

第21回 日本毒科学会学術年会  
第3回 日本毒科学会サテライトシンポジウム

# 生体-毒性物質相互作用

— その評価と機構の解明 —

平成6年6月8日(水)

北海道大学学術交流会館

1994 札幌

第21回日本毒科学会学術年会  
第3回日本毒科学会サテライトシンポジウム

生体-毒性物質相互作用  
—その評価と機構の解明—

平成6年6月8日(水)  
北海道大学学術交流会館

第21回日本毒科学会学術年会  
第3回サテライトシンポジウムオーガナイザー事務局  
北海道大学獣医学部毒性学講座

060 札幌市北区北18条西9丁目  
Tel (011)706-6948, 6949  
Fax (011)717-7569

# 主 題 生体-毒性物質相互作用

## —その評価と機構の解明—

**主旨：** 毒性物質が生体に対して毒性を発現するとき、その毒性の程度あるいは深刻さは毒性物質の標的臓器での濃度と毒性の種類あるいは毒性発現機構に密接に関連する。そしてこの標的臓器での濃度や毒性発現の機構は生体と毒性物質との相互作用によって規定される。

まず、生体内への異物の侵入とそれに伴う毒作用に対して、生体は様々な応答をし、そこに異物と生体側との相互作用が生ずる。あるときは代謝酵素が誘導され、あるときは細胞内微細構造が増殖し、あるときは破壊されるなど、そしてこれらの応答が更に新たな相互作用を生む。これらの総合的全体像が生体に対するその異物の毒性として認識される。これら個々の正常像からのズレをどの様に評価し、全体像と関連付け、毒性発現の予測を可能にするかは、その正確な評価と機構の解明にかかっている。

本シンポジウムのPart Iでは「毒性機構解明へのアプローチ」と題してin vivo, in vitro そして実験動物毒性病理学の立場からそれぞれの新しい方向性を具体例を用いて論じていただく。Part IIでは「毒性評価パラメータの問題点」と題して、臨床病理パラメータ、生化学的パラメータ等の個々の問題点を様々な具体例から論じていただく予定です。

**御挨拶：** 第21回毒学会学術年会長の菅野先生から今回は獣医学の人を中心にサテライトシンポジウムを行ってくださいというお誘いを受け、大阪府大獣医学部の暮部先生と北大獣医学部の藤田が本シンポジウムのお世話をさせていただくことになりました。日本では創薬の関係から毒科学は薬学分野で多くの教育研究が行われておりますが、最近では動物の異常を見ることの出来る獣医こそ毒性学を扱うべきであるということか、人を含めた全ての動物種に影響を及ぼす環境汚染の毒性評価は獣医師が適任であるということからか、獣医学科に毒性学講座の創設が相継いでいます。こうした傾向を感じとられて、「獣医学関係者で本シンポジウムを」というご配慮であると感謝致しております。とはいえ、余りに獣医学に偏ってしまっは様々な分野からご参加頂いている皆様の興味を損ねてしまいます。そこで、ともしれば物質面からのアプローチになりがちな毒科学を動物を扱う側の観点から捉えようと、「生体-毒性物質相互作用」という主題のもとに各分野の先生方にご講演を依頼致しました。生体との相互作用というところにささやかな獣医の主張をお汲み取り頂ければ幸いです。 (藤田)

# 目 次

札幌市内案内図…… 4

会場案内図…… 5

プログラム…… 7

講演予稿

## Part 1 「毒性発現機構解明へのアプローチ」…… 9

Introductory Talk 藤田 正一（北大・獣医学部）

講演1.1 トランスジェニックアニマルの毒性研究への応用……11  
トランスジェニックマウスを用いた遺伝毒性の検定と解析  
塩山 善之、権藤 洋一、勝木 元也（九大・生医研）

講演1.2 化学発癌機構解明への新しいアプローチ……13  
SOS 遺伝子発現を利用した化学発癌性物質の代謝的活性化  
機構解明への新しいアプローチ  
島田 力、山崎 浩史、味村 真弓、小田 美光（大阪府公衛研）

講演1.3 実験動物病理学から見た毒性評価……19  
ポリオールの発癌性およびキノロン薬の腎毒性  
鷺見 信好（日本新薬）

## Part 2 「毒性評価パラメーターの問題点」……23

Introductory Talk 暮部 勝（大阪府大・農学部）

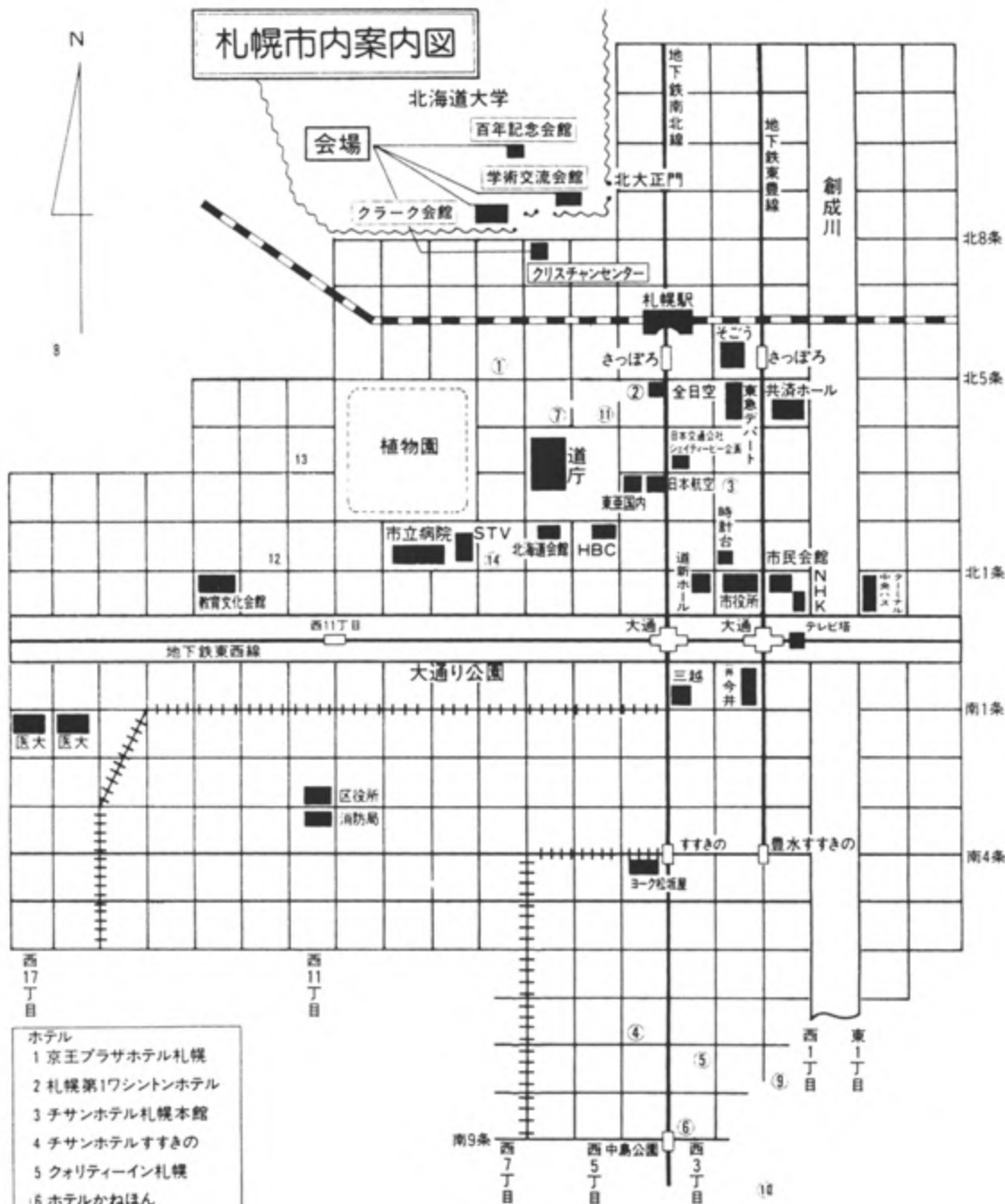
講演2.1 安全性試験における臨床病理パラメーター；製薬協調査結果……25  
松澤 利明（山ノ内製薬）

講演2.2 臨床病理検査変化と毒性発現……31  
（1）動物臨床病理の立場から  
小野 憲一郎（東大・農学部）

講演2.3 臨床病理検査変化と毒性発現……33  
（2）ヒト臨床試験の立場より  
植松 俊彦（岐阜大・医学部）



# 札幌市内案内図



- ホテル
- 1 京王プラザホテル札幌
  - 2 札幌第17シントホテル
  - 3 チサンホテル札幌本館
  - 4 チサンホテルすすきの
  - 5 クオリティーン札幌
  - 6 ホテルかねほん
- 公共宿泊施設
- ⑦ ボールスター札幌
  - ⑧ 清楓荘
  - ⑨ ホテルノースシティ
  - ⑩ ホテルアカシヤ
  - ⑪ KKR札幌
  - ⑫ 北海道厚生年金会館
  - ⑬ JR札幌弥生会館
  - ⑭ 警察エルム会館

## 札幌市内～新千歳空港の交通

- ① 各航空会社の連絡バス利用
- 新千歳空港到着ロビー～市内航空会社支店
  - 所要時間70分
  - 料金 ¥750
- ② JR千歳線の利用
- JR新千歳空港駅～JR札幌駅
  - 15～20分間隔で運行
  - 普通49分・快速36分
  - 料金 ¥940

## 会場への交通案内

- 地下鉄 南北線さっぽろ駅より徒歩約10分  
北12条駅より徒歩約10分

- JR 札幌駅北口より徒歩8分

※駐車場は準備しておりませんので、自家用車でのご来場は御遠慮下さい。

### 会場案内図

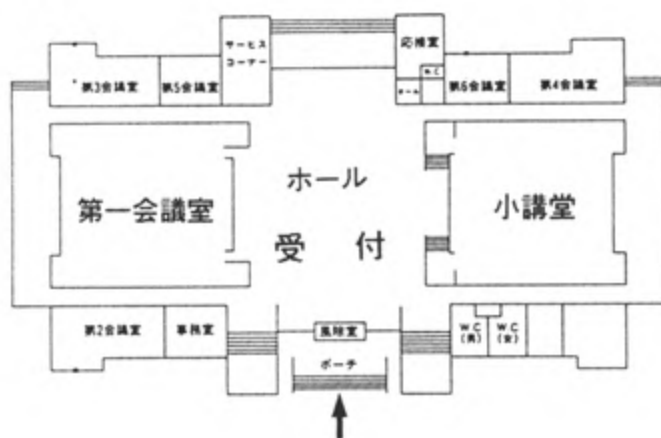


### ●食事・電話

クラーク会館食堂 (11:00-14:00、15:00-18:00)、  
百年記念会館レストラン (11:00-19:00)、  
中央食堂 (8:15-19:00)  
他に大学周辺、札幌駅地下に食堂、レストランが多数あります。  
公衆電話は会場内にあります。

# 学术交流会館会場

## 1 階



## 2 階





# プログラム 6月8日(水)

## Part 1 「毒性発現機構解明へのアプローチ」

座長 藤田 正一 (北大・獣医学部)

- 9:30 Introductory Talk 藤田 正一 (北大・獣医学部)
- 9:40 講演1.1 トランスジェニックアニマルの毒性研究への応用  
トランスジェニックマウスを用いた遺伝毒性の検定と解析  
塩山 善之、権藤 洋一、勝木 元也(九大・生医研)
- 10:20 講演1.2 化学発癌機構解明への新しいアプローチ  
SOS遺伝子発現を利用した化学発癌性物質の代謝的活性化  
機構解明への新しいアプローチ  
島田 力、山崎 浩史、味村 真弓、小田 美光(大阪府公衛研)
- 11:00 休 憩
- 11:10 講演1.3 実験動物病理学から見た毒性評価  
ポリオール発癌性およびキノロン薬の腎毒性  
鷺見 信好(日本新薬)

## Part 2 「毒性評価パラメーターの問題点」

座長 暮部 勝 (大阪府大・農学部)

- 13:00 Introductory Talk 暮部 勝 (大阪府大・農学部)
- 13:10 講演2.1 安全性試験における臨床病理パラメーター；製薬協調査結果  
松澤 利明(山ノ内製薬)
- 13:40 講演2.2 臨床病理検査変化と毒性発現  
(1) 動物臨床病理の立場から  
小野 憲一朗(東大・農学部)
- 14:10 講演2.3 臨床病理検査変化と毒性発現  
(2) ヒト臨床試験の立場より  
植松 俊彦(岐阜大・医学部)
- 14:40 休 憩

- 14:50 講演2.4 細胞内微細構造変化と毒性発現  
(1) 電顕所見と臨床病理パラメーターとの関係  
藤井 登志之、中野 一雄、藤平 司郎、田村 隆之、谷本 純一(藤沢薬品)
- 15:20 講演2.5 細胞内微細構造変化と毒性発現  
(2) 電顕所見と光顕所見との関係  
三森 国敏 (国衛試)
- 15:50 講演2.6 細胞内微細構造変化と毒性発現  
(3) 細胞構造タンパクの変化  
津山 伸吾(大阪府大・農学部)
- 16:20 休 憩
- 16:30 講演2.7 中枢神経における機能障害と生化学パラメーター  
渡辺 泰雄、渋谷 健(東京医大)
- 17:00 講演2.8 遺伝子毒性評価の諸問題ー変異原性試験を中心として  
祖父尼 俊雄(国衛試)

Part 3 「総合討論」 17:30 -

## Part I 毒性発現機構解明への新しいアプローチ

毒性物質の侵入とその作用に対して生体は様々な構造上の、あるいは機能上の防御機構で対応する。例えば皮膚は脂溶性の化学物質ですら簡単には透過できない構造になっている。消化管から吸収された異物に対してはそれらが血流に乗って大静脈に運ばれる直前のかんじん要の位置に肝臓が存在し、薬物代謝酵素が異物を代謝的に解毒しようと待ちかまえている。毒性物質が如何にしてこれらのバリアーを突破して生体内に侵入し、毒性を発揮するかは正に生体と毒性物質との知恵比べの感がある。どうすれば標的臓器に高濃度に毒性物質が蓄積して毒性を発揮できるか、毒性物質の側の戦略を考えると、吸収効率を上げるために脂溶性で比較的小さなサイズとし、組織移行性をよくするためには血漿蛋白結合率が低く、肝臓での代謝を回避するためには構造上代謝を受けにくくするか、逆に代謝を受けても代謝的に活性化され、毒性が強くなるような構造をとればよい。これに対して生体側は脳血液関門や胎盤関門などのバリアーで大切なところへ毒性物質が移行しないようにしたり、代謝酵素を誘導して解毒の促進を行ったり、代謝活性化された毒性物質を抱合酵素で解毒しようとする。このような生体と毒性物質の相互作用が標的臓器における毒性物質の濃度および毒性の強度に大きく関わっている。そして更に細胞及び細胞下のレベルで受容体やその他の微細構造、酵素分子や遺伝子との相互作用が毒性発現の要因となっている。従って、生体と毒性物質の分子レベルでの相互作用を明かにすることは動物個体レベルの毒性発現機構の解明に必須である。

毒性発現機構の解明はその毒性症状の治療、予防の両面に極めて有用であるばかりでなく、生体機能の解明や新しい医薬品の開発に示唆を与えるものでもある。医薬品の開発についていえば、特定の症状を呈する毒性物質の作用機構を明かにすることにより、その毒性を回避する、より科学的な製剤設計も可能となる。このような研究の蓄積は、より安全な医薬品の開発に大きく貢献するばかりでなく、長い目で見れば医薬品開発時の経済性という面でも見あったものになると考えられる。発癌物質などの有害環境汚染物質の毒性発現機構の解明は癌や公害病に苦しむ人々の治療方の確立に有用であるし、また、類縁化合物の毒性の可能性の有無を示唆するものでもある。毒性発現機構の解明は単なる学問的興味のみならず、人々の健康に密着した重要な課題である。

そこで本シンポジウムPart Iでは毒性発現機構解明のための新しいアプローチを大学、公立研究所、企業の3人の先生方にそれぞれの立場から具体的な研究例をもとにお話願うことにした。

トランスジェニックマウスを用いた遺伝毒性の検定と解析

塩山善之\*・権藤洋一・勝木元也  
九州大学生体防御医学研究所  
(〒812 福岡市東区馬出3-1-1)

A Novel Genotoxicity Test by Using Transgenic Mice

Yoshiyuki SHIOYAMA\*, Yoichi GONDO, Motoya KATSUKI  
Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University  
(3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812)

Summary

We have developed HITEC (hypersensitive *in vivo* test of carcinogenicity) mice by using transgenic techniques. The transgene contains the wild-type *rpsL* gene of *E.coli* in a form of a shuttle plasmid vector, pML4. The wild-type of the *rpsL* gene exhibits a dominant trait of streptomycin sensitive in the *E.coli* system. Thus, when the pML4 plasmid is introduced into a streptomycin-resistant *E.coli* host, it will transform the host cells to the dominant streptomycin-sensitive phenotype. If a forward mutation is arisen in the *rpsL* gene, however, the mutant phenotype becomes streptomycin resistant. The pML4 carrying a mutant *rpsL*, therefore, no longer transforms the host *E.coli* cells to streptomycin sensitive; rather, they will remain resistant. In this principle, we can detect the mutations of the *rpsL* transgene in the HITEC mouse genome by efficient recovery of the shuttle vector from the genome followed by the transformation of the host *E.coli* with the rescued vector. Consequently, the HITEC system could provide a quick-and-easy risk assessment test for tissue-specific mutagenicity. We have established more than 20 HITEC mouse lines so far. We tested the applicability of the system for the actual assay, by using three HITEC lines which have high copy number (350-750 copies) integrations of the shuttle vector. We found that 1) an electroporation method gave rise to a sufficient transformation efficiency of *E.coli* with the shuttle vector rescued from HITEC DNA, 2) the background mutation rate was low enough (less than  $5 \times 10^{-5}$ ), 3) administration of MNU elevated the mutation rate, and 4) DNA sequencing of the *rpsL* gene in the streptomycin-resistant colonies revealed various base differences from the wild-type *rpsL* sequence.

