

---

第25回 日本トキコロジー学会学術年会

---

要 旨 集

---

平成10年6月17日(水)～19日(金)

名古屋国際会議場



1998 名古屋

# おかげさまで

## MPR-A4シリーズ 出荷累計台数 **3,000台突破**



東ソー株式会社  
科学計測事業部

**1986年**

パーソナルコンパクト  
マイクロプレートリーダー

MPR-A4 発売

「データ解析プログラム」発売

**1990年**

半読長/2読長切替可能  
マイクロプレートリーダー

MPR-A4i 発売

「毒性試験データ解析プログラム」発売

**1994年**

濃度/カットオフインデックス算出可能  
マイクロプレートリーダー

MPR-A4i II 発売

MPR-A4シリーズ出荷台数3,000台突破

**1998年**

## 感謝値下価格

# 78万円

マイクロプレートリーダー

## MPR-A4i II

### 特長

- 検量線作成・濃度換算機能
- カットオフインデックスの設定と陰陽判定
- A4版サイズ
- 再計算機能
- 複数のプランクセット
- 縦方式/横方式 レポート出力選択

### 用途

- 酵素免疫測定法
- 蛋白定量
- MTT試験など
- その他、可視領域定量
- 臨床検査にも応用



データ転送プログラム進呈中

Windows/Machintosh対応。MPR-A4i II のご購入の際お申し付け下さい



東ソー株式会社  
科学計測事業部

東京本社 ☎(03)3275-1221  
大阪支店 ☎(06)344-3857  
名古屋支店 ☎(052)211-5730

福岡支店 ☎(092)781-0481  
仙台支店 ☎(022)266-2341  
山口営業所 ☎(0834)63-9888

つくば営業所 ☎(0298)55-8166  
徳島営業所 ☎(0886)64-6865

# 目次

	頁
<b>特別講演</b>	
講演 1. (L-1)	1
医薬品安全性評価の人への外挿性向上を目指して：薬物動態研究のあり方 杉山 雄一、鈴木 洋史、伊藤 清美* 東京大学薬学部 製剤設計学教室、*北里大学薬学部	
講演 2. (L-2)	8
Mechanism of Tumor Promotion: Chemical Carcinogen-Induced Oxidative Stress, Signal Transduction and Modulated Cell-Cell Communication James E. Trosko Department of Pediatrics and Human Development, Michigan State University	
<b>セミナー：「毒性試験の質的向上を目指して」</b>	
R-0	15
オルガナイザー序論 土井 邦雄、松澤 利明* 東京大学 農学生命科学研究科、*山之内製薬 創薬安全性研究所	
R-1	16
聴性脳幹反応を用いたイヌにおける聴覚機能検査法 久世 博 田辺製薬 安全性研究所	
R-2	20
ビーグル犬の毒性試験における視覚機能検査への電気生理学的手法の応用 中山 直樹 大正製薬 安全性研究室	
R-3	25
長時間心電図検査を主体としたサルを用いた心毒性試験 清水 憲次 富士バイオメディックス 小淵沢総合研究所	
R-4	28
前立腺機能と薬剤の評価 村越 正典 帝国臓器製薬 安全性研究部	

R - 5		32
	腎障害の評価における超音波画像診断の応用	
	橋本 晃	
	北海道大学 診断治療学	
R - 6		35
	Safety pharmacology testing in general toxicity studies	
	Lewis B. Kinter and David K. Johnson*	
	Preclinical Skill Center, Astra Merck and *Department of Biological Sciences, Nycomed Amersham, USA	
R - 7		37
	Joint scientific committee for international harmonization of clinical pathology testing in animal toxicity and safety studies: Process and outcome	
	Robert L. Hall	
	Department of Pathology, Covance Laboratory, USA	
R - 8		42
	免疫毒性試験ガイドラインの国際的動向について	
	澤田 純一	
	国立衛研 機能生化学部	
R - 9		45
	Statistical science and quantitative understanding	
	David J. Finney	
	Emeritus Prof. Edinburgh University, UK	
R - 10		46
	Approaches to understanding species differences in hepatotoxic responses to therapeutic agents	
	Felix A. de la Iglesia	
	Park-Devis Parm. Res., Warner-Lambert, USA	
R - 11		51
	Teratogenicity of retinoids in rodents, primates and humans	
	Andrew G. Hendrickx	
	Primate Res. Ctr., California University, USA	

# シンポジウム 1:

## 「動物試験と臨床副作用の関連性」

M1-0	57
オルガナイザー序論	
加藤 隆一、馬屋原 宏*	
慶応大学医学部 薬理学、*武田薬品 薬剤安全性研究所	
M1-1	58
事例：臨床副作用「眠気と頭痛」と動物試験	
真鍋 淳、増田 裕*	
三共 安全性研究所、*総合研究所	
M1-2	63
事例：貧血に関する動物試験と臨床試験成績	
藤井 登志之、小原 要	
藤沢薬品 安全性研究所	
M1-3	66
事例：動物試験結果を基とした制ガン剤のヒトにおける安全用量の設定	
堀井 郁夫、川島 明	
日本ロシュ 前臨床科学研究部	
M1-4	72
薬剤によって惹起されるQT延長、致死性不整脈誘発の前臨床における検討	
橋本 敬太郎	
山梨医科大学 薬理学	
M1-5	77
薬物相互作用“ソリブジン薬害”を解明する動物および酵素試験	
渡部 烈、奥田 晴宏、小倉 健一郎	
東京薬科大学 第二衛生化学	
M1-6	82
Dealing with false positive and negative preclinical data in predicting human risk	
David Brown	
Pharmaceutical Services, Covance Laboratories USA	

## シンポジウム 2 :

### 「ヒト型反応を基礎とした毒性試験 :

### ヒト素材の活用と遺伝子組み換えモデル動物の応用」

- M2-0 85  
オルガナイザー序論  
井上 達、三宅 幸雄\*  
国立衛研 毒性部、\*塩野義製薬 新薬研究所
- M2-1 86  
The use of human-derived tissues in drug discovery and development  
Andrew Parkinson  
Xeno Tech: L.L.C., and Pharmacology and Toxicology University of Kansas  
Medical Center, USA
- M2-2 92  
我が国におけるヒト組織の有効活用との方策  
佐藤 哲男  
昭和大学薬学部
- M2-3 96  
ヒト由来細胞を用いた変異原性試験 : ヒトリンパ芽球細胞(TK6)を用いたチミジン  
キナーゼ(tk)遺伝子突然変異検出系の利用  
本間 正充、林 真、祖父尼 俊雄  
国立衛研 変異遺伝部
- M2-4 98  
トランスジェニックマウスを用いた短期発がん性物質の検索法について  
山本 慧、浦野 浩司\*  
萬有製薬、\*実験中央研究所
- M2-5 102  
ヒトP450遺伝子を発現させた細菌の毒性学研究への応用  
鎌滝 哲也、鈴木 昭浩、藤田 健一、中山 佳都夫、能美 健彦\*  
北海道大学 代謝分析学、\*国立衛研
- M2-6 105  
ヒト型動物モデルを用いた安全性試験の展望  
井上 達  
国立衛研 毒性部

# 一般演題 (口演)

## 1. 生殖毒性

107

### 01-1

Long Evans ラットにおける2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxinの応答遺伝子発現の臓器分布と性差

○米元純三、N. R. Jana、S. Sarkar、遠山千春\*、曾根秀子  
国立環境研究所 地域環境研究グループ、\*環境健康部

### 01-2

ジニトロフェノール系化学物質のラットにおける雄性生殖毒性

○高橋 研、北條 仁、青山博昭、寺本昭二  
残留農薬研究所 毒性部

### 01-3

加齢 Fisher344 ラットにおける精巣間細胞腫の発現機序について

○二村芳弘、浜田悦昌、柿沼千早、中村正樹、澁谷靖義  
持田製薬 安全性研究所

### 01-4

精子検査における Crj:CD(SD)IGS, Jcl:Wistar 及び F344/DuCrj ラットでの系統差

○松本 清、松本始緒里、鮫島顕二、大島洋次郎  
武田薬品工業 医薬開発本部 薬剤安全性研究所

## 2. PK/TK

111

### 02-1

LC-MS/MSを用いた血中薬物と臨床検査パラメータの同時定量

○井川 猛、茅野理也、畑 律子、林 俊英  
イナリサーチ

### 02-2

DDT単回経口投与試験(ラット)における血漿、肝臓、脳中のDDTおよび代謝物の分析法ならびに濃度推移

○富山成人、辻 洋美、渡辺茂美子、武田眞記夫、原田孝則、小林裕子  
残留農薬研究所

### 02-3

単回経口投与後の薬物動態に基づく混餌投与中の血漿中濃度時間推移の予測:  
DDTのラットにおけるトキシコキネティクス試験をモデルとして

○渡辺茂美子、富山成人、小林裕子、武田眞記夫、原田孝則  
残留農薬研究所

### 02-4

Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) の5-(2-bromovinyl) uracil

(BVU)による自殺阻害機構：BVUによるDPD修飾部位の決定

○小倉健一郎、奥田晴宏、荒川和人\*、福島正和\*、渡部 烈  
東京薬科大学薬学部 第二衛生化学、\*大鵬薬品工業 創薬センター

02-5

ヒトCYP2B6とヒトNADPH-P450還元酵素を同時に発現する大腸菌の開発

○藤田健一、森 牧子、鈴木昭浩、串田浩孝、鎌滝哲也  
北海道大学薬学部 代謝分析学

02-6

DNAのメチル化によるウサギCYP1A1の発現抑制機構

○高橋芳樹、鈴木千華、鎌滝哲也  
北海道大学薬学部 代謝分析学

### 3. 変異原性

117

03-1

発癌物質による臓器特異的な変異の誘発とその経時変化

—JEMS/MMS研究会共同研究のまとめ—

○伊東 悟<sup>1)</sup>、鈴木孝昌<sup>2)</sup>、中嶋 圓<sup>3)</sup>、蜂谷紀之<sup>4)</sup>、原 巧<sup>5)</sup>  
トランスジェニックマウス変異原性試験研究グループ： <sup>1)</sup>第一製薬、  
<sup>2)</sup>国立衛研、<sup>3)</sup>安評センター、<sup>4)</sup>秋田大学、<sup>5)</sup>食薬センター

03-2

キノリンの in vivo 突然変異誘発性とその抗変異原性構造修飾

○佐伯憲一、宮田裕子、川添 豊、鈴木孝昌\*、林 真\*、祖父尼敏雄\*  
名古屋市立大学薬学部、\*国立衛研 変異遺伝部

03-3

変異原性試験用トランスジェニックマウスを用いた発癌性評価 —その有用性と問題点について—

○羽倉昌志、園田二郎、筒井美枝、見上 孝、築館一男  
エーザイ 安全性研究所

03-4

新しいトランスジェニックマウス gptΔの開発

○増村健一、能美健彦  
国立衛研 変異遺伝部

03-5

10種類のヒトチトクロームP450とNADPH-チトクロームP450還元酵素のサルモネラ菌同時発現系の構築

○中山佳都夫、串田浩孝、岩田 宏、鈴木昭浩、山折 大、藤田健一、  
山田雅巳\*、能美健彦\*、鎌滝哲也  
北海道大学薬学部 代謝分析、\*国立衛研 変異遺伝部



03-6

アフラトキシンB<sub>1</sub>活性中間体エポキシドの加水分解におけるラット及びヒトエポキシド水解酵素の役割

○山崎浩史、W.W. Johnson\*、Y-F. Ueng\*、F.P. Guengerich\*、島田 力  
大阪府立公衆衛生研究所、\*Vanderbilt Univ. Sch. Med.

## 4. 肝臓毒性

123

04-1

ベンゾチアゾール誘導体によるラット肝毒性発現機序の解明 1) 抱合酵素の関与について

○佐藤 玄、青木豊彦、細川 暁、佐神文郎  
エーザイ 安全性研究所

04-2

Clofibrate 投与によるラットの肝臓の変化 - Monosodiumglutamateの影響 -

○五十嵐 功、牧野俊彦、村松敦子、真鍋 淳、矢本 敬  
三共 安全性研究所

04-3

ガラクトサミンとLPSにより誘発される肝毒性におけるTNF $\alpha$ の役割について  
-ラット肝スライスを用いた検討-

○榎富直哉、杉本次郎、島村久美子、田中栄治  
三菱化学 安全性研究所

04-4

肝部分切除および薬物代謝酵素誘導剤投与によるラット肝細胞内 DNA 量の変化

○渡辺真弓、袴田志野婦、矢本 敬、牧野俊彦、瀬畑信哉、田中宏治、  
五十嵐 功、高岡雅哉、真鍋 淳  
三共 安全性研究所

## 5. がん原性

127

05-1

医薬品のがん原性試験成績におけるラットとマウスの成績比較

○青木豊彦\*、入村兼司、古賀照二、佐藤元信、永山 智、藤井登志之、  
松澤利明、務台 衛、安場正子、山下 悟、臼居敏仁  
日本製薬工業協会基礎研究部会第三分科会 (\*エーザイ 安全性研究所、他)

05-2

ヒト正常型c-Ha-ras遺伝子導入ラットにおける発がん感受性

○朝元誠人、鳥山-馬場弘靖、安東 輝、鈴木寛規、竹下文隆、津田洋幸  
国立がんセンター研究所 化学療法部

05-3

遺伝子改変マウスの urethane に対する発癌感受性に関する検討

○渡辺知幸、尾崎正和、川崎 一、伊藤聖一\*  
住友化学工業 生物環境科学研究所、\*実医研

## 05-4

ras H2マウスを用いるがん原性試験代替試験法共同研究：cyclophosphamideによる尿路系腫瘍誘発性の検討を主眼とした26週間試験における間欠投与による用量設定試験

○久田 茂、永嶋雅子、谷藤久人、柴田誠司、飯塚和弘、佐藤敦子、磯部充威、桑山典之、森本秀樹、飯田祝子、増田修治、中山隆治、臼居敏仁\*  
帝国臓器製薬 安全研究部、\*実験動物中央研究所

## 05-5

ラット中期肝発がん性試験法における非変異原性発がん物質の検討

○萩原昭裕、五島英雄、佐野真士、田中 光、玉野静光、白井智之\*  
大雄会医科学研究所、\*名古屋市立大学医学部1病理

## 05-6

中期多臓器発がん性試験法を用いたがん原性の評価

○玉野静光、佐野真士、田中 光、河部真弓、萩原昭裕、白井智之\*  
大雄会医科学研究所、\*名古屋市立大学医学部1病理

# 6. 心脈管系

133

## 06-1

イヌのHCO-60により惹起したアナフィラキシー様反応にみられる頻脈の検討  
—ラジオテレメトリー法を用いた評価—

○宮崎裕康、川島康永、久野博司、松本浩良、池本文彦  
萬有製薬 開発研究所

## 06-2

カーバメート殺虫剤BPMCによる循環機能不全の電気生理学的解析  
—モルモット心室筋のL型Ca<sup>2+</sup>チャネル電流の抑制

○二川治子、高橋宏明、赤羽悟美\*、長尾 拓\*  
残留農薬研究所、\*東京大学薬学部 薬効安全性

## 06-3

サルの非侵襲的心拍出量の測定

○阿久根 淳、福崎好一郎、永田良一、鬼頭 剛  
新日本科学 安全性研究所

## 06-4

ドキシソルピシン遅発性心毒性：筋小胞体Ca<sup>2+</sup>放出機構傷害

○天間恭介、中郡昭人、小山田敏文、原 幸男、近藤洪志、佐々木卓士、明楽 泰\*  
北里大学獣医畜産学部、\*日本MSDRL

## 06-5

マイトマイシンC誘導体KW-2149によるラット肺毒性に対するデキサメタゾンの抑制効果

○原田智子、高場克己、原 卓司、山本 昇\*、田村友秀\*、西條長宏\*、

石井昭男

協和発酵工業 安全性研究所、 \* 国立がんセンター中央病院

06-6

日常にみられる酸塩基平衡の変化：無麻酔イヌの食後にみられる血液のアルカリ化

○尾崎潤一郎、谷本憲昭、久世 博

田辺製薬 安全性研究所

## 7. 内分泌系

139

07-1

甲状腺摘出ラットにおける血中甲状腺ホルモンとTSH濃度の関連

—Phenobarbital および Fluconazole の比較—

○滝沢節子、堀井郁夫

日本ロシュ研究所 前臨床科学研究部

07-2

コウジ酸の4週間反復強制経口投与による甲状腺への影響

○大久保 惇、比嘉良喬、一鬼 勉\*、北島俊一\*、仮家公夫\*\*

三省製薬 開発本部、 \*パナファーム ラボラトリーズ、

\*\*神戸学院大学薬学部

07-3

体内 NO 産生を指標とした安全性評価手法の開発に関する研究 甲状腺障害誘発ラットにおける LPS による体内 NO 産生について

○津田充宥、酒見和枝、宇佐見誠、大野泰雄

国立衛研 安全性生物試験研究センター 薬理部

07-4

In vitro 甲状腺スフェロイド培養系の毒性試験系への応用

井上智彰、○猪又 晃、堀井郁夫

日本ロシュ研究所 前臨床科学研究部

## 8. 腎毒性

143

08-1

臭素酸カリウムの毒性に及ぼす低蛋白食の影響

○中村英明、諏訪浩一、石井孝広、岡崎和志、高須正生、高松利明、

西村 進、榎並倫宣、西村信雄、畠山和久、岡崎修三

ポゾリサーチセンター 御殿場研究所

08-2

ラットを用いた Sevoflurane 分解物による腎毒性のメカニズムについて

○村崎祐子、玉鞍孝子、豊岡康平、三谷 治、井上恵児、長 敏夫、

河井祥一郎、田村 隆

丸石製薬 中央研究所

08-3

有機アニオン輸送体(QAT1)安定発現マウス近位直尿管終末部(S<sub>3</sub>)由来細胞株に

対するセファロリジン(CER)の影響

○武田理夫、小林麻美、関根孝司、細山田真、金井好克、遠藤 仁  
杏林大学医学部 薬理学

08-4

Ochratoxin A の細胞膜輸送：多選択性有機アニオントランスポーター (OAT1) 発現 *Xenopus* 卵母細胞による検討

○津田 実、関根孝司、上野芳夫\*、遠藤 仁  
杏林大学医学部 薬理学、\*東京理科大学薬学部 毒性学・微生物化学

## 9. 血液・骨髄毒性

147

09-1

コモンマーモセットの抗癌剤投与による血液性状に及ぼす影響

○山本光雄、池永哲二、石井百合子、松本直樹、竹田 剛、加藤 譲、  
石井昭男  
協和発酵工業 安全性研究所

09-2

攪拌による赤血球脆弱性検査の試み - アセチルフェニルヒドラジン (APHZ) 投与ラットでの検討 -

○真鍋由恵、松下宗史、林 泰司、松本清司\*  
大鵬薬品工業 安全性研究所、\*信州大学医学部附属動物実験施設

09-3

ラット造血前駆細胞コロニー形成法の確立及び毒性試験系としての可能性の検討

○高松一彦、若田明裕  
山之内製薬 創薬安全性研究所

09-4

血液前駆細胞コロニー形成法を用いた Potassium oxonate による 5-FU 誘発骨髄毒性の軽減効果

○前田泰宏、河内泰英、C.A.Tyson\*、大内田昭信\*\*  
大鵬薬品工業 安全性研究所、\*SRI International、  
\*\*大鵬薬品工業 安全性研究所

09-5

BUUV法を用いた造血幹細胞の細胞動態解析 3) *in vitro* 標識と *in vivo* 標識の差異について 4) p53 遺伝子欠失マウスについて

○平林容子、梅村隆志、児玉幸夫、金子豊蔵、菅野 純、黒川雄二、  
井上 達  
国立衛研 安全性生物試験研究センター

09-6

造血細胞を標的としたウイルスベクターによる遺伝子治療法の有効性と安全性の検討

○日比野仁\*、谷憲三朗、杉山 肇、谷岡功邦\*、浅野茂隆  
東京大学 医科研 病態薬理、\*中外製薬

## 10. 中枢・神経系

153

### 010-1

スunksにおけるMPTPの代謝と脳内へのMPP+の蓄積：ラットとの比較  
辻田泰誠、○有吉範高、横井 毅、高原栄二\*、永田 治、鎌滝哲也  
北海道大学薬学部 代謝分析学教室、\*北陸製薬 開発研究本部

### 010-2

ア rilニトリルで誘発された中枢神経細胞のアポトーシス  
○臧 小萍、谷井秀治、西條清史  
金沢大学医学部 衛生学講座

### 010-3

神経毒性試験における自発運動量測定に関する一考察  
○立花滋博、佐藤 淳、高島宏昌、関 誠、森村智美、原田知子、  
今井 清  
食品薬品安全センター 秦野研究所

### 010-4

神経毒性試験における学習・記憶の測定  
音/状況(文脈)刺激条件付けすくみ反応の機器測定  
○高橋宏明、亀坂泰正、林 百子、松本 力、二川治子、長谷部義男\*  
残留農薬研究所、\*室町機械

### 010-5

ラットの短期記憶検査法としてのスケジュール制御オペラント行動(SCOB)とスコ  
ポラミン、メカミラミン、メタンフェタミンの影響  
○宮川宗之、大谷勝己、本間健資  
労働省産業医学総合研究所

### 010-6

自由摂餌および制限給餌ラットの成長に伴う末梢神経伝導速度の推移に関する基礎  
的検討  
○山下弘太郎、岡崎欣正、日詰信吾、須藤雅人、奈良間功\*  
三菱化学安全科学研究所、\*摂南大学

## 11. 手技・手法、他

159

### 011-1

ラットにおける驚愕性耳介反射を用いた聴覚検査：アクリルアミドならびにIDPNの  
28日間反復投与による聴覚への影響  
○高島宏昌、田中あづさ、吉村慎介、斎藤義明、今井 清  
食品薬品安全センター 秦野研究所

### 011-2

毒性試験における静脈内インフュージョンの技術改良の試み  
○赤木圭介、渡辺 大、溝口靖基、熊原道代、石井俊也、深澤清久、  
松岡哲也、柴田良二、堀口浩資、長島吉和、岡庭 梓  
ボゾリサーチセンター 函南研究所

011-3

長時間持続インフュージョンの事例 - カニクイザルを用いた3カ月間投与

○角崎英志、福崎好一郎、鮫島秀暢、前田 博、宮高宏彰  
新日本科学 安全性研究所

011-4

カニクイザルでの骨粗鬆症モデル：卵巣摘出と低カルシウムが骨密度、強度、代謝に及ぼす影響

○高島宗一<sup>1)</sup>、川越正孝<sup>2)</sup>、高橋弘一<sup>2)</sup>、N.J. Miranda<sup>3)</sup>、D. Collins<sup>3)</sup>、  
林 隆志<sup>1)</sup>、武藤紀生<sup>1)</sup>、中村利孝<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>イナリサーチ、<sup>2)</sup>帝人バイオ・ラボラトリーズ、

<sup>3)</sup>Ina Research Philippines、<sup>4)</sup>産業医科大学 整形外科

011-5

卵巣摘出後のカニクイザルの臨床検査の経時変化

○宝来直人、和泉博之、福崎好一郎、宮高宏彰  
新日本科学 安全性研究所

## 12. アレルギー・免疫毒性

164

012-1

医薬品の抗原性試験および免疫毒性試験の実施調査

○筒井尚久\*、新海健吉、中村和市、牧 栄二

日本製薬工業協会基礎研究部会第二分科会 (\*三菱化学、他)

012-2

低分子医薬品の抗原性試験におけるマウス感作条件に関する検討

○桑原 孝、朝波省吾、田村 工

大塚製薬工場 鳴門研究所 安全性研究部

012-3

低分子薬剤のマウス膝窩リンパ節測定法によるアレルギー性評価

○新海健吉\*、杉原芳樹、國西芳治、中村和市、岩城理進、西田 仁、  
鈴木律好、H.W. Vohr、高橋美晴、高橋健司、筒井尚久、上村裕洋、  
牧 栄二

日本製薬工業協会基礎研究部会 免疫毒性WG (\*三共、他)

012-4

In vitro アナフィラキシー試験法の検討

○井上智彰、穴戸信之、中野康之亮、堀井郁夫

日本ロシュ研究所 前臨床科学研究部

012-5

鼻粘膜免疫用アジュバントとしての組換えコレラ毒素Bサブユニットの評価

○後藤紀久、前山順一、安田陽子\*、亦野恵子\*、井坂雅徳\*、小塚 諭\*、  
谷口 暢\*、三浦 裕\*、朽久保邦夫\*

国立感染症研究所 安全性研究部、 \*名古屋市立大学医学部

## 013-1

毒性試験における統計学的配慮 1) 全般的な注意点

○小宮山靖\*、平田篤由、光森達博、澤 淳悟、笠井英史、熊谷明夫、  
田村博信、平河 威、半田 淳

日本製薬工業協会統計特別小委員会 (\*ヘキストマリオン・ルセル、他)

## 013-2

毒性試験における統計学的配慮 2) 毒性試験における注意点

○平田篤由\*、小宮山靖、光森達博、澤 淳悟、笠井英史、熊谷明夫、  
田村博信、平河 威、半田 淳

日本製薬工業協会統計特別小委員会 (\*マルホ、他)

## 013-3

一般毒性試験における多重比較の利用上の注意点

○浜田知久馬

東京大学医学部 薬剤疫学教室

## 013-4

ラット反復投与毒性試験における計量値データ解析方法の検討

○榊 秀之\*、今溝 裕、五十嵐 俊二、大道克裕、寺井 裕、横内秀夫、  
滝沢 毅、久一真一、池田高志、戸塚和男、村上善紀、水間秀行、山田雅之、  
平田篤由、塚本 修、半田 淳

日本製薬工業協会基礎研究部会第一分科会 (\*千寿製薬、他)

## 013-5

大動物反復投与毒性試験における計量値データの解析について

○木幡信彦\*、堀江成光、佐藤和紀、内田英男、渡辺一人、和知正幸、  
二宮一広、坪内春樹、金田信也、貞永 納、山北 修、半田 淳、安藤正一、  
高橋行雄、芳賀敏郎

日本製薬工業協会基礎研究部会第一分科会 (\*日本ケミファ、他)

## 013-6

ドレイズスコアの代替法による予測についての統計学的検討

○吉村 功<sup>1)</sup>、大森 崇<sup>1)</sup>、大野泰雄<sup>2)</sup>、板垣 宏<sup>3)</sup>、大越健自<sup>3)</sup>、金子豊蔵<sup>2)</sup>、  
栗下昭広<sup>3)</sup>、小島肇夫<sup>3)</sup>、高野勝弘<sup>3)</sup>、高松 翼<sup>3)</sup>、林 真<sup>2)</sup>、吉田武美<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>東京理科大学工学部 経営工学科、 <sup>2)</sup>国立衛研、 <sup>3)</sup>化粧品工業連合会、

<sup>4)</sup>昭和大学

# 一般演題 (ポスター)

## 1. 生殖毒性

175

P1-1

ラット精子運動能の評価法に関する検討  
-  $\alpha$ -Chlorohydrinを用いた *in vitro* 試験-  
○ 吉米地英俊、藤原道夫、松澤利明  
山之内製薬 創薬安全性研究所

P1-2

$\alpha$ -Chlorohydrin の精子運動に及ぼす影響について  
- 精子運動能解析装置(IVOS)を用いた解析-  
○ 福西克弘、寺岡美枝、粟田則男  
鐘紡 薬品開発第一研究所 安全性研究部

P1-3

雄性生殖能評価における各指標間の特性  
- 精巣毒性を有するAdriamycin を用いての比較-  
○ 加藤真之、林 晴美、馬淵愛子、野村幸子、内藤一嘉、加藤佳子、  
太田隆雄、古橋忠和  
日本バイオリサーチセンター 安全性研究部

P1-4

ホウ酸投与によるラット精子の形態異常について  
○ 吉崎 宏、和泉祐子、平山千束、三奈木隆史、吉本結子、兼崎秀一、  
藤本昭宏、杉谷順康、中津 武  
武田薬品工業 医薬開発本部 薬剤安全性研究所

P1-5

ラットにおける制限給餌条件下での雄性生殖能の評価  
○ 坂 芳樹、稲垣 覚、内田美紀、朝鍋うるみ、中塚敏夫、花見正幸、  
松本浩良  
萬有製薬 開発研究所

P1-6

フタル酸エステルのエストロジェン活性の *in vitro* および *in vivo* 試験による評価  
○ 須藤桂子、永井賢司、前田真希、飯塚宏美、加藤正信  
三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所

P1-7

DBPおよびDEHPの卵巣摘出ラットを用いた *in vivo* におけるエストロジェン活性の  
検討  
○ 片山誠一、平塚秀明、永井賢司、山岸保彦、宮川 誠、土谷 稔、  
三浦 稔、加藤正信  
三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所



P1-8

可塑剤 butyl benzyl phthalate の妊娠及び偽妊娠ラットにおける生殖障害

○江馬 眞、宮脇英美子、川島邦夫

国立衛研 大阪支所

P1-9

ラットにおける着床前期間に投与したトリブチルスズの着床阻害作用－脱落膜反応に与える影響－

○原園 景、江馬 眞、川島邦夫

国立衛研 大阪支所 生物試験部

P1-10

雌ラットを用いたエストロゲン様作用物質検索のための短期スクリーニング

○山田智也、宮田かおり、佐古 博、吉岡 薫、紙田祐介、関 高樹、  
奥野泰由、細川俊治、山根節夫、松尾昌季

住友化学工業 生物環境科学研究所

P1-11

The risk assessment of endocrine disrupting chemicals in the aquatic environment using in vivo exposures with fish

C.T. Bowmer, S. Gimeno

TNO Nutrition & Food Research Institute

P1-12

Additive Estrogenic Effect Of Genistein And Bisphenol A, And Anti-Estrogenic Effect Of (-)-Epigallocatechin Gallate In MCF-7 Cells

○Kyung-Sun Kang, Jun Kanno, Tohru Inoue

National Institute of Health Sciences

P1-13

発生毒性解析系としての細胞分化を指標とした胚性幹細胞(ES細胞)利用の試み

○高木篤也、北嶋 聡、平林容子、相賀裕美子、黒川雄二、井上 達

国立衛研 安全性生物試験研究センター 毒性部

P1-14

ピラゾロン誘導体のラット培養胎児への影響(1) -アミノピリンと代謝物の発生毒性について-

○横山 篤、秋田正治、黒田行昭\*

鎌倉女子大学、 \* 国立遺伝学研究所

P1-15

Crj:CD(SD)IGSラットの生殖発生毒性試験背景データ

○納屋聖人、竹中千鶴、佐久間妙子

協和発酵工業 安全性研究所

P1-16

4週間未満の投与でも精巢毒性の検出が可能

○堺 俊治\*、黒田淳二、藤巻由紀夫、白井紀充、小林賢一、渡辺幸彦、古川雅一、成田隆博、畠山茂樹、菅原由憲、小川慎一、佐藤 茂  
日本製薬工業協会基礎研究部会第一分科会 (\*山之内製薬、他)

P1-17

生殖毒性に関するデータベース解析 1)「波状肋骨」について

○池川 直\*、松浦正男、井上立生、大窪康貴、三分一所厚司、谷口英巳、福西克弘、吉田順一、堀本政夫、藤井登志之  
日本製薬工業協会基礎研究部会第三分科会 (\*帝人、他)

P1-18

生殖毒性に関するデータベース解析 2)「頸肋」および「腰肋(過剰肋骨)」について

○花田 哲\*、大導寺俊平、有行史男、石井浩之、岩瀬隆之、関谷公範、谷 泉乃、西 直樹、横本泰樹、堀本政夫、藤井登志之  
日本製薬工業協会基礎研究部会第三分科会 (\*東レ、他)

## 2. PK/TK

193

P2-1

ラットの肝P450酸化系酵素活性の日内変動における性差および成長ホルモンの影響

○古川忠司、渡辺稔之、真鍋 淳、大橋芳彦、瀬畑信哉、岡田忠彦、森 裕司\*  
三共 安全性研究所、 \*東京大学 獣医学部

P2-2

ゴム老化防止剤 2-Mercapto-4-methyl-benzimidazole (4MeMBI) 及び 5-Me異性体 (5MeMBI) のラットにおける単回及び反復投与毒性とトキシコキネティクスの比較

○酒見和枝、伊藤理恵乃、宇佐見誠、大野泰雄、津田充宥  
国立衛研 安全性生物試験研究センター 薬理部

P2-3

Phenotyping of Flavin-containing Monooxygenase using Caffeine Metabolism and Genotyping of FMO3 Gene in a Korean Population

C. S. Park, W. G. Chung, J. H. Kang, H. K. Roh, K. H. Lee, ○Y. N. Cha  
Department of Pharmacology and Toxicology, College of Medicine,  
Inha University

### 3. 変異原性

196

P 3 - 1

Photomutagenicity/Phototoxicity in vitro Assays

E. Wollny\*, O.L. Ullmann, J. Klecak, G. Arcelin, T.R. Allen

\*RCC, Cytotest Cell Research GmbH, RCC, Reaearch & Consulting  
Company Ltd

P 3 - 2

マイトマイシンCの小核誘発性に対する絶食の影響

○朝波省吾、下野和之

大塚製薬工場 鳴門研究所 安全性研究部

P 3 - 3

膀胱特異的発がん剤芳香族アミンの代謝的活性化に関与するヒトアセチル転移酵素の検討

○小田美光、Pramod Aryal

大阪府立公衆衛生研究所 公衆衛生部

### 4. 肝臓毒性

199

P 4 - 1

ショ糖によるアセトアミノフェン肝毒性の増強作用

○埴岡健、北條真由美\*、山添 康\*、

藤沢薬品工業 安全性研究所、\*東北大学薬学部 衛生化学

P 4 - 2

ラット肝臓スライス培養法を用いた in vitro 毒性評価法の検討

—acetaminophenをモデルとして—

○時任康弘、出倉絵里葉、北村和之、川合是彰

田辺製薬 医薬育成研究所

P 4 - 3

マイクロシスチンLR—システイン反応物の安定性及び肝毒性

○竹中重幸、大津隆一、古荘早苗\*

福岡県保健環境研究所 病理細菌課、\*JASCOインターナショナル

P 4 - 4

LPS刺激による Kupffer 細胞を介した細胞障害性のラット、イヌにおける種差について

○浜野宝子、V.Tong、村瀬 正、田中栄治

三菱化学 横浜総合研究所 安全性研究所

## 5. がん原性

203

P5-1

医薬品のがん原性試験成績に関する調査結果

- 務台 衛\*、青木豊彦、入村兼司、古賀照二、佐藤元信、永山 智、  
藤井登志之、松澤利明、安場正子、山下 悟、臼居敏仁  
日本製薬工業協会基礎研究部会第三分科会 (\*三菱化学、他)

P5-2

モノクロロベンゼンのF344 ラットを用いた吸入によるがん原性試験

- 大澤 護、西沢共司、相磯成敏、山本静護、松島泰次郎  
中央労働災害防止協会・日本バイオアッセイ研究センター

P5-3

14日間反復投与したラット肝臓における MethapyrileneとPyrilamineの細胞増殖  
活性について

- 大塚雅則、江原初音、今田中伸哉、白石啓二、寶珠山五月、篠田和俊、  
山崎寛治  
化学品検査協会 日田研究所

P5-4

ラット肝癌細胞における in vivo シスプラチン毒性軽減機構の解析

- 宮本謙一、玉井光男、伊藤香江、野村政明、南野友義\*、大島 徹\*  
金沢大学大学院自然科学研究科医療薬剤学、 \*金沢大学医学部 法医学

P5-5

センソ由来新規 bufadienolide 系化合物 cinobufaginin の細胞死誘導能の解析

- 奥村弘樹、中村和美、井原智美\*、菅又昌雄\*、武田 健、上野芳夫  
東京理科大学薬学部、\*栃木臨床病理研究所

P5-6

lacZ 遺伝子導入細胞を用いた微小転移モデルの確立

- 小林 潔\*、中西速夫、杉本次郎\*、井上芳己\*、務台 衛\*、  
立松正衛  
\*愛知県がんセンター研究所病理学、 \*\*三菱化学 横浜総合研究所

## 6. 心脈管系

209

P6-1

新しいデータ取得・実時間解析システム(HEM)を用いた呼吸・循環器系安全性薬理  
試験の評価

- 竹田三喜夫、富田文美、佐藤重子、水野 洋、齋藤 守、金子武稔、  
山西嘉晴  
エーザイ 薬物評価研究所

P6-2

各種実験動物の心電図 QT 時間の比較及びIII群抗不整脈薬E4031の作用

- 加藤浩嗣、野本研一、吉永貴志、澤田光平  
エーザイ 筑波探索研究所

P 6 - 3

"Using Telemetry to Identify Drug-Induced Changes in Q-T Interval without Estimating QTc in Canine Electrocardiography

○L. B. Kinter

Preclinical Skill Center, Astra Merck Inc.

P 6 - 4

無麻酔・無拘束カニクイザルの血圧および心拍数のテレメトリー法による測定と循環作用薬の影響

○海上 智、藤原 淳、日詰信吾、飯塚宏美

三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所

P 6 - 5

ラジオテレメトリー法のイヌ毒性評価への応用<第2報>

—アナフィラキシー様反応の評価事例—

○宮崎裕康、久野博司、佐々木和彦、藤巻由紀夫、松本浩良、池本文彦

萬有製薬 開発研究所

P 6 - 6

毒性試験における心機能検査の現状と今後の可能性について

○清水 憲次、石山 芳則

富士バイオメディックス 小淵沢総合研究所

P 6 - 7

ラット毒性試験で認められた死亡原因の解析

○山内研司、杉山くに子、松本正博、大石裕司、橋本正晴

藤沢薬品工業 安全性研究所

P 6 - 8

Sprague-Dawley 系雄ラットの自然発生心筋症における餌の成分およびその制限給餌による効果

○花見正幸、K.P. Keenan\*、C.L. Boldwin\*、C.M. Hoe\*、K.A. Soper\*、

G.C. Ballam\*\*, M.J. van Zwieten\*、松本浩良

萬有製薬 開発研究所、\*Merck Research Laboratories、

\*\*Purina Mills

## 8. 腎毒性

217

P 8 - 1

自然発症腎不全モデル動物としてのミラノ正常血圧ラット(MNS)の基礎的検討

○吉岡直記、高橋久英\*、乾 公正\*\*、真板敬三\*\*、田中弘光、岩田光夫

呉羽化学工業生物医学研究所、\*藤田保健衛生大学 実験動物センター、\*\*残留農薬研究所

P 8 - 2

抗真菌活性評価における全身性カンジダ症モデルマウスの検討

○森本泰子、猪又 晃、穴戸信之、滝沢節子、小林和子、志賀敏彦、  
堀井郁夫

日本ロッシュ研究所 前臨床科学研究部

P 8 - 3

6分の5腎摘ラットの毒性試験への応用

—6分の5腎摘ラットと正常ラットの比較—

○水野幸恵、奥山 学、朝枝伸幸、岩井久和、望月健光、田川義章、  
福島昭治\*

三和化学研究所 安全性研究所、 \*大阪市立大学医学部 第一病理

P 8 - 4

コモンマーモセットにおけるシスプラチンによる腎障害の検討

○石井百合子、相本浩司、加国雅和、竹田 剛、山本光雄、原 卓司、  
石井昭男

協和発酵工業 安全性研究所

## 9. 血液・骨髄毒性

221

P 9 - 1

クロフィブレート投与時のラット赤血球膜に対する影響

○岡崎和志、望月雅裕、中村英明、畠山和久、高松利明、西村信雄、  
榎並倫宣、岡崎修三

ボゾリサーチセンター 御殿場研究所

P 9 - 2

抗癌剤(Mitomycin C)による骨髄有核細胞および末梢血への影響：イヌとラットの  
比較

○松本直樹、山本光雄、米重智美、加藤 譲、原 卓司

協和発酵工業 安全性研究所

P 9 - 3

抗凝固剤過剰下におけるラットとイヌ血漿のPTとAPTT延長について

○倉田昌明、野口規子、春日芳朋、杉本哲朗、田中公一、長谷川隆司

中外製薬 安全性研究所

P 9 - 4

毒性試験における自動血球計数装置での粒度分布異常の事例報告

○田邊容子、望月文敏、藤村みどり、中野雄司

旭化成工業 ライフサイエンス総合研究所 安全性研究所

P 9 - 5

カニクイザルにおける血液生化学的パラメーターの日内変動

○稲元弘昭、福崎好一郎、加島政利、池田浩明、鮫島秀暢、岡崎啓幸、  
宮崎宏彰

新日本科学 安全性研究所

## 10. 中枢・神経系

226

### P10-1

Functional Observational Battery 及び神経病理学的検査による神経毒性の検討：  
Vincristineのラット単回投与による行動障害について

○小川哲郎、三村雄一、加藤仁美、村越正典、中山隆治  
帝国臓器製薬 安全性研究部

### P10-2

Functional Observational Battery 及び神経病理学的検査による神経毒性の検討：  
Adriamycinのラット単回投与による末梢神経障害について

○小川哲郎、三村雄一、加藤仁美、村越正典、中山隆治  
帝国臓器製薬 安全性研究部

## 11. 手技・手法、他

228

### P11-1

気管内投与器具のバリデーションと利用方法の検討

○佐藤伸一、関谷泰司、巢山 晋、宮崎 譲、西垣敏明  
イナリサーチ

### P11-2

ベンタクロロフェノールによる培養肝細胞のアポトーシス誘導  
ーギャップ結合細胞間コミュニケーション阻害および酸化的ストレスの関連ー

○佐井君江、Kyung-Sun Kang、黒川雄二、井上 達  
国立衛研 安全性生物毒性センター

### P11-3

一般毒性試験における電顕検査の利用状況調査

○小川慎一\*、森 襄、樋口信昭、小倉基裕、阿瀬善也、鈴木一生、  
泉 英明、秋葉知英、田川義章、竹下 尚、佐藤 茂、堺 俊治  
日本製薬工業協会基礎研究部会第一分科会 (\*旭化成工業、他)

### P11-4

臨床病理検査データと病理組織所見の関連性データベースの構築

○佐藤 茂\*、船橋 斉、湯浅啓史、蟹谷昌尚、大瀧芽久美、三善隆広、  
及川寿治、吉村弘之、三井雅之、林万律子、小川慎一、堺 俊治  
日本製薬工業協会基礎研究部会第一分科会 (\*東菱薬品工業、他)

### P11-5

赤外線式鼓膜温度計による実験動物の体温測定について

○田畑 肇、廣田里香、栗原博司、久保道江、佐々木智、北村和夫  
山之内製薬 創薬安全性研究所

### P11-6

ラットにおける無麻酔下での頸静脈採血による採血量の検討

○星ゆかり、山中義弘、飯島 剛、阿部美佳、城之内公子、小林 充、  
金子英志、秦 純子、小池行也、宇野 洋  
帝人 医薬開発研究所 安全性研究部

P11-7

ラットにおける血液、生化学パラメータおよび薬物血中濃度に対する採血の影響

○武藤信一、田中 智、犬飼伸一、今村卓広、相馬晋司、筒井 将、  
百瀬泰紀、柴田信男、松本清司\*

キッセイ薬品工業 第二研究所、 \*信州大学医学部附属動物実験施設

P11-8

Vascular Access Ports for Repeat-Daily Intravenous Dosing in Rats

J. Harms, C. Crewell, G. DiSalvo, K. Johnson, P. Losco, N. Fetrow,  
D. K. Johnson, ○L. B. Kinter

Department of Biological Sciences, Nycomed Inc., K. Johnson

P11-9

A Maximal Rapid Intravenous Injection Volume in Dogs (*Canis familiaris*)

○L. B. Kinter, H. Donkin, D. K. Johnson

Department of Biological Sciences, Nycomed Inc.

P11-10

末梢静脈用輸液の血管障害性に及ぼす浸透圧の影響

○桑原 孝、朝波省吾、田村 工

大塚製薬工場 鳴門研究所 安全性研究部

P11-11

海綿由来ペプチド-Discodermin A-の細胞膜透過性亢進作用

○尾崎 博、佐藤晃一、堀部紀久子、斎藤みのり、堀 正敏、松永茂樹、  
伏谷伸宏、唐木英明

東京大学大学院 農学生命科学

P11-12

ラットにおけるL-システインの静脈内投与毒性

○原田美輪、梅岡健一、金田信也、岸本恒次、姜 定克、山下邦弘、  
岸本早苗、澤本 修、長根芳文

大塚製薬工場 鳴門研究所

## 12. アレルギー・免疫毒性

240

P12-1

17 years experience with allergenicity/photoallergenicity tests in albino guinea pigs:

A critical review

G. Arcelin, ○L. Ullmann, Th. Pfister, J. Klecak, T.R. Allen

RCC, Research & Consulting Company Ltd

P12-2

PFC測定に代わり得るAnti-SRBC IgMのELISA

○安達智子、金澤由基子、古谷真美、田子和美、小島幸一

食品薬品安全センター 秦野研究所



P12-3

2-メルカプトベンズイミダゾール誘導体のモルモットにおける皮膚感作性と  
化学構造との関係について

○伊佐間和郎、門馬純子\*、鹿庭正昭、中村晃忠

国立衛研、\*医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構

P12-4

高ビリルビン尿症ラットのrecombinant human IL-1 $\beta$ (rhIL-1 $\beta$ )によるストレス応  
答タンパク質やケモカイン遺伝子発現抑制

○小黑多希子、大野真義、Elda H.S.Hausmann\*、吉田武美

昭和大学薬学部 毒物学教室、\*カンサス大学

## 13. データ解析・統計手法

244

P13-1

大動物の一般毒性試験データ（少数例計量値データ）の毒性評価に関するアンケート  
調査について

○半田 淳\*、木幡信彦、堀江成光、佐藤和紀、内田英男、渡辺一人、

和知正幸、二宮一広、坪内春樹、金田信也、貞永 納、山北 修

日本製薬工業協会基礎研究部会第一分科会（\*日本化薬、他）

P13-2

イヌを用いた一般毒性試験における背景データ利用法の検討

—血液生化学的検査データについて—

○北島省吾、小林克己、大石法男、井上博之

食品農医薬品安全性評価センター

## 著者索引

247

## 特別講演

## 医薬品安全性評価の人への外挿性向上を目指して： 薬物動態研究のあり方

杉山雄一<sup>1)</sup>、鈴木洋史<sup>1)</sup>、伊藤清美<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>東京大学大学院薬学系研究科、<sup>2)</sup>北里大学薬学部

(はじめに)

ヒトにおける薬物動態、代謝試験の意義が、最終的には効果的で副作用の少ない薬物治療を行うためのものであることを考えると、ヒトにおけるファーマコキネティクス(PK)、トキシコキネティクス(TK)パラメータを求めることや代謝物を同定すること自身が試験の目的であってはならない。ヒトにおけるこれら試験の結果は、さらに“薬物血中濃度推移と薬効、副作用との関係”に関する試験結果と統合されることによってはじめて臨床における薬効、副作用を推測するための有意義な情報となり得る。これは、作用(薬効、副作用)に直接関係するものは標的組織における薬物濃度推移であるものの測定が困難であるため、それに代用できるものとして(非結合型)血中濃度推移を用いるという考え方に由来している。

近年、医薬品の開発過程が大きく変動しようとしている。すなわち、combinatorial chemistry(CC)の発展により数多くの化合物を短時間で作り、ヒトにおける薬理活性のみならず薬物動態学的特性の優れた化合物を開発初期のスクリーニング段階でピックアップしようというhighthroughput screening(HTS)の動きが欧米の製薬企業を中心に高まってきている。

以上の背景のものとして、医薬品開発において、ヒトにおける薬物動態を外挿・予測する重要性が理解されるであろう。以下に述べる種々の方法論に基づくヒト外挿において、この20年ほどの間に発展してきた生理学的薬物速度論(PBPK model)の果たした役割は大きい。このモデルの考え方、応用例については、セミナーでのHendrickx博士(UC Davis)の講演も参照されたい。

### [1] 生理学的ファーマコキネティクスの考え方<sup>1,2)</sup>

図1に種々の生理学的、生化学的基本パラメータからPBPK modelの手法に基づいて個体レベルでの薬物動態を構築する手法を示した。特に“クリアランスの概念”に基づいた薬物動態の理解は薬物速度論の本質を理解することにつながる。

薬物の体内動態を支配する重要なパラメータであるクリアランス(CL)と分布容積(Vd)は幾つかの生理学的な要因と生化学的な要因によって決定されている。生化学的な要因を様々な実験動物で測定し、それらの値の体重や体表面積とのアロメトリックな関係を用いてヒトでの体内動態を予測する、いわゆる相関論に基づくanimal scale-upの手法は古くから用いられ、多くの成功例が知られている。一方、適切な実験によりこれら生化学的要因を*in vitro*試験管レベルで測定し、組織レベル、さらには個体レベルの体内動態を構築するアプローチは、生理的・病態的な生体側の変動や他の薬物の共存などの外的要因が、目的とする薬剤の体内動態へおおよそ影響を予測することを可能にする。

薬効、副作用の重要なindexである血中濃度下面積 (AUC)、定常状態血中濃度 (Css) を支配する重要なパラメータ、全身クリアランスは主として肝代謝クリアランスと腎排泄クリアランスにより構成される。腎での薬物排泄クリアランスは各種実験動物での値を基にanimal scale-upの手法でヒトでの値を予測する試みが成果を上げている。しかし肝代謝クリアランスは種差の大きいことが知られており、animal scale-up手法の適用には限度がある。このような場合でも、*in vitro*での代謝データ、生体膜透過に関するデータ、蛋白結合性のデータが正確に得られ、それらを生理解剖学的パラメータと統合するならば、*in vivo*での薬物動態をある程度正確に予測することが可能になってきた。

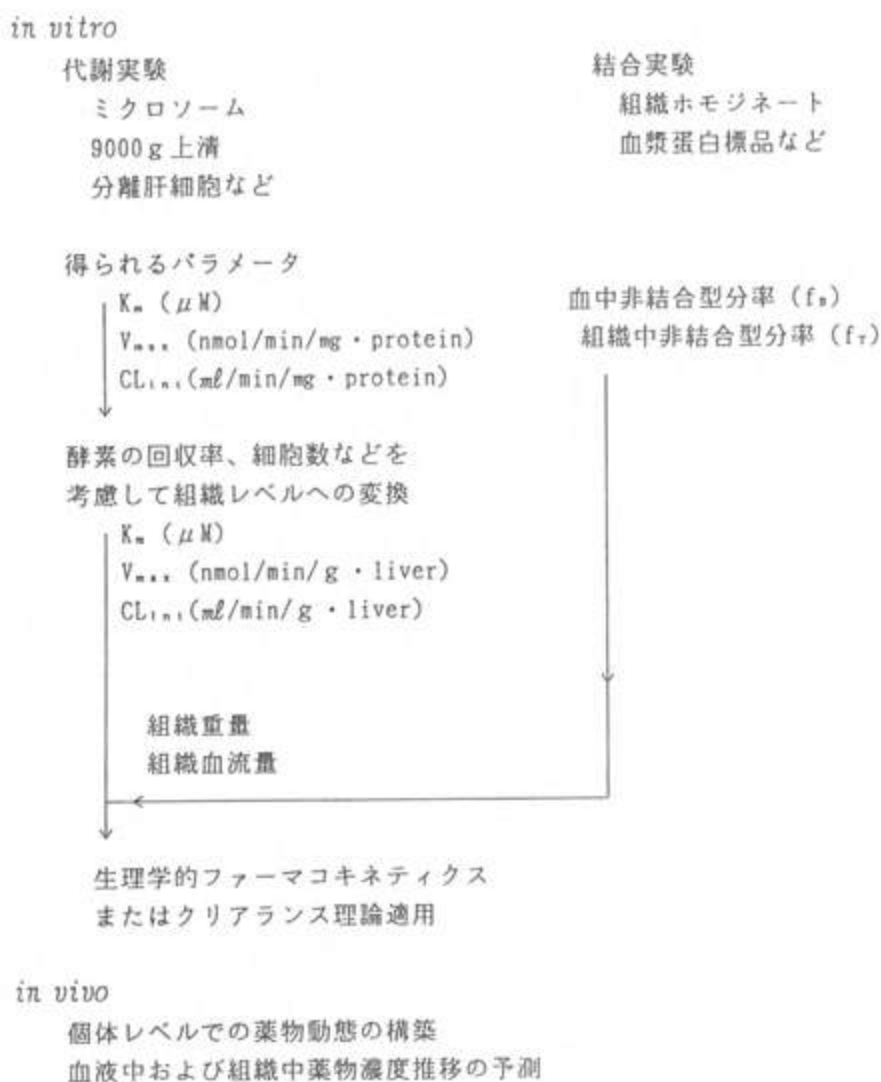


図1 *In vitro*データから*in vivo*、生体レベルでの薬物動態を予測する方法論

[2] *In vitro* (細胞、オルガネラ)での代謝、結合、生体膜透過データから*in vivo*での代謝クリアランスの予測、相互作用の予測<sup>3-8)</sup>

## 2-1) 肝クリアランスの構築

*In vivo*の肝臓における本質的な薬物の代謝能力を表すパラメータ(肝固有クリアランス:  $CL_{int}$ )を予測することを目的として*in vitro*での代謝反応速度を測定する場合、できるだけ生理的な条件に近い実験設定をすることが必要である。

肝臓での薬物除去が代謝反応によるものである場合、肝クリアランス( $CL_H$ )は肝固有クリアランス( $CL_{int}$ )、肝血流量( $Q_H$ )および血中蛋白結合率( $f_u$ )、生体膜透過性などによって支配される。肝抽出率( $E_H$ )、肝アベイラビリティ( $F_H$ )を予測するためには適切な数学モデルを使うことが必要である。我々の最近のラット、ヒトにおける解析によると、dispersion modelを用いることにより、*in vitro*系(microsomeを用いた実験)から*in vivo*での肝代謝クリアランスを予測できることが明らかにされている。

## 2-2) ヒトにおける肝代謝クリアランス予測の実例

我々はP450が関与する32種の代謝反応について、主にヒト肝ミクロソームを用いた代謝試験の文献情報を基に、*in vitro*の $CL_{int}$ を算出した。一方、当該薬物の体内動態に関する文献情報から、dispersion modelにしたがって*in vivo*の $CL_{int}$ を算出し、両者を比較した(図2)。*In vivo*の親化合物の血中消失、尿中排泄、代謝物の尿中recoveryより $CL_{int}$ を算出するに当たっては、肝外での代謝は生じないという仮定および、肝臓への分布は瞬時平衡、受動輸送によるという仮定のもとに行った。両者の比が3倍以内のものが約50%、また5倍以内のものが約70%を示すという程度の一致性が得られた。不一致の要因としては、代謝の個体差のほか、小腸など肝臓以外の臓器における代謝の寄与、膜透過性が低いことによる*in vivo*の $CL_{int}$ の過小評価、肝細胞へのinfluxあるいは肝細胞からのeffluxに能動輸送が関与していることによる*in vivo*の $CL_{int}$ の過大評価あるいは過小評価などが考えられる。

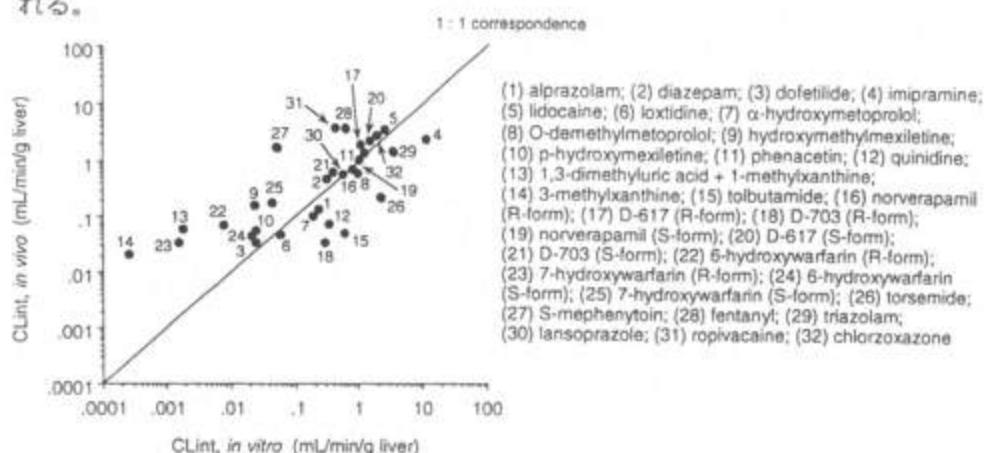


図2 文献情報より算出した*in vivo*および*in vitro*の $CL_{int}$ の比較

また、痴呆症状改善薬として開発中のYM796について、ラット、イヌ、およびヒトの肝ミクロソームを用いて代謝試験を行い、初回通過代謝の非線形性を考慮した解析により経口投与後のAUCおよびバイオアベイラビリティを予測した結果、代謝が非線形の場合にも実測値とほぼ一致する結果が得られた(図3)。

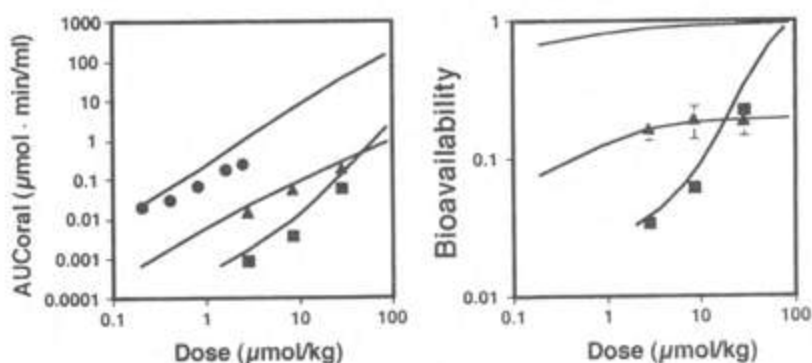


図3 YM796のAUCおよびバイオアベイラビリティの*in vitro*試験からの予測  
 ■: ラット, ▲: イヌ, ●: ヒト, 実線: 予測値

### 2-3) 薬物間相互作用の予測

薬物代謝における薬物間相互作用についても、*in vitro*試験で得られるパラメータをもとにPBPK modelに基づいて*in vivo*での相互作用を定量的に予測することが可能である。代謝酵素の競合阻害に基づく相互作用については、*in vitro*代謝試験により阻害定数(Ki)を算出し、基質および阻害剤の体内動態を考慮することにより、基質の血中濃度変化を予測することができる。一方、阻害剤の代謝物が酵素と共有結合することによるmechanism-based inhibitionの場合には、阻害剤濃度および酵素とのプレインキュベーション時間を変化させた*in vitro*試験を行い、得られた阻害パラメータと酵素のturnover rateなどを用いて、*in vivo*での相互作用を予測する。薬害事件として問題になったソリブジンと5-FUとの相互作用について、5-FUの代謝律速酵素であるdihydropyrimidine dehydrogenase (DPD)の発現系を用いた*in vitro*代謝試験の結果から、ソリブジンの併用によりDPDが失活し、それに伴って5-FUの血中濃度が大きく上昇することが予測された(図4)。

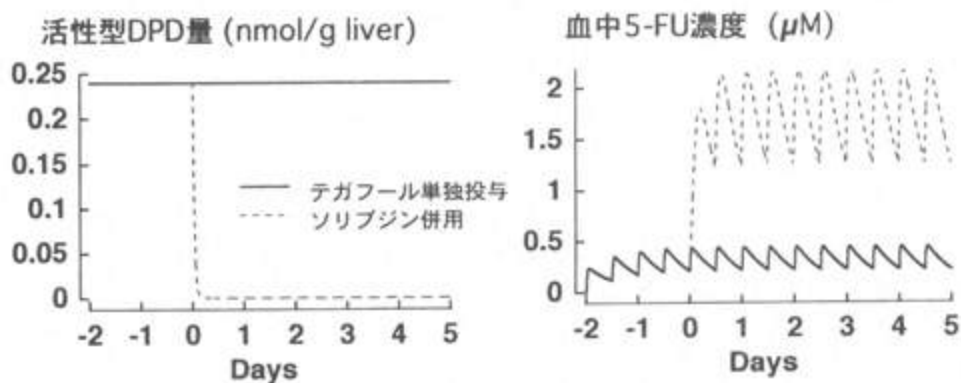


図4 ソリブジンの併用による活性型DPD量および血中5-FU濃度変化の予測

[3] 胆汁排泄、尿中排泄の予測：トランスポーターの関与<sup>9-12)</sup>

肝臓、腎臓は種々の内因性・外因性の物質を血液側から取り込み、胆汁中、尿中に排泄することにより解毒化する重要な臓器である。血液側から肝、腎細胞内への取り込みおよび細胞内から管腔側細胞膜を介した排泄過程機構に関しては、種々の実験系を用いて多くの研究がなされた結果、多くの医薬品の肝胆系への移行が担体輸送によることが証明され、現在では輸送蛋白、遺伝子の同定を目指した多くの研究が世界中で展開されている(図5)。我々の研究グループでも、最近、胆管側の有機アニオン輸送担体、canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) のクローニングを行い、cMOATの基質認識特異性を明らかにするとともに、一連の一次性能動輸送担体は、保存性の高いATP binding cassette (ABC) 領域を有すること、類似のトランスポーターが複数存在することなどを明らかにしている。肝、腎における輸送担体と医薬品動態の関わりが明らかになっている多くの実例がある。例えば、HMG CoA還元酵素阻害剤であるプラバスタチン(有機アニオン性化合物)は、肝臓でのコレステロール合成阻害活性が薬効に関わっている。この薬が経口投与されると、消化管から門脈中への吸収、門脈から肝への取り込み、肝細胞内から胆汁中への排泄のいずれの過程にも能動輸送担体の関与することが明らかになっている。そのため、効率のよい腸管循環が生じており、大部分の薬物分子を薬効の標的である肝臓に留め、循環血中への出現を最小化することにより副作用の軽減に役立っている。今後はこうした輸送特性を開発段階で考慮し、よりstrategicな開発研究が望まれるところである。この他にも、肝、腎におけるトランスポーター研究が活かされる例として、肝、腎ふりわけの問題が挙げられる。例えば、抗生物質、ACE阻害剤など、使用される対象である患者の腎機能、肝機能の個人間変動が予測される場合には、それぞれ胆汁排泄、尿中排泄が主な消失経路になるように薬をデザインすると、血中濃度の個人間変動を最小限に押さえることができるであろう。

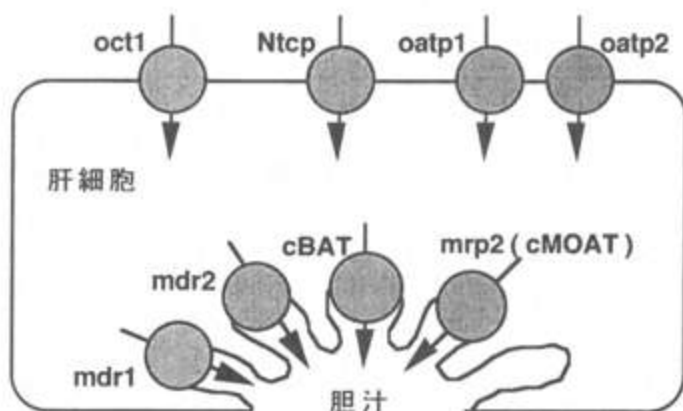


図5 肝臓への取り込みおよび胆汁排泄に関与するトランスポーター

#### [4] ヒトにおける体内動態の個体差を支配する要因の解析<sup>1,7)</sup>

ヒトにおける体内動態の個体差(病態差も含む)は、投与量・対作用(薬効、副作用)の関係における個体差につながるため、その支配要因を理解することは極めて重要である。個体差の原因となり得る素反応過程として、(1)投与部位から循環血中への吸収性、(2)肝代謝固有能力(代謝酵素の量、質)、(3)血中蛋白結合性、(4)腎での排泄能力(糸球体濾過能力、能動的分泌固有能力)、(5)代謝、排泄に関与する臓器での血流速度などを挙げることができる。ヒトにおけるファーマコキネティクスパラメータが得られた場合、その大きさから上記のどの要因が個体差を支配するかについてある程度の考察が可能である。その推定に基づいて限られたヒト試験データから真実を抽出することが重要となろう。例えば、薬物のクリアランスの大きさ、尿中への親化合物の排泄率などの情報から肝での初回通過効果の大きな薬物かどうかの考察が可能である。また、クリアランスの大きさを知ることにより、血流支配か、固有クリアランス支配かを推定できるので、個体差の要因を絞ることが可能となる。また、全身クリアランスが主に腎からの排泄によるものであることを知るにより、クレアチニン測定などによる個体差の予測も可能となる。

#### [5] 血中濃度測定だけで充分であろうか?<sup>13-15)</sup>

##### 5-1) 副作用のターゲットが消化管、肝臓にある場合

これまで血中濃度を基準にしたAUC, C<sub>max</sub>, MRTがTKのパラメータとして用いられてきた。しかながら、経口投与される薬で消化管、肝臓を初回通過するときその大部分が取り込まれる場合を想定すると、決して血中濃度基準のAUCが消化管、肝臓中濃度基準のAUCの良い指標とはならないことがわかる。効率良い腸肝循環の生じる場合にも同様のことが言える。このような場合には、動物実験のレベルで、投与ルート、採血部位を変える実験を組み合わせたデータをとることにより、速度論モデルに基づいて、各組織中での濃度プロファイルを予測することが必要となる。

##### 5-2) 血中-組織への移行に関門のある場合、能動輸送が関与する場合

血中から組織への分布が比較的速やかに生じ、かつ組織への分布の程度が血中蛋白結合性と組織高分子への比較的非特異的結合により決まってくる場合には、血中結合性の種差を補正してやれば、ヒトでの組織分布性(分布容積に反映される)を動物データから予測することは可能である。しかしながら、血液-脳関門に代表されるように、血中と組織中の分布平衡に時間がかかる場合、あるいは最近多くの化合物で証明されているように、肝、腎、小腸などに存在する能動輸送系により薬物分布が支配される場合には、血中-臓器の間をつなぐ伝達関数にどの程度の種差が存在するかについて、ほとんど情報がないため、ヒトにおける予測が困難であるという現状である。今後、この点についても、多くの基礎研究が蓄積されることが望まれる。



(参考文献)

- (1) 「医薬品開発における薬物動態研究」、杉山雄一 編、薬業時報社(1998)
- (2) 「ファーマコキネティクス研究の方法と技術—前臨床から臨床第1相へ—」、杉山雄一 編、日本薬物動態学会、pp. 87-108 (1993)
- (3) 「抗癌剤の相互作用—これからの抗癌剤治療戦略—」、杉山雄一、佐々木康綱 編、医薬ジャーナル社(1998)
- (4) T.Iwatsubo, N.Hirota, T.Ooie, H.Suzuki and Y.Sugiyama: Prediction of *in vivo* drug disposition from *in vitro* data based on physiological pharmacokinetics. *Biopharm. Drug Dispos.* 17: 273-310 (1996)
- (5) T.Iwatsubo, N.Hirota, T.Ooie, H.Suzuki, N.Shimada, K.Chiba, T.Ishizaki, C.E.Green, C.A.Tyson and Y.Sugiyama: Prediction of *in vivo* drug metabolism in the human liver from *in vitro* metabolism data. *Pharmacol. Ther.* 73: 147-171 (1997)
- (6) K.Ito, T.Iwatsubo, S.Kanamitsu, K.Ueda, H.Suzuki and Y.Sugiyama: Prediction of pharmacokinetic alterations caused by drug-drug interactions: Focusing on metabolic interaction in the liver. *Pharmacol. Rev.*, accepted.
- (7) T.Iwatsubo, H.Suzuki, N.Shimada, K.Chiba, T.Ishizaki, C.E.Green, C.A.Tyson, T.Yokoi, T.Kamataki and Y.Sugiyama: Prediction of *in vivo* hepatic metabolic clearance of YM796 from *in vitro* data by use of human liver microsomes and recombinant P-450 isozymes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282: 909-919 (1997)
- (8) T.Iwatsubo, H.Suzuki and Y.Sugiyama: Prediction of species differences (rats, dogs, humans) in the *in vivo* metabolic clearance of YM796 by the liver from *in vitro* data. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283: 462-469 (1997)
- (9) M.Yamazaki, H.Suzuki and Y.Sugiyama: Recent advances in carrier-mediated hepatic uptake and biliary excretion of xenobiotics (review). *Pharm. Res.* 13: 497-513 (1996)
- (10) 鈴木 洋史, 杉山 雄一: 異物排除におけるトランスポーターの役割: cMOAT およびMRP superfamily memberを中心として. *蛋白質核酸酵素* 42: 1273-1284 (1997)
- (11) K.Ito, H.Suzuki, T.Hirohashi, K.Kume, T.Shimizu and Y.Sugiyama: Molecular cloning of canalicular multispecific organic anion transporter defective in EHBR. *Am. J. Physiol.* 272: G16-G22 (1997)
- (12) K.Ito, H.Suzuki, T.Hirohashi, K.Kume, T.Shimizu and Y.Sugiyama: Functional analysis of a canalicular multispecific organic anion transporter cloned from rat liver. *J. Biol. Chem.* 273: 1684-1688 (1998)
- (13) H.Suzuki, T.Terasaki and Y.Sugiyama: Role of efflux transport across the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier on the disposition of xenobiotics in the central nervous system (Review Article). *Adv. Drug Deliv. Rev.* 25: 257-285 (1997)
- (14) K.Takasawa, T.Terasaki, H.Suzuki, T.Ooie and Y.Sugiyama: Distributed model analysis of 3'-azido-3'-deoxythymidine and 2',3'-dideoxyinosine distribution in brain tissue and cerebrospinal fluid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282: 1509-1517 (1997)
- (15) H.Kusuhara, H.Suzuki, T.Terasaki, A.Kakee, L.Lemaire and Y.Sugiyama: P-glycoprotein mediates the efflux of quinidine across the blood-brain barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283: 574-580 (1997)

**MECHANISM OF TUMOR PROMOTION: CHEMICAL  
CARCINOGEN-INDUCED OXIDATIVE STRESS, SIGNAL  
TRANSDUCTION AND MODULATED CELL-CELL  
COMMUNICATION**

James E. Trosko  
Department of Pediatrics and Human Development  
National Food Safety and Toxicology Center  
Michigan State University  
East Lansing, Michigan USA 48824

## INTRODUCTION: AN EVOLUTIONARY PERSPECTIVE

Life evolved in a very hostile environment. As the living organisms evolved, the energy for life was derived from an oxygenated atmosphere by oxidative metabolism. The creation of energy also produced many potentially lethal reactive oxygen species (ROS) [1]. In addition, ROS were generated by background nonionizing and ionizing radiation, as well as various chemicals that interacted with these organisms. Consequently, natural selection of those organisms occurred for those that acquired various defense mechanisms which protected them against the harmful effects of ROS generated by both oxidative metabolisms and exogenously-induced oxidative stress.

Anti-oxidants, free radical-scavaging chemicals, coupled redox cycling biochemical reactions, intracellular sequestration of various chemical reactions, and DNA repair mechanisms to maintain the integrity of the genetic material were acquired by natural selection during evolution. When multicellular organisms evolved from the single cell organism, which survived environmental stresses by adaptive mutations during cell proliferation, a unique gene appeared at the time when three additional cellular functions appeared, namely, **growth control by contact inhibition, cell differentiation and programmed cell death or apoptosis**. This gene coded for a membrane-anchored protein, the **connexin**, which forms a hexameric hemi-channel, the **connexon**. Two connexons of contiguous cells unite to form a channel connecting the neighboring cytoplasm [2]. A number of these connexons unite to form the **gap junction**.

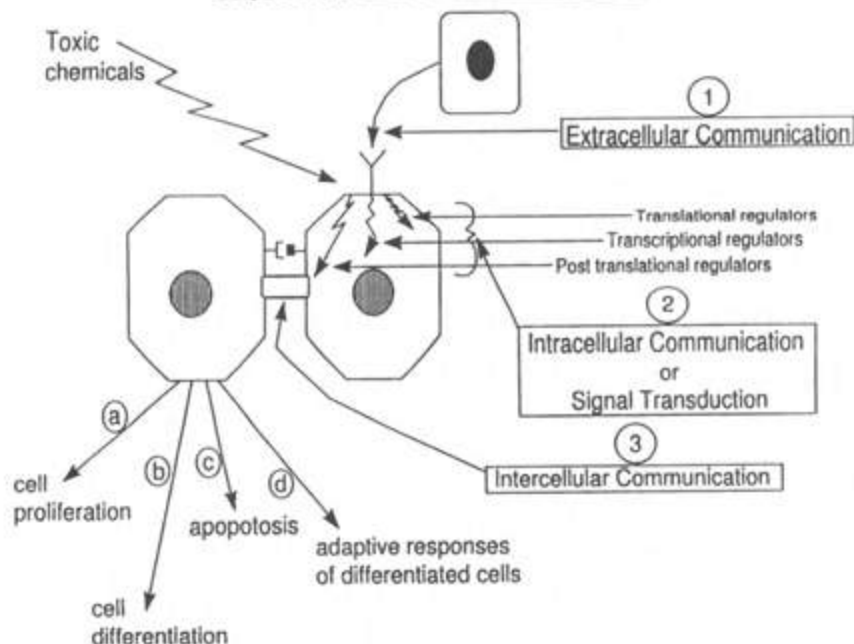
In addition to the adaptive mechanisms found in the single cell organisms, these gap junctions provided new adaptive means to cope with oxidative stress. For example, since ions and small molecular weight molecules could passively flow through the gap junctions of all the coupled cells, the entire regulatory ions and molecules, as well as antioxidants, etc., could be equilibrated. Coupled cells could act as "sinks" or "point sources" for those agents which could harm or protect the cells, respectively. In other words, a multicellular organism is not just a collection of individual cells (as one would characterize a population of bacteria) but it is a well-coordinated collection of societies of phenotypically different cells, each with unique tissue and organ function, together with the basic functions of the component cells, such as cell proliferation, differentiation, apoptosis and if differentiated, adaptive responses.

Both the single cell and multicellular organism developed systems to cope with the background levels of ROS generated by oxidative metabolism for energy of life and the external environment. Levels of ROS above these "background" levels called for various adaptive responses.

## HEALTH AS THE HOMEOSTATIC INTEGRATION OF EXTRA-, INTRA-, AND INTER-CELLULAR COMMUNICATION IN MULTICELLULAR ORGANISMS.

From the single, "toti-potent" fertilized egg to the mature multicellular organism, such as the human which contains about 100 trillion cells (stem, progenitor and terminally-differentiated cells), a delicate coordination of the four cellular functions (proliferation, differentiation, adaptive responses of differentiated cells, and apoptosis) must be maintained. Three major forms of communication are integrated: (a) **extra-cellular** communication via hormones, growth factors, neurotransmitters, and cytokines occurs when one cell secretes one of these communicating signals which interacts with another cell over a distance; (b) **intra-cellular** communication, being triggered by extra-cellular molecules, must regulate the control of gap junctions (at either the transcriptional or posttranslational levels) and the control of various signal transduction mechanisms within the cell to trigger proliferation, differentiation, adaptive responses or apoptosis; and (c) **gap junctional inter-cellular communication (GJIC)** (cell adhesion and cell-matrix interactions are considered subforms of inter-cellular communication) [Figure 1].

## Gap Junctions in Cellular Homeostasis



[Figure 1]

Endogenous extra-cellular signals which can trigger various intra-cellular signal transducing mechanisms can either increase or decrease gap junctional intercellular communication between the cells in a multicellular organisms. Growth, wound healing, tissue repair, pattern formation or tissue differentiation, programmed cell death and adaptive responses of tissues occur when either there is an down- or up-regulation of gap junction function [3].

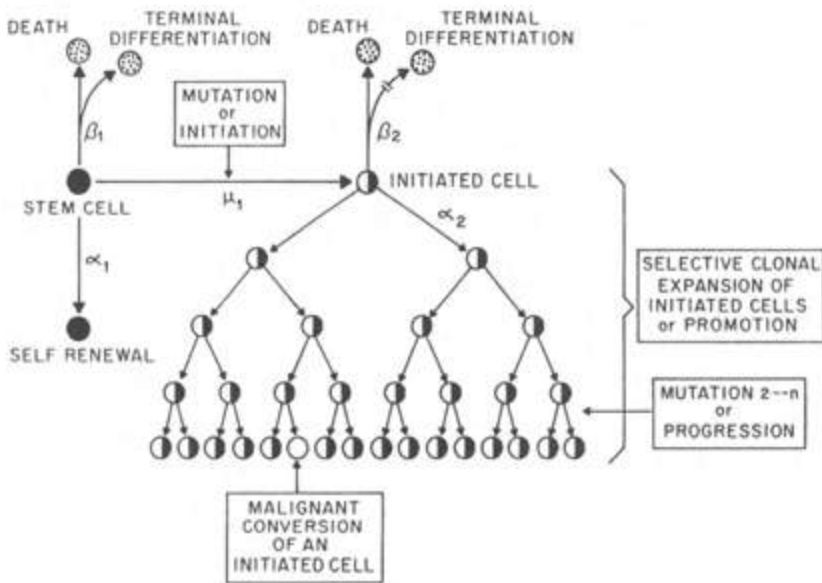
### ROLE OF DISRUPTED GAP JUNCTIONAL INTERCELLULAR COMMUNICATION IN CARCINOGENESIS

Carcinogenesis is well documented in both experimental animal studies and from epidemiological studies to be a multi-stage, multi-mechanism process. It has been described as a "stem cell disease", a "disease of differentiation" or as "oncogeny as partially blocked ontogeny" [4]. Basically, cancer is a problem of dysfunctional homeostatic control. Since gap junctional intercellular communication has been linked as the biological process designed to mediate homeostatic control of cell proliferation, cell proliferation, apoptosis and adaptive responses of differentiated cells, one could speculate that cancer cells must have dysfunctional GJIC. It was first hypothesized by Loewenstein [5] that the transformation of a normal cell to a cancer cell must involve that down regulation of GJIC.

This hypothesis has been further detailed. Starting from the observation that all cancer cells are characterized by the inability to "contact-inhibit" and to terminally differentiate, and that a tumor consists of a clonal-derived group of cells, a series of cancer theories have been integrated by the hypothesis that gap junctional intercellular communication is the "common focal point" of all these hypotheses [6].

The initiation/promotion/progression hypothesis (multi-stage, multi-mechanism hypothesis) can be integrated with the stem cell theory, the oncogene/tumor suppressor gene theory, and the

mutation/epigenetic theories of carcinogenesis. When a single stem cell, which can be defined as a cell capable of both symmetrical or asymmetrical cell division, is exposed to a physical or chemical agent that can stably block its ability to terminally differentiate, apoptosis but not to proliferate, the cell is considered "initiated". If one of the critical genes (either a proto-oncogene or a tumor suppressor gene that regulated differentiation or apoptosis) is mutated or stably altered transcriptionally, then the cell is shifted from dividing **asymmetrically** to one that can divide **symmetrically**. That is, a stem cell is one that can no longer produce a terminally-differentiated daughter but one that can proliferate to form two non-terminally-differentiated "initiated" cells. Initiation appears to be a **mutagenic process**. However, if the initiated cell is still capable of being contact-inhibited by GJIC, it does not grow. If contact inhibition is down regulated by growth factors or exogenous chemicals called **tumor promoters**, then this initiated cell can escape contact inhibition and expand. Since these cells do not terminally differentiate or apoptose, they accumulate into a focus of dysfunctional but not yet malignant cells, such as an enzyme altered focus in the liver, a polyp in colon, a nodule in the breast or a papilloma in the skin (**the promotion phase**). The promotion phase, and the tumor promoters, are viewed as a **mitogenic process** and as **mitogens**, respectively. As long as the promoters are present, the clone of initiated cells can expand. During the expansion of the initiated cell, additional genetic alterations can occur (more mutations). When all of changes needed to allow the initiated cell to escape the dependence on exogenous promoters, it is said to have been converted to the **progression phase**. The promotion phase is an interruptible or reversible process, whereas the progression phase seems to be an irreversible one [Figure 2].



[Figure 2]

A number of experimental observations suggests that gap junctions, when down regulated, contribute to the late states of carcinogenesis, namely, **reversibly** during the tumor promotion process and **irreversibly** during the normal progression phase. All normal cells, except stem cells and normal free-standing cells such as red blood cells and neutrophils, express gap junctions; cells derived from tumor cells have dysfunction homologous or heterologous GJIC; all tumor promoters reversibly down regulate GJIC; growth factors and tumor-promoting hormones and cytokines down regulate GJIC; anti-tumor-promoting chemicals, such as retinoids, carotenoids, and green tea components, up-regulate GJIC and block the tumor promotion phase; anti-oncogene drugs, such as lovastatin, reverse the down-regulation of GJIC by the RAS

oncogene; transfection of various connexin genes into GJIC-deficient cells restores GJIC, growth control and suppressor tumor growth; the anti-sense connexin 43 gene, transfected into normal cells, causes them to behave as tumor cells; and the connexin32 knockout mouse is susceptible to liver tumors after exposure to liver initiators [6,7].

#### **EVIDENCE OF THE OXIDATIVE STRESS-INDUCED EPIGENETIC NATURE OF DISRUPTED GAP JUNCTIONAL COMMUNICATION IN THE TUMOR PROMOTION PHASE OF CARCINOGENESIS.**

While there is no doubt of the role of mutations in cancer formation, **carcinogenesis is more than mutagenesis [6]. Mutagenesis is the qualitative or quantitative alteration in the genetic information of a cell. Epigenetic or non-genotoxic agents alter the expression of the genetic information at the transcriptional, translational or posttranslational levels.** Tumor promoters or tumor promoting conditions, such as cell death, cell removal, are epigenetic in nature because they can stimulate cell proliferation or block apoptosis by their non-genotoxic mechanisms of action. To date, all tumor promoters that have been tested [8] can reversibly modulate GJIC.

While many tumor promoters appear to generate ROS, it is assumed that these ROS damage genomic DNA to cause mutations. However, because (a) the tumor promotion process is reversible, mutagenesis is highly unlikely to be responsible for the mitogenic nature of the promotion phase; (b) classic tumor promoters, such as phorbol esters, saccharin, DDT, dieldrin, peroxisome proliferators, polybrominated and polychlorinated biphenyls, growth factors, TCDD, hormones, etc., are not mutagens but block GJIC by various signal transducing mechanisms; (c) agents that block apoptosis, a component of tumor promotion, are not mutagens; and (d) the ROS generated by the cell and these tumor promoters seem to trigger signal transduction-induced altered gene expression, an epigenetic mechanism [9].

#### **MODULATED GJIC AS THE SCIENTIFIC BASIS FOR EPIGENETIC TOXICOLOGY**

Gap junctions are expressed in all tissues of the body. There are over a dozen of highly evolutionarily-conserved connexin genes [10]. Each of these connexin proteins is regulated at the transcriptional and posttranslational levels by different processes. Because of these two major functions (electrotonic or metabolic synchronization between cells in a tissue), these different connexin proteins are regulated differently in different cell types [11]. The blockage of GJIC during early embryogenesis could lead to embryo-lethality or teratogenesis [12]. As mentioned above, the down regulation of GJIC in initiated tissue can lead to tumor promotion [13]. The interruption of GJIC in germ tissue could lead to reproductive dysfunction [14]. The interference of GJIC in the brain or nervous tissue could lead to neurotoxicities [15]. Agents that could bring about the modulation of GJIC at the transcription or posttranscription levels are epigenetic in nature. Therefore, the understanding of epigenetic mechanisms are as important as genotoxic mechanisms in the field of toxicology.

#### **STEM CELLS, TELOMERASE, GJIC AND IMMORTALITY**

It is generally accepted that the carcinogenic process involves the "immortalization" of a normal "mortal" cell, followed by the neoplastic transformation of the "immortalized" cell [16]. Recently, with the hypothesis that aging or cellular senescence is due to the decrease in telomers of chromosomes because of the decline of telomerase activity and the immortalization of normal "mortal" cells by the transfection of the catalytic telomerase c-DNA [17], this paradigm to explain carcinogenesis seems plausible. However, an alternative hypothesis might explain these observations. Assuming the stem cell is the "target cell" for carcinogenesis, and assuming the normal stem cell is "immortal" until it is induced to terminally differentiate or become "mortal", then one could hypothesize that initiation is the process by which the stem or immortal cell is prevented from terminally differentiating or from becoming "mortal". This appears to fit the "oncogeny as partially blocked ontogeny theory" [4], as well as experimental observations [18].

Stem cells appear to have high levels of telomerase activity [19]. Normal mortal or differentiated cells have low or no telomerase activity and shortened telomers [16]. One hypothesis is that the "immortalization" of a normal mortal cell must occur by up-regulation of the telomeric gene before it can become neoplastically transformed. The hypothesis proposed here is that the stem cell, by being the target cell for the initiation process, is already "immortal" and has high telomerase activity. The initiation process would then prevent the transcriptional down regulation of telomerase gene as it prevents terminal differentiation. Therefore, the subsequence neoplastic transformation which would take place does not up-regulate the telomerase gene, but prevents its down-regulation. It is interesting to note that stem cells do not appear to express their gap junctions [20,21], but gap junctions appear with growth control by contact inhibition and with differentiation of cells. This yin-yang relationship between expressed telomerase gene and suppressed connexin genes should be investigated.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** Scheme of the postulated link between extracellular communication and gap junctional intercellular communication via various intracellular signal transducing mechanisms (second message) mechanisms. Diagram illustrates how exogenous non-genotoxic agents can either interfere with, or mimic, endogenous extracellular signals.

**Figure 2.** The initiation/promotion/progression model of carcinogenesis.  $\beta_1$  = rate of terminal differentiation and death of stem cell;  $\beta_2$  = rate of death, but not of terminal differentiation of the initiated cell ( $- \rightarrow$ );  $\alpha_1$  = rate of cell division of stem cells;  $\alpha_2$  = rate of cell division of initiated cells;  $\mu_1$  = rate of the molecular event leading to initiation (i.e., possibly mutation);  $\mu_2$  = rate at which second event occurs within an initiated cell.

