

第18回 日本毒科学会学術年会 プログラム・要旨集

平成3年7月24日(水)・25日(木)

大阪国際交流センター

1991 大 阪

第18回 日本毒科学会学術年会
プログラム・要旨集

平成3年7月24日(水)、25日(木)

大阪国際交流センター

(〒543 大阪市天王寺区上本町8丁目2-6)

学会事務局 ☎06-775-8929(会期中)

1991 大阪

目 次

御挨拶	1
お知らせとお願い	2
会場案内	4
日程および座長一覧	6
プログラム	
特別講演	8
シンポジウム	8
特別委員会ワークショップ	9
ワークショップ1	9
ワークショップ3	10
ワークショップ2	10
一般演題	11
要旨	
特別講演	21
シンポジウム	25
特別委員会ワークショップ	39
ワークショップ1	53
ワークショップ3	65
ワークショップ2	77
一般演題	89

会 長 堀口 俊一 (大阪市立大学医学部環境衛生学)

企画委員 池田 正之 (京都大学医学部公衆衛生学)
玄番 宗一 (大阪薬科大学第2薬理学)
高島 英伍 (摂南大学薬学部毒性学)
谷村 孝 (近畿大学医学部解剖学第1)
矢ヶ崎 修 (大阪府立大学農学部家畜薬理学)
山本 研二郎 (大阪市立大学医学部薬理学)
和田 博 (大阪大学医学部第2薬理学)

実行委員 圓藤 吟史 (大阪市立大学医学部環境衛生学)
品川 興造 (大阪市立大学医学部環境衛生学)
脇谷 扶美子 (大阪市立大学医学部環境衛生学)
清田 郁子 (大阪市立大学医学部環境衛生学)

事務局 寺本 敬子 (大阪市立大学医学部環境衛生学)

事務局所在地 〒545 大阪市阿倍野区旭町1-4-54
大阪市立大学医学部環境衛生学教室
TEL 06-645-2056 FAX 06-646-0722

御 換 拶

第18回日本毒科学会学術年会

会 長 堀 口 俊 一

第18回日本毒科学会学術年会の開催にあたり、これまでの経緯を述べて御挨拶にかえさせていただきます。

一昨平成元(1989)年6月、第16回学術年会において、次次期会長(1991年度)として、私が推薦され、承認されました。そこで、まず日程と会場を検討しましたが、同上年度に日本産業衛生学会(3月29日-4月1日、於大阪国際交流センター)の会長を勤めなければならぬことを考慮して、本学会の学術年會を同じ会場で7月24、25日の両日に行なうことを予定しました。

毒科学会には村野匡先生のお勧めで当初から会員となっており、学会および学会誌にも時々発表させていただいておりますものの、日頃疎遠でありました。この度の学会運営には何としても薬学等に御関係の諸先生の御助力が欠かせないことは申すまでもございません。そこで近畿在住のこの方面の御専門の先生方に企画委員をお願いして、第1回委員会を平成2(1990)年5月2日、第2回を6月22日に開き、大綱が決まりました。その後、村野先生の御提案による特別委員会のワークショップを加えて、結局シンポジウムと4つのワークショップが決定しました。また特別講演については会長から和田先生に演者をお願いしました。いずれも毒科学領域における重要なテーマが選ばれたと考えております。

大阪では最も暑い天神祭の時に当たりますが、多数参加され、活発な討論とともに、友誼を深められんことを期待しております。

お知らせとお願い

1. 年会参加者の皆様へ

受付 ・学会受付は午前8時30分より行ないます。
(会場の扉は午前8時30分に開きます)

ネームプレート (参加章)

- ・ネームプレートには必要事項を記入し、会場内では必ずご着用下さい。
- ・事前登録された方は同封のネームプレートをご持参下さい。再発行はいたしません。
- ・当日参加の方は参加申込み書をご記入の上、受付にて参加費(6,000円)を納入し、ネームプレートと「プログラム・要旨集」をお受取下さい。

会場内の進行については、座長または司会の指示に従って下さい。

口演中の写真撮影はご遠慮下さい。

会場内での飲食・喫煙は所定の場所でお願ひします。

2. 演者の皆様へ

一般演題 (口演)

- スライド ・口演の30分前までに各会場のスライド受付で、ご自身で試写・確認の上、お渡し下さい。
- ・口演後はすみやかに引き取り下さい。
 - ・スライドは、35mmフィルム(枠50mm×50mm)を使用して下さい。
 - ・一般演題(口演)のスライドは10枚以内でお願いします。
 - ・スライドには演題番号・演者名を明記して下さい。
 - ・プロジェクターは1会場1台です。同一スライドを繰り返して使用される場合は映写回数分の枚数をご用意下さい。

一般演題の口演時間8分、討論4分です。時間厳守を願ひます。

J.Toxicol.Sci.に掲載する英文抄録は、スライドをお渡しの際に受付にご提出願ひます。

次演者の方は発表の10分前までに最前列の次演者席にお着き下さい。

一般演題 (ポスター)

送付しました「ポスター展示要領」に従って掲示して下さい。

9:30～10:00 掲示作業

10:00～17:50 展 示

(この間、11:30～12:00と17:10～17:50の2回、質疑応答です。主発表者はこの時間帯には必ずポスターの前に待機して討論・質疑に応じて下さい)

17:50～18:00 撤去作業

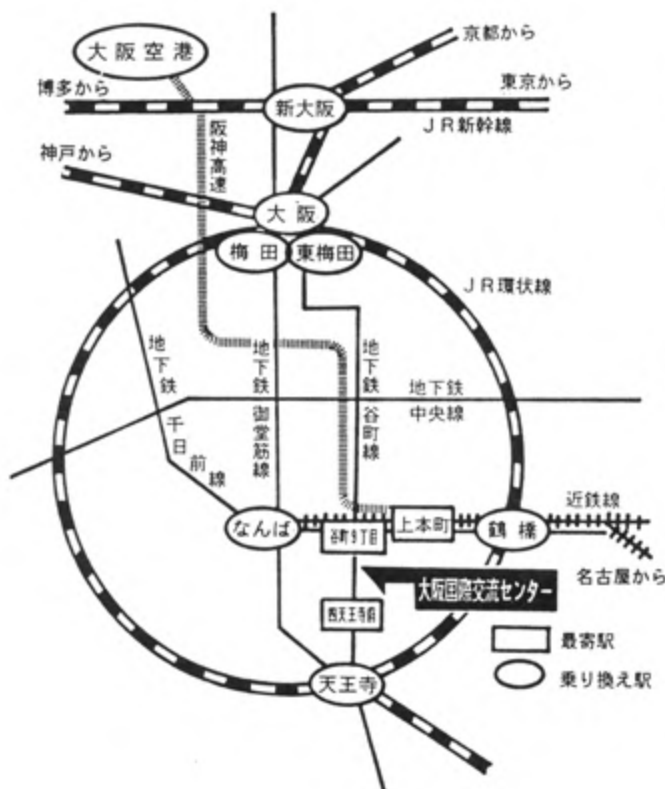
シンポジウム・ワークショップ

- ・スライド ・口演の30分前までに各会場のスライド受付で、ご自身で試写・確認の上、お渡し下さい。
- ・口演後はすみやかにお引き取り下さい。
- ・スライドは、35mmフィルム(枠50mm×50mm)を使用して下さい。
- ・シンポジウム・ワークショップのスライドの枚数は特に制限はありませんが、多過ぎないようにお願いします。
- ・スライドには演題番号・演者名を明記して下さい。
- ・プロジェクターは1会場1台です。同一スライドを繰り返して使用される場合は映写回数分の枚数をご用意下さい。

口演時間は座長の指示に従って、時間厳守を願います。

J.Toxicol.Sci.に掲載する英文抄録は、スライドをお渡しの際に受付にご提出願います。

3. 評議員会 7月24日(水)12時より、2階「さくら」にて開催致します。
4. 総 会 7月25日(木)13時より、第1会場にて開催致します。
5. 懇 親 会 7月24日(水)18時より、2階「さくら」にて開催致します。
当日の申し込み(会費8,000円)も受け付けます。準備の都合上、なるべく早めに総合受付でご予約下さい。



会場への道順

<大阪国際空港より> 約30分

空港バス「上本町」行に乗車（ノンストップ約25分）、下車後徒歩約5分。

<JR新幹線 新大阪より> 約40分

◎地下鉄御堂筋線「新大阪」駅から天王寺・なかもず方面行に乘車、「なんば」駅で千日前線に乗りかえ「谷町9丁目」下車、⑤番出口から徒歩約10分。または「なんば」駅で近鉄奈良線に乗りかえ、「上本町」下車、徒歩約5分。

◎タクシー：約30分、約4,000円。

<JR大阪方面より> 約30分

◎JR大阪環状線（外回り）鶴橋で近鉄線に乗りかえ、「上本町」下車、徒歩約5分。

◎地下鉄谷町線「東梅田」駅から天王寺・八尾南方面行に乘車、「谷町9丁目」駅で下車、⑤番出入口から徒歩約10分。

<JR天王寺方面より> 約15分

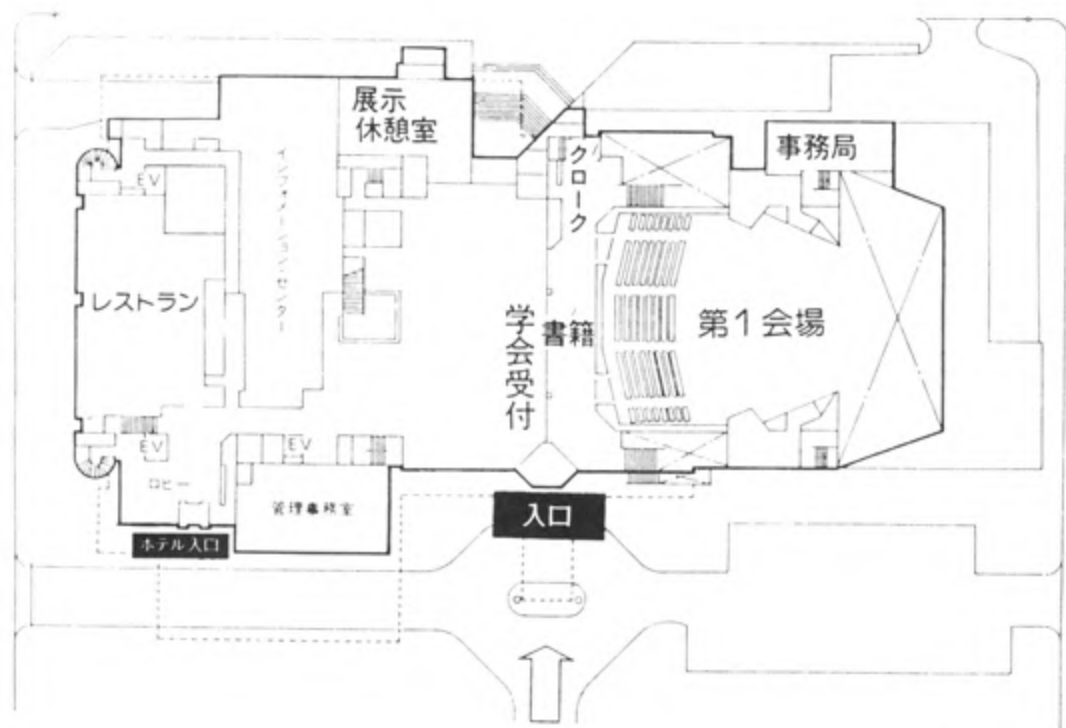
地下鉄谷町線「天王寺」駅から東梅田・大日方面行に乘車し「四天王寺前」駅で下車、①番出入口から徒歩約10分。

※学会用の駐車場は設けておりませんので、車でのご来場はご遠慮下さい。

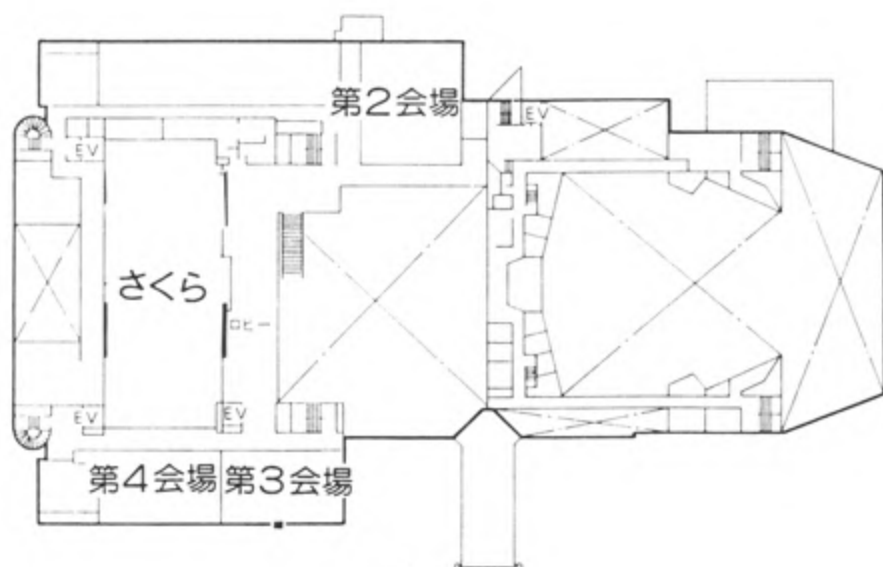


会場案内図

1F



2F



日程および座長一覧・7月24日（水）

	第1会場	第2会場	第3会場	第4会場
8:55	開会の辞			
9:00	特別委員会ワークショップ 「組織培養法を応用した臓器毒性の 新しい評価法の現状と将来」 座長 佐藤 温重 佐藤 哲男	口演発表 201-206 座長 黒岩 幸雄 園藤 吟史 207-211 座長 井上 尚英 門奈 丈之	ポスター展示 301-317	ポスター展示 401-417
9:15				
10:00			質疑応答	質疑応答
11:30	昼食休憩 評議員会（会場：さくら）			
12:00				
13:00	ワークショップ1 「吸入曝露： 粉塵・エアロゾル曝露の制御技術」 座長 池田 正之 児玉 泰	口演発表 212-216 座長 鎌滝 哲也 高仲 正 217-221 座長 遠藤 仁 船江 良彦		
15:00				
15:10	ワークショップ3 「毒性評価のための 多面的アプローチ」 座長 谷村 孝 戸部 満寿夫	口演発表 222-226 座長 江頭 亨 藤井 憐子 227-231 座長 玄番 宗一 平井 正直		
17:10				
17:50			質疑応答	質疑応答

懇親会（会場：さくら） 18:00～20:00

日程および座長一覧・7月25日（木）

	第1会場	第2会場
9:00	ワークショップ2 「化学物質の毒性と活性酸素」 座長 高島 英伍 井村 伸正	口演発表 232-236 座長 唐木 英明 野村 彰 237-241 座長 林 祐造 上野 芳夫
11:00		
11:05	特別講演 「エコ・バイオトキシコロジーと その予防トキシコロジーへの応用」 座長 堀口 俊一	
12:10		
	昼食休憩	
13:00	総 会	
13:45		
13:50	シンポジウム 「制癌剤の毒性」 座長 矢ヶ崎 修 福島 昭治	
16:50		
	閉会の辞	

機器展示(1Fギャラリー)、書籍展示(第1会場前)を24,25日(9:00-17:00)の両日行ないます。

特別講演

第1会場

7月25日(木) 11:05-12:10

「エコ・バイオトキシコロジーとその予防トキシコロジーへの応用」

和田 攻 (東大・医・衛生)

座長 堀口 俊一 (大阪市大・医)

シンポジウム

第1会場

7月25日(木) 13:50-16:50

「制癌剤の毒性」

座長 矢ヶ崎 修 (大阪府大・農・獣医薬理)

福島 昭治 (大阪市大・医・第1病理)

- | | |
|----------------------|----------------------|
| 1 制癌剤のToxicokinetics | 藤田 浩 (鶴見大・歯・細菌学) |
| 2 制癌剤の一般毒性と免疫毒性 | 暮部 勝 (大阪府大・農・獣医・毒性学) |
| 3 制癌剤の発癌性 | 高橋 道人 (国立衛試・病理) |
| 4 制癌剤の発生毒性 | 田中 悟 (国立衛試・毒性) |
| 5 制癌剤誘起性嘔吐 | 南 勝 (東日本学園大・薬・薬理) 他 |

特別委員会ワークショップ 第1会場

7月24日(水) 9:00-11:30

「組織培養法を応用した臓器毒性の新しい評価法の現状と将来」

座長 佐藤 温重 (東京医歯大)

佐藤 哲男 (千葉大・薬・薬物)

- 1 心臓毒性：アドリアマイシン誘発培養心筋細胞障害の成因とその制御
五島 喜與太 (神戸学院大・人文・生物) 他
- 2 血管内皮細胞毒性
室田 誠逸 (東京医歯大・歯顎口腔機能)
- 3 肝臓毒性
大野 泰雄 (国立衛試・薬理) 他
- 4 肺毒性
須加原 一博 (熊本大・医・麻酔)

追加発言 球状凝集細胞塊 (スフェロイド)

竹澤 俊明 (グレース日本・中研)

ワークショップ1

第1会場

7月24日(水) 13:00-15:00

「吸入曝露：粉塵・エアロゾル曝露の制御技術」

座長 池田 正之 (京大・医・公衆衛生)

児玉 泰 (産業医大・衛生)

- 1 エアロゾルの濃度管理
野崎 亘右 (中災防バイオアッセイセンター)
- 2 粒径の選択と制御
津田 修治 (動物繁殖研究所)
- 3 二成分系連続式流動層ダスト発生装置を用いた各種エアロゾルの吸入曝露実験
田中 勇武 (産業医大・労働衛生工学)
- 4 農薬の安全性と吸入毒性試験
川崎 一 (住化・生物環境科学研) 他

ワークショップ3

第1会場

7月24日(水) 15:10-17:10

「毒性評価のための多面的アプローチ」

座長 谷村 孝 (近畿大・医・解剖)
戸部 満寿夫 (日本公定書協会)

- 1 毒性データベースと毒性予測 中館 正弘 (国立衛試)
- 2 動物代替の立場から見た毒性試験 渡辺 正己 (横浜市大)
- 3 近年提唱されている生殖・発生毒性の新しい試験法の基盤
川島 邦夫 (国立衛試)
- 4 Toxicokineticsの毒性評価への応用 野口 英世 (藤沢薬品)

ワークショップ2

第1会場

7月25日(木) 9:00-11:00

「化学物質の毒性と活性酸素」

座長 高島 英伍 (摂南大・薬・毒性)
井村 伸正 (北里大・薬)

- 1 活性酸素研究の現状と展望 大柳 善彦 (藤沢薬品・開発研究所)
- 2 農薬の作用機構と活性酸素 松中 昭一 (関西大・工・生物工学)
- 3 活性酸素による障害とメタロチオネイン
井村 伸正 (北里大・薬) 他
- 4 蛍光プローブを用いた四塩化炭素肝障害の発生におけるフリーラジカルの解析
加藤 眞三 (慶応大・医・内科) 他

座長 黒岩 幸雄 (昭和大・薬・毒物)
 圓藤 吟史 (大阪市大・医・環境衛生)

- 9:15 201 食品化学物質によるin vitro細胞老化(第3報)
 ○笠巻 明子, 浦沢 正三
 (札幌医大・衛生)
- 9:27 202 酸化エチレンによる精巣障害に対するメチルコバラミンの抑制効果
 ○森 晃爾¹⁾, 藤代 一也²⁾, 井上 尚英²⁾, 海道 昌宣³⁾,
 小出 紀³⁾, 今津 和彦⁴⁾
 (1)西日本産業衛生会, 2)産医大・環境中毒,
 3)産医大・第二病理, 4)産医大・第三内科)
- 9:39 203 タリウム中毒の一症例ー生体試料中タリウム濃度ー
 ○千葉 百子¹⁾, 篠原 厚子¹⁾, 稲葉 裕¹⁾, 松林 里絵²⁾,
 八木 皓一²⁾, 田邊 等²⁾
 (1)順天堂大・医・衛生, 2)東京都立神経病院神経内科)
- 9:51 204 脳組織コリン作動性神経活性に及ぼすタリウム化合物の影響
 小野 菜穂子, ○小林 晴男, 中川 暁美, 茂木 朗, 笠嶋 快周,
 鈴木 忠彦
 (岩手大・農・家畜薬理)
- 10:03 205 有機リン系農薬アザメチホスのコリンエステラーゼアイソザイムへの影響
 ○政岡 俊夫¹⁾, 坂口 和子²⁾, 長山 昌広¹⁾, 白井 明志¹⁾,
 赤堀 文昭¹⁾
 (1)麻布大・獣医・薬理, 2)麻布大・環境・衛生行政)
- 10:15 206 5フッ化プロパノールのラットにおける28日間反復吸入毒性試験について
 ○広瀬 明彦, 高田 幸一, 斉藤 実, 小川 幸男, 鈴木 幸子,
 金子 豊蔵, 黒川 雄二
 (国立衛試・安全研・毒性)
- 座長 井上 尚英 (産業医大・環境中毒)
 門奈 丈之 (大阪市大・医・公衆衛生)
- 10:27 207 遠心分析方式の測定機を用いた実験動物の尿の生化学検査について
 ○笠間 菊子, 小島 幸一
 (食品薬品安全センター・秦野研)
- 10:39 208 カニクイザルの血液学および血液化学的検査に関する背景データ
 ○鮫島 秀暢, 本田 多聞, 永田 貴久, 永田 良一
 (新日本科学・安全研)

10:51 209 マウス赤血球の非浸透圧性試験管内溶血について

○金津 赫生

(筑波大・医療技術短大)

11:03 210 ジメチルホルムアミドの肝グルタチオン代謝系に及ぼす影響

○今津 和彦¹⁾, 藤代 一也¹⁾, 井上 尚英¹⁾, 森 晃爾²⁾

(¹⁾産医大・環境中毒, ²⁾西日本産業衛生会)

11:15 211 ジメチルホルムアミドの肝モノオキシゲナーゼ系に及ぼす影響

○藤代 一也¹⁾, 今津 和彦¹⁾, 井上 尚英¹⁾, 森 晃爾²⁾

(¹⁾産医大・環境中毒, ²⁾西日本産業衛生会)

座長 鎌滝 哲也(北大・薬・薬品化学)

高仲 正(国立衛試・安全研・薬理)

13:00 212 ラット大腿静脈を用いた薬剤の血管障害性の評価

○吉田 貢由, 加藤 道幸, 古濱 和久, 柿畑 耕司, 高山 敏

(第一製薬・開発研)

13:12 213 抗生物質トートマイシンのホスファターゼ阻害作用と平滑筋作用

○唐木 英明¹⁾, 堀 正敏¹⁾, D.J.Hartshorne²⁾

(¹⁾東大・農・獣医薬理, ²⁾アリゾナ大・筋生理)

13:24 214 ラット肝薬物代謝酵素系に対するニバレノールの影響

○橋本 英明¹⁾, 矢部 武士¹⁾, 田代 文夫²⁾, 上野 芳夫¹⁾

(¹⁾東京理大・薬・毒・微生物化学,

²⁾東京理大・基礎工・生物工)

13:36 215 肝薬物代謝酵素による2-および3-Chlorodibenzofuranの代謝活性化

○籾内 桃子¹⁾, 福原 守雄²⁾, 川西 徹¹⁾, 郭 新彪¹⁾,

大野 泰雄¹⁾, 高仲 正¹⁾

(¹⁾国立衛試・薬理, ²⁾国立公衆衛生院・衛生薬学)

13:48 216 培養腎上皮細胞におけるシスプラチンおよびカルボプラチンの毒性的差異について

○酒井 徹, 清宮 健一, 暮部 勝

(大阪府大・農・獣医・毒性)

座長 遠藤 仁(東大・医・薬理)

船江 良彦(大阪市大・医・化学)

14:00 217 眼粘膜刺激性試験の代替試験としての正常ヒト表皮角化細胞を用いたIn vitro
細胞障害性試験

○永見 和之, 牧 栄二

(萬有製薬・開発研)

- 14:12 218 2-Chlorodibenzofuranおよび 3-Chlorodibenzofuranのラット培養胎芽の発生に及ぼす影響
○宇佐見 誠, 川島 邦夫, 高仲 正
(国立衛試・安全研・薬理)
- 14:24 219 初代培養肝細胞における2-及び3-monochlorodibenzofuran(MCDF)の薬物代謝活性誘導能のTCDD類との比較
○郭 新彪, 大野 泰雄, 川西 徹, 簾内 桃子, 高仲 正
(国立衛試・薬理)
- 14:36 220 MAO(Monoamine oxydase)阻害活性を持つ薬物の肝細胞障害性評価ーラット初代培養肝細胞を用いた肝細胞障害性試験ー
○川島 明, 堀井 郁夫
(日本ロシュ研・毒性・病理)
- 14:48 221 チトクロームP-450 cDNAの培養細胞株への導入とその毒性学的応用
○澤田 稔, 北村 龍司, 佐藤 恵子, 鎌滝 哲也
(北海道大・薬)
- 座長 江頭 亨 (大分医大・薬理)
藤井 儔子 (帝京大・医・薬理 2)
- 15:10 222 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の雌ラットの生殖能に対する作用
○滝沢 節子¹⁾, 堀井 郁夫¹⁾, 藤井 儔子²⁾
(¹⁾日本ロシュ研・毒性・病理, ²⁾帝京大・医・薬理)
- 15:22 223 降圧薬、合成排卵抑制薬の性ホルモン産生異常(1)
睾丸、副腎に対するプロプラノロール、カプトプリル、ノルエチノドリルの影響
○増渕 美子, 赤池 真理, 平井 正直
(聖マリアンナ医大・薬理)
- 15:34 224 降圧薬、合成排卵抑制薬の性ホルモン産生異常(2)
卵巣に対するプロプラノロール、カプトプリル、ノルエチノドリルの影響
○赤池 真理, 増渕 美子, 平井 正直
(聖マリアンナ医大・薬理)
- 15:46 225 ラットにドーパミン2受容体遮断薬を投与した際の下垂体プロラクチン分泌細胞に対する影響
○須藤 武, 築館 一男, 甲斐 純子, 見上 孝, 山津 清寛
(エーザイ・安全研)
- 15:58 226 脊髄腔内投与における投与液の物理化学的性状の影響
○赤羽 一美, 古濱 和久, 柿畑 耕司, 加藤 道幸, 高山 敏
(第一製薬・安全研)

座長 玄番 宗一 (大薬大・第2薬理)
平井 正直 (聖マリアンナ医大・薬理)

- 16:10 227 ラットのテオフィリン誘発痙攣に対するトロンボキサチンA₂合成阻害薬
DP-1904の相互作用
○工藤 玄, 大野 広志, 野村 護, 高山 敏, 小野寺 威
(第一製薬・安全研)
- 16:22 228 薬物投与による肝奇形様結節および横隔膜ヘルニア発現率の系統差
○萩田 孝一, 北島 省吾, 田中 亮太, 山本 行仁, 伊藤 英記,
安藤 栄恵, 田中 佳子, 中浦 慎介, 小林 和雄
(食品農医薬品安全性評価センター)
- 16:34 229 アルギニン溶液によるラットの浮腫誘発作用
○山田 昌男, 菊池 典子, 佐藤 洋, 坂元 由香, 野村 護
(第一製薬・安全研)
- 16:46 230 ヨード系造影剤の腎負荷ラットに対する影響
○西澤 理江, 古濱 和久, 柿畑 耕司, 高山 敏, 小野寺 威
(第一製薬・開発研・安全研)
- 16:58 231 ハロゲン化エーテル系麻酔薬の多尿を示す副作用の機序
○鄭 圭鎔, 遠藤 仁
(東京大・医・薬理)