**Key Words:** transgenic mice / somatic mutations / induced mutagenesis / risk assessment

これまで不可能であった、マウス個体のすべての体細胞における突然変異を高感度に検出できる遺伝子導入マウスを確立した。これをHITEC (hypersensitive *in vivo* test of carcinogenicity) マウスと呼んでいる。HITECマウスに導入した突然変異モニター遺伝子は、大腸菌系で薬剤耐性として突然変異を容易に検出できるものである。このマウスに、発がん剤や遺伝毒物と思われる環境変異原を投与し、実際の生体に及ぼす影響を迅速簡便に解析するのが、本研究の目的である。環境変異原の解析法としては、現在、Ames法のように単細胞生物での突然変異誘発率を指標とする方法が、その簡便性から主流を占めている。しかし、ヒトのように複雑な発生過程と多様な組織からなる動物個体への突然変異誘発性とは全く異なるものと考えねばならない。本研究では、遺伝子導入マウスを用いているので、突然変異モニター遺伝子は全ての体細胞に内在しており、生きた個体そのものに変異原を投与し、各組織別、発生段階別、また胎児への影響なども検定できる。さらに、導入したモニター遺伝子の大きさが375bpと極めて小さく、その全塩基配列を決定し、実際に生じた塩基置

換を分子レベルでも容易に同定でき、環境変異原によって誘発される突然変異の頻度のみでなく、実際にDNA上に生じた変化も解析できるのが特徴となっている。

用いた突然変異モニター遺伝子は、全長375bpの大腸菌の野生型*rpsL*である。野生型*rpsL*に突然変異が生じると大腸菌をストレプトマイシン耐性に形質転換するので検出が容易かつ鋭敏である。実際には、この野生型*rpsL*遺伝子をもつ大腸菌プラスミドpML4(東大・分生研、真木寿治博士より供与)全体をシャトルベクターとしてトランスジェニックマウスを作成した。すでにpML4を多コピー導入した系統を確立した。検定方法の概略は次の通りである。

1. HITECマウスに環境変異原を、発生段階別に投与する。

2. 各臓器からDNAを抽出し、そのなかの導入遺伝子にて大腸菌を形質転換する。

3. 薬剤耐性となった突然変異モニター遺伝子*rpsL*の塩基配列を決定する。

もしHITECマウスの細胞内でこの*rpsL*に突然変異が生じていると、ステップ2で、ストレプトマイシン耐性の大腸菌コロニーとして現れるので、検出が極めて鋭敏かつ簡便である。さらに、この耐性コロニーよりDNAを調製し、*rpsL*部分の塩基配列を決定し(ステップ3)、既知の野生型の配列と比較すれば、実際に生じた塩基置換も容易に同定される。この方法は、ステップ1で、妊娠雌に変異原を投与することにより、胎児への影響も解析できる。

これまでに、多コピーの導入遺伝子をもつHITECマウスに、変異原を全く投与しないで予備実験を行った。肝臓より約1mgのゲノムDNAが得られ、そのうちの10 $\mu$ gを用いて大腸菌を形質転換したところ、 $2.2 \times 10^5$ 以上の効率でコロニーが得られ、そのうち11個がストレプトマイシン耐性であった。すなわち、バックグラウンドとして $5 \times 10^3$ 以下という突然変異率がえられ、実用段階に達していることがわかった。また、ゲノムDNAの抽出から大腸菌の形質転換までは2日で完了し、3日目にはコロニーとして結果が得られたので、極めて簡便迅速な方法であり、経済性も優れている。現在、アルキル化剤をHITECマウスに投与する実験を開始し、得られるストレプトマイシン耐性コロニーより、シャトルベクターpML4のDNAを抽出し、そのなかのモニター遺伝子*rpsL*部分のDNAシーケンシングを行い、塩基レベルでどのような変化が生じているかも解析中である。

## SOS遺伝子発現を利用した化学発癌性物質の代謝的 活性化機構解明への新しいアプローチ

島田 力・山崎 浩史・味村 真弓・小田 美光  
大阪府立公衆衛生研究所  
(〒537 大阪市東成区中道1-3-69)

Tsutomu Shimada, Hiroshi Yamazaki, Mayumi Mimura, and Yoshimitsu Oda  
Osaka Prefectural Institute of Public Health  
(3-69, Nakamichi 1-chome, Higashinari-ku, Osaka 537)

### Summary

A variety of environmental carcinogens and mutagens have been shown to require metabolic activation by drug-metabolizing enzymes in order to evoke their carcinogenic and mutagenic potentials and the Ames test system is one of the useful methods for detecting these mutagens. Recently one of the SOS-function tests, namely umu test, has been developed. This test system is of great use for the studies of the metabolic activation of a variety of environmental chemicals after introducing several genes of drug metabolizing enzymes such as O-acetyltransferase, nitroreductase, and glutathione S-transferase into the original strain Salmonella typhimurium TA1535/pSK1002. Here we report the recent progress on the metabolic activation of environmental chemicals using these newly developed tester strains and compare the results with those by other assay systems.

Key Words: chemical carcinogen, umu test, cytochrome P450, metabolic activation

環境中に存在する発癌性物質の多くは、DNA障害性を発揮するためには生体内の薬物代謝酵素による活性化が必要で、生成した反応性の代謝物とDNAとの相互作用の結果、癌化のイニシエーションへと導かれる(Guengerich and Shimada, 1991)。実際に細胞が癌化に至るまでの道のりは複雑であるが、初発の発癌性物質によるDNA障害が最も重要で、古くからこの障害性の検出のための有効な方法の開発が検討されてきた。Ames法は代表的な優れた方法の一つであるが、Assayに時間のかかることや、酵素反応速度論的解析は難しい、などの問題点を含んでいる。近年、Odaら(1985)によって開発されたumu法は、大腸菌のSOS遺伝子の内の一つであるumuC遺伝子発現を利用した方法で、発癌性物質によるDNA障害性を効率よく、しかも非常に簡便に検出できる。我々はこの方法を用いて、ラットやヒト肝ミクロゾームP450酵素分子種の発癌性物質の代謝的活性化への役割について研究を展開してきた(Shimada et al., 1989)。ここでは、主にumu法を用いた我々の結果を中心に、発癌性物質の生体内酵素による代謝的活性化機構の解析方法について述べる。

### 1. SOS遺伝子発現を利用した環境発癌性物質のDNA障害性の検出

大腸菌で詳しく研究されているSOS反応とは、細胞のDNA障害に伴う一連の反

応、すなわち細胞分裂の停止、溶原化したファージやコリシンの誘発、突然変異の誘発、DNA修復の向上、遺伝子組換え能の活性化など、必ずしも有利な反応ばかりではないが、細胞が生き残るための適応応答と理解されている。現在、これら反応に関与する約20のSOS遺伝子群が確認されており、いずれもlexAとrecA遺伝子により制御されていると考えられている。これらの遺伝子の一つであるumuオペロンは、umuDとumuCの二つの遺伝子からなり、その産物は、突然変異生成の過程で重要な役割を果たすと考えられている。Shinagawaら(1983)は、umuオペロンの下流にあるumuC'遺伝子とラクトースオペロンの一つである'lacZ'遺伝子を結合させたumuC'-lacZ融合遺伝子を持つプラスミドpSK1002を構築し、このプラスミドをSalmonella typhimurium TA1535に導入した新しい菌株を作製した。Odaら(1985)は、この試験菌株を用いてスクリーニングしたところ、簡便に、しかも感度よく環境変異原・発癌性物質のDNA損傷能を検出でき、得られた結果は、Amesテストでの復帰突然変異の強さと良好な関係にあることを報告した。

## 2. ヒト肝ミクロゾームP450による前発癌性物質の代謝的活性化

以上の試験菌株(Salmonella typhimurium TA1535/pSK1002)を用いるumuテストは、発癌性物質の代謝的活性化におけるP450酵素など薬物代謝酵素の役割に関する研究に非常に優れている。利点の一つは、前日からの菌の前培養にかかる操作を除いて、当日の実験では、器具、ピペット、試液、酵素液その他の滅菌操作をせずに実験が可能である点である。例えば、酵素源や発癌性物質など滅菌操作が煩雑な場合でも、umu法ではそのまま実験がおこなえるのである。もう一つの長所は、反応にかかる時間(菌と発癌性物質ならびに薬物代謝酵素が接触する時間)が2時間と短い点である。このことから、反応速度論的な酵素反応の解析が可能となる。

我々は、umu法を用いて、ヒトのチトクロームP450(以下P450)酵素の多種類の発癌性物質の代謝的活性化への役割を調べ、個々の酵素の機能を表1に示すように分類した(Guengerich and Shimada, 1991; Shimada et al., 1989)。

表 1. ヒトP450酵素による変異原・発癌性物質の代謝的活性化

| P450          | P450分子種により活性化される変異原・発癌性物質   |
|---------------|---|
| CYP1A1:       | benzo(a)pyrene, 2-acetylaminofluorene   |
| CYP1A2:       | 4-aminobiphenyl, 2-aminoanthracene, IQ, MeIQ, MeIQx, Glu-P-1, Glu-P-2, Trp-P-2, PhIP, AαC, 6-aminochrysene, aflatoxin B <sub>1</sub>  |
| CYP2A6:       | N-nitrosodiethylamine, aflatoxin B <sub>1</sub>   |
| CYP2B6:       | 6-aminochrysene   |
| CYP2D6:       | 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)  |
| CYP2E1:       | N-nitrosodimethylamine  |
| CYP3A3/4/5/7: | MOCA, aflatoxin B <sub>1</sub> , aflatoxin G <sub>1</sub> , sterigmatocystin, benzo(a)pyrene-7,8-diol and other dihydrodiols of PAHs, 6-aminochrysene, tris(2,3-dibromopropyl)phosphate |

表 2. *S. typhimurium* NM2000, TA1535/pSK1002ならびにNM2009株における発癌性アリルアミンのラット肝マイクロゾームによる代謝的活性化の比較

| Procarcinogen     | Concentration | <u>umu</u> units/min/mg protein |                |        |
|-------------------|---------------|---------------------------------|----------------|--------|
|                   | ( $\mu$ M)    | NM2000                          | TA1535/pSK1002 | NM2009 |
| 2-Aminoanthracene | 0.1           | 20                              | 33             | 1121   |
|                   | 1             | 51                              | 511            | 1647   |
| 6-Aminochrysene   | 0.1           | 0                               | 64             | 1231   |
|                   | 1             | 0                               | 355            | 869    |
| PhIP              | 3             | 67                              | 134            | 147    |
|                   | 10            | 44                              | 206            | 184    |

### 3. アセチル転移酵素遺伝子導入株によるDNA障害性発癌性物質の高感度検出

多くの発癌性アリルアミン類やアミノアゾ化合物は、2段階の経路で活性化されることが明らかとなっている。初発のP450などによるN-水酸化と引き続くアセチル化反応である。最近、多くのグループからアセチル転移酵素遺伝子を試験菌株あるいは培養細胞に導入し、環境中の発癌性物質の高感度検出あるいは活性化機構の解明の試みがなされている(Watanabe et al., 1990; Ando et al., 1993)。我々もサルモネラ菌のアセチル転移酵素遺伝子を含むプラスミドpNM12を構築し、umu試験菌株に導入し、*S. typhimurium* TA1535/pSK1002/pNM12 (NM2009)を得た(Yamazaki et al., 1992; Oda et al., 1993)。新しく得た菌株は高いアセチル転移活性を有し、またアリルアミン化合物のDNA障害性を高感度に検出できることが明らかとなった(表2)。さらに、アセチル転移酵素欠損株(*S. typhimurium* NM2000)による活性と比較することにより代謝的活性化経路の推定も可能である。例えば表2に示すように、2-aminoanthraceneや6-aminochryseneの場合は、P450/アセチル転移酵素系による活性化が主要と考えられるが、PhIPの場合は、アセチル転移酵素の関与は考え難いなどである(Yamazaki et al., 1992)。

表 3. 6-Aminochrysene(6-AC)と6-aminochrysene-1,2-diol(6-AC-diol)のラット肝マイクロゾームによる代謝的活性化

| Treatment of rats       | P450 content (nmol/mg protein) | O-Dealkylation                          |  | Activation                  |                                  |
|-------------------------|--------------------------------|---|--|-----------------------------|----------------------------------|
|                         |                                | Pentoxy-resorufin (nmol/min/mg protein) | Ethoxy-resorufin (nmol/min/mg protein) | 6-AC (units/min/mg protein) | 6-AC-diol (units/min/mg protein) |
| None                    | 0.72                           | 0.28                                    | 0.54                                   | 1288                        | 1448                             |
| Phenobarbital           | 1.46                           | 4.58                                    | 1.13                                   | 8270                        | 1987                             |
| $\beta$ -Naphthoflavone | 1.16                           | 0.55                                    | 11.8                                   | 4235                        | 3481                             |



#### 4. 6-AminochryseneのP450による活性化におけるN-水酸化代謝物とdiol-epoxide代謝物の役割

上述したように、6-aminochryseneはP450/アセチル転移酵素系により活性化されると考えられたが、umu法を用いて実験を続けると他の代謝経路の存在も示唆された。即ち、ラット肝ミクロゾームを用いると、phenobarbital誘導性P450による活性化はアセチル転移酵素阻害剤(pentachlorophenol)により阻害されるのに、 $\beta$ -naphthoflavone誘導性P450による活性化はpentachlorophenolによって強く阻害されない結果であった(Yamazaki et al., 1992; 1993)。その後6-aminochrysene-1,2-diol (trans-1,2-dihydroxy-1,2-dihydro-6-aminochrysene)を併用してNM2009株でDNA障害性を調べたところ、この化合物は、 $\beta$ -naphthoflavone誘導性P450により活性化されることが明らかとなった(表3)。以上の結果から、6-aminochryseneは、P450により二つの経路(N-水酸化とdiol-epoxide生成)により活性化されるものと推定された。

#### 5. ニトロ還元酵素やその他の薬物代謝酵素遺伝子導入株

以上述べてきたようにumu試験の親株である*S. typhimurium* TA1535/pSK1002に他の遺伝子を導入することにより、感度よく環境発癌性物質のDNA障害性あるいは代謝的活性化経路の推定をおこなうことが可能となる。最近になって、ニトロ還元酵素遺伝子導入株(NM1011)、あるいは本遺伝子とアセチル転移酵素遺伝子の両者を導入したNM3009株が開発され、有効な成績をおさめてきている(Watanabe et al., Oda et al., 1992; Oda et al., 1993)。表4には、umuテストの親株である*S. typhimurium* TA1535/pSK1002と、アセチル転移酵素遺伝子導入株(NM2009)ならびにアセチル転移酵素とニトロ還元酵素両遺伝子導入株(NM3009)における、6種類のニトロアレン化合物のDNA損傷能の比較検討した結果を示した。NM3009株を用いると、高感度にこれらの化合物の遺伝毒性の活性を検出できることがわかる。さらに、最近、グルタチオンS-転移酵素遺伝子やヒトのアセチル転移酵素遺伝子の導入の試みもなされ、今後益々有用な試験菌株が開発されるものと考えられる。

表 4. 3種類の試験菌株(*S. typhimurium* TA1535/pSK1002, NM2009ならびに NM3009株)における6種類のニトロアレン化合物の遺伝毒性活性の比較

| Nitroarenes*            | <i>Salmonella</i> tester strain |        |        |
|-------------------------|---------------------------------|--------|--------|
|                         | TA1535/pSK1002                  | NM2009 | NM3009 |
|                         | umu gene expression (units/ml)  |        |        |
| 1-Nitropyrene           | 106                             | 251    | 765    |
| 3-Nitrofluoranthene     | 140                             | 317    | 1557   |
| 1,3-Dinitropyrene       | 421                             | 790    | 1395   |
| 1,6-Dinitropyrene       | 211                             | 1305   | 1258   |
| 3,7-Dinitrofluoranthene | 197                             | 425    | 538    |
| 3,9-Dinitrofluoranthene | 111                             | 459    | 1162   |

