

# 第26回日本トキシコロジー学会 学術年会



## プログラム・要旨集

平成11年7月21日(水) - 23日(金)

ロイトン札幌

### 特別講演

[Environmental susceptibility genes that cause toxicity and cancer]

D.W. Nebert (Univ.Cincinnati)

[The flavin-containing monooxygenase gene family in humans]

R.M. Philpot(NIEHS)

### 教育講演

[水俣病動物モデルとしての methylmercury chloride による  
rat 小脳顆粒細胞 apoptosis の解析]

長縄和郎 (北海道大学医学部)

### シンポジウム 1

[内分泌攪乱化学物質] (一般公開)

### シンポジウム 2

[トキシコロジー研究:世界と日本]

### シンポジウム 3

[画期的新薬開発におけるトキシコロジストの役割]



北海道大学大学院薬学研究科

1999 札幌

Huntingdon  
Life Sciences

*Service based on science & experience*



# HUNTINGDON

実績が経験と技術を語ります。

ハンティング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、化学基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、イヌヤサルなどは乳剤を用いた毒性試験、変異原性試験、生分解性試験、蓄積性試験、代謝試験、トキレコネットワーク、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。ハンティング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。

ハンティングドンライフサイエンス株式会社  
〒100-0076 東京都千代田区五番町12番地1  
TEL:03(3238-6207) FAX:03(3235-6088)

Huntingdon Life Sciences Ltd  
PO Box 2 Huntingdon  
Cambridgeshire PE10 6ES England

Huntingdon Life Sciences, Inc.  
P.O. Box 2160 Mellers Road  
East Millstone, NJ 08875-2160 U.S.A.



# 第26回 日本トキシコロジー学会学術年会

会期：平成11年7月21日（水）～23日（金）

会場：ロイトン札幌

060-0001 札幌市中央区北1条西11丁目  
TEL.011-271-2711（代）FAX.011-207-3344

## 年会会長

鎌滝 哲也（北海道大学大学院薬学研究科）

## 企画委員

有吉 範高（北海道大学大学院薬学研究科）

五十嵐 俊二（エーザイ）

井上 達（国立医薬品食品衛生研究所）

井村 伸正（北里大学薬学部）

植松 孝悦（北海道薬科大学）

菅野 盛夫（北海道大学医学部）

黒川 雄二（国立医薬品食品衛生研究所）

野口 英世（第一化学薬品・薬物動態研究所）

野村 護（第一製薬・安全性研究所）

藤田 正一（北海道大学獣医学部）

堀井 郁夫（日本ロシュ）

松本 一彦（日本たばこ産業・医薬総合研究所）

南 勝（北海道医療大学薬学部）

吉田 武美（昭和大学薬学部）

渡部 烈（東京薬科大学薬学部）

\*50音順

## 年会事務局

060-0812札幌市北区北12条西6丁目

北海道大学大学院薬学研究科・代謝分析学分野内（有吉範高、池田直香）

TEL:011-706-3235 FAX:011-716-5324 dmbunsec@pharm.hokudai.ac.jp

## 事務局（学会期間中）

060-0001 札幌市中央区北1条西11丁目

ロイトン札幌内

TEL:011-207-2000 FAX:011-207-2001 dmbunsec@pharm.hokudai.ac.jp

# 目次

年会長挨拶.....	1
会場案内.....	2
ご案内とお願い.....	4
各種集会（評議員会、総会、懇親会）の日程.....	6
日程と会場（表）.....	7
プログラム.....	13
特別講演.....	53
教育講演.....	65
シンポジウム1.....	71
シンポジウム2.....	93
シンポジウム3.....	123
ワークショップ.....	165
一般講演.....	185
索引.....	325

# 年会長挨拶

## 第 26 回日本トキシコロジー学会学術年会開催にあたって

北海道大学大学院薬学研究科  
教授 鎌滝哲也

第 26 回日本トキシコロジー学会学術年会を札幌で開催するに当たり、一言ご挨拶申し上げます。

学会の開催をお引き受けさせていただいたことは大変光栄な事ではありますが、同時に不安な事でもあります。学術年会は日本トキシコロジー学会の将来を方向づける大きなイベントあることと、学会の性格上社会との接点を無視できないことなど、かなり欲張った企画をしなくてはならないからであります。

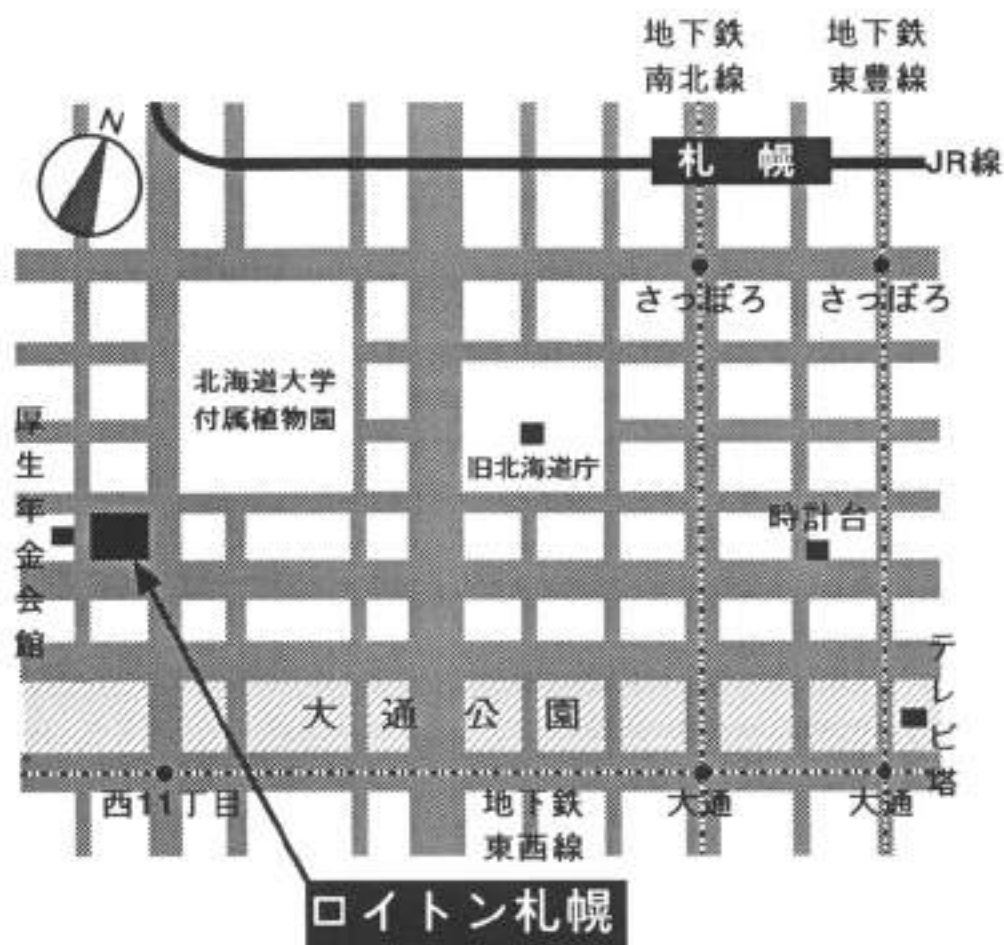
社会との接点といいましても、学会ですから学問の基盤の上に立って議論が進められなくてはなりません。単に社会で注目されているからといって、学会が先頭に立って「危ない、危ない」では学会とは言えません。科学的な裏付けに立って将来を展望した議論があるべきです。

加えて、多方面に渡る学会の参加者の期待にも公平に応えなくてはなりません。学術年会の参加者の多くは企業の研究者です。したがって、企業の研究者に有益な情報が得られる学会でなくてはなりません。しかし、「学術」年会ですから企業の研究者にとって近未来だけでなく遠未来の研究にも有益な情報が得られるものでなくてはなりません。大学や国立研究所の研究者にとっても有益な学会でなくてはなりません。

本学術年会の企画に当たって、これらの点の全てを満足できる企画を、と大いに考えました。社会との接点では「内分泌攪乱物質」を取り上げ、これは問題の性格上、公開講演会と致しました。また、基礎の研究者には「我が国のトキシコロジーと世界のトキシコロジーの比較」を企画いたしました。我が国の研究が進んでいる部分と立ち後れている部分を浮き彫りにしたかったためです。また、我が国では初めての企画として「コントラクトラボの技術力」を取り上げました。この企画は東京薬科大学の渡部教授のご示唆によるものです。

これらの企画案をもとにオーガナイザーの先生方には具体的な企画をお願いしました。私の予想以上の企画になったと喜んでおります。「北海道の学会は印象的だった、来て良かった」と思われることを期待しております。学問を大いに楽しんで頂けますように祈っております。

## ロイトン札幌の案内図

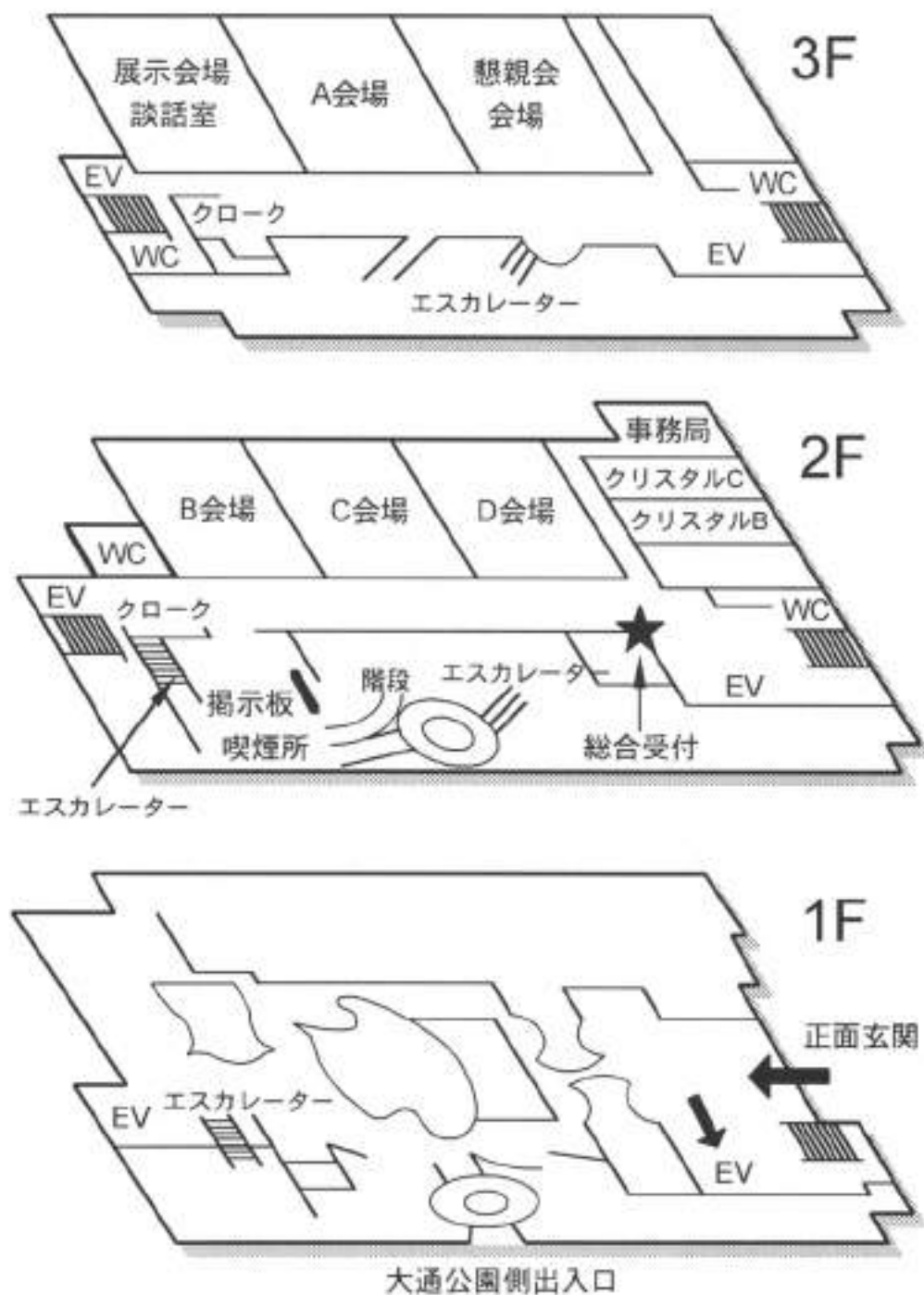


### 交通のご案内

- 1) 地下鉄東西線「西11丁目駅」より徒歩3分
- 2) JR札幌駅よりタクシー5分
- 3) JR札幌駅より徒歩15分

060-0001札幌市中央区北1条西11丁目  
TEL:011-271-2711 (代)

# 会場配置図



## 参加者へのご案内とお願い

### 1. 受付と参加登録

- 総合受付・参加登録： エレベーター前（2F）に総合受付を設置します。

当日参加登録 7月21日（水）8:00～17:00

7月22日（木）8:30～17:00

7月23日（金）8:30～12:00

- 当日受付の参加登録費および懇親会費は以下の通りです。

参加登録費 学会員 10,000円

非会員 12,000円

学生会員 6,000円

懇親会費 10,000円

### 2. ネームプレート

- 年会参加者は必ず所属・氏名を明記したネームプレートを着用して下さい。ネームプレートを着用していない方は入場をお断りします。

### 3. クロークのご案内

- B会場（2F 左）および展示会場（3F 左）前の2ヶ所にクロークを用意しますのでご利用下さい。
- クロークは8:30～17:30の間利用できます。尚、7月22日（木）は8:30～20:30の利用時間となります。

### 4. 休憩・談話室の設置

- 展示会場に休憩・談話用のテーブルとイス、および飲み物を用意します。ご自由にご利用下さい。

### 5. 食事のご案内

- 食事にはホテル内のレストランあるいは周辺の飲食店をご利用下さい。飲食店マップを用意しますのでご利用下さい。

### 6. 喫煙についてのお願い

- 発表会場内は全て禁煙です。喫煙は所定の場所をお願いします。



7. 年会事務局

- 年会期間中の事務局は2階右奥に配置します。

8. 掲示板と緊急電話・ファックス連絡先

- 2階ロビーに掲示板を設置し、連絡事項を掲示いたします。また、学会参加者相互の連絡にもご自由にご利用下さい。
- 事務局電話番号：011-207-2000
- 事務局ファックス：011-207-2001

9. 講演者の方へ

- 30分前までに該当会場の「スライド受付」で受付をして下さい。
- 講演は全てスライドを用いた口頭発表にて行います。所定の発表時間を厳守して下さい。

一般講演：発表8分、質疑応答4分 = 計12分

- スライドは35mmフィルム（ライカ版）で一般講演では **10枚以内**に限定いたします。
- スライドの併写はできません。同一のスライドを2回以上使用する場合は、映写回数分を用意して下さい。
- 講演終了後、使用スライドを忘れずに受け取って下さい。
- *J. Toxicol. Sci.*に掲載する英文抄録を総合受付（2F エレベーター前）の「英文抄録用の受付コーナー」の担当者に提出して下さい。

10. 座長の方へ

- セッションの始まる15分前までに該当会場のスライド受付までご連絡下さい。

## 各種委員会・集会の日程と会場

### 7月20日（火）

編集委員会：	10:30~12:30	クリスタルルーム B (2F)
理事・監事会：	14:00~17:00	クリスタルルーム B (2F)

### 7月21日（水）

認定試験小委員会：	12:00~13:00	クリスタルルーム B (2F)
用語集小委員会：	12:00~13:00	クリスタルルーム C (2F)

### 7月22日（木）

評議員会：	12:00~13:00	A会場（3F 中央）
総会：	13:00~14:00	A会場（3F 中央）
田邊賞授賞式と受賞講演：	14:00~14:50	A会場（3F 中央）
懇親会：	18:00~20:00	懇親会会場（3F 右）

### 7月23日（金）

日本学術会議第7部トキシコロジー研究連絡会打合せ：	12:00~13:00	クリスタルルーム B (2F)
---------------------------	-------------	-----------------

## 日程と会場

7月21日（水）

	A会場 (3F中央)	B会場 (2F左)	C会場 (2F中央)	D会場 (2F右)
8:55	開会の辞 鎌滝哲也			
9:00	シンポジウム1： 「内分泌攪乱化学物質」(一般公開) 21S1A-09-1 ～ 11-2	一般講演	一般講演	
10:00		血液毒性 21B-09-1 ～ 10-4	変異原性 21C-09-1 ～ 09-5	
11:00		循環器毒性 21B-10-5 ～ 11-5	がん原性・ 発がん性 21C-10-1 ～ 11-2	
12:00	昼 休 み			
13:00	ワークショップ	一般講演	一般講演	一般講演
14:00	環境ホルモン 21WA-01-1 ～ 04-3	毒性試験法 21B-01-1 ～ 04-3	異物代謝 21C-01-1 ～ 04-3	腎毒性 21D-01-1 ～ 02-3
15:00				一般毒性 21D-02-4 ～ 04-5
16:00				
17:00				

# 7月22日（木）

	A会場 (3F中央)	B会場 (2F左)	C会場 (2F中央)	D会場 (2F右)
9:00	一般講演 生殖・発生・胎仔毒性 22A-09-1 ～ 11-5	一般講演 神経毒性 22B-09-1 ～ 11-4	一般講演 免疫毒性・ アレルギー 22C-09-1 ～ 11-1	一般講演 細胞毒性 22D-09-1 ～ 09-5
10:00				肝毒性 22D-10-1 ～ 10-5
11:00				トキシコ キネティクス 22D-11-1 ～ 11-5
12:00	評議員会	昼 休 み		
13:00	総 会			
14:00	田邊賞受賞式および受賞講演			
15:00	教育講演 22EA-03-1			
15:45	特別講演1 22LA-03-2			
16:45	特別講演2 22LA-04-1			
17:45				
	懇親会会場 (3F右)			
18:00	懇 親 会			
20:00				

# 7月23日（金）

	A会場 (3F中央)	B会場 (2F左)	C会場 (2F中央)	D会場 (2F右)
9:00	<p>シンポジウム2： 「トキシコロジー研究：世界と日本」 23S2A-09-1 ～ 11-2</p>			
12:00		昼 休 み		
13:00	<p>シンポジウム3： 「画期的新薬開発におけるトキシコロジストの役割」 23S3A-01-1 ～ 03-6</p>			
17:00		閉会の辞 鎌滝 哲也		

特別講演

藤田 隆雄 (東京大学)  
藤田 隆雄、藤田 隆雄、藤田 隆雄  
藤田 隆雄

藤田 隆雄 (東京大学) 藤田 隆雄 (東京大学) 藤田 隆雄 (東京大学)

## プログラム

藤田 隆雄 (東京大学)  
藤田 隆雄 (東京大学) 藤田 隆雄 (東京大学)  
藤田 隆雄

藤田 隆雄 (東京大学) 藤田 隆雄 (東京大学) 藤田 隆雄 (東京大学)

藤田 隆雄 (東京大学) 藤田 隆雄 (東京大学) 藤田 隆雄 (東京大学)

藤田 隆雄 (東京大学) 藤田 隆雄 (東京大学) 藤田 隆雄 (東京大学)

藤田 隆雄 (東京大学)  
藤田 隆雄 (東京大学) 藤田 隆雄 (東京大学)  
藤田 隆雄

藤田 隆雄 (東京大学) 藤田 隆雄 (東京大学) 藤田 隆雄 (東京大学)

藤田 隆雄 (東京大学) 藤田 隆雄 (東京大学) 藤田 隆雄 (東京大学)

藤田 隆雄 (東京大学) 藤田 隆雄 (東京大学) 藤田 隆雄 (東京大学)

## 特別講演

会場：A 会場（3F 中央）

日時：7 月 22 日（木）15:45～16:45

22LA-03-2

座長：加藤 隆一（慶應義塾大学医学部）

"Environmental susceptibility genes that cause toxicity and cancer"

D. W. Nebert (University of Cincinnati, USA)

会場：A 会場（3F 中央）

日時：7 月 22 日（木）16:45～17:45

22LA-04-1

座長：小栗 一太（九州大学薬学部）

"The flavin-containing monooxygenase gene family in humans"

R. M. Philpot

(National Institute of Environmental Health Sciences, USA)

## 教育講演

会場：A 会場（3F 中央）

日時：7 月 22 日（木）15:00～15:45

22EA-03-1

座長：遠藤 仁（杏林大学医学部）

「水俣病動物モデルとしての methylmercury chloride による rat 小脳顆粒細胞 apoptosis の解析」

長嶋 和郎（北海道大学医学部）

## 田邊賞受賞講演

### 受賞講演 1.

会場：A会場（3F 中央）

日時：7月22日（木）14:10～14:30

座長：唐木 英明（東京大学）

浜田 悦昌、二村 芳弘（持田製薬総合研究所）

Induction of leydig cell tumors by lacidipine via up-regulation of the LHRH receptor on leydig cells in rats. *The Journal of Toxicological Sciences*, 23, 35-52 (1998)

### 受賞講演 2.

会場：A会場（3F 中央）

日時：7月22日（木）14:30～14:50

座長：黒川 雄二（国立衛研）

三浦 郷子（和光大学経済学部経済学科環境科学教室）

井村 伸正（北里大学薬学部公衆衛生学教室）

Methylmercury-induced microtubule depolymerization leads to inhibition of tubulin synthesis. *The Journal of Toxicological Sciences*, 23, 379-388 (1998)



# シンポジウム1 (S1)

## 「内分泌攪乱化学物質」 (一般公開)

会場：A会場 (3F 中央)

日時：7月21日 (水) 9:00~12:00

オーガナイザー：黒川 雄二 (国立衛研)

座長：井上 達 (国立衛研)

西川 淳一 (大阪大学)

21S1A-09-1 (9:00~9:20)

概説

菅野 純 (国立衛研)

21S1A-09-2 (9:20~9:50)

野生生物とくに魚類における影響

有園 幸司 (熊本県立大学)

21S1A-09-3 (9:50~10:20)

性ステロイドホルモンレセプターによる遺伝子発現制御の分子メカニズム

加藤 茂明 (東京大学)

21S1A-10-1 (10:20~11:00)

Endocrine-mediated alterations on development and reproduction following exposure to pesticides.

R. J. Kavlock (NHEERL)

21S1A-11-1 (11:00~11:30)

内分泌攪乱化学物質の発がん性

白井 智之 (名古屋市立大学)

21S1A-11-2 (11:30~12:00)

ダイオキシン発がんの疫学的研究

渡邊 昌 (東京農業大学)

## シンポジウム2 (S2)

### 「トキシコロジー研究：世界と日本」

会場：A 会場（3F 中央）

日時：7月23日（金）9:00～12:00

オーガナイザー・座長：井村 伸正（北里大学）  
大沢 基保（帝京大学）

23S2A-09-1 (9:00～9:05)

Introduction

鎌滝 哲也（北海道大学）

23S2A-09-2 (9:05～9:30)

ヒト組織を用いた毒性研究の現状と将来展望

佐藤 哲男（昭和大学）

23S2A-09-3 (9:30～9:55)

代謝研究の成果は毒性学でどう活かされたか

渡部 烈（東京薬科大学）

23S2A-09-4 (9:55～10:20)

Role and significance of mutagenicity studies in the course of  
discovery / development of pharmacological drugs.

E. Gocke (Roche)

23S2A-10-1 (10:20～10:45)

神経毒性学の現状

橋本 敏夫（Northwestern Univ.）

23S2A-10-2 (10:45～11:10)

免疫学の最先端とトキシコロジーの接点

大沢 基保（帝京大学）

23S2A-11-1 (11:10～11:35)

経世代影響研究の現状

野村 大成（大阪大学）

23S2A-11-2 (11:35～12:00)

生物統計学と毒性学

竹内 正弘（北里大学）

## シンポジウム3 (S3)

### 「画期的新薬開発におけるトキシコロジストの役割」

会場：A会場（3F 中央）

日時：7月23日（金）13:00～17:00

オーガナイザー：渡部 烈（東京薬科大学）

野口 英世（第一化学薬品）

座長：野口 英世（第一化学薬品）

Opening Remarks (13:00～13:05)

渡部 烈（東京薬科大学）

#### 基調講演

座長：渡部 烈（東京薬科大学）

黒岩 幸雄（富士バイオメディックス）

23S3A-01-1 (13:05～13:25)

新薬の開発推進に役立つ安全性評価

野口 英世（第一化学薬品）

23S3A-01-2 (13:25～13:45)

創薬研究から開発研究における新しい動向

堀井 郁夫（日本ロシュ）

#### トキシコロジストの役割

座長：野口 英世（第一化学薬品）

堀井 郁夫（日本ロシュ）

23S3A-01-3 (13:45～14:05)

創薬研究における毒性評価

野村 護（第一製薬）

23S3A-02-1 (14:05～14:25)

外部委託試験の有用性と信頼性

松本 一彦（日本たばこ産業）

## 新しい安全性評価試験系の選択

座長：野村 護（第一製薬）  
松本 一彦（日本たばこ産業）

23S3A-02-2 (14:25～14:42)

静脈内インフュージョンによる毒性評価

梅村 建夫（ボソリサーチセンター）

23S3A-02-3 (14:42～14:59)

サル・イヌを用いたテレメトリーシステムにおける安全性薬理評価

西森 司雄（環境バイリス）

清水 恵次（富士バイオメディックス）

23S3A-02-4 (14:59～15:16)

機能不全動物の作製

佐々木 敬幸（動繁研）

23S3A-03-1 (15:16～15:33)

カニクイザルにおける生殖発生毒性試験について 伊原 敏夫（新日本科学）

23S3A-03-2 (15:33～15:50)

*In vitro* ヒト代謝予測試験法

C. E. Green (SRI)

23S3A-03-3 (15:50～16:07)

薬物自己投与実験法の活用

若狭 芳男（イナリサーチ）

座長：渡部 烈（東京薬科大学）

鎌滝 哲也（北海道大学）

総合討論 (16:07～16:50)

Closing Remarks (16:50～17:00)

黒岩 幸雄（富士バイオメディックス）

# ワークショップ

環境ホルモン

会場：A会場（3F 中央）

日時：7月21日（水）13:00～16:36

座長：有蘭 幸司（熊本県立大学）

高橋 芳樹（北海道大学）

21WA-01-1 (13:00～13:12)

エストロゲン様作用物質のスクリーニングのための卵巣摘出ラット子宮アッセイ法における基礎的検討：重量測定法の検討

○角南 整、山田 智也、須方 督夫、奥野 泰由、松尾 昌季

住友化学工業 生物環境科学研究所

21WA-01-2 (13:12～13:24)

全自動免疫化学測定装置によるラット血中ホルモン濃度の測定

○向井 大輔、笹浪 知宏、大庭 耕輔、井上 博之

食品農医薬品安全性評価センター

21WA-01-3 (13:24～13:36)

Diethylstilbestrol (DES)投与雄ラットの血清 $\alpha_{2u}$ -globulin levelの変動と endocrine disrupter screening への応用

○武吉 正博、穴井 俊二、飯田 憲二

化学品検査協会 安全性評価技術研究所

21WA-01-4 (13:36～13:48)

卵巣摘出ラットにおける内分泌攪乱化学物質の甲状腺増殖性病変に対する修飾作用

○高木 久宜、三森 国敏、小野寺 博志、安原 加壽雄、糺谷 高敏、  
広瀬 雅雄

国立衛研 病理

21WA-01-5 (13:48～14:00)

去勢成熟ラットを用いたアンドロゲン活性の評価

○片山 誠一、永井 賢司、平塚 秀明、佐藤 徹哉、前田 真希、

蒲生 ゆみ、飯塚 宏美

三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所

座長：武田 健（東京理科大学）  
永沼 章（東北大学）

21WA-02-1 (14:00～14:12)

去勢成熟ラットを用いた抗アンドロジェン活性の評価

○佐藤 徹哉、片山 誠一、永井 賢司、平塚 秀明、前田 真希、  
涌生 ゆみ、飯塚 宏美

三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所

21WA-02-2 (14:12～14:24)

ヒトエストロゲンレセプター $\alpha$ に対するインビトロ影響評価法 -ヒレスロイド  
剤を中心とした各種化学物質の検討I-

○斎藤 幸一<sup>1)</sup>、富ヶ原 祥隆<sup>1)2)</sup>、磯部 直彦<sup>1)</sup>、金子 秀雄<sup>1)</sup>、  
中塚 巖<sup>1)</sup>、西原 カ<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>住友化学工業 生物環境科学研究所、<sup>2)</sup>大阪大学薬学部

21WA-02-3 (14:24～14:36)

ヒトプロゲステロンレセプターに対するインビトロ影響評価法 -ヒレスロイド  
剤を中心とした各種化学物質の検討II-

○住田 佳代、斎藤 幸一、磯部 直彦、金子 秀雄、中塚 巖

住友化学工業 生物環境科学研究所

21WA-02-4 (14:36～14:48)

経口投与した 2,2-ビス(4-ヒドロキシフェニル)プロパン(ビスフェノール A)  
の妊娠ラットにおける吸収分布動態および胎仔への移行性

○高橋 省、大石 真之

都立衛生研究所 毒性部薬理研究科

21WA-02-5 (14:48～15:00)

内分泌かく乱物質トリクロロベンゼンのラット培養胎児への影響

○横山 篤、秋田 正治

鎌倉女子大学家政学部

座長：前川 昭彦（佐々木研究所）  
奈良間 功（摂南大学）

21WA-03-1 (15:00～15:12)

TCDD の胎児期・授乳期曝露が雄ラットにおよぼす影響

○米元 純三、曾根 秀子、大迫 誠一郎<sup>1)</sup>、西村 典子<sup>1)</sup>、野原 恵子<sup>1)</sup>、  
藤巻 秀和<sup>1)</sup>、牛尾 博子<sup>1)</sup>、宮原 裕一<sup>1)</sup>、青木 康展<sup>1)</sup>、

石塚 真由美<sup>1)</sup>、N.R. Jana、S. Sarkar、遠山 千春<sup>1)</sup>

国立環境研究所 地域環境研究グループ、<sup>1)</sup>国立環境研究所 環境健康部

21WA-03-2 (15:12~15:24)

極めて低濃度のダイオキシン類によるラット精巣細胞の分子シャペロンHSP70、HSP90 および Hop の誘導

福田 重弥子、黒木 能一、田崎 健二、石田 卓巳、石井 祐次、  
○小栗 一太  
九州大学薬学部

21WA-03-3 (15:24~15:36)

Norharman と aniline との共存下に生成する新規変異原物質、aminophenylnorharman の F344 ラットに対する精巣毒性

○戸塚 ゆ加里、川森 俊人、石原 純子、三森 国敏<sup>1)</sup>、久田 茂<sup>2)</sup>、  
杉村 隆、若林 敬二  
国立がんセンター研究所 がん予防、<sup>1)</sup>国立衛研 病理、  
<sup>2)</sup>帝国臓器製薬 安全性

21WA-03-4 (15:36~15:48)

28 日間反復投与試験によるノニルフェノールおよびアトラジンのラット雌性生殖器官に対する影響の検討

○麻生 直、穴井 真紀子、野田 修志、今田中 伸哉、山崎 寛治、  
前川 昭彦<sup>1)</sup>  
化学品検査協会 安全性評価技術研究所、<sup>1)</sup>佐々木研究所 病理

座長：横山 篤（鎌倉女子大学）  
吉岡 忠夫（北海道薬科大学）

21WA-03-5 (15:48~16:00)

*p-tert*-Octylphenol の新生仔期曝露による雌ラット生殖器官への影響

○勝田 真一、吉田 緑、黒田 博之、安藤 進、高橋 正一、  
渡辺 元<sup>1)</sup>、田谷 一善<sup>1)</sup>、前川 昭彦  
佐々木研究所 病理、<sup>1)</sup>東京農工大学農学部 獣医学科家畜生理

21WA-04-1 (16:00~16:12)

*p-tert*-Octylphenol の新生児期曝露が雄ラットの生殖器官系に与える影響

○吉田 緑、勝田 真一、黒田 博之、安藤 進、高橋 正一、  
渡辺 元<sup>1)</sup>、田谷 一善<sup>1)</sup>、前川 昭彦  
佐々木研究所 病理、<sup>1)</sup>東京農工大学農学部 獣医学科家畜生理

21WA-04-2 (16:12~16:24)

モルモット NAD(P)H: quinone oxidoreductase<sub>1</sub>(NQO<sub>1</sub>)遺伝子の発現制御機構

○伊藤 圭輔、高橋 芳樹、北川 学、鎌滝 哲也  
北海道大学薬学部 代謝分析

21WA-04-3 (16.24~16.36)

海洋汚染マーカーとしての野生アザラシ肝チトクローム P450 の有用性の検討

○千葉 一成、榎原 章仁<sup>1)</sup>、岩田 久人、田辺 信介<sup>1)</sup>、数坂 昭夫、  
藤田 正一

北海道大学獣医学部 環境獣医科学毒性、<sup>1)</sup>愛媛大学農学部 環境保全



# 一般講演

## 血液毒性

会場：B会場（2F左）

日時：7月21日（水）9:00～10:48

座長：須賀 哲弥（東京薬科大学）  
平藤 雅彦（北海道医療大学）

### 21B-09-1 (9:00～9:12)

ドライケミストリー法による実験動物の血液生化学検査の基礎検討

○佐藤 雅之、小川 真由美、原 静華、黒沢 亨、仲由 武貴  
明治製菓 安全性研究所

### 21B-09-2 (9:12～9:24)

攪拌による赤血球脆弱性検査の試み -クロフィブラート投与ラットでの検討-

○真鍋 由恵、近藤 泰史、箱井 加津男、林 泰司、松本 清司<sup>1)</sup>  
大鵬薬品工業 安全性研究所、<sup>1)</sup>信州大学医学部 附属動物実験施設

### 21B-09-3 (9:24～9:36)

フローサイトメーター(EPICS XL)を用いた網状赤血球測定に関する基礎検討  
-溶血性貧血モデル動物血を用いたフローサイトメーター法と従来法との比較-

○三浦 大志郎、小林 充、飯島 剛、尾形 昭子、山名 慶、  
古川 純子、小池 行也、宇野 洋  
帝人 医薬開発研究所安全性研究部

### 21B-09-4 (9:36～9:48)

毒性試験系としてのイヌ造血前駆細胞コロニー形成法の検討

○高松 一彦、若田 明裕、廣田 里香  
山之内製薬 安全性研究所

### 21B-09-5 (9:48～10:00)

摂餌量減少と関連した血液学的パラメーターならびに尿検査値の変動についての検討

○井口 綾子、林 裕、西 直樹、沢多 美和、松井 明子、飯野 由香、  
木ノ本 寿子、白石 裕美子、米良 幸典  
ゼリア新薬工業 中央研究所開発研究部

座長：松本 清司（信州大学）  
若田 明裕（山之内製薬）

21B-10-1 (10:00~10:12)

ホウ素化合物のラット造血器およびリンパ系器官を標的とした毒性

○田村 啓、渋谷 淳、豊田 和弘、畝山 智香子、高橋 道人、  
広瀬 雅雄

国立衛研 病理

21B-10-2 (10:12~10:24)

妊娠ラットへのフェニトイン投与が出生児の血液凝固系に及ぼす影響

○小島 夏樹、井本 秀樹、阿部 毅、武藤 秀樹、亀岡 美幸、飯田 茂、  
山本 光雄、納屋 聖人

協和発酵工業 安全性研究所

21B-10-3 (10:24~10:36)

化学療法剤投与ウサギにおける造血抑制作用の血液学的および血液化学的検討

○小林 充、三浦 大志郎、尾形 昭子、城之内 公子、角谷 祐子、  
飯島 剛、小池 行也、宇野 洋

帝人 医薬開発研究所安全性研究部

21B-10-4 (10:36~10:48)

Benzene hemopoietic toxicity revisited -a new concept

○B.I. Yoon, Y. Hirabayashi, Y. Kawasaki, Y. Kodama, T. Kaneko,  
J. Kanno, Y. Matsuhima, T. Umemura, O. Uchida, Y. Kurokawa, T. Inoue  
Biol. Safety Res. Center, NIHS

## 循環器毒性

会場：B会場（2F左）

日時：7月21日（水）10:48～12:00

座長：菅野 盛夫（北海道大学）

鬼頭 剛（新日本科学）

### 21B-10-5 (10:48～11:00)

ラット毒性試験で認められた症状の原因の検討

○尾崎 秀次、服部 淳二、柴崎 義明、黒沢 亨、仲由 武貴  
明治製菓 安全性研究所

### 21B-11-1 (11:00～11:12)

器官培養血管組織に対する抗癌剤 doxorubicin の毒性発現

村田 幸久、○尾崎 博、山脇 英之、堀 正敏、佐藤 晃一、  
唐木 英明  
東京大学農学部 獣医薬理

### 21B-11-2 (11:12～11:24)

イヌおよびカニクイザルにおける polysorbate 80 の循環動態および血中ヒスタミン濃度に及ぼす影響

○佐々木 篤志、藤原 淳、海上 智、飯塚 宏美  
三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所

### 21B-11-3 (11:24～11:36)

テレメトリーシステムを用いたサルの上肢の生理学的、薬理学的研究（II）正常血圧サルと腎性高血圧サルの概日リズム

○亀之園 剛、浜田 大治、福崎 好一郎、永田 良一、鬼頭 剛  
新日本科学 安全性研究所第一研究部

### 21B-11-4 (11:36～11:48)

テレメトリーシステムを用いたサルの上肢の生理学的、薬理学的研究（III）安全性薬理試験への応用

○鬼頭 剛、亀之園 剛、阿久根 淳、福崎 好一郎、永田 良一  
新日本科学 安全性研究所第一研究部

### 21B-11-5 (11:48～12:00)

カンデサルタン・シレキセチル(TCV-116)とジゴキシンの併用による重篤な不整脈誘発の可能性 -シレキセチル側鎖の代謝物シクロヘキサジオールとの相互作用-

○奥西 秀樹  
島根医科大学 薬理

変異原性

会場：C会場（2F 中央）

日時：7月21日（水）9:00～10:00

座長：若林 敬二（国立がんセンター）

造谷 徹（食品薬品安全センター）

21C-09-1 (9:00～9:12)

マウス始原生殖細胞の ENU による apoptosis と突然変異の誘発

○造谷 徹、鹿嶋 崇幸、斎藤 義明、長尾 哲二、今井 清

食品薬品安全センター 秦野研究所

21C-09-2 (9:12～9:24)

エタノール投与によるマウス *in vivo* DNA 損傷の多臓器 SCG 法による検出

○木戸 亮子、津田 修治、松坂 尚典、佐々木 有<sup>1)</sup>

岩手大学、<sup>1)</sup>八戸工業高等専門学校

21C-09-3 (9:24～9:36)

再生肝を用いる小核試験

○野口 忠、鈴木 正明、松島 泰次郎

日本バイオアッセイ研究センター

21C-09-4 (9:36～9:48)

*In vivo* 皮膚小核試験法の開発

○西川 貴史、晴佐久 満、足立 邦明、増田 光輝、林 真<sup>1)</sup>

ライオン 研究開発本部、<sup>1)</sup>国立衛研 変異遺伝

21C-09-5 (9:48～10:00)

1-β-D-Arabinofuranosylcytosine(Ara-C)のラット小核試験 -小核試験の一般毒性試験への統合の可能性-

○並木 千晶、清本 和子、橋本 敦、石塚 修司、荃田 憲一、

浜田 修一

エスエス製薬 中央研究所

がん原性・発がん性

会場：C会場（2F中央）

日時：7月21日（水）10:00～11:24

座長：渡辺 民朗（岩手県立大学）

広瀬 雅雄（国立衛研）

21C-10-1 (10:00～10:12)

Inducible nitric oxide synthase mRNA is upregulated in skin tumors of v-Ha-ras transgenic TG-AC mice treated with benzo(a)pyrene or 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate.

○Byung Mu Lee, Raymond W. Tennant

Div. Toxicol., Coll. Pharm., Sungkyunkwan Univ.

21C-10-2(10:12～10:24)

Tg-rasH2 マウスを用いた短期がん原性試験による Diethylstilbestrol(DES)と *N*-methyl-*N*-nitrosourea(MNU)のがん原性の検索

○務台 衛、佐野 文子、日下部 愛泉、小林 潔、後藤 和広、佐藤 実、杉本 次郎

三菱化学 横浜総合研究所安全性研究所

21C-10-3 (10:24～10:36)

p53 ヘテロ欠損 CBA マウスにおける発がん感受性

○小野寺 博志、三森 国敏、高木 久宜、安原 加壽雄、広瀬 雅雄  
国立衛研 病理

21C-10-4 (10:36～10:48)

抗酸化剤と亜硝酸の併用投与によるラット前胃への影響

○宮内 慎、西川 秋佳、古川 文夫、中村 英明、広瀬 雅雄  
国立衛研 病理

21C-10-5 (10:48～11:00)

タモキシフェンのラット中期肝発がん性試験法を用いた肝発がん性の検討

○佐野 真士<sup>1,2)</sup>、玉野 静光<sup>1)</sup>、萩原 昭裕<sup>1)</sup>、河部 真弓<sup>1)</sup>、  
田中 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>名古屋市立大学医学部 第一病理

21C-11-1 (11:00～11:12)

チオウレアと大量のビタミン A 同時投与ラットにおける甲状腺腫瘍誘発増強メカニズムに関する研究：甲状腺ホルモン合成系への影響

○竹川 潔、井上 五子、奥田 孝二、河下 伸、上村 裕洋、  
高木 司郎、永岡 隆晴、酒盛 政光、竹内 正紀、三森 国敏<sup>1)</sup>

吉富製薬 安全性研究所、<sup>1)</sup>国立衛研 病理

21C-11-2 (11:12~11:24)

ラットにおける xylazine の鼻腔発癌修飾作用

○安原 加壽雄、三森 国敏、小林 裕子<sup>1)</sup>、梶谷 高敏、小野寺 博志、  
高木 久宜、広瀬 雅雄  
国立衛研 病理、<sup>1)</sup>日本植物防疫協会

## 毒性試験法

会場：B会場（2F左）

日時：7月21日（水）13:00～16:36

座長：赤堀 文昭（麻布大学）

小野 宏（食品薬品安全センター）

### 21B-01-1 (13:00～13:12)

一般毒性試験における統計手法とその結果の適切な記述

○浜田 知久馬

東京大学医学部 薬剤疫学

### 21B-01-2 (13:12～13:24)

Effective design and planning of toxicology studies to improve selection of new drug candidates

○Colin Brown

General and Acute Toxicol., Inveresk Res.

### 21B-01-3 (13:24～13:36)

モルモットにおける 8-メトキシソラレンの経口投与による光毒性試験法の検討

○土井 久子、永井 博文、杉本 武志、大島 洋次郎、土井 孝良

武田薬品工業 薬剤安全性研究所

### 21B-01-4 (13:36～13:48)

痛み関連電位により痛み評価法の検討

○中山 直樹、佐々木 正治、八木 久美子、栗原 明義、中村 勇、  
木村 正明

大正製薬 開発研究所安全性研究室

### 21B-01-5 (13:48～14:00)

ビーグル犬における電気生理学的聴覚機能検査法の検討（蝸牛マイクロフォン電位、聴神経複合活動電位および聴性中潜時反応）

○谷本 憲昭、尾崎 潤一郎、久世 博

田辺製薬 安全性研究所

### 21B-02-1 (14:00～14:12)

ドレイズ眼刺激性試験にて評価できない微弱な角膜障害と *in vitro* 細胞毒性の関係

○小島 肇夫、赤座 誠文、堅田 友則、小西 宏明

日本メナード化粧品 総合研究所

座長：津田 修治（岩手大学）  
佐藤 秀蔵（武田薬品）

21B-02-2 (14:12～14:24)

テレメトリーシステムによる消化管運動の測定

○木村 恵人、佐治 大介、美濃部 典子、古川 茂典、石井 権二、  
鈴木 潤、西森 司雄  
環境バイリス研究所

21B-02-3 (14:24～14:36)

一般薬理試験から臨床における消化器系の副作用の予測をするためには腸管輸送能だけでなく胃排出能の検討も必要である

○高木 親、安東 賢太郎、高科 庸子、奥脇 浩子、井上 裕章  
三菱化学 横浜総合研究所安全性研究所

21B-02-4 (14:36～14:48)

アドリアマイシンのラット精子形成に対する影響のフローサイトメトリーによる解析

○飯田 茂、小島 夏樹、納屋 聖人  
協和発酵工業 安全性研究所

21B-02-5 (14:48～15:00)

実験的粘膜損傷犬における血清 C 反応性蛋白濃度の変動

○岩井 久和、望月 健光、加藤 達真、水野 幸恵、田川 義章、  
古田 禎之<sup>1)</sup>、田畑 伸幸<sup>2)</sup>  
三和化学研究所 安全性研究所、<sup>1)</sup>三和化学研究所 製薬研究所、  
<sup>2)</sup>三和化学研究所 試薬

座長：野村 護（第一製薬）  
降矢 強（国立衛研）

21B-03-1 (15:00～15:12)

マウスにおける血中 1, 5-アンヒドログルシトール、フルクトサミンおよびヘモグロビン A1c の診断学的有用性について

○久保 道江、田畑 肇、堺 俊治、鈴木 弘、松澤 利明、  
仮家 公夫<sup>1)</sup>  
山之内製薬 安全性研究所、<sup>1)</sup>神戸学院大学薬学部

21B-03-2 (15:12～15:24)

血中コレステロール／トリグリセライド分画解析技術のマウスへの応用

○川鍋 剛、田畑 肇<sup>1)</sup>、久保 道江<sup>1)</sup>、堺 俊治<sup>1)</sup>、宮下 真一  
ヘレナ研究所、<sup>1)</sup>山之内製薬 安全性研究所



21B-03-3 (15:24~15:36)

ウサギ耳介静脈への持続注入による輸液の血管刺激性試験法

○今井 直人、柴田 博、酢田 照男、柏原 純一、入江 弘之、  
池田 陽一、安藤 信明、川端 好之康、阿部 俊一  
吉富製薬 開発研究所安全性研究部

21B-03-4 (15:36~15:48)

ミニプタを用いた経皮反復投与毒性試験の試み -ビタミンD誘導体の投与経験-

○千葉 修一、松下 智哉、小田部 耕二、伊藤 恒夫、浅野 忠、  
石谷 祥彦<sup>1)</sup>、徳田 和夫<sup>1)</sup>、高田 昌太郎<sup>1)</sup>、山本 利憲<sup>1)</sup>、  
常井 和男<sup>2)</sup>、片桐 公一<sup>2)</sup>、馬宮 洋治<sup>2)</sup>  
中外製薬 安全性研究所、<sup>1)</sup>中外製薬 薬物動態研究所、  
<sup>2)</sup>CSK リサーチパーク

座長：増田 裕 (三共)  
南 正康 (日本医科大学)

21B-03-5 (15:48~16:00)

ミニプタを用いた経皮反復投与毒性試験の試み -実験手技について-

○馬宮 洋治、片桐 公一、堤 秀樹、田辺 博、山口 栄、  
常井 和男、千葉 修一<sup>1)</sup>、松下 智哉<sup>1)</sup>、浅野 忠<sup>1)</sup>、石谷 祥彦<sup>1)</sup>、  
谷川 学  
CSK リサーチパーク、<sup>1)</sup>中外製薬

21B-04-1 (16:00~16:12)

ラット 28 日間反復投与試験法"OECD Guideline 407 enhanced"確立のための  
Flutamide を用いた予備的検討

○豊田 和弘、渋谷 淳、田村 啓、靴谷 高敏、欽山 智香子、  
広瀬 雅雄  
国立衛研 安全性生物試験研究センター病理

21B-04-2 (16:12~16:24)

カニクイザルを用いた長期間持続インフュージョンの事例 -第2報

○角崎 英志、福崎 好一郎、前田 博、鬼頭 剛、宮崎 宏彰  
新日本科学 安全性研究所

21B-04-3 (16:24~16:36)

Ethinyl estradiol の uterotrophic assay における投与経路、投与期間及び再現性  
の検討

○野田 修志、佐藤 正邦、室井 貴子、山崎 寛治  
化学品検査協会 安全性評価技術研究所

## 異物代謝

会場：C会場（2F中央）

日時：7月21日（水）13:00～16:36

座長：数坂 昭夫（北海道大学）

有吉 範高（北海道大学）

### 21C-01-1 (13:00～13:12)

河川水中より単離された変異原物質 PBTA-1 および PBTA-2 のヒト薬物代謝酵素による代謝的活性化

○山崎 義征、藤田 健一、中山 佳都夫、若林 敬二<sup>1)</sup>、鎌滝 哲也  
北海道大学薬学部 代謝分析、<sup>1)</sup>国立がんセンター研究所 がん予防

### 21C-01-2 (13:12～13:24)

CYP2A6 遺伝的多型と肺がんリスクとの関連

○宮本 昌美、梅津 有理、秋田 弘俊<sup>1)</sup>、澤村 祐一<sup>2)</sup>、横田 淳<sup>3)</sup>、  
國頭 英夫<sup>4)</sup>、根本 信雄<sup>5)</sup>、有吉 範高、鎌滝 哲也  
北海道大学薬学部 代謝分析、<sup>1)</sup>北海道大学医学部 第一内科、  
<sup>2)</sup>円山クリニック、<sup>3)</sup>国立がんセンター研究所、  
<sup>4)</sup>国立がんセンター 中央病院、<sup>5)</sup>富山医科薬科大学薬学部

### 21C-01-3 (13:24～13:36)

ヒトフェノール硫酸転移酵素、アリルアミン *N*-アセチル転移酵素の遺伝子多型と尿路上皮癌感受性

○小澤 正吾、加藤 貴彦<sup>1)</sup>、福富 久人<sup>2)</sup>、松本 哲朗<sup>2)</sup>、  
大野 泰雄  
国立衛研 薬理、<sup>1)</sup>産業医科大学 保健情報、<sup>2)</sup>産業医科大学 泌尿器科

### 21C-01-4 (13:36～13:48)

4-Hydroxy-2(*E*)-nonenal エナンチオマー：(*S*)-エナンチオマー選択的な  
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase の不活性化とラット glutathione  
S-transferase A4-4 による解毒

○平塚 明、広瀬 健一郎、渡部 烈  
東京薬科大学薬学部 第二衛生化学

### 21C-01-5 (13:48～14:00)

ヒト dihydropyrimidine dehydrogenase の 5-(2-bromovinyl)uracil による自殺阻害  
機構

○西山 貴仁、小倉 健一郎、須田 一真、渡部 烈  
東京薬科大学薬学部 第二衛生化学

21C-02-1 (14:00~14:12)

雄性 Nts:Mini ラットの肝薬物代謝酵素：Cytochrome P450s および flavin-containing monooxygenase 1(FMO1)

○谷 吉朗<sup>1)</sup>、山本 秀樹<sup>2)</sup>、川地 晶子<sup>3)</sup>、水野 初枝<sup>1)</sup>、  
福重 潤一郎<sup>1)</sup>、細川 常通<sup>1)</sup>、土井 邦雄<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>三共 安全性研究所、<sup>2)</sup>東京大学農学部 獣医病理、

<sup>3)</sup>摂南大学薬学部 毒性

座長：小澤 正吾（国立衛研）

藤田 健一（北海道大学）

21C-02-2 (14:12~14:24)

ラット単離肝細胞における MPTP の代謝および肝細胞毒性 -解毒酵素としてのアルデヒド酸化酵素の意義について-

○吉原 新一、原田 敬輔、太田 茂  
広島大学医学部 総合薬学

21C-02-3 (14:24~14:36)

Crj:CD(SD)IGS ラットと Crj:CD(SD)ラットにおける薬物代謝酵素の比較

○笠間 菊子、田中 あづさ、小島 幸一  
食品薬品安全センター 薬野研究所

21C-02-4 (14:36~14:48)

CB6F1-TgrasH2 マウスにおける肝薬物代謝酵素の検討

○関戸 徹、勝谷 成男、青木 豊彦、佐神 文郎  
エーザイ 開発安全性研究部

21C-02-5 (14:48~15:00)

イヌの肝臓および消化管における P450(CYP2B11, CYP3A12)の局在

○丸山 敏之、渡邊 弘、松井 信志、馬場 隆彦、三好 貴子、  
星元 満里子、大野 浩司  
塩野義製薬 新薬研究所

21C-03-1 (15:00~15:12)

ラット小腸における酸化薬物代謝活性に関する基礎検討 (1) Testosterone hydroxylase 活性の性差、加齢性変化

○若林 美津子、京川 吉正、原内 敏夫、大野 浩司  
塩野義製薬 新薬研究所

21C-03-2 (15:12~15:24)

ラット小腸における酸化薬物代謝活性に関する基礎検討 (2) Testosterone hydroxylase 活性に及ぼす各種誘導剤の影響

○大野 浩司、若林 美津子、京川 吉正、原内 敏夫  
塩野義製薬 新薬研究所

座長：横井 毅（金沢大学）  
中山 佳都夫（北海道大学）

21C-03-3 (15:24~15:36)

ジフェニルの BDF<sub>1</sub> マウス肝薬物代謝酵素系に及ぼす影響  
○籾内 桃子、宮島 敦子、小澤 正吾、大野 泰雄  
国立衛研 安全性生物試験研究センター薬理

21C-03-4 (15:36~15:48)

2-Mercaptobenzimidazole(MB1)およびそのメチル誘導体のラット肝薬物代謝酵素系に及ぼす影響について  
○宮島 敦子、籾内 桃子、引間 知広、酒見 和枝、津田 充有、  
大野 泰雄  
国立衛研 安全性生物試験研究センター薬理

21C-03-5 (15:48~16:00)

Effects of benzothiazole on the xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of acetaminophen  
Kyung Won Seo, Mijung Park, Jun Gyou Kim, Tae Wan Kim,  
○Se Young Choung<sup>1)</sup>, Hyo Jung Kim, Jooil Kim  
Natl. Inst. Toxicol. Res., KFDA, <sup>1)</sup>Coll. Pharm., Kyunghee Univ.

21C-04-1 (16:00~16:12)

変異原・がん原物質を代謝的に活性化するヒト P450 分子種の活性の緑茶カテキン類による阻害  
○武藤 重治、藤田 健一、山崎 義征、鎌滝 哲也  
北海道大学薬学部 代謝分析

21C-04-2 (16:12~16:24)

3-Methylcholanthrene(3MC) あるいは  $\beta$ -naphthoflavone(BNF) 処置による CYP1A1/2 および aryl hydrocarbon receptor(AhR)の肝小葉内局在の変化  
○五十嵐 功、渡辺 稔之、田中 宏治、瀬畑 信哉、牧野 俊彦、  
渡辺 真弓、大橋 芳彦、高岡 雅哉、真鍋 淳  
三共 安全性研究所

21C-04-3 (16:24~16:36)

*In vitro* 代謝試験に基づくヒト *in vivo* 薬物肝代謝能の定量的予測は可能か？：  
Cytochrome P450 が関与する薬物代謝に関する検討  
○中島 由起子、伊藤 清美<sup>1)</sup>、島田 典招<sup>2)</sup>、C.E.Green<sup>3)</sup>、C.A.Tyson<sup>3)</sup>、  
杉山 雄一  
東京大学薬学部 製剤設計、<sup>1)</sup>北里大学薬学部、<sup>2)</sup>第一化学薬品、  
<sup>3)</sup>SRI International

## 腎毒性

会場：D会場（2F 右）

日時：7月21日（水）13:00～14:36

座長：玄番 宗一（大阪薬科大学）

金井 好亮（杏林大学）

21D-01-1 (13:00～13:12)

*In vitro* 腎毒性評価系有用性検討と HTS(high throughput screening)への応用

○堀場 直、田保 充康、熊野 英一、新倉 博文、出来 俊昭

中外製薬 安全性研究所

21D-01-2 (13:12～13:24)

ラットおよびイヌ尿中蛋白の銀コロイド染色によるセルロースアセテート膜電気泳動法の基礎検討

○豊田 直人、池田 和子<sup>1)</sup>、川鍋 剛<sup>2)</sup>、松村 由美<sup>3)</sup>、丸山 潔<sup>4)</sup>、

望月 文敏<sup>5)</sup>

三菱科学安全科学研究所 鹿島研究所、<sup>1)</sup>昭和電工、<sup>2)</sup>ヘレナ研究所、

<sup>3)</sup>マルホ、<sup>4)</sup>科研製薬、<sup>5)</sup>旭化成

21D-01-3 (13:24～13:36)

シスプラチン投与ラットにおける早期腎障害の形態的特徴 -改良タンニン酸・鉄染色法の有用性-

○松井 信志、丸山 敏之、朝野 由美、岡田 学、渡邊 弘

塩野義製薬 新薬研究所安全性研究部門

21D-01-4 (13:36～13:48)

Streptozotocin(STZ)誘発による実験的糖尿病性腎症モデル

○菊森 幹人、矢野 昌彦、左近上 博司、守永 太賀彦、六角 香、

古川 茂典、鈴木 潤、西森 司雄

環境バイリス研究所

座長：姫野 誠一郎（北里大学）

渡辺 満利（持田製薬）

21D-01-5 (13:48～14:00)

慢性腎不全モデルラットにおけるシクロオキシゲナーゼ2の発現増加

○熊野 英一、堀場 直、渡邊 剛、勝山 清加、新倉 博文、

出来 俊昭、

中外製薬 安全性研究所

21D-02-1 (14:00～14:12)

NSAIDsの腎血流量減少作用におけるCOX-2阻害の関与

○田保 充康、堀場 直、新倉 博文、出来 俊昭

中外製薬 安全性研究所

21D-02-2 (14:12~14:24)

アニオン性物質による腎毒性発現における organic anion transporter 1(OAT1)の  
関与

○関根 孝司、武田 理夫、津田 実、車 碩範、于 爾康、金 徒慶、  
金井 好克、遠藤 仁  
杏林大学医学部 薬理

21D-02-3 (14:24~14:36)

受容体型チロシキナーゼの活性化は腎細胞におけるフリーラジカル障害  
を軽減する

○幸田 祐佳、玄番 宗一  
大阪薬科大学 薬理

一般毒性

会場：D会場（2F 右）

日時：7月21日（水）14:36～17:00

座長：鈴木 勝士（日本獣医畜産大学）  
富樫 広子（北海道大学）

21D-02-4 (14:36～14:48)

Crj:CD(SD)IGS ラットの一般毒性試験背景データ I

田中 あづさ、○渡辺 千朗、千坂 亜希子、畔上 二郎、吉村 愼介、  
小島 幸一

食品薬品安全センター 秦野研究所

21D-02-5 (14:48～15:00)

Crj:CD(SD)IGS ラットの一般毒性試験背景データ II

○古谷 真美、安達 智子、田中 あづさ、関 剛幸、加藤 博康、  
小島 幸一

食品薬品安全センター 秦野研究所

21D-03-1 (15:00～15:12)

Cyclophosphamide を 26 週間及び 5 週間投与した CB6F1-Tg-rasH2 マウス及び  
同腹非遺伝子導入マウスにおける毒性発現の差に関する検討(1)一般毒性

○久田 茂、佐藤 敦子、永嶋 雅子、谷藤 久人、柴田 誠司、  
磯部 充威、森本 秀樹、日居 敏仁<sup>1)</sup>

帝国臓器製薬 安全性研究部、<sup>1)</sup>実験動物中央研究所

21D-03-2 (15:12～15:24)

コウジ酸のラット甲状腺機能に及ぼす作用機構

○比嘉 良喬、大久保 惇、北島 俊一<sup>1)</sup>、森安 眞津子<sup>2)</sup>、仮家 公夫<sup>3)</sup>  
三省製薬 開発本部、<sup>1)</sup>バナファーム ラボラトリーズ、

<sup>2)</sup>神戸学院大学薬学部

座長：仮家 公夫（神戸学院大学）  
佐神 文郎（エーザイ）

21D-03-3 (15:24～15:36)

TNF- $\alpha$ ラット下垂体 -甲状腺系に及ぼす影響

○三井 雄史、原田 剛、橋場 雅道、宮内 慎、尾畑 賢臣  
持田製薬 総合研究所安全性研究室

21D-03-4 (15:36～15:48)

ジョサマイシンによる WBN/kob ラット肺炎発生の抑制

○古川 文夫、西川 秋佳、宮内 慎、中村 英明、笠原 健一郎、  
広瀬 雅雄

国立衛研 病理

21D-03-5 (15:48~16:00)

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損水制限、  
フロセミド、BSO、BHA の抑制効果

○原田 智子、高場 克己、原 卓司、石井 昭男

協和発酵工業 安全性研究所

21D-04-1 (16:00~16:12)

カドミウム反復静脈内投与により卵巣摘出カニクイザルに発現した骨病変の定量的解析

○河裾 健志、倉田 祥正<sup>1)</sup>、土居 卓也、平塚 秀明、勝田 修、土谷 稔、  
梅村 孝司<sup>1)</sup>

三菱化学安全科学研究所、<sup>1)</sup>北海道大学獣医学部 比較病理

座長：長尾 拓（東京大学）

若狭 芳男（イナリサーチ）

21D-04-2 (16:12~16:24)

皮下投与によるヒスタミン遊離作用の動物種差の検討

○坂東 富美、渋谷 幸代、黒沢 亨、神藤 康弘、仲由 武貴

明治製菓 安全性研究所

21D-04-3 (16:24~16:36)

カニクイザルを用いた骨粗鬆症モデルの検討(14) -pQCT を用いた大腿骨頭部骨密度の測定

○賀来 直人、角崎 英志、鶴田 恵三、福崎 好一郎、宮崎 宏彰

新日本科学 安全性研究所

21D-04-4 (16:36~16:48)

カニクイザルを用いた反復投与試験における副腎機能の検討

○赤松 博、渡辺 深、林 裕、福崎 好一郎<sup>1)</sup>、宮崎 宏彰<sup>1)</sup>、

笹野 公伸<sup>2)</sup>、西川 哲男<sup>3)</sup>

富士レビオ 医薬研究所、<sup>1)</sup>新日本科学 安全性研究所、<sup>2)</sup>東北大学医学部、  
<sup>3)</sup>横浜労災病院内科

21D-04-5 (16:48~17:00)

L-dopa と脱炭酸酵素阻害剤の長期併用投与によるイヌの雄性生殖器系臓器及びリンパ節への影響

○川島 明、猪又 晃、小林 和子、堀井 郁夫

日本ロシュ研究所 前臨床科学研究部



生殖・発生・胎仔毒性

会場：A会場（3F中央）

日時：7月22日（木）9:00～12:00

座長：川島 邦夫（国立衛研）

栗田 則男（鐘紡）

22A-09-1(9:00～9:12)

MTT 法および SQA 法を併用した 2-ブロモプロパンの精子毒性試験の検討

○大谷 勝己、田井 鉄男、宮川 宗之

労働省産業医学総合研究所

22A-09-2 (9:12～9:24)

Trimethyl Phosphate の 5 日間連続投与が精子運動能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 1-

○福西 克弘、寺岡 美枝、栗田 則男

鐘紡 薬品総合研究開発センター薬品研究所

22A-09-3 (9:24～9:36)

Nitrobenzene(NB)を投与したラット精子の flow cytometry(FCM)による解析

○山本 敏誠、山本 美津雄、河下 伸、米山 充、今西 雅典、

竹内 正紀

吉富製薬 研究本部九州安全性研究所

22A-09-4 (9:36～9:48)

Phenobarbital 奇形誘起に対する Crj:CD (SD)系 IGS ラットの反応性と系統差

○船橋 斉、椛本 健次、立石 湯美、千原 和弘、松岡 信男

大日本製薬 開発研究所

22A-09-5 (9:48～10:00)

ラットにおけるニトロフラソンの精巣毒性に関する検討

○伊藤 今日子、佐々木 智、吉田 康介、岡宮 英明、花田 貴宣、

堺 俊治

山之内製薬 安全性研究所

座長：植松 孝悦（北海道薬科大学）

伊原 敏夫（新日本科学）

22A-10-1 (10:00～10:12)

5-FU の雄生殖毒性における内分泌学的評価

○滝沢 節子、松本 博隆、猪又 晃、堀井 郁夫

日本ロシュ研究所 前臨床科学研究部

22A-10-2 (10:12~10:24)

ハムスターテストによる雄の受胎能検査の Adriamycin 投与ラットを用いた検討

○藤井 咲子、菅 千里、和田 理穂、須永 昌男、中島 準子、  
高橋 智亜紀、古川 正敏、一花 次夫、川島 邦夫<sup>1)</sup>

化合物安全性研究所 安全性研究部門、<sup>1)</sup>国立衛研大阪支所 生物試験

22A-10-3 (10:24~10:36)

Dibromoacetic acid によるラット精巣および精巣上体の病理組織学的変化の  
2週間反復投与毒性試験による検出

○土屋 毅幸、佐野 文子、杉本 次郎、小林 深、大山 直樹、  
佐藤 実、務台 衛

三菱化学 横浜総合研究所安全性研究所

22A-10-4 (10:36~10:48)

4,6-Dinitro-o-cresol 投与ラット精巣上体精子における形態異常の発現

○高橋 研、菊田 雅行、青山 博昭、寺本 昭二

残留農業研究所 毒性第一部

22A-10-5 (10:48~11:00)

Ethinylestradiol のラット精巣上体への影響：精子運動の変化と雄性腺系の機能・  
形態との関係

○兼藤 稚子、金森 進、菱川 敦子、岸 倉次郎

塩野義製薬 新薬研究所

座長：中塚 敏夫（萬有製薬）

見上 孝（エーザイ）

22A-11-1 (11:00~11:12)

マウスおよびラットの卵巣機能に対する 2-Bromopropane の阻害効果

○関口 総一郎、浅野 伍郎<sup>1)</sup>、須田 恵、本間 健資

労働省産業医学総合研究所、<sup>1)</sup>日本医科大学

22A-11-2 (11:12~11:24)

体外におけるマウス卵子の減数分裂の進行と染色体数に及ぼす Griseofulvin の影  
響

○田中 亮太<sup>1)2)</sup>、笹浪 知宏<sup>2)</sup>、鳥山 優<sup>1)</sup>、森 誠<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>岐阜大学 連合農学研究所、<sup>2)</sup>食品農医薬品安全性評価センター、

<sup>3)</sup>静岡大学農学部

22A-11-3 (11:24~11:36)

妊娠初期ラットに投与した diphenyltin dichloride による胚致死作用

○江馬 眞、宮脇 英美子、原園 景、川島 邦夫

国立衛研大阪支所

22A-11-4 (11:36～11:48)

SD系ラットの胚・胎児死亡ならびに胎児体重に及ぼす子宮内の着床位置による影響

○稲若 邦文、中岡 政直、橋本 知春、成田 亜矢子、川村 聡  
住友化学工業 生物環境科学研究所

22A-11-5 (11:48～12:00)

ポリソルベート 80 のウサギ母動物、胎児に対する影響

○納屋 聖人、井本 秀樹、佐内 勇夫、武藤 秀樹、飯田 茂、  
小島 夏樹  
協和発酵工業 安全性研究所

神経毒性

会場：B会場（2F左）

日時：7月22日（木）9:00～11:48

座長：鍋島 俊隆（名古屋大学）

中木 敏夫（帝京大学）

22B-09-1 (9:00～9:12)

*In vitro* 神経毒性評価系としてのラット脳スフェロイド(SP)培養系の検討

○井上 智彰、堀井 郁夫

日本ロシュ研究所 前臨床科学研究部

22B-09-2 (9:12～9:24)

Functional observation and battery (FOB)及び神経病理学的検査による神経毒性の検討：paclitaxelのマウスにおける末梢神経毒性

○磯和 弘一、吉田 牧子、豊吉 亨、大洞 大典、今井 順、

溝石 三喜男、溝園 東治

日本生物化学センター 岐阜研究所

22B-09-3 (9:24～9:36)

Paclitaxelのマウス神経毒性誘発における投与スケジュールの影響

○三村 雄一、小川 哲郎、加藤 仁美、江口 勝也、中山 隆治

帝国臓器製薬 安全性研究部

22B-09-4 (9:36～9:48)

B6C3F1 マウスにおける加齢性末梢神経病変について

○田畑 肇、池上 仁、北村 和夫、久保 道江、伊藤 今日子、

小林 孝一、堺 俊治、飯家 公夫<sup>1)</sup>

山之内製薬 安全性研究所、<sup>1)</sup>神戸学院大学薬学部

22B-09-5 (9:48～10:00)

アクリルアミドにより誘発されるラット末梢神経障害の経時的変化

○奥山 学、市川 一仁、熊澤 俊彦、山野 昌也、村上 和生、

朝枝 伸幸

三和化学研究所 安全性研究所

座長：山本 郁男（北陸大学）

吉岡 充弘（北海道薬科大学）

22B-10-1 (10:00～10:12)

トリオルトトリル燐酸1回投与ウズラのコリンエステラーゼ活性の推移

○木根淵 英雄、秋丸 国広

高知医科大学 衛生

22B-10-2 (10:12~10:24)

脳内アセチルコリン遊離とムスカリン受容体に対するトルエンの影響

○本間 健資、津賀 浩史、須田 恵

労働省産業医学総合研究所 健康障害予防研究部

22B-10-3 (10:24~10:36)

アジュバント関節炎ラット青斑核におけるモルヒネ退薬時の興奮性アミノ酸の遊離

○星 勝治、石突 諭、山本 敦子、藤平 栄一、市原 和夫

北海道薬科大学 薬理

22B-10-4 (10:36~10:48)

Cyclic AMP responsive element binding protein binding protein (CBP)変異マウスを用いたモルヒネ依存の形成メカニズムの解析

○鍋島 俊陸、野田 幸裕、間宮 隆吉、宮本 嘉明、山田 清文、尾池 雄一<sup>1)</sup>、山村 研一

名古屋大学医学部 医療薬学付属病院薬剤部、

<sup>1)</sup>熊本大学医学部 付属遺伝発生研究施設

22B-10-5 (10:48~11:00)

内因性ドバミン神経毒 norsalsolinol は PC12 細胞のドバミン分泌を抑制する

○丸山 豊、鈴木 裕子、寺岡 宏樹<sup>1)</sup>、岩田 久人、数坂 昭夫、藤田 正一

北海道大学獣医学部 毒性、<sup>1)</sup>酪農学園大学獣医学部 毒性

座長：南 勝（北海道医療大学）

星 勝治（北海道薬科大学）

22B-11-1 (11:00~11:12)

除草剤バスタの有効成分グルホシネートアンモニウムによる NMDA 受容体の活性化

○中木 敏夫、三嶋 晃、藤井 侑子

帝京大学医学部 薬理

22B-11-2 (11:12~11:24)

アニリン誘導体(*p*-fluoroaniline, *p*-chloroaniline, *p*-iodoaniline, *p*-bromoaniline)のラットにおける神経毒性の検討

○山下 弘太郎、岡崎 欣正、石井 宏幸、大塚 道夫、須藤 雅人、土谷 稔

三菱化学安全科学研究所

22B-11-3 (11:24~11:36)

トリメチル錫は海馬依存性の長期記憶の獲得(学習)ならびに強化を障害する

○高橋 宏明、亀坂 泰正、松本 力、二川 治子

残留農業研究所

22B-11-4 (11:36~11:48)

The effects of docosahexaenoic acid and dehydroepiandrosterone on the memory loss induced by ibotenic acid or scopolamine in rats

○Seog Youn Kang, Seung Hee Kim, Ki Kyung Jung, Tae Gyun Kim, Se Young Choung<sup>1)</sup>, Hyung-Mee Han

Natl. Inst. Toxicol. Res., KFDA, <sup>1)</sup>Coll. Pharm., Kyunghee Univ.

免疫毒性・アレルギー

会場：C会場（2F中央）

日時：7月22日（木）9:00～11:12

座長：田中 慶一（大阪大学）

藤平 栄一（北海道薬科大学）

22C-09-1 (9:00～9:12)

MHC Class I 分子への抗原送達システムを用いた安全で効果的なワクチンアジュバンドの開発

○中西 剛<sup>1)</sup>、林 哲<sup>1)</sup>、國澤 純<sup>1)</sup>、堤 康央<sup>1)</sup>、田中 慶一<sup>2)</sup>、  
真弓 忠範<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>大阪大学薬学部 薬剤、<sup>2)</sup>大阪大学薬学部 毒性

22C-09-2 (9:12～9:24)

PLNA におけるアレルゲン性物質と刺激性物質の反応差の検出

○須田 朗子、岩城 理進、木村 正明

大正製薬 開発研究所安全性研究室

22C-09-3 (9:24～9:36)

酸無水物のモルモットにおける皮膚感作性 (I) -Maleic anhydride の皮膚感作性原因構造の検討-

○中村 洋介、檜垣 環、林 まき子、加藤 日路士、岸田 文雄、  
磯部 直彦、金子 秀雄

住友化学工業 生物環境科学研究所

22C-09-4 (9:36～9:48)

酸無水物のモルモットにおける皮膚感作性 (II) -酸無水物の皮膚感作性ポテンシャルと CLOGP の関係-

○檜垣 環、中村 洋介、林 まき子、加藤 日路士、岸田 文雄、  
磯部 直彦、金子 秀雄

住友化学工業 生物環境科学研究所

22C-09-5 (9:48～10:00)

マウスにおけるホルムアルデヒドの経皮曝露が化学物質に対するアレルギー反応に及ぼす影響

○五十嵐 良明、鹿庭 正昭、中村 晃忠

国立衛研 療品

22C-10-1 (10:00～10:12)

モルモットのアナフィラキシー試験でみられた非特異的反応

○三枝 由紀恵、星野 健二

山之内製薬 安全性研究所

座長：吉田 武美（昭和大学）  
日居 敏仁（実験動物中央研究所）

22C-10-2 (10:12~10:24)

NC マウスの全身性アナフィラキシー反応に対する高感受性

○副島 潤子、細川 勇、筒井 尚久  
三菱化学 横浜総合研究所安全性研究所

22C-10-3 (10:24~10:36)

免疫応答における内因性メタロチオネインの生理的作用および Cd 毒性軽減作用に関する検討

○松山 晃子、中西 剛、小谷 知之、伊藤 徳夫、田中 慶一  
大阪大学薬学部 毒性

22C-10-4 (10:36~10:48)

メタロチオネイン欠損マウスにおける D-ガラクトサミン/エンドトキシンの致死作用

○木村 朋紀、竹原 都、中西 剛、伊藤 徳夫、田中 慶一  
大阪大学薬学部 毒性

22C-10-5 (10:48~11:00)

Cyclophosphamide を 26 週間及び 5 週間投与した CB6F1-Tg-rasH2 マウス及び同腹非遺伝子導入マウスにおける毒性発現の差に関する検討（2）免疫毒性

○柴田 誠司、久田 茂、谷藤 久人、永嶋 雅子、佐藤 敦子、  
磯部 充威、日居 敏仁<sup>1)</sup>  
帝国臓器製薬 安全研、<sup>1)</sup>実験動物中央研究所

22C-11-1 (11:00~11:12)

IL-1 $\alpha/\beta$  遺伝子欠損マウスを用いた接触性アレルギー皮膚炎メカニズムの基礎的検討

○金澤 由基子<sup>1)2)</sup>、小黑 多希子<sup>1)</sup>、畑尾 正人<sup>3)</sup>、塩田 清二<sup>4)</sup>、  
宝来 玲子<sup>5)</sup>、浅野 雅秀<sup>5)</sup>、岩倉 洋一郎<sup>5)</sup>、小島 幸一<sup>2)</sup>、  
吉田 武美<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>昭和大学薬学部 毒物、<sup>2)</sup>食品薬品安全センター 秦野研究所、  
<sup>3)</sup>資生堂 ライフサイエンス研究センター、<sup>4)</sup>昭和大学医学部 第一解剖、  
<sup>5)</sup>東京大学 医科研



## 細胞毒性

会場：D会場（2F 右）

日時：7月22日（木）9:00～10:00

座長：佐藤 哲男（昭和大学）

三森 国敏（国立衛研）

### 22D-09-1 (9:00～9:12)

アポトーシスを指標とした哺乳類培養細胞による毒性評価

○齋藤 文代、安心院 祥三、大塚 雅則、今田中 伸哉

化学品検査協会 日田研究所

### 22D-09-2 (9:12～9:24)

*N*-methyl-*N*-nitrosourea 誘発ラット視細胞アポトーシスの発生機序 -Bcl-2 family 並びに Caspase family の関与-

○義澤 克彦<sup>1)</sup>、南部 裕之<sup>3)</sup>、楊 維紅<sup>2)</sup>、大石 祐司<sup>1)</sup>、

橋本 正晴<sup>1)</sup>、小原 要<sup>1)</sup>、三木 弘彦<sup>3)</sup>、螺良 愛郎<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>藤沢薬品工業 安全性研究所、<sup>2)</sup>関西医科大学 第二病理、

<sup>3)</sup>関西医科大学 眼科

### 22D-09-3 (9:24～9:36)

SV-T 抗原 Transgenic mice ネフロン由来培養細胞を用いたシリカの細胞毒性の解明

○車 碩鎬、金 珠英、Arthit Chairoungdua、関根 孝司、遠藤 仁

杏林大学医学部 薬理

### 22D-09-4 (9:36～9:48)

細胞磁界測定法によるガリウム砒素の肺胞マクロファージ障害性評価

○岡田 充史、計良 徹、井上 葉子、杉浦 由美子、真下 紀美代、

相澤 好治<sup>1)</sup>、曹 永釵<sup>2)</sup>、小谷 誠

北里大学医学部 衛生学公衆衛生、<sup>1)</sup>忠南大学校医科大学 予防医学、

<sup>2)</sup>東京電機大学工学部 電子工学

### 22D-09-5 (9:48～10:00)

ラット胎仔初代培養肺細胞を用いた *in vitro* 毒性評価系の検討

○猪又 晃、井上 智彰、堀井 郁夫

日本ロシュ研究所 前臨床科学研究部

## 肝毒性

会場：D会場（2F右）

日時：7月22日（木）10:00～11:00

座長：北田 光一（千葉大学）

山下 修司（大塚製薬）

22D-10-1 (10:00～10:12)

LEC ラットの肝障害に対する Oltipraz の影響

○中村 英明、古川 文夫、笠原 健一郎、宮内 慎、西川 秋佳、  
広瀬 雅雄

国立衛研 病理

22D-10-2 (10:12～10:24)

チオアセトアミド誘発肝硬変ラット肝臓のアンモニア代謝

○倍味 繁、越谷 修、澤本 修、豊島 茂樹、川内 佳之、平岡 功、  
菅野 司<sup>1)</sup>

大塚製薬工場 鳴門研究所、<sup>1)</sup>大阪府立大学農学部 獣医生理

22D-10-3 (10:24～10:36)

ラット肝膜リン脂質に対する四塩化炭素の毒性発現機序の赤外分光法による  
研究

○伊 碩柱、数坂 昭夫、藤田 正一

北海道大学獣医学部 環境獣医毒性

22D-10-4 (10:36～10:48)

四塩化炭素の単回吸入投与後にみられたラットの肝臓における複製 DNA 合成  
(RDS) の誘発

○穂山 太郎、片山 誠一、佐藤 徹哉、豊田 直人、平塚 秀明、宮川 誠、  
土谷 稔、三浦 稔

三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所

22D-10-5 (10:48～11:00)

WY-14643 の雄ラット肝細胞増殖に及ぼす影響

○森下 克美、北浦 敬介、佐藤 亮、三谷 公互、伊藤 典男、  
山下 修司

大塚製薬 徳島研究所安全性研究センター

トキシコキネティクス

会場：D会場（2F右）

日時：7月22日（木）11:00～12:00

座長：大野 泰雄（国立衛研）

加藤 将夫（東京大学）

22D-11-1 (11:00～11:12)

急性相反応誘発ウサギにおける薬物体内動態の変化

○斎藤 敏樹<sup>1,2)</sup>、小久江 栄一<sup>1)</sup>、下田 実<sup>1)</sup>、布谷 鉄夫<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>東京農工大学、<sup>2)</sup>日本生物科学研究所

22D-11-2 (11:12～11:24)

抗癌剤塩酸イリノテカン(CPT-11)の胆汁排泄、消化管障害軽減を目的とした  
Pharmacokinetic modulation

○加藤 将夫、堀川 雅人、杉山 雄一

東京大学薬学部 製剤設計

22D-11-3 (11:24～11:36)

2-Mercaptobenzimidazole (MBI)と Lipopolisaccharide (LPS)の複合投与による毒性増強とトキシコキネティクス (TK)

○酒見 和枝、梅村 隆志<sup>1)</sup>、津田 充寿、大野 泰雄

国立衛研 安全性生物試験センター薬理、

<sup>1)</sup>国立衛研 安全性生物試験センター毒性

22D-11-4 (11:36～11:48)

カニクイザルにおけるブロム(Br)の中毒症状

○梅岡 健一、石川 圭子、岸本 恒次、原田 美輪、金田 信也、福田 立、  
長根 芳文、平岡 功、竹之下 洋司<sup>1)</sup>

大塚製薬工場 鳴門研究所、<sup>1)</sup>ケアリー 和歌山生育所

22D-11-5 (11:48～12:00)

Toxicokinetics for a new chitin synthesis inhibitor HW1015 in rats

○Ho-Chul Shin, Young-Mi Lee, Hee-Ok Shim, Moon-Koo Chung,  
Sang-Seop Han

Pharm. Toxicokinetics Lab., Toxicol. Res. Center, Korea Res.,  
Inst. Chem. Technology

## 特別講演

## Environmental Susceptibility Genes That Cause Toxicity and Cancer

Daniel W. Nebert

Center for Environmental Genetics, Department of Environmental Health, Department of Pediatrics—Division of Human Genetics, University of Cincinnati Medical Center, P.O. Box 670056, Cincinnati, Ohio 45267-0056, U.S.A.

Individual risk of toxicity or cancer can often be affected by one's exposure to sufficiently high doses of environmental agents, combined with one's underlying genetic predisposition. If unequivocal DNA tests for genetic susceptibility to toxicity and cancer can be successfully developed, then identification of individuals at increased risk would be very helpful to the fields of public health and preventive medicine. A growing number of human genetic polymorphisms are being characterized; some of these have been demonstrated to be correlated with risk of toxicity or cancer, whereas others presently remain equivocal and require further study. Thus, genetic differences in the regulation, expression and activity of environmental susceptibility genes can be decisive in defining cancer susceptibility and the toxic or carcinogenic power of environmental chemicals.

What is "an environmental disease?" Why are some individuals and some families affected more easily than others? Indeed, even within families, why are some individuals affected whereas others are not? When taking the same dose of a prescribed medication, why do some individuals—but not others—experience side-effects? Why do only seven out of every 100 cigarette smokers die of lung cancer? The answer to each of these questions involves the combination of *environment* and *interindividual genetic variation*.

The first six examples in *Table 1* represent cases in which large doses of an environmental agent can be quite easily documented by a good medical history (*e.g.* pack-years of smoking, length of time and the amount of drug taken). The next three examples represent exposures to sun, to the outdoors, and to chemicals in the work place; quantitation in these cases is generally more difficult than the first six examples (*e.g.* "What is the actual number of days worked? Was the exposure identical on all these days? Are we dealing with a single chemical or a chemical mixture?"). The last four examples of *Table 1* depict even fuzzier cases in which a cause-and-effect correlation can be determined by an epidemiological study of large human populations, but a cause-and-effect in a particular individual is often difficult to prove—medically, or in a court of law (*e.g.* ataxia might occur in one person whose blood Pb<sup>++</sup> level is more than 3 times lower than that of someone who is asymptomatic. "Is the malignancy diagnosed in a worker caused by his/her occupational exposure, or was the worker going to develop it anyway?").

Not listed in *Table 1* are the even more ambiguous situations. For example, how often can an environmental disease be caused by minuscule and intermittent exposures to "everyday" chemicals (*e.g.* eating fruit that had been treated with a fungicide, playing on a golf course that had been sprayed with insecticides or herbicides, ingesting canned food having "detectable" amounts of an endocrine disruptor). Toxicity and cancers occurring in individuals with these kinds of exposures are the most problematic for scientists to quantitate and interpret.

Why is it difficult for a scientist or clinician to be certain of the cause of environmental disease, as one moves down the list in *Table 1*? The answer to this question resides in *our genes*. It is now clear that, just as we each have an original set of fingerprints, each of us has

**Table 1.** Examples of environmentally caused diseases

- 
- Bronchogenic carcinoma in cigarette smokers
  - Chronic bronchitis, emphysema and heavy wrinkles in cigarette smokers
  - Liver fibrosis and cirrhosis in alcoholics
  - Drug-related lupus syndrome in patients taking procainamide
  - Dangerously lowered blood pressure in patients taking debrisoquine or sparteine
  - Lung cancer in people exposed to radon
  - Malignant melanoma, other skin cancers, heat stroke, sunburn in persons exposed to excessive sunlight
  - Lung cancer in uranium mine workers
  - Chloracne, porphyria cutanea tarda in workers exposed to dioxin and other halogenated hydrocarbons
  - Ataxia, lowered mentality in persons exposed to high levels of lead
  - Increased risk of chronic myelogenous leukemia in workers exposed to benzene, increased risk of urinary bladder cancer in chemical dye workers
  - Asthma in children and adults exposed to indoor or outdoor air pollution
  - Toxicity or malignancy in persons living near a hazardous waste site
- 

a novel combination of genes that enable us to be resistant or sensitive to various types of chemical and physical insults. This leads to our own *unique underlying genetic predisposition* to toxicity or cancer. This field of study was termed "ecogenetics" by Brewer in the mid 'seventies, and a subset of this field (interaction between genes and response to drugs) had been named "pharmacogenetics" in 1959 by Vogel (*reviewed in* Gonzalez and Idle, 1994; Kalow and Bertilsson, 1994; Nebert, 1997b).

A phenotype (trait) that is dependent on two or more genes is called *polygenic*, *multifactorial*, or a *multiplex phenotype* (e.g. blood pressure, height, weight). Obviously, the outliers, or individuals at the extreme ends of the spectrum of phenotype (e.g. highest and lowest blood pressure), are the most valuable patients to scientists for isolating and identifying the genes responsible for the phenotype. Virtually 100% of all diseases, including environmental diseases, should be regarded as multiplex phenotypes—usually caused by two or more **major genes** and perhaps several dozen **modifier genes**. For example, an abnormal *BRCA1* "tumor suppressor gene" can be regarded as a **major gene** for increasing one's risk of breast cancer, in probably 5-8% of women, and being homozygous for *NAT2* slow acetylator alleles can be regarded as a **modifier** for enhancing one's risk of breast cancer.

In any population, there are always more than two alleles for any given gene. A *genetic polymorphism* exists when a *subset* (second allele, locus or phenotype) is found in a population. Typically, the allelic frequency is arbitrarily considered by epidemiologists to be "zero," or negligible, or insignificant in its effects on the population structure, if less than 1% of individuals are affected. Others commonly regard a polymorphism as "any time a particular phenotype in a population occurs at frequencies of 1 in 1,000 or 1 in 10,000." "Mutations" are defined as one or more altered bases (adenine, thymine, cytosine, guanine) in the DNA; mutations require one round of new DNA synthesis to become "fixed." For every one mutation that becomes "fixed," there are 1,000 to 100,000 "oxidative hits," or other forms of DNA damage, that get repaired without becoming a mutation. "Spontaneous" mutation rates occur (e.g. by background ionizing radiation) at frequencies between 1 in  $10^6$  and 1 in  $10^8$ . Geneticists therefore regard any allele that persists in a population at a frequency of  $<1$  in  $10^6$

as "having a reason for existing that we do not yet understand." Possible mechanisms—for why a particular allelic variant would persist at greater than spontaneous frequencies in a population—might include: [a] "balanced polymorphisms" (in which presence of the mutant allele confers some advantage to the heterozygote; e.g. sickle-cell anemia), [b] genetic "bottlenecks" (enhanced interbreeding due to low numbers of individuals available, or due to geography), and [c] "founder effects" (spread of a mutant allele, originally by one vigorous individual).

A *biomarker* refers to some type of "evidence that environmental agents have altered cellular macromolecules." Environmental exposure might be *genotoxic* (causing DNA damage) or *nongenotoxic* (disrupting endogenous signal transduction pathways independent of DNA damage) in the cell or organism. This would include chemically altered DNA bases or protein (e.g. oxidized guanine, aflatoxin B<sub>1</sub>-DNA adducts, aniline-hemoglobin adducts, etc.) or elevated components in the cell or organism (e.g.  $\alpha$ -fetoprotein, metallothionein, etc.) as the result of oxidative stress or the metabolism of endogenous or exogenous substrates. Biomarkers are often used as an assessment of exposure to a particular chemical, especially in occupational medicine. The activation of a *proto-oncogene* (e.g. *TRP53*), or the inactivation of a *tumor suppressor gene* (e.g. *WT1*)—leading to cancer—can be the result of mutations caused by abnormally toxic levels of endogenous or foreign chemical metabolites (e.g. benzo[a]pyrene, aflatoxin B<sub>1</sub>); as such, these mutations represent biomarkers. On the other hand, "variant, or mutant, alleles" (i.e. one's genetic predisposition, inherited from one's parents) have sometimes been regarded by epidemiologists as "biomarkers"; this terminology is incorrect and is strongly discouraged.

Of the approximately 100,000 genes in the human genome, what genes might be involved in causing environmental toxicity and cancer? It has been estimated (McKusick, Online Mendelian Inheritance in Man [OMIM]) that as many as 75% of all human genes might contribute to human diseases including environmental diseases. All 100,000 genes can be divided roughly into three broad categories—"metabolism genes," "signal transduction genes," and "infrastructure genes."

*Metabolism genes* code for *enzymes*. Enzymes "act as a catalyst to induce chemical changes, altering a substrate to form an intermediate or product." Benzo[a]pyrene hydroxylase, mediated by CYP1A1, is an example of an enzyme characterized because of its capacity to metabolize the environmental agent benzo[a]pyrene; although CYP1A1 must have an endogenous substrate for evolutionary reasons, and is known to metabolize arachidonic acid metabolites, the true endogenous substrate has not yet been established. Adenine deaminase is generally regarded as an endogenous enzyme metabolizing the substrate adenine; however, any adenine analogue would be regarded as a drug, or environmental agent—thus demonstrating that virtually any "housekeeping gene" encoding an enzyme critical to endogenous pathways in the cell still might contribute to environmental disease under a particular circumstance. Any allelic differences in the genes, encoding either benzo[a]pyrene hydroxylase or adenine deaminase, combined with the proper environmental exposure or dose of drug, could therefore be responsible for interindividual susceptibility to environmental toxicity or cancer. The genes and enzymes involved in metabolism of virtually all endogenous, as well as environmental, chemicals have also been termed "*drug-metabolizing enzymes*" and *DME genes*, respectively, and the receptors that up- and down-regulate many of these enzymes have been called "*DME receptors*" (reviewed in Nebert, 1997a). Hence, DME genes (e.g. *CYP1A2*, *CYP26*, *GSTP1*, *ALDH2*, *UGT1A6*, *NQO1*, *HYL1*, *SULT1*, *FMO3*, ...) comprise the vast majority of the metabolism genes.

*Signal transduction genes* encode proteins (including kinases, phosphatases, transcription factors, cell-surface receptors, DME receptors, tumor suppressors) that participate in signal transduction cascades (e.g. *TRP53*, *RBI*, *APC*, *WT1*, *BRCA1*, *MUTS*, *PMS2*, *MSH6*, *PPA2*, *MDM2*, *TRADD*, *SERCA2*, *AHR*, *RAR*, *RXR*, *PPARA*, ...). Genes encoding proteins involved in the nuclear matrix, histones, chromatin or nucleosomes (anything involved in the transcriptional response to endogenous or exogenous signalling) are also included in this category.

*Infrastructure genes* code for proteins involved in the assembly of all cellular and subcellular structures (e.g. spindle formation, kinesins, adhesion proteins, Golgi apparatus, ribosomes, peroxisomes, nucleolar membranes, ...).

An *environmental susceptibility gene* is thus defined as any gene that encodes a *gene product* (enzyme, or other protein) that an exogenous agent might interfere with (either as an agonist or an antagonist), causing perturbation of normal cellular functions and critical life processes of the cell—leading ultimately to toxicity or malignancy. Susceptibility genes include subsets of metabolism genes, signal transduction genes, and infrastructure genes. Allelic differences in any susceptibility gene are therefore capable of producing differences in individual risk of environmental toxicity or cancer. It would seem reasonable to assume that allelic mutants in metabolism genes are less likely to be lethal, compared with allelic mutants in signal transduction genes or infrastructure genes. Exceptions in signal transduction gene variants would include cases where redundancies in signal transduction cascades exist.

Interindividual differences in DME activities have been shown to be particularly substantial (e.g. 10- to >10,000-fold), whereas differences in receptor affinity and other signal transduction function are not usually so striking (2- to perhaps 20-fold). **Phase I** DMEs, most of which represent cytochromes P450, oftentimes metabolically activate procarcinogens to genotoxic electrophilic intermediates, and **Phase II** DMEs conjugate the intermediates to water-soluble derivatives, completing the detoxification cycle. Thus, genetic differences in the regulation, expression and activity of genes coding for Phase I and Phase II DMEs plus the DME receptors can be crucial factors in defining cancer susceptibility and the toxic or carcinogenic power of environmental chemicals (or chemical mixtures).

Thirty to 60 years ago, DMEs were considered as a "liver detoxification system" responsible for breaking down drugs and other hydrophobic environmental chemicals for excretion. It now seems clear that: *[a]* at least some of these DMEs are located in every eukaryotic cell; *[b]* none of these DMEs exists in the body for the sole purpose of foreign chemical metabolism; *[c]* all DMEs have endogenous compounds as their natural substrates; and *[d]* many of these DMEs have existed in evolution prior to the divergence of bacteria from eukaryotes, indicating that these DMEs have been responsible for critical life functions long before animal-plant divergence (reviewed in Nebert, 1994).

Lastly, the issue of gene nomenclature needs to be approached. When the fields of biochemistry and enzymology exploded in the 'fifties and 'sixties, the International Union of Biochemistry (IUB) established a uniform numbering system for all enzymes; the Enzyme Commission number, "EC number," for all enzymes—independent of species—contains four numbers separated by periods (e.g. 1.1.1.1 for alcohol dehydrogenase; 1.14.17.3 for peptidylglycine monooxygenase), classifying the enzyme by class, subclass and subclass. This system is commonly accepted today.



In 1993 the IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) decided to support strongly the systematic naming of genes across all species—based on divergent evolution of gene superfamilies, similar to what had been done for cytochrome P450 (*CYP*) nomenclature since 1985. This has now been applied successfully to the UDP glycosyltransferase (*UGT*), aldehyde dehydrogenase (*ALDH*), glutathione S-transferase (*GST*), epoxide hydrolase (*HYL*) and sulfotransferase (*ST*) gene superfamilies. More than 1,000 *CYP* genes are categorized across all eukaryotes and prokaryotes, whereas more than 100 *UGT* genes and more than 150 *ALDH* genes have been categorized to date. Each gene in a superfamily has originated from an ancestral gene, present usually more than 2 billion years ago, and exhibits more than 15% similarity to every other gene in that superfamily. The main difference between species that have diverged during the last several hundred million years reflects within each superfamily: [a] gene duplication events; [b] the appearance of new gene functions as the result of genetic drift, unequal crossing-over; and then [c] additional gene duplication events. The number of “core genes” (i.e. those present >400 million years ago) is expected to range between 8,000 and 15,000.

The next decade will witness the most incredible explosion—when all genes in more than 200 genomes will have been isolated and characterized. There will be the urgent need to name between 3 million and 5 million new genes! It is obvious that each “core gene” will represent a unique superfamily. The most efficient, and perhaps most rational, method for gene nomenclature, in this decade of genomics, is to name all genes within each superfamily—*across all species*—on the basis of divergent evolution.

