

第27回  
日本トキシコロジー学術年会  
プログラム・要旨集  
2000年6月28(水)~30日(金)  
パシフィコ横浜



■ 特別講演

1. 「Ovarian Toxicity of 4-vinylcyclohexene epoxides.」  
Glenn Sipes  
(University of Arizona, President of IUTOX, USA)
2. 「International Harmonization of Certification for Toxicologists」  
Arthur Craigmill  
(University of California, President of American Board of Toxicology,  
1999-2000, USA)
3. 「Glutathione-Dependent Toxicity」 M. W. Anders  
(University of Rochester Medical Center, USA)

■ シンポジウム

1. 「臓器毒性とトランスポータ」
2. 「精神行動毒性の評価」
3. 「核内ステロイド受容体PPARの薬効・毒性への関与」



KYORIN

杏林大学医学部  
薬理学教室  
2000

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



**B**  
BILLIS

株式会社 環境ノバイルス研究所

本社 〒528-0052

滋賀県甲賀郡水口町字川555

TEL(0748)63-5253

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/bills/>

最新情報は  
ホームページで  
ご覧頂けます。

# 第27回 日本トキシコロジー学術年会

会期：平成12年6月28(水)～30日(金)

会場：パシフィコ横浜

220-0012 横浜市西区みなとみらい1-1-1

TEL:045-221-2155(代表) FAX:045-221-2136

年会会長：遠藤 仁 (杏林大学医学部薬理学)

企画委員：黒川 雄二 (国立医薬品食品衛生研究所)

鈴木 勉 (星薬科大学薬品毒性学)

土井 邦雄 (東京大学大学院農学生命科学)

遠山 千春 (国立環境研究所環境研究部)

松澤 利明 (山内製薬株式会社)

吉田 武美 (昭和大学薬学部毒物学)

※ 50音順

年会事務局

181-8611 東京都三鷹市新川6-20-2

杏林大学医学部薬理学教室内 (武田 理夫)

TEL:0422-47-5611 内線 3452 FAX:0422-79-1321

Takedam@kyorin-u.ac.jp

事務局

(学会期間中)

220-0012 横浜市西区みなとみらい1-1-1

TEL:045-221-2155 (代表)

# INDEX

---

年会長御挨拶 .....	1
会場へのアクセスのご案内 .....	2
会場内のご案内 .....	3
参加者へのご案内とお願い .....	4
各種集会日程(評議委員会、総会、懇親会) .....	6
会場と催し物のご案内 .....	7
プログラム .....	11
特別講演 .....	53
シンポジウム 1 .....	59
シンポジウム 2 .....	67
シンポジウム 3 .....	75
ワークショップ 1 .....	87
ワークショップ 2 .....	99
ワークショップ 3 .....	111
セミナー 1 .....	125
セミナー 2 .....	139
セミナー 3 .....	153
一般講演 .....	155
索引 .....	317

# 年会長の挨拶

## 第27回日本トキシコロジー学会学術年会開催にあたって

杏林大学医学部教授 遠藤 仁

第27回日本トキシコロジー学会学術年会を横浜で開催するに当たり、一言御挨拶申し上げます。今年の年会は20世紀最後に当たり、世界的にみたトキシコロジー研究のまとめを軸に企画しました。これはとりも直さず、21世紀への“かけ橋”的内容となります。3人の外国人演者にはこの主旨にふさわしい特別講演をお願い致しました。シンポジウム、ワークショップ及びセミナーにおいても現在までの科学的そして社会的に動向が注目されているテーマを取り上げました。トランスポーター研究の進展には近年目覚ましいものがあり、トキシコロジーとの関連を中心に企画しました。また、世界的に拡大するdrug abuseと深く関係する精神行動毒性の評価の問題、次世紀への期待される医薬品の創生との関連をもつ核内ステロイド受容体PPARの問題を加えた、シンポジウムを企画しました。ポストゲノムプロジェクトの時代においてpharmacogenomics あるいはtoxicogenomicsに深く関係する重要なテーマとしては、研究の進歩が著しいテーマである遺伝的多型及び遺伝子改変動物がトキシコロジー研究に与える課題を取り上げていただきました。また新薬開発における新たなガイドラインが作成され、今そのあり方が問われておりますので技術的な内容をワークショップとして、その他をセミナーとして企画致しました。また毒性質問箱は昨年に続き企画させていただきました。

今回の学術大会が新たな世紀への研究進展のきっかけになりますことを切に念じております。

# 会場へのアクセスのご案内



## ■桜木町より（JR京浜東北線、京浜急行線、東急東横線）

徒歩（歩く歩道で約12分）

バス（市営バス4番のりば「パシフィコ横浜行き」130、131、140、141系統 約5分）

タクシー（約5分）

## ■横浜駅より（JR東海道本線、JR横須賀線、京浜急行線）

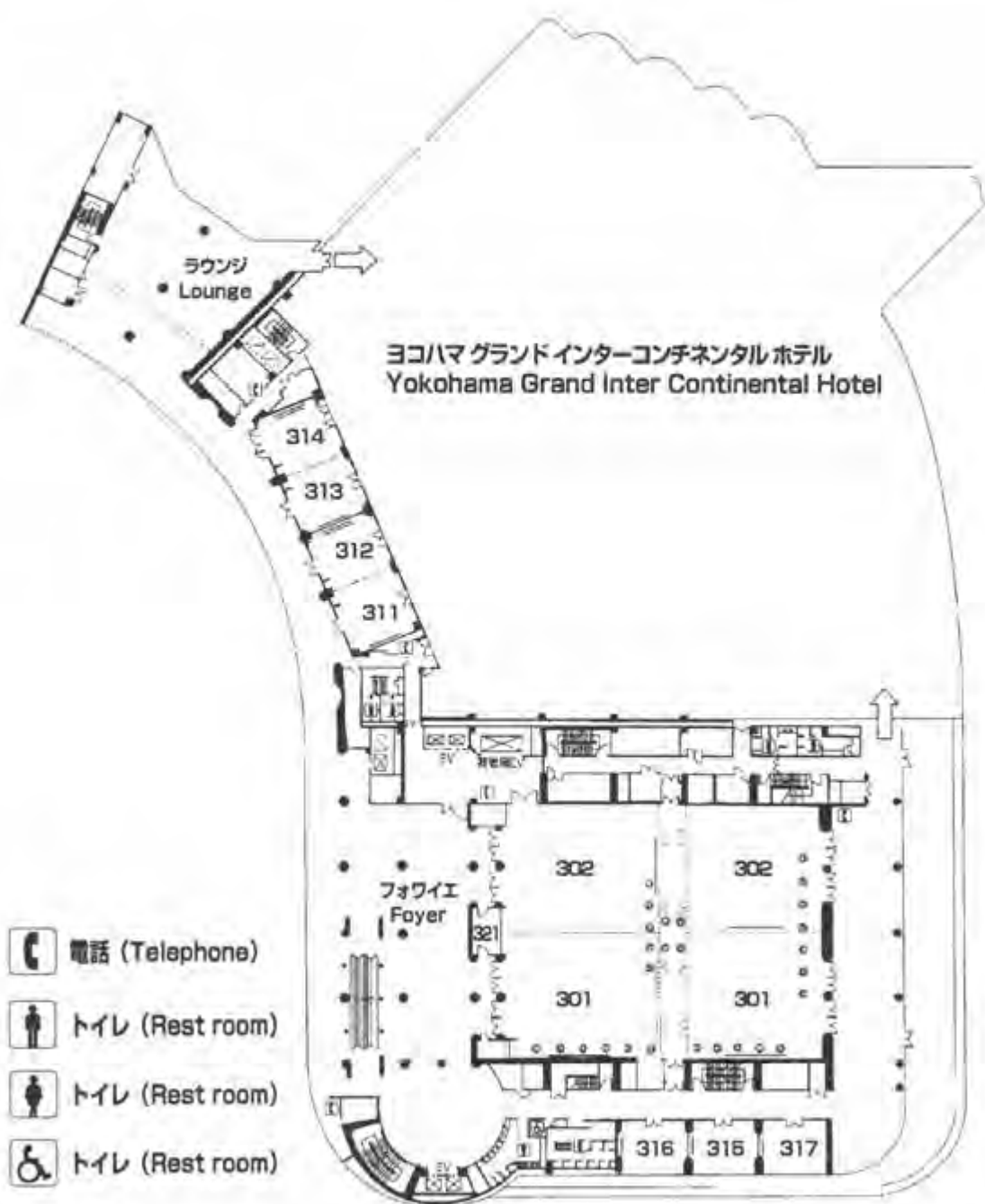
バス（東口そごう1Fバスターミナル 市営バス17番のりば「パシフィコ横浜行き」141系統 約10分）

タクシー（東口ポルタB2F内タクシーのりば 約10分）

シーバス（海上バス横浜そごう駐車場1F隣シーバスのりば 約10分）

交通案内（テープ）045-221-2166

# 会場内のご案内



## 参加者へのご案内とお願い

---

### ■ 総合受付・参加登録

当日参加登録	6月28日(水)	8:30~17:00
	6月29日(木)	8:30~17:00
	6月30日(金)	8:30~17:00

### ■ 当日受付の参加登録費、懇親会費

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
------	---------

### ■ 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いたします。

### ■ クロークのご案内

クロークを用意しておりますのでご利用下さい。利用時間は以下のとおりです。

6月27日(火)	12:00~17:00
6月28日(水)・30日(金)	8:30~17:00
6月29日(木)	8:30~20:00

### ■ ドリンクサービス

ドリンクサービスコーナーを設置致しております。ご自由にご利用下さい。

### ■ お食事の御案内

お食事は周辺の飲食店をご利用下さい。  
受付に飲食店マップをご用意致しております。

### ■ 禁煙についてのお願い

発表会場内は全会場禁煙とさせていただきます。喫煙は指定の場所をお願いいたします。



## ■ 年会事務局

年会期間中の事務局は3階316号室です。

## ■ 掲示板と緊急連絡先

3階総合受付前に掲示板を設置。連絡事項等を掲示致します。  
また、学会参加者相互の連絡等にご自由にご利用下さい。

## ■ 講演発表の方へ

30分前までに当該会場の「スライド受付」で受付をして下さい。  
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枚以内とさせていただきます。

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、映写回数分をご用意下さい。

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。

## ■ ポスター発表の方へ

発表者は、ポスター受付で発表者用リボンと画鋏を受け取って下さい。

内容の表現は発表者の自由といたしますが、1～2m離れた位置から十分に読める程度の大きさの文字を使用して下さい。

縦210cm×横90cmのパネルと演題番号を用意します。発表者は演題番号の右の縦20cm×横70cmのスペースに演題名、所属、発表者（発表者名に○印）を明示して下さい。

J. Toxicol. Sci. に掲載する英文抄録を総合受付の「英文抄録用の受付コーナー」の担当者に提出して下さい。

## ■ 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御連絡下さい。

## 各種委員会・集会の日程と会場

---

### ● 6月27日(火)

理事・幹事会	15:00~17:30	(3階 316)
第28回日本トキシコロジー学会 企画委員会	11:00~14:00	(4階 421)

### ● 6月28日(水)

国際認定トキシコロジスト委員会	12:00~13:00	(3階 316)
編集委員会委員会	12:00~13:00	(4階 419)
認定試験小委員会	12:00~13:00	(3階 317)

### ● 6月29日(木)

血液精薬毒性研究交流	11:00~14:00	(4階 421)
評議員会	12:00~13:00	(3階 301、302)
総会	13:00~	(3階 301、302)
懇親会	18:00~20:00	(3階 303、304)

### ● 6月30日(金)

用語集作成委員会	12:00~13:00	(3階 316)
生涯教育講習会小委員会	12:00~13:00	(3階 317)

# 第27回日本トキシコロジー学会学術年会（横浜）

## 会場と催し物のご案内

6月28日（水）

	3階 301, 302	3階 303	3階 304
9:00	<b>セミナー I</b> 「安全性薬理試験のあり方」 オーガナイザー 藤森親之助 先生 馬屋原 宏 先生	<b>一般演題</b> 「毒性試験法」 「一般毒性 1」 「一般毒性 2」	<b>一般演題</b> 「変異原性、癌原性、 発癌性」 「免疫毒性」
12:00	昼 休 み		
13:00	<b>セミナー II</b> 「ICHガイドラインの 果たした役割と問題点」 オーガナイザー 大野泰雄 先生 島田弘康 先生	<b>一般演題</b> 「腎毒性」 「肝毒性」 「循環器（心、血管）毒性」	<b>一般演題</b> 「神経毒性」 「内分泌攪乱物質 1」 「内分泌攪乱物質 2」 「細胞毒性」
17:00	<b>コントラクトラボ展示（3階 311, 312, 313, 314）（終日）</b>		

## 6月29日(木)

	3階 301	3階 302	ラウンジ	3階 303.304
9:00	<b>シンポジウム 1</b> 「臓器毒性と トランスポーター」 オーガナイザー 金井好克 先生 杉山雄一 先生	<b>シンポジウム 2</b> 「精神行動毒性」 オーガナイザー: 鈴木勉 先生 編島俊隆 先生	ポスター展示	
11:00	昼 休 み			
12:00				
13:00	<b>1. 総会</b> <b>2. 田辺賞授賞式</b>  <b>特別講演</b> 1. Dr. Glenn Sipes (司会: 黒川雄二 先生) 2. Dr. Arthur Craigmill (司会: 佐藤哲男 先生) 3. Dr. MW Anders (司会: 遠藤 仁 先生)		ポスター展示	
14:00				
15:00				
15:50				
16:40				
17:30	コントラクトラボ展示 (3階 311~314)(終日)		18:00 20:00	懇親会

## 6月30日(金)

	3階 301	3階 302	3階 303
9:00	<b>シンポジウム 3</b> 「核内ステロイド受容体の毒性への関与」 オーガナイザー 須崎哲弥 先生 吉田武美 先生	<b>ワークショップ 1</b> 「遺伝的多型と毒性」 オーガナイザー 鎌滝哲也 先生 山添 康 先生	<b>コントラクトラボセミナー</b> 「毒性副作用 トキシコロジストの抱える 毒性に関するQ&A」 オーガナイザー 渡辺 烈 先生 野村 謙 先生 松本一彦 先生
12:00		昼 休 み	
13:00	<b>ワークショップ 2</b> 「毒性評価系のための 遺伝子改変動物の活用」 オーガナイザー 井上 尊 先生 遠山千春 先生	<b>ワークショップ 3</b> 「安全性評価における 技術的な課題」 オーガナイザー 松澤利明 先生 飯家公夫 先生	
16:00			
17:00			
<b>コントラクトラボ展示 (3階 311, 312, 313, 314)(終日)</b>			

# プログラム

---

## ■特別講演

### ■特別講演 1.

5月25日(水) 13時 30分-15時 15分

#### ●PL-1

(Overlaid Toxicity of 4-oxo-2-hydroxybutanoic amide.)

(Sato, Toshi, Department of Applied Chemistry of Aichi Univ.)

5月 27日(金) 12時30分-13時30分

### ■特別講演 2.

5月29日(日) 14時 30分-15時 15分

#### ●PL-2

(International Harmonization of Carcinogen for Toxicology)

(Wang, Dong, Department of Cellular Toxicology, Institute of

Tropospheric Science, Beijing, 100080, P.R.C.)

5月 31日(火) 12時30分-13時30分

### ■特別講演 3.

5月29日(日) 13時 30分-15時 15分

#### ●PL-3

(Guatemala-Developing Today)

(M.A. Arana, University of Technology, Tegucigalpa, 11010,

San Salvador, Guatemala)

YOKO  
FO  
AMA

## ■ 特別講演

### ■ 特別講演 1.

6月29日(木) (3階 301, 302) 15:00~15:50

● PL-1

「Ovarian Toxicity of 4-vinylcyclohexene epoxides.」

I. Glenn Sipes (University of Arizona, President of IUTOX, USA)

司会 黒川雄二 (国立医薬品食品衛生研究所)

### ■ 特別講演 2.

6月29日(木) (3階 301, 302) 15:50~16:40

● PL-2

「International Harmonization of Certification for Toxicologist」

Arthur Craigmill (University of California, Davis, President of American Board of Toxicology, 1999-2000, USA)

司会 佐藤哲男 (昭和大学薬学部)

### ■ 特別講演 3.

6月29日(木) (3階 301, 302) 16:40~17:30

● PL-3

「Glutathione-Dependent Toxicity」

M.W. Anders (University of Rochester Medical Center, USA)

司会 遠藤仁 (杏林大学医学部)

## ■ 田邊賞受賞講演

司会：吉田 武美（昭和大学薬学部）

遠藤 仁（杏林大学医学部）

### ■ 受賞講演1. 14:10～14:30

「Characterization of epididymal sperm motion and its correlation with stages of target cells in rats given  $\alpha$ -chlorohydrin, cyclophosphamide or nitrazepam」

*The Journal of Toxicological of Sciences*, 24(NO.3)187-197, 1999

森 眞輝（(株)資生堂ライフサイエンス研究センター）

### ■ 受賞講演2. 14:30～14:50

「Induction of unscheduled DNA synthesis in hairless mouse epidermis by skin carcinogens」

*The Journal of Toxicological of Sciences*, 24(NO.3)217-226, 1999

兼藤 雅子（塩野義製薬(株)新薬研究所）



## ■ シンポジウム

### ■ シンポジウム1. 6月29日(木) 9:00~11:00 (3階 301)

#### 「臓器毒性とトランスポーター」

オーガナイザー：杉山 雄一(東京大学大学院薬学系研究科)

金井 好克(杏林大学医学部)

#### ● S1-1

Overview：トランスポーターを利用した毒性の回避

○杉山 雄一、加藤 将夫(東京大学大学院薬学系研究科製剤設計学)

#### ● S1-2

薬物性腎障害とトランスポーター

○武田 理夫、遠藤 仁(杏林大学医学部薬理学教室)

#### ● S1-3

血液脳関門トランスポーターと中枢毒性

○辻 彰、玉井 郁巳(金沢大学薬学部)

#### ● S1-4

メチル水銀等毒物の血液-組織関門通過の分子機序

○金井 好克、車 碩鶴、金 徒慶、遠藤 仁(杏林大学医学部薬理学教室)

### ■ シンポジウム2. 6月29日(木) 9:00~11:00 (3階 302)

#### 「精神行動毒性の評価」

オーガナイザー：鈴木 勉(星薬科大学)

鍋島 俊隆(名古屋大学医学部)

#### ● S2-1

精神行動毒性の評価法

○安東 潔((財)実験動物中央研究所 科学技術振興事業団)

#### ● S2-2

覚醒剤による精神行動毒性の評価

○喜多 大三、中嶋 敏勝(奈良県立医科大学薬理学)

● S2-3

オピオイドによる精神行動毒性の評価

○ 成田 年、鈴木 勉 (星薬科大学薬品毒性学教室)

● S2-4

フェンシクリジン (PCP) による精神行動毒性の評価

○ 野田 幸裕、島 俊隆

(名古屋大学大学院医学研究科医療薬学 附属病院薬剤部)

■ シンポジウム3. 6月30日 (金) 9:00~12:00 (3階 301)

「核内ステロイド受容体PPARの薬効・毒性への関与」

オーガナイザー：須賀 哲哉 (東京薬科大学薬学部)

吉田 武美 (昭和大学薬学部)

● S3

核内ステロイドホルモン受容体 (PPAR) の薬効・毒性への関与

○ 須賀 哲哉 (東京薬科大学薬学部)

● S3-1

PPAR の構造と機能

○ 河田 照雄、高橋 信之

(京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻生研機構 肥満・脂質代謝研究プロジェクト)

● S3-2

PPAR $\alpha$ -ノックアウトマウスにおけるエタノール依存性障害の発症機構の解析

○ 青山 俊文<sup>1)</sup>、中島 (那須) 民江<sup>2)</sup>

(<sup>1)</sup>信州大学医学部加齢生化学、<sup>2)</sup>信州大学医学部衛生学)

● S3-3

糖尿病と肥満におけるPPAR $\gamma$ の病態生理学的意義

○ 門脇 孝 (東京大学大学院医学系研究科糖尿病 (代謝内科))

● S3-4

PPAR $\gamma$ とインスリン感受性増強薬

○ 吉政 康直、井上 元、西村 治男、中尾 一和

(京都大学医学研究科臨床病態医科学 第2内科)

● S3-5

**PPAR とフタル酸エステルの毒性**

○ 今井田 克己、白井 智之（名古屋市立大学 医学部 第一病理）

● S3-6

**PPAR：非遺伝子毒性発癌における役割**

○ 渡辺 隆史、本木 喜輝、高木 充弘、山田 純司、須賀 哲弥  
（東京薬科大学 薬学部 臨床生化学教室）

## ■ ワークショップ

### ■ ワークショップ1. 6月30日（金） 9:00～12:00（3階 302） 「遺伝子多型と毒性」

オーガナイザー：鎌滝 哲也（北海道大学大学院薬学研究科）  
山添 康（東北大学薬学部）

#### ● W1-1

毒性学における遺伝的多型：まとめ

○ 鎌滝 哲也（北海道大学大学院薬学研究科）

#### ● W1-2

チトクローム P450 の遺伝的多型とその毒性学的意義：  
CYP2A6 を中心として

○ 有吉 範高<sup>1)</sup>、宮本 昌美<sup>2)</sup>、梅津 有理<sup>3)</sup>、國頭 英夫<sup>4)</sup>、秋田 弘俊<sup>5)</sup>、  
澤村 祐一<sup>6)</sup>、横田 淳<sup>7)</sup>、根本 信雄<sup>8)</sup>、佐藤 邦雄<sup>9)</sup>、鎌滝 哲也<sup>1)</sup>  
(<sup>1)</sup>北海道大学大学院薬学研究科、<sup>2)</sup>国立がんセンター、<sup>3)</sup>北海道大学医学部、  
<sup>4)</sup>丸山クリニック、<sup>5)</sup>富山医科薬科大学、<sup>6)</sup>群馬大学医学部)

#### ● W1-3

チトクローム P450 の遺伝子多型と発癌感受性について：  
CYP1B1 を中心として

○ 渡辺 潤子<sup>1)</sup>、島田 カ<sup>2)</sup>、川尻 晏<sup>3)</sup>  
(<sup>1)</sup>埼玉がんセンター研究所、<sup>2)</sup>大阪府立公衆衛生研究所)

#### ● W1-4

薬物代謝酵素遺伝子多型の簡易迅速検出法の確立とその臨床応用

○ 平塚 真弘、水柿 道直（東北大学医学部附属病院薬剤部）

#### ● W1-5

異物代謝における  $3\alpha$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素の役割と多型

○ 原 明（岐阜薬科大学学生化学教室）

#### ● W1-6

第II相薬物代謝酵素の遺伝子多型と疾病感受性・薬物感受性との関連

○ 小澤 正吾（国立医薬品食品衛生研究所 薬理部）

● W1-7

<まとめ>

○山添 康 (東北大学大学院薬学研究所)

■ ワークショップ2. 6月30日 (金) 13:00~16:00 (3階 301)

「毒性評価系のための遺伝子改変動物の活用」

オーガナイザー: 井上 達 (国立医薬品食品衛生研究所)

遠山 千春 (国立環境研究所)

● W2-1

化学物質による毒性評価系としての遺伝子変異動物

○井上 達, 遠山 千春 (国立医薬品食品衛生研究所, 国立環境研究所)

● W2-2

環境ストレスとメタロチオネイン

○遠山 千春 (国立環境研究所環境健康部)

● W2-3

Novel insights into the antioxidant action of metallothionein in the heart

○Y. James Kang (University of Louisville School of Medicine)

● W2-4

ダイオキシンによるマウスの発生毒性発現のメカニズム

○山下 敬介 (広島大学医学部解剖学第一講座)

● W2-5

Disposition of TCDD in CYP1A2 knock-out mice

○Janet J. Diliberto (Experimental Toxicology Division, NHEERL, US Environmental Protection Agency, USA.)

● W2-6

転写因子による異物代謝系の制御

○山本 雅之 (筑波大学 基礎医学系 先端学際領域研究センター)

● W2-7

Variety of receptor-transgenic animals for evaluation of bio-pharmaceuticals.

○ Joy A.Cavagnaro (Access BIO, USA)

■ ワークショップ3. 6月30日(金) 13:00~16:00 (3階 302)

「安全性評価における技術的な課題」

オーガナイザー: 仮家 公夫 (神戸学院大学薬学部)

松澤 利明 (山之内製薬 (株))

● W3

安全性評価における技術的な課題 オルガナイザー序論

○ 仮家 公夫、松澤 利明\* (神戸学院大学薬学部、山之内製薬 (株) 薬事部\*)

● W3-1

医薬品の免疫毒性評価手順を検討するための共同研究について

○ 中村 和市 (日本製薬工業協会 医薬品評価委員会 基礎研究部会  
免疫毒性ワーキンググループ (塩野義製薬 (株) 新薬研究所))

● W3-2

Immunotoxicology Considerations in Drug Development

○ Peter T.Thomas, PhD Director of Toxicology (Covance  
Laboratories Inc., USA)

● W3-3

An overview of current techniques available for assessment of  
QT interval prolongation in regulatory pharmacology and  
toxicology.

○ Mrs Carol M Algate (Animal Technology Support and  
Development, Huntingdon Life Sciences, UK)

● W3-4

薬物による QT 延長評価法：心筋单相性活動電位 (MAP) 法と微小電極による心筋細胞内活動電位測定 (APD) 法

○ 鈴木 潤、池田 博信、下里 貴、福田 好造、左近上 博司、西森 司雄  
(株) 環境バイリス研究所)

● W3-5

Light and phototoxicology: Status and Current Issues

○ P. Donald Forbes, Christopher P Sambuco, Douglas B. Learn (The center for photobiology, Primedica-Argus Laboratories, USA)

● W3-6

性腺障害を介さない生殖毒性の発現機構

○ 長尾 哲二 ((財) 食品薬品安全センター 秦野研究所 生殖生物学)

● W3-7

研究開発の意志決定に関わる安全性評価の問題点

○ 堀江 透 (テイ・スリー研究所)

## ■ セミナー

### ■ セミナー1. 6月28日(水) 9:00~12:00 (3階 301,302)

#### 「安全性薬理試験のあり方」

オーガナイザー：藤森 観之助（医薬品機構治験指導部）

馬屋原 宏（武田薬品工業(株)）

#### ● Se1-1

##### オーガナイザーによる序論

○ 馬屋原 宏（武田薬品工業(株) 創薬研究本部 研究推進部）

#### ● Se1-2

##### ICH 安全性薬理試験ガイドライン（案）の現状

○ 橋本 宗弘

（ファルマシア・アップジョン(株) 研究統括部 毒性薬理グループ）

#### ● Se1-3

##### 呼吸・循環系からみた安全性薬理試験 —特にQT 延長に関して

○ 橋本 敬太郎（山梨医科大学薬理学教室）

#### ● Se1-4

##### ヒトでの予測を踏まえた安全性薬理試験のあり方

○ 柳田 知司

（東京慈恵会医科大学薬理学第1講座、(株)イナリサーテ薬理毒性部門）

#### ● Se1-5

##### 臨床の立場からみた安全性薬理試験

○ 東 純一（大阪大学大学院薬学研究科）

#### ● Se1-6

##### 安全性薬理試験のあり方：オーガナイザーによるまとめ

○ 藤森 観之助（医薬品機構治験指導部）



## ■ セミナー2. 6月28日(水) 13:00~15:00 (3階 301,302)

### 「ICHガイドラインの果たした役割と問題点」

オーガナイザー: 大野 泰雄 (国立医薬品食品衛生研究所)

島田 弘康 (第一製薬(株))

#### ● Se2-1

##### オーバービュー

○ 黒川 雄二 (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)

#### ● Se2-2

##### 生殖発生毒性 ICH ガイドラインへの企業の取り組み

##### ー JPMA アンケート調査結果からの考察ー

○ 峯島 浩<sup>1)</sup>、沼 敏章<sup>2)</sup>、西垣 敬二<sup>3)</sup>、遠藤 芳彦<sup>4)</sup>、小笠原 裕之<sup>5)</sup>、  
奥田 恭之<sup>6)</sup>、平野 文也<sup>7)</sup>、三宅 幸雄<sup>8)</sup>、松澤 利明<sup>9)</sup> (日本製薬工業協会医  
薬品評価委員会基礎研究部会生殖ワーキンググループ、<sup>1)</sup>ノバルティスファーマ、  
<sup>2)</sup>三井製薬工業、<sup>3)</sup>興和、<sup>4)</sup>ファルマシア・アップジョン、<sup>5)</sup>日本ワイズレタリー、  
<sup>6)</sup>エーザイ、<sup>7)</sup>ヤンセン協和、<sup>8)</sup>塩野義製薬、<sup>9)</sup>山之内製薬)

#### ● Se2-3

##### 遺伝毒性試験ガイドラインに与えた影響

○ 祖父尼 俊雄 (オリンパス光学工業(株))

#### ● Se2-4

##### がん原性試験における Short term test の役割

○ 三森 国敏 (国立医薬品食品衛生研究所 病理部)

#### ● Se2-5

##### ICH ガイドラインの果たした役割と問題点

##### 5. TK, PK の安全性研究における役割

○ 大野 泰雄 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物研 薬理部)

#### ● Se2-6

##### 不純物ガイドラインにおける安全性確保の考え方

○ 島田 弘康 (第一製薬(株) 安全性研究所)

#### ● Se2-7

##### CTD が申請に与える影響ー申請資料のグローバル化ー

○ 河合 睦文

(日本イーライリリー(株) リリーリサーチラボラトリーズジャパン)

● Se2-8

医薬品開発における安全性研究の戦略ーバイオ医薬品を中心にー

○ 牧 栄二 (ヤンセン協和(株) 研究開発本部)

■ セミナー3. 6月30日(金) 9:00~12:00 (3階 303)

「毒性質問箱：トキシコロジストの抱える毒性に関するQ&A」

オーガナイザー：渡部 烈 (東京薬科大学薬学部)

松本 一彦 (日本たばこ産業(株))

野村 護 (第一製薬(株))

## ■ 一般講演

### ■ 毒性試験法

6月28日(水) 9:00~10:12 (3階 303)

座長：金子 豊蔵 (国立医薬品食品衛生研究所)

堀井 郁夫 (日本ロシュ(株) 研究所前臨床化学研究部)

#### ● O-1

血液凝固検査に用いる PT (プロトロビン時間) 測定試薬の比較検討

○ 田原 知徳、赤澤 康平、殊才 孝則

(大塚製薬(株) 徳島研究所 毒性研究部)

#### ● O-2

Flow cytometry を用いたラット精巢毒性検査方法の検討

— Cyclophosphamide、2週間投与の影響 —

○ 加藤 千明<sup>1)</sup>、堀井 郁夫<sup>2)</sup>、北嶋 聡<sup>3)</sup>、相賀 裕美子<sup>1)</sup>、井上 達<sup>4)</sup> (1)日本ロシュ(株) 研究所 前臨床科学研究部、(2)国立医薬品食品衛生研究所 毒性部)

#### ● O-3

ビリルビン酸化分解物の酸化ストレスマーカーとしての有用性

○ 小林 草男<sup>1)</sup>、高橋 統一<sup>2)</sup>、菅井 象一郎<sup>3)</sup>、松本 一彦<sup>1)</sup>、山口 登喜夫<sup>4)</sup> (1)日本たばこ産業(株) 医薬総合研究所 安全性研究所、(2)東京医科歯科大学 難治疾患研究所)

#### ● O-4

雄ラット性成熟過程における Flow cytometry による精子生存性と数の検討

○ 滝沢 節子、加藤 千明、猪又 晃、堀井 郁夫

(日本ロシュ(株) 研究所 前臨床科学研究部)

#### ● O-5

乳蛋白プロモーターを利用した免疫寛容動物の作成

○ 高橋 利一、上田 正次 ((株) ワイエスニューテクノロジー研究所)

● 0-6

**ラジオアイソトープを用いない種々の local lymph node assay 変法の検討**

○山下 昌宏<sup>1</sup>、須田 朗子、田部井 光行、Hans-Werner Vohr、筒井 尚久、鈴木 律好、菊池 克明、望月 講輝、中村 和希

(日本製薬工業協会 医薬品評価委員会 基礎研究部会 免疫毒性ワーキンググループ (東レ))

■ 一般毒性 1

**6月28日 (水) 10:12~11:00 (3階 303)**

座長：赤堀 文昭 (麻布大学獣医学部薬理学教室)

佐藤 秀蔵 (武田薬品 (株)創薬研究本部)

● 0-7

**薬物代謝酵素の性差に起因した雌ラットにおける毒性発現**

○金子 公幸、内田 和美、小林 稔秀、三浦 浩蔵、角 将一、加藤 幾雄、尾上 正治 ((株)ヤクルト本社 中央研究所)

● 0-8

**一般毒性試験における臨床病理検査に関する調査**

○深澤 洋史<sup>1</sup>、苗代 一郎、青木 康治、若井 久和、阿瀬 善也、川原 潤一、木村 敬、青木 豊彦、橋本 正晴 (日本製薬工業協会 基礎研究部第二分科会 (ファイザー製薬 (株) / ファイザー・ヘルスケア・アカデミー))

● 0-9

**J-109388 (Indolocarbazole 系 Topo-I 阻害薬) のイヌ発熱メカニズムの検討**

○宮崎 裕康、吉田 睦、佐々木 和彦、森山 智之、久野 博司、花見 正幸、松本 浩良、池本 文彦 (萬有製薬 (株) 開発研究所)

● 0-10

**NB-506 (Indolocarbazole 系 Topoisomerase-I 阻害薬) 投与後に惹起されるイヌ体温変動の検討**

○吉田 睦、宮崎 裕康、佐々木 和彦、森山 智之、久野 博司、松本 浩良、池本 文彦 (萬有製薬 (株) 開発研究所)

## ■ 一般毒性2

6月28日(水) 11:00~11:48 (3階 303)

座長：岡崎 修三 ((株) ポソリサーチセンター)

久野 博司 (萬有製薬 (株) 安全性研究部)

### ● O-11

毒性試験における初期全身性反応

#### I. 単回投与毒性試験に用いたビーグル犬についての調査

○ 渡辺 大、星谷 達、赤木 圭介、溝口 靖基、神谷 紀礼、水口 浩康、

懸原 道代、戸谷 弘之、長島 吉和、岡庭 梓

((株)ポソリサーチセンター 函南研究所)

### ● O-12

毒性試験における初期全身反応

#### II. イヌにおけるエンドトキシン投与及び外科的侵襲時の所見

○ 星谷 達、渡辺 大、松岡 哲也、堀口 浩資、三木 康宏、水口 浩康、

石井 俊也、野村 典行、長島 吉和、岡庭 梓、

((株)ポソリサーチセンター 函南研究所)

### ● O-13

カニクイザルにおける DXA を用いた経時的体脂肪率測定の見直し及び体脂肪率に対する制限給餌の効果

○ 鎌田 秀一、松山 隆史、角崎 英志、福崎 好一郎、宮島 宏彰

((株)新日本科学 安全性研究所)

### ● O-14

補骨子抽出物の精製毒性発現機序に関する研究

○ 高木 久宜、三森 国敏、小野寺 博志、安原 加壽雄、田村 啓、

那須 昌弘、広瀬 雅雄

(国立医薬品食品衛生研究所 病理部、(株)パナファーム・ラボラトリーズ)

## ■ 変異原性、癌原性、発癌性

6月28日(水) 9:00~10:12 (3階 304)

座長：津田 修治 (岩手大学農学部獣医公衆衛生学教室)

務台 衛 (三菱東京製薬(株) 横浜総合研究所)

### ● O-15

特殊な鉛中毒事例から発見された鉛結合蛋白

○ 南 正康、勝又 聖夫、葉 恵娟 (日本医科大学衛生学公衆衛生学教室)

### ● O-16

ヒトチトクローム P4501A2 とアセチル転移酵素を細胞内で発現する  
umu 試験菌株を用いた癌原性芳香族アミンの検出

○ 小田 美光<sup>1)</sup>、Pramod Aryal<sup>1)</sup>、寺下 隆夫<sup>2)</sup>、F. P. Guengerich<sup>3)</sup>、  
島田 カ<sup>1)</sup> ( <sup>1)</sup>大阪府立公衆衛生研究所、<sup>2)</sup>近畿大学 農学部 食品微生物、  
<sup>3)</sup>Vanderbilt Univ.)

### ● O-17

N-アルキルニトロソアミンの代謝的活性化におけるヒトチトクローム P450 の  
役割

○ 藤田 健一、鎌瀧哲也 (北海道大学大学院薬学研究科代謝分析学分野)

### ● O-18

河川水から単離された 2-phenylbenzotriazole (PBTA) 誘導体の  
ヒト N-アセチル転移酵素 2 (NAT2) による代謝的活性化

○ 山崎 豊征<sup>1)</sup>、藤田 健一<sup>2)</sup>、若林 敬二<sup>3)</sup>、鎌瀧 哲也<sup>4)</sup> ( <sup>1)</sup>北海道大学大学院  
院薬学研究科代謝分析学分野、<sup>2)</sup>国立がんセンター研究所がん予防研究部)

### ● O-19

マウス始原生殖細胞は変異原物質の重要な標的である

○ 濫谷 徹 ((財) 食品薬品安全センター 桑野研究所)

### ● O-20

マウスの多臓器における遺伝毒性と齧歯類癌原性の相関性

○ 佐々木 有<sup>1)</sup>、關橋 暁<sup>2)</sup>、前田 貴直<sup>3)</sup>、河村 公太郎<sup>4)</sup>、一花 次夫<sup>5)</sup>、  
津田 修治<sup>6)</sup> ( <sup>1)</sup>八戸工業高等専門学校、<sup>2)</sup>(株) 化合物安全研究所、<sup>3)</sup>岩手大学獣  
医学科)

## ■ 免疫毒性

6月28日(水) 10:12~11:24 (3階 304)

座長: 上野 光一 (千葉大学大学院薬学研究科薬物治療学)

木村 努 (三共(株)安全性研究所)

### ● O-21

マウス膝窩リンパ節測定法の薬剤免疫毒性評価への応用

○木村 努<sup>1)</sup>、永見 和之、田中 一三、入江 弘之、渡辺 潔、横田 忠、須田 朗子、中村 和希 (日本製薬工業協会 医薬品評価委員会基礎研究部第二分科会免疫毒性ワーキンググループ、<sup>1)</sup>三共(株)安全性研究所)

### ● O-22

デキサメタゾン、シクロスポリンによる免疫毒性試験法の検討

○井上 守、望月 講輝、吉田 純一 (科研製薬(株) 安全性研究所)

### ● O-23

イヌにおける薬物誘発性アレルギー反応に関する検討

○川島 康永、永見 和之、久野 博司、松本 浩良  
(葎有製薬(株) 開発研究所)

### ● O-24

リポポリサッカライド (LPS) によるヘムオキシゲナーゼ 1 遺伝子発現におけるサイトカインの役割

○小黒 多希子<sup>1)</sup>、高橋 祐子<sup>2)</sup>、塩田 清二<sup>3)</sup>、宝来 玲子<sup>4)</sup>、浅野 雅秀<sup>5)</sup>、岩倉 洋一郎<sup>6)</sup>、吉田 武美<sup>7)</sup> (<sup>1)</sup>昭和大学 薬学部 毒物学、<sup>2)</sup>昭和大学 医学部 第一解剖学、<sup>3)</sup>東京大学 医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター)

### ● O-25

鼻粘膜アジュバントとしての組換えコレラ毒素 B サブユニット ( $\gamma$ CTB) のアジュバント活性と安全性

○後藤 紀久<sup>1)</sup>、前山 順一<sup>2)</sup>、井坂 雅徳<sup>3)</sup>、谷口 暢、小塚 諭<sup>4)</sup>、安田 陽子<sup>5)</sup>、栃久保 邦夫<sup>6)</sup>  
(<sup>1)</sup>国立感染症研究所 安全性研究部、<sup>2)</sup>名古屋市立大学 医学部)

### ● O-26

脾臓と胸腺における 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene の免疫毒性発現機構の差異

○宮田 昌明<sup>1)</sup>、高橋 公一<sup>2)</sup>、古川 正幸<sup>3)</sup>、Frank J. Gonzalez<sup>4)</sup>、山添 康<sup>5)</sup> (<sup>1)</sup>東北大学大学院薬科学研究科、<sup>2)</sup>米国国立衛生研究所)

## ■ 腎毒性

6月28日(水) 13:00~14:00 (3階 303)

座長：玄番 宗一(大阪薬科大学薬理学教室)

三浦 克之(大阪市立大学医学部薬理学教室)

### ● O-27

5/6 腎摘ラットにおける血圧日内変動の消失

○堀場 直、熊野 英一、新倉 博文、井上 誠(中外製薬(株)安全性研究所)

### ● O-28

雄ラットに見られる腎臓硝子滴変化の免疫組織化学的解析とその評価への適用

○緒方 英博<sup>1)</sup>、浜村 政夫<sup>2)</sup>、一鬼 勉<sup>3)</sup>、和泉 宏幸<sup>4)</sup>、太田 浩<sup>5)</sup>、  
内田 秀臣<sup>6)</sup>、鎌田 栄一<sup>7)</sup>、長谷川 隆一<sup>8)</sup>(<sup>1)</sup>パナファームラボラトリーズ  
安全性研究部、<sup>2)</sup>国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室)

### ● O-29

シスプラチンによる酸化的腎細胞障害への細胞内カルシウムの関与

○河合 悦子、中尾 貴史、玄番 宗一(大阪薬科大学 薬理学)

### ● O-30

シクロスポリンA 腎障害時に見られる低マグネシウム血症の改善に伴う腎障害の軽減効果

○三浦 克之<sup>1)</sup>、浅井 利大<sup>2)</sup>、山中 伸弥<sup>3)</sup>、金 勝慶<sup>4)</sup>、中谷 達也<sup>5)</sup>、  
岩尾 洋<sup>6)</sup>(<sup>1)</sup>大阪市立大学医学部 薬理学、<sup>2)</sup>大阪市立大学医学部 泌尿器科、奈良先端科学技術大学院大学遺伝子教育センター)

### ● O-31

塩化水銀投与 Brown Norway ラットの腎間質病変における MMP とその制御因子の動態

○鈴木 和彦、中山 裕之、土井 邦雄  
(東京大学大学院農学生命科学研究科獣医病理学教室)



## ■ 肝毒性

6月28日(水) 14:00~14:48 (3階 303)

座長：小澤 正吾 (国立医薬品食品衛生研究所)

出川 雅邦 (静岡県立大学薬学部薬剤学教室)

### ● O-32

2, 2', 4', 5-Tetrabromobiphenyl のメチルスルホン代謝物の強力な  
CYP2B1/2 誘導作用

○ 加藤 善久<sup>1)</sup>、原口 浩一<sup>2)</sup>、湯本 信也<sup>3)</sup>、永野 泰弘<sup>4)</sup>、山崎 友朗<sup>5)</sup>、  
増田 義人<sup>6)</sup>、木村 良平<sup>7)</sup>

(<sup>1)</sup>静岡県立大学 薬学部 薬剤学、(<sup>2)</sup>第一薬科大学 物理分析学)

### ● O-33

2, 2', 4', 5, 5'-Pentachlorobiphenyl の代謝と薬物代謝酵素誘導能：  
ラット、マウス間での種差

○ 新村 康彦<sup>1)</sup>、加藤 善久<sup>2)</sup>、原口 浩一<sup>3)</sup>、根本 清光<sup>4)</sup>、今井 公江<sup>5)</sup>、  
相本 太刀夫<sup>6)</sup>、増田 義人<sup>7)</sup>、出川 雅邦<sup>8)</sup>、木村 良平<sup>9)</sup>

(<sup>1)</sup>静岡県立大学 薬学部 薬剤学、(<sup>2)</sup>第一薬科大学 物理分析学、(<sup>3)</sup>静岡県立大学 薬  
学部 衛生化学、(<sup>4)</sup>摂南大学 薬学部 薬物動態学)

### ● O-34

Tamoxifen 投与によるラット肝腫瘍誘発過程における癌原遺伝子発現の  
RT-PCR 法による解析

○ 笠原 利彦、橋場 雅道、原田 剛、浜田 悦昌、尾畑 賢臣  
(持田製薬(株) 総合研究所安全性研究室)

### ● O-35

医薬品開発における手術材料の有用性と信頼性

○ 鈴木 聡<sup>1)</sup>、新倉 靖子<sup>2)</sup>、倉田 知光<sup>3)</sup>、伊藤 洋二<sup>4)</sup>、草野 満夫<sup>5)</sup>、  
佐藤 哲男<sup>6)</sup>、大野 泰雄<sup>7)</sup>、安原 一<sup>8)</sup>

(<sup>1)</sup>HAB 豊長類機能研究所、(<sup>2)</sup>昭和大学 医学部 第2薬理学教室、(<sup>3)</sup>昭和大学 医学  
部 第2外科学教室、(<sup>4)</sup>国立医薬品食品衛生研究所)

## ■ 循環器（心、血管）毒性

6月28日（水）14:48～15:48（3階 303）

座長：尾崎 博（東京大学大学院農学生命科学研究科）

鬼頭 剛（(株)新日本科学）

### ● O-36

ラットにおける血中 BNP 測定による心臓毒性評価の検討

○大野 理絵、宮田 裕人、白根 里加、潮田 勇、浅沼 富美子、  
八木 健一、木村 正明、(大正製薬(株) 開発研究所 安全性研究室)

### ● O-37

抗癌剤 doxorubicin の長期処理による血管平滑筋抑制作用

○尾崎 博、村田 幸久、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)

### ● O-38

ラットにおける体液量減少の血小板数に及ぼす影響

○三井 雄史、原田 剛、浜田 悦昌、尾畑 賢臣  
(持田製薬(株) 総合研究所 安全性研究室)

### ● O-39

催不整脈作用の前臨床評価の戦略

○古川 武史、軸圓 竜也、永山 伸一、浜田 大治、龍之園 剛、  
永田 良一、鬼頭 剛（(株)新日本科学 安全性事業部 安全性1部）

### ● O-40

Swine as a Model for Anti-proliferative Therapies to Treat Restenosis

○Richard Van Bibber、永田 良一、Steven Gilbert、鬼頭 剛  
(SNBL USA, Ltd.)

## ■ 神経毒性

6月28日(水) 13:00~13:48 (3階 304)

座長: 江頭 亨 (大分医科大学薬理学教室)

小林 晴男 (岩手大学農学部家畜薬理学教室)

### ● O-41

神経毒性を有する重金属化合物の脳組織にホスホリパーゼ C 活性に及ぼす影響

○ 小林 晴男、中川 博文、掘越 喜美子、鈴木 忠彦  
(岩手大学 農学部 家畜薬理学教室)

### ● O-42

Phosphodiesterase 阻害剤によるラット網膜変性症

○ 石田 尚夫、義澤 克彦、高橋 有里、藤井 恒雄、大石 裕司、  
橋本 正晴、小原 要、(藤沢薬品工業(株)安全性研究所)

### ● O-43

環境化学物質の脳神経系への影響: スチレンはサル脳モノアミン酸化酵素活性を阻害する

○ 江頭 亨、高山 房子、山中 康光 (大分医科大学 薬理学教室)

### ● O-44

Use of a Dynamic in Vitro Model to study drug Passage Across the Blood-Brain Barrier

○ Sandra Munro、永田 良一、Steven Gilbert、鬼頭 剛  
(SNBL USA, Ltd.)

## ■ 内分泌攪乱物質 1

6月28日(水) 13:48~14:48 (3階 304)

座長: 青山 博昭 ((財) 残留農薬研究所)

米元 純三 (環境庁国立環境研究所)

### ● O-45

トリブチルスズ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、阿部 毅、龜岡 美幸、江村 美和、納屋 聖人、原 卓司  
(協和発酵工業(株)安全性研究所)

● O-46

内分泌攪乱化学物質のヒト各種スルホトランスフェラーゼ分子種による硫酸抱合

○西山 貴仁、高橋 愛愁、大久保 泰成、小倉 健一郎、渡辺 烈  
(東京薬科大学 薬学部 第二衛生化学教室)

● O-47

血清 $\alpha$ 2u-globulin level の内分泌攪乱物質スクリーニング法への応用

○武吉 正博、佐脇 正邦、野田 修志、山崎 寛治、高月 峰夫  
(財)化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所)

● O-48

フルタマイドの胎児期・新生児期暴露によるF1雄ラットのアンドロゲン依存性器官への内分泌攪乱作用

○宮田 かおり<sup>1)</sup>、藪下 晴津子<sup>2)</sup>、須方 賢夫<sup>3)</sup>、佐野 真士<sup>4)</sup>、吉野 裕子<sup>5)</sup>、中西 巧<sup>6)</sup>、奥野 泰由<sup>7)</sup>  
(<sup>1)</sup>住友化学工業(株)生物環境科学研究所、(<sup>2)</sup>大雄会医科学研究所)

● O-49

ヒト肝細胞 HepG2 を用いたリポーター遺伝子発現系による有機リン系殺虫剤の抗アンドロジェン活性とその構造相関

○田村 廣人<sup>1)</sup>、吉川 博道<sup>2)</sup>、Richard, A.M.<sup>3)</sup>、Gray E.L.<sup>4)</sup>、Maness, S.C.<sup>5)</sup>、Reishmann, K.P.<sup>6)</sup>、Gaido, K.W.<sup>7)</sup> (名城大学農学部応用生物化学科、九州共立大学工学部環境化学科、U.S.EPA、Chemical Industry Institute of Toxicology(CIIT))

■ 内分泌攪乱物質2

6月28日(水) 14:48~15:36 (3階 304)

座長：奥野 泰由 (住友化学工業(株))

武吉 正博 ((財)科学物質評価研究機構日田事業所)

● O-50

卵巣摘出ラットを用いた子宮肥大試験：投与経路の違いによる影響について

○於勢 佳子、山田 智也、奥野 泰由、紙田 裕介、関 高樹  
(住友化学工業(株)生物環境科学研究所)

● O-51

メトキシクロールの卵巣摘出ラットにおける子宮肥大試験

○青山 博昭、小坂 忠司、上野 明紀、武田 眞記夫、中島 信明、寺本 昭二 ((財) 残留農薬研究所)

● O-52

胎児期及び授乳期の低用量 TCDD 曝露が甲状腺機能に及ぼす影響

○米元 純三<sup>1)</sup>、西村 典子<sup>2)</sup>、佐藤 日喜夫<sup>3)</sup>、宮原 裕一<sup>4)</sup>、大村 昌子<sup>5)</sup>、青木 康展<sup>6)</sup>、遠山 千春<sup>7)</sup> (国立環境研究所 環境健康部、国立環境研究所、地域環境研究グループ、<sup>1)</sup>京波大学 医学部、<sup>4)</sup>CREST, JST)

● O-53

2, 3, 7, 8-テトラクロローパラジベンソダイオキシン (TCDD) の毒性発現におけるエストロゲン受容体の関与

○曾根 秀子<sup>1)</sup>、Shubhashish Sarkar<sup>1)</sup>、石冢 真由美<sup>2)</sup>、川野 道宏<sup>3)</sup>、遠山 千春<sup>4)</sup>、米元 純三<sup>5)</sup> (国立環境研究所 地域環境研究グループ、<sup>1)</sup>環境健康部、<sup>2)</sup>日本科学技術事業団、CREST)

■ 細胞毒性

6月28日(水) 15:36~16:36 (3階 304)

座長：井上 智彰 (日本ロシュ(株)日本ロシュ研究所)  
沼澤 聡 (昭和大学薬学毒物学教室)

● O-54

細胞磁界測定法による塩化砒素の肺胞マクロファージの障害性評価

○岡田 充史<sup>1)</sup>、井上 葵子<sup>2)</sup>、小松 裕美<sup>3)</sup>、杉浦 由美子<sup>4)</sup>、相澤 好治<sup>5)</sup>、岡安 勲<sup>6)</sup>、沼田 賀子<sup>7)</sup>、小谷 誠<sup>8)</sup>  
(<sup>1)</sup>北里大学医学部衛生学 公衆衛生学教室、<sup>2)</sup>北里大学医学部病理学教室、<sup>3)</sup>東京電機大学工学部生物電子システム研究室)

● O-55

Trx/ADF 遺伝子改変マウス由来の造血前駆細胞における酸化ストレス物質の造血毒性発現様式

○平林 容子、児玉 幸夫、梅村 隆志、川崎 靖、金子 富蔵、菅野 純、黒川 雄二、井上 達 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター毒性部、\*国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター)

● D-56

**酸化ストレスによるヘムオキシゲナーゼ誘導における aPKC の関与**

○沼澤 聡、坂田 文、石川 牧恵、吉田 武美 (昭和大学 薬学部 毒物学)

● D-57

**In Vitro ラット脳スフェロイド (SP) 長期培養系における**

**6-Aminonicotinamide (6-ANA) の影響**

○井上 智彰、堀井 郁夫 (日本ロシユ (株) 研究所 前臨床科学研究部)

● D-58

**中性アミノ酸トランスポーターのメチル水銀輸送活性の検討**

○金 徒慶、車 碩鶴、Arthit Chairoungdua、稲富 淳、松尾 洋幸、  
金井 好克、遠藤 仁 (杏林大学医学部薬理学教室)

## ■ ポスター 6月29日(木)

展示 9:00~16:40 (3階 ラウンジ)  
質疑応答 11:00~12:00 (3階 ラウンジ)

### ■ 毒性試験法

#### ● P-1

サルの自動採血法による血中活性物質の日内変動

○阿久根 淳、浜田 大治、竜之園 剛、永田 良一、鬼頭 剛  
(株)新日本科学 安全性事業部 安全性1部)

#### ● P-2

イヌを用いた毒性検討への肝生検の導入(2)

—病理組織学的検討—

○小野沢 緑<sup>1)</sup>、仲野 善久<sup>2)</sup>、白石 明<sup>3)</sup>、酒井 寒日<sup>4)</sup>、庄司 陽子<sup>5)</sup>、  
仲由 武貴<sup>6)</sup>、清水 豊次<sup>7)</sup> (1)明治製菓(株)、2) (株)富士バイオメディックス)

#### ● P-3

四塩化炭素による急性肝障害時のイヌ血清 SDH、GLDH、5'-ND、総胆汁酸の経時的変動

○小田部 耕二、江原 裕子、長谷川 妙子、小泉 妙子、田中 直美、  
森 敬男<sup>\*</sup>、野口 規子、千葉 修一、渡部 一人、新倉 博文、井上 誠  
(中外製薬(株)安全性研究所、<sup>\*</sup>(株)CSKリサーチパーク)

#### ● P-4

テトラソリウム塩法、SQA法およびコンピューターを用いた精子自動解析法を併用した2-プロモプロバンのラット精巣毒性試験の検討

○太谷 勝己、宮川 宗之 (労働省産業医学総合研究所)

#### ● P-5

イヌ副腎皮質細胞培養による In vitro グルココルチコイド産生系を用いた副腎皮質毒性物質の評価

○森下 克美、奥村 裕、伊藤 典男、高橋 伸夫  
(大塚製薬(株)徳島研究所 毒性研究部)

- P-6  
**全自動血液凝固測定装置 CA-6000 を用いた血液凝固因子活性測定  
 -血液凝固因子活性の動物種差と血漿試料の保存安定性-**  
 ○ 木村 由美子、京川 吉正、原内 敏夫、大野 浩司  
 (塩野義製薬 新薬研究所)
  
- P-7  
**イヌを用いた毒性・薬物動態試験への肝生検の導入**  
 ○ 清水 茂一、加藤 隆之、清水 憲次、黒沢 亨<sup>1)</sup> (1) (株)富士バイオ  
 メディックス 小淵沢総合研究所、<sup>2)</sup> 明治製薬 (株) 安全性研究所
  
- P-8  
**市販線内障治療薬のカニクイザルにおける眼圧下降作用  
 -麻酔下と無麻酔下の比較-**  
 ○ 澤田 隆博、坂本 順吾、清水 淳、広瀬 祐治、武藤 紀生  
 ((株)イナリサーチ)
  
- P-9  
**ウサギ血栓性脳硬塞モデルを用いた ME3277 による脳出血の検討**  
 ○ 岡子田 建二、森本 眞知子、山本 健一、片羽 一喜、黒沢 亨、  
 仲田 武賢 (明治製薬 (株) 薬品研究所)
  
- P-10  
**ラットにおける血中コレステロール分画法の比較  
 -超遠心法、電気泳動法および直接比色法-**  
 ○ 奈良岡 準、田畑 肇、久保 道江、石川 敦子、堺 俊治  
 (山之内製薬 (株) 安全性研究所)



## ■ 肝毒性

### ● P-11

#### 肝細胞サンドイッチ培養法の毒性評価への応用

○ 鳥塚 尚樹、佐藤 玄、柿本 基治、甲斐 純子、築館 一男、澤田 繁樹、佐神 文部 (エーザイ (株) 薬理安全性研究所)

### ● P-12

#### Tamoxifen 投与によるラット肝薬物代謝酵素誘導測定への RT-PCR 法の応用

○ 橋場 雅道、笠原 利彦、原田 剛、落合 敏秋、尾畑 賢臣  
(持田製薬 (株) 総合研究所安全性研究室)

### ● P-13

#### C57BL/6 マウスを用いた concanavalin A 肝炎モデル

○ 庄司 陽子、小野沢 緑、仲野 善久、白石 明、佐藤 雅之、酒井 東日、仲由 武實、(明治製菓 (株) 薬品総合研究所 安全性研究所)

### ● P-14

#### LEC ラットの肝及び腎障害に対する抗酸化物質の影響

○ 中村 英明、西川 秋佳、古川 文夫、宮内 慎、孫 和永、広瀬 雅雄  
(国立医薬品食品衛生研究所病理部)

### ● P-15

#### ベンゾチアゾール誘導体によるラット肝毒性発現機序の解明

#### 2) Ames 試験を指標とした代謝活性化経路の推定

○ 佐藤 玄<sup>1)</sup>、朝倉 省二<sup>2)</sup>、羽倉 昌志<sup>3)</sup>、小林 直樹<sup>4)</sup>、岡本 康<sup>5)</sup>、  
築館 一男<sup>1)</sup> (エーザイ (株) 薬理安全性研究所、<sup>2)</sup>ケミストリーユニット4)

### ● P-16

#### 薬草 *Thonningia sanguine* のラット肝薬物代謝酵素阻害作用

○ Maxwell Afari Gyamfi、外間 惟夫<sup>\*</sup>、安仁屋 洋子  
(琉球大学 医学部 保健学科生体機能学、<sup>\*</sup>琉球大学付属病院薬剤部)

### ● P-17

#### 四塩化炭素投与によるアクロレイン修飾蛋白の経時的変化と N-acetylcysteine の影響

○ 宮内 慎<sup>1)</sup>、西川 秋佳<sup>2)</sup>、古川 文夫<sup>3)</sup>、中村 英明<sup>4)</sup>、孫 和永<sup>5)</sup>、  
内田 浩二<sup>6)</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>名古屋大  
学 生命農学研究科 食品機能化学)

## ■ 腎毒性

### ● P-18

KK-A<sup>y</sup>マウスにおける糖尿病性腎症の発症時期に関する検討

○ 横田 由美、勝田 修、海上 智 (三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所)

### ● P-19

イブプロフェン配合剤により惹起されたラット腎障害における  
アセトアミノフェンならびにカフェインの影響

○ 若松 昭秀、大林 繁夫、清水 賢治  
(グレラン製薬(株) 研究開発本部 開発研究所)

### ● P-20

尿管腔内に結晶状物質を伴う腎障害の発現機序

○ 吉田 千春、渋谷 幸代、尾崎 秀次、柴崎 義明、早坂 弘康、  
庄司 陽子、黒沢 亨、仲由武實 (明治製薬(株) 薬品総合研究所)

## ■ 生殖・発生・胎仔(児)毒性

### ● P-21

多選択性有機アニオントランスポータを介した Methyl mercury-cysteine  
包含体の輸送

○ 車 碩鑑、関根 孝司、金 徒慶、武田 理夫、金井 好克、遠藤 仁  
(杏林大学医学部薬理学教室)

### ● P-22

マウスにおける塩化カドミウムの催奇形作用に対するグルタチオン前駆物質、  
N-アセチルシステインの防御効果

○ 納屋 聖人<sup>1)</sup>、飯田 茂<sup>1)</sup>、原 卓司<sup>2)</sup>、安田 肇生<sup>2)</sup>  
(<sup>1)</sup>協和発酵工業(株) 安全性研究所、<sup>2)</sup>広島大学 医学部 第一解剖学教室)

### ● P-23

マウスを用いた繁殖毒性試験における一腹仔数の行動発達に及ぼす影響

○ 田中 豊人 (東京都立衛生研究所 毒性部 薬理研究科)

● P-24

**精巢毒性発現におけるテストステロン関与の評価**

○ 下村 和裕、島田 信、藤川 香津子、萩原 美代子、原田 滋雄、古濱 和久 (第一製薬(株) 安全性研究所)

● P-25

**Continuous Intravenous Infusion of Rats for Fertility and Early Embryonic Development Studies - Paternal and Maternal Data**

○ Keith Robinson, Cedric Gordon, Lorri Pinsonneault (ClinTrials BioResearch Ltd.)

● P-26

**イヌ精子検査法の確立に関する検討**

○ 栗原 明義、高木 広憲、井上 忠広、中村 勇、木村 正明 (大正製薬(株) 開発研究所)

● P-27

**マーモセットにおける生殖発生毒性試験法確立のための尿中プロゲステロン代謝物測定法の検討**

○ 眞鍋 ひろ子、Derek Carnie、尾根田 暁、伊原 敏夫、永田 良一 ((株) 新日本科学)

● P-28

**BrdU を胎児期に暴露した雄ラットの行動薬理的検討**

○ 桑形 麻樹子<sup>1)</sup>、松本 亜紀<sup>2)</sup>、長尾 哲二<sup>3)</sup>、赤堀 文昭<sup>4)</sup>、小野 宏<sup>5)</sup>  
(<sup>1)</sup>(財) 食品薬品安全センター 秦野研究所、<sup>2)</sup>麻布大学 生物科学総合研究所/獣医学部 薬理)

● P-29

**フルオロ酢酸による精巢毒性とアポトーシスの関連性**

○ 藤田 和俊<sup>1)</sup>、三森 国敏<sup>2)</sup>、畠山 智香子<sup>3)</sup>、上原 正人<sup>4)</sup>  
(<sup>1)</sup>(財) 化学物質評価研究機構 日田事業所、<sup>2)</sup>国立医薬品食品衛生研究所 病理部、<sup>3)</sup>鳥取大学 家畜解剖)

● P-30

**内分泌かく乱化学物質ビスフェノール A のラット培養胎児におよぼす影響**

○ 横山 篤<sup>1)</sup>、秋田 正治<sup>2)</sup>、清水 茂一<sup>3)</sup>、野崎 善弘<sup>4)</sup>、志熊 廣夫<sup>5)</sup>、黒田 行昭<sup>6)</sup> ( <sup>1)</sup>鎌倉女子大学 家政学部、<sup>2)</sup>(株) 富士バイオメディックス、<sup>3)</sup>国立遺伝学研究所)

● P-31

雌ラットの生殖機能に対する 1, 2-dichloropropane の影響

- 関口 総一郎、須田 恵、雅麗、川井 さゆり、本間 健資（労働省産業医学総合研究所）

● P-32

ラットの妊娠初期に投与した dibutyltin dichloride の胚致死作用

- 江馬 真、原園 景（国立医薬品食品衛生研究所 大阪支所）

## ■ 変異原性

● P-33

ラット多臓器の遺伝毒性検出におけるコメットアッセイの有用性

- 關橋 薫<sup>1)</sup>、前田 貴宣<sup>2)</sup>、河村 公太郎<sup>3)</sup>、一花 次夫<sup>1)</sup>、佐々木 有<sup>4)</sup>、津田 修治<sup>5)</sup>  
(<sup>1)</sup>(株)化合物安全性研究所、<sup>2)</sup>八戸工業高等専門学校、<sup>3)</sup>岩手大学獣医学科)

● P-34

CHL 細胞を用いた染色体異常試験及び小核試験における培養温度の影響

- 朝波 省吾、下野 和之、金田 信也（(株)大塚製薬工場 鳴門研究所）

## ■ 癌原性・発癌性

● P-35

クロロホルムの経口暴露と吸入暴露を組み合わせた投与（複数媒体投与）によるラット肝臓の酵素活性

- 笠井 辰也、武 信、竹内 哲也、西沢 共司、山本 静護、松島 泰次郎（中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター）

● P-36

クロロホルムの F344 ラットを用いて経口暴露と吸入暴露を組み合わせた投与による長期毒性

- 加納 浩和、松本 道治、山崎 一法、鈴木 正明、野口 孝義、長野 嘉介、山本 静護、松島 泰次郎（中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター）

● P-37

**1, 4-ジオキサンの F344 ラットを用いて経口暴露と吸入暴露を組み合わせた投与による長期毒性**

○山本 静護、大澤 護、西沢 共司、齋藤 新、笠井 辰也、野口 孝義、長野 嘉介、松島 泰次郎

(中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター)

● P-38

**p53 (+/-) C57BL/6 および p53 (+/-) CBA マウスにおける phenolphthalein の発がん感受性**

○小野寺 博志、三森 国敏、高木 久宜、安原 加壽雄、田村 啓、広瀬 雅雄、玉置 憲一、野村 達次

(国立医薬品食品衛生研究所 病理部、<sup>1</sup>実験動物中央研究所)

● P-39

**rasH2 マウスにおける t-Butylhydroquinone の単独投与ないし亜硝酸との併用投与による前胃粘膜への影響**

○安原 加壽雄、三森 国敏、荒谷 高敏、小野寺 博志、高木 久宜、田村 啓、広瀬 雅雄 (国立医薬品食品衛生研究所 病理部)

## ■ 循環器 (心、血管) 毒性

● P-40

**イヌの単相性活動電位 (MAP) 測定による安全性薬理学的評価法**

○池田 博信、福田 好造、堤 宏禎、丹治 景子、左近上 博司、西森 司雄、鈴木 潤 ((株) 環境バイリス研究所)

● P-41

**ガラス管微少電極による心筋細胞内活動電位測定 (APD) 法を用いた安全性薬理学的評価法**

○下里 貴ハ、六角 香リ、西森 司雄リ、鈴木 潤リ、百瀬 弥寿徳<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>) (株) 環境バイリス研究所、<sup>2</sup> 東邦大学薬学部)

● P-42

**摘出心筋標本による薬物のQT延長作用評価の問題点：Terfenadine に関する検討**

○田中 光、重信 弘毅 (東邦大学薬学部薬物学)

## ■ 血液毒性

### ● P-43

#### Role of corticosterone in ethyl carbamate-induced immunosuppression in female BALB/c mice

○ Shin-Woo Cha, Mun-Han Lee, Hyoung-Chin Kim, Hee-Kyoung Gu, Kap-Ho Kim, Ju-Hyun Bae and Tae-Cheon Jeong  
(Toxicology Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology and College of Veterinary Medicine, Seoul Natl Univ, Korea)

### ● P-44

#### 免疫毒性試験における血清 IgM 及び IgG 濃度測定の意味に関する検討

○ 久田 茂、永嶋 雅子、柴田 誠司、谷藤 久人、森本 秀樹、飯塚 和弘、増田 修治、飯田 祝子、臼居 敏仁\*  
(帝国臓器製薬(株)安全性研究部、\*実験動物中央研究所)

### ● P-45

#### 医用材料の安全性評価のための感作性試験における試験条件の比較検討

○ 金澤 由基子<sup>1)</sup>、松田 洋<sup>1)</sup>、松岡 千明<sup>1)</sup>、五十嵐 良明<sup>2)</sup>、鹿野 正昭<sup>2)</sup>、小島 幸一<sup>1)</sup>、田中 憲穂<sup>1)</sup>  
(<sup>1)</sup>(財)食品薬品安全センター秦野研究所、<sup>2)</sup>国立医薬品食品衛生研究所)

### ● P-46

#### Cyclophosphamide を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免疫学的パラメーターの変化を指標とした毒性発現の差に関する検討

○ 柴田 誠司、谷藤 久人、久田 茂、永嶋 雅子、森本 秀樹、飯塚 和弘、増田 修治、飯田 祝子、臼井 敏仁\*  
(帝国臓器製薬(株)安全性研究部、\*実験動物中央研究所)

● P-47

**ホルムアルデヒドの吸入暴露によるマウスの化学物質に対するアレルギー反応性の増強**

○五十嵐 良明<sup>1)</sup>、鎌田 栄一<sup>2)</sup>、鹿庭 正昭<sup>1)</sup>、中村 晃忠<sup>1)</sup> (国立薬品食品衛生研究所<sup>1)</sup>療品部、国立薬品食品衛生研究所<sup>2)</sup>総合安全評価研究室)

● P-48

**Contact Dermatitis in BALB/c mice induced by Picryl Chloride**

○Ji-Youn Jung, Kwang-Il Jung, 中山 裕之, 土井 邦雄  
(東京大学大学院農学部生命科学研究所獣医病理学教室)

● P-49

**Nivalenol-Induced Apoptosis in Lymphoid Organs of Mice**

○Amnart Poapolathep, Wijit kiatipattanasakul, 石上 紀明,  
中山 裕之, 土井 邦雄  
(東京大学大学院農学部生命科学研究所獣医病理学教室)

■ 免疫毒性・アレルギー

● P-50

**アニリンのラット運動量に及ぼす影響**

○山下 弘太郎、石井 宏幸、豊田 直人、岡崎 欣正、高橋 要、土谷 稔  
(株)三菱化学 安全科学研究所)

● P-51

**職場における有害化学物質が作業者の嗅覚機能に及ぼす影響**

○錦谷 まりこ<sup>1)</sup>、荒記 俊一<sup>1)</sup>、横山 和仁<sup>1)</sup>、佐藤 元<sup>1)</sup>、河原 克雅<sup>2)</sup>  
(<sup>1)</sup>東京大学医学部公衆衛生学、<sup>2)</sup>北里大学医学部生理学)

● P-52

**Trimethyltin を投与したラットの脳内グリア細胞線維性酸性蛋白 (GFAP) の発現に関する画像解析装置を用いた定量的評価方法の検討**

○石井 宏幸、岡崎 欣正、山下 弘太郎、豊田 直人、高橋 要、  
河野 友紀子、友成 由紀、土谷 稔 (株)三菱化学 安全科学研究所)

● P-53

**トルエンの神経毒性評価におけるアセチルコリン受容体の変化**

- 本間 健資、津賀 浩史、須田 恵  
(労働省産業医学総合研究所 健康障害予防研究所)

● P-54

**Vitamin A aldehyde (retinal) の出生前投与によるラット出生児の行動・機能に及ぼす影響**

- 木原 隆英、谷村 孝\*  
(近畿大学医学部第一解剖学教室、\*近畿大学ライフサイエンス研究所)

● P-55

**抗精神病薬ハロペリドールによる神経毒性発現における酸化ストレス関与の可能性**

- 古木 希、糟谷 史代、五十嵐 一雄 (神戸学院大学薬学部毒性学研究室)

## ■ 神経毒性

● P-56

**ラットにおける脂肪乳剤粒子径の血中コレステロールとリン脂質に及ぼす影響**

- 梅岡 健一、藤本 貴司、岸本 早苗、川内 佳之、越谷 修、澤本 修、  
栗栖 和信、岸本 恒次、中島 芳文、平岡 功  
(株)大塚製薬工場 偏門研究所)

● P-57

**クロルプロファムのラットおよびマウスの造血系に及ぼす影響**

- 藤谷 知子、多田 幸恵、米山 允子 (東京都立衛生研究所 毒性部)

● P-58

**一般毒性試験における尿検査に関する調査**

- 川原 潤一<sup>1)</sup>、木村 敬、桑原 良弘、和田 直人、青木 康治、泉 政明、  
信方 英文、花岡 裕吉、川内 佳之、畠山 茂樹、苗代 一郎、深澤 洋史、  
青木 豊彦、橋本 正晴 (日本製薬工業協会 基礎研究部会第二分科会、(キリンビール(株)医薬開発研究所<sup>1)</sup>)



● P-59

一般毒性試験における血液化学的検査に関する調査

○岩井 久和<sup>1)</sup>、阿瀬 善也、米良 幸典、中野 一行、木村 敬、  
小林 勇二郎、和知 正幸、林 万津子、守田 伸子、苗代 一郎、  
深澤 洋史、青木 豊彦、橋本 正晴 (日本製薬工業協会 基礎研究部会第二分  
科会 (1) (株)三和化学研究所 総合研究所 安全性研究グループ)

● P-60

一般毒性試験における血液学的検査に関する調査

○青木 康治<sup>1)</sup>、百瀬 泰紀、石塚 修司、阿瀬 善也、益本 吉広、  
山本 光雄、川原 潤一、岩井 久和、竹下 尚、苗代 一郎、深澤 洋史、  
青木 豊彦、橋本 正晴 (日本製薬工業協会 基礎研究部会第二分科会  
(1) 北陸製薬 (株) 研究開発本部)

● P-61

Crj : CD (SD) IGS と Sic : SD ラットの一般毒性パラメータの比較

○辻村 裕美子、倉田 昌明、飯高 健、高橋 守、下谷 真智子、  
加藤 まり子、古田 千香子、白井 紀充、佐藤 靖  
(ファイザー製薬 (株) 安全性研究統括部)

● P-62

Chlormadinone acetate (CMA) の自然発症前立腺肥大 (BPH)

イヌの前立腺、精巣及び下垂体に対する作用の免疫病理組織学的検討

○池田 理恵、村越 正典、田川 正志、中山 隆治、五反田 浩太郎、  
三枝 衛、本間 誠次郎 (帝国臓器製薬 (株) 安全性研究部、薬理研究部)

● P-63

骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 におけるメタロチオネイン遺伝子の発現について

○田村 幸彦、大谷 啓一 (東京医科歯科大学 歯学部 歯科薬理学教室)

● P-64

血小板減少回復剤 FR115092 誘発胸水貯留 (I)

○宇波 明、寺井 孝雄、義澤 克彦、三枝 雅、藤本 芳勝、宮安 喜久男、  
橋本 正晴、小原 要 (藤沢薬品工業 (株) 安全性研究所)

● P-65

血小板減少回復剤 FR115092 誘発胸水貯留 (II)

○宇波 明、寺井 孝雄、義澤 克彦、宮安 喜久男、橋本 正晴、小原 要  
(藤沢薬品工業 (株) 安全性研究所)

● P-66

**タモキシフェン反復投与のラット子宮及び卵巣に及ぼす影響**

○ 佐藤 敦子、久田 茂、谷藤 久人、永嶋 雅子、飯塚 和弘、増田 修治、三村 雄一、中山 隆治 (帝国臓器製薬 (株) 安全性研究部)

● P-67

**DHPN 単回投与ラットにおける甲状腺及び精巣毒性の初期変化**

○ 田村 啓、三森 国敏、安原 加壽雄、小野寺 博志、高木 久宜、那須 昌弘、広瀬 雅雄  
(国立医薬品食品衛生研究所 病理部、(株) パナファーム ラボラトリーズ)

## ■ データ解析

● P-68

**Hershberger Assay における副生殖器重量測定法の検討：ホルマリン固定後測定による試験制度の向上**

○ 角南 登、山田 智也、国松 武史、奥野 泰由、紙田 祐介、関 高樹  
(住友化学工業 (株) 生物環境科学研究所)

● P-69

**大腸菌にて発現可能な融合ヒトアンドロジェンレセプターの設計とそれを用いた内分泌攪乱物質としての化学物質の評価**

○ 松井 一裕、曾家 義博、西井 重明、石橋 卓也、川村 良久  
(東洋紡績 (株) 敦賀バイオ研究所)

● P-70

**ヒト前立腺ガン由来細胞株 LNCaP 細胞を用いた *in vitro* 抗アンドロジェン活性評価系の検討**

○ 成見 香瑞範、片山 誠一、永井 賢司、宮川 誠  
(三菱化学 安全科学研究所 鹿島研究所)

● P-71

**去勢ラットの前立腺腫瘍におけるアポトーシスを指標とした *in vivo* 抗アンドロジェン活性評価系の検討**

○ 片山 誠一、成見 香瑞範、岡村 隆之、永井 賢司  
(三菱化学 安全科学研究所 鹿島研究所)

● P-72

フルタマイドの胎児期・新生児期曝露による F1 雄ラットの生殖系ホルモン応答および精巣機能に及ぼす影響

○ 藪下 晴津子<sup>1)</sup>、須方 誓夫<sup>2)</sup>、佐野 真士<sup>3)</sup>、吉野 裕子<sup>4)</sup>、宮田 かおり<sup>1)</sup>、奥野 泰由<sup>1)</sup> (住友化学工業 (株) 生物環境科学研究所、<sup>2)</sup> 大雄会医科学研究所)

● P-73

ビスフェノール A の新生児期投与による雌ラット生殖系に及ぼす影響

○ 加藤 英男、内藤 一恵、吉島 賢一、太田 隆雄、古橋 忠和、岩田 寿雄 ((株) 日本バイオリサーチセンター 試験管理部)

## ■ 環境ホルモン

● P-74

静注用脂肪乳剤の静脈保護作用に関する実験的検討

○ 桑原 孝<sup>1)</sup>、朝波 省吾<sup>2)</sup>  
(<sup>1)</sup>(株) 大塚製薬工場 応用開発部、(<sup>2)</sup>(株) 大塚製薬工場 専門研究所)

● P-75

飲料水中の強力変異原性物質 “MX (3-Chloro-4-(dichloromethyl) -5-hydroxy-2(5H)-furanone)” の毒性評価

○ 広瀬 明彦<sup>1)</sup>、西川 秋佳<sup>1)</sup>、木苗 直秀<sup>2)</sup>、長谷川 隆一<sup>1)</sup> (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、<sup>2)</sup> 静岡県立大学 食品栄養科学部)

● P-76

マウスを用いた催吐作用の検出

○ 高木 観、安東 賢太郎、稲村 直樹、井上 裕章  
(三菱東京製薬 (株) 横浜研究所 安全性研究所)

● P-77

CPP 法に関する基礎的検討：ベンゾジアゼピン系薬物における強化効果の検出

○ 宮脇 出、堀江 泰志、小関 直輝、船橋 斉、松岡 信男  
(大日本製薬 (株) 開発研究所)

## ■ その他

### ● P-78

フローサイトメーター (EPICS XL) の骨髄検査への応用に関する基礎研究

○三浦 大志郎、小林 充、尾形 昭子、古川 純子、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)

### ● P-79

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2ー 若齢ラットと成熟ラットの比較検討ー

○井口 綾子、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、小川 秀治、米良 幸典  
(ゼリア新薬工業 (株) 中央研究所 開発研究部)

## ■ 反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究

### ● P-80

反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究：  
5-FU を用いた2及び4週間反復経口投与比較試験

○松本 博隆、猪又 晃、林 万律子、堀井 郁夫  
(日本ロシュ (株) 研究所 前臨床科学研究部)

### ● P-81

反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する研究  
ー Adriamycin (ADR) 単回静脈内投与後の2及び4週間休薬による精巣毒性  
の比較検討ー

○恒成 一郎、河内 護、松丸 剛久、勝木 昭次  
(日本ベーリンガーインゲルハイム (株) 川西医薬研究所)

### ● P-82

反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究  
(塩酸フェドロゾール：2及び4週間反復経口投与)

○川下 浩人、平塚 一幸、黒田 淳二、浅田 義人、鈴木 忠徳、  
六車 幸美、富岡 聡子、谷 泉乃、近藤 正秀、壺島 浩、永江 祐輔  
(ノベルティスファーマ (株) 筑波研究所 安全性研究グループ)

● P-83

反復投与によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究  
ーレセルピンの2週間あるいは4週間皮下投与による精子形成への影響ー  
○川村 信之、堤 俊輔、竹下 修史  
(アベンティスファーマ(株) 開発研究所 安全性研究室)

● P-84

反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究  
1) Ethynylestradiol の2週間反復経口投与毒性試験  
○大信田 系裕、宮本 庸平、上田 耕平、大森 英爾  
(東レ(株) 医薬研究所 安全性研究室)

● P-85

反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究  
2) カルモフルの28日間及び11日間投与  
○古川 雅一、唐鎌 利雄、梶 政好、五味田 忍、吉村 正寿、渡部 則充  
(三井製薬(株) 生物科学研究所)

● P-86

反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究  
4) Etoposide の2及び4週間静脈内投与による影響の比較  
○川口 雅子、長岡 有紀、香川 雅孝、葛西 靖広、和知 正幸  
(日研化学(株) 大宮研究所 安全性研究室)

● P-87

反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究  
5) Ethylene glycol monomethyl ether の2週間および4週間投与による  
雄性生殖器に対する影響  
○渡邊 厚、中野 雄司、遠藤 貴子、佐藤 則博、甲斐 清徳、白岩 和己、  
小林 洋四郎(旭化成工業(株) ライフサイエンス総合研究所 安全性研究所)

● P-88

反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究  
ー7. 新規白金錯化合物の2週間、4週間および単回投与による精巣毒性ー  
○三沢 保幸、渡辺 一人、桜井 貴之、藤井 悦子、篠本 こすえ、  
加藤 淳彦、杉本 哲朗(中外製薬(株) 安全性研究所)

● P-89

反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究

8) アドリアマイシンの2週間および4週間投与試験

○ 足立 民子、西村 友成、新比恵 啓志、山村 高章、池尾 富弘  
(田辺製薬(株) 安全性研究所)

● P-90

反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究

10) E7010 の2週間反復投与による精巣毒性の検討

○ 奥田 恭之、早川 和宏、田代 俊文、佐藤 国夫、葛山 富春、  
岡田 文弘、榎川 暁、佐神 文郎 (エーザイ(株) 薬理安全性研究所)

● P-91

反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究

11) Cyclophosphamide の2週間および4週間経口反復投与の影響

○ 渡邊 隆夫、山口 則和、秋葉 知英、田中 雅弘、滝本 正美  
(興和(株) 富士研究所 安全性研究部)

● P-92

反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究

12) Estradiol Benzoate の2週間および4週間の反復皮下投与の影響

○ 妻 純子、高橋 洋之、中原 千穂、並木 歩、浅野 哲、宇野 洋  
(帝人(株) 医薬開発研究所 安全性研究部)

● P-93

反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究

13) メチルメタンサルホン酸 (MMS) での2週間および4週間投与試験

○ 小沢 重成、横井 亮平、北村 毅、栗山 和也、小林 一男、柴田 信男  
(キッセイ薬品工業(株) 安全性研究所)

● P-94

反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究

15) シクロフォスファミド単回経口投与の影響

○ 松本 智志、平川 芽衣子、下元 貴澄、佐藤 亮、北浦 敬介、南 孝則  
(大塚製薬(株) 徳島研究所 毒性研究部)

● P-95

反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究  
(17) レセルピンの2あるいは4週間皮下等与試験-

○山内 研司、高浦 由美、仲辻 俊二、能登 貴久、三枝 雅、大石 裕司、  
寺井 孝雄、橋本 正晴、小原 要 (藤沢薬品工業 (株) 安全性研究所)

● P-96

反復投与によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究  
18) エノキサシンの2週間反復投与による検討

○木澤 和夫、古坊 真一、三善 隆広、河村 泰仁  
(富山化学工業 (株) 総合研究所安全性研究所)

● P-97

反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性評価に関する共同研究  
20) エチニルエストラジオールの2および4週間反復投与による影響

○木ノ本 寿子、沢多 美和、小川 秀治、井口 綾子、松井 明子、  
飯野 田香、白石裕美子、西 直樹、米良 幸典  
(ゼリア新薬工業 (株) 中央研究所 開発研究部)

● P-98

反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究  
22) ホウ酸のラットにおける2及び4週間反復経口投与による精巣毒性試験

○工藤 哲、棚瀬 裕文、山崎 正和、中尾 麻衣子、宮田 友貴、  
都留 清志、今井 繁 (杏林製薬 (株) 研究センター 安全性研究部)

● P-99

反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究  
23) 2週間反復投与によるホウ酸のラット精巣毒性の検出

○福田 良<sup>1)</sup>、廣出 充洋<sup>2)</sup>、森 郁生<sup>3)</sup>、森島 英喜<sup>4)</sup>、茶谷 文雄<sup>5)</sup>、  
馬屋原 宏<sup>6)</sup> (武田薬品工業 (株) 創薬研究本部<sup>1)</sup> 薬物機能第二研究所、<sup>2)</sup>薬物機  
能第一研究所、<sup>3)</sup>研究推進部)

● P-100

反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究  
25) ビリメタミンの2または4週間反復投与による影響

○村上 善紀、武田 匡嗣、鈴木 義治、藤井 久子、小笠原 裕之、  
増田 達樹 (日本ワイスレダリー (株) 医薬研究所)

● P-101

反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究  
26) Theobromine の2週間および4週間投与による精巣毒性評価

○船橋 斉、藤岡 美智、河内 真美、立石 湯美、松岡 信男  
(大日本製薬(株) 開発研究所)

● P-102

反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究  
-28) 1, 3-dinitrobenzene 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-

○入村 兼司、山口 昌宏、森永 秀信、杉本 繁夫、近藤 泰史、  
小井田 雅弘(大鵬薬品工業(株) 安全性研究所)

● P-103

反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究  
29) まとめ

○堺 俊治<sup>1)</sup>、高橋 道人<sup>2)</sup>、三森 国敏<sup>3)</sup>、安原 加壽雄<sup>4)</sup>、川島 邦夫<sup>5)</sup>、  
馬屋原 宏<sup>6)</sup>、宮本 庸平<sup>7)</sup>、古川 雅一<sup>8)</sup>、河下 伸<sup>9)</sup>、川口 雅子<sup>10)</sup>、  
中野 雄司<sup>11)</sup>、渡部 一人<sup>12)</sup>、池尾 雷弘<sup>13)</sup>、川下 浩人<sup>14)</sup>、細川 暁<sup>15)</sup>、  
渡邊 隆夫<sup>16)</sup>、浅野 哲<sup>17)</sup>、小沢 重成<sup>18)</sup>、土屋 毅幸<sup>19)</sup>、松本 智志<sup>20)</sup>、  
林 万禎子<sup>21)</sup>、山内 研司<sup>22)</sup>、三善 隆広<sup>23)</sup>、恒成 一郎<sup>24)</sup>、米良 幸典<sup>25)</sup>、  
川村 信之<sup>26)</sup>、工藤 哲<sup>27)</sup>、福田 良<sup>28)</sup>、村上 善紀<sup>29)</sup>、船橋 斉<sup>30)</sup>、入村 兼司<sup>31)</sup>、  
大龍 芽久美<sup>32)</sup>、岡原 明彦<sup>33)</sup>、伊藤 今日子<sup>34)</sup>、大野 泰雄<sup>35)</sup>  
(<sup>1)</sup>山之内製薬(株)、<sup>2)</sup>昭和大学薬学部、<sup>3)</sup>国立医薬品食品衛生研究所、<sup>4)</sup>武田薬  
品工業(株)、<sup>5)</sup>日本製薬工業協会基礎研究部会)





I.G. Sipes, S. Fontaine, K. Thompson and P. Hoyer

Depts. of Pharmacology & Toxicology and Physiology, Center for Toxicology, University of Arizona, Tucson, AZ 85721, USA.

A variety of drugs, environmental pollutants and occupational chemicals, cause ovarian toxicity. One such compound is 4-vinylcyclohexene (4-VCH). Repeated daily dosing with VCH causes loss of primordial and primary follicles in the ovaries of female mice, with the subsequent development of ovarian atrophy and ovarian neoplasms. When administered to female rats, VCH does not produce these ovarian lesions. An explanation for this species difference is bioactivation of VCH to ovotoxic epoxides. Hepatic microsomes from female mice form greater amounts of 1,2- and 7,8-vinylcyclohexene monoepoxides and vinylcyclohexene diepoxide (VCD) from VCH than hepatic microsomes of female rats. When administered to rats these epoxides result in ovarian toxicity but to a lesser degree than in mice. Structure activity studies demonstrated that VCD is the ultimate ovarian toxicant because analogs that only form monoepoxides do not cause ovarian toxicity. Pretreatment (5-10 days) of mice with VCH results in a 2- to 3-fold induction of hepatic cytochrome P450 isoforms (CYP2A and CYP2B) that metabolize VCH to these toxic epoxides. Induction of these P450 isoforms does not occur in the livers of female rats. VCD was administered to female rats to determine the mechanism of ovarian injury. Morphological evaluations of ovaries from VCD treated rats revealed that follicle loss occurs by apoptosis. Subsequent biochemical analyses of follicles obtained from VCD treated rats revealed increased expression of *Bax*, a gene expressed in association with apoptosis. Co-administration of 17 $\beta$ -estradiol along with VCD protects the ovary from follicle loss, whereas the antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen, antagonizes this protective effect. Collectively, these results suggest and VCH, through VCD accelerates the rate of apoptosis (atresia) of ovarian follicles by perturbation of a physiological pathway. (Supported by NIEHS P30-ES06694, ES08979 and T32-ES07091).

Arthur Craigmill

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

There are currently at least 11 groups internationally which certify, accredit, or register non-clinically oriented (general) toxicologists. These groups include the EUROTOX Registry (representing 8 European countries), the American Board of Toxicology (ABT), the Japanese Society of Toxicology (JST), the Academy of Toxicological Sciences (ATS), and the Korean Board of Toxicology (KBT). There are several clinical toxicology boards including the American College of Medical Toxicology, the American Board of Applied Toxicology, and the American Board of Veterinary Toxicology (ABVT). The ABVT certification includes general toxicology elements similar to the ABT and the JST, and for this reason, has participated in the general toxicology harmonization effort.

The task of Harmonization was initiated in 1991 at the EUROTOX Maasterict Congress, which was closely followed by a workshop sponsored by IUTOX in Rome in 1992. In 1994, EUROTOX established a harmonization model, which was formalized in 1996 with the establishment of the EUROTOX Registry based on three founding countries; the United Kingdom, Germany and the Netherlands. This first successful international harmonization effort recognized that formation of an international certification was not necessary or desirable. The EUROTOX model is based on mutual recognition of expertise based on high standards for certification within each of the participating organizations. The EUROTOX register is a listing of professional toxicologists who have been certified by the participating organizations, which now includes Finland, Switzerland, France, Italy and Austria. This mutual recognition is based on high standards for a combination of education, training, experience, publications, and may include a formal examination.

In 1998, another workshop on harmonization was held during the IUTOX Congress in Paris, and IUTOX offered to take the lead in helping to promote harmonization and assist national societies to establish certification schemes. This meeting catalyzed the move towards harmonization and stimulated the participants to action.

In 1999 during the Society of Toxicology Meeting in New Orleans, another meeting was held and the participants agreed to form an Assembly to work towards harmonization based on a background paper which was to be developed under the auspices of IUTOX. The next meeting was held in conjunction with the 2000 SOT meeting in Philadelphia and resulted in the formation of the International Assembly for the Recognition of Toxicologists (IART). The IART was founded by the unanimous consent of the ABT, JST, ATS, EUROTOX, ABVT and the KST, and is open to all countries and organizations which certify or register professional toxicologists. The IART will be chaired by Professor Tetsuo Satoh, second vice-president of IUTOX. The goal of IART is to complete recommendations for mutual recognition of expertise and harmonization of standards to be presented at the IUTOX Congress in Brisbane, Australia in 2001.

A working group of representatives from IART will begin by establishing: 1) the elements needed to demonstrate expertise in toxicology (training, experience, active practice, etc.); 2) how these elements may be demonstrated (publications, technical reports, awards, etc.); 3) the similar aspects of all the certification systems with regard to the elements listed above; 4) the criteria of a satisfactory certification/registration scheme based on the EUROTOX model; 5) the potential hurdles which may be presented and solutions to these problems; and 6) the benefits of harmonization/recognition to individual toxicologists, their employers (industry, government and academia) and the public health of the international community.