\*umu反応液中に加えたnitroareneの濃度は 1 ng/mlである。

## 6. おわりに

ここでは、我々が用いているumuテストを利用した環境変異原・発癌性物質の代謝的活性化に関わる有用性について述べてきた。umuテストでは、必ずしも化学物質の変異原性を直接調べているのではないが、本稿で述べたように、この方法では短時間に感度よく化学物質の遺伝毒性の強さを調べることができ、得られた結果はAmesテストでの成績とよく一致することも報告されている。二つの方法は、それぞれ長所と短所を持っているが、これらの方法を使い分けることで、今後、効率よく化学物質の遺伝毒性・変異原性を調べることが可能となるものと考えられる。なかでも本稿で記してきたように、umuテストを用いると、化学物質の代謝的活性化の研究に、非常に威力を発揮するなど、研究の前段階ではumuテストであらかじめスクリーニングしておき、Amesテストで結果の確認をするような方法をとることが、今後有用になるものと考えられる。

## 文献

- Ando, M., Shindo, Y., Fujita, M., Ozawa, S., Yamazoe, Y. and Kato, R. (1993):  
A new *Salmonella* tester strain expressing a hamster acetyltransferase shows high sensitivity for arylamines. Mutat. Res., 292, 155-163.
- Guengerich, F.P. and Shimada, T. (1991):  
Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P450 enzymes. Chem. Res. Toxicol., 4, 391-407.
- Oda, Y., Nakamura, S., Oki, I., Kato, T. and Shinagawa, H. (1985):  
Evaluation of the new test system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. Mutat. Res., 147, 219-229.
- Oda, Y., Shimada, T., Watanabe, M., Ishidate Jr, M. and Nohmi, T. (1992):  
A sensitive umu test system for the detection of mutagenic nitroarenes in *Salmonella typhimurium* NM1011 having a high nitroreductase activity. Mutat. Res., 272, 91-99.
- Oda, Y., Yamazaki, H., Watanabe, M., Nohmi, T. and Shimada, T. (1993):  
Highly sensitive umu test system for the detection of mutagenic nitroarenes in *Salmonella typhimurium* NM3009 having high *O*-acetyltransferase and nitroreductase activities. Environ. Molec. Mutagen., 21, 357-364.
- Shimada, T., Iwasaki, M., Martin, M.V. and Guengerich, F.P. (1989):  
Human liver microsomal cytochrome P450 enzymes involved in the bioactivation of procarcinogens detected by umu gene response in *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002. Cancer Res., 49, 3218-3228.
- Shinagawa, H., Kato, T., Ise, T., Makino, K. and Nakata, A. (1983):  
Cloning and characterization of the umu operon for inducible mutagenesis in *Escherichia coli*. Gene, 23, 167-174.
- Watanabe, M., Ishidate Jr, M. and Nohmi, T. (1989):  
A sensitive method for detection of mutagenic nitroarenes: construction of nitroreductase-overproducing derivatives of *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100. Mutat. Res., 216, 211-220.
- Watanabe, M., Sofumi, T. and Nohmi, T. (1990):

Sensitive method for detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: new derivatives of Salmonella typhimurium tester strains possessing elevated O-acetyltransferase levels. Mutat. Res., 234, 337-348.

Yamazaki, H. and Shimada, T. (1992):

Activation of 6-aminochrysene to genotoxic products by different forms of rat liver cytochrome P450 in an O-acetyltransferase-overexpressing Salmonella typhimurium strain (NM200). Biochem. Pharmacol., 44, 913-920.

Yamazaki, H., Oda, Y. and Shimada, T. (1992):

Use of a newly developed tester strain Salmonella typhimurium NM2009 for the study of metabolic activation of carcinogenic aromatic amines by rat liver microsomal cytochrome P450 enzymes. Mutat. Res., 272, 183-192.

Yamazaki, H., Mimura, M., Oda, Y., Inui, Y., Shiraga, T., Iwasaki, K., Guengerich, F.P. and Shimada, T. (1993):

Roles of different forms of cytochrome P450 in the activation of the promutagen 6-aminochrysene to genotoxic metabolites in human liver microsomes. Carcinogenesis, 14, 1271-1278.

## ポリオールが発癌性およびキノロン薬の腎毒性

鷺見 信好

日本新薬株式会社 創薬研究本部  
(〒601 京都市南区西大路通八条下ル)

### **Polyol-Induced Carcinogenicity and Quinolone-Induced Renal Toxicity**

Nobuyoshi SUMI

Research Laboratories, Nippon Shinyaku Co., Ltd.  
(Nishiohji Hachijo, Minamiku, Kyoto 601)

#### Summary

The ultimate goal of conducting various toxicological studies for pharmaceuticals is to extrapolate the results obtained in laboratories to human situations. Therefore, the better understanding of the mechanism of toxicity in the preclinical phase is essential for a meaningful extrapolation. The elucidation of toxicological mechanism requires a spectrum of broad discipline that consists of various specialized areas of studies, e.g., biochemistry, pharmacology, pathology, etc. As the specialization of each scientist advances more and more, the cooperative research among specialized scientists from different disciplines for elucidating the mechanism of drug toxicity is of increasing importance. I would like to introduce our approach currently undertaken to elucidate the mechanism of polyol-induced carcinogenicity and quinolone-induced renal toxicity in our laboratory. Although these researches are still in progress and scientifically incomplete, the approach and the outcome so far illuminate the importance of modern toxicology laboratory management.

**Key Words:** mechanism of toxicity, polyol-induced carcinogenicity, quinolone-induced renal toxicity, extrapolation to human situations, toxicology laboratory management

医薬品の開発に毒性試験は必須である。目的はその非臨床段階での毒性の全貌を明確にする事にあり、その為に我々は定められたガイドラインに準拠して各種の試験を遂行している。得られた結果を詳細に記述解析し、最終的にはヒトへの外挿を試みる。このヒトへの外挿というプロセスが我々の最終目的である限り、我々は当然より高度な外挿性を求める。もし現象として捉えたある毒性について、そのより詳細な発現機序が判明したとすれば、それはヒトへの外挿性をより高度化するに違いない。この目的で現在進行中の二三の事例を紹介し、未完成ではあるが参考に供したい。

### 1. ポリオールのラットにおける副腎髄質細胞と精巣間細胞の増殖性病変の発現機序について

ポリオール、即ち複数のOH基をもつアルコールは長期大量投与によりラットで副腎髄質細胞と精巣間細胞の増殖性病変を誘発する(Sinkeldam et al. 1992, Tab. 1)。

Table 1. Incidence of proliferative changes of male Wistar rats fed lactitol for up to 130 weeks

|  | Lactitol<br>% |                 |      |                 |
|--|---------------|-----------------|------|-----------------|
|  | 0             | 2               | 5    | 10              |
| Adrenals (effective number)                  | (45)          | (50)            | (44) | (48)            |
| -basophilic focus, a medullary tumor or both | 19            | 30 <sup>b</sup> | 24   | 30 <sup>a</sup> |
| -basophilic foci                             | 12            | 20              | 19   | 24 <sup>a</sup> |
| -medullary benign or malignant tumors        | 10            | 18              | 8    | 18              |
| -medullary malignant tumors                  | 3             | 4               | 3    | 2               |
| Testes (effective number)                    | (48)          | (50)            | (48) | (49)            |
| -Leydig cell tumors                          | 2             | 2               | 4    | 11 <sup>b</sup> |
| -Leydig cell proliferation                   | 1             | 3               | 4    | 5               |

<sup>a</sup>p<0.05

<sup>b</sup>p<0.01

このポリオール増殖性病変の発現機序を探る目的で実験を実施した。副腎髄質細胞の増殖性病変の発現機序については、SD系雄性ラットに15g/kgのLactitolないしはXylitolを13週間強制経口投与した。その結果、Lactitol投与群並びにXylitol投与群共に尿中カルシウムの顕著な増加が認められた。しかしながら、血漿中カルシウムには変動は認められなかった。血漿中エピネフリン並びにノルエピネフリンについては増加傾向が認められ、副腎髄質細胞の電子顕微鏡検査ではエピネフリン、ノルエピネフリンの分泌亢進を示唆する軽度なゴルジ装置の増生が観察された。また、副腎髄質の細胞性肥大並びに細胞増殖率の増加傾向も認められた。

従って、ポリオールの大量投与により腸管からのカルシウムの吸収が促進され(Ammann et al. 1988)、副腎髄質細胞の機能の亢進状態が持続し、その結果細胞の増殖性変化が誘発される可能性が示唆された。

精巣間細胞の増殖性病変の発現機序については、上記の実験と同様にSD系雄性ラットに15g/kgのLactitolないしはXylitolを26週間強制経口投与した。陽性対照としてFlutamide 20mg/bodyの4週間皮下投与群を設けた。その結果、Lactitol投与群並びにXylitol投与群共に間細胞の体積、増殖率並びに微細構造、下垂体LH産生細胞の増殖率及び血漿中のテストステロン並びにLH濃度に変化は認められなかった。なお、Flutamide投与群では血漿中のLH濃度並びに間細胞の体積と増殖率の増加が認められた。間細胞については、滑面小胞体の増生も観察された。

以上、今回の実験ではポリオール投与による精巣間細胞の増殖性変化の発現機序について、有用な情報は得られなかった。

## 2. キノロン薬のラットにおける腎病変の発現機序について

キノロン系の薬物は、大量投与により結晶尿の出現や腎障害をもたらす(上田ら1992)。このキノロン系薬物の腎病変の発現機序を探る目的で実験を実施した。SD系雌雄ラットに、あるキノロン薬の3000mg/kgを4週間強制経口投与した。病理組織学検査では投与2日目より尿細管腔内に結晶が観察され、次いで尿細管上皮の扁平化、尿細管腔の拡張、尿円柱の形成、再生尿細管の出現が見られた。投与1週間前後より病変の重篤化に伴い炎症性細胞の浸潤も観察された。投与1日目より多数の円形褐色結晶が尿中に出現した。顕微FT-IR装置並びにEDXによる分析の結果、この結晶は投与薬物のマグネシウム塩もしくは遊離の薬物結晶とリン酸アンモニウムマグネシウムの結晶の混合物であると推測された。

従って、大量に投与吸収され原尿中に排泄された薬物が、尿細管における水分の再吸収により結晶化し、これが尿中に排出されるとともに一部の結晶は尿細管内に

留まり、閉塞性の腎障害が惹起されるものと考えられる。

腫瘍も炎症も病理学の基本である。基本を身につけ一人前の病理学者として認められるまでには長い年月が必要である。毒性学は言わずと知れた総合学問であり、病理学はその一部をしめる。病理学者が毒性の全貌を理解し、更にはその毒性の発現機序をも理解していく事はなるほど至難のわざかも知れない。生化学者が病理学を理解し、毒性の全貌を理解しようとする過程も同じかも知れない。学問がここまで専門化し、今後益々加速度が加わる中で、必要とされる毒性発現機序解明の為に、個々人の専門性を機能的に結びつけていく力の増強が当然欠かせない。この意味において、トキシコロジーラボラトリーのマネジメントの重要性が今後益々強調されていくであろう。

#### 文献

Ammann, P., Rizzoli, R. and Fleisch, H. (1988)

Influence of the disaccharide lactitol on intestinal absorption and body retention of calcium in rats. *J. Nutr.*, **118**, 793-795.

上田 泰、斎藤 篤 (編) (1992)

化学療法と腎臓. 東京医学社, 東京.

Sinkeldam, E.J., Woutersen, R.A., Hollanders, V.M.H., Til, H.P., Van Garderen-Hoetmer, A. and Baer, A. (1992)

Subchronic and chronic toxicity/carcinogenicity feeding studies with lactitol in rats. *J. Am. Coll. Toxicol.*, **11**, 165-188.

## Part II 毒性評価パラメーターの問題点

幕部 勝  
大阪府立大学・獣医・毒性

### Part II. Problems on Toxicological Parameters

Masaru KUREBE  
*Department of Toxicology, School of Veterinary Medicine,  
University of Osaka Prefecture*

#### Introduction

The selection of toxicological parameters in protocol and the interpretation of their obtained data are most important for toxicity study and difficult for toxicologists. Thus, in this symposium of part II, experts will summarize many problems on toxicological parameters and give the useful suggestions.

#### 緒 言

医薬品やその他の有用化学物質の開発に際して、毒性スクリーニング、安全性試験及び毒性機序研究等が行われるが、それらプロトコルにどのような評価パラメーターを設定し、また、そのデータをどのように解釈するかは重要な問題である。試験責任者の報告書作成時のデータ解析のみならず、各パラメーターの評価を行う試験従事者がどの程度の熟練技能と洞察力を持っているかによっても試験精度は可なり異なってくるものと考えられる。試験期間中又は最終検査時に認められる極軽度の有害作用を未熟のために見逃すこともあると予想しなければならない。

ヒトでの臨床Phase I, II, IIIで副作用が発現し、動物試験で再検討しなければならないケースがよくあるが、種差のみによるものでなく、動物を用いた安全性試験で評価パラメーターの取り方とデータ解析に原因する可能性も皆無とは言えない。

一般的には、動物試験では評価パラメーターの変動係数が小さいために、群間の統計学的比較及び用量相関からデータ解析され、障害の程度や標的臓器が明らかにされるが、ヒトでは評価パラメーターの変動係数が大きく、評価パラメーターにも制約があるために、個体ごとの病理診断の結果から総合的に判定され、動物とヒトではデータの判定法も異なっている。

動物試験では動物種、系統、年齢、性別、数、飼育条件等が一定に出来るが、ヒト臨床試験ではそれらを一定にすることは不可能である。

試験プロトコル作成時に、評価パラメーターの選択は慣例化されているが、被験物質の化学構造、主作用、Toxicokinetics等から更に経験的に追加されるのが一般的である。しかしながら、例えば肝機能検査異常ではGOT, GPT, LDH, ALPの順に、腎機能検査異常ではBUN, タンパク尿、クレアチニンの順に変動しやすいが、各項目が単独で一定時期のみに変動することがよくあるために注意しなければならない。

血液生化学検査法によっても定量値は異なることがある。例えば、採血から血清分離までの所要時間によってイヌやラットではLDH値が変動し、コリンエステラーゼ値は基質によって異なる。また、各測定値への被験物質やその代謝体の影響についても十分に考慮する必要がある。

上記のような問題点について個々の研究機関での多くの経験に基づいて、安全性試験が実施されるが、未知数の要因によって評価パラメーターが影響されるために、実施機関によって可なり異なった結果となることがよくある。

従って、本シンポジウムでは安全性研究の基礎となっている一般毒性と遺伝毒性における評価パラメーターについて取り上げ、各分野での情報と各研究機関で個々に蓄積された経験に基づいて評価パラメーターの問題点を講演者に整理していただき、評価パラメーターの取り方と解釈について総合的且つ理論的な示唆が得られれば幸いである。



## 講演2.1

安全性試験における臨床病理パラメーター；製薬協調査結果

松澤利明

山之内製薬（株）創薬安全性研究所

〒174 東京都板橋区小豆沢1-1-8

Clinical Pathology Testing Parameters for Nonclinical Toxicity and Safety Studies; Current Survey by the JPMA

Toshiaki MATSUZAWA

Safety Research Laboratories, Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.  
1-8 Azusawa 1-chome, Itabashi-ku, Tokyo 174, Japan

### ABSTRACT

There are many regulatory guidelines for nonclinical toxicity and studies of pharmaceuticals, chemicals, agro-chemicals and food additives in the world. Parameters required by the MHW guidelines are much more than those by other regulatory guidelines.

A survey of the current reference data on animal clinical pathology testing by the JPMA revealed that parameters exceeding requirement were often measured. I believe the clinical pathological parameters should be chosen depending on the toxicity of each test compound.

The International Harmonization for Clinical Pathology Testing Recommendations emphasizes that the animals used for clinical pathology testing should be examined for morphologic pathology findings.

JPMA examined the relationship between clinical pathology findings and other observations parameters in 787 papers of toxicological-oriented journals published over the last 8 years (1985 to 1992). The results showed the following parameters of clinical pathology testing to have toxicological significance; hemoglobin, hematocrit, erythrocyte count, leukocyte count, reticulocyte count and platelet count for hematology, cholesterol, protein, alkaline phosphatase, urea nitrogen, phospholipids, triglyceride, GPT, potassium, GOT and sodium for blood chemistry; and urine volume, urinary sodium, urinary potassium, and urinary osmolality or specific gravity for urinalysis.

JPMA also surveyed the application of statistical methods to clinical pathology parameters.