A systematic approach to the *naming of human alleles* is also urgently needed (Nebert et al., 1999). It is now realized that we can expect between 6 million and 30 million single nucleotide polymorphisms (SNPs) throughout the genome. This means that any gene spanning 10 kb will be anticipated to contain between 20 and 100 SNPs—alone and in combinations—if, for example, the same gene from 1000 individuals is resequenced. However, how far 5'-ward and 3'-ward of a gene is still considered “within that gene?” How should alleles be named when they contain one, two, or combinations of five or ten different SNPs? These and other questions have recently been addressed (Nebert et al., 1999). The naming of human alleles will be presented at the JST Meeting, along with examples of how environmental susceptibility genes alter interindividual risk of toxicity and cancer.

## References

- Gonzalez FJ, Idle JR, 1994, Pharmacogenetic phenotyping and genotyping: present status and future potential. *Clin Pharmacokinet* 26, 59-70
- Kalow W, Bertilsson L, 1994, Interethnic factors affecting drug response. *Advanc Drug Res* 25, 1-53
- Nebert DW, 1994, Drug-metabolizing enzymes in ligand-modulated transcription. *Biochem Pharmacol* 47, 25-37
- Nebert DW, 1997, Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes: what is their clinical significance and why do they exist? *Am J Hum Genet* 60, 265-271
- Nebert DW, 1997, Pharmacogenetics: 65 candles on the cake. *Pharmacogenetics* 7, 435-440
- Nebert DW, Ingelman-Sundberg M, Daly AK, 1999, Genetic epidemiology of environmental toxicity and cancer susceptibility: human allelic polymorphisms in drug-metabolizing enzyme (DME) genes, their functional importance, and nomenclature issues. *Drug Metab Rev* 31, 467-488

## The Flavin-Containing Monooxygenase Gene Family in Humans

Richard M. Philpot

Molecular Pharmacology Section, Laboratory of Signal Transduction

National Institute of Environmental Health Sciences

Research Triangle Park, NC, USA 27709

The flavin-containing monooxygenases (FMO) are a family of drug-metabolizing enzymes that catalyze the oxidation of nitrogen, sulfur, and phosphorous atoms in numerous drugs, pesticides and other chemicals present in the environment. The gene family contains five members (FMO1-FMO 5) all of which appear to be expressed in every species that has been examined. The homologous FMO forms exhibit approximately 55% identity in primary structure and orthologs (same form in different species) exhibit approximately 80% identity. Unlike cytochrome P450, the FMO gene family is completely uniform across species lines.

For some years it was considered that the FMO was a single enzyme. In that regard much attention was paid to the FMO purified from porcine liver and this protein was studied extensively. Only in the past ten years have multiple forms of the FMO been recognized and investigated. This multiplicity is important to the study of drug metabolism in humans because the major FMO isoform in human liver is not the same as the one from the pig.

The five members of the FMO gene family are expressed in a species- and tissue-dependant manner. These enzymes catalyze the oxidative metabolism of a variety of nitrogen-, sulfur-, and phosphorous-containing compounds, some of which are of toxicological importance. The involvement of FMO-mediated reactions in human drug metabolism has been associated with a number of substrates including dimethylaniline, tertiary amines, including imipramine and chlorpromazine, thiobenzamide, and tamoxifen.

The most thoroughly studied of the FMO isoforms are FMO1, the major form expressed in liver of adult pigs, and FMO2, the major form in lung of adult rabbit. However, neither of these isoforms appears to be expressed to any significant extent in liver of adult human. On the basis of catalytic, immunochemical and expression data, it has been shown that FMO3 makes the greatest contribution to FMO-mediated drug metabolism in adult human liver. FMO3 has been cloned from human and rabbit and purified from rabbit, and FMO3 orthologs from macaque and rat have been identified. Results with purified and recombinant FMO3 and with human samples have provided evidence that the unique stereoselectivity of human liver microsomes for the

metabolism of prochiral FMO substrates is a function of FMO3.

In addition to FMO3, FMO5 has also been detected in human liver. However, the activity of FMO5 appears to be limited by low substrate affinity. Transcript for FMO4 has been detected in samples from human liver and FMO4 protein has been assessed by Western blot. Like FMO5, however, the activity of FMO4 for drug substrates appears to be limited.

Recent results demonstrate that livers of adult, male humans contain highly variable amounts of FMO3 and FMO5. In five samples the total FMO3 plus FMO5 content ranged ten-fold, from a high of 150 to a low of 16 pmol per mg microsomal protein. FMO3 content was consistently greater than FMO5 content but the ratio of the two varied from 2:1 to 10:1. The variability in absolute levels of FMO3 is somewhat greater than reported for relative levels of FMO3 determined immunochemically with an antibody to a macaque liver FMO.

Marked variability in FMO-dependent methimazole S-oxidation was also observed in samples from adult human liver, results consistent with those for a number of FMO substrates. The variability with methimazole appears to be entirely a function of FMO3 content. In addition, the nearly identical kinetic properties of microsomal FMO3 (quantitated by immunochemical analysis) and recombinant FMO3 (quantitated by flavin determination) indicates that our results were not compromised by loss of active enzyme during the preparation or storage of microsomal samples, a problem evidenced by levels of immunoreactive protein disproportionately greater than activities. This finding provides a quantitative validation of the methods that have been developed for the preservation of FMO activities in human hepatic microsomal preparations and the handling of hydrophobic proteins for use as immunochemical standards.

Regardless of the FMO3/FMO5 ratio, no kinetic evidence is found for the participation of FMO5 in the metabolism of methimazole. This is entirely consistent with the poor catalytic efficiency of FMO5 (~5000-times less efficient than FMO3) determined with the recombinant enzyme. A lack of participation of FMO5 in the reaction is also supported by the observation that the relationship between rate of methimazole oxidation and FMO3 content comes very close to extrapolating through the origin.

Like S-oxidation of methimazole, N-oxidation of ranitidine also correlates very well with FMO3 content. The high  $K_m$  value (2 mM) for the N-oxidation of ranitidine by FMO3, which appears to account for most if not all of this activity in the samples we examined, is consistent with the low overall metabolism of ranitidine in man. Low affinity ( $K_m$  1-2 mM) FMO-catalyzed formation of ranitidine N-oxide has also been reported for

dog, rat, and guinea pig. In the case of the rat and guinea pig, but not dog, a high affinity phase of N-oxidation was also observed. Human FMO3 also catalyzes the S-oxidation of ranitidine, although at rates that are only about 1/5 the rates of N-oxidation.

Notwithstanding the fact that differences in FMO-mediated metabolism in human hepatic samples appear to be explained by differences in FMO3 content, the most important question regarding this variability remains unanswered. Is it a reflection of individual differences or does it result from a range of values that might be obtained from a single individual over time? The lack of correlation between mRNA and enzyme levels among individuals suggests that the latter possibility deserves consideration. Unless the mechanisms regulating FMO content vary significantly among individuals, inherent differences in enzyme levels should be reflected by some steady state relationship between mRNA and protein. On the other hand, our results, which show great variability in mRNA content for FMO3 may be compromised by variable degradation of mRNA. However, analysis of the protein/mRNA data suggests that this could only be the case if transcripts for FMO3 and FMO5 are affected quite differently in a given sample. A definitive answer to this question depends upon the development of a reliable *in vivo* metabolic determination that can be associated clearly with FMO3.

The conclusion that FMO3 is likely the major contributor to FMO-mediated activity in adult human liver has been reached in a number of studies. New results offer quantitative proof that this is indeed the case for the S-oxidation of methimazole and the N-oxidation of ranitidine. Given the general lack of activity of FMO5 this will likely hold true for the majority of substrates. The quantitative assessment of FMO3 and FMO5 in human liver microsomal preparations demonstrates the utility of the recombinant enzymes for such studies. It has been shown previously that recombinant FMO3 exhibits the general properties of an FMO and that qualitative comparisons between recombinant and microsomal human FMO3 can be made. We have now been able to demonstrate conclusively that the catalytic properties of the enzyme in the two systems are virtually identical and that quantitative assessment of FMO isoforms in human hepatic microsomal samples can be made on the basis of studies with recombinant enzyme.

D. M. Ziegler, Flavin-containing monooxygenases: Catalytic mechanism and substrate specificity. *Drug Metab. Rev.*, 19 (1988) 1-32.

M. Lawton, and R. M. Philpot, Emergence of the Flavin-containing

Monooxygenase Gene Family, Rev. Biochem. Toxicol. (E. Hodgson, J. R. Bend., R. M. Philpot, eds) 11, Toxicology Communications, Inc, Raleigh, NC, 1995, pp 1-27.

I. R. Philips, C. Dolphin, P. Clair, M. R. Hadley, A. J. Hutt, R. McCombie, R. L. Smith, and E. A. Shephard, The molecular biology of the flavin-containing monooxygenases of man, *Chemico-Biol. Interact.*, 96 (1995) 17-32.

V. B. Burnett, M. P. Lawton, , and R. M. Philpot, Cloning, Sequencing, and Characterization of Flavin-containing Monooxygenases FMO3 and FMO4 from rabbit. *J. Biol. Chem.*, 269 (1994) 14314-14322.

N. Lomri, Z. Yang, and J. R. Cashman, Expression in *Escherichia coli* of the flavin-containing monooxygenase D (Form II) from adult human liver: Determination of a distinct tertiary amine substrate specificity. *Chem. Res. Toxicol.*, 6 (1993) 425-429 .

A. E. Rettie, M. P. Lawton, A. J. M. Sadeque, G. P. Meier, and R. M. Philpot, Prochiral sulfoxidation as a probe for multiple forms of the microsomal flavin-containing monooxygenase: Studies with rabbit FMO1, FMO2, FMO3 and FMO5 expressed in *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 311 (1994) 369-377.

L. H. Overby, A. R. Buckpitt, M. P. Lawton, E. Atta-Asafo-Adjei, J. Schulze, and R. M. Philpot, Characterization of flavin-containing monooxygenase five (FMO5) from human and guinea pig: Evidence that the unique catalytic properties of FMO5 are not confined to the rabbit ortholog, *Arch. Biochem. Biophys.*, 317 (1995) 275-284.

C. T. Dolphin, E. A. Cullingford, E. A. Shephard, R. L. Smith, and I. R. Phillips, Differential developmental and tissue-specific regulation of expression of the genes encoding three members of the flavin-containing monooxygenase family of man, FMO1, FMO3, and FMO4, *Eur. J. Biochem.*, 235 (1996) 683-689.

K. Itagaki, G. T. Carver, and R. M. Philpot, Expression and characterization of a modified flavin-containing monooxygenase 4 from humans, *J. Biol. Chem.*, 271 (1996) 20102-20107.

M. P. Lawton and R. M. Philpot, Functional characterization of flavin-containing monooxygenase 1B1 expressed in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* and analysis of proposed FAD- and membrane-binding domains, *J. Biol Chem.*, 268,(1993) 5728-5734.

# 教育講演

水俣病動物モデルとしてのMethylmercury Chlorideによるrat  
小脳顆粒細胞 apoptosis の解析

○長嶋和郎、澤 洋文、岡田由紀、古林与志安\*

北海道大学医学部分子細胞病理学、

\*帯広畜産大学獣医学科家畜病理学

要 約

有機水銀中毒症である水俣病では大脳視覚野・感覚野、小脳顆粒細胞、末梢感覚神経が選択的に侵されやすいことが知られている。Rat に有機水銀 (methylmercury chloride: MMC) を投与すると小脳顆粒層細胞が侵され、水俣病の解析モデルとして有用である。小脳顆粒細胞変性は apoptosis であることを報告してきた。そこで、この小脳顆粒細胞に生ずる apoptosis の発症機序の解明と小脳顆粒細胞に対する特異的性に関する解析を行った。

最初に動物差と rat の株差を検討した。マウスは中毒症状を生じても小脳顆粒層細胞変性を示さなかった。ラットでは WKAH で神経症状の発症と小脳顆粒細胞変性を認めたが、F344, Sprague Dawley, NAR, Wistar では症状も軽く、かつ必ずしも小脳顆粒細胞変性を生じていなかった。

次いで apoptosis 関連蛋白・遺伝子および神経成長因子として ICE, bNOS, Fas, trkB, BDNF の抗体および cDNA を用いて中毒発症前後の小脳組織を対象に Western and Northern blotting を行った。その結果、発症時に ICE mRNA の増加が認められた。また BDNF とその receptor であるチロジinkinナーゼドメインを持つ 145kDa の trkB 蛋白の発現亢進が認められた。一方チロジinkinナーゼドメインを持たない 95kDa の trkB では初期に発現の亢進が観察された。Fas, bNOS (nNOS) では対照群と差が無かった。

小脳顆粒細胞に特異的な転写因子 Zic1 の MMC 中毒における発現様式を検討した。Mouse and human zic1 と homology の高い部分の cDNA を rat brain より cloning し、MMC 投与 rat cerebellum における Zic1 の発現を検討した。その結果、中毒症状発現前から Zic1 mRNA の減少が観察され、小脳顆粒細胞 apoptosis に Zic1 遺伝子が関与していることが示唆された。

Analysis of Cerebellar Granular Cell Apoptosis Induced by Methylmercury Chloride in Rat as a Model for Minamata Disease.

Kazuo NAGASHIMA, Hirofumi SAWA, Yuki OKADA, Yoshiyasu KOBAYASHI\*,  
Laboratory of Molecular & Cellular Pathology, Hokkaido University School of  
Medicine, Sapporo-060, Japan and \*Department of Veterinary Pathology, Obihiro  
University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro-080



ヒト有機水銀中毒症である水俣病の神経特異的障害の発症機構を解析するための動物モデルが必要である。水俣病のトリアスとして大脳皮質視覚野 (visual cortex) の変性、小脳顆粒細胞の変性、末梢神経感覚枝の変性が知られている[1]。Monkey and cat では visual cortex の変性が見られるが、rat and mouse では見られない。そこでまず最初に小脳顆粒細胞変性がどのようなげっ歯類で特異的に生ずるかを検討し、次いで最も良い species and strains を用いて apoptosis に関連する遺伝子発現を検討し、さらに小脳顆粒細胞特異性に関して若干の考察を行った。

## 材料と方法

### 実験動物

マウスでは apoptosis に関連する Fas 関連遺伝子に異常が見られており、また多くの小脳変性ミュータントはマウスの系統で樹立されていることから、3系統のマウス(C57B6, C3H, BALBc, 3 weeks male)を用いた実験を試みた。飲料水に methylmercury chloride (MMC) を 4ml/day として 5mg/kg/day 投与した。

ラット(male)では 3週令の Sprague Dawley (SD)、Fisher 344 (F344)、Wistar、Wistar King Aptekman Hokkaido (WKAH)、Non-albumin rat (NAR)の5系統の rat [2]を用いた。各系統の rat を MMC 投与群(n=4)、非投与群(n=2)に分けて、投与群には 200g rat の飲水量を 20ml/day と仮定し 4mg/kg/day の MMC を ad lib 投与とした。

### 臨床病理学的検索

体重の変化、臨床症状の発現、組織学的変化、アポトーシスの程度、臓器のメチル水銀濃度の検討を MMC 投与前、投与後 7日、14日、21日 で症状を観察した。神経症状が顕著になった 23日目に rat を sacrifice し、大脳、腎臓、肝臓の水銀濃度を測定した。また HE 染色により小脳における病理学的変化を、TUNEL 染色により顆粒細胞におけるアポトーシスの程度を検討した。

### Apoptosis 関連遺伝子解析

Rat cerebellum より TRIzol (Gibco BRL)を用いて RNA および protein を抽出した。Western blotting の抗体としては抗 ICE、抗 Fas、抗 *trkB*、抗 BDNF および抗 bNOS を用いた。Northern blotting には抽出した total RNA 20 $\mu$ g を電気泳動後 rat ICE cDNA probe を用いた Northern hybridization を行った。

### Zic1 の検討

小脳顆粒細胞に特異的な転写因子 *Zic1* の MMC 中毒における発現様式を検討した。Mouse and human *Zic1* と homology の高い部分の cDNA を rat brain より cloning し、MMC 投与 rat cerebellum における *zic1* の発現を検討した。

## 結 果

どの strain の mouse も中毒症状として特有とされる後肢麻痺を生じ瀕死の状態となった。しかし病理学的に調べてみると、末梢神経の変性が著明に見られ、また大脳皮質に apoptosis を示す neuron を認めたが、小脳顆粒細胞の変性は見られなかった。

次に rat の strain による差異を検討した。体重は各群とも投与後 14 日目から有意に減少し、最終的には対照群の 48 から 57% に減少した。臓器のメチル水銀濃度は腎臓では各群間に有意差は認めなかったが、大脳および肝臓では WKAH, NAR が他群に比べて高値を示した。症状は SD を除く他の群では陽性であり、病理学的には、WKAH、次いで NAR の変化が強く、アポトーシスについても同様の結果を認めた[3]。

Apoptosis 関連蛋白の検討では、ICE が発症 rat において protein and mRNA レベルで発現の増加が認められた。また BDNF とその receptor であるチロジンキナーゼドメインを持つ 145kDa の *trkB* 蛋白の発現亢進が認められた。一方チロジンキナーゼドメインを持たない 95kDa の *trkB* では初期に発現の亢進が観察された。Fas, bNOS (nNOS) では対照群と差がなかった。

Zic1 mRNA は病理組織学的に異常が認められない 8 日目より発現が低下し、顆粒細胞層の脱落が著明となる 28 日目では、更に低下した。特異抗体を用いた免疫染色でも Northern blot と同様の結果が得られた。以上より Zic1 は組織学的変化に先行して発現の低下が認められ、顆粒細胞に生じるアポトーシスの制御を行っている可能性が示唆された。

#### D. 考 察

今回行った実験により MMC の臓器障害の程度は、mouse では小脳変性が惹起されず、また rat では strain により異なることが示された。今回の MMC 投与条件下では SD, F344, Wistar, WKAH, NAR の中で、SD が症状、病理組織学的変化、TUNEL 染色とも陰性であり MMC に対する耐性が高いことが証明された。逆に WKAH は、症状は F344, NAR, Wistar と同程度であったが、病理組織学的変化、TUNEL 陽性細胞ともに 5 群の中で最も著明であり MMC に対する感受性が高いことが証明された。また臓器のメチル水銀濃度は、腎臓では各群間に有意差は認めなかったが、大脳および肝臓では WKAH, NAR が他群に比べて高値を示した。WKAH と NAR は脳のメチル水銀濃度もほぼ同程度であったが、病理組織学的変化、アポトーシス陽性細胞の数は WKAH より少なかった。これらの strain 差を規定する因子に関する研究が今後の課題と考えられた。

以上の結果から、rat を用いた MMC の *in vivo* の実験系では WKAH を用いることが望ましいと考えられた。次に我々は MMC による小脳顆粒細胞のアポトーシスの機序を解明することを目的として、小脳顆粒細胞に特異的に発現し、細胞増殖を制御していると考えられている zinc finger protein の一種である転写因子 Zic1 の発現を検索した[4]。human と mouse の Zic1 を比較するとその homology は 85% 以上と高率に保存されている。今回、部分的に cloning した rat Zic1 の cDNA sequence も mouse と 98.1% の homology を有していた。この cDNA を用いた Northern blot により MMC 投与 rat 小脳における Zic1 mRNA の発現は病理組織学的な異常に先行して低下することが示された。また同じ個体から抽出した大脳には Zic1 mRNA はどの時期においても発現は認められず、成体 rat 中枢神経系において Zic1 mRNA の発現は小脳特異的であることが示された。また特異抗体を用いた免疫染色からも MMC 投与により Zic1 蛋白の発現は低下することが示された。以上の結果から MMC の投与により小脳顆粒細胞特異的転写因子である Zic1 が低下し、その後顆粒細胞のアポトーシスによる脱落が起こることが示された。これまでに Zic1 とアポトーシスの関係に関して報告している論文は無く、本実験により Zic1 について新たな知見が得られた。

## 結 論

- 1) MMC 投与に対する小脳顆粒細胞の感受性は mouse では見られず、さらに rat の strain により異なり SD、F344、Wistar、WKAH、NAR の 5 系統の中では WKAH が最も感受性が高かった。
- 2) 小脳変性が生ずる時期に ICE の発現が亢進しており、caspase を介した apoptosis の経路が推定された。
- 3) rat *Zic1* cDNA の一部を RT-PCR 法にて cloning した。MMC の投与により小脳顆粒細胞特異的転写因子である *Zic1* が低下し、その後、顆粒細胞のアポトーシスによる脱落が起こることが示された。

## 参考文献

- 1) Eto K: Pathology of Minamata disease. *Toxicol Pathol* 25: 614-623, 1997.
- 2) Hedrich HJ: Genetic Monitoring of Inbred Strains of Rats. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1990.
- 3) Nagashima K: A review of experimental methylmercury toxicity in rats: Neuropathology and evidence for apoptosis. *Toxicol Pathol* 25: 624-631, 1997.
- 4) Aruga J, Yokota N, Hashimoto M, Furuichi T, Fukuda M, Mikoshiba K: A novel zinc finger protein, *zic*, is involved in neurogenesis, especially in the cell lineage of cerebellar granule cells. *J Neurochem* 63, 1880-1890, 1994.

# シンポジウム 1

シンポジウム1「内分泌攪乱化学物質—研究の現状と問題点—」

オルガナイザー：黒川 雄二（国立医薬品食品衛生研究所）

座長：井上 達（国立医薬品食品衛生研究所）

西川 淳一（大阪大学大学院薬学研究所）

1991年、米国Wisconsin州のWingspreadに集まった環境生物学者らがConsensus statementを出して以後、種々の本が紹介されてきた。それらは邦訳され、大きな話題を呼んだ。そこでの骨子は、野生生物の種の減少、繁殖異常などを基調としたものであったが、ヒトについても言及され、先天性奇形、神経異常、生殖機能低下、さらに悪性腫瘍などの諸病変に、それらとの関連が危惧された。しかし現時点での考え方としては、ヒト影響についてのコンセンサスは得られていない。しかし、もとよりエストロゲン様の作用を起こす農薬とか化学物質は、それ故にすでに使用の中止されている物質が少なからずあることで分かるとおおり、それなりの知見が知られており、従って検討抜きにそうした影響を否定する根拠はない。とりわけ、通常の用量で内分泌臓器以外に組織障害性の検出されないものについての内分泌原性後代生殖障害とその可能性などについては、未検討といってよい。

想定される性質には概ねつぎのような事柄があげられ、それぞれ研究の対象となる。それはまず、1. 受容体原性作用であり、受容体機能の詳細をはっきりさせる必要があること、2. 受容体の多様性とredundancyが関係すること、3. 受容体発現のpleiotropismと高次生命系(内分泌系・免疫系・神経系)への影響、4. 胎児期の高感受性“the window”の問題、そして、5. Signal cross-talkと相乗性/相加性、などである。

シンポジウムでは、菅野 純氏（国立衛生研）が概説を担当し、そうした問題点のありかについて、障害メカニズムに沿って、Introductory addressを行う。つづいて有 蘭幸司氏（熊本県立大学）が野生生物全般についての研究の進展状況を解説する。有 蘭博士には、氏自身の開発になる線虫のvitellogenin遺伝子の発現系についてもご紹介願う。加藤茂明氏（東京大学・分生研）とRobert Kavlock氏（EPA・NHEERI）には核内レセプターを中心にしたシグナル伝達と転写の最新知見について解説を通してこの問題の機構的な背景についての理解を深めて戴く。白井智之氏（名古屋市立大学）は発がんへ関与の仕方についていわゆるプロモーター作用を中心に多くの化学物質についての実験データのご紹介を戴く。最後の渡辺 昌氏は、いわゆる植物ホルモンを含む外因性ホルモン様物質について、ヒト影響を含めた研究をお進めである。これらについてのデータのご紹介が戴けるものと期待される。会員のみなさまのご来聴と活発なご討論をお願い申し上げます。

Endocrine disrupting chemicals -State of science and the subjects-

Organizer: Yuji KUROKAWA, National Institute of Health Sciences  
(NIHS), Japan

Chairs: Tohru INOUE & Jun-ichi NISHIKAWA,  
NIHS & Osaka University Graduate School for Pharmacy

## 概説

菅野 純

## 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部

化学物質が環境中に拡散し、それが野生生物に影響を与える事を最初に大きく取り上げたのは1962年刊行の「沈黙の春(Silent Spring)」であるが、これは毒性学の立場からごく単純化すれば化学物質の「急性毒性・慢性毒性(acute toxicity/chronic toxicity)」に関するものであった言えよう。これに対して、近年の内分泌かく乱化学物質問題の出発点となった「失われし未来(Our Stollen Future)」の唱える問題の妥当性はともかくとして、そこで指摘されていることがらは、化学物質の野生生物に対する「発生期(胎内)暴露・遅延効果(Developmental (Prenatal) Exposure Delayed Effects)」に関するものであると見ることが出来る。生殖に関する器質的および機能的(神経系を含む)な異常が遅延効果として現れた場合、その種の存続が脅かされる事になる。この様な影響が性ホルモン受容体を介する可能性を念頭に置き、より低い濃度の暴露でなんらかの事象が起こりうることを想定する考え方がある。特に異種間での特異性が低いエストロゲン受容体に対する影響がそのメカニズムの中核を成しているとの考え方に沿って、ヒトに対する影響の有無が大きな関心事となって、今日に至っている。

成人(成獣)の内分泌機能は、視床下部—下垂体—内分泌腺間のフィードバック機構により、その恒常性が維持されている。雌性におけるエストロゲンを例にとると、視床下部からGnRHが下垂体に向かって分泌され、それを受けた下垂体からはLH/FSHが卵巣に向かって分泌される。卵巣からエストロゲンが血中に分泌され、子宮、乳腺、骨等の標的臓器に作用しその形態と機能を制御する。血中のエストロゲン濃度は視床下部と下垂体において監視されており、高すぎれば抑制的に、低すぎれば促進的に視床下部—下垂体機能が調節される。標的臓器においても監視部位(視床下部・下垂体)においても血中のエストロゲンを感知しているのが、エストロゲン受容体(ER)である。これは、細胞質内に分布するタンパク質であり、これにエストロゲンが結合すると受容体自体が核内の応答DNA配列に結合して転写活性を生ずる転写因子でもある。エストロゲン様化合物とは、狭義にはこのERに結合する能力を有する化合物と考えることが出来る。

よって、ホルモン受容体への結合性の有無が、その化学物質が内分泌かく乱化学物質たりうるか否かのひとつの指標となる。この様な性質を明らかにする試験管内試験法に受容体競合結合試験 (receptor binding assay) などがある。さらに、受容体を介した転写活性が化学物質にあるか否かを検討する方法に、酵母やヒト培養細胞を用いた応答遺伝子試験 (reporter gene assay) がある。動物個体を用いた実験には、卵巣摘出ラットや性成熟前の幼若ラット (ともに内因性のエストロゲン産生が殆ど無い状態) を用い、フィードバック機構が動かない状況での標的臓器 (子宮など) のエストロゲン反応性を観測する方法がある (子宮肥大試験 (uterotrophic assay) など)。これに対しフィードバック機構が存在する無傷の個体に対するエストロゲン様化学物質の作用は一般的に観測することが難しい (感度が低い)。

個体の発生期には、エストロゲンが様々な器官の正常な発達に関与している。この場合、フィードバック機構は未熟であり、むしろ発生過程において一過性に必要とされ、その時期にその場所においてのみエストロゲンが作用し得る状況にあると考えられる。この様な場面での外来性エストロゲン様化合物の有害作用は、ER との結合性そのものに依存する可能性があり、また、その作用は器官形成異常として残る可能性がある。後者には、下垂体機能や性行動を規定する中枢神経系の構築異常も含まれる可能性があり、そのため、性成熟期まで顕在化しない遅延効果として現れる事も考えられる。この様な影響を総括的に検出しようとする試みが、従来の催奇形性試験や世代試験を一部改訂あるいは補強することによって行われている。また、個々の器官形成に関するモデル実験系を構築し、分子生物学的に器官形成におけるホルモンの作用のメカニズムを解明する試みも始まっている。

エストロゲン様化学物質が環境中に拡散した場合、野生生物のみならずヒトにも降りかかる事は予想される。暴露量のモニタリングは重要な研究課題の一つである。他方、同一環境下での暴露が認められても、動物の種差は、吸収、分配、代謝、排泄、発生途上の胚あるいは胎児への移行、ER 結合性、転写活性機構、共役因子等、に関して依然として大きく存在している。この点で、ヒトに対する影響を念頭においた実験モデル (近交系ラット・マウスを用いた実験など)、と野生生物に対する影響を念頭においた動物実験系とを区別してその結果の考察に当たる必要がある。

以上、内分泌かく乱化学物質問題は、発生学とホルモン受容体学を中核とする新しい毒性生物学的問題と位置づけることで、その解釈がより容易になると言う観点から考えてみたい。

## 野生生物とくに魚類における影響

○有蘭幸司

熊本県立大学環境共生学部

## 1. 環境ホルモンの生態影響の実態

内分泌攪乱化学物質による野生動物への影響の代表的な例について以下、環境庁の「外因性内分泌攪乱化学物質問題に関する研究班中間報告書」に基づきまとめた。

## 1) 貝類

- a) イボニシ 日本の海岸 雄性化及び個体数の減少 有機スズ化合物
- b) ヨーロッパチヂミボラ イギリスの海岸 雄性化及び 個体数減少 有機スズ化合物
- c) アクキガイ科巻貝 北西大西洋沿岸 雄性化及び 個体数減少 有機スズ化合物

## 2) 魚類

- a) ニジマス 英国の河川雌性化 個体数の減少 ノニルフェノール(断定されず)
- b) ローチ 鯉の一種 英国の河川 雌雄同体化 ノニルフェノール(断定されず)
- c) サケ 米国の五大湖 甲状腺過形成 個体数減少
- d) カダヤシ 米国フロリダの河川 雌の雄化 パルプ工場排水 (断定されず)
- e) ホワイトサッカー 鯉の一種 米国スペリオール湖 成熟遅延  
漂白クラフト紙工場排水 (断定されず)

## 3) 両生類及び爬虫類

- a) ワニ 米フロリダ州の湖 オスのベニスの矮小化、卵の孵化率低下、湖内に流入した DDT 等有機塩素系農薬
- b) カエル、サンショウウオ 北米 個体数減少、後足の異常(カエル) 断定されず

## 4) 鳥類

- a) カモメ 米国の五大湖雌性化 甲状腺の腫瘍 DDT, PCB (断定されず)
- b) メリケンアジサシ 米国ミンガン湖卵の孵化率の低下 DDT, PCB (断定されず)

## 5) 哺乳類

- a) アザラシ オランダ 個体数の減少、免疫機能の低下 PCB
- b) シロイルカ カナダ、米国、地中海 個体数の減少 免疫機能の低下 PCB
- c) ビューマ 米国 精巣停留、精子数減少 不明
- d) ヒツジ オーストラリア(1940年代) 死産の多発、奇形の発生  
植物エストロジェン(クローバ由来)
- e) クマ カナダ 雌の雄化 不明



## 2. ビテロジェニン

内分泌かく乱作用のうち特にエストロゲン様作用を、魚類の血中タンパク成分の変動から精査しようとする場合、雄魚の血中に、成熟期の雌にしか存在しないタンパク、ビテロジェニンが注目されている。ビテロジェニンは、鳥類、両生類など卵生動物や魚類などの卵性脊椎動物の繁殖に重要な役割を担っているリンタンパク質の前駆体である。脳下垂体から分泌された生殖腺刺激ホルモンは、エストロゲンを合成する。このエストロゲンは血中のステロイド結合タンパクによって肝臓へ運ばれ、受容体を介して肝臓中で生合成される。合成されたビテロジェニンは、血中に分泌される卵内へ取り込まれ、リポビテリン、ホスピチン、 $\beta$ 'コンポーネントと呼ばれる卵黄タンパクになる。血中ビテロジェニンは一般に雌魚の成熟時に mg/ml レベルまで達することが知られているが、雄魚や未成熟の雌雄魚ではほとんど検出されない。

雄魚や未成熟の雌雄魚でもエストロゲン活性をもっている化合物に暴露された場合、ビテロジェニンが誘導されることが事象として報告されていたが、イギリスの SUMPTER らのフィールド調査等から下水処理施設の放流水で飼育されたニジマスの雄魚の血液にビテロジェニンが検出され、血中ビテロジェニンを調査することで水環境中に存在する内分泌かく乱化学物質の存在及び影響をモニタリングしようとする試みが始まった。

## 3. 特異抗体を用いた血中ビテロジェニン測定法

内分泌かく乱化学物質の魚血中ビテロジェニンへの影響を調べるため、抗体やHPLC法を利用したバイオアッセイが有効と考えられる。近年は各魚種に特異的な抗体を用いた測定系が主に用いられるようになり免疫拡散法、ラジオイムノアッセイ及び酵素免疫測定法が利用されている。欧米においてはそれぞれ研究者が独自に作成したポリクローナル抗体を用いたビテロジェニン測定法で各河川におけるフィールド調査や実験室における水槽実験で内分泌かく乱作用の評価結果が報告されている。しかし、それらの調査結果はあくまでもそれぞれの研究者レベルのものであり、個々のデータを集めて内分泌かく乱作用を解析検定しようとする際には無理が生ずる。そこで日本において行政における統一調査や研究者による各種内分泌かく乱研究用に日本独自の共通ツールとしての各魚に対する抗体の標準化が必然的になってくると考え、コイビテロジェニン測定用モノクローナル抗体を利用した酵素免疫測定法が作成された。コイは日本中の河川、湖沼に棲息し、飼育が容易で性分化や性成熟に関する基礎資料が多く、環境ホルモン実態調査研究に指標魚種として取り上げられている。

## 4. フィールド調査の具体例

欧米では多くの河川で主にニジマスなどの未熟及び成熟雄の魚を3週間以上ケージに入れて調査する試みやコイやローチなどの環境調査が行われている。英国で河口域及び沿岸海域でカレイ(flounder)を用いて行われた調査や日本で多摩川水系を中心に行われた各種調査の概報、さらに東京水産大の橋本らによって報告されているマコカレイの例について紹介したい。

参考文献

- 1) 有菌幸司: 資源環境対策 34: 34-38(1998)
- 2) 有菌幸司: ホルモンと臨床 46: 563-569(1998)
- 3) 井口泰泉: 環境ホルモンを考える 岩波書店 1998
- 4) 環境庁リスク対策検討会 監修: 環境ホルモン 環境新聞社 1997
- 5) 中村将, 井口泰泉: 科学 68: 515-517(1998)
- 6) 原 彰彦 : 科学 68: 591-596(1998)
- 7) P. Matthiessen, Y.T. Allen, C.R. Alchin, S.W. Feist, M.F. Kirby, R.J. Law, A.P. Scott, J.E. Thain, K.V. Thomas: Science Series Technical Report No. 107, CEFAS, Lowestoft, (1998)

The Ecological Effects of Endocrine Disrupting Chemicals.

Koji ARIZONO, Pref. Univ. Kumamoto, Kumamoto 862-8502, Japan

ステロイドホルモンレセプターによる遺伝子発現制御の  
分子メカニズム

加藤茂明

東京大学・分子細胞生物学研究所

性ステロイドホルモンを始めとしたステロイドホルモン、甲状腺ホルモン及びビタミンA、D等の脂溶性生理活性物質をリガンドとする核内レセプター群は、1つの遺伝子スーパーファミリーを形成し、リガンド誘導性転写制御因子である。核内レセプター群は、リガンドの信号を遺伝情報に伝達し、標的遺伝子群の発現を転写レベルで制御する。このような核内レセプターを介する情報伝達系は、個体発生から細胞分化・増殖や代謝制御、更には癌化などにも深く関わっている。

核内レセプターが基本転写装置と共に、転写制御をホルモン依存的におこなうが、最近の研究結果から、このときレセプターへのホルモン結合依存的に相互作用する核内因子群が見い出されている。これら核内因子群は転写共役因子とよばれ、ホルモンやアンチホルモンの生物活性を規定するものと考えられている。そのため内分泌攪乱物質をはじめとした性ステロイドホルモン関連化合物の組織特異的な作用はこれら転写共役因子が鍵を握ると予想されている。また組織の増殖を促す成長因子群が核内レセプターの機能を調節することがわかっている。我々は、核内レセプター群の転写促進機能の分子レベルでの解明を目的に性ホルモンレセプター（エストロゲンレセプター、アンドロゲンレセプター）を材料に、（1）アンドロゲンレセプター、エストロゲンレセプターの転写制御領域の解析、（2）成長因子群からの情報伝達系からのエストロゲンレセプター機能調節の分子メカニズム、（3）エストロゲンレセプター共役因子群の検索及びその性状等の解析を行っており、これらの結果について紹介する。更にこれら知見をもとに性ステロイドホルモン情報伝達系における内分泌攪乱物質の作用点の分子メカニズムについて考察したい。

Endocrine-Mediated Alterations on Development and  
Reproduction Following Exposure to Pesticides<sup>1</sup>

Robert J Kavlock

Reproductive Toxicology Division

National Health and Environmental Effects Research Laboratory

US Environmental Protection Agency

Research Triangle Park, North Carolina, USA

In recent years there has been a growing concern that exposure to chemicals in the environment poses a serious threat to human development and reproduction via disrupting effects on endocrine function. An "endocrine disruptor" has been broadly defined as "an exogenous agent that interferes with the production, release, transport, metabolism, binding, action, or elimination of natural hormones responsible for the maintenance of homeostasis and the regulation of developmental processes." Due to the critical role of hormones in directing differentiation in many tissues, the developing organism is particularly vulnerable to fluctuations in the timing or intensity of exposure to chemicals with hormonal (or anti-hormonal) activity. In addition, the normal functioning of the adult reproductive system is also vulnerable to alterations in endocrine signaling, with subsequent consequences on fertility, fecundity and cancer. Concerns have reached such a level that legislative requirements for identifying chemicals with endocrine disrupting potential were included in the Food Quality Protection Act and the Safe Drinking Water Act which were passed by the US Congress in '96. The regulatory requirements emerging from these Acts will shortly begin to generate a considerable amount of information regarding the potential of a wide variety of chemicals to interact with various components of the endocrine system. More recently, the European Parliament has voted to recommend the use of the precautionary principle in dealing with the regulation of chemicals with endocrine-disrupting actions. This presentation will highlight research conducted in the Reproductive Toxicology Division of the USEPA attempting to characterize both the range of manifestations from exposure to endocrine disrupting chemicals at different life stages and the underlying mode(s) of action. The first example involves the impact of anti-androgens on the developing reproductive track of the male; the second explores the sensitivity of the prostate gland to estrogens during the perinatal period, while the last focuses the vulnerability of the central nervous system in the adult female.

*Effects of anti-androgens on the developing male reproductive track:* While much of the original impetus for the effects of environmental chemicals on the endocrine system revolved around the effects mediated via the estrogen receptor, it has become increasingly clear over the past five years that chemicals which interfere with the production of androgens, or their actions via the androgen receptor, are

---

<sup>1</sup>This is an abstract of a proposed presentation, and does not necessarily reflect the views or position of the US Environmental Protection Agency

potent developmental toxicants. Examples of such chemicals include pharmaceuticals such as the anti-androgen flutamide and the 5 $\alpha$ -reductase inhibitor finasteride, and environmentally relevant compounds such as metabolites of the fungicide vinclozolin (M2) and the organochlorine pesticides DDT (p,p'-DDE) and methoxychlor (HPTE), and the herbicide linuron, (all of which have been shown to be androgen receptor antagonists), and some phthalate acid esters, such as DBP and DEHP, whose modes of action have yet to be determined. Exposure to these chemicals during the period of reproductive track differentiation results in a pattern of effects that is generally restricted to males, and includes hypospadias, retained nipples, reduced testes and accessory sex gland weights, ectopic testes, malformations of the epididymis, and decreased sperm production. In order to more carefully compare the altered phenotype induced in offspring following maternal exposure to anti-androgens, studies were undertaken with procymidone, linuron, iprodione, chlozolate, p,p'-DDE, ketoconazole, DBP, DEHP, PCB169 and ethane dimethane sulfonate (Gray et al, 1999). Male offspring were evaluated at several different ages for a number of different measures of androgen-dependent endpoints (e.g., ano-genital distance, nipple/areola regression, prostate and seminal vesicle weights, testes location and epididymal malformations). These effects were further broken down into whether they were testosterone dependent (e.g., seminal vesicle and levator ani and bulbocavernosus muscle weight, ectopic testes and malformed epididymes) and dihydrotestosterone-dependent (weights of the ventral and lateral prostate, penis and Cowper's gland, ano-genital distance, nipple regression and malformations of the urethra (hypospadias) and presence of a vaginal pouch). In this combined analysis, the test chemicals tended to have relatively distinct clusters: (1) vinclozolin, procymidone and DDE induced classic anti-androgen receptor effects, with DDE being the least potent; (2) DBP and DEHP which induced a relatively high incidence of testicular and epididymal malformations; (3) linuron, which induced effects similar to both groups (1) and (2); and (4) PCB 169 which only altered ventral prostate and epididymal and testes size. For the remaining chemicals, either the effects were somewhat isolated (EDS, slight reduction in anogenital distance; ketoconazole, delayed parturition), or absent (Iprodione and chlozolate). The results indicate that an in utero bioassay can provide important indicators of potential modes of action, and thus could be an effective component of any endocrine toxicity screening battery.

*Effects of estrogens on the developing postnatal prostate:* In the rat, there appears to be two critical periods for prostate growth: the immediate perinatal period in which branching and morphogenesis occurs, and the second just prior to puberty when there is a growth spurt in response to rising levels of prolactin. Appropriate levels of prolactin appear necessary to support normal prostate growth. To examine the role of altered prolactin levels on the prostate, experiments were undertaken in which atrazine (which suppresses maternal prolactin release), estrogen receptor ligands (17 $\beta$ -estradiol, tamoxifen, methoxychlor and ICI 182,720) which stimulate prolactin release, were given in the perinatal period (Stoker, et al 1999a,b). In another experiment, prolactin levels were manipulated in the prepubertal rat by the

dopamine agonist pimozone, by exposure to estrogens such as 17 $\beta$ -estradiol or bisphenol A that raise prolactin levels, or by blocking the estrogen induced rise by cotreatment with the dopamine antagonist bromocriptine (Stoker, 1999c). The results demonstrate that a suppression of maternal prolactin, which has been shown to cause hyperprolactinemia prior to puberty in the offspring, can result in an increased incidence of lateral prostate inflammation in adulthood. Also, perinatal exposure to estrogenic compounds alters the size of the young adult lateral prostate and increases the incidence of inflammation of the lateral prostate. Similarly, hyperprolactinemia during the prepubertal period increased the incidence of lateral prostate inflammation, while a hypoprolactinemic state reduced the incidence. This induced prepubertal-hyperprolactinemia also increased the size of the lateral prostate. Thus, chemicals which alter the levels of prolactin in the perinatal or prepubertal period, clearly have the potential to induce lasting consequences on the lateral prostate, although the long term consequences of these alterations remain to be determined.

*Effects of atrazine on the adult female:* The herbicide atrazine has been shown to induce a premature onset of mammary tumors following administration in a chronic cancer bioassay in Sprague-Dawley, but not Fischer 344 female rats. Because atrazine or its metabolites do not bind to the estrogen receptor, and tumors are not induced in ovariectomized Sprague-Dawley rats, it appears that the formation of tumors must be preceded by some alterations in the endocrine milieu of the female rat. To evaluate the effects of atrazine on reproductive function, female Long Evans and SD rats displaying regular four-day estrous cycles, received 0, 75, 150 or 300 mg/kg/d atrazine by gavage for 21 days. In both strains, atrazine disrupted estrous cycles. For the LE rats, all dose levels were effective, whereas SD rats required a higher dose (150 mg/kg/d) for a longer time for this effect to appear. The increased time spent in vaginal diestrous was associated with elevated serum progesterone and low estradiol concentrations indicative of a repetitive pseudopregnancy. Although there was some indication that a prolonged estrous period occurred in the lower dose ranges, the overall effects do not appear to explain the early development of mammary tumors.

Subsequently, the notable strain susceptibility (insensitive Fischer 344 rats versus sensitive SD rats) has been attributed to differences in the pattern of the reproductive aging. Reproductive cycling in the female SD rat begins to decline at about one year of age, presumably due to the impaired hypothalamic GnRH release that occurs, in part, as a consequence of altered noradrenergic regulation of those neurons. This age-dependent disruption of GnRH release ultimately results in disruption of ovarian cycles and the females assuming a persistent vaginal cornification typified by polyfollicular ovaries that are devoid of corpora lutea. In contrast, in the aging F344 rat, regular cycling gives way to a pattern of repetitive pseudopregnancies in which the corpora lutea is maintained as a result of dysregulation of pituitary prolactin secretion. The net result of the repetitive pseudopregnant condition is a higher level of progesterone exposure to the female.

Hence, the endocrine milieu of the aging SD rat, but not the Fischer 344 rat, favors development of mammary. How atrazine accelerates the aging of the reproductive axis in the SD rat, however, was not determined. In a recent evaluation, IARC (IARC, 1999) has categorized atrazine as a Class III carcinogen (not classifiable as to the hazard to humans) based on this interpretation. Ongoing studies in the RTD are now attempting to locate the site of the initial perturbation of neuroendocrine function by atrazine that should allow a clearer understanding of the risk posed by this chemical. Atrazine exposure, like aging, leads to a decrease in the LH secretion from the pituitary. The amplitude of the preovulatory LH surge is reduced in a dose response manner. Thus, it is possible that commutative exposure to this chlorotriazine simply accelerates the aging process. In support of this suggestion, work in our laboratory has shown that the decrease in LH secretion is the result of changes in GnRH release. Furthermore, we found that atrazine exposure leads to a decrease in hypothalamic norepinephrine (SOT last year and this year), again a phenomenon observed in the aging female. *In vitro* studies (using PC-12 cells) have confirmed that atrazine exposure will decrease norepinephrine synthesis and release. Studies are also underway to determine whether or not this effect is the result of a direct atrazine-induced inhibition of the enzyme dopamine- $\beta$ -hydroxylase (the enzyme that synthesized norepinephrine from dopamine) or an indirect effect of atrazine on the enzyme via membrane mediated event (Das, et al., 1999; Meachum, et al., 1999).

**SUMMARY:** Understanding the mechanisms and manifestations of endocrine disruptors is key to our ability to detect chemicals which act by this mode of action, to understand the full range of biological effects that they induce, and to target analysis in exposed populations. By combining these three, we will strengthen the scientific foundation upon which we assess their risks to both humans and wildlife. These three examples were selected to reflect both the progress being made, and also to note the complexities and subtleties that we must know to understand the potential magnitude of the endocrine disruptor issue.

#### References:

- Chapin, RE, JT Stevens, CL Hughes, WR Kelce, RA Hess and GP Daston (1996). Symposium Overview: Endocrine Modulation of Reproduction. *Fundamental and Applied Toxicology* 29:1-17.
- Cooper, RL, TE Stoker, JM Goldman, MB Parrish and L Tyrey (1996). Effect of atrazine on ovarian function in the rat. *Reproductive Toxicology* 10(4) 257-264.
- Das, PC, McElroy, WK and Cooper, RC (1999). Cyanazine (CYN) affects norepinephrine (NE) release in pheochromocytoma cells. *The Toxicologist* 48(1-5):268.

Eldridge, JC, DG Fleenor-Heyser, PC Extrom, LT Wetzel, CB Breckenridge, JH Gillis, LG Luempert III and JT Stevens (1994). Short-term effects of chlorotriazines on estrous in female Sprague-Dawley and Fischer 344 rats. *J Toxicol. and Environ. Hlth* 43:155-167.

Gray, LE Wolf, C, Lambright, CL, Mann, P, Price, M, Cooper, R and Ostby, J (1999). Administration of potentially antiandrogenic pesticides (procymidone, linuron, iprodione, chlozolinate, p,p'-DDE, and ketoconazole) and toxic substances (Dibutylphthalate and diethylhexylphthalate, PCB169, and ethane dimethane sulphonate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat. *Toxicol. Ind. Hlt*, in press.

IARC (1999). Some Agents which Target Specific Organs in Rodent Bioassays. Volume 73 of the IARC Monograph Series, October 13-20, 1998. Lyon, France (in press).

Meachum, CA, Ward, TR, Cooper, RC and Shafer, T (1999). Effects of the triazine herbicide cyanazine on GABA<sub>A</sub> receptor ligand binding to rat brain membranes and GABA-stimulated <sup>36</sup>Cl flux in synaptoneurones. *The Toxicologist*, 48(1-5):102.

Stoker, TE, Robinette, CL and Cooper, RC (1999a). Maternal exposure to atrazine during lactation suppresses sucklin-induced prolactin release and results in prostatitis in the adult offspring. (Submitted to *Tox. Sci.*)

Stoker, TE, Robinette, CL and Cooper, RC (1999b). Perinatal exposure to estrogenic compounds and the subsequent effects on the prostate of the adult rat: evaluation of inflammation in the ventral and lateral lobes. (submitted to *Repro Tox*).

Stoker, TE, Cooper, RC, Laws, SC, and Robinette, CL. (1999c). Elevated prolactin (PRL) prior to puberty and the development of prostatitis in adult Wistar rats. *The Toxicologist* 43 (1-S): 145.



## 内分泌攪乱化学物質の発がん性

白井智之、朝元誠人、今井田克己

名古屋市立大学 医学部 第一病理

内分泌攪乱化学物質の発がん性に対する疑問と心配は生殖臓器の発達あるいは分化に対するものとかわらない。ホルモンによって発達・分化を調整されている各臓器おもに乳腺、子宮、卵巣、精巣、前立腺、甲状腺などではホルモン環境の恒常性が正常の機能を営むに極めて重要であるとともに、ホルモン環境の乱れが機能の異常とともに、腫瘍の発生にとっても鍵を握っていると言える。その意味からもホルモン依存性の臓器での腫瘍発生に対して、体内のホルモン環境を乱すであろう内分泌攪乱化学物質が何らかの影響を与え、最悪の場合、それ自身が発がん性を示したり、あるいは腫瘍の発生を促進する働きがあるのではとの懸念が生じるのは当然のことのように思われる。

これまでに内分泌攪乱化学物質としてあげられている物質の多くは農薬や工業製品などである。例えばDDT、Dieldrin、PCB、Diethylhexylphthalate、TCDDなどはいずれもDNA障害性は無いものと判定され、高濃度でラットやマウスに投与すると、肝臓に発がん性を示すものの、上記の生殖器系の臓器には腫瘍は形成しない。たぶん内分泌攪乱と腫瘍発生が別々の作用からなっていることを示唆している。

医薬品として開発された女性ホルモン剤であるdiethylstilbesterol(DES)、17 $\beta$ -estradiol(E2)はラットやマウスに投与すると、乳癌、子宮癌や膀胱癌の発生を促進することが示されている。すでにDESは妊娠中の母親が治療の目的で投与を受けた場合、生まれた女児が思春期に膣の腺癌が発生することはよく知られた事実であり、妊娠中のDESへの暴露が子供に発がん性を示すことは小動物を使った実験で確認されている。女性ホルモン剤のこのような発がん性あるいは発がん促進作用は極めて高い濃度で見いだされる現象である。

農薬として開発されたものの中にも乳腺腫瘍を促進するものとして、DDT、Atrazine、Dibromo-3-chloropropaneが報告されており、抗アンドロゲン作用があるとされるVinclozolinは子宮癌や卵巣の腫瘍を誘発することが報告されている。

精巣腫瘍の発生に対する危惧がある。動物実験ではDES、E2、Vinclozolin、Bisphenol Aがラットやマウスの精巣腫瘍を誘発するものの、その腫瘍は間細胞腫で

あり、ヒトで危惧されている杯細胞由来の腫瘍すなわち精細胞腫などの発生は観察されていない。

Testosterone propionateは高濃度で長期間投与（シリコンチューブ内に入れ皮下埋植する）すると、前立腺癌が発生するラットの系統があり、また前立腺癌がん物質投与後に投与すると著しく前立腺癌の発生を促進することが示されている。

このように生殖器に発がん性を示す化学物質が少なからずあるが、多くはホルモン活性の高度なホルモン剤である。内分泌攪乱作用があるとされる化学物質のエストロゲン作用あるいは抗エストロゲン作用、またアンドロゲン作用、抗アンドロゲン作用はそうしたホルモン剤の1000～100000分の1の強さである。用量作用曲線からは発がん性の危険度は仮にあっても極めて少ないことが予想される。

近年きわめて注目されているダイオキシンは昨年の国際癌研究機構でヒトに“発がん性有り”との判定が下されているが、これは事故等で高濃度暴露されたヒトを対象にした疫学調査で非暴露者に比して総合的に癌の発生頻度が上昇したとの結果が根拠となっている。特定の臓器の腫瘍発生を促進したのではない。実験的には肝臓に対する毒性が極めて強く、肝発がんを促進するとの報告があるくらいである。最近体内暴露した雛の仔では乳腺発がん物質に対する感受性が上昇するとの報告がなされており、さらに研究の必要性を示している。ただしE2やDESでは逆に感受性が減少するとの結果が出ており、一定の結論を得るまでには至っていないようである。

抗エストロゲン剤として広く乳癌の治療に用いられているTamoxifenはエストロゲン作用も併せ持っており、子宮内膜癌などのリスク因子である。近年乳癌のリスクの高い女性を対象にしたTamoxifenによる化学予防トライアルの中間報告で進行乳癌が45%抑制されたとの結果が報告された。この中でやはり危惧されていた子宮内膜癌の発生が上昇しており、ホルモン剤の働きは複雑であることが伺える。

さらに大豆などから比較的大量に日本人が摂取しているイソフラボンには女性ホルモン作用があることが明らかで、内分泌攪乱化学物質として考えても差し支えないものである。日本や中国などで前立腺癌や乳癌の罹患率が欧米諸国と比して低いのは食生活習慣からこのイソフラボンの摂取が多いからと考えられている。実験的にも各種の癌細胞の増殖を抑制する働きがあり、またラット前立腺癌の発生を抑制する結果も得られている。

多くの疫学研究では現時点ではダイオキシンや医薬品であるホルモン剤を除いて、内分泌攪乱化学物質がヒトがんのリスク要因になっているとの報告は見られない。内分泌攪乱化学物質の発がん性についてはその作用帰転としてホルモン作用が直接

関与しているのかあるいは化学物質の持つ多作用の一つに発がん性があるってホルモン作用とは関係ないかも知れない。またホルモンレセプターを介した発がん性の有無についても今後研究がなされなければならない。さらに環境中からの暴露であるので内分泌攪乱物質の複合暴露あるいは他の化学物質との相互作用の点も未解決な部分であり、これからの課題となる研究の一つである。

Carcinogenic potential of endocrine disruptors

Tomoyuki SHIRAI, Katumi IMAIDA, Makoto ASAMOTO

1st Department of Pathology, Nagoya City University Medical School

Nagoya-467-8601, Japan

## ダイオキシン発がんの疫学的研究

○渡邊昌、北村公義、長橋雅人  
東京農業大学応用生物科学部

## はじめに

ダイオキシンは急性暴露による塩素座そうや高濃度での肝障害、さらには致死的效果にくわえ、長期間体内に残存することによる発がん、あるいは内分泌攪乱作用が問題となっている。ダイオキシン類は除草剤などの農薬製造の過程で、非意図的に産出された化学物質であるが、近年はごみ焼却場からの排出による環境汚染が問題となっている。環境中での半減期が長いこと、生物濃縮がおきることも問題で、日本人は食事由来のダイオキシンが大半と考えられる。

ダイオキシンは第2次世界大戦前後に発明された2,4-D (ジクロロエチル酢酸) や 2,4,5-T (トリクロロエチル酢酸) などの農薬に混在して生成された。1957年2,4,5-T中の不純物2,3,7,8-TCDDの毒性が明らかにされた。1962~71年に米国がベトナムでオレンジ剤(2,4-D, 2,4,5-T混合剤)を散布し、除草剤(枯葉剤)の催奇性が指摘された。戦後処理でこのオレンジ剤の廃棄は米国でも問題となり、なかでも1979年には五大湖のダイオキシン汚染が問題となった。

日本でも1968年北九州を中心にカネミ油症事件がおき、当初はPCB中毒と思われたが、その後混在するdibenzofuranが原因とわかった。1976年にはイタリアのミラノの北方のセベソにある肥料工場が爆発し、住民がダイオキシンに暴露する事件がおきた。これら事故によるダイオキシン暴露はほとんどTCDDで高濃度であったため、かなりの日時が経過した後でも、血中濃度を測定することにより初期暴露濃度を推定することができた。暴露レベルが決められ、長期間追跡調査された集団のがんリスクを調査することにより、ダイオキシン類の発がん性が1996年にIARCによって検討された。

ごみ焼却場のフライアッシュ中からダイオキシン類が検出されたのは1977年オランダの報告が最初であるが、日本でも1979年京都のゴミ焼却場フライアッシュから、翌年には松山市ゴミ焼却場洗浄水よりダイオキシン類が検出された。

厚生省は1984年廃棄物処理に関わるダイオキシン等専門家会議を開催、また第6回ダイオキシン国際会議が福岡で1986年に開催され、第14回ダイオキシン国際会議も京都で1994年に開催された。1990年には都市ごみ焼却炉に対する

## Epidemiology of Carcinogenicity of Dioxins.

Shaw WATANABE, Kimiyoshi KITAMURA, and Masahito NAGASHI  
Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture  
1-1-1, Sakuragaoka, Setagaya, Tokyo 156-8502

e-mail: swatanab@nodai.ac.jp

ダイオキシン類抑制のガイドラインが作成された。紙・パルプ業界も対策を検討したが、一般の関心は低かった。1996年 IARC のレビューワークと並行して進められていたダイオキシンのリスクアセスメントに関する厚生省の研究班は当面の許容一日摂取量として 10pg-TEQ/kg/day を提案し、1997年にはごみ処理に係るダイオキシン削減対策検討会が、ごみ処理に係るダイオキシン類発生防止等ガイドライン：ダイオキシン類削減プログラムを作成した。環境庁もダイオキシンリスク評価検討会で健康リスク評価指針値とし 5pg-TEQ/kg/day と設定した。

以上のように環境対策の面では欧米の研究から20年遅れたが、昨年より充足したダイオキシン総合対策委員会は健康影響調査も含めて大々的に検討することになった。ここ数年でダイオキシン類のリスクに関する問題は日本においてもかなりはっきりする筈である。

### ダイオキシンのヒト発がん

ダイオキシンの発がん性は1997年2月にリヨンで開かれた IARC の発がん評価ワーキンググループで検討され、グループ 1 に上げられた。20年前の会議ではグループ III、10年前の会議ではグループ II Bであったから段階的にあげられている印象を与える。発がんそのものとは離れるがダイオキシンは内分泌攪乱物質としても知られている。多くの発がん物質がmg/kg オーダーで効果をだすのに対し、ダイオキシンは ng/kg オーダーで作用するので、従来知られている化学物質の100万分の1のオーダーである。このような超微量で作用する物質の生物学はまだ未知の分野が多い。

ダイオキシンのヒト発がん性でもっとも問題となっているのは 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) である。暴露量が血液で測定され、もっとも評価に耐えうるものは、ドイツ2社、米国、オランダそれぞれ1社の肥料工場の事故で暴露した作業従事者とイタリアのセブソで起きた肥料工場爆発事故によって環境暴露した住民コホート研究である。産業コホートはいくつものものがそれぞれまとめられて報告されている。最近の研究ではがん以外に心血管死の増加も報告されている。これら暴露者のダイオキシン類の測定により、その半減期はきわめて長期であることがわかった。

ベトナムの枯葉剤散布に従事した兵士や、農薬散布者の報告もあるが、政治的問題や発生したがん症例数に問題がある。2,3,7,8-TCDD の濃度別にがんの頻度をみると 100 ng/kg 体重以下の濃度では標準化死亡比の増加はみられない。2 ug/kg 体重以上になるとリスクは 2.0 となる。日本人の暴露量はまだ検討され始めたばかりであるが、正常者は 20 pg/g lipid 程度であり、多少曝露の多いものでは 30 pg TEQ/g lipid 程度であった。焼却場の労働者は 50 - 800 pg TEQ/g lipid 程度にまで曝露しているが、TCDD を基に TEF から計算された TEQ が同じ効果を起こすのかどうか人間でははっきりした疫学的データはない。

解剖例による組織中のダイオキシン類の蓄積量は脂肪、肝、筋肉等に多く、異性体では OCDD や6塩化ダイオキシン、5塩化PCBなどが多い。これらの量から 2,3,7,8-TCDD の蓄積量を推計すると 0.5 ng/kg 体重程度であり、BASF のデータと

比較すると200分の1以下のリスクといえる。

### ダイオキシンの発がんパターン

ダイオキシンの発がんパターンが従来知られている化学発癌と異なる点は、(1)臓器特異性がない、(2)量反応関係が不明瞭、(3)高暴露群でもRRが低い、等である。これらの点がIARCのワークショップでも問題になった。肺がん、乳癌、悪性リンパ腫や多発性骨髄腫、軟部組織肉腫などのリスクが報告されているが、肺がんになったものは喫煙者だった、というように他のリスクと重複して作用している可能性がある。全体のRRは1.4程度であっても有意に高く、しかもリスクが高くなるのに20年という長期間が必要である。これらの点は直接的発がん物質と考えるよりもプロモーター型の発がん物質と考えられた理由である。ダイオキシンには異性体が多い。IARCのレビューは2,3,7,8-tetrabenzodioxin についてのみ行われ、他の異性体や dibenzofuran についてはデータ不十分ということになった。しかし、PCBによる中毒と思われていたかねみ油症は dibenzofuran によるものであったし、中国台湾でおきた油症も同様である。前者は肝癌のリスクが有意に高くなり、後者は10年の時点で肝硬変や肝疾患の死亡が高くなっている。一つ一つの化学物質を個別に検討するとリスク要因とならないが、いくつかの物質が複合的に働いてリスク要因となっている場合に、現在の疫学は分析能力に欠けているものがある。ダイオキシン類のように異性体が多いものは単独で存在する場合は少なく、生体内の相互作用も知られていないので難しいものがある。

### 生体への吸収と排泄

ダイオキシン類は農薬工場内の曝露や農薬工場の反応炉の爆発で住民が曝露した Seveso の事故後の調査によって、ヒトへの被害が疫学的に研究されてきた。ベトナム戦争で大量に空からまかれた枯葉剤 2,4,5-T にはダイオキシン類が10%近く混在していた。ベトナム住民の被害状況はなお明らかでないが、皮肉にも戦後米国での処理による汚染や、枯葉剤散布に従事した兵士の健康障害が問題になった。被曝者の血中濃度のダイオキシン測定から被曝時の曝露量を正確に推計することができるようになり、各種病変を引き起こす量も検討がつけられている。ダイオキシンの病変として皮膚病変、肝機能障害、免疫能低下などがあげられ、さらにホルモン攪乱作用や生殖毒としての作用があげられている。

大部分のダイオキシン類は汚染された食物により腸管から吸収される。また、大気が汚染していれば肺から血流へ、また、汚染された土壌で遊んだり耕作をすれば経皮的に吸収され、肝臓に運ばれて蓄積する。肝臓からは脂質とともに脂肪組織に移行し、蓄積する。半減期は著しく長く7年から11年とされる。体内からは大便、乳、皮脂腺分泌物などに混在して排泄される。大便中のダイオキシン類はおそらくコレステロールとともに胆汁に排出され、再吸収されなかったために排泄されたと思われる。私たちの研究室で解剖例の胆汁中のダイオキシンを測定したところ、検出しうる濃度のダイオキシンが排泄されていた。母乳、血中脂質、脂肪組織中のダイオキシン類を同時に測定した Schecter らのデータでは3者間に差はなく、生体

内の脂肪成分中では平行状態にある、という仮説がだされた。生体曝露量は動物実験等との比較性を得るために body burden (生体蓄積量)として pg TEQ/g lipid で表すことが多くなった。特にリスクアセスメントでは有効と思われる。

ダイオキシン類は脂肪溶解性が高いために細胞膜は素通りできるとおもわれる。細胞内の Ah レセプターに結合すると、それはすみやかに核内に移動し、2分子の hsp90 を分離、核内たん白質の Arnt と結合して、遺伝子 DNA に結合、下流の遺伝子を活性化してさまざまなたん白質をつくりだす。CYP1A1 はダイオキシンによって誘導される代表的なたん白質であるが、これは薬剤代謝系の酵素であるので、がん化などに働くにはその他の系の活性化が必要である。

### ダイオキシンの発がん作用機序

ダイオキシン類の細胞レベルでの作用機序は Ah レセプターを介するものと、長年考えられてきた。Ah レセプターにダイオキシンが結合することによって活性化され、これが一連の p450 (CYP) 酵素を活性化し、遺伝子レベルに働いてさまざまな作用を表すというものである。しかし、近年ノックアウトマウスを用いた実験が行われるようになり、Ah レセプターと結合している Src 蛋白の方がその後のカスケード的反応の要になるのではないかと考えられるようになった。

### 今後の問題

ダイオキシン類は 2,4-D、2,4,5-T などの除草剤作成時に副産物として生成し、かなりの濃度で混在していた。また、最近ではごみ焼却場から大気中に放出されたダイオキシン類が生物濃縮を経て、人体に入ってくるという経路が確かなものになりつつある。人体中に入ったダイオキシン類の半減期はきわめて長い、生物影響を起こすのに閾値があるのかどうかという問題もある。本人がかなりの濃度で暴露した場合、20年程度経過するとがんのリスクが高くなるのは疑いがないと思われるが、長期間微量のダイオキシン類を摂取し続けた場合、また、母乳からある程度の量が来た場合の成人後の影響などはまだ未知の分野である。これらの点は今後の長期追跡調査が必要である。

西欧諸国では土壌基準が設定されている。日本でも宮田らにより各地で測定されているが著しく高い地域もある。オランダでは牛乳経由の人体汚染を重要視し、10pgTEQ/g と牧草地の基準が厳しい。ドイツでは葉菜類が土壌汚染を受けやすいために、40pgTEQ/g 以上では農地土壌の入れ替えを、また、学童児が利用する運動場は、100pgTEQ/g 以上で土壌の入れ替えを推奨している。一方、住居地の土壌基準は1000~2000pgTEQ/g の範囲である。日本では、1997年8月に大気汚染防止法の一部が改正され、ダイオキシン類を「指定物質」として指定し、健康影響の未然防止を目的とした「大気環境濃度」の基準値を年平均 0.8 pgTEQ/m<sup>3</sup> に設定された。このような大気環境濃度の設定は今後の汚染軽減対策に有効と考えられる。リスクの解明とともに環境の保全をはかることが重要である。

### 文献

1. IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol 69. Polychlorinated dibenzo-para-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. IARC, Lyon, 1998
2. Bertazzi PA, Bernoulli E, Bramble G, Consign D, Pesatori A. The Seveso studies on early and long-term effects of dioxin exposure: a review. Environ Health Perspect 106(Suppl 2): 625-633, 1998
3. US Department of Health & Human Services. Toxicological Profile for Chlorinated Dibenzo-p-dioxins. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, 1998
4. 渡邊昌、北村公義、長橋雅人、ダイオキシン発がんの疫学的研究、*癌の臨床* 44:1517 - 1522, 1998
5. Watanabe S, Kitamura K, Nagahashi M. Human effects of dioxins and research activity in Japan. *J Epidemiol* 9: (in press)
6. 渡邊昌、環境汚染物質の発癌性、*組織培養工学* 24:252-256, 1998
7. 渡邊昌、環境問題とこれからの栄養学、*学術の動向* 3 (11): 34 - 36, 1998



## シンポジウム 2

井村伸正、大沢基保  
(北里大学薬学部、帝京大学薬学部)

予てから、わが国のトキシコロジー学会で発表される研究が医薬品開発のための安全性試験と行政的規制への対応に関連した分野に偏っていることに不満を持つ関係者が多いと感じていた。当然のことながら、トキシコロジーは極めて広い範囲の科学を取り込みながら発展してきた学問領域で、その研究の標的も多岐にわたっているはずである。進歩の速度が益々高まる多方面の基礎科学で次々に生み出される多くの技術と発想に常に目を向け、これらを取り入れる努力を怠ると、世界の動きに遅れをとることになる。

丁度1年ほど前、鎌倉哲也第26回年会長から「日本のトキシコロジーが世界のレベルに比べてどんな位置にあるか考えてみるためのシンポジウムを組んで欲しい」という難しい依頼を受け、大いに悩んだあげく何とかでき上がったのがこのプログラムである。したがって取り上げた分野は世界と日本で差がありそうなものということになる。勿論その判断はオーガナイザーの独断と偏見に基づいて行われた。

まず、医薬品開発の過程でその有用性が期待されるようになったヒト組織の利用について、HAB協議会委員長兼機能研究所の佐藤哲男博士がわが国の後進性を明らかにすると同時に、その主要な原因ともいえる社会的背景を克服して先進的なレベルに追いつくための戦略を具体的に提示して問題点を指摘して下さる。続いて、渡部烈教授(東京薬科大学)には医薬品を含む化学物質の代謝研究で国際的にも優れた研究者が多いわが国で、その研究成果を医薬品開発における安全性評価に活かすしきれなかった例を挙げながらその原因となった新薬開発・承認のあり方の欠陥を指摘していただき、今後の代謝研究の方向と研究成果の活用に関する御提言を頂く。次はHoffmann-La Roche社のDr. Gockeがすでに四半世紀に亘って新薬の安全性試験の主要な地位を占めてきた変異原性試験について、わが国の優れた試験法を積極的に取り入れた新しい試験の組み合わせとその適切な施行順序による遺伝毒性試験を新薬開発の早い時期に行うことで効率化を計ることを提案する予定である。

神経毒性についての研究は神経組織の構造・機能そのものが極めて複雑かつ精緻であることから毒性発現のエンドポイントが見極めにくいことと相俟って最も遅れている領域であるが、米国毒性学会(Society of Toxicology)の重鎮、Northwestern University の橋本敏夫教授を招いて、お得意のpatch clamp手法を用いた研究例を紹介して頂きながら、Neurotoxicology の現状につき解説していただく。次いで、もうひとつのスタートの遅れた分野として免疫毒性研究を取り上げ、本シンポジウムのオーガナイザーの一人である帝京大学の大沢基保教授が基礎科学として発展の著しい免疫学と毒性学の接点を解説することでわが国の免疫毒性学の行方を提示することになっている。

最近よく話題に上る内分泌攪乱化学物質や放射線など、いわゆる環境有害因子の遺伝的影響に関する研究では、わが国の研究成果が国際的に高く評価されているが、この分野のリーダーである大阪大学の野村大成教授に動物実験のみならずフィールド調査によるヒトへの影響についての国内外の研究例をご紹介いただく。日本が世界をリードする分野の話として盛り上がりを見込んでいる。

最後に、FDA から北里大学へ移った竹内正弘教授がICH合意に基づく新薬治験データの解析において、日本でその遅れが指摘されている生物統計学が果たすべき役割を述べ、悪性試験のデザインからデータ解析まで生物統計学をどう使うか解説する。

このシンポジウムが我々の自己点検評価に役立つことを期待している。

#### Toxicology in Japan and in the World

Organizer: Nobumasa IMURA and Motoyasu OHSAWA  
Kitasato University and Teikyo University

佐藤 哲男

HAB 協議会 会長 類機能研究所

## 【目的】

医薬品の薬効や安全性評価の試験結果と臨床試験の成績との間に見られる大きな乖離の主な原因は、ヒトと動物における薬の代謝酵素の種特異性に基因することが多い。この問題を解決する手段の一つとして、最近、ヒト由来資源(単離細胞、組織成分、樹立細胞系、代謝酵素遺伝子発現系)などの入手、試験が可能となりつつある。これにより、医薬品開発の場合には、臨床試験へ入る前の橋渡し試験(ブリッジングテスト)が出来る環境となり、従来に比べてはるかに高い確度でヒトにおける医薬品の代謝、安全性を予測することが可能となった。遺伝子を用いる科学は今や技術的には定着しつつあるが、その反面、それと平行して倫理的問題が浮上している。欧米とは異なる社会的背景を持つ我が国において如何にしてこれに対処するか、そして、それに附随する問題点は何か、それが今回の発表の主旨である

## 【ヒト組織の活用に関する海外の現状】

米国では、移植肝が何らかの正当な理由で移植に用いられない場合、その肝臓は合法的に基礎研究に用いることが許されており、その収集、供給ネットワークが確立されている (Figure 1)<sup>1)</sup>。

ヨーロッパにおいても、1997年に英国政府が支援した会社組織 "Pharmagene" が設立され、ヒト組織を用いた研究、受託業務を行っている (Figure 2)<sup>2)</sup>。

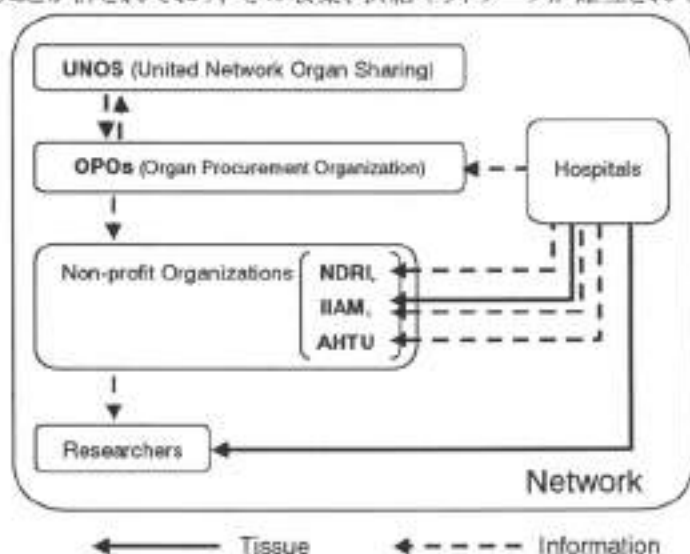


Figure 1 Human Tissue Procurement Network in the U.S.A.

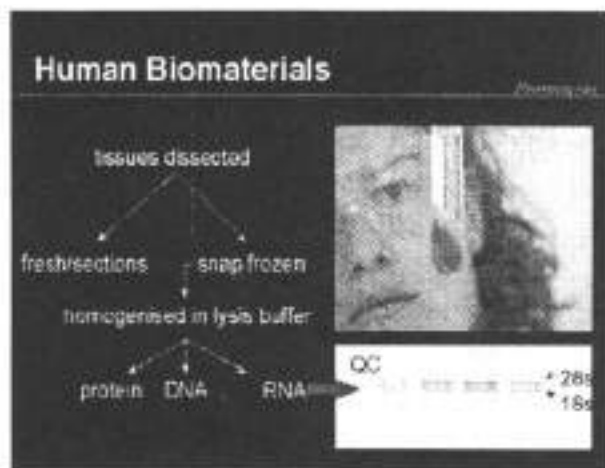


Figure 2 Establishment of Pharmagene

In April 1996, Pharmagene raised equity funding of £1.4 million (\$2.24m) from the founders, 3i Cambridge and Abacus Nominees Ltd. These funds were used to establish the state-of-the-art facilities and to set up several collaborations for tissue supply. Pharmagene has also established one of the world's most comprehensive collections of human RNAs and proteins and the technologies with which to utilise this highly valued resource.

In July 1997, the Company raised a further £5 million (\$8 million) from a group of investors led by 3i Cambridge, and Abacus (Nominees) Ltd. This group includes Alta-Berkeley V.C.V., Ivory and Sime Enterprise Venture Capital plc., Sosei & Co. Ltd., Enterprise Venture Capital Trust plc., Cambridge Quantum Fund Ltd., funds managed by Generics Asset Management, and Delta Equity Fund Limited Partnership. Directors and staff also made further investments.

Pharmagene also receives revenues received from its partnerships with biotechnology and pharmaceutical companies.

<http://www.pharmagene.com/frames/menu/Funding.htm>

#### A) HAB 協議会 (Human and Animal Bridge Discussion Group)<sup>36)</sup>

1994年に我が国においてこの種の目的のために設立された最初の非営利機関であり、その最終目的は国内において臨床および基礎研究を対象としたヒト組織供給ネットワークを確立することである。

##### (1) NDRI との国際協定

国内でのネットワークが完成するまでの間、1996年4月から米国の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、それに基づいてヒト肝がほぼ1回の割合で供給されている。HAB協議会ではヒト肝の研究業務を担当するために1996年に附属霊長類機能研究所を設立し、ヒト肝の保存状態、保存期間と肝細胞のバイアビリティなどについて生化学的ならびに形態学的研究を行っている。さらに、大学ならびに企業の研究者との間で共同研究を進めており、医学、薬学に関わるヒト肝を用いた総合的な研究を展開している。

#### 【ヒト組織の活用に関する国内の現状】

我が国では、固有の倫理的または情緒的問題により、欧米なみに割り切って実施することはかなり困難であった。しかし、1997年12月に厚生大臣の諮問により、「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方」に関する専門委員会が発足し、5回の会議で鋭意検討した結果、1998年8月に画期的な改革を盛り込んだ最終報告書が提出され、さらに、1998年12月には厚生大臣への答申の運びとなった (Figure 3)。これにより、我が国においても手術ヒト組織の有効利用の道が公式に開け、ヒューマンサイエンス振興財団が中心となり鋭意検討を開始している。

現在までに次の研究グループが国内において研究活動を行っている。

## (2)薬物相互作用のデータベース化

HAB 協議会では、1999年1月から製薬企業30社が参加し、各社が上市している医薬品を対象として、同一ヒト肝ミクロソームを用いて他社の医薬品との相互作用の可能性を検討している。

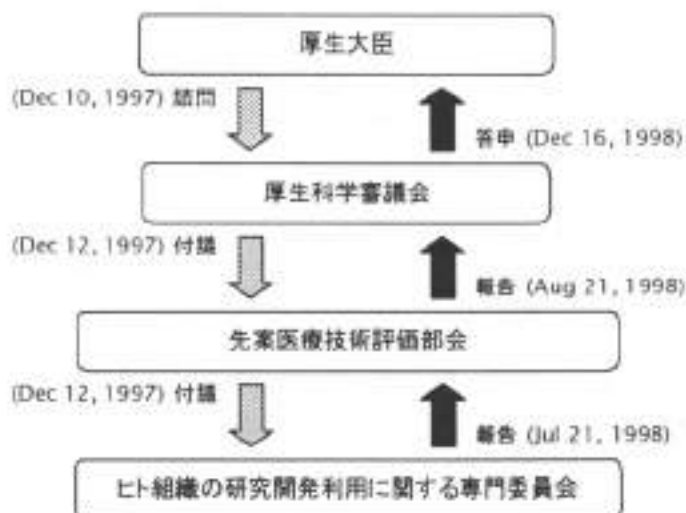


Figure 3 手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方

## (3) ヒト肝臓 S9 を用いた Ames 試験

佐藤らは製薬企業との共同研究により、医薬品や典型的な変異原物質について従来のラット S9 を用いた Ames 試験とヒト S9 との比較試験を行い、ある種の化合物では両者で大きな差のあることが観察された<sup>5)</sup>。

## B) 日本学術会議第7部トキシコロジー研究連絡委員会 (トキシコロジー研連)。

同研連では平成9年より手術切除試料を学術研究に用いるための方策の検討を開始し、1997年、1998年の2回にわたり同研連主催のシンポジウムを開催し、我が国においてこの種の活動を推進している。

## [ヒト組織の所有権とインフォームドコンセント]

医学はヒトを扱うライフサイエンスであるので常に倫理と表裏一体で進歩する。したがって、科学技術が急速に進歩すると、それに伴って倫理に関する新たな問題が生じ、また、新たな混乱が引き起こされるといふ現実もある。しかし、過去においてこのような混乱を排除してきたのも科学であることを考えると、倫理的理由のみで単純に科学の進歩を停滞させてはならず、その解決を考えるべきである。個体から遺伝子のレベルに向かって爆発的勢いで科学が発展しているとき、科学者は DNA の世界と共にそれが宿る生命と精神の倫理にも配慮しなければならない。これらの場合、個人の尊厳や人格の尊重の上に立って、科学の発展を受け入れることについて社会的コンセンサスを得ることが大前提であることは論を待たない。一方、ヒト肝を学術研究の目的に用いることは、別の問題を提起する。それは、組織を提供した患者個人への利益になる場合と、個から社会への貢献の場合が考えられる。後者の場合、それは、ボランティア精神の問題につながることから、患者の同意が得られるか否かが鍵となる。

#### [わが国における研究システムの整備と今後の戦略]<sup>9)</sup>

ヒト組織を医学、薬学の研究に有効活用する場合、我が国において困難を極めている最大の要因は倫理的問題である。つまり、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などでは別の立場がとられている。すなわち、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確保されるならば、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である。これらの考え方の違いは利益の解釈の違いによる。ヒト試料の提供と取り扱いについては、必要不可欠な維持経費以外には、利益を拒否する非営利的考え方がわが国においては受け入れ易いことは当然である。

#### [おわりに]

一般に、科学が飛躍的に進展するとき、それに伴って倫理とは何かを再評価することが必要である。ヒト試料の有効活用はその一例であり、この場合、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。

結論として、(1)何をすべきか、(2)何が出来るか、(3)何が問題か、(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、厚生大臣答申に関して関係者が英知を結集して真剣に考える時にきている。

#### [引用文献]

1. Guideline for Industry. Drug Metabolism/Drug Interaction Studies in the Drug Development Process: Studies In Vitro (FDA, April, 1997)
2. Internet "Pharmagene"
3. 特集「医薬品研究におけるヒト試料の有用性」、*アニテックス* (1996) 8:235-259
4. 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* (1997) 33, 41-45
5. A. HAKURA, S. SUZUKI, T. SATOH. Advantage of the use of human liver S9 in the Ames test. *Mutation Research* (1999) 438, 29-36.
6. 佐藤 哲男:ヒト組織を用いた学術研究—欠かせぬ倫理的評価—:*日経サイエンス* (1997) 7, 23-25

## 代謝研究の成果は毒性学でどう活かされたか

渡部 烈

東京薬科大学薬学部

## はじめに

多岐にわたる毒性化学物質のなかで、きわめて重大な共通する毒性、たとえば癌原性などについては、化学構造—毒性相関がまず最初に明らかにされ、次いで毒性発現メカニズムを明らかにする目的の一つとして代謝研究が行われる。今日では、多くの化学物質の毒性発現にそれらの代謝物が深くかかわっていることは常識となっている。そして、毒性化学物質の代謝にも化学構造との密接な関係が存在することが明らかにされて、化学構造—毒性—代謝物の相関が確立されつつある。この3者の関係から、毒性試験が未だ実施されていない化学物質の毒性についても、生成する代謝物を想定することによって、その毒性の種類が予測できるようになってきた。最も研究がすすんでいる分野が遺伝毒性化学物質の代謝と化学構造の関係である。

本講演では、題意にしたがって、世界とわが国を対比させながら「代謝研究の成果」が毒性学で 1) よく活かされた例、2) これから活かされるであろう例、および 3) 全く活かされず悲惨な結果につながった例をとりあげる。

## 1. エポキシドの生成と癌原性

代謝研究の成果が毒性学でよく活かされた例として、多環状芳香族炭化水素 (PAH) の癌原性メカニズムの中核を占めるエポキシドの生成と DNA の化学修飾がある。最もよく研究されたベンゾ[a]ピレン (BaP) から発癌活性体である BaP のジオールエポキシド (湾領域エポキシド) の生成 (Fig. 1) は、BaP の異性体である BeP が発癌性を示さない理由を説明でき、他の PAH 類の癌原性または変異原性の有無の予測を可能

## Role of Drug Metabolism Study in Aspecting the Toxicity of Drugs and Chemicals

Tadashi WATABE. Department of Drug Metabolism and Molecular Toxicology, School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Science, Tokyo 192-0392, Japan.

にした。しかし、これらの研究の大部分は米国において行われ、わが国における研究成果としては、見るべきものは殆ど無い。

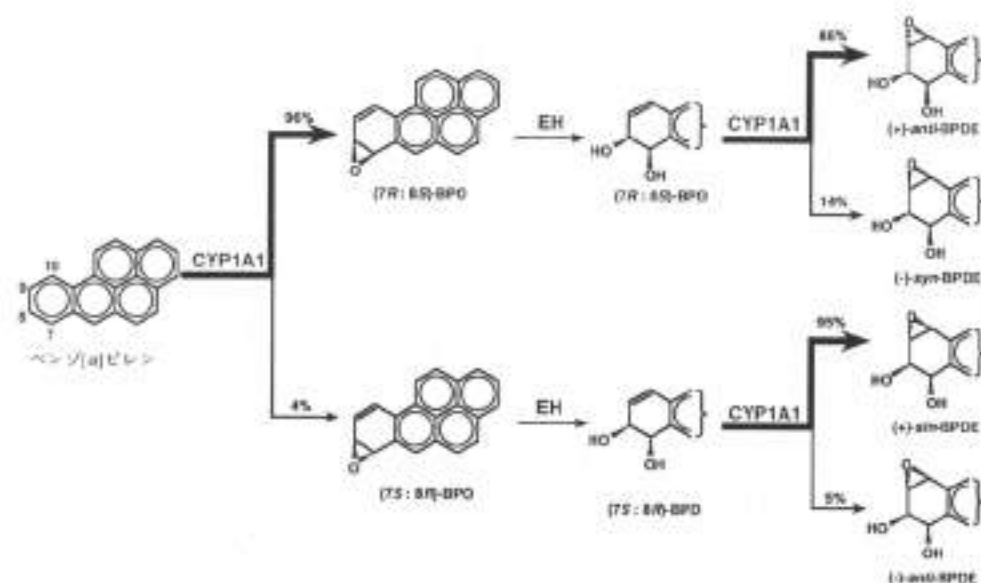


Fig. 1. ラット肝ミクロソームにおけるベンゾ[a]ピレンの代謝的活性化のメカニズム。EH: エポキシドヒドロラーゼ

現在、全ての毒性学の教科書に記載されている PAH の代謝的活性化メカニズムの解明を可能にしたのが、1970 年における筆者によるエポキシドヒドロラーゼ (EH) と EH 阻害剤の発見 (1) であることを付言しておく。ミクロソーム中に存在する EH は、PAH から CYP によって生成するエポキシドを速やかに水解してしまうが、EH 阻害剤 (オレフィンのエポキシド) を共存させると、その水解が完全に阻害され、各種エポキシド異性体の生成状況が明らかになる。

## 2. アリールメチルサルフェートの生成と癌原性

次は、代謝研究の成果がこれから活かされるであろう例である。ベンゾ[a]アントラセン (BA) やクリセン (CR) は、ミクロソームによって湾領域ジオールエポキシドを生成するにもかかわらず、癌原性がきわめて微弱である。しかし BA にメチル基を 1 つ導入した 7-Me-BA、2 つ導入した 7,12-diMe-BA (DMBA)、CR に 1 つメチル基を導入した 5-Me-CR は強力な癌原性を示す。DMBA の癌原性は BaP よりも強く、5-Me-CR のそれは BaP と同等であり、7-Me-BA のそれは BaP よりもやや弱い。筆者らは DMBA、7-Me-BA、5-Me-CR についてその代謝的活性化のメカニズムを提唱した (2-4)(Fig. 2)。これが端緒となっていくつかの研究グループが多種のアルコールの反応性に富む硫酸エステルの DNA 修飾性と変異原性を数多く報告している。

但し、Wisconsin 大の J. A. Miller 教授らは、DMBA から生成する 7-HMBA サルフェートは究極型ではないと反論した。同教授の影響力は大きく、活性硫酸エステル



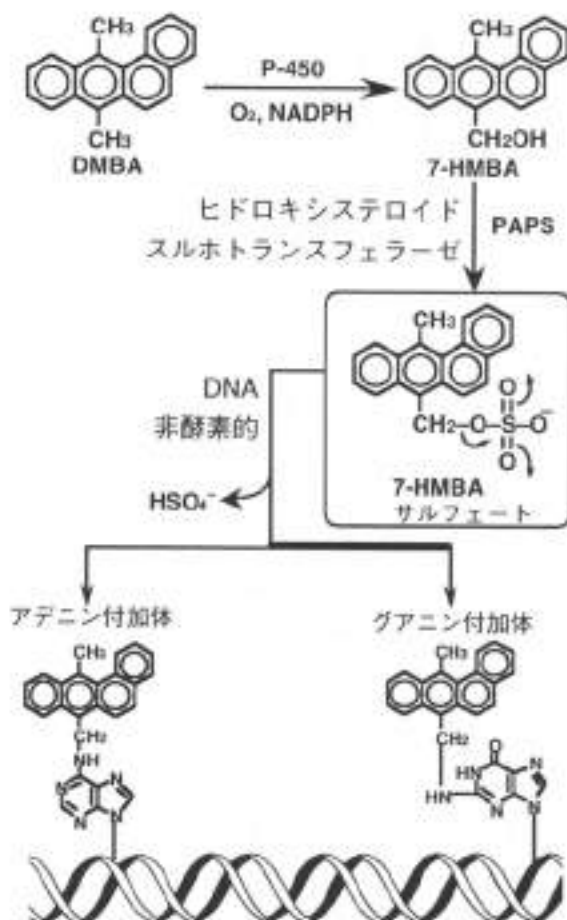


Fig. 2. 癌原性物質 DMBA の代謝的活性化と DNA 修飾のメカニズム

の生成と発癌性研究の発展の重大な阻害因子となった。しかし、1998 年になって、Kentucky 大の Flesher 教授らは、Miller 教授らの発癌研究は誤っており、やはり 7-HMBA サルフェートは究極型であると報告した。今後のこの分野の研究の展開が期待される。

### 3. ソリブジンの代謝物によるソリブジン薬害

抗帯状疱疹新薬ソリブジンと 5-フルオロウラシル (5-FU) 系抗癌薬の併用による相互作用致死は、ソリブジンの代謝物である 5-(2-プロモピニル)ウラシル (BVU) が 5-FU の代謝律速酵素である肝ジヒドロピリミジン・アヒドロゲナーゼ (DPD) を不活性化して、5-FU の組織中濃度を致死レベルにまで上昇させた結果である (5-9)(Fig. 3)。この薬害は当然活かされるべき代謝研究の成果が毒性の予測に全く活かされなかったことによる。

ソリブジンを開発した日本商事(株)の研究者達は、ヒトおよびラットで未吸収のソリブジンの一部が腸内で細菌によって分解されて BVU を生成し、吸収されて、肝

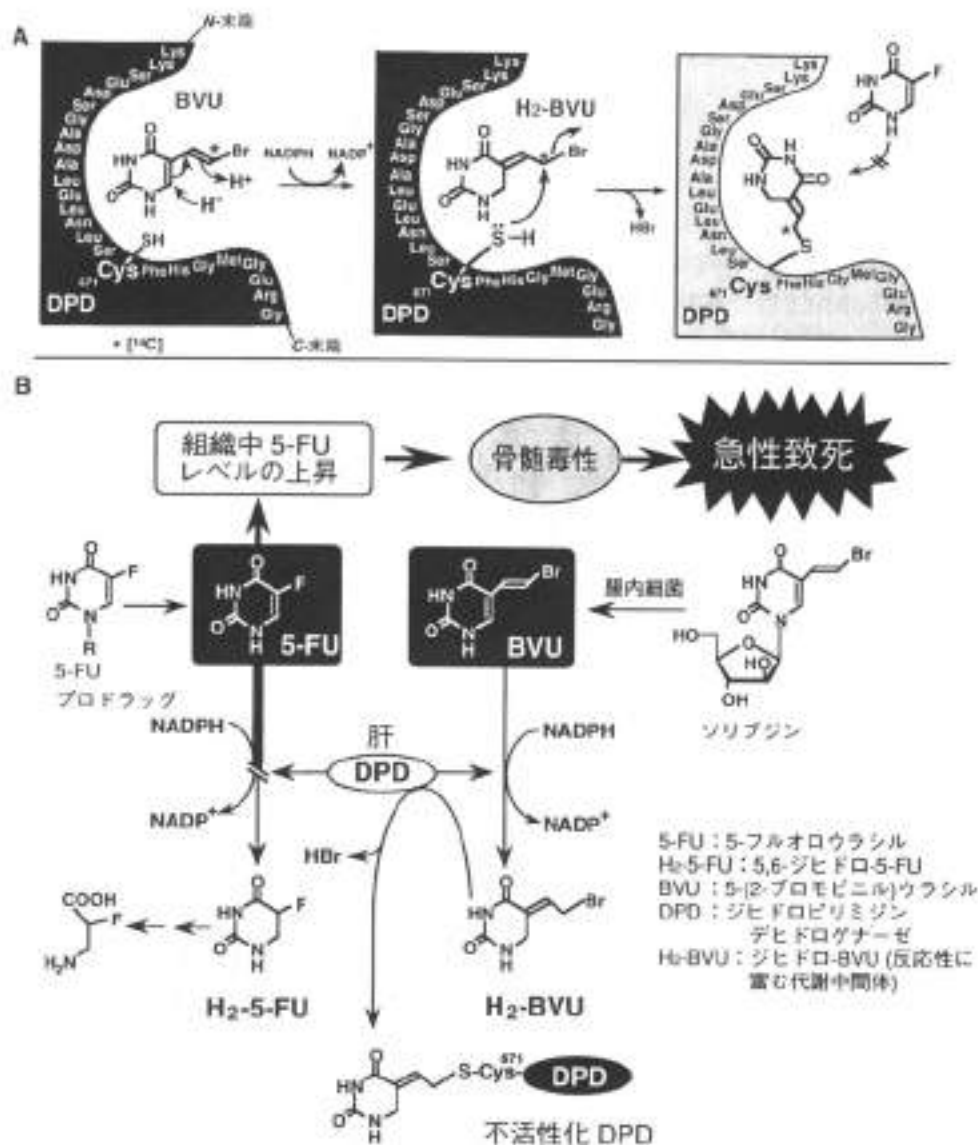


Fig. 3. ソリブジンから腸内細菌によって生成する 5-(2-プロモビニル)ウラシル (BVU) によるヒトのジヒドロピリミジン・デヒドロゲナーゼ (DPD) の自殺阻害メカニズム (A) とラットにおけるソリブジンと 5-FU 製剤の相互作用による急性致死メカニズム (B)。ヒトおよびラット肝 DPD は 5-FU の代謝分解における代謝律速酵素である。

を経て血中に出現することを明らかにしていた。ソリブジンとは無関係に、Desgranges らは BVU をラットに投与すると、併用した 5-FU の血漿中濃度が異常に上昇し、その原因が DPD の不可逆的な阻害によるらしいことを、ソリブジンの開発が治験第 1 相に入る段階で既に報告していた。帯状疱疹は、術後の癌の再発防止のた

めに化学療法剤を投与され、免疫機能が低下した患者に発症し易いことが良く知られているので、ソリブジンと 5-FU プロドラッグの併用毒性試験は必須であったはずである。この試験は欧米の創薬先進国では必ず実施されていたであろう。わが国における新薬の開発・承認のあり方に重大な欠陥があった。

筆者らはラットにおいて、5-FU プロドラッグとソリブジンの併用投与に際してのトキシコキネティクス試験によってソリブジン薬害を再現し、相互作用致死のメカニズムを解明することができた。あわせて、BVU による DPD の不可逆的阻害についても、ラットおよびヒト精製 DPD を用いてそのメカニズムを明らかにすることができた (Fig. 3)。5-FU の基質アナログである BVU は、DPD によって還元されると反応性に富む H<sub>2</sub>-BVU となり、DPD の基質結合部位の 671 番目の Cys 残基を修飾した。修飾された DPD はもはや 5-FU を代謝できなくなり、その結果 5-FU の組織中濃度が致死レベルにまで上昇したのである。

この薬害の重大な教訓として、5-FU プロドラッグを多用しているわが国で、日常的に起こっている可能性がある DPD の遺伝的欠損者 (人口の約 1% と推定される) における 5-FU による致死的薬害の防止が急務であることを特筆しておく。この点についても、1993 年以来、欧米は先行しており、わが国はこれからである。

#### 引用文献

- 1) Maynert, E. W., Foreman, R-L., and Watabe, T., *J. Biol. Chem.*, 245, 5234-5238 (1970).
- 2) Watabe, T., Ishizuka, T., Isobe, M., and Ozawa, N., *Science*, 215, 403-405 (1982).
- 3) Watabe, T., Hiratsuka, A., Ogura, K., and Endoh, K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 131, 694-699 (1985).
- 4) Okuda, H., Nojima, H., Miwa, K., Watanabe, N., and Watabe, T., *Chem. Res. Toxicol.*, 2, 15-22 (1989).
- 5) 渡部 烈、奥田晴宏、小倉健一郎、薬学雑誌、117, 910-921 (1997).
- 6) 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).
- 7) 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).
- 8) Okuda, H., Ogura, K., Kato, A., Takubo, H., and Watabe, T., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 287, 791-799 (1998).
- 9) 西山貴仁、小倉健一郎、須田一真、渡部 烈、日本薬学会第 119 年会講演要旨集 3, 28 (1999).

