困難があったこと、データの解析評価法に問題があったこと、参加機関の種々の理由による脱落があったこと、などが挙げられている。

さらに、このようにしてバリデーシヨン作業が終了したとき、その成績を評価する基準の設定が必要である。これは客観的な基準であって、学問的に、社会的に、国際的に合意された基準でなければならない。そして、行政規制の毒性試験の代替法として承認されるように努力する必要性が認められてきた。

化粧品原料の安全性評価のための眼刺激性試験代替法のバリデーション
 -計画及び経過-

大野泰雄¹、金子豊蔵²、小林敏明³、井上 達²、吉田武美⁴、林 真⁵、門馬純子²、大野忠夫⁶、藤井昭男³、増田光輝³、秋山純一³、板垣 宏³、大越健自³、奥村秀信³、柿島博³、笠井 裕³、栗下昭弘³、小島肇夫³、西條 薫⁶、坂本一民³、杉浦秀次³、高野勝弘³、辰見 寿³、谷 尚子³、千葉勝由³、中村恒彰³、松川清治³、松重知保³

¹国立衛試（薬理）、²国立衛試（毒性）、³日本化粧品工業連合会、⁴昭和大学（薬、毒物）、⁵国立衛試（変異遺伝）、⁶理研（ジーンバンク）

我々は化粧品原料の眼粘膜刺激性試験代替法の妥当性を確認するために、①CAM 試験（肉眼観察法とtrypan blue 染色法）、②溶血試験、③ヘモグロビン変性試験、④MATREX試験、⑤SKIN² (ZK1100)試験、⑥HeLa-MTT試験、⑦SIRC-CV 試験及びSIRC-NR 試験、⑧CHL-CV試験、⑨CornePack 試験、⑩EYTEX 試験について、9種の界面活性剤と生理食塩水を用い、23施設の協力による、施設間一次バリデーションを行い、ドレイズ試験結果と比較した。その結果、1)血清添加培養液を用いた培養細胞試験（⑥⑦⑧）結果は極めて類似している、2)培養細胞試験と受精鶏卵試験(CAM) はドレイズ試験結果と良い対応を示す、3)溶血性試験やヘモグロビン変性試験、またEYTEX 試験では対応性が相対的に劣るが、簡便である、4)被験物質の特性を明らかにすることや原理が異なる他の試験法とバッテリーを組むのに有効である、ことを示した。

試験法の特性をより明らかにするために、より広い範囲の化粧品原料を用いた30施設の協力による施設間二次バリデーションを行った。前回の経験に基づき、SIRC-CV 法の削除、ヘモグロビン変性試験のSOP の変更、及びSOP の minor な変更を若干行った。次演者の要旨に示したように、被験物質としては化粧品原料に多い色素や水不溶性物質が含まれるとともに、無刺激物から、強刺激物まで含むように15種類選択した。結果は原液、及び10, 1, 0.1% 水溶液或いは懸濁液0.1ml について行ったドレイズ試験結果と比較した。個々の試験結果の詳細は別の演者が発表するが、ドレイズ試験結果がバラツキはかなり大きいことも明らかとなり、これを踏まえて代替法の評価、及び利用法について考察することが必要である。現在、更に14品目の物質を用いた三次バリデーションを実施中であり、これらの結果を合わせて、平成7年度末には本研究グループとしてのドレイズ眼刺激性試験代替法の利用に関する最終提案を行いたいと考えている。

化粧品原料の安全性評価のための眼粘膜刺激性試験代替法の二次バリデーション (1) 計画およびIn vivo試験結果

金子豊蔵¹、井上 達²、鈴木登志郎³、加藤利博³、杉山千生³、柿島 博^{4,5}、中村恒彰^{4,6}、辰見 寿^{4,7}、萩野滋延^{4,8}、門馬純子¹、大野泰雄⁹

¹国立衛試・毒性、²放医研・生理病理、³(株)日本セイギケン総合研究所、⁴日本化粧品工業連合会、⁵鐘紡(株)、⁶ライオン(株)、⁷サンスター(株)、⁸(株)資生堂
⁹国立衛試・薬理

我々は、化粧品原料の眼粘膜刺激性評価試験系として、in vitro 代替試験法がどこまで使えるかを明らかにすることを目的として、界面活性剤を中心とした一次バリデーションを実施し、日本動物実験代替法学会第7回大会で報告した。また、第21回日本毒科学会では、並行して行なったドレイズ眼粘膜刺激性試験に病理組織学的検討を加えて報告した。今回の二次バリデーションでは、より広い範囲の化粧品原料を用いて実験を実施し、前回の結果と合わせて解析・検討を行った。

〔方法〕 13週令のウサギ (Std:NZW、雄、日本ISILシ-) を用い、ブラインド化した15種の化粧品原料、Sucrose Fatty Acid Ester(S2-1)、Glycerin (S2-2)、Acid Red 92(S2-3)、Polyoxyethylene Sorbitan Monooleate(20E.O.,S2-4)、Calcium Thioglycollate (S2-5)、Distearyldimethylammonium Chloride (S2-6)、2-Ethylhexyl p-Dimethylamino Benzoate(S2-7)、Cetylpyridinium Chloride(S2-8)、Methyl p-Hydroxybenzoate (S2-9)、Isopropyl Myristate (S2-10)、Polyethylene Glycol 400 (S2-11)、Silicic Anhydride (S2-12)、Benzyl Alcohol (S2-13)、Sodium Salicylate (S2-14)、m-Phenylenediamine (S2-15)の注射用蒸留水10%水溶液 (または懸濁液) それぞれ0.1ml、投与液の調製が不可能なものについては原体 0.1ml (or g)を3例の右眼に点眼し、ドレイズの方法で観察を行った。なお、この結果により、さらに100%または 1%、0.1% 濃度の試験を追加し、評点20を挟む2点がとれるように試験を行なった。

〔結果〕 10%液の最大評価点で刺激性は、Non(0-0.5) : S2-2、S2-4、S2-7、S2-11、S2-14、Slight(0.5-15) : S2-1、S2-5、S2-10、S2-15、Mild(15-25) : S2-3、S2-13、Severe(50-110) : S2-8であった。100%でS2-6はSevere、S2-9とS2-12はSlightに分類された。個々の動物のドレイズ評点にバラツキがみられ、最大評価点で最も大きく、MildやModerateに分類される物質で大きかった。この要因の一つとして障害の回復期に角膜間質に繊維化が強く起こる個体があるためと考えられる。また、化粧品の眼粘膜刺激性を評価する上で重要な評点15前後においてもバラツキが認められ、in vivoとin vitroの対応性を検討する場合にはこれらを考慮する必要性があると考えられる。

ドレイズ眼粘膜刺激性試験代替法の二次バリデーション
 (2) 有精鶏卵の漿尿膜 (CAM) を用いる方法

萩野滋延^{1,2}、木下成美、谷 尚子^{1,3}、中村恒彰、小野菜穂子^{1,4}、小西貴美代^{1,5}、小島肇夫^{1,6}、大野泰雄⁷

¹日本化粧品工業連合会、²(株)資生堂、³ポーラ化成工業(株)、⁴ライオン(株)、⁵サンスター(株)、⁶日本メナード化粧品(株)、⁷国立衛試・薬理

【目的】我々は化粧品原料の眼粘膜刺激性を評価する系としてin vitro試験法が利用できるか否かを明らかにすることを目的に界面活性剤を中心とした一次バリデーションを実施し、日本動物実験代替法学会第7回大会¹⁾で報告した。今回、二次バリデーションとして化粧品原料について枠を広げた検討を実施した。本報告ではこのうち鶏卵の漿尿膜 (CAM) を用いる2種の評価法について報告する。

【材料及び方法】被験物質は本プロジェクトに共通であり、15種の化粧品原料を用いた。試験は同一の標準操作手順書に従い5施設で実施した。その他の詳細は(1)計画及びin vivo試験結果に示した。

【結果および考察】肉眼判定法はCAMを赤色に染色し判定できない赤色素以外の全ての被験物質において試験可能であった。参加5施設の評価値は肉眼判定の感度差によると考えられる変動が認められた。ドレイズ試験との対応性を10種の被験物質を用いた一次バリデーションの結果と合わせて検討したところ、本法の方が感度が高かったが、相関係数(r)は0.724であり対応関係が認められた。一方、トリパンブルー染色法は全ての被験物質について試験可能であったが、同様に5施設の評価値に変動が認められた。ドレイズ試験との対応性については被験物質を液体と粉末とに分けた場合に直線回帰が可能であり、良い対応性が得られた(全物質:r=0.696、液体:r=0.931、粉末:r=0.926)。本試験法は施設間の再現性の面で限界はあるが、眼粘膜刺激性試験代替法として有用であることが示された。

【引用文献】1) 萩野滋延他、日本動物実験代替法学会第7回大会要旨集、96-97(1993)

化粧品原料の安全性評価のための眼刺激性試験代替法の二次バリデーション

3) 赤血球試験

岡本裕子、大越健自^{1,2}、大内淳子^{1,3}、柿島博、小川朋康^{1,4}、板垣宏
津田孝也^{1,5}、古本勉^{1,6}、小島肇夫^{1,7}、金子豊蔵、岩瀬佳美、門馬純子⁸
大野泰雄⁹

¹日本化粧品工業連合会、²(株)コーセー、³(株)花王、⁴鐘紡(株)、⁵(株)資生堂、
⁶P&G、⁷日本マート化粧品(株)、⁸国立衛試・毒性、⁹国立衛試・薬理

我々は化粧品原料の眼刺激性評価系としてのin vitro試験法の妥当性を確認するための施設間バリデーションの一環として、赤血球試験について、界面活性剤を用いた施設間一次バリデーションを行い、本試験が、簡便であり、施設間の再現性、in vivoとの対応性が概ね良好であることを示した(第7回日本動物実験代替法学会大会¹⁾)。今回は、試験法の特性を更に明らかにするために、より広い範囲の化粧品原料を用いた二次バリデーションを行い、その結果を前回の結果と合わせて解析した。

〔材料と方法〕

赤血球は、ヒザジ無菌保存血より赤血球を分離して使用した。試験法は、赤血球膜損傷により溶出したヘム吸光度を測定する方法を選択した。測定の指標は、50%溶血率を示す被験物質濃度(HC50値)を用いた。その他の詳細は、1)計画及びin vivo試験結果に示した。

〔結果および考察〕

本試験への参加は7機関であった。今回の試験では、着色や白濁によってHC50値が得られなかった被験物質が3種あった。施設間の再現性は、陽性対照の平均変動係数が平均0.288と問題はなかった。また、in vivoの結果(最大総評価点:10%濃度)とin vitro結果(逆数)との相関係数は、0.868と良好であった(n=11)。得られた回帰直線から、in vivoトリス評価20点以上を陽性、10点以下を陰性とした場合、in vitro結果がfalse negativeとなったものは、ベンジルアルコールのみであり、false positiveはなかった。

以上より、着色物質や白濁物質を除く化粧品原料に対し、本試験法は、in vitro眼刺激性評価系として有用であることが示唆された。

なお、本研究は、一部、厚生科学研究費の援助を受けた。

引用文献:1) 岡本裕子他、トリス眼粘膜刺激性試験代替法の一次バリデーション 2) 赤血球試験、日本動物実験代替法学会第7回大会要旨集 P98-99(1993)

化粧品原料の安全性評価のための眼刺激性試験代替法の
二次バリデーション 6) MATREX™による刺激性試験

大内淳子^{1,2}, 笠井裕^{1,2}, 小島肇夫^{1,3}, 奥村秀信^{1,4}, 荒島雅樹^{1,4}, 加藤俊則^{1,5},
古本勉^{1,5}, 木下成美^{1,6}, 谷尚子^{1,6}, 中村恒彰^{1,7}, 鈴木幸一^{1,7}, 石橋卓也⁸, 堀洋⁸,
西川多美子⁸, 大野泰雄⁹

¹日本化粧品工業連合会, ²花王(株), ³日本メナード化粧品(株),
⁴(株)ノエビア, ⁵P & G, ⁶ポーラ化成工業(株), ⁷ライオン(株),
⁸東洋紡績(株), ⁹国立衛試・薬理

我々は化粧品原料の眼刺激性評価系としてのin vitro試験法の妥当性を確認するための施設間バリデーションの一環として, MATREX™試験について, 界面活性剤を用いた施設間一次バリデーションを行い, MATREX™試験が施設間再現性やドレイズ試験との対応性が比較的良好な試験法であることを示した(第7回日本動物試験代替法学会大会)。今回は, 試験法の特徴を更に明らかにするために, より広い範囲の化粧品原料を用いた二次施設間バリデーションを行い, その結果を前回の結果と合わせ解析した。

[材料と方法]

MATREXはヒト皮膚線維芽細胞をコラーゲンゲル中に包埋したもので, 3次元構造を形成している。MATREXに溶媒で希釈した被験物質を適用し, 24時間の曝露を行った。曝露終了後MTTアッセイを行い, 無処置対照に対する生存率を算定した。この生存率が50%となる被験物質濃度(EC50値)を求め刺激性の指標とした。

その他の詳細は計画及びin vivo試験結果に示した。

[結果および考察]

本試験への参加は7施設であった。

MATREX試験の施設間での再現性については, EC50値より刺激度を分類した際に施設間での差がほとんどなく, 全施設の平均EC50値に対する各施設のEC50値の順位相関係数も0.98以上と高かったことから, 良好であると言えた。

また, MATREX試験のEC50値(対数)と, 10%濃度でドレイズ試験を実施した時の最大評価点との対応性は比較的良好であり, それぞれの試験で確定値が得られた20検体について解析を行ったところ, 相関係数は1次で回帰した場合0.662であった。一方, ドレイズ試験評価点の15±5点を境界とした識別性も良好であり, 20検体中偽評価物質となったのは, 3点(False negative:ベンジルアルコール, False positive:Tween20, polyoxyethylene glycol monolaurate(10E.O.))であった。

以上の結果より, MATREX試験は施設間の再現性が良好で, ドレイズ試験との対応性も比較的良好な方法であることが示唆された。また, 他の多くのin vitro試験法と異なり, 溶媒に不溶な被験物質についても評価が行えることから, 有用な代替法となりうるものと考えられた。

尚, 本研究は, 一部, 厚生科学研究費の援助を受けた。

引用文献 1) 笠井 裕, 他 ドレイズ眼粘膜刺激性試験代替法の一次バリデーション
5) MATREX™による刺激性試験, 日本動物実験代替法学会第7回大会要旨集,
P104-105(1993)

化粧品原料の安全性評価のための眼刺激性試験代替法の二次バリデーション
7) ウサギ角膜初代細胞(CornePack)を用いた細胞毒性試験

内山貴司、秋山純一、宮井恵里子^{1,2}、坂本一民、大沼美由紀^{1,3}、大越健自、
岡本裕子、森戸由美子^{1,4}、小島肇夫^{1,5}、奥村秀信、澤村淳子^{1,6}、千葉勝由、
牧野育代^{1,7}、山本良平、鳥島久、柳瀬浩⁸、大野泰雄⁹

¹日本化粧品工業連合会、²加美乃素(株)、³味の素(株)、⁴(株)コーセー、
⁵日本メナード化粧品(株)、⁶(株)ノエビア、⁷(株)ヤクルト、⁸倉敷紡績(株)
⁹国立衛試・薬理

我々は化粧品原料の眼刺激性評価系としての*in vitro*試験法の
妥当性を確認するため施設間バリデーションの一環として、Corne-
Pack試験について、界面活性剤を用いた施設間一次バリデーション
を行い、ドレイズとの対応性も比較的良い試験系であることを示し
た(第7回日本動物実験代替法学会大会¹⁾)。今回は、試験法の特
性を更に明らかにするために、より広い範囲の化粧品原料を用いた
二次施設間バリデーションを行い、その結果を前回の結果と合わせ
て解析した。

(材料と方法)

試験法は、倉敷紡績(株)より凍結細胞として供給された正常ウ
サギ角膜上皮細胞の二次培養細胞を無血清培地で培養し、ニュート
ラルレッド取り込み法²⁾により、コントロールに対する吸光度が50
%減少する被験物質濃度(NR50値)を細胞毒性の指標とした。

その他の詳細は前演題1)の計画及び*in vivo*試験結果に示した。

(結果及び考察)

本試験への参加は、7研究機関であった。14検体中、NR50値が確
定したものは10検体あり、その変動係数を研究室間の再現性の指標と
して考えると、平均変動係数は0.340であった。また、一次と二次の
バリデーションの検体で、*in vivo*との対応が可能な17検体のNR50
値(対数)とドレイズ評価点(最大総評価点10%濃度)との相関係数は
-0.600であった。なお、今回の検体中、明らかな偽評価物質として
1検体(Benzyl Alcohol)のみがFalse negativeとして認められ、そ
の他は比較的良い対応が見られた。

以上の結果から、本試験法は、施設間変動も比較的少なく、陰性
対照も安定しており、キットの利便性などから、更に広範囲の物質
を用い眼粘膜刺激性試験代替法として検討を加える価値があると思
えられた。なお、本研究は、一部、厚生科学研究費の援助を受けた。

引用文献

- 1) 小島 肇夫、他、ドレイズ眼粘膜刺激性試験代替法の一次バリ
デーション 6)ウサギ角膜初代細胞(CornePack)を用いた細胞毒性
試験、日本動物実験代替法学会 第7回大会要旨集p106-107(1993)
- 2) Torishima, H., Yamamoto, R., Nishino, T. and Watanabe, M. (1993)
Neutral red assay using stored normal rabbit corneal epithelial cells, Proceedings of the 7th annual meeting of Japanese
Society for Alternatives to Animal Experiments, 88-9

化粧品原料の安全性評価のための眼刺激性試験代替法の二次バリデーション
9) 哺乳類培養細胞株 (HeLa 細胞) を用いた細胞毒性試験

千葉勝由、牧野育代^{1, 2}、大内淳子、笠井裕^{1, 3}、津雲勝義、柿島博^{1, 4}、
宮井恵里子、秋山純一^{1, 5}、岡本裕子^{1, 6}、鶴見淑子、奥村秀信^{1, 7}、
加藤久美子、杉浦秀次^{1, 8}、宮島敦子、大野泰雄⁹

¹日本化粧品工業連合会、²(株) ヤクルト、³花王(株)、⁴鐘紡(株)、
⁵加美乃素(株)、⁶(株) コーセー、⁷(株) ノエビア、⁸ホーユー(株)、
⁹国立衛試・薬理部

我々は化粧品原料の眼刺激性評価系としての *in vitro* 試験法の妥当性を確認するための施設間バリデーションの一環として、HeLa 細胞に対する毒性試験について、界面活性剤を用いた施設間一次バリデーションを行い、施設間再現性が高く、ドレイズとの対応性も比較的高い試験系であることを示した(第7回日本動物実験代替法学会大会¹⁾)。今回は、試験法の特性を更に明らかにするために、より広い範囲の化粧品原料を用いた二次施設間バリデーションを行い、その結果を前回の結果と合わせ解析した。

〔材料と方法〕

試験法は、ヒト子宮頸部癌由来細胞株 HeLa 細胞を用い、Mosmann の MTT 還元法²⁾により、コントロールに対する吸光度が 50% 減少する被験物質濃度 (EC₅₀ 値) を細胞毒性の指標とした。

その他の詳細は、1) 計画および *in vitro* 試験結果に示した。

〔結果および考察〕

本試験への参加は、8 研究機関であった。14 検体中、EC₅₀ 値が確定したものは 11 検体あり、その変動係数を研究室間の再現性の指標として考えると、0.080~0.699 の範囲にあったが、平均変動係数は 0.226 であり、一次バリデーションの平均変動係数 0.292 に比べて小さかった。また、一次と二次のバリデーションの検体で *In vivo* との対応が可能なる 18 検体の EC₅₀ 値対数と 10% におけるドレイズ評価点 (最大総評価点) との相関係数は -0.856 であり、良好な対応性が認められた。なお、今回の検体中、明らかな偽陽性物質として 1 検体 (Polyethyleneglycol Monolaurate)、および偽陰性物質として 1 検体 (Benzyl Alcohol) が認められた。

以上の結果から、本試験法は、施設間再現性が高く、ドレイズ試験との相関性も比較的良好であり、より広い範囲の化粧品原料についても眼粘膜刺激性試験代替法として有用であることが確認されたものと考えられた。

なお、本研究は、一部、厚生科学研究費の援助を受けた。

References :

- 1) 小島肇夫、他. ドレイズ眼粘膜刺激性試験代替法の一次バリデーション 8. 哺乳類培養細胞株 (HeLa および CHL 細胞) を用いた細胞毒性試験. 日本動物実験代替法学会第 7 回大会要旨集, p110-111. (1993)
- 2) Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. *J. Immuno Methods*, 65:55-63. 1983.

評価項目間の比較

三分一所 厚司

三共株式会社 安全性研究所

ラットの精巣毒性を評価するための検査項目として、病理組織学的検査では精巣、精巣上体、前立腺および精嚢等について、精子検査では精巣上体尾部から採取した精子の運動性、精子数、奇形率、また精巣中の精子数について調べる。生殖器官重量は精巣、精巣上体、前立腺、精嚢等について測定する。生殖機能検査では交尾率、妊娠率を調べ、胎児の剖検時観察により胚・胎児の死亡率、着床率等を求める。共同研究で使われた検体について、検査項目間の相互関係について比較検討した。16検体中12検体で病理組織学的変化が他の検査項目で影響が見られた用量より低い用量で認められた。これらの12検体は、adriamycin, compound C, EおよびT, etretinate, nefiracetum, nitrazepam, nitrofurazone, reserpine, pyridoxine, reserpine and spironolactoneである。このことから病理組織学的検査が他の検査項目より精巣の変化を早期の段階で検索することが可能であることを示している。残りの4検体はcyclophosphamide, estradiol, ethinyl estradiolおよびhaloperidolで、病理組織学的に変化が見られたが、最低用量群で精子検査、器官重量、交配試験の項目で影響が認められた。Cyclophosphamideは毒性が強いため投与用量、投与期間について考慮する必要がある。またestradiolおよびethinylestradiolはホルモンを介して生殖器官重量の低下と生殖機能に影響を与えることが知られている。以上のことから精巣毒性を評価するためには、病理組織学的検査が重要項目であり、また薬物の作用機序を考慮して各検査項目について比較検討することが必要であると考えられる。

精子検査の在り方

川島邦夫

国立衛生試験所・安全性生物試験研究センター・毒性部

生殖毒性試験で雄性生殖能への影響がみられた場合、精子への影響が有るか、精子の何が障害されたかを明かにすることは重要であり、次のような指標があげられる。

1. 精子運動性

- ①精子活力：運動している精子を対照に実施する。最も活発な運動に対して4点を与え、運動の減弱に従って減点し、運動性が認められない場合を0とする5段階の採点により評価する。
- ②精子前進性：ホールスライドグラスに滴下した希釈精子液中に、約20°の角度で立てたガラス毛細管内の移動距離を計測して評価する。
- ③運動精子率：運動精子数と、非運動精子数を数えその比を求める。スライドグラス法、光川法、精子解析装置（Cell Soft、Hamilton Thorn、CellTrack）、画像解析装置等が使用されている。

2. 精子生存率

生体染色により、生死を判別して生存率を算出する。

3. 精子数

血球計算盤、ディスプレイザブル精子数測定チャンバーなどを用いて算定する。

4. 精子形態（奇形精子率）

エオシン・アニリンブルー法、オパール・ブルー法、Fontana氏鍍銀法などで染色した精子を、スライドグラスに塗抹して400倍で観察し、精子奇形率を算出する。

検査に際しては、薬物の特性を考慮して検査法を選択する必要がある。本シンポジウムではこれら精子検査法とその実施上の留意点について述べる。

病理検索での問題点

安原加壽雄，三森国敏，高橋道人

国立衛生試験所・病理部

生殖毒性において，医薬品の雄性生殖能に対する適切な評価法が ICH により求められ，雄性生殖に及ぼす影響を協同研究により検討した．その結果，短期間で精巣毒性を評価するには，病理形態学的に検索することが重要であるという結論に到達した．

精巣に変性，壊死および巨細胞出現等の明らかな形態学的変化が発現する場合には，一目でそれらの変化を検出することは可能であるが，以下のような微細な病変については精上皮サイクルを考慮にいたした形態学的検査が不可欠であった．この様な検索方法を行なうには先ず，アーティファクトを最小限にした標本作製することが必要である．

1. 抗悪性腫瘍剤では，精細管の萎縮がみられたが，精査すると各ステージの円形精子細胞が消失しており，この物質の減数分裂に対する障害が推察された． 2. reserpine等では，第IX-XIステージにおいても成熟精子の停滞が観察され，セルリ細胞から成熟精子の離去する機序が遅延していることが推察された． 3. 抗痴呆薬では，通常的光顕検査で明瞭な変性所見が得られなかったが，精巣上体管内に変性精子細胞が多数観察されたほか，精上皮サイクルを考慮して精査した結果，第I-VIステージにおいて円形精子細胞の剥離が検出された． 4. 一方， α -chlorohydrinでは，精上皮サイクルを考慮にいたした検索法を用いても，精巣に形態学的な異常は検出されなかったが，精子運動能検査では著しい機能低下が観察され，本剤における精子運動能の抑制が示唆された．

以上の結果，短期間で精巣に対する障害を検出するには精子形成サイクルを考慮した観察方法を取り入れることが必須であり，さらに，機能試験を加味した総合的な評価を行なうことが必要であると結論づけられた．

投薬期間の妥当性

樋口 敏 浩

住友化学工業株式会社 生物環境科学研究所

雄性生殖毒性評価のための交配前投与期間として、今までは各国のガイドラインでラットでは約9～10週間とされてきた。この投与期間は理論上、精子の形成サイクルを一通りカバーするという点で合理的であると思われるが、一方では、経験的な視点から、雄性生殖毒性を検出するための必要条件であるか否かに、疑問が持たれていた。

近年、ガイドラインの国際的ハーモナイゼーションにより、雄の交配前投与期間として4週間が提示されたが、これをきっかけにこの議論がクローズアップされてきた。

我々は、16社による雄性生殖毒性評価法確立のための共同研究において、雄の交配前投与期間を4週間に短縮することの妥当性について実証することを目的の一つとして、ラットを用いて検討を進めてきた。その結果、検索項目として適切な指標を設定すれば、4週間の投与で雄性生殖毒性を検出することは可能である、という結論を得た。

本演題では、共同研究でのデータを紹介し、結論として得られた交配前投薬期間の妥当性について述べる。

回復性に関して

岸 倉次郎

塩野義製薬（株）新薬研究所

毒性試験において発現した雄性腺系に対する毒性変化が、可逆的であるか又は非可逆的であるかは、雄動物への投与期間の妥当性及び解析パラメータの検索等の毒性検出能の検索と並んで、毒性の重篤度の評価に重要である。回復性をみるためには、適切な休薬期間の設定と、有効な解析パラメータでの検索が必要である。本研究では、投与期間と回復期間との関係並びに解析パラメータの検出感度について検討し、雄性腺系に対する毒性変化の回復性の特徴について考察した。資料として、研究班に参加した16社のなかで回復性試験を実施した4社の成績を基にした。

被験物質として、 α -chlorohydrin (α -CH: 2、8 mg/kg)、ethinylestradiol (EE: 3、10 mg/kg)、抗癌剤X (X: 12.5、25、50 mg/kg)及びnitrazepam (NZ: 20、40、80 mg/kg)を使用した。投与期間はいずれも4週間で、成熟雄ラットに反復投与した。検索項目として、交配検査、器官重量の測定、精巣の病理組織学的検査及び精子検査等を実施した。

交配検査において、 α -CHは同居開始を投与2週間後及び休薬終了2～3日前に実施した。 α -CH投与群では4週間投与後精巣の重量と病理組織学的所見及び精子数に変化がみられなかったが、精子運動性及び授胎率の低下などの極めて特徴的な変化を示した。休薬2週間で全検査項目に変化が認められず、極めて早い回復性を示した。EE投与群では、4週間投与後全項目で変化が認められた。これらの変化は、休薬4週間で軽減する傾向はみられたものの、依然有意な変化として認められた。X投与群では、4週間投与最高用量群で精巣重量減少、精巣の病

理組織学的変化及び精子数の減少がみられたが交配成績に影響は認められなかった。休薬8週間後、精巣重量の回復及び病理組織学的変化の軽減傾向が認められた。NZ投与群では、4週間投与後、交尾率を除く全ての項目に変化が認められた。交配成績は、休薬4週間で授胎率の低下が認められたが、休薬11週間で有意な変化はみられなくなった。しかし休薬11週間でも精巣重量の減少、精巣の病理組織学的変化及び精子数の減少がみられ、完全には回復していなかった。一方、毒性発現機序として、 α -CHは精子に対する直接作用、EEは精子形成の間接的な抑制作用、X及びNZは生殖細胞又は／及びセルトリ細胞への直接的抑制作用によるものであることが推察された。

精子に直接作用する α -CHは、回復性(授胎率)が著しく早い、直接又は間接的に精子形成を抑制する被験物質は回復性が遅い。特に精巣の病理組織学的変化に関しては投与期間をはるかに越す回復期間が必要であり、かつ交配成績より検出感度が高いと推察された。

臨床病理検査に関するサンプルサーベイランス

(1) 実施方法と血液学的検査成績

○野村 護¹⁾、海野 隆²⁾、守田 伸子³⁾、長谷川 浩之⁴⁾
 林 裕⁵⁾、松澤 利明⁶⁾、関田 清司⁷⁾、小野 敦⁷⁾
 降矢 強⁷⁾、黒川 雄二⁷⁾、林 裕造⁷⁾

¹⁾第一製薬、²⁾ 鱒、³⁾ サンドビス、⁴⁾ 大鵬薬品、⁵⁾ 富士ビデオ、⁶⁾ 山之内製薬、⁷⁾ 国立衛生試験所

【目的】医薬品の開発研究における非臨床試験実施施設で血液学および血液化学的検査に使用している自動分析機器の精度について、同一の動物血液および血清を用い全国規模でサンプルサーベイランスを行い、各施設間の変動を調査した。本研究はヒューマンサイエンス財団の基金による「製剤評価研究事業」の1993年度事業の一端として実施された。

【方法】10週齢Crj:CD系雄ラット210匹から麻酔下に腹大動脈採血し、プール血液および血清を作製した。血液サンプルはEDTA2K加採血管を用い、凝固がないことを確認後プール。血清サンプルは凝固促進型分離剤入り試験管を用い、室温30分放置後3000rpm, 15分遠心し分離血清をプールした。各自家調製サンプルはシリコンコート試験管に分注し、全国の参加施設へ20時間以内に冷蔵輸送した。測定はガイドラインの推奨項目を各施設の測定条件下に3回の平均値を調査票に記入し国立衛試に送付した。収集データから平均値、標準偏差を求め各項目別の変動係数を算出した。各データを散布図として表示し、中央値からの逸脱範囲を明確にした。ラットサンプルに加え、同時に標準血液および血清を送付し得られた値を各標準サンプルの推奨値と比較し、差異を検討した。

【結果】施設は製薬協60、安研協23、PIフォーラム8、財団法人4、医薬工2に国立衛試を加えた98施設が参加した。血液検査機器は5社29種、血液化学検査機器は30社88機種が使用されていた。自動分析機器から全データを得た施設は22、複数機器を使用した施設は76あった。解析結果はRBC 788 ± 23 、WBC 122 ± 10 、PLT 121 ± 10 、HGB 15.7 ± 0.4 、HCT 47.0 ± 2.1 であった。標準血液はラット血液に比べ変動幅が小さく、ラットで大きな変動を示したことから、ヒト用機器を動物用に転用する際の値付けに問題があることが示唆された。

臨床病理検査に関するサンプルサーベイランス
 (2) 血液化学的検査成績

○林 裕¹⁾、海野 隆²⁾、長谷川浩之³⁾、松澤利明⁴⁾
 野村 護⁵⁾、関田清司⁶⁾、斉藤 実⁶⁾、降矢 強⁶⁾
 黒川雄二⁶⁾、林 裕造⁶⁾

¹⁾ 富士レビオ、²⁾ 鐘紡、³⁾ 大鵬薬品、⁴⁾ 山之内製薬
⁵⁾ 第一製薬(日本製薬工業協会)、⁶⁾ 国立衛生試験所

【目的】ヒトの臨床検査において常用される、精度管理を目的としたサンプルサーベイランスを実験動物に応用し、毒性試験のデータ評価の基準ともなる血液化学的検査の精度管理の実態を調査した。

本研究はヒューマンサイエンス財団の基金による「製剤評価研究班」の1993年度事業の一端として実施された。

【方法】前報に従って調製した血清を用いて、約24時間以内に測定した。検査項目は、毒性試験ガイドラインに従って、総蛋白質、アルブミン、A/G比、グルコース、コレステロール、トリグリセリド、尿素窒素、ビリルビン、クレアチニン、GOT、GPT、ALP、Na、K、Cl、Ca、IPを対象とした。参加施設はデータを所定の用紙に記録し、予め定められた施設番号を記入後、国立衛生試験所毒性部に送付した。以後の解析はブラインドで実施した。

【結果】いずれかのサンプルが平均値 $\pm 2SD$ の範囲を逸脱した施設の割合を検討した。逸脱例がない施設が38%、1項目が33%、2項目が16%、3項目以上が13%であり、最大で9項目逸脱した例も認められた。

各検査項目別にその特徴をまとめると、ラットおよびヒトの検体とも変動が小さい電解質(NaでCV値が1.2~1.9%)などの項目、ラットおよびヒトとも変動が大きい酵素系(ALPでCV値が34.2~35.9%)の項目、ヒトでの測定法をそのまま動物に適用するには問題のある項目(アルブミンでラットのCV値が20.7%、ヒトのCV値が6.5~6.9%)の3種類に大別された。なお、酵素系の項目の変動原因として、試薬または測定原理の差によるものが大であり、測定原理をよく吟味した上で用いることが必要と考えられた。