## REFERENCES:

1. Buttke, T.M. and Sandstrom, P.A. Redox regulation of programmed cell death in lymphocytes. *Free Radic. Res.* 22:389-397, 1995.
2. Kumar, N.M. and Gilula, N.B. The gap junction communication channel. *Cell* 84: 381-388, 1996.
3. Loewenstein, W.R. Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochim. Biophys. Acta.* 560: 1-65, 1979.
4. Potter, V.R. Phenotypic diversity in experimental hepatomas: The concept of partially-blocked ontogeny. *Br. J. Cancer* 38: 1-23, 1978.
5. Loewenstein, W.R. Permeability of membrane junctions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 137: 441-472, 1966.
6. Trosko, J.E., Chang, C.C., Madukar, B.V., and Dupont, E. Oncogenes, tumor suppressor genes, and intercellular communication in the "oncogeny as partially-blocked ontogeny theory". In: *New Frontiers in Cancer Causation*. O.H. Iversen, ed., Taylor and Francis, Wash., D.C., pp. 181-197, 1993.
7. Temme, A., Buchman, A., Gabriel, H.-D., Nelles, E., Scharz, M., and Willecke, K. High incidence of spontaneous and chemically-induced liver tumors in mice deficient for connexin 32. *Current Biol.* 7: 713-718, 1997.
8. Trosko, J.E., and Chang, C.C. Nongenotoxic mechanisms in carcinogenesis: role of inhibited intercellular communication. In: *Banbury Report 31: Carcinogen Risk Assessment: New Directions in the Qualitative and Quantitative Aspects*. R.W. Hart and F. G. Hoerger, eds., Cold Spring Harbor, New York, pp. 139-170, 1988.
9. Trosko, J.E., and Inoue, T. Oxidative stress, signal transduction and intercellular communication in radiation carcinogenesis. *Stem Cells* 15: (suppl. 2) 15: 59-67, 1997.
10. White, T.W., Bruzzone, R. and Paul, D.L. The connexin family of intercellular channel forming proteins. *Kidney Int.* 48: 1148-1157, 1995.
11. Spray, D.C., Saez, J.C., Hertzberg, W.L., and Dermietzel, R. Gap junctions in liver: Composition, function and regulation. In: *The Liver: Biology and Pathobiology*. Arias, I.M.,

- Boyer, J.L., Fausto, N, Jakoby, W.B., Schachter, D.A., and Shafritz, D.A., eds., Raven Press, New York, 951-967, 1994.
12. Trosko, J.E., Chang, C.C., and Netzloff, M. The role of inhibited cell-cell communication in teratogenesis. *Terat. Carcinogen. Mutagen.* 2: 31-45, 1982.
  13. Trosko, J.E., Chang, C.C. and Medcalf, A. Mechanisms of tumor promotion: Potential role of intercellular communication. *Cancer Invest.* 1: 511-526, 1983.
  14. Ye, Y.X., Bombick, D., Hirst, K., Zhang, G.X., Chang, C.C., Trosko, J.E., Akera, T. The modulation of gap junctional communication by gossypol in various mammalian cell lines in vitro. *Fund. Appl. Toxicol.* 14: 817-832, 1990.
  15. Trosko, J.E., Jone, C., and Chang, C.C. Inhibition of gap junctional-mediated intercellular communication in vitro by aldrin, dieldrin and toxaphene: A possible mechanism for their tumor-promoting and neurotoxic effects. *Mol. Toxicol.* 1: 83-93, 1987.
  16. Land, H., Parada, L.F., and Weinberg, R.A. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblast requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304: 596-602, 1983.
  17. Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S., and Wright, W.E. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279: 349-352, 1998.
  18. Yuspa, S.H., and Morgan, D.L. Mouse skin cells resistant to terminal differentiation associated with initiation of carcinogenesis. *Nature* 293: 72-74, 1981.
  19. Kang, K.S., Trosko, J.E., and Chang, C.C. Telomerase activity in a normal human breast epithelial cell type with stem cell characteristics and its neoplastically transformation cells. *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* 38: 504, 1997.
  20. Chang, C.C., Trosko, J.E., El-Fouly, M.H, Gibson-D'Ambrosio, R.E., and D'Ambrosio, S. Contact insensitivity of a subpopulation of normal human fetal kidney epithelial cells and of human carcinoma cell lines. *Cancer Research* 47:1634-1645, 1987.
  21. Kao, C.Y., Nomata, K., Oakley, C.S., Welsch, C.W., and Chang, C.C. Two types of normal human breast epithelial cells derived from reduction mammoplasty: phenotypic characterization and response to SV40 transfection. *Carcinogenesis* 16: 531-538, 1995.



# セミナー

## 「毒性試験の質的向上を目指して」 オルガナイザー序論

土井 邦雄、松澤 利明\*

東京大学 農学生命科学研究科、山之内製薬 創薬安全性研究所\*

動物実験代替法や分子生物学は著しく発展しているが、哺乳を用いる全身的毒物試験を代替する事は極めて困難である。従って、げっ歯類や非げっ歯類を用いた毒性試験はヒトへの安全性を外挿する上で必須である。

哺乳動物における全身的毒性の検出のための検査あるいは観察は機能、生化学、形態の3領域に大別される。数年前に日本製薬工業協会が実施したアンケート調査結果によると、反復投与毒性試験における機能検査の役割は、毒性試験の検査項目の主役ではなく、技術的にも十分ではないとされている。今回のセミナーの前半では、機能検査の分野で活躍されている専門家の方々に聴覚、視覚、心電図、前立腺ならびに腎臓機能の検査について新しい技術や知見と毒性との関連性について解説をお願いした。

中盤では、毒性試験における新規トピックとして国際的視野からその意義と動向への対応を含め、安全性薬理検査、臨床病理検査、免疫毒性検査およびデータ解析や論文のまとめ方について専門家にそれぞれ解説をお願いした。最後の2題は、肝毒性および催奇形性の発現機序について薬物動態あるいは生理学的側面から解明する事の必要性を解説して頂く事にした。これらのトピックは、ヒトを含む動物種差に関する事例であり、動物からヒトへの外挿にかかわるものでシンポジウム1で更に討議される。

これらの課題を一つずつ解決する事によって哺乳動物を用いる毒性試験の精度は高くなり、再現性に優れる成績が得られるものと思われる。これらの成果として、動物資源の節減や動物への苦痛の軽減に連なることを期待する。

How to improve the quality of mammalian toxicology studies.

Kunio DOI and Toshiaki MATSUZAWA\*

Tokyo University, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, and

\*Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd., Safety Research Laboratories

## 聴性脳幹反応 (auditory brainstem response) を用いた イヌにおける聴覚機能検査法

久世 博

田辺製薬 (株) 安全性研究所

動物において、一般に用いられている聴覚検査法として、音刺激を与えて耳介反射をみる方法、音刺激で条件づけした動物のオペラント行動の変化を観察する方法等がある。しかしながら、耳介反射は慣れの問題や主観が入り、オペラント行動をみる方法では、事前に動物に学習させる必要があり、ラット等では比較的容易であるが、イヌ等では難しい。

ヒトの乳幼児あるいは小児の聴覚検査法として、聴性脳幹反応 (auditory brainstem response ; ABR) を記録する方法が用いられている。そこで、我々はこの検査法を、動物の聴覚機能検査法として適用した。ここで ABR の原理について説明しておく。ABR とは、音刺激を繰り返し与え、聴覚神経系を興奮させることによって得られる脳幹部での電位を頭皮上より記録したもので、一種の誘発脳波と考えれば良い。ABR は音刺激から 10ms の間に発生する 5~7 個の電位 (現れる波の順に I、II、III あるいは P1、P2、P3 と呼ぶ) であるが、微小な電位のため 500~1000 回程度の加算が必要である。ABR の起原については、多くの報告があるが、Hashimoto(1981)や Møller(1985)のヒトでの報告では、I 波は蝸牛神経、II 波は蝸牛神経~蝸牛神経核、III 波は交叉後の上オリブ核、IV 波、V 波は外側毛帯~下丘が関与しているといわれている。従って、どの波に変化が現れるかによって聴覚異常の発現部位を推定することができる。

ABR は、イヌでは無麻酔下で記録できる。ラットでも無麻酔下での記録は可能であるが、体動による雑音が入るため麻酔下のほうが安定した記録が行える。なお、麻酔薬による影響は殆ど受けないが、体温の変化による影響を受けるため、麻酔下で記録する場合には、体温を一定に保持させておく必要がある。

音刺激として通常は音の立ち上がりが急峻な 4kHz 前後の周波数のクリック音刺激が用いられる。クリック音刺激では安定した反応が記録できるが、周波数特異性が低く、高周波音域での刺激ができないため、高周波音域にのみ聴覚障害が現れた場合には見落とすおそれがある。

Auditory brainstem response in beagles as an auditory functional test

Hiroshi KUSE, Safety Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co.,Ltd.

この点、音刺激としてトーンビップ音を用いれば、周波数特異性が高く、高周波音を発生させることができるので、動物の可聴限界域を検査することができる。トーンビップ音の短所としては安定性が悪いことがあげられる。従って、両者を組み合わせて検査すれば、その精度を増すことができる。クリック音およびトーンビップ音ともに刺激頻度として、通常は10~20Hz（1秒間に10~20回の音刺激）が用いられる。

動物においてABRの異常は、現れる各波の潜時および電位の変化を測定することによって判定することができる。蝸牛、蝸牛神経あるいは血管条等の内耳に障害があれば、I波および後ろの波に変化が生じる。現れる変化としては潜時の遅れや電位の低下等である。波の数はラットで5個、イヌでは5~7個程度認められるが、刺激音圧を下げていくにつれ、波は不明瞭となり、徐々に消失する。通常、ヒトでは刺激音圧を下げいき、ABR波型の完全に消失する音圧を求め、それを聴覚閾値（ABR閾値）とする。このABR閾値を測定し、正常者と比べて閾値がどれだけ上昇するかで障害の程度を判定する。ABR波型は個体によって変異があり、電位も変わるが、潜時は常に一定である。従って、同一個体について同一条件下で経時的にABRを記録しておけば、潜時や電位の変化から、どの時点で聴覚障害が生じ、どの時点で回復したかを知ることができる。

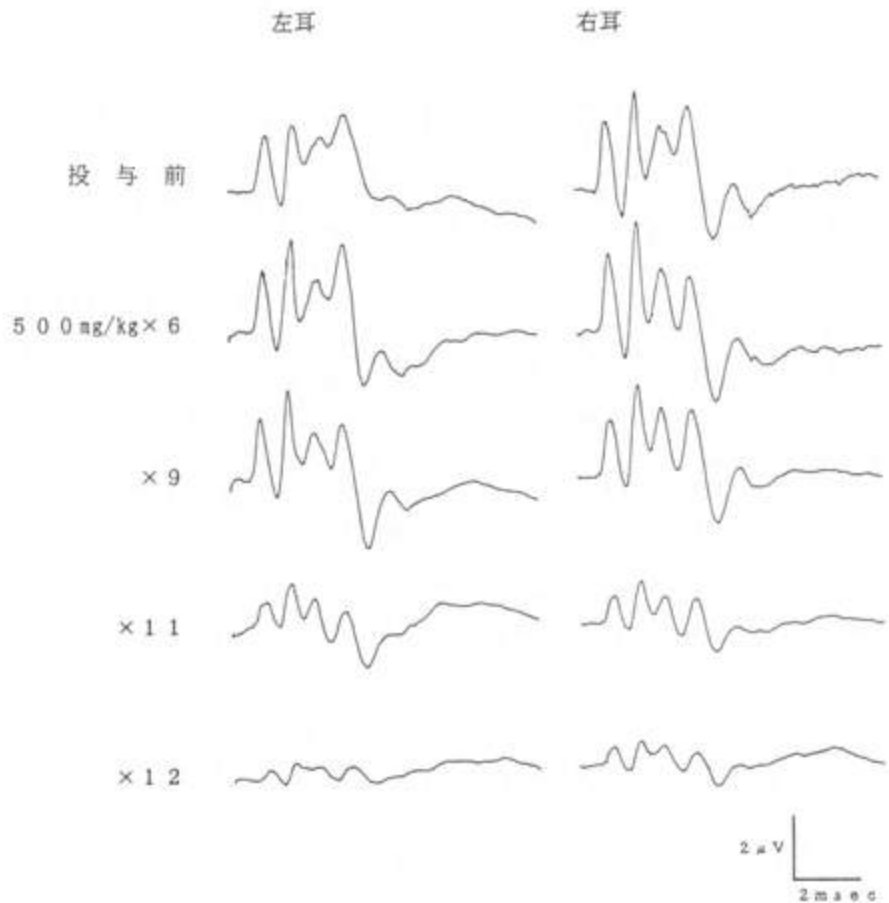
電極は針電極が使用されるが、我々は鱈口クリップ電極を用いている。頭頂部に+電極を、同側の耳朶に一電極を、そして対側の耳朶にアースをつけて記録する。音源としては、ヘッドホンあるいはスピーカーを用いる。機器としては音刺激装置の組み込まれている誘発電位検査装置（MEB-5504,日本光電）を使用している。トーンビップ音を用いて高周波音域の検査をするのであれば、ヒト用に開発された機器（10kHz前後が上限）では検査できないので、新たに高い周波数を発生させる音刺激装置（ダイヤモンドカルシステム・DPS-725）およびスピーカー（バイオニア・PT-R7Ⅲ）を必要とする。

以下に我々が用いている記録条件を示す。

刺激音           : クリック音  
刺激周波数       : 4 kHz  
刺激頻度         : 20 Hz  
加算回数         : 1000  
高域フィルター : 3 kHz  
低域フィルター : 50 Hz  
記録時間         : 10 msec

ABRの再現性および組織障害との関連性を調べるために以下の試験を実施した。聴覚障害を惹起することが知られているカナマイシンをイヌ（ビーグル）に反復皮下投与（投与量；125~500mg/kg）し、薬物誘発性の聴覚障害を惹起させると共に経時的にABRを記録した。ABRに変化のあった時点で動物を剖検した後、聴覚器の病理組織検査を実施し、ABRの変化と蝸牛の病理組織変化との相関性を調べた。その結果、ABRの変化は蝸牛有毛細胞の変性・脱落と高い相関を示した。また、ABRに変化が現れても、直ちに蝸牛等の病理組織に変化は認められず、ABRの異常が続いた後に病理組織で変化が現れることが明らかになった。従って、薬物誘発聴覚障害においてABRの感度は高く、その経時的記録により聴覚障害の発生時期および程度を正確に知ることが可能である。

以上のように、ABRは動物に侵襲を与えることなく測定でき、聴覚障害の有無を定量的に検索出来るとともに、経時的に記録することにより、その回復性についても知ることができる有用な検査法と思われた。



カナマイシンを500 mg/kgの投与量で12回投与したイヌのABR変化

## ビーグル犬の毒性試験における視覚機能検査への電気生理学的手法の応用

○ 中山直樹

大正製薬株式会社 開発研究所 安全性研究室

### はじめに

視覚機能を電気生理学的に評価する指標としては、網膜の機能を評価する網膜電図 (Electroretinogram : ERG) および視覚伝導路の機能を評価する視覚誘発電位 (Visual Evoked Potential : VEP) の2つの誘発電位が考えられる。近年、電子医療機器の発達に伴い誘発電位の測定および解析が容易となったことにより、これら電気生理学的指標は、ヒトの臨床の場では広く普及し、多くの成果を上げている。一方、動物実験、特に薬物の安全性評価 (毒性試験) における視覚機能障害の検出は、主に眼科学的検査による外観・前眼部・中間透光体・眼底の変化、病理組織学的検査による形態学的な変化からの推察であり、実際に視覚機能がどの程度障害されているのか、また、その機能障害がどの様に進行あるいは回復するか等は、症状から判断する以外に詳細な検討はあまり行われていない。そのためヒトで副作用として視覚機能障害が良く知られている薬剤においても、毒性試験で視覚機能障害を確認することは困難であり、毒性試験における、より精度の高い視覚機能障害検出法が望まれている。

### 1. 網膜の機能評価について

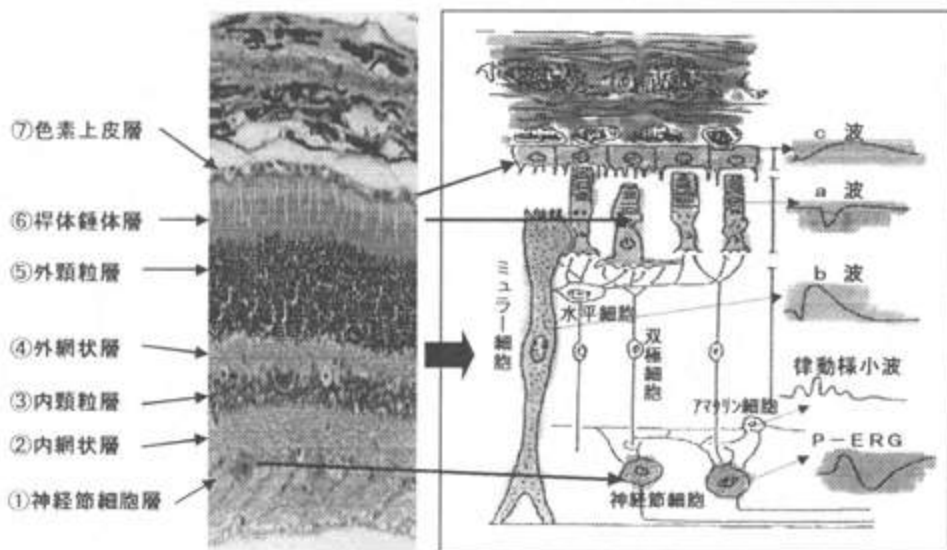
網膜の機能はERGによって評価することが可能である。網膜は眼球の硝子体から強膜側に向かって、①神経節細胞層 (神経節細胞の細胞体)、②内網状層 (双極細胞、アマクリン細胞、神経節細胞のシナプス)、③内顆粒層 (水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞、ミュラー細胞の細胞体)、④外網状層 (光受容体細胞、水平細胞、双極細胞のシナプス) ⑤外顆粒層 (光受容体細胞の

An investigative electrophysiological examination of visual function in beagle dog toxicity studies

Naoki NAKAYAMA.

Toxicology Laboratory Pharmaceutical Research Laboratories, Taisho Pharmaceutical CO., LTD. Yoshino-cho 1-403, Ohmiya-shi, Saitama, 330-8530 Japan.

細胞体), ⑥杆状体・錐状体層, ⑦色素上皮層の7つの層構造から成る。網膜表面に到達した光は①, ②, ③および④を通過してから⑤および⑥の光受容体細胞を興奮させ, その興奮が①へ伝えられる。この網膜機能を錐体系, 桿体系に分離して評価するためにヒトでは, 国際臨床視覚電気生理学会 (ISCEV) による国際的標準化が進められている<sup>1)</sup>。また, 色素上皮の機能評価 (c波)<sup>2)</sup> や神経節細胞等の機能評価 (P-ERG)<sup>3, 4)</sup> 等さまざまな検討が行なわれている。しかし, それらの方法をビーグル犬の毒性試験の一環として取り入れることは, 網膜構造の相違, 測定に要する時間等の理由により制約される。現時点でビーグル犬の毒性試験に視覚機能障害検出のスクリーニングテストとして利用可能と考えられる指標は, 強い白色閃光刺激 (フラッシュ刺激) により誘発されるERG (Flash-Electroretinogram: F-ERG) である。このF-ERGは光受容体細胞を主な起源としているa波, ミュラー細胞を主な起源としているb波およびアマクリン細胞を主な起源としている律動様小波により評価される。

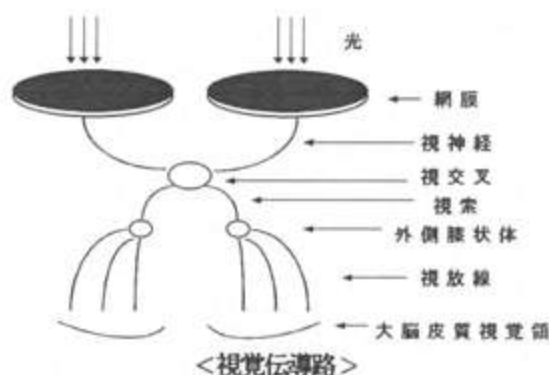


<網膜の基本構造とERG>

## II. 視覚伝導路の機能評価について

網膜の視細胞からの視覚情報が視神経→視交叉→視索→外側膝状体→視放線→大脳皮質視覚領と伝達される視覚伝導路の機能は, VEPによって評価することが可能である。VEPは刺激方法により, フラッシュ刺激によるVEP (Flash-Visual Evoked Potential: F-VEP) およびビデオモニターを用い格子模様を一定の頻度で反転させる刺激 (パターンリバーサル刺激) によるVEP (Pattern Reversal-Visual Evoked Potential: P-VEP) が検討されている。F-VEPは, ヒトでは発光量等の測定条件に大きく左右され, 再現性が悪いことから, その有用性には問題があるとされている。一方, P-VEPは再現性に優れ, ヒトの臨床診断に有用とされている<sup>5)</sup>。しかし, これまでP-VEPは, 動物にビデオモニター上のパターンを認識させることが困難と考えられ, 毒性試験では検討されなかった。



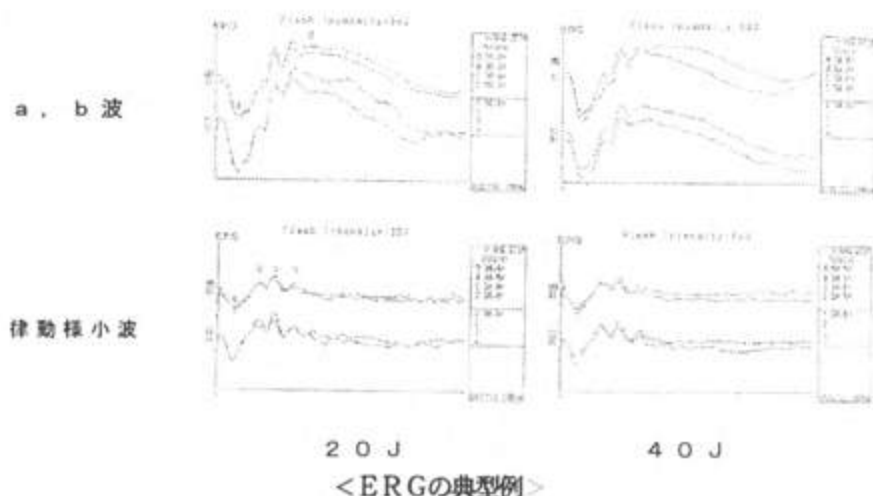


### III. 正常ビーグル犬での検討

正常ビーグル犬での検討のため、雄13匹(約10カ月齢、体重9~12kg)を用いた。測定には、麻酔薬を使用しないで獣医領域で鎮静剤として使用されている筋弛緩剤のキシラジン(約2.0mg/kg)と不整脈、徐脈を防止する目的で硫酸アトロピン(約0.05mg/kg)の皮下投与により鎮静(イヌの歩行はふらつき歩行となるが、意識はあり尾を振っている状態)させ、また、トロピカミド・塩酸フェニレフリン(ミドリリンP)の点眼により充分に散瞳させた状態で実施した。測定は5日から1週間の間隔で2回行い再現性を確認した。なお、全ての測定において測定ごとに波形を2回記録し、その波形の信頼性を確認した。

#### 1. ERG(F-ERG)の測定条件および結果

電極: 基準電極付コンタクトレンズ型金電極、暗順応時間: 30分間以上、光源までの距離: 約15cm、刺激眼: 左眼、発光量: 20および40J、解析時間: 100ms、感度: 50.0 $\mu$ V/DIV、高域フィルタ(HIGH CUT): 1kHz、低域フィルタ(LOW CUT): 1Hzおよび50Hz(律動様小波)の条件で測定した。その結果、7.5~8.4msecの間に陰性波(a波)および37.2~38.6msecの間に陽性波(b波)ならびにa波とb波の間に3つの律動様小波(15.5~16.3, 22.1~22.6および30.1~30.2msec)が再現性良く記録された。また、20および40Jの発光量の違いによる明らかな差は認められず、20Jの発光量で十分に評価が可能と考えられた。



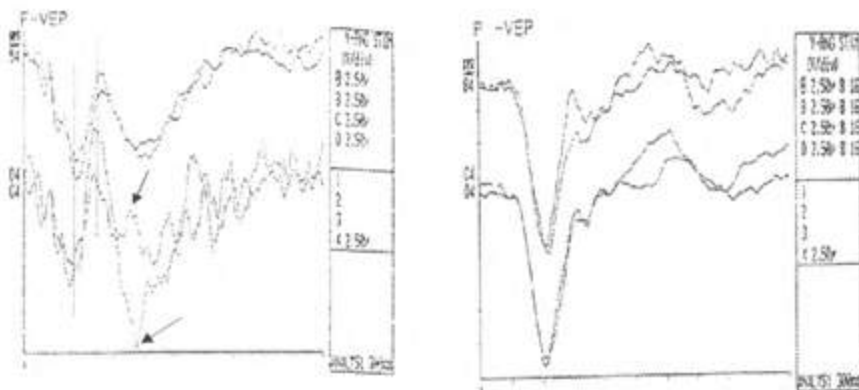
### 3. VEPの測定条件および結果

#### ①F-VEP

誘発用電極を用いて、導出電極を外後頭隆起の表面の中心点（イニオン）に、また、基準電極を右耳の乳様突起部に取り付けた。さらに、接地電極を左右の前頭鼻骨縫合正中面の閃節（ナジオン）に取り付けた。測定はフラッシュ両眼刺激とし、光源までの距離：約15cm、発光量：0.6および1.2J、加算回数：100回、解析時間：300ms、刺激頻度：1Hz、感度：2.50  $\mu$ V/DIV、高域フィルタ(HIGH CUT)：100Hz、低域フィルタ(LOW CUT)：1Hz、Reject Level： $\pm 4$ div で実施した。その結果、100msec 前後の位置に陽性波が記録されたが再現性は悪く、F-VEPは発光量等の測定条件に大きく左右された。従って、F-VEPはヒトと同様にビーグル犬においても、その有用性には問題があると考えられた。

#### ②P-VEP

誘発用電極を用いて、導出電極をイニオンに、基準電極をナジオンに、また、接地電極を右耳の乳様突起部に取り付けた。測定はパターンリバーサル両眼全視野刺激とし、モニターまでの距離：約30cm、Checker Size：170、22及び5mm（個々の格子の視角：約1955、253及び57.5分、刺激視野の視角：約65度）、加算回数：100回、解析時間：300ms、刺激頻度：2Hz、感度：2.50  $\mu$ V/DIV、高域フィルタ(HIGH CUT)：100Hz、低域フィルタ(LOW CUT)：1Hz、Reject Level： $\pm 4$ div で実施した。その結果、50~80msec の間に陰性波が再現性良く記録された。波形の頂点潜時はChecker Sizeの大きいものほど早く、小さくなるに従って遅く記録され、振幅はChecker Size 22mmで最も大きく記録された。従って、P-VEPはヒトと同様にビーグル犬においても再現性良く記録することが可能であり、ビーグル犬の毒性試験において、視覚伝導路の機能を評価する指標に成り得ると考えられた。



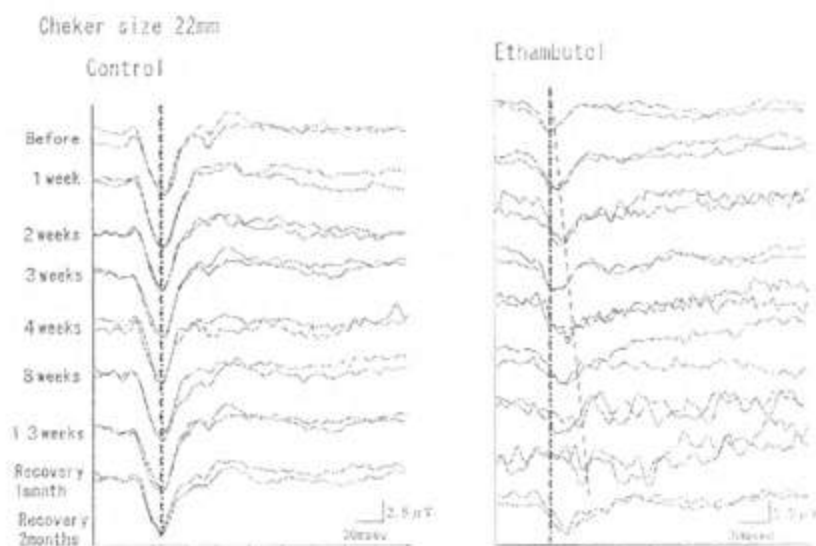
(点線および矢印で示す如く、F-VEPはP-VEPに比較して再現性は悪い)

#### <VEPの典型例>

#### IV. 毒性試験への応用

ERGおよびVEPの検討結果を基に、ヒトの副作用として視覚機能障害が多く報告されているが、動物実験では検出することが困難とされているEthambutol (EB)をビーグル犬に反復経口投与し、電気生理学的手法による視覚機能障害の検出を試みた。

雄ビーグル犬6匹(約10ヵ月齢、体重8~11kg)を用い、ControlおよびEB群に各3匹を割り当てた。投与は一般状態に変化が認められない状況下での視覚機能への影響を検討するために、食欲が減退した時点で投与量を減少させ、1,000~200mg/kgまで徐々に減量し、3ヵ月間反復経口投与した。ERGおよびVEPを投与前、投与1, 2, 3, 4, 8及び13週後並びに休業1ヵ月後(回復傾向が認められない1例は休業2ヵ月後にも)に測定した。その結果、EBの経口投与により、P-VEPは頂点潜時の延長及び波形の不明瞭化がみられた。また、休業による回復性も認められた。一方、F-VEPは波形の再現性が悪く、明確に変化を捉えることはできなかった。また、ERGには明らかな変化は認められず、本試験条件下では、EBは網膜機能に影響を及ぼさないと考えられた。



<典型例のP-VEP推移>

## まとめ

ビーグル犬の毒性試験における、視覚機能障害検出のスクリーニングテストにF-ERG(a波、b波および律動様小波)およびP-VEPは応用可能な電気生理学的指標であり、これらの電気生理学的指標は毒性試験における視覚機能障害検出技術の向上に有用と考えられる。

## 【文献】

- 1) M. F. Marmor and E. Zrenner(1995): Standard for clinical electroretinography (1994 update), Doc. Ophthalmol. 89: 199-210.
- 2) 田沢豊(1980): 人眼ERG・c波の特性と臨床応用. 眼紀31: 1223-1248.
- 3) 飛松省三(1996): 視覚誘発電位の最近の進歩. 脳波と筋電図24(3): 173-183.
- 4) M. F. Marmor, G. Holder, V. Porciatti, G. Trick and E. Zrenner(1996): Guidelines for basic pattern electroretinography, Doc. Ophthalmol. 91: 291-298.
- 5) 高橋剛夫, 黒岩義之 編集(1995): Section 2 視覚生理検査, C視覚電位. 視覚と脳波の臨床, pp38-57. 新興医学出版社, 東京.

## 長時間心電図検査を主体としたサルを用いた心毒性試験

清水憲次

株式会社富士バイオメディックス 小淵沢総合研究所

## 1. はじめに

毒性試験における心機能検査とは、血液循環システムを中心としての心臓の機能に対する被験物質の毒性学的影響を検索するための検査である。動物を用いた心機能評価のために、獣医臨床では日常検査として触診による脈の観察（脈診）、聴診器を用いた心音と呼吸音の観察（聴診）、胸部X線撮影、心電図検査、心エコー検査、血圧検査、尿および血液化学的検査を、また特殊検査として長時間心電図検査、心血管カテーテル検査、血管心臓造影検査、心臓電気生理検査、CT、MRIなどを実施している。毒性試験においてもこれらの検査を必要に応じて組み合わせて実施すべきである。しかし毒性試験では、①多くの動物を一定の方法で検査する、②検査による動物への影響を最小限とする、③臨床と比べて軽度な変化を評価する必要がある、④検査結果は数値化が望ましい等の点から、現在一般的に実施されている検査は心電図検査、血圧検査、尿および血液化学的検査ならびに心臓の病理学的検査程度である。このうち心機能を直接的に評価しうる心電図と血圧検査では、両検査とも検査時に動物を保定する必要があることから動物の安静を保つことが難しく評価に苦しむことが多い。また心電図に関しては一般に記録時間が短いことから不整脈の評価には適当でない。演者らはこれらの問題点を解決し、且つより詳細な心電図解析を行うためにイヌとサルの毒性試験に長時間心電図検査を導入している。以下にその検査概要とサルを用いた心毒性試験の一例を紹介する。

Cardiac Toxicity Study in Monkeys Using Mainly an Ambulatory Electrocardiography.

Noritsugu SHIMIZU

Kobuchisawa Laboratories, Fuji Biomedix Co.,Ltd.

## 2. 長時間心電図検査の概要

長時間心電図はホルター心電図とも言われ、ヒト臨床では虚血性心疾患や不整脈の発見・診断、抗不整脈剤、抗狭心症薬などの薬効評価、心臓ペースメーカーの機能評価などに欠くことのできない検査として利用されている。演者らはこの長時間心電図検査をビーグルとカニクイザルの毒性試験に取り入れている。動物の胸部に電極を張り付けてジャケットを着せ、そのポケットに心電計（電池式）を入れてカセットテープに心電図を入力する方法で、通常の飼育状態において無麻酔で約24時間単位の長時間心電図を記録する。専用の解析装置を用いてカセットテープから圧縮心電図と任意の時間の拡大心電図を紙に記録し、心拍数推移、各波形の持続時間、不整脈の出現数などを解析している。

演者の施設における背景データでは、ビーグルの心拍数は日中高く深夜から早朝に最低値を示すのに対して、カニクイザルの心拍数は日中高く照明が消えた夕刻から早朝までに一定の低値を示し、種による相違がみられる（図1）。また、ビーグルの心電図では呼吸性の不整が顕著にみられるのに対して、カニクイザルでは軽微である（図2）。不整脈では第2度A-Vブロック、心室性期外収縮などが健康なビーグルおよびカニクイザルに低頻度ではあるが出現することを確認している。このような動物種毎の心電図の特徴を把握することで、長時間心電図を毒性試験に取り入れて評価することが可能となった。

## 3. 長時間心電図検査を主体としたサルを用いた心毒性試験の一例

### 〔材料および方法〕

供試動物は2～4才の雄カニクイザル21頭で、1群3頭で対照群と被験物質6用量の計7群を設定した。投与検体を静脈内へ単回投与し、投与後14日までに一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、長時間心電図検査、血液学・血液化学的および尿検査、ならびに病理学的検査を行い、被験物質の毒性を心臓を中心に検討した。

### 〔結果〕

心臓に関連した変化として、長時間心電図において投与用量に関連した心拍数の増加とその回復状況が観察できた。死亡例では心室性期外収縮の多発、ST下降、T波の陰性化、QT延長などの心電図変化に加えて、血中Caの減少、GOT、LDH、CKおよびCK-MBの増加、ならびに心筋障害がみられた。すなわち、本試験では長時間心電図と血中酵素の経時的変化および心筋の器質的変化を考察することにより、投与用量と心毒性の関連を明らかにすることができた。

## 4. まとめ

毒性試験における心機能の評価方法として、長時間心電図検査とそれを用いたサルの心毒性試験を紹介した。これまで毒性試験で一般的に用いられている心機能関連の検査に加えて、長時間心電図検査など動物の安静時の心機能を連続的に測定できる検査を取り入れることにより、心機能の毒性学的評価の精度をかなり向上できるものと考えられる。

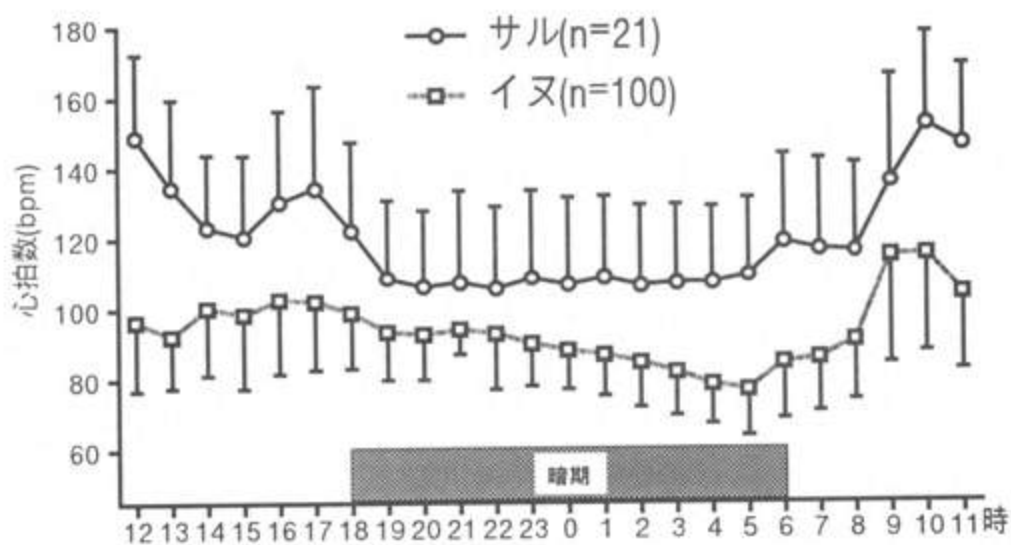
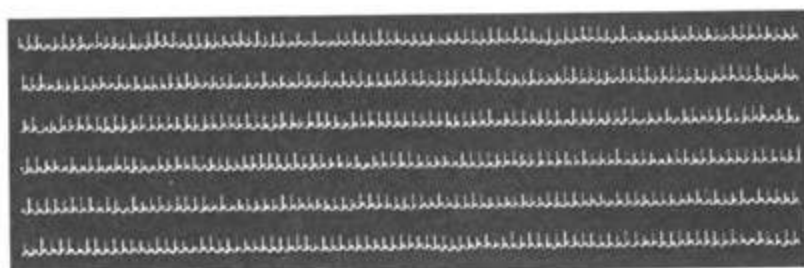
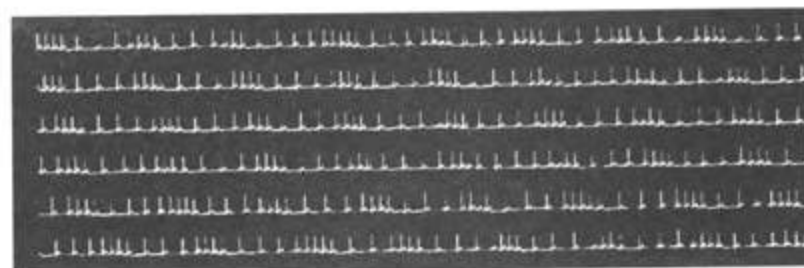


図 1 サルとイヌの心拍数日内変動の比較

サル



イヌ



10 sec

図 2 サルとイヌの心電図（深夜）の比較 (R-L lead)

## 前立腺機能と薬剤の評価

村越正典

帝国臓器製薬株式会社 安全性研究部

前立腺は androgen の標的器官であり、その発生、分化、形態保持および分泌機能は androgen 依存性である。一方、前立腺の生物学的意義およびその役割については現在でも不明な点が多いが、加齢に伴う増殖性病変の発生および癌化が極めて高頻度に認められる。前立腺肥大症 (BPH) は、加齢に伴いヒトおよびイヌで認められる良性疾患であることより、ヒト BPH の pathogenesis あるいは治療薬の開発に関しては、イヌを用いた検討が最適であると考えられている。しかし、自然発生 BPH イヌを用いた実験系は、動物数の確保や実験開始前の BPH 確定診断などの困難を伴うことから、ラットなどでの応用が期待されるところでもある。

本セミナーでは、現在までに報告した実験例を中心に①実験的 BPH の作出方法、②評価方法としての経直腸的超音波断層法 (Transrectal ultrasonography; TRUS)、③前立腺組織の機能病理学的 (免疫組織化学的) 評価方法および④前立腺のホルモン応答性と脂質過酸化について解説を加えたい。

## 1. イヌ

## 1) 実験的 BPH イヌの作出法 (antiandrogen 剤の評価例)

12 ヶ月齢以上の雄性ビーグル犬を去勢後、 $5\alpha$ -androstane- $3\alpha, 17\beta$ -diol (A-diol; 25mg) と  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ; 0.25mg) を週 3 回で 25 週間筋肉内投与した。同時に、投与開始 4 週間後から antiandrogen 剤として  $17\beta$ -acetoxy-6-chloro-2-oxa-4,6-pregnadiene-3,20-diol (TZP-4238; 0.5mg/kg) または chlormadinone acetate (CMA; 2.5mg/kg) を週 6 回、21 週間経口投与した。

Prostatic function and assessment of drug.

Masanori Murakoshi

Safety Research Department, Teikoku Hormone Mfg. Co., Ltd.,

1604 Shimosakunobe, Takatsu-ku, Kawasaki 213-0033, Japan.

## 【結果】

最終解剖時の前立腺重量は、A-diol + E<sub>2</sub> で 37.68 ± 4.69g, A-diol + E<sub>2</sub> + TZP-4238 で 7.74 ± 1.01g, また、A-diol + E<sub>2</sub> + CMA で 14.09 ± 9.88g であった。病理組織学的には、glandular hypertrophy/hyperplasia と診断され、間質の増殖はほとんど認められなかった。超微形態学的には、粗面小胞体と Golgi complexes の発達が特徴的に認められ、分泌顆粒の exocytosis 像も頻りに観察された。一方、antiandrogen 剤投与群では、前立腺上皮の著明な萎縮が認められ間質が目立った。超微形態学的には、粗面小胞体の減少、分泌顆粒の消失および脂肪様構造の出現を認めた。

### 2) 経直腸的超音波断層法 (Transrectal ultrasonography: TRUS)

薬物投与前および薬物投与期間中 (4 週毎) に動物を麻酔し、超音波診断装置 (SONOLAYER-L; SAL-77B, Toshiba) にて、経直腸的に前立腺の横断面、縦断面の映像を各々 2 枚ずつ撮影し、横断面の長径と短径および縦断面の長径をそれぞれ計測した。

## 【結論】

BPH の誘発には androgen と estrogen の協調作用が必要であり、androgen : estrogen の比率は 100 : 1 が最適と考えられた。また、TRUS を実施することで非侵襲的形態計測による薬物評価が可能であり、最終的な病理組織学的検査にも重要な情報を与えるものと考えられた。なお、自然発生 BPH イヌを用いての検討も同様に可能である。

## 2. ラット

さらに簡便かつ有用な BPH モデルの作出を目的として、我々はラットへの応用を試みた。

### 1) 実験的 BPH ラットの作出法 (antiandrogen 剤の評価例)

8~10 週齢の雄性 Wistar ラットを去勢後、testosterone propionate (TP; 1mg) および  $\beta$ -estradiol 3-benzoate (EB; 0.01mg) を週 6 回 7 週間皮下投与した。同時に、投与開始 3 週間後から antiandrogen 剤として TZP-4238 (8mg/kg) または CMA (20mg/kg) を週 6 回 4 週間経口投与した。

### 2) 前立腺細胞への機能病理学的手法 (免疫組織化学) の導入と評価

ヒト前立腺の機能的マーカーとしては、acid phosphatase あるいは prostate specific antigen (PSA) 等が広く知られ、臨床的にも疾患の確定あるいは薬物効果の判定に役立っている。

我々はラットの前立腺組織で以下の免疫組織化学的検討を行い、前立腺機能状態の把握と同時に、薬物評価の一助としている。

#### a) 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) 染色

S 期細胞が染色され、その標識率 (陽性細胞数) から細胞増殖の程度が判断できる。

#### b) Androgen receptor (AR) 染色

上皮細胞のみでなく間質の細胞 (平滑筋細胞) の核にも局在し、ホルモン刺激に起因した増殖あるいは萎縮の良きマーカーである。



### c) Apoptosis 関連

TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL)法による apoptosis の検出と oncoprotein である Bcl-2 の免疫組織化学により、細胞死とその回避状態が判断できる。

### d) Glutathione-peroxidase (GSH-PO) 染色

過酸化脂質の最も効果的な scavenger であり、前立腺では上皮細胞の細胞質内に局在している。この局在状態は前立腺での androgen 刺激と密接に関連し、去勢後では GSH-PO 染色性の減弱あるいは消失が認められ、この状態に androgen (testosterone) を投与すると、GSH-PO 染色性の回復および増強が観察される。

### 【結果】

#### 1) 前立腺腹葉 (Ventral lobe)

重量は TP + EB で  $857 \pm 106.4$ mg (相対重量:  $295 \pm 48.6$ mg), TP + EB + TZP-4238 で  $427 \pm 55.6$ mg (相対重量:  $128 \pm 16.3$ mg), TP + EB + CMA で  $544 \pm 45.5$ mg (相対重量:  $169 \pm 8.3$ mg) であり、BrdU 標識率は、順に  $5.49 \pm 0.57\%$ ,  $0.58 \pm 0.20\%$  および  $0.88 \pm 0.40\%$  であった。病理組織学的には TP + EB で glandular hypertrophy を認め、AR の染色性および GSH-PO の細胞内局在性も明瞭であった。一方、antiandrogen 剤投与群では、腺上皮細胞の萎縮が顕著であり、AR および GSH-PO の染色性も減弱あるいは消失して観察された。

#### 2) 前立腺背側葉 (Dorsolateral lobe)

重量は TP + EB で  $593 \pm 81.5$ mg (相対重量:  $108 \pm 22.3$ mg), TP + EB + TZP-4238 で  $235 \pm 21.3$ mg (相対重量:  $59 \pm 8.3$ mg) であり、BrdU 標識率は、それぞれ  $3.94 \pm 0.23\%$  および  $0.32 \pm 0.12\%$  であった。病理組織学的には TP + EB で glandular hypertrophy を認め、さらに間質も増生を呈した。AR は上皮細胞の核および間質の平滑筋細胞の核に明瞭に局在し、GSH-PO も上皮細胞の細胞質内に染色性を認めた。一方、antiandrogen 剤投与群では、腺上皮細胞が著しく萎縮し、AR は腺上皮細胞の核のみならず間質の平滑筋細胞の核にも減弱または消失して観察された。

### 【結論】

ラットの前立腺では組織学的に腹葉と背側葉に区別され、前者では androgen に感受性が高く、後者では estrogen に感受性が高いといわれる。我々は、イヌ実験的 BPH と同様に androgen : estrogen を 100 : 1 の比率で同時投与することで、ラットの前立腺では腹葉のみならず背側葉においても glandular hypertrophy が誘発され、さらに背側葉においては同時に間質の増生も伴うことを観察した。免疫組織化学的に AR は、腺上皮細胞の核のみならず、間質の平滑筋細胞の核にも局在し、antiandrogen 投与で双方の核の AR 局在性が減弱または消失した。GSH-PO は腺上皮細胞内に観察されたが antiandrogen 投与に伴い AR と同様に減弱または消失して観察された。

以上より、前立腺における GSH-PO の局在性は androgen 作用を概略的に評価できる有効な方法と考えられた。

### 3. 前立腺マーカーとしての glutathione-peroxidase

GSH-PO は前立腺のみならず、ほとんどの組織細胞内に分布しており、一部の組織細胞ではその普遍的な染色態度から、特定の細胞のマーカーとなりつつある。また、細胞の状態が正常から可逆的適応反応の範囲内であれば GSH-PO の染色性が認められるが、腫瘍性増殖あるいは癌化した細胞では GSH-PO の染色性(発現)が全く消失することも判明している。

前立腺における GSH-PO の発現は、免疫組織化学的検索より、androgen (testosterone) dependent と考えられているが、この GSH-PO の発現の誘導および抑制が翻訳レベルで行われているのか、あるいは遺伝子の転写レベルで制御されているのかは明らかでない。

そこで、8~10 週齢の雄性 SD ラットを①正常無処置群、②去勢群、③去勢後 TP (1mg)3 日間投与群および④去勢後 TP (1mg)7 日間投与群に分け、摘出した前立腺腹葉を対象に GSH-PO mRNA の Northern blotting を行った。その結果、relative hybridization (%)がそれぞれ 100%、45.4%、200.9%および 195.6%となった。以上のことから、TP による GSH-PO の発現制御は転写レベルで行われていることが証明され、GSH-PO の前立腺マーカーとしての可能性が示唆された。

#### 【参考文献】

- 1) Murakoshi M, Inada R, Makino M et al.: Acta Pathol Jpn 40: 71-879, 1990.
- 2) Murakoshi M, Inada R, Tagawa M et al.: Acta Pathol Jpn 42: 151-157, 1992.
- 3) Murakoshi M, Tagawa M, Inada R et al.: Endocrinol Jpn 39: 331-340, 1992.
- 4) Murakoshi M, Tagawa M, Inada R et al.: Endocrinol Jpn 40: 479-488, 1993.
- 5) Murakoshi M, Inada R, Tagawa M et al.: Acta Histochem Cytochem 26: 101-108, 1993.
- 6) Murakoshi M, Inada R, Tagawa M et al.: Acta Histochem Cytochem 27: 75-80, 1994.
- 7) Murakoshi M, Inada R, Tagawa M et al.: J Toxicol Pathol 7: 387-395, 1994.
- 8) Murakoshi M, Ikeda R, Tagawa M et al.: Acta Histochem Cytochem 29: 283-288, 1996.
- 9) Murakoshi M, Ikeda R, Tagawa M et al.: Tokai J Exp Clin Med 21: 55-59, 1996.
- 10) Murakoshi M, Ikeda R, Tagawa M et al.: J Toxicol Pathol 10: 229-232, 1997.

#### 【共同研究者】

本研究には多くの当社研究員の方々、および諸先生方に御指導・御助言をいただきました。この場をかりて心から感謝申し上げます。

帝国臓器製薬株式会社

安全性研究部：池田理恵，田川正志，森正雄，鈴木 稔，江口勝也，飯塚和弘，  
増田修治，飯田祝子，中山隆治

薬理研究部：本間誠次郎，三枝 衛，五反田浩太郎

群馬大学医学部泌尿器科学教室：山中英寿教授

産業医科大学分子生物学教室：溝上 敦博士

東海大学医学部病態診断系病理学：竹腰 進博士，渡辺慶一教授

## 腎障害の評価における超音波画像診断の応用

橋本 晃

北海道大学大学院獣医学研究科診断治療学講座

超音波(Ultrasound : US)診断はUSの持つ特性を活かし、非侵襲性、易反復性、易操作性及び即時性などの利点があることから、日常的な臨床診断法として、また総合画像診断における必須の検査法として、医学、獣医学の臨床各領域において広く利用されていることは周知のとおりである。しかし、US検査の実験手法としての有用性あるいは実験動物への応用については、まだ検討されておらず、情報も少ない。演者は、実験動物を用いる種々の研究における解析手法としてのUS検査の応用という観点から検討を行っている。

新薬開発などの過程で、種々の薬剤の安全性に関する試験として、実験動物を用いる腎障害性試験で使われる腎臓は一方ではUS検査の適応性の最も大きい臓器の一つでもある。このことから、薬剤性腎障害の評価にUS検査法を応用してみようという試みは、US検査を日常的に行っている演者にとっては自然の帰結になる。

本講演では、最初に腎臓のUS検査についての総論的な内容を述べ、次に実際の応用例について紹介したい。

US検査はUSの持つ性質を利用した画像診断法であって、その原理は装置から発進したUSが生体内へ伝播し、生体内の種々臓器・組織で反射（音響的な性質の異なる境界で反射）したUSを映像化するものである。描出された画像は反射波

**Ultrasonographic evaluation of drug-induced renal injury in experimental animals**

Akira HASHIMOTO. Department of Veterinary Clinical Sciences,  
Graduate School of Veterinary Medicine, HOKKAIDO University,  
Sapporo 060-0818, Japan

の強さに応じて白から黒の輝度階調差（エコーレベル）で表示される。つまり強い反射波ほどより白く（高エコー）、弱い反射波ほどより黒く（低エコー）、そして反射を欠く場合には真黒（エコーフリー）に表示される。

#### I 腎臓の病変（病態）に由来する画像情報（異常エコー）

1. 腫大と萎縮：大きさの異常（変化）
2. 腎臓辺縁の異常：形の不整や変形（突出、陥没、断裂）
3. 腎臓実質の異常：
  - 1) 内部構造の異常：3層構造、皮髄境界のエコーの変化
  - 2) 腎盂の異常：中心部エコーの変形、離解、消失
  - 3) 局限性病変：内部エコー（液性、充実性）、境界（壁）の整、不整
  - 4) びまん性病変：皮質、髄質エコーレベル、肝腎コントラストの変化
4. 結石、石灰化：音響陰影の存在
5. 血管の異常：拡張、消失

#### II 腎臓の病変（病態）の評価（解析）に応用できるUS検査の手法

1. Bモード法
2. カラードプラー、パワードプラー法
3. US組織診断（Tissue characterization）
4. USガイド下穿刺生検
5. US内視鏡

#### III ウサギを用いた抗生物質の腎障害性試験におけるUS検査

ウサギ19羽を用い、セファロリジン（CER）、セファロチン（CET）及びゲンタマイシン（GET）について、それぞれ大腿部筋肉内に1回投与し、経時的にUS検査を行い、併せて血液生化学的検査及び病理組織学的検索を行った。

CER投与群（0.5 g/kg）の腎臓のUS検査では、腫大、皮質エコーレベルの上昇、髄質エコーの拡大と皮髄境界の明瞭化などの画像所見が認められた。これらの画像所見の変化は腎臓の肉眼的及び病理組織学的変化（尿細管上皮細胞の変性・壊死、髄質のうっ血）によく一致していた。また、投与後の経時的観察では、画像変化と病変の進展の相関も認められた。一方、CET投与群（0.5 g/kg）及びGEN投与群（0.5 g/kg）では、対照群の画像所見との違いは指摘できず、病理組織学的にも意義のある病変は認められなかった。さらに、各投与群と対照群及び各投与群間の2画面表示を用いた画像所見の比較、ヒストグラム解析及び肝腎コ

ントラスト像でもCER投与群とCET及びGEN投与群との違いが明瞭に観察された。これらの成績から、US検査は抗生剤投与時の腎障害の有無や程度の判定に応用できることが示唆された。US検査では同一個体における投薬後の腎臓の変化を経時的に観察することが可能であり、従来の病理学的検索では得られない情報が得られ、新たな解析手法として応用できると思われる。

#### IV 病態解析手法としてのUS検査の応用例

演者がこれまでにUS検査の応用を試みた実験例について簡単に紹介する。

1.  $Ca^{++}$ 拮抗性抗不整脈剤投与後のウサギ胎仔心拍動の観察
2. 感染性因子（ウイルス培養液）の羊水内接種後の感染胎仔の経時的観察
3. 猫条虫感染ラット肝臓の経時的観察

US検査法は実験動物を用いる種々の研究において、従来の手法にはない特徴を持ち、新しい解析手法としての有用性、応用性があると思われる。腎障害の評価におけるUS検査の応用が、毒性試験の質的向上に役立つ示唆を与えることになれば幸いである。

## Safety Pharmacology Testing in General Toxicity Studies.

Lewis B. Kinter<sup>1)</sup> and David K. Johnson<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Preclinical Skill Center, Astra Merck, Inc., Wayne, PA, U.S.A and

<sup>2)</sup>Department of Biological Sciences, Nycomed Amersham, Inc., Wayne, PA, U.S.A.

Safety pharmacology (SP) and general toxicology (GT) evaluations are required for international registration of new pharmaceuticals and diagnostics. Safety pharmacology studies reveal potentially harmful effects on critical organ functions, while general toxicology studies identify target organs and describe toxic responses relying heavily on microscopic pathology (Williams, 1990) Both disciplines:

1. contribute to preclinical safety assessment and dose selection for initial clinical evaluations (Phase I)
2. have separate academic and industrial origins, and
3. have evolved independently as applied scientific disciplines in pharmaceutical development.

However, recent changes in scientific and regulatory objectives, and advances in digital electronic technologies have reduced or eliminated philosophical differences and technical barriers that have previously separated these disciplines. The experimental preparations used for SP and GT should model the Phase I study in terms of maturity, sex, presence/absence of anesthetics, and route(s) of administration. Dose selection for SP should cover the range of therapeutic efficacy through minimum toxicity (Kinter et al., 1994), the ranges covered by single-dose and/or dose range-finding GT. There are efficiencies to be gained when SP and GT are conducted in the same animal species, including common pharmacodynamic, drug absorption, distribution, metabolism, excretion, and pharmacokinetic databases.

GT studies are conducted in accord Good Laboratory Practice regulations (and/or international equivalents) and there is increasing demand that SP be conducted in similar accord (Lumley, 1994). SP is increasingly the responsibility for toxicologists (Kinter et al., 1994; Sullivan et al. 1995).

Finally, advances in scientific paradigms, digital electronic data accumulation and miniaturized radiotelemetry technologies permit many safety pharmacology endpoints to be monitored simultaneously in conscious animals, from mice to monkeys, within the conduct of GT studies. Cardiovascular parameters (blood pressure and heart rate), respiratory parameters (rate and pleural pressures), electrocardiogram and derived ECG parameters, body temperature, and animal activity can be monitored dynamically and continuously for days, months or longer using miniaturized pressure and/or biopotential telemetry technology (Kinter et al, 1997b). Central and peripheral neuromuscular and autonomic functions can be assessed using telemetry and functional observation module technologies (Kinter et al., 1997a). Gastric pH and emptying time, and intestinal pH and transit time can be monitored using orally-administered telemetry capsules (Youngberg, 1985; Mojaverian, 1996).

We conclude that by taking advantage of existing technologies, it is possible to evaluate many SP endpoints within GT studies, and in doing so to recognize efficiencies in numbers of studies conducted, numbers of animals used, resources expended, and time elapsed.

## References

Kinter, L.B, et al. (1994) Status of safety pharmacology in the pharmaceutical industry - 1993. *Drug Dev. Res.* **32**:208-216.

Kinter et al. (1997a). *Fund. Appl. Toxicol.* **36**:64.

Kinter et al. (1997b) In Comprehensive Toxicology, vol 2, ed. PD. Williams and GH Hottendorf, Pergamon, pp.155-168.

Lumley, C. (1994). General pharmacology, the international regulatory environment, and harmonization of guidelines. *Drug Dev. Res.* **32**:223-232.

Mojaverian, P. (1996). *Drug Dev. Res.* **38**:73-85.

Sullivan, A. and Kinter, L.B. (1995). Status of safety pharmacology in the pharmaceutical industry - 1995. *Drug Dev. Res.* **35**:166-172.

Williams, P. (1990). *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **12**:238-252.

Youngberg et al. (1985) *Am. J. Vet. Res.* **46**:1516-1521

**Joint Scientific Committee for International Harmonization of  
Clinical Pathology Testing in Animal Toxicity and Safety Studies:  
Process and Outcome**

Robert L. Hall

Department of Pathology  
Covance Laboratories Inc.  
Madison, Wisconsin

In 1991, an International Workshop on Clinical Pathology Testing in Preclinical Safety Assessment was held in Washington, D.C.<sup>1</sup> At that meeting, representatives from the United States Food and Drug Administration (FDA) and Environmental Protection Agency (EPA) acknowledged the interest and expertise of the attendees with respect to clinical pathology and encouraged laboratory medicine professionals with experience in animal toxicity and safety studies to provide input concerning testing guidelines for new drugs, chemicals, and food additives. In response, a joint task force of the American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) and the American Association of Clinical Chemistry-Division of Animal Clinical Chemistry (AACC-DACC) produced and published a document with recommendations for clinical pathology testing of laboratory animals used in subchronic and chronic preclinical toxicity and safety studies.<sup>2</sup> At the Vth Congress of the International Society for Animal Clinical Biochemistry (ISACB) in Parma, Italy (1992), representatives of eight scientific organizations met and agreed to use the task force document as a starting point for discussion of internationally harmonized recommendations. The effort was later increased to include two members from each of ten different scientific organizations including the ASVCP, AACC-DACC, Japanese Pharmaceutical Manufacturer's Association (JPMA), ISACB, and six European organizations. The JPMA was represented by Drs. Toshiaki Matsuzawa and Mamoru Nomura. The goal of the Joint Scientific Committee for International Harmonization of Clinical Pathology Testing was to refine the recommendations and produce a consensus document that could be used as a basis for international harmonization of animal clinical pathology testing guidelines developed by government regulatory agencies and professional standards organizations. This effort was independent of the International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH).

The process used for developing the recommendations was agreed upon at the 1st European Congress of Comparative Clinical Pathology in Nottingham, England (1993). Each organization of the Joint Scientific Committee was asked to evaluate the original task force document and propose revisions. Eighty-seven (87) proposed revisions were received, and each was voted upon by all 10 member organizations. Acceptance of a proposed revision required approval from at least 7 of the 10 organizations. Twenty-six (26) revisions were accepted. A new document, including the accepted revisions, was prepared and distributed to the member organizations for final comments. These comments were presented by each member organization at the VIth Congress of the ISACB in Guelph, Ontario (1994), and final revisions were made by consensus at that meeting. A final document was prepared, submitted to the Journal of Fundamental and Applied Toxicology in 1995, and published in 1996.<sup>3</sup> The remainder of this abstract describes the recommendations of the Joint Scientific Committee for International



Harmonization of Clinical Pathology Testing. It is important to recognize that the recommended core hematology, clinical chemistry, and urinalysis tests are *minimum* recommendations for scientifically sound safety assessment studies in laboratory animals. Additional clinical pathology testing may be necessary to better characterize any observed or expected toxic effects of a test material.

The core recommended hematology tests are total white blood cell (WBC) count, absolute differential WBC count, red blood cell (RBC) count, hemoglobin concentration, hematocrit (or packed cell volume), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), evaluation of RBC morphology, and platelet count. The importance of calculating absolute WBC differential counts from the total WBC count and the relative (or %) WBC counts was stressed by all members of the Joint Scientific Committee. The evaluation of RBC morphology was accepted by consensus, but the method of evaluation was not defined. Most laboratories prepare blood smears and examine the RBCs microscopically for morphologic characteristics such as variations in size (i.e., anisocytosis, microcytosis, or macrocytosis), color (i.e., polychromasia), shape (i.e., poikilocytosis), and hemoglobin content (hypochromasia). Other laboratories may choose to evaluate RBC morphology with the use automated measurements such as MCV, MCH, MCHC, red cell distribution width (RDW), and hemoglobin distribution width (HDW). For those laboratories using automated measurements, it is advisable to routinely prepare blood smears in the event the data indicate a need to examine the RBCs microscopically.

Although not routinely recommended, absolute reticulocyte counts and bone marrow cytologic examinations may be indicated by other hematology findings. For example, test material-induced anemia is an indication for performing absolute reticulocyte counts to assess whether the anemia is regenerative or nonregenerative. Unexplained nonregenerative anemia, leukopenia, thrombocytopenia, or pancytopenia are indications for performing bone marrow cytologic examinations. It was therefore recommended that blood smears be made for possible reticulocyte counts and bone marrow smears be made at sacrifice for possible cytologic examination. If a laboratory has the ability to perform automated reticulocyte counts, it may wish to do these routinely as an alternative to preparing reticulocyte count smears.

Prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT) (or appropriate alternatives) and platelet count are the core recommended tests for assessment of hemostasis. If blood volume limitations are a concern (e.g., multiple blood collections for a rat study), it may be advisable to perform PT and APTT only at study termination.

The core recommended clinical chemical tests are glucose, urea nitrogen, creatinine, total protein, albumin, globulin (calculated from total protein and albumin), cholesterol, calcium, sodium, potassium, and selected tests of hepatocellular and hepatobiliary health and function. Measurement of at least two scientifically appropriate tests for hepatocellular evaluation (e.g., alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, sorbitol dehydrogenase, glutamate dehydrogenase, or total bile acids) and at least two scientifically appropriate tests for hepatobiliary evaluation (e.g., alkaline phosphatase, gamma glutamyltransferase, 5'-nucleotidase, total bilirubin, or total bile acids) is

recommended. Because there are several acceptable tests used to evaluate hepatic health and function, the Joint Scientific Committee decided it was appropriate to give each laboratory the freedom to choose those tests which best met their individual needs and with which they had the most experience. For example, glutamate dehydrogenase is commonly evaluated in Europe, but no commercial kit for this enzyme assay is available in the United States.

The core recommended urinalysis tests, performed on an overnight sample (i.e., approximately 16 hour collection), are an assessment of urine appearance (color and turbidity), volume, specific gravity or osmolality, pH, and either the quantitative or semiquantitative determination of total protein and glucose.

In addition to listing minimum recommended clinical pathology tests, the Joint Scientific Committee's consensus document includes some general comments on frequency of testing, blood sample collection, urine collection, tests considered inappropriate as routine screening tools, statistical analysis, and data interpretation. Several of these topics will now be addressed.

Frequency and timing of clinical pathology testing is dependent upon study duration, study objectives, the biological activity of the test material, and the species tested. The Joint Scientific Committee made *minimum* recommendations that may be modified because of these factors. Limited blood volume in mice dictates that blood sample collection is practical only when the animals are sacrificed. Prestudy clinical pathology testing is not recommended for rats because of the relatively large number of animals per group, the homogeneity of the population, and the risk of adversely affecting the health of young animals due to blood loss or the blood collection procedure. For repeated-dose studies in rats, testing should at least be done at study termination. Interim testing is usually not necessary for long-duration studies (e.g., 13-week study) if testing was done in short-duration studies (e.g., 4-week study) that used dose levels not substantially lower than those of the long-duration studies. Clinical pathology testing is not recommended for rats after 52 weeks (1 year) because naturally occurring diseases obscure meaningful interpretation of laboratory data. For carcinogenicity studies, the only recommendation is to make blood smears for animals at unscheduled terminations (e.g., moribund animals) and at study termination. If necessary, the smears can be used as an adjunct to histopathology for the identification of hematopoietic neoplasia. For repeated-dose studies in nonrodents, testing should be done before initiation (i.e., prestudy or baseline), at least once during the study, and at study termination. For studies of 6 weeks' duration or less, the interim testing interval is recommended within 7 days of initiation of dosing. The primary purpose for this early interval is to detect transient increases in serum/plasma enzyme activity that may be absent at later intervals. This information is very important for the clinical trials. Urinalysis testing should be conducted at least once during a repeated-dose study. It is best to conduct the urinalysis testing at the same time as other clinical pathology tests. Although not stated in the Joint Scientific Committee's document, urinalysis testing for mice is impractical and not recommended as a routine test.

Because hematology and clinical chemistry tests can be influenced by the conditions under which the blood samples are collected (e.g., fasting, anesthesia, site of collection), it is critical that concurrent control and treated animals are bled in the same manner. Samples should also be collected in a manner that

minimizes time-related biases (e.g., randomization of control and treated animals). Collection of urine samples should be done in a manner to minimize contamination (e.g., with food, drinking water, feces, blood) and maintain sample quality (e.g., collected in a cooled container or with a suitable preservative). Pooling of blood or urine samples is not recommended.

The Joint Scientific Committee listed several tests that are specifically not recommended for routine use in animal toxicity and safety studies. These tests include ornithine decarboxylase, ornithine carbamoyltransferase, lactate dehydrogenase, creatine kinase, fractionation of serum/plasma proteins (i.e., protein electrophoresis), microscopic examination of urine sediment, and urinary mineral and electrolyte excretion (e.g., urine sodium, potassium, chloride, calcium, or inorganic phosphorus excretion). Although ornithine decarboxylase appears in the test lists of several regulatory guidelines, it has no value as a diagnostic clinical chemistry test. This enzyme may have been included in the original FDA guidelines by mistake, and the error was repeated by other organizations. The FDA may have intended to include ornithine carbamoyltransferase, a liver-specific enzyme involved in the urea cycle that enjoyed limited popularity as a diagnostic test in the late 1970's. This enzyme never demonstrated a clear diagnostic advantage over other more common liver enzymes (e.g., alanine aminotransferase) and is rarely measured in today's laboratories. Lactate dehydrogenase is very similar to aspartate aminotransferase, and the use of another nonspecific enzyme is not considered beneficial. Creatine kinase may be helpful for evaluating test materials that cause muscle injury but was not considered necessary for the great majority of test materials, especially if aspartate aminotransferase is already part of the clinical chemistry test list. Blood collection techniques (e.g., cardiac puncture and retro-orbital plexus collection) can diminish the value of measuring muscle enzyme activities. As a diagnostic test, serum/plasma protein fractionation (i.e., electrophoresis) is used to evaluate large, unexplained increases or decreases in globulin concentration. With respect to increased globulin concentration, the goal of protein fractionation is to rule out a monoclonal gammopathy caused by some cancers of lymphoid origin (e.g., plasma cell myeloma). Monoclonal gammopathies and large, unexplained decreases in globulin concentration are rare in toxicity and safety studies, and the routine use of serum/plasma fractionation is inappropriate. Microscopic examination of urine sediment may be helpful for screening test materials that are known to cause severe renal or bladder toxicity, but histopathology is a more sensitive tool for detecting lesions of the kidney and bladder. In part, this is because the collection of high quality urine specimens from many animals at one time is very difficult. On rare occasion, examination of urine sediment may be valuable for detecting the presence of crystals specific for a test material. Measurement of urinary mineral or electrolyte excretion may be appropriate for test materials that are known to affect renal function (e.g., diuretics) or bone metabolism (e.g., parathyroid hormone), but as routine screening tests, these are inappropriate. If serum/plasma mineral and electrolyte concentrations are greatly affected by a test material and other causes for these findings are ruled out (e.g., vomiting, diarrhea, renal failure), an assessment of the renal handling of the mineral or electrolyte in question may then be valuable.

Although the Joint Scientific Committee recommended the use of appropriate statistical methods to analyze clinical pathology data, it also stated that "Regardless of the outcome of statistical analysis, scientific interpretation is

necessary for the ultimate determination of test material treatment effects. Statistical significance alone should not be used to infer toxicological or biological relevance of clinical pathology findings. Additionally, the absence of statistical significance should not preclude the possibility that test material treatment effects exist." With regard to historical reference ranges, the Joint Scientific Committee noted that concurrent control animal data are more appropriate than historical reference ranges for comparison with data from treated animals. The uniqueness of each study relative to design and conduct often precludes meaningful comparisons with historical data from earlier studies.

The Joint Scientific Committee document represents the consensus recommendations of several international scientific organizations with respect to the minimum clinical pathology testing necessary for animal toxicity and safety studies. It is hoped that the recommendations will be followed by government regulatory agencies and professional standards organizations as they revise and harmonize the guidelines for these types of studies.

1. International Workshop on Clinical Pathology Testing in Preclinical Safety Assessment (1992): Toxicologic Pathology, Volume 20, Number 3 (Part 2), 469-537.
2. Weingand, K., Bloom, J., Carakostas, M., Hall, R., Helfrich, M., Latimer, K., Levine, B., Neptun, D., Rebar, A., Stitzel, K., and Troup, C. (1992): Clinical Pathology Testing Recommendations for Nonclinical Toxicity and Safety Studies. Toxicologic Pathology, Volume 20, Number 3 (Part 2), 539-543.
3. Weingand, K., Brown, G., Hall, R., Davies, D., Gossett, K., Neptun, D., Waner, T., Matsuzawa, T., Salemink, P., Froelke, W., Provost, J., Dal Negro, G., Batchelor, J., Nomura, M., Groetsch, H., Boink, A., Kimball, J., Woodman, D., York, M., Fabianson-Johnson, E., Lupart, M., and Melloni, E. (1996): Harmonization of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundamental and Applied Toxicology, Volume 29, 198-201.

## 免疫毒性試験ガイドラインの国際的動向について

澤田 純一

国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部

OECD毒性試験ガイドライン407と免疫毒性試験ガイドライン： OECD(経済協力開発機構)毒性試験ガイドライン407は、細菌類を用いる28日間の反復経口投与毒性試験に関するものであり、1995年に改定され、神経毒性関連の試験項目の追加と同時に、免疫毒性関連の病理学的試験項目が追加されている<sup>1)</sup>。また、ガイドライン408及び409(90日間反復経口投与毒性試験)も同様な修正が行われる予定となっている。しかし、改定ガイドライン407を用いても免疫毒性物質の検出ができない(擬陰性となる)例も示され、検出率の増大のためにさらに免疫毒性試験項目を追加する必要性が従来より指摘されていた。このような背景を受けて、免疫毒性試験ガイドラインに関するOECD専門家会議(Ad Hoc Working Group on Immunotoxicity, 1996年12月, US-EPAにて)が開催された。この会議では、免疫毒性関連の試験項目をさらに追加する必要性、追加すべき試験項目などに関して討議が行われた。その結果、ガイドライン407に追加が望まれる免疫毒性試験項目としては、ヒツジ赤血球等のT依存性抗原に対する抗体産生(ELISAまたはPFC)が妥当であるとの合意が得られた。その詳細としては、1群8匹以上の4群(3段階の用量)の雌性動物を用いることが勧められている。現在、この提案はまだドラフトの段階であるが、将来、正式な提案となるものと思われる。

米国EPAの免疫毒性試験ガイドライン： Environmental Protection Agency (EPA)のOffice of Prevention, Pesticides and Toxic Substances (OPPTS)は、EPA内の従来のガイドライン及び上述の改定OECDガイドラインを調和させるため、全面的な毒性試験ガイドラインの改正を行っている。1996年2月には、生化学的農業(bio-

Current Topics in Immunotoxicity Testing Guidelines.

Jun-ichi SAWADA, Division of Biochemistry and Immunochemistry, National Institute of Health Sciences, Tokyo 158-8501, Japan.

chemical pest control agents [BPCAs])の免疫毒性試験ガイドライン (OPP 152-18及びOPP 152-24)を、それぞれOPPTS 880.3550 Immunotoxicity及びOPPTS 880.3800 Immune Responseに移行させている<sup>2,3)</sup>。これらは、それぞれTier I及びTier IIのBPCAsに専用のガイドラインである。Tier Iにおいては、マウスまたはラットを用いた30日以上反復投与試験(経口、経皮、または吸入)を行う。試験項目としては、病理学的検査の他に、体液性免疫(抗SRBC抗体産生等)、細胞性免疫(MLR $\gamma$ アイ、DTH $\gamma$ アイ、CTL $\gamma$ アイの中の1つ)、非特異的免疫(NK細胞活性、腹腔マクロファージ数及び貪食能)の免疫機能検査が含まれている。Tier Iにおいて、異常が認められた場合には、Tier IIに進み、毒性の回復の検討、宿主抵抗性の変化の検討、必要に応じてその他の検査項目が要求される。

また、EPAは1996年6月に、化学農薬の毒性試験に関するガイドライン群の改訂案を公表している。この案では、免疫関連組織の病理学的試験が必要に応じて反復投与毒性試験に追加されている他、免疫毒性試験ガイドラインとして、OPPTS 870.7800 Immunotoxicityが新たに追加されている<sup>4)</sup>。この免疫毒性試験ガイドライン案には、抗SRBC抗体産生とリンパ球ポピュレーションの検査が含まれている。抗SRBC抗体産生は、30日間反復経口投与ラットまたはマウスを用いてPFCまたはELISAを行う。また、リンパ球ポピュレーションの検査では、フローサイトメトリーによる脾臓または末梢血主要リンパ球ポピュレーション(CD3、CD45R、CD4、及びCD8陽性細胞及びNK細胞)の変化を調べる。NK細胞に関しては、NK細胞活性によってもよい。なお、フローサイトメトリー及びELISAを用いる試験は、別途要求されるより長期の反復投与毒性試験の際に追加して行ってもよいとされている。

さらに、1997年8月には、TSCA(有害物質規制法)の対象とされる化学物質の毒性試験に関するガイドライン群の改正が行われている<sup>5)</sup>。これらは、上述のOPPTSガイドライン案を修正したものでTSCA Test Guidelines (40 CFR 799)と呼ばれているが、免疫毒性試験ガイドラインとしては、799.9780 TSCA Immunotoxicityが新たに設定されている。9780ガイドラインでは、28日間の反復投与で、抗SRBC抗体産生への影響を調べることが求められている。影響が認められる場合にはリンパ球のポピュレーションの変化を、影響が認められない場合にはNK細胞活性をさらに検討してもよい。

米国FDAの免疫毒性試験ガイドライン(案)：既に数年前に、Food and Drug Administration (FDA)のCenter for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN)は食品添加物の免疫毒性試験法ガイドライン案を提案している<sup>6)</sup>。Center for Devices and Radiological Health (CDRH)では、個別の医療用具のガイダンスの中で免疫毒性試験に関して触れているが、最近、医療用具全般の免疫毒性試験フレームワークに関するガイダンス案を提出しており、その中では、人体への接触の度合いに応じて、異なった免疫毒性試験項目を設定することが提案されている<sup>7)</sup>。

なお、国際標準化機構(ISO)のTC(技術委員会)194でも、医療用具等の免疫毒性試験に関して、FDA/CDRH案をもとに議論を開始する予定があると云われている。

[文献]

- 1) Koeter, H. B. W. M. (1995) International harmonisation of immunotoxicity testing. *Hum. Exp. Toxicol.*, 14, 151-154
- 2) US-EPA (1996) Health Effects Test Guidelines. OPPTS 880.3550 Immunotoxicity
- 3) US-EPA (1996) Health Effects Test Guidelines. OPPTS 880.3800 Immune Response
- 4) US-EPA (1996) Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.7800 Immunotoxicity (public draft)
- 5) US-EPA (August 15, 1997) Toxic Substances Control Act Test Guidelines (Final rule). *Fed. Reg.*, 62 (158), 43820-43864
- 6) US-FDA CFSAN: Toxicological principles for the safety assessment of direct food additives and color additives used in food. Redbook II (draft)
- 7) CDRH Immunotoxicology Working Group (1996) Immunotoxicity Testing Framework (Draft Document); US-FDA (March 18, 1997) *Fed. Reg.*, 62 (52), 12832-12833

## STATISTICAL SCIENCE AND QUANTITATIVE UNDERSTANDING

DAVID J. FINNEY  
Emeritus Professor of Statistics, University of Edinburgh, UK

## ABSTRACT:

Authors of papers in biological journals need to make their uses of statistical methods and software explicit and maximally comprehensible. Editors and referees have important responsibilities for this. Inexact use of technical terminology causes confusion. Computer software is invaluable but not infallible. Graphical presentation should not conceal numerical results. Tests of statistical significance should be reserved for specific needs, which will rarely include multiple comparison procedures. Experiments that involve repeated measurements need special care in statistical analysis. Full attention should be given to principles of statistical estimation as well as to choice of appropriate statistical technique. At all times, ethical standards of scientific integrity must contribute to precision and clarity. Clinical research that neglects well-established statistical principles may be intrinsically unethical.

Journal of Toxicological Sciences Vol. 23, No.2,93 - 104 (1998) 参照

本講演の内容は、講師の希望に基づき、上記にフルペーパーとして掲載され、本年会の資料の中に、別冊が添付されています。科学論文の書き方、試験データの扱い、統計解析手法に関する講師のアドバイスが述べられています。第25回日本トキシコロジー年会のより多くの参加者にアピールし、予めご理解を得て、活発な意見の交換を図りたいという意向によるものです。なお、Finney先生は以前にも統計解析方に関する考え方を本学会誌 Journal of Toxicological Sciences Vol. 20, 165 - 170 (1995) に寄稿されてされているのでご参照下さい。



## Approaches To Understanding Species Differences In Hepatotoxic Responses To Therapeutic Agents.

Felix A. de la Iglesia

Pathology and Experimental Toxicology, Parke-Davis Pharmaceutical Research Division, Warner-Lambert Company, Ann Arbor, MI 48105

Hepatotoxic reactions in humans are not predictable from preclinical toxicology studies in several species of laboratory animals. This is a puzzling phenomenon, given the depth and length of these experimental studies and the extent of accumulated data. Experience shows that in many instances, however, the preclinical models have demonstrated usefulness. The application of post hoc experimental models may help in understanding the mechanism of the liver reactions. The purpose of this report is not to review preclinical studies, but to reflect on methodological approaches that are useful to understand a significant clinical toxicity without preceding animal findings.

During the clinical development program, unexpected increases in serum aminotransferases were found in Alzheimer's disease patients treated with tetrahydroaminoacridine (tacrine) for several weeks.(1) About 50% of the patients had transaminases above the upper limit of normal (ULN). Of these, 25% had elevations 3 times above ULN, 6% had 10 times ULN and 2% had 20 times ULN. Women appeared to be more susceptible than men and there was no relationship to blood levels probably due to high first pass effect of the drug. No other liver function tests were altered, such as alkaline phosphatases or bilirubin. Upon drug discontinuation, the transaminases receded quickly. The same pattern of serum enzyme alterations was observed consistently in the post-marketing experience. This enzyme elevation was usually uncomplicated and in many instances it receded while patients stayed on drugs and to date we have no reports that it has resulted in progressive liver damage. A review of the preclinical toxicity studies did not reveal similar enzyme aberrations, and attention was directed to mechanistic and investigative studies.(2)

Initial *in vitro* studies concerned with the metabolism of tacrine were focused on metabolism and on biotransformation products. Human liver microsomes formed reactive metabolites covalently bound to proteins. Protein adduct formation was less in rat than in human liver.(3) Similarly, a 7-hydroxy tacrine metabolite represented an intermediate in the formation of other reactants. These findings stimulated further studies in attempt to identify subcellular targets of toxicity in isolated hepatocytes.

The time and concentration-related release of intracellular enzymes was followed in isolated rat hepatocytes.(4) The release of LDH, AST and ALT was similar over concentrations up to 125  $\mu\text{g/ml}$ . The asymptotic curve showed a precipitous increase in extracellular enzyme levels at exposures above 100  $\mu\text{g/ml}$ , indicating severe, lethal cytotoxicity (Fig. 1). Exposure of rodent liver cell cultures for 4 and

24 hours to tacrine revealed simultaneous leakage of the three different enzymes. These enzymes have different subcellular localization (i.e., LDH in cytosol, transaminases from mitochondria and cytosol) and the collective release would point to a more general toxic effect that includes increased plasma membrane permeability.

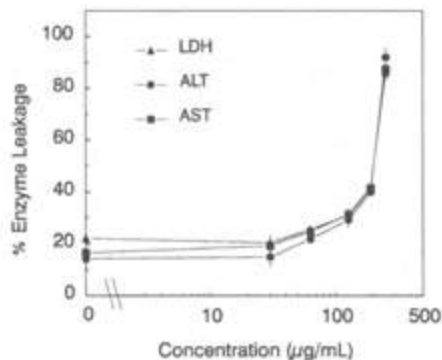


Figure 1\*

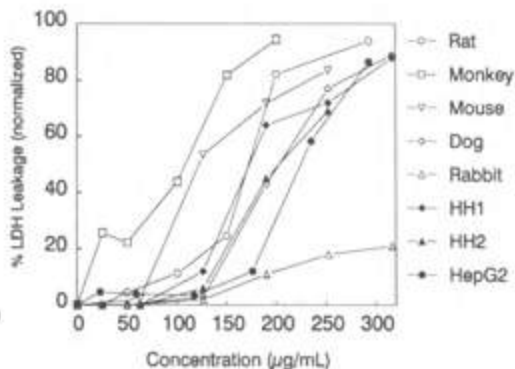


Figure 2\*

Based on clinical findings, it is plausible that human liver cells could be more sensitive than animal hepatocytes. To test this hypothesis an experiment evaluating enzyme leakage was conducted using rat, monkey, mouse, dog, rabbit and human hepatocytes, including the stable cell line HepG2.(5) Liver cells from these species responded to drug effects in a sigmoid fashion, with liver cells from monkeys and mouse being more sensitive than human and rat, and rabbit least sensitive (Fig. 2). A subsequent experiment indicated that human hepatocytes show time-related enzyme leakage either during exposure or in the post-exposure incubation interval.

These simple isolated cell incubation studies were aimed basically to determine the range of cytotoxicity and led us to explore cellular dynamic responses in an attempt to identify the target organelles involved. By means of laser confocal fluorescence microscopy, human and rat hepatocytes were assessed using FITC-dextran and rhodamine-123 over a range of tacrine exposures.(6) Tacrine-exposed hepatocytes showed increased FITC-dextran uptake and decreased rhodamine-123 uptake over time (Fig. 3). The data were obtained from quantitative measurements of fluorescence in the different cultures. The mechanism of the dye uptake indicated accelerated lysosomal activity and reduced mitochondrial transmembrane potential. These observations were corroborated after electron microscopy showed altered mitochondrial morphology and changes in the endoplasmic reticulum membranes and ribosomes.

\* Figures 1 and 2 adapted from references 4 and 5.

The changes in ribosomes appeared to constitute a unique tacrine toxicity and lead us to explore a comparison of this drug with other acridines. A battery of simple and complex acridines was applied to human hepatocytes and evaluated by the same quantitative fluorescence assay.(7) Both 1-hydroxy and 7-hydroxy tacrine metabolites, acridine hydrochloride, acridine 9-carboxylic acid, and eserine, a non-acridine cholinesterase inhibitor, did not induce characteristic endoplasmic reticulum changes, but damaged mitochondria, reduced mitochondrial membrane potential, and were cytotoxic (Fig. 4).

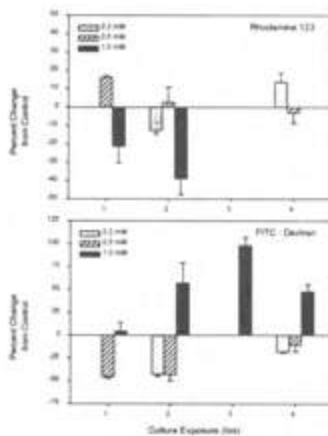


Figure 3\*

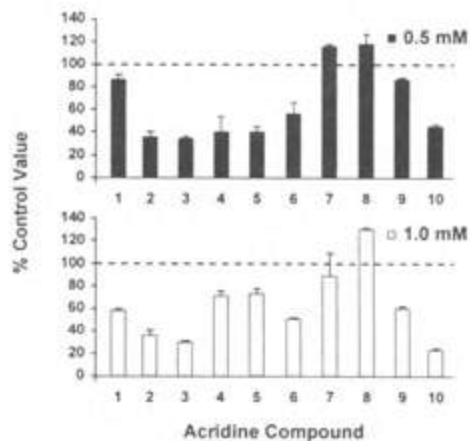


Figure 4\*

These data indicate that the tacrine-like subcellular changes are reproducible with other acridines and these agents cause significant mitochondrial dysfunction in human hepatocytes. While tacrine showed the greatest effect on transmembrane mitochondrial potential, it had the less cytotoxicity. A similar pattern of effects was observed with the 1-hydroxy and 7-hydroxy tacrine metabolites. These results indicate that the tacrine toxicity may not only be specific to mitochondria, and still cause a wider spectrum of intracellular events. Thus, the concurrent reductive or oxidation product formation may be a related event that does not play a primary perpetuating role in the cascade of events after the drug has been metabolized.