M. W. Anders

Department of Pharmacology and Physiology, University of Rochester, 601 Elmwood Ave., Rochester, New York 14642

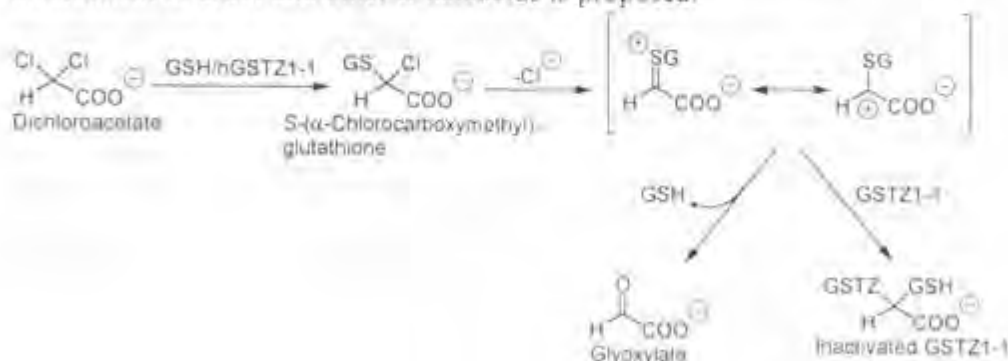
Glutathione-dependent reactions play important roles in the detoxication of xenobiotics. Glutathione is the most abundant, sulfur-centered nucleophile in the body; concentrations typically range from 2–10 mM in most tissues. The cytoprotective effects of glutathione are largely associated with its role as a second substrate for a range of detoxifying enzymes. Glutathione transferases (GSTs) catalyze the first step in the mercapturic acid pathway that leads to the formation of mercapturic acids (*S*-substituted *N*-acetyl-L-cysteines). Other glutathione-dependent detoxication reactions include the glutathione peroxidases (both selenium-dependent and GSTs), formaldehyde dehydrogenase, glyoxylases I and II, and nonenzymatic reactions with soft electrophiles and free radicals.

In addition to its role in detoxication, studies in our laboratory and others have defined a range of glutathione-dependent bioactivation reactions. These include the cysteine conjugate  $\beta$ -lyase pathway for the bioactivation of nephrotoxic haloalkenes, the bioactivation of geminal- and vicinal-dihaloalkanes, the GST zeta (GSTZ1-1)-catalyzed bioactivation of  $\alpha$ -haloacids, glutathione conjugates as delivery forms for quinones, reversible glutathione conjugates as delivery forms for isothiocyanates, thiocyanates, and  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyls, glutathione mercaptides as delivery forms for methyl mercury, and the one-electron oxidation of thiols.

We have studied several aspects of the  $\beta$ -lyase pathway, and our most recent studies have dealt with the bioactivation of the sevoflurane degradation product 2-(fluoromethoxy)-1,1,3,3,3-pentafluoro-1-propene (Compound A). Compound A is nephrotoxic in rats and concern has been raised about whether humans anesthetized with sevoflurane and thereby exposed to Compound A are at risk of kidney damage. Metabolites indicative of glutathione- and  $\beta$ -lyase-dependent metabolism are formed in rats given Compound A and in human subjects anesthetized with sevoflurane. Cysteine *S*-conjugates of Compound A are substrates for rat, nonhuman primate, and human renal  $\beta$ -lyase, but rates in human tissues are much lower than in rat tissues. 2-(Fluoromethoxy)-3,3,3-

trifluoropropanoic acid, which is a metabolite characteristic of the  $\beta$ -lyase-dependent bioactivation of Compound A, is also formed *in vitro*. Moreover, the glutathione and cysteine *S*-conjugates of Compound A are nephrotoxic in rats. These data indicate that Compound A undergoes  $\beta$ -lyase-dependent bioactivation. Also, Compound A-associated renal injury has not been reported in human subjects anesthetized with sevoflurane, perhaps in part because of the low activities of human renal  $\beta$ -lyases.

$\alpha$ -Haloacids (dichloroacetate [DCA] and bromochloroacetate) are disinfection by-products found in drinking water in the U.S. DCA causes liver tumors in mice and rats. DCA is also used in the clinical management of congenital lactic acidosis. DCA is metabolized to glyoxylate and several glyoxylate-derived compounds, including glycolate, oxalate, glycine, and hippuric acid. Recent studies in our laboratory demonstrated that GSTZ1-1 catalyzes the metabolism of DCA and other  $\alpha$ -haloacids. GSTZ1-1 is a recently discovered GST that is found in plants and animals and is identical with maleylacetoacetate isomerase, which catalyzes the penultimate step in tyrosine degradation. Several polymorphic variants of hGSTZ1-1 have been identified that differ in their activities with  $\alpha$ -haloacids as substrates. The elimination  $t_{1/2}$  for DCA is prolonged in human subjects given multiple doses of DCA. We have recently demonstrated that DCA is an efficient inactivator of rat, mouse, and human liver GSTZ1-1 and of recombinant hGSTZ1-1. Moreover, polymorphic variants of hGSTZ1-1 differ in their susceptibility to inactivation of DCA. The DCA-dependent inactivation of hGSTZ1-1 is associated with the covalent modification of the enzyme by [ $^{14}$ C]DCA in the presence of glutathione and by [ $^{35}$ S]glutathione in the presence of DCA. These data show that DCA is a mechanism-based inactivator of hGSTZ1-1 and explain the change in elimination  $t_{1/2}$  seen after repeated administration of DCA. Based on these studies, this reaction mechanism for the GSTZ1-1-dependent metabolism of DCA and other  $\alpha$ -haloacids is proposed:



(Supported by National Institute of Environmental Health Sciences grant ES03127).



○杉山雄一、加藤将夫

## 東京大学大学院薬学系研究科製剤設計学

(1) 総論 近年の目覚ましい分子生物学的研究の進歩から、トランスポーターは種々の薬物の吸収、分布、排泄に重要な役割を果たすことが明かとなってきた。従って、トランスポーターによる認識をうまく利用し、標的組織選択的な動態特性をもつ化合物を医薬品として選別していく試みが、今後ますます重要になるものと思われる。一例として、pravastatinなどのHMG-CoA reductase阻害薬は、消化管吸収、肝臓への取り込みと胆汁側への排泄のいずれにもトランスポーターが介在し、効率的な腸管循環を受けると考えられている。このような動態特性は標的臓器が肝臓である薬剤に対して有利であると考えられる。

トランスポーターの介在する動態特性は一方で、臓器毒性の観点からは注意が必要である。副作用臓器におけるトランスポーターを介する能動的な取り込みによる集積性は臓器毒性の発現につながる危険性がある。また、トランスポーターを介した濃縮的な胆汁排泄に起因すると考えられる消化器毒性が、NSAIDsや一部抗癌剤において議論されている。すなわちindomethacinの各動物種における累積胆汁排泄量は消化器毒性と良好な相関のあることが知られ(Fig. 1)、後述する塩酸イリノテカン(CPT-11)の消化器毒性も胆汁排泄との関連性が示唆されている。脳や小腸における排出トランスポーターや、肝臓や腎臓など消失臓器に発現したトランスポーターを介する薬物間相互作用は循環血中や脳中薬物濃度の上昇を引き起こす危険性がある。排泄トランスポーターを介した薬物間相互作用の例として、digoxinとquinidine, quinine, verapamil, methotrexateとprobenecidやNSAIDsとの相互作用が報告されている。

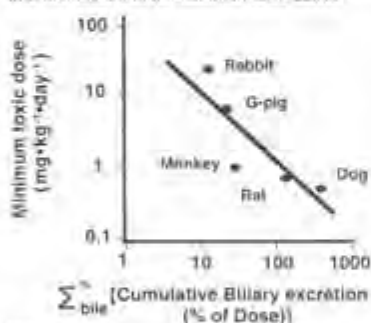
薬物の毒性回避のストラテジーの一つとして、肝腎振り分けの制御が挙げられる。肝腎に発現するトランスポーターによる薬物の肝臓・腎臓への移行性の振り分けは、薬物の全身血中からの消失経路を規定する主要因の一つとなりうる。従って、あらかじめ投与される患者群に腎疾患患者の多いことが明らかな場合、腎消失型の薬物を設計することは、患者の病態の程度による体内動態の個体差を生む結果となり、毒性発現の面から使いづらい医薬品を生む可能性がある。トランスポーターによる輸送をうまく利用することによって、肝臓による代謝・排泄と腎排泄とをほぼ同等に受ける薬剤であれば、そのような個体差による変動は比較的小さなものとなるであろう。今後、トランスポーターが動態を支配する薬物の数が増えるにつれて、このような消失経路のバランスや他の薬物との相互作用の問題にも着目する必要が出てくるものと思われる。



(2) 薬物間相互作用を利用した胆汁排泄トランスポーターの制御によるCPT-11  
 消化管毒性の制御 薬物間相互作用に起因する毒性発現を防ぐためには、相互作用の定量的な予測が重要である。肝トランスポーターを介する薬物間相互作用の予測は、血管側膜、胆管側膜を介した少なくとも2つの膜透過過程を定量的に評価することが必要である。我々は*in vitro*、*in vivo*の双方でこのような両側膜上における輸送を個々に評価することが可能な実験動物(ラット)を用い、*in vitro*情報に基づいた*in vivo*胆汁排泄クリアランス低下の定量的予測を、methotrexateに対するprobenecidによる相互作用を例に、試みた。False negativeを避けるという観点からは、取り込み側と排泄側の相互作用の積が胆汁排泄阻害の見積りに有効であることが示唆される。

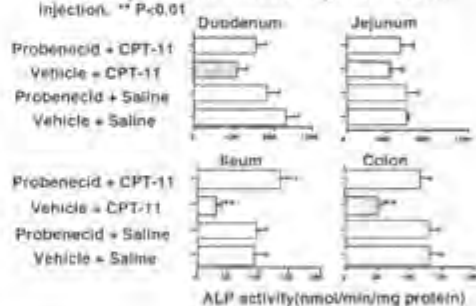
このような定量的予測が可能となれば、薬物間相互作用を積極的に応用した毒性回避の試みも不可能ではないと考える。塩酸イリノテカン(CPT-11)は、活性代謝物SN-38によって幅広い抗腫瘍スペクトルを示す薬物であるものの、一部臨床例で予期せぬ下痢を生じる。この原因の一つとしてSN-38の胆汁排泄が考えられること。排泄がcMOAT/MRP2を介することが我々の研究から明かとなったこと。から、CPT-11による消化器毒性の軽減を目的として、ヒト*in vivo*でSN-38の胆汁排泄を阻害する可能性の最も高い化合物を臨床薬の中から検索したところprobenecidが見いだされた。さらにprobenecidとの同時投与によりCPT-11投与による慢性消化器毒性が顕著に低下し(Fig. 2)、本strategyの妥当性が示唆された。

Fig. 1 Correlation between biliary excretion of indomethacin and its minimum toxic doses



$\frac{CL_{bile} \cdot AUC_0}{Dose} = 100$  (containing the mucosa in the splanchnic circulation).  
 (D. E. Duggan et al., *Biochem. Pharmacol.*, 35, 1748-1754, 1978.)

Fig. 2 Intestinal alkaline phosphatase (ALP) activity at 7th day after the start of repeated CPT-11 injection. \*\* P<0.01



### (3) 引用文献

1. Yamazaki M, Suzuki H and Sugiyama Y. Recent advances in carrier-mediated hepatic uptake and biliary excretion of xenobiotics. *Pharm Res*, 13: 497-513, 1996.
2. Kusuvara H, Suzuki H and Sugiyama Y. The role of P-glycoprotein and canalicular multispecific organic anion transporter in the hepatobiliary excretion of drugs. *J Pharm Sci*, 87: 1025-1040, 1998.
3. Suzuki H and Sugiyama Y. In "Membrane transporters as drug targets" edited by G. Amidon and W. Sadee, Plenum Publishing Corp., New York, pp. 387-440, 1999.
4. Chu XY, Kato Y, Ueda K, Suzuki H, Niinuma K, Tyson CA, Welzer V, Dabbs JE, Froehlich R, Green CE and Sugiyama Y. Biliary excretion mechanism of CPT-11 and its metabolites in humans; involvement of primary active transporters. *Cancer Res*, 58: 5137-5143, 1998.

○武田理夫、遠藤仁

杏林大学医学部薬理学教室

腎において、近位尿細管には薬物を濃縮的に取り込む薬物トランスポータが存在するため、それらの薬物が細胞内に蓄積し障害をうけやすい。主な薬物トランスポータとしては、有機アニオントランスポータ(OAT)と有機カチオントランスポータ(OCT)が挙げられる。近年これらの近位尿細管に存在する薬物トランスポーター遺伝子が次々に単離され、近位尿細管における薬物輸送機構の詳細が次第に明らかにされつつある。これまでに我々の研究室で単離された OAT ファミリー遺伝子は、近位尿細管基底側に存在する OAT1 および OAT3、そして上皮側に存在する OAT4 である。今回はこれらの OAT ファミリー(ヒトおよびラット OAT1、ヒトおよびラット OAT3 およびヒト OAT4)を安定発現した近位尿細管細胞を用いて、薬物性腎障害発症および進展に関与する薬物輸送の分子機構および制御について得られた知見を紹介する。

#### ①セファロリジン (CER)、オクラトキシン A (OTA) 腎障害の責任 OAT の同定と OAT 間の基質認識の違い

Beta-lactam 系抗生物質である CER は最初に開発されたセファロsporin系抗生物質であるが、腎障害性が高く現在は臨床的には用いられていない。しかしながら薬物性腎障害の実験モデルとしてはしばしば用いられている。一方 OTA は、バルカン地方に多発する慢性間質性腎炎であるバルカン腎症の原因物質の一つと考えられているカビ毒である。これらの腎障害においては従来より基底側の OAT により取り込まれ、上皮側の排出が制限されていることから細胞内に蓄積し腎障害を惹起すると考えられていた。我々の検討により、これらの薬物輸送および腎障害には基底側の OAT1、OAT3 が関与することが明らかにされたが、両者の基質認識には差異が認められた。

#### ②メトトレキサート (MTX)の尿中排泄における薬物間相互作用の作用点としての OAT

抗腫瘍薬 MTX は OAT を介して尿中に排泄されると考えられているが、非ステロイド性消炎鎮痛剤などの併用により尿細管分泌が低下する。そして血中濃度

が上昇し糸球体濾過量が増加することにより、尿細管腔中の MTX 濃度が上昇し、MTX が析出、沈澱し尿細管閉塞による急性腎不全を来す。このような MTX 輸送および薬物相互作用の作用点としての OATファミリーが同定された。

### ③薬物性腎障害の細胞内メデイエーターである活性酸素のトランスポータ機能への影響

抗腫瘍薬シスプラチン、アミノグリコシド系抗生物質ゲンタミシンあるいはCERなどによる腎障害の細胞内メデイエーターとして、従来より活性酸素の関与が知られていた。薬物性腎障害において発生した活性酸素が OAT の機能に影響を与えるかを H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を添加して検討した。その結果 OAT1 および OAT3 の輸送活性は、共に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> により downregulation され、そしてそれは V<sub>max</sub> の低下によることが明らかにされた。

これらの結果により、薬物性腎障害の原因薬物の取り込みあるいは排出の分子機構が明らかにされ、腎障害発症機構がより明確になる。さらには hOAT ファミリー安定発現細胞は、新たに開発される薬物の腎排泄性、腎障害性および薬物相互作用を開発早期において予測可能なスクリーニング系として今後有用であると考えられる。

### Drug-induced Nephrotoxicity and Transporters

Michio Takeda and Hitoshi Endou, Dept. of Pharmacology and Toxicology, Kyorin Univ. Sch. of Med., Mitaka-shi, Tokyo, 181-8611

辻 彰、玉井郁巳

金沢大学薬学部

薬物の中枢毒性あるいは中枢性副作用は脳内に侵入することにより惹起されるが、脳内移行性は多くの物質に対して血液-脳間の物質交換を司る血液脳関門の生体防御機構によって制御されている。一般に物質の細胞膜透過性は透過分子の脂溶性に依存するが、血液脳関門を形成する脳毛細血管内皮細胞の場合はたとえ脂溶性物質であっても末梢組織と比べて組織移行性が抑制されている。現在ではそのメカニズムの一つとして脳内（内皮細胞内）から血液中に不要異物・毒物を汲み出すトランスポーターの存在が明らかになってきた。1992年、我々は多様な脂溶性抗がん剤をがん細胞外へと排出することにより癌を耐性化するトランスポーター P-糖タンパクが、血液脳関門を形成する脳毛細血管内皮細胞の血液側膜に存在し、薬物の脳内移行に対するバリアーとして働くことを報告した。その後、P-糖タンパクをコードする *mdr1a* 遺伝子を欠く *mdr1a* 欠損マウスが報告され、数種の薬物の脳内移行制限機構としての P-糖タンパクの役割が遺伝子レベルで明らかにされた。

キノロン系抗菌薬は幅広い抗菌スペクトラムを有しており、また消化管吸収性や組織移行性に優れているため頻用される抗菌薬である。しかし、一部の誘導体は中枢性副作用としてけいれん作用を引き起こすので、本抗菌薬の脳移行性評価は重要である。我々は、分布容積が大きいにもかかわらずキノロン系抗菌薬の脳/血漿中濃度比(Kp)が小さい原因として、中枢解毒にかかわる排出型トランスポーターの関与を仮定し検討を行った。その結果、新規のキノロン系抗菌薬である HSR-903 あるいは grepafloxacin については、*in vitro* および *in vivo* 血液脳関門透過・取り込み実験において、用いたキノロン系抗菌薬の濃度上昇とともに脳移行の指標としての Kp 値の増大が観測された。本結果は、汲み出し方向に働くトランスポーターの飽和によって説明される現象と解釈される。さらに P-糖タンパクの関与について *mdr1a* 遺伝子欠損マウスを用いたところ、多くのキノロン系抗菌薬で P-糖タンパク欠損によって Kp 値が顕著に増大することが見出された。

抗アレルギー薬である H<sub>1</sub> アンタゴニストの中には副作用として眠気を催すものがあるが、この副作用も本薬物の脳移行性に起因していると考えられる。H<sub>1</sub> アンタゴニストは大きく塩基性と両性イオン型に分類される。脳移行性あるいは血液

脳関門透過性を測定すると明らかに塩基性誘導体のほうが高い。さらに、内皮細胞内取り込み過程において mepyramine のような塩基性化合物は、トランスポーターが関与する現象を示した。さらに、cetirizine のような両性イオン型誘導体は本トランスポーターに対する親和性が低かったことから、血液脳関門において脳内移行に関わるトランスポーターへの親和性が中枢性副作用と関連することが示唆された。一方、terfenadine や ebastine のようなカチオン型  $H_1$  アンタゴニストは、肝代謝によって両性イオン型に変換される。Ebastine の両性イオン型代謝物である carebastine の脳移行性を brain uptake index (BUI) 法によって求めた場合、ラットにおける BUI 値は ebastine の 10% 程度まで低下し、中枢性副作用が惹起されにくくなるものと考えられた。一方、 $H_1$  アンタゴニストは P-糖タンパクによって脳外に汲み出されることも見出された。*mdr1a* 遺伝子欠損マウスに対して放射性標識 ebastine あるいは carebastine を静脈内投与した時、脳組織内全放射活性は正常マウスに比べていずれも 5 倍以上増加し、明らかに両性イオン型、カチオン型いずれも P-糖タンパクが脳移行障壁となることが明らかになった。*mdr1a* 遺伝子欠損動物の場合も ebastine の脳移行性は carebastine よりも高く、両性イオン型の carebastine に変換されることで中枢性副作用が現れにくくなるものと考えられる。

強心配糖体の digoxin も P-糖タンパクによる排除を受けるが、*mdr1a* 遺伝子欠損マウスで digoxin の脳移行動態を解析すると、組織結合に起因すると考えられる長期に渡る脳内蓄積性を示す。同様の digoxin の脳内蓄積性の増加は、cyclosporin A のような P-糖タンパク阻害剤の併用によっても観測される。したがって、トランスポーターを介した組織分布性が競合するような場合は、血中濃度変化以上に組織内濃度が変動し、その中枢毒性が予測されにくいことに注意を要する。

以上、P-糖タンパクが中枢解毒機構として重要であることを示したが、血液脳関門には他の排出型トランスポーター群が中枢解毒の役割を演じている。上述したキノロン系抗菌薬は、P-糖タンパク以外のトランスポーターである MRP や分子の実体が不明なアニオン交換輸送系によって血液中へ汲み出される可能性が示された。grepafloxacin についてラット脳灌流法によって血液脳関門透過性を評価した場合、P-糖タンパクに影響しないアニオン交換輸送阻害薬 DIDS によって脳移行性は増加する。Carebastine については *mdr1a* 遺伝子欠損マウスにおいても非線形的に脳内移行性が増大し、複数の排出型トランスポーターの存在を示唆する結果を得た。したがって、血液脳関門には排出に働く複数のトランスポーターが備わっており、様々な化合物の中枢解毒に働いているものと推測される。このような中枢解毒型トランスポーターに対して阻害剤となる薬物等の併用投与によって中枢毒性が惹起される可能性もある。正常な状態では血液脳関門型トランスポーター群によって維持されている中枢機能が、病態・併用薬物などによるトランスポーター活性変動によって大きく影響される可能性が予測される。したがって、血液脳関門トランスポーター群の分子の実体の解明ならびにそれらの量的重要性に関する理解が必要である。

メチル水銀等毒物の血液-組織関門通過の  
分子機序

金井好克、車碩鎬、金徒慶、遠藤仁

杏林大学医学部薬理学教室

血液から組織への物質移行は、その障壁としての血液-組織関門によって高度に制限され、特に親水性物質の関門の通過は、そこに存在するトランスポータによりその選択性が決定されている。化合物の臓器毒性の発現は、標的細胞の感受性とともにもその体内動態が重要な決定因子となるが、特に神経系や胎盤など血液-組織関門の強固な臓器においては、関門の透過性が臓器毒性を大きく左右する。その最も顕著な実例の一つが、水俣病の起因物質として知られるメチル水銀である。メチル水銀は、無機水銀とは異なった毒性を示すが、これはメチル水銀の体内動態が、無機水銀とは著しく異なることが大きな要因となる。メチル水銀は、チオール基を持つ化合物と生体内において容易に反応し付加体を形成するため、その体内動態はシステインなどのチオール基を持つ低分子化合物の動態と密接に関わっている。

メチル水銀のシステイン抱合体は、種々の実験的証拠から中性アミノ酸輸送系 L を介して血液-脳関門や胎盤関門を通過すると想定されていた。輸送系 L は、 $\text{Na}^+$ -非依存的にメチオニンを含む大型の中性アミノ酸を輸送する輸送系であり、広い基質選択性を有し、アミノ酸類似の薬物や毒物の透過経路となることからその分子の実体の解明が待たれていたものである。最近われわれはその分子クローニングに成功し、LAT1 (L-type amino acid transporter 1) 及び LAT2 の 2 つのアイソフォームが存在することを明らかにした<sup>1,2)</sup>。LAT1 及び LAT2 をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、メチル水銀輸送活性を検討したところ、両者ともに  $^{14}\text{C}$ -メチル水銀単独では輸送しないが、そのシステイン抱合体に対して有意な輸

送活性を示した。その取り込みは、濃度依存的であり輸送系 L の抑制薬によって抑制された。すなわち、クローニングした輸送系 L トランスポータ LAT1 及び LAT2 を用い、メチル水銀がシステイン抱合体としてアミノ酸輸送系 L を介して輸送されることが実証されたことになる。LAT1 及び LAT2 の特異抗体を用いた免疫組織化学的検討により、LAT1、LAT2 は血液-脳関門及び胎盤関門に存在することが示された。LAT1 及び LAT2 はメチル水銀の関門透過の経路となると考えられる。

外来性異物や内因性物質の抱合体の多くは、有機アニオン輸送系を介して輸送される。メチル水銀の体内動態においても、アミノ酸輸送系以外に有機アニオン輸送系の関与が指摘されてきた。われわれが以前同定した、脳及び腎に発現する多選択性有機アニオントランスポータ OAT1<sup>31</sup> (organic anion transporter 1) 及び OAT3<sup>32</sup> について、メチル水銀及びそのシステイン抱合体の輸送を検討したところ、OAT3 がメチル水銀及びそのシステイン抱合体をとともに輸送することが明らかになった。OAT3 は腎近位尿細管上皮細胞の血管側に存在し、メチル水銀による腎毒性の発現に関与すると考えられる。OAT3 は神経系にも強い発現が見られ、メチル水銀の神経毒性との関わりに興味もたれる。

本研究によりメチル水銀がシステインとの抱合体を形成することにより、アミノ酸輸送系及び有機アニオン輸送系により輸送されることが示された。特に、血液-脳関門や、胎盤関門のアミノ酸トランスポーター LAT1 及び LAT2 は、メチル水銀の関門通過の重要な経路として位置づけられたことになる。

#### 参考文献：

- 1) Kanai, Y. et al. *J. Biol. Chem.*, 273: 23629-23632 (1998).
- 2) Segawa, H. et al. *J. Biol. Chem.*, 274: 19745-19751 (1999).
- 3) Sekine, T. et al. *J. Biol. Chem.*, 272: 18526-18529 (1997).
- 4) Kushihara, H. et al. *J. Biol. Chem.*, 274: 13675-13680 (1999).

## シンポジウム 2

---



安東 潔

(財) 実験動物中央研究所, 科学技術振興事業団

精神行動毒性の評価法について論じるためには、まず精神行動毒性とは何であるかについて明らかにしたうえで、その評価法について述べる必要がある。そこで、化学物質の中樞神経系に関する機能毒性を精神毒性と行動毒性に分けて考え、さらにこれらの神経学的基盤であり、形態的な変化としてもとらえうる神経毒性について、サル類を用いたパーキンソン病モデルの実験を例にとり考えよう。

この実験では、カニクイザルやコモンマーモセットなどのサル類に MPTP を反復投与すると黒質のドーパミン神経が破壊され、振戦、無動、筋固縮、姿勢保持障害などのパーキンソン病様の症候が発現される<sup>2)</sup>。これをパーキンソン病モデルと考えて、各種の薬物のこの症候に対する改善効果の有無から抗パーキンソン病薬の薬効を評価する試験法が広く利用されている<sup>3)</sup>。

このような実験の流れを横糸として、化学物質の標記毒性とその評価法を縦糸として以下のストーリーを組み立てた。MPTP の黒質-線条体系のドーパミン作動性神経破壊は同物質の神経毒性によると考えられ、その毒性は脳の病理組織学的検索などにより把握されうる<sup>4)</sup>。この神経破壊は前述のパーキンソン病様の運動障害をもたらす。このような MPTP による行動毒性は肉眼による症候観察や自発運動量測定、学習行動観察などの行動的検索法により把握される。MPTP の反復投与中には中樞神経興奮やカニクイザルなどでは幻覚様の行動がみられる場合がある。しかし、言語的伝達手段のないサルではこれが幻覚なのかどうかについて知るすべはない。したがって、このような行動のみから MPTP の精神毒性の有無を論じることはむづかしい。

さて、MPTP で惹起されたパーキンソン病様の症候に対する L-DOPA の効果について検索する薬効評価試験について述べよう<sup>1)</sup>。症候を発現しているマーモセットに L-DOPA を投与すると 5 ないし 10 mg/kg, i.p. で肉眼的に観察した障害スコア得点が減少し、赤外線感知センサーで記録した自発運動量が増加する。このことは、運動量として客観的に定量的に測定された無動を含めた症候が改善されたことを意味する。そして、これらの用量はヒトでの臨床用量に近いものであり、その意味ではここで述べた試験は抗パーキンソン病薬の薬効評価試験として sensitive で valid なものといえる。さて、L-DOPA の用量を 20 mg/kg 以上に

したらどうなるであろうか。自発運動量はさらに増加するが、症候観察により過度な中枢神経興奮としての常同行動などがみられる。薬効の指標であった自発運動量増加がこの時点で行動毒性の指標に転じるのである。肉眼的症候観察のうち運動機能とは別に、サルが観察者を凝視するなどの刺激-反応機能は高用量のL-DOPAでは障害されている。臨床では患者が常用量のL-DOPAを連用すると幻覚妄想などの精神毒性が発現する場合があるが、マーモセットの高用量の効果はヒトでのこのような毒性とどの程度相関があるのか興味深い研究課題である。

以上で、サル類のMPTPによるパーキンソン病モデルを用いた薬効評価試験をとおして、神経毒性、行動毒性、精神毒性がどのように把握されるのがあるいは把握されないのかについて述べた。前2者の毒性は動物実験である程度直接的に観察でき、それをヒトに外挿することができる。しかし、精神毒性は動物実験から直接観察できるものではなく、ヒトへの外挿については推測によらざるおえない。現在のところ、幻覚妄想などを含むアンフェタミン類のヒトでの中枢神経興奮効果は、サルなどでは幻覚様行動として、ラットなどでは自発運動の亢進として把握されているが、ヒトでのこれらの薬物の臨床事例を動物実験にフィードバックさせて研究を進めることは重要である。

さらに、行動毒性について付言すれば、その内容をより細かくみてゆくと運動機能、感覚機能、学習記憶認知機能、動機づけ、覚醒の程度などの障害に分類されうる。しかし、実際の行動はこれらの概念上の要素が統合されて行動機能を発現しているのであるから、分析的に機能要因をつきとめようとするには自己矛盾が存在する。

行動毒性は以上のような様々な要因を含んでいるので、単一の実験のみで測定しようとするには無理がある。まずは、生体の統合された機能としての行動に対する化学物質の影響を検索し、次に特定の行動機能におよぼす影響を見定める場合には、それに則したsensitiveでvalidな試験を実施する必要がある。精神毒性については、ヒトでの化学物質の意識レベルでの毒性発現事例を参考にして動物での行動実験の結果を考察する必要がある。

謝辞：本研究の一部は、喫煙科学研究財団および科学技術振興事業団戦略的基礎研究「脳を守る」などの助成による。

#### 引用文献

- 1) 安東潔：神経疾患研究動物としてのコモンマーモセットの利用—パーキンソン病モデルの作成と薬効評価試験法の検討—。アニテックス1999; 11: 14-18.
- 2) Langston JW, Forno LS, Rebert CS, Irwin I. Selective nigra toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey. *Brain Res* 1984; 292: 390-394.
- 3) Nomoto M, Iritane M, Fukuzaki K, Fukuda T. Effects of bifenelane on parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the common marmoset. *Neuro Sci Letters* 1994; 178: 95-98.

○喜多大三、中嶋敏勝

奈良県立医科大学薬理学

覚醒剤の乱用はヒトにおいて強度の精神依存を引き起こし、精神分裂病様の幻覚・妄想を伴う精神毒性を発現する。また、覚醒剤への生体の感受性は長期間影響を受け、感受性亢進または逆耐性現象と呼ばれる現象を発現させる。この現象は実験動物においても再現できるため、精神分裂病の再燃現象におけるモデル動物の一つと考えられている。このモデル動物は、比較的低用量の覚醒剤反復投与によって発現する自発運動および常同行動を指標としている。他方、覚醒剤を用いたもう一つのモデル動物は、神経毒性のモデルに使用されている。このモデルは、覚醒剤の中から高用量の反復投与あるいは一回大量投与で発現する。この覚醒剤による神経毒性の特徴は、線条体・海馬におけるドハミンおよびセロトニンの変性および破壊を特徴としており、ドハミン神経毒性のモデル動物の一つとしても考えられている。

我々は、この覚醒剤のメタンフェタミンを反復投与することによって発現する神経毒性モデル動物を用いてその発現機構および行動変化について研究を進めている。このメタンフェタミンの反復投与によって発現する神経毒性は、線条体におけるドハミンの過剰遊離がその主たる要因と考えられ、その過剰遊離したドハミンから生成される活性酸素分子種の関与を指摘してきた。最近では、細胞内エネルギー代謝の変動、グルタミン酸神経系および一酸化窒素などの関係が示唆されている。この神経毒性発現時における全身症状としては、顕著な体温上昇ならびに常同行動がみられる。我々は、この神経毒性発現に伴う行動変化が投与量の増加に伴って自傷行動を発現させ、メタンフェタミンによる内

在性ドハミンの遊離と関係しているので、メタンフェタミンによる神経毒性発現の行動指標になりうる可能性を推測する。前述の逆耐性モデルにおける常同行動変化において、嗅ぎ行動から、覚醒剤の反復投与によって詰めおよび咬みへの移行が報告されている。このように覚醒剤の神経毒性発現時における行動変化は、逆耐性モデルにおける常同行動の行動変化との類似点も考えられる。

今回、覚醒剤による精神行動毒性の評価を、メタンフェタミンによる行動とその神経毒性発現機構の両面から考察する。

○成田 年, 鈴木 勉

星薬科大学 薬品毒性学教室

精神行動毒性は主として中枢神経系の機能を障害する毒性であり、感覚、思考、運動などの障害を中心とする外因性の精神機能障害を意味する。精神行動毒性の一つとして薬物依存があげられるため、本研究においてはmorphineによる精神依存形成におけるグルタミン酸神経系ならびに細胞内情報伝達機構の検討を行った。

グルタミン酸受容体の一つであるNMDA受容体は、高い $Ca^{2+}$ の透過性と $Mg^{2+}$ ブロックなどの特異なチャネル特性を有しており、さらにNR1およびNR2の2つのサブユニットから構築されることが明らかにされている。NR2サブユニットにはさらに4種(NR2A-NR2D)のサブファミリーが存在し、それぞれ発現時期、発現部位が異なることが知られており、NMDA受容体サブユニットのうち、NR1およびNR2Aサブユニットはほぼ脳全体に広く分布しているが、NR2Bサブユニットは大腦皮質、海馬、線条体などの前脳に限局することが明らかにされている。

本研究において、マウス脳分画膜標本を用いてNMDA受容体サブユニットのC末端領域に対する抗体の選択性をWestern blot法により確認し、脳内におけるNMDA受容体サブユニットの分布について検討したところ、NR1、NR2AおよびNR2Bのいずれのサブユニットも、大腦皮質、海馬において高密度に認められた。また、前脳辺縁部においてもその存在が確認されたが、中脳領域においてはいずれのサブユニットの存在も認められなかった。さらに、NMDAを尾静脈より持続注入することにより痙攣を発現させ、これらNMDA受容体サブユニットに対する選択的抗体の脳室内処置による抗痙攣作用、およびその効果の持続性について検討した。その結果、いずれのサブユニットの抗体前処置によっても、対照群に比べ有意な痙攣閾値の上昇が認められ、この効果は抗体処置後3日間持続することが明らかとなった。

一方、morphineをはじめとする麻薬性鎮痛薬の連用による鎮痛耐性や身体依存の形成、さらには精神依存形成がNMDA受容体拮抗薬であるdizocilpineの処置により抑制されることが報告されている。Dizocilpineは、NR1/NR2AおよびNR1/NR2BサブユニットからなるNMDA受容体に同程度の親和性を有することが明らかにされている。本研究においては、NMDA受容体拮抗薬によるmorphine誘発報酬効果の抑制作用にいずれのサブユニットが関与しているかを明確にするために、conditioned place preference (CPP)法を用い、morphine誘発報酬効果に対する特異的抗体前処置の影響を検討した。その結果、NR2Bの抗体前処置によってのみ、有意な報酬効果の抑制が認められ、NR1およびNR2Aサブユニットの抗体前処置によっては、何ら有意な影響は認められなかった。さらに、morphineにより条件づけされたマウスの脳分画膜標本において、前脳辺縁部のNR2Bサブユニットが特異的にup-regulationすることを見いだした。近年当教室において、NR2Bサブユニットを含むNMDA受容体を選択的に拮抗するifenprodilにより、morphine誘発報酬効果は著明に抑制されることを報告している。これらのことから、NMDA受容体サブユニットのうち特にNR2Bサブユニットがmorphine誘発報酬効果の形成に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

さらに、近年の分子生物学的研究によりNMDA受容体サブユニットのC末端領域は、protein kinase C (PKC)によるリン酸化部位であることが明らかにされている。本研究では、NMDA受容体の機能調節に関する細胞内情報伝達機構、特にPKCの関与について詳細な検討を行なった。PKC阻害薬であるcalphostin Cは、用量依存的にmorphine誘発報酬効果を抑制した。一方、morphine誘発報酬効果発現時に中枢神経に多く存在し、慢性疼痛のようなシナプスの可塑性に関与することが知られているPKC $\gamma$  isoformのみが前脳辺縁部において特異的にup-regulationすることを見いだした。以上、本研究により側坐核のNR1/NR2Bサブユニットで構築されたNMDA受容体が、morphine誘発報酬効果の発現に重要な役割を果たしていること、さらにmorphine誘発報酬効果発現の一部にPKC $\gamma$ の活性化が関与していることを明らかにした。また、これらの結果はNR1/NR2Bサブユニットで構築されたNMDA受容体のC末端領域に存在するPKCによるリン酸化部位を封鎖することにより、長期増強のようなNMDA受容体の持続的な活性化を抑制し、morphine誘発報酬効果を抑制することが可能であることを示唆している。

○野田 幸裕, 鍋島 俊隆

名古屋大学大学院医学研究科医療薬学・附属病院薬剤部

非競合的 N-methyl-D-aspartate 受容体拮抗薬のフェンシクリジン (PCP) は、分裂病様症状に類似した陽性症状、陰性症状あるいは認知障害などの精神毒性 (PCP 精神病) を発現する。一方、実験動物に PCP を急性あるいは連続投与すると様々な行動異常が惹起されるが、PCP 連続投与後の精神行動毒性を評価した報告はほとんどない。本発表では、当研究室においてこれまでに評価した PCP 連続投与マウスにおける精神行動毒性について報告する。

### 1. 潜在学習能力 (注意力) 低下の評価

この試験は、マウスが一度短時間であるが、曝された環境をどれだけ認知しているかを調べるもので、装置の構成についての空間的記憶とその中にある給水用のノズルの位置についての記憶能を評価することができる。また、この記憶は自由な探索行動の中で特別に強化されることなく獲得されるため、動物の潜在的な学習能力を反映すると考えられている。この試験は訓練試行とテスト試行からなり、訓練試行では十分に水を与えたマウスを装置内に入れてから給水ノズルを見つけるまでの潜時 (finding latency) を測定した。PCP (10 mg/kg/day) を 14 日間連続投与し、休薬 1 日後にテスト試行を行ったところ、finding latency が有意に延長し、潜在学習が障害されていた。しかし、メタンフェタミン (1 mg/kg/day) を 14 日間連続投与したマウスでは、そのような障害は認められなかった。

### 2. 社会的行動低下の評価

Social interaction 試験は、2 匹の動物間で認められる良い嗅ぎ行動や追尾行

動などの自発的な行動を指標として、動物の社会的行動を評価する実験系である。PCP (10 mg/kg/day) をマウスに 14 日間連続投与し、休薬 3, 7, 21, 28 日後に social interaction 試験を行ったところ、saline 連続投与マウスと比較して社会的行動が有意に低下していた。しかし、PCP (10 mg/kg/day) を 7 日間およびメタンフェタミン (1 mg/kg/day) を 14 日間連続投与したマウスでは、そのような低下は認められなかった。

### 3. 意欲低下の評価

動物にストレスを与えたときに誘発される精神障害の評価として、強制水泳試験において観察される無動状態がある。すなわち、マウスやラットを水を入れた狭いシリンダー内に入れると、最初は水から逃れようと激しく遊泳するが、やがて水中での動きを止め、無動状態を呈するようになり、実験動物の意欲低下を評価できる。我々は、一度強制水泳というストレスを受けた動物に PCP を連続投与した後、再び強制水泳というストレスを負荷した時の無動状態が PCP 連続投与によってどのように影響されるか検討した。PCP (10 mg/kg/day) を 14 日間連続投与し、休薬 1 日後に各マウスの無動時間を測定したところ、無動時間が saline 連続投与群に比べ有意に延長し、強制水泳による無動状態が増強された。この増強作用は、PCP 休薬 28 日後まで観察された。しかし、PCP (10 mg/kg/day) を 5 日間およびメタンフェタミン (1 mg/kg/day) を 14 日間連続投与したマウスでは、そのような増強は認められなかった。一方、無動状態の増強を示した PCP 連続投与マウスの脳内モノアミン作動性神経機能を調べたところ、前頭前皮質におけるドパミン代謝回転は低下しており、逆にセロトニン代謝回転は亢進していた。従って、PCP 連続投与マウスに認められた精神行動障害の発現機序に脳内モノアミン作動性神経系の機能障害が関与している可能性が示唆された。

以上の様に、PCP はメタンフェタミンと異なり、多彩な精神行動障害を惹起し、これらの精神行動毒性は、ある一定期間 PCP を連続投与すると惹起され、休薬後も数週間以上持続する。また、PCP の精神行動毒性は、精神分裂病様症状と類似していることから、PCP による精神行動毒性の発現機序が解明されれば、精神分裂病の発症機序の解明にも重要な手がかりになるものと思われる。





シンポジウム「核内ステロイドホルモン受容体(PPAR)の  
薬効・毒性への関与」

須賀 哲弥

東京薬科大学 薬学部 臨床化学教室

PPAR(peroxisome proliferator-activated receptor)は核内ステロイドホルモン受容体群の一種であり、現在PPAR $\alpha$ 、PPAR $\beta$ ( $\delta$ )、PPAR $\gamma$ の3種の存在が知られている。これらは糖尿病・高脂血症・炎症など種々の疾患の病態解明の研究や新しい作用メカニズムを有する医薬品開発の標的受容体として注目されている。一方で、PPARに対するリガンドとなるある種の医薬品が、その副作用として肝障害や肝臓癌の発生を誘起することも知られており、毒性学的にも注目される場所である。

本シンポジウムでは、(1)PPARの構造と機能・PPAR調節機構に関する新しい情報(京都大学 河田照雄)、(2)PPAR $\alpha$ ノックアウトマウスにおけるエタノール依存性障害(信州大学 青山俊文)、(3)糖尿病と肥満におけるPPAR $\gamma$ の生理学的意義(東京大学 門脇 孝)、(4)PPAR $\gamma$ とインスリン感受性増強薬(京都大学 吉政康直)、(5)PPARとフタル酸エステルの毒性(名古屋市立大学 今井田克巳)、(6)ペルオキシソーム増殖薬による発肝癌(東京薬科大学 渡辺隆史)などについて新しい情報を交換し、PPARの毒性学的意義について議論しようとするものである。

○河田 照雄、高橋 信之

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻  
生研機構 肥満・脂質代謝研究プロジェクト

ペルオキシソーム増殖剤応答性レセプター (peroxisome proliferator-activated receptor: PPAR) は、発見当初リガンドが不明ないわゆるオーファンレセプターであった。しかし、そのリガンドが薬理的な作用、特にチアゾリジン誘導体のごとくインスリン抵抗性や脂質代謝の改善、さらには血管機能、炎症や発ガンなどにも重要な役割を果たすことが判明するに至り病態生理学的にきわめて重要なレセプターとして位置づけられるようになってきた。

I. PPARサブタイプの発現と機能: PPARは1990年に初めてマウス肝臓から $\alpha$ 型遺伝子をはじめとしてクローニングされ、その後種々の動物種および臓器から複数のPPARサブタイプ遺伝子が見いだされている。哺乳動物では、 $\alpha$ 、 $\delta$  [ヒトではNUC1、マウスではFAAR (fatty acid-activated receptor)、カエルではPPAR $\beta$ とも呼ばれている]、および $\gamma$ の3種類が明らかとなっている。 $\alpha$ 型は主として肝臓、その他心筋や消化管に発現が認められる。 $\delta$ 型は組織特異性がみられず普遍的に発現しているが脳内での発現がやや多い。 $\delta$ 型は他の2種のサブタイプに較べるとその生理的機能が全くわかっておらず今後の解明が期待される。一方、 $\gamma$ 型遺伝子はさらに $\gamma$ 1型と $\gamma$ 2型の2種類のアイソホームが知られており、それらはPPAR $\gamma$ 遺伝子のプロモーター選択によって5'末端の異なるmRNAから生成される。 $\gamma$ 1型は、脂肪組織や免疫系臓器、副腎、小腸で発現している。 $\gamma$ 2型は脂肪細胞で特異的な発現がみられ、脂肪細胞の分化と深く関連していると考えられている。さらにヒト脂肪組織や大腸では第3番目のアイソホーム、 $\gamma$ 3型のmRNA (翻訳産物は $\gamma$ 1型と同じ) が存在し、コレステロール代謝の制御因子であるADD1/SREBP-1による転写制御が明らかとなってきており興味深い。どのPPARも、RARなどの他の核内レセプターと同様にRXRと安定なヘテロ二量体を形成して標的遺伝子の特異的なDNA認識配列 (PPRE) に結合し転写調節を行う。PPARの標的遺伝子は数多く、このことがPPAR機能の多様性を生み出している。

II. PPARリガンド: PPARサブタイプの特徴のひとつは、化学構造的に極めて多様な化合物をリガンドとすることである。また、 $\alpha$ 、 $\delta$ 型がクロフィブレート類、フタル酸エステルや脂肪酸およびその誘導体。また $\gamma$ 型が新規インスリン抵抗性改善剤であるチアゾリジン誘導体やプロスタグランジン代謝物の一種である

15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J<sub>2</sub>などをリガンドとしているようにPPAR各サブタイプ間でリガンドの結合あるいは活性化特異性が認められる。このことは各サブタイプ間のリガンド結合ドメインの相同性が低いことや、PPAR $\gamma$ リガンド結合領域のX線構造解析によりリガンド結合空間が他の核内レセプターよりも広いことから支持されている。興味深いことに最近、PPAR $\gamma$ の内因性リガンドとして酸化LDL由来のリノール酸酸化物が同定され、泡沫細胞における遺伝子発現制御のキーレギュレーターとしてもPPAR $\gamma$ が注目されはじめている。今後、循環器研究領域においてもPPARは重要な位置づけとなるであろう。また、リノール酸やエイコサペンタエン酸などの食事から由来するポピュラーな脂肪酸類が、程度の差はあるものの直接PPAR全てのサブタイプのリガンドになることが示されてきている。PPARは広く脂質代謝系遺伝子の発現調節を行うことから、脂質代謝におけるPPARの分子センサーとしての新たな生理的機能が注目される。

III. PPAR調節機構：以前から脂肪細胞の分化は細胞増殖因子により抑制されることは良く知られていたが、最近、増殖因子刺激によって活性化されるMAPキナーゼによってPPAR $\gamma$ がリン酸化を受け不活性型となることが示された。つまり、正常な状態ではPPAR $\gamma$ はリン酸化システムによってリン酸化を受けて不活性型となり機能が抑制されているものと推察される。さらに最近、核内レセプターとタンパク質-タンパク質相互作用し、転写の活性化能を正あるいは負に制御するコアクチベーターやコリプレッサー（共役因子）の性状が急速に明らかにされつつある。核内レセプターによる転写活性化に必須のコアクチベーターとしてCBP (cAMP Response Element Binding-protein Binding Protein)が1996年に報告された。CBP (CBP/p300)はさまざまな組織で普遍的に発現し、核内レセプターのみならず、Jun, Fos, C/EBP $\beta$ , pp90<sup>ras</sup>, NF- $\kappa$ B, MyoD, p160(SRC-1)、ヒストンアセチラーゼ、さらにはSTATなどさまざまな情報伝達系の分子と複合体を形成しインテグレーターとして機能していることが判明してきた。例えば、脂肪細胞の分化に影響する外来性因子は以前から多数報告されていたが、興味深いことにそれらの因子のほとんどは情報伝達経路の下流で種々の転写因子を介してCBPと相互作用しうること明らかとなっている。また、ごく最近白色脂肪細胞の分化に関わるPPAR $\gamma$ のコアクチベーターとしてPGC-2 (PPAR $\gamma$  co-activator 2)が報告された。PGC-2は、CBPがPPAR $\gamma$ のAF-2領域に結合するのとは異なり、AF-1領域に結合して転写活性を増強させ、さらに興味深いことに他のPPARサブタイプとは相互作用しないという。レセプターサブタイプ選択的なコアクチベーターとPPARの相互作用は、PPARの生理機能の多様性を考察する上で極めて重要であろう。このようにPPAR $\gamma$ の機能発現は、増殖因子/MAPキナーゼ系によるPPARタンパク質のリン酸化活性修飾やADD1/SREBP1転写因子を介したPPAR $\gamma$ 及びそのリガンド生成の制御、さらにはCBPなどのコアクチベーターを介したPPAR $\gamma$ 自身の転写活性化能などの複数の調節機構が存在する。このような微細なPPAR $\gamma$ 機能の調節機構は、 $\gamma$ 型以外のサブタイプにおいても存在する可能性があり、今後の重要な研究課題となるであろう。

○青山俊文<sup>1</sup>、中島(那須)民江<sup>2</sup>信州大学医学部加齢生化学<sup>1</sup>、衛生学<sup>2</sup>

慢性エタノール投与により、ヒビ等の実験動物では肝臓障害を容易に生じることが知られているが、マウスやラットでは脂肪肝やspotty necrosis よりも進んだ症状には至らない。このため、エタノール依存性障害の発症機構の解析については、適したモデル動物が使用出来ない状況にあった。この不便を克服するために、ラットに外科的処理を施し、液体エタノール食を強制投与する Tsukamoto-French モデルが開発された。このラットにおいては、肝臓に炎症、繊維化、zonal necrosis、肝肥大、脂肪肝等ヒトに見られる典型的な肝臓障害が生じる。しかし、肝臓障害の発症頻度は低く、より重度の障害をより高頻度に形成させるために非常に高いエタノール濃度を必要とする点で、理想的なモデル動物とは言い難い。

我々は、PPAR $\alpha$  ノックアウトマウスに対し、種々のストレスを与え、表現型の変化を励起させ、そのメカニズムを分子レベルで解析する研究を行ってきた。PPAR $\alpha$  ノックアウトマウスに4%エタノールを含む Lieber の液体食を、野性型マウスに対して pair-feeding となるように一ヶ月間与えたところ、全ての個体は重度の脂肪肝(>10%湿重量%)を呈した。投与を六ヶ月間に延長する過程で、約半数のマウスは、ふるえ・歩行困難・視覚刺激に対する反応劣化等の異常行動を呈した。異常行動の有無にかかわらず、投与六ヶ月後に処理・解析を行なったところ、全ての個体(n>14)に次に示す症状が検出された。

(1) 重度肝肥大、(2) 強度脂肪肝、(3) 高脂血症、(4) GOT, GPT の上昇、(5) 炎症細胞浸潤、(6) 繊維化、(7) zonal necrosis、(8) アポトーシス、(9) ミトコンドリア膨満 これらの症状はヒトにおけるアルコール性肝臓障害の基本的症状に全て合致する。これらの発症機構について、分子レベルで解析を行ない、確定的結論を得たので、それらについて概説します。

門脇 孝

東京大学大学院医学系研究科糖尿病・代謝内科

肥満には脂肪細胞分化が亢進し脂肪細胞数が増加したものと、脂肪細胞数は不変だが脂肪細胞肥大によるものがある。このうち、糖尿病、脂質代謝異常、高血圧などの生活習慣病と関連が深いのは、脂肪細胞肥大型肥満であり、肥大脂肪細胞から産生されるTNF $\alpha$ やFFAなどのインスリン抵抗性惹起因子やレプチン、PAI-1などのアディポサイトカインの過剰がそれらの病態の分子基盤をなすと考えられる。PPAR $\gamma$ の合成リガンドであるチアゾリジン誘導体は、通常は停止状態となっている脂肪細胞分化を誘導し小型脂肪細胞を増加させ、同時に大型脂肪細胞をアポトーシスによって減少させることにより、脂肪細胞肥大に伴うインスリン抵抗性を改善する<sup>1)</sup>。一方、PPAR $\gamma$ ヘテロ欠損マウスでは、野生型に比し高脂肪食下での脂肪細胞肥大による肥満や、それに伴うインスリン抵抗性の出現が抑制されていた<sup>2)</sup>。また、ヒトのPPAR $\gamma$  Pro12Ala遺伝子多型はPPAR $\gamma$ の機能低下を伴うが、この多型を有するものは、肥満時のインスリン抵抗性が軽度であり<sup>2</sup>型糖尿病に対して抵抗性であった<sup>3)</sup>。PPAR $\gamma$ はRXRとヘテロダイマーを形成して作用する。そこで、機能的にPPAR $\gamma$ アンタゴニストとして働くRXRアンタゴニストを高脂肪食下で肥満、インスリン抵抗性、糖尿病を惹起するマウスに投与したところ、脂肪細胞肥大と脂肪蓄積、インスリン抵抗性、高血糖の全てを抑制しうることを見出した。以上より、PPAR $\gamma$ は俊約遺伝子の1つと見なすことが出来、高脂肪食下で、肥満とインスリン抵抗性を媒介することが初めて明らかになった。また、脂肪分化を促進させることによりインスリン抵抗性を改善するPPAR $\gamma$ /RXRアゴニストに加えて、PPAR $\gamma$ /RXR情報伝達系のアンタゴニストが脂肪細胞肥大を抑制することにより肥満とインスリン抵抗性・糖尿病の両者の強力な治療薬となる可能性が示された。

## 文献

- 1) Okuno, A., et al.: Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats.  
J. Clin. Invest. 101: 1354-1361, 1998
- 2) Kubota, N., et al.: PPAR $\gamma$  mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance.  
Mol. Cell 4: 597-609, 1999
- 3) Hara, K., et al.: A Pro12Ala polymorphism in PPAR $\gamma$ 2 may confer resistance to type II diabetes.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., In press, 2000

吉政康直、井上 元、西村治男、中尾一和

京都大学医学研究科臨床病態医科学・第2内科

PPAR $\gamma$ は甲状腺ホルモン/ステロイドレセプタースーパー・ファミリーに属する核レセプターであり、RXRとヘテロ2量体を形成しPPAR応答性配列 (PPRE) を有する遺伝子の転写を活性化する。PPAR $\gamma$ はC/EBPファミリーの転写因子とともに、脂肪細胞分化及び脂肪蓄積に不可欠であるばかりでなく、最近、他のcell lineageに属する細胞の分化にも関与する事が示されている。1995年、チアゾリジン誘導体はPPAR $\gamma$ のリガンドであることが明らかにされ、そのインスリン抵抗性改善作用の機序に関する研究が進行してきた。

2型糖尿病の成因に、膵 $\beta$ 細胞からのインスリン分泌障害に加えて、インスリン標的臓器 (骨格筋、脂肪組織) におけるインスリンによる糖輸送障害—インスリン抵抗性—が重要な役割を果たしていることは従来より多くの視点より明らかにされており、特に、人においては骨格筋におけるインスリン抵抗性の重要性が示されている。一方、脂肪萎縮性糖尿病 (lipotrophic diabetes) では、著明なインスリン抵抗性が認められること、また、最近、脂肪細胞分化に関与するC/EBPファミリーのdominant negative form及びSREBP-1cのconstitutively active formを脂肪組織特異的に発現させたトランスジェニックマウスは脂肪細胞の発生異常を認め、高度のインスリン抵抗性を示すこと、また、レプチン過剰発現トランスジェニックマウスでは、ほとんど脂肪組織が認めないにも関わらず、インスリンの感受性の亢進が認められることが報告され、生体におけるインスリン感受性の決定 (調節) において、骨格筋ばかりでなく脂肪細胞の質的量的な変化が重要であることが示唆されている。チアゾリジン誘導体の耐糖能障害改善の用量は、in vitroでのPPAR $\gamma$ 結合親和性と平行すること、また、3T3L1脂肪細胞分化能を有することより、インスリン抵抗性改善効果はPPAR $\gamma$ を介した作用であると考えられる。また、一部の薬剤はPPAR $\alpha$ を介した作用を示すものが認められる。チアゾリジン誘導体は空腹時血糖、HbA1cを低下させる効果を示し、投与後血中インスリン濃度は軽度ながら低下する。また、正常血糖下グルコースクランプ法を用いた成績より、投与後において、インスリンによる糖利用率が増加することが示されており、インスリン分泌を増加させず、内因性のインスリンの作用増強により血糖を低下させる薬剤である。また、しばしば著効例 (responder) が認められ、これら著効例の臨床的特徴を明らかにすることは、チアゾリジン誘導体の人における作用点を明らかにする意味で重要である。

脂肪細胞分化におけるPPAR $\gamma$ の役割、また、他の転写因子 (C/EBP $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 、及びADD1/SREBP-1c) との相互作用について研究の進歩が見られるが、チアゾリジン誘導体のインスリン抵抗性改善作用の機序に関してはまだ不明な点が多いが、脂肪細胞、骨格筋への作用に注目し、2, 3の興味ある成績と仮説が提示されている。

PPARをターゲットとした創薬研究には、2, 3の方向性があり、開発は現在進行している。ひとつは、PPAR $\alpha$ を介した作用を同時に有するPPAR $\gamma$ アゴニストであり、脂質代謝への好影響を期待できる。また、RXR選択的アゴニスト (レキサ

ノイド)は遺伝性肥満糖尿病マウスにおいてインスリン抵抗性改善作用を有することが報告され、チアゾリジン誘導体との相加効果が期待できる。

PPAR $\gamma$ をめぐる最近の研究の進歩は、インスリン感受性に関するコンセプトを大きく変貌させ、糖代謝調節における脂肪組織の役割の重要性を示してきた。しかしながら、人における病態生理学的意義の解明はまだ残された課題であり、チアゾリジン誘導体の臨床成績の蓄積はこの意味において重要である。最近、人において、PPAR $\gamma$ 遺伝子のミスセンス変異が同定された。発端者はヘテロであり、著明なインスリン抵抗性、2型糖尿病、若年発症高血圧、高TG、低HDL血症を示し、この臨床的特徴はインスリン抵抗性症候群(シンドロームX)に類似している。また、PPAR $\gamma$ 遺伝子多型 (Pro13Ala)のアラニン多型は抗肥満、抗インスリン抵抗性と連関することが報告された。これらの成績は、人においてPPAR $\gamma$ が糖脂質代謝、エネルギー代謝において重要な働きを有していることを示すとともに、PPAR $\gamma$ の機能状態が代謝調節において正負両面の効果を示すことが示唆され、PPAR $\gamma$ に関する創薬研究に重要であると考えられる。



今井田克己、白井智之

名古屋市立大学 医学部 第一病理

フタル酸エステルは主に塩化ビニル樹脂を中心としたプラスチックに柔軟性を与える可塑剤として使用されており、その代表的な物質が Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)である。これらをラット、マウスなどげっ歯類に投与すると肝細胞に peroxisome proliferation が起こり、肝腫大、脂肪酸の $\beta$ 酸化の増加などが見られ、高濃度投与により肝腫瘍の発症が報告されている。この作用機序としては peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)を介したものであることが明らかにされ、少なくとも $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ の3つの subtype が知られている。この receptor は細胞分化や腫瘍の promotion、さらに apoptosis に関与することが分かってきている。しかし、この発現には種差が明らかであり、PPAR $\alpha$ の発現は肝腫瘍発症のみられるげっ歯類で高く、ヒトの発現量はその10分の1以下であり、ヒトへのリスクアセスメントする際の重要な点である。一方、この毒性の一つとして最近注目されている内分泌かく乱作用に関する問題点が指摘されている。そこで、本シンポジウムでは DEHP の内分泌かく乱作用との関連性について述べるとともに、われわれの行ってきた DEHP のラット肝発癌過程での前癌病変の発症に関する実験結果を中心に報告する。

内分泌かく乱物質の定義としては「生体の恒常性、生殖、発生あるいは行動に関与する種々の生体内のホルモンの合成、分泌、体内輸送、結合、作用あるいはその除去などの諸過程を阻害する性質を持つ外来性の物質」と定義される。これはいくつかのカテゴリーに分類され、1.ヒトや動物の天然の性ホルモン、2.合成エストロゲン（医薬品として開発されたもの）、3.植物エストロゲン（植物中に存在するエストロゲンで少なくとも20種が知られる）4.農薬、5.工業化学品、6.ダイオキシン類、7.多環芳香族炭化水素、8.その他の化合物、に分類される。DEHP は5.の工業化学品に分類され、エストロゲン様作用があるとの報告があるものの、逆に *in vivo* および *in vitro* の実験系でエストロゲン活性を示さないとの報告もある。内分泌かく乱作用を検出する試験系の確立に関しては現在日本を含め、各国が精力的に取り組んでいるところであり、今後試験系の信頼性を含めた検討が重要であると思われる。

一方、DEHPは前述の如く peroxisome proliferator として作用し、ラットおよびマウスの肝に発癌性を示すことが知られている。そこで、この DEHP をラット中期発癌性試験法とその実験系を応用した試験系を用いて、DEHP のラット肝発癌における用量相関性とラット肝の前癌病変である肝細胞小増殖巣(foci)における glutathione S-transferase placental form (GST-P)の発現性の変化について検討した。このラット肝中期発癌性試験法は被験物質の発癌性、発癌修飾作用の有無を 8 週間の実験系で判定するもので、長期発癌性試験結果とよく相関することや、被験物質の検索に必要な量が少量ですむ点など有用な実験系で、長期発癌性試験の代替法の一つとして国際的にも評価されている。この試験系では指標病変としてラット肝の前癌病変である GST-P 陽性細胞巣を用いているが、peroxisome proliferator の多くはこの GST-P の発現を抑制することが知られており、これら物質の肝発癌性の評価として GST-P 陽性細胞を用いることは適切でない。そこで、本試験では、foci を病理組織学的に分類し、各種 foci と GST-P の発現との関連性を検討した。

実験には6週齢のF344雄ラットを用い、Diethylnitrosamine (DEN, 200mg/kg, b.w.) を単回腹腔内投与し、2週後より各群に DEHP を 12000、3000、300、30 および 0 ppm を混餌投与した。陽性対照として clofibrate を 3000 ppm の濃度で同様に混餌投与した。全群とも実験開始 3 週の時点で 2/3 肝部分切除を行い、肝細胞の増殖を促進させた。実験開始後、8、24、48 週経過後に剖検するとともに 49 週後より 4 週間休養する群を設けた。剖検後、肝の切片を GST-P 抗体による免疫染色を行い、GST-P 陽性細胞巣を画像処理装置を用いて単位面積当たりの発生個数ならびに面積を算出した。さらに、GST-P 染色標本とその連続切片である HE 染色標本との対比により foci を病理組織学的に好酸性、好塩基性および明細胞性に分類した。

その結果、DEHP の 12000ppm 群と clofibrate 群において体重の増加抑制を観察した。また、DEHP の 3000ppm 以上の群および clofibrate 群において肝重量の増加が見られた。しかし、この肝重量は 4 週間の休養により対照レベルに回復した。病理組織学的には DEHP の 300ppm 以上の群および clofibrate 群で肝細胞の細胞質に好酸性顆粒が観察された。肝の GST-P 陽性細胞巣は DEHP 投与により減少したが、HE 標本では GST-P 陰性の好酸性小増殖巣が経時的に増加し、4 週間の休養により減少した。clofibrate 群でも同様の現象が認められ、HE 標本での foci の総数は対照群と比較して差はなかった。一方、過形成結節の発生は 48 週および 52 週（休養後）の 12000ppm 群、48 週の 3000ppm 群でそれぞれ、全例に認め、肝細胞癌の発生頻度は 12000ppm 群において 48 週で 20% (1/5) であり、52 週では 75% (9/12) といずれも統計学的に有意に増加した。一方、30ppm 群ではいずれの検査項目においても対照群と比較して差はなかった。

以上の結果より、DEHP 投与によって foci の GST-P の染色性は陽性から陰性へと転換し、さらに、GST-P 陰性の好酸性小増殖巣の増加が DEHP の肝発癌性と相関することを明らかにした。

○渡辺隆史、本木喜輝、高木充弘、山田純司、須賀哲弥

東京薬科大学・薬学部・臨床生化学教室

ペルオキシソーム増殖薬 PP (peroxisome proliferator)は種々の化学構造を持ち、天然のステロイドや脂肪酸、そしてフタル酸エステルなどのプラスチック可塑剤、クロフィレートなどの脂質低下薬が含まれる化学物質である。これらをグン菌類動物に投与すると、ペルオキシソーム増殖に代表される種々の変化が肝臓に生じ、長期間の投与で肝臓に高頻度の腫瘍発生がみられる。PPによる肝癌発生にはペルオキシソーム増殖が必須との考えが支配的であるが、未だその詳細な機構は明らかではない。一方ヒトではペルオキシソーム増殖が起こらない。こうした種間の感受性の差の原因を解明することは、PPのヒトでのリスク予測にとり必須といえる。近年、PPによる多面的な効果が、ペルオキシソーム活性化受容体 PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor)により仲介されていることが明らかにされ、発肝癌における PPAR の役割が注目されている。ここでは演者らの PP による肝癌誘発機構に関する研究の概略、そして発肝癌と PPAR との関連に関する最近までの研究を紹介し、非遺伝子毒性発肝癌における PPAR の役割を考察してみたい。

PP は遺伝子毒性 (変異原性) を示さないが、ラットなどでは単独で投与しても癌が発生するため、非遺伝子毒性 (非変異原性) 発癌物質に位置付けられている。さらにこの種の薬物による発癌にはペルオキシソーム増殖が必須の過程であることも WHO の癌研究専門家会議で確認されている。

PP による発癌は独特の性格を帯びている。発癌の初期過程ではペルオキシソーム増殖に続いて前癌病変が出現する。こうした病変は、ジエチルニトロソアミンなどの変異原性発癌物質と異なり、胎盤型グルタチオン S-転移酵素(GST-P)陽性病変としては検出されず、肝臓全体に発現誘導された酵素の中に陰性病変として検出される。さらに演者らは、PP による発癌過程における細胞増殖因子の関与について検討した。その結果、この発癌に肝細胞増殖因子(HGF)の低下が関与する可能性を示した。HGF の低下は PP による普遍的な現象であり、変異原性発癌物質には見られない特異な現象であった。またラットにおける PP による肝癌発生は HGF の静脈内投与で顕著に抑制された。さらに生成した肝臓癌から分離した細胞を用いて、in vitro コロニーアッセイを行ったところ、極めて低濃度の HGF 添加によりコロニー生成は抑制された。最近、HGF は正常肝細胞の増殖を促進するが、癌細胞に対しては抑制的に作用することが明らかになっている。したがってこれらの結果は、PP による肝 HGF 低下が癌増殖にいたるプロモーション過程の抑制を弱め、癌細胞増殖にとり好都合な環境をもたらすことを示唆している。PP により活性化された PPAR $\alpha$  が HGF

遺伝子の調節領域において活性化因子と拮抗的に作用しあっていることが推察される。

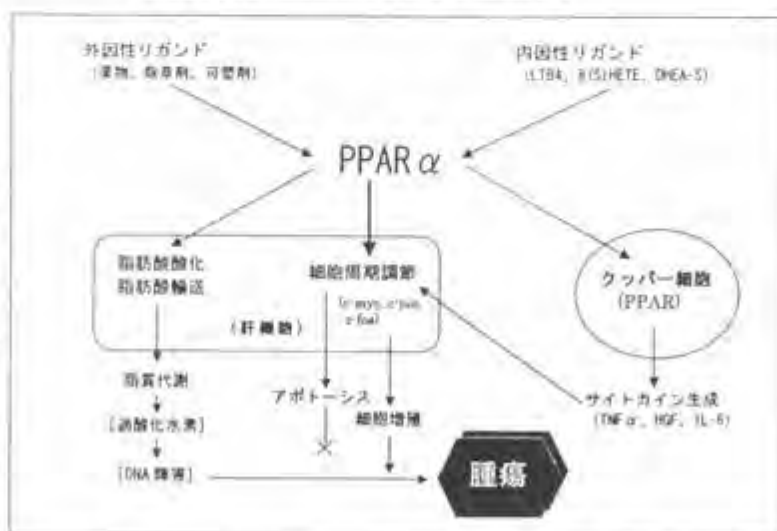
PP による発癌機構のひとつとして「酸化的ストレス」説があるが、最近では PP の細胞増殖/分化制御因子としての役割が注目されつつある。すなわち PP は肝細胞のアポトーシスを抑制するとともに、c-myc, c-Ha-ras, fos, jun および egr-1 などの増殖制御遺伝子を誘導する。こうした増殖制御遺伝子の発現は、細胞周期をS期へと進行させることになる。また PP は肝臓、特にクッパー細胞における TNF $\alpha$  mRNA の発現を高進させ、TNF $\alpha$  や IL-6 の遊離を促進させることが示唆されている。肝細胞増殖とアポトーシスのバランスの破綻、それが PP による発癌プロモーション・プログレッション過程の活性化をもたらすと考えられる。

こうした発癌過程においてベルオキシゾーム増殖すなわち PPAR $\alpha$  が必須の役割を果たしていることは、Gonzalez らが作製した PPAR $\alpha$  ノックアウトマウスを用いた発癌実験により決定的である。野生型および PPAR $\alpha$  欠失マウスに PP を投与すると、野生型では全例に腺腫が発生したのに対して、後者では全くそのような変化が起こらなかった。また PPAR $\alpha$  欠失マウスでは、PP による肝肥大、ベルオキシゾーム増殖、標的遺伝子の転写活性化などの多面的応答を全く示さない。さらにドミナントネガティブな PPAR $\alpha$  の過剰発現 (PPAR $\alpha$  の活性阻止) がモルモット肝臓でのアポトーシスを増大させることも報告されている。

ところで、PP の生体に対する作用の大きな特徴として種差があげられる。PP によるベルオキシゾーム増殖や酵素誘導は、ラットやマウスなどでは顕著に起こるが、ヒトでは全く起こらない。最近、ヒトとマウス肝臓における PPAR $\alpha$  のレベルに大きな差があり、ヒトはマウスの 1/10 以下であることがわかった。しかも PP に対する応答性を調べてみると、ほとんど陰性であり、PPAR $\alpha$  ノックアウトマウスに近い状態であった。しかし PP による脂質低下作用はヒトでもラットでも起こり、これも PPAR $\alpha$  の関与とされている。したがって PP に対する応答性の種差については未だ不明の点が多く、今後の研究を待たねばならない。

PPAR $\alpha$  ノックアウトマウスを用いた研究により、PPAR $\alpha$  はベルオキシゾーム増殖、酵素誘導、有糸分裂、発肝癌に重要な関与をしていることが明らかになった。しかし、そうした肝細胞増殖制御に関する実質細胞以外の細胞やサイトカインなどの多くの因子の関与については未解明の部分が多く残されている。PP によるヒトにおける発癌リスクの評価を確実なものにするためには、これらに関してもより詳細な研究が必要である。

図1. 発癌における PPAR $\alpha$  の役割



PP によるヒトにおける発癌リスクの評価を確実なものにするためには、これらに関してもより詳細な研究が必要である。

## ワークショップ 1

---

鎌滝 哲也

北海道大学大学院薬学研究科

ヒトゲノムプロジェクトの進展は、ヒトの生命体（物質）としての本質を一步深く掘り下げて見る機会を与えてくれる。疾患の真の原因を明らかにしたり、それをターゲットにした医薬品の開発などはもとより、医薬品に対する個体差の究明などヒトゲノムの解析から得られる情報は広範な医学研究領域に活用出来る。

同じ量の毒性物質に暴露されても、ヒトの毒性物質に対する反応は一様ではなく、あるヒトは過剰な反応を示す一方、全く反応しないヒトもいる。このような、毒性物質に対する反応の個体差は経験的に数多く知られていたが、そのメカニズムは近年まで明らかにされていなかった。

薬物代謝における個体差が薬物の反応の個体差を規定する因子として注目され、さらに薬物の代謝に関わる酵素の遺伝子多型が明らかにされ、その遺伝子診断法が開発されつつある。まだ、情報量としては充分ではないが、いずれ医薬品の効果の個体差の予測が遺伝子診断法によって実現するであろう。毒性物質の解毒化と活性化に関わる酵素も薬物の代謝に関わる酵素と同一である。したがって、毒性物質に対する反応の個体差も予測できるようになるであろう。

本シンポジウムでは、毒性物質に対する反応の個体差がどのように進展しているのかについて、我が国で先端的な研究を展開している演者に講演を依頼した。先ず、肺がんや乳がんリスクとP450の遺伝的多型について、当該P450遺伝子の多型の発見、遺伝子変異が酵素活性に及ぼす影響、遺伝子診断法の確立、ケース・コントロールスタディーによる遺伝子変異が乳がんリスクに及ぼす影響など精力的な研究が展開されている。このようなケース・コントロールスタディーでは多数の個体から採取された遺伝子解析が必要とされるが、この遺伝子解析を簡便に行う方法の開発も重要である。この点についても非観血的な方法が開発されている。今後発展が期待される分野である。

薬物代謝に関連した酵素の中でも、従来余り注目されていなかったジヒドロジオール脱水素酵素は多環芳香族炭化水素の毒性発現と密接な関係を持つ酵素である。この酵素の遺伝子にも遺伝的な多型があることが最近見いだされた。この酵素の機能、遺伝的多型についても詳しく述べられており、今後の展開が期待される。

薬物代謝反応は第I相反応と呼ばれる酸化、還元および加水分解反応と、第II相反応と呼ばれる抱合反応に分類される。チトクロームP450やジヒドロジオール脱水素酵素は第I相反応と呼ばれ、グルクロン酸抱合や硫酸抱合それにN-アセチル化反応などは第II相反応に分類される。第II相反応は解毒反応と考えられていたが、現在は第II相反応でも解毒化と活性化の両方の意味を持つことが分かっている。第II相反応を触媒する酵素にも遺伝子多型が数多く報告されている。これらの酵素の遺伝子多型とその毒性学的な意義についてもまとめて紹介された。

これらの研究は未だ緒に付いたばかりと言える。今後多数の遺伝子多型が報告され、その全容が明らかにされれば、毒性物質に対する個体のリスクが高い確率で予測できると期待される。このような予測は予防医学的な観点からも重要であると思われる。

○有吉範高<sup>1)</sup>、宮本昌美<sup>2)</sup>、梅津有理<sup>3)</sup>、國頭英夫<sup>4)</sup>、秋田弘俊<sup>5)</sup>、澤村祐一<sup>6)</sup>、横田 淳<sup>3)</sup>、根本信雄<sup>3)</sup>、佐藤邦雄<sup>3)</sup>、鎌滝哲也<sup>3)</sup>

1)北海道大学大学院薬学研究科、2)国立がんセンター、3)北海道大学医学部、4)丸山クリニック、5)富山医科薬科大学、6)群馬大学医学部

チトクロームP450 (CYP) は、環境中の様々ながん原物質を代謝的に活性化し、DNA傷害性を有する究極発がん物質に変換する反応を触媒する。喫煙は、肺がんをはじめ、種々のがんの発癌要因であることが疫学的に証明されている。煙草の煙には多環芳香族炭化水素やニトロソアミン類などの多種類のがん原物質が含まれており、CYPを中心とした薬物代謝酵素によって活性化され、結果的に発がんを惹起するものと考えられている。したがってCYPの活性が、発がんの過程において重要な役割を占めると考えられている。一方、多くのCYPには遺伝的多型に基づく酵素活性の著しい個体差があることが近年明らかにされつつある。以上のことから、がん原物質を代謝的に活性化するCYPの活性が異なるヒトでは発がんリスクが異なる可能性が予想される。実際、類似の喫煙歴をもつ喫煙者や、職業上、同程度のがん原物質の暴露を受けているヒトであっても、がんを発症するヒトと発症しないヒトがいることは古くから経験的に知られており、発がんリスクを規定している遺伝的因子が存在する可能性が考えられてきた。

そこで今回我々は、煙草の煙に含まれるニトロソアミン類の代謝的活性化に関与するCYP2A6に注目して、CYP2A6の活性の個体差をもたらず遺伝的多型と、肺がんの感受性について検討を行った。

CYP2A6はニコチンの主要代謝酵素であり、煙草の煙に存在するニトロソアミン類の代謝的活性化に関わる酵素である。また遺伝的多型に基づく活性の著しい個体差があることが知られている。我々は以前、日本人においてCYP2A6酵素活性の著しい個体差を見出し、その原因が、欧米人に存在する遺伝的多型と全く異なる多型に起因することを明らかにした。

#### Toxicological Significance of Genetic Polymorphism of Cytochrome P450 : Genetic Polymorphism of CYP2A6 and Lung Cancer Risk

Noritaka ARIYOSHI<sup>1)</sup>, Masami MIYAMOTO<sup>2)</sup>, Yuri UMETSU<sup>3)</sup>, Hideo KUNITOH<sup>4)</sup>, Hirotohi DOSAKA-AKITA<sup>3)</sup>, Yu-ichi SAWAMURA<sup>5)</sup>, Jun YOKOTA<sup>6)</sup>, Nobuo NEMOTO<sup>3)</sup>, Kunio SATO<sup>3)</sup> and Tetsuya KAMATAKI<sup>3)</sup>  
1)Lab. Drug Metab., Hokkaido Univ. 2)Natl. Cancer Inst. 3)1st Dept. Internal Med., Hokkaido Univ. Sch. Med. 4)Maruyama Clinic 5)Fac. Pharm. Sci., Toyama Med. Pharm. Univ. 6)Dept. Internal Med., Gunma Univ. Sch. Med.

この多型ではCYP2A6遺伝子において、酵素蛋白質の全翻訳領域を欠失していたため、全欠損型多型 (CYP2A6\*4C)と命名した。この多型の頻度を明らかにする過程において、さらに別の遺伝的多型である置換型多型 (CYP2A6\*1B)も見い出し、これらのアリルを区別しうる遺伝子診断法を開発した。

CYP2A6\*4Cをホモ接合体で有するヒトではCYP2A6酵素蛋白質が全く発現しないため、酵素活性の完全欠損をもたらす一方、図1に示すように、CYP2A6\*1BはCYP2A6遺伝子と、下流に存在する偽遺伝子であるCYP2A7と

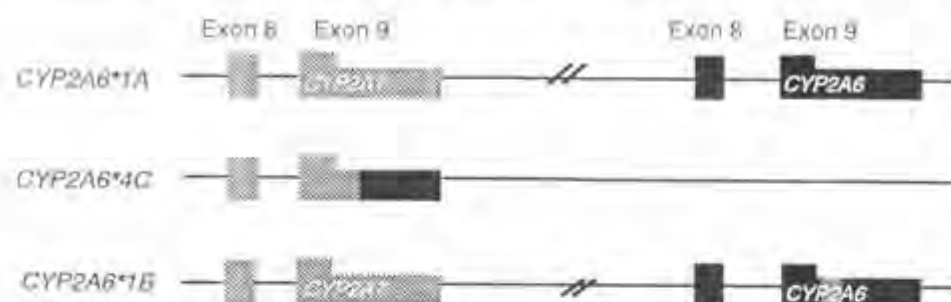


図1 日本人におけるCYP2A6の主な遺伝的多型

の置換を有しているが、その変異の部位が3'非翻訳領域であるため、酵素活性への直接的な影響は考え難く、野性型 (CYP2A6\*1A)に比べて著しい活性低下はないものと予想される。

我々はCYP2A6の遺伝的多型、特にCYP2A6\*4Cを有するヒトでは、煙草の煙に含まれるがん原物質の代謝的活性化能力が低いと肺がんリスクが少ないという作業仮説を検証するために、日本人喫煙者男性を対象とし、ケース・コントロールスタディを実施した。非がん患者と肺がん患者におけるCYP2A6の遺伝子型の分布は、有意 ( $P=0.012$ ) に異なっており、CYP2A6の遺伝的多型と肺がんリスクには関連性があることが示された。非がん患者に比べ、肺がん患者ではCYP2A6\*4Cをホモ接合体で有するヒトの割合が少なく、CYP2A6\*4Cをホモ接合体で有するヒトでは、CYP2A6を欠損しているためがん原物質が代謝的に活性化されないという仮説を支持していた。オッズ比を算出したところ、CYP2A6\*4Cをホモ接合体で有するヒトではCYP2A6\*1Aをホモ接合体で有するヒトを1.00とした場合、0.19 (95%信頼区間 0.07-0.53) と有意な低下が認められた。肺がんは病理学的に複数の組織型に分類されるが、従来喫煙と最も関連性の高いものとしては、扁平上皮がんが知られている。そこで次に、肺がんを組織型別に分類し、CYP2A6の遺伝的多型がどの組織型の肺がんに関連性があるかを検討した。予想通り、扁平上皮がん患者におけるCYP2A6遺伝子型の分布は、非がん患者と有意 ( $P=0.039$ ) に異なっており、CYP2A6の遺伝的多型は、扁平上皮がんのリスクと関連性があることが示された。さらに興味深いことに、CYP2A6\*4Cをホモ接合体で有するヒトは、扁平上皮がん患者および、小細胞肺がん患者には全く認められず、この結果は、CYP2A6\*4Cをホモ接合体で有するヒトでは、喫煙してもこれらのがんには罹りにくいことを意味する結果と考えられる。また、CYP2A6\*4Cアリルの存在が喫煙量に及ぼす影響についても検討を行ったのであわせて報告する。



チトクローム P450 の遺伝子多型と発癌感受性について  
CYP1B1 を中心として

○渡辺 潤子<sup>1</sup>、島田 力<sup>2</sup>、川尻 要<sup>1</sup>

埼玉がんセンター研究所<sup>1</sup>、大阪府立公衆衛生研究所<sup>2</sup>

化学発癌物質の代謝は Phase I の薬物代謝酵素である P450 による活性化反応と Phase II のさまざまな転移酵素による解毒化反応により構成されており、この代謝的バランスが発癌感受性に重要な役割を果たしていると指摘されている。薬物代謝は本来は生体の異物に対する防御機構であり一般的には解毒反応であるが、化学発癌物質の場合にはこの過程で反応性に富む活性代謝産物が生じ、DNA との結合性を示すことにより発癌のイニシエーションが進行すると考えられている。P450 はヒトにおいて約 30 種類の存在が認められているスーパーファミリー遺伝子の一つであるが、それぞれの P450 分子種には基質特異性があり、外来性の化学物質の代謝だけでなく、内在性のステロイドホルモンや胆汁酸などの重要な生理活性物質の生合成、代謝にも関与している。ヒトにおいては CYP 1、2、3 など に属する特定の P450 分子種がさまざまな化学発癌物質の活性化代謝に関与することが知られている。

最も典型的な化学発癌と考えられる肺癌はその罹患のリスクとして喫煙がある。タバコ煙中にはさまざまな発癌性物質が含まれており、それぞれの活性化反応に関与する P450 分子種も異なっている。我々は、先にタバコ煙中に含まれる代表的な発癌性物質である芳香族炭化水素、ベンゾピレンの代謝に関与している CYP1A1 の遺伝子多型と肺癌発症との関連性について検討した。その結果、CYP1A1 遺伝子上に強く連鎖した 2 つの多型、poly A 付加シグナルより 250 bp 下流の *Msp*I 多型と P450 のヘムが配位するのに必要な Cys の近傍の *Ile-Val* 多型が見出され、これらの多型が統計学的に有意に肺癌発症と関連していることを明らかにした。また、解毒代謝系の酵素である Mu 型グルタチオン-S-転移酵素 (GSTM1) 遺伝子多型との組み合わせによる肺癌感受性を検討した結果、リスクの増加が認められた。このことは、発癌物質の代謝活性化と解毒代謝化のバランスが遺伝的にアンバランスであることに起因して発癌感受性の個人差が現われたことを意味している。

今回は、TCDD により誘導される分子種の一つとして同定された CYP1B1 を中

心に報告する。発癌性を示す化学物質のなかで、ベンゾピレン等の多環芳香炭化水素は CYP1A1 により、またアリルアミン類は CYP1A2 により 主として代謝活性化されることが知られているが、CYP1B1 は CYP1A1 と CYP1A2 の両方の基質特異性を併せもっており、多環芳香炭化水素とアリルアミン類の両方を代謝活性化することが出来る。また、CYP1B1 は内在性の基質としてエストロゲンを代謝し、特に17 $\beta$ -estradiol の4位水酸化反応は CYP1B1 が一番強い活性を示すことが知られている。17 $\beta$ -estradiol の4位水酸化は実験動物において発癌性を高めると示唆されており、ヒトにおいても 4-OH/2-OH の比は乳癌発症過程で上昇することが報告され、CYP1B1 発現の上昇は発癌の指標になると言われている。このように、CYP1B1 は 化学発癌性物質の活性化だけでなく、エストロゲンの代謝においても重要な酵素であり、発癌に深く関連している。SSCP 法による解析の結果、CYP1B1 543 アミノ酸配列中一塩基の変異により、48 残基目の Arg から Gly へ、119 残基目の Ala から Ser へ、432 残基目の Leu から Val へアミノ酸置換を伴う多型が存在することが明らかとなった。これらの多型のなかで、特に 119 Ala-Ser 多型は CYP1B1 酵素の活性に重要な基質認識部位にあることから、基質認識に変化を生じ発癌感受性の個人差が生じる可能性が考えられるため重要である。48 と 119 残基目の多型は連鎖していることから、119 Ala-Ser 多型と 432 Leu-Val 多型で代表される二つの多型について、肺癌及び乳癌感受性との相関性を統計学的に検討した。同時に、二つの多型の組み合わせによる4つのタイプのCYP1B1 を E.coli においてNADPH-P450 reductase と共に発現させて 酵素活性を測定し、多型による影響を分子生物学的に比較検討した結果をあわせて報告する。

○平塚真弘, 水柿道直

東北大学医学部附属病院薬剤部

ある種の薬物を服用すると、副作用が発現しやすい人たちが存在する。これは肝の主要な代謝酵素であるチトクローム P450 (CYP) や CYP 以外の薬物代謝酵素が遺伝的に欠損していることに起因していることが知られている。したがって、これら薬物代謝酵素遺伝子多型の検出は、医薬品の重篤な副作用の発生を臨床レベルで未然に防ぐためにも非常に重要である。現在国内外において、種々の薬物代謝酵素遺伝子多型と投与薬物の血中濃度・治療効果等の相関関係に関する情報が積み上げられている。しかし、薬物代謝酵素の遺伝子多型を有する患者に対して、臨床レベルでそれらの診断を行い、薬物の適正使用を行っている施設は非常に少ない。これは、簡便、迅速かつ正確な多型検出システム・プロトコールが未開発であることが原因と考えられる。我々が検討を行った遺伝子多型簡易検出システムは、これらの問題をクリアする方法である。本法は、対立遺伝子特異的増幅法と蛍光プローブ法を組み合わせた方法で、微量の血液、唾液などを試料として、約2時間半で多種の薬物代謝酵素遺伝子多型を検出することができる。方法としては、末梢血よりゲノム DNA を調製し、それを鋳型として薬物代謝酵素の既知遺伝子多型を検出できる対立遺伝子特異的増幅プライマーセットを設計した。また、それらの PCR 産物にハイブリダイズするような、両端を蛍光色素でラベルした TaqMan プローブを設計し、対立遺伝子特異的増幅法と組み合わせて PCR 反応を行った。検出にはパーキンエルマー社 ABI PRISM7700 を用いて、各サイクルごとの蛍光強度を測定した。遺伝子型の判別は蛍光強度が検出可能になる PCR サイクル数(Ct)を用いた。つまり野生型対立遺伝子増幅用プライマーでの Ct(Ctwt)から、変異対立遺伝子増幅用プライマーでの Ct(Ctmt)を引いた値(Ctwt-Ctmt)から判定した。PCR サイクルの増加に伴い、ミスマッチを持つプライマーによっても非特異的な増加が認められた。しかし、野生、ヘテロ及びホモ型の(Ctwt-Ctmt)値に有意な差が認められた。これにより、種々の薬物代謝酵素既知遺伝子多型の有無を簡易に、しかもハイスループットに検出する方法 (AS-TaqMan PCR 法) を確立できた。現在までに、

CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP2D6, TPMT, NAT2, ALDH2 及び DPYD の各遺伝子多型を同一の反応条件で検出できる系を確立している。

また、我々は、この技術をイソニアジド投与患者の副作用発現回避に臨床応用している。患者は、混合性結合織病及び突発性血小板減少性紫斑病と診断された 25 歳の女性である。免疫抑制作用のためプレドニゾン、またプレドニゾンの胃腸障害防止・治療のためファモチジン及びプテレン、プレドニゾンの易感染防止のためイソニアジド、貧血改善のためアスコルビン酸とクエン酸第一鉄ナトリウム、不眠症状のためエチゾウムを投与された。薬物療法を開始後から悪心・嘔吐を発現した。副作用発現は週 2 回で、朝の服薬後約 1 時間であった。薬物動態に影響を及ぼす肝機能及び腎機能の指標となる AST、ALT、BUN には特に異常値は見いだされなかった。また、服用薬剤の薬学的管理の結果、重複投与、投与禁忌、慎重投与、相互作用などは認められなかった。服用薬剤の悪心・嘔吐の発現頻度を調べたところ、クエン酸第一鉄ナトリウムの副作用である可能性も否定できなかった。しかし、副作用発現時期がイソニアジドの服用日と一致するため、その代謝酵素である NAT2 の遺伝子多型を疑った。本研究は東北大学医学部倫理委員会より承認されたプロトコールに則り、患者に十分な説明がなされ同意が得られた後行われた。ゲノム DNA は、患者の肉体的及び身体的ストレスでできるだけ軽減するため、末梢血ではなく、唾液 1 ml より抽出した。日本人で検出されている既知 NAT2 遺伝子多型 3 種 (NAT2\*5B, NAT2\*6A, NAT2\*7B) を AS-TaqMan PCR 法を用いて患者の NAT2 遺伝子型を解析した結果、正常型の遺伝子型が NAT2\*4/\*4 であるのに対し、患者の遺伝子型は NAT2\*7B/\*7B の変異型ホモ接合体であった。これらの結果を基に、担当医、担当薬剤師及び報告者の間で投薬を中止することとした。その後、患者の悪心・嘔吐は消失した。

イソニアジド投与における悪心・嘔吐は、この薬剤による肝機能障害とともに診療上最も問題となるものの一つである。そのため副作用発現予測のリスクファクターの確立が期待されている。もし、NAT2 遺伝子多型とこのような副作用発現の関係が明確になれば、薬物療法開始前に NAT2 遺伝子多型を判定することにより、副作用の発現しやすい患者を推定することが可能となる。欧米では NAT2 遺伝子の欠損頻度が約 50%と報告されているが、わが国では約 10%と少ない。しかし現在、結核治療や感染予防にイソニアジドは広く用いられているため、日本人でもその代謝酵素のジェノタイプングは非常に重要であると言える。また近年、結核患者数が増加の傾向にあるため、イソニアジドを投薬される患者はますます増加し、遺伝子欠損者に対する副作用防止の対策が必要となってくるであろう。

○ 原 明

岐阜薬科大学

ヒドロキシステロイド脱水素酵素 (HSD) は、ステロイドホルモン生合成および不活性化を行い、核受容体に結合するステロイドホルモン量を変化させて最終的には遺伝子発現を調節する。ステロイドホルモン生合成に関与する 3 $\beta$ -、11 $\beta$ -及び 17 $\beta$ -HSD の欠損症は重篤な症状をもたらす。3 $\alpha$ -HSD は、内分泌腺におけるステロイドホルモン生合成には直接関与しないが、男性および黄体ホルモンを代謝してその体内濃度の調節を行い、最近 GABA<sub>A</sub> 受容体に結合する神経ステロイドの生合成酵素の一つであることが明らかにされてきた。また、3 $\alpha$ -HSD は種々のカルボニル化合物をアルコール体に還元するカルボニル還元酵素活性、多環状芳香族炭化水素のジヒドロジオール体をカテコール体に酸化するジヒドロジオール脱水素酵素活性、さらにプロスタグランジン脱水素酵素活性を示す多機能な酵素である。このジヒドロジオール脱水素酵素は、多環状芳香族炭化水素の発癌性を減弱させるが、逆にカテコール生成物の自動酸化により活性酸素や反応性の  $o$ -キノンを生成するのでナフタレンや多環状芳香族炭化水素の毒性の発現にも関与する。したがって、本酵素の欠損や多型は精神機能調節、ケトン基を有する薬物の薬効発現および芳香族炭化水素の毒性発現における個人差の一因になると考えられる。