今回のサーベイランスでは、機器自体に明らかな原因が存在する可能性のある逸脱値は少なく、むしろヒト用の臨床検査機器を動物用に転用する際の初期条件がまちまちであることが変動の原因であることが示唆された。

カニクイザルリンパ球の全血法あるいは比重遠心法による
フローサイトメトリー解析

○小倉 剛、野口規子、田村博志、宇佐美正義、寺尾恵治*

中外製薬・安全研、国立予研・筑波霊長類センター*

【目的】フローサイトメトリーによるリンパ球表面マーカー解析の際のリンパ球分離法には、全血法や比重遠心法などがあるが、これら分離法によって得たリンパ球の表面マーカー解析結果の比較検討は充分行われていない。今回、カニクイザルのリンパ球表面マーカー解析におけるリンパ球分離法を確立するため、全血法あるいは比重遠心法によって得たリンパ球の表面マーカー陽性細胞率を比較検討した。

【方法】カニクイザル(5~6歳齢、雌雄各6頭)よりリンパ球採血を行い、全血法あるいはFicoll(Pharmacia:d=1.077)を用いた比重遠心法によって、白血球あるいはリンパ球を分離した。その後、得られたリンパ球のCD4(Leu3a)、CD8(Leu2a)、CD16(Leu11a)、CD20(Leu16)陽性細胞率をFACScanにて測定するとともに、リンパ球ゲートリングの際に障害となる赤血球の残存量を算定した。

【結果および考察】全血法による各陽性細胞率の平均±標準偏差(%)は、CD4⁺:29.1±8.9、CD8⁺:49.3±11.8、CD4⁺・CD8⁺:2.9±2.8、CD16⁺:17.0±6.2、CD20⁺:7.1±4.8であった。全血法に較べて比重遠心法では、CD8⁺細胞率が36.7±9.0%と低値を示した。比重遠心法でCD8⁺細胞率が低値を示したので、Percoll(Pharmacia)等張ストック液より段階希釈液を作製し、各分画におけるリンパ球の分布を調べたところ、リンパ球の一部はd=1.077に相当する分画より高比重分画にも分布していた。現在、各分画のリンパ球表面マーカーの詳細を解析中である。赤血球残存量(OD)は、全血法:0.089±0.026、比重遠心法:0.028±0.004であり、全血法で高い値を示した。

以上、全血法と比重遠心法による解析結果を比較したが、リンパ球分離法によって、リンパ球表面マーカーの陽性細胞率に差がみられる場合があり、カニクイザルのリンパ球を比重遠心法で分離する際には、全てのリンパ球が一定の分画に分布しないことを考慮し、解析を行わねばならないと考えられた。また、赤血球の残存については、両方法ともリンパ球にゲートをかける時に大きな影響を及ぼすほどの残存量ではなく、方法論選択の際に第一義的に考慮する必要はないものと考えられた。

カニクイザルにおける頻回採血の血液学的検査および血液化学的検査に及ぼす影響

○鮫島秀暢，中間和浩，石神和彦，宮脇宏彰，永田良一

株式会社新日本科学 安全性研究部

近年，毒性試験においてトキシコカイネティクスが定常化し，投与後採血を頻回に実施することが多くなって来ている．また，サルを用いた試験では臨床試験（Phase I）と同様な試験計画で採血を行い，投与後 24 時間までに頻りに臨床検査を実施する場合も多い．本試験では血液学的および血液化学的検査に及ぼす頻回採血の影響をカニクイザルを用いて調べた．雄の成熟カニクイザル 9 匹を対照群，頻回採血群および頻回採血＋拘束群の 3 群に分け，クロスオーバー法（回復期間 3 週間）により検討した．対照群は 24 時間内の変動の有無を調べる目的で設定し，0 および 24 時間に採血し，検査した．他の 2 群の採血は 0，0.5，1，2，4，6，8 および 24 時間の計 8 回とし，その後 8 日目にも行った．採血はいずれも保定器（Ryo V，新日本科学）を用い，保定開始後 2 分以内に大腿静脈から 1 回 3 ml を採取した．拘束群では，持続静脈内投与を想定し，保定器（Ryo V）を用いて 1 時間拘束した．血液学的検査：頻回採血により RBC，Hb および Ht のわずかな減少傾向が認められたが，1 時間拘束の影響は認められなかった．血液化学的検査：頻回採血により CPK は 0.5 時間の採血から増加しはじめ，8 時間で初回採血時の 20 倍以上の値を示し，24 時間でも高値が継続したが，8 日目の検査では回復していた．LDH および GOT でも同様な傾向がみられたが，増加の程度は軽度であった．1 時間の拘束を加えることによる影響は認められなかった．**結論**：赤血球系と筋肉由来の酵素系に対する頻回採血の影響が示唆されたが，いずれも可逆的変化であり，1 時間の拘束を加えることによりその影響が増強されることはなかった．

混餌投与試験における血中薬物濃度

—採血ポイントの検討—

○近藤正実、北崎直

武田薬品工業（株）・薬剤安全性研究所

ICHでは、がん原性試験におけるToxicokinetics情報として、4点以上の採血ポイントで測定した血中薬物濃度から算出されるAUCで暴露量を求めることを提案している。経口剤のがん原性試験は多くの場合、混餌投与で行われる。しかし、マウス及びラットの摂餌行動の主時間帯が消灯後にあるため、正確なAUCを求めるには夜間採血が必要となる。我々は、実験者の負担が少なく、かつ精度の高い暴露量(AUC)が得られる標準的な採血ポイントを検索した。

〔方法〕3種類の化合物(A, B, C)について、それぞれ3～5投与量水準で雌雄のマウスあるいはラットの混餌投与試験を実施した。採血ポイントは投薬7日目の8時から2時間々隔で24時間、合計13点とし、化合物A及びBは未変化体と代謝物、化合物Cは未変化体の血中薬物濃度を測定した。また、同時間々隔で飼料摂取量を測定した。動物室照明の点灯時間は7-19時とした。

〔結果〕3種の化合物の血中薬物濃度は各動物の摂餌パターンに追従する推移を示した。即ち、マウスでは C_{max} は18-6時の夜間に、 C_{min} は8-16時の昼間にみられたが、ラットのこれらは更に広い時間帯に認められた。 C_{max} と C_{min} の比はマウスでは約7倍、ラットでは約2倍であった。化合物A及びBの代謝物の C_{max} は、未変化体のそれとほぼ同じ時間帯に認められた。8, 14, 20, 8時の4ポイントの薬物濃度から算出したAUCの平均値は、2時間毎13ポイントから得たAUCの $101 \pm 10\%$ (Mean \pm S. D., マウス:85-115%, ラット:82-125%)を示すことがわかった。

以上の結果より、混餌投与における暴露量を求める際にICH案を満足し、精度的にも充分と考えられる標準的な採血ポイントを選定できた。

一般口演(C会場)

9:00~12:00 C-01~C-15

13:00~16:24 C-16~C-32

マウス混餌投与試験の摂餌推移に関する基礎的検討

石橋成太良、浜洲泰久、吉田 勝、中沢素邦、
安達孝浩、吉川健一、田村博信、鷺見信好

日本新薬株式会社 安全性研究部

【目的および方法】

がん原性試験などの混餌投与の場合、全身的曝露の評価には動物の摂餌パターンを把握し、適切な時間帯に採血することが必要である。現在ステップ4にあるICHのトキシコキネティクス（TK）ガイダンスでも、混餌投与においては適切なTKデータを得るために特に注意を払うべきであると謳っており、動物の摂餌パターンに関する背景データの蓄積が重要となってくる。今回マウスの混餌投与の条件下において、24時間にわたる1時間毎の摂餌量を測定し、適切なTKデータを得るための採血のタイミングを解析した。

6週齢の雌雄B6C3F₁マウスを用い、午後7時～午前7時の暗環境で、24時間にわたり1時間毎の摂餌量を測定した。摂餌期間は13週間とし、摂餌初日、7週目、13週目の3回実施した。

【結果および考察】

マウスの摂餌量の推移は、午前10時頃より減少し、午後2時頃一旦底となった後、夕刻頃から増加に転じ、暗環境下ではほぼコンスタントな摂餌を示したが、明け方にかけて再び減少し始め、午前7時頃から増加するパターンとなった。摂餌期間による差および性差はみられなかった。これらのデータよりTKプロファイルを得るための採血時間として、午前10時、午後2時、午後6時、午後10時、午前2時、午前6時のポイントが適切であると考えられた。また今回の我々の成績も含め、各試験施設より発表された摂餌推移は必ずしも共通のものではなく、これら背景データの蓄積は各試験施設毎に収集しておく必要があると考えられた。

イヌ血清ALPの由来臓器と絶食の影響について

○井上芳巳，江口文子，榎富直哉，田村 茂，務台 衛

三菱化学(株)横浜総合研究所 安全性研究所

〔目的〕イヌを用いた安全性試験において薬物投与などの影響により食欲が低下し，摂餌量の低下が起こったり無採食になることがある。この時の血清ALP (Alkaline phosphatase)は低下することを我々は経験しているが，この低下の原因については不明であった。今回，正常なイヌでの血清ALPの由来臓器を調べ，絶食下での臓器由来ALPの変化について検討を行った。

〔方法〕正常なイヌ(ビーグル，8カ月齢)の血清および臓器(肝臓・骨・小腸)抽出ALPの酵素活性とアイソザイムを阻害剤を添加して比較測定した。阻害剤には小腸ALPを強く阻害するL-フェニルアラニンと肝・骨ALPを強く阻害する尿素を使用し，酵素活性はBessey-Lowry変法で，アイソザイムはタイタンⅢを支持体として電気泳動を行い，5-プロモ-3-インドリリン酸-P-トリジン塩を基質として反応発色させて調べた。また，絶食は4日間行い同様に調べた。

〔結果・考察〕非絶食下の酵素活性では10mMのL-フェニルアラニン添加による残存活性率は，血清(86.9%)，肝(86.6%)，骨(88.0%)，小腸(49.7%)であった。また，4Mの尿素添加による残存活性率は，血清(0%)，肝(0.2%)，骨(0%)，小腸(44.4%)で，いずれの場合も血清ALPの残存活性率は肝・骨ALPと同様であった。さらに，3Mの尿素添加による残存活性率は，肝(11.9%)，骨(0.3%)で，肝では10%程度活性が残るのに対して骨は殆ど完全に阻害され，この時の血清ALPは6.1%で肝と骨の中間を示していた。一方，アイソザイムでは陽極側から肝・骨・小腸の順に泳動され，血清ALPは肝と同じ位置に泳動された。またナイミダゼ処理を行うと肝・骨・小腸ALPはほぼ同じ位置に泳動されたが，血清ALPは肝・骨・小腸ALPより陽極側に2本のバンドに分離され，この2本のバンドのうち陰極側に位置するバンドは4Mの尿素添加により消失したことから骨由来と考えられた。以上のことから，正常なイヌの血清ALPには小腸由来のものは無く，肝臓・骨由来である可能性が大きいと結論した。さらに，絶食下での臓器由来ALPの変化についても報告する。

網状赤血球のRNA含有量は造血機能指標としてなりえるか？

○石島 奈美、嘉松 望美、高橋 裕詞、大野 広志、野村 護

第一製薬㈱ 開発研究所 安全性研究センター

〔目的〕末梢血の網状赤血球数（RET）の測定は、赤血球の造血状態を調べる検査として広く用いられている。従来の測定法には用手法あるいは画像解析法が知られている。近年、新たにフローサイトメーター（FCM）を用いる方法が開発され、処理能力、精度ともに良好な成績が報告されている。これらの機器はヒト RET に含有される RNA の蛍光強度によって幼若な RNA の含有量の多い順に、High Fluorescence Ratio（HFR）、Middle Fluorescence Ratio（MFR）、Low Fluorescence Ratio（LFR）として分画できる。この機能を応用して、赤血球造血能の評価が可能であるかラットを用いて検討した。

〔方法〕7週齢の Crj:CD 系雄ラットを 5匹/群用い、 β -acetylphenylhydrazine（APHZ）の（40 mg/kg、sc）、adriamicin（ADR）の（7 mg/kg、iv）、cyclophosphamide（CY）の（25 mg/kg、po）を単回投与し、寫血群は尾静脈から 3 ml 採血した。処置後 4、7、14、21 日に RET および RNA 分画を測定した。

〔結果〕APHZ 群では投与後 4日から貧血が認められた。この時点で RET は増加傾向を示したのみであったが、HFR は明らかに増加し、造血能の亢進をより鋭敏に反映していた。投与後 7日で貧血が増加するのに伴い、RET、HFR、MFR ともに明らかな増加がみられ、造血能のより強い亢進を認めた。一方、抗癌剤である ADR では、貧血が出現しない投与後 4および 7日に RET、HFR、MFR の明らかな減少がみられたが、貧血が認められた 14 日では HFR は増加傾向を示し、造血能が回復していることを示唆していた。

以上のことから、RNA 含有量による RET を調べることにより、骨髓機能を把握することが可能であり、ラットでも造血能指標として有用と考えられた。

卵巣摘出ラットにおける臨床検査パラメーターの経時的変化

安藤理恵子、中山由美子、棚橋清子、中村純、
国松武史、関高樹、吉武彬

住友化学工業株式会社 生物環境科学研究所

【目的】

実験的骨粗鬆症モデル動物として広く用いられている卵巣摘出ラットの骨代謝関連パラメーターの変動については多くの報告があるが、一般的血液・血液生化学パラメーターについてはよく知られていない。そこで、卵巣摘出後3ヶ月間の血液・血液生化学パラメーターの経時的変化について検討した。

【方法】

10週齢のSD系雌ラット各15匹に卵巣摘出(OVX)、偽手術(SHAM)を施した後、術後2、4、9週目に眼窩静脈叢より、14週目にはエーテル麻酔下腹大動脈より採血を行った。得られた血液を用い、血液・血液生化学検査、および血清中プロラクチン(PRL)、エストラジオール(E2)、オステオカルシン(OST)を測定した。また、同時に術後1、2、3、4、6、9、10、12、14週目に尿を採取し、尿中デオキシヒドロキシリン(DPD)を測定した。

【結果】

術後2週目よりE2、蛋白質(TP)、コリンエステラーゼ(CHE)の低値、およびOST、コレステロール(TCHO)の高値が、術後4週目よりアルカリ性フォスファターゼ(ALP)およびリンパ球(LYMP)の高値に基づく白血球数の高値、術後14週目ではカルシウム(CA)、アルブミン(ALB)、AG比の低値が認められた。

【結論】

卵巣摘出による臨床検査パラメーターの変動を検討した結果、E2低下に基づくと考えられる骨代謝関連パラメーター(ALP、OST、DPD)の変化の他、TCHO、ALB、CHE、LYMPなどへの影響が認められた。

コモンマーモセットのX線全身照射による造血機能の変化

鈴木 修三^{1, 2)}, 直 弘^{1, 2)}, 谷岡 功邦²⁾, 日々野 仁³⁾

1)前臨床医学研究所, 2)実中研, 3)東大医科研・病態薬理

[目的] 実験動物として確立された小型霊長類であるコモンマーモセットに, X線全身照射したときの骨髄機能の抑制と回復の推移について検索した。

[実験] メス(1~2才)のマーモセットに 350, 450 および550radのX線を全身照射(日立メディコ: MBR-1505R)し, 以下の検討を行なった。①照射後の血液性状。②450rad照射した動物にrhG-CSFの2 μ g/kgを照射後皮下投与した時の白血球数の回復能。③550rad照射後35日目の動物の骨髄細胞のコロニー形成能。④照射後35日目までの二次感染の有無。

[結果] ①各線量とも照射後の各血球数で顕著な減少を示し, 白血球は 350および450 radで22日目以降, 血小板は350radで32日目から復傾向認められたが, 550 radでは35日目においてもいずれの血球数にも回復傾向はみられなかった。②G-CSF投与により450rad照射例の好中球数は, 26日目(G-CSF投与第8日目)から増加が観察され, 32日目(G-CSF投与第15日目)に照射前の好中球数に回復した。③35日目の550 rad照射例における骨髄細胞のコロニー形成能は無処置例の骨髄細胞にくらべ明らかな減少を示したが, rhIL-3およびrhEpoの添加によりBFU-Eを形成した。④照射後35日目の実験終了時まで, 二次感染はみられなかった。

[考察] 小型霊長類のマーモセットにX線を全身照射することにより線量依存的な骨髄障害が惹起した。この障害は, ヒトの造血因子により回復を示した。今回の実験では従来のマカカ属のサルに比べ骨髄障害による二次感染は少ないと考えられた。

Lipopolysaccharide腹腔内投与により惹起される
血中活性酸素種の動態と脂質過酸化亢進反応について

江頭 亨, 高山 房子, 山中 康光

大分医大・医・薬理

【目的】好中球などから産生される活性酸素種は生体を細菌の侵入から守る重要な役割を果たすが、一方で生体を酸素ストレスにさらす危険因子ともなりえる。グラム陰性菌よりの放出性毒素 lipopolysaccharide (LPS, endotoxin) は血小板機能、凝固栓溶系、prostaglandin代謝や微小循環動態に影響し、各種臓器障害を引き起こすと考えられている。また、LPSが直接 oxidant stressorとなりうることも、注目されつつある。今回、各臓器に種々の障害をもたらすintermediatorとして血中の活性酸素の役割に着目し、LPS処理後のラットにおける白血球の活性酸素産生能の変化や血液中の脂質過酸化亢進について、経時的に観察した。

【結果】白血球活性酸素産生能を全血のPMA刺激で生じるルミノールの酸化発光(CL)で検討したところ、LPS腹腔内投与後6時間経過では軽度な上昇であったが、30時間経過前後には10・30倍以上に増加した。SODでこのCLの5・10%、NaN₃では大部分が抑制されることから、白血球から血中に放出される活性酸素種は傷害性の高い OCl⁻であることが推測された。この活性酸素種による酸素ストレス状態を同時採血の血漿で、t-butyl hydroperoxide 誘発の血漿CLにより検討した。血中脂質過酸化状態は、LPS投与6時間後から有意に上昇推移していた。今回の実験法は、LPSで惹起された血中酸素ストレス状態の評価のため、全血および血漿を試料としCL測定を行なったが、1回の採血量は100μlで充分であり、同一個体で経時的な変化を追跡できる利点があった。

リポ多糖 (LPS) 投与ラットにおける血中及び尿中
 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ の著増と血液細胞数変動との相関について

北嶋 聡、○津田 充宥、江下 希美、松島 裕子、
 斉藤 実、門馬純子、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・薬理部

【目的】LPS等のエンドトキソンの刺激を受けた生体では、L-アルギニンを基質とする一酸化窒素(NO)合成酵素誘導に伴ってNO産生が起り、その酸化物 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ の血中及び尿中での著増が示されている。このNO産生には以前から、マクロファージ(M ϕ)活性化の関与が示されてきたが、培養細胞実験より好中球や内皮細胞からのNO産生も示されており、由来細胞は多種多様と考えられる。本研究ではラットへのLPS投与時のNO産生と血液細胞数変動との相関を調べ、M ϕ 以外の細胞がNO産生に関与するか否かを明らかにするための基礎的な検討を目的とした。

【方法】Wistar系ラット(8週令、雄)にLPS(E. coli)を1mg/kg, b. w. で腹腔内投与、投与後3h, 9h及び24hの3群(一群5匹)及び対照群(生理食塩水)を設けた。尚、LPS投与の16h前より絶食した。採血は眼窩静脈叢より、採尿は代謝ケージ中で絶食、脱イオン水供給下に行った。血清中及び尿中 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ の定量はCd還元カラムを付した自動NOx測定装置(東京化成)を用い、血球数及び白血球百分比は常法により求めた。

【結果及び考察】LPS投与により血中 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 濃度は9h後に最高値 $304.8 \pm 11.0 \mu\text{M}$ を示し対照群の約18倍上昇した。尿中 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 量は $49.6 \pm 8.0 \mu\text{mole}/24\text{h}$ で対照群の約50倍に著増した。総白血球数及びリンパ球数は投与後3hで一過性に減少し、好中球及び単球数は経時的に増加した。血小板数は経時的に24h後には対照群の30%に低下した。

以上の事より、LPS投与による血中及び尿中 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 量増加時に、血液像の多様な変動が認められ、これらの血液細胞の活性化に伴うNO産生の可能性が示唆された。今後、各血液細胞の特異的活性化剤を用い、NO産生との関係を、更に究明する必要があると考えられた。

非ペプチド性Angiotensin II拮抗薬のラットでの毒性
試験において認められた変動パラメーターの解析

望月宴交, 佐野孝一, 山内研司, 中岡農, 橋本正晴, 峯崎弘

藤沢薬品工業株式会社 安全性研究所

抗高血圧薬であるAngiotensin II拮抗薬およびその類薬であるACE阻害剤の反復投与毒性試験においてしばしば共通した毒性検査項目の変動が観察される。今回、当社で開発したA II拮抗薬をもとにその発現機序について検討したので報告する。

6-7週齢雄性SD系ラットにA II拮抗薬を2週間経口投与した結果体重の増加抑制、摂餌量の軽度の減少、貧血傾向、BUNおよび血清鉄の上昇、肝、心重量の減少、腎重量の上昇がみられた。これらの変動と摂餌量の低下との関連を調べたところ、A II拮抗薬投与による体重の増加抑制および肝重量の減少は摂餌量減少によるものであった。反復投与後の腎機能検査ではGFRおよびRPFとも異常はみられなかった。一方、尿素クリアランスは投与後6時間までは低値を示したが、投与後24時間のクリアランスは正常に回復した。このとき、BUNの上昇がみられたが、尿中の尿素窒素排泄量の増加もみられた。これらの結果よりA II拮抗薬投与により尿素の排泄動態が一時的に変化するものの、BUNの上昇は尿素生成の亢進に起因する可能性が考えられた。以上の変動は飲水に生理食塩水を摂取させることにより、いずれも消失あるいは軽減したが、反復投与後の尿中Naの排泄量に変動はみられなかったため、利尿剤Furosemideと異なりNaの尿中への喪失により説明されるものではなかった。以上の結果の他、A II拮抗薬投与による貧血傾向およびA IIに関連する摂水動態に対する影響についても解析したので併せて報告する。

キノホルム毒性に感受性の高いラットにおける キノホルムの体内動態について。

堀 眞一郎、大谷 幸子

(財)東京都神経科学総合研究所、神経生化学部門

[目的] スモンの病因はキノホルム(Cf)の副作用による神経障害である。神経毒性の予知には動物実験は欠かせないが、毒性を検定する際、動物の個体間での毒性に対する感受性の差が大きな障害になる。先に、私達はWistar系ラットでCfの毒性に対して遺伝的に感受性の高いラット(CfS)と低いラット(CfR)を分別することに成功した(1)。このラットを毒性検定に使用するには、CfR、CfSの性質の由来を確定しておく必要がある。今回は、キノホルムの体内動態と、肝臓の排泄能の検査に使用されるICGの体内動態とを比較検討した。

[実験方法] 24代継代した20週齢、体重350-400gmのCfSとCfRを使用し、エーテル麻酔下に開腹し、胆管、尿管、股動静脈血管に挿管した。静脈から4%manitol含生食塩水を点滴しながら保温した。体温が37°Cに回復した後、ハ°リン100単位を注入後、4%manitol-ハ°リン(10単位/ml)含生食塩水を点滴して維持した。覚醒後、ICGを静脈から0.3 mg/kg体重投与し、経時的に、動脈血、胆汁および尿を採取し、それらに含まれるICGの濃度を測定した。引続き、ラット血清に溶解したCfを静脈より1mg投与し、経時的に動脈血、胆汁および尿を採取し、それらに含まれる遊離、グルクロン酸抱合および硫酸抱合のCfを抽出しGC-MS法によって定量した。

[結果および考察] ICGは胆汁に排泄され、尿には全く排泄されなかった。血中のICGは10分以内に、測定限界にまで減少した。胆汁へは3時間以上にわたり、排泄された。血漿からの消失速度、胆汁への排泄速度はCfS及びCfRの間で差はなかった(2)。

Cf投与30分後の血中の濃度、投与10-20分の間での胆汁、尿中への排泄速度は、遊離、硫酸抱合及びグルクロン酸抱合のいずれのCfにおいても、CfSとCfRの間に差はなかった。遊離Cfの血中濃度は投与30分後には0.2~0.4nmoles/mlにまで低下した。血中の硫酸抱合及びグルクロン酸抱合Cfは投与直後から低値であった。Cfの投与量は1mg(3.27 μ moles)であるから、ラットの総血液量を体重の6%と仮定して血中初期濃度は~150 nmoles/mlとなる。よって、投与後30分以内にほとんどのCfは血中から排除されたと推測される。Cfの胆汁への排泄速度はグルクロン酸抱合体が遊離及び硫酸抱合の50~200倍で、遊離と硫酸抱合の間に差はなかった。尿への排泄速度は硫酸抱合がグルクロン酸より2~3倍速かった。遊離体はグルクロン酸抱合体の1/3~1/20であった。これらの結果は肝臓ではグルクロン酸抱合され、抱合体は直ちに胆汁中に排泄されること、また、腎臓では硫酸抱合あるいはグルクロン酸抱合され、直ちに尿中に排泄されることを示している。Cfの血中濃度、胆汁および尿への排泄速度において、CfSとCfRの間に差が認められなかったことは、幼若ラットでの結果(3)とは異なる。CfSがCfRに比べ、少量のCfによって致死するという事実を、肝臓、腎臓における解毒機能では説明出来ない。今後、致死量以下のCfを数カ月にわたる長期間投与して、発症させることで、この感受性の由来の解明を試みたい。1)医学のあゆみ(1992)163、155-156。 2)田邊等ほか、厚生省特定疾患スモン研究班・平成5年度研究報告書p.57-9, 1994。 3)Kotaki H et al. J.Pharmacobio-Dyn.9,970-974, 1986。

顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)は新生児ラットの成長を抑制しなかった

○古坊真一、松本清司、小川幸男*、関田清司*、
小野 敦*、降矢 強*、黒川雄二*

信州大学・医学部・動物実験施設

*国立衛生試験所・安全性生物試験研究センター・毒性部

幼若ラットの骨髄では3日齢頃から赤芽球のみが急激に増加する。この変動に注目して、1日齢のラットに顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)を投与することにより間接的に骨髄赤芽球を減少させた場合、新生児にどのような影響がみられるか検討した。

【方法】Slc:SDラット(SPF)の雄新生児8匹に1日齢よりG-CSF(ノイトロジン、100 μ g/kg/dayを10ml/kg体重)を10日間皮下投与し、血液・骨髄検査、肝、脾、胸腺の重量測定及び組織学的検査を実施した。対照動物には生理食塩液の同量を投与した。

【結果】G-CSF投与群では、末梢好中球数、MCH、MCHCが有意に増加したが、赤血球数は軽度減少した。MCVは軽度の増加傾向を示した。骨髄では顆粒球系細胞が増加したが、赤芽球、リンパ球は減少し、総細胞数は軽度減少した。この変化の程度は末梢血に比べ骨髄で強く認められた。脾重量の増加、脾及び肝における髓外造血の亢進像がみられた。なお、体重は両群間に差はみられなかった。

【考察】新生児ラットは急速に成長し、7日齢の体重は出生時の約2.7倍になる。この体重及び赤血球が増加する時期にG-CSFを投与すると、骨髄赤芽球は対照群の約52%に抑制された。脾重量は1.35倍に増加したが、体重及び赤血球数は変化しなかった。

以上のことから、G-CSFは間接的に骨髄赤芽球の増殖を抑制するが、主に脾臓由来の赤血球で補われるため、体重及び血液学的検査値に影響しないと考えられた。なお、軽度ではあるがMCV及びMCHに差がみられ、このことは骨髄及び脾臓由来の赤血球サイズが産生部位により異なる可能性を示唆するものと考ええる。

一般毒性試験における機能検査の現況

田村茂¹, 奈良博², 吉田勝³, 藤井邦伸⁴, 小林孝志⁵, 松岡信男⁶, 貞永納⁷,
中野雄司⁸, 田中楊幸⁹, 橋本正晴¹⁰ (日本製薬工業協会基礎研究部会)

三菱化学¹, 塩野義製薬², 日本新薬³, 日研化学⁴, 森下ルセル⁵,
大日本製薬⁶, 協和発酵⁷, 旭化成工業⁸, 大塚製薬⁹, 藤沢薬品¹⁰

一般毒性試験の血液、尿の臨床病理検査については従来よりさまざまな調査によりその動向が把握されている。一方、眼、心電図などの機能検査についての調査はいまだ行われていないもののその重要性についての認識は高まってきている。日本製薬工業協会基礎研究部会では将来の機能検査の方向を考えることを目的として、機能検査の種類、方法、頻度やどのような薬剤でどの検査が行われているかなどの現況を加盟99社にアンケート調査し、87社より回答を得た。また、邦文7誌について1984-1993年の10年間の反復投与毒性1243試験（ラット 742試験、イヌ 381試験、サル73試験）についても調査を行い、以下の結果を得たので報告する。

アンケート調査ではほとんどの施設で常時実施している機能検査は眼科学検査（視診、眼底検査）、イヌ、サルでの心電図検査であった。その他、イヌ、サルの心拍・脈拍数、体温は約半数、ラット・イヌでの耳介反射イヌ・サルでの血圧、イヌのPSPテストは約25%の施設が常時実施している。また、尿中酵素活性測定、各種内分泌ホルモンの測定、抗体測定、便潜血、ラットでの性周期の観察などは15-35施設で一般毒性試験に追加して実施あるいは新たに試験を設定して実施されていた。これらの検査の実施理由は以前に実施した試験で異常がみられたため、あるいは類薬で毒性が認められているためなどであった。文献調査でもほぼ同様の結果が得られており、特に眼科、心電図、聴覚検査については実施頻度、方法、対象動物などより詳細に検討した。また実施頻度の少ない検査項目については、その実施理由は薬効を考慮して実施している場合が多かった。

実験動物血漿を用いた日立自動分析装置736における
臨床生化学検査試薬の検討

平位奈美, 坂爪正志, 田坂知也, 豊田祐司

山之内製薬株式会社 創薬安全性研究所

実験動物を用いた毒性試験で実施される臨床生化学検査は, 測定項目数が10項目を越える場合が多く自動分析装置を用いた測定が一般的である。今回, 日立自動分析装置736を用いて7項目の液状試薬 (GOT, GPT, ALP, CHO, TG, PL, GLU; シリテスト社) と現在使用の用時調製試薬との比較を行ったので報告する。

同時再現性は, いずれの項目でも変動係数が2.1%以下と良好であった。直線性は, GOTが0~2700IU/L, GPTが0~2400IU/L, ALPが0~3300IU/L, CHOが0~850mg/dl, TGが0~1200mg/dl, PLが0~1000mg/dl, GLUが0~1000mg/dlの範囲まで確認した。妨害物質に対する影響は, 溶血ヘマトクリットはGOTに対して184mg/dl以上で正の誤差が, ALPに対しても184mg/dl以上で負の誤差がみられた。抱合型ビリルビンはALPに対して61.5mg/dl以上で負の誤差がみられた。その他の項目では, 溶血ヘマトクリット460mg/dl, 抱合型ビリルビン20.5mg/dl, 遊離型ビリルビン17.5mg/dl, 乳び2560ヘルマジン濁度まで影響はみられなかった。

各動物種 (ラット, イヌ, サル) の血漿を試料とした際の液状試薬と現在使用試薬の相関は, GOTおよびGPTではいずれの動物種においても液状試薬 (UV-Rate法) が現在使用試薬 (GSCC法) に比べ低値を示したが相関係数はいずれも0.902以上を示した。ALPは測定法の違いにより単位が変わり, 液状試薬 (GSCC準拠法) の測定値が現在使用試薬 (Kind-King法) に比べラットでは約10倍, イヌでは約16倍, サルでは約20倍高い値を示したが, 相関係数はいずれの動物種でも0.923以上を示した。CHO, TG, PLおよびGLUは各動物種において現在使用試薬とほぼ同じ測定値が得られた。

毒性試験動物代替試験の実施状況

—日本製薬工業協会のアンケート調査—

甲田 彰¹ 浅利 晃² 落合 敏秋³ 重栖 幹夫⁴ 金城 義明⁵ 田中 均⁶
 田岸 莊一郎⁷ 中村 正平⁸ 原田 寧⁹ 前田 充則¹⁰ 橋本 正晴¹¹

日本製薬工業協会基礎研究部会¹ 住友製薬² 生化学工業³ 持田製薬⁴ ハシダ⁵ ヲダ⁶
⁷日本製薬 ⁸ロート製薬 ⁹東京田辺製薬 ¹⁰京都薬品 ¹¹日本リヂー ¹²日本カクダ ¹³藤沢薬品

日本製薬工業協会基礎研究部会加盟99社を対象に、毒性試験分野における動物代替試験の現状を把握するために、各社における実施状況、その目的、用いている実験系などについてアンケート調査を行い、85社から回答があった。

何らかの毒性分野で動物代替試験の経験を持つ会社は50社で、うち10社は現在中止されている。また実施経験のない35社のうち23社はその必要性はあると回答された。動物代替試験が多く実施されている毒性分野は肝毒性で32社あり、次いで催奇形性、腎毒性、眼刺激性、皮膚刺激性であり、これらの分野では10社以上で経験があった。数社で経験のある分野は、心臓、神経、免疫、抗原性、癌原性、血液、精巣、副腎の各毒性であった。