- 301 フェレットおよびラットを用いた抗癌剤Cisplatinの毒性におよぼすHX-1920の影響
南 勝, ○城下 恭輝, 遠藤 泰, 門間 芳夫
(東日本学園大・薬・薬理)
- 302 プロカインアミドのマウス膝下リンパ節アッセイ
○勝谷 成男¹⁾, 塩野谷 博¹⁾, 鈴木 弘真²⁾, 堀江 透²⁾
(¹⁾エーザイ・安全性研, ²⁾エーザイ・筑波研)
- 303 norethisteroneおよびethinyl estradiol のラットにおける生殖機能に及ぼす影響の検討
○原田 滋雄, 高山 敏
(第一製薬・開発・安全研)
- 304 生殖、発生毒性試験へのラット全胚培養系の応用(Ⅱ)
ー培養開始時の胎仔の発生段階の同一性についてー
○秋田 正治¹⁾, 横山 篤²⁾, 黒田 行昭³⁾
(¹⁾鎌倉女子大, ²⁾日本たばこ, ³⁾麻布大・生物研)
- 305 培養胎仔における心拍数低下と催奇形性についてーアスピリン、イミプラミン、メチルアゾキシメタノールを用いてー
○横山 篤¹⁾, 秋田 正治²⁾
(¹⁾日本たばこ, ²⁾鎌倉女子大)
- 306 ラット胎芽細胞培養法を用いたIn vitro催奇形性評価(micromass teratogen assay)
○水野 文夫¹⁾, 川上 素子¹⁾, 武田 量雄¹⁾, 岩瀬 隆之²⁾, 池田 保男²⁾
(¹⁾三菱化成安全科学研究所, ²⁾三菱化成・安全研)
- 307 腎スライス法におけるグルタチオン減少と腎細胞障害
○泉谷 修一, 玄番 宗一
(大阪薬大・第二薬理)
- 308 肝の虚血-再循環による多臓器への影響
○工藤 欣邦, 江頭 亨, 永井 敬之, 山中 康光
(大分医大・薬理)
- 309 ラット肝臓に対するclofibrateの作用-感受性の系統間比較-
○矢本 敬, 大橋 芳彦, 木村 邦男, 松沼 尚史
(三共・安全研)
- 310 ラット及びヒト肝チトクロームP-450によるトリメタジオン代謝
○河野 真弓¹⁾, 今岡 進²⁾, 田中 栄之介¹⁾, 三澤 章吾¹⁾, 松江 良彦²⁾
(¹⁾筑波大・社会医学系, ²⁾大阪市大・医)

- 311 ラット貧血および白血球減少モデルにおける骨髄および脾臓有核細胞数の推移
○島田 晴美, 稲毛 富士郎, 高田 早苗, 古濱 和久, 高山 敏
(第一製薬・開発研・安全研)
- 312 サルのモンキーチェア拘束に伴う血液化学的検査値への影響
○平田 真理子, 斎藤 悦子, 中西 秀樹, 小泉 治子
(実中研・前臨床研)
- 313 カニクイザルの完全房室ブロックと房室結節病変との関連
○森田 晴夫, 下村 和裕, 須永 昌男, 小泉 治子
(実中研・前臨床医学研)
- 314 OECD反復投与毒性及び生殖発生毒性併合試験法(ReproTox)
ーシクロホスファミドを用いた検討ー
○田中 悟, 川島 邦夫, 内藤 克司, 中路 幸男, 高橋 道人,
今井田 克己, 宇佐見 誠, 内田 雄幸, 鎌田 栄一, 児玉 幸夫,
高田 幸一, 安原 加津雄, 梅村 隆志, 小野寺 博志, 古川 文夫,
古田 京子, 松島 裕子, 豊田 和弘, 今沢 孝喜, 高仲 正,
黒川 雄二, 林 裕造, 戸部 満寿夫
(国立衛試・安全研)
- 315 反復経口投与におけるアラビアゴムの影響
○山口 格, 西 直樹, 逸見 弘子, 米良 幸典, 松田 和夫
(ゼリア新薬・中研・開発)
- 316 ラボラトリーロボットによる試料自動秤量システムの開発
新留 敏雄, 田村 繁昭, ○出口 隆志
(協和安全性研)
- 317 経口避妊薬によるラット血清アルカリフォスファターゼ上昇の詳細検討
○東條 宏子, 大野 広志, 野村 護, 高山 敏
(第一製薬・安全研)

- 401 医薬品の添付文書に記載されている副作用と毒性試験結果の関連性
○野村 彰, 他
(日本製薬工業協会・基礎研究部会, 日本新薬・中研)
- 402 ESRによる出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)メタロチオネインの
活性酸素消去作用
○川口 友理子, 鬼頭 英明, 佐藤 孝彦, 永瀬 久光, 津谷 和美
(岐阜薬大・公衆衛生)
- 403 ケルセチンの変異原活性におよぼすメタロチオネインの影響
○岡本 章良¹⁾, 黒田 孝一¹⁾, 圓藤 吟史²⁾, 川井 信子¹⁾,
森田 茂¹⁾, 堀口 俊一²⁾
(¹⁾大阪市立環科研, ²⁾大阪市大・医・環境衛生)
- 404 金属化合物による小核誘発作用とキレート剤によるその抑制効果について
○伊東 悟, 松浦 由美子, 服部 千春, 多田 左知子, 島田 弘康
(第一製薬・中研)
- 405 4-(2'-Pyridylazo)resorcinol の後反応を伴う陽イオン交換HPLC法による
カドミウム等の測定について
○林 泰司, 鈴江 敏彦, 曾山 桃子, 須藤 純一
(東日本学園大・薬・毒理)
- 406 ラットにおける合成リピドAとendotoxinの毒性比較
○相良 奈美, 西澤 理江, 柿畑 耕司, 古濱 和久, 高山 敏,
小野寺 威
(第一製薬・開発研)
- 407 ランタン及びビトリウムのラットにおける28日間反復経口投与毒性試験
について
○小川 幸男, 鈴木 幸子, 内藤 克司, 斉藤 実, 鎌田 栄一,
広瀬 明彦, 金子 豊蔵, 黒川 雄二
(国立衛試・安全研)
- 408 金属類の免疫毒性 化学特性とその毒性発現の特異性
○吉田 貴彦, 重田 定義
(東海大・医・衛生)
- 409 DMBAマウス皮膚発癌に及ぼす反復的な創傷の影響
○坂内 なるみ, 市村 彰敏, 下地 尚史, 原田 寧
(日本レダリー・生物研)
- 410 BPO-蛋白結合物の結合比が抗原性試験に及ぼす影響
○前田 泰宏, 黒川 光男, 今村 健二, 大内田 昭信
(大鵬薬品・安全研)

- 411 Piperonyl Butoxideのマウスの後世代に及ぼす影響
 ○田中 豊人, 大石 眞之, 高橋 省
 (東京都立衛研・毒性・薬理)
- 412 ビベロニルプトキシドのラットにおける亜急性毒性
 ○藤谷 知子¹⁾, 樺島 順一郎¹⁾, 高橋 省¹⁾, 大石 眞之¹⁾,
 米山 允子¹⁾, 中野 雅行²⁾
 (1)東京都立衛研・薬理, 2)千葉大・医・真核微生物研)
- 413 ラットの肝臓、腎臓、肺に対するPyrroleの影響
 ○鈴木 尋之, 塚本 久美子, 池田 祐三
 (花王・生物科学研)
- 414 ビーグル犬におけるparaquatの反復毒性試験: 病理学的所見と肺線維症誘発実験
 ○永田 貴久¹⁾, 政岡 俊夫¹⁾, 赤堀 文昭¹⁾, 永田 良一²⁾,
 河野 猪三郎²⁾
 (1)麻布大, 2)新日本科学)
- 415 ラットにおける尿中 β_2 -microglobulin酵素免疫測定法の確立と応用
 ○鈴木 雅実¹⁾, 小林 智子²⁾, 杉本 哲朗¹⁾, 鈴木 繁生¹⁾,
 蒲池 信一²⁾, 辻 紘一郎³⁾
 (1)中外製薬・安全研, 2)中外製薬・試験研,
 3)シー・エス・ケー実験動物研)
- 416 2,2'-メチレンビス(4-メチル-6-tert-ブチルフェノール)(MBMBP)の
 ラットにおける急性および亜慢性毒性試験
 ○高木 篤也, 佐井 君江, 門馬 純子, 会田 喜崇, 高田 幸一,
 内藤 克司, 中路 幸男, 黒川 雄二
 (国立衛試・毒性)
- 417 ラット骨髄検査でみられた週齢差と性差について
 ○小倉 剛¹⁾, 野口 規子¹⁾, 小倉 昌子¹⁾, 有賀 恭子¹⁾,
 田村 博志¹⁾, 松本 清司²⁾
 (1)中外製薬・安全研, 2)信州大・医)

座長 唐木 英明（東大・農・獣医薬理）
野村 彰（日本新薬・中検）

- 9:00 232 毒性試験における臨床検査の正常値1. 採材条件
○松澤 利明
(日本製薬工業協会・基礎研究部会, 山之内製薬・安全研)
- 9:12 233 毒性試験における臨床検査の正常値2. 血液学的検査
○野村 護
(日本製薬工業協会・基礎研究部会, 第一製薬・安全研)
- 9:24 234 毒性試験における臨床検査の正常値3. 血液化学的検査
○海野 隆
(日本製薬工業協会・基礎研究部会, 鐘紡・薬品安全研)
- 9:36 235 ラット、マーモセット、サル、ネコ、イヌ、およびヤギにおける
アセチルフェニルヒドラジンによる溶血性貧血の比較
○樽見 千利, 山下 和男, 永田 健一, 鈴木 和美, 寺西 宗広,
村松 敦子, 小柳 藤夫, 岡本 真理子, 木村 邦男, 増田 裕
(三共・安全研)
- 9:48 236 リコンビナント インターロイキン -2(IL-2)投与マウスの細胞表面マーカーを
用いた免疫毒性の評価
○井上 智彰, 堀井 郁夫
(日本ロシュ研・毒性・病理)
- 座長 林 祐造（国立衛試・安全研）
上野 芳夫（東京理大・薬・毒性）
- 10:00 237 臨床で薬剤誘発性ループスや過敏性を発現する薬剤のモルモットとマウスに
おける薬剤特異的な免疫応答
○勝谷 成男, 塩野谷 博
(エーザイ・安全研)
- 10:12 238 多臓器中期発癌試験法を用いての発癌物質および発癌修飾物質の低濃度複合効果
○福島 昭治¹⁾, 柴田 雅朗²⁾, 高田 信康¹⁾, 村井 隆¹⁾,
大年 辰幸¹⁾
(¹⁾大阪市大・医・第一病理, ²⁾名古屋市大・医・第一病理)
- 10:24 239 多臓器中期発癌試験法による非肝発癌物質の検索
○佐野 真士, 高場 克己, 岩崎 省吾, 萩原 昭裕, 白井 智之,
伊東 信行
(名市大・医・第一病理)

10:36 240 中期発癌性試験法による181化合物の発癌性の検索

○高橋 智, 星谷 達, 箱井 加津男, 柴田 雅朗, 河部 真弓,
長谷川 良平, 伊東 信行

(名市大・医・第一病理)

10:48 241 BHAおよびCatecholの各種臓器に対する発癌の促進および抑制効果

○玉野 静光, 浅川 恵美子, 小木曾 正, 田中 光, 広瀬 雅雄

(名市大・医・第一病理)

特別講演

平成3年7月25日(木) 11:05-12:10

第1会場

「エコ・バイオトキシコロジーと その予防トキシコロジーへの応用」

和田 攻 (東大・医・衛生)

座長 堀口 俊一 (大阪市大・医・環境衛生)

特別講演

エコ・バイオトキシコロジーとその予防トキシコロジーへの応用

和田 攻

東京大学医学部衛生学教室

1. トキシコロジーの内容

トキシコロジーの定義は、立場によって異なるが、その歴史、時代の背景および期待を考えると、①すべての科学的情報・技術を用いて（学際的）、有害因子（化学的因子のみならず物理的因子も含めて）による人の健康障害や環境破壊を防ぐ学問、②有害因子の有害作用の定量的研究とその応用が妥当と思われる。

古典的トキシコロジーは、人への化学因子の暴露と中毒に着目したが、生化学的手法の発展を取り入れたバイオトキシコロジー、機構トキシコロジー、分子トキシコロジーの確立、環境問題への関心の増大に伴うエコトキシコロジーの誕生、さらにはトキシコロジーの目的が健康障害の予防へと移行するにつれ、化学物質の環境中での発生から人の暴露吸収、体内での変化・移行、活性型因子の標的臓器への接触による影響の出現とその全ての過程に対する予防対策を対象とするエコ・バイオ・予防トキシコロジーの確立が望まれるようになった。

2. 予防トキシコロジーの変遷

①第Ⅰ期：1500年代のParacelsusの毒の概念の確立から端を発する近代トキシコロジーの流れは、まず食品の有害添加物・自然毒対策に重点が置かれ（1700～1850年）、やがて化学分析法の発展を取り入れ、食品衛生法規の制定（～1900年）、栄養不良と中毒の区別の確立に伴う動物実験トキシコロジーをその手法として取り入れ毒性試験法の基礎が確立された（1920～1950年）。

②第Ⅱ期：その後、産業の発展に伴う化学物質、薬品の増大、農薬の環境汚染や産業廃棄物汚染による公害病の発生は、化学物質に

対する安全性の追求、有害性評価の厳格化をもたらし、ゼロ志向、GLP、Delany条項などが組み込まれた（1950～1970年）。反面、分析化学の発達による自然界での発癌物質の検出や、生物学の発達による体内代謝、毒機構の解析などから、単なる科学的検知に対し定量的概念が導入された（1970～）。

③第Ⅲ期：手法としての疫学、動物実験と人への外挿、とくにバイオトキシコロジーの発展によるバイオマーカーの利用、ファルマコキネティックスの導入、数学モデルの導入などを応用して、予知のリスクアセスメントがトキシコロジーの中心課題となり（1976年～）、更にはゼロリスクから最小リスクを目指したリスクマネジメント手法の確立（1983年～）、最近では、過去の過剰防衛手法に対する反省から科学技術、トキシコロジーの発展に基づいた定量的リスクアセスメントや、動物を用いたトキシコロジーからの脱皮（動物代替法）も試みられ、新しいトキシコロジーの時代を迎えようとしている（1985年～）。とくにリスクアセスメントの過剰安全巾、手法による不一致などの是正が望まれる。

3. トキシコロジーの課題

トキシコロジーは、現社会において最も活躍が期待される学際的学問領域であるが、未開拓の部分が極めて多い。

①新しい関連科学の技術の導入と応用

②より良きリスクアセスメントの確立＝エコ・バイオ・予防トキシコロジーの発展：情報バンク・ネットワークの充実、外挿法の確立（とくに高用量から低用量、動物から人）、動物代替法の開発と実用化（特別委員会）。

③エコトキシコロジーの発展

④トキシコロジーの推進、専門性の確立：若い研究者の養成（総務・教育・集会委）、社会へのPR（集会委）、学会活動の充実（総務委）、ジャーナルの充実（編集委）、国際化（実行・準備委）、財政的裏付け（財務委）。

⑤トキシコロジー教育の充実

いずれの課題も日本毒科学会会員のご理解とご協力が不可欠である

シンポジウム

平成3年7月25日(木) 13:50-16:50

第1会場

「制癌剤の毒性」

座長 矢ヶ崎 修 (大阪府大・農・獣医薬理)

福島 昭治 (大阪市大・医・第1病理)

S-1 制癌剤のToxicokinetics 藤田 浩 (鶴見大・菌・細菌学)

S-2 制癌剤の一般毒性と免疫毒性 暮部 勝 (大阪府大・農・獣医・毒性学)

S-3 制癌剤の発癌性 高橋 道人 (国立衛試・病理)

S-4 制癌剤の発生毒性 田中 悟 (国立衛試・毒性)

S-5 制癌剤誘起性嘔吐 南 勝 (東日本学園大・薬・薬理) 他

S 司会の言葉

矢ヶ崎 修

大阪府立大学・農・獣医薬理

制癌剤はアルキル化薬、代謝拮抗薬、抗生物質、ホルモン剤および免疫抑制剤に大別されるが、ホルモン剤と免疫抑制剤を除き、核酸合成、蛋白合成、細胞分裂を抑制する薬物が多い。

正常細胞に比べて、悪性腫瘍細胞はその増殖速度が大きいという点に着目して薬効が期待されているので、通常正常細胞もある一定の割合で障害をうける。従ってこのことが悪性腫瘍の化学療法の限界となる。すなわち、risk-benefit balanceに立脚して使用されていて、その安全域は低く、副作用の出現は避け難い。正常細胞の中でも骨髄細胞、毛根、腸管上皮、生殖細胞は増殖能力が大きいので、抗悪性腫瘍薬によって影響を受けやすい。従って、その使用に際して起こる副作用はかなり共通している。ブレオマイシンによる肺繊維症、ダウノマイシンによる心臓毒性は、特殊といえる。ホルモン剤、免疫抑制剤は、骨髄機能傷害を示さず、それぞれ特異な毒性を示すが、これらはその作用機構から考えて当然といえる。

制癌剤の毒性の問題は、risk-benefit balanceの問題であるので、個々の薬剤の危険性を十分に予測し、危険性を最小限に止める使用法を行なうように留意しなければならない。この種の問題には十分な社会的同意が必要であるから、事前に十分な危険性の評価 risk-assessment が要求される。

本シンポジウムは、このような観点から、今までに得られた制癌剤の副作用に重点をおいて企画されたものであり、この企画が、今後の制癌剤の改善・開発に寄与する事を望みたい。

S-1 制癌剤の toxicokinetics

藤田 浩

鶴見大学歯学部細菌学教室

抗癌剤はほとんどが核酸の合成や障害を作用機序とするものである。癌細胞のみならず、骨髄や消化管上皮など増殖の盛んな正常組織に対して有害反応を示す。その他に、心、肺、腎、肝、神経系などに重大な特殊毒性を示すものが知られている。

抗癌剤が一定の投与量、投与方法で投与される場合、正常な肝、腎機能を持ったものとして、投与量が設定されている。

抗癌剤はそれぞれ一定の elimination route を有する。たとえば、ブレオマイシン、シスプラチン、メソトレキセート、ネオカルチノスタチンのような薬剤は投与量の過半数が尿へ排泄される。アンスラサイクリン系やビンカアルカロイドなどは胆汁から主に排泄される。マイトマイシンCや5-FUは肝における代謝によって不活性化解毒される。

肝あるいは腎の機能低下のある人にこれらの薬剤を full dosis 投与した場合、当然強い有害反応がくることを覚悟しなければならない。抗癌剤の生体内動態を熟知し、個々の患者の年齢、体表面積、体調、臓器機能に適合した投与を行うべきである。

本シンポジウムにおいて、以下の項目について、わが国で使用頻度の高い数種の抗癌剤の有害反応を説明し、その対策を論じる。

- 1) アンスラサイクリン系薬剤と心毒性
- 2) ブレオマイシン類と肺線維症
- 3) マイトマイシンCと骨髄毒性
- 4) シスプラチンと腎毒性

- 5) 弗化ピリミジン系薬剤と骨髄および消化管毒性
- a) 毒性発現機序
 - b) 薬物動態からの考察
 - c) 他抗癌剤や放射線の併用による影響
 - d) biochemical modulation による副作用の増強と軽減
 - e) 肝, 腎, 肺など臓器機能との関係
 - f) dose reduction
 - g) 投与方法の考案による毒性の軽減
 - h) ビタミン類, S H 化合物などの併用による毒性の中和
 - i) 新剤形の設計による毒性の軽減
 - j) 副作用の pattern の異なる新誘導体の開発

S - 2 制癌剤の一般毒性と免疫毒性

暮 部 勝

大阪府立大学・農・獣医・毒性

近年、多くの制癌剤が開発され、全ての制癌剤について述べることは時間的制約から困難である。従って、殺細胞作用があり、毒性が強いために重要な問題となっているアルキル化剤、代謝拮抗剤、植物性製剤、抗生物質製剤、金属錯体、酵素製剤の中から比較的繁用されている代表的な制癌剤に限定し、それらの一般毒性について述べる。腫瘍治療のために使用されるホルモン製剤と関連化合物についてはここでは省略する。副作用の少ない制癌剤は効果もないと言われるように全ての制癌剤にはdose-limiting factorとなる毒性が必ずあることから、最近、副作用を少なくして、効果を高めるために一定の臨床プロトコールで併用投与、間歇投与、短期大量投与や局所適用がよく行なわれる。各制癌剤について毒性の性質と機序を明かにすることは臨床治療および新規の制癌剤開発に有益である。一般に制癌剤はcell cycleの一定phaseでDNA、RNA、蛋白質に影響して、殺腫瘍細胞作用を発揮するため、cell cycleの活発な正常細胞にも有害作用を発揮する。例えば、骨髄およびその他の造血臓器（リンパ球減少、白血球減少、血小板減少、貧血）、消化器粘膜（悪心嘔吐、下痢、口内炎、胃腸障害）、毛包（脱毛）、生殖組織（排卵・精子形成の障害）、腎、肝、皮膚等に障害が通常発現しやすい。また、毒性が比較的早期に発現する制癌剤（cyclophosphamide, bleomycin, peplomycin, mitomycin C, adriamycin）と比較的遅延して発現する制癌剤（methotrexate, fluorouracil, tagafur, cytosine arabinoside, vincristine, vinblastine）とに大別される。1）アルキル化剤（nitrogen mustard, cyclophosphamide, ifosfamide, carboquone, thio-TEPA, BCNU, CCNU, methyl-CCNU, ACNU, MCNU, busulfan, melphalan, dacarbazine等）はDNAをアルキル化するために、cell cycleに特異性がないがS phaseに毒性を発現し、細胞分裂を阻害する。増殖組織は抵抗性が低く、非増殖組織は抵抗性が高いために、造血組織、上皮組織、生殖組織、毛包等に毒性が認められる。脂溶性が高く脳血液関門を通過するnitrogen mustardやnitroso-ureasは中枢神経毒性を発現する。Ifosfamideや cyclophosphamideは強い出

血性膀胱炎を惹起するが、これは活性体の膀胱粘膜への高分布から説明され、尿量確保やSH化合物 (disulfiram, 2-mercaptoethane) によって予防される。2) 代謝拮抗剤の中で葉酸類似体としてmethotrexate, ピリミジン類似体として fluorouracil, tagafur, cytosine arabinoside, プリン類似体としてmercaptopurin, thioguanine等が代表薬剤として挙げられる。これら薬剤は核酸合成系を阻害するため、同様に増殖の盛んな組織、即ち、造血組織、生殖組織、消化器、肝、腎等に毒性が発現しやすい。3) 植物性製剤は microtubuline形成を阻害し、有糸分裂を中期で停止させるvinca alkaloids とS-G₂ interphaseに作用するepipodophyllotoxinsとに大別される。前者のvincristineは骨髄毒性が弱く、dose-limiting factor は神経毒性でneuropathyや骨格筋異常を惹起し、vinblastineは神経毒性が弱く、dose-limiting factorは骨髄毒性である。後者の etoposideやteniposideでは骨髄毒性、悪心嘔吐、脱毛、神経毒性、心毒性等が認められる。4) 制癌抗生物質 (a) mitomycin は細胞内で還元されて活性化され、アルキル化剤と類似の毒性を発現する。(b) Bleomycinとpeplomycinは骨髄毒性や免疫抑制は非常に弱いが、肺繊維症が dose-limiting factorとなる。(c) Adriamycinと daunorubicinもアルキル化剤の臓器毒性と類似しているが、非可逆的なcardiomyopathyを惹起するのが欠点である。Adriamycinと比べてaclacinomycinやepirubicinは心毒性が弱く、pirarubicinは心毒性や脱毛が少ない。5) 金属錯体化合物の中で、制癌作用の強い cisplatin はDNAと cross linkするためにアルキル化剤と類似の毒性を発現するが、骨髄毒性が弱く、悪心嘔吐、腎毒性、聴覚器毒性が強い。Carboplatin ではそれら毒性が弱くなっている。6) 酵素製剤のL-asparaginaseは蛋白合成に利用するL-asparagineを枯渇させるために、clotting factor, 抗体、insulin, albumin等の合成を阻害し、それら欠乏の毒性症状を発現する。7) 制癌剤は顆粒球、T細胞、B細胞を減少させ、また、癌細胞に特異的に障害を与える Killer T細胞、マクロファージ、K細胞および非特異的に障害を与えるNK細胞、活性化顆粒球、活性化マクロファージに影響し、免疫毒性を示す。従って、Biologic-Response Modifiers としての免疫賦活剤や免疫産生物質と制癌剤がよく併用投与される。8) 制癌剤によるradicals産生と毒性との関係については最近、詳細に検討されている。Bleomycinの肺繊維症、adriamycinの心毒性、cisplatinの腎毒性はそれら組織への高濃度分布による核DNA結合時のradicals放出およびミトコンドリアやマイクロゾームでのradicals産生との関係が検討され、細胞毒性はDNA合成阻害のみでは説明不可能となってきた。毒性の臓器特異性とradicals産生能との関係について検討中である。

S-3 制癌剤の発癌性

高橋道人

国立衛生試験所 安全性生物試験研究センター 病理部

癌の化学療法は第二次世界大戦の末期に nitrogen mustard 及びその誘導体の制癌作用を利用して臨床的に用いられるようになったのが最初であり、癌の化学療法の歴史は比較的浅いものである。

癌の化学療法が始められてまもなく、制癌剤には癌を引き起こす作用のあることが判明した。1948年、英国の Haddow らは 4-aminostilbene が動物に腫瘍を引き起こすことを示し、「発癌作用を有する物質は同時に制癌作用を有し、その逆も真である。」と述べたが、以来、その言葉は Haddow の paradox として知られるようになった。そして20年程して、ヒトにおいても、chlornaphazine の治療を受けた患者に膀胱癌が発生することが明らかになり、効果的な制癌剤にはその治療により、別の腫瘍を発生させるという矛盾した事実が明白となった。

現在使用されている制癌剤を作用機序別に分類すると、アルキル化剤、抗生物質 (DNA結合剤)、代謝拮抗剤、細胞分裂阻害剤 (紡錘体阻害剤)、ホルモン剤、その他に分けられる。制癌剤の発癌性を評価する場合、動物実験及び疫学的情報を作用機序に基づいて解析する必要がある。

1. アルキル化剤

アルキル化剤はその作用機序から予想されるように、ほとんどの場合、動物及びヒトで発癌性が認められている。動物ではマウス、ラット及びサルにおいて発癌性が認められている。ヒトでは急性白血病及び膀胱癌の発生が認められている。

2. 抗生物質 (DNA 結合剤)

制癌剤として使用されている抗生物質には DNA と強く結合するものがあ

るので、アルキル化剤と同様に発癌性を有する可能性がある。現在のところ動物ではマウス及びラットで発癌性が認められているが、ヒトにおける発癌性は明らかでない。

3. 代謝拮抗剤

6-mercaptopurine (6-MP) はマウスでリンパ肉腫及び白血病の増加が認められているが、ヒトにおける発癌性は明らかでない。5-fluorouracil (5-FU) をはじめとする他の代謝拮抗剤の動物及びヒトでの発癌性は、現在のところ認められていない。しかし、腎移植時に免疫抑制剤として azathiopurine を長期使用した例ではリンパ腫の発生率が高いという疫学的報告がある。

4. 細胞分裂阻害剤

古くは colchicine , 現在では vinblastine , vincristine 等が臨床で使用されているが現在のところ発癌性は認められていない。しかし、これらは単独で使用されることが少ないため、単独の発癌性を疫学調査しにくいという事情も考慮すべきである。

5. ホルモン剤

動物ではマウス、ラット及びハムスターで発癌性が認められており、ヒトでは子宮頸部及び膣の明細胞癌が認められている。これらの薬剤の作用機序を考えれば直接作用する発癌物質というよりも、発癌補助あるいは発癌プロモーターとして作用していると考えられる。

6. その他

ほとんど発癌性に関する情報が得られていない。

癌原性試験はラット、マウスに最大耐量(MTD)を2年間(マウスは1年半)にわたって投与するのが原則である。しかし、多くの制癌剤は毒性の強い物質が多く MTD が低く設定されるために、発癌性が検出されない場合がある。我々は 6MP 及び 5-FU について癌原性試験を実施したが、ほぼ陰性の結果となった。一方、抗生物質の adriamycin では1回～数回の静脈内投与で、腎腫瘍の発生を認めた。制癌剤の発癌性を検出するためには、作用機序を考慮に入れた適切な試験を実施する必要がある。

S-4 制癌剤の発生毒性

田 中 悟

国立衛生試験所 安全性生物試験研究センター 毒性部

医薬品などが生体に対して有害な反応を引き起す場合、その能力は毒性と呼ばれるが、特に、生殖細胞の形成や胚・胎児の発生など、個体の発生、発達、成長の過程に対して有害な反応を引き起す能力を発生毒性と呼ぶ。具体的な発生毒性としては、生殖細胞形成の障害、胚・胎児の発生の障害、さらに出生後に認められる成長や諸機能の発達の障害などが挙げられる。