本講演では、ヒトの 3 $\alpha$ -HSD の構造的知見を含めて、異物代謝における役割と遺伝的多型性についての最近の研究を紹介する。

1) 3 $\alpha$ -HSD アイソザイムの構造と組織分布：ヒト組織には、他の動物種と異なり、83%以上のアミノ酸配列が一致する 4 種のアイソザイムが存在する。これらは $\alpha/\beta$  パレル型の高次構造である aldo-keto reductase (AKR) ファミリーに属するので AKR1C1-AKR1C4 と命名され、構造機能相関研究により補酵素、基質や阻害剤の結合に関わるアミノ酸残基や領域が明らかにされつつある。AKR1C4 は肝臓に特異的であるが、他のアイソザイムは多くの組織に発現する。

2) アイソザイム間の基質特異性の違い:各アイソザイムによりステロイドやプロスタグランジン (PG) に対する特異性が異なる。AKR1C2と1C4は3 $\alpha$ -HSD活性だけ示すが、AKR1C1は20 $\alpha$ -HSD活性、AKR1C3は17 $\beta$ -HSD活性を示す。AKR1C4を除く3種はPGD<sub>2</sub>からPGF<sub>2 $\alpha$</sub> 及びPGH<sub>2</sub>からPGF<sub>2 $\alpha$</sub> を生成するPGF合成酵素活性を示す。AKR1C3は17 $\beta$ -HSDおよびPGF合成酵素活性が強く、17 $\beta$ -HSD type 5とも呼ばれ、また最近cDNAクローニングによりヒトPGF合成酵素とも同一であると報告され、このアイソザイムの命名は現在混乱した状況にある。

3) 異物の代謝:〈ケトン基を有する薬物の還元〉ヒト肝では3 $\alpha$ -HSDと構造の違うカルボニル還元酵素が存在するが、10種の薬物に対する各酵素の反応性の比較により、5種の薬物はカルボニル還元酵素より3 $\alpha$ -HSDアイソザイムによって効率的に還元代謝されることが示されている。〈芳香族炭化水素の代謝〉動物種または組織によって3 $\alpha$ -HSD以外のジヒドロジオール脱水素酵素が存在するが、ヒト肝ではジヒドロジオール脱水素酵素活性の大部分は3 $\alpha$ -HSDアイソザイムによる。Benzene dihydrodiol 酸化における速度定数から求められる触媒効率 $AKR1C4 > 1C1 > 1C3 > 1C2$ であるが、7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene 酸化の比活性は $AKR1C2 > 1C1 > 1C4 > 1C3$ であり、基質の構造によりアイソザイム間で反応性が異なる。

4) 多型:これまでの3 $\alpha$ -HSD cDNAのクローニングにおいて、各アイソザイムの多型を示唆するcDNA (AKR1C1で1種、AKR1C2で3種、AKR1C3で1種、AKR1C4で2種) が単離されている。日本人検体における発現 mRNA 分子種の分析では、AKR1C1-1C3には上記の多型が認められないが、AKR1C4では2塩基2アミノ酸置換変異体が検出されている。また、血縁関係のない日本人 (137例) および5家系の末梢血 DNA 試料の分析では、AKR1C4のこの変異遺伝子のアリル頻度は0.088であった。AKR1C4は肝におけるステロイドおよび胆汁酸代謝の主要アイソザイムであり、この変異酵素では本来の酵素活性が半減するため、変異遺伝子のホモ接合の個人ではステロイド代謝や異物代謝が影響されると思われる。肝および腎試料の3 $\alpha$ -HSDアイソザイムの活性比には個人差があり、また最近AKR1C4遺伝子の5'非翻訳領域の変異も見出され、さらに異物やレチノイン酸により他のアイソザイム遺伝子の転写が促進されると報告されている。今後、5'非翻訳領域の変異も含めた各アイソザイムの変異遺伝子の同定とその表現型の生体に及ぼす影響を明らかにする必要がある。

小澤正吾

国立医薬品食品衛生研究所・薬理部

第II相薬物代謝酵素は、生体内基質や生体外異物およびそれらの第I相薬物代謝酵素による代謝物に、グルクロン酸、硫酸、アセチル、グルタチオン抱合等を行う。これらの代謝過程は、一般に化合物の水溶性を増したり、生体高分子と共有結合をおこす反応性中間体の解毒の意義をもつ。一方、ある種の薬物や癌原物質については、第II相薬物代謝酵素により代謝活性化され、薬物の活性体を生成したり、生体高分子損傷をおこしたりすることが示されている。

上述の種々の抱合反応を触媒するUDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT)、硫酸転移酵素 (SULT)、アシルアミン N-アセチル転移酵素 (NAT)、グルタチオン S-転移酵素 (GST) は、それぞれアミノ酸の相同性を有する多くの分子種から構成されている。ヒトや実験動物において、これら第II相薬物代謝酵素活性に個体差が認められ、その個体差の原因となっている遺伝子の塩基配列の個体差、すなわち遺伝子多型が明らかにされている分子種が増えてきている (表1)。

表1 疾病/薬剤感受性の個体差に関連する多型性薬物代謝酵素分子種と変異対立遺伝子

代謝酵素分子種	代表的基質	変異対立遺伝子
UGT UGT1A1	ビリルビン、p-ニトロフェノール	多種類の遺伝子多型 (塩基欠損、エクソンの欠損、塩基挿入による酵素タンパクの欠損)
SULT ST1A3	p-ニトロフェノール、 ミノキシジル (ロザイムの成分) PhIP、4-アミノピフェニル等の 癌原性芳香族アミン	コドン 213Arg/His 多型

表1 (続き)

代謝酵素分子種	代表的基質	変異対立遺伝子
NAT NAT1 NAT2	p-アミノ安息香酸 イソニアジド、スルファメサジン、 癌原性芳香族アミン	NAT1: polyA 付加シグナル多型 NAT2: 多種類の遺伝子多型 (塩基置換で変異アミノ酸)
GST GSTM1 GSTP1 GSTT1	トランススチルベンオキシド ベンゾ[a]ピレンのエポキシド等 エチレンオキシド	GSTM1: 遺伝子の欠失 GSTP1: コドン 105Ile/Val 多型 GSTT1: 遺伝子の欠失

PhIP, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine

第II相薬物代謝酵素の遺伝子多型と疾病感受性および薬物感受性との関連は、ある酵素による薬物や環境変異原・癌原物質の代謝活性化能や解毒的代謝能の個体差に起因するものと思われる(表2)。

表2. 薬物代謝酵素の遺伝子多型と疾病感受性・薬剤感受性の個体差

代謝酵素分子種	感受性の個体差を示す疾病と疾病の原因となりうる物質 感受性の個体差を示す薬物
UGT1A1	高ビリルビン血症
ST1A3	発がん感受性 (癌原性芳香族アミン)
NAT1/2	発がん感受性 (癌原性芳香族アミン)、イソニアジド等の薬物感受性
GSTs	発がん感受性 (ベンゾ[a]ピレン等)

現在までに、各種臓器癌について、第II相薬物代謝酵素の遺伝子多型に着目した多くの症例対照研究が行われた。さらに、疾病の原因となっていると考えられる物質や、薬物の代謝に対する多型性第II相薬物代謝酵素の機能の差異の知見を得ることにより、遺伝子多型と疾病感受性、薬物感受性との関係が確立される。疾病感受性、薬物感受性ともに、複数の感受性要因が絡み合った結果として現われてくる点が、問題の解決を困難にしている。最近、遺伝子多型をハイスループットに解析する技術の開発が盛んである。このような新技術に期待するところは非常に大きい。

本ワークショップでは、講演者が SULT, NAT, GST の遺伝子多型と発がん感受性の関連について解析した結果を含め、第II相薬物代謝酵素の遺伝子多型と疾病感受性・薬物感受性との関連 につき、述べてみたい。



山添康

東北大学大学院薬学研究科

個々に特異的な抗体を産生して対応する免疫システムと違って、薬物代謝酵素は限られた分子種で脂溶性化学物質の解毒に機能している。主に肝に含まれる代謝酵素分子種はそのゆるやかな基質選択性によって、多様な異物を代謝し異物の体内蓄積を防いでいる。

現在、化学物質、殊に医薬品の安全性が大きな社会問題となっている。安全性の評価は重要な課題であるが、容易でない。その難しさの背景に個人差の問題がある。ヒトは解毒能力に著しい個体差があり、これが薬効、安全性、さらには環境リスクの個人差と深く関わっているとされている。実際、ヒトで代謝酵素遺伝子の変異が高頻度に見つかっており、その変異と薬物の安全性や化学物質による発がんリスクの関係が盛んに論議されている。

今回、ヒト薬物代謝酵素の遺伝的多型と毒性発現との関連がワークショップに取り上げられる。5人の演者によって新しい多型の発現から応用までの広い範囲の議論が盛りあがること期待している。



井上 達、遠山 千春

国立医薬品食品衛生研究所、国立環境研究所

様々の化学物質の毒性発現メカニズムがある中で、実験動物にそれらに応じた遺伝子改変を施してやるならば、それに対応した際だった反応性の亢進や特異的の除去が観察される。それは、当該の物質の毒性発現にかかわる分子種やシグナル経路を解明することに効果的な役割を果たすだけでなく、併せて実用面でも既知もしくは未知の化学物質の毒性性格を明らかにする上で有用である。

このワークショップでは、まずメタロチオネインを介する金属毒性や酸化的ストレスに関連する肝、腎、肺など種々の臓器での毒性発現について、そのノックアウト動物を用いて明らかになった毒性発現機構に関するお話を国立環境研の遠山千春部長にご紹介戴いた後、さらに心臓における酸化的ストレス障害を中心としたお話をLouisville大学医学部のJames Kang博士にお伺いする。ついで、ダイオキシン類によって誘導されるアリール・ハイドロカーボン受容体(AhR)のノックアウト動物から見たTCDDsによる口蓋裂や腎奇形発症のメカニズムについて広島大学医学部の山下敬介助教授に、また角度を変えて、CYP1A2のノックアウトから見たTCDDsの影響について米・環境防護庁健康&環境影響研のJanet Diliberto博士にそれぞれ講演願う。

がん遺伝子Mafの関連遺伝子として転写因子Nrf-2をクローニングし、これが異物代謝系第2相酵素群を統一的に制御することを見出した筑波大学先端研の山本雅之教授には、これらに纏わるあたらしい酸素ストレス・センサー系の概念と、このNrf-2ノックアウト動物の特異的な異物代謝や化学発がんへの態様についてお話戴く。

最後のJoy Cavanegro博士(アクセス・バイオ、前FDA・CBER)には、近年薬物開発の前臨床試験で急速にニーズの増しているヒト型受容体トランスジェニック動物の応用例を、バイオ医薬品を中心にご紹介戴く。ヒト型受容体のノックアウト・ノックインの手法によるヒト受容体発現動物についてみれると同時に、ヒトと動物でのシグナル伝達分子の異同等による実験結果の解釈上の問題点などについても解説して戴く。

遠山千春

国立環境研究所環境健康部

金属結合蛋白質、メタロチオネイン (MT) は、重金属との結合やフリーラジカル除去効果を有することから、金属ストレスや酸化ストレスに対して防衛的役割を果たしていると考えられている。しかしながら、金属ストレスおよび酸化ストレスに対する生理的レベルのMTの役割については不明な点が多く残されている。最近、遺伝子ターゲティング法によりMT-1および-2の発現を抑えたMT欠損マウスが作出され、世界中の様々な研究機関で生体内でのMTの役割に関する研究に広く利用されている。本講演では、金属ストレスおよび酸化ストレスによる急性毒性並びに環境化学発がんおよびMTの役割について、MT欠損マウスを用いた最近の研究成果を紹介する。

### 金属ストレス

MT欠損マウスおよび野生型マウスに金属水銀蒸気を1日4時間、3日間曝露して、24時間後に肺の病理組織学的形態変化を観察した。その結果、MT欠損マウスの肺では、金属水銀蒸気曝露によって、顕著なうっ血や肺胞の拡張不全（無気肺）が認められたが、野生型マウスにおける肺への影響は軽微であった。また、MT欠損マウスでは、塩化第二水銀の皮下投与による急性腎毒性や塩化カドミウムの皮下投与による急性肝毒性が野生型マウスに比べて著しく増強することが認められた。このように、MT欠損マウスは、金属水銀蒸気曝露による肺毒性、イオン型無機水銀投与による腎毒性およびカドミウム投与による肝毒性に対して高い感受性を示すことが明らかとなった。

一方、MTは、金属水銀蒸気曝露後の肺および腎臓並びに塩化第二水銀皮下投与後の腎臓への水銀の取り込みや塩化カドミウム皮下投与後の肝臓へのカドミウムの取り込みに影響を与えないが、これらの臓器での水銀並びにカドミウムの蓄積・保持に深く関与することがMT欠損マウスを用いた検討により明らかとなった。

### 酸化ストレス

MT欠損マウスおよび野生型マウスに、毒性の標的組織が異なる5種類のフリーラジカル誘起物質（パラコート、アセトアミノフェン、エタノール、シスプラチンおよびX線）をそれぞれ投与（全身照射）して、各物質による標的組織での毒性発現に及ぼすMTの影響を検討した。その結果、MT欠損マウスでは、パラコート

による肺毒性、アセトアミノフェンやエタノールによる肝毒性、エタノールによる胃および十二指腸の粘膜病変、シスプラチンによる腎毒性並びにX線による骨髄障害が野生型マウスに比べて著しく増強し、これらのフリーラジカル誘起物質の急性毒性の発現にMTが防衛的な役割を果たしていることが明らかとなった。

また、フリーラジカル誘起物質の毒性に対する亜鉛前投与の影響を検討したところ、亜鉛を前投与した野生型マウスでは、腎臓や骨髄中のMT濃度が有意に増加し、シスプラチンによる腎毒性およびX線による骨髄障害が共に軽減された。しかし、MT欠損マウスでは、亜鉛前投与によってこれらの組織中MTは検出限界以下であり、野生型マウスのような軽減効果は認められなかった。従って、亜鉛の前投与が示すシスプラチンの腎毒性および放射線の骨髄障害の軽減効果は、あらかじめ腎臓や骨髄中で誘導合成されたMTによるものであることが示唆された。

### 環境化学発がん

MT欠損マウスおよび野生型マウスの皮膚に、強力な環境発がん物質である7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) を塗布して、DMBA単独皮膚発がんおよびDMBA/12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 二段階皮膚発がんに対するMTの効果を検討した。その結果、MT欠損マウスでは、DMBA単独で誘発される皮膚腫瘍（パピローマ）の発生が野生型マウスに比べて著しく増強されることが認められた。さらに、DMBA/TPA併用により誘発される皮膚腫瘍の発生が、発生率や発生時期およびマウス1匹あたりの腫瘍数の点においてMT欠損マウスで増強されることがみいだされた。以上のことから、MTは化学発がん抑制因子として、生体内で重要な役割を果たしていることが明らかとなった。しかも、その際に誘発されたパピローマにおいて*c-Ha-ras*のcodon 61のA<sup>292</sup>からTへの変異が認められたことから、MTのDMBA単独およびDMBA/TPA皮膚発がん抑制作用には*c-Ha-ras*遺伝子の点変異の抑制が関与していることが示唆された。また、DMBA単独塗布直後の皮膚の炎症の様子を観察したところ、0.5 mg DMBAを塗布した野生型マウスでは3日後に皮膚の肥厚が観察されたが、その後、正常の皮膚に回復した。これに対し、MT欠損マウスでは、3日後に表皮の肥厚、5日後に糜爛、7日後に潰瘍が観察された。このように、DMBAによる炎症作用に対してもMT欠損マウスが高い感受性を示したことから、MTはDMBAに対する抗炎症因子としても重要な役割を果たしていることが示唆された。炎症作用はその後の腫瘍発生に関与することから、MTが示すDMBA皮膚発がんの抑制効果の要因の一つとして、MTの抗炎症作用も関係している可能性が考えられる。

### まとめ

MT欠損マウスでは、重金属（金属水銀、無機水銀、カドミウム）、酸化的ストレス（バラコート、アセトアミノフェン、エタノール、シスプラチン、放射線）および化学発がん物質（DMBA）に対する感受性が増大することが明らかとなった。従って、金属ストレスおよび酸化的ストレスによる急性毒性並びに化学発がんに対する生体内防御因子として重要な役割を果たしていることが示唆された。また、MTは、無機の水銀やカドミウムの体内動態にも深く関与することが明らかとなった。このように、MT欠損マウスはMTの生理機能を解明するための実験モデルとして有用であり、今後益々その利用が増えていくものと思われる。

Novel insights into the antioxidant action  
of metallothionein in the heart

Y. James Kang

University of Louisville School of  
Medicine

Cardiomyopathy induced by free radicals has been revealed in many heart disease conditions. Using cardiac-specific metallothionein (MT) overexpressing transgenic mouse model produced in this laboratory, we have demonstrated that MT provides protection against heart injury induced by oxidative stresses. This protection correlates with the inhibitory effect of MT on lipid peroxidation. Further studies have revealed that a common cellular event, myocardial apoptosis, is highly responsible for the free radical-mediated cardiomyopathy, and MT significantly reduces the number of cells undergoing apoptosis under oxidative stress.

To study biochemical and molecular mechanisms of the action of MT, primary cultures of neonatal mouse cardiomyocytes have been established in this laboratory. Using this newly-developed experimental model, we have examined the effects of MT on signal transduction pathways that mediate apoptosis induced by adriamycin, anoxia-reoxygenation, ANF, TNF, and hydrogen peroxide in myocardial cells. Employing immunocytochemical methods combined with confocal and electron microscopy, We have identified that

mitochondrial cytochrome c release, caspase-3 activation, and cleavage of protein kinase C-delta are involved in the oxidative stress-mediated apoptosis. Another biochemical consequence that is activated by oxidative injury is the mitogen activated protein kinases (MAPK) mediated apoptotic pathway. MT greatly inhibits the release of cytochrome c from mitochondria and this effect correlates with its inhibition on activation of caspase 3 and the subsequent inhibition of apoptosis. MT also blocks the activation of p38-MAPK by oxidative stresses. The p38 is further demonstrated, by using a p38-specific inhibitor, to be involved in the stress-induced apoptosis.

These studies, by applying molecular biotechnology and cutting-edge experimental approaches to myocardial responses to oxidative stresses, provide significant novel insights into free radical-induced cardiomyopathy, the role of MT in cardiac protection against oxidative injury, and importantly, clinical implications of MT in cardiac diseases.

Supported in part by NIH grants (CA68125 and HL59225), the American Heart Association Established Investigator Award (9640091N), and the Jewish Hospital Foundation, Louisville, KY, USA.

山下敬介

広島大学医学部解剖学第一講座

ダイオキシン類とはジベンゾジオキシン、ジベンゾフラン、多塩化ビフェニール (PCB) の総称である (図1)。これらはハロゲン化芳香族炭化水素に属し、さらにベンツピレン、メチルコランスレンは多環性芳香族炭化水素に属する。ダイオキシン類の生体毒性は多岐にわたり、急性毒性、薬物代謝酵素の誘導、発癌のプロモーション、免疫毒性、発生毒性 (催奇形性)、生殖毒性を引き起こす。これらの毒性の多くはダイオキシン受容体 (Aryl hydrocarbon receptor、以下タンパクをAhR、遺伝子をAhrと略) を介して発現すると考えられてきた。AhRは細胞内に存在する約90 kDのタンパクで、ダイオキシンをはじめとするリガンドが結合すると活性化される、受容体型転写因子である。

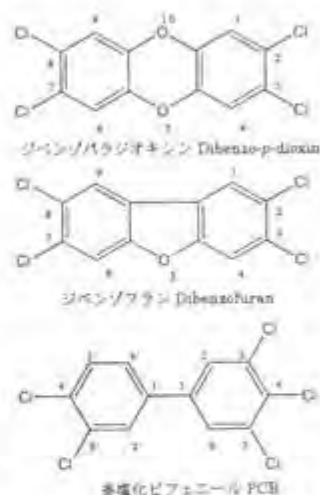


図1 ダイオキシン類

1997年にAhr欠損マウスが東北大学藤井義明教授のグループと東京大学勝木元也教授のグループの共同研究により作出された (Mimura et al., *Genes to Cells* 2: 645-654, 1997) このマウスを用いてダイオキシン類の生体毒性発現の機序が次第に明らかにされつつある。本発表では、ダイオキシンによる発生毒性について概説する。

A. ダイオキシンによるマウス口蓋裂誘発はAhRを介する。

C57BL/6Jマウスの雄・雌を一晚交配した。妊娠12.5日 (臍栓発見日=妊娠0日、胎齢0日) に母体体重kgあたり40  $\mu$ gの割合で2,3,7,8四塩化ジベンゾパラジオキシン (以下TCDDと略) を強制経口投与した。胎齢18.5日の胎仔を観察した。一方、Ahr欠損ホモ個体 (Ahr<sup>-/-</sup>) は一見何の異常も示さず生殖も可能である。Ahr<sup>-/-</sup>雌雄の個体を同様に交配しTCDDを投与した後、胎仔を観察した。C57BL/6J胎仔 (遺伝子型はAhr<sup>+/+</sup>) には口蓋裂が100%、腎盂拡大が91%に見られたが、Ahr<sup>-/-</sup>胎仔ではいずれの異常も見られなかった。このことによりTCDDの口蓋裂および腎盂拡大誘発作用がAhRを介することが証明された。

つぎに、母体の遺伝子型による影響をなくすため、Ahr<sup>+/-</sup> (Ahrヘテロ) マウス



の雄・雌を交配し同様の実験を行った。胎仔は $Ahr+/+$ 、 $+/-$ 、 $-/-$ の3つの遺伝子型をもつ。口蓋裂・腎盂拡大の頻度はそれぞれ $Ahr+/+$ 胎仔で100%、100%、 $Ahr+/-$ 胎仔で28%、89%、 $Ahr-/-$ 胎仔で0%、0%であった。 $Ahr+/-$ 胎仔の奇形の頻度(口蓋裂28%、腎盂拡大89%)に違いが生じたのはなぜかという疑問が残った。

B.  $Ahr+/-$ 胎仔における口蓋裂誘発感受性は $Ahr+/+$ 胎仔よりも低い。

そこで、 $Ahr+/-$ 胎仔におけるTCDD用量と奇形発現との関係を見た。用量反応関係を $Ahr+/+$ 胎仔のそれと比較した(図2)。 $Ahr+/-$ 胎仔もTCDDの用量に依存して口蓋裂・腎盂拡大が誘発されるが、その感受性は $Ahr+/+$ よりも低いこと、半数機能不全 Haploinsufficiencyが見られることが明らかとなった。

C. ダイオキシンは二次口蓋突起の発育を抑制することにより、口蓋裂を誘発する。

実験にはICRマウスを用いた。マウスの二次口蓋突起は胎齢13.5日には左右それぞれ垂直に位置している。ICR系では胎齢14.25日には左右の口蓋突起が挙上し水平転位し、突起先端同士が接触する。接触とともに突起内側縁の上皮は癒合を開始し、胎齢15.5日には癒合を終える。

ダイオキシンが口蓋突起の増殖に及ぼす影響を見るために、以下の通り実験した。妊娠12.5日のマウスにTCDDを40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ の割合で投与し、妊娠13.5、14.5日に母体を屠殺し、胎仔を取り出した。細胞増殖能を見る目的で、屠殺2時間前に母体にBrdUを腹腔内投与した。胎仔頭部前額断切片を作製し、抗BrdU染色を施し、口蓋突起の上皮細胞・間葉細胞の増殖能を無処置対照群のそれと比較したところ、胎齢13.5日において、TCDD投与群での口蓋突起の間葉細胞のBrdU取り込みが対照に比して低いことが明らかとなった。胎齢14.25、14.5日において、左右の口蓋突起間の距離はTCDD投与群で各々の時期に0.39、0.27 mmであったのに対し、対照群は各々の時期に0.1、0 mmであった。このことから、TCDDは口蓋突起の発育を抑制することが明らかとなった。

次に、TCDDにより発育が抑制された口蓋突起には、もはや癒合する能力がないのかどうかを見た。胎仔の頭蓋底の左右幅を狭める実験条件下(妊娠7.5日に塩化カドミウムを投与し、外脳を誘発した胎仔)で上記実験を行ったところ、胎仔の口蓋突起はいずれも癒合した。TCDDは口蓋突起上皮同士の癒合を阻害するものではないことが明らかとなった。

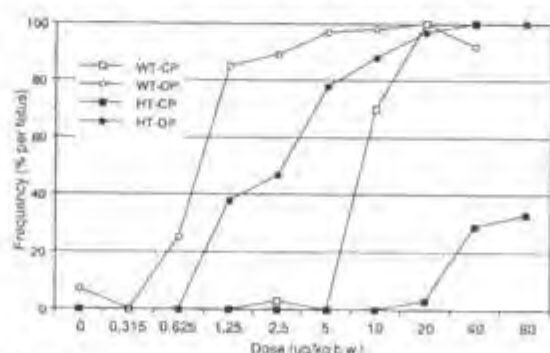


図2 TCDDの用量と奇形誘発との関係を示す用量反応曲線。野生型(WT)と $Ahr$ ヘテロ(HT)胎仔の口蓋裂(CP)・腎盂拡大(DP)誘発頻度を示す。妊娠12.5日にTCDDを1回強制経口投与し、母体を18.5日に屠殺後、胎仔を観察した。

Janet J. Diliberto

Experimental Toxicology Division, NHEERL, US Environmental Protection Agency, Research Triangle Park, North Carolina, USA.

Dioxin (TCDD; 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin) is prototype and most potent member of the highly lipophilic polyhalogenated aromatic hydrocarbons (PHAHs) which are persistent and ubiquitous contaminants in the environment. TCDD acts as a ligand and binds to the aryl hydrocarbon receptor (AhR) which results in a wide range of adverse biological responses. Body burdens associated with these effects are dependent on the disposition of the ligand. Disposition of TCDD and dioxin-like compounds is influenced by their lipophilicity, binding affinities to the AhR, binding affinities to the CYP1A2 (which is regulated by the AhR), and metabolism. The knock-out (KO) mice with either a null, mutant gene for CYP1A2 or AhR have been used by our laboratory to study the mechanism of toxicity for TCDD. As seen by studies using these KO mice, CYP1A2 was demonstrated to be the inducible hepatic binding protein responsible for dose-dependent hepatic sequestration of TCDD. Also, disposition of TCDD was different in CYP1A2 KO mice than in the parental strains of mice. In CYP1A2 KO mice, lipid solubility played the key role for disposition of TCDD and related compounds. Studies with AhR KO mice demonstrated that removal of AhR affects the pharmacokinetic behavior of TCDD as seen by differences in TCDD disposition in AhR KO and genetically normal mice. Knock-out animal models are important models to understand the role of these proteins on effects of dioxin, a known human carcinogen, and dioxin-like compounds in humans at environmental background levels. (This abstract does not necessarily reflect EPA policy.)

○山本 雅之

筑波大学・基礎医学系／先端学際領域研究センター

赤血球特異的な遺伝子発現の制御機構の研究から、癌遺伝子 Maf の細胞性関連因子である小 Maf 群因子が、NF-E2 転写因子を構成する一つのサブユニットであり、もう一つのサブユニットである p45 とヘテロ二量体を形成して NF-E2 活性を示すことを見出した<sup>1)</sup>。小 Maf 群遺伝子としては、ニワトリで MafF, MafG, MafK の 3 種が報告されているが、私たちはマウスにおけるそれぞれの相同蛋白質を同定し、その機能を解析した。一方、NF-E2 の大サブユニット p45 は CNC 群と呼ばれる転写因子ファミリーに所属するが、このファミリーに属する転写因子として、新たに ECH/Nrf2 と Nrf3 を同定した<sup>2)3)</sup>。Maf 因子も CNC 因子も、塩基性領域とロイシンジッパー構造を共通に保持しており、その構造を介して様々な 2 量体を構成して、DNA 上の Maf 認識配列 (MARE と呼ぶ) に結合し、一群の遺伝子の転写を活性化する。ところで、Nrf2 遺伝子を破壊しても造血発生に大きな変化は見られなかったが、同マウスにおいては異物代謝系第 2 相に属する酵素群 (グルタチオン S-トランスフェラーゼやキノンレダクターゼなど) の誘導的発現が著明に欠落していた<sup>4)</sup>。また、Nrf2 ノックアウトマウスは、酸化ストレスに対する応答、例えば、ヘムオキシゲナーゼの誘導的発現を欠損していた<sup>5)</sup>。これらのことは、従来、ヘテロな集団と考えられていた異物代謝系第 2 相の酵素群が、Nrf2 を介した統一的な制御系によって制御されていること、また、異物代謝系と酸化ストレス応答系の一部が共通の制御系の影響下にある

ことを示している。

親電子性試薬や活性酸素により Nrf2 の DNA 結合活性は増加するが、しかし、Nrf2 自身の遺伝子の発現誘導は起こらず、Nrf2 の mRNA は増加しない。そこで、Nrf2 分子の詳細な構造活性連関の解析を行ったところ、同分子の N 末端に存在する Neh2 ドメインが上述のような環境刺激に应答するのに重要であることを発見した<sup>9)</sup>。本ドメインには新規の細胞骨格結合性蛋白質 Keap1 が結合して、Nrf2 活性を抑制的に制御する。Keap1 と Nrf2 の結合は親電子性試薬で解離し、その結果 Nrf2 は核に移行して、抗酸化酵素群の強力な転写活性化因子として機能する。これらの知見は、Nrf2 と Keap1 が新たな酸素ストレスのセンサー系として機能することを示しており、異物代謝系および化学発癌の研究において、たいへん興味深い。

- 1) Regulation of transcription by dimerization of erythroid transcription factor NF-E2 p45 with small Maf proteins. Igarashi, K., Kataoka, K., Itoh, K., Hayashi, N., Nishizawa, M. and Yamamoto, M. *Nature* **367**, 568-572 (1994)
- 2) Cloning and characterization of a novel erythroid-derived CNC family transcription factor heterodimerizing with the small Maf family proteins. Itoh, K., Igarashi, K., Hayashi, N., Nishizawa, M. and Yamamoto, M. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 4184-4193 (1995)
- 3) Molecular cloning and functional characterization of a new CNC family transcription factor Nrf3. Kobayashi, A., Itoh, E., Toki, T., Takahashi, S., Igarashi, K., Hayashi, N. and Yamamoto, M. *J. Biol. Chem.* **274**, 6443-6452 (1999)
- 4) An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant responsive elements. Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M. and Nabeshima, Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**, 313-322 (1997)
- 5) Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the N-terminal Neh2 domain. Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J.D. and Yamamoto, M. *Genes Dev.* **13**, 76-86 (1999)
- 6) Regulatory mechanisms of cellular response to oxidative stress. Itoh, K., Ishii, T., Wakabayashi, N., Yamamoto, M. *Free Radical Res.* **31**, 319-324 (1999)

Variety of receptor-transgenic animals for evaluation of bio-pharmaceuticals.

Joy A. Cavagnaro

Access BIO, P.O. Box 1362, Leesburg, VA 20177-1400, USA

A key consideration in support of the rational design and evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals has been the definition of a relevant species for preclinical studies. Preclinical program development has been accelerated by innovative experimental designs that incorporate efficacy, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety/toxicity endpoints. In addition, unlike conventional pharmaceuticals- the use of animal models of disease, as a relevant test species have not only seemed to accelerate the selection of potential lead candidates but these models have also been used to help define potential biomarkers of activity and safety for subsequent clinical studies. There is no "right model." Like conventional pharmaceuticals it is important to define the questions that need to be answered and determine which model is best suited to answer the questions. The challenge in evaluation of biopharmaceuticals is often the unique species specificity of these products. For example, receptor binding and/or activity is often restricted to non-human primate species. However, this exquisite specificity has led to the development of transgenic animal models including knock-outs, knock-ins, and models expressing human receptors. Some investigators have had problems of interpretation due to lack of experience with these models including longevity, natural life history, pathology, fecundity and breeding outcomes. Additional considerations include ensuring proper expression and regulation of the transgenic component and comparability of signal transduction pathways and other aspects of receptor biology. In some cases, the immunogenicity of products in the transgenic animal may still be an issue. Specific examples of the use of transgenic animals will be discussed for representative product classes including a monoclonal antibody, growth factor, vaccine and gene transfer product. The area of transgenic animal model development is an important area of continuing research. Such models enable sponsors and investigators to assess the actual clinical product and may obviate the need to carry on parallel development plans with homologous proteins.

## ワークショップ 3

---

安全性評価における新技術的と課題  
オルガナイザー序論

飯家公夫、松澤 利明\*

神戸学院大学 薬学部、山之内製薬(株) 薬事部\*

医薬品の探索研究は、技術的革新の進展に著しいものがある。一方、非臨床安全性試験は種々の規制があるため、急激な発展は見られていないが、方法論的には工夫がなされてきている。しかしながら、科学の進歩に伴って醫歯類や非醫歯類を用いた非臨床安全性試験は、ヒトへの外挿性を高くするために、信頼性のより高い新しい技術の開発の必要性が求め続けられている。

本ワークショップでは、免疫毒性、安全性薬理、光毒性および生殖毒性の領域について、最近の話題を各分野の専門家に紹介・解説を依頼した。

免疫毒性については、日本製薬工業協会および化学物質等試験研究協議会との共同研究の方向性と医薬品の開発段階における試験の在り方についての解説。安全性薬理については、最近の話題として本年会のセミナーの1つで国際的動向が紹介される。ここでは、欧米や日本のCROにおける技術的取組の紹介をお願いした。光毒性については、米国規制当局より試験のガイドライン案が公表されているので、実際どのような操作をして、どのような成績が得られのかについて紹介して頂けると期待している。生殖毒性については、話題の内分泌攪乱物質が性腺を介さずに生殖毒性を発現すると考えられてきているので、その発現様式の紹介と解説。最後の1題は、薬物動態試験などの知見を基に、研究開発の進め方について包括的な考え方を紹介して頂ける予定である。

これらの課題を一つずつ解決する事によって哺乳動物を用いる非臨床安全性試験の精度は高くなるものと思われる。さらに、これらの成果から動物資源の節減や動物への苦痛の軽減する可能性が見いだされることを期待したい。

Advanced technologies for safety evaluation of pharmaceuticals.

Kimio KARIYA and Toshiaki MATSUZAWA\*

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kobegakuin University, Ikawaddani-cho, Nishi-ku, Kobe, Japan and \*Drug Regulatory Department, Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd., Hasune, Itabashi, Tokyo, Japan

中村和希

日本製薬工業協会 医薬品評価委員会 基礎研究部会  
免疫毒性ワーキンググループ (塩野義製薬株式会社 新薬研究所)

これまでに環境化学物質等の免疫毒性評価手順が定められてきているが、医薬品については米国食品医薬品庁 医薬品評価研究センターや欧州医薬品審査庁 医薬品委員会がそれぞれ独自に免疫毒性評価手順に対する考え方を公表している。日本においても、そろそろ確固たる考えを持つべき時期に来ているのではなかろうか。その際、単に諸外国の考え方を模倣するのではなく、医薬品の薬効、曝露形態および他の毒性試験等を考慮しながら、実験データあるいは経験に基づいた議論を行うべきである。日本製薬工業協会 医薬品評価委員会 基礎研究部会は、このような背景、考え方のもと医薬品の免疫毒性評価手順を検討するための共同研究を実施することにした。なお、今回の共同研究では化学物質等安全性試験受託研究機関協議会所属各社にも呼びかけ計39社の参加を得た。

医薬品の免疫毒性評価を行う場合、一般毒性試験から得られる免疫系臓器等に関する様々なデータを有効に活用すべきであることは言うまでもない。その際、一般毒性試験で得られる病理形態学的所見が、どのように生体の免疫機能を反映しているかについて十分に考える必要がある。したがって、今回の共同研究では種々の化合物を用いて病理・血液学的所見と免疫機能の関連性を検討することを主な目的とした。

---

Collaborative study to establish a procedure for immunotoxicology evaluation of pharmaceuticals.

Kazuichi Nakamura

Immunotoxicology Working Group, Preclinical Evaluation Subcommittee,  
Drug Evaluation Committee, Japan Pharmaceutical Manufacturers Association;  
Developmental Research Laboratories, Shionogi & Co., Ltd.



今回、免疫機能検査としては、幅広く免疫担当細胞の機能を把握することのできる胸腺依存性抗原に対する抗体産生能測定試験を行うことにし、ヒツジ赤血球（SRBC）に対する血清抗体の酵素免疫測定（ELISA）および plaque-forming cell（PFC）アッセイを選択した。また、あわせてフローサイトメトリーあるいは免疫組織化学による胸腺、脾臓のリンパ球サブセットの解析も実施することにした。1群8匹の Cj:CD(SD)IGS ラット（雄）を用い、3用量の化合物あるいは媒体を1日1回、計14日間および28日間連続投与する。なお、投与開始時のラットの週齢は投与期間が14日間の場合8週齢、また投与期間が28日間の場合6週齢とした。いずれの投与期間の場合も、最終投与後1日目に病理学的検査のための解剖、血液学的検査、ELISA のための採血あるいは PFC アッセイを行う。また、ELISA および PFC アッセイのための SRBC 免疫を、それぞれ採血あるいはアッセイの6日前あるいは4日前に行うことにした。

今回の共同研究では、病理・血液学的所見と免疫機能の関連性の検討以外にも幾つかの目的がある。まず、実践を通して医薬品の免疫毒性評価手順に関する細かな問題点を把握し、その解決策を見出そうとしている。実際、共同研究にあたっては、用いるラットの系統・性・週齢、飼料、投与期間等の問題について議論がなされた。また、技術的な面に関しても、技術講習会を開催したり、意見あるいは情報交換を行いながら互いの技術の向上を計っている。各施設において、免疫毒性評価のための試験法の確立やシステム作りが徐々に進められていくものと考えている。

免疫機能検査については、今回、胸腺依存性抗原に対する抗体産生能測定試験を取り上げたが、免疫系は種々の免疫担当細胞が複雑に協調しあって機能しており、その他に例えば NK 細胞活性測定試験やマクロファージの貪食能測定試験等についても考慮に入れておく必要がある。また、種々の宿主抵抗性試験の実施についても模索を始めておくべきかもしれない。免疫毒性評価手順を検討するうえで、これらの試験に関しても、効率よく、どのような場合に実施したらよいかを考えておくべきと言える。この点については今後の課題になるであろう。

免疫毒性試験は新規の試験であるので、その実施にあたっては、技術水準や社会的認識等の面においても様々な問題を解決していく必要がある。また、これまで免疫毒性試験については欧米から多くを学んできたが、背景データの蓄積などの面において残念ながら欧米には及ばない。しかし、少しでも経験を増やしながらかデータを集め、自分達の考えを形成していく必要があるのではなからうか。本共同研究によって、医薬品の免疫毒性評価に関する問題の1つでも解決できればと考えている。

Peter T. Thomas, PhD  
Director of Toxicology

Covance Laboratories Inc., 3301 Kinsman Blvd.,  
Madison, WI 53704 USA

Immunotoxicology is becoming increasingly important to the process of drug development. Considered as "specialized testing," evaluation of the immune system is important in nonclinical studies where unintended immunosuppression is noted or where toxicity must be differentiated from deliberate, targeted immunopharmacologic effects. Furthermore, in the case of large molecular weight proteins or conjugated haptens, the development of specific antibody can alter the pharmacodynamics of the compound. In these instances, evaluation of immune function has been carried out in specific efficacy models to support drug discovery efforts as well as in GLP toxicology studies to answer specific mechanistic questions that arise during development. In contrast to the U.S. Environmental Protection Agency, that advocates a tiered approach to immunotoxicity testing, the U.S. Food and Drug Administration prefers a science-based approach to dealing with immunologic issues with sponsored compounds. Due to international validation efforts that have occurred over the last 15 years, the testing approaches for immune function are most advanced in rodent models and have been validated and utilized in standard nonclinical safety studies supporting drug development programs. Furthermore, to improve safety assessment and relevance, the degree to which the *in vitro* immune function tests correlated with accepted and meaningful models of host resistance to disease have been reasonably well characterized. This presentation will provide a review of the background leading to the present regulatory perspective on immunotoxicology and present examples illustrating its impact on drug development.

An overview of current techniques available for assessment of QT interval prolongation in regulatory pharmacology and toxicology.

Mrs Carol M Algate

Animal Technology Support and Development, Huntingdon Life Sciences, Woolley Road, Alconbury, Cambs. PE17 5HS, UK

The Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP) has issued a Points to Consider document entitled 'The assessment of the potential for QT interval prolongation by non-cardiovascular medicinal products'. In this document the CPMP propose pre-clinical in-vitro and in-vivo testing in addition to detailed clinical investigation.

Measurement of the electrocardiogram in laboratory animals has long been recognised as a legitimate means of detecting changes in the heart's electrical conductivity. The methodology, although not standardised across companies, should be robust enough within companies to permit the detection of ECG changes, particularly in QT intervals, reflective of the clinical situation. This, however, has not historically been the case as indicated by compounds such as terfenadine. It was this inability of the methodology to detect the possible QT interval prolongation that prompted the issue of this CPMP document. There are many ways in which collection of the ECG from laboratory animals can be improved and range from a small change in study design to the introduction of state of the art telemetric measurement in ambulatory animals.

The proposal to perform in-vitro studies, specifically to demonstrate effects on QT interval, was a new requirement and one for which the pharmaceutical industry were, in general, ill prepared. Nevertheless many companies have now added this 'requirement' to their drug safety submission packages. The diversity in the electrophysiological testing methodology adopted poses certain problems. Not only the range of tissues (purkinje, papillary and cardiac myocytes) but also species and physiological conditions compound the variations. This, taken with the lack of background information showing, to date, no clear relationship between the degree of QT prolongation and the risk of Torsades in man, makes interpretation of data obtained from these different studies extremely difficult. The need to construct a usable intra-company database becomes critical.

Each method for QT interval determination has advantages and disadvantages and should be considered along with the individual compound chemical structure, potential use and pharmacodynamic/pharmacokinetic profile. Not until a correlation between pre-clinical data and clinical manifestation has been demonstrated can a method be regarded as ideal.

○鈴木 潤、池田博信、下里 貴、福田好造、左近上博司、  
西森司雄

株式会社 環境バイリス研究所

ICH の検討課題に安全性薬理試験が取り上げられ、そのガイドラインがほぼ合意に達したとのことである。それに関連して我々が既に取り組んでいる安全性薬理試験法、特に心電図 QT 延長作用に関連する試験法について報告する。

抗生物質や抗ヒスタミン剤にみられる QT 延長作用とそれに伴う重篤な不整脈の発現に関する臨床研究が数多く報告され、また、その基礎としての電気生理学的研究も 1980 年代より報告の数が明らかに増加している。そこで用いられている試験法の検討と、我々が実施している安全性薬理学的評価法のうち、心筋単相性活動電位 (MAP) 法およびガラス管微小電極による細胞内活動電位 (APD) 法について報告し、心電図との相関性さらに安全性試験 (GLP) として実施する場合の問題点について考察したい。

尚、本研究の実施に当っては、MAP 法を山梨医科大学 橋本敬太郎先生、杉山 篤先生、APD 法を千葉大学医学部 甲谷晴昭先生、APD 法およびその他の方法を東邦大学薬学部 百瀬弥寿徳先生にご指導いただいたことを記して深謝致します。

#### MAP 法<sup>1)2)</sup>

チオペンタール (30 mg/kg, i. v.) 麻酔下にイヌを背位固定、気管カテーテルにより気道を確認した。1% ハロタン麻酔下、大腿静脈に 8F シースを挿入し、静脈を確認した。シースを介して、MAP/pacing カテーテル (EPT) を右心室に導き、右心室筋へ押し当てた。MAP/pacing カテーテルは MAP DC-COUPLED ISOLATED PREAMPLIFIER (EPT) を介して生体アンプ (AB-621G, 日本光電) へ導き、また体外心電図を第 II 誘導で心電図アンプ (AC-601G, 日本光電) を介して計測した。得られた生体信号は AD 変換 (MP-100WS) 後、循環動態解析ソフトウェア MP/VAS3 Ver. 1.6 (フィジオテック) を用いて  $MAP_{90}$  を算出した。

#### APD 法<sup>3)4)</sup>

モルモット乳頭筋標本作製: Pentobarbital 麻酔下、心臓を摘出し、混合ガス (95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>) を通気した Tyrode 液中で右心室の乳頭筋を摘出した。摘出乳頭筋標

本を Organ bath にピンで固定し、36°Cに保温した Tyrode 液を灌流した。  
活動電位測定: ガラス電極を乳頭筋標本に刺入し、フィールド電気刺激(頻度: 0.5 Hz、  
期間: 1 msec、電圧: 閾値の 150~200%)した時に得られる活動電位波形を微小電極  
増幅器を介して記録した。安定した波形が得られてから、溶媒および各濃度の薬  
物を含む Tyrode 液を累積的に各々少なくとも 30 分間灌流し、灌流開始直前および  
30 分までの APD<sub>90</sub> (90% 再分極までの活動電位持続時間)、静止膜電位および活動電  
位高(amplitude)を測定した。

### 結果および考察

- ①陽性対照候補物質(astemizole、cisapride など)を用いて、MAP<sub>90</sub>および APD<sub>90</sub>の  
用量依存的な延長作用が観察された。
- ②心拍数に影響を与える薬物の評価に従来より用いられる修正 QT 間隔(QTc)と  
MAP<sub>90</sub>との間に乖離が見られた。
- ③どこまでデータ採集の validation を厳密に行うかの議論は残るが、いわゆる信  
頼性基準の薬理試験のレベルまたはそれ以上のレベルの安全性薬理試験のための方  
法として上記の方法は実施可能であると考えられる。

### 引用文献

- 1) Sugiyama A et al : Effects of nonsedating antihistamine, astemizole, on the  
*in situ* canine heart assessed by cardiohemodynamic and monophasic action  
potential monitoring. *Toxicol Appl. Pharmacol.* **143**, 89-95(1997)
- 2) Sugiyama A and Hashimoto K : Effects of gastrointestinal prokinetic agents,  
TKS159 and cisapride, on the *in situ* canine heart assessed by  
cardiohemodynamic and electrophysiological monitoring. *Toxicol Appl  
Pharmacol.* **152**, 261-269(1998)
- 3) Nakaya H et al : Electropharmacological effects of UK-1745, a novel  
cardiotonic drug, in guinea-pig ventricular myocytes. *Eur. J. Pharmacol.* **383**,  
361-371(1999)
- 4) Kii Y, Inui A and Ito T: Effects of histamine H<sub>1</sub> receptor antagonists on  
action potentials in guinea-pig isolated papillary muscles. *Arch. Int.  
Pharmacodyn* **331**, 59-73(1996)

P. Donald Forbes, Christopher P. Sambuco and  
Douglas B. Learn

The Center for Photobiology, Primedica-Argus Laboratories  
905 Sheehy Drive, Horsham, PA 19044, USA

Structural and functional damage caused by acute or chronic sunlight exposure of superficial tissues (e.g., cutaneous and anterior ocular layers) is well documented. In those same target tissues, several interactions between drug products and "light" (optical radiation; ultraviolet or visible spectrum from natural or artificial sources) are also well known. We now recognize that there are conditions under which the effects of drug interactions with light are not limited to the body's surface tissues. Internal organs or retinal receptors also may be susceptible to such damage, if for example, they happen to occupy the intensely illuminated field of a medical examination or surgical lamp.

Several families of compounds are associated with light-drug interactions. For convenience we may distinguish between "direct" interactions involving photochemistry of the compound in question, and "indirect" mechanisms that do not require such photochemistry. Examples of drug classes with "direct" or photochemical interactions include psoralens (furocoumarins) and fluoroquinolone antimicrobials (FQA), both of which elicit phototoxic reactions in cell cultures, in animals and in man. Both classes include members that enhance photocarcinogenesis in laboratory rodents, and at least one psoralen, in combination with UVR, is a recognized human carcinogen. Several photodynamic therapy (PDT) drugs are administered systemically and consequently, they may elicit a phototoxic response in any tissue or organ that is then illuminated sufficiently. Yet other classes of compounds interact with light to produce a cutaneous immune response known as photocontact sensitization or photoallergy.

Examples of diverse drug classes with "indirect" or non-photochemical light-related interactions include tumor promoters, retinoids and dopamine agonists in rodents, plus systemic immune suppressors in both rodents and man. We can also consider photoprotection as a type of indirect interaction since the aim of photoprotection is to reduce light absorption or to prevent its consequences. Sunscreens are the most obvious and best represented examples of this interaction, but radioprotectant drugs are also being evaluated for such benefits.

We are now well beyond recognizing such interactions simply as laboratory curiosities. Because of their clinical relevance, tests for drug-light interactions are now a recognized part of the screening array and safety evaluations available to toxicologists. Considering the spectrum of new drugs and drug delivery systems, the traditional phototoxicology tests (photocytotoxicity, phototoxicity, photoallergy, photocarcinogenesis) have taken on many new forms and features, both *in vivo* and *in vitro*. Tests involving "alternative" models seem to appear daily; their validity undergoes constant evaluation.

In many jurisdictions, drug testing guidelines increasingly incorporate concerns related to light-drug interactions, but the guidelines tend to reflect significant regional and national differences in political, cultural and economic norms. This presentation includes comparisons of several different regulatory approaches as they influence the exercise of phototoxicology.

長尾 哲二

(財) 食品薬品安全センター秦野研究所・生殖生物学

現行の生殖発生毒性試験のうち受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 (I 試験) では、雄の交配前投与期間の検討、精子検査、性腺の組織学的検査の実施の可否の検討などに重点が置かれている。しかし、精子の運動性・形態・数、性腺の組織学的形態、あるいは各種性ホルモン濃度に影響が認められなくても生殖能力に影響が現れることは多い。そこで精巣障害を介さない生殖毒性の発現について、脳に特異的に取り込まれる核酸類似物質を用いた実験例を紹介する。

ラットの妊娠 9～15 日あるいは 16～20 日に、5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) の 12.5～100 mg/kg を連続腹腔内投与した後、自然分娩させて雄新生児を得た。成熟後に無処置雄と交配させ、生殖機能に対する処理効果を、交尾率 [C]、妊娠率 [F]、精巣比体重値 [T] に関して調べた。9～15 日処理群では、[C] が用量依存的に減少し、100 mg/kg 区で 0% となった。[F] も用量依存的に減少し、50 mg/kg 区で 0% となった。16～20 日処理群では 100 mg/kg 区でも [C] および [F] は対照群と同レベルであった。[T] に関してはいずれの処理群においても有意な処理効果は認められなかった。さらに 9～15 日処理群の 100 mg/kg 区では、性腺、脳および下垂体の組織学的形態、精子運動能ならびにテストステロン濃度にも処理効果はみられなかった。同様の結果はマウスでも得られた。また用量-反応関係を検討するために BrdU の 100～800 mg/kg をマウスの妊娠 10 日に投与すると 200mg/kg 以上の処理群で [C] の著しい減少が認められたが、性腺の組織学的異常は観察されなかった。そこで脳を調べた結果、[C] の低下が認められた用量域で軽度の脳室拡張が観察されたので、BrdU 処理による生殖障害は脳障害を介して発現する、という作業仮説を立てた。この仮説の下に、妊娠 10 日あるいは 16 日に BrdU を投与して胎児の脳を調べたところ、妊娠 10 日投与では大脳外套脳室帯 ventricular zone of the telencephalon および間脳視床下部辺縁 mantle layers of the diencephalon の細胞においてアポトーシスが無処置対照以上に著増しているのが認められた。この細胞死の増加は、最低用量でも起きており、非閾値型の用量依存性を示した。妊娠 16 日投与では細胞死の有意な増加はみられなかった。これらの結果は次のことを示唆する。①胎



生期における低用量の BrdU 処理によるアポトーシスの結果生ずる脳細胞欠損は、周囲の健全脳細胞の分裂によって完全修復されて中枢神経系障害をもたらさない。②アポトーシスが組織修復能の限界を超えて過剰誘発されると、中枢神経系障害が発生し、後に交尾行動など生殖機能の低下をもたらす。③胎生前～中期の脳細胞は、後期脳細胞と比較して BrdU に対し高感受性である。

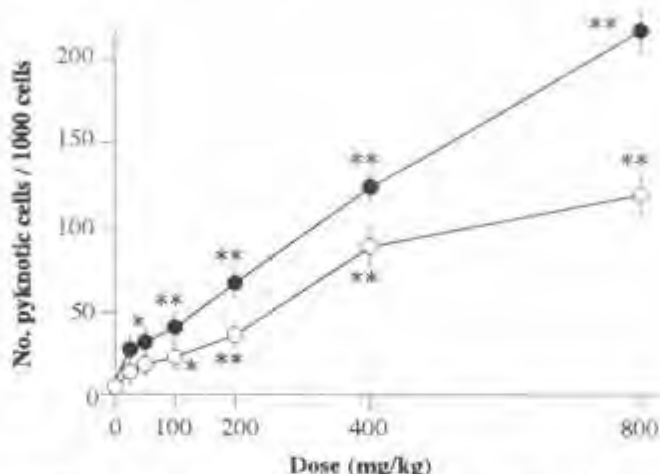


Fig. 1. Dose-response curve of the incidence of pyknotic cells in the ventricular zone of the telencephalon (○) and in the ependymal and mantle layers of the diencephalon (●) of embryos of dams treated with BrdU on day 10 of gestation. Each point represents the mean of four to six embryos. Vertical lines represent S.E. \*Significantly different from the control at  $P < 0.05$ ; \*\*Significantly different from the control at  $P < 0.01$ .

ラットの性行動を調節すると考えられている視床下部神経核群の性的二型核 (SDN-POA) の構造には、体積、ニューロン数およびニューロン密度とも変化はみられなかったが、BrdU の胎生期処理個体には、生後の学習・記憶能力の低下ならびに自発運動量の亢進がみられたことから、なんらかの神経伝達系の障害が発現していると考えられる。今後、胎生期中枢神経系障害と生後の生殖機能障害との関連のギャップを埋めることが重要である。

#### 【参考文献】

- Nagao et al. (1997) *Reprod. Toxicol.* 11: 37-45  
 Nagao et al. (1997) *Reprod. Toxicol.* 11: 663-673  
 Nagao et al. (1998) *Reprod. Toxicol.* 12: 477-487  
 Nagao et al. (1998) *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 18: 73-92  
 Nagao et al. (1999) *Reprod. Toxicol.* 13: 303-311  
 Kuwagata M, Nagao T, et al. (1998) *Reprod. Toxicol.* 12: 541-549

堀江 透

ディ・スリー研究所

**臨床での重篤な副作用をいかに予測するか**

すでに上市された医薬品でも市販後調査の中で安全性に問題が生じ市場から回収される事態も起こっている。1998年、海外からの副作用情報であるが、副作用の発生により医薬品が市場から回収された。非ステロイド系解熱鎮痛剤デュラクトで2万人に一人の割合で生じる重い肝障害が原因であった。デュラクトは上市1年弱で、250万件の使用経験の中で、死亡・重篤な肝障害が12件報告された。チトクロームP-450の阻害に基づく薬物相互作用が生じ、市場から回収したボシコールの例もある。相互作用に基づく重篤な副作用が発現し販売を中止せざるを得なかった。安全性の問題は研究開発の重要意思決定要因となることはよく知られているが、市販された後も安全性に問題が生じれば市場から回収という企業にとって手痛いダメージを受けることになる時代である。医療現場では相互作用は副作用の問題として捉えられ、併用する薬剤によっては重篤な副作用を生じることがあり、薬物代謝酵素の誘導・阻害の代謝的特徴は有用性を失わせるだけの重要な問題を提起する。

**研究開発の意思決定に関わる安全性の問題**

創薬研究における探索段階では実験動物を用いて臨床効果を予測する薬効薬理試験が実施されるが、多くの場合主作用の延長上で起こる毒性的変化を毒性と評価しない場合もある。安全域が広ければ問題ではないと判断する場合が多いが、動物での安全域と臨床での安全性評価とは大きく異なる。臨床では効いて当たり前であるか

ら安全域という評価は成り立たない。ヒトでの副作用症状を動物から予測することについては①心脈管系は 86%、消化器系は 35%、呼吸器系は 60%、中枢神経系は 33%の一致を見るが、皮膚症状は 0%でほとんど予測できない。臨床第 I 相試験時の安全評価の問題で開発を中止したケースについて示す。①降圧作用を有する活性代謝物が認められた。ラットでは未変化体に比べて活性代謝物の割合が 0.5%と極めて少なく問題とならなかったが、ヒトでは未変化体の 3.5 倍と逆に高濃度を示し、活性代謝物による起立性低血圧が観察された。活性代謝物による予期しない副作用が発現したケースである。②血漿中濃度に著しい光学異性体の差が認められた。動物(マウス、ラット、ビーグル犬およびサル)では d 体と l 体の薬物動態に有意な差は認められなかったが、ヒトでは d 体と l 体との間に Cmax で 50 倍の差が生じた。非臨床試験の段階では d 体、l 体の薬効に差が無く、薬物動態にも差がないため、ラセミ体での開発を進めていたが、臨床第 I 相試験において、光学異性体の薬物動態に大きな差が生じたためラセミ体での開発を断念した。塩基性化合物は血漿中の  $\alpha$ 1-acidglycoprotein と結合するが、動物では d 体、l 体の蛋白結合率に差はなく、ヒトとチンパンジーだけが d 体、l 体との間に大きな蛋白結合率に差が生じ、薬物動態に光学異性体間の差が観察されたのである。非結合型薬物濃度が効果にも安全性にも重要であることを示したケースである。③ヒトでの半減期が約 360 時間と著しく長く、蓄積性が懸念された。副作用は認められなかったが、蓄積による副作用が発現した場合、速やかに体外へ排泄させる手段がないことが問題にされ、安全性の問題で開発を断念せざるを得なかった。④臨床第一相試験で CYP3A4 の誘導が観察された医薬候補品が実際、初期臨床第二相試験においてシクロスポリンとの併用により、シクロスポリンの作用を減弱して同薬剤のリバウンドに伴う「寝汗、全身のほてり、発汗、上肢・手の熱感」が出現した。薬物代謝酵素の誘導・阻害は臨床、薬効、副作用および薬物相互作用の面から新薬開発上の重要な問題を提起し、開発を困難にする。

## セミナー 1

馬屋原 宏

武田薬品工業（株）  
創薬研究本部 研究推進部

「安全性薬理試験」とは、新薬候補化合物の安全性を薬理学的観点から検討する非臨床試験である。この用語は、最近まで国際的に共通な定義もなく、主に欧米の一部の研究者によって使用されるにすぎなかった。しかし、安全性薬理試験は臨床試験の開始や承認申請に必要な非臨床試験のひとつとして、現在ICHにおいてガイドラインの作成が進行中であり、今や非臨床試験の中で最もホットな話題となっている。

日本では安全性薬理試験的な試験は一般薬理試験の中で実施されてきた。日本における一般薬理試験関連の規制としては、1967年の薬務局長通知に初めて一般薬理試験の必要性が記載された。次いで1975年の課長通知で、一般薬理試験については、「一次スクリーニングの結果を示し、中枢神経、末梢神経、感覚器系、呼吸・循環器系、平滑筋及び主要臓器について検討すること、及び腎機能および臨床副作用に関連した試験も実施することが望ましい」と記載された。この通知には試験項目や方法の詳細は記載されず、試験者の裁量に任されたが、その結果一般薬理試験の試験項目はその後止めどなく増加することとなった。このため試験項目を記載したガイドラインの作成を要望する声が国内外から高まり、これを受けて1991年に世界に先駆けて「一般薬理試験ガイドライン」が制定された。このガイドラインには、試験の目的として、1) 薬理作用のプロフィールを明らかにすること、2) 臨床副作用の予測と対策の検討、3) 毒性試験によっては必ずしも明らかにし難い機能への影響の検討、の3つが記載された。この改訂により試験項目が通常実施すべきA項目と必要に応じて実施すべきB項目とに整理された。しかし、元々厚生省のガイドラインの目的は承認申請の際に必要なデータのリストであり、安全性の検討よりもむしろ薬理学的プロファイリングを主目的とし、クライアントは規制当局であった。従って試験項目は依然として多く、臨床試験との関連が薄かった。これに対し欧米では、安全性薬理試験は臨床試験の開始に必要な試験という意識が強く、主なクライアントは治験（倫理）委員会や治験担当医師であった。従って厚生省の一般薬理試験ガイドラインは欧米の企業や規制当局の受け入れるところとならず、欧米企業が日本に新薬承認申請する際には、実施済みの安全性薬理的試験に加

えて、不足している一般薬理試験項目を追加して厚生省に申請するのが常套手段となっていた。

一方、1993年には米国でGeneral Pharmacology/Safety Pharmacology Discussion Meetingが発足し、以後毎年Philadelphiaに日・米・欧の専門家を集めてこの分野の試験のあるべき姿を議論するようになった。また、1994年にICHで「臨床試験の実施に必要な非臨床試験の実施タイミングのガイドライン」の検討が開始され、1997年にこのガイドラインが成立した。このガイドラインは、安全性薬理試験を、少なくとも生命維持に直接関係する臓器については臨床試験の開始まで実施すべき試験として、初めて国際的ガイドラインに記載したという意味で画期的なものである。しかしこのガイドラインでは、安全性薬理試験の定義をはじめ試験の詳細は将来の検討事項として残された。

これらの情勢から、国内においても「一般薬理試験ガイドライン」の見直しの気運が高まり、これを受けて厚生省は1996年に「一般薬理試験ガイドラインのハーモナイゼーション推進のための厚生科学研究班（班長：国立衛研 藤森室長）」を組織し、「一般薬理試験ガイドライン」の改訂に取りかかった。1998年夏には研究班から現行の「一般薬理試験ガイドライン」に代わるものとして「安全性薬理試験ガイドライン改定案」が提示され、国内のみならず海外のコメントを求めるために欧米にも発送された。

ところがほぼ同時にCPMP（欧州医薬品庁）が「安全性薬理試験ガイドライン案」を公表し、FDAもガイドライン案を検討中であると伝えられた。そこで製薬協（基礎研究部会）は、安全性薬理試験ガイドラインのハーモナイゼーションが必要であるとして厚生省と協議し、安全性薬理試験ガイドラインの作成をICHの新トピックとすることをICH運営委員会に提案し、1998年9月にこれが承認された。これを受けて「一般薬理試験ガイドラインのハーモナイゼーション推進のための厚生科学研究班」は、発展的に解消して「安全性薬理試験ガイドラインのハーモナイゼーション推進のための厚生科学研究班」として再組織された。

ICH安全性薬理試験ガイドラインの作成は、厚生省の「安全性薬理試験ガイドライン案」が欧米案と異なり、試験項目を記載せず、GLPにも触れない内容であったため、最初難航が予想されたが、実質的審議期間1年で2000年2月にStep 2（日・米・欧、産・官の一次合意段階）に達した。このガイドラインは、6カ月の意見徴集期間を置いて2000年1月にはStep 4（最終合意段階）に達すると考えられている。

本セミナーは、本年度のトキシコロジー学会学術年会在り度この意見徴集期間に開催されるのに合わせ、安全性薬理試験に対する理解を深めるために計画された。本セミナーでは、まず最初に「ICH安全性薬理試験ガイドライン（案）の現状」と題して、ICH安全性薬理試験ガイドラインを審議した専門委員会(EWG)のラポーター（班長）を勤めたファルマシアアップジョンの橋本宗広氏に、安全性薬理試験ガイドライン作成の背景と、ガイドラインの内容を解説していただく。その後、基礎と臨床の両面から、特に動物データからヒトへの外挿性の可能性と限界をテーマに3人の専門家に安全性薬理試験の解説をしていただく。まず、山梨医科大学薬理学教室の

橋本敬太郎教授に、「呼吸・循環器系からみた安全性薬理試験—特にQT延長に関して」と題して安全性薬理試験の中で最も重要と考えられる呼吸・循環器系の安全性薬理試験、特にQT延長に関して臨床での安全性が動物実験から予測できるかどうかなどについて専門的立場から講演して頂く。次に厚生科学研究班で常にオビニオンリーダーであられた東京慈恵会医科大学とイナリサーチの柳田知司名誉教授に、「ヒトでの予測を踏まえた安全性薬理試験のあり方」と題し、一般薬理試験と安全性薬理試験の違い、安全性薬理試験の具体的進め方、安全性薬理試験のヒト安全性への外挿の有効性と限界などについて論じていただく。次いで、大阪大学薬学部の東純一教授に、「臨床の立場から見た安全性薬理試験」と題して、治験（倫理）委員会あるいは治験担当医が必要とする安全性薬理試験情報とは何かを、実例を含めながら論じていただき、最後に医薬品機構の藤森観之助顧問（厚生科学研究班長）に全体をまとめていただく。

橋本宗弘

ファルマシア・アップジョン（株）

研究統括部 毒性・薬理グループ

[ガイドライン作成の背景] 被験薬の生理機能に対する安全性評価として薬理試験の必要性については認知されていたが、国際的には用語・定義・目的について明確にされていなかった。本邦においては、世界に先駆けて1991年に一般薬理試験ガイドラインが公布され、被験薬の対象となる疾病に関する作用（薬効薬理作用）以外の薬理作用のプロファイルを明らかにするとともに臨床適用時に発現の可能性のある副作用の予測に資していた。安全性薬理試験という用語がICHガイドラインに最初に用いられたのは、1997年に公布されたM3（非臨床試験の実施時期）およびS6（バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床試験ガイダンス）である。その中で、生命維持に関係する生理機能についての安全性薬理試験は臨床試験試験開始前に実施することを求めてられている。このような背景の中で、安全性評価に重点を置いた薬理試験の国際的ガイドラインの必要性が高まり、安全性薬理試験がICHの新規テーマとして1998年の9月に取り上げられることになった。

[ガイドラインの要点] 安全性薬理試験は、生理機能に及ぼす被験薬の望ましくない薬力学的な作用を暴露量と関連付けて検討する試験と定義付けられた。新規合成医薬品、生物工学由来医薬品および場合によっては既承認薬が本ガイドラインの対象となる。安全性薬理試験の目的は、被験薬の可能性のある副作用を特定したり、前臨床および臨床で見られた有害作用の評価、その機序を検討することにある。副作用には、薬効薬理作用と関連するもの、化学構造または治療分類に共通する作用、受容体、酵素活性から予測できるもの等がある。存在する可能な限りの全ての情報（薬理、毒性、代謝、臨床、文献）を考慮して試験を計画・実施する必要がある。評価方法は、試験によっては標準的方法から全く新しい技術や手法が必要になることがある。従って、安全性薬理試験の選択、計画および実施



には定型的なものを求めるのは難しく、むしろもっとも適切な試験を理論的に決定していくことが重要である。しかしながら、生命維持に関わる生理機能についての試験は、Core Battery の試験（中枢、循環、呼吸）として原則的にどの被験薬についても求められている。中枢試験の標準法として FOB（Functional Observational Battery）、Irwin の変法が推奨されている。循環器については、基本項目は呼吸・血圧・心電図の測定であるが、近年重要と考えられている電気生理学的検討も考慮すべき項目となっている（本ガイドラインの付加文書として将来検討予定）。呼吸については、回数・深度を求めることになっているが深度について通常は症状観察でも可能である。Core Battery 以外の試験は定型的なものではなく、懸念される副作用の可能性がある場合は、必要に応じて実施することが求められる。これらについては、Core Battery のフォローアップ試験および Core Battery で実施されていない項目についての補足試験（腎・泌尿器系、自律神経系、胃腸管系、その他の器官）が挙げられている。安全性薬理試験の実施が必ずしも必要とされない場合は、生命維持に関わる臓器への分布・全身暴露が極めて低くその薬理学的特性が明らかにされている局所投与薬物、末期癌患者に投与されるような細胞毒性薬物（新規作用機序のものは除く）の臨床試験前の試験、高度に臓器選択性を持たせたバイオテクノロジー応用医薬品等が挙げられている。用量の設定については、薬効用量もしくは治療用量以上の用量での用量反応関係について確認する必要がある。無影響であることを示す時の最高用量は、同一投与経路および同様な投与期間の毒性試験で何らかの影響を及ぼす用量（震戦・攣縮引き起こし正当な生理機能への評価を妨げる場合はそれも用量制限の因子となりうる）が設定されていなければならない。試験の品質・信頼性を保証するために、安全性薬理試験は基本的には GLP で実施されねばならない（特に、core battery）。しかし、先に述べたように非定型的な試験については GLP を完全に実施できない場合もある。その場合には、実施できない理由、試験の評価に与える影響を述べるとともに、試験の再構築性を考慮に入れ適切な実験資料保管がなされていなければならない。

本発表では、ガイドライン(案)の内容を各項目に従ってさらに詳述する。

○橋本敬太郎

山梨医科大学 薬理学教室

### 背景

International Conference on Harmonization の一つのトピックとして「安全性薬理試験」という概念が導入され、ガイドラインが作成中である。従来かあ薬効薬理試験としての動物実験を循環系の薬物、特に心臓作用薬について行っているの、それらの動物実験データとその後に明らかになった臨床成績や副作用を振り返って、積極的に臨床での安全性が動物実験から予測できるか、また不必要な動物実験減らせるかを考えてみたい。

クラス I 抗不整脈薬 (Na チャネル抑制薬) が Cardiac Arrhythmia Suppression Trial (CAST) study 等により長期投与で心臓死を増加させたことは、Na チャネルの機能が正常の心臓電気活動でも重要なことから、薬理作用から有害作用を説明したり、心臓作用薬に関しては前臨床試験に催不整脈作用を検討するためのプログラム電気刺激法などが積極的に導入される様になった。しかし CAST 以降の抗不整脈薬として K チャネル抑制薬が開発された時には、臨床での torsades de pointes (TdP) の発生を前臨床試験から予測出来なかった。K チャネルを抑制し、QT および心筋不応期を延長させる薬物は動物実験でのリエントリー不整脈に対する有効性や、既存の抗不整脈薬との薬効の差は証明でき、d-ソタロール、E-4031、ニフェカラン、セマチリド、ドフェチリドなどが臨床試験まで進んだが、先天性 QT 延長症候群が突然死を起しやすいことと同様に、薬物でも TdP と言われる危険な心室頻拍が誘発される事が報告され、多くのクラス III 薬に対する開発が中断された。さらにこれらのクラス III 抗不整脈薬と同様に QT を延長する薬物に共通して不整脈発生や突然死が報告され、それらの中には心臓作用薬として開発されなかったテルフェナジン、アステミゾール、エリスロマイシンなどが含まれ大きな問題になった。その後の研究で動物実験で心電図の QT 延長を証明したり、より正確に単相性活動電位 (Monophasic Action Potential, MAP) で不応期の延長やイオンチャネルレベルでの作用機序を明らかにすることは出来、徐脈時に強く QT を延長する薬物に危険度が高いことが分かった。しかし少しでも有意に QT が延長したら危険なのか、ある程度以上の延長が危険なのかは不明である。またイスなどを使ってのそれらの薬物による催不整脈作用の証明も、慢性房室ブロック犬を使えば証明できることが明らかになったが、こ

とが明らかになったが、これらの手間が掛かり高価な動物実験がすべてのQT延長を起こす薬物に必要なのかは不明である。

#### ガイドライン案にもられている薬物の循環系に対する評価項目

薬物の検討すべき循環系に対する作用 Core Battery として血圧、心拍数、心電図に対する作用を検討し、場合によって摘出心臓、遊離心筋細胞などを用いた電気生理学的な実験も必要だと述べられている。さらにより詳細に検討する Follow-up Studies には、心拍出量 cardiac output、心筋（心室）収縮性 ventricular contractility、血管抵抗 vascular resistance、内因性および外因性神経伝達物質の循環系に対する作用などが求められよう。特に心臓機能は臨床的に非観血的に心拍出量、駆出率 ejection fraction、心筋短縮率 fractional shortening、心室局所壁運動異常などが超音波エコー法で容易に求められることから、それらに対する動物実験も揃える必要がある。超音波エコー装置は比較的高価な上に、イヌでは肺臓が心臓と胸壁の間に存在し超音波がうまく反射しにくいこともあり、それらのデータ取得には開胸した心臓に距離測定用超音波プローブや左心室内カテーテル挿入などの手術操作を加えた実験が必要であり、またラットやマウスなどの小さい動物では詳細なデータを得にくい。

#### 我々の動物実験の成績と臨床効果に差のあった事例

前述の前臨床試験の時点で臨床での薬物の有害作用を予見出来なかったことは、いくつかの薬物で経験があるが、その中には麻酔の影響によるものもある。例えば動物実験で使うバルビタール系麻酔薬は心拍数を高くさせるために、クラスⅢ薬の徐脈で増強される過度のQT延長およびそれによるTdPの発生が見つけれなかった。ハロセン麻酔や無麻酔下の慢性房室ブロック犬ではそれらの作用が証明できている。正常な実験動物では認めにくいのが、病態時に出現し易い循環系の作用として、心収縮力低下作用がある。抗不整脈薬のジソピラミドは心筋収縮力を抑制するが、血管収縮作用や自律神経系の代償作用で血圧の低下は認めにくい。心不全状態の心臓には危険であることが、前臨床成績からは強調されなかった。種差による問題はしばしば起こり得るが、我々はヒトでの心筋梗塞時に最も使われ有用とされるリドカインがイヌでは大量で強い中枢興奮作用を伴う様な用量でしか効かなかったことを報告した。おおむねイヌで決定した抗不整脈薬の有効血中濃度は臨床でのものと関連したが、リドカインはイヌでの有効濃度が高かった。またいくつかの薬物では臨床上QT延長が認められたのに、イヌの心電図記録では変化が認められなかった。

以上のような事例は、比較的少なく我々は薬物の動物実験の成績が臨床での薬効、安全性を予測する上で有用であるとは信じているが、しかし細かな点までの相関を限り無く求めるよりは、種差を考えればヒトでの試験を慎重に行う方が薬物開発での時間の節約にもなるし、またしばしば問題になる臨床での有害事象の報告の発生率が低いことを考えると、それを動物実験で再現するのは極めて困難と思われる。

柳田 知司

- 1) 東京慈恵会医科大学薬理学第1講座
- 2) (株)イナ リサーチ 薬理毒性部門

ある被験薬をヒトにはじめて適用するとき、最も危惧されるのは薬物に対する異常な反応、とくに生命の維持にかかわる重篤な薬物反応の発現である。そのため、臨床第1相試験に入る際の治験審査委員会では非臨床安全性試験の成績がつぶさに検討され、ヒトでの安全性が予測されるが、その際に最も頼りになる情報は、単回投与あるいは反復投与毒性試験の成績ではなく安全性薬理試験の成績とされている。その理由は、第1相試験では被験薬の投与は、まず単回で、それも薬物の作用が発現しないと思われる低用量から開始され、その際の身体症候や血中濃度を確認しながら、段階を踏んで徐々に薬効量と考えられる用量まで増量される。したがって毒性試験で用いられる用量で起こる変化はあまり参考にならず、薬物の作用が発現する前後の用量で生体にどのような重篤な薬物反応が起こるかが関心の的となる。従来的一般薬理試験はこの情報をカバーするために行われてきたが、一般薬理試験は安全性に資するのみならず、全身に対する薬物の作用スペクトルも把握するという狙いがあるため試験項目が広範囲になり、かつ安全性という観点からは試験項目が形骸化して無駄が多い試験となってしまった嫌いがあった。そのため今後、ICH では臨床用量を適用したときのヒトでの安全性という点に焦点を絞った安全性薬理試験が議題として取り上げられ検討されている。

単回あるいは短期反復投与時の生命維持にかかわる重篤な反応と言えば、その多くは急性の反応で、まずは循環機能、呼吸機能、および中枢神経機能の障害が考えられる。そこで現在ICHで検討されているガイドライン案では、この3つの器官系に及ぼす影響を調べる試験を基本試験として core battery 試験と呼び、薬物の特性に応じて消化器や泌尿器、血液などの器官系に及ぼす影響

を調べる試験を supplement 試験と呼んでいる。また core battery 試験で重篤な反応の発現を示唆する結果がみられたときには、さらにもう少し詳細な変化、発現機序、あるいは救急治療法などを追求するための追加試験が必要とされが、これらの試験は follow up 試験と呼ばれている。名称はともかくとして、現在 ICH で議論されている安全性薬理試験はこのような内容である。

このうち core battery 試験はその方法にあまり選択の余地はなく、また、どのような薬物でも一通りは行う試験となるであろうから、ある程度標準化されることになろう。それに対して supplement 試験や follow up 試験は、個々の薬物の物理化学的および薬理学的特性に合わせて、あるいは core battery 試験の成績如何で試験の種類や方法が選択されるべきものであり、研究者の自由裁量による面が多くなる。自由裁量に際して常に忘れてはならないことは、その試験が果たしてどれだけヒトでの重篤な反応の予測や発現機序の解明に役立つかどうかという吟味である。詳しくれば詳しいほど良い、というものではない。たとえば core battery 試験でみられた全ての異常について follow up 試験を行う必要はなく、それがヒトでどれだけ重篤な反応につながるかを判断の上実施の是非を決めることが大切である。そのために研究者は、第1相試験に入るに際してヒトでの安全性予測のためにどのような情報が必要とされるかを心得ておく必要がある。

どのような試験にせよ、役に立つ情報とは、目的とそのための方法の選択が適切で、かつ適切な用量が用いられている試験によって得られる。しばしば、無麻酔下の試験で得られたグローバルな情報の方が、高度の技術を駆使した緻密な、しかし麻酔下の試験で得られた情報よりヒトでの安全性の予測には役に立つことが多く、必ずしも情報量が試験の薬理学的レベルの高さに相関するとは限らない。

これらの試験によりヒトでの安全性は十分に保証できるかという点、必ずしもそうとも言えず、例えばアナフィラキシーショックなどの急性アレルギー反応が起こらないとは言えない。しかし、現在のところヒトでそれを的確に予測する方法がない現状では、それは予測の限界を超える問題であり、今後の研究の進歩に委ねるより他にいたしかたないであろう。

東 純一

大阪大学大学院薬学研究科

新規医薬品のヒト臨床試験に先立って実施しなければならない非臨床試験には、単回および反復投与毒性試験をはじめ多くの毒性試験がある。一方、安全性評価の試験として安全性薬理試験および薬物動態試験がある。医薬品開発の主目的となる薬効を評価するには、薬効薬理試験 (primary pharmacodynamics) が行われる。

ヒト臨床試験での初回投与量を設定し、また有害事象を推測、把握するために、毒性の標的臓器、用量依存性、暴露との関係、回復性などの毒性の特徴に関する試験結果を得ておくことは、科学的かつ倫理的な面から被験者の安全性を確保するための重要な情報を与える。一方、安全性の確認を目的とする安全性薬理試験 (safety pharmacology) は、心血管系、中枢神経系、呼吸器系のように主として生命維持に重要な生体臓器機能 (core battery) に対する作用を評価するものである。独立した試験としてまたは毒性試験の一環として実施されるが、通常、有害事象が特定の薬理作用に基づくものであれば安全性薬理試験、非特異的な細胞毒性や器官毒性によるものならば毒性試験の対象であるとされる。

本セミナーで演者に与えられた演題は、第Ⅰ相試験 (臨床薬理試験) の開始に際し、「core battery studies (心臓・循環器系、呼吸器系、中枢神経系) でどのような機能を見ておくと安心して臨床試験を開始できるか？」である。安全性薬理試験をどのように取り入れるかについて私見を述べ、続いて安全性薬理試験を考えるうえで参考になると思われる臨床例を元に話題を提供する。安全性薬理試験と毒性試験はいずれも重要であるが、その境界は不明瞭である。ヒトに初めて医薬品候補物質を投与する時、臨床の立場からの回答は唯一つ、「いずれの情報も重要と考える」である。

#### 安全性薬理試験について

安全性薬理試験の概念は元々日本にはなく、欧米の一部の製薬企業で臨床試験の開始前に、いわゆる core battery 系を中心に主として動物を対象として実施されていた

試験である。安全性薬理試験で用いられる用量もしくは濃度は、ヒトで目的とする治療効果を得るために必要な量、さらには毒性試験で何らかの毒性が出る量と考えられる。この試験の情報から、ヒトに初めて薬物を投与する時に最も懸念される有害反応は；

- それが死に繋がらないか？
- それが如何に重篤か？
- 対応策があり、かつ対応が可能か？
- 後遺症が残らないか？ などである。

推定有効用量で生命維持機能に対する何らかの影響が認められるにもかかわらず、ヒト臨床試験を開始するという場合を想定し考えてみる。初回投与量の設定に関する議論も当然、不可欠であるが、ここで知りたい情報は；

- 有害反応を引き起こす物質が確認されているか？
- 有害反応を引き起こす機序が解明されているか？
- 有害反応の用量反応性が確認されているか？
- 有害反応の前兆を評価し、臨床的に捉えることが可能か？
- 有害反応に対する処置法があるのか？
- 有害反応に種差はあるのか？
- 有害反応が起こりやすい生体側の要因があるのか？ などである。

通常は、目的とする薬理作用が認められる用量と安全性薬理試験で有害反応が認められる暴露量が接近していれば、その有害反応の危険度を勘案して臨床試験の実施の是非が議論される。当然、この開きが大きければ試験を実施してもよいと考えるが、如何なる有害反応であっても、上記の情報があれば比較的安心して臨床試験が開始できる。

#### 話題提供：常用量の併用投与時の肝機能障害

結核治療薬 isoniazid (INH) と rifampicin (RFP) の併用投与で、高頻度に肝機能障害が発現することが知られている。INH の主代謝酵素は *N*-acetyltransferase 2 (NAT-2) で、古くから遺伝子多型が知られ、変異遺伝子の発現頻度には人種差が認められる。また、INH の NAT-2 によらない代謝物の一つに hydrazine がある。一方、RFP は多くの薬物代謝酵素を強力に誘導する作用がある。

今回は、常用量の INH と RFP の併用投与時に認められる肝機能障害を事例として、問題点を抽出し、常用量、親化合物と代謝物、薬物代謝酵素遺伝子多型と人種差、薬物相互作用（酵素誘導による）について論じ、臨床の立場から見た医薬品の安全性について問題を提起し、考えてみたい。

藤森観之助

医薬品機構治験指導部

最初に安全性薬理と一般薬理の役割の差について述べたい。効力に関する薬効薬理試験以外の薬理試験とした一般薬理試験に被験物質の安全性予測や副作用の機序・対策のための解析の他に候補医薬品の絞り込みや投与量設定などの可能性を期待したのは当然であり、日本の現行一般薬理試験ガイドラインには安全性に関する薬理試験以外に薬理プロファイルという部分を含めた。しかし標的疾患のメカニズム解析など解析技術の発展に伴い、機能における薬動力学標的がより特異的かつ明確化するにつれ、薬効薬理作用以外の薬理作用を更に望ましくない作用（安全性薬理作用）とその他の（Secondary）薬力学的作用に分ける方がより合理的であると国際的には見なされる方向となった。また、医薬品の開発における安全性の確保として、臨床副作用の予想等における重要性が増すにつれ、より一般薬理試験の範疇にその役割が期待されるようになった。その結果、一般/安全性薬理の定義、試験範囲など、日本の現行一般薬理試験ガイドラインの存在を意識した議論が国内外で沸きあがり、それを受けて平成8年より「一般薬理試験ガイドラインのハーモナイゼーションのための研究班」が発足し、安全性に焦点をおいた一般薬理試験ガイドラインの改正（安全性薬理試験ガイドライン案）研究を進めた。その結果がICHに反映し、先導的役割を果たし、ICHの正式Topic: S7としてガイドライン化の作業を開始して以来、わずか1年でStep 2 安全性薬理試験ガイドライン案が完成し、ほぼ3極の医薬品業界サイドおよび規制サイドで同意に達せしめた。第一題でそのICHガイドラインの内容が紹介される。

医薬品によってヒト機能に起きる有害事象を予測することは医薬品の開発上、極めて重要であることは当然である。研究班で結論に達した安全性薬理試験の原則は自主的な試験の選択を尊重することである。現在の古典的薬理試験は他の安全性



試験に比べると方法の確立あるいは技術の体系化が遅れており、実験動物での結果からヒトでの有害事象の発生を予測出来ることは少なく、動物からヒトへの外挿において劣っていると指摘されることが多い。特に中枢神経機能でのヒトでの安全性の予測は困難であることは否めないが、データから何らかの懸念の兆候が見て取れる場合には積極的な Follow-up 試験を考慮する気概が望まれる。一方機能メカニズムの解明が進みつつある心血管系ではイヌ等の実験動物の反応（例えば QT 延長等）から時にはヒトでの有害反応を予測できる場合があり、エンドポイントの適切な選択とインビトロ試験を含む新技術の開発により将来有害反応を回避しうる割合が高まることが予想できる。標的器官の機能における障害発生メカニズムの解明が進むにつれ、ヒト標的機能の遺伝子を導入したモデル動物やインビトロ試験を含む適切な手法により予測の精度の上昇およびデータの利用価値の上昇は今後大いに期待される。将来、発ガン性をめぐる安全性試験並みに安全性薬理試験の開発が盛んとなることを期待している。ICH 安全性薬理試験ガイドラインでは重要な生命維持に与かる機能に関しては、コアバッテリーによるスクリーニング的検討により、ヒトに最初に暴露する前に重篤な有害効果を避けるために必要な試験の選択実施を判断することとしている。またヒトでの機能予測に大きく関わる試験であるので、原則として GLP の適用を要求している。しかしコアバッテリーを含む種々の情報から安全性の懸念がある場合に、積極的に必要と思われる項目について試験を行うためには、試験の遂行に支障は少ないように考慮する必要がある。従って、特殊な手法等、妥当な理由があれば、非 GLP で行ってもよい。しかしその場合でもデータおよび記録文書の保管により信頼性・再現性を保証するのは当然とした。

今後の問題は 21 世紀における有効な安全性薬理手法の開発と安全性薬理研究者の育成であろう。

Se2-1

## セミナー 2

YOKO  
F  
A  
M

黒川雄二

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

日米欧三極による ICH(International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use、医薬品承認ハーモナイゼーション国際会議)は、ICH-1(1991)から開始され、ICH-2(1993)、ICH-3(1995)、ICH-4(1997)と継続した。その目的として、①三極の現行ガイドラインの整理統合、②新しい適切な検査法の導入、③試験期間の短縮、④使用動物数の削減等により科学的柔軟性を重視した試験法を策定することにより、医薬品の開発及び新薬による治療の促進化が上げられる。具体的には、三極の規制当局(EU, FDA, MHW)及び製薬企業(EFPIA, PhRMA, JPMA)の 6-Pack で構成される専門家会議(EWG)が、品質(Quality)、安全性(Safety)、有効性(Efficacy)及び境界領域(Multidisciplinary)の 4 部門について設けられている。

このような動きをふまえて厚生省では、92年度から厚生科学研究「医薬品規制ハーモナイゼーション推進国際共同研究」を発足させ、安全性に関しては「動物実験等による薬物代謝及び安全性評価のための国際共同研究」班を設定し、S1 から S7 までの 7 分野、更に安全性が深く関わっている M3 について実験・研究・調査等を行ってきた。現時点で、がん原性・遺伝毒性・トキシコキネティクス・単回及び反復投与毒性・生殖毒性・バイオ医薬品に関する 13 の試験法が既に公表・通知されており、安全性薬理試験ガイドライン策定が進行中である。

これら膨大な成果は、現在 9 年度目に入った当班研究(のべ 48 研究課題)における 400 名近い産・学・官の専門家の密接な協力の結果であり、この経験を、今後さらに最新の科学的知見を反映させて行う各種ガイドラインのメンテナンスにおいても有効に生かして行きたい。

○峯島 浩<sup>1)</sup>、沼 敏章<sup>2)</sup>、西垣敬二<sup>3)</sup>、遠藤芳彦<sup>4)</sup>、小笠原裕之<sup>5)</sup>、  
奥田恭之<sup>6)</sup>、平野文也<sup>7)</sup>、三宅幸雄<sup>8)</sup>、松澤利明<sup>9)</sup>

日本製薬工業協会医薬品評価委員会基礎研究部会 生殖ワーキンググループ  
1)バリエリスファーマ、2)三井製薬工業、3)興和、4)フナブシ・ファーマジョン、5)日  
本ワイスケル、6)エーザイ、7)サント協和、8)塩野義製薬、9)山之内製薬

生殖発生毒性試験の ICH ガイドライン(S5A)は、1993 年に三極で合意に達し (Step4)、我が国ではその内容が 1994 年に薬審第 470 号にて初めて通知された。さらには一部懸案事項であった雄性受胎能試験に関する記載(S5B)が 1995 年に合意したことで、1997 年の薬審第 316 号通知に反映され現在に至っている。ICH ガイドラインの基本的な考え方は、三極ガイドラインの重複部分を排除し、試験デザインに科学的柔軟性を持たせること、科学的に妥当な動物数の削減および試験期間の短縮さらには新しい適切な検査手法の導入にあった。このような ICH の基本的な考え方は、年を重ねるにつれ、また試験を実施する研究者の考え方や受け取り方により、実際には変化している可能性がある。そこで、日本製薬工業協会医薬品評価委員会基礎研究部会の生殖ワーキンググループでは、同基礎研究部会の加盟会社を対象とし、①日本国内企業で ICH ガイドライン導入後から現在までに、意識の変化があったか、② ICH ガイドラインの解釈について国内の研究者と海外の研究者との間に考え方の相違があるか、③ 専門家からみた ICH ガイドラインの妥当性・柔軟性、の三点の主な切り口でアンケート調査を企画した。調査事項としては、生殖試験の「試験計画—試験の組み合わせ」、検査手法、TK 試験の利用およびタイミングなど生殖試験に関する全般的事項とし、生殖毒性試験に付随する、トキシコキネティクス (TK) の ICH ガイドライン (S3A:1994 年に合意、1996 年に薬審第 443 号で通知)、非臨床試験のタイミングの ICH ガイドライン (M3:1997 年に合意、1998 年に医薬審第 1019 号で通知) に及んだ質問も盛り込んだ。

調査は 2000 年 2 月初旬に質問を送付し、2 月末の時点で、86 社中 76 社 80 施設 (13 海外施設を含む) から回答を得た。これらのうち実際に ICH ガイドラインに準拠して何らかの生殖毒性試験を実施した経験のある施設は 63% (50 施設) で、その内訳は国内 37 施設、米国 6 施設、欧州 7 施設であった。本要旨では 2 月末目までに得られたこれらの回答の途中集計結果とその考察を以下に報告する。

日本国内企業でガイドライン導入後から現在までの意識の変化は主として 1996 年に同じく製薬協が実施したアンケート調査結果との比較により考察した。1996 年時点ですでに Step 4 から 4 年経過しており、十分にガイドラインが浸透していたためか、現在のアンケート結果と大きな意識の変化はみられなかった。唯一、TK の実施については実施施設が増え、生殖発生毒性試験での TK に対す

る考え方の変化が示唆された。しかしながら、欧米と比較すると欧米では TK を全回答施設で実施しているのに対して、我が国では TK を実施していない施設が 22% にみられた。