試験の目的では、スクリーニング試験および毒性機序解析の2つが多く、その他に動物愛護や経費節減も挙げられた。

用いている実験系では、全体としては哺乳類動物の細胞を用いた系が多かったが、毒性分野毎で系の特徴が少し異なった。肝毒性では灌流・スライス臓器が、催奇形性では全胚培養、micro mass cultureが、また、眼・皮膚刺激性では非生物系材料の検査キットも用いられていた。

動物代替試験のバリデーションについては、実施施設の大部分で何らかの対応がとられていた。主なものは陽性対照物質との比較、in vivoとの相関性をみることであったが、試験目的により異なる、あるいは複数を組み合わせるといった意見も多かった。

LECラット肝細胞スフェロイドにおける銅蓄積性について

○吉沢正純、上野光一、米田信次、佐藤哲男、*大道正義、
鈴木和夫
千葉大・薬、*千葉市環境保健研究所

【目的】我々は昨年日本毒科学会学術年会において、温度感受性ポリマーを用いたLECラット肝スフェロイド形成法と、その長期培養について報告した。今回、このLECラット肝より作製したスフェロイドを用いて銅の蓄積性および銅の蓄積形態について検討したので報告する。

【方法】8週齢のLECラット（日本チャールスリバー）より単離した肝細胞を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型コラーゲンの均一混合物をコートしたディッシュ上に播種し、接着伸展させた。その後培地温度を下げることで得られる細胞シートを回収し、疎水性ディッシュに再播種し、3日間血清含有のChee's培地で培養した。4日目以降、無血清Chee's培地で培養を行った。銅暴露は培養5日目のスフェロイドに行った。銅蓄積量は高周波誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)により測定し、銅蓄積形態はHPLC/ICP-MSにより測定した。また、走査型電子顕微鏡(SEM)によりLECラット肝スフェロイドの内部構造の観察も行った。

【結果および考察】作製したLECラット肝スフェロイド内部をSEMにより観察した結果、肝実質細胞と非実質細胞が密接に存在しており生体に近い形態を有していた。LECラット肝スフェロイドは銅50 μ Mの暴露においてSD系ラット肝スフェロイドに比べ銅蓄積量の多いことが示された。さらに銅蓄積形態を測定した結果、LECラット肝スフェロイドはSD系ラット肝スフェロイドに比べメタロチオネイン(MT)と結合した銅(Cu-MT)が多く存在していることが示された。しかし、銅100 μ M以上の暴露ではLECラット肝スフェロイドで著しい銅含量の低下が認められた。また、亜鉛暴露による亜鉛蓄積性について測定した結果、LECラット肝スフェロイドはSD系ラット肝スフェロイドに比べ、亜鉛を異常に蓄積することおよびZn-MTも著しく増加することが示された。

ラット肝細胞スフェロイドを用いた劇症肝炎の 発症に関与するサイトカインの検討

○小林明子、上野光一、吉沢正純、佐藤哲男

千葉大・薬・薬物

【目的】我々は昨年の本会学術年会において、ラット肝細胞スフェロイドを用いた*Propionibacterium acnes* (*P. acnes*)-LPS誘発劇症肝炎モデルの作製と、その生化学的性質の検討について報告した。今回、本*in vitro*肝炎モデルにおいて、肝炎発症に関与するサイトカインの定量を行ったので報告する。

【方法】9週齢のSD系雄性ラットを用い、*P. acnes*静注4日後にコラゲナーゼ灌流法により肝実質細胞(PC)と非実質細胞(NPC)をそれぞれ単離した。PCとNPCを1:1の比率で混合後、回転培養器(ヤマト科学)を用い、混合ガス(5%CO₂+40%O₂)を通気しながら37℃で回転培養を行った。24時間培養してスフェロイドを形成させた後、LPSを培地中に添加し、培養48時間後に培地およびスフェロイドを採取して、培地中GOT、GPTおよびLDH活性を測定した。さらに、培地中およびスフェロイド中の、IFN- γ 、TNF- α およびIL-8量を測定した。また、細胞接着因子であるLFA-1の抗体を、LPS暴露2時間前に培地中に添加し、LPS暴露後の肝炎発症抑制効果について検討した。

【結果および考察】*P. acnes*で感作したラット肝細胞より作成したスフェロイドにLPSを暴露すると、培地中逸脱酵素活性の有意な上昇が見られ、*in vivo*同様の*P. acnes*-LPS二段階発症機構による肝細胞障害が起こっていることが確認された。さらに本*in vitro*肝炎モデルの発症において特異的に放出されるサイトカインの定量を試みたところ、LPS暴露後24時間に培地中へのTNF- α 分泌のピークが見られた。また、TNF- α によって産生が促進され、炎症局所への好中球遊走因子として知られるIL-8量は、LPS暴露後48時間で培地中への分泌量およびスフェロイド中含量とも著しく上昇した。さらに、本*in vitro*肝炎モデルにおいて、LFA-1抗体を前処置したスフェロイドにLPSを暴露したところ、LPS暴露により上昇する培地中のGPT活性は有意に減少した。以上について、現在測定中の他のサイトカインの定量結果と併せて報告する。

新規抗腫瘍剤 Capecitabine(Ro 09-1978, 5'-DFCR
誘導体)の毒作用
—毒作用の動物種差と腸管毒性の軽減—

川島明, 小林和子, 阿保敬, 今村いつる, 堀井郁夫

日本ロシュ(株)研究所 毒性病理部

[目的] Furtulon(5'-DFUR)は、腫瘍組織の pyrimidine nucleoside phosphorylase (PyNPase)によって 5-FU に変換され抗腫瘍活性を発揮するが、経口投与された Furtulon の一部が直接 腸管の PyNPase によって 5-FU に変換されるため、連続、高用量投与により下痢の出現が報告されている。我々は、腸管では変換されにくく、吸収された後、肝臓にて効率良く Furtulon に変換される薬物として Capecitabine を見だし、その毒作用を検討した。

[方法] ラット、マウス、カニクイザルを用いて反復投与毒性試験を実施し、動物種による毒作用の違いを検討した。また、ヒトとの類似代謝系を持つカニクイザルに、Furtulon, Capecitabine を4週間連続経口投与し、毒作用を比較検討した。

[結果] サル、マウスを用いた毒性試験では、腸管、リンパ・造血器系への作用が見られた。これらは、増殖活性の高い臓器への抑制作用として報告されているフルオロピリミジン系薬物の持つ毒作用と同質で、肝臓への毒作用もなく、Capecitabine 特異的な毒作用は認められなかった。ラットを用いた試験では、高用量投与によって、ごく軽度な腸管への影響が伺われたのみであった。この毒作用の動物種差は、Capecitabine の Furtulon への代謝変換酵素である acylamidase 及び Cytidine deamidase の活性に起因したものであり、Capecitabine による毒作用は、Furtulon の血中 AUC に依存していることがわかった。また、ヒトと最も類似した代謝系を持つサルに Furtulon を 0.5mmol/kg にて投与すると、投与開始後早期から、Furtulon 0.25 及び Capecitabine 1mmol/kg 投与では、投与約 1~2 週間後から、軟便・下痢、体重、摂餌量減少が見られ、死亡例が出現した。これらの動物の便性状変化と腸管の病理組織学的変化は良く相関していた。等モル投与量で比較した場合、Capecitabine の腸管への毒作用の程度は、Furtulon に比較して約 1/4 であることがわかった。

新規抗腫瘍剤 Capecitabine (Ro09-1978, 5'-DFCR 誘導体) の毒作用

-サル, ラット, マウスにおけるトキシコキネティクス-

進藤英俊、川島 明、田原 整*、堀井郁夫

日本ロシュ (株) 研究所 毒性病理部, *薬物動態代謝部

Capecitabine (Ro 09-1978) は 5'-DFCR (5'-deoxy-5-fluorocytidine) 誘導体で、Furtulon (5'-DFUR) の腸管毒性を軽減することを目的として開発された化合物である。5'-DFCR 誘導体は、未変化体のまま腸管を通過し、主に肝臓に存在する Acylamidase により 5'-DFCR になり、Citidine deaminase により Furtulon になる。Furtulon は腫瘍組織中で活性の高い Pyrimidine nucleoside phosphorylase (PyNPase) によって 5-FU となり抗腫瘍効果を現す。今回我々は、サル、ラット、マウスを用いた毒性試験、トキシコキネティクス (TK) 試験を基に 5'-DFCR 誘導体の毒性と血漿中 Furtulon-AUC 値の相関性、変換酵素の動物種差について考察したので報告する。

Capecitabine のサルを用いた 4 週間反復投与毒性試験、TK 試験を行った結果、Furtulon の AUC 値に依存して軽～中等度の腸管毒性が認められた。同様の結果は 4 種の類似 5'-DFCR 誘導体を経口投与した場合においても認められた。しかし、Furtulon を経口投与した場合では AUC 値が低いにもかかわらず、強い毒性が認められた。これは Furtulon が吸収される際、腸管において 5-FU に変換されるために 5'-DFCR 誘導体よりも低い AUC 値で強い毒性が発現したものと考えられる。

Capecitabine から 5'-DFCR への変換は、ヒト=マウス=ラット>サルの順に高く、5'-DFCR から Furtulon への変換はサル>ヒト=マウス>>ラットの順に高い。5'-DFCR 誘導体の毒性は、Furtulon の AUC 値に相関するので Furtulon への変換活性の高い動物種では毒性が強く発現し、低い動物種では低く発現する。ラットでは高用量の投与でも Furtulon-AUC 値は上がり、毒性も極めて低かったが、サルでは高い Furtulon-AUC 値がみられ、毒性も強く発現した。マウスは両動物種の間中型と考えられた。

アントラサイクリン系制癌剤アドリアマイシンとピラルビシンの作用特異性とそれらの細胞内Translocatorとの関係

○清宮 健一、Guanxun Tian、松尾 三郎、暮部 勝

大阪府立大学・獣医・毒性

演者らは、マウスリンパ性白血病細胞L1210の細胞質中に制癌剤アドリアマイシン（ADM）と特異的に結合し、核内に移行するためのTranslocatorが存在することを示唆してきた。また、ADMの有効性として核におけるDNA Intercalationと、毒性としてミトコンドリアや小胞体におけるラジカル産生とに、作用が分離されることを示唆してきた。そこで、今回は心毒性が弱く、有効性が強いと報告されているアントラサイクリン系制癌剤ピラルビシン（THP）およびADMの核への作用特異性にそれらの核へのTranslocatorがどのように関与するかを解析することにした。L1210細胞DNAへの ^3H thymidine取り込みを指標としたDNA合成阻害作用は、THPでADMよりも約5倍高く発現した。L1210細胞へのTHPの取り込みは、ADMよりも約5～6倍高く認められた。両薬剤とも大部分が核に分布し、その分布の割合は、THPの方がADMよりも高かったが、L1210細胞から単離した核における取り込みおよびDNA celluloseへの結合能は、両薬剤間で著差はなかった。L1210細胞から調製したcytosol画分の存在下でのADMおよびTHPの単離核への取り込み様式は、単純拡散コンポーネントとcarrier輸送コンポーネントの2つからなり、carrier輸送コンポーネントは、ADMよりもTHPの方が高かった。 ^{14}C ADMとL1210細胞の細胞質から調製した結合画分との結合は、THPによって競合的に抑制され、THPの結合定数はADMのそれよりも約5倍高かった。以上の結果から、L1210細胞の細胞質中にはADMおよびTHPに対して特異的に結合し、核へ移行させるためのTranslocatorの存在が示唆される。また、これら制癌剤のTranslocatorへの結合親和性が制癌剤の核内移行に重要な要因となり、核DNAへの作用特異性を決定すると考えられる。

各種抗癌剤併用投与によるマウス肺毒性の検討

○吉田貢由 高田早苗 加藤道幸 野村護 小野寺威

第一製薬株式会社 開発研究所 安全性研究センター

ある種の抗癌剤は、臨床で肺炎、肺線維症等の副作用を起こすことが知られている。また、これらの抗癌剤は他の抗癌剤と併用されることが多く、薬物間の相互作用による肺毒性の増強が懸念される。

そこで、bleomycin (BLM) および cyclophosphamide (CPA) の肺毒性に対するイリノテカン (CPT-11)、シスプラチン (CDDP) および 5-FU の併用投与の影響をマウスを用いて検討した。

7 週齢の雌性 BALB/C 系マウスに、各抗癌剤を 1 回/週の頻度で 6 週間腹腔内または静脈内投与した。その 1 週間後に動物を放血屠殺し、体重、肺重量および肺線維化の指標として肺 hydroxyproline (HP) 量を測定した。

その結果、BLM 20 mg/kg 単独投与は体重増加抑制を示したが、肺重量および HP 量には影響しなかった。しかし、BLM + CDDP 5 mg/kg 群では HP 量が軽度増加した。なお、BLM + CPT-11 20 mg/kg および BLM + CPT-11 + CDDP 群には明らかな変化はみられなかった。また、CPA 200 mg/kg 単独投与により肺重量および HP 量が増加した。しかしこれらの増加に対して、CPT-11、CDDP、5-FU 20 mg/kg、CPT-11 + CDDP または CPT-11 + 5-FU の併用は明らかな影響を示さなかった。以上の結果から、BLM と CDDP の併用により肺線維症が発現しやすくなるが、他の抗癌剤の併用では肺毒性を増強しないことが示された。

抗酸化剤1-0-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone (HTHQ)のヘテロサイクリックアミン誘発変異原性およびラット肝前癌病変に対する抑制効果

玉野静光¹、田中 光¹、木村重紀¹、広瀬雅雄¹
三木徳太郎²、白井智之¹、佐藤利夫³

¹ 名市大・医・1病理、² 日本ハイボックス、³ 徳島文理大・薬

我々は抗酸化剤1-0-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone (HTHQ)がヘテロサイクリックアミン(HCA)であるGlu-P-1のラット肝発癌を抑制することを既に報告した。今回、Glu-P-1およびMeIQxで誘発された変異原性および肝前癌病変(GST-P陽性巣)の発生に対するHTHQの抑制効果の用量相関性について報告する。

【方法】変異原性試験は、Salmonella TA98株を用いたAmes試験で行い、Glu-P-1 (20 μ g/plate)またはMeIQx (10 μ g/plate)とHTHQ (20~2.5 μ g/plate)をS-9 mix存在下で同時に処理し、復帰変異コロニー数をHCA単独と比較した。In vivo肝中期発癌性試験では、雄F344ラットにDEN (200 mg/kg bw, 1回腹腔内)投与2週後からGlu-P-1 (0.02%)もしくはMeIQx (0.03%)とHTHQ (1.0~0.0625%)を単独あるいは複合で6週間混餌投与し、3週後に部分肝切除を施行した。8週で屠殺し、肝のGST-P免疫組織化学染色を行い、陽性細胞巣を定量的に解析した。【結果】復帰変異コロニー数はHTHQ 2.5 μ g/plate以上で68~100% (対Glu-P-1)、59~100% (対MeIQx)の抑制率を示した。GST-P陽性巣は、0.125%以上の投与で数および面積はそれぞれ58~83%、77~94% (対Glu-P-1)と31~81%、39~83% (対MeIQx)の抑制率を示し、いずれも用量依存性に抑制された。【結論】HTHQの抗変異原性の結果と中期発癌性試験による抑制作用には強い相関が見られた。また、HTHQはGlu-P-1およびMeIQxによる変異原性および肝前癌病変の発生をいずれも用量依存性に抑制したことから、HCAに対する化学予防剤としての有効性が示された。

ペルオキシゾーム誘導剤によるラット肝小増殖巣に対する
オルニチン脱炭酸酵素の免疫組織化学的検討

西川秋佳¹、古川文夫¹、池崎信一郎¹、今沢孝喜¹、
吉田敏則²、原田孝則²、真板敬三²、高橋道人¹

¹国立衛試・病理、²残農研・毒性

【目的】多くのペルオキシゾーム誘導剤がげっ歯類に対する肝発癌性を示すことが知られている。しかし、他の肝発癌物質の場合と異なり、これらの化合物によって誘発されるラットの肝細胞小増殖巣は、肝酵素偏倚巣の一般的指標である胎盤型グルタチオンS-トランスフェラーゼや γ -グルタミルトランスペプチダーゼが陰性であり、前癌病変としての酵素学的指標が見出されていない。一方、オルニチン脱炭酸酵素(ODC)の誘導は、大腸や膵胃の発癌プロモーション活性をよく反映する指標と考えられている。今回、種々のペルオキシゾーム誘導剤をラットに投与し、誘発された肝の増殖性病変についてODCの免疫組織化学的検討を行なった。【材料と方法】雄のF344ラットにdiethylnitrosamineを腹腔内投与後、2週目より0.3%のclofibrate、0.3%のdi-(2-ethylhexyl)phthalate、0.45%のdehydroepiandrosteroneおよび対照として0.05%のDDTを実験終了まで混餌投与した。また、3週の時点で2/3の部分肝切除を施行した。8週、20週ないし32週の時点で剖検し、肝をメタカーン固定後、パラフィン切片をH-E染色により病理組織学的に検索するとともに、抗ODC抗体を用いて免疫組織化学的に検討した。【結果と考察】病理組織学的に、肝細胞小増殖性病変は好酸性/明細胞型、好塩基性型および両染性型に分類された。ODCはDDT投与群およびペルオキシゾーム誘導剤投与群ともに、好酸性/明細胞型或は両染性型の増殖巣に強く染色される傾向がみられ、好塩基性型は殆どが陰性であった。また、腫瘍性結節では染色性が低い傾向が認められた。以上より、ペルオキシゾーム誘導剤で誘発されるラットの肝細胞小増殖巣の一部がODCの免疫組織化学により認識できる可能性が示唆された。

ペルオキシソーム増殖薬誘発肝癌における核内タンパク質のリン酸化

田村 浩, 雲林 弘成, 渡辺 隆史, 須賀 哲弥

東京薬大

【目的】 ペルオキシソーム増殖薬は非遺伝子毒性発肝癌性物質として知られている化合物である。しかしその発肝癌機構はいまだ十分に解明されていない。近年になり癌化、細胞増殖など様々な現象に核内タンパク質のリン酸化が重要な役割を果たしていることが明らかにされている。このことから我々はペルオキシソーム増殖薬による発癌機構解明を目的として、本薬物誘発肝癌における核内タンパク質リン酸化の変動について検討した。

【方法】 F-344雄性ラットに0.1% Wy-14,643を2~95週間、2% DEHPを95週間混餌自由摂食させ、その後肝臓から単離精製核を調製した。この核を用いて*in vitro*でリン酸化反応を行い、SDS-PAGE、オートラジオグラフィーによりリン酸化タンパク質を検出した。

【結果・考察】 Wy-14,643投与(80-95週間)によって誘発された肝癌において13 kDaのタンパク質(P13)にアルカリ耐性のリン酸化の上昇が認められた。P13のリン酸化は肝癌周辺組織に比べ特に肝癌組織で著しく上昇しており、このリン酸化の上昇はWy-14,643の投与期間に依存していた。さらに、P13のリン酸化はDEHPによって誘発された肝癌においても顕著な上昇が認められた。以上のことから、P13のリン酸化の上昇はペルオキシソーム増殖薬によって誘発される肝癌あるいは肝前癌病変の成長に関係があると考えられ、そのリン酸化アミノ酸残基はチロシンであると推定される。

アフラトキシンB₁の肝発がん性におけるマイクロシスチン及びフモニシンの相互作用

関島 勝^{1, 2}, 永田諭志⁴, Chen Gang³, Yu Shun-Zhang³,
上野芳夫^{2, 4}

¹三菱化学BCL, ²東京理科大生命研, ³上海医科大, ⁴東京理科大薬学

[目的] 肝発がんの危険因子のアフラトキシンB₁(AFB₁)の穀物汚染が認められる地域において、肝発がん促進性を有することが知られている植物病原真菌 *Fusarium moniliforme*由来のフモニシン(FBs)や、淡水に繁茂する*Microcystis*由来のマイクロシスチン(MCLR)が、高いレベルで検出されることを既に報告した。また疫学的調査からこれら中国海門県などの地域が肝がんの多発地帯であることが判明している。そこで、これらの毒素類の複合汚染がもたらす障害発生を究明する目的で、ラット肝中期発がん性試験を実施したので報告する。

[方法] 6週令のF344ラット(雄)に、ジエチルニトロソアミン(DEN)を200mg/kgにて1回腹腔内投与し、更に2週間後にAFB₁(0.5mg/kg)を1回腹腔内投与した。2週目より MCLRを1または10 μg/kg、週2回で6週間腹腔内投与した。FBs群はFB₁として10または100ppm含有する混餌飼料を6週間自由摂取させた。8週目に全動物を屠殺し、肝臓の発がん早期から出現するGST-Pの酵素変異巢の数及び面積を免疫組織化学的に解析した。なお、実験開始3週目に全ての動物について2/3肝部分切除を行った。

[結果及び考察] 1) MCLR投与による相互作用。GST-P陽性巢(数/面積)は、DENのみを投与した対照群(2.46/0.39)に対して、AFB₁単独(8.34/1.69)もしくはMCLRとAFB₁の両方を投与した各群(MCLR1 μg/kg;10.72/2.26, 10 μg/kg;9.16/1.96)において有意な増加が認められた。またMCLR(1 μg/kg)とAFB₁とを投与した場合に最も高く、それぞれを単独に投与した場合の単純加算値より高い値を示した。肝組織連続切片についてH&E染色による病理学的解析の結果、MCLRとAFB₁の両方を投与した各群で特に好酸性に富む領域の有意な増加が認められたことから、MCLRとAFB₁には肝発がん性において、正の相互作用が有るものと推測された。なお各群の動物体重及び肝重量の有意な変動は認められなかった。2) FBs投与による相互作用。FB₁混餌飼料を与えた場合、体重の有意な変動がないの対し、肝及び腎重量の有意な減少が認められた。現在、GST-P陽性巢およびH&E染色像の解析を進めており、これら毒素類の環境汚染の実態と肝発がん性を中心とした複合汚染による障害発生について考察を加える予定である。

ラット肝中期発癌性試験法による sodium phenobarbital の肝発癌プロモーション作用と P-450 誘導の用量相関性

萩原昭裕¹、松田 勉²、北野光昭²、河部真弓¹、
佐野真士¹、船江良彦³、福島昭治²、白井智之¹

¹名市大・医・1病理、大阪市大・医・²1病理、³化学

【目的】 sodium phenobarbital (PB) のラット肝発癌プロモーション作用発現の閾値を、肝中期発癌性試験法を用いて検索すると共に肝組織中における P-450 誘導との関連性を検討した。

【方法】 6週齢の F344系雄ラットを用い、実験開始時に diethylnitrosamine (DEN) を 200mg/kg 体重の濃度にて 1 回腹腔内投与し、2 週経過後より PB を 0, 7.5, 15, 30, 60, 125, 250 および 500 ppm (実験 1) または 0, 1, 2, 4, 7.5, 15, 500 ppm (実験 2) の濃度で 6 週間混餌投与した。全群 3 週経過後に 2/3 肝部分切除を行い、8 週経過後に屠殺剖検した。各群の肝に発生した胎盤型 glutathione S-transferase (GST-P) 陽性細胞巢の単位面積あたりの個数および面積を、画像処理装置を用いて測定し、対照群と比較検討した。また、ラット肝における P-450 分子種の誘導を免疫組織化学的および生化学的に検索した。

【結果】 肝重量では 60 ppm 以上の用量で有意な増加が示された。肝における GST-P 陽性細胞巢の定量的解析値では、125 ppm 以上の群で有意な増加を、60 ppm 群で増加傾向を認めた。肝組織中における P-450 2B1, 2C6, 3A2 蛋白発現量では 60 ppm 以上の用量で有意な増加を認めた。一方、PB の低用量投与実験 (実験 2) において GST-P 陽性細胞巢の定量値は、7.5 ppm 以下で減少傾向を示し、特に 1 および 2 ppm 群で有意な減少を観察した。また、PB の 15 ppm 以下の用量では P-450 3A2 蛋白発現量の有意な減少が認められた。

【結論】 PB の肝発癌プロモーション作用は、60 ppm 以上で用量相関性に発現し、P-450 の誘導と相関していた。しかし、低用量、特に 1 および 2 ppm では、逆に肝発癌抑制作用を示すことが明らかとなった。

強変異原Arylmethyl Sulfateの活性発現における塩素イオンの関与

○奥田晴宏、小倉健一郎、渡部 烈

東京薬科大学・薬学部・第二衛生化学教室

【目的】 癌原性arylmethanol類はラット肝においてsulfotransferaseによってarylmethyl sulfate (AS)へと代謝活性化され、DNAと付加体を形成することを昨年の本学会で報告した。最近Glatt (独)らは、ASの活性はASと塩素イオンとの反応により生成するchloromethyl誘導体に起因すると主張している。本研究ではASの活性発現にさらに塩素イオンが関与するか否かを明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】 1)150 mM塩素イオンの添加は2種のAS、5-hydroxymethylchrysene sulfate (5-HCRS)ならびに7-hydroxymethyl-12-methylbenz[a]anthracene sulfate (7-HMBAS)の*S. typhimurium* TA98に対する直接変異原性を2倍に増大したが、両者の仔牛胸腺DNAに対する修飾には殆ど影響しなかった。2)上記AS類は、150 mM塩素イオンの添加により反応性に富む5-chloromethylchrysene (5-CCR)および7-chloromethyl-12-methylbenz[a]anthracene (7-CMBA)をそれぞれ非酵素的に生成した。またその生成は塩素イオンの濃度に依存的であり、5mM塩素イオン共存下では認められなかった。3) 5-CCRは5-HCRSの1500倍の極めて強い直接変異原性を示したが、7-CMBAの変異原性はその不安定性の故にむしろ7-HMBASより低かった。

【考察・結語】 高濃度の塩素イオンの添加によりAS類はさらに一部がchloromethyl体に変換され、変異原性を指標とするかぎり活性が増大することが明らかとなった。しかし、哺乳動物では、その塩素イオン濃度は細胞質内では細胞外濃度に比べて極めて低く(約5 mM)、塩素イオン関与の活性化はin vivoでは起こりえないと推定される。

キノロン系合成抗菌剤のマウスリンフォーマ試験における
誘発コロニーの解析

○中山 志保、島田 弘康、野村 護

第一製薬株式会社 開発研究所安全性研究センター

キノロン系合成抗菌剤には、抗菌作用が強くなるに従い *in vitro* 系での染色体異常誘発作用や DNA 損傷作用のあるものが報告されているが、遺伝子突然変異誘発に関する報告は少ない。マウスリンフォーマ試験は ICH 遺伝毒性のコアバッテリーにおける重要な課題として現在取り上げられているが、本試験法は、第 11 染色体上に Thymidine kinase 遺伝子座をヘテロに持ち (tk+/-)、遺伝子突然変異および染色体異常が同時に検出できる試験系として注目されている。今回われわれは、levofloxacin (LVFX) について本試験法により検討を行った。その結果、用量に依存して突然変異コロニーが増加したが、その多くは染色体異常に繋がると考えられている遺伝子欠失型の small colony であった。この small colony について Southern blotting による解析を行った結果、全例に tk+/- 遺伝子座の欠損が認められた。LVFX は、通常の菌株セットを用いた復帰突然変異試験では陰性であり、また、チャイニーズ・ハムスター由来 CHO-K1 細胞の HGPRT 遺伝子座を指標とした遺伝子突然変異の検出系でも陰性の成績が得られた。一方、CHL 細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験では用量に依存した染色体異常誘発作用が認められた。上記の検討結果より、今回のマウスリンフォーマ試験における突然変異コロニーの増加は、DNA 塩基を修飾するような点突然変異によるものではなく、TK 遺伝子座を含む比較的大きな欠失による遺伝的損傷によるものであることが明らかになった。

天然化学物質ケルセチンおよびフラボノイドの
リスクアセスメント

曾根 秀子¹、青木 康展²、遠山 千春²、米元 純三¹

国立環境研・地域環境研究グループ化学物質健康リスク評価
研究チーム¹、環境健康部²

フラボノイドは野菜、果物、生薬及びワインに広く分布している天然化学物質である。フラボノイド化合物のうち、10種類以上がAmes試験で陽性となることが知られているが、そのうちケルセチンは最も強い変異原性を示す。従って、ヒトは、これらフラボノイドを常に摂取しており、ケルセチンの摂取量は、欧米人の場合、食物中含有量から25mg/day（体重60 kgに換算すると、0.4 mg/kg体重/day）と報告されている。今回、毒性試験の文献情報からケルセチンおよびフラボノイドの発がんおよび非発がんに対するリスクの評価を試みた。

National Toxicology Program (NTP) Technical Report (TR409)において、ケルセチンを1,000、10,000、40,000 ppmの用量でF344/Nラットに投与した癌原性試験の結果が報告されている。雄のラットでは、10,000 ppm（平均摂取量548 mg/kg体重/day）で、腎尿管の過形成と、40,000 ppm（平均摂取量2,262 mg/kg体重/day）で腎の良性腫瘍の増加が認められている。従って、NOAELは10,000 ppm以下と判断した。NOAELに1,000 ppm（平均摂取量52 mg/kg体重/day）を用いた場合、Reference dose (RfD)を200とするとADI (mg/kg体重/day)は $52/200 = 0.25$ となる。人の摂取量（0.4 mg/kg体重/day）はこの値より大きい値となるので腎臓傷害に対するリスクが発生することになる。しかし、Benchmark doseを用いた場合のADIは人の摂取量より大きくなることが予測される。NOAEL及びRfDの設定の仕方によってADIは変化するのでこの点について議論したい。また、フラボノイドmixtureでのADIの外挿についても考察する。

ハムスターBOP誘発膵病変における血液型 A物質の発現

古川文夫、西川秋佳、池崎信一郎、高橋道人

国立衛生試験所 病理部

糖蛋白質は糖鎖とペプチド鎖の結合様式によって、ムチン型と血液型に分類され、後者にはA型糖鎖、B型糖鎖、H型糖鎖が知られている。AおよびB型糖鎖はH型糖鎖から合成され、H型糖鎖はI型糖鎖あるいはII型糖鎖といわれる前駆物質から合成される。これらの糖鎖構造は癌化に伴い変化する可能性があり、特にハムスターの膵腫瘍においてA物質は腫瘍マーカーとして有用であるとの報告がある。ハムスターに N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP)を投与すると、膵の腺癌および異形成病変と、その他に膵腺管の過形成、末梢膵管の増生、膵内肝細胞などが発生する。今回、これらの病変における血液型糖鎖A物質の発現を検討した。【実験材料および方法】5週齢の雌シリアンゴールデンハムスターを用い 10mg/kg のBOPを生理食塩水に溶解し、週1回、合計5回、背部皮下に投与した。投与終了後、4~24週まで4週毎に屠殺・解剖し、10%中性緩衝ホルマリンにて固定後、常法に従ってパラフィン包埋、薄切切片を作製、H-E染色を行うとともに、免疫組織化学的にA物質を染色し病理組織学的に検討した。【結果および考察】膵腺癌および異形成病変はBOP投与後8週目以降に認められた。A物質は正常膵管で陰性を示し、異形成病変で陽性、腺癌では弱陽性を示した。膵管の過形成や膵内肝細胞は陽性、末梢膵管の増生は陰性を示した。A物質は膵管上皮細胞の異型性が認められる初期の増殖性病変に対して陽性を示し、悪性度の指標として利用できる可能性が示唆された。

HL60細胞株におけるT-2 toxinによる細胞内カルシウムイオン濃度の 上昇とアポトーシス誘導

○吉野 直人¹⁾、川村 理¹⁾、滝沢 万里³⁾、瀬戸 加大⁴⁾、田代
文夫⁵⁾、本多 三男²⁾、上野 芳夫¹⁾

¹⁾東京理科大学薬学部、²⁾国立予防衛生研究所エイズ研究センター、³⁾国立予
防衛生研究所、⁴⁾愛知がんセンター化学療法部、⁵⁾東京理科大学基礎工学部

第21回本学会（札幌、1994年6月）で、我々は諸種の有毒微生物代謝産物がヒト前骨髄性白血病細胞HL-60に対して染色体DNAの断片化を特徴とするアポトーシスを誘導することを報告した。今回、それら有毒微生物代謝産物のうち、トリコテセン系細胞毒であるT-2 toxin(T-2)によるアポトーシス誘導の機構を細胞分子学的に検討した。

フローサイトメーターで解析したところ、T-2の濃度が5ng/ml以上、添加後2時間で染色体DNAの断片化が再確認された。この染色体DNAの断片化を指標とするアポトーシス率は、T-2の濃度依存的に上昇した。このとき、アポトーシスはG0/G1期、S期、G2/M期いずれからも誘導され、細胞周期には関連しないことが示唆された。しかし、トリパンブルー色素排除法による生細胞数はアポトーシス誘導が観察される時間でも増加していた。

アポトーシス関連酵素にはカルシウム依存型のものが多く、細胞内カルシウム濃度を蛍光色素Fluo-3を使用して共焦点レーザー顕微鏡により測定したところ、細胞内カルシウム濃度がT-2添加後4-8分後に約30秒ほど一過性に上昇する細胞と、全く変化しない細胞が存在することが観察された。細胞内カルシウムキレート剤であるBAPTA-AMで処理した細胞では、アポトーシスが観察されなかったことから、T-2によるアポトーシス誘導の機構には細胞内のカルシウム濃度の上昇が関与していることが判明した。尚、細胞内カルシウム濃度を調節し、アポトーシスに対して抑制的に働く蛋白質であるbcl-2の発現量を測定したところ、T-2存在下および非存在下でもその発現量の経時的変化には差は見られなかった。