**Role and significance of mutagenicity studies in the course of discovery/development of pharmaceutical drugs\*.**

Elmar Gocke, F. Hoffmann-LaRoche Ltd, Pharma Research Preclinical development, CH 4070 Basel Switzerland  
e-mail: elmar.gocke@roche.com

During the last 25 years mutagenicity testing has become an integral part of toxicological assessment of new pharmaceuticals. While initially there was hope that a battery of simple and rapid genotoxicity tests could correctly predict carcinogenic properties of the test compounds this hope has not become reality. During the last 10 to 15 years it has been more and more recognized that many compounds which are classified as carcinogens work via indirect, non-genotoxic mechanisms (although ultimately mutations do accumulate in relevant oncogenes). On the other side it has become clear that the observation of genotoxicity of a compound in any in vitro or even in an in vivo test does not necessarily predict that these compounds are capable of inducing tumours in experimental bioassays.

This realisation has naturally had considerable impact on the role of mutagenicity testing in drug development. Initially compounds were screened in a battery of tests with the hope to recognize all carcinogenic properties. The battery consisted (at least in Europe) of four basic tests. Often additional tests which were hoped to increase sensitivity were performed. Numerous, divergent tests were used often because the scientist at a specific toxicology lab had had prior experience and/or a special liking to this test or because there were rumours that the authorities in a certain country preferred to receive test results of a specific test. Also, the tests were designed to be very extensive and far-reaching. For instance, the dose selection in the chromosomal aberration tests included excessively toxic dose levels and as a consequence unspecific, toxicity related effects were seen with questionable relevance for in vivo exposure conditions.

With the knowledge that the mutagenicity tests cannot play the role initially expected from them, and probably also because of increasing pressure on financial costs and speed of development, the evaluation of new pharmaceuticals for genotoxic liabilities began to concentrate and consolidate on fewer, well validated test systems. ICH, the Intl. Conference of Harmonisation had a large impact on the extend of testing and on the test design. The new developments have been influenced largely by very well performed Japanese ring trials, e.g in the ML/TK and MNT tests. Nowadays a basic battery of 3 tests will be performed to satisfy registrational requirements:

- A gene mutation test in bacteria (Ames assay),
- either a chromosomal aberration test in vitro (CA)  
or a mouse lymphoma/thymidine kinase test (ML/TK)
- a micronucleus test in vivo (MNT).

For certain classes of drugs the standard battery might be changed. Structurally 'suspicious' compounds should, for instance, be subjected to all four tests. If problematic results are observed it is expected that further investigations with appropriate variations of the test conditions will be initiated. The employment of

additional genotoxicity test systems (e.g. the in vivo unscheduled DNA synthesis (UDS) systems and toxicokinetic investigations might become necessary.

Although the standard battery prescribed by ICH has become rather solidly established there are many developments in the field. Current projects center on establishing the MNT in vitro test as alternative to the CA test, on defining roles for the single cell gel electrophoresis (COMET) and transgenic mutation assays (e.g. Mutamouse, Big Blue) in risk assessments. Specific types of action, such as photochemical genotoxicity, have recently received considerable attention.

In pharmaceutical industry the increasingly competitive environment is inducing attempts to cut down further on development times. In preclinical research and development the current catch words are 'high through-put screening' and 'multidimensional optimisation'. For the field of mutagenicity testing this means that the experts are involved even earlier in the development process than they were before. In our company the colleagues will send to us several promising lead candidates at the stage of lead identification with the request to predict potential genotoxic properties. Analysis methods have been introduced which require little time and little amount of test compound. The latter point is very important since at the initial stages of development only milligram-amounts of the drug are available. In combination with the pharmacological findings the results of (geno)toxicity tests and pharmacokinetics investigations influence lead optimisation in contrast to the previous situation where pharmacological lead optimisation was predominant for much longer periods of development.

In our experience an average of ca 25 % of genotoxicity tests yield 'problematic' results which require further investigations and - depending on the risk/benefit situation - might lead to abandonment of the project. Clearly the recognition of genotoxic potential at the earliest possible stage of development can bring substantial savings in cost and time.

Compared to prediction/detection of adverse **toxic** effects the chances of success of early screening programmes for **genotoxic** effects appear particularly good for two reasons:

1. Structure/activity relations are more clearcut since the ultimate target (DNA) is structurally more uniform and more 'simple' than the diverse targets in general toxicology
2. DNA is practically identical between simple prokaryotes and mammalian/human organisms,

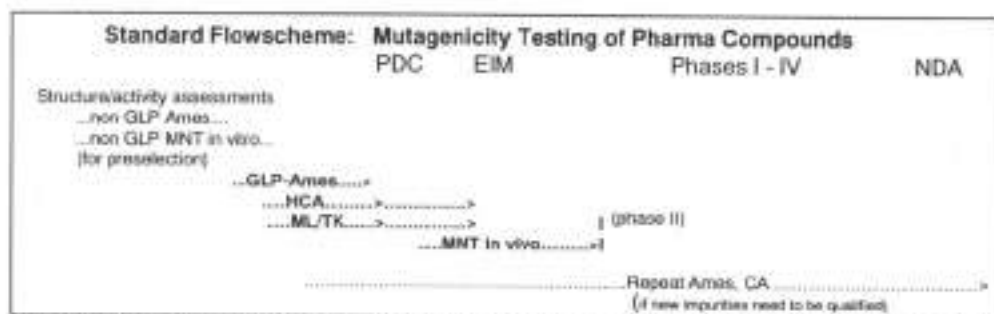
Computer based toxicity prediction systems (DEREK, TOPCAT, CASE) are being utilized to recognize structural alerts. The predictions - as for other computerized prediction systems - have the most elaborate foundation in the mutagenicity area. The DEREK system used by Roche has been in operation for about three years, providing reassurance that alerting structural features do not go undetected (as far as possible). An internatl. user group is constantly working on refining the system. A short overview about retrospective validation studies will be presented.

The so called 'SOS' response is a well investigated reaction of bacteria to genotoxic stress (DNA damage). Reporter gene constructs i.e. fusions of SOS promoters with

the luciferase operon, green fluorescent protein or galactosidase, glucuronidase genes are established and are being automated for incorporation into HTS screens.

Miniaturisation of mutagenicity test systems by cutting down the volume of the incubation mix and/or extending treatment times is one option to reduce material requirements of the *in vitro* mutagenicity tests. We have implemented a miniaturized version of the Ames test based on a protocol developed by Kado et al. The time saving of this version compared to the standard protocol is not very dramatic but more importantly material requirements are reduced to ca 20 to 50 mg per assay. In addition we use an MNT *in vitro* assay with mouse lymphoma cells to predict the potential of test compounds to induce chromosomal aberrations. This test requires about the same material as the microAmes assay.

For a compound which yields no problematic aspects the following flow scheme will be adhered to:



(abbreviations: PDC: selection point for full development; EIM: entry into man; NDA: new drug approval; GLP: good laboratory praxis; HCA: chromos. aberration assay with human lymphocytes; MNT: micronucleus test)

Of course, if problematic activities are observed the scheme will be changed according to the observations. For instance, it will be checked if impurities could be responsible for the genotoxic effects. Due to the exquisite sensitivity of the *in vitro* mutagenicity assays it has occurred several times that presence of minor amounts of impurities led to positive results. The possibility of artefactual results due to test specific conditions is considered. Structural analogues of the test compound will be screened to get an idea of the responsible structural elements and the mechanism of action. Performance of additional tests is considered. An intensive risk/benefit discussion will be initiated.

As time permits I will discuss the impact of 'exemplary' positive mutagenicity results with a few selected pharmaceuticals. It is sometimes mentioned that positive mutagenicity findings constitute a 'killing' criterium for development of a drug. That this is often not true will become apparent. A thorough investigation of the test conditions and a good understanding of the mechanism of action can often provide evidence of activities which are artefactual and/or irrelevant for the human exposure conditions or which allow a positive risk/benefit assessment.

## Prospect of Neurotoxicology

Toshio Narahashi

Department of Molecular Pharmacology and Biological Chemistry,  
Northwestern University Medical School, 303 E. Chicago Avenue,  
Chicago, IL 60611, USA

A variety of environmental chemicals act on the nervous system to cause toxicity. Many therapeutic drugs exert side effects through interactions with the nervous systems. Thus neurotoxicology is becoming one of the most important and serious issues in biomedical sciences. The significance is increasingly recognized in light of the predication that brain research will remain the last frontier in biology in the coming century.

However, the progress in neurotoxicology has been slow compared with other disciplines in biomedical sciences for several reasons. First of all, the nervous system, particularly brain, has an extremely complex structure. Second, the physiological function is mediated by fast signal transmission in the order of milliseconds with the exception of some slow processes such as memory. Third, the end point of toxic effects by chemicals is in many cases not clearly defined; this is in sharp contrast with carcinogenesis.

Several approaches and techniques have been used for the study of neurotoxicity. Electrophysiology is most powerful and straightforward as very fast millisecond changes in electrical signals associated with nerve function can be recorded and analyzed (Narahashi, 1992b). General biochemical techniques are useful for assessing changes in various biochemical components such as enzymes and neurotransmitters. However, these techniques cannot follow the fast time course of changes, and caution must be exercised to determine whether biochemical changes are the cause or merely the results of intoxication. Molecular biology and genetics techniques have recently been used, and have proven powerful in identifying the molecular aspects of toxic action; for example, the receptor amino acid that is responsible for binding of and functional changes caused by chemicals can be identified. Histological techniques have been used extensively in neurotoxicology especially for the study of chronic effects such as delayed neurotoxicity. The techniques are becoming more powerful with the adoption of advanced technologies including confocal microscope and imaging techniques. However, caution must also be exercised here to distinguish whether the observed changes are the cause or the results of intoxication.

Only a few examples of our recent studies will be described below in order to illustrate the current situation of neurotoxicology. Our studies utilize electrophysiological approaches especially patch clamp techniques which are most sophisticated.

*Selective Tetrodotoxin block of sodium channel.* Tetrodotoxin (TTX) (Fig. 1) is a toxin contained in the ovary and liver of puffer fish (Narahashi, 1974). It is also contained in some other animals, and certain species of bacteria are known to be responsible for production of TTX. It is a potent neurotoxin, blocking nerve and muscle conduction at low concentrations without any effect on other receptors and channels. Since our discovery of TTX's selective block of sodium channels (Fig. 1), it has become a useful laboratory tool for the study of various ion channels (Narahashi, 1974, 1988). One TTX molecule binds to one sodium channel at or near the channel's external orifice thereby occluding the flow of sodium ions even though the channel gating mechanisms

are working unimpaired. This is one of the simplest cases in which a chemical acts on a channel through the straightforward mechanism. However, most other chemicals and toxins act on neuroreceptors and ion channels in a much more complex manner (Narahashi, 1998).

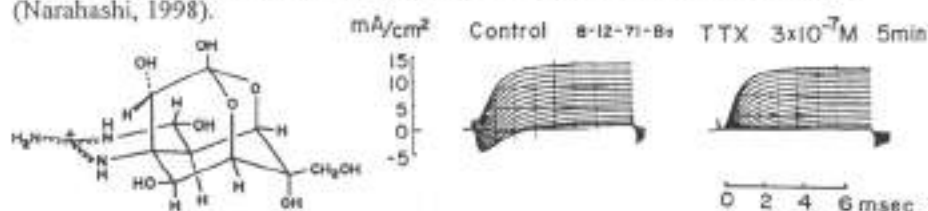


Fig. 1. Tetrodotoxin (TTX) and its selective block of sodium currents.

**Pyrethroid action on sodium channels.** Pyrethroids are synthetic derivatives of pyrethrins which are contained in the flower of a chrysanthemum species. The pyrethrum insecticide was used extensively before and during World War II, and a number of synthetic pyrethroids were tested during the past 30 years in an attempt to develop insecticides with high insecticidal activity, low mammalian toxicity, and biodegradability.

Pyrethroids (Fig. 2) generally cause hyperactivity in both insects and mammals, although much higher doses are required for the latter. Our extensive study over many years has unequivocally demonstrated that the primary target of pyrethroids is sodium channels (Narahashi, 1992a, 1996; Narahashi et al., 1998). The pyrethroid hyperactivity is due to

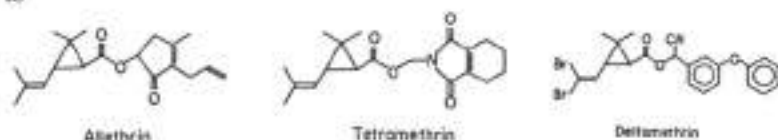


Fig. 2. Pyrethroids

repetitive discharges in various regions of the nervous system, which in turn are produced when the depolarizing after-potential that immediately follows the action potential is elevated to reach the threshold membrane potential for action potential generation (Fig. 3). The next question is how pyrethroids increase the depolarizing after-potential. This can best be studied by patch clamp and voltage clamp techniques with which ion channel activity that underlies action potential generation can be measured. It is clearly demonstrated that the sodium current keeps flowing for a prolonged period of time when the sodium channels are opened by stimulation (Fig. 4). However, the sodium currents shown in Figure 4 are an ensemble of small sodium currents flowing through a number of individual sodium channels. To analyze the effects of pyrethroids on individual sodium channels, we have to use the single-channel patch clamp technique. Figure 5 shows an example of such an experiment using neuroblastoma cells. In control experiments, individual sodium channels open for a short time (a few milliseconds) only near the beginning of a depolarizing stimulus. After exposure to pyrethroid, the channels open for a prolonged period of time, occasionally for as long as a few seconds. Thus the sequence of events is depicted as follows: prolonged opening of individual sodium channels → prolonged whole-cell sodium current → increase in depolarizing after-potential → repetitive discharges → hyperexcitation.



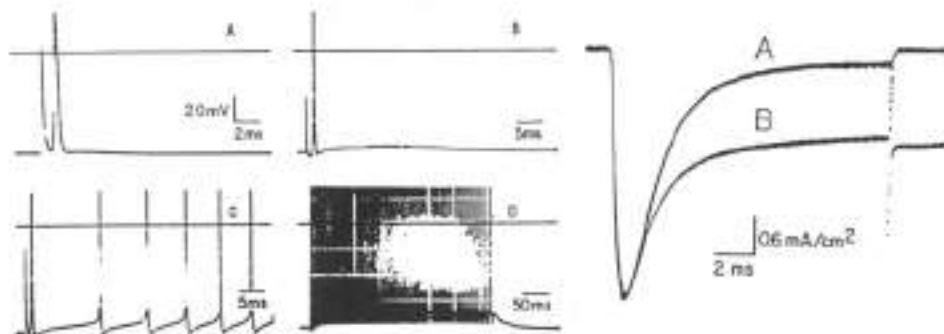


Fig. 3 (left). Repetitive discharges evoked by a single stimulus in a crayfish giant axon after exposure to  $10 \mu\text{M}$  (+)-trans tetramethrin. A, control; B, 5 min after exposure to tetramethrin; C and D, 10 min. From Lund and Narahashi (1981).

Fig. 4 (right). Prolongation of sodium current by  $1 \mu\text{M}$  ( $\Delta$ )-trans allethrin in a squid giant axon. A, control; B, allethrin. From Narahashi and Lund (1980).

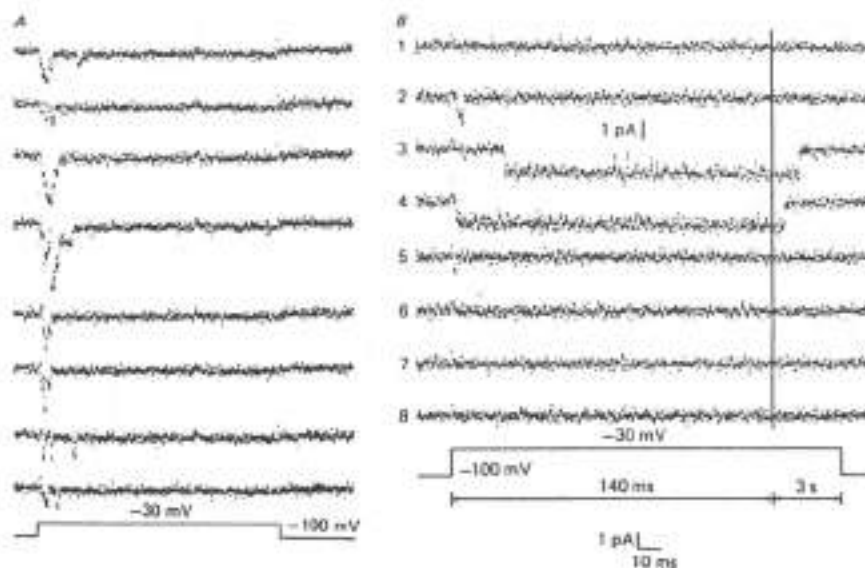


Fig. 5. Effects of deltamethrin on single sodium channel currents of a N1E-115 neuroblastoma cell. A, control; B,  $10 \mu\text{M}$  deltamethrin. In deltamethrin, the open time is greatly prolonged (up to  $\sim 1$  sec compared to the control of a few milliseconds; note change in time scale), and opening occurs with a long delay. Chinn and Narahashi (1986).

We have developed a technique by which the fraction of sodium channel population that is modified by pyrethroids can be measured (Fig. 6). Only a very small percentage, approximately 1% of sodium channel population needs to be modified by pyrethroid for the depolarizing after-potential to reach the threshold membrane potential for repetitive discharges, i.e. for the animal to develop hyperactivity. This is the reason why pyrethroids are so potent (Tatebayashi and Narahashi, 1994; Song and Narahashi, 1996).

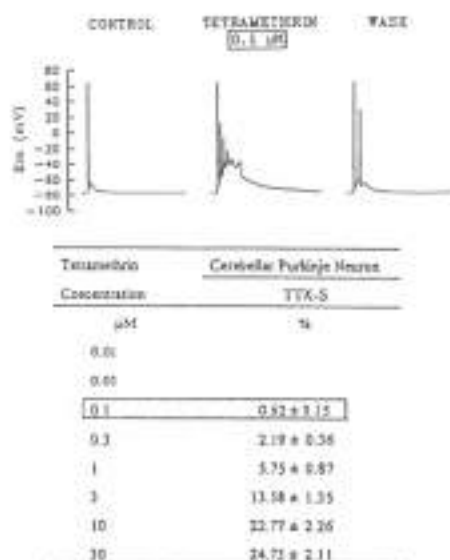


Fig. 6. Only a small fraction (0.62%) of sodium channel population needs to be modified by the threshold concentration (0.1  $\mu\text{M}$ ) of tetramethrin to evoke repetitive discharges in a rat cerebellar Purkinje neuron (Song and Narahashi, 1996).

Pyrethroids are much more toxic to insects and lower animals than to mammals, with the differences in  $\text{LD}_{50}$ s in the order of several thousand-fold. The major factor that contributes to the difference in  $\text{LD}_{50}$ s is the sodium channel (Song and Narahashi, 1996). The sodium channels of lower animals are much more sensitive to pyrethroids than those of mammals (Table 1). Other factors such as detoxication also contribute but to a much lesser extent.

Table 1. Mechanism of selective toxicity of pyrethroids.

Selectivity Factors	Mammals	Insects	Estimated Differences
<b>Polency on Nerve</b>			
Due to Temperature Dependence	Low (37°C)	High (25°C)	5
Due to Intrinsic Sensitivity	Low	High	10
Recovery	Fast	Slow	5
<b>Detoxication Rate</b>			
Due to Enzymatic Action	High	Low	3
Due to Body Size	High	Low	3

*Alcohol actions on neuroreceptors.* Ethanol has actions on a variety of neuroreceptors and ion channels, including but not limited to, glutamate receptors,  $\text{GABA}_A$  receptors,  $5\text{-HT}_2$  receptors, and calcium channels. The activities of those receptors are either augmented or suppressed depending on the receptor. However, ethanol is not a very potent chemical requiring 30-100 mM to exert effects. We have recently found that ethanol at a concentration of 10-300 mM potently modulates neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) in a complex manner (Narahashi et al., 1999). Rat cortical neurons in primary culture and human embryonic kidney (HEK) cells in which various nAChR subunits are recombinantly expressed were used for patch clamp experiments (Aistrup et al., 1999).

Cortical neurons are endowed with at least two types of nnAChRs, one that generates  $\alpha$ -bungarotoxin ( $\alpha$ -BuTX)-sensitive, fast desensitizing currents ( $\alpha 7$  type), and the other that generates  $\alpha$ -BuTX-insensitive, slowly desensitizing currents ( $\alpha 4\beta 2$  types) (Fig. 7). The  $\alpha$ -BuTX-sensitive current is only slightly suppressed by ethanol, but the  $\alpha$ -BuTX-insensitive current is potently augmented by ethanol in concentrations ranging from 10 to 300 mM (Fig.8).

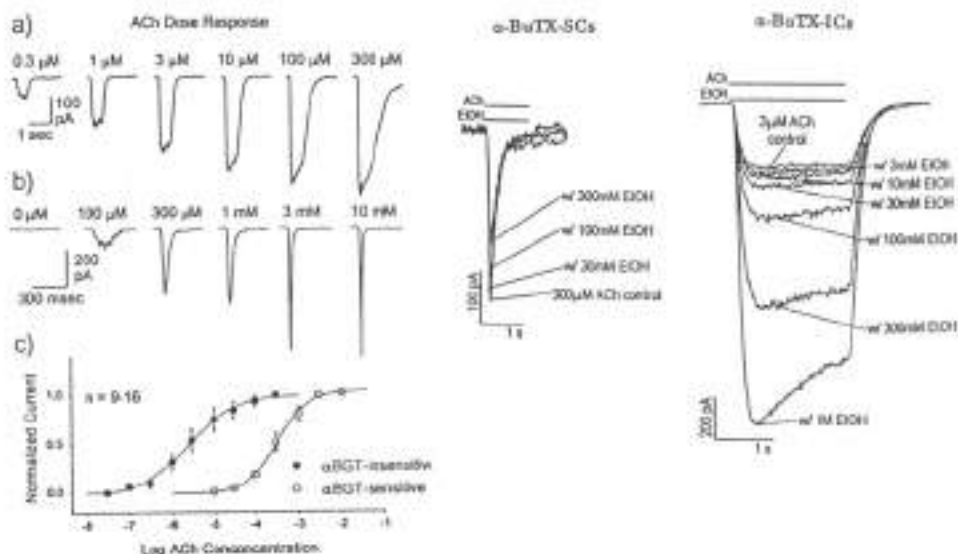


Fig. 7 (left). Two kinds of nicotinic receptors in rat cortical neurons. a,  $\alpha$ -bungarotoxin-insensitive, slowly decaying currents evoked by various concentrations of ACh. b,  $\alpha$ -bungarotoxin-sensitive, fast decaying currents. c, ACh dose-response curves. Modified from Aistrup et al. (1999).

Fig. 8 (right).  $\alpha$ -bungarotoxin-sensitive currents are slightly inhibited by 30-300 mM ethanol, which  $\alpha$ -bungarotoxin-insensitive currents are greatly potentiated by 3 - 1000  $\mu$ M ethanol. From Aistrup et al. (1999).

Experiments using HEK cells show that the AChR subunits  $\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 4\beta 4$ , and  $\alpha 3\beta 4$  are sensitive to ethanol potentiation, whereas the subunit  $\alpha 3\beta 2$  is less sensitive. These and other data have important implications. First, since ethanol action is AChR subunit specific, the effect cannot be explained by the old lipid theory which dictates that alcohols and anesthetics interact with the lipid phase of the membrane thereby causing anesthesia. Second, since nnAChRs are present on both presynaptic and postsynaptic sides modulating the release of other neurotransmitters, ethanol effects on nnAChRs will be amplified through a cascade of synaptic events resulting in wide-spread alterations of synaptic activities.

## References

- Aistrup, G.L., W. Marszalec and T. Narahashi (1999). Ethanol modulation of nicotinic acetylcholine receptor currents in cultured cortical neurons. *Mol. Pharmacol.* **55**, 39-49.

- Chinn, K. and T. Narahashi (1986). Stabilization of sodium channel states by deltamethrin in mouse neuroblastoma cells. *J. Physiol.* 380, 191-207.
- Lund, A.E. and T. Narahashi (1981). Modification of sodium channel kinetics by the insecticide tetramethrin in crayfish giant axons. *Neurotoxicology* 2, 213-229.
- Narahashi, T. (1974). Chemicals as tools in the study of excitable membranes. *Physiol. Rev.* 54, 813-889.
- Narahashi, T. (1992a). Nerve membrane Na<sup>+</sup> channels as targets of insecticides. *Trends in Pharmacological Sciences* 13, 236-241.
- Narahashi, T. (1992b). Mechanisms of neurotoxicity. Electrophysiological studies. Cellular electrophysiology. In: *Neurotoxicology*. Ed. M.B. Abou-Donia, CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 155-189.
- Narahashi, T. (1996). Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. *Pharmacology and Toxicology*. 78, 1-14.
- Narahashi, T. (1988). Mechanism of tetrodotoxin and saxitoxin action. In: *Handbook of Natural Toxins*. Vol. 3. Marine Toxins and Venoms. Ed. by A.T. Tu, Marcell Dekker, Inc., New York, pp. 185-210.
- Narahashi, T. (1998). Chemical modulation of sodium channels. In: *Ion Channel Pharmacology*. Ed. by B. Soria and V. Ceña. Oxford University Press, Oxford. pp. 23-73.
- Narahashi, T. and A.E. Lund (1980). Giant axons as models for the study of the mechanism of action of insecticides. In: *Insect Neurobiology and Pesticide Action (Neurotox. 79)*, Soc. Chem. Industry, London, p. 497-505.
- Narahashi, T., K.S. Ginsburg, K. Nagata, J.-H. Song and H. Tatebayashi (1998). Ion Channels as targets for insecticides. *NeuroToxicology*, 19(4-5), 581-590.
- Song, J.-H. and T. Narahashi (1996). Modulation of sodium channels of rat cerebellar Purkinje neurons by the pyrethroid tetramethrin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277, 445-453.
- Tatebayashi, H. and T. Narahashi (1994). Differential mechanism of action of the pyrethroid tetramethrin on tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270, 595-603.

○大沢 基保

帝京大学薬学部 環境衛生学教室

## 1. 免疫学とトキシコロジーの接点

かつて、Claude Bernardは毒性物質が精巧な生命現象の解析手段となると考えていた。英国の toxicologist Dr. Aldridgeはこの考えを敷衍して、トキシコロジー研究の二元的な目的について次のように述べている。"Research in toxicology defines the factors determining the degree of interaction with the primary target and also illuminates the molecular aspects of the biological processes involved."

このことは、primary targetを免疫系に限った場合にもあてはまる。免疫系に毒性応答をもたらす因子とその機構の解明は、免疫機構を解析することにつながる。

免疫学とトキシコロジーの接点は二つある。その一つは、免疫学の知見や技術のトキシコロジーへの応用である。抗原抗体反応は毒性物質や毒性マーカーの定量やその作用機序の解析に応用されてきた。この面の発展は急速であり、生体試料に用いるには定量の特異性について問題は残っているが、各種の有害汚染物質やその影響のバイオマーカーのELISA定量キット（例：アフラトキシン、ダイオキシン、ミクロシスチン、ピテロジェニンなど）が開発されている。

一方、トキシコロジーの側からの接点は、免疫系を直接的あるいは間接的な毒性標的とする、あるいはその機能変化を毒性マーカーとする免疫毒性学の展開である。毒性物質による直接的な免疫組織の傷害のほかに、それに伴う免疫機能の攪乱は、生体防御能の低下による感染や発癌、あるいは免疫機能の異常亢進によるアレルギーや自己免疫などの二次的影響を誘発しうる。免疫毒性学は複雑な毒性症状とその発現を免疫指標で解析・評価するとともに、毒性病理をとおして隠れた免疫反応の仕組みを浮かび上がらせることにも貢献している。本来は免疫毒性物質である cyclophosphamide, cyclosporin A, tacrolimus (FK506) などの薬物は、免疫毒性の機序が明らかになるにつれ、免疫機能の解析手段としても用いられるようになった。また、薬物・化学物質によるハプテン化や neoantigen の誘導は、抗原の認識機構の研究モデルとしても使われてきた。さらに、サイトカインや抗体などの免疫製剤の副作用も、免疫関連分子を介した毒性として免疫毒性学の研究対象になっている。

免疫毒性の研究は、その毒性の試験法の確立を中心テーマとして検討されてきた。米国とオランダにおいて精力的に検討され、実験動物によるその試験法パネ

A Current Aspect on Interrelation between Immunology and Toxicology  
Motoyasu OHSAWA, Department of Toxicology and Environmental Health, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University, Sagamiko, Kanagawa 199-0195, Japan.

ルが提案されており、OECDの専門部会で統一指針の作成が検討がされている。試験法作成面で後発の日本もこの作業に参画している。さらに、最近では、ヒトでの免疫毒性与健康影響の発掘と評価法の確立に研究の重点が移りつつある。

## 2. 免疫学の先端と免疫毒性研究

臨床免疫学・免疫生物学における先端的なトピックスの一つに、Th1/Th2パラダイムがある。この仮説を中心に、トキシコロジーとの関係について論じてみたい。

### 1) Th1/Th2パラダイム (Type 1/Type 2 パラダイム)

免疫反応は細胞傷害活性によりT細胞が主要な役割を果たす細胞性免疫と、抗体産生を通じてB細胞が主要な役割を果たす液性免疫に大別される。細胞性免疫は主にウイルス感染細胞や腫瘍細胞からの防御に、液性免疫は主に細菌感染からの防御に関わる。抗原刺激は、通常細胞性免疫について液性免疫を誘発するが、これらの両機能を誘発する。これら免疫機能はTh1とTh2としてマウスとヒトで確認されたヘルパーT細胞(Th)の2つのサブセットから産生されるサイトカインにより調節されている。その特異的な表面マーカーはまだ確立されていないが、Th1細胞はIFN- $\gamma$ やIL-2を産生し、これを介してCD8<sup>+</sup>T細胞による細胞性免疫能を促進する。Th2細胞はIL-4やIL-10を産生し、これを介してB細胞による抗体産生を誘導し液性免疫能を促進する。このことから、Th1/Th2のバランスが細胞性免疫と液性免疫の間の免疫応答の優位性に関与するというTh1/Th2パラダイムが提起された [1]。これらサイトカインはTh1、Th2以外の細胞から産生されるものもあることから、最近ではこの説はType 1/Type 2パラダイムと修正されている [2]。

### 2) Type 1/Type 2 パラダイムと免疫毒性

Th1、Th2の産生するサイトカインの中で、IFN- $\gamma$ やIL-4などは他方のTh細胞サブセットの機能を抑制し、相互のバランスの維持に寄与している。このことは、アジュバント関節炎モデルの実験動物にIL-4抗体を投与すると、容易にアジュバント関節炎を発症させる [3] ことでも明らかのように、Th1/Th2機能のバランス (Type 1/Type 2 のバランス) が崩れると、免疫異常が生じる。最近、Shearer [4] は病態生理状態とType 1/Type 2 のバランス変化をまとめているが、これを基にして毒性薬理学的知見を加えたものがTable 1である。すなわち、Type 1/Type 2 のバランスは薬物や毒性物質のような外来物質によっても変化するのである。言い換えると、Type 1 /Type 2 のバランスは毒性物質の免疫影響におけるマーカーとなり、それにより発生する症状を予測する指標になりうるものである。また、逆に薬物や毒性物質はType 1/Type 2 バランスの免疫学的意義を検証する実験的手段ともなりうると思う。

過敏症試験にはこの考えが取り込まれ、呼吸器アレルゲン (I型過敏症誘発) と接触アレルゲン (IV型過敏症誘発) がそれぞれ Type 2 と Type 1 の異なるサイトカインを誘導することから、アレルゲン物質を被験動物の血中サイトカインのフィンガープリントから分類することが考えられている [5]。日本においては、抗

原性試験の検討の流れで即時型過敏症モデルや Popliteal lymph node assay の研究に力点が注がれてきたが、これにもサイトカイン・フィンガープリントを取り込めれば、国際的な試験法の統一も可能と考えられる。

References:

1. T.R. Mosmann and R.L. Coffman, *Ann. Rev. Immunol.*, 7(1989) 145-173.
2. M. Clerici and G.M. Shearer, *Immunol. Today*, 15 (1994) 575-581.
3. S. Yoshino, Y. Murata and M. Ohsawa, *J. Immunol.*, 161(1998) 6904-6908.
4. G.M. Shearer, *Mechanisms Ageing Development*, 94 (1997) 1-5.
5. R.J. Dearman, D.A. Basketter and I. Kimber, *Toxicol. Appl. Phatmacol.*, 138 (1996) 308-316.

Table 1. Examples of dominant type 1 and type 2 cytokine profiles

Type 1 cytokines	Type 2 cytokines
Dominant cell-mediated immunity	Dominant humoral immunity
<i>Pathophysiological :</i>	
	Infection
Leishmania (protective)	Leishmania (susceptible)
Tuberculosis (protective)	Tuberculosis (susceptible)
HIV infection (resistant)	HIV infection (susceptible)
	Autoimmunity
Type I diabetes	Atopic diseases
Autoimmune thyroiditis	Lupus (SLE)
Crohn's disease	Hypereosinophilia
	Others
Acute GVH disease	Chronic GVH disease
Recurrent abortions	Successful pregnancy
Youth and adults	Infants and elderly(?)
<i>Toxicopharmacological :</i>	
Chemical contact allergy	Chemical respiratory allergy
	Hg-induced glomerulonephritis
	Rutin
	TCDD (type 1 decreased)
	mild Zn deficiency (type 1 decreased)

野村大成

大阪大学大学院 医学系研究科 遺伝医学・放射線基礎医学講座

文明科学の進歩は、人類に多大の便宜と生活の向上をもたらし、正に我々はその榮華をほしいままにしている。しかし、この大いなる欲望の見返りに、母なる地球に多くの負担をかけることとなり、その創造力と消化力にも限界があることを知ることになった。

一方、この大地に生まれ育った人類および全ての生命体は、物質文明の進歩により、それまでさらされたことのない新しい環境や人工放射能、太陽紫外線、そしてダイオキシン等人為起源有害因子に曝露されることになり、その影響は、いち早く生態系にあらわれ、より複雑な形態で現在地球に住む人類自身に降りかかってきている。また、その障害は我々自身のみならず、生殖細胞を通じて我々の子孫に伝達される可能性が明らかになってきた。(1, 4, 13)

これまで、環境有害因子の人体影響は、人類への直接的影響を中心に研究され、子孫への影響は突然変異等、ごく限られた学術分野でしか、研究されていなかった。しかし、継代的影響と呼ばれるこの分野の研究は、最近、世界的に注目され、国際裁判等でも討議されるようになった。幸いにも、この分野は日本が世界を大きくリードしている。本シンポジウムでは、放射線および人為起源有害物質の次世代への影響について、30年近くの間、二十日ネズミを用い手がけてきた研究の一部を見て頂き、この地球環境の改善と障害防護に役立てたい。

Transgenerational Effects of Environmental Toxic Agents in Mice and Men

Taisei NOMURA, Dept. Radiat. Biol. and Med. Genetics, Faculty of Med., Osaka Univ.,  
Osaka 565-0871, Japan



## 1. 生殖細胞被曝による次世代への影響。1,49)

### 1) 父マウスの有害物質被曝で、流死産、発生異常、がんが発生。

先ず最もわかりやすい例を示そう。雄マウスにX線を1回だけ作用させたのち、15日ほどたってから正常無処置の雌マウスと交配した。出産直前に帝王切開し調べたところ、見かけ上元気な胎仔は3匹しかなく、6個の小さな塊（ヒトでは流死産に相当）が見られた。父親が被曝しても子供が死亡する明白な証拠である。このような現象は、精子、精子細胞（被曝後マウスで3週間、ヒトで1ヶ月以内に授精）が被曝した場合に見られ、広島・長崎の被曝者の子供のように精原細胞期（精子をつくる元の細胞。マウスで被曝後8週、ヒトでは3ヶ月以上たってから授精）の被曝では、このような流死産は起こらない。しかし、見かけ上元気な胎児を詳しく調べてみると、低い頻度ながらもヒトに見られるような形態異常や仮死（自然呼吸ができない）が起こっていた。しかも、生まれたマウスをそのまま育ててみると、1年位たって、肺、肝、卵巣などにがんが発生した。その頻度は、精子、精子細胞期被曝に比べ、精原細胞期被曝では低く、約1/2になる。形態異常の場合も同じ結果であった。放射線のみならず、4NQO, DMBA, ENUや鎮痛剤の溶媒として日本人に大量使用されたウレタン(Ethylcarbamate)などの化学物質によっても同じような結果が得られた。形態異常については、1984年英国のLyon博士によりX線を用いて確認され、以後、多くの研究者により種々の化学物質で確認され、Paternal Toxicology（父親由来の障害）という新しい学術分野が確立された。

雄マウスにダイオキシン(TCDD)を投与し、正常雌マウスと交配した場合、着床前喪失と生存胎仔数の有意な減少が見られる。頻度は低いが、生存胎仔に仮死と対照群に見られないような重度の形態異常が発生している。その原因を追求中である。がんについても、小規模ながらいくつかの追試報告がなされた。下記のSellafield事件後、実験手続上の問題から否定的論文も1編あったが、カナダで私のマウスを用い、X線とトリチウム水で、イギリスで別個にプルトニウムで昨年、追試確認された。

### 2) 母マウスが授精前に被曝しても同じ結果。

授精前に雌マウスに作用させた場合、少量の放射線では、仔マウスにがんは殆ど発生しないが、大量の放射線に曝露されると仔マウスに高率にがんと形態異常が発生した。化学物質も同じであった。

### 3) 形態異常、がんは次の世代に伝わってゆく。

これら親マウスの被曝により次世代のマウスに起こったがんと形態異常は更に

次の世代に伝わっていく可能性も示された。

#### 4) 複合効果。

授精前に放射線に被曝した場合、その仔マウスが生後、微量の発がん促進物質の作用を受けると、高率に発がんすることを証明した。これは、1988, 1998年に追試確認されている。

#### 5) ダイオキシンによる精子間接死と授精障害。<sup>10, 11)</sup>

ダイオキシン投与によりマウス精巣は著しく萎縮し、精子数の減少が見られる。放射線照射や、変異原投与によりよく見られる現象である。しかし、マウス精子へのDNA損傷は殆ど認められないし、ヒト精子についても、染色体損傷は誘発されない。

ダイオキシン投与マウス精巣に見られる主たる変化は、精細胞の栄養細胞である Sertoli 細胞の障害である。栄養細胞の障害により、精子形成が障害され、二次的に(間接的に)精子数が減少しているのではないかと考えている。これを精子の間接死と名付けた。このような現象は、プラスチックの可塑剤である、フタル酸エステルでも見られる。最近話題になっているヒト・精子数の減少に、このような環境有害物質(内分泌攪乱物質)の影響が考えられるが、量的に大きな差がある。胎児期への作用をも考慮する必要がある。何故なら、合成エストロゲン DES やウレタンがマウス胎仔発生過程に作用すると生後、精巣、卵巣の萎縮が見られ、精子、卵子数の著しい減少を来すことが20年以上前からわかっている。<sup>2)</sup> また、ダイオキシン処理されたヒト精子には、染色体異常等の遺伝的障害は誘発されないが、ハムスター卵への挿入が約 1/2 まで減少する。<sup>10, 11)</sup> 合成洗剤の主剤である LAS や AS に比べると、はるかに授精障害は弱い。<sup>3)</sup>

## 2. ヒトにおける調査。

### 1) がん<sup>7, 8)</sup>

1990年、Gardner らは、英国Sellafield核燃料再処理施設で働いていた父親が、授精前に体外被曝線量として、広島・長崎の場合の4分の1に相当する100 mSv以上の放射線を受けていた場合、その子供たちに白血病発生の危険率が通常の6倍から8倍になることを発表した。以前から、同じような報告はあった。Gardner 博士の報告は、野村のマウス実験より、その原因の1つに父親精子の被曝(遺伝的影響)を取り上げた。また、授精前6ヶ月の間に父親が被曝している場合、子供の白血病発生のリスクが異様に高いことは、精子・精子細胞は精原細胞よりも放射線感受性が高いことを示唆している。被曝線量は大きく異なるが、

マウス実験と同じ様な傾向であった。より多くの放射線をあびた広島・長崎の被爆者の子供には、白血病の有意な増加は確認されていないことと大きく異なっている。セラフィールド裁判は54例の白血病症例のうちわずか2例しか扱っておらず、父親被曝との有意の相関を見出すことは不可能であり、原告団の敗訴に終わった。英国政府による再調査結果もほぼ同時に公表され、従業員の子供での白血病発生リスクは、Gardner 報告よりも更に高いことがわかったが、授精前の放射能被曝との関連は証明できなかった。しかし、マウス実験で仔マウスに誘発される腫瘍の殆どは白血病ではなく成人型の腫瘍である。出生後の生活環境（複合被ばく）も大きく異なるし、民族差（マウス系統差）も否定できない。ヒトでは、少なくともがん年齢に達するまで経過を追うことが必要である。子宮内被曝で、マウス実験が予測したように、成人型のがんが増加する可能性が残っている。

## 2) 発生異常<sup>10,11)</sup>

枯葉剤（ダイオキシン混入）散布地区で闘った北ベトナム兵士（男性）が帰国後、被曝していない北ベトナム女性と結婚した場合、非散布地区で戦った北ベトナム兵士の場合に比べ、子供に形態異常が有意に高く発生しているとのヒトでの多くの報告がある。雄マウスに放射線照射や変異原投与した時の F<sub>1</sub> 障害と同じようなことが起こっている可能性が示されているが矛盾点も多い。

## 3. 妊娠中に有害物質に曝露された場合。

妊娠中に作用した場合は、胎児への直接作用であるから、私はその影響を継世代影響には分類していない。しかし、見かけ上、同じように見えることも多いので、特記すべきことのみ記載しておく。

### 1) 受精直後の卵は非常に殺されやすい。<sup>3,11)</sup>

授精直後の卵は、放射線や化学変異原物質に極めて高感受性であり、しきい値がない。合成洗剤のようにこれまで他の検査では有害性が検出されにくかったものまで強い影響を示す。但し、着床前に死亡することは、妊娠しなかったのと同じことになり、これまで注目されなかった。しかし、ヒトでも、妊娠の早期診断（授精後48時間）が可能となり、着床前死亡と見られるものが1/3もあり、ヒトでも同じようなことが起こっているかもしれない。

### 2) 臓器原基形成期への作用は形態異常を起こす。

危険期としきい値が明確にある。サリドマイドは、これまでヒトになかったような形態異常を誘発したので、ヒトで因果関係が判明した。もし、よくあ

る形態異常が発生していたらわからなかっただろう。

3) 胎児成長期以降ならがんが発生。

これまで安全といわれた時期だった。<sup>2)</sup> 前述の流産の治療薬（合成エストロゲン、DES）でヒトでも証明された。この場合も、ヒトになかった病理組織像（副腎腫瘍に似ている）を示す腫瘍が発生したため、因果関係がわかった。

引用文献

- 1) Nomura, T., *Cancer Res.*, **35**, 264-266 (1975).
- 2) Nomura, T., and Kanzaki, T., *Cancer Res.*, **37**, 1099-1104 (1977).
- 3) Nomura, T., Kimura, S., Hata, S., Kanzaki, T., and Tanaka, H., *Life Sciences*, **26**, 49-54 (1980).
- 4) Nomura, T., *Nature*, **296**, 575-577 (1982).
- 5) Nomura, T., *Mutation Res.*, **121**, 59-65 (1983).
- 6) Nomura, T., *Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis* (Ed. Ramel, C.), pp. 13-20, Alan R. Liss, New York (1986).
- 7) Nomura, T., *Nature*, **345**, 671 (1990).
- 8) Nomura, T., *Br. Med. J.*, **306**, 1412 (1993).
- 9) Nomura, T., *Male-mediated Developmental Toxicity* (eds. Olshan, A.F., Mattison, D. R.), Plenum Press, New York, pp. 117-127 (1994).
- 10) 野村大成、*環境科学会誌*, **9**, 79-91 (1996).
- 11) 野村大成、*ここまでの化学物質の生殖毒性*、婦人民主クラブ、東京 (1997).
- 12) 野村大成、「あなたは子孫を残せるか」別冊宝島411、83-96 (1998).
- 13) 野村大成、「Of Mice and Men (生きとし生けるもの)」*敵愾*, **31**, 13-20 (1998).

**Biostatistics and Toxicology**

Masahiro Takeuchi  
Division of Biostatistics  
Center for Clinical Pharmacy and Clinical Sciences  
Kitasato University Graduate School

**Key Words:** Biostatistics, Toxicology, International Conference on Harmonization (ICH), New Drug Application (NDA)

Recently new drug development procedures have received international attention. For instance, the International Conference on Harmonization (ICH) among three regions—the United States, Europe, and Japan—has been held several times since 1991 in order to obtain mutual agreements on new drug development procedures from both industry and regulatory officials. One of the purposes of the ICH process is to make beneficial drugs available to the public as quickly as possible.

Several phases exist in the development of new drugs—animal studies, Phase I, II, and III. Carcinogenicity issues are mainly investigated on animals before testing on human beings. After safety issues are resolved in the animal studies, several testings are undertaken with human beings. Therefore, an assessment of the risk of drug exposure in humans includes an assessment of the risk for carcinogenicity in tests on rodents.

One of the responsibilities of statisticians is to conduct statistical reviews of long-term animal carcinogenicity experiments on pharmaceuticals carried out and submitted by drug sponsors as part of their investigational new drug (IND) or new drug application (NDA). Statisticians evaluate the validity of the designs and the appropriateness of methods of data analysis employed by the sponsor. In addition, statisticians also need raw data in electronic form to perform further statistical analyses that they believe are appropriate and necessary to evaluate the analyses and conclusions contained in the reports.

In this paper we discuss statistical issues regarding the designs of animal carcinogenicity experiments, methods of statistical analysis of tumor data, and interpretation of study results.

**Key Reference:**

ICH (1995), *Guidance for Industry: Dose Selection for Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals*, ICH-S1C.

ICH (1996), *Guidance on Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals*, ICH-S1B, Federal Register, vol. 63, 8983-8986, 1998.



### シンポジウム3 画期的新薬開発におけるトキシコロジストの役割 オーガナイザー序論

野口英世、渡部 烈  
(第一化学薬品、東京薬科大学)

近年、画期的新薬を開発するためにgenomicsを基としたtarget orientedな創薬研究が展開される様になり、非常に新規性の高い化合物が創出されて開発のパイプラインに現れる様になった。この様な化合物の安全性評価においては既存化合物の評価法に追従するだけでは安全に開発を進めることが難しくなることが予想される。新規性の高い化合物の安全性評価では化合物特性に合わせた評価が必要であり、開発の段階毎に適切な安全性評価が求められる。従って、創薬段階での安全性評価は医薬品としての承認審査時点に求められる画一的評価とは逆に、評価の個別化が必要となる。この様な安全性評価では試験系の選択、試験の実施、結果の判定や評価などに経験を積んだ研究者の参加が望まれる。また、万一、副作用が発現した場合の緊急治療法の検討なども含めた総合的安全性研究が必要となる。

創薬段階での安全性評価では種々の試験系の確保が必要となるが、限られた研究資源の中で開発企業が総ての試験系を独自に常時確保することは経済的に困難であり、研究効率から考えても無駄が多い。この様な特殊な試験系は試験の受託を専門とする企業がそれぞれ特徴のある試験系として製薬企業に提供することによって新薬の開発研究がより効率化し、併せて洗練された試験系を用いた客観性の高い評価が行えることが期待でき、医療上有用な新薬の開発に大きく寄与するものと考えている。そのためには、種々の専門的評価系をどの研究機関が保有しているのかや、その試験系の有用性や信頼性などについて公開されている必要がある。

本シンポジウムでは画期的新薬を開発するうえでの諸問題を考察し、受託試験企業が保有している試験系を公開して頂き、開発の過程で効果的な安全性評価を効率的に行うため方策を模索するとともに、創薬研究段階におけるトキシコロジストの役割について論議する。

The Services of Toxicologists in the New Drug Development Process

Organizers : Hideyo NOGUCHI and Tadashi WATABE

Daiichi Pure Chemicals and Tokyo University of Pharmacy and Life Science

## 新薬の開発推進に役立つ安全性評価

○野口英世

京都薬科大学大学院

〔開催の主旨〕 画期的新薬を開発するために genomics を基とした target oriented な創薬研究が展開されるなかで、combinatory chemistry や HTP screening によって多数の新規化合物が創出される<sup>1)</sup>。新規性の高い化学構造は新しい毒作用を内在する可能性があり、新しい薬理作用は新しい副作用の原因となることが危惧される。このような創薬の新しいアプローチから生まれた新規化合物のヒトでの評価試験をどのように進めるのか、その際の安全性評価をどのように行うのかといった新しい問題が投げかけられている。

〔新医薬品開発過程における安全性評価の問題点〕 医薬品承認審査基準の国際間調和をはかる ICH ではヒト試験に入るタイミングが論議され、そのために必要とする毒性試験が論議されている。しかし、新しい薬効が病気の治療に寄与するかどうかはヒトでの臨床試験で確認する必要がある、新しい薬理活性物質はヒトでの薬効を確認してはじめて開発候補品として巨額の開発費を投入する価値が生まれる。

従って、これら新規化合物は非臨床段階で薬物の毒性作用を定量的に検出し、

Toxicology Support ADME と毒性試験 toxicokinetics のデータからヒトでの薬物暴露量を定量的に予測しなければならない<sup>2-4)</sup>。また、毒性が代謝物や代謝的活性体に依存することもあるので、ヒト組織を用いた *in vitro* 試験で確認しておく必要がある<sup>5,6,7)</sup>。

ヒトでは遺伝的、環境的要因による代謝の個人差があり、個人差の発現には人種差、地域差も認められる。そのため、安全係数の狭い薬物では代謝の個人差を考慮して

Accelerate and improve the safety evaluation under drug discovery process.  
Hideyo NOGUCHI, Postgraduate School, Kyoto Pharmaceutical University,  
Kyoto-607-8414, Japan



用法・用量を定める必要がある。また、海外データを利用するには個人差の発生頻度についても評価する必要がある。さらに、市販後は複数の医薬品と併用することが多く、薬物代謝に起因する薬物相互作用の可能性についてもスクリーニング段階で検討しておく必要がある<sup>8)</sup>。

医薬品の治療効果や副作用は画一的に取り扱うことが困難であり、すでに安全性評価の確立した輸入医薬品と新規性の高い化合物の安全性評価とはおのずと異なることになる。すなわち、後者では開発の段階ごとに化合物特性に合わせた評価が必要であり、そのためには化合物特性を考慮した新しい評価試験系を開発しながら、直近に行うヒト試験の安全性を予測して開発を進める工夫が必要となる。さらに、開発段階から市販直後の段階では患者の代謝特性にあわせた医薬品の使用が望まれる。

これら開発過程で必要とする多彩な安全性評価試験の技術を一企業で常に確保しておくことは困難で、経済的にも無駄が多い。また、安全性評価に用いるデータは単に中立的であるだけの研究施設で実施すれば良いのではなく、信頼性が保証された透明性の高いGLP下で行われる必要がある。そのために客観的に安全性評価試験を専門に行う受託試験施設にアウトソーシングして信頼性を確保しながら開発研究の効率化をはかることが考えられる。

〔結語〕本シンポジウムでは画期的新薬を開発するための諸問題を論議し、医薬品開発に寄与する安全性評価試験を効率的に実施していく道を探る。また、医薬品の安全性評価の新しい研究対象となりつつある創薬研究段階でのトキシコロジストの役割についても論議して頂きたいと考え、本シンポジウムを企画した。

## 文献

- 1) 野口照久 構造生物学と創薬科学 ファルマシア、35, 5 (1999)
- 2) H.Noguchi, Toxicokinetics as part of the safety evaluation of new pharmaceuticals under development, *J. Toxicol. Sci.*, 16, suppl. 11, 103-106 (1991)
- 3) 野口英世、毒性試験における薬物動態、薬物動態、7, 376-381 (1992)
- 4) Y.Tanaka, H.Shimojyo, T.Hata, M.Hashimoto, H.Noguchi, Toxicokinetics of zenarestat, an aldose reductase inhibitor in animals and man, *Xenobiotica*, 24, 461-471 (1994)
- 5) 野口英世、トキシコキネティクスの毒性評価への応用、中毒研究、6, 221-226 (1993)

- 6) 野口英世 薬物動態とトキシコキネティクス、ファルマシア、30, 619-621 (1994)
- 7) H. Noguchi, A proposal for avoiding toxic Interactions of a drug under development to estimate inhibitory ability on the drug metabolizing enzymes In human liver, *J. Toxicol. Sci.*, 21, 317-321 (1996)
- 8) G. C. Moody, S. J. Griffin, A. N. Mather, D. F. McGinnity, R. J. Riley, *Xenobiotic*, 29, 53-75 (1999)

創薬研究から開発研究における新しい動向  
— 安全性試験の位置付けと新しい戦略 —

○ 堀井郁夫

日本ロシュ株式会社 研究所 前臨床科学研究部

1. Target oriented な創薬 —創薬と安全性試験との関わり—

“病氣”とは外部環境、食物、および Life-Style (たとえばストレス) が遺伝子に影響を及ぼし、複雑な反応および相互作用の結果引き起こされるものであり、“すべての病氣は遺伝子的要素に関して発現している”と言っても過言ではない。現在、Genomics を基とした創薬への “Molecule Target” の方法として、遺伝子発現・制御に関与する様々な因子を介した生体内での相互機構過程を制御したりする治療薬が主要なものとなって来ている。たとえば糖尿病の一因子である Insulin を Targeting した場合、Insulin の合成・分泌の制御に関しては、それに関する Gene expression は多数の因子により複雑にコントロールされている。したがってどこを Molecular targeting するかということが、薬物の開発にあたり、非常に重要なポイントになってくる。したがって、安全性試験の評価ではこのような治療の観点からの薬効発現の背景を基とした、毒作用の発現を考える必要がある。一方、薬効の延長上にない毒性の Target があるかもしれない点も考慮する必要がある。いずれにしても毒作用発現そのものも、Gene expression に大きく関与している事は既知の事である。

2. 新薬開発過程における創薬から新薬申請までの研究のパラダイムシフト

2-1. 創薬の初期から lead/candidate selection までの過程

Molecular targeting がなされた後、近年では Combinatorial chemistry の導入により、短期間で多くのスクリーニングすべき化合物が合成できるようになった。よって、多種の化合物について、少量で毒性を調べる必要性がでてきた。それを “High Throughput Toxicology” と呼ぶ。そこで、それに対応する為には毒性研究のパラダイムシフトが必要となってきた。“New Paradigm” と言っても基本的には化合物を選択し、臨床に適用する上で意味のある改良を導くべきである。創薬の初期においては多数の化合物が少量合成され、その必要とされる毒性評価要求に対して

New trends in pharmaceutical research from discovery to development

— The position of toxicological research in pharmaceutical development and its new strategy —

Ikuro HORII, Dept. of Preclinical Science, Nippon Roche Research Center, Kanagawa 247-8530 Japan.

的確に対応するには *In vitro* のシステムの開発が必須である。*In vitro* 試験は少量の化合物でも実施可能であり、分子および細胞レベルでの毒性評価を行うことになる。その次の段階として *Pilot in vivo* 試験があり、この段階では化合物の量はやや多量に必要となってくるが、分子および細胞レベルでの毒性に加え、機能的および形態学的な評価が可能となり、また *Toxicokinetic* の知見も合わせてその薬物に対する臨床での安全性に対する知識と理解はより深まっていく。また、逆に、より深い知識と理解を十分に活用するには、各段階で可能な限り毒性評価の適切な “*Toxicological Marker*” および “*Pharmacodynamic Marker*” を見出しておくべきである。

## 2.2. Entry-Into-Human 時

最初に人に投薬するにあたりガイドライン上必要とされている毒性試験を基として、最もヒトに外挿できる動物種における無毒性量/毒作用発現量と有効血中濃度/毒作用発現血中濃度の関係を明らかにし、“*Toxicological Precursor*” を設定するとともに的確な “*Safety / Risk Assessment*” をする事が重要である。

## 2.3. 臨床試験遂行時 (Phase I - III)

臨床試験の Phase I から Phase II/III に向けての毒性試験は、GLP に準拠した多数の動物を用いた *In vivo* 試験が主であるが、臨床試験からフィードバックされた結果も含めて毒性を評価し、その開発中の薬物が人に対して効果的であり、また “*Safety Margin*” が十分あることを見極める知識や経験、理解が必要となってくる。

“*New Paradigm*” には以下のような事項があげられる。

### 1) 創薬の早期における毒性評価

まず、従来よりも創薬のより早い段階で既存のデータベースを利用し毒性を評価し、効率的な創薬を目指すことが主要点であり、“*Bioinformatics*” として構造活性相関、遺伝子発現試験の企画と解釈を行い、その後、“*Improved In-vitro Screen*” として *In vitro* システムを設定し毒性評価をする点が強調される。必要とあらばヒト細胞・組織を考慮した *Gene chip* システムを利用する事が要求される。

最も重要なアプローチとして “*Molecular Toxicological Endpoint*” を明確にし、遺伝子発現系からの毒作用を考慮した新しい毒性試験系を設定していくのが今後の焦点となってくるであろう。

### 2) 人への外挿を考慮した毒性試験実施・評価

手法や技術としては、新しい機能検査（臨床検査や超音波を利用した検査など）の導入、病態モデル動物での毒性試験（トランスジェニック動物の利用など）、*Bioinformatics and genomics*（遺伝子発現技術・情報を適用する）などのより高度で新しい知識・技術の導入が望まれる。

### 3) 得られた Know-how や新しい Technology をどうするか?

“Intranet” を十分に利用し、On-line peer reviews, Cross-functional chat groups, Expert advice などのシステムを積極的に取り入れる土壌が要求される。

“Knowledge Base” としては、化合物ごとの蓄積データ歴、構造に関する知識、新しく確立された技術や手段に関する経験を何等かのデータベースとして有効利用できる事が重要である。すなわち、“World-wide Software Framework” として、どこでも、いつでもデータにアクセスすることが可能であることが必要とされる。

### 4) どのように効率よく Reporting していくか?

“Data Warehousing” や “Intranet Publishing and Documentation” の概念を持ち込んだ機能的な Documentation system は必須のものとなってくる。

## 3. New technology の例

### ・ Computer-based screen

特に早期創薬の時、まだ、化合物が合成されていない時、構造活性相関からみた毒性の予測が必要となってきた。構造 (3D 構造も含む) からコンピュータを用いて遺伝子毒性・発癌性・一般毒性・生殖毒性等を予測することができれば、合成前にその化合物を “Kill” することができ有意義である。その際、コンピュータには In vivo や In vitro のスクリーニングから得られた経験や分子構造についての知識を “Knowledge Base” として持っていなければならない。新しい化合物についての予測の正確性は、その “Knowledge” の量分に対してどれだけの投資と努力を払ったかによって決まるであろう。

### ・ Gene chip technology

化合物を暴露した細胞または組織から、mRNA を抽出し、どのような遺伝子が発現しているか In-situ hybridization を用いて検出する。結果の解釈にあたっては各種のデータベースを用い、New molecular toxicological endpoints を従来の毒性結果と対応させる。解釈のため In-house knowledge base を充実させていくことも必要である。

### ・ Reporter gene constructs

Reporter gene は検出の容易な蛋白を形成することから、この Reporter gene 蛋白を分析することにより、その Reporter gene が関与している遺伝子の発現状態を推定するという方法を用いて毒作用を推定していく方法もある。特異的な遺伝子の Up-regulation が観察された場合、その細胞の特異的な反応としてとらえる事ができ、時には遺伝子異常をみるよりも、より効果的に変化を捉える事ができる。

### ・ Reaggregate cultures (spheroids)

一例を挙げれば、肝細胞の Spheroids については、機能的な胆管と内皮構造を持つ

系が確立されている。そのような培養 Spheroid に薬物を作用させた後、病理組織学的、生化学的 Marker および Reporter genes 等を用いて検査が行われ、細胞障害を引き起こす特異的な酵素の誘導、細胞内の毒作用相関の検出（ある細胞によって毒性代謝物が形成され、他の細胞によって活性化される）等が容易にみる事ができる。

#### 4. 現在及び将来の展望

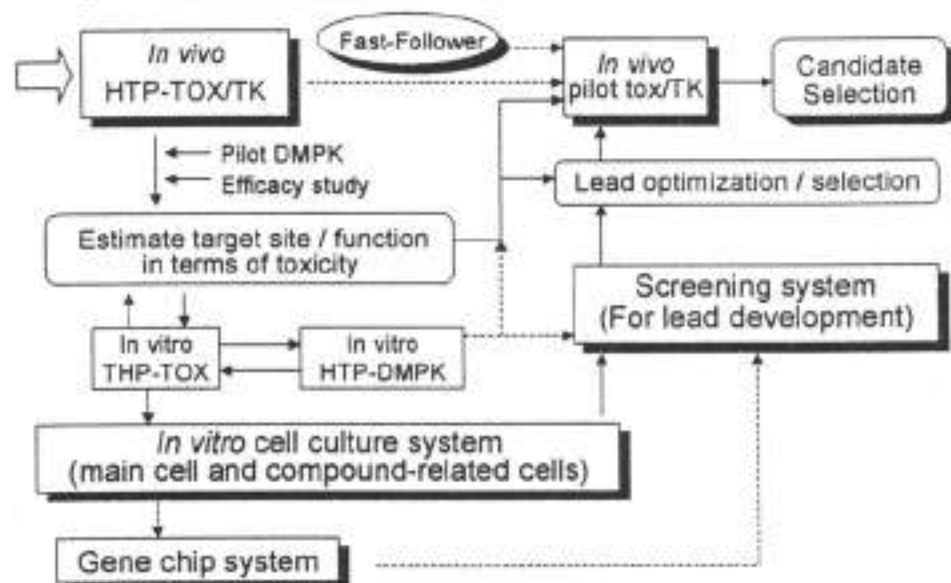
##### ・創薬の現在のアプローチの仕方

現在の毒性試験の創薬への関わり方として、In vitro screening, Cell culture, High-throughput Tox/PK を介して探索された Lead compounds について、Pilot Tox/PK、単回の PK study、および非 GLP の Ames test 等を行い、Candidates を Safety pharmacology、2/4 週間の毒性試験や TK 試験、GLP の変異原性試験等からしぼり込み PDC (Product Development Compound)へ、さらに Dose-regimen Tox/TK や代謝が行われ臨床へと入っていくのが通常である。以後も長期の毒性試験、生殖毒性試験、癌原性試験等が実施され、開発が進行する。現在、このような創薬の過程において、予試験的な2週間の毒性試験あたりまでは製薬会社内部で行うことが多いが、以後の毒性や薬物代謝試験については有効な Resources の利用の面から委託試験所を利用することが多くなっている。

##### ・創薬の将来のアプローチの仕方 (Fig. 1)

創薬の初期に実施される In vivo HTP-Tox 試験としては、少量の薬物を用いて、短期間の内に答えを出すことが必要なことから、小動物を用い（必要であればサルを使用）、少ない動物数（2~3 匹）、少ない群（1~2 group）、短期間（3~5 日）、

Fig. 1 Present / Future toxicological approach for drug discovery



比較的高用量で実施することになる。この実験の条件は、供給される化合物量により決まり、毒性を検出するための感度の高い特異的なパラメーター、早い病理標本作成方法、テレメトリーシステムの導入等により、標的部位やその機能について、適切にまた素早く評価を下していかなければならない。これらの評価にあたっては、主要臓器およびその薬物の標的臓器を用いた細胞による *In vitro cell culture system* や *Gene chip system* を利用することにより、より有意義な結果が得られると考えられる。*In vitro cell culture system* や *Gene chip system* はそれ自体、一つの *Lead compound* のスクリーニングシステムとして有用である。

## 5. おわりに

科学の発展に伴い、医療における治療の *Target* 及び *Targeting* の方法が変化し、また、創薬における評価方法も変化する。この事実は、今までもそうであったように今後もめまぐるしく変化するのは周知の事である。我々、医薬品の安全性を評価する科学者もこの点を常に考慮し、時には先んじて、時には慎重にそれに対応して行かない限り、“安全性の評価力”は向上しないと明言できよう。

## 参考文献

- Pilero AM and Serabian MA. Preclinical development strategies for novel gene therapeutic products. *Toxicologic Pathology*, 27: 4-7. 1999
- Dyer MR, Cohen D and Herrling PL. Functional genomics: from genes to new therapies. *Drug Discovery Today*. 4: 1359 - 6446. 1999.
- Regalado A. Drug development's preclinical bottleneck. *Start-up*, December: 26 - 37. 1997.
- Alden CL, Sagartz JE, Smith PF, Wilson AG, Bunch RT, and Morris DL. The pathologist and toxicologist in pharmaceutical product discovery. *Toxicologic Pathology*, 27: 104 - 106. 1999.
- Benfenati E and Gini G. Computational predictive programs (expert systems) in toxicology. *Toxicology*. 119: 213 - 225, 1997.
- Marshall A and Hodgson J. DNA chips: An array of possibilities. *Nat. Biotechnol.* 16: 27 - 32. 1998.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, and Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microassay. *Science*, 270: 467 - 470. 1995.

## 創薬研究における毒性評価

○野村 護

第一製薬株式会社 安全性研究所

## 1. 動物種差と比較毒性評価

医薬品開発における毒性研究は、経済活動に伴い意図的に用いられる化学物質に関する毒性学であり、毒性試験法である。単回・反復投与毒性、生殖発生毒性、免疫毒性、局所刺激性あるいは癌原性試験等については従来から実験動物としてマウスやラット等のげっ歯類およびモルモット、ウサギ、イヌ、サル等の非げっ歯類が使用されてきた。これらの試験は前臨床試験と呼ばれる如く、臨床試験に先立ち実施され、評価結果からヒトへの外挿、予測を基に安全性を確保し、ヒトでの安全性を確認する第一相臨床試験を実施してきた。

すべての動物実験のデータはヒトに外挿し得るのか疑問であるが、従来の医薬品開発のステップとして欠くことのできない手法の一つであった。しかし、ヒトを含めた各種動物の代謝的側面が解るに連れ、ヒトと動物間の大きなギャップに悩むことになった。この問題を救うのに少しく貢献したのが霊長類であることは周知の事実である。マウスとヒト、ラットとヒト、イヌとヒトやがてサルとヒトの連鎖の如く比較することによって類似性を見出し、部分的な相同性結果をもってヒトへの副作用予測を推察していた傾向がある。実験結果からデータを得ていない間隙を補完する内挿や、実験データの外側を推論する外挿は推計学的手法に立脚したデータの予測と言えるが、実験動物から得られたデータからヒトを予測することは「Extra-species extrapolation」即ち、超動物種差間外挿と言っても過言ではない。これらの問題を解決することは容易なことではなく、多数の実験動物を使用する逐次実験によって膨大なデータのなかから僅かの真実を得ているのが現状であろう。

一方、非臨床試験から得られたデータから化学物質が持つ毒性学的特徴を把握し、さらに安全性薬理に代表される中枢神経系および呼吸循環器系への作用を調べてヒトの生命維持系への影響を評価したり、ヒト組織あるいは細胞を用いて化学物質のヒト代謝予測をすることが最近の毒性評価のツールとなる時代になった。

## 2. 探索研究と開発研究に対する毒性研究のあり方

Role of the Toxicologist : 1. Toxicological evaluation in pharmaceutical drug exploratory research.

Mamoru NOMURA, Drug Safety Research Laboratory, Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd. Tokyo-134-8630, Japan.



最近の創薬研究ツールの変化は、保守的な研究者にとっては隔世の感があると思われるが、欧米製薬企業においてはコンビナトリアル合成やCADD合成によって化学物質を合成しHTSによって選択的な合目的活性評価が現実に行われている。

従って、従来からの盲目的なガイドライン信奉者でなくても時代の変遷と要求されている評価が保守的なトキシコロジストの役割を大きく変えようとしていることに気づく時であろう。即ち、創薬の初期段階では微量の合成検体を如何に効率よく評価できるかが求められているのである。ヒトに代謝が類似する動物と言うだけの理由でカニクイザル等の霊長類を早期探索的毒性研究に使用することは少ないだろうが、ヒト細胞を用いての細胞障害性や細胞分化抑制あるいは形態異常などの評価系を応用することには納得できるだろう。in vitro 評価系の目覚ましい発展のみでなく、従来型のアニマルスケールアップでなく、ある種の遺伝子を導入あるいは欠損させたノックインやノックアウトマウスの応用も、合目的な評価法の一つになり得ている。マウスでの毒性評価は微量の合成検体でもある程度スクリーニングとして成立するが、十分なバイオマテリアルが得られないため特定の毒性を調べるために使用されるケースが多いと考えられる。しかし、ヒトの外挿を考慮すると霊長類を用いた毒性評価は重要な情報を提供できることから小型の霊長類マーモセット等の早期探索毒性研究への応用は今後、医薬品開発のスクリーニングとしての利用価値が高くなるであろう。一方、毒性評価を担当するトキシコロジストの資質が問われているのも事実であり、欧米の認定トキシコロジストの質の高い学力に匹敵する人材は日本では数少ない。毒性を評価することは即ち、オールマイティな学問領域をカバーし学際的研究に明るくなくては勤まらないとも言える。特に、ヒトを予測するための毒性研究のなかにはオーバードーズでの薬理学、即ち一般薬理学の評価系も含める必要がある。基本的には動物の多次元観察や中枢作用および呼吸循環系の評価を無麻酔無拘束下に評価する技術が必要とされる。このための必須技術としては、従来的一般薬理ガイドラインに提示されている評価項目に加えて、いわゆる機能毒性評価が有用な評価法として利用される価値が高いことになる。

### 3. 毒性研究の進め方

新規化学物質に対しての毒性評価には多岐に渡る応用研究が必要となるが、最初の物質に対する評価としては、①in vitroでの変異原性を調べ、②培養細胞系での合目的試験評価さらに、毒性薬理的評価として③モデルマウスでの評価、④安全性薬理としてのバイタルファンクション、反復毒性として⑤小型霊長類での評価、⑥機能毒性評価（電気生理学、臨床化学）と病理学的評価が早期の探索研究として必要であろう。リードオブティマイズされた候補品の開発研究では、如何に早く非臨床試験の評価を完結し、ヒト試験に入る前に倫理上の問題をクリアーできるだけの評価データを得ておくことが肝要であろう。

このために必要な試験をアウトソーシングできる、信頼される受託研究機関の存在は医薬品開発の成功確率を高めることになり、技術レベルと評価能力を含めた科学者の交流と、対話、討論により生まれた共通認識がトキシコロジストとしての世界的なハーモニゼーションの基盤となり得ると考える。

松本一彦

日本たばこ産業㈱ 医薬総合研究所 安全性研究所

本シンポジウムは安全性評価研究会のメンバーが中心となり企画されたものである。その研究会は第13回毒科学会年会(1986)のワークショップに参加したシンポジストが柱になり発足したもので、現在約300人の会員を擁し、年3回の研究会と毎日のE-mailによる討議のいずれかに参加することが会員資格となっている。そこには公的機関、企業、コントラクトラボに所属するあらゆる分野の毒性研究者が集っており、所属機関の壁を取り払った形で討議がなされ、その成果はサイエンティスト社から「谷本学校毒性質問箱」として発行されている。

従来、コントラクトラボの毒性研究者は製薬企業を顧客として見ることから、毒性研究に対し、受身の態度で臨んできたように思う。企業によっては依頼被験物質の薬効作用や構造式を開示せず、単なる毒性試験引け請け人として扱われないところもあるが、反対に自社の外部機関としての扱いで、すべてを開示して、考察までしっかり書くことを要求する会社もある。それは企業の規模にもよるがそこを指揮しているリーダの体質にもよる。そういう中で、コントラクトラボは企業が手におえない難しい試験をこなしてきており、技術的には非常にすぐれたものを身につけたラボも多くなってきた。最近ではTKがらみでサルの試験が多くなってきたが、サルの施設を有している企業はほんの一握りで、コントラクトラボに頼らざるをえない。したがって、サルの毒性に関する技術と知識は一部の企業を除き、コントラクトラボが優れたものを持ち始めている。ただ、サルの供給体制には問題があり、今後、良質のサルを安定して入荷することが各コントラクトラボの命題になると思われる。それは、日本だけでなく外国のコントラクトラボでも同じ問題を抱えている。

一般的に外国のコントラクトラボの方が日本のそれより、全てがすぐれているように思われるが必ずしもそうではない。マウスのがん原性試験では強制経口投与がうまくできなかったり、サルでは寄生虫、結核に感染したものを提供されることもある。

Usefulness and confidence of contract laboratories for the toxicity study.  
Kazuhiko MATSUMOTO, Toxicology Research Laboratories, Central  
Pharmaceutical Research Institute, JAPAN TOBACCO INC., Kanagawa-  
257-0024, Japan

また、欧米のコントラクトラボの中には動物愛護の問題から自設の Laboratory Veterinarian を抱えており研究の内容如何にかかわらず、愛護の目から殺処分を判断しているところもある。その権限は強く、試験責任者の判断より優先されることもあるということを知っておかなければいけない。

しかし、外国のコントラクトラボには日本に来てレクチャーをする優れた研究者が多く、実力ではハイレベルのスタッフを抱えていることは周知のことである。

近年、日本のコントラクトラボにも製薬企業や大学から優れた人材が入るようになり、少し欧米に近づいてきた。また、学会活動も活発になってきており、ちなみに第20回のトキシコロジー学会（千葉、1993年）では発表したコントラクトラボの施設数が11%であったものが、昨年（名古屋）では19%に増えており、その演題数も11%から22%に増加している。その増加した分、施設数で38%が22%、演題数で31%が20%と大学が減少している。

公的機関および企業はほぼ横ばいであった。勿論、もっと長期間にわたっての調査がなされなければ真の傾向は掴めないが、一事象は捉えているものと思われる。

	平成5年度				平成10年度			
	演題数		施設数		演題数		施設数	
大学	50	30.7%	32	38.1%	33	19.8%	17	21.5%
公立研究所	28	17.2%	10	11.9%	25	15.0%	9	11.4%
企業	62	38.0%	29	34.5%	59	35.3%	27	34.2%
コントラクトラボ	18	11.0%	9	10.7%	36	21.6%	15	19.0%
外国	5	3.1%	4	4.8%	14	8.4%	11	13.9%
合計	163	100.0%	84	100.0%	167	100.0%	79	100.0%

前述の安全性評価研究会においてもコントラクトラボの研究者の参加は活発であり、分科会の1つとして活動している背景データ分科会では統計学者の指導の元に、背景データをいかに取り、いかに使うかというテーマで6施設のコントラクトラボが莫大なデータを持ち寄り検討している。その成果は9月に開かれる安全性評価研究会の奈川フォーラム99で発表される予定である。

これからのコントラクトラボに期待されることは大きく、最低1つは他の施設には無い、誇るべき技術を有するべきである。本シンポジウムでの後半に行われるコントラクトラボの有する技術の発表はそのような期待をこめて企画されたものである。コントラクトラボは企業からの受注を待つことだけでなく、受注試験を予知し、新しい技術や知識の導入を図るべきであろう。そのためには、企業毒性研究者と discussion する機会をたくさんつくり、これからどのような薬が開発されようとしていて、その評価に伴う技術は満足いくものなのか、自分の所でやるとするとどのような技術を開

発しなければいけないのか、などを始終模索すべきである。高価な装置を必要とする技術だけでなく、例えば、高脂血症薬の開発に付随して測定が予測される脂溶性ビタミンの測定ができるということだけでも、企業側からみれば当該施設の利用理由になる。コントラクトラボの研究者ももっと外に出て他機関の毒性研究者との会話を広げる努力をして欲しい。

企業内毒性研究者は開発化合物の毒性試験ならびに毒性作用機序の検討に追われ、基礎的な毒性学を研究するゆとりを持ってるところは少ない。開発品目が多ければ多いほど、その傾向は強い。基礎的な毒性学の研究はコントラクトラボの毒性研究者に負うことが多く、他機関の毒性研究者との協力を基に学会をリードしていくことを願ってやまない。

本シンポジウムのコントラクトラボからの演者は自社の技術のみならず、関連技術を持つ他社の技術紹介もすることになっているが時間の制限から十分にその紹介ができないと思われる。その分、展示場で発表することになっており参加者の関心を引く紹介がなされるであろう。ぜひ、ブースを覗いてみて欲しい。以下に、共同発表者でシンポジウム関連展示発表予定の施設を紹介する。

(順不同) 新日本科学、環境バイリス、イナリサーチ、富士バイオメディクス、ボゾリサーチセンター、動物繁殖研究所、SRI、COVANCE、HUNTINGDON、三菱化学安科研。

## 静脈内インフュージョンによる毒性評価

梅村 建夫

株式会社ボゾリサーチセンター

静脈内持続投与法は、血管にカテーテルを留置し、被験液を任意の注入条件によって注入する方法で、暴露量を任意に調節し、長時間にわたって期待する血中濃度を維持することが可能な方法である。本方法は、点滴法として臨床では長い歴史があるものの、毒性試験の領域においては技術的な観点からボラス投与による評価が主としてなされてきた。ボラス投与では急激な血中濃度の上昇による急性作用が強調され、任意の血中濃度を長時間保った時の毒性評価は、実際上困難であった。毒性試験における静脈内持続投与法の応用の利点は、ヒトの臨床における暴露条件に可能な限り近い方法で投与し、その安全性を評価できることにあると思われる。今回、 $\beta_2$  アドレナリン作動薬を用いてボラス投与と静脈内持続注入による毒性の比較、並びに静脈内持続注入法の生殖発生毒性試験への応用について報告する。

塩酸リトドリンは、子宮平滑筋弛緩作用を有する $\beta_2$  アドレナリン作動薬であり妊婦の流産防止薬として臨床では点滴剤として多用されている。静脈内持続注入法の有用性を確認するため、ビーグル犬を用いて本剤 30 mg/kg/day を静脈内にボラス投与した時と静脈内に持続注入した場合の毒性を比較した。その結果、塩酸リトドリンの血中濃度推移及び発現した毒性変化には明らかな差がみられ、ボラス投与した動物の血中濃度は持続注入した場合に比べて遥かに高い値であった。また、ボラス投与した動物では GOT、GPT、CPK、LDH、Alp の高値など臨床検査値の変動、さらに、心臓では Contraction band necrosis などの病理組織学的変化が見られた。一方、持続注入ではこれらの変化は認められず、皮膚の潮紅、頻脈が一過性にみられたに過ぎなかった。このように、静脈内持続注入法は、静脈内に急速注入した場合に起こる急激な血中濃度の上昇を避けることが可能であり、任意の血中濃度を維持することによってヒトへの外挿が可能なデータが得られるものと考えられる。

次に、本法をラットでの生殖発生毒性試験に応用する試みについて紹介する。Crl:CD ラットを用い、大腸静脈からカテーテルを留置して医薬品毒性試験法ガイドラインにおける 1) 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験及び 2) 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験のスケジュールに準じて生理食塩液を

Toxicological Evaluation by Intravenous Infusion Technique

Tatsuo UMEMURA, Bozo Research Center Inc., Gotemba Laboratory, Shizuoka 412-0039, Japan.

48 及び 120mL/kg/day 持続注入する 3 種の実験を行い、得られた成績を当施設の背景データと比較した。実験 1 では雄に交配前 4 あるいは 9 週間注入した後、無処置雌と交配した。妊娠 14 日に無処置雌を剖検して母動物・胚の状態を観察した。実験 2 では雌に交配の 2 週間前から妊娠 17 日まで注入した（交配は無処置雄と行った）。妊娠 20 日に雌を剖検して母動物・胎児の観察を行った。実験 3 では妊娠 7 日から F1 児の離乳までの間、注入して母動物の分娩・哺育、F1 児の生存性を観察した。

その結果、実験 1 および 2 における交尾率、妊娠率、精子検査成績、着床率、胚・胎児死亡率、生存胎児体重、外表・内臓・骨格の異常・変異の発現率はいずれも背景データの範囲内の値であった。一方、実験 3 では死産児率は 48mL/kg/day の持続注入で 7.0%、120mL/kg/day の持続注入で 10.7%、出生率は 120mL/kg/day の持続注入で 80.3%、F1 児の生後 4 日生存率は 120mL/kg/day の持続注入で 78.8%であり、これらの指標に関しては背景データの範囲（死産児率：0.0~5.9%、出生率：87.4~96.5%、F1 児の生後 4 日生存率：85.3~100%）を僅かに外れた。これら死産児率、出生率及び F1 児の生後 4 日生存率が背景データの範囲から外れた原因として、留置カテーテルによる血管への物理的侵襲、異物である留置カテーテルへの生体反応、手術操作あるいは術後の感染による影響が主な要因と推定された。これらの要因のうち、留置カテーテルに対する生体の異物反応を除く他の 2 つに関しては、その影響を極力小さくすることが可能と考え、カテーテルの材質・先端部の形状の改良と手術器具・器材の滅菌方法などの改善を行い、再度、実験 3 のスケジュールで 120 mL/kg/day を注入する追加実験を実施した。その結果、死産児率、出生率及び F1 児の生後 4 日生存率のいずれの指標も背景データの範囲内の値になった。このようにカテーテルの材質及びカテーテル先端部形状の改良、カテーテルを含めた手術器具・器材の滅菌法の改善を行うことにより、手術及びカテーテル留置の影響を最小限に抑えることが可能であり、生殖発生毒性試験のみならず、一般毒性試験においてもより適切な毒性評価が可能であることが示唆された。

サル・イヌを用いたテレメトリーシステムにおける安全性薬理評価

○西森司雄 池田博信 土山道夫 左近上博司 鈴木 潤<sup>1)</sup> 清水憲次<sup>2)</sup>

1) 株式会社環境バイリス研究所 2) 株式会社富士バイオメディックス

Combinatorial chemistryとhigh throughput screeningにより画期的新薬の候補物質のseedsは飛躍的に増加している。それに伴ってin vivoにおける薬効および安全性評価の早期での実施がますます重要性を増し、少量の試料でいかに多くの情報を得るかが、次の開発ステップの決め手となる。

環境バイリス研究所ではサルの無麻酔無拘束での血圧測定をテレメトリーシステムにより行ってきた。テレメトリーシステムでは生体電位信号として血圧のほか心電図、脳波、筋電図など、また体温、活動量なども測定が可能である。

The Assessment of Safty Pharmacology in Monkeye and Dogs using a radiotelemetry system

Tsukao NISHIMORI, Hironobu IKEDA, Michio TSUCHIYAMA, Hiroshi SAKONJ  
O,

Jun SUZUKI 1) and Noritsugu SHIMIZU 2)

1) Environmental Biological Life Science Research Center Inc. SHIGA, 528-0052  
JAPAN

2) Fuji Biomedix Co., Ltd. YAMANASHI, 408-0044, JAPAN

今回、サルを用いて行動、血圧、心拍数および脳波を同一動物について観察、測定できる方法を検討した。この方法では安全性薬理における中枢神経機能に及ぼす有害反応および心血管機能に及ぼす有害反応を同時に評価することができ、また試料の節約にもなる。測定法としては慢性実験テレメトリー自動計測システム（DSI system）を用い、血圧は大動脈からカニューレを挿入し大動脈圧を、脳波は前頭葉の皮質脳波を測定した。心拍数は血圧の脈派から計測した。またビデオシステムにより動物の行動も併せて観察・録画した。テレメトリー測定の特徴としては、無麻酔無拘束に慢性的に測定できる点あげられるが、ヒトとの接触など環境因子から受ける影響は避けられず、投与時以外は極力ヒトとの接触を避ける注意が必要である。また体位、体動により影響を受けるので、行動観察を同時に行うことも重要である。同一個体でも日により測定値は変動するが麻酔下の実験と比較してより生理的条件下に薬物の作用をみることができる。イスについても血圧、心拍数についてテレメトリー法で測定しており、サルほど環境の影響は受けないが投与による上昇は避けられない。

株式会社富士バイオメディックスではヒトのホルター心電図をサル・イヌに応用した長時間心電図検査を用いて薬物の心臓への影響を検討しているが、その結果としてサル・イヌともに心拍数には日内変動があり、その日内変動には種差があり、そのことは自律神経活動の種差にも関連する。無麻酔の動物の心電図は多くの外的刺激を受け、このことは特にサルについて顕著であった。長時間心電図では教科書的な知識では判断できない所見にしばしば遭遇する。心電図異常と血清酵素（CK、LDH）の関連についても報告する。

またハンディンドン ライフサイエンスにおいては、霊長類における安全性薬理評価の一環として、マーモセットにおけるテレメトリーシステムを現在開拓中



とのことでした。

コーヴァンスラボラトリーにおいてもサル・イスでのテレメトリーを実施しておりそのデータについても紹介する。

## 機能不全動物の作製

佐々木敬幸

財団法人動物繁殖研究所

新薬開発における疾患モデルは開発薬の薬効を裏付けるために必要不可欠のものである。日本国内においては行政側からも申請段階において薬効を裏付ける試験資料として疾患モデル動物による試験成績が強く求められている。さらに疾患患者における安全性の確保という観点から、前臨床試験においても疾患動物を用いての安全性試験の必要性が論じられている。

一般的に機能不全動物は疾患モデルの範疇に入る。機能不全動物の作製は自然発症疾患モデル動物の開発による方法と人為的な方法に大別される。

自然発症疾患モデル動物は自然発症した動物を選抜し、主に兄妹交配によって病態を遺伝的に固定して作製されている。この方法の問題点としては意図的に対象とする疾患に合わせて作製するのではなく、いわば偶然の集積によるものといえる。近年ではノックアウト動物を代表とする遺伝子操作によるトランスジェニック動物の開発が盛んになり、新薬開発への貢献は大きい。現状のトランスジェニック動物の作製はほとんどの場合マウスに限定されることが多い。

これら自然発症疾患モデルについては参考文献を紹介するにとどめ(1)(2)(3)(4)(5)、今回は多くの動物種を利用することが可能な薬物誘発と器官摘出などにより作製された機能不全動物(以下人為的機能不全動物という)について解説していきたい。自然発症疾患モデル動物では、個体毎の病態の程度によりデータがばらつき、信頼あるデータを得るために大規模な試験が要求される。人為的機能不全動物の有意な点は、病態の程度が一定の範囲におさまることにある。

このような背景の下で、人為的機能不全動物の利用は有用性が高く、その作製にあたっては高い技術が要求される。トキシコロジストとしてこのような技術を保持していくことは重要ではあるが、多岐に渡る分野について作製技術を修得することは多大な時間とマンパワーを要求される。その際にコントラクトラボへのアウトソーシングは有効な手段である。

安全性試験領域における疾患モデル動物の必要性は高まっているが、現在のところ薬物の代謝、排泄機能に重点がおかれている。また、トランスジェニック動物を利用した発癌性試験について最近検討されるようになった(6)(7)。そこで今回、代表的な人為的機能不全動物をあげ、作成方法並びに基礎的なデータを紹介するとともにその他のいくつかのモデルを例示して安全性試験への適用を考えたい。

## 腎機能不全

腎機能不全により腎透析を受ける患者は日本国内においても多く、前臨床試験における人為的機能不全動物の利用も多い分野と思われる。この疾患の分類はWIDによりされておりその疾患に対応した代表的なモデル動物を併記して表1に示した。

Producing of malfunction animal models

Sasaki Yoshiyuki, Imanishi Institute for Animal Reproduction

表1 原発性糸球体疾患の光顕形態像による分類

原発性糸球体疾患 (糸球体腎炎及び関連症候群)	モデル系
A. 微小糸球体異常	単クローン抗体腎症ラットなど
B. 巣状/分節性障害	5/6腎摘出ラットなど
C. びまん性糸球体腎症	
a. 膜性糸球体腎炎 (膜性腎症)	能動 Heymann 腎炎ラットなど
b. 増殖性糸球体腎炎	
① メサンギウム増殖性糸球体腎炎	IgA 腎症モデルマウスなど
② 管内性増殖性糸球体腎炎	PA-Ag モデルウサギなど
③ 膜性増殖性糸球体腎炎 (I型、III型)	
④ 膜性増殖性糸球体腎炎 (II型)	
⑤ 管外性 (半月体形成性) 糸球体腎炎	馬杉腎炎ラットなど
c. 硬化性糸球体腎炎	
D. 未分類糸球体腎炎	

WHO, 1982 にモデル動物を加筆作成した。

このうち今回は巣状糸球体硬化症のモデルとして 5/6 腎摘出ラットモデルを紹介する。

#### 5/6 腎摘出ラットの作製方法

1. ベントバルビタール麻酔(40mg/kg 腹腔内投与)を施した動物を腹位に保定し、最終肋骨から後方に除毛し、70%ヒデンアルコールにて消毒する。
2. 最終肋骨より指1本後方背部皮膚ならびに筋層を切開し、右腎臓を曝露する。
3. クレンメで腎動静脈を止血し、腎臓の上下を 1/3 ずつ切除する。切除部位に医療用アロンアルファを少量滴下し止血する。
4. 出血のないことを確認し、腎臓を腹腔にもどし抗生物質を滴下後、筋層と皮膚を縫合する。
5. 同様に1週間後左腎臓を全摘出する。

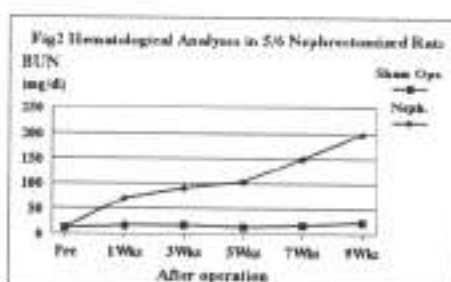
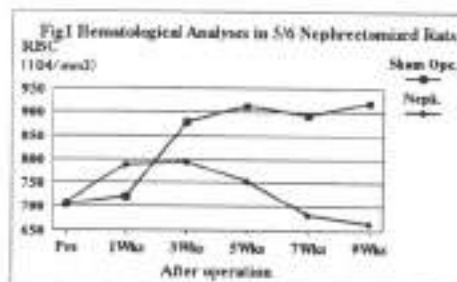


Fig1 では腎臓摘出 3 週後に明かな貧血がみられ、Fig2 では摘出後 1 週目から有意な BUN の上昇がみられており、腎性貧血あるいは糸球体機能不全モデルとして利用できる。

#### 肝機能不全

肝臓はいうまでもなくほとんどの薬物が透過し、なんらかの代謝を受け毒性学的に最も重要な器官である。薬物代謝に影響を与える肝疾患は多く、モデル動物の利用も

多岐にわたっている。主な肝疾患モデルを表2にまとめた。

表2 主な肝疾患モデル動物

発症形式	モデル	誘発方法	動物
自然発症	ウイルス性肝炎	—	ウッドチャックなど
	肝炎・肝臓	—	LECラット
実験的誘発	中毒性肝障害	四塩化炭素	ラット、ウサギなど
		ガラクトサミン	ラット
	脂肪肝	アルコール	ラット
		四塩化炭素など	ラット
	肝線維症	四塩化炭素	ラットなど
		アルコール	ラットなど
	肝硬変	四塩化炭素	ラット、イヌなど
		ジエチルニトロサミンなど	イヌなど
	肝腫瘍	癌原性化学物質	ラットなど
	胆汁うっ滞症	クロルプロマジンなど	ラット、サル
胆管性胆汁性肝硬変	ウシ胆管結膜	ウサギ	

8)より一部抜粋した。

ビーグルによる四塩化炭素の投与経路は強制経口投与の実施例が多いが<sup>1)</sup>、当所における実施例では嘔吐の発現が多く見られ、病態の程度にばらつきが認められた。そこで、安定した肝障害のモデルを作製できるように皮下投与により検討を行った。四塩化炭素の投与経路として皮下投与が選択されない理由として重篤な刺激性があげられ、種々検討した結果、刺激性を回避して次のような成績を得た。

#### 肝障害ビーグルの作製方法

- 1.四塩化炭素はミネラルオイル(SIGMA Co.,Ltd)に25%濃度で溶解する。
- 2.溶解した四塩化炭素を0.25mg/kgの用量を数カ所の投与部位に分注投与する。
- 3.肝障害の誘発程度により複数日反復投与する。

Fig3 Biochemical Analyses in Beagle Dogs Treated with CTC

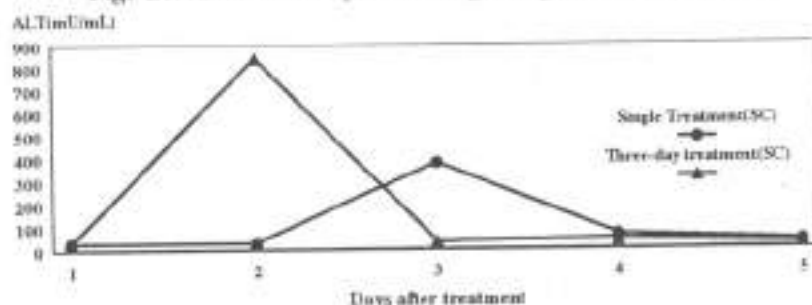


Fig3 にビーグルによる四塩化炭素皮下投与例を示した。ALT の測定値では単回投与において投与後3日目に、3日間連続投与では投与終了2日目に増大が認められた。なお、いずれの例も組織学的検査により肝細胞に障害が認められていた。

#### 内分泌機能不全

内分泌機能不全モデルは目的器官の摘出により作成されることが多く、下垂体、甲状腺、副腎、卵巣、精巣などを摘出して研究されている。毒性領域においてこれらの応用はあまり見られないと考えられるが、ここでは下垂体摘出ラットによる精集中

DNA ポリメラーゼ活性低下<sup>14)</sup>について紹介し、遺伝子レベルにおける毒性メカニズムの解明のてがかりになるかどうか考えたい。

#### 下垂体摘出ラットの作製方法 (周明頭法)<sup>15)</sup>

1. ベントバルビタール麻酔を施した動物を保定台に背位に保定し、下顎から頷骨にかけて剃毛する。
2. 下顎皮膚を 70%ヒビテンアルコールにて消毒後正中線に沿って切開し、気管の一部を切開して呼吸を確保する。
3. 術野確保のために鉤を固定し、脳蓋底を露出し、蝶形骨にデンタルドリルで穿孔する。
4. 穿孔した骨片を取り除き、脳硬膜を切開し下垂体を露出させる。
5. 吸引スポイトを穿孔部にあて下垂体を吸引する。
6. 摘出された下垂体の形状を確認し、摘出部の止血後、慎重に鉤をはずし皮膚を縫合する。

Table3 Changes of the DNA polymerase activities in testis of hypophysectomized rats

	DNA polymerase			
	(U/g tissue)	(U/mg protein)	(U/mg DNA)	(U/gland)
Sham 1W	888 ± 23	23 ± 2.0	261 ± 8	710 ± 14
Sham 2W	892 ± 24	20 ± 1.5	270 ± 9	872 ± 15
Hypox 1W	327 ± 8**	7 ± 0.5**	82 ± 3**	107 ± 6**
Hypox 2W	187 ± 5**	4 ± 0.3**	41 ± 2**	41 ± 2**
Hypox+LH.FSH	731 ± 11*	18 ± 1.0*	203 ± 9*	293 ± 12*

文献 10) より一部抜粋した。

下垂体摘出後 1 週以降において明かな DNA ポリメラーゼβの減少が認められている。

#### 免疫機能不全

免疫機能不全疾患として近年、エイズのモデルとして SCID マウスの利用が注目を浴びているところである。病態モデルとしての分類を表 4 に整理した。

表 4 免疫機能不全における疾患モデル

自然発症病態モデル	後天性免疫不全症	SCID マウスなど
	全身性エリテマトーデス	ループスマウスなど
	血管炎自然発症マウス	SL/Ni マウスなど
	免疫異常	NC 系マウスなど
人為的機能不全動物	自己免疫病	新生期胸腺摘出マウスなど
	橋本甲状腺炎モデル	胸腺摘出-X線照射ラットなど
	血管炎	免疫複合体病動脈炎ウサギなど
	アミロイド症	カゼイン誘発アミロイド症マウスなど

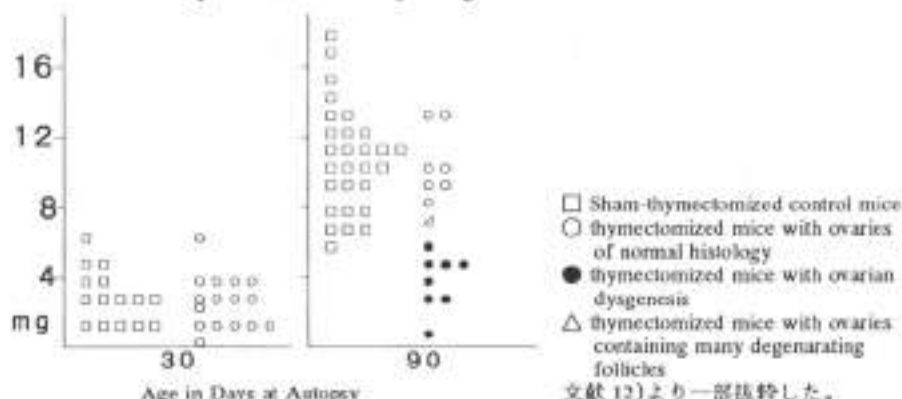
ここでは新生期胸腺摘出マウスによる自己免疫疾患モデルについて紹介する。

#### 新生期胸腺摘出マウスの作製方法

1. 出生 2~4 日齢のマウスを水中などに入れ低温麻酔を施し、背位に保定する。
2. 胸骨部皮膚を 70%ヒビテンアルコールにて消毒後、皮膚を切開する。
3. ピンセットで筋膜を穿孔し、胸腺と結合織を剥離する。
4. 吸引スポイトを挿入して、胸腺を吸引する。

5. 医療用アロンアルファで胸膜を癒合し、抗生物質を滴下後皮膚を縫合する。
6. 手術後の動物は保温器で十分加温し、体温が上がり、活動が活発になったことを確認して哺育母動物と同居させる。

Fig 4. Age Changes in ovarian weight and histology in (C3H/HeMs × 129)F1 mice thymectomized at 3 days of age



90 日齢(胸腺摘出 2 ~ 4 日齢)で明かな卵巣重量の低下と変性が認められている。

#### 引用文献

- 1) 三森国敏ら, (1998): 遺伝子改変動物を用いた短期発がん性試験法の国際的動向, *J. Toxicol. Sci.*, 23(3), App.107-111.
- 2) 三森国敏, (1998): ICHにおける遺伝子改変動物を用いた短期発がん性試験法: その現状と今後解明すべき点, 麻布大学毒性試験談話会シンポジウム講演要旨集, 4-5.
- 3) 内貴正治ら監修, (1996): [疾患別] モデル動物の作製と新薬開発のための試験・実験法, 技術情報協会.
- 4) 京極方久編, (1984): 難治疾患のモデルと動物実験, ソフトサイエンス社.
- 5) 川俣順一ら編, (1979): 疾患モデル動物ハンドブック, 医歯薬出版.
- 6) 川俣順一ら編, (1982): 疾患モデル動物ハンドブック No.2, 医歯薬出版.
- 7) 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団, (1993), 「疾患モデル動物維持、分与等に関するアンケート」調査報告書, HS レポート.
- 8) 遠藤武男編, (1988): 胆肝疾患(下) 肝疾患の実験モデル, 日本臨床(増刊号) 46, 1163-1211.
- 9) J.F. Van Vleet, et al., (1968): Evaluation of Liver Function Tests and Liver Biopsy in Experimental Carbon Tetrachloride Intoxication and Extrahepatic Bile Duct Obstruction in the Dog, *Am. J. Vet. Res.*, 29(11), 2119-2131.
- 10) AKIO NAGASAKA, et al., (1984): Hormonal Regulation of Deoxyribonucleic Acid Polymerase  $\beta$  Activity in Rat Testis, *Endocrinology*, 115(3), 1110-1115.
- 11) 前島一淑ら監修, (1995): バイオメディカルリサーチマニュアル Vol. V 実験外科手術, 養賢堂.
- 12) Nishizuka, Y., et al., (1971): Ovarian dysgenesis by neonatal thymectomy in the mouse, *Endocrinology*, 89, 886.