腫瘍細胞の分裂増殖を阻害し破壊する作用をもっている制癌剤は、いろいろな種類の動物において、発生毒性を示すことが知られている。制癌剤の主な発生毒性としては精子形成の障害と胎児発生の障害が挙げられる。精子形成が障害されると不妊になる。胎児の発生が障害されると胎児死亡、発育遅滞あるいは奇形が発現する。発生毒性として不妊や胎児死亡は重要であるが、ヒトでの影響を考えた場合、奇形発現は悲劇的であり、特に重要である。

制癌剤（癌化学療法剤）の発生毒性について、奇形発現を中心に概説する。

1) アルキル化薬

アルキル化作用を有する薬物群で、DNA合成を阻害し、細胞分裂を妨げ、細胞毒性を示す。ほとんどのアルキル化薬が実験動物に対していろいろな奇形を発現する。精子の形成を障害するものも多い。busulfan、chlorambucil、cyclophosphamide 及び nitrogen mustard は動物のみならず、ヒトにおいても奇形を発現することが報告されている。また、cyclophosphamide は雄ラットへの投与によって胎児に奇形を発現したり、また出生児の行動異常を誘発することが報告されている。

2) 代謝拮抗物質

天然に存在する代謝物質の形成または機能を阻害する薬物群で、核酸の

代謝阻害作用を有する。この薬物群も多くのもので、実験動物に対していろいろな奇形を発現する。また、aminopterin、azauridine、cytarabine、5-fluorouracil 及び methotrexate はヒトにおいても奇形を発現することが報告されている。

3) 抗生物質

制癌効果を有する抗生物質も、actinomycin D、mitomycin C など多くのもので実験動物に対して催奇形性を示す。しかし、ヒトにおける奇形発現の報告はないようである。

4) ホルモン

この薬物群は特異的な制癌剤ではなく、内分泌環境をかえることによって内分泌依存性の腫瘍を治療するものであり、他の化合物とは薬理作用の面で異なる。アンドロゼンなどの性ホルモン剤は実験動物及びヒトにおいて女児の男性化を誘発する。また、造精機能や生殖機能にも影響を及ぼす。副腎皮質ホルモン剤も実験動物に対して口蓋裂を中心とした奇形を発現するが、ヒトでは明らかでないようである。

5) その他

その他の癌化学療法剤についても、asparaginase、procarbazine、vinblastineなど多くのもので実験動物でいろいろな奇形を発現することが知られている。

制癌剤の多くは、なんらかの作用機序により、DNA、RNA あるいは蛋白の合成を抑制して、細胞の分裂増殖を阻害する働きをもっている。また、治療目的のためには、かなりの高用量が適用されることが多いと考えられる。したがって、制癌剤がヒトに対して生殖細胞の形成に始まる発生の過程において適用された場合、奇形発現などの発生毒性を示す危険性があると考えられる。

S-5 制癌剤誘起性嘔吐

南 勝、遠藤 泰、門間芳夫、城下恭輝

東日本学園大・薬学部・薬理

くはじめに>シスプラチン(CIS)やシクロホスファミド(CYCL)などの制癌剤は、激しい嘔吐を惹起する為に癌患者に拒絶されることが多い。制癌剤による嘔吐は癌化学療法に大きな制限を与えている。嘔吐のモデル動物であるフェレット(ferret)を用いて、種々の制癌剤による嘔吐を行動学的に観察し、組織のカテコールアミンならびにインドールアミンなどの生化学的検索を行った。制吐薬前処置による結果と比較検討した我々のこれまでの成績を中心に報告する。

<方法>フェレットは、Marshall社(NY)より輸入した体重1~1.5kgの雄性のものを用いた。制癌剤の毒性評価あるいは制吐薬の薬効評価を行うにあたって行動パラメーターを数値化して表わした。制吐薬の投与30分後に制癌剤を腹腔内投与しretching(空嘔吐)あるいはvomiting(嘔吐)の有無および頻度、嘔吐の持続時間ならびに嘔吐発現までの時間などを6時間にわたって記録した。制吐薬としては、ドパミン(DA)受容体拮抗薬であるドンペリドンおよびメトクロプラミドなどの既に市販されているものに加えて、新しく開発されたセロトニン(5-HT₃)受容体拮抗薬SN-307(GR38032F)およびN-3256、N-3388を使用した。制癌剤投与3時間後に胃および回腸を摘出し液体窒素にて冷凍し-80℃にて保存した。5-HTならびにカテコールアミン含量の分析にはHPLC-ECD法を用いた。

<結果>(1) CIS 5mg/kg(i.p.)ではフェレットは嘔吐を起こさなかったが、7mg/kgでは3例中2例に、10mg/kgでは全例に嘔吐が起こった。プラチナ誘導体であるシスプラチンのほか非プラチナ系制癌剤CYCLおよびUFT(テガフル・ウラシル)によってもフェレット

は嘔吐を惹起した。(2) CISおよびCYCLによる誘起性嘔吐を、SN-307は用量依存的に抑制した。ドンペリドン、メトクロプラミド、N-3256ならびにN-3388投与群も同様に、CISによるretchingならびにvomitingを抑制した。(3) CIS投与群の回腸5-HT含量は対照群に比しおよそ2倍に上昇したが、DA含量には差異がみられなかった。制吐薬投与群の5-HT含量はCIS単独投与群との間に有意な差異を示さなかった。(4) 末梢作用によって嘔吐を惹起することが知られている硫酸銅を経口投与した場合にも、消化管の5-HT含量が上昇していた。硫酸銅による嘔吐もSN-307によって抑制された。(5) フェレットの胃に分布する迷走神経を切断し、数日を経た後にCISを投与したが嘔吐は完全には抑制されなかった。

<考察ならびに結論>

制癌剤は、両刃の剣のように、抗悪性腫瘍作用の強いものほど嘔吐を惹起する。制癌剤の毒性評価と制吐薬の薬効評価に、嘔吐のモデル動物フェレットが有用であることが示された。嘔吐の発現には、消化管内の5-HT含量などが上昇し迷走神経の求心性線維を経て嘔吐中枢を興奮させる場合と、中枢性あるいは体液性にCTZの興奮を介して嘔吐中枢を刺激する場合とがある。制癌剤の種類によって誘起性嘔吐がより中枢性か末梢性かと異なる。投与2時間後に嘔吐を発現するCISにしても、20分後に嘔吐を起こすCYCLにしても、5-HT₃拮抗薬のSN-307やN-3388の有効血中濃度の範囲にある時、フェレットは嘔吐を惹起しなかった。制吐薬としては従来のD₂拮抗薬のほか5-HT₃拮抗薬が有効であることが示された。

特別委員会ワークショップ

平成3年7月24日(水) 9:00-11:30

第1会場

「組織培養法を応用した臓器毒性の 新しい評価法の現状と将来」

座長 佐藤 温重 (東京医歯大・歯)

佐藤 哲男 (千葉大・薬・薬物)

- SW-1 心臓毒性：アドリアマイシン誘発培養心筋細胞障害の成因とその制御
五島 喜與太 (神戸学院大・人文・生物) 他
- SW-2 血管内皮細胞毒性 室田 誠逸 (東京医歯大・歯顎口腔機能)
- SW-3 肝臓毒性 大野 泰雄 (国立衛試・薬理) 他
- SW-4 肺毒性 須加原 一博 (熊本大・医・麻酔)
- 追加発言
球状凝集細胞塊 (スフェロイド) 竹澤 俊明 (グレース日本・中研)

SW 司会の言葉

佐藤 温重、佐藤 哲男*

東京医科歯科大学歯学部、*千葉大学薬学部

動物実験に対する社会状況の変化や科学技術の進展を踏まえて、ヒトにおける毒性予知あるいは毒性発現機序解明により妥当性のある試験法を開発することが急務である。この問題の解決をめざし、本学会では平成2年度に「毒性試験法開発に関する特別委員会」を設置した。本委員会はこの分野の研究の方向づけと具体的研究組織の整備を当面の課題としており、その推進のため、今後継続的にシンポジウム等を開催することとしている。その一環である今回のワークショップでは、組織培養法を応用した次世代の簡易毒性試験として臓器の特性を有するいわゆる機能細胞の培養系を用い、特異的毒性指標による臓器毒の評価を目標として、心筋、血管内皮細胞、肝細胞、肺上皮を中心にこの萌芽的領域の現況と将来を展望する。さらに、機能細胞の培養は分化機能の誘導をいかにするかである。最近、肝細胞の培養に関して2つの高分子材料が合成され、高分化肝細胞の培養を著しく進展させている。肝細胞膜表面のアシアロ糖タンパク質リセプターと相互作用するPVL A吸着シャーレによる肝機能高発現培養法(Akaike, J., ら1989)や温度感受性コポリマーを用いた肝細胞の三次元構築(スフェロイド)培養法がそれである。追加討論ではスフェロイド培養の毒性評価法への応用について展望する。

SW-1 心臓毒性：アドリアマイシン誘発 培養心筋細胞障害の成因とその制御

五島 喜與太、岡本正志*、紀氏健雄*

神戸学院大学人文学部生物学、*同 薬学部生化学

心筋細胞は心臓の実質を構成し、拍動つまり収縮と弛緩の繰り返しを営む本体である。脊椎動物では横紋筋に属するが、骨格筋が多核細胞であるのに対して、心筋は単核細胞の集合体である。生体内心臓は神経、結合組織や血管などとの複雑な相互作用のもとで機能しており、心筋細胞も生体内では何層にも重層した状態にあって、しかも細胞間隙が多い。したがって、生体の心臓や摘出心筋組織を用いた実験系では、灌流液の個々の細胞への拡散時間に差が生じ、薬物などの毒性や作用機序の解析を複雑にすることがしばしば見受けられる。これに対して、培養心筋細胞は直接培養液と接しているため、薬物の心筋への作用を直接的にしかも容易に観察することができる。さらに培養系では、単一心筋細胞の反応のみならず、それらが接触して細胞間にギャップ結合が形成された心筋細胞シートを用いると、心筋細胞間の相互作用を観察することができる。このように培養系は、薬物の心筋細胞への毒性や作用を調べるには優れた実験系であるといえる。ここでは、はじめに培養心筋細胞の持つ基礎的性質について述べ、つぎに制癌剤のひとつであるアドリアマイシン(ADM)によって誘発される心筋細胞障害の成因について、培養系を用いた私共の最近の知見を紹介する。

1) 培養心筋細胞の基礎的性質

マウス胎児やウズラ胚などの幼若な発生段階にある心臓の心房や心室から、酵素処理により分離した単一心筋細胞をシャーレにまくと、心筋細胞はおよそ12時間後にはシャーレ底に接着し、伸展し拍動を始める¹⁾。しかし、用いた心臓の発生段階や調製部位によっ

て、自動拍動を示す単一心筋細胞の割合、拍動数の分布や薬物に対する反応性も異なってくる²⁾。また、単一心筋細胞の拍動数は1分間あたり10-250回と個々の細胞により著しく異なるのに対して、単一心筋細胞が接触して細胞シートを形成すると、シート内の各々の細胞の拍動はすべてが同期化し、1分間あたり100-180回と単一心筋細胞の拍動数の分布とは異なってくる³⁾。また、培養心筋細胞から得られる活動電位は、心室から調製した細胞のものでさえ、成体心臓の自動能を有する部位(洞結節)の細胞から得られた活動電位と類似した形を有し、ペース・メーカー電位を持っている⁴⁾。

2) ADM誘発心筋細胞障害の成因とその特徴

ADMは臨床上有益な制癌剤であるが、投与量が一定限度を越すと、心電図変化や頻脈など可逆的、致命的な心筋障害を誘発することが知られている。ADMの心臓への毒性作用は、心筋培養系においても再現することができる³⁾。

マウス培養心筋細胞シートに35 μ M ADMを添加すると、およそ10時間後には心筋細胞の拍動数の低下と共に拍動異常が誘発され、その後細胞シート内の個々の細胞は非同期拍動と同期拍動を繰り返すようになる。また、ADMによって誘発された細胞シートの不整拍動時の $[Ca^{2+}]_i$ は、正常時に比べて弛緩期 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が認められる。さらに、非同期拍動している細胞シートに、細胞内 Ca^{2+} キレーターとしてQuin 2-AM (0.5 μ M)を添加すると細胞シートの非同期拍動は再び同期して拍動するようになるが、 Ca^{2+} キレート力の弱いFluo 3-AMの添加では改善されない。現在のところADMによる心筋細胞の非同期拍動は、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇に伴うギャップ結合微小孔の閉鎖により生じるものと考えている。

[文献] 1) K. Goshima, J. Mol. Cell. Cardiol., 8, 217 (1976)
2) 五島喜與太, 蛋白質核酸酵素, 23, 1283 (1978) 3) 岡本正志他, 蛋白質核酸酵素, 35, 1657 (1990) 4) 五島喜與太, 生体の科学, 29, 180 (1978)

SW-2 血管内皮細胞毒性

室 田 誠 逸

東京医科歯科大学・歯学部・顎口腔機能研究部門

血管内皮細胞が障害されると、その局所では抗血栓症が失われるので、血小板や白血球の粘着・凝集が進行する。血小板や白血球は凝集すると、実に様々な物質を細胞外へ放出する。血小板膜リン脂質からはアラキドン酸の遊離が起こる。アラキドン酸は血小板内でトロンボキサン A_2 や、12-H P E T E、12-H E T Eへ代謝され、血小板外へ放出される。一方、白血球は、活性化されて凝集するとさまざまな加水分解酵素、活性酸素、5-H P E T E、5-H E T E、15-H P E T E、15-H E T Eおよび種々のロイコトリエンなどが作られ細胞外へ放出される。これらの物質は、内皮下組織に作用し、内膜肥厚をはじめいろいろな悪影響をもたらす。このように血管内皮細胞障害は、動脈硬化をはじめとする種々血管病変の初期病変として注目されている。したがって血管内皮細胞がいかなる物質によって障害を被るか、またそれはいかなる機序によるものであるのか、さらには、血管内皮細胞の障害を防ぐには、いかなる手段を構わずればよいのかなどについて研究を行うことはきわめて重要であると思われる。そこで我々は、*in vitro*における血管内皮細胞の障害実験系をまず確立した。この実験系で観察を行うとアラキドン酸のリボキシゲナーゼ代謝物15-H P E T Eおよび12-H P E T Eに強力な血管内皮細胞障害活性が見つかった。 $3 \times 10^{-5} M$ の15-H P E T Eは約60%の血管内皮細胞に障害をもたらし、1時間後、細胞死にいたらしめた。これに対し、M C I - 186は、 $10^{-5} M$ でこの15-H P E T Eによる血管内皮細胞障害を、完全に阻止することができた。つぎに15-H P E T Eの血管内皮細胞障害のメカニズムにつ

いて検討した。放射能標識15-H P E T Eを用いて調べると、15-H P E T Eはアラキドン酸の場合と同様に細胞膜のリン脂質画分へ取り込まれることがわかった。そして細胞膜中で・OHラジカルを放出して15-H E T Eへ代謝されることも判明した。それに伴って細胞膜中の過酸化脂質量も増大した。これは、活性酸素である・OHラジカルが細胞膜中に存在する脂質をラジカル化し細胞膜脂質の連鎖的な過酸化反応を進行させたためと思われる。鉄イオンのキレート剤DesferrioxamineやラジカルスカベンジャーMK-447、抗酸化剤BHT等は15-H P E T Eによる細胞膜の過酸化反応を止めるとともに、15-H P E T Eによる血管内皮細胞障害を阻止した。ついで細胞内に実在する物質で、細胞障害を予防するものについて検討した結果、グルタチオンが内因性の細胞障害予防因子であることがわかった。グルタチオンは前処理するだけでも細胞障害を予防することが出来た。グルタチオン枯渇薬であるBSOやDEMを添加した場合には15-H P E T Eによる細胞障害が強く促進された。ついでグルタチオン濃度を逆に上げるような物質を加えた場合について検討した。OTCはグルタチオンの前駆体であるシステインのさらに前駆体にあたる物質で、これを加えると細胞内のグルタチオン濃度が上がる。OTCを加えて細胞内グルタチオン濃度が上がると細胞障害はより完全に予防されることがわかった。エブセレンという物質はグルタチオンペルオキシダーゼ類似の作用をもった薬物であるが、やはり細胞障害を予防する活性が強いことがわかった。このように細胞内に存在するグルタチオンあるいはそれとカップルして過酸化脂質を消去できるグルタチオンペルオキシダーゼが細胞の障害を予防する内因性のものであることがわかった。ついで活性化白血球の血管内皮細胞障害活性を検討した、白血球は各種ケミカルメディエータによって活性化され活性酸素を産出・放出する。この活性酸素の産生量と血管内皮細胞障害活性との間には強い相関関係が認められた。これらの活性酸素を強力に消去する薬物に血管内皮細胞障害予防効果のあることも判明した。

SW-3 肝臓毒性

大野 泰雄、広田 晃一、郭 新彪

国立衛生試験所・薬理部

薬物や化学物質は様々な機構で、多くの場合臓器特異的な毒性を、母化合物あるいは代謝物による引き起こす。一方、肝臓は代謝を通じて薬物を生体から排泄するために中心的な働きを持つ器官であるとともに、生体における主要な薬物代謝活性化の部位であることから、肝臓自身が化学物質の毒性発現の重要な標的となるとともに反応性の高い代謝中間体を血中に供給することにより他の臓器における毒性発現に影響している可能性もある。従って、肝における薬物の代謝に関する情報を得ることは薬物の肝臓毒性を理解する上で必要であるだけでなく、他の臓器を標的とする薬物の場合にも重要である。この点で実験が比較的容易であり、代謝物の測定も容易な *in vitro* の実験系は便利である。*in vitro* 試験系には灌流肝臓標本から細胞下分画まで、様々な標本が存在するが、ここでは薬物の代謝と細胞毒性を同時に検討でき、比較的長期の実験が可能な初代培養肝細胞標本を用いた試験法について述べる。

一般的な肝細胞の初代培養法においてはラット肝臓からコラーゲナーゼ灌流法を用いて無菌的に遊離肝細胞を調製し、コラーゲンを被覆した培養皿上に播き、牛胎児血清を添加した培養液中で培養する。ラットの場合は約1週間の培養が可能である。通常の条件下では肝細胞は培養皿上に接着、伸展するが、細胞分裂は認められない。臓器より遊離させた直後の細胞では細胞膜に異常が生じており、ホルモン応答能等が低下しているが、これらは初代培養により回復してくる。また、数日にも及ぶ実験が可能であることから他の *in vitro* 試験系では不可能である化学物質による酵素誘導や、長期的

な代謝調節、また、薬物による慢性的効果の検討が可能である。

一方、初代培養肝細胞を毒性や代謝の研究に応用する当たりの最大の問題はチトクロームP-450 関連の酵素活性が急速に低下するとともに、薬物代謝活性の特異性も変化してしまうことにある。例えば、パラセタモールの代謝的な活性化は培養の経過とともに低下する。一方、パラセタモールの抱合は硫酸抱合が若干低下するが、グルクロン酸抱合は増加すると報告されている。

薬物代謝活性の誘導能に関する研究では芳香族炭化水素による誘導は比較的強く認められ、*in vivo* と質的かつ量的に対応した結果が得られる。しかし、フェノバルビタールによる*in vivo* と類似した誘導は起こり難く、芳香族炭化水素と同様の誘導パターンを示してしまうことが多い。*in vivo* でフェノバルビタール型の誘導を示すとされているメチラポンも*in vitro*ではMC型の誘導を示す。培養液中へNicotinamideを添加したり、Matrigelという特殊なゲル上で培養することによりフェノバルビタールにより*in vivo* と類似した誘導パターンを得ることができるとは、定量的な対応はまだ検討されていない。なお、肝細胞の調製法は培養法を工夫することにより分化した機能を長く維持できるとの報告もある。

化学物質の毒性を*in vitro*で検討する場合には上のような薬物の代謝活性化や解毒過程の変動の可能性について考慮しておく必要があるが、薬物の吸収・分布・排泄といった過程が*in vitro*系には存在しないことも結果の解釈の上で忘れてはならない。

なお、肝細胞毒性を評価する際の指標として、細胞内GSH 含量の低下、LDH やGOT 等の細胞内酵素の遊離、酸素消費量や細胞内ATP 含量やMTT の還元、アルブミン合成、また、DNA 合成やDNA フラグメンテーション等があるが、細胞間コミュニケーションに対する影響が発癌プロモーション過程や癌奇形性に関係する新しい指標として測定されており、これについても若干の考察を加える。

SW-4 肺毒性

須加原 一博

熊本大学医学部麻酔科

肺は、主要臓器の中で大気と直接接触しその影響を第一に受けるだけでなく、循環血液全体と接する解剖学および生理学的に特異な位置にあり、ガス交換のみならず非呼吸性機能として多くの生理機能を営んでいる。大気汚染など気相面からの重大な影響を第一に受けるのは、肺胞上皮細胞であり、本来早期に大気汚染物質などそれ自体により、あるいは各種炎症細胞を介して肺胞上皮細胞の障害が起こるはずである。しかし、臨床症状がでるまでには長い歳月を必要とし、進行している場合が多い。大気汚染などによる人体への影響を早期発見し予防する上からも、感受性の高い *in vitro* の検査法の開発が望まれている。肺胞Ⅱ型上皮細胞は、1) 肺表面活性物質の合成分泌、2) 肺障害時に増殖し、肺胞Ⅰ型上皮細胞に分化すること、3) 肺胞被覆層の水、電解質の調節など正常肺構築の維持に重要な機能を有している。演者らは、これまでの研究によりラット肺やヒト切除肺より肺胞Ⅱ型上皮細胞を分離培養し、形態学的、生化学的および電気生理学的特性を明らかにすると共に、フィルター上に培養された肺胞上皮細胞層が形態学的あるいは薬理的に *in vivo* の肺胞上皮に類似していること、さらに急性肺障害では細胞自体の障害よりも早期に細胞間結合部に障害を起こすこと即ち肺胞上皮細胞透過性を亢進することを証明している。本研究では、ラット肺およびヒト肺より分離・培養した肺胞Ⅱ型上皮細胞を用いて、各種薬剤、高濃度酸素や種々の大気汚染物質（炎症細胞との相互作用

を含む) による、1)分離培養した肺胞Ⅱ型上皮細胞の形態学的、免疫組織化学的变化、2)分離培養した肺胞Ⅱ型上皮細胞の肺表面活性物質産生分泌および細胞増殖能の変化、3)肺胞上皮細胞の透過性の変化などから、Ⅰ. 各種障害物質の影響の有無、影響する最小濃度(及び許容濃度)の推定、Ⅱ. 各種 anti-oxidant の予防効果およびⅢ. 呼吸器障害発生因子の検索を行おうとするものである。さらに、in situ hybridization 法などの最近の分子生物学的手法による検索も紹介する。

方法・結果および考案: ラット肺やヒト切除肺からエラスターゼと濃度勾配遠心法により肺胞Ⅱ型上皮細胞を分離・培養する。ラット当たり $10\sim 20 \times 10^6$ 個の、ヒト切除肺では肺重量1g 当たり $1\sim 2 \times 10^6$ 個の肺胞Ⅱ型上皮細胞が得られ、タンニン酸固定により求めた細胞のpurityはそれぞれ80~95%と70%前後であった。両者には形態学的、免疫組織化学的に少し違いがみられたが、機能的にはあまり差がみられなかった。分離細胞をコラーゲン膜上に培養1~2週間後、このコラーゲン膜をUssing chamberにセットし電気生理学的パラメーターを測定すると、肺胞腔側が負の電位差(PD)、抵抗(R)、短絡電流(SCC)を有し、形態学的にも、薬理的にもin vivo の肺胞上皮細胞に類似していた。たばこの煙や各種炎症細胞の肺胞上皮細胞透過性への影響を調べた。Tobacco smoke をUssing chamber内にbubblingすると、細胞活性を示すSCC やPDが低下し、バッファー液に肺胞マクロファージを加えると低下が促進された。tobacco smoke 自体による肺胞上皮細胞障害だけでなく、肺胞マクロファージを刺激することで障害が増強することが示された。ニコチン、アクロレイン、窒素酸化物やantioxidant(SOD、カタラーゼなど)や α_1 -アンチトリプシンなどの影響も検索した。さらに、高濃度酸素投与による肺表面活性物質アポ蛋白遺伝子の過剰発現などについても報告し、肺毒性評価法の将来を展望してみたい。

追加発言 球状凝集細胞塊（スフェロイド）

竹 澤 俊 明

グレース日本中央研究所

1. ホモスフェロイド（ヒト真皮由来線維芽細胞のスフェロイド）

細胞培養の場合、細胞の回収法として従来はトリプシン・EDTAを用いているが、この方法では細胞-細胞間の結合を切断するなどいくつかの欠点がある。これを改良する目的で、温度感受性ポリマーであるポリNイソプロピルアクリルアミドをI型コラーゲンと共に培養基質として用いた結果、多くの利点が見出された¹⁾。このポリマーは培養温度37°Cでは溶解せず、約25°Cで溶解する、いわゆる下限臨界共溶温度（LCST）が約30°Cのポリマーである。本法では、従来 of 回収法とは異なり、化学物質が直接細胞に作用することなく、温度変化のみで基質を溶解し、細胞-基質間結合を切断する。したがって、この様な基質上でコンフルエントまで培養した細胞は、細胞-細胞間結合を維持しており、一枚のシートとして回収できる。直径15mmの培養皿（24ウェル培養プレート）より得たこの細胞シートをさらに疎水性培養皿で培養すると、細胞シートは培養皿に接着することなく、剥離後約12時間目までに剥離直後の約45%の大きさにまで著しく収縮し、剥離後2日目までに直径約0.7mmのスフェロイドを形成することが分かった。また、スフェロイドのグルコース消費量・乳酸産生量・ATP含量は、単層培養細胞のそれらの約1/4~1/8であった。さらに、スフェロイド形態形成に対するシクロヘキシミド、及びアクチノマイシンDの影響を検討した結果、両物質とも細胞シートとして剥離後約12時間以内に起こる初期収縮には殆ど影響を示さなかったが、その後の完全なスフェロイド形態形成を阻害した。

2. ヘテロスフェロイド

上述の基質上でコンフルエントまで培養したヒト真皮由来線維芽細胞の上に、ラット初代肝実質細胞を播種して肝細胞を線維芽細胞に接着させた後、温度を低下させて重層細胞シートを回収した。さらにこの細胞シートを疎水性培養皿で培養することで、ラット初代肝実質細胞とヒト真皮由来線維芽細胞より成るヘテロスフェロイドの形成に成功した。さらに、パラフィン切片のHE染色により、ヘテロスフェロイドの外周部は扁平な線維芽細胞で覆われており、内部は両細胞の存在が確認された。抗ラットアルブミン抗体染色により、21日間培養したヘテロスフェロイド内部の肝細胞でもアルブミンの合成能が保持されていることが確認された。さらに、TEM観察より、肝細胞間にはデスモソーム及び毛細胆管様構造が、また、肝細胞-線維芽細胞間にはディッセ氏腔様間隙が認められた。

3. 本法の毒性評価法への応用の可能性

増殖期と考えられる二次元単層培養細胞と休止期と考えられる三次元構築体であるスフェロイドの可逆的遷移状態を提供する当培養系は、生体の発生、分化、若しくは病態変化と類似性があると考えられるため、今後、毒性評価法への応用が期待できる。さらに、今までの医薬品の開発段階や毒性評価には、主に実験動物やヒトの培養細胞が使用されてきたが、この場合、動物からヒトへの、若しくは、培養細胞からヒト個体への外挿という困難な問題が常につきまとっている。これを解決する目的で、今後、オルガノイド（器官類似構造）モデルと考えられる間充織細胞と上皮（又は内皮）系細胞のヘテロスフェロイドを使用することにより毒性評価法への新たな展開が考えられる。

1) T. Takezawa et al. *Bio/Technology* 8, 854-856, 1990.