Key Words: Blood chemistry, coagulation, hematology, urinalysis, animals, toxicity testing, regulatory guidelines,

安全性試験における臨床病理検査値に関する日本製薬工業協会基礎研究部会（製薬協：JPMA）の調査結果と臨床病理検査の国際調和（IHCPT）の動向を紹介する。

毒性ガイドラインで推奨（要求）されている臨床病理検査の項目は規制当局毎にそれぞれ異なり、統一がとれていない。これらの毒性ガイドラインのうち日本のガイドライン（MHW, MAFF）は他に比べて多数の検査項目を推奨（要求）している（Hall 1992）。1984年にMHWの毒性ガイドラインが発行され、その後5年間に実施された毒性試験について臨床病理検査値の背景データを製薬協加盟施設にアンケート調査したところ、個々の検査項目の実施率はTable 1及び2に示すように、ほとんどの施設で毒性ガイドラインの推奨する項目を満たしていた（Matsuzawa 1992, Matsuzawa et al. 1993）。

毒性試験における臨床病理検査の国際調和の勧告案（IHCPT）では、組織所見を反映できる項目に重点をおいた検討がされている（Weingand et al. 1992）。Table 1及び2に示すような血液学的検査、血液化学検査および尿検査にCoreとOption項目に分けるべき議論がされている。また、採材（測定前条件）に関する方法も日本の毒性ガイドラインとは考えを異にしている。最近、製薬協も参加して、この種の国際調和の協議が進められている。

製薬協では、臨床病理検査における異常値の出現頻度を1985～1992年に発行された雑誌のうち比較的多く利用されている医薬品研究、応用薬理、基礎と臨床、薬理と治療、Progress in Medicine, Chemotherapy, J.Tox.Sci., Tox.Appl.Pharmacol., の787論文から総データ数15,030を集計した。異常値（統計学的有意差があるデータ）を毒性ありと毒性なしに分類した。このうち毒性ありは約30%、毒性なしは約70%であった。異常値のうち毒性ありとした判定理由は薬理作用の関連、病理所見あり、関連する他項目に変化あり、用量反応ありとするレポートが多かった。一方、異常値を毒性なしとした判定理由は病理所見なし、用量依存なし、生理的・正常範囲内（背景データ内）であり、偶発的变化、毒性学的意義なし、一貫性なし、投与前値と差なし等が主なものであった（製薬協 1994）。統計学的有意差があって、毒性もあるとする頻度が高くなれば臨床病理検査の果たす役割がさらに重要となり、ヒトへの外挿も容易となる。

統計学的有意差のある異常値を解析すると、毒性と判定した異常値の出現する頻度の多い検査項目は、血液学検査項目ではヘモグロビン>ヘマトクリット>赤血球数>白血球数>網状赤血球数>血小板数の順であった。血液化学検査項目ではコレステロール>蛋白質>アルカリ性フォスファターゼ>尿素窒素>リン脂質>中性脂肪>GPT>カリウム>GOT>ナトリウムの順であった。尿検査では尿量、ナトリウム、カリウム、比重の順であった。これらの検査項目には毒性ガイドラインのコア項目としての存在意味があると思われる。

臨床病理検査の異常値と組織病理検査の異常所見との関連を、最近1982～1992年に発行された雑誌から検索した。血液学的検査及び尿検査で異常値がある場合に1/3が病理所見と、血液化学検査で異常値がある場合に1/2が病理

所見と関連があると記載されていた(製薬協 1994)。今後、病理所見と臨床病理検査値の関連を明らかにするためには、特に、臓器特異性ならびに種特異性が高く、微量で簡便な測定が可能なパラメーターを採用することが肝要である。そのためには、測定方法も検討すべきであると考えられる。

臨床病理検査の異常値出現頻度の統計学的有意差は用いる統計学的解析法によって異なる。測定前条件ならびに測定条件の国際調和だけでなく、統計学的評価法も国際的ハーモナイゼーションが必要と思われる。臨床病理検査値に用いられる統計解析の実態調査も製薬協加盟会社を対象に実施した。検査値が頻度で表示される場合は、順位検定後多重比較法あるいは直接確率・ $\chi^2$ 検定法が多く用いられていた。検査値が平均値とそのばらつきで表示される場合は、不等分散後に順位検定法あるいは不等分散後にウエルチ検定法が多く用いられていた(製薬協 1994)。

MHWガイドラインとIHCPT勧告案との関わり等を詳細に考察したい。

おわりに、本調査にご協力とご支援頂いた製薬協加盟会社、基礎研究部会の五十嵐俊二(エーザイ)、野村 護(第一製薬)、海野 隆(鐘紡)、米沢秀利(小野薬品)氏ならびに関係諸氏に深謝申し上げます。

#### 文献

- Hall, R.L.(1992): clinical pathology for preclinical safety assessment: current global guideline. *Toxicol.Pathol.*, 20, 472-476.
- Matsuzawa, T. (1992): Present status of animal clinical pathology examinations in the Japanese Pharmaceutical Manufacturers Association. *Toxicol. Pathol.* 20, 528-533.
- Matsuzawa, T., Nomura, M. and Unno, T.(1993). Clinical pathology reference ranges of laboratory animals. *J.Vet.Med.Sci.* 55, 351-362.
- 製薬協 医薬品評価委員会(1994): 基礎研究部会 資料63
- Weingand, K. et al., (1992): Clinical pathology testing recommendation for nonclinical toxicity and safety studies. *Toxicol. Pathol.* 20, 539-543.

Table 1 Draft IHCPT Recommendations, MHW Guideline Requirement  
JPMA Survey Data

| Hematology & Coagulations |     |             |                 | Urinalysis |     |               |                 |
|---------------------------|-----|-------------|-----------------|------------|-----|---------------|-----------------|
| IHCPT                     | MHW | Parameters  | JPMAa<br>Survey | IHCPT      | MHW | Parameters    | JPMAb<br>Survey |
| ○                         | ×   | RBC         | 100c            | ○          | ×   | Volume        | 89              |
| ○                         | ×   | Hemoglobin  | 100             | + e        | ×   | pH            | 90              |
| ○                         | ×   | Hematocrit  | 100             | +          | ×   | Glucose       | 92              |
| ○                         |     | MCV         | - d             | +          | ×   | Ketones       | 92              |
| ○                         |     | MCH         | -               | +          | ×   | Bilirubin     | 86              |
| ○                         |     | MCHC        | -               | #          | ×   | Protein       | 93              |
| #                         | ×   | Reticulocy. | 78              | +          | ×   | Occult blood  | 92              |
| ○                         | ×   | WBC         | 100             | +          |     | Urobilinogen  | 91              |
| ○                         | ×   | Diff. WBC   | 90              | ○          | ×   | SG/OSM        | 94              |
| ○                         | ×   | Platelet    | 99              | #          | ×   | Sodium        | 57              |
|                           |     | ESR         | 3               | #          | ×   | Potassium     | 57              |
| #                         |     | Myelogram   | -               | #          |     | Chloride      | 45              |
| ○                         | ×   | PT          | 80              | #          |     | Inorga. Phos. | 6               |
| ○                         | ×   | APTT        | 62              | #          | ×   | Sediment      | 50              |
|                           |     | Fibrinogen  | 24              |            |     | Creatinine    | 7               |
|                           |     |             |                 | #          |     | NAG           | 5               |
|                           |     |             |                 |            |     | GGT           | 2               |
|                           |     |             |                 | #          |     | Mg            | 2               |

MHW Guideline: ×

Draft IHCPT Recommendation: ○ (Core Test); # (Optional Test)

a: Total number of facilities: 117 (JPMA Survey, 1989)

b: Total number of facilities: 101 (JPMA Survey, 1989)

c: Practical performance rate (%)

d: not prepared

e: Urine reagent strip testing are not recommended routinely

Table 2 Draft IHCPT Recommendations, MHW Guideline Requirement  
JPMA Survey Data

| Blood Chemistry |     |              |                 |       |     |                 |                 |
|-----------------|-----|--------------|-----------------|-------|-----|-----------------|-----------------|
| IHCPT           | MHW | Parameters   | JPMAa<br>Survey | IHCPT | MHW | Parameters      | JPMAa<br>Survey |
| #               | ×   | GOT          | 100             |       | ×   | Protein E.F     | 26              |
| #               | ×   | GPT          | 100             | ○     |     | Globulin        |                 |
| ○               | ×   | T.Protein    | 99              |       | ×   | A/G             |                 |
| ○               | ×   | Albumin      | 96              |       |     | P.Lipids        | 41              |
| ○               | ×   | Glucose      | 99              |       |     | F. Fatty Acids  | 18              |
| ○               | ×   | T.Cholester. | 99              |       |     | F. Cholester.   | 8               |
|                 | ×   | Triglycerid. | 90              |       |     | HDL Cholester.  | 2               |
|                 | ×   | Bilirubin    | 83              |       |     | Uric acid       | 23              |
| ○               | ×   | UN           | 99              | #     |     | GGT             | 21              |
| ○               | ×   | Creatinine   | 94              |       |     | Cholinesterase  | 25              |
| #               | ×   | Alk.phospha. | 99              |       |     | LAP             | 17              |
| ○               | ×   | Sodium       | 98              |       |     | Amylase         | 6               |
| ○               | ×   | Potassium    | 98              |       |     | Mg              | 3               |
| ○               | ×   | Chloride     | 87              |       |     | Fe              | 8               |
| ○               | ×   | Calcium      | 97              |       |     | Osmolality      | 2               |
| ○               | ×   | Inorg. P.    | 90              | #     |     | SDH             |                 |
|                 |     | LDH          | 70              | #     |     | T.Bile acids    |                 |
|                 |     | CPK          | 61              | #     |     | 5' Nucleotidase |                 |

MHW Guideline:×

Draft IHCPT Recommendation: ○(Core Test);#(Optional Test)

a:Total number of facilities:118 (JPMA Survey, 1989)

b:Practical performance rate (%)

(2) 動物臨床病理の立場から

動物臨床病理の立場から

小野憲一郎

東京大学農学部獣医臨床病理学講座  
(〒113 東京都文京区弥生1-1-1)

Clinico-pathological findings and the manifestation of toxicity

Kenichiro ONO

Department of Veterinary Clinical Pathobiology, Faculty of Agriculture,  
The University of Tokyo  
(1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113)

Summary

The enhancement of free radical generation is widely accepted to induce phospholipid peroxidation in various organs. It is also known some products derived from the phospholipid peroxidation shows cytotoxic effects. Phospholipid hydroperoxides, the primary products of peroxidation, have been considered to perturb the cellular homeostasis via the activation phospholipase A<sub>s</sub> and the subsequent accumulation of lysophospholipids in membranes. The end products of the peroxidation, mainly malondialdehydes, were demonstrated to be associated with the polymerization and aggregation of membrane compounds and the reduction of cellular functions. Therefore, the selective quantitation of the each peroxidation products is an available technique to evaluate the manifestation of toxicity.

Key Words: cytotoxicity, free radical, malondialdehyde, membrane phospholipid, phospholipid hydroperoxide

毒性発現の評価にあたっては、これまで様々な検査法が開発・検討され、実際に応用されているが、なかでも臨床病理学的な検査により得られる情報が重要視され、かつ最も多用されていると考えられる。臨床病理学は臨床病態学、検査医学あるいは検査診断学と称されるごとく生体検査、検体検査あるいは臨床検査などを通じて得られた生体情報を分析、評価することで病因や病態を総合的に解析する学問である。したがって、獣医臨床病理学は獣医臨床において臨床検査を担うことは明らかであるが、いわゆる臨床検査と同一のものではない。すなわち、

獣医臨床病理学は著しい進展を遂げる生物学、物理学、生理学、生化学や薬理学などで得られた様々な知識あるいは技術を導入していくことで、関連学問分野と獣医臨床との連携を計ることになる。

獣医領域における臨床検査は、動物の疾病に関して、(1)客観的な診断の根拠を得る、(2)その障害の程度を知る、(3)治療過程を判断する、(4)予後の判定をする、ならびに(5)問診あるいは症状などで把握しきれない異常を検出することなどを目的とするもので、罹患動物を診断あるいは治療する上で欠かせないものの一つである。したがって、臨床検査を実施する場合には多目的のスクリーニング検査であるのか、あるいは特殊な目的に沿った検査であるのかなど、その目的を明確に捉える必要がある。また、その結果については、異常の認められた場合には、その異常が真の異常であるか否か、さらにその異常が生ずる機序を考え、次のステップを選択しなければならない。これらの点を考慮すると、毒性評価のパラメーターとして臨床検査結果を評価する際には、その目的をさらに明確にする必要があると思われる。

今回、動物臨床病理の立場から、「臨床病理検査変化と毒性発現」というテーマを戴いたが、その全容を述べることは困難である。そこで、近年、様々な疾患の発症因子の一つとして注目されている脂質過酸化反応産物の診断的意義について、これまでの知見を概説するとともに我々の成績を紹介し、毒性評価パラメーターとしての意義を考察したい。

フリーラジカルによる脂質の過酸化反応は生体内のいずれの不飽和脂肪酸にも起こりうるが、脂質のラジカル連鎖的酸化反応あるいは各種疾患における発症機序ならびに病態との関連を考慮すると、とくにリン脂質の過酸化反応が注目されている。生体膜の極性脂質の大部分は不飽和脂肪酸に富むリン脂質で、ラジカルによる過酸化反応あるいは脂質のラジカル連鎖的酸化反応を受け易く、過酸化された膜リン脂質は膜の構造を破壊し、その流動性や透過性を変化させ、さらに膜蛋白や酵素の失活により膜の機能を低下あるいは障害させると考えられている。現在、獣医領域では仔牛の白筋症、豚のストレス症候群、馬の運動後の溶血や筋肉障害あるいは犬のゲンタマイシン誘発性腎不全などの疾患の発症に関与すると考えられている。実際、サラブレッド成馬のべ6頭に運動を負荷し、運動前、運動直後、24時間後の赤血球のリン脂質ヒドロペルオキシド、遊離アルデヒドおよび蛋白結合アルデヒド類を測定したところ、フォスファチジルエタノラミン由来のリン脂質ヒドロペルオキシドが運動後有意に低下し、蛋白結合態のアルデヒド類が増加した。アルデヒド類はイオンチャンネルなどの膜蛋白に結合し、それらの機能を障害することから、過激な運動に伴った筋肉障害などの発症には脂質の過酸化反応が関与すると考えられた。この他、心筋症ハムスターで認められた遊離アルデヒド類の増加、あるいはラジカルによる培養神経細胞の死滅など脂質過酸化反応産物ならびに膜リン脂質ヒドロペルオキシドの測定が毒性発現の一つのパラメーターになりうるものと推測される。

この分野については優れた総説が多数出版されており、参照されたい。

#### 文献

Sies, H. (1987):

活性酸素と疾患 (井上正康 監訳)、学会出版センター、東京

内山 充、松尾光芳、嵯峨井 勝 編:

過酸化脂質と疾患、学会出版センター、東京

など

## (2) ヒト臨床試験の立場より

植松 俊彦\*

浜松医科大学薬理学  
(〒431-31 浜松市半田町3600)

Changes in the data of clinical laboratory tests related to  
manifestation of drug toxicity: Comments from the view-point of  
conducting clinical studies

Toshihiko UEMATSU

Department of Pharmacology, Hamamatsu University School of Medicine  
(3600 Handa-cho, Hamamatsu 431-31, Japan)

### Summary

Phase I clinical studies are conducted mainly in healthy male volunteers to investigate the safety, pharmacokinetics and, if possible, pharmacological actions of newly developed drugs. Before entering phase I studies, the results of various preclinical studies so far conducted should be carefully reviewed and assessed, above all, to ensure the safety of healthy subjects. For that purpose the test items such as hematological and blood biochemical tests as well as physical examinations, which will be evaluated in phase I studies, should be cautiously determined. Nevertheless, unpredicted abnormal findings in these tests probably attributable to the toxicity of test drug are sometimes encountered in the phase I studies. Those are sometimes due to the species differences in drug action or drug metabolism or, otherwise, of unknown origin.

I have experienced some unpredicted hepatic, renal and hematological toxicities, metabolic changes, allergic reactions, etc. due to test drugs in phase I studies with healthy volunteers. In the present paper the items of clinical laboratory tests are discussed in the context of early detection of potential toxicity of test drug in phase I study and predictability of drug toxicities in preclinical studies.