ガイドラインの解釈については、国内の研究者と海外の研究者との考え方の相違が随所でみられ、それらの根底にはガイドラインの柔軟性に対する受け止め方の差があるように感じられる。試験計画が柔軟になったかどうかという質問に対しては、欧米では半数以上の施設が「はい」と答えているのに対し、我が国では「どちらともいえない」という回答が目立ち、欧米の研究者のほうが ICH のガイドラインをより柔軟に解釈している。具体例として、Fertility 試験を雌雄別に実施しているかどうかを問う質問では、国内では半数以上の施設で同時に実施していると答えているのに対して、欧米ではケースバイケースとの回答が多くを占めていた。また、雄受胎能試験で精子検査を「必ず実施している」施設は我が国で目立って多かった。

ICH ガイドラインでは、「試験計画-試験の組合せ」の選択が可能となっており、試験デザインに柔軟性と妥当性を持たせると共に動物数の削減が期待できる「単一試験計画法」及び「二試験計画法」が具体的な試験計画法として提示されている。しかし今回の調査では、国内の 70% 以上の施設において実施の経験がなく、1997 年に行った調査結果の未実施率 94% と比べても、飛躍的に実施経験施設が増加してるとは考えられなかった。また、欧米の施設でも同様に「単一試験計画法」及び「二試験計画法」の実施経験は少なかった。実施経験がない理由としては、「開発の段階に合わせた実施ができない」、「被験物質が多量に必要である」、「実際に試験実施を決断するような低毒性の被験物質が現れない」などが多く、現実的にはこれらの試験計画は広く採用されているとは言えない状況であった。動物数の削減についてはラット試験に関しては減少傾向にあるものの、ウサギに関してはやや増加傾向であった。一方、ウサギ試験ではより少ない動物数で充分評価可能であるとの意見が多かった。また、胎児検査方法、TK など柔軟性を重視したが為に記載内容が簡潔過ぎ、研究者が戸惑いを感じている項目も若干認められた。

ICH ガイドラインが抱える問題として、今回のアンケートでは ICH 以外のガイドラインを考慮して試験計画をしている施設が 35% あり、グローバルな統一ガイドラインとしての位置付けにもかかわらず、まだ他のガイドラインを考慮せざるを得ない状況が伺えた。

発表では、さらに詳細な分析結果を示し、グローバルな視点での生殖発生毒性試験の現状把握と今後の課題に関して参考となる情報を提供し話題としたい。

祖父尼 俊雄

オリンパス光学工業（株）

I C Hにおける遺伝毒性の論議は、I C H-1後の1992年より開始され、1997年のI C H-4において最終的な合意に達した。遺伝毒性試験の特徴は、単一な試験系ではなく、いくつかの試験を組み合わせる点にあり、どのような試験を組み合わせるかについては各国において異なる考えを持っている。そのため、標準的な組み合わせについて合意を得るには長期に渡る論議が必要となった。I C Hでは、個々の試験法の全項目を論議するのではなく、国際的な調和を得るために最も重要な項目を取り上げ、それらを集中的に論議するという方針をとった。以下に、I C Hでの論点を紹介し、それが本邦のガイドライン改訂にどのような影響を与えたかを述べる。

I C Hで最初に取り上げた課題は以下の通りである。

1. 細菌を用いる復帰突然変異試験における大腸菌株の必要性
2. In vitro試験の最高用量の設定
3. In vitro試験での析出用量での試験の実施
4. In vitro試験での再試験の必要性
5. In vitro試験で陽性結果が得られた場合に必要な試験
6. 小核試験と骨髄染色体異常試験との同等性
7. 小核試験での雌雄動物の必要性
8. In vivo試験が陰性結果の場合の標的臓器の暴露の証明
9. 最小必要な試験の組合せにおけるほ乳類培養細胞を用いる遺伝子突然変異試験の必要性
10. 最少必要な試験の組合せの定義
11. Phase IIに関連した遺伝毒性試験の実施のタイミング

上記のうち、2と3および9と10はそれぞれ1つの課題として論議された。11は他の毒性試験とも関連するので、別のワーキンググループを設け、そこで論議された。上記の課題の1, 2, 3, 5, 6, 7, 8については、最終的に1995年に合意が得られ、I C Hガイドライン「医薬品のための遺伝毒性試験の特定項目に関するガイダンス」として承認された。合意が得られなかった4と10（9も含め）については引き続き論議が行われ、1997年のI C H-4においてI C Hガイドライン「医薬品の遺伝毒性試験の標準的組合せ」として承認された。

以下に従来のガイドラインに影響を与えた主な点を紹介する。

### 1. 遺伝毒性試験の標準的組合せ

本邦では細菌を用いる復帰突然変異試験 (RM)、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験 (CA)、マウスを用いる小核試験 (MN) の組合せであるが、米国ではCAの代わりにマウスリンフォーマ試験 (MLA) を用いており、欧州ではRM、CA、MNに加えてほ乳類培養細胞を用いる遺伝子突然変異試験 (CGM) の4試験の組合せであった。ここでは、特にMLAがCAの代わりとなし得るかが最大の論点となり、そのため国際的な共同研究が行われた。その結果、従来の短時間処理に加え、連続処理を追加することにより、MLAとCAの一致率がおよそ90%となり、MLAがCAの代わりになりうると判断された。欧州ではCGMを組入れるメリットはないとの判断から、本邦の組合せを受け入れていた。最終的には、RM、CAあるいはMLA、MNの3試験の組合せが合意された。このことは、本邦の従来の組合せ (RM、CA、MN) は米国でも受け入れられ、逆に米国の組合せ (RM、MLA、MN) は本邦でも受け入れられることを示している。

### 2. In vivo試験が陰性結果の場合の標的臓器の暴露の証明

従来のガイドラインに含まれていない新しい項目である。MNが陰性の場合には、幼若赤血球 (PCE) の割合の減少、骨髓、血中もしくは血漿中の被験物質の直接測定あるいはオートラジオグラフィを用いる方法によって、被験物質が標的臓器に到達していることを確認する必要がある。もし、in vitro試験が陽性の場合には、暴露の証明はMNと同じ動物種、系統、投与経路、最高用量もしくは適切な用量を用いることが望まれている。In vitro試験が陰性の場合には上記の方法以外にADME試験の結果から推察してもよい。いずれにしても、PCEの割合の減少がみられない場合には別に試験が必要となる。

### 3. In vitro試験の標準的方法

これはin vitro試験で再試験が本当に必要なのかどうかの論議の結果として得られたものである。単純な同一条件での繰返し試験は不要であるが、結果の確認のための試験は必要であるとの考えに立っている。RMでは予備試験が本試験と同様の条件を満たしていれば、それで十分に確認が取れると判断され、これまでの本邦のガイドラインで対応できる。一方、CAでは、最初に代謝活性化系の存在および非存在下で短時間処理を行い、その結果が陰性の場合には連続処理を行い、陰性結果の確認を行うことになった。これは従来のガイドラインが連続処理を主体としてきたのとは異なり、短時間処理を主体とし、結果が陰性の場合のみに連続処理 (CHL細胞では24時間) が必要となる。また、48時間連続処理は必要に応じて行うこととなり、これまでの方法とは異なるのでその点留意する必要がある。

また、MLAではCAと基本的に同じであり、短時間処理が陰性の場合に24時間の連続処理を行う。一方、CGMはRMと同様で、予備試験が本試験と同様の条件を満たしていれば、繰返しの試験は不要となっている。

上記の他、試験選択の考え方や試験結果の評価を含め、従来のガイドラインには含まれていない項目を紹介する予定である。

三森国敏

国立医薬品食品衛生研究所 病理部

医薬品に関する国際ハーモナイゼーション第4回会議(ICH4)での新しいがん原性試験ガイドラインの策定により、我が国においても1999年11月に医薬品についてのがん原性試験ガイドラインがこのICHガイドラインに準拠して大幅に改定された。このガイドラインによると、従来の2種のげっ歯類を用いた試験を実施する代わりに、一種のげっ歯類のがん原性試験の実施に加えて、トランスジェニック(Tg)やノックアウト(KO)マウスなどの遺伝子改変動物を用いた短期発がん試験モデル、イニシエーション・プロモーションモデルや新生仔動物モデルの中から一つの試験を実施してがん原性を評価することが可能である。この新しいガイドラインにおいては、ラットの長期がん原性試験で殆どのがん原性物質は検出可能であるが、全てのがん原性物質を検出することは出来ないことから、それを発癌メカニズムの解析が容易とみなされる新しい短期発癌代替法で補填して行くという新しい考え方が基本概念となっている。しかし、これらの短期発癌試験法については、未だ検証作業が十分でないことから、遺伝子改変動物を用いた短期発がん性試験法に関しては、ヒト型c-Ha-ras遺伝子導入Tgマウス(rasH2マウス)モデルの有用性についての研究がわが国で、がん抑制遺伝子p53の片側のアレル(exon5)を欠損させたC57BL p53<sup>-/-</sup>マウス(p53<sup>-/-</sup>マウス)や活性型v-Ha-ras遺伝子を胎児型 $\alpha$ -globinプロモーターとSV40と共に導入したTg.ACマウスを用いた試験モデルの有用性についての研究が米国で実施されている。また、色素性乾皮症修復遺伝子を欠損させたXPA<sup>-/-</sup>マウスを用いた試験モデルの有用性についての研究がオランダで実施されている。一方、国際生命科学協会(International Life Science Institute; ILSI)の1部門であるHealth and Environmental Science Institute (HESI)が日米欧の製薬企業や受託研究機関からの参画を募り、1997年にAlternatives to Carcinogenicity Testing Subcommittee (ILSI-HESI ACT)を発足させ、rasH2、p53<sup>-/-</sup>、Tg.AC、XPA<sup>-/-</sup>マウスなどの遺伝子改変動物ならびに新生仔動物モデルのがん原性評価法の有用性についての検討が実施されており、今年の11月には今までに集積された検証作業成績からこれらの短期発癌試験モデルの有用性を評価することになっている。本セミナーでは、これらの短期発癌試験モデルについての検証作業の経過を説明すると共に、その有用性と問題点について述べる。



遺伝子改変動物モデル：ヒトでの発癌における重要なプロセスはプロト型癌遺伝子の活性化と癌抑制遺伝子の不活性化にあると考えられていることから、癌遺伝子を導入したトランスジェニック(Tg)マウスや癌抑制遺伝子をノックアウトしたマウスの応用は近年急速に拡大してきており、その発癌メカニズムの解明に有用な動物としてこれらが注目されている。rasH2 および p53<sup>-/-</sup>マウスは、今までの検証作業成績から遺伝毒性発がん物質の検出に非常に感受性が高いことが示されているが、これらのマウスにおいても、必ずしもすべての遺伝毒性発がん物質を検出できる訳ではないことを示唆する成績が最近得られている。また、これらのモデルの発がんメカニズムについては未だ不明な点があり、これらを明確にする研究が今後不可欠である。Tg.AC マウスや XPA<sup>-/-</sup>マウスは未だ検証作業が十分ではなく、その有用性を評価するにはさらなるデータの蓄積が必要である。

イニシエーション・プロモーションモデル：既に伊東らにより作出された肝二段階発癌モデルや多臓器発癌モデルがあげられる。これらにおいては、あらかじめ遺伝毒性発癌物質でイニシエーション処置を施しているため、被験物質について短期間に発癌性の可能性を検出することが可能であると共に、その発癌メカニズムの解析にこのモデルが非常に適していることも示されている。一方、多臓器発癌モデルについては、発癌標的臓器が複数に及ぶため未知の発癌物質の検出には有用である。しかし、イニシエーターとして数種類の発癌物質を用いなければならないという試験実施面での制約がある。また、この検証作業に用いた被験物質の数は未だ十分ではなく、今後更なる検証作業データの蓄積が必要である。

新生児モデル：新生時に被験物質を 1-2 回投与し、その発癌性を検出するモデルであり、強い遺伝毒性発癌物質の検出には有用であることが示されている。しかし、被験物質の投与回数が少ないことから、弱い遺伝毒性発癌物質や非遺伝毒性発癌物質の検出には適さないようである。

ICH で提案された短期発癌代替法は、従来の長期がん原性試験での欠点（多数の動物を使用、評価に長期間を要する、発癌メカニズムの解析が困難など）を補い、短期間に被験物質の発癌性を予測する上で非常に有用であり、上述のように、短期発癌代替法の中では短期間に遺伝毒性発癌物質の検出が可能なものもあることが報告されている。また、これらの短期発癌代替法は発癌メカニズムが明らかにされていることから、これらのモデルで発癌陽性結果が得られた場合にはその発癌メカニズムを予測することも可能であると当初考えられていた。しかし、遺伝子改変動物モデルでは、必ずしもそのモデルでの発癌物質による発癌メカニズムは明確にされていないものもあり、そのモデルで陽性結果が得られた場合にその発癌性がヒトに外挿出来るか否か結論することが困難なモデルもある。今後、これらの短期発癌代替法を採用するには、多くの検証作業の集積が必要であるが、さらに上記の不明な点を明確にするための発癌メカニズムに関する研究の実施が強く望まれる。

大野泰雄

国立医薬品食品衛生研究所、安全性生物研、薬理部

1994 年に ICH でトキシコキネティクス(TK, Note for guidance on toxicokinetics, The assessment of systemic exposure in toxicity studies)とファルマコキネティクス(PK, Pharmacokinetics: Guidance for repeated dose tissue distribution studies)のガイダンスが合意に達した。その後各極で対応が進み、我が国ではそれぞれ 1996 年に通知された。前者は毒性評価において血中濃度で代表される全身暴露の状況を知ることの必要性を示したものである。このデータにより、どの程度の血中濃度で毒性が発現するか判断できることから、後に合意された ICH のタイミングのガイダンス(Guideline for non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials for pharmaceuticals, 1997)では、初めてヒトに投与する前に、TK を含めた安全性試験結果を評価することが求められた。現在作成中の臨床薬物動態試験ガイダンスでは患者においても動態を測定することが想定されており、今後、治療効果と血中濃度との関係についての情報が今まで以上に得られるものと期待される。これらのデータの蓄積により、遺伝的多型や薬物相互作用による血中濃度変動による有効性や副作用への影響を今までより高いレベルで評価する事が可能となろう。一方、後者は反復投与組織分布試験を行うべき状況について合意に達したものである。要約すると、1) 組織中からの消失半減期が長い場合、2) 反復投与試験で血中濃度の変化が単回投与試験から予想されたものよりも著しく高い場合、3) 安全性評価に重要と思われるような毒性が特定の臓器に観察され、それが短期の毒性試験や単回投与組織分布試験、薬理試験結果から予想できなかった場合、4) 標的指向型薬剤の場合、である。3) の場合に得られる結果は当該薬物の安全性評価に重要であることから GLP 下で行うことが勧められている。これらのガイダンスの導入により、安全性を動物及びヒトにおける体内動態を含めて評価することの必要性が、広く認識されたものと思う。

○島田 弘康

第一製薬株式会社 安全性研究所

ICH Q3A および Q3B ガイドラインは、原薬および製剤における不純物に関する問題点を解決するために作成され、すでに Step 5 となっている。1999 年 10 月に一部改訂され、それぞれ Q3A(R)および Q3B(R)として現在 Step 2 の状態に戻っているが、不純物の安全性確保に関する記述は変わっていない。

ガイドラインでは、原薬および製剤中の不純物量およびその安全性確認に関して、承認申請に際しての指針として示されている。しかし、安全性確認が必要な不純物量の閾値が一日の最大投与量との関係で細かく規定されていることから、その閾値を超えた場合については臨床試験中でも安全性確認が必要となる。また、製法変更や処方変更に伴う新規不純物についても同様な規定が適用されることから、申請時のみならず開発中のいろいろな場面で不純物の安全性確認が必要となり、医薬品開発初期から不純物に関して一貫した施策の必要性が問われている。

一方、本ガイドラインにおける不純物の安全性確保に関する記載が具体的でないため、その解釈および運用方法について混乱が生じており、また、各社によってもその対応に差が見受けられる。製薬協では本問題を解決するために品質および安全性の専門家からなるプロジェクトチームを編成し、アンケート調査などを通じて、問題点の把握とその具体的な解決策について検討している。

本セミナーでは、医薬品開発における不純物確保の基本的な考え方、開発初期からのストラテジーならびに安全性確認のための安全性試験（遺伝毒性試験および反復投与毒性試験）を実施する際の問題点などについて述べると共に、医薬品開発のいろいろな場面で遭遇する事例についても触れるつもりである。

ICH不純物ガイドラインにおける安全性確保の考え方

	Preclinical phase	Phase I	Phase IIb	Phase III	Phase IV
原 薬	<p>安全性確認?</p> <p>安全域</p> <p>↓</p> <p>安全性試験から確認</p>	<p>製法変更</p> <p>不純物含量増加</p> <p>↓</p> <p>1.臨床試験(I)から確認 2.安全性試験(I)から確認</p> <p>新規不純物</p> <p>↓</p> <p>ICH(I)に従い確認</p>		<p>最終規格</p> <p>安全性確認の 必要な量以上</p> <p>↓</p> <p>1.臨床試験(I)から確認 2.安全性試験(I)から確認 3.ICH(I)に従い確認</p>	製法変更
	不純物含量				
製 剤	<p>安全性確認?</p> <p>関連分解生成物</p> <p>↓</p> <p>ICH(I)に従い確認</p>	<p>処方変更</p> <p>分解生成物含量増加</p> <p>↓</p> <p>臨床試験(I)から確認</p> <p>新規分解物</p> <p>↓</p> <p>ICH(I)に従い確認</p>		<p>最終規格</p> <p>安全性確認の 必要な量以上</p> <p>↓</p> <p>1.臨床試験(I)から確認 2.ICH(I)に従い確認</p>	処方変更
	<p>試験物質</p> <p>単離/含有成分(製剤)</p> <p>遺伝毒性試験</p> <p>スクリーニング試験</p> <p>一般毒性試験</p> <p>性、動物数、投与期間、用量</p>	分解生成物含量			

CTDが申請に与える影響  
 - 申請資料のグローバル化 -

河合睦文

日本イーライリリー(株)  
 リリー リサーチ ラボラトリーズ ジャパン

CTD(Common Technical Document)は、ICH各極の規制当局が要求する新医薬品の承認審査資料の国際的ハーモナイゼーションを推進し、申請資料の共通化を目的とするものである。

ICHにより、三極における医薬品承認申請に必要な資料の技術的要件の調和に関しては著しい成果を挙げてきている一方で、資料作成方法については検討されていなかったため、現在までのところ申請書類の構成や内容に関する要件は三極において異なっている。CTD(ICH-M4)はこの問題を扱うトピックであり、品質・安全性(非臨床)・有効性(臨床)の各専門家作業部会(Expert Working Group, EWG)が、ガイドライン(案)の作成作業を行っている。安全性分野については1999年3月に行われたICH-EWG会議(ブリュッセル)においてドラフトがほぼ完成したことを、第1回ICH即時報告会(平成11年3月、主催:(財)日本公定書協会)において報告した(医薬品研究 Vol.30, No.8, p.422-429, 1999)。その後、1999年10月にCTDドラフトはICH運営委員会によって承認され、インターネット上で公開されるに至っている(<http://www.ifpma.org/ich5c.html>)。

CTDは以下のModule I-Vで構成されている。

- Module I : Regional Administrative Information
- Module II : Executive Summary  
Written and Tabulated Summary
- Module III : Quality Study Reports
- Module IV : Non-clinical Study Reports
- Module V : Clinical Study Report

Module I は各極の要求により独自に作成されるものでありCTDの対象とはされていない。Module II は試験成績の概要的存在として位置付けられている。安全性(非臨床)の Executive Summary は薬理、薬物動態および毒性試験を通しての包括的かつ客観的な評価に主眼が置かれる。Written/Tabulated Summary は各試験成績を受け入れ可能な様式でまとめるためのツールであるが、必要に応じてより分かりやすくするために様式を変更することは差し支えないとされている。Module III-V は品質・安全性(非臨床)・有効性(臨床)の各試験報告書である。

非臨床試験の配列の詳細を以下に示す。

1. Pharmacology
  - 1.1 Primary Pharmacology
  - 1.2 Secondary Pharmacology
  - 1.3 Safety Pharmacology
  - 1.4 Pharmacodynamic Drug Interaction
2. Pharmacokinetics
  - 2.1 Analytical Methods
  - 2.2 Absorption and Excretion
  - 2.3 Tissue Distribution
  - 2.4 Metabolism
  - 2.5 Pharmacokinetic Drug Interaction (Non-human)
3. Toxicology
  - 3.1 Single-Dose Toxicity
  - 3.2 Repeated-Dose Toxicity
  - 3.3 Genotoxicity
  - 3.4 Carcinogenicity
  - 3.5 Reproductive Toxicity
  - 3.6 Other Toxicity Studies

CTDは終局的には電子的標準化を目指しており、ICH-M2(医薬品規制情報の伝送に関する電子的標準、Electric Standard for Transfer of Regulatory Information。)EWGとの共同作業が進められている。共通化された申請書類、その作成手段、電子的ツール等によって良い意味での影響が期待される。

## ○ 牧 栄二

## ヤンセン協和株式会社研究開発本部

遺伝子組み換え技術を応用して製造されるバイオ医薬品の開発は、新規化合物のプロファイルをスクリーニング試験で洗い出し、特異な作用を有する化合物のみを開発候補品として取り上げる一般医薬品の開発と異なり、バイオ医薬品の場合はそのもの自身が既に生理活性を有する蛋白物質であることから、バイオ医薬品の開発は初めから一般医薬品と異なる。

バイオ医薬品の安全性の検討は、つい先頃まで平成元年9月11日付け薬審第24号厚生省薬務局通知「医薬品毒性試験法ガイドライン」に基づいて取り扱われてきたが、当ガイドラインによる安全性評価は一般医薬品の域を出るものではなかった。この度平成12年2月22日付けにて医薬審326号「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」がICHガイドラインの制定に基づき通知され、バイオ医薬品の非臨床における安全性評価を適切に行うための基本原則がここに示された。この通知の施行日より、本通知に基づいて実施された試験による試料を医薬品の製造承認申請に添付すべき資料とすることができる。

バイオ医薬品の安全性を詳細に論ずる際に特に留意しなければならない点がある。バイオ医薬品も一般医薬品と同様にその効力を発揮するために特異的な受容体を必要とする。その受容体依存性選択的作用機序の結果として、バイオ医薬品も重篤な過敏性反応を誘発する可能性がある。また、種特異性に起因する問題として、バイオ医薬品に対するヒトと動物の間の異なった分子構造システムにより、同種蛋白を用いた動物実験においてもその評価に限界が存在する(例 1L-3)。バイオ医薬品の安全性評価を複雑にする要因として臓器間における共通受容体分布(プレオトロピズム)があり、その結果として遠隔組織での予期しない現象の発現をもたらす(例 1L-4)。Cytokineにおいては親和性の異なったサブユニットへのヘテロ結合に基づく用量相関性の不連続性が認められ、これはαサブユニットとβサブユニットへのヘテロ結合に基づくもので、用量設定ならびに非臨床試験の実施の困難さを意味する。

バイオ医薬品の安全性評価は適切な受容体を有する試験動物を用いて実施しなければならないが、ヒト型のバイオ医薬品が試験動物に何ら生物学的応答を示さない場合、通常の動物試験は推奨されない。このような場合、ヒト型のリガンドに対する受容体遺伝子を持つトランスジェニック動物の作製あるいは同種蛋白でのシュミレーション試験も考える必要がある。ヒト型試験系の開発の重要性は認識される場所であるが、トランスジェニック動物の開発支援には、秘密保持など事前に解決すべき問題がある。また、同種蛋白を用いた動物試験は有効な評価手段ではある(例 anti-mouse TNF Mab)が、上述の IL-3 のような事例においては同種蛋白による安全性評価はヒトに対して適切な情報を与えないことになる。

安全性評価の機能的な指標となる安全性薬理試験についても一般医薬品の安全性薬理試験プログラムをバイオ医薬品の実施プログラムとして適用することには問題があり、またバイオ医薬品の多様性のため試験方法を一律化することは適当ではない。当セミナーにおいては monoclonal antibodies, cytokines, growth factors を例に挙げ、どのような項目を検討すべきかを考えてみたい。また、医薬審 326 号によれば、当該試験は毒性試験に組み込まれた形で安全性薬理の検討も一法として記述されているが、その利点・問題点についてもまとめてみたい。



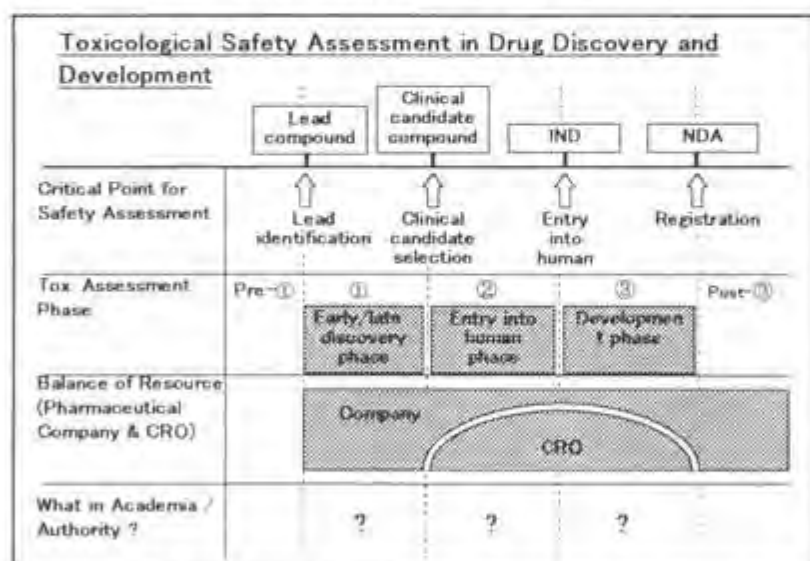
## セミナー 3



渡部 烈1)、松本 一彦2)、野村 護3)

1)東京薬科大 2)日本たばこ産業 3)第一製薬

現在の日本におけるトキシコロジーの現況は、ICH 合意に端を発した合理的且つスピーディな創薬開発が世界標準として適用され急速に変革しつつある。加えて創薬パラダイムの変革に基づくシーズ発掘と開発におけるセーフティ・アセスメントの手法が探索研究へ大きくシフトして来た為企業研究の最適化、は(1)創薬早期の毒性評価 (2)ヒト試験に供する Candidate 化合物の選択とその評価 (3)承認申請時前後のリスク・アセスメントにマ



ンパワー投入している。このような背景のもとで毒性試験評価をするトキシコロジーの空洞化に対する後継者

の育成や ICH 合意事項の解釈について論じたい。また、次世紀の新技术の応用と将来のトキシコロジストに必要とされる知識あるいは考え方は、先端科学に取り組むアカデミアとの協業無しには成立しなくなることを予測して、真に必要な素養を求めたい。これらの趣旨から、予め質問事項を以下に示し、セミナー当日にコメンテーターを含めてフロアー・ディスカッションの形で活発に論じたい。

## 1. トキシコロジーの現況

### 1) セーフティ・アセスメント

Q1: 最終報告書の考察に無毒性量の記載は必要と思いますか？

Q2: ヒトのリスク・アセスメントをするのに何が重要な情報となるのですか？

### 2) ハーモナイゼーション運用上の問題

Q1: ICHで合意された事柄と現実との間に矛盾する事例がありますか？

## 2. 21世紀のトキシコロジー

### 1) ゲノムサイエンス

Q1: HTS-Tox. や Toxicogenomic は毒性試験にどの様に関わってくると思いますか？

### 2) トキシコロジーの空洞化

Q1: トキシコロジーの空洞化に伴う教育はどの様に対応されますか？

Q2: 毒性試験受託施設(CRO)に何を求めますか？

## 3. アカデミアは Tox. Assessment のどの Phase にどの様に参画できますか？



○田原 知徳, 赤澤 康平, 殊才 孝則

大塚製薬㈱ 徳島研究所 毒性研究部

【目的】毒性試験において、PT(プロトロンビン時間)の測定には、ヒト臨床検査用の試薬が流用されている。さらに各試薬メーカー間で試薬組成が異なっているため、実験動物のPTを測定する際、感度などの問題点があった。今回、全自動血液凝固測定装置CA-6000(シスメックス㈱)を用いて実験動物、管理用正常血漿のPTを指標としPT測定試薬の比較検討を行なった。

【方法】11週齢SD系ラット、7カ月齢ビーグル犬それぞれから得た9容量の全血に1容量の3.8%クエン酸ナトリウム溶液を混和し、遠心分離後の上層を試料として用いた。併せて、管理用正常血漿をヒト試料として使用した。市販されているPT測定試薬のうち3種類を用いて、同時再現性、感度について検討した。

【結果】同時再現性：3測定試薬中1測定試薬で測定した場合を除いて、いずれの測定試薬も変動係数が3.5%以下であり良好であった。感度：各試料を100%試料とし、生理食塩水を加えて2倍希釈液<50%試料>、4倍希釈液<25%試料>を調製し測定を行なった。ヒト、ビーグル犬試料では、3種類いずれの測定試薬を用いた場合も、希釈倍率の増加に従ってPTが延長した。しかし、ラット試料においては、3測定試薬中1測定試薬で測定した場合を除いて、100%試料と比べて50%試料、25%試料でPTの短縮が認められた。この認められたPTの短縮の程度は、測定試薬間において異なっていた。

【考察】本感度試験条件下では、試薬により動物種に対する反応性が異なることが明らかとなり、特にラット試料を測定する場合、PT測定試薬の組成を考慮する必要性が考えられた。

Evaluation of Various Prothrombin Time Reagents in Blood Coagulation Test.

Tomonori TAHARA, Ko-hei AKAZAWA and Koumei KOTOSAI, Dept. of Toxicology,  
Tokushima Research Institute, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd, Tokushima 771-0192

Flow cytometryを用いたラット精巣毒性検査方法の検討  
— Cyclophosphamide、2週間投与の影響 —

○加藤 千明<sup>1)</sup>、堀井 郁夫<sup>1)</sup>、北嶋 聡<sup>2)</sup>、相賀 裕美子<sup>1)</sup>、  
井上 達<sup>2)</sup>

- 1) 日本ロシュ（株）研究所、前臨床科学研究部
- 2) 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

[目的] Flow cytometry を用いた精巣毒性の評価については、迅速かつ客観的なデータが得られる手法として医薬品開発研究に広く用いられるようになってきている。我々は、DNA 量と細胞の大きさにより精巣細胞を分類する手法(北嶋ら, in preparation)を検討し、その有用性について cyclophosphamide(CP)を用いて検索した。[方法] 0.20 mg/kg CP を2週間経口投与した雄 SD ラット(9週齢：10匹/群)より解離精巣細胞を調製し、Flow cytometry を用いて DNA 量と細胞の大きさにより各精巣細胞を分類・定量し、その障害像を調べた。より分化の進んだ生殖細胞の障害像についても調べるため、各群、半数例については、2週間の回復期間を設け、同様に検討した。[結果及び考察] 精巣細胞は、DNA 量により、Sub-n(成熟精子)、n(精細胞)、2n(体細胞、精原細胞 etc.)、4n(精母細胞 etc.)に分かれ、n、2n、4n については、細胞の大きさにより、L(小型細胞)とR(大型)の2分画に分類された。CP、2週間投与により、2n-L と4n-L が有意に減少し、精原細胞から初期精母細胞が障害を受けていることが示唆された。一方、通常の DNA 量のみによる定量結果、及び精巣の臓器重量には有意な差は認められなかった。2週間の回復期間終了後は、4n-R の減少のみが認められ、障害が初期精母細胞から後期精母細胞に移行していることが確認できた。以上の結果より、Flow cytometry を用いて、DNA 量と細胞の大きさにより精巣細胞を分類する方法は、従来の DNA 量のみによる分類と比較し、より精度よく、精巣の障害像を把握できることが示された。

なお、本研究は、Human Science 総合研究事業の一環として実施したものである。

The assessment of dual parameter flow cytometry analysis to detect the testicular toxicity caused with cyclophosphamide in rats

Chiaki KATOH<sup>1)</sup>, Ikuo HORII<sup>1)</sup>, Satoshi KITAGIMA<sup>2)</sup>, Emiko SAGA<sup>2)</sup>, and Tofru INOUE<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Dept. of Preclinical Science, Nippon Roche Research Center, Kanagawa, 247-8530, Japan.

<sup>2)</sup>Dept. of Toxicology, Biological Safety Research Center, NIHS, Tokyo, 158-8501, Japan

## ビリルビン酸化分解物の酸化ストレスマーカーとしての有用性

○小林章男<sup>1</sup>、高橋統一<sup>1</sup>、菅井象一郎<sup>1</sup>、松本一彦<sup>1</sup>、山口登喜夫<sup>2</sup>

<sup>1</sup>日本たばこ産業(株)医薬総合研究所 安全性研究所

<sup>2</sup>東京医科歯科大学 難治疾患研究所

【目的】近年、ビリルビン (BR) の抗酸化作用が明らかにされ、生体における重要な抗酸化物質として再評価されている。また、抗 BR モノクローナル抗体 (24G7) を用いることにより、BR 酸化分解物である Biopyrrin の検出が可能になった。今回我々は、高脂血症剤である fenofibrate を投与したラットを用いて、血漿中・尿中の BR および Biopyrrin を測定し、毒性試験における有用性について検討した。

【方法】6 週齢の雄性 Crj:CD(SD)IGS ラットに fenofibrate を反復経口投与し、経日的に採血および採尿して血漿中・尿中 BR、Biopyrrin および肝臓の血液生化学的パラメーターを測定した。BR はジアゾ法、Biopyrrin は 24G7 を用いた EIA 法にて測定した。

【結果】血漿中 Biopyrrin、尿中 BR 排泄量 および尿中 Biopyrrin 排泄量は投与初期から用量依存的に増加した。また、尿中 Biopyrrin 排泄量の増加は BR と比較してより明らかであった。一方、血液生化学的パラメーターでは AST が投与後期に増加したものの、BR に明らかな変化はみられなかった。

【考察】fenofibrate の投与により肝臓では PPAR $\alpha$  が関与したペルオキシソームの増殖がみられる。BR 排泄量および Biopyrrin の増加は、ペルオキシソーム増殖により産生したラジカルに対する生体の適応反応を示していると思われる。これらの結果は、尿中 BR および Biopyrrin 排泄量が酸化ストレスの鋭敏なマーカーとなりうることを示している。

Studies on oxidative metabolites of bilirubin as a sensitive marker of oxidative stress.

Akio KOBAYASHI<sup>1</sup>, Tadakazu TAKAHASHI<sup>1</sup>, Shoichiro SUGAI<sup>1</sup>, Kazuhiko MATSUMOTO<sup>1</sup>, Tokio YAMAGUCHI<sup>1</sup>, <sup>1</sup>Toxicology Research Lab., Central Pharmaceutical Research Institute, JAPAN TOBACCO INC., Kanagawa 257-0024, Japan, <sup>2</sup>Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, 113, Japan

## 雄ラットの性成熟過程における Flow cytometry による精子生存性と数の検討

○滝沢節子、加藤千明、猪又晃、堀井信夫

日本ロシュ（株）研究所 前臨床科学研究部

【目的】Flow cytometry を用いて、成熟ラット（10 週齢以上）の精巣上体尾部の精子生存性と数を測定する手法はすでに報告している。しかし、毒性試験では 7 週齢頃に解剖を行い毒性を評価することも多い。今回、生殖器が未熟な若い週齢のラットにおいて、本 Flow cytometry 法により、どのような分析結果を示すかを検討した。

【方法】SD-Slc 雄ラットを 7, 8, 9 および 10 週齢時に屠殺し、精巣上体尾部の精子試料について、Flow cytometry を用いて精子生存性と数を測定すると共に、精子の顕微鏡観察（形態・運動性）および生殖器の病理組織学的検査も合わせて実施した。

【結果】Flow cytometry を用いた精子検査において、精子生存性については 7 週齢では生存精子数が少なかったが、8 および 9 週齢では 10 週齢とほぼ同様の値を示した。精子数では週齢を経るに従い増加し、特に 7 および 8 週齢では十分量の試料を採取できなかった。精子の顕微鏡観察では、7 週齢では全例が異常（無精子または未熟な精子・赤血球の出現、運動性の低下等）を示し、これらの形態学的な変化は Flow cytometry の Dot plot の異常と対応関係が認められた。8 週齢では形態的に著変は認められないものの、多くは運動性の低下を伴っていた。9 および 10 週齢では正常な形態および運動性を示した。病理組織学的検査では、精巣において 7 週齢では精細管上皮の変性（性成熟に伴う変性像）、精巣上体においては管腔内に変性した精子が 8 週齢まで観察され、生殖器の未熟さが示されたが、9 週齢以降は正常な成熟した病理組織像を示した。

【結論】本 Flow cytometry 法では、ラット精子生存性および数について、9 週齢以降は測定上十分な評価が可能であった。8 週齢以下のラットにおいては、その性成熟の未熟さ（精子数が少ない、形態学的に未熟な精子等）を反映した測定結果が得られた。

Sperm viability and counts by flow cytometric analysis in maturing stage of rats.

Setsuko TAKIZAWA, Chiaki KATOH, Akira INOMATA and Ikuo HORII.

Dept. Preclinical Science, Nippon Roche Research Center, Kamakura, 247-8530



高橋 利一、上田 正次

(株)ワイエスニューテクノロジー研究所

組換えヒト蛋白質バイオ医薬品の薬効薬理・毒性試験では、実験動物への反復投与による当該蛋白質に対する抗体の産生が正しい評価の妨げになることがしばしば観察されている。我々は乳蛋白質プロモーターの制御下でヒト蛋白質を発現する融合遺伝子をラットに導入することで、ヒト蛋白質に対する免疫寛容をラットに付与する方法を検討した。本来雄の乳腺細胞は成長と共に退行するため、当該蛋白質の個体に対する影響を抑制することが出来る。一方、ヒト等の哺乳動物では奇乳と呼ばれる乳汁様分泌物が雌雄を問わず新生直後に分泌され、トランスジェニック(Tg)ラットでも随伴して新生直後に導入遺伝子が発現することが報告されている。 **材料および方法**：ウシ  $\alpha$ S1-casein プロモーターにヒト成長ホルモン(hGH)を連結した Tg 雄ラット 3 系統 H(高発現) / M(中発現) / L(低発現) に対して、リコンビナント hGH(ヒューマトロープ)のアジュバント投与により感作して生産された抗 hGH 抗体を ELISA 法により測定した。 **結果と考察**：用いた 3 系統の Tg ラットにおいて抗 hGH 抗体の産生が強く抑制され、いずれのラインについても hGH に対する免疫寛容が成立した。雌の乳汁への hGH 生産量に 100 万倍の差があるにもかかわらず、3 系統ともに免疫寛容が付与されたことは、リンパ球の教育時期と同期した遺伝子発現が免疫寛容成立を高めることが示唆された。本法により作製した Tg ラットは発現量の差に影響されず寛容が成立することから、一般的に Tg 発現量が低いとされる cDNA を用いた構築でも利用できる。さらに系統化した Tg ラットが使用できるため、均一な実験が繰り返し行えるため、新生時期の蛋白質投与により免疫寛容を付与する旧来の方法に比べてより確実で有用な手法と考えられた。

Immunological tolerance induction under milk protein gene regulation.

Ri-ichi Takahashi and Masatsugu Ueda

YS New Technology Institute Inc., 519 Shimoishibashi, Ishibashi-machi, Shimotsuga-gun, Tochigi

## ラジオアイソトープを用いない種々の local lymph node assay 変法の検討

○山下昌宏<sup>1)</sup>、須田朝子、田部井光行、Hans-Werner Vohr、筒井尚久、鈴木律好、菊池克明、望月講輝、中村和市

日本製薬工業協会 医薬品評価委員会 基礎研究部会  
免疫毒性ワーキンググループ (東レ<sup>1)</sup>)

Local lymph node assay (LLNA) は、化合物の皮膚感作性を予知するための試験法として米国においては食品医薬品庁などの規制当局によって既に認知されている。今回、2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) および benzocaine の 2 種の化合物を用いてラジオアイソトープ (RI) を用いる原法と RI を用いない方法の比較検討を行った。

1 群 6 匹の CBA/JN マウス (8 週齢、雌) を用い、DNCB (0.01%~0.50%)、benzocaine (2.5%~10%) あるいは溶媒としての A00 (アセトン:オリーブオイル=4:1) を 3 日間連続して両耳介に 25  $\mu$ L ずつ塗布してマウスを感作した。RI を用いる方法では、感作終了後 2 日目に <sup>3</sup>H-thymidine を尾静脈内注射し 5 時間後に耳介所属リンパ節細胞中の放射能活性を測定した。RI を用いない *ex vivo* 法として、感作終了後 2 日目にリンパ節を摘出し細胞を前培養後、BrdU を添加し細胞内に取り込まれた BrdU を酵素免疫測定法にて定量した。また、感作終了後 1 日目に採取した細胞を Con A 存在下で 24 時間培養し、その培養上清中の IL-2 濃度の測定も行った。次に、RI を用いない *in vivo* 法では、感作終了直後マウスの皮下に浸透圧ポンプを埋め込み BrdU を数日間持続投与後、FITC 標識抗 BrdU 抗体を用いリンパ節細胞内に取り込まれた BrdU をフローサイトメトリー (FCM) にて解析した。また、耳介肥厚度の測定では、初回感作前および感作終了後 3 日目に耳介肥厚度を測定し、感作前後の差分による肥厚度の測定を行った。FCM によってリンパ球表面膜抗原 (CD3、CD4、CD8、CD45R/B220、CD25) および proliferating cell nuclear antigen の解析を行った。

現在データの解析を行い、RI を用いない方法の有用性について検討中である。

### Local lymph node assay with non-radioactive alternative endpoints

Masahiro YAMASHITA<sup>1)</sup>, Akiko SUDA, Mitsuyuki TABELI, Hans-Werner VOHR, Naohisa TSUTSUI, Ritsuyoshi SUZUKI, Katsuki KIKUCHI, Kouki MOCHIZUKI, Kazuichi NAKAMURA, Immunotoxicology Working Group, Preclinical Evaluation Subcommittee, Drug Evaluation Committee, Japan Pharmaceutical Manufacturers Association, Toray Industries, Inc.<sup>1)</sup>

○金子公幸、内田和美、小林稔秀、三浦浩哉、角 将一、  
加藤幾雄、尾上正治

株式会社ヤクルト本社中央研究所

【目的】ACAT阻害活性を有するヤウチノン B 誘導体の毒性スクリーニング中に、雌ラットに対して特異的に顕著な毒性発現をもたらす化合物(Code No.YIC-C8-434)を認めたので、その毒性発現の性差の機序について薬物代謝の側面から検討を行った。

【方法】雌雄のSD系ラット(7週齢)を用い、YIC-C8-434の反復経口投与における一般毒性学的変化と薬物血中濃度推移を検討した。次に、無処置の雌雄ラットから調製した肝ミクロソームを用い、YIC-C8-434の代謝における性差とP450の関与、並びにP450分子種の特異的阻害剤を用いたラットP450分子種を同定した。

【結果・考察】YIC-C8-434の500 mg/kg/day反復投与により、雌ラットでは死亡、体重及び摂餌量の減少、血液化学検査値の異常、胸腺、卵巣及び子宮の各臓器重量の減少等の多様な毒性発現を認めたが、雄では異常を認めなかった。このときの薬物血中濃度は、雄に比べて雌が顕著な高値を示した。NADPH存在下での肝ミクロソームによるYIC-C8-434の代謝には雌雄差が見られるとともに、雄ラット肝ミクロソームへのSKF525A添加により濃度依存性の代謝阻害が認められ、YIC-C8-434の代謝にP450が関与することが示唆された。雄ラットの肝ミクロソームを用いてYIC-C8-434の代謝に関与するラットのP450分子種を同定した結果、CYP3A2であることが判明した。一般にCYP3A2は雌ラットには発現が低いことから、雌ラットに本薬物の毒性が認められた原因は、CYP3A2の発現量の性差に起因して本薬物を代謝できなかったためと考えられた。

Expression of Toxicity in Female Rats in relation to Sex-Differences in Drug-Metabolizing Enzyme.

Kimiyuki KANEKO, Kazumi UCHIDA, Toshihide KOBAYASHI, Kouzou MIURA, Ikuo KATO, Masaharu ONOUE, YAKULT Central Institute for Microbiological Research, 1796 Yaho, Kunitachi-shi, Tokyo, 186-8650, Japan.

○深澤洋史<sup>1)</sup>、苗代一郎、青木康治、岩井久和、阿瀬善也、川原潤一、  
木村 敬、青木豊彦、橋本正晴

日本製薬工業協会 基礎研究部会第二分科会

(ファイザー製薬株式会社<sup>1)</sup> ファイザー・ヘルスケア・アカデミー)

〔目的〕ヒトに対する医薬品の安全性の外挿を的確に行うため、一般毒性試験における検査項目の意義を再考し、検査項目選択の妥当性を明らかにすることが重要となってきた。今回、臨床病理検査項目の国際的基準案(IHCPT, International harmonization of clinical pathology testing)の検討の一環として、一般毒性試験における臨床病理検査の実施状況について調査したので報告する。

〔調査方法〕日本製薬工業協会(JPMA)基礎研究部会加盟企業 89 社を対象にアンケート形式で、マウス、ラット、イヌおよびサルを用いた反復投与毒性試験における臨床病理検査の実施状況とその理由、および測定上の課題・問題点等の調査を実施した。回収した回答は、動物種毎、血液学的検査、血液化学的検査および尿検査毎に集計し、解析を行うとともに、1989 年に実施した JPMA の同様の調査成績と比較検討した。

〔結果・考察〕血液学的検査では、PT、APTT については 90%以上の施設で実施されていた。また IHCPT で推奨されている MCH、MCHC、MCV については各動物種で 90%以上の施設で実施されており、これは測定機器の普及によるものと考えられる。血液化学的検査では、蛋白分画が以前に実施された調査結果と比較して実施率が高く、ラット、イヌおよびサルで 50%以上であった。その他の項目については以前の調査結果と大差はなかった。尿検査については厚生省毒性試験法ガイドラインに例示された項目の実施率が高く、以前の調査結果と大差はなかったが、尿沈渣、ナトリウム、カリウムは以前より高い実施率であった。

Current Status of Clinical Pathology Testings in General Toxicity Studies for Pharmaceuticals.

Hirofumi FUKAZAWA<sup>1)</sup>, Ichio NAESHIRO, Yasuji AOKI, Hisakazu IWAI, Yoshiya AZE, Junichi KAWAHARA, Takashi KIMURA, Toyohiko AOKI, Masaharu HASHIMOTO

Japan Pharmaceutical Manufacturers Association, Tokyo, Japan

(Pfizer Pharmaceuticals Inc., Pfizer Healthcare Academy<sup>1)</sup>)

## J-109388 (Indolocarbazole 系 Topo-I 阻害薬) のイヌ発熱メカニズムの検討

○宮崎裕康, 吉田睦, 佐々木和彦, 森山智之, 久野博司, 花見正幸, 松本浩良, 池本文彦

萬有製薬株式会社 開発研究所

(緒言) J-109388 (Indolocarbazole 系 Topo-I 阻害薬) によるイヌの発熱についてテレメトリーシステムを用いて精査し、そのメカニズムの検討を行った。

(方法) 動物は腹腔内にテレメトリーモニターを埋め込み、十分に回復させたビーグル犬計 13 匹 (10・23 ヶ月齢, 雌 6 匹, 雄 7 匹) を使用した。まず, 8 匹に J-109388 の 10 mg/kg (N=3), 1.0 mg/kg (N=3), 0.1 mg/kg (N=1) あるいは Vehicle (N=1) を静脈内に約 1 時間持続投与し、経時的に血液生化学検査を実施した。また, 24 時間後の病理組織検査を実施した。次に, 残り 5 匹に, J-109388 の 10 mg/kg を同手法により投与し, その 4 時間あるいは 12 時間後にインドメタシンの 1.0 mg/kg を 1 匹づつ, 残り 3 匹は, 24 時間後にインドメタシンの 1.0, 0.1, 0.01 mg/kg を 1 匹づつ静脈内投与した。試験期間中, 症状観察とともにテレメトリーシステムにより体温をモニターした。

(結果及び考察) J-109388 のほぼ致死量の 10 mg/kg で, 2 相性 (約 6 時間, 39.9℃ 及び 18 時間, 41.0℃) の発熱が観察された。また, 嘔吐, 下痢がみられ, 白血球は 22 時間より減少し, IL-6 及び CRP の上昇がみられた。病理組織検査では, 腸管の Peyer's Patch 内のリンパ球の消失及び好中球の浸潤, 小腸上皮細胞の壊死が観察された。一方, インドメタシンは用量依存的な解熱効果を示し, 予防的投与においても体温上昇を抑制し, 嘔吐および下痢の発現を抑えた。

これらの結果は J-109388 によるイヌの発熱が何らかの炎症性の反応であることを示すとともに, この発熱に腸管病変が関与していることを示唆した。

### Mechanism of Fever Induced by J-109388 (Indolocarbazoles Topoisomerase-I Inhibitor) in Dogs

Hiroyasu MIYAZAKI\*, Mutsumi YOSHIDA, Kazuhiko SASAKI, Tomoyuki MORIYAMA, Hiroshi KUNO, Masayuki KEMI, Hiroyoshi MATSUMOTO, Fumihiko IKEMOTO

Development Research Labs, Banyu Pharmaceutical Co.Ltd.

NB-506(Indolocarbazole 系 Topoisomerase-I 阻害薬)投与後に惹起される  
イヌ体温変動の検討

○吉田睦、宮崎裕康、佐々木和彦、森山智之、久野博司、松本浩良、  
池本文彦

萬有製薬株式会社 開発研究所

【緒言】 NB-506 のヒト臨床試験において、投与後 1～8 時間に血漿中 IL-6 濃度の上昇を伴う非感染性発熱がみられた。そこで今回、ラジオテレメトリーシステムを用いて NB-506 投与後のイヌにおける経時的な体温変動を明らかにし、ヒトでみられた発熱と比較検討した。

【方法】 動物は腹腔内に体温測定用テレメトリーモニターを埋め込み、術後順調に回復したビーグル犬を用いた。初回に Vehicle を投与し、続いて 2 週間毎に NB-506 を低用量 (0.9 mg/kg) から高用量 (80 mg/kg) まで用量増加し計 4 回投与した。約 1 時間の静脈内持続投与後、テレメトリーシステムを用いて連続的に体温をモニターし、症状観察、血液/生化学検査、血漿中 CRP 及び IL-6 濃度の測定を行った。

【結果及び考察】 80 mg/kg 投与後、3 相性の発熱がみられた。第 1 相は投与 3 時間後にみられ、投与 12 時間後まで約 39℃ の熱が持続した。第 2 相は投与 12 時間後よりみられ、投与 22 時間後まで約 40℃ の熱が持続した。第 3 相は投与 4 日後よりみられ、約 41℃ の熱が持続した。第 1 相の発熱と平行して血中 IL-6 及び AST/ALT の上昇がみられたが、好中球の減少はみられなかった。また、第 3 相の発熱と平行して好中球の顕著な減少と CRP 及び IL-6 の上昇がみられた。発熱 2 日目には起立困難な状態になったため、インドメタシンと抗生物質との併用治療を行ったところ、良好な解熱効果と一般状態の改善効果が得られた。これらの結果から、第 3 相の発熱は好中球減少による二次的な感染性発熱であることが判断された。一方、第 1 相の発熱は、第 3 相の感染性発熱と異なり好中球減少を伴わず投与早期に見られる点でヒト臨床で見られた非感染性発熱と類似していた。

Fever with NB-506(Indolocarbazoles, Topoisomerase-I Inhibitor) in Early Phase After Dosing in Dogs

Mutsumi YOSHIDA\*, Hiroyasu MIYAZAKI, Kazuhiko SASAKI, Tomoyuki MORIYAMA, Hiroshi KUNO, Hiroyoshi MATSUMOTO and Fumihiko IKEMOTO  
Development Research, Banyu Pharmaceutical Co., Ltd.

## 毒性試験における初期全身性反応

## 1. 単回投与毒性試験に用いたビーグル犬についての調査

星谷 達, ○渡辺 大, 赤木 圭介, 溝口 靖基, 神谷 紀礼,  
水口 浩康, 熊原 道代, 戸谷 弘之, 長島 吉和, 岡庭 梓

株式会社ボゾリサーチセンター 函南研究所

背景：単回投与毒性試験において、被験物質及び投与経路の如何を問わず、ビーグル犬に投与後1週間以内に特徴的な一連の反応を認めることがある。これはヒトなどで主として急性炎症に伴って認められる急性相反応を含む全身性反応と同一の性格を持つと考える。目的：初期全身性反応と考えられる変化の実態を明らかにしてその意義を考察する。方法：試験開始前及び被験物質投与7日後迄の血液検査データがある単回投与毒性試験(n=25)について、フィブリノーゲン(Fibrinogen)及び白血球(WBC)の一過性増加(いずれか一方が対投与前値比150%以上)を認めた試験について変化の推移を検討した。結果と考察：約半数の試験でWBC及びFibrinogenの双方あるいは単独の一過性上昇(処置後1-3日)のみが目立った変化として記録された。これらの変化とくにFibrinogenのその程度には、用量反応関係が認められた。今回の調査で、初期全身性反応が非特異的反応として稀ならず発現することが明らかになった。その発現は、急激かつ一過性であり、用量反応関係を示すことを特徴とするが、毒性試験において被験物質の潜在的毒性の有無とは切り離して扱うべきと考える。

WBC・Fibrinogen 両データのある試験	双方 増加	WBC のみ増加	Fibrinogen のみ増加	双方 正常	WBC data だけの試験	増加	正常	
経口	3	0	0	1	2	7	4	3
静脈内	6	2	1	2	1	1	1	-
静脈内(持続)	3	2	1	-	1	1	-	-
結腸内	1	-	-	1	-	-	-	-
経皮	1	-	-	-	1	-	-	-
皮下	1	-	-	-	1	-	-	1
n=15	4	2	4	5	10	6	4	

## Early Systemic Response in Toxicity Studies

## 1. Survey of Beagle Dogs Subjected to Single Dose Toxicity Studies

Toru HOSHIYA, Dai WATANABE, Keisuke AKAGI, Yasumoto MIZOGUCHI, Kazunori KAMIYA, Hiroyasu MIZUGUCHI, Michiyo KUMAHARA, Hiroshi TOYA, Yoshikazu NAGASHIMA and Azusa OKANIWA

Kannami Lab. Bozo Research Center Inc., 1308 Kuwahara-Sanbonmatsu, Kannami-cho, Tagatagun, Shizuoka 419-0101

## 毒性試験における初期全身性反応

## II. イヌにおけるエンドトキシン投与及び外科的侵襲時の所見

○星谷 達, 渡辺 大, 松岡 哲也, 堀口 浩資, 三木 康宏,  
水口 浩康, 石井 俊也, 野村 典行, 長島 吉和, 岡庭 梓

株式会社ボゾリサーチセンター 函南研究所

目的：著者らは前報で述べた如く、単回投与試験に供したビーグル犬に、初期全身性反応とみなすべき変化を稀ならず認めている。本報ではビーグル犬に実験的初期全身性反応を起こし、毒性試験で見られるものと比較した。方法：実験 1) エンドトキシン  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$  静脈内投与、実験 2) 後大静脈内留置カテーテル設置術、及び実験 3) 2) の術後 2 週間経過後エンドトキシン後大静脈内投与。いずれの場合も処置前及び処置後 1 週にわたり臨床観察、血液及び血液生化学検査、但し、2) では手術日の経時検査実施せず。供試動物は 1~2 才齢ビーグル(♂2 + ♀3, n=5)。結果：実験 1 及び 3) では投与 30 分後から 6 時間後にかけて、嘔吐、自発運動減少、眼結膜や口粘膜の貧血や潮紅、震え、体位異常及び粘性便等が発現、とくに実験 3) では、1) と比較し、変化顕著。投与翌日以降、全個体に異常なし。同時に、投与 3 時間後を中心に約  $1^\circ\text{C}$  の直腸温上昇、心拍数変動を記録。総白血球数は処置 30 分後激減(最低値：処置前値比 15%)、以後、漸増、6 時間後はほぼ処置前値と同等、処置翌日には実験 2) を含め最高値(処置前値比 127~293%、中間値 207%)、以後、漸減、5 あるいは 7 日後には処置前値と同等。Fibrinogen 値は実験 1) では 30 分から 1 時間後、実験 3) ではやや遅れて減少(最低値：処置前値比 65%)以後、漸増、6 時間後は処置前値に近く、全実験を通じ、1 及び 2 日後に最高値(処置前値比 141~223%、中間値 177%)を示し、以後、漸減、5、あるいは 7 日後には処置前値と同等。考察：白血球及び Fibrinogen 値の変動の程度及びその推移は、エンドトキシン注射及び外科手術の両条件を通じて、殆ど異なるところがなかった。これらの知見は、単回投与試験に供したビーグル犬で認められる血液検査所見と同様で、いずれも初期全身性反応として共通の生物学的意義を持つと考えた。

## Early Systemic Response in Toxicity Studies

## II. Findings in Beagle Dogs Injected with Endotoxin or Subjected to Surgical Operation

Toru HOSHIYA, Dai WATANABE, Tetsuya MATSUOKA, Kousuke HORIGUCHI, Yasuhito MIKI, Hiroyasu MIZUGUCHI, Toshiya ISHII, Noriyuki NOMURA, Yoshikazu NAGASHIMA and Azusa OKANIWA

Kannami Lab. Bozo Research Center Inc., 1308 Kuwahara-Sanbonmatsu, Kannami-chô, Tagatagun, Shizuoka 419-0101



◎鎌田秀一、松山隆史、角崎英志、福岡好一郎、宮崎宏彰

株式会社新日本科学 安全性研究所

【目的】近年、先進国諸国において肥満が現代成人病として問題視され、その治療薬の開発が期待されている。肥満治療薬の薬効評価には体脂肪率の変化を測定することが有用であると考えられる。そこで我々は、高体脂肪率の雌カニクイザルを用いて3段階の給餌量を設定し、体重及び体脂肪率の変動を経時的に調べ、体脂肪に及ぼす摂餌量の影響について検討したので報告する。【実験方法】雌カニクイザル（体重 4.0～6.0 kg、年齢 4～9 才）10 匹を各群の平均体重及び体脂肪率がほぼ一定の値となるように考慮し、180g 給餌群[最大摂餌群、1 群 (n=3)]、60g 給餌群[軽度制限給餌群、2 群 (n=3)]及び 24g 給餌群[高度制限給餌群、3 群 (n=4)]に配した。固型飼料として Teklad Certified 25 % Monkey Diet (W)、HSD を与えた。体脂肪率の測定には単位面積当たりの骨量を求めるために用いる Dual Energy X-ray Absorptiometry (DXA) の測定原理を応用して測定した。すなわち、動物を麻酔下で仰臥位にし、骨密度測定装置 (DPX-α, Lunar 社製) を用いて全身をスキャンし、全身の脂肪重量/組織重量の百分率を測定した。なお、実験期間中は、摂餌量測定を毎日、体重測定を週 1 回、体脂肪率測定を実験開始後 2、4、6 及び 8 週目に行った。【結果】8 週間の実験期間中、1 群の摂餌量は給餌量の約 83% で、2 及び 3 群では給餌量のほぼ 100% であった。実験開始後 8 週目の 1、2 及び 3 群の体重は、実験開始前値を 100% とすると、109.9%、91.1% 及び 83.5%、体脂肪率は 102.5%、81.6% 及び 51.3% であった。【結論】本方法を用いることにより、カニクイザルの体脂肪率を経時的にモニターできることが示された。本実験で認められた体脂肪率減少は、実験開始 8 週目において体重の減少率よりも大きかったことから、DXA を用いた体脂肪率測定ではその経時的変化を鋭敏に捉えられる可能性があることが示唆された。

The Measurement of Body Fat Ratio in Cynomolgus Monkeys, Using DXA and the effect of Limited Feeding on Body Fat Ratio

Shuichi KAMATA, Takashi MATSUYAMA, Hideshi TSUSAKI, Koichiro FUKUZAKI, and Hiroaki MIYAJIMA

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

□高木久宜<sup>1</sup>、三森国敏<sup>1</sup>、小野寺博志<sup>1</sup>、安原加壽雄<sup>1</sup>、田村啓<sup>1</sup>、  
那須昌弘<sup>2</sup>、広瀬雅雄<sup>1</sup>

<sup>1</sup>国立衛研・病理部

<sup>2</sup>(株)パナファーム・ラボラトリーズ

【目的】補骨子抽出物は、マメ科の植物であるオランダビユの果実をエタノール抽出した天然素材由来の食品添加物であり、焼き鳥、唐揚げ、浅漬けの日持ち向上剤として用いられる。先行した 13 週間亜慢性毒性試験で、高用量群に精巣萎縮がみられた。そこで、補骨子抽出物の精巣毒性の発現機序を明らかにする目的で以下の実験を行った。

【方法】実験 1: 8 週齢の F344 ラットに 2000mg/kg の補骨子抽出物を単回強制経口投与後、1、3、7 および 14 日に血清ホルモン値測定のため採血し、精巣を採取した。実験 2: 6 週齢の F344 ラットに 3% の補骨子抽出物を混餌投与し、1、2、4、8 および 12 週に血清ホルモン値測定のため採血し、精巣を採取した。

【結果】実験 1: 投与群と対照群の間には精巣重量に差は認められなかった。投与 1 日では、投与群に血清 LH の有意な減少、FSH、Teststerone の減少傾向がみられた。病理組織学的には、投与 1 日よりライディッヒ細胞の萎縮、3 日よりバキデン期精母細胞の軽度な変性が認められた。実験 2: 投与開始 1 週より、投与群で有意な体重増加抑制が認められた。精巣重量は、投与開始 2 週より投与群で相対重量が有意に減少した。投与 1 と 2 週では、投与群で血清 FSH、Teststerone が有意に減少した。病理組織学的には、投与 1 週よりライディッヒ細胞の萎縮と精細管内伸長精子細胞の消失ならびに円形精子細胞の減少がみられた。

【考察】今回の実験において、LH および FSH が減少したことから、補骨子抽出物は視床下部/下垂体前葉に作用すると考えられ、二次的にライディッヒ細胞での Teststerone の合成が抑制されたものと推察された。また、FSH の減少に起因する二次的なセルトリ細胞の機能低下も考えられ、精母細胞より後の精子細胞に対して毒性を発現させるものと考えられた。

#### Mechanistic studies on testicular toxicity of *Psoralea corylifolia* extract in rats.

Hisayoshi TAKAGI<sup>1</sup>, Kunitoshi MITSUMORI<sup>1</sup>, Hiroshi ONODERA<sup>1</sup>, Kazuo YASUHARA<sup>1</sup>, Toru TAMURA<sup>1</sup>, Masahito NASU<sup>2</sup> and Masao HIROSE<sup>1</sup> Division of Pathology, National Institute of Health Sciences, Tokyo 158-8501, Japan<sup>1</sup>, Panapharm Lab., Kumamoto, 869-0425<sup>2</sup>

○南正康、勝又聖夫、葉恵娟

日本医科大学衛生学公衆衛生学教室

数年前に、漢方薬を長期服用して、鉛中毒になった事例を報告した。この事例は、猪苓湯を用いた例で、その中の各成分の中、滑石に20-50  $\mu\text{g/g}$ の鉛が含まれていた。この程度の鉛では鉛中毒にはならない。この滑石に含まれている鉛を、漢方薬を煮るポット壁に付着蓄積させる成分もあることもわかった。ゼラチンである。ゼラチンが鉛をポット壁に蓄積させる。この鉛の一部が漢方薬の中に入り200回も漢方薬を煮ていると、この滲出鉛はミリグラムオーダーとなる。中毒の原因は、この蓄積鉛であった。それでは、何故、ゼラチンが、鉛をくっつけるのかという点が問題となる。ゼラチンの成分の中に、鉛を強く、つける蛋白があったのである。分子量約3万2千の蛋白で、現在、これを解析中であり、学会で一部がわかるであろう。

Lead binding protein, a component of Gelatin, which was found during the analysis of lead poisoned case.

○Masayasu Minami, Masao katumata, Hui-jan Ye

ヒトチトクロームP4501A2とアセチル転移酵素を細胞内で発現する *umu* 試験菌株を用いた癌原性芳香族アミンの検出

Pramod Aryal<sup>1,2</sup>, 寺下隆夫<sup>2</sup>, F. P. Guengerich<sup>3</sup>, 島田 力<sup>1</sup>,  
○小田美光<sup>1</sup>

大阪府立公衆衛生研究所<sup>1</sup>, 近畿大学農. 食品微生物<sup>2</sup>,  
Vanderbilt Univ.<sup>3</sup>

〔目的〕 癌原性芳香族アミンの遺伝毒性は、P4501A2とO-アセチル転移酵素（O-AT）に依存していることが知られている。今回、我々は、ヒトのP450遺伝子とNADPH-P450還元酵素遺伝子を導入した *umu* 試験菌株OY1001/1A2と、さらにサルモネラのO-AT遺伝子を導入した *umu* 試験菌株OY1002/1A2を開発し、それらの菌株を用いて、芳香族アミンが細胞内でP450 1A2とO-ATによって代謝的活性化され、DNA損傷性を示すかどうかを *umuC* 遺伝子発現誘導を指標にして検討した。〔方法〕 OY1001/1A2株、OY1002/1A2株およびO-AT欠損したOY1000/1A2株を用い、これらの菌株を1mM IPTG、0.5mM δ-アミレプリニック酸とtrace elements存在下で2時間対数増殖期にした菌液に被験物質を加えて、さらに3時間、37℃で培養後、菌体内のβ-ガラクトシダーゼ活性を常法により測定した。〔結果と考察〕 OY1002/1A2株は、OY1001/1A2株よりも MeIQ, IQ, MeIQx, 2-aminoanthracene, Trp-P-1, Gln-P-1, 及びTrp-P-2を高感度に検出できることがわかった。これらの結果から、新たに開発した試験菌株OY1002/1A2は、細胞内でヒトP450及びO-ATを発現させて代謝活性化させることにより、芳香族アミンの遺伝子毒性を検出できることがわかった。

Detection of Carcinogenic Aromatic Amines Using *Umu* Tester Strains Endogenously Expressing Human Cytochrome P450 1A2 and NADPH-P-450 Reductase, and Bacterial O-Acetyltransferase.

Pramod ARYAL<sup>1,2</sup>, Takao TERASHITA<sup>2</sup>, F. P. GUENGERICH<sup>3</sup>, Tsutomu SHIMADA<sup>1</sup>, and Yoshimitsu ODA<sup>1</sup>, <sup>1</sup>Osaka Prefectural Institute of Public Health, <sup>2</sup>Kinki Univ., Fac. Agr., <sup>3</sup>Vanderbilt Univ. Sch. Med. USA.

○藤田健一、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】*N*-アルキルニトロソアミンの代謝的活性化におけるヒトチトクローム P450(CYP)の役割を明らかにすることを目的とした。特に *N*-アルキルニトロソアミンのアルキル側鎖の構造と代謝的活性化に関与するヒト CYP の関係の解明を目指した。ヒト CYP と 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 YG7108 株を用いて検討した。

【方法】*N*-ニトロソジメチルアミン(NDMA)、*N*-ニトロソジエチルアミン(NDEA)、*N*-ニトロソジプロピルアミン(NDPA)、*N*-ニトロソジブチルアミン(NDBA)、*N*-ニトロソメチルエチルアミン(NMEA)、*N*-ニトロソメチルプロピルアミン(NMPA)、*N*-ニトロソメチルブチルアミン(NMBA)および *N*-ニトロソエチルブチルアミン(NEBA)について検討した。11 種類のヒト CYP のそれぞれを OR と同時に発現するサルモネラ菌 YG7108 株を用いて Ames 試験を行い、*N*-アルキルニトロソアミンの代謝的な活性化に関与する CYP 分子種を同定した。変異原産性活性(復帰変異コロニー数/nmol *N*-アルキルニトロソアミン/pmol CYP)を算出し、各 CYP 分子種について比較した。

【結果】小さなアルキル側鎖を有する NDMA、NMEA は、主として CYP2E1 により代謝的に活性化された。アルキル側鎖が大きくなるにつれて CYP2E1 の寄与は小さくなり、CYP2A6 に関与が増加した。NDEA、NDPA、NMPA、NMBA の活性化に関与する主要な CYP は CYP2A6 であった。興味深いことに、これらの *N*-アルキルニトロソアミンよりもさらにアルキル側鎖の大きな NDBA においては主として CYP1A1 が代謝的活性化に関与した。以上、8 種類の *N*-アルキルニトロソアミンの代謝的活性化におけるヒト CYP の役割を解明した。

Role of human cytochrome P450 on the metabolic activation of *N*-alkylnitrosamines.

Ken-ichi FUJITA and Tetsuya KAMATAKI

Lab. of Drug Metab., Grad. Sch. of Pharm. Sci., Hokkaido Univ., Sapporo, Hokkaido, 060-0812

○山崎義征<sup>1</sup>、藤田健一<sup>1</sup>、若林敬二<sup>2</sup>、鎌滝哲也<sup>1</sup><sup>1</sup>北海道大学大学院薬学研究科代謝分析学分野、<sup>2</sup>国立がんセンター研究所がん予防研究部

【目的】2-Phenylbenzotriazole (PBTA) 誘導体は、河川水から単離された新規な変異原物質である。我々はすでに、当研究室で樹立したヒトチトクローム P450 (CYP) を発現するサルモネラ菌 TA1538 株を用いて、これらの変異原物質がヒト CYP1A1 によって代謝的に活性化されることを明らかにした。これらの化学物質はヒト CYP1A1 による活性化に引き続き、サルモネラ菌の *O*-アセチル転移酵素によりアセチル化され活性化された。しかし、PBTA 誘導体がヒトのアセチル転移酵素によりアセチル化され活性化されるかについては不明である。そこでヒト *N*-アセチル転移酵素 2 (NAT2) の PBTA 誘導体の代謝的活性化への関与を検討した。

【方法】当研究室で樹立したヒト NAT2 を発現するサルモネラ菌 YG7130 株を用い、ベンゼン環の 4 位に結合した窒素原子の置換基が異なる 6 種類の PBTA 誘導体 (PBTA-1 [-N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], PBTA-2 [-N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>CN], PBTA-3 [-NHC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OH], PBTA-4 [-NH<sub>2</sub>], PBTA-5 [-N(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OH)<sub>2</sub>] および PBTA-6 [-N(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OCOCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]) について変異原性試験を行った。ヒト CYP1A1 を発現する大腸菌の膜画分を反応系に添加した。

【結果】反応系にヒト CYP1A1 を添加した場合、検討した 6 種類の PBTA 誘導体はすべてサルモネラ菌に発現したヒト NAT2 により活性化された。PBTA 誘導体の濃度が 1.4 μM における復帰変異コロニー数は NAT2 を発現しない親菌株を用いた場合の 11 から 25 倍であった。反応系に CYP1A1 添加しない場合、復帰変異コロニー数は増加しなかった。

以上、検討した 6 種類の PBTA 誘導体は、ヒト CYP1A1 による代謝的活性化に引き続きヒト NAT2 によりアセチル化され、さらに活性化されることを明らかにした。

Role of human *N*-acetyltransferase in the metabolic activation of 2-phenylbenzotriazole (PBTA) derivatives.

Yoshiyuki YAMAZAKI<sup>1</sup>, Ken-ichi FUJITA<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, Sapporo, Hokkaido, 060-0812; <sup>2</sup>Cancer Prevention Div, Natl. Cancer. Ctr. Res. Inst., Chuo-ku, Tokyo, 104-0045

## マウス始原生殖細胞は変異原物質の重要な標的である

直谷 徹

(財) 食品薬品安全センター薬野研究所

**[目的]** マウス始原生殖細胞 (PGC) は、雌雄ともにすべての生殖細胞の基幹となる細胞群である。これまで主に *N*-Ethyl-*N*-nitrosourea (ENU) を用いて、マウス特定座位試験 (SLT)、トランスジェニックマウス試験 (TGM)、マウススポット試験 (MST) および発生組織学的観察 (HST) を雄 PGC について行ってきた。今回、これらの結果を総合して考察する。

**[材料および方法]** SLT: C3H/He の雌雄を交配し、発生 8.5 日から 13.5 日胚の PGC に ENU を経胎盤投与した。得られた雄をテスター系統 PW 雌と交配して、次世代児の観察によって突然変異体を同定し、誘発突然変異率を求めた。MTG: MutaMouse の雌雄を交配し、SLT と同様に ENU を投与した。得られた F1 雄の精巣を摘出し、DNA 抽出などを行い、Positive selection 法によって Mutant frequency を求めた。MST: PW 雌および C57BL/6 雌を交配し、発生 10.5 日に種々の変異原物質を経胎盤投与した。出生児について、毛色のスポットおよび精巣の重量などを測定した。HST: C57BL/6 雌雄を交配し、発生 10.5 日に種々の変異原物質を経胎盤投与した。発生中の PGC について、組織標本を作製し、HE 染色と apoptosis の検出を行った。

**[結果および考察]** ENU による突然変異誘発率は SLT および TGM でともに発生 10.5 日が最も高く 13.5 日で最も低く、明らかな発生時期特異性を示した。さらに、SLT ではクラスター突然変異が発生時期が早いほど、用量が高いほど容易に得られた。MST では、F1 のスポットが用量依存的に誘発され、精巣重量も用量依存的に減少した。HST では、ENU および Aminophenylnotharman によって、apoptosis が用量依存的に誘発されることが認められた。

これらの結果から、マウス PGC は、ENU により比較的容易に突然変異が誘発され、また種々の変異原物質によって細胞死が誘発されることが分かった。マウス PGC は生殖細胞の根幹細胞であるので、突然変異が誘発されれば大きな遺伝的影響を与えることになる。また、細胞死の誘発によって妊性低下や不妊などが誘発される。さらに、PGC は発生過程で性分化を行うため、内分泌攪乱化学物質の標的ともなりうる重要な細胞群である。

Mouse primordial germ cells as targets of chemical mutagens

Tohru SHIBUYA

Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center, Hadano, Kanagawa Japan

○佐々木有<sup>1</sup>、関橋薫<sup>2</sup>、前田貴宣<sup>2</sup>、河村公太郎<sup>2</sup>、一花次夫<sup>3</sup>、  
津田修治<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 八戸工業高等専門学校、<sup>2</sup> (株) 化合物安全性研究所、

<sup>3</sup> 岩手大学獣医学科

comet assay は、DNA 鎖切断または DNA 感受性部位のような DNA 損傷をもつ DNA が強い電場下で変性・低分子化することを利用し、DNA 損傷を DNA の低分子化として comet tail 電気泳動で検出する方法であり、その像が彗星のように見えることからこのように呼ばれている。この方法では DNA 損傷を DNA 複製による固定を経ずに検出することができるため、非分裂性組織を含むあらゆる動物組織の DNA 損傷を検出できる。そこで、IARC と NTP で発癌性データに収載されたものから選んだ 206 化合物の遺伝毒性をマウスの主要 8 臓器で評価し、マウスの多臓器における遺伝毒性と発癌類癌原性の相関性を検討した。

芳香族型アミン化合物を除く有機溶剤、ヒドロカルボン類の大部分は、広範囲の臓器にわたって遺伝毒性を示した。芳香族型アミン化合物は、発癌標的臓器である肝に強い遺伝毒性を示した。有機化合物と無機化合物は腸内細菌によって代謝に還元代謝されるが、結腸で強い遺伝毒性を示した。以上のように、遺伝毒性が認められる臓器は化学物質の種類によって決定される傾向があることを示唆された。 comet assay で検出される各臓器での遺伝毒性は発癌性に必ずしも一致せず、多くの場合は発癌標的の必要条件的なものであっても十分条件的なものではないこと、少なくとも一つの臓器で陽性となった場合に comet assay で陽性と規定すると、非発癌物質で comet assay 陽性となるものは少数にとどまった。これらことから、 comet assay は Ames 試験陽性の化合物の発癌性を in vivo 遺伝毒性として予測することには有効である可能性が示唆される。

Correlation of Genotoxicity and Carcinogenicity in mouse multiple organs

Yu F. SASAKI, Kaoru SEKIHASHI, Takanobu MAEDA, Kohtaro KAWAMURA,  
Tsuguo IKKA and Shuji TSUDA

Hachinohe Natl. Col. Techn., Chemical Safety Res. Co. and Iwate Univ.



○木村 努<sup>1)</sup>、永見和之、田中一三、入江弘之、  
渡辺 潔、横田 忠、須田朗子、中村和希

日本製薬工業協会 医薬品評価委員会 基礎研究部会 第二分科会  
免疫毒性ワーキンググループ (三共、安全性研究所<sup>1)</sup>)

【目的】前々回の本会で、マウス膝窩リンパ節測定法 (popliteal lymph node assay: PLNA) において自己免疫誘発物質および penicillin G (PcG) などの抗生物質が陽性反応を示すこと、A/J マウスまたは BALB/c マウスで良い応答性が得られること、および複数の施設での PLNA データを示した。今回、評価薬剤を増やし約 35 種の薬剤につき A/J マウスまたは BALB/c マウスを用いた PLNA について行った共同研究の結果を示す。また、PLNA をアレルギー性予知試験として使用する際の問題点および今後の課題を取り上げる。

【方法】A/J マウスまたは BALB/c マウスの片方の後肢足蹠皮下に薬剤を、反対側の後肢には溶媒を投与し、投与後 7 日目に膝窩リンパ節を採取し、cellularity index を算出した。さらに初回投与後 10 日目に 2 回目の投与を行い、その 2 日後に膝窩リンパ節を採取し 2 次応答を調べた。その際、フローサイトメトリーによるリンパ球サブセットの解析も行った。

【結果】本法が臨床でのアレルギー学的副作用を示す化合物の一部と相関性を持つことが示唆された。また、アレルギー性物質では 2 次応答が 1 次応答に比べ迅速かつ高いものであったが、刺激性物質ではこの現象は認められなかった。なお、従来 PLNA では高分子物質の反応は認められないといわれていたが、今回ウシ血清アルブミンの 2 回投与により、cellularity index の上昇が認められた。

【課題】PLNA の原法では、薬物の代謝物が感作性の本体である場合にはアレルギー性物質を検出できない問題点がある。また、PLNA がどの様に利用出来るのか、経口剤を含め今後更なる検討が必要である。

Application of the mouse popliteal lymph node assay to immunotoxicology evaluation of drugs.

Tsutomu KIMURA<sup>1)</sup>, Kazuyuki NAGAMI, Kazumi TANAKA, Hiroyuki IRIE, Kiyoshi WATANABE, Makoto YOKOTA, Akiko SUDA, Kazuichi NAKAMURA, Immunotoxicology Working Group, Preclinical Evaluation Subcommittee, Drug Evaluation Committee, Japan Pharmaceutical Manufacturers Association; Sankyo Co., Ltd.<sup>1)</sup>

○井上 守、望月 講輝、吉田 純一

科研製薬(株)安全性研究所

化学物質の免疫毒性評価法として種々の段階試験法が提案されているが、初期段階から免疫機能試験を含む方向と、反復投与毒性試験で免疫関連器官への影響が予測された場合に免疫機能を検討する方向が提示されている。今回、免疫抑制剤であるシクロスポリンとデキサメタゾンの薬効量での免疫関連器官の重量、有核細胞数および抗体産生への影響を検討した。

【方法】雄性CCラットの静脈内に羊赤血球(SRBC)を感作し、7日後の血清中抗SRBC-IgM抗体および18日後の抗SRBC-IgG抗体を測定した。抗体測定はSRBC膜抗原を固相化したイムノプレートを用い、ビオチン標識抗ラットIg抗体とパーオキシダーゼ標識ストレプトアビジンによるELISA法で行った。薬剤投与は感作日より18日間、反復経口投与により行った。最終投与の翌日に放血致死後、顎下リンパ節、腸間膜リンパ節、胸腺、脾臓重量および大腿骨骨髓、末梢血中の有核細胞数を測定した。

【結果および考察】3mg/kg、10mg/kgのシクロスポリンにより抗SRBC抗体産生は抑制されたが、体重および免疫関連器官の重量、細胞数には影響が認められなかった。一方、デキサメタゾンでは最小用量の0.017mg/kgより免疫関連器官の重量の低下がみられるにもかかわらず、抗SRBC抗体産生は中間用量の0.05mg/kgでも影響は認められなかった。さらに、抗SRBC-IgM抗体では最大用量の0.15mg/kgにおいても有意な影響が認められなかった。薬効量のシクロスポリンでみられる免疫機能への影響は免疫関連器官の重量および骨髓、末梢血中の有核細胞数には反映しないものと考えられる。免疫毒性の把握には初期段階から機能への影響を検討することが必要なものと考ええる。

Evaluation of immunotoxicity tests using dexamethasone and ciclosporin  
Mamoru Inoue, Kohki Mochizuki, Junichi Yoshida  
Safety Research Laboratories, Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.  
Shizuoka 426-8646, Japan

○川島康永、永見和之、久野博司、松本浩良

萬有製薬株式会社 開発研究所

【緒言】 イヌは、アトピー等、ヒトと同様のアレルギー反応を示すため、アレルギー研究において重要な動物種と考えられる。しかし、イヌにおける薬物誘発性アレルギー反応に関する研究報告は殆どなく、その評価法も限られている。そこで今回、ペニシリン(PCG)-タンパク結合物を抗原としてイヌに投与し、どのようなアレルギー反応が観察されるか確認すると共に、その評価法を検討した。

【材料及び方法】 PCG-ウシ血清アルブミン(BSA)結合物を、Alumと共に2週間間隔で4回、ビーグル犬に皮下投与して感作した。4次感作後2週間目に、PCG-イヌ血清アルブミン(DSA)結合物を静脈内投与し、誘発される一般徴候と血漿中ヒスタミン濃度の推移を観察した。また、感作期間中、毎週1回の採血を行い、得られた血清について、PCG特異的IgG及びIgE抗体価をELISAにより測定した。

【結果】 惹起投与後、嘔吐、脱糞、充血等の一般徴候が観察された。この動物の血漿中ヒスタミン濃度は、惹起投与後に急激に上昇していた。充血等の一般徴候の発現は血中ヒスタミン濃度の上昇と一致していた。さらに、ELISAによりPCG特異的IgG及びIgE抗体価の測定を検討した結果、感作に従った特異抗体価の上昇が確認された。

【考察】 イヌへのPCG-タンパク結合物の惹起投与により即時型の一般徴候が認められ、この反応は血中ヒスタミン濃度の上昇を伴っていた。また、感作期間中のPCG特異的IgG及びIgE抗体価を測定した結果、感作に従った抗体価の上昇が確認され、上記の反応が薬物抗原特異的な即時型アレルギー反応であることが示された。以上の結果より、今後は薬物抗原特異的な抗体価を測定することにより、イヌにおける薬物由来のアレルギー反応を迅速且つ簡便に診断及び予知することが可能と考えられた。

#### Investigation of Drug-Induced Allergy in Dogs

Yasunaga KAWASHIMA\*, Kazuyuki NAGAMI, Hiroshi KUNO, Hiroyoshi MATSUMOTO

Development Research, Banyu Pharmaceutical Co., Ltd.

リポポリサッカライド(LPS)によるヘムオキシゲナーゼ-1 遺伝子発現におけるサイトカインの役割

小黒多希子<sup>1)</sup>, 高橋祐子<sup>2)</sup>, 塩田清二<sup>3)</sup>, 宝来玲子<sup>1)</sup>, 浅野雅秀<sup>3)</sup>, 岩倉洋一郎<sup>3)</sup>, 吉田武美<sup>1)</sup>

1)昭和大学薬学部毒物学, 2)医学部第一解剖学, 3)東大医科研ヒト疾患モデル研究センター

【目的】ヘム分解の律速酵素であるヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)は, 様々な酸化的ストレスに応答するストレス応答タンパク質で, 近年では本酵素誘導時の生体防衛効果の報告も相次いでいる。LPS によるマウス肝臓での HO-1 遺伝子発現は, LPS により誘導された IL-1 $\beta$ や NO が関与しているとの報告があるが, ノックアウトマウスを用いた詳細な検討はなされていない。そこで本研究は, 種々のサイトカインノックアウトマウスを用いて比較検討を行った。

【実験方法】実験動物として IL-1 $\alpha/\beta$ ノックアウトマウス(IL-1KO)と TNF $\alpha$ ノックアウトマウス(TNF $\alpha$ KO)を用いた。LPS は, 生理食塩水に溶解しマウスに 0.1mg/kg の投与量で腹腔内投与し, その一定時間後に肝臓を取り出した。AGPC 法により total RNA を抽出しノーザンブロットを行った。血清中のサイトカイン量を ELISA kit により測定した。

【実験結果】マウス肝臓では LPS 投与 2 時間後に HO-1mRNA 発現がピークとなり, wild マウスでは対照の約 30 倍に増加した。IL-1KO は LPS 投与により HO-1mRNA が増加したが, wild マウスより少ない傾向であった。TNF $\alpha$ KO では LPS による HO-1 遺伝子発現がほとんど認められなかった。この時のサイトカイン量を測定したところ, IL-1KO では wild マウスとほぼ同程度の TNF $\alpha$ や IL-6 産生が認められたが, TNF $\alpha$ KO では, IL-1 $\beta$ 産生量が著しく低かった。以上のことより LPS による HO-1 遺伝子発現には TNF $\alpha$ が大きく関与していることが示唆された。

Role of cytokines for HO-1 gene expression by lipopolysaccharide (LPS).

Takiko OGURO<sup>1)</sup>, Yuko TAKAHASHI<sup>1)</sup>, Seiji SHIODA<sup>3)</sup>, Reiko HORA<sup>1)</sup>, Masahide ASANO<sup>3)</sup>, Yoichiro IWAKURA<sup>3)</sup> and Takemi YOSHIDA<sup>1)</sup>. <sup>1)</sup>Dept. Biochem. Toxicol., <sup>2)</sup>Dept. Anatomy, Showa Univ., Tokyo, <sup>3)</sup>Inst. Med. Sci., Tokyo Univ., Tokyo

鼻粘膜アジュバントとしての組換えコレラ毒素Bサブユニット(rCTB)のアジュバント活性と安全性

○後藤紀久<sup>1</sup>、前山順一<sup>1</sup>、井坂雅徳<sup>2</sup>、谷口 暢<sup>2</sup>、小塚 諭<sup>2</sup>、安田陽子<sup>1</sup>、  
朽久保邦夫<sup>2</sup>

<sup>1</sup>国立感染症研究所・安全性研究部、<sup>2</sup>名古屋市立大学・医学部

【目的】粘膜面での感染症の防御は重要な戦略である。我々は経鼻で粘膜免疫応答を誘導し、すぐれた特異粘膜IgA抗体と血清IgG抗体産生を刺激する組換えコレラ毒素Bサブユニット(rCTB)について、現行ワクチンへの応用を目的として、安全性とアジュバント活性を検討した。

【方法】BALB/cマウス(雌, 7週齢)に液状ジフテリアトキソイド(Dr)5LfをrCTB10 $\mu$ gと同時経鼻(i. n.)投与し、血清および各粘膜の洗浄液を採取し、各種抗Dr抗体価をELISA法で測定した。また同種マウス腹腔M $\phi$ を用い、rCTBで刺激した場合に産生されるサイトカインおよびrCTBをOVAと共にi. n.投与した後、感作された脾細胞を採取し、それらを抗原刺激した場合に産生されるサイトカインを定量した。安全性面ではin vitro, in vivoの両試験法によりrCTB等の安全性を調べた。更にアレルギーに關与すると考えられている血清IgE抗体価も測定した。

【結果および考察】rCTBの添加がないと、粘膜でのIgA抗体、血清IgG抗体産生は25Lfでもみられないが、DrとrCTBとを同時投与すると、5Lfで全てのマウスで検出できた。また感染防御可能な十分に高い抗毒素価も得られた。rCTBとOVAでi. n.免疫した場合、抗原刺激した脾細胞からIL-2, 4, 5そして10の産生が認められた。このことからrCTBはTh1/Th2バランスをTh2タイプへ傾ける粘膜免疫にみられる作用があるらしい。血清IgE抗体はほとんど誘導されなかった。in vitro, in vivo試験でrCTBは毒性を示さなかったが、モルモットを用いた実験で、単回投与では見られない好酸球浸潤等が頻回投与により観察され、現在、マウスを用いて検討している。以上の結果よりrCTBは粘膜アジュバントとして経鼻ワクチン化に有用であると考えられる。

Adjuvanticity and Safety of rCTB as a Nasal Mucosal Adjuvant.

Norihisa GOTO<sup>1</sup>, Jun-ichi MAEYAMA<sup>1</sup>, Masanori ISAKA<sup>1</sup>, Toru TANIGUCHI<sup>1</sup>,  
Satoshi KOZUKA<sup>1</sup>, Yoko YASUDA<sup>2</sup> and Kunio TOCHIKUBO<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Dept. of Safety  
Research on Biologics, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 208-0011,  
Japan. <sup>2</sup>Dept. of Microbiology, Nagoya City University Medical School, Nagoya  
467-8601, Japan.

○宮田昌明<sup>1</sup>、高橋公一<sup>1</sup>、吉川正幸<sup>1</sup>、Frank J. Gonzalez<sup>2</sup>、山部康<sup>1</sup><sup>1</sup>東北大学大学院薬学研究科、<sup>2</sup>米国立衛生研究所

**【目的】** 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)は皮膚や乳線において強力な発がん性を示すとともに多くの免疫関連臓器に毒性を示す。DMBAによる免疫毒性の発現機構については発がんと同様なチトクロームP450(CYP)やミクロゾームエポキシドヒドロラーゼ(mEH)による代謝的活性化を必要とする機序やAhレセプター(AhR)を介する機序が考えられているが、各々の臓器についての詳細な解析はなされていない。本研究ではAhR非感受性マウス、DMBAの代謝的活性化に関与するmEHの欠損マウス及びその野生型マウスを用い胸腺、脾臓における免疫毒性の発現機構について解析した。

**【結果】** AhR非感受性マウスではDMBA処理において脾臓の重量は濃度依存的に減少したが、胸腺では変化がなかった。一方野生型マウス(AhR感受性)では脾臓、胸腺ともに重量が減少したが、対応するmEH欠損マウスでは、胸腺のみで重量の減少が認められた。100 mg/kgDMBAの投与により野生型マウス脾細胞のLPS, PHA応答性は完全に抑制されたが、mEH欠損マウスでは約30%の応答性が残存していた。一方脾細胞に直接DMBAを処理した場合、mEH欠損マウス脾細胞では、野生型マウス脾細胞に比べて、DMBAによる免疫抑制作用に抵抗性を示した。ウエスタンブロット解析により野生型マウスにおいてのみ肝臓、脾臓中にmEHの発現が認められた。脾臓ミクロゾームによるDMBAの代謝物をDMBA処理野生型マウスとmEH欠損マウスで比較したところ野生型マウスにのみDMBA-3,4-diol体が認められた。

**【結論】** DMBAによる脾臓の細胞毒性にはmEH等の関与する代謝的活性化が重要であることが示唆された。一方胸腺においてはAhR依存的な機構の重要性が示唆され、脾臓と胸腺でDMBAによる細胞毒性の発現機構に差異があることが示された。

Difference between spleen and thymus in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced immunotoxicity

Masaaki MIYATA<sup>1</sup>, Koichi TAKAHASHI<sup>1</sup>, Masayuki FURUKAWA<sup>1</sup>, Frank J. GONZALEZ<sup>2</sup> and Yasushi YAMAZOE<sup>1</sup> <sup>1</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Aoba-ku, Sendai 980-8578, <sup>2</sup>National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, 20892

○堀場直、熊野英一、新倉博文、井上誠

中外製薬株式会社 安全性研究所

【目的】ヒトの腎性高血圧では血圧日内変動が消失することが知られており、循環器臓器障害に対する新しいリスクファクターの一つとして重視されている。5/6 腎摘ラット(NX ラット)はヒトの腎症を最も反映しているといわれ、汎用されているが血圧日内変動に関する報告は未だない。そこでテレメトリーシステムを用いた検討を行った。

【方法】SD 系雌性ラットにテレメトリーシステム用送信機を埋め込み、その後腎動脈結紮による 5/6 腎摘出術を施した。腎摘後 12 週まで 1 週間おきに 24 時間連続で血圧、心拍数の測定を行った。血圧、心拍数の日内変動率は以下の計算式により算出した。  
《変動率(%)=(日中平均値-夜間平均値)/夜間平均値》 また、血液・尿生化学検査を同時に行い、腎症進展と日内変動との関連について検討した。

【結果】偽手術ラット(Sham ラット)では、検討期間中、日中血圧、夜間血圧はそれぞれ  $95.5 \pm 5.8$ 、 $101.2 \pm 5.6$  mmHg と日中血圧が有意に低値で、血圧の変動率は  $-5.98 \pm 1.83\%$  と明らかな日内変動が認められた。腎摘出により有意な昇圧が認められるとともに、血圧の変動率も有意に上昇し、日中降圧の消失、いわゆる non-dipper 症状が認められた。腎症の進展とともに non-dipper 症状はさらに顕著になり、血圧の変動率と血中クレアチニン値の間には正の相関( $r^2=0.602$ )が認められた。また、尿中 Na<sup>+</sup>排泄の日内変動も NX ラットで消失しており、血圧と Na<sup>+</sup>排泄の日内変動に深い関わりがあることが示唆された。心拍数は実数、日内変動率とも NX、Sham ラットで差は認められず、腎摘出による血圧日内変動の消失は交感神経系の異常によらないことが示唆された。

【結論】5/6 腎摘ラットではヒトと同様に腎症の進展に伴い、血圧日内変動の消失が認められることが明らかになった。その一因として尿中 Na<sup>+</sup>排泄の関与が示唆された。

The circadian rhythm of blood pressure disappears in rats with chronic renal failure.