Ribosomal alterations appeared to constitute early phenomena in the course of events leading to more pronounced cellular effects.(8) RNA synthesis was affected and showed delayed protein synthesis inhibition even 24 hours post-exposure (Fig. 5). Coincidental with these changes, LDH leakage was inversely proportional to decreased protein synthesis. Cultures followed for reductive metabolism by means of conversion of dihydroxyrhodamine increased over time. Irreversible binding to cellular proteins also followed the same pattern.

\* Figures 3 and 4 adapted from references 6 and 7, respectively.

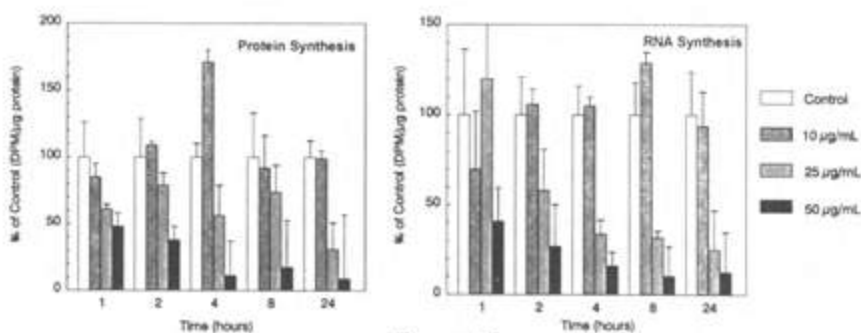


Figure 5\*

The most significant findings from these studies relate to decrements in mitochondrial function and integrity. Recent studies from this laboratory explored the effects of tacrine on electron transport and respiration in human, rat, dog and monkey mitochondria.(9) Alterations in respiratory control were found below the concentrations that produced morphologic changes. Human mitochondria showed increased State 4 respiration as opposed to increased State 3 in rats. This unexpected finding may represent a significant species-related difference that may account for the tolerability of the drug by rats. Mitochondria from older animals were more sensitive to tacrine than preparations from young animals. Human mitochondria DNA synthesis was also impaired, and it appears that tacrine does not have to be metabolized to exercise these effects. Human mitochondria had significant changes in respiratory control ratio at concentrations of 5 µg/ml, well below the exposures needed to evoke similar changes in other species, indicating that humans had the highest sensitivity.

In summary, the overall evaluation of biochemical, functional and structural findings indicate that tacrine has significant effects on mitochondria. These alterations may play a role in the development of cellular injury in the clinical setting, particularly if these lesions are cumulative. Future studies will attempt to investigate the translational and genotypic events that constitute the basis of these changes. The research approach described here represents an example of basic investigations in various experimental paradigms designed to elucidate clinical-preclinical toxicity correlations and species differences in response.

Acknowledgements. D. Monteith, J. Theiss, J. Haskins, D. Robertson and D. Plymale implemented some of these studies and collaborated actively in these investigations.

\* Unpublished from Monteith et al, 1998.

## References

1. Watkins, P.B., Zimmerman, H.J., Knapp, M., Gracon, S.I., Lewis, K.W. (1994) Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. *J. Amer. Med. Assoc.* 271: 992-1024.
2. Woolf, T.F., Pool, W.F., Walker, R.M., Monteith, D.K. (1996) Liver reactions to tacrine. In: *Drug-Induced Hepatotoxicity*, Cameron, R., Feuer G. and de la Iglesia, F.A. (eds). Springer-Verlag, Heidelberg, p. 395-410.
3. Woolf, T.F. Pool, W.F., Bjorge, S.M., Chang, T., Goel, O.P., Purchase, C.F., Schroeder, M.C., Kunze, K.L. and Trager, W.F. (1993) Bioactivation and irreversible binding of the cognition activator tacrine using human and rat liver microsomal preparations: species difference. *Drug. Metab. Disp.* 21: 874-882.
4. Monteith, D.K., Emmerling, M.R., Garvin, J. and Theiss, J.C. (1996) Cytotoxicity study of tacrine, structurally and pharmacologically related compounds using rat hepatocytes. *Drug. Chem. Toxicol.* 19: 71-84.
5. Monteith, D.K. and Theiss, J.C. (1996) Comparison of tacrine-induced cytotoxicity in primary cultures of rat, mouse, monkey, dog, rabbit and human hepatocytes. *Drug. Chem. Toxicol.* 19: 59-70.
6. Monteith, D.K., Theiss, J.C., Haskins, J.R. and de la Iglesia, F.A. (1998) Functional and subcellular organelle changes in isolated rat and human hepatocytes induced by tetrahydroaminoacridine. *Arch. Toxicol.* 72: 147-156.
7. Plymale, D.R. and de la Iglesia, F.A. (1998) Acridine-induced subcellular and functional changes in isolated human hepatocytes in vitro. (submitted).
8. Farris, M.W., Johnsen, S.A., Walton, L.P., Mumaw, V.R. and Ray, S.D. (1994) Tetrahydroacridine-induced ribosomal changes and inhibition of protein synthesis in rat hepatocyte suspensions. *Hepatology* 30:240-246.
9. Robertson, D.G., Braden, T.K., Urda, E.R., Lalwani, N.D. and de la Iglesia, F.A. (1998), Elucidation of mitochondrial effects by tetrahydroaminoacridine (tacrine) in the rat, dog, monkey and human hepatic parenchymal cells. *Arch. Toxicol.* 72: (In press).

## Teratogenicity of Retinoids in Rodents, Primates and Humans

Andrew G. Hendrickx

California Regional Primate Research Center, University of California,  
Davis, California

### INTRODUCTION:

The main goal of developmental toxicology is to assess human risk. Among the major difficulties in risk assessment is the rigorous determination of the human dose or level of exposure that has no adverse effect on the embryo. In the past it has been customary 'to assume that animal teratogens represent potential human teratogens' and to derive safe levels of human exposure from animal no-observed-adverse-effect-levels (NOAELs) and lowest-observed-adverse-effect-levels (LOAELs). More recently, extrapolations have also been made from high to low dose, from one exposure route to another, and from one exposure time frame to another (Eckhoff and Willhite, 1997; Clewell et. al., 1996). Physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) models take into consideration all of these parameters in estimating human risk.

One of the most recently identified human teratogens (13-*cis*-retinoic acid [RA], isotretinoin, Accutane) provides a good example of risk assessment extrapolations based on animal data. The unintentional use (for treatment of cystic acne) of 13-*cis*-RA during early human pregnancy causes spontaneous abortion and a characteristic pattern of malformations which involve craniofacial, brain, cardiac and thymic development (Lammer et al, 1985). The most common of these adverse outcomes are structural and/or functional deficits of the brain, followed by craniofacial anomalies, especially ear malformations, facial asymmetry, micrognathia and cleft palate. The teratogenic risk is approximately 35% among pregnancies exposed to 13-*cis*-RA after the 15th day of conception (Lammer et al., 1985).

### RESULTS AND DISCUSSION:

13-*cis*-RA: This retinoid is teratogenic in the mouse, rat, rabbit, hamster and monkey. In addition, the concordance in the malformation syndrome is remarkably close across species, but the administered teratogenic dose ranges from less than 1 mg/kg day in the human to more than 100 mg/kg/day in mice and rats.

There are several lines of evidence which suggest that there is a pharmacological threshold for RA:

- 1) RA, a metabolite of retinol (Vitamin A), is an endogenous compound required for normal growth and development;
- 2) RA modulates gene expression by binding to specific RA receptors (RARs and RXRs) which are present in embryonic tissues sensitive to retinoid teratogenesis;
- 3) RA excess as well as RA deficiency can result in abnormal development.

Table 1 provides a comparison of the LOELs for 13-*cis*-RA and all-*trans*-RA in commonly used laboratory species and humans. Considering the administered dose, the mouse, rat, and rabbit are much more sensitive to all-*trans*-RA but much less sensitive than the hamster and monkey to 13-*cis*-RA (Eckhoff & Willhite, 1997; Hummler et al., 1990). The human is the most sensitive of all the species to 13-*cis*-RA since malformations occur at 0.5-1.5 mg/kg, the therapeutic dose range. It should be noted that identification of the retinoid administered dose is straightforward, but it is the absorbed and metabolized dose capable of RAR/RXR transactivation which determines the internal threshold dose.

Table 1. Species Differences in Retinoid Teratogenicity

	Lowest Teratogenic Dose	
	<u>all-trans RA</u> (mg/kg/d)	<u>13-cis RA</u> (mg/kg/d)
Mouse	4	100
Rat	2	150
Hamster	12.5	25
Rabbit	2	10
Monkey	10	<2.5
Human	-	0.5-1.5

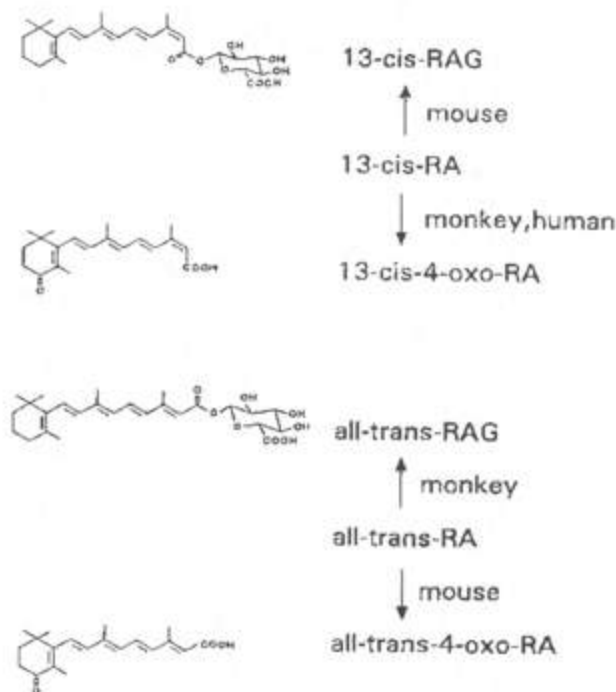
A comparison between the least sensitive species (mouse) and the most sensitive species (monkey) on the basis of administered dose of 13-*cis*-RA indicates that the half-life ( $T_{1/2}$ ) is much longer in the primate embryo (Table 2). Furthermore, the embryo/maternal (E/M) ratio indicates a more extensive accumulation of 13-*cis*-RA in the embryo of the primate than the mouse.

Table 2. 13-*cis*-Retinoic Acid

	<u>Mouse</u>	<u>Primate</u>
Teratogenic dose (mg/kg/day)	100	<2.5
$T_{1/2}$ (hr)	<1	13.2
Major metabolite	13- <i>cis</i> -RAG (glucuronidation)	13- <i>cis</i> -4-oxo-RA (oxidation)
E/M ratio	<0.1	0.4

The greater sensitivity of the primate compared to the mouse embryo is primarily attributable to differences in maternal metabolism. The primary metabolic pathway for 13-*cis*-RA in the mouse is glucuronidation, which produces 13-*cis*-RA glucuronide, and is considered a "detoxification" pathway. Conversely, the primary metabolic pathway for 13-*cis*-RA in the primate is oxidation which produces 13-*cis*-4-*oxo*-RA (Hummler et al., 1994). This metabolite readily crosses the placenta and may act as a teratogen in concert with 13-*cis*-RA and all-*trans*-RA (Fig. 1).

Fig. 1



In summary, the greater teratogenicity in the primate compared to the mouse is attributable to differences in maternal metabolism/kinetics as well as placental transfer, both of which lead to greater embryonic exposure in the primate.

**Vitamin A:** The teratogenicity of hypervitaminosis A has been well established in a number of laboratory species, including mice, guinea pigs, hamsters, and rabbits. Epidemiological studies have suggested, but not proven, that intake of high levels of vitamin A during early human pregnancy may also pose a teratogenic risk. Recent studies carried out in the cynomolgus monkey provide risk assessment information which is relevant to human safety (Miller et al., 1998). Oral exposure to vitamin A (retinyl palmitate, AROVIT) administered at 7,500 IU/kg (n=20), 20,000 IU/kg (n=26), and 40,000 IU/kg (n=8) during early pregnancy (GD 16-27) results in a dose-related increase in abortions and malformations which affect typical retinoid target tissues, including the craniofacial region, heart, and thymus. The NOAEL





Interpretation of PBPK models involves assessment of the following embryo and maternal factors:

- Maternal metabolic pathways
- Pharmacokinetic parameters (eg.,  $C_{max}$ , AUC)
- Type of placenta
- Length of organogenesis (eg., human/monkey = 35/30 days compared to the rodent/rabbit = 10 days)
- Identification of appropriate dose

#### SUMMARY:

- Retinoids have provided an excellent model for assessment of teratogenic risk in animals and extrapolation to humans
- PBPK models take into account many factors, including dose levels, routes, and timing of exposure, placental transport, and embryonic and maternal compartments, which are relevant to determining safe levels during pregnancy
- Differences in the teratogenicity of retinoids in mammalian embryos is largely attributable to differences in maternal metabolism

#### REFERENCES:

1. Clewell, H.J., Andersen, M.E., et al. (1996). Physiologically-based pharmacokinetic model for retinoic acid and its metabolites. *J Am Acad Derm* 36(3 Pt2):577-585.
2. Eckhoff, C. and Willhite, C.C. (1997). Embryonic delivered dose of isotretinoin (13-cis-retinoic acid) and its metabolites in hamsters. *Toxicol Appl Pharmacol* 146:79-87.
3. Hummler, H., Korte, R., and Hendrickx, A.G. (1990). Induction of malformation in the cynomolgus monkey with 13-cis-retinoic acid. *Teratology* 42:263-272.
4. Hummler, H., Hendrickx, A.G., and Nau, H. (1994). Maternal toxicokinetics, metabolism, and embryo exposure following a teratogenic dosing regimen with 13-cis-retinoic acid (isotretinoin) in the cynomolgus monkey. *Teratology* 50:184-193.
5. Lammer, E.J., Chen, D.T., Hoar, R.M., et al. (1985). Retinoic acid embryopathy. *N Engl J Med* 313:837-841.
6. Miller, R.K., Hendrickx, A.G., Mills, J.L., Hummler, H., and Wiegand, U.-W. (1998). Periconceptional vitamin A use: how much is teratogenic? *Reprod Toxicol* 12(1):75-88.

# シンポジウム 1

シンポジウム1 動物試験と臨床副作用の関連性  
オルガナイザー序論

加藤 隆一、馬屋原 宏\*

慶応大学医学部、武田薬品薬剤安全性研究所\*

新薬の臨床試験や承認申請に当たっては様々な動物試験（毒性試験及び安全性に係わる薬理・薬物動態試験）の成績の提出が要求される。これは動物試験の結果が臨床における副作用の予測に役立つと信じられているからであろう。しかし動物試験の結果が臨床における副作用の予測にどれくらい役に立つかに関しては報告が少ない。

動物試験の成績と臨床における副作用の関連性に関しては、日本製薬工業協会基礎研究部会が過去にいくつかの調査を実施し、ある程度の予見性が認められるもの（血圧・心拍数への影響、胃・腸管の障害、口渇・縮瞳などの自律神経系の障害、注射部位の損傷など）と、予見が困難なもの（頭痛・悪心などの自覚症状、薬疹などのアレルギー症状、白血球・リンパ系の障害、肝機能障害など）が挙げられている。

しかしながら、このような調査によって動物を用いた毒性試験の結果が医薬品の安全性評価にどれ程寄与しているかを判断することは困難である。なぜならば、臨床試験の所見と動物試験の成績を比較することが可能な医薬品または候補化合物は、承認にこぎ着けたか、あるいは少なくとも臨床試験が実施可能であると判断されたものであり、従って動物試験で安全性の篩いがかけられた後のものに限られるからである。すなわち動物で強い毒性を示した候補化合物については、それらの開発が中止されるか、あるいは安全性を十分に考慮した用量でのみ臨床試験が実施されるため、動物での所見に対応するヒトのデータが得られず、予見性が不明となるからである。

その一方で、臨床試験段階あるいは市販後に予期せぬ安全性の問題に直面し、開発が中止されたり「使用上の注意」が改訂される事例が珍しくないことから、十分な高用量で様々な安全性試験を行ったにもかかわらず動物試験の篩をくぐり抜けてしまう候補化合物が少なくないと考えられる。本シンポジウムでは医薬品あるいは候補化合物の安全性に係わる事例について動物とヒトの所見の関連性に関する貴重なデータをできるだけ詳細に報告していただき、動物試験の予見性、その限界あるいは問題点を討議したいと考えている。

Relation between the toxicological findings from animal safety studies and the adverse event in clinical trials — Introduction by the organizers

Ryuichi KATOH and Hiroshi MAYAHARA\*

Keio University, School of Medicine and Takeda Chemical Industries Ltd.\*

## 事例：臨床副作用「眠気と頭痛」と動物試験

○真鍋 淳<sup>1)</sup>, 増田 裕<sup>2)</sup>三共(株)安全性研究所<sup>1)</sup>, 総合研究所<sup>2)</sup>

## 1. 眠気

眠気のみカニズムは依然として明らかではないが、眠っている時の脳波では、覚醒時よりも波の数が減少し、規則的で大きな波が現れることが知られている。この状態を脳波の同期化といい、同期化した脳波が乱れる(脱同期)と覚醒する。ただし、いわゆるREM睡眠のときにも脱同期することが報告されている。脳幹網様体に存在する網様体賦活系(Reticular Activating System, RAS)では、感覚器官から大脳皮質への刺激伝達経路の側枝が非特異的に刺激を伝達する。この系が活動しているときは覚醒状態を保つことがわかっている。眠気を起こすのは別の領域であるが、物理的にRASへの刺激伝達を遮断することによっても昏睡状態を起こすことができる。

一方、睡眠と覚醒が神経によってではなく、ホルモンのような物質によって調節されているという考え方により、いくつかの物質が報告されている。その中でも比較的、生理的意義が明らかな物質として、プロスタグランジン(PG)が報告されている。例えば、PGD<sub>2</sub>は内在性の睡眠誘発物質で、PGE<sub>2</sub>は覚醒物質であることがラットなどを用いた実験で確認されている。

## 1. 副作用としての眠気

副作用として眠気を発現する薬物は数多く知られている。抗うつ薬、鎮痛薬、抗喘息薬など中枢神経系に作用する薬物の他に降圧剤、インターフェロン、H<sub>1</sub>受容体拮抗薬などがあげられる。特に、今回事例として紹介する抗アレルギー薬(H<sub>1</sub>受容

Case Report: Side Effects (Drowsiness and Headache) in Clinical Studies and Animal Studies

Sunao MANABE<sup>1)</sup> and Hiroshi MASUDA<sup>2)</sup>Lab. Anim. Sci. & Toxicol. Labs.<sup>1)</sup> and Research Institute<sup>2)</sup>, Sankyo Co., Ltd., Tokyo 140-0005, Japan.

拮抗型)において、眠気は代表的な副作用であり、脳内に広く分布するヒスタミン神経系のH<sub>1</sub>受容体遮断により起こるとされているが、その作用メカニズムは十分に明らかになっていない。ヒスタミン作動性神経は視床下部などに存在するが、ラットでは活動期に、脳内の特定の部位に限らずヒスタミン遊離量が増加し、活動期の終わりにはヒスタミン遊離量が速やかに減少することが報告されている。この変化は摂餌や照明の有無に関係なく生じる現象であり、ラットの活動と密接に関係している。

## 2. 眠気と動物実験

眠気を検出するために有効と考えられている動物実験およびパラメータの代表的なものを以下にあげる。

### 1) 一般行動・自発運動量

### 2) 麻酔薬による麻酔時間の延長

バルビタール系の麻酔薬を投与し、正位反射消失の持続時間を測定する。15%麻酔延長薬容量(PD<sub>15</sub>)を算出し、比較する。

### 3) 筋弛緩

### 4) 脳波

睡眠時の脳波の同期化、REM睡眠時の脱同期などは哺乳類に共通している。

### 5) 脳内移行性

脳内H<sub>1</sub>受容体結合(*ex vivo*)と気道収縮(*in vivo*)から受容体遮断比を算出する。

## 3. 検体Aの事例

検体AはH<sub>1</sub>拮抗型抗アレルギー薬の改良型として開発された。アレルギー性皮膚炎および喘息モデルを用いて検索したところ、優れた抗アレルギー・喘息作用が認められた。

### 動物試験結果

#### 1) 一般行動・自発運動量

大量投与(100 mg/kg以上)では一般行動観察において鎮静効果が認められた。

#### 2) 麻酔薬による麻酔時間の延長

マウスの子オペンタール麻酔時間は100 mg/kgで有意に増強されたが、マウスの子オペンタール麻酔とモルモットのペントバルビタール麻酔を比較した結果、モルモットの方が薬物容量依存的に麻酔時間の延長効果が認められ、より定量性があることが明らかになった。モルモットのペントバルビタール麻酔時間の延長を他の抗ヒスタミン薬と比較した結果、検体AのPD<sub>15</sub>はKetotifenの10倍程度、中枢鎮静作用が比較的弱いTerfenadineやAstemizoleに比べても高い値を示し、検体Aの中枢鎮静作用は極めて弱いと推測された。

#### 3) 筋弛緩

作用は認められなかった。

#### 4) 脳波

マウスの脳波測定では1 mg/kg以上で覚醒相の減少と睡眠相の増加が認められた。

#### 5) 脳内移行性

経口投与時の脳内 H<sub>1</sub> 受容体結合 (*ex vivo*) と気道収縮 (*in vivo*) の受容体遮断比はほぼ1であり、比較的脳内に移行しやすいと考えられた。

6) その他、通常の安全性試験結果に眠気の副作用を示唆する変化は皆無。

### 臨床試験結果

第1相試験において、対照薬として用いた Diazepam および Ketotifen とほぼ同等の眠気・鎮静の副作用発現が認められ、開発中止に至った。

## 4. 結論

少なくとも、本剤における動物試験では、モルモットを用いた麻酔時間の延長作用はヒトでの眠気の良い検出指標とはならなかった。一方、大量投与による鎮静効果、マウスの脳波の変化、脳内移行性の実験結果がヒト臨床の眠気に関連している現象かも知れない。特に、脳内移行性の実験結果がヒトでの眠気の良い指標となる可能性が高いとされるが、ヒトの眠気との (*in vitro-in vivo*) 相関に関するデータはまだ十分とはいえない。

### 1.1. 頭痛

頭蓋内圧の上昇、あるいは逆に脳内の血管拡張による脳圧減少などに起因して頭痛が発現すると考えられている。また、血管拡張作用による機械的刺激が、頭蓋内外の痛覚感受部位に作用し、頭部に痛みを感じるとも言われている。その血管拡張には、脳血管収縮作用を有するセロトニン (5-HT) あるいは NO などが関与し、例えば、髄膜の血管内皮に位置する 5-HT<sub>2B</sub> レセプターと NO を介して偏頭痛が発現する。髄膜からは、三叉神経を経て痛みが伝達されると考えられている。NO を介する頭痛は、ニトログリセリンで有名である。

#### 1. 副作用としての頭痛

精神安定剤として用いられるリチウム塩を服用すると、頭蓋内圧上昇により頭痛がおこることが報告されている。ATP 依存性カリウムチャンネルを開放する薬物 (降圧剤)、 $\alpha$ 1 遮断薬 (降圧剤)、Ca 拮抗薬 (血管平滑筋弛緩剤) によっても、血管拡張作用の結果、頭痛が生じる。さらに、今回二つ目の事例として紹介するプロスタサイクリンあるいはその誘導体 (beraprost sodium, cicaprost, ciprotenone など) による副作用としても頭痛、紅潮などが報告されている。しかし、これらプロスタサイクリン系の薬剤による頭痛発現メカニズムについての詳細は不明である。また、検出法も動物から摘出した動脈を用いた系で、5-HT など血管拡張因子、あるいはその他の因子を検討しているが、これらはむしろ薬効を考慮したものであろう。すなわ

ち、前臨床の段階での頭痛の検出法は確立されているとはいえない。その中で、vascular headacheの指標として、ラット硬膜のNOS-positive nerve fiberと肥満細胞を免疫組織学的に証明することで予測可能かもしれないとの報告はあるが、これが実際頭痛という副作用の検出に使われているかどうかは不明である。

## 2. 頭痛と動物試験

頭痛を検出するために有効と考えられる動物試験およびパラメーターは明らかではない。しかし、薬剤開発の段階で実施される一般薬理試験および安全性試験の内、以下のパラメーターは臨床での頭痛の発現に何らかの関連を持つかも知れない。

- 1) 一般行動・中枢系一般薬理試験
- 2) 循環系一般薬理試験

## 3. 検体Bの事例

検体Bはプロスタサイクリン(PGI<sub>2</sub>)誘導體(carbacyclin)であり、血小板凝集阻害作用を有する。すなわち、血小板で生成される血小板凝集作用を有するトロンボキサシンA<sub>2</sub>に拮抗する。

## 動物試験結果

### 1) 一般行動・中枢系一般薬理試験

マウス、ラット、イヌでは抑制作用(イヌでは脱力も)、サルでは(-)。

### 2) 循環系一般薬理試験

- ①血圧、心拍数、血流(ベ麻酔犬)：降圧15 mmHg
- ②血圧、心拍数、血流、心仕事量、心電図(開胸犬)：TPR -10%、CW -10%
- ③血圧、心拍数、血流(クロ麻酔犬)：BF増加
- ④血圧、心拍数、心電図(覚醒犬)：降圧15 mmHg
- ⑤臓器血流量(ベ麻酔兎)：胃、大腸増加
- ⑥血管拡張(麻酔犬)：+35%  
摘出モルモット心臓 in vitro：+55%  
摘出ラット心臓 in vitro：+39%
- ⑦摘出心臓(ラット) in vitro：収縮力低下-39%

3) その他、通常の安全性試験結果に頭痛の副作用を示唆する変化は皆無。

## 臨床試験結果

初期第II相試験で頭痛および顔面紅潮が高い頻度で発現し、開発を中断した。

## 4. 結論

血管拡張作用を有する薬剤の全てで頭痛が発現する訳でもないが、本剤の血管拡張作用がヒトの臨床の頭痛に関連している可能性が高い。したがって、薬剤を開発する側からすると、血管拡張作用を有するものならば、頭痛の発現を考慮すべきで



あろう。しかし、薬効的に極めて有効な薬剤に軽度の血管拡張作用があるからといって開発を断念する材料になるか否か極めて難しい。

## 11. まとめ

実験動物を用いた安全性試験および *in vivo/in vitro* の一般薬理試験の詳細な検討によっても、臨床における副作用を正確に予測することが困難であるのは周知である。今回報告した事例の眠気と頭痛はその好例であろう。しかし、動物試験による予測性をより高めるためには、今回の事例のようなヒト臨床の副作用と動物試験結果を検討し両者の相関についてのデータを蓄積することと、副作用発現メカニズムに関する基礎的研究を継続することが必須であろう。

## 事例：貧血に関する動物試験と臨床試験成績

○ 藤井登志之、小原要

藤沢薬品工業(株) 安全性研究所

動物試験の成績からヒトへの作用(薬効、安全性)を予測することは大変難しいことである。しかし、動物試験の成績は臨床試験を行うための1つの根拠となり得る。

最近、十分な安全性が確保できると予測された化合物が、試験の進捗に伴い、安全域が得られなくなった事例を経験したのでその成績を報告する。

化合物はユニークな化学構造式を有し、薬理試験で狭心症の治療効果が確認されている。

また、認められた貧血は溶血性貧血と判断され、化合物の投与中止により、速やかに回復するものであった。

臨床試験中止に至るまでに実施した臨床および非臨床試験の主なものは次の通りである。

臨床試験	非臨床試験
第Ⅰ相単回、連続投与試験	マウス、ラット、イヌ単回投与毒性試験
初期第Ⅱ相単回、連続投与試験	ラット、イヌ2週間反復投与予備毒性試験 ラット4週間反復投与毒性および4週間回復試験 ラット、イヌ13週間反復投与毒性試験
第Ⅱ相長期(8週間および4~6ヵ月)連続投与試験	ラット、イヌ52週間反復投与毒性試験

マウス、ラットおよびイヌを用いた単回投与毒性試験並びにラットおよびイヌを用いた13週間反復投与成績からヒトでの単回投与量を算出した。すなわち、ヒトに化合物を最初に単回投与する用量は1.0 mg/ヒトとした。

A case : Anemia in animal and human studies.

Toshiyuki FUJII, Kaname OHARA  
Fujisawa pharmaceutical Co., LTD.  
Toxicology Research Laboratories, Osaka-532, Japan.

用量算出指標	計算過程	初回投与用量
LD <sub>50</sub> ×1/600	マウス単回投与毒性	439mg/kg×1/600
	イヌ単回投与毒性	>32mg/kg×1/600
最大無影響量 ×1/60	ラット13週間反復投与毒性	1.0mg/kg×1/60
	イヌ13週間反復投与毒性	3.2mg/kg×1/60

本化合物のヒトでの推定有効血漿中濃度はイヌを用いた薬理試験成績などから1~3 ng/mL と考えられ、ラットおよびイヌを用いた13週間週間反復投与毒性試験での毒性所見(貧血)がみられない血漿中化合物濃度は12~14ng/mLであった。これらの成績からヒトでの単回投与の上限用量はC<sub>max</sub>で10ng/mL(投与量換算40mg)まで安全であると考えられた。

13週間反復投与毒性試験	投与量(mg/kg)	毒性所見	C <sub>max</sub> (ng/mL)
ラット	1.0	なし	11.7
	3.2	貧血傾向	37.4
	10.0	貧血傾向	117.0
イヌ	1.0	なし	4.4
	3.2	なし	13.9
	10.0	貧血傾向	43.5

健常成人男子を対象とし、本化合物の1~40mgを単回経口投与試験を実施した。1~8mgまでの投与では観察・測定したすべての項目に著変は認められなかったが、10mg以上で血圧降下、20mg以上で脈拍数増加などがみられた。しかし、本試験成績から忍容性は概ね良好と判断された。同時に実施した40mg用量での空腹時と食後投与における薬物速度論的パラメータの比較では、食後投与のC<sub>max</sub>は空腹時投与の1/4~1/5でAUCは3割程度低かった。続けて実施した7日間連続経口投与(40mg×3回/日)試験においても血圧降下や脈拍数増加はみられたものの、忍容性は良好と判断された。

患者を対象とし、本化合物の10、20および40mgを単回経口投与した試験で良好な忍容性が得られたため、20mg×3回/日および40mg×3回/日の14日間連続投与による有効性、安全性評価のための予備試験を実施した。安全性に問題なく有効性も40mg×3回/日投与で確認された。40mg×3回/日投与を中心に症例数の増加と投与期間の延長(8週間)に伴う有効性、安全性評価を行った。有効性は確認されたものの、安全性評価では貧血傾向を疑わしめる検査値が少数例に観察された。

貧血所見は投与期間の延長に伴ってあらわれる傾向を示したことに加え、狭心症治療薬の中には耐性の出現を示すものもあることより、治験を拡大するに先立ちこれらの問題点を解決すべく、更に多数の患者で長期間投与(4~6ヵ月)試験が同用量で実施された。

投与開始後4ヵ月の血液パラメータの解析で貧血傾向が明瞭となった。一方、本試験実施中にイヌに 52 週間反復投与した試験の成績が報告され、3.2mg/kg 投与群の病理組織学的検査で貧血を疑う所見がみられ、無毒性量が 1mg/kg となった。

所見	程度	投与量 (mg/kg)							
		0		1.0		3.2		10	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
	—	3	4	3	2				
ヘモジデリン	±								
沈着増加	+	1		1	2	2	2		1
	++					2	2	4	3

動物数：4/性    —：著変なし    ±：軽度    +：中等度    ++：高度

本化合物は臨床試験で有効性が期待される用量で貧血が示唆された。

また、貧血のみられる投与量での血中濃度がヒトとイヌとでほとんど差が認められなかった。それ故、適応症も考慮してリスク/ベネフィットのバランスを再考したとき本化合物についてはリスクが優ると判断し、開発中止に至った。

## 事例：

## 動物試験成績を基とした制ガン剤のヒトにおける安全用量の設定

○堀井 郁夫, 川島 明

日本ロシュ研究所 前臨床科学研究部

[はじめに] 動物を用いた安全性試験結果からヒトへの外挿性を検討し、その安全用量を設定することは、非常に重要なことである。特に、EIM/Phase I に用いる初回用量を設定することは難しいことではあるが、その予測性を提唱することは、前臨床試験の安全性に係わる我々に課せられた一つの大きな使命である。今回、Cytostatic に分類される制ガン剤の開発において、前臨床試験成績から臨床試験に用いる投与量を予測することができたのでその事例を報告する。

## 1. Capecitabine の開発時における安全量の予測

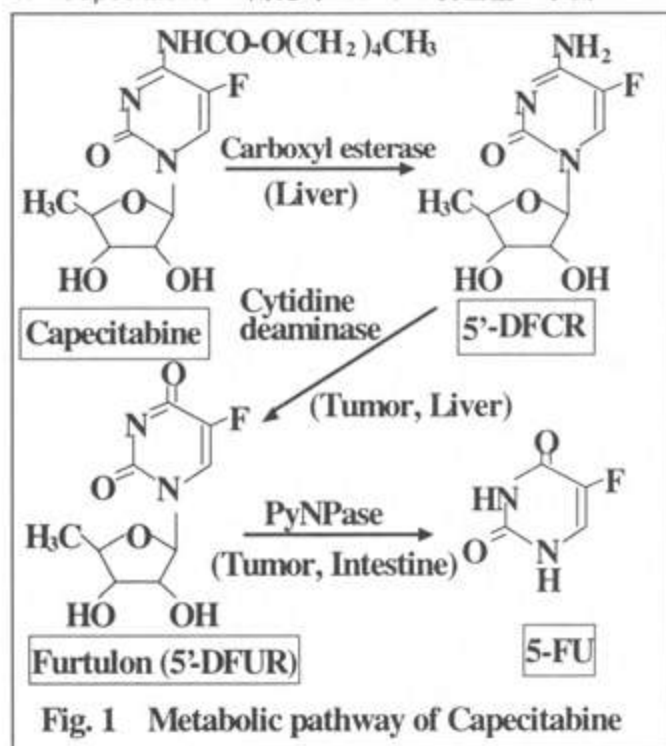


Fig. 1 Metabolic pathway of Capecitabine

Capecitabine は, Furtulon<sup>®</sup> (5'-DFUR, 5'-deoxy-5-fluorouridine, doxifluridine) の腸管毒性の軽減を目的として開発された 5'-DFCR 誘導体 (5'-deoxy-5-fluorocytidine derivatives) に属する制ガン剤で経口投与後、腸管にて速やかに吸収された後 Fig.1 に示す代謝を経て最終的に腫瘍中のピリミジンフォスホリラーゼ(PyNPase)によって 5-FU に代謝される腫瘍選択性の高い制ガン剤である。<sup>(1,2)</sup> ヒトを含め腸管には PyNPase 活性が存在するため 5'-DFUR を経口投与するとその一部が 5-FU

Case study: Determination of the safety dose and dose regimen of cytostatic anti-cancer drugs for clinical trials based on the pre-clinical safety studies

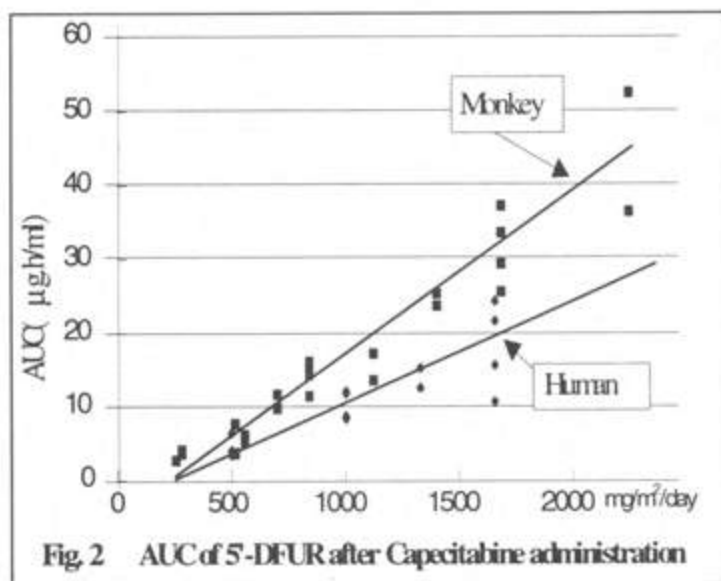
Ikuo Horii and Akira Kawashima. Nippon Roche Research Center, 200, Kajiwara, Kamakura City, Kanagawa Pref., 247-8530, Japan

に変換され腸管毒性が出現するものと考えられている。<sup>(3)</sup> 従って、腸管では代謝を受けずに腫瘍中の PyNPase によって 5-FU に変換されるプロドラッグの開発を行ってきた。その過程でヒト及びサルの 5'-DFCR の N<sup>4</sup> 変換酵素には、基質特異性の異なる 2 種類の酵素(A, B)が存在し、A は肝臓に B は腸管に多く存在することが明らかとなり、腸管の B 酵素によって代謝されにくく、肝臓の A 酵素(Carboxyl esterase)によって 5'-DFCR に変換される 5'-DFCR 誘導体を探索した。また、5'-DFCR 誘導体の代謝変換に係わる上記 3 酵素(Carboxyl esterase, Cytidine deaminase, PyNPase)の実験動物(ラット, マウス, サル)での主要臓器における活性分布を詳細に検討した結果、ヒトの代謝変換に高い類似性を持つ動物種がサル(カニクイザル)であることが明らかとなり<sup>(4)</sup>、動物試験にてヒトへの毒作用を評価する場合、サルのデータを基に検討することとした。この様に、ヒトにおける安全性を実験動物から外挿する際には、使用する動物種における代謝関連酵素活性の詳細を検討することが不可欠であり、最も外挿性の高い動物種を選択することが必須であると言える。その上で、数種類の N<sup>4</sup> 置換 5'-DFCR 誘導体をサルに投与し、血中プロファイルと毒作用の関係を調べたところ、毒作用と 5'-DFUR の AUC には明らかな相関関係があることが判った。(Table 1)

**Table 1 4-week tox. studies of N<sup>4</sup>-substituted 5'-DFCR derivatives in cynomolgus monkeys**

Test article	Capecitabine			B			C		D		E	
Dosage(mmol/kg/day)	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0
Dead/animals	0/6	0/6	2/3	0/6	0/6	2/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	2/3
AUC (5'-DFUR)( $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ )	5.4	38	53	3.9	29	48	11	40	19	32	35	70
Intensity of toxicity												
Loose stool/Diarrhea	-	+	++	-	-	++	-	-	-	+	+	++
Body weight loss	-	±	++	-	-	++	-	±	-	-	±	++
White blood cells ↓	-	+	++	-	+	++	-	+	-	-	-	++
Atrophy of thymus/spleen	-	+	++	-	+	++	-	+	+	+	+	+++
Myelosuppression	-	+	++	-	+	++	-	+	-	-	-	++
Damage of GI tracts	-	+	++	-	-	++	-	-	-	+	-	+++

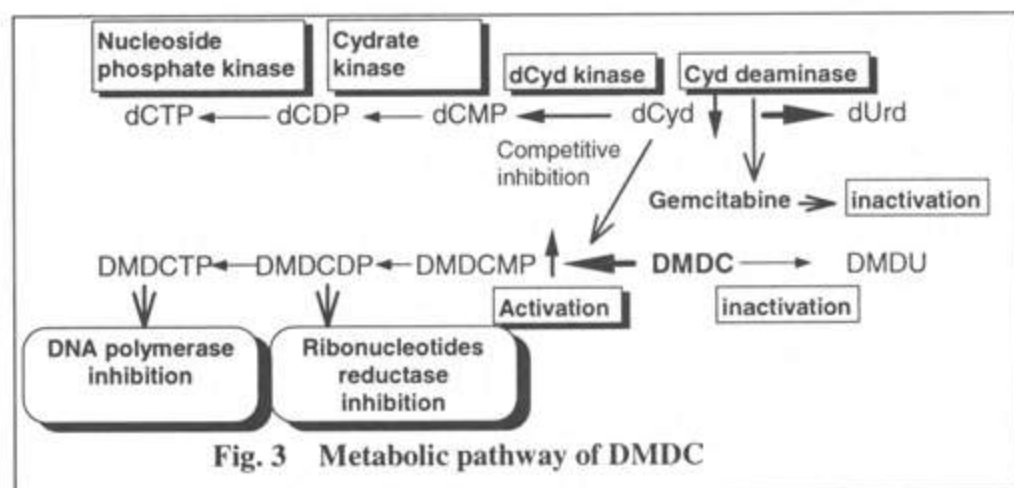
また、サルを用いた 4 週間試験などにおいて無毒性量と判断された Capecitabine の投与用量は、0.15 mmol/kg/day (約 850 mg/m<sup>2</sup>)であり、この時の 5'-DFUR の AUC は 13.8  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  であることが判った。この無影響量に安全係数を 3 として、約 1/3 用量に相当する 300 mg/m<sup>2</sup> をヒトへの初回投与用量と決定した。実際に、海外でのヒト単回投与 300 mg/m<sup>2</sup> における 5'-DFUR の AUC は、2.33  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  であり、サルから予測した AUC 量(約 4.8  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ )に比較してやや下回ることが判った。さらに、capecitabine の Phase I<sup>(5)</sup> における 5'-DFUR 量をサルのそれと共にプロットすると Fig. 2 になり、上述のことが確かめられた。また、サルを用いた試験成績から、ヒトにおける最大投与量は、5'-DFUR の AUC として約 15  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  を超えないよう安全性を確保する必要があることもわかった。



この様に、最も外挿性の高い動物種を用いて、毒作用を表わすTKパラメータが何であるかを明らかにした上でヒトへの初回投与量を算出し、それをヒトでの実測PKパラメータと比較検討し、Phase Iの投与用量を決めていくことが重要であると結論づけられる。

## 2. DMDCの開発時における安全量の予測

DMDCは、2'-deoxycytidine誘導体で、生体内でリン酸化され、二リン酸化物、三リン酸化物がそれぞれribonucleotides reductase, DNA polymeraseを阻害を行なうことにより制ガン作用を発揮する。(Fig. 3)<sup>(6,7)</sup> また、同系統の薬物GemcitabineはCyd deaminaseによって不活化されるのに対して、DMDCは、cytidine (Cyd) deaminaseによるinactivationに抵抗性があり、代謝不活化されにくい特徴を持っている。<sup>(8)</sup> またCyd deaminase活性の高い臓器では、組織中dCyd量が減少しているためdCyd kinaseによるDMDCのリン酸化がより進むことになり抗腫瘍活性が高まると考えられている。<sup>(9)</sup>



本剤は、経口剤として開発中であるが、当初の静脈内注射による開発時、ラット及びイヌを用いた試験成績が存在した。しかし、ラット、イヌを用いた成績から設定した臨床初回投与量(40 mg/m<sup>2</sup>)は、すでにヒトでのMTDに相当する用量であった。

これは、Cyd deaminase 活性を殆ど持たないラット、イヌを前臨床試験に使用して初回投与用量を推定したこと、Cyd deaminase に対する感受性が同系統の薬物 Gemcitabine と同じであると考えたことに起因したものであった。そこで、我々は、経口剤として開発するにあたり、EIM/Phase I までに必要とされる前臨床試験は、Cyd deaminase 活性を有するマウス、サルを用いて行なうこととした。DMDC の毒作用は、増殖活性の高い臓器、いわゆる骨髄・免疫系臓器、消化管、生殖器、皮膚に認められ、なかでも、骨髄に対する作用は、ヒトへの適用を考えると最大の留意点であった。サルを用いた4週間試験成績(Table 2)では、高用量群(10 mg/kg)で上述毒

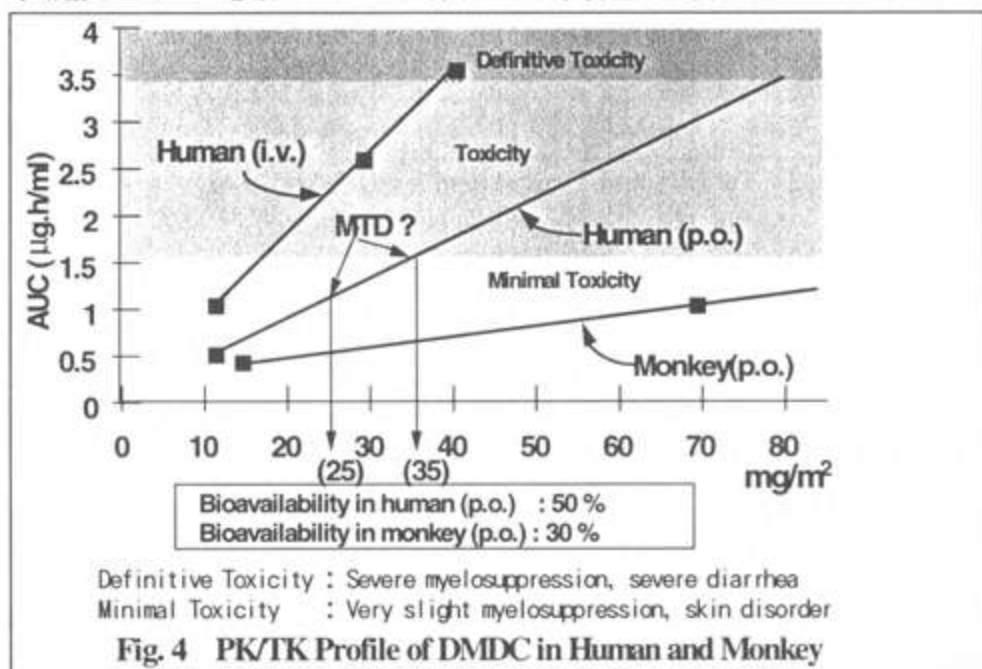
**Table 2 Toxicity and Toxicokinetics of DMDC in Monkeys**  
(4-week tox. study, repeated administration)

	Non-toxic dose	Toxic dose	Definitive toxic dose
	1 mg/kg	3 mg/kg	10 mg/kg
		Slight myelosuppression, Hand-Foot-Syndrome	Lethal, Hand-Foot-Syndrome Severe myelosuppression Regressive changes in digestive, lymph-hematopoietic, skin and reproductive organs
AUC ( $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ )	$0.42 \pm 0.13$	$0.95 \pm 0.21$	$3.22 \pm 1.51$
Cmax ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	$0.21 \pm 0.05$	$0.37 \pm 0.09$	$0.97 \pm 0.44$

性が明らかで、中間用量の 3 mg/kg を連日投与しても軽度な骨髄抑制と皮膚症状が認められた。<sup>(10)</sup> このことは、連日投与すると骨髄抑制と皮膚症状が感受性の高い毒作用であることを示しており、これらの毒作用を軽減することがヒトへの安全性には不可欠であると考えられた。また、サル及びラットを用いて1日2回あるいは3回に分割して同用量を経口投与した場合、これらの毒作用は強まることが判った。<sup>(11)</sup> この結果から、DMDC の毒作用は、1日1回の投与では DMDC の AUC に相関して強まるが、分割投与した場合、ある一定レベル以上の血中濃度が維持される時間に相関して強まるものと考えられた。ただ、本剤は、臨床で使用する場合には骨髄に対する毒作用の出現を可能な限り避けるため、長期間の連日投与に替わり休薬を挟みながら、(10日間投与18日間休薬、あるいは、14日間投与14日間休薬のレジメ)臨床試験を行なうべきと考えたため、サルを用いた間歇投与毒性試験を実施した。その結果、骨髄及び皮膚症状の回復には、少なくとも14日間の休薬期間が必要であることがわかった。これらの成績をもとに、経口投与によるヒト初回投与量は、最も感受性の高かったサルを用いた4週間試験における無毒性量(1 mg/kg)の1/3量に相当する 12 mg/m<sup>2</sup> から出発することとし、PK data を検討しながらワンストップづつ用量を上げていくこと、さらに急激な骨髄毒性発現見られた場合に備えて G-CSF 付加投与などのレスキュー体制下で慎重に臨床試験に入ることを決めた。実際には、静脈内投与で MTD であった時の DMDC の AUC 3.5 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  を超えないことを考慮して経口投与の Phase I 試験が設定された。Figure 4 は、これまでに得られたヒト静脈内投与及びサル経口投与 PK/TK Profile からヒト経口投与時のプロフ



ファイルと推定したものである。毒作用は、ヒト、サルともに AUC が  $1.2 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  以上に達した場合にその発現が見られ、AUC が  $3.5 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  に達すると重篤な毒作用(極めて強い骨髄毒性)が見られると考えられた。また、静脈内投与では、投与用量を上げると急激に AUC が上昇するため、安全域が狭くなってしまふ。しかし



経口投与では、AUC の上昇の傾きが低く、安全域が広く確保できることがわかる。これは、DMDC を経口剤として投与すれば、投与量漸次増大に伴う AUC 上昇が急激ではなく、適度な Bioavailability が保たれるために、静脈内投与に比較して安全域を広く確保出来ることを示している。即ち、サルの血漿中 DMDC プロファイルとヒトの血漿中 DMDC プロファイルには上記のような相関が見られ、サルの結果からヒトの安全性が外挿できることが示された。また、ヒトとサルの間にバイオアベイラビリティの差があることも考慮する必要性も示された。

#### [まとめ]

以上、2種類の Cytostatic compound に属する制ガン剤を例にして、前臨床試験成績から臨床試験における安全性の確保を目的とした初回投与用量の決定、投与レジメの設定について言及した。これらの経験から、ヒトにおける安全用量の設定には次のことが重要であると言える。

1. 薬剤の活性発現機序とそれを取り巻く各種代謝酵素活性の詳細な検討
  2. ヒトの代謝プロファイルに近似した動物種の選定
  3. 最も感受性の高い動物種を用いた試験成績から、毒性与暴露量の関係の解明
  4. ヒトで予想される毒性の種類とそれを最小限に抑える対処法の決定
- ただ、動物試験成績のみから全てを予測出来るものではないことは明確で、可能な限りの動物データをそろえた上で、直接 Phase I に入る前に、極く少数例でのヒト PK Profile を知っておくことは、その後の予測性を増すことに大きく繋がるものと考えている。

[Reference]

- (1) Ishikawa T, Utoh M, Sawada N, Nishida M, Fukase Y, Sekiguchi F and Ishitsuka H : Tumor selective delivery of 5-Fluorouracil by Capecitabine, a new oral fluoropyrimidine carbamate, in human cancer xenografts. *Biochem. Pharmacol.* 55 (9), 1998 in press.
- (2) Miwa M, Ura M, Nishida M, Sawada N, Ishikawa T, Mori K, Shimma N, Umeda I and Ishitsuka H : Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, Capecitabine, which generates 5-fluorouracil selectivity in tumors by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue. *Eur. J. Cancer* 1998 in press.
- (3) Ninomiya Y, Miwa M, Eda H, Sahara H, Fujimoto K, Ishida M, Umeda I, Yokose K and Ishitsuka H : Comparative antitumor activities and intestinal toxicity of 5'-deoxy-5-fluorouridine and its prodrug trimethoxybenzoyl-5'-deoxy-fluorouridine. *Jpn. J. Cancer Res.* 81, 188-195, 1990
- (4) Miwa M, Ura M, Sawada N, Nishida M and Ishitsuka H : Tissue distribution patterns of carboxylesterase, cytidine deaminase and pyrimidine nucleoside phosphorylase activity in the human and experimental animals. Roche Research Report, 1997
- (5) Reigner B G, Twelves C, Budman D R, Creaven P J, Schellens J H M, Kuruma I, Dumont E and Osterwalder B : Pharmacokinetics (PK) and pharmacodynamics (PD) of Capecitabine in two Phase I studies. Roche Research Report, 1995
- (6) Plunkett W, Huang P, Xu Y Z, Heinemann V, Grunewald R and Gandhi V: Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potentialiation. *Semin. Oncol.* 22 (4), Suppl. 11, 3-10 (Aug. 1995)
- (7) Matsuda A, et al.: Nucleosides and nucleotides as antitumor and antiviral agents. (ed. C. K. Chu and D. C. Baker) page 1-21, Plenum Press, New York (1993)
- (8) Ura M, Miwa M, Eda H and Ishitsuka H : Susceptibility of DMDC to cytidine deaminase and that of DMDU to pyrimidine nucleoside phosphorylases. Roche Research Report, 1996
- (9) Eda H, Ura M, Ouchi K, Tanaka Y, Miwa M and Ishitsuka H : The antiproliferative activity of DMDC is modulated by inhibition of cytidine deaminase and by transfection of the enzyme gene. *Cancer Research* 1998 in press
- (10) Kawashima A, Abo T, Kubota T, Yokoyama Y, Suguro T, Imamura I, Inomata A and Horii I : Four-week oral toxicity study of Ro 09-3431 (DMDC) in monkeys. Roche Research Report, 1996
- (11) Kawashima A, Isobe T, Shishido N and Horii I : 5-day oral toxicity study of Ro 09-3431 (DMDC) with divided administration in mice and monkeys. Roche Research Report, 1996

薬剤によって惹起されるQT延長、致死性不整脈誘発の前臨床試験における検討

○橋本敬太郎

山梨医科大学 薬理学教室

### 背景

1990年以降、抗不整脈薬についてはクラスⅠ Naチャンネル抑制薬については有名なCardiac Arrhythmia Suppression Trial (CAST) study等により長期投与での催不整脈作用と考えられる心臓死の増加が臨床的に明らかになり、抗不整脈薬の使用が減少し、同様の作用機序を持つ薬物の開発が世界的に中止になった。また一時はElectrophysiological Study Versus Electrocardiographic Monitoring (ESVEM) studyでKチャンネルを抑制し、QTおよび心筋不応期を延長させてリエントリーを断ち切るソタロールが不整脈患者の長期生存率を改善するのではないかと報告され、日本のE-4031, MS-551, KCB-328を始めとしていわゆるクラスⅢ抗不整脈薬と言われるセマチリド、ドフェチリド、アジミリドなど多くのKチャンネル抑制薬が開発され、臨床治験が行われた。これら薬物の前臨床試験では、リエントリー不整脈に対する有効性が示され、また心拍数の高い小動物やベントバルビタール麻酔下のイヌ等では催不整脈作用がなかったが、治験に入ると臨床的には既に知られていた先天性QT延長症候群が突然死を起しやすいことと同様に、薬物でもtorsades de pointes (TdP)と言われる危険な心室頻拍が誘発される事が報告され、クラスⅢ薬に対する開発意欲も急速に低下している。さらにテルフェナジン、アステミゾール、エリスロマイシンなどの非心臓作用薬でQT延長を起す薬物にも同様の催不整脈作用が報告され、大きな問題になっている。今回、前臨床試験でQT延長と催不整脈作用が証明できるか、QT測定に問題は無いか等の問題を考えてみる。

Drug induced QT prolongation and proarrhythmic effects in animal studies

Keitaro HASHIMOTO, Department of Pharmacology, Yamanashi Medical University, Yamanashi 409-3898, Japan

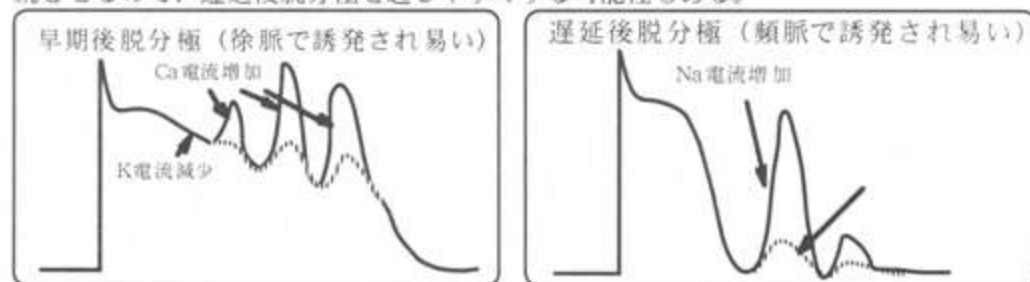
## QT延長と催不整脈作用

心臓電気生理学の知識として、心臓の活動電位、心電図、イオンチャネルの関係を理解し、QT延長のイオン機序を頻脈性不整脈の発生機序と共に理解すれば、薬物によるQT延長の危険性は自ずと明らかになる。頻脈性不整脈は下の表の様に自動能を持つ心筋の機能亢進による自動能機序、または心筋の一部に伝導抑制と不応期短縮があり心拍毎に消失するはずの興奮が残って旋回し健常心筋を興奮させるリエントリー機序の2つの成因がある。

		発生部位	発生機序
自動能不整脈	高所性自動能亢進	洞房結節	Ca電流↑(β受容体↑)
		心室プルキンエ繊維	H電流↑(β受容体↑)
	異常自動能発生	心房及び心室プルキンエ繊維(場合により心室、心室筋)	細胞内Ca <sup>2+</sup> (Ca電流↑(β受容体↑), Na電流↑, Na/Ca交換↓) ↓ 筋小胞体より振動性Ca放出 ↓ 脱分極電流発生(Na/Ca交換電流, 非選択性陽イオンチャネル↑) ↓ 長電流↓, Ca電流↑(β受容体↑)
			早期後脱分極
リエントリー不整脈	興奮伝導時間延長	心室筋、心室筋、プルキンエ繊維、洞房結節	Na電流↓, 細胞間結合↓
		洞房結節	Ca電流↓, 細胞間結合↓
	不応期短縮	心室筋部位	KまたはCl電流↑(β受容体↑) CaまたはNa電流↓

洞房結節の自動能や房室結節、プルキンエ線維の異所性自動能はβ受容体などを介して細胞内cAMPが増加し、L型Ca電流などが増加して亢進するが、QT延長と関係の深い異常自動能には下図に示すようにKチャネル抑

制等により再分極過程の延長(QT延長)に伴い再分極しない脱分極状態から振動性電位を発生する早期後脱分極と、細胞内Ca濃度を増加させNa/Ca交換電流を発生させるか、Caの筋小胞体からの振動性放出によって脱分極電流が流れることにより発生する遅延後脱分極によるものがある。QT延長を起す薬物はCa電流を持続させるので、遅延後脱分極を起しやすくする可能性もある。



リエントリー不整脈は解剖学的には心臓内にいくらかでも存在する心筋のリング状の配列の存在や、機能的には興奮終了時に各細胞間に存在する不応期のバラツキにより、興奮可能な細胞群により形成される周回する仮想的なリング組織を一方向性の伝導とそのリングの長さが、興奮が持続している組織の長さ(伝導速度×不応期)より大きいと興奮波の先端には不応期を脱した細胞によるexcitable gapが発

生し、興奮が回りつづけることにより発生する。従ってクラスⅢ薬は excitable gap が小さいリエントリー不整脈には不応期を延長させて抑制する。これら二つの不整脈発生機序は独立して起りえるので、クラスⅢ薬を含め QT 延長を起す薬物は臨床上大部分を占めると考えられるリエントリー不整脈に対しては抗不整脈作用を持つが、異常自動能により催不整脈作用も持つてしまうことになる。

正常自動能は頻回刺激により抑制され、遅延後脱分極による撃発活動 (triggered activity) は頻回刺激により誘発されること、早期後脱分極は徐脈時に著明になりそれによる撃発活動や TdP の発生率も高まることなどで診断できる可能性があり、また遅延後脱分極は単相性活動電位 (monophasic action potential, MAP) で診断できる場合もある。

クラスⅢの薬物の代表であるアミオダロンは作用発現が長期投与によらなければみられないし、いくつかの K チャネルの他に Na チャネル、L 型 Ca チャネル、甲状腺ホルモンを介する作用もあるとされているが、どの作用が主に不整脈を抑制するのかは不明である。最近開発された K チャネルを抑制する薬物は iK を主に抑制する d-ソタロールやその類似物である E-4031, MS-551, KCB326、セマチリド、ドフェチリドなどがあり、速い iK の成分 (iKr) を抑えるが、治療が必要な頻脈の時には十分な QT 延長がなく、徐脈の時に特に QT 延長を起すために TdP を誘発し易いことが知られており、この現象を逆頻度依存性の QT 延長作用と呼ぶ。iKs と呼ばれる iK の遅い成分を抑制するアジミリド等では逆頻度依存性があまり認められないのではと考えられている。

#### QT 延長作用薬の催不整脈作用の動物実験による証明

クラスⅢ薬の前臨床試験として初期に催不整脈作用が見つからなかったことに動物種や麻酔薬の影響があった。TdP は現在ではウサギの摘出心筋や、無麻酔下のウサギにクラスⅢ薬を投与することで誘発出来る事が知られており、また我々はイヌでも徐脈を起しやすいハロセン麻酔下の開胸犬でクラスⅢ薬は TdP をかなりの高率で起すことを認めている。但し同じ徐脈状態でも、ウサギとは異なり、無麻酔のビーグル犬では 24 時間心電図を取っても重篤な催不整脈作用は認められていない。徐脈に伴う TdP を起しやすくするために房室ブロックを作製し、血中 K を低下させる方法を組み合わせて TdP を証明するイヌやブタのモデルは知られているが、我々も房室ブロック犬を長期生存させ、心筋リモデリングにより心肥大をおこし、これらのイヌにクラスⅢ薬を投与すると高率に TdP または心室細動 (VF) を発生するモデルを作製した。このモデルではアステミゾール等の QT 延長作用薬に共通して同様の催不整脈作用を検出することが出来た。以上のような方法で抗不整脈作用と催不整脈作用を動物で証明するのは可能であり、次頁の表に我々のクラスⅢ薬のイヌでの成績をまとめた。

	再灌流VF (ハロセン麻酔)	再灌流VF (バルビタール麻酔)	プログラム 電気刺激	ハロセン有酸素麻酔 心室細動	24hr ECG (コントロール)	24hr ECG (催不整脈検査)	24hr ECG (AVブロック)
アミオダロン静注	無効 05.7 mg/kg			0/0			
アミオダロン経口	無効 (200 mg, 20%)						
アゾニリド	有効 60 mg+0.1 ml	有効 60 mg+0.1 ml		1/8			
ドフェチリド	無効 0.1 mg/kg	無効 0.1 mg/kg	有効 0.1 mg/kg	0/8	心室内支行伝導 (10 mg, p=)	心室期外収縮 (10 mg, p=)	
0-803	有効 0.003 mg/kg			3/0			
0C1025	無効 11 mg/kg	有効 11 mg/kg	有効 0.5 mg/kg	4/8	心室内支行伝導 (10 mg, p=)		
5S-55t	有効 0.6 mg/kg	有効 0.6 mg/kg	有効 11 mg/kg	2/0	心室内支行伝導 (100 mg, p=)	心室期外収縮 (100 mg, p=)	T波増大 2.0 (20 mg, p=)
セサチリド	無効 10 mg/kg	無効 10 mg/kg	有効 10 mg/kg	2/0	心室内支行伝導 (100 mg, p=)	心室期外収縮 (100 mg, p=)	T波増大 1.7 (20 mg, p=)
ソフダロール	無効 0.5 mg/kg	有効 110 mg/kg		0/0			

## QT 延長の証明

QT 時間は心電図の誘導がいくつか選べる中動物以上であれば測定は難しくない。しかし T 波は形が薬物投与や体位で変わったり、U 波と一緒にあったりして測定しづらいことがある。電気生理学的に重要なのは不応期であるので、動物実験では期外刺激法で測定すべきであるが、毒性実験等では活動電位の持続時間、または QT 時間で不応期の変化を予想せざるを得ない。その点では、我々もイヌの実験に用いている MAP 記録用カテーテルを用いれば、不応期の測定や活動電位持続時間、または運がよければ後脱分極を直接記録出来る。この方法を使えば逆傾度依存性の QT 延長が強い薬物かどうかの判定も簡単である。この QT 時間は心筋活動電位の記録からも明らかな様に、心拍数や刺激頻度により容易に変化する。これを臨床で補正するのが Bazett の式で

$$QTc = QT / \sqrt{RR} \quad (QTc: \text{補正值}, RR: \text{RR 間隔})$$

で表わされる。薬物が心拍数を変化させる場合があるので、QT 時間の変化より有用かもしれないが、動物の早い心拍数の場合にも適用してよいかは問題である。

## 催不整脈作用予測の問題点

現在 QT 延長は致死性の不整脈発生に関与することは認められている。特にクラス III 薬では動物でも臨床でも TdP が起ることが証明されており、特に臨床では女性や血中 K 濃度が低い人に起りやすいとされている。また先天性 QT 延長症候群の患者が心臓突然死を起しやすいことも知られているので、QT 延長を起す薬物には催不整脈作用を予想するのは当然であろう。但し同時に薬効もあるのなら、その有用性と危険性の比重で判断する必要がある。但し心臓突然死のうち、QT 延長をともしないいわゆる Burgada 型の心電図所見、すなわち右脚ブロックと ST 上昇を伴い急性不整脈死をする症例があることも注目され、臨床的には先天性 QT 延長症候群に認められた Na チャネルの先天性異常による不活性化の遅延または K チャネルの先天性異常による電流減少とは異なり、Na チャネルに新たな種類の先天性異常があり、不活性化の電位依存性や不活性化からの回復過程の促進等が起っていることが証明された。この様な異常が薬物でも起れば心臓死を起すことも考えられるが、いまのところ報告がない。

参考文献

1. Hashimoto, K. et al.: Effects of the new class III antiarrhythmic drug MS-551 and d-sotalol on canine coronary ligation-reperfusion ventricular arrhythmias. *Jpn. J. Pharmacol.* 68:1-9, 1995.
2. Ishii, M., Kamiya, J. and Hashimoto, K.: Cellular electrophysiological effects of MS-551, a new class III antiarrhythmic agent. *Drug Develop. Res.* 35:61-8, 1995.
3. Yamada, A., Motomura, S. and Hashimoto, K.: Comparison of direct negative chronotropic and positive inotropic effects of sematilide to those of E-4031 and MS-551 and the reverse frequency-dependent prolongation of cardiac refractoriness of sematilide. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 27:159-66, 1996.
4. Xue, Y. X. et al.: Antiarrhythmic and proarrhythmic effects of sematilide in canine ventricular arrhythmia models. *Jpn. J. Pharmacol.* 70:129-38, 1996.
5. Sugiyama, A. et al.: Effects of the antihypnotic and neuroprotective drug, lubeluzole, on repolarization phase of canine heart assessed by monophasic action potential recording. *Toxicol. Applied Pharmacol.* 139:109-14, 1996.
6. Chen, J.-G. et al.: Effects of dofetilide, a class III antiarrhythmic drug, on various ventricular arrhythmias in dogs. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 28:576-84, 1996.
7. Sugiyama, A. et al.: Effects of nonsedating antihistamine, astemizole, on the *in situ* canine heart assessed by cardiohemodynamic and monophasic action potential monitoring. *Toxicol. Applied Pharmacol.* 143: 89-95, 1997.
8. Hashimoto, K. et al.: Effects of class III antiarrhythmic drugs on ventricular arrhythmias in dogs. *Exp. Clin. Cardiol.* 2: 25-9, 1997.
9. Chen, Q et al.: Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* 392: 293-6, 1998
10. Singh, B.N. and Breithardt, G.A. Guest editors: Symposium: Changing trends in antiarrhythmic therapy: Worldwide experience with class III agents. *Am. J. Cardiol.* 80(8A), 1997

## 薬物相互作用“ソリブジン薬害”を解明する動物および酵素試験

○渡部 烈、奥田晴宏、小倉健一郎

東京薬科大学 薬学部 第二衛生化学教室

## 1. 薬物相互作用研究の基本戦略

1) 下記の重大な生体機能に影響を及ぼす薬物治療用量域が狭い薬物との併用における相互作用研究は、とくに慎重に実施する必要がある。

- |            |          |
|------------|----------|
| a. 心-循環器機能 | b. 呼吸器機能 |
| c. 中枢神経系機能 | d. 造血器機能 |

ソリブジン薬害は、併用していた5-フルオロウラシル(5-FU)製剤(d項に相当)との相互作用による。

2) ヒトにおける各薬物の代謝律速酵素の同定を行う必要がある。ヒト臓器およびヒト酵素発現系の使用が必須。とくに $K_m$ の測定が重要。 $V_{max}/K_m$ (代謝除去率)の測定も重要。

3) 代謝除去が特定の酵素分子種に依存し、メタボリックスイッチングが殆ど起こらない上記1) a-d項に属する薬物は、同一代謝律速酵素によって代謝される $K_m$ が小さい薬物の併用により容易に重篤な中毒症状を呈する。とくに、遺伝的にその薬物に対する代謝律速酵素のレベルが低いヒト、poor metabolizer (PM)、が非常に危ない。

4) 代謝律速酵素の mechanism-based inhibition (不可逆的阻害) は上記1) a-d項の機能に影響を及ぼす薬物の相互作用研究にとって最重要ポイントとなる。この場合、人為的に、長期間にわたるPMが発生し、薬物の異常高血漿中レベルが持続し、

Toxicokinetic and Enzymatic Studies on the Lethal Interactions between the Antiviral Sorivudine and the Anticancer Prodrugs of 5-Fluorouracil

Tadashi WATABE, Haruhiro OKUDA, and Kenichiro OGURA, Dept. Drug Metab. Mol. Toxicol., School of Pharm., Tokyo Univ. Pharm. & Life Sci., Tokyo 192-0392, Japan



重篤な中毒症状に陥るか、死に至る可能性がある。ソリブジン薬害はこの例である。

5) 薬物相互作用研究において、代謝拮抗が問題となる場合は、動物実験データによってヒトでの薬物相互作用を予測することは殆どできない。代謝律速酵素のヒトと動物間での種差が予測できないからである。1997年よりグローバルスタンダードとなっている開発候補薬のhuman screening study (SIND)が新薬開発において第I相臨床試験の前段階で必要なゆえんである。この点に関して、学会と行政は、それぞれの責任において、グローバルスタンダードとわが国のスタンダードの余りにも大きなへだたりを縮める努力を早急に開始しなければならない。ただし、mechanism-based inhibitionによる薬物相互作用の研究には、動物試験データは有用な場合が多い。例えば、ソリブジン薬害はラットを用いる試験で確実に予測できた。

## 2. ソリブジン薬害発生メカニズムの解明—分子レベルでのトキシコキネティクス (TK)試験による

### 1) はじめに

ソリブジン薬害の発生メカニズムに関する筆者らの最近の総説<sup>1)</sup>において指摘しているように、この薬害は予防が確実にできた“全くの人災”であった。開発、申請、および承認の各段階で、薬物代謝—毒性試験に関する科学的に適正な判断力があれば、予防できた。ソリブジンの開発ならびに承認に関与した人びとは、毒性試験をガイドラインにしたがって、パッケージテストとして漫然と実施し、その結果を型通りに判定すべきではなかった。トキシコロジストは、自らが知り得た事実に基づいて科学的な判断基準にしたがって、必要な毒性試験系とは何かを考え、それを構築し、実施すべきであったことを、亡くなられた18名の患者の方々にとって指摘しておきたい。

### 2) 抗帯状疱疹薬ソリブジンと抗癌薬5-FUプロドラッグの致死的相互作用のTK

ソリブジン開発の段階でトキシコロジストが独自に、かつ必然的に構築すべきであった毒性試験は、ソリブジンと5-FUプロドラッグを併用したときの5-FUの血漿中および組織中レベルのTKであった。とくに5-FUの毒性発現標的組織である骨髄と小腸粘膜組織中の5-FUレベルと組織の損傷の関係は精査すべき最重点項目であった。むろん、ソリブジン投与後の肝の5-FU代謝律速酵素ジヒドロピリミジン・デヒドロゲナーゼ(DPD)の活性やソリブジンから生成する5-(2-プロモビニル)ウラシル(BVU)の濃度測定も重要であった。

ソリブジンの開発に際して、5-FUプロドラッグとの併用毒性試験が必須であった理由は、以下のA-Gに述べる事実に基づく。これらの事実はいずれもソリブジン開発以前または開発のごく初期の段階で明らかにされていた。

- A. 帯状疱疹は、高齢者のみならず、癌の再発予防のために化学療法薬で治療を受けている免疫抵抗力の低下した患者に多発する疾患である。
- B. わが国においては、多数(少なくとも20万人)の癌患者が、癌の再発予防のために5-FUプロドラッグを日常的に服用している。

- C. わが国においては、癌患者に対するインフォームドコンセント率がきわめて低い（現在でも約20%）。したがって、5-FUプロドラッグ服用者の特定（薬歴の管理）がきわめて困難である。
- D. 5-FU製剤は薬物治療用量域が狭く、血漿中の5-FUのレベルが臨床用量におけるその数倍上昇すると、容易に骨髄および消化器粘膜組織の損傷をひき起こし、重篤な中毒症状を招く。
- E. 5-FUの代謝はラットおよびヒトで80%以上が肝のDPDに依存しており、代謝律速酵素DPD以外の酵素による5-FU代謝分解経路は知られていない。
- F. 経口薬ソリブジンをラットおよびヒトに投与すると、腸内細菌によって、一部が分解されてBVUを生成し、BVUは吸収されたのち血中に現われる。
- G. ラットにBVUを直接腹腔内投与すると肝DPDを失活させる。このとき5-FUを腹腔内投与するとラットが死に至る。

筆者らがラットを用いて実施したソリブジンと5-FU製剤(テガフル:FTを使用)の反復経口併用投与におけるTK試験の要点(Fig. 1)<sup>2)</sup>:

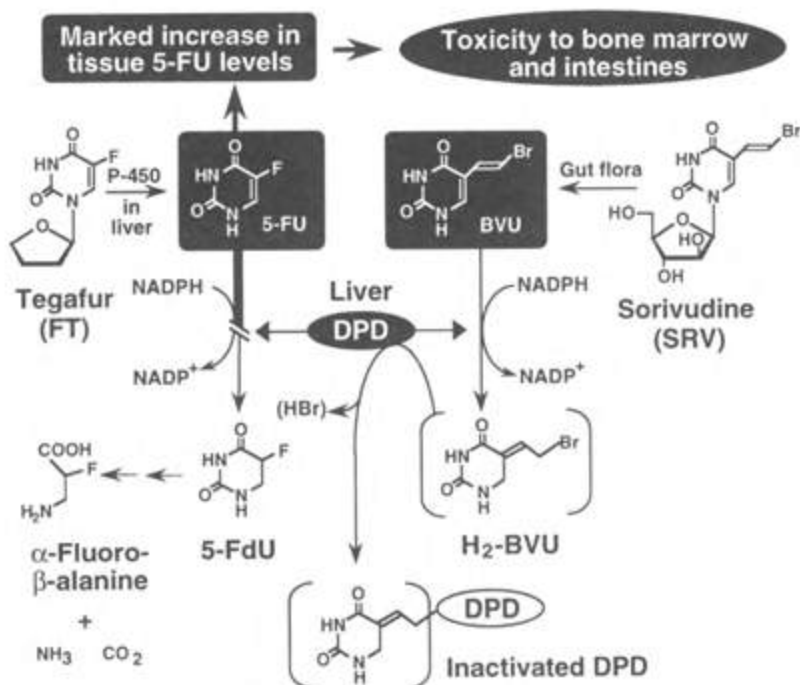


Fig. 1. Proposed Mechanism for Lethal Toxicity Exerted by Oral Co-administration of Sorivudine and Tegafur to Rats and Humans.

In rats and humans, liver dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) plays a key role as the rate-limiting enzyme in catabolism of 5-fluorouracil (5-FU) formed from the oral anticancer pro-drug, tegafur (FT), by P-450 in the liver after being absorbed. (*E*)-5-(2-bromovinyl) uracil (BVU) formed from the oral antiviral, sorivudine (SRV), by gut flora is absorbed through intestinal membrane and irreversibly inactivates liver DPD in the presence of NADPH. The irreversible inactivation is caused by covalent binding of a dihydro-BVU as a reactive form to DPD. In the resultant DPD-deficient rats and humans, 5-FU in their plasma and tissues is markedly increased to lethal levels. By Okuda, H., *et al.* (1997) and Ogura, K., *et al.* (1998).

- A. 反復併用投与開始後3-4日目に下血が起こり、6日目には著しい白血球と血小板数の減少を起し(いずれも薬害患者で認められた症状)、10日目には全ラットが死に至った。各薬物の単独反復投与では、ラットは対照群に比べて、投与開始後20日目においても何らの生理的变化も示さなかった。
- B. 反復併用投与開始後のラット肝からはBVUが検出され、肝DPD活性は著しく低下しており、血漿中および諸臓器中の5-FUレベルは致死レベルにまで上昇していた。急性致死の原因は、測定された骨髄中の高い5-FUレベルによることが、生存骨髄細胞数の激減からも明らかであった。小腸粘膜の著しい壊死が下血の原因であることも小腸組織中の高い5-FUレベルで容易に説明できた。なお、骨髄および小腸粘膜細胞に共通する特徴は、癌細胞に似て、高度な分裂増殖性であり、DNAの複製もさかんなことである。

### 3) BVUによるラット肝DPDの自殺阻害 (Fig. 1)<sup>9)</sup>

ラット肝より精製したDPDはNADPH存在下、 $[^{14}\text{C}]$ BVUによって速やかに阻害され、DPDに放射能がとり込まれた。とり込まれた放射能はDPDのゲルろ過クロマトグラフィーによっても、DPDタンパク質の変性条件下で行われるSDS-PAGEによっても除去されなかった。NADPH不在下では、BVUはDPDを不活性化しなく、DPDと共有結合を形成しなかった。NADPH存在下でもソリブジンはDPDの活性に何らの影響を及ぼさなかった。これらの事実は、BVUがDPDによってアシルプロマイド型の活性代謝物ジヒドロ-BVU (5-(2-プロモエチリデン)ウラシル)に還元されると、DPDに共有結合して酵素活性を失わせることを示唆している。したがって、BVUはDPDの自殺基質となることが明らかになった。

### 4) BVUによるヒトDPDの自殺阻害 (Fig. 1)<sup>9)</sup>

BVUによるDPDの自殺阻害機構に関しては「ラットにおいてはそうであっても、はたしてヒトでは？」という疑問が残る。毒性発現における種差の問題である。筆者らはヒトDPDを大腸菌中で発現させ、精製して、この問題を解決した。結果は、上記3)項で述べたラットの場合と全く同じであった。ヒトDPDはラットDPDよりも低濃度のBVUで不可逆的に阻害された。

ヒトDPDについてはさらに、活性代謝物ジヒドロ-BVUが以下のAおよびBで述べるように、DPD分子のピリミジン結合部位に存在するCys残基のSH基に共有結合するという間接的な知見を筆者らはごく最近得た (Fig. 2)。

- A. NADPH存在下で、 $[^{14}\text{C}]$ BVUによって不活性化されたヒトDPDより、トリプシン処理によって得られた放射性ペプチドのアミノ酸配列分析の結果は、ジヒドロ-BVUがピリミジン結合部位中の $^{67}\text{Cys}$ 残基に結合していたことを示していた。当然のことながら、このペプチド配列中1箇所しか存在しないCysは同定不能となった。なお、ヒトおよびラットDPDの $[^{14}\text{C}]$ BVUによる不可逆的阻害と放射能標識は、20 mMメルカプトエタノール、ジチオスレイトール、システイン、またはグルタチオンの添加によって全く抑制されなかった。
- B. ヒトDPDのピリミジン結合部位の $^{67}\text{Cys}$ を $^{67}\text{Ser}$ に変異させたDPD(C671S)は、

NADPH存在下で5-FUを還元するにもかかわらず、BVUによっては失活しなかった。

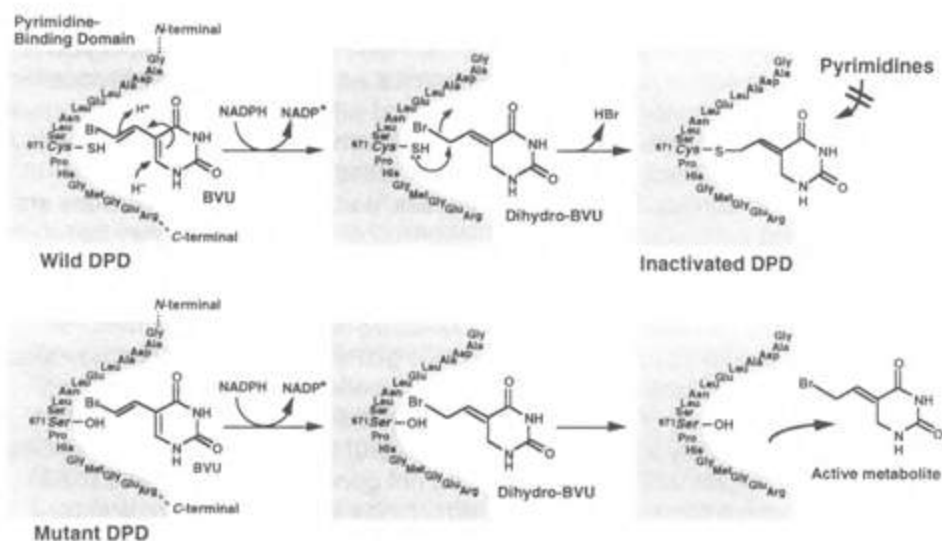


Fig. 2. Proposed Mechanism for Mechanism-based Inactivation of DPD by BVU.

The amino acid sequence represents the proposed potential pyrimidine-binding domain in the wild type of human DPD (top) with which [<sup>14</sup>C]BVU has been demonstrated by the authors to react through the sulfhydryl group of the <sup>671</sup>Cys residue. A mutant type of human DPD (C671S) with significant activity toward 5-FU is not inactivated nor radiolabeled by [<sup>14</sup>C]BVU.

#### 引用文献

- 1) 渡部 烈、奥田晴宏、小倉健一郎、薬学雑誌、**117**, 910-921 (1997).
- 2) Okuda, H., Nishiyama, T., Ogura, K., Nagayama, S., Ikeda, K., Yamaguchi, S., Nakamura, Y., Kawaguchi, Y., and Watabe, T., *Drug. Metab. Dispos.*, **25**, 270-273 (1997).
- 3) Ogura, K., Nishiyama, T., Takubo, H., Kato, A., Okuda, H., Arakawa, K., Fukushima, M., Nagayama, S., Kawaguchi, Y., and Watabe, T., *Cancer Lett.*, **122**, 107-113 (1998).

Dealing With False Positive and Negative Preclinical Data  
in Predicting Human Risk  
David Brown, DPhil

The purpose of preclinical testing is to evaluate the full spectrum of biological activities of a chemical in order to define potential hazards when the chemical is given to man. The probability that a given hazard will be observed in man (usually as an adverse event) following exposure to the chemical is defined as the risk. An understanding of the principles of "Risk:Benefit" assessment is important to scientists involved in drug development process, particularly when decisions are made concerning early controlled human exposures. This process may be illustrated by comparing trials conducted in patients with a life threatening illness. Healthy volunteers are recruited into Phase I trials specifically because they have no defined pattern of disease. They can expect no material improvement (or benefit) to their health status and it is therefore generally accepted that they must not be exposed to any undue risk. In contrast, a patient with a life threatening illness may expect to experience some improvement in their medical condition and will therefore usually accept a greater degree of risk. It is, however, important to realize that "Risk:Benefit" assessments do not generate a precise and fixed value, but one which can be varied according to the exposure pattern and the sensitivity of individuals.

To perform an assessment of risk, it is necessary to extrapolate findings made in animals to man. This is a complex and imprecise process, but some general principles will be offered to simplify the process. Specific examples will then be given to illustrate the application of these principles.

First, it is helpful to use a classification of toxicity because this will indicate the degree of confidence in making the extrapolation to man. One useful model is the following

Type	Characteristic Response
I	Excess primary pharmacology
II	Excess of a characterised secondary pharmacology
III	Receptor - mediated events not previously seen
IV	Hypersensitivity, idiopathic responses

A typical Type I effect might be a dramatic fall in blood pressure and compensatory tachycardia following treatment with a drug known to cause marked peripheral vasodilatation. A typical Type II effect might be drowsiness following treatment with use of a histamine H<sub>1</sub> antagonist for allergic rhinitis. These events are well understood, predictable and can be managed in a clinical setting. In general, therefore, Type I and II effects would not threaten the development of a potentially valuable product. Type III effects are not predictable (by definition) and those cause most problems in assessing human risk because they are most commonly found when we move into new therapeutic areas. Type IV is the most difficult category to detect in animal studies. It is addressed in part at this meeting

and an example will be given, but this remains a significant source of post marketing withdrawal.

The specific value of the classification is that it gives an early indication of the therapeutic index of a new candidate. This may be very helpful in guiding critical "Go/No Go" decisions, particularly in view of the fact that FDA is now considering the issues of drugs with a narrow therapeutic index.

In making a "Risk:Benefit" assessment on the basis of toxicity studies in animals, it is important to consider the important variables which help to govern the response.

The major variables which need to be considered are:

- The formulation of the test article (vehicle, particle size, pH)
- The route and rate of administration
- Species differences in toxicokinetics and pharmacokinetics
- Species differences in routes and rates of metabolism (affecting detoxification on the production and clearance of toxic metabolites)
- Qualitative species differences in response (mood change, headache, skin itch)
- Quantitative species differences in response (the response of an animal to a humanized protein)

Risk assessments based on animal data are not to be treated as absolute truths but should always be related to these important criteria.

Specific examples will be used to illustrate these important principles and to show experimental findings which over or underestimated human risk in early trials.

These examples will be taken to illustrate the following critical factors:

- The importance of assessing potential effects of the vehicle or carrier
- Use of the appropriate rate and frequency of administration
- Assessment of species differences in kinetics
- Use of the appropriate dose route and formulation
- Species differences due to differences in rates or routes of metabolism and protein binding
- Quantitative differences in response
- The influence of age on toxicokinetic and pharmacokinetic parameters

In view of the importance of understanding the rates and routes of metabolism, the role and timing of human studies with radiolabelled drugs will be reviewed. The important factors governing the safety of volunteers or patients dosed with radiotracers will be considered and the types of study which provide the most useful data will be discussed. The factors which control the disposition of a chemical in the body, and particularly any indication of accumulation, are of greatest importance. The use of quantitative whole body autoradiography is discussed and the role of *in vitro* studies of metabolism and interaction with metabolic enzymes, most notably the cytochromes, is reviewed.

In conclusion, a quantitative approach to the expression of human risk is immensely helpful when extrapolating from animal data. It is particularly important to understand and accept the principle that not all toxicity seen in animal studies is relevant to the human situation. It is therefore incorrect to aggregate all potentially

adverse events and apply equal weighting to them. Despite our best efforts, it is possible that some drugs will continue to be withdrawn post marketing because of adverse events. Many of these withdrawals will be due to rare events which cannot readily be detected in animal models or in relatively small scale clinical trials. The challenge for the preclinical scientists is to improve our systems continuously in order to reduce the cost and suffering associated with post marketing withdrawals while trying to ensure that potentially valuable drugs are not terminated unnecessarily through inadequate understanding of their effects.