伊原敏夫

株式会社新日本科学

〔目的〕生殖発生毒性試験では基本的にラット及びウサギが用いられている。しかし、最近の新薬の開発動向からみて問題とされているものにバイオ医薬品があり、その安全性を検討するためにはヒトに類似の生物学的応答を示す動物種の選択が重要である。また、プロラクチン分泌に影響を示すドーパミン作用薬や非ステロイド性抗炎症薬に対してはラットの使用は不適切であることなどから、これら動物種以外の第3の動物種の選択が必要となってきた。この観点から比較的入手が容易であり、通年にわたって妊娠が可能なカニクイザルをモデル動物として選択した。今回、カニクイザルを用いた生殖発生毒性試験法 (Segment I, II, III) 及び各試験での主要観察項目についてその概要を述べる。

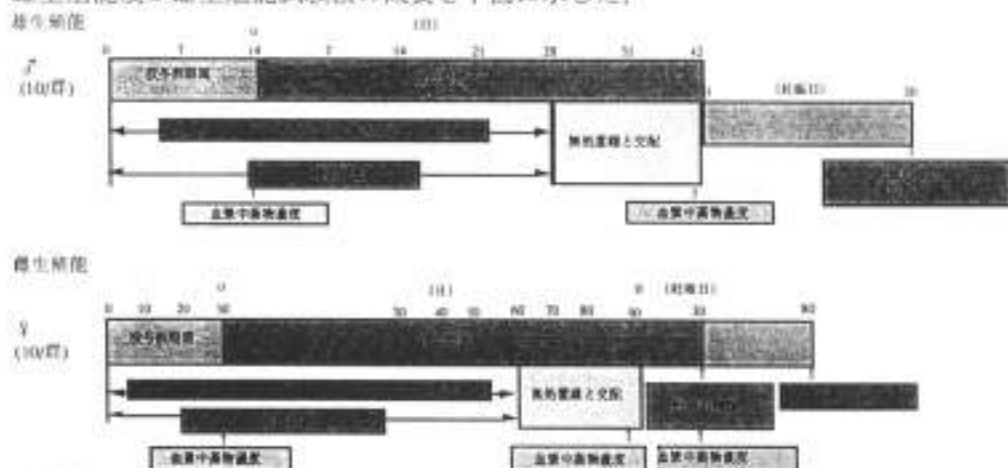
Reproduction and Developmental Toxicity Study in Cynomolgus Monkeys

Toshio IHARA, Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd., Kagoshima 891-1394 Japan

## 1. 受精能及び着床までの初期胚発生に関する試験

カニクイザルでは規則的な月経周期を示す場合でも、1回の交配での妊娠率は30~40%である。従って、雄生殖能試験と雌生殖能試験に分けて行うことが成績評価を容易にすると考えられる。

雄生殖能及び雌生殖能試験法の概要を下図に示した。



本試験では雄の交尾行動、精巣上体内の精子性状及び授精能ならびに雌の受精、胚の着床前発生及び着床に及ぼす影響を検索する。使用動物数は雌雄とも10匹/群を標準としている。一般的な観察項目に加えて、交尾行動の観察、月経周期、精子検査、ホルモン測定及び血漿中薬物濃度測定を行う。雌の帝王切開は基本的に妊娠80日に行い、胚の発育度を調べる。

### 1) 精子検査

陰茎部電気刺激法<sup>11)</sup> (15~40V, 10~30mA) を用い1回/週の頻度で精液を採取し、色調、精子数(血球計測板を用いて計測)、精液量(採取後30分間保温後液状部及び凝固物を計測)、生存率(一定区画の非運動精子数の計測)、活力(5段階で評価し、生存指数を算出)及び奇形率を調べる。反復採取(1回/週、5週連続)による精液性状の結果は下表の通りである。

Items	No. of Animals	Weeks of Examination				
		1	2	3	4	5
Semen Color		YW	YW	YW	YW	YW
Semen Volume (mL, mean ± S.D.)	15	0.145 0.100	0.164 0.126	0.199 0.130	0.220 0.124	0.233 0.124
Coagulum weight (mg, mean ± S.D.)	15	30.3 38.2	25.2 34.6	37.8 67.0	25.4 35.2	19.7 33.2
Sperm Concentration (10 <sup>6</sup> /mL, mean ± S.D.)	15	122.4 96.2	124.3 36.1	128.6 52.1	116.9 32.1	118.1 27.5
Sperm Motility (% , mean ± S.D.)	15	75.33 5.16	79.17 4.60	79.50 3.68	76.50 4.80	78.17 4.48
Malformation Ratio (% , mean ± S.D.)	15	27.73 7.18	28.51 4.92	27.91 7.31	26.61 6.23	28.39 5.15

YW : Yellowish white



2) ホルモン (テストステロン, FSH, インヒビン,  $17\beta$  エストラジオール, プロゲステロン, プロラクチン)

テストステロン, FSH 及びインヒビンは 1 回/週 の頻度で, エストロジェンは月経発現後 1, 7, 9, 11, 13, 16, 23, 30 日に, プロゲステロンは月経発現後 1, 9, 13, 16, 19, 23, 27, 30 日に, プロラクチンは月経発現後 1, 7, 9, 11, 13, 16, 23, 30 日の頻度で採血, 測定する。

テストステロン,  $17\beta$  エストラジオール, プロゲステロンの推移は下表の通りである。

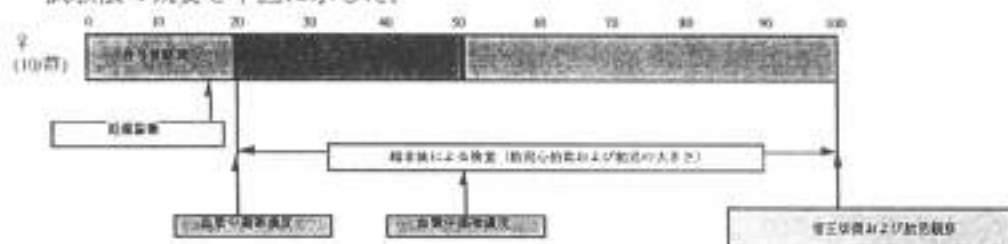
	Testosterone (ng/mL)									
	1 W	2 W	3 W	4 W	5 W	6 W	7 W	8 W	9 W	10 W
Mean	8.33	9.87	12.99	14.51	15.08	14.07	11.73	17.14	13.15	15.52
S.D.	5.67	7.74	6.46	6.78	7.46	5.26	4.59	9.19	6.80	6.67
n	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15

Day of menstrual cycle	1	8	15	22	29
Number of animals	15	15	15	15	8
Estradiol (pg/mL)		31.3 ± 17.2	113.5 ± 49.6	35.9 ± 71.9	31.5 ± 17.6
Progesterone (ng/mL)	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1	2.8 ± 1.5	6.0 ± 8.1	0.4 ± 0.1

Day 0 of the menstrual cycle is an onset of menses. The mean duration of menstrual cycle was 27.3 ± 3.3 days.

## 2. 胚・胎児発生に関する試験

試験法の概要を下図に示した。



本試験では使用妊娠動物数は 10 匹/群, 投与期間は妊娠 20 日から 50 日, 帝王切開は妊娠 100 ± 2 日に行う。胎児の観察は生死, 体重, 外形, 骨格及び内臓観察ならびに器官及び胎盤の重量測定を標準としている。

### 1) 妊娠診断及び妊娠経過

妊娠診断は交配期間の中間日を妊娠 0 日として, 妊娠 16~18 日相当日に超音波診断装置 (SSD-2000, アロカ社) を用いて行う。この発生段階では胎のうがみられる。投与開始日は神経嚢及び神経溝のみみられる妊娠 20 日から, 主要な外表器官の分化が終了する妊娠 50 日までとする。帝王切開はケタミン麻酔及び吸入麻酔 (笑気ガス, イソフルラン) の併用下で妊娠 100 ± 2 日に行う。母動物は原則として剖検しない。

超音波診断装置を用いて, 胎児の心拍確認及び体長測定を行い, 妊娠経過及び胎児の発育を調べる。

### 2) 自然発生流産 (胚死亡) 率及び異常の型とその頻度

演者の施設における自然流産 (胚死亡) の頻度は平均 8.3% (0~20%) であり, 妊娠 40 日までに発現する場合が多い。

### 3) 自然発生異常の型とその頻度

外形異常、骨格異常、骨格変異、内臓異常及び内臓変異の頻度は下表のとおりである。骨格観察は Dawson の変法<sup>2)</sup> を用いた Alizarin red S 染色を用い、内臓観察は帝王切開時の胎児の新鮮標本について Barrow らの方法<sup>3)</sup> (腎臓及び心臓はホルマリン固定後 Wilson 法<sup>4)</sup> 及び Dr. Hendrickx の方式) を用いて行う。

Items	Number of fetuses examined	Number of fetuses with abnormalities	Incidence (%)
External abnormalities	170	2	1.2
Cleft spine		1	0.6
Polydactyly		1	0.6
Visceral abnormalities	170	2	1.2
Aplasia of kidney (unilateral)		1	0.6
Ventricular septal defect		1	0.6
Major skeletal abnormalities	146	5	3.4
Absence of the 12th rib		5	3.4
Minor skeletal abnormalities	146	24	16.4
Shortening of the 12th rib		8	5.5
Cervical rib		21	14.4
Lumbar rib		19	13.0
Bifurcation of the 1st cervical vertebral arch		1	0.9
Wavy rib		1	0.9
Placental abnormalities	170	20	11.8
Fusion of primary and secondary placenta		3	1.8
Single placenta		18	10.6

### 3. 出生前及び出生後の発生ならびに母動物の機能に関する試験

試験法の概要を下図に示した。



\* 瞳孔反射、呼吸観察、観察記録、調力、体温、一般行動 \*\* 行動、観察結果、観察結果

本試験では母動物の分娩・哺育状態、児の出生前及び出生後の死亡、成長、機能発達、生殖能を検索する。使用妊娠動物数は 10 匹/群、投与期間は妊娠 100 日から生後 30 日までを基本としている。

#### 1) 行動・機能検査

新生児は生後 3 ヶ月で離乳させるが、ほぼこの時期に反射 (耳介反射、瞳孔反射)、感覚 (痛覚)、握力及びホームケージ内での一般行動を調べる。眼科的検査として眼底検査を。また、軟 X 線撮影による骨格検査を実施している。

## 2) 生殖能検査<sup>5, 6)</sup>

児が生殖年齢に達するまでには3~4年を要することから、生後6ヵ月の児について、精巣の機能試験としてHCG (500 IU/個体) 及びHMG (15 IU/個体) を、卵巣の機能試験としてHCG (1000 IU/個体) 及びHMG (15 IU/個体) を筋肉内投与し、テストステロン及びエストラジオールの推移を調べる。ホルモン濃度測定後、児の片側の精巣あるいは卵巣を摘出し、組織学的検査を行っている。その結果、雄では投与3日後のテストステロン濃度が $43.38 \pm 11.43$  ng/mL、雌では投与開始4あるいは9日目の投与6時間後のエストラジオール濃度がそれぞれ $1243.6 \pm 672.9$  pg/mL 及び $3309.8 \pm 1412.1$  pg/mL と高値を示す。組織学的観察では精子形成及び卵胞の発達と卵子が確認できる。これらの成績をもって精巣及び卵巣は正常機能を有すると評価している。

## 文献

- 1) Matsubayashi, K. : Comparison of the Two Methods of Electroejaculation in the Japanese Monkeys (*Macaca fuscata*). *Exp. Anim.*, 31 (1), 1-6 (1982)
- 2) Dawson, A. B. : A note on the staining of skeleton of cleared specimens with alizarin red. *S. Stain Technol.*, 1, 123-124 (1926)
- 3) Barrow, M. V. and Taylor, W. J. : A rapid method for detecting malformations in rat fetuses. *J. Morph.*, 127, 291-306 (1969)
- 4) Wilson, J. G. : *Teratology ; Principles and Techniques*. Wilson, J. G. and Warkany, J., eds., Univ. Chicago Press (1965)
- 5) Sameshima, H., Oneda, S., Ihara, T. and Hamana, K. : Ovarian Response to Exogenous Gonadotropins in Infant Cynomolgus Monkeys. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 15 (3), 194-204 (1996)
- 6) Sameshima, H. and Hamana, K. : Testicular Response to Exogenous Gonadotropins in Infant Cynomolgus Monkeys. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 15 (5), 371-380 (1996)

## Present and Future Applications of *In Vitro* Drug Metabolism Models

Carol E. Green

Biopharmaceutical Development Division, SRI International,  
Menlo Park, CA

The principal goals in evaluating drug metabolism using *in vitro* models are to identify all the major metabolic pathways that affect the test drug in humans and to predict potential interactions of the test drug with the metabolism of other drugs (U.S. Food and Drug Administration, 1997). Additional studies such as species comparisons of metabolism, evaluations of drug cytotoxicity to target organs, and determinations of skin and intestinal absorption *in vitro* involve similar techniques and also provide valuable information for the development of new drugs.

With the advent of combinatorial chemistry and genomic programs at pharmaceutical companies, the number of compounds moving through the discovery pipeline is rapidly increasing. As a result, there is additional pressure for the *in vitro* metabolism and absorption techniques to meet this challenge by providing rapid, rational and integrated approaches predicting metabolism and bioavailability of new drug candidates in humans.

Microsomes from human liver are being used extensively by pharmaceutical companies to define major metabolic pathways in humans. For example, human liver microsomes and cDNA-expressed P450 enzymes are applied to high and medium through-put screening approaches for determining the metabolic stability of chemical libraries and predicting drug-drug interactions due to inhibition of metabolism (Crespi et al., 1997; Rodrigues, 1997). The Caco2 cell model is being evaluated by many companies to predict the absorption of drugs from the GI tract. Both of these approaches are readily adaptable to advanced analytical techniques like liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS/MS) that allow highly sensitive and selective analysis of multiple compounds simultaneously (Beaudry et al., 1998).

The complete metabolite profile of a drug can be obtained with intact liver systems, including hepatocytes and liver slices, in which cofactors are at physiological levels and enzymes are present in normal cellular orientation. These preparations replicate *in vivo* metabolite profiles and species differences (Green et al., 1986; Chenery et al., 1987; Vickers et al., 1992). In addition, human hepatocyte cultures are an accepted model for predicting cytochrome P450 induction (Pickard et al., 1990;

Donato et al., 1995 ). While these techniques do not qualify as "high throughput" assays, they are readily adaptable to multi-well culture formats, decreasing the number of cells required and increasing the number of compounds that can be simultaneously studied. Molecular toxicology techniques and microarray assays that measure gene expression are being developed and investigated by several companies and may offer rapid screening methods for future use.

Microsomes prepared from other drug-metabolizing organs including skin, lung, kidney, and small intestine are used to predict non-hepatic drug metabolism. Because the human small intestine contains significant P450 enzymes, in particular CYP3A4 and CYP3A5 (Kivisto et al., 1996), there is a growing appreciation of the significant contribution of the small intestine to the first pass effect of orally administered drugs and to interindividual variation (Lampen et al., 1995; Thummel et al., 1996). For example, saquinavir, a protease inhibitor drug with low oral bioavailability, has been demonstrated to be extensively metabolized by human intestinal CYP3A4 (Fitzsimmons and Collins, 1997).

To facilitate completion of *in vitro* human tissue studies, several companies provide the required services and supplies. At SRI International, we pioneered the development of *in vitro* models using human tissues for metabolism and cytotoxicity studies starting in 1981, and have provided research services with human and animal microsomes, hepatocytes, and tissue slices to pharmaceutical companies for over 10 years. Several other companies now have *in vitro* metabolism capabilities and their current services will be summarized in the presentation. Table 1 lists the types of studies that SRI routinely performs; preparations from human, mouse, rat, rabbit, dog and monkey are available for use in these studies. In addition, SRI can perform a variety of related assays for detecting cytotoxicity using liver preparations, bone marrow, and kidney proximal tubules. Assays using bile canicular membrane vesicles are also being optimized at this time.

Table 2 presents a list of cells and tissue preparations that are available commercially for use in *in vitro* metabolism and absorption studies. Lists of companies, services and products presented are not necessarily complete because growth in this market is rapid and continuing, with additional products being offered frequently.

In summary, an early understanding of how a compound is metabolized is important for candidate selection from among several pharmacologically active compounds. In addition, techniques which provide data on metabolism can be combined with models for drug absorption to predict bioavailability, another critical factor to be considered in compound selection. Because *in vitro* methods allow the collection of such data using a small amount of compound and provide results relevant to human patients as well as laboratory species, these techniques are finding widespread application in the pharmaceutical industry.

**Table 1**  
***In Vitro* Metabolism/Disposition Capabilities of SRI International**

<b>Assays</b>	<b><i>In Vitro</i> Model</b>
Metabolism profile in liver	Microsomes, S9, hepatocytes, liver slices
Extrahepatic metabolism	Subcellular fractions/ homogenates from small intestine, skin, kidney, lung
Determination of kinetic constants for metabolite formation	Microsomes, hepatocytes
Identification of CYP form responsible for metabolite formation	Microsomes
Drug-drug interactions by inhibition of metabolism	Microsomes, hepatocytes
Induction of cytochrome P450	Hepatocytes
Drug absorption/penetration	Human skin, Caco2 cells

**Table 2**  
**Human Cells and Tissue Preparations for *In Vitro* Metabolism Studies**

<b>Products</b>	<b>Applications</b>	<b>Sources</b>
cDNA expressed human P450s	1) Drug-drug interactions 2) Identification of enzyme	GENTEST Corp.
Human liver microsomes/S9	1) Metabolite profile 2) Drug-drug interactions: inhibition of enzymes 3) Metabolic activation 4) Kinetic parameters of metabolism	Anatomic Gift Foundation Cedra GENTEST Corp. Human Biologics Intl. <i>In Vitro</i> Technologies Xenotech LLC
Human hepatocytes (fresh and cryopreserved)	1) Metabolite profile 2) Drug-drug interactions: inhibition and induction 3) Kinetic parameters 4) Cytotoxicity	Biowhittaker, Inc. <i>In Vitro</i> Technologies IIAM
Human liver slices	1) Metabolite profile 2) Cytotoxicity	IIAM Human Cell Culture Center
Other primary human cells/cell lines	1) Efficacy studies 2) Cytotoxicity assays 3) Absorption	Clonetics American Type Culture Collection

## References

- Beaudry, F., LeBlanc, J. C., Coutu, M., Brown, N. K. *In vivo* pharmacokinetic screening in cassette dosing experiments; the use of on-line Pprospekt liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry technology in drug discovery. (1998) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **12**, 1216-1222.
- Chenery, R. J., Ayrton, A., Oldham, H. G., Standing, P., Norman, S. J., Seddon, T., and Kirby, R. Diazepam metabolism in cultured hepatocytes from rat, rabbit, dog, guinea pig, and man. (1987) *Drug Metab. Dispos.* **15**, 312-317.
- Crespi, C. L., Miller, V. P. and Penman, B. W.. Microtiter plate assays for inhibition of human, drug-metabolizing cytochrome P450. (1997) *Anal. Biochem.* **248**, 188-190.
- Donato, M. T., Castell, J. V., and Gomez-Lechon, M. J. Effect of model inducers on cytochrome P450 activities of human hepatocytes in primary culture. (1995) *Drug Metab. Dispos.* **23**, 553-558.
- Fitzsimmons, M. E. and Collins, J. E. Selective biotransformation of the human immunodeficiency virus protease inhibitor saquinavir by human small-intestinal cytochrome P4503A4. (1997) *Drug Metab. Dispos.* **25**, 256-266.
- Green, C. E., LeValley, S. E., and Tyson, C. A. Comparison of amphetamine metabolism using isolated hepatocytes from five species including humans. (1986) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **237**, 931-936.
- Kivisto, K. T., Bookjans, G., Fromm, M. F., Griese, E. U., Munzel, P., and Kroemer, H. K. Expression of CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 in human duodenal tissue. (1996) *Brit. J. Clin. Pharmacol.* **42**, 387-389.
- Pickard, L., Fabre, I., Fabre, G., Domergue, J., Saint Aubert, B., Mourad, G., and Maurel, P. Cyclosporin A drug interactions. Screening for inducers and inhibitors of cytochrome P-450 (cyclosporin A oxidase) in primary cultures of human hepatocytes and in liver microsomes. (1990) *Drug Metab. Dispos.* **18**, 595-606.
- Rodrigues, A. D. Preclinical drug metabolism in the age of high throughput screening: an industrial perspective. (1997) *Pharm. Res.* **14**, 1504-1510.
- Thummel, K. E., O'Shea, D., Paigg, M. F., Shen, D. D., Kunze, K. L., Perkins, J. D., and Wilkinson, G. R. Oral first-pass elimination of midazolam involves both gastrointestinal and hepatic CYP3A-mediated metabolism. (1996) *Clin. Pharmacol. Ther.* **59**, 491-502.



U.S. Food and Drug Administration, Guidance for Industry. Drug metabolism/drug interaction studies in the drug development process: studies *in vitro*. April 1997.

Vickers, A. E. M., Fischer, V., Connors, S., Fisher, R. L., Baldeck, J.-P., Maurer, G., and Brendel, K. Cyclosporin A metabolism in human liver, kidney, and intestine slices. Comparison to rat and dog slices and human cell lines. (1992) *Drug Metab. Dispos.* **20**, 802-809.

○若狭芳男, 佐々木幹夫, 柳田知司

株式会社イナ リサーチ 薬理研究部

動物における薬物自己投与実験法には、静脈内、胃内あるいは気道内にカテーテルを、あるいは脳内にガイド管をそれぞれ留置し、動物がレバースイッチを押したときにそれらを介して一定量の薬液や蒸気（気道内）を注入する方法のほか、薬物を餌あるいは飲料水に混入して経口的に摂取させる方法などがある。動物種としては、マウス、ラット、イヌ、ネコなどのほか、リスザル、カニクイザル、アカゲザル、ヒヒなどの霊長類が用いられている。このうち、アカゲザルでは豊富な基礎データが集積され、ヒトで乱用されるほとんどの薬物を活発に自己投与することが知られている。媒体よりも活発な自己投与がみられる場合、その薬物は強化効果を有するといいい、また、強化効果はヒトでの精神依存の形成に深く関与すると考えられている。したがって、薬物自己投与実験法はヒトにおける薬物の精神依存性を予測するための有用な方法であると言える。そこで、ここではまずアカゲザルでの薬物自己投与法を用いた強化効果の検索について紹介する。次いで、薬物によって発現する不安、緊張などの不快感を反映すると考えられる嫌悪刺激効果について、リスザルでの薬物自己投与法を用いた検索法を紹介する。

## (A) 強化効果の検索

## 1) 強化効果の有無の検索

通常、媒体と被験物質の自己投与頻度を比較観察し、媒体を上回るレベルの自己投与がみられた被験物質は強化効果を有すると判定される。ただし、一時的に高い自己投与がみられても持続しない場合は該当しない。

## 2) 強化効果の強さの検索

強化効果が検出されても、自己投与回数の多さは薬効の持続時間に影響されるため、そのまま強化効果の強さを現してはいない。そこで、強化効果の強さを検索する方

The practical use of drug self-administration technique in monkeys.

Yoshio WAKASA, Mikio SASAKI and Tomoji YANAGITA

Pharmacology Department, Ina Research Inc. 8047 Nishiminowa, Ina-shi, Nagano, 399-4501 Japan

法の一つとして、薬物を1回自己投与する毎に次の自己投与に必要なレバー押し回数を漸増する比率累進実験法が用いられる。比率累進実験法では、サルが到達した最終比率（最後の自己投与に要したレバー押し回数）が強化効果の強さの指標とされる。この方法により、コカインあるいは身体依存を形成した場合のモルヒネの最終比率は1万回を超えることが報告されている（Table 1, 2）<sup>1)</sup>。最終比率は動物のレバー押し行動の訓練度によって影響を受けるが、ニコチンの最終比率は多くても2千回前後であり（Fig. 1）、これらの薬物のヒトでの精神依存性の強さの違いを反映する成績が得られている。

薬物間の強化効果の強さを比較する方法としては、比率累進実験法のほかに、複数の用量段階についてそれぞれ複数のFR値での自己投与を観察し、それらを比較する方法がある。

Table 1 Results of progressive-ratio test on different unit doses of cocaine

Monkey No.	Saline	Cocaine, unit dose, mg/kg		
		0.03	0.12	0.48
243	800 (2)	400	6,400 (16)	6,400 (16)
248	400 (3)	800	3,200 (4)	6,400 (8)
281	200 (1)	800	6,400 (8)	12,800 (16)
334	200 (1)	1,600	3,200 (2)	12,800 (8)
Mean of ( )	0.72	1.0	7.5	12.0

( ) = Ratio against 0.03 in each monkey.

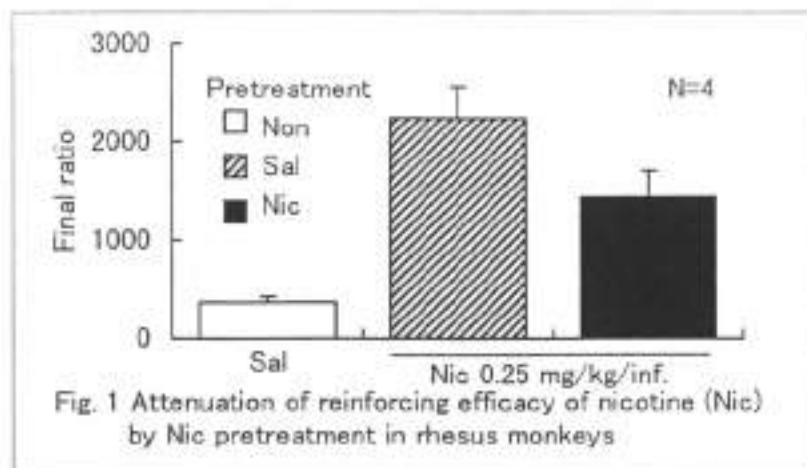
(Yanagita, 1973)<sup>1)</sup>

Table 2 The highest lever-press ratio for the final dose before extinction

Drug	Monkey No.	Dependent or its analogous state (A)	Non-dependent state (B)	A/B ratio
Morphine	174	1,600*	1,600	1
	234	12,800	1,600*	8
	248	12,800*	6,400	2
	254	6,400	200*	32
Cocaine	281	800	1,600*	1/2
	334	3,200*	6,400	1/2

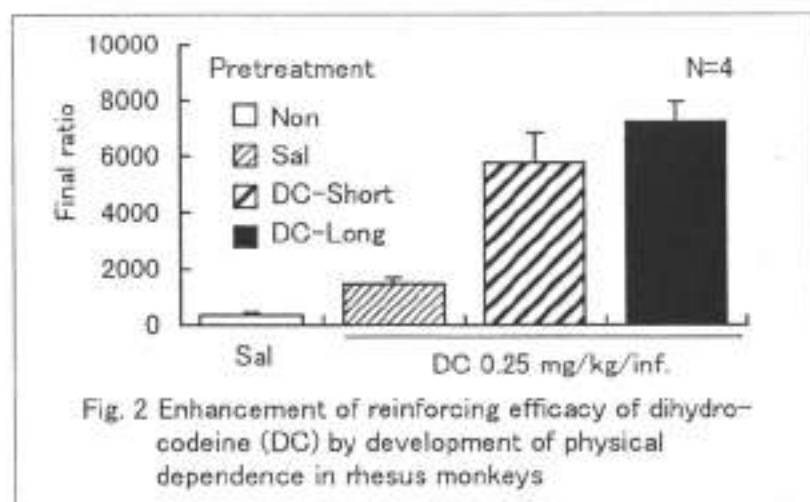
\* Tested first.

(Yanagita, 1973)<sup>1)</sup>



### 3) 身体依存形成による強化効果の増強

ヒトでは、身体依存が形成されると退薬症候の苦痛から逃れるために精神依存が増強することが知られている。この現象を比率累進実験によって検索することが可能である。鎮咳および鎮痛作用を有するジヒドロコデインを前処置して身体依存を形成した結果、最終比率は前処置期間の長さに応じて増加したことから、ジヒドロコデインの強化効果は身体依存の形成によって増強することが示唆された (Fig. 2)。一方、身体依存性はほとんど問題にならないとされるコカイン (Table 2)、およびオピオイドなどに比べて身体依存形成能がきわめて弱いニコチン (Fig. 1) ではそれぞれの薬物の前処置によって強化効果が減弱する傾向がみられた。これは、耐性が形成されて見かけ上の用量が低下したことによると推測される。



#### 4) 他の薬物による強化効果の修飾

依存性薬物の強化効果の強さは、他の薬物によって増強あるいは減弱することが知られている。ジヒドロコデイン、カフェイン、クロルフェニラミンおよびメチルエフェドリンが配合された市販の鎮咳シロップがかつて乱用されたことがあるが、ジヒドロコデインの強化効果が他の3種配合薬の併用によって増強されることが比率進実験法で確認された (Fig. 3)。一方、依存性薬物の強化効果を減弱させる薬物の検索は薬物依存症治療薬の開発と深く関わっており、アルコールあるいはコカインの自己投与が数種の薬物によって抑制されることが報告されている。

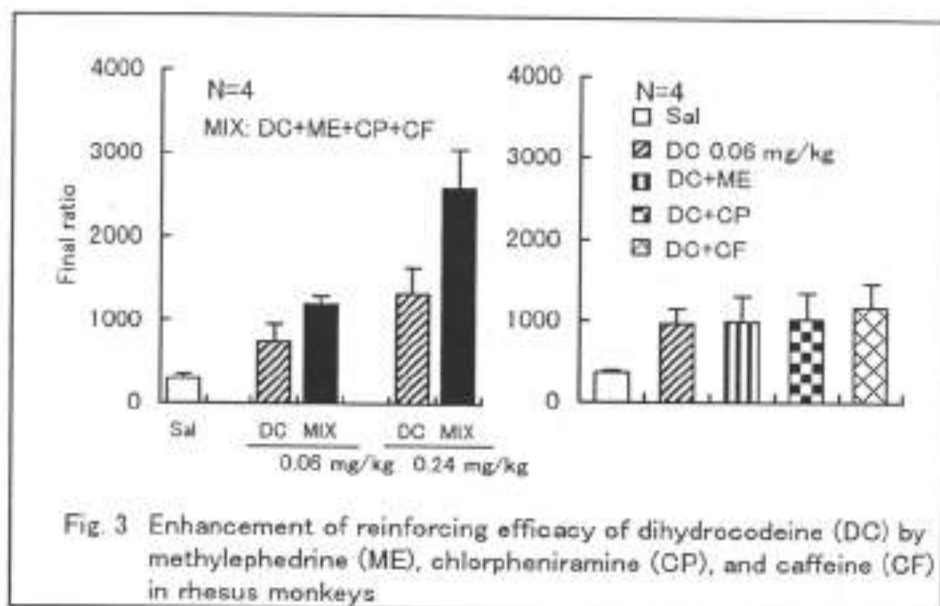


Fig. 3 Enhancement of reinforcing efficacy of dihydrocodeine (DC) by methylephedrine (ME), chlorpheniramine (CP), and caffeine (CF) in rhesus monkeys

#### (B) 嫌悪刺激効果の検索

自己投与実験技術を用いた薬物の嫌悪刺激効果に関する検討が報告されている。リスザルを用い、初めにレバー押しによる餌ペレット摂取行動を訓練した。餌摂取行動が安定したのち、餌強化と同時に静脈内カテーテルを介してヒスタミン、ニコチン、 $\beta$ -CCE あるいはコカインを静脈内に注入するセッションと、生理食塩液を注入するセッションを繰り返した結果、いずれの薬物の注入によっても用量依存的にレバー押し回数が減少したが、前3者では生理食塩液の注入ではレバー押しがベースラインと変わらなかったことから、これらの薬物が一定用量以上で嫌悪刺激となることが示唆された (Fig. 4) <sup>2)</sup>。

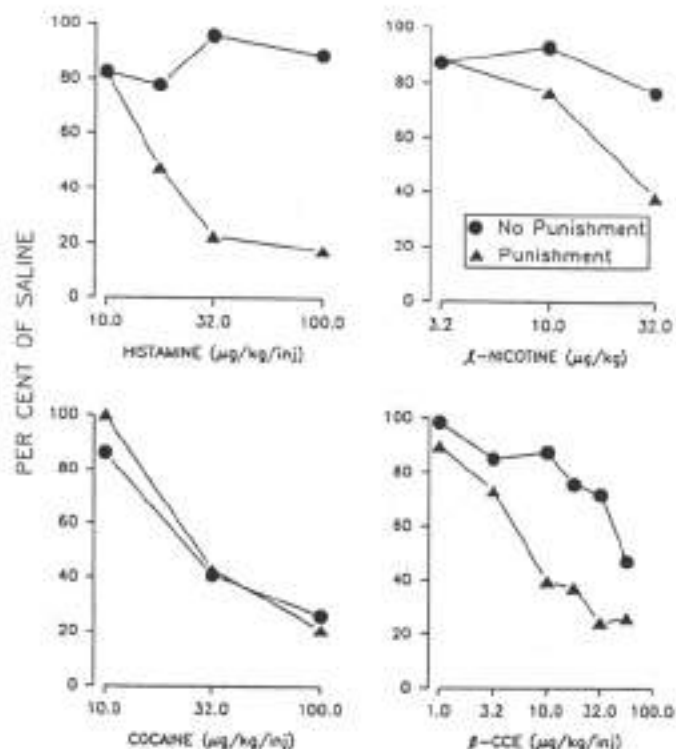


Fig. 4 Effects of histamine, l-nicotine, cocaine or  $\beta$ -CCE dose per injection on rates of responding in the two components of the multiple fixed-ratio, fixed-ratio schedule. Abscissae: dose, log scale; ordinates: average response rates expressed as a percentage of the rates obtained when saline was injected. Triangles show rates of responding in the component in which injections were scheduled; circles show rates of responding in the component in which injections were not scheduled. Each point is the mean of values for subjects S-183, S-487, S-781 and S-980; the value for each subject is the mean of at least two determinations of the effects of that dose. Note that histamine selectively suppressed rates of responding in the component in which injections were scheduled, and that a selective suppression of responding occurred with l-nicotine at 32  $\mu\text{g/kg/inj}$ . There was no selective suppression produced by cocaine. (Takada et al., 1992)<sup>3</sup>

以上の通り、薬物自己投与実験法はヒトにおける薬物の精神薬理効果を動物で検索するための有用な方法と考えられる。

#### 文献

- 1) Yanagita, T.: An experimental framework for evaluation of dependence liability of various types of drugs in monkeys. *Bulle. Narcot.* 25: 57-67 (1973).
- 2) Takada, K., Barrett, J.E., Allen, M.S., Cook, J.M. and Katz, J.L.: Punishing of schedule-controlled behavior with  $\beta$ -carboline injections: Antagonism and comparisons with other compounds. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 261: 138-145 (1992)

# ワークショップ

エストロゲン様作用物質のスクリーニングのための卵巣摘出  
ラット子宮アッセイ法における基礎的検討：重量測定法の検討

○角南 整、山田智也、須方督夫、奥野泰由、松尾昌季

住友化学工業株式会社 生物環境科学研究所

[目的] 我々は、卵巣摘出ラットを用いた子宮アッセイ法は高感度にエストロゲン様作用物質を検索できることを第25回日本トキシコロジー学会学術年会にて発表した。今回、さらに広範囲の17 $\beta$ -Estradiol(E2)投与によって、その検出感度を確認するとともに、子宮重量の測定方法について検討した。[方法] 7週齢の無処置あるいは卵巣を摘出(OVX群)したCrj:CD(SD)IGS雌ラットを用い(OVX群は術後1週間後から)、E2を0、0.1、1、10および50  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ の用量で3日間腹腔内投与した。最終投与の翌日、動物を屠殺して子宮を摘出し、その重量を測定した。内液含有湿重量に加え、子宮角の一部を切開し、その内液除去後の重量(内液除去後湿重量)および、70 $^{\circ}\text{C}$ で約24時間乾燥させた後の重量(乾燥重量)を測定した。[結果] (1) 剖検において、OVX群にて子宮の大型化および貯留が10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 以上で有意に認められた。(2) OVX群へのE2投与により、用量依存的に子宮重量は増加し、1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 以上で内液除去後湿重量および乾燥重量の、10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 以上で内液含有湿重量の有意な増加がみられた。(3) 各測定法間の相関係数( $r$ )は、内液含有湿重量-内液除去後湿重量で0.9073、内液除去後湿重量-乾燥重量で0.9881、内液含有湿重量-乾燥重量で0.8813であり、内液除去後湿重量と乾燥重量は強い正の相関関係にあった。(4) 無処置群では、前回同様にE2投与による影響は認められなかった。[考察] 卵巣摘出ラットを用いた3日間子宮アッセイは、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有用であり、また、子宮重量の測定方法としては、内液除去後湿重量の測定により、乾燥重量と同程度の感度でエストロゲン様作用物質を検出可能であることが確認できた。

Evaluation for activity of uterotrophic assay utilizing ovariectomized rats to detect estrogen-like compounds : method of uterine weight measurement

Osamu SUNAMI, Tomoya YAMADA, Tokuo SUKATA, Yasuyoshi OKUNO, Masatoshi MATSUO, Environmental Health Science Laboratory, Sumitomo Chem. Co. Ltd., Osaka 544-8558, Japan.



## 全自動免疫化学測定装置によるラット血中ホルモン濃度の測定

○向井大輔、 笹浪知宏、 大庭耕輔、 井上博之

(財)食品農医薬品安全性評価センター

近年、化学物質による内分泌かく乱作用が注目されており、その影響を調べるため様々な手法が開発されつつある。化学物質の影響を的確に検出するためには、これらの方法と併せて実験動物では血中ホルモン濃度の変化を調べることが必要である。最近では全自動免疫化学測定装置の測定感度は著しく向上したが、これらの機器で使用される試薬はいずれもヒトを対象としたものであり、実験動物、特にラットに関するデータはこれまで見当たらない。今回我々は、各機器メーカーの協力により Immuno 1 (株)バイエルメディカル)、 ACS 180(株)バイエルメディカル)、 Vitros ECi (株)オーソ・クリニカル・ディアグノスティックス) を用いてラットの血中ホルモン濃度測定の検討を行ったので報告する。

ラット血清 10 検体について、エストラジオール-17 $\beta$  ( $E_2$ )、プロゲステロン ( $P_4$ )、テストステロン ( $T$ )、トリヨードチロニン ( $T_3$ )、チロキシン ( $T_4$ )、卵巣刺激ホルモン (FSH)、黄体形成ホルモン (LH)、甲状腺刺激ホルモン (TSH) およびプロラクチン (PRL) をそれぞれの機器で測定した。また、これとは別にラジオイムノアッセイ (RIA) 法でホルモン濃度を測定し (株) SRL)、各機器との比較を行った。

性ステロイドホルモンである  $E_2$ 、 $P_4$  および  $T$  の測定では、いずれの機器でも RIA 法との間で相関係数が 0.9 以上あり、高い相関性を示した。また、 $T_3$  および  $T_4$  の測定では、検体間のばらつきが少なく、相関係数は性ステロイドホルモンと比較して低値であったが ( $T_3$ : 0.59~0.84、 $T_4$ : 0.87~0.93)、すべての機器において検出可能であった。ペプチドホルモンである FSH、LH、TSH および PRL の測定ではすべての機器で検出下限以下であったが、これはこれらホルモンの分子構造がヒトとラットとの間で差異があるためと考えられた。以上のことより、全自動免疫化学測定装置はラットのペプチドホルモン測定には問題があるが、性ステロイドホルモンおよび甲状腺ホルモンの測定に有効であることが示された。

Measurement of hormone concentration in rat serum by automated immunoassay systems.

Daisuke MUKAI, Tomohiro SASANAMI, Kousuke OBA and Hiroyuki INOUE.  
Biosafety Research Center, Foods, Drugs and Pesticides, Iwata-gun, Shizuoka  
437-1213, Japan

Diethylstilbestrol (DES)投与雄ラットの血清 $\alpha_{2u}$ -Globulin level の変動と  
Endocrine Disrupter Screening への応用

○武吉正博、穴井俊二、飯田憲二

財団法人 化学品検査協会 安全性評価技術研究所

$\alpha_{2u}$ -globulin (AUG)は成熟雄ラットの血清及び尿中に存在する分子量約 19kDa の蛋白質であり、肝臓で生合成される。AUG の生合成や遺伝子の転写は各種ホルモン(Estrogen, Androgen, Growth hormone 等)によって影響を受けることが知られており、特に Estrogen 暴露による肝臓での AUG 遺伝子の転写や血清 AUG の減少にみられるように Estrogen と AUG の密接な関連が示唆されている。そこで我々は Sandwich ELISA 法によるラット血清中の AUG の測定方法を開発し、その Endocrine Disrupter screening 法への応用の可能性について検討した。今回開発したウサギ polyclonal 抗体を用いた Sandwich ELISA 法は添加回収率は 98.3 %、同時再現性は C.V.=4.53~13.15%、日差再現性は C.V.=6.24%と良好な結果が得られており、正常雌ラット及び雄ラットの血清 AUG level の測定結果も既報と一致するものであった。本法を用いて Endocrine disrupter 研究に繁用されている Diethylstilbestrol (DES)を正常雄ラットに投与した際の血清 AUG 濃度の変動を観察した結果、DES 投与群で著しい減少が観察され、病理組織学的に精巣の萎縮性変化を認めなかった動物においても明らかな血清 AUG の低下が認められた。このことから、血清 AUG の測定は正常動物に対する Estrogenic chemical の影響を鋭敏に検出できるものと推察される。今後の研究により Estrogenic chemical 投与による血清 AUG level 減少のメカニズムを明らかにし、AUG 測定の意義を明確にする必要があるが、本蛋白質は通常行われる毒性試験の中で測定し、評価することが可能であるため、本法の開発は Endocrine Disrupter の新規 *in vivo* screening 法として期待できるものと思われる。

Changes in serum  $\alpha_{2u}$ -Globulin levels in male rat administered with Diethylstilbestrol (DES) and application to the screening test for Endocrine disrupting chemicals

Masahiro TAKEYOSHI, Shunji ANAI and Kenji IIDA, Chemical Assessment Center, Chemicals Inspection & Testing Institute

卵巣摘出ラットにおける内分泌攪乱化学物質の甲状腺増殖性病変に対する修飾作用

○高木久宜、三森国敏、小野寺博志、安原加壽雄、梶谷高敏、  
広瀬雅雄

国立医薬品食品衛生研究所・病理部

【序論】内分泌攪乱化学物質 (EDC) の 1 つである ethinyl estradiol (EE) を N-methyl-N-nitrosourea (MNU) でインヒビション処置されたラットに反復投与すると甲状腺腫瘍が誘発されることが報告されている。今回、我々は、甲状腺二段階発癌モデルを用いて EDC の甲状腺に対する修飾作用を検索した。【方法】3 週齢 F344 ラットの卵巣を除去し、1 週間後に 2000mg/kg の diisopropanolnitrosamine (DHPN) を単回皮下投与した。その 1 週後より抗甲状腺剤である 1000ppm の sulfamethoxine (SDM) を 8 週間飲水投与した (OVX 群)。偽手術群として、卵巣除去術以外同様の処置を行う群も設けた (Sham 群)。その後 28 週間、OVX 群では 1-0.5ppm EE (1 群)、1000ppm methoxychlor (2 群)、4000ppm atrazine (3 群)、10000ppm bisphenol A (4 群)、1000ppm SDM (5 群)、基礎飼料 (6 群) を与え、sham 群では 1-0.5ppm EE (7 群) ないし基礎飼料 (8 群) を投与した。【結果】最終体重は、OVX 群では 6 群に比し 1-5 群で有意な減少がみられた。Sham 群では 8 群に比し 7 群で有意な減少がみられた。OVX 群での甲状腺重量は、6 群に比し 5 群で絶対・相対重量が有意に増加した。子宮重量は、6 群に比し 1, 2 群で絶対・相対重量が有意に増加した。Sham 群の 7 と 8 群の間には有意な臓器重量における変動はみられなかった。病理組織学的には、OVX 群でいずれの群においても甲状腺増殖性病変が発生し、5 群のその大きさは 6 群に比し明らかに増加したが、その他の群では有意な変動はみられなかった。Sham 群でも両群の間に有意な変動はみられなかった。【結論】今回の実験条件下では、EE およびその他の EDC の甲状腺に対する発癌修飾作用を確認するまでには至らなかった。

Modifying Effects of Endocrine Disrupting Chemicals to Thyroid Proliferative Lesions in Ovariectomized Rats

Hisayoshi TAKAGI, Kunitoshi MITSUMORI, Hiroshi ONODERA, Kazuo YASUHARA, Takatoshi KOUJITANI and Masao HIROSE. Division of Pathology, National Institute of Health Sciences, Tokyo 158-8501, Japan

## 去勢成熟ラットを用いたアンドロゲン活性の評価

○片山誠一, 永井賢司, 平塚秀明, 佐藤徹哉,  
前田真希, 涌生ゆみ, 飯塚宏美

三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所

【目的】化学物質のアンドロゲン活性を検出するためのスクリーニング試験法として去勢ラットを用いた方法 (Hershberger assay) が知られているが, 実験者により使用動物の週齢, 投与経路, 投与期間等に違いがあり, 背景データも少ない。今回, 我々は去勢成熟ラットにAR agonist であるTestosterone propionate (TP) を反復皮下投与し, 去勢から投与開始までの期間, 投与期間および用量反応性について検討したので報告する。【方法】SD系雄性ラットを8あるいは9週齢で去勢後, 10~11週齢時にTPを3, 7あるいは10日間反復皮下投与し, 各最終投与後24時間に解剖した。用量反応性の検討では0.01, 0.03, 0.1, 0.3 mg/kgの用量で投与した。前立腺腺葉のReplicative DNA Synthesis (RDS) 誘発率を評価するため, 解剖2時間前にBrdUを腹腔内投与した。検索パラメータとして, 器官重量 (前立腺腺葉, 精囊, 肛門挙筋, 球海綿体筋), 血清中ホルモン濃度 (T, DHT, T4, TSH, LH, FSH), 前立腺腺葉のRDS誘発率を評価した。

【結果】去勢から投与開始までの期間 (1および2週間) を検討した結果, 1週間で十分であると判断した。TPの投与期間 (3, 7および10日間) の検討を行ったところ, 前立腺腺葉および精囊重量は用量および投与期間依存的に増加した。しかし, 10日間の投与では個体間差が大きくなることから, 投与期間としては7日間が適していると判断した。TPを7日間皮下投与し, 用量反応性の検討を実施したところ, 0.03 mg/kg以上の群で前立腺腺葉のRDS誘発率の高値, 0.1 mg/kg以上の群で前立腺腺葉, 精囊, 球海綿体筋重量およびT濃度の高値, 0.3 mg/kg群で肛門挙筋重量およびDHT濃度の高値およびLH濃度の低値が認められた。本実験系において, アンドロゲン活性を最も鋭敏に検出できたパラメータは, 前立腺腺葉のRDS誘発率であった。

Assessment of androgenic activity using castrated adult male rats.

Seiichi KATAYAMA, Kenji NAGAI, Hideaki HIRATSUKA, Tetsuya SATO, Maki MAEDA, Yumi WAKO and Hiromi IIZUKA. Kashima Laboratory, Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd., Ibaraki, 314-0255, Japan.

## 去勢成熟ラットを用いた抗アンドロゲン活性の評価

○佐藤徹哉, 片山誠一, 永井賢司, 平塚秀明,  
前田真希, 涌生ゆみ, 飯塚宏美

三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所

【目的】今回、我々は去勢成熟ラットにFlutamide (FLU, AR antagonist) および Testosterone propionate (TP, AR agonist) を7日間反復皮下投与し、FLUの抗アンドロゲン活性の検出感度に及ぼすTP濃度の影響 (I) およびFLUの用量反応性 (II) について検討したので報告する。【方法】SD系雄性ラットを9週齢で去勢後、10~11週齢時に各試験物質を7日間反復皮下投与し、最終投与後24時間に解剖した。(I) では、FLUを0.4, 2, 10 mg/kgの用量で投与し、同時にTPを0.1あるいは0.5mg/kg投与した。(II) では、FLUを0.1, 0.3, 1, 3 mg/kgの用量で投与し、同時にTPを0.1 mg/kg投与した。前立腺腺葉のReplicative DNA Synthesis (RDS) 誘発率を評価するため、解剖2時間前にBrdUを腹腔内投与した。検索パラメータとして、器官重量(前立腺腺葉、精囊、肛門挙筋、球海綿体筋) および前立腺腺葉のRDS誘発率を評価した。

【結果】(I) では、いずれのTP用量でもFLU 2 mg/kg以上の群で前立腺腺葉の相対重量の低値が認められた。しかし、より低用量のFLU 0.4 mg/kg群における前立腺腺葉の相対重量のコントロール比は、TP 0.5 mg/kgでは88.4 %であったのに対し、TP 0.1 mg/kgでは58.6 %とより強く抑制された。さらに、TP 0.1 mg/kgでは前立腺腺葉のRDS誘発率の低下がFLU用量に依存してみられたのに対し、TP 0.5 mg/kgでは同様の傾向は認められなかった。これらの結果から、TP濃度は0.1 mg/kgが適していると判断した。(II) では、FLU 0.3 mg/kg以上の群で前立腺腺葉および精囊重量の低値、FLU 3 mg/kg群で前立腺腺葉のRDS誘発率の低値が認められた。TP濃度を0.1 mg/kgおよび投与期間を7日に設定した本実験系において、FLUの抗アンドロゲン活性を最も鋭敏に検出できたパラメータは、前立腺腺葉および精囊重量であった。

Assessment of anti-androgenic activity using castrated adult male rats.

Tetsuya SATO, Seiichi KATAYAMA, Kenji NAGAI, Hideaki HIRATSUKA, Maki MAEDA, Yumi WAKO and Hiromi IIZUKA. Kashima Laboratory, Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd., Ibaraki, 314-0255, Japan.

ヒトエストロゲンレセプター $\alpha$ に対するインビトロ影響評価法  
 -ピレスロイド剤を中心とした各種化学物質の検討 I-

○斎藤幸一<sup>1)</sup>、冨ヶ原祥隆<sup>1,2)</sup>、磯部直彦<sup>1)</sup>、金子秀雄<sup>1)</sup>、  
 中塚 巖<sup>1)</sup>、西原 力<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>大阪大学大学院薬学研究科

[目的]近年、内分泌攪乱作用として化学物質の女性ホルモン(エストロゲン)様あるいは抗ホルモン様作用が懸念されている。今回、各種ピレスロイド剤を中心とした各種化学物質のヒトエストロゲンレセプター $\alpha$ に対する影響をエンドポイントの異なる3種類の *in vitro* アッセイ法を用いて検討し、化学物質のホルモン様あるいは抗ホルモン様作用の評価法を提案する。[方法]ピレスロイド8剤(スミサイジン、アレスリン、スミスリン、エトック、ペーパーズリン、パーメスリン、サイパーメスリン、イミプロスリン)と各種陽性対照化合物(E2、ゲニステイン、Bis-フェノール A、ノニルフェノール、4-OH-タモキシフェン等)のエストロゲンおよび抗エストロゲン作用を以下に従い検討した。①コントロールレポーター導入 HeLa 細胞を用いた各種化学物質のヒトエストロゲンレセプター $\alpha$ に非依存的な細胞影響濃度の検討② HeLa 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイによるレセプター依存的な転写活性への影響の検討③ Two-hybrid 法によるリガンド依存的なレセプターとコアクチベーターの結合性の検討④蛍光偏光度測定システムを用いたレセプターと化学物質の結合性の検討。[結果及び結論]まず、化合物の溶解性と①より適切な供試化合物濃度を決定した後(最高濃度 $\leq 10\mu\text{M}$ )、3種の方法(②、③、④)により、ピレスロイド8剤および陽性対照化合物のヒトエストロゲンレセプター $\alpha$ に対する作用を検討した。その結果、各種陽性対照化合物は明らかにレセプターに結合し、エストロゲンまたは抗エストロゲン作用を示したのに対し、ピレスロイド剤8剤はレセプターに対する結合性とエストロゲンおよび抗エストロゲン作用を示さなかった。培養細胞を用いた内分泌攪乱物質の正確な *in vitro* 影響評価では、細胞毒性等を加味した供試化合物濃度決定(特に抗ホルモン作用評価の場合)とシグナル伝達の相互作用等の複雑な要因の関与が考えられるため、エンドポイントの異なる方法による検討・解析が重要である。

Evaluation of *in vitro* methods for detecting the effects of chemicals on human estrogen receptor  $\alpha$  using various chemicals, mainly pyrethroid insecticides

Koichi SAITO<sup>1)</sup>, Yoshitaka TOMIGAHARA<sup>1), 2)</sup>, Naohiko ISOBE<sup>1)</sup>, Hideo KANEKO<sup>1)</sup>, Iwao NAKATSUKA<sup>1)</sup> and Tsutomu NISHIHARA<sup>2), 1)</sup> Environmental Health Science Laboratory, Sumitomo Chemical Co., Ltd., Osaka 554-8558, Japan. <sup>2)</sup>Laboratory of Environmental Biochemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 565-0871, Japan.

ヒトプロゲステロンレセプターに対するインビトロ影響評価法  
 -ピレスロイド剤を中心とした各種化学物質の検討II-

○住田佳代、斎藤幸一、磯部直彦、金子秀雄、中塚巖

住友化学工業(株) 生物環境科学研究所

〔目的〕プロゲステロンレセプターはステロイドホルモン的一种であるプロゲステロンと結合し、標的遺伝子の発現を誘導することで受精卵着床、妊娠維持等の生理作用を示す。近年、内分泌攪乱作用として化学物質のホルモン様作用あるいは抗ホルモン様作用が懸念されている。そこで、各種ピレスロイドを中心にプロゲステロンレセプターに対する影響を3種類の *in vitro* アッセイ法で調べた。

〔方法〕ピレスロイド8剤(スミサイジン、アレスリン、スミスリン、エトック、ペーパーズリン、パーメスリン、サイパーメスリン、イミプロスリン)、数種の環境汚染物質及び毒性対照化合物(プロゲステロン、RU486)を以下の3種類の *in vitro* アッセイ法に供した。

①ヒト乳がん由来細胞T-47Dを用いたレポーター遺伝子アッセイ(ルシフェラーゼアッセイ)法、②Two-hybrid法、③T-47D細胞由来のレセプターを用いたバインディングアッセイ法。

〔結果及び結論〕正確なレセプターに対する影響評価を *in vitro* アッセイ法を用いて行う場合にはエンドポイント(転写活性、リガンド依存的なレセプターとコアクチベーターとの結合性、レセプターとの結合等)の異なるアッセイ法を組み合わせることも、また、細胞を用いたアッセイ系には種々の要因が複雑に関与することがあるため、化合物の溶解度及び細胞毒性(コントロールプラスミドによりモニター)を考慮することが非常に重要である。特に、抗ホルモン様作用を調べるときには細胞毒性を調べるのが重要である。

以上のような3種類のアッセイの結果から、上記ピレスロイド剤はレセプターに対する結合性を示さず、プロゲステロン様あるいは抗プロゲステロン様作用はないと考えられた。

尚、Two-hybrid法については大阪大学大学院薬学研究科 西原力先生のご指導を賜りました。ここに深く感謝いたします。

Evaluation of *in vitro* methods for detecting the effects of chemicals on human progesterone receptor using various chemicals, mainly pyrethroid insecticides.

Kayo SUMIDA, Koichi SAITO, Naohiko ISOBE, Hideo KANEKO and Iwao NAKATSUKA  
 Environmental Health Science Laboratory, Sumitomo Chemical Co., Ltd., Osaka 554-8558,  
 Japan.

経口投与した 2,2-ビス(4-ヒドロキシフェニル)プロパン (ビスフェノールA) の妊娠ラットにおける吸収分布動態および胎仔への移行性

○高橋 省、大石眞之

都立衛生研究所 毒性部 薬理研究科

[目的] 環境ホルモン作用が疑われるビスフェノールA (BPA) はポリカーボネート樹脂やエポキシ樹脂などの原料 (単量体) で、それらの樹脂で作られた食品パッケージからの食品への混入が問題となっている。BPA の妊娠ラットにおける吸収分布動態および胎仔への移行性について調べた。[方法] 妊娠 18 日目の雌 F344/DuCrj(Fischer)ラットに、BPA をプロピレングリコールに溶かし(25%)、体重 1kg あたり 1g の用量で一回経口投与した。30 分、1、2、4、6 時間後に断頭放血して殺し、母体の血液、肝臓、腎臓、および胎仔を採取し、ポリトン型ホモジナイザーを用いて約 20 倍容のアセトンで BPA を抽出した。アセトン抽出物を乾固後、蒸留水と n-ヘキサン(1:1)を加え振とう攪拌し、n-ヘキサン層に溶解した BPA を高速液体クロマトグラフィーにより測定した。[結果] 母体の血中 BPA 濃度は投与後 30 分で一番高く約  $2 \mu\text{g/g}$  であり、以後漸減し投与後 6 時間目で  $0.4 \mu\text{g/g}$  となった。母体の肝臓中の濃度は投与後 30 分で最も高く約  $100 \mu\text{g/g}$  であり、以後漸減して、6 時間後に約  $10 \mu\text{g/g}$  となった。母体の腎臓中の濃度は投与後 30 分で最も高く約  $20 \mu\text{g/g}$  で、以後漸減し 6 時間後に約  $2 \mu\text{g/g}$  となった。胎仔は 30 分後のものが採れず、1 時間目以後のデータであるが、1 時間後で最も高く約  $2.5 \mu\text{g/g}$  を示し、以後漸減して 6 時間後に約  $0.6 \mu\text{g/g}$  となった。[結論] 1. BPA の吸収分布は極めて速く、ラットにおいて BPA は経口投与後 1 時間以内に母体内主要臓器及び胎仔において最高濃度に達すると推測される。2. BPA は胎盤を極めて容易に通過する物質である。すなわち、胎仔内濃度は、ほぼ母体の血中濃度に等しいか、それより少し高めに推移し、胎盤のバリアーはこの物質に対しては殆ど役に立っていないものと推測される。3. 投与後 1 時間以内の胎仔への移行については検討中である。

Disposition of orally administered bisphenol A in pregnant rats and the placental transfer to fetuses

Osamu TAKAHASHI and Shinshi OISHI. Department of Toxicology, the Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, Tokyo 169-0073, Japan



## 内分泌かく乱物質トリクロロベンゼンの ラット培養胎児への影響

○横山 篤、秋田 正治

鎌倉女子大学、家政学部

【目的】 殺菌剤ヘキサクロロベンゼンの類縁体であるトリクロロベンゼンは、内分泌かく乱物質作用を有すると言われている。一連の環境ホルモンの精子側への影響は他の研究機関に委ねて、我々は受精した後の着床胚つまり胎児への影響を検索している。今回はその微量で発現するという胎児毒性を解析しその機序を解明するために、ラット培養胎児にトリクロロベンゼンを処理して影響を観察したので報告する。

【実験方法】 ラット胎児は胎齢11日目で母獣より無菌的に取り出し、48時間の培養を実施した。処理濃度は、トリクロロベンゼンとして1, 5, 10  $\mu$ g/ml で、培養液中に処理した。またトリクロロベンゼンを培養液に溶解するためにDMSO (0.5 M) を用いた。このDMSOは対照群として正常な範囲の濃度を使用した。

【培養胎児への判定結果】 胎児の生理機能への影響は心拍動と血液循環を観察したが、前処理群で有意差はないが低い傾向を示した。また5  $\mu$ g/ml 以上の処理群で発育成長の指標は頂殿長で10%、総たんぱく質量が17%未処理群と比較して低下を示した。発現奇形は、水腫、四肢異常、背部陥入、前頭部隆起抑制、口唇裂が10  $\mu$ g/ml 処理群で48%以上発生した。特にラット培養胎児は死亡する例が最高用量の10  $\mu$ g/ml で5%発現した。以上の結果より1  $\mu$ g/ml は無影響量であり、5  $\mu$ g/ml は発育抑制量、10  $\mu$ g/ml は再奇形量と判断でき、この現象の延長線上に流産や不妊の原因の可能性が示唆された。

Effects of trichlorobenzene as endocrine disrupting chemical on cultured rat embryos

Atsushi YOKOYAMA and Masaharu AKITA, Kamakura Women's College,  
Kanagawa-247-8511, Japan.

## TCDD の胎児期・授乳期曝露が雄ラットにおよぼす影響

○米元純三、曾根秀子、大迫誠一郎\*、西村典子\*、野原恵子\*、藤巻秀和\*、牛尾博子\*、宮原裕一\*、青木康展\*、石塚真由美\*、NR Jana, S Sarkar, 遠山千春\*

国立環境研究所 地域環境研究グループ、\*環境健康部

〔目的〕妊娠ラットにTCDDを投与し、雄性仔の生殖器、精子形成への影響、甲状腺ホルモン、免疫系への影響を検討し、胎児期、授乳期のダイオキシンの曝露による仔への影響のリスク評価の基礎資料を得ることを目的とした。

〔方法〕妊娠15日のHoltzmanラットに12.5、50、200および800ng/kg体重の2,3,7,8-四塩化ジベンゾ-p-ダイオキシン(TCDD)を一回経口投与し、雄について生後49、63、120日後に解剖し各種検索をおこなった。

〔結果及び考察〕血清中のT4濃度は、生後63日齢の800ng/kg投与群において対照に比べ有意に低下していた。血清T3およびTSH濃度はいずれの発育ステージにおいてもTCDDによる影響は見られなかった。病理組織所見では一部のラットに甲状腺肥大と濾胞細胞の過形成(120日齢の800ng/kg投与群、2/12)が認められた。免疫系への影響としては49日齢で、脾細胞数が用量依存的に減少し、50ng/kg群以上で有意の差が認められた。120日齢では胸腺の細胞数に用量に依存した減少傾向が見られた。雄性生殖器官では、精巣重量、一日精子産生数(DSP)、精巣上体重量、精巣上体尾部精子数(SR)に変化は認められなかった。副生殖腺のうち、前立腺重量は49日齢では800ng/kg群で、120日齢では12.5、200および800ng/kg群で有意に減少した。肛門性器間距離は、49日齢では200ng/kg以上で、63、120日齢では50ng/kg以上で有意な減少が見られた。雄性生殖器では発生過程においてテストステロンに反応して発達する精巣、精巣上体よりもデヒドロテストステロンに反応する前立腺、外生殖器(肛門性器間距離)に低用量TCDDの影響が見られた。

## Effects of Maternal Exposure of Male Rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin

Junzo YONEMOTO, Hideko SONE, Seiichiro OHSAKO, Noriko Nishimura, Keiko NOHARA, Hidekazu FUJIMAKI, Hiroko USHIO, Yuuichi MIYABARA, Yasunoba AOKI, Mayumi ISHIZUKA, NR JANA, S SARKAR and Chiharu TOHYAMA. NIES, TSUKUBA-305, Japan.

## 極めて低濃度のダイオキシン類によるラット精巣細胞の分子シャペロン HSP70、HSP90および Hop の誘導

福田亜弥子、黒木龍一、田崎健二、石田卓巳、石井祐次、○小栗一太

九州大学 大学院 薬学研究科

【目的】ダイオキシン類は、生物蓄積性の高い環境汚染物質であり、生体に多様な影響を及ぼすが、作用メカニズムの本質的な理解には至っていない。われわれは、組織障害あるいは生体ストレスなど、様々な要因によって誘導される分子シャペロン HSP90 と HSP70 が、コブラナー-PCB を投与したラット肝臓において顕著に誘導されることを明らかにしている。最近、ダイオキシン類が、外因性内分泌攪乱物質として及ぼす生殖毒性が危惧されている。そこで、本研究では、男性生殖細胞への影響を検討する目的で、ダイオキシン類のラット精巣ライディッヒ細胞における HSP90、HSP70 の発現に及ぼす影響について検討した。また、これらのタンパク質とともにステロイドホルモンレセプターヘテロコンプレックス集合体を形成する Hop (HSP70-HSP90 organizing protein) の発現についても検討した。【方法】ラット精巣ライディッヒ細胞株 LC540 を、10% 牛胎児血清を含む Eagle's MEM 培地で、70% コンフルエントに達するまで培養し、その後さらに 1% 血清培地で 1 日子備培養した後、DMSO に溶解した 100 nM 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PenCB) を添加し、1~24 時間培養した。用量依存性の検討では、10 pM, 100 pM, 1 nM, 10 nM, 100 nM PenCB を添加して観察した。細胞を回収した後、サイトソル分画を調製し、SDS-PAGE に付した後 Hsp70, HSP90 および Hop に特異的な抗体を用いて免疫染色を行った。【結果・考察】その結果、いずれのタンパク質も、最も低濃度の 10 pM から顕著な誘導が認められた。環境汚染レベルのダイオキシン相当量に近いダイオキシン類によって、ストレス応答性のタンパク質が顕著に変化することを意味している。これがダイオキシン類の多様な作用メカニズムを説明するか明らかではない。しかし、すべての生物に認められる熱ショック応答性などとは異なる、高等生物細胞のダイオキシン類に対するストレスタンパク質の応答である。

## Significant Induction of Molecular Chaperones, HSP70, HSP90 and Hop in a Rat Testis Cell by Very Low Level of Dioxins

Ayako FUKUDA, Ryuichi KUROGI, Kenji TASAKI, Takumi ISHIDA, Yuji ISHII and Kazuta OGURI. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan

Norharmanとanilineとの共存下に生成する新規変異原物質、aminophenylnorharmanのF344ラットに対する精巣毒性

○戸塚ゆ加里<sup>1</sup>、川森俊人<sup>1</sup>、石原純子<sup>1</sup>、三森国敏<sup>2</sup>、久田 茂<sup>3</sup>、杉村 隆<sup>1</sup>、若林敏二<sup>1</sup>

<sup>1</sup>国立がんセ・研 がん予防、<sup>2</sup>国立衛研 病理、<sup>3</sup>帝国機器製薬(株)安全性

タバコの煙や加熱食品中に存在するnorharmanはaniline等の芳香族アミンと共存させたときに、S9 mix存在下に*S. typhimurium* TA98に対して変異原性を示す。この変異原性の発現は、norharmanとanilineが結合した新規変異原物質、9-(4'-aminophenyl)-9H-pyrido[3,4-b]indole (aminophenylnorharman)の生成によることが明らかになった。Aminophenylnorharmanの実験動物に対する毒性をF344雄ラットを用いて検討した。

Aminophenylnorharmanはnorharmanと*p*-bromonitrobenzeneを出発材料として化学合成した。Aminophenylnorharmanを50及び100 mg/kgの投与量で、10週齢のF344雄ラットに単回胃内強制投与し、体重及び各臓器の病理学的変化を観察した。50 mg/kgの投与量では体重抑制はほとんど見られなかった。一方、100 mg/kgの投与群においては、17%の体重抑制が認められ、投与後3日目には精巣のセルトリ細胞の空砲化が観察され、それは投与後5及び6日目にはさらに増加した。又、精子細胞の多核巨細胞化及び精子細胞の脱落や消失等の精巣毒性を示す所見が観察された。以上のことより、aminophenylnorharmanはセルトリ細胞の障害を介して、精巣毒性を示すことが示唆された。

100 mg/kgの投与群において、上記所見に加え、膀胱粘膜障害、骨髄抑制及び胸腺萎縮等の所見が観察された。

Testicular Toxicity of Aminophenylnorharman, A Product from the Reaction of Norharman and Aniline, in F344 Rats.

Yukari TOTSUKA, Toshihiko KAWAMORI, Junko ISHIIHARA, Kunitoshi MITSUMORI, Shigeru HISADA, Takashi SUGIMURA and Keiji WAKABAYASHI.

Cancer Prevention Division, National Cancer Center Research Institute, 1-1, Tsukiji 5-chome, Chuo-ku, Tokyo, 104-0045, Japan.

28日間反復投与試験によるノニルフェノールおよびアトラジンの  
ラット雌性生殖器官に対する影響の検討

○<sup>1</sup>麻生 直、<sup>1</sup>穴井真紀子、<sup>1</sup>野田修志、<sup>1</sup>今田中伸哉、<sup>1</sup>山崎寛治、  
<sup>2</sup>前川昭彦

<sup>1</sup>財団法人 化学品検査協会、安全性評価技術研究所、

<sup>2</sup>財団法人 佐々木研究所、病理部

[目的]最近、内分泌攪乱物質を検出するためのスクリーニング試験法の必要性が盛んに議論されている。今回、既存の OECD407 テストガイドライン(28日間反復投与試験)が作用の弱い内分泌攪乱物質の雌性生殖器官への影響を検出できるか否かを検討するため、内分泌攪乱物質に対して感受性が異なると思われる3系統のラットを用いて当該試験法に準拠した方法で試験を実施した。

[方法]12週齢の Crj:CD(SD)IGS、F344/DuCrj(Fischer)及び Crj:Donryu ラットの雌に対し、ノニルフェノール 0、60、250 mg/kg、アトラジン 5、50 mg/kg を28日間経口投与した。その後性周期が休止期になるまで投与を続け、休止期になったものについてその都度屠殺後剖検し、下垂体、肝臓、腎臓、副腎、卵巣、子宮重量を測定した。腎臓を除く上記器官と膣及び乳腺については、常法に従って HE 染色後組織学的検査を実施し、子宮内膜については、BrdU による細胞分裂像についても検討した。なお、投与期間中、一般状態及び性周期の観察と体重測定を実施した。

[結果および考察]両物質投与で性周期の異常、子宮内膜の BrdU 陽性細胞の増加傾向、アトラジン投与で卵巣の萎縮等が認められた。しかしながら、いずれも影響が明確でなかったことから、作用の弱い物質についての影響を検出するには試験法の再検討と共に既存のパラメータに加え新たなパラメーターの導入が必要であると思われた。

Effects of nonylphenol and atrazine on female reproductive organs of rats in 28-day repeated toxicity study

<sup>1</sup>Sunao ASO, <sup>1</sup>Makiko ANAI, <sup>1</sup>Shyuji NODA, <sup>1</sup>Nobuya IMATANAKA, <sup>1</sup>Kanji YAMASAKI, and <sup>2</sup>Akihiko MAEKAWA. <sup>1</sup>Chemicals Assessment Center, Chemicals Inspection & Testing Institute and <sup>2</sup>Department of Pathology, Sasaki Institute

*p*-tert-Octylphenol の新生仔期暴露による雌ラット生殖器への影響

○勝田真一<sup>\*1</sup>、吉田 緑<sup>\*1</sup>、黒田博之<sup>\*1</sup>、安藤 進<sup>\*1</sup>、高橋正一<sup>\*1</sup>、  
渡辺 元<sup>\*2</sup>、田谷一善<sup>\*2</sup>、前川昭彦<sup>\*1</sup>

\*1 財団法人 佐々木研究所 病理部

\*2 東京農工大学 農学部獣医学科 家畜生理学教室

**目的** *p*-tert-Octylphenol(OP)は、エストロゲン様作用を有する内分泌攪乱物質として注目されている。今回、雌ラットの出生直後からの OP 暴露による影響を検討したので報告する。**材料及び方法** 実験1：妊娠 Crj:Donryu ラットを導入し、出生日を P0 とし 24 時間以内に OP を皮下注射した(P1)。その後隔日毎に計 8 回(P1-15)注射し、腔スミアを用いて性成熟後の性周期を調査した。投与用量は 12.5-100mg/kg とした。実験2：100mg/kg の投与用量で P1 のみ、P1, 3, 5 の 3 回及び P1-15 の 8 回投与の 3 群を設け、腔開口日及び性周期について調べた。実験3：100mg/kg の投与量で P1-15 の 8 回投与し、無処置動物を対照として 11 週齢まで経時的に組織学的検索を行った。また、10 週齢で卵巣を摘出し、1 週後の子宮及び腔を検索した。なお、性成熟以降の対照は発情期を用いた。**結果及び考察** OP の 100mg/kg 8 回投与では性周期がみられず持続発情が続いた。持続発情の出現頻度は 1 回投与で 0%、3 回投与で 25%、8 回投与では 100%であり、8 回投与で腔開口が約 4 日早まった。これより、新生仔期 OP 投与は雌ラットに対して、腔開口の早期化と性成熟後の持続発情をもたらすことが明らかとなった。また同群では、腔開口までの時期においては、組織学的に子宮内膜腺の形成抑制が顕著であった。腔開口以降の卵巣は萎縮し黄体の形成不全が明らかであり、子宮内膜上皮の細胞増殖活性の増加と細胞死の減少、被覆上皮の上皮内過形成や多層化像が認められた。これらの動物の卵巣を摘出した場合、腔スミアは速やかに去勢スミアとなり、子宮も萎縮した。以上の結果、OP 投与により引き起こされた持続発情による子宮及び腔の変化は、卵巣依存性であることが示唆された。

Persistent effects on reproductive tracts in female rats by neonatal exposure of *p*-tert-octylphenol.

Shin-ichi KATSUDA<sup>\*1</sup>, Midori YOSHIDA<sup>\*1</sup>, Hiroyuki KURODA<sup>\*1</sup>, Jin ANDO<sup>\*1</sup>, Masakazu TAKAHASHI<sup>\*1</sup>, Gen WATANABE<sup>\*2</sup>, Kazuyoshi TAYA<sup>\*2</sup> and Akihiko MAEKAWA<sup>\*1</sup>.

\*1 Dept. Pathol., Sasaki Inst.; \*2 Lab. Vet. Physiol., Tokyo Univ. Agri. Tech.

○吉田 緑<sup>\*1</sup>、勝田真一<sup>\*1</sup>、黒田博之<sup>\*1</sup>、安藤 進<sup>\*1</sup>、高橋正一<sup>\*1</sup>、  
渡辺 元<sup>\*2</sup>、田谷一善<sup>\*2</sup>、前川昭彦<sup>\*1</sup>

\*1 財団法人 佐々木研究所 病理部

\*2 東京農工大学 農学部獣医学科 家畜生理学教室

**[目的]** エストロゲン様作用を有する *p*-tert-octylphenol(OP)は下水中を通じて広く環境中に存在することからヒトの健康への影響が懸念される内分泌攪乱物質の一つである。我々は、新生児期の OP 暴露がラット生殖器系へ与える影響を検討する一環として、OP の雄ラットに与える影響について形態学的検査を中心に検討したので報告する。

**[材料と方法]** 出生後 24 時間以内の雄 Crj:Donryu ラットに 100 および 200mg/kg の OP を背部皮下に投与した。その後、生後 15 日齢まで隔日に計 8 回同様に投与した。これらの動物は、6, 10, 14, 21, 28, 35, 49 および 56 日齢(200mg/kg 群は 28, 49, 56 日齢のみ)において経時的に剖検し、同日齢の同腹の無処置動物(対照群)と比較した。精巣、精巣上体、前立腺および主要臓器は 10 日齢以降秤量し、精巣、精巣上体はブアン液、その他の臓器は中性緩衝ホルマリン液に固定して形態学的検査に供した。

**[結果および考察]** OP 投与群の体重は投与開始直後より 49 日齢まで軽度であるが用量依存性の増加抑制を示した。臓器重量では、精巣の絶対あるいは相対値が OP100mg/kg 群の 35 日齢、200mg/kg 群の 49 日齢まで持続的に低下したが、56 日齢で有意差は観察されなかった。重量の低下は、精巣上体では 100mg/kg 群の 28 日齢、200mg/kg 群の 49 日齢まで、前立腺では 100mg/kg 群の 49 日齢まで、200mg/kg 群の 49 日齢でその傾向が観察されたが、これらの低値は精巣同様 56 日齢では認められなかった。形態学的検査では、OP 群の精巣、精巣上体、前立腺の分化発育の程度は何れの検査時期も対照群と同様であり、また精上皮の形態計測においても OP 群と対照群の間で有意差は認められず、上述の重量低下と関連する組織所見は得られなかった。以上の結果は新生児期の OP の暴露が 7 週齢まで雄ラットの体重増加抑制、生殖器系の重量低下をもたらすことを示しており、新生児期の OP 暴露はこの時期における雄ラットの生殖器系の発育分化に何らかの影響を与える可能性が示唆された。

Effects on reproductive tracts of male Donryu rats by neonatal exposure of *p*-tert-octylphenol

Midori YOSHIDA<sup>\*1</sup>, Shin-ichi KATSUDA<sup>\*1</sup>, Hiroyuki KURODA<sup>\*1</sup>, Jin ANDO<sup>\*1</sup>, Masakazu TAKAHASHI<sup>\*1</sup>, Gen WATANABE<sup>\*2</sup>, Kazuyoshi TAYA<sup>\*2</sup> and Akihiko MAEKAWA<sup>\*1</sup>.

\*1 Dept. Pathol., Sasaki Inst.; \*2 Lab. Vet. Physiol., Tokyo Univ. Agri. Tech.

モルモット NAD(P)H: quinone oxidoreductase<sub>1</sub>(NQO<sub>1</sub>)遺伝子の  
発現制御機構

○伊藤圭輔、高橋芳樹、北川学、鎌滝哲也

北海道大学大学院薬学研究科 代謝分析学分野

【目的】NAD(P)H: quinone oxidoreductase<sub>1</sub>(NQO<sub>1</sub>)は、ベンゾ[*a*]ピレンの活性代謝物の解毒に関与し、ダイオキシンなどの多環芳香族炭化水素(AH)によってその発現が誘導される。したがって、NQO<sub>1</sub>の誘導は、生体防御の観点から重要な役割を果たしていると考えられる。一方、モルモットではAHを投与してもNQO<sub>1</sub>は全く誘導されず、AHに対する感受性も高いことが知られている。そこで本研究では、モルモットにおけるNQO<sub>1</sub>の誘導の制御機構を分子レベルで解明することを目的とした。

【方法・結果】まず、モルモット NQO<sub>1</sub> 遺伝子の 5'-上流領域を単離し、その塩基配列を決定したところ、モルモット NQO<sub>1</sub> 遺伝子にも、AH による誘導的発現に関与する XRE 配列が存在していることが分かった。しかし、単離した領域をヒト肝がん由来 HepG2 細胞に導入し、リポーターアッセイを行っても、AH による転写活性化は見られなかった。これまで我々は、Ah receptor(AhR)/Arnt 複合体以外の因子、Upstream stimulatory factor 1(USF1)が AH によるウサギ CYP1A1 の誘導を抑制していることを明らかにしてきた。そこで、モルモット NQO<sub>1</sub> 遺伝子にも AhR/Arnt 複合体以外の因子が XRE に競合的に結合しているために誘導されない可能性を考えた。この可能性を検証するため、モルモット NQO<sub>1</sub> 遺伝子の XRE をプローブとしてゲルシフトアッセイを行ったところ、HepG2 細胞およびモルモット肝由来の核抽出液中に XRE 配列を認識する因子が存在していることを見出した。抗体を用いてゲルシフトアッセイを行った結果、この因子は USF1 や AhR/Arnt 複合体ではないことが明らかとなった。以上の結果から、モルモットでは何らかの因子が XRE 配列に結合しているために NQO<sub>1</sub> 遺伝子の活性化が起こらず、AH に対し高感受性を示す可能性が推測された。

Regulation of NAD(P)H: quinone oxidoreductase<sub>1</sub>(NQO<sub>1</sub>) gene Expression in Guinea Pig

Keisuke ITOH, Yoshiki TAKAHASHI, Manabu KITAGAWA and Tetsuya KAMATAKI. Laboratory of Drug Metabolism, Hokkaido University Graduate School of Pharmacy, Sapporo



海洋汚染マーカーとしての野生アザラシ肝チトクロームP450の  
有用性の検討

○千葉一成<sup>1</sup>・榎原章仁<sup>2</sup>・岩田久人<sup>1</sup>・田辺 信介<sup>2</sup>・数坂昭夫<sup>1</sup>・  
藤田正一<sup>1</sup>

1: 北海道大学大学院 獣医学研究科 環境獣医科学講座 毒性学教室

2: 愛媛大学 農学部 環境保全学講座環境化学研究室

The accumulation of the pollutants, mainly polychlorinated biphenyl congeners (PCBs) and its effect on physiological status of the seal have been reported in last two decades. We studied if the levels of the accumulation of PCBs in the free-living spotted seal (*Phoca largha*) from the ocean surrounding Hokkaido island, Japan have any relation with hepatic microsomal contents of CYP isozymes and monooxygenase activities. The alkoxyresorufin O-dealkylase (AROD) of these seal liver microsomes was characterized by the high activity of O-deethylation of ethoxyresorufin followed by O-dealkylations of methoxyresorufin, benzyloxyresorufin and pentoxyresorufin (PROD) in this order. Among hydroxylations of testosterone, 6 $\beta$ -hydroxylase (T6 $\beta$ H) activity is the highest, followed by the activities of 2 $\beta$ - and 16 $\beta$ - (T16 $\beta$ H) hydroxylations. Testosterone 16 $\alpha$ -, 7 $\alpha$ - and 2 $\alpha$ -hydroxylase activities commonly observed in rats were not detectable in the seal. The concentrations of non-ortho- and mono-ortho-coplanar PCBs accumulated in the fat of the seal were positively correlated with the catalytic activities (AROD and T6 $\beta$ H) of the liver. Significant correlations were shown between these activities and the expression levels of CYP proteins recognized by polyclonal anti-rat CYP1A1 and CYP3A2 anti-sera. On the other hand, the levels of expression of CYP2B were very low in the seal liver microsomes and showed no significant correlations even with PROD or T16 $\beta$ H activities. These results indicate that hepatic CYP proteins of the seal cross-reactive to anti-rat CYP1A1 and CYP3A2 anti-sera are responsible for the activities of AROD and testosterone hydroxylations, and that the levels of expressions of these isozymes can be a good biomarker for the exposure to PCBs.

Seal Liver P450, as a Marker Enzyme for Marine Pollution?

Issei CHIBA<sup>1</sup>, Akihito SAKAKIBARA<sup>2</sup>, Hisato IWATA<sup>1</sup>, Shinsuke TANABE<sup>2</sup>, Akio KAZUSAKA<sup>1</sup> and Shoichi FUJITA<sup>1</sup> 1. Laboratory of Toxicology, Department of Environmental Veterinary Sciences, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Japan

2. Laboratory of Environmental Chemistry, Department of Environmental Conservation, Faculty of Agriculture, Ehime University, Matsuyama, Japan

# 一般講演

## ドライケミストリー法による実験動物の血液生化学検査の基礎検討

○佐藤 雅之、小川 真由美、原 静華、黒沢 亨、仲由 武寛

明治製菓株式会社 安全性研究所

【目的】一般に毒性試験における血液生化学検査は、溶液測定法により実施されている。近年、臨床における血液生化学的検査は、ドライケミストリー法（ドライ法）が測定の簡便さや精度管理の容易さなどから普及しつつある。そこで、実験動物の血液生化学検査におけるドライケミストリー法の有用性を検討した。

【材料および方法】ドライ法の測定機器は AUTO-5（富士メディカル㈱）を用い、溶液測定法は COBAS FARA II（ROCHE）および EA03（A&T）を用いた。測定試料は、ラットとイヌの血漿・血清の高濃度試料を段階希釈して用いた。すなわち、無処置の SD 系ラットの血漿およびビーグル犬の血清を凍結乾燥し、各動物における正常範囲の 2 倍以上の高値である試料を作製した。また、電解質については、無処置動物の試料に NaCl または KCl を添加したものをを用いた。測定は、16 項目について実施した。また、同時再現性および日差再現性について正常動物の試料を用いて実施した。

【結果および考察】両測定法を比較した結果、殆どの項目において相関係数 0.9 以上と良好な相関を示した。また、同時再現性および日差再現性は、殆どの CV 値が ±5% 以内と良好な結果が得られた。なお、イヌでは問題なかったがラットのクレアチニンでは正常値が機器の定量可能範囲の下限付近であるため良好な相関を示さなかった。しかし、毒性評価では主に増加変化が問題となることから毒性試験での使用には問題ないと考えられる。従って、動物試料についてもドライ法による血液生化学検査は、適用可能であり、安全性試験において有用であると考えられた。

Investigation on biochemical findings by the dry chemistry method in laboratory animals

Masayuki SATO, Mayumi OGAWA, Shizuka HARA, Tohru KUROSAWA, Takemi NAKAYOSHI

Toxicology Lab., Meiji Seika Kaisha Ltd., Kanagawa, 222-8567, Japan

攪拌による赤血球脆弱性検査の試み  
—クロフィブラート投与ラットでの検討—

○真鍋由恵<sup>1)</sup>, 近藤泰史<sup>1)</sup>, 箱井加津男<sup>2)</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、本学会(第25回年会)に於いてアセチルフェニルヒドラジン投与貧血ラットでその有用性を報告した。今回、高脂血症治療薬であり溶血性貧血を惹起するとされるクロフィブラートをラットに投与したモデルを用いて、本法の有用性を検討したので報告する。

【実験】雄性ラット(Crj:CD(SD)IGS, 8週齢)に0, 100および300mg/kg(各群6匹)のクロフィブラートを3週間経口反復投与した。投与期間終了後に攪拌による赤血球脆弱性検査および各検査を実施した。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で10, 30および60秒間攪拌し②の操作を行う。なお、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。

【結果および考察】血液学的検査：ヘモグロビン量およびヘマトクリット値にごく軽微な低下(3%前後)傾向がみられたが、有意差は認められなかった。攪拌による赤血球脆弱性検査：30および60秒間攪拌後の残存赤血球数の割合(%)が減少し、脆弱性の亢進が観察された。血液化学的検査：LDHの上昇、アルブミンの増加、中性脂肪の減少がいずれも軽度のみられた。剖検：肝の明らかな腫大がみられた。病理組織学的検査は現在検索中である。

以上、今回の実験条件下ではクロフィブラート投与による血液学的変化は認められなかったが、攪拌による赤血球脆弱性検査では明らかな脆弱性の亢進が確認された。このように、薬効が異なる2つの薬物において、血液学的変化に先行して赤血球脆弱性に変化がみられたことから、本法は安全性評価のための有用な一手法であると考えられた。

An attempt to measure erythrocyte fragility with stirrer—Study in rats administered with Clofibrate.

Yoshie MANABE<sup>1)</sup>, Yasufumi KONDOU<sup>1)</sup>, Kazuo HAKOI<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.

フローサイトメーター (EPICS XL) を用いた網状赤血球測定に関する基礎検討  
 — 溶血性貧血症\*動物血を用いたフローサイトメーター法と従来法との比較 —

三浦大志郎、小林充、飯島剛、尾形昭子、山名慶、古川純子、  
 小池行也、宇野洋

帝人株式会社 医薬開発研究所 安全性研究部

【目的】フローサイトメーターEPICS XLを用いたフローサイトメーター法による動物血の網状赤血球測定について、基礎検討 (同時再現性、安定性、直線性等) および従来法 (パターン認識法、目視法) との比較による有用性検討を実施した。

【材料および方法】フローサイトメーター法では Retic-STAT 2 染色試薬で Sic-SD 500 血液を染色後、EPICS XL による測定および reticOne ソフトウェアによりデータ解析を行い網状赤血球率を求めた。従来法ではネーデルラント・ブームを用いた Brecher 法に準じて経生体染色標本を作製し、HITACHI 8200 血液像自動分類装置 (パターン認識法) あるいは鏡検 (目視法) による測定を行い網状赤血球率を求めた。溶血性貧血症\*動物としてはアザミ\*アザミ\*ラジゲン (APHZ) 経口投与法を用いた。

【結果】フローサイトメーター法の基礎検討では、同時再現性 (CV 値 5.2 ; 5 回連続測定、3 個体分の平均)、安定性 (室温または 4℃、24 時間保存血液の測定) および直線性 (網状赤血球率 0.47~12.62% の範囲) について良好なデータが得られた。また、パターン認識法に対しては相関係数  $r^2=0.75$ 、目視法に対しては相関係数  $r^2=0.97$  と良好な相関性が認められた。溶血性貧血症\*動物血の測定においては、パターン認識法では目視法に比べて網状赤血球率が高値となったのに対し、フローサイトメーター法では目視法との間で良好な相関性が認められた。パターン認識法と目視法との間で認められた網状赤血球率のずれは、APHZ 投与により多発するパッチ小体あるいは有核赤血球を分別できず網状赤血球と誤認されることが原因と推察された。

【結論】フローサイトメーター法は極めて微量 (2 $\mu$ L) の血液を用いて瞬時に数万個もの赤血球数に対する解析が実施可能であるばかりでなく、薬剤投与により生じる種々の妨害因子の影響を受けることなくかつ高精度なデータが取得可能な測定方法であることが示唆された。なお、仮を用いた検討結果についても合わせて報告する。

Basic examination of reticulocytes count using flow-cytometer (EPICS XL) :

A comparative study between flow-cytometer method and conventional method using hemolytic-anemia animals.

Daishiro Miura, Mitsuru Kobayashi, Takeshi Iijima, Shoko Ogata, Kei Yamana, Jyunko Furukawa, Yukiya Koike and Hiroshi Uno, Teijin Institute for Biomedical Research, 4-3-2 Asahigaoka, Hino, Tokyo 191-8512, Japan

## 毒性試験系としてのイヌ造血前駆細胞コロニー形成法の検討

○高松一彦, 若田明裕, 廣田里香

山之内製薬株式会社 安全性研究所

【目的】化合物の造血毒性を評価するために、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。しかし毒性試験に汎用されている動物であるイヌの細胞を用いている報告は少ない。本研究はイヌ造血前駆細胞のコロニー形成法を確立するために、培養条件の検討を行った。さらに、造血毒性の知られている化合物が本培養系において示す毒性を調べることにより、本培養系の毒性試験系としての可能性を検討した。【方法】イヌ骨髓細胞を、赤芽球コロニー形成法では $\alpha$ MEM, FCS, BSA, 2-Mercaptoethanol を含む軟寒天培地にコロニー刺激因子として rh Erythropoietin を加えた培地で培養した。白血球コロニー形成法では、 $\alpha$ MEM, FCS を含む軟寒天培地にコロニー刺激因子として *Salmonella typhosa* の lipopolysaccharide を投与したイヌの血清を加えた培地で培養した。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 4 日目に好中球コロニー数が最大となり、5 日目以降その数は急激に減少した。また培養 4 日目からマクロファージコロニーも形成され、8 日目まで徐々に数が増加した。8 日目以降数に変化は見られなかった。また、何れの系においても播種細胞数、コロニー刺激因子濃度に依存したコロニー数の増加がみられた。これらの系に、造血毒性を示すことが報告されている Azidothymidine, Doxorubicin, cis-Platinum, 5-FU を添加したところ、全ての化合物において何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。

Evaluation of Colony-Forming Units assay using dog hematopoietic progenitor cells as a toxicological test system.

Kazuhiko TAKAMATSU, Akihiro WAKATA, Rika HIROTA, Safety Research Laboratories, Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd. Tokyo-174-8511, Japan.