Naoshi HORIBA, Eichi KUMANO, Hirofumi SHINKURA and Makoto INOUE.  
Safety Assessment Laboratory, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., 1-135 Komakado,  
Gotemba-shi, Shizuoka, Japan

雄ラットに見られる腎臓硝子滴変化の免疫組織化学的解析と  
その評価への適用

○緒方英博<sup>1</sup>、浜村政夫<sup>1</sup>、一鬼 勉<sup>1</sup>、和泉宏幸<sup>1</sup>、太田 浩<sup>1</sup>、内田秀臣<sup>1</sup>、  
鎌田榮一<sup>2</sup>、長谷川隆一<sup>2</sup>

<sup>1</sup>パナファーム・ラボラトリーズ 安全性研究部

<sup>2</sup>国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室

【目的】実験動物を用いた安全性試験で発現する変化のうち、動物固有の反応と考えられる変化はヒトへ外挿する際に考慮すべきではない。 $\alpha_2$ -グロブリン( $\alpha_2$ -G)は、雄ラットの肝臓で生成され、約60%が尿細管上皮に再吸収され加水分解されるが、残りは尿中に排泄される。 $\alpha_2$ -Gが化学物質と結合することで上記代謝が阻害されて尿細管上皮に結合物が蓄積し、硝子滴あるいは好酸性小体として観察される。一方、 $\alpha_2$ -Gは雌ラットや雌雄のマウス、ヒト等には存在しないと考えられていることから、その蓄積に伴う腎障害は雄ラット固有の反応と考えられる。雄ラットのみの硝子滴出現は多くの化学物質で報告されており、無影響量(NOEL)の根拠としている。しかし、硝子滴を $\alpha_2$ -G蓄積として免疫組織化学的に確認した報告は少ない。今回、硝子滴出現がNOELの根拠となった代表的な既存化学物質について、特殊染色及び免疫組織化学的手法を加えて再評価を行ったので報告する。

【材料及び方法】国内で試験された既存化学物質のうち、硝子滴出現がNOELの根拠となった10物質を選び、各試験ごとに対照群及び高用量群、並びに硝子滴出現がみられた最低の用量群から3匹群の雄を抽出し、その動物のパラフィン包埋の腎標本から薄切切片を製作した。この切片にHE、PAS及びアザン・マロリー染色を施して鏡検するとともに、抗 $\alpha_2$ -G抗体を用いた免疫組織化学的検討を行った。

【結果及び考察】すべての物質で用量相関的に硝子滴が出現し、高用量群では他の変化も認められたが、9物質では最低用量に硝子滴出現以外の変化はみられなかった。硝子滴はPAS染色陰性、アザン・マロリー染色で黄色、抗 $\alpha_2$ -G抗体に対して陽性を示し、 $\alpha_2$ -Gを含むことが確認された。 $\alpha_2$ -Gは雄ラット固有のものであり、同様な変化がヒトで生じる可能性は極めて低いことから、9物質に見られた硝子滴は $\alpha_2$ -G沈着による変化として、ヒトへの健康影響を判断する際には除外するのが妥当と考えられた。

The immunohistochemical analysis on the hyaline droplets in male rat kidney and the application for extrapolation to humans.

Hidehiro OGATA<sup>1</sup>, Masao HAMAMURA<sup>1</sup>, Tsutomu ICHIKI<sup>1</sup>, Hiroyuki Izumi<sup>1</sup>, Hiroshi OHTA<sup>1</sup>,  
Hideomi UCHIDA<sup>1</sup>, Enchi KAMATA<sup>1</sup>, Ryuichi HASEGAWA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dep. of Toxicology, Panapharm Laboratories, Kumamoto, Japan

<sup>2</sup> Div. of Risk Assessment, NIHS, Tokyo, Japan



○河合悦子, 中尾貴史, 玄番宗一

大阪薬科大学薬理学

【目的】抗悪性腫瘍薬シスプラチンの副作用に重篤な腎障害があり、そのことが用量制限因子となっている。その腎障害の原因として、活性酸素種の増大や細胞内カルシウム濃度の上昇が考えられている。今回、シスプラチンによる活性酸素産生増大と細胞内カルシウム濃度上昇との関係を腎上皮細胞株 LLC-PK<sub>1</sub> を用いて検討した。

【方法】培養腎上皮細胞 LLC-PK<sub>1</sub> がコンフルエントに達した後、シスプラチン(500 μM)、および抗酸化剤 DPPD(10 μM)、細胞内カルシウムキレーター BAPTA-AM(100 μM)、またはカルシウム拮抗薬 nifedipine(10 μM)を含む培地と交換した。シスプラチン暴露一定時間後に、細胞内カルシウム濃度を fura 2 を用いて、活性酸素産生能を NBT 法で調べた。細胞障害の指標として細胞から培地に遊離した LDH 活性を測定した。

【結果】LLC-PK<sub>1</sub> において、シスプラチンは活性酸素の産生や LDH 遊離の増大を引き起こした。シスプラチンによる細胞障害(LDH 遊離増大)に先がけて細胞内カルシウム濃度の増大がみられた。DPPD、BAPTA-AM および nifedipine は、シスプラチンによる細胞内カルシウム濃度や活性酸素産生、LDH 遊離の増大を有意に抑制した。BAPTA-AM は、シスプラチンによる細胞内カルシウム濃度の上昇を nifedipine よりも早期に抑制した。

【考察】培養腎上皮細胞 LLC-PK<sub>1</sub> において、抗酸化剤はシスプラチンによる LDH 遊離の増大とそれに先がけて起こる細胞内カルシウム濃度の上昇を抑制し、BAPTA-AM が nifedipine よりも早い時期に細胞内カルシウム濃度の上昇を抑制したことより、シスプラチンによる活性酸素産生増大が、細胞内カルシウム貯蔵部位からのカルシウム遊離を引き起こし、腎細胞障害を惹起すると考えられる。

Increase in Cytosolic Free Calcium Concentration in LLC-PK<sub>1</sub> cells contributes to Oxidative Injury Induced by Cisplatin

Yoshiko KAWAI, Takafumi NAKAO, Munekazu GEMBA, Div. of Pharmacology, Osaka University of Pharmaceutical Sciences, Takatsuki, Osaka 569-1094

## シクロスポリンA腎障害時に見られる低マグネシウム血症の改善に伴う腎障害の軽減効果

三浦克之<sup>1</sup>、浅井利大<sup>1</sup>、山中伸弥<sup>1</sup>、金勝慶<sup>1</sup>、仲谷達也<sup>2</sup>、岩尾洋<sup>3</sup>大阪市立大学医学部薬理学<sup>1</sup>、同泌尿器科<sup>2</sup>、奈良先端科学技術大学院大学遺伝子教育センター<sup>3</sup>

【目的】シクロスポリンA (CsA) による急性腎障害は腎血管の収縮を特徴とする腎機能低下で可逆的であるのに対し、腎間質の線維化を伴う慢性腎組織障害は不可逆的なものと考えられている。CsA使用時には低マグネシウム(Mg)血症が認められることから、本実験では低Mg血症改善によるCsA腎障害への効果と、その作用機転について検討した。

【方法】減塩食下にラットにCsAを15 mg/kg/dayの割合で1週、2週、ならびに4週間皮下投与を行った。対照群としてはvehicleであるolive oilを同様に皮下投与し、さらにCsAによる低Mg血症を改善するために減塩・高Mg食で飼育したラットにCsAを投与した。実験終了時、腎組織を抽出し、ノーザンブロットおよび組織学的検索に供した。

【結果】CsA投与により2-4週で血漿クレアチニンおよび尿素窒素は増加し、クレアチニンクリアランスは低下した。同時に腎皮質でのレニン遺伝子およびエンドセリン-1 (ET-1) 遺伝子の発現は増加した。高Mg食によりCsA単独投与に見られた低Mg血症を改善すると、これらの腎機能の変化は改善されるとともにET-1の発現も抑制されたが、レニンの発現は抑制されなかった。一方、CsAの4週投与で尿細管の萎縮と単核細胞の浸潤を伴う腎間質の縞状の線維化が観察され、細胞外基質のコラーゲンI、IVおよびTGF- $\beta$ 、PAI-1の遺伝子発現も2-4週で増加した。一方、細胞外基質の分解抑制系に働くTIMP-1および細胞浸潤に関与するオステオポンチンはCsA投与開始後1週で既に明らかに発現の亢進が認められ、以降持続した。これらの変化はすべて高Mg食により著しく抑制された。

【結論】低Mg血症を改善することでCsA投与による腎機能の低下が改善され、この抑制効果にET-1の発現抑制が関与することが示唆された。またCsA慢性腎組織障害の改善効果にTIMP-1、オステオポンチンの遺伝子発現の抑制が重要であることが示唆された。

## Amelioration of Cyclosporine A nephropathy by Correction of Hypomagnesemia in Rats.

Katsuyuki MIURA, Toshihiro ASAI, Shinya YAMANAKA, Shokei KIM, Tatsuya NAKATANI and Hiroshi IWAO. Dept Pharmacol and Urology, Osaka City Univ Med Sch, Osaka, Research Education Center for Genetic Information, Nara Inst Sci Technol, Nara

## 塩化水銀投与Brown Norway ラットの腎間質病変におけるMMPとその制御因子の動態

○鈴木和彦、中山裕之、土井邦雄

東京大学大学院農学生命科学研究科獣医病理学教室

腎間質線維化は細胞外基質の産生と分解の不均衡により発現する病態といわれ、分解についてはmetalloproteinases (MMPs)の活性が重要とされている。MMPは前駆蛋白として産生され、plasminによって活性化し、plasmin産生はplasminogen activators (PA) とplasminogen activator inhibitors (PAI)により制御されている。MMPの活性は一方で抑制因子であるtissue inhibitors of metalloproteinase (TIMPs)によっても制御されている。さらに、上記の全ての因子の発現がTGF- $\beta$ 1によって制御されているということが報告されている。我々は以前の研究で、塩化水銀投与Brown Norway(BN)ラットに尿細管傷害後性間質線維化が認められ、線維化にはM $\phi$ 、筋線維芽細胞およびTGF- $\beta$ 1が深く関与していることを報告した。本研究では、このモデルにおけるMMPs (MMP-2, MMP-7, MMP-9)ならびにその制御因子 (uPA, PAI-1, TIMPs) のmRNAの発現の動態を検索するとともに、それらとTGF- $\beta$ 1 mRNAの動態との関連について検討した。BN ラットに塩化水銀 (1mg/kg b.w.)を1ないし3回投与し、採材した腎組織よりRNAを抽出後、direct RT-PCRを行った。〔結果〕MMPの中ではMMP-7の発現の有意な上昇がみられた。制御因子の中では、TIMP-1とPAI-1の発現の上昇が顕著であったのに対し、TIMP-2, TIMP-3およびuPAには有意な変動は認められなかった。以上の結果より、本モデルでのMMP活性は、PAI-1によるplasmin産生抑制に伴う前駆蛋白の活性化の抑制、および、TIMP-1を主体としたTIMPsによるMMP活性自体の抑制によって制御されることが示唆された。また、これらのmRNAの発現制御にTGF- $\beta$ 1が関与している可能性も示唆された。

### Kinetics of MMPs and Their Regulatory Factors in Mercuric Chloride-Induced Tubulointerstitial Fibrosis in Brown Norway Rats

Kazuhiko SUZUKI, Hiroyuki NAKAYAMA and Kunio DOI  
Department of Veterinary Pathology, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8657

## 2,2',4',5-Tetrabromobiphenyl のメチルスルホン代謝物の強力な CYP2B1/2 誘導作用

○加藤善久<sup>1</sup>, 原口浩一<sup>2</sup>, 湯本信也<sup>1</sup>, 木野泰弘<sup>1</sup>, 山崎友朗<sup>1</sup>,  
増田義人<sup>2</sup>, 木村良平<sup>1</sup>

静岡県立大学薬学部薬剤学<sup>1</sup>, 第一薬科大学物理分析学<sup>2</sup>

【目的】 難燃剤として広く用いられてきた polybrominated biphenyl(PBB)のメチルスルホン(MeSO<sub>2</sub>)代謝物の生物活性や毒性についての研究は全く成されていない。演者らは、PBB 製品の 1 成分である 2,2',4',5-tetrabromobiphenyl(TBB)の MeSO<sub>2</sub> 代謝物のラット肝薬物代謝酵素系に及ぼす影響について検討した。

【方法】 Wistar 系雄性ラットに、投与物質を腹腔内投与し、肝臓の MeSO<sub>2</sub> 体濃度、薬物代謝酵素活性及び cytochrome P450(P450)分子種量を測定した。

【結果・考察】 3-MeSO<sub>2</sub>-TBB(0.35 μmol/kg)をラットに投与すると、総 P450 量、7-benzyloxy-, 7-pentoxy-及び 7-ethoxyresorufin 代謝活性は、48~168 時間まで有意に増加した。種々の用量(0.05~2.0 μmol/kg)の 3-MeSO<sub>2</sub> 誘導体を投与した時、用量の増加に伴って、総 P450 量、7-benzyloxy-, 7-pentoxy- 及び 7-ethoxyresorufin 代謝活性、phenobarbital(PB)誘導性 P450 分子種量が増加した。特に、7-benzyloxy-及び 7-pentoxyresorufin 代謝活性、CYP2B1/2 量の増加が顕著であった。一方、4-MeSO<sub>2</sub> 誘導体では、総 P450 量及び 3 種の代謝酵素活性に変化は認められなかった。TBB 342 μmol/kg 投与後の肝臓中 3-MeSO<sub>2</sub> 体濃度は、3-MeSO<sub>2</sub>-TBB 0.1~0.2 μmol/kg 投与後のそれと同レベルであった。この時、TBB 投与後の総 P450 量、7-benzyloxy-及び 7-pentoxyresorufin 代謝活性、CYP2B1/2 量の増加割合は、3-MeSO<sub>2</sub>-TBB 投与後のそれらと同程度であった。

以上の結果から、3-MeSO<sub>2</sub>-TBB は強力な PB 様誘導剤であることが明らかになった。また、TBB の CYP2B1/2 の誘導作用に 3-MeSO<sub>2</sub> 代謝物が大きく寄与していることが示唆された。

2,2',4',5-Tetrabromobiphenyl metabolite, 3-MeSO<sub>2</sub>-2,2',4',5-tetrabromo-biphenyl is a potent inducer of CYP2B1/2.

Yoshihisa KATO<sup>1</sup>, Koichi HARAGUCHI<sup>2</sup>, Shinya YUMOTO<sup>1</sup>, Yasuhiro NAGANO<sup>1</sup>, Tomoaki YAMAZAKI<sup>1</sup>, Yoshito MASUDA<sup>2</sup> and Ryohei KIMURA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, Shizuoka 422-8526

<sup>2</sup> Daiichi College of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka 815-8511

2,2',4',5,5'-Pentachlorobiphenyl の代謝と薬物代謝酵素誘導能：  
ラット、マウス間での種差

加藤菁久<sup>1</sup>、○新村康彦<sup>1</sup>、原口浩一<sup>2</sup>、根本清光<sup>1</sup>、今井公江<sup>1</sup>、  
相本太刀夫<sup>3</sup>、増田義人<sup>2</sup>、出川雅邦<sup>3</sup>、木村良平<sup>1</sup>

静岡県立大学薬学部薬剤学<sup>1</sup>、第一薬科大学物理分析学<sup>2</sup>、  
静岡県立大学薬学部衛生化学<sup>3</sup>、摂南大学薬学部薬物動態学<sup>4</sup>

【目的】 2,2',4',5,5'-Pentachlorobiphenyl (CB101) のメチルスルホン(MeSO<sub>2</sub>) 体への代謝量及び CB101 による肝薬物代謝酵素誘導におけるラット、マウス間での種差を検討した。

【方法】 CB101(342 μmol/kg) を、Wistar 系雄性ラット(体重 150~200 g)あるいは ddy 系雄性マウス(体重 27~35 g) にそれぞれ腹腔内投与し、経時的に、肝臓及び糞中の未変化体及び含硫代謝物量を測定するとともに、肝臓の第 1 相薬物代謝酵素活性、UDP-glucuronosyltransferase (UDP-GT) 活性及び glutathione S-transferase (GST) 活性を測定した。

【結果・考察】 CB101 投与後の肝臓中の未変化体の減少速度、3-及び 4-MeSO<sub>2</sub> 代謝物の生成量に、ラット、マウス間で明らかな差異が認められた。CB101 投与 8 日後迄の、投与量に対する 3-メチルスルフィド(3-MeS) 代謝物の糞中排泄率は、ラットでは 0.3%、マウスでは 0.6%であった。一方、4-MeS 代謝物の排泄率は、ラットでは 2%、マウスでは 1.3%であった。また、マウスにおける 3-及び 4-MeSO<sub>2</sub> 代謝物の排泄率は、ラットの場合より 5~15 倍高く、それぞれ 0.1、0.23%であった。一方、CB101 投与後の 7-benzyloxy-及び 7-pentoxoresorufin 代謝活性は、いずれもマウスよりラットにおいて顕著に上昇した。また、UGT2B1 活性は、ラットで顕著に上昇し、マウスではほとんど変化しなかった。さらに、CB101 投与時の各 GST 分子種の変動にも、ラット、マウス間で種差が認められた。

以上、CB101 の代謝パターンには、ラット、マウス間で違いがあること、また、CB101 投与による各種肝薬物代謝酵素誘導にも種差があることが明らかになった。

*In vivo* metabolism of 2,2',4',5,5'-pentachlorobiphenyl and its inductive activity of drug-metabolizing enzymes: Species difference between rats and mice.

Yoshihisa KATO<sup>1</sup>, Yasuhiko SHINMURA<sup>1</sup>, Koichi HARAGUCHI<sup>2</sup>, Kiyomitsu NEMOTO<sup>1</sup>,  
Kimie IMAI<sup>2</sup>, Tachio AIMOTO<sup>3</sup>, Yoshito MASUDA<sup>2</sup>, Masakuni DEGAWA<sup>1</sup> and Ryohei  
KIMURA<sup>1</sup>. <sup>1</sup> School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, Shizuoka 422-  
8526, <sup>2</sup> Danchi College of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka 815-8511, <sup>3</sup> Faculty of  
Pharmaceutical Sciences, Setsunan University, Osaka 573-0101

○笠原利彦、橋場雅道、原田剛、浜田悦昌、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】 Tamoxifen についてはラット長期投与による肝腫瘍誘発作用が知られており、その機序についても種々の検討がなされている。しかしながら、発癌過程における、癌原遺伝子等の発現について検討を加えた報告はない。そこで、癌原遺伝子に加え、細胞周期制御遺伝子の発現を RT-PCR 法により検討した。

【方法】 5 週齢の雌 Crj:CD(SD)IGS ラットに Tamoxifen 20mg/kg/day を 3 箇月間経口投与した。最終投与の翌日に、ペントバルビタール麻酔下で放血致死後摘出した肝臓より RNA を抽出し、cDNA を作製、次いで、c-myc, c-jun, ki-ras, PCNA, Cyclin D1 の PCR を行った。それぞれの PCR 産物量をキャピラリー電気泳動システムにより、2 本鎖 DNA 分析キット (HEWLETT PACKARD) を用いて定量した。

【結果及び考察】 対照群に比較して、Tamoxifen 投与群では c-myc で 4.3 倍、ki-ras で 1.6 倍、PCNA で 3.2 倍、Cyclin D1 で 3.1 倍と有意な増加がみられ、c-jun も明らかな増加傾向を示した。一方、病理組織学的検索では、肝臓に細胞増殖巣及び腫瘍が認められた個体はなかった。以上の結果より、肝腫瘍が発現しない時期においても、mRNA に変化が起きていることが明らかとなり、RT-PCR 法による癌原遺伝子・細胞周期制御遺伝子の発現量の測定は、発癌機序の解析に有効であると考えられた。また、RT-PCR 法は、比較的少量のサンプルからも可能で Northern blot よりも簡単に検出でき、キャピラリー電気泳動等との組み合わせにより定量も可能であることより、毒性評価においても有用性が高いものと考ええる。

Analysis of proto-oncogene expression by tamoxifen in rat liver using reverse transcription polymerase reaction(RT-PCR).

Toshihiko KASAHARA, Masamichi HASHIBA, Tsuyoshi HARADA, Yoshimasa HAMADA and Masanomi OBATA. Toxicology Laboratory, Research Center, Mochida Pharmaceutical Co., Ltd., 342, Gensuke, Fujieda, Shizuoka 426-8640, Japan.

○鈴木 聡<sup>1,3)</sup>、新倉靖子<sup>1)</sup>、倉田知先<sup>1,2)</sup>、伊藤洋二<sup>1,3)</sup>、  
草野満夫<sup>1,3)</sup>、佐藤哲男<sup>1)</sup>、大野泰雄<sup>1,4)</sup>、安原 一<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup> HAB 重長類機能研究所, <sup>2)</sup> 昭和大学医学部第2薬理学教室

<sup>3)</sup> 昭和大学医学部第2外科学教室, <sup>4)</sup> 国立医薬品食品衛生研究所

【緒言】1998年12月16日に出示された厚生大臣答申によって、我が国においても、ヒト材料を開発研究に供することが出来るようになった。本研究では、長時間温阻血状態におかれた手術切除肝からヘパトサイトを単離し、そのバイアビリティ、薬物代謝能に関して検討を行い、手術切除組織の有用性と問題点について評価を行った。

【方法】昭和大学外科学教室から供与された11例の手術切除肝臓の非癌部位を用い、常法にしたがってコラゲナーゼ灌流法によりヘパトサイトを単離した。単離ヘパトサイトは、トリパンブルー染色で、生細胞数を計測し、10%FBS含有培養液中で、コラーゲンコート培養プレートに播種し、オーバーナイトで培養した。その後、培地を無血清培地に換え、検鏡し接着率を観察した。この単離ヘパトサイトを用い、播種40時間後にチトクロームP450分子種の標識特異基質を添加し活性を測定した。

【結果および考察】手術切除組織は、摘出時に長時間温阻血状態におかれる。本試験に供された試料も20~40分それぞれ温阻血状態にあったため、単離ヘパトサイトのバイアビリティの低下が予想された。脳死肝を用いた試験報告では約 $1 \times 10^7$  cells/gの回収率であるのに比べ、本試験の回収率はそれよりも低い。手術切除組織は切断面が電気メスで焼かれているため、肝重量当たりの回収率は単純には比較できない。それにもかかわらず、本試験で単離されたヘパトサイトは高い接着性を示した。また、今回の試料から単離したヘパトサイトを用いて播種40時間後にP450アイソザイムの活性を測定した結果、高い薬物代謝能を示した。したがって、手術切除組織でも十分に医薬品の開発研究に使えることが示唆された。現在、肝毒性の評価系としての有用性に関しても検討中である。

#### Benefits of surgical materials in drug development

Satoshi SUZUKI<sup>1)</sup>, Yasuko NIKIRA<sup>1)</sup>, Norimitsu KURATA<sup>2)</sup>, Yoji ITO<sup>3)</sup>,  
Mitsuo KUSANO<sup>3)</sup>, Tsutsuo SATOH<sup>1)</sup>, Yasuo Ohno<sup>4)</sup>, Hajime YASUHARA<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Biomedical Res. Inst. Inba, Chiba 270-1402, <sup>2)</sup>Dept. of Pharmacology, Showa Univ.

Shinagawa, Tokyo 142-8666, <sup>3)</sup>Dept. of Surgery, Showa Univ. Shinagawa, Tokyo 142-8666.

<sup>4)</sup>Div. of Pharmacology, Natl. Inst. of Health Sci. Setagaya, Tokyo 158-8501

大野理絵、宮田裕人、白根里加、潮田 勇、浅沼富美子  
八木健一、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】安全性試験における心機能への影響を精査する際、血中酵素・アイソザイムを指標にして評価することが多い。今回我々は安全性試験における機能的評価法の一つとして、心臓に由来するホルモンで、利尿・血圧降下又はアルドステロン分泌抑制等の多くの生理学的作用を有し、またヒトで心不全の重症度の判定等に用いられているbrain natriuretic peptide(BNP)<sup>1)</sup>等の有用性について検討した。

【方法】SD(IGS)系雄性ラットにisoproterenol(ISP)の2mg/kgを単回静脈内投与又はdesipramine(DES)の30mg/kgを腹腔内7日間投与し、血中CPK、LDH及び各々のアイソザイム、血中GOT、BNPを測定した。CPK、LDH、GOTは自動分析装置(7070、日立)により測定し、CPKとLDHのアイソザイムは電気泳動法(アガロースゲル；ヘレナ研究所)で分画した。また、BNPはELISA法(PENINSULA LAB.)により測定した。

【結果及び考察】ISP、DES投与群では、対照(無処置)群と比べて血中CPK、LDH、GOT及びCPK、LDHの心傷害を示唆するアイソザイムが増加し、BNPも変動した。心傷害時の指標として、今回、心特異的で心機能、心肥大と関連し、その血中濃度変化は鋭敏と言われているBNPについても検討したが、本試験の結果から、BNPはLDH、CPK及び各アイソザイムと合わせて、ラットの心傷害時での指標に成り得る可能性が示唆された。なお、心臓ホルモンであるatrial natriuretic peptide(ANP)<sup>2)</sup>についても現在検討中である。

1) 斎藤能彦：心室由来ホルモン・BNPについて、*Ther. Res.*, **19**, 115, 1998.

2) 山路 徹：ホルモンとしての心房性ナトリウム利尿ペプチド、*東京医学*, **93**, 355, 1986.

Investigation of BNP for Cardiac Injury in Rats.

Rie OHNO, Hiroto MIYATA, Rika SHIRANE, Isamu USHIODA, Fumiko ASANUMA, Ken-ichi YAGI and Masaaki KIMURA, Toxicology Laboratory, Pharmaceutical Research Laboratories, Taisho Pharmaceutical Co., Ltd., Ohmiya, Saitama, 330-8590, Japan.



○尾崎 博, 村田幸久, 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(DXR)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。さらに, 治療時に低血圧を招くことも知られている。第26回本学会では, 器官培養を用いて血管に対する比較的高用量(1~10 $\mu$ M)のDXRの長期作用検討し, アポトーシスやネクローシスを引き起こすことを発表したが, 今回は低用量(0.3 $\mu$ M)の作用を検討したので報告する。

【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DXR0.3 $\mu$ Mは全く影響しなかった。他方, 0.3 $\mu$ MのDXR存在下で血管を器官培養すると, 器官培養の時間に依存してnorepinephrine収縮が抑制された。この時,  $\alpha_{1A}$ 受容体のダウンレギュレーションがみられたが, mRNAレベルでの変化は観察されなかった。一方, 高濃度Kやエンドセリン-1による収縮も0.3 $\mu$ MDXRで抑制されたが, norepinephrine収縮の抑制と比べ弱かった。これに対して1 $\mu$ MのDXRではアポトーシス様変化がみられ, norepinephrine収縮だけではなく高濃度K収縮も強く抑制された。収縮蛋白系に対する作用を検討する目的でskinned fiberを作製し,  $Ca^{2+}$ とATPによる収縮性を検討したところ, 0.3 $\mu$ Mは無作用であったが, 1 $\mu$ Mでは有意に抑制された。

【考察】 DXRは培養血管平滑筋組織に対して, 低用量で $\alpha_1$ 受容体を持異的にダウンレギュレーションし, norepinephrineによる収縮を抑制することが明らかとなった。DXRの血圧低下作用に, この様な作用が関与する可能性が示唆された。

#### Inhibition of contraction by chronic treatment with anticancer drug doxorubicin in organ culture

Hiroshi OZAKI, Takahisa 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

○三井雄史，原田剛，浜田悦昌，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】血小板数減少の原因としては、造血障害、抗血小板抗体の産生、脾臓機能亢進による血小板の分布異常などが知られている。今回、体液量減少の関与が示唆される血小板数減少を経験したので、摂水制限による体液量の減少が血小板数に及ぼす影響を検討し、代表的利尿剤である Furosemide 投与での事例を検証した。

【方法】6 週齢の雄 Slc:Wistar ラットに 7 日間摂水制限（蒸留水を強制経口投与：5ml/day/rat）し、引き続き 24 時間の自由摂水（摂水制限解除）を行った。7 日間制限後および制限解除後に頸静脈より採血し、Plt, RBC, Hct, Hb を測定した。加えて、Furosemide 100 mg/kg を 7 日間静脈内投与し、初回および 7 回投与の投与前および投与後 5, 24 時間に尾静脈採血し、Plt, RBC, Hct, Hb を測定した。

【結果】7 日間摂水制限（5ml/day/rat）によって血液濃縮（RBC, Hct, Hb の増加）とともに血小板数の減少が認められ、摂水制限解除後の 24 時間自由摂水によりその程度はさらに増強された。Furosemide では、初回投与から本剤の利尿作用によると考えられる血液濃縮が投与 5 時間後に認められ、24 時間後には回復した。一方、血小板数は初回投与では変化が認められなかったものの、7 日間投与後 24 時間には血小板数の減少が認められた。

【結論】ラットでは体液量減少の持続によって血小板数減少が誘発されることが明らかになった。また、利尿剤の反復投与によっても利尿作用消失後に血小板数の減少がみられ、体液量の変化との関連が示唆された。

Effect of decrease in body fluids on the number of thrombocytes in rats.

Takeshi MITSUI, Tsuyoshi HARADA, Yoshimasa HAMADA, and Masaomi OBATA. Toxicology Laboratory, Research Center, Mochida Pharmaceutical Co., Ltd., 342 Gensuke, Fujieda, Shizuoka 426-8640, Japan.

○古川武史、軸蓮竜也、永山伸一、浜田大治、龜之園 剛、永田良一、  
鬼頭 剛

(株)新日本科学、安全性事業部、安全性1部

【目的】開発中の被験物質が心室筋の再分極を延長させる性質があるかを早い時期に検査する定常の方法を求める要求が多くなった。一般的な方法は摘出心室筋細胞の活動電位のAPD95に対する作用を調べる方法であるが、この方法だけで全てが網羅されたわけではなく、やはり *in vivo* 系の試験も必要になってくる。そこで、我々は催不整脈作用の有無を検討する評価系として *in vitro* および *in vivo* 系を組み合わせた decision tree を考えた。【実験方法】*In vivo* 系：体重 300-400 g の雄性モルモット、10-12 kg の雄性ビーグル犬および体重 4-5 kg の雄性カニクイザルを用いた。モルモットは麻酔下に標準肢誘導および単極肢誘導で ECG を記録した。薬物は外頸静脈内に投与した。カニクイザルはテレメトリーシステムで右胸部および左側腹部に埋め込んだ電極によって ECG (II) を記録した。ビーグル犬は麻酔下に、MAP 用カテーテルを左大腿静脈から挿入し、右心室内の心内膜に接触させて MAP を測定した。同時に ECG (II)、血圧および心拍数を測定した。*In vitro* 系：体重 300-400 g のモルモットを用いた。摘出した心臓をコラゲナーゼを含む  $Ca^{2+}$  free の Tyrode 液で 6-9 分間灌流し、その後 Krebs 液中で振とうして心室筋細胞標本を作製した。この標本を用いて、patch-clamp 法で活動電位およびイオン電流に対する作用を検討した。【成績および総括】抗ヒスタミン剤の astemizole は麻酔モルモットにおいて 0.3-3 mg/kg(i.v.) で QT 延長、覚醒カニクイザルでは 3 mg/kg(i.v.) で著しい QT 延長から QRS 波形と周期が変化し、心室期外収縮が頻発して torsades de pointes の発現を観察した。Astemizole は 10-50 nM で APD の著明な延長を示した。学会では他の化合物の成績も合わせて発表する。

Strategy for preclinical evaluation of the proarrhythmic risk

Takeshi FURUKAWA, Tatsuya JIKUZONO, Shinichi NAGAYAMA, Taiji HAMADA  
Takeshi KAMENOSONO, Ryoichi NAGATA and Go KITO  
Shun Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.

○Richard VAN BIBBER, Ryoichi NAGATA, Steven GILBERT, Go KITO

SNBL USA

【目的】 Balloon angioplasty has revolutionized the way coronary artery disease is treated around the world. The use of stents and new anticoagulants has improved clinical outcomes even further. However, the major limitation of coronary angioplasty continues to be restenosis. Restenosis is a complex biological process leading to the re-occlusion of an artery previously subjected to coronary intervention. Restenosis is a result of four general processes including thrombus formation, elastic recoil of the vessel wall, negative remodeling, and neointimal formation. It is the formation of the neointima, characterized by smooth muscle cell hyperplasia, which has proven the most difficult to treat.

Restenosis occurs in up to 50% of coronary patients. Currently, significant research is underway to develop therapies to treat and prevent this process.

Swine are recognized model for restenosis because of the similarities to humans in the vascular response to injury. Coronary balloon overstretch is a common means to achieve a restenosis-like response in swine. Mechanical devices, radiation, systemic drug delivery and local drug delivery have all been tested in this model. The coronary arteries are typically harvested 28 days following injury. The data are quantified using a morphometric analysis system. Control animals receiving a balloon injury and some form of therapy. This model is predictable and offers rapid screening for potential anti-restenosis therapies.

Swine as a Model for Anti-proliferative Therapies to Treat Restenosis

Richard VAN BIBBER, Ryoichi NAGATA, Steven GILBERT, Go KITO  
SNBL USA, Ltd. J4716 NE 87<sup>th</sup> St. Redmond, WA 98052 U.S.A.

神経毒性を有する重金属化合物の脳組織ホスホリパーゼC活性に及ぼす影響

中川博文, 堀越喜美子, ○小林晴男, 鈴木忠彦(岩手大)

岩手大学農学部家畜薬理学教室

【目的】重金属化合物の神経毒性発現機序として、伝達物質の動態に対する影響に関する研究が多くなされてきたが、レセプターから蛋白質のリン酸化の過程に及ぼす作用については報告が少ない。今回、シグナル伝達におけるホスホリパーゼC (PLC) 活性に対するSH基高親和性（水銀、ヒ素、アンチモン）および低親和性（スズ、鉛、タリウム）重金属化合物の影響について検討した。

【方法】SD系雌ラットの脳組織よりPLC標本を作製し、基質 $[^3\text{H}]$ phosphatidylinositol biphosphate ( $\text{PIP}_2$ )から $[^3\text{H}]$ inositol trisphosphate ( $\text{IP}_3$ )の生成量を測定した。in vitro実験は大脳皮質（皮質）、in vivo実験では皮質および小脳あるいは海馬のPLC活性を測定した。

【結果】in vitroでは、PLC活性を無機水銀( $\text{HgCl}_2$ )は $10^{-4}$  Mで抑制し、塩化メチル水銀(MMC)は $10^{-6}$  Mで亢進したが、他の化合物は $10^{-6}$ - $10^{-4}$  Mにおいて有意な影響を示さなかった。3 mg/kgの $\text{HgCl}_2$ あるいはMMCを単回、3あるいは7日間投与後24時間の皮質および小脳のPLC活性は、MMCを7日間投与した小脳において上昇したが、その他の投与による両脳部位PLC活性の変化は検出されなかった。1.3, 2 および3 mg/kgの塩化鉛またはトリメチルスズ(TMT)を単回あるいは反復投与、またはTMTを1.3 mg/kg単回投与後典型的な神経症状を示したラットの皮質および海馬のPLC活性は、いずれの投与も両脳部位において変化は認められなかった。

【まとめ】MMCはPLC活性に影響して細胞内カルシウムの動態に変化をもたらし、神経活性に影響を与える可能性が考えられる。有機スズや鉛の神経毒性におけるPLCの関与は大きくないと考えられる。

Effects of Neurotoxic Heavy Metal Compounds on Brain Phospholipase C

Hirofumi NAKAGAWA, Kimiko HORIKOSHI, Haruo KOBAYASHI and Tadahiko SUZUKI. Dept. of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Iwate University, Ueda, Morioka 020-8550

◎石田尚夫, 義澤克彦, 高橋有里, 藤井恒雄, 太石裕司,  
橋本正晴, 小原要

藤沢薬品工業(株)・安全性研究所

**【目的】**細胞内 cGMP・cAMP 濃度を調節する Phosphodiesterase(PDE)は種々の生理作用を有するが、網膜での PDE 阻害は網膜の機能変化を惹起することが報告されている。我々は当社で合成した PDE 阻害剤がラットに網膜変性症を誘発することを見いだしたので、その発症メカニズムについて検討した。**【方法】**6週齢の IGS 系雌ラットに本剤を単回経口投与後、14日間に渡り経時的に網膜電図並びに眼底を検査すると同時に、病理組織学的観察、網膜各層の厚みの形態計測、外顆粒層単位面積当たりの TUNEL 染色陽性細胞数の算出、超微形態観察、網膜 DNA fragmentation assay、網膜 Caspase-3 colorimetric protease assay を行った。**【結果】**網膜電図では投与3時間から a, b 波の頂点潜時延長、振幅低下並びに律動様小波が消失し、投与6時間以降これら波形が消失した。眼底では投与3日から反射性亢進に加え血管の狭細化が明らかであった。組織学的に投与12時間より外顆粒層視細胞の核濃縮/破壊像、桿体錐体層の空胞化/破壊像が観察され、視細胞-外顆粒層の荒廃は時間経過とともに進行し、網膜厚は投与14日で对照群の51%まで減少した。投与12時間から視細胞核に TUNEL 染色陽性シグナルが発現し、TUNEL INDEX もピークを示し、DNA の ladder が確認された。電顕では投与6時間から桿体錐体層外節先端部の変性・消失、色素上皮細胞内のファゴゾームの増加が出現し、投与12時間から視細胞核の著しいクロマチン凝集像が観察された。Caspase-3 の活性には有意な変動はみられなかった。

**【まとめ】**PDE 阻害剤をラットに単回投与することにより網膜変性症が誘発された。その変化は投与後短時間に網膜電図の波形異常が出現し、その後、器質的变化として網膜 PDE の存在部位である外節の変化に続き視細胞のアポトーシスが生じることが判明した。また、その非可逆的变化は極めて短時間に進行することが明らかとなった。

Mechanism of Retinal Degeneration Induced by Phosphodiesterase Inhibitor in Rats.

Hisao ISHIDA, Katsuhiko YOSHIZAWA, Yuri TAKAHASHI, Tsuneo FUJII, Yuji OHSHI, Masaharu HASHIMOTO, and Kaname OHARA, Toxicol. Res. Labs. Fujisawa Pharmaceutical Co., LTD.

環境化学物質の脳神経系への影響：スチレンはサル脳モノアミン酸化酵素活性を阻害する

江頭 亨、高山房子、山中康光

大分医科大学薬理学教室

【目的】環境化学物質の毒性に関して、内分泌系および生殖系に対する影響については多くの報告があるが、中枢神経系への毒性に関する報告は少ない。今回、脳内モノアミン酸化酵素(MAO)活性に対するスチレンの効果を*in vitro* で検討した。

【方法】サルおよびラットの脳のミトコンドリア分画とサル血小板を酵素材料とした。MAO-A活性は5-HTを、MAO-B活性は $\beta$ -PEAを基質としたラジオアイソトープ法で測定した。環境化学物質として、スチレンモノマーを用いた。

【結果および考察】1 mMのスチレンモノマーはラットの脳のMAO-AおよびMAO-B活性を約25%、15%阻害した。一方、サル脳では、MAO-AおよびMAO-B活性は約60%および15%阻害された。この阻害は濃度依存的であり、MAO-A活性に対して、競合的阻害であった。また、スチレンモノマー、スチレンダイマー、スチレントリマーで阻害を比較したところ、スチレントリマーが最も強い阻害を示した。サル血小板MAO-B活性に対する効果を検討したが、1 mMのスチレンモノマーで約17%の阻害を示したのみであった。サル脳では強いMAO-A活性の阻害が認められラットとは相違し、種特異性があるのかもしれない。また、スチレンに関連した職業に従事している人の血小板MAO-B活性が低下することから、脳内のMAO-B活性の低下を予想し、スチレンによる精神疾患の原因とした報告が多い。しかし、今回の実験からスチレンはMAO-A活性を強く阻害することから、*in vivo* でもMAO-A活性の阻害の可能性があり、血小板MAO-B活性が低下しているスチレン暴露者では脳内のMAO-A活性も低下している可能性が考えられる。このMAO-A活性低下もスチレンに関連した職業に従事している人の精神症状の病因に関係しているものと思われる。

Study of environmental chemicals on central nervous system:  
Styrene inhibits monoamine oxidase activity in monkey brain, *in vitro*.

Yoru EGASHIRA, Fusako TAKAYAMA and Yasumitsu YAMANAKA,  
Department of Pharmacology, Oita Medical University, 1-1,  
Idaigaoka, Hasama-machi, Oita 879-5593.

Use of a Dynamic *in Vitro* Model to study drug Passage Across the Blood-Brain Barrier

□ Sandra MUNRO, Ryoichi NAGATA, Steven GILBERT, Go KITO

SNBL USA

【目的】Promising therapeutics aimed at the CNS often fail in clinical trials, since many drugs are excluded by the blood-brain barrier (BBB). Approaches to overcoming this predicament require the development of strategies aimed at opening the BBB, or the design of compounds suitable for targeted CNS delivery. We present an *in vitro* model of the BBB that can be used to investigate drug passage across the brain endothelial monolayer. The model consists of a three-dimensional, co-culture system, using several artificial capillaries supported inside a sealed chamber. Endothelial cells are seeded intraluminally, while glial cells are seeded in the extraluminal space. The ability of glial cells to induce a barrier in the endothelial monolayer is monitored by measuring the passage of  $^{14}\text{C}$ -sucrose from the intraluminal space into the extraluminal space. Permeate and impermeate compounds were applied to the *in vitro* BBB system intraluminally. Aliquots of media were taken from the extraluminal space (ELS) and the intraluminal space (ILS) at specific time intervals and assayed for presence of each compound. The permeability value for each compound was obtained by integrating the area under the ELS and ILS data points and normalizing for the ILS surface and ILS/ELS volume ratios. The data presented demonstrate the usefulness of the model in 1) assessing the ability of compounds to cross the *in vitro* blood-brain barrier and, 2) determining if compounds induce active exclusion by the barrier.

Use of a Dynamic *in Vitro* Model to study drug Passage Across the Blood-Brain Barrier

Sandra MUNRO, Ryoichi NAGATA, Steven GILBERT, Go KITO  
SNBL USA, Ltd. 14716 NE 87<sup>th</sup> St. Redmond, WA 98052 U.S.A.



トリブチルスズ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、阿部 毅、亀岡美幸、江村美和、納屋聖人、原 卓司

協和発酵工業株式会社 安全性研究所

トリブチルスズは内分泌攪乱化学物質の一つであり、精子形成への影響が懸念される。精巣にはライディッヒ細胞、セルトリ細胞等、内分泌系に関与する体細胞が存在するが、これらの細胞は精細胞には存在しない細胞骨格ピメンチンを有する。本研究では、抗ピメンチン抗体を用いたフローサイトメトリーにより、精巣中の体細胞と精細胞を分類して測定し、トリブチルスズの精子形成への影響を評価した。

10週齢の Crj:CD(SD)IGS 系雄ラットに、オリーブ油または塩化トリブチルスズ 200mg/kg を単回経口投与し、投与 1、3、7 日後に剖検した。左右の精巣重量を測定し、左側精巣から細胞を遊離した後に、-20°C に冷却した 70% エタノールで固定した。固定した精巣細胞をマウス抗ピメンチンモノクローナル抗体及び FITC 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体、プロビジウムイオダイドで蛍光染色した後に、フローサイトメーター EPICS Elite で測定し、ピメンチン陽性及び陰性の 1 倍体、2 倍体、S 期、4 倍体の比率、精細管 1g あたりの精巣細胞数を求めた。

オリーブ油投与群の精巣細胞には、ピメンチン陽性の体細胞が約 10%、陰性の精細胞が約 90% 認められた。また精細胞中には 1 倍体が約 80%、2 倍体が約 10%、S 期が約 2%、4 倍体が約 8% 含まれていた。塩化トリブチルスズの投与 1、3、7 日後いずれの時点においても、精巣細胞の比率には変化がなかった。精細管 1g あたりの細胞数、精巣重量にも変化は認められなかったが、投与 7 日後の精巣重量が塩化トリブチルスズによって有意に減少した。

これらの結果から、トリブチルスズは精巣での精子形成に対しては直接的な影響を及ぼさず、副生殖腺に対して何らかの影響を及ぼす可能性が示唆された。

A flow cytometric analysis of cytotoxic effects of tributyltin on rat spermatogenesis.

Shigeru HIDA, Takeshi ABE, Miyuki KAMEOKA, Miwa EMURA, Masato NAYA and Takuji HARA, Toxicological Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Ube-755-8501, Japan.

○西山貴仁, 高橋愛悠, 大久保泰成, 小倉健一郎, 渡部 烈

東京薬科大学 - 薬学部 - 第二衛生化学教室

【目的】ヒトや野生動物の内分泌作用を攪乱し、生殖機能障害や悪性腫瘍等の毒性を発現する可能性が指摘されている内分泌攪乱化学物質 (EDC) による環境汚染が問題となっている。近年、EDC の生態系への影響に関する報告が数多くなされているが、ヒトにおける生体内代謝や解毒機構に関する検討は殆ど行われていないのが現状である。そこで本研究においては EDC のうちフェノール性水酸基を有し、硫酸抱合により代謝される可能性があるビスフェノールA (BPA)、ノニルフェノール (NP)、オクチルフェノール (OP)、および内分泌攪乱作用を有すると疑われている種々のアルキルフェノール類、ならびに植物エストロゲンと呼ばれるゲニステイン (GS)、およびダイゼイン (DZ) の、ヒト各種スルホトランスフェラーゼ (ST) 分子種による硫酸抱合反応について検討した。

【方法】ヒスチジンタグ付きヒト ST 分子種 P-PST1, M-PST, DHEA-ST および EST を大腸菌可溶性画分中に発現させ Ni-アフィニティーカラムを用いて精製した。ヒト各種 ST 分子種の EDC に対する硫酸抱合活性を [<sup>35</sup>S]PAPS を用い、生成する [<sup>35</sup>S]硫酸抱合体を TLC により分離し、ラジオルミノグラフィーにより定量した。

【結果・考察】BPA, NP, OP および種々のアルキルフェノール類は P-PST1, DHEA-ST および EST によりいずれも硫酸抱合を受けた。なお、M-PST はこれらの基質に対して硫酸抱合活性を示さなかった。また、GS および DZ はそれぞれ EST および P-PST1 が主として抱合反応に関与することが明らかとなった。また、GS は EST の標準基質である estradiol に対する抱合活性を低濃度より阻害することがあわせて明らかとなった。

## Sulfation of endocrine disrupting chemicals by human sulfotransferases

Takahito NISHIYAMA, Enko TAKAHASHI, Kazumasa OKUBO, Kenichiro OGURA, and Tadashi WATABE.

Dept. of Drug Metab. Mol. Toxicol., School of Pharm., Tokyo Univ. Pharm. Life Sci., Tokyo 192-0392, Japan

血清  $\alpha_{2u}$ -globulin level の内分泌攪乱物質スクリーニング法への応用

○武吉正博、佐脇正邦、野田修志、山崎寛治、高月峰夫

(財) 化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所

$\alpha_{2u}$ -globulin ( $\alpha_{2u}$ -g) 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、その生合成は各種ホルモン (Estrogen, Androgen, Growth hormone 等) によって影響を受けることが知られている。我々は血清中  $\alpha_{2u}$ -g の Endocrine Disrupter Screening 法への応用の可能性について検討した。また、Estrogenic chemical による  $\alpha_{2u}$ -g 遺伝子転写抑制のメカニズムを解明するため、 $\alpha_{2u}$ -g 遺伝子の調節領域の解析及び  $\alpha_{2u}$ -g 産生細胞株 (A49-SC2) に対する  $17\beta$ -estradiol (E2) 及び dihydrotestosterone (DHT) の影響を検討した。Diethylstilbestrol (DES) を正常雄ラットに投与した際の血清  $\alpha_{2u}$ -g 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、精巣の病理組織学的変化を認めなかった動物においても明らかな血清  $\alpha_{2u}$ -g の低下が認められた。また、Bisphenol A 投与動物でも同様に用量依存的な血清  $\alpha_{2u}$ -g の減少が観察された。A49-SC2 細胞に E2 及び DHT を作用させた場合、E2 による  $\alpha_{2u}$ -g 発現誘導はみられたが、DHT による誘導はみられなかった。また、転写調節領域の解析結果から  $\alpha_{2u}$ -g の生合成は Androgen に依存する何らかの二次或いは更に高次の因子によって発現誘導され、Estrogen による  $\alpha_{2u}$ -g 低下も細胞 level での直接作用ではなく、少なくとも二次的な因子が関与しているものと推察された。 $\alpha_{2u}$ -g の Estrogen による発現抑制のメカニズムや Androgen による発現誘導のメカニズムは未だ不明な点が多く、今後解明すべき課題も残されているが、 $\alpha_{2u}$ -g 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、Endocrine Disrupter の新規 Biomarker として有用と思われる。

Applicability of serum alpha 2u globulin levels to screening test for endocrine disrupting chemicals

Masahiro TAKEYOSHI, Masakuni SAWAKI, Shuji NODA, Kanji YAMASAKI, Mineo TAKATSUKI, Chemicals Assessment Center, Chemicals Evaluation and Research Institute, Hita, Oita 877-0061

## フルタマイドの胎児期・新生児期暴露による F1 雄ラットのアンドロゲン依存性器官への内分泌攪乱作用

○宮田かおり<sup>1)</sup>、葦下晴津子<sup>1)</sup>、須方督夫<sup>1)</sup>、佐野真士<sup>2)</sup>、  
吉野裕子<sup>2)</sup>、中西巧<sup>2)</sup>、奥野泰山<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>住友化学・生科研、<sup>2)</sup>大雄会医科学研究所

【目的】抗アンドロゲン物質であるフルタマイドを妊娠ラットに投与して、F1 雄に対する胎児期および新生児期暴露の影響を検討した。

【方法】Crj: CD (SD) IGS、(SPF) 雌ラットに妊娠 12 日から分娩 3 日目までフルタマイドを 0.15、0.6、2.5、10.0、100mg/kg の用量で連日強制経口投与した。F1 の出生数を確認し、そのうち雄について体重の推移、一般症状、A-G distance、乳頭の有無、精巣下降の有無、外生殖器の異常を観察した。また生後 4 および 60 日齢で屠殺し、生殖器および副生殖器の観察および組織学的検査を実施した。60 日齢については、器官重量の測定および精子検査も実施した。

【結果】出生数には差は見られなかったが、100mg/kg 群において出生後から 60 日齢まで一貫して体重の低値が認められた。2.5mg/kg 以上の群で、A-G distance の減少が認められた。10mg/kg 以上の群では乳頭の遺残、陰茎下裂、Vaginal pouch あるいは陰茎の形態異常および停留精巣が認められた。また、前立腺、精囊、肛門挙筋+球海綿体筋および精巣重量の低値、病理学的にはこれら組織の小型化、形成不全あるいは萎縮、球海綿体筋内部の尿道憩室上皮の角化重層扁平上皮化が認められた。精巣精細管の萎縮は全ての停留精巣に加え、100mg/kg 群では陰嚢内に下降した精巣においても認められた。また 100mg/kg 群では、さらに副生殖器の炎症、尿道憩室上皮の粘液円柱上皮化が認められた。

【結論】フルタマイドの胎児期および新生児期大量投与により、雄の児に影響が認められた。本実験条件では A-G distance が最も鋭敏なパラメーターであった。

Endocrine disrupting effects of fetal and postnatal exposure of flutamide on androgen-dependent organs of F1 male rats

Kaori MIYATA, Setsuko YABUSHITA, Tokuo SUKATA, Masashi SANO, Hiroko YOSHINO, Takumi NAKANISHI and Yasuyoshi OKUNO, Environmental Health Science Lab. Sumitomo Chemical Co. Ltd., Daiyu-Kai Institute of Medical Science

ヒト肝臓細胞HepG2を用いたリポーター遺伝子発現系による有機リン系  
殺虫剤の抗アンドロジェン活性とその構造相関

田村廣人<sup>1</sup>, 吉川博道<sup>1</sup>, Richard, A. M.<sup>3</sup>, Gray, E. L.<sup>3</sup>, Maness, S. C.<sup>4</sup>,  
Reishmann, K. P.<sup>4</sup> and Gaido, K. W.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>名城大学農学部, <sup>2</sup>九州共立大学工学部, <sup>3</sup>U.S.EPA, <sup>4</sup>CITE

[背景]殺虫剤DDTの代謝物DDE, 殺菌剤ピククロリンやプロシミドンの代謝物および除草剤リニユロンがアンドロジェン受容体 (AR) に作用しアンタゴニスト活性を示すことが明らかになってきた事より, 他にも同様の作用を示す化合物が環境中に存在するのではないかという懸念が高まってきた。しかし, これら内分泌かく乱作用を発現する化合物の化学構造は多様であり, 単純な推測によりAR活性を予測する事は困難である。そこで演者らは, ARアンタゴニスト活性を示す化合物の探索研究を実施し, 外来化合物が作用を発現するための構造要求性について若干の知見を得たので報告する。

[方法]ヒト肝臓細胞HepG2を用いたリポーター遺伝子発現系により, ARアンタゴニストの探索を行った。トランスフェクションには, ヒトアンドロジェン受容体遺伝子, リポーター遺伝子としてMMTV4uc, およびトランスフェクション効率の確認のためβ-ガラクトシダーゼ遺伝子を用いた。化合物の構造解析は, SpartanおよびAM1ソフトを用いて3次元構造を求め活性相関を検討した。

[結果]既存のARアンタゴニスト活性を示す化合物の構造上の類似性をもとに探索した結果, 有機リン系殺虫剤フェントロチオンは, 既存剤フルタミドと同等のARアンタゴニスト活性を発現した。本化合物の阻害様式は, 解析の結果, 可逆的拮抗阻害剤であることが判明した。リン酸エステルのアルキル鎖が長くなるにつれARアンタゴニスト活性は減少した。また, ベンゼン環の置換基は, 電子吸引基が高活性を示した。さらに, ARと化合物との結合は, 水素結合能を有する官能基のnegative chargeの大きさとそれらの分子間距離に依存していることが推測された。

Interaction of Organophosphate Insecticides with the Androgen Receptor

Tamura, H.<sup>1</sup>, Yoshikawa, H.<sup>2</sup>, Richard, A. M.<sup>3</sup>, Gray, E. L.<sup>3</sup>, Maness, S. C.<sup>4</sup>,  
Reishmann, K. P.<sup>4</sup> and Gaido, K. W.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Meijo University, <sup>2</sup>Kyushukyoryu University, <sup>3</sup>U.S.EPA, <sup>4</sup>CITE

卵巣摘出ラットを用いた子宮肥大試験：  
投与経路の違いによる影響について

○於勢佳子，山田智也，奥野泰由，紙田祐介，関 高樹

住友化学工業株式会社 生物環境科学研究所

【目的】エストロゲン様作用物質を検出する *in vivo*スクリーニング法として子宮肥大試験が提唱されており、現在、これを標準化すべく様々な検証がなされている。今回我々は、エストロゲン作用が強い Ethynyl estradiol (EE)、弱い Methoxychlor (MXC)、植物性エストロゲンの Genistein を卵巣摘出ラットに3日間投与し、投与経路による子宮重量の反応性の違いを検討した。【方法】卵巣を摘出した7週齢の Crj-CD(SD)・IGS 雌ラットに、術後7日目より EE(10 $\mu$ g/kg)、MXC(125, 250, 500mg/kg)、Genistein(4, 25, 75mg/kg)を1日1回、連続3日間、経口投与(PO)あるいは皮下投与(SC)した。なお、対照群には溶媒(10%エタノール含有コンタクト)を投与した。最終投与の翌日に子宮の内容物込湿重量(Wet wt.)と内容物除去後湿重量(Blotted wt.)を測定した。【結果】POではEE10 $\mu$ g/kg投与で子宮重量に変化はなく、Genisteinでは75mg/kg投与でのみWet wt.とBlotted wt.が増加(対照群に比して1.3倍)し、MXCでは全投与群(125, 250, 500mg/kg)で対照群に比してWet wt.で2.4倍, 4.7倍, 6.2倍、Blotted wt.で2.1倍, 2.8倍, 2.9倍まで増加した。一方、SCでは対照群に対してEE10 $\mu$ g/kg投与でWet wt.で8.2倍、Blotted wt.で3.7倍、Genisteinの25, 75mg/kg投与でWet wt.で2.2倍, 2.7倍、Blotted wt.で2.2倍, 2.5倍、また、MXCでは500mg/kg投与でのみWet wt.で2.2倍、Blotted wt.で2.0倍まで増加した。【考察】EEおよびGenisteinではSCの方が、MXCではPOの方が感度が高かった。これは、同一被験物質でも投与経路により反応性が異なることを示し、当該試験実施の際は、被験物質毎に投与経路を慎重に選択すべきであると考えられた。

Evaluation of Uterotrophic Responses to Estrogenic Agents Administered by Different Routes in Ovariectomized Rats.

Keiko OSE, Tomoya YAMADA, Yasuyoshi OKUNO, Yusuke KAMITA,  
Takaki SEKI Environmental Health Science Laboratory, Sumitomo Chem. Co. Ltd.,  
Osaka 544-8558, Japan.

○青山博昭、小坂忠司、上野明紀、武田眞記夫、中島信明、吉本昭二

(財) 残留農薬研究所

子宮肥大試験は、化学物質のエストロゲン様作用を鋭敏に検出することができるスクリーニング試験として、その有用性が期待されている。しかし、観察する指標や被験物質の投与経路については、未だ議論のあるところである。今回の実験では、エストロゲン様作用を持つことが明らかなメトキシクロール (MXC) を卵巣摘出ラットに皮下または経口投与して、子宮および膣の反応を比較した。

50~400mg/kg の MXC を 1 日 1 回 3 日間皮下投与したところ、子宮における MAPK の活性化 (チロシンのリン酸化) が 100 mg/kg 以上の用量で、内膜上皮細胞の増殖活性 (PCNA 陽性細胞出現率) の上昇が 200 mg/kg 以上の用量でそれぞれ観察されたが、子宮重量の増加は 400 mg/kg の用量でも誘発されなかった。一方、MXC を 200 mg/kg 経口投与した場合には、子宮における MAPK の活性化および子宮内膜上皮細胞の増殖活性の上昇について皮下投与群とほぼ同様の結果が得られたほか、間質細胞の肥大および子宮重量 (湿重量および子宮腔内の分泌物を除去した後の重量の両者) の増加が、明確に認められた。したがって、投与経路の違いによる見かけ上の子宮の応答の差 (重量増の有無) は、間質細胞の変化と分泌物の有無によるものと考えられる。

また、膣では、いずれの投与経路でも 200mg/kg の用量で粘膜細胞の出現と上皮細胞層の肥厚が誘発されたが、変化の程度は皮下経路に比べて経口経路の方で強かった。

以上のように子宮および膣の反応に差が見られた理由の一つとして、MXC あるいは代謝産物である HPTE の標的臓器中の濃度や減衰速度が投与経路の違いによって異なる可能性が考えられるので、今後はこれらの物質の体内動態を確認する必要がある。

#### Uterotrophic Assay of Methoxychlor in Ovariectomized Rats.

Hiroaki AOYAMA, Tadashi KOSAKA, Aito UENO, Makio TAKEDA, Nobuaki NAKASHIMA and Shoji TERAMOTO, Institute of Environmental Toxicology, Mitsukaido, Ibaraki 303-0043

## 胎児期及び授乳期の低用量 TCDD 曝露が甲状腺機能に及ぼす影響

西村典子<sup>1)</sup>、○米元純三<sup>2)</sup>、佐藤巳嘉夫<sup>3)</sup>、宮原裕一<sup>4)</sup>、大村昌子<sup>5)</sup>、  
青木康展<sup>6)</sup>、遠山千春<sup>7)</sup>

国立環境研究所<sup>1)</sup> 環境健康部、<sup>2)</sup> 地域環境研究グループ、  
<sup>3)</sup> 筑波大・医、<sup>4)</sup> CREST, JST

〔目的〕 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)は UDP-glucuronosyl-transferase を誘導し、thyroxine (T4) glucuronidation を促進することにより血中 T4 レベルを低下させることが報告されている。特に周産期の血中甲状腺ホルモンレベルの変化は、甲状腺機能の不可逆的な変化をもたらす。そこで、妊娠中および授乳中ラットへの低用量 TCDD 曝露が仔の甲状腺機能へおおよぼす影響を検討した。

〔方法〕 妊娠 15 日の Holtzman ラットに 200 および 800 ng/kg 体重の TCDD を一回経口投与し、生後 21 および 49 日目にと殺し、血清中 T4、triiodothyronine (T3)を測定した。肝臓、甲状腺、脳下垂体について病理組織学的検索を行った。UDP-glucuronosyltransferase-1 (UGT-1)と cytochromeP4501A1 (CYP1A1)の mRNA の発現を RT-PCR で解析した。血清、肝臓および脂肪組織の TCDD 濃度を GC-MS により測定した。

〔結果及び考察〕 血清中の T4 濃度は、生後 21 日齢の 200ng/kg 投与群の雄ラット及び 800ng/kg 投与群雌雄ラットにおいて対照に比べ有意な低下が認められたが、生後 49 日齢ラットでは対照群のレベルに回復していた。血清 T3 濃度は 800ng/kg 投与群雌ラットで、対照群に比べて有意な増加が認められた。生後 21 及び 49 日齢で、200ng/kg 投与群から CYP1A1 mRNA の顕著な誘導が認められた。生後 21 及び 49 日齢で、200ng/kg 投与群で UGT-1 mRNA レベルの有意な上昇が認められたが、49 日齢では対照群のレベルであった。血清及び臓器中の TCDD 濃度は、生後 21 日目で最高値を示したが、49 日齢では著しく減少した。TCDD による肝 UGT-1 の誘導とそれによる T4 の排泄促進が示唆された。

Effects of in Utero and Lactational Exposure to Low Dose of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on Thyroid Function in Holtzman Rats.

Noriko Nishimura, Junzo YONEMOTO, Mikio SATOH, Yuutchi MIYABARA, Masako OHMURA, Yasunobu AOKI and Chiharu TOHYAMA. National Inst. for Environ. Studies (NIES), Tsukuba Univ, CREST, JST, Tsukuba, Ibaraki 305-0053



## 2,3,7,8-テトラクロロ-パラ-ジベンゾダイオキシン (TCDD) の毒性発現におけるエストロゲン受容体の関与

○曾根秀子<sup>1)</sup>, Sarkar Shubhashish<sup>1)</sup>, 石塚真由美<sup>2)</sup>, 川野道宏<sup>1)</sup>, 遠山千春<sup>3)</sup>, 米元純三<sup>1)</sup>

国立環境研究所・<sup>1)</sup>地域環境研究グループ・<sup>2)</sup>環境健康部,  
<sup>3)</sup>日本科学技術事業団・CREST,

〔目的〕TCDDの発癌性や生殖毒性には性ステロイドホルモンの関与が考えられている。これまでに我々は、ヒト子宮内膜癌細胞を用いた実験系において、TCDDによるチトクローム P450 (CYP) 1A1 の誘導にはエストロゲン受容体 (ER) の応答性が必要であることを明らかにした。そこで今回、*in vivo* 実験系において TCDD の毒性発現における ER の関与について検討したので報告する。

〔実験方法〕1. ラットにおける実験：卵巣を摘出した 6 週齢の雌 Long-Evans ラットをコーンオイル投与群、300 ng TCDD /kg, p.o. 投与群、17-βエストラジオール (E2) 5 μg/kg, i.p. 投与群、E2+TCDD 投与群の 4 群に分けた。コーンオイル及び TCDD 投与後の 8 日目に動物を解剖して肝臓を摘出し、CYP1A1 の誘導能、aryl hydrocarbon 受容体 (AhR) 及び ER の発現変動を調べた。2. マウスにおける実験：6 週齢の雄 CBA/OYC の *p53+/+*、*p53+/-* 及び *p53-/-* の遺伝子型マウスに 40mg β-ナフトフラボン /kg を投与し、投与後 4 日目に動物を解剖して肝臓を摘出し、上記と同様に応答分子の変動を検討した。

〔結果及び結論〕1 の実験：TCDD による CYP1A1 の誘導能は、E2 投与により約 45% 増強された。AhR に関しては、細胞質分画では変動は認められず、核分画では、E2、TCDD、E2+TCDD 投与群に AhR 蛋白質の発現が認められた。2 の実験：β-ナフトフラボンによる CYP1A1 の誘導能及び ER の発現は *p53-/-* の遺伝子型マウスで最も高かった。これらの結果より TCDD や β-ナフトフラボンによる CYP1A1 の誘導にはエストロゲン受容体の関与が考えられた。すなわち、AhR を介した CYP1A1 の誘導が関与する毒性発現にはエストロゲン受容体の関与が考えられる。

Involvement of Estrogen Receptor in 2,3,7,8-tetrabibenzo-*p*-dioxin induced-Toxicity

Hideko SONE, Shubhashishī SARKAR, Mayumi ISHIZUKA, Michihiro KAWANO, Chiharu THOYAMA, Junzo YONEMOTO. Regional Environmental Div., Environmental Health Div., National Institute for Environmental Studies, CREST, Tsukuba, Ibaraki, 305-0053

細胞磁界測定法による塩化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> 井上葉子,<sup>1)</sup> 小松裕美,<sup>1)</sup> 杉浦由美子,  
<sup>1)</sup> 相澤好治,<sup>2)</sup> 岡安 勲,<sup>2)</sup> 沼田賀子,<sup>3)</sup> 小谷 誠

<sup>1)</sup> 北里大学医学部衛生学公衆衛生学教室,<sup>2)</sup> 北里大学医学部  
病理学教室,<sup>3)</sup> 東京電機大学工学部生物電子システム研究室

〔はじめに〕昨年、当学会で発表したガリウム砒素(GaAs)の呼吸器毒性に続き、今回は、細胞に障害を与える因子としてAsイオンに着目し、塩化砒素(AsCl<sub>3</sub>)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〕昨年の演題で用いた試料溶液である、GaAs懸濁液をポアサイズ0.2 μmのフィルターでろ過し、ろ液中As濃度をICP発光分析法で定量した。その結果、AsCl<sub>3</sub>を2.88、4.26、5.83、6.82 μg添加する事で、GaAs懸濁液と同じ砒素イオン濃度を再現できることを確認して試料として用いた。【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、実験群にはAsCl<sub>3</sub>を上記の如く添加し、対照群にはPBSを添加した。一晚培養後に磁化し、磁化後20分間の残留磁界をプロットして、緩和曲線を作成したところ、実験群においては、2.88 μgの群は極僅か緩和したが、4.26、5.83、6.82 μgの各群は殆ど緩和しなかった。また磁化後2分間の緩和係数(λ)を求めたところ、対照群であるPBSと、全ての実験群との間に有意差が認められた。【酵素活性値測定】同様の手順で培養後、培養液中に放出された乳酸脱水素酵素(LDH)の活性値を測定し、放出率を求めると、対照群であるPBSと、全ての実験群との間に有意差が認められた。【形態学的観察】細胞診染色(ギムザ染色)法を用いて、肺胞マクロファージの形態学的変化を観察すると、実験群の約半数以上に障害が認められた。

〔結論〕以上の結果から、AsCl<sub>3</sub>による肺胞マクロファージに対する細胞障害性が、明らかとなった。今後は、塩化ガリウム(GaCl<sub>3</sub>)溶液の細胞障害性についても評価して、GaAsの毒性を解明して行くことが、課題として残された。

Magnetometric Evaluation for The Toxicity of Arsenic Chloride solution to Alveolar Macrophages in Hamsters. <sup>1)</sup>Mitsushi OKADA,<sup>1)</sup> Yoko INOUE,<sup>1)</sup> Yumi KOMATSU,<sup>1)</sup> Yumiko SUGIURA,<sup>1)</sup> Yoshiharu AIZAWA,<sup>2)</sup> Isao OKAYASU,<sup>2)</sup> Yoshiko NUMATA,<sup>3)</sup> Makoto KOTANI <sup>1)</sup> Dep. of Preventive Medicine & Public Health, <sup>2)</sup> Dep. of Pathology, School of Medicine, Kitasato University, Kanagawa 228-8555, Japan <sup>3)</sup> Dep. of Electronics, Faculty of Engineering, Tokyo Denki University, Tokyo 101-0054, Japan

Trx/ADF 遺伝子改変マウス由来の造血前駆細胞における酸化ストレス物質の造血毒性発現様式

平林 容子、児玉 幸夫、梅村 隆志、川崎 靖、金子 豊蔵、  
菅野 純、黒川 雄二\*、井上 達

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部  
+ 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター

生体は活性酸素種からの防御機構を有し、その障害は多くの疾患の重要な因子となるとともに、その除去によって寿命が延長することなども想定されてきた。他方、最近新たに、こうした活性酸素種が細胞内シグナル伝達の一翼をにこなしていることも示されている。例えば過酸化水素は、IL-3 受容体やそのシグナル伝達を担う STAT5 のリン酸化や、c-fos の発現誘導を司る。Thioredoxin (Trx) は disulfide reducing protein のひとつであり、大腸菌からヒトに至るまで様々な酸化ストレス応答時に関与する因子として知られている。今回、自己再生性増殖能と分化能を併せ持つところの造血幹細胞レベルでのこの遺伝子機能の解析を行う目的で、Trx/ADF 遺伝子の過剰発現マウス(「ト」マウス)および、ヘテロ欠失マウス骨髓造血幹細胞のコロニー形成能を指標として、紫外線及びバラコートに対する感受性を検討した。まず紫外線感受性は、同一線量でも高線量率での照射で、「ト」マウス由来コロニーの生残率は野生型と比較して差異を認めない(1000/m<sup>2</sup>で野生型 1%、「ト」マウス 2%)が、低線量率の同一線量照射では「ト」マウス由来コロニーは全く減少しなかった(野生型では生残率 70%)。バラコートを添加してコロニーアッセイを行うと、野生型も「ト」マウスも濃度依存性に生残率が低下するが、「ト」マウスでの減少率は寛和していた(50 $\mu$ M で野生型 18.1%、「ト」マウス 40.0%)。因みにバラコートを全身投与すると、白血球数の減少が観察される一方で、野生型では特に赤芽球性コロニー数の増加を認め、ヘテロ欠失マウスではこれがより低濃度から観察された。「ト」マウスでは 50 $\mu$ g/Kg の投与まで非投与群との差異は認められない。培養に添加した場合とは異なるこうした結果はバラコートの臓器特異的な分子毒性表現様式を示している。

Hematotoxicity by oxidative stress agents using Thioredoxin/ADF transgenic and knock-out mice: Comparison between *in vitro* and *in vivo* study.

Yoko HIRABAYASHI, Yukio KODAMA, Takashi UME-MURA, Yasushi KAWASAKI,  
Toyozo KANFKO, Jun KANNO, Yuji KUROKAWA, Tohru INOUE, Biological Safety  
Research Center, NHIS, Tokyo 158-8501, Japan

○沼澤 聡、坂田 文、石川牧恵、吉田武美

昭和大学薬学部毒物学

【目的】酸化ストレスは、ヘム分解酵素でありストレス応答タンパクとして知られるヘムオキシゲナーゼ (HO-1) を著明に誘導する。HO-1 誘導は細胞・組織に依存しないことから、酸化ストレスシグナルを理解する上で良い指標となり得る。我々は、還元型グルタチオンが特異的に低下するモデルを用いて、HO-1 の発現誘導に関わる細胞内シグナルの解析を行ってきた。その過程で、酸化ストレス下に誘導された c-Fos や AP-1 DNA 結合活性は、HO-1 発現に必要な条件ではなく、誘導増強因子として関与していることを示した。最近、PKC が酸化ストレスにより活性化することや、グルタチオンが *in vitro* で PKC を不活化することなどが報告され、HO-1 誘導における PKC の役割に興味を持たれた。本研究では PKC が HO-1 誘導に直接関わる細胞内シグナル伝達因子として機能することを示唆する結果を報告する。【結果・考察】グルタチオン低下剤ホロンは、HO-1 を誘導する濃度範囲で細胞内 4-ヒドロキシノネナール (4-HNE) 量を増加させ PKC を活性化した。生理的に到達し得る濃度の外来性に添加した 4-HNE (10  $\mu$ M) は、著明な HO-1 誘導作用を示した。ホロンと 4-HNE による HO-1 誘導は、cPKC 阻害剤 Go6976 や IPA で cPKC と nPKC をダウンレギュレートした場合でも認められたが、PKC 分子種非選択的阻害剤 Ro31-8220 では強く阻害された。一方、ホロン添加直後より一過性の  $\alpha$ PKC の活性化が認められ、その用量依存性は HO-1 の場合と類似した。以上の結果より、グルタチオン減少により 4-HNE 量が相対的に増加することにより  $\alpha$ PKC が活性化されることが、HO-1 誘導における主要な役割を担っていることが示唆された。

Involvement of  $\alpha$ PKC in Oxidative Stress-induced Heme Oxygenase-1

Satoshi NUMAZAWA, Aya SAKATA, Maki ISHIKAWA and Takemi YOSHIDA, Department of Biochemical Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences, Showa University, Shinagawa, Tokyo 142-8555.

## In Vitro ラット脳スフェロイド (SP) 長期培養系における 6-Aminonicotinamide (6-ANA) の影響

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]** 昨年第 26 回の本学術年会において、ラット脳 SP の In Vitro 神経毒性評価系としての重要性について発表したが、今回は、脳 SP は長期培養が可能なることから、低用量の 6-ANA に 4 週間まで暴露した場合の変化について調べたので、報告する。

**[方法]** 交配 17 から 19 日目の SD ラット胎児大脳を抽出し、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>、湿潤条件、ロータリーシェイカー上で数日から、数ヶ月間培養した。SP が形成され、3 次元的細胞構築が形成された後に、6-ANA を 0.1~10 μM の濃度で培養系に添加し、経時的に光学顕微鏡及び透過型電子顕微鏡にて形態を観察し、2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase (CNP) 活性を測定した。

**[結果及び考察]** ラット脳 SP の形態は、培養開始数週間後には、表層の部分と中心の部分の 2 層を形成し、表層の部分には有髄神経繊維及び無髄神経繊維が走行し、細胞間にはやや間隙が存在した。中心の部分は、表層より細胞間隙が少なく、グリア細胞様細胞及び無髄神経繊維が主に認められた。6-ANA の添加により、ラット脳 SP の CNP 活性は経時的に減少し、形態は、数日間の 6-ANA 高用量短期暴露においては、比較的大きな空胞化が認められたが、1ヶ月間の 6-ANA 低用量長期暴露においては、主に SP 中心部分に細胞質のスポンジ状空胞化が認められた。6-ANA 低用量長期暴露の形態変化は、In Vivo で報告されている変化と類似し、ラット脳 SP 培養系の数週間から 1ヶ月に及ぶ化合物への長期暴露毒性評価が少量の化合物で可能な系であることが示された。この In Vitro の系は、神経毒性メカニズムの解明及び、中枢神経を標的とした薬物のスクリーニングの系として有用であると考えられた。

In Vitro Effects of 6-Aminonicotinamide (6-ANA) on a Rat Brain Spheroid (SP) Long Term Culture System.

Tomoaki INOUE and Ikuo HORII, Dept. of Preclinical Science, Nippon Roche Research Center, Kamakura, Kanagawa 247-8530

金徒慶、車碩鎬、Arthit Chairoungdua、羅富輝、  
松尾洋孝、金井好克、遠藤仁

杏林大学医学部薬理学教室

メチル水銀は、水俣病の起因物質として知られ、チオール基を持つ化合物と生体内において容易に抱合体を形成するため、その体内動態はグルタチオン、システインあるいはそれらの誘導体の体内動態と密接に関わっている。特に、メチル水銀のシステイン抱合体を輸送するとされる中性アミノ酸輸送系Lは、メチル水銀の体内動態における主要な輸送経路と考えられてきた。最近われわれは分子クローニングにより、輸送系Lの分子の実体を明らかにした。輸送系Lは、LAT1 (L-type amino acid transporter 1) 及びLAT2の2つのアイソフォームからなり、それぞれが血液・脳関門、胎盤関門、あるいは上皮細胞などにおいてに異なった分布を示す。本研究では、LAT1及びLAT2をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、メチル水銀輸送活性を検討した。LAT1あるいはLAT2を発現したアフリカツメガエル卵母細胞は、ともに<sup>14</sup>C-メチル水銀単独では取り込まないが、<sup>14</sup>C-メチル水銀のシステイン抱合体に対して有意な取り込み活性を示した。この取り込みは、濃度依存적であり輸送系Lの抑制薬によって抑制された。さらに、LAT1による<sup>14</sup>C-メチル水銀のシステイン抱合体の取り込みはアミノ酸との交換輸送であり、LAT1を介する輸送の特性と一致していた。本研究は、クローニングした輸送系LトランスポーターLAT1及びLAT2を用い、メチル水銀がシステイン抱合体としてアミノ酸輸送系Lを介して輸送されることを明らかにされた。LAT1及びLAT2は、一般の細胞の細胞膜の他、血液・脳関門、胎盤関門、上皮組織でのアミノ酸透過を担当するトランスポーターであり、メチル水銀の体内動態の重要な決定因子であると考えられる。

Transport of methylmercury mediated by system L neutral amino acid transporters

Do Kyung Kim, Seok Ho Cha, Arthit Chairoungdua, Jun Inatomi,  
Hirotaka Matsuo, Yoshikatsu Kanai, and Hitoshi Endou

Department of Pharmacology and Toxicology, Kyorin University  
School of Medicine, 6-20-2 Shinkawa, Mitaka, Tokyo 181-8611, JAPAN

サルの自動採血法による血中活性物質の日内変動

○ 阿久根 淳, 浜田大治, 亀之園 剛, 永田良一, 鬼頭 剛

(株)新日本科学 安全性事業部 安全性1部

【目的】内分泌をはじめ生体の活性物質はその活性様式に適用した日内変動を示すことが知られている。薬理試験のみならず毒性試験においてもこれらの物質の日内変動を把握することは大切である。しかし、採血時に拘束することは動物にストレスを与えることになる。性腺 hormone, 副腎 hormone, insulin, NEFA 等のように測定する物質によってはストレスが測定値に影響を及ぼすことが知られている。特にサルの場合その傾向が著しく強い。我々は、サルにおいてより自然な形で採血し、内分泌をはじめ生体の活性物質の真の日内変動を測定する目的で今回自動採血装置を用いて実験を行った。【実験方法】体重 4-5 kg のカニクイザルおよび 8-9 kg のアカゲザルを用いた。あらかじめ、無菌的に動物は ketamine 麻酔下で大腿静脈内に採血用のカニューレを挿入し、カニューレの多端を皮下を通して背部から対外に取り出し、テーサーの中を通してシーベルに接続させた。シーベルと自動採血装置の吸入口をポリウレタンチューブで接続した。1回の採血量は 0.5-1.0 ml で、10 分間隔の採取が可能であった。採取した血液は 4℃ に保冷したチャンパー内に保存されるシステムになっている。【成績および総括】NEFA に関しては、カニクイザルでは昼間は 0.28 - 0.44 mEq/L, アカゲザルは 0.40 - 0.63 mEq/L を示し、夜間にはカニクイザルは 0.10 - 0.15 mEq/L, アカゲザルは 0.16 - 0.24 mEq/L の変化がみられた。この成績から、カニクイザルおよびアカゲザルともに NEFA は自律神経系の活動性に依存した日内変動を示した。現在、GH および insulin の日内変動についても測定中で、結果は本学会で紹介する。

Circadian rhythm of circulating active substances in conscious monkeys using the autonomic blood sampling method

Atsushi AKUNE, Taiji HAMADA, Takeshi KAMENOSONO, Ryoichi NAGATA,  
Go KITO  
Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.

イヌを用いた毒性検討への肝生検の導入(2)  
 -病理組織学的検討-

○ 小野沢 緑<sup>1)</sup>、仲野 壽久<sup>1)</sup>、白石 明<sup>1)</sup>、酒井 東日<sup>1)</sup>、  
 庄司 陽子<sup>1)</sup>、仲由 武實<sup>1)</sup>、清水 憲次<sup>2)</sup>

1)明治製菓株、2)株式会社富士バイオメディクス

【目的】肝臓は薬物代謝における主要臓器であり、また多くの化学物質の毒性標的臓器である。肝臓を同一動物から経時的に採取し、その標本が評価に耐えうるものであれば、毒性評価上大きなメリットになるものと考えられる。そこで今回、イヌを用いた経皮的肝生検による採取肝組織が病理組織学的評価に適用できるか検討を行った。

【方法】1. 生検方法：動物を無麻酔下で保定し、剣状突起から左肋骨弓を剪毛および消毒し、塩酸リドカイン注射液で皮下浸潤麻酔し、ディスポーザブル生検針(14 G)により内側左葉の肝穿刺を行った。

2. 病理組織標本作製：採取した肝組織を10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、定法に従いパラフィン切片標本作製し、H-E染色を施して病理組織学的検査を行った。

【結果および結論】1回の採材で約10 mgの量の組織を採取でき、これを通常の4 μmの厚さで薄切を行うと、10枚程度の標本が作製可能であった。この際、1切片上には10程度の肝小葉が含まれていることが判明した。穿刺による組織障害も採取した組織の最外層の細胞のみの障害にとどまっており、肝臓の組織評価には十分に耐え得るものであった。

また、古い穿刺跡も、若干の単核球の浸潤と間質の増生が観察されるのみであり、ほぼ正常状態に回復しているものと考えられた。

以上より、今回の肝組織の採取方法は、組織学的に見ても動物に対する影響は非常に軽微であり、毒性試験における経時的な組織評価に十分利用できるものと考えられた。

ただし、その穿刺には熟練を要し、その技術的水準によって、血液生化学的検査データなどバックグラウンドが若干幅が出ることが懸念されるため、その点については十分注意する必要があるものと考えられた。

Introduction of liver biopsy in toxicity study with dogs(2)  
 -Histopathological examination-

Midori ONOZAWA<sup>1)</sup>, Yoshihisa NAKANO<sup>1)</sup>, Akira SHIRAISHI<sup>1)</sup>, Toki SAKAI<sup>1)</sup>,  
 Yoko SHOJI<sup>1)</sup>, Takemi NAKAYOSHI<sup>1)</sup> and Noritsugu SHIMIZU<sup>2)</sup>

1)Toxicology Lab., Meiji Seika Kaisha Ltd., Kanagawa, 222-8567, Japan

2)Toxicology Dept. Fuji Biomedix Co., Ltd. Yamanashi, 408-0044, Japan



四塩化炭素による急性肝障害時のイヌ血清 SDH, GLDH, 5'-ND, 総胆汁酸の経時的変動

○小田部耕二、江原裕子、長谷川妙子、小泉妙子、田中直美  
森敏男\*、野口規子、千葉修一、渡部一人、新倉博文、井上誠

中外製薬(株)安全性研究所、\* (株)CSKリサーチパーク

【目的】International Harmonization of Clinical Pathology Testing(IHCPT)において安全性試験で推奨される臨床検査項目の勧告案が1996年に発表された。この中には日本では一般的に普及していない肝機能検査として、肝細胞障害指標であるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(SDH)とグルタミン酸アミノトランスフェラーゼ(GLDH)、肝胆道系障害指標である5'-ヌクレオチドターナーゼ(5'-ND)と総胆汁酸(TBA)が含まれている。今回、これらの検査項目の有用性を調べる目的でイヌの急性肝障害モデルを作製して経時的変動を観察し、一般的肝機能検査であるAST, ALT, ALP,  $\gamma$ -GTP, ビリルビンと比較検討した。

【方法】1歳齢のビーグル犬(Beagle/CSK)6例(雄4例, 雌2例)に20%四塩化炭素トリブ油溶液を1mL/kgの用量で経口単回投与した。投与前および投与後1, 2, 4, 8, 15日に採血して、血清中のSDH, GLDH, 5'-ND, TBAおよびAST, ALT, ALP,  $\gamma$ -GTP, ビリルビンを日立自動分析装置H-7170を用いて測定した。

【結果】SDHはASTと類似した推移を示し、投与後1日より増加して2日をピークに急増した後4日には急減し、以後漸減して15日までには投与前値に回復した。一方、GLDHはALTと類似した推移を示し、投与後1日より増加して2日をピークに漸減したが、反応の弱かった1例を除いては15日にも軽度増加していた。5'-NDは投与後1~4日の間に軽度増加した。TBAは投与後1日以降に変動がみられ、反応の強かった2例では15日にも増加した。投与後1から2日の肝障害急性期における上昇率で比較すると、SDH, GLDHはAST, ALTよりも高く、5'-NDはALPと同程度であるが $\gamma$ -GTPよりは高く、TBAはビリルビンより高いことが確認された。現在、肝障害発生初期の変化について追加検討中であり、併せて報告する。

Time-Course Changes of Canine Serum SDH, GLDH, 5'-ND and Total Bile Acid during Acute Liver Injury after Carbon Tetrachloride Administration.

Koji OTABE, Yuko EBARA, Taeko HASEGAWA, Taeko KOIZUMI, Naomi TANAKA, Toshio MORI\*, Noriko NOGUCHI, Shuichi CHIBA, Kazuto WATANABE, Hirafumi SHINKURA and Makiyo INOUE Safety Assessment Laboratory, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., \*CSK Research Park, INC, 135 Komakado 3-chome, Gotemba-shi, Shizuoka 412-8513, Japan

□ 大谷勝己、宮川宗之

労働省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)曝露により韓国半導体工場の労働者が生殖異常をきたしたことや、内分泌攪乱化学物質が問題視されるようになったことから、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致命的欠点がある。この様な状況で簡便・迅速かつ多数検体処理能を有する客観的測定方法を併用しつつ2BPの精巣毒性試験を実施するために、光学的手法であるテトラゾリウム塩法の開発、SQA(簡易精子性状分析器 Sperm quality analyzer)法およびコンピューターを用いた精子自動解析法(CASA)の導入をはかり検討した。

[方法]F344雄性ラットにオリーブオイルに溶解した2BPを週2回4週間皮下投与の後、麻酔下で解剖し、各臓器重量を測定、また血液、精巣および精巣上体を採取した。血液の分析をするとともに、精巣上体尾部からハサミで精子を培地に浮遊させ、①マイクロプレートを用いたMTTおよびWST-3法による吸光度測定②SQA法によるSM1(sperm motility index)値の測定および③CASAによる各種パラメーターの測定を行った。

[結果および考察]2BP 2000mg/kgの高濃度曝露群において、白血球数や血小板数の減少を認めた。また、MTT法および同法の変法であるWST-3法で有意な吸光度の減少を認めた。さらにCASAにより有意な精子減少も確認した。しかし、今回の条件では運動能への影響が少なかったためか、SQA法では変化が認められず、CASAでも運動能の指標に変化はなかった。以上より、白血球数や血小板数などの血液学的指標により生殖毒性を事前評価しうる可能性が示唆された。また、2BPによる精子数の減少は高濃度群に認められたが、MTT法、WST-3法、及びCASAにより同様な結果が得られ、これらの手法の精子分析における有効性が示された。とくにWST-3法はMTT法より簡便かつ多数検体同時処理能があるため今後の活用が期待される。また、精巣、精巣上体尾部、前立腺、精囊腺に有意な重量減少が認められた群があったが、腎臓、肝臓では変化がなかった。現在、組織学的な検査を行っている。本研究は科学技術振興調整費により行った。

Evaluation of Testicular Toxicity of 2-Bromopropane using Tetrazolium Salt, SQA and CASA methods in rats.

Katsumi Ohtani and Muneoyuki Miyagawa, National Institute of Industrial Health, Ministry of Labor, Kawasaki, 214-8585, Japan.

## イヌ副腎皮質細胞培養による *In vitro* グルココルチコイド産生系を用いた副腎皮質毒性物質の評価

○森下 克美, 奥村 裕, 伊藤 典男, 高橋 伸夫

大塚製薬株式会社 徳島研究所 毒性研究部

【目的】 副腎皮質でのグルココルチコイド産生に及ぼす薬物の直接作用を検討する系として、イヌ副腎皮質細胞 *in vitro* 培養系を確立し、既知の副腎皮質毒性物質である aminoglutethimide (AG), metyrapone (MT) および 1-(*o*-chlorophenyl)-1-(*p*-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane (DDD)を用いて、この系の有用性を検討した。

【方法】 イヌより両副腎を摘出、髄質部分を除いた後、細切してコラゲナーゼ処理し、皮質細胞を単離した。細胞は  $5 \times 10^4$  /well 濃度で 96 穴マイクロプレートにて 20 時間前培養した後、 $10^{-8}$  M の ACTH 存在下で AG, MT あるいは DDD とさらに 24 時間反応させた。培養上清中の cortisol 濃度は ELISA キット (NEOGEN<sup>®</sup>) を用いて、また生細胞数は MTT 法にて測定した。さらに一部の培養上清について、HPLC を用いてグルココルチコイドおよびその前駆体類の量も測定した。

【結果】 AG および MT は  $10^{-8}$  M, DDD は  $3 \times 10^{-5}$  M 以上で濃度依存的に生細胞数を減少させた。ELISA による測定では、AG および DDD は  $3 \times 10^{-8}$  M 以上で、また MT は  $3 \times 10^{-6}$  M 以上で濃度依存的に cortisol 産生を減少させた。HPLC によるグルココルチコイドおよび前駆体類の測定では AG, MT, DDD いずれも aldosterone, cortisol および corticosterone 量を減少させた。また MT では 11-deoxycortisol および deoxycorticosterone 量の増加も認められた。

【結語】 AG は前駆体類の枯渇, MT は 11 $\beta$ -hydroxylase の阻害, DDD は細胞毒性によって cortisol 産生を抑制していることが示唆され、これは今までに報告されている各物質の作用メカニズムと一致するものであった。本試験系は、副腎皮質毒性物質がグルココルチコイド産生経路のどの段階に作用しているかについて比較的簡便に推定できることから、薬物の副腎皮質毒性のメカニズム検討に有用な系であると考えられた。

### Evaluation of Adrenocortical Toxicants on Glucocorticoid Production in Canine Adrenocortical Cell Culture

Katsumi Morishita, Hiroshi Okumura, Norio Ito, and Nobuo Takahashi

Toxicology Department, Tokushima Research Institute, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.