シンポジウム 2



シンポジウム2「ヒト型反応を基礎とした毒性試験：  
ヒト素材の活用と遺伝子組み換えモデル動物の応用」  
オルガナイザー序論

井上 達, 三宅 幸雄\*  
国立衛研, 塩野義新薬研\*

新薬の開発に欠かせないのが非臨床毒性試験である。各種動物を用いた毒性試験が実施され、ヒトに対するリスク評価がなされてきた。シンポジウム1でも取り上げられる筈であるが、動物試験成績から臨床副作用が予測できる場合と、難しい場合がある。ヒトへの外挿が困難な場合、往々にして動物の薬を開発しているのではないと揶揄されることもある。科学の進歩に伴い、こうした背景を受けて、ヒト型の薬物反応を取り入れた試験系の開発研究がめざましく進められている。

先ず、ヒト型反応を直接利用する試験、つまりヒトの素材（細胞あるいは臓器片）を用いる方法がある。反応系の解析が進み、分析精度の向上などにより、直接ヒト型反応が検出でき、ヒトへの毒性予測が可能である。しかし、素材の入手難もあれば反応性のヘテロジェネイティーも考えられる。どのような利点と問題点があるか、また、問題点を克服するためにはどう利用して行けばよいか、その将来性についてご講演願うこととする。

次いで、ある特定のヒト型反応に着目し、そのヒト遺伝子を導入した試験系も、微生物に始まり培養細胞やマウス・ラットの動物に至るまで数多く開発されている。一つにはヒトのがん遺伝子を導入したトランスジェニックマウスがあり、短期発がん性試験の試験系として期待されている。更に、薬物代謝酵素遺伝子の導入も幅広く行われ、ヒトの薬物代謝が検出できるとして期待が集められている。これらは科学技術の進歩の賜物ではあるが、ヒト遺伝子を導入した結果、どのような反応性の変化が期待でき、より高いリスク評価に寄与できる可能性を秘めているかを解説いただくこととする。

本シンポジウムでは、従来の試験系の特徴を踏まえ、それらにどのような不都合があり、それを解決するためにどのようなヒト型反応を取り入れた試験系が検討されてきたか、更に、ヒト型反応を利用した毒性試験の在り方、開け行くその将来像について討議したいと考えている。

Toxicity studies based on the humanized reactions: practical use of human-derived tissues and application of transgenic animals — Introduction by the organizers

Tohru INOUE and Yukio MIYAKE\*, National Institute of Health Science, Japan and Developmental Research Laboratories, Shionogi & Co., Ltd.\*

## The use of human-derived tissues in drug discovery and development

Andrew Parkinson

XenoTech L.L.C., 3800 Cambridge, Kansas City, KS 66103, and the Department of Pharmacology, Toxicology and Therapeutics, University of Kansas Medical Center, Kansas City, KS 66160, USA.

Advances in molecular biology and combinatorial chemistry have dramatically affected the process of drug discovery and pre-clinical drug development. This presentation will focus on the rationale for using human-derived material (either human-derived tissue or recombinant human proteins) in drug discovery and development, with particular emphasis on the use of these materials for drug metabolism studies. The use of human-derived tissue for certain types of drug safety evaluation has been endorsed by regulatory agencies in Europe and North America, where the routine procurement of organs for transplantation purposes has made it socially acceptable to use human-derived tissues for research purposes. Consequently human-derived materials are used increasingly in drug discovery and development

### Drug discovery

Laboratory animals continue to play an indispensable role in evaluating the pharmacologic and toxicologic properties of drugs and new molecular entities (NME's). However, it is now apparent, largely as a result of advances in molecular biology techniques, that each of the well established classes of receptor (*i.e.*, adrenergic, cholinergic, GABA, muscarinic receptors *etc.*) is composed of an entire family of receptor subtypes, each of which is a potential therapeutic target. The number of receptor subtypes, and their ligand-binding properties, differs from one species to the next. In some cases, even a single amino acid substitution can dramatically affect the affinity with which ligands bind to a receptor, and there are several documented cases where small differences between human and rat receptors have a large effect on ligand binding. Therefore, during the process of drug discovery, it has become increasingly important to use recombinant human receptors or human-derived tissue to screen NME's (such as those present in a combinatorial library) to identify potential drug candidates.

The process of selecting a lead drug candidate from a combinatorial library is a process of attrition, meaning that chemicals are dropped from further consideration after each step of the selection process. The initial tests are designed to select chemicals with desirable ligand-binding properties, and are based on high-throughput screening procedures with human receptors. After this process, the so-called targeted library may still contain literally thousands of chemicals, which can be subjected to tests that are designed to select chemicals with desirable pharmacokinetic properties, such as high metabolic stability, high oral bioavailability and low potential to interact with other drugs. Metabolic stability (*i.e.*, the resistance

of NME's to metabolism) is often assessed with human liver microsomes. Human liver microsomes are preferable to liver microsomes from rats or other laboratory animals because of species differences in drug metabolism. In other words, just as there are important quantitative and qualitative differences in receptors from one species to the next, so there are important species differences in the substrate specificity and metabolic capability of cytochrome P450 and other classes of drug-metabolizing enzymes. Human liver microsomes can be used to assess metabolic stability in a high-throughput procedure. In this regard, human hepatocytes offer several advantages over human liver microsomes, but the lack of a consistent and reliable supply of well characterized human hepatocytes currently precludes this possibility. Rat hepatocytes are sometimes used to assess metabolic stability of targeted combinatorial libraries. In this case, the fact that rat hepatocytes contain all drug-metabolizing enzyme systems, not just the cytochrome P450 system present in liver microsomes, is an advantage that arguably offsets the disadvantage of using non-human material.

Human-derived cell lines, such as Caco-2 cells, can be used to assess the oral bioavailability of drugs and NME's, and such techniques are used to screen drug candidates. Several *in vitro* techniques have been developed to assess drug-drug interactions, and these techniques are also widely used in drug development, where they are applied to lead drug candidate and back-up compounds.

### Drug development

*In vitro* techniques based on human-derived materials have been developed to gather three types of information, namely (1) which P450 enzymes are responsible for metabolizing a drug or NME, (2) which drugs or NME's can inhibit P450 enzymes, and (3) which drugs or NME's can induce or suppress the expression of P450 enzymes. The fact that human-based systems are used to gather this information is important because there are significant species differences in the function and regulation of cytochrome P450. Indeed, species differences in cytochrome P450 function are so marked and unpredictable as to preclude the possibility of accurately predicting the function of human P450 enzymes based on studies in non-human systems. The information gathered from these various *in vitro* studies can be used to predict or explain pharmacokinetic variation (as might occur when a drug is primarily metabolized by a polymorphically expressed enzyme) and drug interactions (as might occur when one drug either inhibits or induces the metabolism of another, concomitantly administered drug). The usefulness of this information stems from the fact that the duration of action of many drugs is determined by their rate of metabolism by a single P450 enzyme.

By establishing whether a drug is metabolized by a P450 enzyme that is polymorphically expressed (such as CYP2D6 and CYP2C19) or extensively inhibited by commonly prescribed drugs (such as CYP3A4), reaction phenotyping helps identify those drugs and NME's that might exhibit considerable pharmacokinetic variability. By establishing whether a drug can potentially inhibit the P450-dependent metabolism of drugs with a narrow therapeutic index (such as

warfarin, cyclosporin, terfenadine, cisapride *etc.*), inhibition profiling helps identify those drugs and NME's that might cause clinically significant drug interactions. The literature is replete with examples of drugs that have been withdrawn from development or the marketplace because of problems associated with their metabolism by or inhibition of cytochrome P450. Prompted in part by the serious interactions between terfenadine (the active ingredient in the non-sedating anti-histamine, Seldane) and antibiotics and antifungals that inhibit CYP3A4 (such as erythromycin and ketoconazole), the US Food and Drug Administration (FDA) now advocates that new drugs be assessed for their potential to interact with other concomitantly administered drugs. European regulatory agencies have adopted similar guidelines to those issued by the FDA .

### Reaction phenotyping

The biotransformation of a xenobiotic in humans is frequently dominated by a single P450 enzyme. Human liver microsomes and recombinant human P450 enzymes can be used to determine which P450 enzyme or enzymes are primarily responsible for metabolizing a drug or NME; a process commonly referred to as *reaction phenotyping*. Information from reaction phenotyping can also be used to explain or predict adverse drug reactions that result from the polymorphic expression of certain P450 enzymes. For example, individuals with a genetic deficiency of CYP2D6 (5-10% of Caucasians) or CYP2C19 (12-23% of Asians) are poor metabolizers (PMs) of drugs whose rate of elimination is determined by these P450 enzymes. Several drugs whose dosage regimen is complicated by an individual's CYP2D6 or CYP2C19 phenotype have been withdrawn or denied approval by the FDA or European regulatory agencies.

Three *in vitro* approaches have been developed for reaction phenotyping. The three approaches are (1) **correlation analysis**, which involves measuring the rate of xenobiotic metabolism by several samples of human liver microsomes and correlating reaction rates with the variation in the level or activity of the individual P450 enzymes in the same microsomal samples; (2) **chemical or antibody inhibition**, which involves an evaluation of the effects of known P450 enzyme inhibitors on the metabolism of a xenobiotic by human liver microsomes, and (3) **recombinant human P450 enzymes**, which are used can establish whether a particular P450 enzyme can or cannot biotransform a xenobiotic. Each approach has its advantages and disadvantages, and a combination of approaches is usually required to identify which human P450 enzyme is responsible for metabolizing a xenobiotic. All approaches to reaction phenotyping *in vitro* should be carried out with pharmacologically relevant substrate concentrations.

### Inhibition of cytochrome P450

In addition to predicting the likelihood of some individuals being poor metabolizers because of a genetic deficiency in P450 expression, information on which human P450 enzyme metabolizes a drug can help predict or explain drug interactions. For

example, when administered with certain antifungals (e.g., ketoconazole) or antibiotics (e.g., erythromycin), the anti-histamine terfenadine (Seldane) and the gastric pro-kinetic agent cisapride (Propulsid) causes *Torsades de Pointes*, which in some individuals has led to fatal ventricular arrhythmias. These drug-drug interactions can be rationalized on the basis that terfenadine and cisapride are extensively metabolized by intestinal and hepatic CYP3A4. When CYP3A4 is inhibited by ketoconazole or erythromycin, the plasma levels of terfenadine or cisapride become sufficiently elevated to block cardiac potassium channels. These drug interactions are so severe that Hoechst Marion Roussel Inc., has withdrawn Seldane from the US market at the recommendation of the FDA.

Inhibitory drug interactions generally fall into three categories. The first involves competition between two drugs that are metabolized by the same P450 enzyme. For example, omeprazole inhibits the metabolism of diazepam because both these drugs are metabolized by the same human P450 enzyme, namely CYP2C19. The second inhibitory drug interaction is also competitive in nature, but the inhibitor is not a substrate for the affected P450 enzyme. The inhibition of CYP2D6 by quinidine is a good example of this type of inhibition because quinidine potently inhibits CYP2D6 but is metabolized by another P450 enzyme, namely CYP3A4. The third type of drug interaction results from non-competitive inhibition of cytochrome P450, and often involves mechanism-based inhibition or suicide inactivation of cytochrome P450. The inhibition of terfenadine metabolism by macrolide antibiotics appears to be example of this type of drug interaction. CYP3A4 converts macrolide antibiotics to a metabolite that binds so tightly (but non-covalently) to the heme moiety of CYP3A4 that it is not readily released from the enzyme's active site. The potential for one drug to inhibit the P450-dependent biotransformation of another can be assessed *in vitro* with human liver microsomes or recombinant human P450 enzymes. The clinical significance of such inhibition depends on the absolute and relative *in vivo* concentration of the inhibitor and substrate, and whether biotransformation is the rate-limiting step in drug elimination.

### Induction of cytochrome P450

By inducing cytochrome P450, one drug can increase the metabolism of a second drug and thereby decrease or ameliorate its therapeutic effect. A dramatic effect of this type of drug interaction is the induction of ethinyl estradiol metabolism by certain anticonvulsants and rifampin, which can ameliorate the contraceptive effect of the former drug. Induction of CYP3A4 by rifampin complicates the treatment of transplant patients with cyclosporin or tacrolimus, and the treatment of AIDS patients with certain HIV-protease inhibitors.

*In vitro* techniques for evaluating xenobiotics as P450 enzyme inducers include the use of primary cultures of hepatocytes, precision-cut liver slices, immortalized cells lines and reporter gene constructs. Of these various approaches, that based on primary cultures of human hepatocytes has proven to be the most reliable. When hepatocytes are cultured under conditions that restore near-normal morphology

(including cell polarity) and the expression of liver-specific genes (e.g., albumin and other secretory proteins), P450 enzymes can be induced by xenobiotics to levels that are comparable to those achieved *in vivo*.

The major advantage of using hepatocytes to assess drugs as P450 enzyme inducers is that this approach can be applied to humans, which often differ from rodents in their responsiveness to P450 enzyme inducers. For example, omeprazole is a CYP1A enzyme inducer in humans but not mice or rabbits, and rifampin is a CYP3A inducer in humans but not mice or rats. In rats, the CYP2B enzymes are the major P450 enzymes induced by phenobarbital, whereas drug interactions with phenobarbital in humans stem largely from induction of P450 enzymes in the CYP3A and CYP2C subfamilies. These species differences underscore the importance of using human hepatocytes for assessing the enzyme-inducing potential of drugs and NME's.

Recent studies suggest that hepatocytes isolated from cirrhotic human liver can also be used for enzyme induction studies, which tends to support the "sick-liver, healthy hepatocyte" theory of liver cirrhosis. The fact that cirrhotic liver can be used for enzyme induction studies expands the available sources of human liver for *in vitro* studies.

#### Gender and ethnic differences

There is ample evidence to suggest that the disposition of some drugs differs between men and women, or differs between one ethnic group (geographic population) to the next. Gender differences may be the result of hormonal influences on P450 expression, and ethnic differences may reflect, at least in part, ethnic differences in the incidence of polymorphic enzyme expression such as CYP2D6 (Caucasian > Asians) and CYP2C19 (Asians > Caucasians), although ethnic differences may also reflect differences in mean body fat and, perhaps more importantly, diet. It might be argued, therefore, that drugs being developed in America and Europe should be subjected to safety tests conducted with Caucasian livers, whereas drugs being developed in Asia should be tested with Asian livers. However, several objections can be raised to counter this argument. First, P450 enzyme levels vary enormously from one subject to next, even when comparisons are made among members of a single sex and ethnic background. These inter-individual differences over-shadow gender and ethnic differences. Second, although the *levels* of a given P450 enzyme may, on average, be higher or lower in one particular gender or ethnic group, the *properties* of the P450 enzymes involved in drug metabolism appear to be the same across all ethnic groups and genders. In other words, if a drug were found to inhibit CYP2C19 in Caucasians, the same drug would be expected to inhibit CYP2C19 in Asians or any other ethnic group. However, the drug would not exert an inhibitory effect in individuals who lack this enzyme (just as omeprazole fails to inhibit diazepam metabolism in CYP2C19-deficient individuals), in which case the drug would have a greater chance of inhibiting CYP2C19 in Caucasians than in Asians because relatively few Caucasians are genetically deficient in CYP2C19.

In summary, human-derived tissues are being used more and more in drug discovery and development. Extrapolating the results of *in vitro* experiments with human-derived tissue to the *in vivo* situation appears to be less problematic than similarly extrapolating the results of *in vivo* experiments in laboratory animals.

### References

1. A. Parkinson. An overview of current cytochrome P450 technology for assessing the safety and efficacy of new materials. *Toxicol. Pathol.* **24**: 45-57, 1996.
2. A. Parkinson. Biotransformation of Xenobiotics. Chapter 6 in: *Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons*. Fifth edition (Ed: C.D. Klaassen). McGraw Hill. New York, pp. 113-186, 1996.
3. A. Parkinson, R. Pearce, A. Madan and J. Forster. Availability and preservation of human tissues, and the use of human liver microsomes in drug metabolism research. In: *The Use of Human In Vitro Systems to Support Preclinical Safety Assessment*. (Eds. A. Sundwall, G. Alvan, E. Lindgren, P. Moldeus, T. Salmonsson and P. Sjöberg). pp. 17-28. Tryckgruppen, Stockholm, Sweden. 1997.
4. A. Parkinson, A. Madan, J. Forster, K. Carroll, K. Marcucci, R. DeHaan and E. LeCluyse. Enzyme Induction: Assessing the Potential for Drug Interactions. In: *Drug-Drug Interactions: Analyzing in vitro-in vivo Correlations*. (Ed.: W. Hori). Chapter 1.7, pp.1-33. International Business Communications, Inc. Massachusetts. 1997.

## 我が国におけるヒト組織の有効活用とその方策

佐藤 哲男

昭和大学薬学部

**1. 医薬品開発におけるヒト組織の必要性和問題点：副作用の予測と回避**

医薬品開発において、動物を用いた非臨床試験のデータと臨床試験成績の間に大きなへだたりを経験することが少なくない。これには種々の要因が考えられるが、その一つとして動物とヒトとの間の薬物代謝能の差に基因することが多い。医薬品の開発においては最少限の動物実験は必要不可欠であるものの、動物とヒトとの間の溝を少しでも小さくすることが効率的な医薬品開発の道である。さらに、医薬品の副作用の個人間バラツキの原因として、患者個々の薬物代謝能の違いに基づくことが多い。したがって、薬物治療においては患者個々に出来る限り正確な代謝能を測定し、予期せぬ副作用を未然に防ぐことが出来ればより安全な医療が期待される。これらの問題を解決する最も効果的方法の一つとしては、非臨床試験から臨床試験に移行する前に予め少量のヒト組織、例えば肝臓成分を使用して試験管内テストを行い、その情報を臨床試験に反映させることである。この様な試験を導入することにより、非臨床試験において使用される実験動物数は削減され、また、臨床試験をより合理的かつ迅速に実施することが出来る。

**2. ヒト組織の有効使用に関する国際的現状**

米国においては、10年以上前から米国食品医薬品局(FDA)が新薬の承認審査の際にヒト肝臓成分を用いた薬物の代謝データを要求しており、1997年に最新のガイドラインが公示された<sup>1)</sup>。これにより無用な動物実験は無くなり、より安全性の高い医薬品が開発されている。また英国では、1996年に国家機関である医学研究会議(MRC)の支援の下に、ファルマジーン社が設立され<sup>2)</sup>、医薬品開発にヒト組織を用いた広範な試験が開始された。最近では、英国以外の国々においても同様の傾向が定着しつつあり、1997年12月に公開さ

Benefits and Problems of the use of human materials in drug development in Japan.

Tetsuo SATOH, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Showa University, Hatanodai 1-5-8  
Shinagawa-ku, Tokyo 142-8555, Japan.



れたヨーロッパ連合(EU)の薬物相互作用試験ガイドラインでは、ヒト肝臓ミクロソームを用いた代謝試験が要求されている<sup>3,4)</sup>。

1994年にオランダにおいて、欧米日の研究者によるヒト肝臓の薬物代謝研究における有用性に関するクローズドワークショップが開催された<sup>5)</sup>。筆者も日本の現状を報告する機会を得たが、当時の欧米の状況が我が国に比べて如何に先を走っているかを痛感した。ひるがえって我が国の現状をみると、非臨床試験では依然として動物試験が主流を占めている。従って、臨床試験における投与量の設定や試験薬物の安全性は動物のデータに基づいて網渡的に予測せざるを得ない。また、医薬品が市販された後でもその副作用の発生に十分に留意しなければならない。そこで、現時点において我が国で米国と同程度のヒト試料を用いた試験を実施するためには、次に述べる我が国特有のいくつかの問題を解決しなければならない。

### 3. ヒト組織の有効活用に関する国内の現状

ヒト組織を医学、薬学の研究に有効活用する場合、我が国において最も深刻な点は倫理的問題であり、当然ながら生命倫理の一般原則に沿った行動が要求される。ヒトの組織は個人の尊厳性に帰属していることから、それを商取引の対象としてはならないとする社会通念がある。勿論、ヒト組織の授受は金銭的利益と結びつけた形で放任してはならず、研究目的の場合にはあくまでも非営利方式で行うべきである。このような考え方に対して、米国ではヒト組織を用いることにより、医薬品の安全性がより高く担保されるならば、組織を提供するという善意に対して無償を強いるのではなく代価を支払うことは当然であるとする考え方がある。これらの考え方の違いは利益の解釈の違いによるのであり、ヒト試料の提供とその取り扱いについては、必要不可欠な維持経費以外は利益を拒否する非営利的な考え方が我が国においては支配的なことは当然である。

#### HAB 協議会(Human and Animal Bridge Discussion Group)の設立<sup>6)</sup>

HAB 協議会は1994年に我が国において医学、薬学、獣医学、製薬企業の有志により設立された非営利学術団体である。その最終目的は国内において学術研究(医薬品開発を含む)を対象としたヒト肝臓試料供給ネットワークを確立することである。

#### 1) HAB 協議会の主な業務内容

- (1) 学術年会、(2) ヒト組織を用いた先端的研究に関する国際セミナーの開催、(3) NEWSLETTER の発行(年2回)

#### 2) NDRI との国際協定

国内でのネットワークが完成するまでを条件として、1996年4月に米国の NIH 傘下の非営利機関である NDRI(National Disease Research Interchange)と国際協定を結び、それに基づいて米国国内で肝移植に不適な肝臓が不定期に供給されている。

#### 3) 研究内容

(1) ヒト肝成分の保存状態および保存期間と肝酵素の変動、(2) ヒト肝成分を用いた薬物の安全性評価系の確立、(3) 大学ならびに民間の研究者との共同研究。

(4) ヒト肝臓S9を用いた Ames test。Ames test において陽性を示す典型的な化学物質13種類について、市販ラットS9と米国 NDRI から入手した12種類のヒト肝臓の内4種類についてS9を調製しラットと比較検討した。その結果、例えば、ラットで強力な変異原性を示すアフラトキシンB1ではヒトでその程度が極めて低く、逆に2-アミノアントラセンではヒトがラットの約10倍強力であった。したがって、医薬品開発においてもヒト肝臓S9の有用

性が指摘される。

#### 4) 薬物相互作用のデータベース化

研究者が独自で薬物相互作用の情報を収集することは、情報量が飛躍的に増加している今日では至難のわざである。そこで、相互作用の情報をデータベース化して、利用者がいつでもアクセス出来る体制を整備することは、医薬品の副作用の予知に極めて効率的である。医薬品の相互作用は、ヒト組織を使用することによりその予知が格段に精度を増す。最近の例としてはソリブジンとフルオロウラシル系薬物との相互作用が記憶に新しいところである。これらは単独で使用する限り極めて有効性が高くこの様な危険性はない。臨床において相互作用の有無を予知するためには、ヒト試料を用いて事前に相互作用の発現の可能性を試験し、それが示唆される場合は避けるようにすることが必要である。HAB協議会では、各製薬企業で既に市販している医薬品を対象として、同一ロットのヒト肝ミクロソームを用いて各医薬品の相互作用をチェックし、それを数値化してデータベースとして管理、公開することにより、医薬品の危険度を未然に予知するのに役立てることを検討している。

#### 4. わが国における研究システムの整備と提言<sup>7)</sup>

欧米とはいささか異なる社会環境において我が国独自の戦略を実現するためには、関連領域の専門家、学識経験者、行政側などが結集して検討し、官民一体の研究資源センター的な非営利機関を早期に設立することが急務である。この場合、倫理委員会に相当する監視機構を同時に設置することも必要である。このような非営利機関の設置は、ICHに基づく医薬品開発の国際的調和を考えた場合、むしろ遅きに失する感がある。

国内のネットワークづくりを具体化するためには、既に述べた必要性と問題点を明確にするのみならず、(1)研究体制の確立とそれを運営するための経済基盤の確保(2)広報と世論の支持(3)臨床医の理解と協力(4)医師と患者との信頼関係の確保、(5)患者のインフォームド・コンセントの在り方、などを検討し、さらに、(6)今後、法整備と共に移植肝の内移植に不適合の肝臓の使用も検討課題として残されている。

ヒト組織を使用する場合に最も重要なことは、組織を提供する患者個人の人格の尊重を前提とした理念が確立されねばならない。つまり、人体の一部は当然ながらその個人に帰属するものであるため、提供者が自発的に納得して譲渡された場合にのみ有効活用が可能となる。この場合でも、ヒト組織の利用者は患者や一般社会に貴重な情報を提供することに努め、両者の円滑な協力関係を築くことを考えるべきである。臨床においては、組織提供患者の診断あるいは治療に益することが優先されるが、同時に、適切なインフォームド・コンセントに基づいて組織の一部を医薬品の開発に有効に活用出来るならば、より安全な医薬品の創製につながり、これによる社会への貢献は計り知れない。

#### 5. おわりに

生命科学が飛躍的に発展するとき、それに付随する問題点について、いわゆる倫理とは何かを改めて考える必要がある。今回のヒト組織の有効活用はその一例であり、正当な理由と個人あるいは社会への還元が明確にされたとき初めて可能となる。いかに高邁な理屈を並べたとしても、それが社会に受け入れられない限り実現は望まれない。HAB協議会が行っている学術的非営利事業は決して科学者の先陣争いではなく、如何にして合理的な医薬品開発の環境をつくるかが最終目標の一つである。我が国において国際競争に打ち勝つための戦略としては、(1)何が必要か、(2)何が問題か、(3)何が出来るか、(4)い

かにして実現するか、(5)それによる社会的波及効果は何か、などについて、関係者が英知を結集して真剣に考える時に来ている。さもないければ、医薬品開発は急速に国外に流出し、国内における医薬産業の空洞化は免れない。結論として、我が国の現状においてヒト組織の有効利用を推進するためには、(1)我が国固有の感情的問題、(2)法律上ならびに倫理的問題点、(3)世論の同意、などを明確にし、それらを解決することが迫られている。

#### 参考資料

1. Guideline for Industry. Drug Metabolism/Drug Interaction Studies in the Drug Development Process: Studies In Vitro(FDA, April, 1997)
2. Internet "Pharmagene"
3. Replacement of Animal Studies by In Vitro Models(EU, February, 1997)
4. Note For Guidance on the Investigation of Drug Interactions(EU, December, 1997)
5. 佐藤 哲男:「新薬開発のための薬物代謝研究におけるヒト生肝臓使用」に関する国際ワークショップ報告書(1994)(HAB 協議会誌)
6. 佐藤哲男:HAB(Human and Animal Bridge) 協議会と霊長類機能研究所の設立:ファルマシア 33, 41-45(1997)
7. 佐藤哲男:ヒト組織を用いた学術研究一欠かせぬ倫理的評価一:日経サイエンス 1997年7月号 pp23-25。

ヒト由来細胞を用いた変異原性試験：ヒトリンパ芽球細胞(TK6)を用いたチミジンキナーゼ(tk) 遺伝子突然変異検出系の利用

本間 正充、林 真、○祖父尼 俊雄

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 変異遺伝部

ヒトリンパ芽球細胞株TK6は17番染色体長腕に存在するチミジンキナーゼ遺伝子をヘテロ(*tk*+/-)にもつため、これをターゲットとした劣性の遺伝子突然変異検出系として利用することができる。*tk*を利用した遺伝子突然変異検出系は、従来の *hprt* や Na/K ATPase による遺伝子突然変異検出系と異なり、点突然変異などの小さなDNAの変異だけでなく、染色体レベルに及ぶような大きなDNAの欠失、あるいは染色体間の組換えによる変異などをも検出できるという利点がある。そのため、Ames試験で検出される mutagen と染色体異常試験で検出される clastogen の両者をカバーしうる遺伝子突然変異検出系として注目されている。

一方、*tk*における突然変異は癌抑制遺伝子における2ndヒットに相当し、観察される突然変異スペクトルは、代表的なヒト癌抑制遺伝子である Rb や p53 の変異スペクトルと極めて近似している。ヒト細胞を用いた検出系であることに加えて、ヒト細胞の癌化過程における遺伝子変化に対応した *in vitro* 遺伝子毒性試験といえる。また、本試験で得られた変異体を遺伝子解析することにより、環境変異原のもつ突然変異誘発機構を分子レベルで解析することも可能である。

本シンポジウムでは、*tk* 遺伝子突然変異検出系の有用性を紹介すると共に、変異体の遺伝子解析によって明らかになった環境変異原の特性について2、3紹介する。例えば、アルキル化剤などによって誘発された変異体の大部分は点突然変異体であり、放射線などによって誘発された変異体は遺伝子全体の消失を伴うことが多い。このことは、アルキル化剤は塩基対置換を、放射線は染色体レベルの大きな構造異常を主として誘発することを示している。このように本試験は突然変異を量的に評価するだけでなく、分子生物学的解析を加えることにより、突然変異のタイプを質的に捕らえることも可能であり、環境変異原のリスク評価の上でも重要である。

Mutagenicity tests using cultured human cells: Application of gene mutation assay in thymidine kinase (tk) gene of a human lymphoid cell line (TK6).

Masamitsu HONMA, Makoto HAYASHI and Toshio SOFUNI, Division of Genetics and Mutagenesis, Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan.

さらに、これまで Ames 試験や *hprt* 試験では検出困難である非 DNA 傷害性変異原の検出にも *tk* 突然変異試験を用い、特性の解析を行っている。例えば、強力な発癌プロモーターである TPA は *tk* 遺伝子で突然変異誘発性を示したものの、その変異スペクトルは自然誘発のものと同様であった。このことは TPA は遺伝的不安定性を助長し、自然突然変異全体を押し上げる作用をもつことを示唆している。この遺伝的不安定化がプロモーター作用と関係している可能性がある。

本試験系は環境変異原などの外的因子による突然変異だけでなく、突然変異を制御する細胞側の内的因子の研究にも有用である。最近、DNA 修復、DNA 複製、組換え、細胞周期の停止、アポトーシスを制御する細胞内因子が突然変異の生成や抑制と強く関係していることが解明されつつある。これら因子の遺伝子を破壊したり、高発現させた条件下で、突然変異の頻度やその変異スペクトルを検討することは、その因子の機能を知るだけでなく、癌化過程での遺伝的要因を分子レベルで解明することに繋がるものと考えられる。

このような因子のうち、我々は特に突然変異の制御において重要な役割を演じているとされている p53 に注目している。TK6 細胞の変異株で異常な p53 タンパクのみを高発現する WTK-1 細胞を用いて *tk* 突然変異を検討したところ、自然変異頻度は 30 倍以上も高かった。また、変異体を解析したところ、多数の変異体は不均衡型転座を伴い、*tk* 遺伝子を消失していた。このことは WTK-1 細胞が遺伝的に不安定になっていることを示しており、p53 は主として染色体レベルでゲノムの安定化に関与しているものと考えられる。

上記で紹介した試験系はヒト遺伝子そのものであることから、そこで得られた知見は直ちにヒト個体における DNA レベルでの作用機序の外挿に用いることが可能である。これに生体での吸収、代謝、分布、排泄などの要因を取り入れて、ヒトにおける遺伝子障害性のリスク評価に貢献できるものと考えている。

トランスジェニックマウスを用いた短期発がん性物質の  
検索法について

○山本 慧<sup>1)</sup>、浦野浩司<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 萬有製薬、<sup>2)</sup> 実験動物中央研究所

新薬候補物質や環境中の化学物質の安全性を評価する上でがん原性試験は欠かせない項目である。現在は主としてラットおよびマウスを用いた長期がん原性試験が行われているため、結果を得るまでに2年以上の時間を要する。経済的にみてもその間の動物飼育管理、施設の維持管理や人件費など莫大な費用を要するのが現状であり、試験の結果如何では、医薬品としての開発を中止せざるを得なくなる場合もある。さらに長期がん原性試験で得られた結果が必ずしもヒトでの発がんリスクを的確に反映しているとは限らないという点も指摘される。以上のような問題点を解決するため、より短かい期間で医薬品候補物質や各種の化学物質のがん原性をよりの確に評価できる動物実験系の開発が切望されており、そのためには各種のがん原物質に高い感受性を示す動物が不可欠である。International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)においても現在2種類のげっ歯類(ラットおよびマウス)を用いて行われている長期がん原性試験を簡便化する方法が議論されてきた。しかし発がん過程は複雑であることから、全ての医薬品あるいは化学物質のヒトに対するがん原性を確実に検出することができる単一の方法はないと考えられる。その結果長期がん原性試験はラットでのみ行い、従来マウスで行われてきた長期がん原性試験の代替法を検討することが決定され、がん遺伝子を導入したトランスジェニックマウス、がん抑制遺伝子を欠失させたノックアウトマウス、新生仔マウスあるいは2段階発がんモデルなどがその候補となった。

一方、ras遺伝子は細胞増殖を規定しており、種々のヒト腫瘍および実験動物の

A rapid carcinogenicity testing system using transgenic mice harboring human prototype c-Ha-ras gene

Satoshi YAMAMOTO<sup>1)</sup> and Koji Urano<sup>2)</sup>, <sup>1)</sup>Banyu Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo 153, Japan and <sup>2)</sup>Central Institute for Experimental Animals, Kawasaki 216, Japan

腫瘍において点突然変異による活性化が明らかになっている。そのためヒトプロト型c-Ha-ras遺伝子を導入したrasH2マウスは、ヒトに対する各種のがん原物質に対して通常のマウスよりも高い感受性を示す可能性があり、ヒトにおけるがん原物質を検出するためのモデル動物としての有用性が期待されている。

我々は今回、短期がん原性試験系モデル動物としてrasH2マウスが利用できるかどうかを評価するために29種類の化学物質について、本マウスでのがん原性を検討した。各がん原性試験には、rasH2マウス80匹およびrasH2マウスの同腹マウスで遺伝子が導入されなかったマウス (non-Tgマウス) 80匹 (いずれも雌雄40匹ずつ)、合計160匹を使用した。がん原性試験はマウスが生後7週齢に達した時点から開始し、試験開始後26週間経過した時点で全ての動物を解剖して腫瘍の発生状況を観察した。ただし試験終了時まで死亡あるいは瀕死状態に陥ったマウスはその都度解剖した。今回がん原性試験に供した29種類の被験物質を、サルモネラ菌における変異原性および長期がん原性試験での結果 (ラットおよびマウスでのがん原性) を元にグループ分けした。すなわち、変異原性がありかつラットおよびマウスでのがん原性がある17物質、変異原性はないがラットおよびマウスでのがん原性がある5物質、変異原性がなくマウスのみでがん原性が確認されている1物質、変異原性はあるがラットおよびマウスでのがん原性がない3物質、変異原性がなくかつラットおよびマウスでのがん原性もない3物質である。各々の化学物質の投与経路および用量は原則として米国National Toxicology Programで実施されている長期がん原性試験に準じ、rasH2・non-Tgマウス群共に低用量群 (15匹)、高用量群 (15匹) および対照群 (10匹) を設定した。

実験の結果をTable.1にまとめた。変異原性がありかつがん原性がある17物質中、16物質において薬物を投与したrasH2マウス群で26週間以内に腫瘍発生を認め、その内13物質による腫瘍発生率は非投与群のそれより有意に高かった。またそのうちの14物質においては対照群のnon-TgマウスよりもrasH2マウスにおける腫瘍発生率が高く、11物質については統計的にも有意な差が見られた。また変異原性はないががん原性がある5物質すべてにおいて薬物を投与したrasH2マウス群で26週間以内に腫瘍発生を認め、そのうちの3物質で非投与群に比し腫瘍発生率が有意に高かった。また3物質において、対照群のnon-TgマウスよりもrasH2マウスにおける腫瘍発生率が有意に高かった。変異原性がなくマウスのみでがん原性が確認されている物質として1,1,2-trichloroethaneを投与したところ26週間以内に腫瘍の発生は認められなかった。変異原性はあるががん原性がない3物質を投与した結果、1物質で薬物を投与したrasH2マウスと同処置のnon-Tgマウスで同程度の腫瘍発生を認めた。変異原性もがん原性もない3物質を投与した場合にはいずれにおいても腫瘍の発生を認めなかった。

以上の結果をまとめると、rasH2マウスにおける26週間のがん原性試験によって変異原性のあるがん原物質についてはかなりの確率で検出できること、また変異原性のないがん原物質についても検出できる可能性が高いことが明らかになった。腫瘍の発生率については、わずかな例外を除いてほぼ用量依存的に増加することが明

らかになった。また変異原性のあるがん原物質および変異原性のないがん原物質に対して、rasH2マウスはnon-Tgマウスよりも感受性が高いことも明らかになった。確認された腫瘍のうち悪性腫瘍のほとんどは、rasH2マウスにがん原物質を投与した場合に確認されており、同じ処置を施したnon-Tgマウスでは悪性腫瘍はほとんど認められないか、認められてもごくわずかであった。rasH2マウスにがん原物質を投与した場合、いわゆる標的臓器（B6C3F1マウスを使用した長期がん原性試験で腫瘍ができる臓器）に腫瘍ができることが多かったが、それ以外にも肺における腺腫、脾臓における血管肉腫あるいは前胃における扁平上皮癌などが頻りに確認されたことからこれらは本マウスにおける好発腫瘍であると考えられた。

変異原性はあるががん原性のない物質あるいは変異原性もがん原性もない物質をrasH2マウスに投与した場合、有意な腫瘍発生を認めなかったが、4-nitro-*o*-phenylenediamine（変異原性はあるが、がん原性は認められていない）で、ごくわずかな腫瘍（肺腺腫）が認められたことから、変異原性はあるががん原性はないとされている物質に関しては更なる検討が必要と考える。また変異原性がなくマウスのみでがん原性が確認されている（すなわちヒトに対する発がんリスクが疑わしいと考えられる）物質として今回唯一採用した1,1,2-trichloroethaneで、rasH2マウスで有意な腫瘍発生を認めなかったことは、ヒトにおける発がんリスクを予想する上で有利な点と考えられるが、この点に関しても更なる検討が必要といえる。

上述したように、種々のがん原物質をrasH2マウスに投与した場合、肺腫瘍が比較的頻りに確認されたが、それらの腫瘍について導入遺伝子の点突然変異の有無を検討したところ突然変異の発現頻度はきわめて低かった。また、肺腫瘍（肺腺腫または腺癌）発生との関連が明らかな内因性Ki-ras（マウスの）遺伝子の変異を検討したところ、各種がん原物質投与によりrasH2マウスに発生した肺腫瘍には、Ki-ras遺伝子の変異は全く認められなかった。その一方で、対照のnon-Tgマウスに発生した肺腫瘍ではKi-ras遺伝子の変異が高頻度に認められた。またrasH2マウスに発生した肺腫瘍にはmicrosatellite instabilityも認められなかった。これらの結果より、rasH2マウスにおける肺腫瘍発生のメカニズムがnon-Tgマウスのそれとは異なることが示され、更に、rasH2マウスにおいては導入遺伝子の変異やKi-ras遺伝子の変異は肺腫瘍の発生に重要でないことが示唆された。また前胃や皮膚の腫瘍では導入遺伝子の変異が比較的高率に認められたが、他の腫瘍ではやはり導入遺伝子の変異は低率であった。



**Table 1.** Results of rapid carcinogenicity testing using rasH2 mice

Tested chemicals	Rapid tumor response in rasH2 mice	Tumor incidence	Malignant tumors	
			rasH2	non-Tg
<i>Mutagenic (Salmonella) carcinogens (trans-species)</i>				
<i>p</i> -Cresidine	+#	Tg≡Non-Tg	+	+
Cyclophosphamide	±	Tg≡Non-Tg	+	-
DEN	+#	Tg>Non-Tg#	+	-
1,2-Dimethylhydrazine	+#	Tg>Non-Tg#	+	-
4HAQO	+#	Tg>Non-Tg#	++	+
MAM	+	Tg>Non-Tg	+	-
Melphalan	+	Tg>Non-Tg	+	-
MNNG	+#	Tg>Non-Tg#	+	-
MNU	+#	Tg>Non-Tg#	+	-
NNK	+#	Tg<Non-Tg#	+	-
4NQO	+#	Tg>Non-Tg#	+	-
Phenacetin	+#	Tg>Non-Tg#	+	-
Procarbazine	+	Tg>Non-Tg	+	-
4,4'-Thiodianiline	+#	Tg>Non-Tg#	+	-
Thiotepa	+#	Tg>Non-Tg#	+	-
Vinyl carbamate	+#	Tg>Non-Tg#	++	+
4-Vinyl-1-cyclohexene diepoxide	+#	Tg>Non-Tg#	++	+
<i>Nonmutagenic (Salmonella) carcinogens (trans-species)</i>				
Benzene	+#	Tg>Non-Tg#	+	-
Cyclosporin	+	Tg>Non-Tg	+	-
1,4-Dioxane	+	Tg>Non-Tg#	+	-
Ethyl acrylate	+#	Tg>Non-Tg#	+	-
Ethylene thiourea	+#	Tg≡Non-Tg	+	+
<i>Nonmutagenic (Salmonella) carcinogen (mouse-only)</i>				
1,1,2-Trichloroethane	-			
<i>Mutagenic (Salmonella) noncarcinogens</i>				
<i>p</i> -Anisidine	-			
8-Hydroxyquinoline	-			
4-Nitro- <i>o</i> -phenylenediamine	±	Tg≡Non-Tg	-	-
<i>Nonmutagenic (Salmonella) noncarcinogens</i>				
Resorcinol	-			
Rotenone	-			
Xylene (mixed)	-			

#:p&lt;0.05

## ヒトP450 遺伝子を発現させた細菌の毒性学研究への応用

○ 鎌滝哲也、鈴木昭浩、藤田健一、中山佳都夫、能美健彦<sup>1)</sup>

北海道大学大学院薬学研究科 代謝分析学分野

<sup>1)</sup> 国立医薬品食品衛生研究所

[はじめに] チトクロームP450 (以下P450又はCYP) には多数の分子種があるだけでなく、そのそれぞれに対応する分子種の性質にも動物間で差異が認められる。加えて、各分子種の存在量にも種差が存在するため、時として薬物や毒物を投与した際に動物の種によって異なった代謝産物が生成する。その代謝産物が毒性を示す場合には毒性の種差が発現する。したがって、ヒトの肝などを用いて薬毒物の代謝経路や代謝速度を調べればヒトにおける毒性がある程度予測できる。しかしながら、ヒトの肝を用いるには、

- 1) 我が国においては脳死患者の新鮮な肝を容易に用いることが出来ない。外国から輸入した肝を用いるのにも問題がある。
- 2) ヒトにおいては、病態、薬物の投与、遺伝的多型、死後時間、など個体差が存在し、数個の肝を用いた研究から、ヒトにおける代謝を定量的に評価することは困難である。
- 3) さらに、ヒトにおける薬毒物の代謝産物の化学構造などを調べるには大量の肝試料を必要とする。また、
- 4) ヒトの肝で変異原物質の代謝的活性化が起こる場合にはヒトの肝を用いても、検出感が悪いなどの欠点があり、ヒトにおける代謝的活性化のメカニズム、ヒトにおける化学物質の予測などの要求を満たしていない。

そこで、本研究では上述の4) すなわち、ヒトにおける代謝的活性化を高感度に検出し、且つヒト肝における代謝的活性化にどのP450分子種が関与しているかを簡単に調べる系の開発を目指した。従来の変異原assay系では以下のような欠点がある。すなわち、

- 1) ヒトの肝を恒久的に供給するには無理があり、しかも上述したようにヒトには個体差が大きい。

Application of Genetically Engineered Bacteria Carrying Human Cytochrome P450 to Toxicological Studies.

Tetsuya KAMATAKI, Akihiro SUZUKI, Kenichi FUJITA, Katsuo NAKAYAMA and Takehiko Nohmi\*

Laboratory of Drug Metabolism, Division of Pharmacology and Toxicology, Hokkaido University Graduate School of Pharmacy, Sapporo, and \*Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences, Tokyo

- 2) 変異原のassayに用いるサルモネラ菌は化学物質の細胞壁透過性を高めてあるものの、細胞の外で生成した化学的に不安定（反応性の高い）な活性代謝物は細胞壁に共有結合するため、細胞内に到達してDNAに結合するのは一部でしかないと考えられる。したがって、検出感が低いと予想される。
- 3) ヒト肝を用いても、どの酵素がどの程度の活性化能を持つのかなどの詳細なメカニズムに関連した情報が得られない。

このような欠点を克服するために、ヒトの酵素を細菌内に発現させる系を開発した。この系では、ヒトの肝の供給が不要であり、化学的に安定な化学物質（変異原物質）は菌体内に容易に到達して、そこで活性化を受けるため親化合物の菌体内への透過が律速にならない。また、菌体内で活性代謝物が生成するので、活性代謝物がDNAなどの生体成分に効率よく到達して結合する。しかも、菌体に導入した活性化酵素の遺伝子は予め分かっているので、どの酵素が活性化するのかなどの活性化メカニズムに関連した情報が予め予想できる。

〔結果〕一例としてCYP1A2を発現するサルモネラ菌の開発について紹介する。周知のように、CYP1A2は演者らが蛋白の焼けこげに含まれる数々のヘテロサイクリックアミンのN-水酸化を触媒する酵素として見出したP450の一分子種である。本酵素はPCBや3-Bや3-メチルコランスレンなどによって誘導される。P450が機能するためにはNADPH-P450還元酵素が必要である。そこで、CYP1A2とNADPH-P450還元酵素を同時に発現させるプラスミドを構築しサルモネラ菌に導入した。N-水酸化されたヘテロサイクリックアミンは、ついで細菌の持つO-アセチル転移酵素（ヒトではN-アセチル転移酵素）によってO-アセチル化される。O-アセチル転移酵素はサルモネラ菌の酵素を過剰発現させて得た。このようにして開発したサルモネラ菌TA1538/ARO（AはCYP1A2、RはNADPH-P450還元酵素を、OはO-アセチル転移酵素を意味する）を主として用い、対照としてTA1538/A、TA1538/ARなどを構築して用いた。CYP1A2とNADPH-P450還元酵素の活性は7-エトキシレゾルフィンO-脱エチル化酵素活性の存在で確認し、O-アセチル転移酵素の活性はイソニアジドN-アセチル転移酵素活性の存在で確認した。濃度を変えて、9種のヘテロサイクリックアミンと3種の芳香族アミンの変異原性を調べたところ、通常のassay系に比較して、極めて低濃度で変異原性が検出された。比較のために、復帰変異コロニー数が用量依存的に増加している濃度範囲で、しかも溶媒のみを添加したときの2倍のコロニー数が検出された濃度を比較したところ、サルモネラ菌TA98を用いた通常の変異原試験系の4-1000倍の高感度で変異原性が検出できた。4-1000倍の違いはO-アセチル転移酵素に依存して活性化されるかどうかによるものと考えられる。また、pMオーダーの濃度でも検出が出来たことより、通常の食事で摂取されるヘテロサイクリックアミン濃度でも検出できる高感度検出系となった。この高感度化がいかなる原因で達成できたかを検討したところ、予想通りCYP1A2やNADPH-P450還元酵素それにO-アセチル転移酵素遺伝子が細胞内に発現したことにより達成できたことが判明した。

[考察] CYP1A2やNADPH-P450還元酵素それにO-アセチル転移酵素をサルモネラ菌に発現させ、高感度にヘテロサイクリックアミンを検出でき、さらにヒトにおける変異原活性化能の予測系、言い換えると発がんリスクの予測系を構築することが出来た。ことさら言うまでもないが、化学物質の透過性の高いサルモネラ菌株にP450遺伝子などを導入しているのです、このサルモネラ菌発現系は、ヒトにおける薬物代謝の予測系としても有用性が高いと考えられる。さらに、活性代謝物が遺伝子損傷を示す場合だけでなく、化学物質暴露によって生菌数が変化するかを調べることによって、活性代謝物の細胞毒性を予測することが出来るかも知れない。このようなアイデアは現在検討中であり、正確に評価するには検討の結果を待たなくてはならないが、サルモネラ菌発現系はいくつもの可能性を秘めた発現系であると言える。

## ヒト型動物モデルを用いた安全性試験の展望

○井上 達

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部

このシンポジウムでは、ヒト型モデル動物や毒性試験モデル動物などの開発に関する現状と展望について討論することが中心課題となっている。

既存化学物質や農薬、また医薬品などの中には、ヒトと実験動物とで反応性の異なるものやヒトに特異的に作用する物質が少なくない。従って動物組織の反応性をもってヒト組織の反応性を予測することはしばしば困難である。しかしそうした認識は、必ずしも旧来から明確であったわけではない。チトクローム P450 を代表とする薬物代謝酵素系には大きな種差があり、動物を用いた試験結果のヒトへの外挿に問題のあることは今日ではよく知られている。これまでの歴史的な薬剤事故の中に、実験動物との種差に基づいた、ヒト特有の代謝酵素に由来するものが少なからず含まれていたことは隠れもない事実である。併せてヒト由来の肝組織・細胞系やヒト型試験系による体内動態の予測、それらの他の薬物や食品中の成分などとの相互作用を予測する必要性も考慮される。

従来のガイドラインに基づく遺伝毒性試験系では、ラット肝由来の S9 分画を用いた試験が行われている。しかし抱合酵素の関与や代謝活性のヒトとの相違に基づく誤った評価も避け難い。動物を用いた試験で毒性が観察されなくともヒトでの毒性がないとは言い切れず、何れにしても、通常の動物実験を中心とする毒性試験については、近未来に向けて何らかの新しい方策が検討されなくてはならない。

農薬や一般化学物質、また、微生物の産生する内毒素やマイコトキシンなどでは、必ずしも良い対応策がないため研究段階にある。因みに、ボツリヌス菌の毒性はヒトではブタの数 100 倍、またダイオキシンの急性毒性の場合、モルモットの感受性はハムスターのその 1000 倍にも及ぶという。尚、ヒト型サイトカインなどヒト特異的バイオ医薬品におけるヒト型反応動物のニーズについては、昨年の本学会シン

---

Development of Humanized Animals to Detect Possible Human Reaction in the Model Animals -Future Prospects and the Conclusion of the Symposium-

Tohru INOUE, Division of Cellular & Molecular Toxicology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagayaku, Tokyo 158-8501, Japan

ポジウムで詳述したとおりである。

これまでの①安全性の評価系や②薬効の評価系は、それらのガイドラインの限りでは、通常の実験動物を“漫然”と使うスキームで出来ている。しかしここではここで取り上げているようなケースでの安全性の如何も、薬効や障害性などの可能性についても、予知の把握に困難の生ずることが少なくないことは明らかである。実験動物における発がん性試験を例とした場合も、適切な遺伝子改変動物のようなものを積極的に導入することにより、臓器特異性・頻度・発がん機構など種々の面で、今日の科学の到達段階に相応した予測信頼性の向上をはかることが必要である。ヒト型試験系には、この他にすでによく知られているヒトにない実験動物特有の擬陽性毒性などの排除の方策にも貢献することが期待されている。ヒト型試験系を開発する課題は以上に述べたような様々な期待を担っている。

こうした課題の進展に対応して、未知部分に対して安全係数などの導入によって行われる今日のリスク算定方式なども、ヒト型試験系の開発によって得られる真の情報によって絶えず客観化の方向へと改められてゆくことが期待されている。こうしたヒト型試験系を開発を促す原動力には、従来とかく受け身的にとらえられがちであった安全性研究の、産業基盤開発の低コスト化に寄与する新しい戦略としての可能性、いわば“先導的安全性研究”への期待が込められている。

毒性試験モデルのいま一つの方向性は、ヒトと動物とを問わず、毒性に対して客観的に高感受性となる毒性指標を解明し、これを用いた反応系を樹立することである。例えば、酸化ストレスに関連するチオレドックスやスーパーオキシド・ディスムターゼなどの過剰発現や機能欠失をもつ遺伝子改変動物、あるいはいわゆる老化遺伝子のような、寿命を支配すると考えられる遺伝子に対して直接・間接に働きかけるような毒性検知系などの樹立には、一般毒性の合理的で鋭敏な検知系としての役割が期待される。その理由は、化学物質の中にそうした毒性発現機構を背景にもつ物質が少なくないこと、またこうした防御系が原核生物から真核生物に至るまで良く保存されていて異なった種間での相対的外挿性が良いことなどに基づいている。もっとも、こうした寿命を支配する遺伝子に関連する実験動物が化学物質などの“毒性”に対して高い種間交叉性をもった表徴種となり得る可能性の基礎には、“毒性”の惹起機構そのものが、寿命の短縮を引き起こす構造を内包するものとする仮説が含まれている。

昨年は、以上のような可能性の示唆される様々の遺伝子改変動物が、自然科学雑誌の巻頭を飾った。今後、それらの将来的な利用や、新しい試験動物の作製の可能性についても言及したい。

ここに紹介した研究の一部は、医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構の基礎研究“医薬品の安全性・有効性を評価するためのヒト型試験系の開発に資する基礎研究”への研究費による。Studies appeared in this abstract were supported, in part, by the Program for Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences of the Organization for Drug ADR Relief, R & D Promotion and Product Review of Japan.

## 一般演題 口演

- 1 : 生殖毒性
- 2 : PK/TK
- 3 : 変異原性
- 4 : 肝臓毒性
- 5 : がん原性
- 6 : 心脈管系
- 7 : 内分泌系
- 8 : 腎毒性
- 9 : 血液・骨髄毒性
- 10 : 中枢・神経系
- 11 : 手技・手法、他
- 12 : アレルギー・免疫毒性
- 13 : データ解析・統計手法

Long Evans ラットにおける 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin の応答遺伝子発現の臓器分布と性差

○米元純三、N. R. Jana、S. Sarkar、遠山千春\*、曾根秀子

国立環境研究所 地域環境研究グループ、\*環境健康部

(目的) 環境汚染物質であるダイオキシンは環境ホルモンとしての作用も知られていることから、近年、ヒトで報告されている生殖影響との関連が懸念されている。ダイオキシンの作用の多くはAh(Aryl hydrocarbon)レセプターとの結合が最初のステップと考えられている。Ahレセプターを介したチトクロームp450(CYP)1A1遺伝子発現の誘導は、ダイオキシンの初期の鋭敏な生化学的反応である。本研究はダイオキシンの生殖毒性の機序解明の基礎的データを得ることを目的として、ダイオキシン投与ラットにおけるCYP1A1、CYP1A2、AhレセプターのmRNA発現の臓器分布、性差を検討した。

(方法) 6週令の雌雄LongEvans ラットに2,3,7,8-TCDD (100, 300, 1000 ng/kg)を経口一回投与し、7日後に屠殺し、血液及び臓器(脳、肝、脾、胸腺、精巣、前立腺、子宮)を採取した。CYP mRNAの発現はラットcompetitive RT-PCR Set (TaKara Biomedicals)により定量的に測定した。AhレセプターのmRNA発現は設計したPCRprimerを用いてRT-PCR法により測定した。

(結果及び考察) CYP1A1のmRNA発現は脳、肝、脾、胸腺、精巣、前立腺で認められた。精巣、前立腺では1000ng/kgでのみ認められた。肝、脾では、雌での発現が雄より高く性差が認められた。CYP1A2のmRNA発現は肝、脾、前立腺で認められた。対照におけるAhレセプターの発現は肝、前立腺で認められた。CYP1A2およびAhレセプターmRNA発現が精巣では認められず、前立腺でのみ認められたことは、生殖腺へのダイオキシン毒性の観点から興味深い。

Expression of dioxin-related genes in response to 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in various tissues of male and female Long Evans rats

Junzo YONEMOTO, Nihar R. JANA, Shubhashish SARKAR, Chiharu TOHYAMA\* and Hideko SONE

Regional Environment Division, \*Environmental Health Division, National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Ibaraki-3050053, Japan.



## ジニトロフェノール系化学物質のラットにおける雄性生殖毒性

○高橋研, 北條仁, 青山博昭, 寺本昭二

財団法人残留農薬研究所 毒性部

〔目的〕 Dinitrophenol系化学物質4,6-dinitro-o-cresol (DNOC) は, ラット精巣より分離したセルトリ・生殖細胞共培養系に対して, 構造的に類縁の精巣毒性物質2-sec-butyl-4,6-dinitrophenol (DNBP) と同様の障害作用を現すことを第24回本学会学術年会で報告したが, *in vivo*における雄性生殖毒性については明らかにされていない。今回我々は, DNOCを雄ラットに投与して精子形成に及ぼす影響を検討し, DNBPの精巣毒性と比較を行ったので報告する。

〔材料および方法〕 0, 4, 7.5, 15 mg/kgのDNOC, あるいは7.5 mg/kgのDNBPをコーンオイル (5 ml/kg) に溶解し, 各群12匹のJcl:SD雄ラットに5日間連続強制経口投与した。投与後3日と14日に動物を安楽死させ, 精巣, 精巣上体, 精囊および前立腺の重量を測定し, 病理組織学的に検査した。右側の精巣上体については頭部と尾部精子の数を数えた。尾部精子については, 形態と運動性の検査も行った。

〔結果および考察〕 15 mg/kg DNOC投与群とDNBP投与群で, 投与中にそれぞれ5匹および1匹の動物が死亡した。投与後3日の検査ではいずれの群の動物にも異常は認められなかったが, 被験物質に暴露された精子細胞が精巣上体尾部に移動する投与後14日の検査では, 15 mg/kg DNOCとDNBP投与群に精巣上体重量の低下, 尾部精子の運動性の低下と形態異常 (主に尾の離断) の増加が認められた。精巣の組織学的検査では, いずれの群にも精子形成の異常は認められず, 精祖細胞や精母細胞に対する障害作用は検出されなかった。以上の結果から, DNOCはDNBPと同様に, 精子細胞以降の精子完成過程を障害することにより, 精子の形態および運動性に影響を現すことが示唆された。

Acute Testicular Toxicities of 4,6-Dinitro-o-cresol and 2-sec-Butyl-4,6-dinitrophenol in Rats.

Ken TAKAHASHI, Hitoshi HOJO, Hiroaki AOYAMA and Shoji TERAMOTO, Toxicology Division, Institute of Environmental Toxicology, Ibaraki 303-0043, Japan

## 加齢 Fisher344 ラットにおける精巣間細胞腫の発現機序について

○二村芳弘、浜田悦昌、柿沼千早、中村正樹、澁谷靖義

持田製薬株式会社 安全性研究所

〔目的〕加齢 Fisher344 ラットでは精巣間細胞腫の発生が知られている。一方、Sprague-Dawley (SD) ラットでは精巣間細胞腫の自然発生は稀である。今回、両系統ラットより分離した精巣間細胞の性質を比較し、Fisher344 ラットの精巣間細胞腫発現の機序解明を試みた。

〔方法〕6, 12, 18 および 24 カ月齢の Crj:Fisher344 ラット (SPF) ならびに 6, 12 および 24 カ月齢の Crj:SD ラット (SPF) より麻酔下で血液を採取し、放血致死後、精巣を摘出した。重量測定後、酵素処理およびフィコール遠心分離により間細胞を分離した。血中テストステロン量および LH 量 (時間分解蛍光測定法)、得られた間細胞の DNA 含量および Ca 量 (蛍光法)、 $17\beta$ -および  $3\beta$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素 (HSD) 活性値 (比色法)、細胞内情報伝達経路ならびに LH 受容体量、LHRH 受容体量および発癌遺伝子量 (時間分解蛍光測定法) を測定した。さらに、間細胞を 5%炭酸ガス下で 2 時間培養し、テストステロン産生量、 $17\beta$ -および  $3\beta$ -HSD 活性値ならびに  $5'$ -bromodeoxyuridine (BrdU) 取込み量 (時間分解蛍光測定法) を求めた。

〔結果〕Fisher344 ラットでは 6 カ月齢に比して 18 および 24 カ月齢で精巣重量の増加がみられ、かつ、12 カ月齢以上で精巣間細胞の LH 受容体量の増加および  $17\beta$ -HSD 活性値の低下、18 カ月齢以上で LHRH 受容体量、cAMP 量、PKA 活性値および発癌遺伝子量の増加ならびに  $3\beta$ -HSD 活性値の低下が認められた。加えて、12 カ月齢以上でテストステロン産生量の減少、18 カ月齢以上で  $17\beta$ -および  $3\beta$ -HSD 活性値の低下および BrdU 取込み量の増加が認められた。また、24 カ月齢の血中テストステロン量および LH 量の減少が認められた。一方、SD ラットでは精巣の重量および精巣間細胞の性質に加齢に伴う変化は認められなかった。

〔結論〕加齢 Fisher344 ラットでは下垂体の LH 産生の低下による間細胞 LH 受容体の増加ならびに間細胞の  $17\beta$ -HSD 活性の低下が間細胞腫発生の引き金となる可能性が示唆された。

A possible mechanism for development of Leydig cell tumors in aging Fisher 344 rats.

Yoshihiro FUTAMURA, Yoshimasa HAMADA, Chihaya KAKINUMA, Masaki NAKAMURA and Yasunori SHIBUTANI. Toxicology Laboratory, Mochida Pharmaceutical Co., Ltd., 342 Gensuké, Fujieda, Shizuoka 426-8640, Japan.

精子検査における Crj:CD(SD)IGS、Jcl:Wistar 及び F344/DuCrj ラットでの系統差

○松本 清、松本始緒里、鮫島顕二、大島洋次郎

武田薬品工業株式会社・医薬開発本部・薬剤安全性研究所

精子検査は薬物投与により生じた生殖能への影響を解析するための手段として有用であり、そのための使用動物種・系統における基礎データの収集は重要である。今回、無処置の Crj:CD(SD)IGS(19~21 週齢)、Jcl:Wistar(19~20 週齢)及び F344/DuCrj(15~17 週齢)ラットの各 50 例について精巣上体精子の形態観察(頭部、体部及び尾部の精子)及び精子自動解析装置 Cellsoft4000 による精子運動能解析(精巣上体尾部の精子)を実施し、系統差を調べたので報告する。

精子の形態観察では、Jcl:Wistar 及び F344/DuCrj において精巣上体頭部、体部及び尾部の平均の形態異常率が両系統共それぞれ 1.7、1.4 及び 1.6%であった。主な異常の型は no head 及び amorphous であり、異常の頻度及び型共に精巣上体の部位による差はみられなかった。Crj:CD(SD)IGS では、精巣上体頭部、体部及び尾部でそれぞれ 5.4、5.0 及び 14.2%と他の 2 系統に比べ高値であり、特に尾部にのみ no head が高率に観察される個体がみられた。

Cell soft4000 による精子運動能解析では、Crj:CD(SD)IGS の motility が  $68.3 \pm 26.6\%$  であり Jcl:Wistar 及び F344/DuCrj のそれぞれ  $80.8 \pm 11.6\%$  及び  $83.3 \pm 9.4\%$  に比べ低く、個体間のばらつきも大きかった。curvilinear velocity( $\mu$  m/s)、straight line velocity( $\mu$  m/s)、linearity、beat/cross frequency(Hz)、A.L.H.( $\mu$  m) に関しては、3 系統で大きな差はみられなかったが、いずれのパラメータにおいても Crj:CD(SD)IGS では他の 2 系統に比べ個体間のばらつきが大きい傾向がみられた。

更に、これら全例について精巣の PAS 染色標本による精子形成ステージを考慮した組織学的観察を実施しているのであわせて報告する。

Strain Difference in sperm examination in Crj:CD(SD)IGS, Jcl:Wistar and F344/DuCrj rats.

Kiyoshi MATSUMOMO, Shiori MATSUMOTO, Kenji SAMEJIMA and Yojiro OOSHIMA, Drug Safety Research Laboratories, Pharmaceutical Division, Takeda Chemical Industries, LTD., Oosaka 532, Japan.

## LC-MS/MSを用いた血中薬物と臨床検査パラメータの同時定量

○井川 猛, 茅野理也, 畑 律子, 林 俊英

株式会社イナリサーチ

〔目的〕 LC-MS/MSは分子量さえ特定できれば複数の化合物について、同時に高感度で定量できるという特徴を持っている。今回我々はこの装置の特徴を応用し、動物実験において、投与された薬物の血中濃度とビリルビンやクレアチニン等の臨床検査パラメータを同時に定量できるような測定系を開発した。

〔方法〕 薬物血中濃度測定のためのモデル薬物としてアセトアミノフェンを用い、ラットに投薬後、経時的に採血を行い血漿を得た。得られた血漿をアセトニトリルで除蛋白した液をMSのポジティブ系にかかるようにアセトニトリル：10mM酢酸アンモニウム（1：1）混液に溶解しサンプルとした。アセトアミノフェンはparent ion:159.9m/z, daughter ion:109.9m/z, クレアチニンはparent ion:114.0m/z, daughter ion:43.7m/z, ビリルビンはparent ion:585.2m/z, daughter ion:299.2m/zのMultiple Reaction Monitoring法でMS/MS分析を行った。

〔結果〕 今回の系では被験物質であるアセトアミノフェンについては定量限界3 $\mu$ g/mLで分析が可能であった。ビリルビンについては0.02mg/dl, クレアチニンについては0.01mg/dlまで測定が可能であった。また測定値はビリルビンはアルカリアゾ法, クレアチニンに関しては酵素法とほぼ同様の値が得られた。

〔結論〕 今回の分析系は、投与した被験物質の血中濃度の時間的経過を追うことと同時に、わずかな血液量で肝臓障害の指標となるビリルビン、腎臓障害の指標となるクレアチニンを測定できることから、トキシコキネティクスなどで求められている「暴露と毒性試験の時間経過の検討」「薬物暴露の毒性試験との関連づけ」において有用であると考えられる。

Simultaneous analysis of blood drug concentrations and blood chemistry parameters using LC-MS/MS.

Takeshi IGAWA, Masaya CHINO, Ritsuko HATA, Toshihide HAYASHI  
Ina Research Inc.

DDT単回経口投与試験（ラット）における血漿、肝臓、脳中のDDTおよび代謝物の分析法ならびに濃度推移

○富山成人，辻 洋美，渡辺茂美子，武田眞記夫，原田孝則，小林裕子

財団法人 残留農薬研究所

【目的】 DDTは、効果の高い殺虫剤として開発されたが、肝毒性および肝発癌性があり、近年世界的に注目を集めている内分泌攪乱物質のひとつともされている。DDTの分析法は、従来CG（ECD）法が主であり、バリデートされた方法として生体試料の分析に用いることは種々の点で困難である。今回、ラットにおける血漿、肝臓、脳中のDDTおよび代謝物について固相抽出カラムを用いたHPLC法を確立し、バリデーションを試みた。また、本分析法をラット単回経口投与試験における血漿、肝臓、脳中の定量に応用し、その濃度推移と臨床症状等の関連についても検討した。

【方法】 分析法としては、各試料をC18ミニカラムで抽出し、フロリジルミニカラムで精製した後、HPLC（UV）を用いて定量した。バリデーションは、正確度、精密度で規定し、項目としては、選択性、検出限界、直線性、抽出率、定量限界、再現性（日内、日間変動）、希釈試験、安定性（分析操作条件下、保存条件下）で行った。バリデートした分析法を用いて、DDTを1000 ppm単回強制経口投与したラットについて、血漿、肝臓、脳中のDDTおよび代謝物濃度を経時的に定量した。

【結果】 今回確立したHPLC（UV）法は、感度変化が軽微で定量範囲も広域にわたり、良好な直線性が得られた。また、固相ミニカラムの使用により、分析法の簡便化および使用溶媒量の削減が可能であった。本分析法は、設定した各バリデーション項目について、血漿、肝臓、脳試料においてそれぞれ良好な正確度、精密度および再現性等を確保することができた。DDT単回経口投与試験において、DDT濃度は投与8時間後に血漿、肝臓、脳中で最高値に達し、これは臨床症状として投与8時間後から痙攣が観察された結果とほぼ一致した。

Analytical Method for Determination of DDT and Its Metabolite in Rat Plasma, Liver and Brain, and Their Concentrations through Single Oral Administration.

Naruto TOMIYAMA, Hiromi TSUJI, Momiko WATANABE, Makio TAKEDA, Takanori HARADA, and Hiroko KOBAYASHI. Institute of Environmental Toxicology, Ibaraki 303-0043, Japan

単回経口投与後の薬物動態に基づく混餌投与中の血漿中濃度時間推移の予測：DDTのラットにおけるトキシコキネティクス試験をモデルとして

○渡辺茂美子、富山成人、小林裕子、武田眞記夫、原田孝則

財団法人 残留農薬研究所

混餌投与法による TK 試験における適切な採取時期の設定や暴露レベルの予測に資するため、単回経口投与で得られた薬物動態学的パラメーターから混餌投与の血中濃度時間曲線の推移を予測する方法を検討した。混餌投与法を体重や摂餌パターンに従って経時的に変化する用量を以って反復経口投与したと見做し、混餌投与における血中濃度の予測に重ね合わせの原理を適用して、単回経口投与の薬物動態パラメータに基づき Excel®を用いて血漿中濃度を予測した。予測結果の適合性について、DDT (*p,p'*-Dichlorodiphenyltrichloroethane)の5-6週齢 F344 雄ラットにおける TK 試験を実施して検討した。加えて、肝の CYP2B1 含量と connexin32 (Cx32) スポット数を経時的に測定し、全身および肝臓内薬物暴露量との関連性を検討した。DDT 106 mg/kg (50%LD<sub>50</sub>)を単回経口投与後 192 時間まで血漿中 DDT 濃度を測定し、薬物動態パラメータを求めた。これに基づき、50, 160, 500, 1000 ppm の DDT 調製飼料を雄ラットに最長 4 週間自由摂取させた場合の血漿中 DDT 濃度の予測を行った。DDT 血漿中濃度を実測し予測適合性を確認した。単回経口投与後の血中 DDT 動態は  $t_{1/2\alpha}$ , 1.5 hr の一次吸収過程と 2 相の消失過程( $t_{1/2\alpha}$ , 9.5hr;  $t_{1/2\beta}$ , 76.8 hr) をもつ 2 コンパートメントモデルに従うことが推定された。これより混餌投与の血漿中 DDT 濃度時間曲線を予測した結果、午前 9 時付近の濃度は定常状態の平均血漿中濃度に相当し、午前 3~5 時にピークに、午後 5 時にトラフレベルにあると推測された。投与 1 週間は実測 DDT 濃度と予測レベルは一致し、予測の妥当性が確認された。投与開始 2 週間後以降、160 ppm 以上で血漿・肝臓内 DDT 濃度の低下が認められた。肝 CYP2B1 誘導と肝細胞傷害性の指標としての Cx32 数減少は、血漿・肝臓内薬物濃度の経時変化に相応し、AUC 依存性が認められた。

Prediction of plasma concentration-time profiles in feeding study from the data on single oral administration : Application to toxicokinetic study of DDT in F344 male rats

Momiko WATANABE, Naruto TOMIYAMA, Hiroko KOBAYASHI, Makio TAKEDA, Takanori HARADA, Institute of Environmental Toxicology, Ibaraki 303-0043, Japan

Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) の5-(2-bromovinyl)uracil (BVU)による自殺阻害機構：BVUによるDPD修飾部位の決定

○小倉健一郎<sup>1)</sup>、奥田晴宏<sup>1)</sup>、荒川和人<sup>2)</sup>、福島正和<sup>2)</sup>、渡部 烈<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>東京薬科大学・薬学部・第二衛生化学教室、<sup>2)</sup>大鵬薬品工業株式会社創薬センター

**【目的】** ソリブジン (SRV) 薬害として知られる抗ウイルス薬 SRV と 5-FU 系抗癌薬の併用により発生した致死的医薬品相互作用は、5-FU の代謝律速酵素である dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) が SRV から腸内細菌により生成する 5-(2-bromovinyl)uracil (BVU) により共有結合的に修飾され、不活性化されるために 5-FU の生体濃度が異常に上昇したためであることを、既に我々はラットを用いたトキシコキネティクス研究ならびに精製 DPD を用いた阻害実験により明らかにした。本研究では、ヒト DPD (hDPD) を用いて BVU による阻害機構と修飾部位を明らかにすることを目的とした。

**【方法】** 大腸菌発現 hDPD を NADPH 共存下、<sup>14</sup>C]BVU とインキュベートして得た放射能標識 hDPD を trypsin により限定分解し、得られた放射能標識ペプチドのアミノ酸配列決定を行った。変異 hDPD (C671S) は部位特異的変異法により作製した。

**【結果・考察】** 発現 hDPD は NADPH 共存下 <sup>14</sup>C]BVU とインキュベートすると放射能により修飾された。放射能標識 hDPD の限定分解により得られた放射性ペプチドを HPLC により精製し、N-末端アミノ酸配列を測定した結果、このペプチドの配列は DPD の pyrimidine-binding domain と一致しており、その配列中の <sup>67</sup>Cys が解析不能であったことからこの残基が修飾されていることが強く示唆された。そこで、この <sup>67</sup>Cys を Ser に置換した hDPD (C671S) を大腸菌中に発現させ、精製した酵素標品を用いて BVU による阻害実験を行った結果、hDPD (C671S) は 5-FU 還元活性を示したが BVU によっては全く阻害されなかった。以上の結果から、hDPD の BVU による不活性化は、hDPD によって BVU から生成する活性代謝物により hDPD の <sup>67</sup>Cys が共有結合的に修飾され、失活する自殺阻害反応に起因することが強く示唆された。

Suicidal inactivation of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) by 5-(2-bromovinyl)uracil (BVU): determination of the amino acid residue modified by BVU

Kenichiro OGURA<sup>1)</sup>, Haruhiro OKUDA<sup>1)</sup>, Kazuhito ARAKAWA<sup>2)</sup>, Masakazu FUKUSHIMA<sup>2)</sup> and Tadashi WATABE<sup>1)</sup>. <sup>1)</sup>Dept. of Drug Metab. Mol. Toxicol., School of Pharm., Tokyo Univ. Pharm. Life Sci., Tokyo 192-03, Japan, <sup>2)</sup>Hanno Res. Center, Taiho Pharmaceu. Co. Ltd., Saitama 357, Japan.

ヒトCYP2B6とヒトNADPH-P450還元酵素を同時に発現する大腸菌の  
開発

○藤田健一, 森牧子, 鈴木昭浩, 串田浩孝, 鎌滝哲也

北大薬学部・代謝分析

【目的】ヒトCYP2B6は、抗がん薬シクロホスファミドや6-アミノクリセンなどのがん原物質の代謝的活性化に関与することが知られているが、特異的な基質や阻害剤が明かにされておらず、毒性学的な意義の解明は進んでいないのが現状である。そこで本研究では大腸菌にヒトCYP2B6とCYPに対する電子伝達の役割を担うNADPH-P450還元酵素(OR)とを同時に発現させ、その菌体を用いて簡便に毒性学的意義の検討が可能な系を開発することを目的とした。

【方法】CYP2B6およびORのcDNAをヒト肝総RNAよりRT-PCR法にて単離した。大腸菌にて高い発現レベルを達成するために、従来の報告を参考にしてCYP2B6 cDNAのアミノ酸のN-末端部をコードする部分をPCRによる変異導入法により改変し、発現ベクターpCWに組み込んだ。OR cDNAは改変せずに組み込んだ。構築したベクターを大腸菌DH5 $\alpha$ 株に導入した。CYPの発現をCO差スペクトルにより確認した。また、ORの発現を1分あたりのチトクロームcの還元速度により確認した。7-エトキシマリンの脱エチル化反応により発現したCYP2B6の酵素活性を確認した。

【結果と考察】pH5.8の培地を用い、誘導剤イソプロピル- $\beta$ D(-)-チオガラクトピラノシドの添加後36h培養した場合にCYP2B6の発現レベルは最大であった。CO差スペクトルにより算出したCYP2B6の発現レベルは103.6 nmol/L cultureであった。この時点におけるORの発現レベルは964 units/L cultureであった。また発現したCYP2B6は7-エトキシマリンの脱エチル化酵素活性を有し、そのレベルはリンバ芽球細胞を用いたCYP2B6発現系の約2.1倍であった。この大腸菌発現系はCYP2B6の毒性学的な意義の検討に有用であると考えられる。

Establishment of Genetically Engineered *E. coli* Co-expressing Human CYP2B6 and NADPH-P450 Reductase.

Ken-ichi FUJITA, Makiko MORI, Akihiro SUZUKI, Takahiro KUSHIDA and Tetsuya KAMATAKI. Div. of Drug Metab., Hokkaido Univ., Japan.



## DNAのメチル化によるウサギCYP1A1の発現抑制機構

○高橋 芳樹、鈴木 千華、鎌滝 哲也

北海道大学薬学部代謝分析学講座

【目的】CYP1A1はベンゾ[*a*]ピレンの代謝的活性化に関与し、ダイオキシンや3-メチルコランズレン(MC)などの芳香族炭化水素(Ah)によってその発現が誘導される。しかし、MCによるCYP1A1の発現には組織特異性がありウサギの腎臓ではCYP1A1の発現が誘導されるが、肺ではほとんど誘導されない。このようなCYP1A1の発現抑制は、Ahに対する発がん感受性の低下を引き起こし毒性学的に重要である。そこで本研究では、ウサギ肺由来の細胞に見られるCYP1A1の発現抑制機構の解明を目的とした。

【方法・結果】ウサギ腎臓由来のRK13細胞および肺由来のR9ab細胞についてメチルコランズレン(MC)によるCYP1A1 mRNAの発現をS1マッピング法により解析した。その結果、RK13細胞ではCYP1A1 mRNAの誘導的発現が認められたが、R9ab細胞では全く検出されなかった。一方、CYP1A1の誘導的発現を仲介するAhリセプター(AhR)やArnt mRNAの発現レベルには両細胞間で差が認められなかった。このことから、CYP1A1の発現抑制の原因は、転写因子の側ではなく遺伝子の側にあると考えられた。そこで我々は、ウサギCYP1A1遺伝子の5'-上流領域に見られるXREの配列中にメチル化を受ける可能性のあるCpG配列が存在していることに注目し、XREのメチル化による誘導抑制の可能性について検証した。まず、DNAの脱メチル化剤である5-aza-2'-deoxycytidine存在下で培養した後、MCによるCYP1A1 mRNAの発現を調べた。その結果、Ahに非応答性のR9ab細胞についてもMC存在下でCYP1A1 mRNAの発現が認められ、CYP1A1の発現抑制にDNAのメチル化が関与していることが分かった。そこで、亜硫酸ナトリウムによる脱アミノ反応とPCRを組み合わせた方法によりXREのコア配列中に見られるCpGのメチル化の状態を解析したところ、RK13細胞ではXREがほとんどメチル化されていないのに対し、R9ab細胞では高度にメチル化されていることが分かった。さらに、ゲルシフトアッセイによりAhR/Arnt複合体はメチル化されたXREに結合できないことも分かった。以上の結果から、ウサギ肺におけるCYP1A1遺伝子の発現抑制にXREのメチル化が関与し、芳香族炭化水素に対する発がん感受性を調節している可能性が推測された。

## Silencing of CYP1A1 Expression in Rabbits by a DNA Methylation.

Yoshiki TAKAHASHI, Chiharu SUZUKI and Tetsuya KAMATAKI  
Division of Drug Metabolism, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University

発癌物質による臓器特異的な変異の誘発とその経時変化  
 - JEMS/MMS 研究会共同研究のまとめ -

トランスジェニックマウス変異原性試験研究グループ

世話人 ○伊東悟<sup>1)</sup>、鈴木孝昌<sup>2)</sup>、中嶋圓<sup>3)</sup>、蜂谷紀之<sup>4)</sup>、原巧<sup>5)</sup>

1) 第一製薬(株)、2) 国立衛研、3) (財)安評センター、4) 秋田大学、  
 5) (財)食薬センター

トランスジェニックマウス変異原性試験研究グループは、第1回目の共同研究として ethylnitrosourea による臓器特異的な変異の誘発について報告し (Environ. Mol. Mutagen., 28, 363-375, 1996)、トランスジェニックマウスを用いる変異原性試験の有用性を示した。今回は、5つの既知発癌物質 (procarbazine, PCZ; propyl nitrosourea, PNU; 4NQO; DMBA; dipropylnitrosamine, DPN) を用いて、変異誘発の臓器特異性と変異の経時変化に関して24機関の参加により検討した。

【方法】Muta<sup>1</sup>Mouse に各化合物を小核の誘発用量あるいは予備的な検討結果を基に単回腹腔内投与し、投与後7日、14日、28日目に各種臓器を採取した。対象とする臓器は、骨髄、肝臓、精巣については全化合物共通とし、他に腎臓、肺、大腸などを追加して、化合物当たり5臓器以上について、positive selection 法により検討した。また、染色体異常誘発性についても検討するために、末梢血を用いる小核試験も同時に行った。

【結果】小核試験では、DPN以外の化合物において、顕著な小核の誘発が認められた。一方、lacZ 遺伝子の変異頻度は、PNU, DMBA, DPNにおいて複数の臓器で上昇していた。4NQOの腹腔内投与では、発癌標的臓器である肺でのみ陽性であったが、経口投与では複数の臓器で陽性となった。PCZでは陽性となる臓器が認められなかったため、投与量を増やして5日間の連続投与を行ったところ、発癌標的臓器である肺を含めた複数の臓器で陽性の結果が得られた。変異誘発の経時変化については、肝臓および精巣では28日目にかけて上昇していく傾向が認められたが、骨髄での変異の発現は早く、その後一定か経時的に減少する傾向も認められた。

Time-course Variations and Organ Specificity of Five Carcinogens Induced Mutagenesis in Muta<sup>1</sup>Mouse: Results of the 2nd Collaborative Study on the Transgenic Mutation Assay by JEMS/MMS

Satoru ITOH<sup>1)</sup>, Takayoshi SUZUKI<sup>2)</sup>, Madoka NAKAJIMA<sup>3)</sup>, Noriyuki HACHIYA<sup>4)</sup> and Takumi HARA<sup>5)</sup>. <sup>1)</sup>Daiichi Pharmaceutical <sup>2)</sup>NIHS <sup>3)</sup>Biosafety research Center <sup>4)</sup>Akita University <sup>5)</sup>Food and Drug Safety Center

キノリンの *in vivo* 突然変異誘発性とその抗変異原性  
構造修飾

○佐伯憲一<sup>1</sup>、宮田裕子<sup>1</sup>、川添 豊<sup>1</sup>、鈴木孝昌<sup>2</sup>、  
林 真<sup>2</sup>、祖父尼俊雄<sup>2</sup>

<sup>1</sup>名市大・薬、<sup>2</sup>国立衛研・変異遺伝

キノリン(Q)はラット及びマウスに対し肝発癌性を有し、サルモネラ菌に対し変異原性を示す。一方、Ashbyらはrat *in vivo* UDS試験が陰性であったことからキノリンが non-genotoxic carcinogen であると報告している。そこで我々は、キノリンの *in vivo* 突然変異誘発性について Muta™Mouse を用いて検討した結果、肝臓においてのみ約4倍の変異頻度の増加が見られ、その変異スペクトルは88%がG to C transversionであることを明らかにした。この結果より、キノリンによる肝発癌は *in vivo* における肝細胞DNAに対する遺伝子傷害に起因するものであることが強く示唆されたほか、その遺伝子傷害は主にGあるいはCへの付加体形成であることが示唆された。一方我々は、キノリンへのフッ素置換による遺伝子傷害性への影響についても検討し、3位フッ素置換(3-FQ)によりキノリンの変異原性(Ames test)及び前癌病変誘発性(rat)が何れも消失することを明らかにしている。そこで、これらフッ素置換キノリンの *in vivo* 突然変異誘発性について Muta™Mouse を用いて検討した。方法は、一群5匹の9週齢雄性 Muta™Mouse にQ, 3-FQ, 5-FQを50 mg/kgで4日間連続 i.p. 投与し、最終投与後14日目の肝臓のDNAより lacZ 遺伝子を packaging 法により回収し、GalE 法による positive selection により変異頻度(MF)を算出した。その結果、Q及び5-FQ投与群では、いずれも陰性対照群の4倍から5倍のMFの上昇が見られたのに対し、3-FQ投与群では陰性対照群レベルであった。これにより、3位フッ素置換はキノリンの抗変異原性構造修飾として有効であることが *in vivo* においても示された。

Antimutagenic structural modification of quinoline assessed by an *in vivo* mutagenesis.

Ken-ichi SAEKI<sup>1</sup>, Yuko MIYATA<sup>1</sup>, Yutaka KAWAZOE<sup>1</sup>, Takayoshi SUZUKI<sup>2</sup>, Makoto HAYASHI<sup>2</sup>, Toshio SOFUNI<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Fac. Pharm. Sci., Nagoya City Univ., <sup>2</sup> Div. Genet. Mutagen., Natl. Inst. Health Sci.

変異原性試験用トランスジェニックマウスを用いた発癌性評価  
—その有用性と問題点について—

○羽倉昌志、園田二郎、筒井美枝、見上 孝、築館一男

エーザイ（株）安全性研究所

【目的】トランスジェニックマウスを用いた *in vivo* 変異原性検出系は、化学物質による遺伝子突然変異を臓器特異的に検出する有用な系であることが一般的に認識されるようになってきた。しかしながら、本試験系の発癌性予測試験としての有用性と問題点についてはいまだ十分には理解されていない。このため、化学物質によって各臓器に引き起こされた突然変異の強さと発癌標的・非標的臓器との関係を比較検討した。

【方法】8週令雄性 Muta™Mouse に Benzo[a]pyrene (BP) の 125 mg/kg を5日間経口投与し、最終投与後2週目(14日目)および26週目に、各臓器における *lacZ* 導入遺伝子上の突然変異頻度を Positive selection 法を用いて調べた。一方、発癌性はBPを Muta™Mouse に75および125 mg/kgの投与量で5日間経口投与し、最終投与後41週目で剖検し、各臓器について病理学的検査を実施した。

【結果および考察】BPの発癌性試験の結果、腫瘍標的臓器は前胃、脾臓、肺であった。一方、BP最終投与後2週目で変異頻度の高かった臓器は順に、大腸>小腸、前胃>骨髄、脾臓>腺胃>肝臓、肺>腎臓、心臓であり、脳には変異が起きていなかった。さらに、BP発癌の後期段階である最終投与後26週目においても、調べた6臓器の全てに突然変異が観察され、変異頻度の高かった臓器の順に、大腸>前胃>脾臓>肺、肝臓、腺胃であった。以上の結果から、*lacZ* 遺伝子を reporter gene にもつ Muta™Mouse は *in vivo* 突然変異を臓器特異的に検出できるという有用性があるものの、発癌標的臓器・非標的臓器を各臓器における突然変異の有無および強さからは予測することは困難であることが示唆された。

Estimation of cancer risk from somatic mutation assays

Atsushi HAKURA, Jiro SONODA, Yoshie TSUTSUI, Takashi MIKAMI and Kazuo TSUKIDATE. Drug Safety Research Laboratories, Eisai Co., Ltd., Ibaraki-300-26, Japan.