今後、PKC阻害剤、カルモジュリン拮抗剤等の試薬を用いてT-2による細胞内でのカルシウムの動員の機序を解析し、またT-2の蛋白質合成阻害作用とアポトーシスとの関連の有無についても検討し報告する予定である。

硫酸化多糖体の骨代謝に対する影響

○上杉康夫、東條宏子、中村美穂、梶村哲世、野村護、高山敏、小野寺威

第一製薬株式会社・開発研究所・安全性研究センター

DS-4152は血管新生抑制活性を示す硫酸化多糖体で、カポジ肉腫の治療薬として米国で開発中である。DS-4152は毒性試験で骨粗鬆症様の変化が認められている。またヘパリン等の硫酸化多糖体は実験的にも臨床的にも長期間投与により骨量減少を引き起こすことが知られている。しかし、これらの薬剤の生体内での骨代謝に対する影響の詳細は明らかではない。今回、硫酸化多糖体としてDS-4152(DS)、ヘパリン(HEP)、デキストラン硫酸(DX)を用いて6週齢のCrlj/CD (SD)系雄ラットの骨代謝に対する影響を検討した。

各硫酸化多糖体を単回あるいは14日間静脈内に反復投与し骨および血中の骨代謝パラメータを測定した。反復投与ではいずれの薬剤でも骨強度、骨重量、骨塩量の低下を引き起こした。DSおよびHEPでは血中骨型アルカリフォスファターゼ(b-ALP)の低下、血中酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ(TRAP)および血中カルシウム量(Ca)の上昇が認められ、骨芽細胞活性抑制と破骨細胞活性化により骨病変が引き起こされたと考えられた。しかしDXでは破骨細胞活性化はみられたが骨芽細胞活性抑制は認められなかった。単回投与ではHEPでは投与1時間後に、DSおよびDXでは投与24時間後にCaの上昇が認められ、薬剤により反応に差がみられた。

以上より、いずれの硫酸化多糖体も反復投与により骨粗鬆症様変化を引き起こすことが明らかになった。ヘパリンおよびDS-4152では骨芽細胞活性の抑制および破骨細胞の活性化が認められたが、デキストラン硫酸では骨芽細胞に対する影響は認められなかった。このことより、硫酸化多糖体により骨に対する作用メカニズムは異なることが考えられた。

エンドセリン受容体拮抗剤の3T3-E1培養骨芽細胞に及ぼす効果

○澤田和彦、鈴木弘美、堀井郁夫

日本ロシュ(株)研究所・毒性病理

近年、エンドセリン関連薬剤が、骨のリモデリングや頭蓋顔面骨の発生に関与する骨芽細胞に対して何らかの影響を及ぼす可能性が示され、その毒作用の把握は、エンドセリン関連薬剤を開発する上で重要である。エンドセリン(ET)-1は、21個のアミノ酸残基からなる血管作動性ペプチドである。ETは、3つのイソペプチド(ET-1, -2, -3)からなる1つの遺伝子群を構成し、二型の受容体(ET_A受容体、ET_B受容体)が存在する。一般的に、ET受容体は血管内皮細胞をはじめ、様々な組織に存在し、組織特異的なETの作用発現に働いているとされているが、最近では、骨芽細胞にも存在し、ET-1が培養骨芽細胞の細胞増殖や、アルカリホスファターゼ活性等の細胞の機能を制御していることが知られてきている。

本研究は、市販のET受容体拮抗剤([Dpr¹, Aps¹⁵]-Endothelin-1, Peninsula Lab. Inc.)を用いて、拮抗剤のマウス由来3T3-E1培養骨芽細胞の増殖、及びアルカリホスファターゼ活性やI型コラーゲン生産性など、細胞機能に及ぼす直接効果を調べ、拮抗剤が骨組織に対して毒性効果を示す可能性を検討した結果、拮抗剤は、培養骨芽細胞の増殖に対して顕著な抑制効果を示すが、その細胞機能には影響を及ぼさない等の知見を得た。また、拮抗剤とET-1を同時添加したときの効果(競合作用の有無)、拮抗剤処理による細胞周期の変化等についても報告する。

斑状歯形成におけるフッ素の毒性機序：分泌期エナメル芽細胞での細胞内輸送阻害におけるG蛋白の関与

○松尾三郎、清宮健一、暮部勝

大阪府立大学・獣医・毒性

フッ素に汚染した飲水の摂取により生じる斑状歯は、実験的にもラットで形成され石灰化不全のエナメル質の形成とともに、分泌期エナメル芽細胞での細胞内輸送の乱れを示す。一方、フッ素がAl₃₊と共存することにより、三量体G蛋白の活性化を調節することと、このG蛋白が細胞内輸送に関与していることが近年示唆され、注目を集めている。本研究では、斑状歯形成におけるフッ素の毒性発現機序を明らかにする一端として、エナメル芽細胞の細胞内小器官におけるG蛋白の分布をADPリポシル化、immunoblot及びimmunocytochemistryによって検討した。〈材料と方法〉7-8週齢のWistar系雄性ラットを用い、NaF(1.25%生食溶液)を20 mg/kgの割合で1日2回4日間皮下投与又は、NaF(12.62uM)を4週間飲水により投与した後に、切歯歯胚を採取し実験に供した。百日咳(IAP)毒素を用いたADPリポシル化は、エナメル芽細胞層のホモジェネートのショ糖勾配を用いた遠心分離によって調整した膜面分を用いて行った。同様に調整した膜面分を用いたimmunoblotは一次抗体にG_{i-3}及びG_oを認識する抗体を用いて行った。また、この抗体を用いてpost embedding法によりimmunocytochemistryを行った。〈結果〉ADPリポシル化では、ゴルジ膜面分だけでなくrER膜面分においても、IAP毒素に感受性を示すG蛋白の存在が示され、この41kDのX-Rayフィルム上でのbandはNaF投与群でより弱く認められる傾向にあった。immunoblotでは対照群とNaF投与群の両者でほぼ同じ様な所見が得られ、ゴルジ膜面分では41kDの部位に明瞭なbandが認められたが、rER膜面分では認められなかった。一方、immunocytochemistryでも対照群と投与群とにほとんど差はなかったが、immunoblotと多少異なりゴルジ装置とrERの両者においてG_{i-3}又はG_oの存在を示す金粒子が認められた。immunoblotとimmunocytochemistryの所見が多少異なるものの、NaF投与による細胞内輸送阻害にはこれらの細胞内小器官に分布するIAPに感受性のあるG蛋白の関与が考えられ、さらにその機構の解析を重ねている。

一般口演(D会場)

9:00~12:00 D-01~D-15
13:00~16:36 D-16~D-33

Tolueneの妊娠ラット吸入暴露による生殖発生毒性

I. 胎児の器官形成期暴露試験

- 小野 敦、関田清司、広瀬明彦、小川幸男、齊藤 実
内藤克司、金子豊蔵、降矢 強、松本清司*、田中 悟
黒川雄二

国立衛試・毒性部、*信州大・医・動物実験施設

[目的]薬物乱用は、近年我が国においても大きな社会問題となっている。特に有機溶剤は入手が比較的容易なため若年層を中心に乱用者が後を断たず、その次世代に与える影響についての検討が必要である。今回、我々はシンナーの主成分であり乱用者の特に多いトルエンについて、妊娠ラットに胎児の器官形成期反復吸入暴露を行い、その母動物、胎児及び新生児に与える影響について検討した。

[方法]10週齢のSlc:SD妊娠ラット(20匹/群)の妊娠7~17日にトルエンを縦層流角錐型チャンバーを用いて0(対照群)、600及び2000ppm、6時間/日全身暴露した。親動物については体重・摂餌量を測定し、各群13匹について妊娠20日に帝王切開して剖検し、胎児について性別判定、体重測定、外形検査及び骨格検査を行った。残りの親動物は、自然分娩させ出生児の身体的発達の観察及び行動機能検査を行い、分娩後22日に剖検した。新生児は離乳時及び8週齢時に剖検した。また剖検時には、血液形態学・血清生化学的検査、骨髄検査及び臓器重量測定をあわせて行った。

[結果及び考察]親動物の体重及び摂餌量は2000ppm群で暴露期間中有意に抑制及び減少した。しかし、暴露期間終了後は有意差は認められなかった。帝王切開による胎児の検査では、トルエン暴露群で死胚率及び高い死胚率を有する母動物数の増加傾向が軽度であるが認められ、胎児体重も低い傾向を示した。しかし、外形異常及び骨格異常を有する胎児は認められなかった。一方、出生児の検査ではトルエンの影響は認められなかった。以上により、高濃度のトルエン吸入による親動物への毒性及び胚胎児毒性発現が示唆された。

モノブチルスズ、ジブチルスズおよびトリブチルスズ
のラットにおける発生毒性の比較

江馬 真、黒坂麗子、天野博夫、小川義之

国立衛生試験所大阪支所 生物試験部

有機スズ化合物は農薬やプラスチック安定剤等として広く使われており、そのなかでもジブチルスズの催奇形性についてはよく知られている。dibutyltin dichloride (DBT)はラットにおいて母体毒性を示さない投与量でも催奇形性を示し、奇形発現の感受期は妊娠7-8日であることを我々はすでに報告した。ラットに投与されたトリブチルスズはジブチルスズおよびモノブチルスズに代謝されることが知られている。今回はmonobutyltin trichloride (MBT)およびtributyltin chloride (TBT)をDBTの胎児奇形発現の感受期に投与してDBTの発生毒性と比較した。Wistarラットの妊娠7-8日（精子発見日＝妊娠0日）にDBT 10または15 mg/kg, MBT 1000, 1500 または2000 mg/kg, TBT 40または80 mg/kgを経口投与し、妊娠20日にラットを殺して胎児への影響を調べた。DBT投与では、対照群に比べて有意の母体体重増加の抑制、胎児体重の低下、着床後の胚死亡率の上昇がみられた。また奇形胎児の発現頻度も著しく有意に増加し、外脳症、下顎裂、唇裂、舌癒合、頸腰椎骨異常、小無眼症等の奇形が多く観察された。MBT投与では1000 mg/kg投与群に母体体重増加の有意な抑制、1500 および2000 mg/kg投与群で妊娠ラット死亡率の有意の上昇がみられたが、着床後の胚死亡率および奇形胎児の発現頻度の有意の上昇は認められなかった。TBT投与では、40および80 mg/kg投与群において有意の母体体重増加の抑制および着床後胚死亡率の上昇が認められたが、奇形胎児発現頻度の上昇はみられなかった。これらの結果から、DBTのラットにおける発生毒性はMBTおよびTBTのそれとは異なり、DBTの催奇形性はDBT自体の作用によることが示唆された。

ラット培養胎児における解熱鎮痛剤による口唇裂発現
 についての一考察 <サリチル酸の場合>

秋田 正治、横山 篤

鎌倉女子大・家・栄養

アスピリンの主成分であるサリチル酸 (SA) は動物実験において著しい催奇形性を示した。特に多発したのは口唇・口蓋裂であった。しかし、口唇裂の発現様式に種々のタイプが認められた。我々はこの発現奇形の違いを解明するため、培養したラット胎児を用いてSAの直接作用を観察した。実験方法は胎齢11日のラット胎児を72時間回転培養した。SAの処理濃度は*in vivo*試験において催奇形性が認められた母獣の血液中濃度を参考にして300 ug/mlとした。実験結果は成長の指標である蛋白量でSAの影響が軽度に認められたが頂殿長には影響はなかった。しかし催奇形率は70%を示し、その内、口唇裂は47%であった。*in vivo*試験では両側性の口唇裂が5%発現したが*in vitro*試験では認められなかった。発現した口唇裂の内85%が右側偏側性で、15%が左側偏側性を示した。この偏りがラット培養胎児の発生段階の微妙な差によるものかどうかは不明である。一方、鼻突起周辺の血液循環や体循環(毛細血管の分枝の程度)はSA処理で差はなかった。また生理機能の指標である心拍動数も対照群との間に差は認められなかった。我々は現在、SAの処理は培養液中におこなっているのを、鼻突起に左右別にマイクロインジェクションして別々に調査できる方法に変えている。この実験の結果は予備データであるが、左側に100%の奇形を発現させる事ができた。これらの結果より、仮説の段階であるが、左右の鼻突起の形成過程に時間的なズレが生じたところにSAが作用したと考えられる。

Pyridoxineの雄性生殖能に及ぼす影響

堤俊輔、田中俊光、後藤鋼星、赤池雅司

ヘキストジャパン（株）医薬研究開発本部

【目的】Pyridoxine(PN)を大量投与すると、精子細胞数の減少、精巣及び精巣上体重量の低値、精細管内の精細胞の変性等がみられ、形態学的な所見からPNによる精巣毒性は、セルトリ細胞に障害を与えることにより精子細胞の遊走遅延が一因と考えられている。今回、PN用いて投与期間の妥当性及び雄性受胎能の検査法について検討した。

【方法】250及び500mg/kgのPNをラットに2、4、あるいは6週間腹腔内投与後、無処置雌と交配した。交尾率、受胎率、生殖臓器重量、血液生化学検査、Sperm head count、精巣上体尾部の精子の運動性及び平均運動速度、電気泳動による精巣内蛋白質の分析、生殖臓器の組織学的検査を実施した。4及び6週間投与した群の半数例は4週間の回復を設け、交配以外の全ての検査を同様に実施した。

【結果及び考察】いずれの薬物投与群も投与2週目以降から体重増加抑制がみられた。2週間投与両群でのセルトリ細胞の空砲が極くわずかにみられたのみであった。4及び6週間投与では、両薬物投与群で、精子運動性の低値及び精上皮細胞の変性等の病理組織学的変化がみられた。更に、500mg/kg投与群で、受胎率の低値、精子平均速度の低値、精巣及び精巣上体重量の低値、精巣内蛋白質の異常がみられた。回復群では、250mg/kg投与群では回復していたが、500mg/kg投与群では回復せず、むしろ悪化していた。

以上のことから、雄性生殖能の評価に必要な投与期間は4週間で十分であり、精巣毒性を評価する際病理組織学的検査は最も軽度な変化を検出した。

Nefiracetam投与によるラット雄性生殖毒性

○島田 信、坂口 ゆかり、原田 滋雄、柿畑 耕司、
野村 護、高山 敏

第一製薬（株）開発研究所安全性研究センター

雄性ラットにNefiracetamを4週間および9週間経口投与し、雄の生殖能力に関する種々の検査を行い、その成績を比較して4週間投与試験の妥当性を検討した。

【材料および方法】4週間投与試験では11週齢のSlc:SD系雄ラット45匹を使用した。また、9週間投与試験では6週齢のSlc:SD系雄ラット45匹を使用した。両試験とも、対照群、Nefiracetamの500mg/kgおよび1500mg/kg群の計3群を設け、1群15匹で実施した。検査項目として体重、交配検査および胎児検査を行い、雄の屠殺時に精巣、精巣上体および前立腺重量を測定した。また、精巣内精子数測定および精子運動性の検査を実施した。更に、生殖臓器の病理学的検査を併せて行った。

【結果および考察】Nefiracetamを4週間および9週間投与した結果、1500mg/kgで体重、精巣、精巣上体および前立腺重量、精巣内精子数および受胎率の減少が認められ、更に、9週間投与試験の500mg/kgで精巣上体および前立腺重量の減少が認められた。また、4週間投与試験の500mg/kgで精巣内精子数の減少が認められた。病理組織学的検査の結果、1500mg/kgで精細管の変性および精巣上体中の精子の消失が認められ、500mg/kgで精子の残留が確認された。以上の成績から、ICHガイドラインで示されている4週間の投与期間でも、Nefiracetamの雄性生殖毒性は十分評価できるものと考えられた。さらに、現在500mg/kg群で認められた変化の回復性について検討中である。

Estradiol benzoate を用いた雄性生殖能評価法に関する検討

○池川直、秦純子、中富一文、菅原茂樹、宇野洋、伊澤義弘

帝人株式会社 医薬開発研究所 安全性研究部

近年、薬物の雄性生殖能に対する影響を評価する上で、投与期間および指標の重要性が注目されている。そこで、精巣毒性を有することが知られている Estradiol benzoate (E2B) の 0.2, 2 および 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を Slc:SD 系雄ラットに 4 あるいは 9 週間皮下投与して、その影響を検討した。評価の指標として、体重、摂餌量、精巣、精巣上体、精囊、前立腺、副腎および下垂体の重量、精子形成ステージを考慮した精巣の病理組織学的検査成績、交配成績、精巣上体尾部中の精子の数および運動能を用いた。

その結果、投与期間が 4 週間の場合には、体重増加抑制、摂餌量の減少、前立腺および精囊の重量の低下、下垂体および副腎の重量の増加、ライディッヒ細胞の萎縮および Stage IX, X および XI における精子の停滞が 2 および 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で認められた。20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では、さらに精巣上体重量の低下、交尾率の低下、生殖細胞の壊死および脱落も認められた。0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群ではいずれの指標にも変化は認められなかった。投与期間が 9 週間の場合には、4 週間の場合にみられた変化に加えて、20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では精巣重量の減少、授胎率の低下傾向、精巣上体尾部中の精子の数および運動能の低下が認められた。

以上のように、E2B の雄性生殖能に対する薬物の影響を評価する上では、病理組織学的検査および副生殖腺の重量は検出感度が高かった。またこれらの指標を用いた場合には、投与期間が 4 週間であっても 9 週間の場合と同様な変化が認められた。

白金錯化合物 Compound C のラットにおける雄性生殖能への影響 - 4週間反復投与と9週間反復投与の比較 -

○津野達也、溝口啓二、田中直美、原洋明、五十嵐真一

中外製薬・安全性研究所

【目的】雄ラットの生殖能に対する薬物の影響を判断するために、白金錯化合物を用いて4週間投与と9週間投与について比較検討した。

【方法】白金錯化合物の1、3、10mg/kgを4週間、0.3、1、3mg/kgを9週間、それぞれ雄ラット(S1c:SD)に投与し、無処置の雌と交配させた。さらに、精巣中精子数の計数、精巣、精巣上体、精囊および前立腺の重量測定ならびに病理組織学的検査を実施した。雌は妊娠13日に帝王切開し、着床数、黄体数を計数し、胚の生死を観察した。

【結果】4週間反復投与では3、10mg/kg群で体重増加抑制、10mg/kg群で精巣上体、精囊、前立腺の重量低下および精巣重量の増加がみられ、精巣中精子数は有意に減少した。精巣の病理組織学的検査では、10mg/kg群において精細管の拡張、精母細胞と精子細胞の変性および空胞化、セルリ細胞の空胞化、精上皮細胞の壊死、巨細胞形成、精母細胞および精子細胞の核に空胞が観察された。また、10mg/kg群で着床数および着床率の減少がみられたが、すべての投薬群で交尾率、妊娠率および胚の死亡率に有意な差は認められなかった。

9週間反復投与では3mg/kg群で1例死亡し、有意な体重増加抑制が観察された。しかし、精巣の病理組織学的検査、精巣中精子数、生殖臓器重量、交尾および妊娠率、帝王切開所見には有意な差はみられなかった。

【結論】以上の結果から、9週間投与と比較して4週間投与でも十分に雄動物の生殖臓器に対する毒性影響を判定することが可能であり、また、病理組織学的検査、精巣中精子数、生殖臓器重量は交尾率および妊娠率と比較して感度のよい検査指標であることが示唆された。

ラットにおける生存精子の識別法

○加藤真之、木村均、林晴美、戸部公子、古橋忠和

(株)日本バイオリサーチセンター 羽島研究所

ICHガイドラインでは、「受胎能および着床までの初期胚発生に関する試験」において雄性生殖器の機能的影響を検索するため『精巣上体または精巣中の精子数と精子の生存率』の評価が推奨されている。しかし、生体染色（エオジン、エオジン・アニリンブルーなど）を用いた従来の方法ではラット精子の生存率算定は非常に困難である。また、全精子中の活動精子の割合（活動精子率）を生存率とする方法も行われているが、仮死精子が含まれるなど本来の生存率を表わしてはいない。そこで、生存精子の識別を行うことが出来れば正確な生存率の算定が可能になると考え、細胞内酵素活性を利用した方法について検討を行った。

精子が呼吸し、運動を行うために必要なエネルギー供給源の1つとして、細胞膜の主要構成成分であるリン脂質を基質とした内因性呼吸の存在が知られている。我々は、この脂質代謝により上昇したエステラーゼ活性を、生体膜透過性の蛍光色素（Calcein AM）で標識することにより生存精子の識別を行った。同時に、損傷した細胞膜にのみ透過性を有し、核酸と選択的に結合する蛍光色素（Ethidium Homodimer）を用いることにより、死滅精子の確認も併せて行った。

生存精子を指標として算出したラットの精巣上体尾部精子の生存率は、96.8%±3.65（Max.: 99.7%、Min.: 82.3%、n=45）であった。さらに、物理的に死滅させた精子と生存精子とを任意の割合で混合したサンプルを用いて生存率を算出したところ、理論値との間に良い相関が得られた。

CASA-System (HTM-IVOS) を用いた精子試験 I. α -chlorohydrin

川島邦夫、門馬純子、高木篤也、北嶋 聡、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

生殖毒性試験における精子検査で重要なエンドポイントと考えられている、精子運動性を客観的に評価する手段としてCASA-Systemが用いられている。今回は、HTM-IVOS (HAMILTON THORNE) を用いて α -chlorohydrin (α -CH) の精子運動性に及ぼす影響を検索した。

SD系SPF雄ラットに α -CHの1, 2および4mg/kgを10週齢時から投与を開始し、投与28日目に無処置発情前期雌と1体1で終夜同居させた。翌朝膣垢を採取して後尾の有無を調べ、膣垢中に精子が観察された日を妊娠0日とした。後尾確認後、雄について精巣および精巣上体重量を測定し、採取した精巣上体精子についてCASA-Systemの運動性指標を、培養開始時と240分後の2回調べた。後尾成立雌は妊娠15日に屠殺し妊娠の有無を確認した。

総移動速度は0分で1mg/kgから、240分で2mg/kgから有意な低下が認められた。基準点通過速度は0分の1および4mg/kgで、240分で2mg/kgから有意な低下が認められた。最短移動速度は0および240分とも2mg/kgから有意な低下が認められた。直進性は0および240分とも4mg/kgで有意な低下が認められたが、直進係数は0および240分とも各用量群に有意な変化は見られなかった。頭部の振幅は0分では各用量群に有意な変化は見られなかったが、240分では2mg/kgから有意な低下が見られた。頭部の振り回数は0分では各用量群に有意な変化は見られなかったが、240分では4mg/kgで有意な低下が見られた。運動率は0および240分とも2mg/kgから有意な低下が見られた。4mg/kg用量で交尾率が若干低下し、妊娠は成立しなかった。

以上の結果から、 α -CHを用いた場合、精子運動障害性に対するHTM-IVOS精子運動指標の感受性は運動率、総移動速度、最短移動速度、基準点移動速度、頭部の振幅、直進係数、頭部の振り回数、直進性の順であることを明らかにした。

Trimethylphosphate および Ornidazole 投与ラットでの
Flow cytometry による精子生存性および精子数の検討

加藤千明、深津信子、滝沢節子、堀井郁夫

日本ロシュ（株）研究所、毒性病理部

[目的] 我々は、これまで Flow cytometry (FC) による精子生存性および精子数に関する測定方法を開発検討してきた。今回、雄生殖能に影響を与えることが知られている 2 種類の薬物 (Trimethylphosphate: TMP および Ornidazole: ONZ) についてラットに投与し、得られた精子試料を用いて、FC 法による精子生存性および精子数測定について検討を行った。

[方法] 雄 SD-Slc ラット (14 週齢: 10 匹/群) に TMP 600mg/kg 5 日間または ONZ 200mg/kg 13 日間投与を行い、精巣上体尾部から得た精子について FC による精子生存性および数の測定を行うと共に、生殖器 (精巣および精巣上体) の病理組織学的検査および精子運動性 (目視) を検査し障害の程度を確認した。

[結果および考察] TMP 群では生殖器の病理組織学的検査で、精巣に精子細胞の著しい変性、および精巣上体に変性した精子形成細胞がみられ、精子運動性でも著大な低下が認められたが、FC による精子生存性 (対照群 77.1% および TMP 群 35.4%) および精子数 (対照群 $1.6 \times 10^6/\text{mg}$ および TMP 群 $0.8 \times 10^6/\text{mg}$) の検査でも明確な低下が認められた。一方、精子運動性のみに影響を与えるといわれる ONZ 群では、生殖器の病理組織学的検査に著変は認められず、精子運動性に軽度な影響が観察されたのみであるが、FC による精子生存性 (75.5%) および精子数 ($1.3 \times 10^6/\text{mg}$) に著変は認められなかった。以上の結果から、FC を用いた精子生存性および精子数についての分析は、雄生殖能に影響を与える薬物を投与した動物の精子試料においても、信頼性のある結果が得られると考えられた。

ラットにおける雄性生殖能評価法の検討-1

用手法による精子検査方法の検討

○吉崎 宏、北村紀子、平山千束、大島洋次郎、杉谷順康

武田薬品、薬剤安全性研究所

雄性生殖能への影響の検査として、ラットにおける精子検査が注目されている。今回、我々はラットでの精子検査(数及び運動性)方法について、Jcl:Wistar ラットの精巣上体尾部を用いて検討した。

精子の運動性については尾部より漏出させた精子を培養液中で拡散・浮遊させた液を、精子数については全精巣上体尾部を希釈液中で細切した精子浮遊液を用いた。

精子の運動性に関しては、①培養液、②牛血清アルブミン(BSA)添加濃度、③ pH、④標本調製後の経時変化について検討した結果、培養液については M-199 と M-199(Hanks' salt 加)では同等の運動性がみられたが、HBSS では調製後の時間経過とともに運動性が低下する傾向がみられた。また、BSA 添加濃度及び pH の影響はみられなかった。精子数に関しては、①希釈液、②測定用チャンバーについて検討した結果、希釈液による差はみられず、チャンバー内の精子の分散性はマクラー精子数測定盤が最も良好であった。これらの結果から、培養液としては pH 調製の容易性を考慮して、pH7.2、0.5% BSA 添加 M-199(Hanks' salt 加)が適切であると判断した。

適切であると判断した上述の方法を用いて、ホウ酸の 50、150 及び 500 mg/kg/日を 2 週間経口投与した雄ラットの精子検査(数及び運動性)を実施したところ、50 mg/kg 群では変化はみられなかったが、150 及び 500 mg/kg 群では精子数及び運動性の低下がみられ、Linder, R. E. らの報告(J. Toxicol. Environ. Health, 31, 133, 1990)と同様の結果を得た。従って、今回我々が用いた方法は、精子へ及ぼす薬物の影響を検出し得る一方法であると考えらる。

免疫組織学的染色によるラットの精巣毒性評価法の検討

岡田洋明、庄司陽子、脇川典子、白石 明、川音晴夫

明治製菓（株） 安全性研究所

現在、精巣毒性試験の評価法を確立することが安全性試験における大きな課題となっており、特にその病理学的評価については種々の方法が検討されている。一般的に、ステージ鑑別の方法としては精子形成サイクルの各ステージを把握し病変の発現するステージを鑑別することにより評価を行う。PAS染色で精子細胞のアクロソームの形や角度などを観察するのが最も正確であるが、これには膨大な時間がかかるため、略式としてH. E. 染色標本でステージを大まかにブロック分けして観察する方法が一般的である。しかし、この方法でも熟練が必要であり簡便とは言い難い。今回は Proliferating Cell Nuclear Antigen(PCNA)抗体を用いた免疫組織学的染色法による精巣病理の評価法を検討したので報告する。

PCNA抗原は、細胞周期のDNA複製期(S期)の細胞核に存在する。また精細管内の精祖細胞, 精母細胞, 円形精子細胞, 精子細胞及びセルトリ細胞の5種類は形による鑑別が容易なので、これらの細胞のS期を特異的に染色することによりステージ及びブロックの分類が容易になると考えた。本試験では、正常成熟ラットの精巣を用いH. E. 染色、PAS染色及びPCNA染色の結果を比較した。その結果、PCNA染色では精細管は4つの異なる染色パターンを示し、またそれらは、PAS染色によるステージ鑑別及びH. E. 染色で形態学的に分類した1～4の各ブロック分に対応し判別も容易であった。PCNA染色は市販の抗体で簡便に行える染色法であり、従ってその発色パターンによって行う精巣病理評価は熟練を必要とせず簡便な評価法と考えられた。

精巣の毒性病理学的研究；ジニトロベンゼン投与により誘発された精巣のアポトーシスについて

○守田 禎一， 吉田一晴， 河村泰仁， 児玉卓也

富山化学工業(株)総合研究所安全性研究所

【目的】1,3-dinitrobenzene(以下 DNB と示す)はラット精巣の精細管上皮に変性，壊死を引き起こすことが報告されているが、壊死とアポトーシスの関連についての報告は少ない。今回、我々は DNA fragmentation assay 法および *in situ* nick end labeling(TUNEL)法を用いて DNB 投与ラット精巣のアポトーシスについて検討した。【方法】SD 系雄性ラットに DNB(60mg/kg)を単回経口投与し、経時的に精巣を採取した。右側の精巣をブアン固定後にパラフィン切片を作製し、病理組織学的検査および TUNEL 解析を実施した。左側の精巣からは総 DNA を抽出しアガロース・ゲル電気泳動法によりその泳動パターンを調べた。【結果】病理組織学的検査では、投与6時間後にセルトリ細胞の変性および精母細胞に apoptotic body 様の死細胞の出現を認め、その出現数は経時的に増加した。TUNEL 解析では、多くの精母細胞の核に一致して TUNEL 陽性所見を認めた。電気泳動解析では、投与24時間後の精巣において、典型的な階段状の泳動パターンがみられ、ゲノム DNA のヌクレオソーム単位での断片化を認めた。【考察】以上の結果より、DNB 投与24時間で精母細胞にアポトーシスが誘発されたと考えられる。本研究の結果より、DNB 投与による精巣障害の初期段階では精母細胞にアポトーシスが生じることが示唆された。

雄ラットの形態分化観察に関する検討

－ 陰茎龟头包皮分離について －

○藤淳一郎、河谷善則、熊田幸浩、鈴木祥太、大島洋次郎

武田薬品、医薬開発本部、薬剤安全性研究所

ラットを用いた生殖毒性試験では、雄ラットの形態分化の指標として従来精巣下降の観察が行われてきた。しかし、ICH 3極調和ガイドラインにおいて陰茎龟头と包皮との分離が、testosteroneの上昇に伴った変化として推奨されている。本実験では、LH-RH アゴニストの徐放性製剤であるリュープリン[®]の 0.24 及び 2.4 mg/kg を生後 22 日の雄ラットの背部皮下に単回投与し、血中 testosterone 濃度の上昇を抑制させ、血中 testosterone 濃度と陰茎龟头包皮の分離及び精巣下降との関係を検討した。

投薬群では、投与翌週より精巣及び精巣上体重量の用量に伴った低値あるいは低値傾向が、2.4 mg/kg 群では 7 及び 8 週齢時に体重の有意な低値がみられた。血中 testosterone 濃度は無処理群では生後 45 日に全例が上昇を示したが、0.24 mg/kg 群では 5 例中 2 例で、2.4 mg/kg 群では 5 例のいずれにおいても検出限界以下であった。更に、2.4 mg/kg 群では、52 日齢においても 5 例中 3 例で testosterone は検出限界以下であった。精巣下降に関しては、その完了時期において対照群と各投薬群との間には差は認められなかった。一方、陰茎龟头包皮分離の開始及び完了については 6 から 8 週齢ごろに用量に伴った遅延を示して観察された。その遅れは、0.24 mg/kg 群で対照群に比べ約 1 日、2.4 mg/kg 群では約 3 日(開始)あるいは 6 日(完了)であった。このように testosterone の上昇と陰茎龟头包皮分離は、同様な遅延傾向を示したことから、両者には密接な関係があることが推察された。したがって、本観察項目は、形態分化の指標として有用であると考えられる。

雄および雌生殖能試験へのカニクイザルの応用

○尾根田暁，鮫島秀暢，山本 隆，福田浩一，
伊原敏夫，永田良一
株式会社新日本科学 安全性研究部

近年，バイオ技術によって開発された医薬品はその生理活性が霊長類に限定される場合が多く，生殖・発生毒性試験の分野でもサルの利用が増えて来ている．今回，カニクイザルを雄および雌の生殖能試験に応用するに際し，1) 交配適期の決定と妊娠率（授精率），2) 月経周期とエストロジェンおよびプロジェステロンの変動，3) 雄におけるテストステロンの変動，4) 雄の精子検査について基礎的検討を加えた．

1. 月経周期には個体による変動幅があったが，86.8%の動物が22日から39日の周期を示し，この範囲の周期を正常と判断した．
2. 正常月経周期を示す動物では，月経発現後11日目から16日目の間に排卵がみられ，この間が交配適期と判断した．
3. 1回の交配での雌の妊娠率は53%，また，雄の授精率は60%の範囲にあった．
4. 月経周期にともない，エストロジェンおよびプロジェステロンは一定の変化を示した．測定頻度は，月経発現日を基準にして週2回必要であった．
5. 成熟雄のテストステロン濃度（週1回4週間測定）は，平均で8.33～14.51 ng/ml（個別値では0.4～31.5 ng/ml）を示し，個体間での変動がみられた．
6. 精子検査での精液採取法としては，陰茎刺激法および直腸電極法ともに有用であり，頻度は週1回が妥当と考える．