ワークショップ 1

平成3年7月24日(水) 13:00-15:00

第1会場

「吸入曝露：粉塵・エアロゾル曝露の制御技術」

座長 池田 正之 (京大・医・公衆衛生)
児玉 泰 (産業医大・衛生)

- W1-1 エアロゾルの濃度管理 野崎 亘右 (中災防バイオセンター)
- W1-2 粒径の選択と制御 津田 修治 (動物繁殖研究所)
- W1-3 二成分系連続式流動層ダスト発生装置を用いた各種エアロゾルの
吸入曝露実験 田中 勇武 (産業医大・労働衛生工学)
- W1-4 農業の安全性と吸入毒性試験 川崎 一 (住化・生物環境科学研) 他

W1 司会の言葉

池田正之、児玉 泰*

京都大学・医・公衛、*産業医科大学・衛生

大気汚染に伴う浮遊粒子状物質やエアロゾルの吸入、農薬散布時における粉塵の吸入、あるいは鉱山や窯業に代表される粉塵職場での粉塵曝露など、粉塵やエアロゾルが経気道的に侵入して生じる健康障害には多くの実例がある。粉塵・エアロゾルは呼吸に伴って人体内に摂取される有害物質の物性としてガス・蒸気とならんで重要な形態である。

動物実験において粉塵・エアロゾルを吸入させようとする場合、ガス・蒸気の場合と同様に当然その濃度が問題となるが、今一つ大きな問題となるのは粒径である。*respirable*あるいは“吸入性”という用語の存在が示すように空気力学的粒径が一定以上の大きさである場合には肺胞に達し難くなることが知られている。またある種の粉塵は発生後時間が経つにつれて相互に付着し合い、結果的に大きな粒径の粒子に成長して行くことも知られている。

本ワークショップでは吸入毒性実験における技術として“一定以下の粒径”の粉塵・エアロゾルを“所定の濃度”で、動物実験に必要な“長期間”、如何にして発生させるか、その最新の手法を4人の演者より教示を受けるとともに、相互討論により一層の改善を目指したい。

W1-1 エアロゾルの濃度管理

野 崎 亘 右

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

化学物質を実験動物に吸入させて生体影響を調べるためには、その物質の所要量を含んだ空間を作り、その中に実験動物を置くか又は頭だけ入れて吸入させるのが、通常の方法である。具体的には多種類の方法に派生している。これらは呼吸器系からの投与によって得られた結果を、活用する目的に応じて方法が選択される。

即ち（１）呼吸器による局所毒性

（２）吸入による全身毒性

（３）安全性確保のための基準値の検討

（４）疾患モデル、即ち呼吸器系疾患の実験的再現

（５）経気道的薬物投与の研究

（６）呼吸器、特に肺の生理学的、解剖学的な研究

などであると思われる。これらは現在、医学、労働環境などの大気環境衛生、薬物中毒学そして医療など、各種の学問分野で応用されている。

ここでは吸入試験がエアロゾルを対象としておこなわれるときの技術について述べる。

エアロゾルは次のように分類される。① ダスト ② ヒューム ③ ミスト ④ 霧 ⑤ 煙 ⑥ 灰 などである。

これらは吸入チャンバーを用いて吸入試験にもってゆくために、エアロゾルの濃度の空間分布、濃度の時間的推移、更に吸入性粒子（respirable particles）の確保とその検証等が必要である。

吸入試験への技術は被験物質の素材の物性に応じて使用する方法や装置が選択される。一連の技術の中で、吸入試験を遂行するため

の基本的な流れは →原材料の調製 →発生（エアロゾル化） →濃度調節 →供給 の順序になるが、場合によっては発生源若しくは発生装置の現場そのものを吸入試験室に持ち込んで試験することもあり、多くの技術的制約を抱えたなかでの暴露試験もあり得る。

ここに、吸入対象となるエアロゾルの物性とその起源および対象になる物質名などについて下記する。

ダスト： 鉱物や重金属等を破碎した粉体粒子。木材等の植物性粉じん、医・農薬等の顆粒剤、アスベスト、グラスウール等繊維性工業材料またはスパイクタイヤ等によって削り取られた舗装道路の汚染粉じんなど総てダストの範疇であり、吸入試験にもってゆくためにはとくに試料の調製（preparation）が重要である。

ヒューム： 各種鉱物・重金属など、常温で固体の物質が融解して発生した高温の蒸気が冷えて、夥しい固体の微粒子に変化したものである。溶鉱炉あるいは溶接現場でのヒュームは代表的なエアロゾルである。吸入試験では、ヒュームの発生炉の使用が必須であり、これを除けばダストの技術と内容的に類似している。

ミスト： 液体を力学的に破碎して生じた液滴を総称する。メッキ工場での硫酸ミストや器物の塗装現場での溶剤ミストは代表的である。通常はバブラーやアトマイザー、ネブライザーなどによってミストを作るが、エアゾールと呼称した夥しい商品は殆んどがミストの簡易発生器である。例えばスプレー化粧品、殺虫剤、園芸用等各種農薬、日曜大工のエアゾール塗料など。これらはミストの分散を促進するためにフロンガスを封入したり、基剤を高圧で封入したポンベにしたりする。日常生活での利用が多い。吸入試験の際での濃度調節や粒径の検証は方法はあるが、ルーチン作業としては仲々難しいものである。今後の技術的進展が待たれる。

霧・煙・灰： これらが単体で吸入被験物質の対象になることはまれで殆んど混合物として扱われる。例えばタバコ煙なども多くの夾雑物で構成されている。以上のことがらについて、吸入暴露のための濃度調節など、僅かな経験を挿入して話題提起したい。

W1-2 粒径の選択と制御

津田 修治

動物繁殖研究所

ミストやダスト等のエアロゾルの吸入毒性試験においてどのような粒径を用いるべきかを定めるためには、粒径の吸入毒性に及ぼす影響を把握しその機序を解析する必要がある。

このために、ミストの粒径の選択曝露が可能な吸入試験装置を開発した。それは円筒形の鼻部曝露型チャンバーで、ミストを下方から上方へ向かって発生曝露し、その発生部位と動物の間に慣性衝突型の粒径分離装置を備えている。また、チャンバー内にもう一つの同心円状の内箱があり、チャンバーの気積が狭められ、使用薬物の消費量が最少限に抑えられている。

これを用い、2種の有機リン剤CVPとフェンチオンを、肺実質内に到達可能な $1\mu\text{m}$ (MMAD)以下の小粒子ミストと、そこまで到達せずにおも鼻咽頭部に沈着する $6\sim 8\mu\text{m}$ の大粒子ミストに分けてラットに吸入曝露し、急性毒性、薬物血中濃度、コリンエステラーゼ活性などを測定し、この結果を主として薬物動態学的に解析した。LC50を基準とした吸入毒性は、いずれの場合にも大粒子の方が明らかに強かった(3~5倍)。CVPはP=O型の有機リン剤で、親化合物そのものがコリンエステラーゼ活性を阻害して毒性を発現するが、フェンチオンはP=S型の有機リン剤であり、体内で代謝されてコリンエステラーゼ阻害活性を発現する。このCVP大粒子は、小粒子に比較して総沈着率が高いために、より大量に呼吸器内に沈着する。CVPの沈着部位から体循環への吸収率を示す生物学的利用率は、鼻咽頭部沈着後と肺実質であり差がないために、大粒子曝露によってCVPはより多く体循環に吸収され、血中のCVP濃度が高くなり、脳内のコリンエステラーゼがより強く抑制されることが明らかになり、これがCVP大粒子の強い毒性発現の一因と考えられた。フェンチオンの場合も、大粒子の

呼吸器内総沈着率は小粒子よりも高く、コリンエステラーゼの抑制も強かった。しかしながら、フェンチオンの鼻咽頭部位への沈着後の生物学的利用率は、肺実質に比較して約10分の1と極めて低く、血中フェンチオン濃度は、小粒子暴露時よりも低かった。したがって、フェンチオンの大粒子は鼻咽頭部位に沈着後、体循環に入る前により選択的に代謝活性化されて強い毒性を発現するが、小粒子の場合はあまり代謝を受けずに、より直接的に肺から体循環に吸収されるものと考えられた。さらに、BPMCやプロパホスを用いて、粒径の選択暴露による吸入毒性の差を検討したところ、いずれも大粒子の毒性の方が強かった。しかしながら、上記の結果からもしCVPのように親化合物が活性物質であり、フェンチオンのように大粒子の吸入後の生物学的利用率が低くて、体循環への吸収量が少ないものがあれば、その化合物の大粒子の全身毒性は弱いことも予想された。

このように、エアロゾル粒子の粒径の吸入毒性に及ぼす影響は、その粒子の呼吸器内での沈着部位と沈着量、その部位に沈着してからの薬物の吸収・代謝、薬物代謝と解毒・活性化の関係、および呼吸器内の局所障害の性質と程度によって変化する。しかしながら吸入毒性試験はこれらの情報なしで行なわなければならないことがほとんどであり、その時には、3～5 μ m程度の粒径のエアロゾルを用いて吸入毒性試験を行なうのが合理的と考えられる。すなわち、粒径と呼吸器内沈着率の関係からこの粒径のエアロゾルにより上部気道から肺実質までの総合的な毒性が、一般に最も感度よく検出されるものと思われる。

W1-3 二成分系連続式流動層ダスト発生装置を用いた各種エアロゾルの吸入曝露実験

田中勇武

産業医科大学 産業生態科学研究所 労働衛生工学教室

はじめに： 最近、新素材ということで機能性をもった付加価値の高い材料の開発が急激に増加しようとしている。これらの材料は、機能性を持たせるために高純度、超微粒、極細となる傾向にあり、工学的、技術的に有用であることはもちろん重要であるが、それと同時にこれら微粒子に接する人々への健康影響、特に微粒子という性格から吸入曝露による健康影響も考慮して開発する必要がある。特に、慢性影響について不明であれば、曝露時にはその影響が無いからといって、将来アスベストなどと同じ歴史を繰り返す恐れがある。このため、新しく開発されようとしている化学物質の有用性ととも有害性をあらかじめ予測しておく必要があると考えられる。

有害性の予測： 未知のあるいは新しいエアロゾルのヒトへの吸入による健康影響を予測するために、動物を用いて実験的に調べる方法がある。この結果をヒトに外挿するとき重要な因子として、ヒトと実験動物との沈着とクリアランスの異同についての検討がある。まず環境中の濃度、粒子の大きさ、曝露時間などの見掛け上の曝露量とこれら吸入された粒子がヒトや動物の呼吸器管内にどれだけ吸入され、そのうち何パーセントが呼吸器管内に留まり、どこの位置にどれくらい長く滞留するか、さらにどういう機構で排泄されるか、すなわち、真の曝露量との関係について検討しておくことが必須事項である。次に、この真の曝露量に対して、量影響関係、量反応関係を詳しく調べる必要がある。これらの定量的研究からエアロゾルの有害性を予測することができるようになる。

エアロゾルの吸入毒性試験： 生体影響を考える上での基本は、

その有害因子、ここではエアロゾルを生体内へ取り込むところから始まる。通常生体への侵入経路については経口、経皮、経気道と3つある。エアロゾルについては、物理的特性から経気道的侵入による生体影響が最も重要となる。このためその有害性の有無を検証するために吸入毒性試験が必要になるが、現在の毒性試験の投与形式は経口投与や、注入投与が多く、吸入毒性試験は非常に遅れている。特にガスや蒸気と比較してエアロゾルの遅れがめだっている。この最大の理由は、吸入曝露試験に必要な長期に安定して一定濃度を発生させるエアロゾル発生装置の開発が遅れたことにある。筆者らは二成分系連続式流動層ダスト発生装置を開発し、長期間安定して一定濃度の吸入性粉体を発生させている。

吸入曝露実験結果： 二成分系連続式流動層ダスト発生装置を用いて、すでに石炭燃焼時に発生するフライアッシュ、ニッケル精錬工程で発生すると予測されるニッケル金属、酸化ニッケル、硫化ニッケルなど化学形態の異なるニッケル化合物、農薬製造や散布時に吸入されると予測される粉剤農薬、アスベストの代替品として広く利用されてきたガラス繊維、セラミックファイバーおよびタバコ副流煙、さらに木粉とタバコ煙の複合吸入などの急性、亜急性、慢性の吸入毒性について検討してきた。

おわりに： 健康影響について調査が必要なエアロゾルの数に比較して、吸入曝露実験はその設備や実験期間の長さなどの制約から、調べられているエアロゾルの数は非常に少ない状況である。今後は新素材として種々の粒子の開発、生産の増大が見込まれるが、それらの生体影響については不明であるものが多く、開発と併行してこれらについて明確にしておくことは重要である。すでにエアロゾルの吸入毒性試験を実施して、安全性について検討している企業もある。我々もエアロゾルによる健康障害防止の立場から、積極的に協力して行こうと考えている。

W1-4 農薬の安全性と吸入毒性試験

川崎 一、川口 忍

住友化学 生物環境科学研究所

緒言：吸入毒性試験は農薬原体の安全性評価に関する重要な情報を与えると同時に製剤化による農薬の安全面における性能向上の評価にも欠かせない研究手法のひとつである。このような農薬の開発研究、特に安全性評価に必須な吸入毒性試験の実際について紹介したい。

農薬の製剤化と毒性：有用な農薬として備えるべき機能は、①低毒性、②高選択性、③易分解性、④低残留性である。また、⑤環境汚染低減のために低施用量で有効な高活性であることも重要な要素である。効力が強く、かつ安全性の高い農薬原体の創製は、農薬開発の基本であるが、さらに安全性を高めるための製剤化努力も積極的に行われている。農薬の製剤化とは、高い有効性を充分に発揮させるための散布技術であるとともに農薬原体の持つ種々の欠点（主として、薬害、刺激性、一般毒性、魚毒性など）をカバーして、実用場面での問題を少なくする技術でもある。製剤化による毒性の軽減に関する最近のトピックスは、マイクロカプセル製剤の開発であり、これにより効力面での機能化と同時に安全性をより高めることが可能となった。

農薬の登録申請に必須な吸入毒性試験：国内登録では農薬取締法に基づき、主として散布者安全の立場から、原体についてはラットを用いた吸入急性毒性試験および13週間の吸入投与による亜急性毒性試験が必要とされる。吸入方法は、ほとんど全身曝露方式による。製剤に対してはラットを用いた吸入急性毒性試験が実施されるが、防疫薬に分類される場合は、この他にラットにおける1カ月の

吸入亜急性毒性試験が実施される。なお、海外登録に関してはそれぞれ規制が異なり、米国EPAのFIFRA（殺虫剤、殺菌剤、殺鼠剤法）、TSCA（有害物質規制法）やOECDなどのガイドラインでは毒性試験のひとつとして長期吸入毒性試験を課す場合がある。なお、吸入毒性試験方法は投与方式が違う他は経口投与などによる他の毒性試験と変わる所はないが、最近では気道、肺に対する影響を評価する目的でこれらの器官・組織について詳細な病理組織学検査を実施する場合がある。

吸入毒性試験実施上の問題点：農業に特徴的な問題点としては、①乳剤は高濃度曝露が可能であるが、用いる有機溶剤によっては爆発の危険性があり、到達気中濃度に制約がある、②溶剤の毒性が強くなるため実使用場面との差が大きくなる、③懸濁製剤（フロアブル剤）は実使用場面での安全性は高いが、実験的に高濃度の気中濃度を維持するのは困難である、④製剤用副資材単体の毒性データが少なく、また、農業原体と副資材との混合による毒性学的な相互作用についての基礎研究が遅れている、などがある。

農業の吸入毒性試験法の課題と展望：吸入投与と経口投与で毒性発現に差のある事が知られており、呼吸器経路による体内吸収の解析は毒性研究における新しい研究分野である。また、小動物による毒性データから人へのリスクアセスメントをするにあたり、ラットなど小動物と人における化合物の吸入特性の差が重要であるが、未知の部分が多い。従って、今後は吸入特性を解析するに必須な情報をもたらすトキシコ・キネティックスの導入、特に新しいトレーサー技術の開発が期待されている。

ワークショップ 3

平成3年7月24日(水) 15:10-17:10

第1会場

「毒性評価のための多面的アプローチ」

座長 谷村 孝 (近畿大・医・解剖)

戸部 満寿夫 (日本公定書協会)

W3-1 毒性データベースと毒性予測 中館 正弘 (国立衛試)

W3-2 動物代替の立場から見た毒性試験

渡辺 正己 (横浜市大・医)

W3-3 近年提唱されている生殖・発生毒性の新しい試験法の基盤

川島 邦夫 (国立衛試)

W3-4 Toxicokineticsの毒性評価への応用

野口 英世 (藤沢薬品)

W3 司会の言葉

谷村 孝、戸部 満寿夫*

近畿大学医解剖、*日本公定書協会

化学物質のヒトにおける毒性（安全性）を評価するためには、多面的あるいは多角的に検討する必要があると考えられる。毒性の評価は、定まった王道があるわけではなく、その化学物質の薬理学的特性やヒトとの関わり方に応じて、色々の方面から色々の方法で、解析的であつまた総合的な検討が必要となろう。

一般には、化学構造と薬理活性や毒性との相関など非生物学的アプローチを第一関門とし、哺乳類由来の *in vitro*系や非哺乳動物を用いる関門、哺乳類を用いる *in vivo*系の関門、そして、ヒトにおける症例や疫学調査などによる最終のチェックがありうる。また、*pharmacokinetics*に関するデータによる定量的な評価、更には作用機序の検討が重要である。

本ワークショップでは、試験法そのものの開発よりも、試験成績を評価するために応用しうる各種の方法や技術について、学際的なアプローチを考えた。即ち、毒性データベースからの予測、動物代替からみた評価のあり方、最も評価が困難であるとされる生殖・発生毒性について新しい試験法の基盤、さらに *toxicokinetics*の毒性評価への応用等について、それぞれの専門の立場から解説を頂き、どのように統合したアプローチがとりうるか、またとるべきかについて、討議したいと考えている。

W3-1 毒性データベースと毒性予測

中 館 正 弘

国立衛生試験所安全性生物試験研究センター総合評価研究室

近年、毒性予測に関する関心が高まりつつある。毒性予測の必要性の認識が高まっている理由としては、次の事柄が考えられる。

- 1) 新規に新しい物質を設計し、開発する際に、早い段階で毒性プロファイルを知ることの必要性
- 2) 既存化学物質で安全性が確認されていないものについての試験の優先順位設定の必要性
- 3) 亜急性毒性試験の結果から慢性毒性を予測することの必要性
- 4) *in vitro*試験の結果から*in vivo*試験の結果を予測することの必要性
- 5) 特定の化合物群に関しての毒性発現機構解明の必要性
- 6) 現在の毒性試験において得られた種々の項目（一般症状、血液生化学的検査、臓器重量、病理組織学的検査等）に関する相関性の予測の必要性

7) 動物を用いた毒性実験の結果からのヒトへの毒性予測の必要性
これらの予測を行うための手段としては、主に定性的、定量的構造活性相関や統計学的手法を駆使することとなる。薬効の面からの構造設計には、メカニズムが明らかな場合が多いため定量的構造活性相関を用いるのが一般的であるが、毒性予測のための構造活性相

関は、毒性発現のメカニズムが特定出来なかつたり、不明な場合が多いため非常に限定された化合物群以外では定量的構造活性相関は利用できない場合が多い。従って、毒性予測手法の開発には、過去の経験（データ）を最大限に利用することが必要となり、過去に行われた毒性データをコンピュータを用いてデータベース化して利用することが必要となる。現在、国際的に見ても種々の毒性に関するファクトデータベースが開発されつつあるが、実際に利用可能なものは限られている。また、利用可能なものでも各々の設計思想が異なっているため、そのデータ内容やデータの信頼性も異なっている。しかしながら、限られたデータであっても信頼性のあるデータベースを利用することにより、上記の毒性予測手法を開発することは可能と思われる。毒性の専門家は、各々の経験から種々の相関に関する知識を持っている。しかしながら、これらの知識は個々の専門家が独自に持っているもので全部の知識を統合することが出来ない。コンピュータ技術が進歩し、さらに最近は人工知能の技術も利用可能になりつつあり、個々の専門家が持っている知識、文献やデータベースから得られる知識を、知識ベース化することによる毒性予測手法の開発研究は、今後種々の面からの展開が期待される。

筆者らは、データ数は限られているものの毒性（変異原性、催奇形性、発癌性等）のファクトデータベースを構築し、これを利用して変異原性を予測するための知識ベースシステムを開発した。現在さらに他の毒性試験（催奇形性等）への適用を検討中であり、本ワークショップでは、毒性評価への一つのアプローチとして、この毒性予測システムの概略及び国際的な毒性データベースと毒性予測に関連する研究状況を紹介したい。

W3-2 動物代替の立場から見た毒性試験

渡辺正己

横浜市立大学医学部ラジオアイソトープ研究センター

毒性試験の目標は、安全性評価に利用できる化学物質についての毒性学的データをつくること、すなわち個々の化学物質についての毒性の輪郭をあきらかにすることにある。生体で毒性が発現する場合、通常その作用は複雑であり、その全容を知る事は難しい。生体内へ入った化学物質は、吸収され、代謝活性化され、標的組織にたどり着き、様々な様式でそれを障害する。障害を受けた組織では、諸々の生化学的反応を介して、ある細胞では損傷修復機構が働き、ある細胞では細胞死が起こる。この両方向の反応が絡み合って組織全体としての反応が決定され、様々な組織の反応が影響しあって個体としての運命が決定される。安全性評価は、こうした複雑な一連の反応を漏らすことなく掬い取ることが要求され、この意味では、丸ごとの動物実験は広い範囲の見張り役としてうってつけであった。

しかし、最近、丸ごとの動物の使用にはいくつかの重大な問題があることが認識されるようになった。第1に、生きた動物を、とくに毒性試験に使うことは、動物愛護との関連で人々にある種の感情を引き起こすことである。欧米諸国では、この運動の一部が“生命科学否定”といった過激な方向に発展し重大な問題となりつつあると伝えられる。幸いなことに我国には、まだ科学的基盤のうえでこの問題に取り組む余地が残されており我々が果たさねばならない役割は大きい。第2に、丸ごとの動物実験は、毒性評価に必要な完全なデータを作るために時間と経費がかかりすぎることである。日本では、年間850万匹を越える動物が毒性試験に使われ莫大な費用を使っている。こうした経済的理由から大部分の化学物質が完全な安全性評価を受けている可能性は少ないと予想される。

しかし、動物実験代替研究の最も重要なポイントは、こうした動物愛護

とか経費削減などの問題とは別に、動物実験それ自身がすでにくつきの矛盾をもつことにある。その第1は、結果の再現性の問題である。生体は個体差が大きく動物の飼育環境や飼料など様々の要因で反応はかなり多様化し、試験機関間の結果に統一性が見られない場合が多い。通常、実験動物は純系飼育されており遺伝的素質は同一であり安全性試験の結果はあまりばらつかないと想定されているが、実際はかなりバラツキを生ずる。純系の実験動物でさえこのありさまであるから、かなり不均一な集団であるヒト集団にあてはめると反応はもっと複雑で多様化するに違いない。そして、最後のもっとも重大な問題は、“動物実験がヒトのモデルになり得るか？”という疑問である。この動物実験データのヒトへの外挿問題は、生物学者が長年抱き続けている問題である。最近の生物学における技術進歩は、生物メカニズムが種の差を超えて普遍的な一面を持つ反面、分化した機能を中心に種による差が歴然と存在することを明らかにしている。我々の研究では、マスの細胞は試験管内で容易にがん化させることができるが、ヒト細胞はまったくがん化させることはできない。発がん剤処理による遺伝子の損傷や修復動態、あるいは突然変異の誘導動態などは両者でまったく差がないので、両者の発がんメカニズムに根本的な違いがあると推測している。この事実は、マスで発がん実験を行いヒトに演繹することの科学的意味を幾分希薄にしてしまったのではないだろうか。

このように、オーソドоксиと思われていた丸ごと動物を使った安全性試験に重大な不確定要素が潜んでいることが指摘されるようになった今、様々な見地から動物実験を見直し、科学的に再構築する時期にさしかかっていると見えよう。動物実験代替研究は、動物愛護運動に端を発して始まったが、本来の意味は、新しい生命科学研究体系を発展させるための技術開発であり、その技術を基礎研究のみならず応用研究に広げる一連の研究活動であるといえよう。

【参考資料】

渡辺正己(1991)In vitroの手法を用いた動物実験、畜産の研究、45、83-87.