Key Words: phase I study, newly developed drug, toxicity, clinical laboratory test, predictability

新薬開発の一連の流れの中において、第I相試験の役割とは、前臨床試験において有用性が示唆された薬物を、主に健常人に初めて投与して、主としてその安全性と体内動態、可能ならばその薬理作用を明らかにすることである。それによって、第II相以降の臨床試験にて当該薬物の有効性・有用性の検討を行う価値があるか否かの判断をする手ごたえを提供することである。第I相試験はそれ以降の患者を対象とした臨床試験とは異なり、対象が健常人であり、薬物を用いることによる直接のメリットはないので、被験者の安全性が最重視されねばならない。そのためには、第I相試験へ移行すること自体の可否の判断や、試験実施のプロトコル立案のためには、前臨床試験データの広範な検討が必要となる(植松 1993)。しかし、そこには常に動物とヒトとの「種差」という大きな壁が立ちはだかつており、予測し得る毒性以外に常に予測し得ない毒性が発現する可

\*現住所：501-10 岐阜市司町40 岐阜大学医学部薬理学講座



能性を考慮しなければならない。第I相試験の原則は、健常人に不可逆的な障害を絶対に生じさせてはならないという点であり、もし毒性が発現したら発現の極く初期の段階でそれを感知し、速やかに適切な処置を取り得る、臨床病理的毒性評価パラメーターを測定しモニターする必要がある。しかし一方で、対象が善意の健常人であるため、その測定のために被験者に過度の緊張や負担・侵襲を強いたりすることは避けねばならず、又、静脈穿刺の回数や採血量が増えたりするといったことは最小限に止める必要があり、実施できる検査には自ずと制限が生じる。

本シンポジウムにおいては、当研究室で今までに実施した数多くの第I相試験の中で、予測し得なかった毒性や臨床検査値異常を経験した薬物のいくつかについて、その観察された臨床病理パラメーターの変動の経過と毒性の評価につき考察し、前臨床試験で果たして予測可能であったか否かについても検討し、話題提供とさせていただくことを目的とした。

## 1. 肝機能障害

臨床試験においてしばしば経験され、又、最も注意が喚起されるものが、GOT (AST) やGPT (ALT) を主体としたトランスアミナーゼの変動である。

第I相試験においては、対象が健常人であるがために生じる現象についても特に考慮に入れておく必要がある。即ち、7日間程度の連続投与試験において、薬物でなくプラセボを投与した被験者においてもGPTやGOTの漸増、正常域外への逸脱が認められることを以前よりしばしば経験していた。肥満傾向の者やGOT/GPT比が逆転している者がそのような変動を来し易いことは漠然と推察されていたので、健常人を連続投与試験で長期間入院状態に置いて拘束することにより運動量が日常より極端に減少することが原因であろうと考えた。摂取カロリーと消費カロリーのアンバランスから余剰カロリーが脂肪として肝臓に沈着し、脂肪肝傾向となってトランスアミナーゼの上昇を来すという図式である。これは実際に臨床薬理学的実験によって証明した(金丸ら、1989)。薬物を全く投与しない2群の健常人に、摂取する食餌を共通とし、片や運動を殆どさせないで室内で過ごさせ運動による消費カロリーを100kcal/日程度に抑えた群と、片や積極的に運動を行わせ運動により600kcal/日程度を消費させた群を設け、トランスアミナーゼの変化を比較したところ、非運動群では4~5日目から上昇し始め、6名中2名で7日目からGPTが正常域外へ逸脱した。これは、患者とは違い、食欲は正常にあり、或いは飲酒制限等により拘束されてフラストレーションが蓄積し、逆に食欲が異常に亢進している健常人において認められる現象と考えて良い。この証明がなされた後は、連続投与試験に際しては、被験者には全てカロリーカウンターを身につけさせ、ある場合には積極的に散歩等運動を励行し、或いは毎朝の食前体重を測定・目安とすることにより、摂取カロリーと消費カロリーのバランスをとることを必ず行っている。このことを厳密に行った上でトランスアミナーゼの上昇を見た場合には、薬剤との因果関係が強く疑われるのである。

薬剤によるトランスアミナーゼ異常即ち肝機能障害が強く疑われたものとして血小板凝集阻害薬 (drug A) について紹介する。単回投与試験においては異常を認めなかったが、7日間の連続投与試験においては、投与終了24時間目(8日目)には6名中5名で、9日目には全例でGPTが正常域外へ逸脱し、投与は終了しているにも拘らず11日目に上昇がピークに達した。その後は漸減し、全例で正常域に復帰したのは19~25日目であった。本試験ではプラセボ投与群を設けていなかったが、カロリーバランスを十分に管理していたこと、GPTは投薬終了後も上昇し値200K.U.を超える例もあったことから薬剤による肝細胞障害が強く疑われた。その後、本剤の動物での毒性試験の追加実施等が試みられ

たが肝機能障害は確認し得なかった。

## 2. 腎機能障害

血中BUNやクレアチニンはルーチンで測定し、特に腎障害の可能性が示唆されていればクレアチニークリアランスを測定するが、一週間からせいぜい十数日の健常人での連続投与試験において、それらパラメーターを変動させるほどの障害は経験したことがない。薬物が腎排泄型でその溶解性が低く結晶の析出が危惧される場合には、顕微鏡による結晶の有無の観察、尿細管由来の逸脱酵素やマイクログロブリンの測定を適宜行っている。

Ca拮抗作用を主体とした抗高血圧・抗狭心症薬 (drug B) は、前臨床試験において体内動態に種差が認められ、経口投与後ラットでは未変化体が血中に存在したが、イヌでは初回通過効果のため検出されなかった。ヒトでの体内動態を予備的に検討する目的で、低用量から漸増法にて被験者各2~3名に経口投与する予備試験を開始した。低用量から未変化体が血中に検出されたため、その代謝はラット型に近いと判断し、予定通り用量を漸増させていった。しかしある用量で、効果即ち血管拡張作用による頭重感が観察されたが、投与後2時間の時点で排尿時に尿道の灼熱感・排尿痛を全3名の被験者が訴えた。肉眼的にも尿はやや白濁しており、顕微鏡観察したところ稲穂状の結晶が観察された。急ぎ、その前の半分の用量の投薬を受けた被験者に詳しい問診を行ったところ、2名中1名で同じ自覚症状があったことが判明した。両投与量の5名の被験者で、尿中NAG、 $\alpha_1$ -ミクログロブリン、 $\beta_2$ -ミクログロブリンを測定、それらの高値を確認し、正常化するまで経過観察を行った。特に正常化が遅延した3名は約3カ月半後に入院精査し、それによってほぼ正常に復したと判断した。原因究明のため、尿中結晶の分析を行ったところ、結晶は本剤の代謝物の一つ、酸化物であることが判明した。ラット及びイヌでは肝臓での代謝速度の違いが示唆されていたが、いずれの垂急性毒性試験においても、腎臓での結晶析出を含めた腎障害を示唆するデータは得られておらず、ラット・イヌとも異なりヒトにおいて不溶性の代謝物が蓄積し、尿から排泄されて結晶を析出するという大きな種差が示唆された。

## 3. 血液障害

血算、白血球分画、網状赤血球数、クームス試験、PTやAPTT等血液凝固試験はルーチン検査として適宜組み合わせるで施行している。

抗ロイコトリエン作用を主体とした抗アレルギー薬 (drug C) の場合は、単回投与試験では何等異常を認めなかったが、7日間の連続投与試験において著明な血小板数の減少を認めた。投与終了24時間目(8日目)には6名中3名で正常域以下に低下し、10~12日目まで低下し6名中5名で正常域を逸脱し、最も低値を示した者では血小板数2万5千であった。13日目には全例で回復傾向を示し、15日目には全例でほぼ投与前値まで復するか、リバウンド傾向により高値を示した。この間、出血傾向は認められず、凝固系の検査では異常がなく、血尿も認められなかった。更に、他の血球系には全く有意な変動を認めず、ピュアな血小板系のみ抑制であった。本剤においても、動物実験で本毒性を示唆する所見は全く認められなかった。

## 4. アレルギー反応

発疹等の臨床所見が中心となる。特にセフェム系の抗生剤の場合には必ずある頻度で発生することは予測されるのであり、頻度が何万分の一であっても、せいぜい総数30~40名の被験者を対象とする第I相試験で起こる可能性は常に存在している。発疹等の軽い所見更にはショック様症状まで散発的に認められる場合が多い。

セフェム系抗生剤 (Drug D) の場合、低用量一日一回5日間の連続投与試験では何等異常が認められなかったが、2倍の用量の連続投与試験では6名中4名で発疹が出現し、発疹が出現していなかった1名を含め5名でエボセリンを対照とした本剤に対するリンパ球幼弱化反応の陽性所見を認めた。本剤は長期毒性試

験で赤血球数の減少が認められ、慎重にステップワイズに第I相試験を実施したが、アレルギー反応が隘路となった。発疹等が散発的に出現し、アレルギーが疑われても必ずしもリンパ球幼弱化反応が陽性を示さず、判断に苦しむ場合が多い中で、本剤はかなり明確な検査所見が得られた例である。

#### 5. 代謝への影響

尿酸代謝は、特にラットやイヌとヒトとでは核酸の終末産物が異なっており、ルーチンの前臨床試験で尿酸代謝への影響を予測することは困難である。

当研究室においては、新規アルドース還元酵素阻害薬 (Kanamaru et al. 1993) 及び非ペプチド性アンギオテンシンII受容体拮抗薬 (Nakasima et al. 1992) について、その尿酸排泄作用を第I相試験の中で新たに明らかにした。いずれも尿の採取時に尿の性状の変化から尿酸排泄の増加を予想したものである。尿酸排泄作用は高尿酸血症の予防や治療にはメリットとなるが、過度の尿酸排泄促進は尿細管での尿酸の析出から腎機能障害という毒性を惹起する可能性を常にらんでいる。

最後の尿酸排泄作用の発見に象徴されるように、毒性発現を検知するには注意深い観察が最も重要である。また、以上に挙げた全ての薬剤に共通して、種差による前臨床試験の予測性の低さが改めてクローズアップされたと考えられる。毒性評価のパラメーター測定も、患者の身体的負担と経済的な問題から、やみくもに網を張るという方法は取るべきではないので、やはり限られたパラメーターの変動から注意深い観察によって毒性を早期に発見し、不可逆的な障害に至らないように速やかに適切な処置をとることが、第I相のみならず臨床試験一般に要求されるものと考えられる。

#### 文 献

- 金丸光隆、長嶋 悟、植松俊彦、中島光好 (1989): 7日間の長期入院拘束が健康人の生化学検査結果に与える影響。臨床薬理 20, 493-503.
- Kanamaru, M., Uematsu, T., Nagashima, S., Mizuno, A., Terakawa, M., Sugiyama, A. and Nakashima, M. (1993): Aldose reductase inhibitory and uricosuric activities of FK366 in healthy volunteers. J. Clin. Pharmacol., 33, 1122-1231.
- Nakashima, M., Uematsu, T., Kosuge, K. and Kanamaru, M. (1992): Pilot study of the uricosuric effect of DuP-753, a new angiotensin II receptor antagonist, in healthy subjects. Eur. J. Clin. Pharmacol., 42, 333-335.
- 植松 俊彦 (1993): 治療のあり方を考える 5. 臨床第I相試験。薬理と治療 21, 11-18.

## 講演2.4 細胞内微細構造変化と毒性発現

### (1) 電顕所見と臨床病理パラメーターとの関係

藤井 登志之, 中野 一雄, 藤平 司郎

田村 隆之, 谷本 純一

藤沢薬品工業株式会社 安全性研究所

(〒 532 大阪市淀川区加島 2-1-6)

### (1) Relation between Electron Microscopic Findings and Changes in Clinical Pathology Parameters

Toshiyuki FUJII, Kazuo NAKANO, Shiro FUJIHIRA,

Takayuki TAMURA and Junichi TANIMOTO

Toxicology Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.

1-6, 2-chome, Kashima, Yodogawa-ku, Osaka 532, Japan

#### Summary

Electron microscopic findings in the liver and changes in clinical pathology parameters concerned with liver functions were investigated and summarized from the results of toxicity studies in dogs.

The drug-induced hepatic injuries were grouped as below and individually discussed. Hepatocellular type: pyknosis and deformation of the nucleus in the hepatocytes, dilatation and vesiculation of the smooth endoplasmic reticulum and swelling of the mitochondria accompanied with increases in GOT, GPT and alkaline phosphatase. Cholestatic type: dilatation of the bile canaliculi, decrease in the microvilli and proliferation of microfilaments accompanied with increases in alkaline phosphatase, total cholesterol and bilirubin, decrease in BSP excretion rate and increase in relative liver weight. Storage type: appearance of myeloid bodies in the hepatocytes or of amorphous substance in the bile canaliculi accompanied with increase in alkaline phosphatase. Other type: proliferation of the smooth endoplasmic reticulum accompanied with increases in total cholesterol and relative liver weight. However, since there were various factors affecting changes in morphology and data, i.e., effects of drugs on clinical pathology parameters, signs on systemic condition in dogs, severity of lesion in the liver and observation and examination times, it is very difficult to consider the relation between electron microscopic findings and clinical pathology parameters from toxicology studies in dogs.

Key Words: Electron microscopic findings, clinical pathology parameters, drug-induced hepatic injuries, dogs.

ラットやイヌを用いた毒性試験では種々の臨床病理パラメーターが測定されており、同時に生体を構成する各種器官及び組織の病理組織学的観察が、光学顕微鏡のみならず電子顕微鏡を用いて実施されている。しかし、これら臨床病理パラメーターと病理組織学的所見との関連性につき、薬物を用いた試験で比較した報告（長瀬ら、1976）は少ない。

一方、ヒトにおいても薬物により誘発されたとされる変化で、臨床病理パラメーターと病理組織学的所見との関連を比較した報告は、肝臓を除いてはあまり多く認められない。

ヒトにおいて薬物中毒性の変化がその超微構造を含めかなりよく知られている肝臓に関し、毒性試験に用いる動物、特にイヌでの肝機能検査と肝組織像について、我々の経験例を中心に報告する。

なお、薬物により誘発された肝障害の病理組織学的所見は文献（市田ら、1975）を参考に、肝細胞障害型、胆汁うっ滞型、蓄積型及びその他に分類した。また、臨床病理パラメーターは獣医学領域での臨床血液化学検査に関する著書（友田、1987）を参考に、鋭敏性及び特異性に加え日常臨床検査として常用されているものを選択した。すなわち、トランスアミナーゼ（GOT及びGPT）、アルカリ性フォスファターゼ（AIP）、乳酸脱水素酵素（LDH）、 $\gamma$ -グルタールトランスペプチターゼ（ $\gamma$ -GTP）、総コレステロール（T.Chol）トリグリセライド（TG）、総ビリルビン（Bilirub）、BSP排泄率及び肝重量比を取り上げた。

## 1. 肝細胞障害型

光顕的には、小葉中心性肝細胞壊死像を呈するもので薬物投与後、短期間で発生した例及び比較的長期間の反復投与後に発生した例を示す。

### 1) 臨床病理パラメーター変動

両薬物で共通した臨床病理パラメーターはGOT及びGPT活性の上昇、AIP値及び総Bilirub値の上昇などであった。また、LDH値、 $\gamma$ -GTP値及び肝重量比は一方の薬物で上昇、他方の薬物で無変動、T.Chol値及びTG値は一方の薬物で上昇、他方の薬物で減少などであった。なお、セフェム系抗生物質（渡辺ら、1970）の中にはGPT活性の低下を示すものがみられるため、ロイシンアミノペプチターゼ（LAP）の測定は有意義と考えられる。程度は低い、グルココルチコイドや抗痙攣剤（Center, S.A., 1986）により、GOT及びGPT活性の上昇がみられる場合もある。

### 2) 電顕的観察所見

両薬物で共通した電顕所見は細胞核の変形・濃縮、ミトコンドリアの膨化、滑面小胞体の腔の拡張及び脂肪滴の出現であった。一方にのみみられた所見としては、ライソゾームの増加であり、この所見の違いは薬物の投与期間に関連するよう思われた。その他、短期間で肝細胞壊死を認めた例で、膜様成分の集積像、核内脂肪滴の出現頻度の増加をみた。これらの所見は稀であるが、対照群のイヌでもみられるものであった。

## 2. 胆汁うっ滞型

単細胞壊死を伴い、薬物投与後比較的速やかに発生した例及び光顕的には肝細胞に変化を認めず、長期反復投与後にその発生を確認した例を示す。

### 1) 臨床病理パラメーター変動

両薬物で共通した臨床病理パラメーターはAIP値、T.Chol値及びBilirub値の上昇、BSP排泄率の低下ならびに肝重量比の増加などであった。また、まったく異なるものとしてはGPT活性、GOT活性及び $\gamma$ -GTP値の上昇の有無などであった。LDH値及びTG値は著変を認めなかった。

### 2) 電顕的観察所見

両薬物で共通した電顕所見はライソゾームの増加、毛細胆管の拡張、微絨毛の減少、毛細胆管内胆汁栓形成及びKupffer細胞の活性化などであった。更に、拡張した毛細胆管周囲にはマイクロフィラメントの増生を示す例も散見された。一方にのみみられた所見としては、ミトコンドリアの変化（変形、巨大化、クリステのcurling、バラクリスタルの出現）及び滑面小胞体の増生であった。

両薬物で共通した電顕所見はヒトの胆汁うっ滞型の超微構造変化（織田、1980）とはほぼ一致するものであった。また、ミトコンドリアの変化は正常犬でもしばしばみられる変化であり、肝機能障害との関係は明らかでない。