全自動血液凝固測定装置 CA-6000 を用いた血液凝固因子活性測定  
 —血液凝固因子活性の動物種差と血漿試料の保存安定性—

○木村由美子、京川吉正、原内敏夫、大野浩司

塩野義製薬・新薬研究所

[目的] 毒性試験における血液凝固系の検査項目としてプロトロンビン時間(PT)及び活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)が最も汎用されている。しかし、PTやAPTTの測定によって血液凝固異常の有無は検出できるものの、これらの測定のみでは一連の血液凝固反応のどの段階に異常が生じたかを特定することは困難である。そこで、血液凝固異常の機序解明を行なう上で血液凝固因子活性の測定が有用な測定項目になると考え、全自動血液凝固測定装置CA-6000(Sysmex)を用いた実験動物の凝固因子活性測定法の設定を試みた。

[方法] SD系ラット、ビーグルイヌ、カニクイザルの血漿を測定試料とした。各凝固因子欠乏血漿(II, V, VII, X, VIII, IX, XI, XII)におけるPT及びAPTTの延長が当該因子を含む測定試料(血漿)の添加によって回復し、その回復の程度は添加された当該因子量に比例することから、段階希釈した正常血漿の凝固因子欠乏血漿への添加によるPT及びAPTTの補正值から標準曲線を作成し、測定試料についても同様の測定を行い得られた凝固時間から試料中の凝固因子濃度を正常に対する活性パーセントとして算出した。

[結果] 各凝固因子に関して、ラット、イヌ、サル共に両対数グラフ上で血漿濃度(凝固因子活性)と凝固時間との間に良好な直線性が得られた。しかし、その傾きは、各因子間で大きく異なり、また、明らかな動物種差も認められた。血漿試料の-80℃における冷凍保存時の保存安定性を検討した結果、イヌの第XI及びXII因子が2週間保存後に試料採取直後の測定値に比べ10~20%程度の活性変動を示したものの、その他、全ての凝固因子活性に良好な保存安定性が4週間まで認められた。

Application of Automated Blood Coagulation Analyzer CA-6000 to Measurement of Blood Coagulation Factors.

Yumiko KIMURA, Yoshimasa KYOKAWA, Toshuo HARAUCHI and Kouji OHNO,  
 Developmental Research Laboratories, SHIONOGI & CO. LTD., Toyonaka 561-  
 0825, Japan.

○清水茂<sup>1)</sup>、加藤隆之<sup>2)</sup>、清水憲次<sup>3)</sup>、黒沢 章<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>株式会社富士バイオメディックス、小淵沢総合研究所

<sup>2)</sup>明治製菓株式会社、安全性研究所

【目的】肝臓中薬物濃度の測定は、薬物の毒性・動態評価の重要な指標となる。現在、剖検時に肝臓の一部を採取して薬物濃度を測定する方法が一般的で、同一動物での経時的測定の報告は見当たらない。今回、イヌを用いて経皮的肝生検による肝組織の繰り返し採取方法を検討し、動物に与える影響および摂餌状態による相違について検査した。【方法】①生検方法：動物を無麻酔で保定し、剣状突起から左肋骨弓を剪毛および消毒し、塩酸リドカイン注射液で皮下浸潤麻酔した。超音波診断装置による透視下で、ディスポーザブル生検針（14G）を用いて、2時間間隔で5回肝生検を行った。②検査方法：14～16か月齢の雄ビーグルを使用し、絶食状態で肝生検を行った群（以下、絶食群）、給餌後に肝生検を行った群（以下、給餌群）および対照として腹壁のみを穿刺した群の3群、各3頭を設定した。各生検時点に一般状態を観察し、生検前、生検後1, 3, 7および14日に血液学的検査、血液化学的検査および肝機能検査（ICG）を行い、生検後14日に代表例を剖検して病理学的に検査した。【結果および結論】本方法により、各生検時点とも10～20mgの肝組織の採取が可能であった。生検後1日に白血球数、ASTおよびALT値の軽度な増加が認められたが、白血球数とAST値は生検後3日、ALT値は14日に回復した。剖検では内側左葉の一定領域に肝穿刺の痕跡が認められる程度であった。ICG検査に異常はみられなかった。絶食群と給餌群では、穿刺角度は異なるが、超音波診断装置による観察で同様に採取することが可能であった。以上、絶食および給餌状態のいずれにおいても、肝組織の採取は安全かつ確実で、動物に対する影響も軽微であり、毒性試験や薬物動態試験に有用と考えられた。今後は、実際の動物試験に導入して、医薬品開発に利用する予定である。

#### Application of Liver Biopsy for Safety and Pharmacokinetic Study in Dogs

Shigekazu SHIMIZU<sup>1)</sup>, Takayuki KATO<sup>2)</sup>, Noritsugu SHIMIZU<sup>3)</sup>, Tōhru KUROSAWA<sup>2)</sup>. <sup>1)</sup>Kobuchisawa Laboratories, Fuji Biomedix Co.,Ltd.

<sup>3)</sup>Toxicology Lab., Meiji Seika Kaisha Ltd.

市販緑内障治療薬のカニクイザルにおける眼圧下降作用  
—麻酔下と無麻酔下の比較—

○澤田隆博, 坂本憲吾, 清水 淳, 広瀬祐治, 武藤紀生

株式会社 イナリサーチ

【目的】動物における緑内障治療薬の薬効検索には、多くの場合、ウサギあるいはイヌが用いられている。しかし、ウサギはヒトでの薬効を必ずしも適切に反映しないとの報告があり、また、イヌの眼球は解剖学的にヒトへの類似性が低い。今回、我々はカニクイザルを用い、数種緑内障治療薬の眼圧下降効果を麻酔下および無麻酔下で比較検討したので報告する。【方法】モンキーチェアーに拘束し、無麻酔下で眼圧を測定する操作に充分馴化させたカニクイザル 30 頭を用いた。眼圧測定には ALCON APPLANATION PNEUMATONOGRAPH を使用した。副交感神経作動薬(0.25%塩酸ピロカルピン)、交感神経β受容体遮断剤(0.5%マレイン酸チモロール)、代謝型プロスタグランジン製剤(0.005%ラタノプラスト)を無麻酔下で、あるいは塩酸ケタミンによる麻酔下でそれぞれ点眼し、眼圧を測定した。【結果】0.25%塩酸ピロカルピンでは単回点眼で眼圧の下降が認められたが、麻酔下と無麻酔下で下降の程度に明確な差はなかった。0.5%マレイン酸チモロールの単回点眼では、無麻酔下で眼圧下降がみられたが、麻酔下での眼圧下降はわずかであった。0.005%ラタノプラストの単回点眼では麻酔下および無麻酔下でも眼圧下降はみられなかったが、反復点眼では 2 日目から眼圧下降が認められた。

【考察】いずれの薬物によっても、カニクイザルにおいて眼圧下降効果をとらえることができた。各薬物による眼圧下降を無麻酔下と麻酔下で比較した場合、麻酔下でのデータのバラツキが大きい傾向があり、その理由の一つとして麻酔深度のバラツキによる可能性が考えられた。また、サルを眼圧測定操作に充分馴化させることにより、麻酔の影響を排除した無麻酔下での眼圧測定が可能であった。

Intraocular tension-decreasing effects of commercially available therapeutic agents for glaucoma in cynomolgus monkeys

— Comparison between anesthetized and conscious animals —

Takahiro SAWADA, Kengo SAKAMOTO, Jun SHIMIZU, Yuji HIROSE, Norio MIYATO,

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

## ウサギ塞栓性脳梗塞モデルを用いた ME3277 による脳出血の検討

○園子田 健二, 森本 眞知子, 山本 健一, 片羽 一嘉, 黒沢 亮,  
仲由 武實

明治製菓株式会社 薬品総合研究所

【目的】血小板膜 GP II b/III a 拮抗作用を有する抗血小板薬 ME3277 は、急性期脳血栓症に対する治療効果が期待される一方、脳血管が傷害されている患者では強い抗血小板作用に伴う脳出血が懸念される。そこで、抗血小板薬では禁忌とされる塞栓性脳梗塞を想定したモデルを用いて患者病態における脳出血の危険性を検討した。

【方法および結果】病態モデルは tPA の有効性評価に用いられるウサギ塞栓性脳梗塞モデルを参考として、評価条件を設定した。すなわち、ウサギ自家血液から分離した血小板を Thrombin により凝固させて白色血栓を作製し、これを内頸動脈から注入して中大脳動脈を閉塞した。栓子注入後 4 時間の症状観察で旋回運動や起立困難などの症状が認められた動物では、脳スライスの TTC 染色観察から求めた脳梗塞率（梗塞部分体積/大脳体積）の平均が約 20%であった。ME3277 と陽性対照薬の tPA は栓子注入後 4 時間目から 2 時間 infusion した。ME3277 は血小板凝集をはほぼ 100%抑制する用量とその 5 倍量、tPA はウサギにおける有効用量である。その結果、tPA 群の脳出血は 6/9 例に観察され、6 例の脳出血率（出血部分体積/大脳体積）は  $5.10 \pm 2.33\%$  (1.24-7.44) であった。一方、5%グルコースを投与した Control 群の脳出血は 1/9 例（脳出血率 4.28%）、ME3277 低用量および高用量群ではそれぞれ 0/4、1/9 例（脳出血率 8.30%）で観察された。

【考察】以上のように、tPA の有効用量を臨床使用上、禁忌と考えられる時間帯に投与した結果、脳出血が多発した。一方、ME3277 投与により脳出血の発現率は増加しなかった。したがって、ME3277 は脳血管が傷害されている可能性が高い塞栓性脳梗塞患者においても、脳出血の助長は少ないものと推察された。

Cerebral hemorrhagic examination following the administration of ME3277 in a rabbit embolic stroke model

Kenji ZUSHIDA, Machuko MORIMOTO, Kenichu YAMAMOTO, Kazuyoshi KATAHA,  
Tohru KUROSAWA and Takemi NAKAYOSHI

Toxicology Lab, Meiji Seika Kaisha Ltd., Kanagawa, 222-8567, Japan

ラットにおける血中コレステロール分画法の比較  
 -超遠心法, 電気泳動法および直接比色法-

○奈良岡 準, 田畑 肇, 久保 道江, 石川 敦子, 堺 俊治

山之内製薬株式会社 安全性研究所

【緒言】血中コレステロール(CHO)の分画法としては、超遠心分離法、電気泳動法等があるが、多検体迅速処理が求められる毒性試験では従来不向きとされてきた。近年、超遠心機および高圧電気泳動装置の改良により、迅速な処理が可能となり、また臨床では LDL-CHO、HDL-CHO の直接比色法が普及しつつある。そこで今回我々はラット血漿を用いて、超遠心法、電気泳動法、直接比色法による CHO 分画法について比較検討した。

【材料および方法】高脂血症モデルラット(外因性, 内因性)、一夜絶食ラットおよび無処置ラットより採取した血漿について、高性能小型超遠心機(CS150GX, S150AT アングルローター, HITACHI)を用いて超遠心処理(901,000 ×g)を施し、VLDL, LDL, HDL の各分画を分取して CHO を定量した。また同一血漿を用い、高圧電気泳動法ならびに直接比色法による分画を行った。

【結果および考察】無処置ラットの CHO は、いずれの方法においても HDL 分画主体であり、絶食による VLDL および LDL 分画比の低下が認められ、従来の成績と一致した。高脂血症モデルラットでは VLDL 分画比の著しい上昇が認められたが、方法間に成績の乖離が認められた。とりわけ、LDL-CHO の直接比色法は他の二法の成績とは大きく乖離し、ラットへの適用に際しては注意する必要があるものと考えられた。

Comparison of blood cholesterol fraction in rat by ultracentrifugation, electrophoresis and colorimetry.

Hitoshi NARAOKA, Hajime TABATA, Michie KUBO, Atsuko ISHIKAWA,  
Toshiharu SAKAI

Safety Research Laboratories, Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.  
Itabashi-ku Tokyo 174-8511



○鳥塚尚樹, 佐藤玄, 柿木基治, 甲斐純子, 築館一男, 澤田繁樹,  
佐神文郎

エーザイ株式会社 薬理安全性研究所

【目的】初代培養肝細胞を用いた *In vitro* 毒性研究は一般的にごく短時間の処理で行うことが多く、化合物の評価を急性でしか行っていないとも言える。よって本研究では、肝細胞サンドイッチ培養法が長期間培養による *In vitro* 毒性評価系としての可能性を持つと考え、細胞機能、形態などの面から検討を行った。

【方法】培養プレート (60 mm 径) に 1 mg/mL の Type I コラーゲンゲルを作成し、雄ラット (Slc:SD, 8 週齢) の肝細胞  $2 \times 10^6$  cells を植え込み、4 時間後に接着した細胞の上にさらに 1 mg/mL の Type I コラーゲンゲルを重ね、サンドイッチ培養とした。細胞機能の指標として、アルブミン分泌量、呼吸能 (MTT assay) の 2 項目を測定した。また、位相差顕微鏡及び電子顕微鏡による観察も行った。併せて、D-galactosamine (GalN) 処理群も設定し、これらの項目について検討した。

【結果及び考察】アルブミン分泌と呼吸能は 1 週間にわたって維持され、細胞機能が良好であることが示された。電子顕微鏡による観察では培養 1 週間後の細胞で微絨毛と接着斑が見られ、オルガネラも維持されていた。このような形態の再構成と維持は、アルブミン分泌や呼吸能などの細胞機能の良好な維持を裏付けるものと考えられた。また、GalN の処理濃度によっては、細胞機能が 1 週間にわたって徐々に低下しつつもゼロにはならないことが観察された。よって、サンドイッチ培養法であれば、短期間の急激な毒性と時間をかけて徐々に増悪する毒性の閾値の評価ができることを示唆するものであると考え、現在さらに詳細な検討を行っている。

Application of hepatocytes cultured in a sandwich configuration for toxicity assessment.

Naoki TORITSUKA, Gen SATO, Motoharu KAKIKI, Junko KAI, Kazuo Tsukidate,  
Shigeki SAWADA and Fumio SAGAMI.

Drug Safety and Disposition Research Laboratories, Eisai Co., Ltd., Gifu, 501-6195 Japan.

## Tamoxifen 投与によるラット肝薬物代謝酵素誘導測定への RT-PCR 法の応用

○橋場雅道、笠原利彦、原田剛、落合敏秋、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】 Tamoxifen はラット肝において薬物代謝酵素を誘導し、その代表的な CYP 分子種として CYP2B 及び 3A サブファミリーが報告されている。その検索手法には、活性測定、Western 及び Northern blotting、ELISA 法等が用いられている。これらの手法は操作が煩雑であったり、CYP 分子種の正確な同定が困難である場合がある。そこで、様々な分子種の同定が可能である RT-PCR 法の応用を試みた。また、PCR 産物の分析にはキャピラリー電気泳動を用い、本装置の PCR 産物の定量的評価への応用についても検討した。

【方法】 5 週齢の雌 Crj:CD(SD)IGS ラットに Tamoxifen 20mg/kg/day を、1 日 1 回、3 箇月間強制経口投与した。最終投与の翌日にペントバルビタール麻酔下で、放血致死後摘出した肝臓より RNA を抽出し、cDNA を作製、次いで PCR 反応を行った。CYP2B1、CYP2B2、CYP3A1、CYP3A2、CYP3A9、CYP3A18、CYP3A23 の各分子種を対象に、キャピラリー電気泳動システムにより、2 本鎖 DNA 分析キット (HEWLETT PACKARD) を用いて PCR 産物の分析を行った。

【結果及び考察】 対照群に比較して、Tamoxifen 投与群では CYP2B サブファミリーで 2.1~5.8 倍、CYP3A サブファミリーで 2.6~12.5 倍の上昇を示した。また、雌で加齢に伴い消滅することが報告されている CYP3A2 は、対照群では発現が認められなかったが、タモキシフェン投与群で発現が認められた。以上の結果より、RT-PCR 法は肝薬物代謝酵素誘導における各 CYP 分子種の同定に有効であり、これらの PCR 産物の定量的評価にキャピラリー電気泳動が有用であることが示唆された。

Application of RT-PCR on analysis of hepatic drug metabolizing enzyme induction in rat treated with tamoxifen.

Masamichi HASHIBA, Toshihiko KASAHARA, Tsuyoshi HARADA, Toshiaki OCHIAI and Masaomi OBATA, Toxicology Laboratory, Research Center, Mochida Pharmaceutical Co.,Ltd., 342 Gensuke, Fujieda, Shizuoka 426-8640, Japan.

## C57BL/6 マウスを用いた concanavalin A 肝炎モデル

○庄司 陽子, 小野沢 緑, 仲野 善久, 白石 明, 佐藤 雅之,  
酒井 東日, 仲由 武貴

明治製菓株式会社総合研究所 安全性研究所

Concanavalin A (Con A) はマウスに静脈内投与することにより、免疫系を介した肝炎を発症することで知られている。一般的には BALB/c マウスを用いた急性肝炎モデルが知られているが、一方では亜急性モデルの作出も試みられている。しかし、BALB/c は Con A の反復投与により、肝障害の程度が軽減する傾向にあるうえ脾臓や胸腺などのリンパ系組織の損傷が大きいため、用量と投与間隔の調節が難しく、亜急性肝炎モデルへの適用は現実的でないと考えられる。今回は、ウィルス性肝炎(MHV)に感受性の高い C57BL/6 マウスに注目し、亜急性肝炎モデルとしての適性を評価するために、Con A 単回投与後の組織学的変化を中心にその病態を BALB/c マウスと比較検討したので報告する。

材料および方法: 雄の C57BL/6N および BALB/cA マウスに Con A 10 mg/kg を静脈内単回投与し、3, 5, 7 日後に採血するとともに、肝臓・脾臓・胸腺をホルマリン固定して組織標本を作製し、経時的な病理組織変化を比較した。

結果: C57BL/6 マウスでは、投与後3日から肝臓に広範な壊死が認められ、投与後7日で壊死巣が残る個体も見られたが、脾臓・胸腺では観察期間中に著明な傷害性変化が見られたものはなかった。

これに対し BALB/c では、肝臓の変性壊死巣は小さく、時間の経過に従って速やかに修復していたが、脾臓および胸腺ではリンパ球の壊死・脱落が著明であり、投与後7日でも同程度の病変が認められた。

Con A 肝炎を亜急性に維持するためには、リンパ球の生存・活性化は必須であると考えられる。従って、肝臓の広範囲な壊死を発現する一方でリンパ系の傷害が少ない C57BL/6 マウスは、亜急性肝炎モデル作出に有望なマウス系統であると考えられた。

## Concanavalin A-induced hepatic injury in C57BL/6 mouse

Yoko SHOJI, Midori ONOZAWA, Yoshihisa NAKANO, Akira SHIRAISHI, Masayuki SATO, Toki SAKAI, and Takemi NAKAYOSHI  
Toxicology Lab., Meiji Seika Kaisha Ltd., Yokohama, 222-8567

□ 中村英明、西川秋佳、古川文夫、宮内 慎、係 和永、広瀬雅雄

国立医薬品食品衛生研究所病理部

【はじめに】LEC ラットは肝炎後に肝細胞癌や腎細胞癌を自然発症する系統で、病変の原因として銅の蓄積による酸化的ストレスが示唆されている。今回この関与を解明する目的でLEC ラットにおける抗酸化物質の影響を検討した。【実験方法】15週令の雄LEC ラットを10匹ずつ4群に分け、それぞれ1%のN-acetylcysteine (NAC)、quercetin (QC)、phytic acid (IP<sub>6</sub>)あるいは基礎飼料のみを与え、投与2及び6週に5例ずつ計画屠殺した。

【結果】NAC群では対照群と比較して投与6週において剖検所見での黄疸の消失、腎比重量の有意な減少、血清中の鉄、銅およびGOTの有意な減少が、投与2及び6週において病理組織学的検査でLEC ラット特異的な肝障害を示唆する大型な核を伴う肝細胞肥大の抑制が認められ、また投与6週で対照群にみられた腎尿細管壊死が抑制された。QC群では投与6週に血清中の銅の有意な増加が、病理組織学的検査で腎尿細管壊死の増強が認められた。IP<sub>6</sub>群では投与6週において病理組織学的検査で腎尿細管壊死の抑制が認められた。なお、銅染色の結果、投与2及び6週に肝臓での銅蓄積が全例に、投与6週に腎臓での銅蓄積がNAC群を除く全例に見られた。

【結論】NAC群では肝臓での銅蓄積が認められたにも関わらず、肝障害が軽減化されたことから、NACは銅の肝臓への流入を抑えるというより、蓄積した銅により生じる障害（酸化的ストレス等）を抑制したと推測される。一方、肝臓には大きな差は見られなかったが、腎障害がQC群では増強され、IP<sub>6</sub>群では抑制された。これらの結果は抗酸化物質それぞれのメカニズム等の違いにより、銅の引き起こす障害に対する作用が変わることを示唆した。

Effects of antioxidants on spontaneous hepatic and renal lesions in LEC rats.

Hideaki NAKAMURA, Akiyoshi NISHIKAWA, Fumio FURUKAWA, Makoto MIYAUCHI, Hwa-Young SON and Masao, HIROSE, Division of Pathology, National Institute of Health Sciences, Tokyo 158-8501, Japan

ベンゾチアゾール誘導体によるラット肝毒性発現機序の解明 2) Ames  
試験を指標とした代謝活性化経路の推定

○佐藤 玄, 朝倉 省二, 羽倉 昌志, 小林 直樹\*, 岡本 康\*, 築館 一男

エーザイ株式会社 薬理安全性研究所, \*ケミストリーユニット 4

〔目的〕ベンゾチアゾール誘導体である E2011 は, MAO-A 特異的な新規阻害剤である。一昨年の本学会で, ラットにおける E2011 の反復投与毒性試験においてみられた細胞核肥大や前癌病変等の肝毒性は, 脱炭酸とそれに続く水酸化およびアセチル化によって引き起こされた可能性を発表した。この仮説に基づく本化合物の潜在的なイニシエーション活性を確認するため, E2011 およびその関連化合物を用いて *in vitro* で変異原性の検索を行った。

〔材料および方法〕E2011 (3 級アミン), ER-120923-00 (6-ABT 骨格に E2011 と同じ 3 級アミン構造を持つ化合物), ER-120921-00 (ER-120923-00 の脱炭酸体; 2 級アミン), そして 6-ABT (1 級アミン) の変異原性をサルモネラ試験菌株を用いて検討した。

〔結果〕E2011 は *S. typhimurium* TA100 および YG1029 (TA100 に O-AT 遺伝子のマルチコピープラスミドを導入し, 芳香族アミン等に対する感受性を高めた菌株) いずれにおいても陰性であった。ER-120923-00 も同様に, YG1029 菌株で陰性であった。2 級アミンである ER-120921-00 は S9 mix 存在下 YG1029 で弱い変異原性を示し, さらに 1 級アミンである 6-ABT は, S9 mix 存在下 YG1029 で強い変異活性を示した。

〔考察〕ベンゾチアゾール骨格 6 位の 1 級および 2 級アミン構造は変異原性に寄与すると考えられ, また, その活性発現には S9 mix (チトクロム P450) とアセチル転移酵素が必要であることが示された。この結果は, E2011 が脱炭酸 (Ames 試験系では進行しないと考えられる) とそれに続く水酸化およびアセチル化によって反応性の高い中間体へと変換されて変異原性を誘発することにより, 核肥大や前癌病変などの変化を引き起こすという考えを支持するものであると考えられた。

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

2) Bioactivation of benzothiazoles with amine structures in the Ames/*Salmonella* assay.

Gen SATO, Shoji ASAKURA, Atsushi HAKURA, Naoki KOBAYASHI, Yasushi OKAMOTO and Kazuo TSUKIDATE. Drug Safety Research Laboratories and Chemistry Unit 4, Eisai Co., Ltd., Tsukuba, 300-2635 Japan.

○Maxwell Afari GYAMFI, 外間 惟夫\*, 安仁屋 洋子

琉球大学医学部保健学科生体機能学,\*附属病院薬剤部

In this study the effect of the aqueous extract of *Thonningia sanguinea* on 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD, P450 1A1), 7-pentoxoresorufin O-dealkylase (PROD, P450 2B1), 7-methoxyresorufin O-demethylase (MROD, P450 1A2), aniline hydroxylase (Aniline, P450 2E1) and erythromycin N-demethylase (ERDM, P450 3A1) in induced rat liver microsomes was studied. While *T. sanguinea* extract increased ERDM activity, it showed a dose-dependent inhibitory effects on other P450 monooxygenase activities particularly, EROD and PROD which are mediated primarily by P450 1A1 and P450 2B1 respectively. Kinetic analysis of P450 activity of 3-methylchloranthrene-induced microsomes demonstrated that *T. sanguinea* inhibited EROD and MROD activities by a non-competitive and competitive mechanism, respectively. The analysis of alterations produced by *T. sanguinea* on PROD kinetic parameters in phenobarbital-induced microsomes suggested that the inhibition is non-competitive. Pretreatment of rats with *T. sanguinea* prolonged pentobarbital and phenobarbital sleeping time, however plasma phenobarbital concentration determined on awakening showed no significant difference between control and *T. sanguinea* treated rats. *T. sanguinea* was also found to be a potent inhibitor of the liver cytosolic glutathione S-transferase. The observed P450 iso-enzyme selective inhibitory properties of *T. sanguinea* might help explain previously observed hepatoprotective effects of this medicinal herb besides its antioxidative properties.

Inhibitory effects of the medicinal herb, *Thonningia sanguinea* on liver drug metabolizing enzymes of rats.

Maxwell Afari GYAMFI, \*Nobuo HOKAMA and Yoko ANIYA

Dept. of Physiology & Pharmacology, School of Health Sciences, \*Hospital Pharmacy  
Faculty of Medicine, University of the Ryukyus, Nishihara, Okinawa 903-0215, Japan.

○宮内 慎<sup>1</sup>、西川秋佳<sup>1</sup>、古川文夫<sup>1</sup>、中村英明<sup>1</sup>、孫 和永<sup>1</sup>、内田浩二<sup>2</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>名古屋大学生命農学研究科 食品機能化学

【目的】アクロレインは脂質過酸化物の 1 つであり、近年酸化ストレスの指標として注目されている。今回、脂質過酸化物の産生と細胞障害との関連および指標としての有用性を調べるため、ラット四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) 誘発肝細胞障害モデルを用いて、免疫組織化学的にアクロレインを経時的に検索した。また、*N*-acetylcysteine (NAC) の影響も合わせて検討した。【方法】6 週齢の雄性 F344 ラットに、1 群及び 2 群は 2500 mg/kg の CCl<sub>4</sub> を経口投与し、2 群は四塩化炭素投与前 72 時間から 1% の NAC を混餌投与した。3 群はコーン油のみを投与し、対照群とした。投与後 1, 2, 4, 6, 24, 48, 72 時間に剖検し、肝臓の病理組織学的検索およびアクロレイン修飾蛋白に対する抗体で免疫染色を行った。

【結果】病理組織学的検索の結果、1 群および 2 群では、投与後 4 時間で軽微な単細胞壊死が、投与後 24 および 48 時間で重度の広範壊死が認められ、72 時間では壊死は軽減していた。アクロレイン陽性細胞は、1 群および 2 群で投与後 4 時間で小葉中間部に認められ、6 時間ではびまん性に認められた。24 時間では小葉中心部に認められ、脂肪変性した細胞では特に強かった。48 時間以降では陽性細胞数はほとんど認められなかった。NAC は CCl<sub>4</sub> 誘発肝細胞壊死および脂質過酸化に影響しなかった。【考察】アクロレイン陽性細胞はすでに報告されている HNE と同様に壊死の前に発現し、経時的にその数および発現部位が変化した。また、本免疫染色は酸化ストレスの関与した細胞障害の指標として有用であることが示唆された。NAC の影響については、投与量、投与時期を考慮する必要がある。

Sequential observation of acrolein-modified protein and effect of *N*-acetylcysteine in rat livers treated with carbon tetrachloride

Makoto MIYAUCHI<sup>1</sup>, Akiyoshi NISHIKAWA<sup>1</sup>, Fumio FURUKAWA<sup>1</sup>, Hideaki NAKAMURA<sup>1</sup>, Hwa-Young SON<sup>1</sup>, Koji UCHIDA<sup>2</sup> and Masao HIROSE<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Division of Pathology, National Institute of Health Sciences, Tokyo 158-8501, and <sup>2</sup>Laboratory of Food and Biodynamics, Nagoya University Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya 464-8601, Japan

KK-A<sup>y</sup>マウスにおける糖尿病性腎症の発症時期に関する検討

○植田山美, 勝田 修, 海上 智

三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所

【目的】KK-A<sup>y</sup>マウスは高血糖, 高インスリン血症および低耐糖能などを示すインスリン非依存型糖尿病モデル動物である。KK-A<sup>y</sup>マウスが糖尿病性腎症を発症することは知られているが, 発症時期については詳細な検討が行われていない。今回, KK-A<sup>y</sup>マウスにおいて糖尿病性腎症の発症時期について検討を行った。

【方法】雄性KK-A<sup>y</sup>マウスおよび対照として用いた雄性C57BL/6J (C57BL) マウスは, 通常的环境下で個別飼育した。体重, 摂餌量, 摂水量, 血糖および尿中アルブミン濃度は4週齢から2または3週間毎に, 血清中の総蛋白, 尿素窒素, グレアチニン, インスリン濃度は12, 18および26週齢時に測定を行った。また, 腎臓の組織学的検査は12, 18および26週齢時に行った。

【結果および考察】KK-A<sup>y</sup>マウスの血糖値は6週齢でC57BLマウスより約2.3倍高く, 12~24週齢では2.9~4.5倍の高値であった。血清インスリン濃度もKK-A<sup>y</sup>マウスではC57BLマウスよりも18週齢で106倍高値であった。尿中アルブミン濃度はC57BLマウスと比較してKK-A<sup>y</sup>マウスでは4週齢ですでに約8倍高く, 12~24週齢で35~70倍もの高値を示した。腎臓の組織学的検査では, KK-A<sup>y</sup>マウスでは18週齢時に全例でび慢性の糸球体メサンギウム増生像がみられ, Capsular drop 様の滲出性病変も大半の動物で限局性に認められた。26週齢時にはこれらの変化がやや進行していた。しかし, C57BLマウスではいずれの週齢でも明らかな組織学的変化は認められなかった。以上のことから, KK-A<sup>y</sup>マウスでは6週齢時からすでに高血糖, 高アルブミン尿がみられ, 18週齢時には組織学的に全例で腎症が発症していることが明らかとなった。

The Study on Critical Stage of Diabetic Nephropathy in Yellow KK Mice.

Yumi MAKITA, Osamu Katsuta, and Satoshi UNAKAMI, Kashima Laboratory,  
Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd., Ibaraki, 314-0255, Japan.



イブプロフェン配合剤により惹起されたラット腎障害におけるアセトアミノフェンならびにカフェインの影響

○若松昭秀, 大林繁夫, 清水賢治

グレラン製薬株式会社 研究開発本部 開発研究所

【目的】 イブプロフェン(IP)とアセトアミノフェン(AA)を2:1で配合した場合、鎮痛効果の増強と胃障害の軽減が確認された。さらに、臨床において鎮痛効果の増強が認められているカフェイン(CF)を追加し、一般用解熱鎮痛薬承認基準よりIP:AA:CFの配合比を150:65:80とし、雄性ラットを用いた4週間反復経口投与毒性試験を実施したところ、用量依存的な腎乳頭壊死の発現がみられた。そこで、主薬であるIPにAAならびにCFを配合することによる、ラット腎障害発現の変化について検討した。【方法】 使用動物は6週齢のCrj:CD(SD)系雄性ラットとし、1群5匹とした。投与群は、対照(0mg/kg)群、IP(150mg/kg)群、IP(150mg/kg)+AA(65mg/kg)群、IP(150mg/kg)+CF(80mg/kg)群およびIP(150mg/kg)+AA(65mg/kg)+CF(80mg/kg)群とし、投与期間は2週間、投与経路は経口とした。投与14日目に尿検査、また、翌日に血液化学的検査および病理組織学的検査を実施した。【結果】 IP+CFおよびIP+AA+CF群では、尿量の増加と尿潜血が、IP+CF群ではさらにBUNの上昇がそれぞれみられた。病理組織学的検査において、腎乳頭壊死がIP群の1例、IP+CF群の5例およびIP+AA+CF群の3例にそれぞれみられた。【結論】 今回の配合比における腎障害の程度は、IP+CF群>IP+AA+CF群>>IP群≧IP+AA群>対照群の順に強く現れ、IPとCFを配合することで腎障害が著しく増悪した。また、IPにAAを配合すると腎に対する影響は変化がみられないが、CFの配合によって現れる腎障害を抑制する傾向がみられることが示された。

The influence of acetaminophen and/or caffeine on renal impairment of rats caused by ibuprofen mixture.

Akihide WAKAMATSU, Shigeo OHBAYASHI and Kenji SHIMIZU  
Research Center, Grelan Pharmaceutical Co., Ltd. Tokyo 205-8501, Japan

## 尿細管腔内に結晶状物質を伴う腎障害の発現機序

○吉田 千春, 渋谷 孝代, 尾崎 秀次, 柴崎 義明, 早坂 弘康,  
庄司 陽子, 黒沢 亨, 仲由 武貴

明治製菓株式会社 薬品総合研究所

注射用抗血小板薬 ME3277 のラットを用いた 28 日間反復投与毒性試験において、腎の尿細管腔内に結晶状物質を伴う組織変化（尿細管の拡張、上皮細胞の変性・壊死・再生、炎症細胞浸潤等）が観察された。そこで今回は、ME3277 による腎障害の発現機序について検討したので報告する。

ME3277 を SD ラットに 1 日 1 回で 1, 3, 7 または 14 日間静脈内投与して尿検査と腎の病理組織検査を実施した。その結果、尿中には結晶が観察され、LC/MS で分析したところ、ME3277 であることが確認された。尿量は投与 3 日目以降増加し、尿中 ALP、NAG 活性は投与 3 日目に上昇した。顕微鏡観察では尿細管腔内の結晶状物質と、それに伴う組織変化がおおむね全例に認められ、変化の程度は 3 日投与群から 14 日投与群まで著しい差はなかった。この様に、ME3277 の腎障害は反復投与の初期に被験物質が尿細管腔内に析出することに起因して発現すると考えられた。一方、ME3277 は内因性ヒスタミン遊離作用を有し、反復投与初期にはヒスタミンに基づく症状（発赤・浮腫・チアノーゼ・活動性の低下等）が観察される。そこで、ヒスタミン遊離と腎障害の関連性を想定し、ME3277 を SD ラットに 1 日 1 回 3 日間投与するとともにジフェンヒドラミンを併用（ME3277 の 1 時間前に皮下投与）した。その結果、ME3277 投与による上記の症状はジフェンヒドラミンにより著しく軽減した。この時の剖検及び顕微鏡観察では腎に結晶は観察されず、組織変化もほとんどみられなかった。また、尿中 ALP、NAG 活性の上昇も抑制された。

以上のことから、ラットに ME3277 を大量投与すると尿中に排泄された被験物質が尿細管の水分再吸収過程で析出し、尿細管の閉塞性腎障害を引き起こすと考えられ、その過程には投与初期の内因性ヒスタミン遊離が関与すると推測された。

## Study on renal toxicity accompanied by intratubular crystalline substances

Chiharu YOSHIDA, Sachyo SHIBUTANI, Syuji OZAKI, Yoshiaki SHIBAZAKI,  
Hiroyasu HAYASAKA, Yoko SHOJI, Tohru KUROSAWA and Takemi NAKAYOSHI  
Toxicology Lab., Meiji Seika Kaisha Ltd., Kanagawa, 222-8567, Japan

多選択性有機アニオントランスポータを介したMethyl mercury-cysteine抱合体の輸送

車碩鎭、関根孝司、金徒慶、武田理夫、金井好克、遠藤仁

杏林大学医学部薬理学教室

メチル水銀は重金属の内最も有毒な元素の一つである。電荷を持つ水銀はシステインあるいはチオール基と高い親和性を持つため生体内において重要な役割を果たしている蛋白質などと結合し有害な影響を及ぼしている。そのメチル水銀による毒性発現はおもに腎臓、神経系及び胎児の発達の課程で表れることが知られており、無機水銀及び有機水銀のシステイン抱合体の体内への輸送経路として有機アニオン輸送体の関与が考えられてきた。最近われわれは分子クローニングにより、腎臓及び脳より基質多選択性有機アニオントランスポーター (OAT) 1及び3の2つのアイソフォームのクローニングに成功した。本研究では、OAT1及びOAT3を用いてメチル水銀及びメチル水銀とシステイン抱合体の輸送特性及び細胞毒性をアフリカツメガエル卵母細胞と遺伝子安定発現細胞で検討した。メチル水銀及びメチル水銀とシステイン抱合体の取り込みはOAT3を発現したアフリカツメガエル卵母細胞のみに対し有意な増加を示し、この取り込みは容量依存的であった。OAT3遺伝子安定発現細胞を用いたメチル水銀及びメチル水銀とシステイン抱合体の細胞毒性をMIT法を用いて検討した結果メチル水銀及びメチル水銀とシステイン抱合体による細胞毒性は時間及び容量依存的であり、メチル水銀とシステイン抱合体による細胞の生存率はメチル水銀に比べ有意な低下が認められた。免疫組織学検討でOAT3は腎臓の血管側に染色が認められた。以上の結果よりメチル水銀とシステイン抱合体はOAT3を介し輸送されその毒性を表すことか示唆された。

Transport of methyl mercury-cysteine conjugate by multispecific organic anion transporter

Seok Ho Cha, Takashi Sekine, Do Kyung Kim, Michio Takeda, Yoshikatsu Kanai and Hitoshi Endou

Department of Pharmacology and Toxicology, Kyorin University School of Medicine, 6-20-2 Shinkawa, Mitaka, Tokyo 181-8611, Japan

マウスにおける塩化カドミウムの催奇形作用に対するグルタチオン前駆物質、N-アセチルシステインの防御効果

○納屋聖人, 飯田 茂, 原 卓司, 安田峯生\*

協和発酵工業株式会社安全性研究所

\*広島大学医学部第一解剖学教室

グルタチオン(GSH)は生体内異物に対して解毒作用を有する物質で、我々はこれまでにマウスやラットを用いて外因性の GSH が 5-フルオロウラシルや塩化カドミウム(Cd)の催奇形作用を抑制することを確認している。今回は GSH の前駆物質である N-アセチルシステイン(NAC)について、Cd の催奇形作用に対する軽減効果を検討したので報告する。

【方法】Slc:ICR マウスを交配し、妊娠 7, 10, 11 日(嚢栓発見日=0日)のいずれかに Cd の 3.5 あるいは 5.0mg/kg を腹腔内に投与した。NAC は 160mg/kg を Cd 投与の 2 時間前に静脈内に投与した。妊娠 17 日に母動物を屠殺して胎児をとり出し、外部異常を観察した。

【結果】妊娠 11 日に Cd を投与した場合には Cd 単独投与での口蓋裂、口蓋ヒダの異常、四肢奇形の発現率はそれぞれ 77%, 48%, 14%であった。これに対して NAC を前処理した場合での異常発現率は 19%, 9%, 2%であった。妊娠 10 日の Cd 単独投与での口蓋裂、口蓋ヒダの異常の発現率はそれぞれ 7%, 33%であり、NAC を前処理した場合には 6%, 10%であった。妊娠 7 日に Cd を投与した場合には外脳が 56%発現し、この条件下では NAC による軽減効果はみられなかった。外脳に対する軽減効果を確認するためには NAC の投与量、前処理時間を変えるなどの更なる検討が必要であると考えられる。

Protective effects of N-acetylcysteine, a precursor of glutathione, on teratogenicity of cadmium chloride in mice.

Masato NAYA, Shigeru HIDA, Takuji HARA and \*Mineo YASUDA. Toxicological Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Ube 755-8501, \* Department of Anatomy, Hiroshima University School of Medicine, Hiroshima 734-8551

## マウスを用いた繁殖毒性試験における一腹仔数の行動発達に及ぼす影響

○田中豊人

東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科

【目的】齧歯類のような多産系の哺乳動物を用いて繁殖毒性試験を行なう場合、一腹仔数が出生後の新生仔の発達や親動物の行動に影響を与えることが考えられる。当研究所では、一腹仔数を調整しない方法を用いてマウスの繁殖毒性試験を行なっているが、その際に一腹仔数が新生仔の発達にどのような影響を及ぼすのかを対照群のデータを基に検証し、実験手法の妥当性について検討する。

【方法】当研究所でこれまでに行なった8つの2世代毒性試験の対照群から得られた74腹仔924匹の仔マウス(Crj: CD-1)について、生後0, 4, 7, 14, 21日に各個体の体重を、生後4, 7, 14日に各個体の行動発達に関する項目を測定した。行動発達の測定項目は正向反射と背地走性は生後4, 7日に、断崖回避は生後7日に、遊泳試験(方向・頭角度・四肢の動き)は生後4, 14日に、嗅覚性指向反応は生後14日に測定した。仔体重については各腹仔の平均値を、行動発達については各時期のエンドポイントに達した仔の頻度(比率)を雌雄別に各腹仔の代表値として用いた。一腹仔数と仔体重の関係と一腹仔数と行動発達の関係については回帰分析を行ない、仔体重を行動発達の関係については相関分析を行なった。

【結果】仔体重は雌雄ともに授乳期間を通して一腹仔数の増加とともに成長が抑制され、回帰分析の結果は各時期ともに決定係数( $r^2$ )は0.5以上で $P<0.01$ で有意であった。一腹仔数と行動発達では各測定項目とも回帰分析の結果、決定係数( $r^2$ )は0.5未満であり、有意な結果が得られなかった。仔体重と行動発達では雄の生後4日の遊泳試験の方向で弱い相関が見られたが、その他の項目には相関が見られなかった。以上の結果から、一腹仔数が仔マウスの行動発達に殆ど影響を与えないことが確認された。

Effects of litter size on behavioural development in two-generation toxicity studies in mice.

Fuyohito TANAKA, Department of Toxicology, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, 3-24-1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073.

○下村和裕、島田信、藤川香津子、萩原美代子、原田滋雄、古澤和久

第一製薬株式会社 安全性研究所

【目的】薬物による精巣毒性発現におけるテストステロン(T)の関与を評価する試験系の作出を試みた。

【材料および方法】まず、T粉末を詰めた外径3mmのシリコンチューブ2.5、5、20または40cmを12週齢のSlc:SDオスラットの背部皮下に4週間埋め込み血清および精巣中Tの測定、精巣、精巣上体および前立腺重量の測定、精巣内精子頭部数(SHC)の測定ならびに組織学的検査を行った。次に、T低下により精巣障害を起こすエチニールエストラジオール(EE)10mg/kgを無処置ラット(EE群)およびTチューブ40cm埋め込みラット(EE+T群)に4週間経口投与し、同じ検査を行った。

【結果および考察】2.5および5cm群では精巣重量およびSHCの低値、生殖細胞の変性および精子停留などがみられ、精子形成は維持されていなかった。20および40cm群では精巣および精巣上体重量ならびにSHCは対照群と同程度であり、生殖細胞にも変化はみられず、精子形成は維持されていた。

EE群では血清および精巣Tがほとんど検出できず、精巣、精巣上体および前立腺重量は低値を示した。SHCは0であり、精細管の萎縮、精子細胞の消失、生殖細胞の変性および精子停留がみられた。一方、EE+T群では血清および精巣Tは高いレベルを示した。精巣、精巣上体および前立腺重量の減少は認められず、SHCも対照群と同程度であった。組織学的検査でも変化はみられなかった。

以上、EEによる精巣障害はTの補充により防止できたことから、T低下にともなう変化であることが確認できた。今回の試験系は精巣障害の機序を検討する際に、Tの関与を明らかにすることが出来る有用な系であると考えられた。

Evaluation of testosterone participation in the appearance of testicular toxicity

Kazuhiro SHIMOMURA, Makoto SHIMADA, Katsuko FUJIKAWA, Miyoko HAGIWARA, Shigeo HARADA and Kazuhisa FURUHAMA. Drug Safety Research Laboratory, Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd., Edogawa-ku, Tokyo, 134-8630

Continuous Intravenous Infusion of Rats for Fertility and Early Embryonic Development Studies - Paternal and Maternal Data

Keith ROBINSON, Cedric GORDON and Lorri PINSONNEAULT

ClinTrials BioResearch Ltd., Senneville, Quebec, Canada

Continuous intravenous infusion, via an indwelling catheter, is often used in pre-clinical safety evaluation studies to mimic the proposed clinical route and treatment regimen. The feasibility of using this route for fertility and early embryonic development studies (ICH-1) has been established in Sprague-Dawley rats and a number of definitive studies have been performed. Consideration of the control data set from these studies, in comparison to control data from routine studies allows for examination of possible effects of this treatment procedure.

Catheters were implanted into the vena cava, via the femoral vein, of male or female rats under general anaesthesia. The catheter was linked to an infusion pump and attached, via a swivel, to the outside of the cage. The animals were then infused at rates of between 0.5 to 2.0 ml/kg/h for the treatment period; males were treated for 28 days prior to mating, throughout mating and until necropsy. Females were treated for 14 days prior to mating, during mating and up to gestation day 7. Treated males were mated with untreated (uncatheterized) females and treated females were mated with proven breeder males. A cesarean section was performed on gestation Day 13 or 20 for the females (treated and untreated) and male reproductive assessments (including epididymal sperm analysis) were performed at necropsy for the treated males.

The males and females treated by continuous intravenous infusion showed no differences of significance for reproductive parameters. It was concluded that fertility studies performed with continuous intravenous infusion treatment provided data comparable to that of studies performed using routine dosing methods.

Continuous Intravenous Infusion of Rats for Fertility and Early Embryonic Development Studies - Paternal and Maternal Data

Keith ROBINSON, Cedric GORDON and Lorri PINSONNEAULT,  
ClinTrials BioResearch Ltd., Senneville, Quebec, Canada

栗原明義、高木広瀨、井上忠広、中村勇、木村正明

大正製薬株式会社開発研究所

イヌにおける精子検査は、精液を同一個体から経目的に採取できることから、変化の発現内容と時期及びその回復度を評価する上で有用性が高いとされている。我々は、精巣毒性評価の一環として、イヌ精子検査を当社で実施するに当たり、その方法の細点を検討した。正確な検査データを得るためのキーポイントは以下の通りである。

精液採取：精液を安定して得るために、精液採取の訓練（馴化）及び馴化動物の選別を行うことが必須である。また、採取頻度（間隔）は試験期間中一定がよい。

精子数：精液採取の段階で第2分画のみを正確に取ることは困難であることから、精子数の評価は精子濃度よりも総射出精子数の方が適切であると思われる。

精子運動性：採取から測定までの間、精子運動性の低下を防ぐには37℃よりも低温の方が適している。マイクロセルは夾雑物が多く、検査には不適であった。

精子形態：塗抹後、カバーガラスをかけない方が観察は容易であった。また、精液中の精子は採取後数日経過すると、多数の精子はその尾部がコイル状（どぐろ）になるため、塗抹は採取日に行う必要がある。

セルソフト条件：ブタ精子解析用パラメータを基本に調整したものが目視検査と最も相関していた（Cell size range-low; 6, -high; 40）。

顕微鏡条件：オリンパス製の位相差顕微鏡を用いて精子運動性を観察する場合、対物レンズはオリンパスUPlan FINHの使用を推奨する。

#### Establishment of sperm analysis in dogs

Akiyoshi KURIHARA, Hironori TAKAGI, Tadahiro INOUE, Isamu NAKAMURA and Masaaki KIMURA

Toxicology Laboratory, Pharmaceutical Research Laboratories, Taisho Pharmaceutical Co., Ltd., Omiya, Saitama 330-8530, Japan



マーモセットにおける生殖発生毒性試験法確立のための尿中プロゲステロン代謝物測定法の検討

○真鍋ひろ子, Derek Carnie, 尾根田暁, 伊原敏夫, 永田良一

株式会社新日本科学

マーモセットの交配適期決定のため、HPLCを用いた尿中プロゲステロン代謝物の測定法を検討するとともに腔内電気抵抗を測定した。

マーモセット (*Callithrix jacchus*) 10匹について週3回採尿した。その尿 (100  $\mu$ L) に 1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5, 10  $\mu$ L) 及び  $\beta$ -glucuronidase / arylsulfatase (15  $\mu$ L) を添加し、37°C で 18 - 24 時間反応させた。ジエチルエーテル (2.5 mL) を添加して震とう後遠心 (3,500 rpm, 15 分) し、上層を分取乾固した。残渣をエタノール (100  $\mu$ L) に溶解し、10 mg/mL トリクロロ酢酸 (200  $\mu$ L) と 10 mg/mL dansylhydrazine (100  $\mu$ L) を添加し、暗所で 1 時間反応させた。反応後乾固し、移動層 (100  $\mu$ L) で再溶解後 HPLC で分析した。HPLC の測定条件は、カラム ODS2, 100 x 4.6 mm, 移動層 50 w/v% アセトニトリル/水, 流量 2 mL/min, 蛍光波長 Ex, 350 nm, Em, 520 nm とした。また、腔内電気抵抗はインピーダンスチェッカー (室町機械株式会社) を用いて無麻酔下で測定した。

マーモセットのプロゲステロン主要代謝物である hydroxypregnanolone は 5 例中 2 例では 78 ~ 322  $\mu$ g/mg creatinine をピークに月 1 回の周期性がみられ、2 例では 235 ~ 254  $\mu$ g/mg creatinine のピークが 2 ヶ月に 1 回みられた。このピーク値を指標としてマーモセットの周期性を調べ、交配適期の決定が可能と考えられる。また、腔内電気抵抗の測定では 1.0 k $\Omega$  前後の値が得られたが、周期的に 0.8 k $\Omega$  値が得られた。この値は hydroxypregnanolone 値の増減とほぼ一致していた。

以上の結果からマーモセットの尿中 hydroxypregnanolone 測定と、腔内電気抵抗測定との併用は交配適期の決定に有用な方法であると考ええる。

Evaluation of measurement methods for the determination of urinary progesterone metabolite levels for reproductive and development studies in marmosets

Hiroko MANABE, Derek CARNIE, Satoru ONEDA, Toshio IHARA, Ryoichi NAGATA, Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd., 2438 Miyanoura, Yoshida, Kagoshima 891-1394

○桑形麻樹子<sup>1)</sup>、松本亜紀<sup>1)</sup>、長尾哲二<sup>1)</sup>、赤堀文昭<sup>2)</sup>、小野 宏<sup>1)</sup>

1) (財)食品薬品安全センター・秦野研究所

2) 麻布大学・生物科学総合研究所/獣医学部・薬理

【目的】胎齢 9-15 日に BrdU(BU)を暴露されたラット雄出生児では、自発運動量 [LA]の増加、性行動の減弱など行動異常を示すこと、また、性成熟後、無処置雌と交配させると交尾能の著しい低下が認められることを既に報告した。今回、この雄出生児に認められた [LA]の増加について神経伝達系との関連性を検討した。

【方法】BU 0 (対照群)あるいは 50 mg/kg/day を Cd;CD(SD)IGS ラットの妊娠 9-15 日に腹腔内投与し、自然分娩にて雄出生児を得た。生後 5-10 週に、[LA]および性行動に関与すると考えられている神経伝達物質の拮抗薬を投与し、オープンフィールドにおける移動距離を調べた。拮抗薬は、5-HT<sub>1</sub>あるいは 5-HT<sub>2</sub> 受容体拮抗薬である NAN190 あるいは ketanserin、DA<sub>1</sub>あるいは DA<sub>2</sub> 受容体拮抗薬である SCH23390 あるいは sulpiride を選択し、オープンフィールド試験の実施 1 時間前にいずれも腹腔内投与した。

【結果および考察】NAN190 あるいは ketanserin の単独投与 (BU 0+拮抗薬)により、無処置対照と比較して [LA]は著しく減少した。また、BU+NAN190 投与では BU による [LA]の増加を著しく抑制し、その減少率は NAN190 単独投与による [LA]の減少率とほぼ同値であった。BU+ketanserin 投与では BU による [LA]の増加を抑制しなかった。一方、SCH23390 あるいは sulpiride 単独投与でも、無処置対照に比べ [LA]が減少した。BU+SCH23390 投与により BU による [LA]の増加をわずかに抑制したが、BU+sulpiride 投与では BU による [LA]の増加を抑制しなかった。以上の結果から、胎生期 BU 暴露によってラット雄出生児にみられた行動異常の原因として少なくとも中枢神経伝達系異常の関与が考えられた。

Effects of 5-hydroxytryptamine (5-HT) and dopamine (DA) receptor antagonists on behavioral alterations of male rat offspring elicited by prenatal exposure with 5-bromo-2'-deoxyuridine.

Makiko Kuwagata<sup>1)</sup>, Aki Matsumoto<sup>1)</sup>, Tetsuji Nagao<sup>1)</sup>, Fumiaki Akahori<sup>2)</sup> and Hiroshi Ono<sup>1)</sup>

1) Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center, 2) Azabu University, Research Institute of Bioscience/School of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology

○篠田和俊<sup>1)</sup>、三森国敏<sup>2)</sup>、畷山智香子<sup>3)</sup>、上原正人<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>(財)化学物質評価研究機構・日田事業所、<sup>2)</sup>国立衛研・病理、

<sup>3)</sup>鳥取大学・家畜解剖

【目的】クエン酸回路(TCA 回路)のアコニターゼを阻害するフルオロ酢酸(FA)の投与によって誘発される精巣毒性とアポトーシスの関連性について検討を行った。

【材料と方法】性成熟に達している 10 週齢の雄性 Sprague Dawley ラットに FA を 0.5 あるいは 1.0 mg/kg の用量で単回強制経口投与を行い、投与後 3、6、12、24、48 及び 72 時間後に屠殺解剖して、組織学的ならびに電子顕微鏡的検索、TUNEL 法、DNA ゲル電気泳動を実施した。

【結果及び考察】組織学的検索では造精細胞の変性は投与 6 時間後に精細管ステージ I の初期円形精子細胞、また 12 時間後ではステージ II-IV の精祖細胞で認められた。変性精祖細胞は電子顕微鏡的検索においてアポトーシスの形態学的特徴を示し、また TUNEL 法でも陽性を呈したが、変性精子細胞ではこれらの特徴は認められなかった。投与 24 時間及び 48 時間後では、変性精子細胞は引き続き認められ、その後、多核巨細胞を形成したが、変性精祖細胞は一転して消失し、TUNEL 法においても陽性精祖細胞の出現頻度は対照群に比して有意に減少したことから、精祖細胞のアポトーシスが抑制されていることが示された。DNA ゲル電気泳動においては投与 12 時間後のみにラダーパターンが認められた。以上の結果から、FA による精巣毒性では投与直後に精祖細胞のアポトーシスならびに精子細胞のネクローシスがともに誘発され、その後、精祖細胞のアポトーシスは抑制されることが示された。FA は細胞内 ATP の低下を生じるが、近年、細胞内 ATP 濃度が細胞死のタイプを決定する要因の一つであることが示唆されており、これら精祖細胞及び精子細胞では各々の ATP 産生系における TCA 回路依存性の程度によっていずれかの細胞死を生じたものと推察された。

Induction and inhibition of testicular germ cell apoptosis by fluoroacetate in rats.

Kazutoshi Shinoda<sup>1)</sup>, Kunitoshi Mitsumori<sup>2)</sup>, Chikako Uneyama<sup>3)</sup>, Masato Uehara<sup>1)</sup>. <sup>1)</sup>Hita Laboratories, Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan, <sup>2)</sup>Division of Pathology, National Institute of Health Sciences, <sup>3)</sup>Department of Veterinary Anatomy, Tottori University.

内分泌かく乱化学物質ビスフェノールAの  
ラット培養胎児におよぼす影響

○横山 篤<sup>1</sup>、秋田 正治<sup>1</sup>、清水 茂一<sup>2</sup>、野崎 善弘<sup>2</sup>、志熊 寛大<sup>2</sup>、  
黒田 行昭<sup>3</sup>

<sup>1</sup>鎌倉女子大学・家政学部、<sup>2</sup>㈱富士バイオメディックス、  
<sup>3</sup>国立遺伝学研究所

【目的】 内分泌かく乱化学物質として疑いが持たれているビスフェノールAは、生体においてどのような影響をおよぼすのか、さらにそのメカニズムについても種々の報告があるが、その詳細は不明な点が多い。とくに胎児に対しての影響を検討するためには、さらに多角的に考える必要がある。そこでわれわれは、ビスフェノールAが胎児の発生におよぼす影響を詳細にしらべることを目的とし、全胚培養法を用いて検討している。今回は、器官形成期中期にあたるラット胎児におよぼす影響を調べたので報告する。

【方法】 ラット胎齢11,5日目のラット胎児を48時間培養した。培養液は、100% ラット血清を用い、ビスフェノールAを培養液中に1および100ppmの濃度で添加した。そして48時間培養し、培養した胎児の経時的観察を行った。

【結果・考察】 ビスフェノールAを添加した場合の影響を検討した結果、未処理群と比較し100 ppm 処理群において処理2時間後から心拍動数の低下が認められ、培養48時間後の培養胎児は総体節数の低下、短尾、浮腫、血腫、下顎の低形成などの異常が認められた。1ppm処理群においては、胎児の形態異常は認められなかったが、48時間後の心拍動数の低下と、卵黄囊ならびに胎児の血液循環の低下が確認された。

以上の結果よりビスフェノールAは培養胎児に対し循環系に影響をおよぼし、その後、形態形成に異常が起こると考えられた。さらに今回1ppm処理群においては形態異常は認められなかったが、培養48時間後循環系に異常が確認されたことから、現在ポリカーボネート樹脂製器具等から溶出されるビスフェノールAの基準値 2.5ppmに関して、今後詳細な検討が必要なが示唆された。現在組織学検討を行っており、あわせて報告する。

EFFECTS OF BISPHENOL A ON CULTURED RAT EMBRYOS

Atsushi Yokoyama<sup>1</sup>, Masaharu Akita<sup>1</sup>, Shigekazu Shimizu<sup>2</sup>, Yoshituro Nozaki<sup>2</sup>, Hiro Shikuma<sup>2</sup> and Yukiaki Kuroda<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Kamakura Women's College, Kamakura, Kanagawa, 247-8511, Japan, <sup>2</sup>Fujip Biomedix Co. Ltd., Kitakoma-gun, Yamanashi, 408-0044, Japan and <sup>3</sup>National Institute of Genetics, Mishima, Shizuoka, 411-8540, Japan

○関口総一郎, 須田 恵, 翟 雅麗, 川井さゆり, 本間健資

労働省産業医学総合研究所

【目的】フロンに代替化学物質である 2-bromopropane (2-BP) は、性差に関係無く強い生殖毒性を有することがヒト、マウス、ラットで見出された。これに対し、2-BP の構造類似体である 1-bromopropane (1-BP) および肝・腎毒性を有すると考えられている 1,2-dichloropropane (DCP) は、現在、作業現場において使用されているが、その生殖毒性はほとんど検討されていない。そこで本研究では既知の生殖毒性物質として 2-BP を用い、雌ラットの生殖機能に対する 1-BP および DCP の毒性作用を検討した。【方法】暴露チャンパー内において F344 系ラットは 1-BP または 2-BP の 50, 200 および 1,000 ppm、あるいは DCP の 50, 100 および 200 ppm ガスに 1 日 8 時間、解剖の当日まで連日、暴露された。対照群のラットは同一条件下で空気のみ暴露された。全てのラットは暴露期間を通じ、スメアテストによって性周期を確認され、暴露開始後 21~25 日の期間内の性周期が発情期となる日に解剖された。解剖時には卵巣および子宮の重量を測定し、卵管内の排卵卵子数を計測した。【結果と考察】6 日またはそれ以上の間隔の性周期に着目して、その出現率を検討した結果、DCP の 100 および 200 ppm 暴露群において対照群に比べて有意 ( $P < 0.01$ ) な増加が認められた。また、両群における排卵卵子数は減少し、特に 200 ppm 暴露群では対照群との間で有意差 ( $P < 0.05$ ) が認められた。これら性周期の明らかな遅延および排卵卵子数の明らかな減少は 1-BP または 2-BP 暴露群においては見出されなかった。以上の結果より、本研究で用いた暴露スケジュールにおいては DCP の生殖毒性は 2-BP より低濃度で、より早期に現れることが明らかとなった。従って、DCP は雌性生殖毒性を有する化合物である可能性が示唆された。

#### Toxic Effect of 1, 2-Dichloropropane on Reproductive Function in F344 Female Rats

Soichiro SEKIGUCHI, Megumi SUDA, Ya-Li ZHAI, Sayuri KAWAI, Takeshi HONMA  
National Institute of Industrial Health, Kawasaki, Kanagawa 214-8585

○江馬 眞, 原園 景

国立医薬品食品衛生研究所大阪支所

我々は先に、tributyltin chloride (TBTCI) 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 (Toxicol. Lett., 89, 185-190, 1996; Arch. Environ. Contam. Toxicol., 34, 94-99, 1997)。今回は、TBTCI の代謝物である dibutyltin dichloride (DBTCI) 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 3.8, 7.6 または 15.2 mg/kg の DBTCI 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。また、妊娠 0-3 日または妊娠 4-7 日の 15.2 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 群をもうけて比較した。

妊娠 0-3 日の DBTCI 投与では 7.6 mg/kg の投与で対照群に比べて有意に低い妊娠率及び有意に高い着床前胚死亡率がみられ、15.2 mg/kg の投与で対照群及び Pair-fed 群に比べて有意に低い妊娠率及び有意に高い着床前胚死亡率が認められた。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、生存胎児の数及び体重に DBTCI 投与の影響はみられなかった。妊娠 4-7 日の DBTCI 投与では妊娠率、黄体数及び着床数には DBTCI 投与による影響はみられなかったが、7.6 及び 15.2 mg/kg 投与群の着床後胚死亡率は対照群及び Pair-fed 群に比べて有意に高かった。7.6 及び 15.2 mg/kg 投与群の生存胎児体重は対照群に比べて有意に低かった。

これらから、DBTCI をラットの妊娠初期に投与したとき妊娠率の低下及び胚致死が惹起されることが明らかになった。

Early embryonic loss induced by dibutyltin dichloride in rats.

Makoto EMA and Akira HARAZONO, National Institute of Health Sciences,  
Osaka Branch, Osaka 540-0006

## ラット多臓器の遺伝毒性検出におけるコメットアッセイの有用性

○関橋 薫<sup>1</sup>、前田 貴宣<sup>1</sup>、河村 公太郎<sup>1</sup>、一花 次夫<sup>2</sup>、佐々木 有<sup>3</sup>、  
津田 修治<sup>1</sup>

<sup>1</sup> (株) 化合物安全性研究所、<sup>2</sup> 八戸工業高等専門学校、

<sup>3</sup> 岩手大学獣医学科

コメットアッセイは、DNA 鎖切断または7βが感受性部位のような DNA 損傷をもつ DNA が強いpH下で変性・低分子化することを利用し、DNA 損傷を DNA の低分子化として37°Cで電気泳動で検出する方法であり、その像が彗星のように見えることからこのように呼ばれている。この方法により IARC で1類発癌物質として、NTP で細菌類癌原物質、非癌原物質として評価されたものから選んだ 206 化合物の遺伝毒性を7βの主要 8 臓器で評価し、7βの多臓器における遺伝毒性と細菌類癌原性の相関性を検討してきた。その結果、この試験系は Ames 試験陽性の化合物の癌原性を *in vivo* 遺伝毒性として予測することに有効であることがわかった。しかし、癌原性試験をはじめとする毒性試験ではラットが主に用いられ、7βによって示してきた結果をラットに外挿するためには、両種の差を検討することが重要である。そこで、NTP の癌原性データにおいて種差が示されているものについて遺伝毒性の種差を検討した。7β癌原性・7β非癌原性の Aniline, Azobenzene, *o*-Pgenylphenol, 7β非癌原性・7β癌原性の *p*-Chloro-*o*-toluidine, Chlorodibromomethane, 1,2-Dichloropropane は癌原性の種差にかかわらず両種の複数の臓器で遺伝毒性陽性であった。また、両種癌原物質の陽性反応、両種非癌原物質の陰性反応にも種差は認められなかった。このことから、コメットアッセイで検出できる DNA 損傷の生成には大きな種差がないものと考えられ、コメットアッセイは7βを対象動物としても有用な試験系であると考えられる。

Detection of genotoxicity in multiple rat organs by the comet assay

Kaoru SEKIHASHI, Takanobu MAEDA, Kohtaro KAWAMURA, Tsuguo IKKA, Yoichi SASAKI, and Shuji TSUDA

Hachinohe Natl. Col. Techn., Chemical Safety Res. Co. and Iwate Univ.

## CHL 細胞を用いた染色体異常試験及び小核試験における培養温度の影響

○朝波省吾, 下野和之, 金田信也

株式会社大塚製薬工場 鳴門研究所

**[目的]** 高温培養下において染色体異常の誘発が認められることはすでに知られている。今回、低温領域も含め、培養温度の染色体異常誘発性及び小核誘発性に対する影響を CHL 細胞を用いて検討した。

**[方法]** 染色体異常試験は、培養 3 日目に 31, 33, 40 および 42°C で 1-23, 2-22, 3-21, 6-18 および 24-0 時間(Treatment-Recovery time)処理後、標本を作製した。小核試験では、培養 2 日目に 31, 33, 40 および 42°C で 1-47, 2-46, 3-45, 6-42 および 24-24 時間(Treatment-Recovery time)処理後、標本を作製した。

**[結果]** 染色体異常試験では、40°C の 24-0 時間処理、42°C の 6-18 及び 24-0 時間処理において異常を有する細胞の出現頻度に有意な上昇が認められた。小核試験では、31 及び 33°C の 24-24 時間処理、40°C の 24-24 時間処理、42°C の 2-46 時間以上の処理において異常を有する細胞の出現頻度に有意な上昇が認められた。

**[結論]** 高温培養下においては、染色体異常誘発性が認められ、また小核誘発性についても同様に認められた。低温培養下においては、染色体異常誘発性は認められなかったが、小核誘発性は認められた。染色体異常のひとつである異数体の誘発条件として、高温及び低温暴露が知られている。また小核試験では異数体を検出できる可能性があることから、低温培養下における小核出現頻度の上昇は紡錘体機能の阻害が関与しているものと考えられた。一方、高温培養下においては、紡錘体機能の阻害だけでなく、染色体切断作用を含む染色体構造異常が誘発されるので、小核試験と共に染色体異常試験においても陽性結果が得られたものと考えられた。

Effects of temperature on the frequencies of chromosome aberrations and micronuclei in CHL cells

Shougo ASANAMI, Kazuyuki SHIMONO, and Shun-ya KANEDA

Naruto Research Institute, Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc., Tokushima, 772-8601, Japan.



クロロホルムの経口暴露と吸入暴露を組み合わせた投与  
 (複数媒体投与) によるラット肝臓の酵素活性

○ 笠井辰也、武 信、竹内哲也、西沢共司、山本静護、松島泰次郎

中央労働災害防止協会・日本バイオアッセイ研究センター

【目的】クロロホルムの複数媒体暴露による影響を明らかにする目的で経口暴露(飲水投与)と吸入暴露を組み合わせた投与(複数媒体投与)による試験を実施し、肝臓の酵素活性を検討した。

【方法】ラットの雄 40 匹を 2 群に分け、一方には飲水にクロロホルムを 1000ppm の濃度で混入し、他方には脱イオン水のみを与えた。これらの 2 群をそれぞれ 4 群に分け(各群 5 匹)、そのうち 3 群に対して、クロロホルムを 25, 50, 100ppm の濃度で吸入暴露し、1 群に対して新鮮空気のみを暴露した。暴露を 5 週間行った後、常法に従って、肝ミクロゾーム、肝サイトゾールを調製しそれぞれの蛋白量を測定した。肝ミクロゾームについてはチトクローム p450, b5 及びアニリン水酸化活性を測定した。肝サイトゾールについては GSH 量、GST 活性を測定した。また各群毎に調製した肝ミクロゾームまたは肝サイトゾールを密封容器内でクロロホルムガスと 37°C、15 分間のインキュベーションを行い、クロロホルムの消費速度を比較した。

【結果と考察】肝ミクロゾームのチトクローム p450 は吸入暴露と飲水投与を合わせた群で吸入暴露濃度に相関して減少した。アニリン水酸化活性は吸入暴露のみの群及びこれに飲水投与を合わせた群で、暴露濃度に対応して増加がみられた。肝サイトゾールの GSH 量は吸入暴露のみでも、これに飲水投与を合わせた群でも暴露濃度に対応して増加し、GST 活性もこれに対応して増加した。肝ミクロゾーム及びサイトゾールにおけるクロロホルムの消費速度は吸入暴露のみでも濃度に対応して上昇し、これに飲水投与を合わせるとさらに上昇がみられた。このクロロホルムの消費速度の上昇は肝ミクロゾームに比べて肝サイトゾールで顕著であった。

Multiple-route Exposure Effects of Chloroform on Rat Liver Microsomes and Cytosol Activity

Tatsuya KASAI, Makoto TAKE, Tetsuya TAKEUCHI, Tomoshi NISHIZAWA,  
 Seigo YAMAMOTO and Taijiro MATSUSHIMA.

Japan Bioassay Research Center, Japan Industrial Safety & Health Association,  
 Hadano 257-0015, Japan.

クロロホルムの F344 ラットを用いて経口暴露と吸入暴露を  
組み合わせた投与による長期毒性

○加納浩和、松本道治、山崎一法、鈴木正明、野口幸義、長野嘉介、  
山本静護、松島泰次郎

中央労働災害防止協会・日本バイオアッセイ研究センター

【目的】クロロホルムの複数媒体暴露による影響を明らかにする目的で経口暴露（飲水投与）と吸入暴露を組み合わせた投与（複数媒体投与）による長期毒性試験を実施し、血液・生化学パラメーター、病理組織学的変化を検討した。

【方法】動物は6週齢の F344/DuCrj (Fisher) ラットの雄を用いた。群の構成については、400匹の動物を2群に分け、一方には飲水にクロロホルムを1000ppmの濃度で混入し、他方には脱イオン水のみを与えた。これらの2群をそれぞれ4群に分け（各群50匹）、そのうち3群に対して、クロロホルムを25, 50, 100ppmの濃度で吸入暴露し、1群に対しては新鮮空気のみを暴露した。暴露は2年間行った。

【結果と考察】(1)血液・生化学的検査では、トリグリセライド、リン脂質、GOT、GPT に、各投与経路で変化がみられるが、その程度は吸入のみ、または経口のみと比較して複数媒体投与群での変化がより増強した。尿素窒素は複数媒体投与でのみ増加が認められた。尿検査ではグルコースに複数媒体投与のみに顕著な変化がみられた。(2)非腫瘍性病変では腎臓の異型尿細管過形成、炎症性細胞集簇、好塩基性変化、尿細管腔拡張、近位尿細管核増大、肝臓の炎症性細胞集簇、脂肪変性、鼻腔の嗅上皮の萎縮、甲介の癒着など複数媒体投与のみでみられるか、あるいは吸入、経口のいずれの投与でもみられるものが複数媒体投与でその変化が増強した。(3)腫瘍性病変では、腎臓に腎細胞腺腫と腎細胞癌、甲状腺に濾胞状腺腫と濾胞状腺癌の発生増加が認められた。これらの腫瘍はこの用量の吸入または飲水投与のみではみられず複数媒体投与により増強される可能性を示すと考えられた。本研究は環境庁の委託により実施した。

Long-term Toxicology Study of Chloroform in the F344 Rats by Multiple-route Exposure (Drinking Water and Inhalation)

Hirokazu KANOU, Michiharu MATSUMOTO, Kazunori YAMAZAKI, Masaki SUZUKI, Takayoshi NOGUCHI, Kasuke NAGANO, Seigo YAMAMOTO and Taijiro MATSUSHIMA, Japan Bioassay Research Center, Japan Industrial Safety & Health Association, Hadano 257-0015, Japan.

1,4-ジオキサン の F344 ラット を用いて経口暴露と吸入暴露を  
組み合わせた投与による長期毒性

○山本静護、大澤護、西沢共司、斎藤新、笠井辰也、野口孝義、  
長野嘉介、松島泰次郎

中央労働災害防止協会・日本バイオアッセイ研究センター

【目的】1,4-ジオキサンの複数媒体暴露による影響を明らかにする目的で経口暴露（飲水投与）と吸入暴露を組み合わせた投与（複数媒体投与）による長期毒性試験を実施し、血液・生化学パラメーター、病理組織学的変化を検討した。

【方法】動物は6週齢のF344/DuCrj (Fisher) ラットの雄を用いた。群の構成については、400匹の動物を2群に分け、一方には飲水に1,4-ジオキサンを1000ppmの濃度で混入し、他方には脱イオン水のみを与えた。これらの2群をそれぞれ4群に分け（各群50匹）、そのうち3群に対して、1,4-ジオキサンを50、250、1250ppmの濃度で吸入暴露し、1群に対しては新鮮空気のみを暴露した。暴露は2年間行った。

【結果と考察】(1)血液・生化学的検査では、GOT、GPT、 $\gamma$ -GTPに吸入暴露の1250ppmに飲水投与を合わせた群で増加がみられた。このうち $\gamma$ -GTPは吸入暴露のみの1250ppm群でも増加した。しかし個体差もあり、複数媒体投与の影響は明らかでなかった。(2)非腫瘍性病変では鼻腔で篩骨甲介の骨過形成、鼻腺の増殖、扁平上皮過形成、固有層の硬化と水腫様変性および鉍質沈着の発生増加が吸入暴露で起こり、飲水投与のみでは認められないが、複数媒体投与により発生が増加した。また、肝臓の海绵状変性と腎臓の近位尿細管の核増大の発生増加は、吸入あるいは飲水だけの投与で認められ、複数媒体投与群では変化がより増強した。(3)腫瘍性病変では、鼻腔の腫瘍、腹膜の中皮腫及び肝臓の肝細胞腺腫と肝細胞癌の発生増加が認められた。これらの腫瘍の中で鼻腔の腫瘍については、吸入のみでは扁平上皮癌だけであったが、これに飲水投与を合わせると扁平上皮癌の他に腺癌の発生が認められた。本研究は環境庁の委託により実施した。

Long-term Toxicology Study of 1,4-Dioxane in the F344 Rats by Multiple-route Exposure (Drinking Water and Inhalation)

Seigo YAMAMOTO, Mamoru OHSAWA, Tomoshi NISHIZAWA, Arata SAITO, Tatsuya KASAI, Takayoshi NOGUCHI, Kasuke NAGANO and Taijiro MATSUSHIMA.

Japan Bioassay Research Center, Japan Industrial Safety & Health Association, Hadano 257-0015, Japan.

p53(+/-)C57BL/6 および p53(+/-)CBA マウスにおける phenolphthalein  
の発がん感受性

○小野寺博志、三森国敏、高木久宜、安原加壽雄、田村啓、広瀬雅雄、  
玉置憲一<sup>1</sup>、野村達次<sup>1</sup>

国立医薬品食品衛生研究所・病理部、<sup>1</sup>実験動物中央研究所

近年、ICH の合意によりマウス発がん性試験の代替として遺伝子改変動物を用いた短期発がん性試験が容認された。遺伝子改変マウスは現在、多くの検証作業が進められており、遺伝毒性発がん物質について標的臓器は必ずしも一致しないものの発がん性については従来の長期実験結果と一致した結果が得られている。phenolphthalein(ph) は、Ames 試験が陰性。染色体異常および小核試験が陽性で、がん原性試験では F344 ラットの腎と副腎、B6C3F1 マウスで造血器系と卵巣に腫瘍を誘発し、p53 の片側アレルの exon 5 をノックアウト(KO)した C57BL/6 マウス(p53(+/-)TSG マウス)での 6 ヶ月の実験においてもリンパ腫を誘発することが知られている。しかし、rasH2 マウスを用いた我々の実験で ph はいずれの組織にも腫瘍は誘発されなかった。遺伝毒性発がん物質に感受性が高いとされる p53KO マウスについては、我が国では p53 片側アレルの exon 2 を KO した CBA マウス(p53(+/-)CBA マウス)と exon 5 を KO した C57BL/6 マウス(p53(+/-)CIEA マウス)が供給されているが、これらのマウスに対する ph の発がん感受性は明確にされていない。今回、同じ p53(+/-)KO マウスにおいても発がん感受性が同じであるか否かを明らかにするために以下の実験を行った。

雌雄の p53(+/-)C57BL/6J(CILA (実中研)) と p53(+/-)CBA(オリエンタル酵母)およびそれらの同腹の Wild マウスを用い、ph を 6000 および 12000ppm の濃度で基礎飼料に混じり 26 週間自由に与えた。実験期間中に ph に起因すると思われる体重増加抑制や死亡動物は認められなかった。雌雄とも各投与群で造血器系を含めいずれの組織も投与に関連する腫瘍の増加は認められなかった。以上の結果より、同じ p53(+/-)マウスでも遺伝子改変操作や系統の違いにより発がん感受性が異なることが示唆された。

Carcinogenic susceptibility of phenolphthalein in heterozygous p53 deficient  
C57BL/6 and CBA mice

Hiroshi ONODERA, Kunitoshi MITUSMORI, Hisayoshi TAKAGI, Kazuo  
YASUHARA, Hajime TAMURA, Masao HIROSE, Kenji TAMAOKI<sup>1</sup>, Tatsuji  
NOMURA<sup>1</sup> (Div. Pathol., Natl. Inst. Health Sci., <sup>1</sup>Cent. Inst. Lab. Anim.)

rasH2 マウスにおける *t*-Butylhydroquinone の単独投与ないし  
亜硝酸との併用投与による前胃粘膜への影響

○安原加壽雄, 三森国敏, 梶谷高敏, 小野寺博志, 高木久宜, 田村啓,  
広瀬雅雄

国立医薬品食品衛生研究所・病理部

【目的】*t*-Butylhydroquinone(TBHQ)はラットやマウスでの発癌性試験では陰性であるが、マウスへの 13 週間混餌投与では前胃に過形成が発生する。また、ラットでは TBHQ と亜硝酸との併用投与により短期間で前胃に過形成が誘発され、発癌性も疑われている。今回、短期発癌試験系の動物モデルとして前胃発癌に感受性が高いとされているヒトプロト型 *c-Ha-ras* 遺伝子を導入した CB6F1 トランスジェニックマウス (rasH2 マウス) を用いて TBHQ 単独投与ないし TBHQ と亜硝酸との併用投与に対する前胃粘膜への影響を検討した。

【方法】実験 I : 雌雄の rasH2 マウスおよび同腹仔の非遺伝子導入 CB6F1 マウス (Non-Tg マウス) に 0, 2500 ないし 10000ppm の TBHQ 混餌飼料を 26 週間自由に摂取させた。実験 II : 上記マウスに 5000ppm TBHQ 混餌飼料, 0.2% 亜硝酸水, TBHQ 混餌飼料と亜硝酸水あるいは基礎飼料を 26 週間自由に摂取させた。

【結果】実験 I : TBHQ 投与に起因する増殖性病変の誘発は前胃に認められなかった。実験 II : TBHQ と亜硝酸との併用投与群の腺胃/前胃境界部に扁平上皮の過形成が rasH2 マウスの雄で 62%, 雌で 46% および Non-Tg マウスの雄で 18%, 雌で 12% に認められ、雌雄ともに rasH2 マウスで有意に増加した。しかし、腫瘍性病変の発生はいずれの群にも認められなかった。

【考察】rasH2 マウスは前胃発癌に感受性が高いことが報告されている。今回、TBHQ 単独では過形成が発生せず、亜硝酸との併用投与のみで弱い過形成が認められたことは、TBHQ は亜硝酸との併用投与においても発癌性を示す可能性は低いことが示唆された。

Effect of *t*-butylhydroquinone and sodium nitrite alone or in combination on the forestomach of rasH2 mice.

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

○池田博信、福田好造、堤 宏植、丹治景子、左近上博司、西森司雄  
鈴木 潤

株式会社 環境バイリス研究所

【目的】近年、医薬品による心電図 QT 間隔の延長、更に続いて起こる torsades de pointes とよばれる心室性不整脈による突然死が問題になっている。心電図の QT 間隔は心室筋の単相性活動電位 (monophasic action potential : MAP) 持続時間の平均値を表している。QT 間隔は心拍数に依存するため、その計測には修正 QT 間隔を利用してきた。しかし、QT 間隔の計測や QTc 算出にはさまざまな問題がある。今回、MAP の 90% 再分極持続時間 (MAP<sub>90</sub>) を計測し、MAP<sub>90</sub> 測定の標準的方法について検討した。

【方法】チオペンタール (30 mg/kg, i. v.) 麻酔下にイヌを背位固定、気管カテーテルにより気道を確保した。1% ハロタン麻酔下、大腿静脈に 8F シースを挿入し、静脈を確保した。シースを介して、MAP/pacing カテーテル (EPT) を右心室に導き、右心室筋へ押し当てた。MAP/pacing カテーテルは MAP DC-COUPLED ISOLATED PREAMPLIFIER (EPT) を介して生体アンプ (AB-621G, 日本光電) へ導き、また体外心電図を第 II 誘導で心電図アンプ (AC-601G, 日本光電) を介して計測した。得られた生体信号は AD 変換 (MP-100WS) 後、循環動態解析ソフトウェア MP/VAS3 Ver. 1.6 (フィジオテック) を用いて MAP<sub>90</sub> を算出した。

【結果】抗ヒスタミン剤 astemizole の 0.3~3 mg/kg, i. v. および 5-HT<sub>4</sub> 受容体活性化作用を持つ消化管運動改善薬である cisapride の 0.01~1 mg/kg, i. v. は用量増加に伴い MAP<sub>90</sub> を延長した。その他の薬物についても陽性対照候補物質として安全性薬理試験を実施する際の条件を検討した。

Safety Pharmacological Evaluation Using Canine Electrophysiological and Monophasic Action Potential Monitoring.

Hironobu IKEDA, Kouzou FUKUDA, Hirotada TSUTSUMI, Keiko TANJII, Hiroshi SAKONJO, Tsukau NISHIMORI and Jun SUZUKI, BILIS, Minakuchi, Shiga 528-0052

ガラス管微小電極による心筋細胞内活動電位測定 (APD) 法を用いた  
安全性薬理学的評価法

○下里 貴, 六角 香, 西森司雄, 鈴木 潤<sup>1)</sup>, 百瀬弥寿徳<sup>2)</sup>

1) 株式会社 環境バイリス研究所

2) 東邦大学薬学部

【目的】

安全性薬理試験の一環として、電気生理学的方法による *in vitro* 心筋細胞内活動電位 (APD) 測定について検討した。

【方法】

モルモット乳頭筋標本作製: Pentobarbital 麻酔下、心臓を摘出し、混合ガス (95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>) を通気した Tyrode 液中で右心室の乳頭筋を摘出した。摘出乳頭筋標本を Organ bath にピンで固定し、36℃ に保温した Tyrode 液を灌流した。

活動電位測定: ガラス電極を乳頭筋標本に刺入し、フィールド電気刺激 (頻度: 0.5 Hz 期間: 1 msec. 電圧: 閾値の 150~200%) したときに得られる活動電位波形を微小電極用増幅器を介して記録した。安定した波形が得られてから、溶媒および各濃度の薬物を含む Tyrode 液を累積的に各々少なくとも 30 分間灌流し、灌流開始直前および 30 分までの APD<sub>90</sub> (90% 再分極までの活動電位持続時間)、静止膜電位および活動電位高 (amplitude) を測定した。

【結果】

QT 延長作用を有するとされる抗ヒスタミン剤 astemizole、β受容体遮断薬 sotalol、クラス Ia 抗不整脈薬 quinidine に用量依存的な APD<sub>90</sub> 延長作用が確認された。その他の陽性対照候補物質の作用についても検討した。

Safety Pharmacological Evaluation by Action Potential Measurement (APD) Techniques on Cardiac Muscles Using Intracellular Glass Microelectrodes.

Takashi SHIMOSATO, Kaori MUSUMI, Tsukao NISHIMORI, Jun SUZUKI<sup>1)</sup> and Yasunori MOMOSE<sup>2)</sup>. 1) BILIS, Minakuchi, Shiga 528-0052, 2) Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toho University, Funabashi, Chiba 274-8510

○田中光、重信弘毅

東邦大学薬学部薬物学

近年循環系および非循環系の各種治療薬により心電図波形のQT延長や *torsades de points* などの致死性不整脈が誘発される危険が注目されている。これらの有害作用は一般に心筋の再分極異常によるものであり、摘出心筋標本の活動電位持続時間を延長する作用と相関すると考えられている。今回我々はQT延長や *torsades de points* 誘発が報告されている抗アレルギー薬 terfenadine による活動電位持続時間延長作用を、感受性が高いとされているウサギ Purkinje fiber を含めた各種摘出心筋組織標本や単離心筋細胞を用いてガラス微小電極法により検討した。Terfenadine 1-20  $\mu\text{M}$  はモルモット心室筋組織標本およびウサギ左心房筋、心室筋および Purkinje fiber 組織標本において静止膜電位や活動電位の振幅に影響しなかった。Terfenadine 10-20  $\mu\text{M}$  はモルモット心室筋、ウサギ左心房筋および Purkinje fiber において活動電位の最大立ち上がり速度および持続時間を減少させた。いずれの部位、濃度においても活動電位持続時間の延長は見られなかった。一方単離モルモット心室筋細胞では terfenadine 10  $\mu\text{M}$  により活動電位持続時間の著明な延長が見られた。薬物のQT延長作用を評価する *in vitro* の指標としてウサギ Purkinje fiber などの摘出心筋組織標本の活動電位持続時間延長作用の検討が定着しつつあるが、本研究で検討した terfenadine のように、*in vivo* でのQT延長作用や催不整脈作用を有していながら *in vitro* では組織標本の活動電位持続時間を延長しない薬物が存在することも考慮する必要がある。

Drug-induced increase in action potential duration in tissue preparations may not be predictive of *in vivo* QT-prolongation ; studies with terfenadine.

Hikaru TANAKA and Koki SHIGENOBU. Dept. Pharmacol., Toho Univ. Sch. Pharmaceut. Sci., Funabashi, Chiba 274-8510



## Role of corticosterone in ethyl carbamate-induced immunosuppression in female BALB/c mice

Shin-Woo Cha, Mun-Han Lee<sup>1</sup>, Hyoung-Chin Kim, Hee-Kyoung Gu, Kap-Ho Kim, Ju-Hyun Bae and Tae-Cheon Jeong

Toxicology Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology and College of Veterinary Medicine, Seoul Natl Univ, Korea

To investigate possible role of corticosterone in ethyl carbamate-induced immunosuppression, the antibody response to a T-cell dependent antigen, sheep red blood cells (SRBCs), and subpopulation of thymocytes and splenocytes were investigated in female BALB/c mice. When mice were treated with ethyl carbamate intraperitoneally for 7 consecutive days at 100, 200 and 400 mg/kg, the antibody response was significantly suppressed and thymus and spleen weight was decreased from 200 mg/kg. These doses also caused an increase in serum corticosterone level. Flow cytometric analysis demonstrated the significant decrease in the number of splenic macrophages, B- and T-cells and thymic CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> and CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>. Ethyl carbamate-induced suppression of the antibody response was partially recovered when adrenalectomized (ADX) mice was treated with ethyl carbamate. In addition, splenic subpopulation of B- and T-cells and macrophages which was significantly reduced by ethyl carbamate was partially blocked in the ADX mice. Moreover, a single dosing of corticosterone at 25 mg/kg to ADX mice caused a significant suppression of antibody response to SRBCs. These results indicate that ethyl carbamate-induced increase in corticosterone level is sufficient for immunosuppression in female BALB/c mice, and this may be one mechanism by which the stress response causes immunosuppression.

## Role of corticosterone in ethyl carbamate-induced immunosuppression in female BALB/c mice

Shin-Woo Cha, Mun-Han Lee<sup>1</sup>, Hyoung-Chin Kim, Hee-Kyoung Gu, Kap-Ho Kim, Ju-Hyun Bae and Tae-Cheon Jeong

Toxicology Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology and College of Veterinary Medicine, Seoul Natl Univ, Korea

○久田 茂, 永嶋雅子, 柴田誠司, 谷藤久人, 森本秀樹, 飯塚和弘,  
増田修治, 飯田祝子, 臼居敏仁\*

帝国機器製薬安全性研究部, \*実験動物中央研究所

血清 immunoglobulin (以下 Ig) 濃度は、反復投与毒性試験において ELISA 法により容易に測定可能なパラメータであるが、免疫毒性試験における血清 Ig の測定意義は明確ではない。そこで、以下に示す実験において血清 IgM 及び IgG 濃度を測定し、その測定意義について検討した。【実験1】CB6F1 マウスに、0, 50 及び 150mg/kg の用量の cyclophosphamide (以下 CP) を週 1 回の頻度で 5 回強制経口投与し、最終投与の翌日に屠殺解剖した。その結果、CP 投与群には胚中心の消失を含む B 細胞領域の萎縮が発生した。B 細胞領域の変化に比して T 細胞領域及び胸腺皮質の萎縮は軽度であった。また、骨髄には成熟顆粒球の過形成が認められた。一方、血清 IgG 濃度は用量依存的に低下し、IgM 濃度も軽度に低下した。【実験2】細胞毒性を示す化合物 (以下、化合物 A) を、週 1 回の頻度で 5 回 SD ラットに反復投与した場合には、胸腺皮質の萎縮、並びに骨髄及び胚中心の一過性の萎縮が発生したが、血清 IgM 及び IgG 濃度は変化しなかった。一方、化合物 A を SD ラットに 5 日間連続投与した場合には、一定用量以上で、高度の骨髄萎縮、血清 IgM 及び IgG 濃度の顕著な低下を伴う免疫抑制、並びに敗血症などの細菌感染が発生して死亡した。【考察】実験1では他の領域に比して B 細胞領域に対するより選択的な障害の発生に伴って血清 Ig の低下が認められた。血清 Ig の多くは腸内細菌に対する抗体と考えられ、血清 IgM の低下は LPS 等の胸腺非依存性抗原に対する抗体産生能の低下を反映し、血清 IgG の低下には T 細胞による Ig の class switch の抑制も関与すると考えられた。実験2では、化合物 A の連日投与により血清 Ig の低下を伴う免疫不全が発生し、間欠投与時には、免疫系に軽度の組織変化が生じたものの、抗体産生能及び Ig の class switch への影響は軽微である可能性が考えられた。以上の実験から、血清 Ig 濃度の測定により、T 及び B 細胞の機能変化を評価できる可能性が示唆された。

Some consideration to the Significance of Serum Immunoglobulin Levels in the Immunotoxicity Testing.