W3-3 近年提唱されている生殖・発生毒性の新しい試験法の基盤

川島 邦夫

国立衛生試験所 安全性生物試験研究センター 薬理部

ヒトの生涯は受精→子宮内生活→出生→生後発育→成熟→老化→死という過程をたどる。この間に、生殖細胞（精子、卵子）形成→排卵（黄体形成）→受精→着床（妊娠）→分娩→保育という生殖事象を繰り返す。この複雑な生殖事象に対する毒性を検索するため、種々の方式の試験法指針が提示されている。

その試験のありかたは、被験物質の用途によって二つの方式に大別される。一つは、医薬品に対する試験法で、ヒトにある程度限られた期間、生物活性を期待して比較的大量が意図的に適用されるため、生殖・発生の各過程ごとに綿密な検索を必要とする。従って生殖・発生過程を3区分して妊娠前および妊娠初期投与試験、胎児の期間形成期投与試験、周産期および授乳期投与試験の3種類の試験が実施されている。これらの試験の指標としては生殖細胞の形成、性周期、交尾行動、排卵（黄体形成）、受精、着床（妊娠）、妊娠初期の胚子発生、妊娠後期の胎児発育、胚・胎児死亡、発育遅延、奇形発生、分娩、授乳、出生児の成長・発達に対する遅発的影響などがある。

もう一つは、非意図的に比較的小量が長期間にわたって連続的に摂取または暴露される可能性が極めて大きい食品添加物、農薬、環境を汚染する恐れのある化学物質などを対照にした試験法指針である。これらの物質については、親も児も何世代にもわたって同じ物質に暴露されることを考慮して、複数世代にわたって被験物質を連日投与する、いわゆる多世代生殖毒性試験が実施されている。これらの試験の指標としては医薬品と同様のものが挙げられている。さらに、器官形成期投与における障害の検索が多世代生殖毒性試験では出来難いため、催奇形性試験を別に実施し、妊娠後期の胎児発生、胚・胎児死亡、発育遅延、奇形発生などに関する検索が行われている。

現在ヒトの生活環境中に存在する多種類の化学物質の毒性については評価されているものが少なく、これらを従来 of 試験法指針に従って試験を実施す

ることは、多くの日数と経費が必要であり、容易ではない。このような現状から、OECDは1990年に毒性に関する情報が殆ど認められない高生産量の既存の一般化学物質について、通常の毒性試験を実施するための優先順位を決めることを目的としたラットを用いるCombined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening test guideline (ReproTox)を公表した。ReproToxは、化学物質を雌雄親ラットに交配前14日間、交配期間(14日間)、妊娠期間中(22日間)および哺育3日まで投与し、哺育4日目(試験期間41~54日間)に雌雄親ラットおよび哺育児の剖検を行い、反復投与毒性と生殖発生毒性を同一の試験においてスクリーニングしようとする試験法である。この試験法では生殖・発生指標のうち性周期、交尾行動、排卵、受精、着床、妊娠初期の胚子発生、胚・胎児死亡、発育遅延、奇形発現、分娩、授乳などに対する影響は検出し得るが、生殖細胞の形成(精子)に対する影響、出産児の成長・発達および生殖能に対する影響は検出できない。

一方、米国では「国家毒性調査計画(National Toxicology Programme: NTP)」により化学物質の安全性点検とリスクアセスメントが進められている。この目的を遂行するため、生殖・発生毒性試験においてマウスを用いる試験法(Reproductive Assessment by Continuous Breeding: RACB)が開発・実施されている。

RACBは化学物質を雌雄親マウス(F0)に交配前7日間、同居期間(98日間)および同居期間終了後21日間(妊娠期間を含む)投与し、同居期間中に成立した妊娠毎にF0の交尾能、受胎能および出産児(F1)の形態異常を検索するとともに、同居期間の最後に成立した妊娠についてはF1を哺育させ、F0にはF1の離乳時まで投与を行い、F1には離乳時から成熟時(74±10日)の交配期間、妊娠期間を通して分娩時まで投与を続け、化学物質が生殖毒性を示すかどうかを検索する試験法である。この試験では生殖細胞の形成、性周期、交尾行動、排卵(黄体形成)、受精、着床(妊娠)、妊娠初期の胚子発生、妊娠後期の胎児発生、胚・胎児死亡、発育遅延、分娩、授乳、出生児の成長(離乳時まで)などの指標に対する影響が検出できる。奇形発生の検出は可能である。しかし、この試験法では出産児の成長(離乳後)・発達に対する影響は検出できない。このRACBは研究者の選択度が多いことが特徴であると言われている。

本ワークショップでは、生殖・発生毒性における様々な指標の検出の可否について、新しく提案、実施されつつあるReproToxおよびRACBを従来の生殖・発生毒性試験法と比較して述べる。

W3-4 Toxicokinetics の毒性評価への応用

野口英世

藤沢薬品工業（株） 安全性研究所

新薬開発における毒性試験の目的は、被験薬の毒性学的プロフィールを明らかにし、毒性発現の閾値や無影響量を求めることによって、ヒトに適用した際の安全性を予測することにある。毒性試験は確実中毒量と無影響量を含む数用量で行うが、異常な高用量の投与でもさしたる毒性が現れなかったり、毒性の強さが用量比例的でないことはよく経験する。一般に薬物は投与部位から循環血流に乗って作用部位に到達して作用を発現する。従って、被験薬や被験動物に何らかの理由があって、薬物が作用部位に到達していない場合には期待どおりの作用が現れない。そこで、毒性試験の中での薬物動態を解明し、薬物による体負荷を正確に知り、作用部位での濃度と毒作用の関係を明らかにする必要がある。

Pharmacokineticsは生体内での薬物の量的、質的な変化の速度過程を追及する学問であると定義されているので、toxicokineticsは毒性発現量での毒物の量的、質的な変化の速度過程の研究と考える事が出来る。さらに、毒性試験では薬物の毒作用や試験期間中の加齢やストレスなどによって薬物動態が変化していることがあり、薬物代謝の種差・性差などと共に毒性試験に特有の問題を解明することもtoxicokineticsの研究目的となる。

ここでは毒性試験への薬物動態の知識の導入について考察することとし、毒性試験結果のヒトへの外挿、毒性発現の化学的機序解明、分子毒性学における薬物と生体の相互作用などについては除外した。

1. 毒性試験で用いる投与剤型の決定

① 被験薬の物理化学的特性

- ② 投与剤型の特性
- 2. 試験系の選択
 - ① 動物種を選択
 - i. 吸収率とbioavailability
 - ii. 薬物動態の非線形性
 - ② 被験動物での基礎データ
 - i. 被験動物毎（雌雄別）に各投与量の C_{max} , T_{max} , AUC , $t_{1/2}$, CL_{10} などを求める
 - ii. 毒性試験中の予測血漿中薬物濃度を計算する
 - iii. 定量分析法は動物毎に精度，正確さ，再現性を確認する
- 3. 前臨床段階での毒性試験と初期臨床試験用量の推定
 - ① 反復投与試験中の血漿中濃度測定
 - i. 初日，中間日，最終日に経時的に測定する（予測値との比較，酵素誘導）
 - ii. 24h 値を頻回測定する（蓄積性）
 - iii. C_{max} 付近のモニター（コンプライアンス）
 - ② 妊娠による V_d の変化，蛋白結合の変化，胎盤通過性と胎児への移行性，乳汁中への分泌などを評価しておく
 - ③ 無影響量と毒性発現量の血漿中濃度をシミュレーションする
- 4. ヒトと動物の比較薬物動態が解明された段階での toxicokinetics
 - ① モニターする必要がある代謝物の決定と測定すべき試料を決める
 - ② 長期毒性試験では加齢による薬物動態の変化を考慮する
 - ③ 代替投与経路の選択
 - ④ 毒性試験とヒト試験の pharmacokinetics を比較して，動物での毒性試験がヒトでの安全性をどの程度カバーしているかを考察する

ワークショップ 2

平成3年7月25日(木) 9:00-11:00

第1会場

「化学物質の毒性と活性酸素」

座長 高 島 英 伍 (摂南大・薬・毒性)

井 村 伸 正 (北里大・薬)

W2-1 活性酸素研究の現状と展望 大 柳 善 彦 (藤沢薬品・開発研究所)

W2-2 農薬の作用機構と活性酸素 松 中 昭 一 (関西大・工・生物工学)

W2-3 活性酸素による障害とメタロチオネイン

井 村 伸 正 (北里大・薬) 他

W2-4 蛍光プローブを用いた四塩化炭素肝障害の発生における

フリーラジカルの解析

加 藤 眞 三 (慶応大・医・内科) 他

W2 司会の言葉

高 島 英 伍

摂南大学薬学部

ヒトをはじめとする多くの生物は、酸素なしに生きることはできず、酸素を極めて有効に利用する機構を備えている。その一方、反応性の低い基底状態の酸素を活性化させて酸化反応や酸素添加反応として利用することは、遊離の活性酸素によってさまざまな障害が起きる可能性のあることを意味している。活性酸素の生成抑制と除去が、生物にとって必須の機能であり、その機能が十分でなかったり、活性酸素の生成を増加するような環境条件では、種々の障害や疾患が生じる。生物の進化のなかで、酸素障害を防御できる機能を獲得した生物こそ酸素を利用できる能力を獲得したとさえ考えられている。毒科学の面からみても、化学物質には生体内で活性酸素を生成して、その毒性を現わすものが少なくない。

本ワークショップでは、活性酸素を毒科学の立場から概観することとした。まず、活性酸素研究の現状の解説とともにひろい立場から今後の展望をして頂く。ついで、活性酸素生成が毒性原因となる代表的な物質としてパラコートなどの農薬の毒作用機構、重金属との結合性が高くフリーラジカル除去作用をもつと考えられている生体内物質であるメタロチオネインの作用と癌治療への応用、さらに毒性にラジカルが関与する代表的毒物の一つ四塩化炭素による肝障害解析のための蛍光プローブの応用、と3テーマについて発表して頂く。

その後、フロアをまじえて討論を進め、毒科学における活性酸素の意義を勉強したいと考えている。

W2-1 活性酸素研究の現状と展望

大 柳 善 彦

藤沢薬品・開発研・薬理2

活性酸素の傷害作用

活性酸素とはsuperoxide radical (O_2^-), H_2O_2 , hydroxyl radical ($\cdot OH$), hypochlorite (OCl^-), singlet oxygen (1O_2)及びこれらと不飽和脂肪酸 ($LOOH$)より生ずる $LOO\cdot$, $LO\cdot$ などである。ミトコンドリア及びミクロソームの電子伝達系よりの1電子逸脱により、またアラキドン酸代謝系よりも生ずるが、生体傷害に関係の深いのは活性化された好中球、マクロファージよりのものと、虚血-再灌流時にキサンチン、オキシデース (XOD) 系より生ずる活性酸素である。細菌、抗原-抗体複合体、lymphokineとの接触で白血球などはその表面のNAD(P)H oxidaseが活性化され、多量の O_2 などを出す。これは細菌を殺す防御機序であるが、それが過剰となると炎症をもたらす事を演者は1976年に報告した。炎症はアレルギー、自己免疫疾患、各臓器の壊死を招く。また農薬、医薬品の副作用にも活性酸素や他のfree radicalは関与する。心臓、脳などでの虚血と再灌流時の傷害は主にXODよりの活性酸素によるらしい。虚血はあらゆる手術時の問題となるし、移植片の生着は免疫拒絶反応のみによるものでなく、虚血の面からの配慮が今後重要となろう。

活性酸素に対する防御機構

酸素の中で生きている限り、酸素毒に我々は曝されている。 O_2^- を除去する酵素superoxide dismutase (SOD)が1969年に発見され、第一義的な防御の役目をしている。SODで生成する H_2O_2 はさらにcatalaseかglutathione peroxidaseで無毒化される。SODは炎症を抑え、虚

血一再灌流傷害をも防止するが、血中寿命が非常に短いため薬剤としては修飾SODやliposome-SODが検討されている。SODがどの動物より得たものか、投与の経路やタイミングも重要である。食物中より主に補給されるビタミンC、E、フラボノイドやグルタチオン、尿酸、ビリルビンなども活性酸素処理に働いており、 H_2O_2 と O_2^- より、最も危険な $\cdot OH$ が生ずる時には鉄や銅イオンが傷害を上げるので、そのキレーターであるdesferoxamineやXODの阻害剤のallopurinolも多くの実験系で防御的に働く。

メディエーターとしての活性酸素

ごく最近、少量の局所で生ずる活性酸素が細胞の分化、増殖を支配するとの報告が多く出てきている。内皮依在性血管弛緩因子(EDRF)がNOであり、 O_2^- で素早く消失するとの発見は大きなテーマを提供した。すでにインスリンの二次メッセンジャーが H_2O_2 であるとか、GABA受容体の基質への結合能が活性酸素で変化するともされている。免疫グロブリンの産生能は低酸素分圧下では5倍も上昇するとの結果は、これまでの21%酸素下での全ての細胞による免疫実験の結果は低酸素分圧にある生体での反応に何ら役立つものではない事を意味する。活性酸素の知見に基づいた薬理、毒性、免疫学等の再検討も望まれるのが現状である。

W2-2 農薬の作用機構と活性酸素

松 中 昭 一

関西大学工学部 生物工学科

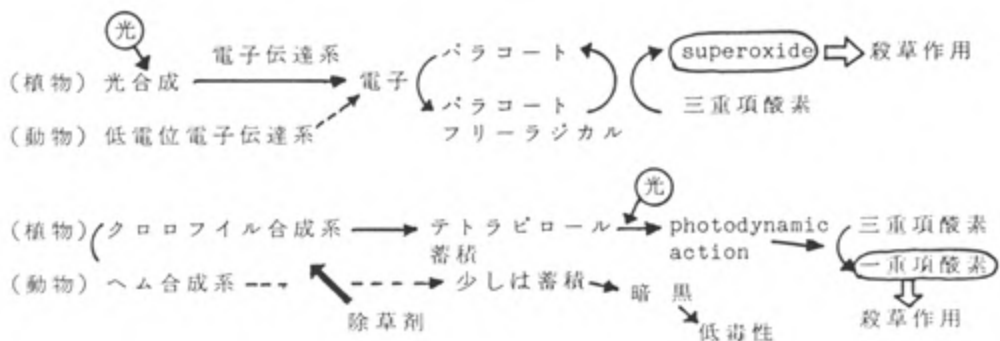
農薬のなかでも、除草剤は、高等植物である雑草を標的としており、植物は酸素環境に囲まれ、色素を多く含み、かつ太陽光線を体内にとりこむため、活性酸素発生に好都合であるので、活性酸素発生促進をその作用機構とする除草剤の実例をあげることができる。

その実際に利用されている除草剤の2つのグループについて、それぞれの作用機構を概観すると次のようになる。

(1) 光合成電子伝達系による除草剤パラコート等からの superoxide の生成

パラコートは、大型の雑草に茎葉処理して、短期間にこれらを枯殺する有用な除草剤であるが、その普及にともなって悪用・誤用の度合が増加して問題視され、現在では、その剤型を改良して使用されている。その成分は、生化学において酸化還元電位の低いところで酸化還元指示薬として使用されるメチルピオローゲンである。

植物は、その光合成の電子伝達系において、光の照射を受けると色素系の電子を活性化し、酸化還元電位の低いところへ追い上げ、これに続く電子伝達系で光合成に必要なエネルギー ATP を生成するが、さらにもう一度光のエネルギーを受取って電子を活性化し、これは還元力である NADPH の生成に貢献する。ここにパラコートが存在すると、パラコート自身は電子を受取ってそのフリーラジカルとなり、これは



普通の酸素(三重項酸素)によって酸化され、もとのパラコート分子にもどるが、同時にこの酸素は一電子還元されて superoxide となる。この活性酸素が細胞に作用して殺草作用を発揮する。動物においても、酸化還元電位の低いところではパラコートに電子をわたすことができるので、暗所においても、ゆっくりではあるが強い毒性を発揮するので、上述のような社会問題を生じたと考えられる。

(2) ジフェニルエーテル系除草剤および関連化合物による一重項酸素の生成

CNP 等のジフェニルエーテル系除草剤及び oxadiazon 等のヘテロ環化合物は、光が無いと殺草作用を発揮せず、類似した殺草症状を呈し、かつ動物に対して低毒性というグループを構成している。その作用は、クロロフィル・ヘム等の生合成の過程での protoporphyrinogen IX oxidase を強力に阻害しテトラピロール類(主に protoporphyrin IX) を蓄積して、その photodynamic action による一重項酸素の生成と考えられている。この場合、動物においても多少のテトラピロール類の蓄積はみられるが、その代謝および光の不足によって低毒性を示すものと考えられる。

W2-3 活性酸素による障害とメタロチオネイン

井村伸正、佐藤雅彦、永沼章

北里大学薬学部

低分子量金属結合たん白質として知られるメタロチオネイン (MT) は微生物から哺乳動物まで広範囲の生物種に分布し、重金属をはじめ多くの要因によってその生合成が誘導されるところから何等かの重要な生理活性を担う生体内物質と目されて来た。然しながら、これが生体内で実際に果たしている役割は未だ解明されていない。哺乳類のMTは約60個の構成アミノ酸のうち約20個がシステインでSH基に富むところから、重金属との結合生が強く、Zn、Cu等必須金属の恒常性維持、或は外界から侵入する有害性重金属の毒性発現の抑制等に関わることが推定されているが、最近、アルキル化剤との反応性が高いこと、さらに、フリーラジカル除去作用を有する^{1,2)}ことなど、興味深い性質が報告されるようになった。MTのフリーラジカルとの反応性については否定的な知見も報告されており³⁾、十分に確認された性質とは断定し得ない。そこで我々は、毒性学的な見地からMTのフリーラジカル除去作用について検討し、さらに、その医療への利用の可能性を探ってみた。

フリーラジカルを生成する薬毒物の毒性軽減

マウスにMT合成誘導剤としてZnCl₂ (200 μmol/kg) を1日1回2日間皮下投与し、その24時間後に致死量のアドリアマイシン、ブレオマイシン、パラコート、セファロリジン、メナジオンまたはCCl₄を腹腔内に投与した。その結果、ZnCl₂の投与により、ここに用いた全ての薬毒物の致死毒性が顕著に抑制された。以上の薬毒物はいずれも生体内でフリーラジカルを生成することにより脂質の過酸化を惹起すると考えられている。そこでマウス肝臓ホモジネート(5%)にこれら薬毒物を添加し、*in vitro*で37°C、1時間反応させたときに生ずる脂質の過酸化(TBA反応性物質として定量)に対する、予め肝臓中に誘導したMTの効果調べた。ZnCl₂未処置のマウス肝臓ホモジネートで観察される著しい脂質の過酸化はZnCl₂を予め投与したマウスの肝臓ホモジネートでは亜鉛の投与量依存的に抑制され、この時、各薬毒物により引き起される脂質過酸化の程度は肝臓ホモ

ジネート中のMT濃度と負の相関を示した。なお、未処置マウスの肝臓ホモジネートに部分精製したMTを添加した場合にも同様な脂質過酸化の抑制が有意に認められた。

枯草剤として用いられているパラコートは肺の組織傷害を起すことが知られているが、上述した致死毒性のみならず、それによる肺組織中の過酸化脂質の産生がZnCl₂の前投与により顕著に抑制されること、また、ZnCl₂投与ではMT以外の主要なラジカルスカベンジャーのレベルは変化しないことも認められた。

癌治療におけるMT利用の可能性について

癌化学療法剤として繁用されるアドリアマイシンについては、その制癌効果及び心不全をはじめとする副作用の発現に活性酸素生成が深く関わっていると考えられる。我々は、アドリアマイシンの致死毒性がMT誘導剤としての各種重金属化合物の前投与により抑制されることを見出し、さらにMT誘導剤としてBi化合物を用いることにより、その心毒性、骨髄毒性が軽減されるのに対し抗腫瘍性は全く影響を受けないことを明らかにした⁴⁾。ブレオマイシンやペプロマイシンもまた、ラジカル生成によりその効果並びに副作用を発現すると考えられるが、これら制癌剤の毒性もBi化合物の前投与により抑えられること、また、MTを予め誘導することによりアルキル化剤として働く制癌剤の毒性も軽減されること、さらには、その電離作用で生ずるフリーラジカルを介して癌縮小効果を示すγ線照射の主要な副作用である白血球の減少も、標的組織でのMTの誘導により改善されることなど⁵⁾から、MTは癌治療における副作用軽減のための有用な手段として期待できよう。

文献

1. Shiraishi, M. et al., *Physiol. Chem. Phys.*, 14, 533-537, (1982).
2. Thornalley, P.J. and Vasak, M., *Biochim. Biophys. Acta*, 827, 36-44, (1985).
3. Arthur, J.R. et al., *Free Rad. Res. Comms.*, 4, 15-20, (1987).
4. Naganuma, A. et al., *Jpn. J. Cancer Res.*, 79, 406-411, (1988).
5. Satoh, M. et al., *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 25, 1727-1731, (1989).

W2-4 蛍光プローブを用いた四塩化炭素肝障害の発生におけるフリーラジカルの解析

加藤 眞三、末松 誠、鈴木 秀和、石井 裕正、土屋 雅春

慶応義塾大学医学部内科

目的 薬剤性肝障害の発生機序の一つとしてフリーラジカルの関与が考えられている。四塩化炭素による肝障害はラジカルが関与する代表的なモデルであり数多くの研究が報告されているが、活性酸素の産生を個々の肝細胞レベルや肝微小循環の小葉内において空間的かつ時間的に解析したものはない。演者らはhydroperoxideと反応することにより蛍光物質となるdichlorofluorescein (DCFH) および細胞死にともないDNAと反応し蛍光を発するpropidium iodide (PI) をプローブとして用い蛍光顕微鏡下に観察し、活性酸素の産生と細胞死の関係を解析することを試みたので報告する。

方法 体重が約200gのWistar系雄性ラットを24時間禁食の後、以下の実験に供した。まず、コラゲナーゼ灌流法により遊離肝細胞を分離し、肝細胞浮遊液に5 μ MのDCFH-diacetateを5分間加えた後洗浄し、DCFHを細胞内に負荷した肝細胞を作成した。1mMの四塩化炭素を添加後、DCFHがhydroperoxideと反応して生ずるDCFの蛍光(460 \rightarrow 520nm)を経時的に観察した。次に、肝小葉内における酸素ストレスの分布を明らかにするため灌流肝により検討した。臓器の灌流は95%酸素/5%二酸化炭素ガスにより飽和させたKrebs-Ringer-重炭酸緩衝液で行い、3ml/min/g肝重量の流速とした。5 μ MのDCFH-diacetateを含む灌流液にて10分間灌流し、細胞内にDCFHを負荷した。1mMの四塩化炭素を添加後、灌流肝表面からのDCFの蛍光を経時的測定し

た。遊離肝細胞および灌流肝は、倒立型蛍光顕微鏡により肝表面の小葉構造を観察し、SIT-cameraおよびdigital image processor (C-2400-08/ARGUS-200, 浜松ホトニクス)により蛍光を撮像し画像解析した。Polychrometer (HR320, Jobin-Yvon, France)にmicrochannel analyzer (C-2491-01, 浜松ホトニクス)を組合せた装置を用い、蛍光顕微鏡下に観察された蛍光のスペクトルを解析した。細胞のviabilityを見るためPI (1 μ M)にて灌流し、その核への染色を蛍光像 (535→590 nm)としてとらえた。実験終了時にFITC-アルブミンを門脈側より注入し、観察領域の微小循環血流分布を撮像し、DCFの蛍光像と重ね合わせて検討した。

結果 分離肝細胞による実験では四塩化炭素により蛍光の増加が観察された。この蛍光はスペクトル分析によりDCFの蛍光に一致するものであった。DCFの蛍光の増加はチトクロームP450の阻害剤であるSKF-525A (150 μ M)の添加により抑制され、薬物代謝の結果として生ずることが示唆された。また、cimetidine (800 μ M)やchlorpromazine (50 μ M)の添加により抑制がみられフリーラジカルの関与が示唆された。この反応は早く表れるもの、遅く表れるものなど個々の細胞により反応の速さが異なることが明らかとなった。PIの蛍光の増加は、DCFの蛍光の増加に遅れて出現し、四塩化炭素による酸素ストレスの結果細胞死をきたすことが示唆された。灌流肝では、終末肝静脈の周囲の肝細胞よりDCFの増加が観察され、灌流肝におけるフリーラジカルの発生部位とin vivoにおける四塩化炭素肝障害の障害部位と一致することが明らかになった。抑制実験では分離肝細胞と同様の抑制効果が認められた。

結語 蛍光プローブDCFHを用いることにより、四塩化炭素肝障害荷おける酸素ストレスを空間的および時間的に解析することが可能となった。

一般演題（口演）

平成3年7月24日(水)

第2会場

演題番号 201-231

○笠 卷 明 子・浦 沢 正 三

札幌医科大学 衛生学

我々はこれまでに食品化学物質のあるものが、*in vitro*で人正常二倍体細胞 HAIN-55に対して老化マーカーを伴う細胞寿命の短縮を誘導することを報告してきた。これらの物質のなかにはgenotoxic (GT)物質のみならずnon-genotoxic (non-GT)物質も含まれることから、細胞老化機序解明の一助としてさらに多くの物質について老化促進作用の検討を行なった。

[方法] 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) の formazan 生成によるミトコンドリア酸化酵素活性 (MTT 活性) が、これまで用いた老化マーカーに先行して低下し、平行して変化することから、これを老化マーカーとして用いた。HAIN-55 細胞の対数増殖期に GT あるいは non-GT 物質で夫々1回-数回あるいは頻回処理を行なった細胞について、MTT 活性が50% 低下を示す細胞集団倍加回数 (PDL) 値を対照細胞のそれと比較することにより老化促進作用の検討を行なった。

[結果] 食品添加物、天然食品成分、カビ毒、農薬および抗生物質の夫々数種類について検討を行なった結果、GT物質の aflatoxin B₁ allyl isothiocyanate、2,4,5-T などにより対照細胞より有意に早い PDL で MTT活性の低下が認められたほか、non-GT物質の canavanine, ochratoxin, paraquat によってもその頻回処理によって有意の結果が得られ、遺伝子レベル以外にも細胞老化を促進させる機構の存在が示唆される。なお、high-resolution banding 法による解析による限りでは細胞老化による染色体の変化を特定することは出来なかった。

○森 晃爾¹⁾、藤代一也²⁾、井上尚英²⁾、海道昌宣³⁾、
小出 紀³⁾、今津和彦⁴⁾

¹⁾西日本産業衛生会、²⁾産医大環境中毒、

³⁾産医大第二病理、⁴⁾産医大第三内科

〔目的〕種々の化学物質により引き起こされる精巣障害は、一度障害が完成するとその回復は困難である場合が多く、障害に対する予防手段が必要である。今回酸化エチレンによる精巣障害のモデルを利用し、男性不妊症の治療に用いられる活性型ビタミンB₁₂であるメチルコバラミンの障害抑制効果について検討を行った。

〔方法〕8週令のウィスター系雄ラット32匹を対象群、メチルコバラミン投与群、酸化エチレン曝露群、酸化エチレン曝露およびメチルコバラミン投与群の4群に分けた。酸化エチレンの曝露は500ppmの濃度で、1日6時間、週3日、6週間行った。メチルコバラミンは、500 μ g/kgを週5日、皮下投与した。障害の評価は病理学的検討、精巣および精巣上体の精子数、精子頭部の奇形率および精巣のLDH-X活性で行った。また酸化エチレンによる精巣障害時変化が認められる、グルタチオン代謝系の酵素についても測定した。

〔結果〕酸化エチレン曝露群では、対象群と比較して、各パラメーターで障害が認められた。またメチルコバラミン投与群では変化は認められなかった。酸化エチレン曝露およびメチルコバラミン投与群では、対象群と比較すると、各パラメータとも障害がみられたが、酸化エチレン単独曝露群に比べて、障害の抑制が認められた。これらの抑制効果は、精巣重量ではほぼ100%であり、また精子数でも十分な抑制効果が認められたが、精子頭部の奇形率への効果はわずかであった。一方、酸化エチレンによるグルタチオン代謝系の変化には、メチルコバラミンは影響を及ぼさなかった。

タリウム中毒の一症例
—生体試料中タリウム濃度—

千葉百子¹、篠原厚子¹、稲葉 裕¹

松林里絵²、八木皓一²、田邊 等²

¹順天堂大学医学部衛生学教室

²東京都立神経病院神経内科

歩行障害、異常感覚を主訴として入院し、次第に精神症状、意識障害、脱毛を呈した 38 才の男性について、入院後 18 日頃からタリウム (Tl) 中毒を疑い、毛髪および爪の Tl を測定したところ多量の Tl を検出したので本患者を Tl 中毒と断定した。その後、血液および尿中 Tl 濃度を経日的に測定した。活性炭を投与すると共に全身状態の改善に努めたが、多臓器障害を呈し、入院 50 日目に死亡した。成因を明かにするために臓器中のタリウムを測定した。Tl は試料を湿式灰化してから無炎原子吸光で測定した。標準添加法により各試料中の濃度を求めた。毛髪中に 13.58 $\mu\text{g/g}$ 、爪に 8.73 $\mu\text{g/g}$ 、血中に 0.35 $\mu\text{g/ml}$ 、尿中に 5.11 $\mu\text{g/ml}$ の Tl が検出された。血中および尿中 Tl は生存中は経日的に低下が観察された。死後の臓器からは肝 0.54、脾 0.66、腎 0.82、肺 0.49、大胸筋 0.66、脳 0.40 $\mu\text{g/g wet}$ の Tl が検出されたが脂肪組織からは検出されなかった。

小野菜穂子，○小林晴男，中川暁美，茂木 朗，
笠嶋快周，鈴木忠彦

岩手大学農学部家畜薬理学教室

タリウム化合物の毒性の主体は中枢神経系に対する作用であり，その毒性発現機序の1つとしてコリン作動性神経系への影響が考えられる．本研究では，1分子に2原子のタリウムを有する硫酸タリウムおよび1原子のタリウムを有する酢酸タリウムについて，脳組織コリナージックパラメータに及ぼす影響をマウス大脳皮質を用いて *in vitro* で検討した．

＜結果＞両化合物とも 10^{-6} - 10^{-4} M の濃度ではアセチルコリン (ACh) 分解酵素、アセチルコリンエステラーゼの活性には何ら影響を及ぼさなかった．両タリウム化合物はACh 合成酵素、コリンアセチルトランスフェラーゼ活性を阻害したが、その作用は酢酸タリウムの方がやや大であった．シナプトソームによるコリンの取り込み機構である高親和性コリン取り込みおよび低親和性取り込みに対して両タリウム化合物は 10^{-6} - 10^{-4} M の濃度において阻害作用を示した．両タリウム化合物はいずれも 3 H-quinuclidinyl benzilate のムスカリニック・アセチルコリンレセプターへの結合能にはほとんど影響しなかった．皮質切片からの K^+ 誘発ACh遊離ならびにACh 合成に対していずれのタリウム化合物も顕著な作用を示さなかった．

＜結論＞以上より、タリウム化合物はコリン作動性神経系に対して、主としてACh 合成系を阻害することによって伝達機構を阻害することが考えられる．以上の作用は、硫酸タリウム (Tl_2) が酢酸タリウム (Tl) より大の関係は認められなかった．

○政岡俊夫¹、坂口和子²、長山昌広¹、白井明志¹、赤堀文昭¹

麻布大・獣医・薬理¹、麻布大・環境・衛生行政²

ラットのコリンエステラーゼ (ChE) アイソザイムは6分画を示すことを報告したが¹⁾、有機リン系殺虫剤アザメチホスによるこのChEアイソザイム分画の変動と血清ChE活性値への影響を検討した。

方法：Wistar系雄ラット(100匹)を5群に分け、アザメチホスの投与量は270mg/kg、80mg/kg、27mg/kgおよび8mg/kgを1回経口投与し、対照群にはオリーブ油を同様に投与した。投与後6、24時間、5、10および30日目にハロタン麻酔下にて採血し、直ちに血清を分離して試料とした。ChE活性値の測定にはEllman²⁾らの方法で定量し、また、ChEアイソザイムの測定にはPolyacrylamide gradient Gel Epを用い、Juul³⁾らの方法で染色後、デンスitomーター(島津DU-8)で定量した。なお、基質は両測定ともAc-S-Chを用いた。

結果：アザメチホス270mg/kg投与群においては、6時間目でChE活性値が最も強く抑制され、24時間では回復傾向にあった。5日目では対照群に比べ有意差(p=0.05)はみられないもののやや抑制されており、10日目の時点では対照群のレベルまで回復していた。一方、ChEアイソザイムのバンド数は対照群、投与群とも6分画を示し、バンド数にはアザメチホスの影響はみられなかった。しかし、バンドの相対的濃度比においては差が認められた。すなわち、ラットの主バンドはバンド5およびバンド6であり、その相対的濃度は対照群のバンド6>バンド5に対し、270mg/kgの投与群ではバンド5>バンド6と逆転していた。また、バンド6の占める割合は、投与量の多寡に比例してその割合は減少し、反対にバンド5が増加していた。このことから、ChE活性値とChEアイソザイムのバンド6とは何らかの関係があると思われる。

1) Sakaguchi, K. et al.: Physico-Chem. Biology 31:1, 1987.