## 3. 蓄積型

肝細胞の腫大と肝細胞内好酸体の出現を認めた例及び肝細胞間に緑色色素の沈着を認めた例を示す。

### 1) 臨床病理パラメーター変動

肝細胞の腫大と細胞内好酸体の出現を認めた例では、AIP値の上昇と肝重量比の増加であり、その他の検査項目にはほとんど著変を認めなかった。一方、肝細胞間に緑色色素の沈着を認めた例ではGPT活性、AIP値、T.Chol値及びBilirub値の上昇、BSP排泄率の低下などがみられた。

### 2) 電顕的観察所見

肝細胞の腫大と細胞内好酸体の出現を認めた例では、ミエリン様小体の出現及び滑面小胞体の増生であった。一方、肝細胞間に緑色色素の沈着を認めた例ではライソゾームの増加、毛細胆管の拡張、毛細胆管内無構造物の出現、ミトコンドリアの膨化・変形などであった。フェノバルビタール投与でAIP値が上昇する場合、その機序は肝細胞障害や胆汁うっ滞によるよりもむしろ誘導物質（Chemical inducer）による誘導（Sturtevant, F.C., et al, 1977）が主な原因と考えられている。ミエリン様小体の出現をみた例では著しい滑面小胞体の増生がみられることより、同様の機序が考えられる。

## 4. その他

光顕的に肝細胞の腫大を認める例（甲状腺濾胞上皮の肥大を伴う）及び認められない例を示す。

### 1) 臨床病理パラメーター変動

両薬物で共通した臨床病理パラメーターはT.Chol値の上昇と肝重量比の増加であった。その他では、肝細胞腫大を認める例でTG値の上昇（AIP値の上昇を伴う場合、伴わない場合）をみた以外、残りの検査項目に著変を認めなかった。

## 2) 電顕的観察所見

両薬物で共通した電顕所見は滑面小胞体の増生であった。その他、肝細胞の腫大を認めない例でグリコーゲン顆粒の減少をみた。

T.Chol値の上昇の原因の一つに、甲状腺ホルモンの関与があげられる(生野ら, 1982)。甲状腺の形態変化を伴う例では甲状腺ホルモンの不足に伴い、Low Density Lipoprotein (LDL) の合成低下及び異化の抑制が生じ、その結果、血中濃度が上昇した可能性が考えられる。

以上、臨床病理パラメーターの変動と電顕的観察所見との関連性を薬物投与したイヌの代表的な例で検討してきた。しかし、生じた変動あるいは変化が機能的なものか、毒性的なものかの区別が大変困難な場合があり、また、薬物投与による個体の反応にも大きなバラツキがみられた。従って、現状では検査項目単位ごとの変動と電顕で認められる微小器官独自の变化との関連性について説明することは困難であるが、それらの関連性について本シンポジウムで出来るだけ考察したい。

## 文 献

- Center, S.A. (1986) : Biochemical evaluation of hepatic function in the dog and cat. In : Current Veterinary Therapy IX. (Kirk, R.W. ed) 924-936
- 生野哲雄, 馬場茂明 (1982) : コレステロール 日本臨床 (臨時増刊号) 40 254-258
- 市田文弘, 佐々木博 (1975) : 薬物による肝障害の病理 薬物と肝臓 (織田敏次編) 中外医学社 43-76
- 長瀬すみ, 田中寿子 (1976) : 実験動物の臨床生化学データ - 病理組織像との関連 - ソフトサイエンス社 278-285
- 織田正也 (1980) : 胆汁うっ滞と肝超微構造 代謝 17 (2) 166-168
- Sturtevant, F. C., Hoffmann, W.E. and Donner, J. L. (1977) : The effect of three anticonvulsant drugs and ACTH on canine serum alkaline phosphatase. J. Amer. Anim. Hosp. Assoc. 13, 754-757
- 友田 勇 (1987) : 臨床血液化学検査 I - 肝機能検査と血液酵素 - 学窓社 1-12
- 渡辺信夫, 岩波黄葵, 藤井登志之 (1970) : Cefazolin sodiumの毒性及び胎仔への影響 Chemotherapy 18 (5) 528-542

## 電顕所見と光顕所見との関係

三森国敏  
国立衛生試験所 病理部  
(〒158 世田谷区上用賀1-18-1)

### Relationship between electron microscopic and light microscopic findings

Kunitoshi MITSUMORI

National Institute of Health Sciences, Division of Pathology  
(1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158)

#### Summary

Cells in various organs/tissues have various mechanisms of protection for many stresses of foreign chemicals. Morphological changes induced by chemicals are different depending on their toxic mechanisms and/or the intensity of their toxic stresses. Problems on the morphological evaluation of toxicities of chemicals are as to whether we can detect most toxic changes in traditional light microscopic examinations, without using electron microscopy.

Reactions of cells in various organs to toxic injuries are morphologically subdivided into adaptation, reversible or irreversible cell injuries, and extracellular responses. We can detect toxic changes such as destruction of tissue structures and extracellular responses in light microscopic examinations. On the other hand, it is difficult to detect subcellular changes in cellular organelles in light microscopy, since these changes can be detected only in electron microscopy. However, we can elucidate the subcellular changes in organelles even in a light microscopic level, if we perform immunohistochemistry using antibodies to specific markers for cellular organelles. Therefore, it is not always necessary to perform electron microscopic examinations for the toxicological evaluation of almost all the chemicals examined, but the conduct of electron microscopic examinations should be decided based on the results of other functional/morphological examinations.

生体を構成する種々の臓器・組織における細胞は、化学物質の種々の毒性刺激に対して多彩な防御機構を備えている。その毒性刺激のメカニズムとしては、細胞膜障害、代謝活性化、共有結合や酸化性ストレス等があげられ、それらのメカニズムの違いや毒性刺激の程度により惹起される形態学的病変は様々である。毒性評価上問題となるのは、これらの病変が電顕観察法を用いず、従来の光顕検索でどこまで解析が可能なのかという点である。



毒性障害に対する細胞反応としては以下の変化があげられる。化学物質の毒性刺激が重篤にならない限り、細胞は「恒常性」と呼ばれる範囲で構造と機能を維持することができる。もし、細胞が過度の生理的刺激やある種の病的刺激に遭遇した場合、萎縮、肥大、化生や過形成等の正常機能を維持する「適応」反応が発現する。しかし、これらの刺激に対して細胞の適応反応が困難な場合あるいは刺激がその適応能力を超える時には、「細胞障害」が引き起こされる。毒性刺激が強いものでないか、あるいは十分な時間があれば取り除かれる性質のものならば、その障害は可逆的であり、細胞は機能的および形態学的に正常状態に回復する。他方、刺激が重篤かつ持続的であるならば、非可逆的障害が引き起こされ、細胞は壊死に陥る。さらに、この細胞障害による壊死や損傷組織を除去・再生するために炎症や修復性変化等の「細胞外反応」が発現する。これらの毒性物質障害に対する細胞反応の全ては、必ずしも顕微鏡検査で検出することは困難であり、電顕的観察が不可欠であることが多い。

本シンポジウムでは、これらの毒性刺激に対する適応、可逆的・非可逆的細胞障害や細胞外反応等が酵素組織化学的検査や免疫組織化学検査等を含めた種々の顕微鏡検査法でどこまで解析が可能か、また、その解析上の問題点について述べたい。

適応反応：毒性物質によって頻繁に引き起こされる代表的な適応反応は肥大である。肥大は細胞内小器官の増生によることが多く、化学物質によって誘発される小器官の適応性変化としては、滑面小胞体(SER)、ペルオキシソーム、ミトコンドリア、ライソソーム、中間径フィラメント増生等があげられる。これらの変化は電顕観察によりいずれの小器官の増生によるものかを同定することは容易である。一方、HE染色標本では、小胞体の増生は顕微鏡的に細胞質の淡明化・均一好酸性、ペルオキシソームの増生は好酸性・微細顆粒状、ミトコンドリアは好酸性・粗大顆粒状をそれぞれ示すが、これらの鑑別が困難なことも多い。これらは化学物質の毒性を予測する上で重要であり、各小器官に特異的な酵素や抗体を用いた特殊染色を行い、肥大の原因が何かを明確にすべきである。

萎縮は、細胞内小器官や基質の容積の減少を特徴とするものであり、顕微鏡観察においても認識可能である。化生や異形成は正常構成細胞とは異なる細胞への分化を示す変化であり、過形成は正常細胞の分裂に伴う細胞数の増加を特徴としているので、これらについては細胞分化の方向性の同定以外には顕微鏡観察で病変の特徴は把握可能である。化生、過形成や異形成では、細胞骨格蛋白、特に中間径フィラメントの種類に変動がみられることが多いので、これらに対する抗体を用いた免疫染色によりこの種の細胞骨格の変動を解析することが可能である。

可逆的細胞障害：細胞が壊死に陥らないような障害に関連する形態学的変化に対して古くから使用されてきた「変性」に対応する変化であり、この障害には、水腫

性腫脹、脂肪変性やその他細胞内小器官の急性障害初期変化等が挙げられる。可逆的障害に際してみられる最も特徴的な変化は細胞内の水分量の増加による細胞腫脹であり、水腫変性とも呼ばれるものである。電顕的には、細胞質基質から小胞体槽への水の移動による小胞体槽の拡張である。脂肪変性は、細胞質内に膜を持たない脂肪滴として観察され、細胞内の脂肪の代謝あるいは利用の不均衡を反映するものである。細胞内小器官の急性障害初期変化としては、細胞膜と結合するポリゾームの粗面小胞体表面からの離脱があげられる。ミトコンドリアも基質の拡張による腫大やクリスタの膨化を示す。しかし、このような変化を被っても、ミトコンドリアの機能障害は発現しない。その他、核内クロマチンの急激な凝集も可逆的障害性変化である。これらの小器官の変化は光顕的に見つけることは困難であり、殆どが見逃されている。

非可逆的細胞障害：細胞に対する急性の毒性刺激が非常に強い場合、細胞の構造と機能に変化が生じ、細胞死を招く。この壊死を生ずる過程には、細胞の酵素消化と蛋白質の変性の二つの変化が同時に発現し、蛋白変性が優勢の場合には凝固壊死に、細胞構築の他家融解が進展した場合は融解壊死に陥る。これらの壊死性変化は光顕で充分認識可能であるが、ある組織での細胞構築の崩壊性変化の解析は従来のホルマリン固定・パラフィン包埋・HE染色標本では困難なことがある。例えば、精巢の精細管内における各種精細胞の同定や初期変性像の検出および神経組織における神経線維の変性・再生変化の解析はこの種の標本での光顕観察では殆ど困難である。それぞれの検索に適切な固定液の選択や合成樹脂包埋剤の利用等の標本作成法の変更が必要である。

細胞外反応：障害組織や壊死組織に対する炎症反応や修復反応であり、脈管から種々の液性や細胞性成分がこれらの反応に加わる。これらの炎症や修復性変化は、障害を被った細胞に対する反応性変化であり、病変を形成している各種構成成分の把握を目的としているため、光顕で解析が充分可能である。

以上のように、組織構築における形態変化や細胞外反応等の毒性変化は光顕で解析可能であるが、細胞内小器官の変化の解析は光顕では困難であり、電顕観察の助けが必要となる。しかし、最近、細胞内小器官に対する特異的マーカー抗体が入手できることから、これらの免疫組織染色を導入することにより、光顕下で細胞内小器官における変化を把握することが可能であり、必ずしも全ての毒性評価に対して電顕観察を行う必要はないと思われる。但し、光顕観察において注意しなければならない点として、光顕観察で何等変化がみられなくても、生化学や薬理的検査成績から特定の組織になんらかの変化が発現している可能性が疑われることもある。光顕観察のみで形態学的毒性変化の最終評価は行うべきではなく、種々の機能・形態学的検索手法を実施した上でこれらの毒性変化を総合的に評価すべきである。

## 細胞構造タンパクの変化

津山伸吾

大阪府立大学 獣医 分子生物学教室

(〒593 大阪府堺市学園町1-1)

### Changes in Cytoskeletal Proteins Caused by Chemical Modification

Shingo TSUYAMA

Laboratory of Molecular Biology, Department of Veterinary Science,

University of Osaka Prefecture

(1-1, Gakuen-cho, Sakai, Osaka 593)

#### Summary

Many cytoskeletal proteins, such as microtubules and microfilaments, have a physiological roles involving a cell shape, organelle transport, cell division, and secretion in eukaryotic cells. Microtubule-associated protein 2 regulates microtubule assembly and disassembly through phosphorylation and dephosphorylation. Microfilaments polymerized with actin monomers are modified with ADP-ribose from NAD by mono-ADP-ribosyltransferase or botulinum C2 toxin. Mono-ADP-ribosylated actin loses its ability to undergo polymerization. Monoclonal antibodies against ADP-ribosylhydrolase, which completely inhibited the enzyme activity, and NAD cause catecholamine release from permeable chromaffin cells. At the same time, cyclic ADP-ribose increases the intracellular concentration of calcium from the endoplasmic reticulum. These results suggest that chemical modification by phosphorylation and mono-ADP-ribosylation of cytoskeletal proteins causes not only changes in the cell configuration but also changes in cell functions.

Key Words: microtubules, microfilaments, phosphorylation,  
mono-ADP-ribosylation, signal transduction

#### はじめに

真核細胞に見いだされる細胞骨格系タンパク質については通常の光学顕微鏡では観察しにくいこともあって、その生理学的機能等は永く解からなかった。しかし、多くの生物学に関わる人は細胞有糸分裂時に認められる繊維状のものの存在は知っていた。近年の細胞生物学では、細胞骨格系タンパク質について多くの知見をもたらしており、毒性学における光学、電子顕微鏡による形態学的観察に基づき組織細胞の形態異常は原因、結果の如何に拘わらず、細胞骨格系タンパク質の非生理学的状態を具現していると言っても過言ではないと考えられる。過去の我々の研究を含めて、細胞生物学に於ける細胞骨格系タンパク質の一部を

述べ、毒性評価のパラメーターの参考にして頂ければ幸いである。

## 微小管

有糸分裂時に認められる微小管はあらゆる真核細胞にあるが、比較的その含量の多い哺乳動物の脳では、分子量57,000の $\alpha, \beta$ -tubulinヘテロダイマーが重合し、その際微小管修飾タンパク質と呼ばれる分子量30~6万の一連のタンパク質からなっている。このなかでも比較的よく調べられているMAP-2は分子量27万の耐熱性単一ペプチドで、tubulin結合domainとcytosolに突き出したprojection domainを持つ。Cyclic AMPがsecond messengerとして細胞のenergyレベルや細胞機能と密接な関係を持つことが知られて以来、細胞骨格系タンパク質との関わりに興味を持たれた。Slobodaら(1982)はcyclic AMPによりMAP-2にリン酸化がおり、tubulinの重合阻害がおこること、それもMAP-2のtubulin結合domainのSer, Thr残基がリン酸化されることをin vitroで証明した。他に、calcium依存性calmodulin kinaseもMAP-2のリン酸化を引き起こしtubulinの重合を阻害すること(Yamauchi and Fujisawa, 1982)、またC-kinaseも同様の作用があることが明らかにされた(Tsuyama et al., 1986)。これらの結果は、細胞内情報伝達に細胞骨格系の主要なタンパク質の一つである微小管がタンパク質リン酸化機構を介して細胞形態や生理機能に変化をあたえていることが解かる。その後、細胞分裂時に有糸分裂活性化タンパク質が複雑なリン酸化機構を経て細胞分裂に重要な働きをすることが明らかにされた(Nishida and Gotoh, 1993)。更に、最近有糸分裂時に染色体の極移動をおえたときに微小管を切り刻むタンパク質がウニや蛙の卵に存在していることが報告されており、katanineと名づけられている(McNally and Vale, 1993)。その他、細胞内の小顆粒の移動を司るmotorタンパクとして順行性の顆粒移動をおこなうkinesine, 逆行性の顆粒移動をおこなうdynein等の運動タンパクが微小管に結合している等が明らかになってきている(Vale, 1992)。

以上、述べてきた微小管に影響を与える薬物として、最近人工合成に成功したtaxolがある。taxolは西洋イチイの樹皮から抽出されるアルカロイドで、制癌効果を持つ。このアルカロイドは微小管の重合をGTP非存在下に促進して、細胞分裂をG2期で止める。逆に、colchicine, colcemid, nocodazole, vinblastineやbrenomyolは微小管重合を阻害し細胞増殖を阻害したり、細胞形態の異常を引き起こす(Amos and Amos, 1991)。一般に、制癌効果を持ったり、細胞形態に異常を引き起こす薬物等は程度の差はあっても微小管構成タンパク質に何らかの影響を与えていることが知られている。

## マイクロフィラメント

細胞骨格系タンパク質のなかで最も細い繊維であるマイクロフィラメントはアクチンモノマーが重合したもので、大きく分けて筋肉の収縮系フィラメントと非筋肉細胞に存在している。非筋肉細胞では、細胞膜の裏打ちをおこない細胞膜のtensionをアクチン結合タンパクと共に司っている。又近年、分泌細胞での分泌