摂餌量減少と関連した血液学的パラメーターならびに尿検査値の変動  
についての検討

○井口綾子, 林 裕, 西 直樹, 沢多美和, 松井明子, 飯野由香,  
木ノ本寿子, 白石裕美子, 米良幸典

ゼリア新薬工業(株) 中央研究所・開発研究部

〔目的〕 反復投与毒性試験において、体重減少や摂餌量低下は頻繁に認められる所見である。しかし、その他の毒性パラメーターの変動が化合物投与に起因する変化であるのか、摂餌量及び体重減少に伴う二次的変化であるのかの判断に際しては苦慮するところである。そこで、今回は、摂餌量減少(制限給餌)による血液学的検査ならびに尿検査に対する影響について、ラットを用いて検討した。

〔方法および結果〕 6週齢のCrj:CD(SD)IGS雄ラットを用い、夜間絶食(16:00~10:00の約18hr.絶食)及び全日絶食の初期段階(3日間)での血液学及び尿検査を実施し、その後、4週目まで餌を自由に摂取させ回復性を確認した。

絶食3日目で、夜間絶食群の摂餌量は対照群の約50%まで減じたが、体重は約20%の減少にとどまった。また、全日絶食群の体重減少は対照群の約30%であった。血液学的パラメーターは、白血球数の減少とともに、好中球比の減少、リンパ球比の増加及び赤血球数の増加が認められた。同時に、脾臓の絶対、相対重量の減少と、胸腺の絶対重量の増加及び相対重量の減少が観察され、摂餌量低下の影響が比較的短期間で発現することが確認された。これらの変化は、4週目まで自由に餌を摂取させたことにより回復性を示した。また、尿中Na/K濃度は、夜間絶食群でNa: 65%, K: 45%, 全日絶食群でNa: 20%, K: 17%, まで減少を示した。これは、摂餌量低下によりこれらの吸収量が減少し、体内の恒常性を保つために、排泄が制限されたものと考えられる。

現在、長期制限給餌による影響を確認するため、追加試験を実施中である。

Influence of food restriction on hematology and urinalysis in Rats.

Ayako IGUCHI, Yutaka HAYASHI, Naoki NISHI, Miwa SAWADA, Akiko MATSUI,  
Yuka IINO, Toshiko KINOMOTO, Yamiko SHIRAIISHI and Yukinori MERA.  
Central Research Laboratories, ZERIA Pharmaceutical Co., Ltd., 2512-1, Oshikiri, Kohnan-  
machi, Ohsato-gun, Saitama, Japan.

ホウ素化合物のラット造血器およびリンパ系器官を標的とした毒性

○田村 啓、渋谷 淳、豊田和弘、畝山智香子、高橋道人、広瀬雅雄

国立医薬品食品衛生研究所・病理部

【緒言】我々は、先に、有機スズ化合物に代わる防泥剤の1つであるトリフェニルホウ素を基本骨格とするピリジン・トリフェニルボラン(PTPB)のラットの骨髄傷害について報告した(第4回免疫毒性研究会)が、同時に観察された胸腺の萎縮については、摂餌量及び体重減少等のストレスの影響も否定できなかった。今回は低栄養等を示さない用量のPTPB、ならびに同じ基本骨格を持つトリフェニル(n-オクタデシルアミン)ボロン(TPB)によるラットの血液及びリンパ系組織への影響を検討した。

【方法】5週齢の雄F344ラットに、TPBを200,400,800ppm、ならびにPTPBを100,200ppmで1ないし4週間混餌投与した。TPB800ppmを1週間投与後、基礎飼料を3週間与える回復群も設けた。投与期間中、体重、摂餌量を測定し、投与開始後1及び4週で各群の半数ずつを剖検し、血液学的ならびに病理組織学的検索を行った。【結果及び考察】両化合物とも類似の毒性変化を示し、TPBは200ppmからPTPBは100ppmから赤血球数、血小板数が低下、さらにTPB800ppm投与群では大腿骨骨髄細胞数が減少した。また両化合物とも投与量と投与期間に依存して胸腺重量を低下させ、PTPB投与群では脾臓重量も減少した。組織学的に骨髄では赤芽球及び巨核球系細胞の減少による細胞密度の低下が認められ、アポトーシスの増加も観察された。胸腺ではアポトーシスの増加と高度の萎縮が認められ、脾臓ではT細胞領域(抗Pan-T抗体陽性)とB細胞領域(抗Pan-B抗体陽性)の減少が観察された。これらの変化は投与開始後4週目に顕著に認められ、またTPB回復群では軽減した。以上、両化合物は骨髄造血細胞及びT,Bリンパ球系細胞を傷害することが明らかとなり、それらはトリフェニルホウ素化合物共通の毒性である可能性が示唆された。

Triphenyl boron compounds affect both lymphoid and hematopoietic organs in rats.

Toru TAMURA, Makoto SHIBUTANI, Kazuhiro TOYODA, Chikako UNEYAMA, Michihito TAKAHASHI, and Masao HIROSE., Div. of Pathology, National Institute of Health Sciences



妊娠ラットへのフェニトイン投与が出生児の血液凝固系に及ぼす影響

○ 小島夏樹, 井本秀樹, 阿部毅, 武藤秀樹, 亀岡美幸, 飯田 茂,  
山本光雄, 納屋聖人

協和発酵工業株式会社安全性研究所

我々は先の試験でフェニトイン 200 および 300mg/kg を妊娠 10~14 日のラットに経口投与し、自然分娩で得られた出生児の生後観察を行った。その結果、分娩時には特に異常は認められなかったが、生後 24 時間以内に約 3~4 割の出生児に腹部膨満が発現し約半数の出生児が死亡した。死亡児の 9 割以上に消化管の出血が認められたほか脳の出血も低頻度で発現した。今回は出血の機序解明を目的として、同処置により得られた生後 0 日の出生児をエーテル麻酔して腹大動脈から採血し、血液凝固系に及ぼす影響を検討した。対照群には溶媒である 1%カルボキシメチルセルロースナトリウム溶液を投与した。動物は約 11~13 週齢の Sle:SD ラットを使用した。

出生児の剖検時に消化管の膨満、脳および消化管の出血が認められた。出生児の血液凝固系への影響ではプロトロンビン時間(PT)および活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)の延長、フィブリノーゲンの低下が 200 および 300mg/kg 投与群の雌雄出生児で認められ、出生児の出血は血液凝固系の障害によるものと推察された。ヒトではフェニトインを服用した妊婦から生まれた新生児でビタミンK依存性の血液凝固因子が低下し、PT や APTT が延長して出血性疾患が発現することが知られている。従って今回の結果からラット出生児の出血にもビタミンK依存性凝固因子の障害が関与していることが示唆された。このほか赤血球数の減少が 300mg/kg 投与群の雌雄出生児で、減少傾向が 200mg/kg 投与群の雄出生児で認められたほか、血小板数の低下が 300mg/kg 投与群の雌出生児のみで認められた。従ってフェニトインは出生児の造血系の発生にも障害を及ぼす可能性が示唆された。

Effects of maternal phenytoin treatment on blood coagulation of rat offspring.

Natsuki KOJIMA, Hideki IMOTO, Takeshi ABE, Hideki MUTOH, Miyuki KAMEOKA, Shigeru IIDA, Mitsuo YAMAMOTO and Masato NAYA  
Toxicological Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Ube-755-8501,  
Japan.

化学療法剤投与ウサギにおける造血抑制作用の  
血液学および血液化学的検討

○小林充、三浦大志郎、尾形昭子、城之内公子、角谷祐子、飯島剛、  
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】実験動物における化学療法剤投与による造血抑制モデルとしてはマウス、ラットが一般的であるが、ウサギについては化学療法剤投与による毒性、造血系に対する作用に関する情報、背景データがこれまで十分に存在しなかった。そこで今回我々は、代表的な化学療法剤であるフルオロウラシル(5-FU)とシクロホスファミド(CPA)についてウサギにおける造血抑制作用を詳細に検討した。

【材料および方法】約12~17週齢のKbl:JW系雄性ウサギに5-FUまたはCPAを単回静脈内投与し、経日的に8~14日間採血して血液学的検査を実施した。

【結果】ウサギにおける静脈内投与の概略の致死量は5-FUが25 mg/kg, CPAが300 mg/kgであった。5-FUの6.25, 12.5 mg/kgの単回静脈内投与では、12.5 mg/kg投与群で投与後6日目をbottomとした好中球数の軽度な減少が認められたが、6.25 mg/kg投与群では変化はみられなかった。末梢血のその他の血球数に変化はなかった。一方、CPAの30, 60, 120 mg/kgの単回静脈内投与では、投与後1日目をbottomとしたリンパ球数の減少、投与後3日目をbottomとした好中球数、網状赤血球率の減少が、それぞれ用量依存的に認められた。

単回投与時における血液化学的検査値、骨髄検査値の変動、反復投与の影響について検討を加え、これらを併せて化学療法剤投与によるウサギ造血抑制モデルの有用性について報告する。

Hematological and blood chemical study of the inhibitory effect on the hematopoietic system in the chemotherapeutics administered to rabbit.

Mitsuru KOBAYASHI, Daishiro MIURA, Syoko OGATA, Kimiko JONOUCHI, Yuko KAKUYA, Takeshi IJIMA, Yukiya KOIKE, Hiroshi UNO. Safety Research Department, Pharmaceuticals Development Research Laboratories, TEIJIN

**Benzene hemopoietic toxicity revisited- a new concept**

HI YOON, Y HIRAHAYASHI, Y KAWASAKI, Y KODAMA, T KANEKO, J KANNO, Y MATSUSHIMA, T UMEMURA, O UCHIDA, Y KUROKAWA, T INOUE

Biological Safety Research Center, NIHS, Tokyo-158, Japan

Benzene has long been known as an ultimate leukemogen for human, and later it was also proved to induce leukemia in mice (Cronkite *et al.*, 1982). However, the leukemogenic mechanism is still controversial. The background of the leukemogenicity has been thought to be induced by elevation of cycling fraction in the hemopoietic stem cells during benzene exposure, which is thought to be a reflection of suppression of hemopoiesis in bone marrow as same as in the spleen. Recently our study, however, disclosed that the kinetics of hemopoietic progenitor cells was not stimulated, but rather suppressed during the exposure. The inconsistency between Cronkite *et al's* and ours is based on a different cytotoxic exposure in *in vitro* and *in vivo* for [<sup>3</sup>H]TdR/BrdUrd. Our results show a significant suppression CFU-GM in S phase from 37.1 % in control down to 16.3 %. Formulations of BrdUrd-incorporation in both groups show dramatically different slopes between the non-treated control and the benzene exposed; 0.107 and 0.007 respectively. Y-intercept for each regression curve was also different each other. Our present data strongly suggest that the leukemogenicity during benzene exposure may not be due to direct toxicity of the inhalation but probably due to the hemopoietic continuous oscillation which encourages a sort of promoting effect for leukemogenic spontaneous candidate cells.

## ラット毒性試験で認められた症状の原因の検討

○尾崎 秀次、服部 淳二、柴崎 義明、黒沢 亨、仲由 武寛

明治製菓株式会社 安全性研究所

【目的】ある化合物Aのラットを用いた毒性試験において、投与後直ちに顔面や四肢の潮紅・腫脹あるいは不規則呼吸などを呈し、死亡する動物が認められた。症状の程度には週齢による違いが認められ、6週齢に比べて9週齢で強く、死亡率も高かった。これらの変化の原因として、化合物Aによるヒスタミン遊離に基づく末梢血管拡張、血圧低下作用が推測された。そこで、この症状発現の原因と週齢による毒性強度の差について、循環器評価を中心に検討した。

【方法および結果】6および9週齢のSD系雄性ラットを使用し、ウレタン麻醉下で観血的に血圧を測定するとともに血漿中ヒスタミン濃度をELISA法により測定した。(実験1)ラットに毒性試験で用いた用量の化合物Aを静脈内投与すると、投与開始1~3分から耳介の潮紅と共に一過性の血圧低下が認められた。これらの変化の強度(低下率および持続時間)は用量に依存していた。高用量では60%以上血圧が低下し、投与後1時間までに死亡する個体もみられた。血漿中のヒスタミン濃度は血圧の低下に対応して一過性に上昇し、上昇程度は用量に依存していた。(実験2)6および9週齢のラットに化合物Aを投与すると、どちらの週齢でも用量に依存して血圧の低下がみられたが、6週齢より9週齢のラットの方が大きく低下した。血漿中ヒスタミン濃度の上昇率に週齢による差はなく、むしろ6週齢の方が高い傾向であった。(実験3)6および9週齢のラットにヒスタミンを静脈内投与すると、用量に依存して血圧が低下し、6週齢より9週齢の方が大きく低下した。

【結論】以上のことから、ラット毒性試験でみられた症状は、化合物Aの持つヒスタミン遊離作用に起因すると考えられた。また、週齢による毒性強度の差は、週齢間でのヒスタミン遊離に差がないことから、遊離したヒスタミンに対する感受性の差に起因するものと推測された。

Study on the cause of general signs in rat treated with compound A

Syuji OZAKI, Junji HATTORI, Yoshiaki SHIBAZAKI, Tohru KUROSAWA and Takemi NAKAYOSHI

Toxicology Lab., Meiji Seika Kaisha Ltd., Kanagawa, 222-8567, Japan

器官培養血管組織に対する抗癌剤doxorubicinの毒性発現

村田幸久、○尾崎 博、山脇英之、堀正敏、佐藤晃一、唐木 英明

東京大学大学院農学生命科学研究科 獣医薬理学教室

【目的および方法】Doxorubicin(DX)は白血病などの治療のための抗癌剤として用いられているが、強い心臓毒性が知られている。本研究はDXの血管に対する長期作用を機能と形態の両面から解析することを目的として、器官培養を行った血管組織を用いて検討した。

【結果】摘出直後のウサギ摘出腸間膜動脈の収縮性に対してDXは全く影響しなかった。血管を1週間無血清DMEM培地中で器官培養すると、収縮の絶対張力は減少するものの、顕著な形態学的変化は認められなかった。抗癌剤としての治療濃度域である $1\mu\text{M}$ のDX存在下で血管を無血清下で器官培養すると、器官培養の時間に依存して高濃度Kおよびnorepinephrine(NE)収縮の最大張力は抑制された。器官培養1週間後ではNE収縮は完全に消失したが、高濃度K収縮は約40%残存した。一方、治療濃度域を超える $10\mu\text{M}$ DX存在下で1週間器官培養すると、血管の収縮能は完全に消失した。 $1\mu\text{M}$ DXで1週間器官培養した血管において、平滑筋細胞の多くは核濃縮を引き起こしていた。また、ほとんどの細胞がTUNEL染色陽性であった。一方、 $10\mu\text{M}$ DXを1週間処置した血管では、平滑筋細胞の核濃縮は認められなかった。また、ほとんど全ての細胞がTUNEL染色陽性であった。DX無処置、 $1\mu\text{M}$ および $10\mu\text{M}$ DX存在下で1週間器官培養した血管組織よりDNAを抽出し、アポトーシスに特有なDNAラダーの検討を行ったところ、 $1\mu\text{M}$ DX存在下で1週間処置した血管組織においてのみDNAラダーが認められた。

【考察】DXは培養血管平滑筋組織に対して、治療量ではアポトーシスを誘導して血管の収縮能を消失させるのに対して、高用量ではアポトーシスは誘導せず、ネクローシス様の変化を生じさせることが示唆された。

Toxicological effect of anticancer drug doxorubicin on organ cultured vascular tissue

Hiroshi OZAKI, Yukihiisa MURATA, Hideyuki YAMAWAKI, Masatoshi HORI, Koichi SATO and Hideaki KARAKI. Department of Veterinary Pharmacology, Graduate School of Agriculture and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo-113-8657, Japan

イヌおよびカクニイザルにおける polysorbate 80 の循環動態および血中ヒスタミン濃度に及ぼす影響

○佐々木 篤志, 藤原 淳, 海上 智, 飯塚 宏美

三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所

【目的】界面活性剤を含む点滴静注剤の循環動態に及ぼす影響をイヌで検討する場合に、界面活性剤のヒスタミン遊離作用により主成分の作用が覆い隠される可能性がある。そこで我々は、polysorbate 80 をイヌおよびカクニイザルに投与することにより循環動態および血中ヒスタミン濃度に及ぼす影響を比較検討した。

【方法】ビーグルイヌおよびカクニイザルを実験に用いた。イヌおよびカクニイザルをイソフルランの吸入麻酔下にて血圧、心拍数、血流量、心拍出量および血中ヒスタミン濃度を経時的に測定した。polysorbate 80 は 1 時間の持続注入とし、測定は投与終了後 2 時間まで行った。また、polysorbate 80 の溶媒対照として 5%ブドウ糖液を持続注入した。

【結果】イヌに polysorbate 80 を投与したところ用量依存的に血圧の低下、心拍数および血流量の減少が認められた。また、血中ヒスタミン濃度の上昇も認められた。しかし、カクニイザルでは、イヌで変化を示した用量を投与しても循環動態および血中ヒスタミン濃度に明らかな変化は認められなかった。

【まとめ】これらの結果から点滴静注剤の評価には、ヒスタミンの遊離作用が大きく出てしまうイヌよりもサルを用いた実験系の方が、本来薬物が持っている作用を捉えられるものと考えられた。

Effect of polysorbate 80 on cardiovascular system and blood histamine concentration in dogs and cynomolgus monkeys

Atushi SASAKI, Atsashi FUJIWARA, Satoshi UNAKAMI and Hiromi IIZUKA  
Kashima Lab, Mitsubishi Chemical Safety Institute, Ibaraki 314-0255, Japan.

テレメトリーシステムを用いたサルの生理学的、薬理学的  
研究 (II) 正常血圧サルと腎性高血圧サルの概日リズム

○亀之園 剛、浜田大治、福崎好一郎、永田良一、鬼頭 剛

(株)新日本科学 安全性研究所 第一研究部

[目的] 生体の血圧・心拍数・体温等は1日を周期とする概日リズムがある。ところで、高血圧等の循環器疾患では血圧の概日リズムに異常があることが認められている。我々は、カニクイザルを用いて腎性高血圧サルと正常血圧サルの概日リズムの差を比較検討した。[実験方法] 雄性カニクイザル(体重 3-4 kg、年齢 4-5 歳)を用い、テレメトリーシステム用送信器(TL11M2-D70-PCT, DATA SCIENCES, INC.)の腹腔内埋め込み手術を実施した。動物は受信ボードを装備した観察ケージで飼育した。術後手術創が完全に治癒し血圧および心電図が安定した時期より実験に供した。血圧・心拍数および体温はDataquest®(DATA SCIENCES, INC.)、心電図(第二誘導)は ECG Processor (SHP-8、株式会社ソフトロン)を用いて解析した。腎性高血圧サルは、送信器を埋め込んだ後に、左腎動脈狭窄により作製した(2腎、1クリップ型)。[成績] 正常血圧サルでは、血圧・心拍数・体温の日内変動は一定で、7日間規則的な概日リズムを示した。日中の収縮期圧、拡張期圧、心拍数および体温は、80-100 mmHg, 50-70 mmHg, 100-150 beats/min および 38.0-38.7 °C であった。一方、夜間の収縮期圧、拡張期圧、心拍数および体温は、60-70 mmHg, 30-40 mmHg, 70-90 beats/min および 36.7-37.5 °C であった。腎性高血圧サルの急性期では、収縮期圧、拡張期圧および心拍数はそれぞれ 150-160, 100-110 mmHg および 130-150 beats/min で、夜間の低下は見られなかった。1ヶ月後では高血圧を維持していたが、夜間には 10-20 mmHg 下降し、概日リズムが戻ってきた。[総括] 腎性高血圧サルでは、急性期において血圧および心拍数の概日リズムが消失した。

Physiological and pharmacological studies in cynomolgus monkey using telemetry system (II). The circadian rhythm of cardiovascular hemodynamics in normotensive and hypertensive monkey

Takeshi KAMENOSONO, Taiji HAMADA, Koichiro FUKUZAKI, Ryoichi NAGATA and Go KITTO. Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.

テレメトリーシステムを用いたサルの生理学的、薬理学的  
研究 (III) 安全性薬理試験への応用

○鬼頭 剛、亀之岡 剛、阿久根 淳、福崎好一郎、永田良一

(株)新日本科学 安全性研究所 第一研究部

[目的]新薬の臨床試験に必要な一般薬理試験は従来の内容から大きく変わろうとしている。ICHM3 のガイドラインでは中枢神経系・循環器系・呼吸器系に対する作用が求められており、近いうちに安全性薬理試験に移行する可能性が大きい。従来の試験と異なる点は、薬理学的なプロファイルから安全性のプロファイルを重要視している点である。我々は、生体の機能に対する前臨床試験と臨床試験の安全性の bridging test として無麻酔下のサルによる試験を試みた。[実験方法] 雌性カニクイザル (体重 3-4 kg、年齢 4-5 歳) を用いた。テレメトリーシステム用送信器 (TL11M2-D70-ECT, DATA SCIENCES, INC.) を無菌的に腹腔内に埋め込み、動物は受信ボードを装備した観察ケージで飼育した。術後手術創が完全に治癒し、血圧および心電図が安定した時期より実験に供した。血圧・心拍数・呼吸数・体温および活動性は Dataquest® (DATA SCIENCES, INC.)、心電図 (第二誘導) は ECG Processor (SBP-8, 株式会社ソフトロン) を用いて解析した。塩酸アミオダロンの 40 mg/kg/day を、3-4 日間反復投与し、実験期間中連続してデータを解析・集積するとともに、動物の行動をビデオ装置を用いて連続記録した。[成績および総括] 塩酸アミオダロン 40 mg/kg/day で、3 日後には収縮期血圧および拡張期血圧はそれぞれ 20-25% 低下し、夜間の心拍数は約 10% 減少した。QT 間隔は延長する傾向が見られた。一方、呼吸数・体温および活動性には変化を認めなかった。塩酸アミオダロンは 1 週間以上反復投与することによって QT 間隔の延長から心室性の不整脈を誘発することが知られている。今回は投与期間が短かったが、塩酸アミオダロンの反復投与による循環器系への影響が確認でき、このシステムの安全性薬理試験への応用が十分可能であると考えられた。

Physiological and pharmacological studies in cynomolgus monkey using telemetry system (III). Applications of conscious monkeys to safety pharmacological studies

Go KITO, Takeshi KAMENOSONO, Atsushi AKUNE, Koichiro FUKUZAKI and Ryoichi NAGATA. Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.



カンデサルタン・シレキセチル (TCV-116) とジゴキシンの併用による重篤な不整脈誘発の可能性 —シレキセチル側鎖の代謝物シクロヘキサンジオールとの相互作用—

○奥西 秀樹

島根医科大学 薬理学講座

【目的】アンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬TCV-116 (TCV) はACE阻害薬と同等の抗心不全効果が期待されている。しかし、利尿薬+ジゴキシン (DGX) +TCVを併用した心不全患者では心室細動や心臓突然死の報告が少なくない。シレキセチル側鎖の代謝物であるシクロヘキサノール (CH)やシクロヘキサンジオール (CHD) がDGXと相互作用して不整脈を誘発する可能性を検討した。【方法】ビーグル犬に3週間の右心室急速ペーシングおよび実験直前に容量負荷を加えて心不全モデルを作製した。これを3群に分け、Ⅰ群はCHまたはCHD静注、Ⅱ群はDGX (0.24mg/kg) 単独投与、Ⅲ群はDGXにCHやCHDを併用して不整脈誘発作用を検討した。【結果】Ⅰ群:1,2-CHD (4mg/kg) は心室性/上室性期外収縮を誘発したが一過性であった。CHと1,3-CHD (12mg/kg) は影響がなかった。Ⅱ群:DGX単独ではⅠ度房室ブロックと稀に期外収縮を認めただけで、死亡例はなかった。Ⅲ群:DGX投与後に1,2-CHDまたは1,4-CHDを静注すると全例で期外収縮が頻発し、やがてTorsades de pointes や心室細動に移行し、1,2-CHD投与の3例のうち、低K<sup>+</sup>血症の2例が死亡した。CHと1,3-CHDはDGXと併用しても無影響であった。【結論・考察】心不全イヌに1,2-または1,4-CHDとDGXを併用すると重篤な不整脈を生じることが示された。これら代謝物は、心不全病態やジゴキシンによる心筋イオンチャネルの機能異常を増悪させる可能性がある。CHや1,3-CHDは無害なので、催不整脈作用について構造・活性相関が示唆される。CHDは腎クリアランスが不良で、心不全では腎機能低下も加わって、TCV連続投与によりCHD蓄積の可能性があり、心不全合併高血圧患者に対するTCV処方が今後増加すると予測されるが、不整脈誘発の危険性を警告しておきたい。

Potential Risk for Life-Threatening Arrhythmia by Combined Use of Candesartan Cilexetil (TCV-116) and Digoxin: Interaction with Cyclohexanedioles, Cilexetil Promoiety-Derived Metabolites.

Hideki Okunishi, Department of Pharmacology, Shimane Medical University, Izumo 693-8501, Japan.

## マウス始原生殖細胞の ENU による apoptosis と突然変異の誘発

○益谷 徹、鹿嶋崇幸、斎藤義明、長尾哲二、今井 清

(財) 食品薬品安全センター秦野研究所

[目的] 私達は直接エチル化剤の N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) が、マウスの発生 8.5 日から 13.5 日胚の雄始原生殖細胞 (PGC) に、強力な遺伝子突然変異誘発作用を有することを特定座位試験によって認めた (Shibuya et al., 1993, 1996)。誘発突然変異率は発生 10.5 日胚が最も高く 13.5 日胚で最も低いという、明らかな発生時期特異性を示した。さらに、これらの発生時期では 1 匹の雄親から同一遺伝子座の突然変異体が複数匹出現する、クラスター突然変異が容易に得られた。今回、発生 10.5 日胚の始原生殖細胞 (PGC) に ENU を経胎盤投与し、発生 13.5 日胚の生殖隆起における PGC の apoptosis および *c-kit* の発現を観察し、PGC における ENU による突然変異の発生時期特異性およびクラスター突然変異の成因について考察した。

[材料および方法] C57BL/6 マウスの雌雄を交配し、プラグの確認日を発生 0.5 日とし、発生 10.5 日胚の始原生殖細胞 (PGC) に ENU を経胎盤処理し、発生 13.5 日胚の生殖隆起の PGC における apoptosis を Tunnel 法によって組織化学的に観察した。PGC の同定には *c-kit* 抗体を用いた。

[結果および考察] ENU による apoptosis は用量依存的に増加した。この結果とこれまでに得られた突然変異誘発のデータに基づいて、突然変異誘発率の用量依存性およびクラスター突然変異の成因について解析した。その結果、これらの事象は、マウス PGC の数が少ないことおよび ENU による apoptosis の誘発を反映しているものと考えられた。今後、発生 8.5 日および 13.5 日胚の雄始原生殖細胞 (PGC) についても同様の解析を行い、さらに胚発生時期の特異性について解析を行う。

Induction of apoptosis and mutation in mouse primordial germ cells by ENU.

Tohru SHIBUYA, Takayuki KASHIMA, Yoshiaki SAITO, Tetsuji NAGAO and Kiyoshi IMAI. Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center, Hadano, Kanagawa 257-8523, Japan

エタノール投与によるマウス *in vivo* DNA 損傷の多臓器 SCG 法による  
検出

○木戸 亮子<sup>1</sup>、津田 修治<sup>1</sup>、松坂 尚典<sup>1</sup>、佐々木 有<sup>2</sup>

<sup>1</sup>岩手大学、<sup>2</sup>八戸工業高等専門学校

[目的]エタノールはヒト発癌物質とされており、またその神経毒性およびヒト胎児アルコール症候群が知られている。しかしながら、動物実験による発癌試験は限られており、それらの機序はまだ十分に明らかにされていない。そこで我々は *in vivo* 多臓器 SCG 法を用いて、エタノール投与後のマウスにおける DNA 損傷を検討した。  
[材料および方法]雄マウスを 12 時間絶食させ、エタノールを経口投与(4, 8g/kg)し、2, 4, 6 時間後に脳、肺、肝、腎、胃、脾臓、骨髄を摘出した。これらを緩やかにホモジナイズし、遠心分離した後、アガロースゲルに包埋し、アルカリ下で電気泳動し、蛍光染色により観察した。さらに妊娠 7 日のマウスに同用量のエタノールを経口投与し、4, 8 時間後に各種母体臓器と胎児を摘出し、前述と同様に処理、観察した。また、Disulfiram(200, 400mg/kg)4 時間前処置の効果を検討した。  
[結果および考察]雄ではエタノール投与後 4 時間をピークとして脳、肺に用量依存的に DNA 損傷がみられた。雌では、雄と同様に脳、肺に DNA 損傷がみられた。さらに胎児に用量依存的な DNA 損傷が 8 時間でより強くみられた。Disulfiram による DNA 損傷の増強は認められなかった。以上のことから、本実験でみられた DNA 損傷はアセトアルデヒドを介するものではなくエタノールの直接作用による可能性が示唆された。

Detection of ethanol-induced DNA damage in mice by the modified SCG assay

Ryoko KIDO<sup>1</sup>, Shuji TUDA<sup>1</sup>, Naonori MATUSAKA<sup>1</sup>, Yu F. SASAKI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Iwate University, <sup>2</sup>Hatinohe National College of Technology

○野口 忠、鈴木正明、松島泰次郎

日本バイオアッセイ研究センター

肝臓は薬物代謝の主要な器官で、多くの化学物質は肝臓で活性化され標的臓器で変異原性や発癌性を示す。in vivo 変異原性試験では骨髓細胞を用いる小核試験が主に用いられているが、代謝活性化により変異原性を示す物質に対する感受性は低い。それで我々は成熟ラットの再生肝を用いる小核試験を開発し、これまでに 21 物質について試験を実施したので報告する。

試験は 8~15 週齢の F344 雄 ラットに試験物質を腹腔内に単回投与し、適当な処置時間をおいた後に全体の 2/3 の部分肝切除を行う方法、または部分肝切除後に試験物質を投与する方法で実施した。部分肝切除後 4 日目に肝細胞をコラゲナーゼ灌流法により分離し、中性ホルマリンで固定した後、4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) で染色し蛍光顕微鏡で小核を有する肝実質細胞を観察した。

試験を実施した 21 物質 (dimethylnitrosoamine、diethylnitrosoamine、dipropylnitrosoamine、dibutylnitrosoamine、N-butyl-N-butanolnitrosoamine、diphenylnitrosoamine、methyl methanesulfonate、ethylnitrosoarea、urethane、chloroform、carbon tetrachloride、1,2-dichloroethane、tetrachloroethylene、1,4-dioxane、benzene、thioacetamide、2-acetylaminofluorene、4-nitroquinoline-1-oxide、mitomycin C、colchicine、diethylstilbesterol) のうち 18 物質 (アンダーラインの物質) が陽性と評価された。このうち 14 物質が IARC の 2B クラス以上の物質で動物で発ガン性が認められている。骨髓小核試験では 5 物質しか陽性と評価されない。再生肝を用いる小核試験は発癌物質に対する感受性が高い有用な方法である。

#### Micronucleus test using partially hepatectomized rat liver

Tadashi NOGUCHI, Masaaki SUZUKI and Taijiro MATSUSHIMA.

Japan Bioassay Research Center, Hadano, KANAGAWA 257-0015, Japan.

○西川貴史<sup>1</sup>、晴佐久満<sup>1</sup>、足立邦明<sup>1</sup>、増田光輝<sup>1</sup>、林 真<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ライオン株式会社・研究開発本部

<sup>2</sup>国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部

〔目的〕近年、*in vivo*小核試験は骨髄および血液のみにとどまらず、化学物質の標的となる他の臓器についても検討が進められている。皮膚については、人体とそれを取り巻く外界との重要なインターフェイスの一つであり、多種多様な化学物質に暴露されていることから、遺伝毒性の評価として重要な臓器である。しかしながら、報告されている皮膚細胞を用いた小核試験のほとんどが*in vivo/in vitro*系であり、完全な*in vivo*系での確立が殆どなされていないのが現状である。そこで我々は、*in vivo*皮膚小核試験法の開発を目的として、既知皮膚発がん物質を $\text{H}^*$ として用いて検討したので報告する。

〔方法〕供試動物には5週齢のSD系ラットを使用した。除毛した背部皮膚 $3 \times 4\text{cm}$ に7 $\mu\text{l}$ の $\text{H}^*$ 油（4:1）を媒体とした各被験物質を0.2mL、24時間間隔で3回連続塗布した。最終塗布24時間後、皮膚を摘出、細切し、0.02%EDTA処置（室温、10 min）および0.25%トリプシン処置（4℃、約15 h）後表皮を剥離し、10%子牛血清添加 $\text{H}^*$ MEM培地中に細胞を攪拌分散させた。細胞浮遊液を $\text{H}^*$ で濾過し、表皮細胞を集めた。75mM KClで低張処理後、 $\text{H}^*$ :酢酸（3:1）にて3回固定を行った。固定後1%酢酸/ $\text{H}^*$ の細胞懸濁液としてスライドガラス上に滴下した。乾燥後アリジンブルー染色を行い、蛍光顕微鏡下に小核の有無を観察した。

〔結果および考察〕 $\text{H}^*$ 化合物として用いた既知皮膚発がん物質（DMBA、MNNG、ENNG）を3回連続塗布することにより、顕著な小核の誘発が用量依存的に観察された。本手法は、今後化学物質の皮膚における遺伝毒性を評価できる試験系としての発展が期待できる。

Study of a rat skin *in vivo* micronucleus test by skin carcinogens

Takashi NISHIKAWA<sup>a</sup>, Mitsuru HARESAKU<sup>a</sup>, Kuniaki ADACHI<sup>a</sup>, Mitsuteru MASUDA<sup>a</sup> and Makoto HAYASHI<sup>b</sup>, <sup>a</sup>R&D, Lion Co., Kanagawa 256-0811, Japan. <sup>b</sup>Division of Genetics and Mutagenesis, NIHS, Tokyo, 158-5801, Japan.

1-β-D-Arabinofuranosylcytosine(Ara-C)のラット小核試験  
 -小核試験の一般毒性試験への統合の可能性-

○並木千晶、清本和子、橋本敦、石塚修司、梶田憲一、  
 浜田修一

エスエス製薬(株)、中央研究所

[目的] 小核試験では、マウスを使用した単回あるいは2回投与法が一般的である。一方、長期投与による一般毒性試験の多くはラットで行われており、もし2週間以上の長期投与の小核試験が一般毒性試験を兼ねてラットで実施できれば、労働力と動物数の削減だけでなく、薬物動態をはじめとする一般毒性に関する情報も同時に得られ、化学物質の安全性を評価する上で非常に有用である。今回、日本環境変異原学会 MMS 研究会の第13回共同研究の一環として、1-β-D-Arabinofuranosylcytosine(Ara-C)のラット4週間小核試験を実施した。

[方法] Ara-Cの0, 40, 80, 160, 320mg/kgをCD(SD)IGS系雄性ラットに4週間反復投与した。標本作製は、末梢血では、投与開始前、2, 3, 4, 7, 14, 21回目および最終投与後24時間、骨髓および精巣は、最終投与後24時間とし、個体当たり2000個の幼若および成熟赤血球(精巣は前期精子細胞)、1000個(骨髓は200個)の幼若赤血球比を観察した。また、最終投与後24時間目に剖検を行い、骨髓、肝臓および脾臓の病理組織学的検査を実施した。

[結果および考察] Ara-Cの320mg/kg投与群では、2回目投与後24時間より末梢血において小核誘発性がみられ、以後経時変化がなく、いずれにおいても小核誘発性が認められた。4週投与後では、末梢血と骨髓では陽性となったが、精巣では小核誘発性がみられなかった。病理組織学的検査では、脾臓において髓外造血の亢進とヘモジデリン色素の増加がほぼ用量依存的に認められた。以上の結果から、Ara-Cにおいては、4週間の反復投与後でも末梢血と骨髓に小核誘発がみられ、一般毒性試験の動物を用いた小核試験実施の可能性が示唆された。

Evaluation of 1-β-D-Arabinofuranosylcytosine(Ara-C) in Rat Long-term Micronucleus Assay: Possibility of its Integration into General Toxicological Studies.

Chiaki NAMIKI, Kazuko KIYOMOTO, Atsushi HASHIMOTO, Shuji ISHISTUKA, Ken-ichi KUKITA and Shuichi HAMADA. Central Research Laboratories, SSP Co., Ltd., Chiba 286-8511, Japan.

Inducible nitric oxide synthase mRNA is upregulated in skin tumors of *v-Ha-ras* transgenic TG-AC mice treated with benzo(a)pyrene or 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate

○ Byung Mu Lee, Raymond W. Tennant

Division of Toxicology, College of Pharmacy, SungKyunKwan University  
#300 Churchun-Dong, Changan-Ku Suwon City, Kyunggi-Do, 440-746,  
South Korea. Tennant (NIEHS, P.O.Box 12233, RTP, NC 27709, USA)

The correlation of the steady-state level of inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA with skin tumors induced following treatment with benzo(a)pyrene (BP) or 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) was investigated in transgenic TG-AC mice carrying *v-Ha-ras* oncogene fused to the promoter of the mouse embryonic  $\alpha$ -like,  $\zeta$ -globin gene. Skin tissues (papillomas, carcinomas, and their surrounding tissues) were collected from TG-AC mice treated with BP (40 $\mu$ g 2/week, for 25 weeks) or treated with TPA (2.5 $\mu$ g 2/week, for 2 weeks). In animals treated with TPA, iNOS gene was not detectable until papillomas were formed. The increase of iNOS mRNA was locally confined to papilloma region, but not to the surrounding skin tissues (iNOS/MIMIC < 0.02) of papillomas regardless of the numbers of papillomas. In animals treated with BP only, both papillomas (iNOS/MIMIC = 0.073) and carcinomas (iNOS/MIMIC = 0.639) induced iNOS gene expression. Furthermore, the surrounding tissues or papillomas and carcinomas indicated minor increase of the steady-state level of iNOS mRNA (iNOS/MIMIC: 0.049, 0.054). These data suggest that iNOS gene expressions may underlie tumorigenesis during both TPA promotion and BP carcinogenesis in TG-AC mice.

Inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA transcripts was investigated in skin tumors of transgenic TG-AC mice treated with benzo(a)pyrene (BP) or 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA).

Byung Mu LEE<sup>1</sup> and Raymond W. TENNANT<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Division of Toxicology, College of Pharmacy, SungKyunKwan University, Suwon City, South Korea

<sup>2</sup>NIEHS, P.O.BOX 12233, RTP, NC 27709, USA

Tg-rasH2 マウスを用いた短期がん原性試験による Diethylstilbestrol (DES) と *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) のがん原性の検出

○ 務台 衛, 佐野文子, 日下部愛泉, 小林 潔, 後藤和広,  
佐藤 実, 杉本次郎

三菱化学(株)横浜総合研究所安全性研究所

【はじめに】げっ歯類を用いる長期がん原性試験の代替法として、ヒトプロト型 *c-Ha-ras* 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス(CB6F1-Tg-rasH2)を用いた短期がん原性試験法が提唱されており、その有用性に関する検証作業が ILSI-HESI の国際共同研究として進められている。その一環として、我々は、DESを用いた 26 週間試験を行うと共に、陽性対照物質である MNU を用い発がん感受性や標的性について検討した。

【材料・方法】8週齢の Tg マウスと Non-Tg マウスの雌雄を1群あたり 15 匹づつに振り分けた。投与用量(経路)は、DES(混餌): 0, 0.1, 0.3, 1.0ppm; MNU(単回 ip): 0, 18.75, 37.5, 75.0mg/kgとした。26週間の実験期間中は体重および摂餌量を測定し、剖検・器官重量測定後、常法に従いH. E. 標本を作製し、病理組織検査を実施した。

【結果・考察】DES投与群では、用量に依存した体重増加抑制がみられた。病理検査では諸器官に DES に起因する変化が用量相関的にみられた。DES に起因する腫瘍性変化としては、精巣の間細胞腫が Tg マウスの高用量群および Non-Tg マウスの中・高用量群の少数例にみられたが、Tg マウスにのみ誘発された腫瘍はなかった。

MNU投与群では、Tg マウスにおいてリンパ腫、前胃過形成・腫瘍、皮膚腫瘍、ハーダ腺腫および肺腫瘍が誘発され、発生頻度および悪性度(前胃)に用量相関性がみられた。一方、Non-Tg マウスでは高用量群でリンパ腫と前胃過形成が散発したのみであり、発がん感受性において Tg マウスとの間に有意差がみられた。

これらより、Tg-rasH2マウスはMNUのようなgenotoxicな発がん物質には高い感受性を有することが再確認された。一方、ホルモン作用などのepigeneticな発がん要因に対する感受性はTgマウスとNon-Tgマウスの間で差がない可能性が示唆された。

Detection of carcinogenic potential of Diethylstilbestrol (DES) and *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) by the alternative testing model using Tg-rasH2 mouse.

Mamoru MUTAI, Fumiko SANO, Manami KUSAKABE, Kiyoshi KOBAYASHI, Kazuhiro GOTO, Minoru SATO, and Jiro SUGIMOTO

Toxicology Laboratory, Yokohama Research Center, Mitsubishi Chemical Corporation



○小野寺博志・三森国敏・高木久宜・安原加壽雄・広瀬雅雄

国立医薬品食品衛生研究所・病理部

p53 癌抑制遺伝子を欠損させたマウスは発がん物質に対する感受性が高く、短期発がんスクリーニングとしての有用性が期待されている。しかし、最近 p53 遺伝子のノックアウト法やノックアウトした動物の系統により感受性が異なることを示す報告がなされている。我々は p53 遺伝子 exon 5 をノックアウトした p53 ヘテロ欠損 CBA マウス[p53(+/-)マウス]とその同腹仔の野生型マウス[p53(+/+)マウス]を用いて、既知発がん物質に対する発がん感受性を検討した。

Dimethylnitrosamine(DMN) 5mg/kg を単回腹腔内投与後 500ppm の Phenobarbital(PB)を飲水で 26 週間投与した結果、p53(+/-)マウスの肝腫瘍が p53(+/+)マウスに比べ有意に増加し、前癌病変も増加する傾向を示した。

N-methyl-N-nitrosourea(MNU)を雄に 50 ないし 10ppm を飲水投与、あるいは雌雄に 50ppm を 26 週間投与した結果、p53(+/-)マウスで肝や肺に腫瘍が発生したが、腺胃には腫瘍は誘発されなかった。

N-ethyl-N-nitrosourea(ENU)を 120mg/kg 単回腹腔内投与後、26 週間観察した結果 p53(+/-)マウスで高率に子宮腫瘍(90%)と肺腫瘍(81%)が誘発された。

一方、米国 Taconic Farms が維持している p53(+/-)TSG マウスは exon 2 をノックアウトした C57BL6 マウスであり、DMN/PB 投与では肝腫瘍は誘発されなかったが、MNU 投与では腺胃の腫瘍が誘発されることが報告されている。以上の結果より、同じ p53 ノックアウトマウスでも p53 のノックアウト領域の違いや、遺伝子操作された動物の系統により発がん感受性が異なることが示唆された。

Susceptibility of p53 heterozygous knockout CBA mice to carcinogenic substances

Hiroshi ONODERA, Kunitoshi MITUSMORI, Hisayoshi TAKAGI,  
Kazuo YASUHARA, Masao HIROSE  
(Div. Pathol., Natl. Inst. Health Sci.,)

○宮内 慎、西川秋佳、古川文夫、中村英明、広瀬雅雄

国立医薬品食品衛生研究所 病理部

【目的】アスコルビン酸やフェノール系抗酸化物質のなかには、亜硝酸との併用投与によりラット前胃粘膜に強い細胞障害を起こし、過形成を発生させるものがあり、長期間の投与では種癌も発生する。そこで、環境中の抗酸化物質について、亜硝酸との併用投与によるラット前胃への影響を解析した。【方法】6週齢の雄性F344ラットに、1%の濃度で9種類の抗酸化物質を混餌投与し、同時に0.2%の濃度で亜硝酸を飲水投与した。また、各化合物単独投与群、亜硝酸単独群、対照群を設けた。4週後に剖検し、胃について病理組織学的に検索および抗PCNA抗体による免疫染色を行い、PCNA陽性細胞数を測定した。【結果】病理組織学的に、各化合物または亜硝酸の単独投与では、異常は認められなかった。 $\alpha$ -トコフェロール、エリソルビン酸ナトリウム、緑茶カテキン、ヒドロキノンまたは $o$ -フェニルフェノールと亜硝酸との併用投与により、前胃に炎症、びらん、角化の亢進を伴う扁平上皮細胞の過形成が認められ、その変化はエリソルビン酸ナトリウムとヒドロキノンを特に強かった。PCNA陽性細胞数は、エリソルビン酸ナトリウム、緑茶カテキン、ヒドロキノンまたは $o$ -フェニルフェノールと亜硝酸との併用投与により、亜硝酸単独投与群に比べて有意に増加した。【考察】 $\alpha$ -トコフェロール、エリソルビン酸ナトリウム、緑茶カテキン、ヒドロキノンまたは $o$ -フェニルフェノールと亜硝酸との併用投与により、前胃に細胞障害さらに細胞増殖が発生した。この詳細なメカニズムは不明であるが、ジアゾキノン類などの変異原性物質の生成、活性酸素の関与等が示唆されている。現在、エリソルビン酸およびヒドロキノンと亜硝酸を併用投与した時の、尿中8-hydroxydeoxyguanosineの測定を行っている。

Effects of combined treatment with antioxidants and sodium nitrite in the rat forestomach

Makoto Miyauchi, Akiyoshi Nishikawa, Fumio Furukawa, Hideaki Nakamura and Masao Hirose. Division of Pathology, National Institute of Health Sciences, Tokyo 158-8501, Japan

タモキシフェンのラット中期肝発がん性試験法を用いた肝発がん性の検討

○佐野真士<sup>1,2</sup>、玉野静光<sup>1</sup>、萩原昭裕<sup>1</sup>、河部真弓<sup>1</sup>、田中 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] 乳癌の治療薬として使用されているタモキシフェンはラット肝臓に対して発がん性が報告されている。しかし、過去に我々で実施した雄ラットを用いた中期肝発がん性試験法（伊東テスト）では陰性の結果であった。そこで今回、ラット雌雄を用い、発がん性の報告されている投与濃度および投与経路で中期肝発がん性試験を実施し、タモキシフェンのラット肝に対するがん原性について再検討した。

[方法] 6週齢のF344系ラット雄75匹、雌60匹を用い1群15匹に群分けした。実験開始時に Diethylnitrosamine (DEN)を200mg/kg体重で単回腹腔内投与し、3週目よりタモキシフェンを6週間投与した。タモキシフェンは雄には100および500ppm、雌には500ppmの濃度でそれぞれ混餌投与、また11.3mg/kgの濃度で雌雄に強制経口投与した。なお、対照群は雌雄とも混餌投与群に対しては基礎飼料を、強制経口投与群に対しては溶媒である0.5%CMCを投与した群をそれぞれ設けた。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] 体重増加の抑制および肝臓と腎臓の相対重量の増加を雌雄とも全ての投与群で観察した。雄では GST-P 陽性細胞巢の単位面積あたりの個数および面積の増加を500ppm混餌投与群で観察し、11.3mg/kg強制経口投与群では面積の増加のみが示された。雌では500ppm混餌投与群で有意差を認めないものの個数の増加傾向が観察された。しかし、強制経口投与群では GST-P 陽性細胞巢の個数および面積は対照群と比較して有意差を認めなかった。[結論] 発がん性の報告された投与濃度を用いて再検討を行った結果、タモキシフェンのラット肝に対する発がん性が確認され、中期肝発がん性試験法の有用性が示された。

Effect of hepatocarcinogenesis of Tamoxifen in the rat medium-term liver bioassay (Ito test).

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

チオウレアと大量のビタミン A 同時投与ラットにおける甲状腺腫瘍発症増強メカニズムに関する研究：甲状腺ホルモン合成系への影響

○竹川 潔, 井上五子, 奥田孝二, 河下 伸, 上村裕洋, 高木司郎, 永岡隆晴, 酒盛政光, 竹内正紀, 三森田敏<sup>1</sup>

吉富製薬(株)安全研, <sup>1</sup>国立衛研・病理

[目的] *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) 処置したラットにチオウレア (TU) を飲水投与する甲状腺二段階発癌モデルにおいて, 大量のビタミン A (VA) の同時混餌投与により甲状腺腫瘍発生が増強することを我々は既に報告した (Cancer Lett. 103: 19-31 (1996)), そのメカニズムとしては, 肝 T4-UDP-GT 活性の上昇による血中甲状腺ホルモン値の減少と, それに伴う TSH 分泌の増加による濾胞上皮への増殖刺激の増加が主体と考えられた (Arch. Toxicol. 71: 661-667 (1997)). 今回の実験では, 同様の二段階モデルにおいて, VA が甲状腺ホルモン合成に影響を与えるか否かを検討した. [方法] 雄性 F344 ラットを DHPN 処置後, 4 週間にわたり基礎飼料および水道水で飼育 (DHPN 群), 0.2% TU を飲水投与 (DHPN/TU 群), 0.1% VA を混餌投与 (DHPN/VA 群), または TU を飲水投与すると同時に VA を混餌投与した (DHPN/TU+VA 群). 甲状腺へのよう素の取込みおよびよう素の蛋白結合量を測定した. さらに, 血中 T3 値, T4 値, TSH 値を測定し, 甲状腺を病理組織学的に検査した. [結果] 甲状腺へのよう素の取込みおよび蛋白結合量は DHPN 群に比べて DHPN/TU 群および DHPN/TU+VA 群で減少したが, その減少は DHPN/TU 群に比べて DHPN/TU+VA 群で軽減された. 血中 T4 値は DHPN 群に比べて DHPN/TU 群で減少し, DHPN/TU+VA 群ではさらに減少した. TSH 値は DHPN 群に比べて DHPN/TU 群で増加し, DHPN/TU+VA 群ではさらに高値を示した. 濾胞上皮由来の増殖性病変の発生率または発生個数には, DHPN/TU 群および DHPN/TU+VA 群間で差は認められなかったが, それらの BrdU 陽性率は後者でやや高かった. [結論] 今回, TU による甲状腺ホルモン合成の抑制が VA 同時投与によって増強されなかったことから, VA 同時投与による甲状腺腫瘍発生の増強効果には, 甲状腺ホルモン合成の抑制は関与せず, 肝臓の T4-UDP-GT 活性の増強によるものであることがさらに裏付けられた.

A study on mechanisms of the enhanced thyroidal tumorigenesis in rats by large amounts of vitamin A simultaneously given with thiourea: Effects on thyroidal hormone syntheses

Kiyoshi TAKEGAWA, Itsuko INOUE, Kohji OKUDA, Shin KOHGE, Kamimura YASUHIRO, Shiro TAKAGI, Takaharu NAGAOKA, Maramitsu SAKAMORI, Masaki TAKEUCHI, and Kunitoshi MITSUMORI<sup>1</sup>. Safety Evaluation Lab., Yoshitomi Pharm., Fukuoka-871, Japan, <sup>1</sup>Div. Pathol., Nat. Inst. Health Sci., Tokyo-158, Japan

## ラットにおける xylazine の鼻腔発癌修飾作用

○安原加壽雄<sup>1</sup>、三森国敏<sup>1</sup>、小林裕子<sup>2</sup>、穂谷高敏<sup>1</sup>、小野寺博志<sup>1</sup>、  
高木久宜<sup>1</sup>、広瀬雅雄<sup>1</sup>

<sup>1</sup>国立医薬品食品衛生研究所・病理部、

<sup>2</sup>(社)日本植物防疫協会

〔目的〕Xylazine(XZ)は $\alpha_2$  アドレナリン受容体刺激剤であり、家畜の鎮静剤として海外で広く使用されている。この代謝物である 2,6-dimethylaniline(DMA)には鼻腔発癌性を有することが示されているが、XZ の発癌性試験が実施されていないことから畜産食品を介しての XZ の発癌リスクが懸念されている。我々は第 15 回日本毒性病理学会において DMA が鼻腔発癌プロモーターであることを報告した。今回、XZ に鼻腔発癌プロモーション作用が存在するか否かを明らかにする目的でラット鼻腔二段階発癌試験を行った。

〔方法〕5 週齢の雄性 F344 ラットを 2 群に分け一方に 2400mg/kg の Diisopropanol-nitrosamine(DIPN)を、他方に生理食塩水を皮下投与した。6 週齢でこれらの動物を更にそれぞれ 3 群に分け、1000ppm の xylazine hydrochloride(DIPN+XZ, XZ 群)あるいは陽性対照として 3000ppm の DMA(DIPN+DMA, DMA 群)、また、基礎飼料(DIPN, 対照群)を 12 カ月間自由に摂取させた。実験終了時に血漿中の XZ あるいは DMA 含量を測定すると共に、鼻腔粘膜を病理組織学的に観察した。

〔結果〕DIPN+XZ, XZ, DIPN および対照群の血漿中 XZ と DMA 量は検出限界(0.02 $\mu$ g/ml)以下であったが、DIPN+DMA あるいは DMA 群の血漿中 DMA 量は各々 0.27 あるいは 0.49 $\mu$ g/ml であった。組織学的に鼻腔粘膜の腫瘍が DIPN+DMA 群(53%)で DIPN 群(20%)に比し有意に増加したが、DIPN+XZ 群(25%)では DIPN 群と同程度であった。

〔結論〕DIPN+XZ および XZ 群では鼻腔発癌の原因物質である DMA は検出限界以下であり、かつ、鼻腔腫瘍誘発の増強はみられなかったことから、本実験条件下では XZ は鼻腔発癌プロモーターではなく、また、XZ 摂取による DMA 暴露の危険性は極めて少ないことが示唆された。

## Modifying Effects of Xylazine in Rats Nasal Carcinogenesis

Kazuo YASUHARA<sup>1</sup>, Kunitoshi MITSUMORI<sup>1</sup>, Hiroko KOBAYASHI<sup>2</sup>, Takatoshi KOUJITANI<sup>1</sup>, Hiroshi ONODERA<sup>1</sup>, Hisayoshi TAKAGI<sup>1</sup> and Masao HIROSE<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Div. of Pathol., Natl. Inst. Hlth. Sci., Tokyo-158-8501, <sup>2</sup>Jap. Plant Protect. Assoc., Ibaraki-303-0043, Japan.

## 一般毒性試験における統計手法と その結果の適切な記述

○浜田知久馬

東京大学

論文における“Statistical Analysis”のセクションにおける記述の原則は、論文の読者が、類似データに対して同じ解析を行なうのに十分な情報を提供することである。客観的な科学論文である以上、第三者による評価を含めた実験の追試を可能にする必要がある。結果については、“Statistical Analysis”の記述と矛盾がなく、しかも対応を明らかである必要がある。以下いくつかの注意点を簡条書きで示す。

- ・統計解析(statistical analysis)の節を設けているか。
- ・目的と実験デザイン、統計解析手法が適合しているか。(例えば、用量反応性を検討する目的なのに、実際の解析は群間比較しか行なっていないようなことはないか)
- ・割り付け方法についての記載はあるか。
- ・解析の単位(処理を割り付けた単位)は明確に示されているか。
- ・用いた全ての統計手法が記述されているか。
- ・統計手法と統計解析の結果の対応が明らかであるか(使った手法の羅列で終わっていないか)。
- ・ $a \pm b$ の表現では、 $\text{mean} \pm \text{SD}$ ,  $\text{mean} \pm \text{SE}$ のいずれであるかが明確か。有意水準は明確に示されているか。
- ・両側検定・片側検定のいずれであるかが明確に示されているか。
- ・グラフの中で説明されていない点や線がないか。
- ・p値や、信頼区間を示す必要がないか。
- ・Nの大きさが明示的に示されているか。
- ・統計手法の前提条件は満たされているか。
- ・適切な参考文献が示されているか。
- ・統計手法名は正確か(特にスペルミスに注意)
- ・ソフトウェア特有の用語を用いていないか。

Appropriate description of statistical analysis and its result in toxicological studies.

Chikuma Hamada

Department of Pharmacoepidemiology, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Tokyo-113, Japan

Effective Design and Planning of Toxicology Studies to Improve Selection of New Drug Candidates.

Colin Brown

Head of General and Acute Toxicology, Inveresk Research, Tranent  
EH31 2NE, Scotland

Pharmaceutical toxicology is increasingly subject to time constraints arising from commercial pressure to place new drugs on the market in the shortest possible time. The varying demands of scientific principles, regulatory requirements, and market forces are challenging pharmaceutical toxicologists to produce good science that will satisfy regulators whilst keeping development programmes on track.

This presentation will illustrate how clinical aims impact on preclinical studies; optimisation of drug batches; impurity management; how *in vitro* studies in drug metabolism can benefit toxicologists; and planning toxicology studies to meet clinical requirements. Species selection and the duration of early preclinical studies are looked at in detail. Real examples of drug development programmes of variable duration will be presented. Risk/benefit analysis in selecting new drug candidates will be illustrated. It has been shown that a variation of 2-3% in success rates in bringing new compounds to market can affect R&D costs by 8-15%.

With the cost of getting a new drug to the market currently around \$600,000,000, this presentation is important to all toxicologists with responsibilities for developing new drug candidates.

Effective Design and Planning of Toxicology Studies to Improve Selection of New Drug Candidates.

Colin Brown, Head of General and Acute Toxicology, Inveresk Research, Tranent,  
EH33 2NE, Scotland

モルモットにおける8-メトキシソラレンの経口投与による  
光毒性試験法の検討

○土井久子、永井博文、杉本武志、大島洋次郎、土井孝良

武田薬品工業株式会社 薬剤安全性研究所

[目的] 薬物の経皮投与による光毒性試験については比較的多くの報告があるが、経口投与など経皮以外の投与方法による光毒性試験については情報が少ない。医薬品の投与経路の多くは経皮以外であり、これらの評価系の確立が必要と考えられる。本研究では、経皮投与による光毒性試験の陽性対照としてよく用いられる8-メトキシソラレン(8-MOP)を経口投与して光毒性試験の条件検討を行った。

[方法] 8-MOPをモルモットに強制経口投与し、背部皮膚に長波長紫外線を照射した後の皮膚の変化を観察した。

[結果及び結論] 1. 投与量: 10 mg/kg 以上で皮膚反応がみられ、その強さは用量依存的であった。2. 照射量: 皮膚反応は 5 J/cm<sup>2</sup> 以上で照射量依存的であった。20 J/cm<sup>2</sup> では光照射単独で紅斑が観察された。3. 照射のタイミング: 投与2時間後に照射を開始した場合に最も強い皮膚反応がみられ、投与6時間後では皮膚反応は観察されなかった。4. 週齢差: 炎症及び真皮の出血に起因する紫斑は4及び7週齢で顕著であり、紅斑及び浮腫は10及び15週齢で顕著であった。5. 経時変化: 皮膚反応は照射24~48時間後がピークであった。組織学的検査では照射4時間後までに表皮基底細胞の壊死、24時間後には皮下組織に浮腫が認められた。48時間後以降には浮腫は軽減し、表皮全層の壊死と微小膿疱形成がみられた。

以上、8-MOPは経口投与による光毒性試験の陽性対照物質として使用可能であり、その光毒性による皮膚反応を誘発することができた。

Investigational Study for Phototoxicity in Guinea Pigs upon Oral Administration of  
8-methoxypsoralen

○Hisako DOI, Hirofumi NAGAI, Takeshi SUGIMOTO, Yojiro OOSHIMA and Takayoshi DOI. Drug Safety Research Laboratories, Takeda Chemical Industries, LTD., Osaka 532-8686, Japan.



- 中山直樹、佐々木正治、八木久美子、栗原明義、中村勇、  
木村正明

大正製薬株式会社 開発研究所 安全性研究室

〔目的〕実験動物における痛みの評価法は確立されておらず、痛みは病理組織学的検査による形態学的な変化や動物の苦痛症状等から推察されている。従ってかなり重篤な痛みでなければ検出することが出来ず、また、その痛みを定量化することは困難である。そこで我々はヒトで報告されている電気生理学的手法を用いて痛みの定量化を検討した。

〔方法〕痛み関連電位として頭皮上から記録される後期陽性成分(p-LPC: Pain-late positive component)を指標として検討した。成人男性(3人)、雌カニクイザル(3匹)およびビーグル犬(3匹)の上腕(正中神経近部)を電気刺激(2, 4, 8および16mA)し、10Hzの頻度で20回加算して電位を記録した。

〔結果〕ヒト、カニクイザルおよびビーグル犬でp-LPC(ヒト:210~340msec, サル:118~189msec, イヌ:87~125msec)を記録することが可能であった。p-LPCの頂点潜時は、ビーグル犬<カニクイザル<ヒトの順であった。また、刺激強度に依存した振幅の増加が認められ、p-LPCを指標とすることで痛みの定量化が可能と考えられた。

Investigation on the method of evaluating the pain by pain-related late positive component

○ Naoki NAKAYAMA, Shoji SASAKI, Kumiko YAGI, Akiyosi KURIHARA, Isamu NAKAMURA and Masaaki KIMURA.

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

ビーグル犬における電気生理学的聴覚機能検査法の検討  
 (蝸牛マイクロフォン電位、聴神経複合活動電位および聴性中潜時反応)

○谷本恵昭, 尾崎潤一郎, 久世博

田辺製薬(株) 安全性研究所

薬剤投与による聴覚機能の減退あるいは消失は、人の QOL を大きく損なう要因の一つである。前臨床試験において新規化合物の聴覚器への影響を検討することは、人での聴覚器に対する副作用を回避する上で重要と思われる。以上のことより、新規化合物において評価可能な実験系を確立するため、以下の聴性誘発反応の測定を行った。

ビーグル犬における電気生理学的聴覚機能の基礎的なデータ取得のため、若齢犬(2~3才)3例、および老齢犬(11~12才)8例を用いて、内耳の機能評価を目的に蝸牛マイクロフォン電位(CM)および聴神経複合活動電位(AP)を、聴覚伝導路中枢の機能評価を目的に聴性中潜時反応(MLR)の測定を行った。若齢犬と比較して、老齢犬ではCMの振幅が減少した。APは刺激周波数4kHzで振幅が最大(若齢:6.5-23.4、老齢:0.6-7.8  $\mu$ V)となり、潜時は最短(若齢:1.2-1.5、老齢:1.3-1.8 msec)であった。また、音圧に比例して振幅の増大および潜時の短縮がみられた。老齢犬ではいずれの測定条件でも振幅の減少および潜時の延長がみられた。MLRではP<sub>0</sub>、P<sub>1</sub>波とも、2kHzで振幅が最大(若齢:2.6-3.5および1.4-2.2、老齢:0.5-3.4および0.4-2.7  $\mu$ V)となり、音圧に比例して振幅が増大した。P<sub>0</sub>波潜時は2kHz以下で延長したが、3kHz以上では周波数に関わらず約10 msecで推移した。老齢犬では若齢犬と比較して、各波振幅が減少し、P<sub>1</sub>波潜時は短縮する傾向にあった。

以上のように各聴性誘発反応の測定を行い、ビーグル犬の聴覚機能における老齢性変化を捉えることが可能であった。今回、3つの聴性誘発反応の測定を行ったが、各部位の機能を電気生理学的に個別に抽出することにより、聴覚機能障害のより詳細な評価が可能であると思われた。

Electrophysiological auditory examination in beagle dogs.

Cochlear microphonics, compound action potential and auditory middle latency response

Noriaki TANIMOTO, Junichiro OZAKI and Hiroshi KUSE. Safety Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd., Osaka-532-8505, Japan.

ドレイズ眼刺激性試験にて評価できない微弱な角膜障害と  
*in vitro* 細胞毒性の関係

○小島肇夫、赤座誠文、壺田友則、小西宏明

日本メナード化粧品（株）総合研究所

[目的]化粧品の誤使用によって生じる眼刺激性においては、洗浄処置などにより角膜に重篤な障害を起こすような症例はほとんどない。しかし、まれに適切な処置にも係らず、霞目や涙目を訴えるクレームを受けることがある。このような症状はドレイズ眼刺激性試験を実施しても再現することはできないが、微弱な反応はブラチド氏角膜計により、角膜のゆがみとして評価することが可能である。しかし、動物愛護の観点から、眼刺激性試験に関しては代替法の必要性が問われている。そこで、眼刺激性の代替法として、界面活性剤の評価に有用であるといわれている *in vitro* 細胞毒性試験を用い、ドレイズ試験にて評価できない微弱な眼刺激性の予測性について検討を行った。

[材料及び方法] 被験物質としては、水溶液にて調整した各種界面活性剤溶液を試験液とした。試験液は、過去の文献より、ドレイズ試験にて角膜障害が生じない濃度を限定使用した。動物試験としては、ウサギの左眼に試験液を適用し、1 及び 24 時間後の角膜の状態をブラチド氏角膜計を用いて調べ、そのゆがみの程度によって 5 段階のランク付けをした。右眼は対象眼とした。*in vitro* 細胞毒性試験としては、Balb 3T3 細胞を用いるニュートラルレッド (NR) 取り込み試験を行い、対照に対して取り込みが半分に減る濃度 NR50 値を求めた。

[結果及び考察] NR50 値が 1 %濃度以上である試験液は、すべて角膜のゆがみは見られなかった。よって、微弱な反応の有無を予測するため、細胞毒性試験を使用することは可能と考えられた。

Comparison with *in vitro* cytotoxicity and corneal damage which can not be evaluated in Draize eye irritation test.

Hajime KOJIMA, Narifumi AKAZA, Tomonori KATADA and Hiroaki KONISHI,  
Research Laboratory, Nippon Menard Cosmetic Co. Ltd., Nagoya-451,0071, Japan

○木村恵人、佐治大介、美濃部典子、古川茂典、石井権二、  
鈴木 潤、西森司雄

株式会社 環境バイリス研究所

【目的】消化管運動の研究は、古くは摘出胃腸管を用いた測定に始まり、ラットやウサギ等比較的小型の実験動物を用いた測定が行われてきた。生体位での消化管運動測定法には、筋電図法やバルーン法が用いられてきた。ストレインゲージ法の導入によりイヌを用いた測定がさかんに行われるようになり、生理的な運動解析が可能となった。しかし、実験動物の薬物に対する感受性、反応性がヒトと異なることから、ヒトに近い動物を用いた試験系が望まれている。そこで我々は、テレメトリーシステムを用いてカニクイザルの消化管運動の測定を試みた。現在までの検討で若干の知見を得たのでイヌのデータと比較し報告する。

【方法】雄性カニクイザルを用いて、慢性的にストレインゲージ・フォーストランスデューサーを胃前底部および空腸または回腸に装着し、無麻酔無拘束下に消化管運動を測定した。

【結果および考察】カニクイザルの消化管運動は、サルがケージ内を動き回るなどの体動による影響を受けずに安定した収縮運動を測定することが可能であった。また、カニクイザルにおいても、イヌと同様の摂食による運動の変化が認められた。空腹期運動は、静止期と収縮期を繰り返す空腹期伝播性運動を示した。この空腹期伝播性収縮は、ヒトでも存在することが知られており、本テレメトリーシステムは消化管運動の研究や薬効評価に有用である。

#### Measurement of Gastrointestinal Motility Using a Telemetry System

Ayahito KIMURA, Daisuke SAJI, Noriko MINOBE, Shigenori FURUKAWA,  
Kenji ISHII, Jun SUZUKI and Tsukao NISHIMORI.  
Environmental Biological Life Science Research Center Inc.  
Ukawa, Minakuchi, Koka, Shiga 528-0052, Japan

一般薬理試験から臨床における消化器系の副作用の予測をするためには腸管輸送能だけでなく胃排出能の検討も必要である

○高木 親、安東賢太郎、高科庸子、奥脇浩子、井上裕章

三菱化学(株)横浜総合研究所安全性研究所

【目的】一般薬理試験の必須試験項目である腸管輸送能ではほとんど作用がないにもかかわらず、臨床において消化器系の副作用が認められた薬剤があった。そこで我々は消化器系の副作用の予測のためには腸管輸送能の検討だけでは不足と考え、腸管輸送能ではほとんど作用がなく、臨床において消化器系の副作用が認められた薬剤であるサケカルシトニンおよび塩酸ドキシソルピシンを用いてマウスにおける腸管輸送能と胃排出能試験法である phenol red 法および beads 法を比較検討した。

【方法】ddY 系雄性マウスを一晩絶食して用いた。腸管輸送能は 5%アラビアゴム液に懸濁した 5%炭末液を 0.2ml/mouse 経口投与し、炭末投与 30 分後の輸送率を求めた。phenol red 法は 0.5%CMC 液に溶かした 0.2%phenol red を 0.05ml/mouse 経口投与し、1 時間後に胃内に残った phenol red を 540 nm の吸光度で定量した。beads 法は直径 0.6mm のイオン交換樹脂 40 個を 0.5ml の精製水とともに経口投与し、1 時間後に胃内に残った beads を数えた。

【結果】サケカルシトニンは 30U/kg 筋肉内投与まで炭末輸送に影響しなかったが、phenol red 法では 10U/kg 以上で、beads 法は 3U/kg 以上で胃排出を抑制した。塩酸ドキシソルピシン 10g/kg 静脈内投与まで炭末輸送および phenol red 法による胃排出に影響しなかったが、3mg/kg 以上で beads 法による胃排出を抑制した。

【考察】腸管輸送能の検討だけでは消化器系の副作用を見落とす可能性があり、胃排出能の検討も必要と思われる。また、胃排出能の試験法は phenol red 法より beads 法の感度が良いと思われる。

Not only gastrointestinal transit but also gastric emptying should be assessed in general pharmacological studies to improve the predictivity of gastrointestinal adverse event in clinical trials.

Kan TAKAGI, Kentaro ANDO, Yoko TAKASHINA, Hiroko OKUWAKI, Hiroaki INOUE. Toxicology Laboratory, Yokohama Research Center, Mitsubishi Chemical Co., Yokohama 227-8502, Japan

○飯田 茂、小島夏樹、納屋聖人

協和発酵工業株式会社 安全性研究所

フローサイトメトリー (FCM) による精巣毒性評価には、DNA 量を指標とした測定法が汎用されている。我々は FCM の測定指標を充実するため、BrdU の取込みを用いた DNA 合成期 (S 期) 細胞の測定 (BrdU-FCM) を検討してきた。本研究では DNA 合成を抑制することが報告されている抗癌剤アドリアマイシン (ADR) のラット精子形成への影響を評価し、BrdU-FCM の精巣毒性評価への有用性を検討した。

10 週齢の Crj:CD (SD) IGS 系雄ラットに生理食塩液または ADR 8mg/kg を尾静脈内に単回投与し、投与 1、3、7、14、21 日後に剖検した。剖検の 1 時間前に BrdU 50mg/kg を尾静脈内に単回投与して BrdU 標識した。左側精巣の重量を測定した後に BrdU-FCM に供し、1 倍体 (1C)、2 倍体 (2C)、4 倍体 (4C)、S 期の比率を求めた。また精巣細胞採取に使用した精細管重量、獲得した精巣細胞数及び比率をもとに、精細管 1g あたりの 1C、2C、4C、S 期の細胞数を求めた。

S 期は比率、数ともに ADR 投与 1 日後から減少する傾向にあり、投与 7 日後以降は著明に減少した。4C の比率と数は、S 期の減少に伴って投与 14 日後から有意に減少した。2C は比率、数ともに投与 14 日後に一過性に減少した。1C の比率は投与 14、21 日後に有意に増加したが、数には影響がなかったことから、S 期、4C の減少に伴って相対的に比率が増加したと考えられた。精巣重量は投与 7 日後から有意に低下し、精巣細胞数の減少を反映した変化が認められた。

これらの結果から、BrdU-FCM は ADR の DNA 合成期細胞に対する影響を鋭敏かつ短期間で検出することができ、精巣毒性の評価法として有用と考えられた。

A flow cytometric analysis of cytotoxic effects of adriamycin on rat spermatogenesis.

Shigeru IIDA, Natsuki KOJIMA and Masato NAYA, Toxicological Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Ube-755-8501, Japan.

○岩井久和<sup>1)</sup>、望月健光<sup>1)</sup>、加藤達真<sup>1)</sup>、水野幸恵<sup>1)</sup>、田川義章<sup>1)</sup>、  
古田禎之<sup>2)</sup>、田畑伸幸<sup>3)</sup>

㈱三和化学研究所 安全性研究所<sup>1)</sup>、製薬研究所<sup>2)</sup>、試薬部<sup>3)</sup>

〔目的〕急性相蛋白の一つであるC反応性蛋白(CRP)は、イヌにおいても存在が確認され、外科手術、感染症、内科疾患で血清CRP濃度の増加することが報告されている。そこで、毒性発現をより早期に確認する方法としてCRP測定による毒性研究への応用を考え、今回、イヌの口腔粘膜に損傷を作製し損傷部位の程度と血清中CRPとの関係について比較検討を行ったので報告する。

〔方法〕2歳例の雄ビーグル犬に塩酸ケタミン麻酔下、電気綴(60℃、10秒)による熱損傷を作製し、損傷部位の大きさを測定するとともに、損傷作製前、損傷作成後1、3、7、10、14および21日に採血を行い、各時点での血清中CRP濃度の測定(免疫比濁法、HITACHI 7070)を実施した。また、損傷作製後の肉眼的観察ならびに病理組織学的検査を実施し、炎症の状態とCRPとの関係についても検討を行った。

〔結果および考察〕損傷部位面積は、損傷作製翌日に最高値を示し、その後修復し、平均19日には肉眼的な変化を認めなかった。病理組織学的にも損傷作製翌日には粘膜上皮～下層の壊死・欠損、好中球浸潤、粘膜固有層～下層の浮腫、筋層の軽度変性、好中球浸潤を認めた。損傷作製後8日には粘膜の菲薄化や粘膜固有層～下層のリンパ球浸潤のみを認める程度に回復した。一方、血清中CRPは、損傷部位の面積推移と同様、損傷作製後1～3日に最高濃度を示し、その後減少し損傷作製後7日にはかなりの回復を認め、21日にはほぼ正常値を示した。以上の結果より、血清中CRPは熱損傷による炎症性変化とともに上昇し、その後は損傷の修復過程と一致した変動を示すことが確認された。イヌのCRP測定は胃障害モデル等でも有用性が報告されており、今回の試験結果ともあわせ毒性試験への応用が期待できるものと考えられた。

#### Changes in Serum C-Reactive Protein (CRP) in Experimental Oral Wounds in Dogs.

Hisakazu Iwai<sup>1)</sup>, Tatemitsu Mochizuki<sup>1)</sup>, Tatsuma Kato<sup>1)</sup>, Yukie Mizuno<sup>1)</sup>, Yoshiaki Tagawa<sup>1)</sup>, Yoshiyuki Furuta<sup>2)</sup> and Nobuyuki Tabata<sup>3)</sup>. <sup>1)</sup>Safety Assessment Laboratory, <sup>2)</sup>Pharmaceutical Laboratory, and <sup>3)</sup>Diagnostics Department, Sanwa Kagaku Kenkyusho Co., Ltd., Inabe, Mie, 511-0406, Japan.

マウスにおける血中 1,5-アンヒドログルシトール、フルクトサミン  
およびヘモグロビン A<sub>1c</sub> の診断学的有用性について

○久保道江, 田畑肇, 塚俊治, 鈴木弘, 松澤利明, 仮家公夫\*

山之内製薬株式会社 安全性研究所

\*神戸学院大学 薬学部

〔目的〕近年ヒトでは糖代謝指標として、1,5-アンヒドログルシトール(1,5-AG)、フルクトサミン(FRA)、ヘモグロビン A<sub>1c</sub>(HbA<sub>1c</sub>)等が汎用されているが、実験動物における報告例は少なく、その診断学的意味は不明な点が多い。今回、遺伝的およびストレプトゾトシン(STZ)投与による高血糖マウス、および制限給餌による低血糖マウスを用いて、これら糖代謝指標の有用性について検討した。

〔材料・方法〕6週齢の C57BL/KsJ-db/m マウスを、STZ 単回投与群、70%制限給餌群および無処置対照群の3群を設定し、さらに同一週齢の C57BL/KsJ-db/db 遺伝的糖尿病マウス群を設定して、13週間飼育した。処置2および4日、以降1~2週間に最低1回、血糖、HbA<sub>1c</sub>、1,5-AG、FRAを測定し、さらに遊離脂肪酸、総ケトン体、3-ヒドロキシ酪酸、中性脂肪、総コレステロール、リン脂質等の測定も行った。

〔結果・考察〕STZ 単回投与群では投与翌日より血糖は上昇し、2週後に対照群の約3倍に、その後も緩やかに上昇し13週後に対照群の約4倍に達した。1,5-AGは投与翌日より終始一貫して対照群の1/5~1/10の範囲で推移した。FRAは投与1週に有意な差を認めた後4週まで上昇し、以降は対照群の2~3倍の範囲で推移した。HbA<sub>1c</sub>は終始緩やかに上昇し、投与2週より有意な差を認め、13週後には対照群の4倍に達した。C57BL/KsJ-db/db マウスでもほぼ同様の成績が確認された。制限給餌群では血糖は低下し、FRAは投与4週より、HbA<sub>1c</sub>は投与13週で有意な低値が認められた。また、血糖と1,5-AG、FRA、HbA<sub>1c</sub>の Pearson 積率相関係数を算出したところ、いずれの指標間にも有意な相関が認められた。以上のことから、いずれの指標もマウスの血糖推移の把握に有用であると考えられる。

Clinical usefulness of 1,5-anhydroglucitol, fructosamine and hemoglobin A<sub>1c</sub> in mice.

Michie KUBO, Hajime TABATA, Toshiharu SAKAI, Hiroshi SUZUKI,  
Toshiaki MATSUZAWA and Kimio KARIYA\*

Safety Research Laboratories, Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

\*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kobegakuin University



○川鍋剛<sup>1</sup>, 田畑肇<sup>2</sup>, 久保道江<sup>2</sup>, 堺俊治<sup>2</sup>, 宮下真一<sup>1</sup>

<sup>1</sup>株式会社ヘレナ研究所

<sup>2</sup>山之内製薬株式会社 安全性研究所

【緒言】血中リポ蛋白分画中のコレステロール(CHO)およびトリグリセライド(TG)の同時解析技術(コレトリコンボ電気泳動, 株式会社ヘレナ研究所)を用いて, 正常および高脂血症マウスの血中脂質特性について検討した。

【材料および方法】①食餌および加齢の影響と系統差: B6C3F1, C3H/HeN および C57BL/6N マウスを用いて, 7, 45, 90 および 125 週齢時, 飽食下および一夜絶食下の血中脂質濃度を測定し, コレトリコンボ電気泳動を行った。②薬剤誘発性あるいは遺伝的高脂血症モデル: ストレプトゾトシン(STZ)またはグリセロール投与による高脂血症マウスおよび遺伝的肥満・糖尿病型高脂血症マウス C57BL/KsJ-db/db についても同様の解析を行った。

【結果および考察】①血中脂質濃度は C57BL<B6C3F1<C3H の順に高く, 絶食時には VLDL 分画の減少による TG 濃度の低下が顕著であった。B6C3F1 と C57BL マウスはほぼ同じ電気泳動パターンを呈し, C3H マウスは VLDL および CM 比が高いのが特徴であった。B6C3F1 マウスでは, 90 週齢以降に, VLDL および LDL-CHO 比の上昇, さらに 125 週齢では LDL および CM-TG 比の上昇が認められた。②STZ 投与および db/db マウスでは VLDL および CM 分画の増加による TG 濃度の上昇, db/db マウスではさらに HDL 分画の増加による CHO 濃度の上昇が認められた。

本法はコレステロール分画とトリグリセライド分画の波形と量を解析することにより, HDL, VLDL, LDL および CM 中の脂質の質的および量的変化を捉えることができ, マウス等の小動物においても微量の血液で繰り返し検査が可能であり, 脂質解析手段として有用な手法と考えられる。

Application of analytical technologies of cholesterol and triglyceride separations in mouse serum.

Tsuyoshi KAWANABE<sup>1</sup>, Hajime TABATA<sup>2</sup>, Michie KUBO<sup>2</sup>, Toshiharu SAKAI<sup>2</sup>  
Shinichi MIYASHITA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Helena Laboratories Co., Ltd, Saitama, 336-0001, Japan.

<sup>2</sup>Safety Research Laboratories, Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd, Tokyo, 174-8551, Japan.

○今井直人、柴田博、酢田照男、柏原純一、入江弘之、池田陽一、  
安藤信明、川畑好之康、阿部俊一

吉富製薬株式会社 開発研究所 安全性研究部

【目的】血管刺激性試験はウサギ耳介静脈を用いた貯留法が一般的であるが、末梢静脈より持続注入される輸液製剤では、臨床使用時の影響を十分に予測できるとは言い難く、血管刺激性の外挿性を高めるには可能な限り臨床用法に準じた投与期間・投与方法による評価が適切と考えられる。ウサギ耳介静脈へ長期間連続的に持続注入する際、耳介の動きによるアーティファクツ的な刺激性を回避する為に動物及び耳介の動きを完全に抑止すると共に、動物の健康・衛生維持のため水分・栄養補給、排泄物の処置など動物愛護への配慮も必要である。今回我々はこれら試験遂行上の問題を解消した持続注入による血管刺激性試験法を確立し、各種栄養輸液の刺激性を評価した。【方法】従来の筒型保定器を利用し、底面にスリットを施して糞尿の排泄・処置を容易にした。頭部には自製の耳介保定器を装着し、頭部の保定に加え後方（腎部）からも保定具を挿入し、動物の動きをほぼ完全に抑制した。本拘束下で耳介静脈から留置針を用いて各種栄養輸液について、臨床と同用量（40mL/kg/日）による最長1週間持続投与を行い、刺激性発現の程度を肉眼的及び病理組織学的に評価し、貯留法の結果と比較した。【結果】本法において留置針抜去等による脱落例の発生はほとんどなく、衛生・健康状態も良好であり、持続投与する薬剤の血管刺激性評価には適切な保定法と思われた。また、各種輸液の刺激性評価の結果、貯留法により刺激性の認められなかった輸液及び文献的には低刺激性とされる輸液においても、投与2～3日目より留置部位を起点に刺激性が認められ、浮腫を伴いながら耳介に波及していくのが明らかとなり、刺激性の強弱は輸液のpH、浸透圧等の関与が大きいことが示唆された。本試験法は、各種輸液成分単位での刺激性の検討・評価に、感度の高い方法として応用可能と考えられた。今後、本試験結果の外挿性も考慮した上で、持続注入における刺激性発現のメカニズム考察を行いたい。

Venous irritation test by continuous infusion from auricular veins in rabbits

Naoto IMAI, Hiroshi SHIBATA, Teruo SUDA, Jun-ichi KASHIHARA, Hiroyuki IRIE, Yoichi IKEDA, Nobuaki ANDO, Yoshiyasu KAWABATA and Shun-ichi ABE. Safety Evaluation Laboratory, YOSHITOMI PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD., Hyogo, 679-2296, Japan

ミニブタを用いた経皮反復投与毒性試験の試み  
 - ビタミンD誘導体の投与経験 -

○千葉修一<sup>1</sup>、松下智哉<sup>1</sup>、小田部耕二<sup>1</sup>、伊藤恒夫<sup>1</sup>、浅野 忠<sup>1</sup>、石谷祥彦<sup>2</sup>、  
 徳田和夫<sup>2</sup>、高田昌太郎<sup>2</sup>、山本利憲<sup>2</sup>、常井和男<sup>3</sup>、片桐公一<sup>3</sup>、馬宮洋治<sup>3</sup>

中外製薬株式会社 安全性研究所<sup>1</sup>、薬物動態研究所<sup>2</sup>  
 株式会社 CSK リサーチパーク<sup>3</sup>

【目的】経皮投与薬剤の毒性評価は、用いる動物種の皮膚の性状により、薬物動態プロファイルが異なる可能性がありヒトへの外挿を行うためには適切な動物の選択が重要となる。今回我々は現在使用可能な実験動物の中でも皮膚が最も人に近いとされているミニブタで反復投与毒性試験を行うにあたり、一般毒性試験における代表的なパラメータの経時的解析をビタミンD誘導体であるOCT軟膏を用いて検討したので報告する。

【方法】6~7ヵ月齢の雄のミニブタ(CSK Miniature Swine)10例を使用し、5および25  $\mu$ g/kg群に各3例、50  $\mu$ g/kgおよび基剤を投与する対照群に各2例を割り付けた。25  $\mu$ g/kgのOCT軟膏ワセリンを基剤とする)を2週間反復経皮投与した。1回あたりの軟膏塗布時間は5時間、投与部位は試験期間を通じて開放状態とした。

【結果】1)いずれの投与量においても投与した軟膏中の約半分のOCTが吸収されたが、血中の薬物濃度は5  $\mu$ g/kg群では殆ど検出されず、25および50  $\mu$ g/kg群では投与量に応じて増加した。また、反復投与により血中OCT濃度に変化は認められなかった。2)50  $\mu$ g/kg群の1例で投与開始後9日より、25  $\mu$ g/kg群の1例で投与期間終了時に、血中カルシウム濃度の上昇を示したが、両群の他の例では異常は認められなかった。3)50  $\mu$ g/kg群の血中カルシウム濃度が高値を示した例では、BUNの上昇、腎臓の重量増加と石灰沈着などが認められた。4)血清中1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>濃度はOCT投与群で低値を示した。

【考察および結論】ミニブタを用いた2週間の経皮反復投与毒性試験を実施した結果、投与量に応じた薬物への暴露が確認され、ビタミンD<sub>3</sub>誘導体を持つ血中カルシウム増加作用などの毒性所見の経時的観察を評価する事が可能であった。

Experimental Technology of Percutaneous Toxicity Test in Miniature Swine; Experience with Vitamin D Analog

Shuichi Chiba<sup>1</sup>, Tomochika Matsushita<sup>1</sup>, Koji Otake<sup>1</sup>, Tsuneo Itoh<sup>1</sup>, Tadashi Asano<sup>1</sup>, Yoshihiko Ishitani<sup>2</sup>, Kazuo Tokuda<sup>2</sup>, Shotaro Takada<sup>2</sup>, Toshinari Yamamoto<sup>2</sup>, Kazuo Tokui<sup>2</sup>, Koichi Katagiri<sup>2</sup> and Yoji Mamiya<sup>3</sup> <sup>1</sup> Safety Assessment Laboratory, <sup>2</sup> Drug Metabolism Laboratory, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., 1-135 Komakado, Gotemba-shi, Shizuoka, <sup>3</sup> CSK Research Park Safety Assessment Laboratory, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., 6598 Toyoda, Suwa-shi, Nagano, Japan

ミニブタを用いた経皮反復投与毒性試験の試み  
—実験手技について—

○馬宮洋治<sup>1)</sup>、片桐公一<sup>1)</sup>、堤秀樹<sup>1)</sup>、田辺博<sup>1)</sup>、山口栄<sup>1)</sup>、常井和男<sup>1)</sup>  
千葉修一<sup>2)</sup>、松下智哉<sup>2)</sup>、浅野忠<sup>2)</sup>、石谷祥彦<sup>2)</sup>、谷川学<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>株式会社CSKリサーチパーク、<sup>2)</sup>中外製薬株式会社

【目的】ミニブタの皮膚はヒトと多くの類似点を有しており、経皮毒性試験に有用な実験動物と考えられている。しかし実験手技は充分には整備されておらず、他の動物種に比較して大型でハンドリングが困難であることから、経皮毒性試験では投与方法、投与下における薬物動態試験などの顔回採血をどのようにして行うかが要点であり、試験の実施にはこれら一連の連携した実験手技の確立が必要と考えられる。そこで今回、我々はミニブタを用いた2週間の経皮反復投与毒性試験の実施にあたり、関連した実験手技の検討、開発を行ったので報告する。

【手技】6～7カ月齢のミニブタ（CSK Miniature Swine）雄10匹を供試した。  
1.経皮投与方法：Moultonの式より全体表面積を算出し、その10%に相当する面積を投与範囲として、投与開始時から開放下で5時間維持出来るよう背部皮膚の適切な位置に設定した。毎回投与前に角質層を傷つけないよう配慮しながら除毛し軟膏を剤型とする薬剤を軟膏ヘラを用いて塗布し、5時間経過後に拭き取り投与終了とした。2.顔回採血法：予め麻酔下で前大静脈洞に静脈留置用カテーテルを留置しコネクタ一部分を背部に導き採血経路とした。この経路より投与した状態で薬物動態試験を実施した。

【結果・考察】投与部位のケージ面への僅かな接触は観察されたが、背部皮膚への投与位置の設定は適切と思われ、カテーテル留置と併用することにより、ケージ内において無麻酔・無拘束下での投与と投与面を開放状態で長時間維持しながらの顔回採血を試験期間を通じて実施することが出来た。ミニブタは背部に四肢や口が届かないという身体的特徴があり、この点を利用した手技の検討と開発がミニブタを用いた経皮反復投与毒性試験の実施に重要であると考えられた。

Experimental Technology of Percutaneous Toxicity Test in Miniature Swine;  
Experimental Procedure

Yoji MAMIYA<sup>1)</sup>, Koichi KATAGIRI<sup>1)</sup>, Sakae YAMAGUTI<sup>1)</sup>, Hideki TSUTSUMI<sup>1)</sup>,  
Kazuo TOKOI<sup>1)</sup>, Shuichi CHIBA<sup>2)</sup>, Tomochika MATSUSHITA<sup>2)</sup>, Tadashi ASANO<sup>2)</sup>,  
Yoshihiko ISHITANI<sup>2)</sup> and Manabu TANIGAWA<sup>2)</sup>, CSK Research  
Park, Inc., <sup>1)</sup>6598 Toyada, Suwa-shi, Nagano, <sup>2)</sup>Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., 1-  
135 Komakado, Gotemba-shi, Shizuoka, Japan

ラット28日間反復投与試験法 "OECD Guideline 407 enhanced"  
確立のためのFlutamideを用いた予備的検討

○豊田和弘、渋谷 淳、田村 啓、萩谷高敏、畝山智香子、広瀬雅雄

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 病理部

【目的】内分泌かく乱化学物質のスクリーニングを目的としたラット28日間反復投与試験法 "OECD Guideline 407 enhanced" 確立のための予備的検討として、非ステロイド性抗androgen作用物質のFlutamideを用いて以下の試験を実施した。

【方法】7週齢のCrj:CD (SD) IGS系ラット雌雄各40匹を1群10匹の各4群に分け、Flutamideをコーン油に混じて、それぞれ4、1、0.25、0 (対照群) mg/kg/dayの用量で強制経口投与した。雄は投与回数を28回とし、最終投与の翌日に全生存動物を屠殺した。雌は膣スメア法にて性周期を観察し、28回投与の翌日から4日の間で発情静止期に相当する日に屠殺、或いは性周期の異常を認めた場合は28回投与の翌日に屠殺し、いずれも屠殺前日まで投与を継続することとした。

【結果及び考察】雌雄とも試験期間中Flutamideの投与に関連した臨床症状の異常は無く、中途死亡動物も認められなかった。雄では、Flutamide投与による変化として、精巣上体の絶対重量の低下と乳腺の腺房組織の萎縮が4及び1 mg/kg投与群で、血清中のテストステロンとエストラジオール値の上昇及び副生腺重量の低下が4 mg/kg投与群で認められたが、血液及び血清生化学検査、精子検査の結果においては明らかな変化は認められなかった。また、雌では、性周期をはじめとしていずれの検査項目においてもFlutamideの投与に関連した変化は認められなかった。今回の投与用量の設定は公比を4とし、3用量群と1対照群の計4群で試験を実施したが、微弱なホルモン作用を有する化学物質について、そのホルモン作用と無影響量 (NOEL) とを1回の試験で調べるためには、投与用量の設定や指標として用いる検査項目に関して更なる検討が必要と思われた。

Preliminary Repeated Dose (28 Days) Oral Toxicity Study of Flutamide to Establish "OECD Guideline 407 Enhanced" in Rats.

Kazuhiro TOYODA, Makoto SHIBUTANI, Toru TAMURA, Takatoshi KOUJITANI, Chikako UNEYAMA and Masao HIROSE. Division of Pathology, Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences, Tokyo 158-8501, Japan.

○角崎英志、福崎好一郎、前田 博、鬼頭 剛、宮高宏彰

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。我々は昨年の本学会においてカニクイザルを用いた3ヵ月間持続静脈内投与の方法および結果について報告した。今回はその方法に若干の変更を施したところ、良好な結果を得たので報告する。また、本方法を応用した病態モデル作出も試みたので、併せて報告する。【実験方法】塩酸ケタミン麻酔下で雌雄各4匹のカニクイザル(4~6才)の大腿静脈内にシリコンチューブを留置した。チューブの他側は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の中を通してシーベルにつなぎ、注射筒と接続した。動物にはジャケットを着せ、テーサー基部をジャケットに固定した。術後3日間は抗生物質を筋肉内投与した。生理食塩液を約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。投与ライン中に濾過滅菌フィルター(MILLEX-GV, 0.22 μm, 日本ミリポア株式会社)を挿入した。投与期間中は一般状態の観察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。【成績および総括】手術後、一般状態および体重推移には異常はみられなかった。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ず、前回報告した方法で得られた結果よりも良好な結果が得られた。また、本方法を応用し、グルコースおよびフルクトースを用いた耐糖能試験を実施中である。この結果は本学会で報告する。

A case of long-term continuous intravenous infusion in cynomolgus monkeys - II

Hideshi TSUSAKI, Koichiro FUKUZAKI, Hiroshi MAEDA, Go KITO and Hiroaki NIYAJIMA,  
Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd., Kagoshima, 891-1394 Japan

## Ethinyl Estradiol の Uterotrophic Assay における投与経路、投与期間及び再現性の検討

○野田修志、佐脇正邦、室井貴子、山崎寛治

財団法人 化学品検査協会 安全性評価技術研究所

[目的] 幼若雌ラットを用いた Uterotrophic assay の検出感度の比較を投与経路及び投与期間について、また結果の再現性について検討した。[材料と方法] エストロゲン作用物質として Ethinyl estradiol を用いた。動物は幼若雌ラットを使用した。投与は 1 群 12 匹とし、皮下(0, 0.06, 0.6, 6  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ )及び経口投与群(0, 0.06, 0.6, 6  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ )を設定した。投与期間は皮下、経口投与群の各用量 6 匹は 21 日齢から 3 日間、残り 6 匹は 21 日齢から 7 日間とした。最終投与の 6 時間後解剖し、子宮、卵巣の湿重量を測定した。また、再現性を検討するため、実験 2 として上述の実験 1 と同一方法で再実験を行った。[結果及び考察] 実験 1 において、剖検では、子宮腔内の水様性分泌物充満が、3 及び 7 日間皮下投与の 0.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  以上の群、3 及び 7 日間経口投与の 6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群で観察された。子宮の相対及び絶対重量では、3 日間皮下投与の 6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群、7 日間皮下投与の 0.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  以上の群、3 及び 7 日間経口投与の 6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群で統計学的に有意な増加が認められた。実験 2 において、剖検所見は実験 1 と同様であった。子宮の相対及び絶対重量では、3 日間皮下投与の 0.06  $\mu\text{g}/\text{kg}$  以上の群、7 日間皮下投与の 0.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  以上の群、3 及び 7 日間経口投与の 6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群で統計学的に有意な増加が認められた。実験 1 及び 2 いずれにおいても、より低い用量で子宮重量増加が検出できたのは皮下投与であった。しかし、投与期間に関しては、実験 1 では 7 日間、実験 2 では 3 日間投与の方が高感度であった。さらに、実験 1 では 0.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  以上の群で子宮重量の有意な増加がみられたのに対し、実験 2 では 0.06  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群でも増加がみられ、同一条件で実験を行ったにもかかわらず、再現性に乏しい結果が得られた。なお、本研究は平成 10 年度 NEDO の受託事業によって行われたものである。

Appraisal of Administration Routes, Its Periods and Data Reproducibility of Uterotrophic Assay with Ethinyl Estradiol in Immature Female Rats.

Shyuji NODA, Masakuni SAWAKI, Takako MUROI and Kanji YAMASAKI. Chemicals Assessment Center, Chemicals Inspection & Testing Institute, Japan.