2) Ellman, G. L. et al.: Biochem. Pharmacol. 7:88, 1961.

3) Juul, P. and Deopold, I. H.: Am J. Ophth. 65:527, 1968.

○広瀬明彦，高田幸一，斉藤 実，小川幸男，
鈴木幸子，金子豊蔵，黒川雄二

国立衛生試験所 安全性生物試験研究センター 毒性部

近年のフロン規制に伴い、代替フロンがその注目を浴びているが、その中の一つである5フッ化プロパノールについて28日間の反復吸入毒性試験を行なった。本物質は、既存化学物質の一つであるが、急性毒性以外にその毒性に関する情報は少ない。そこで本実験では、曝露の可能性の高い経路である吸入によりラットを曝露させ、28日間後、及び14日間の回復期間後の一般毒性を検討した。

〔実験方法〕1週間馴化後の5週齢雌雄F344/NSlcラットを対照群を含め4群に分け、横送流型の大型チャンバー内で飼育し、毎日6時間の曝露を行なった。5フッ化プロパノールは、バブリングにより発生させ、一定の各濃度(10ppm, 100ppm, 1000ppm)の空気を各群のチャンバーに送流した。曝露及び回復期間終了後、解剖し、病理及び生化学的検査を行なった。

〔結果と考察〕体重、摂餌量は、各群に大きな違いは、見られなかったが、顕著な変化として、雄100ppm, 1000ppm群と雌1000ppm群で1.5倍位上もの肝重量の増加が観察された。血清生化学検査では、雄100ppm, 1000ppm群にChEの3-6倍もの誘導が、認められた他、雌雄1000ppm群で有意なAlbとCRNの増加、TChoの減少が、認められた。さらに、肝臓ホモジネートの解析より、ペルオキシゾームのβ酸化比活性が、雄100ppm, と1000ppm群で各々約5と7倍増加していた。14日間の回復期間後には、以上の雌雄1000ppm群の変化は、対照群のレベルまで戻っていた。以上の結果より、本物質はペルオキシゾーム増殖剤に特徴的な性質を持つことが判明し、作用機作において、他の増殖剤との関連性に興味を持たれる。

笠間 菊子 小島 幸一

(財)食品薬品安全センター 秦野研究所 生化学研究室

尿は、生体内代謝および腎機能の変化を鋭敏に反映していると考えられる。動物を用いた毒性試験において、尿成分の検査はルーチン的に行われているが、血液生化学的検査に比較してやや定性的な色彩が強い。そこで、測定の定量性、迅速性等を向上させるために、生化学自動分析装置を用いて尿中物質の定量測定を行うことを試み、測定法の検討を行ったので報告する。

試料の尿は、雄のSDラットの24時間蓄尿を用いた。生化学自動分析装置は、昨年の本学会で報告したものと同一遠心分析方式の測定機を用い、蛋白質、グルコース、無機リンおよびクレアチニンのそれぞれの濃度、アルカリフォスファターゼ、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ、ロイシンアミノペプチダーゼおよびN-アセチル- β -D-グルコサミニダーゼのそれぞれの活性について、測定条件の検討を行った。

生化学自動分析装置について確立した測定条件による結果と、従来当研究室で行ってきた用手法による測定の結果とを比較したところ、いずれの項目も相関性は十分に良好であった。また、再現性にもすぐれ、血液生化学的検査と同様に十分に信頼し得る測定値がすみやかに得られることが明らかとなった。

さらに、他の動物の尿および項目についても測定条件の検討を加えている。

○鮫島秀暢, 本田多聞, 永田貴久, 永田良一

株式会社新日本科学 安全性研究室

バイオ技術による医薬品や中枢神経系作用薬などの開発に伴い安全性試験におけるサル、特にカニクイザルの利用が近年増加する傾向にある。一方、サルを用いた安全性試験では、ゲッ菌類に比べ試験供与例数が少なく、個体間の変動が大きいいため、対照群との比較とともに背景データとの比較が、成績を評価する上でたいへん重要と考えられる。しかし、カニクイザルの背景値に関する報告は国内では吉田ら (Exp. Anim. 35(3), 1986) が繁殖カニクイザルを用いて年齢別に測定した結果があるものの、安全性試験と関連した報告は少ない。

今回、演者らは最近3年間にわたり株式会社新日本科学霊長類研究施設において安全性試験に供した推定年齢4才前後の無処置カニクイザル(原産地:インドネシア, 雄 632例, 雌 576例)における血液学的検査(赤血球数, 白血球数, ヘマトクリット値, ヘモグロビン濃度, 血小板数, 赤血球恒数, 白血球分類, 網状赤血球数, プロトロンビン時間, 活性化部分トロンボプラスチン時間, フィブリンノーゲン濃度)および血液化学的検査(GOT, GPT, ALP, LDH, LAP, γ -GTP, CPK, 総ビリルビン, 総たんぱく, アルブミン, 総コレステロール, 中性脂肪, リン脂質, 糖, BUN, 尿酸, 無機リン, Ca, Na, K, Cl, たんぱく分画)に関する背景データをまとめて報告する。

金津 蘇生

筑波大学医療技術短期大学部

げっし類赤血球は等張溶液中で比較的短時間内に溶血する。pH 6.0以下では光学顕微鏡で認められる分断を伴い溶血するが(第14回本学会発表)、pH 7.0以上では分断を伴うことなく溶血する。今回、生理的pHにおける溶血について検討した。

ICR雄雄マウスよりエーテル麻酔下にヘパリン採血し、生理的食塩水にて3回洗浄、その10 μ lを各溶液5mlに浮遊させ、37°C回転培養器または水浴に孵置し、一定時間後に溶血度と位相差顕微鏡像を観察した。溶液はトリス・マレイン酸緩衝液(pH 7.2~7.4)をもちい、NaClで290mosmに調整した。1)緩衝液中では4時間以内に完全溶血した。2)CaCl₂~25mMは溶血を促進した。3)アデノシン~5mMは溶血を抑制した。4)CaCl₂とアデノシンには拮抗作用が見られた。5)デキストラン(MW>60,000)は4%で溶血を抑制したが、スクロースには抑制効果がなかった。6)位相差顕微鏡像は経過中、分断や膨大化を示さず、ゴーストは小球状を呈した。

結語：マウス赤血球は血漿不在下では直接ヘモグロビンが流出する程度のポア-が生ずるものと考えられる。ポア-形成をカルシウムイオンは促進し、アデノシンは抑制する。

210 ジメチルホルムアミドの肝グルタチオン代謝系に及ぼす影響

今津和彦¹・藤代一也¹・井上尚英¹・森 晃爾²

産医大産生研環境中毒¹・西日本産業衛生会²

【目的】ジメチルホルムアミド（DMF）は人工・合成皮革やアクリル系繊維などの有機溶剤として広く使用されている物質で肝障害を起こすことが知られているが、その機序については不明である。最近、DMFに曝露されたヒトの尿中からメルカプツール酸が検出されたと言う報告がなされた。そこで、我々はラットを用いて肝グルタチオン系酵素に及ぼす影響について検索したので報告する。

【方法】曝露群、対照群とも7週令のWistar系雄性ラットを用い、pair-fedした。飲水の摂取は自由に行なわせた。曝露群にはDMF（0.5 ml/kg）を連日投与で2週間、皮下に投与した。対照群には生理食塩水を同様に投与した。最終投与後、24時間でエーテル麻酔下に解剖した。血液生化学は自動分析計にて測定した。肝臓は生理食塩水で灌流した後、定法にてサイトゾール分画を得、グルタチオンレダクターゼ（GR）活性をCarlberg & Mannervikの方法で、グルタチオンペルオキシダーゼ（GPx）活性をt-butyl-hydroperoxideを基質とするBeutler et al.の方法で、グルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）活性を1-chloro-2,4-dinitrobenzeneを基質としてHabig et al.の方法で測定した。

【結果】血液生化学ではGOT・GPTの軽度上昇を見た。肝サイトゾール分画中のグルタチオン系酵素では対照群に比し曝露群でGST活性の有意な増加を認めた。

【考察】以上の結果は、ラットにおいてもDMFがグルタチオン包合を受ける可能性があることを示唆するものと思われた。

211 ジメチルホルムアミドの肝モノオキシゲナーゼ系に及ぼす影響

藤代一也¹・今津和彦¹・井上尚英¹・森 晃爾²

産医大産生研環境中毒¹・西日本産業衛生会²

【目的】ジメチルホルムアミド（DMF）は人工・合成皮革やアクリル系繊維などの有機溶剤として広く使用されている物質で肝障害を起こすことが知られているが、その機序については不明である。DMFは肝シトクロームP-450により脱メチル化され、N-メチルホルムアミドとなり尿中に排泄されると言われているが、DMFの肝シトクロームP-450に及ぼす影響についての報告は少ない。そこで、我々はラットを用いてこの点について検索したので報告する。

【方法】曝露群、対照群とも7週令のWistar系雄性ラットを用い、pair-fedした。飲水の摂取は自由に行なわせた。曝露群にはDMF（0.5 ml/kg）を連日投与で2週間、皮下に投与した。対照群には生理食塩水を同様に投与した。最終投与後、24時間でエーテル麻酔下に解剖した。血液生化学は自動分析計にて測定した。肝臓は生理食塩水で灌流した後、定法にてミクロゾーム分画を得、シトクロームP-450量及びプロトヘム量をOmura & Satoの方法で、シトクロームb₅量をStrittmatter & Velickの方法で測定した。その他、NADPH-cytochrome c reductase活性、NADH-ferricyanide活性、アミノピリン脱メチル化活性及びアニリン水酸化活性を測定した。

【結果】肝ミクロゾーム分画中のシトクロームP-450量の減少をみた他、興味ある知見を得た。

【考察】以上の結果は、少なくともP-450のある分子種については何らかの機序により減少し、種々の薬物代謝に影響を及ぼす可能性を示唆するものと思われる。

○吉田貢由、加藤道幸、古濱和久、柿畑耕司、高山 敏

第一製薬(株) 開発研究所

一般的に静脈内投与する薬剤はその薬理作用に拘わらず、投与時の血管に対する直接的な障害性が懸念される。そこで、我々はラット大腿静脈を用いて、色素(evans blue)の血管透過性を指標とした評価法について基礎的検討を行うと共に、数種の薬剤の血管に対する影響を調べた。実験には8~9週齢の雄SD系ラットを用いた。ペントバルビタールナトリウム麻酔下に、左大腿部を切皮後、大腿静脈に25G翼状針を刺入して薬液(2ml)をインフュージョンポンプで注入した。薬液注入中に0.5% evans blue 1mlを尾静脈より投与した。薬液注入終了後、直ちに動物を放血屠殺し、投与部位の血管および周囲組織を採取して重量を測定した。その後、組織を1N水酸化カリウムで溶解(37℃ 一晩放置)して、evans blueを抽出、比色(620nm)した。検討項目としては、投与速度、投与液のpHおよび浸透圧について行い、その後、各種のcephem系抗生物質(CET, CER, CPIZ, CEZ, CTX, FMOX)および酢酸(0.75および6%)で障害度を比較した。

その結果、投与速度が早い程、血管透過作用は強く現れたが、注入速度は2ml/hrが適当であった。次に注入液のpH(3~11)および浸透圧(0~1200mOsm/kg)の影響を調べたが、検討した範囲内では特に作用は認められなかった。一方、cephem系薬剤および酢酸の血管透過作用の強さは6%酢酸>CET≥0.75%酢酸>CER=CTX≥CEZ=CPIZ=FMOX=Salineの順であり、ウサギの筋肉内投与による局所刺激性の報告と類似した結果が得られた。これらのことから、今回行った方法は薬剤の血管に対する障害性を知る上で一つの指標となるかもしれない。

○唐木英明、堀正敏、D. J. Hartshorne

東京大学農学部獣医薬理、アリゾナ大学筋生理

トートマイシン (TM) は放線菌の産生する抗真菌抗生物質であり、各種の培養細胞の形態変化と細胞死を起こす。我々は海産毒由来のホスファターゼ阻害剤であるカリクリンAが同様の細胞障害作用を示すことを本学会で報告した (J Toxicol Sci 14, 326, 1989; *ibid.* 15, 215, 1990)。そこでTMのホスファターゼ活性に対する作用を検討し、すでに知られているホスファターゼ阻害剤の平滑筋作用との比較を行った。心筋由来の2A型および平滑筋あるいは骨格筋由来の1型ホスファターゼ活性に対する作用を、 ^{32}P 標識20 kD ミオシン軽鎖を用いて測定し、また平滑筋の内因性ホスファターゼに対する作用を検討したところ、以下の表のような成績を得た。従って、TMはホスファターゼ阻害作用を有し、1型と2A型ホスファターゼを同様の濃度で阻害するカリクリンAと類似の作用をもち、濃度により2A型と1型を順次抑制するオカダ酸とは異なる作用をもつことが明らかにされた。次に、摘出ラット大動脈標本における作用を検討したところ、TM、オカダ酸およびカリクリンAはそれぞれ50%有効濃度が3 μM 、3 μM 、0.1 μM で収縮を起こし、その作用は外液Caに依存しなかった。また、モルモット盲腸紐平滑筋脱膜化標本ではこれらのホスファターゼ阻害剤は外液Caに依存しない収縮を引き起こした。これらの収縮はミオシン軽鎖の磷酸化を伴っていた。以上の成績から、TMはホスファターゼの阻害作用によりミオシン軽鎖の磷酸化を引き起こし、平滑筋収縮を起こすものと考えられた。TMの細胞障害作用にも同様の作用機作が示唆されるが、この点についてさらに検討中である。

ホスファターゼ	TM	オカダ酸	カリクリンA
	50%抑制濃度 (nM)		
1型	3.2	2.24	5
2A型	3.2	1.0	3
平滑筋内因性	6	7.0	1

○橋本英明¹⁾、矢部武士¹⁾、田代文夫²⁾、上野芳夫¹⁾東京理科大・薬 毒性学・微生物化学¹⁾、基礎工 生物学²⁾

(目的)我々はすでに、*Fusarium*属真菌のトリコテセン系マイコトキシンであるnivalenol (NIV) が世界各国の各種穀物や食品を汚染していることを明らかにしてきた。NIV の摂取が、諸種環境汚染物質の毒性発現をどのように左右するかを明らかにすることを目的とし、aflatoxin B₁ (AFB₁) 投与マウスにおいて、NIV の長期投与が雌性において肝癌の発生を抑制することを報告してきた。今回、NIV の短期投与ラット肝における薬物代謝酵素系の変動、および AFB₁ 代謝活性化への影響を検討した。

(方法)SD系雄性ラットに、NIV(0.50 mg/kg, i. p.) を1日2回、1, 3, 7日間投与した。同様に0, 0.25, 0.50, 1.0 mg/kg(i. p.) を1日2回、3日間投与し、最終投与24時間後屠殺し、肝ミクロゾームおよびサイトゾールを調製し、cytochrome P-450(P-450) 含量および各種薬物代謝酵素活性を測定した(急性毒性)。またラットを、0, 6, 12, 30ppm のNIV 含有飼料で2及び4週間飼育し同様に肝薬物代謝酵素活性を測定した(亜急性毒性)。AFB₁ 代謝活性化はin vitroおよび in vivoでの [³H] AFB₁ -DNA付加体生成量を指標とした。また P-450 及び glutathione S-transferase (GSI) の isozyme レベルの変動をWestern blot法で解析した。

(結果・考察)急性NIV 投与により諸種の肝薬物代謝酵素活性は減少する傾向がみられた。一方亜急性ではNIV の摂取によりP-450 含量は6, 12, 30 ppm の2週間投与群、及び30 ppmの4週間投与群において有意な上昇を示し、Western blot法により P-450 II C11 及びその交叉タンパクの発現量増加が確認された。上清GSI 活性は、6, 12 ppm の2週及び4週間投与群において有意に上昇し、Western blot法によりこの上昇はGSI 1-2 の誘導によるものであることが確認された。ミクロゾームの AFB₁ -DNA付加体生成活性はNIV 摂取により2-3 倍上昇し、NIV 投与群由来のサイトゾールの添加により AFB₁ -DNA付加体生成は対照群に比べて阻害された。またin vivo でのAFB₁ -DNA付加体生成量はNIV 摂取により対照の約60%に減少した。即ち、NIV の短期亜致死量投与は肝薬物代謝活性を低下せしめるが、連続投与では、P-450 をはじめとするPhase 1 の酵素群を誘導すると共にPhase 2 の酵素であるGSI もまた上昇させることが判明し、結果として、in vivo においてNIV 投与により AFB₁ -DNA付加体の生成が減少すると推論された。

簾内桃子・福原守雄^{*}・川西 徹・郭 新彪・大野泰雄・
高仲 正国立衛生試験所・薬理,^{*} 国立公衆衛生院・衛生薬学

環境汚染物質として問題となっている 2, 3, 7, 8-Tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxinの類縁化合物であるMonochlorodibenzofuranの肝薬物代謝酵素による活性化についてはあまりよく知られていない。今回我々はラットとハムスターの肝ミクロソームを用いて、2-Monochlorodibenzofuran (2MCDF)と3-Monochlorodibenzofuran (3MCDF)の代謝活性化の様式と関与するP-450分子種について検討した。

【方法】代謝活性化酵素としてPhenobarbital (PB: 60mg/kg/day) および3-Methylcholanthrene (MC: 25mg /kg/day) を3日間腹腔内処置したウィスター系ラットおよびシリアンゴールドンハムスターの肝ミクロソーム分画を用いた。代謝活性化は、*Salmonella typhimurium* TA98を用いた変異原活性を指標として調べた。P-450分子種の関与を調べるため、いくつかの分子種の抗体による代謝活性化の阻害度を調べた。

【結果と考察】ミクロソームを添加しない場合、2MCDFに変異原活性は認められなかったが、3MCDFでは濃度依存的な活性の増加が認められた。さらに、いずれのミクロソームの添加によっても2MCDFの変異原活性は認められなかった。一方、3MCDFでは、ミクロソームの添加によって変異原活性が増強され、ハムスターよりラットで強い活性がみられた。3MCDFは、ハムスターでは、各処置群で同程度の変異原活性を示したが、ラットではMC処置群と無処置群で強い変異原活性を示した。また、ラットミクロソームによる3MCDFの変異原活性は、ラットP-450c抗体等で強く阻害され、ラットにおける3MCDFの代謝活性化におけるP-450IA1の関与が示唆された。

酒井 徹・清宮健一・暮部 勝

大阪府立大学・農・獣医・毒性

シスプラチン(CDDP)は優れた制癌作用を持つ反面、臨床上腎障害が問題となることがある。最近開発された制癌性プラチナ錯体のカルボプラチン(CBDCA)はCDDPとほぼ同様の制癌スペクトルを示すが、その腎障害はCDDPより弱いことが知られている。これら薬剤の腎障害部位は近位尿細管に特異的に認められ、その発現機序の詳細については未だ明確にされていない。そこで、演者らは制癌性プラチナ錯体の腎毒性機序を明確にする目的で、今回はブタの近位尿細管上皮株化細胞のLLC-PK₁細胞を用いてCDDPおよびCBDCAの腎毒性の強度および性質について比較検討した。LLC-PK₁細胞は5%の牛胎児血清を含むF12/DMEM培養液中で培養した。Confluent後の細胞にCDDPおよびCBDCAを添加培養し、一定時間後に種々の毒性パラメータの観察を行なった。CDDPおよびCBDCA処置によって、生化学的パラメータの変化としては、刷子縁膜、細胞質およびライソソーム酵素等の培養液中への遊離増加、細胞内還元型グルタチオンおよび過酸化脂質含量の変動等が認められた。形態的变化としては細胞間隙の明瞭化、ドーム形成の抑制、細胞壊死等が認められた。これらパラメータの変動はCDDPおよびCBDCAの処置濃度および時間に依存して認められた。また、CDDPの作用強度はCBDCAのそれに比べて約10倍強度であった。以上の結果から、CBDCAの腎毒性はCDDPに比較して、その強度は明らかに弱いと結論される。さらに、この腎毒性強度の差異が細胞内への移行率、ラジカル産生能、DNA cross link 能といかに関係するかについて考察する予定である。

眼粘膜刺激性試験の代替試験としての正常ヒト表皮
角化細胞を用いた *In vitro* 細胞障害性試験

○永見和之、牧 栄二

萬有製薬(株) 開発研究所

薬物の眼粘膜刺激性試験はウサギの眼を用いて検討されているが、その試験の動物に与える影響や実験期間の短縮などを考えるとき、その代替試験としての *in vitro* 試験の確立の必要性が実感され、今回 *in vitro* 細胞障害性試験を検討し、*in vivo* 試験と比較した。

【方法】*In vitro* 試験は市販の正常ヒト表皮角化細胞 (NHEK) および無血清培地を用い、マイクロプレート法にて行った。即ち、3~5 継代の NHEK 1×10^4 個を各 well に無血清培地 200 μ l と共に移植し、2 日間の前培養後、培養液を被験物質含有培地と交換し、更に 2 日間の培養を行った。細胞の生存率は MTT 発色法により行い、無処置対照に対する吸光度の割合から生存率を求め、50% 阻害濃度 (IC_{50}) を算出した。一方、ウサギの眼粘膜刺激性試験は Draize 法により行い、被験薬液 100 μ l を各濃度当たり 3~6 匹のウサギに点眼し、時間経過を追って観察した。各被験物質は 3 濃度以上を用い、刺激の見られない最大濃度 (DS0) を求めた。

【結果】19 種類の被験物質 (benzalkonium chloride、cefalotin sodium、sodium lauryl sulfate、Tween、formaldehyde など) について検討し、その IC_{50} 値を求め、またその再現性も確認した。19 種類の被験物質のうち有機溶媒を除く 8 種類の薬物の DS0 値と IC_{50} 値の相関性を調べたところ、その相関係数は 0.99 であった。ここで得られた IC_{50} -DS0 曲線は、新規薬物の眼刺激性を示す濃度を推測する際に有用で、また動物試験における濃度設定にも利用できることを確認した。複数の薬剤を混合した被験液についても検討したが、その結果は IC_{50} -DS0 曲線より推測できた。

宇佐見 誠、川島 邦夫、高仲 正

国立衛生試験所・安全性生物試験研究センター・薬理部

〔目的〕 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin 等の多塩素化芳香族化合物は、動物実験において催奇形性を含む強い毒性を示すことが知られているが、類縁化合物である 2-Chlorodibenzofuran (2MCDF) 等の毒性は明かでない。そこで我々は、ラット胎芽培養法を用いて 2MCDF および 3-Chlorodibenzofuran (3MCDF) の発生毒性を調べDibenzofuran (DF) と比較したので報告する。

〔方法〕 ウィスター系ラットの妊娠 9.5 日胎芽を用い、Dimethyl sulfoxide に溶解した 2MCDF, 3MCDF および DF を、0, 30, 100, 300 および 1000 μM となるように培養液に添加して、48 時間回転培養し、胎芽の発育および形態異常を調べた。2MCDF についてはさらに、代謝活性化を検討するために、Phenobarbital および 5, 6-Benzoflavone で誘導したラット肝 S9 および補酵素を添加して同様に実験した。

〔結果および考察〕 2MCDF, 3MCDF および DF はいずれも、胎芽の形態異常の発生率を増加させ 1000 μM で発育を抑制した。形態異常としては、出血および神経管の異常が多く認められた。ラット肝 S9 および補酵素を添加した場合にも、2MCDF の影響には変化が認められなかった。これらの結果から、2MCDF, 3MCDF および DF には発生毒性に差がないと考えられた。

初代培養肝細胞における2-及び3-monochlorodibenzofuran (MCDF) の薬物代謝活性誘導能のTCDD類との比較

郭 新彪、大野泰雄、川西 徹、篠内桃子、高仲 正

国立衛生試験所・薬理部

Dioxin類やDibenzofuran類には非常に強い毒性を有するものがあることから、*in vivo* で2-MCDF及び3-MCDFの毒性を検討する前に、初代培養肝細胞を用いて*in vitro*で薬物代謝活性誘導能を検索し、TCDD類や多環芳香属炭化水素類の作用と比較した。

(方法) SD系ラットよりコラーゲン灌流法により調製した遊離肝細胞をコラーゲン塗布培養皿上でdexamethasone, insulin, δ -ALA及び10% 牛新生児血清を含むWilliams' E 培地で48時間培養した。薬物は培養2 時間目から48時間目まで培養液中に添加した。

(結果と考察) 2-MCDFの薬物代謝活性の誘導能は弱く、エトキシクマリン脱エチル化活性に対して、20 μ Mではほとんど影響を与えず、100 μ M でも対照群の約150%にしか活性が増加しなかった。一方、3-MCDFの誘導はこれより強く、100 μ M では対照群の約3 倍に増加させ、この代謝活性を2 倍に誘導する用量は30-40 μ M と計算された。なお、2-MCDFと3-MCDFはAHH 活性も同様に誘導したが、ベンチルレゾルフィン脱ベンチル化活性の誘導は比較的弱かったことから、メチルコラントレン(MC)型の誘導能を持つものと推定された。

MCにおけるエトキシクマリン代謝活性の2 倍誘導用量は27nMであり、3-MCDFの場合の1000分の1 であったことから、3-MCDFの誘導能は弱いと言える。

1,2,3,4-TCDDのエトキシクマリン代謝活性の2 倍誘導用量は42nM、1,3,6,8-TCDDでは114nM で、それぞれMCの1.5 倍、4.1 倍であり、MCより誘導能は若干弱かった。

これらの結果から、*in vivo* での誘導能について考察する。

M A O (Monoamine oxydase)阻害活性を持つ薬物の
肝細胞障害性評価
—ラット初代培養肝細胞を用いた肝細胞障害性試験—

○川島 明、堀井 郁夫

日本ロシュ研究所 毒性・病理部

[目的]

M A O 阻害活性を持つ薬物 (Hydrazine, Iproniazid, Moclobemide) の肝臓に対する障害性について、ラット初代培養肝細胞を用いて検討した。培養肝細胞に薬物を添加後、培養上清中に逸脱する酵素活性を測定し、陽性対照物質の四塩化炭素の障害性と比較検討した。

[方法]

SD-S1c系雄ラットの肝臓からコラゲナーゼ灌流法により肝細胞を分離し、単層培養後、薬物を添加し、培養上清中と肝細胞内 G O T, G P T, L D H 活性を測定した。また、肝細胞内グルタチオン量を増加させるために L-Cysteine を、また減少させるために B S O (Buthionine sulfoxime) を、それぞれ培養前から添加し、薬物添加に対する影響を検討した。

[結果]

一般に、Hydrazine, Iproniazid などの M A O 阻害活性を持つ薬物は、強い肝毒性を持つと言われるが、肝障害性が弱い薬物 (Moclobemide, Ro19-6327) でも、高用量添加で酵素逸脱が認められ、L-Cysteine 添加でも肝細胞障害性は弱まらなかった。

四塩化炭素添加による肝細胞からの酵素逸脱は、6時間以内にプラトーに達し、L-Cysteine の前添加により四塩化炭素の肝細胞障害性は弱まることが判った。また、B S O 添加による影響は認められなかった。

以上のことから、Moclobemide の高用量添加による肝細胞障害性は四塩化炭素の障害機序と異なったものであることが示唆された。また、Hydrazine, Iproniazid 添加による肝細胞障害性についても併せて報告する。