顆粒の細胞膜への移動の barrier として exocytosis を制御していると考えられている (Burgoyne, 1990: 1991)。細胞内情報伝達機構のうち mono-ADP-ribosyl 化は種々の細菌毒素を用いて明らかにされてきた (Ueda and Hayaishi, 1985)。Botulinum C2 toxin (非神経毒) は非筋肉細胞のアクチンの N 末から 177 番目の Arg を mono-ADP-ribosyl 化し、アクチンフィラメントの重合を阻害することを明らかにした (Aktories et al., 1986; Vandekerckhove et al., 1988) が、その際非筋肉細胞に、内在性のアクチンを受容体とする mono-ADP-ribosyl 化が起きていることが見い出された (Matsuyama and Tsuyama, 1991)。アクチンを受容体とする mono-ADP-ribosyltransferase 活性は脳、副腎、膵等の分泌器官に高く、またその逆反応を司る ADP-ribosylhydrolase 活性もこれらの分泌器官に高かった。この ADP-ribosylhydrolase の単一抗体を作製したところ、酵素活性を完全に阻害できる単一抗体 (9E7) を得た。この抗体を用いて ADP-ribosylhydrolase の細胞内酵素局在を調べた結果、脳では神経細胞のシナプス領域を含む周辺部 (Tsuyama et al., 1992)、副腎では分泌顆粒周辺に存在することが免疫組織化学観察で解かった。更に、精製したクロマフィン顆粒膜に ADP-ribosylhydrolase が局在することが細胞分画法と SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) と immunoblotting の結果から明らかになった。この抗体を saponin で細胞膜に小さな穴を開けた副腎クロマフィン細胞に導入し、NAD を与えると、細胞内  $Ca^{++}$  の増加とカテコラミンの顕著な放出が認められた (Tsuyama et al., 投稿中)。即ち、副腎のクロマフィン細胞のカテコラミン含有顆粒は細胞膜の内側にあるアクチンフィラメントに保持されていて、刺激による細胞内の mono-ADP-ribosyl 化レベルの上昇により mono-ADP-ribosyl 化アクチンモノマーが増え、細胞内のアクチンのフィラメントとモノマーの平衡がずれて、分泌顆粒はアクチンフィラメントの barrier から細胞膜の分泌部位に接近し内包されているカテコラミンを放出するものと考えられる。このとき細胞内の  $Ca^{++}$  濃度の上昇は NAD から生成される cyclic ADP-ribose の endoplasmic reticulum へ inositol-triphosphate とは異なった部位への結合により endoplasmic reticulum からもたらされる。又、我々は確認できなかったがミトコンドリアに mono-ADP-ribosyl 化を受けて、ミトコンドリアから  $Ca^{++}$  放出をうながす signal protein が存在すると言われる (Richter et al., 1983)。

上述のアクチンモノマーは、 $Mg^{++}$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$  等のイオン濃度が 2~100 mM で重合する。従って、非筋肉細胞ではアクチンの半量は重合し、他の半量はアクチン結合タンパク質と結合して存在すると言われる。ワライ茸の毒である phalloidin は環状ペプチドで、アクチンフィラメントと結合して激烈な毒症状を示す。培養細胞である PC12、CHO 細胞は phalloidin や C2 toxin で著しい形態変化を引き起こす。

#### 細胞骨格系タンパク質の細胞情報伝達経路

上述したように、細胞骨格系タンパク質は種々の刺激によりその重合、脱重合

平衡をくずして変化することを明らかにした。これらの変化は細胞形態の変化に直接結びついていると考えられる。しかし、生理学的には細胞骨格系タンパク質の化学修飾機構の序列はいかになっているかについてはあまり知見がない。最近、我々は *in vitro* での微小管精製に  $Ca^{++}$  依存性 protease の阻害剤を添加すると、微小管修飾タンパク質の中に mono-ADP-ribosyltransferase と ADP-ribosylhydrolase が含まれることを見いだした。このような標本に mono-ADP-ribosylation 反応を行うと、MAP-2 の tubulin 結合部位に最大 6 箇所 に ADP-ribose が結合し、微小管の重合を阻害する事、更に、この MAP-2 の mono-ADP-ribosyl 化はリン酸化と競合することを見いだした。MAP-2 はアクチンとも cross-linking することからこれらの何れの化学修飾も細胞形態の維持に重要な生理学的意味を持つものと考えられる。この微小管から精製された ADP-ribosylhydrolase は calmodulin 依存性 kinase や C-kinase でリン酸化を受け、活性を失う。この結果は細胞骨格系アクチン、微小管の signal 伝達はリン酸化が先行することを示唆している。これらの細胞情報を如何に選別して target に伝えるのか？細胞骨格系タンパク質の生理機能が多岐にわたる故、興味ある問題と考えている。それ故、制癌剤や毒物が様々な細胞形態の変化を引き起こす時、我々が予期しない細胞骨格系タンパク質との関わりが、新たな細胞生物学や分子生物学の発展をもたらすものと思われる。

#### 文献

- Aktorics, K., Barmann, M., Ohishi, I., Tsuyama, S., Jakobs, K.H. and Habermann, E. (1986) : Botulinum C2 toxin ADP-ribosylates actin. *Nature*, **322**, 390 - 392.
- Burgoyne, R.D. (1990) : Secretory vesicle-associated proteins and their role in exocytosis. *Annu. Rev. Physiol.* **52**, 647 - 659.
- Amos, L.A. and Amos, W.B. (1991) : *Molecules of the Cytoskeleton*. Macmillan Molecular Biology Series. Macmillan, London.
- Burgoyne, R.D. (1991) : Control of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1071**, 174-202.
- Matsuyama, S. and Tsuyama, S. (1991) : Mono-ADP-ribosylation in brain: Purification and characterization of ADP-ribosyltransferases affecting actin from rat brain. *J. Neurochem.*, **57**, 1380 - 1387.
- McNally, F.J. and Vale, R.D. (1993) : Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules. *Cell*, **75**, 419 - 429.
- Nishida, E. and Gotoh, Y. (1993) : The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem Sci.*, **18**, 128 - 131.
- Richter, C., Winterhalter, K., Baumhuter, S., Lotscher, H.-R., and Moser, B. (1983) : ADP-ribosylation in inner membrane of rat liver mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3188 - 3192.
- Sloboda, R.D., Rudolph, S.A., Rosenbaum, J.L. and Greengard, P. (1975) : Cyclic

- AMP-dependent endogenous phosphorylation of a microtubule-associated protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 177 - 181.
- Tsuyama, S., Bramblett, G.T., Huang, K.-P. and Flavin, M. (1986) : Calcium/phospholipid-dependent kinase recognizes sites in microtubule-associated protein 2 which are phosphorylated in living brain and are not accessible to other kinases. *J. Biol. Chem.*, **261**, 4110 - 4116.
- Tsuyama, S., Matsuyama, S., Fujita, H., Awa, T. and Takahashi, K.P. (1992) : Mono-ADP-ribosylation of actin and GTP-binding protein in neurotransduction in rat brain. *Recent. Adv. Cell Mol. Biol.*, **3**, 95 - 107.
- Tsuyama, S., Fujita, H., Masuda, W., Takenaka, S. and Takahashi, K.P. (in preparation) : Role of mono-ADP-ribosylation on catecholamine release from chromaffin cells.
- Ueda, K. and Hayaishi, O. (1985) : ADP-ribosylation. *Annu. Rev. Biochem.*, **54**, 73 - 100.
- Vale, R.D. (1992) : Microtubule motors: many new models off the assembly line. *Trends Biochem Sci.*, **17**, 300 - 304.
- Yamauchi, T. and Fujisawa, H. (1982) : Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 by calmodulin-dependent protein kinase (kinase II) which occurs only in the brain tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **109**, 975 - 981.

## 中枢神経における機能障害と生化学パラメーター

渡辺 泰雄・渋谷 健  
東京医科大学・薬理学教室  
(160 東京都新宿区新宿6-1-1)

### Functional Disorders in the Central Nervous System And their related Biochemical Parameter

Yasuo Watanabe and Takeshi Shibuya  
*Department of Pharmacology, Tokyo Medical College  
(6-1-1 Shinjuku, Shinjuku-Ku, Tokyo 160, Japan)*

#### SUMMARY

In the recent reports, it is well-documented that the excessive amounts of cytosolic  $Ca^{2+}$  caused the neuronal dysfunction in the central nervous system. For instance, under low energy conditions induced by brain ischemia, infarction or neuronal injury, the excessive amounts of glutamate in the synaptic cleft provoke the massive influx of  $Ca^{2+}$  into the brain neuronal cells, and the delayed neuronal death is appeared. Furthermore, many neurotoxic agents elevate the cytosolic  $Ca^{2+}$  levels either rapidly or consecutively, and then produce severe convulsions, motor dysfunction and neuronal death. Thus, disruption of calcium homeostasis in the intra- and/or extra-cellular system might be one of factors for resulting the neuronal damage in the central nervous system. These evidences lead us to take into consideration of that determination of cellular  $Ca^{2+}$  movement might be a biochemical parameter of neuronal dysfunction in the central nervous system.

**Key Words:**  $Ca^{2+}$ , cytosolic  $Ca^{2+}$  levels, excitatory amino acids, paraquat, locomotor activity, rota-rod performance, cultured cerebellar granule cells, LDH

中枢神経系機能の恒常性を保つためには栄養補給のみならず細胞-細胞間伝達ならびに細胞内情報系に關与する生体微量活性物質が重要な働きを有することは云うまでもない。これら活性物質のうち幾種かの神経伝達物質は、神経細胞からの放出異常や取り込み機構の異常によって脳疾患を生じさせる一因となると考えられている。現在までの研究から、伝達物質の異常動態によって発現すると思われる脳疾患として、感情障害、精神分裂症、痙攣発作、パーキンソン氏病、アルツハイマー病と枚挙に暇がなく、しかも、各々の疾患の治療として神経伝達物質の動態に直接影響を及ぼす薬物が用いられ、ある程度の奏功を呈していることから裏付けされ得る。しかしながら、脳内神経伝達物質の動態異常が必ずしも中枢神経系の機能障害を反映させているとは考えられない事実も多くの研究から示唆されている。

一方、近年の脳研究の進歩により、脳機能維持のための重要な因子の一つとして神経



細胞の内外に存在する無機イオンの動態が明らかとなり、注目を浴びてきている。殊に、 $\text{Ca}^{2+}$ の動態については選択的な蛍光指示薬の出現により、その研究成果は飛躍的に発展し、中枢神経細胞機能調節の維持における $\text{Ca}^{2+}$ の重要性を証明したと云っても過言ではない (Grynkiewicz et al., 1985)。たとえば、幾種かの脳疾患あるいは循環器疾患によって発症する脳神経細胞障害の起因物質の一つが $\text{Ca}^{2+}$ であり、しかも細胞内への $\text{Ca}^{2+}$ の過剰流入が遅発性細胞死を引き起こしたり、精神障害を誘発することは次第に明らかとなっている (Choi, 1988)。さらに、興奮性神経毒や多くの神経毒の薬理作用発現機序として細胞内への急激な、あるいは持続的な $\text{Ca}^{2+}$ の流入が主体であることを指摘されるようになってきている (Komulainen and Bondy, 1988)。

本シンポジウムでは、大いなる関心が持たれていても未だ明確な解答が現時点で得られていない中枢神経系機能障害の発症時における生化学的パラメーターの候補物質として、 $\text{Ca}^{2+}$ が可能であるか否かを明らかにするため、従来までの報告と我々のパラコート (PQ; 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridium) を神経毒として応用した研究成績を加味して、脳神経細胞の初期培養細胞を利用し興奮性アミノ酸動態と細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 動態との関連性を中心に検索し、*In Vitro*系の実験のみならず*In Vivo*系での成績を加え多角的に解析して考究した。

世界中で広範に使用されている農薬の一つであるPQが、誤飲あるいは自殺の目的で体内に摂取された場合の中毒症状として、気管支、肺を中心とした呼吸器系の障害が周知なものである。呼吸器系中毒の発症機序として、PQがエネルギー依存型の輸送系を介して細胞内に取り込まれ、フリーラジカルや活性化酸素の過剰産生を誘発し細胞機能障害を引き起こすことが報告されている (Karl and Friedman, 1983)。一方、PQは脳-血液関門の通過性が低いことから中枢神経系における病理学的に明らかな異常所見を示す報告は少ない。しかしながら、PQはParkinson症候群を惹起させるMPP<sup>+</sup>の構造式との類似性から中枢神経系への直接適用により脳神経機能障害を誘発させることが予測され、神経毒として中枢神経疾患発症機序の解明に有機的な研究手段として用いられる可能性が考えられる。

例えば、PQのラット脳室内あるいは脳実質内投与により明らかな行動異常や痙攣が誘発されるが、これらがMPP<sup>+</sup>と同様に脳内ドーパミン(DA)神経系へPQが選択的に取り込まれDA神経系の変性を引き起こす結果のみで説明できないことはBarbeau et al(1985)やPerry et al(1986)の報告からも明かである。さらに、これらの機能障害発現の一端に脳神経細胞内への $\text{Ca}^{2+}$ 過剰流入の関与が最近示唆されるようになりフリーラジカルや活性化酸素の過剰産生の可能性も原因となることが考えられるようになってきた (Hughes, 1988 ; Yoshimura et al., 1993)。PQの神経毒性発現機序を考究するため、*In Vitro*系では1)興奮性アミノ酸動態に及ぼす影響、ならびに、2)神経終末における $\text{Ca}^{2+}$ 動態に及ぼす影響を中心に検索した。

1)PQの脳神経細胞におけるアミノ酸動態に及ぼす影響を培養小脳顆粒細胞を用いて検索した。結果として、PQのアミノ酸神経系に対する薬理効果としては、Glu神経系の神経活動の興奮作用が本研究から示唆された。なぜならば、PQの適用によりGlu量への影響は認められなかったものの、Gluの主要代謝物でもあるGln量の用量依存的な増量が観察された。しかも、GluからGlnへの主要代謝酵素であるGln合成酵素活性もPQ適用によ

り著明な増加を示したことからPQはGlu神経系活動に対し興奮作用を有するものと思われる。一方、共存するグリア細胞数の増減によりPQのアミノ酸神経活動、殊にGlu神経系に及ぼす影響が異なってくる可能性も本研究から示唆された。グリア細胞数の共存が少ない培養小脳顆粒細胞へのPQの適用は共存数の多い細胞群と比較して培養液中へのGlu放出量はいずれの投与量も亢進していたが、Gln量はグリア細胞数の多い方でいずれも高い値を示した。これらの結果は、神経細胞から放出されたGluの主要な取り込み系としてのグリア細胞の重要性、ならびに主要代謝酵素であるGln合成酵素がグリア細胞にのみ存在している事実から考察され得る。さらに、PQの多量(2mM)により誘発される神経細胞障害の発症にはGlu放出ならびにGly量の増加によるGlu受容体からのCa<sup>2+</sup>流入の促進作用により生じると考えられた。

2)PQの神経終末分画におけるCa<sup>2+</sup>変動に及ぼす影響を検索した。結果として、PQ1mMおよび2mMを前処置すると神経終末における持続的な増量が確認された。さらに、50mM KCl誘発脱分極刺激により増加する細胞内Ca<sup>2+</sup>量はPQ前処置によって明らかに増強された。しかしながら、興味あることにCa拮抗薬であるflunarizineを前処置するとPQによって誘発される持続的な細胞内Ca<sup>2+</sup>量の増量および50mM KClによる急激なCa<sup>2+</sup>量の増量は抑制された。

さらに、*In Vivo*系においてPQの神経毒としての薬理効果を検索した。

ラットの一般行動における成績：100nmol以上のPQをラット側脳室内に投与30分間でもっとも顕著に観察された異常行動は、前肢におけるdrop hand様麻痺と後肢での屈曲性内転および強直性痙攣であった。投与後6時間以内に間代性痙攣の発現が85%以上のラットで観察され、これらの症状を呈した動物はすべて投与3日以内に死亡した。PQ100nmolから400nmolの投与で用量依存的な異常行動の発現率が得られた。一方、PQの50nmol投与では上記の所見は一切観察されなかったが、rotarod法による検定から協調運動の失調が観察された。しかも、この運動失調はCa拮抗薬の前処置によって改善され、Ca作動薬(BAY K 8644)により増悪された。PQのラット側脳室内投与により発現する行動異常は、培養脳神経細胞の研究成績と神経終末におけるCa<sup>2+</sup>量の変動を加味すると、脳内の興奮性アミノ酸の放出をPQは促進しCa<sup>2+</sup>の細胞内への流入を増量させ、脳神経系の興奮性を亢進させることにより発現することが示唆される。さらに、PQの用量依存的なGlu神経活動の興奮作用はラットで間代性痙攣から強直性痙攣の発現頻度を高め、生存率を低下させるものと思われる。