新しいトランスジェニックマウス *gpt*Δの開発

○増村健一、能美健彦

国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部

動物個体内で起こる様々なタイプの突然変異（塩基置換、フレームシフト、欠失変異）を簡便に検出し分子レベルで解析するうえで、トランスジェニックマウスは有用である。しかし既存のトランスジェニックマウスを用いる突然変異試験は、変異体の検出や変異部位の同定に要する労力や費用が大きいという欠点を持っている。我々は、これらの点を改善するために新しいトランスジェニックマウス *gpt*Δを作製した。

このマウスは、大腸菌 *gpt* 遺伝子をレポーターとする 6-TG selection により点突然変異（塩基置換とフレームシフト）を、入芽因子 *redI/gam* 遺伝子をレポーターとする Spi<sup>r</sup> selection により欠失変異を選択的にポジティブセレクションするという特徴を持っている。得られた変異クローンからは、PCR 法と DNA シークエンシングにより変異部位の解析が可能である。

*gpt*Δマウスをエチルニトロソウレア（ENU 150 mg/kg、単回腹腔投与、7日後に屠殺）で処理すると、骨髄の *gpt* Mutant Frequency は無処理マウスに比べ約 4 倍に上昇した。*gpt* 遺伝子上の変異部位を同定したところ ENU 処理群で A:T→T:A のトランスバージョンが顕著に増大していた。一方、マウスをガンマー線照射すると脾臓の Spi<sup>r</sup> Mutant Frequency は顕著に増大し、変異体からは 1 bp～約 10 k bp の欠失変異が同定された。

以上の結果から、このトランスジェニックマウスは個体における点突然変異と欠失突然変異の検出および分子レベルの解析に有効であることが示された。

*gpt* delta Transgenic Mouse Mutagenesis Test System.

Ken-ichi MASUMURA and Takehiko NOHMI.

Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences

10種類のヒトチトクロームP450とNADPH-チトクロームP450還元酵素のサルモネラ菌同時発現系の構築

○中山佳都夫<sup>1</sup>、串田浩孝<sup>1</sup>、岩田宏<sup>1</sup>、鈴木昭浩<sup>1</sup>、山折大<sup>1</sup>、藤田健一<sup>1</sup>、山田雅巳<sup>2</sup>、能美健彦<sup>2</sup>、鎌滝哲也<sup>1</sup>

<sup>1</sup>北海道大・薬・代謝分析、<sup>2</sup>国立衛研・変異遺伝

〔目的〕我々はこれまでに大腸菌におけるヒトチトクロームP450（P450あるいはCYP）発現系を開発し、その有用性を示してきた。今回は更に、薬物代謝および毒性学的研究のいずれにも有用なヒトP450発現系を構築するために、ヒトP450とNADPH-チトクロームP450還元酵素を同時に発現するサルモネラ菌を樹立することを目的とした。

〔方法〕ヒトP450（CYP1A1、CYP1A2、CYP2A6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4、CYP3A5）とNADPH-チトクロームP450還元酵素cDNAを組み込んだ同時発現プラスミドをサルモネラ菌に導入し、それぞれのP450分子種のサルモネラ菌同時発現系を構築した。がん原性ニトロソアミンなどのアルキル化剤に高感受性を示し、変異原性試験にも有用な菌株を作成するためO<sup>6</sup>-メチルグアニンDNAメチルトランスフェラーゼを欠損するサルモネラ菌株YG7108を用いた。それぞれのP450分子種について培養温度、時間、培地のpHなどの条件を検討した。続いて、発現酵素の活性をそれぞれのP450分子種の基質を用いて検討した。

〔結果〕10種類のヒトP450同時発現サルモネラ菌の樹立に成功した。ヒトP450の発現量はそれぞれの分子種について、最大発現条件下で65から503 nmol/liter cultureの範囲であった。また、発現酵素の活性を検討した結果、サルモネラ菌whole cellの状態それぞれのP450分子種の基質に対して触媒活性を示した。

したがって、樹立したサルモネラ菌同時発現系は薬物代謝研究に加えて、変異原性試験などの毒性学的研究への応用も期待できる非常に有用な系であると考えられる。

Establishment of *Salmonella* Tester Strain Co-expressing Cytochrome P450 and NADPH-cytochrome P450 Reductase.

Kazuo NAKAYAMA<sup>1</sup>, Hirota KUSHIDA<sup>1</sup>, Hiroshi IWATA<sup>1</sup>, Akihiro SUZUKI<sup>1</sup>, Satoshi YAMAORI<sup>1</sup>, Ken-ichi FUJITA<sup>1</sup>, Masami YAMADA<sup>2</sup>, Takehiko NOHMI<sup>2</sup> and Tetsuya KAMATAKI<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Fac. of Pharmaceut. Sci., Hokkaido Univ., <sup>2</sup>NIHS, Japan.

アフラトキシンB<sub>1</sub> 活性中間体エポキシドの加水分解におけるラット  
及びヒトエポキシド水解酵素の役割

○山崎浩史, W.W. Johnson, Y.-F. Ueng, F. Peter Guengerich,  
島田 力

大阪府立公衆衛生研究所, Vanderbilt Univ. Sch. Med.

【目 的】アフラトキシンB<sub>1</sub>の代謝的活性化機構は、主にチトクロームP450酵素(CYP又はP450)によって生成される8,9-エポキシドのDNA結合とされている。一方、活性エポキシドの解毒化については、エポキシド水解酵素やグルタチオン転移酵素の関与が予想されている。東アジアのアフラトキシンB<sub>1</sub>の汚染地域では、ヒト肝癌との因果関係が疑われており、肝癌患者ではエポキシド水解酵素の変異頻度が高く、血清中アフラトキシンB<sub>1</sub>-アルブミン付加体量が多いことも報告されている。本研究ではアフラトキシンB<sub>1</sub> 8,9-エポキシドの加水分解におけるラット及びヒトエポキシド水解酵素の影響をin vitroで調べることを目的とした。

【方 法】ヒト及びラットの遺伝子発現又は肝より精製したエポキシド水解酵素を用い、stopped-flow装置によりアフラトキシンB<sub>1</sub> 8,9-エポキシドの加水分解反応速度を測定した。アフラトキシンB<sub>1</sub>の代謝物及び遺伝毒性はHPLC法及びサルモネラTA1535/pSK1002株を用いるumu法により調べた。

【結果及び考察】アフラトキシンB<sub>1</sub>はヒトCYP3A4によりexo体に変換されたが、CYP1A2によるエポキシド生成物はendo及びexo体であった。アフラトキシンB<sub>1</sub> 8,9-エポキシドはexo体に極めて高い直接DNA傷害性が認められた。水中で不安定であるアフラトキシンB<sub>1</sub> exo-8,9-エポキシドの加水分解反応は、エポキシド水解酵素によって自然分解速度の約22%が促進された。CYP3A4によるアフラトキシンB<sub>1</sub>の代謝的活性化反応は、P450に対して約50倍量のエポキシド水解酵素存在下に抑制された。以上の結果から、アフラトキシンB<sub>1</sub>代謝の解毒過程におけるエポキシド水解酵素による活性中間体の加水分解の役割は大きくないことが推測された。

Roles of rat and human epoxide hydrolase in hydrolysis of aflatoxin B<sub>1</sub> 8,9-epoxide

Hiroshi YAMAZAKI, W.W. JOHNSON, Y.-F. UENG, F. Peter GUENGERICH, and Tsutomu SHIMADA. Osaka Pref. Inst. Public Health, Osaka 537, Japan, and Vanderbilt Univ., Nashville, TN 37232, USA.

ベンゾチアゾール誘導体によるラット肝毒性発現機序の解明 1) 抱合酵素の関与について

○佐藤 玄, 青木 豊彦, 細川 暁, 佐神 文郎

エーザイ株式会社 安全性研究所

〔目的〕ベンゾチアゾール誘導体の一種である E2011 は, Monoamine oxidase (MAO) type A に選択的な MAO 阻害作用を有している。本試験は, ラットにおける E2011 の反復投与毒性試験においてみられた肝毒性 (肝細胞の核肥大等) の発現機序を解明する目的で行った。

〔材料および方法〕SD 系雌ラットに E2011 の 150 mg/kg を 1 日 1 回, 2 週間強制経口投与した。一方, E2011 の投与 45 分前に sulfotransferase (ST) 阻害剤として 2,6-dichloro-4-nitrophenol (DCNP; 10 mg/kg, i.p) および pentachlorophenol (PCP; 5 mg/kg, i.p) を, また UDP-glucuronosyl transferase (UDP-GT) 阻害剤として ranitidine (RA; 100 mg/kg, p.o) を前処置し, E2011 による肝毒性に対する修飾作用を検討した。

〔結果〕E2011 単独投与でみられた肝細胞核肥大は, DCNP の前処置により増悪したが, PCP の前処置によって著明に抑制された。また, RA の前処置は E2011 による肝毒性に影響を与えなかった。

〔考察〕今回用いた DCNP および PCP の投与条件は, いずれもアセトアミノフェンの硫酸抱合を 2 週間連続的に抑制するのに十分な量であり, かつ阻害の程度はほぼ同等である (佐藤ら, 第 23 回日本毒科学会学術年会)。したがって, 今回得られた結果は, PCP が ST に加えて acetyltransferase (AT) を阻害することに起因しており, AT が肝毒性発現に大きく関与していることが示唆された。なお, UDP-GT の毒性への関与はほとんどないものと考えられた。

Investigational study for hepatotoxicity in rats induced by E2011 repeated administration.

1) Aspects from involvement of phase II conjugating enzymes.

Gen SATO, Toyohiko AOKI, Satoru HOSOKAWA and Fumio SAGAMI. Drug Safety Research Laboratories, Eisai Co., Ltd., Gifu, 501-6195 Japan.



Clofibrate 投与によるラットの肝臓の変化  
 - Monosodium glutamate の影響 -

○五十嵐功, 牧野俊彦, 村松敦子, 真鍋 淳, 矢本 敬

三共(株) 安全性研究所

【目的】新生雄ラットに monosodium glutamate(MSG)を高量投与すると, 成長ホルモン(GH)の分泌抑制に伴い, 肝臓中薬物代謝酵素プロファイルが雄型から雌型へと変動する。一方, ベルオキシゾーム増生剤に対するラット肝臓の反応には性差があり, 雄で強く変化が発現することが知られている。今回, clofibrate(CPIB)投与時の雄ラット肝臓の変化に対する MSG 前処置の影響を検討した。

【材料および方法】F344 ラットを用い MSG 処置群には, 生後1日目より MSG(4 g/kg)を隔日に5回皮下投与した。その後, 18週齢時より CPIB(200 mg/kg)を14日間反復経口投与した。MSG 無処置群として, 19週齢の無処置雄 F344 ラットに CPIB を同様に投与した。また, 溶媒対照として, 2% Tween 80 溶液を投与する群を設けた。投与終了後, 血液生化学的検査, 肝重量の測定, 光顕および電顕検査を実施した。

【結果および考察】MSG 処置群の最終体重は, 無処置群の 60~70%と顕著に低値を示したことから, MSG の投与により GH の分泌が抑制されたものと判断した。CPIB 投与により肝重量の増加, 血清総コレステロールおよびトリグリセリドの低下などのパラメーターに変化が認められたが, これらの変化の程度は MSG 処置群の方が MSG 無処置群と比較して軽度であった。光顕検査の結果, CPIB 投与による肝細胞肥大が両群でみられたが, その程度は MSG 処置群で軽度であった。また, 電顕検査の結果, MSG 処置群では CPIB 投与による滑面小胞体の増生はほとんど認められず, ベルオキシゾームの増生も軽度であった。これらの結果は, MSG 処置により肝薬物代謝酵素のプロファイルを雄型から雌型に変化させたことで CPIB に対する雄 F344 ラットの感受性が減弱したことを示唆している。

Effects of monosodium glutamate pretreatment on the rat liver changes by clofibrate administration.

Isao IGARASHI, Toshihiko MAKINO, Atsuko MURAMATSU, Sunao MANABE and Takashi YAMOTO. Laboratory Animal Science & Toxicology Laboratories, Sankyo Co., Ltd., Fukuroi, Japan.

ガラクトサミンと LPS により誘発される肝毒性における TNF $\alpha$  の役割  
について —ラット肝スライスを用いた検討—

○樹富直哉、杉本次郎、島村久美子、田中栄治

三菱化学株式会社 横浜総合研究所 安全性研究所

ガラクトサミン(GalN)と LPS の同時投与により誘発される肝毒性は抗 TNF $\alpha$  抗体や SOD の投与によって軽減されることから、Kupffer 細胞が産生する炎症性因子の毒性への関与が示唆されている。今回我々は GalN/LPS による肝毒性における TNF $\alpha$  の役割について、肝スライスを用いて検討を行った。2.5mM の GalN と 10, 100ng/mL の LPS を肝スライスに同時曝露し 24 時間培養した結果、LPS は濃度依存的に GalN の毒性を増強した。またこの毒性は、スライスを 0.01~1  $\mu$ M のデキサメタゾン(DEX)で2時間前処理することにより軽減された。培養液中の TNF $\alpha$  活性を測定した結果、GalN/LPS 群では LPS 単独曝露群に比較して高活性の TNF $\alpha$  (約 10units/mL, maximal at 6hr of culture)が検出され、DEX 前処理群では TNF $\alpha$  は検出されなかった。GalN の存在、非存在下で TNF $\alpha$  をスライスに曝露した結果、TNF $\alpha$  は単独では毒性を惹起しなかったが、GalN 存在下では高濃度 (10<sup>4</sup>units/mL) で GalN の毒性を増強した。以上のように *in vivo* における GalN/LPS の肝毒性の主因と推察されている TNF $\alpha$  について検討した結果、GalN/LPS 群の培養液中に高活性の TNF $\alpha$  が検出され、DEX 前処理群ではその産生は抑制されていた。しかしながら TNF $\alpha$  は単独では肝スライスにおいて毒性を誘発せず高濃度でのみ GalN の毒性を増強したことから、本実験系においては TNF $\alpha$  はそれ自体が直接の毒性原因ではなく、GalN/LPS により誘発される肝毒性を修飾する因子である可能性が示唆された。

The role of tumor necrosis factor alpha in hepatotoxicity induced by combined exposure of D-galactosamine and lipopolysaccharide to precision-cut rat liver slices.

Naoya MASUTOMI, Jiro SUGIMOTO, Kumiko SHIMAMURA and Eiji TANAKA.  
Toxicology Laboratory, Yokohama Research Center, Mitsubishi Chemical Corporation, 1000 Kamoshida-cho, Aoba-ku, Yokohama, Japan.

肝部分切除および薬物代謝酵素誘導剤投与によるラット肝細胞内  
DNA 量の変化

○渡辺真弓, 袴田志野婦, 矢本 敬, 牧野俊彦, 瀬畑信哉, 田中宏治  
五十嵐功, 高岡雅哉, 真鍋 淳

三共(株) 安全性研究所

(目的) 細胞内 DNA 量測定は, 増殖活性や増殖ステージの分布を知る一方法である。フローサイトメーター(FCM)を用いて肝細胞内 DNA 量を測定し, 再生性増殖および薬物代謝酵素誘導剤投与による DNA 量分布の変化を調べた。

(方法) F344 ラット(雄 10 週齢)を用い, 以下の実験処置とともに 70%肝部分切除を施した。すなわち, フェノバルビタール(PB, 80 mg/kg)を 5 日間経口投与後肝切除した群(PbHC 群), 肝切除後, 切除当日から PB(40 mg/kg)を経口投与した群(HCPb 群), 肝切除のみ実施した群(HC 群)を設けた。肝切除 1 日または 2 日後に麻酔下で放血後, 肝臓を摘出し重量を測定した。DNA 量測定のため, 肝臓をホモジナイズし, Triton X-100 で細胞質成分を除去し, Propidium iodide 溶液で染色した。FCM で 2 倍体と 4 倍体の細胞数を計測し, 4 倍体の割合(4n)を算出し, HC 群を対照として比較した。

(結果および考察) 肝実重量は, HCPb 群は HC 群とはほぼ同程度の推移を示したが, PbHC 群は HC 群と比較して高い値で推移した。DNA 量は, PbHC 群は HC 群とはほぼ同程度の推移を示した。HCPb 群は HC 群と比較して, 肝切除 1 日後では同程度の値を示したが, 2 日後では HC 群よりも低い値を示した。以上の結果から, PB 前処置は再生性増殖に明らかな影響を与えないものと思われる。一方, HCPb 群では, 肝切除 2 日後の 4n の増加の割合は HC 群よりも軽度であり, 肝切除後の PB 投与は再生性増殖に重要な DNA 合成に, 影響を与える可能性が示唆された。

Effects of phenobarbital, a drug-metabolizing enzymes inducer, on hepatic DNA ploidy in hepatectomized rats

Mayumi WATANABE, Shinobu HAKAMATA, Takashi YAMOTO, Toshihiko MAKINO, Shinya SEHATA, Koji TANAKA, Isao IGARASHI, Masaya TAKAOKA, Sunao MANABE, Laboratory Animal Science & Toxicology Laboratories, Sankyo Co., Ltd., Fukuroi, Japan

## 医薬品のがん原性試験成績におけるラットとマウスの成績比較

○青木豊彦<sup>1)</sup>, 入村兼司, 古賀照二, 佐藤元信, 永山 智,  
藤井登志之, 松澤利明, 務台 衛, 安場正子, 山下 悟, 白居敏仁

日本製薬工業協会 基礎研究部会第三分科会  
(エーザイ株式会社 安全性研究所<sup>1)</sup>, 他)

〔目的〕医薬品のがん原性試験に関する成績を調査し、二種のげっ歯類をがん原性試験に用いる科学的妥当性および有用性を検討したので報告する。

〔調査方法〕日本製薬工業協会(JPMA)加盟の製薬企業を対象に1994年と1997年の二回に分けてアンケート形式で、がん原性試験実施の有無、がん原性試験成績、変異原性試験成績、試験デザイン、TKの実施状況、結果の解釈および規制当局の対応、開発状況等について薬剤毎に詳細な調査を実施した。回収した回答の内、ラットおよびマウスの二種についてのがん原性試験成績が揃った157の医薬品について、その試験成績を比較検討した。

〔結果・考察〕薬効分類別では循環器官用薬(約35%)が最も多く、以下、中枢神経系用薬(約20%)、消化器官用薬、アレルギー用薬(約10%)の順で長期服用される薬剤についてがん原性試験が多く行われていた。157化合物中少なくともラットあるいはマウスの雄あるいは雌において腫瘍発生の増加があると判断された薬剤は約50%であり、マウス・ラットの両種で発生増加を示した薬剤はその内のわずか1/3であった。また、二種の間で標的となる臓器・性の一致率もそれぞれ20~30%と高くなく、標的臓器が一致したのはドーパミン拮抗薬、腫瘍用薬、肝ペルオキシゾーム増生剤など、その発現機序が明らかな場合のみであった。ラットで発生増加をみた標的臓器は薬物の大量投与で影響され易い内分泌系が主体であった。一方、マウスでのみ発生増加をみた標的臓器は試験間で発生頻度に大きなバラツキを示し、その評価に問題のある肝が大半であった。〔本調査の詳細については、本学会のポスターセッション(医薬品のがん原性試験成績に関する調査結果)において発表する〕

### Comparison of the Results of Rat and Mouse Carcinogenicity Studies for Pharmaceuticals.

Toyohiko AOKI<sup>1)</sup>, Kenji IRIMURA, Teruji KOGA, Motonobu SATO, Satoshi NAGAYAMA, Toshiyuki FUJII, Toshiaki MATSUZAWA, Mamoru MUTAI, Masashi YASUBA, and Satoru YAMASHITA and Toshimi USUI  
Carcinogenicity Working Group, Japan Pharmaceutical Manufacturers Association, Tokyo, Japan (Belonging to Eisai Co., Ltd.<sup>1)</sup> and other companies)

## ヒト正常型c-Ha-ras遺伝子導入ラットにおける発がん感受性

○朝元誠人、鳥山-馬場弘靖、安東輝、鈴木寛規、竹下文隆、津田洋幸

国立がんセンター研究所 化学療法部

正常型ヒトc-Ha-ras遺伝子導入マウスでは、発癌物質誘発の肺腺腫、前胃乳頭腫、脾血管腫、皮膚乳頭腫などに対して感受性が高い事が知られている。我々は、ヒト正常型c-Ha-ras遺伝子導入(Tg)ラットを作成し、乳腺、食道、膀胱および肝発癌における感受性を検索し、導入および内在性のc-Ha-rasの変異の有無を検索した。TgラットはNMU, DMBAおよびPhIPの乳腺発癌、NMBAによる食道発癌に対して著しく高感受性を示し、いずれの実験系でも8週から16週という短期間に100%のTgラットに多発性の腫瘍が発生した。BBN膀胱発癌に対しては一匹あたりの腫瘍の数はNon-Tgラットに比較して有意にTgラットに多くみられが、癌の発生頻度に差は認められなかった。肝発癌に対しては、TgラットとNon-Tgラットに感受性の差異は見いだされなかった。著しく高感受性を示したTgラットの乳癌および食道腫瘍においては導入および内在性のc-Ha-rasの変異は全くないかごくわずかであったが、Non-Tgに誘発された乳癌および食道腫瘍には内在性のc-Ha-rasの変異を高率に認めた。BBN誘発膀胱癌ではごく低頻度にNon-Tgにおいてのみ内在性のc-Ha-rasの変異を検出した。導入遺伝子の発現は乳腺、食道、膀胱、肝を含めた全臓器で認められた。以上より、このTgラットは乳腺と食道において発がん高感受性であり、NMU, およびNMBAは導入c-Ha-rasを標的として点突然変異を誘発することはまれで、導入遺伝子の発現が発癌感受性に重要な役割を果たしていると考えられた。また、このTgラットの臓器特異的発癌感受性はc-Ha-rasの異常が如何にそれぞれの臓器発癌に関与しているかを示していると考えられる。現在このTgラットが発がん物質および発がん修飾物質の検出系として有用であるかを検索中である。

## Susceptibility of Human Proto c-Ha-ras Transgenic Rats to Carcinogens.

Makoto ASAMOTO, Hiroyasu TORIYAMA-BABA, Akira ANDO, Hiroki SUZUKI, Fumitaka TAKESHITA and Hiroyuki TSUDA. National Cancer Center Research Institute, Chemotherapy Division, Tokyo 104-0045, Japan

## 遺伝子改変マウスの urethane に対する発癌感受性に関する検討

○渡辺知幸<sup>1)</sup>、尾崎正和<sup>1)</sup>、川崎一<sup>1)</sup>、伊藤聖一<sup>2)</sup><sup>1)</sup>住友化学工業 (株) 生物環境科学研究所 <sup>2)</sup> (株) 実研

【目的】現行の動物を用いた長期飼育生試験の代替試験法のひとつとして遺伝子改変マウスを用いた短期発癌生試験が提案されている。しかし、その有用性については十分な検討がなされていないとは言えない。そこで、遺伝子障害性の発癌物質である urethane を p53 遺伝子欠損マウスおよびヒト c-Ha-ras 遺伝子導入マウスに投与し発癌感受性を検討した。【材料および方法】 p53 遺伝子欠損 (p53<sup>+/-</sup>) およびその野生型 (p53<sup>+/+</sup>)、c-Ha-ras 遺伝子導入 (c-Ha-rasTG) およびその野生型 (c-Ha-rasNTG)、C57BL/6、BALB/c ならびに B6C3F1 マウス (7 週令、雄) の各 15 匹に urethane (500ppm) を飲水にて 3 週間投与し投与開始後 26 週目に諸臓器の病理組織学的検索を実施した。それぞれの対照として同系マウスの無処置群を設けた。【結果】 urethane 投与により、p53<sup>+/-</sup>マウスの肝臓に血管腫瘍の発生を認めた。一方、c-Ha-rasTG マウスでは、肺腫瘍の誘発を認めた。p53<sup>+/-</sup>、p53<sup>+/+</sup>ならびに c-Ha-ras<sup>+/-</sup>の原系統である C57BL/6 マウスの urethane 投与群において、肝臓のペリオシスを散見した。肺腫瘍は c-Ha-rasNTG、c-Ha-rasTG の原系統である BALB/c ならびに B6C3F1 マウスの urethane 投与群においても観察された。肝臓の血管腫瘍は、c-Ha-rasTG マウスにのみ観察され urethane 投与によりその発生頻度が増加した。【考察および結論】 p53 遺伝子欠損マウスおよび c-Ha-ras 遺伝子導入マウスともに urethane に対して発癌感受性を示したが、各系統に臓器特異性のあることが判明した。これらの臓器特異性のうち、肝臓における血管腫瘍および肺腫瘍の誘発特異性は各遺伝子改変マウスの原系統の形質を反映したものと考えられた。なお、c-Ha-rasTG マウスにおいてのみ肝臓における血管腫瘍の発生を見たことから、c-Ha-rasTG マウスは遺伝子改変により新たな形質を獲得したことが示唆された。

## Susceptibility to Carcinogenesis by Urethane in Genetically Engineered Mice

Tomoyuki WATANABE<sup>1)</sup>, Masakazu OZAKI<sup>1)</sup>, Hajime KAWASAKI<sup>1)</sup> and Seiichi Ito<sup>2)</sup>. <sup>1)</sup>EHSI, Sumitomo Chemical Co., Ltd., Osaka 554-8558, Japan. <sup>2)</sup>NEMRI, Hruna 370-33, Japan.

ras H2マウスを用いるがん原性試験代替試験法共同研究：  
cyclophosphamide による尿路系腫瘍誘発性の検討を主眼とした26週  
間試験における間欠投与による用量設定試験

○久田 茂, 永嶋雅子, 谷藤久人, 柴田誠司, 飯塚和弘, 佐藤敦子,  
磯部充威, 桑山典之, 森本秀樹, 飯田祝子, 増田修治, 中山隆治,  
臼居敏仁\*

帝国臓器製薬安全性研究部, \*実験動物中央研究所

Cyclophosphamide (CY) は出血性膀胱炎を誘発すると共に、経口投与によりヒト  
やラットに膀胱癌を発生させる事が知られているが(ラット:0.63mg/kg 以上の混  
水投与), 最高 30mg/kg の用量のCYを週2回の頻度で6ヶ月間強制経口投与した  
ras H2マウスに尿路系腫瘍は発生しなかった(Yamamoto, S. et al. Carcinogenesis,  
Vol.17, 2455, 1996). そこで, 1) 低用量のCYを連日投与した場合, 及び, 2) 尿  
路系に障害が発生する高用量のCYを間欠投与した場合の ras H2マウスにおける腫  
瘍発生率を2社で比較する事にした。今回は間欠投与による4週間用量設定試験の  
結果を報告する。

【方法】雌雄各群5匹のCB6F1マウス(投与開始時6週齢)を使用し, 0, 30, 50,  
70 及び 90mg/kg のCYを週1回または週2回の頻度で4週間強制経口投与した。雄の  
み初回投与時及び4週間投与時に尿検査を実施し, 週2回投与群は最終投与の3日後  
に, 週1回投与群は7日後に解剖した。

【結果】週2回投与群:投与4週目で雄の 70mg/kg 以上, 雌の 90mg/kg で体重増加  
が抑制された。WBC は雌雄の 30mg/kg で軽度な低下, 50mg/kg 以上では雄 90mg  
/kg を除き顕著な低下を示した。また, 胸腺萎縮及び精巣萎縮が CY投与群に認め  
られ, 雄の70mg/kg 以上では髄外造血と脾腫が認められた。4週間投与後の尿には  
90mg/kg で潜血が認められ, 雌雄の70mg/kg 以上で移行上皮に核の大小不同及び軽  
度な肥厚が認められた。

週1回投与群:50mg/kg 以上で精巣萎縮が認められた以外に, 上述の週2回投与群  
で認められた変化は観察されなかった。

【考察】週2回投与の場合, 尿路障害が発生する70mg/kg 以上を長期投与する事は  
WBCの低下のために困難と考えられた。尿路障害が発生する高い用量のCYを長期  
間投与するためには, 週1回の頻度で 90mg/kg より高い用量が必要であると考えら  
れた。

Alternatives to carcinogenicity testing using ras H2 mice: dose range finding study for the  
26-week assay by the intermittent dosing of cyclophosphamide in order to assess the  
inducibility of urothelial tumors

Shigeru HISADA, Masako NAGASHIMA, Hisato TANIFUJI, Seiji SHIBATA, Kazuhiro  
IIZUKA, Atsuko SATO, Mitsui ISOBE, Noriyuki KUWAYAMA, Hideki MORIMOTO,  
Noriko IIDA, Shuji MASUDA, Ryuji NAKAYAMA and Toshimi USUI\*  
Teikoku Hormone Mfg. Co., Ltd. and \*Central Institute of Experimental Animals

## ラット中期肝発がん性試験法における非変異原性発がん物質の検討

○萩原昭裕<sup>1</sup>、五島英雄<sup>1,2</sup>、佐野真士<sup>1,2</sup>、田中 光<sup>1</sup>、玉野静光<sup>1</sup>、  
白井智之<sup>2</sup>

<sup>1</sup>大雄会医科学研究所、<sup>2</sup>名古屋市大・医・1病理

[目的] ラットを用いた、中期肝発がん性試験法（伊東テスト）は、肝発がん物質の優秀な検出法として国際的に高く評価され、ICHにおいても医薬品の発がん性を検出するための新しい試験法の1つとして推奨されている。今回、現在までに実施された非変異原性発がん物質の検索結果について報告する。

[方法] 6週齢のF344系ラット雄を用い、実験開始時にDiethylnitrosamine (DEN)を200mg/kg体重で単回腹腔内投与し、2週後より被験物質を6週間投与した。被験物質として、47検体の非変異原性発がん物質を用いた。全動物に対し、第3週時に部分肝切除術を行った。8週経過後に屠殺剖検し、免疫染色による肝の胎盤型glutathione S-transferase (GST-P)陽性細胞巢の出現を定量的に解析した。

[結果] 非変異原性発がん物質47検体のうち29検体が陽性を、9検体が陰性を、9検体が抑制を示した。しかし、肝発がん物質32検体に限定し解析すると、ペルオキシゾーム増生物質5検体を除いて26/27(96%)と高率な陽性を示した。また、マウスの肝臓に対して発がん性を示す13検体についても、ペルオキシゾーム増生物質2検体を除くと11/11(100%)の陽性率を示した。更に、ペルオキシゾーム増生物質(DEHPおよびclofibrate)については、実験期間を延長し(24週)、H&E染色標本で変異細胞巢を定量的に解析することにより陽性の結果が得られている。なお、抑制結果を示した9検体中6検体は、肝以外の臓器に発がん標的性を示す酸化防止剤であった。

[結論] 本試験法により、ラットのみならずマウスにおける肝臓を標的とする非変異原性発がん物質を高精度に検出できることが明らかとなった。

Analysis of 47 non-genotoxic carcinogens in the medium-term liver bioassay (Ito test).

A. Hagiwara<sup>1</sup>, H. Goshima<sup>1,2</sup>, M. Sano<sup>1,2</sup>, H. Tanaka<sup>1</sup>, S. Tamano<sup>1</sup>, T. Shirai<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Daiyu-kai Inst. Med. Sci., <sup>2</sup>1st Dept. Pathol., Nagoya City Univ. Med. Sch.



## 中期多臓器発がん性試験法を用いたがん原性の評価

○玉野静光<sup>1</sup>、佐野真士<sup>1,2</sup>、田中 光<sup>1</sup>、河部真弓<sup>1</sup>、萩原昭裕<sup>1</sup>、  
白井智之<sup>2</sup>

<sup>1</sup>大雄会医科学研究所、<sup>2</sup>名古屋市大・医・1病理

【目的】発がん物質は遺伝毒性を示すものとそうでないものとに大別される。これらはいずれも、潜在するイニシエートされた細胞を単クローン性に選択的に増殖させ、腫瘍性病変として顕在化させる作用を持つ。我々はこの性質を利用して、新規開発物質のがん原性を一つの実験法で短期に検出する中期多臓器発がん性試験法を開発し、そのバリデーションを行ってきたので報告する。

【方法】6週齢 F344 雄ラットを用い、イニシエーションとして3種類 (DEN, 100mg/kg, ip1回, MNU, 20mg/kg, ip4回, DHPN, 0.1%飲料水で2週間—DMD処置) または5種類 (DEN, 100mg/kg, ip1回, MNU, 20mg/kg, ip4回, BBN, 0.05%飲料水で2週間, DMH, 40mg/kg, sc4回, DHPN, 0.1%飲料水で2週間—DMBDD処置) の発がん物質を4週間に投与し、その後被験物質を16週間 (DMD法) または24週間 (DMBDD法) 投与し、発生する前腫瘍性および腫瘍性病変を免疫組織化学的あるいは病理組織学的に検索した。

【結果】検索総数72被験物質のうち、いずれかの試験法で発がん性が陽性と判定された物質数は、既知肝発がん物質17/17(100%)、肝以外に標的臓器を持つ既知発がん物質19/21(90%)、非発がん物質0/3(0%)および発がん性未知物質13/31(42%)であった。

【考察および結論】既知発がん物質での結果は38例中36例(95%)が陽性で、長期がん原性試験の結果とほぼ一致し、発がん物質の検索法として極めて有用であった。また、発がん性を短期に予測でき、かつその臓器標的性を見出しうると同時に、発がん機序の解析にも有用と考えられる。

## Validation of Medium-Term Multi-Organ Bioassay Protocols for Carcinogens.

Seiko TAMANO<sup>1</sup>, Masashi SANO<sup>1,2</sup>, Hikaru TANAKA<sup>1</sup>, Mayumi KAWABE<sup>1</sup>, Akihiro HAGIWARA<sup>1</sup> and Tomoyuki SHIRAI<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Daiyu-kai Institute Medical Science, Ichinomiya-491-0113 and <sup>2</sup>1st Dept. of Pathol., Nagoya City Univ. Med. Sch., Nagoya-467-0001, Japan.

イヌの HCO-60 により惹起したアナフィラキシー様反応にみられる  
 頻脈の検討 — ラジオテレメトリー法を用いた評価 —

○宮崎裕康、川島康永、久野博司、松本浩良、池本文彦

萬有製薬株式会社 開発研究所

(目的)アナフィラキシー様反応(AR)を惹起したイヌは、血圧の低下に伴って頻脈がみられることが知られている。しかし、この頻脈の経時変化や発現メカニズムについての結論はこれまで得られていない。一方で、ラジオテレメトリー(RT)法は覚醒下無拘束のイヌの循環動態の検討に有用性が高いと考えられる。そこで、今回、HCO-60(硬化ひまし油)によりARを惹起し、RT法を用いて、頻脈の検討を行った。

(方法)テレメトリーモニターを体内に埋め込み、術後3週間回復させたビーグル犬(9ヶ月齢、雌)12匹を3匹ずつ4群に分け、HCO-60の2.6、13及び65 mg/kgを静脈内に持続投与し、RT法により血圧及び心拍数の測定を連続的に行った。また、残り3匹を用いて、HCO-60の同3用量を同手法により投与し、血中ヒスタミンの測定を経時的に行った。

(結果)血圧は用量依存的に低下し、最低値  $63.6 \pm 3.4$  mmHg (13 mg/kg 群、投与後 28.0  $\pm$  3.5 分)及び  $36.8 \pm 6.2$  mmHg (65 mg/kg 群、20.7  $\pm$  3.1 分)を示した。その後血圧は増加を始め、投与後 60 分で両群共に正常レベルに回復した。一方、心拍数は一過性の上昇の後、血圧低下に伴って減少し、血圧が最低値を示した時点の心拍数は  $125.3 \pm 14.0$  bpm (13 mg/kg)及び  $107.7 \pm 20.3$  bpm (65 mg/kg)であった。その後、心拍数は160 bpmを越え、約 30 分(13 mg/kg)及び 60 分(65 mg/kg)持続した。血中ヒスタミンレベルは最高値 268.2 ng/ml (13 mg/kg 群、投与後 20 分)及び 518.9 ng/ml (65 mg/kg, 10 分)を示したが、血圧回復後の頻脈の発現時には低値であった。

(結論)今回の検討は、イヌの HCO-60 により惹起した AR の頻脈は血圧低下の直前と回復後で発現していることを明らかにした。また、血圧低下時の心拍数はむしろ低値であることから、AR における心機能の抑制作用の存在を示唆させた。

Tachycardia During Anaphylactoid Reaction Induced by HCO-60 in Dogs  
 - Assessment Using a Radio-Telemetry Technology -

Hiroyasu MIYAZAKI, Yasunaga KAWASHIMA, Hiroshi KUNO, Hiroyoshi MATSUMOTO, Fumihiko IKEMOTO

Development Research Laboratories, Banyu Pharmaceutical Co., Ltd.

カーバメート殺虫剤 BPMC による循環機能不全の電気生理学的解析  
 —モルモット心室筋の L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル電流の抑制

○二川治子, 高橋宏明, 赤羽悟美\*, 長尾拓\*

残留農薬研究所, \*東京大・薬・薬効安全性

コリンエステラーゼ阻害剤を哺乳動物に投与すると、中枢性の血圧上昇のあと呼吸機能不全に陥り急性死を生ずる。しかしながら、カーバメート殺虫剤である BPMC をウサギに静脈内投与するとアトロピンや人工呼吸では拮抗されない循環機能不全による死亡がみられ、この循環機能不全は心収縮力と末梢血管抵抗の減少による血圧低下に由来していた（第 22 回年会報告）。BPMC は摘出大動脈の収縮を抑制し、この抑制は外液  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の増加および Bay K8644 の添加によって拮抗された。さらに、BPMC は収縮抑制に先行して細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  レベルを減少させた。これらのことから、BPMC は L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを介する  $\text{Ca}^{2+}$  の流入抑制によって末梢血管抵抗を減少させた可能性を示唆した（第 69 回薬理学会年会）。本報告では循環機能不全のもう一方の要因である心収縮力減少の機序を調べるため、摘出心筋の収縮および L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルに対する BPMC の作用を検討した。

BPMC をハートレイ系雄性モルモットに静脈内投与するとウサギと同様の循環機能不全による死亡を生じた。さらに、BPMC はモルモットおよびウサギ摘出乳頭筋の電気刺激による収縮を同様に抑制した。次に、ホールセルパッチクランプ法を用いてモルモット単離心室筋細胞の L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル電流 ( $I_{\text{Ca(L)}}$ ) に対する BPMC の作用を調べると、BPMC は濃度に依存して  $I_{\text{Ca(L)}}$  を抑制した。その抑制はピーク電流の抑制に加えて電流の decay の促進に起因していた。また、BPMC は  $I_{\text{Ba(L)}}$  を  $I_{\text{Ca(L)}}$  と同様に抑制し、 $I_{\text{Ca(L)}}$  の steady-state inactivation curve を過分極方向にシフトさせた。これらの結果から BPMC は L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを介する  $\text{Ca}^{2+}$  の流入を抑制して心収縮を抑制し、循環機能不全を生ずると推測された。

Electrophysiological study of cardiovascular collapse by specific carbamate insecticide, 2-s-butylphenyl methylcarbamate: Inhibitory effects on the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current of guinea-pig ventricular myocytes.

Haruko FUTAGAWA, Hiroaki TAKAHASHI, Satomi ADACHI-AKAHANE\*, and Taku NAGAO\*. Inst. Environ. Toxicol., Ibaraki 303-0043 and \*Lab. of Pharmacol. & Toxicol. Grad. Sch. Pharmaceut. Sci., University of Tokyo, Tokyo 113-0033, Japan.

サルの非侵襲的心拍出量の測定

○阿久根淳, 福崎好一郎, 永田良一, 鬼頭 剛

(株)新日本科学 安全性研究部門

〔目的〕心拍出量の測定は、毒性あるいは薬理試験において心機能を調べるうえで非常に重要なパラメーターである。一般には電磁血流計による大動脈流量あるいはスワングアンツカテーテルによる熱希釈法による測定方法が広く用いられている。しかし、カニクイザルに対してはいずれの方法も侵襲があまりにも大きすぎる。今回、我々は新しい小型の経食道プローブを装備した非観血循環動態モニター装置を使用する機会を得たのでカニクイザルを用いて心拍出量の測定を試みた。〔実験方法〕雌性カニクイザルを用いた。使用した測定装置はDYNEMO 3000 (SOMETEC社)で、2種類の超音波トランスジューサー（パルスドップラー、Mモードエコー）を内蔵する経食道プローブであり、食道壁から下行大動脈血流速度をリアルタイムに計測し、ECGおよび血圧の監視モニターからの信号で複数のパラメーターを測定できる。動物をケタミン麻酔下に横臥位にし、食道内のトランスジューサーの位置を下行大動脈に合わせ、速度波形および大動脈壁の画像から大動脈血流量（ABF）、大動脈血圧（ABP）、心拍数（HR）、一回の心拍出量（SVa）、左心室等容収縮期（PEPi）、左心室収縮駆出時間間隔（LEVTi）、末梢血管抵抗（TSVRa）を求めた。ABFの再現性を確認する目的で、同一動物で測定日を改めて数回測定した。〔実験成績〕カニクイザルの1回目の測定では、ABF:473-610 ml/min, SVa:4.4-5.9 mlで大動脈の直径は7.65-8.22 mmであった。2日後の測定でもほぼ同じ値であった。〔総括〕今回検討した測定装置は心拍出量の値が高く出る傾向を示したが、再現性が認められたことから相対的な変化を見ることは可能であった。非侵襲的で連続的に、しかも短時間で測定できることは毒性試験に十分応用できると考えられる。

Non-invasive measurement of cardiac output in cynomolgus monkey

Atsushi AKUNE, Koichiro FUKUZAKI, Ryoichi NAGATA and Go KITO  
Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd., Yoshida, Kagoshima, 891-1394,  
Japan.

ドキシソルピシン遅発性心毒性：筋小胞体  $Ca^{2+}$  放出機構傷害

○天間恭介、中郡昭人、小山田敏文、原幸男、近藤洪志、佐々木卓士、明楽泰<sup>1</sup>

北里大学獣医畜産学部、<sup>1</sup>日本 MSDRL

ドキシソルピシン心毒性は、投与終了から数年、時には 10 年以上経過して発現する例がある。本研究において、この遅発性心毒性の機序解明のために、ドキシソルピシン投与ラットから得た摘出心臓における心収縮力記録実験 (postrest contraction, staircase) および [<sup>3</sup>H]ryanodine 結合実験を行った。ドキシソルピシン (2.5 mg/kg, iv.) は週 1 回、3 回投与した。そして、最終投与から、1, 13 および 18 週目に心臓を摘出し、各実験に用いた。対照群ではドキシソルピシンの代わりに生理的食塩水を投与した。

収縮力記録実験：ラット摘出左心房筋標本は顕著な postrest contraction (反復刺激を一旦停止し、再開した最初の刺激に反応して現れる強い収縮) を発現した。ドキシソルピシン最終投与から 1 週目の筋標本ではその postrest contraction に影響を認めることができなかったが、13 週目で有意な減弱を、18 週目ではさらに顕著な減弱を認めた。また、ラット摘出心房筋は典型的な negative staircase を発現した (刺激頻度 0.1~1 Hz)。ドキシソルピシン投与は低頻度部分の収縮力を特に強く減少させることにより、その staircase の型に変化を与えた。また、その減少効果は、1 週目、13 週目、18 週目と最終投与後の経過の長さと共に顕著になった。

[<sup>3</sup>H]ryanodine 結合実験：ラット心室筋から精製した筋小胞体膜標本における Scatchard plot 解析では、18 週目で Bmax 値の低値が観察された。

以上の結果から、ドキシソルピシンによる筋小胞体  $Ca^{2+}$  放出機構の傷害が、投与終了後の時間経過と共に重度に進行することが明らかになった。ドキシソルピシンによる遅発性心毒性の機序として筋小胞体  $Ca^{2+}$  放出機構の傷害が示唆された。

Doxorubicin-induced late cardiotoxicity: impairment of the  $Ca^{2+}$  releasing mechanism in the sarcoplasmic reticulum

Kyosuke TEMMA, Akihito CHUGUN, Toshifumi OYAMADA, Yukio HARA, Takushi SASAKI, Hiroshi KONDO and Tai AKERA<sup>1</sup>. School of Veterinary Med. and Animal Sci., Kitasato Uni., Towada-shi, Aomori 034-8628 and <sup>1</sup>MSDRL-Japan, Tokyo 107-0052, Japan.

マイトマイシンC誘導体KW-2149によるラット肺毒性に対する  
デキサメタゾンの抑制効果

○原田 智子<sup>1</sup>、高場 克己<sup>1</sup>、原 卓司<sup>1</sup>、山本 昇<sup>2</sup>、田村 友秀<sup>2</sup>、  
西條 長宏<sup>2</sup>、石井 昭男<sup>1</sup>

<sup>1</sup>協和発酵工業(株)・安全性研究所、<sup>2</sup>国立がんセンター中央病院

【目的】KW-2149は抗腫瘍薬マイトマイシンC(MMC)の誘導体で、前臨床試験においてMMCよりも優れた抗腫瘍効果および骨髄毒性の軽減が報告されている。KW-2149のヨーロッパ臨床第I相試験において、抗腫瘍効果が認められると同時に、肺毒性(肺機能の低下、胸水貯留、呼吸困難、胸部X線検査で異常陰影)の発現が報告されたことから、肺毒性の抑制を目的として、ラットを用いてデキサメタゾン(DM)の有用性を検討した。

【方法】SD系雄性ラットにKW-2149(3.28 mg/kg)を週1回の頻度で3回静脈内投与した。DMはKW-2149投与前後に2回(0.1 mg/kg; 12時間前、3時間前)、3回(0.1 mg/kg; 12時間前、3時間前、1日後)あるいは4回(0.1 mg/kg; 12時間前、3時間前、0.05 mg/kg; 1日後、2日後)静脈内投与した。KW-2149最終投与後6週間の一般状態観察および体重測定を行うとともに、経時的に動物を屠殺し、剖検、胸水貯留量の測定、胸水蛋白濃度および血清蛋白濃度の測定を実施した。

【結果および考察】DMはKW-2149の肺毒性に起因する死亡、体重増加抑制、呼吸困難、胸水貯留、肺の暗赤色斑の発現を抑制した。その抑制効果はDMの4回投与群で強い傾向にあった。KW-2149投与により発現した胸水の蛋白濃度は3 g/dLを越え、胸水/血清蛋白濃度比も0.5を越えたことから、浸出性胸水と判断された。胸水貯留量の少ないDM投与群ではこれらの値は低い傾向にあった。以上の成績から、KW-2149による肺毒性の抑制に対するDMの有用性が示唆された。

Inhibitory effects of dexamethasone on a new mitomycin C derivative KW-2149 induced pulmonary toxicity in rats.

<sup>1</sup>Tomoko HARADA, <sup>1</sup>Katsumi TAKABA, <sup>1</sup>Takuji HARA, <sup>2</sup>Noboru YAMAMOTO, <sup>2</sup>Tomohide TAMURA, <sup>2</sup>Nagahiro SAIJO and <sup>1</sup>Akio ISHII. <sup>1</sup>Toxicological Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Yamaguchi-755-8501, Japan, <sup>2</sup>National Cancer Center Hospital, Tokyo-104-0045, Japan.

日常にみられる酸塩基平衡の変化  
無麻酔イヌの食後にみられる血液のアルカリ化, Alkaline tide

○尾崎潤一郎, 谷本憲昭, 久世博

田辺製薬(株) 安全性研究所

救急医療, 麻酔管理等で患者の Vital sign を捉えるために血液ガスのモニターがされている。我々が日常実施している単回投与毒性試験あるいは安全性薬理試験において血液ガスのパラメータを取得することは, より有用な情報を得ることになると考えたので以下の試験を実施した。

イヌにおける血液ガスパラメータの基礎的なデータ取得のため, 若齢犬(1才)および老齢犬(12才)の各3例を用いて空腹時から摂餌後にかけての血液ガスパラメータの変化を無麻酔・拘束下でみた。空腹時には若齢犬 ( $\text{HCO}_3^- = 20-21 \text{ mmol/L}$ ) に比して老齢犬 ( $23-24 \text{ mmol/L}$ ) で軽度の代謝性アルカローシス状態にあった。また, 摂餌後には若齢 ( $\text{HCO}_3^- = 25-28 \text{ mmol/L}$ ) および老齢犬 ( $27-31 \text{ mmol/L}$ ) とともに, 血液の一過性のアルカリ化(Alkaline tide)がみられ, 老齢犬の中には Alkaline tide に対して呼吸性の代償作用が強く働き, 軽度の低酸素血症 ( $\text{PaO}_2 = 76 \text{ mmHg}$ ) に陥ったと考えられる動物があった。なお, この Alkaline tide が Cimetidine の  $5 \text{ mg/kg(iv)}$  投与で軽減されたことから, 以前から消化器領域において知られている胃酸分泌に関連した変化であることが推察された。

以上のように血液の酸塩基平衡のわずかな変化を捉えておくことは, 血液ガス測定を含む毒性試験を立案する上で重要と思われる。血液ガスパラメータは, 呼吸器系あるいは腎機能を評価する有用なパラメータの一つであるが, 今回の成績から, 胃酸あるいは脾外分泌等の消化器系の機能を評価するパラメータとなり得る可能性も示唆された。

#### A usual change in acid/base balance

The alkalization of blood after feeding in conscious dogs, Postprandial Alkaline Tide

Junichiro OZAKI, Noriaki TANIMOTO and Hiroshi KUSE. Safety Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd., Osaka-532-8505, Japan.

甲状腺摘出ラットにおける血中甲状腺ホルモンと TSH 濃度の関連  
 -Phenobarbital および Fluconazole の比較-

○滝沢節子、堀井郁夫

日本ロシュ（株）、研究所、前臨床科学研究部

【目的】酵素誘導物質は甲状腺外の機構（肝臓からの甲状腺ホルモン排泄増加）により、甲状腺の腫大や腫瘍等の異常を引き起こす可能性が示されているが、全ての酵素誘導物質において甲状腺に形態学的な変化が観察されているとは限らない。甲状腺に影響を及ぼす Phenobarbital (PB) および及ぼさない Fluconazole (FC) の両薬物について、甲状腺ホルモン分泌量にフィードバックによる影響を受けないモデル動物（甲状腺摘出+浸透圧ミニポンプにより T4・T3 の補充）を用いて、甲状腺ホルモン (T4・T3) の血中からの消失および甲状腺刺激ホルモン (TSH) の推移を比較・検討した。

【方法】甲状腺摘出 SD 雄ラットの皮下に浸透圧ミニポンプ（甲状腺ホルモン充填）を移植し (Day -3)、3日後 (Day 0) に PB (75 mg/kg/day)、FC (100 mg/kg/day) または溶媒 (5% gum arabic) の経口投与を開始した。Day -3, 0, 4, 7 および 10 に血清中の甲状腺ホルモン濃度および TSH 濃度を測定すると共に、Day 10 に屠殺し肝臓における T4 に対する UDP-glucuronosyltransferase (GT-T4) 活性を求めた。

【結果】T4 については、PB 群および FC 群共に対照群と比較して血中からの消失は同程度に増加しており、その結果は GT-T4 活性の同程度の増加と対応していた。一方、T3 については Day 4 において、PB 群および FC 群共に対照群と比較して血中からの消失は増加しているものの、その消失率は PB 群の方が高かった。TSH については数日の遅れ (Day 7) はあるものの、血中 T3 濃度の減少に対応して増加するのが PB 群において観察された。以上の結果から、血中の TSH 濃度は主に T3 濃度によって調節され、FC 群では血中 T3 濃度の消失率の低いことが、血中 TSH 濃度の増加を引き起こさず、甲状腺の過剰刺激による腫大・腫瘍につながらないのではないかと推定された。

A relation of serum thyroid hormone levels (T4 and T3) to serum TSH level in thyroid hormone-infused thyroidectomized rats: a comparative study between Phenobarbital and Fluconazole.

Setsuko TAKIZAWA and Ikuo HORII. Preclinical Science Department, Nippon Roche Research Center, Kanagawa, 247-8530, Japan.



## コウジ酸の4週間反復強制経口投与による甲状腺への影響

○大久保悖<sup>1)</sup>、比嘉良喬<sup>1)</sup>、一鬼勉<sup>2)</sup>、北島俊一<sup>2)</sup>、仮家公夫<sup>3)</sup>三省製薬(株)・開発本部<sup>1)</sup>、(株)パナファーム ラボラトリーズ<sup>2)</sup>  
神戸学院大学・薬学部<sup>3)</sup>

【目的】コウジ酸を混餌でラットに投与することにより甲状腺へのヨードの取り込み阻害が認められ、それに伴い血中T3/T4の減少とTSHが上昇する報告がある(第56回日本癌学会：小野寺ら，1997年)。しかし、短期の強制経口投与実験では逆の結果が認められ、投与方法の差異により反応の違いが疑われた。そこで今回、混餌投与実験と同様の用量を用い、強制経口投与での甲状腺に対するコウジ酸の影響を検討した。

【実験方法】雄性ラット(F344/DuCrj,6週齢)にコウジ酸1000mg/kgを最高に250、62、5、15、4、0mg/kgを毎日一回、4週間連続強制経口投与した。動物は投与開始1、2、3、4週目に経時的に各群5匹づつ解剖し、甲状腺重量、ヨード取り込み、有機化および血中甲状腺関連ホルモンの測定を行った。【結果】甲状腺重量はコウジ酸1000mg/kg投与群の全期間で有意な増加を認めたが、250mg/kg以下の投与群では対照群と差は認められなかった。ヨードの取り込みと有機化は1000mg/kg群の全期間で有意な増加傾向を示した。甲状腺ホルモン(T4)は1000mg/kg投与群の全期間で有意に減少した。TSHは全ての投与群で全期間を通して変動は観察されなかった。甲状腺の病理組織学的検索では1000mg/kg投与群で投与開始1週目から濾胞上皮の肥大を認め、その傾向は4週まで続いたが、期間と共にその程度が増強されることはなかった。【まとめ】混餌投与実験では比較的低用量で甲状腺の重量の増加、ヨード取り込み阻害、甲状腺濾胞上皮の肥大・コロイド減少が認められたが、今回の強制経口投与ではコウジ酸の濃度がほぼ等しいにも関わらず1000mg/kg群の最高用量でのみ変化が認められ、ヨードの取り込みは逆に増加した。これらの結果より、コウジ酸の吸収・排泄速度を考慮すると混餌投与と強制経口投与で甲状腺に対する作用が異なる可能性が示唆された。

Effect of Kojic Acid on Rat Thyroid Gland Administered Orally for 4 Weeks.

Atushi OHKUBO<sup>1)</sup>, Yoshitaka HIGA<sup>1)</sup>, Tsutomu ICHIKI<sup>2)</sup>, Shunichi KITAJIMA<sup>2)</sup> and Kimio KARIYA<sup>3)</sup>. R&D SANSHO SEIYAKU, Fukuoka 816-8550<sup>1)</sup>, Panapharm Lab., Kumamoto 869-0425<sup>2)</sup>, Fac. Pharm. Sci. Kobegakuin Univ., Kobe 651-5180<sup>3)</sup>

体内 NO 産生を指標とした安全性評価手法の開発に関する研究  
 甲状腺障害誘発ラットにおける LPS による体内 NO 産生について

○津田充宥、酒見和枝、宇佐見誠、大野泰雄

国立医薬品食品衛生研究所  
 安全性生物試験研究センター・薬理部

【目的】アルギニンを基質とする体内一酸化窒素 (NO) 産生系が近年明らかにされ、血管内皮系、免疫系、発がんへの影響など広範な生体機能に関与している。本研究では化学物質の安全性評価手法開発の一環として、各種毒性物質に暴露されたラットでのエンドトキシン LPS (E.coli) 負荷による免疫応答としての体内 NO 産生能への影響を調べることを目的とした。今回は、ゴム等の老化防止剤 2-Mercapto-benzimidazole (MBI) 投与により甲状腺機能低下症を誘発したラットへの LPS 負荷による体内 NO 産生能への影響を検討し、興味ある知見を得たので報告する。

【方法】雄性 Wistar ラット (7W) に MBI (50mg/kg/day, Corn oil 5ml/kg) を 7 日間、反復強制経口投与して甲状腺機能低下症を誘発したラットに、LPS (1mg/kg, Saline 5ml/kg) を腹腔内投与して、5h, 10h, 24h, 30h 及び 48h 後に採血した。LPS 投与後 48 時間採尿した。血中 NO<sub>2</sub> / NO<sub>3</sub> 濃度及び尿中 NO<sub>2</sub> / NO<sub>3</sub> 排泄量は Cd 還元カラムを付した自動 NO<sub>x</sub> 分析機を用いて測定した。対照群として Corn oil 及び MBI の単独反復経口投与群 (LPS の代わりに Saline 腹腔内投与) を設けた。

【結果と考察】LPS 投与により、甲状腺機能低下症誘発ラット群 (MBI / LPS) における血清中 NO<sub>2</sub> / NO<sub>3</sub> 濃度は Oil / LPS 群 (395µM, 10h) の約 2 倍に上昇した。対照群 (MBI / Saline 及び Oil / Saline) の血清中 NO<sub>2</sub> / NO<sub>3</sub> 濃度は 16~20µM であった。一方、MBI / LPS 群の 24 時間尿中における NO<sub>2</sub> / NO<sub>3</sub> 量は Oil / LPS 群の約半量であったが、48 時間尿中への NO<sub>2</sub> / NO<sub>3</sub> 排泄量に有意差はなかった。しかし、尿量は MBI 投与群で有意に増加した。MBI 投与による硝酸イオンの尿中排泄低下が血中 NO<sub>2</sub> / NO<sub>3</sub> 濃度の上昇の一因と推測された。詳細は現在検討中である。

Development of Safety Evaluation Method by Monitoring the Endogenous Nitric Oxide Formation. Endogenous NO formation Stimulated by LPS in Hypothyroid Rats Treated with 2-Mercaptobenzimidazole.

Mitsuhiro TSUDA, Kazue SAKEMI, Makoto USAMI, Yasuo OHNO.  
 National Institute of Health Sciences, Tokyo 158-8501, Japan

## In vitro 甲状腺スフェロイド培養系の毒性試験系への応用

井上 智彰、○猪又 晃、堀井 郁夫

日本ロシュ(株) 研究所 前臨床科学研究部

内分泌系への毒性評価系を持つことは、医薬品の毒性評価にとって重要な事である。甲状腺への直接毒性作用を評価する系としては、甲状腺だけを試験系に入れた in vitro の系が報告されているが、そのほとんどが甲状腺細胞 (TC) の単層培養系を用いている。最近、単離細胞から in vitro で再構成したスフェロイド培養系が広く行われるようになり、肝細胞では、細胞構築、細胞機能等の in vivo により近い条件を長期間保つことができることが報告されている。我々は、TC のスフェロイド培養系を試み、その形態・機能について調べたので報告する。

**[方法]** SD 系雄ラット (2 週齢) の甲状腺を摘出し、トリプシンおよびコラゲナーゼ処理により細胞浮遊液を調製した。培養液 (MEM、10% FCS) 中に TC を浮遊し、Poly-HEMA コートした 6 穴プレートに分注し、37°C、5% CO<sub>2</sub>、湿潤条件下、ロータリーシェイカー上で培養した。培養液に Thyroid stimulating hormone (TSH) を添加し、TC スフェロイドの形態および機能 (ヨウ素の取り込み) の経時変化について調べた。

**[結果]** TC を培養開始後翌日にはスフェロイドを構成し、濾胞状の形態を構成した。TSH を添加した培養系では、スフェロイドのサイズが大きく、充実性細胞塊を構成した。スフェロイドを構成した後に TSH を添加したところ、濾胞状構造の大型化が認められ、TSH に対して反応していることが示唆された。また、TSH の用量依存的なヨウ素の取り込みが認められた。以上の結果より、TC スフェロイドは、構造・機能共に in vivo の状態に近く、in vitro 毒性試験系としての応用ができるものと考えられた。

Application of In Vitro Thyrocyte Spheroid Culture System for the Toxicity Evaluation System.

Tomoaki INOUE, Akira INOMATA and Ikuo HORII.

Nippon Roche Research Center, Kamakura, Japan.

## 臭素酸カリウムの毒性に及ぼす低蛋白食の影響

○中村英明、諏訪浩一、石井孝広、岡崎和志、高須正生、高松利明、  
西村進、榎並倫宣、西村信雄、畠山和久、岡崎修三

(株)ボゾリサーチセンター 御殿場研究所

【目的】低蛋白飼料による長期飼育はラット慢性腎症の発生を抑え、生存率を向上させることが報告されている。そこでラット腎発癌物質として知られる臭素酸カリウム( $\text{KBrO}_3$ )をラットに4週間反復経口投与し、飼料中の蛋白質含量によって毒性発現に影響を与えるか否かを検討した。

【方法】Crj:CD(SD)IGS雄ラットを40匹ずつの2群に分け、一方には通常飼料(CRF-1、蛋白質含量23%)を他方には低蛋白飼料(CR-LPF、蛋白質含量18%)を与えた。臭素酸カリウムの投与量は、通常飼料および低蛋白飼料群ともに15、50、150 mg/kg/日とし、4週間反復強制経口投与した。投与開始時の週齢は8週齢であった。投与期間中あるいは投与期間終了時に尿検査、血液・血液化学検査を実施し、また、腎の病理組織学的検査を実施した。

【結果】死亡が150mg/kg投与群にみられ、通常飼料では9/10例、低蛋白飼料では5/10例が死亡し、致死率は通常飼料群で高かった。また、通常飼料群では体重増加抑制、摂餌量減少、貧血傾向、尿素窒素の増加、脾臓重量の増加が低蛋白飼料群に比べて強い傾向がみられた。一方、低蛋白飼料群では尿中酵素(クレアチニン補正 NAG, GPT, ALP)活性の上昇、尿量および蛋白質総排泄量の増加が、通常飼料群に比べて強い傾向にあった。

【考察】 $\text{KBrO}_3$ による毒性は、全般的に通常飼料群で強い傾向がみられたが、腎機能検査項目の変動は低蛋白飼料群で大きく、この差は飼料中の蛋白質含量の違いによるものと考えられた。なお、腎の形態学的異常の程度についても考察を加える予定である。

Effects of Low Protein Diet on the Toxicity Induced by Potassium Bromate in Rats.

Hideaki NAKAMURA, Koichi SUWA, Takahiro ISHII, Kazushi OKAZAKI, Masao TAKASU, Toshiaki TAKAMATSU, Susumu NISHIMURA, Tomonori ENAMI, Nobuo NISHIMURA, Kazuhisa HATAYAMA, Shuzo OKAZAKI. Gotemba Laboratory, BOZO Research Center Inc., Shizuoka 412-0039, Japan.

ラットを用いた Sevoflurane 分解物による腎毒性のメカニズム  
について

○村崎祐子、王鞍孝子、豊岡康平、三谷 治、井上恵児、  
長 敏夫、河井祥一郎、田村 隆

丸石製薬株式会社 中央研究所

[目的]Sevoflurane 分解産物である [fluoromethyl-2,2-difluoro-1-(trifluoromethyl) vinyl ether](comA) は特異的に近位尿細管障害を起こすと報告されている。我々は既に comA による腎障害の程度にラット系統差が認められたことを報告した。これは代謝における相違によると考えられるため、既に明らかにされた主な代謝経路について、ラット 3 系統 - Sprague-Dawley(S), Wistar(W), Fischer(F) - の違いを *in vitro* で明らかにしようとした。[方法]肝での CYP と glutathione-S-transferase(GST) による代謝には、ミクロソーム画分を用いた。腎での  $\beta$ -lyase による代謝には組織の 9000g 上清を用いた。Cysteine-comA conjugate(C-comA) を化学合成し、 $\beta$ -lyase の基質とした。comA と肝酵素の反応及び C-comA と腎酵素の反応による遊離フッ素イオンをイオンメータで測定した。[結果]CYP(NADPH-dependent) による脱フッ素は S、W、F でそれぞれ 0.16、0.22、0.33( $\mu$  mole/mg protein) となった。GST (glutathione-dependent) による結果はそれぞれ 0.80、2.01、1.72( $\mu$  mole/mg protein) となった。同様に GST 活性測定の結果も S が最も低値となった。 $\beta$ -lyase(C-comA-dependent) による脱フッ素は S、W、F でそれぞれ 0.12、0.17、0.17(mmole/mg protein) であった。一方、DCVC を基質とした  $\beta$ -lyase 活性はそれぞれ 161.8、264.9、163.1( $\mu$  g pyruvate/mg protein/30min) であった。さらに腎  $\beta$ -lyase mRNA の発現量は酵素活性と同様の傾向が得られた。[結論]我々が既に報告したように、comA 吸入実験では尿中  $\alpha$ -GST 値が S で有意に高値を示すことと今回の結果から、comA による腎障害は  $\beta$ -lyase に起因するだけでなく、他の代謝経路が関与すると考えられる。

Mechanism of Sevoflurane Degradation Product-Induced Nephrotoxicity in Rats.

Yuko MURASAKI, Takako OHKURA, Kouhei TOYOOKA, Osamu MITANI, Keiji INOUE, Toshio CHOW, Yoichiro KAWAI and Takashi TAMURA. Central Research Laboratory / Maruishi Pharm Co., Ltd., Osaka, Japan.

有機アニオン輸送体(OAT1)安定発現マウス近位直尿細管終末部(S3)由来細胞株に対するセファロリジン(CER)の影響

○武田理夫, 小林麻美, 関根孝司, 細山田真, 金井好克, 遠藤仁

杏林大学医学部薬理学

【目的】CERは最初に開発されたセフェム系抗生物質であり薬物性腎障害のモデルとしてしばしば用いられている。CERは近位尿細管基底側より有機アニオン輸送体を介して細胞内に取り込まれ、活性酸素種を生成し障害を惹起すると考えられていた。今回は最近単離されたOAT1遺伝子安定発現S3細胞株を樹立し、CERの腎障害発症機構について検討を加えた。【方法】S3細胞にラットおよびヒトOAT1発現ベクターあるいは発現ベクターのみをリポゾーム法で導入し、G418選択によりラットおよびヒトOAT1安定発現S3細胞株(S3OAT1)およびコントロールのモノクローンS3細胞株(S3pcDNA3.1)を得た。<sup>14</sup>C-PAHの取り込み活性に対するCERの影響および<sup>14</sup>C-CERの取り込み活性を評価した。過酸化脂質生成はTBA反応性物質で、細胞生存率はtrypan blue法で評価した。【結果】1.S3OAT1では<sup>14</sup>C-PAHの取り込みは濃度および時間依存的に増加が認められた。2.<sup>14</sup>C-PAHの取り込みはPAH,probenecidおよびCERにより濃度依存的にまたincubationの温度を37°Cから4°Cにすることにより抑制された。3.S3OAT1は<sup>14</sup>C-CER取り込み活性を示した。4.CERによる過酸化脂質産生および細胞障害はS3pcDNA3.1に比べてS3OAT1で増強していた。そしてそれらはprobenecidあるいは抗酸化剤 $\alpha$ -tocopherolの投与により抑制された。【結論】CERが近位尿細管基底側より有機アニオン輸送体を介して細胞内に取り込まれ活性酸素種産生の増加により障害を惹起するという従来的前提が実験的に裏づけられた。

Effect of Cephloridine (CER) in Mouse Terminal Proximal Straight Tubule (S3) Cell Lines Stably Expressing Organic Anion Transporter 1 (OAT1).

Michio TAKEDA, Mami KOBAYASHI, Takashi SEKINE, Makoto HOSoyAMADA, Yoshikatsu KANAI, Hitoshi ENDOU, Department of Pharmacology and Toxicology, Kyorin University School of Medicine, Tokyo, 181-8611, Japan.

Ochratoxin Aの細胞膜輸送：多選択性有機アニオントランス  
ポーター（OAT1）発現*Xenopus*卵母細胞による検討

○津田実，関根孝司，上野芳夫\*，遠藤仁

杏林大学医学部 薬理学教室

\*東京理科大学薬学部 毒性学・微生物化学教室

【目的】 ochratoxin Aは穀物等を介し人体へ蓄積されるマイコトキシンであり，特に腎臓での毒性が問題となっている．欧州の東部で多発する腎症（バルカン腎症）の原因物質とも考えられている．最近，当研究室において薬物や環境毒素の腎排泄に中心的な役割を果たす有機アニオントランスポーター（OAT1）を単離した．OAT1は腎特異的に発現し，基質選択性が極めて広く，多くの外来性異物や内因性物質の腎排泄を仲介することを我々は既に確認している．本研究では，ochratoxin Aなどのマイコトキシン類のOAT1を介した腎への取り込みについて検討した．

【方法】 OAT1 cRNAを10 ng注入した*Xenopus*卵母細胞を3日間インキュベートした後，実験に供した．輸送及び阻害実験は，卵母細胞に阻害剤存在，非存在下でラベル体（OAT1の典型的基質である<sup>14</sup>C-pアミノ馬尿酸（PAH）あるいは<sup>3</sup>H-ochratoxin A）溶液を加え1時間インキュベートした後，卵母細胞の示す放射能を測定した．

【結果】 OAT1を発現させた卵母細胞において，ochratoxin Aは<sup>14</sup>C-PAHの輸送を強く阻害した（ $K_i$ ：2  $\mu$ M）．他のマイコトキシン（citrininおよびfumonisin B1）も阻害作用を示した．OAT1発現卵母細胞は<sup>3</sup>H-ochratoxin Aを輸送し，その輸送はNa非依存性であり，Na<sup>+</sup>/ジカルボン酸共輸送体との共発現により促進された．ochratoxin AはOAT1の高親和性基質であった（ $K_m$ ：2  $\mu$ M）．ochratoxin Aの輸送はOAT1の典型的基質（PAH，probenecid等）により阻害された．

【考察】 ochratoxin AはOAT1により腎臓（近位尿細管細胞）に三次性能動輸送機序で取り込まれ，腎毒性を示すことが示唆された．

The plasma membrane transport of ochratoxin A by multispecific organic anion transporter 1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes  
Minoru TSUDA, Takashi SEKINE, Yoshio UENO\* and Hitoshi ENDOU.  
Department of Pharmacology and Toxicology, Kyorin University School of Medicine, Tokyo 181-8611, Japan. \*Department of Toxicology and Microbial Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Science, Science University of Tokyo, Tokyo 162, Japan.

## コモンマーモセットの抗癌剤投与による血液性状に及ぼす影響

○ 山本 光雄、池永 哲二、石井百合子、松本 直樹、竹田 剛、加藤 譲、  
石井 昭男

協和発酵工業(株)・安全性研究所

【目的】ヒトに近い真猿類に属するコモンマーモセットに抗癌剤(MMC、ACNU)を投与し、その血液毒性を評価することによって実験動物モデルとしての有用性を検討した。

【方法】生後約2歳齢のコモンマーモセットにMMC(0.7、1.4、3.0mg/kg)またはACNU(3.75、5.5、7.5 mg/kg)を単回静脈内に投与した。MMC群では投与後3週間、ACNU群では8週間まで観察し、その間大腿静脈より0.4~0.7mLの血液を採取し、血液および血液生化学的検査を実施した。

【結果】MMCでは瀕死・死亡が3.0mg/kgで投与後12~16日の間に認められた。血液学的検査では0.7mg/kg以上で白血球数の減少が投与後2日よりみられ、その後増加と減少を繰り返す変化が認められた。血小板数は投与後4~7日に軽度の減少が認められた。血液生化学的検査ではトランスアミナーゼ、尿素窒素の増加が認められた。ACNUでは3.75mg/kg以上で白血球数が投与後2日以降減少のあと、増加傾向を示す2相性の変化が認められた。血小板数は投与後14日以降減少が認められ、21日をnadirに回復傾向を示した。赤血球数は軽度の減少が認められた。血液生化学的検査ではトランスアミナーゼ、尿素窒素の増加が認められた。

【結論】コモンマーモセットにMMCまたはACNUを投与した結果、カニクイザルでみられるような白血球数および血小板数の減少が観察された。また、他の実験動物で認められている肝、腎障害も観察され、コモンマーモセットの実験動物モデルとしての有用性が示唆された。

Hematological toxicity of anticancer drugs(MMC,ACNU) in common marmosets.

Mitsuo YAMAMOTO, Tetsuji IKENAGA, Yuriiko ISHII, Naoki MATSUMOTO,  
Tuyoshi TAKEDA, Yuzuru KATO and Akio ISHII.

Toxicological Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Yamaguchi-  
755-8501, Japan.



## 攪拌による赤血球脆弱性検査の試み

—アセチルフェニルヒドラジン(APHZ)投与ラットでの検討—

○真鍋由恵<sup>1)</sup>, 松下宗史<sup>1)</sup>, 林泰司<sup>1)</sup>, 松本清司<sup>2)</sup>

- 1) 大鵬薬品工業(株) 安全性研究所
- 2) 信州大学医学部附属動物実験施設

[緒言]我々は赤血球の溶血性を評価するための新しい検索法として、血液を等張な条件で希釈し、物理的な力を加えて赤血球の脆弱性を評価する方法(以下、攪拌による赤血球脆弱性検査)を考案し、アセチルフェニルヒドラジン(以下 APHZ)を投与した溶血性貧血モデルラットでその有用性を検討した。

[実験]雄性ラット(Crj:CD(SD)IGS,9~10 週齢)に APHZ 10 および 40mg/kg を単回皮下投与し、投与後 6, 24, 48, 72 時間に採血した。攪拌による赤血球脆弱性検査は以下の手順に従った。①血液を生理食塩液で 200 倍に希釈し、希釈血液 1mL を丸底プラスチック試験管に移す。②直ちに CELLTAC MEK-5153(日本光電)を用いて赤血球数を測定する。③丸底試験管の希釈血液を試験管ミキサー(井内盛栄堂)で 10,30 および 60 秒間攪拌し②の操作を行う。なお、この操作は採血から測定まで 2 時間以内に実施し、評価は攪拌時間 0 秒を 100%とした場合の 10, 30 および 60 秒間攪拌後の残存赤血球数の割合(%)によった。これとは別に、全血の赤血球数を総合血液学検査装置 H\*1E(パイエル・三共)を用いて測定した。

[結果および考察] 血液所見：赤血球数は、APHZ 10mg/kg 群ではいずれの時期にも変化はみられなかったが、40mg/kg 群では投与後 72 時間に減少がみられた。

攪拌による赤血球脆弱性検査：APHZ 10mg/kg 群は投与後 48 時間以降で、40mg/kg 群は、投与後 6 時間から脆弱性が増大していた。この成績は、全血の赤血球数減少がみられる用量(APHZ 40mg/kg)ではより早い時期に、赤血球数減少がみられない用量(APHZ 10mg/kg)においても脆弱性の変化を確認できる可能性を示唆している。なお、本法の安全性試験における有用性を現在検討中である。

An attempt to measure erythrocyte fragility with stirrer — Study in rats administered with acetylphenylhydrazine(APHZ).

Yoshie MANABE<sup>1)</sup>, Norifumi MATSUSHITA<sup>1)</sup>, Taiji HAYASHI<sup>1)</sup>, Kiyoshi MATSUMOTO<sup>2)</sup>. 1) Drug Safety Research Lab, TAIHO Pharm. Co., Ltd. Tokushima. 2) Institute of Experimental Animals, Shinshu Univ. Sch. of Med., Matsumoto, Japan.

ラット造血前駆細胞コロニー形成法の確立及び毒性試験系としての可能性の検討

○高松一彦, 若田明裕

山之内製薬株式会社 創薬安全性研究所

【目的】化合物の造血毒性を造血前駆細胞のレベルで評価するために、造血前駆細胞のコロニー形成法を用いた評価が数多く報告されている。しかしそれらの報告の多くはマウスで成されており、毒性試験に汎用されているラットを用いた系は十分に検討されていない。そこで本研究では、ラット骨髄細胞を用いて赤芽球及び白血球コロニー形成法の確立を試みた。さらに、造血毒性をもつ化合物を培養系に添加した際のコロニー数の減少を指標に、確立した系の毒性試験系としての可能性を検討した。【方法】ラット骨髄細胞を、赤芽球コロニー形成法では $\alpha$ MEM, FCS, BSA, rh Erythropoietin, 2-Mercaptoethanolを含む軟寒天培地で、白血球コロニー形成法では $\alpha$ MEM, FCS, rMu GM-CSFを含む軟寒天培地で培養した。化合物は培養期間中培地に添加し続けた。【結果】赤芽球コロニー形成法においては培養 2-3 日目に赤芽球コロニーが形成され、4 日目以降その数は急激に減少した。白血球コロニー形成法においては培養 3-4 日目に好中球コロニーが形成され、5 日目以降その数は急激に減少した。培養 6 日目にはマクロファージコロニーが形成され、6 日目以降数に急激な変化は見られなかった。これらのコロニー数は播種した細胞数に比例して増加した。また、コロニー刺激因子の濃度に依存してコロニー数が増加し、一定濃度以上になると増加はみられなくなった。これらの結果から、各種コロニー形成に適した培養条件を設定した。この系に、造血毒性の知られている Azidothymidine, Doxorubicin, cis-Platinum, 5-FU, 及び Chloramphenicol をそれぞれ添加したところ、すべての化合物において、いずれのコロニーも用量依存的に数が減少した。以上の結果から、本培養系が毒性試験系として使用できる可能性が示唆された。

Establishment and evaluation of Colony-Forming Units assay using rat hematopoietic progenitor cells as a toxicological test system.

Kazuhiko TAKAMATSU, Akihiro WAKATA. Medicinal Safety Laboratories, Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd. Tokyo-174-8511, Japan.

血液前駆細胞コロニー形成法を用いた Potassium oxonate による  
5-FU 誘発骨髄毒性の軽減効果

○前田泰宏、河内泰英、C.A. Tyson\*、大内田昭信

大鵬薬品工業株式会社 安全性研究所 \* : SRI International

[目的] Potassium oxonate(Oxo)は、抗癌剤である 5-fluorouracil(5-FU)のリン酸化酵素 orotate phosphoribosyltransferase を阻害し、5-FU の殺細胞効果を減弱することが知られている。今回我々はマウス及びヒト骨髄中の血液前駆細胞の *in vitro* コロニー形成法を用いて、5-FU による骨髄毒性に対する Oxo の影響を検討した。

[材料および方法] 6~11 週齢の C57BL/6 マウスの大腿骨から採取した骨髄及び米国でのボランティアからの骨髄細胞を用いた。メチルセルロースを用いて骨髄細胞を浮遊培養し、コロニー成長刺激因子、5-FU 及び Oxo を添加して顆粒球・マクロファージコロニーを形成させ、その数を計測した。対照群のコロニー数に対する比率をもって 5-FU の骨髄毒性及び Oxo の軽減効果を検討した。[結果] 5-FU の 50%コロニー形成抑制濃度は、マウスでは  $0.76 \mu\text{M}$ 、ヒトでは  $1.1 \mu\text{M}$  であった。マウス骨髄細胞では、 $1 \sim 2 \mu\text{M}$  の 5-FU に対し、5-FU : Oxo = 1 : 2.5 からコロニー形成率は顕著に回復し、5-FU : Oxo = 1 : 40 で完全な回復も認められた。ヒト骨髄細胞では、 $1 \sim 5 \mu\text{M}$  の 5-FU に対し Oxo 添加によりコロニー形成率は部分的に(12~60%)回復したが、完全な回復は認められなかった。また、Oxo 単独でもコロニー形成の抑制作用が認められた。ヒトにおいて Oxo によるコロニー形成の回復が顕著でなかった原因として、培養期間がマウスの 7 日間に対し 17 日間と長期であったことから Oxo の分解による作用の減弱が考えられた。以上の結果から、マウス及びヒトの骨髄細胞を用いたコロニー形成法により Oxo の骨髄毒性の軽減効果が確認され、この方法が薬剤の骨髄毒性の検討に有用であることが示された。

Potassium oxonate modulation of 5-fluorouracil-induced myelotoxicity in colony forming assay of hematopoietic precursor cells.

Yasuhiro MAEDA, Yasuhide KOUCHI, Charles A. Tyson\* and Akinobu OHUCHIDA Drug Safety Research Laboratory, Taiho Pharmaceutical Co., Ltd., Tokushima Japan, \* : SRI International, Menlo Park, CA.

## BUUV法を用いた造血幹細胞の細胞動態解析

- 3) *in vitro* 標識と *in vivo* 標識の差異について
- 4) p53 遺伝子欠失マウスについて

○平林 容子、梅村 隆志、児玉 幸夫、金子 豊蔵、菅野 純、  
黒川 雄二\*、井上 達

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部

\* 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター

BUUV法は、プロモデオキシユリジンの *in vivo* 持続標識と、当該標識細胞のみを特異的に殺傷する近紫外線照射とを組み合わせた造血幹細胞動態解析法であり、造血幹細胞レベルでの細胞動態を把握するための従来になかった新しい方法である(第24回大会)。前回に引き続き、この方法を用いて、3) *in vivo* 標識と *in vitro* 標識とが与える結果の差異について検討を行い、4) p53 遺伝子欠失マウスの骨髓造血幹細胞動態を解析したので併せて報告する。【結果】横軸に BrdUrd 投与時間、縦軸に殺傷率をとると、殺傷率は経時的に上昇し、ある時点で plateau に達する。この時 Y 切片は単位時間当たりの cycling fraction を、上昇曲線の傾きは generation time を、plateau レベルは cycling fraction の大きさを各々反映する。3) 分化を伴う造血幹細胞の場合、*in vitro* 標識の 37°C30 分の孵置時間中に人為的に細胞動態に入る分画の存在が不当に細胞回転分画を高値にすることが想定される結果を得た。即ち、*in vivo* 標識では、経時的な測定曲線から求めた外挿値 (7.7%) は、1時間の *in vivo* パルス標識 (9.9%) の値に一致するが、*in vitro* 標識では 37.4%であった。次に 4) p53 遺伝子ホモ欠失マウスの骨髓造血幹細胞についての検討結果では同腹のワイルドマウスに比べて、Y 切片が大きく、傾きはむしろ緩徐であったが、plateau レベルには差異は認められなかった。p53 欠失による造血幹細胞の増殖の亢進と何らかの恒常性維持機構による抑制のフィードバックが関連していることを示唆するものと考え

Hemopoietic Stem-Cell Kinetics Evaluated by Bromodeoxyuridine Incorporation Followed by Near-UV Exposure to Kill Cycling Stem Cells (BUUV).

3) Differences between *in vitro* Labeling and *in vivo* Labeling.

4) Bone Marrow Cells from P53-KO Mice

Yoko HIRABAYASHI, Takashi UMEMURA, Yukio KODAMA, Toyozo KANEKO, Jun KANNO, Yuji KUROKAWA, Tohru INOUE. Biological Safety Research Center, NIHS, Tokyo-158-8501, Japan.

造血細胞を標的としたウイルスベクターによる遺伝子治療法の有効性と安全性の検討

○日比野仁<sup>1,3</sup>、谷憲三朗<sup>1</sup>、杉山肇<sup>1</sup>、谷岡功邦<sup>2</sup>、浅野茂隆<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東大・医科研・病態薬理、<sup>2</sup>実験動物中央研究所、<sup>3</sup>中外製薬

【目的】遺伝子治療の臨床応用に際し、各種ベクターの有効性と安全性の検討が必要であることから、ウイルスベクター感染の造血能への影響を検討し、レトロウイルスによる遺伝子導入造血細胞のマーモセット移植モデルを作成し、導入遺伝子の発現と安全性を検討した。【方法】 $\beta$ -gal 遺伝子を含むレトロウイルスおよびアデノウイルスにてマーモセット骨髄および末梢血造血細胞への遺伝子導入を行い、コロニー形成能をメチルセルロース法にて検討した。レトロウイルスにより MDR1 遺伝子を導入した末梢血造血前駆細胞(PBPC)を自家移植し、造血能の回復、導入遺伝子の発現、replication competent retrovirus(RCR)発現の有無を、野生型ウイルスを対照として Mus Dunning 細胞での増幅後、PG4 細胞による S+L-アッセイにて検討した。【結果】レトロウイルスでは、15-20%の導入効率を得られ、感染によるコロニー形成能の低下は認めなかったが、感染時間の延長に伴い、造血細胞の分化に伴うコロニー数減少がみられた。アデノウイルスでもコロニー形成能に影響は認めず、約 10%の導入効率を得たがその発現細胞はコロニー形成細胞の一部であった。3頭に MDR1 遺伝子導入 PBPC を移植したが、全頭に造血回復がみられ、血清中に RCR を検出しなかった。導入 MDR1 遺伝子は、導入効率は低いものの、末梢血リンパ球、顆粒球中に 1年以上にわたり検出し得た。【考察】レトロ、アデノウイルスいずれにおいても、造血能に影響を与えずに造血前駆細胞への遺伝子導入は可能であるが、長期発現を目的とした場合にはレトロウイルスが適当と考えられた。しかし、目的遺伝子の高発現のためには、導入効率をより向上させる必要がある。また、現在繁用されている組換えレトロウイルスベクターより RCR が生じる可能性は低いものと考えられた。

Evaluation of Efficacy and Safety for Gene Transduction into Hematopoietic Progenitor Cells by Various Virus Vectors.

Hitoshi HIBINO<sup>1,3</sup>, Kenzaburo TANI<sup>1</sup>, Hajime SUGIYAMA<sup>1</sup>, Yoshikuni TANIOKA<sup>2</sup>, Sigetaka ASANO<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Dept. of Hematology/ Oncology, The Institute of Medical Science, Univ. of Tokyo, <sup>2</sup>Central Institute of Experimental Animals, <sup>3</sup>Chugai Pharmaceutical Co.