以上の結果を基に，雄および雌カニクイザルにおける生殖能試験法を確立した．

ラットの生後発育に伴う肝臓の変化 - P450アイソザイムの変動に注目した生化学的、免疫組織学的検討 -

○瀬畑 信哉，渡辺 稔之，五十嵐 功，矢木 敬，真鍋 淳

三共(株)安全性研究所

【目的】Phenobarbitalやclofibrate等の薬物代謝酵素誘導剤に対する動物の感受性には性差がある。例えば、clofibrateに対する雄ラットの感受性は成熟と共に増強する。今回、clofibrateに対する感受性の差に重要な関与を持つと考えられるP450量とP450アイソザイムの、動物の生後発育に伴う変動を生化学的および免疫組織化学的に検討した。さらにP450 mRNAの発現についても調べた。

【方法】雌雄F344ラット(3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13週齢)の肝臓を採取し、CYP2C6, 2C11, 2C13, 4A1に対する特異抗体を用いたP450アイソザイムに関する生化学的検査および免疫組織学的検査を行った。また、肝臓からRNAを抽出し、ノーザンブロット解析およびドットブロット解析を行いP450アイソザイムmRNAの発現について検討した。

【結果および考察】P450含量は若干の増減はあるものの、雌雄とも動物の週齢に関わらずほぼ一定であった。P450アイソザイムのうち、動物の発育に伴い明らかな変化を示したのは雄のCYP2C11であった。雄のCYP2C11量は3週齢のラットでは非常に少なく、7週齢から急増した。他のP450アイソザイムは、3, 4週齢の動物を除きほぼ一定量であった。抗CYP2C11抗体を用いた雄の肝臓の免疫染色の結果、3週齢では肝小葉全体が弱陽性に染色され、4週齢以降は小葉中心性に発育にともない染色強度が増強した。また、CYP2C11 mRNAも発育と共に発現量が増加した。以上、肝臓中P450含量は動物の発育に関わらずほぼ一定量存在すること、雄ではCYP2C11量が7週齢以降大幅に増加することが確認できた。

カニ肝臓異物代謝酵素Cytochrome P450による 環境モニタリング

○石塚真由美¹、星英之¹、源宣之²、升田真木彦¹、数坂昭夫¹、藤田正一¹

¹北大、獣医、環境獣医、毒性、²岐阜大、農、獣医、公衆衛生学講座

〔目的〕近年、水棲生物においても、多くの環境汚染物質を代謝するCytochrome P450が存在することが明らかとなった。モクズガニは日本全国の河川および河口域に棲息している汽水産のカニであり、河川中においては食物連鎖の頂点に立つ。そこで、このカニの異物代謝酵素を汚染の指標酵素として用いた、新たな環境モニタリング方法の確立を目的として本研究を行った。

〔方法〕各河川（北海道：石狩川・茨戸川・尻別川、茨城県：利根川）からモクズガニの雌雄を採取し、ガスクロマトグラフィーを用いて生体に蓄積するPCBやDDTの濃度を調べた。また、それぞれの河川由来のカニの肝臓を用いてマイクロソーム画分を調製し、その酵素について測定した。Cytochrome P450量は分光学的に、薬物代謝酵素活性は、HPLCあるいは光学的に測定した。変異原物質の代謝的活性化能はAmes法を用いて測定した。各河川における多環芳香族類は、ブルーレーヨン法によって採取し、ベンゾピレンを指標として、蛍光度計を用いてその汚染度を調べた。

〔結果〕PCBおよびDDTに関しては、生体内蓄積と薬物代謝酵素との間に相関は見られなかった。各河川が多環芳香族による汚染レベルは、エリスロマイシンN脱メチル化活性については、雌雄のいずれに関しても相関を持たなかった。しかし、特に雄におけるCytochrome P450量、ベンゾピレン 3位水酸化活性、エトキシマリン 0-脱エチル化活性、エトキシレゾルフィン 0-脱エチル化活性、イミプラミン 2位水酸化活性、ブニトロロール 4位水酸化活性、および変異原物質の代謝的活性化能は、ベンゾピレンを指標とした多環芳香族量との間に高い相関性を得た。従って、少なくとも雄のモクズガニにおけるCytochrome P450およびその活性は多環芳香族の汚染に関して指標となることが分かった。

ヘテロサイクリックアミンを活性化するヒトCYP1A2のバキュロウイルス (BmNPV)を用いた発現

○佐久間勉¹⁾、中山佳都夫¹⁾、稲野恵子¹⁾、
Frank J. Gonzalez²⁾、伊東進¹⁾、鎌滝哲也¹⁾

北大・薬・代謝¹⁾、米国 NIH²⁾

【目的】ヒトCYP1A2はフェナセチンやカフェインの代謝のみならずTrp-P-2やIQなどのヘテロサイクリックアミンやアフラトキシンB₁など広範囲な変異／がん原物質の活性化に関与するチトクロームP450である。本酵素の発現にはヒトにおいて個体差が存在することから、がん原物質に対するの感受性の個人差の原因の1つとして近年注目されている。しかしながら、ヒトP450の研究は肝試料の入手と酵素の精製が困難であることから分子レベルの研究の進展のためには効率の良い発現系の使用が望まれている。バキュロウイルス発現系は高い異種蛋白質の発現効率が期待できることからヒトCYP1A2をバキュロウイルス—昆虫細胞系で発現させることを試みたので報告する。

【実験・考察】ヒトCYP1A2の全翻訳領域をトランスファーベクターpBKblueに挿入し組換えトランスファーベクターを構築した。これをウイルス染色体DNAとともにBm6細胞にトランスフェクトし、培養上清より相同的組換えによって生じた組換えウイルスBmh1A2を単離した。ウエスタンブロット分析およびスペクトルの測定によってBmh1A2が感染したBm6細胞の中でヒトCYP1A2が発現していることを確認した。効率的に発現させる条件について検討した。Bm6細胞にBmh1A2を感染後1日経過時に培養液にヘミンを添加し、感染後5日目に細胞を回収した場合に最も高い発現レベルに達し、全細胞蛋白質mg当たり0.068 nmol P450であった。現在、発現ヒトCYP1A2の酵素活性の測定を行なっている。

Phenobarbitalによる第I相肝薬物代謝酵素誘導と細胞間コミュニケーション減少との関連：投与終了後の回復性に注目して

○五十嵐 功, 渡辺稔之, 大橋芳彦, 杉浦智美
木村邦男, 田中宏治, 佐藤里子, 真鍋 淳

三共(株)・安全性研究所

Phenobarbitalをラットに投与するとCYP2B1をはじめとする肝薬物代謝酵素が誘導され, それと密接に関連してgap junction(GJ)の構成蛋白であるconnexin32(Cx32)が減少する. Cx32の減少は細胞間コミュニケーション(ICC)の阻害を意味し, これがPBの肝腫瘍プロモータ作用につながるとも考えられている. 従来, 酵素誘導とICC阻害の相関は検討されて来たが, 両者の回復性を同時に比較した報告はない. 本実験ではPB投与終了後の回復性に注目した.

[材料および方法]

F344ラット(8週齢, 雄)に0.1%のPBあるいは蒸留水を3あるいは6週間飲水投与した. 投与終了後0, 3, 7, 14日目に肝臓を採取し, 肝臓中P450量およびmethoxycoumarin 0-demethylase(MCD), ethoxycoumarin 0-deethylase(ECD), propoxycoumarin 0-depropylase(PCD)活性をそれぞれ測定した. また, CYP2B1とCx32に対する特異抗体を用いて免疫ブロッキングおよび免疫組織化学的染色を実施した.

[結果および考察]

PBの3あるいは6週間の投与終了時点では, P450量が増加, MCD, ECD, PCD活性が上昇し, 酵素誘導が明らかであった. これらの値は時間の経過と共に減少・低下し, 投与終了14日目には対照群と同様な値にまで回復した. CYP2B1蛋白の増加と減少も活性の推移によく一致した. 一方, Cx32蛋白は上記酵素活性・蛋白とは逆に投与終了時点で減少, その後時間経過と共に対照レベルにまで回復した. また, 免疫組織化学染色から, Cx32の減少とCYP2B1誘導は共に小葉中心性に惹起され, 両者の回復も同部位でよく相関した. 以上, PB投与により生じるICC阻害には回復性があり, それは酵素誘導の回復と極めてよい相関を示すことが明らかとなった.

殺菌剤 Etridiazole による第Ⅱ相肝薬物代謝酵素誘導と 細胞間コミュニケーション減少との関連

○田中宏治, 渡辺稔之, 五十嵐 功, 矢本 敬, 大橋芳彦, 真鍋 淳

三共(株)安全性研究所

【目的】Phenobarbital (PB)の処置により, CYP2B1 を始めとする薬物代謝酵素が肝臓で誘導され, それと相関して gap junction (GJ)を介した肝細胞の細胞間コミュニケーションが減少することが報告されている. 一方, 殺菌剤である Etridiazole (EZ)は, その投与により肝肥大を起こすことから薬物代謝酵素誘導能を有すると考えられた. 今回, EZ が PB と同様の誘導能を有するか, また, GJ を介した細胞間コミュニケーションを減少させるかを検討した.

【材料および方法】ラット (Crj:CD 雄)に EZ (640, 1280 ppm)あるいは PB (1000 ppm)を混入した粉末飼料を 28 日間経口投与した. 投与終了後, 肝臓の薬物代謝酵素活性の測定および病理学的検査を行った. また, GJ の構成蛋白である connexin32 (Cx32)に対する抗体を用い GJ の増減を評価した.

【結果および考察】各投与群で光顕的に肝細胞の肥大, 電顕的に滑面小胞体の増生が観察され, PB 同様 EZ の投与により肝薬物代謝酵素が誘導されていることが示唆された. しかし, 両者の薬物代謝酵素誘導能には差があり, PB が第Ⅰ相 (P450酸化系)および第Ⅱ相 (UDP-GT および GST)の酵素を誘導したのに対し, EZ は第Ⅱ相酵素, 特に UDP-GT の著明な誘導を発現したものの, 第Ⅰ相酵素活性はむしろ阻害した. 一方, Cx32 蛋白は PB および EZ 両投与群で明らかに減少した. これまで CYP2B1 を中心とした第Ⅰ相の酵素誘導と GJ の減少には密接な関連があると報告されている. しかし, 本試験の EZ 投与群でみられたように, 第Ⅰ相の抑制, 第Ⅱ相の誘導に伴う細胞間コミュニケーションの減少が示されたことは大変興味深い.

プラスチック可塑剤で誘導されるラット肝カルボキシル
エステラーゼのcDNAクローニングとCOS細胞での発現

○細川正清、甚目敦子、藤澤正枝、中村隆広、佐藤哲男

千葉大学薬学部薬物学研究室

【目的】演者らは、これまで哺乳動物肝ミクロソーム画分より薬物や毒物の代謝活性化機構に重要な役割を果たしているカルボキシルエステラーゼ (CEase) を精製し諸性質について詳細に検討してきた。今回、プラスチック可塑剤として広く用いられている di(2-ethylhexyl-phthalate (DEHP) で誘導されるラット肝CEaseのcDNAクローニングを行ない構造的特性を解析すると共に、CEase遺伝子を哺乳動物細胞に導入発現し諸性質について検討したので報告する。

【方法】ラット肝CEaseのcDNAクローニングは、DEHPと同様にペルオキシソーム増殖剤であるクロフィブレートを投与したラット肝 λ gt11 および λ gt10 ライブラリーを用いて行った。

【結果・考察】ラット肝CEaseアイソザイムの特異抗体および特異配列を用いたスクリーニングの結果、ラット肝CEaseアイソザイムRL1をコードしていると考えられる、RL1-6P(1922 bp) およびRH1をコードしているものと考えられるRH1-1(1955 bp) のcDNAクローンを得た。両cDNA共に全翻訳領域、poly A 付加シグナルおよび polyAを含んでいた。また、翻訳領域のアミノ酸から推定される残基数は、RL1-6Pでは562個、RH1-1では565個であった。さらに、このアミノ酸配列について他のCEaseと比較したところ、活性中心と推察されている Ser (GESAGG), Glu (KQEXGW), His (GDHXD) やシステイン近傍に種を通じて保存されている領域がみられたが、一部の領域に著しい差異が認められたことから、この領域が基質特異性を決定している可能性が示唆された。さらに、C-末端のアミノ酸配列を調べたところ、KDELモチーフと考えられるHXELの配列を示したことから、本酵素は小胞体内腔側に局在しているものと推察された。また、これらのcDNAをCOS細胞で発現させたところ、RL1-6Pは palmitoyl-CoA に、またRH1-1は butanilicaine に高い特異性を示し、それぞれの精製酵素の基質特異性と一致したので、現在基質特異性の決定部位の検討を行っている。

GunnラットにおけるPhenobarbital誘導性の*p*-Nitrophenol UDP-グルクロン酸転移酵素の欠損について

○石井祐次、鶴田和興、高見篤子、埴岡伸光*、小栗一太

九大・薬 衛生・裁判、*現 国立衛試

【目的】先天性黄疸ラットであるGunnラットには、bilirubin UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT)を始めとするUGT 1 familyの酵素が欠損している。Gunnラットには、3-methylcholanthrene誘導性の*p*-Nitrophenol (*p*-NP) UGT (UGT1*06)が欠損している。*p*-NP UGT活性はphenobarbital (PB)によっても誘導される。本研究では、PB処理したGunnラットと正常なWistar系ラットの間で肝ミクロソームの*p*-NP UGT活性を比較した。また、両者の ω -(β -carboxypropionylamino)octyl Sepharose 4Bカラムクロマトグラフィーにおける挙動についても検討を加えた。【方法・結果】Nova-Pak C₁₈カートリッジ (Waters)を装着したHPLCを用い、移動相はCH₃CN-10 mM Na phosphate buffer (pH 2.1), 2.5 mM SDS [1 : 9, v/v]、流速1.2 ml/min、検出はUV242 nmとした。酵素反応は、3.0 mM *p*-NP, 37.5 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 7.5 mM MgCl₂, 2 mM UDP-glucuronic acid, 100 μ g L- α -phosphatidylcholine, 2.0 mg bovine serum albumin (BSA)および酵素液0.1 mlを最終容量0.2 mlとし37°C 30分incubationした。ミクロソームを酵素とする場合には、0.05% Brij 58 (最終濃度)で4°Cで30分間活性化した後使用した (通常10 μ g proteinを使用)。反応は0.1 mlの1 M TCAで停止させ、これに0.1 mlの3% BSAを加えて攪拌した後、氷中に30分以上放置した。内容物を1.5 mlのmicro-test tubeに移し、4°Cで9,000 rpm 5分間遠心分離した上清20 μ lを直接HPLCに付した。Calibrationの場合には、*p*-NP glucuronideを酵素液の代わりに使用した。この方法で、*p*-NP glucuronideの t_r は、4.0分で、定量限界は0.15 nmol/min/mlであった。Gunnラットにおいても*p*-NP UGT活性は、PB誘導性であったが、Wistar系ラットのそれに比較して有意に低かった。カラムクロマトグラフィーにおける挙動からも、*p*-NPに活性を示すPB誘導性のUGTがGunnラットには欠損していることが示唆された。

ラット肝 クラス *theta* Glutathione S-Transferase (GST)
の遺伝子構成とその解析

○西山貴仁、平塚明、小倉健一郎、渡部烈

東京薬科大学・薬学部・第2衛生化学教室

【目的】 演者らは、癌原性アリールメチルサルフェートを解毒抱合するラット肝クラス *theta* GST アイソザイム Yrs-Yrs, Yrs-Yrs' および Yrs'-Yrs' について報告してきた。すなわち2種のサブユニット (Yrs および Yrs') により構成されるこれら GST は、極めてその諸性質が類似しており、さらにその *N*-末端および限定分解ペプチドの *N*-末端アミノ酸配列を解析した限りでは、違いは認められないことから、一次構造上極めて同等性が高いことが示唆される。また演者らが単離した cDNA (*theta*-1) はサブユニット Yrs に対応していることが大腸菌中での発現実験により明らかになっている。しかしながら、サブユニット Yrs' に対応すると考えられる cDNA は単離されていない。そこで今回演者はクラス *theta* GST 遺伝子の構成ならびにその構造を明らかにすることを目的とした。

【方法】 Sprague-Dawley ラット λ EMBL 4 DNA ライブラリーのスクリーニングは *theta*-1 cDNA-*Taq*I 断片 (758 bp) を、また genomic southern blot 分析は *theta*-1 cDNA をプローブとして用いた。

【結果・考察】 *Bgl*II, *Eco*RI およびその二重消化によるラット肝 DNA の southern blot 分析の結果とスクリーニングにより単離されたクローン (*gYrs*) の southern blot 分析の結果、検出されたバンドは1本ないし2本であった。また両者のバンドのパターンは極めて類似していた。*gYrs* の塩基配列を解析したところ Yrs 遺伝子は約 4 kb にわたっており5個のエクソンから構成され、他のクラスの既知 GST 遺伝子と比較すると、最も少ないエクソン数であった。以上のことより、GST Yrs および Yrs' は1つの遺伝子からの産物であることが強く示唆された。また本研究により初めてクラス *theta* GST 遺伝子の全構造が明らかになった¹⁾。

1) Ogura, K., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205, 1250 (1994).

発癌活性代謝物アリールメチルサルフェートを解毒する
新種のマウス肝 Glutathione S-Transferase m_4

○平塚 明、金澤光徳、奥田晴宏、渡部 烈

東京薬科大学・薬学部・第二衛生化学教室

【目的】 演者らはこれまで、ラットおよびマウス肝において発癌性アリールメタノール類はいずれも細胞質の sulfotransferase によって反応性に富む硫酸エステル体へ代謝され、ついでこれら活性硫酸エステル体は同画分の glutathione S-transferase (GST) により解毒されること、さらにラットでは、*theta* クラスの GST 分子種である GST Yrs-Yrs が本活性体を特異的に GSH 抱合体へと解毒することを明らかにしてきた。本研究では、マウスにおいて上記活性硫酸エステル類を無毒化する GST 分子種の解明を目的とした。

【方法】 GST の精製は、7 週齢雄性 ddY マウス肝細胞質画分より、5-hydroxymethylchrysene sulfate (5-HCRS) GSH 抱合活性を指標とし、各種クロマトグラフィー (DE-52, S-hexyl-GSH Sepharose 6B, chromatofocusing, Blue Sepharose, GSH Sepharose 6B, TSK Gel 3000SW) により行なった。GST 分子種の HPLC 分析は逆相分配カラムを用い行なった。

【結果・考察】 5-HCRS-GSH 抱合活性を有する GST 分子種 (GST m_4 と命名) は下記に列挙する諸性質を有していた。1) S-hexyl-GSH ならびに GSH アフィニティーカラムに保持されなかった。2) サブユニット分子量 24,500 のホモ二量体であった。3) ラットの *theta* クラスに属する GST Yrs-Yrs より調製した抗体とのみ免疫交差性を示し、他のクラス (*alpha*, *mu*, および *pi*) の抗体とは免疫交差性を示さなかった。4) N-末端アミノ酸配列は *theta* クラスに属する既知の GST 分子種全てと極めて高い同等性を示した。5) 1-Menaphthyl sulfate および ethacrynic acid を良好な基質としたが、CDNB, DCNB, EPNP 等に対する GSH 抱合活性は示さなかった。

【結語】 ddY系雄性マウス肝細胞質画分より、*theta* クラスに属する GST 分子種 (GST m_4) を初めて単離・精製することに成功した。同分子種は、マウス肝において活性硫酸エステルの GSH 解毒抱合活性を有する唯一の GST 分子種であった。

イヌおよびサル肝可溶性画分のフェノールスルホトランス
フェラーゼ：発現とその諸性質

○小倉健一郎、薩川正広、奥田晴宏、渡部 烈

東京薬科大学・薬学部・第二衛生化学教室

【目的】フェノールスルホトランスフェラーゼ (PST) はフェノール類、カテコールアミン類の硫酸抱合反応を触媒するほかに、癌原性アリアルアミン類の代謝的活性化に重要な役割を果たしている。ヒトおよびラット肝 PST については数種のアイソザイムが知られており、cDNA クローニングも報告されている。しかしながら、薬毒物の安全性試験や代謝研究に繁用されるイヌおよびサルの PST に関する研究は極めて乏しく、一次構造やアイソザイム構成については全く不明である。そこで今回、イヌおよびサル肝 PST の cDNA クローニングを行い、大腸菌中で発現させた PST について熱安定性を指標として肝可溶性画分の PST 活性と比較検討することを目的とした。

【方法】雄性ビーグル犬および雄性カニクイザル肝 cDNA ライブラリーから単離した cDNA の翻訳領域を発現ベクター pKK223-3 に組み込み、同ベクターにより形質転換した大腸菌可溶性画分の PST 活性について、熱安定性および各種基質に対する硫酸抱合能を測定した。

【結果・考察】イヌおよびサル肝 cDNA ライブラリーからそれぞれ 295 アミノ酸残基よりなるタンパク質(dPST-1P および mPST-1P)をコードする cDNA が単離された。両 PST のアミノ酸配列はヒト PST のそれと 86-95% の高い同等性を示した。大腸菌中で発現させた両タンパク質は、いずれも 4-nitrophenol, naphthol 類, dopamine および minoxidil に活性を示したが、estrone や アリサイクリックアミンに対しても活性を有していた。両動物種の肝可溶性画分中の PST 活性の熱安定性を検討したところ、それぞれ熱安定性型および熱不安定型の少なくとも 2 種の PST が存在することが明らかになり、今回クローニングされた PST はいずれもその挙動から熱安定型の PST に相当することが明らかになった。

5/6腎部分切除ラットを用いた腎毒性試験の検討-1
 - 投与時期による腎毒性物質への反応性の相違について -

○ 茨田享子¹⁾, 中村聡子¹⁾, 今井節夫¹⁾, 外尾亮治²⁾, 五十嵐章之³⁾,
 吉田緑³⁾, 前川昭彦³⁾

¹⁾ 財団法人 動物繁殖研究所 財団法人 安全性試験研究センター

²⁾ 財団法人 動物繁殖研究所 実験動物研究センター ³⁾ 財団法人 佐々木研究所

我々は、第21回本大会において慢性腎不全実験モデルとしての5/6腎部分切除ラットの死に至るまでの腎機能の変化について報告した。今回は、この腎切除ラットに腎毒性物質を投与し、投与時期による腎病変の相違について検討したので報告する。

方法：腎部分切除後の急性期、安定期および腎機能下降期の各時期において、各7例にゲンタマイシン (GM) 30mg/kg, dayを頸背部皮下に2週間連続投与し、腎機能の変化を検討した。

結果とまとめ：

- 1) 投与開始後に尿の潜血反応が連続して認められた。
- 2) 急性期の投与において、5/6腎切除対照群（生理食塩水投与）に比較して、5/6腎切除GM投与群では、尿中のグルコース、LDHの排泄量の著しい増加およびCa排泄量の増加が認められ、尿細管の機能障害が示された。さらに、水分および電解質の再吸収率の低下に加えてクレアチンクリアランスによる糸球体濾過率の著しい低下も認められ、GM投与により尿細管のみならず糸球体の機能障害がおこることが示唆された。また、血清クレアチニンの著しい増加および無機リンの増加傾向も認められた。これらの変化は、模擬手術動物へのGM投与ではいずれも軽度であるか、もしくは認められなかった。
- 3) 術後7週目以降の腎機能安定期の投与においても、上記の変化が同様に認められた。尿中のALP、 γ -GTP、血清尿素窒素、Caおよび電解質は、いずれの投与時期においても変化は認められなかった。また、腎機能下降期における変化および各時期における病理組織学的所見についても報告の予定である。

ゲンタマイシン投与および部分腎摘動物の腎機能に関する基礎的 検討

○村上善紀、山崎清美、市村彰俊、坂内なるみ、坂口弘、田内清憲

日本レダリー株式会社生物研究所

薬物の腎毒性をより鋭敏に検出するために、人為的にネフロン数を減少させた部分腎摘動物、あるいは腎毒性を有する薬剤の前処理によって腎機能を低下させた動物に対して、被験物質を投与して検討する方法は有用である。今回我々は、部分腎摘動物およびゲンタマイシン投与動物の腎機能について検討を行い、それぞれの実験モデルとしての特徴について検討したので報告する。

方法) 動物は同一週齢の雄性SDラットを用いた。7週齢で腎臓を外科的に摘出し、1/2あるいは5/6腎摘動物を作製した。ゲンタマイシンは9週齢の正常動物に60mg/kg/dayを7日間連続皮下投与した。比較対照は無処置動物とした。各動物とも10週齢から毎週1回、代謝ケージを用いて16時間尿を採取し、尿量、試験紙を用いての半定量検査、尿沈渣検査およびNAG、LDH、AIP活性、クレアチニン(Cr)、タンパク(TP)、グルコース(Glu)、Na、K、およびCl濃度を測定した。同時に頸静脈から採血し、血清中の尿素窒素(UN)、クレアチニン、タンパク、アルブミン(Alb)、無機リン(IP)、Na、K、Cl濃度を測定した。またPSPを静脈内投与し、15分後の血漿中PSP濃度の測定を行った。

結果) 飲水量、尿量は全ての処置群で増加が認められた。ゲンタマイシン投与群では、投与終了時の検査で尿中NAG活性の増加と尿沈渣中に尿細管上皮および円柱が認められたが、その後回復する傾向が認められた。5/6腎摘動物では血中UNおよびCr濃度の増加が認められ、糸球体濾過量(Ccr)も1/2腎摘動物では無処置と差がなかったが、5/6腎摘動物では低下が認められた。PSPは、無処置群と比較して1/2および5/6腎摘動物とも増加し、腎摘出量に比例して増加する傾向が認められた。このほか経時的变化についても検討中であり、これらの結果ならびに形態的变化と併せて報告する。

過酸化脂質およびESR法を用いたクロム(Cr)による腎障害の検討

水野章子、車 碩鎬、遠藤 仁

杏林大学医学部薬理学

【目的】 Cr(VI)による腎障害機序を、過酸化脂質(LPO)の測定、ESR法によるラジカル種の検討により明らかにする。

【方法】 ラット皮質尿細管浮遊液に $K_2Cr_2O_7$ (Cr(VI))0.1-10mM添加し、37°Cで30-90分間incubate後、TBA法にてLPOを測定した。次にHPX-XOD系にCrを添加し、ESRで観察した。続いてSV40-T抗原遺伝子導入トランスジェニックマウス由来不死化培養細胞に、Cr2mMを添加し37°Cで30分間incubate後、スピントラップ剤(DMPO)100mMを加え水溶液用セルに吸引、5分後にESRの掃引を開始した。ESRによる検討は、deferroxamine、SODを5分間preincubateし同様に行った。

【結果】 ラット皮質尿細管浮遊液にCrを添加すると、LPOは濃度、時間依存性に増加した。HPX-XOD系にSOD、Crを添加すると、 $\cdot OH$ の生成がみられ、Crの濃度と $\cdot OH$ ラジカルの強度との間に正の相関関係が認められた。近位尿細管終末部(S_3)細胞浮遊液にCrを添加しESRで観察したところDMPO-OHが観察された。そしてSODの投与により $\cdot OH$ のシグナル強度は減弱し、deferroxamineによりDMPO-OHは完全に抑制された。

【考察】 Crによる細胞障害にはフリーラジカルが関与し、少なくとも O_2 が $\cdot OH$ の発生源として重要であると思われた。さらにこの培養細胞とESRを用いた $\cdot OH$ 発生系は、 $\cdot OH$ 除去能を有する各種薬物のスクリーニングに有用であると思われた。

Cdによる腎障害機序について

林 泰司, 曾山桃子, 照井 潤, 高島一哉, 須藤純一

北海道医療大学薬学部毒理学講座

〔目的〕 Cdによる腎障害機序の解明のため、ラットに CdCl_2 を投与し、腎、肝、血漿中での Cd の動態および関連酵素の変動について調べた。

〔方法〕 雄性S.D.系ラット (200 g) に CdCl_2 を 3 mg Cd/kg 体重で 8 日間連続皮下投与した。投与開始後、0 (投与前), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15, 20 日目にエーテル麻酔下で開腹し、腹部大動脈より血液を採取し、肝および腎を摘出し、Cd および酵素の測定に使用した。さらに、投与開始後10日目に腎および肝の病理組織学的検査を行った。

〔結果〕 肝では、メタロチオネインに結合したCd (MTs-Cd) は投与期間中増加し、投与終了後も高値を示した。血漿では、glutamyl transpeptidase (GOT) およびMTs-Cdは投与期間中増加し、投与終了後も高値を示しており、この両者の変動は強い相関を有していた。腎では、leucine aminopeptidase (LAP) および N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) は投与後 6日目より20日まで低下を示し、投与開始後10日目に最も低い値を示しており、病理組織学的にも変性が認められた。メタロチオネインに結合していない Cd (non-MTs-Cd) および膜結合性Cd (Mem-Cd) はこの時期増加していた。Mem-Cdの測定値はnon-MTs-Cdの値はほとんど等しいことが認められ、また、Mem-Cdは LAPおよびNAG と強い相関を示していた。

〔考察〕 得られた結果は、 CdCl_2 の投与により、肝でのCd結合MTsの生成の促進、そのCd結合MTsの肝から血液中への放出、その腎への取り込みがCd投与により連続して起こり、しかも腎での細胞膜に結合した形で分布するCdが腎障害を引き起こす本体であることが示唆された。

マレイン酸塩製剤によるイヌにおける急性腎障害

勝村英夫、笠間菊子、青木道子、吉村慎介、小野宏

財団法人食品薬品安全センター秦野研究所

マレイン酸塩として使用されている薬剤は少なくないが、マレイン酸はイヌで著明な腎障害を起こすことが報告されている。われわれは、雌雄ビーグル犬にマレイン酸を経口投与して調べ、10 mg/kg 以上の投与で、1回の投与でも蛋白尿、糖尿、細胞尿を誘発し、病理組織学的に尿細管壊死を起こすことを確認した。

市販のマレイン酸塩製剤から trimebutin maleate(セレキノン、田辺) および cinepazide maleate(ブレンディール、第一) を選定し、それぞれマレイン酸として約 10mg/kg を含む量を、雌雄ビーグル犬に7日間連続経口投与した。投与当日から尿糖、尿蛋白の排泄、および尿中酵素(LDH, γ -GTP, ALP, LAP) 排泄の増加が認められた。ただし、NAG の変化は明らかではなかった。また、雄イヌでは精液中の酵素活性の影響が考えられた。クレアチニン・クリアランスはやや低下するものもあったが、変化を起こさないものが多かった。連続投与を行ううち尿の変化は軽減する傾向が認められたが、軽度ながら統計学的に有意の血漿アルブミンの低下とコレステロールの上昇が起こってきた。BUN や血漿クレアチニンの値には著変はなかった。

これら腎障害は臨床では報告されていないので、前臨床試験の情報として重大な意味を持つとは言えないものの、このイヌにおける高感度の反応の成因を解明して、高リスク条件を明らかにする必要がある。また、前臨床毒性試験では投与早期から尿の変化に注意する必要がある。

ラットにおける尿分析データの性差について（第4報）
雄ラットにおけるHexestrol dipropionateの尿分析データに及ぼす影響

○杉浦正幸, 山田久陽, 村上美穂子, 木村正明, 樽本保男

大正製薬株式会社 開発研究所 安全性研究室

尿化学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いる。我々は、以前、尿分析データの加齢に伴う変化、性差、去勢による影響について検討し、性ホルモン、特にテストステロンが尿分析データに影響を及ぼしていることを明らかにした。今回、雄ラットにおいて、性ホルモンを変動させる薬剤（合成エストロジェン）Hexestrol dipropionate(HX)を単回投与し、尿分析データに及ぼす影響を検討した。

7週齢Wistar系雄ラットに、HX 50,200及び800 μ g/kgを単回皮下投与し1ヵ月間経日的に尿分析を行った。また、最終採尿後に血中のTestosterone(TS)の変動を確認するため、TSの血中濃度をRIA法により測定した。

尿量及び摂水量はHX投与9日後より増加し、最終の採尿である29日後では回復傾向が認められた。尿比重では尿量の増加に伴い減少が観察された。尿中排泄において総タンパク、アルブミン、グルコース、クロル、LAP、 γ -GTPはHX投与により、1～4日後の比較的早期から減少し、投与29日後では回復あるいは回復傾向が認められた。LDH、NAGでは上記のパラメータよりも遅れて、比較的軽度な減少が認められた。一方、A/GではHX投与により増加が認められた。カルシウム及びALPはHX投与により減少及び増加が認められ、一定した傾向がみられなかった。投与29日後のTSの血中濃度はHX 200 μ g/kgで減少が認められたが、800 μ g/kgでは検出限界以下あるいは正常レベルの値を示した例が認められた。

今回の結果から、HX投与により尿分析パラメータは明らかに変動し、直接的に腎へ影響を及ぼさない薬剤においても性ホルモン分泌の減少を介し、尿分析データの多くを減少させることが示唆された。

ラットを用いた腎尿細管障害モデルの尿中 β_2 -ミクログロリン排泄量について

○池田尚隆、石丸照美、花見正幸、佐村恵治、松本浩良、池本文彦

萬有製薬（株）開発研究所

＜目的＞腎臓の機能的変化を生前検査において鋭敏かつ早期に検出することは、腎毒性を評価する上で重要な意味がある。今回我々はラットの軽度から中等度の腎尿細管障害モデルを用いて尿細管の機能的変化を検討する目的で、低分子蛋白である β_2 -ミクログロリン(β_2 -M)の尿中排泄量を指標とし近位尿細管の再吸収能について評価した。