○澤田 稔、北村龍司、佐藤恵子、鎌滝哲也

北海道大学・薬

チトクローム P-450 は、多くの外来性異物の解毒や代謝的活性化において中心的な役割を担う酵素である。しかし、変異原性試験や種々の毒性試験に用いられている培養哺乳類細胞株には P-450 活性が著しく低下あるいは欠損しているものが少なくない。そこで我々は、P-450 の cDNA を発現ベクターに組み込んで培養細胞に導入し、安定的に P-450 を発現する細胞株の樹立を試みた。同時にこの方法によって、多様性に富む P-450 分子種の細胞内での機能の解析を目指した。今回用いた cDNA は、サル P-450IA1 をコードする MKah1、及びヒト胎児肝で特異的に発現している P-450HFLa をコードする HFL33 (P-450IIIA7) である。

[方法] MKah1 の coding region を発現ベクターに組み込み、ネオマイシン耐性遺伝子を持つプラスミドと共にリン酸カルシウム-DNA共沈法によりチャイニーズ・ハムスター線維芽細胞株 CHL にトランスフェクトした。HFL33 についても同様に発現プラスミドを構築してヒト乳癌由来細胞株 MCF-7 にトランスフェクトした。次いで G-418 で選択し、これらについて P-450 の発現及び aflatoxin B1 (AFB1) に対する感受性を調べた。

[結果] MKah1 を導入した CHL 細胞から、mRNA レベルで発現が確認されるクローンが数個得られた。発現量の最も多いクローン(A-15)は AFB1 の致死作用に対し親株の25倍の感受性を示し、しかも、この高感受性は P-450IA に特異的な阻害剤である α -naphthoflavone によって顕著に抑制された。これらの結果は、導入した MKah1 から産生される P-450 蛋白質が細胞内で機能していることを示している。AFB1 の突然変異試験においても、A-15 クローンをを用いた場合にのみ陽性の結果が得られた。

HFL33 を導入した MCF-7 細胞からもノーザンブロット分析により3個のクローンで発現が認められた。これらは抗 P-450IIIA 抗体を用いるウェスタンブロット分析でも期待される分子量が示された。また、AFB1 に対する感受性が親株に比べて約8-10倍上昇していた。この細胞株は胎児型 P-450 の薬理的・毒性学的機能を検討するうえで極めて有用であると考えられる。

○滝沢 節子、堀井 郁夫、藤井 信子*

日本ロシュ研究所 毒性・病理部
*帝京大学 医学部 薬理学教室

【目的】1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ はビタミンD作用を司る最終活性代謝産物であり、その静脈内投与により、副甲状腺に直接作用し、PTHの産生、分泌を抑制する薬剤である。本薬物のラットの生殖試験において、高用量群(0.45mcg/kg)で雌動物のみに交配能、妊娠能の低下がみられ、さらに、妊娠例は胎児が認められず、全例初期吸収胚であった。雌動物の生殖機能低下が不可逆的なものかどうか、また、その原因を検討するために回復試験および性周期試験を実施するとともに、カルシウム代謝系因子についての検討も併せて行なった。

【方法】回復試験は1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ 0.45mcg/kgを雌ラットに6週間投与後、2週間の回復期間を設定し、溶媒投与群雄と交配させ、交配能、妊娠能および妊娠例についての子宮内検査を実施した。性周期試験は、投与前2週間、投与期間3週間(0.45mcg/kg)、回復期間2週間の膣スメアを検査した。投与終了時および回復期間終了時に内分泌系・生殖器系臓器を摘出し精査した。また、カルシウム、PTH、カルシトニン等のカルシウム代謝関連因子についての測定も実施した。

【結果】2週間の回復期間の設定により、低下していた交配能および妊娠能は回復した。また、妊娠例では対照群と同程度の生存胎児が認められるようになり、初期吸収胚数、後期死亡数および胎児に異常は認められず、本薬物の雌ラットに対する生殖機能への作用が可逆的なものであることが示された。また、性周期試験では、投薬後数日で発情期を示さなくなる例が散見され、交配能の低下は性周期の異常に起因することが示された。また、投与終了時の病理組織学的検査では生殖器系臓器(子宮、卵巣)の未成熟状態が観察された。投与中止後は数日で発情期の回復が認められ、本作用が可逆的であることが示された。さらに以上の結果とカルシウム代謝系因子の変動との関連性についても言及する。

降圧薬、合成排卵抑制薬の性ホルモン産生異常(1)
 睪丸、副腎に対するプロプラノロール、カプトプリル
 ノルエチノドリの影響

増淵美子、赤池真理、平井正直

聖マリアンナ医科大学 薬理学教室

Androgen、estrogenは高血圧の発症・維持に介入し、一方、経口避妊薬は高血圧を発症しその5%は重症高血圧を惹起する。今回、ヒトに常用される降圧薬、経口避妊薬のsteroids産生への直接作用をin vitroで調べた。Donryu ratの睪丸(LH-NIH-S13、1 μ g、180分)、副腎(合成ACTH、100mIU、120分)を夫々Krebs-Ringer Phosphate buffer(pH7.40)でincubationした。①Intact、②propranolol(Pr)、③captopril(Cap)、④norethynodrel(Nor)の4群とした。睪丸：Pr群ではtestosterone(To)有意高値、 Δ^4 -androstenedione(A)、estradiol(E_2)に変化なく、Cap群ではTo、A有意高値、Nor群ではTo、 E_2 有意高値を示した。副腎：Pr群ではcorticosterone(B)、 E_2 、Aに変化なく、Cap群ではBが有意低値、Nor群ではBは有意高値、 E_2 有意高値を示した。以上から、正常ラット睪丸に対し、Pr、Cap及びNorによる 17β -HSD刺激作用、 5α -reductase抑制作用、Prによる β -blocker作用、Capによるangiotensin I貯留、angiotensin II減少に基づく作用及び $C_{17,20}$ -lyase刺激作用が示唆された。正常ラット副腎に対し、Cap及びNorによる 11β -hydroxylase抑制及びB代謝亢進作用、Capによるangiotensin系への睪丸と同様の作用及びB代謝亢進作用が示唆された。結論として、(1)睪丸に対し β -blockerによるTo有意増加、angiotensin変換酵素阻害薬によるTo、A及びdihydrotestosterone有意増加、合成progestinによるTo及び E_2 の有意増加を認めた。(2)副腎に対し合成progestinによるB有意減少、 E_2 有意増加を見いだした。

降圧薬、合成排卵抑制薬の性ホルモン産生異常(2)
卵巣に対するプロプラノロール、カプトプリル、ノル
エチノドリルの影響

赤池真理、増淵美子、平井正直

聖マリアンナ医科大学 薬理学教室

前報で、睾丸に対する降圧薬 β -blocker [propranolol (Pr)],
angiotensin 変換酵素阻害薬 [ACEI; captopril (Cap)] 及び合成
progestin [経口避妊薬; norethynodrel (Nor)] の作用を *in vitro* で
調べ Pr 及び Cap は、androgen 産生有意亢進、Nor は androgen、
estrogen 産生亢進を見出した。今回は、卵巣に対する影響を調べた。
管理飼育した 56 日齢 Wistar rat に PMS (Ayrest, Equinex) 100
IU/0.2ml saline/rat, s.c. 投与、53 時間後断頭放血致死、卵巣を
切片とし 5ml Krebs-Ringer Phosphate buffer (pH7.40) で 37°C、
30 分 preincubation 後、新 buffer で ① 卵巣 only、② 卵巣 + Pr (100
 μ g)、③ 卵巣 + Cap (100 μ g)、④ 卵巣 + Nor (10 μ g) の各群 37°C、
180 分 incubation した。抽出・純化・TLC 単離後各 steroids を
RIA 法、蛍光法で定量した。Pr 群は、① 群に比し progesterone
(Po) 有意高値、estradiol (E_2) 低値傾向を示した。Cap 群は、Po
の高値傾向 20α -OH-P、 Δ^4 -androstenedione (A) 及び E_2 の低値傾向
が示された。Nor 群は 20α -OH-P、testosterone (To) の有意高値
Po 及び A の高値傾向が示された。以上、卵巣 steroidogenesis に
対し；(1) β -blocker による Po 高値、 E_2 低値、ACEI による Po 高
値、 E_2 、A、 20α -OH-P 低値及び経口避妊薬による Po、 20α -OH-P、
A 及び To の高値が示された。即ち、(2) 雌に対し、降圧薬、経口
避妊薬による卵巣 steroids 産生異常、性周期異常の生殖生理機能
低下の発現を証明した。

須藤 武、築館一男、甲斐純子、見上 孝、山津清實

エーザイ 安全性研究部

ラットにドーパミン2受容体(DA2)遮断薬を投与すると、血中プロラクチン(PRL)値が上昇することはよく知られている。しかし、PRL産生臓器である下垂体の機能的・形態的变化についてはなお明確にされていない。今回、我々はラットにDA2遮断薬を投与した際の下垂体PRL細胞の機能的・形態的变化について検討したので報告する。

【材料および方法】SD雌ラットにハロペリドール(HPD)10mg/kg/dayを投与し、単回投与30分および24時間後、また7回連投および28回連投24時間後に採血・剖検を行い、血中および下垂体中のPRL値の測定、ならびに下垂体の免疫電顕的な観察を行った。

【結果】血中PRL値は、単回投与30分後で対照群の約500倍に上昇し24時間後でも約200倍であった。7回および28回連投24時間後においては正常動物とほぼ同レベルであった。一方、下垂体中のPRL値は、単回投与30分後で対照群の約1/2、24時間後では約1/5に減少していた。7回および28回連投24時間後では対照群とほぼ同レベルであった。免疫電顕的な観察結果、単回投与30分後では対照群と比較してPRL陽性細胞に形態的な差異を認められなかったが、24時間後ではPRL陽性顆粒が減少していた。7回以上の投与群では、PRL陽性細胞の粗面小胞体がよく発達しPRL陽性顆粒も増加していた。

【考察】DA2遮断薬の連投により、下垂体PRL分泌細胞は電顕的にPRL合成が賦活化された所見が観察された。一方、血中および下垂体中のPRL量は変化していないことから、PRL分泌細胞ではドーパミンに対するSupersensitivityが生じ、HPDに対する反応が低下している可能性がありin vitroの結果を加え考察したい。

脊髄腔内投与における投与液の物理化学的性状の影響

○赤羽一美、古濱和久、柿畑耕司、加藤道幸、高山敏

第一製薬株式会社・安全性研究センター

ラットを用いての脊髄腔内投与は、痙攣誘発能あるいは脳への作用を把握するのに有用な方法である。しかし、投与溶液の物理化学的性状（pH 及び浸透圧）が生体にいかなる影響を及ぼすか不明な点が多い。そこでラットに脊髄腔内カニューレを施し検討した。

実験には、7週齢のSlc:SD系の雄ラットを5～6匹/群用いた。軽いエーテル麻酔下に、ラット第3と第4腰椎の椎間孔に20G注射針を刺入し、針穴を介してポリエチレンチューブSP10（O.D. 0.61 mm）を髄腔内に約7 cm挿入した。その後、カニューレーを留置したまま20 G針を抜き、保定器に入れ覚醒させ、インフュージョンポンプを用いて溶液を注入した。結果の評価は症状観察及び死亡率で行った。得られた成績は以下の通りである。

- 1) 生理食塩液を用いて注入速度と液量の関係を検討したところ、2 mlを0.5 ml/min以下の注入速度で投与すれば死亡は全く認められなかった。
- 2) 投与溶液がほぼ等張300 mOsm/kg H₂Oの条件下でpHを3～10に変化させたところアルカリ側（pH 8～10）で死亡が多発したのに対し、酸性側（pH 6～3）では死亡がみられなかった。
- 3) 投与溶液を酸性（pH 7または4）にし、浸透圧を0～2000 mOsm/kg H₂Oに変化させたところ300～600 mOsm/kg H₂Oでは死亡しなかったが、これらの範囲外では死亡が多発した。

以上の成績から、液量が2 ml以下で投与速度が0.5 ml/minの時、pHが酸性側で浸透圧が300～600 mOsm/kg H₂Oであれば投与液の物理化学的影響は少ないと考えられた。

○工藤 玄、大野 広志、野村 護、高山 敏、小野寺 威

第一製薬(株) 安全性研究センター

【目的】 トロンボキサ₂合成阻害薬であるDP-1904の抗喘息薬としての適応を考えた場合、臨床的にテオフィリンとの併用が予想されるが、本薬物は高用量の投与により肝薬物代謝酵素の阻害を示すことがわかっている。そこで今回、DP-1904併用投与によるテオフィリン誘発痙攣および心電図変化に及ぼす影響をラットにおいて、同じイミダゾール環を有し、薬物代謝酵素阻害作用を持つシメチジンと比較検討したので報告する。

【方法】 7週齢のSlc:SD系雄ラットに、DP-1904およびシメチジンの0.1、0.3、1.0mmol/kgを、テオフィリン投与30分前に経口投与(対照群には溶媒の1%メチルセルロースを投与)し、2%アミノフィリン(Sigma社)溶液を静脈内持続投与(0.25mg/min)して、最大痙攣発現量を算出した。心電図変化については、アミノフィリン静脈内持続投与後(0.23mg/min)、経時的に心電図を測定した。心電図変化として、ST junctionのP-P base lineからの下降を指標とした。

【結果】 最大痙攣発現までのテオフィリン投与量は、DP-1904(DP)およびシメチジン(CM)ともに1.0mmol/kg投与により有意な低下が認められた。CMでは0.3mmol/kg投与群でも低下傾向がみられたが、DPは0.3mmol/kg投与群では対照群との差はなかった。心電図変化についても、DPおよびCMともに1.0mmol/kg投与により、テオフィリン投与量は有意に低下したが、0.3mmol/kgではCM投与群に低下傾向がみられ、DP投与群では対照群との差はなかった。以上のことより、DP-1904は高用量投与によりテオフィリンの代謝を阻害するが、その効果はシメチジンより弱いものと推測された。

○萩田孝一、北島省吾、田中亮太、山本行仁、伊藤英記、
安藤栄恵、田中佳子、中浦慎介、小林和雄

(財) 食品農医薬品安全性評価センター

一般毒性試験の剖検時においてしばしば観察される肝臓の奇形様結節は、生殖発生毒性試験の胎児検査においても観察される所見である。この発現頻度は、種々の薬物を投与する事により、横隔膜ヘルニアの発現とともに増強されることも報告されている。今回、我々は、3系統のラットを用い、薬物投与による肝奇形様結節および横隔膜ヘルニアの発現頻度について比較した。

〔実験方法〕 Crj:Fischer、Crj:WistarおよびSlc:Wistar系ラット12~13週齢動物を用い、それぞれ交配させ妊娠9日目にBisdiamine1000mg/kg/day,poおよびActinomycin D,165 μ g/kg/day,ipを投与した。妊娠動物は妊娠20日に帝王切開し子宮内の状態および胎児の外表を検査した後、生存胎児全例を10%中性緩衝ホルマリン液に固定し検査した。

〔結果〕肝奇形様結節および横隔膜ヘルニアの発生率は、Crj:Fischer系ラットのActinomycin D投与群(A群)でそれぞれ66.7%、0.0%、Bisdiamine投与群(B群)でそれぞれ63.7%、10.4%であり、Crj:Wistar系では、A群:25.7%、3.3%、B群:21.6%、48.0%、また、Slc:Wistar系ではA群:61.5%、19.2%、B群:84.1%、15.9%であった。観察された肝奇形様結節は全て肝主葉中央に位置し、横隔膜の菲薄化を伴っていた。又、横隔膜ヘルニアは全て左側ヘルニアであり、肺の低形成を伴っていた。

以上、同じWistar系ラットでも発現頻度に違いがみられ、Slc:Wistar系の発現率はCrj:Fischer系に近い発現率であった。尚、肝奇形様結節および横隔膜ヘルニアの発現機序に横隔膜形成が関与していることが知られており、系統間の横隔膜細胞の初期分化に及ぼす薬物の影響を知る上で興味深い。

○山田 昌男、菊地 典子、佐藤 洋、坂元 由香、野村 護

第一製薬(株) 安全性研究センター

バイオテクノロジー製剤の毒性試験の際に、蛋白の可溶化剤として含まれるアルギニンにより、ラットに一過性の浮腫が生ずることを認めたが、サルにはみられなかった。今回、この浮腫の発現機作および種差について検討したので報告する。

【方法】ラットの浮腫誘発の検討には、5週齢のSlc:SD系雄ラットを1群3匹用いL-塩酸アルギニン(森下製薬製)の150、500および1500mg/kgを静注後15、30、60分、3、6、12時間、1、3、7、14日にエーテル麻酔下に採血後、屠殺剖検した。対照群には無処置の他に生食投与のNaCl群を置いた。種差検討には、Slc:ddY雄マウス、Crj:Hartley系雄モルモット、NZW(日農産)系雄ウサギ、雌ビーグル(CSK産)および雄カニクイザル(Siconbrec産)を用い、症状観察、足蹠容積(ラット)、血液一般(EDTA-2K加)、凝固線溶系(3.2%クエン酸Na加)、血液生化学、血漿浸透圧、イヌ、サル、を除く臓器重量(心、肝、腎、肺、脾)および臍を加えた臓器の組織学的検査を行った。

【結果】ラットは投与後15分から四肢掌蹠の浮腫を認め、30から60分に顔面に浮腫が波及した。最大の浮腫発現時間は30分後にみられ、平均足蹠容積は無処置対照群 1.78 ± 0.09 ml、1500mg/kg群 2.13 ± 0.16 mlと約20%の増加を示した。凝固線溶活性はPT時間の軽度の延長とATⅢおよび α_2 PIの活性低下が投与後60分まで明らかにみられ、フィブリノゲンの低下を伴った。フィブリン・フィブリノゲン分解産物(FDP)は投与後30分から3日に検出され12時間から1日後に $20 \mu\text{g/ml}$ と高値を示した。種差の検討では、マウス、モルモット、ウサギ、イヌおよびサルともに浮腫を認めず、また、血液凝固線溶系パラメータに変化を認めなかった。

以上のことから、高用量のアルギニンはラットに対し凝固線溶系に作用し活性を低下させ、軽度の液相線溶を生じ、血管透過性が亢進すると推察された。しかし、ラット以外の動物には認められず、明らかな種差があると結論された。

○西澤 理江 古濱 和久 柿畑 耕司 高山 敏
小野寺 威

第一製薬株式会社 安全性研究センター

ヨード系造影剤の高用量をラットに静脈内投与すると、腎尿細管上皮細胞に空胞が生じることはよく知られている。今回、これらの空胞化が腎障害発現に関与するか否か2～3の腎負荷ラットを用いて調べた。実験には6週齢雄SD系ラットを用いた。造影剤としては iotaramate, ioxaglate, iohexol 及び iotrolan を使用した。腎負荷動物は両腎の動静脈を一時的に阻血（腎虚血ラット）あるいは gentamicin sulfate 60 mg/kg を7日間皮下投与（GM投与ラット）して作成した。腎障害の評価は血清UN 及び creatinin, 尿検査（蛋白, NAG, γ -GTP）及び腎の組織検索より行った。その結果、正常ラットに各造影剤を単回静脈内投与（2 gI/kg）すると腎機能検査には全く異常はみられなかったが、iotrolan > iohexol > ioxaglate > iotaramate の順に腎尿細管上皮細胞の空胞化が強く認められた。一方、腎虚血ラットでは全ての造影剤投与で腎障害の悪化傾向がみられたが、その強さは ioxaglate が最も強かった。また、GM投与ラット（造影剤と1回ないし3回併用投与）でも ioxaglate のみに腎障害がみられ、空胞化形成能と腎障害との間に解離が認められた。以上のことより、本条件下の腎負荷動物では、造影剤による空胞化形成能は腎障害誘発と直接関連性がないと推測した。

鄭 圭 鎔、 遠藤 仁

東京大学医学部薬理学教室

腎臓は生体の水と電解質の維持に重要な役割を有し、特に水は集合尿細管での抗利尿ホルモンである arginine vasopressin (AVP)による細胞内 cAMPを介して調節されている。一方、ハロゲン化エーテル系麻酔薬である methoxyflurane (MF)は麻酔患者に多尿が認められる副作用が知られているが、その機序に関しては不明のままに、副作用の少ない新規化合物が導入されている。この多尿の機序を解明するため、AVPによる細胞内遊離カルシウム ($[Ca^{2+}]_i$)の上昇に対する各種ハロゲン化エーテル系麻酔薬(enflurane, EF; isoflurane, IF; sevofrane, SF)の効果を比較検討した。体重190 - 230gのSDラット(雄)の左腎をcollagenaseで灌流し、髓質部集合尿細管(OMCT)を単離した。 $[Ca^{2+}]_i$ の測定は蛍光指示薬であるFura-2を用いた。OMCTにおいて、AVP($>10^{-14}M$)及びMF($>10^{-10}M$)は濃度依存性に $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させた。使用された4種類の麻酔薬で、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇作用はMFが最も強かった。AVP($10^{-7}M$)による一過性 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は $10^{-8}M$ のEF、IF、MF及びSFの前処理によって完全に抑制された。しかし、 $10^{-8}M$ ではMFのみがAVPによる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇作用を完全に抑制したが、それ以外の麻酔薬にはAVP抑制効果が認められなかった。これらの結果より、MFは麻酔効果を表す以下の低濃度でAVPの一過性 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を介した抗利尿作用を阻止させ、従って強い多尿の副作用を顕著に示すものと考えられる。

一般演題 (ポスター)

平成3年7月24日(水)

第3会場

演題番号 301-317

ポスター展示 10:00-17:50

質疑応答 11:30-12:00, 17:10-17:50

南 勝、城下恭輝、遠藤泰、門間芳夫

東日本学園大・薬・薬理

(目的) ラットと嘔吐のモデル動物フェレットを用いて、抗癌剤Cisplatin(CDDP)の副作用である嘔吐と腎機能障害などの急性毒性に対する抗癌剤のmodulatorであるHX-1920の影響を検討した。

(方法ならびに結果) Wistar系雄性ラットならびにN.Y. Marshall社より輸入したFitch種の雄性フェレットを用いた。CDDPならびにHX-1920は腹腔内に投与した。ラットの実験: Probit法により算出したCDDPのLD₅₀は6.4 mg/kgであった。CDDP(10 mg/kg)投与2日後に採血し、臓器を摘出した。血中尿素窒素(BUN)、クレアチニン(Cr)の有意な上昇が認められ、骨髄では白血球、リンパ球細胞の軽度な減少が観察された。CDDP(6.4 mg/kg)投与群は著明な体重の減少を起し、14日目までに約半数は死亡したが、CDDP投与後、HX-1920(100 mg/kg)を連続投与した群では、CDDPによる体重減少は早期に回復し、全例(n=10)が死亡しなかった。フェレットの実験: CDDP(10 mg/kg)投与による嘔吐の数(retchers and vomits)ならびに持続時間は、HX-1920(100 mg/kg)の前投与により減少傾向を示し、嘔吐発現までの時間は有意に延長した。HX-1920前投与群のBUN, Crの上昇は、CDDP投与群に比し抑制傾向を示した。ラットならびにフェレットより摘出した臓器の病理学的検索、さらに生化学的に腸管カテコールアミン含量ならびにセロトニン含量についても検索した。

(まとめ) HX-1920は、ラットおよびフェレットにおいてCDDPによる腎臓への急性毒性を抑制し、フェレットにみられる嘔吐を抑制した。HX-1920は、CDDPの毒性に対するmodulatorとなり得るものと思われた。

勝谷 成男, 塩野谷 博, *鈴木 弘真, *堀江 透

エーザイ株式会社 安全性研究部, *同筑波研究所

〔目的〕マウスを用いた膝下リンパ節(PLN)アッセイは, 薬剤によって誘導される自己免疫疾患の可能性についての予測のための, ひとつの方法と考えられている。しかし, 薬剤誘発性 H^+ のリスクの高い薬剤のひとつであるプロカインアミド(PA)では, このアッセイの結果は陽性とはならない。この原因として, PLNアッセイに直接関与する生体の部位においては, 薬剤の代謝が十分に行われなためと考え, このアッセイに *in vitro*での代謝系を導入し, 検討した。

〔方法〕PAとラットのS-9 mixtureを 37°C で反応させ, 限外ろ過膜によって高分子画分を除去した。これをマウスの足蹠皮下に50 μl 投与した。両側のPLNを摘出した後, 投与した側と反対側のPLNの重量比より, 反応を評価した。

〔結果および考察〕実験に用いた3系統のマウス ($\text{C}_3\text{H}/\text{He}$, $\text{C}_{57}\text{BL}/6$, BALB/c)において, 5または10mgのPAによって, 陽性となった。一方, S-9 mixtureと反応させなかったPAや, PAの代謝物のひとつであるアセチルプロカインアミドでは, 反応はほとんど認められないか, 同量のPAに比較すると弱いものであった。 $\text{C}_3\text{H}/\text{He}$ マウスを用いた実験において, PAの反応は投与2日後には認められ, 投与18日後においても観察された。これらの結果より, PAの反応は酸化反応による代謝物によることが示唆された。また, *in vitro*での薬剤代謝系と組み合わせたPLNアッセイによって, 代謝物の関与が考えられる薬剤による自己免疫の誘導の可能性の予測ができると考えられた。

生殖機能に及ぼす影響の検討

原田滋雄、高山 敏

第一製薬（株）開発研究所安全性研究センター

経口避妊薬の有効成分であるnorethisteroneとethinyl estradiolのが性周期、排卵、卵輸送、着床ならびに泌乳に及ぼす影響についてSD系ラットを用いて検討し、以下の成績を得た。

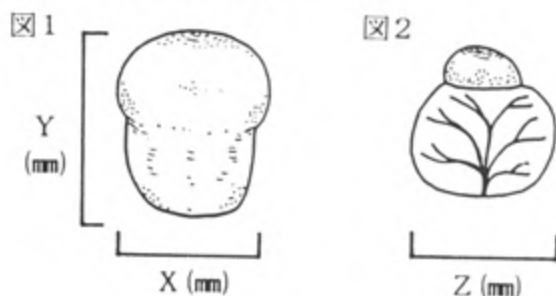
- 1) norethisteroneの0.25~16mg/kg、ethinyl estradiolの0.08~0.512mg/kgを性周期を回帰するラットに連日経口投与した結果、いずれの薬物でも最低用量から性周期の延長が認められ、最高用量では性周期が廃絶した。
- 2) norethisteroneでは16mg/kg、ethinyl estradiolでは0.064mg/kg以上の用量を発情期から発情前期まで経口投与すると、排卵抑制が認められた。
- 3) norethisteroneでは16mg/kg、ethinyl estradiolでは0.128mg/kg以上の用量を妊娠0日から連日経口投与すると、卵管から子宮への卵輸送および子宮からの卵の排出が促進された。
- 4) 16mg/kgのnorethisterone、25mg/kgのethinyl estradiolを妊娠0日から連日経口投与すると、卵の着床が完全に抑制された。
- 5) norethisteroneあるいはethinyl estradiolを泌乳ラットに分娩直後から毎日経口投与した結果、norethisteroneについては2.0mg/kg以上、ethinyl estradiolについては0.064mg/kg以上の用量で泌乳抑制作用が認められた。

秋田正治¹⁾、横山 篤²⁾、黒田 行昭³⁾

¹⁾鎌倉女子大、²⁾日本たばこ産業、³⁾麻布大学生物研

現在、米国などにおいて発生毒性試験をin vitroで行う方法として、全胚培養法 (chick を含む) が検討されているが、種々の問題をかかえている。その一つとして、培養開始時の胎子の発生段階を揃える (サイズの統一) 方法が、胎子を直接観察できないために困難な点である。今日まで、ラットの雌雄を一晩同居させる交配法を用いた場合より、2時間同居させる交配法が胎子を揃える上では成果があったが、本実験において我々は、in vitro系を用いる場合は子宮より取出し胎子膜に包まれた状態の胎子を直接観察し選別した方が、より正確であると考えている。すなわち、子宮より取出した胎子の図1で示したXとYの外径および湿重量を測定して、培養前に解剖した際における胎子膜剥離の段階で、卵黄囊直径 (Z) (図2) を測定する方法がある。今回は、より効率的に速やかにこの操作を行うために、脱落膜まで含めた胎子の湿重量 (mg) および外径 (X, mm) を測定し、一群は培養 0時間の、また一群は48時間培養後の各々の胎子の総体節数および頂殿長を測定し、胎子の発育段階を推定した。