スunksにおける MPTP の代謝と脳内への MPP<sup>+</sup> の蓄積：ラットとの比較

薙田泰誠<sup>1)</sup>、○有吉範高<sup>2)</sup>、横井毅<sup>2)</sup>、高原栄二<sup>2)</sup>、永田治<sup>2)</sup>、鎌滝哲也<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>北大薬学部・代謝分析、<sup>2)</sup>北陸製薬(株)開発研究本部

【目的】1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP)は生体内でチトクロームP450の分子種CYP2D6やCYP1A2によって代謝されるが、その主要な解毒反応はフラビン含有モノオキシゲナーゼ(FMO)によるN-酸化反応であると考えられている。一方、MPTPはモノアミノオキシダーゼB(MAO-B)によって代謝的に活性化され、最終的にMPP<sup>+</sup>を生じてドパミンニューロンの特異的変性を引き起こし、神経細胞死を惹起することがパーキンソン病様症状を呈する機序と考えられている。本研究では肝FMO活性が著しく低い動物種として演者らが見出したスunksにおいて、MPTPの標的臓器である脳での代謝を明らかにし、毒性本体MPP<sup>+</sup>の脳内濃度をラットと比較検討することを目的とした。

【方法】6週齢雄性スunksおよび7週齢雄性SDラットから常法により脳ホモジネートを調製し、MPTP N-酸化酵素活性とMPP<sup>+</sup>生成活性をHPLC法で測定した。その際、加熱処理により両活性におけるFMOの寄与率を求めた。一方、MPTPを5 mg/kg 単回腹腔内投与し、所定時間に脳を摘出して脳内MPP<sup>+</sup>濃度を測定し、その時間推移を検討した。

【結果・考察】脳ホモジネートにおけるMPP<sup>+</sup>生成活性はスunksおよびラットで同程度であったが、スunksのMPTPN-酸化酵素活性はラットの10%以下であった。またラット脳におけるN-酸化酵素活性はMPP<sup>+</sup>生成活性と異なり、加熱処理によって著しく阻害され、脳における主要な解毒酵素もFMOであることが示唆された。両動物種のMPP<sup>+</sup>の脳からの消失には著しい動物種差が観察された。

Metabolism of MPTP, Accumulation and Disposition of MPP<sup>+</sup> in Brain of *Suncus Murinus*: Comparison between Rats and *Suncus*.

Taisei MUSHIRODA, Noritaka ARIYOSHI, Tsuyoshi YOKOI, Eiji TAKAHARA, Osamu NAGATA and Tetsuya KAMATAKI. Div. of Drug Metab., Hokkaido Univ., Sapporo, Japan, Hokuriku Selyaku CO., LTD., Fukui, Japan.

## アリルニトリルで誘発された中枢神経細胞のアポトーシス

○ 威 小萍, 谷井秀治, 西條清史

金沢大学, 医学部, 衛生学講座

〔目的〕アリルニトリル(ALN)投与マウスは長期間行動異常を引き起こすが、手綱核、縫線核などにかなり限局したTUNNEL陽性細胞を含む病理変化が認められ、特定の部位におけるアポトーシスの惹起と行動異常の関与が示唆されることを昨年度本会において報告した。アポトーシスを証明するためには他の方法による支持も必要である。アリルニトリル投与マウスの神経細胞をアポトーシスとの関連で調べた。又、培養細胞(PC<sub>12</sub>D)を用いて同様に調べた。

〔方法〕雄性マウス(ddY,体重約25g)にALNを経口投与(0,63,84,112mg/kg in olive oil),あるいはPC<sub>12</sub>D細胞にALN3mMを1時間負荷した。マウス脳は投与後2日目と14日目,PC<sub>12</sub>D細胞は2日間培養後,Hoechst33258(H33258)やCaspase-3(CCP32)によるアポトーシス染色法を行った。

〔結果〕ALN投与2日後の内側手綱核,海馬,歯状回,視床下部などTUNNEL陽性細胞が観察された部位に一致して,H33258アポトーシス小体とCCP32陽性細胞が検出された。これらの病理変化は投与14日にはさらに著明であった。ALN処理PC<sub>12</sub>D細胞は浮遊細胞が対照群の約3倍に増加したうえ,付着細胞でもアポトーシス小体の形成が観察された。NGFで神経細胞化を誘導するとアポトーシス小体の形成がさらに増加した。

〔結論〕ALNは内側手綱核,海馬,歯状回,視床下部に局在するかたちでアポトーシスを誘導すると考えられた。

## Allylnitrile- Induced Apoptosis in Neurocytes

Xiaoping ZHANG, Hideji TANII and Kiyofumi SAIJOH. Department of Hygiene, Kanazawa University School of Medicine, Kanazawa 920, Japan.

## 神経毒性試験における自発運動量測定に関する一考察

○立花滋樹、佐藤淳、高島宏昌、関誠、森本智美、原田知子、今井清

財団法人食品薬品安全センター、薬価研究所

自発運動は、症状観察の重要な項目の一つであるが、肉眼観察では変化を絶対量的に評価することは困難である。そこで今回我々は、主として末梢神経の障害を起すことが知られている2種類の化学物質を28日間経口投与し、自発運動量測定装置のひとつであるSUPERMEXを用いて自発運動量に対する影響について検討した。

7週齢のCrj:CD(SD:IGS)雄ラットに3,3-iminodipropionitrile(IDPN)を20、50または100 mg/kg、あるいはアクリルアミド(ACR)を3、10または30 mg/kgの用量で4週間反復経口投与した。対照群には蒸留水を同容量投与した。投与開始3日前ならびに投与1(投与開始日)、8、15、22、および28日にSUPERMEXを用いて2時間の自発運動量ならびに立ち上がり回数を測定した。また、投与26日に円形(直径1.5m)のオープンフィールドを用いて3分間の行動を観察した。

その結果、SUPERMEXにおいて、IDPNの100 mg/kg投与群およびACRの30 mg/kg投与群では、投与1日より自発運動量および立ち上がり回数が減少した。立ち上がり回数も対照群とも投与28日までこの低値が継続したものの、IDPN 100 mg/kg投与群の自発運動量は、投与8日以降増加し、投与15日以降は対照群との間に差が認められなくなった。IDPNの投与により、舞臺海症状といわれる不随意の首部の振りおよび強固な行動が起ることが知られており、今回の検討においても、オープンフィールドにおいてIDPNの100 mg/kg投与群で同様の症状が認められた。一方、対照群では一般状態の観察およびオープンフィールドで歩行等の運動の抑制が認められていることから、投与15日以降の自発運動量に差が認められなくなった原因として、こうした不随意運動も計測されたためと考えられた。立ち上がり回数の減少はACR 10 mg/kg投与群においても認められた。オープンフィールドにおいては、ACRの10 mg/kg以上の投与群、IDPNの100 mg/kg投与群で移動距離および立ち上がり回数が減少した。以上の結果から、自発運動量測定装置を用いて運動量を数値化する場合には、一般状態の観察結果とあわせて慎重に検討を行う必要があることが明らかとなった。

An Assessment for Measurement of Motor Activity with an Automated Device in Neurotoxicity Study.

Shigehiro TACHIBANA, June SATO, Hiromasa TAKASHIMA, Makoto SEKI, Tomomi MORIMURA, Tomoko HARADA, Kiyoshi IMAI  
Food and Drug Safety Center, Hatano Research Institute



神経毒性試験における学習・記憶の測定—音/状況（文脈）刺激条件  
付けすくみ反応の機器測定

○高橋宏明, 亀坂泰正, 林百子, 松本力, 二川治子, 長谷部義男\*

残留農薬研究所, \*室町機械株式会社

OECD の神経毒性試験ガイドライン発行に伴い我国でも同ガイドラインの発行が予定されている。本ガイドラインならびに先行する EPA ガイドラインには一次スクリーニング的項目（FOB、握力、行動量など）に加えて学習・記憶などの脳機能検査が挙げられている。しかしながら、安全性試験に学習・記憶検査を導入するには試験モデルの選択や多数動物を円滑に測定する方法など実際的な問題が多く残されている。一方、近年、音/状況（文脈）刺激条件付け「すくみ反応」は海馬依存性の簡便な学習・記憶モデルとして利用されている。昨年の本学会でも「すくみ反応」の目視観察を行い、安全性試験の一貫として利用できる可能性を示唆した。本報告では円滑に「すくみ反応」を測定するために機器測定の可能性を検討し、トリメチルスズ（TMT）投与後の検査に応用した。

SPF 雄性 F344 ラットを使用した。TMT をラットに経口投与し、FOB、握力、行動量を測定した。別群のラットで電気フットショックに対して音/状況（文脈）刺激を条件付けし「すくみ反応」を測定した。TMT 投与に先立って、「すくみ反応」の目視測定（ビデオ撮影）と機器測定（スーパーメックス、室町機械、左右前後から同時測定し不動時間を計測）を比較すると、極微細な動きを除いて両者で同様の結果が得られた。TMT 最高用量群（8 mg/kg）に痙攣、攻撃性など中枢興奮を示す症状がみられ、一部は死亡した。4 mg/kg 投与群に明確な症状は認められなかった。音刺激による「すくみ反応」に明確な変化は認められなかったが、状況刺激による「すくみ行動」は低用量投与群で減少する傾向がみられた。以上の結果は「すくみ反応」の機器測定はスクリーニングに利用可能であることを示唆していた。

Screening method for leaning and memory in neurotoxicity study: automated measurement of tone/context-conditioned freeze response.

Hiroaki TAKAHASHI, Yasumasa KAMESAKA, Momoko HAYASHI, Tsutomu MATSUMOTO, Haruko FUTAGAWA, and Yoshio HASEBE\*, Inst. Environ. Toxicol., Ibaraki 303-0043 and \*Muromachi Kikai, Tokyo 101-0017.

ラットの短期記憶検査法としてのスケジュール制御オペラント行動 (SCOB) とスコポラミン、メカミラミン、メタンフェタミンの影響

○宮川宗之、大谷勝己、本間健資

労働省産業医学総合研究所

**【目的】**ラットの SCOB を指標にして薬物が短期記憶に及ぼす影響を評価する方法を検討した。使用した強化スケジュールはタイムアウト付交替型混合スケジュール(alternating mix FR 10 DRO 10 sec with TO)で、『迅速な反応(FR)』と『無反応で待機(DRO)』という2種類の行動が要求される事態が、タイムアウト(TO)を挟み交互に出現する。手掛かりとなる弁別刺激は呈示されないので、効率良く報酬を得るには、TO 前の『記憶』をたよりに TO 後の行動選択を行う必要がある。記憶保持時間となる TO 長をセッション内で上下に変化させて行動切替えの正確さをみることで記憶の保持曲線が求められる。スコポラミン、メカミラミン、メタンフェタミンの急性投与の影響を測定し、短期記憶試験法としての有効性を検討した。

**【方法】**雄性 Fischer344 ラットを使用した。一群ではレバー押し反応に対して、もう一群ではノーズポーク反応に対して、食餌強化によるオペラント条件付けを行った。TO 長は4、8、12、16、20 秒の5段階とし、TO 中は照明をおとした。約 80 セッションの訓練の後、各薬物を腹腔内投与し、FR と DRO における反応頻度と初発反応潜時を測定した。また初発反応を、その潜時により 10 秒を基準にして [Hit]、[Miss]、[False Alarm]、[Correct Rejection] に分類し、[Hit] と [False Alarm] の生起確率から Accuracy (=  $P[\text{HIT}] - P[\text{FA}]$ ) と Bias (=  $P[\text{HIT}] + P[\text{FA}] - 1$ ) を求め、それぞれ『反応の正確さ』と『反応性』の指標とした。

**【結果】**保持時間(TO)に対し Accuracy をプロットした記憶保持曲線から、短期記憶を解析した。Accuracy は保持時間に応じた低下傾向を示した。いずれの薬物の投与でも全体的な Accuracy の低下がみられた。メタンフェタミンは Accuracy 曲線の傾きに影響を与えた。

**【考察】**保持時間-Accuracy 曲線から、短期記憶の忘却過程に及ぼす薬物の影響が解析可能なことが示された。SCOB は一般に performance measure として多用されるが、交替型混合スケジュール等、工夫により cognitive (memory) measure としても有効である。

Schedule-Controlled Operant Behavior as a Memory Measure and Effects of Scopolamine, Mecamylamine and Methamphetamine in Rats.

Muneyuki MIYAGAWA, Katsumi OHTANI, and Takeshi HONMA. National Institute of Industrial Health, Ministry of Labour, Kawasaki 214-8585, Japan.

自由摂餌および制限給餌ラットの成長に伴う末梢神経伝導速度の推移に関する基礎的検討

○山下弘太郎<sup>1</sup>, 岡崎欣正<sup>1</sup>, 日詰信吾<sup>1</sup>, 須藤雅人<sup>1</sup>, 奈良間功<sup>2</sup>

<sup>1</sup>三菱化学安科研, <sup>2</sup>摂南大

【目的】糖尿病ラットの末梢神経症や種々の化学物質投与で誘発される末梢神経毒性では、運動神経伝導速度(MNCV)の低下がみられることがある。一方、ラットは生後から20数週齢まで成長に伴ってMNCVが速まることが知られている。一般の毒性試験では体重の減少あるいは増加抑制を伴うことが多く、MNCVの低下が末梢神経毒性を直接反映したものなのか、あるいは体重増加抑制による二次的影響を反映したものなのかの評価が困難なことも多い。そこで、今回演者らはラットの成長とMNCVの関係に着目して基礎データの収集を行ったので、その結果を報告する。

【材料および方法】雄性Crj:CD(SD) IGSラットを5週齢で自由摂餌(FF)群と制限給餌(RF)群の2群に振り分け、RF群にはFF群の2/3量の飼料を毎日与えた。体重および摂餌量の測定は週1回の頻度で行った。5週齢時にFF飼育した3匹、7、9、11週齢時に各群の3匹ずつをネブタール麻酔下でMNCV測定に供した。MNCVは、坐骨および脛骨神経の電気刺激による反応を足底部趾間より筋電図として導出、記録し、その波形から算出した。測定後、全例について全身灌流固定を施し、坐骨および脛骨神経を採取して光顕的に観察した。

【結果およびまとめ】RF群の体重は制限給餌開始後からFF群に比べて低値で推移した。MNCVは、FF群で5週齢35.2m/sec, 7週齢48.6m/sec, 9週齢51.2m/sec, 11週齢66.3m/sec、一方、RF群では7週齢40.2m/sec, 9週齢39.1m/sec, 11週齢51.5m/secであった。すなわち、MNCVは体重の増加抑制を反映して低値を示す傾向にあることが示唆された。一方、組織学的に各群の坐骨および脛骨神経線維に軽度のミエリン崩壊像が散発的に認められたが、MNCVとの関連性は明らかでなかった。

Motor nerve conduction velocities during growth of SD rats fed *ad libitum* or restricted diets.

Kotaro YAMASHITA<sup>1</sup>, Yoshimasa OKAZAKI<sup>1</sup>, Shingo HIDUME<sup>1</sup>, Masato SUDO<sup>1</sup> and Isao NARAMA<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd., Ibaraki-314-0255, Japan.

<sup>2</sup>Setsunan Univ., Osaka-573-0101, Japan.

ラットにおける驚愕性耳介反射を用いた聴覚検査  
 アクリルアミドならびに IDPN の 28 日間反復投与による聴覚への影響

○高島宏昌、田中あづき、吉村慎介、斎藤義明、今井清

財団法人食品薬品安全センター、秦野研究所

驚愕性耳介反射は、音刺激による耳介反射の閾値の変化を測定することにより聴覚の異常を検出する方法で、検査前の動物に対する条件付けが不要なこと、比較的簡単な装置で実施できること等からラットの聴覚検査法として有用と考えられる。今回我々は、聴覚毒性を示すことが明らかとなっている 3,3'-iminodipropionitrile(IDPN)ならびに体勢、振動知覚等に障害を示すと考えられるアクリルアミド(ACR)をラットに反復投与し、驚愕性耳介反射の聴覚検査としての有用性について検討した。

7 週齢の Crj:CD(SD:IGS)雄ラットに IDPN の 100 mg/kg、あるいは ACR の 30 mg/kg を 4 週間連日反復投与した。1 群の動物数は 5 匹とし、投与開始前に行った測定で反応が明らかであった動物を選別して検査した。対照群には蒸留水を同容量投与した。23 あるいは 24 回投与後に、1 匹ずつ遮音箱に収容した動物に、純音による刺激(0.2~20 kHz)を与え、耳介反射あるいは頭部の振動の有無を観察した。刺激の提示時間は 0.5 秒間、各刺激の間隔は 1 から 180 秒の範囲で不規則に行い、各波長とも 12 から 60 dB の範囲で音圧を変化させ反射の閾値を求めた。なお、刺激無提示時の背景音は使用しなかった。この結果、IDPN 投与群の 5 匹中 3 匹では 3 kHz より短波長での反射の閾値 (20~40 dB) が上昇した。これらの変化は Crofton らによる IDPN 投与ラットの聴覚障害に関する報告に一致することから、驚愕性耳介反射の聴覚検査のスクリーニング法としての有用性が示された。なお、ACR 群、対照群の閾値には投与前後で変化は認められなかった。アクリルアミド群については 25 回投与後に、IDPN 投与群については 28 回投与後にそれぞれ代表例について灌流固定を行い、現在、聴覚器に関する病理組織学的検査を実施しているのであわせて報告する。

Evaluation study of startle pinna reflex audiometry to detect chemically induced olfactory defects.

Hirromasa TAKASHIMA, Azusa TANAKA, Shinsuke YOSHIMURA, Yoshiaki SAITOU, Kiyoshi IMAI. Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center, Kanagawa-257, Japan

毒性試験における静脈内インフュージョンの技術改良の試み

- 赤木圭介、渡辺 大、溝口靖基、熊原道代、石井俊也、深澤清久、  
松岡哲也、柴田良二、堀口浩資、長島吉和、岡庭 梓

株式会社ボゾリサーチセンター 函南研究所

[目的]毒性試験における静脈内インフュージョンは臨床 regimen に従って薬物を投与し、その安全域を確認することにある。静脈内に長期間留置するカテーテルは生体にとっては異物であり、これによって起こる変化は毒性の評価上障害となる。

我々は従来使用してきたシリコンカテーテルによる影響を改善するため、ヒトの臨床で多用されている特殊なカテーテルと比較検討した。

[方法]試験系として 6~8 ヶ月齢雌雄ビーグル犬を用いた。シリコンカテーテル(OD:3.1mm、ID:1.6mm、LOMIR BIOMEDICAL)群として 87 頭、アンスロン P-U カテーテル(OD:1.7mm、ID:1.1mm、東レ株式会社)群として 38 頭にカテーテルを大腿静脈から挿入し、先端を腹部後大静脈に進め、7~20 週間留置し、期間中の一般状態、体重、摂餌量、血液、血液化学検査を行うとともに終了後、病理解剖に供した。

[結果]シリコンカテーテル留置群では程度の差はあるものの、静脈炎、静脈周囲炎、肺の血栓性塞栓症などの病理組織所見が概ね全例に観察された。血液学的には白血球増多症、赤血球減少症、好中球増多症などカテーテル留置部に発生した炎症を反映した所見が散見された。一方、アンスロン P-U カテーテル留置群では、これらの変化はごく一部の例に認められたに過ぎず、留置血管の病変は皆無かあるいは軽微な変化に留まった。肺の血栓性塞栓症はわずかながら認められた。

[結論]アンスロン P-U カテーテルはカテーテル留置局所の病変を大きく軽減し、安全性試験における毒性評価上の支障はなかった。従って、静脈内インフュージョン試験に用いるカテーテルの素材としての有用性が確認された。

Improvement of intravenous infusion technique in toxicity studies

Keisuke AKAGI, Dai WATANABE, Yasumoto MIZOGUCHI, Michiyo KUMAHARA, Toshiya ISHII, Kiyohisa FUKASAWA, Tetsuya MATSUOKA, Ryoji SHIBATA, Kosuke HORIGUCHI, Yoshikazu NAGASHIMA, Azusa OKANIWA,

Kannami Laboratories, BOZO RESEARCH CENTER, Inc. Shizuoka 419-0101, Japan.

長期間持続インフュージョンの事例 - カニクイザル用いた3ヵ月間投与

○角崎英志, 福崎好一郎, 鮫島秀暢, 前田 博, 宮脇宏彰

株式会社 新日本科学 安全性研究所

【目的】医薬品の毒性試験では, 可能な限り臨床適用方法に準拠した投与を実施することが必要である。今回, その投与方法の一つとしてカニクイザルを用いて持続的に静脈内に3ヵ月間投与したので, その方法および結果について報告する。

【方法】雌雄各5匹のカニクイザル(3~6才)の大腿静脈内にシリコンチューブを下記の手順で留置した。塩酸ケタミン麻酔下でシリコンチューブを左大腿静脈から後大静脈まで挿入後, チューブの後端を皮下を通して背部から体外に取り出し, ステンレス製テーサー(Lomir Biomedical Inc.)の中を通してシーベル(Lomir Biomedical Inc.)につなぎ, 注射筒と接続した。動物にはジャケット(Lomir Biomedical Inc.)を着せテーサー基部をジャケットに固定した。術後3日間は抗生物質(マイシリンゾル明治®, 明治製薬)を筋肉内投与した。生理食塩液をインフュージョンポンプ(BSP-99M, Braintree Scientific Inc.)を用いて約2.5 ml/hr/個体の投与速度で1日24時間, 3ヵ月間持続的に静脈内へ注入した。投与期間中は一般状態の観察, 摂餌量および体重測定を実施し, 尿検査, 血液学的検査, 血液化学的検査も併せて実施した。また, 投与終了後は剖検を行い, 病理組織学的検査を実施した。

【結果】手術後, 一般状態, 摂餌量および体重推移には異常はみられず, 尿検査, 血液学的検査, 血液化学的検査についても特記すべき変化はみられなかった。病理学的検査については, 現在実施中である。

A case of contious intravenous infusion - 3-month study in cynomolgus monkeys

Hideshi TSUSAKI, Koichiro FUKUZAKI, Hidenobu SAMESHIMA, Hiroshi MAEDA and Hiroaki MIYAJIMA. Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd, Yoshida, Kagoshima, 891-1394, Japan

カニクイザルでの骨粗鬆症モデル：卵巣摘出と低カルシウムが骨密度、強度、代謝に及ぼす影響

○高島宗一<sup>1)</sup>、川越正孝<sup>2)</sup>、高橋弘一<sup>2)</sup>、N.J.Miranda<sup>3)</sup>、D.Collins<sup>3)</sup>、林隆志<sup>1)</sup>、武藤紀生<sup>1)</sup>、中村利孝<sup>4)</sup>

1)イナリサーチ 2)帝人バイオ・ラボラトリーズ  
3)Ina Research Philippines 4)産業医科大学整形外科

〔目的〕リモデリング部分が骨の主体であるカニクイザルを用いて卵巣摘出を行い、骨粗鬆症モデルの特性を明らかにする。

〔方法〕6歳以上の雌カニクイザルを、無処置群、卵巣摘出+普通食群および卵巣摘出+カルシウム制限食群に振り分けた(n=6)。経時的にDXAによる骨塩量測定、骨代謝マーカーの測定を行い卵巣摘出後18ヶ月に骨を摘出した。椎体の圧迫強度試験および大腿骨の3点曲げ強度試験を実施した。さらに別の椎体、大腿骨を用いて、中央横断面の非脱灰標本を作製し、骨形態計測を行った。

〔結果〕椎体の骨塩量は、卵巣摘出+普通食群で卵巣摘出後9ヶ月に有意に減少した。骨形成マーカーのオステオカルシンは、卵巣摘出+正常食群および卵巣摘出+カルシウム制限食群で卵巣摘出後3ヶ月に有意に上昇した。椎体の圧迫強度では、卵巣摘出+普通食群および卵巣摘出+低カルシウム群で有意な低下が認められた。

骨形態計測の結果、卵巣摘出+カルシウム制限食群の骨梁幅では無処置群と比較して差が認められなかったが、骨梁数、骨梁間隙は、減少、増加した。骨石灰化速度は、卵巣摘出+普通食群で上昇していた。

〔考察および結論〕卵巣摘出を行うこと、さらにカルシウム制限食を与えることにより海綿骨では、骨塩量が減少し強度も低下した。これは、卵巣摘出したことにより骨代謝が高回転になったためであることが示唆された。従って本モデルは、骨粗鬆症のモデルとして有用であると考えられた。

Osteoporosis Model in Cynomolgus Monkeys: Effect of Ovariectomy and Low Calcium Diet on Bone Density, Structure and Metabolism

Soichi TAKASHIMA<sup>1)</sup>, Masataka KAWAGOE<sup>2)</sup>, Hirokazu TAKAHASHI<sup>2)</sup>, N.L.J Miranda<sup>3)</sup>, D. Collins<sup>3)</sup>, Takashi HAYASHI<sup>1)</sup>, Norio MUTO<sup>1)</sup>, Toshitaka NAKAMURA<sup>4)</sup>

1) Ina Research Inc., 2) Teijin BIO Laboratories, Inc., 3) Ina Research Philippines Inc.  
4) University of Occupational and Environmental Health

## 卵巣摘出後のカニクイザルの臨床検査の経時変化

○宝来直人, 和泉博之, 福崎好一郎, 宮崎宏彰

株式会社 新日本科学 安全性研究所

【目的】わが国では、現在、高齢化社会が急速に進行しており、骨粗鬆症が重大な問題になりつつある。骨粗鬆症の動物モデルとしてカニクイザルが有用とされているが、使用するサルの年齢は腰椎骨密度のピークを考慮し、9歳前後であり、一般毒性試験で用いられているサルより比較的高齢であり、投与期間として16カ月も推奨されている。今回、9～12歳の雌カニクイザルの卵巣を摘出し、摘出後18カ月までの期間中、骨密度および骨代謝マーカーを調べると共に、一般毒性試験で用いられている諸検査を実施したので、結果について報告する。

【方法】9～12歳の雌カニクイザルを用いて、7頭を卵巣摘出（OVX）群、7頭を偽手術（sham）群として、実験に供した。期間中に一般毒性試験のガイドラインに準じ、一般状態観察、体重測定、摂餌量、尿検査、血液学的検査、血液化学的検査を経時的に実施し、摘出後18カ月に剖検、器官重量および病理組織学的検査を行った。また、腰椎の骨密度（BMD）および骨代謝マーカー（骨型アルカリフォスファターゼ；b-ALP、オステオカルシン；OC、酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ；TRAP、尿中デオキシピリジノリン；D-pyr、尿中ピリジノリン；pyr）も経時的に測定し、剖検後、腰椎および大腿骨の骨強度を測定した。

【結果】いずれの群も一般状態群に異常はみられず、摂餌量および体重にOVX群とsham群で差はみられなかった。OVX群では卵巣摘出後4週目には血中エストラジオールは検出限界以下になり、子宮の萎縮性変化を伴った重量の低値がみられた。BMDの減少がみられ、骨代謝マーカーの変化以外に、尿および血液検査で顕著な変化はみられなかった。

The changes in clinical examination's data after ovariectomy in cynomolgus monkeys

Naoto HORAI, Hiroyuki IZUMI, Koichiro FUKUZAKI and Hiroaki MIYAJIMA. Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd., Yoshida, Kagoshima, 891-1394, Japan



## 医薬品の抗原性試験および免疫毒性試験の実施調査

○筒井尚久<sup>1)</sup>、新海健吉、中村和市、牧 栄二日本製薬工業協会 基礎研究部会第二分科会  
(三菱化学 横浜総合研究所<sup>1)</sup>)

日本製薬工業協会（以下、製薬協）基礎研究部会第二分科会免疫毒性 WG では、本年の2月から3月にかけて、製薬協基礎研究部会加盟各社を対象として抗原性試験および免疫毒性試験に関するアンケート調査を実施したので、その結果について報告する。

製薬協基礎研究部会による抗原性試験および免疫毒性試験の実施状況に関する調査は、今回で二度目となる。1988年から1991年に実施された抗原性試験が対象となった前回の調査では、殆どの製薬会社が、原則として全ての医薬品について多種多様な試験方法で抗原性試験を実施していた。しかし、その後抗原性試験を取り巻く環境は変化し、抗原性試験の実施に関しては、開発医薬品の特性に応じたケース・バイ・ケースの対応が可能であるとの考えが厚生省より示され、現在、試験の実施/非実施の判断はそれぞれの開発企業に一任されている。また、試験方法についても、抗原性試験のデータが蓄積されるにつれて、各企業独自の判断で、被験医薬品の抗原性評価のために適切と思われる手技・手法を選択し、実施されているように思われる。そこで、このような抗原性試験の実施状況ならびに使用された試験方法を把握するために、再度アンケート調査を行い、前回のアンケート調査以降実施された抗原性試験の実状ならびにこの2年間の抗原性試験の進め方に関して回答を得た。更に、外資系の企業には、諸外国における医薬品の薬物アレルギー評価に関する考え方ならびに実施状況について調査し、回答を得た。また、ここ数年、医薬品の免疫毒性に関しても関心が深まりつつあることから、免疫毒性試験の実施状況についても合わせて調査した。今回、これらの調査結果について報告し、今後の抗原性試験ならびに免疫毒性試験のあり方について討議したい。

The results of surveys about antigenicity and immunotoxicity studies conducted in pharmaceutical companies in Japan.

Naohisa TSUTSUI<sup>1)</sup>, Kenkichi SHINKAI, Kazuichi NAKAMURA and Eiji MAKI. Japan Pharmaceutical Manufacturers Association, Tokyo, Japan (Mitsubishi Chemical Corporation<sup>1)</sup>)

## 低分子医薬品の抗原性試験におけるマウス感作条件に関する検討

○桑原孝、朝波省吾、田村工

株式会社大塚製薬工場 鳴門研究所 安全性研究部

【目的】マウス—ラット PCA 反応は、医薬品の抗原性試験に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ることが多い。今回我々は低分子医薬品の抗原性試験を想定して、ペニシリン G(PcG)を用いてマウスの感作条件について再検討した。

【方法】感作量、アジュバント、感作投与経路について以下に示す感作群を設定し、検討した。1) PcG の 5mg/body を水酸化アルミニウムゲル(Alum)とともに腹腔内(ip)投与; 2) PcG の 5  $\mu$ g/body を Alum とともに ip 投与; 3) PcG の 5mg/body を Alum とともに皮下(sc)投与; 4) PcG の 5mg/body を Freund's Complete Adjuvant(FCA)とともに ip 投与; 5) PcG の 5mg/body を FCA とともに sc 投与; 6) PcG の 0.5mg/body を FCA とともに sc 投与。BALB/c 及び C3H/He 系マウスのそれぞれ 10 匹に、各感作液を 2 週間隔で 3 回投与した。最終感作の 2 週間後に採取した抗血清を生理食塩液で 5 倍希釈し、SD 系ラットの背部皮膚を用いた PCA 反応により陽性率を比較した。誘発抗原としては PcG と牛血清アルブミンの結合物を用いた。

【結果】アジュバントに Alum を用いた感作群では、ほとんど陽性結果が得られなかった。FCA を用いた感作群では、ip より sc の方が、低用量よりも高用量の方が陽性率が高い結果となった。すなわち、PcG の 5mg/body を FCA とともに sc 投与した感作群が、BALB/c で 8/10 及び C3H/He で 9/10 と最も高い陽性率を示した。

【考察】低分子医薬品の抗原性試験では、マウスに感作する場合もモルモットと同様アジュバントに FCA を用い、比較的高用量を sc で感作するのが適切と考えられた。

A Suitable Sensitizing Method for Mice in Antigenicity Studies of Low Molecular Drugs.

Takashi KUWAHARA, Shougo ASANAMI and Takumi TAMURA.  
Naruto Research Institute, Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.,  
Tokushima 772-8601, Japan.

## 低分子薬剤のマウス膝窩リンパ節測定法によるアレルギー性評価

○新海健吉<sup>1)</sup>, 杉原芳樹, 國西芳治, 中村和市, 岩城理進, 西田仁, 鈴木律好, H.W.Vohr, 高橋美晴, 高橋健司, 筒井尚久, 上村裕洋, 牧栄二

日本製薬工業協会 基礎研究部会第二分科会  
(三共 安全性研究所<sup>1)</sup>)

【目的】マウス膝窩リンパ節測定法 (popliteal lymph node assay, PLNA) は免疫毒性評価のスクリーニング法の一つで, その陽性反応と臨床における免疫学的副作用の発現性には高い相関性があることが知られている。しかしながら, PLNA の対象は主に自己免疫誘発性物質に向けられており, アレルゲン性物質は殆ど対象になっていない。今回, マウス PLNA の実験条件ならびに再現性を検討するとともに, 薬物アレルギーあるいは自己免疫疾患誘発作用が報告されている薬剤を選択し, マウス PLNA と臨床での副作用, 特に薬物アレルギーとの対応性を確認すべく, 製薬工業協会医薬品評価委員会基礎研究部会免疫毒性 WG において共同研究を行った。

【方法】雌の A/J, BALB/c, ICR マウス (7~8 週齢) の後肢足蹠の皮下に薬剤を単回投与し, 7 日目の PLN 応答を cellularity index を指標に評価した。

【結果と考察】A/J を用いた試験で, アレルギー性あるいは自己免疫誘発性の副作用が知られる薬剤につきそれぞれ数種類を評価したところ, いずれの薬剤も有意な PLN 応答を示した。一方, 臨床でこのような副作用が殆ど報告されていない薬剤の PLN 応答は陰性であった。この試験成績に基づいて, 次の段階に試験を進めた。すなわち, アレルゲン性物質として penicillin G (3 用量), 自己免疫誘発性物質として D-penicillamine (3 用量), 免疫学的機序による副作用がないとされる物質として barbital (1 用量) を被験薬剤とし, これら 3 剤と 3 系統マウスの組合せによる PLN 応答を評価した。本演題では, 以上の共同研究のデータを総括して報告する。この測定法が, 薬物アレルギーを予知するための評価系として有用であるか確認するために, さらに数多くの薬剤の PLN 応答の評価を予定している。

Evaluation of Allergic Potential of Low Molecular Weight Drugs by Mouse Popliteal Lymph Node Assay. Kenkichi SHINKAI<sup>1)</sup>, Yoshiki SUGIHARA, Yoshiharu KUNINISHI, Kazuichi NAKAMURA, Yoshinobu IWAKI, Hitoshi NISHIDA, Ritsuyoshi SUZUKI, H.W.VOHR, Miharu TAKAHASHI, Kenji TAKAHASHI, Naohisa TSUTSUI, Yasuhiro KAMIMURA and Eiji MAKI.  
Japan Pharmaceutical Manufacturers Association, Tokyo, Japan.  
(Sankyo Co., Ltd.<sup>1)</sup>)

## In vitro アナフィラキシー試験法の検討

○井上 智彰、穴戸 信之、中野 康之亮、堀井 郁夫

日本ロシュ(株) 研究所 前臨床科学研究部

医薬品探索早期のスクリーニングでは、試験に使う被験物質の必要量が少ないこと、試験期間が短いことが重要である。医薬品探索に関与する毒性試験においても同じことが言えるが、従来からの毒性試験では、それらに対応していないことが多い。我々は、抗原性試験の in vitro 化に取り組んで来たが、今回は、PCA 試験の代替となる in vitro アナフィラキシー試験について検討した。

**[方法]** 陽性対照抗血清として、卵白アルブミン (OVA) で免疫した C57BL/6 マウスから得たものを用いた。無処置の SD ラットから採取した腹腔内細胞 (PC) をマスト細胞を含む反応細胞とし、PC の培養系に検体血清を添加し、3 時間培養した。その後、細胞を洗浄し、抗原である OVA を加えて、更に 30 分培養した。非特異的なヒスタミン (H) 遊離剤として、Compound 48/80 (C) を用いた。培養後に、上清中に遊離した H を、Fluorescamine 誘導化法により、HPLC にて定量分析した。なお、抗血清の in vivo での抗体価は、ラットを recipient とした PCA 試験で確認した。

**[結果]** 反応細胞として用いた PC は、C に対して用量相関的に検出に十分な H の遊離を示し、細胞および H の検出系は、この試験系に適していると考えられた。PC を陽性対照抗血清で処理後、抗原で刺激した系において、有為に高い H の遊離が認められ、in vivo PCA 試験の抗体価に近い血清希釈倍率まで有為に高い値を示した。この事より、今回の in vitro アナフィラキシー試験の感度は、in vivo PCA 試験とほぼ同等であり、抗原性試験の試験系として取り入れることができるものと考えられた。

Investigation of In Vitro Anaphylaxis Test.

Tomoaki INOUE, Nobuyuki SHISHIDO, Kounosuke NAKANO and Ikuo HORII.

Nippon Roche Research Center, Kamakura, Japan.

## 鼻粘膜免疫用アジュバントとしての組換えコレラ毒素Bサブユニットの評価

○後藤紀久<sup>1</sup>、前山順一<sup>1</sup>、安田陽子<sup>2</sup>、赤野恵子<sup>2</sup>、井坂雅徳<sup>2</sup>、小塚 諭<sup>2</sup>、  
谷口 暢<sup>2</sup>、三浦 裕<sup>2</sup>、枋久保邦夫<sup>2</sup>

<sup>1</sup>国立感染症研究所・安全性研究部、<sup>2</sup>名古屋市立大学・医学部

〔目的〕感染症において、粘膜面における防御機構の確立は重要である。我々は粘膜上に分泌型IgAを誘導し、かつ、血中のIgG抗体をも誘導できる毒性のない安全なアジュバントの開発研究の一環として、グラム陽性の非病原菌である*Bacillus brevis*-プラスミド系で産生させ、精製した、ホロ毒素を含まない組換えコレラ毒素Bサブユニット(rCTB)の粘膜ワクチン応用の可能性を安全性とアジュバント活性の両面から検討した。

〔方法〕安全性：CT, CTB(CT微量含有市販品), rCTBに対し、Hartley雌モルモットの腹腔マクロファージより遊離するLDHの測定及びCT, CTB, Al(OH)<sub>3</sub>gel, rCTBをモルモットの筋肉内、鼻腔内、結紮小腸内投与後の病理組織学的所見を観察した。アジュバント活性：BALB/c雌マウスに液状破傷風トキソイド(nTT)と共にrCTB(10 μg)を経鼻投与し、血清および唾液、肺、鼻腔、小腸、大腸、膣の洗浄液中の抗TT抗体価をELISA法により測定した。また、破傷風毒素で免疫マウスを攻撃し、発症防御効果を観察した。

〔結果および考察〕CTは対照との間に有意なLDH遊離を示したが、CTB及びrCTBは有意な遊離を示さなかった。CT, CTB, Al(OH)<sub>3</sub>gelは筋肉内、小腸内投与で強い炎症を起した。しかし、CTBはメーカーにより毒性に差が認められた。rCTBはいずれの投与ルートでも明確な組織変化を起こさなかった。経鼻投与による粘膜の反応はCT以外ではほとんど認められなかった。nTT+rCTBの経鼻投与は局所粘膜と血中において特異抗体産生を誘導し、免疫マウスは発症および致死から免れた。rCTBは安全で効果的に粘膜アジュバントとして作用し、破傷風トキソイドの経鼻ワクチン化の可能性が示唆された。本研究のために御助力いただいた(財)化学及血清療法研究所に深謝いたします。

Evaluation of Recombinant Cholera Toxin B Subunit as a Nasal Mucosal Adjuvant. Norihisa GOTO<sup>1</sup>, Jun-ichi MAEYAMA<sup>1</sup>, Yoko YASUDA<sup>2</sup>, Keiko MATANO<sup>2</sup>, Masanori ISAKA<sup>2</sup>, Satoshi KOZUKA<sup>2</sup>, Tooru TANIGUCHI<sup>2</sup>, Yutaka MIURA<sup>2</sup> and Kunio TOCHIKUBO<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Dept. of Safety Research on Biologics, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 208-0011, Japan. <sup>2</sup>Dept. of Microbiology, Nagoya City University Medical School, Nagoya 467-8601, Japan.

毒性試験における統計学的配慮 1) 全般的な注意点

○小宮山 靖<sup>1)</sup>、平田篤由、光森達博、澤 淳悟、笠井英史、  
熊谷明夫、田村博信、平河 威、半田 淳

日本製薬工業協会 統計特別小委員会  
(ヘキスト・マリオン・ルセル<sup>1)</sup>)

非臨床試験の使命は「薬剤の特徴づけ」と「予測」であると言える。また、非臨床試験の個々の試験は独立したものではなく開発計画全体の中で互いに関連し合うものであり、開発戦略から離れた実験は企業研究たり得ないと考えられる。特に、動物試験は、その結果から予測されるものが臨床試験実施の妥当性、根拠を与えるという重要な役割を担っている。昨今、非臨床試験の高い科学性が要求されるようになってきているのも当然の流れであろう。一方、薬の開発費用は益々膨れ上がる傾向にあり、製薬企業にとっては科学性とともに経済性を同時に満たすことも重要な課題となっている。試験の科学性や経済性を保証するためには計画段階から様々な判断が必要となるが、その判断は、開発戦略などの様々な制約条件のもとで、生物学的な思考とともに統計学的な思考が要求される。臨床試験では、ICHにおいて試験のあり方に関してはE8（臨床試験の一般指針）が、統計的原則ではE9（臨床試験のための統計的原則）が示されているものの、非臨床試験で体系的に試験の計画から報告までに必要な統計的な考え方を記載したものは少ない。このような背景のもとで日本製薬工業協会の医薬品評価委員会では、統計特別小委員会を新たに設置し、その活動の中で非臨床試験の統計学的原則を記述した指針を現在作成中である。

本指針は、薬の開発全体を視野に入れた上で、非臨床試験について統計学的な観点から原理原則を提案するものであり、具体的な検定手法の解説や提案を行うものではない。本セッションにおいては、その概略を提示し、研究者側のご意見をいただき、指針に反映させていきたいと考えている。

The statistical consideration in animal toxicity studies. 1) General consideration in non-clinical studies.

Osamu KOMIYAMA<sup>1)</sup>, Atsuyoshi HIRATA, Tatsuhiko MITUMORI, Jungo SAWA, Hidefumi KASAI, Akio KUMAGAYA, Hironobu TAMURA, Takeshi HIRAKAWA and Jun HANDA. Japan Pharmaceutical Manufacturers Association, Tokyo, Japan  
(Hoechst Marion Roussel Ltd.<sup>1)</sup>)

毒性試験における統計学的配慮 2)毒性試験における注意点

○平田篤由<sup>1)</sup>, 小宮山 靖, 光森達博, 澤 淳悟, 笠井英史,  
熊谷明夫, 田村博信, 平河 威, 半田 淳

日本製薬工業協会 統計特別小委員会  
(マルホ 研究開発本部<sup>1)</sup>, 他)

毒性試験における統計的問題としては、背景データ、決定樹、多項目性や分散の違いによる評価が挙げられる。未だ議論の多い背景データに関して統計的注意点を提起する。背景データの利用としては4つが挙げられる。i)稀少な出現頻度の所見・データの有効利用：がん原性試験や生殖・発生毒性試験における希少な奇形や腫瘍の発生がこれに当たる。ii)試験実施施設における所見・データの適正な評価：はずれ値や正常範囲の把握が重要であり、データの変動特性やその範囲を理解する一助になる。つまり、得られたデータの妥当性や結果の再現性に対して精度管理の観点から情報が得られる。iii)データのバラツキの制御：バラツキが小さければ、同じ例数であっても高い検出力で統計解析が行える。検査項目のバラツキを小さくする努力は、検査項目の質的向上につながる。iv)評価因子の選択：過去の試験データより評価項目のバラツキや変動範囲などの特性が提供されるならば、有益な情報となり得る。つまり、同一の事象に対して様々な角度から検査を行う場合、検査項目における反応の特異性も考慮して、得られる結果・評価の明確さから各種検査項目間で重要性における順序付けの可能性が考えられる。事前情報として、検査項目のバラツキや検出されるべき差が見積もられれば、解析方法を考慮した動物数の設定が可能であろうし、必要に応じて補足的な検査項目の追加の可能性が考えられる。また、多項目問題は、未知物質の肝障害など毒性に対して GOT, GPT, Alb など複数の検査項目における変化を関連させて検討するために生じている。毒性の評価は、現実的には試験責任者の科学的判断に委ねられているので、決定樹など手法の善し悪しの問題でなく、毒性を見逃さないための探索的な統計学的手法の利用を提言する。

The statistical consideration in animal toxicity studies(2)

In view of scientific data-management in toxicity studies

Atsuyoshi HIRATA<sup>1)</sup>, Osamu KOMIYAMA, Tatsuhiro MITSUMORI,  
Jungo SAWA, Hidefumi KASAI, Akio KUMAGAYA, Hironobu TAMURA, Takeshi  
HIRAKAWA, Jun HANDA

Statistics Subcommittee, Japan Pharmaceutical Manufactures Association,  
Tokyo, Japan (Belonging to MARUHO Co., Ltd.<sup>1)</sup> and other companies)

## 一般毒性試験における多重比較の 利用上の注意点

○浜田知久馬

東京大学

### 1. 目的

検定の多重性による第1種の過誤の増大を防ぐために、t検定に代わって多重比較の手法が一般毒性試験では用いられるようになったが、適切に用いられてない例もいくつかみられる。本発表では、不適切な多重比較の典型例を紹介し、どのように改善すべきかについて解説する。

### 2. 多重比較の不適切な利用例

- 1 分散分析で有意なときのみ、多重比較を行なう。
- 2 例数がアンバランスなときにScheffeの方法を用いる。
- 3 Duncanの方法を利用する。
- 4 パラメトリックでは多重比較を行うが、ノンパラでは多重性の調整を行わない。
- 5 C PC D1 D2 D3型の実験で、Dunnnett検定を用いる。

多重比較法は、本来、分散分析とは独立に構築された方法であるが、慣習的に最初に分散分析を行い、有意な結果が得られたときのみ多重比較を行う場合が多い。この場合、双方で有意な結果が得られたときのみ有意になるので、実際の有意水準はそれぞれの有意水準より、小さくなってしまう。また毒性試験において、対照群と各用量群の比較で、例数のバランスがとれていればDunnnett, そうでなければScheffe法を使い分けるアルゴリズムが長年用いられているが、Dunnnett型の比較にScheffe法を用いると過度に保守的になる。特に毒性試験でアンバランスになるケースは、高用量で毒性による死亡が起きている場合が多く、このように毒性の発現が予想されるケースで、必要以上に保守的な方法を用いるのは明らかに好ましくない。別な例では、Duncanの方法が頻用されるが、この方法は第一種の過誤が名義水準より大きくなってしまうため、適切な多重比較法とはいえない。

このように毒性試験データの解析では、多重比較が適切に用いられてない例が多くあり、早急な改善が望まれる。

Pitfalls of multiple comparisons in general toxicity studies.

Chikuma Hamada

Department of Pharmacoepidemiology, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Tokyo-113, Japan



## ラット反復投与毒性試験における計量値データ解析方法の検討

○榎秀之<sup>1)</sup>, 今溝裕, 五十嵐俊二, 大道克裕, 寺井裕, 横内秀夫, 滝沢毅,  
久一真一, 池田高志, 戸塚和男, 村上善紀, 水間秀行, 山田雅之,  
平田篤由, 塚本修, 半田淳

日本製薬工業協会 基礎研究部会第一分科会 統計ワーキンググループ  
(千寿製薬 開発研究所<sup>1)</sup>、他)

ラット反復投与毒性試験における計量値データについて、製薬協統計WGではどのような統計手法を用いたとき、毒性判断に有用か検討している。今回は毒性研究者に知られている手法を用い、実際の19試験データを解析し、手法を適用する場合の考え方や、問題点などをまとめた。

毒性試験においては、用量相関性の有無が毒性変化を判断するために用いられることが多い。用量相関性の評価を統計的に行う場合、有意水準を幾らに設定すれば毒性評価上の有用性を高められるかについて、回帰分析およびボンキー法の閉手順ならびにウィリアムズ法を用いて検討した。また、投薬に起因する変化の中に用量相関性を示さないケースもあり、その時の評価方法も併せて検討した。つぎに、パートレット検定の結果でノンパラメトリック法へ移行する決定樹がよく使われている点について、不等分散と評価された項目で、パラメトリックおよびノンパラメトリックの用量相関性、群間比較の検定を行い、検定結果の相違点などを検証し、ノンパラメトリック検定に移行するアルゴリズムの妥当性について検討した。また、対照群との比較を行う前提として、一元配置分散分析あるいはクラスカル・ワリスの検定で一様性の検定が行われることもある。これらの一様性の検定では有意性を認めない場合で、用量相関性、群間比較で有意差を認めるケースを検討し、一様性の検定で終わる危険性を実際の試験データを用いて検証した。毒性試験において投薬に起因する変化として取り上げられた変化に対して、検定だけでは見落とされる場合もあるが、これらの検討の中で、視覚的にデータを確かめることの有用性についても実際の毒性試験データを用いて検討した。

Investigation on statistical methods for quantitative data in repeated dose toxicity studies in rats

Hideyuki SAKAKI<sup>1)</sup>, Hiroshi IMAMIZO, Toshiji IGARASHI, Katsuhiro OHMICHU,  
Hiroshi TERAU, Hideo YOKOUCHI, Tsuyoshi TAKIZAWA, Shinichi HISAICHI,  
Takashi IKEDA, Kazuo TOTSUKA, Yoshiki MURAKAMI, Hideyuki MIZUMA,  
Masayuki YAMADA, Atsuyoshi HIRATA, Osamu TSUKAMOTO, Jun HANDA,  
Statistics Working Group, Japan Pharmaceutical Manufacturers Association,  
Tokyo, Japan (Belonging to Senju Pharmaceutical Co., Ltd<sup>1)</sup> and other companies)

## 大動物反復投与毒性試験における計量値データの解析について

○木幡信彦<sup>1)</sup> 堀江成光 佐藤和紀 内田英男 渡部一人 和知正幸  
 二宮一広 坪内春樹 金田信也 貞永 納 山北 修 半田 淳  
 安藤正一 高橋行雄 芳賀敏郎<sup>2)</sup>

日本製薬工業協会 基礎研究部会第一分科会 統計ワーキンググループ  
 (日本ケミファ 研究所<sup>1)</sup>、他、東京理科大学<sup>2)</sup>)

イヌなどの大動物を用いた毒性試験における計量値データの解析は、1群当たりの例数が限られるため、各動物から複数回の測定を行ったり、個々の動物における各検査データの関連性が重視されるなどの特色があり、げっ歯類の試験とは異なった解析手順が求められている。今回、製薬協基礎研究部会加盟各社の協力を得て、毒性評価の考え方のアンケート調査と実際のデータを用いた解析手順の検討を行った。

毒性評価と統計解析との関係のアンケート調査では、統計解析は必ずしも必要ないとの意見と客観的な指標として必要との意見がほぼ半数であった。毒性については各データの関連性やその薬物の薬理作用など様々な情報を総合して判断しており、統計解析は見逃しを防ぐために必要と考えられていた。このような点から、グラフなどを活用してデータ間の関連性など全体像を視覚的に把握する事の重要性が示唆された。

大動物試験では、例数の面で厳密な検証は困難で、むしろ見逃しを避けるために探索的な解析が必要と考えられる。小動物試験のように各時点での決定樹方式の解析を安易に行うべきではなく、むしろ検出力を高める工夫が必要である。その方法として、性をプールして例数を確保する、投与前値を利用して個体差を調整する、時系列変化パターンを利用するといった解析などが考えられる。性をプールする点については、多くの場合プールした方が検出力の向上が認められ、低下する場合でも項目などに一貫した傾向はなく、特に毒性の見落としに繋がることはなかった。投与前値の利用については、データをそのまま使用した解析と投与前値を共変量とした解析、投与前値からの差及び変化率をとった解析を比較・検討中である。その他の方法についても検討中である。

**Analysis of quantitative data from the repeated dose toxicity studies in non-rodents.**  
 Nobuhiko KOWATA, Shigeaki HORIE, Kazunori SATO, Hideo UCHIDA, Kazuto  
 WATANABE, Masayuki WACHI, Kazuhiro NINOMIYA, Haruki TSUBOUTI, Shinya  
 KANEDA, Osamu SADANAGA, Osamu YAMAKITA, Jun HANDA, Masakazu  
 ANDOH, Yukio TAKAHASHI, Toshiro HAGA, Statistics Working Group, Japan  
 Pharmaceutical Manufacturers Association, Tokyo, Japan (Belonging to Nippon  
 Chemiphar Co.,Ltd<sup>1)</sup> and other companies), Science University of Tokyo<sup>2)</sup>

## ドレイズスコアの代替法による予測についての統計学的検討

○吉村功<sup>1</sup>, 大森崇<sup>1</sup>, 大野泰雄<sup>2</sup>, 板垣宏<sup>3</sup>, 大越健自<sup>3</sup>, 金子豊蔵<sup>2</sup>,  
栗下昭弘<sup>3</sup>, 小島肇夫<sup>3</sup>, 高野勝弘<sup>3</sup>, 高松翼<sup>3</sup>, 林真<sup>2</sup>, 吉田武美<sup>4</sup>

<sup>1</sup>東京理大, <sup>2</sup>国立医薬品食品衛生研, <sup>3</sup>化粧品工業連合会, <sup>4</sup>昭和大

[目的] 1991年から3次にわたった多施設バリデーション研究で, 12代替法とドレイズ眼刺激性試験のデータが得られた。これを統計学的に解析し, 各代替法のドレイズスコア予測性を検討する。[方法] 調べた39物質の内 (D1)界面活性剤と多価アルコール, 有機酸塩の19物質, (D2) アルコール, 酸, アルカノールアミンを除いた25物質, の二つのデータセットについて各代替法とドレイズスコアの関係が直線的になるように変数変換を行い, 予測モデルを設定する。(1) 予測値で無刺激と判断して差し支えない閾値が設定できるか調べる。(2) 予測値で強刺激と判断して誤りが生じる代替法と生じない代替法を調べる。(3) 標準物質で無刺激, 弱刺激, 強刺激等を判別したときどの程度判定が確かか調べる。[結果] (A) 代替法の予測性能比較では二つのデータセットの違いがほとんどない。(B) 全施設で得られた代替法の中央値とドレイズスコア(MAS)を対比させたとき, 各施設ごとで両者を対比させたときとの違いもきわめて小さい。(C) 予測値とMAS間で当てはめた直線の信頼区間の下端を閾値として無刺激性を判定できる代替法は ZK1100, MATREX, ComePack, SIRC-CV, SIRC-NR, Hela-MTT, CHL-CV である。(D) Tween 20, SLS, Triton X-100 を代替法での判断指標とし, ドレイズスコアの 5, 25, 50 を境界値として判定を行った場合, 間違いが生じない代替法はなかったが, 多施設全体で見たときのずれが1段階までのものは, SIRC-NR, Hela-MTT, CHL-CV であった。

Examination of the Predictability of Draize Eye Irritation Score by Alternative Assays from Statistical Viewpoint

Isao YOSHIMURA and Takashi OMORI: Science Univ. of Tokyo. Yasuo OHNO, Toyozo KANEKO and Makoto HAYASHI: NIHS. Hiroshi ITAGAKI, Kenji OHKOSHI, Akihiro KURISHITA, Hajime KOJIMA and Katsuhiko TAKANO, Tasuku TAKAMATSU: Japan Cosm. Industry Assoc. Takemi YOSHIDA: Showa Univ.

## 一般演題 ポスター

P 1 : 生殖毒性

P 2 : PK / TK

P 3 : 変異原性

P 4 : 肝臓毒性

P 5 : がん原性

P 6 : 心脈管系

P 8 : 腎毒性

P 9 : 血液・骨髄毒性

P 10 : 中枢・神経系

P 11 : 手技・手法、他

P 12 : アレルギー・免疫毒性

P 13 : データ解析・統計手法

ラット精子運動能の評価法に関する検討  
 -  $\alpha$ -Chlorohydrin を用いた *in vitro* 試験 -

○ 苫米地 英俊, 藤原 道夫, 松澤 利明

山之内製薬株式会社 創薬安全性研究所

$\alpha$ -Chlorohydrin(ACH)は、精子の運動能を変化させることにより雄ラットの授胎能を低下させることが知られている。ACH と同様に、運動能に影響を及ぼすことで雄ラットの授胎能を低下させる化合物としては Ornidazole と Trimethylphosphate が知られており、精子検査において運動能に対する影響を検討することの重要性が示唆される。しかし、*in vivo* で精子の運動能に対する影響を検討する際には、個体間のばらつきが多く、検出精度をあげるためには多くの動物が必要となる。また、精子の運動能に異常が認められた場合、その変化が精子運動能への直接作用か否かを明確にすることが出来ない。そこで、今回は *in vitro* での評価の可能性を ACH を用いて検討した。

雄ラットに ACH を単回経口投与した後、エーテル麻酔下で後大静脈より採血し、血清を分離した。得られた血清を 0.5%BSA 添加 Medium199 に 5%の割合で加えて培養液とした。無処置ラットの精巣上体尾部より採取した精子を調製した培養液中で培養し、精子の運動能を培養開始後 0, 1, 2 および 3 時間に測定した。測定は精子運動能解析装置 HTM-IVOS を用いて行い、運動精子率、運動速度(Path Velocity;VAP, Straight Line Velocity;VSL, Curvilinear Velocity;VCL), 頭部振幅、頭部振動回数および直進性を測定した。その結果、培養開始後 1 時間より VAP, VSL および VCL に有意な低下が認められ、精子運動能に対する ACH の影響を明確に検出することが出来た。

本試験系は *in vivo* の評価系に比べ使用する動物数が少ないため少量の化合物で評価が可能なこと、評価に要する時間が短いこと、凍結保存血清サンプルの使用が可能であること、代謝物の評価も同時に行えるなどの利点を有することから、化合物の精子運動能に対する影響を検出するための有用な方法となる可能性が考えられた。

Method for estimation of the rat sperm - *in vitro* study of  $\alpha$ -Chlorohydrin -

Eishun TOMABECHI, Michio FUJIWARA and Toshiaki MATSUZAWA,  
 Medicinal Safety Laboratories, Yamanouchi Pharmaceutical Co.,Ltd.

$\alpha$ -Chlorohydrinの精子運動に及ぼす影響について  
—精子運動能解析装置(IVOS)を用いた解析—

○福西克弘、寺岡美枝、粟田則男

鐘紡株式会社 薬品開発第一研究所 安全性研究部

**[目的]**精子運動能の評価方法として効率性と客観性の面から近年コンピュータを用いた画像処理による自動測定装置(CASA)の有用性が注目されてきている。しかし、CASAはメーカー毎に運動能を示すパラメーターの算出方法が異なることもあり、何が精子運動能或いは繁殖能を反映する最も良いパラメーターであるかについては検討すべき点が多い。今回、CASAの一つであるHamilton Thorne Research社製精子運動能解析装置(IVOS)を用いて単回投与による $\alpha$ -Chlorohydrin(ACH)の精子運動能へ及ぼす影響について検討したので報告する。

**[材料及び方法]**動物は12~14週のJcl:SD系雄ラットを用いた。ACHの5,10及び20mg/kgを経口投与し、投与後3及び24時間にラットをエーテル麻酔下で屠殺し、精巢上体尾部から得られた精子をIVOSを用いて測定した。

**[結果及び考察]**投与後3時間及び24時間の運動精子率は対照群とACH群との間に有意な差はみられずACHの影響は認められなかった。一方、ACH10mg/kg群では投与後3時間ではPath Velocity(VAP)及びLateral Amplitude(ALH)が有意に低下した。投与後24時間では、投与後3時間の指標に加えProgressive Velocity(VSL),Track Speed(VCL)が有意に低下し、Beat Frequency(BCF)は有意に増加した。ACH20mg/kg群ではVAP, VSL, VCL, ALHが有意に低下し、BCFが有意に増加した。投与後24時間では投与3時間と同様のパラメーターの変化が認められた。このように、ACHは単回投与後3時間から精子運動能へ影響が認められた。また、今回の実験条件ではACHの精子運動能への影響を早期に示すIVOSの精子運動能測定パラメーターはVAP及びALHであった。

The Effect of  $\alpha$ -Chlorohydrin on Sperm Motility and Other Characteristic Parameters Measured by CASA-system(IVOS).

Katsuhiko FUKUNISHI, Mie TERAOKA and Norio AWATA . New Drug R&D Laboratory, KANEBO LTD., Osaka534-8666, Japan

雄性生殖能評価における各指標間の特性  
-精巣毒性を有するAdriamycinを用いての比較-

○加藤真之、林 晴美、馬淵愛子、野村幸子、内藤一嘉、加藤佳子、  
太田隆雄、古橋忠和

株式会社日本バイオリサーチセンター 安全性研究部

前臨床試験における雄性生殖能評価は、交配検査を中心として行われてきた。近年、交配検査だけでは不十分と考えられるようになり、精子検査(運動能、数および形態)を付加した評価が実施されている。そこで、精巣毒性を有するAdriamycin(ADM)を用い、雄性生殖能評価の各指標間の特性を明らかにする目的で、毒性の検出感度を比較した。  
[材料および方法] 成熟SD系ラットにADMの0.5、1.0および2.0mg/kgを1回/週の頻度で4週間静脈内投与した後、精巣および精巣上体重量を測定し、精巣は組織学的検査に、精巣上体は精子検査に供した。また、一部の動物は無処置雌との交配検査を行い、妊娠13日に妊娠黄体数、着床数および生存胚数を数えた。精子運動能検査はHTM-IVOS (Hamilton Thorne Research)を用いて、精子数測定は精巣上体尾部を用いたSperm Head Count法にて、形態検査はWyrobekらの分類に準じて行った。  
[結果および考察] 精巣重量はADM各群で、精巣上体重量ではADMの1.0mg/kg以上の各群で減少が認められた。精巣の組織学的検査では、ADM各群で精祖細胞の減少、1.0mg/kg以上の各群で精母細胞の減少、2.0mg/kg群では精子細胞の減少とセルトリ細胞の空胞化も認められた。精子検査では、運動能、数および形態ともADMの1.0mg/kg以上の各群で投与による影響が認められた。交配検査では、ADMの2.0mg/kg群で受胎率、着床数および生存胚数の減少傾向が認められた。

以上、精巣毒性を有するADMを用いた当実験条件下で雄性生殖能評価の各指標間の比較を行った結果、臓器重量、組織検査>精子検査(運動能、数および形態)>交配検査の順に毒性検出感度が高いことが示された。

Characteristics of Several Parameters to Evaluate Male Fertility  
- Comparison of Sensitivity on Reproductive Parameters Using the Testicular  
Toxicant Adriamycin -

Masashi KATO, Harumi HAYASHI, Aiko MABUCHI, Sachiko NOMURA, Kazuyoshi NAITO,  
Keiko KATO, Takao OTA and Tadakazu FURUHASHI, Nihon Bioresearch Inc. Safety  
Study Department, Gifu-501-6251, Japan.

ホウ酸投与によるラット精子の形態異常について

○吉崎 宏、和泉祐子、平山千束、三奈木隆史、吉本結子、  
兼崎秀一、藤本昭宏、杉谷順康、中津 武

武田薬品工業株式会社 医薬開発本部 薬剤安全性研究所  
光支所

〔目的〕ホウ酸のラットにおける精巣及び精子形態に及ぼす影響はすでに知られており、我々もこれまでにホウ酸投与によりラットの精子数減少及び精子運動性の低下を確認している。今回、ホウ酸のラット精子の形態に及ぼす影響を検討したので報告する。

〔方法〕ホウ酸の50, 150 および 500mg/kg を Jcl:Wistar 雄ラットに3週間強制経口投与し、下記方法により精子の形態を調べた。精巣上体尾部を37℃に加温した培養液(M-199, 0.5%BSA 加)10~15ml 中で細切し、15分間精子を遊出させた。精子浮遊液は氷水中で冷却・不動化後、スライドガラスに塗抹・乾燥し、10%ホルマリン液で固定した。次に、1%エオジンY液で10分間染色後、1%酢酸溶液で弁色・乾燥し、パーマウントで封入し精子塗抹標本を作製した。観察は光学顕微鏡下でラット1匹当たり400の精子について実施した。形態異常は主に頭部の不定型、頭部の欠損、頸部の屈曲および尾部の屈曲等に分類し、各々の発現頻度を調べた。

〔結果〕ホウ酸投与により、精子の中片部と尾部(主部+終部)の境界付近と考えられる部分で尾の屈曲あるいは切断した精子(対照群:3.4%, 500mg/kg 群:13.8%)および頭部の欠損した精子(対照群:3.3%, 500mg/kg 群:11.7%)が特徴的に観察され、その発現頻度は対照群に比べて有意に高値であった。尾の屈曲した精子を走査型電子顕微鏡で調べたところ、中片部と尾部の境界付近の組織の崩壊が観察された。

Effects of Boric Acid on Sperm Morphology in Rats

Hiroshi YOSHIKAZI, Yuko IZUMI, Chizuka HIRAYAMA, Takashi MINAGI,  
Yuko YOSHIMOTO, Shuichi KANESAKI, Akihiro FUJIMOTO,  
Toshiyasu SUGITANI, Takeshi NAKATSU, Drug Safety Research  
Laboratories, Hikari Branch, Pharmaceutical Development Division,  
Takeda Chemical Industries, Ltd., 4720 Mitsui, Hikari, Yamaguchi  
743-5802, Jpan



## ラットにおける制限給餌条件下での雄性生殖能の評価

○坂 芳樹、稲垣 覚、内田美紀、朝鍋うるみ、中塚敏夫、花見正幸、  
松本浩良

萬有製薬(株) 開発研究所

イヌおよびサルを用いた安全性試験では至適一定量の餌を与える制限給餌が一般的である。一方、齧歯類を用いた試験では飽食給餌が行われているが、この方法による餌の過剰摂取が試験成績に影響を与える変動因子であるとの観点から、制限給餌の導入が検討されている。制限給餌を導入する有用性の1つとして、がん原性試験における自然発生病変の発現時期の遅延による生存率の向上があり、さらに薬物動態学的観点からも一様な条件下で薬物を暴露できる利点がある。本試験では飽食および至適と考えられている制限給餌条件下で雄繁殖能試験を実施し、両給餌条件下での成績を比較することで本試験への制限給餌導入の有用性を検討した。

5週齢のCrj:CD(SD)IGS雄ラットを制限給餌群(22.0 ± 0.5 gm/day)と飽食群に分け、解剖予定の18週齢まで体重、摂餌量等の背景対照データを収集した。14週齢時に同系統の雌動物と交配させ授胎能検査を行った。解剖時に雄動物は、精巣・精巣上体の臓器重量および病理組織学的検査に加え、精巣上体尾部中の精子数ならびに輸精管中精子の運動能検査を実施した。制限給餌群における試験期間を通じての体重増加量は、飽食群の増加量の67%であり、飽食群と比較してばらつきが少なかった。雌動物との交尾率、授胎率、臓器重量、病理組織学的検査、精子数、運動精子率および帝王切開所見については、両群間に差異は認められなかった。

以上の結果から、両給餌条件下での授胎能検査成績に差異がなかったことより、本試験で用いた制限給餌がラット授精能に影響を及ぼさないことが確認できた。さらに、本給餌法では生物学的に均一な条件下で試験成績を評価できることから、今後の雄繁殖能試験における給餌法として採用できると考えられた。

## Evaluation for Fertility under Optimized Diet Restriction in Male Rats

Yoshiki BAN, Satoru INAGAKI, Miki UCHIDA, Urumi ASANABE, Toshio NAKATSUKA, Masayuki KEMI and Hiroyoshi MATSUMOTO. Development Research Laboratories, Banyu Pharmaceutical Co., Ltd., Saitama-360-0214, Japan.

フタル酸エステルのエストロジェン活性の*in vitro*  
および*in vivo*試験による評価

○須藤桂子, 永井賢司, 前田真希, 飯塚宏美, 加藤正信

三菱化学安科研 鹿島研究所

【目的】最近, 化学物質の内分泌攪乱作用が問題となっている, フタル酸エステルは, 合成樹脂の可塑剤, 各種溶剤等に使用され, 内分泌攪乱作用が疑われている汎用化学物質である. 今回, 我々は5種類のフタル酸エステルのエストロジェン活性の有無を確認し, アルコール基の差, 主要な代謝物であるモノエステルについての知見を得ることを目的として, 受容体結合試験 (*in vitro*試験) ならびに卵巣摘出ラットの子宮への影響 (子宮湿重量, プロジェステロン受容体誘導) を調べる*in vivo*試験を実施したので報告する.

【方法】5種類のフタル酸ジエステル, DBP, DEHP, DnOP, DINP, DIDPならびに各ジエステルに対応するモノエステル, MBP, MEHP, MnOP, MINP, MIDPについて評価した. 比較対照にはBBPを用いた. 受容体結合試験では, [<sup>3</sup>H]estradiolのエストロジェン受容体 (ER) への結合に対するフタル酸エステルの抑制の程度によってERへの親和性を評価した. ERはラット子宮より調製した. *in vivo*試験では, フタル酸エステル(1000mg/kg/day)を卵巣摘出ラットに3日間反復皮下投与し, 最終投与の翌日に子宮を摘出し, 子宮重量およびプロジェステロン受容体 (PR) の誘導を指標に評価した.

【結果】受容体結合試験では, 比較対照として用いたBBPで $3 \times 10^{-9}$ Mから影響が認められた. その他のフタル酸については, いずれも $3 \times 10^{-8}$ Mまで影響が認められなかったが, DBP, DEHP, MINPおよび MIDPでは $1 \times 10^{-9}$ Mで影響が認められた. *in vivo*試験では, いずれのフタル酸エステルでも子宮重量, PR量に影響は認められなかった.

Estrogenic activity of phthalate esters *in vitro* and *in vivo*.

Keiko Sudo, Kenji Nagai, Maki Maeda, Hiromi Iizuka and Masanobu Kato.

Kashima Laboratory, Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd., Ibaraki, 314-0255, Japan.

DBPおよびDEHPの卵巣摘出ラットを用いた*in vivo*における  
エストロゲン活性の検討

○片山誠一, 平塚秀明, 永井賢司, 山岸保彦,  
宮川 誠, 土谷 稔, 三浦 稔, 加藤正信

三菱化学安科研 鹿島研究所

【目的】最近、化学物質の内分泌攪乱作用が問題となっている。DBPおよびDEHPは、合成樹脂の可塑剤、各種溶剤等に使用され、内分泌攪乱作用が疑われているフタル酸エステルである。今回、我々は卵巣摘出ラットにDBPおよびDEHPを5日間反復腹腔内投与し、*in vivo*におけるエストロゲン活性について検討したので報告する。【方法】SD系雌ラットを6週齢で卵巣摘出後、7～8週齢時にDBPとDEHP（ともに1000mg/kg/day）を5日間反復腹腔内投与し、その翌日解剖した。陽性対照として17β-estradiol (E2 : 1, 2.5, 7.5, 50μg/kg/day)を同様に投与した。細胞増殖動態を評価するため、投与開始前日に BrdUを充填した浸透圧ポンプを埋め込んだ。検索パラメータとして、器官重量（子宮、下垂体、副腎、肝臓）、子宮内液重量、子宮内膜上皮の高さ、血清中プロラクチンおよび脳組織中ドーパミン濃度、子宮中のレセプター数（ER, PR）を測定した。子宮、膈、乳腺、下垂体、副腎、肝臓については病理組織学的に検査した。【結果】E2投与群では子宮と下垂体重量および子宮内液重量の高値、DBP投与群では肝臓重量の高値がみられた。プロラクチンおよびドーパミン濃度は、いずれの群にも対照群との間に有意差は認められなかった。子宮内膜上皮の高さは、E2投与群では高値を示したが、DBPおよびDEHP投与群では有意差は認められなかった。病理組織学的検査において、E2投与群では子宮の内膜増生、膈の粘膜上皮の増生、乳腺の乳管増生および腺増生がみられたが、DBPおよびDEHP投与群ではこれらの変化は認められなかった。本会では、子宮中のレセプター数（ER, PR）の変化および細胞増殖動態の詳細なデータについても併せて報告する。

Effect of DBP and DEHP Administration on *in Vivo* Estrogenic Activities  
in Ovariectomized Rats.

Seiichi Katayama, Hideaki Hiratsuka, Kenji Nagai, Yasuhiko Yamagishi,  
Makoto Miyagawa, Minoru Tsuchitani, Minoru Miura and Masanobu Kato.  
Kashima Laboratory, Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd., Ibaraki, 314-0255, Japan.

可塑剤butyl benzyl phthalateの妊娠及び偽妊娠ラットにおける生殖障害

○江馬 眞, 宮脇英美子, 川島邦夫

国立医薬品食品衛生研究所大阪支所

我々は先に、可塑剤として使われている butyl benzyl phthalate (BBP)がラットにおいて胚致死作用および催奇形作用を示すことを報告した。今回は、妊娠及び偽妊娠ラットを用いてBBPによる妊娠初期における胚致死作用について検討した。

ラットの妊娠0日(精子発見日)から8日まで250, 500, 750または1000 mg/kgのBBPを経口投与し、妊娠20日に開腹して胚/胎児に対する影響を調べた。1000 mg/kg投与群における妊娠率は58%となり、対照群に比べて有意に低かった。平均着床数は750及び1000 mg/kg投与群で有意に低く、平均着床前胚死亡率は1000 mg/kg投与群で有意に高かった。着床の認められた雌においては、litter当たりの黄体数にBBP投与群と対照群との間の差はみられなかったが、litter当たりの着床数は1000 mg/kg投与群で有意に低かった。750及び1000 mg/kg投与群におけるlitter当たりの着床後胚死亡率は有意に高かった。

偽妊娠4日に脱落膜反応を誘起した偽妊娠ラットを用いて、BBPの子宮に対する影響を検討した。ラットの偽妊娠0日(膣栓発見日)から8日まで250, 500, 750または1000 mg/kgのBBPを経口投与し、偽妊娠9日の子宮重量を子宮の脱落膜腫形成の指標とした。偽妊娠ラットの卵巣重量は750及び1000 mg/kg投与群で有意に低かったが、黄体数にはBBP投与群と対照群との間の差は認められなかった。子宮重量は750及び1000 mg/kg投与群で有意に低くなり、BBPが脱落膜腫形成を抑制することが明らかになった。

これらの結果から、BBPによる妊娠初期における胚致死作用は子宮の脱落膜反応の抑制に起因することが示唆された。

Reproductive failure induced by plasticizer butyl benzyl phthalate in pregnant and pseudopregnant rats.

Makoto EMA, Emiko MIYAWAKI and Kunio KAWASHIMA. National Institute of Health Sciences, Osaka Branch, Osaka 540-0006, Japan.

ラットにおける着床前期間に投与したトリブチルスズ  
の着床阻害作用-脱落膜反応に与える影響-

○原園 景、江馬 眞、川島邦夫

国立医薬品食品衛生研究所大阪支所生物試験部

有機スズ化合物は農業や工業の分野で広く使われており、そのうちトリブチルスズは殺生物作用を有していることから、船底や漁網の防汚剤、農業用殺菌剤として使われてきた。前回、我々はラットにおいて塩化トリブチルスズ (TBTCI) を妊娠初期に投与すると、妊娠率が低下することを報告した (Toxicol. Lett. 89, 185-190, 1996; Arch. Environ. Contam. Toxicol. 34, 94-99, 1998)。今回、TBTCIを着床前期間に投与したときの妊娠の成立に及ぼす影響について、偽妊娠ラットにおける脱落膜反応を指標にして子宮に対する影響を検討した。

ラットの妊娠0-3日にTBTCIを0、8.1、16.3、32.5mg/kg経口投与し、妊娠20日に開腹して胚-胎児に対する影響を調べた。妊娠0-3日にTBTCIを投与した群の妊娠率は、対照群の100%に対し、8.1、16.3、32.5mg/kg投与群ではそれぞれ84.6、37.5、12.5%と用量依存的に減少した。

次に、偽妊娠ラットを用いて、偽妊娠0-3日にTBTCIを0、4.1、8.1、16.3、32.5mg/kg経口投与し、偽妊娠4日の午前11時から午後1時の間に、両側の子宮内膜の反子宮間膜側を機械的に刺激することにより脱落膜反応を誘起した。偽妊娠9日に開腹して子宮重量を測定し脱落膜反応の指標とした。TBTCI投与により子宮重量は投与量の増加とともに減少し、16.3mg/kg以上の投与量で有意に減少した。

TBTCIは妊娠ラットで妊娠率の低下が観察されたのとはほぼ同じ投与量で偽妊娠ラットにおける脱落膜反応を抑制したことから、TBTCIによる妊娠率の低下には子宮の脱落膜反応の抑制が関与していると考えられる。

Evaluation of Implantation Failure Induced by Tributyltin Chloride Administered during the Preimplantation Period: Effect on Decidual Cell Response.

Akira HARAZONO, Makoto EMA and Kunio KAWASHIMA. Biological Evaluation, National Institute of Health Sciences, Osaka Branch, Osaka 540-0006, Japan

雌ラットを用いたエストロゲン様作用物質検索のための短期スクリーニング

○山田智也、宮田かおり、佐古 博、吉岡 薫、紙田祐介、  
関 高樹、奥野泰由、細川俊治、山根節夫、松尾昌幸

住友化学工業株式会社 生物環境科学研究所

〔目的〕エストロゲン様作用物質の検索のためのラットにおける短期 *in vivo* スクリーニング系の基礎データを取得するため、基本的に O'Connor らの方法 (Fundam. Appl. Toxicol. 33, 182, 1996) を用い、さらに血液学・血液生化学的検査および臓器重量測定を追加し、17  $\beta$ -Estradiol (E<sub>2</sub>) 投与による各パラメーター変化を調べた。また、卵巣摘出・非摘出動物における感受性の違いを比較検討した。

〔方法〕6週齢の Crj:CD(SD)IGS 雌ラットにて卵巣摘出 (OVX 群) および偽手術 (Sham 群) を行い、その1週間後から、E<sub>2</sub> を 0, 0.001, 0.05 mg/kg/day の用量で4日間腹腔内投与した。最終投与翌日に、動物を屠殺し、血液学・血液生化学的検査、臓器重量測定、病理組織学的検査 (子宮、膈)、子宮の上皮細胞の細胞高の測定および BrdU を用いた子宮の細胞増殖率の測定を行った。

〔結果〕(1)OVX 群への E<sub>2</sub> 投与により、体重増加抑制、摂餌量減少、末梢血網赤血球数減少、血漿アルブミンの増加、血漿アパリン酸アミトランスフェラーゼ・アラニンアミトランスフェラーゼの減少、脾臓および胸腺の重量減少、子宮の大型化および重量・細胞増殖率・上皮細胞高の増加がみられた。(2)Sham 群への E<sub>2</sub> 投与は、OVX 群と一部同じ傾向の変化もみられたが、その程度は軽微であった。

〔考察〕エストロゲン様作用を示す化合物の短期 *in vivo* スクリーニング系としては、卵巣摘出動物を用いた方が検出感度がよいことが確認され、またその指標としては、子宮の重量・細胞増殖率・上皮細胞高が特に鋭敏に反応することが明らかとなった。

A Short-Term Screen to Detect Estrogen-Like Compounds Using Female Rats.  
Tomoya YAMADA, Kaori MIYATA, Hiroshi SAKO, Kaoru YOSHIOKA, Yusuke KAMITA, Takaki SEKI, Yasuyoshi OKUNO, Shunji HOSOKAWA, Setsuo YAMANE and Masatoshi MATSUO. Environmental Health Science Laboratory, Sumitomo Chem. Co. Ltd., Osaka 554-0022, Japan.

**The risk assessment of endocrine disrupting chemicals in the aquatic environment using in vivo exposures with fish.**

C.T. Bowmer & S. Gimeno

Dept. of Environmental Toxicology,  
TNO Nutrition & Food Research Institute,  
P.O.Box 6011 2600 JA Delft, The Netherlands.

Chemicals capable of disrupting the hormonal balance of organisms have long been known. However, it has only recently been established that some industrial intermediates, which were assumed to act exclusively by a (non)polar narcotic mechanism of toxicity, can also bind to estrogen receptors and alter the hormonal and reproductive balance in fish species.

New chemicals and high volume existing chemicals placed on priority lists are subjected to a generic risk assessment in the European Community. As yet, there are no in vivo methods for assessing the endocrine potential of chemicals suitable for use in risk assessment.

In a series of studies at TNO, using all male populations of the carp *Cyprinus carpio*, obtained from crossing normal females (XX) with a homogametic (YY) supermale, the industrial intermediates tertiary pentyl phenol (TPP) and butylbenzyl phthalate (BBP) have been investigated.

- The life stage most vulnerable to hormonal disturbance through exposure to TPP was the period of sexual differentiation. Exposure of fertilised eggs and embryos caused no apparent reproductive effects later on.
- Exposure to TPP for 20-30d immediately prior to or during sexual differentiation caused the development of a permanent oviduct instead of the normal vas deferens (NOEC < 36 µg · l<sup>-1</sup>) accompanied by the development of intersex gonads.
- Male fish possessing oviducts are assumed to be sterile.
- Such effects were irreversible upon returning the fish to clean water.
- Exposure of mature sub-adults to TPP for periods of 30-90d caused a regression in the development of the male testis.
- Exposure of all male carp to BBP for 20-30d during sexual differentiation did not cause the development of an oviduct.

Carp are used as a model for predicting effects in the aquatic environment. However, in the vicinity of waste water treatment plants, other species such as trout *Onchorynchus mykiss* and roach *Rutilus rutilus* have been reported with clear indications of intersex gonads. The fact that the hormonal balance of fish tends to be relatively easily disturbed renders them especially vulnerable. Using Predicted No Effect Concentrations (PNEC's) generated by such 28d tests with carp, and Predicted Environmental Concentrations (PEC) derived from biodegradation simulation tests or waste water treatment data, the PEC:PNEC ratio can be used to provide a simple risk assessment tool for assessing endocrine disruption in the aquatic environment.

Additive Estrogenic Effect Of Genistein And Bisphenol A, And Anti-Estrogenic Effect Of (-)-Epigallocatechin Gallate In MCF-7 Cells.

O Kyung-Sun Kang, Jun Kanno and Tohru Inoue.

Division of Cellular and Molecular Toxicology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-Ku, Tokyo 158-8501, Japan.

Genistein(GEN), found in soy products, is a phytochemical with several potent biological activities, while Bisphenol A(BPA) is widely using in food container, can coating and dental sealants etc. We focused on both estrogenic and proliferative activity of GEN and BPA. GEN and BPA enhance the proliferation of estrogen-dependent MCF-7, human breast cancer cells, at concentrations as low as 100 nM of GEN and 8 ng/ml of BPA achieving similar effect to that of estradiol at 1 nM. The expression of the estrogen responsive gene, pS2 was also induced by treatment with concentration of GEN as low as 1nM and BPA as low as 4 ng/ml in MCF-7 cells. Taken together, it is concluded that GEN and BPA can act as an estrogen agonist resulting in cell proliferation and induction of the estrogen responsive pS2 gene in MCF-7 cells. We examined whether (-)-Epigallocatechin gallate(EGCG) has an anti-estrogenic effect after treatment with GEN and BPA, alone or in mixtures, in MCF-7 cells. Our results showed that EGCG could inhibit cell proliferation induced by 17- $\alpha$ -estradiol, GEN and BPA. Therefore, it is suggested that GEN and BPA might modulate human endocrine system at the human exposure levels, and these endocrine modulating effects of GEN and BPA could be protected by EGCG which is major flavonoid component in green tea.

Additive Estrogenic Effect Of Genistein And Bisphenol A, And Anti-Estrogenic Effect Of (-)-Epigallocatechin Gallate In MCF-7 Cells.

Kyung-Sun KANG, Jun KANNO and Tohru INOUE. Division of Cellular and Molecular Toxicology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-Ku, Tokyo 158-8501, Japan.



発生毒性解析系としての細胞分化を指標とした胚性幹細胞 (ES 細胞) 利用の試み

○高木篤也、北嶋聡、平林容子、相賀裕美子、黒川雄二、井上達

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター毒性部

〔目的〕 マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) は神経、筋、心筋、血管内皮、血球、軟骨細胞などに分化可能な多分化能を有しており、発生毒性の機序解析系として有用であると思われる。そこで、今回は ES 細胞を神経系細胞に分化させることが知られているレチノイン酸及び種々のホルモン様物質の神経系細胞分化への影響を検討した。

〔方法〕 ES 細胞を浮遊培養で 2 日間培養して凝集塊を形成させ、その 2 日間に *All-trans-retinoic acid* (ATRA) (0.5  $\mu$ M)、9-*cis-retinoic acid* (*cis*-RA) (0.5  $\mu$ M)、3,3',5'-triiodo-L-thyronine (T3) (1 nM)、17 $\beta$ -estradiol (17BE) (10 nM)、ATRA (0.5  $\mu$ M)+*cis*-RA (0.5  $\mu$ M)、ATRA (0.5  $\mu$ M)+T3 (1 nM)、ATRA (0.5  $\mu$ M)+17BE (10 nM)、Di (2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) (10, 100 or 1000  $\mu$ M) または KC400 (0.1, 1 or 10  $\mu$ M) を培地に添加した。その後、細胞を細胞培養用皿に撒き、7 日間培養後、ニューロン及びアストログリアの指標として Neurofilament (NF) 及び Gial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) の蛋白レベルをそれぞれウエスタンブロット法にて測定した。

〔結果及び考察〕 NF レベルの増加は ATRA、*cis*-RA 群で認められたが、対照群、T3 または 17BE 群では認められなかった。この ATRA による増加に 17BE は影響を及ぼさなかった。GFAP レベルは ATRA 及び *cis*-RA 群で増加したが、T3 nor 17BE 群では増加しなかった。さらに、GFAP 抗体に反応する蛋白の発現が、DEHP と KC400 群で認められた。一方、細胞像は各群とも非常に chaotic であり、肉眼的判別は困難であった。以上の結果、適切な分化マーカーを用いることにより、ES 細胞は発生毒性の解析系として有用であると思われた。現在、ES 細胞の中胚葉誘導を対象とした解析系について検討を行っている。

An *In Vitro* Developmental Toxicity Test Using Murine Embryonic Stem Cell Differentiation in Culture

Atsuya TAKAGI, Satoshi KITAJIMA, Yoko HIRABAYASHI, Yumiko SAGA, Yuji KUROKAWA and Tohru INOUE. Div. of Toxicol., Biological Safety Research Center, NIHS, Tokyo-158-8501, Japan.