同時にラットの腎毒性評価に一般的に用いられている種々の臨床検査及び腎の病理組織学的検査を行い、その所見と比較検討した。

＜方法＞6週齢の雄SDラットを用いて、Furosemide (F)(50mg/kg s.c.), Glycerol (G) (1000 mg/kg s.c.)と併用又は単独でCephalothin (CET)(800mg/kg i.v.)及びCephaloridine (CER) (800mg/kg i.v.)の単回投与試験を実施した。投与日の午後から翌朝まで氷冷下で採取した16時間蓄尿を用いて、一般尿検査（定性及び沈渣）と尿中NAG活性及び尿中 β_2 -M濃度を測定した。また、投与24時間後に採血し、血清中の尿素窒素(BUN)、クレアチニン(CREA)濃度を測定するとともに腎のH-E染色標本作製し病理組織学的検査を行った。尚、 β_2 -Mの測定はラット β_2 -M抗体を用いたEIA法(Amersham®)で測定した。

＜結果＞一般尿検査の定性及び沈渣においてF+G+CER投与群で蛋白、潜血、尿細管上皮及び粗大顆粒円柱が確認された。血中ではBUN、CREA濃度の軽度の上昇と尿中NAG活性の軽度の上昇が確認された。しかしCER単独投与群では尿沈渣で尿細管上皮が軽度に認められたのみであった。一方尿中 β_2 -Mは、無処置群で12.5 $\mu\text{g}/\text{body}$ であったが、CER単独投与群で347.7 $\mu\text{g}/\text{body}$ 、F+G+CER投与群で530.0 $\mu\text{g}/\text{body}$ と極めて高濃度の尿中排泄が確認された。投与24時間後の病理組織学的所見ではF+G+CER投与群で中等度、CER単独投与群では軽度の近位尿細管上皮の変性がみられた。

＜考察＞これらのことから、腎障害を検出するために用いられている一般的な検査項目からは、器質的または機能的な微妙な変化を定量的に予測することは困難であると思われた。尿中の β_2 -Mの測定により、定量的な予想ができると思われ、さらに腎臓の病理組織学的所見と良い相関を示した。すなわち本実験では特異的なラット β_2 -M抗体を使用したことにより、尿中 β_2 -Mが感度が良く、極めて軽度から中等度の近位尿細管障害を定量的かつ鋭敏に予測できるものと考えられた。

イヌ腎臓中 glutathione S-transferase 活性
—肝臓との相関—

○渡辺稔之、杉浦智美、平野光一、大橋芳彦

三共株式会社・安全性研究所

【目的】 Glutathione S-transferase (GST) は、アミノ酸の構造解析から α 、 μ 、 π 、 θ の4つのクラスに分類される。イヌでは、 θ クラスに属する GST Yd₁Yd₁ により、1,2-dichloro-4-nitrobenzene (DCNB) が特異的にグルタチオン抱合を受ける。我々は、安全性試験に使用した無処置群のイヌ（ビーグル）の肝臓におけるDCNBのグルタチオン抱合活性を調べ、個体間でその活性に非常に大きなばらつきがあることをこれまでに報告している^[1]。今回、腎臓における同活性を測定し、肝臓における活性との関連を調査した。

【方法】 三カ所の動物生産施設で生産され、毒性試験の対照群に使用したイヌの肝臓（外側左葉の一部）、および腎臓（皮質の一部）から、常法に従い cytosol を調製した。GST 活性は、DCNBを基質として Habig らの方法に準じて測定した。

【結果・考察】 イヌ 59 例の肝、および腎 cytosol における DCNB に対する GST 活性は、それぞれ 0.0 ~ 156.5 nmol/min/mg protein、0.0 ~ 68.2 nmol/min/mg protein で、肝、腎ともに個体間に非常に大きな活性のばらつきが見られた。肝臓と腎臓における本活性には高い相関が認められ（相関係数：0.923）、肝臓において高い活性を示す個体は、腎臓においても高い活性、肝臓で中程度の活性を示す個体は、腎臓でも中程度の活性を示した。また、肝臓において 10 nmol/min/mg protein 以下の低い活性しか示さないイヌは 59 例中 5 例存在し、このイヌは腎臓においても、いずれも 2 nmol/min/mg protein 以下の活性しか示さなかった。肝、腎ともに活性にばらつきはあるものの、どの個体も腎臓においては肝臓の約半分程度の活性を示した。イヌの肝臓においては DCNB の代謝に関与する GST 分子種は GST Yd₁Yd₁ のみであることが報告されており、今回得られた結果から、GST Yd₁Yd₁ は腎臓にも存在し、肝臓と同様に腎臓でも DCNB は唯一 GST Yd₁Yd₁ によりグルタチオン抱合を受ける可能性が考えられた。さらに、低活性のイヌは肝臓と腎臓いずれにおいても GST Yd₁Yd₁ の活性、あるいは含量が低いことが示唆された。今後さらに多くのデータを集積するとともに、肝、腎の本活性のばらつきの原因について究明する予定である。 [1] 第21回 日本毒科学会学術年会 プログラム要旨集 p.173

E-1)

ドレイズ眼刺激性試験代替法の2次バリデーション
- Skin² (ZK1100及びZK1200モデル) 試験 -

1,2加藤俊則、1,2古本 勉、1,2中沢 晴、1,3杉浦秀次、1,3宇
佐美雅仁、1,4柿嶋 博、1,4桑原裕史、1,5大内淳子、1,5笠井
裕、1,6岡本裕子、1,7小島 肇、1,8柴田道男、1,8津田孝也、
9風間明美、10大野泰雄

1日本化粧品工業連合会、2マックスファクター(株)、3ホ
ーユー(株)、4鐘紡(株)、5花王(株)、6(株)コーサー、
7日本メナード化粧品(株)、8(株)資生堂、9オリエンタル
酵母工業(株)、10国立衛試・薬理

【目的】我々は化粧品原料の眼刺激性評価系としての*in vitro*試験法の妥
当性を確認するために、界面活性剤を用いた施設間1次バリデーションを
行い、日本動物実験代替法学会第7回大会で報告した。今回、2次バリデ
ーションとして、より広い範囲の化粧品原料を用いた検討を実施した。

【材料と方法】試験にはSkin²ZK1100キット及びZK1200キットを用い、
方法はキット付属の操作説明書に従った。その他については1)計画及び
*in vivo*試験結果に示した。本試験への参加はZK1100モデルが8施設、
ZK1200モデルが5施設であった。

【結果および考察】ZK1100モデル：今回の14検体についてMTT50値
が10,000以上となるのは4検体であり、8検体について確定値が得られ
た。なおこれらの施設間変動係数は0.13から0.85の間にあった。今回の
結果を1次バリデーションの結果と併せて解析し、*in vivo*試験との対応
を検討すると、対数変換したMTT50値とドレイズ試験最大総評価点との
相関係数は0.60であり、ベンジルアルコールが偽陰性と判定され、偽陽性
と判定されるものはなかった。

ZK1200モデル：本試験では2%の検体濃度を用いたが、ほとんどの検体
が無刺激と判定され、確定したt50値を得られなかった。この結果はドレ
イズ試験で得られた各検体の刺激ランクと良い一致を示したが、検体の刺
激性を差別化するためには、より高い濃度で試験を行うべきであろう。

以上より、両試験法は眼粘膜刺激性試験代替試験法として有用性が確認
されたが、今後さらに3次バリデーション実施し、代替法としての特性を
より明確にする予定である。

一般口演(E会場)

9:00~12:00 E-01~E-15

13:00~16:36 E-16~E-33

ドレイズ眼粘膜刺激性試験代替法の二次バリデーション
 (4) ヘモグロビン変性試験

畑尾正人、村上賢子^{1,2}、坂本一民、瀧野嘉延、大沼美由紀^{1,3}、柿島 博、小川朋康^{1,4}、松重知保^{1,5}、金子豊蔵、門馬純子、岩淵佳美⁶、小島肇夫^{1,7}、千葉勝由^{1,8}、松川清治、増田邦夫^{1,9}、大野泰雄¹⁰

¹日本化粧品工業連合会、²(株)資生堂、³味の素(株)、⁴鐘紡(株)、⁵牛乳石鹸共進社(株)、⁶国立衛試・毒性、⁷日本メナード化粧品(株)、⁸(株)ヤクルト本社、⁹龍宝堂製薬(株)、¹⁰国立衛試・薬理

【目的】我々は化粧品原料の眼粘膜刺激性を評価する系として*in vitro*試験法が利用できるか否かを明らかにすることを目的に界面活性剤を中心とした一次バリデーションを実施し、日本動物実験代替法学会第7回大会¹⁾で報告した。今回、二次バリデーションとして化粧品原料について枠を広げた検討を実施した。本報告ではこのうちヘモグロビン変性を用いる評価法について報告する。

【材料及び方法】被験物質は本プロジェクトに共通で、一次を含め、合計24種の化粧品原料をブラインドで使用した。試験は同一の標準操作手順書に従い、9施設で行った。測定は分光光度計を用いた。その他の詳細は、(1)計画および*in vivo*試験結果に示した。

【結果および考察】陽性対照(cetylpyridinium chloride 0.1%)に対して50%のヘモグロビン変性率を示す被験物質濃度(RDC₅₀)の施設間変動は、得られた値自体が低いことも影響し、変動が見られたが、被験物質濃度1%時のヘモグロビン比変性率(1%RDR)および最大吸収波長の比変化率(1%λmax)では比較的良い施設間再現性が見られた。また、Draize最大総評価点との相関係数はそれぞれ、R= -0.667、0.626、0.799となった。本方法は主として蛋白変性を分光光度計で評価する機構に基づくため適用に限界はあるが、眼刺激性物質の分類に対して簡便かつ有効なスクリーニング方法であることが示された。

【引用文献】1)板垣 宏他、日本動物実験代替法学会 第7回大会要旨集 100-101 (1993)

化粧品原料の安全性評価のための眼刺激性試験代替法の
二次バリデーション
8) ウサギ角膜由来細胞 (SIRC細胞) を用いる試験

谷 尚子、木下成美^{1,2}、岡本裕子^{1,3}、小谷麻由美^{1,4}、
板垣 宏、村上賢子^{1,5}、杉浦秀次、加藤久美子^{1,6}、小島肇夫^{1,7}、
大野忠夫、西條 薫、加藤麻矢子⁸、大野泰雄⁹

¹日本化粧品工業連合会、²ポーラ化成工業㈱、³㈱コーセー、
⁴㈱サンスター、⁵㈱資生堂、⁶ホーユー㈱、
⁷日本メナード化粧品㈱、⁸理化学研究所、⁹国立衛生・薬理

我々は化粧品原料の眼刺激性評価系としての *in vitro* 試験法の妥当性を確認するための施設間バリデーションの一環として、SIRC細胞を用いる試験について、界面活性剤を用いた施設間一次バリデーションを行い、施設間再現性が高く、ドレイズ試験との対応性も比較的高い試験系であることを示した(第7回日本動物実験代替法学会大会)¹⁾。今回は試験法の特性を更に明らかにするために、より広い範囲の化粧品原料を用いた二次施設間バリデーションを行い、その結果を前回の結果と合わせ解析した。

[材料と方法]

試験法はSIRC細胞を用い、BorenfreundらのNR(ニュートラルレッド)取込み試験法²⁾に基づき、細胞生存率が50%となる被験物質濃度(EC₅₀値)を測定指標とした。

その他の詳細は1)計画および*in vivo*試験結果に示した。

[結果および考察]

本試験への参加は7研究施設であった。14検体中EC₅₀値の確定した11検体での平均変動係数は0.35であり、施設間の再現性の指標として考えると良好な結果であった。また、一次と二次のバリデーションで得られたEC₅₀値(対数)のうちドレイズ試験(最大総評価点:10%濃度)との対応が可能で18検体での相関係数は-0.885であり良い対応性を示した。今回の検体中Benzyl Alcoholのみが明らかに偽陰性物質として認められた。

以上の結果から、本試験法は広い範囲の化粧品原料についても眼刺激性試験代替法として有用である可能性が示唆された。

なお、本研究は、一部、厚生科学研究費の援助を受けた。

引用文献: 1) 板垣 宏、他 日本動物実験代替法学会第7回大会要旨集、108~109(1993)

2) Borenfreund et al, Toxicol. Lett., 24, 119-124(1985)

化粧品原料の安全性評価のための眼刺激性試験代替法の二次バリデーション
10) 哺乳類細胞株 (CHL細胞) を用いた細胞毒性試験

奥村秀信、荒島雅樹^{1,2}、大内淳子、笠井裕^{1,3}、津雲勝義、柿島博^{1,4}、小谷麻由美^{1,5}、
小島肇夫^{1,6}、中澤晴、大澤宏行、加藤俊則^{1,7}、宮島敦子、大野泰雄⁸

¹日本化粧品工業連合会、²(株)ノエビア、³花王(株)、⁴鐘紡(株)、
⁵サンスター(株)、⁶日本メナード化粧品(株)、⁷P&G、⁸国立衛試・薬理

我々は化粧品原料の眼刺激性評価系としての *in vitro* 試験法の妥当性を確認するための施設間バリデーションの一環として、CHL細胞を用いた細胞毒性試験について、界面活性剤を用いた施設間一次バリデーションを行い、施設間変動が少なくまたドレイズとの対応性が比較的良好を示した(第7回日本動物実験代替法学会大会¹⁾)。今回は、試験法の特性を更に明らかにするため、より広い範囲の化粧品原料を用いた二次バリデーションを行い、その結果を前回の結果と合わせ解析した。

〔材料と方法〕

試験法はSaotomeらの方法²⁾に基づき、96穴マイクロプレートに10%牛血清含有のMEM培地にてCHL細胞を2000個/ウェル播種し72時間培養後、培地に溶解または懸濁状態の被験物質と48時間接触させた。毒性評価は、クリスタルバイオレットで細胞を染色し、陰性対照との比較による吸光度から算出した細胞存在率50%となる被験物質濃度をEC₅₀値で表わした。

その他詳細は1)計画及び*in vivo*試験結果に示した。

〔結果および考察〕

本試験は7施設にて実施し、本試験の15検体中、EC₅₀値が確定したものは11検体であった。そのEC₅₀値の変動係数を施設間の再現性指標とすると、本試験における平均変動係数は0.477であり、一次の平均変動係数0.297に比べ変動が大きかった。また、一次および二次を通してEC₅₀値が確定した17検体のlogEC50と、検体濃度10%でのドレイズ最大評価点との比較を行った結果、一回帰にて相関係数0.831が得られ良好な対応が認められた。今回の検体中、明らかな偽陽性物質として1検体(Calcium Thioglycolate)および偽陰性物質とし1検体(Benzyl Alcohol)が認められた。以上より、本試験方法はドレイズ眼粘膜刺激性試験との相関性も比較的良好であり、更に3次バリデーションのデータを加えて妥当性を最終評価する予定である。

なお、本研究は、一部、厚生科学研究費の援助を受けた。

References :

1) 小島肇夫 他、ドレイズ眼粘膜刺激性試験代替法の一次バリデーション 8) 哺乳類培養細胞株(HeLaおよびCHL細胞)を用いた細胞毒性試験、日本動物実験代替法学会第7回大会要旨集、p110-111(1993)。

2) K. Saotome, H. Morita and M. Umeda, Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtitre plate and its application to injection drugs. *Toxicology in Vitro*, 3, 317-321(1989)

化粧品原料の安全性評価のための眼粘膜刺激試験代替法の二次バリデーション。 11) E Y T E X[®] を用いる試験

○松川清治、増田邦夫^{1, 2}、柿島博、小川朋康、島康世^{1, 3}、松重知保^{1, 4}、中村恒彰、水谷秋子^{1, 5}、新海輝夫⁶、大野泰雄⁷

¹ 日本化粧品工業連合会、² 龍宝堂製薬(株)、³ 鐘紡(株)、
⁴ 牛乳石鹼共進社(株)、⁵ ライオン(株)、⁶ In Vitro International Co.、⁷ 国立衛試・薬理

〔目的〕我々は、化粧品原料の眼刺激性評価系としてのin vitro 試験法の妥当性を確認するための施設間バリデーションの一環として、E Y T E X[®] 試験について、界面活性剤を用いた施設間一次バリデーションを行い、施設間のばらつきが少なく、また、ドレイズとの対応性も比較的良いことを示した。(第7回日本動物実験代替法学会大会)¹⁾。今回は、試験法の特性を更に明らかにするため、より広い範囲の化粧品原料を用いた二次施設間バリデーションを行い、その結果を前回の結果と合わせ解析した。

〔材料と方法〕試験材料は、In Vitro International社から市販のE Y T E X[®] キットの提供を受け、これを用いた。試験濃度の選択や操作手順はプロトコールに準じた。その他の詳細は、「1) 計画及び In-Vivo試験結果」に示した。

〔結果及び考察〕本試験への参加は、5施設であった。施設間の変動係数は0.231 となり、再現性は良好であった。ドレイズ最大値総評価点との一次回帰相関係数は、0.438 であった。最大値総評価点の10~20点をグレーゾーンとする相関性の真偽評価では、偽評価は32被験物質中11物質(偽陽性6, 偽陰性5)であった。また、E Y T E X法独自の、スコアを刺激度クラスに分類する評価法では、ドレイズスコア15点を境とした対応で、偽評価は32被験物質中9物質(偽陽性5, 偽陰性4)となり、一致率は72%であった。なお、本研究は、一部、厚生科学研究費の援助を受けた。

引用文献: 1) 柿島博 他 ドレイズ眼粘膜刺激試験代替法の一次バリデーション 9) EYTEXを用いる試験、日本動物実験代替法学会第7回大会要旨集、P112~113(1993)

トレチノインによりラットF₁産児に惹起された眼科学的異常

○久野博司、小松哲郎、日高正泰、秋元倫代、池田孝則

萬有製薬（株）開発研究所

マウス及びハムスターにトレチノイン（All trans レチノイン酸）を器官形成期の初期に投与すると、胎児に眼奇形として無眼球症、小眼球症が誘発される。しかし産児について眼病変を詳細に観察した報告はない。今回演者らは、トレチノインを奇形誘発臨界期に投与して得られたラットF₁産児について眼球内部の変化の有無を眼科学的に検討し、若干の知見を得たので以下に報告する。

1群15匹のSD系ラットにトレチノインを0（対照）、2、4、及び6 mg/kg/dayの用量で妊娠8-10日の期間、5 ml/kg/dayの容量で経口投与した。母動物は妊娠21日に分娩用ケージに移し、自然分娩させた。生後8週齢時に眼の外貌を観察すると共に、倒像検眼鏡及びスリットランプを用いて中間透光体及び眼底を観察した。0（対照）、2、4、及び6 mg/kg/day群の検査動物数は、それぞれ211、214、219及び139匹であった。

投与に関連した眼科学的所見として、無眼球症または小眼球症、紅涙、角膜の血管形成、及び眼球乾燥虹彩、脈絡膜と視神経乳頭のコロボーマ、虹彩の形成不全、網膜血管の欠損、及び水晶体血管膜の遺残が4 mg/kg/day以上の用量群で認められた。無眼球症または小眼球症の発現頻度は4及び6 mg/kg/day群で1.4及び8.6%であった。紅涙は、トレチノインにより惹起された病変の中で最も高頻度に観察され、4及び6 mg/kg/day群の産児4.1及び16.0%に認められた。眼球乾燥は、4及び6 mg/kg/day群の産児1及び2匹と少なかったが、当研究施設のSD系ラットでは認められたことがないことから、投与に関連する変化と判断した。さらに6 mg/kg/day群では角膜の血管形成が、5.0%の産児に認められた。コロボーマは4及び6 mg/kg/day群の産児0.9及び3.6%に認められた。さらに6 mg/kg/day群では網膜血管の欠損、虹彩の形成不全、及び水晶体血管膜の遺残が、5.8%の産児の同一眼球に認められた。両群におけるこれらの病変の発現率には、左右の眼球の差及び雌雄差は認められなかった。トレチノイン投与に関連して生じた水晶体血管膜の遺残は、水晶体包膜直下に豊富な硝子体血管として認められ、ラットによくみられる硝子体動脈の遺残とは異なる臨床所見を示した。眼球内血管の異常と虹彩の形成不全・脈絡膜、視神経円板及び虹彩のコロボーマ発現との関連性を比較すると、血管異常と虹彩の形成不全は同一眼球にみられ、これらの異常が見られる眼球にはコロボーマ及び小眼球症が併せて認められた。しかし、コロボーマ及び小眼球症を示しているも、血管異常及び虹彩の形成不全がみられない眼球があった。また、コロボーマは腹鼻側に発現していたことから、眼盃裂の癒合不全に関連する変化と考えられた。一方、血管異常は眼盃裂の癒合不全に加えて硝子体血管及び水晶体血管膜の発生異常が関与することが示唆された。

トレチノインをSD系ラットに妊娠8日から10日に亘り投与したところ、その産児に薬物投与に関連する眼の病変が4 mg/kg/day以上の用量で認められた。しかし2 mg/kg/dayの用量では眼科学的所見は観察されず、眼発生に及ぼす影響はない用量と考えられた。

マウス網膜電図記録法の検討及び
そのヨウソ酸ソーダによる網膜症への応用

杉本眞次、今若実穂、倉田一之、金丸健一

伊藤隆康、西条武俊、佐藤秀蔵

武田薬品・医薬開発本部・薬剤安全性研究所

マウスの網膜電図(ERG)を指標とした視覚毒性試験法の確立を目的に本検討を実施した。先ず、ステンレス線で作製したコイル型電極を用いたERGの記録条件を設定した。次いで、既知網膜毒であるヨウソ酸ソーダ(SI)の12.5、25及び50 mg/kgをマウス静脈内に単回投与した後、経日的にERGを記録し、投与30日後に網膜の病理組織学的検査を実施しその影響を調べた。

- 1)ウレタン、キシラジン及びケタミンの併用麻酔下で光刺激強度1.2 joule、光刺激間隔0.2あるいは0.1 Hz、加算回数16回、暗順応時間30～60分において、ERG上のa波、b波、律動様小波及びc波を比較的安定して記録できることを確認した。
- 2) SI 25 mg/kg投与群では、投与1日後に先ずc波の消失、律動様小波の減弱、a波及びb波の増加が、次いで3ないし7日後よりa波及びb波の減弱が認められ、その後、投与28日後まで回復性はみられなかった。50 mg/kg投与群では上記変化がより顕著に認められた。
- 3) SI 25mg/kg以上の投与群で外顆粒層の皺曲、杆・錐状体層の配列の乱れ及び視細胞の減少、網膜色素上皮細胞の脱落が認められ、これらの変化も50mg/kg投与群ではより顕著であった。
- 4)以上より、ステンレス線のコイル型電極を用いてマウスERG上のa波、b波、律動様小波及びc波を比較的安定して記録できること、既知網膜毒であるSIのERGに及ぼす変化を記録できたこと、更に、網膜の病理組織学的検査からERGの変化を裏付ける結果を得たことから、本ERG記録法はマウスにおける視覚毒性試験法として有用な方法であることが確認された。

老齡Fischer344ラットの視覚障害

○大塚 博比古、今井 良悦、伊藤 昌枝、笹野 和憲

武田薬品工業株式会社 薬剤安全性研究所

Fischer344(F344)ラットは加齢により網膜萎縮が起こり、視機能が低下する可能性が示唆されている。今回、老齡F344ラットの視覚誘発電位を測定し、加齢による視機能の低下との関連について電気生理学的、行動生理学的及び病理組織学的に検索した。

〔方法〕27ヶ月齢のF344/Jclラット雌雄各7例について検査した。対照として7ヶ月齢雌雄各10例を用いた。1)明暗識別能検査：ラットの暗所指向性を利用して、T字型明暗箱での暗所選択率を求めた。2)眼科学的検査：両側眼について、散瞳剤点眼後に眼底カメラによる眼底観察を行った。3)網膜電位(ERG)及び視覚誘発電位(VEP)測定：左側眼球の強膜内及び右側視覚野上に埋め込んだ電極からERG及びVEPを記録した。4)病理組織学的検査：両側眼のH・E染色標本を作製し、鏡検した。

〔結果及び考察〕明暗識別能検査における老齡ラットの暗所選択率は75%に低下していた。ERG及びVEPは14例中8例で無反応、2例でERGのみ、4例でERG及びVEPの両方が認められたが、その振幅は著明に低下していた。また、病理組織学的には網膜の杆・錐状体層及び外顆粒層の著明な萎縮がみられ、その程度はERG・VEPが無反応であったもので最も強かった。以上の結果から、老齡Fischer344ラットでは視細胞層の萎縮及びERGの減衰、即ち網膜の光に対する反応の低下に伴ったVEPの減弱あるいは消失がみられ、視覚障害に深く関与していることが推察された。

カルバメート系農薬のラット糖代謝に及ぼす影響

黒沢 英俊、永松 國助、長谷川 明、大野 泰雄*

日大 薬学部 臨床生化学 *国立衛試 薬理部

カルバメート系殺虫剤は有機リン剤と同様にコリンエステラーゼ (ChE) を阻害することが知られている。一方ダイアジノンやマラチオンなどの有機リン剤は高血糖を誘発することが報告されている。そこで今回、各種カルバメート系農薬を用いて、ラット糖代謝に及ぼす影響について検討した。

【方法】7週齢の Wistar 系雄性ラットにカルバメート系農薬の Alany carb (ALC)、Isoprocarb (MIPC)、Diethofencarb (DFC)、Mefenacet (MFC) を各々 35、30、40、84 mg/ml/kg(コーン油溶液)腹腔内投与した。対照群にはコーン油を 1 ml/kg 投与した。投与 2 時間後に屠殺し、脳 ChE 活性、肝グリコーゲン含量、血糖値、血清中 ChE 活性およびインシュリン含量をそれぞれ測定した。

【結果】ALC は脳 ChE を対照群に比べて約 20% 阻害し、また MIPC は約 40% 阻害した。また DFC、MFC は ChE の阻害は認められなかった。さらに ALC および MIPC を投与したものは対照群 (160mg/dl) と比較して 1.7 倍、1.6 倍の血糖値の有意な上昇が、また肝グリコーゲン含量は対照群に比べて約 50%、および 30% の有意な減少を示した。DFC、MFC についてはいずれも変化は認められなかった。血清中インシュリン濃度は、血糖値の上昇がみられた ALC、MIPC 投与群では対照群に比べ減少する傾向が見られた。

【考察】カルバメート系殺虫剤により脳 ChE が阻害されると高血糖が認められることより、カルバメート系農薬投与により認められる高血糖は中枢のコリン作動性神経の興奮が原因であると考えられる。また、血清中インシュリン濃度の低下傾向が見られたことも高血糖誘発の一つの要因であると考えられる。

雄ウサギにカーバメート殺虫剤 BPMC を静脈内投与した時の
循環機能不全による急性死

○二川治子、北條優子、高橋宏明

残留農薬研究所

コリンエステラーゼ (ChE) 阻害剤を哺乳動物に投与した時の急性死の経過は、中枢性の血圧上昇のあと呼吸機能不全に陥り死亡すると考えられている。自発呼吸下のウサギにフィゾスチグミンを静脈内投与するとこの特徴的な死亡経過がみられるが、投与中から著明な血圧低下を示し死亡を生ずるカーバメート殺虫剤 (BPMC) があることを報告した (21回年会)。本報告は、代表的 ChE阻害剤フィゾスチグミンと対比することにより、BPMC による急性死が ChE阻害によらない循環機能不全によること、その不全に関わる機序を調べた。

実験にはハロセン麻酔した雄性日本白色ウサギ (体重約3 kg) を用いた。人工呼吸下でフィゾスチグミン、BPMCを静脈内投与すると、自発呼吸下と同様の血圧変化が認められた。人工呼吸もしくはアトロピン処置によりフィゾスチグミンのLD50値は数倍増加したが、BPMCのLD50値は変化しなかった。フィゾスチグミン投与により血圧、心収縮力 (dp/dt_{max})、末梢血管抵抗の増加が認められ、この増加はアトロピン前処置により拮抗された。一方、BPMC投与によりこれらのパラメータは減少し、アトロピン前処置による影響はなかった。ChE活性、電気刺激による摘出乳頭筋収縮、NEもしくは高濃度カリウムによる摘出血管平滑筋収縮に対してフィゾスチグミン、BPMCは抑制作用を示した。ChE活性を抑制する濃度で換算するとBPMCはフィゾスチグミンに比べてより強く筋収縮を抑制した。

以上より、フィゾスチグミンによる死亡は呼吸機能不全によるが、BPMCによる死亡の直接の原因は循環機能不全によると考えられた。この循環機能不全にはBPMCの心臓、血管平滑筋への直接の抑制作用が関与すると思われる。

抗コリンエステラーゼ薬の反復投与による耐性発現と脳ムスカリン性レセプター

柏田景子、大川内真紀、橋本 渉、○小林晴男、松久祐貴、
鈴木忠彦、佐藤 至、松坂尚典

岩手大学農学部獣医学科

不可逆的抗コリンエステラーゼ（抗ChE）薬を反復投与すると抗ChE症状やムスカリン作動薬に対する症状が軽減、すなわち耐性現象を生じることが知られている。この耐性現象の1機序として中枢ムスカリン性アセチルコリン受容体（mAChR）数の減少が報告されている。今回、亜急性中毒量の有機リン剤DDVP（3 mg/kg）あるいはカーバメイト剤プロポクサー（PRX, 10 mg/kg/day）をラット皮下に7あるいは14日間反復投与して、耐性発現の有無、線条体、海馬および大脳皮質のアセチルコリンエステラーゼ（AChE）活性並びにmAChRの変化、ラットの症状および行動の変化について、また、投与停止後のこれらの変化についても検討した。

DDVPあるいはPRX投与後に観察される振戦、流涎、線維性攣縮などの肉眼的症状の発現時間、持続時間およびその程度は実験期間中ほとんど変化しなかった。ロタロッド（回転棒）機能の低下はDDVPでは4-5日、PRXでは7日より改善傾向がみられ、耐性を確認した。3脳部位のAChE活性は、DDVPでは著明に低下し、投与停止後も完全に回復せず、AChEのエイジング（aging）が確認されたが、PRXでは可逆的であった。mAChRの測定は³Hリガンドの結合能より推察した。全mAChRには³H]quinuclidinyl benzilate（QNB）、M1-mAChRには³H]-pirenzepine（PZ）そしてM2-mAChRには³H]AF-DX 384の結合能を測定した。3脳部位の³H]QNB結合能はDDVPでは投与7日および14日で同程度低下してmAChR数の減少（down-regulation）が確認され、14日間投与した場合は完全な回復は投与停止後10日までには認められなかった。DDVPの反復投与によって³H]PZ結合能は35-50%及び³H]AF-DX 384の結合能はDDVPの反復投与によって約60%に低下し、M1及びM2-mAChRのdown-regulationが確認された。投与停止後の回復は、³H]PZ結合能では1週間投与後の回復が、また³H]AF-DX 384の結合能は2週間投与後の回復が早かった。PRXの反復投与による全mAChR、M1-mAChR及びM2-mAChRの変化は顕著ではなかった。オクソトレモリンの低体温作用は、DDVP反復投与あるいはPRX 1週間投与によって緩和されたがPRX 2週間投与ではむしろ増強された。以上、DDVPの反復投与によってAChE活性は顕著に低下しているにもかかわらず、耐性現象を示し、M1-mAChRおよびM2-mAChRのdown-regulationが認められた。また、可逆性抗ChE薬PRXの急性中毒量の連続投与によってもDDVPの場合と様相を異にするが、行動に変化が生じ、中枢コリン作動性神経機構もAChE活性およびmAChRが変化することが示された。

アコニチンの急性毒性に対する耐性の形成

○島田 瞭、山口和子、柳田知司

(株)前臨床医学研究所

アコニチンはトリカブトの根から得られるアルカロイドで古くから漢方薬に配合される生薬(附子)として用いられている一方、強力な毒物として知られている。アコニチンが誤用あるいは過量摂取された場合には重篤な急性中毒が現われ死に至ることが報告されている。しかし、アコニチンが繰り返し摂取された時の急性毒性発現の有無強弱に関する報告は見当らない。そこで今回、アコニチンの急性毒性の発現に及ぼすアコニチン前処置の影響を検索する目的で、以下の実験を行なった。【方法】オスマウスにアコニチン 1.5 ないし 5.1 mg/kg を胃内投与し、死亡の発現率を観察した。次に、アコニチン 0.16 mg/kg (低用量、LD₅₀の 1/10相当量)あるいは 0.79 mg/kg (中用量、LD₅₀の 1/2相当量)を投与して2あるいは 24時間後に 5.02 mg/kg (高用量、LD₅₀相当量)のアコニチンを投与し、死亡の有無を観察した。高用量のアコニチン投与で死亡しなかった動物にさらに 2日間高用量を反復投与して死亡の有無を観察した。【結果】1) 無処置動物へのアコニチン高用量投与により 90%の動物が死亡した。2) 低用量で 2時間前処置した動物における死亡率は 50%に低下したが、24時間の前処置ではほとんど影響はみられなかった。3) 中用量の 2時間および 24時間前処置ではいずれも死亡率は 30%に低下した。48時間前処置では死亡率は 50%であった。4) 高用量投与で死亡が起こらなかった動物に繰り返し高用量を投与しても死亡は観察されなかった。【考察】アコニチンの急性毒性には顕著な急性耐性が形成されることが明らかとなった。この耐性は投与 2時間後には形成され 48時間後でも消失しないことがわかった。