Shigeru HUSADA, Masako NAGASHIMA, Seiji SHIBATA, Hisato TANIFUJI, Hideki MORIMOTO, Kazuhiro HIZUKA, Shuji MASUDA, Noriko HIDA, and Toshimio USUI\*. Teikoku Hormone Mfg., Co. Ltd, Kawasaki 213-8522. \*CIEA, Kawasaki 216-0001

金澤 由基子<sup>1)</sup>、松田 洋<sup>1)</sup>、松岡 千明<sup>1)</sup>、五十嵐 良明<sup>2)</sup>、  
鹿庭 正昭<sup>2)</sup>、小島 幸一<sup>1)</sup>、田中 憲穂<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> (財)食品薬品安全センター・秦野研究所

<sup>2)</sup> 国立医薬品食品衛生研究所

【目的】 医用材料の安全性評価のための生物学的試験の一つとして感作性試験があり、その中でモルモットを用いる Maximization test (GPMT) が多くのガイドラインに記載され、最も広く行われている。しかし、ガイドライン間で試験条件に相違点がある。本研究では、特に大きな相違点である被験物質の抽出法を中心に、国内ガイドラインと ISO 基準 (ISO 10993-10) との試験条件の比較検討を行った。

【方法】 実験には 4 週齢の Hartley 系モルモット (雌) を各群 5 匹用いた。GPMT は各ガイドラインに従って行った。被験物質として、加硫促進剤の 2-メルカプトベンゾチアゾール (MBT) 2.0 phr 配合ゴム (MBT-H)、同 0.2 phr 配合ゴム (MBT-L) およびジブチルジチオカルバメート亜鉛 (ZnDBC) 0.5 phr 配合ゴム (ZnDBC-H) を用いた。国内ガイドラインに従った試験では、14 倍量のアセトン-クロロホルム (1:1) 混液 (A-C) で抽出し濃縮乾燥させたものを用いた。感作投与では 5 あるいは 10 % オリーブ油懸濁液を、惹起では A-C 溶液あるいはワセリン軟膏物を開放あるいは閉塞適用した。ISO 基準に従った試験では、オリーブ油 20 mL/片面 60 cm<sup>2</sup> で抽出した溶液をそのまま用いた。惹起は閉塞適用で行った。

【結果】 A-C 抽出物で試験を行った群では、惹起媒体としてワセリンを用いた方が A-C を用いるより反応が強かった。また、同じ A-C 惹起では、閉塞適用の方が開放適用より明らかに反応が強かった。オリーブ油抽出液で試験を行った群では、評価点は低かったものの MBT-H および MBT-L の感作で全例が陽性を示した。ZnDBC-H では、反応が弱く、媒体に用いたオリーブ油の刺激反応と区別できなかった。有機媒体抽出の方が感度が高いが、オリーブ油抽出でもある程度の感作性が評価できることが示唆された。

Comparison of GPMT Methods: ISO 10993-10 and Japanese guidelines (YAKUKI No.99)

Yukiko KANAZAWA<sup>1)</sup>, Hiroshi MATSUDA<sup>1)</sup>, Chiaki MATSUOKA<sup>1)</sup>, Yoshiaki IKARASHI<sup>2)</sup>, Masaaki KANIWA<sup>2)</sup>, Koichi KOJIMA<sup>1)</sup> and Noriho TANAKA<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Hatano Res. Inst. FDSC, <sup>2)</sup> National Institute of Health Sciences

Cyclophosphamide を 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免疫学的パラメーターの変化を指標とした毒性発現の差に関する検討

○柴田誠司, 谷藤久人, 久田 茂, 永嶋雅子, 森本秀樹, 飯塚和弘, 増田修治, 飯田祝子, 日居敏仁\*

帝国機器製薬安全性研究部, \*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(rasH2マウス)は短期がん原性試験のモデルとして期待されている。代謝物が発がん性を示す化合物のがん原性をrasH2マウスを用いて評価する場合には、化合物に対する代謝能に発癌遺伝子導入による影響がないことが重要と考えられる。我々は以前に、cyclophosphamide (CP)を用いて、26週間がん原性試験、並びに37週齢時から5週間投与した追加試験を実施し、免疫毒性学的パラメーターの変化に、発癌遺伝子導入の影響がみられないことを示した。今回は、若齢のrasH2及びnon-TgマウスにCPを5週間投与し、両マウス間で免疫毒性の発現を比較するとともに、前回に報告した37週齢マウス(加齢マウス)を用いた5週間投与試験の結果と比較した。

【方法】雌雄の rasH2 及び non-Tg マウス(投与開始 10~11 週齢)に、0、50 及び 150mg/kg の用量の CP を週 1 回の頻度で 5 週間強制経口投与し、最終投与の翌日に屠殺・解剖した。胸腺及び脾臓重量の測定、血液学的検査、リンパ球サブセット分析、並びに血漿 IgM 及び IgG 濃度の測定を実施した。

【結果及び考察】rasH2 及び non-Tg マウスに共通して、50mg/kg 以上で、胸腺及び脾臓重量の低下、血漿 IgM 及び IgG 濃度の低下、末梢白血球数並びに脾臓あたりの T 及び B 細胞数の減少が用量依存的に認められ、150mg/kg 群では、B/T 細胞数比の顕著な低下が認められた。これらの変化は rasH2 及び non-Tg マウス間で同程度であった。一方、加齢マウスの 150mg/kg 群には、胸腺重量、末梢白血球数並びに脾臓あたりの T 及び B 細胞数の減少がみられたが、若齢マウスと同程度の変化であった。以上の結果から、免疫毒性を誘発する CP の代謝物の生成能は、rasH2 及び non-Tg マウス間、並びに若齢及び加齢マウス間で同様であると考えられた。

Differences in immunotoxic changes between CB6F1-Tg rasH2 mice and their non-transgenic littermates given cyclophosphamide by gavage weekly for 5 weeks.

Seiji SHIBATA, Hisato TANIFUJI, Shigeru HISADA, Masako NAGASHIMA, Hideki MORIMOTO, Kazuhiro HIZUKA, Syuji MASUDA, Noriko HIDA and \*Toshimi USUI, Teikoku Hormone Mfg., Co. Ltd., Kawasaki, Japan. \*CIEA, Kawasaki, Japan.

○五十嵐良明<sup>1</sup>、鎌田栄一<sup>2</sup>、鹿庭正昭<sup>1</sup>、中村晃忠<sup>1</sup>国立医薬品食品衛生研究所 <sup>1</sup>療品部、<sup>2</sup>総合評価研究室

【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、原因として空気汚染が疑われている。ホルムアルデヒド(HCHO)は、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も考えられる。本研究では、マウスを用いて、吸入暴露による HCHO の一般毒性及び他の化学物質に対するアレルギー反応性の変化を観察した。

【方法】BALB/c系マウスを5週齢で購入し、1週間馴化した後、使用した。ホルマリンを噴霧し、空気と混合して HCHO 混合空気を作成した。この混合空気を1日6時間、28日間連続暴露を行い、体重、摂餌量、血液学的検査及び血清生化学的検査を行った。感作誘導期の反応として、trimellitic anhydride (TMA)及び2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)の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については惹起による耳腫脹反応、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。

【結果と考察】HCHO濃度は低濃度群0.1 ppm、高濃度群1.44 ppmであった。マウスの体重及び摂餌量とも対照群と差は見られなかった。臓器重量、血液学的検査及び血清生化学的検査において、HCHO暴露による変化は観察されなかった。吸入暴露に伴うHCHOに対しての感作の成立はなかった。TMA及びDNCBによるLNC増殖反応はHCHO暴露により増強された。血清IgE抗体価及び耳腫脹反応には著しい変化はなかった。したがって、本条件下では、マウスに対して一般的な毒性はないものの、感作誘導が増強されることがわかった。

Increased Sensitization Response to Chemical Allergens in Mice Inhaling Formaldehyde.

Yoshiaki IKARASHI<sup>1</sup>, Eichi KAMATA<sup>2</sup>, Masa-aki KANIWA<sup>1</sup> and Akitada NAKAMURA<sup>1</sup> <sup>1</sup>Division of Medical Devices, <sup>2</sup>Division of Risk Assessment, National Institute of Health Sciences, Tokyo 158-8501

Ji-Youn JUNG, Kwang-II JUNG, Hiroyuki NAKAYAMA and Kunio DOI

Department of Veterinary Pathology, Faculty of Agriculture,  
The University of Tokyo 113-8657

Contact dermatitis is a common and distinctive form of allergic skin disease. In this study, BALB/c female mice were sensitized by topical application with 150 $\mu$ l of picryl chloride (PCL) to abdominal skin. At 4, 11, 18 and 25 days after the sensitization, 20 $\mu$ l of 1% PCL was applied to the left ear. Up to 48 hours after each application, ear thickness and serum IgE level were measured and histological and immunohistochemical examinations were carried out on ear skin. As a result, the ear swelling response and the number of mast cells, CD4positive T cells and CD8positive T cells increased, and the level of serum IgE elevated in accordance with increasing time of PCL application. In addition, degranulation of mast cells was enhanced in accordance with increasing time of PCL application, suggesting a certain relationship between the elevation of serum IgE level and the enhancement of mast cell degranulation. Thus, PCL could induce prominent contact dermatitis in BALB/c female mice.

Contact Dermatitis in BALB/c mice induced by Picryl Chloride

Ji-Youn JUNG, Kwang-II JUNG, Hiroyuki NAKAYAMA and Kunio DOI  
Department of Veterinary Pathology, Faculty of Agriculture, The University  
of Tokyo 113-8657

## Nivalenol-Induced Apoptosis in Lymphoid Organs of Mice

○Annart POAPOLATHEP, Wjit KIATIPATTANASAKUL,  
Noriaki ISHIGAMI, Hiroyuki NAKAYAMA and Kunio DOI

Department of Veterinary Pathology, Faculty of Agriculture,  
The University of Tokyo

Nivalenol(NIV) was orally administered to ICR:CD-1 male mice at the dose levels of 5, 10 and 15 mg/kg body weight. Five animals of each group was sacrificed at 12, 24 and 48 hours after inoculation(HAI), respectively, and purposed to elucidate the process of development of apoptosis in the thymus, Peyer's patch and spleen. There were no signs of clinical disorders and no changes in body and organ weights until 48 HAI except for that the thymus weight significantly decreased at 48 HAI. Immunohistochemically, the number of apoptotic lymphocytes evaluated by in situ detection for fragmented DNA showed a dose-dependent increase at 12 HAI in both the thymus and Peyer's patch, while it became to increase at 24 HAI in the spleen. Moreover, the DNA ladder was first detected at 12 HAI in the thymus of 15mg/kg-group by agarose gel electrophoresis. The results clearly indicate that NIV is able to induce apoptosis in the lymphoid tissues of mice.

## Nivalenol-Induced Apoptosis in Lymphoid Organs of Mice

Annart POAPOLATHEP<sup>1</sup>, Wjit KIATIPATTANASAKUL<sup>1</sup>, Noriaki ISHIGAMI<sup>1</sup>,  
Hiroyuki NAKAYAMA<sup>1</sup> and Kunio DOI<sup>1</sup>. Dept. of Veterinary Pathology, Faculty  
of Agriculture, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8657.

○山下弘太郎，石井宏幸，豊田直人，岡崎欣正，高橋 要，上谷 稔

(株)三菱化学安科研

【目的】我々は大量のアニリン (AN) をラットに単回投与することで，歩行異常と脊髄白質の空胞化を特徴とする神経毒性が誘発されること，これらの変化は回復性があることを報告した (第15回日本毒性病理学会)。一方，この検討の中で探索行動の持続時間の短縮に基づく運動量の減少が捉えられたが，その回復性は確認できず，また，この減少の意義についても不明であった。そこで今回，この運動量減少の再現性を確認するための検討を行った。また，AN投与では溶血性貧血を起こすことから，この様な貧血の及ぼす運動量への影響についても併せて検討した。

【材料および方法】4週令の雄性SD系ラット (各群20匹) にAN 500および1000 mg/kg (経口)，フェニルヒドラジン (PHZ) 120 mg/kg (皮下)，対照としてオリーブ油 (経口) を単回投与した。各群8匹の運動量 (①探索行動のみられるケージ交換直後1時間，②活動量の多い夜間を含む14時間) を投与前日および投与後1，4，9，14，21日に測定した (投与後9週まで予定)。また，投与後1，4，9，14日には，各群3匹の血液学的検査を実施した。

【結果】投与後21日までの結果：運動量の減少 (①，②) がAN 1000 mg/kg群とPHZ 120 mg/kg群で投与後1日にみられた。この他の測定日ではAN投与群およびPHZ 120 mg/kg群に対照群との明らかな運動量の差はみられなかった。投与後1日の探索行動および活動量の減少は一般状態の悪化によるものであり，貧血のピーク時 (投与後4日) および歩行異常の発現時期 (投与後9，14日) には運動量への影響はなかった。

【まとめ】今回の検討ではAN投与による探索行動の減少は認められなかった。また，溶血性貧血は運動量に対し，直接的な影響を及ぼさないことが示された。

#### Effects of Aniline on Motor Activity in Rats

Kotaro YAMASHITA, Hiroyuki ISHII, Naoto TOYOTA, Yoshimasa OKAZAKI, Kazumasa TAKAHASHI and Minoru TSUCHITANI, Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd., Ibaraki-314-0255, Japan.



錦谷まりこ<sup>1, 2</sup>, 荒記俊一<sup>1</sup>, 横山和仁<sup>1</sup>, 佐藤元<sup>1</sup>, 河原克雅<sup>2</sup>

<sup>1</sup>東京大学医学部公衆衛生学, <sup>2</sup>北里大学医学部生理学

【目的】重金属(マンガン、クロム、鉛)および有機溶剤(トルエン)が労働者の嗅覚機能に及ぼす影響を明らかにする。さらにこれら物質の神経行動機能への影響を解析する。

【対象と方法】韓国及び日本の男子作業者を暴露群とし、対照群は同職場の男子事務または運転作業者とした。嗅覚閾値検査(T&T olfactometry, olfactory perception threshold test)を行うと共に神経行動テストと振戦の測定を行った。マンガン作業者[29人、機械等の製造工場(韓国)における溶接作業員]の血中マンガン濃度[0.6-2.3 (平均 1.4)  $\mu\text{g/dl}$ ]、クロム作業者[27人、鍍金作業者(韓国)]の血中クロム濃度[0.2-3.7 (平均 1.3)  $\mu\text{g/dl}$ ]、鉛作業者[62人、電気製品製造工場(韓国)の作業員]の血中鉛濃度[11.0-41.6 (平均 24.6)  $\mu\text{g/dl}$ ]及び尿中デルタアミノレブリン酸濃度[0.2-2.0 (平均 1.1)  $\text{mg/l}$ ]、有機溶剤作業者[16人、事務用品製造工場(日本)のインク混合作業員]の血中トルエン濃度[0.010-0.288 (平均 0.070)  $\mu\text{g/dl}$ ]は対照群に比べて有意に高かった。

【結果】マンガン作業者はT&T olfactometryのうち検知閾値と認知閾値の得点が対照群に比べて有意に高かった( $P<0.05$ )。クロム作業者は同じく認知閾値の得点が対照群に比べて有意に高かった( $P<0.05$ )。また認知閾値の得点は重回帰分析でクロム暴露期間と有意な関係を示し( $P<0.05$ )、暴露期間が長いほど認知閾値が増加した。鉛作業者は神経行動テスト(digit symbol)の得点が対照群に比べて有意に低かったが( $P<0.05$ )、嗅覚機能検査に対照群との有意差は見出されなかった。有機溶剤作業者はいずれのテスト結果も対照群との間に有意差が認められなかった。

【結論】職業性のマンガン、クロム暴露により影響される嗅覚機能のうち、主要なものは認知機能の低下であり、マンガンではさらに嗅覚の検知機能も低下することが示唆された。また、T&T olfactometryは職業性のマンガン、クロムによる嗅覚影響を評価する有効な手法であると考えられた。

#### Assessment of Olfactory Function in Workers Exposed Chemical Hazards

Mariko NISHIKITANI<sup>1,2</sup>, Shunichi ARAKI<sup>1</sup>, Kazuhito YOKOYAMA<sup>1</sup>, Hajime SATO<sup>1</sup>, Katsumasa KAWAHARA<sup>2</sup> <sup>1</sup>Dept. of Public Health and Occupational Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Bunkyo-Ku, Tokyo 113-0033 <sup>2</sup>Dept. of Physiology, Kitasato University School of Medicine, Sagami-hara, Kanagawa 228-8555

Trimethyltinを投与したラットの脳内グリア細胞線維性酸性蛋白 (GFAP) の発現に関する画像解析装置を用いた定量的評価方法の検討

○石井宏幸, 岡崎欣正, 山下弘太郎, 豊田直人, 高橋 豊, 河野友紀子, 友成由紀, 土谷 稔

㈱三菱化学安科研

トリメチル錫 (TMT) の投与で誘発される神経細胞壊死後の星状膠細胞の肥大と増生について、抗GFAP抗体に対する反応性を基に画像解析し、その定量的評価法を検討した。また、脳内GFAP含量を定量して画像解析による結果と比較した。

【材料および方法】TMT 3, 6, 12mg/kgあるいは精製水を7週令の雄性SD系ラット (6匹/群) に単回経口投与した。投与後6日に断頭放血後、脳を正中矢状断した。左側は10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定後、病理組織学的検査と画像解析 (抗GFAP抗体で免疫染色標本を作製し、大脳皮質、線条体、海馬、視床/視床下部、小脳、橋/延髄の6区分について、それぞれ10, 1, 2, 4, 3および2視野に細分してGFAP陽性領域を測定) を行った。右側脳も同様に6区分し、Sandwich ELISA法により定量した。GFAP量および陽性領域は対照群に対する百分率を用いて算出した。

【結果】12mg/kg群では重度の神経細胞壊死が発現した大脳皮質と海馬で画像解析およびELISA法ともに対照群と比較して明らかなGFAPの増強がみられた。線条体、視床/視床下部と橋/延髄では画像解析でGFAPの増強がみられたが、ELISA法では差はなかった。また、小脳ではプルキンエ細胞の壊死が高頻度にもみられたが、画像解析とELISA法では対照群との差はなかった。大脳皮質を各視野毎に画像解析すると増強の程度に差がみられた。6mg/kgでは大脳皮質と海馬に神経細胞壊死が散発的にみられた。一方、画像解析ではいずれの区分にも明らかな増強はなかったが、散発的に高値を示す個体がみられた。ELISA法ではいずれの区分にも変化はなかった。

星状膠細胞の肥大と増生は画像解析による定量化によって評価可能であることが確認された。

The Examination of Quantitative Analysis using Image Analyzer on the Expression of Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) in the Brain of Rats Received Trimethyltin.

Hiroyuki ISHII, Yoshimasa OKAZAKI, Kotaro YAMASHITA, Naoto TOYOTA, Kaname TAKAHASHI, Yukiko KAWANO, Yuki TOMONARI and Minoru TSUCHITANI, Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd., Ibaraki-314-0255, 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

工業化学薬品として種々の有機溶剤が使用されているが、トルエンは最も幅広く使用されている化学物質のひとつである。しかし、麻酔作用などを有するために吸入による中毒事故が多発し、一方でシンナー遊びなどの社会的問題にも関わっている。そこでトルエンによる神経障害を実験的に検討してきた。今回は、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、脳ホモジェネートの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。その結果、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。

ヒトムスカリン受容体m2サブタイプ(hm2 receptors)を発現させたCHO細胞における、Gi蛋白活性化へのトルエンの影響を調べた。フォルスコリンによるcAMP産生は、hm2 receptorsの刺激によるGi蛋白の活性化により減弱する。このGi蛋白の活性化はトルエン存在下で阻害された。GTPγS結合のカルバミルコリンによる活性化は、CHO細胞の膜分画をトルエンと共存させて測定すると大きく阻害された。

ヒトβ2アドレナリン受容体(β2-AR)とムスカリン受容体m2サブタイプ(hm2 receptors)を発現させたCHO細胞における、G蛋白へのトルエンの影響を調べた。イソプレテレンールによるcAMP産生の刺激に対して、トルエンは有意な変化を与えなかった。一方、カルバミルコリンによるcAMP産生の阻害に対して、トルエンは有意な減弱作用を示した。

Changes in brain muscarinic receptors induced by toluene

Takeshi HONMA, Hirofumi TSUGA, and Megumi SUDA. Division of Health Effects Research, National Institute of Industrial Health, Kawasaki 214-8585, Japan

○木原隆英、谷村 孝\*

近畿大学医学部第1解剖学教室

\*近畿大学ライフサイエンス研究所

【目的】Vitamin A (VA)は、中枢神経系の催奇形性物質であり、行動発生毒性物質でもある。VAの末端の水酸基をアルデヒド基に置換した、シス型の13-cis-retinalの報告は非常に少ない。そこで、われわれはWistar系ラットの行動発生毒性の感受性が高い妊娠中期に経口投与し、その出生児の行動・機能異常の検索を行い、以前行ったVAの実験結果と比較検討した。

【方法】Icd: Wistar系ラットの妊娠11と12日(腹腔確認日=0日)に13-cis-retinalの形態異常を生じない量の10mg/kg/dayまたは生理的食塩水(対照)を強制経口投与した。母体は、自然分娩させ、そのまま出生児を哺育させ、生後4日に一腹児数を8匹に調整した。離乳前行動発達試験は、立ち直り反射(生後5日)、背地走性反応(7日)、水泳発達試験(8と10日)を出生児全例について行った。生後21日に児を離乳し、成熟雄ラットについて、回転棒試験、オープンフィールド試験およびテイルフリック試験を行った。

【結果および考察】離乳前行動発達試験では、立ち直り反射および背地走性反応においてretinal投与群が対照群より有意な低値を示した。VAでは背地走性反応にのみ影響があった。水泳発達試験では、retinal投与群が8と10日共に対照群より有意な低値を示し、VAでは10日のみ発達遅滞が認められた。成熟雄ラットではretinal投与群が対照群と比較して、回転棒試験では落下までの時間が有意に短く、テイルフリック試験で温湯に対する反応時間が有意に長かった。VAの結果も同程度であった。以上のことより、13-cis-retinalはVAより特に離乳前期で強い行動発生毒性を示した。

Effects of prenatal 13-cis-retinal exposure on behaviors of Wistar rat offspring

Takahide KIHARA and Takashi TANIMURA, First Dept. Anatomy, Kinki Univ. School of Medicine and Life Science Institute, Kinki Univ. Osakasayama, Osaka 589-8511

古木 希、糟谷史代、五十嵐一雄

神戸学院大学薬学部毒性学研究室

【目的】抗精神病薬ハロペリドール(HP)の投与により、薬剤性パーキンソニズム以外に、特に長期間服用時に遅発性ジスキネージアなどの神経毒性が発現することはよく知られている。HPの代謝物として、神経毒MPP<sup>+</sup>類似構造を有するカチオン性代謝物HPP<sup>+</sup>が報告されて以来、この代謝物の関与が神経毒性発現との関連で注目されている。一方、HPの連用は薬物代謝反応により、連続的な酸化ストレス発生の可能性が示唆される。そこで我々は、HP投与動物の脳組織内における酸化ストレスの変動について検討した。【実験方法】雄性 ddY マウス (25-28 g) に HP (5 mg/kg) を一日2回、3日間および9日間経口投与し、最終投与2時間後に脳組織を摘出した。摘出脳のホモジネートについて、ドーパミンとその代謝物濃度をHPLC/ECD法により測定した。また、過酸化脂質レベル、さらにGSH/GSSGレベルを測定した。次に雄性Wistarラット (250-290 g) の脳線条体部位に HP 0.1 mM を10分間灌流し、灌流液内シトルリン濃度をLC/MS法により測定した。【実験結果および考察】HPの経口投与3日間により、脳組織内HPP<sup>+</sup>濃度の増加に伴い、脳組織内ドーパミン代謝は亢進し、酸化型グルタチオン濃度の上昇傾向が観察された。また脳組織における過酸化脂質レベルもやや上昇傾向がみられた。一方、投与9日間では、脳組織内ドーパミン代謝の亢進はみられるが、酸化ストレスの有意な変動は観察されなかった。次に脳線条体部位への HP 灌流は、脳内 NO ラジカルの産生を誘導することが観察された。以上の結果は、HP投与による酸化ストレスの誘導は急性的なもので、HPの長期連用は生体内防御反応を進行させ、酸化ストレスの影響はむしろ低下すると考えられる。

## Possible Involvement of Oxidative Stress in the Haloperidol-Induced Neurotoxicity

Nozomi FURUKI, Fumiyo KASUYA and Kazuo IGARASHI Laboratory of Biochemical Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kobegakum University, Nishi-ku, Kobe 651-2180

ラットにおける脂肪乳剤粒子径の血中コレステロールとリン脂質に及ぼす影響

○梅岡健一、藤本貴司、岸本早苗、川内佳之、越谷 修、澤本 修、  
栗積和信、岸本恒次、中島芳文、平岡 功

株式会社大塚製薬工場 鳴門研究所

**[目的]** 高カロリー輸液に脂肪乳剤を添加した場合、脂肪粒子の粗大化をはじめ様々な配合変化が起こることが知られている。今回、ラットを用い脂肪粒子径の血中脂質に対する影響について検討した。

**[検討 1]** 市販の 10%脂肪乳剤と類似の Lipid S (100g/L 大豆油、乳化剤として 12g/L 卵黄レシチン、平均粒子径 0.25 $\mu$ m)、粒子径の大きな Lipid L (S と同組成、平均粒子径 1.2 $\mu$ m) を使用した。雄性 SD ラット(200-250g)に脂肪乳剤各 20mL/kg (2g TG/kg) を 7 日間静脈内投与し、対照群としては生理食塩液を同容量投与した(n=6)。投与終了翌日に採血(絶食下)し、血清中のトリグリセライド(TG)、総コレステロール(T-Cho)、HDL コレステロール(HDL-Cho)、遊離コレステロール(F-Cho)、リン脂質(PL) を測定した。その結果 TG に変化はなかったが、T-Cho、F-Cho および PL が Lipid L で高値を示した(p<0.01, vs 生食)。HDL-Cho に変化はみられなかったことより、T-Cho の上昇は LDL 画分の F-Cho 上昇に由来したものと考えられた。

**[検討 2]** Lipid L は S に比べ約 5 倍の粒子径であることから、TG の乳化に必要な PL 量は S の 1/5 と考えられる。従って、L では乳化に関与しない PL の過剰が推察されたため、粒子径は L と同じで乳化剤が半量(6g/L)である Lipid L(1/2)について検討した。その結果、L(1/2)では各 Cho および PL に全く変化がみられなかった。

**[結論]** 脂肪粒子が粗大となった脂肪乳剤では血中 Cho と PL が上昇し、その原因として脂肪乳剤中に過剰となった乳化に関与しないレシチン(PL)が考えられた。

Effect of particle size of lipid emulsion on serum cholesterol and phospholipid in the rat.

Ken-ichi UMEOKA, Takashi FUJIMOTO, Sanae KISHIMOTO, Yoshiyuki KAWAUCHI, Osamu KOSHITANI, Osamu SAWAMOTO, Kazunobu KURISU, Kohji KISHIMOTO, Yoshifumi NAKASHIMA, and Isao HIRAOKA. Naruto Research Institute, Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc., Tokushima, 772-8601, Japan.

□藤谷知子、多田幸恵、米山允子

東京都立衛生研究所 毒性部

目的 馬鈴薯の発芽防止剤として使われるクロルプロファムの亜慢性毒性を、マウスとラットを用いて調べた。方法 Chlorpropham [Isopropyl-N-(3-chlorophenyl) carbamate; CIPC]を餌に混ぜて、雄雌のF 344 ラット(0, 7500, 15000 および 30000 ppm) と ICR マウス(1875, 7500 および 30000 ppm)に、13 週間投与した。投与終了時、主要臓器の重量を測定し、血液学的検査と血漿生化学検査(ラットのみ)、および主要臓器と大腿骨髄の病理学的検査を行った。対照群と投与群の差を、Scheffe の多重比較検定で分析した。結果 <ラット>雄雌のすべての投与群で肝臓腫大が、雄雌の 15000 および 30000 ppm 群で顕著な脾臓腫大が、用量相関性に見られた。雄雌の 15000 および 30000 ppm 群のメトヘモグロビン値の上昇、雄雌のすべての投与群の赤血球数・ヘマトクリット値・血中ヘモグロビン濃度(雄 7500 群を除く)の低下と平均血球容積の増加、雄雌の 30000 ppm 群の白血球数の増加と血小板数の減少が見られた。また、脾臓の赤髄髄の鬱血・リンパ鞘の萎縮・ヘモジデリン沈着・髄外造血・皮膜の繊維化が、雄雌のすべての投与群で用量相関性に見られた。<マウス>雄雌の 7500 および 30000 ppm 群の肝臓腫大と、雄の 30000 ppm 群と雌の 7500 および 30000 ppm 群の脾臓腫大が見られた。雄雌の 7500 および 30000 ppm 群のメトヘモグロビン値の上昇、雄雌の 30000 ppm 群の血中ヘモグロビン濃度・ヘマトクリット値・平均血球容積・白血球数の増加が見られた。また、脾臓の赤髄髄の鬱血・リンパ鞘の萎縮・ヘモジデリン沈着・髄外造血、肝細胞の腫大と壊死・細胞浸潤が、雄雌の 7500 あるいは 30000 ppm 群に見られた。まとめ クロルプロファムは、主にラットとマウスの造血系に影響を及ぼした。

## Effects of Chlorpropham (CIPC) on hematopoietic system in rats and mice

Tomoko FUJITANI, Yukie TADA and Masako YONEYAMA, Department of Toxicology, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073

○川原潤一<sup>1)</sup>、木村 敬、桑原良弘、和田直人、青木康治、  
泉 政明、信方英文、花岡裕吉、川内佳之、高山茂樹、苗代一郎、  
深澤洋史、青木豊彦、橋本正晴

日本製薬工業協会 基礎研究部会第二分科会  
(キリンビール株式会社 医薬開発研究所<sup>1)</sup>)

〔目的〕医薬品の非臨床安全性試験における臨床病理検査項目の国際基準案（IHCTP）を検討するための一環として、一般毒性試験における尿検査の実施状況について調査したので報告する。

〔調査方法〕日本製薬工業協会（JPMA）基礎研究部会加盟の製薬企業 89 社を対象にアンケート形式で、マウス、ラット、イヌおよびサルを用いた反復投与毒性試験について尿検査の測定項目、測定理由、採尿条件および測定上の課題・問題点等の調査を実施した。その結果について前回 1989 年の JPMA の調査結果との比較を含め、解析を行った。

〔結果・考察〕ラット、イヌおよびサルでは、必須検査項目は厚生省毒性試験法ガイドラインに例示されている項目の実施率が高く、実施理由も「厚生省ガイドラインに記載されている」が最も多かった。その他の必須実施項目では、ウロビリノーゲンの実施率が高く、実施理由として「毒性評価上有用である」と回答する施設が多かった。オプションで実施している項目ではクレアチニンの実施率が高かった。前回の調査と概ね類似した実施状況であったが、ラットおよびイヌで沈渣、ナトリウムおよびカリウムの実施率の増加がみられた。採尿条件については IHCTP に従って実施している施設は少なく、各動物種とも採尿時に冷却および防腐剤を使用する施設は少数で、測定までの保存条件は室温が最も多かった。採尿時間は、ラット、マウスおよびイヌでは 4 時間と 24 時間、サルでは 2 時間と 16 時間に設定している施設が多かった。測定上の課題・問題点としては、採尿に関する問題（特に、餌、糞および水の混入）を指摘する施設が多かった。

#### Current Status of Urinalysis in General Toxicity Studies for Pharmaceuticals.

Jun-ichi KAWAHARA<sup>1)</sup>, Takashi KIMURA, Yoshihiro KUWAHARA, Naoto WADA, Yasuji AOKI, Masaaki IZUMI, Hidefumi NOBUKATA, Yuukichi HANAOKA, Yoshinuki KAWAUCHI, Shigeki HATAKEYAMA, Ichiro NAESHIRO, Hirofumi FUKAZAWA, Toyohiko AOKI, Masaharu HASHIMOTO. Japan Pharmaceutical Manufacturers Association, Tokyo, Japan (Pharmaceutical Development Laboratory, Kirin Brewery Co., Ltd.<sup>1)</sup>)



○岩井久和<sup>1)</sup>、阿瀬善也、米良幸典、中野一行、木村 敬、小林勇二郎、  
和知正幸、林 万津子、守田伸子、苗代一郎、深澤洋史、青木豊彦、  
橋本正晴

日本製薬工業協会 基礎研究部会第二分科会

(株式会社 三和化学研究所 総合研究所 安全性研究グループ<sup>1)</sup>)

〔目的〕医薬品の非臨床安全性試験における臨床病理検査項目の国際的基準案 (IHCPT) を検討するための一環として、一般毒性試験での血液化学的検査の実施状況について調査したので報告する。

〔調査方法〕日本製薬工業協会 (JPMA) 基礎研究部会加盟の製薬企業 89 社を対象にアンケート形式で、マウス、ラット、イスおよびサルを用いた反復投与毒性試験における血液化学的検査の測定項目および測定理由、測定試料の種類・採取条件などについて調査を実施し、その結果について前回 1989 年の JPMA の調査結果との比較を含め解析を行った。また、測定上の問題点についても検討を加えた。

〔結果・考察〕測定項目に関する調査結果では、厚生省毒性試験法ガイドラインで例示されている項目は前回の調査結果と同様、蛋白分画を除きほとんどの施設で測定されていた。蛋白分画については前回の調査時より測定施設が増加し、半数の施設で実施されていた。一方、IHCPT で推奨されている項目のうち  $\gamma$ -GTP は全ての動物種で比較的实施頻度が高かったが、その他の推奨項目 (GLDH, 5'-Nucleotidase, SDH, 総胆汁酸) はほとんど測定されていなかった。測定項目別の実施率は、マウスでやや低いものもみられたが、動物種間による大きな違いはみられなかった。

採血の際、マウス・ラットではほとんどの施設が麻酔を施し、約 70% の施設が麻酔剤にエーテルを使用していたが、イス・サルでは無麻酔であった。採血部位はマウスで後大静脈、ラットで腹大動脈、イスで橈側皮静脈、サルで大腿静脈からとしている施設が最も多かった。採血前の絶食は、各種動物とも約 7 割の施設で行っており、一晚絶食を行う施設が多かった。

#### Current Status of Clinical Chemistry in General Toxicology Studies for Pharmaceuticals.

Hisakazu IWAI<sup>1)</sup>, Yoshiya AZE, Yukinori MERA, Kazuyuki NAKANO, Takashi KIMURA,  
Yujirou KOBAYASHI, Masayuki WACHI, Mariko HAYASHI, Nobuko MORITA, Ichiro  
NAESHIRO, Hirofumi FUKAZAWA, Toyohiko AOKI, Masaharu HASHIMOTO

Japan Pharmaceutical Manufacturers Association, Tokyo, Japan

(<sup>1)</sup>Safety Assessment Group, Central Research Laboratory, Sanwa Kagaku Kenkyusho Co., LTD.)

○青木康治<sup>1)</sup>、百瀬泰紀、石塚修司、阿瀬善也、益本吉広、山本光雄、川原潤一、岩井久和、竹下尚、苗代一郎、深澤洋史、青木豊彦、橋本正晴

日本製薬工業協会 基礎研究部会第二分科会  
(北陸製薬株式会社 研究開発本部<sup>1)</sup>)

〔目的〕医薬品の非臨床安全性試験における臨床病理検査項目の国際的基準案 (IHCPT) を検討するための一環として、一般毒性試験における血液学的検査の実施状況について調査したので報告する。

〔調査方法〕日本製薬工業協会基礎研究部加盟 (JPMA) の製薬企業 89 社を対象にアンケート形式でマウス、ラット、イヌおよびサルを用いた反復毒性試験における血液学的検査の測定項目および測定理由、採血条件および測定上の課題・問題点などを調査し、解析を行うとともに、前回 1989 年に実施した JPMA の同様の調査成績と比較検討した。

〔結果・考察〕測定項目に関する調査結果では、マウスを除き厚生省毒性試験法ガイドラインに例示された項目は 90% 以上の施設で実施されていた。これらの項目の測定理由としては「ガイドラインに記載されている」のみならず、凝固系検査項目を除いて多くの施設が「毒性評価上重要」と回答した。その他、血液スミアについては全体の実施率は比較的低いものの、非齧歯類での実施率は齧歯類に比べ高かった。なお、今回の調査結果は前回の調査結果と大きく変わるものではなかった。採血はいずれの動物種でも多くの施設が絶食下で実施し、マウス・ラットでは主に麻酔下で腹部大動脈または後大静脈より、イヌ・サルでは主に無麻酔下で四肢の静脈より採血を実施していた。抗凝固剤には凝固系検査にクエン酸 Na、その他の項目に EDTA が主に使用されていた。

#### Current Status of Hematology in General Toxicity Studies for Pharmaceuticals

Yasuji AOKI<sup>1)</sup>, Yasunori MOMOSE, Shuji ISHIZUKA, Yoshiya AZE, Yoshihiro MASUMOTO, Mitsuo YAMAMOTO, Jun-ichi KAWAHARA, Hisakazu IWAI, Hisashi TAKESHITA, Ichiro NAESHIRO, Hirofumi FUKAZAWA, Toyobiko AOKI, Masaharu HASHIMOTO

Japan Pharmaceutical Manufacturers Association, Tokyo, Japan  
(Research and Development Division, Hokuriku Seiyaku Co., Ltd.<sup>1)</sup>)

## Crj:CD(SD)IGS と Sle:SD ラットの一般毒性パラメータの比較

○辻村裕美子, 倉田昌明, 飯高 健, 高橋 守, 下谷真智子, 加藤まり子  
古田千香子, 白井紀充, 佐藤 靖

ファイザー製薬株式会社 安全性研究統括部

【目的】同じSprague-Dawley(SD)系ラットにおいても、公表されている正常値などから、生産者等によって一般毒性パラメータに相違点の存在することが推察される。我々の知る限り Crj:CD(SD)と Crj:CD(SD)IGS の比較を除いて、この様な比較は知見が乏しい現状にある。今回、当施設で使用経験のある Crj:CD(SD)IGS(以下、IGS)と Sle:SD(以下、Sle)を用いて同一条件下で、ラット反復投与毒性試験の最長期間6ヶ月を想定した試験を実施し両者の差異を検証した。【方法】IGS は日本チャールスリバーより、Sle は日本エスエルシーより入手した(雌雄各 20 匹)。経口投与を想定し、6週齢より 0.5% methyl cellulose を強制投与した。血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、眼科学的検査は、基本的に投与開始前と投与開始後1、3および6ヶ月に実施した。臓器重量測定は6ヶ月(32週齢)の時点で実施した。【結果】体重推移については、雄ではIGSがSleを上回ったが、雌では同等であった。摂餌量でも体重と同様の傾向がみられた。尿検査では、雌雄ともIGSのN-acetyl-β-D-glucosaminidase排泄量がSleのそれを上回った。血液学的・血液生化学的検査でみられた両ラットの主な差異は下記のとおりである：白血球数・リンパ球数でIGS>Sle(雌雄)；ALP, globulinでIGS<Sle(雌雄)；5' nucleotidaseでIGS<Sle(雄)。臓器重量では、副腎(雌雄)と精巣の絶対・相対重量ともにIGSがSleを下回った。

【まとめ】今回の比較成績は、同じSD系においても体重、血液・生化学パラメータおよび臓器重量に差異が存在することが示された。今回我々は腎臓、精巣、肝臓その他の組織学的差異を加え、報告する。

Comparison of general toxicological parameters between Crj:CD(SD)IGS and Sle:SD rats

Yumiko TSUJIMURA, Masaaki KURATA, Takeshi HIDAKA, Mamoru TAKAHASHI, Machiko SHIMOYA, Mariko KATO, Chikako FURUTA, Norimitsu SHIRAI, Yasushi SATO, Pfizer (Pharmaceutical Inc.), Drug Safety Evaluation, Chita-gun, Aichi 470-2393

Chlormadinone acetate(CMA)の自然発症前立腺肥大 (BPH) イヌの前立腺、精巣及び下垂体に対する作用の免疫病理組織学的検討

池田理恵、村越正典、田川正志、中山隆治、五反田浩太郎、三枝 隆、本間誠次郎

帝國臓器製薬株式会社 安全性研究部、薬理研究部

[目的]前立腺肥大症 (BPH) は、加齢に伴いヒト及びイヌでのみ認められる良性疾患であることから BPH の pathogenesis あるいは治療薬の開発に関しては、イヌ BPH モデルを用いることが最適と考えられる。今回は、広く臨床の場で用いられている酢酸クロルマジノン (CMA) の作用を自然発症 BPH イヌを対象としてその前立腺、精巣及び下垂体に着目して免疫病理組織学的に検討した。[材料と方法] 5-8 年齢のビーグル犬を BPH 対照群と CMA 投与群に分け CMA は、0.03 及び 0.1mg/kg/day の用量で 6 ヶ月間連日経口投与した。摘出された各組織は、ホルマリン固定-パラフィン切片作製後、HE 染色した。下垂体は、抗-LH、ACTH、GH、PRL、TSH、FSH 抗体を用いた免疫染色を行い、前立腺は、アンドロゲン受容体 (AR) 及び  $5\alpha$  リダクターゼタイプ 2 ( $5\alpha$ ) の局在性についても検討した。[結果と考察] 前立腺は CMA の用量に応じて主として腺上皮が萎縮し間質が目立つようになった。AR は、腺上皮細胞及び間質の平滑筋細胞の核に明瞭に局在したが、CMA 投与に伴い両方の核の染色性は極めて低下した。 $5\alpha$  は、間質の平滑筋細胞の細胞質内にびまん性に認められたが、CMA 投与に伴いその染色性は著しく低下した。精巣及び下垂体には著変を認めず、下垂体のホルモン産生細胞にも変化を認めなかった。以上より、CMA は、前立腺の腺上皮のみならず間質の平滑筋細胞にも萎縮作用を示すことが考えられ、ヒト BPH の縮小過程においても腺上皮と間質の平滑筋に作用する可能性が示唆された。

Histopathological and Immunohistochemical Studies of the Effect of Chlormadinone Acetate (CMA), on Canine Spontaneous Benign Prostatic Hyperplasia (BPH)

Rie IKEDA, Masanori MURAKOSHI, Masashi TAGAWA, Takaharu NAKAYAMA, Kotaro GOTANDA, Mamoru MIEDA and Seijiroh HONMA. Safety Research and Pharmacological Research Depts. Teikoku Hormone Mfg. Co., Ltd., Kawasaki, Kanagawa 213-0033

## 骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 におけるメタロチオネイン遺伝子の発現について

○田村幸彦、大谷啓一

東京医科歯科大学歯学部歯科薬理学教室

【目的】金属結合蛋白質のひとつであるメタロチオネイン(MT)は、生体内で重金属の解毒や排泄、微量金属の調整、フリージカルの除去など様々な作用が報告されており、重金属投与により誘導合成されることが知られている。ところで、イタイイタイ病の原因金属であるカドミウムは、硬組織とくに骨に蓄積する傾向が強く、骨芽細胞や破骨細胞などの骨系細胞に直接的に作用することが報告されている。今回我々は、骨芽細胞様細胞を用いて重金属によるMT遺伝子の発現とMTによるカドミウムの細胞毒性の軽減について報告する。

【方法】マウス頭蓋冠より樹立された骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)を10%FBSを含む $\alpha$ -MEM培地で24時間培養後、アスコルビン酸(0.2 mM)、 $\beta$ -グリセロリン酸(1 mM)を添加しコンフルエント後に、亜鉛(5~200  $\mu$ M)処理をした。MT mRNAに特異的なプライマーを用いて、RT-PCR法によりMT遺伝子の発現を観察し、さらに亜鉛処理したMC3T3-E1細胞にカドミウム(100  $\mu$ M)処理後、アルカリフォスファターゼ染色およびアリザリンレッド-S染色を行い、染色された面積および形成されたnoduleを対照群と比較検討した。

【結果と考察】RT-PCR法により骨芽細胞様細胞を亜鉛処理することにより、MT遺伝子の発現が用量依存的に観察された。またカドミウムによる骨芽細胞様細胞の分化およびnodule形成の抑制は、亜鉛の前処理によりそれぞれ減少した。今回の結果より、亜鉛によりin vitroで骨芽細胞様細胞にMT遺伝子の発現が観察され、このMTがカドミウムによる骨芽細胞様細胞の石灰化抑制を軽減する可能性が示唆された。

Gene expression of metallothionein in cultured osteoblast-like cells.

Yukihiko TAMURA and Keiichi OHYA.

Dept. of Dental Pharmacology, Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental Univ., Tokyo 113-8549

○宇波 明, 寺井孝雄, 義澤克彦, 三枝 雅, 藤本芳勝,  
宮安喜久男, 橋本正晴, 小原 要

藤沢薬品工業 (株) 安全性研究所

FR115092は、ハンセン氏病治療薬であるdapsone をプロトタイプとして合成された血小板減少回復剤であり、dapsone と同様にW/BF1 マウスの血小板減少性紫斑病(ITP)モデル、およびマウスにおけるマイトマイシンC誘発血小板減少モデルにおいて有効性が認められている<sup>1)</sup>。我々は、FR115092のラットSeg1試験(単回投与)において胸水が貯留することを見出したので、その毒性プロファイルについて報告する。胸水貯留は投与12~24時間後に認められ、その貯留量は投与するラットの週齢に依存して増加した。この胸水貯留に雌雄差は認められなかった。また本所見は反復投与では認められず、その他の動物種であるマウスやイヌでは発現しなかった。FR115092を単回投与した時の胸水貯留量の変化と、肺および心臓の湿重量変化および両器官と心嚢膜の病理組織学的変化を経時的に比較した結果、胸水が貯留し始める投与 6時間後において有意な肺湿重量の増加、肺間質の血管周囲に浮腫が観察され、投与12時間後には浮腫は肺胞まで拡大していた。なおその他の器官にはFR115092投与に起因する変化は認められなかった。

以上、FR115092をラットに単回経口投与することにより、これまで知られている抗癌剤や殺鼠剤などの場合と比較してより短期間で大量の胸水が貯留することが明らかになった。またこの胸水貯留は肺血管からの血漿成分の漏出に起因するものであることが示唆された。

1) Nishigaki, F. et al., *Journal of Pharmacy & Pharmacology*, 51(7), 857-865 (1999).

Fluid accumulation in the thoracic cavity induced by FR115092, the effective compound against thrombocytopenia (I).

Akira UNAMI, Takao TERAI, Ratsuhiko YOSHIZAWA, Tadashi SAEGUSA, Yoshikatsu FUJIMOTO, Kikuo MIYAYASU, Masaharu HASHIMOTO and Kaname OHARA, Toxicology Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka 532-8514

○宇波 明, 寺井孝雄, 義澤克彦, 宮安喜久男, 橋本正晴,  
小原 要

藤沢薬品工業(株) 安全性研究所

FR115092がラットにおいて胸水貯留を誘発することについては前演題で報告した。薬剤起因性の胸水貯留には、炎症・免疫システムの活性化あるいは肺血管圧の変化などが関与していることが考えられた。これを踏まえ、炎症に関与するメディエーター類の受容体拮抗剤及び降圧剤などの胸水貯留への影響を検討した。その結果、血管透過性亢進作用が強いLT, histamine, 5-HT, BK, NKの各受容体の特異的拮抗剤やNSAID, および降圧剤はいずれもFR115092誘発の胸水貯留に対してほとんど影響しなかった。しかしステロイド剤としてdexamethasone, あるいは強力な免疫抑制剤として知られるcyclosporin Aを前投与することにより本剤誘発の胸水貯留がそれぞれ50%あるいは90%抑制されることが明らかとなった。

以上のことから、FR115092誘発胸水貯留の発症メカニズムとしてリンパ球系細胞の機能亢進が関与している可能性が示唆された。

なお、本剤は胸水貯留の他に血小板減少回復作用及びthyroid peroxidase (TPO)阻害作用を有する。これらの作用の胸水貯留発現への関与についても調べた。すなわち本剤のプロトタイプ化合物で血小板減少回復作用を有するdapsoneと、代表的なTPO阻害剤であるpropylthiouracilについて、胸水貯留誘発作用の有無を検討した。その結果、両化合物ともほとんど胸水貯留を惹起せず、これらの2つの作用は胸水貯留の発現に関与していないと考えられる。

Fluid accumulation in the thoracic cavity induced by FR115092, the effective compound against thrombocytopenia (II).

Akira UNAMI, Takao TERAI, Katsuhiko YOSHIZAWA, Kikuo MIYAYASU, Masaharu HASHIMOTO and Kaname OHARA, Toxicology Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka 532-8511

## タモキシフェン反復投与のラット子宮及び卵巣に及ぼす影響

○佐藤敦子, 久田 茂, 谷藤久人, 永嶋雅子, 飯塚和弘, 増田修治,  
三村雄一, 中山隆治

帝國臓器製薬株式会社 安全性研究部

【目的】タモキシフェンは乳癌治療に汎用されている抗エストロゲン剤であるが、エストロゲン作用も併せ持つことが知られている。今回我々はタモキシフェンの3ヵ月間投与を行い、子宮及び卵巣に投与量によって異なる変化を認めたので報告する。

【方法】6週齢の雌性SD系ラットにタモキシフェンを0, 10及び50mg/kgの用量で3ヵ月間反復経口投与した。タモキシフェンはクエン酸塩を用い2%Tween80に懸濁して投与した。3ヵ月投与終了後にペントバルビタールNa麻酔下で放血致死させ、卵巣及び子宮を摘出して重量を測定し、常法に従ってヘマトキシリン・エオジン染色標本作製して病理組織学的検査を行った。

【結果及び考察】投与期間中一般状態に異常は認められなかったが、体重増加抑制が用量に依存して認められた。子宮重量の低下及び子宮内膜の萎縮が両投与群で認められたが、50mg/kg群ではさらに子宮内膜上皮の肥厚（高円柱上皮化）も認められた。卵巣では、10mg/kg群で黄体萎縮（明らかな数の減少あるいは消失）、嚢胞卵胞の増加及び間質細胞の腫大と増生が認められた。50mg/kg群では嚢胞卵胞はほとんど認められなくなり、間質細胞の増生がより顕著に認められて、老齢ラットの萎縮した卵巣に類似した状態を呈した。以上より、子宮及び卵巣において10mg/kg投与で抗エストロゲン作用に起因すると思われる変化が認められたのに対し、50mg/kg投与ではそれに加えてエストロゲン作用によると思われる毒性変化も発現することが示唆された。

## Effects of Tamoxifen Treatment on the Uterus and Ovary in Rats.

Atsuko SATO, Shigeru HISADA, Hisato TANIFUJI, Masako NAGASHIMA, Kazuhiro IIZUKA, Shuji MASUDA, Yuuichi MIMURA and Takaharu NAKAYAMA. Safety Research Department., Teikoku Hormone Mfg. Co., Ltd. Kawasaki, Japan



○田村 啓、三森国敏、安原加壽雄、小野寺博志、高木久宜、  
 那須昌弘、広瀬雅雄

国立衛研・病理部、<sup>1</sup>（株）パナファーム・ラボラトリーズ

【目的】Diisopropanolnitrosamine(DHPN)の単回皮下投与後の長期観察ではラットに甲状腺腫瘍が誘発されるが、投与初期における甲状腺関連ホルモンの変動については明らかにされていない。一方、DHPN を反復投与することにより精巣萎縮が誘発されるがその毒性発現機序は明らかにされていない。今回、これらの不明な点を明らかにするため、DHPN を単回投与し、甲状腺や精巣、及びその関連ホルモンに及ぼす初期影響を経時的に検索した。【方法】雄 F344 ラットに DHPN(2000mg/kg)を単回皮下投与し、6, 14, 24, 48 時間、4, 7, 14 日後に5匹ずつ剖検して血液を採取し、血清中の T3, T4, TSH, FSH, LH 及び testosterone レベルを測定するとともに、甲状腺、精巣について組織学的検索を行った。また各時期毎に4匹の溶媒対照群を設けた。【結果】甲状腺：血清 T3, T4 に顕著な変化は認められなかった。血清 TSH は7日及び14日後に明らかな上昇が観察された。甲状腺濾胞上皮の PCNA 標識率は48時間後に減少したが、4日、7日後には顕著に増加し、14日後には再び対照群レベルに減少した。精巣：投与後24, 48時間にステージXII~XIIIの精細管基底部に TUNEL 陽性の変性細胞が観察され、精祖細胞数の減少が認められた。投与後7日ではステージVI~VIIIの精祖細胞、精母細胞、円形精子細胞数の減少が認められた。血清 FSH は投与後14日で有意に増加した。血清 LH に顕著な変化は認められなかった。testosterone は48時間、4日、7日後に減少したが、14日後には回復した。【考察】一過性の血清 TSH 上昇と甲状腺濾胞上皮の増殖活性の増加は DHPN の毒性による初期の甲状腺障害に対する反応性の変化と考えられた。精上皮の変化は血清 testosterone 低下以前から観察され、血清 FSH や LH にも初期に顕著な変化はみられなかったことから、DHPN が直接、精祖細胞を傷害したものと推察された。

Early changes of the thyroid and testis in rats given a single administration of diisopropanolnitrosamine.

Toru TAMURA, Kunitoshi MITSUMORI, Kazuo YASUHARA, Hiroshi ONODERA, Hisayoshi TAKAGI, Masahiro NASU<sup>1</sup> and Masao HIROSE. Div. of Pathology, Natl. Inst. Hlth. Sci., Tokyo 158-8501. <sup>1</sup>Panapharm Lab., Kumamoto 869-0425.

## Hershberger Assay における副生殖器重量測定法の検討：精液凝固固定後測定による試験精度の向上

○角南 整, 山田智也, 国松武史, 奥野泰由, 紙田祐介, 園 高樹

住友化学工業株式会社 生物環境科学研究所

[目的] 雄性あるいは抗雄性ホルモン様作用の検出法の一つである Hershberger Assay において、副生殖器重量は最も鋭敏な指標の一つである。今回、その精度および実用性検証の一環として、10%中性緩衝ホルマリン液による固定前後に器官重量測定を行い、器官重量に対する固定の影響を検討した。さらに、各種化合物について、Hershberger Assay を用いて、抗雄性および雄性ホルモン作用の有無を検討した。[方法] 10 週齢の Crj:CD(SD)IGS 雄マウスを去勢し、去勢 1 週間後から以下の実験を行った。《実験Ⅰ》①無処置群、② Testosterone Propionate (TP: 0.25 mg/kg/day, s.c.) 投与群、③ TP + *p,p'*-DDE (陽性対照, 100 mg/kg/day, p.o.) 投与群に分け、5 日間投与した。最終投与の翌日、前立腺腹葉および背側葉、精囊(凝固腺含む)、肛門挙筋+球海綿体筋(筋肉)、尿道球腺、陰茎龟头を摘出し、固定前および24時間固定後に重量を測定した。《実験Ⅱ》また、上記方法を用いて Ethynyl estradiol (EE), Methoxychlor, Fenitrothion について抗アンドロゲン作用の有無を、Fenitrothion についてアンドロゲン作用の有無を検討した。《実験Ⅰ》全測定器官の固定前後の重量を比較したところ、高い正の相関関係があり、各器官の CV 値が固定前後で差がなく、*p,p'*-DDE 投与群の対照群に対する重量の割合にも変化がなかった。固定後に重量を測定することにより、内容液の流出を回避でき、かつ、脂肪等の付着物を確実に除去できるため、試験精度の向上に繋がると考えられた。《実験Ⅱ》*p,p'*-DDE 投与群で各器官重量の減少が認められる条件下で、Methoxychlor 投与群では抗アンドロゲン作用を示唆する変化が認められ、EE および Fenitrothion 投与群では何ら変化が認められなかった。また、Fenitrothion についてはアンドロゲン作用についても陰性の結果であった。

Evaluation for Method of Organ Gravimetry of Sex Accessory Organs and Tissues in Male Rats: Effects of Formalin Fixation in a Hershberger Assay.

Osamu SUNAMI, Tomoya YAMADA, Takeshi KUNIMATSU, Yasuyoshi OKUNO, Yusuke KAMITA, Takaki SEKI, Environmental Health Science Laboratory, Sumitomo Chem. Co. Ltd., Osaka 544-8558, Japan

大腸菌にて発現可能な融合ヒトアンドロゲンレセプター的设计と  
その応用：内分泌攪乱物質としての化学物質の評価

松本千太郎, 野家義博, 西井中明, 五嶋卓世, 川村良久

東洋紡績株式会社 数智バイオ研究所

【目的】化学物質との相互作用を評価しうる活性ヒトアンドロゲンレセプター（以下hARと略）の大腸菌発現系を構築する。この系で発現されたhAR標品によりARとの相対作用について報告のある、代表的な化学物質を評価する。

【材料と方法】転写活性化に関わるA領域を除くhAR遺伝子断片を、特異的プライマーにより設計し、一部改変したマルトース結合蛋白（以下MBPと略）融合蛋白発現ベクターに連結した。このベクターの大腸菌形質転換体中のARの結合活性を、デキストランチャペール法に基づき、合成アゴニストである(3H)ミボレロンを用いて検出した。活性確認後、MBP融合hARと(3H)ミボレロンを用いた測定系（4℃、3時間反応）にて、ノンラベルのミボレロン、R1881、ジヒドロキシテストステロンおよびテストステロンとの競合反応性を調べた。また組換え酵母を用いた検討でP.SohniとJ.P.Sunterにより抗アンドロゲン作用を示す化学物質として報告（1998年）された、ジニチルスチペロール、ビスフェノールA、ノニルフェノールなどについても競合反応性を検討した。

【結果と考察】構築した発現プラスミドを保持する形質転換体は、継代的にも安定であり、一定の活性なMBP融合hARを発現していた。このMBP融合hARは内在性アゴニスト、合成アゴニストいずれにも鋭敏な反応性を有し、抗アンドロゲン作用の報告がある化学物質にも明確なドーズレスポンスを示した。

これらのことから、大腸菌にて発現されたMBP融合hARは、アゴニスト・アンタゴニストいずれをも検出でき、化学物質のAR相互作用のポテンシャルにつき、迅速かつ簡便に評価可能な、ブレイクフリーニスマに適したツールと考えられる。

Design of the fused and active human androgen receptor expressed in *E.coli* and the estimation of the potent endocrine disrupting chemicals by using it

Kazubiro Matsui, Yoshihiro Soya, Shigeaki Nishi, Takuya Ishibashi, Yoshihisa Kawamura: Tsuruga Institute of Biotechnology, TOYOBO : 10-24 Toyo-cho, Tsuruga-shi, Fukui 914-0047

ヒト前立腺がん由来細胞株 LNCaP 細胞を用いた  
*in vitro* 抗アンドロジェン活性評価系の検討

○成見香瑞穂, 片山誠一, 永井賢司, 富川誠

三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所

【目的】化学物質の抗アンドロジェン活性の評価法として、レポーター遺伝子アッセイをはじめとしたいくつかの *in vitro* スクリーニング法が検討されているが、代謝物の影響も併せて評価可能な簡易かつ高感度な試験系は少ない。今回、我々はアンドロジェン依存的に増殖する LNCaP 細胞を用いて、代謝活性化法を含め、多様な化学物質に応用可能な *in vitro* 抗アンドロジェン活性評価系の確立を目的とした基礎的検討を行ったので報告する。

【方法】LNCaP 細胞を 96 穴プレートで 2 日間前培養後、無血清条件下で dihydrotestosterone(DHT) 及び被験物質で共処理した。共処理後 7 日目の細胞増殖率を WST-8 で測定し、DHT 依存的細胞増殖への被験物質の影響を評価した。被験物質の代謝活性化にはラット S9 を用い、2 時間の前処理を行った。被験物質として AR antagonist である *p,p'*-DDE および flutamide を使用した。

【結果】DHT 濃度依存的な増殖曲線を得るための条件を検討した結果より、前培養時の添加血清濃度を 0.5% 以下、細胞数を  $2 \times 10^5$  cells/mL、DHT 濃度を 0.001 ~ 1  $\mu$  M および処理時間を 7 日間とした。*p,p'*-DDE 処理では、0.01  $\mu$  M においても強い増殖抑制 (陰性対照値比の 10% 以下) を示し、極めて低濃度から抗アンドロジェン活性を評価できる系であることが示唆された。代謝活性化法の検討では、S9mix の組成を通常の染色体異常試験で用いられる場合と同様にし、代謝時間を 2 時間に設定した。活性代謝物が抗アンドロジェン活性を示す flutamide 処理において、-S9 法では 1  $\mu$  M で約 50% の増殖抑制しかみられなかったのに対し、+S9 法ではその 1/100 の 0.01  $\mu$  M で同程度の増殖抑制を示した。これらの結果から、本評価系は代謝物の抗アンドロジェン活性をも十分に評価可能な高感度 *in vitro* スクリーニング系として有用であることが示唆された。

*In vitro* screening method to identify anti-androgenic activity using the human prostatic cancer cell line LNCaP.

Kazunori NARUMI, Seiichi KATAYAMA, Kenji NAGAI and Makoto MIYAGAWA.  
Kashima Laboratory, Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd., Ibaraki, 314-0255, Japan.

去勢ラットの前立腺腹葉におけるアポトーシスを指標  
とした*in vivo*抗アンドロジェン活性評価系の検討

○片山誠一, 成見香瑞穂, 岡村隆之, 永井賢司

三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所

【目的】化学物質の抗アンドロジェン活性の評価法として、前立腺腹葉重量の変化を指標とした方法が知られているが、この方法のみでは細胞動態への影響を知ることはできない。我々は去勢ラットの前立腺腹葉におけるアポトーシスをフローサイトメトリーで解析することにより、迅速かつ簡便な抗アンドロジェン活性の評価系を確立することを目的として検討を行った。【方法】(I) SD系雄性ラットを10週齢で去勢し、24、48および72時間後のアポトーシスの経時的変化を解析した。(II) AR agonistに対する反応を評価するために、去勢直後からtestosterone propionate (TP : 0.1, 0.3, 1 mg/kg/day)を3日間反復皮下投与した。(III) AR antagonistであるflutamide (FLU : 0.1, 0.3, 1, 3, 10 mg/kg/day), *p,p'*-DDE (DDE : 10, 100 mg/kg/day), vinclozolin (VIN : 10, 100 mg/kg/day)を3日間反復皮下投与し、同時にTP(0.3 mg/kg/day)を皮下投与した。各最終投与後24時間に前立腺腹葉細胞を単離・固定後、fluorescein-dUTPを用いたTUNEL反応によってDNA鎖分解物を標識し、アポトーシス細胞の割合をフローサイトメトリーで解析した。【結果】去勢後24時間からアポトーシス細胞の有意な増加がみられ、その割合は去勢後72時間まで増加し続けた。去勢ラットにTPのみを投与した結果、アポトーシス細胞はTP 0.3 mg/kg/day以上の群で正常ラットと同等のレベルまで有意に減少した。そこで、抗アンドロジェン活性の評価に用いるTP用量を0.3 mg/kg/dayに設定し、FLU, DDEおよびVIN投与の影響を評価した。FLUでは3 mg/kg/day以上の群、DDEおよびVINでは10 mg/kg/day以上の群でアポトーシス細胞の有意な増加が認められた。これらの結果から、本実験系はアンドロジェン依存性細胞のアポトーシスを指標とした*in vivo*抗アンドロジェン活性評価系として有用であることが示唆された。

*In vivo* screening method to identify anti-androgenic activity with apoptosis  
in the castrated rat ventral prostate.

Seichi KATAYAMA, Kazunori NARUMI, Takayuki OKAMURA and Kenji NAGAI.  
Kashima Laboratory, Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd., Ibaraki, 314-0255, Japan.

フルタマイドの胎児期・新生児期曝露によるF1雄ラットの生殖系ホルモン応答および精巣機能に及ぼす影響

○森下晴津子<sup>1)</sup>、須方督夫<sup>1)</sup>、佐野真士<sup>2)</sup>、吉野裕子<sup>2)</sup>、  
宮田かおり<sup>1)</sup>、奥野泰田<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>住友化学・生科研、<sup>2)</sup>大雄会医科学研究所

【目的】抗アンドロゲン物質であるフルタマイドを妊娠ラットに投与して、F1雄ラットの生殖系ホルモン応答および精巣機能に対する胎児期・新生児期曝露の影響を検討した。

【方法】Crj:CD(SD)IGS、(SPF)雌ラットに妊娠12日から分娩3日までフルタマイドを0.15、0.6、2.5、10.0、100mg/kgの用量で連日強制経口投与した。出生したF1雄について、生後4日齢の精巣の病理組織学的検査[HE染色、アンドロゲン受容体(AR)免疫染色]、血清ホルモン[黄体形成ホルモン(LH)、テストステロン(T)]、精巣ホルモン(T)測定を実施した。また、精巣下降の有無を確認し、60日齢で屠殺して4日齢で実施した項目に加えて精巣重量測定および精子検査(数、運動性)を実施した。

【結果および結論】4日齢の10mg/kg以上で血清T、LHの高値および精巣Tの高値傾向が認められた。精巣下降については10mg/kg以上で停留精巣が認められ、100mg/kgではその発現がより高頻度であった。60日齢では10mg/kg以上で精巣重量、精子数の低下および組織学的に精細管萎縮が認められ、100mg/kgで血清LHが高値、血清Tおよび精巣Tが高値傾向を示した。60日齢のAR免疫染色では、ライノ細胞の染色性に対照群との差が認められなかったが、対照群で認められたライノ細胞のステロイド依存的染色性は10mg/kg以上の群で消失した。精子運動性およびAR局在性には対照群との差は認められなかった。以上のように胎児期・新生児期にフルタマイドを投与することによりホルモンの変動および精子形成能低下が認められ、これらに関する無毒性量は2.5mg/kgであった。

Effects on Sexual Hormone Levels and Testicular Function in F1 Male Rats by Fetal and Postnatal Flutamide Exposure

Setsuko YABUSHITA, Tokuo SUKATA, Masashi SANO, Hiroko YOSHINO, Kaori MIYATA, and Yasuyoshi OKUNO, Environmental Health Science Lab., Sumitomo Chemical Co., Ltd., Daiyu-Kai Institute of Medical Science

○加藤英男 内藤一嘉 吉島賢一 太田隆雄 古橋忠和  
岩田寿雄

株式会社 日本バイオリサーチセンター 試験管理部

〔目的〕 内分泌かく乱化学物質とされるものには *in vitro* あるいは *in vivo* の試験系においてエストロゲンと類似の作用を示す可能性が示唆されている。そこで今回、我々は内分泌かく乱化学物質の雌ラット新生児への投与による生殖系に及ぼす影響について、ビスフェノールAを用いて検討した。

〔方法〕 Crj:CD (SD) IGS ラットの雌新生児を用いた。一群の動物数は 8 匹とした。投与量は、ビスフェノールA 0、0.25、1 および 4 mg/匹とし、いずれも出生日より 10 日間、背部に皮下投与(0.02 mL/匹)した。また、比較対照としてエストラジオール 17  $\beta$  (以下、E2 と略) 10  $\mu$ g/匹を 10 日間同様に投与した。生後 61~80 日齢に性周期を観察し、80 日齢で卵巣を摘出し、重量測定した。さらに、卵巣摘出後 14 日間および 46~47 週齢時に性周期を観察した。性周期観察後、3 日間、E2 0.5  $\mu$ g/kg を皮下投与し、翌日に剖検し、子宮重量を測定した。

〔結果〕 (1) 生後 61~80 日齢の性周期では、1 mg/匹以下の群は異常がみられなかったが、4 mg/匹群および E2 10  $\mu$ g/匹群は連続発情を含む発情期の延長あるいは不規則な発情周期がみられた。

(2) 卵巣重量は、4 mg/匹群および E2 10  $\mu$ g/匹群で低値であった。

(3) 子宮重量は、4 mg/匹群および E2 10  $\mu$ g/匹群で低値であった。

以上の結果から、ビスフェノールA は 1 mg/匹以下の投与では影響を及ぼさなかったが、4 mg/匹という大量投与では雌ラット生殖系にエストロゲンと類似した影響を及ぼすことが示唆された。

Effect of bisphenol A on the reproductive system in female rats during the neonatal period.

Hideo KATO, Kazuyoshi NAITO, Ken-ichi YOSHIIJIMA, Takao OTA, Tadakazu FURUHASHI and Toshio IWATA.

Study Department, Nihon Bioresearch Inc., Hashima, Gifu 501-6251

○桑原孝<sup>1)</sup>、朝波省吾<sup>2)</sup>株式会社大塚製薬工場<sup>1)</sup> 応用開発部、<sup>2)</sup>鳴門研究所

【目的】末梢静脈用輸液において最も頻度が高く問題となる副作用は静脈炎であるが、輸液に脂肪乳剤を添加することで静脈炎が減るという報告がある。この作用は浸透圧が下がることに起因すると考えられるが、さらに、脂肪の直接的な静脈保護作用も考えられている。本研究は、脂肪乳剤の添加が静脈炎に与える影響を明らかにするために実施した。

【方法】コントロールとして3%アミノ酸・7.5%グルコース・電解質輸液(AG、815 mOsm/kg)、AGに20%脂肪乳剤を加えたもの(LAG、733 mOsm/kg)、2.7%グリセロールを加えたもの(GAG、735 mOsm/kg)及び生理食塩液を加えたもの(SAG、718 mOsm/kg)を、ウサギ耳介静脈内に5 mL/kg/hrの速度で24時間投与した。投与終了の24時間後に投与静脈を採取、病理組織学的に検査した。

【結果】障害性の指標のひとつである「静脈内皮細胞の消失」はコントロール液AGを投与した8例全例に(平均グレード=1.75)、LAG投与群では8例中7例に(平均グレード=1.00、 $p<0.05$  vs AG)、GAG投与群では8例中5例に(平均グレード=0.87、 $p<0.05$  vs AG)、SAG投与群では8例中6例に(平均グレード=0.87、 $p<0.05$  vs AG)それぞれ認められた。いずれの添加によってもコントロール液AGに対して有意な軽減がみられたが、LAG、GAG及びSAG間には有意差はなかった。

【考察】これらの結果から、脂肪乳剤の添加は2.7%グリセロールや生理食塩液と同程度に静脈炎を軽減し、その軽減作用は浸透圧を下げることによるものであり、脂肪乳剤は直接的な静脈保護作用は持たないものと考えられた。

An Experimental Study on Veno-protective Effect of Parenteral Lipid Emulsion.

Takashi KUWAHARA<sup>1)</sup> and Shougo ASANAMI<sup>2)</sup><sup>1)</sup>Therapeutic Application Development Dept., <sup>2)</sup>Naruto Research Institute, Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc., Tokushima 772-8601, Japan.



飲料水中の強力変異原性物質“MX(3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone)”の毒性評価

○広瀬明彦<sup>1</sup>、西川秋佳<sup>1</sup>、木苗直秀<sup>2</sup>、長谷川隆一<sup>1</sup>

<sup>1</sup>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  
<sup>2</sup>静岡県立大学 食品栄養科学部

〔目的〕MX(3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone)は、水道の塩素消毒処理の過程で生じる副生成物の一つであるが、サルモネラを使った Ames 試験において強力な変異原性を示す物質としても知られている。MX は、各国で飲料水中に数十 ppb オーダーで検出されていると共に、近年ラットに対して発がん性があることが報告され、ヒトの健康影響に対する評価を行うことが急務となっている。本研究ではMXの毒性評価とヒトに対する健康影響のリスクアセスメントを行った。

〔方法〕MXの毒性影響に関する情報を毒性の種類ごとに分類し、各毒性に対してNOAEL(またはLOAEL)、発がん性に関してはユニットリスクを算出した。さらに、各々に対するTDI(tolerable daily intake)とVSD(virtual safety dose)を算出し、飲料水中におけるMXの安全性を評価した。

〔結果および考察〕MXはサルモネラ菌に対する変異原性以外には乳類細胞用いた*in vitro*系でも遺伝子障害性を示すが、SH化合物等の生体内成分との共存条件下では速やかにその遺伝子障害性を失う。しかし、一部の*in vivo*遺伝子障害検出系での陽性結果に加え、ラットに対してはがん原性物質である。また、皮膚や消化器系に対しては発がんプロモーション作用を持つことも報告されている。以上の知見を基に、MXがヒトに対して遺伝子障害性を持つと仮定した場合のVSDは5ng/kg/day、非遺伝子障害性であると仮定した場合のTDIは40ng/kg/dayであると算出された。総合的には、現時点での飲料水中のMXによる発がんリスクは低いと考えられるが、生殖発生毒性等に関する知見は現時点でほとんど報告されておらず、この評価は暫定的なものである。

Toxicity evaluation of a strong mutagen MX (3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone) in drinking water.

Akihiko Hirose<sup>1</sup>, Akiyoshi Nishikawa<sup>1</sup>, Naohide Kinoshita<sup>2</sup>, and Ryuichi Hasegawa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan. <sup>2</sup>School of Food and Nutritional Science, University of Shizuoka, Shizuoka 422-8526, Japan

高木 親, 安東賢太郎, 稲村直樹, 井上裕章

三菱東京製薬(株)横浜研究所安全性研究所

【目的】マウスは嘔吐をしないことが知られている。しかしながら、我々はマウスを用いて催吐作用が検出できればフェレット等と比べ安価かつ簡便であることから有用性が高いと考え、催吐作用を有することが知られている数種の薬剤を用い、マウスで消化器機能の検討に用いられる実験項目である腸管輸送能および胃排出能に及ぼす影響を検討した。

【方法】 ddY 系雄性マウスを一晚絶食して用いた。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、炭末投与後 30 分の輸送率を求めた。胃排出能は直径 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】硫酸銅は 10mg/kg 以上の経口投与で腸管輸送能を亢進したが 3mg/kg 以上で胃排出能を抑制した。シスプラチンは 10mg/kg までの静脈内投与で腸管輸送能に影響しなかったが 1mg/kg 以上で胃排出能を抑制した。アポモルヒネは 0.3mg/kg までの皮下投与で腸管輸送能に影響しなかったが、0.3mg/kg で胃排出能を亢進した。塩酸ドキシソルピシンは 10mg/kg までの静脈内投与で腸管輸送能に影響を及ぼさなかったが 3mg/kg 以上で胃排出能を抑制した。サケカルシトニンは 30U/kg までの筋肉内投与で腸管輸送能に影響を及ぼさなかったが 3U/kg 以上で胃排出能を抑制した。(塩酸ドキシソルピシンおよびサケカルシトニンは前回の本学会にて発表済み)

【考察】催吐作用を有する薬剤は嘔吐を起こさないマウスでも消化器機能に影響を及ぼしており、マウスを用いても催吐作用の検出が可能であることが示唆された。また、その際胃排出能の方が腸管輸送能よりも良い指標になると思われた。

#### Detection of drug-induced emetic effect in mice

Kan TAKAGI, Kentaro ANDO, Naoki INAMURA, Hiroaki INOUE Toxicology Laboratory, Yokohama Research Center, Mitsubishi-Tokyo Pharmaceuticals, Yokohama 227-0033, Japan

CPP法に関する基礎的検討：ベンゾジアゼピン系薬物における  
強化効果の検出

○宮藤 出, 堀江泰志, 小関直輝, 船橋 斉, 松岡信男

大日本製薬株式会社 開発研究所

【目的】近年、薬物の精神依存性の評価法としてラットを用いたConditioned Place Preference (CPP) 法が注目を浴びている。しかし、CPP法ではベンゾジアゼピン系薬物 (BZP系薬物) に代表される中枢抑制性薬物の強化効果を検出することが困難とされている。そこで、我々はCPP法による中枢抑制性薬物の強化効果を検出可能とする至適実験条件を、BZP受容体アゴニストであるシアセバム (DZP) およびトリアゾラム (TRZ) を用いて検討した。

【方法および結果】実験には白黒2つの区画からなるボックスを使用した。条件付けとして薬物処置後、動物を直ちに一方の区画に30ないしは50分間閉じ込め、翌日に溶媒を処置した後、他方の区画に同じ時間閉じ込めた。この操作を1セットとし、3セット終了毎に動物を薬物非投与条件下でボックス内 (仕切りをはずした状態) に置き、15分間自由に行動させて薬物側区画と溶媒側区画の滞在時間を測定した。強化効果の指標として各区画の滞在時間の差 (CPPスコア) を用いた。各試験には6週齢のJcl:SD系雌性ラットを1群につき4~8匹用いた。【実験1】DZP (0.25, 0.5, 1.0 mg/kg) およびTRZ (1, 3, 10, 30, 100 μg/kg) を腹腔内投与し、条件付け回数を9セットとした。その結果、いずれの投与群でもバラツキが大きく、明らかな強化効果は認められなかったが、CPPスコアはTRZ群の方がDZP群よりも高い傾向にあった。【実験2】TRZ (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 μg/kg) を静脈内投与し、条件付け回数を12セットとした結果、3及び10 μg/kg群で明らかな強化効果が認められた。

【考察】以上の結果から、TRZの強化効果の検出には、投与経路と条件付け期間が重要であることが示唆された。また、これら実験条件を適切に設定することで、CPP法においてもBZP系薬物の強化効果の検出が可能となることが示された。

Basic Study of Conditioned Place Preference (CPP) Method: The Detection of Reinforcing Effect in Benzodiazepines

Izuru MIYAWAKI, Hiroshi HORIE, Naoteru KOSEKI, Hitoshi FUNABASHI and Nobuo MATSUOKA. Developmental Research Laboratories, Daiippon Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka 564-0053, Japan.

三浦大志郎、小林亮、尾形昭子、古川純子、飯島剛、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】実験動物の骨髄検査(骨髄有核細胞数測定、表面抗原発現の解析)に対するフローサイトメーターによる解析を検討した。

【材料及び方法】ラット(Slc:SD)大腿骨から骨髄を採取し、ベックマン・コールター社製フローサイトメーター(EPICS XL)を用いて解析した。(1)骨髄有核細胞数の測定:骨髄サンプルにOptilyse C(ベックマン・コールター社)を添加して赤血球を溶血させた後、Flow-count(ベックマン・コールター社)を混合してCALリージョンを設定したプロトコルを用いて解析した。(2)表面抗原解析:種々の抗ラット表面抗原抗体(ファージン社)を $1\text{mg}/10^6$ 細胞の濃度で骨髄サンプルに添加し30分間インキュベートした後、Optilyse C処理により赤血球を溶血させ解析した。末梢血での発現についても同時に解析した。

【結果及び考察】正常ラットの骨髄有核細胞数を測定したところ、 $2 \times 10^6$ 細胞/ $\mu\text{L}$ 前後の測定値が得られた。この結果は従来報告されている骨髄有核細胞数の値に近かった。一方、表面抗原解析結果は以下の表のようになった。

		CD2	CD8a	CD11b	CD18	CD45	CD45R	CD61	CD71	CD90	抗ラット顆粒球
末梢血	リンパ球	+	+	-	+	+	-	+	±	+	-
	単球・顆粒球	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
骨髄		-	-	-	-	+	+	-	+	+	-

発現の程度:+(強い発現) ±(弱い発現) -(発現なし)

これらの結果のうち、末梢血での表面抗原発現については従来報告されている結果とほぼ一致するものと考えられたが、骨髄については、表面抗原発現細胞をソーティングし形態的分類を実施する必要性が示唆された。なお、骨髄毒性作用を示す薬剤を投与し上記の表面抗原発現の変動についても検討を予定しており、その結果も併せ、骨髄検査へのフローサイトメーターの利用の可能性について報告する。

Basic Study on the Using Flow-cytometer (EPICS XL) for the Bone Marrow Examination

Daihiro MIURA, Mitsuru KOBAYASHI, Shoko OGATA, Junko FUJIKAWA, Takeshi IJIMA, Yukiya KOIKE and Hiroshi UNO. Safety Research Department, Pharmaceuticals Development Research Laboratories, TEIJIN LIMITED, Hino, Tokyo 191-8512

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2 — 若齢ラットと成熟ラットの比較検討 —

○井口綾子, 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, 小川秀治, 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。昨年の本学会(第26回)において、通常的安全性試験に使用される週齢のラットを用いた制限給餌試験について報告したが、今回は、動物の週齢による制限給餌の影響を確認するため、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、20週齢超過のラットを用いて検討した。

【方法および結果】 23週齢のCj:CD(SD)IGS雄ラットを用い、4週間の55%制限給餌を行った後、尿検査および血液学的検査を実施した。

実験結果から、臨床病理検査および器官重量は、ほとんどの項目で6週齢のラットと同様の変動傾向を示すことが確認された。尿検査結果では、尿中Na,K濃度は、対照群(100%)に比し、制限給餌群でNa:72%,K:69%まで減少を示した。血液学的検査では、白血球数の減少、白血球分類の変動及び赤血球系パラメーターの増加が認められ、同時に、脾臓および胸腺の絶対重量の減少が観察された。一方、6週齢のラットと結果の異なる項目は、体重推移、尿定性検査、副腎の絶対重量及び胸腺の相対重量値であった。すなわち、6週齢のラットでは、体重増加抑制、尿中の比重、蛋白、ケトン体及び白血球の低下、副腎絶対重量の減少及び胸腺相対重量の増加が観察されたのに対し、23週齢のラットでは、体重減少、尿中白血球の低下及び胸腺相対重量の減少が観察された。これらの異なる結果は、ラットの週齢による成長度ならびに給餌制限によるストレスの感受性の差異に起因すると推察された。

Influence of food restriction on hematology and urinalysis in Rats 2.

— Comparison of young rats and young-adult rats —

Ayako IGUCHI, Naoki NISHI, Miwa SAWADA, Akiko MATSUI, Yuka IINO, Toshiko KINOMOTO, Yumiko SHIRAIISHI, Shuji OGAWA and Yukinori MERA.

Central Research Laboratories, ZERIA Pharmaceutical Co., Ltd., 2512-1, Oshikiri, Kohnanmachi, Ohsato-gun, Saitama, Japan.

反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する  
共同研究：5-FUを用いた2及び4週間反復経口投与比較試験

○松本 博隆、猪又 晃、林 万律子、堀井 郁夫

日本ロシュ（株）研究所、前臨床科学研究部

[目的] ラット雄性生殖器に対する 5-fluorouracil (5-FU)の影響を比較するため、2週間及び4週間反復経口投与試験を実施した。[材料及び方法] 5週齢の Sprague-Dawley (SD-slc)系雄ラットを用い、3週間または1週間の検疫期間終了後、各々2週間、4週間試験に供試した。雄性生殖器に対して何らかの影響が期待される用量として2週間試験では20, 30 mg/kg 群を、4週間試験では0 (対照群)、20 mg/kg 群を各群5匹ずつ設定した。薬液投与は胃ゾンデによる強制経口投与により行い、投与容量は1 ml/100 g 体重とした。投与期間中、症状観察を毎日、体重・摂餌量測定を週2回実施した。投与期間終了後、動物を屠殺、剖検し、雄性生殖器系臓器の重量測定を実施した。精巣、精巣上体をブアン液により固定後、常法に従ってHE染色標本作製し、病理組織学的検索を実施した。[結果] 両試験において、5-FU反復経口投与により糞便の減少、被毛状態の悪化及び削瘦が認められた。剖検所見において、精巣の萎縮及び軟化、副生殖腺の萎縮が認められ、ほぼすべての雄性生殖器において絶対重量減少が認められた。病理組織学的検査では、両試験ともに精細管上皮の変性及び精巣上体管における変性精子形成細胞が認められ、2週間試験ではさらに精細管上皮の剥離、精子形成の減少、セルトリ細胞の空胞化、精細管内における巨細胞形成、及び精巣上体管の精子数減少が認められた。[考察] 本試験結果より、ラット雄性生殖器に対する5-FUの影響は2週間試験で検出し得ることが示された。また、雄性生殖器の変化は、用いる動物の週齢によりその発現強度が異なることが示され、毒作用評価上、投与開始時に同一週齢の成熟動物を用いることの必要性が示唆された。

Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats: 2 and 4 weeks comparative oral repeated dosing studies on male reproductive organs in rats treated with 5-fluorouracil

Hirofumi MATSUMOTO, Akira INOMATA, Mariko HAYASHI, Ikuo HORII, Dept. Preclinical Science, Nippon Roche Research Center, Kamakura, 247-8530, Japan

反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する研究  
 --Adriamycin (ADR)単回静脈内投与後の2及び4週間休薬による精巣毒性の比較検討--

○恒成一郎, 河内 護, 松丸剛久, 勝木昭次

日本ベーリンガー・インゲルハイム(株) 川西医薬研究所

【目的】厚生科学研究「2週間の反復投与毒性試験による雄性生殖器への影響の可否に関する研究(ICH-2W 大野班)」として、我々は既知の精巣毒性誘発物質であるADRをラットに単回投与し、2週間の休薬期間で精巣毒性が検出可能か否かを検討した。

【材料及び方法】動物は各群10匹のCj;CD(SD)雄ラットを用いた。ADR 2及び6mg/kgを8週齢(2週間休薬群)あるいは6週齢(4週間休薬群)のラットに単回投与し、それぞれ10週齢時に精巣毒性を検査した。また幼若ラットへの影響を検討するために、同系4週齢ラットに同用量のADRを単回投与し、2週間後に検査した(幼若投与群)。対照群には生理食塩水を同様に投与した。最終屠殺時に精巣重量を測定した後、病理組織学的検査を実施した。さらに精細管のstage II-III, V, VII, X及びXIIについてステージ鑑別による定量的評価を実施した。

【結果】2あるいは4週間休薬群では精巣絶対重量の有意な低下を示したが、2週間休薬群では精巣相対重量において有意な差はなかった。病理組織学的検査では、2週間休薬群の2および6mg/kg群で精上皮細胞の消失が観察された。4週間休薬群では精上皮細胞の消失が著しく、さらに6mg/kg群では多核巨細胞の出現、精子形成の低下が観察された。精巣のステージ鑑別では、2週間休薬の2mg/kg群ではstage XとXIIの精祖細胞及び精母細胞の有意な減少が、さらに6mg/kg群では全stageの精祖細胞、stage Vを除く全stageで精母細胞の有意な減少が認められた。4週間休薬群では全stageの精祖細胞及び精母細胞、stage II-IIIとVの精子細胞の有意な減少が用量依存的に認められた。一方、幼若投与群では精巣重量の変化は明らかでなかったが、6mg/kg群では全stageで精祖細胞及び精母細胞の有意な減少が認められた。

【結論】ADR単回投与後の2週間休薬によって、ラット精巣毒性は検出可能であることが確認された。またADRの4週齢投与ラットへの影響は8週齢投与ラットに比べ、軽度であることが示唆された。

Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs in rats,  
 --Testicular toxicity of adriamycin observed at 2 and 4 weeks after single intravenous  
 administration--

Ichiro TSUNENARI, Mamoru KAWACHI, Takehisa MATSUMARU and Shoji KATSUKI,  
 Department of Toxicology & Safety Assessment, Kawanishi Pharma Research Institute,  
 Nippon Boehringer Ingelheim Co., Ltd., 3-10-1, Yato, Kawanishi, Hyogo 666-0193, Japan

反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究  
(塩酸 フェドロゾール 2 及び 4 週間反復経口投与)

○川下浩人、宇塚一幸、黒田淳二、浅田義人、鈴木忠徳、  
六重幸美、富岡聡子、谷泉乃、近藤正秀、峯島浩、永江祐輔

ノバルティス ファーマ 株式会社 筑波研究所 安全性研究グループ

Fadrozole hydrochloride (Afema<sup>®</sup>) is a potent, selective and non-steroidal aromatase inhibitor, which suppresses the estrogen biosynthesis from androgen and is clinically used for the treatment of breast cancer. The purpose of this study was to investigate whether any toxic effect on rat male reproductive organs could be detected following 2-week treatment with fadrozole hydrochloride. Doses of 0, 30 and 60 mg/kg/day of the test article were given perorally by gavage to HanBm WIST male rats. The males were allocated to 9 groups, and were treated from 6 weeks old or from 8 weeks old for 2 weeks, or from 6 weeks old for 4 weeks.

From the results in this study, certain toxic effects on rat male reproductive organs could be detected following both 4-week and 2-week oral treatment with fadrozole hydrochloride at doses of 30 and 60 mg/kg/day. Those effects, which consisted of reduced weight of seminal vesicle, prostate and epididymis, and degeneration/necrosis of the pachytene spermatocytes in the stage VII or VIII seminiferous tubules, were observed to be dose-related. This effect was also expressed quantitatively by staging analysis as a reduction in the number of stage VII pachytene spermatocytes at 30 and 60 mg/kg/day. The epididymal sperm examinations revealed no treatment-related changes in any groups.

Regarding treatment duration, these effects of 4-week treatment on male reproductive organs were similar to those of 2-week treatment at the same dose levels, except for the weights of seminal vesicle and prostate, which were more reduced by 4-week treatment than by 2-week treatment. About the age at which treatment started, there was no notable difference in detectability of toxicity in male reproductive organs between 2-week treatment from 6 weeks old and 2-week treatment from 8 weeks old.

It was concluded that the changes observed in rat male reproductive organs by 4-week treatment with fadrozole hydrochloride could be detected also by 2-week treatment.

Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats.

— Fadrozole hydrochloride: An oral 2/4-week male reproductive organ toxicity study —

Hiroyuki KAWASHITA, Kazuyuki HIRATSUKA, Junji KURODA, Yoshihito ASADA, Tadanori SUZUKI, Yukimi MUGURUMA, Satoko TOMIOKA, Mizuno TANI, Masahide KONDO, Hiroshi MINESHIMA and Yusuke NAGAE. Toxicology/Pathology, Tsukuba Research Institute, Novartis Pharma K. K. 8, Ohkubo, Tsukuba, Ibaraki 300-2611, Japan



反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究 -レセルピンの2週間あるいは4週間皮下投与による精子形成への影響-

○川村信之、堤 俊輔、竹下修史

アベンティス ファーマ (株) 開発研究所 安全性研究室

【目的】2週間の反復投与で雄性生殖器に対する毒性を検出することが可能かどうかを調べるため、4週間皮下投与でラットの精巣に精子停滞が生じることが知られているレセルピンを用い、2週間投与と4週間投与の比較試験を行った。

【方法】レセルピンの0.05および0.1mg/kgを、Crj:CD(SD)IGS雄ラットに8週齢から2週間あるいは6週齢から4週間皮下投与した後、精巣、精巣上体、前立腺の重量を測定し、精巣および精巣上体について病理組織学的検査を行った。

【結果と考察】2週間投与ではレセルピン0.1mg/kg群で体重減少が認められた。4週間投与ではレセルピン0.1mg/kg群で体重減少および前立腺重量の減少が認められた。病理組織学的検査では、2週間あるいは4週間投与のレセルピン0.05mg/kgおよび0.1mg/kg群の少数の動物に、軽度～中等度のstep19精子停滞が認められた。しかし、精上皮細胞の変性を伴う精細管萎縮がレセルピン投与群と対照群の両方に散発的に認められたことと、その変化により精子停滞が生じうることから、レセルピンを2週間投与することにより精子形成に対する毒性を検出することが可能かどうかについて明確な結論には至らなかった。

Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats- Effects of daily subcutaneous administration of reserpine on spermatogenesis for 2 and 4 weeks-

Nobuyuki KAWAMURA, Shunsuke TSUTSUMI, Shuji TAKESHITA, Drug Safety Evaluation, Lead Optimization, Drug Innovation & Approval Division, Aventis Pharma Ltd.