ピラゾロン誘導体のラット培養胎児への影響 (1)  
 -アミノピリンと代謝物の発生毒性について-

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

1) 鎌倉女子大学、2) 国立遺伝学研究所

【目的】 解熱鎮痛薬アミノピリン (aminopyrine : AM) が、食物中の亜硝酸と反応して発癌物質ジメチルニトロソアミンを生成することが判明して以来、ピラゾロン誘導体の内服は行われなくなり、注射剤または座薬として用いられている。

AMは母獣の肝臓で代謝され4-アミノアンチピリン (AA) になり、未変化体 (AM) とともに胎盤を通過して胎児に到達する。in vivo 試験におけるラット胎齢 11 日目の羊水内投与では AM 200  $\mu$  g/embryo の処理で胎児の死亡が 60 %、口唇裂の発現が 20 %であった。AA 250  $\mu$  g/embryo の処理では変化は認められなかった。これらの結果は母獣を麻酔下で手術し、AM 等の処理をするので薬物のみの影響を観察したとはいえない。そこでわれわれはラット全胚培養法を用いて AM と AA の胎児へのそれぞれの直接的作用を観察したので報告する。

【方法】 全胚培養法は、ラット胎齢 11 日目の胎児を取り出し 72 時間の培養を行った。AM 20  $\mu$  g/embryo、AA 250  $\mu$  g/embryo をそれぞれ培養液中に 2 時間処理し、その影響を調べた。

【結果・考察】 胎児の心拍動数は AM 処理群で 20 % の低下を示し、血液循環系の低下も招いた。頂殿長は 13 % の低下、総体節数は 4 % の有意な低下をそれぞれ示した。奇形発現率は 100 % を示し個別の奇形タイプは、曲短尾 90 %、頭部の隆起抑制 80 %、死亡胚 10 %、口唇裂 40 % であった。これらのことから AM は胎児への強い毒性の直接作用をもつことが確認された。一方 AA は、培養胎児に対しては対照群といずれの指標においても差は認められなかった。

以上の結果から、AM 投与の in vivo への羊水内投与の結果と in vitro の全胚培養法による解析が一部、一致することが示唆された。さらに in vitro 下で経時的に AM のラット胎児への影響がみられ、また代謝物の組み合わせによる変化も確認できると考えられた。

Effects of Aminopyrine on Cultured Rat Embryos.

Atsushi YOKOYAMA<sup>1)</sup>, Masaharu AKITA<sup>1)</sup> and Yukiaki KURODA<sup>2)</sup>,<sup>1)</sup> Kamakura Women's College, Kamakura, Kanagawa, 247-8511, Japan and <sup>2)</sup> National Institute of Genetics, Mishima, Shizuoka, 411-0801.

## Crj:CD(SD)IGS ラットの生殖発生毒性試験背景データ

○納屋 聖人, 竹中 千鶴, 佐久間 妙子

協和発酵工業(株)安全性研究所

日本チャールス・リバーで新たに作出された Crj:CD(SD)IGS ラットを生殖発生毒性試験に導入するのに先立ってその背景データを得るべく、いわゆる Segment 2 試験 (III試験: 胚・胎児発生に関する試験) に相当するデータの収集を行ない、従来の系統である Crj:CD(SD) ラット、ならびに Slc:SD ラットの当施設における背景データとの比較を行なった。

日本チャールス・リバー(株)から購入した Crj:CD(SD)IGS ラット雌雄を交配して 30 匹の妊娠動物を得た。室温  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、相対湿度  $55 \pm 15\%$ 、12 時間照明 (午前 7 時～午後 7 時) の飼育室で、オリエンタル酵母製の飼料 CRF-1 と水道水を自由に摂取させた。妊娠期間中は一般状態を観察して、体重と摂餌量を測定した。妊娠 20 日に母動物を屠殺して妊娠黄体数、着床数を観察し、子宮を摘出して胎児の生存・死亡状況、胎児体重、奇形に関する観察 (外部異常、骨格異常、骨格変異、内部異常) を行なった。

当施設における Crj:CD(SD) ラット、および Slc:SD ラットの背景データと比較して、妊娠期間中の母動物の体重推移、摂餌量、胎児死亡率、胎児生存率、生存胎児体重には差異はなく、胚・胎児の発育は良好であり、また外部異常、骨格異常、骨格変異、内部異常に関しては Crj:CD(SD) ラットや Slc:SD ラットと同様にその自然発生発現頻度は低いことが確認された。

今回の成績から、本系統をいわゆる Segment 2 試験 (III試験: 胚・胎児発生に関する試験) に使用することに支障はないものと考えられた。

Back ground data for reproductive and developmental toxicity studies of Crj:CD(SD)IGS rats.

Masato NAYA, Chizuru TAKENAKA and Taeko SAKUMA. Toxicological Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Ube-755-8501, Japan.

## 4 週間未満の投与でも精巣毒性の検出が可能

○堺 俊治<sup>1)</sup>、黒田淳二、藤巻由紀夫、白井紀充、小林賢一、渡辺幸彦、古川雅一、成田隆博、島山茂樹、菅原由憲、小川真一、佐藤 茂

日本製薬工業協会 基礎研究部会 第一分科会

(1: 山之内製薬㈱ 創薬安全性研究所)

薬物を雄性動物に投与して受胎能および初期胚の発生に及ぼす影響を検討する試験(従来の Seg. I 試験)における投与期間は従来は9週間であったが、国立衛試/製薬協による共同研究データをもとに、ICHにおいて4週間に短縮された。この場合、4週間以上の反復投与試験において生殖器に及ぼす影響が適切な病理組織検査によって検討されていることが必要である。この共同研究では2週間の可能性についても一部で検討されたが、結論をみるには至らなかった。しかし、2週間の投与で十分ではないか、という声も多い。

そこで、製薬協基礎研究部会毒性病理ワーキンググループ(WGPAT)では、4週間未満の投与で精巣毒性が検出できるかどうかを調査した。対象はWGPATに参加する31社とし、4週間未満の投与期間で精巣毒性が発現した化合物の経験の有無について問い合わせた。その結果、4週間未満の投与により精巣毒性を経験した、という12化合物の例が報告された。これらは、1例を除いて通常の病理組織学的検査で検出された。また、4週間未満という短期のパイロット試験あるいはスクリーニング試験では、肉眼的に異常がなければ精巣の病理組織検査を実施しない施設がWGPATの約半数に及ぶことを加味すると、4週間未満の投与による精巣毒性の頻度がさらに増すものと思われる。このことから、Seg. I試験の雄性動物への投与期間を2週間に短縮できる可能性が示唆される。しかし、4週間の投与でみられた精巣毒性が2週間の投与では見られないケースもあることから、投与期間を2週間に短縮するにはさらに検討が必要である。

Testicular toxicity could be detected in studies of shorter duration than 4 weeks

Toshiharu SAKAI<sup>1)</sup>, Junji KURODA, Yukio FUJIMAKI, Norimitsu SHIRAI, Ken-ichi KOBAYASHI, Yukihiro WATANABE, Masakazu FURUKAWA, Takahiro NARITA, Shigeki HATAKEYAMA, Yoshinori SUGAWARA, Shin-ichi OGAWA and Shigeru SATOH

Japan Pharmaceutical Manufacturers Association, Tokyo, Japan

1): Medicinal Safety Laboratories, Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

## 生殖毒性に関するデータベース解析

## 1)「波状肋骨」について

○池川直<sup>1</sup>、松浦正男<sup>2</sup>、井上立生<sup>3</sup>、大窪康貴<sup>4</sup>、三分一所厚司<sup>5</sup>、  
谷口英巳<sup>6</sup>、福西克弘<sup>7</sup>、吉田順一<sup>8</sup>、堀本政夫<sup>9</sup>、藤井登志之<sup>10</sup>

<sup>1</sup>帝人、<sup>2</sup>日本ケミファ、<sup>3</sup>丸石製薬、<sup>4</sup>富士レビオ、<sup>5</sup>三共、<sup>6</sup>久光製薬、  
<sup>7</sup>鐘紡、<sup>8</sup>キスト・マリン・セル、<sup>9</sup>ファイザー製薬、<sup>10</sup>藤沢薬品工業

[目的および方法]「波状肋骨」は一般的に骨格変異として扱われており、生後回復する変化と考えられている。しかし、他の毒性指標(骨格異常等)との関連性は明らかとなっていない。そこで、我々は生殖毒性に関するデータベースを用いて、「波状肋骨」と他の毒性指標との関連性について調査した。尚、データベースは、1990～1995年に6雑誌(薬理と治療、基礎と臨床、応用薬理、医薬品研究、Chemotherapy、J. Tox. Sci.)に掲載された胎児器官形成期投与試験(ラット:146試験、ウサギ119試験)を基に、前年度当ワーキンググループが作成したものである。

[結果]「波状肋骨」が有意に増加した試験として、データベースからラットでは5試験が抽出された。一方、ウサギでは、ラットで「波状肋骨」が増加する薬剤においても、またその他の薬剤においても「波状肋骨」が有意に増加したという報告はなかった。従って、「波状肋骨」はラットで特徴的に薬物影響として発現する変化である可能性が示唆された。また、ラット胎児で「波状肋骨」の増加が認められた1文献において、生後には「波状肋骨」の出現率の減少が認められており、今回の調査も「波状肋骨」は生後回復する変化であることを支持する結果であった。「波状肋骨」の増加が認められた投与量では、母体の体重、摂餌量、一般状態および胎児の体重が有意に変化していた場合が多かった。しかし、「波状肋骨」の増加が認められた投与量において、胎児の外表、内臓および骨格等の形態異常の出現率は必ずしも増加していなかった。

尚、この研究は平成9、10年度の日本製薬工業協会(製薬協)基礎研究部会第3分科会生殖毒性ワーキンググループの活動の一環として実施した。

## Reproductive toxicity database survey 1 : wavy rib

Sunao IKEGAWA (Teijin), Masao MATSUURA (Nippon Chemiphar), Tatsuo INOUE (Maruishi), Yasutaka OHKUBO (Fijirebio), Atsushi SANBUISHO (Sankyo), Hidemi TANIGUCHI (Hisamitsu), Katsuhiko FUKUNISHI (Kanebo), Junichi YOSHIDA (Hoechst Marion Roussel), Masao HORIMOTO (Pfizer), Toshiyuki Fujii (Fujisawa)

## 生殖毒性に関するデータベース解析

## 2) 「頸肋」および「腰肋(過剰肋骨)」について

○花田哲<sup>1</sup>、大導寺俊平<sup>2</sup>、有行史男<sup>3</sup>、石井浩之<sup>4</sup>、岩瀬隆之<sup>5</sup>、関谷公範<sup>6</sup>、  
谷泉乃<sup>7</sup>、西直樹<sup>8</sup>、横本泰樹<sup>9</sup>、堀本政夫<sup>10</sup>、藤井登志之<sup>11</sup>

<sup>1</sup>東レ、<sup>2</sup>科研製薬、<sup>3</sup>田辺製薬、<sup>4</sup>トアエイヨ、<sup>5</sup>三菱化学、<sup>6</sup>大塚製薬、<sup>7</sup>ノバルティス・ファーマ、<sup>8</sup>セリア新薬工業、<sup>9</sup>鳥居薬品、<sup>10</sup>ファイザー製薬、<sup>11</sup>藤沢薬品工業

〔目的および方法〕胎児の骨格検査において、腰肋は骨格異常に関連した変化として捉えられているが、収集した文献のデータベースからもそれが示されるのか、また過剰に存在する肋骨として、頸肋は腰肋と同様に異常の指標となりうるのか調査した。即ち、1990～1995年の6雑誌（基礎と臨床、応用薬理、医薬品研究、薬理と治療、Chemotherapy および J.Tox.Sci.）に掲載されたラットおよびウサギの胎児器官形成期投与試験（ラット：146試験、ウサギ：119試験）における、腰肋あるいは頸肋の有意な増加が認められた試験について、他の毒性所見との関連性について検討した。但し、ウサギの頸肋については1試験のみであったので検討からは除外した。

〔結果〕腰肋の有意な増加はラットおよびウサギでそれぞれ19および14試験で認められた。これら試験を薬効別に区分すると、抗腫瘍薬および循環器用薬が多かった。腰肋の増加した試験において、骨格異常の有意な増加はラットで5試験（骨格異常の増加した総数：6試験）およびウサギで4試験（骨格異常の増加した総数：7試験）で認められ、骨格異常の増加には腰肋の増加を伴っている場合が多かった。ラット頸肋が増加した7試験において、骨格異常の増加は4試験（骨格異常の増加した総数：6試験）で認められ、腰肋と同様に骨格異常の増加には頸肋も伴っている場合が多かった。外表および内臓異常との関連に関しては、ラットで外表異常がみられた場合のみ、腰肋あるいは頸肋の増加する頻度が高い傾向を示した。腰肋および頸肋はともに母体毒性および子宮内胎児発達毒性を示す用量で発現する傾向があった。

尚、この研究は平成9、10年度の日本製薬工業協会（製薬協）基礎研究部会第3分科会生殖毒性ワーキンググループの活動の一環として実施した。

## Reproductive toxicity database survey 2: Cervical rib and supernumerary rib

Satoshi HANADA (Toray), Shunpei DAIDOUJI (Kaken), Fumio ARIYUKI (Tanabe), Hiroyuki ISHII (Toa eiyo), Takayuki IWASE (Mitsubishi Chemical), Kiminori SEKIYA (Otsuka), Mizuno TANI (Novartis), Naoki NISHI (Zeria), Yasuki YOKOMOTO (Torii), Masao HORIMOTO (Pfizer), Toshiyuki FUJII (Fujisawa)

ラットの肝 P450 酸化系酵素活性の日内変動における性差  
および成長ホルモンの影響

○古川忠司, 渡辺稔之, 真鍋 淳, 大橋芳彦, 瀬畑信哉, 岡田忠彦,  
森 裕司<sup>1)</sup>

三共(株)安全性研究所, <sup>1)</sup> 東京大学・獣医

我々は、ラットにおいて P450 が触媒する 7-alkoxycoumarin(7-methoxycoumarin, 7-ethoxycoumarin および 7-propoxycoumarin) の O-脱アルキル化活性(ACD 活性)に、暗期に高値となる明瞭な日内変動が認められることを本学会で報告した。しかし、この結果は雄で得られたものであり、雌についてはまだ確認されていない。また、ラットでは ACD 活性に性差のあることが知られている。そこで今回、ACD 活性の日内変動を雌ラットについて調べ、さらにこの活性の日内変動における成長ホルモン(GH)の影響についても検討した。はじめに、雌ラットにおける肝臓中の ACD 活性を 9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 1:00 および 5:00 について調べたところ、雄で認められるような日内変動は認められず、この活性の日内変動に性差の存在することが明らかとなった。そこで、この性差に GH が関与しているか否かを調べるために、下垂体を摘出した雄ラットに GH を 1 日 2 回皮下投与(GH-sc 群: 雄型の分泌パターンを模倣)、あるいは浸透圧ポンプを用いて持続投与(GH-inf 群: 雌型の分泌パターンを模倣)を 1 週間行い、肝 ACD 活性を明期(13:00)および暗期(1:00)に測定して、擬手術を施した雌雄および下垂体摘出のみを施した雄(Hpx 群)の場合と比較した。その結果、GH-sc 群の ACD 活性は暗期に高値となる明瞭な明暗差を示し、Hpx 群よりも雄の結果に類似していた。一方、GH-inf 群では明暗差は明確でなく、雌の結果に類似していた。これらの結果から、ACD 活性の日内変動における性差には GH の分泌パターンの相違が強く関与していることが示唆された。また、GH-sc 処置では CYP2C11 などの雄特異的分子種が誘導されることが知られているので、ACD 活性の日内変動の発現にはこれらの分子種が関与していることが推察された。

Sex difference and effect of growth hormone on daily fluctuation of hepatic P450 monooxygenase activities in rats.

Tadashi FURUKAWA, Toshiyuki WATANABE, Sunao MANABE, Yoshihiko OHASHI, Shinya SEHATA, Tadahiko OKADA and Yuji MORI<sup>1)</sup>. Laboratory of Animal Science & Toxicology Laboratories, Sankyo Co., Ltd. <sup>1)</sup> Veterinary Medical Science, Univ. of Tokyo.

ゴム老化防止剤 2-Mercapto-4-methyl-benzimidazole (4MeMBI) 及び 5-Me 異性体 (5MeMBI) のラットにおける単回及び反復投与毒性とトキシコキネティクスの比較

○酒見和枝、伊藤理恵乃、宇佐見誠、大野泰雄、津田充宥

国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター・薬理部

【目的】 2-Mercaptobenzimidazole (MBI) 及びそのメチル誘導体 MeMBI (4Me体及び 5Me体の1:1 混合物) は、ゴム等の老化防止剤として使われている。昨年、著者らは両化合物のラットへの反復経口投与に際して見られた、MBI と MeMBI の著しい甲状腺毒性の差が、トキシコキネティクス (TK) の顕著な差に起因することを示した。今回、著者らは 4Me異性体の分離精製に成功したことから、これら Me異性体の単回経口投与での毒性及びその TK を比較すると共に、混合物投与の場合の TK との比較検討を行なった。

【実験方法】 5週齢の Wistar系雄ラットに 4MeMBI 及び 5MeMBI を単回 (25~400 mg/kg)、または14日間反復 (0.6 mmole/kg) 強制経口投与した。一般状態の観察と体重、摂餌量並びに飲水量の測定、採血、採尿、解剖(臓器重量測定)を行った。血清及び尿中の未変化体量、代謝物量は HPLC を用いて測定した。又、血清中 T3、T4 及び TSH を測定した。

【結果及び考察】 単回投与では、両異性体とも用量に依存して自発運動の低下、後肢麻痺、腹臥、横臥が見られたが、5Me体でのみ死亡例が観察された。又、その症状発現は血中未変化体濃度によく対応していた。反復投与では両投与群において一般状態の異常は認められなかったが、肝臓及び甲状腺重量が増加し、胸腺重量が減少した。混合物投与時と比較して 4Me体投与群では Cmax、AUCともに減少し、肝重量の増加を伴ったことから反復投与による代謝酵素の誘導が示唆された。これに対して、5Me体投与群では同等か逆に増加した。混合物投与においては、5Me体による 4Me体の代謝抑制が見られ、反復投与によりその効果は更に顕著になった。

Comparison of Toxicities and Toxicokinetics between 2-Mercapto-4-methyl-benzimidazole (4MeMBI) and its 5-Methyl Isomer (5MeMBI) in Rats Treated by Single and Repeated Oral-Dose Administrations.

Kazue SAKEMI, Rieno ITO, Makoto USAMI, Yasuo OHNO, Mitsuhiro TSUDA.  
National Institute of Health Sciences, Tokyo 158-8501, Japan



### Phenotyping of Flavin-containing Monooxygenase using Caffeine Metabolism and Genotyping of FMO3 Gene in a Korean Population

C.S. Park, W.G. Chung, J.H. Kang, H.K. Roh, K.H. Lee and Y.N. Cha

Department of Pharmacology and Toxicology,  
College of Medicine, Inha University, Incheon 402-751, Korea

Flavin-containing monooxygenase (FMO) activity has been determined in 82 Korean volunteers by taking the molar concentration ratio of theobromine (TB) and caffeine (CA) present in the 1 hr urine (between 4 and 5 hr) samples collected after administration of a cup of coffee containing 110 mg of CA. Among the 82 volunteers, there were 19 females and 63 males (30 smokers and 52 non-smokers). Using the urinary molar concentration ratio of TB/CA as the index of the in vivo FMO activity, the volunteers could be phenotyped into low (0.53 - 2.99) and high (3.18 - 11.95) metabolizers divided by the antimode of 3.18. Peripheral bloods were sampled from these volunteers and their genomic DNAs were amplified by PCR with oligonucleotides designed from intronic sequences of human FMO3 gene. Comparing the nucleotide sequences of the amplified FMO3 gene originating from individuals with high and low FMO activities, 9 point mutations were identified in the open reading frame sequences. Among these 9 mutations, we have analyzed 3 mutations (FMO3/Stop<sup>148</sup>, Lys<sup>158</sup> and Gly<sup>308</sup>) in depth for the purpose of correlating the FMO activities with FMO3 mutant genotypes in a Korean population. A rare FMO3/Stop<sup>148</sup> mutant allele originating from FMO3/Gly<sup>148</sup> occurred by substitution of G442T in exon 4 and yielded a premature TGA stop codon. The stop codon was detected in one subject with lowest FMO activity who had the mutation in a heterozygous state. In a pedigree study, he was found to have inherited the mutation from his mother who also had the heterozygous stop codon and low FMO activity. Two common mutations were detected in exons 4 and 7. The one mutation in exon 4 resulted from G472A change eliminating a Hinf I restriction site and produced an amino acid substitution from Glu<sup>158</sup> to Lys. The other mutation in exon 7 resulted from A923G change generating a Dra II restriction site and producing a non-conservative replacement of Glu<sup>308</sup> to Gly. Based on the secondary structure maps of FMO3 enzyme proteins for these two mutant types, the FMO3/Gly<sup>308</sup> mutation transformed the helix structure into a sheet shape and appeared to have a greater potential to produce a dysfunctional FMO3 enzyme than the FMO3/Lys<sup>158</sup> mutation which does not cause alteration in the secondary structure. Comparing the phenotypes of FMO activity with those of FMO3 mutant genotypes, about 80% of volunteers with homozygous and/or heterozygous mutations on either one or two of the above mentioned mutation sites showed low FMO activities. Thus the individuals with these FMO3 gene mutations may have defective metabolic activity for many clinically used drugs and dietary plant alkaloids which are oxidized primarily by the hepatic FMO3.

(This work was supported by the research grant from the Genetic Engineering Program of the Ministry of Education (1997: 261-1-2) and also by a Inha University grant (1997)).

### Photomutagenicity/Phototoxicity *in vitro* Assays

E. Wollny\*, L. Ullmann, J. Klecak, G. Arcelin, T.R. Allen  
RCC, Research & Consulting Company Ltd., CH 4452 Itingen, Switzerland  
\*RCC, Cytotest Cell Research GmbH; D-64380 Rossdorf, Germany

Drugs that are photoactive absorb light and subsequently release energy causing biological damage. The greatest concern is for drugs which absorb primarily UVB (280 to 320 nm) and/or UVA (330 to 400 nm). Drugs administered to patients either orally or topically can cause skin reactions following exposure to sunlight.

Primary mechanisms are phototoxicity in which the immune system is not involved and photoallergy that requires a primary immune response to cause skin reactions.

Traditional screening methods to detect phototoxic compounds followed the established toxicology pattern of using both *in vitro* and *in vivo* test systems. *In vitro* biochemical reactions examine photoxidation of amino acids and proteins, or photoactivated binding or damage to DNA. *In vitro* studies assessing photoactivated damage to red blood cells (membrane toxicity) or cytotoxicity to mammalian cells growing in culture are routinely performed before animal studies. Animal studies include photosensitisation and phototoxicity in hairless mice or guinea pigs. Acute phototoxicity studies in humans complete the traditional battery of studies.

In this paper *in vitro* Photomutagenicity (Ames Test) as well as a Photo Chromosomal Aberration Assay (CA) are introduced.

The test systems introduced for the determination of phototoxicity are the 3T3 neutral red test as well as an actual study type which uses human keratinocytes respectively human cell lines from Keratinocytes (e.g. HaCat-cells) as well as artificial skin models.

## マイトマイシンCの小核誘発性に対する絶食の影響

○朝波省吾, 下野和之

株式会社大塚製薬工場 鳴門研究所 安全性研究部

【目的】最近反復投与した動物を用いる小核試験が考えられており, 最高用量などで餌を食べなくなった動物において小核誘発性を評価する可能性がでてきた。そこで我々は, 変異原物質の小核誘発性に対する絶食の影響を, 投与前から絶食させた動物を用いて検討した。

【方法】変異原物質であるマイトマイシンC (MMC) の0.1及び0.5mg/kgを投与1~3日前から絶食させたマウスの腹腔内に単回投与した。その後も絶食を継続させて投与24時間後に骨髓細胞を採取した。個体当たり2000個の多染性赤血球を観察して小核出現頻度を算出した。

【結果及び考察】MMCの0.1mg/kg投与群では, いずれの絶食期間においても有意な小核誘発性は認められず, 絶食による明らかな小核誘発への増強作用は認められなかった。一方, 0.5mg/kg投与群においては, 飽食群で $6.7 \pm 1.2\%$ の小核誘発が認められたにもかかわらず, 投与前の絶食日数が増えるごとに小核出現頻度の減少が観察され, 2日及び3日絶食させた群では有意な小核誘発性が認められなくなった。これらは, マウス骨髓において絶食日数の増加に伴い明らかな骨髓抑制が観察されたことから, 絶食による見かけ上の小核誘発性の抑制であると考えられた。

Effect of food deprivation on micronucleus induction by mitomycin C in mice

Shougo ASANAMI and Kazuyuki SHIMONO. Naruto Research Institute,  
Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc., Naruto, Tokushima 772-8601, Japan.

膀胱特異的発がん剤芳香族アミンの代謝的活性化に関与するヒトアセチル転移酵素の検討

○小田美光、Pramod Aryal

大阪府立公衆衛生研究所、公衆衛生部

〔目的〕我々は、ヒトアセチル転移酵素遺伝子 (NAT1とNAT2) を導入した二つの試験菌株を開発し、ニトロアレーンと芳香族アミンの遺伝毒性について検討を行い、それらの物質を高感度に検出できることを明らかにした。今回、NAT1とNAT2を導入した菌株を用いて、ヒト、動物で膀胱がん性を示す芳香族アミンがいずれのNATによって代謝的活性化され、変異原性を示すかどうかを *umuC* 遺伝子発現誘導を指標にして検討した。〔方法〕NAT1高産生株 (NM6002)、NAT2高産生株 (NM6011) およびO-AT欠損した親株 (NM6000) を用い、これらの菌株を対数増殖期にした菌液を被験物質とS-9 mix存在下で2時間、37℃で培養後菌体内のβ-ガラクトシダーゼ活性を常法により測定した。〔結果と考察〕NAT1高産生は、4-アミノピフェニール、β-ナフチルアミン、O-トリジン、O-アニシジン、ベンチジンによって用量に依存して *umuC* 遺伝子を発現することが認められた。NAT2高産生株は、β-ナフチルアミン、4-アミノピフェニール、O-アニシジンによって *umuC* 遺伝子誘導を生じたが、NAT1株よりも弱いことがわかった。一方、親株はいずれの化学物質でも誘導がほとんど認められなかった。これらの結果から、膀胱がんを生じる芳香族アミンは、主にNAT2よりもNAT1によって代謝的活性化され、変異原性作用を示していることが考えられる。

Metabolic Activation of Aromatic Amines Bladder Carcinogens by Human N-Acetyltransferase Enzyme expressed in Bacterial SOS/Umu Test System.

Yoshimitsu ODA and Pramod ARYAL, Osaka Prefectural Institute of Public Health, Osaka-537-0025, Japan.

## シヨ糖によるアセトアミノフェン肝毒性の増強作用

○植岡健一<sup>1), 2)</sup>, 北條真由美<sup>2)</sup>, 山添康<sup>2)</sup>)<sup>1)</sup>藤沢薬品工業(株)安全性研究所、<sup>2)</sup>東北大学薬学部衛生化学教室

[目的]アセトアミノフェンは解熱鎮痛剤として広く用いられており、通常の用量では副作用が少ないものの、大量投与により重篤な肝障害を引き起こすことが知られている。今回、単独では軽微な肝毒性しか示さない量のアセトアミノフェンをシヨ糖と同時に投与した時に肝毒性が増強されたので、その詳細について検討した。

[方法]SD系雄性ラット(7週齢)を約18時間絶食させた後、アセトアミノフェンおよびシヨ糖溶液を経口投与し、24時間後に採血および肝臓重量の測定を行った。肝毒性の指標として血清中のalanine aminotransferase (ALT)およびsorbitol dehydrogenase (SDH)活性を測定した。

[結果]400 mg/kgのアセトアミノフェン単独投与では、軽微な肝毒性しかみられなかったが、85%シヨ糖溶液(3.4 g/kg体重)を同時に投与すると、著しいALTおよびSDH活性の上昇がみられ、その程度はシヨ糖溶液の濃度に依存していた。次に肝毒性を誘発することが知られている四塩化炭素、D-ガラクトサミン、 $\alpha$ -ナフチルイソチオシアネートおよびリボポリサッカライドで上昇するALTおよびSDH活性をシヨ糖は亢進させなかった。また、キサンチンオキシダーゼ阻害薬であり、アセトアミノフェンの肝毒性を軽減することが知られているアロプリノール(125 mg/kg, i.p.)の前処置は、シヨ糖とアセトアミノフェンの併用投与で起こる肝毒性をほぼ完全に抑制した。

[考察]シヨ糖は特異的にアセトアミノフェンの肝毒性を増強する。その作用点は肝毒性が惹起される過程でキサンチンオキシダーゼが活性化される以前のところに関与している可能性が示唆された。

## Sucrose-mediated Modulation of Acetaminophen-induced Hepatotoxicity

Kenichi HANIOKA<sup>1), 2)</sup>, Mayumi HOJO<sup>2)</sup> and Yasushi YAMAZOE<sup>2)</sup>. <sup>1)</sup>Toxicol. Res. Lab., Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd, Osaka, 532-8514, Japan. <sup>2)</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Sendai, 980-8578, Japan

ラット肝臓スライス培養法を用いた *in vitro* 毒性評価法の検討  
—acetaminophen をモデルとして—

○時任康弘、出倉絵里葉、北村和之、川合是彰

田辺製薬株式会社 医薬育成研究所

【目的】肝障害惹起物質のひとつである acetaminophen をモデル化合物とし、*in vitro* 肝毒性評価系としての組織スライス培養法の有用性について検討した。

【方法】無処置および phenobarbital を 3 日間前投与した SD 系雄ラットから肝臓を採取し、Vitron 社製の tissue slicer を用いて氷冷 buffer 中で約 200 $\mu$ m 厚のスライスを作製した。作製した肝臓スライスは、37 $^{\circ}$ C、95%O<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub> の条件下で Waymouth's medium に浸して回転培養した。5mM の acetaminophen に暴露して 6 および 24 時間培養後、スライス中の potassium 含量ならびに medium への LDH の漏出割合を測定して毒性の指標とした。また、ラットの glutathion-S-transferase(GST) isozyme の各特異的阻害剤を用いて前処置を施したスライスについても同様の検討を実施した。

【結果】無処置ラットの肝臓スライスを用いた場合、5mM の acetaminophen を 24 時間暴露しても毒性は発現しなかったのに対し、phenobarbital を前投与したラットの肝臓スライスでは、組織中の potassium 含量が著明に減少し、medium 中への LDH 漏出割合が増加していた。また、GST 活性を阻害した場合も、やはり毒性発現の増強が認められた。

【考察】Acetaminophen の肝毒性は、代謝中間体 N-acetyl-*p*-benzoquinone imine(NAPQI) に起因するとされる。薬物代謝酵素の誘導、あるいは GST の阻害により増加した NAPQI が惹起する肝毒性は、スライス培養法においても確認された。肝臓スライスを用いた *in vitro* 毒性評価法は、初代培養肝細胞に比べてより簡便で、且つ *in vivo* に近い assay 系として有用であり、組織学的検討への応用も可能であると考えられる。現在、硫酸抱合等に関わる酵素の阻害剤を用いて、抱合反応の毒性発現に対する影響について検討中である。

Application of Precision-Cut Liver Slice Incubation System for *In Vitro* Toxicity Study :  
Use of acetaminophen as a Model Hepatotoxicant.

Yasuhiro TOKITO, Eriha DEKURA, Kazuyuki KITAMURA and Yoshiaki KAWAI. Lead Optimization Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd. Saitama-335-8505, Japan.

## マイクロシスチンLR-システイン反応物の安定性及び肝毒性

○竹中重幸\*、大津隆一\*、古荘早苗\*\*

\* 福岡県保健環境研究所、病理細菌課

\*\* JASCO インターナショナル株

【目的】マイクロシスチン(MC)の発がんプロモーションはProtein Phosphatase 1 及び2Aのシステイン残基にMichael Reactionにより共有結合し、その活性を阻害することにより間接的に行われる。一方、MCの代謝物に関する報告はMCのADDA残基が脱メトキシ化した3-amino-2, 6, 8-trimethyl-10-phenyldeca-4E, 6E-dienoic acid (DmADDA)やMCのシステイン抱合体(MC-Cys)の報告がある。我々はこのMC-Cysの安定性及び肝毒性について若干の新しい知見を得たので報告する。

【方法】L-システイン 10モルにMC-LR 1モルを加え、室温に放置し、経時的に一部をサンプリングし、高速液体クロマトグラフーマススペクトロメトリー(LC-MS)で分析を行った。また、pH3、4、5、6、7及び8のMcIlvaine緩衝液中での紫外線(UV)吸収スペクトルを測定した。さらに、緩衝液中のMC分解物をガスクロマトグラフーマススペクトロメトリー(GC-MS)にて測定した。肝急性毒性試験はddY系雄性マウス、4週齢、20gを用い、MC換算量で100 $\mu$ g/kgを腹腔内投与した。

【結果】我々はMC-LRとシステインを室温にて反応させ、Michael Reactionが起こるか否かを再現したところ、MC-LRの保持時間とは異なる位置にピークを見出し、そのマススペクトルはMCのものと同じであった。また、そのピークは72時間後に消滅した。その反応溶液をGC-MSで分析したところ、DmADDAのピークを確認した。さらに、pH3~8の範囲でMCのスペクトルが変化しており、やはり、それらの溶液中にはDmADDAが認められた。これらの結果により、生理的条件下ではMCはSH基によるCarbonyl基への求核的な攻撃のほうが、Michael Reactionよりも強く現れると考えられる。この混合物のマウスへの急性毒性は認められなかった。

## Stability and Toxicity of Microcystin LR Conjugated with L-Cysteine

Shigeyuki TAKENAKA\*, Ryuichi OTSU\* and Sanae FURUSHO\*\*

\* Fukuoka Institute of Health &amp; Environmental Sciences, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan., \*\* JASCO International Co. Ltd., Hachioji, Tokyo 192, Japan.

LPS 刺激による Kupffer 細胞を介した細胞障害性の  
ラット、イヌにおける種差について

浜野宝子、V. Tong、村瀬 正、田中栄治

三菱化学株式会社 横浜総合研究所 安全性研究所

近年、肝毒性発現における Kupffer 細胞の関与が *in vivo* での Kupffer 細胞阻害実験や *in vitro* での炎症性因子放出実験など、様々な実験で明らかになってきている。今回、LPS 刺激による Kupffer 細胞の細胞障害性について、ラット、イヌの Kupffer 細胞を用いた新たな *in vitro* assay 系を確立し、その種差を検討した。また、GdCl<sub>3</sub> 投与したラットの Kupffer 細胞を用いた場合の細胞障害性についても併せて検討したので報告する。

【方法】ラットおよびイヌ肝臓より Percoll 比重密度勾配法により Kupffer 細胞を分離し、各々の Kupffer 細胞と BrdU でラベルした WRL68(Human Liver embryo)および LPS を 24 時間共培養した。その後、培養上清中に放出される BrdU-DNA 量を ELISA にて測定し、WRL68 細胞に対する障害性を評価した。また、分離 24hr 前に GdCl<sub>3</sub> (5 および 10mg/kg) を投与したラット Kupffer 細胞の細胞障害性について同法を用いて測定した。

【結果】LPS 刺激による Kupffer 細胞の WRL68 細胞に対する障害はラットに比ベイスで顕著に認められ、Kupffer 細胞を介する細胞障害性に種差が認められた。また、GdCl<sub>3</sub> 投与により Kupffer 細胞が介する細胞障害性の低下が認められた。

Species difference between rat and dog in LPS-induced Kupffer cell-mediated cytotoxicity.

Takako HAMANO, Vicent TONG, Tadashi MURASE and Eiji TANAKA.  
Toxicology Laboratory, Yokohama Research Center, Mitsubishi Chemical Corporation. 1000, Kamoshida-cho, Aoba-ku, Yokohama, Japan.



## 医薬品のがん原性試験成績に関する調査結果

○務台 衛<sup>1)</sup>, 青木豊彦, 入村兼司, 古賀照二, 佐藤元信, 永山 智,  
藤井登志之, 松澤利明, 安場正子, 山下 悟, 臼居敏仁

日本製薬工業協会 基礎研究部会第三分科会  
(三菱化学(株)横浜総合研究所安全性研究所<sup>1)</sup>)

【はじめに】げっ歯類を用いるがん原性試験は、2年間を要する大規模試験であり、医薬品開発において重要な位置を占める。しかし、試験成績が公表されることは稀で、用量設定をはじめとする試験デザインや成績の解釈について、公に論議・考察する基盤がなかった。そこで、製薬協基礎研究部会(がん原性WG)では、医薬品のがん原性試験の試験デザイン、成績評価などの主要項目についてアンケート調査を実施し、医薬品のがん原性試験の現状について調査したので報告する。

【調査方法】計2回の調査を実施した。第1回目は1994年に製薬協基礎研究部会に参画する製薬企業を対象に実施し、100化合物についての有効回答を得た。1997年には、これらの企業を対象に、トキシコキネティクスの実施状況および化合物追加を目的に第2次調査を実施した。なお、がん原性試験成績の評価基準については、WGで再検討を行い、試験および化合物間での統一を図った。

【結果・考察】全157医薬品が評価対象となった。腫瘍用薬を除く大多数の薬剤は、遺伝毒性を示さないものと考えられた。また、ほとんどの試験は、1980年代以降に実施されており、現行の毒性試験法ガイドラインに準拠しているものと考えられた。使用された動物の系統は、ラットではFischer系とSD系が、マウスではB6C3F1とICR系が大半を占めていた。用量設定根拠は、予備試験での体重増加抑制を挙げた例が約半数を占めた。投薬に起因した腫瘍発生頻度の増加は、約半数の薬剤で見られた。これらの大半は、ラットあるいはマウスのいずれかでのみ腫瘍発生頻度の増加が見られ、ラットでは薬剤の大量投与による内分泌環境の攪乱が、マウスでは使用された系統の肝発がん高感受性が影響しているものと考えられた。一部の薬剤ではラットとマウスの両種で腫瘍発生頻度の増加をみたが、発がん標的臓器の一致率は低かった。

これらの結果は、ヒトへの外挿を前提とした医薬品における長期がん原性試験が様々な課題一過剰量投与、使用される動物・系統の遺伝的背景、ヒトと動物の解剖・生理学的な相違などを抱えていること、および医薬品のがん原性試験に際しては、薬剤の様々な生理作用を考慮した試験デザインや結果解釈が極めて重要であることを示唆している。【本調査の概要については、本学会の口演(医薬品のがん原性試験におけるラットとマウスの成績比較)において発表する】

## Survey of Carcinogenicity Studies of the Pharmaceuticals in Rodents.

Mamoru MUTAI<sup>1)</sup>, Toyohiko AOKI, Kenji IRIMURA, Teruji KOGA, Motonobu SATO,  
Satoshi NAGAYAMA, Toshiyuki FUJII, Toshiaki MATSUZAWA, Masashi YASUBA,  
Satoru YAMASHITA, and Toshimi USUI

Japan Pharmaceuticals Manufacturers Association, Tokyo, Japan

(Toxicology Laboratory, Yokohama Research Center, Mitsubishi Chemical Corporation<sup>1)</sup>)

モノクロロベンゼンの F344 ラットを用いた吸入によるがん原性試験

○大澤護、西沢共司、相磯成敏、山本静護、松島泰次郎

中央労働災害防止協会・日本バイオアッセイ研究センター

【目的】モノクロロベンゼンは大気汚染防止法で規制されていない物質であるが、近年、この物質に低濃度・長期間にわたり暴露された場合の発がん等の慢性影響が懸念されている。今回、吸入暴露によるがん原性を検索する目的で F344 ラットを用いてがん原性試験を行った。

【方法】1 群雌雄各 40 匹の F344/DuCrj ラット(6 週齢)にモノクロロベンゼンを 0, 70, 200, 600ppm の濃度で 1 日 6 時間、1 週 5 日間、104 週間全身暴露した。投与期間中、一般状態の観察、体重・摂餌量の測定、尿検査を行い、投与終了後に動物を屠殺し血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、臓器重量測定及び病理組織学的検査を行った。

【結果・結論】雌雄の 200ppm 以上の群で肝臓と腎臓の重量増加がみられた。病理組織学的検査では雌雄とも全投与群で慢性腎症の程度の増強がみられ、雄の 600ppm 群では慢性腎症による死亡により生存率が低下した(生存率: 対照群; 78%、600ppm 群; 43%)。また、肝臓の前腫瘍性変化である好酸性小増殖巣と均質状の好塩基性小増殖巣が雄の 600ppm 群で増加し、雌でも軽度であるが 600ppm 群で好酸性小増殖巣、空胞性小増殖巣及び混合性小増殖巣の増加がみられた。腫瘍性病変としては雄の投与群で肝細胞腺腫の発生が増加したが、投与濃度に対応した明らかな増加ではなかった(対照群: 0/40 例、70ppm 群: 5/40 例、200ppm 群: 2/40 例、600ppm 群: 5/40 例)。肝細胞癌は雄の 600ppm 群に 1 例認められただけであった。以上のように、雌雄の肝臓に前腫瘍性変化の増加が認められたが、腫瘍性変化の明確な増加はみられず、モノクロロベンゼンのがん原性の十分な証拠は得られなかった。

Carcinogenesis Study of Monochlorobenzen in the F344 Rat (Inhalation Study)

Mamoru OHSAWA, Tomoshi NISHIZAWA, Shigetoshi AISO, Seigo YAMAMOTO and Taijiro MATSUSHIMA.

Japan Bioassay Research Center, Japan Industrial Safety & Health Association, Hadano 257-0015, Japan.

14日間反復投与したラット肝臓における Methapyrilene と Pyrilamine の細胞増殖活性について

○大塚雅則、江原初音、今田中伸哉、白石啓二、寶珠山五月、篠田和俊、山崎寛治

財団法人化学品検査協会 日田研究所

【目的】細胞増殖の誘発を指標に肝発癌物質と非発癌物質を識別できるか否かを検討するため、類似構造を持ちともに変異原性陰性の結果を示す肝発がん物質 Methapyrilene (MPH) と非発がん物質 Pyrilamine (PYR) をそれぞれ 14 日間経口投与したラットの肝臓において S 期肝細胞を免疫組織化学的に検出し細胞増殖活性の違いを調べた。【方法】9 週齢の F344 ラット雄を 1 群 5 匹として 0, 30, 100 mg/kg の MPH または 0, 125, 250 mg/kg/day の PYR を 14 日間強制経口投与し、その間経口的に体重の測定、肝重量の測定、病理組織学的検査、血液生化学的検査を実施した。S 期肝細胞は、屠殺 2 日前から BrdU を間歇的に腹腔内投与し抗 BrdU 抗体を用いて LSAB 法により免疫組織化学的に検索した。【結果】MPH: 30 mg/kg/day 投与群では対照群との間に体重、相対肝重量に差はみられなかったが、ALT 活性の増加を示し、小葉辺縁部で肝細胞肥大、核小体の明瞭化を認めた。100 mg/kg/day 投与群では体重の増加抑制と相対肝重量の有意な増加が認められた。肝障害指標酵素の活性が有意に上昇し、小葉辺縁部で肝細胞肥大、核小体の明瞭化、胆管の増生、単細胞壊死が観察された。細胞増殖活性は用量に相関して有意に増加する結果であった。PYR: 投与群と対照群の体重増加に差はみられなかったが、相対肝重量の有意な増加を認めた。両投与群とも血液生化学的検査に異常はみられず、病理組織学的変化も観察されなかった。肝細胞の増殖はいずれの投与群においても認められなかった。【結論】MPH では肝毒性に対する代償的な肝細胞増殖の有意な増加が認められたが、PYR では血液生化学及び病理組織学的検査に異常はみられず肝細胞の増殖もなかった。これらは、既に報告されている MPH と PYR の 13 週間混餌投与試験の結果と一致することが確認され、14 日間反復投与による肝細胞の増殖活性を発がん物質と非発がん物質識別の指標にできることが示唆された。本研究は通商産業省・工業技術院の委託により行った。

Effects of Methapyrilene and Pyrilamine on Hepatocellular Replication in Rats Following 14 -Day Treatment.

Masanori OTSUKA, Hatsune EHARA, Shinya IMATANAKA, Keiji SHIRAISHI, Satsuki HOSHUYAMA, Kazutoshi SHINODA and Kanji YAMASAKI. Hita Research Laboratories, Chemicals Inspection and Testing Institute, Oita-877, Japan

ラット肝癌細胞における *in vivo* シスプラチン毒性軽減機構の解析

○宮本謙一、玉井光男、伊藤香江、野村政明  
南野友義\*、大島徹\*

金沢大学大学院自然科学研究科医療薬剤学講座  
\*金沢大学医学部法医学教室

ラット腹水肝癌AH66細胞は、その亜株であるAH66F細胞に比べ種々の抗癌剤に対して低毒性を示す、いわゆる、自然多剤耐性癌細胞であるが、これまでシスプラチン (CDDP) に対する毒性の違いは認められていなかった。しかし、*in vivo* においてAH66細胞がCDDPに対して低毒性を示すことを明らかにした。今回、この *in vivo* におけるCDDP毒性軽減機構について若干の知見を得たので報告する。【方法】*In vitro* において、牛胎仔血清 (FBS, 5%) 又は担癌ラットより採取した腹水 (5%) 存在下で培養したAH66細胞に対するCDDPの50%細胞毒性濃度 ( $IC_{50}$ ) を測定した。メタロチオネイン (MT) 量はCd-Hem法により、またCDDP細胞内蓄積量はPt量を原子吸光度計により測定した。また、緒因子のmRNAの発現量をRT-PCR法によって検出した。【結果】AH66細胞を腹水中で培養することにより、CDDPの $IC_{50}$  値は上昇し、FBS中で培養した場合に比べCDDPの毒性が約1/3に低下した。また、AH66細胞を同様に腹水中で培養したとき、細胞内MT量が処置時間に依存して増加した。一方、腹水中で培養したAH66細胞の細胞内CDDP蓄積量は、FBS中で培養した細胞に比べ有意に低く、この低下した細胞内CDDP蓄積量はブチオニンスルフォキシミンおよびアジ化ナトリウムを前処理することにより抑制された。さらに、腹水中で培養することにより、有機アニオントランスポーターであるcanalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) mRNAの発現が亢進した。【考察】AH66細胞の *in vivo* CDDP毒性軽減機構として、腹水中の何らかの成分に反応して増加したMTによるCDDPの捕捉・解毒、および、誘導されたcMOATによる細胞内で形成されたグルタチオン-CDDP抱合体の排泄の亢進が示唆された。

Analysis of *in vivo* cisplatin cytotoxic reduction mechanism in rat hepatoma cells

Ken-ichi MIYAMOTO, Mitsuo TAMAI, Yoshie ITO, Masaaki NOMURA, Tomoyoshi MINAMINO and Tohru OHSHIMA. Kanazawa University, Kanazawa 920, Japan.

センソ由来新規 bufadienolide 系化合物 cinobufagin の細胞死誘導能の解析

○奥村弘樹<sup>1</sup>、中村和美<sup>1</sup>、井原智美<sup>2</sup>、菅又昌雄<sup>2</sup>、武田 健<sup>1</sup>、  
上野芳夫<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 東京理科大学 薬学部

<sup>2</sup> 栃木臨床病理研究所

〔目的〕アポトーシスは自発的な細胞死であり、発生及び生体の恒常性維持の上で重要な働きをする。また、アポトーシスは各種抗ガン剤などにより誘発可能であることから生体防御の機能も担っている。本研究ではすでにセンソ由来の bufalin にアポトーシス誘導能が報告されていることに基づき、今回新たに同定された新規化合物 cinobufagin について、ヒト前骨髄性白血病細胞株 HL-60 に対するアポトーシス誘導活性を同属系化合物 bufalin と比較検討した。

〔方法〕HL-60 は bufalin または cinobufagin で処理し、DNA 断片化の解析及び電子顕微鏡観察に供した。また bufadienolide 系化合物のアポトーシス誘導細胞内機構を解析するために HL-60 は各種アポトーシス阻害剤で前処理し、bufalin または cinobufagin を加えた。細胞生存率は propidium iodide (PI) 染色法で判定した。

〔結果〕Bufalin (1 $\mu$ g/ml) または cinobufagin (20 $\mu$ g/ml) 処理 6 時間後に DNA 断片化の形成が認められたが、電子顕微鏡観察では通常のアポトーシスとは異なる形態が観察された。また、bufadienolide 誘導アポトーシスはカルシウム依存性エンドヌクレアーゼ阻害剤 ZnCl<sub>2</sub> 前処理によりほぼ阻害された。

〔考察〕以上の結果より、cinobufagin は bufalin 同様 HL-60 に対しアポトーシス誘導活性を有し、その過程はカルシウム依存性の経路が存在することが明らかとなった。しかし、電子顕微鏡観察ではアポトーシス特有の典型的な形態が観察されなかった。従って、bufadienolide 誘導細胞死がアポトーシスによるものかどうかは、今後さらに詳細な解析が必要である。

Analysis of Cell Death-Inducing Activity of Cinobufagin, a Novel Bufadienolide in Venom of Giant Toad.

Hiroki OKUMURA<sup>1</sup>, Kazumi NAKMURA<sup>1</sup>, Tomomi IHARA<sup>2</sup>, Masao SUGAMATA<sup>2</sup>, Ken TAKEDA<sup>1</sup> and Yoshio UENO<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, Science University of Tokyo, Tokyo 162-0826. <sup>2</sup>Institute of Tochigi Clinical Pathology, Tochigi 329-0112, Japan.

## *lacZ* 遺伝子導入細胞を用いた微小転移モデルの確立

○小林 潔<sup>1,2</sup>, 中西速夫<sup>1</sup>, 杉本次郎<sup>2</sup>,  
井上芳己<sup>2</sup>, 務台 衛<sup>2</sup>, 立松正衛<sup>1</sup>

<sup>1</sup>愛知県がんセンター研究所病理学第一部

<sup>2</sup>三菱化学(株)横浜総合研究所 安全性研究所

【目的】癌転移の初期過程に対する化学物質の促進/抑制作用を評価する *in vivo* 実験系の確立を目的とし、大腸菌  $\beta$ -galactosidase (*lacZ*) 遺伝子を酵素組織学的なマーカーとして転移性細胞に導入して微小転移モデルの作製を試みた。【方法】マウス肺癌細胞、マウス大腸癌細胞ならびにラット前立腺癌細胞に、プラスミドベクター-pCMV*lacZ* を用いて、肺マクレーション法により *lacZ* 遺伝子を導入した。*lacZ* 遺伝子導入細胞の選択の後、酵素組織染色(X-Gal 染色)を指標としたシグナルクロニングの結果、数十代の継代後も安定的に  $\beta$ -galactosidase を発現するクローンを得た(4A1-1, PLS301Z, Lum-1Z)。これらの細胞を  $1 \times 10^6$  個、C57BL雄マウス(4A1-1)、ICR系雄メドマウス(PLS301Z)、または ICR系雌メドマウス(Lum-1Z)の静脈内に移植した。肺を経時的に採取して X-Gal 染色を施し、実体顕微鏡による観察、マクリン樹脂切片による組織学的な検索を行った。さらに、4A1-1細胞移植時における、ヘパリン硫酸の同時投与による転移抑制効果(細胞接着阻害効果)を検討した。【結果】*lacZ* 遺伝子導入細胞は X-Gal 染色により、実体顕微鏡下で肺の微小転移の観察および定量化が可能であった。組織学的観察では、1~数個の細胞からなる微小な転移を確実に観察することができた。ヘパリン硫酸の移植時投与により、肺における微小転移果数は顕著に減少した。

【まとめ】微小転移の段階で転移巣を高感度に検出する実験系を確立した。本実験系は種々の生理活性物質、医薬品あるいは化学物質の、微小転移形成過程に対する影響の評価に応用可能であると考ええる。

Establishment of Micrometastasis Models Using Bacterial *lacZ* Gene-tagged Cells.

Kiyoshi KOBAYASHI<sup>1,2</sup>, Hayao NAKANISHI<sup>1</sup>, Jirou SUGIMOTO<sup>2</sup>, Yoshimi INOUE<sup>2</sup>, Mamoru MUTAI<sup>2</sup>, and Masae TATEMATSU<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Laboratory of Pathology, Aichi Cancer Center Research Institute, 1-1, Kanokoden, Chikusa-ku, Nagoya 464, and <sup>2</sup>Toxicology Laboratory, Mitsubishi Chemical Co. Yokohama Research Center, 1000, Kamoshida-cho, Aoba-ku, Yokohama 227, Japan.

新しいデータ取得・実時間解析システム (HEM) を用いた  
呼吸・循環器系安全性薬理試験の評価

○竹田三喜夫, 富田文美, 佐藤重子, 水野洋, 斎藤守  
金子武稔, 山西嘉晴

エーザイ株式会社 薬物評価研究所 開発薬効室

ヒトでの安全性を薬理学的特性から検討する安全性薬理試験において、呼吸・心脈管系の評価は重要である。通常試験のデータは、ポリグラフを介し紙媒体 (チャート) に記録され、後日チャートから実験者が値を読み取り種々のパラメータを算出する。近年種々開発されているコンピュータによるデータ取得・解析システムは、手作業での解析に伴う煩わしさがなく、またヒトが読み取るより値が正確であり、情報がデジタル化されているためデータを直接統計や図表作成などに利用できるといったメリットがある。反面、解析項目やデータ取得時間に制約があるとか、データやソフトのバリデーションについて不安があるなどの問題点もある。今回演者らは NOTOCORDSYSTEM 社 (仏) が開発した、新しいデータ解析システム (HEM) を導入し試験で使用したのでその経験を報告する。HEM は従来の解析システムのように、データ取得前にあらかじめ測定 (解析) 間隔や回数を決めたり、決めた間隔や回数しか測定 (解析) できないといった制約はない。従って通常の心・脈管系試験の時間範囲であれば、データレコーダと同じように試験開始から終了まですべてのデータを実時間で収集可能である。測定 (解析) 間隔や回数は、あたかもチャートから読み取るごとく解析時に任意に設定できる。また、解析項目として心電図、血圧、心収縮力、血流量といった指標以外に、従来の解析システムにはなかった呼吸波形の解析 (一回、分時換気量など) ができる点もユニークである。当日は HEM の概要を紹介するとともに、コンピュータシステムを用いた場合の課題について考察したい。

Evaluation of Cardiovascular Safety Pharmacology Study Using New Data Acquisition and Real Time Data Analyzing System (HEM)

Mikio TAKEDA, Ayami TOMITA, Shigeko SATOH, Hiroshi MIZUNO, Mamoru SAITO, Takeru KANEKO and Yoshiharu YAMANISHI. Department of Developmental Efficacy Research, Drug Evaluation Research Laboratories, Eisai Co., Ltd., Ibaraki 300-26, Japan.

各種実験動物の心電図 QT 時間の比較及び III 群抗不整脈薬  
E4031 の作用

○加藤浩嗣、野本研一、吉永貴志、澤田光平

エーザイ株式会社 筑波探索研究所

[目的] 心電図上の QT 時間を延長する薬剤が *torsade de pointes* と呼ばれる重篤な不整脈を誘発することが問題となっている。T 波は心室の再分極過程に対応するが、再分極に関わるイオン機序が動物種によって異なるとされている。そこで、各種実験動物において、IKr ブロッカーである E4031 の QT 時間に対する作用を比較検討し、どの動物種がヒトの臨床を反映するかを検討した。[方法] マウスは ether 麻酔下、ラット及びウサギは pentobarbital 麻酔下、モルモットは urethan 麻酔下で、ビーグル犬は笑気と enflurane の混合吸入麻酔下、及び覚醒下にて標準誘導心電図を記録し、E4031 静脈内投与の作用を比較検討した。[結果] マウスの T 波は R 波に接合しており、また、ラットの T 波はそのピークが S 波直後にあり、各々特有の波形を示した。マウス及びラットの QT 時間に対して E4031 は影響を及ぼさなかった。それに対し、モルモット、ウサギ、及びイヌの T 波は比較的ヒトの T 波に類似しており、また、E4031 により QT 時間が延長した。しかし、その程度には種差が認められた。モルモットでは最高用量である 1 mg/kg 投与によっても QT 時間の延長は 15% 程度に止まった。一方、ウサギにおいては、0.01 mg/kg 投与で QT 時間は 20% 以上延長し、0.03 - 0.1 mg/kg 投与によって心室性期外収縮や *torsade de pointes* 様の心室頻拍が誘発された。イヌにおいては麻酔下と覚醒下でその感受性が異なり、麻酔下では 0.1 mg/kg で 40% 以上の延長が認められたのに対し、覚醒下では 12% 程度であった。[結語] E4031 による QT 延長は、臨床第 I 相試験成績と比較すると麻酔下のイヌの結果がヒトにおける効果を良く反映すると考えられるが、ヒトにおける QT 延長を予測するためには動物種及び実験条件を考慮する必要がある。

Comparison of QT Interval in Several Experimental Animals and the Effects of E4031, a Class III Antiarrhythmic Agent

Hiroshi KATOH, Ken-ichi NOMOTO, Takashi YOSHINAGA, Kohei SAWADA. Tsukuba Research Laboratories, Eisai Co., Ltd., Ibaraki 300-2635, Japan.



**USING TELEMETRY TO IDENTIFY DRUG-INDUCED  
CHANGES IN Q-T INTERVAL WITHOUT ESTIMATING QT<sub>c</sub>  
IN CANINE ELECTROCARDIOGRAPHY**

L. B. Kinter

Preclinical Skill Center, Astra Merck Inc. Wayne PA 19087

The Q-T interval (QT), measured from the onset of the Q wave to the end of the T wave, is the summation of ventricular depolarization and repolarization, and represents ventricular systole. Drug-induced changes in the QT heart rate relationship are markers for proarrhythmic activity. However, QT varies inversely with the heart rate (HR, corresponding to the R-R interval, RR) and it is long appreciated that differences in HR between baseline and drug-treated conditions (or test groups) produces differences in QT. To address this problem, QT interval at HR=60 bpm is accepted as a useful reference value (QT<sub>c</sub>) in both animals and humans, and when QT<sub>c</sub> must be estimated (when HR is greater than or less than 60 bpm) a formula developed empirically by Bazett (1920) from human data:  $QT_c = kQT/RR^{0.5}$ , where  $k=0.37$  and  $0.40$  for males and females, respectively) is often employed. Unfortunately, this formula does not successfully relate QT and QT<sub>c</sub> in beagle dogs and in other species, and its application in animal toxicology studies has resulted in spurious findings of prolonged QT<sub>c</sub>. We previously modeled QT (0.214 to 0.160 sec) and RR (0.857 to 0.316 sec) data, representing HR from 70 to 190 bpm, from 250 male beagle dogs (data from Osborne and Leach, 1971) to yield a power-correct relationship:  $QT_c = QT/RR^{0.3}$ . (Mann et al., *The Toxicologist* **14**:376, 1994) This relationship has a QT<sub>c</sub> of 0.33 sec and a slope of 0.00004 sec/bpm. Power correction of 2851 QTs from our canine ECG database yielded a QT<sub>c</sub> of 0.28 sec and a slope of 0.00005 sec/bpm. We concluded that power correction of the QT/RR relationship for beagle dogs yields a QT<sub>c</sub> value within or very near the anticipated range for dogs (0.15 to 0.25 sec) that is independent of HR. However, power correction of control data from normal animals is only a diagnostic convenience and may or may not be useful for accurately identifying drug-induced changes in the QT that are markers for proarrhythmic activity. What is desired is an individual profile of the QT/HR relationship, covering the physiological range of HR values prior to treatment (baseline) and then again following treatment. Normal circadian heart rate values vary greatly in conscious unrestrained dogs, ranging from approximately 20 to 200 bpm.. Electrocardiogram (ECG) telemetry permits continuous capture and analysis of ECGs in conscious dogs for months or longer, permits the use of blocked statistical analysis designs and offers a powerful and sensitive new approach with which to identify drug effects on QT without estimating QT<sub>c</sub>.

無麻酔・無拘束カニクイザルの血圧および心拍数のテレメトリー法による測定と循環作用薬の影響

○海上 智, 藤原 淳, 日詰信吾, 飯塚宏美

三菱化学安全科学研究所・鹿島研究所

〔目的〕無麻酔・無拘束カニクイザルの血圧・心拍数の日内変動を観察し、それに及ぼす長時間作用型の $\beta$ 遮断薬とCaチャンネル遮断薬の影響について検討した。

〔方法〕雄カニクイザルを入荷後3ヶ月以上、同一環境下で馴化した。麻酔下でサルの大腿動脈枝より大動脈内に圧センサーに接続したカテーテルを挿入して留置し、側腹部の皮下に発信器を固定した。血圧と心拍数は、発信器からの圧信号をテレメトリー方式でホームケージ上面に設置した受信ボードを介し、脈波と脈拍数として記録した。術後1週間以上経過したのち、血圧と心拍数の日内変動を5日間観察した。その後、 $\beta_1$ 遮断薬としてatenololを、Caチャンネル遮断薬としてnitrendipineをいずれも14:00に経口投与し、24時間にわたって連続的に血圧と心拍数を記録した。

〔結果〕カニクイザルの血圧は、収縮期圧が明期(8:00～20:00)に110～140 mmHg、暗期(20:00～8:00)に90～120 mmHg、拡張期圧が明期に68～85 mmHg、暗期に53～73 mmHgで規則的な日内変動を示した。心拍数は明期に125～180 bts/min、暗期に85～140 bts/minで、とくに照明の点灯時には平均58 bts/minの急激な上昇を示した。Atenololは2 mg/kg投与では血圧に明らかな影響を与えなかったが、心拍数を持続的に減少させた。また、この薬物は点灯時における心拍数の急激な上昇を抑制した。Nitrendipineは2 mg/kg経口投与で明期暗期にかかわらず血圧の低下と心拍数の上昇を引き起こした。

〔まとめ〕無麻酔・無拘束下のカニクイザルの血圧・心拍数は明期に高く、暗期に低い規則的なリズムを刻むこと、およびこの日内変動に及ぼす循環作用薬の効果がヒトで報告されている成績とほぼ一致することが明らかとなった。

Measurement of blood pressure and heart rate using telemetry method in conscious cynomolgus monkeys, and effect of cardiovascular drugs on the circadian rhythms

Satoshi UNAKAMI, Atsushi FUJIWARA, Shingo HIZUME, Hiromi IIZUKA  
Kashima Lab., Mitsubishi Chemical Safety Institute, Ibaraki-314-0255, Japan.

ラジオテレメトリー法のイヌ毒性評価への応用<第2報>  
 — アナフィラキシー様反応の評価事例 —

○宮崎裕康、久野博司、佐々木和彦、藤巻由紀夫、松本浩良、池本文彦

萬有製薬株式会社 開発研究所

(目的)昨年、ラジオテレメトリー(RT)法による血圧測定値の精度、RT法と従来の毒性評価法との比較の観点から、その有用性を報告した。今回、評価法をより具体化し、RT法を用いた毒性評価の一例として、HCO-60(硬化ひまし油)による既知の毒性を評価し、その有用性を検討した。(方法)テレメトリーモニターを体内に埋め込み、術後3週間回復させたビーグル犬(9ヶ月齢、雌)9匹を3匹づつ3群に分け、HCO-60の2.6、13及び65 mg/kgを静脈内に持続投与し、症状観察と平行して、血圧、心拍数及び皮下体温の測定をRT法により連続的に行った。また、HCO-60投与前日に、生理食塩水を同動物に同手法で投与し、コントロールとした。(結果及び考察)発赤及び腫脹は13及び65 mg/kg投与群で、投与直後より約2時間みられた。血圧は用量依存的に低下し、最低値 $63.6 \pm 3.4$  mmHg (13 mg/kg群、投与後28.0 $\pm$ 3.5分)及び $36.8 \pm 6.2$  mmHg (65 mg/kg群、20.7 $\pm$ 3.1分)を示し、3例中2例が投与開始15分より10分間横たわった。動物が横たわった血圧レベルは40 mmHg前後であった。その後血圧は増加を始め、投与後60分で両群共に正常レベルに回復した。一方、心拍数は一過性の上昇の後、血圧低下に伴って減少し、血圧回復後再び増加した。皮下体温は投与後60分で $0.4^{\circ}\text{C}$  (13 mg/kg)及び $0.7^{\circ}\text{C}$  (65 mg/kg)まで減少した。今回、HCO-60の毒性評価に、RT法を用いたことにより、症状変化に平行して、心拍数、血圧及び皮下体温の変化を定量的且つ経時的に測定することができた。これにより、HCO-60は13 mg/kg以上で循環器系へ影響し、65 mg/kgではショックに陥る重篤な毒性を有するものの、この反応は一過性で且つ可逆的であることが示された。薬物の毒性評価において機能面での評価が重要視されており、RT法により得られる情報は薬物の毒性評価をより適正化すると考えられた。

Application of Radio-Telemetry Technology for Safety Assessment in Dogs <2nd >  
 - A Case of Assessment on Anaphylactoid Reaction -

Hiroyasu MIYAZAKI, Hiroshi KUNO, Kazuhiko SASAKI, Yukio FUJIMAKI,  
 Hiroyoshi MATSUMOTO, Fumihiko IKEMOTO

Development Research Laboratories, Banyu Pharmaceutical Co., Ltd.

## 毒性試験における心機能検査の現状と今後の可能性について

○清水憲次、石山芳則

株式会社富士バイオメディックス 小淵沢総合研究所

演者は本会セミナーにおいて、心機能検査の1例として「長時間心電図検査を主体としたサルを用いた心毒性試験」を紹介した。ここではその補足発表として、現在毒性試験に一般的に使われている心機能検査法および近い将来実施可能となるであろう検査法の特徴と問題点を述べる。

心電図検査：ラット、イヌ、サルで自動解析心電計を用いて、動物を保定した状態で標準肢誘導の心電図を記録し、自動解析できる。本法では各波形の電位と持続時間、平均電気軸が正確に測定できるが、動物の安静状態の維持や不整脈の評価は難しい。イヌとサルではホルター法による長時間心電図検査で不整脈の定量的測定と通常の飼育状態での心拍変動を評価できるが、データ量が膨大で解析時間が長い。

血圧検査：オシロメトリックあるいはテイルカフ法により動物の前肢あるいは尾から非侵襲的に血圧を測定できるが、個体によっては測定値にバラツキが大きく、測定機種による使い易さや精度の差も大きい。テレメトリー法では通常の飼育状態で直接法による血圧を連続測定できるが、動物の腹腔あるいは皮下に血圧送信器を外科的に埋入することから投薬までに回復期間が必要である。

心エコー検査：ヒトおよび獣医臨床での検査方法を参考に、実験動物での心エコー検査が検討されている。心エコー検査では心臓の壁厚や内腔の大きさ、心筋や弁などの動き、さらに心内の血流の方向、速度、流量などが分かり、非侵襲的にその場で心機能の定量評価が行える。しかし、技術の習得に時間がかかるほか、実験動物での検査例および背景データの報告が少なく、毒性試験に使用するにはさらに検討が必要と考える。

Present Status of Cardiac Function Examinations and its Utility in Future.

Nritisugu SHIMIZU, Yoshinori ISHIYAMA.  
Kobuchisawa Laboratories, Fuji Biomedix Co.,Ltd.

## ラット毒性試験で認められた死亡原因の解析

○山内研司<sup>1</sup>, 杉山くに子<sup>1</sup>, 松本正博<sup>2</sup>, 大石裕司<sup>2</sup>, 橋本正晴<sup>1</sup>藤沢薬品工業(株) 安全性研究所 一般毒性<sup>1</sup>, 病理<sup>2</sup>

【目的】Compound A をラットに強制経口投与したとき、異常呼吸音、腹部膨満、体重・摂餌量の減少につづく死亡が認められた。死亡例の剖検では胃・腸管にガスの充満を伴った拡張が観察され、病理検査では気管、気管支、及び肺内気管支に炎症性変化が認められた。これらの結果は、本化合物投与による死因が呼吸器毒性であることを示唆する。そこで、この呼吸器毒性に至るまでの過程を調べた。

【方法及び結果】①炭素末を含む本剤の経口投与後の気管に炭素末の存在と炎症反応がみられた。②本剤を気管内に微量投与すると、経口投与と同様の異常呼吸音、腹部膨満及びガスの充満を伴う胃・腸管の拡張及び気管～肺内気管支に炎症像が認められた。③本剤を反復経口投与し、上部気道の精査と胃腸管に貯留したガス成分を分析した結果、病理検査で粘膜上皮細胞の剥離、壊死、炎症細胞浸潤、フィブリンの析出及び鼻咽頭管の部分的閉塞にまで至る例が観察され、胃に貯留したガスの成分・含量は大気中のものと同じであった。④鼻腔を強制的に閉鎖したラットの観察で、異常呼吸音の発現と胃・腸管にガスの貯留を伴う拡張が観察された。⑤経口投与と同用量の本剤を混餌投与しても上記の毒性変化は全く認められなかった。

【考察】界面活性作用を有する本剤を溶液状態で強制経口投与した際に、発生した泡が、鼻腔を含む気道系に流入し、直接、気道粘膜に接触することにより炎症を惹起し、鼻腔の狭窄・閉塞を招来することが明らかとなった。その結果、口呼吸による空気嚥下の持続を来し、胃腸管での空気の貯留、さらに、摂餌・摂水の低下をも引き起こし、衰弱・死亡したものと推察した。

## Analysis of the Cause of Death in Rats given Compound A.

Kenji YAMAUCHI, Kuniko SUGIYAMA, Masahiro MATSUMOTO, Yuji OISHI and Masaharu HASHIMOTO. Dept. General Toxicol.,<sup>1)</sup> Dept. Pathol.,<sup>2)</sup> Toxicol. Res. Lab., Fujisawa Pharm. Co. Ltd., Osaka, 532-8514, Japan

Sprague-Dawley 系雄ラットの自然発生心筋症における餌の成分およびその制限給餌による効果

○花見正幸<sup>1)</sup>, K.P. Keenan<sup>2)</sup>, C.L. Boldwin<sup>2)</sup>, C.M. Hoe<sup>2)</sup>, K.A. Soper<sup>2)</sup>, G.C. Ballam<sup>3)</sup>, M.J. van Zwieten<sup>2)</sup>, 松本浩良<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 萬有製薬(株) 開発研究所, <sup>2)</sup> Merck Research Laboratories, <sup>3)</sup> Purina Mills

イヌおよびサルを用いた安全性試験では至適一定量の餌を与える制限給餌が一般的であり、Sprague-Dawley 系ラットにおいても、摂餌量を制限することによって、自然発生病変の頻度や程度、死亡率が低下することが知られている。この観点から、我々は給餌法による SD 系ラット長期飼育時の影響を比較検討している。本試験では給餌法検討の一環として、自然発生心筋症(CM)の発生状況を主な指標として飼料成分と給餌量の比較検討を行った。

5 週齢の CrI:CD(SD)雄ラットを、通常の高蛋白維持用(Purina 5002)と線維含量を増量した高線維飼料(Purina 5002-9)の各々の制限給餌(DR) (22g/day)と飽食(AL)群に配し、2 年間飼育した。死亡率、摂餌量、体重、血清生化学検査、体脂肪量、心重量、心組織所見等を比較すると共に、心組織の Masson Trichrome 染色を施し、心線維化領域の画像処理を行い、各摂餌条件下での CM の発生率と程度及び線維化領域の面積を比較した。その結果、試験 1 年までは、両 AL 群で全ての検査値が両 DR 群よりも高い値を示した。試験 2 年目では、5002AL 群で他 3 群と比較し、血清 triglycerides 値や心重量値の平均値の上昇と共に個体値のバラツキが増大した。また同群では心筋変性と線維化の程度の有意な増加が認められ、細胞浸潤を加えた 3 パラメーターで評価した CM の頻度と程度並びに線維化面積が有意な高値を示した。

従って、高線維飼料は心線維化発生を遅延したが、CM を抑制するまでには至らず、一方、制限給餌は高蛋白及び高線維飼料に関わらず雄SDラットのCMを抑制した。以上の結果から、CM の発生には餌の成分の違いよりも摂餌量の影響が大きいことが判明し、CM を抑制するには制限給餌法が有効であった。

The Effects of Diet and Moderate Dietary Restriction on Spontaneous Cardiomyopathy in Male Sprague-Dawley Rats

Masayuki KEMI<sup>1)</sup>, Kevin P. KEENAN<sup>2)</sup>, Carol L. BOLDWIN<sup>2)</sup>, Chao-Min M. HOE<sup>1)</sup>, Keith A. SOPER<sup>2)</sup>, G.C. GALLAM<sup>1)</sup>, Matthew J. VAN ZWIETEN<sup>2)</sup>, and Hiroyoshi MATSUMOTO<sup>1)</sup>. <sup>1)</sup> Development Research Laboratories, Banyu Pharmaceutical Co., Ltd., Saitama-360-0214, Japan, <sup>1)</sup> Merck Research Laboratories, West Point, PA, USA, and <sup>1)</sup> Purina Mills, St. Louis, MO, USA.

自然発症腎不全モデル動物としての  
ミラノ正常血圧ラット (MNS) の基礎的検討

- 吉岡 直記<sup>1</sup>、高橋 久英<sup>2</sup>、乾 公正<sup>3</sup>、真板 敬三<sup>3</sup>、  
田中 弘光<sup>1</sup>、岩田 光夫<sup>1</sup>

<sup>1</sup>呉羽化学工業 (株)、<sup>2</sup>藤田保健衛生大学・実験動物センター、  
<sup>3</sup> (財) 残留農薬研究所

【目的】本態性高血圧モデル動物であるミラノ高血圧ラット(MHS)の正常血圧対照動物 (以下MNS) は週齢の経過に伴い腎不全を自然発症する。今回、我々はこのMNS腎不全について経時的に臨床病理学および病理形態学的検査を実施し、若干の知見を得たのでこれを報告する。

【検討項目】5~38週齢の雄性MNSの尿検査、血液化学的検査、腎臓病理組織学的検討および電子顕微鏡検査を行った。

【結果】10週齢時には尿中タンパク排泄量が約100mg/dayを示し、その後週齢の経過に伴い増加した。尿量に変化はみられなかった。血液化学的検査では20週齢以降総コレステロールおよび中性脂肪が高値を示した。30週齢以降Cr、BUN値が上昇した。

腎臓病理組織学的検討では10週齢時に硝子円柱像がみられた。20週齢には軽度の糸球体硬化が散見された他、間質の線維化、細胞浸潤、硝子円柱、尿細管拡張がみられた。30週齢では尿細管の萎縮や円柱を含む囊胞状拡張が皮質部に混在してみられた。糸球体には硝子様物質が沈着し、分節状硬化巣やポウマン囊との癒着や肥厚を伴う像が多く観察された。38週齢において、腎変化はさらに進行し、上皮小体肥大もみられ、腎性二次性上皮小体機能亢進症がおきているものと推測された。

腎臓の電子顕微鏡学的検査では、10週齢時に糸球体基底膜の軽度肥厚と上皮細胞足突起の局限性癒合が認められた。20週齢時には上皮細胞の足突起癒合の増強と細胞質内高電子密度顆粒の増加、血管内皮細胞の肥大とメザンギウム域の基質増加・拡大が観察された。38週齢時に上皮細胞の足突起癒合は慢性となり、上皮細胞の膜状囊胞化がみられた。一部の上皮細胞は剥離し、糸球体の分節状硝子化あるいは硬化巣の形成、ポウマン囊壁との癒着および部分的メザンギウム間入がみられた。

Basic Study on the Spontaneous Nephropathy in the Milan Normotensive Strain (MNS) of Rats.

Naoki YOSHIOKA<sup>1</sup>, Hisahide TAKAHASHI<sup>2</sup>, Kosei INUT<sup>3</sup>, Keizo MAITA<sup>3</sup>, Hiromitsu TANAKA<sup>1</sup> and Mitsuo IWATA<sup>1</sup>. <sup>1)</sup> Kureha Chemical Industry Co., Ltd, Tokyo 169, Japan.

<sup>2)</sup> Laboratory Animal Center, Fujita Health University, Nagoya 470, Japan.

<sup>3)</sup> The Institute of Environmental Toxicology, Tokyo 187, Japan.

## 抗真菌活性評価における全身性カンジダ症モデルマウスの検討

- 森本泰子, 猪又晃, 宍戸信之, 滝沢節子, 小林和子, 志賀敏彦,  
堀井郁夫

日本ロシュ(株), 研究所, 前臨床科学研究部

【目的】抗真菌剤開発において, 全身性カンジダ症モデル動物はその薬効を評価する際に多用されてきた。一般的に, このモデルは評価時にその生存率を指標としており, 感染時の毒作用パラメーターがどのように推移するのかが詳細には知られていない。今回, 我々はこの病態モデルについて, 生死確認の他, 各種臨床検査, 病理組織学的検査を経時的に実施, 検討したので報告する。

【方法】4.5週齢のICR雄マウスに *Candida albicans* (CY1002) 約  $6.5 \times 10^6$  cell / 20g bw を尾静脈より接種し, アゾール系抗真菌剤 Fluconazole(FCZ)群は 1.5mg/kg を, 対照群は溶媒のみを b.i.d.で感染当日から3日間経口投与した。毎日症状観察, 体重・摂餌量測定を実施, 感染の 1.8 hr., 1, 2, 3, 4, 7, 10 日後に 3~5 匹ずつ採血後, 剖検し各種検査を行った。

【結果】対照群では Day2 から感染による症状の悪化が認められ, Day3 には 50%の動物が死亡した。FCZ 群では Day8 にわずかに被毛状態の悪化が, Day10 に初めて死亡例が認められた。血液生化学的検査で, 対照群に Day1 より BUN の著しい増加が認められ, Day2 には CRE, K の増加が認められた。これに対し FCZ 群では Day7 まで変化は認められなかった。対照群の腎臓では剖検時に著しい褐色および白色病巣が散在性に認められ, 病理組織学的検査で感染 8 hr 後から菌要素の存在が確認された。さらに炎症細胞の浸潤が観察された。FCZ 群では投薬中 (Day2 まで)は組織学的変化はほとんど認められず, Day3 以降に菌要素が確認された。

【結論】全身性カンジダ症モデルマウスでは, 腎臓への菌侵襲, それに伴う腎障害が感染初期より現れ, 代表的な抗真菌剤はこの腎臓に対する障害を抑え薬効を示すものと考えられた。本モデルを用いた評価系では, 生存率だけでなく感染初期に腎機能等の幾つかのパラメーターを比較することで薬効を評価し得ることが示唆された。

### Toxicological evaluation of systemic candidiasis mouse model treated with antifungal compound

Hiroko MORIMOTO, Akira INOMATA, Nobuyuki SHISHIDO, Kuzuko KOBAYASHI,  
Setsuko TAKIZAWA, Toshihiko SHIGA and Ikuo HORII  
Preclinical Science Department, Nippon Roche Research Center,  
Kanagawa-247-8530, Japan



6分の5腎摘ラットの毒性試験への応用  
—6分の5腎摘ラットと正常ラットの比較—

水野幸恵<sup>1)</sup>、奥山 学<sup>1)</sup>、朝枝伸幸<sup>1)</sup>、岩井久和<sup>1)</sup>、望月健光<sup>1)</sup>、  
田川義章<sup>1),2)</sup>、福島昭治<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> (株)三和化学研究所 安全性研究所

<sup>2)</sup> 大阪市立大学 医学部 第一病理

〔目的〕毒性試験において、病態モデル動物を使用する機会はほとんどなく、またその生理学的な情報は十分ではない。一方、ヒトで発現した副作用のメカニズム解明や、正常動物で発現した毒性変化のヒトへの外挿に際して、病態モデル動物を使用することは有用であると考えられる。そこで今回、慢性腎不全モデルとして汎用されている、部分的腎摘出ラット（6分の5腎摘ラット）における血液学的検査、血液生化学的検査および尿検査において、若干の知見を得たので報告する。

〔方法〕7週齢で左腎臓を3分の2摘出し、さらに9週齢で右腎臓を摘出した Slc : SD 系雄ラット 10 匹を用いて、17 週齢時に尿検査を、18 週齢時に血液および血液生化学的検査を実施した。なお、対照として同週齢の正常ラット 10 匹を用い、比較検討した。

〔結果および考察〕6分の5腎摘ラットと対照とした同週齢の正常ラットより得られたデータを比較した結果、6分の5腎摘ラットにおいて血液学的検査では、赤血球数の減少ならびに MCV および MCH の増加が認められた。血液生化学的検査では、尿素窒素およびクレアチニンの増加、総蛋白およびアルブミンの減少がみられた。尿検査においては、尿量の増加ならびに電解質、比重および浸透圧の減少が認められた。これらの結果は腎障害に伴って起こる主要な変化を反映するものであり、腎不全状態での毒性学的検討に対し本モデルを使用することが有用であることが示唆された。なお、部分的腎摘出後の各検査値の経時的な変化および腎臓の組織学的検査について、現在検討中である。

Application of Partially Nephrectomized Rats to the Toxicity Study  
— Comparison of Partially Nephrectomized Rats and Normal Rats —

Yukie MIZUNO<sup>1)</sup>, Manabu OKUYAMA<sup>1)</sup>, Nobuyuki ASAEDA<sup>1)</sup>, Hisakazu IWAI<sup>1)</sup>, Tatemitsu MOCHIZUKI<sup>1)</sup>, Yoshiaki TAGAWA<sup>1),2)</sup> and Shoji FUKUSHIMA<sup>2)</sup>. <sup>1)</sup>Safety Assessment Laboratory, Sanwa Kagaku Kenkyusho Co., Ltd., Inabe, Mie, 511-0406, Japan.

<sup>2)</sup>First Department of Pathology, Osaka City University Medical School, Osaka, 545-0051, Japan.

## コモンマーモセットにおけるシスプラチンによる腎障害の検討

- 石井 百合子、相本 浩司、加国 雅和、竹田 剛、山本 光雄、  
原 卓司、石井 昭男

協和発酵工業（株）・安全性研究所

【目的】真猿類に属するコモンマーモセットにシスプラチン(CDDP)を投与し、臨床で認められるような腎毒性が再現できるか否かを検討したので報告する。

【方法】約3歳齢のコモンマーモセット雌にCDDP 3.75、5.5、7.5 mg/kgを静脈内に単回投与し、4～16週間の観察を行った。検査項目として、一般状態観察、血液学的検査、血液生化学的検査、病理組織学的検査を実施した。

【結果および考察】CDDP 7.5 mg/kgの投与後6日に自発運動の減少、体温低下、下痢便および震えを示し、瀕死状態に至った。その他の投与群では、一般状態における顕著な変化は認められなかった。血液生化学的検査において、5.5 mg/kg以上の投与群において用量依存的に尿素窒素が増加し、腎障害を示唆する変化が認められた。病理組織学的検査でも、3.75 mg/kg投与群において、ボウマン嚢被膜の肥厚や主に遠位尿細管の管腔拡張や尿細管上皮の再生などが認められた。この他に血液学的検査において、赤血球数および白血球数、血小板数の減少が認められたが、骨髄抑制は軽度であった。さらに、トランスアミナーゼやアルカリホスファターゼが増加し、3.75 mg/kg投与群の病理組織学的検査では肝臓で肝細胞の壊死果がみられ、肝障害を示唆する変化が認められた。

以上のように、コモンマーモセットにおいても、ヒト、イヌでみられるような尿素窒素の増加やボウマン嚢被膜の肥厚の他に、主に遠位尿細管の管腔拡張、尿細管上皮の変性などヒトと類似した腎障害が認められた。

Investigation of nephrotoxicity induced by Cisplatin in common marmosets.

Yuriko ISHII, Koji AIMOTO, Masakazu KAKUNI, Tsuyoshi TAKEDA, Mitsuo YAMAMOTO, Takuji HARA and Akio ISHII.

Toxicological Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Yamaguchi 755-8501, Japan

## クロフィブレート投与時のラット赤血球膜に対する影響

- 岡崎和志、望月雅裕、中村英明、畠山和久、高松利明、西村信雄、  
榎並倫宣、岡崎修三

(株) ポゾリサーチセンター 御殿場研究所

〔目的〕高脂血症治療剤であるクロフィブレートをラットに投与した時、血清脂質の低下やベルオキシゾーム増生を伴う肝臓の腫大とともに、貧血を惹起することが報告されている。しかし、貧血の発現機序については知られていない。今回、我々はクロフィブレートの赤血球に対する影響を、ラットを用いて検討した。

〔方法〕1群6匹の8週齢Crj:CD(SD)系雄ラットにクロフィブレートを0、50および200 mg/kg/日の投与量で4週間経口投与した。投与期間終了の翌日に赤血球数を始めとする血液・血液化学検査と赤血球膜（ゴースト）、血清および肝臓における過酸化脂質量の測定をTBA法により行い、また、肝臓および造血器系器官について病理組織学的検索を行った。

〔結果〕50および200mg/kg投与群では、ベルオキシゾームの増生によると考えられる肝細胞の肥大がみられた。血液学検査では赤血球数、ヘモグロビン量およびヘマトクリット値の低下がみられ、貧血が惹起された。また、200mg/kgでは血清および赤血球膜の過酸化脂質量はいずれも対照群の約1.6倍の値を示し、有意に高かった。さらに、血清中総ビリルビン量の増加および赤血球の形態異常（有口赤血球、標的赤血球）がみられた。これらの結果から、クロフィブレートによる貧血は、溶血性のものであり、赤血球膜の脂質過酸化による脆弱化が溶血の一因と推定された。

Effects of Clofibrate on the Erythrocyte Membrane in Rats.

Kazushi OKAZAKI, Masahiro MOCHIZUKI, Hideaki NAKAMURA, Kazuhisa HATAYAMA,  
Toshiaki TAKAMATSU, Nobuo NISHIMURA, Tomonori ENAMI, Shuzo OKAZAKI. Gotemba  
Laboratory, BOZO Research Center Inc., Shizuoka 412-0039, Japan.