キノロン系抗菌剤およびその関連化合物の GABA_A受容体イオンチャネル機能に及ぼす影響

○伊藤芳久¹, 宮坂知宏¹, 福田英臣¹, 赤羽浩一², 木村陽一²

日本大・薬・薬理¹, 第一製薬・探索第一研究所²

キノロン系抗菌剤とフェンブフェンのような非ステロイド系抗炎症薬を併用すると、けいれんなどの中枢興奮作用が現れることが明らかとなっている。このメカニズムをより明らかにする目的で、ラット大脳皮質シナプトニューロソーム画分における GABA_A受容体を介した³⁶Cl⁻取込みに及ぼすキノロン系抗菌剤の影響を、フェンブフェンの代謝産物であるビフェニル酢酸 (BPAA) の存在下と非存在下で比較検討した。また、フルオロキノロン誘導体のノルフロキサシン (NFLX) と BPAA が化学構造上結合した新規化合物 hybrid 1 および hybrid 2 の影響についても検討した。【方法】8-9 週令の Wistar 系雄性ラットの大脳皮質より、既報の方法でシナプトニューロソーム画分を調製した。本画分における GABA アゴニストであるムシモール依存性の³⁶Cl⁻取込みを指標として、各種薬物の影響を検討した。【結果および考察】NFLX およびエノキサシンは、単独でムシモール依存性の³⁶Cl⁻取込みを用量依存的に抑制したが、この作用は GABA_Aアンタゴニストのビククリンや SR 95531 と比較して弱かった。BPAA の存在下では、両薬物による阻害曲線は低濃度側にシフトした。この効果は、BPAA の濃度に依存していた。構造上 NFLX と BPAA の結合がフレキシブルなタイプである hybrid 1 は、濃度依存的にムシモール依存性の³⁶Cl⁻取込みを抑制したが、平面上に固定された構造を持つ hybrid 2 の抑制作用は、著しく弱かった。また、hybrid 1 の作用は、10⁻⁵ M BPAA 存在下の NFLX の作用よりもさらに強力であった。以上の結果から、キノロン系抗菌剤の GABA_A受容体を介するクロライドイオン取込み抑制は BPAA によって著名に増強されること、および hybrid 1 は非常に強力な GABA_A受容体機能抑制作用を持つことが明らかとなった。

一般薬理研究における循環作用評価に及ぼす
麻酔薬の影響

森和彦、北野裕、笠井義男、高砂浄、広橋正章、野村護

第一製薬株式会社開発研究所安全性研究センター

目的：一般薬理試験における薬物の循環作用評価には、麻酔動物が繁用されている。しかし、麻酔薬の影響により、ヒトでの循環作用（副作用）を必ずしも予期し得ないことが多々ある。我々は、通常バルビツール系の麻酔薬を用いた評価を行っているが、覚醒下とは全く異なる成績が得られる場合もあることを経験している。そこで、種々の化合物の循環作用を覚醒あるいは種々の麻酔条件下で比較検討した。

実験方法：覚醒あるいは麻酔（ペントバルビタール、チオブタバルビタール、ウレタン、ハロセン+笑気、 α -クロラロス）動物を用いて、数種の化合物の循環器系（血圧および心拍数）に対する作用を検討した。

結果：数種の化合物（NE、ACh、Ca拮抗薬）により惹起される圧受容体を介する反射性頻脈あるいは徐脈は、いずれの麻酔薬によっても覚醒下と比較して顕著に抑制された。また、臨床試験において頻脈を誘発した化合物（抗生物質）の作用は、覚醒動物においては明らかに再現されたが、麻酔動物の場合、その作用は減弱、消失あるいは反転した。

結語：麻酔薬の影響により、循環動態の初期値あるいは薬物の反応性に差異が生じ、薬物の副作用を予測し難くなる。ヒトでの循環器系への副作用を予測する目的で実施する一般薬理試験においては、麻酔動物のみならず覚醒動物を用いた検討を行うことが必要である。

レゼルピン投与によるラット副腎髄質のドーパミンβ-水酸化酵素活性上昇と細胞増殖亢進の相関に関する検討

吉田 信也、久田 茂、飯塚和弘、堀内 敏、鈴木 稔

帝国臓器製薬株式会社安全性研究部

レゼルピンは、副腎髄質細胞中のカテコールアミン (CA) 含量を直接的に減少させる。この CA 減少によって副腎髄質に連結する交感神経が刺激され、神経刺激は髄質中のドーパミンβ-水酸化酵素 (DBH) 誘導に作用することが知られている。また、レゼルピンは副腎髄質細胞増殖の亢進作用を有することが明らかにされている。我々は、レゼルピンによるこれらの変化について、用量的な関連を調べる目的で、同一の試験系により両者を比較した。

SD系の雄ラットにレゼルピン0.5、1.0および2.5mg/kgを3回隔日皮下投与し、最終投与の24時間後にチラミンを基質とする比色法を用いて副腎髄質DBH活性を測定した。DBH活性は、37°Cにおいて、1時間あたりに生成するオクトパミン量(nmol)で表した。また、細胞増殖性についても同じスケジュールで試験を行い、その間5日間にわたり核酸アナログのプロモデオキシウリジン(BrdU)をミニ浸透圧ポンプを用いて連続注入(120μg/kg)した。次いで、BrdU免疫組織化学的染色を行って、副腎髄質のBrdU標識率を求めた。

今回の結果では、レゼルピン投与群でDBH活性の用量に依存した上昇を認めた。1.0mg/kgおよび2.5mg/kg投与群では溶媒対照と比較して有意差がみられた。BrdU標識率についてもDBH活性と同様に1.0mg/kg以上で有意に増加した。したがって、DBH活性の上昇は細胞増殖と平行して起こることが明らかとなった。

ナトリウム塩化合物による胃粘膜障害作用の検討

○三井雅之、清水久美、小林孝志、山崎誠、吉田順一、
谷川廣行

森下ルセル(株) 総合研究所 安全性研究室

【目的】塩化ナトリウム(NaCl)の胃粘膜障害作用は良く知られており、医薬品を含む種々の化合物には多くのナトリウム塩があることから、これらの化合物の胃粘膜に対する影響が懸念される。今回、反復経口投与毒性試験において胃炎様の胃粘膜障害像が観察されたdisodium化合物である潰瘍性大腸炎治療薬Balsalazide (BSZ)を用いて、ナトリウムイオンと本障害発現との関連について検討した。

【材料及び方法】実験には6週齢のCrj:CD系雄ラットを用いた。ナトリウム塩としては、BSZ、NaCl、グルコン酸ナトリウム(SG)及び乳酸ナトリウム(SL)を用い、ナトリウムのモル量が同等となるように、対照群(1%MC)、BSZ 3000mg/kg、BSZのナトリウムフリー体(BSZ-F) 2700mg/kg、NaCl 800mg/kg、SG 3000mg/kg及びSL 1540mg/kgの各投与群を設け、2週間経口投与した。検査としては、尿中及び血中電解質の測定を実施するとともに、胃について電顕、特殊染色などを含めた病理組織学的検査を実施した。

【結果及び考察】各ナトリウム塩投与群において、尿中ナトリウム排泄の増加が認められたが、血中ナトリウム濃度に変動はみられなかった。また、組織学的には、各ナトリウム塩に共通して、炎症細胞浸潤、胃腺窩領域の肥厚、同部位の細胞内好酸性滴状物などが境界縁近傍の腺胃部粘膜に認められた。一方、BSZ-FではBSZと尿中代謝物排泄量はほぼ同等であったにも関わらず、胃の変化はまったく認められなかった。これらのことから、BSZによる胃炎様障害はナトリウムイオンに起因するものであり、化合物原体のもつ毒性ではないと考えられた。

抗凝固薬 DX-9065a のラット盲腸に及ぼす影響

吉池通晴、大野広志、土屋俊也、野村 護

第一製薬(株) 開発研究所 安全性研究センター

【目的】 抗凝固薬として開発中のDX-9065aをラットに経口反復投与した際、盲腸重量の増加を伴った盲腸腫大作用が観察されている。今回、本薬剤をラットに単回および反復経口投与し、盲腸腫大作用に関する投与用量、期間ならびに盲腸内容物への影響を検討した。また、本薬剤は軽度ではあるがトリプシン阻害作用も有していることから、蛋白分解酵素阻害剤であり膵炎の治療剤として使用されているcamostatと比較検討した。【方法】 7週齢のCrj:CD系雄性ラット(5~6匹/群)を使用した。DX-9065aおよびcamostatの0.9mmol/kgを経口単回投与6および24時間後、経口反復投与3、7および14日間後に、盲腸を摘出し湿重量を測定した。その後、内容物の浸透圧および水分含量を乾燥重量法により求めた。また、ラット回腸-盲腸部間の結紮ループを作製し、水分吸収量を求めた。

【結果・考察】 DX-9065aの経口投与により、用量・投与期間に依存して盲腸が腫大(重量増加)し、盲腸内容物量および盲腸内容物中の水分含量の増加ならびに浸透圧の低下が観察された。等モル量のcamostatでは盲腸腫大および盲腸内容物量の増加傾向はあるものの、内容物中の水分含量にも明らかな変化は認められなかった。したがって、DX-9065aの盲腸腫大にはcamostatとは異なり内容物中の水分含量の増加が一部関与する可能性が示唆された。そこで、DX-9065aのラット回腸-盲腸部間における水分吸収量を測定したところ、回腸、盲腸ともに有意な水分吸収の抑制が認められた。以上の結果より、DX-9065aの盲腸腫大作用には、回腸部ならびに盲腸部における水分吸収の抑制に伴う盲腸内容物の水分含量増加が一部関与しているものと考えられた。

塩酸イリノテカンによるラット遅延性下痢の発症機作の
解明角 将一¹，尾上正治¹，遠山 清¹，鎌滝哲也²¹(株)ヤクルト本社中央研究所，²北海道大学薬学部

塩酸イリノテカン(CPT-11)の副作用である遅延性下痢の発症機序仮説の一つに腸肝循環代謝により腸内で生成され、再吸収される活性代謝物SN-38の腸粘膜障害作用が考えられる。我々はその生成に関与する腸内 β -Glucuronidase(β Gluc)活性と遅延性下痢の関係を明らかにするため、無菌ラットや異なる腸内菌叢を持つブリーダー由来のラットを用いた検討並びに抗生物質で β Gluc活性を持つ腸内細菌増殖を抑制した系を用いて両者の関係を検討した。

【方法】無菌と通常菌叢の比較はF344系ラットを、ブリーダー差は3つのブリーダー由来の7系統のラットを用いて検討した。抗生物質投与実験ではバンコマイシン(VM)又はナリジクス酸(NA)を飲水添加又は混餌により与えた。遅延性下痢はCPT-11の60mg/kg、2週間又は4日連日静注により誘発し、それぞれの実験系において下痢発症頻度、糞便 β Gluc活性及び消化管の病理組織変化を調べた。

【結果】無菌と通常菌叢ラットの比較では両者の下痢発生頻度が低かったため明確な差が得られなかった。特定のブリーダー由来ラットでは遅延性下痢が発症し、糞便 β -Gluc活性も他のブリーダーのラットに比べ高い傾向がみられた。盲腸には粘膜上皮の変性と粘膜下組織の浮腫並びに偽膜様物の形成が認められた。抗生物質投与実験では、VM処置により遅延性下痢が完全に抑制されるとともに糞便 β Gluc活性の抑制が認められ、盲腸粘膜上皮の変性は弱く、粘膜下組織の浮腫と偽膜様物の形成は観察されなかった。

【考察】ラットのCPT-11遅延性下痢の発症は腸内菌叢の影響を受け、特に偽膜性腸炎様変化の誘発が関与すると考えられた。VM処置はこの変化を阻止することのほか、 β Gluc活性を持つ腸内細菌の増殖を抑制して脱抱合代謝の抑制をもたらし、生成されるSN-38量を低下させて盲腸粘膜障害を軽減することにも寄与していると考えられた。

Dextran sulfate sodium誘発ラット潰瘍性大腸炎の回復性の検討

○吉田順一、森瀧あかね、三井雅之、小林孝志、清水久美
谷川廣行

森下ルセル(株) 総合研究所 安全性研究室

【目的】Dextran sulfate sodium(DSS)誘発ラット潰瘍性大腸炎はヒト潰瘍性大腸炎のモデルとして有用である。本モデルでは大腸下部に糜爛を主とする広範囲な障害が惹起されるが、組織学的に障害部位の広がり把握するのは困難なため、糜爛部位と正常部位を染め分け、その面積を計測する方法が考案されている。今回、ラットを用いてDSS潰瘍性大腸炎モデルを作製し、経時的な回復状況の観察により、本モデルの有効な指標となる諸項目について検討した。

【材料及び方法】7週齢のCrj:CD系雄ラットを実験に用いた。動物に3%DSS水溶液を9日間飲水投与し、投与終了後0, 2, 4及び8週目に麻酔下で採血した後、動物を放血致死させた。なお、対照群には蒸留水を与えた。血液検査はRBC, WBC等について実施した。結腸及び直腸を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液注入により粘膜面を仮固定した後、腸管を切開し更に同液で本固定した。腸管は3%酢酸液に溶解させた1%alcian blue染色液で染色した後、大腸各部位の長さを測定し、濃青染域及び白色域の面積を計測した。下部結腸及び直腸については、確認のためH・E染色標本作製し、病理組織学的検査を実施した。

【結果及び考察】炎症に起因した白血球増加は早期に回復し、2週目で正常範囲となった。DSS投与により下部大腸特に直腸部位において糜爛形成及び直腸長の短縮が顕著であったが、これらは休薬により経時的に面積縮小または伸展した。また休薬により肛門部に連続する重層扁平上皮が直腸の障害部位上に伸展し、その下部では修復像が認められた。以上より、潰瘍性大腸炎の回復指標として糜爛面積、大腸各部位の長さに加え、重層扁平上皮面積も有用と考えられた。

ラットにおける甲状腺機能低下時の血漿脂質の変動

森下克美, 三谷公互, 小倉基裕, 北浦敬介, 神辺敏実

大塚製薬(株) 徳島研究所 毒性研究部

【目的】ヒトの甲状腺機能低下症では、しばしば血中コレステロールの増加を伴うように、甲状腺ホルモンは脂質代謝に大きな影響を及ぼすことが知られている。今回、我々はラットを用いて甲状腺機能低下時の血漿脂質の変動について検討したので報告する。

【方法】6～7週齢の雌雄SDラットを1群5匹ずつに割り付け、15mg/kgのPropylthiouracil (PTU)を2週間強制経口投与後、血漿中コレステロール (CHO), トリグリセライド (TG), 遊離脂肪酸 (FFA), トリグリセライド分泌能 (TGSR)を測定した。また、去勢ラットについても同様の方法で検討した。

【結果】雌雄とも15mg/kgのPTU投与により、血清中T4値の低下、甲状腺濾胞上皮細胞の肥大が認められた。雄の非去勢群では、PTU投与によりCHOの増加、TGの低下及びTGSRの増加が認められた。去勢群でも同様にCHOの増加及びTGの低下が認められたが、TGSRの増加は認められなかった。一方、雌の非去勢群ではPTU投与によってもCHO及びTGに変化は認められず、TGSRの低下のみが認められた。また去勢群ではCHOの増加及びTGSRの低下が認められた。なお、各群ともPTU投与による体重減少は認められなかった。

【結論】15mg/kgのPTU投与により雄ではCHOの増加及びTGの低下が認められたが、雌では明らかな変化は認められなかった。したがって、ラットにおける甲状腺機能低下時の脂質代謝には性差がみられ、女性ホルモンは甲状腺機能低下時の血漿脂質の変動を抑制する方向に働いている可能性が推察された。

チオウレアの血中甲状腺ホルモン低下作用機序に関する研究

- 小野寺 博志¹, 三森 国敏¹, 安原 加壽雄¹, 務台 衛²,
北浦 敬介³, 森下 克美³, 前川 昭彦⁴, 高橋 道人¹

¹ 国立衛試、² 三菱化学、³ 大塚製薬、⁴ 佐々木研

【目的】我々は肝薬物代謝酵素を誘導するphenobarbital(PB)と甲状腺ペルオキシダーゼ阻害剤のthiourea(TU)をラットに同時投与した場合、血中甲状腺ホルモンが減少し、甲状腺腫瘍の発生が相乗的に促進されると同時に、肝重量と肝 glutathione-S-transferase(GST)活性も著しく増加することを報告した(第53回日本癌学会)。この結果より、TUにはPBと同様の肝での甲状腺ホルモン代謝酵素を誘導する作用が存在する可能性が推察されることから、以下の実験を行った。

【実験方法】6週齢F344雄ラットにN-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine (DHPN) 2800mg/kg体重を一回皮下投与し、その一週間後より0.2あるいは0.1% TU含有水、0.2あるいは0.1% PB含有飼料または無処置の飼料と水を10週間投与した。投与後、胆汁中T3/T4の排泄量、肝のT4 uridine diphosphate glucuronosyl transferase (UDP-GT) 活性および血清中の甲状腺関連ホルモンを測定した。

【結果】体重増加は0.1% PB群以外は有意に抑制されたが、肝重量は全ての投与群で対照群に比べ有意に増加した。胆汁排泄量はPB投与群で有意に増加したが、TU群では変化はなかった。胆汁中の総T3/T4排泄量はPB投与群で2倍以上の高値を示したのに対し、TU群では低値であった。T4UDP-GT活性はTU群で上昇しなかったが、PB群では高値を示し、それは0.2%群よりむしろ0.1%群で高かった。血中T4値は0.2% TU群で有意に低下した。

【結語】今回の成績ではTU投与により肝T4UDP-GTは誘導されず、TUはP450やGST等の薬物代謝酵素を誘導するが、肝での甲状腺ホルモン代謝酵素を誘導する作用はないことが示唆された。

ラットで認められた副腎毒性の発現機序に関する検討

○須藤 武、築館一男、見上 孝

エーザイ（株） 安全性研究部

我々は昨年の本学会において、ACAT阻害を主作用とする薬剤の創出に際し、ラットにおいて強い副腎毒性を示す一連の化合物が認められたことを報告した。今回、その発現機序に関し副腎皮質初代培養細胞を用い検討を行い、若干の知見が得られたので報告する。

【材料及び方法】ラットにおいて副腎皮質細胞の変性・壊死を起こし、またin vitro系で著明なコルチステロン分泌抑制を示した化合物（ER 3295）を中心に検討を行った。SD雌ラットより無菌的に摘出した副腎をコルチナールで処理し皮質細胞を単離し、24穴マイクロプレートで72時間培養後、培養液にて2回洗浄した後に種々の検討に供した。

【結果】①化合物濃度が15 μ M以下では細胞障害性は認められなかったが、30 μ M以上では濃度およびincubation時間に依存した培養上清中のLDH値の増加が認められた。②LDH値の増加に先行して、著明な細胞内ATP量の減少が認められた。③この細胞障害作用は、Fructose、DeferoxamineまたはEDTAの同時添加により抑制されたが、DPPDまたはVerapamilでは抑制されなかった。④細胞障害の抑制効果は、FructoseとEDTAとを同時に添加することにより、それぞれの単体添加よりも強く認められた。

【考察】ER3295による副腎皮質初代培養細胞に対する障害作用は、細胞内のATP量の減少に起因したものと考えられ、化合物のミトコンドリアに対する毒性が示唆された。また、障害作用の発現には複数の経路が存在するものと思われ、呼吸系に対する影響やラジカルの関与が示唆された。

ラットを用いたPlaque-forming cell (PFC)
assay — 1次免疫応答と2次免疫応答

○中村 裕行、杉本 武志、中井 洋一

武田薬品工業・薬剤安全性研究所

免疫毒性の評価において、PFC assayは液性免疫に対する影響を検討する有効な方法のひとつである。今回、毒性試験でしばしば用いられているラットを用いて、ヒツジ赤血球 (SRBC) に対する1次免疫応答および2次免疫応答についてPFC assay法で検討したので報告する。

【方法】F344/Jclラットに 1×10^8 個のSRBCを静脈内注射することにより免疫し、Cunningham & Szenbergの方法に準拠して、PFC assayを行った。

【結果】1次免疫応答の場合、IgM-PFCおよびIgG-PFCはそれぞれ免疫4日後および免疫6日後に最高に達し、IgM-PFCの方がIgG-PFCより高値を示した。2次免疫応答の場合、IgM-PFCおよびIgG-PFCはともに2次免疫3日後に最高に達し、IgG-PFCの方がIgM-PFCより高値を示した。免疫機能を低下させることが知られているcyclophosphamide (CyP) をラット静脈内に投与し、PFC反応に及ぼす影響について検討した。その結果、PFC assay前日にCyPを投与するとPFC反応は抑制されるが、免疫前日にCyPを投与するとCyPの投与量あるいはCyP投与からPFC assayまでの期間によりCyPのPFC反応への影響は異なった。1次免疫および2次免疫のいずれにおいてもCyPのIgM-PFCとIgG-PFCに及ぼす影響には差は認められなかった。

【結論】ラットを用いてSRBCによるPFC反応について検討した結果、1次免疫応答と2次免疫応答では、そのkineticsが異なること、CyPは1次免疫応答、2次免疫応答のいずれにおいても、免疫時および抗体産生時に影響を及ぼすことが示唆された。

モルモットを用いた抗原性試験におけるキャリア・タンパク質の交叉反応性に関する研究

井上智彰、志村賢一、鈴木弘美、加藤千明、堀井郁夫

日本ロシュ(株)、研究所、毒性病理部

モルモットを用いた抗原性試験におけるキャリア・タンパク質(CP)として血清アルブミン(SA)がよく用いられているが、免疫時および惹起時において交叉反応性がないことが必要条件である。更に、生体内に近い条件では交叉反応性がないタンパク質でも、水以外の溶媒を加えた場合や、*oil-in-emulsion*とした場合は、タンパク質が変性し隠れていた抗原決定基が現れる場合も考えられる。このような背景から、今回、CPの交叉反応性について検討したので報告する。

[方法] 抗原として、モルモット血清アルブミン(GPSA)、またはウシ血清アルブミン(BSA)を生理的食塩水、Dimethylsulfoxideを含む生理的食塩水、またはアルカリ性の緩衝液に溶解し、インキュベートした後 Freund's adjuvant とともに 1 mg/body をハートレイ系雄モルモットに皮内投与(2週間間隔、3回)することにより免疫した。最終免疫後1週目に採血し、GPSA、BSA、マウス血清アルブミン(MSA)、または卵白アルブミン(OVA)に対する抗体を PCA 反応、および ELISA により調べた。

[結果] モルモットにおいて同種タンパク質にあたる GPSA を免疫した場合、生理的食塩水に溶解した場合でも MSA および BSA に対して反応する抗体が検出されたが、OVA に対して反応する抗体は検出されなかった。また、BSA を免疫した場合も、MSA に対して反応する抗体が検出されたが、OVA に対する抗体は検出されなかった。このように、SA は種が異なってもある程度交叉反応性があるが、OVA との交叉反応性は低いことより、免疫時に SA を用いる場合は、惹起には OVA を CP として選択することが推奨される。

薬物アレルギー発現機序の研究：
 キャリヤー蛋白の検索（第6報）

絵柳玲子¹⁾ 重松秀成 久成由紀子²⁾ 石井祐次 小栗一太³⁾

第一工大¹⁾ 第一薬大²⁾ 九大薬³⁾

【目的】薬物アレルギーにおいて低分子である薬物が抗原となるためには生体高分子と結合することが必須である。そこで sulfanilamide アレルギーにおいてハプテンとされている活性代謝物のモデル蛍光標識化合物を用い、ラットおよびモルモット肝可溶性およびマイクロゾーム画分からキャリヤー蛋白を単離することを目的とした。

【実験・結果】1) 蛍光標識化合物の合成：4-nitrobenzylamine より dansyl化した amino (DNS-4ABA), hydroxylamino (DNS-4-HABA) および nitroso 体 (DNS-4-NSBA) を常法に従って合成した。2) DNS-4HABA 結合蛋白の精製：DNS-4HABA と常法により得られたラットおよびモルモット肝可溶性およびマイクロゾーム蛋白をそれぞれ、0.1M, pH 7.4 のリン酸緩衝液中で 37°C、60 分間振盪下で反応させた。反応液を透析後、HPLC で単一のピークとなるまで精製し、SDS-PAGE によりほぼ単一バンドとなった DNS-4HABA 結合蛍光バンドを切り取り、N 末端からのアミノ酸配列を検討した。その結果、ラットの可溶性およびマイクロゾーム画分からユビキチン (8.7 kD), fatty acid binding protein (30 kD), unknown (35 kD) を、モルモットの可溶性画分からは glutathione-S-transferase b (class- μ) を単離した。3) モルモット皮膚反応：DNS-4HABA / FCA で感作したモルモットの 3 週間後の誘発試験の結果は DNS-4ABA < DNS-4HABA < DNS-4NSBA の順で紅斑を惹起した。この紅斑の強さはグルタチオンおよびモルモット肝可溶性蛋白との結合量と相関した。

【考察】以上の結果は、上記の結合蛋白が sulfanilamide アレルギーのキャリヤーとなる可能性を示した。

モルモットPCA反応の受身感作時間に関する検討

○桑原 孝，朝波 省吾

(株)大塚製薬工場 鳴門研究所

【目的】モルモットPCA（受身皮膚アナフィラキシー）反応は、医薬品の抗原性試験において最も汎用される反応系であるが、その実験条件は蛋白抗原について検討された知見を基に設定されている。その中で、IgG検出を目的とする受身感作時間については4～6時間が一般に用いられている。この設定時間の妥当性を、今回再検討した。

【方法】受身感作用抗血清としては、モルモット抗PcG血清、抗DNP血清及び抗OA血清を使用し、抗PcG血清及び抗DNP血清に対する惹起抗原としてはハプテン蛋白結合物を用いて検討した。受身感作時間を4時間及び24時間としたPCA反応において、陽性を示す最高希釈倍率を検出力として比較した。

【結果及び考察】抗OA血清に関しては、4時間の方が検出力が高く、色素の鮮明度も優れていた。また、24時間では、抗体価の高い抗血清の受身感作により全身性アナフィラキシー反応を起こし死亡してしまう場合もあった。したがって、蛋白抗原を検討する場合の受身感作時間は、やはり4時間が適当であると考えられた。一方、ハプテンでは、抗PcG血清及び抗DNP血清ともに24時間の方が検出力が高く、4時間では陰性結果、24時間では陽性結果の場合もみられた。したがって、低分子の医薬品を検討する場合には、受身感作時間は24時間が適当であると考えられた。

L. monocytogenes 感染実験系を用いた
化学物質の免疫毒性試験法に関する研究

○鈴木幸一, 中村恒彰, 増田光輝, 井上 智¹⁾, 小西良子²⁾,
熊谷 進²⁾
ライオン(安全性評価センター), 1): 予研(獣医科学部),
2): 予研(食品衛生微生物部)

我々は第 19 回毒科学会において *Listeria monocytogenes* 感染マウスを用いる宿主抵抗性試験法が化学物質の免疫系への影響を評価できる有用な試験法であることを報告した。そこで今回、*L. monocytogenes* 感染に対し感染抵抗性抑制作用を示す Diethylstilbestrol(DES)と、亢進作用を示す Prednisolone(PRE), T₂ toxin を用い、免疫担当細胞およびサイトカインを指標として *L. monocytogenes* 感染防御に対するこれら物質の影響を検討した。

[方法] DES, PRE, T₂ toxin を 5 週齢の BALB/c マウスに 5 日間連続皮下投与した。2 日間の休薬後、*L. monocytogenes* (ヒト由来 Y1 株) を感染させ、感染後 7 日目まで経時的に血液および *L. monocytogenes* の標的臓器である脾臓を採取した。脾臓中の免疫担当細胞量はフローサイトメトリを用いて測定した。血漿中の INF- γ および脾臓ホモジネート上清中の INF- γ , TNF- α , GM-CSF の各サイトカインの定量は ELISA 法により行った。

[結果と考察] DES 投与により感染マウスの死亡数は増加し感染抵抗性の抑制が認められた。これら感染動物の脾臓では Mac-1 陽性細胞量の低下、および TNF- α 量の低下が認められたことから、DES はマクロファージ系に作用し、*L. monocytogenes* 感染防御能に抑制的に働くことが示唆された。一方 PRE および T₂ toxin 投与により感染マウスの死亡数は減少し、感染抵抗性の亢進が認められた。この場合 Mac-1 陽性細胞量が増加し、また TNF- α 量の増加が認められたことから、PRE および T₂ toxin はマクロファージ系に作用し *L. monocytogenes* 感染防御能に亢進的に働くことが示唆された。

2種の抗癌剤を用いた免疫毒性学的検討

○水戸誠二、渡辺潔、堀正樹

田辺製薬(株)安全性研究所

〔目的〕近年、医薬品をはじめ化学物質の免疫毒性が注目されているが、免疫毒性の評価方法は免疫能を指標としたものが主流を占めている。今回、リンパ球サブセットの解析を中心に、サイクロフォスファミド（CYP）およびOK-432の免疫系に及ぼす影響を調べた。

〔方法〕C57BL/6J雄マウスを10週齢より用いた。CYP（2, 20mg/kg）およびOK-432（0.1, 1KE/kg）を7日間連続皮下投与した。最終投与翌日に血液、脾臓、胸腺を採取し、臓器重量、白血球数、血漿中IgM、IgGおよびIgA量を測定し、T細胞、B細胞、NK細胞の全リンパ球に対する比率をFACStarを用いて解析した。

〔結果〕（1）CYPの高用量群で脾臓および胸腺の相対重量が低下し、OK-432投与群で脾臓の相対重量が上昇した。

（2）CYPの低用量群およびOK-432投与群で血液中および脾臓中の白血球数が増加し、CYPの高用量群で血液中、脾臓中および胸腺中の白血球数が減少した。

（3）CYPの高用量群で血漿中IgA量が低下した。

（4）脾臓中のT細胞の比率は、CYPの高用量群で上昇し、その他の群では低下した。CD4⁺T細胞とCD8⁺T細胞の比はいずれの群でも変化はみられなかった。B細胞の比率はすべての群で低下した。

CD5⁺B細胞の比率は、CYPおよびOK-432の高用量群で低下し、CD5⁻B細胞の比率はCYP投与群およびOK-432の高用量群で低下した。

NK細胞の比率はすべての群で低下した。

血液及び胸腺中のリンパ球サブセットの変動も併せて報告する。

血液生化学検査における免疫学的指標の利用

○安達智子 岸田由紀 堀口恵子 古谷真美
金澤由基子 小島幸一 小野宏

(働)食品薬品安全センター 秦野研究所

現在OECDにおいては、血液学、病理学的検査結果から免疫学的な考察を行い、より広く毒性をとらえる試みがなされている。血液生化学においても免疫学的な因子の測定が提唱されていることを受けて、我々はラット血漿中のC3たんぱく質、IgE の測定法を確立し、本学会で報告してきた。そこで、これらの項目の安全性試験への利用を目的として、6種類の化学物質について投与を行ったラット血漿中のC3たんぱく質、IgE および新たに確立した測定法によるIgGの測定を行った。通常血液生化学をはじめ他の検査結果をあわせて検討したので報告する。

【方法】化学物質は Trimethyl phosphate, 1-aminoanthraquinone, 2,6-dichlorotoluene, *p*-*tert*-butylphenol, Thiophene, 1,4-butanediol の6種類を3用量ずつ検討した。試験は“OECD化学物質試験法ガイドライン/ 反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験法”に従って行った。C3たんぱく質およびIgG は生化学自動分析装置を用いた免疫比濁法、IgE は酵素免疫測定法により測定した。

【結果および考察】IgG においては、今回検討した6種類の化学物質によって用量に依存した変化は認められなかった。これに対してC3たんぱく質は、2,6-dichlorotoluene の投与によって中用量から高用量にかけて有意な増加が認められた。また、IgE は検出限界以下の検体が大半を占めたなかで、2,6-dichlorotoluene, 1,4-butanediol の投与によって若干の増加が認められた。

通常血液生化学検査結果では、2,6-dichlorotoluene の投与における高用量群で、総たんぱく質の有意な増加が認められたが、アルブミンの値は変化しなかったことからA/G 比が低下した。しかし、IgG の増加は認められず、C3たんぱく質量が増加したことから補体系の変化が一因であることが示唆された。

EIA法による抗原特異的IgE抗体検出法の検討

○福永裕樹、入江弘之、小柴 博、花田秀一、岩井正和

㈱ミドリ十字・中央研究所・安全性研究所

【目的】 現在、抗原性試験における抗原特異的マウスIgE抗体の検出はラットをレシピエントとするPCA反応が汎用されている。しかし、PCA反応で多数の検体を処理することは、多くの労力と時間を要すると同時に多数のラットを使用しなければならない。そこで、検出能がPCA反応に匹敵し、かつ操作の自動化が可能なEIA法を検討し、抗原特異的マウスIgE抗体の検出を試みた。

【方法】 ペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリホスファターゼ(ALP)もしくは β -D-ガラクトシダーゼ(GAL)標識抗体を用い、モノクローナル抗DNPマウスIgE抗体(MoAb)、抗DNPマウス血清、抗HSAマウス血清中の抗原特異的IgE抗体価を不溶化抗原固相を用いる間接非競合EIA法により測定した。

【結果】 抗原の吸着率が高くかつCV値の低い担体を用いてMoAbにより検討した結果、検出能は標識酵素の測定限界に比例するものであり、標識酵素にGAL、その基質として4-MU-Galを用い、加水分解により生じた4-MUを蛍光法により測定する系が検出能ならびに再現性に優れていた。抗血清(PCA抗体価200倍)を用いた検討においては、cut off値を片側確率での $t_{0.95}$ 値より定めた場合、至適条件下で蛍光法により測定した感作抗原に対するIgE抗体価は8000倍以上を示した。

【結論】 測定の簡便性、検出能および再現性等を考慮した場合、生物発光法、酵素的サイクリング比色法等と比較し、GALを標識酵素として用いる蛍光法が抗原性試験での抗原特異的IgE抗体検出に最適であると考えられた。また、本EIA法では二次抗体を変えることにより試験系にマウス以外の動物を用いることも可能であると思われる。