河川水中より単離された変異原物質 PBTA-1 および PBTA-2 のヒトの薬物代謝酵素による代謝的活性化

○山崎義征<sup>1</sup>、藤田健一<sup>1</sup>、中山佳都夫<sup>1</sup>、若林敬二<sup>2</sup>、鎌滝哲也<sup>1</sup>

<sup>1</sup>北大・薬・代謝分析、<sup>2</sup>国立がんセンター・研・がん予

【目的】 2-[2-(Acetylamino)-4-[bis(2-methoxyethyl)amino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole (PBTA-1) および 2-[2-(acetylamino)-4-[N-2-(cyanoethyl)ethylamino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole (PBTA-2) は淀川支流の河川水から単離された。これらはサルモネラ菌 TA98 株を用いた Ames 試験においてラット肝 S9 mix 存在下で変異原性を示した。しかしヒトの酵素による代謝的活性化については検討されておらず、活性化の経路も同定されていない。そこでこれらの化学物質の活性化にヒトチトクローム P450 (CYP) が関与するか否か検討した。

【方法】 PBTA-1 および PBTA-2 について、当研究室で樹立したヒト CYP および NADPH-チトクローム P450 還元酵素 (OR) を同時に発現するサルモネラ菌 TA1538 株を用いて変異原性試験を行った。10 種のヒト CYP について検討した。さらにヒト CYP1A1 と OR およびサルモネラ菌の-Aセチル転移酵素 (OAT) を 3 種同時に発現するサルモネラ菌 TA1538 株を用いてアセチル抱合の関与も検討した。

【結果および考察】 PBTA-1 および PBTA-2 いずれも、ヒト CYP1A1 を発現するサルモネラ菌 TA1538 株を用いたときのみ復帰変異コロニーの増加を認めた。また、ヒト CYP1A1、OR および OAT を 3 種同時に発現する菌株を用いたときには、PBTA-1 および PBTA-2 の比活性はヒト CYP1A1、OR のみを発現する菌株を用いたときと比較してそれぞれ 80 倍および 40 倍高かった。以上、PBTA-1 および PBTA-2 はヒト CYP1A1 によって代謝的に活性化された後にアセチル抱合されて変異原性を示すことを明らかにした。

Metabolic Activation of PBTA-1 and PBTA-2 which were Isolated from River Water by Human Enzymes.

Yoshiyuki YAMAZAKI<sup>1</sup>, Ken-ichi FUJITA<sup>1</sup>, Kazuo NAKAYAMA<sup>1</sup>, Keiji WAKABAYASHI<sup>2</sup> and Tetsuya KAMATAKI<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Lab. of Drug Metab., Grad. Sch. of Pharm. Sci., Hokkaido Univ., Japan; <sup>2</sup>Cancer Prevention Div., Natl. Cancer Ctr. Res. Inst., Japan



○宮本昌美<sup>1</sup>、梅津有理<sup>1</sup>、秋田弘俊<sup>2</sup>、澤村祐一<sup>3</sup>、横田淳<sup>4</sup>、國頭英夫<sup>5</sup>、根本信雄<sup>6</sup>、有吉範高<sup>1</sup>、鎌滝哲也<sup>1</sup>

1)北海道大学・大学院薬学研究科・代謝分析学分野、2)北海道大学・医学部・内科学第一講座、3)円山クリニック、4)国立がんセンター・研究所、5)国立がんセンター・中央病院、6)富山医科薬科大学・薬学部

**[目的]** CYP2A6 は、タバコ煙に含まれる 4-(メチルニトロソアミノ)-1-(3-ピリジル)-1-ブタノン (NNK) 等のがん原物質の代謝的な活性化に関与する薬物代謝酵素である。したがって CYP2A6 の酵素活性が低いヒトでは NNK の究極発癌物質への変換が少なく、発がんリスクが低い可能性が考えられる。一方当研究室では、本酵素活性を完全に欠失する CYP2A6 遺伝子全欠損型変異を日本人から初めて見出した。そこで今回、CYP2A6 遺伝的多型と肺がんリスクの関連性の有無を明らかにすることを目的とした。

**[方法]** 当研究室で開発した遺伝子診断法を用いて日本人健常者 127 名 (平均年齢 58.3 歳) および肺がん患者 260 名 (同 62.1 歳) の CYP2A6 遺伝子型を判定し、オッズ比 (OR) と 95% 信頼区間 (95% CI) により、肺がんリスクと遺伝子型、アリル型の関連を評価した。

**[結果]** 遺伝子型で見た場合、CYP2A6 全欠損型変異をホモ接合体で有するヒトの頻度は、健常者に対し肺がん患者で低かった。OR は野生型遺伝子をホモで有する場合を 1.00 としたとき、全欠損型遺伝子をホモで有する場合には 0.16 (95% CI: 0.04 - 0.57) と有意に低かった。アリル頻度でも、健常者に対して肺がん患者の全欠損型アリル頻度は低く、野生型アリル群の OR を 1.00 としたとき、全欠損型アリル群の OR は 0.43 (95% CI: 0.28 - 0.67) と有意に低かった。以上のことから、CYP2A6 全欠損型遺伝子の頻度と肺がんリスクには関連性が認められた。

Relationship between Genetic Polymorphism of CYP2A6 and Lung Cancer Risk

Masami MIYAMOTO<sup>1</sup>, Yuri UMETSU<sup>1</sup>, Hirotohi AKITA<sup>2</sup>, Yuichi SAWAMURA<sup>3</sup>, Jun YOKOTA<sup>4</sup>, Hideo KUNITOU<sup>5</sup>, Nobuo NEMOTO<sup>6</sup>, Noritaka ARIYOSHII<sup>1</sup> and Tetsuya KAMATAKI<sup>1</sup>.

1)Laboratory of Drug Metabolism, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, 2)First Department of Medicine, Hokkaido University School of Medicine, 3)Maruyama Clinic, 4)National Cancer Center Research Institute, 5)National Cancer Center Hospital, 6)Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toyama Medical and Pharmaceutical University

ヒトフェノール硫酸転移酵素、アリルアミンN-アセチル転移酵素の  
遺伝子多型と尿路上皮癌感受性

○小澤正吾<sup>1</sup>、加藤貴彦<sup>2</sup>、稲富久人<sup>3</sup>、松本哲朗<sup>3</sup>、大野泰雄<sup>1</sup>

<sup>1</sup>国立医薬品食品衛生研究所・薬理部、

<sup>2</sup>産業医大・保健情報、<sup>3</sup>産業医大・泌尿器科

[目的] ヒト肝をはじめとする組織に発現しているフェノール硫酸転移酵素分子種のうち、ST1A3 (TS-PST) やアリルアミン N-アセチル転移酵素 (NAT2) は、N-ヒドロキシ-4-アミノピフェニルなど N-水酸化癌原アミンの代謝活性化能を有する。4-アミノピフェニルはタバコの煙に含まれ、膀胱癌との関連が疑われている。我々は、ST1A3 につき、アミノ酸置換を伴う遺伝子多型 (R213H) を日本人について認めた。また、NAT2 については、遺伝子型と NAT2 の酵素活性形質 (迅速・遅延) が予測できる。これら遺伝子多型と尿路上皮癌感受性との関連を調べるため、日本人尿路上皮癌患者と健常者間で、異型酵素遺伝子の出現頻度を比較した。また、ST1A3 および NAT2 の遺伝子型の組み合わせが尿路上皮癌感受性に及ぼす影響を調べた。[方法] 尿路上皮癌患者 (166 名)、および健常者群 (214 名) の白血球よりゲノム DNA を抽出し、ST1A3、NAT2 遺伝子型を PCR-RFLP 法で判定した。種々の遺伝子型と尿路上皮癌感受性との関連を odds ratio (OR) を求めて解析した。[結果と考察] 今回、調べた尿路上皮癌患者について、ST1A3 (<sup>213</sup>R/R) ホモのヒトの OR は 1.25 (95% CI, 0.78-2.03)、NAT2 の遅延型アリのホモのヒトの OR は 2.11 (95% CI, 1.08-4.26) であった。ST1A3 の <sup>213</sup>H アリルを一個以上有し、かつ NAT2 迅速型のヒトに対し、NAT2 遅延型のヒトの OR は 2.07 (0.48-9.84) であった。さらに、ST1A3 の <sup>213</sup>R アリルのホモで、NAT2 遅延型のヒトの OR は 2.45 (95% CI, 1.04-5.98) であり、ST1A3 の <sup>213</sup>R 型アリルは NAT2 遅延型アリルによる尿路上皮癌感受性を高めることが示された。

Genetic polymorphisms of carcinogen-activating human phenol sulfotransferase and arylamine N-acetyltransferase, and urothelial cancer susceptibility

Shogo OZAWA<sup>1</sup>, Takahiko KATOH<sup>2</sup>, Hisato INATOMI<sup>3</sup>, Tetsuro MATSUMOTO<sup>3</sup>, Yasuo OHNO<sup>1</sup>. <sup>1</sup> Div. Pharmacol., NIHS, Tokyo 158-8501; <sup>2</sup> Dept. HealthSci. Inf., UOEH; <sup>3</sup> Dept. Urology, UOEH., Kitakyushu 807-8555

4-Hydroxy-2(*E*)-nonenal エナンチオマー：(*S*)-エナンチオマー選択的な glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase の不活性化とラット glutathione *S*-transferase A4-4 による解毒

○平塚 明、広瀬健一郎、渡部 烈

東京薬科大学・薬学部・第二衛生化学教室

【目的】生体内脂質過酸化反応において *n*-6 系の多不飽和脂肪酸残基の過酸化物の分解により生成される 4-hydroxy-2(*E*)-nonenal (4-HNE) は、タンパク質や核酸に対する反応性が高く、細胞毒性や遺伝毒性を示すことが知られている。一方、過酸化脂質から生成する 4-HNE はラセミ体であることが知られているが、4-HNE エナンチオマー間における毒性発現ならびに解毒代謝に関する立体選択性については全く不明である。そこで、本研究ではその点を解明することを目的とした。

【方法】4(*R*)-または 4(*S*)-HNE を、市販の rabbit muscle glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) と 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2 中でインキュベーションし、残存 GAPDH 活性を測定した。ラット(*r*) GSTA4-4 は、大腸菌発現酵素を常法により精製し使用した。

【結果・考察】1) 4-HNE エナンチオマーは、GAPDH 活性を強く阻害し、その阻害効果には 4(*S*) > 4(*R*) の立体選択性が認められた。2) ラット肝可溶性画分における 4-HNE の解毒代謝反応は、GSH 抱合 >> NADH 依存的還元 > NAD<sup>+</sup> 依存的酸化の順に低下した。3) 上記の GSH 抱合反応 (4(*S*) > 4(*R*)) ならびに NADH 依存的還元反応 (4(*R*) > 4(*S*)) には立体選択性が認められたが、NAD<sup>+</sup> 依存的酸化反応には立体選択性は認められなかった。4) ラット肝における 4-HNE の主要解毒酵素である *r*GST A4-4 による GSH 抱合反応は、4(*S*) > 4(*R*) の立体選択性が認められ、4(*S*)-HNE は 4(*R*)-エナンチオマーに比べ、*k*<sub>cat</sub>/*K*<sub>m</sub> 値でおよそ 4 倍、*K*<sub>m</sub> 値でおよそ 1/3 の値を示した。上記の結果より、4-HNE の主要解毒酵素である *r*GST A4-4 は、GAPDH 活性の阻害効果の強い 4(*S*)-HNE を選択的に解毒抱合することがはじめて明らかとなった。

4-Hydroxy-2(*E*)-nonenal enantiomers: (*S*)-selective inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and detoxication by rat glutathione *S*-transferase A4-4

Akira HIRATSUKA, Kenichiro HIROSE, and Tadashi WATABE

Dept. of Drug Metab. Mol. Toxicol., School of Pharm., Tokyo Univ. Pharm. Life Sci., Tokyo 192-0392, Japan.

ヒト dihydropyrimidine dehydrogenase の 5-(2-bromovinyl)uracil による  
自殺阻害機構

○西山貴仁、小倉健一郎、須田一真、波部 烈

東京薬科大学・薬学部・第二衛生化学教室

【目的】抗ウイルス薬 sorivudine (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) により不可逆的に不活性化されるために 5-FU の組織内濃度が致死的レベルまで異常に上昇したためであることを我々は既にラットを用いたトキシコキネティクス試験ならびにラットおよびヒト精製 DPD (hDPD) を用いた阻害実験から明らかにした。本研究では BVU による hDPD の阻害機構および修飾部位を明らかにすることを目的とした。

【方法】hDPD と [<sup>14</sup>C]BVU を NADPH 存在下インキュベートし不可逆的に不活性化して得た放射性 hDPD をトリプシンにより限定分解し、得られた放射性ペプチドについてアミノ酸配列の解析および MALDI-TOF 質量分析計を用いて質量分析を行った。

【結果・考察】NADPH 共存下で [<sup>14</sup>C]BVU によって不活性化した hDPD より 2 種の放射性ペプチド断片を単離し、全アミノ酸配列 (22 および 23 アミノ酸残基) を解析した結果、DPD の基質結合部位と推定されているピリミジン結合部位と一致していた。その配列中に唯一存在する 671 番目の Cys 残基はいずれも解析不能であった。質量分析より、アミノ酸配列分析で、解析不能であった Cys 残基を加えて計算される質量より 139 Da だけ増加した分子イオンピークが検出された。以上の結果、hDPD の BVU による不活性化は、BVU から hDPD によって代謝的に生成する活性代謝物 5,6-dihydro-5-(2-bromoethylidene)uracil が hDPD のピリミジン結合部位中に存在する 671 Cys 残基の SH 基を共有結合的に修飾することによる自殺阻害 (mechanism-based inhibition) に起因することが明らかになった。

Mechanism-based inhibition of human dihydropyrimidine dehydrogenase by 5-(2-bromovinyl)uracil

Takahito NISHIYAMA, Kenichiro OGURA, Kazuma SUDA, and Tadashi WATABE.  
Dept. of Drug Metab. Mol. Toxicol., School of Pharm., Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.,  
Tokyo 192-0321, Japan.

雄性 Nts:Mini ラットの肝薬物代謝酵素: Cytochrome P450s  
および flavin-containing monooxygenase 1 (FMO1)

○谷 吉朗<sup>1,2</sup>, 山本 秀樹<sup>1</sup>, 川地 晶子<sup>1</sup>, 水野 初枝<sup>1</sup>,  
福重 潤一郎<sup>1</sup>, 細川 常通<sup>1</sup>, 土井 邦雄<sup>2</sup>

<sup>1</sup>三共・安全研, <sup>2</sup>東京大・農・獣医病理, <sup>3</sup>摂南大・薬・毒性

**【目的】** Nts:Mini ラットは、近年開発された transgenic 動物で、Wistar/Jel ラットに導入されたラット成長ホルモン (GH) の antisense DNA の働きにより GH レベルが Wistar ラットに比べて低値を示す。一方ラットでは、肝薬物代謝酵素である cytochrome P450 の isoform の一部が GH によって制御されていることが知られている。今回 Mini ラットの肝 P450s (CYP2B1/2, CYP2E1, CYP3A2, CYP2C11) について、その活性および Western blot 法によるタンパク発現を調べ、Wistar ラットとの比較を試みた。また、同じく肝薬物代謝酵素である FMO1 についても同様に調べた。**【材料と方法】** 雄性 Wistar ラットおよび Mini ラット (6, 14, 26 週齢, 各週齢 n=4) を用いた。肝ミクロソームを調製し、P450 総含有量、各 P450 分子種および FMO の活性、ならびに各 P450 分子種および FMO1 の相対的タンパク量を測定した。系統間および週齢間の差は、交互作用を考慮した 2-way ANOVA および Fisher's protected LSD 法により検定した。**【結果・考察】** P450 総含有量はいずれの週齢でも Mini ラットは Wistar ラットに比べて低値を示した。雄型の P450 である CYP2C11 および CYP3A2 は、Mini ラットにおいて活性、タンパク量とも抑制がみられた。これらの変化は GH レベルが低いことに起因する変化と考えられ、P450 総含有量の低値はこれらの分子種の発現抑制によるものと考えられる。CYP2B1 は活性、タンパク量とも Mini ラットが低値を示し、CYP2E1 および CYP2B2 のそれらは高値を示した。Mini ラットにおける CYP2B1 以外の P450s の活性およびタンパク量の正常動物からの変動は、GH 欠乏ラットモデルである下垂体除去ラットや dwarf ラットにおける過去の報告と一致した。一方、Mini ラットの肝 FMO1 のタンパク量は Wistar ラットに比べて高値を示したが、FMO 活性は Wistar ラットと同等であったことから、FMO の発現に関しては GH は促進的には作用しないことが示唆された。以上の結果から、Mini ラットは肝薬物代謝酵素の GH による制御を研究するうえで、興味深い動物であると思われる。

Hepatic microsomal drug-metabolizing enzymes in male Nts:Mini rats: Cytochrome P450s and flavin-containing monooxygenase 1 (FMO1).

Yoshiro TANI<sup>1,2</sup>, Hideki YAMAMOTO<sup>1</sup>, Akiko KAWAJI<sup>1</sup>, Hatsue MIZUNO<sup>1</sup>, Junichiro FUKUSHIGE<sup>1</sup>, Tsunemichi HOSOKAWA<sup>1</sup> and Kunio DOI<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Laboratory Animal Science and Toxicology Laboratories, Sankyo Co., Ltd., Tokyo 140-8710, Japan, <sup>2</sup>Department of Veterinary Pathology, Faculty of Agriculture, The University of Tokyo, Tokyo 113-8657, Japan and <sup>3</sup>Department of Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Science, Setsunan University, Osaka 573-0101, Japan.

ラット単離肝細胞における MPTP の代謝および肝細胞毒性  
—解毒酵素としてのアルデヒド酸化酵素の意義について—

○吉原 新一, 原田 敬輔, 太田 茂

広島大・医・総合薬

【目的】 既に我々は無細胞系において肝可溶性酵素のアルデヒド酸化酵素(AO)が Parkinsonism 発症物質 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)の MAO-B による酸化中間体MPDP<sup>+</sup>を効率的に MPTP lactam へ変換することにより、活性代謝物 MPP<sup>+</sup>の生成を抑制しうることを明らかにしている。そこで今回、AO の解毒酵素としての意義を明らかにすべく AO 活性変動が及ぼす MPTP 代謝への影響並びにそれらと肝細胞毒性との関連性についてラット単離肝細胞を用いて検討した。

【方法】 雄性 Jcl:Wistar の肝からコラゲナーゼ灌流法により調製した単離肝細胞を 95%O<sub>2</sub>:5%CO<sub>2</sub> 気相下 1 mM MPTP と 2 時間インキュベートし、生成する代謝物を HPLC により定量した。また、AO 基質 1 mM 2-Hydroxypyrimidine(2-OH PM)共存下にも同様のインキュベーションを行った。一方、肝細胞毒性の指標として Trypan blue exclusion test による viability の変化およびメディウム中への乳酸脱水素酵素 (LDH)の漏出を経時的に観察した。【結果および考察】 2-OH PM 非存在下では MPP<sup>+</sup>に次ぐ主代謝物として MPTP lactam の経時的生成が認められた。2-OH PM 共存下では MPTP lactam の生成が抑制され、相補的に MPP<sup>+</sup>の生成が増大した。このことは 2-OH PM による AO の拮抗阻害の結果、MPDP<sup>+</sup>から MPTP lactam への代謝が抑制され MPP<sup>+</sup>の生成が促進されたことを意味する。一方、MPTP 非存在下や 2-OH PM 単独存在下では殆ど変化が認められない肝細胞毒性の指標も 1 mM MPTP 存在下では経時的な viability の低下および LDH 活性の上昇が認められた。これらの細胞毒性指標は 2-OH PM 共存下では明らかな増加傾向を示した。以上の結果は肝 AO が MPTP 代謝において極めて重要な解毒酵素として機能していることを示唆するものである。

Metabolism and Toxicity of MPTP in Isolated Rat Hepatocytes: Relevance of Hepatic Aldehyde Oxidase as a Detoxification Enzyme in MPTP Metabolism.

Shin'ichi YOSHIHARA, Keisuke HARADA and Shigeru OHTA  
Institute of Pharmaceutical Sciences, Hiroshima University School of Medicine,  
1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8551, Japan.

Crj:CD (SD) IGS ラットと Crj:CD (SD)ラットにおける薬物代謝酵素の比較

○笠間菊子、田中あづさ、小島幸一

財団法人食品薬品安全センター薬野研究所

チャールス・リバー㈱が、遺伝的分岐を最小限にして均一な実験動物を供給するために考案した Gold standard system により生産された Crj:CD (SD) IGS ラットについて各種肝薬物代謝酵素を測定し、従来の方式により生産された Crj:CD (SD)ラットの測定値と比較した。

測定には日本チャールス・リバー㈱から4週齢で提供された Crj:CD (SD) IGS ラットおよび Crj:CD (SD) ラットを金属製ケージに個別に収容し、固型飼料 (CE-2) および水道水を自由に摂取させて9、18および31週齢(4、13および26週間試験に相当)の剖検時まで飼育した動物を用いた。剖検時に採血後すみやかに肝を摘出し、重量を測定した後、外側左葉を分取し、直ちに1.15% 塩化カリウム溶液で灌流した。その後通常の手順に従い、マイクロソーム画分および上清画分を採取し、マイクロソーム画分については Aminopyrine-N-demethylase、Aniline-*p*-hydroxylase、7-Ethoxycoumarin-O-deethylase、UDP-glucuronyltransferase 活性を、上清画分については Glutathione-S-transferase 活性を測定した。

Crj:CD (SD) IGS ラットと Crj:CD (SD) ラットの測定値を比較したところ、Aminopyrine-N-demethylase、Aniline-*p*-hydroxylase、7-Ethoxycoumarin-O-deethylase のマイクロソーム蛋白あたりの活性が Crj:CD (SD) IGS ラットの雄の9、18および31週齢および雌の9週齢において高値を示した。

以上の結果から、薬物によっては Crj:CD (SD) IGS ラットと Crj:CD (SD) ラットで毒性発現量に差が生じる可能性があると考えられた。

A comparison of drug metabolizing enzymes between Crj:CD(SD)IGS and Crj:CD(SD) rats

Kikuko KASAMA, Azusa TANAKA and Kohichi KOJIMA, Hatano Research institute, Food and Drug Safety Center, Kanagawa 257-8523, Japan.

○関戸徹, 勝谷成男, 青木豊彦, 佐神文郎

エーザイ株式会社 開発安全性研究部

[目的] ICH S1B ガイドラインが施行され, 現在, 医薬品のがん原性を評価する試験の代替法の一つとしてトランスジェニック動物を用いた validation 試験が国際共同研究として進行中である。このトランスジェニック動物を用いた試験系においては, 活性代謝物による発がんという観点から, これらの動物における薬物代謝能が遺伝子導入あるいは改変によって影響を受けていないことが重要である。今回, 我々はトランスジェニック動物を用いたがん原性代替試験に用いられている遺伝子導入動物のひとつである CB6F1-TgrasH2 (TgrasH2) マウスにおける肝薬物代謝酵素を調べるとともに, 国際共同研究の化合物の一つである clofibrate を TgrasH2 マウスに投与した際の肝薬物代謝酵素に対する影響を併せて検討した。

[方法] 16 週齢の雌雄の Tg-rasH2 マウスおよび rasH2 遺伝子が導入されていない CB6F1-nonTgrasH2 (non-TG) マウスに, clofibrate の 500 mg/kg または媒体を 12 日間反復経口投与した。投与終了後, これらの動物の肝臓を摘出し, 肝ホモジネートおよび肝ミクロソームを調製した。肝ミクロソームのチトクローム P450 および b5 量と薬物代謝活性(アミノピリン N-脱メチル化活性, アニリン水酸化活性, ベンズフェグミン N-脱メチル化活性, p-ニトロアニソール O-脱メチル化活性)を測定した。

[結果] Tg-rasH2 マウスと non-TG マウスの比較では, チトクローム P450 および b5 量と肝薬物代謝酵素活性には差はなく, 遺伝子導入による影響は認められなかった。clofibrate を投与した際には, Tg-rasH2 マウスと non-TG マウスともに肝臓の体重に対する相対重量が増加し, 肝ミクロソームあたりの蛋白量が増加がみられた。尚, 現在, チトクローム P450 分子種およびペルオキシソーム酵素活性等を測定中である。

Hepatic Drug Metabolizing Enzymes in CB6F1-TgrasH2 Mice.

Tohru Sekido, Naruo Katsutani, Toyohiko Aoki and Fumio Sagami,  
Department of Developmental Safety Assessment Research, Eisai Co., Ltd.



イヌの肝臓および消化管における P450(CYP2B11, CYP3A12)  
の局在

○丸山敏之, 渡邊 弘, 松井信志, 馬場隆彦, 三好貴子, 星元満里子,  
大野浩司

塩野義製薬 新薬研究所安全性研究部門

[目的]薬物経口投与時の初回通過代謝が注目され、肝臓及び消化管における薬物代謝酵素(P450)分子種の誘導や阻害を介した薬物相互作用がヒト及び動物で検討されている。一方、ヒト及び動物の P450 は分子種の違いにより組織内の局在が異なることが知られ、薬物投与時の肝障害の肝小葉内領域選択性の一因となる可能性も指摘されている。P450 分子種による肝小葉内の局在や消化管における局在についてはヒト及びラットで報告されているが、イヌに関する報告はない。今回、ビーグル犬の肝臓及び消化管について、P450 分子種の違いによるそれぞれの肝小葉内及び消化管上皮における局在を明らかにする目的で、二種類の P450 (CYP2B11, CYP3A12) に対する抗血清を用いた免疫組織化学により、無処置、phenobarbital (PB) 投与あるいは rifampicin (RIF) 投与後のそれぞれの局在と誘導時の局在の変動及び染色性の変化を検討した。[方法]無処置及び PB(20mg/kg/day)あるいは RIF (10mg/kg/day) をそれぞれ 7 日間連続投与したビーグル犬の肝臓及び小腸について CYP2B11, CYP3A12 に対する免疫組織学的及び免疫電顕的検討を行った。また、ELISA 法により肝臓及び消化管上皮の各酵素量を測定すると共にマーカー酵素である 16  $\alpha$ -OHT, 6  $\beta$ -OHT 活性を測定した。[結果]無処置例では CYP2B11 は肝小葉辺縁域、CYP3A12 は小葉中心域に局在を示した。PB 及び RIF 投与例の肝細胞は腫脹及び好酸性変化を示し、免疫組織学的に小葉全体が両酵素の強い陽性所見を示した。小腸上皮は、無処置例の絨毛表層部に CYP3A12 の弱い陽性所見を認め、RIF 投与例では陽性所見の増強と陽性領域の拡大を認めたが、CYP2B11 は無処置及び薬物投与例共に明らかな陽性所見を示さなかった。ELISA 及び生化学的検討結果は組織学的検討結果を裏付けるものであった。

Distribution of P450(CYP2B11, CYP3A12) in the liver and intestine of dogs.

Toshiyuki MARUYAMA, Hiroshi WATANABE, Shinji MATSUI, Takahiko BABA,  
Mariko HOSHIMOTO, Kouji OHNO, Safety Research Division, Developmental  
Laboratories, SHIONOGI, Toyonaka-561-0825 JAPAN

ラット小腸における酸化的薬物代謝活性に関する基礎検討 (I)  
 Testosterone hydroxylase 活性の性差、加齢性変化

○若林美津子、京川吉正、原内敏夫、大野浩司

塩野義製薬・新薬研究所

[目的] 薬物経口投与時の小腸における初回通過代謝が注目され始め、肝臓だけでなく小腸におけるCytochrome P450(P450)の誘導や阻害を介した薬物相互作用も問題となってきた。その結果、医薬品開発の早い段階で開発候補化合物のP450に対する影響を肝臓だけでなく小腸も含めて解析評価することが重要となってきた。そこで今回、最も汎用されている実験動物種であるラットを用い小腸におけるP450関与の薬物代謝酵素活性の性差及び加齢性変化の有無について基礎検討を行った。

[方法] 雌雄SD系ラット(6, 8, 12, 20, 32週齢)から肝臓及び小腸を採取し、それぞれマイクロゾームを調製した。これを用いてTestosterone 6 $\beta$ -, 16 $\alpha$ -, 16 $\beta$ -hydroxylase(6 $\beta$ -, 16 $\alpha$ -, 16 $\beta$ -OHT)活性を測定し性差及び加齢性変化について検討すると共に、各P450分子種に対する抗血清を用いた添加阻害実験を行い6 $\beta$ -, 16 $\alpha$ -, 16 $\beta$ -OHT活性を触媒するP450分子種の同定を試みた。

[結果] 小腸における6 $\beta$ -, 16 $\alpha$ -, 16 $\beta$ -OHT活性は肝臓に比べ低いものの、肝臓とは異なり殆ど性差は認められなかった。また、雌雄共に小腸の6 $\beta$ -OHT活性は抗CYP3A1抗血清で、16 $\alpha$ -, 16 $\beta$ -OHT活性は抗CYP2B1抗血清で強く阻害された。さらに、これら活性は生後20週以降に低下を示し、特に雄で著しく、12週までの活性に比べ1/5以下のレベルとなり、加齢に伴い低下することが確認された。これらの結果は、経口剤の消化管吸収時の初回通過代謝への小腸P450の寄与を評価する場合や長期反復投与毒性試験において留意すべきであろう。

Oxidative Drug Metabolizing Activity in Rat Small Intestine (I). Sex-, and Age-related Differences in Testosterone Hydroxylase Activities.

Mitsuko WAKABAYASHI, Yoshimasa KYOKAWA, Toshio HARAUCHI and Kouji OHNO. Developmental Research Laboratories, SHIONOGI & CO. LTD., Toyonaka 561-0825, Japan.

ラット小腸における酸化薬物代謝活性に関する基礎検討 (2)  
 Testosterone hydroxylase 活性に及ぼす各種誘導剤の影響

○大野浩司, 若林美津子, 京川吉正, 原内敏夫

塩野義製薬・新薬研究所

[目的] Cytochrome P450(P450)の誘導は薬物相互作用を引き起こす主な要因の一つとなっている。近年、薬物経口投与時の小腸における初回通過代謝が注目され始め、小腸におけるP450の誘導も考慮する必要性が生じている。したがって、医薬品開発の早い段階で開発候補化合物のP450に対する影響を肝臓だけでなく小腸も含めて解析評価することが重要となってきた。そこで今回、ラットに各種誘導剤を反復経口投与し小腸におけるP450関与の薬物代謝酵素活性に及ぼす影響について検討した。

[方法] 雌雄SD系ラット(7~8週齢)にPhenobarbital(PB, 80 mg/kg/day, for 4 days)又はClotrimazole(CLT, 50 mg/kg/day, for 3 days)を反復経口投与し、最終投与24時間後に肝臓及び小腸を採取してマイクロゾームを調製した。これを用いてTestosterone 6 $\beta$ -, 16 $\alpha$ -, 16 $\beta$ -hydroxylase(6 $\beta$ -, 16 $\alpha$ -, 16 $\beta$ -OHT)活性を測定し、さらに、各P450分子種に対する抗血清を用いた添加阻害、Western Blotting及びELISAを行い、各P450分子種の量的変動を確認した。

[結果] PB又はCLT投与によって雌雄共に小腸の16 $\alpha$ -, 16 $\beta$ -OHT活性は4~5倍上昇し、この活性上昇は抗CYP2B1抗血清の添加により消失した。また、Western Blotting及びELISAの結果、小腸CYP2Bの発現増加(約5倍)が確認され、PB又はCLTによる小腸CYP2Bの明らかな誘導が確認された。一方、6 $\beta$ -OHT活性及びCYP3Aの発現量は、これら誘導剤の投与によって肝臓では著しく上昇もしくは増加したのに対し、小腸の6 $\beta$ -OHT活性及びCYP3Aの発現量は全く変化を示さなかった。以上の結果から、PBやCLTに対するCYP3Aの応答性が肝臓と小腸では異なることが確認された。

Oxidative Drug Metabolizing Activity in Rat Small Intestine (2). Changes in Testosterone Hydroxylase Activities by Treatment with Phenobarbital and Clotrimazole.

Kouji OHNO, Mitsuko WAKABAYASHI, Yoshimasa KYOKAWA and Toshio HARAUCHI. Developmental Research Laboratories, SHIONOGI & CO. LTD., Toyonaka 561-0825, Japan.

○篠内桃子、宮島敦子、小澤正吾、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】柑橘類の防カビ剤として食品添加物に指定されているジフェニル Diphenyl は、雌BDF1マウスに肝癌を発生させることが報告されている。発癌に関与する化学物質には、酵素誘導能を有する物のあることが知られている事から、ジフェニルがBDF1マウスのペルオキシゾーム酵素および薬物代謝酵素におよぼす影響について検討した。

【方法】10週齢の雌雄BDF1マウスに、ジフェニルを2.6および5.2 mmol/6 ml corn oil/kg、クロフィブラート2.6mmol/6 ml cornoil/kgを屠殺72、48および12時間前に経口投与した。肝ホモジネートのKCN-非感受性パルミトイルCoA (PCoA)酸化活性とミクロゾーム分画におけるラウリン酸11、12-水酸化(LA 11-OH/12-OH)活性、ペントキシレゾルフィンO-脱ベンチル化(PROD)活性、cytochrome P450 (P450)とb5 (b5)含量およびWestern blot法によりCYP分子種について検討した。

【結果・考察】無処置群ではLA 11-OH活性とPROD活性は雌雄間で有意な差が認められ、雌では雄の2倍高い値を示した。ジフェニルは肝臓の相対臓器重量に影響をおよぼさなかったが、ジフェニル2.6および5.2 mmol/kgの雌への投与により、ペルオキシゾーム増殖の指標であるPCoA酸化活性は対照群の1.5倍と1.8倍に、CYP 4A型の代謝酵素であるLA 12-OH活性はそれぞれ3.5倍と5倍に上昇した。CYP2B酵素であるPROD活性は1.8倍に上昇した。LA 11-OH活性、P450 およびb5含量の増加はわずかであったが、CYP4A蛋白は強く増加された。一方雄では、クロフィブラートによる誘導は認められたものの、ジフェニル投与によるPCoA 活性、12-OH活性およびCYP4A蛋白の増加は認められなかったことから、BDF1マウスで見られたジフェニルの毒性発現の性差には、酵素誘導における性差の関与が示唆された。

Effects of diphenyl on hepatic drug-metabolizing enzymes in BDF1 mice.

Momoko SUNOUCHI, Atsuko MIYAJIMA, and Yasuo OHNO

Division of Pharmacology, Biochemical safety Research Center, NIHS, Tokyo 158-8501, Japan

## 2-Mercaptobenzimidazole(MBI)およびそのメチル誘導体のラット肝薬物代謝酵素系に及ぼす影響について

○宮島敦子、籾内桃子、引間知広、酒見和枝、津田充石、大野泰雄

国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験センター・薬理部

【目的】 MBIおよびそのメチル誘導体MMBI(4-MMBI, 5-MMBIの1:1混合物)は、ゴム等の老化防止剤として使用されている。両化合物をラットに反復経口投与するとMBIでのみ著しい甲状腺毒性と血中濃度の上昇がみられた。そこで、MBIおよびMMBIを用いてラット肝薬物代謝酵素系に及ぼす影響について検討を行なった。

【方法】 5週齢のWistar系雄ラットに、MBI(0.3 mmol/kg), 4-, 5-MMBI(0.6 mmol/kg), MMBI mix(0.6, 1.2 mmol/kg)を8日間経口投与し、甲状腺および肝臓を摘出した。対照群および薬物投与群の肝臓よりマイクロゾーム画分を調製し、7-Ethoxycoumarin, 7-Ethoxyresorufin, 7-Pentoxeresorufinの脱アルキル化活性(ECOD, EROD, PROD)、Cytochrome P450含量およびNADPH-cytochrome P450 reductase活性(P450 red)について測定した。またWestern blot法により誘導されるCYP分子種について検討した。

【結果・考察】 いずれの薬物投与群においても対照群に比べて、甲状腺および肝臓の相対臓器重量は有意に増加していた。肝臓より調製したマイクロゾーム画分の薬物代謝酵素活性について測定した結果、ECODはMBI投与群では約1/2に減少し、4-, 5-MMBI, MMBI mix投与群では1.3~2.0倍に上昇した。ERODは5-MMBI投与群では4.2倍、4-MMBI, MMBI mix投与群では10~13倍に上昇した。PRODは全投与群で上昇し、特に5-MMBI, MMBI mix(1.2)投与群では各々4.9, 5.3倍に上昇した。一方、MBI投与群においてはP450含量が有意に減少し、P450 redは対象群約1/2まで低下しており、甲状腺毒性の発現の差には、薬物代謝酵素系の誘導と阻害の差が関与していると考えられた。さらにWestern blot法を用いた解析の結果、4-MMBI, MMBI mix投与群ではCYP1A1/2が、5-MMBI投与群ではCYP2B1/2がそれぞれ著しく誘導されており、4-MMBIと5-MMBIでは誘導されるCYP分子種が異なることが示唆された。

Effects of 2-Mercaptobenzimidazole(MBI) and its methyl derivatives MMBI on rat liver metabolic enzymes.

Atsuko MIYAJIMA, Momoko SUNOUCHI, Tomohiro HIKIMA, Kazue SAKEMI,  
Mitsuhiro TSUDA, and Yasuo OHNO  
Division of Pharmacology, Biochemical safety Research Center, NIHS, Tokyo 158-8501,  
Japan

Effects of Benzothiazole on the Xenobiotic Metabolizing Enzymes and Metabolism of Acetaminophen

Kyung Won Seo, Mijung Park, Jun Gyou Kim, Tae Wan Kim, OSe Young Choung\*, Hyo Jung Kim and Jooil Kim

National Institute of Toxicological Research, Korea Food and Drug Administration, \*Coll. of Pharmacy, Kyunghee Univ., Seoul, Korea

Benzothiazole (BT) is present in tobacco smoke and widely used as industrial and pharmaceutical purpose. In this study we have investigated the influence of BT on the activities of hepatic cytochromes P450 monooxygenases (P450s) and UDP-glucuronyltransferase (UDP-GT), sulfotransferase and glutathione-S-transferase (GST) in male Sprague-Dawley rats. We also examined if BT would change the metabolism and toxification of acetaminophen (AA) through modulation of metabolizing enzymes. BT (1mmol/kg, *p.o.*, 5 days) markedly increased the enzyme activities of P4501A1, 1A2, 2B1, 3A4, 2E1, UDP-GT and GST in liver. The conjugates of AA-glucuronide (AA-Glu) and AA-glutathione (AA-GS) in bile excreted for 2 hr, were quantified by HPLC in rats injected with AA (150 mg/kg, *i.v.*) after pretreatment of BT. BT significantly enhanced the AA-GS to 1.6 fold of control, whereas dramatically decreased AA-Glu to 34% of control in bile. After pretreatment of BT (1mmol/kg, *p.o.* 5 days) in ICR mice, potentiation of hepatotoxicity of AA (400 mg/kg, *i.p.*, 24 hr) was observed by measuring serum ALT activities. These results indicate that BT is potent inducer of P450s and phase II metabolizing enzymes. Moreover, increase of AA-GS conjugate and aggravation of AA hepatotoxicity by pretreatment of BT may be related to induction of P450s.

Effects of Benzothiazole on the Xenobiotic Metabolizing Enzymes and Metabolism of Acetaminophen

Kyung Won SEO, Mijung PARK, Jun Gyou KIM, Tae Wan KIM, Se Young CHOUNG\*, Hyo Jung KIM and Jooil KIM. National Institute of Toxicological Research, Korea Food and Drug Administration, \*Coll. of Pharmacy, Kyunghee Univ., Seoul, Korea

変異原・がん原物質を代謝的に活性化するヒトP450分子種の活性の  
緑茶カテキン類による阻害

○武藤重治、藤田健一、山崎義征、鎌滝哲也

北大・薬・代謝分析

【目的】毒性物質の多くは生体内の薬物代謝酵素系によって代謝的に活性化され、がん原性を含む毒性を獲得する。マウスやラットの肝において、がん原物質を代謝的に活性化する一部の分子種のチトクローム P450 (CYP) を緑茶に含まれるカテキン類が阻害することが報告されている。カテキン類は化学発がんを予防することが知られており、がん原物質の代謝的活性化の阻害がカテキン類による化学発がん予防の一因として考えられる。しかしながら、ヒトの CYP の活性のカテキン類による阻害については明らかにされていない。そこで、本研究ではヒト肝の CYP に対するカテキン類の阻害効果を検討した。

【方法】ヒト CYP 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より調製した膜面分を用い、各 CYP によるがん原物質の代謝的活性化の程度を Ames 試験により定量した。カテキン類をがん原物質と同時に添加した場合の復帰変異体数の減少により阻害効果を評価した。また、各 CYP 分子種に典型的な基質を用い、その代謝反応に対するカテキン類の阻害効果も検討した。

【結果】ベンゾ[a]ピレン (B[a]P)、アフラトキシン B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) はそれぞれ CYP1A1、CYP3A4 により代謝的に活性化される。20 μM の B[a]P および 20 μM の AFB<sub>1</sub> により誘発される復帰変異体数は 12.5 μM のエピガロカテキンガレートの添加により約 50% に減少した。また、EGCG は CYP1A1 によるエトキシマリン の脱エチル化反応および CYP3A4 によるミダゾラム 1'-水酸化反応も阻害した。K<sub>i</sub> 値はそれぞれ 17 μM および 14 μM であった。その他の CYP の活性もカテキン類が非特異的に阻害した。阻害は没食子酸基を持つカテキン類で強かった。以上の結果より、カテキン類がヒトの CYP を阻害し、がん原物質を含む毒性物質の活性化を抑制することが示唆された。

Inhibition of human cytochrome P450 involved in the metabolic activation  
of mutagens/carcinogens by catechins in green tea.

○Shigeharu MUTO, Ken-ichi FUJITA, Yoshiyuki YAMAZAKI, Tetsuya  
KAMATAKI

Lab. of Drug Metab., Grad. Sch. of Pharm. Sci., Hokkaido Univ., Japan

3-Methylcholanthrene(3MC)あるいは  $\beta$ -naphthoflavone(BNF)処置による  
CYP1A1/2 および aryl hydrocarbon receptor(AhR)の肝小葉内局在の変化

○五十嵐功, 渡辺稔之, 田中宏治, 瀬相信哉, 牧野俊彦, 渡辺真弓,  
大橋芳彦, 高岡雅哉, 真鍋淳

三共株式会社 安全性研究所

【目的】3MCあるいはBNFをラットに投与すると、肝臓ではCYP1A1/2が誘導される。しかし、それらの誘導部位は両化合物で異なり、3MC投与では肝小葉中心部、BNF投与では肝小葉辺縁部で誘導される。一方、aryl hydrocarbon(Ah)によるCYP1A1/2の誘導機構が分子レベルで明らかにされ、誘導には細胞質内に存在するAhRとAhの結合が必須と考えられている。そこで、本実験では、上記誘導部位の差がAhRの分布差によって発現している可能性を考え、各々の肝小葉内局在を検討した。

【材料および方法】F344ラット(10週齢、雄)に3MCあるいはBNFの1, 10および30 mg/kgを3日間連続腹腔内投与した。対照群にはコーンオイルを投与した。投与終了後、肝臓を採取してcytochrome P450(P450)の誘導の程度を生化学的に調べると共に、CYP1A1, CYP1A2およびAhRの局在を免疫組織化学的に検索した。

【結果および考察】3MCあるいはBNFによるP450の誘導が投与量の増加に依存して強くなることが生化学的検査において確認された。3MC投与群のCYP1A1, CYP1A2およびAhRの局在は、いずれも小葉内同領域の肝細胞に一致して認められ、投与量の増加に伴って小葉中心部から辺縁部へと拡大した。一方、BNF投与群では、CYP1A1およびCYP1A2の局在が投与量の増加と共に小葉辺縁部から中心部へと拡大したが、AhRは小葉中心部に認められるのみで投与により変化することはなかった。本実験は、BNFを投与するとAhRの存在しない小葉辺縁部にCYP1A1とCYP1A2が誘導されることを明らかにした。このことは、BNFによる両P450アイソザイムの誘導に今回検索したAhRが関与しない機構が存在する可能性を示唆している。

Changes of the Localization of CYP1A1/2 and Aryl Hydrocarbon Receptor in the Liver  
Lobule Treated with 3-Methylcholanthrene or  $\beta$ -Naphthoflavone.

Isao IGARASHI, Toshiyuki WATANABE, Kouji TANAKA, Shinya SEHATA, Toshihiko  
MAKINO, Mayumi WATANABE, Yoshihiko OHASHI, Masaya TAKAOKA and Sunao  
MANABE. Laboratory Animal Science & Toxicology Laboratories, Sankyo Co., Ltd.,  
Fukuroi, Japan.



*In vitro* 代謝試験に基づくヒト *in vivo* 薬物肝代謝能の定量的予測は可能か? : Cytochrome P450 が関与する薬物代謝に関する検討

○ 中島由起子<sup>1)</sup>、伊藤清美<sup>2)</sup>、島田典招<sup>3)</sup>、C.E.Green<sup>4)</sup>、  
C.A.Tyson<sup>4)</sup>、杉山雄一<sup>1)</sup>

1) 東京大(院)薬学系、2) 北里大学薬学部、3) 第一化学薬品、  
4) SRI International

【目的】我々はヒト肝ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験データからの *in vivo* 肝代謝クリアランスの予測法を検討しており、良好な結果を得ている。本研究では、各薬物代謝に関与する CYP isozyme の種類と寄与率を評価した上で、ヒト肝ミクロソーム及びヒト CYP 発現系を用いた代謝試験より *in vivo* 代謝能の予測に関して検討を行い、発現系がヒト肝ミクロソームの代替と成り得る可能性についても考察した。

【方法】ヒト CYP 発現系およびヒト肝ミクロソームを用いて *in vitro* 試験を行い、肝代謝固有クリアランス ( $CL_{int, in vitro}$ ) を算出した。一方、文献から得た体内動態パラメータおよび生理学的パラメータから、dispersion model に基づいて *in vivo* 肝代謝固有クリアランス ( $CL_{int, in vivo}$ ) を算出した。肝ミクロソームを用いた試験から算出した  $CL_{int, in vitro}$  を、単位 CYP あたりの値および肝臓 1g あたりの値に変換し、それぞれ CYP 発現系を用いた試験から算出した  $CL_{int, in vitro}$  及び  $CL_{int, in vivo}$  と比較することによりヒト CYP 発現系の有用性および *in vitro* から *in vivo* への予測性を評価した。

【結果・考察】検討した全 50 代謝経路の約 6 割では、肝ミクロソームを用いた代謝試験より算出した  $CL_{int, in vitro}$  と  $CL_{int, in vivo}$  との差異は 3 倍以内という良好な結果が得られ、特に、主として CYP3A4 が関与している代謝経路においては非常に良好な予測性が得られた。また、ヒト CYP 発現系を用いた試験から算出した  $CL_{int, in vitro}$  とヒト肝ミクロソームを用いて行った試験より算出した  $CL_{int, in vitro}$  とは、検討した 9 経路全てにおいて、数倍の範囲で一致した。代謝に関与している CYP isozyme の種類に関わらず良好な予測性が示されたことから、ヒト肝ミクロソームの代替としてヒト CYP 発現系が有用であることが示唆された。

Is it possible to quantitatively predict *in vivo* drug metabolizing activity of cytochrome P450 in human liver from *in vitro* metabolic studies ?

Yukiko NAKAJIMA<sup>1)</sup>, Kiyomi ITO<sup>2)</sup>, Noriaki SHIMADA<sup>3)</sup>, Carol E.Green<sup>4)</sup>,  
Charles A.Tyson<sup>4)</sup>, and Yuichi SUGIYAMA<sup>1)</sup>. 1) Grad.Sch.Pharm.Sci., Univ.Tokyo,  
2) Sch.Pharm.Sci., Kitasato Univ., 3) Daiichi Pure Chemicals Co.,Ltd., 4) SRI International

In vitro 腎毒性評価系有用性検討と HTS(high throughput screening) への応用

○堀場直、田保充康、熊野英一、新倉博文、出来俊昭

中外製薬株式会社 安全性研究所

1. LLC-PK1 細胞と CHL 細胞を用いた in vitro 腎毒性評価系有用性検討

〔目的〕 In vitro の腎毒性試験の確立は動物数・検体量の削減、試験期間の短縮が期待され、新薬開発のスピードアップに貢献できる。

〔方法〕 近位尿細管の性質をよく保持した LLC-PK1 (ブタ腎上皮由来) を用いて既知腎毒性物質、非腎毒性物質の障害性を検討した。また、細胞障害性との分離のために対照細胞として線維芽細胞である CHL (ハムスター肺由来) を同時に用いた。

〔結果〕 腎毒性を有する 13 化合物 (近位尿細管直接障害が認められているのは 11 化合物) のうち 8 化合物で LLC-PK1 特異的な障害が認められた。腎毒性を有さない 5 化合物では LLC-PK1 特異的な障害は認められなかった。以上より同系は近位尿細管の障害を検出する系として有用であると考えられた。

2. 同系の HTS への応用

〔目的〕 腎障害性、細胞障害性より毒性面からのスクリーニングを行うとともに、データベースを構築し、構造毒性相関をとる。

〔方法〕 Biomek 社の HTS システムを用いて当社化合物バンクの 45,000 検体を上記評価系にかけた。障害性は上清中への LDH 漏出、WSTassay (MTT 改変) により評価した。

〔結果〕 LLC-PK1 細胞においては 44,264 化合物のうち約 2.6%にあたる 1,141 化合物に障害性が認められた。CHL に関しては現在検討中である。検討終了後データベースへの入力を行い、腎細胞特異的な障害性を有する化合物、細胞障害性を有する化合物を抽出し、構造との相関をとる予定である。

In vitro nephrotoxicity assay and its application to HTS (high throughput screening)

Naoshi HORIBA, Mitsuyasu TABO, Eiichi KUMANO, Hirofumi SHINKURA and Toshiaki DEKI. Safety Assessment Laboratory, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., 1-135 Komakado, Gotemba-shi, Shizuoka, Japan

ラットおよびイヌ尿中蛋白の銀コロイド染色による  
セルロースアセテート膜電気泳動法の基礎検討

○豊田直人<sup>1</sup>, 池田和子<sup>2</sup>, 川鍋 剛<sup>3</sup>, 松村由美<sup>4</sup>,  
丸山 潔<sup>5</sup>, 望月文敏<sup>6</sup>

<sup>1</sup>三菱化学安科研, <sup>2</sup>昭和電工, <sup>3</sup>ヘレナ研究所, <sup>4</sup>マルホ,  
<sup>5</sup>科研製薬, <sup>6</sup>旭化成

【目的】尿蛋白の電気泳動パターンは、腎障害の指標となる。しかし、尿の濃縮処理が煩雑であること、濃縮した尿では鮮明な泳動パターンが得られにくいこと、多検体の処理が難しいことなどから、毒性試験の日常検査として利用しにくい。よって、芝らの考案した高感度な銀コロイド染色(J.Clin.Lab.Anal., Vol.10, 403-406, 1996)を用いて、ラットおよびイヌ尿のセルロースアセテート膜(セア膜)電気泳動を試みた。

【方法】無処置のラットおよびイヌの尿を用いて、バリデーションを行った。また、ラットに薬剤(HgCl<sub>2</sub>, puromycin aminonucleoside : PAN)を投与し、腎障害時の尿を測定した。尿は濃縮せず、自動電気泳動装置 Epalyzer(ヘレナ研究所)で電気泳動後、用手法にて銀コロイド染色を施し、再び Epalyzer を用いて波長 525 nm でデンシトメトリーを行った。

【結果・考察】バリデーションの結果、ラット尿は 6 日間、4℃および-80℃保存で著しい変化はなかった。イヌの尿は 6 日間、4℃保存で著しい変化はなかったが、-80℃保存では保存 1 日目から凍結による影響がみられた。採尿後、速やかに泳動を行うのが望ましいが、数日間であれば 4℃保存が安定と思われた。日内および日間再現性は、大きな分画で変動係数は 10%以下、小さな分画でも変動係数は約 20%であり、良好な結果と判断した。セア膜に塗布する蛋白濃度は 20~80 mg/dL で同様な泳動パターンを得ることができた。塗布する最適な蛋白濃度は 50 mg/dL 以下と思われた。薬物を投与したラットの尿の電気泳動パターンについては、検討中である。

【結論】1)銀コロイド染色は、尿の濃縮を必要としない高感度な染色法であった。2)支持体にセア膜を用いることで、再現性の高い結果を得ることができた。3)操作が容易なため、日常検査に導入可能で、腎障害のスクリーニングとして有用であると考えられた。

Colloidal Silver Staining on Cellulose Acetate Membrane Electrophoresis for Analysis of Urinary Proteins in Rats and Dogs.

Naoto TOYOTA<sup>1</sup>, Kazuko IKEDA<sup>2</sup>, Tsuyoshi KAWANABE<sup>3</sup>, Yumi MATSUMURA<sup>4</sup>,  
Kiyoshi MARUYAMA<sup>5</sup> and Fumitoshi MOCHIZUKI<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd., Ibaraki, 314-0255, Japan, <sup>2</sup>Showa Denko K.K., Chiba, 267-0056, Japan, <sup>3</sup>Helena Laboratories Co., Ltd., Saitama, 336-0001, Japan, <sup>4</sup>Maruho Co., Ltd., Kyoto 600-8815, Japan, <sup>5</sup>Kaken Pharmaceutical Co., Ltd., Shizuoka, 426-8646, Japan, <sup>6</sup>Asahi Chemical Industry Co., Ltd., Shizuoka, 410-2321, Japan

シスプラチン投与ラットにおける早期腎障害の形態的特徴  
— 改良タンニン酸-鉄染色法の有用性 —

○松井信志、丸山敏之、朝野由美、岡田 学、渡邊 弘

塩野義製薬・新薬研究所・安全性研究部門

**[目的]** シスプラチン(CDDP)による障害は光顕的に腎臓の近位尿細管直部の壊死として観察される。投与直後の障害像をヘマトキシリン・エオジン(H-E)染色標本を用いて光顕的に捉えるのは難しいが、電顕的には、投与 24 時間後に近位尿細管セグメント 3 (S<sub>3</sub>)でごく僅かな変化が観察されている。我々は、近位尿細管の構造が明瞭に観察できるように改良したタンニン酸-鉄(MTA-F)染色により CDDP 投与直後のラット近位尿細管上皮細胞の形態学的変化を経時的に観察した。また、同時に作製した電顕標本の観察結果と比較した。**[方法]** CDDP 5 mg/kg を Jel:SD 系雄ラットに単回静脈内投与し 30、60 及び 120 分後に腎臓を採取した。光顕用標本は 10%中性緩衝ホルマリン固定後、パラフィン切片を作製し、0.5%タンニン酸水溶液、0.5%塩化第二鉄水溶液及び 0.2%ヘマトキシリンエタノール液で処理(MTA-F 染色)して光顕的に観察した。電顕用標本はグルタルアルデヒド固定・オスミウム後固定後、超薄切片を作製しウラン・鉛の 2 重染色を施して電顕的に観察した。**[結果]** MTA-F 染色は腎臓の尿細管基底膜、刷子縁及び基底陥入を明瞭に染色し、光顕的にセグメント(S<sub>1</sub>またはS<sub>2</sub>)を区別できた。CDDP 投与 60 分後では H-E 染色標本で識別できない近位尿細管上皮細胞の空胞化及び膨化が MTA-F 染色により S<sub>3</sub>で観察できた。投与 120 分後では、投与 60 分後の変化に加え尿細管腔内への細胞質の突出や刷子縁の脱落がみられた。これらのことから、CDDP による近位尿細管上皮細胞の変化は S<sub>3</sub>から始まり、形態学的特徴は細胞質の膨化、空胞化、刷子縁の脱落及び尿細管腔内への細胞質突出であることが光顕的にも確認できた。

**[文献]** 1) Dobyant, Dennis C. et al.: J. Pharmacol. Exp. Ther. 213: 551 - 556, 1980.

Morphological characterization of the early stage of *cis*-Platinum nephrotoxicity on rats. — Usefulness of modified tannic acid - ferric chloride stain —

Shinji MATSUI, Toshiyuki MARUYAMA, Yumi ASANO, Manabu OKADA, Hiroshi WATANABE. Safety Research Division, Developmental Laboratories, SHIONOGI & CO., LTD, Toyonaka-561-0825 Japan

○菊森幹人、矢野昌彦、左近上博司、守永太賀彦、六角 香、  
古川茂典、鈴木 潤、西森司雄

株式会社 環境バイリス研究所

【目的】SD ラットを用いて、STZ 誘発による糖尿病性腎症モデルの作製を試みた。また、腎組織の病態解析には、画像解析装置による定量化を行ったので合わせて報告する。

【方法】6週齢のSD ラットを用いて、STZ 40～60 mg/kg を静脈内投与(1回処置)し、処置後、1週間後から26週目まで体重測定および尿検査、血液検査、血液生化学検査等を行った。処置後26週目にエーテル麻酔下で灌流固定により腎摘出を行い、10%中性緩衝ホルマリン液に固定した。また、数例の腎臓については電顕サンプルを採取した。形態的観察として常法により、パラフィン切片を作製後、PAS染色を施し、画像解析装置を介して腎糸球体面積およびPAS陽性のメサンギウム基質面積を計測し、メサンギウム基質の面積比を求めた。電顕的には糸球体基底膜の状態について観察した。なお、無処置群を設け、比較対照とした。

【結果】経時的に実施した臨床検査で、血糖値は1週目より終始300～400 mg/dL前後の高値で推移した。尿量は1週後より終始高値(200 ml/day前後)で対照群の約20倍の値を示した。尿中アルブミン排泄量は処置後、徐々に増加し、26週目には対照群に比し顕著な増加を示した。形態的には腎糸球体でのメサンギウム基質の面積比は対照群に比べ増加し、糸球体基底膜の肥厚も観察された。

【結論】今回の実験成績より、糖尿病性腎症の特徴的变化として、尿中アルブミン排泄量の増加、組織学的所見ではメサンギウム基質領域の拡大および腎糸球体基底膜の肥厚等が認められた。従って、STZ 40～60 mg/kg i.v.の処置により、糖尿病性腎症モデルが作出される事が確認できた。

#### Streptozotocin - induced Diabetic Nephropathy Model in Rats

Mikito KIKUMORI, Masahiko YANO, Hiroshi SAKONJO, Tagahiko MORINAGA,  
Kaori MUSUMI, Shigenori FURUKAWA, Jun SUZUKI and Tsukao NISHIMORI.  
Environmental Biological Life Science Research Center Inc.  
Ukawa, Minakuchi, Koka, Shiga 528-0052, Japan

○熊野英一、堀場 直、渡邊 剛、勝山清加、新倉博文、出来俊昭

中外製薬株式会社 安全性研究所

【目的】プロスタグランジン類 (PGs) は生体の恒常性維持のために重要な調節因子として知られ、特に腎臓は PGs の豊富な組織である。非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) による腎障害は、PGs 産生酵素であるシクロオキシゲナーゼ (COX) を阻害することにより引き起こされるが、これらは健常時ではなく既に腎障害を有する場合に多いことが知られている。近年、腎臓では常在型酵素である COX-1 に加え、誘導型酵素である COX-2 の発現も報告されているが、病態時の各アイソザイムの発現については報告がなされていない。そこで、今回慢性腎不全モデルラットを用いて腎障害時における COX アイソザイムの発現について検討した。

【方法】7/8 腎動脈結紮による慢性腎不全モデルラットを作製し、腎臓中 COX-1 および 2 の発現、腎臓中 PGs 量および腎機能を術後 12 週まで経時的に検討した。腎臓中 PG は EIA 法にて、腎臓中 COX-1 および 2 の発現は免疫組織化学的手法およびウエスタンブロットング法にて検討した。

【結果・考察】腎臓中 PGs 量は、PGE<sub>2</sub> には変化が認められなかったが、PGI<sub>2</sub> は術後 8 週で軽度に、12 週では有意に増加した。COX-2 の発現は腎不全群および偽手術群ともに緻密斑に認められ、腎不全群では、術後 8、12 週において経時的な COX-2 発現の増加が認められた。一方、COX-1 は両群とも尿細管に発現がみられたが、両群間に差は見られず、また実験期間中にも変化は認められなかった。腎不全群における COX-2 発現量とクレアチニンクリアランスの間には相関関係 ( $r^2=0.756$ ) が認められた。以上より、腎臓中 COX-2 発現は腎障害の進展とパラレルに変化し、COX-2 の発現は病態下での腎機能維持に重要であることが示唆された。

Selective increase of cyclooxygenase-2 expression in the remnant kidney in the rat

Eiichi KUMANO, Naoshi HORIBA, Tsuyoshi WATANABE, Kiyoka KATSUYAMA, Hirofumi SHINKURA and Toshiaki DEKI. Safety Assessment Laboratory, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., 1-135 Komakado, Gotemba-shi, Shizuoka, Japan

○田保充康、堀場直、新倉博文、出来俊昭

中外製薬株式会社 安全性研究所

NSAIDsによる腎障害の原因の一つとして、腎血管拡張性 prostaglandin (PG)の産生低下による腎血流量の減少が知られている。Cyclooxygenase (COX)には常在型酵素であるCOX-1と誘導型酵素であるCOX-2が存在し、生体内の血流量の調節にはCOX-1が関与すると考えられている。しかしながら、近年、腎臓にCOX-2が恒常的に発現していることが報告され、NSAIDsによる腎障害にCOX-2阻害が関与する可能性が考えられている。そこで、本実験では、麻酔下ラットにおいて、非選択的COX阻害剤であるindomethacin及びCOX-2選択的阻害剤であるNS-398の腎血流量に対する作用をパルスドップラー法を用いて比較し、NSAIDsの腎血流量減少作用におけるCOX-2阻害の関与について検討した。

Indomethacin、NS-398の静脈内単回投与により腎血流量はいずれも1mg/kgから用量依存性に減少し、両薬物の腎血流量減少作用の強さはほぼ同じであった。これらの作用は腹大動脈の腎動脈分枝部からPGI<sub>2</sub> (100 μg/kg/hour)を持続投与することにより抑制された。一方、両薬物は大腿血流量に対して減少作用を示さなかった。腎組織中のCOX分布を免疫組織学的に検索した結果、COX-2は糸球体近傍に存在する緻密斑に発現していた。以上のことから、NSAIDsによる腎血流量の減少に腎組織中のCOX-2の阻害が関与している可能性が高いことが示唆された。

COX-2 inhibition may participate in the decrease of renal blood flow induced by NSAIDs

Mitsuyasu TABO, Naoshi HORIBA, Hirofumi SHINKURA and Toshiaki DEKI.  
Safety Assessment Laboratory, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., 1-135  
Komakado, Gotemba-shi, Shizuoka, Japan

アニオン性物質による腎毒性発現におけるorganic anion transporter 1 (OAT1)の関与

○関根孝司、武田理夫、津田実、車 碩鎬、于 爾康、金 徒慶、  
金井好克、遠藤 仁

杏林大学医学部薬理学教室

外因性物質による腎障害発生機序の一つは、当該物質の尿細管細胞への蓄積による直接障害である。この機序により組織特異的に障害が発生する最大の理由は、腎毒性物質が選択的に尿細管細胞（特に近位尿細管細胞）へ取り込まれることによる。我々は、近位尿細管細胞(S2)の基底側膜に特異的に発現し、種々のアニオン性物質の尿細管細胞への取り込みに関与する有機アニオントランスポーター-OAT1

(organic anion transporter 1) を単離し、これまでその輸送特性および基質選択性について報告してきた。

腎毒性物質には、有機アニオンが多く含まれ、それらによる腎毒性発現には、OAT1が深く関与していることが推定される。今回、βラクタム系抗生物質、カビ毒、およびシステイン抱合体の腎毒性発現におけるOAT1の関与について報告する。

【方法】培養細胞（CHO、マウス近位尿細管由来細胞等）にOAT1を安定発現させ、上記腎毒性物質のOAT1による輸送を検討した。さらに、これらの腎毒性物質による細胞毒性とOAT1による輸送との関連を検討した。

【結果】OAT1は、腎毒性を有するβラクタム系抗生物質や、一部のカビ毒を輸送することが示され、またシステイン抱合体の輸送も示唆された。これらの腎毒性物質の培養液への添加により、コントロール細胞に比してOAT1発現細胞のcell viabilityが有意に低下し、さらにこのcell viability低下の低下は、probenecidやPAH (p-aminohippurate)をとともに添加することにより抑制された。

【結語】一連の実験により、腎障害性アニオン性物質のOAT1による輸送を確認した。OAT1を発現させた*in vitro*実験系は、腎毒性物質のスクリーニング、さらに腎毒性発現メカニズムの解明に有用である。

Involvement of OAT1 (organic anion transporter 1) in the development of renal toxicity related to anionic substances.

Takashi SEKINE, Michio TAKEDA, Minoru TSUDA, Seok Ho CHA, Erkang YU, Do Kyung KIM, Yoshikatsu KANAI and Hitoshi ENDOU. Department of Pharmacology and Toxicology, Kyorin University School of Medicine, Mitaka, Tokyo 181, Japan



受容体型チロシンキナーゼの活性化は腎細胞における  
フリーラジカル障害を軽減する

大阪薬科大学薬理学教室

○ 幸田祐佳、玄番宗一

【目的】抗生物質セファロリジン(CER)や虚血-再灌流による急性腎不全の発症にフリーラジカルが関与する。最近、フリーラジカル障害と細胞内シグナル伝達との関連性が考慮されている。そこで、ラット腎皮質切片や培養腎上皮細胞を用いて、過酸化障害に対する受容体型チロシンキナーゼ刺激の効果を検討した。

【方法】SD系雄性ラットの腎皮質切片を CER 存在下で好氣的にインキュベート、又は培養腎上皮細胞(LLC-PK<sub>1</sub>)を低酸素-再酸素化することによりフリーラジカル障害を惹起した。腎細胞障害の指標として、切片においては過酸化脂質(TBARS)量、糖新生能及び PAH 蓄積能を、LLC-PK<sub>1</sub> 細胞においては LDH 遊離量を測定した。

【結果】コンフルエンスに達した LLC-PK<sub>1</sub> 細胞において、6時間低酸素下で培養後1時間 CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養(再酸素化)することにより LDH 遊離は増大した。このような再酸素化障害(LDH 遊離増大)を、HGF は有意に抑制した。CER は、腎皮質切片において、過酸化脂質を増大させ、糖新生能と PAH 蓄積能を低下させた。このような CER によるフリーラジカル障害は、HGF のみならず IGF-1 によっても軽減された。チロシンキナーゼ阻害薬 lavendustin A は、CER によるフリーラジカル障害に対する HGF の軽減効果を減弱させた。また、CER 障害に対する IGF-1 の軽減効果も lavendustin A により減弱させられた。

【結論】腎細胞において、細胞増殖因子は過酸化障害を軽減したことから、受容体型チロシンキナーゼの活性化は、フリーラジカル障害に抑制効果を発現すると考えられる。

Amelioration by Tyrosine Kinase Activity of Free Radical-Induced Injury in Renal Cells.

Yuka KOHDA and Munekazu GEMBA, Division of Pharmacology, Osaka University of Pharmaceutical Sciences, Nasahara, Takatsuki, Osaka 569-1094, Japan.

田中あづさ、○渡辺千朗、千坂亜希子、畔上二郎、吉村慎介、小島幸一

財団法人食品薬品安全センター秦野研究所

Crj:CD(SD)IGS ラットを一般毒性試験に導入するにあたり、4ならびに26週間の試験に相当する生理学および病理学的背景データの収集を行い、従来当研究所で一般毒性試験に用いてきたCrj:CD(SD)ラットのデータとの比較をした。また、26週間の試験データについては、「Biological Reference Data on CD(SD)IGS Rats-1998」掲載の我々のデータ（通常飼料群）との比較を行い、再現性についても観察した。

日本チャールス・リバー株式会社より4週齢で提供されたCrj:CD(SD)IGSならびにCrj:CD(SD)雌雄ラットは、1週間の検疫・馴化期間を経て群分けし、4週間試験には各群10匹を、26週間試験には各群20匹を充てた。室温 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度50~65%、12時間照明（7:00~19:00点灯）、換気回数約15回/時の飼育室で、飼料としてCE-2（日本クレア株式会社）を、飲料水として市水道水を自由摂取させて飼育し、一般状態、体重、摂餌量、摂水量、尿、血液、血液生化学、眼科所見、病理学的所見について観察した。ここでは尿、血液および血液生化学以外のデータについて紹介する。

体重は雌雄ともCrj:CD(SD)IGSラットはCrj:CD(SD)ラットと比較して第2週以降低値で推移し、統計学的に有意な差がみられた。また、摂餌量にも有意差が認められた。

13および26週間の試験に相当する前回の試験で得られた成長曲線および摂餌量と比較したところ差は認められず、データの再現性が確認された。病理組織学的検査では、Crj:CD(SD)IGSラットはCrj:CD(SD)ラットと比較して肺島の線維化や褐色色素沈着、肝臓の門脈周囲性の脂肪化、心筋変性および線維化、腎臓の好塩基性尿管や円柱など、本検討週齢では加齢性病変の頻度や程度が低く、Crj:CD(SD)に対して加齢性変化の発現時期が遅れていると考えられた。

#### Background Data of General Toxicological Parameters in CD(SD)IGS I

Azusa TANAKA, Chiaki WATANABE, Akiko CHISAKA, Jiro AZEGAMI, Shinsuke YOSHIMURA and Kohichi KOJIMA, Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center, Kanagawa 257-8523, Japan.

○古谷 真美, 安達 智子, 田中 あづさ, 関 剛幸, 加藤 博康,  
小島 幸一

財団法人 食品薬品安全センター 秦野研究所

Crj:CD(SD)IGS ラットは、Charles River 社が遺伝的分岐を最小限にして、可能な限り均一な実験動物を提供するシステムで生産されている。我々はこのラットに関して、バックグランドデータの蓄積を行っている。その中から 4 ならびに 26 週間の試験に相当する尿、血液および血液生化学検査のデータについて、従来の Crj:CD(SD)ラットと比較して報告する。

〔方法〕日本 Charles River 社より 4 週齢で提供された Crj:CD(SD)IGS ならびに Crj:CD(SD)雌雄ラットを 4 週間試験には各群 10 匹、26 週間試験には各群 20 匹使用した。検査項目は前報「Crj:CD(SD)IGS ラットの一般毒性試験背景データⅠ」に示した。尿、血液および血液生化学検査の測定は、リニテック 200 (ライオン三共)、Coulter Counter Model S-PLUS IV (コーラー・エレクトロニクス)、COBAS-FARA (ロシュ)、EA05(A&T)、エプイデ (ヘルテ)、CA-1000(東亜医用電子)等を用いて行った。

〔結果〕1, 4, 13 および 26 週に行った尿検査では、Crj:CD(SD)に対して Crj:CD(SD)IGS 雄の電解質に有意な差が散見された。4 および 26 週間試験における血液検査では、雌雄とも Crj:CD(SD)に対して Crj:CD(SD)IGS の白血球数が有意に低値を示した。また、血液生化学検査では、脂質系の項目の多くに低値が認められた。加えて、26 週間試験では蛋白質系、酵素系ならびに電解質類にも有意な差が認められた。Crj:CD(SD)IGS を用いて一般毒性試験等を行う際には、Crj:CD(SD)と異なるこれらの点について考慮しておく必要が認められた。

#### Background Data of General Toxicological Parameters in CD(SD)IGS Ⅱ

Mami FURUYA, Tomoko ADACHI, Azusa TANAKA, Takayuki SEKI, Hiroyasu KATO and Kohichi KOJIMA. Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center, Hadano, Kanagawa 257-8523, Japan

Cyclophosphamide を 26 週間及び 5 週間投与した CB6F1-Tg-rasH2 マウス及び同腹非遺伝子導入マウスにおける毒性発現の差に関する検討  
(1)一般毒性

久田 茂, 佐藤敦子, 永嶋稚子, 谷藤久人, 柴田誠司, 磯部充威, 森本秀樹, 白居敏仁\*

帝国臓器・安全研, \*実験動物中央研究所

ヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子を片側アレルに導入した CB6F1-Tg-rasH2 マウス(以下, Tg マウス)は, 短期がん原性試験の有用なモデルとして期待されている。通常, Tg マウスを用いる短期がん原性試験の用量設定試験には野生型マウスを用いるが, ras 遺伝子導入に伴う毒性発現への影響についてはほとんど調べられていない。そこで, cyclophosphamide(以下 CP)の週 1 回強制経口投与による 26 週間がん原性試験, 及び 5 週間投与試験において, Tg 及び同腹非遺伝子改変(non-Tg)マウスに発生した毒性変化を比較した。【方法】雌雄の Tg 及び non-Tg マウスを用い, 26 週間がん原性試験(投与開始時 7 週齢)では 0, 50, 100 及び 150mg/kg, 5 週間試験(投与開始時 37 週齢)では 0 及び 150mg/kg の用量で CP を週 1 回強制経口投与し, 最終投与の翌日に屠殺・解剖した。尿検査を 26 週間がん原性試験では初回投与時及び 3, 6ヶ月目に, 5 週間試験では 4 週目まで毎週, 投与直後に実施した。【結果】(1)一般毒性(26 週間がん原性試験) 投与期間中には体重低下, 切歯の萎縮・折損, 及び脱毛が発生した。また, 肺重量が増加し(肺胞組織球症あるいは間質性肺炎の発生による), 精巣及び卵巣重量が低下した。以上の変化及び血液学的並びに生化学的検査値の変化には, Tg 及び non-Tg マウス間の差が認められなかった。(2)膀胱の変化 CP の副作用として出血性膀胱炎及び膀胱癌(移行上皮癌)の発生が知られている。26 週間がん原性試験及び 5 週間の追加試験において, Tg マウスに膀胱重量の増加及び移行上皮の過形成(単純及び PN 過形成)が認められた。また, Tg 及び non-Tg マウスの CP 投与群には, 尿潜血陽性例が散見されたが, 膀胱重量増加との間に明白な関連は認められなかった。【結論】Tg 及び non-Tg マウスには, CP の反復投与によりほぼ同等の毒性が発生したが, 膀胱の重量増加及び移行上皮の増殖は Tg マウスのみが発生した。

Differences in toxic changes between CB6F1-Tg-rasH2 mice and their non-transgenic littermates given cyclophosphamide by gavage weekly for 5 or 26 weeks. (1) General toxicity.

Shigeru HISADA, Atsuko SATO, Masako NAGASHIMA, Hisato TANIFUJI, Seiji SHIBATA, Mitsui ISOBE, Hideki MORIMOTO and \*Toshimi USUI. Teikoku Hormone Mfg. Co., Ltd., Kawasaki, Japan. \*CIEA, Kawasaki, Japan.

○比嘉良喬<sup>1)</sup>、大久保惇<sup>1)</sup>、北島俊一<sup>2)</sup>、森安眞津子<sup>2)</sup>、仮家公夫<sup>2)</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>2)</sup>

**【目的】**ラットにおけるコウジ酸4週間強制経口投与実験においてコウジ酸のように吸収・排泄速度が早い化合物は、反復あるいは連続摂取など投与方法の違いにより毒性パラメータに影響を与えることを本学会第25回学術年会で報告し、コウジ酸による甲状腺肥大が血中T4の低下に伴うTSHの過剰分泌によるものと推測した。今回、甲状腺機能に及ぼすコウジ酸の作用機構の解析を目的に検討した。

**【実験方法】**実験1:ラット甲状腺細胞(FRTL-5)を用いてメチマゾール及び過塩素酸ナトリウムを陽性対照にヨードの取り込み活性及びヨード有機化活性に対するコウジ酸の影響を調べた。実験2:コウジ酸をラットに 1000mg/kg単回投与し、甲状腺へのヨードの取り込み及びヨードの有機化並びに甲状腺関連ホルモンに対する経時的なコウジ酸の影響を調べた。

**【結果】**実験1:コウジ酸はヨードの取り込み活性を阻害しなかったが、有機化を阻害した。実験2:コウジ酸投与群の甲状腺へのヨードの取り込み率は、投与24時間後までは有意に低かったが、投与48時間後には回復した。ヨードの有機化は、投与6時間後まで有意に低かったが、投与24時間後には回復した。血清T4は有意な減少又は減少傾向を示した。

**【まとめ】**以上の結果から、コウジ酸の甲状腺機能に及ぼす作用メカニズムは、①コウジ酸は甲状腺におけるヨード有機化を阻害し、T3及びT4の生成を抑制する。②この血中T4の低下によるネガティブ フィードバック機構が働きTSHが過剰に分泌され、甲状腺が肥大すると推測された。従って、報告されている甲状腺の肥大は、コウジ酸を大量にしかも長期間連続摂取時のみに見られる現象と考えられる。

Action Mechanism of Kojic Acid on Rat Thyroid Function.

Yoshitaka HIGA<sup>1)</sup>, Atushi OHKUBO<sup>1)</sup>, Shunichi KITAJIMA<sup>2)</sup>, Matsuko MORIYASHU<sup>2)</sup> and Kimio KARIYA<sup>2)</sup>. R&D SANSHO SEIYAKU, Fukuoka 816-8550<sup>1)</sup>, Panapharm Lab., Kumamoto 869-0425<sup>2)</sup>, Fac. Pharm. Sci. Kobogakuin Univ., Kobe 651-5180<sup>2)</sup>

○三井雄史, 原田剛, 橋場雅道, 宮内慎, 尾畑賢臣

持田製薬株式会社 総合研究所 安全性研究室

〔目的〕 TNF- $\alpha$  のラット下垂体-甲状腺系に及ぼす影響を *in vivo* および *in vitro* 実験で明らかにすること。

〔方法〕 ヒト TNF- $\alpha$  (0,  $3 \times 10^5$  JRU/kg/day) を Slc:Wistar 雄ラットに 3 箇月間静脈内投与し、血漿  $T_4$  値,  $T_3$  値, TSH 値の測定、下垂体、甲状腺の重量測定、病理組織学的検査 (HE 染色, TSH 免疫染色) を行った。加えて、Slc:Wistar 雄ラットから得た単離甲状腺上皮細胞を TSH 添加又は非添加下で TNF- $\alpha$  (0, 10, 30, 100, 300, 1000 JRU/ml) と共に 3 週間培養し、細胞ホモジネート中のペルオキシダーゼ活性、 $T_4$  5'-脱ヨード酵素活性を測定した。

〔結果〕 血漿  $T_4$ ・ $T_3$  の低下、TSH の上昇、甲状腺重量の増加、小型濾胞の増加を伴う甲状腺濾胞上皮細胞の過形成、下垂体前葉 TSH 産生細胞の空胞化が認められた。これらの所見は TNF- $\alpha$  が下垂体-甲状腺系に影響を及ぼすことを示している。また、単離甲状腺細胞への影響として、甲状腺細胞数の減少 ( $\geq 100$  JRU/ml)、ペルオキシダーゼ活性の低下 ( $\geq 300$  JRU/ml)、 $T_4$  5'-脱ヨード酵素活性の低下 (1000 JRU/ml) が認められた。この成績は TNF- $\alpha$  の甲状腺への直接作用を示唆している。

〔結論〕 TNF- $\alpha$  はラット甲状腺ペルオキシダーゼ活性、 $T_4$  5'-脱ヨード酵素活性抑制を介して血漿  $T_4$ ・ $T_3$  値を低下させるため、negative feedback により TSH 産生を刺激して甲状腺濾胞上皮細胞の過形成を誘導したものと推察された。

#### Effect of human TNF- $\alpha$ on pituitary-thyroid axis in rats

Takeshi MITSUI, Tsuyoshi HARADA, Masamichi HASHIBA, Makoto MIYAUCHI and Masaomi OBATA. Toxicology Laboratory, Research Center, Mochida Pharmaceutical Co., Ltd., 342 Gensuke, Fujieda, Shizuoka 426-8640, Japan.

○古川文夫、西川秋佳、宮内 慎、中村英明、笠原健一郎、  
広瀬雅雄

国立医薬品食品衛生研究所 病理部

【目的】マクロライド系抗生物質であるジョサマイシンは、マイコプラズマ感染症の治療薬としてヒト臨床適用の他、動物用医薬品として飼料中に添加される。これまで実施した慢性毒性試験および癌原性試験において、発癌性は陰性であり、好塩基性肝細胞癌および慢性腎症の発生をむしろ低下させた。WBN/Kob ラットは自然発症の糖尿病ラットで、一年以内に慢性膵炎に随伴して糖尿病を発症する。今回、このラットの膵炎発症に対するジョサマイシンの影響について検討した。【実験材料および方法】5週齢の雄 WBN/Kob ラット 30 匹を 3 群に分け、2.5%、1.25%、0%（対照群）のジョサマイシンを 56 週間混飼投与後、屠殺・剖検した。また、各群 5 匹は 10 週間後に屠殺・剖検した。常法に従い病理組織学的検索を行うとともに、最終屠殺時には血清および尿中の生化学的検査を実施した。【結果】体重は 0%群に比しジョサマイシン投与群で抑制傾向を示したが、41 週日以降は改善し、逆に 0%群の増加抑制が顕著となった。10 週後において膵炎は 2.5%群で 1/5 例（20%）、1.25%群で 3/5 例（60%）、0%群で 5/5 例（100%）に認められた。56 週後において 0%群に比しジョサマイシン投与群で血清アルブミンの増加、フルクトサミン、血糖、BUN、P、GPT、ALP および尿糖の減少、尿中 NAG（N-アセチルグルコサミニダーゼ）の 1.25%群での著しい減少が認められた。組織学的に、0%群に比しジョサマイシン投与群で慢性膵炎の軽減、腎尿管上皮細胞の透明化の減少が認められた。【まとめ】WBN/Kob ラットにジョサマイシンを投与すると、慢性膵炎が軽減し、糖尿病の発症が抑制された。

Effects of josamycin on spontaneous pancreatitis of WBN/Kob rats

Fumio FURUKAWA, Akiyoshi NISHIKAWA, Makoto MIYAUCHI, Hideaki  
NAKAMURA, Ken-ichiro KASAHARA and Masao HIROSE. Division of Pathology, NIHS,  
Tokyo 158-8501, 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  
摂水制限、フロセミド、BSO、BHAの抑制効果

○ 原田 智子、高場 克己、原 卓司、石井 昭男

協和発酵工業株 安全性研究所

【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(胸水貯留、呼吸困難、肺機能の低下等)の発現が報告された。そこで、肺毒性の軽減方法検討を目的として、KW-2149によるラット胸水貯留モデルを複製し、摂水制限、利尿剤(フロセミド)、GSH枯渇剤(BSO)、抗酸化剤(BHA)の胸水貯留抑制効果を検討した。

【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。摂水制限はKW-2149投与の18時間前から6時間後までの24時間又は投与直後から24時間実施した。フロセミド(初回:12.5 mg/kg、2,3回目:100 mg/kg)とBSO(200 mg/kg)は各々KW-2149投与の30分前と18時間前に腹腔内投与した。BHAは2%の割合で餌に混ぜ、試験期間中自由に摂取させた。投与期間中に一般状態の観察、飲水量および尿量の測定を行い、投与期間終了後1週時点で剖検、胸水貯留量および血清アルブミン量の測定を実施した。

【結果および考察】BHAはKW-2149投与によって発現する胸水貯留、呼吸困難、血清アルブミン量の減少を抑制した。しかし、摂水制限、フロセミド、BSOでは明らかな抑制効果は得られなかった。KW-2149の肺毒性抑制には抗酸化剤が有効と考えられた。

Inhibitory effects of limiting water intake, furosemide, BSO and BHA on pulmonary toxicity of a new mitomycin C analogue KW-2149 in a novel rat model.

Tomoko HARADA, Katsumi TAKABA, Takuji HARA and Akio ISHII.  
Toxicological Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Yamaguchi-  
755-8501, Japan.



カドミウム反復静脈内投与により卵巣摘出カニクイザルに  
発現した骨病変の定量的解析

○河堀健志<sup>1)</sup>, 倉田祥正<sup>1,2)</sup>, 土居卓也<sup>1)</sup>, 平塚秀明<sup>1)</sup>, 勝田 修<sup>1)</sup>,  
土谷 稔<sup>1)</sup>, 梅村孝司<sup>2)</sup>

1) 三菱化学安科研, 2) 北大院・獣医・比較病理

【目的】卵巣を摘出したカニクイザルを用いて、塩化カドミウム ( $CdCl_2$ ) の反復静脈内投与による慢性カドミウム中毒症候群の作出を試み、骨病変に関する定量的解析を行った。

【材料および方法】インドネシア産カニクイザル (推定年齢 5 才以上; 雌) を卵巣摘出(OVX)後 1 ヶ月から生理食塩水に溶解した  $CdCl_2$  を 0(n=4), 1.0(n=3)および 2.5 mg/kg(n=3)の用量で 13~15ヶ月間反復静脈内投与 (2~3回/週) した。剖検時に摘出した腰椎および大腿骨を 70%アルコールで固定し、吉木法標本を作製した。また、胸骨および大腿骨を 10%ホルマリンで固定し、HE染色標本を作製した。画像解析装置 (IPAP; 住化ラボ・ビス株式会社) を用いて Tissue volume(TV), Bone volume(BV), Osteoid volume(OV), Bone surface(BS)および Osteoid surface(OS)を測定し、Bone volume% (BV/TV), Osteoid volume% (OV/TV, OV/BV), Osteoid surface% (OS/BS), Osteoid thickness(OTh)および Trabecular thickness(Tb.Th)を算出した。また、腰椎および大腿骨については DXA 法により骨密度の測定を行った。

【結果および考察】カドミウム投与群(1.0 および 2.5 mg/kg)の腰椎で OV/TV(9倍), OV/BV(12~15倍), OTh および OS/BS の増加が、大腿骨皮質骨で OV/BV(5~12倍)の増加が認められた。また、大腿骨骨幹端部で BV/TV(45~50%)および Tb.Th(18~35%)の低下が、胸骨で BV/TV の低下(20~46%)が認められた。その他に胸骨で Tb.Thに、腰椎で BV/TV および Tb.Th に低下傾向が認められた。骨密度は腰椎で 26~27%、大腿骨で 20~22%の低下が認められた。以上の結果、卵巣を摘出したカニクイザルに塩化カドミウムを長期間反復静脈内投与することで、霊長類においてもイライチ病に類似した骨軟化症および骨粗鬆症を作出できることが示唆された。

Quantitative analysis of a bone lesion in ovariectomized Cynomolgus monkey given repeated intravenous injection of  $CdCl_2$

Takeshi Kawasuso<sup>1)</sup>, Yoshimasa Kurata<sup>1,2)</sup>, Takuya Doi<sup>1)</sup>, Hideaki Hiratsuka<sup>1)</sup>, Osamu Katsuta<sup>1)</sup>, Minoru Tsuchitani<sup>1)</sup>, Takashi Umemura<sup>2)</sup>, <sup>1)</sup>Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd., Ibaraki-314-0255, Japan. <sup>2)</sup>Hokkaido Univ., Hokkaido-060-0818, Japan.

○坂東 富美、渋谷 幸代、黒沢 亨、神藤 康弘、仲由 武賢

明治製菓株式会社 安全性研究所

【目的】安全性試験において内因性ヒスタミンの遊離に基づく皮膚の紅潮、腫脹等を経験することが多く、この症状の強弱には薬物によって異なる動物種差が認められる。ヒスタミンの主たる供給源は皮膚のマスト細胞と考えられる。そこで、症状発現の種差を簡便に検討する方法として、化合物の皮内投与による血管透過性の評価を試みた。

【方法および結果】〔静脈内投与：IV〕ある化合物AをIVするとイヌで最も低用量から皮膚症状が発現し、ラットではイヌの10倍以上の用量で症状がみられた。サルとモルモットでは同様の条件で明らかな症状は発現しなかった。すなわち、IVで症状が出やすい順はイヌ>ラット>サルとモルモットと考えられた。いずれの動物でも血漿中ヒスタミン濃度は上昇した。なお、化合物AのIVにより症状が発現する血漿中ヒスタミン濃度は、ラットではイヌの100~1000倍高値であった。〔皮内投与：ID〕上記の動物種に色素をIVした後、種々濃度の化合物AをIDし投与部位の色素を抽出・定量すると、いずれの動物種でも色素の漏出がみられ、イヌで最も低濃度から漏出した。IDで血管透過性が亢進しやすい順はイヌ>ラット>サルとモルモットであり、IVで症状が出やすい順と一致した。一方、同様に種々濃度のヒスタミンをIDした場合、血管透過性が亢進しやすい順はイヌとサル>モルモット>ラットとなった。血管透過性が亢進するヒスタミン濃度は、ラットではイヌの100~1000倍高値であった。

【考察】化合物AにおいてはIDによる血管透過性亢進の種差はIVによる症状発現の種差を反映すると考えられた。また、化合物AとヒスタミンのIDの結果が一致しないことから、動物種差には、薬物によるヒスタミン遊離のしやすさと遊離したヒスタミンに対する感受性の2つが関与すると推測された。

Study on the animal differentia in histamine release by intradermal administration of compound A

Fumi BANDO, Sachiyo SHIBUTANI, Tohru KUROSAWA and Takemi NAKAYOSHI

Toxicology Lab., Meiji Seika Kaisha Ltd., Kanagawa, 222-8567, Japan

## カニクイザルを用いた骨粗鬆症モデルの検討 (14)

- pQCT を用いた大腿骨頸部骨密度の測定

○實来直人、角崎英志、鶴田恵三、福岡好一郎、宮嘉宏彰

株式会社新日本科学 安全性研究所

【目的】高齢化社会に向けて骨粗鬆症が重大な問題として認識され、特に寝たきりとの関係が深い大腿骨頸部の骨折は大きな問題であり、同部位の骨量測定は骨折予測の上からも重要と考えられている。今回、pQCT (XCT-3000, Norland Stratec) を用いて、大腿骨頸部における全骨、海綿骨および皮質骨密度を測定するとともに、DXA を用いて腰椎、大腿骨および橈骨遠位部における骨密度も測定し、pQCT の結果との相関も調べた。【実験方法】いずれの実験においても最大骨量および骨端の閉鎖が確認された9歳以上の雌カニクイザルを用いた。動物は室温  $26 \pm 2$  °C、湿度  $50 \pm 10$  %、換気回数 15 回/時間、照明 1 日 12 時間の動物室内において、個別ケージで飼育した。飼料は固型飼料 (HSD, Ca 含量 1.15%) 108 g を毎日与えた。大腿骨頸部における XCT-3000 の測定条件はスキャン速度 15 mm/s で関心領域中を 4 スライスした。同日中に 3 回大腿骨頸部における骨密度を測定し、日内変動を調べた。日差変動については、初回測定から 27 日までにそれぞれの動物を 5 回ずつ測定した。また、DXA では DPX- $\alpha$  (LUNAR) を用いて腰椎および大腿骨、DCS-600 (Aloka) を用いて橈骨遠位部における骨密度を測定した。【成績および総括】全骨、海綿骨および皮質骨における日内変動の CV 値はいずれも 3 % 以内で、日差変動についてはそれぞれ 0.41%、2.19% および 1.24% であった。pQCT および DXA から得られた骨密度は、いずれも正の相関を示したが、皮質骨密度においては低い相関であった。DXA 法による骨密度測定では、面積密度でしか骨密度を示すことができなかったが、pQCT 法では海綿骨と皮質骨を分離して体積密度を解析することができ、今回、サルを用いて重大な骨折部位である大腿骨頸部において再現性の高いデータが得られた。

Investigation of osteoporosis model in cynomolgus monkeys (14)

- Measurement of BMD in neck of femur using pQCT

Naoto HORAI, Hideshi TSUSAKI, Keizo TSURUTA, Koichiro FUKUZAKI and Hiroaki MIYAJIMA, Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd., Kagoshima 891-1394, Japan

○赤松 博<sup>1</sup>、渡辺 稔<sup>1</sup>、林 裕<sup>1</sup>、福崎好一郎<sup>2</sup>、宮脇宏彰<sup>2</sup>、  
世野公伸<sup>3</sup>、西川哲男<sup>4</sup>

<sup>1</sup>富士レビオ株式会社 医薬研究所、<sup>2</sup>株式会社 新日本科学 安全性研究所、<sup>3</sup>東北大学大学院医学系研究科、<sup>4</sup>横浜労災病院内科

【目的】最近、医薬品の毒性試験においてサルが汎用されてきている。しかし、サル副腎機能に関しては基礎的な検討はなされてはいない。そこで、我々はカニクイザルを用いた反復投与試験で副腎機能検査に関する基礎的な検討を行ったので報告する。

【方法】雌雄のカニクイザル（3～5才）を投与開始前に8週間の馴化期間を設けて副腎機能に関する検査を実施し、雌雄各6匹を選別して試験に用いた。投与は、0.5% CMC-Na水溶液を1日1回、経鼻胃内用ゾンアを用いて52週間連日強制経口投与した。副腎機能に関する検査として、馴化3及び5週、投与25及び50週（尿中ホルモン検査は51週）にACTH負荷試験、血中ホルモン検査、尿中ホルモン検査を実施した。病理組織学的検査は、副腎のHE染色標本、免疫組織化学的検査は副腎ホルモン合成酵素の発現動態を検討した。

【結果】血清コルチゾール値は、雌雄とも馴化開始時に高値を示したが雄では投与の継続とともに低値を示す個体がみられた。投与50週のACTH負荷試験では、ACTH投与60分値で血清コルチゾールがACTH投与前値の雄で約1.3～2.4倍、雌で1.0～1.8倍に増加を示した。病理組織学的検査では、副腎皮質束状帯に軽度のcortical noduleがみられた。免疫組織化学的検査では、各合成酵素の副腎皮質における発現動態は正常であった。

【結論】副腎はストレスによる影響を強くうける器官であるが、本試験の病理組織学的検査では明らかなストレス負荷を示唆する所見も観察されず、ACTH負荷試験によってもコルチゾール増加反応が認められ、その他の指標も安定していることより、副腎機能の評価は実施できるものと考えられた。

Analysis of Adrenocortical Function under Long-term Administration of Medications in Cynomolgus Monkeys.