抗癌剤(Mitomycin C)による骨髄有核細胞および末梢血への影響：  
イヌとラットの比較

○松本 直樹、山本 光雄、米重 智美、加藤 譲、原 卓司

協和発酵工業(株)・安全性研究所

【目的】抗癌剤による実験動物の造血毒性に種差がみられることは多々報告されているが、骨髄細胞と末梢血の動態についての相関性の面から種差を検討した例は少ない。今回、ラット(Crj:CD)とイヌ(Beagle)に Mitomycin C(MMC)を単回投与し、骨髄有核細胞と末梢血中の白血球数および赤血球数の動態を経時的に測定し、両者間に種差があるかどうかを検討した。

【方法】イヌおよびラットに MMC の最大耐量近傍である 0.4mg/kg および 4.0mg/kg をそれぞれ単回静脈内投与し、経時的に末梢血採取を行うとともに、イヌでは胸骨の骨髄穿刺による骨髄採取、ラットでは大腿骨の骨髄採取を行なった。得られた末梢血および骨髄細胞については自動血球計測装置を用い細胞数を計測した後、それぞれの塗抹標本を血液細胞分析装置あるいは光学顕微鏡下で細胞分類を行なった。

【結果】イヌの骨髄に対する影響は有核細胞数が投与後 2 日より減少し、投与後 7 日に nadir を示した。細胞分類では顆粒球系細胞で前骨髄球、骨髄球、後骨髄球が投与後 7 日、赤芽球系細胞で好塩基性赤芽球、多染性赤芽球、正染性赤芽球が投与後 7 ないし 10 日にそれぞれ nadir を示した。顆粒球系細胞群に対し末梢血中の白血球は遅れて減少する傾向を示した。また、赤芽球系細胞群は著しい減少を示したが、末梢血中の赤血球数の減少は軽度なものであった。回復性は末梢血中の白血球数では速やかな回復を示したものの、骨髄中の顆粒球系細胞および赤芽球系細胞では緩やかな回復を示した。ラットの骨髄に対する影響は有核細胞数が投与後 2 日に nadir を示し、細胞分類においても好中球を除く顆粒球系細胞、赤芽球系細胞およびリンパ球系細胞が同時点で nadir を示した。末梢血では白血球が投与後 2 日に nadir を示す減少が認められたが、赤血球数に変化は認められなかった。この様に MMC 投与によるラットの有核細胞および末梢血白血球数への影響はイヌとは異なり早期に認められた。回復性はイヌと同様に末梢血の白血球が最も早い回復を示した。

Effect of anticancer drug (Mitomycin C) on peripheral blood and bone marrow :  
Comparison of dogs and rats.

Naoki MATSUMOTO, Mitsuo YAMAMOTO, Tomomi YONESHIGE, Yuzuru KATO and  
Takuji HARA. Toxicological Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.,  
Yamaguchi-755-8501, Japan.

## 抗凝固剤過剰下におけるラットとイヌ血漿のPTとAPTT延長について

○倉田昌明、野口規子、春日芳朋、杉本哲朗、田中公一、長谷川隆司

中外製薬(株) 安全性研究所

血液凝固試験では、抗凝固剤(クエン酸ナトリウム溶液)1容に対して血液9容の割合で採血する。しかし、血漿量に対するクエン酸ナトリウム溶液量の割合が上昇した場合(例えば、脱水状態などヘマトクリット値が著しく上昇した場合)、プロトロンビン時間(prothrombin time: PT)と活性化部分トロンボプラスチン時間(activated partial thromboplastin time: APTT)が延長することが主にヒトの臨床で報告されている。今回、ラットとビーグル犬より得られた血漿を用いて、クエン酸ナトリウム過剰下におけるPTとAPTTの延長について検討した。

1) ラットとイヌの血漿(標準法に従い血液9容に対し3.2%クエン酸ナトリウム溶液1容の割合で採血した後、遠心分離により得られた血漿)にクエン酸ナトリウム溶液を添加したところ、添加量あるいは計算により求められた想定ヘマトクリット値に依存してPTとAPTTが延長した。

2) この延長は、PTよりAPTTで、イヌよりラットで顕著にあらわれた。

3) 3.2%と3.8%クエン酸ナトリウム溶液を用いた比較検討から、クエン酸ナトリウム溶液過剰によるPTとAPTTの延長は血漿の希釈によるものではなく、クエン酸ナトリウム濃度の上昇に起因することが示された。

今回の成績は、実験動物においても血漿サンプルに対するクエン酸ナトリウム過剰が生ずる場合に“みかけ”のPTとAPTTの延長が起こることと、この延長の程度はパラメータと動物種により異なることを示している。

Prolongation of PT and APTT under Excessive Anticoagulant in the Plasma from Rats and Dogs.

Masaaki KURATA, Noriko NOGUCHI, Yoshitomo KASUGA, Tetsuro SUGIMOTO, Kouichi TANAKA and Takashi HASEGAWA. Safety Assessment Laboratory, Chugai Pharmaceutical Co.Ltd. Shizuoka 412-8513, Japan.

毒性試験における自動血球計数装置での粒度分布異常の事例報告

○田邊容子、望月文敏、藤村みどり、中野雄司

旭化成工業株式会社 ライフサイエンス総合研究所 安全性研究所

血液検査における自動血球計数装置は他の臨床検査の自動分析装置と異なり、測定項目の血球を確実に計数できているかの保証が難しい。また、正常なヒトの検体において正確に計数できるように設計されているため、実験動物、特に薬物を連続投与した場合にその保証はない。当施設では多項目自動血球計数装置K-1000（東亜医用電子）を使用しているが、ラット及びビーグル犬を用いた毒性試験において計数値は表示されたものの、粒度分布異常のフラグが認められたケースがあった。この場合、異常フラグが示された項目を含めた値が正確に計数されていないと考えられる。このような事例について紹介する。

薬物Aの20mg/kgを1カ月間反復経口投与した雄ラットにおいて、試験群の5例中1例、TK群の14例中9例に赤血球及び血小板の異常フラグが認められた。薬物Bを1カ月間反復経口投与したイヌにおいて、1mg/kg群で雌の3例中1例に、4mg/kg群で雄の5例の全例と雌の5例中2例に、16mg/kg群で雌雄の5例中4例に白血球の異常フラグが認められ、そのうち4mg/kg群及び16mg/kg群の雌各1例では血小板の異常フラグも認められた。薬物Cの80U/kgを12カ月間反復皮下投与したラットにおいて、雄12例中1例に赤血球及び血小板の異常フラグが認められた。粒度分布異常の認められた血液検体については血液塗抹標本を観察し、形態変化の有無を確認したが、明らかな原因は不明であった。

Case Study in the Anomaly of Blood Cell Distribution  
Determined Using Automated Hematology Analyzer on Toxicity  
Studies.

Yoko TANABE, Fumitoshi MOCHIZUKI, Midori FUJIMURA and  
Yuji NAKANO, LAB. FOR TOXICOLOGICAL RESEARCH INSITITUTE FOR  
LIFE SCIENCE RESEARCH, ASAHI CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD. 632-1  
Mifuku, Ohito-Cho, Tagata-Gun, Shizuoka-Ken, Japan.

## カニクイザルにおける血液生化学的パラメーターの日内変動

○稲元弘昭, 福崎好一郎, 加島政利, 池田浩明, 鮫島秀暢,  
岡崎啓幸, 宮脇宏彰

株式会社 新日本科学 安全性研究所

【目的】一般毒性試験でカニクイザルを使用する機会が多くなり、臨床検査においても従来から大動物で使用されているイヌと同様な検査を行っており、血液検査も頻繁に実施されている。そこで、今回、蓄積した血液生化学的データ（ホルモン検査も一部含む）を紹介すると共に、各パラメーターの日内変動も測定したので、その結果も報告する。

【方法】3～6歳の雄カニクイザル40匹を用いて、8:30, 10:00, 12:00, 14:00, 16:00, 18:00に大腿静脈より採血し、1あるいは2週間隔で10回実施した。ASAT, ALAT（いずれもJSCC準拠処方）、ALP（p-ニトロフェニルリン酸基質法）、LDH（UV Rate法）、CPK（UV Rate法）、総ビリルビン（アルカリアゾビリルビン法）、総たんぱく（ビウレット法）、アルブミン（BCG法）、総コレステロール（COD-DAOS法）、トリグリセリド（GPO-DAOS法）、グルコース（GlcK・G-6-PDH法）、BUN（ウレアーゼ-GIDH法）、クレアチニン（Jaffé法）、無機リン（モリブデン酸直接法）、Ca（OCPC法）を自動分析装置（Clnalyzer RX-10型、日本電子株式会社）で測定した。サルは9:00から10:00までの制限給餌を行い、インスリンも測定した。

【結果】摂餌後にインスリンの一過性の顕著な上昇がみられたが、グルコース濃度の上昇は軽度であった。ASAT, ALAT, LDHおよびCPKは経時的に上昇を示したが、採血時の動物の拘束に起因した変化によるものであった。

## Circadian rhythm of blood chemistry in cynomolgus monkeys

Hiroaki INAMOTO, Koichiro FUKUZAKI, Masatoshi KASHIMA, Hiroaki IKEDA, Hodenobu SAMESHIMA, Keiko OKASAKI and Hiroaki MIYAJIMA. Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd., Yoshida, Kagoshima, 891-1394, Japan

Functional Observational Battery 及び神経病理学的検査による  
神経毒性の検討：Vincristine のラット単回投与による行動障  
害について

○小川哲郎、三村雄一、加藤仁美、村越正典、中山隆治

帝国臓器製薬(株) 安全性研究部

抗癌剤の中には神経毒性を示すものが多く、antimicrotubule agentでは、これが投与制約因子となることも知られている。今回我々は、antimicrotubule agentである vincristineをラットに単回投与し、Functional Observational Battery (FOB) と神経病理学的検査による神経毒性試験を実施した。

SD系 (Cj:CD) 雄性ラットに0、300及び500  $\mu$ g/kgの vincristineを単回、尾静脈内に投与した。投与1、2、7、14及び28日 (500  $\mu$ g/kg群は投与2日まで) に詳細な一般状態観察、神経学的検査 (カタレプシー検査、指間距離、着地時肢間距離、後肢置き直し反応、正向反射、聴覚反応、痛覚反応及び屈曲反射) 及びオプンフィールド行動試験からなるFOBを実施し、投与28日に灌流固定を行い神経病理学的検査を実施した。

FOBにおいて、歩行異常 (麻痺性歩行)、後肢置き直し反応及び屈曲反射の鈍化・消失、指間距離及び着地時肢間距離の短縮等が投与1~7日の vincristine投与群で認められた。

神経病理学的検査では、vincristine投与群の神経系に異常は認められず、腓腹筋に変性 (筋線維の腫脹、空胞化及び崩壊) が認められた。

以上の結果から、vincristineのラット単回静脈内投与は、筋障害に起因した行動障害モデルとなることが明らかとなり、また本実験で実施したFOBは筋毒性の検出にも有効であると考えられた。

Studies on the neurotoxicity using functional observational battery and neuropathological examination : Behavioral abnormality induced by vincristine in rat.

Tetsuo OGAWA, Yuuichi MIMURA, Hitomi KATO, Masanori MURAKOSHI, Takaharu NAKAYAMA. Safety Research Department, Teikoku Hormone Mfg.Co.,Ltd., Kawasaki city, Japan



Functional Observational Battery 及び神経病理学的検査による  
神経毒性の検討：Adriamycin のラット単回投与による末梢  
神経障害について

○小川哲郎、三村雄一、加藤仁美、村越正典、中山隆治

帝国臓器製薬(株) 安全性研究部

神経毒性は、医薬品の安全性試験における重要な検討項目の1つである。成熟動物の神経細胞は分裂能力を失っており、壊死を起こすと再生されないことを考えると、重篤な神経障害は確実に検出されなければならない。今回我々は、Functional Observational Battery (FOB) と脳、脊髄、脊髄神経節及び坐骨神経を対象とした神経病理学的検査からなる神経毒性試験法を検討し、その陽性対照を得る目的で抗癌剤 adriamycin を用いた実験を行った。

SD系 (Crj:CD) 雄性ラットに0及び10 mg/kgのadriamycin (Ad) を単回、尾静脈内に投与した。切迫屠殺日及び投与28日にFOBを実施した後、灌流固定を行い神経病理学的検査を行った。

FOBから得た結果で神経障害を示唆する変化として、流涎、立毛、屈曲反射の鈍化・消失及び歩行異常(失調性歩行)がAd群で認められた。

Ad群の神経病理学的検査では、脊髄神経節細胞の変性・壊死とそれともなう末梢神経及び中枢側の上行性伝導路(脊髄後索及び楔状束)の神経線維の崩壊・消失及び細胞浸潤(貪食細胞)、三叉神経脊髄路における神経線維の崩壊と細胞浸潤(貪食細胞)が認められた。

以上の結果から、Adのラット単回投与は、血液脳関門の欠如している末梢神経に障害を起こし、神経細胞の壊死を伴う重篤で不可逆的な末梢神経障害モデルとなると考えられた。

Studies on the neurotoxicity using functional observational battery and neuropathological examination : Peripheral neurotoxicity induced by adriamycin in rat.

Tetsuo OGAWA, Yuuichi MIMURA, Hitomi KATO, Masanori MURAKOSHI, Takaharu NAKAYAMA. Safety Research Department, Teikoku hormone Mfg.Co.,Ltd., Kawasaki city, Japan

## 気管内投与器具のバリデーションと利用方法の検討

○佐藤伸一、関谷泰司、栗山晋、宮崎諒、西垣敏明

株式会社イナリサーチ

〔目的〕下部呼吸器疾患に対する動物モデルは、これら疾患の治療薬開発や作用機序を解明するために重要である。この目的のため、気管内あるいは肺内に目的物質を直接、定量的に投与する必要がある。Penn Century 社製の粉末および溶液の気管内投与器具は、この目的に適った装置である。今回、本小動物粉末用器具について、投与の定量性を含む全体的な器具のバリデーションを *in vitro* で行い、またラット肺内投与方法と肺内への粉末物質の分布性を検討した。

〔方法〕*in vitro* バリデーションには、乳糖、炭素末、硫酸バリウム、各種色素を用い、投与可能量あるいは噴霧率、噴霧状態などを検討した。また、SD ラットを用い気管内投与方法を検討するとともに、活性炭粉末投与による肺内への分布を組織学的に検索した。

〔結果〕Penn Century 製小動物粉末用 DP-3 モデルでは、乳糖の場合 1~20 mg の範囲で 95% 以上の噴出が可能であったが、均一な噴霧を行うには約 5 mg までが限度と考えられた。比較的重い物質や、吸湿性物質では噴霧率は僅かであり、使用可能物質は限定された。ラットの気管内投与は、エーテル麻酔下に背臥保定にて顔帯鏡とピンセットのみで可能であり麻酔後、1 分以内の投与方法が確立された。本投与方法によって、反復投与試験が可能と考えられ、現在検討中である。炭素粉末をマーカーとした肺内分布については、各葉間で差異はあるものの、粒子サイズに依存して気管支から肺胞内まで広く分布し、粒子サイズを変えることにより到達部位を選択できる事が示唆された。各種の肺疾患研究に利用可能な器具と判断され、肺疾患モデル作製の検討を行っているので併せて報告する。

Validation and Utilization of Delivery Device for Intratracheal Administration of Dry Powders.

Shin-ichi SATOH, Yasuji SEKITANI, Susumu SUYAMA, Yuzuru MIYAZAKI and Toshiaki NISHIGAKI, Ina Research Inc.

ペンタクロロフェノールによる培養肝細胞のアポトーシス誘導  
—ギャップ結合細胞間コミュニケーション阻害および酸化ストレスの関連—

○佐井 君江, Kyung-Sun Kang, 黒川 雄二\*, 井上 達

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験センター・毒性部

\*国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験センター

【目的】アポトーシスは、細胞が障害を受けた際の能動的な自己防衛機構の一つと考えられる。ギャップ結合を有する細胞が放射線等により障害を受けた場合には、ギャップ結合細胞間コミュニケーション(GJIC)が亢進し、その後アポトーシスの誘導が起ることから、GJICのアポトーシス誘導における寄与が示唆されている。一方、我々は肝障害性のペンタクロロフェノール(PCP)によるアポトーシスには、GJICの亢進ではなく、むしろ阻害が先行することを見出した。そこで本研究では、アポトーシス誘導の機序にGJIC阻害が関与する経路のあること、またその機序について調べるため、ラット肝上皮細胞由来の培養細胞系で検討した。PCPはミトコンドリアの酸化リン酸化の脱共役作用があることから、特にこのアポトーシス誘導の機序における、ミトコンドリア機能変化に伴って産生されると考えられる酸素ラジカル種の生成について調べ、さらにそれらとギャップ結合蛋白(コネクシン43)の発現量及びリン酸化状態の変化、ならびにp53誘導との関連も検討した。【方法】c-mycを導入した肝上皮細胞株(WB-myc細胞)にPCP(40  $\mu$  M)を添加し37°Cで培養した。GJICは蛍光色素(lucifer yellow)を用いた scrape-loading/dye transfer法により、アポトーシスはDNA ladder形成を指標に検出した。酸素ラジカル種の生成はdichlorodihydrofluoresceinの蛍光強度変化を指標とし、コネクシン43及びp53の発現量はWestern blottingにより解析した。【結果】PCP処理1時間以内にGJIC阻害がおこり、これはコネクシン43のリン酸化の低下を伴っていた。またこれらと酸素ラジカル種の生成との関連が認められた。3時間後にはp53の誘導が起り、6時間後にはDNA ladder形成が確認された。以上のことから、PCPによるアポトーシスの開始にGJIC阻害が先行することが明らかとなり、このことから、細胞生存に重要な分子(Ca<sup>2+</sup>イオン、セカンドメッセンジャー等)のギャップ結合を介した細胞間での共有の阻害が、アポトーシス誘導の原因となる可能性が考えられる。またこのアポトーシスの機序には、酸化ストレスの生成とそれに伴うp53の発現誘導を介した経路によることが示唆された。現在、さらにアポトーシス誘導機序におけるGJIC阻害、ミトコンドリア機能変化との関連の詳細について、正常型細胞(WB細胞)との比較とともに検討中である。

Pentachlorophenol-Induced Apoptosis in Rat Liver Epithelial Cells: Relation to Inhibition of Gap Junctional Intercellular Communication and Oxidative Stress.

Kimie SAI, Kyung-Sun KANG, Yuji KUROKAWA\* and Tohru INOUE. Division of Cellular and Molecular Toxicology, Biological Safety Research Center, NIHS, Tokyo 158-8501, Japan, \* Biological Safety Research Center, NIHS, Tokyo 158-8501, Japan,

## 一般毒性試験における電顕検査の利用状況調査

○小川慎一<sup>1)</sup> 森 襄 樋口信昭 小倉基裕 阿瀬善也 鈴木一生  
 泉 英明 秋葉知英 田川義章 竹下 尚 佐藤 茂 堺 俊治

日本製薬工業協会 基礎研究部会第一分科会  
 (旭化成工業 安全性研究所<sup>1)</sup>)

一般毒性試験における病理学的検査では酵素抗体法をはじめとする各種検査法が利用可能になり、電顕検査の意義も次第に変化しつつある。そこで製薬協毒性病理WGに加盟する機関を対象に電顕利用の現状について調査したので報告する。

**電顕検査の対象試験・器官・個体等**： 試料採取は GLP 試験に限定している機関が半数を超えていた。採取した試料全てについて観察までおこなっている機関はなく、大半がブロックまで作製し以後の作業は必要に応じ行っている。観察まで行った場合の理由としては、光顕所見の説明が最も多く、以下、臓器重量変動の説明、精査の為であった。対象器官は、肝臓および腎臓を基本とするところが最も多く、ケースバイケースとしているところも複数みられた。対象個体数は、大動物・小動物共に各群から2～3例としている機関が最も多く、その他対照群および高用量群から2～3例あるいは大動物に関しては全個体と回答した機関も複数みられた。

**所見採取方法**： 撮影した写真から所見を採取している機関が最も多く、蛍光板(又はモニタ)から所見をとり撮影した写真からさらに詳細な所見をとっている機関がこれに次いだ。蛍光板(又はモニタ)だけから所見をとっている機関は少数であった。

**電顕の有用性**： 半数近くの機関が光顕では捉えられなかった変化を電顕により初めて確認した経験をもち、また大多数の機関が光顕その他の検査での変化を電顕により説明できた経験があると回答している。しかし今後の電顕利用法としては、有効な場合は利用するが毒性試験で必ず電顕を見ておく必要はない、問題となりそうな器官の試料は採取しておき必要が生じた場合に観察を行える状態にしておくのが現実的だ、と考えている機関が多数であった。

The results of questionnaires about the electron microscopy in general toxicity studies.  
 Shin-ichi OGAWA<sup>1)</sup>, Jo MORI, Nobuaki HIGUCHI, Motohiro OGURA, Yoshiya AZE,  
 Kazuo SUZUKI, Hideakira IZUMI, Tomohide AKIBA, Yoshiaki TAGAWA, Takashi  
 TAKESHITA, Shigeru SATO, Toshiharu SAKAI  
 Japan Pharmaceutical Manufacturers Association, Tokyo, Japan  
 (Asahi Chemical Industry Co.,Ltd.<sup>1)</sup>)

## 臨床病理検査データと病理組織所見の関連性データベースの構築

○佐藤茂<sup>1)</sup> 船橋齊 湯浅啓史 蟹谷昌尚 大瀧芽久美 三善隆広  
及川寿浩 吉村弘之 三井雅之 林万律子 小川慎一 堺俊治

日本製薬工業協会 基礎研究部会第一分科会  
(東菱薬品工業 青梅研究所<sup>1)</sup>)

毒性試験を行うに当たり、被験物質の毒性を明らかにすることが重要であるのは言うまでもない。その際、きわめて重要なファクターとなるのが臨床病理検査データと病理組織所見であるが、これらの関連性についての報告は少ない。そこで、製薬協毒性病理WG加盟施設31社を対象に、とくに未発表のものを中心として臨床病理検査データと病理組織所見の関連性について調査したので報告する。

【方法】種、系統、性別、検査時齢、薬効分類、投与量、経路、1群の例数、臓器名、部位、所見、所見のあった例数および検査項目と値(対照群も含め)を記載する調査票を配布、回収し、データベース(DB)ソフトに入力した。ついで、希望の項目についてDB検索し、表計算ソフトで対照群との比率を算出してグラフ化した。

【結果】提供されたデータは、施設数19、調査票数76、所見数のべ191(所見なしを含む)、検査項目数のべ5800あまりにのぼった。動物種別では、ラット79%、イヌ12%、マウス9%であった。臓器別では、肝25%、腎19%、以下脾、骨髄、リンパ節、心などの順であった。一般的に関連ありとされる肝所見とGOT、GPT、BIL、LDHなどが連動する傾向が見られたほか、興味ある結果として、肝細胞肥大や腫大などの所見に、GOTとの関連性が低く、壊死などの所見に関連性の高い傾向が見られた。一方、腎所見とGOTを組み合わせた検索では、肝所見のない場合は関連性が低く、肝所見を伴う場合は関連性が高かった。このようにデータベースを活用して種々の検索を試みることで、毒性試験の考察の一助、とくに両者の関連性の境界付近の判断や、さらにヒトへの毒性の予測に重要な示唆を与える材料として役立つと思われる。

Construction of a data base on correlation between clinical laboratory data and histopathological findings.

Shigeru SATO, Hitoshi FUNABASHI, Hirofumi YUASA, Masanao KANITANI, Megumi OHTAKI, Takahiro SANZEN, Toshiharu OIKAWA, Hiroyuki YOSHIMURA, Masayuki MITSUI, Mariko HAYASHI, Shin-ichi OGAWA, Toshiharu SAKAI  
Japan Pharmaceutical Manufacturers Association, Tokyo, Japan  
(Tobishi Pharmaceutical Co. Ltd<sup>1)</sup>)

## 赤外線式鼓膜温度計による実験動物の体温測定について

○田畑肇, 廣田里香, 栗原博司, 久保道江, 佐々木智, 北村和夫

山之内製薬株式会社 創薬安全性研究所

〔目的〕近年, ヒトでは鼓膜とその周辺組織から放射される熱性赤外線エネルギーを測定する, 小型かつ簡便で迅速性に優れた体温測定装置が普及してきた. 動物の体温測定は直腸温が一般的であるが, 多数の動物について測定を行うことは必ずしも容易ではなく, 毒性試験では体温変化の検知は触診に依ることが多かった. 今回, イヌ, ウサギ, モルモット, ラットおよびマウスを用いて, 直腸温と耳内温あるいはその他の体表面温度等との比較を行い, 毒性試験への応用について検討した.

〔材料・方法〕ブラウンサーモスキヤン pro1 瞬間体温計 (ブラウンジャパン) を耳内, 口腔内およびその他の体表面温度測定用に, 電子体温計 CTM-303 (テルモ) を直腸温測定用に, その他に MGA II (芝浦電子製作所) を背部皮下温測定用に使用した. イヌ, ウサギ, モルモット, ラットおよびマウスの直腸, 耳内等の各部体温の測定精度, 日内あるいは日差変動幅等について検討した. また, ペントバルビタールあるいはエタノール投与時の各部の体温低下についても検討を行った.

〔結果・考察〕概ね, 直腸温 (38~39℃代)  $\geq$  耳内温, 口腔内温, 背部または腹部表面温 (36~39℃代)  $>$  耳介, 尾根部表面温  $\geq$  足底温 (26~33℃代) の順に体温は高く, 測定精度に関しては, 直腸温  $\geq$  腹部あるいは背部表面温  $\geq$  耳内温 (変動係数 1%以下) の順であった. 耳内温, 口腔内温, 腹部または背部表面温と直腸温の相関性は高く, ペントバルビタールあるいはエタノール投与による体温低下時には直腸温に先行して耳内温が変動することも確認された. 実測値あるいは精度の点でやや劣る場合がみられるものの, 迅速性に優れる赤外線式鼓膜温度計による体温測定は, 毒性試験における体温変化検知の有用な一手段となりうるものと考えられた.

## Body temperature of laboratory animals using an infrared tympanic thermometer

Hajime TABATA, Rika HIROTA, Hiroshi KURIHARA, Michie KUBO, Satoru SASAKI and Kazuo KITAMURA. Medicinal Safety Laboratories, Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo 174-8511, Japan.

ラットにおける無麻酔下での頸静脈採血による採血量の検討

○星 ゆかり, 山中義弘, 飯島 剛, 阿部美佳, 城之内公子, 小林 充,  
金子英志, 秦 純子, 小池行也, 宇野 洋

帝人(株) 医薬開発研究所 安全性研究部

〔目的〕毒性試験でTKを実施する際、1匹から採取できる血液量は動物数や群構成を決める上で重要な因子となる。今回、6、10、19週齢のラットを用いて、無麻酔下での頸静脈採血法による採血量と血液学パラメータに与える影響の関連について検討した。

〔実験1〕SD系雄性ラット各群6匹を用い、6週齢では6、8、11、15、22ml/kg・BW、10、19週齢では4、6、8、11、15ml/kgを採血し、24時間後に血液学パラメータの変動を検討した。その結果、各週齢とも採血量に応じたRBC、HbおよびHtの減少が認められ、6、10週齢では11ml/kg以上で、19週齢では8ml/kg以上で網状赤血球数(Ret)の増加が認められた。

〔実験2〕6、10週齢の動物を用い、実験1でRetが増加しなかった採血量8ml/kgと明らかに増加した15ml/kgについて採血後0、6時間、1、2、3、4、7日目における血液学パラメータおよび体重の変化を検討した。その結果、6週齢の8ml/kg群ではRetは極めて軽度な増加傾向を示したが、体重に変化は認められなかった。15ml/kg群ではRetは4日目をピークに中等度に増加し、体重増加抑制が認められた。10週齢の8ml/kg群ではRetは4日目をピークに軽度に増加し、わずかな体重増加抑制が認められた。15ml/kg群ではRetは4日目をピークに高度に増加し7日目においても高値を示し、明らかな体重増加抑制が認められた。10週齢の15ml/kg群のエリスロエフィ量を検討した結果、採血後6時間で急激な増加が認められ、1日目をピークに減少し7日目には回復した。

〔まとめ〕急激な失血に対する反応であるRet増加および体重変動を指標とした場合、6週齢では8ml/kg・BWが影響を及ぼさない最大量と考えられた。10、19週齢ではこれら指標に変動が認められ、週齢により採血量を考慮する必要があると考えられた。

Examination on Blood Sampling Volume from Jugular Vein under Non-Anesthetic Condition in Rats

Yukari HOSHI, Yoshihiro YAMANAKA, Takeshi IJIMA, Mika ABE,  
Kimiko JONOUCHI, Mitsuru KOBAYASHI, Hideshi KANEKO, Junko HATA,  
Yukiya KOIKE and Hiroshi UNO. Safety Research Department, Pharmaceuticals  
Development Research Laboratories, TEIJIN

ラットにおける血液、生化学パラメータおよび薬物血中濃度  
に対する採血の影響

○武藤信一\*、田中智\*、犬飼伸一\*、今村卓広\*、相馬晋司\*、  
筒井将\*、百瀬泰紀\*、柴田信男\*、松本清司\*\*

\* キッセイ薬品工業(株)第二研究所

\*\* 信州大学医学部附属動物実験施設

[目的] 小動物からの頻回採血はその影響を少なくすることが望ましく、例えばラットのトキシコキネティクス試験では薬物の血中濃度に影響を及ぼさない採血量および回数を知ることが評価上重要である。そこで、採血量の違いによる血液および生化学パラメータの変動を検討し、併せて薬物の血中濃度への影響も検討した。

[方法] 6および10週齢のSDラットより1日4回(4時間以内)の総量が1, 2, 4mlとなるように保定器で頸静脈より採血した。採血毎に血液検査(RBC, HB, HT, MCV, MCH, MCHC, Reti.)および生化学検査(TP, ALB, NEFA, CHO, TG, GLU, AST, ALT, UN)を行うとともに、採血2週間後のこれら項目の回復性を調べた。また、薬物動態に関する報告が多い*dl*-propranolol hydrochlorideを投与(1mg/kg, i.v.)し、その薬物の血中濃度を測定した。

[結果および考察] 血液検査では両週齢とも採血量に応じたRBC, HB, HTの減少およびReti.の増加が認められ、変化の程度は6週齢のほうが10週齢より大きかった。6週齢では4ml群でMCVの増加がみられた。生化学検査ではNEFA, AST, ALTの上昇とTP, ALB, CHO, TGの低下が採血量および週齢に関連なくみられ、これらの変化は採血手技によるストレスや針の穿刺による障害性等が原因と考えられた。なお、体重推移には両週齢とも採血量の影響が認められなかった。また、薬物血中濃度には採血量による明らかな影響は認められなかった。

以上、今回の条件では血液検査に採血量の影響がみられたが、生化学検査および薬物の血中濃度には認められなかった。しかし、薬物によってはその血中濃度に採血量が影響することも考えられるため、今後は種々の薬物で検討を加える予定である。

Effect of blood sampling for hematological and biochemical parameters in toxicokinetics study of rat

Shin-ichi MUTO\*, Satoru TANAKA\*, Shinichi INUKAI\*, Takahiro IMAMURA\*, Shinji SOMA\*, Masaru TSUTSUI\*, Yasunori MOMOSE\*, Nobuo SHIBATA\*, and Kiyoshi MATSUMOTO\*\*. \*Toxicology Laboratories, Kissei Pharmaceutical Co., Ltd. \*\*Inst. of Exp. Anim., Shinshu Univ. Sch. of Med.



### Vascular Access Ports for Repeat-Daily Intravenous Dosing in Rats

J. Harms, C. Crewell, G. DiSalvo, K. Johnson, P. Losco, N. Fetrow,  
D.K. Johnson, and L.B. Kinter

Department of Biological Sciences, Nycomed Inc., Wayne, PA.

Tail venipuncture (TV) is the most common method for intravenous administration of test articles in rats; however, for some applications this method may be difficult or impossible. As an alternative, we compared use of surgically implanted vascular access ports (VAP, Ratoport, Access Technologies) vs. TV in 30 male Sprague-Dawley rats (~370g). After randomization into Control, TV and VAP groups (10/group), VAPs were implanted using full sterile surgical techniques; ports were placed on the r. dorsal thoracic flank and the catheters tunneled to ventral neck, introduced into the r. jugular and advanced ~3.5 cm towards the heart. All incisions were closed with suture. Because sterile surgical procedures were used, no antibiotics were given. Following a recovery period (10 days) in which VAP rats were monitored closely for evidence of post-surgical infection, the TV and VAP rats received sterile saline (3 mL/kg; 25 g needles) once daily; the Control rats were not treated. Injection site skin (TV and VAP groups) was scrubbed and disinfected daily prior to dosing. VAP contents were removed prior to dosing. Following dosing, a 0.5 mL flush of saline was given and the VAPs/catheters were filled with 50% glucose containing 100 IU/mL heparin. After 13 daily TV or VAP injections, all rats were humanely killed and necropsies performed. Blood was analyzed for clinical chemistry and hematology parameters, and heart, kidney, liver, lung and spleen were evaluated microscopically. All rats gained weight and there were no treatment-related differences in clinical chemistry and hematology parameters.

Group	Final Weight	Focal Myocarditis	Endocardial Thickening	Hair Granulomas
Control	400 grams	1/10	0/10	0/10
TV	390 grams	2/10	0/10	1/10
VAP	450 grams	0/10	3/10	3/10

In the TV group, there was increased incidences of minimal focal myocarditis. In the VAP group, catheter tips were located in the vena cava (6/10) or r. atrium (4/10) and there was endocardial thickening in the latter animals probably associated with placement of the catheter tips in the heart. In both TV and VAP groups, there were hair granulomas and small inflammatory foci in the lungs, probably related to epidermal 'coring' associated with skin penetration with either technique. We conclude that VAPs are an acceptable alternative for up to 2-week repeat daily intravenous dosing in rats; if implanted into a sterile environment, VAPs are associated with no more iatrogenic histopathological findings than TV. However, precise placement of the catheter tip in the vena cava, but not in the heart is crucial to prevent iatrogenic cardiac lesions which could contribute to pathology and morbidity in longer-term studies.

### A Maximal Rapid Intravenous Injection Volume in Dogs (*Canis familiaris*)

L.B. Kinter, H. Donkin and D.K. Johnson

Department of Biological Sciences, Nycomed Inc., Wayne, PA.

Previous studies in conscious dogs have shown that the maximum intravenous infusion (over 60 minutes) volumes of solutions consisting of non-metabolizable osmolytes (e.g., saline) or metabolizable osmolytes (e.g. dextrose) are 60 and 18 mL/kg, respectively, and that the most sensitive marker of toxicity was cardiac rate (Mann and Kinter, *Gen. Pharmacol.* 24:357-366, 1993). In this study, we extended those findings, to define a maximum (or limit) volume for rapid intravenous injections. Three beagle dogs (1M/2F) were prepared with cardiovascular telemetry transmitters with catheters placed in the abdominal aorta. After at least 14 days recovery from surgery, all dogs were given intravenous dose volumes 6, 20, and 60 mL/kg (equivalent to ~9, 30, and 86% estimated blood volume) of 0.9% saline, or sham treatment on 4 separate days each separated by at least 48 hours. On each study day, dogs were prepared with separate dosing and blood sampling catheters (AngioCath, 20g and Surflo, 18g, cephalic or radial veins). Following collection of at least 30 minutes of baseline cardiovascular data (blood pressure, cardiac rate), saline was administered (~1.0 mL/sec) and CV parameters collected for 60 minutes. Blood samples were collected prior to dosing (baseline), and at 3, 10, and 60 minutes following dosing for evaluation of hematological parameters. Data are presented as peak change from baseline ( $\Delta_{max}\%$ , generally at 3 minutes post dosing), and time (min) to return to ~50% of the peak increase above baseline values ( $T_{1/2}$ ).

Volume (mL/kg)	Hematocrit (max% )	Heart Rate (max%)	Heart Rate ( $T_{1/2}$ )
0 (sham)	+5%	26%	NA
6	-15%	24%	2 min
20	-15%	46%	1 min
60	-27%	48%	13 min

Sham injection and injection of 6 mL/kg saline were not associated with detectable changes in Hct, HR, or arterial pressure. Rapid intravenous injection of 20 mL/kg saline is associated with substantial hemodilution and transient tachycardia. Rapid injection of 60 mL/kg saline was associated with substantial and prolonged decreases in Hematocrit (Hct) and increases in HR. All of the changes in arterial pressure were within the ranges associated with gentle handling of conscious dogs (Sham); no clinical signs or unexpected overt clinical signs were associated with any treatment. Because of the rapid efflux of intravenously injected saline into the extracellular fluid, the changes observed in this study are likely minimal estimates of the changes that would likely occur following administration of more complex osmolytes which redistribute more slowly from the cardiovascular compartment. We propose that 20 mL/kg is an acceptable maximal rapid infusion volume not to be exceeded if acute and chronic effects associated with excessive and prolonged vascular volume expansion are to be avoided.

## 末梢静脈用輸液の血管障害性に及ぼす浸透圧の影響

○桑原孝、朝波省吾、田村工

株式会社大塚製薬工場 鳴門研究所 安全性研究部

【目的】末梢静脈用輸液において最も問題となる副作用は静脈炎であり、静脈炎を引き起こす要因として輸液の高張性が知られている。今回、浸透圧が血管障害性に及ぼす影響についてウサギ耳介静脈を用いて病理組織学的に検討した。

【方法】3%アミノ酸・7.5%グルコース・電解質輸液(AGE, 851mOsm/kg)と、AGEを1.5倍希釈した検体(1.5-D, 561mOsm/kg)をウサギ耳介静脈内に10mL/kg/hrの速度で18時間持続投与した。投与終了の24時間後に投与静脈を採取、病理組織学的に検査した。さらに、1.5-Dについては1.5倍速度の15 mL/kg/hrの速度で18時間投与することにより、溶質量としてAGEと同量投与した場合についても検討した。

【結果】AGE投与群では、静脈内皮細胞の消失、炎症性細胞の滲出、静脈周囲組織の水腫が6例中5例に認められた。1.5-D投与群では6例中1例のみに軽度の変化がみられたが、残りの5例には異常は認められなかった。さらに、1.5-Dを1.5倍速度で投与した場合もほとんど障害性は認められなかった。

【考察】AGEは含有する栄養基質の量から浸透圧が851mOsm/kgと高くなっている。10mL/kg/hrの速度で18時間持続投与した結果、投与静脈に対し障害性を示した。この障害性は、1.5倍希釈(561mOsm/kg)することによってほとんど消失し、高張性が原因と考えられた。また、希釈した分投与速度を速くして、同じ投与時間で栄養基質としてAGEと同量を投与した場合も障害性はほとんどみられなかった。したがって、容量が増えても浸透圧を減らすことが静脈炎を防ぐには効果的であると考えられた。

Effect of Osmolality on Phlebitic Potential of Infusion Solutions for Peripheral Parenteral Nutrition.

Takashi KUWAHARA, Shougo ASANAMI and Takumi TAMURA.  
Naruto Research Institute, Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.,  
Tokushima 772-8601, Japan.

## 海綿由来ペプチド-Discodermin A-の細胞膜透過性亢進作用

○尾崎 博、佐藤晃一、堀部紀久子、斎藤みのり、堀 正敏、松永茂樹、  
伏谷伸宏、唐木英明

東京大学大学院・農学生命科学

【目的】海綿由来の discodermin A (DC-A) は、14 個のアミノ酸からなる強力な抗菌性作用を持ったペプチドである。DC-A は、そのアミノ構造から疎水性が高く細胞膜に対して作用を持つことが予想された。今回我々は、DC-A の細胞膜透過性亢進作用について、主に平滑筋細胞を用いて検討したので報告する。【結果】ウサギ腸間膜動脈に DC-A (1-30  $\mu\text{M}$ ) を適用すると、収縮は濃度依存性に一過性に増加した後、静止レベルまで減少した。細胞内 Ca 蛍光指示薬である fura-PE3 を負荷したラット大動脈標本に、低濃度 DC-A (1-3  $\mu\text{M}$ ) を投与すると、細胞内 Ca 濃度と収縮張力はともに増加した。高濃度 DC-A (10-30  $\mu\text{M}$ ) の適用により収縮はさらに増加したが、fura-PE3 の細胞外への漏出が認められた。ウサギ腸間膜動脈において、ATP (5.9 mM) および Ca (10  $\mu\text{M}$ ) 存在下で DC-A (30  $\mu\text{M}$ ) を適用すると緩やかな持続性収縮が観察された。その後、DC-A 非存在下で ATP および Ca を適用しても持続性の収縮張力が観察された。平滑筋由来 A10 細胞において、DC-A (1-30  $\mu\text{M}$ ) 処置により細胞膜非透過性蛍光物質である calcein および ethidiumhomodimer-1 の膜透過性が、濃度および時間依存性に増加した。さらに、高濃度 DC-A (10  $\mu\text{M}$ ) 処置により細胞内エステラーゼの漏出も認められた。また、ウサギ門脈標本に DC-A (1-30  $\mu\text{M}$ ) を投与すると、乳酸脱水素酵素の細胞外への漏出が濃度および時間依存性に増加した。【考察】以上の結果より、DC-A は濃度および作用時間に依存して種々の大きさのポアを細胞膜に形成することが示唆された。DC-A は連続した 6 つの疎水性アミノ酸残基を持つことから、細胞膜に対して直接作用するペプチド性生理活性物質であることが示唆された。

Effect of discodermin A, an antimicrobial peptide, on the cytoplasm membrane.

Hiroshi OZAKI, Koichi SATO, Kikuko HORIBE, Minori SAITO-MITSUI, Masatoshi HORI, Shigeki MATSUNAGA, Nobuhiro FUSETANI and Hideaki KARAKI. Department of Veterinary Pharmacology, Radio Isotope Center, Department of Aquatic Bioscience, Graduate School of Agriculture and Life Sciences, The University of Tokyo, Bunkyo-Ku, Tokyo 113-8657, Japan.

## ラットにおけるL-システインの静脈内投与毒性

- 原田美輪, 梅岡健一, 金田信也, 岸本恒次, 姜 定克  
山下邦弘, 岸本早苗, 澤本 修, 長根芳文

株式会社大塚製薬工場 鳴門研究所

[目的] 生体内アミノ酸であるシステインは食品添加物や医薬品に広く用いられているが、その毒性についての報告は少なく、幼若ラットでの脳病変、網膜病変の報告が散見されるのみである。そこで今回、我々はラットに4週間システインを静脈内投与し、その毒性を検討したので報告する。

[材料・方法] 6週齢の雄性SD(Crj;CD)系ラットを用い、尾静脈よりL-システインの100, 300, 1000mg/kg(0.5, 1.5, 5%溶液)を4週間静脈内投与した。対照群は生理食塩液の20mL/kgを静脈内投与した。動物数は各群10匹とした。投与期間中、週に2回体重と摂餌量を測定し、投与終了時に尿検査、血液検査、病理学的検査を行なった。

[結果] 一般状態では自発運動減少、流涎、腹臥位等が、体重及び摂餌量では増加抑制、一過性の減少が高用量群でみられた。また、尿潜血及び蛋白陽性、Hb、Ht、MCV及びMCH低下、網状赤血球数、T-Bil.、K、Ca増加を高用量群で認めた。病理学的検査では、腎臓に赤血球円柱を伴った尿細管上皮の好塩基化が中用量群よりみられ、小脳に分子層、プルキンエ細胞層及び顆粒層の神経細胞壊死・脱落、精巣上体に精子肉芽腫が高用量群にみられた。

[結論] システインの静脈内投与では、従来報告されている脳病変に加え、貧血、腎臓障害、精巣上体の精子肉芽腫が新たな毒性所見として確認された。

Toxicity Study in Male Rats Infused Intravenously L-Cysteine.

Miwa HARADA, Ken-ichi UMEOKA, Shinya KANEDA, Kohji KISHIMOTO, Sadakatsu KYO, Kunihiro YAMASHITA, Sanae KISHIMOTO, Osamu SAWAMOTO, Yoshifumi CHONE, Naruto Research Institute, Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc., Tokushima.

**17 years experience with  
allergenicity/photoallergenicity tests in albino guinea pigs  
A critical review**

G. Arcelin, L. Ullmann, Th. Pfister, J. Klecak, T.R. Allen  
RCC, Research & Consulting Company Ltd., CH 4452 Itingen, Switzerland

The pre-clinical safety evaluation of new drugs or chemicals frequently requires the determination of their potential to cause delayed contact hypersensitivity. For many years, several guinea pig tests have been used successfully to identify chemicals possessing the potential to cause delayed contact hypersensitivity.

The latest international guidelines such as FDA/EPA, OECD, EU, MITI, MAFF and MHW, however, only require the Maximisation-Test (Adjuvant test type) or the Bühler-Test (Non-Adjuvant test type).

With the Maximisation test one can assess the allergenic potential of the test chemical while the Bühler test provides an allergenic risk potential for humans.

(Bühler-Test)

Some authorities request the photoallergenicity test for those compounds showing an absorption spectrum in the UVA/UVB range or which are photodegradable.

Several test procedures have been described. Consequently, discrepancies exist in the conduct of the tests between different test laboratories and the sensitivity of these assays can vary widely between laboratories. This poster provides a short description of the three above-mentioned guinea pig test methods performed at RCC and includes relevant results over a period of 17 years.

## PFC 測定に代わり得る Anti-SRBC IgM の ELISA

○安達 智子<sup>1)</sup>、金澤 由基子<sup>2)</sup>、古谷 真美<sup>1)</sup>、  
田子 和美<sup>2)</sup>、小島 幸一<sup>1)</sup>、<sup>2)</sup>

(財) 食品薬品安全センター 秦野研究所

<sup>1)</sup> 生化学研究室、<sup>2)</sup> 免疫毒性学研究室

免疫機能の試験方法である溶血斑形成細胞 (PFC) 測定に代わる方法として、ヒツジ赤血球 (SRBC) に特異的なラット IgM (anti-SRBC IgM) 濃度を直接定量する ELISA が有用であることを報告してきた。本年はこの ELISA での測定値の信頼性を確認するために、試験内変動や試験間変動について検討した。また、ラットの凍結血漿中での anti-SRBC IgM の安定性、凍結融解が測定値に与える影響等についても調べた。

〔方法〕 3年間にわたって行った各種の試験について、SRBC 投与 4 日後の anti-SRBC IgM 濃度と PFC 測定について、試験内、試験間の変動幅を比較した。また、低反応性の SRBC モデルとして通常の 1/2 濃度の SRBC を投与した時の両測定への影響を比較した。SRBC を投与後のラット血漿を -135℃ および -30℃ で保存、あるいは凍結融解を繰り返し、測定値に影響を与えない期間あるいは回数を調べた。

〔結果および考察〕 実施したすべての試験内で、ELISA は PFC 測定に比べて変動幅は小さく、投与の影響を安定して検出するためには有利であると考えられた。また、その変動幅は通常の 1/2 濃度の SRBC を用いた場合においても、ELISA の方が小さく抑えられた。一方、試験間での anti-SRBC IgM 濃度と PFC 数の平均値はほぼ一定であった。ラット凍結血漿中の anti-SRBC IgM は少なくとも 1 年間、少ない回数の凍結融解には安定であった。従って、anti-SRBC IgM 濃度を直接定量する ELISA は PFC に比べて施設間での測定値の比較を行うことにも十分適応できるものと考えられた。

The ELISA of SRBC-Specific Antibody ( IgM ) Concentration as an Alternative Method for the PFC Assay

Tomoko ADACHI, Yukiko KANAZAWA, Mami FURUYA, Kazumi TAGO and Kohichi KOJIMA.

Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center, Hadano, Kanagawa 257-8523, Japan.

## 2-メルカプトベンズイミダゾール誘導体のモルモットにおける皮膚感作性と化学構造との関係について

○伊佐間和郎<sup>1)</sup>、門馬純子<sup>2)</sup>、鹿庭正昭<sup>1)</sup>、中村晃忠<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>国立医薬品食品衛生研究所

<sup>2)</sup>医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構

【目的】2-メルカプトベンズイミダゾール(MBI)のメチル誘導体及び5-置換誘導体の皮膚感作性試験を実施し、皮膚感作性と化学構造との関係について検討した。

【被験物質】メチル誘導体群：MBI、2-メルカプト-1-メチルベンズイミダゾール(1MMBI)、2-(メチルメルカプト)ベンズイミダゾール(2MMBI)、2-メルカプト-4-メチルベンズイミダゾール(4MMBI)、2-メルカプト-5-メチルベンズイミダゾール(5MMBI)、1-メチル-2-(メチルメルカプト)ベンズイミダゾール(12DMBI)、2-メルカプト-1,3-ジメチルベンズイミダゾール(13DMBI)、2-メルカプト-5,6-ジメチルベンズイミダゾール(13DMBI)。

5-置換誘導体群：MBI、5MMBI、2-メルカプト-5-ニトロベンズイミダゾール(5NMBI)、5-クロロ-2-メルカプトベンズイミダゾール(5CIMBI)、2-メルカプト-5-メキシベンズイミダゾール(5MOMBI)。

【感作性試験】モルモット・マキシミゼーション法に従って、1次感作にはフロイント完全アジュバント(FCA)乳化液、被験物質の5%オリーブ油溶液、被験物質の5%FCA乳化液を各々100μlずつ皮内注射し、2次感作には被験物質の5%ワセリン混和物50mgを48時間閉塞パッチした。惹起には被験物質の1%アセトン溶液100μlを塗布した。惹起48時間後の皮膚反応から各被験物質の平均評価点を求めた。

【結果】メチル誘導体群では、2MMBI、12DMBI、13DMBIには皮膚感作性が認められず、その他の誘導体には皮膚感作性が認められた。メチル誘導体群の感作性強度は、56DMBI > 1MMBI > 4MMBI > 5MMBI > MBIとなった。また、5-置換誘導体群では、すべての誘導体に皮膚感作性が認められ、それらの感作性強度は、5MOMBI > 5CIMBI > 5NMBI > 5MMBI > MBIとなった。

Structure-activity relationships for skin sensitization potential of 2-mercapto-benzimidazole derivatives in guinea pigs.

Kazuo Isama<sup>1)</sup>, Junko MOMMA<sup>2)</sup>, Masa-aki KANIWA<sup>1)</sup> and Akitada NAKAMURA<sup>1)</sup>. <sup>1)</sup>National Institute of Health Sciences, Tokyo 158-8501, Japan.

<sup>2)</sup>The Organization for Drug ADR Relief, R&D Promotion and Product Review, Tokyo 100-0013, Japan.



高ビリルビン尿症ラットの recombinant human IL-1 $\beta$   
(rhIL-1 $\beta$ )によるストレス応答タンパク質やケモカイン遺伝子発現抑制

○小黒多希子、大野真義、Elda H.S. Hausmann\*、吉田武美

昭和大学 毒物学教室、\*カンサス大学

[目的]我々はrhIL-1 $\beta$ によるストレス応答タンパク質やケモカインの遺伝子発現が臓器により異なることをラットで明らかにしている。本研究では、抗酸化作用を有するビリルビンがrhIL-1 $\beta$ の作用を防御できるか、Eisai Hyperbilirubinuria Rat (EHBR/Eis)を用いて検討した。[方法]EHBR(+:ビリルビン尿症陽性、 -:ビリルビン尿症陰性)にrhIL-1 $\beta$  (12.5および50 $\mu$ g/kg)を背面皮下投与し、3時間後に肝臓、腎臓、肺を得た。AGPC法によりtotal RNAを得、Northern blotによりヘムオキシゲナーゼ(HO)-1、メタロチオネイン(MT)、単球化学誘引タンパク(MCP)-1のmRNAの変化を検討した。ヒトIL-1 $\beta$ およびラットIL-8の血清中濃度はELISA法により定量した。[結果と考察]rhIL-1 $\beta$  (50 $\mu$ g/kg)投与3時間後の血清中rhIL-1 $\beta$ 濃度はEHBR(-)で約4.5ng/mlであったが、EHBR(+ )ではその約80%の濃度であった。IL-1刺激により産生されるIL-8の血清中濃度は、EHBR(-)ではいずれの投与量においても約450ng/mlであった。さらに、EHBR(+ )のIL-8濃度はEHBR(-)の約85%であった。rhIL-1 $\beta$ 投与により肺と腎臓でMCP-1mRNA増加が認められたが、EHBR(+ )はEHBR(-)より増加の程度が弱い傾向が認められた。rhIL-1 $\beta$ によりいずれの臓器においても認められるMTmRNA発現増加は、EHBR(+ )はEHBR(-)の約70~50%に減少した。以上の事から、EHBR(+ )はrhIL-1 $\beta$ によるストレス応答にある程度抵抗性を示すことが明らかになった。

Suppressed Response of Eisai Hyperbilirubinuria rats to Recombinant Human IL-1 $\beta$  in the Expression of Stress Response Protein and Chemokine Genes.

Takiko OGURO, Masayoshi OHNO, Elda H.S. Hausmann\* and Takemi YOSHIDA. Showa Univ. Tokyo-1420064, Japan, \*Univ. Kansas Med. Ctr., USA

## 大動物の一般毒性試験データ(少数例計量値データ)の毒性評価 に関するアンケート調査について

○半田 淳<sup>1)</sup>、木幡信彦、堀江成光、佐藤和紀、内田英男、渡辺一人  
和知正幸、二宮一広、坪内春樹、金田信也、貞永 納、山北 修

日本製薬工業協会 基礎研究部会第一分科会統計ワーキンググループ  
(日本化薬 創業本部<sup>1)</sup>、他)

イヌなどの大動物をもちいた反復投与試験などで同一個体から繰り返し得られる測定データ(少数例計量値データ)の統計解析法を確立するためには、採用する解析フローの統計学的妥当性と共に生物学的な有意性と整合性を考える必要がある。今回、製薬協基礎研究部会加盟各社の協力を得て各施設で使用されている統計解析法とデータの取り扱い及び毒性変化の評価ポイントについてアンケートによる調査を実施したので報告する。なお、アンケート回収施設は61社で、うち2社は社内未実施のため無回答であった。

統計解析方法は小動物の場合と同様が多く(74%)、投与前と各測定時点間で対応のあるt検定(17%)も用いられていたが、統計解析を実施していない施設(19%)もあった。統計解析は、毒性評価上必要(56%)と、必ずしも必要ない(42%)がほぼ半数であった。統計学的有意差を一応の参考(57%)又は重視(43%)しているが、統計学的有意差があっても毒性変化としなかった経験を頻繁又はたまに(96%)持っており、一方統計学的有意差がなくても毒性変化と判断したことも頻繁又はたまに(75%)あった。群集計データのみで評価している施設はなく、全個別データ(58%)あるいは異常が疑われた項目で問題があった動物については他の項目すべて(30%)を詳細に調べているが、グラフ化などの視覚的な評価はあまり普及していなかった(26%)。外れ値は研究者が個別表から判断(88%)し、検体以外に原因があったときのみ除く(64%)か、関連項目に変動がないとき偶発として考察に記載(63%)されていた。投与前値は対照群と差があったときに否定するために利用(72%)され、対照群と各投与群で個別別の時系列変化パターンの比較(56%)も行われていた。毒性評価では、病理組織学的検査での器質的変化>項目間での関連性>背景データからの逸脱度=統計学的な差、の順で重視されていた。提案した標準的な毒性評価フローについては概ね妥当との評価を受けた。

Results of the survey about toxicological assessments of quantitative data from the repeated dose toxicity studies in non-rodents.

Jun HANDA<sup>1)</sup> Nobuhiko KOWATA, Shigeaki HORIE, Kazunori SATO, Hideo UCHIDA, Kazuto WATANABE, Masayuki WACHI, Kazuhiro NINOMIYA, Haruki Tsubouti, Shinya KANEDA, Osamu SADANAGA, Osamu YAMAKITA, Statistics Working Group, Japan Pharmaceutical Manufacturers Association, Tokyo, Japan (Belonging to Nippon Kayaku Co., Ltd.<sup>1)</sup> and other companies)

イヌを用いた一般毒性試験における背景データ利用法の検討  
—血液生化学的検査データについて—

○北島省吾, 小林克己, 大石法男, 井上博之

(財)食品農医薬品安全性評価センター

一般毒性試験において得られた血液生化学的検査データを評価する時, 統計学的に対照群と投薬群との間の相違を検討すると同時に, 背景データを考慮してその意義を判断することが多い。しかし, 背景データを利用する場合には, その背景データがどの程度の利用価値を持ち, また, どのように利用できるのかを十分に検討しておく必要がある。そこで本報では当施設で集積されたイヌの血液生化学的検査値の背景データを分析するとともに, その適切な利用法を検討した。

【方法】当施設で同一条件下で実施した4週間反復経口投与試験7試験, 13週間反復経口投与試験8試験, 52週間反復経口投与試験5試験の各試験3ないし6例の対照群のビーグル犬(投与開始時6ヵ月齢, HRP, 雄92例, 雌97例)から得られた総蛋白, アルブミン, A/G, 血糖, 総コレステロール, 遊離脂肪酸, 中性脂肪, リン脂質, 尿素窒素, クレアチニン, 総ビリルビン, GOT, GPT, ALP, CPK, LDH,  $\gamma$ -GTP, ナトリウム, カリウム, 塩素, カルシウム, 無機リンの測定値について, 各検査項目の時系列変化および試験間の差の有無を二元配置分散分析法により解析した。

【結果および考察】検査月齢および性別により各々の検査項目は, 時系列変化および試験間の両方に差の認められた項目, すなわち, その試験の対照群との比較で変化の有無を判断すべき項目, 時系列変化のみに差が認められた項目, すなわち, 同一月齢の背景データの使用が可能な項目, 試験間のみに差が認められた項目, すなわち, 投与前値との比較が可能な項目, 両方ともに差の認められなかった項目, すなわち, 正常動物のすべての背景データの使用が可能な項目に分類された。今回の検討は, 所有する検査データを吟味する一助となるものと考えられた。

Studies on the application of the historical control data obtained from the blood chemistry values of toxicity studies with dogs.

Shogo KITAJIMA, Katumi KOBAYASHI, Norio OISHI and Hiroyuki INOUE.

Biosafety Research Center, Foods, Drugs and Pesticides(An-Pyo Center)

582-2 Arahama, Shiohinden, Fukude-cho, Iwata-gun, Shizuoka, Japan

## 著者索引

## 著者索引 (日本名)

### <ア>

- |        |                        |        |                  |
|--------|------------------------|--------|------------------|
| 相磯 成敏  | P5-2                   | 池永 哲二  | O9-1             |
| 相本 浩司  | P8-4                   | 池本 文彦  | O6-1, P6-5       |
| 青木 豊彦  | O4-1, O5-1, P5-1       | 井坂 雅徳  | O12-5            |
| 青山 博昭  | O1-2                   | 伊佐間 和郎 | P12-3            |
| 赤木 圭介  | O11-2                  | 石井 百合子 | O9-1, P8-4       |
| 赤羽 悟美  | O6-2                   | 石井 孝広  | O8-1             |
| 秋田 正治  | P1-14                  | 石井 浩之  | P1-18            |
| 秋葉 知英  | P11-3                  | 石井 俊也  | O11-2            |
| 阿久根 淳  | O6-3                   | 石井 昭男  | O6-5, O9-1, P8-4 |
| 明楽 泰   | O6-4                   | 石山 芳則  | P6-6             |
| 朝枝 伸幸  | P8-3                   | 泉 英明   | P11-3            |
| 朝鍋 うるみ | P1-5                   | 和泉 博之  | O11-5            |
| 朝波 省吾  | P3-2, O12-2,<br>P11-10 | 和泉 祐子  | P1-4             |
| 浅野 茂隆  | O9-6                   | 磯部 充威  | O5-4             |
| 朝元 誠人  | O5-2                   | 板垣 宏   | O13-6            |
| 阿瀬 善也  | P11-3                  | 一鬼 勉   | O7-2             |
| 安達 智子  | P12-2                  | 伊東 悟   | O3-1             |
| 阿部 美佳  | P11-6                  | 伊藤 理恵乃 | P2-2             |
| 荒川 和人  | O2-4                   | 伊藤 香江  | P5-4             |
| 有行 史男  | P1-18                  | 伊藤 清美  | L-1              |
| 有吉 範高  | O10-1                  | 伊藤 聖一  | O5-3             |
| 粟田 則男  | P1-2                   | 稲垣 覚   | P1-5             |
| 安東 輝   | O5-2                   | 稲元 弘昭  | P9-5             |
| 安藤 正一  | O13-5                  | 乾 公正   | P8-1             |

### <イ>

- |        |            |        |              |
|--------|------------|--------|--------------|
| 飯島 剛   | P11-6      | 井上 惠児  | O8-2         |
| 飯田 祝子  | O5-4       | 井上 智彰  | O7-4, O12-4  |
| 飯塚 宏美  | P1-6, P6-4 | 井上 博之  | P13-2        |
| 飯塚 和弘  | O5-4       | 井上 芳己  | P5-6         |
| 五十嵐 俊二 | O13-4      | 井上 立生  | P1-17        |
| 五十嵐 功  | O4-2, O4-4 | 猪又 晃   | O7-4, P8-2   |
| 井川 猛   | O2-1       | 井原 智美  | P5-5         |
| 池川 直   | P1-17      | 今井 清   | O10-3, O11-1 |
| 池田 浩明  | P9-5       | 今田中 伸哉 | P5-3         |
| 池田 高志  | O13-4      | 今溝 裕   | O13-4        |
|        |            | 今村 卓広  | P11-7        |

入村 兼司	05-1, P5-1	大塚 雅則	P5-3
岩井 久和	P8-3	大野 真義	P12-4
岩城 理進	012-3	大野 泰雄	07-3, 013-6, P2-2
岩瀬 隆之	P1-18	大橋 芳彦	P2-1
岩田 宏	03-5	大道 克裕	013-4
岩田 光夫	P8-1	大森 崇	013-6
		岡崎 啓幸	P9-5
<ウ>		岡崎 欣正	010-6
上野 芳夫	08-4, P5-5	岡崎 修三	08-1, P9-1
宇佐見 誠	07-3, P2-2	岡崎 和志	P9-1, 08-1
臼居 敏仁	05-1, 05-4, P5-1	岡田 忠彦	P2-1
内田 英男	013-5, P13-1	岡庭 梓	011-2
内田 美紀	P1-5	小川 慎一	P1-16, P11-3, P11-4
海上 智	P6-4	小川 哲郎	P10-1, P10-2
宇野 洋	P11-6	奥田 晴宏	M1-5, 02-4
梅岡 健一	P11-12	奥野 泰由	P1-10
梅村 隆志	09-5	奥村 弘樹	P5-5
浦野 浩司	M2-4	奥山 学	P8-3
		小倉 健一郎	M1-5, 02-4
<エ>		小倉 基裕	P11-3
覆並 倫宣	08-1, P9-1	小黒 多希子	P12-4
江原 初音	P5-3	尾崎 潤一郎	06-6
江馬 眞	P1-8, P1-9	尾崎 博	P11-11
遠藤 仁	08-3, 08-4	尾崎 正和	05-3
及川 寿浩	P11-4	小田 美光	P-3-3
玉鞍 孝子	08-2	小原 要	M1-0
		小山田 敏文	06-4
<オ>			
大石 法男	P13-2	<カ>	
大石 裕司	P6-7	柿沼 千早	01-3
大内田 昭信	09-4	加国 雅和	P8-4
大久保 惇	07-2	笠井 英史	013-1, 013-2
大窪 康貴	P1-17	加島 政利	P9-5
大越 健自	013-6	春日 芳朋	P9-3
大澤 護	P5-2	片山 誠一	P1-7
大島 洋次郎	01-4	加藤 譲	09-1, P9-2
大島 徹	P5-4	加藤 佳子	P1-3
太田 隆雄	P1-3	加藤 浩嗣	P6-2
大瀧芽久美	P11-4	加藤 真之	P1-3
大谷 勝己	010-5	加藤 仁美	P10-1, P10-2
大津 隆一	P4-3		

加藤 正信 P1-6, P1-7  
 加藤 隆一 M1-0  
 金井 好克 O8-3  
 金澤 由基子 P12-2  
 蟹谷 昌尚 P11-4  
 鹿庭 正昭 P12-3  
 金子 英志 P11-6  
 金子 武稔 P6-1  
 金子 豊蔵 O9-5, O13-6  
 兼崎 秀一 P1-4  
 金田 信也 O13-5, P11-12,  
 P13-1  
 鎌滝 哲也 M2-5, O2-5, O2-6,  
 O3-5, O10-1  
 紙田 祐介 P1-10  
 上村 裕洋 O12-3  
 亀坂 泰正 O10-4  
 唐木 英明 P11-11  
 仮家 公夫 O7-2  
 河井 祥一郎 O8-2  
 川合 是彰 P4-2  
 川越 正孝 O11-4  
 川崎 一 O5-3  
 川島 明 M1-3  
 川島 康永 O6-1  
 川島 邦夫 P1-8, P1-9  
 川添 豊 O3-2  
 河部 真弓 O5-6  
 菅野 純 O9-5, P1-12

<キ>

岸本 恒次 P11-12  
 岸本 早苗 P11-12  
 北嶋 聡 P1-13  
 北島 俊一 O7-2  
 北島 省吾 P13-2  
 北村 和之 P4-2  
 北村 和夫 P11-5  
 鬼頭 剛 O6-3  
 姜 定克 P11-12

<ク>

串田 浩孝 O2-5, O3-5  
 久世 博 R-1, O6-6  
 國西 芳治 O12-3  
 久野 博司 O6-1, P6-5  
 久保 道江 P11-5  
 熊谷 明夫 O13-1, O13-2  
 熊原 道代 O11-2  
 倉田 昌明 P9-3  
 栗下 昭広 O13-6  
 栗原 博司 P11-5  
 黒川 雄二 O9-5, P1-13,  
 P11-2  
 黒田 行昭 P1-14  
 黒田 淳二 P1-16  
 桑原 孝 O12-2, P11-10  
 桑山 典之 O5-4

<ケ>

花見 正幸 P1-5, P6-7

<コ>

小池 行也 P11-6  
 河内 泰英 O9-4  
 古賀 照二 O5-1, P5-1  
 小島 幸一 P12-2  
 小島 肇夫 O13-6  
 五島 英雄 O5-5  
 児玉 幸夫 O9-5  
 小塚 諭 O12-5  
 後藤 紀久 O12-5  
 小林 潔 P5-6  
 小林 充 P11-6  
 小林 賢一 P1-16  
 小林 克己 P13-2  
 小林 麻美 O8-3  
 小林 裕子 O2-2, O2-3  
 小林 和子 P8-2  
 小宮山 靖 O13-1, O13-2  
 木幡 信彦 O13-5, P13-1  
 近藤 洪志 O6-4

<サ>

佐井 君江 P11-2  
西條 清史 O10-2  
西條 長宏 O6-5  
斎藤 みの里 P11-11  
斎藤 守 P6-1  
斎藤 義明 O11-1  
佐伯 憲一 O3-2  
相賀 裕美子 P1-13  
堺 俊治 P1-16, P11-3,  
P11-4  
榊 秀之 O13-4  
佐神 文郎 O4-1  
佐久間 妙子 P1-15  
酒見 和枝 P2-2, O7-3  
佐古 博 P1-10  
佐々木 卓士 O6-4  
佐々木 和彦 P6-5  
佐々木 智 P11-5  
貞永 納 O13-5, P13-1  
佐藤 玄 O4-1  
佐藤 淳 O10-3  
佐藤 茂 P1-16, P11-3,  
P11-4  
佐藤 元信 O5-1, P5-1  
佐藤 晃一 P11-11  
佐藤 重子 P6-1  
佐藤 伸一 P11-1  
佐藤 哲男 M2-1  
佐藤 敦子 O5-4  
佐藤 和紀 O13-5, P13-1  
佐野 真士 O5-5, O5-6  
鮫島 秀暢 O11-3, P9-5  
鮫島 顕二 O1-4  
澤 淳悟 O13-1, O13-2  
澤田 光平 P6-2  
澤田 純一 R-8  
澤本 修 P11-12  
三善 隆広 P11-4  
三分一所 厚司 P1-17

<シ>

志賀 敏彦 P8-2  
宍戸 信之 O12-4, P8-2  
篠田 和俊 P5-3  
柴田 信男 P11-7  
柴田 誠司 O5-4  
柴田 良二 O11-2  
澁谷 靖義 O1-3  
島田 力 O3-6  
島村 久美子 O4-3  
清水 憲次 R-3, P6-6  
下野 和之 P3-2  
城之内 公子 P11-6  
白井 紀充 P1-16  
白井 智之 O5-5, O5-6  
白石 啓二 P5-3  
新海 健吉 O12-1, O12-3

<ス>

菅又 昌雄 P5-5  
菅原 由憲 P1-16  
杉谷 順康 P1-4  
杉原 芳樹 O12-3  
杉本 次郎 O4-3, P5-6  
杉本 哲朗 P9-3  
杉山 <くに子> P6-7  
杉山 肇 O9-6  
杉山 雄一 L-1  
鈴木 一生 P11-3  
鈴木 寛規 O5-2  
鈴木 孝昌 O3-1, O3-2  
鈴木 昭浩 M2-5, O2-5, O3-5  
鈴木 千華 O2-6  
鈴木 洋史 L-1  
鈴木 律好 O12-3  
須藤 雅人 O10-6  
須藤 桂子 P1-6  
巢山 晋 P11-1  
諏訪 浩一 O8-1



<セ>			竹田 三喜夫	P6-1
関 誠	O10-3		竹田 剛	09-1, P8-4
関 高樹	P1-10		武田 眞記夫	02-2, 02-3
関谷 泰司	P11-1		武田 健	P5-5
関根 孝司	08-3, 08-4		武田 理夫	08-3
関谷 公範	P1-18		竹中 重幸	P4-3
瀬畑 信哉	04-4, P2-1		竹中 千鶴	P1-15
			田子 和美	P12-2
<ソ>			立花 滋博	O10-3
臧 小萍	O10-2		立松 正衛	P5-6
相馬 晋司	P11-7		田中 光	05-5, 05-6
曾根 秀子	O1-1		田中 智	P11-7
園田 二郎	03-3		田中 栄治	04-3, P4-4
祖父尼 俊雄	M2-3, 03-2		田中 公一	P9-3
			田中 宏治	04-4
<タ>			田中 弘光	P8-1
大導寺 俊平	P1-18		田中 あづさ	O11-1
高岡 雅哉	04-4		田邊 容子	P9-4
高木 篤也	P1-13		谷 泉乃	P1-18
高島 宏昌	O10-3, O11-1		谷 憲三朗	09-6
高島 宗一	O11-4		谷井 秀治	O10-2
高須 正生	08-1		谷岡 功邦	09-6
高野 勝弘	O13-6		谷口 暢	O12-5
高場 克己	06-5		谷口 英巳	P1-17
高橋 研	O1-2		谷藤 久人	05-4
高橋 久英	P8-1		谷本 憲昭	06-6
高橋 健司	O12-3		田畑 肇	P11-5
高橋 宏明	06-2, O10-4		玉井 光男	P5-4
高橋 弘一	O11-4		玉野 静光	05-5, 05-6
高橋 行雄	O13-5		田村 工	O12-2, P11-10
高橋 美晴	O12-3		田村 隆	08-2
高橋 芳樹	O2-6		田村 博信	O13-1, O13-2
高原 栄二	O10-1		田村 友秀	06-5
高松 翼	O13-6			
高松 一彦	09-3		<チ>	
高松 利明	08-1, P9-1		茅野 理也	02-1
田川 義章	P8-3, P11-3		中郡 昭人	06-4
滝沢 毅	O13-4		長 敏夫	08-2
滝沢 節子	07-1, P8-2			
竹下 尚	P11-3		<ツ>	
竹下 文隆	O5-2		塚本 修	O13-4

築館 一男 03-3  
角崎 英志 011-3  
辻 洋美 02-2  
津田 実 08-4  
津田 洋幸 05-2, 07-3, P2-2  
土谷 稔 P1-7  
筒井 将 P11-7  
筒井 尚久 012-1, 012-3  
筒井 美枝 03-3  
坪内 春樹 013-5, P13-1

<テ>

出倉 絵里葉 P4-2  
寺井 裕 013-4  
寺岡 美枝 P1-2  
寺本 昭二 01-2  
天間 恭介 06-4

<ト>

土井 邦雄 R-0  
遠山 千春 01-1  
時任 康弘 P4-2  
柘久保 邦夫 012-5  
戸塚 和男 013-4  
苔米地 英俊 P1-1  
富田 文美 P6-1  
富山 成人 02-2, 02-3  
豊岡 康平 08-2  
鳥山-馬場弘靖 05-2

<ナ>

内藤 一嘉 P1-3  
永井 賢司 P1-6, P1-7  
長尾 拓 06-2  
中嶋 圓 03-1  
永嶋 雅子 05-4  
長島 吉和 011-2  
永田 治 010-1  
永田 良一 06-3  
中津 武 P1-4  
中塚 敏夫 P1-5

中西 速夫 P5-6  
長根 芳文 P11-12  
中野 康之亮 012-4  
中野 雄司 P9-4  
中村 英明 08-1, P9-1  
中村 晃忠 P12-3  
中村 正樹 01-3  
中村 利孝 011-4  
中村 和市 012-1, 012-3  
中村 和美 P5-5  
中山 佳都夫 M2-5, 03-5  
中山 直樹 R-2  
中山 隆治 05-4, P10-1,  
P10-2  
永山 智 05-1, P5-1  
納屋 聖人 P1-15  
奈良間 功 010-6  
成田 隆博 P1-16

<ニ>

西 直樹 P1-18  
西垣 敏明 P11-1  
西沢 共司 P5-2  
西田 仁 012-3  
西村 進 08-1  
西村 信雄 08-1, P9-1  
二宮 一広 013-5, P13-1

<ノ>

能美 健彦 M2-5, 03-4, 03-5  
野口 規子 P9-3  
野村 幸子 P1-3  
野村 政明 P5-4  
野本 研一 P6-2

<ハ>

芳賀 敏郎 013-5  
袴田 志野婦 04-4  
萩原 昭裕 05-5, 05-6  
羽倉 昌志 03-3  
橋本 敬太郎 M1-4

- |        |   |        |                                  |
|--------|---|--------|----------------------------------|
| 橋本 晃   | R-5                                     | 平河 威   | O13-1, O13-2                     |
| 橋本 正晴  | P6-7                                    | 平田 篤由  | O13-1, O13-2,<br>O13-4           |
| 長谷川 隆司 | P9-3                                    | 平塚 秀明  | P1-7                             |
| 長谷部 義男 | O10-4                                   | 平林 容子  | O9-5, P1-13                      |
| 秦 純子   | P11-6                                   | 平山 千束  | P1-4                             |
| 畑 律子   | O2-1                                    | 廣田 里香  | P11-5                            |
| 畠山 茂樹  | P1-16                                   | 深澤 清久  | O11-2                            |
| 畠山 和久  | O8-1, P9-1                              |        |                                  |
| 蜂谷 紀之  | O3-1                                    |        |                                  |
| 花田 哲   | P1-18                                   | <フ>    |                                  |
| 埴岡 健一  | P4-1                                    | 福崎 好一郎 | O6-3, O11-3,<br>O11-5, P9-5      |
| 浜田 知久馬 | O13-3                                   | 福島 昭治  | P8-3                             |
| 浜田 悦昌  | O1-3                                    | 福島 正和  | O2-4                             |
| 浜野 宝子  | P4-4                                    | 福西 克弘  | P1-2, P1-17                      |
| 林 真    | M2-3, O3-2, O13-6                       | 藤井 登志之 | M1-2, O5-1, P5-1<br>P1-17, P1-18 |
| 林 俊英   | O2-1                                    | 藤田 健一  | M2-5, O2-5, O3-5                 |
| 林 晴美   | P1-3                                    | 藤巻 由紀夫 | P1-16, P6-5                      |
| 林 泰司   | O9-2                                    | 藤村 みどり | P9-4                             |
| 林 百子   | O10-4                                   | 藤本 昭宏  | P1-4                             |
| 林 隆志   | O11-4                                   | 藤原 淳   | P6-4                             |
| 林 万律子  | P11-4                                   | 藤原 道夫  | P1-1                             |
| 原 巧    | O3-1                                    | 伏谷 伸宏  | P11-11                           |
| 原 幸男   | O6-4                                    | 二川 治子  | O6-2, O10-4                      |
| 原 卓司   | O6-5, P8-4, P9-2                        | 二村 芳弘  | O1-3                             |
| 原園 景   | P1-9                                    | 船橋 齊   | P11-4                            |
| 原田 孝則  | O2-2, O2-3                              | 古川 雅一  | P1-16                            |
| 原田 知子  | O10-3                                   | 古川 忠司  | P2-1                             |
| 原田 美輪  | P11-12                                  | 古荘 早苗  | P4-3                             |
| 原田 智子  | O6-5                                    | 古橋 忠和  | P1-3                             |
| 坂 芳樹   | P1-5                                    | 古谷 真美  | P12-2                            |
| 半田 淳   | O13-1, O13-2,<br>O13-4, O13-5,<br>P13-1 |        |                                  |
|        |   | <ホ>    |                                  |
| <ヒ>    |   | 寶珠山 五月 | P5-3                             |
| 比嘉 良喬  | O7-2                                    | 北條 真由美 | P4-1                             |
| 樋口 信昭  | P11-3                                   | 北條 仁   | O1-2                             |
| 久一 真一  | O13-4                                   | 宝来 直人  | O11-5                            |
| 久田 茂   | O5-4                                    | 星 ゆかり  | P11-6                            |
| 日詰 信吾  | O10-6, P6-4                             | 細川 暁   | O4-1                             |
| 日比野 仁  | O9-6                                    | 細川 俊治  | P1-10                            |

細山田 真	O8-3	真鍋 淳	M1-1, O4-2, O4-4, P2-1
堀 正敏	P11-11	真鍋 由恵	O9-2
堀井 郁夫	M1-3, O7-1, O7-4, O12-4, P8-2	馬淵 愛子	P1-3
堀江 成光	O13-5, P13-1	馬屋原 宏	M1-0
堀口 浩資	O11-2		
堀部 紀久子	P11-11	<ミ>	
堀本 政夫	P1-17, P1-18	三浦 稔	P1-7
本間 健資	O10-5	三浦 裕	O12-5
本間 正充	M2-3	見上 孝	O3-3
		水野 洋	P6-1
<マ>		水野 幸恵	P8-3
真板 敬三	P8-1	水間 秀行	O13-4
前田 博	O11-3	溝口 靖基	O11-2
前田 真希	P1-6	三谷 治	O8-2
前田 泰宏	O9-4	三井 雅之	P11-4
前山 順一	O12-5	光森 達博	O13-1, O13-2
牧 栄二	O12-1, O12-3	三奈木 隆史	P1-4
牧野 俊彦	O4-2, O4-4	南野 友義	P5-4
増田 裕	M1-1	三村 雄一	P10-1, P10-2
増田 修治	O5-4	宮川 誠	P1-7
樹富 直哉	O4-3	宮川 宗之	O10-5
増村 健一	O3-4	三宅 幸雄	M2-0
亦野 恵子	O12-5	宮崎 譲	P11-1
松浦 正男	P1-17	宮崎 裕康	O6-1, P6-5
松尾 昌季	P1-10	宮嶋 宏彰	O11-3, O11-5, P9-5
松岡 哲也	O11-2		
松澤 利明	R-0, O5-1, P1-1, P5-1	宮田 かおり	P1-10
		宮田 裕子	O3-2
松下 宗史	O9-2	宮本 謙一	P5-4
松島 泰次郎	P5-2	宮脇 英美子	P1-9
松永 茂樹	P11-11		
松本 始緒里	O1-4	<ム>	
松本 清	O1-4	薙田 泰誠	O10-1
松本 力	O10-4	務台 衛	O5-1, P5-1, P5-6
松本 浩良	O6-1, P1-5, P6-5, P6-8	武藤 紀生	O11-4
		武藤 信一	P11-7
松本 清司	O9-2, P11-7	村上 善紀	O13-4
松本 正博	P6-7	村越 正典	R-4, P10-1, P10-2
松本 直樹	O9-1	村崎 祐子	O8-2
松本 直樹	P9-2	村瀬 正	P4-4

村松 敦子 04-2

<モ>

望月 雅裕 P9-1  
望月 健光 P8-3  
望月 文敏 P9-4  
百瀬 泰紀 P11-7  
森 襄 P11-3  
森 牧子 O2-5  
森 裕司 P2-1  
森村 智美 O10-3  
森本 秀樹 O5-4  
森本 泰子 P8-2  
門馬 純子 P12-3

<ヤ>

安田 陽子 O12-5  
安場 正子 O5-1, P5-1  
山内 研司 P6-7  
山折 大 O3-5  
山岸 保彦 P1-7  
山北 修 O13-5, P13-1  
山崎 寛治 P5-3  
山崎 浩史 O3-6  
山下 弘太郎 O10-6  
山下 悟 O5-1, P5-1  
山下 邦弘 P11-12  
山添 康 P4-1  
山田 雅之 O13-4  
山田 雅巳 O3-5  
山田 智也 P1-10  
山中 義弘 P11-6  
山西 嘉晴 P6-1  
山根 節夫 P1-10  
山本 光雄 O9-1  
山本 慧 M2-4  
山本 昇 O6-5  
山本 光雄 P8-4, P9-2  
山本 静護 P5-2  
矢本 敬 O4-2, O4-4

<ユ>

湯浅 啓史 P11-4

<ヨ>

横井 毅 O10-1  
横内 秀夫 O13-4  
横本 泰樹 P1-18  
横山 篤 P1-14  
吉岡 薫 P1-10  
吉岡 直記 P8-1  
吉崎 宏 P1-4  
吉田 順一 P1-17  
吉田 武美 O13-6, P12-4  
吉永 貴志 P6-2  
吉村 功 O13-6  
吉村 弘之 P11-4  
吉村 慎介 O11-1  
吉本 結子 P1-4  
米重 智美 P9-2  
米元 純三 O1-1

<ワ>

若田 明裕 O9-3  
渡辺 茂美子 O2-2, O2-3  
渡辺 大 O11-2  
渡辺 烈 M1-5, O2-4  
渡辺 一人 O13-5, P13-1  
渡辺 幸彦 P1-16  
渡辺 真弓 O4-4  
渡辺 知幸 O5-3  
渡辺 稔之 P2-1  
和知 正幸 O13-5, P13-1

## 著者索引 (英名)

Allen, T.R.	P3-1, P12-1	Kang, J. H.	P2-3
Arcelin, G.	P3-1, P12-1	Kang, Kyung-Sun	P1-12, P11-2
Aryal, Pramod	P3-3	Keenan, K.P.	P6-8
Ballam, G.C.	P6-8	Kinter, Lewis B.	R-6, P6-3, P11-8, P11-9
Baldwin, C.L.	P6-8	Klecak, J.	P3-1, P12-1
Bowmer, C.T.	P1-11	Lee, K. H.	P2-3
Brown, David	M1-6	Losco, P.	P11-8
Cha, Y. N.	P2-3	Miranda, N.J.	O11-4
Chung, W. G.	P2-3	Park, C. S.	P2-3
Collins, D.	O11-4	Pflster, Th.	P12-1
Crewell, C.	P11-8	Roh, H. K.	P2-3
DiSalvo, G.	P11-8	Sarkar, S.	O1-1
Donkin, H.	P11-9	Soper, K.A.	P6-8
Fetrow, N.	P11-8	Tong, V.	P4-4
Finney, David J.	R-9	Trosko, James E.	L-2
Gimeno, S.	P1-11	Tyson, C.A.	O9-4
Guengerich, F.P.	O3-6	Ueng, Y-F.	O3-6
Hall, Robert L.	R-7	Ullmann, L.	P3-1, P12-1
Harms, J.	P11-8	Vohr, H.W.	O12-3
Hausmann, Elda H.S.	P12-4	Wollny, E.	P3-1
Hendrickx, Andrew G.	R-11	Zwieten, M.J. van	P6-8
Hoe, C.M.	P6-8		
Iglesia, Felix A. dela	R-10		
Jana, N. R.	O1-1		
Johnson, David K.	R-6, P11-8, P11-9		
Johnson, K.	P11-8		
Johnson, W.W.	O3-6		

### 第25回 日本トキコロジー学会学術年会 要旨集

●発行日/平成10年5月18日 ●発行人/五十嵐 俊二

●発行所/エーザイ株式会社 東京研究所 〒112-8088 東京都文京区小石川4-6-10 TEL 03-3817-5356 FAX 03-3811-7477

●印刷所/株みづほ TEL 03-5390-7811



## 日本でのこれまでの経験と知識も強味です セーフファームラボラトリーズ

日本の顧客のニーズに誠意をもって、高品質の技術で迅速に低料金で対応している英国安全性試験機関です。

- 所在地：英国ダービー市。創立1971年。従業員数3百名。敷地101,200平方米。
- 現在の日本の顧客数：約4百社。



### 試験の種類

- 経口毒性：急性、28日間、90日間、52週間など。
- 経皮毒性：急性、21日間、28日間、90日間など。
- 吸入毒性：急性、21日間、28日間、90日間など。
- 生殖毒性：催奇形性、受精・初期胚発達、ラット、妊娠前・妊娠初期、ラット、胎仔器官形成、ウサギおよびラット。

- 変異原性：Ames、染色体異常、小核、遺伝子突然変異、姉妹染色分体交換、優性致死、マウスリンパ腫、不定期DNA合成など。
- 皮膚刺激：急性、14日間、28日間など。
- 眼刺激：急性。
- 感受性：皮膚感受、光感受、光毒性など。
- その他：環境内分泌攪乱テスト、局所リンパ節試験など、多数、下記にお問い合わせ下さい。

# SafePharm Laboratories

P.O. Box 45 Derby DE1 2BT England  
Telephone: (0332) 792896 Telex: 377079  
SAFPHM G Fax: (0332) 799018



日本総代理店

株式会社 **メディアサービス**  
テクノサポート部

東京都中央区日本橋茅場町2-14-1  
〒103-0025 第一井上ビル303号  
Tel. (03) 3666-9915 Fax. (03) 3666-9916

Huntingdon  
Life Sciences

Service based on science & experience



# HUNTINGDON

実績が経験と技術を語ります。

ハンティンドンライフサイエンスは、その長い歴史を通して、医薬、農薬、化学品などの様々な業界の安全性評価試験に多くの実績を築いてきました。その受託業務範囲は、物理化学的性状、イヌやサルなどほ乳類を用いた毒性試験、変異原性試験、生分解性試験、蓄積性試験、代謝試験、トキシコネティク、環境動態試験等すべての分野にわたります。世界最大規模の試験設備の中で、トップレベルの技術を投入し、国際的に通用する試験結果を提供。日本国内では難しいとされる試験の実施も可能です。また、行政規制当局に対する届け出業務も代行し、豊富な経験に基づいた質の高い書類作成は定評です。ハンティンドンライフサイエンスの豊富な経験と高い技術はその実績が物語ります。

ハンティンドンライフサイエンス株式会社  
〒102-0076 東京都千代田区五番町12番地1  
TEL(03)3238-6387 FAX(03)3238-6388

Huntingdon Life Sciences Ltd  
PO Box 2 Huntingdon  
Cambridgeshire PE18 6ES England

Huntingdon Life Sciences, Inc.  
P.O. Box 2360 Mettlers Road  
East Millstone, NJ 08875-2360 U.S.A