遅延型アレルギー反応（４）メタクリル酸誘導体の
反応性の検討

○金澤由基子 小島幸一 岡田富士桜 横山雄一*
平尾政則*

働食品薬品安全センター秦野研究所 免疫毒性学研究室
* HOYA株式会社 ビジョンケアディビジョン

メタクリル酸誘導体をモデルとした遅延型アレルギー反応について、その分子量や構造の違いと、モルモットを用いたMaximization Testの最大無刺激濃度での反応性の強さとの関連について、昨年の本学会等において報告してきた。今回は、最低感作濃度を指標とした感作性の強さを物質の構造を基に比較し、化学構造による変化を検討したので報告する。

【方法】 Hartley 系雌性モルモットを用い、Magnusson らの方法に準じてMaximization Test を実施した。メチルメタクリル酸を母核物質として、脂肪鎖長の異なる誘導体、メチル基をフッ素やケイ素で置換した誘導体など計26種類を用いた。最低感作濃度（MIC）は感作濃度を公比10で設定し、惹起濃度を一定にした場合に陽性反応を示した最低濃度とした。物理化学的性質の指標として、Octanol/Water 分配係数の対数值（logP）、脂肪鎖の炭素数等を用いた。

【結果】 MIC は、全体として $1 \sim 10^{-7}$ Mの値を示した。脂肪鎖長が偶数の誘導体では、炭素数12をピークとして反応性が変化した。また、これらのMIC とlogPとの間には良好な相関が認められた。一方、メタクリル基を2個、3個と増やしてもMIC の値はほとんど変化しなかった。さらに、メタクリル基の2重結合を飽和したイソブチル体では、MIC は大きくなり、感作性が弱くなった。これらの結果から、メタクリル酸誘導体の感作性の強さは、メタクリル基の数より側鎖である脂肪鎖の長さ、また飽和、不飽和の違いなどに影響されることが示された。

アルデヒド類のモルモットにおける皮膚感作性なら
びに交差反応性の構造活性相関について

○ 門馬純子、北嶋 聡、関口裕巳、¹⁾伊佐間和郎、
¹⁾鹿庭正昭、津田充有、²⁾澤田純一、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
¹⁾ 療品部、²⁾ 機能生化学部

【目的】 殺菌・消毒剤、医薬品および染料等の合成原料、あるいは化粧品
の香料として広く使用されているアルデヒド類の皮膚感作性につ
いては、動物実験やヒトで多く報告されているが、これら化合物の
化学構造と感作性の強さについての報告は見当たらない。今回、種々
のアルデヒド類の安全性評価の一環として、Formaldehyde(FA)を始め
とする7つのモノアルデヒド類 Acetaldehyde(AA)、Propionaldehyde
(PA)、Acrolein、Crotonaldehyde(CRA)、Benzaldehyde(BA)、Cinnam-
aldehyde(CA)、およびジアルデヒドである Glutaraldehyde(GA)の皮膚
感作性、ならびにそれら化合物間における交差反応性をモルモットを
用いて検討し、その分子量や構造の違いによる反応の強さについて比
較した。

【実験方法】 皮膚感作性試験は Maximization法に準拠し、実験群、
溶媒対照群および陽性対照群各5匹の Hartley系雌性モルモット (5~
6週齢) を用いて実施した。感作濃度は、予備試験の結果を参考にし、
0.0033mM~330mMを用いた。なお、感作時溶媒は生理食塩液 (FA、AA、
PA および GA) およびオリーブ油 (Acrolein、CRA、BA および CA) を
用いた。一方、惹起 (誘発) 濃度は、一次刺激性を示さない最大無刺
激濃度以下とし、0.0033mM~330mMの希釈段階を用いた。なお、惹起時
溶媒はアセトンを用いた。感作性の強さの評価は既報の方法に従った
(Contact Dermatitis, 31,72-85,1994)。交差反応性試験は、各アル
デヒド感作動物に FA、AA、PA、Acrolein、CRA、BA、CA および GAで
惹起を行った。溶媒はアセトンを用いた。

【結果および考察】 皮膚感作性の強さは、Acrolein>CRA>CA>GA>>FA、
AA、PA および BAの順であった。交差反応性は、AA 感作動物は他のアル
デヒド類 (Acrolein、CRA、CA および GA) に交差反応性を示し、ま
た、アルデヒド類 (AA、PA、CRA および BA) で感作された動物は CA
にも交差反応性を示した。以上のことから、アルデヒド類の中でも、
炭素鎖に不飽和結合を有するアルデヒド類が強い皮膚感作性を示す可
能性が示唆された。

アルデヒド類のモルモット皮膚感作性と物理化学的性質との相関性について

○伊佐間和郎、鹿庭正昭、¹門馬純子、¹北嶋 聡、²津田充有、
¹黒川雄二、中村晃忠

国立衛生試験所 療品部、¹安全性生物試験研究センター・毒性部、
²薬理部

【目的】

アルデヒド類は種々の薬剤および染料の合成原料、あるいは香料として広く使用されているが、一方ではアルデヒド類が原因物質と考えられる接触皮膚炎事例が数多く報告されている。しかし、アルデヒド類の感作性の強さをその化学構造から考察した報告は見当たらない。そこで今回、安全性評価の一環として行われた7つのアルデヒド類；Formaldehyde(FA)、Acetaldehyde(AA)、Propionaldehyde(PA)、Acrolein、Crotonaldehyde(CRA)、Banzaldehyde(BA)、Cinnamaldehyde(CA)、Glutaraldehyde(GA)の皮膚感作性試験の結果と相関する物理化学的性質を検索する目的で種々の実験を行った。即ち、アルデヒド類のFT-IRスペクトルを同条件で測定してカルボニル基に由来する吸収帯の波数を求めた。また、アルデヒド類と1級アミノ化合物との結合性からアルデヒド類のタンパク結合性を予測した。これらの物理化学的性質と皮膚感作性の強さの関係を調べた。

【実験方法】

FT-IRスペクトル：演者が作成した液体ATRセルを用いて7つのアルデヒドのFT-IRスペクトルを測定した。なお、測定には7つのアルデヒドをそれぞれ水/メタノール(1/2)混液に同モル濃度に溶かした溶液を用いた。

タンパク結合性：同モル濃度のアルデヒド水溶液にタンパクモデル化合物として1級アミノ化合物を添加した時の濃度変化をHPLC法を用いて測定した。

【結果および考察】

7つのアルデヒド類の皮膚感作性の強さとFT-IRスペクトルにおけるカルボニル基に由来する吸収帯の波数の間には相関関係が認められた。即ち、カルボニル基に由来する吸収帯が低波数なアルデヒドほど皮膚感作性が強かった。また、タンパク結合性との間にも一定の関係が認められた。これらの結果からアルデヒド類の皮膚感作性の強さには、カルボニル基の反応性が寄与していることが分かった。

索引

あ

青木 道子	D-30
青木 康展	C-27
赤池 雅司	D-04
	座長
赤羽 浩一	E-13
秋田 正治	D-03
秋元 倫代	E-06
秋山 純一	MS1-2
	MS1-7
	MS1-8
朝波 省吾	E-26
浅利 晃	C-13
安達 孝浩	C-01
安達 智子	E-29
阿保 敬	C-16
天野 博夫	D-02
荒島 雅樹	E-04
	MS1-6
安藤 理恵子	C-04

い

飯塚 和弘	E-15
五十嵐 章之	D-26
五十嵐 功	D-16
	D-19
	D-20
五十嵐 真一	D-07
池川 直	D-06
池崎 信一郎	C-21
	C-28
池田 孝則	E-06
池田 尚隆	D-32
池本 文彦	D-32
	座長
伊佐間 和郎	E-32
	E-33
伊澤 義弘	D-06
石井 祐次	D-22
	E-25

石神 和彦	MS3-4
石島 奈美	C-03
石塚 真由美	D-17
石橋 成太良	C-01
石橋 卓也	MS1-6
石丸 照美	D-32
板垣 宏	E-03

市村 彰俊	D-27
伊東 進	D-18
伊藤 隆康	E-07
伊藤 昌枝	E-08
伊藤 芳久	E-13
稲野 恵子	D-18
稲場 進	S-5
井上 智達	E-27
井上	MS1-2
	MS1-3

井上 智彰	WS-5
井上 芳己	E-24
伊原 敏夫	C-02
	D-15
	座長
茨田 亨子	D-26
今井 節夫	D-26
今井 良悦	E-08
今沢 孝喜	C-21
今村 いづる	C-16
今若 実穂	E-07
井村 伸正	座長
入江 弘之	E-30
岩井 正和	E-30
岩淵 佳美	E-02
	MS1-5

う

上杉 康夫	C-30
上野 光一	C-14
	C-15
上野 芳夫	C-23
	C-29

小倉 基裕	E-20	加藤 千明	D-10
小栗 一太	D-22		E-24
	E-25	加藤 俊則	E-01
	座長		E-04
落合 敏秋	C-13		MS1-6
尾根田 暁	D-15	加藤 利博	MS1-3
小野 敦	C-10	加藤 真之	D-08
	D-01	加藤 麻矢子	E-03
	MS3-1	加藤 道幸	C-19
小野 菜穂子	MS1-4	金澤 光徳	D-24
小野 宏	D-30	金澤 由基子	E-29
	E-29		E-31
	MS1-1	鹿庭 正昭	E-32
	座長		E-33
尾上 正治	E-18	金子 豊蔵	D-01
小野寺 威	C-19		E-02
	C-30		MS1-2
小野寺 博志	E-21		MS1-3
			MS1-5
		金丸 健一	E-07
		鎌滝 哲也	D-18
柿島 博	E-01		E-18
	E-02		座長
	E-04		E-20
	E-05	神辺 敏実	座長
	MS1-2	唐木 英明	D-12
	MS1-3	川音 晴夫	C-16
	MS1-5	川島 明	C-17
	MS1-8		D-09
柿畑 耕司	D-05	川島 邦夫	MS2-2
笠井 裕	E-01		D-14
	E-04	河谷 善則	C-24
	MS1-2	河部 真弓	C-29
	MS1-6	川村 理	D-13
	MS1-8	河村 泰仁	C-23
	E-14	Gang, Chen	
笠井 義男	D-30		
笠間 菊子	E-01		
風間 明美	C-30		
梶村 哲世	E-11	岸 倉次郎	MS2-5
柏田 景子	D-17	岸田 由紀	E-29
数坂 昭夫	D-30	北浦 敬介	E-20
勝村 英夫	E-03		E-21
加藤 久美子	MS1-8		座長
		北崎 直	MS3-5

き

北嶋 聡	C-07		
	D-09		
	E-32	甲田 彰	C-13
	E-33	小柴 博	E-30
北野 光昭	C-24	小島 幸一	E-29
北野 裕	E-14		E-31
北村 紀子	D-11	小島 肇夫	E-01
木下 成美	E-03		E-02
	MS1-4		E-03
	MS1-6		E-04
木村 邦夫	D-19		MS1-2
木村 重紀	C-20		MS1-4
木村 均	D-08		MS1-5
木村 正明	D-31		MS1-6
木村 陽一	E-13		MS1-7
清宮 健一	C-18	小谷 麻由美	E-03
	C-32		E-04
金城 義明	C-13	児玉 卓也	D-13
		後藤 鋼星	D-04
		小西 貴美代	MS1-4
国松 武史	C-04	小西 良子	E-27
久野 博司	E-06	小林 明子	C-15
熊谷 進	E-27	小林 和子	C-16
熊田 幸浩	D-14	小林 孝志	C-11
雲林 弘成	C-22		E-16
倉田 一之	E-07		E-19
栗下 昭弘	MS1-2	小林 敏明	MS1-2
車 碩鎬	D-28	小林 晴男	E-11
暮部 勝	C-18	小松 哲郎	E-06
	C-32	近藤 正実	MS3-5
	座長	Gonzalez, Frank J.	D-18
黒川 雄二	C-07		
	C-10		
	D-01	西條 薫	E-03
	D-09		MS1-2
	E-32	西条 武俊	E-07
	E-33	斉藤 実	C-07
	MS3-1		D-01
	MS3-2		MS3-2
黒坂 麗子	D-02	坂内 なるみ	D-27
黒沢 英俊	E-09	坂口 弘	D-27
桑原 孝	E-26	坂口 ゆかり	D-05
桑原 裕史	E-01	坂爪 正志	C-12

坂本 一民	E-02 MS1-2 MS1-7	新海 輝夫 進藤 英俊	E-05 C-17
佐久間 勉	D-18		す
笹野 和憲	E-08	須賀 哲弥	C-22
貞永 納	C-11	菅原 茂樹	D-06
薩川 正広	D-25	杉浦 智美	D-19
佐藤 温重	座長		D-33
佐藤 至	E-11	杉浦 秀次	E-01
佐藤 里子	D-19		E-03
佐藤 秀蔵	E-07		MS1-2
	座長		MS1-8
佐藤 哲男	C-14	杉浦 正幸	D-31
	C-15	杉谷 順康	D-11
	D-21	杉本 眞次	E-07
	座長	杉本 武志	E-23
佐藤 利夫	C-20	杉山 千生	MS1-3
佐野 孝一	C-08	鈴木 和夫	C-14
佐野 眞士	C-24	鈴木 幸一	E-27
佐村 恵治	D-32		MS1-6
鮫島 秀暢	D-15	鈴木 修三	C-05
	MS3-4	鈴木 祥太	D-14
澤田 和彦	C-31	鈴木 忠彦	E-11
澤田 純一	E-32	鈴木 勉	座長
	座長	鈴木 登志郎	MS1-3
澤村 淳子	MS1-7	鈴木 弘美	C-31
三分一所 厚司	MS2-1		E-24
		鈴木 稔	E-15
		須藤 純一	D-29
		須藤 武	E-22
		角 将一	E-18
		Shun-Zhang, Yu	C-23
重栖 幹夫	C-13		
重松 秀成	E-25		
柴田 道男	E-01		
島 康世	E-05		
島田 弘康	C-26		
島田 信	D-05	関 高樹	C-04
島田 瞭	E-12	関口 裕巳	E-32
清水 久美	E-16	関島 勝	C-23
	E-19	関田 清司	C-10
志村 賢一	E-24		D-01
庄司 陽子	D-12		MS3-1
白井 智之	C-20		MS3-2
	C-24		C-29
白石 明	D-12	瀬戸 加大	D-16
		瀬畑 信哉	

			棚橋 清子	C-04
			谷 尚子	E-03
外尾	亮治	D-26		MS1-2
曾根	秀子	C-27		MS1-4
曾山	桃子	D-29		MS1-6
			谷岡 功邦	C-05
			谷川 廣行	E-16
				E-19
田内	清憲	D-27	田原 整	C-17
高木	篤也	D-09	玉野 静光	C-20
高砂	浄	E-14	田村 康一	S-2
高島	一哉	D-29	田村 茂	C-02
高田	早苗	C-19		C-11
高野	勝弘	MS1-2	田村 浩	C-22
高橋	公太	S-4	田村 博志	MS3-3
高橋	信弘	S-3	田村 博信	C-01
高橋	宏明	E-10	樽本 保男	D-31
高橋	道人	C-21		
		C-28		
		E-21		
		MS2-3	千葉 勝由	E-02
		WS-4		MS1-2
高橋	裕詞	C-03		MS1-7
高見	篤子	D-22		MS1-8
高山	敏	C-30	Tian, Guanxun	C-18
		D-05		
		座長		
高山	房子	C-06	築館 一男	E-22
滝沢	節子	D-10	津雲 勝義	E-04
滝沢	万理	C-29		MS1-8
田岸	莊一郎	C-13	對馬 敏夫	S-1
田坂	知也	C-12		座長
田代	文夫	C-29	津田 孝也	E-01
瀧野	嘉延	E-02		MS1-5
辰見	寿	MS1-2	津田 充宥	C-07
		MS1-3		E-32
田中	宏治	D-19		E-33
		D-20	土屋 俊也	E-17
田中	悟	D-01	堤 俊輔	D-04
田中	俊光	D-04	津野 達也	D-07
田中	直美	D-07	鶴田 和興	D-22
田中	暢幸	C-11	鶴見 淑子	MS1-8
田中	光	C-20		
田中	均	C-13		

寺尾 恵治	MS3-3	奈良 博	C-11
照井 潤	座長 D-29		
			に
		西川 秋佳	C-21
			C-28
東條 宏子	C-30	西川 多美子	MS1-6
遠山 清	E-18	西山 貴仁	D-23
遠山 千春	C-27		
戸部 公子	D-08		の
豊田 祐司	C-12	野口 規子	MS3-3
鳥島 久	MS1-7	野村 護	C-03
			C-19
			C-26
			C-30
内藤 克司	D-01		D-05
直 弘	C-05		E-14
中井 洋一	E-23		E-17
中岡 農	C-08		MS3-1
中澤 晴	E-01		MS3-2
	E-04		座長
中沢 素邦	C-01		
永田 諭志	C-23		は
永田 良一	D-15		
	MS3-4	萩野 滋延	MS1-3
中富 一文	D-06		MS1-4
中野 雄司	C-11	萩原 昭裕	C-24
中間 和浩	MS3-4	橋本 正晴	C-08
中村 晃忠	E-33		C-11
中村 聡子	D-26		C-13
中村 純	C-04	橋本 渉	E-11
中村 正平	C-13	長谷川 明	E-09
中村 隆広	D-21	長谷川 浩之	MS3-1
中村 恒彰	E-05		MS3-2
	E-27	秦 純子	D-06
	MS1-2	畑尾 正人	E-02
	MS1-3	甚目 敦子	D-21
	MS1-4	花田 秀一	E-30
	MS1-6	花見 正幸	D-32
中村 裕行	E-23	埴岡 伸光	D-22
中村 美穂	C-30	浜洲 泰久	C-01
中山 佳郁夫	D-18	林 泰司	D-29
中山 志保	C-26	林 晴美	D-08
中山 由美子	C-04	林 裕	MS3-1
永松 國助	E-09		MS3-2

よ

横山	篤	D-03
横山	雄一	E-31
吉池	通晴	E-17
吉川	健一	C-01
吉崎	宏	D-11
吉沢	正純	C-14
		C-15
吉田	一晴	D-13
吉田	順一	E-16
		E-19
吉田	信也	E-15
吉田	武美	MS1-2
吉田	敏則	C-21
吉田	勝	C-01
		C-11
吉田	貢由	C-19
吉田	緑	D-26
吉武	彬	C-04
吉野	直人	C-29
嘉松	望美	C-03
吉村	慎介	D-30
米田	信次	C-14
米元	純三	C-27

わ

脇川	典子	D-12
鷺見	信好	C-01
渡辺	潔	E-28
渡辺	隆史	C-22
渡辺	稔之	D-16
		D-19
		D-20
		D-33
渡部	烈	C-25
		D-23
		D-24
		D-25
		座長

賛助企業および団体御芳名

エーザイ(株) 研究開発本部

コーニング・ヘーゼルトン(株)
(米国 ヴァージニア州ヴィエナ市)

三共(株) 安全性研究所

塩野義製薬(株) 新薬研究所

ゼリア新薬工業(株)

第一製薬(株) 開発研究所

大正製薬(株) 総合研究所

大鵬薬品工業(株) 製薬センター 安全性研究所

武田薬品工業(株) 医薬開発本部 薬剤安全性研究所

田辺製薬(株) 研究開発企画センター

中外製薬(株) 安全性研究所

帝国臓器製薬(株)

帝人(株) 医薬開発研究所 安全性研究部

日本チャールス・リバー(株)

日本臨床薬理研究所(株)

日本ロシュ(株) 研究所

萬有製薬(株) 研究開発企画部

藤沢薬品工業(株) 安全性研究所

ブリistol・マイヤーズ・スクイブ(株) 神奈川研究所

山之内製薬(株)

ヤンセン協和(株)

(平成7年5月20日現在：五十音順)

NITRIC OXIDE

一酸化窒素測定装置 NO MONITOR



MODEL NO-501

◇実験研究用

本装置は微量液体や気体の一酸化窒素を電気化学的にとらえ正確に安定に測定します。新しく開発されたプローブは先端が小さく応答性に優れ、*in vivo* *in vitro* での測定が可能であり、幅広い分野に応用できます。

概要

本機は、ポーラログラフィーにおける拡散電流が電極で電解されるイオン種の濃度に比例することを利用して一酸化窒素の濃度を測定する装置です。この装置の主要点は一酸化窒素ガスを電流量に変換する検知部にあり、現在のところ電気化学的方法を用いるものが最もコンパクトで安価となっております。分析器の性能は検知部の電気化学反応の安定度によって規定されたため、本装置では特別な電極材質に形状や製造方法等を充分検討し、小型で電極金属表面での電気化学反応が充分安定なものを使用しています。したがって他の物理的方法に比べるとはるかに簡便で正確な測定ができ、環境学、生物学、医学等の臨床、研究に広く用いられます。

in INTER MEDICAL co.,ltd.
株式会社 インターメディカル

本社/〒461 名古屋市東区第一丁目25番1号
TEL (052) 937-7060 FAX (052) 937-5423
東京支社/〒157 東京都世田谷区粕谷三丁目32番16号
営業部 TEL (03) 5384-6387 FAX (03) 5384-6487
大阪支社/〒532 大阪府淀川区西中島4丁目2番4号
営業部 TEL (06) 886-4151 FAX (06) 886-4152
英国支社/TEL (0732) 325516 FAX (0732) 325516



Semen 自動解析装置



CellSoftシリーズ 3000型

精子運動自動解析の代表的なシステムです。——

CellSoftシリーズ 4000型

生殖毒性試験のために開発されました。——

米国CRYO Resources社によって開発されたCellSoft™は、人、家畜、グツ菌類、海洋生物など、及びトキシコロジー分野を対象とした精子運動自動解析システムです。

採取された精子を顕微鏡テレビカメラにより、精子運動像として捕らえ、コンピュータに入力することにより、精子運動解析に必要な各種パラメータを自動的に計算し、その結果を表示、出力することができます。

不妊検査、人工受精、増殖、及び毒性の評価(生殖試験)に必要な

総精子数、精子濃度、精子運動率、精子平均速度、直線性、ヘッド最大・平均振幅値、ヘッド振り周波数、平均運動半径、円運動精子数、円運動率、速度・直線性分布グラフ

が瞬時に定量解析できます。

このシステムの導入により、精子検査の処理時間の短縮(省力化)、検査データの均一化をはじめ、精子運動の定量的把握による精子研究の促進がはかれます。

標準ソフトウェア以外に精子を評価する、豊富なオプションプログラムが開発されており、システムの拡張性があります。

上記製品についてのお問い合わせ、メンテナンスのご用命は、……

日本総代理店

NEUROSCIENCE, INC.

株式会社 ニューロサイエンス

本社 ■〒110 東京都台東区台東3-15-1 平和生命ビル
TEL.(03)5688-1061 FAX.(03)5688-1065
大阪支店 ■〒532 大阪市淀川区西中島6-1-19
TEL.(06) 307-7311 FAX.(06) 307-7727
福岡支店 ■〒812 福岡市博多区博多駅南4-3-9 アバダント86
TEL.(092)414-0251 FAX.(092)414-0125



ACTSおよびUIWオプション実装のH*1Eの全景



動物用血液分析に

H*1Eに動物用バージョン

毒性薬理研究に、実験動物学に、

獣医畜産学に



総合血液学検査装置

H*1E

バイエル・三共株式会社

東京都中央区築地6丁目19番20号

全自動電気泳動分析装置

実験動物の電気泳動 自動化!!



測定試薬

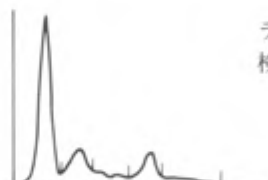
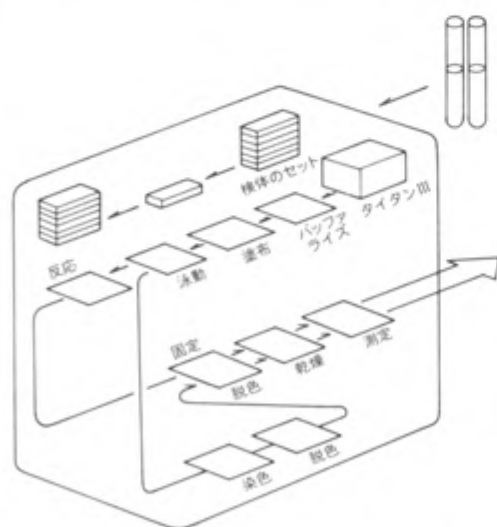
血清蛋白用染色液 (ボンソーS)

タイタン LDH アイソエンザイム 試薬

タイタン ALP アイソエンザイム 試薬

その他、承認済の試薬の使用により

他項目の測定が可能



ラット血清蛋白分画
検体処理数 30検体/時



イヌ血清蛋白分画
検体処理数 60検体/時

 株式会社 **ハラ研究所**

本社 〒336 埼玉県浦和市常盤9丁目21番19号
TEL.048(833)3208代 ■ FAX.048(833)3273
TEL.03(3580)3388(直通)

支社 〒540 大阪市中央区農人橋2丁目1番31号 第6松屋ビル7階
TEL.06(945)1070 ■ FAX.06(945)1055



ペプチド研究所のイオンチャネルブロッカー

List of Ion Channel Blockers

Ca²⁺ Channel Blockers

	Code	Compound		Price:Yen
L-type	4255-s	Calciseptine	0.1 mg vial	30,000
N-type	4161-v	ω -Conotoxin GVIA	0.5 mg vial	38,000
N-type	4289-v	ω -Conotoxin MVIIA	0.5 mg vial	30,000
N-type	4284-v	ω -Conotoxin SVIB	0.5 mg vial	30,000
P-type	4256-s	ω -Agatoxin IVA	0.1 mg vial	30,000
P-type	4294-s	ω -Agatoxin TK	0.1 mg vial	30,000
P/Q-type	4283-s	ω -Conotoxin MVIIC	0.1 mg vial	15,000
P/Q-type	4283-v	ω -Conotoxin MVIIC	0.5 mg vial	30,000
	4300-s	PLTX-II	0.1 mg vial	30,000

K⁺ Channel Blockers

Ca²⁺-Activated K⁺ Channel Blockers

BK-type ¹⁾	4235-s	Iberiotoxin	0.1 mg vial	23,000
BK-type ¹⁾	4259-s	Kaliotoxin (1-37)	0.1 mg vial	22,000
IK-type ²⁾	4227-s	Charybdotoxin*	0.1 mg vial	22,000
SK-type ³⁾	4257-v	Apamin	0.5 mg vial	18,000
SK-type ³⁾	4260-s	Scyllatoxin (Leiurotoxin I)	0.1 mg vial	20,000

¹⁾ High conductance ²⁾ Intermediate conductance ³⁾ Small conductance * also has BK-type blocking activity

Voltage-dependent K⁺ Channel Blockers

4258-v	MCD-Peptide	0.5 mg vial	30,000
4287-s	Stichodactyla toxin	0.1 mg vial	22,000
4290-s	Margatoxin (MgTX)	0.1 mg vial	22,000

Na⁺ Channel Blockers

4217-v	μ -Conotoxin GIIIB	0.5 mg vial	38,000
4263-v	μ -Conotoxin GS	0.5 mg vial	40,000

Chloride Channel Blocker

4282-v	Chlorotoxin	0.5 mg vial	45,000
--------	-------------	-------------	--------

- 上記製品はいずれも有機化学的に合成された高純度な研究用試薬です。
- 詳しくはカタログがございますので弊社営業部までご請求下さい。

株式会社 ペプチド研究所

〒562 大阪府箕面市稲4丁目1番2号
電話(0727)29-4121(代) FAX(0727)29-4124

安全性試験の海外委託は
豊富な実績ときめ細かな対応で信頼のおける
コーニング・ヘーゼルトンにお任せ下さい

- ▶ イヌ、サル、ラットの連続静脈内注入試験
- ▶ 一般毒性試験、癌原性試験、神経毒性試験、生殖・発生毒性試験、遺伝及び細胞毒性試験
- ▶ コンピュータを駆使した迅速な報告書作成
(癌原性試験の査察済み最終ドラフト報告書が最終屠殺より6.5ヶ月でお届けできます)
- ▶ フロッピー申請対応

米国首都ワシントン近郊に位置する当研究所は
FDA, EPA等米国政府規制官庁との交渉に最適です

CORNING Hazleton, Inc., 9200 Leesburg Pike, Vienna, Virginia 22182, U.S.A.

TEL: (703) 893-5400 FAX: (703) 759-6947

二重収束質量分析計

ベンチトップGC/MS誕生。

GCmateは「全自動測定」特にルーチン分析の自動化を対象に設計・開発されたベンチトップタイプのGC/MSシステムです。分析計は、小形でユニークな二重収束光学系を基本に、微量定量・定性分析はもとより精密質量測定と簡易操作を両立させています。さらに最新のOS(MS-Window)を採用して、ビジュアルで高速・快適な操作環境を実現しています。

- マスレンジ: m/z 1~1000(加速電圧 2.5kV)、
m/z 1~2000(加速電圧 1.25kV)
- GC/MS感度: EIモード 0.03ng、
S/N \geq 10(メチルステアレートM⁺)
- 分解能: 500、1000、3000、5000

MS-GCmate
GC/MS SYSTEM



○ 全国一律お電話でのお問い合わせ先は本邦全53都道府県 ☎ 03-3284-1436

Serving Advanced Technology

JEOL 日本電子

本社・昭島製作所 〒196 東京都昭島市武蔵野3-1-2 ☎(0425)42 2161
東京事務所/東京支店 〒100 東京都千代田区丸の内3-3-1新東京ビル ☎(03)3284 1436
西東京(0425)42 2135・札幌(011)726 9680・仙台(022)222 3324・筑波(0298)56 3220・横浜(045)474 2181
名古屋(052)581 1406・大阪(06) 304 3941・広島(082)261 3790・高松(0878)71 8487・福岡(092)411 2381

New!



東京医科大学式 自動ホールボード試験装置 MODEL ST-1

主な特長

- 抗不安薬の評価を的確に且つ容易に行なうことが可能になりました。
- タイムコースを追うことにより、ストレス実験における新奇環境への情動的適応性を見ることが出来ます。
- 薬効評価を行なう際に動物を情動反応性の高いグループと低いグループとに分けて効率よく実験を行なう為のグルーピングが容易です。
- 測定項目が多岐にわたる為、探索行動等の評価も併せて行なえます。
 - ① 初期反応潜時、ヘッドティップの回数及び時間、行動時間、行動距離、平均行動速度、右/左旋回数、右/左方向転換回数、区画横切り回数、区画別滞留時間、レアリング回数、レアリング時間（以上自動計測）
 - ② 脱糞、排尿、見繕い、洗顔、その他ユーザー独自設定のイベント3種類（以上リモートキーによるマニュアル入力）
- 得られたデータをロータスマたはエクセルのテキストファイルに変換する機能を備えています。

自動ホールボード試験装置 MODEL ST-1は新奇環境下での情動行動の多角的解析を目的として開発されたシステムであり、従来困難とされてきた緩和な抗不安作用の前臨床評価や、ストレス状況への情動的適応性の評価などの多様な実験に応用可能です。

Muromachi

総発売元 室町機械株式会社

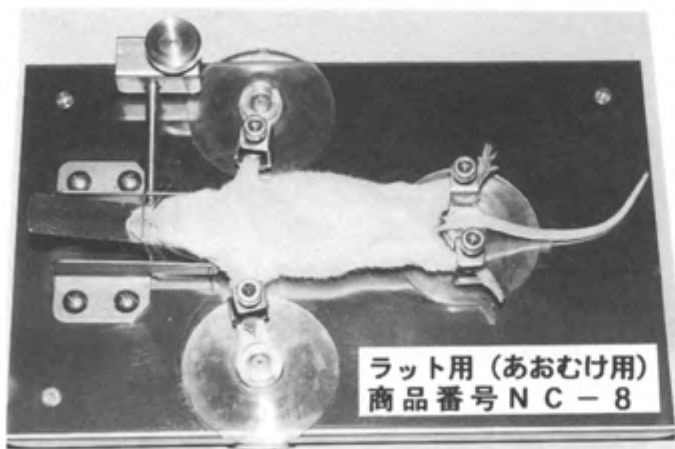
本社：〒103 東京都中央区日本橋室町4-2-1 大社ビル
TEL 03(3241)2444 FAX 03(3241)2940
大阪営業所：〒532 大阪市淀川区木川東4-5-3長谷興産新大阪ビル
TEL 06(302)1277 FAX 06(302)5026

ラット・マウス・モルモット用

NAIGAI

-CFK

小動物実験用固定器



特長

- ① あおむけ、うつぶせの状態のいづれでもラット・マウス・モルモットを無麻酔でワンタッチで固定できます。
- ② 無麻酔で採血、薬物投与も経時的に頸静脈から確実に行えます。
- ③ 頸静脈からの脱血も簡単にできます。

総販売元



株式会社エヌ・エム・エス

〒103 東京都中央区日本橋本町4-2-17 石田ビル3階

TEL03-3242-0681 FAX03-3242-0685

代理店

LMS 株式会社エル・エム・エス

〒101 東京都千代田区外神田2-2-19 ロクゴウビル

TEL03-5296-0950 FAX03-5296-0945

第22回 日本毒科学会学術年会 プログラム・要旨集

●発行日/平成7年6月10日 ●発行人/藤井 綾子

●発行所/帝京大学医学部 薬理学講座 〒173 板橋区加賀2-11-1 TEL(03)3964-1211 FAX(03)3964-0602

●印刷所/帝京印刷株 TEL(0552)53-9829