中枢神経系に対する毒性発現機序の一部に、PQは他の興奮性毒物と同様のグルタミン酸受容体を介する細胞内Ca<sup>2+</sup>量の異常増量、ならびにPQ自体がCa<sup>2+</sup>を細胞内へ持続的に流入させることが考えられ、その結果として協調運動の失調や重篤な痙攣を発症させることが推測された。このように、細胞内で過剰量のCa<sup>2+</sup>を誘発させる物質は中枢神経毒としても作用して運動機能障害を惹起させる可能性が強い。さらに、臨床報告として、精神障害発症の患者の血小板内のCa<sup>2+</sup>量は外部刺激によって健康人よりも増量の程度が亢進していることが示唆されている。すなわち、細胞内のCa<sup>2+</sup>量の過剰、あるいは異常動態が中枢神経系の機能障害(精神障害のみならず運動機能障害を含む)発症と深く関連すると思われる。そこで、Ca<sup>2+</sup>が中枢神経系機能障害の生化学的パラメーターとして応用されることが期待される。

## 文献

- Barbeau A, Dallaire L, Buu NT, Poirier J, Rucinska E (1985) Comparative behavioral, biochemical and pigmentary effects of MPTP, MPP<sup>+</sup> and paraquat in *rana pipiens*. Life Sci. 37, 1529-1538
- Choi DW (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. Neuron 1: 623-634
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien Y (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. J. Biol. Chem. 260, 3440-3450
- Hughes JT (1988) Brain damage due to paraquat poisoning: A fatal case with neuropathological examination of the brain. Neurotoxicology 9, 243-248
- Komulainen H, Bondy SC (1988) Increased free intracellular Ca<sup>2+</sup> by toxic agents: an index of potential neurotoxicity. TIPS 9, 154-156
- Perry TL, Yong VW, Wall RA, Jones K (1986) Paraquat and two endogenous analogues of the neurotoxic substance N-methyl-4-ohenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine do not damage dopaminergic nigrostriatal neurons in the mouse. Neurosci. Lett. 69, 285-289
- Karl PI, Friedman PA (1983) Competition between paraquat and putrescine for accumulation by rat lung slices. Toxicology 26:317-323
- Yoshimura Y, Watanabe Y, Shibuya T (1993) Inhibitory effects of calcium channel antagonists on motor dysfunction induced by intracerebroventricular administration of paraquat. Pharmacol. & Toxicol. 72, 229-235

遺伝子毒性評価の諸問題—変異原性試験を中心として

祖父尼 俊雄

国立衛生試験所・変異遺伝部

(〒158 東京都世田谷区上用賀1-18-1)

Characteristics of Genotoxic Tests

Toshio SOFUNI

Division of Genetics and Mutagenesis,

National Institute of Health Sciences

(1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158)

Summary

The characteristics of genotoxic tests are to involve many independent different test systems with several different genetic endpoints and different measurement parameters within the same genetic endpoint, using a variety of species from bacteria to experimental animals. For the evaluation of genotoxic test results, it is important to deeply consider the variation of experimental conditions derived from above mentioned characteristics.

Key Words: Genotoxic test, Mutagenicity test, Gene mutation, Chromosomal aberration

遺伝子に対する毒性影響といえば、かなり広範囲をカバーすることになるが、やはりその中心となるのはいわゆる変異原性試験と呼ばれているものである。変異原性試験にどこまで含めるかは必ずしも定かでないが、遺伝子(DNA)に対す損傷およびそれに起因する変異体と規定すると、自ずと慣例的に言われている変異原性試験がカバーしている領域となる。最近、genotoxicityという言葉が多用されるようになったが、この言葉の定義もあまり定かでない。遺伝子(DNA)に対するありとあらゆる影響を含める広義の意味で用いると筆者は解釈しているが、異論もある。また、この言葉の和訳に「遺伝毒性」を用いると、親から子に伝わる heritable 毒性という狭義の意味と混同され易く、問題がある。そこで、ここではあえて「遺伝子毒性」という言葉で、遺伝子(DNA)に対する初期的修飾から生殖細胞を経由して次世代に現われる遺伝的な影響まで含める極めて広義の意味で用いることにする。本文では慣例上変異原性試験あるいは遺伝毒性試験という言葉を用いることがあるが、それは同じ広義の意味で用いていると解釈して頂きたい。

他の毒性試験などと比べると、遺伝子毒性試験には次のような特徴がある：1) 単一の試験ではなく、多数の個別の試験が含まれている、2) 試験毎に用いる遺伝的パラメータが異なる、3) 同一の遺伝的パラメータに対しても用いる測定パラメータが異なるものがある、4) ファージ・バクテリアから哺乳動物までの多様な生物種を対象とする in vitro と in vivo の試験系が含まれている。近年、新しい試験技術も次々と開発されてきており、それに伴い新しい測定パラメータや遺伝パラメータ

が用いられるようになってきた。ここでは、代表的な変異原性試験である遺伝子突然変異試験と染色体異常試験を中心に述べ、新たに開発されている試験法についても付言する。

## 1. 遺伝子突然変異試験

### a. 測定パラメータ

遺伝子突然変異試験の測定パラメータは、基本的には突然変異が生じた変異体（変異コロニー）のみであり、比較的単純である。特に、微生物や培養細胞を用いる場合にはプレート上の変異コロニー数を計測するので、結果としてこの数値のみが表示され、陰性対照との比較および濃度依存性によって試験結果の評価が行われる。そのため、測定パラメータによる結果評価の問題点はほとんどないが、次項での試験システムに関するパラメータは結果の評価に重要な意味をもつ。尚、付随的な情報としては、微生物や細胞に対する毒性影響で、これが最高用量の設定条件など、試験成立の吟味に用いる。

マウスを用いる遺伝子突然変異試験では、突然変異を主に毛色の変化として、ショウジョウバエを用いる試験では眼の色、形や羽毛の変化としてとらえるので、その分類および判定は単純ではない。その詳細はここでは割愛する。

### b. 試験システムパラメータ

現在最も一般的に行われているのが Ames 試験、つまりサルモネラ菌や大腸菌を用いる復帰突然変異試験である。復帰突然変異というのは、正常から突然変異により生じた変異菌株が正常に戻る（復帰する）ことを利用して突然変異を検出するもので、サルモネラ菌ではヒスチジン要求性、大腸菌ではトリプトファン要求性を用いて変異コロニーの選抜を行う。

用いる菌株には数種類あり、それぞれの変異 DNA 上の塩基配列の特徴により、誘発される突然変異の型（塩基対置換やフレームシフト）が判別できる。これらの菌株では、細胞壁のリポ多糖類が欠損し細胞膜の透過性の高まっているもの、除去修復能が欠損し紫外線感受性となっているもの、さらには pKM101 プラスミッドを導入して高感受性となっているものがある。このようなそれぞれ特徴の異なる菌株を 4～5 種類組み合わせさせて試験を行い、多様な化学物質の特性に対応できるように工夫されている。

復帰突然変異試験と対比するものとして、前進突然変異試験がある。これは正常から変異体への直接的な変化を捉えるもので、主に薬剤抵抗性を指標としており、例えば正常細胞は 8-アザグアニン処理により生存できないが、突然変異により 8-アザグアニン耐性となった変異体を検出する方法である。サルモネラ菌においても行われている試験であるが、復帰突然変異試験のように一般的にはない。しかし、哺乳類培養細胞を用いる遺伝子突然変異試験ではこれまで最も一般的な方法として用いている方法である。

### c. 試験プロトコールパラメータ

復帰変異試験プロトコールとしては、現在主要な 2 つの方法がある。1 つは菌体と被験物質とを混ぜて、プレート上にまき、変異コロニーの出現をみるプレート法である。もう 1 つは、菌体と被験物質をあらかじめ 20 分間処理し、その後プレート上にまき、変異コロニーの出現をみるブレインキューベーション法である。

バクテリアでは動物個体のような代謝酵素をもっていないため、代謝活性化をうけてから突然変異を示す化合物には適さないため、ラット肝ホモジネートより調製した S9 mix を用いる代謝活性化法が併用されている。

試験プロトコール上では上記の2点に留意して結果の評価を行う必要がある。

## 2. 染色体異常試験

### a. 測定パラメータ

遺伝子突然変異の測定パラメータは比較的単純であるが、染色体異常試験の場合には測定の対象となる染色体異常が複雑であるため、どの程度まで詳細に分析するかによって試験結果の内容が異なってくる。染色体異常を大別すると、形態の変化である構造異常と数の変化である数的異常とに分けられる。この2つは生成のメカニズムが異なり、前者はDNAに対する障害に起因するが、後者は細胞分裂の際の紡錘糸などの蛋白に作用するため、同じレベルで評価することはできない。それぞれ別々に記録し、個別に結果の評価を行う。

最終的な結果の判定には染色体異常をもつ細胞の出現頻度(%)を用いることで最近国際的に合意が得られつつある。但し、構造異常の場合にはそれぞれの細胞に含まれる異常の数が無視されるため、正確な用量反応関係が得られないとの見方がある。構造異常には染色体型と染色分体型の2種類の異常があり、その違いにはDNAに対する作用機作や細胞周期が関連することから、明確に区別する必要がある。この2種類の異常はさらに、ギャップ、切断、交換の3種に分けられ、合計6種類の分類が基本となる。異常細胞の出現頻度で表示する場合でも少なくともこの6種類を明確に区別して集計すべきである。但し、ギャップについては研究者により定義が異なり、DNA障害を必ずしも反映しないと考えられる微細な変化の場合には、構造異常に含めずに評価する必要がある。

交換型異常はさらに対称型と非対称型、および単一染色体内(腕内と腕間)交換、2本染色体間交換等と詳細に分類できる。これらの染色体異常の中には細胞分裂の際に分裂障害によって死滅しやすいものと、正常細胞のように分裂を繰り返し生存できるものがある。前者を不安定型異常、後者を安定型異常という。一般にはこのような詳細な分類、記録をしても常時結果の評価に反映できるわけではないので、前述のように最小限の情報としては染色体型と染色分体型の切断と交換、必要な場合にはギャップを含めて記録することで十分である。

上述の測定パラメータは培養細胞を用いる場合でも実験動物の体細胞を用いる場合でも同じである。但し実験動物の生殖細胞では異常の分類、判定が異なってくる。最近、実験動物の骨髄での染色体異常試験の代わりに小核試験が盛んに行われているが、これは赤血球の小核が測定パラメータであるので、極めて単純である。赤血球当たりの小核の数を問題にする必要もなく、小核をもつ赤血球の出現頻度が唯一のパラメータで、これに細胞毒性の指標として、全赤血球中での幼若赤血球の割合を用いる。

### b. 試験システムパラメータ

現在一般に用いられている細胞種はごく限られており、復帰変異試験ほどの多様性はない。培養細胞では、一般にチャイニーズ・ハムスター細胞株(CHL, CHOなど)やヒト末梢リンパ球が用いられ、これらの細胞種間における試験結果の差異が論議されているが、明確な結論は得られていない。実験動物としては、マウスが一般的で、ラットあるいはハムスターを用いることもある。

### c. 試験プロトコールパラメータ

試験プロトコールは染色体異常試験による結果の評価に影響を及ぼす重要な要因である。培養細胞を用いる染色体異常試験では、被験物質の処理時間と標本作製時間が重要となる。処理方法としては、短時間処理後回復時間において標本作製す

る方法と、長時間連続処理後直ちに標本作製する方法とがある。これまでのデータベースの解析によると、短時間処理がより多く染色体異常を検出していることから、短時間処理法を中心とし、陰性結果が得られた場合には連続処理で確認するという考え方が取り入れられつつある。尚、復帰変異試験と同様に代謝活性化系を組み入れる必要がある。

実験動物を用いる場合にも、検体投与後の標本作製時間が重要である。そのため、単回投与の場合は複数の標本作製時期を設けるか、予備実験で最適な標本作製時期を確認しておく必要がある。投与回数も問題であるが、複数回数の投与の場合は、最終投与から一定時期の単一標本作製で十分であるとの意見が大勢を占めている。

### 3. その他の試験法でのパラメータ

代表的な2つの試験において論議の対象となるパラメータをとり上げてみたが、遺伝子毒性のためのパラメータとしてはまだ様々なものがある。例えば、DNAに対する初期的作用としてのDNA付加体がある。その測定のため種々の方法が開発されているが、薄層クロマトグラフィーによる<sup>32</sup>P-ポストラベル法が多用されている。DNAの初期的損傷としてはDNA鎖切断を測定する方法があり、DNA損傷に起因するDNA合成(UDS)を測定する方法やDNA損傷からのシグナルによるSOS反応を利用する方法もある。

最近、実験動物を用いる遺伝子突然変異試験としてトランスジェニックマウスを用いる方法が開発されているが、この方法では最終的な測定パラメータは微生物を用いる試験と同じくプレート上での変異コロニー数となる。遺伝子変異をみる新しい試みとしては、ミニサテライトDNAを利用したDNAフィンガープリント法と呼ぶものがある。

染色体異常を検出するために、特定の染色体のDNAプローブによるFISH法を利用した染色体ペインティング法が用いられるようになった。これは特異的に染め出される染色体の数によって容易に異常が識別できるものである。また、マウスセントロメア特異的DNAプローブを用いて、小核にセントロメアがあるか否かを判定し、異数性誘発性を検出しようとする試みもある。

今後、遺伝子毒性を評価するために次々と新しいパラメータが提起されてくると考えられるが、これらのパラメータの妥当性が確認されることによって、今後遺伝子毒性試験の内容も自ずと変化し、それに伴って試験結果の評価基準の精度も高まっていくものと考えられる。

索引 (数字は講演番号を示す)

|                                   |     |                                  |     |
|-----------------------------------|-----|----------------------------------|-----|
| A                                 |     | M                                |     |
| animals                           | 2.1 | malondialdehyde                  | 2.2 |
| B                                 |     | mechanism of toxicity            | 1.3 |
| blood chemistry                   | 2.1 | metabolic activation             | 1.2 |
| C                                 |     | microfilaments                   | 2.6 |
| Ca <sup>2+</sup>                  | 2.7 | microtubules                     | 2.6 |
| cell injuries                     | 2.5 | mono-ADP-ribosylation            | 2.6 |
| chemical carcinogen               | 1.2 | morphological examinations       | 2.5 |
| chromosomal aberration            | 2.8 | mutagenicity test                | 2.8 |
| clinical laboratory test          | 2.3 | N                                |     |
| clinical pathology parameters     | 2.4 | newly developed drug             | 2.3 |
| coagulation                       | 2.1 | P                                |     |
| cultured cerebellar granule cells | 2.7 | paraquat                         | 2.7 |
|                                   |     | pathology                        | 2.2 |
| cytochrome P-450                  | 1.2 | phase I study                    | 2.3 |
| cytosolic Ca <sup>2+</sup> levels | 2.7 | phospholipid peroxidation        | 2.2 |
| D                                 |     | phosphorylation                  | 2.6 |
| dogs                              | 2.4 | polyol-induced carcinogenicity   | 1.3 |
| drug-induced hepatic injuries     | 2.4 | predictability                   | 2.3 |
|                                   |     | Q                                |     |
| E                                 |     | quinolon-induced renal toxicity  | 1.3 |
| electron microscopic findings     | 2.4 | R                                |     |
| electron microscopy               | 2.5 | regulatory guidelines            | 2.1 |
| excitatory amino acids            | 2.7 | risk assessment                  | 1.1 |
| extrapolation to human situations | 1.3 | rota-rod performance             | 2.7 |
|                                   |     | S                                |     |
| F                                 |     | signal transduction              | 2.6 |
| free radical                      | 2.2 | somatic mutations                | 1.1 |
| G                                 |     | T                                |     |
| genotoxic test                    | 2.8 | toxicity                         | 2.3 |
| gene mutation                     | 2.8 | toxicity testing                 | 2.1 |
| H                                 |     | toxicological evaluation         | 2.5 |
| hematology                        | 2.1 | toxicology laboratory management | 1.3 |
| I                                 |     |                                  |     |
| induced mutagenesis               | 1.1 | transgenic mice                  | 1.1 |
| immunohistochemistry              | 2.5 | U                                |     |
| L                                 |     | umu test                         | 1.2 |
| LDH                               | 2.7 | urinalysis                       | 2.1 |
| light microscopy                  | 2.5 |                                  |     |
| locomotor activity                | 2.7 |                                  |     |



第21回 日本毒科学会学術年会 第3回 日本毒科学会サテライトシンポジウム

生体-毒性物質相互作用 —その評価と機構の解明— 「プログラム・要旨集」

---

●発行日/平成6年5月23日 ●発行人/藤田 正一

●発行所/北海道大学獣医学部 毒性講座 〒060 札幌市北区北18条西9丁目 TEL(011)706-6948・6949 FAX(011)717-7569

●印刷所/森アド・シイシイ TEL(011)552-4134