Hiroshi AKAMATSU<sup>1</sup>, Kiyoshi WATANABE<sup>1</sup>, Yutaka HAYASHI<sup>1</sup>, Koichiro FUKUZAKI<sup>2</sup>, Hiroaki MIYAJIMA<sup>3</sup>, Nobuhiro SASANO<sup>3</sup>, Tetsuo NISHIKAWA<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Pharmaceuticals Research Laboratories, Fujirebio Inc., <sup>2</sup>Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd., <sup>3</sup>Tohoku University School of Medicine, <sup>4</sup>Department of Medicine, Yokohama Rosai Hospital

## L-dopa と脱炭酸酵素阻害剤の長期併用投与によるイヌの雄性生殖器系臓器及びリンパ節への影響

○川島明, 猪又 晃, 小林和子, 堀井郁夫

日本ロシュ(株)研究所 前臨床科学研究部

[目的] パーキンソン病治療薬として使用される L-dopa は脳内で dopamine に変換されることにより効果を発現する。今回, L-dopa と末梢(脳外)での L-dopa 代謝を阻害する Benserazide(脱炭酸酵素阻害剤)を長期間, 高用量で併用経口投与したところ, イヌの雄性生殖器に軽度な萎縮性変化と顎下リンパ節の黒色化が見られた。そこで雄性生殖器の病理組織学的変化と性腺刺激ホルモンとの関係を明らかにするため血中 Testosterone 量を測定し, さらに顎下リンパ節においては沈着色素の同定を行ない, L-dopa 代謝に関わる毒作用発現機構について考究した。

[方法] 22 ヶ月齢ビーグルに Madopar (L-dopa + Benserazide = 4:1) 100 mg/kg/day の用量で 13 週間連日併用経口投与し, 剖検すると共に, 血中 Testosterone 量を測定した。また, 顎下リンパ節は Fontana-Masson 及び Bleaching method にてメラニン証明のための染色を実施した。

[結果] 13 週間投与したビーグルの雄性生殖器(精巣, 精巣上体, 前立腺)では重量低下と萎縮性変化(精巣における精子形成の低下と精巣上体管内における精子の減少, 前立腺の萎縮)が認められた。また, 投与終了時の血清 Testosterone 値が有意に減少していた。さらに, 顎下リンパ節への沈着色素は陽性対照のメラニンと同様の染色態度を示した。これらの変化はラット及び 4 週間投与ビーグルでは見られていない。

[考察] dopamine は下垂体からの prolactin の放出を低下させる。また, prolactin は LH/FSH 分泌に対応し, Leydig cell の LH receptor 数及び Steroidogenesis に影響を及ぼすことが知られている。従って, L-dopa + Benserazide 投与により脳内 dopamine の持続的上昇に起因した内分泌系の変化から誘発された Testosterone の低下などにより雄性生殖器の萎縮性変化がもたらされたものと考えられた。また, 顎下リンパ節のメラニン沈着は, 末梢における L-dopa の代謝が Dopa oxidase によるメラニンへの代謝経路に進んだためと推察された。

Effect on male reproductive organs and lymph nodes in dogs treated for long period with L-dopa and decarboxylase inhibitor

Akira KAWASHIMA, Akira INOMATA, Kazuko KOBAYASHI and Ikuo HORII  
Dept. Preclinical Science, Nippon Roche Research Center, Kamakura, 247-8530, Japan

○ 大谷勝己、田井鉄男、宮川宗之

産業医学総合研究所

[目的] フロン代替品として用いられた2-ブロモプロパン(2BP)の曝露により韓国の半導体工場の労働者に生殖障害をきたした。また近時、内分泌攪乱化学物質(いわゆる環境ホルモン)が問題視されるようになり、雄性生殖毒性の重要性が再認識されている。しかし、従来の用手法(目視法)による精子検査の場合、測定者の主観に左右されやすく施設間比較ができない等の欠点がある。最近では画像解析法(CASA)が普及しつつあるが、高価な機器が必要となるため汎用性がない。このような状況で簡便・迅速かつ安価で多数検体処理能を有する客観的方法を併用しつつ2BPの精子毒性試験を実施するために、光学的手法であるMTT(テトラゾリウム塩)法およびSQA(Sperm Quality Analyzer)法の導入をはかった。

[方法] F344雄性ラットにオリーブオイルに溶解した2BPを週3回4週間腹腔内投与の後、麻酔下で解剖し精巣および精巣上体を採取した。重量測定後、精巣上体尾部からハサミで精子を37℃で保温下で培地に浮遊させ、①精子数を血球計算盤を用いて顕微鏡下で計測し、②マイクロプレートを用いたMTT法による吸光度測定③SQA法によるSMI(Sperm Motility Index)値の測定を行った。

[結果および考察] 2BPを1000mg/kgの高濃度で曝露した群において①精子数の減少②吸光度の低下③SMI値の低下が有意に認められた。これらは生存精子数、運動精子数の減少に依存した結果と考えられ、当該機器分析手法を併用することの有効性を示すものである。

(なお、本研究は科学技術振興調整費、生活・社会基盤研究のうちの生活者ニーズ対応研究『内分泌攪乱物質による生殖への影響とその作用機構に関する研究』の一環として行った。)

Evaluation of Testicular Toxicity of 2-Bromopropane using MTT and SQA Methods

Katsumi Ohtani, Tetsuo Tai and Muneyuki Miyagawa, National Institute of Industrial Health, Ministry of Labor, Kawasaki, 214-8585, Japan

Trimethyl Phosphateの5日間連続投与が精子運動能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1—

○福西克弘、寺岡美枝、粟田剛男

錦紡株式会社 薬品総合研究開発センター 薬品研究所

**[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、精子運動能及び精子数への影響が知られているTrimethyl Phosphate(TMP)を連続投与し、CASAの一つであるHamilton Thron Research社製精子運動能解析装置(IVOS)を用いて影響を検討したので報告する。**[材料及び方法]**動物は11週齢のC57BL/6 CD (SD) IGS系雄ラットを用いた。TMPの60、200及び600mg/kg/日を5日間連続経口投与し、投与開始後6日にラットをエーテル麻酔下で屠殺し、精巣上体尾部から得られた精子についてIVOSを用いて測定した。また、精巣重量及び精子数についても測定した。**[結果及びまとめ]**運動精子率はTMP600mg/kg群で30.7%と、対照群の83.3%と比べ有意な低下が見られた。しかし、TMP60及び200mg/kg群では運動精子率の低下は認められなかった。精子運動能については、Swimming Speedの指標であるPath Velocity、Straight Line Velocity及びCurvilinear VelocityがTMP200mg/kg群から対照群に比べ低下傾向あるいは有意な低下を示した。Swimming Patternの指標ではBeat FrequencyがTMP200mg/kg群から有意に増加した。Lateral AmplitudeはTMP600mg/kg群でも明らかな変化は見られなかった。その他の指標では、200mg/kg群でStraightness、Linearity及びProgressiveの低下が認められた。精巣重量及び精子数はTMP600mg/kg群で有意に低下した。以上のように、Swimming Speed及びSwimming PatternはTMPの精子運動能への影響を早期に示すIVOSの精子運動能測定指標であると考えられた。

The Effect of Trimethyl Phosphate for 5 days Treatment on Sperm Motile - Changes of Characteristic CASA system (IVOS) Parameters -.

Katsuhiko FUKUNISHI, Mie TERAOKA and Norio AWATA,

Pharmaceutical Research Laboratories, Pharmaceuticals R & D Center,  
KANEBO LTD., Osaka 534-8666, Japan

Nitrobenzene (NB) を投与したラット精子の flow cytometry (FCM) による解析

○山本敏誠, 山本美津雄, 河下 伸, 米山 充, 今西雅典, 竹内正紀

吉富製薬株式会社 研究本部 安全性研究所

〔目的〕生殖発生毒性試験では、化合物による雄性生殖能の評価のために、精子検査が実施されている。我々は効率性と客観性の面から、FCM に着目し、FCM を用いた精子数および精子生存率の同時解析法を検討してきた。今回、精子の形態変化の同時解析法についても検討し、精巣毒性を有する NB を用いて、本法の有用性を検証したので報告する。

〔方法〕100 又は 300 mg/kg の NB を 8 週齢の SD 系雄ラットに単回経口投与した。投与 28 日後に、10 例群を無処置の雌と交配させて生殖機能を検査した。また、別途、8 例群を安楽死させ、精巣および精巣上体重量を測定し、精巣上体尾部より採取した精子を FCM および顕微鏡を用いて解析した。更に精巣および精巣上体の病理組織学的検査を実施した。

〔結果〕100 mg/kg では、全ての検査項目に NB による影響を認めなかった。300 mg/kg では、精巣重量、精巣上体重量および授胎率が低下した。また、病理組織学的検査により、精細管の萎縮、セルトリ細胞の空胞化等を認めた。更に、顕微鏡観察により、運動率の低下および形態異常発生率（特に尾部離脱精子の割合）の増加を認め、300 mg/kg では精子形成能および授胎能への強い影響が窺えた。このような NB による障害を受けた精子を FCM で解析した結果、精子数および精子生存率の低下を認めた。更に、興味深いことに、FCM の light scatter histogram で、正常な精子が分布されない領域の精子が増加した。同領域には、単離した尾部離脱精子が分布したことから、これらの精子は、尾部離脱精子である可能性が示唆され、FCM の light scatter histogram で尾部離脱精子の出現率を確認できると考えた。

〔結論〕本法により NB による精子への影響を検出できた。本法は、同一試料中の精子数、精子生存率および尾部離脱精子率を、1 回の測定により、同時に解析可能であることから、化合物の精子への影響を評価する上で、有用な方法であることが示唆された。

Flow cytometric analysis (FCM) of sperms taken from rats treated with nitrobenzene (NB).

Toshinobu YAMAMOTO, Mitsuo YAMAMOTO, Shin KOHGE, Mitsuru YONEYAMA, Masanori IMANISHI and Masaki TAKEUCHI. Safety Evaluation Laboratory, Yoshitomi Pharmaceutical Industries Ltd., Fukuoka-871-8550, Japan.



○船橋 齊, 椋本健次, 立石湯美, 千原和弘, 松岡信男

大日本製薬㈱ 開発研究所

【目的・方法】 Crj:CD(SD) 系 IGS [以下 CD(IGS) 系] ラットは、遺伝的分岐を可能な限り最小限にすることを目的として考案された動物である。我々は、本系統で新規化合物の催奇形性を評価するにあたり、催奇形性薬剤に対する本系統の反応性を検討した。ラットに心・大血管異常および胸骨異常を誘起することが知られている抗てんかん薬 Phenobarbital を CD(IGS) 系, Jcl:SD (以下 SD) 系および Jcl:Wistar (以下 Wistar) 系ラットに 20, 40, 80mg/kg の用量で妊娠 7~17 日に経口投与し、妊娠 21 日に帝王切開して、胎児の内臓および骨格を検査した。

【結果】 内臓では、すべての系統の 40mg/kg 以上に心室中隔欠損の増加、80mg/kg に部分的大血管転換、肺動脈發育不全および総房室管遺残の増加がみられ、さらに CD(IGS) および SD 系の 80mg/kg に完全大血管転換、騎乗大動脈、胸腺頸部残留の増加、CD(IGS) 系の 80mg/kg に総動脈幹、房室弁中隔尖亀裂の増加がみられた。骨格では、異常として CD(IGS) および SD 系の 80mg/kg に胸骨分節癒合の増加、変異として CD(IGS) および SD 系の 40mg/kg 以上に過剰肋骨、80mg/kg に腰椎過剰の増加がみられた。骨化進行では、すべての系統の 20mg/kg 以上に頭蓋骨および胸椎体の骨化遅延がみられたが、この変化に胎児体重との関連は認められなかった。

【考察・結論】 CD(IGS) 系では Phenobarbital により心・大血管系、胸腺および胸骨の異常、肋骨および腰椎の変異、ならびに頭蓋骨および胸椎体の骨化遅延がみられ、その異常および変異の型と発現頻度ならびに発現用量は SD 系とほぼ同等であった。Wistar 系では心・大血管系異常および骨化遅延は同様にみられたものの、胸腺および胸骨の異常、ならびに肋骨および腰椎の変異は認められなかった。

Response and Strain Difference of Crj:CD(SD) IGS Rats on Teratogenicity of Phenobarbital.

Hitoshi FUNABASHI, Kenji MUKUMOTO, Yumi TATEISHI, Kazuhiro CHIHARA and Nobuo MATSUOKA. Developmental Research Laboratories, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd, Osaka 564-0053, Japan.

○伊藤今日子, 佐々木智, 吉田康介, 岡宮英明, 花田貴宣, 堀俊治

山之内製薬㈱ 安全性研究所

[背景] ニトロフラゾンは4週間の反復投与で精巣毒性を示すことが確認されている。今回、2週間の反復投与でも精巣への影響が確認できるかを検討した。同時にその初期変化について経時的に検討した。

[方法] 雄SDラットに6週齢から50mg/kgの投与量で4週間、あるいは8週齢から50および100 mg/kgの投与量で2週間一日一回反復経口投与し、精巣と精巣上体を摘出後、重量を計測した。ブアン固定後、パラフィン切片を作製し、H&EおよびPAS染色を施し組織学的に検査した。また6週齢から50および100 mg/kgを投与したラットについて投与1, 2, 4, 7および10日間の変化の推移を追った。

[結果] 2および4週間投与した全ての動物で精巣および精巣上体重量の減少がみられ、顕著な精細管の萎縮と精巣上体管内の精子数の減少がみられた。精細管内に精子細胞は全く見られず、セルトリ細胞のみの精細管から様々な数の精母細胞を含む精細管までみられたが、いずれにおいても減数分裂中の精母細胞はみられなかった。ときに精母細胞由来と思われる多核巨細胞も観察された。また、全例でライディッヒ細胞の肥大、および一部の動物で増生がみられた。

変化は50mg/kgでは投与4日から、100mg/kgでは投与2日から主として精母細胞および精子細胞の変性あるいは壊死としてみられた。

[結論] ニトロフラゾンの精巣に対する影響は精母細胞および精子細胞の変性あるいは壊死として短期投与で発現することが判った。

#### A testis toxicity study of nitrofurazone in rats

○Kyoko Ito, Satoru Sasaki, Kohsuke Yoshida, Hideaki Okamiya, Takanori Hanada,  
Toshiharu Sakai  
Safety Research Laboratories, Yamanouchi Pharmaceutical, Co., Ltd.

○滝沢節子、松本博隆、猪又晃、堀井郁夫

日本ロシュ（株）研究所、前臨床科学研究部

〔目的〕 5-FU のラット雄生殖器に対する毒性学的影響を、血清中の生殖系ホルモンの変動を中心に内分泌学的に評価した。

〔方法〕 SD-S1c 雄ラットに、5-FU を 2/4 週間 (0, 20, 30 mg/kg/day) 反復投与を行い、投与終了時に採取した血清中の生殖系ホルモン (FSH, LH, GnRH, Pro-alpha C, Prolactin, total & free Testosterone, Activin A, Inhibin B) を測定すると共に、生殖器の病理学的検査を行った。

〔結果および考察〕 5-FU 投与群で精細管の変性や精子形成減少等の精巣の病理組織学的変化がみられた。FSH および LH については投薬による明瞭な影響は認められなかったが、GnRH は投薬群で増加、さらに、FSH によりその合成が調節される Pro alpha-C も投薬群で増加が認められた。精子形成の各段階に作用し、また LH による Testosterone 合成を増強する Prolactin は投薬群で減少が認められた。Testosterone は投薬群で著明な減少が認められたが、その合成の場である Leydig 細胞には病理組織学的に著変は認められず、この減少は 5-FU により誘導された Testosterone の代謝酵素の変化に起因しているのではないかと推測された。Leydig 細胞から分泌される Activin は投薬群で減少が認められた。Sertoli 細胞の機能を反映する Inhibin B については投薬群で減少傾向が認められ、特に Sertoli 細胞の空胞化が観察された例では低い値を示した。

〔結論〕 5-FU の雄生殖毒性は、精子形成細胞の正常な細胞分裂を阻害する 5-FU の直接的な作用に主に起因していると考えられるが、上記に示した Prolactin や Testosterone の減少および Sertoli 細胞の機能低下を介しても、その毒性が増強されるのではないかと考えられた。

Endocrinological assessment of male reproductive toxicity in rats induced by 5-FU treatment.

Setsuko TAKIZAWA, Hirotaka MATSUMOTO, Akira INOMATA and Ikuo HORII. Dept. Preclinical Science, Nippon Roche Research Center, Kamakura, 247-8530 Japan.

ハムスターテストによる雄の受胎能検査の Adriamycin 投与ラットを用いた検討

○藤井咲子<sup>1</sup>、菅千里<sup>1</sup>、和田理穂<sup>1</sup>、須永昌男<sup>1</sup>、中島準子<sup>1</sup>、  
高橋智亜紀<sup>1</sup>、古川正敏<sup>1</sup>、一花次夫<sup>1</sup>、川島邦夫<sup>2</sup>

<sup>1</sup>株式会社 化合物安全性研究所 安全性研究部門

<sup>2</sup>国立医薬品食品衛生研究所 大阪支所 生物試験部

[目的] 精子の受胎能は、化学物質の雄性生殖能への影響を評価する指標の一つである。検査法は自然交配によるものであるが、交尾が成立しない場合は直接的な判定はできない。そこで、交尾率の低下することが知られる Adriamycin (ADR)を投与した雄ラット精子を用いてハムスターテストを実施し、受胎能の判定が可能であるかを検討した。

[方法] SD系の雄ラット(10週齢)に、1 mg/kg/dayのADRを、28日間毎日腹腔内に投与した。対照群には生理食塩液を同様に投与した。投与終了日に、ADR投与群16匹、対照群10匹の雄を無処置発情前期雌と1対1で一晩同居させて交尾率を調べた。交尾が確認されなかったADR投与群10匹と未交配の対照群10匹について、投与終了日の翌日にハムスターテストを行った。さらに精巣および精巣上体の重量測定と病理組織学的検査も併せて実施した。交尾成立雌は妊娠14日に剖検して妊娠の有無を確認した。

[結果および考察] ADR投与群の交尾率は37.5%(対照群:100%)に低下した。交尾成立雌は精巣の精祖細胞の消失が認められたが、受胎率は100%であり、平均着床数(15.7)は対照群(15.1)とほぼ同じであった。一方、交尾不成立雌では、精巣の障害の程度は交尾成立雌とほぼ同じであったが、体重減少および一般状態の悪化が顕著であった。これらのことから、交尾不成立の主な原因は、ADR投与による一般状態への悪影響であると推察される。ハムスターテストの結果では、交尾不成立雌の精子侵入率(42.2%)は、対照群(66.0%)より低いものの、成熟精子を障害するとされる $\alpha$ -Chlorohydrinを投与した雄の結果(0%、第37回日本先天異常学会)より高かった。以上の事より本研究では、自然交配では交尾が成立しない場合の受胎能を調べる検査方法として、ラット精子ハムスターテストの有用性が示唆された。

A Study on Application of Zona Free Hamster Egg Sperm Penetration Test for Male Rat Fertility Testing Using Adriamycin-Administered Rats

Sakiko FUJII<sup>1</sup>, Chisato SUGA<sup>1</sup>, Riho WADA<sup>1</sup>, Masao SUNAGA<sup>1</sup>, Noriko NAKAJIMA<sup>1</sup>, Chiaki TAKAHASHI<sup>1</sup>, Masatoshi FURUKAWA<sup>1</sup>, Tsuguo IKKA<sup>1</sup>, and Kunio KAWASHIMA<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Safety Research Division, Safety Research Institute for Chemical Compounds Co., Ltd, Sapporo, Hokkaido, Japan. <sup>2</sup>Division of Biological evaluation, National Institute of Health Sciences, Osaka Branch, Osaka, Japan.

Dibromoacetic acid によるラット精巣および精巣上体の病理組織学的  
変化の2週間反復投与毒性試験による検出

○土屋 毅幸, 佐野 文子, 杉本 次郎, 小林 深, 大山 直樹,  
佐藤 実, 務台 衛

三菱化学(株)横浜総合研究所 安全性研究所

【緒言】化学物質の雄性生殖器への影響評価が、げっ歯類を用いた2週間毒性試験の病理検査で検出可能かどうかを確認するため、精巣毒性物質として知られるDibromoacetic acid (DBAA)を用い以下の検討を行った。

【材料と方法】動物は8および6週齢のSD系雄ラットを使用した。DBAAは0, 5, 50および250mg/kgの用量で1日1回強制経口投与した。5, 50mg/kg群にはそれぞれ2および4週間投与群を、250mg/kg群には2週間投与群を設定した(各群6匹)。投与期間終了後、動物を屠殺し精巣および精巣上体を摘出、重量測定した。その後、精巣はブアン液にて、精巣上体は中性緩衝ホルマリン液にて固定し、常法に従いH.E.染色標本作製し検査した。

【結果】いずれのDBAA投与群においても体重および精巣重量への影響は認められず、肉眼的にも精巣および精巣上体に変化は見られなかった。250mg/kgの2週間投与群で精巣上体の実重量の低値が見られた。病理組織検査において、250mg/kgの2週間投与群、50mg/kgの4および2週間投与群で精巣に異型遺残体、精子遺残がほぼ全例に認められた。また、250mg/kgの2週間投与群では、精巣上体の管腔内に異型遺残体が見られ、管腔の狭小化も認められた。5mg/kgでは4週間投与群の1例にのみ精巣に精子遺残が見られた。

【結論】DBAAに関しては本試験条件下で、2週間投与でも4週間投与の場合と同程度に、精巣あるいは精巣上体の病理組織変化が検出できることが明らかとなった。

Detection of Dibromoacetic acid-induced histopathological changes in testes and epididymides of rats by 2-week repeated dose toxicity study.

Takayuki TSUCHIYA, Fumiko SANO, Jiro SUGIMOTO, Kiyoshi KOBAYASHI, Naoki OYAMA, Minoru SATO and Mamoru MUTAI. Toxicology Laboratory, Yokohama Research Center, Mitsubishi Chemical Corporation

4,6-Dinitro-*o*-cresol 投与ラット精巣上体精子における形態異常の発現

○高橋研, 菊田雅行, 青山博昭, 寺本昭二

財団法人 残留農薬研究所 毒性第1部

[目的] ジニトロフェノール系化学物質4,6-Dinitro-*o*-cresol (DNOC) を雄ラットに5日間経口投与 (15 mg/kg/day) すると, 投与終了後14日目の精巣上体尾部精子に尾の離断と運動精子率の低下が認められる (本学会第25回学術年会)。今回の実験では, DNOC投与ラットにおける異常精子出現の経緯を明らかにするため, 精巣上体頭・体・尾各部における精子の形態的变化を投与終了直後から経時的に観察した。

[材料および方法] 0, 10, 15 mg/kgのDNOCをcorn oil (5 ml/kg) に溶解し, Jel:SDラットに5日間連続強制経口投与した。投与終了後1, 7, および14日に精巣上体を摘出し, 頭, 体, 尾に3分割してそれぞれに含まれる精子をD-PBSに拡散させ, 精子浮遊液を得た。精子浮遊液を希釈して血球計算盤で精子数を数えた後, 200個の精子について位相差顕微鏡下で形態を観察した。さらに, 一部の精子標本については, 走査電子顕微鏡下で形態を精査した。

[結果および考察] 15 mg/kg投与群では異常精子率の顕著な上昇が認められ, 異常精子の主な出現部位は投与終了後1日で頭部, 7日で体部, 14日で尾部と経時的に変化した。各部における異常率の上昇は一過性であり, 前述の時期に最高となった後低下した。また, 投与終了後1日と7日に見られた異常は精子の中片部/尾部主部における限局性の表層剥離であったのに対し, 14日では尾の離断がほとんどであった。10 mg/kg群でも同様の変化が観察されたが, その頻度は低かった。これらの結果から, DNOCにより引き起こされる精子の形態的異常は精巣内完成期精子への暴露に由来し, まず精巣上体頭部において中片部/尾部主部の表層が限局的に剥離して内層が露出し, 後に頭部と尾部が離断するものと考えられた。

Appearance of Morphologically Abnormal Sperm in the Caput, Corpus, and Cauda Epididymis of Male Rats after treatment with 4,6-Dinitro-*o*-cresol.

Ken TAKAHASHI, Masayuki KIKUTA, Hiroaki AOYAMA, and Shoji TERAMOTO. Toxicology Division I, Institute of Environmental Toxicology, Ibaraki 303-0043, Japan.

Ethinylestradiol のラット精巣上体への影響：  
精子運動の変化と雄性腺系の機能・形態との関係

○兼藤 雅子, 金森 進, 菱川 敦子, 岸 倉次郎

塩野義製薬株式会社 新薬研究所

【目的】Ethinylestradiol (EE) 投与ラットの精巣上体精子変化を、授胎能、精巣組織、内分泌等との関係を含めて検討し EE の雄の性腺系への影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】11 週齢の成熟雄ラットに EE (1 および 10mg/kg) を 3, 5 日間と 1, 2, 3 および 4 週間、反復経口投与し (対照はゴマ油)、最終投与翌日に解析を実施した。

【結果および考察】精子運動の変化は 1 週間で 10mg/kg 群に、2 週間で両投与群に、運動精子率、運動速度および首振り振幅値 (ALH) の低下として認められ、それに伴い授胎能も 1 週間から低下した。また、同時に精巣上体尾部中精子数も 1 週間で顕著に減少したのに対し、精巣中精子数および精上皮の組織変化は 2 週間までごく軽度であった。これらのことから、精巣上体精子の機能や数の変化は、精巣障害を反映したのではなく、精巣上体への直接作用によることが示唆された。3 週間以上の投与では、精細管の著しい障害と精巣中精子数の顕著な減少が認められ、それに伴い精巣上体精子の運動性、数もさらに低下した。一方、血中の testosterone (T) 濃度は 3 日間で完全に低下し、同時に血中 LH および FSH 濃度も低下した。また、精上皮においても stage VII での精母細胞の変性、stage VIII 以降での step 19 の精子細胞の遺残等、T 低下時に特徴的な変化が認められた。これらの結果から EE による negative feedback 機構を介した T の低下が、精巣・精巣上体の変化の要因であることが示唆された。

【結論】EE は精巣に著明な障害を起こす前に短期間で精巣上体に影響を及ぼすことが明らかとなった。T の低下を介して、精巣のみならず精巣上体にも作用し、精子運動、精子数の低下と、それに伴う授胎能低下を引き起こすことが示唆された。精子運動評価はこのような精巣上体精子への影響を捉えるのに有用な手段となり得る。

Effects of Ethinylestradiol on Epididymis in Rats:

Correlation of Sperm Motion with Function and Morphology of Male Reproductive Organs

Masako KANETO, Susumu KANAMORI, Atsuko HISHIKAWA and Kurajiro KISHI. Developmental Research Laboratories, Shionogi & Co., Ltd., Osaka 561-0825, Japan

マウスおよびラットの卵巣機能に対する2-Bromopropane  
の阻害効果

○関口総一郎、浅野伍郎\*、須田恵、本間健資

労働省産業医学総合研究所、\*)日本医科大学

「目的」2-Bromopropane (2-BP) は、オゾン層を破壊するとして使用が規制されているフロン<sup>®</sup>の代替化学物質として注目され、電子部品の洗浄作業などに盛んに用いられた。近年、韓国の電子部品工場において2-BPが原因と考えられる集団中毒が発生した。その中毒症状として男性においては乏精子症および無精子症が、女性においては無月経症が認められた。これにより、生殖腺に対する2-BPの毒性効果が疑われ、その詳細に関する動物実験が既に行われているが、卵巣機能に対する2-BPの影響は十分に検討されていない。そこで、本研究においては、排卵卵子数を指標として2-BPの卵巣毒性効果を検討した。「方法」ICR系マウスに対して500・1, 000・2, 000ng/kgの2-BPを、F344系ラットに対して500・1, 000ng/kgの2-BPを2または3日間隔で合計7または8回、腹腔内投与した。その後、PMSG-hCG誘起排卵処理による排卵卵子数、または自然排卵による排卵卵子数を数えた。同時に、内臓の諸臓器重量および生殖腺の重量測定、血中生化学値の検討を行った。「結果と考察」マウスおよびラット共に生殖腺以外の臓器の重量に対する2-BPの影響は認められなかった。また、血中生化学値からは、明らかな肝臓および腎臓障害を示す結果を得ることができなかった。これらに対して誘起排卵卵子数および自然排卵卵子数は、2-BP投与群において有意な減少を示した。以上の結果より、本研究で用いた2-BPの投与スケジュールにおいて、齧歯目雌個体に対する2-BPの毒性効果は生殖腺に特異的であると考えられ、排卵を阻害する卵巣毒性作用が明らかに認められた。

Inhibitory Effect of 2-Bromopropane on Murine Ovarian System.

Soichiro SEKIGUCHI, Goro ASANO\*, Megumi SUDA, Takeshi HONMA,  
National Institute of Industrial Health, Kawasaki 214-8585,  
\*)Nippon Medical School, Tokyo 113-8602, Japan



体外におけるマウス卵子の減数分裂の進行と染色体数に及ぼす  
Griseofulvin の影響

○田中 亮太<sup>1,2)</sup>・笹浪 知宏<sup>2)</sup>・鳥山 優<sup>3)</sup>・森 誠<sup>3)</sup>

1) 岐阜大学大学院連合農学研究科, 2) (財) 食品農医薬品安全性評価  
センター, 3) 静岡大学農学部

【目的】マウスの卵子は出生直後から排卵までの間、第一減数分裂前期 (GV 期) で停止している。この時期の卵子を卵胞から抽出し、*in vitro* で培養すると、第二減数分裂中期まで進行させることができる。そこでこの培養法を応用して、体細胞有糸分裂や *in vivo* で生殖細胞の減数分裂の進行に影響を及ぼし、染色体の数的異常を起こすことが知られている Griseofulvin (GF) を体外成熟中のマウス卵子に暴露し、減数分裂の進行や染色体数に及ぼす影響を調べた。

【材料および方法】3～4週齢の ICR 雌マウス (Slc:ICR) に妊馬血清性腺刺激ホルモンを投与し、48 時間後に卵丘細胞に含まれた卵子を採取した。培養液には修正 Whitten's Medium を用い、卵子は 5%炭酸ガス、37℃の条件で培養した。GF は、1、3 および 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度になるようにジメチルスルフォキシドに溶解して培養液に添加した。培養終了後、卵丘細胞を除去して卵子を観察するとともに、GV 期以外の卵子については染色体の伸展標本を作製し、第一減数分裂中期 (MI) および第二減数分裂中期 (MII) の染色体像を観察した。MII については染色体数を数えた。

【結果】0、1、3 および 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の GF で 15 時間培養した結果、3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上の群で第一減数分裂前期あるいは MI に停止する卵子の割合が用量依存的に増加し、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  群では MII まで進行した卵子は認められなかった。また、3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  群で MII まで進行した卵子では染色体数異常の発生率が増加した。10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で暴露時間の違いによる影響を調べた結果、GF は GV 期から MI までの過程に作用すると減数分裂の進行の遅れや Diploid を起こし、MI から MII までの過程に作用すると染色体の分離異常を起こすことが示唆された。

Effect of griseofulvin on meiotic maturation and aneuploidy in mouse oocyte *in vitro*

Ryota Tanaka 1)2), Tomohiro Sasanami 2), Masaru Toriyama 3), Makoto Mori 3)  
The United Graduate School of Agricultural Science, Gifu University 1)  
Biosafety Research Center, Foods, Drugs and Pesticides (An-pyo Center) 2)  
Faculty of Agriculture, Shizuoka University 3)

○江馬 航, 宮脇英美子, 原園 景, 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, triphenyltin chloride (TPTCl) をラットの妊娠初期に投与したとき着床阻害を惹起することを報告した (Reprod. Toxicol., 11, 201-206, 1997)。今回は, TPTCl の代謝物である diphenyltin dichloride (DPTCl) をラットの妊娠初期に投与したときの影響について検討した。

ラットの妊娠 0-3 日 (精子発見=妊娠 0 日) または妊娠 4-7 日に 4.1, 8.3, 16.5, 24.8 または 33.0 mg/kg の DPTCl 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。

妊娠 0-3 日の 24.8 mg/kg 投与群における妊娠率は 42.9% となり, 対照群に比べて有意に低かった。妊娠 0-3 日の 16.5 及び 24.8 mg/kg 投与群では着床前胚死亡率が有意に高かった。妊娠 0-3 日投与の着床が認められたラットにおいては, 黄体数, 着床数, 着床前及び着床後胚死亡率, 生存胎児数に DPTCl 投与による影響はみられなかった。妊娠 4-7 日の 33.0 mg/kg 投与群における妊娠率は 38.5% となり, 対照群に比べて有意に低かった。妊娠 4-7 日投与の着床の認められたラットにおいては, 黄体数及び着床数には DPTCl 投与による影響はみられなかったが, 33.0 mg/kg 投与群で生存胎児数が有意に減少し, 着床後胚死亡率が有意に上昇した。妊娠 0-3 の 24.8 mg/kg 投与群または妊娠 4-7 日の 33.0 mg/kg 投与群のラットの飼料摂取量と同量の飼料を与えた Pair-fed 群においては, 妊娠率, 着床前及び着床後の胚死亡率に飼料摂取の低下による影響は認められなかった。

これらから, DPTCl をラットの妊娠初期に投与したとき胚致死作用を示し, この作用は妊娠のより早期に投与したときに強く発現することが明らかになった。

Early embryonic loss induced by diphenyltin dichloride in rats.

Makoto EMA, Emiko MIYAWAKI, Akira HARAZONO and Kunio KAWASHIMA,  
National Institute of Health Sciences, Osaka Branch, Osaka 540-0006, Japan.

## SD系ラットの胚・胎児死亡ならびに胎児体重に及ぼす子宮内の着床位置による影響

○稲若邦文、中間政直、橋本知春、成田亜矢子、川村 聡

住友化学工業株式会社 生物環境科学研究所

〔目的〕生殖発生毒性試験で行われる胎児の観察では、子宮内の位置により胎児体重に差があることが経験的に知られているが、一方で、このようなpositional effectに関する報告は少ない。今回、我々は、当所において実施したラットの子宮内所見のデータを抽出し、着床あるいは生存胎児数ごとに集計することで、着床位置の情報を単純化し、これらの及ぼす胚・胎児死亡あるいは胎児体重への影響について解析を試みた。

〔方法〕解析には、当所で1993年から1998年に実施した、SD系ラットを用いた生殖発生毒性試験における対照群のデータ（165腹、交尾成立確認日=妊娠0日、帝王切開日=妊娠20日）を用いた。子宮角ごとに着床数、胚・胎児死亡数、生存胎児数および生存胎児体重を子宮内の着床位置の情報とともに抽出し、左右の区別なく、子宮角を1単位として着床（生存胎児）数あるいは位置ごとに集計した。

〔結果〕子宮角あたりの平均着床数は $7.7 \pm 2.49$ 、平均生存胎児数は $7.2 \pm 2.46$ であった。子宮角あたりの胚・胎児の死亡数は、着床数とともに増加する傾向がみられたが、胚・胎児の死亡率に換算すると、着床数の違いによる顕著な差はみられなかった。生存胎児体重では、子宮角あたりの生存胎児数が3から11の間ではほとんど変動がみられなかった（ $3.21 \sim 3.31g$ 、平均 $3.24 \pm 0.32g$ ）が、12匹以上では漸減する傾向がうかがえた。子宮内の位置が及ぼす影響について、最もサンプル数の多かった着床数9、生存胎児数8の場合を検討した結果、胚・胎児死亡については着床位置の明らかな影響は認められなかったが、生存胎児体重では、卵巣側が最も軽く（ $3.12 \pm 0.365g$ ）、子宮頰部に向けて増加する傾向がみられた（ $3.18 \sim 3.38g$ ）。

## Effects of Intrauterine Position on Resorptions and Fetal Weight in the SD Rat.

Kunifumi INAWAKA, Masanao NAKAOKA, Chiharu HASHIMOTO, Ayako NARITA and Satoshi KAWAMURA. Environmental Health Science Laboratory, SUMITOMO Chemical Co., Ltd. Osaka, Japan.

○納屋聖人，井本秀樹，佐内勇夫，武藤秀樹，飯田 茂，  
小島夏樹

協和発酵工業株式会社安全性研究所

非イオン系界面活性剤であるポリソルベート 80 は溶媒としてしばしば毒性試験に用いられている。ポリソルベート 80 をイヌに静脈内投与すると掻痒行動や皮膚の発疹が発現するものの、ラットではこのような影響は発現しないことが知られている。しかしながらウサギに対するポリソルベート 80 の影響に関しては報告が少ないため、今回我々はウサギの妊娠 6 日から 18 日までポリソルベート 80 を静脈内投与して、母動物と胎児に対する影響を検討した。

北山ラベスから購入した日本白色種ウサギ(Kbl:JW,SPF)雌雄を交配させて妊娠動物を得た。ポリソルベート 80 は体重 1kg あたり 2ml になるように生理食塩液で調整し、1, 3, 10mg/kg を耳介静脈から 1ml を約 5 秒の速度で投与した。対照群には生理食塩液を同様に静脈内投与した。

母動物の一般状態観察、妊娠期間中の体重推移、摂餌量に関しては対照群とポリソルベート 80 投与群の間で差はみられなかった。妊娠 28 日に実施した開腹検査では黄体数、着床数、生存胎児数、胎児生存率、胎児死亡率、胎児体重、胎盤重量は対照群とポリソルベート 80 投与群の間で差はなかった。胎児の奇形に関する観察ではいずれの群においても外部異常の発現はなく、また骨格異常、内部異常の発現率はいずれも低値であった。骨格変異としては腰肋や痕跡状過剰肋骨が対照群を含む各群でみられたものの、群間に差はみられなかった。

これらの成績からポリソルベート 80 は 10mg/kg 以下の用量ではウサギを用いる実験に使用することに支障はないと考えられた。

Effects of polysorbate 80 on dams and fetuses in rabbits.

Masato NAYA, Hideki IMOTO, Isao SANAI, Hideki MUTOH, Shigeru IIDA and Natsuki KOJIMA. Toxicological Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Ube-755-8501, Japan.

## In vitro 神経毒性評価系としてのラット脳スフェロイド (SP) 培養系の検討

○井上 智彰、堀井 郁夫

日本ロシュ(株) 研究所 前臨床科学研究部

**[目的]** 創薬初期における毒性評価には、必要とされる薬物量が少ないこと、同時に多くの薬物の評価ができることが要求され、High Throughput Toxicology の1つとして In vitro 毒性評価系は必須である。今回は、in vitro 神経毒性評価系として、ラット胎児脳より調製した再凝集 SP 培養系の有用性について検討したので報告する。

**[方法]** 交配 17 日目の SD ラット胎児大脳を摘出し、単細胞浮遊液を調製し、Poly-HEMA コート Plates に分注後、37°C、5%CO<sub>2</sub>、ロータリーシェイカー上で、数日から数ヶ月間培養した。培養開始 2、3 日後には SP が形成されたが、経時的に H-E 標本を作製することにより形態を観察し、Acetylcholinesterase (AChE)、2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase (CNP) 活性の経時変化を調べた。既知の神経毒性物質として、6-Aminonicotinamide (6-ANA)をこの培養系に添加し、形態および、タンパク質量、AChE、CNP の変化を測定した。

**[結果及び考察]** ラット脳 SP の形態は、in vivo の脳に酷似し、経時的に神経系に特異的な酵素の含量が増加し、in vitro 培養系で神経系が分化成熟することが示唆された。6-ANA の添加により、散在性の空胞化が認められ、グリア細胞マーカーの CNP が特異的に低下しているのが観察された。この 6-ANA による CNP の低下は、用量相関的であり、暴露日数に依存して低下が亢進していた。また、CNP の低下は、形態学的変化に良く相関していた。このように、ラット胎児脳より調製した SP 培養系は、in vivo の脳を形態学的、生化学的に再現しており、神経毒性物質 6-ANA の培養系への添加によっても、既に報告されている in vivo での変化と同様の変化を示し、in vivo に非常に近い in vitro 毒性評価系として、重要であると考えられた。

An Investigation of A Rat Brain Spheroid Culture System for the In Vitro Evaluation of Neurotoxicity.

Tomoaki INOUE and Ikuo HORII. Dept. Preclinical Science, Nippon Roche Research Center, Kamakura, 247-8530, Japan.

Functional Observational Battery (FOB) 及び神経病理学的検査による  
神経毒性の検討: Paclitaxel のマウスにおける末梢神経毒性

○磯和弘一, 吉田牧子, 豊吉亨, 大洞大典, 今井順, 満石三喜男,  
満園東治

(株)日本生物化学センター 岐阜研究所

**【目的】**Paclitaxel ( $C_{47}H_{51}NO_{11}$ ) は西洋イチイ (*Taxus brevifolia*) 樹木成分由来の抗腫瘍薬である。Paclitaxel は臨床においてしびれ, 知覚異常, grip strength の低下等を主徴とする末梢神経症状を引き起こすことが報告されている。実験動物ではマウス及びラットで末梢神経毒性を誘発することが報告されているが, 詳細な神経病理学的特徴については不明な点が多い。今回 paclitaxel のマウスに対する神経病理学的特徴を明らかにする目的で神経毒性試験を実施した。

**【方法】**6週齢の Crj:BDF<sub>1</sub> マウスに, 0 または 30 mg/kg の paclitaxel を 2日に1回, 3回 (Day 1, 3, 5) 静脈内投与し, 21日間の観察期間中, 詳細な一般状態観察, Tail pinch test, 傾斜板法及び Rota-rod 検査からなる FOB を実施した (Day 6, 14 及び 21)。実験終了時, 灌流固定を行い, 神経病理組織学的検査を行った。

**【結果及び考察】**FOBにおいて, Day 6に忌避反応の減少によるハンドリングの容易さが認められた。Tail pinch testではDay 6に反応潜時の延長が, 傾斜板法では全ての検査時期に落下角度の有意な低値が認められた。Rota-rod 検査ではDay 6にのみ落下回数が増加傾向が認められた。病理組織学的検査では, 坐骨及び脛骨神経に髄球の増加が, ときほぐし検査で myelin ovoid and balls の増加を主体とする異常神経線維の増加が認められた。神経線維ヒストグラム解析では, 大径有髄神経線維の減少が認められた。Paclitaxel は大径有髄線維を標的とする末梢神経毒性を発現することが明らかとなった。Paclitaxel のマウスにおける末梢神経毒性 profile はヒト末梢神経障害 profile とよく類似しており, 本試験法は類縁化学物質のヒトでの末梢神経障害性予測に有用な試験系となり得るものと考えられた。

Peripheral neurotoxicity induced by paclitaxel in mice

Koichi ISOWA, Makiko YOSHIDA, Tohru TOYOSHI, Daisuke OBORA, Jun IMAI,  
Mikio MITSUISHI and Toji MITSUZONO.

Gifu Research Laboratories, JBC Inc., Gifu 503-0628, Japan

## Paclitaxel のマウス神経毒性誘発における投与スケジュールの影響

○三村雄一、小川哲郎、加藤仁美、江口勝也、中山隆治

帝国臓器製薬(株) 安全性研究部

Paclitaxel は、チューブリン脱重合阻害作用を有する抗腫瘍剤であり、臨床において知覚神経毒性の誘発が報告されている。今回我々は、雄性BDF1マウスを用いて、末梢神経毒性の出現と投与スケジュールとの関連について検討を行った。

Paclitaxel 30mg/kgを1回の投与用量とし、単回、3時間間隔・3回(q3h×3)、連日・3回(q1d×3)、2日に1回・3回(q2d×3)及び週1回・4回(q7d×4)の尾静脈内投与を行った。また、対照群にはq3h×3またはq2d×3で溶媒(cremophol EL:ethanol:saline=1:1:6)の投与を行った。q7d×4群では最終投与10日後、その他の投与群では初回投与17または18日後に全身灌流固定を行い、末梢神経線維のときほぐし標本及びエポキシ樹脂包埋による1μm切片を作製した。各標本における異常神経線維(myelin ovoid, paranodal demyelination, myelin infold, myelin thickening, whorl, edema, swelling等)を数え、定量的な評価を実施した。Paclitaxel投与による神経毒性として、myelin ovoid及びwhorl線維が観察された。これらの障害の出現に関して、明確な投与スケジュールの影響が認められ、その程度はq2d×3>q1d×3>q3h×3, q7d×4の順に顕著であった。また、単回投与では、異常を認めなかった。

以上のことから、paclitaxelによる末梢神経毒性の誘発は、投与スケジュールの影響を強く受けることが明らかとなった。

Paclitaxel-induced peripheral neurotoxicity depends on the treatment schedule in mice

Yuuichi MIMURA, Tetsuo OGAWA, Hitomi KATO, Katsuya EGUCHI, Takaharu NAKAYAMA. Safety research department, Teikoku hormone Mfg. Co., Ltd, Kanagawa-213-8522, Japan

○田畑肇, 池上仁, 北村和夫, 久保道江, 伊藤今日子, 小林孝一,  
堀俊治, 仮家公夫\*

山之内製薬株式会社 安全性研究所

\*神戸学院大学 薬学部

実験動物の長期飼育において、加齢性末梢神経障害が知られている。今回は B6C3F1 マウスを用いてその病態的および機能的な障害性について検討した。

実験は 5 ロット計 170 匹の B6C3F1 雌マウスを 5~130 週齢の期間に 5~20 匹単位で解剖し、後肢の背側神経根、坐骨神経、総腓骨神経、脛骨神経および腕神経叢を病理組織学的に検査した。体温、前後肢の握力および後肢の運動神経伝導速度(MNCV)等の生理機能検査、および血糖、HbA<sub>1c</sub>、フルクトサミン、ケトン体等の血液生化学検査を適宜行い、加齢性末梢神経病変との関連性を検討した。

病理組織学的には、90 週齢以降、背側神経根および近位坐骨神経等の末梢神経の近位部に髄鞘の拡張および軸索の萎縮を特徴とする病変が認められた。遠位坐骨神経や総腓骨神経では主として髄球形成を特徴とする神経線維の変性がみられた。これら自然発症性の加齢性末梢神経病変の発現率は 100 週齢を超えた時点で 100%に達し、以降加齢に伴い病変部は拡大し、シュワン細胞の増殖が顕著となった。さらに遠位の脛骨神経でも、軽度ながら髄球形成を特徴とする神経線維の変性がみられた。直腸温、後肢表面温および MNCV は加齢に伴い低下し、握力は 100 週齢以降に低下する傾向が認められたが、前述の末梢神経病変との関連性は明らかではなかった。一方、52 週齢以降、血糖の低下した動物が散見され、80 週齢前後から昼夜一貫した低血糖動物が数%の頻度で認められた。これらの動物では HbA<sub>1c</sub> およびフルクトサミンの低下、およびケトン体の上昇を伴っており、MNCV の低下および広範な末梢神経病変が認められたことから、数週間以上におよぶ低血糖状態が、老齢期に自然発症する末梢神経障害を増悪させている可能性が考えられた。

Spontaneous age-related peripheral neuropathy in B6C3F1 mice.

Hajime TABATA, Hisashi IKEGAMI, Kazuo KITAMURA, Michie KUBO, Kyouko ITO,  
Kouichi KOBAYASHI, Toshiharu SAKAI and Kimio KARIYA\*

Safety Research Laboratories, Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

\* Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kobegakuin University



○奥山 学、市川一仁、熊澤俊彦、山野昌也、村上和生、朝枝伸幸

巽三和化学研究所 安全性研究所

【目的】神経毒性試験は、1991年に米国EPAで試験法が策定され、1995年OECDでもガイドラインに取り入れられた。近年日本国内でも本試験法は注目され、ガイドライン化に向けて検討が進められている。今回、我々は神経毒性物質として知られているアクリルアミドをラットに13週間反復投与し、Functional Observational Battery (FOB) ならびに神経病理学的検査により末梢神経に及ぼす影響を経時的に検討した。

【方法】6週齢のCrj:CD系雄ラットにアクリルアミド12mg/kg(生理食塩液に溶解)を13週間腹腔内投与(5日/週)した。FOBは投与開始前、投与開始後4、8及び13週目に実施した。神経病理学的検査は、投与開始後4、8及び13週目に全身灌流固定した動物から腓腹神経、脛骨神経、坐骨神経、脊髄神経根および脊髄を採取し、エボンあるいはパラフィン包埋した標本を用いて行った。

【結果および考察】FOBでは、投与開始後4週目にlanding foot splayの増加が認められ、8週目には歩行異常ならびに歩行量の減少がみられた。さらに、13週目には立ち上がり動作の減少及び後肢握力の低下が認められた。一方、神経病理学的検査では、腓腹神経、脛骨神経および坐骨神経において投与開始後8週目より神経線維の変性および有髄神経線維数の減少が認められ、13週目にはより顕著となった。脊髄神経根では腹根には変化は認められなかったが、背根において8週目より神経線維の変性がみられ、13週目にはより顕著となった。

以上の結果から、アクリルアミドにより誘発される末梢神経障害は、神経病理学的検査よりもFOBの方がより早期に検出できることが明らかとなった。

The Time-Related Changes in Peripheral Nerve of Rats Intoxicated with Acrylamide.

Manabu OKUYAMA, Kazuhito ICHIKAWA, Toshihiko KUMAZAZAWA, Masaya YAMANO, Kazuo MURAKAMI and Nobuyuki ASAEDA. Safety Assessment Laboratory, Sanwa Kagaku Kenkyusho Co., Ltd., Inabe, Mie, 511-0406, Japan.

○ 木根潤英雄, 秋丸国広

高知医科大学・衛生学教室

トリオルトトリル燐酸 tri-ortho-tolyl phosphate (TOTP) は以前 tri-ortho-cresyl phosphate (TOCP) といわれた有機燐化合物であり、合成樹脂の可溶剤などに用いられる。アメリカで発生した食中毒事件を契機に、TOTP は有機燐剤の通性である cholinesterase (ChE) 活性阻害作用に基づく急性毒性の他に、曝露後 8 日以上を経過して発症する特異的な遅発性神経毒性 organophosphate induced delayed neurotoxicity(OPIDN) をもつことがわかった。OPIDN はその後、少数の有機燐農薬からも証明され、それらはいずれも生産が中止された。OPIDN に対する感受性は動物種によって著しく異なり、マウス・ラットは発症しない。実験動物としてニワトリが用いられているが、演者らはウズラも使用できることを確立した。

ところでラットに TOTP を投与した実験で、血清 butyrylcholinesterase (BuChE) 活性が阻害されたが、赤血球 acetylcholinesterase (AChE) 活性は影響を受けなかった、という報告がある。そこでウズラに TOTP を経皮投与して ChE 活性値測定を試みた。鳥類は哺乳類と異なり、赤血球 AChE が認められない。そのため血漿 BuChE と、脳 AChE を測定した。前者が投与 6 時間後に著しく活性値が低下し、15 日後にようやく回復したのに対して、後者はほとんど変化が認められなかった。その後ニワトリ脳ホモジネートに TOTP を加えると BuChE 活性値が低下したという *in vitro* の実験報告を知り、ウズラで *in vivo* の実験を試みた。その結果、脳 AChE が低下しないのにも拘わらず、脳 BuChE は血漿 BuChE と同様に著しく低下し、血漿 BuChE 活性が回復した後もなお活性阻害が持続することがわかった。今回は投与後 35 日までの推移を報告する。

Cholinesterase Activity in Quails Administered a Single Dose of Tri-ortho-tolyl Phosphate.

Hideo KINEBUCHI and Kunihiro AKIMARU.

Dept. of Environ. & Occup. Hlth. Kochi Med. Sch., Nankoku 783-8505, Japan.

○本間 健資、津賀 浩史、須田 恵

労働省・産業医学総合研究所 健康障害予防研究部

トルエンは溶剤として工業的あるいは家庭用品としても幅広く使われているが、麻酔作用などの為に中毒事故が多発している。また、シンナー遊びなどの社会的問題にも関わっているため、トルエンによる神経障害を実験的に検討している。

脳微量透析法(Brain Microdialysis: MD)は、自由行動下の動物の脳内物質を経時的に採取する方法として有用であるので、有機溶剤の中枢神経系への影響を検討するためにMD実験をおこなった。また、脳内アセチルコリン濃度の変化も測定した。ラットにトルエンを投与すると、脳ホモジェネートのアセチルコリン濃度の増加が観察された一方で、MD法でみたときのアセチルコリン神経終末からのアセチルコリンの遊離量の減少が観察された。

また、アセチルコリン受容体に対するトルエンの影響を検討した。ラットをトルエンガスに曝露して吸入させ、その直後に脳を取り出し、ホモジェネートから調整した膜分画のムスカリン受容体へのリガンドの結合を調べた。前皮質・海馬・線状体・小脳の各部位における、 $K_d$ と $B_{max}$ 値を算出したが、曝露による明らかな変化は認められなかった。各脳部位におけるN-methylscopolamine結合に対するカルバミルコリンの置換により、高親和性および低親和性部位における $IC_{50}$ 値の変化を調べた。トルエン曝露の影響は、前皮質と海馬にみられたが、線状体と小脳にはみられなかった。前皮質の高親和性部位においては、カルバミルコリンの結合は曝露により大きく減少した。トルエンはラットのアセチルコリン神経系に影響を与える事がわかった。

Effects of toluene exposure on brain cholinergic neurons

Takeshi HONMA, Hirofumi TSUGA, and Megumi SUDA. Division of Health Effects Research, National Institute of Industrial Health, Kawasaki 214-8585, Japan

アジュバント関節炎ラット青斑核におけるモルヒネ 退薬時の興奮性  
アミノ酸の遊離

○星 勝治、石突諭、山本 敦子、藤平栄一、市原 和夫

北海道薬科大学・薬理

〔目的〕モルヒネがアジュバント関節炎を促進または阻害したりするという報告があるが、現在その機序については不明である。そこで演者らは、アジュバント関節炎ラットを作成し、モルヒネ依存ラットのナロキソンによる退薬症候時に、青斑核から遊離される興奮性アミノ酸量の変動を調べた。

〔方法〕SD 雄性ラット (280-300 g) を使用した。正常ラットと関節炎ラットにモルヒネ (26 nmol/ $\mu$ l/h) を3日間脳室内投与し、モルヒネ依存ラットを作成した。4日目に接続部を外し、マイクロダイアリシス用プローブを青斑核 (LC) に固定し、リング液で平衡化後、ナロキソン (NLX) 誘発退薬症候時におけるラット LC 内の遊離アミノ酸量を HPLC で測定した。同時にラットの行動も調べた。

〔結果〕LC に 48 nmol/5  $\mu$ l の NLX を投与後、15分で LC 内のグルタミン酸 (Glu) とアスパラギン酸 (Asp) の遊離量が対照 (生食) 群に比べそれぞれ 250 と 350% に増加した。Glu 量の増加は少なくとも 30分持続した。しかし、関節炎ラットのモルヒネ退薬時と正常ラットのナロキソン投与における Glu と Asp の遊離量には、それぞれ有意な変動が認められなかった。さらに、正常ラットのモルヒネ退薬時に、種々の行動が認められたが、関節炎ラットでのそれは僅かであった。

〔考察〕アジュバント関節炎ラットのモルヒネ退薬時に LC 内の興奮性アミノ酸遊離が阻害されたという結果から、モルヒネの  $\mu$ -オピオイド受容体がアジュバント関節炎により影響を受けることが示唆された。

Excitatory amino acid release in the locus coeruleus during naloxone-precipitated morphine withdrawal in adjuvant arthritic rats

Katsuji Hoshi, Satoshi Ishizuki, Atsuko Yamamoto, Eiichi Fujihira and Kazuo Ichihara

Department of Pharmacology, Hokkaido College of Pharmacy

Cyclic AMP responsive element binding protein binding protein (CBP) 変異マウスを用いたモルヒネ依存の形成メカニズムの解析

○鍋島俊隆、野田幸裕、間宮隆吉、宮本嘉明、山田清文、尾池雄一\*、山村研一\*

名古屋大学医学部医療薬学・附属病院薬剤部

\* 熊本大学医学部附属遺伝発生研究施設

〔緒言〕 モルヒネを連用するとヒトや実験動物において依存が形成される。モルヒネ依存は、薬物の精神薬理作用による精神依存と退薬による不快な生体反応を示す身体依存に分類される。近年これらの依存形成メカニズムには cyclic AMP (cAMP) 系が関与していることが報告されている。しかし、それらの報告の多くは培養細胞や摘出標本を用いており、このような *in vitro* で得られた結果がどの程度行動薬理的に反映されるかは明らかでない。そこで、モルヒネ依存の形成メカニズムを行動薬理的に解析するために cAMP response element binding protein (CREB) の coactivator である CBP の変異マウスを用いて検討した。

〔方法〕 動物には CBP 変異マウス (Hum. Mol. Gen. 8, 387, 1999) およびその同腹の野生型マウスの 9-12 週齢を用いた。モルヒネ (10 mg/kg s.c.) を 1 日 2 回 5 日間連続投与し、6 日目のモルヒネ投与 2 時間後にナロキソン (5 mg/kg i.p.) を投与して身体依存症状を誘発した。ナロキソン投与直後から退薬症状の発現を 15 分間観察した。また、モルヒネ (1 あるいは 10 mg/kg s.c.) を用いて conditioned place preference 試験を行い、精神依存の形成についても検討した。

〔結果及び考察〕 野生型マウスにおいてナロキソンによって誘発される退薬症状およびモルヒネによる place preference が、変異マウスではそれぞれ有意に減弱していた。これらのことから cAMP 系がモルヒネの薬物依存 (身体および精神) の形成の両方に関与している可能性が示唆された。

Analysis of morphine dependence mechanism using cyclic AMP responsive element binding protein binding protein (CBP) mutated mice.

Toshitaka NABESHIMA, Yukihiro NODA, Takayoshi MAMIYA, Yoshiaki MIYAMOTO, Kiyofumi YAMADA, Yuichi OIKE\* and Ken-ichi YAMAMURA\*. Dept. of Neuropsychopharmacol. & Hosp. Pharm., Nagoya Univ. Sch. of Med., Nagoya 466-8560,

\*Dept. of Develop. Genet., MIEG, Kumamoto 862-0976, Japan.

内因性ドパミン神経毒norsalsolinolはPC12細胞のドパミン分泌を抑制する

○丸山 豊、鈴木裕子、寺岡宏樹\*、岩田久人、数坂昭夫、藤田正一

北海道大学大学院獣医学研究科環境獣医学講座毒性学教室  
\*酪農学園大学獣医学部毒性学教室

【目的】パーキンソン氏病は黒質ドパミン神経細胞の選択的な変性・脱落によって発生する神経変性疾患である。その原因物質の一つとして内因性のドパミン神経毒である6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines (DHTIQs)が疑われている。DHTIQsの神経細胞傷害作用は詳細に検討されているが、神経伝達物質分泌に対する影響や、その細胞内動態は明かではない。そこで、DHTIQsの一種であるnorsalsolinol (NS)のドパミン分泌に与える影響とその細胞内動態を検討することを目的とした。【方法】神経成長因子を処置して神経細胞様に分化させたPC12細胞を用いた。ドパミンとNSはHPLC-ECDにより測定した。【結果】①NS (1-100 $\mu$ M)の前処置は、静止時の分泌には影響を与えず、ATP (100 $\mu$ M)およびK<sup>+</sup> (50mM)刺激による分泌を濃度依存性に抑制した。②K<sup>+</sup>による細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇はNSの前処置により変化しなかったが、 $\beta$ -escin処置により作成した高透過性細胞のCa<sup>2+</sup>誘発性ドパミン分泌を抑制した。③NS前処置後に分泌刺激を与えると、ドパミン分泌量に比例してNSの放出が認められた。また、細胞ホモジネートのショ糖密度勾配遠心法によりドパミンとNSは同一画分に存在することが明かとなった。④NSは濃度依存性に細胞内に取り込まれた。この取り込みはドパミントランスポーターの抑制薬であるGBR-12909により抑制された。⑤NSは濃度依存的に分泌顆粒中に取り込まれた。この取り込みは分泌顆粒性モノアミントランスポーター阻害薬であるreserpineにより抑制された。【考察】以上の成績は、NSは細胞内Ca<sup>2+</sup>動員に影響を与えず、分泌機構のCa<sup>2+</sup>感受性を低下させることによってドパミン分泌を抑制することを示唆する。また、細胞内に取り込まれたNSは分泌顆粒にも分布し、分泌刺激時にドパミンと共に開口放出によって細胞外に放出されると考えられた。これらの知見はパーキンソン氏病や薬剤性パーキンソニズム発症のメカニズムとの関連から興味を持たれる。

Norsalsolinol, an endogeneous dopaminergic neurotoxin, inhibits dopamine secretion in PC12 cells.

Yutaka MARUYAMA, Yuko SUZUKI, Hiroki TERAOKA\*, Hisato IWATA, Akio KAZUSAKA and Shoichi FUJITA. Laboratory of Toxicology, Department of Environmental Veterinary Sciences, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Japan and \*Department of Toxicology, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Japan.

## 除草剤バスタの有効成分グルホシネートアンモニウムによるNMDA受容体の活性化

○中木敏夫, 三嶋 見, 藤井備子

帝京大学医学部薬理学講座

[目的]除草剤バスタは我が国でも多く用いられており, 誤飲等の際にはけいれんや記憶障害などの中枢神経症状が出現する。しかし, その毒性機序は不明である。バスタの有効成分はグルホシネートアンモニウムである。グルホシネートはグルタミン酸に構造が類似していることから, グルタミン酸受容体に結合する可能性があり, 中枢神経症状の一部はグルタミン酸受容体の活性化と推定することも可能である。本研究では一酸化窒素の生成を指標にして, グルホシネートがグルタミン酸受容体を活性化するか否かを検討した。

[方法]無麻酔無拘束の雄性Fisher344ラットの小脳での微小透析法を用いて一酸化窒素の生成を評価した。透析部位はlambdaから-4.0 mm, 正中から右側へ1.0 mm, 骨表面から3 mmに固定した。薬物は透析プローブ内から投与し, 硝酸イオン及び亜硝酸イオンをGriess反応によって定量することにより一酸化窒素の生成を評価した。

[結果]グルホシネートは用量に依存して一酸化窒素の生成を増加させた。この作用はカイニン酸やN-methyl-D-aspartate(NMDA)に比べ力価は100分の1程度であった。グルホシネートのこの作用はNMDA受容体非競合的遮断薬であるdizocilpineやCPPで有意に抑制されたが, kainate/AMPA受容体拮抗薬であるDNQXでは抑制されなかった。

[考察・結論]グルホシネートは中枢神経系NMDA受容体を活性化することが明らかになった。力価はカイニン酸やNMDAに比べると低い, 例えばグルホシネート換算で23gの誤飲事故での血中濃度は服毒後6時間でも1mM以上であり, NMDA受容体を活性化する濃度に達しているものと考えられた。バスタの誤飲事故に対してNMDA受容体拮抗薬の有効性が考えられた。

Activation of Cerebellar NMDA Receptors by a Herbicide, Glufosinate Ammonium.

Toshio NAKAKI, Akira MISHIMA and Tomoko FUJII. Department of Pharmacology, Teikyo University School of Medicine, Tokyo, 173-8605, Japan

アニリン誘導体 (*p*-fluoroaniline, *p*-chloroaniline, *p*-iodoaniline, *p*-bromoaniline) のラットにおける神経毒性の検討

○山下弘太郎, 岡崎欣正, 石井宏幸, 大塚道夫, 須藤雅人, 土谷 稔

三菱化学安科研

【目的】我々はアニリンをラットに大量単回投与すると症状・行動観察において歩行の異常, 病理組織学的に脊髄白質の空胞化を主とする神経毒性が誘発されることを報告した(第15回日本毒性病理学会)。そこで今回, アニリン誘導体のうちパラフルオロアニリン(FA), パラクロロアニリン(CA), パラヨードアニリン(IA), パラブロモアニリン(BA)について, 神経毒性誘発能の有無を検討した。

【材料および方法】4週齢の雄性SD系ラット(各群9匹)にFA 600mg/kg, CA 300mg/kg, IA 700mg/kg, BA 500mg/kgの用量で単回経口投与した。対照群には溶媒(オリーブ油)のみを投与した。症状観察, 体重測定その他, 機能行動検査(FOB)を投与前, 投与後8, 14日に, 運動量測定を投与前, 投与後7, 13日に行った。投与後9日に各群3匹, 投与後15日に全生存例を灌流固定し, 脳, 脊髄, 坐骨神経の病理組織学的検査を行った。

【結果およびまとめ】全誘導体群でチアノーゼ, 貧血等の症状が投与後3日までみられ, IA群とBA群の各1例が死亡した。投与後6日から後肢が開き体の揺れる歩行が, その後, 歩行中の転倒, 後肢の引きずり等がみられた。歩行の異常の程度はBA群>FA群・CA群であり, 投与後10日頃を境にいずれの群でも軽減した。一方, IA群では歩行に異常はみられなかった。FOBでは, 前肢・後肢握力の低下, 歩行の異常, 筋緊張の低下がFA群, CA群, BA群で, 空中正向反射の異常がFA群, BA群で, 立ち上がり数の減少がCA群とBA群で, 正向反射の異常がBA群でみられた。病理組織学的検査では全誘導体群で脊髄白質の空胞化病変が認められ, その程度はBA群>FA群・CA群>IA群であった。また, 空胞化病変の程度は, 症状観察およびFOBでの異常の程度とほぼ一致した。いずれの誘導体とも, 程度の差はみられたがアニリンと同様の神経毒性を誘発した。

Neurotoxic potentiality of aniline derivatives (*p*-fluoroaniline, *p*-chloroaniline, *p*-iodoaniline, *p*-bromoaniline) in rats.

Kotaro YAMASHITA, Yoshimasa OKAZAKI, Hiroyuki ISHII, Michio OTSUKA, Masato SUDO and Minoru TSUCHITANI. Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd., Ibaraki-314-0255, Japan.



トリメチル錫は海馬依存性の長期記憶の獲得（学習）ならびに強化を障害する

○高橋宏明， 亀坂泰正， 松本力， 二川治子

残留農薬研究所

化学物質の神経系に対する安全性評価は神経毒性試験ガイドラインに従って実施されている。このガイドラインでは一次スクリーニング試験項目（FOB，握力，行動量など）に加えて学習・記憶などの脳機能の検査が挙げられている（OECD，EPA）。一方，トリメチル錫（TMT）は種々の神経症状ならびに選択的な海馬の神経細胞死を生ずる神経毒性物質として知られており，スクリーニング試験の陽性対照物質としても取り上げられている。昨年の本学会において，TMTは一次スクリーニング試験項目に比べて低用量から「状況手掛かりに対するすくみ反応の発現（海馬依存性の長期記憶）」を障害することを報告した。本報告ではTMTがいずれの記憶過程を障害するのか検討するとともに，記憶の細胞レベルのモデルといわれる長期増強（LTP）に対する影響を検討した。

TMTを0，1，2，4，8 mg/kgの用量でSPFの雄性F344ラットに経口投与すると，4 mg/kg以上の投与群に状況手掛かりによるすくみ反応の減少が，8 mg/kg投与群には海馬CA1，CA3，CA4領域の神経細胞死が観察された。TMTの4 mg/kg投与は記憶の獲得を抑制したが，想起には影響しなかった。一方，TMTの4 mg/kg投与は貫通線維-歯状回のLTPを抑制する傾向を示し，シャッファー側枝-CA1のLTPを有意に抑制した。

以上の結果は，TMTは神経細胞死を生ずる用量よりも低用量で海馬依存性記憶の獲得（学習）ならびに強化を抑制することによって，記憶障害を生ずる可能性を示唆していた。

Trimethyltin impairs acquisition (learning) and consolidation of hippocampus-dependent long-term memory.

Hiroaki TAKAHASHI, Yasumasa KAMESAKA, Tsutomu MATSUMOTO, and Haruko FUTAGAWA. Inst. Environ. Toxicol., Ibaraki 303-0043, Japan.

The Effects of Docosahexaenoic acid and Dehydroepiandrosterone on the Memory Loss Induced by Ibotenic acid or Scopolamine in Rats

<sup>o</sup>Seog Youn Kang, Seung Hee Kim, Ki Kyung Jung, Tae Gyun Kim, Se Young Choung\* and Hyung-Mee Han

National Institute of Toxicological Research, Korea Food and Drug Administration, \*Coll. of Pharmacy, Kyunghee Univ., Seoul, Korea

The effects of docosahexaenoic acid (DHA) and dehydroepiandrosterone (DHEA) on the memory loss were investigated in two different animal models of dementia. In the active avoidance retention performance, DHA and DHEA was administered to animal for 24 days and ibotenic acid was injected into the nucleus basalis meynert on the 12<sup>th</sup> day. In the passive avoidance retention performance, either ibotenic acid or scopolamine was injected 24 hours or 30 min before the experiment. All animals were tested for acetylcholinesterase (AChE) activity, AChE, amyloid protein and synaptophysin distribution and the degree of lipid peroxidation in the brain. DHA and DHEA did not have any effect on the inhibition of active and passive avoidance induced by ibotenic acid. On the other hand, scopolamine-induced inhibition of passive avoidance was partially reversed by DHA, indicating the implication of DHA in potentiation of cholinergic transmission. The animal administered DHEA significantly decreased body weight. No differences were observed in AChE activity, AChE distribution, amyloid protein deposition, synaptophysin distribution and the degree of lipid peroxidation between DHA or DHEA-treated and vehicle (10% corn oil)-treated groups. These results demonstrated that administration of DHA or DHEA for 24 days did not have any effect on the memory loss induced by ibotenic acid whereas scopolamine-induced memory loss was partially reversed by DHA. The precise role of cholinergic transmission potentializing effect of DHA in term of improving memory and/or learning ability remains to be elucidated.

The Effects of Docosahexaenoic acid and Dehydroepiandrosterone on the Memory Loss Induced by Ibotenic acid or Scopolamine in Rats

<sup>o</sup>Seog Youn Kang, Seung Hee Kim, Ki Kyung Jung, Tae Gyun Kim, Se Young Choung\* and Hyung-Mee Han, National Institute of Toxicological Research, Korea Food and Drug Administration, \*Coll. of Pharmacy, Kyunghee Univ., Seoul, Korea

## MHC Class I 分子への抗原送達システムを用いた安全で効果的なワクチンアジュバントの開発

○中西 剛<sup>1,2</sup>、林 哲<sup>1</sup>、國澤 純<sup>1</sup>、堤 康央<sup>1</sup>、田中慶一<sup>2</sup>、真弓忠範<sup>1</sup><sup>1</sup>大阪大学大学院薬学研究科・薬剤学分野、<sup>2</sup>同・毒性学分野

近年のワクチン開発においてコンポーネントワクチンは、その安全性の高さから注目されているが、一般に単独投与でも殆ど効果が得られないことから、効果的なアジュバントの開発が待望されている。またAIDSなどの感染症や癌などにおいては、その病態細胞を排除に中心的な役割を果たしている細胞傷害性T細胞（CTL）の誘導が必須であると考えられるが、コンポーネントワクチンは外来性抗原であるが故に、エンドサイトーシスで取り込まれた後、殆どがMHC class II 分子を介して抗原提示されてしまいCTLを誘導するために必要不可欠であるclass I 分子を介した抗原提示の効率が非常に低いという致命的欠点も有している。このような背景のもとこれまでも様々なCTL誘導アジュバントが開発されてきたが、従来までのアジュバント開発は「抗原提示」というワクチンにおいて最も重要なプロセスを十分に考慮せず、非特異的な免疫反応を活性化するimmunomodulator機能を第一選択として付与していたために、そのほとんどが炎症反応という副作用が付きまとうという屈辱的な結果に終わっていた。したがってこれらを安全かつ効果的なワクチンとして設計していくためには、抗原をMHC class II のみならず、抗原を直接細胞質中に導入し、class I 抗原提示経路にも積極的に送達しうる技術の開発が必要不可欠であると考えられる。一方でこれまでに我々は、リポソームにセンダイウイルスの膜融合能を付与した膜融合リポソーム（FL）の開発を行ってきた。FLは、*in vitro*、*in vivo* 双方において、遺伝子や蛋白質などを細胞に傷害を与えることなく、効率よく細胞質中に直接導入することができる。従って、FLにより封入抗原を直接細胞質中に導入することで、MHC class I 分子を介した抗原提示が可能になるものと考えられる。そこで本研究では、FLをワクチンに応用しこの問題の解決を試みた。その結果、FLは効率よく外来性抗原を直接細胞質内に導入し内在性抗原として認識させる結果、効率よくMHC I 抗原提示経路に送達できることが確認された。また、FLにより効果的に抗原特異的CTLを誘導できることが判明した。したがってFLは、外来性抗原を効率よくMHC class I分子と共に提示させ、CTLを誘導できるアジュバントになる可能性が示され、抗原分子を直接細胞質内に導入するという本アプローチにより、安全かつ効果的なワクチンを開発できる可能性が示唆された。

A novel CTL vaccine delivery system using fusogenic liposomes

Tsuyoshi NAKANISHI<sup>1,2</sup>, Akira HAYASHI<sup>1</sup>, Jun KUNISAWA<sup>1</sup>, Yasuo TSUTSUMI<sup>1</sup>, Keiichi TANAKA<sup>1</sup> & Tadanori MAYUMI<sup>1</sup>, <sup>1</sup>Dep. of Biopharmaceutics, <sup>2</sup>Dep. of Toxicology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Suita, Japan.

○須田 明子, 岩城 理進, 木村 正明

大正製薬株式会社 開発研究所 安全性研究室

〔目的〕マウス膝下リンパ節測定法 (Popliteal Lymph Node Assay ; PLNA) は免疫毒性評価法の一つで, 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, 刺激性物質が擬陽性を示すことから, その判別が課題となっている。今回我々は, その判別のために, PLNA の二次応答の検出と, フローサイトメトリーによる T/B 細胞存在比率の変化の解析を試みた。

〔方法〕雄の ICR マウス (6~8 週齢) の左後肢足趾皮下に TNBS (1mg/mouse) または SDS (0.1mg/mouse) を, 右後肢には溶媒を投与した。初回投与 28 日後に初回投与用量の 1/10 用量で二次免疫した。経時的に PLN を採取し, 個体ごとに cellularity index を求めた後, FITC 標識 CD3 抗体, PE 標識 CD45R/B220 抗体で染色し, フローサイトメトリー解析により T/B 細胞の存在比率を求めた。

〔結果と考察〕アレルギー性物質である TNBS は, 初回投与 7 日目に index が 16.5 のピークを示し, その後減少した。二次免疫 2 日目には index が 13.1 でピークとなり, 二次応答を示した。この間, 溶媒投与側 PLN に比べて TNBS 投与側 PLN の B 細胞の存在比率は増加した。一方, 刺激性物質である SDS は初回投与 10 日目に index が 2.8 を示したが, 二次免疫による応答はおこらなかった。また, index 上昇時に B 細胞存在比率は変化しなかった。従って, PLNA の二次応答の検出と, フローサイトメトリーによる T/B 細胞存在比率の解析が, アレルギー性物質と刺激性物質の判別に有効な手段となり得ることが示唆された。

Differentiation of Allergenic and Irritant Compounds in Mouse Popliteal Lymph Node Assay.

Akiko SUDA, Yoshinobu IWAKI and Masaaki KIMURA. Toxicology Laboratory, Pharmaceutical Research Laboratories, Taisho Pharmaceutical Co., Ltd. No. 403, Yoshino-cho 1-chome, Ohmiya-shi, Saitama, 330-8530, Japan.

## 酸無水物のモルモットにおける皮膚感作性 (I)

- Maleic anhydride の皮膚感作性原因構造の検討 -

○中村洋介、楡垣 環、林まき子、加藤日路士、岸田文雄、磯部直彦、金子秀雄

住友化学工業株式会社 生物環境科学研究所

[目的] 皮膚感作性物質は蛋白質と反応する構造を有していることが多く、部分構造などから、種々の化学物質の皮膚感作性を予測できる場合がある。化学物質によっては、反応部位が複数あることもあり、どの構造が皮膚感作性の原因となっているかについての検討をすることは予測の上でも有益である。樹脂等の原料として使用されている Maleic anhydride (MA) は反応性に富み、酸無水物構造および  $\alpha, \beta$ -不飽和カルボニル基などの蛋白質と反応可能な部位を有している。従って、MA は皮膚感作性ポテンシャルを有するが、皮膚感作性の原因構造として、どちらの構造が強く影響しているかは不明である。そこで今回、MA および類似構造を有する化学物質のモルモットを用いた皮膚感作性試験を実施し、MA の皮膚感作性原因構造について推察した。

[実験方法] 皮膚感作性は Adjuvant and Patch Test (APT) で調べた。動物は Hartley 系雌性モルモット (5週令) を用い、1群5匹とした。化合物は MA および類似骨格を有する Citraconic anhydride (CA)、Succinic anhydride (SA)、4-Cyclopenten-1,3-dione (CD) あるいは Maleimide (MI) を用いた。MA 感作動物については類似構造化合物を用いた交差反応性試験も実施した。溶媒にはアセトンを用いた。

[結果および考察] 酸無水物構造および  $\alpha, \beta$ -不飽和カルボニル基を有する MA および CA、 $\alpha, \beta$ -不飽和カルボニル基のみを有する CD および MI は皮膚感作性陽性であり、酸無水物構造のみを有する SA は陰性であった。また、交差反応性の結果から、MA は CA、Maleic acid および MI などと交差反応性を示すものの SA および CD とは交差反応性を示さないことが判明した。以上の結果から、MA の皮膚感作性は酸無水構造よりも  $\alpha, \beta$ -不飽和カルボニル基が強く関与していることが示唆された。

Skin sensitization of acid anhydrides in guinea pigs (I)

- Skin sensitizing structure of maleic anhydride -

Yosuke NAKAMURA, Tamaki HIGAKI, Makiko HAYASHI, Hiroshi KATO, Fumio KISHIDA, Naohiko ISOBE and Hideo KANEKO, Sumitomo Chemical Co., Ltd. Environmental Health Science Laboratory, Osaka, Japan.

## 酸無水物のモルモットにおける皮膚感作性 (II)

-酸無水物の皮膚感作性ポテンシャルと CLOGP の関係-

○檜垣 環、中村洋介、林まき子、加藤日路士、岸田文雄、磯部直彦、金子秀雄

住友化学工業株式会社 生物環境科学研究所

〔目的〕カルボン酸無水物は樹脂や化学薬品の原料等、様々な用途で広く使用されている。しかし、反応性に富むために、皮膚中の蛋白質と反応して接触皮膚炎などのIV型アレルギーを起こす可能性がある。これまで酸無水物構造を有する化合物の皮膚感作性について構造活性相関を検討した報告はなかった。そこで、カルボン酸無水物の皮膚感作性試験を実施し、CLOGP との相関関係を調べた。また、各酸無水物の交差反応性を検討し、側鎖の長さとの交差反応性の関係を明らかにした。

〔実験方法〕皮膚感作性は Adjuvant and Patch Test (APT) で調べた。動物は Hartley 系雌性モルモット (5 週令) を用い、1 群 5 匹とした。被験物質として側鎖の長さの異なる酸無水物骨格のみを有する化合物、酸無水物と  $\alpha, \beta$ -不飽和カルボニル基を有する化合物、 $\alpha, \beta$ -不飽和カルボニル基のみを有する化合物を用いた。各酸無水物の感作濃度は 10%、誘発濃度は 1%、再誘発濃度は 10% または 1% とした。溶媒にはアセトンを用いた。

〔結果および考察〕SA を除く全ての酸無水物は皮膚感作性陽性となった。カルボン酸無水物のみを基本骨格とする化合物の場合、感作率または平均評点と CLOGP の間に良い相関関係を認めた。一方、酸無水物構造以外に  $\alpha, \beta$ -不飽和カルボニル基を有する Maleic anhydride (MA)、Citraconic anhydride (CA)、Itaconic anhydride (IA)、あるいは、 $\alpha, \beta$ -不飽和カルボニル基のみを有する 4-Cyclopenten-1,3-dione (CD)、Maleimide (MI) は相関から外れた。また、酸無水物骨格のみを有する化合物の交差反応性の結果から、側鎖の炭素鎖数が  $\pm 4$  個以内の場合に良い交差反応性を示すことが判明した。以上の結果から、酸無水構造のみを有する化合物では、皮膚感作性ポテンシャルは CLOGP と良い相関関係を示すことが判明し、また、交差反応性の検討から、炭素鎖数が  $\pm 4$  個以内は交差反応性を示すことが示唆された。

Skin sensitization of acid anhydrides in Guinea pigs ( II )

- Relationship between skin sensitizing potential and CLOGP of acid anhydrides -

Tamaki HIGAKI, Yosuke NAKAMURA, Makiko HAYASHI, Hiroshi KATO, Fumio KISHIDA, Naohiko ISOBE and Hideo KANEKO. Sumitomo Chemical Co., Ltd. Environmental Health Science Laboratory, Osaka, Japan.

マウスにおけるホルムアルデヒドの経皮暴露が化学物質に対するアレルギー反応に及ぼす影響

○五十嵐良明、鹿庭正昭、中村晃忠

国立医薬品食品衛生研究所 療品部

[目的] 化学物質による皮膚、粘膜気道アレルギー疾患は近年急激に増加しており、原因として室内空気汚染が疑われている。ホルムアルデヒドは接着剤、繊維製品、木材など種々の分野で使用される。そのため、ほとんどの室内環境で検出され、これが種々の症状に影響を与えている可能性が考えられる。本研究は、感作性物質に対する反応性がホルムアルデヒドによって変化するかどうか、マウスを用いて検討した。

[方法] アレルゲンとして trimellitic anhydride (TMA) 及び 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) を用いた。暴露用としてホルマリン溶液 (HCHO) をアセトンで 2% に希釈して、BALB/c 系マウス (雌、6~8 週齢) の腹部に 2 週間塗布した。感作誘導期の反応として、local lymph node assay による耳介リンパ節細胞(LNC)の増殖活性を測定した。DNCB については腫起による耳腫脹反応及びリンパ球幼若化反応を、TMA については血清 IgE 抗体価を HCHO 暴露群と未暴露群とで比較した。また、LNC のサイトカイン産生能 (IL-4、IL-6 及び IFN- $\gamma$ ) についても検討した。

[結果と考察] TMA による LNC 増殖反応は HCHO の前処理により増強された。一方、DNCB による LNC 増殖反応に対しては、影響は少なかった。TMA 処理による血清 IgE 抗体価の増加は HCHO 暴露によりさらに増加した。DNCB に対する耳腫脹反応は HCHO 暴露により弱くなった。したがって、HCHO 暴露は I 型アレルギー反応を増強し、IV 型アレルギーについては変化ないか、むしろ抑制することがわかった。TMA 誘導による LNC からの IL-4 及び IL-6 産生は、HCHO 暴露によって増強され、DNCB 誘導による IFN- $\gamma$  産生は低下した。よって、HCHO 暴露による感作性反応の強度の変化は、これらサイトカイン産生動態が関与すると考えられた。

Influences of Dermal Application of Formaldehyde on Immune Responses to Contact and Respiratory Chemical Sensitizers in Mice.

Yoshiaki IKARASHI, Masa-aki KANIWA and Akitada NAKAMURA.

Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, Tokyo 158-8501, Japan.

○三枝由紀恵, 星野健二

山之内製薬株式会社 安全性研究所

【目的】我々は、薬物のアナフィラキシー試験において、溶媒対照である生理食塩液と Freund's complete adjuvant(CFA)の乳化物を感作したモルモットに、水溶性カルボジイミド(WSC)法で調製した薬物蛋白結合物で誘発すると低頻度ながらも陽性反応が認められる現象を経験した。今回、captopril をモデル化合物として薬物蛋白結合物を調製し、PCA 反応を中心にこの原因を検討した。

【方法】生理食塩液、captopril(15 mg/animal)、WSC 法で調製した captopril-BSA (1 mg/animal)を各々CFA とともに混合乳化して、10 例の Hartley 系雌性モルモットに 1 週間隔で 3 回皮下投与した。最終感作の 2 週後に採血し、同種 PCA 反応を行った。惹起には、WSC 法で調製した captopril-OVA、captopril を加えずに WSC と担体蛋白を反応させた carbodiimide-OVA を用いた。また、captopril-BSA を同様に単独感作し、CFA の成分である *Mycobacterium Butyricum*(*M. Butyricum*)の抽出液で惹起した。

【結果】生理食塩液感作群では、対照群であるにも関わらず captopril-OVA で惹起した場合に数例に陽性反応が認められた。また、carbodiimide-OVA で惹起しても陽性反応が認められた。captopril および captopril-BSA 感作群では、captopril を含まない carbodiimide-OVA で惹起した場合にも陽性反応が認められた。これら陽性が認められた血清を *M. Butyricum* の抽出液にて吸収すると陰性になった。また、captopril-BSA を単独感作した場合は、*M. Butyricum* 抽出液で惹起すると陽性反応が認められた。

【考察】非特異的な陽性反応は、CFA に含まれる *M. Butyricum* に対する抗 *M. Butyricum* 抗体と WSC 法で調製した薬物蛋白結合物の交差反応である可能性が考えられた。

#### Non-Specific Reaction of Anaphylaxis Test in Guinea Pigs

Yukie SAEGUSA, Kenji HOSHINO,

Safety Research Laboratories, Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo  
174-8511, Japan.



○副島 潤子, 細川 勇, 筒井 尚久

三菱化学(株)・横浜総合研究所・安全性研究所

【目的】我々はこれまでに、NC マウスは低分子化合物による全身性アナフィラキシー反応に対する感受性が高く、BALB/c マウスに比べて重篤なアナフィラキシー症状(ショック死の増加)を呈することを報告してきた。今回はこのような NC マウスのアナフィラキシーに対する高感受性の原因を検討する目的で、NC マウスと BALB/c マウスの抗原特異的抗体、サイトカインおよびヒスタミン産生を比較した。

【方法】NC/Jic マウスと BALB/c マウスにハプテンであるトリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム(TNBS)を単独あるいは FCA とともに皮下投与した。最終感作後 11 日に採血し、血清中の抗 TNP IgG1 抗体および抗 TNP IgE 抗体を測定した。また、採取した脾細胞を ConA とともに培養し、培養液中の IL-4 および IFN- $\gamma$  を測定した。ヒスタミン測定には、TNP-BSA で惹起後 15 分に採取した血漿を用いた。

【結果】TNBS 感作群では NC マウスと BALB/c マウスの血清中 IgG1 に差は認められなかった。TNBS+FCA 感作においても同様の結果であった。血清中 IgE は TNBS+FCA 感作群において NC マウスが高値を示したが、TNBS 感作群では差が認められなかった。脾細胞培養液中の IL-4 および IFN- $\gamma$  は NC マウスより BALB/c マウスの方がむしろ高値を示した。一方、血漿中ヒスタミン量は NC マウスが明らかに高値を示した。

【結論】以上の結果より NC マウスの全身性アナフィラキシーに対する高感受性には、抗体産生量ではなく、ヒスタミン産生量が関与していることが示唆された。

#### Hypersensitivity to Systemic Anaphylactic Reaction in NC Mice

Junko SOEJIMA, Isamu HOSOKAWA and Naohisa TSUTSUI, Toxicology Laboratory, Yokohama Research Center, Mitsubishi Chemical Co., Kanagawa 227-8502, Japan

○松山晃子、中西 剛、小谷知之、伊藤徳夫、田中慶一

大阪大学大学院薬学研究科・毒性学分野

〔目的〕重金属と免疫系は密接に関係しており、Znなどの微量必須金属はリンパ球活性化にも必要不可欠であるなどの報告がなされているが、逆にCdなどは重篤な免疫毒性を招くことが報告されている。一方で、重金属解毒への関与が知られているメタロチオネイン (MT) は、重金属のみならずIL-6などのサイトカインやグルココルチコイドによっても誘導されること、また免疫系の発生に欠かせない哺乳類の胎児の肝臓や、新生児の胸腺で高発現している事実などから免疫系への関与が示唆されてきた。しかしながら、これまでの報告は外因性MTが免疫機能を修飾するなどの断片的な報告にとどまっており、内因性MTの免疫系への直接的な関与についての報告は皆無であった。そこで本研究では、MT-KOマウスを用いて免疫系における内因性MTの生理的意義に関する検討を行った。〔方法〕動物は129/Svおよび129/Sv由来のMT-KO雄性マウスを用いた。免疫細胞のsubpopulationの解析は、各動物から脾臓、胸腺細胞を調製しFACS解析をすることにより行った。リンパ球増殖能はリンパ節細胞 ( $1 \times 10^5$  cells/well) に増殖刺激を与え培養し、 $^3\text{H}$ -thymidin取り込み量の測定、またはMTT法により評価した。〔結果〕リンパ球細胞のsubpopulation、リンパ球増殖能は両マウス間で差が認められなかった。培養時にCdを添加すると、増殖刺激を与えなかった場合は両マウス間でCd感受性に差は認められなかったが、増殖刺激を与えた場合には、MT-KOマウスにおいてのみ経時的なCd感受性の増大が認められた。〔考察〕内因性MT はリンパ球の分化、増殖応答には必須でないことが示唆された。またリンパ球の内因性MTがCdの毒性軽減作用を示し、その作用には増殖刺激が大きな影響を持つ可能性が示唆された。

## Cadmium Cation Detoxific Role of Endogenous Metallothionein in Immune Responses

Akiko MATSUYAMA, Tsuyoshi NAKANISHI, Tomoyuki ODANI, Norio ITOH & Keiichi TANAKA. Dep. of Toxicology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan.

## メタロチオネイン欠損マウスにおける D-ガラクトサミン/エンドトキシンの致死作用

○木村朋紀、竹原 都、中西 剛、伊藤徳夫、田中慶一

大阪大学大学院 薬学研究科 毒性学分野

【目的】生体防御因子として位置づけられているメタロチオネイン(MT)は種々の刺激により誘導されることが知られている。しかしながら、その生理的意義に関しては、重金解毒作用が証明されているのみで他の役割に関しては推測の域を出ていない。我々は炎症時のMT誘導がIL-6によりメディエートされることを報告しており、今回はその生理的意義の解明を目的としてD-ガラクトサミン/エンドトキシニンによる致死作用へのMTの関連をMT遺伝子欠損マウスを用いて検討した。また、D-ガラクトサミン/エンドトキシニンによる致死作用の主要なメディエーターはTNF- $\alpha$ であり、致死の主要な原因は血管内血液凝固(DIC)であることからこれらに関しても検討を行った。

【方法】MT-I、II遺伝子欠損マウスとしてMastersらにより作製されたマウスを用いた。D-ガラクトサミン/エンドトキシニン惹起致死作用感受性の比較は腹腔内投与、8時間後までの生存率を調べることにより行った。血中TNF活性はL929細胞を用いたバイオアッセイ法により測定した。また、DICはプロトロンビン時間(PT)を延長するので、常法に従いこれを測定した。

【結果および考察】D-ガラクトサミン/エンドトキシニン惹起致死作用に対し、MT遺伝子欠損マウスは高感受性であった。この結果は炎症時のMT誘導が生体防御的な役割を担っている可能性を示唆している。血中TNF活性には有意な差を認めなかったことから血中TNF活性上昇以降の作用にMTが何らかの関与をしていることが推測される。一方、PTの延長はMT欠損マウスで顕著であったことから、DICの重篤度の差が致死感受性の差の原因の一つであると考えられる。

Lipopolysaccharide-Induced Lethality in D-Galactosamine-Sensitized Metallothionein-Null Mice.

Tomoki KIMURA, Miyako TAKEHARA, Tsuyoshi NAKANISHI, Norio ITOH and Keiichi TANAKA. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka, 565-0871 Japan.

Cyclophosphamide を 26 週間及び 5 週間投与した CB6F1-Tg-rasH2 マウス  
及び同腹非遺伝子導入マウスにおける毒性発現の差に関する検討  
(2)免疫毒性

柴田誠司, 久田 茂, 谷藤久人, 永嶋雅子, 佐藤敦子, 磯部充威,  
白居敏仁\*

帝國臓器製薬・安全研, \*実験動物中央研究所

ヒトプロト型 *c-Ha-ras* 遺伝子を導入した CB6F1-Tg-rasH2 マウス(以下 Tg マウス)は短期がん原性試験における有用なモデルとして期待されている。通常、Tg マウスを用いる短期がん原性試験の用量設定試験には野生型マウスが用いられるが、*ras* 遺伝子導入に伴う毒性発現の影響については調べられていない。そこで、cyclophosphamide (CP) の投与による免疫毒性発現への影響を Tg 及び non-Tg (同腹非遺伝子導入) マウス間で比較した。

【方法】雌雄の Tg 及び non-Tg マウスを実験に用いた。26 週間試験(投与開始時 7 週齢)では CP の用量を 0、50、100 及び 150mg/kg に、5 週間試験(投与開始時 37 週齢)では、0 及び 150mg/kg に設定した。いずれも週 1 回の頻度で強制経口投与し、最終投与の翌日に屠殺・解剖した。26 週間試験では脾臓に関して、5 週間投与試験では血液、脾臓及び胸腺に関して、フローサイトメトリーによるリンパ球サブセット分析を実施した。

【結果】26 週間試験における CP 投与群では、雌雄ともに用量依存的に胸腺及び脾臓の重量が減少し、いずれの用量群も、雄では脾臓における T 細胞及び B 細胞の比率が、雌では脾臓における B 細胞の比率が低下した。5 週間試験の CP 投与群では、雌雄の胸腺重量及び雌の脾臓の相対重量が減少し、末梢血における B 細胞、T 細胞、CD4<sup>+</sup> 及び CD8<sup>+</sup> 細胞比率の低下、脾臓における B 細胞比率の顕著な低下、ならびに胸腺における CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 細胞比率の低下、及び CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> 細胞比率の上昇がみられた。以上の変化には Tg 及び non-Tg マウス間で差はみられなかった。

【考察】CP 投与による毒性は T 細胞に比して B 細胞に強く発現すること、及び T 細胞数比の減少は 5 週間投与時に末梢血で明らかになり、その後脾臓に及ぶと考えられた。また、CP による免疫毒性の発現には Tg と non-Tg マウスで差が認められず、*ras* 遺伝子導入の影響はないものと考えられた。

Differences in toxic changes between CB6F1-Tg-rasH2 mice and their non-transgenic littermates given cyclophosphamide by gavage weekly for 5 or 26 weeks.

(2) Immunotoxicity.

Seiji SHIBATA, Shigeru HISADA, Hisato TANIFUJI, Masako NAGASHIMA, Atsuko SATO, Mitsui ISOBE and \*Toshimi USUI, Teikoku Hormone Mfg., Co. Ltd., Kawasaki, Japan. \*CIEA, Kawasaki, Japan.

IL-1  $\alpha$  /  $\beta$  遺伝子欠損マウスを用いた接触性アレルギー皮膚炎メカニズムの基礎的検討

○金澤 由基子<sup>1,2</sup>、小黑 多希子<sup>1</sup>、畑尾 正人<sup>3</sup>、塩田 清二<sup>4</sup>、  
宝来 玲子<sup>5</sup>、浅野 雅秀<sup>6</sup>、岩倉 洋一郎<sup>2</sup>、小島 幸一<sup>2</sup>、吉田 武美<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 昭和大・薬・毒物、<sup>2</sup> (財)食品薬品安全センター・薬野研、<sup>3</sup> (株)資生堂・ライフサイエンス研究センター、<sup>4</sup> 昭和大・医・第一解剖、<sup>5</sup> 東大・医科研

[ 目的 ] アレルギー性接触皮膚炎(ACD)では、皮膚に存在するランゲルハンス細胞(LC)が抗原を局所リンパ管に提示するが、この LC の移動および成熟に IL-1  $\beta$  が大きく関与していることが知られている。本研究では、ACD 発症メカニズムにおいて、IL-1 がどのような役割を果たしているかを検討するために、IL-1  $\alpha$  /  $\beta$  遺伝子欠損マウス (IL-1 KO) に ACD を発症させ、野生型の BALB/c マウス (BALB/c) と反応性を比較した。

[ 方法 ] 実験日は 10 週齢の IL-1 KO (雌) 10 匹と 10 週齢の野生型 (BALB/cAnKO) (雌) 11 匹を用いた。実験第 1 日に PCA と等量混合した 0.1% 2,4-ジニトロクロロベンゼン (DNCB) オリブ油溶液を背側皮下に 0.1 ml 投与し、続いて、実験第 8 および 15 日に 0.1% DNCB エタノール溶液を腹部に 0.1 ml 開放塗布した。実験第 26 日に右耳介に 5% DNCB アセトン溶液を、左耳介にはアセトン、それぞれ 20  $\mu$ l 開放塗布し、その 24 および 48 時間後、耳厚をダイヤルシクネスゲージ (三豊製作所) で測定した。また、ACD 発症時の産生サイトカイン量を調べるために、5% DNCB アセトン溶液で再発起後、12 および 24 時間目に得た血清中の IL-4、IFN- $\gamma$  および IL-5 濃度を ELISA キット (Endogen) で測定した。

[ 結果 ] 24 時間後の測定では、BALB/c の左右の耳厚差は 0.182 mm、IL-1 KO では 0.237 mm、48 時間後では、それぞれ 0.151 mm および 0.187 mm であり、IL-1 KO でも BALB/c と同等以上の反応が認められ、IL-1  $\alpha$  /  $\beta$  遺伝子欠損による反応抑制は認められなかった。血清中 IFN- $\gamma$  濃度は、BALB/c では再発起 12 時間後に平常値の 100 倍強まで上昇し、24 時間後にはほぼ平常値に戻ったのに対し、IL-1 KO では採血時期に関係なく高値を示すものが認められた。IL-5 濃度は、両系のマウスとも平常値より高値を示したもののばらつきが大きく、有意な変化は認められなかった。IL-4 は検出できなかった。以上の結果より、IL-1  $\alpha$  /  $\beta$  遺伝子が欠損していても ACD は惹起されるが、関連するサイトカインの動きには違いのある可能性が示唆された。

Mechanism of Allergic Contact Dermatitis in IL-1  $\alpha$  /  $\beta$  Doubly Deficient Mice

Yukiko KANAZAWA<sup>1,2</sup>, Takiko OGURO<sup>1</sup>, Mastsu HATAO<sup>3</sup>, Seiji SHIODA<sup>4</sup>, Reiko HORAI<sup>5</sup>, Masahiko ASANO<sup>6</sup>, Yoichiro IWAKURA<sup>6</sup>, Kohichi KOJIMA<sup>2</sup> and Takemi YOSHIDA<sup>6</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmaceut. Sci., Showa Univ., <sup>2</sup>Hatno Res. Inst., FDSC, <sup>3</sup>Shiseido Res. Center,

<sup>4</sup>School of Med, Showa Univ., <sup>5</sup>Inst. of Med Sci., Tokyo Univ.