反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究 1) Ethynylestradiol の2週間反復経口投与毒性試験

宮本庸平, 上田耕平, ○大信田系裕, 大森英爾

東レ株式会社 医薬研究所 安全性研究室

【目的】ラットにおいて4週間反復投与により精巣に影響を与えることが知られているホルモン系薬物である Ethynylestradiol を用いて、2週間反復投与した場合の雄性生殖器官への影響が検出可能か否か検討する。なお、本研究は「厚生科学研究(上田班):反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究(略称:ICH-2W 大野班)」の一環として参加したものである。

【方法】投与用量は3および10mg/kgとし、対照群として溶媒(0.5%CMC)投与群を設定した。投与期間は2週間とし、比較のため3mg/kgの4週間投与群も設定した。動物には、Crj:CD(SD)系雄ラットを用い、投与経路は経口投与とした。検査項目は、体重測定、器官重量測定および精巣の病理組織学的検査・形態計測とした。形態計測については、精子形成評価(PAS染色)、DNA合成能評価(PCNA法)、アポトーシス評価(TUNEL法)を実施した。

【結果】1. すべての薬物投与群で体重増加抑制または体重減少がみられ、精巣、精巣上体、前立腺および精嚢重量が有意に減少した。2. 精子細胞遺残、パキテシス期精母細胞のアポトーシス、ライディッヒ細胞萎縮などの病理組織学的変化がすべての投与群で観察されたが、4週間投与群においてより強度であった。3. 精子形成およびDNA合成能は4週間投与群においてのみ低下したが、アポトーシスの指標となるTUNEL indexは3mg/kgの4および2週間投与群において共に有意な高値を示した。

【結論】Ethynylestradiolによる精巣毒性は、器官重量の減少ならびに病理組織学的退行変性から2週間投与で検出可能であることが明らかになった。また、精巣毒性評価において、TUNEL法が有用であることが分かった。

Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats.

1) 2 weeks peroral toxicity study of ethynylestradiol.

Keiyu OSHIDA, Kohei UEDA, Eiji OHMORI and Youhei MIYAMOTO. Safety Assessment Laboratory, Pharmaceutical Research Laboratories, Toray Industries, Inc., 1-2, Sonoyama 3-chome, Otsu, Shiga 520-0842

反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究 2)カルモフルの28日間及び11日間投与

○古川雅一、唐鎌利雄、梶政好、五味田忍、吉村正寿、渡部則充

三井製薬工業株式会社生物科学研究所

【目的】JPMA及びNIHSの共同研究のひとつとして、我々は雄性ラットにカルモフルを11日間投与し、4週間投与で発現する生殖器官に対する毒性の評価が2週間以内の反復投与でも可能か否かを検討した。

【材料及び方法】Jel:SD系の6週齢の雄ラットにカルモフルを、実験1では15匹に対して28日間、実験2では14匹に対して11日間投与し、一般状態観察、体重測定、精巣及び精巣上体の重量測定並びに組織学的検査を実施した。重量測定及び組織学的検査は全期間投与した動物について評価した。投与両実験とも対照として溶媒である0.5% methylecellulose溶液を5~6匹のラットに投与した。

【結果】死亡又は瀕死屠殺が実験1で7例（投与開始日をday 0としてday 5、7、8、27に各1~2例）、実験2で9例（day 2、4、7、8、9、10、11に各1~3例）発現した。投与期間中の体重には両実験ともに有意な減少又は増加抑制が認められた。精巣及び精巣上体実重量の減少並びに体重比重量の増加が両実験においてほぼ同様にみられた。組織学的には実験1の精巣においてセルトリ細胞の空胞変性、伸張精子細胞の変性、円形精子細胞の剥離、多核巨細胞形成が8例全例の動物に観察された。このうちの2~3例は著明な変化であった。実験2では、いずれも軽度な変化であったが、円形精子細胞の剥離及び多核巨細胞形成が5例中2例に、セルトリ細胞の空胞変性が5例中4例に認められた。一方、精巣上体管内の細胞残さが実験1においてほぼ全例にみられた。この変化は実験2では観察されなかった。

【結論】雄性生殖器に対するカルモフルの毒性は、2週間以内の投与によっても精巣を組織学的に検査することによって検出することが可能であると結論付けられた。

Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats. 2) 28 days and 11 days administration of carmofur

Masakazu FURUKAWA, Toshio KARAKAMA, Masayoshi KAJI, Shinobu GOMITA, Masatoshi YOSHIMURA and Norimitsu WATANABE, Institute of Biological Science, Mitsui Pharmaceuticals, Inc., 1900-1 Togo, Mobaru, Chiba 297-0017

反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究  
4) Etoposideの2及び4週間静脈内投与による影響の比較

○川口雅子, 長岡有紀, 香川雅孝, 葛西靖広, 和知正幸

日研化学株式会社 大宮研究所 安全性研究室

【目的】Etoposide(ET-抗癌剤)を、ラットに2及び4週間反復投与した場合の雄性生殖器官に対する影響を比較した。また、ETの他の器官・組織に対する影響についても検索した。

【方法】ETを5及び10mg/kg/week(週1回の割合)でラットに2及び4週間反復静脈内投与し、精巣、精巣上体、前立腺、精嚢、胸腺、骨髄、心、肝、腎、肺、脾などの病理組織学的検査を実施した。精巣については、精細管を4groupに大別した後、各々のGroupの精祖細胞、精母細胞及び精子細胞を観察した。

【結果】雄性生殖器官では、2及び4週間投与群とも、5及び10mg/kgで精巣における生殖細胞の減少/消失が観察された。この変化は、特に精祖細胞と精母細胞に顕著に認められた。雄性生殖器官以外では、2及び4週間投与群とも、5及び10mg/kgで胸腺における髄質の萎縮と皮質の幼若リンパ球の増加、骨髄における脂肪細胞の増加と幼若造血細胞の増加が認められた。

【考察】ETは細胞周期のS期とG<sub>2</sub>期を停止させ、細胞分裂を阻害することにより抗腫瘍効果を発揮する。今回、2及び4週間投与群の5及び10mg/kgで認められた精巣、胸腺および骨髄の変化は、ETが分裂増殖の活発な器官での細胞の有糸分裂を阻害することを示唆する所見であり、ETの抗癌剤としての作用機序を反映するものと考えられた。また、本剤の雄性生殖器官に対する標的細胞は精巣の精祖細胞と考えられた。

【結論】ETの雄性生殖器官に対する影響は、2週間反復投与でも4週間反復投与と同様の病理組織学的変化として確実に検出できると判断された。

Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats.

4) Comparison of the effects of 2- and 4- week intravenous administration of Etoposide

Masako KAWAGUCHI, Yuki NAGAOKA, Masataka KAGAWA, Yasuhiro KASAI and Masayuki WACHI.

Toxicology Group, Omiya Research Laboratory, Nikken Chemicals Co., Ltd., Saitama 330-0835, Japan.

反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究  
 5) Ethylene glycol monomethyl etherの2週間および4週間投与による  
 雄性生殖器に対する影響

○渡邊 厚、中野雄司、遠藤貴子、佐藤則博、甲斐清徳、白岩和己、  
 小林洋四郎

旭化成工業株式会社 ライフサイエンス総合研究所 安全性研究所

【目的】医薬品候補物質を初めてヒトに投与する(Phase I 試験)前に必要とされる反復投与試験の投与期間は、日本では4週間、欧米では2週間が必要とされ、ICHでは合意されていない。そこで、我々は4週間反復投与でラットの雄性生殖器に影響を与えることが知られているEthylene glycol monomethyl ether (EGME)をCrj:CD(SD)雄ラットに4週間および2週間の反復投与を実施し、2週間投与で雄性生殖器の毒性評価が可能か検討を行った。

【方法】4週間投与群にはEGME100mg/kg/dayを6週齢より、2週間投与群には100および200mg/kg/dayを8週齢より連日経口投与した。投与終了後、精巣および精巣上体の重量測定および病理検査を行った。また、精巣についてはTUNEL法を用いて、アポトーシスの関与についても検討を行った。

【結果および考察】剖検にて、EGME-200(2W)の精巣および精巣上体の萎縮が観察され、器官重量ではEGME-100(4W)群、EGME-200(2W)群の精巣および精巣上体で減少が認められた。組織学的には、EGME-100(4W)群およびEGME-100(2W)群の精巣において、ステージXIVからII, IIIにおけるパキテン期精母細胞および精子細胞の減少が観察され、EGME-200(2W)群では上記変化に加え、精細管の萎縮、多核巨細胞の出現も観察された。また、精巣上体ではEGME-200(2W)群およびEGME-100(4W)群の精巣上体管頭部における精子数の減少および上皮細胞の脱落が観察され、EGME-100(2W)群では精子数の減少のみ観察された。一方、TUNEL染色では精巣のパキテン期精母細胞に選択的陽性所見が得られ、アポトーシスが関与しているものと推察された。以上のことから、EGMEの2週間投与で、雄性生殖器官の毒性評価が出来るかと判断された。

Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats.

5) Repeated toxicity study on ethylene glycol monomethyl ether for 2 and 4 weeks to detect effects on male reproductive organs in rats.

Atsushi WATANABE, Yuji NAKANO, Takako ENDO, Norihiro SATO, Kiyonori KAI, Kazumi SHIRAIWA and Yousiro KOBAYASHI, Lab. for Toxicological Research Institute for Life science Research, Asahi Chemical Industry CO., LTD., Shizuoka, 410-2321, Japan.

○三沢保幸, 渡部一人, 桜井貴之, 藤井悦子, 塚本こずえ,  
加藤淳彦, 杉本哲朗

中外製薬株式会社 安全性研究所

【目的】Compound C (白金錯化合物である抗腫瘍剤) を用いて4週間投与によって発現する雄性生殖器官への影響が2週間投与でも検出が可能であるかを、ラットを用いて病理学的に検討した。併せて、単回投与による精巣毒性についても検討した。

【方法】SD系雄ラットを使用し、4週間反復投与は6週齢から、2週間反復投与は8週齢から投与を開始し、剖検時の週齢を10週齢とした。単回投与では、8週齢で投与した。4週間反復投与に10mg/kg/day、2週間反復投与に10mg/kg/day および20mg/kg/day、各投与期間毎に生理食塩液投与群を設け、それぞれに雄5匹を充てた。単回投与試験では、40および80mg/kgを投与し、7日後と14日後に各群5例を剖検した。剖検後、精巣および精巣上体の重量を測定し、ブアン液で固定後、常法に従いパラフィン切片を作製し、HE染色を施し、病理組織学的観察を行った。

【結果】4週間投与では精巣の腫大と萎縮がみられ、2週間投与では精巣の腫大のみが認められた。病理組織学的には、4週間投与では精細管の拡張または萎縮、精細管上皮細胞の変性/壊死、精細管上皮細胞の減少、多核巨細胞形成およびセルトリ細胞の空胞変性が観察された。2週間投与では、精細管の拡張および精細管上皮細胞の変性/壊死が認められた。なお、著しい体重減少のため1週間投与とした20 mg/kg/day群においても、軽微ながら精巣病変が観察されたが、病変検出は容易ではなかった。単回投与では亜致死量の80 mg/kgで、投与後14日に精巣病変は明瞭に観察されたが、7日後では病変の発生頻度や程度が弱かった。

【考察および結論】単回投与では、投与後7日では病変は弱く、投与後14日では明瞭であったことから、精巣毒性検出には2週間程度必要と考えられた。また、反復投与においては本薬の精巣毒性は、4週間投与に比べると病変の進展に違いはあるものの、2週間投与で確実に検出することができた。

Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats  
-7. Testicular toxicity of 2-or 4-week or single-dose administration of a novel Platinum Complex-

Yasuyuki MISAWA, Kazuto WATANABE, Takayuki SAKURAI, Etsuko FUJII, Kozae TSUKAMOTO, Atsuhiko KATO and Tetsuro SUGIMOTO Safety Assessment Laboratory, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., 1-135 Komakado, Gotemba-shi, Shizuoka, 412-8513, Japan

反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究  
8) アドリアマイシンの2週間および4週間投与試験

○足立民子、西村友成、新比恵啓志、山村高章、池尾富弘

田辺製薬（株）安全性研究所

【目的】厚生科学研究「2週間の反復投与毒性試験による雄性生殖器への影響評価の可否に関する研究」の一環として、抗がん剤アドリアマイシンを用い、雄性生殖器への影響が2週間投与でも検出できるかどうかを検討した。

【材料と方法】Slc:SD系雄ラットにアドリアマイシンの0、1および2mg/kgを週1回、2週間あるいは4週間静脈内投与し、雄性生殖器に対する障害の差を検討した。【結果】1mg/kgの4週間投与群で投与14日から、2mg/kgの2週間投与群で投与7日から体重増加抑制がみられた。これらの群では左右精巣の絶対重量も減少した。組織学的観察では、1mg/kgの4週間投与群と2mg/kgの2週間投与群で精祖細胞の減少が認められたが、1mg/kgの2週間投与群は対照群と差がなかった。そこで、対照群と1mg/kgの2週間投与群についてステージ解析を行った結果、1mg/kgの2週間投与群の精巣において、精祖細胞および精母細胞の有意な減少が確認された。

【まとめ】本剤の投与期間を2週間とした場合でも、十分な投与量を選択するか、あるいは低い投与量でもより鋭敏な検査方法を用いることによって精巣毒性は検出可能であることが確認された。

Collaborative Work to Evaluate Toxicity on Male Reproductive Organs by Repeated Dose Studies in Rats. —Testicular Toxicity in Male Rats Given Adriamycin For Two or Four Weeks—

Tamiko ADACHI, Tomonari NISHIMURA, Hiroshi IMAHIE, Takaaki YAMAMURA and Tomihiro IKEO. Safety Research Laboratory, TANABE SEIYAKU Co., Ltd. 3-16-89, Kashima, Yodogawa-ku, Osaka city 532-0031

反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究 10)E7010の2週間反復投与による精巣毒性の検討

○奥田恭之、早川和宏、田代俊文、佐藤国夫、葛山富春、岡田文弘、細川暁、佐神文郎

エーザイ株式会社 薬理安全性研究所

【目的】 チュブリン重合阻害剤 E7010(N-[2-[(4-hydroxyphenyl)amino]-3-pyridinyl]-4-methoxybenzenesulfonamide)を、ラットに4週間投与することにより、円形精子細胞の減少・消失を特徴とする精巣障害が誘発されることを既に報告した(1, Toxicol. Sci. 20, 217, 1995)。今回、ICH大野班共同研究の一貫として、E7010による精巣毒性が2週間投与で検出可能か否かを検討するとともに、標的細胞および障害メカニズムを明確にする目的で検討を加えた。

【方法】E7010の50, 75mg/kgを各群5例の8週齢SDラットに2週間反復投与した。精巣・精巣上体を摘出後重量測定し、FSA液にて固定した。パラフィン切片作製後、H-E, PASならびにTUNEL染色を施し病理組織学的に観察した。さらに、E7010 50mg/kgの単回投与1週間後に剖検し、精巣を病理組織学的に観察すると共に、4つのステージ(II-III, V, VII, X II)について、セルトリ細胞あたりの各精上皮細胞数を計測した。

【結果・考察】2週間投与群では、75mg/kg群で著しい精巣障害が認められた。精上皮細胞の減少・消失がびまん性に認められ、セルトリ細胞のみを残す精細管も観察された。50mg/kg群では、種々の成熟段階の精上皮細胞の減少、細胞死が観察されたが、特にステージXIVの減数分裂期精母細胞の細胞死が特徴的であった。TUNEL染色では、それらの多くが陽性を示し、細胞障害にアポトーシスが関与していることが示唆された。50mg/kg単回投与群では、円形精子細胞(ステージVII)ならびにバキーン期精母細胞(ステージX II)の減少が特徴的であり、減数分裂期精母細胞ならびに有糸分裂期タイプB精祖細胞の障害が反映されているものと判断された。

以上、E7010による精巣毒性は、2週間反復投与で検出可能であった。

Collaborative Work to Evaluate Toxicity on Male Reproductive Organs by Repeated Dose Studies in Rats. 10)Testicular Toxicity after 2-Week Repeated Dose of E7010.

Yasuyuki OKUDA, Kazuhiro HAYAKAWA, Toshifumi TASHIRO, Kunio SATO, Tomiharu KATSURAYAMA, Fumihito OKADA, Satoru HOSOKAWA and Fumio SAGAMI. Drug Safety & Disposition Research Laboratories, Eisai Co., Ltd. Hashima, Gifu 501-6195



反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究  
 II) Cyclophosphamide の 2 週間および 4 週間経口反復投与の影響

○渡邊隆夫、山口則和、秋葉知英、田中雅弘、滝本正美

興和(株) 富士研究所 安全性研究部

【目的】“ICH-2W 大野班”の共同研究の一環として、げっ歯類における精巣毒性の検出が2週間投与で可能であるかを検討するために、精巣毒性を示す代表的な薬物であるCyclophosphamide (以下 CP) をラットに2週間および4週間経口反復投与し、比較検討した。【材料及び方法】C<sub>71</sub>:CD(SD)系雄性ラットにCPの2.5, 5及び10mg/kgを4週間、5, 10, 20及び40mg/kgを2週間それぞれ経口反復投与した。各群の動物数は5匹とした。全生存動物に対し、松井らの手法に準じて精巣の精細管ステージ鑑別(V, VII及びXIIステージ)を実施し、対照群と比較検討した。【結果】4週間投与の10mg/kg投与では、ステージ鑑別を実施したV, VII及びXIIステージにおいてCPの標的細胞である精祖細胞(type A)数の有意な減少が認められ、さらにそれぞれのステージで精祖細胞(type B)数、Ⅱ期精母細胞数、精子細胞数(以上Vステージ)、アルブト期精母細胞数、Ⅱ期精母細胞数、精子細胞数(以上VIIステージ)、ザイゲン期精母細胞数、Ⅱ期精母細胞数(以上XIIステージ)の有意な減少も認められた。一方、2週間投与では4週間と同様に10mg/kg以上の投与でV, VII及びXIIのいずれのステージにおいて精祖細胞(type A)数の有意な減少が認められた。また、20mg/kg投与では精祖細胞(type A)数の減少に加え、精祖細胞(type B)数、Ⅱ期精母細胞数(以上Vステージ)、アルブト期精母細胞数(VIIステージ)、ザイゲン期精母細胞数(XIIステージ)の有意な減少も認められた。【結論】CPのラット精巣に対する毒性については、精巣の精細管ステージ鑑別を行うことにより、4週間投与時と同様の毒性変化が、2週間投与においても検出可能であることが示唆された。

Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats.

—Effects of cyclophosphamide on spermatogenesis—

Takao WATANABE, Norikazu YAMAGUCHI, Tomohide AKIHA, Masahiro TANAKA and Masayoshi TAKIMOTO, Dept. of Toxicology, Fuji Research Laboratories, Kowa Co., Ltd., 332-1 Ohnohinden, Fuji-city, Shizuoka 417-8650, Japan

○黎純子, 高橋洋之, 中原千穂, 並木歩, 浅野哲, 宇野洋

帝人株式会社 医薬開発研究所, 安全性研究部

【目的】本試験は「2週間の反復投与毒性試験による雄性生殖器への影響評価の可否に関する研究」の一試験として実施した。今回、雄性生殖器へ影響を及ぼすことが知られている Estradiol Benzoate (E<sub>2</sub>B) について検討した。

【方法】E<sub>2</sub>B の 0, 5, 20, 50 および 100  $\mu$ g/kg を、6週齢および8週齢の Slc:SD 系ラットにそれぞれ4週間および2週間皮下投与し、体重測定、一般状態観察、剖検、器官重量測定(脳、精巣、精巣上体、副腎、下垂体、前立腺および精囊)、病理組織学的検査(精巣、精巣上体)を実施した。

【結果】4週間投与試験では全 E<sub>2</sub>B 投与群において、対照群と比較し有意な体重増加抑制が認められた。また、5  $\mu$ g/kg 以上の投与群では精巣、精巣上体、精囊および前立腺の小型化、ならびに副腎の大型化が認められ、50  $\mu$ g/kg 以上の投与群では下垂体の大型化が認められた。また、精巣の病理組織学的検査では、ライディック細胞萎縮、パキン期精母細胞変性/壊死、精子細胞停滞(ステージ IX, X および XI)、精細管萎縮が、精巣上体では、萎縮、細胞残屑、精子減少が全 E<sub>2</sub>B 投与群において認められた。一方、2週間投与試験においても、上記の変化が 20  $\mu$ g/kg 以上の投与群で認められた。しかし、5  $\mu$ g/kg 群においてはいずれの変化も認められなかった。

【まとめ】体重測定、剖検所見(前立腺、精囊、副腎)、器官重量(副腎)、病理組織学的検査(精巣、精巣上体)における変化は2週間投与試験では 20  $\mu$ g/kg 以上、4週間投与試験では 5  $\mu$ g/kg 以上の投与群で E<sub>2</sub>B 投与に起因した変化が認められた。以上のことから、4週間投与で検出される変化は、用量を上げれば2週間投与でも同様に検出できることが確認された。

Collaborative Work to Evaluate Toxicity on Male Reproductive Organs by Repeated Dose Studies in Rats. 12) Effects of Estradiol Benzoate after 2-Week Administration

Junko HATA, Hiroyuki TAKAWASHI, Chiho NAKAWARA, Ayumi NAMIKI, Satoshi Asano and Hiroshi UENO  
Safety Research Department, Pharmaceuticals Development Research Laboratories, Teijin Limited,  
Hino, Tokyo, 191-8512

○小沢重成、横井亮平、北村毅、栗山和也、小林一男、柴田信男

キッセイ薬品工業株式会社 安全性研究所

【目的】ラット雄性生殖器官に対する毒性作用は4週間投与において精巣の詳細な病理検索を実施することにより検出可能とされている。今回2週間投与において検出可能であるかをメチルメタンスルホン酸 (MMS) を用いて検討した。

【方法】SD系雄性ラット(4週間投与:7週齢, 2週間投与:9週齢)に4週間投与は20mg/kg, 2週間投与は20, 40mg/kgで経口投与した。投与用量は反復投与小核試験での結果より設定した。一般状態観察、体重・摂餌量測定、臓器重量測定、病理組織学的検索、精巣のステージ解析を実施した。

【結果および考察】死亡例の発現および一般状態の変化は認められなかった。体重および摂餌量の低値が2週間投与の40mg/kgで認められた。精巣および精巣上体重量の低値が2週間投与の40mg/kgで認められ、精巣上体重量の低値が2週間投与の20mg/kgで認められた。病理組織学的観察において4週間投与の20mg/kgおよび2週間投与の40mg/kgともに精上皮細胞の減少・腔内への脱落からなる精巣毒性所見が観察された。また、ステージ計測では2週間投与の20あるいは40mg/kgで精母あるいは精祖細胞の減少がみられた。以上の結果より、MMSの経口投与では、2週間の反復投与により雄性生殖器官への影響が評価できると判断した。

Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats 13) Two-week and 4-week administration study of methyl methanesulfonate (MMS)

Shigenari OZAWA, Ryouhei YOKOI, Tsuyoshi KITAMURA,

Kazuya KURIYAMA, Kazuo KOBAYASHI, Nobuo SHIBATA

Toxicology Research Laboratories, Kissei Pharmaceutical Co., Ltd.

反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究  
15) シクロフォスファミド単回経口投与の影響

○松本智志, 平川芽衣子, 下元貴澄, 佐藤亮, 北浦敬介, 南孝則

大塚製薬(株) 徳島研究所 毒性研究部

シクロフォスファミド (Cyclophosphamide; Cp) は細胞分裂を抑制するアルキル化剤であり, Cp を投与すると, 精祖細胞の障害に基づく精巣毒性が生じることが報告されている。今回, ラットに Cp を単回投与し精巣および精巣上体への影響を検討したのでその結果を報告する。

材料及び方法: Cp を 100mg/kg の用量 (経口投与時の LD<sub>50</sub> 値) で SD 系雄性ラットに単回経口投与し, 投与 1, 3, 7, 14 日後 (Day1, 3, 7 および 14) に解剖し, 精巣および精巣上体を病理組織学的に観察した。精巣はブアン固定, PAS 染色標本を作製し, 4 つのステージ (II・III, V, VII および XII) についてセルトリ細胞あたりの各精上皮細胞数を計測した。

結果: 通常の病理組織学的検査では Day14 にステージ XII~XIV のザイゴテン期精母細胞の減少を認める例がみられた。精巣上体に変化はみられなかった。ステージ別に解析した結果, Day1 に変化はみられなかったが, Day3 にステージ II・III の精祖細胞, Day7 にステージ II・III の精祖細胞, ステージ V の精祖細胞およびステージ VII のプレプトテン期精母細胞, Day14 にステージ VII の精祖細胞とステージ XII のザイゴテン期精母細胞の減少がみられ, 精祖細胞が選択的に障害されている事が示唆された。

まとめ: Cp の単回投与 3 日後からステージ別解析により精巣障害が検出された。従って, Cp の精巣毒性は十分な用量を投与すれば投与開始から 2 週間以内であっても検出可能と考えられた。

Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats. 15) Effects of a single oral dose of cyclophosphamide

Satoshi MATSUMOTO, Meiko HIRAKAWA, Takasumi SHIMOMOTO, Makoto SATO, Keisuke KITAURA and Takanori MINAMI. Dept. of Toxicology, Tokushima Research Institute, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Tokushima-771-0192, Japan

反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する  
共同研究 (17) -レセルピンの2あるいは4週間皮下投与試験-

○山内研司, 高浦由美, 仲辻俊二, 能登貴久, 三枝 雅, 大石裕司,  
寺井孝雄, 橋本正晴, 小原 要

藤沢薬品工業 (株)・安全性研究所

**[目的]** 厚生科学研究の ICH 関連研究 (略称: ICH-2W 大野班) の一環としてレセルピンをラットに4週間反復投与したときに発現する雄性生殖器への影響が2週間投与でも検出できるか否かを調べた。

**[方法]** 1 群各 5 匹の Crj:CD (SD) 系雄ラットにレセルピンの 0.05 及び 0.1 mg/kg/day を 4 週間, 0.05, 0.1 及び 0.2 mg/kg/day を 2 週間反復皮下投与し, 精子数検査, 生殖器の重量測定及び病理組織学的検査を行った。

**[結果]** レセルピンの 2 週間及び 4 週間投与は, 雄性生殖器の肉眼的変化 (剖検), 器官重量及び精子数に影響を与えなかったが, 病理組織学的には種々の所見を導いた。すなわち, 4 週間投与の 0.05 及び 0.1 mg/kg/day 群には前立腺分泌物の減少及びステップ 19 の精子細胞のリテンションの増加が各群半数例以上に認められた。これに対し, 2 週間投与の 0.05 mg/kg/day 群には前立腺分泌物の減少が 1 例に認められただけであった。しかし, 0.1 及び 0.2 mg/kg/day 投与群ではほとんどの例で前立腺分泌物の減少がみられ, 加えて精細管ステージ VI 精母細胞のアポトーシスと精巣上体の管腔内に細胞残屑の出現が観察された。

**[まとめ]** レセルピンのラット雄性生殖器毒性は 2 週間投与でも検出されることが判明した。但し, 2 週間と 4 週間投与とは雄性生殖器毒性量に差異があり, 投与期間を短縮すれば, より高用量の投与が必要になるものと思われた。

Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats (XVII). -Effects of Reserpine in 2- and 4-week studies-

Kenji YAMAUCHI, Yumi TAKAURA, Takahisa NOTO, Syunji NAKATSUJI, Masashi SAEGUSA, Yuji OTSHI, Takao TERAI, Masaharu HASHIMOTO, and Kaname OHARA, Toxicol. Res. Labs. Fujisawa Pharmaceutical Co., LTD.

反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究 18) エノキサシンの2週間反復投与による検討

○木澤和夫, 古坊真一, 三善隆広, 河村泰仁

富山化学工業㈱総合研究所安全性研究所

【目的】臨床試験開始前に必要なげっ歯類による反復投与毒性試験の最短投与期間については、ICHで三極の合意が得られていない。すなわち、欧米では最短投与期間は2週間であるが、日本では、2週間の投与期間で雄性生殖器官への影響を評価できるという十分なデータがないという理由から、4週間が求められている。そこで三極のハーモナイゼーションを図る目的で、JPMAとNIHSが、2週間投与で雄性生殖器官への影響が検出できるか否かを検討する共同研究を開始した。その一環として、4週間投与で精巣障害がみられるキノロン系抗菌薬のエノキサシンを2週間反復経口投与し、精巣及び精巣上体に及ぼす影響を検討した。

【方法】8週齢のSD系ラット5匹にエノキサシン3000 mg/kgを2週間反復経口投与した後に剖検し、精巣及び精巣上体重量を測定した。精巣及び精巣上体は、各々ブアン液、10%中性緩衝ホルマリン液で固定した後、H&E染色標本を作製して組織学的に検査した。また、精巣についてTUNEL法によるアポトーシスの検索を行った。

【結果】エノキサシンを投与したラットには、精巣重量体重比の増加、精巣上体重量の減少がみられた。また、精巣では精子細胞及び精母細胞の変性、Step 19精子細胞の停滞、精子細胞の核クロマチンの辺縁凝集、多核巨細胞形成、セルトリ細胞の空胞変性がみられた。TUNEL法では変性した精子細胞及び精母細胞が陽性を示した。

【まとめ】エノキサシン3000 mg/kgを2週間投与したラットにおいて、精巣重量体重比の増加、精巣上体重量の減少、組織学的に精巣の退行性変化がみられたことから、エノキサシンの雄性生殖器官に対する影響は2週間投与で検出可能であると考えられた。また、エノキサシンの精巣障害にはアポトーシスが関与している可能性が示唆された。

Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats

18) Effects of 2-week repeated dosing of Enoxacin on male reproductive organs

Kazuo KIZAWA, Shinichi FURUBO, Takahiro SANZEN and Yasuhito KAWAMURA  
Drug Safety Research Laboratory, Toyama Chemical Co., Ltd., Shimookui, Toyama, 930-8508,  
Japan

反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究  
20) エチニルエストラジオールの2および4週間反復投与による影響

○木ノ本寿子, 沢多美和, 小川秀治, 井口綾子, 松井明子, 飯野由香,  
白石裕美子, 西 直樹, 米良幸典

ゼリア新薬工業(株) 中央研究所・開発研究部

【目的】厚生科学研究の「げっ歯類の2週間反復投与毒性試験による雄性生殖器官への影響評価の可否に関する研究 (ICH-2W 大野班)」における共同研究で我々はホルモン物質であるエチニルエストラジオールを被験物質として4週間投与によって発現する雄性生殖器官への影響が2週間投与によっても検出可能であるか検討した。

【方法】Cj,CD(SD)雄ラットにエチニルエストラジオール 0.3, 3.0 mg/kg/day を6週齢から4週間または8週齢から2週間皮下投与した。対照群には0.5%カルボキシメチルセルロース水溶液を6週齢から4週間皮下投与した。投与終了後、精巣、精巣上体、前立腺および精嚢の器官重量測定および病理組織学的検査を実施した。

【結果】器官重量測定では、2週間投与の精巣の相対重量以外は、エチニルエストラジオール処置群における検索臓器が対照群に比して有意な減少を示した。病理組織学的検査では、エチニルエストラジオール処置群において、精巣ではライディッシュ細胞の萎縮、パキテン期精母細胞の変性/壊死、セルトリ細胞の空胞化、精子遺残および精子減少が観察された。また、精巣上体では精巣上体管の萎縮、精子減少および細胞残渣が観察された。さらに2週間投与の3.0mg/kg/day 群および4週間投与群において多核巨細胞の形成が観察された。

【結論】以上の結果から、2週間投与でも軽度ながら4週間投与でみられた所見が得られた。しかし、2週間投与の低用量群ではその程度がごく軽度であったため用量を十分高くすることでエチニルエストラジオールによる精巣毒性は2週間でも検出可能であると考えられた。

Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats.

20) Effects of repeated doses of ethinylestradiol for 2 and 4 weeks

Toshiko KINOMOTO, Miwa SAWADA, Shuji OGAWA, Ayako IGUCHI, Akiko MATSUI,  
Yuka IINO, Yumiko SHIRAISHI, Naoki NISHI and Yukinori MERA.

Central Research Laboratories, ZERIA Pharmaceutical Co., Ltd., 2512-1, Oshikiri, Kohnamachi, Ohsato-gun, Saitama, Japan.

○工藤 哲、棚瀬 裕文、山崎 正和、中尾 麻衣子、宮田 友貴、都留 清志、  
今井 繁

杏林製薬株式会社 研究センター 安全性研究部

**[目的]** 精巣毒性が知られているホウ酸を用いて、2週間反復投与でラットの精巣毒性検出の可否を検討した。

**[方法]** ホウ酸の 0, 125, 250及び500 mg/kg/日を各群6匹の雄性Crj:Wistarラットに8週齢から2週間または6週齢から4週間経口投与した。対照群には6週齢から滅菌蒸留水を同様に投与した。投与期間終了後、精子検査、精巣及び精巣上体の器官重量測定並びに病理組織学的検索を行った。

**[結果]** 一般状態、体重、器官重量では、2週間及び4週間投与の各群とも変化はみられなかった。精子検査では、4週間投与で精子数及び運動精子率の減少が認められたが、2週間投与では著変は認められなかった。精細管上皮構成細胞のステージ鑑別では、4週間投与500 mg/kg群で各ステージの伸長精子細胞及びstage VIIの精粗細胞の減少、2週間投与500 mg/kg群のstage VIIの精粗細胞及び円形精子細胞の減少並びにstage Xのpachytene精母細胞の増加が認められた。病理組織学的検査では、4及び2週間投与ともに、Stage IX-X Iの精子遺残が500 mg/kg群で認められ、4週間投与500 mg/kgでは、その他に精細胞の変性または壊死、精細管腔への精細胞剥離及び細胞残屑、多核巨細胞、sertoli細胞の空胞化、精巣上体においては管腔内に剥離した精細胞または細胞残屑、精子数の減少もみられた。2週間投与でも同質の変化が軽度であるが認められた。

**[結論]** 病理組織学的検査において、2週間投与の500 mg/kg群でも、4週間投与と同様にホウ酸の初期毒性変化である Stage IX-X Iの精子遺残及び精細胞の変性が認められた。従って、ホウ酸のラットの精巣毒性は、2週間反復経口投与で評価が可能であると考えられた。

Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose study in rats

22) Comparative Two- and Four-week Repeated Oral Dose Testicular Toxicity Study of Boric Acid in Rats

Satoshi KUDO, Hirofumi TANASE, Masakazu YAMASAKI, Maiiko NAKAO,  
Yuki MIYATA, Kiyoyuki TSURU and Shigeru IMAI  
Research Center, Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd.

1848, Nogi, Nogi-machi, Shimotsuga-gun, Tochigi 329-0014



反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究  
23) 2週間反復投与によるホウ酸のラット精巣毒性の検出

○福田 良<sup>1)</sup>、廣出 充彦<sup>2)</sup>、森 郁生<sup>2)</sup>、森島 英喜<sup>1)</sup>、茶谷 文雄<sup>1)</sup>、  
馬屋原 宏<sup>3)</sup>

武田薬品工業株式会社 創薬研究本部

1) 薬物機能第二研究所、2) 薬物機能第一研究所、3) 研究推進部

【目的】「2週間の反復投与毒性試験による雄性生殖器官への影響評価の可否に関する研究（略称：ICH-2W 大野班）」の共同研究の一つとして、雄ラット生殖器官への毒性が知られているホウ酸をモデル化合物として、2週間反復投与によるラット精巣毒性の検出の可否について検討した。

【方法】ホウ酸の300及び500 mg/kg/日を各群6匹の雄性Jcl:Wistarラットに8週齢から2週間あるいは6週齢から4週間経口投与し、体重、精巣及び精巣上体の器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。なお、対照群には6週齢から4週間、蒸留水を同様に投与した。

【結果】体重では、500 mg/kgの2及び4週間投与群で体重増加抑制傾向がみられた。器官重量では、500 mg/kgの2週間投与群で精巣重量の低値が、300及び500 mg/kgの4週間投与群で精巣及び精巣上体の低値がみられた。病理組織学的検査では、300及び500 mg/kgの2週間投与群で円形精子細胞の剥離、step 19精子細胞の遊離遅延、遺残体様構造物の増加及び精巣上体頭部の管腔内の細胞残屑の増加がみられた。また、500 mg/kgの2週間投与群ではstep 19精子細胞のcytoplasmic lobesの変形像、精細管内の細胞残屑の増加並びに多核巨細胞の形成あるいはパキテン期精母細胞の壊死を伴う限局性精細管萎縮がみられた。300 mg/kgの4週間投与群では300及び500 mg/kgの2週間投与群と同質の変化がみられ、500 mg/kgの4週間投与群で、び漫性の精細管萎縮がみられた。

【結論】2週間投与の300 mg/kg群から病理組織学的に精巣への軽微な影響が認められ、2週間投与の500 mg/kg群では4週間投与の300 mg/kg群と同質の明確な変化が認められた。従って、ホウ酸のラット精巣毒性は十分な用量を投与することにより、2週間反復投与で検出可能であると考えられた。

Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats.  
23) Testicular toxicity of boric acid after 2- and 4-week administration

Ryo FUKUDA, Mitsuhiro HIRODE, Ikuo MORI, Fumio CHATANI, Hideki MORISHIMA and Hiroshi MAYAHARA

Drug Safety Research Laboratories, Takeda Chemical Industries, Ltd. 2-17-85, Jusohomomachi, Yodogawa-ku, Osaka 532-8686, Japan

○村上善紀、武田匡嗣、鈴木義治、藤井久子、小笠原裕之、増田隆樹

日本ワイスレダリー株式会社医薬研究所

【目的】雄性生殖器官への毒性評価に必要とする投与期間に関しては、ICH における検討課題となっている。4 週間投与で雄性生殖器官への毒性の認められた化合物が、2 週間投与でも毒性が検出可能か検討する共同研究の一環として、本試験では、8 週間の反復投与で精巣毒性が認められている葉酸代謝拮抗剤ピリメタミン (PYR) について、2 週間の反復投与で精巣毒性が認められるかどうか検討した。【材料・方法】雄性 SLC:SD ラットを6 週齢で購入し、検疫馴化の後、投与終了時の週齢を合わせるため、2 週間投与群は8 週齢から、4 週間投与群は6 週齢から投与を開始した。PYR (和光純薬工業) は、0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液に懸濁し、金属製胃ゾンデを用いて1 日1 回強制経口投与した。投与量は、2 週間投与群は12.5、25 及び50 mg/kg/日とし、4 週間投与群は6.25、12.5 及び25 mg/kg/日とした。各々の投与期間が終了した動物は、安楽死させて剖検し、精巣、精巣上体、前立腺及び精嚢を摘出して重量を測定した。これらの器官は、常法によりヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製して鏡検するとともに、精巣についてはPAS 染色標本を作製して、精細管ステージ鑑別を実施した。また、精巣上体を細切して精子懸濁液を作製し、精子数を計数するとともに、SQA を用いて精子活力を計測した。【結果】いずれの投与群でも、一般状態及び体重変化に薬物の影響は認められなかった。剖検においても異常は認められず、器官重量にも薬物投与による有意な変化は認められなかった。精巣上体の精子を用いた精子検査では、精子数及び活力に薬物の影響は認められなかった。しかし、病理組織学的検査において、50mg/kg/日の2 週間投与群でステージⅠ～Ⅲの精細管上皮におけるバキテン期精母細胞の消失及び変性が認められた。【結論】PYR のラット2 週間投与では、病理組織学的検討を行うことにより、雄性生殖器官への影響を検出することが可能であった。

Collaborative Work to Evaluate Toxicity on Male Reproductive Organs by Repeated Dose Studies in Rats 25) The Effects of 2- or 4-week Pyrimethamine Treatment in Rats

Yoshinori MURAKAMI, Masashi TAKEDA, Yoshiharu SUZUKI, Hisako FUJII, Hiroyuki OGASAWARA, Tatsuki MASUDA, Medical Research Laboratories, Wyeth Lederle Japan, Ltd. Shiki, Saitama 353-8511

反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究  
26) Theobromine の2週間および4週間投与による精巣毒性評価

○船橋 晋、藤岡美智、河内真美、立石湯美、松岡信男

大日本製薬㈱ 開発研究所

【目的】ICH ガイドライン (M3) において、初めてヒトに投与するまでに必要なラット反復投与毒性試験の最短投与期間は欧米で2週間、日本で4週間とされており、この不一致は2週間投与により雄性生殖器官への影響が検出可能か否かの見解の相異によるものであった。このような背景の下、NIHS および JPMA による ICH 関連研究として、2週間投与による雄性生殖器官への影響評価の可否が検討された。我々はその共同研究の一環として、長期投与で精巣毒性を誘発することが知られている theobromine について、雄ラットへの2週間および4週間投与により、精巣への影響を評価したので報告する。

【方法・結果】Theobromine の 250、500mg/kg を Cj:CD(SD)系雄ラット (1群6例) に6又は8週齢から2週間、および6週齢から4週間強制経口投与し、生殖器官の重量測定および病理組織学的検査を行った。死亡が2週間 (6および8週齢投与開始) および4週間投与で500mg/kg 群の1~3例にみられた。体重増加抑制が4週間投与で250および500mg/kg 群に、2週間投与で500mg/kg 群に認められた。精巣重量の減少あるいはその傾向が4週間投与で250および500mg/kg 群に、2週間投与で500mg/kg 群に認められた。精巣の病理組織学的変化が4週間投与で250mg/kg 群の1例および500mg/kg 群の3例に、2週間投与 (6および8週齢投与開始) で500 mg/kg 群の各1例に認められ、その主な所見は精母細胞および精子細胞の脱落および変性/壊死、精細管の空胞化並びに多核巨細胞の形成であった。また、同群において、精巣上体管腔内に精細胞の剥離に由来した細胞残屑が認められた。

【考察】以上の結果より、theobromine の精巣毒性は投与開始週齢が6週齢および8週齢のいずれの条件下においても、2週間投与により検出可能であることが示唆された。また、theobromine の標的細胞は主に精母細胞および精子細胞と考えられた。

Collaborative Work to Evaluate Toxicity on Male Reproductive Organs by Repeated Dose Studies in Rats, 26) Effects of 2- or 4-Week Administration of Theobromine on the Testis.

Hitoshi FUNABASHI, Michi FUJIOKA, Mami KOUCHI, Yumi TATEISHI and Nobuo MATSUOKA, Developmental Research Laboratories, Daiinippon Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka 564-0053, Japan.

反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する共同研究  
 — 28) 1,3-dinitrobenzene 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 —

○入村 兼司, 山口 昌宏, 森永 秀信, 杉本 繁夫, 近藤 泰史, 小井田 雅弘

大鶴薬品工業(株) 安全性研究所

【緒言】厚生科学研究「2 週間の反復投与毒性試験による雄性生殖器への影響の可否に関する研究(ICH-2W 大野班)」の一環として、我々は 4 週間反復投与でラット雄性生殖器への影響が知られている 1,3-dinitrobenzene(DNB)をモデル化合物として、2 週間反復投与でラットの精巣毒性が検出可能か否かを検討した。

【材料と方法】動物は雄性 C<sub>57</sub>BL/6J(SD)ラットを使用した(4~5 匹/群)。4 週間投与では DNB の 25, 50mg/kg/day を 8 週齢から、2 週間投与では DNB の 50, 75mg/kg/day を 8 週齢から 1 日 1 回強制経口投与した。対照群には 8 週齢から sesame oil を 4 週間同様に投与した。投与期間終了後動物を屠殺し、精巣および精巣上体の分離摘出、器官重量測定および病理組織学的検査(FSA 固定、HE 染色)を行った。

【結果】体重測定では、何れの DNB 投与群においても対照群と比較し差は見られなかった。器官重量測定では、50mg/kg/day の 2 および 4 週間投与で精巣の重量が低値傾向を示し、75mg/kg/day の 2 週間投与で精巣重量の低値と精巣上体重量の低値傾向が見られた。病理組織学的検査では、50mg/kg/day の 2 および 4 週間投与で精巣の精上皮に細胞数減少、多核巨細胞形成、空胞化および変性・壊死がほぼ全例に見られた。精巣上体では管腔内に剥離細胞および精子数減少がほぼ全例で認められた。以上の組織学的変化の程度は、一部の变化を除いて 2 週間投与群の方が 4 週間投与群に比較して軽度であった。75mg/kg/day の 2 週間投与では、精巣および精巣上体に 50mg/kg/day の 4 週間投与群と同質の変化がほぼ同程度に見られた。

【結論】DNB 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様に、精巣および精巣上体の病理組織学的変化を検出できることが明らかとなった。

Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats: 28) Detection of 1,3-dinitrobenzene-induced histopathological changes in testes and epididymides of rats by 2-week repeated dose toxicity study

○Kenji IRIMURA, Masahiro YAMAGUCHI, Hidenobu MORINAGA, Shigeo SUGIMOTO, Yasufumi KONDOU, Masahiro KOIDA Drug Safety Research Laboratories, TAIHO Pharmaceutical Co., Ltd. 224-2, Ebisuro, Hiraishi, Kawauchi-cho, Tokushima 771-0194, Japan

反復投与試験によるラット雄性生殖器官への毒性の評価に関する  
共同研究 ・ ・ 29) まとめ

堺俊治<sup>1)</sup>、高橋道人<sup>2)</sup>、三森国敏<sup>3)</sup>、安原加壽雄<sup>4)</sup>、川島邦夫<sup>1)</sup>、  
馬屋原宏<sup>4)</sup>、宮本庸平<sup>5)</sup>、古川雅一<sup>5)</sup>、河下伸<sup>5)</sup>、川口雅子<sup>5)</sup>、中  
野雄司<sup>5)</sup>、渡部一人<sup>5)</sup>、池尾富弘<sup>5)</sup>、川下浩人<sup>5)</sup>、細川暁<sup>5)</sup>、渡邊  
隆夫<sup>5)</sup>、浅野哲<sup>5)</sup>、小沢重成<sup>5)</sup>、土屋毅幸<sup>5)</sup>、松本智志<sup>5)</sup>、林万律  
子<sup>5)</sup>、山内研司<sup>5)</sup>、三善隆広<sup>5)</sup>、恒成一郎<sup>5)</sup>、米良幸典<sup>5)</sup>、川村信  
之<sup>5)</sup>、工藤哲<sup>5)</sup>、福田良<sup>5)</sup>、村上善紀<sup>5)</sup>、船橋斉<sup>5)</sup>、入村兼司<sup>5)</sup>、  
大瀧芽久美<sup>5)</sup>、岡原明彦<sup>5)</sup>、伊藤今日子<sup>5)</sup>、大野泰雄<sup>5)</sup>

1) 山之内製薬㈱、2) 昭和大学薬学部、3) 国立医薬品食品衛生研究  
所、4) 武田薬品工業㈱、5) 日本製薬工業協会基礎研究部会

臨床試験実施に関連した非臨床試験実施タイミングに関しては、ICH-M3 ガイ  
ドラインにおいて多くの点で合意された。しかし、男性に初めて医薬品候補物  
質を投与する前に行うべきげっ歯類を用いた反復投与毒性試験の投与期間に  
ついては、合意されずに残った。これは、雄性生殖臓器への影響の有無の検出  
が2週間で可能であるか否かについて十分な情報が得られていなかったこと  
による。

そこで、厚生省と日本製薬協が共同して、開発中の医薬品候補物質の雄性ラ  
ット生殖臓器への毒性影響の有無を検討するための反復投与毒性試験の投与  
期間が2週間で十分か否かを評価するためのバリデーション試験を実施した。  
参加企業は製薬協加盟の28社で、核酸修飾剤、細胞分裂阻害剤、代謝阻害剤、  
抗感染症薬、ホルモン類及びその拮抗薬、その他の医薬品及び化学物質の合計  
24物質、30プロトコールについて2週間及び4週間試験の結果を比較した。

試験の結果、予備試験あるいは本試験において、報文結果に反する陰性デー  
タあるいは予想外の死亡が見られたためにそれ以上の検討を中止した theophylline  
および busulfan を除き、いずれの薬物及びプロトコールにおいても4  
週間試験と同様の結果が、4週間試験と同じ用量或いはより高用量を用いた2  
週間試験においても認められた。この結果から、2週間試験においても開発中  
の医薬品候補物質の雄性生殖器官への影響の検出が可能であると結論された。

Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by  
repeated dose studies in rats 29) Summary of the studies

Toshiharu SAKAI<sup>1)</sup>, Michihito TAKAHASHI<sup>2)</sup>, Kunitoshi MITSUMORI<sup>3)</sup>, Kazuo  
YASUHARA<sup>5)</sup>, Kunio KAWASHIMA<sup>5)</sup>, Hiroshi MAYAHARA<sup>5)</sup>, and Yasuo OHNO<sup>5)</sup>

1) Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd., 2) Showa University, 3) National  
Institute of Health Science, 4) Takada Chemical Industries, Ltd.



## 演者索引 (日本名)

---

### <あ>

相澤 好治 O-54  
相本 太刀夫 O-33  
青木 豊彦 O-8, P-58, P-59, P-60  
青木 康治 O-8, P-58, P-60  
青木 康展 O-52  
青山 俊文 S3-2  
青山 博昭 O-51  
赤木 圭介 O-11  
赤澤 康平 O-1  
赤堀 文昭 P-28  
秋田 弘俊 W1-2  
秋田 正治 P-30  
秋葉 知英 P-91  
阿久根 淳 P-1  
浅井 利大 O-30  
朝倉 省二 P-15  
浅田 義人 P-82  
朝波 省吾 P-34, P-74  
浅沼 富美子 O-36  
浅野 哲 P-92, P-103  
浅野 雅秀 O-24  
東 純一 Scl-5  
阿瀬 善也 O-8, P-59, P-60  
足立 民子 P-89  
安仁屋 洋子 P-16  
阿部 毅 O-45  
荒記 俊一 P-51  
有吉 範高 W1-2  
安東 潔 S2-1  
安東 賢太郎 P-76

### <い>

飯島 剛 P-78  
飯塚 和弘 P-46  
飯高 健 P-61

飯田 茂 O-45, P-22  
飯田 祝子 P-44, P-46  
飯塚 和弘 P-44, P-66  
飯野 由香 P-79, P-97  
五十嵐 一雄 P-55  
五十嵐 良明 P-45, P-47  
井口 綾子 P-79, P-97  
池尾 富弘 P-89, P-103  
池田 博信 W3-4, P-40  
池田 理恵 P-62  
池本 文彦 O-9, O-10  
井坂 雅徳 O-25  
石井 俊也 O-12  
石井 宏幸 P-50, P-52  
石上 紀明 P-49  
石川 敦子 P-10  
石川 牧恵 O-56  
石田 尚夫 O-42  
石塚 修司 P-60  
石塚 真由美 O-53  
石橋 卓也 P-69  
和泉 宏幸 O-28  
泉 政明 P-58  
一鬼 勉 O-28  
一花 次夫 O-20, P-33  
伊藤 今日子 P-103  
伊藤 典男 P-5  
伊藤 洋二 O-35  
稲富 淳 O-58  
稲村 直樹 P-76  
井上 元 S3-4  
井上 忠広 P-26  
井上 達 W2-1, O-2, O-55  
井上 智彰 O-57  
井上 裕章 P-76  
井上 誠 O-27, P-3

井上 守	0-22	江馬 眞	P-32
井上 葉子	0-54	江村 美和	0-45
猪又 晃	0-4, P-80	遠藤 貴子	P-87
伊原 敏夫	P-27	遠藤 仁	S1-2, S1-4, 0-58, P-21
今井 公江	0-33	遠藤 芳彦	Se2-2
今井 繁	P-98		
今井田 克己	S3-5		
新比恵 啓志	P-89	<お>	
入江 弘之	0-21	大石 裕司	0-42, P-95
入村 兼司	P-102, P-103	大久保 泰成	0-46
岩井 久和	0-8, P-59, P-60	大澤 謙	P-37
岩尾 洋	0-30	大信田 系裕	P-84
岩倉 洋一郎	0-24	大瀧 芽久美	P-103
岩田 寿雄	P-73	太田 隆雄	P-73
		太谷 勝己	P-4
<う>		太田 浩	0-28
上田 耕平	P-84	大野 浩司	P-6
上田 正次	0-5	大野 泰雄	Se2-5, 0-35, P-103
上野 明紀	0-51	大野 理絵	0-36
上原 正人	P-29	大林 繁夫	P-19
潮田 勇	0-36	大村 昌子	0-52
白居 敏仁	P-44, P-46	大森 英爾	P-84
内田 和美	0-7	大谷 啓一	P-63
内田 浩二	P-17	小笠原 裕之	Se2-2
内田 秀臣	0-28	岡崎 欣正	P-50, P-52
海上 智	P-18	小笠原 裕之	P-100
宇波 明	P-64, P-65	尾形 昭子	P-78
畝山 智香子	P-29	緒方 英博	0-28
宇野 洋	P-78, P-92	岡田 文弘	P-90
梅岡 健一	P-56	岡田 充史	0-54
梅津 有理	W1-2	岡庭 梓	0-11, 0-12
梅村 隆志	0-55	岡原 明彦	P-103
		尾上 正治	0-7
<え>		岡村 隆之	P-71
江頭 亨	0-43	岡本 康	P-15
江原 裕子	P-3	岡安 勲	0-54
		小川 秀治	P-79, P-97



奥田 恭之	Se2-2, P-90	加藤 幾雄	0-7
奥野 泰由	0-48, 0-50, P-68, P-72	加藤 隆之	P-7
奥村 裕	P-5	加藤 千明	0-2, 0-4
小倉 健一郎	0-46	加藤 英男	P-73
小黑 多希子	0-24	加藤 将夫	S1-1
尾崎 秀次	P-20	加藤 まり子	P-61
尾崎 博	0-37	加藤 善久	0-32, 0-33
小沢 重成	P-93, P-103	門脇 孝	S3-3
小澤 正吾	W1-6	金井 好克	S1-4, 0-58, P-21
於勢 佳子	0-50	金澤 由基子	P-45
小田部 耕二	P-3	鹿庭 正昭	P-45, P-47
小田 美光	0-16	金子 公幸	0-7
落合 敏秋	P-12	金子 富蔵	0-55
尾根田 暁	P-27	金田 信也	P-34
小野沢 緑	P-2, P-13	兼藤 雅子	田辺實講演2
小野寺 博志	0-14, P-38, P-39, P-67	加納 浩和	P-36
小野 宏	P-28	鎌田 栄一	0-28, P-47
尾畑 賢臣	0-34, 0-38, P-12	鎌涌 哲也	W1-1, W1-2, 0-17, 0-18
小原 要	0-42, P-64, P-65, P-95	鎌田 秀一	0-13
		紙田 裕介	0-50, P-68
<か>		神谷 紀礼	0-11
甲斐 清徳	P-87	亀岡 美幸	0-45
甲斐 純子	P-11	亀之園 剛	0-39, P-1
川内 佳之	P-58	唐鎌 利雄	P-85
香川 雅孝	P-86	唐木 英明	0-37
柿本 基治	P-11	飯家 公夫	W3
笠井 辰也	P-35, P-37	川井 さゆり	P-31
葛西 靖広	P-86	河合 睦文	Se2-7
笠原 利彦	0-34, P-12	河合 悦子	0-29
梶 政好	P-85	川内 佳之	P-56
糟谷 史代	P-55	川口 雅子	P-86, P-103
片羽 一麿	P-9	川崎 靖	0-55
片山 誠一	P-70, P-71	河下 伸	P-103
勝木 昭次	P-81	川下 浩人	P-82, P-103
勝田 修	P-18	川島 邦夫	P-103
勝又 聖夫	0-15	川島 康永	0-23
葛山 富春	P-90	川尻 要	W1-3
加藤 淳彦	P-88	河田 照雄	S3-1



---

小林 一男 P-93  
小林 直樹 P-15  
小林 稔秀 O-7  
小林 晴男 O-41  
小林 充 P-78  
小林 勇二郎 P-59  
小林 洋四郎 P-87  
小松 裕美 O-54  
五味田 忍 P-85  
近藤 正秀 P-82  
近藤 泰史 P-102

<さ>

齋藤 新 P-37  
三枝 雅 P-64, P-95  
酒井 東日 P-2, P-13  
堺 俊治 P-10, P-103  
相賀 裕美子 O-2  
坂田 文 O-56  
佐神 文郎 P-11, P-90  
坂本 憲吾 P-8  
桜井 真之 P-88  
左近上 博司 W3-4, P-40  
佐々木 和彦 O-9, O-10  
佐々木 有 O-20, P-33  
佐藤 亮 P-94  
佐藤 敦子 P-66  
佐藤 国夫 P-90  
佐藤 邦雄 W1-2  
佐藤 玄 P-11, P-15  
佐藤 晃一 O-37  
佐藤 哲男 O-35  
佐藤 則博 P-87  
佐藤 元 P-51  
佐藤 雅之 P-13  
佐藤 巳喜夫 O-52  
佐藤 靖 P-61  
佐野 真士 O-48, P-72

佐脇 正邦 O-47  
澤田 繁樹 P-11  
澤田 隆博 P-8  
沢多 美和 P-79, P-97  
澤村 祐一 W1-2  
澤本 修 P-56  
三善 隆広 P-96

<し>

塩田 清二 O-24  
輪蘭 亀也 O-39  
志熊 廣夫 P-30  
重信 弘毅 P-42  
藤田 和俊 P-29  
柴崎 義明 P-20  
柴田 誠司 P-44, P-46  
柴田 信男 P-93  
渋谷 幸代 P-20  
蓋谷 徹 O-19  
島田 力 W1-3, O-16  
島田 弘康 Se2-6  
島田 信 P-24  
島 俊隆 S2-4  
清水 賢治 P-19  
清水 茂一 P-7, P-30  
清水 淳 P-8  
清水 憲次 P-2, P-7  
下里 貴 W3-4, P-41  
下野 和之 P-34  
下村 和裕 P-24  
下元 貴澄 P-94  
下谷 真智子 P-61  
庄司 麻子 P-2, P-13, P-20  
白石 明 P-2, P-13  
白石 裕美子 P-79, P-97  
白井 智之 S3-5  
白井 紀充 P-61  
白岩 和己 P-87

白根 里加	0-36	<た>	
新倉 博文	0-27, P-3	高浦 由美	P-95
新村 康彦	0-33	高木 観	P-76
<す>		高木 久宜	0-14, P-38, P-39, P-67
菅井 象一郎	0-3	高木 広憲	P-26
須方 賢夫	0-48, P-72	高木 充弘	S3-6
須賀 哲弥	S3, S3-6	高月 峰夫	0-47
杉浦 由美子	0-54	高橋 愛愁	0-46
杉本 繁夫	P-102	高橋 要	P-50, P-52
杉本 哲朗	P-88	高橋 公一	0-26
杉山 雄一	S1-1	高橋 統一	0-3
凶子田 建二	P-9	高橋 伸夫	P-5
鈴木 和彦	0-31	高橋 信之	S3-1
鈴木 聡	0-35	高橋 洋之	P-92
鈴木 潤	W3-4, P-40, P-41	高橋 守	P-61
鈴木 忠彦	0-41, P-82	高橋 道人	P-103
鈴木 勉	S2-3	高橋 祐子	0-24
鈴木 正明	P-36	高橋 有里	0-42
鈴木 義治	P-100	高橋 利一	0-5
鈴木 律好	0-6	高山 房子	0-43
須田 朗子	0-6, 0-21	田川 正志	P-62
須田 恵	P-31, P-53	滝沢 節子	0-4
角南 整	P-68	滝本 正美	P-91
角 将一	0-7	竹内 哲也	P-35
<せ>		竹下 修史	P-83
関口 聡一郎	P-31	竹下 尚	P-60
関 高樹	0-50, P-68	武田 眞記夫	0-51
関根 孝司	P-21	武田 匡嗣	P-100
關横 薫	0-20, P-33	武田 理夫	S1-2, P-21
<そ>		武 信	P-35
曾根 秀子	0-53	武吉 正博	0-47
祖父尼 俊雄	Se2-3	田代 俊文	P-90
曾家 義博	P-69	多田 幸恵	P-57
孫 和永	P-14, P-17	立石 湯美	P-101
		田中 一三	0-21
		田中 豊人	P-23
		田中 直美	P-3
		田中 憲穂	P-45

田中 光 P-42  
 田中 雅弘 P-91  
 棚瀬 裕文 P-98  
 谷口 輔 O-25  
 谷藤 久人 P-44, P-46, P-66  
 谷 泉乃 P-82  
 谷村 孝 P-54  
 田畑 肇 P-10  
 田原 知徳 O-1  
 田部井 光行 O-6  
 玉井 郁巳 S1-3  
 玉置 泰一 P-38  
 田村 啓 O-14, P-38, P-39, P-67  
 田村 廣人 O-49  
 田村 幸彦 P-63  
 丹治 薫子 P-40

<ち>

千葉 修一 P-3  
 車 頌鶴 S1-4, O-58, P-21  
 茶谷 文雄 P-99

<つ>

津賀 浩史 P-53  
 塚本 こすえ P-88  
 築館 一男 P-11, P-15  
 角崎 英志 O-13  
 辻 彰 S1-3  
 辻村 裕美子 P-61  
 津田 修治 O-20, P-33  
 土谷 穂 P-50, P-52  
 土屋 毅幸 P-103  
 筒井 尚久 O-6  
 堤 俊輔 P-83  
 堤 宏禎 P-40  
 恒成 一郎 P-81, P-103  
 都留 清志 P-98

<て>

出川 雅邦 O-33  
     雅輔 P-31  
 寺井 孝雄 P-64, P-65, P-95  
 寺下 隆夫 O-16  
 寺本 昭二 O-51

<と>

土井 邦雄 O-31, P-48, P-49  
 遠山 千春 W2-1, W2-2, O-52, O-53  
 戸谷 弘之 O-11  
 栃久保 邦夫 O-25  
 富岡 聡子 P-82  
 友成 由紀 P-52  
 豊田 直人 P-50, P-52  
 鳥塚 尚樹 P-11

<な>

内藤 一嘉 P-73  
 苗代 一郎 O-8, P-58, P-59, P-60  
 永井 賢司 P-70, P-71  
 永江 祐輔 P-82  
 中尾 一和 S3-4  
 長岡 有紀 P-86  
 中尾 翼史 O-29  
 長尾 哲二 W3-6, P-28  
 中尾 麻衣子 P-98  
 中川 博文 O-41  
 中嶋 敏勝 S2-2  
 中島(那須)民江 S3-2  
 中島 信明 O-51  
 永嶋 雅子 P-44, P-46, P-66  
 長島 吉和 O-11, O-12  
 中島 芳文 P-56  
 仲谷 達也 O-30  
 永田 良一 O-39, O-40, O-44, P-1,  
     P-27  
 仲辻 俊二 P-95

中西 巧	0-48		
長野 嘉介	P-36, P-37		
中野 一行	P-59		
永野 泰弘	0-32		
中野 雄司	P-87, P-103		
仲野 善久	P-2, P-13		
中原 千穂	P-92		
永見 和之	0-21, 0-23		
中村 晃忠	P-47		
中村 勇	P-26		
中村 和市	W3-1, 0-6, 0-21		
中村 英明	P-17		
永山 伸一	0-39		
中山 隆治	P-62, P-66		
中山 裕之	0-31, P-48, P-49		
仲由 武實	P-2, P-9, P-13, P-20		
那須 昌弘	0-14, P-67		
並木 歩	P-92		
納屋 聖人	0-45, P-22		
奈良岡 準	P-10		
成田 年	S2-3		
成見 香瑞範	P-70, P-71		
<b>&lt;に&gt;</b>			
新倉 靖子	0-35		
西井 重明	P-69		
西垣 敬二	Se2-2		
西川 秋佳	P-14, P-17, P-75		
中村 英明	P-14		
錦谷 まりこ	P-51		
西沢 共司	P-35, P-37		
西 直樹	P-79, P-97		
西村 友成	P-89		
西村 典子	0-52		
西村 治男	S3-4		
西森 司雄	W3-4, P-40, P-41		
西山 真仁	0-46		
<b>&lt;め&gt;</b>			
沼澤 聡	0-56		
沼田 賀子	0-54		
沼 敬章	Se2-2		
<b>&lt;ね&gt;</b>			
根本 清光	0-33		
根本 信雄	W1-2		
<b>&lt;の&gt;</b>			
野口 孝義	P-36, P-37		
野口 規子	P-3		
野崎 善弘	P-30		
野田 修志	0-47		
野田 幸裕	S2-4		
能登 貴久	P-95		
信方 英文	P-58		
野村 達次	P-38		
野村 典行	0-12		
野村 護	W3		
<b>&lt;は&gt;</b>			
萩原 美代子	P-24		
羽倉 昌志	P-15		
橋場 雅道	0-34, P-12		
橋本 敬太郎	Se1-3,		
橋本 正晴	0-8, 0-42, P-58, P-59,		
	P-60, P-64, P-65, P-95		
橋本 宗弘	Se1-2		
長谷川 妙子	P-3		
長谷川 隆一	0-28, P-75		
島山 茂樹	P-58		
秦 純子	P-92		
花岡 裕吉	P-58		
浜田 大治	0-39, P-1		
浜田 悦昌	0-34, 0-38		
浜村 政夫	0-28		
早川 和宏	P-90		

- |        |                         |        |                      |
|--------|-------------------------|--------|----------------------|
| 早坂 弘康  | P-20                    | 藤本 芳勝  | P-64                 |
| 林 万律子  | P-59, P-80, P-103       | 藤森 觀之助 | Se1-6                |
| 原 明    | W1-5                    | 船橋 芥   | P-77, P-101, P-103   |
| 原内 敏夫  | P-6                     | 古川 純子  | P-78                 |
| 原口 浩一  | O-32, O-33              | 古川 武史  | O-39                 |
| 原園 景   | P-32                    | 古川 文夫  | P-14, P-17           |
| 原田 剛   | O-38                    | 古川 雅一  | P-85, P-103          |
| 原 卓司   | O-45, P-22              | 古川 正幸  | O-26                 |
| 原田 滋雄  | P-24                    | 古木 希   | P-55                 |
| 原田 剛   | O-34, P-12              | 古田 千香子 | P-61                 |
|        |                         | 古橋 忠和  | P-73                 |
|        |                         | 古瀧 和久  | P-24                 |
|        |                         | 古坊 真一  | P-86                 |
| <ひ>    |                         | <ほ>    |                      |
| 久田 茂   | P-44, P-46, P-66        | 宝栄 裕子  | O-24                 |
| 平岡 功   | P-56                    | 外間 惟夫  | P-16                 |
| 平川 芽衣子 | P-94                    | 星谷 達   | O-11, O-12           |
| 平塚 一幸  | P-82                    | 細川 暁   | P-90, P-103          |
| 平塚 真弘  | W1-4                    | 堀井 郁夫  | O-2, O-4, O-57, P-80 |
| 平野 文也  | Se2-2                   | 堀江 透   | W3-7                 |
| 平林 容子  | O-55                    | 堀江 泰志  | P-77                 |
| 広瀬 明彦  | P-75,                   | 堀口 浩資  | O-12                 |
| 広瀬 雅雄  | O-14, P-14, P-17, P-38, | 堀越 喜美子 | O-41                 |
|        | P-39, P-67              | 堀場 直   | O-27                 |
| 広瀬 祐治  | P-8                     | 堀 正敏   | O-37                 |
| 廣出 充洋  | P-99                    | 本間 誠次郎 | P-62                 |
|        |                         | 本間 健資  | P-31, P-53           |
| <ふ>    |                         | <ま>    |                      |
| 深澤 洋史  | O-8, P-58, P-59, P-60   | 前田 真宣  | O-20, P-33           |
| 福崎 好一郎 | O-13                    | 前山 順一  | O-25                 |
| 福田 好造  | W3-4, P-40              | 牧 栄二   | Se2-8                |
| 福田 良   | P-99, P-103             | 横田 由美  | P-18                 |
| 藤井 悦子  | P-88                    | 増田 修治  | P-44, P-46, P-66     |
| 藤井 恒雄  | O-42                    | 増田 達樹  | P-100                |
| 藤井 久子  | P-100                   | 増田 義人  | O-32, O-33           |
| 藤岡 美智  | P-101                   | 益本 吉広  | P-60                 |
| 藤川 香津子 | P-24                    |        |                      |
| 藤田 健一  | O-17, O-18              |        |                      |
| 藤谷 知子  | P-57                    |        |                      |
| 藤本 貴司  | P-56                    |        |                      |

松井 明子 P-79, P-97  
 松井 一裕 P-69  
 松岡 千明 P-45  
 松岡 哲也 O-12  
 松岡 信男 P-77, P-101  
 松尾 洋孝 O-58  
 松澤 利明 Se2-2, W3  
 松島 泰次郎 P-35, P-36, P-37  
 松田 洋 P-45  
 松丸 剛久 P-81  
 松本 亜紀 P-28  
 松本 一彦 W3, O-3  
 松本 智志 P-94, P-103  
 松本 博隆 P-80  
 松本 浩良 O-9, O-10, O-23  
 松本 道治 P-36  
 松山 隆史 O-13  
 真鍋 ひろ子 P-27  
 馬屋原 宏 Se1-1, P-99, P-103  
  
 <み>  
 三浦 克之 O-30  
 三浦 浩蔵 O-7  
 三浦 大志郎 P-78  
 三枝 衛 P-62  
 三木 康宏 O-12  
 三沢 保幸 P-88  
 水柿 道直 W1-4  
 水口 浩康 O-11, O-12  
 溝口 靖基 O-11  
 三井 雄史 O-38  
 三森 国敏 P-67, P-103, Se2-4,  
 O-14, P-29, P-38, P-39  
  
 南 孝則 P-94  
 南 正康 O-15  
 峯島 浩 Se2-2, P-82  
 三村 雄一 P-66  
 宮内 慎 P-14, P-17

宮川 誠 P-70  
 宮川 宗之 P-4  
 三宅 幸雄 Se2-2  
 宮崎 裕康 O-9, O-10  
 宮瀧 宏彰 O-13  
 宮田 かおり O-48, P-72  
 宮田 裕人 O-36  
 宮田 昌明 O-26  
 宮田 友貴 P-98  
 宮原 裕一 O-52  
 宮本 昌美 W1-2  
 宮本 庸平 P-84, P-103  
 宮安 喜久男 P-64, P-65  
 宮脇 出 P-77  
 三善 隆広 P-103

<む>

六車 幸美 P-82  
 六角 香 P-41  
 武藤 紀生 P-8  
 村上 善紀 P-100, P-103  
 村越 正典 P-62  
 村田 幸久 O-37

<め>

米良 幸典 P-59, P-79, P-97, P-103

<も>

望月 講輝 O-6, O-22  
 本木 喜輝 S3-6  
 百瀬 弥寿徳 P-41  
 百瀬 泰紀 P-60  
 森 郁生 P-99  
 森下 克美 P-5  
 森島 英喜 P-99  
 守田 伸子 P-59  
 森 敏男 P-3  
 森永 秀信 P-102



森 真輝 田辺賞講演 1  
森本 秀樹 P-44, P-46  
森本 真知子 P-9  
森山 智之 O-9, O-10

<や>

八木 健一 O-36  
安田 肇生 P-22  
安田 陽子 O-25  
安原 加壽雄 O-14, P-38, P-39, P-67, P-103  
安原 一 O-35  
柳田 知司 Set-4  
薮下 晴津子 O-48, P-72  
山内 研司 P-95, P-103  
山口 登喜夫 O-3  
山口 則和 P-91  
山口 昌宏 P-102  
山崎 一法 P-36  
山崎 寛治 O-47  
山崎 友朗 O-32  
山崎 正和 P-98  
山崎 義征 O-18  
山下 敬介 W2-4  
山下 弘太郎 P-50, P-52  
山下 昌宏 O-6  
山添 康 W1-7, O-26  
山田 純司 S3-6  
山田 智也 O-50, P-68  
山中 伸弥 O-30  
山中 康光 O-43  
山村 高章 P-89  
山本 健一 P-9  
山本 静護 P-35, P-36, P-37  
山本 雅之 W2-6  
山本 光雄 P-60  
山脇 英之 O-37

<ゆ>

湯本 信也 O-32

<よ>

葉 恵娟 O-15  
横井 亮平 P-93  
横田 淳 W1-2  
横田 忠 O-21  
横山 篤 P-30  
横山 和仁 P-51  
吉川 博道 O-49  
義澤 克彦 O-42, P-64, P-65  
吉島 賢一 P-73  
吉田 純一 O-22  
吉田 武美 O-24, O-56  
吉田 千春 P-20  
吉田 健 O-9, O-10  
吉野 裕子 O-48, P-72  
吉政 康直 S3-4  
吉村 正寿 P-85  
米元 純三 O-52, O-53  
米山 允子 P-57

<わ>

若林 敬二 O-18  
若松 昭秀 P-19  
和田 直人 P-58  
渡邊 厚 P-87  
渡部 一人 P-3, P-88, P-103  
渡辺 潔 O-21  
渡辺 満子 W1-3  
渡辺 大 O-11, O-12  
渡邊 隆夫 P-91, P-103  
渡辺 隆史 S3-6  
渡辺 烈 O-46  
渡部 則充 P-85  
渡部 烈 W3  
和知 正幸 P-59, P-66

## 演者索引 (英名)

---

### <A>

Amnart Poapolathep	P-49
Arthit Chairoungdua	O-58
Arthur Craigmill	PL-2

### <C>

Cedric Gordon	P-25
Christopher P Sambucu	W3-5

### <D>

Derek Camie	P-27
Douglas B. Learri	W3-5

### <F>

F.P. Guengerich	O-16
Frank J. Gonzalez	O-26

### <G>

Gaido, K. W.	O-49
Gray E. L.	O-49

### <H>

Hans-Werner Vohr	O-6
Hee-Kyoung Gu	P-43
Hyoung-Chin Kim	P-43

### <I>

I. Glenn Sipes	PL-1
----------------	------

### <J>

Janet J. Diliberto	W2-5
Ji-Youn Jung	P-48
Joy A. Cavaignar	W2-7
Ju-Hyun Bae	P-43

### <K>

Kap-Ho Kim	P-43
Keith Robinson	P-25
Kwang-Il Jung	P-48

### <L>

Lori Finsonneault	P-25
-------------------	------

### <M>

M. W. Anders	PL-3
Maness, S. C.	O-49
Maxwell Afari Gyamfi	P-16
Mrs Carol M Algate	W3-3
Mun-Han Lee	P-43

### <P>

P. Donald Forbes	W3-5
Peter T. Thomas	W3-2
Pramod Aryal	O-16

### <R>

Reishmann, K. P.	O-49
Richard Van Bibber	O-40
Richard, A. M.	O-49

### <S>

Sandra Munro	O-44
Sarkar Shubhashish	O-53
Shin-Woo Cha	P-43
Steven Gilbert	O-40
Steven Gilbert	O-44

### <T>

Tae-Cheon Jeong	P-43
-----------------	------

### <W>

Wijit kiatipattanasakul	P-49
-------------------------	------

### <Y>

Y. James Kang	W2-3
---------------	------

## 司会、座長一覧

---

### ■ 特別講演

黒川 雄二	SL-1
佐藤 哲男	SL-2
遠藤 仁	SL-3

### ■ シンポジウム、ワークショップ、セミナー

井上 達	W2-1~W2-7
大野 泰雄	Se2-1~Se2-9
金井 好克	S1-1~S1-4
鎌滝 哲也	W1-1~W1-7
仮家 公夫	W3-1~W3-7
島田 弘康	Se2-1~Se2-9
須賀 哲弥	S3-1~S3-6
杉山 雄一	S1-1~S1-4
鈴木 勉	S2-1~S2-4
遠山 千春	W2-1~W2-7
鍋島 俊隆	S2-1~S2-4
藤森 觀之助	Se1-1~Se1-6
松澤 利明	W3-1~W3-7
馬屋原 宏	Se1-1~Se1-6
山添 康	W1-1~W1-7
吉田 武美	S3-1~S3-6
渡部 烈	S3
野村 護	S3
松本 一彦	S3

### ■ 一般講演

青山 博	0-44~0-48
赤堀 文昭	0-7~0-10
井上 智彰	0-53~0-57
上野 光一	0-21~0-25
江頭 亨	0-41~0-43
岡崎 修三	0-11~0-14
奥野 泰由	0-49~0-52
尾崎 博	0-35~0-40
小沢 正吾	0-31~0-34
金子 豊蔵	0-1~0-1
鬼頭 剛	0-35~0-40
木村 努	0-21~0-25
久野 博司	0-11~0-14
玄番 宗一	0-26~0-30
小林 晴男	0-41~0-43
佐藤 秀蔵	0-7~0-10
武吉 正博	0-49~0-52
津田 修治	0-15~0-20
出川 雅邦	0-32~0-34
沼澤 聡	0-53~0-57
堀井 郁夫	0-1-1~0-1-6
三浦 克之	0-26~0-30
務台 衛	0-15~0-20
米元 純三	0-44~0-48

## 協賛会社および団体名

---

(株) アイティアス (Primedica Corporation 日本代表)	日本ベーリンガーインゲルハイム (株)
アベンティス・ファーマ (株) 開発研究所	日本ロシュ (株) 研究所 前臨床科学研究部
アムジェン (株)	日本ワイスレダリー (株) 臨床開発本部
池本理化工業 (株)	バイエル薬品 (株)
エーザイ (株)	萬有製薬 (株)
小野薬品工業 (株)	ファルマシア・アップジョン (株)
(株) 池田理化	藤沢薬品工業 (株) 安全性研究所
(株) カイゲン	丸石製薬 (株)
(株) 三和化学研究所 総合研究所	山之内製薬 (株) 安全性研究所
(株) トミー精工	
グラクソ・ウェルカム (株)	(50音順、5月31日現在)
シェリングプラウ (株)	
塩野義製薬 (株) 新薬研究所	
スミスクラインビーチャム製薬 (株)	
第一製薬 (株) 安全性研究所	
大正製薬 (株) 創薬研究所	
大鵬薬品工業 (株) 安全性研究所	
武田薬品工業 (株) 薬物機能第二研究所	
帝国製薬 (株) 研究開発本部	
帝国臓器製薬 (株)	
日研化学 (株) 大宮研究所	
日本イーライリリー (株)	
日本シェーリング (株) 前臨床開発研究部	
日本臓器製薬 (株) 生物活性科学研究所	
日本たばこ産業 (株)	

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™**

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、霊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。

チャールス・リバー・グループから  
毒性・代謝研究のための画期的ソフトウェア、  
新登場!

マルチケース

# MULTICASE(M-CASE)<sup>TM</sup>

総合ソフト

## META<sup>TM</sup>

代謝物予測ソフト



## CASET<sup>TM</sup>

毒性評価予測ソフト

- 化合物の毒性の有無、生分解、代謝経路、代謝物を予測
- 50種以上のデータベースを用意
  - Carcinogenicity
  - Mutagenicity
  - Irritation
  - Developmental and acute toxicity
  - Ecotoxicity
  - Biodegradation
- 貴社の毒性データを付加して、独自のデータベースが構築可能

MULTICASEはFDAの評価を受けた結果、FDAと研究契約(CRADA)を締結し、FDAが所有する原則非公開の「医薬用化合物に関するげっ歯類carcinogenicity」のデータベースの使用を許可されています。また、その評価結果はFDA Reportとして発行されています。

先端医療開発のパートナー



お客様は

日本チャールス・リバー株式会社

第二営業部 〒222-0033 横浜市港北区新横浜2-3-8 東伸24新横浜ビルB-4F  
TEL 045(474)9336 FAX 045(474)9341

Email: crj-sd@yokohama.email.ne.jp

<http://www.crj.co.jp>



CTBRはクオリティー（品質）・リスポンシブネス（迅速）・イノベーション（革新）をモットーとして皆様のニーズにお応えします。

CTBR - 信頼と貢献に基づいた相互関係の発展をめざして...

CTBRは、過去15年間に亘り、日本の医療業界の皆様とお仕事をしてまいりました。今日、日本はCTBRにとって、米国に次いで世界第二の市場になっています。CTBRでは、研究者、技術者、サポート・スタッフを含む従業員総数約900人で、年間850件以上のGLP準拠前臨床試験を手掛け、報告書オンタイム提出成績98%を誇っています。1984年に日本と取引を始めて以来、私どもの皆様に対するコミットメントは今も変わりません。最高レベルのサービスを提供し、皆様の新薬開発の成功に貢献していくことを目指しています。

#### CTBR 試験サービス

- 分析化学・生物学的分析
- 骨関連研究
- 循環器系プロファイル
- 臨床検査
- 薬物代謝・薬物動態試験
- 一般毒性試験、癌原性試験
- 遺伝毒性試験（今年度後期開始予定）
- 免疫化学検査
- インフュージョン・薬理学・バイオテクノロジー試験
- 吸入毒性試験
- 神経毒性試験
- 病理学的検査
- 生殖毒性試験

ご連絡はCTBR 総代理店、豊田通商株式会社まで。CTBRのウェブサイト <http://www.ctbr.com> もご覧ください。



● 豊田通商株式会社  
〒102 東京都中央区日本橋2丁目14番5号  
電話: 03 (3242) 8158  
FAX: 03 (3242) 8498

CTBR

87 Sennerville Road  
Sennerville, Quebec  
Canada, H9X 3R3  
Tel: (514) 630 8200 Fax: (514) 630 8230  
E-mail: [marketing@ctbr.com](mailto:marketing@ctbr.com)  
Web site: [www.ctbr.com](http://www.ctbr.com)

米国 シアトル郊外に

# 安全性研究所・薬理研究所

を開設しました。

## SNBL USA

Biosciences研究所・Biosupport研究所



SNBL Biosciences

・Biosciences 研究所

ラット、マウス、カニクイザル、アカゲザルの一般毒性試験  
がん原性試験 関節炎の病態モデル試験 骨粗鬆症試験  
ラット、ウサギ、サルの生殖試験 など

・Biosupport 研究所

ミニブタまたはヒツジにおける循環器系の各種病態モデル試験  
神経疾患各種モデル試験及び神経毒性・神経薬理試験  
血液脳関門の新規の三次元モデルのin vitro試験 など



SNBL Biosupport

お問い合わせ先

## 株式会社 新日本科学

[www.snbl.com](http://www.snbl.com)

本社 : 鹿児島郡吉田町宮之浦2438  
TEL 099-294-2600 FAX 099-294-3619  
( 鮫島 秀輔 hsame@snbl.co.jp )

東京支社 : 東京都港区虎ノ門1-1-23 虎ノ門東宝ビル  
TEL 03-3500-5045 FAX 03-3500-5046  
( 松居 良正 matsui@snbl.co.jp )

大阪支社 : 大阪府中央区伏見町2-1-1 住友銀行高麗橋ビル  
TEL 06-6233-8411 FAX 06-6233-8412  
( 堀江 信一 osk021@snbl.co.jp )



**OVER**

## **20 YEARS OF DOING BUSINESS WITH JAPANESE COMPANIES**

Inveresk Research recognises the importance of building long-term business relationships. We understand the key factors which contribute to successful partnerships. That is why we have over 20 years experience of working with Japanese companies.

With a Japanese office based in Tokyo, and visits to Japan by senior scientific and medical staff from the UK every month, there is always an opportunity to discuss your outsourcing requirements. Inveresk Research provides a full preclinical and clinical service and offers to assist with any aspect of drug development.

Please give us a call or look at our website today for more information.



**Inveresk Research**

**INTERNATIONAL SOLUTIONS**

Corporate Headquarters, UK. Inveresk Research International Ltd. Tel: +44(0) 1875 614545. Fax: +44(0) 1875 614555.

Email: [info@inveresk.com](mailto:info@inveresk.com)

USA (East Coast) Tel: +1 703 824 7850. Fax: +1 703 824 7851. USA (West Coast) Tel: +1 415 491 6460. Fax: +1 415 491 6464.

Japan Tel: +81 3 5634 5858. Fax: +81 3 5634 4934. Website: [www.inveresk.com](http://www.inveresk.com)

21世紀は生命科学とITの世紀。  
貴社のシステム化戦略はもうお決まりですか？

# CTC

## Challenging Tomorrow's Changes

電子申請を支えるこれからの非臨床開発支援システムを御提案します。

CTCラボラトリーシステムズ株式会社

### 安全性試験 TOXstaff21

ON  
ORACLE

只今展示実演中！  
ブースにて御待ちします。

GLP試験のみならず柔軟な試験デザインが行え探索毒性試験などでの利用が可能です。  
一般毒性・生殖毒性・病理・臨床病理・統計解析・レポート作成の機能を提供します。  
高い汎用性によりカスタマイズが不要。必要に応じた機能をアドオンできます。  
従来のシステムと比較して導入保守コストが低くバージョンアップも容易です。  
国立医薬品食品衛生研究所の用語集に基づく所見マスターが利用可能です。  
多様な帳票レイアウトはほとんどのユーザー様の要求を満足します。  
SASを利用した統計計算を含む帳票が極めて簡単な操作でできます。  
バージョンアップにより機能拡張・改善が行われます。  
サーバーはWindows NTとUNIXが選択できます。

NEW!

2000年度リリース版

- PDF電子帳票機能
- バックグラウンド機能
- 統計機能拡張

TOXstaff21は価値の高いパッケージソリューションを提供します。

### 薬物動態試験 ADMEstaff

ON  
ORACLE

TK試験をはじめ、臨床・非臨床の薬物動態試験をトータルにサポートします。  
TOXstaffと連携し、動物情報などを連動して御利用いただけます。

### 文書管理 DOCUMENTUM

ON  
ORACLE

製薬企業における文書管理システムの業界標準Documentum  
30P管理、研究計画、報告書管理、電子申請業務支援等の文書管理システム構築サービスを提供します。

### 製剤開発/分析 SQL\*LIMS

ON  
ORACLE

世界で1000サイト以上の実績を誇るLIMS(Laboratory Information Management System)の世界標準  
製剤規格・安定性試験・品質管理試験システム構築サービスを提供いたします。

CTCラボラトリーシステムズ株式会社

TEL: 03-3419-9408 担当: 有賀 e-mail: aruga@ctc-g.co.jp

本社: 東京都目黒区中目黒 16-7

http://www.ctc-g.co.jp/~CTC/

# 視点は21世紀

受託機関に求められるもの！

それは技術レベルの高さに加え、永遠に続く  
パートナーシップです。

安評センターは、医薬品・農薬・食品・化学物質・医用材料などの安全性に関する各種実験・調査研究を実施しています。



## (財)食品農医薬品安全性評価センター

スクリーニング試験から各種安全性試験まで幅広く対応しています。

研究所 〒437-1213 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜582-2

TEL (0538)58-1266 FAX(0538)59-1170

東京事務所 〒110-0015 東京都台東区東上野2-18-7 共同ビル(上野)5F

TEL (03)3837-2340 FAX(03)3837-7850

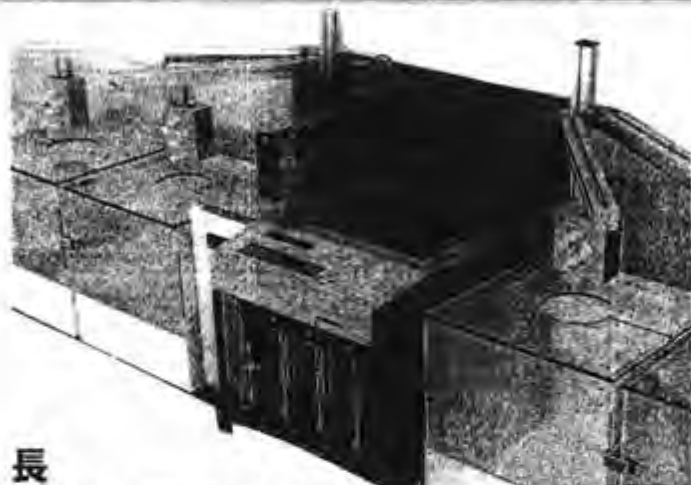
詳しくはホームページをご覧ください <http://village.infoweb.or.jp/~anpyo/>

省力化……小動物の採血が自動化されました。

**EiCOM**

動物へのストレスが軽減されます。

## 自動連続血液サンプリング装置 DR-V 型



特許申請中

### 特長

- ◎ 4チャンネルです。4匹同時採血ができます。
- ◎ 装置内での血栓による詰まり対策は万全です。
- ◎ 動物の自然に近い状態からサンプリングが可能です。
- ◎ 採血試料は電子冷却により0℃以下に冷却できます。

## 酸化窒素分析システム

**EiCOM**

液体クロマトグラフとグリース試薬法のドッキング——ENO-200シリーズ



### NO Analyzer

ジアゾ化合物の赤色反応の吸光度を測定。  
NO<sub>2</sub>、NO<sub>3</sub>の測定から、極めて測定が難しい生体内一酸化窒素の動態を知ることができます。

- 0.1ピコモルの検出感度。
- NO<sub>2</sub>、NO<sub>3</sub>をカラムで分離測定するから高精度。
- 安定性と再現性が抜群の実績ある測定法。
- 簡単操作で、高稼働率。
- 移動相、反応液の空運転防止機能つき。
- 生体試料の測定に最適。



株式会社

**エイコム**

本社：京都市伏見区下鳥羽円面田町24-2 〒612-8474  
TEL(075) 622-2112 FAX(075) 622-2114  
東京営業所：TEL(03) 3818-5223 FAX(03) 3818-4540  
札幌営業所：TEL(011) 813-3268 FAX(011) 813-6001  
<http://www.eicom.co.jp> E-mail: [eicom@po.sphere.ne.jp](mailto:eicom@po.sphere.ne.jp)



Services Available at CTL

## Zeneca Central Toxicology Laboratory (略称 CTL)

### CTLの試験受託

#### ----- はじめに -----

ゼネカ中央毒性研究所 (Zeneca 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載せております。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 ホルモン攪乱およびプロテオミクス
- 免疫生物学 化学およびタンパクアレルギー 免疫毒性学 分子生理学 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
- がん生理学とメカニズム
- 製品の弁護および登録のためのメカニズム研究

Zeneca

お問い合わせ先：

株式会社 リブレ

Zeneca 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：repr@hi-dio.nc.jp

Zeneca 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

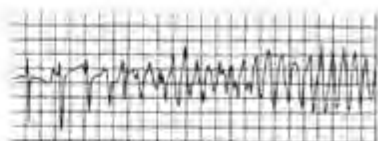
**第27回日本トキシコロジー学会学術年会 要旨集**

発行 2000年6月28日  
発行代表者 逸藤 仁  
発行所 杏林大学医学部薬理学教室  
181-8611 東京都三鷹市新川6-20-2  
TEL: 0422-47-5511 内線3452  
印刷 (有) ヤマト企画

---

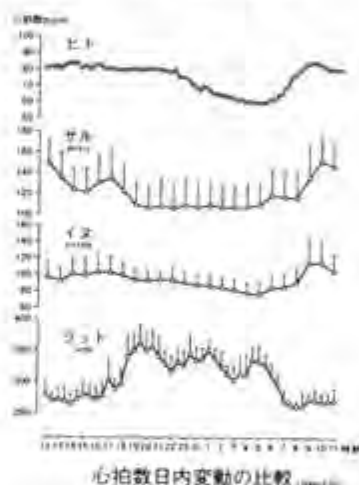
# ヒトへのリスク回避・・・

いま開発中の医薬品は、  
心臓にやさしいですか？



無麻酔のイヌ，サルを用いて  
循環器系への影響を評価します

医薬品が初めてヒトに投与される前に，循環器系に対する危険性を，イヌ，サルを用いて心電図（ホルター法），血圧（テレメトリー法）から詳細に解析します。



## ■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：大阪市淀川区東三国 4-4-15 コラム新大阪 6F phone (06) 6396-2732 fax (06) 6396-2745

# WE SPEAK YOUR LANGUAGE

Global development  
partner to the  
pharmaceutical, biopharm,  
agricultural and industrial  
chemical industries

Skills and expertise to  
provide unrivalled depth  
and breadth of services

Knowledge and  
experience to design and  
manage full added value  
programmes

Dedicated to quality  
of science and  
customer service

## Huntingdon Life Sciences

*Working for a better future*

ハンチンドン・ライフサイエンス株式会社

〒102-8576 東京都千代田区千代田1-1-1 漢明21館

Tel:03(3)218-6381 / Fax:03(3)218-6389

**Huntingdon Life Sciences Ltd.**

Huntingdon, Cambridgeshire (UK)

Eye, Suffolk (UK)

Princeton, New Jersey (USA)

[www.huntingdon.com](http://www.huntingdon.com)