○齋藤文代、安心院祥三、大塚雅則、今田中伸哉

財団法人化学品検査協会 日田研究所

【目的】アポトーシスは細胞の増殖や分化と同様に生体の恒常性維持のため、遺伝子にコードされた生理的な細胞死である。しかし薬物や毒性物質による細胞障害などの非生理的条件下でも誘導され、低濃度暴露や暴露初期にアポトーシスが引き起こされることが知られている。本研究では細胞を毒性物質に暴露した後、細胞の生存率とアポトーシスによる細胞死を定量的に調べ、アポトーシスを毒性評価の早期指標として適用できるか否かを検討した。

【方法】新生仔牛血清を10%添加したイーグルMEM培地で培養したチャイニーズ・ハムスター肺線維芽細胞(CHL/IU)に種々の濃度の Rhodamine 6G (R6G)、Trichloroethylene (TCE)、Actinomycin D (AmD)、Thioacetamide (TAA)を暴露した。MTT法により細胞生存率を求め、アガロースゲル電気泳動によるDNA断片の検出と蛍光染色(Hoechst33258)による形態学的観察によりアポトーシスを検出した。

【結果】1-1000  $\mu$ M の R6G を3時間、1-20 mM の TCE を6時間、1-100 nM の AmD を24時間、1-30 mM の TAA を48時間、CHL/IU細胞に暴露した後、MTT法により細胞毒性を評価した。IC<sub>50</sub>はそれぞれ約170  $\mu$ M、7 mM、17 mM、30 nMであった。形態学的観察に基づき、500細胞中に占めるアポトーシス細胞の割合を算出した結果、R6Gではアポトーシスの誘発はみられなかったが、AmDでは20 nMからアポトーシスが誘発され、IC<sub>50</sub>付近でピークに達し(27%)、DNAの断片化も確認された。TCEやTAAでは細胞毒性が見られない濃度域で第一のピークがみられ、IC<sub>50</sub>を超えた致死領域で第二のピークが見られた。これらのことから細胞が50%以上生存している濃度域でもアポトーシスは誘発され、それは物質によって異なることが分かった。また、10 mMを超える濃度では浸透圧の変化によって誘発される可能性も同時に示唆された。なお、本研究は平成10年度厚生科学研究費補助金によって行われたものである。

Evaluation of cytotoxicity with apoptosis in cultured mammalian cells

Fumiyo SAITO, Syozo AJIMI, Masanori OTSUKA, Nobuya IMATANAKA, Hita Research Laboratories, Chemicals Inspection and Testing Institute, Oita, Japan

N-methyl-N-nitrosourea誘発ラット視細胞アポトーシスの発生機序 —Bcl-2 family並びにCaspase familyの関与—

○義澤克彦<sup>1,2</sup>、南部裕之<sup>3</sup>、楊維紅<sup>2</sup>、大石裕司<sup>1</sup>、橋本正晴<sup>1</sup>、  
—小原要<sup>1</sup>、三木弘彦<sup>3</sup>、蝶良愛郎<sup>2</sup>

<sup>1</sup>藤沢薬品工業(株)安全性研究所、<sup>2</sup>関西医大 病理Ⅱ、<sup>3</sup>眼科

[目的] N-methyl-N-nitrosourea (MNU) は発癌性・催奇形性を有する7βH<sub>2</sub>誘発剤であり、多種の動物の網膜視細胞に7βH<sub>2</sub>誘発を誘発する (Tsubura, et al., Anim. Eye Res., 1998)。今回、MNU誘発の視細胞アポトーシスのメカニズムを明らかにするために、Bcl-2 family 並びに Caspase family の関与について検討した。

[方法] 50日齢の雄SDラットにMNU75mg/kgを単回腹腔内投与し、投与後6、12、24、72時間並びに7日に屠殺し、眼球を10%中性緩衝ホルマリン固定パラフィン包埋及びacetone固定Amex包埋し、TUNEL染色及び7-methyldeoxy-guanosine(7-MedGua)の免疫染色を施した。また、網膜のBax並びにBcl-2の発現をWestern blotにより、Caspase 3、6 及び 8の活性をColorimetric protease assayにより解析した。

[結果] 組織学的に投与後24時間より視細胞の核濃縮・破壊像が観察され、それ以降病変は進行し、7日には外顆粒層及び桿体錐体層が一部消失した。投与後6時間より視細胞に7-MedGua及びTUNELのシグナルが観察され、TUNEL陽性細胞は増加し、24時間でピークに達した。また、投与後12時間からBaxの発現が増強し、Bcl-2の発現は逆に減少した。Caspase 3、6 及び 8活性は、投与後6時間から各々増強し、72時間でピークに達した。

以上の結果から、MNU誘発ラット網膜変性における視細胞アポトーシスはDNA付加体(7-MedGua)の形成、7βH<sub>2</sub>誘発関連蛋白の変動(Baxの発現増強、Bcl-2の発現減弱)並びに7βH<sub>2</sub>誘発実行過程に関与するCaspase 3、6 及び 8の活性増強が関与することが明らかとなった。

Mechanism of N-methyl-N-nitrosourea-induced photoreceptor apoptosis in SD rat: the regulation of Bcl-2 family and Caspase family.

Katsuhiko YOSHIZAWA<sup>1,2</sup>, Hiroyuki NAMBU<sup>3</sup>, Jihong YANG<sup>2</sup>, Yuji OISHI<sup>1</sup>, Masaharu HASHIMOTO<sup>1</sup>, Kaname OHARA<sup>1</sup>, Hirohiko MIKI<sup>3</sup> and Airo TSUBURA<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Toxicology Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., LTD., Osaka-532-8514, Japan, <sup>2</sup>Dep. Of Pathology, <sup>3</sup>Ophthalmology, Kansai Medical University, Moriguchi-570-8506, Japan.

○車 碩鎬、金 珠英、Arthit Chairoungdua、関根孝司、遠藤 仁

杏林大学医学部薬理学教室

【目的】 主肺症の原因物質であるシリカは肺のみではなく肝臓および腎臓等にも障害を示すことが報告されてきた。本研究の目的はシリカの毒性発現メカニズムを腎臓ネフロン由来培養細胞を用いて明らかにすることである。

【方法】 近位尿細管 ( $S_1$ ) および髓質集合尿管 (IMCT)由来培養細胞での細胞内遊離カルシウム濃度をFura-2/AMを用いて2波長蛍光顕微鏡で測定した。細胞毒性はトリパンブルー排除および細胞内ATP含量の変化を用いて評価した。細胞内ATP含量の測定はluciferin-luciferaseを用いたmicrochemiluminescence方法で行った。

【結果】 腎臓ネフロン由来培養細胞の細胞内遊離カルシウム濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) は、シリカの添加により容量依存的に増加した。シリカに対する細胞内遊離カルシウム濃度上昇は、IMCT細胞において、 $S_1$ 細胞より、より低濃度 ( $6 \mu g/ml$ ) より観察された。シリカによる $[Ca^{2+}]_i$ 変化は1 mMのEGTAを2分間前処理することにより完全に抑制され、また、phospholipase C抑制剤であるU73122 ( $5 \mu M$ , 30分) 前処理はシリカによる $[Ca^{2+}]_i$ 変化に影響を及ぼさないことから、シリカによる $[Ca^{2+}]_i$ 変化は細胞外からの流入であることが推測された。シリカによる細胞毒性をトリパンブルー排除法により検討した結果、容量依存的に細胞毒性が増加し、IMCT細胞が細胞内遊離カルシウム濃度と同様、より敏感であった。一方類似の粒子である $Al_2O_3$ による $[Ca^{2+}]_i$ 変化及び細胞毒性は観察出来なかった。シリカによる細胞毒性発現はカルシウムchealatorであるEGTA及びcalcium channel blockerであるnifedipineにより有意に減少した。細胞内ATP含量と $[Ca^{2+}]_i$ の間には負の相関が認められた。

【結論】 シリカによる細胞毒性発現は細胞内遊離カルシウム濃度の増加が原因であることが明らかになった。

Silica increases cytosolic calcium and cause cell injury in renal cell line

Seok Ho CHA, Ju Young KIM, Arthit CHAIROUNGDU, Takashi SEKINE, Hitoshi ENDOU

Department of Pharmacology and Toxicology, Kyorin University School of Medicine, Mitaka, Tokyo 181, Japan



細胞磁界測定法によるガリウム砒素の肺胞マクロファージ  
障害性評価

○<sup>1)</sup>岡田充史,<sup>1)</sup>計良 徹,<sup>1)</sup>井上葉子,<sup>1)</sup>杉浦由美子,  
<sup>1)</sup>眞下紀美代,<sup>2)</sup>相澤好治,<sup>2)</sup>菅 永毅,<sup>3)</sup>小谷 誠

<sup>1)</sup>北里大学医学部衛生学・公衆衛生学,<sup>2)</sup>忠南大学校  
医科大学予防医学教室,<sup>3)</sup>東京電機大学工学部電子工学科

[はじめに]ガリウム砒素はコンピュータ産業において、近年用いられる化合物であるが、砒素の毒性については、昨年夏の和歌山砒素カレー事件からも良く知られているところである。そこで我々は、ガリウム砒素の呼吸器毒性について、ハムスターの肺胞マクロファージを用いて評価した。

[方法と結果]【細胞磁界測定】細胞磁界の指標として四三酸化鉄を肺胞マクロファージに添加した後に、実験群にはガリウム砒素を2, 4, 10, 20 $\mu$ g添加し、対照群にはPBSを添加した。一晩培養した後に磁化し、20分間の残留磁界を測定した。次に磁化直後の残留磁界を100%として、磁化後20分間の残留磁界をもとにして緩和曲線を作成すると、実験群における緩和は対照群と比較して、量依存的に遅延した。また磁化後2分間の緩和係数( $\lambda$ )を $B=B_0 \exp(-\lambda t)$ より求めたところ、対照群であるPBSと、実験群の4, 10, 20 $\mu$ gとの間に、有意差が認められた。【酵素活性値測定】肺胞マクロファージに上記と同様に試料を添加して、上清に含まれるLDHの活性値を測定した。LDHの放出率を求めると、対照群であるPBSと、実験群のすべての間に、有意差が認められた。

【形態学的観察】光学顕微鏡観察では、超生体染色法及び酵素免疫染色法を用いて、細胞の傷害率及びアポトーシス比率を評価した。また電子顕微鏡観察では、細胞の形態学的変化を観察した。肺胞マクロファージの障害は、実験群において認められたが、対照群においては、ほぼ正常であった。

[結論]ガリウム砒素による肺胞マクロファージの障害性が、明らかな事実として提示された。今後は、ガリウム砒素懸濁液が経時的に溶解する事による、ガリウム及び砒素溶液の障害性の程度を、より明確にする事が課題として残された。

Magnetometric Evaluation for The Toxicity of Gallium Arsenide particles to Alveolar Macrophages in Hamsters.

<sup>1)</sup>Mitsushi OKADA, <sup>1)</sup>Tohru KEIRA, <sup>1)</sup>Yoko INOUE, <sup>1)</sup>Yumiko SUGIURA, <sup>1)</sup>Yoshiharu ALZAWA, <sup>2)</sup>Young-Chae CHO, <sup>3)</sup>Makoto KOTANI <sup>1)</sup> Dep. of Preventive Medicine & Public Health, School of Medicine, Kitasato University, Kanagawa 228-8555, Japan. <sup>2)</sup> Dep. of Preventive Medicine & Public Health, College of Medicine, Chungnam National University, Taejeon 301-131, Korea. <sup>3)</sup> Dep. of Electronics, Faculty of Engineering, Tokyo Denki University, Tokyo 101-0054, Japan.

○猪又 晃、井上 智彰、堀井 郁夫

日本ロシュ（株）研究所、前臨床科学研究部

[目的] 肺組織への直接毒性作用を解明する上で、初代培養肺細胞を用いた *in vitro* 毒性評価系は、重要な情報を提供する。今回我々は、Bleomycin (BLM)がラット胎仔の培養肺細胞に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] 妊娠 19 日目(産前確認 : 0 日)の SD ラットから摘出した胎仔より肺を摘出した。摘出肺を細断後、酵素処理により単離細胞に分散した。単離した細胞をプレートへの付着性の違いを利用し、上皮細胞と線維芽細胞とに分離した。トリプシン-EDTA 処理を行い、培養液に再分散した各細胞分散液は、上皮細胞単独群、および線維芽細胞単独群とし、24 well プレートに播いた。24 時間培養後、0, 1, 10, 100  $\mu\text{g/ml}$  の用量で BLM を添加し、経時的に培養上清中の LDH 活性測定および形態学的観察を実施した。

[結果] 培養上清中の LDH 活性は、BLM 添加後 8 時間までは上皮細胞、および線維芽細胞群共に変化はほとんど認められなかった。BLM 添加後 24 時間より、上皮細胞群では用量相関的に経時的に上昇したが、線維芽細胞群では 48 時間後まで上昇は認められなかった。また、形態学的観察結果は、LDH 活性の測定結果をほぼ裏付けるものであったが、線維芽細胞群では BLM の用量に相関して肥大、伸展等の形態学的変化が認められた。

[結論] 今回の結果より、ラット胎仔初代培養肺細胞において、BLM は上皮細胞に対して特異的に細胞障害性を有すること、また線維芽細胞に形態変化を引き起こすことが示された。よってこのラット胎仔初代培養肺細胞の系は、肺組織への毒性作用を評価する上で有用であると考えられた。

*In Vitro* Toxicological Evaluation by Using Fetal Rat Primary Lung Cells.

Akira INOMATA, Tomoaki INOUE, Ikuo HORII. Dept. Preclinical Science, Nippon Roche Research Center, Kamakura, 247-8530, Japan.

○中村英明、古川文夫、笠原健一郎、宮内慎、西川秋佳、広瀬雅雄

国立医薬品食品研究所 病理部

【はじめに】抗住血吸虫薬 Oltipraz は、げっ歯類において、aflatoxin B<sub>1</sub>、CCl<sub>4</sub>、acetaminophen 等による肝障害を抑制する。また、様々な発癌モデルにおいて、癌を抑制する作用を有し、特に大腸及び肝臓でその効果が高いことが知られている。今回我々は、銅の代謝異常を示し、肝障害及び肝細胞癌や腎細胞癌を自然発症することが知られている LEC ラットに Oltipraz を混飼投与し、その影響を調べた。

【実験方法】6週齢の雄 LEC ラットを 20 匹ずつ 2 群に分け、一方に 400ppm Oltipraz 混合飼料を、もう一方には基礎飼料を与え飼育した。死亡又は瀕死動物を速やかに剖検するとともに、投与開始から 5、10 及び 25 週後に各群数匹ずつ計画屠殺した。計画殺動物は腹部大静脈より採血し、得られた血清を用いて血液生化学検査を行った。また、肝臓及び腎臓を採取し、臓器重量測定及び病理組織学的検査を実施した。

【結果】死亡動物が Oltipraz 投与群において投与 10-15 週に 8 例 (40%) みられ、基礎飼料群において投与 16 週に 1 例 (5%) みられた。死亡動物は全て中等度～高度の黄疸を示した。血液生化学検査で、投与 25 週において基礎飼料群に比べ Oltipraz 投与群で血清銅、GOT、GPT、LDH、ALP 及びγ-GTP の増加がみられた。また、Oltipraz 投与群に肝臓及び腎臓の比重量の有意な増加及び増加傾向がみられた。

【考察】以上の結果から、Oltipraz 投与群により強い肝障害の兆候が認められた。死亡状況から投与 12-14 週 (16-18 週齢) において障害が強くと考えられる。これは LEC ラットにおいて銅の肝臓への蓄積が最も高くなり、肝炎が発症する時期と重なっており、Oltipraz が肝臓への銅の蓄積に関わっていると推察される。これらの結果に病理組織学的検索結果を加え報告する。

Effects of Oltipraz on spontaneous hepatitis of LEC rats.

Hideaki NAKAMURA, Fumio FURUKAWA, Ken-ichiro KASAHARA, Makoto MIYAUCHI, Akinori NISHIKAWA and Masao HIROSE. Division of Pathology, NIHS, Tokyo-158-8501, Japan.

○倍味 繁<sup>1)</sup>、越谷 修<sup>1)</sup>、澤本 修<sup>1)</sup>、豊島茂樹<sup>1)</sup>、川内佳之<sup>2)</sup>、  
平岡 功<sup>1)</sup>、菅野 司<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 株式会社大塚製薬工場 鳴門研究所

<sup>2)</sup> 大阪府立大学 農学部 獣医生理

〔目的〕肝硬変患者で高アンモニア (NH<sub>3</sub>) 血症は脳症発現の危険因子となるが、肝硬変肝における NH<sub>3</sub> 代謝様式は明らかでない。今回、ヒトの病態をよく反映するチオアセトアミド (TAA) 誘発肝硬変ラットの肝臓における NH<sub>3</sub> 代謝を検討した。

〔モデル作製〕5週齢のSD系雌ラットに0.03%TAA水溶液を飲水として4週間または12週間連日投与し、処置中止後は水道水に切り替え2日後に実験に用いた。

〔結果〕TAAを4週間処置 (TAA4w) すると、肝障害 (核小体の肥大、核分裂像、単細胞壊死) が発現し、12週間処置 (TAA12w) では肝硬変へと移行した。TAA4wで血中 NH<sub>3</sub> 濃度は上昇しなかったが、尿中への尿素排泄量は減少傾向を示した。TAA12wでは、血中 NH<sub>3</sub> 濃度が上昇し、これと一致して尿中への尿素排泄量が減少した。Colored microsphere を脾臓に注入して肝門脈血流を調べたところ、門脈-大循環短絡路はTAA処置ラットで発現していなかった。血流肝臓において、0.25-1mM 塩化アンモニウム (NH<sub>4</sub>Cl) からの尿素及びグルタミン (Gln) 産生速度はいずれもTAA4wで減少し、TAA12wではさらに顕著に減少したが、負荷したNH<sub>3</sub>の取り込みはTAA12wでのみ減少した。10mM NH<sub>4</sub>Clからの最大尿素産生速度は、TAA4wで影響されなかったが、TAA12wでは減少した。

〔結論〕TAAによる肝硬変発症前では、肝臓の尿素及びGln産生速度は減少していたが、尿素産生の最大速度とNH<sub>3</sub>取り込みに影響はなかった。肝硬変の発症に伴い、血中NH<sub>3</sub>濃度の上昇が認められたが、これは肝臓における尿素及びGln産生の著明な抑制とNH<sub>3</sub>取り込みの低下によってもたらされた。以上、肝臓のNH<sub>3</sub>代謝抑制が、肝硬変患者における高アンモニア血症発現の原因の1つとして考えられた。

#### Changes in Hepatic Ammonia Metabolism in Rats with Thioacetamide-Induced Liver Cirrhosis.

Shigeru MASUMI<sup>1</sup>, Osamu KOSHITANI<sup>1</sup>, Osamu SAWAMOTO<sup>1</sup>, Shigeki TOYOSHIMA<sup>1</sup>, Yoshiyuki KAWAUCHI<sup>1</sup>, Isao HIRAOKA<sup>1</sup> and Tsukasa SUGANO<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Naruto Research Institute, Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc., Tokushima, Japan. <sup>2</sup> Department of Veterinary Physiology, College of Agriculture, Osaka Prefecture University, Osaka, Japan.

○尹碩柱、数坂昭夫、藤田正一

北海道大学大学院獣医学研究科環境獣医科学講座毒性学教室

[目的]  $\text{CCl}_4$  は代表的な肝毒性物質であり多くの研究がなされている。我々は分光学的手法による毒性発現機序の解明を試みてきた。今回、赤外分光法に用いて  $\text{CCl}_4$  のラット肝膜リン脂質に対する毒性発現の機序解明を試みた。[方法] 各2匹の雌性SDラットに、生食(コントロール)あるいは  $\text{CCl}_4$  (0.8ml/kg b.w.) を腹腔に投与し、肝障害が顕著に現れる24時間後にラットをと殺した。肝臓を摘出し、そのホモジネート(Hm)あるいはミクロソーム(Ms)を調製した。 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$  を用いてそれらに含まれるリン脂質を抽出してスペクトル試料とした。同様に、コントロールラットのMsを用いてNADPH存在下で  $\text{CCl}_4$  の *in vitro* での代謝実験を行い、その時生ずるMsの損傷を  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$  で抽出したリン脂質試料で検討した。[結果]  $\text{CCl}_4$  投与群、Hmから抽出した試料では、脂質の過酸化に加えて脱リン酸が進行していることが  $\sim 3010\text{ cm}^{-1}$  および  $1300\sim 900\text{ cm}^{-1}$  における吸収強度の減少から明らかになった。同時に、細胞内情報伝達物質であるジアシルグリセロール(DAG)の生成が、それに特徴的な吸収強度の増加から確認された。しかし、P450による  $\text{CCl}_3\cdot$  の生成が最も盛んに起きていると考えられるMsからの試料では、脂質の過酸化は起きているもののリン酸部の脱リン酸は起きていないことが分かった。この事は、Msを用いた *in vitro* での反応でも確かめられた。[考察]  $\text{CCl}_4$  をラットに投与した時にMsで生成するラジカルは肝原形質膜およびMs両部での脂質過酸化に関与するが、少なくともMsでの膜リン酸部の脱リン酸反応には関与しないことが明らかになった。この時、細胞内情報伝達物質DAGの生成も認められ、その肝原形質膜での肝損傷修復過程への関与が示唆された。

Infrared spectroscopic study on the mechanism of  $\text{CCl}_4$  toxicity toward membrane phospholipids from rat liver

Seokjoo YOON, Akio KAZUSAKA and Shoichi FUJITA

Laboratory of Toxicology, Department of Environmental Veterinary Sciences, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Japan

四塩化炭素の単回吸入投与後にみられたラットの肝臓における  
複製 DNA 合成 (RDS) の誘発

○穂山太郎, 片山誠一, 佐藤徹哉, 豊田直人,  
平塚秀明, 宮川 誠, 土谷 稔, 三浦 稔

三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所

【目的】RDS試験は、非変異がん原性物質の検出に有効な短期のスクリーニング試験法である。四塩化炭素はAmes試験陰性で経口投与によってラットに肝腫瘍を誘発することが知られている。今回、我々は揮発性化学物質のヒトへの影響を評価するために、四塩化炭素を単回吸入投与し、発がん性の短期予測が可能か否かを検討した。

【材料および方法】9週齢の雄性F344ラットに10および20 (EUガイドラインの限界濃度) mg/Lで四塩化炭素を4時間、単回吸入投与した。投与後24, 48, 72, 96, 168時間に、BrdUを腹腔内投与してパルス標識した肝臓を摘出した。常法に従ってホルマリン固定・パラフィン包埋後、連続薄切標本を作製し、抗BrdU抗体による免疫染色およびH&E染色を行った。鏡検部位は内側右葉とし、2000個の細胞を計数することにより、その中に占めるRDS誘発細胞の出現頻度 (%) を算出した。さらに、同部位の病理組織学的検査を行った。また、肝臓摘出時に後大静脈から採血し、血液化学的検査を実施した。

【結果】20mg/L群では24~96時間にRDSの有意な上昇がみられ、48時間にピークを示した。血液化学的検査では、RDSの上昇ピークに先行して24時間にASAT, ALATおよびLDHの上昇ピークが認められた。10mg/L群でも同様の傾向が認められた。病理組織学的には20mg/L群でRDSの上昇ピークに先行して重度の小葉中心性肝細胞壊死、中等度の肝細胞空胞化および炎症性細胞浸潤が認められた。10mg/L群では軽度の小葉中心性肝細胞壊死、中等度の肝細胞空胞化および炎症性細胞浸潤が認められた。これらの結果から、揮発性の高い四塩化炭素の発がん性を単回吸入投与によるRDS試験で十分に予測可能であることが示唆された。

Induction of replicative DNA synthesis (RDS) in rat livers following single inhalation exposure with carbon tetrachloride.

Taro HOYAMA, Seiichi KATAYAMA, Tetsuya SATO, Naoto TOYOTA, Hideaki HIRATSUKA,  
Makoto MIYAGAWA, Minoru TSUCHITANI, Minoru MIURA  
Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd., Ibaraki, 314-0255, Japan.

○森下 克美, 北浦 敬介, 佐藤 亮, 三谷 公互, 伊藤 典男, 山下 修司

大塚製薬株式会社 徳島研究所 安全性研究センター

**[目的]** ベルオキシゾーム増生剤の WY-14643 (WY) はラット肝細胞増殖を亢進させることが知られている。また一方で肝細胞の ploidy を誘発することも知られているが、細胞増殖への影響を ploidy ごとに検討した報告は少なく、まだ一定の結論は得られていない。そこで今回、雄 SD ラットの肝細胞増殖に及ぼす WY 投与の影響を、免疫組織化学およびフローサイトメトリーを用いて検討し、あわせて肝細胞 ploidy の変化についても評価した。

**[方法]** 実験Ⅰ：雄性 SD ラットに 100mg/kg の WY を週 5 日間、最長 4 週間反復経口投与し、肝重量、肝細胞増殖活性 (PCNA 免疫組織化学染色) の経時的推移、肝臓の組織学的変化を観察した。実験Ⅱ：100mg/kg の WY を 4 日間反復経口投与し、フローサイトメトリーを用いて肝細胞の PCNA 陽性率ならびに ploidy を測定した。

**[結果]** 実験Ⅰ：投与 4 日目までに肝重量は顕著な増加を示し、その後もゆるやかな増加が持続した。PCNA 陽性率は投与 2 日目をピークとした著しい増加を示したが、その後は次第に対照群のレベルにまで減衰した。組織学的には肝細胞および核の腫大が認められた。実験Ⅱ：肝細胞 PCNA 陽性率はすべての ploidy で増加した。ただし、その程度は 2N 肝細胞よりも 4N 以上の肝細胞で顕著であった。また肝細胞全体では、2N 肝細胞比率の減少および 4N 以上の肝細胞比率の増加が認められた。

**[結論]** WY による肝重量増加は、肝細胞の分裂増殖に加えて肝細胞および核の腫大がその原因と考えられた。また、程度に差はみられたものの、PCNA 陽性率は全ての ploidy で増加し、肝細胞全体では 4N 以上の肝細胞比率の増加が認められた。

#### Effect of WY-14643 on Hepatocyte Proliferation in Male Rats

Katsumi Morishita, Keisuke Kitaara, Makoto Sato, Kiriminobu Mitani, Norio Ito, and Shuji Yamashita  
Drug Safety Research Center, Tokushima Research Institute, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.

○斎藤敏樹<sup>1,2</sup>, 小久江栄一<sup>1</sup>, 下田実<sup>1</sup>, 布谷鉄夫<sup>2</sup><sup>1</sup>農工大, <sup>2</sup>日本生物科学研究所

〔目的〕肝薬物代謝による薬物動態は感染症、炎症やその他の急性相反応により著しく影響される。急性相反応時には肝ミクロソームチトクロームP450 (CYP) 依存薬物代謝活性の低下が生じ、薬物のクリアランスが変化する。本研究では、大腸菌リポポリサッカライド (LPS) により急性相反応を誘発したウサギにおける薬物動態の変化について報告する。

〔材料および方法〕日本白色種雌ウサギ (kbl:JW) に、LPS 50  $\mu$ g/kgを単回筋肉内投与し急性相反応を誘発した。対照として生理食塩液を同様に投与した群を設けた。LPS投与前、投与後2、4、8および24時間に直腸体温の測定および採血をし、血漿中IL-6およびアルブミン (ALB) 濃度を測定した。LPS投与後24時間に、アンチピリン (7 mg/kg)、テオフィリン (5 mg/kg)、フェニトイン (10 mg/kg) およびニフェジピン (2 mg/kg) を静脈内投与後血漿中濃度を測定し、総クリアランス ( $CL_{tot}$ )、半減期 ( $t_{1/2}$ )、分布容積 ( $V_d$ )、時間-濃度曲線下面積 (AUC) および平均滞留時間 (MRT) を算出した。

〔結果〕LPS投与後、直腸体温およびIL-6は急速に上昇し、急性相反応の誘発が確認された。アンチピリン、テオフィリン、フェニトインおよびニフェジピンの  $CL_{tot}$  は、LPS投与群で対照群に比して有意な低値を示した。アンチピリンは肝酸化的代謝能のプローブとして知られていること、テオフィリン、フェニトインおよびニフェジピンは、それぞれ主にCYP1A2、CYP2C9およびCYP3A3/4で代謝されることから、急性相反応時のCYP依存活性の低下による薬物代謝の抑制が、ウサギを用いたin vivo試験においても確認された。

#### The Alteration of Drug Disposition in Rabbits during Acute Phase Response

Toshiki SAITOH<sup>1,2</sup>, Eiichi KOKUE<sup>1</sup>, Minoru SHIMODA<sup>1</sup>, and Tetsuo NUNOYA.

<sup>1</sup>Department of Veterinary Medicine, Tokyo University of Agriculture and Technology, <sup>2</sup>Nippon Institute for Biological Science.



抗癌剤塩酸イリノテカン(CPT-11)の胆汁排泄、消化管  
障害軽減を目的としたPharmacokinetic modulation

○加藤将夫、堀川雅人、杉山雄一

東京大学大学院・薬学系研究科・製剤設計学教室

【目的】CPT-11は優れた抗腫瘍効果を示すものの、臨床生まれに高度な副作用（下痢）を生じる。消化管障害のメカニズムは未だ不明であるが、活性代謝物SN-38による直接的な毒性発現が考えられている。我々の解析からSN-38の消失経路として肝臓内でのグルクロン酸抱合とともに胆汁排泄が重要であり、胆管側膜上に発現するcMOAT/MRP-2による能動輸送を受けることが示唆されている。胆汁排泄されたSN-38による消化管毒性の可能性が考えられることから、排泄を阻害する臨床応用の可能な方法論の確立が重要である。本研究ではこの確立を目的としてcMOAT阻害剤との同時投与、抱合活性の誘導を目指した方法論、の妥当性について検証した。

【方法】ラット胆管側膜 $\mu$ シムにおけるcMOAT基質の輸送に対する種々の有機アミノ酸による阻害を検討した。胆汁排泄阻害はin vivoにおいても確認した。抱合活性の誘導はGuptaら(Cancer Chemother Pharmacol 39,440,1997)に従いphenobarbitalによって行い肝灌流系において抱合、胆汁排泄、血管側へのeffluxの各メカニズムを分離評価した。

【結果と考察】ラットで観察されたSN-38胆汁排泄メカニズムのcMOAT阻害剤による減少は、阻害剤の血漿中濃度と $K_i$ 値とからほぼ予測可能であった。その上で、ヒト臨床投与量での血漿中濃度と本実験で得た $K_i$ 値とから、阻害効果を示す可能性の最も高い化合物の選別を試みたところprobenecidが最適であった。Phenobarbital投与後のSN-38の胆汁排泄はむしろ促進される傾向にあり、速度論解析の結果、グルクロン酸抱合よりもエステラーゼによるSN-38生成が顕著に誘導されることが示唆された。灌流液中へのSN-38のeffluxもphenobarbitalにより顕著に促進され、血管側膜透過過程においても輸送に変化（uptakeの低下ないしeffluxの亢進）のあることが示唆された。

Pharmacokinetic modulations of anticancer drug CPT-11 and its active metabolite SN-38 with an aim to decrease SN-38 biliary excretion and gastrointestinal toxicity

Yukio KATO, Masato, HORIKAWA, and Yuichi SUGIYAMA.

Department of Biopharmaceutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

## 2-Mercaptobenzimidazole (MBI) と Lipopolisaccharide (LPS) の複合投与による毒性増強とトキシコキネティクス (TK)

○酒見和枝<sup>1</sup>、梅村隆志<sup>2</sup>、津田充寿<sup>1</sup>、大野泰雄<sup>1</sup>国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験センター  
薬理部<sup>1</sup>、毒性部<sup>2</sup>

【目的】細菌等感染と薬物との相互作用を検討するために、ゴム抗酸化剤 MBI とエンドトキシン (LPS) とのラットへの複合投与による毒性増強、免疫応答の指標としての NO 産生量の変化及び MBI の体内動態の変化を調べた。

【実験方法】Wistar 系雄ラット (日本 SLC, 8W) に MBI (50mg/kg, in Corn oil) を経口投与し、更に 30 分後に LPS (1mg/kg) を腹腔内投与した。投与後は一般症状を観察し、経時的に採血するとともに、採尿を行なった。投与後 24、48 及び 72 時間に解剖を行ない、臓器重量を測定した。血中及び尿中の NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> 量は自動窒素酸化物測定装置で、MBI 量は HPLC で測定した。また、クレアチニンクリアランス及び血清中 CRN、BUN、GOT、GPT を調べた。

【結果及び考察】MBI と LPS の複合投与群では、腹臥・下痢・流涙・流涎などが観察され、LPS 単独投与群に比べ全体的に一般状態が増悪する個体が多く、重篤な血尿を伴い死亡する例も見られた。MBI 単独投与群では一般状態に変化は認められなかった。体内 NO 産生指標としての血中 NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> 濃度は、LPS 単独投与群に対して複合投与群では C<sub>max</sub>・AUC とともに約 2 倍に上昇した。尿中への NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> の 72 時間までの総排泄量は単独、複合同群間で変わらなかったが、24 時間までの排泄量は複合投与群で少なく、またクレアチニンクリアランスの低下、BUN の上昇、腎重量の増加が見られたことから腎機能の低下が考えられた。MBI の体内動態についても MBI 単独投与群に比べて血中 AUC が増大し、尿中排泄の遅延が観察され、更に MBI の脱硫代謝物への代謝阻害がみられた。また肝重量の増加、GOT・GPT の上昇が認められた。以上のことから各々の単独投与では軽微であった肝及び腎毒性が複合投与によって増強され、一時的な排泄障害、代謝阻害を引き起こしたことが MBI 及び NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> の血中 AUC を増大させたものと考えられた。

Increased liver and kidney toxicities caused by co-administration of  
2-Mercaptobenzimidazole (MBI) and Lipopolisaccharide and toxicokinetics of MBI.

Kazuo SAKEMI, Takashi UMEMURA, Mitsuhiro TSUDA and Yasuo OHNO.  
Division of Pharmacology and Toxicology, Biological Safety Research Center, NIHS, Tokyo  
158-8501, Japan.

- 梅岡健一<sup>1)</sup>, 石川圭子<sup>1)</sup>, 岸本恒次<sup>1)</sup>, 原田美輪<sup>1)</sup>, 金田信也<sup>1)</sup>  
 福田立<sup>2)</sup>, 長根芳文<sup>2)</sup>, 平岡功<sup>2)</sup>, 竹之下洋司<sup>2)</sup>

- 1) 株式会社大塚製薬工場 鳴門研究所  
 2) 株式会社クアリー 和歌山生育所

**[目的]** 化合物 A のカニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験において、動作緩慢、歩行失調、うずくまり及び摂餌量低下を主徴とする死亡がみられ、TK 試験より代謝物である Br の関与が疑われた。そこで今回、カニクイザルに NaBr を反復投与し、血中 Br 濃度と中毒症状の関連について検討した。

**[材料及び方法]** 雄性カニクイザルに、蒸留水に溶解した NaBr の 300mg/kg を 3 週間、600mg/kg を 11 日間経口投与した(n=3,2)。投与期間中の一般状態、摂餌量、血液学的検査、血液化学的検査及び血中 Br 濃度(塩化金吸光度法)を測定した。

**[結果]** 血中 Br 濃度は経日的に増加し、600mg/kg では投与 4 日で中程度の動作の緩慢、1 週間ではさらに直立困難、歩行異常、脱力等が中程度にみられ、摂餌量も低下し、Br 濃度は 60mEq/L に達していた。投与 10 日には Br 濃度が 70 mEq/L に達し、1 例では上記の症状が高度となり、摂餌が殆どみられず瀕死状態となったため 11 日に切迫殺した。他の 1 例も 11 日には動作の緩慢とうずくまりが高度になった。一方、300mg/kg では Br 濃度は 1 週間で約 35 mEq/L、2 週間で約 50mEq/L となり、2 週より動作緩慢、直立困難、歩行異常及び脱力等が軽度のみであった。以後 3 週まで投与したが Br 濃度は上昇せず、症状の程度も変わらなかった。なお、300 及び 600mg/kg のいずれの動物においても血液検査で著変はみられなかった。

**[結論]** 今回、NaBr の投与により化合物 A の 13 週間投与試験と同様の中毒症状を認めた。これらの症状は血中 Br 濃度が 40~50mEq/L より発現し、60mEq/L 以上で瀕死状態に至るものと考えられた。

#### Effect of Bromine on Clinical Sign in Male Monkeys.

Ken-ichi UMEOKA<sup>1)</sup>, Keiko ISHIKAWA<sup>1)</sup>, Kohji KISHIMOTO<sup>1)</sup>, Miwa HARADA<sup>1)</sup>, Shinya KANEDA<sup>1)</sup>, Tatsuru FUKUDA<sup>1)</sup>, Yeshifumi CHONE<sup>1)</sup>, Isao HIRAOKA<sup>1)</sup> and Yohji TAKENOSHITA<sup>2)</sup>. 1) Naruto Research Institute, Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc., Tokushima, 772-8601, Japan. 2) Wakayama Branch, Keari Co., LTD., Wakayama, 648-0003, Japan.

Toxicokinetics for a new chitin synthesis inhibitor HW1015  
in rats

OHo-Chul Shin, Young-Mi Lee, Hee-Ok Shim,  
Moon-Koo Chung, Sang-Seop Han

Pharmacokinetics & Toxicokinetics Lab., Toxicology  
Research Center, Korea Research Institute of Chemical  
Technology, Taejon 305-600, Korea

We studied an oral 13-week toxicokinetics for newly synthesized chitin synthesis inhibitor, HW1015, in SD rats. Following oral administrations at doses of 125, 500 and 2000 mg/kg, the toxicokinetic properties were characterized by one compartment open model with lag-time absorption and first order elimination in each dose. At a single administration kinetic study, a marked dose-related nonlinearity was observed. The AUC and  $C_{max}$  values in the doses of 500 and 2000mg/kg were decreased up to 40 and 10 %, respectively, compared to those in the dose of 125 mg/kg. At the last phase of 13-week oral repeated administration, the dose-dependent nonlinear kinetics was also confirmed in each dose. Furthermore, there were no significant differences in the pharmacokinetic parameters between the initial and 13-week phase. This finding implies that the HW1015 is not accumulative and that the higher doses, 500 and 2000mg/kg, employed in this study are readily associated with saturable absorption kinetics for oral exposure. The NOAEL (no observed adverse effect level) of HW1015 was estimated to be 2000mg/kg and 500mg/kg in male and female rats, respectively, in a separate 13-week oral toxicity study. Therefore, HW1015 seems to be a very safe agrochemical for oral exposure despite of its considerable oral bioavailability.



# 著者索引 (日本名)

## <ア>

相澤 好治 22D-09-4  
 青木 豊彦 21C-02-4  
 青木 康展 21WA-03-1  
 青山 博昭 22A-10-4  
 赤座 誠文 21B-02-1  
 赤松 博 21D-04-4  
 秋田 弘俊 21C-01-2  
 秋田 正治 21WA-02-5  
 秋丸 国広 22B-10-1  
 阿久根 淳 21B-11-4  
 朝枝 伸幸 22B-09-5  
 浅野 伍郎 22A-11-1  
 浅野 忠 21B-03-4、21B-03-5  
 浅野 雅秀 22C-11-1  
 朝野 由美 21D-01-3  
 安心院 祥三 22D-09-1  
 畔上 二郎 21D-02-4  
 麻生 直 21WA-03-4  
 足立 邦明 21C-09-4  
 安達 智子 21D-02-5  
 穴井 俊二 21WA-01-3  
 穴井 真紀子 21WA-03-4  
 阿部 俊一 21B-03-3  
 阿部 毅 21B-10-2  
 有箇 幸司 21S1A-09-2  
 有吉 範高 21C-01-2  
 粟田 則男 22A-09-2  
 安東 賢太郎 21B-02-3  
 安藤 進 21WA-03-5  
 21WA-04-1  
 安藤 信明 21B-03-3

## <イ>

飯島 剛 21B-09-3、21B-10-3  
 飯田 憲二 21WA-01-3  
 飯田 茂 21B-10-2、21B-02-4  
 22A-11-5  
 飯塚 宏美 21WA-01-5  
 21WA-02-1、21B-11-2  
 飯野 由香 21B-09-5  
 五十嵐 功 21C-04-2

五十嵐 良明 22C-09-5  
 井口 綾子 21B-09-5  
 池上 仁 22B-09-4  
 池田 和子 21D-01-2  
 池田 陽一 21B-03-3  
 石井 昭男 21D-03-5  
 石井 権二 21B-02-2  
 石井 宏幸 22B-11-2  
 石井 祐次 21WA-03-2  
 石川 圭子 22D-11-4  
 石突 論 22B-10-3  
 石田 卓巳 21WA-03-2  
 石谷 祥彦 21B-03-4、21B-03-5  
 石塚 修司 21C-09-5  
 石塚 真由美 21WA-03-1  
 石原 純子 21WA-03-3  
 磯部 直彦 21WA-02-2  
 21WA-02-3、22C-09-3  
 22C-09-4  
 磯部 充威 21D-03-1、22C-10-5  
 磯和 弘一 22B-09-2  
 市川 一仁 22B-09-5  
 市原 和夫 22B-10-3  
 一花 次夫 22A-10-2  
 伊藤 今日子 22A-09-5、22B-09-4  
 伊藤 清美 21C-04-3  
 伊藤 圭輔 21WA-04-2  
 伊藤 恒夫 21B-03-4  
 伊藤 徳夫 22C-10-3、22C-10-4  
 伊藤 典男 22D-10-5  
 稲富 久人 21C-01-3  
 稲若 邦文 22A-11-4  
 井上 五子 21C-11-1  
 井上 智彰 22B-09-1、22D-09-5  
 井上 裕章 21B-02-3  
 井上 博之 21WA-01-2  
 井上 葉子 22D-09-4  
 猪又 晃 21D-04-5、22A-10-1  
 22D-09-5  
 伊原 敏夫 23S3A-03-1  
 今井 清 21C-09-1  
 今井 順 22B-09-2

- |        |                    |        |                    |
|--------|--------------------|--------|--------------------|
| 今井 直人  | 21B-03-3           | 大橋 芳彦  | 21C-04-2           |
| 今田中 信哉 | 21WA-03-4、22D-09-1 | 大洞 大典  | 22B-09-2           |
| 今西 雅典  | 22A-09-3           | 大山 直樹  | 22A-10-3           |
| 井本 秀樹  | 21B-10-2、22A-11-5  | 岡崎 欣正  | 22B-11-2           |
| 入江 弘之  | 21B-03-3           | 岡田 学   | 21D-01-3           |
| 岩井 久和  | 21B-02-5           | 岡田 充史  | 22D-09-4           |
| 岩城 理進  | 22C-09-2           | 尾形 昭子  | 21B-09-3、21B-10-3  |
| 岩倉 洋一郎 | 22C-11-1           | 岡宮 英明  | 22A-09-5           |
| 岩田 久人  | 21WA-04-3、22B-10-5 | 小川 哲郎  | 22B-09-3           |
|        |                    | 小川 真由美 | 21B-09-1           |
| <ウ>    |                    | 奥田 孝二  | 21C-11-1           |
| 于 爾康   | 21D-02-2           | 奥西 秀樹  | 21B-11-5           |
| 牛尾 博子  | 21WA-03-1          | 奥野 泰由  | 21WA-01-1          |
| 臼居 敏仁  | 21D-03-1、22C-10-5  | 奥山 学   | 22B-09-5           |
| 海上 智   | 21B-11-2           | 小倉 健一郎 | 21C-01-5           |
| 畝山 智香子 | 21B-10-1、21B-04-1  | 小栗 一太  | 21WA-03-2          |
| 宇野 洋   | 21B-09-3、21B-10-3  | 小黑 多希子 | 22C-11-1           |
| 梅岡 健一  | 22D-11-4           | 奥脇 浩子  | 21B-02-3           |
| 梅津 有理  | 21C-01-2           | 尾崎 秀次  | 21B-10-5           |
| 梅村 孝司  | 21D-04-1           | 尾崎 潤一郎 | 21B-01-5           |
| 梅村 隆志  | 22D-11-3           | 尾崎 博   | 21B-11-1           |
| 梅村 建夫  | 23S3A-02-2         | 小澤 正吾  | 21C-01-3、21C-03-3  |
|        |                    | 小谷 知之  | 22C-10-3           |
| <エ>    |                    | 小田部 耕二 | 21B-03-4           |
| 江口 勝也  | 22B-09-3           | 小野寺 博志 | 21WA-01-4、21C-10-3 |
| 江馬 眞   | 22A-11-3           |        | 21C-11-2           |
| 遠藤 仁   | 21D-02-2、22D-09-3  | 尾畑 賢臣  | 21D-03-3           |
|        |                    | 小原 要   | 22D-09-2           |
| <オ>    |                    | <カ>    |                    |
| 尾池 雄一  | 22B-10-4           | 角谷 祐子  | 21B-10-3           |
| 大石 眞之  | 21WA-02-4          | 笠原 健一郎 | 21D-03-4、22D-10-1  |
| 大石 祐司  | 22D-09-2           | 笠間 菊子  | 21C-02-3           |
| 大久保 惇  | 21D-03-2           | 柏原 純一  | 21B-03-3           |
| 大迫 誠一郎 | 21WA-03-1          | 鹿嶋 崇幸  | 21C-09-1           |
| 大沢 基保  | 23S2A-10-2         | 数坂 昭夫  | 21WA-04-3、22B-10-5 |
| 大島 洋次郎 | 21B-01-3           |        | 22D-10-3           |
| 太田 茂   | 21C-02-2           | 片桐 公一  | 21B-03-4、21B-03-5  |
| 大谷 勝己  | 22A-09-1           | 堅田 友則  | 21B-02-1           |
| 大塚 雅則  | 22D-09-1           | 片山 誠一  | 21WA-01-5          |
| 大塚 道夫  | 22B-11-2           |        | 21WA-02-1、22D-10-4 |
| 大野 浩司  | 21C-02-5、21C-03-1  | 勝田 修   | 21D-04-1           |
|        | 21C-03-2           | 勝田 眞一  | 21WA-03-5          |
| 大野 泰雄  | 21C-01-3、21C-03-3  |        | 21WA-04-1          |
|        | 21C-03-4、22D-11-3  | 勝谷 成男  | 21C-02-4           |
| 大庭 耕輔  | 21WA-01-2          |        |                    |

勝山 清加	21D-01-5	北浦 敬介	22D-10-5
加藤 茂明	21S1A-09-3	北川 学	21WA-04-2
加藤 貴彦	21C-01-3	北島 俊一	21D-03-2
加藤 達真	21B-02-5	北村 和夫	22B-09-4
加藤 仁美	22B-09-3	木戸 亮子	21C-09-2
加藤 日路士	22C-09-3、22C-09-4	鬼頭 剛	21B-11-3、21B-11-4
加藤 博康	21D-02-5		21B-04-2
加藤 将夫	22D-11-2	木根 渕 英雄	22B-10-1
金井 好克	21D-02-2	木ノ本 寿子	21B-09-5
金澤 由基子	22C-11-1	金 珠英	22D-09-3
金森 進	22A-10-5	金 徒慶	21D-02-2
鹿庭 正昭	22C-09-5	木村 恵人	21B-02-2
金子 秀雄	21WA-02-2	木村 朋紀	22C-10-4
	21WA-02-3、22C-09-3	木村 正明	21B-01-4、22C-09-2
	22C-09-4	京川 吉正	21C-03-1、21C-03-2
金田 信也	22D-11-4	清本 和子	21C-09-5
兼藤 雅子	22A-10-5		
鎌滝 哲也	21WA-04-2、21C-01-1	<ク>	
	21C-01-2、21C-04-1	蓮田 憲一	21C-09-5
	23S2A-09-1	日下部 愛泉	21C-10-2
上村 裕博	21C-11-1	久世 博	21B-01-5
亀岡 美幸	21B-10-2	國澤 純	22C-09-1
亀坂 泰正	22B-11-3	國頭 英夫	21C-01-2
亀之園 剛	21B-11-3、21B-11-4	久保 道江	21B-03-1、21B-03-2
唐木 英明	21B-11-1		22B-09-4
仮家 公夫	21B-03-1、21D-03-2	熊澤 俊彦	22B-09-5
	22B-09-4	熊野 英一	21D-01-1、21D-01-5
川内 佳之	22D-10-2	倉田 祥正	21D-04-1
川地 晶子	21C-02-1	栗原 明義	21B-01-4
川島 明	21D-04-5	黒木 龍一	21WA-03-2
川島 邦夫	22A-10-2、22A-11-3	黒沢 亨	21B-09-1、21B-10-5
河裾 健志	21D-04-1		21D-04-2
川鍋 剛	21B-03-2、21D-01-2	黒田 博之	21WA-03-5
川端 好之康	21B-03-3		21WA-04-1
河部 真弓	21C-10-5	<ケ>	
川村 聡	22A-11-4	計良 徹	22D-09-4
川森 俊人	21WA-03-3	玄番 宗一	21D-02-3
菅野 純	21S1A-09-1		
<キ>		<コ>	
菊田 雅行	22A-10-4	小池 行也	21B-09-3、21B-10-3
菊森 幹人	21D-01-4	河下 伸	21C-11-1、22A-09-3
岸 倉次郎	22A-10-5	糀谷 高敏	21WA-01-4、21B-04-1
岸田 文雄	22C-09-3、22C-09-4		21C-11-2
岸本 恒次	22D-11-4	幸田 祐佳	21D-02-3



- 小久江 栄一 22D-11-1  
 越谷 修 22D-10-2  
 小島 幸一 21C-02-3、21D-02-4  
 21D-02-5、22C-11-1  
 小島 夏樹 21B-10-2、21B-02-4  
 22A-11-5  
 小島 肇夫 21B-02-1  
 小谷 誠 22D-09-4  
 後藤 和広 21C-10-2  
 小西 宏明 21B-02-1  
 小林 潔 21C-10-2、22A-10-3  
 小林 孝一 22B-09-4  
 小林 充 21B-09-3、21B-10-3  
 小林 裕子 21C-11-2  
 小林 和子 21D-04-5  
 近藤 泰史 21B-09-2
- <サ>  
 齋藤 幸一 21WA-02-2  
 21WA-02-3  
 齋藤 敏樹 22D-11-1  
 齋藤 文代 22D-09-1  
 齋藤 義明 21C-09-1  
 三枝 由紀恵 22C-10-1  
 堺 俊治 21B-03-1、21B-03-2  
 22A-09-5、22B-09-4  
 榊原 章仁 21WA-04-3  
 佐神 文郎 21C-02-4  
 酒盛 政光 21C-11-1  
 酒見 和枝 21C-03-4、22D-11-3  
 左近上 博司 21D-01-4  
 佐々木 篤志 21B-11-2  
 佐々木 智 22A-09-5  
 佐々木 敬幸 23S3A-02-4  
 佐々木 正治 21B-01-4  
 佐々木 有 21C-09-2  
 笹浪 知宏 21WA-01-2、22A-11-2  
 笹野 公伸 21D-04-4  
 佐治 大介 21B-02-2  
 佐藤 敦子 21D-03-1、22C-10-5  
 佐藤 晃一 21B-11-1  
 佐藤 哲男 23S2A-09-2  
 佐藤 徹哉 21WA-01-5  
 21WA-02-1、22D-10-4  
 佐藤 亮 22D-10-5
- 佐藤 雅之 21B-09-1  
 佐藤 実 21C-10-2、22A-10-3  
 佐内 勇夫 22A-11-5  
 佐野 文子 21C-10-2、22A-10-3  
 佐野 真士 21C-10-5  
 佐藤 正邦 21B-04-3  
 沢多 美和 21B-09-5  
 澤村 祐一 21C-01-2  
 澤本 修 22D-10-2
- <シ>  
 塩田 清二 22C-11-1  
 柴崎 義明 21B-10-5  
 柴田 誠司 21D-03-1、22C-10-5  
 柴田 博 21B-03-3  
 渋谷 幸代 21D-04-2  
 渋谷 淳 21B-10-1、21B-04-1  
 渋谷 徹 21C-09-1  
 島田 典招 21C-04-3  
 清水 憲次 23S3A-03-2  
 下田 実 22D-11-1  
 城之内 公子 21B-10-3  
 白井 智之 21S1A-11-1  
 21C-10-5  
 白石 裕美子 21B-09-5  
 新倉 博文 21D-01-1、21D-01-5  
 21D-02-1  
 神藤 康弘 21D-04-2
- <ス>  
 菅 千里 22A-10-2  
 須方 督夫 21WA-01-1  
 菅野 司 22D-10-2  
 杉浦 由美子 22D-09-4  
 杉村 隆 21WA-03-3  
 杉本 次郎 21C-10-2、22A-10-3  
 杉本 武志 21B-01-3  
 杉山 雄一 21C-04-3、22D-11-2  
 鈴木 潤 21B-02-2、21D-01-4  
 鈴木 弘 21B-03-1  
 鈴木 正明 21C-09-3  
 鈴木 裕子 22B-10-5  
 須田 朗子 22C-09-2  
 須田 一真 21C-01-5  
 酢田 輝男 21B-03-3

須田 恵	22A-11-1、22B-10-2	武吉 正博	21WA-01-3
須藤 雅人	22B-11-2	田崎 健二	21WA-03-2
須永 昌男	22A-10-2	立石 湯美	22A-09-4
角南 整	21WA-01-1	田中 あづさ	21C-02-3、21D-02-4 21D-02-5
鎌内 桃子	21C-03-3、21C-03-4	田中 慶一	22C-09-1、22C-10-3 22C-10-4
住田 佳代	21WA-02-3	田中 宏治	21C-04-2
<セ>		田中 光	21C-10-5
関 剛幸	21D-02-5	田中 亮太	22A-11-2
関口 総一郎	22A-11-1	田辺 信介	21WA-04-3
関戸 徹	21C-02-4	田辺 博	21B-03-5
関根 孝司	21D-02-2、22D-09-3	谷 吉朗	21C-02-1
瀬畑 信哉	21C-04-2	谷川 学	21B-03-5
<ソ>		谷藤 久人	21D-03-1、22C-10-5
副島 潤子	22C-10-2	谷本 憲昭	21B-01-5
曾根 秀子	21WA-03-1	田畑 伸幸	21B-02-5
<タ>		田畑 肇	21B-03-1、21B-03-2 22B-09-4
田井 鉄男	22A-09-1	田保 充康	21D-01-1、21D-02-1
高岡 雅哉	21C-04-2	玉野 静光	21C-10-5
高木 観	21B-02-3	田村 啓	21B-04-1、21B-10-1
高木 可郎	21C-11-1	田村 博信	21C-09-5
高木 久宜	21WA-01-4、21C-10-3 21C-11-2	田谷 一善	21WA-03-5 21WA-04-1
高科 庸子	21B-02-3	<チ>	
高田 昌太郎	21B-03-4	千坂 亜希子	21D-02-4
高場 克己	21D-03-5	千葉 一成	21WA-04-3
高橋 省	21WA-02-4	千葉 修一	21B-03-4、21B-03-5
高橋 研	22A-10-4	千原 和弘	22A-09-4
高橋 智亜紀	22A-10-2	車 碩鎬	21D-02-2、22D-09-3
高橋 宏明	22B-11-3	曹 永銀	22D-09-4
高橋 正一	21WA-03-5 21WA-04-1	長根 芳文	22D-11-4
高橋 道人	21B-10-1	<ツ>	
高橋 芳樹	21WA-04-2	津賀 浩史	22B-10-2
高松 一彦	21B-09-4	角崎 英志	21B-04-2、21D-04-3
田川 義幸	21B-02-5	津田 修治	21C-09-2
滝沢 節子	22A-10-1	津田 充宥	21C-03-4、22D-11-3
竹内 正紀	21C-11-1、22A-09-3	津田 実	21D-02-2
竹内 正弘	23S2A-11-2	土谷 稔	21D-04-1、22B-11-2 22D-10-4
竹川 潔	21C-11-1	土屋 毅幸	22A-10-3
武田 理夫	21D-02-2	筒井 尚久	22C-10-2
竹之下 洋司	22D-11-4		
竹原 都	22C-10-4		

- |        |                               |        |                                 |
|--------|-------------------------------|--------|---------------------------------|
| 堤 秀樹   | 21B-03-5                      | 中村 晃忠  | 22C-09-5                        |
| 堤 康夫   | 22C-09-1                      | 中村 勇   | 21B-01-4                        |
| 螺良 愛郎  | 22D-09-2                      | 中村 英明  | 21C-10-4、21D-03-4<br>22D-10-1   |
| 鶴田 恵三  | 21D-04-2                      | 中村 洋介  | 22C-09-3、22C-09-4               |
| <テ>    |                               | 中山 佳都夫 | 21C-01-1                        |
| 出来 俊昭  | 21D-01-1、21D-01-5<br>21D-02-1 | 中山 隆治  | 22B-09-3                        |
| 寺岡 宏樹  | 22B-10-5                      | 中山 直樹  | 21B-01-4                        |
| 寺岡 美枝  | 22A-09-2                      | 仲由 武貴  | 21B-09-1、21B-10-5<br>21D-04-3   |
| 寺本 昭二  | 22A-10-4                      | 鍋島 俊隆  | 22B-10-4                        |
| <ト>    |                               | 並木 千晶  | 21C-09-5                        |
| 土井 邦雄  | 21C-02-1                      | 納屋 聖人  | 21B-02-4、21B-10-2<br>22A-11-5   |
| 土井 孝良  | 21B-01-3                      | 橋橋 敏夫  | 23S2A-10-1                      |
| 土井 卓也  | 21D-04-1                      | 成田 亜矢子 | 22A-11-4                        |
| 土井 久子  | 21B-01-3                      | 南部 裕之  | 22D-09-2                        |
| 通山 千春  | 21WA-03-1                     | <ニ>    |                                 |
| 徳田 和夫  | 21B-03-4                      | 西 直樹   | 21B-09-5                        |
| 常井 和男  | 21B-03-4、21B-03-5             | 西川 秋佳  | 21C-10-4、21D-03-4<br>22D-10-1   |
| 戸塚 ゆ加里 | 21WA-03-3                     | 西川 貴史  | 21C-09-4                        |
| 冨ヶ原 祥隆 | 21WA-02-2                     | 西川 哲男  | 21D-04-4                        |
| 豊吉 亨   | 22B-09-2                      | 西原 力   | 21WA-02-2                       |
| 豊鳥 茂樹  | 22D-10-2                      | 西村 典子  | 21WA-03-1                       |
| 豊田 直人  | 21D-01-2、22D-10-4             | 西森 司雄  | 21B-02-2、21D-01-4<br>23S3A-02-3 |
| 豊田 和弘  | 21B-10-1、21B-04-1             | 西山 貴仁  | 21C-01-5                        |
| 鳥山 優   | 22A-11-2                      | <ヌ>    |                                 |
| <ナ>    |                               | 布谷 鉄夫  | 22D-11-1                        |
| 永井 賢司  | 21WA-01-5<br>21WA-02-1        | <ネ>    |                                 |
| 永井 博文  | 21B-01-3                      | 根本 信雄  | 21C-01-2                        |
| 長尾 哲二  | 21C-09-1                      | <ノ>    |                                 |
| 中岡 政直  | 22A-11-4                      | 野口 忠   | 21C-09-3                        |
| 永岡 隆晴  | 21C-11-1                      | 野口 英世  | 23S3A-01-1                      |
| 中木 敏夫  | 22B-11-1                      | 野田 修志  | 21WA-03-4、21B-04-3              |
| 中島 準子  | 22A-10-2                      | 野田 幸裕  | 22B-10-4                        |
| 中島 由起子 | 21C-04-3                      | 野原 恵子  | 21WA-03-1                       |
| 長嶋 和郎  | 22EA-03-1                     | 野村 大成  | 23S2A-11-1                      |
| 永嶋 雅子  | 21D-03-1、22C-10-5             | 野村 護   | 23S3A-01-3                      |
| 永田 良一  | 21B-11-3、21B-11-4             | <ハ>    |                                 |
| 中塚 蔵   | 21WA-02-2<br>21WA-02-3        |        |                                 |
| 中西 剛   | 22C-09-1、22C-10-3<br>22C-10-4 |        |                                 |

萩原 昭裕	21C-10-5				21D-03-4、22D-10-1
箱井 加津男	21B-09-2		廣田 里香		21B-09-4
橋場 雅道	21D-03-3				
橋本 敦	21C-09-5		<フ>		
橋本 知春	22A-11-4		福崎 好一郎		21B-11-3、21B-11-4
橋本 正晴	22D-09-2				21B-04-2、21D-04-3
畑尾 正人	22C-11-1				21D-04-4
服部 淳二	21B-10-5		福重 潤一郎		21C-02-1
花田 貴宣	22A-09-5		福田 重弥子		21WA-03-2
馬場 隆彦	21C-02-5		福田 立		22D-11-4
浜田 修一	21C-09-5		福西 克弘		22A-09-2
浜田 大治	21B-11-3		藤井 咲子		22A-10-2
浜田 知久馬	21B-01-1		藤井 侑子		22B-11-1
林 哲	22C-09-1		藤田 健一		21C-01-1、21C-04-1
林 泰司	21B-09-2		藤田 正一		21WA-04-3、22B-10-5
林 まき子	22C-09-3、22C-09-4				22D-10-3
林 真	21C-09-4		藤平 栄一		22B-10-3
林 裕	21B-09-5、21D-04-4		藤巻 秀和		21WA-03-1
原 静華	21B-09-1		藤原 淳		21B-11-2
原 卓司	21D-03-5		二川 治子		22B-11-3
原内 敏夫	21C-03-1、21C-03-2		船橋 斉		22A-09-4
原園 景	22A-11-3		古川 茂典		21B-02-2、21D-01-4
原田 敬輔	21C-02-2		古川 純子		21B-09-3
原田 剛	21D-03-3		古川 文夫		21C-10-4、21D-03-4
原田 智子	21D-03-5				22D-10-1
原田 美輪	22D-11-4		古川 正敏		22A-10-2
晴佐久 満	21C-09-4		古田 祐之		21B-02-5
坂東 富美	21D-04-2		古谷 真美		21D-02-5
<ヒ>			<ホ>		
比嘉 良喬	21D-03-2		寶来 直人		21D-04-3
檜垣 環	22C-09-3、22C-09-4		宝来 玲子		22C-11-1
引間 知広	21C-03-4		星 勝治		22B-10-3
久田 茂	21WA-03-3、21D-03-1		星野 健二		22C-10-1
	22C-10-5		星元 満里子		21C-02-5
菱川 敦子	22A-10-5		細川 勇		22C-10-2
平岡 功	22D-10-2、22D-11-4		細川 常通		21C-02-1
平塚 明	21C-01-4		穂山 太郎		22D-10-4
平塚 秀明	21WA-01-5		堀 正敏		21B-11-1
	21WA-02-1、21D-04-1		堀井 郁夫		21D-04-5、22A-10-1
	22D-10-4				22B-09-1、22D-09-5
広瀬 健一郎	21C-01-4				23S3A-01-2
広瀬 雅雄	21WA-01-4、21B-10-1		堀川 雅人		22D-11-2
	21B-04-1、21C-10-3		堀場 直		21D-01-1、21D-01-5
	21C-10-4、21C-11-2				21D-02-1

本間 健資	22A-11-1、22B-10-2	三井 雄史	21D-03-3
<マ>		満石 三喜男	22B-09-2
前川 昭彦	21WA-03-4 21WA-03-5 21WA-04-1	満園 東治	22B-09-2
前田 博	21B-04-2	三森 国敏	21WA-01-4 21WA-03-3、21C-10-3 21C-11-1、21C-11-2
前田 真希	21WA-01-5 21WA-02-1	美濃部 典子	21B-02-2
牧野 俊彦	21C-04-2	三村 雄一	22B-09-3
眞下 紀美代	22D-09-4	宮内 慎	21C-10-4、21D-03-3 21D-03-4、22D-10-1
増田 光輝	21C-09-4	宮川 誠	22D-10-4
倍味 繁	22D-10-2	宮川 宗之	22A-09-1
松井 明子	21B-09-5	宮下 真一	21B-03-2
松井 信志	21C-02-5、21D-01-3	宮島 敦子	21C-03-3、21C-03-4
松尾 昌季	21WA-01-1	宮島 宏彰	21B-04-2、21D-04-3 21D-04-4
松岡 信男	22A-09-4	宮原 裕一	21WA-03-1
松坂 尚典	21C-09-2	宮本 昌美	21C-01-2
松澤 利明	21B-03-1	宮本 嘉明	22B-10-4
松下 智哉	21B-03-4、21B-03-5	宮脇 英美子	22A-11-3
松島 泰次郎	21C-09-3	三好 貴子	21C-02-5
松村 由美	21D-01-2	<ム>	
松本 一彦	23S3A-02-1	向井 大輔	21WA-01-2
松本 清司	21B-09-2	椋本 健次	22A-09-4
松本 力	22B-11-3	六角 香	21D-01-4
松本 哲朗	21C-01-3	務台 衛	21C-10-2、22A-10-3
松本 博隆	22A-10-1	武藤 重治	21C-04-1
松山 晃子	22C-10-3	武藤 秀樹	21B-10-2、22A-11-5
真鍋 淳	21C-04-2	村上 和生	22B-09-5
真鍋 由恵	21B-09-2	村田 幸久	21B-11-1
馬宮 洋治	21B-03-4、21B-03-5	室井 貴子	21B-04-3
間宮 隆吉	22B-10-4	<メ>	
真弓 忠範	22C-09-1	米良 幸典	21B-09-5
丸山 潔	21D-01-2	<モ>	
丸山 敏之	21C-02-5、21D-01-3	望月 健光	21B-02-5
丸山 豊	22B-10-5	望月 文敏	21D-01-2
<ミ>		森 誠	22A-11-2
三浦 大志郎	21B-09-3、21B-10-3	森下 克美	22D-10-5
三浦 稔	22D-10-4	守永 太賀彦	21D-01-4
三木 弘彦	22D-09-2	森本 秀樹	21D-03-1
三嶋 晃	22B-11-1	森安 眞津子	21D-03-2
水野 初枝	21C-02-1		
水野 幸恵	21B-02-5		
三谷 公互	22D-10-5		

<ヤ>

八木 久美子 21B-01-4  
安原 加壽雄 21WA-01-4、21C-10-3  
21C-11-2  
矢野 昌彦 21D-01-4  
山口 栄 21B-03-5  
山崎 寛治 21WA-03-4、21B-04-3  
山崎 義征 21C-01-1、21C-04-1  
山下 弘太郎 22B-11-2  
山下 修司 22D-10-5  
山田 清文 22B-10-4  
山田 智也 21WA-01-1  
山名 慶 21B-09-3  
山野 昌也 22B-09-5  
山村 研一 22B-10-4  
山本 敦子 22B-10-3  
山本 利憲 21B-03-4  
山本 敏誠 22A-09-3  
山本 秀樹 21C-02-1  
山本 光雄 21B-10-2  
山本 美津雄 22A-09-3  
山脇 英之 21B-11-1

<ユ>

尹 乘一 21B-10-4  
尹 碩柱 22D-10-3

<ヨ>

楊 繼紅 22D-09-2  
横田 淳 21C-01-2  
横山 篤 21WA-02-5

義澤 克彦 22D-09-2  
吉田 康介 22A-09-5  
吉田 武美 22C-11-1  
吉田 牧子 22B-09-2  
吉田 緑 21WA-03-5  
21WA-04-1  
吉原 新一 21C-02-2  
吉村 慎介 21D-02-4  
米元 純三 21WA-03-1  
米山 充 22A-09-3

<ワ>

若狭 芳男 23S3A-03-3  
若田 明裕 21B-09-4  
若林 敬二 21WA-03-3、21C-01-1  
若林 美津子 21C-03-1、21C-03-2  
涌生 ゆみ 21WA-01-5  
21WA-02-1  
和田 理穂 22A-10-2  
渡辺 潔 21D-04-4  
渡辺 元 21WA-03-5  
21WA-04-1  
渡邊 昌 21S1A-11-2  
渡辺 千朗 21D-02-4  
渡邊 剛 21D-01-5  
渡辺 稔之 21C-04-2  
渡邊 弘 21C-02-5、21D-01-3  
渡辺 真弓 21C-04-2  
渡部 烈 21C-01-4、21C-01-5  
23S2A-09-3

## 著者索引 (英名)

Brown, John Colin	21B-01-2	Kim, Seung Hee	22B-11-4
Chairoungdua, Arthit	22D-09-3	Kim, Tae Gyun	22B-11-4
Choung, Se Young	21C-03-5	Kim, Tae Wan	21C-03-5
	22B-11-4	Kodama, Y.	21B-10-4
Chung, Moon-Koo	22D-11-5	Kurokawa, Y.	21B-10-4
Gocke, E.	23S2A-09-4	Lee, Young-Mi	22D-11-5
Green, C.E.	21C-04-3	Matushima, Y	21B-10-4
	23S3A-03-2	Mu, Lee Byung	21C-10-1
Han, Hyung-Mee	22B-11-4	Nebert, D.W.	22LA-03-2
Han, Sang-Seop	22D-11-5	Park, Mijung	21C-03-5
Hirabayasi, Y.	21B-10-4	Philpot, R.M.	22LA-04-1
Inoue, T.	21B-10-4	Sarkar, S.	21WA-03-1
Jana, N.R.	21WA-03-1	Seo, Kyung Won	21C-03-5
Jung, Ki Kyung	22B-11-4	Shim, Hee-Ok	22D-11-5
Kaneko, T.	21B-10-4	Shin, Ho-Chul	22D-11-5
Kang, Seog Youn	22B-11-4	Tennant, Raymond W.	21C-10-1
Kanno, J.	21B-10-4	Tyson, C.A.	21C-04-3
Kavlock, R.J.	21S1A-10-1	Uchida, O	21B-10-4
Kawasaki, Y.	21B-10-4	Umemura, T.	21B-10-4
Kim, Jun Gyou	21C-03-5	Yoon, BI	21B-10-4
Kim, Hyo Jung	21C-03-5		
Kim, Jooil	21C-03-5		

# 座長一覧

## 特別講演

小栗 一太	22LA-04-1
加藤 隆一	22LA-03-2

## 教育講演

遠藤 仁	22EA-03-1
------	-----------

## 田邊賞受賞講演

唐木 英明	受賞講演1
黒川 雄二	受賞講演2

## シンポジウム

井上 達	21S1A-09-1~11-2
井村 伸正	23S2A-09-1~11-2
大沢 基保	23S2A-09-1~11-2
鎌滝 哲也	総合討論
	Closing Remarks
黒岩 幸雄	23S3A-01-1~01-2
西川 淳一	21S1A-09-1~11-2
野口 英世	Opening Remarks
	23S3A-01-3~02-1
野村 護	23S3A-02-2~03-3
堀井 郁夫	23S3A-01-3~02-1
松本 一彦	23S3A-02-2~03-3
渡部 烈	23S3A-01-1~01-2
	総合討論
	Closing Remarks

## ワークショップ

有園 幸司	21WA-01-1~01-5
高橋 芳樹	21WA-01-1~01-5
武田 健	21WA-02-1~02-5
永沼 章	21WA-02-1~02-5
奈良間 功	21WA-03-1~03-4

前川 昭彦	21WA-03-1~03-4
横山 篤	21WA-03-5~04-3
吉岡 忠夫	21WA-03-5~04-3

## 一般講演

赤堀 文昭	21B-01-1~02-1
有吉 範高	21C-01-1~02-1
粟田 則男	22A-09-1~09-5
伊原 敏夫	22A-10-1~10-5
植松 孝悦	22A-10-1~10-5
日厩 敏仁	22C-10-2~11-1
大野 泰雄	22D-11-1~11-5
小澤 正吾	21C-02-2~03-2
小野 宏	21B-01-1~02-1
数坂 昭夫	21C-01-1~02-1
加藤 将夫	22D-11-1~11-5
金井 好克	21D-01-1~01-4
仮家 公夫	21D-03-3~04-1
川島 邦夫	22A-09-1~09-5
菅野 盛夫	21B-10-5~11-5
北田 光一	22D-10-1~10-5
鬼頭 剛	21B-10-5~11-5
玄番 宗一	21D-01-1~01-4
佐神 文郎	21D-03-3~04-1
佐藤 秀蔵	21B-02-2~02-5
佐藤 哲男	22D-09-1~09-5
澁谷 徹	21C-09-1~09-5
須賀 哲弥	21B-09-1~09-5
鈴木 勝士	21D-02-4~03-2
田中 慶一	22C-09-1~10-1
津田 修治	21B-02-2~02-5
富樫 広子	21D-02-4~03-2
長尾 拓	21D-04-2~04-5
中木 敏夫	22B-09-1~09-5



中塚 敏夫	22A-11-1~11-5	三森 国敏	22D-09-1~09-5
中山 佳郎夫	21C-03-3~04-3	南 正康	21B-03-5~04-3
鍋島 俊隆	22B-09-1~09-5	南 勝	22B-11-1~11-4
野村 護	21B-03-1~03-4	山下 修司	22D-10-1~10-5
姫野 誠一郎	21D-01-5~02-3	山本 郁男	22B-10-1~10-5
平藤 雅彦	21B-09-1~09-5	横井 毅	21C-03-3~04-3
広瀬 雅雄	21C-10-1~11-2	吉岡 充弘	22B-10-1~10-5
藤田 健一	21C-02-2~03-2	吉田 武美	22C-10-2~11-1
藤平 栄一	22C-09-1~10-1	若狭 芳男	21D-04-2~04-5
陣矢 強	21B-03-1~03-4	若田 明裕	21B-10-1~10-4
星 勝治	22B-11-1~11-4	若林 敬二	21C-09-1~09-5
増田 裕	21B-03-5~04-3	渡辺 満利	21D-01-5~02-3
松本 清司	21B-10-1~10-4	渡辺 民朗	21C-10-1~11-2
見上 孝	22A-11-1~11-5		

## 協賛会社および団体名

旭化成工業  
アズウェルネスコカンパニー  
アムジェン  
イナリサーチ  
エーイー企画  
エーザイ  
SRI インターナショナル日本支社  
大塚製薬工場  
小野薬品工業  
オリンパス光学工業  
化学品検査協会  
科研製薬  
化合物安全性研究所  
環境バイリス研究所  
協和醗酵工業  
キリンビール  
クインタイルズ・アジア・インク  
サイエンスタナカ  
埼玉第一製薬  
杉野目記念会  
札幌市  
参天製薬  
サントリー  
塩野義製薬  
資生堂  
新日本科学  
スミスクライン・ビーチャム製薬  
住友化学工業  
住友製薬  
ゼネカ  
第一化学薬品  
第一製薬  
第一ラジオアイソトープ研究所  
大正製薬  
大日本製薬  
大鵬薬品工業  
大雄会医科学研究所  
武田薬品工業  
田辺製薬  
中外製薬  
ツムラ  
帝国臓器製薬

帝人  
東京田辺製薬  
東洋紡  
東レ  
トミー精工  
鳥居薬品  
日研化学  
日本医学臨床検査研究所  
日本ウェルカム  
日本食品分析センター  
日本新薬  
日本チャールス・リバー  
日本農産工業  
日本バイオアッセイ研究センター  
日本ベーリンガーインゲルハイム  
日本メナード化粧品  
日本ロシュ  
ノバルティスファーマ  
バイエル薬品  
ハンティンドンライフサイエンス  
萬有製薬  
ファイザー製薬  
ファルマシア・アップジョン  
藤沢薬品工業  
富士バイオメディックス  
ヘキスト・マリオン・ルセル  
ほくやく  
北陸製薬  
北海道  
北海道和光純薬  
三菱化学安全科学研究所  
明治製薬  
メディアサービス  
メルシャン  
持田製薬  
山之内製薬  
吉富製薬  
ライオン  
ローヌ・プーランローラー

(50音順)

(平成11年6月15日現在)

日立微量高速遠心機 **himac CF 15R**

## ロータクイックセッティング方式



CF 15R微量高速遠心機 販売価格 ¥720,000(本体)



実験台でチューブセット

50/15ml培養管チューブも  
11,000rpmで使用可能

全てのロータを載せるだけでセット完了

## ▶特長

- ロータクイックセッティング方式採用(駆動軸に載せるだけ)
  - 豊富なロータを簡便に使用可能
  - チャンバー内にチューブを落としても簡単に取り出せます。
  - 固定忘れによる事故の心配がありません。
- 静かな運転音(大幅な静音化)
- 強力な冷凍機により全てのロータを最高回転数で4℃以下に冷却可能  
(フロン規制対応、非特定フロンHFC134a採用)
- 豊富な機能
  - 各3段階の加速・減速レート
  - メロディーブザー(6種類)
  - 4種類の運転条件メモリー

日製産業株式会社

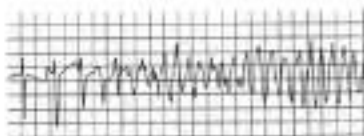
本社 〒105-8711 東京都港区西新橋一丁目2番14号 科学システム営業本部 電話(03) 3504-7211(ダイヤルイン)  
 東京支店 北海道0111-221-7241 青森01721-264-7271 新潟02581-251-4811 徳島02451-451-9151 群馬02621-241-7011  
 千葉047621-63-3482 神奈川04521-581-5841 京浜04751-241-1551 新潟0251-389-2551 福岡0821-221-4514  
 大阪03671882-3391 九州0921-721-2621

日立工機株式会社

本社工場 〒111-8522 東京都台東区北千住3-15-15 電話(03) 235-1384(ダイヤルイン)  
 ショールーム(東京都千代田区)〒100-0001 電話(03) 5561-1111 http://www.hitachi-hime.co.jp/home/  
 日立工機(株)営業課(東京都千代田区)〒100-0001 電話(03) 5561-1111

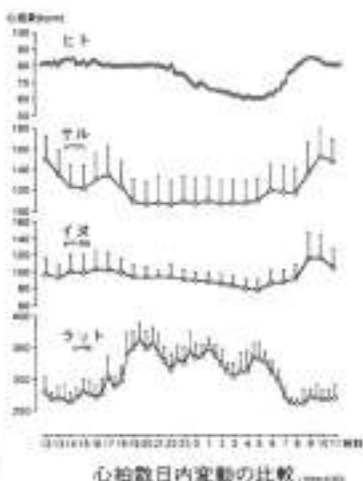
# ヒトへのリスク回避・・・

いま開発中の医薬品は、  
心臓にやさしいですか？



## ホルター心電図による心毒性評価

医薬品が初めてヒトに投与される前に、心臓に対する危険性がないかどうかを、各種動物（サル、イヌなど）の無麻酔・長時間心電図検査により詳細に解析します。



### ■非臨床試験から臨床第I相試験まで

新薬の研究開発のフィールドで、あらゆるご要望に対するお手伝いをさせていただきます。



株式会社

富士バイオメディックス

### 小淵沢総合研究所

山梨県北巨摩郡小淵沢町 10221 〒408-0044  
phone (0551) 36-2455 fax (0551) 36-3895

本社： 埼玉県鴻巣市東一丁目 1-25 phone (0485) 43-3411 fax (0485) 43-3722  
大阪営業所：大阪府淀川区東三国 4-4-15 コラム新大阪 6F phone (06) 6396-2732 fax (06) 6396-2745

# in vitro 薬物代謝研究用 ヒト肝ミクロソーム



## 商 品

- ヒト肝ミクロソーム  
(プールド)
- ヒト肝S9フラクション
- 動物種別肝ミクロソーム  
(マウス・ラット等)
- リアクション フェノタイピング キット  
(プールド、個別)
- 動物種別キット  
(ヒト、ビーグル、マウス・ラット等)
- チトクロームP450 抗体

新薬開発の時間短縮に  
薬物間の相互作用の研究に  
遺伝多型の研究に  
種間薬物代謝の相違の研究に

## 受託試験 (GLP, non-GLP)

- チトクロームP450の阻害
- チトクロームP450の誘導
- リアクション フェノタイピング
- その他ご相談に応じます。

ゼノテック社製品の総輸入販売元

## 日本農産工業株式会社

バイオ部 〒220-8146 横浜市西区みなとみらい2-2-1  
ランドマークタワー 46F

TEL (045) 224-3713 FAX (045) 224-3737 ご注意・お問い合わせは直接お電話またはFAXで。

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**

JAPAN BIOASSAY  
RESEARCH CENTER

JAPAN INDUSTRIAL SAFETY & HEALTH ASSOCIATION



**受託試験内容**

- |           |               |
|-----------|---------------|
| ☆ 吸入毒性試験  | ☆ がん原性試験      |
| ☆ 経口毒性試験  | ☆ 生殖発生毒性試験    |
| ☆ 経皮毒性試験  | ☆ 微生物変異原性試験   |
| ☆ 皮膚刺激性試験 | ☆ 培養細胞染色体異常試験 |
| ☆ 皮膚感作性試験 | ☆ 哺乳類小核試験     |

いずれの試験においても、随時ご相談に応じます。



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

〒257-0015 神奈川県秦野市平沢 2445 番地

TEL 0463-82-3911

FAX 0463-82-3919

医薬品・農薬・化学品の安全性試験から  
上市・マーケティングまで  
確かなパートナーシップをお約束する

**COVANCE**<sup>TM</sup>

THE DEVELOPMENT SERVICES COMPANY

- ◆ COVANCEでは、毒性試験（一般・繁殖・吸入・生殖）、代謝試験、一般薬理試験、生物学的安全性試験、残留農薬試験、環境への影響調査などの試験を受託しております。
- ◆ COVANCEの設備は、日本・アメリカ・EUのGLP対応です。（ISO9001取得済）また、雪長類に関する長期発癌性試験を実施した最初のCROです。
- ◆ COVANCEには、アメリカ（2ヶ所）・イギリス・ドイツの研究所を軸として医薬先進国を結ぶネットワークがあります。アメリカ・EUでの登録・申請に豊富な経験を持つCOVANCEを海外展開のパートナーとしてご指名下さい。
- ◆ COVANCEは、安全性試験からフェーズIまでの合計期間で5ヶ月を切った最初のCROです。また、時間短縮のために、チームINDなどのタスクフォースも設立されています。
- ◆ COVANCEには、日本の医薬品・化学品メーカーのニーズにお応えするため、専門担当チームがあります。

**コーヴァンス インク 日本支社**  
**コーヴァンス ラボラトリーズ ジャパン**  
〒103-0027 東京都中央区日本橋 2-15-3  
グレイスビル日本橋 9F  
Tel: 03-3242-7561 Fax: 03-3242-7586

コーヴァンス ラボラトリーズ（旧商号コーニング ヘーゼルトン）は、Covance Inc.の非臨床部門です。



ついに出了! 培養なしの簡易検出!

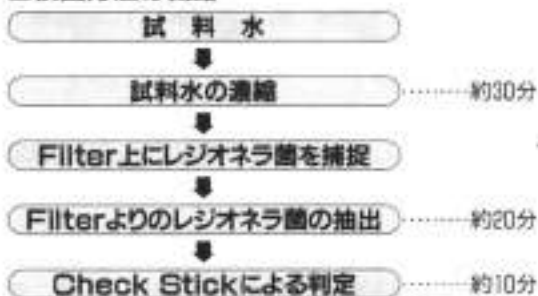
# レジオネラ検出キット

レジオネラ血清群タイプ1 検出用

空調用冷却塔水等の自主管理モニター用!

- メンブランフィルター法により、検出試料水を濃縮。培養なしでも  $5 \times 10^3$  CFU/100ml まで検出可能。
- イムノクロマト法によりスティック上に出現するラインを検出。結果も簡単、一・目・瞭・然!

### ■検出方法の概略



ホントに今日から  
1時間?!

★レジオネラ菌は地球上での発育が非常に遅いため、通常、培養だけで5日以上を要します。

### ■チェック スティックの原理



### 〈キットの内容〉

1. チェックスティック
2. プレフィルター
3. フィルター
4. 抽出液

●両方のゾーンにラインが出たら陽性

203-5400

レジオネラ検出キット

レジオネラ血清群タイプ1 検出用 10回用

※本キットは体外診断用ではありません。

※資料をご請求下さい。

## 和光純薬工業株式会社

本 社：〒540-8605 大阪市中央区道徳町三丁目1番2号  
東京支店：〒103-0023 東京都中央区日本橋本町四丁目5番13号  
URL: <http://www.wako-chem.co.jp>

問い合わせ先

フリーダイヤル: 0120-052-099    フリーファックス: 0120-052-806  
西日本: 本社 学術部    tel.06(6203)1788    fax.06(6201)5965  
E-mail: [labchem-sec@wako-chem.co.jp](mailto:labchem-sec@wako-chem.co.jp)  
東日本: 東京支店学術部    tel.03(3270)8123    fax.03(3242)6501  
E-mail: [labchem-tect@wako-chem.co.jp](mailto:labchem-tect@wako-chem.co.jp)



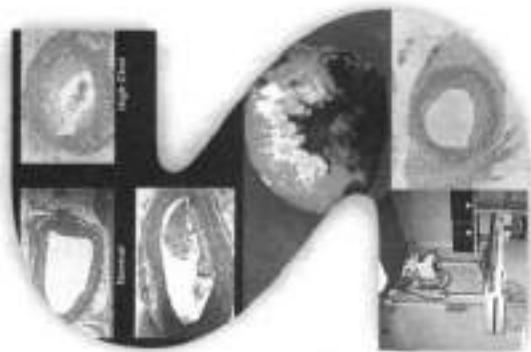
確かな情報をより早く



薬物動態試験

薬理試験

安全性試験



株式会社 環境/バイリス研究所

本社 〒528-0052

滋賀県甲賀郡水口町字川1555

TEL(0748)63-5253 FAX(0748)62-9062

東京事務所 〒103-0001

東京都中央区日本橋小伝馬町4番9号 (小伝馬第一生命ビル日本精化株式会社内)

TEL(03)3661-8484 FAX(03)3664-7866

ホームページアドレス <http://www.jungle.or.jp/bilis/>

最新情報は  
ホームページで  
ご覧頂けます。

医薬品研究開発のアウトソーシング・パートナーとして



## 非臨床試験を総合的に受託致します

- 毒性試験 (GLP) 一般毒性試験/特殊毒性試験
- 各種薬効薬理試験 マウス/ラット/モルモット/イヌ/ハムスター/  
フェレット/各種病態モデル
- 一般薬理試験 A項目/B項目
- スクリーニング試験 In vivo/In vitro
- 生物学的同等性試験 実験動物による試験/臨床試験検体の定量・解析
- 微量定量・解析 TK/PK/臨床試験検体(HPLCからLC-MS/MSまで)
- 安定性試験 生物系試験/化学系試験
- 配合変化試験 錠散剤/輸注剤/軟膏剤等各種剤形



株式会社 応用医学研究所

### お問い合わせ先

- ◇東京事務所 (加藤) Tel.(03)5275-2915  
こさづま
- ◇生物ラボラトリー (小佐妻) Tel.(0133)64-5533

### 中期発癌性試験

短期的に化学物質の発癌性の有無を推測することが可能。特に中期肝発癌性試験は、ユニークな方法とデータの信頼



GBT-F 発癌細胞

性から、国際的に高い評価を得ており、新規化学物質の開発を推進する上で重要なデータを提供することができます。

#### 【受託試験の内容】

食品添加物、医薬品、農薬などの化学物質について、マウスまたはラットを用いて下記の試験をGLP対応により実施します。

- 中期肝発癌性試験
- 中期多臓器発癌性試験
- その他の中期発癌性試験 (膀胱、腎、腎臓、肺、甲状腺、鼻腔、皮膚等)
- 一般毒性試験 (急性、亜急性、慢性毒性試験)
- 発癌性試験
- 病理組織標本の作製および検査

#### 【安全性試験支援システムの販売】

ユーザフレンドリーなハーフメード型コンピュータシステムにより、安全性試験における報告書作成までの一連の業務を統合的に支援します。



### 新研究所

2000年1月完成予定



株式会社大雄会医科学研究所

〒481-0113 愛知県一宮市浅井町西浅井二軒塚25  
PHONE 0566-51-1831/6 FAX 0566-51-5834  
E-mail: dims@imat.or.jp  
URL: <http://www.imat.or.jp/~dims/>

SafePharmとメディアサービスの12年を超える  
allianceが築きあげた豊富な実績と高い信頼性に  
ご期待ください。

- 英国安全性試験機関 SafePharm Laboratories 日本総代理店
- 化審法、安衛法届出代行業務での豊富な経験と実績
- 世界各国へもSafePharmを通じ、EPA(TSCA)へはRACを通じての  
新規化学物質の届出代行
- 安全性試験報告書も含む技術文献の翻訳



株式会社 **メディアサービス**  
テクノサポート部

〒103-0026 東京都中央区日本橋茅場町2-14-1 第一井上ビル303号  
TEL.(03)3666-9915 FAX.(03)3666-9916  
E-mail:mediasap@tky2.3web.ne.jp

**セーフファームラボラトリーズ**

- 英国 ダービー市
- ・ 創 立 1971年
- ・ 従業員数 320名
- ・ 敷 地 101,200平方米

# ぶんせき

## 新しい用途を提案



試薬・臨床試薬・理化学機器・分析機器

**北海道和光純薬株式会社**

〒001-0015 札幌市北区北15条西4丁目10番地  
TEL 011-747-2811 代 FAX 011-747-2934

毒性試験

代謝・動態

分析

# thinking

## pharmaceuticals?

臨床第Ⅰ相試験

臨床第Ⅱ・Ⅲ相試験

データマネジメント・統計解析

薬事コンサルテーション

Corporate Headquarters, UK  
Inveresk Research International Limited  
Telephone: +44 (0) 1875 614545  
Fax: +44 (0) 1875 614555  
Email: [inveresk\\_research@sgsgroup.com](mailto:inveresk_research@sgsgroup.com)  
Website: [www.inveresk-research.com](http://www.inveresk-research.com)

Japan  
Telephone: +81 3 5634 5858  
Fax: +81 3 5634 4934

USA (East coast)  
Telephone: +1 703 824 7850  
Fax: +1 703 824 7851

USA (West coast)  
Telephone: +1 415 491 6460  
Fax: +1 415 491 6464

医薬品、バイオ医薬品企業への開発業務全般に亘る業務サービスを提供します。

スポンサー企業の様々なご要望にかなったサービス提供の実績から世界中の企業にご賛同頂いております。

下記アドレス迄ご連絡下さい。

Inveresk Research is delighted to be participating in the Japanese Society of Toxicology 26<sup>th</sup> Annual Meeting.

Mr Colin Brown, Head of General and Acute Toxicology at our UK headquarters will be accompanied by Mr Takashi Yoneda and Ms Mari Mochizuki representatives from our Japanese agents, CRC Research Institute.

They will be very pleased to discuss your development plans and requirements for outsourcing. At Inveresk Research, we have experience and expertise in all aspects of drug development including :

- Toxicology
- Mammalian Metabolism
- Clinical Trials
- Regulatory Consultancy
- Bioanalysis
- Stability Studies

Please visit our exhibition booth for further discussions.

# think



## Inveresk Research

第 26 回日本トキシコロジー学会学術年会 要旨集

発行代表者 ..... 鎌瀬 哲也

発行所 ..... 北海道大学大学院薬学研究科代謝分析学分野  
060-0812 札幌市北区北 12 条西 6 丁目  
TEL 011-706-3233

印刷 ..... (株) アイワード  
060-0033 札幌市中央区北 3 条東 5 丁目 5-91  
TEL 011-241-9341 (代)

平成 11 年 6 月 7 日 印刷  
平成 11 年 6 月 15 日 発行



International Non-clinical Assessment

## Global Services

ポーダレスで医薬品開発が進む時代。  
イナリサーチはグローバルなサービスを提供します。

# 新世紀へ

## Core Consulting

医薬品開発を効率的かつ科学的に。  
イナリサーチは関連分野のコンサルティング機能を強化し、  
的権かつ有用なコンサルテーションを行います。

Since 1974 医薬品開発をサポートする



株式会社 イナリサーチ

お問い合わせ、資料のご請求は

東京支所 TEL03-3902-2377 FAX03-3902-2477

大阪支所 TEL06-6223-1752 FAX06-6223-1758



## AstraZeneca Central Toxicology Laboratory (略称 CTL)

### CTLの試験受託

#### ----- はじめに -----

アストラゼネカ中央毒性研究所 (AstraZeneca Central Toxicology Laboratory, 略称CTL) は毒性科学の全分野において世界的な評価を戴いております。アストラゼネカグループとしてCTLは優れた研究施設と支援施設を持ち、広範な規制対応と先進的な研究活動を続けて参りました。

CTLは科学的な専門知識と経験に基づいた効率的で包括的な毒性関係のサービスを提供し、お客様に重要かつ競争力のあるサービスを行っております。

さらに、50年以上にわたる毒性試験で得た深くて広い経験により、お客様のニーズに合わせたプロトコルや意志決定に役立つ一連の試験を実施し、かかる費用に対して最も効率的な受託試験を行うことが出来ます。

CTLは多分野で経験を積んだチームを活用して、総合的なアプローチを行い、共同プログラムを進めることが出来ます。

#### ----- 医薬品試験 -----

CTLはお客様のご要望に合った新薬スクリーニングのパッケージや安全性評価試験の正式規制対応のパッケージを提供することが出来ます。後者は、既存および新規の医薬、バイオテクノロジーおよび医療器具のための臨床試験(第I-IV相)と市場開発許可を支援するために計画されたものです。このプログラムはCTLを通じて経験豊富な臨床試験機関を組織する迅速な対応が出来るように計画できます。

#### ----- コンサルタントおよび専門家の検証 -----

CTLは毒性学者から科学的評価の一環として最高の水準と国際的評価を多年にわたって維持しています。提供する経験の広さと深さにより、

CTLは科学的見地と多くの経験を積んだ規制環境について主たる毒性分野すべてについてコンサルタントサービスと専門家の検証を提供できます。

#### ----- 研究能力 -----

CTLは最新の研究室で上級の科学者が行う広範な試験研究を提供いたします。

研究室で可能な研究能力には下記のものが含まれます：

- 神経生物学 電気生理学 神経毒性学 毒性遺伝学 内分泌機能 神経内分泌学およびホルモン攪乱
- 免疫生物学 化学およびタンパクアレルギー 免疫毒性学 サイトカイン測定とその機能
- 抗原抗体反応の分子的調節 膜生化学 細胞生物学
- 製品の弁護および登録のためのメカニズム研究

AstraZeneca 

お問い合わせ先：  
株式会社 リブレ

AstraZeneca Central Toxicology Laboratory 日本オフィス  
東京都中央区日本橋茅場町3-5-3  
電話：03-5643-2755 Fax：03-5643-2756 電子メール：repre@hi-ho.ne.jp

AstraZeneca Central Toxicology Laboratory 英国  
Business Development  
Tel: +44(0)1625-514534 Fax: +44(0)1625-517314  
E-mail: CTL.BUSINESS.DEV@CTL.ZENECA.COM