胎齢11日目の脱落膜層まで含めた胎子の湿重量は 135.7 ± 14.2 mg、外径は 5.40 ± 0.28 mmであり、その時の胎子の頂殿長は 4.10 ± 0.40 mm、総体節数は 32.4 ± 1.0 、総タンパク質量は 293 ± 43 ug/胎子であり、湿重量と総体節数の間に相関係数0.72という値を得た。そこで、無作為に胎齢11日目の胎子を培養した群 (A群) と、湿重量が130 ~ 139mg の胎子を選び出し培養を行った群 (B群) において、24時間後の心拍動数、卵黄囊の直径、総体節数さらに48時間後の心拍動数、頂殿長、および総体節数を測定し、それぞれの群内の分散を比較した。その結果、どの測定項目もB群はA群に比べ低い分散値を示した。これらの結果から、直接胎子が観察できなくても、培養する胎子の脱落膜層まで含めた湿重量を一定範囲に限定することによって、培養開始時に発育段階の揃った胎子を得ることが可能となった。さらに、この培養開始時の胎子の発育段階を揃えることにより、実際的に培養胎子の成長発育をより厳密に評価することが可能になったと考えられる。



横山 篤、秋田 正治*

日本たばこ産業、*：鎌倉女大

（目的）我々は現在まで全胎仔培養法を用いて数種の薬物のラット胎仔への影響を観察してきた。今回は奇形発現と培養胎仔の心拍動数とその関連性について検討したので報告する。

（方法）胎齢11日のラット胎仔を摘出後72時間回転培養した。薬物処理は培養液内添加を用い、2時間処理とした。処理薬物は、アスピリン500ug/ml、イミプラミン30ug/mlおよびメチルアゾキシメタノール（MAM）10ug/mlを用いた。

これらは全胎仔培養で100%催奇形性を示す用量であり、同時に心拍動数低下も併発する共通点がある。（結果）アスピリン処理後1時間で培養胎仔の心拍動数は、対照群に比べて25%の有意な低下を示した。その後の培養胎仔の成長指標は総蛋白質量は14.7%、総体節数は23.6%、頂殿長は22.2%のそれぞれ有意な低下を示し、浮腫や口唇裂など重篤な催奇形性が認められた。つぎに培養胎仔の心拍動数に低下作用を持つ薬物としては、イミプラミンとMAMが上げられる。両薬物において、作用時間10分より急激に心拍数は低下し、停止する例も多く観察された。この時の成長指標はイミプラミン処理において総蛋白質量で26.4%、総体節数で23.6%、頂殿長で5.6%の有意な低下を示した。一方MAM処理でも同指標において41.9%、25.4%、33.3%の低下を示した。また、イミプラミンでは全身性の障害が強く、MAMでは小頭症が多発した。以上の結果より、これらの薬物の催奇形性の型は異なるが、その発現の要因のひとつとして胎仔心拍数の低下という現象が考えられた。

ラット胎芽細胞培養法を用いたIn vitro催奇形性評価
(micromass teratogen assay)

水野文夫, 川上素子, 武田量雄¹⁾, 岩瀬隆之, 池田保男²⁾

1)三菱化成安全科学研究所 2)三菱化成 安全性研究所

In vitroにおける催奇形性評価方法の一つとしてMicromass teratogen assay がFlint らにより報告されている。本法は摘出・解離させたラット胚の前肢芽, 中脳部細胞を化学物質と共に5日間培養し, 各細胞の軟骨細胞塊, 神経細胞塊への増殖・分化障害を指標として催奇形性を評価するものである。しかし, その評価基準は未だ定まっておらず, 十分な検出力の検証も行われていないのが現状である。そこで我々は, 催奇形性既知の各種化合物52検体(陽性対照30検体, 陰性対照22検体)を用いて, 評価基準および検出力の検討を行ったので報告する。

培養はFlint ら(1987)の方法に従い, 細胞障害性の測定はNeutral red(NR) assay により, 分化障害性の測定はNR assay 後の標本を軟骨細胞はalucian blueで, 神経細胞はヘマトキシリンで染色し, 細胞塊の総面積を画像処理装置を用いて測定した。評価は IC_{D50} 値(50%分化障害濃度)および, IC_{D50} 値と IC_{P50} 値(50%細胞障害濃度)の比(P/D比)を算出して行った。

その結果, 催奇形性陽性の判断基準を IC_{D50} 値が50 ug/ml以下, かつP/D比が1.5以上とし, In vivo データと比較したところ Specificity(陰性の一致率):90.9%, Sensitivity(陽性の一致率):76.7%, Predictivity(陽性および陰性の一致率):82.7% との結果が得られた。従って, この基準を用いることにより, 本法を高い検出力で, 簡便かつ迅速な化合物のスクリーニング法として利用することが可能であると考えられた。

泉谷修一，玄番宗一

大阪薬科大学第二薬理学教室

腎毒性について *in vitro* での評価系の内で，腎スライス（切片）法は試料の調製および実験方法において簡便である。これまでにゲンタマイシンなど各種薬物の腎毒性を切片法を用いて検討されているが，腎細胞機能障害とともに，グルタチオン（GSH）の低下も報告されている。今回，演者らは，GSH減少の腎細胞機能に及ぼす影響について腎切片法を用いて検討した。〔方法〕SD系雄性ラットから調製した切片を，好氣的にインキュベートすることにより腎細胞機能を測定した。又，切片からミトコンドリア分画を調製しGSH量を測定した。GSH枯渇剤としてdiethylmaleate（DEM）を使用した。

〔結果〕DEMを含む生理的塩溶液中で，切片をインキュベートした。切片GSH量は，DEMの濃度に依存して減少し，それに伴い腎細胞機能も影響を受けたが，糖新生能，たんぱく性SH，及び過酸化脂質への影響に比して，tetraethylammonium（TEA）取り込み能とATP量の低下は敏感であり，DEM 1mMで影響を受けた。DEM 1mM存在下で，インキュベートした切片から調製したミトコンドリアのGSH量は対照のそれと差がなかった。

〔結論〕GSH減少は，細胞内の酸化還元状態に著しい影響を与えると考えられる。この時，腎細胞においては，ATP産生能，及び細胞膜の薬物輸送系が強く影響を受けるが，これにはサイトゾールのGSH減少が関与すると示唆された。腎切片法を用いて腎毒性を評価するに際して，GSH量の変動が重要な因子となると考えられる。

○工藤欣邦 江頭 亨 永井敬之 山中康光

大分医科大学薬理学教室

〔目的〕肝の虚血—再循環で活性酸素や脂質過酸化反応による肝障害が惹起されることはよく知られているが、このような病態が多臓器に与える影響を検討した報告は少ない。我々は虚血—再循環肝障害モデルを作成し、腎、肺、脳組織中の脂質過酸化物質、SOD 活性、及び血中Endotoxin を測定することにより、これら多臓器への影響を検討した。〔方法〕体重200～220gのWistar系雄性ラットの門脈及び肝動脈をクリップにて30及び60分間結紮し、再循環して12時間後に、(1)血清中の肝由来酵素(GOT, GPT, LDHetc.) (2)肝、腎、肺及び脳組織中のTBA反応物質及びSOD活性 (3)血中Endotoxin 及び β -glucuronidase活性 を測定した。〔結果〕肝の虚血—再循環群では血清中の肝由来酵素は、対照(sham ope)群に比べ有意に上昇した。TBA反応物質(脂質過酸化物質)も肝、腎において虚血—再循環群で有意に高値を示したが、肺、脳においては有意差を認めなかった。肝においては虚血時間30分間に比べ60分間の方が高値を示した。またSOD活性は、いずれの臓器も有意差を認めなかった。血中Endotoxin はToxicolor(T)法、Endospesy(E)法共に肝の虚血—再循環群で高値を示したが、特に β -glucan量を反映する(T-E)値は有意に高値を示した。また、血中 β -glucuronidase活性も虚血—再循環群で高値を示した。〔考察〕肝の虚血—再循環モデルでは、肝由来酵素、肝組織中脂質過酸化物質の著明な上昇が見られ、重篤な肝障害が惹起された。この時同時に、腎の脂質過酸化物質も上昇し、腎に何らかの影響が及ぶことが示唆された。また血中 β -glucan-like activityの上昇が見られ、内因性Endotoxinの上昇が示唆された。

矢本 敬, 大橋芳彦, 木村邦男, 松沼尚史

三共株式会社 安全性研究所

脂質低下剤の clofibrate(CPIB)等をラットやマウスに投与すると肝細胞ペルオキシゾーム(Pox)を増生し肝肥大を惹起する。このような化合物(Pox増生剤)に対する感受性には動物種差があり、ゲッ菌類の感受性が高い。しかし、動物の系統による感受性の差については報告が少ない。そこでラットについて Pox増生剤に対する感受性の系統間比較を行った。8週齢の F344ラット, SDラット, および Wistar Lewis(W-L)ラットに CPIBを粉末飼料に混合(0.1%, 0.2%)して 14日間与え血液生化学的検査を行い、肝臓中薬物代謝酵素活性・カルニチンアセチルトランスフェラーゼ(CAT)活性・Pox β -酸化活性・カタラーゼ活性を測定した。また、肝臓の微細形態学的検査を実施した。

その結果、薬剤平均摂取量に各系統間で差は認められなかった。F344, SD, W-Lラットのすべてにおいて肝重量が増加した。血液生化学的検査では総コレステロール・トリグリセリドの減少が認められた。肝臓中の CAT活性・Pox β -酸化活性は著しく上昇したが、薬物代謝酵素活性の上昇は軽度であった。微細形態学的には、肝細胞の滑面小胞体が軽度に増生し Poxは明らかな増生を示した。これらの変化の程度は W-Lラットが最も強く F344ラットは W-Lラットより若干軽度で SDラットが最も軽度であった。

以上のことからラットに CPIBを投与した場合、いずれの系統においても Poxは増生するが、その程度には系統差のあることが明らかとなった。

河野真弓¹, 今岡進², 田中栄之介¹, 三澤章吾¹, 船江良彦²¹ 筑波大・社会医学系 ² 大阪市大・医

【目的】近年トリメタジオン (TMO) は肝機能障害時における肝薬物代謝能を表す指標の一つとして有用であると考えられている。TMOは主に肝ミクロゾームのP-450系でN-demethylationを受け、主代謝産物であるジメタジオン(DMO)を生成する。しかしTMOの代謝を肝のどのP-450分子種が担っているかは未だ明らかになっていない。またヒトに関してもどの分子種が関与しているかは解っていない。そこで今回我々はラットとヒトから精製したP-450とそれに対する抗体を用いて、TMO代謝に関与するラットとヒトのP-450分子種について選択性を検討した。

【方法】ラット及びヒト肝ミクロゾームから精製したP-450を用いて再構成系でTMO代謝活性を測定した。またウサギから作成した抗体を用いてミクロゾームのTMO代謝活性の阻害実験も併せて行った。

【結果及び考察】無処置ラットの肝ミクロゾーム、フェノバルビタール(PB)処置肝ミクロゾームでのTMO代謝活性はそれぞれ0.229、1.060 nmol/min/mgであった。また再構成系においては無処置の雄ラットにおいて主な分子種であるUT-2(IIC11)、PBで最も強く誘導されるPB-4(IIB1)が、TMOに対して強い代謝活性を示した。抗体を用いた活性阻害実験では無処置のミクロゾームではUT-2抗体が、PB処置ミクロゾームではPB-4抗体がTMO代謝活性を強く抑制した。このことよりUT-2とPB-4がTMOの代謝反応に大きく関与していることが明らかになった。またヒト肝ミクロゾームのTMO代謝活性は0.219 nmol/min/mgであり、無処置ラットの活性と類似していた。またさらにラットP-450抗体を用いてヒト肝ミクロゾームの活性阻害実験を行った。

○島田晴美、稲毛富士郎、高田早苗、古濱和久、高山敏

第一製薬 開発研究所 安全性研究センター

骨髄および脾臓は造血における中心的臓器であり、血液毒性評価上重要である。これまで演者らは毒性試験において最も繁用されるラットを用いて、骨髄および脾臓有核細胞の簡便な定量的検査法の基礎的検討を行ってきた。今回この方法を用いてラットの貧血および白血球減少モデルにおける骨髄および脾臓有核細胞に及ぼす影響を検討した。

実験にはSprague-Dawley系雄性ラットを用いた。貧血モデルは瀉血(全血の約25%相当量)により、白血球減少モデルはadriamycin(5mg/kg, iv)またはcyclophosphamide(CY, 100mg/kg, ip)により作製した。各処置後1, 3, 7 および14日に末梢血液中の赤血球数(RBC)、総白血球数(WBC)、好中球数(N)、リンパ球数(L)網状赤血球数(Ret)を測定すると共に動物を屠殺して骨髄および脾臓を採取した。正常ラット血清と細胞培養液(RPMI-1640)を1:1に混合した希釈液中で骨髄および脾臓の一部をsingle cellに分散後、自動血球計数装置(Sysmex E-5000)にて有核細胞数を計数し、1mgあたりの細胞数(骨髄:NBMC, 脾臓:NMC)および脾臓あたりの細胞数(TNSC)を算出すると共に塗抹標本にて形態学的に分類し、赤芽球系細胞数(Ery)、骨髄球系細胞数(Mye)、リンパ球系細胞数(Lym)等を求めた。

貧血モデルではRetの増加を伴ったRBC減少が瀉血1~7日後に認められ、脾臓においてはTNSCおよびEryの増加が認められたが、骨髄の有核細胞数は大きな変動を示さなかった。このことから瀉血により急激に生じた貧血からの回復には主として脾臓における髄外造血の関与が示唆された。ADRによる白血球減少モデルではWBC, N, Lが投与1~7日後に減少し、14日後にほぼ対照群と同等に回復したが、Nの減少が最も顕著であった。骨髄ではNBMCおよびMyeがNと比較的良く一致した動きを示したがLymは3日後に減少が認められたのみであり一致した動きを示さなかった。一方脾臓では重量、TNSC、脾臓あたりのLymなどがLに良く一致して顕著に減少したが、NSCおよび脾臓1mgあたりのLymの減少は比較的軽度なものであった。CY投与でもADRと概ね類似した成績が得られたが、各型の細胞数の相対的な動きに若干の相違が見られた。

以上の成績から本法を毒性試験における通常の血液学的検査および組織学的と併せて実施することにより、造血機能のより定量的な把握が可能と考えられた。

○平田真理子，斎藤悦子，中西秀樹，小泉治子

実中研・前臨床医学研究所

近年，生物学的製剤の開発が進むにつれ薬物に対する反応性がヒトに近いことなどから，サルを用いた試験が増加する傾向にある。サルに無麻酔下で投与あるいは種々の検査を行うには，モンキーチェア等に拘束して行うことが多いと思われる。今回，我々は血液生化学的検査値に及ぼす拘束の影響について検討を行い，若干の知見を得たので報告する。なお，本実験は当研究所動物委員会の承諾を得て実施した。

〔方法〕オスカニクイザルを，1日2時間3日間連続でモンキーチェアに拘束した。拘束前日，拘束終了後1日，8日および15日に血液を採取し，GOT・LDH・CPKは血漿を，GPT・AIP・総コレステロール・リン脂質・カルシウム・総タンパクには血清を用いて測定を行った。

〔結果および考察〕拘束後1日では拘束前値に比べ，CPK活性が平均で約106倍，GOT活性が12倍，LDH活性が8倍，GPT活性が5倍の増加を示した。一方，総コレステロール，総タンパクおよびカルシウム濃度はそれぞれ15%，9%および12%の低下を示した。CPKおよびGOT活性は8日に，他は15日にほぼ拘束前の値を示した。また，電気泳動法あるいはCPK-M阻害抗体法等のアイソザイム分析から，これらの酵素の上昇は主として骨格筋由来によると考えられた。

以上のことから，拘束に伴う血液生化学的検査値への影響は多大であり，サルを用いた実験では検査値の解釈ならびに実験条件に十分な配慮が必要と考えられた。現在，これらの結果を基にモンキーチェアを用いる際のサルの実験条件について検討中である。

○森田晴夫, 下村和裕, 須永昌男, 小泉治子

実験動物中央研究所付属・前臨床医学研究所

薬物によって惹起される毒性病変の本質を理解するために、我々は生前の諸検査と剖検後の病理組織学的な所見との関連を検討してきている。今回、サル毒性試験にみられた完全房室ブロック例について、刺激伝導系の一部を連続切片で検索する機会に遭遇し、興味ある知見が得られたので報告する。

<材料と方法>

動物：カニクイザルのメス1頭（完全房室ブロック例）、推定5才。他にメス4頭（対照例）、推定4～7才。

心電図検査：モンキーチェアに保定、無麻酔下。双極胸部誘導（A-B）¹⁾ および標準肢誘導。

病理組織学的検査：房室結節～ヒス束付近の組織片を採取し、パラフィン包埋後各約1000枚（5頭すべて）の連続切片を作製し、H-E、マッソン・トリクロームおよびPAS染色を施し、光顕的に観察。

<結果>

心電図上の観察では、P波とQRS群との関連性はなく完全房室ブロックと診断されたが、この変化は数日後に回復し洞性リズムとなった。連続切片の組織学的観察では、房室結節～ヒス束付近の刺激伝導系に接して、ヘモジデリン沈着、形質細胞およびマクロファージを主体とした炎症細胞浸潤がみられた。しかし、刺激伝導系の細胞そのものには、明らかな変化はみられなかった。

<まとめ>

サルとならんで一般毒性試験に汎用されているイヌでも、完全房室ブロックは稀で、常に病的であるといわれている。しかし、詳細な検索をした剖検例が少ないためか、完全房室ブロックと刺激伝導系の病理組織学的な変化との関係が必ずしも明らかではない²⁾。今回みられたカニクイザルの症例は、病変の部位がイヌの症例³⁾と類似していた点で、組織学的な変化と完全房室ブロックの発生とに何らかの関連が考えられた。

<参考文献>

- 1) Uchino, T., and et al. (1970). *Adv. Anim. Cardiol.*, 3, 1-12.
- 2) Dear, M. G. (1970). *J. Small Anim. Pract.*, 11, 17-26.
- 3) Robertson, B. T., and et al. (1972). *J. A. V. M. A.*, 161, 180-184.

- 田中 悟, 川島邦夫, 内藤克司, 中路幸男, 高橋道人, 今井田克己,
宇佐見誠, 内田雄幸, 鎌田栄一, 児玉幸夫, 高田幸一, 安原加寿雄,
梅村隆志, 小野寺博志, 古川文夫, 古田京子, 松島裕子, 豊田和弘,
今沢孝喜, 高仲 正, 黒川雄二, 林 裕造, 戸部満寿夫

国立衛生試験所安全性生物試験研究センター

OECDは、高生産量の既存化学物質について反復投与毒性及び生殖発生毒性を同時にスクリーニングする方法として、ReproTox試験法を提案した(1990年)。今回われわれは、毒性既知のシクロホスファミド(CP)を用い、ReproTox法の有用性について検討したので報告する。

CPは、0, 2, 3, 4.5 及び6.7mg/kg体重量を雌雄各12匹のSD系ラットに交配14日前から、雄には交配を通して42日または43日間(半数ずつ)、雌には交配・妊娠・分娩を通して哺育3日まで、それぞれ毎日1回強制経口投与した。雌雄親ラット及び新生児とも最終投与翌日に剖検した。

反復投与毒性として、粗毛等の症状、体重増加抑制、摂餌量減少及び死亡が認められた。血液検査で白血球数の用量依存的な減少及び貧血所見が、血清生化学検査でALPの減少等が認められた。また、胸腺及び脾重量の減少が認められ、病理組織検査で胸腺、脾臓、骨髄の萎縮及び肝臓の巣状壊死が認められた。明らかな精子形成障害及び腎障害は認められなかった。

生殖発生毒性として、交尾能、受胎能の障害及び奇形発現は認められなかったが、子宮内死亡の増加、出産率及び生児分娩率の低下、新生児の体重及び生存率の低下等が認められた。

今回の実験において、CPについて報告されている主な反復投与毒性及び生殖発生毒性が検出され、ReproTox法の併合毒性試験法としての有用性が示唆された。なお、催奇形性等の障害が検出されなかったのは、ReproToxは比較的長期間の連続投与を必要とする試験法であるために、1回用量が催奇形性等の障害発現量に達していなかったためと考えられる。

山口 格、西 直樹、逸見 弘子、米良 幸典、松田 和夫

ゼリア新薬工業株式会社 中央研究所開発研究部

各種毒性試験において、投与検体の懸濁剤として汎用されているアラビアゴムを連続投与した時の生体に及ぼす影響を調べる目的で、アラビアゴムのラットにおける4週間反復経口投与毒性試験を実施した。

1群12匹の6週齢F344系雄ラットに、500 mg/kg、1000 mg/kgおよび2000 mg/kgのアラビアゴム溶液を10 ml/kg用量で1日1回28日間連続強制経口投与した。対照として、同数の動物に溶媒として用いた蒸留水を同様に投与した溶媒対照群および無処置対照群を設けた。投与期間中、一般状態の観察、体重・摂餌量および摂水量の測定を実施し、投与終了時に尿検査を実施した。投与終了後、全ての動物を屠殺剖検し、血液学的検査、血液化学的検査および器官重量測定、ならびに病理組織学的検査を実施した。

溶媒対照群およびアラビアゴムの各濃度投与群では、無処置対照群に比較して有意な体重増加抑制、摂餌・摂水量の減少傾向が認められ、投与処置の影響が示唆された。アラビアゴム投与群では2000 mg/kg群で溶媒対照と比較して、体重、摂餌・摂水ともに高値を示す傾向が認められた。また、血清ナトリウム値が1000および2000 mg/kg投与群で有意な低値を示し、血清クロール値が同群で逆に有意な高値を示した。器官重量では、副腎の絶対重量が溶媒対照群に比較してアラビアゴム投与群で用量依存的な増加を示し、相対重量でも500および1000 mg/kg投与群で有意な増加を示した。しかしながら、以上の変化はいずれも軽微な変化で、生理的変動域を大きく越えるものではなく、また、病理組織学的検査においても著変は認められなかった。

新留敏雄，田村繁昭，○出口隆志

㈱ 協和安全性研究所

現在，医薬品の安全性試験の中で中動物の反復投与試験（経口投与）において，一般にとられている試料調製方法は，体重と用量に応じて1頭毎にサンプル量を算出し，ゼラチンカプセルに秤量充填する方法である。これらの作業の煩雑さから，秤量作業の自動化による省力化及び作業者の負担減を目的として，ザイマーク社製のラボラトリーオートメイションロボット（LAロボット）を組み込んだ試料秤量システムを開発したので報告する。

本システムは，ロボット本体を中心にカプセルラック，ロボットハンド，天秤，秤量システムを有し，その周辺にシステムコントローラ，パソコンを配置したものである。ロボットハンドにより指定されたカプセルをつかみ，秤量システム本体に収納された天秤によりサンプルを自動秤量し，その値はシステムに読み込まれ保存される。秤量範囲は20～1000mg，1サイクル当りのカプセル最大数量は1試験7群，群当り雌雄各6頭，7日分までとした。使用カプセルについては，広く用いられている1/4oz，1/80oz，J typeの2種類を用いることとした。

安息角など試料の物性及び条件設定と，充填量の分布，目的値との誤差などの関係を求めた。その結果，安息角は45度以下が充填しやすいと思われ，充填量の分布については，許容範囲を目的値の±1%にした場合，目的値より低い値に分布する傾向が見られたが，許容範囲の下限を上げる事で解消された。目的値との誤差についても±0.3mg以内に収まった。また，イヌの12ヶ月の試験1本当たり約1人/月の省力化が計られた。

○東條 宏子、大野 広志、野村 護、高山 敏

第一製薬(株) 安全性研究センター

〔目的〕 Norethisteroneおよびethinyl estradiolを配合した経口避妊薬であるDT-5061(DT)を連投するとラットにおいてのみ肝の組織変化を伴わずに血清アルカリフォスファターゼ(ALP)の上昇を認め、肝型および骨型アイソザイムの増加によることを報告した(日本薬学会110年会)。しかし、予備的検討により副腎摘出でこれらのALPの上昇は認められなかった。そこで、今回は、副腎の関与を確認するために、副腎摘出し、コルチコステロンを投与したラットにおいて、DTの血清ALPに及ぼす影響を検討した。

〔方法〕 6週齢のCrj:CD(SD)系雌ラット(1群7匹)を使用し、DTの5.35mg/kgをシャム処置(Sham)群、副腎摘出(ADX)群、副腎摘出・コルチコステロン(3mg/rat)投与(ADX-CORT)群に3日間経口投与し、血清ALP、血清ALPアイソザイム、肝組織中ALP濃度、肝重量の測定および組織学的検査を行った。

〔結果〕 Sham-DT群ではDTの投与により血清ALP、肝型(ALPL)および骨型(ALPB)アイソザイム、肝中ALP濃度、肝重量の増加が確認された。ADX群では副腎摘出により、Sham群と比較して血清ALP、ALPLの減少が認められた。しかし、ADX-DT群では、DTの投与によりADX群と比較して血清ALP、ALPLおよびALPBの増加はみられなかった。CORTを投与したADX-CORT群ではSham群と比較してALPLの増加がみられたが、DTを投与しても血清ALP、ALPL、ALPBの増加は認められなかった(ADX-CORT-DT群)。

これらの結果、DTによるラット血清ALPの上昇は主に副腎を介した作用と考えられた。

一般演題 (ポスター)

平成3年7月24日(水)

第4会場

演題番号 401-417

ポスター展示 10:00-17:50

質疑応答 11:30-12:00, 17:10-17:50

野村彰、他 日本製薬工業協会 基礎研究部会

日本新薬（株） 中央研究所

「動物を用いた毒性試験結果と臨床での副作用の関連性」を解析する為に、基礎研究部会加盟企業を対象に各企業の保有するデータについてアンケート調査し、67社から回答を得た。アンケートの設問の一つ、「過去10年以内に上市された医薬品の添付文書〔使用上の注意〕欄に記載されている臨床副作用に対応する何等かの徴候が毒性試験で発現したか」の解析結果について概要を紹介する。

回答された合計238品目の医薬品（循環器用薬経口剤40品、中枢神経系用薬経口剤32品、抗生物質製剤注射剤23品等）に記載される副作用の種類は800余に上り、これらを253種類に中分類し、さらに、26器官別大分類に分けて集計した。

多く記載されている副作用は、悪心嘔吐、下痢、腹痛、便秘等の消化管障害、頭痛頭重、めまい、しびれ感等の中枢・末梢神経系障害、発疹、掻痒、発汗等の皮膚付属器障害、疲労感、発熱、むくみ等の一般的全身障害、肝機能異常、食欲不振、口渇、傾眠、心リズム障害、貧血、白血球数異常、血小板数異常、腎障害であった。

何等かの兆候が高率に毒性試験に発現している臨床副作用に、消化管障害、肝機能や代謝の異常、腎障害、貧血、赤血球数異常があり、逆に、対応する毒性徴候が無いか、あるいは発現し難い副作用には、頭痛頭重、疲労感、関節痛等の痛みの類、聴覚や味覚の異常、不眠症、精神不安定、発汗、むくみ、アレルギー症状があった。

急性毒性試験から得られる臨床副作用情報は乏しく、一方、一般薬理試験から示唆されるものが少なくない。3カ月以下とこれを越える反復投与試験の間に特記すべき差は認められなかった。

402 ESRによる出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) メタロチオネインの活性酸素消去作用

○川口友理子、鬼頭英明、佐藤孝彦、永瀬久光、津谷和美

岐阜薬科大学・公衆衛生学教室

メタロチオネイン (MTと略す) は、システイン含量の高いきわめて特異的な低分子重金属結合蛋白質であり、微生物から高等動物に至るまで広範囲に存在するが、その構造、分子量は微生物で違いが見られる。一方、生理的意義については重金属毒性軽減作用、必須微量元素の生体内恒常性維持がよく知られているが、最近ではその活性酸素消去作用が注目を集めている。演者等は出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*, Scと略す) をCd, Znで曝露して得たSc MTの活性酸素消去作用につき電子スピン共鳴吸収法 (ESR) を用いて検討を行なった。

(実験方法) 発酵研究所より入手した出芽酵母をCd又はZnを含むYEPD培地で馴養し、集菌ののちソニケーターを用いて細胞を破壊した。105,000×Gで遠心して得られた可溶性画分につきSephadex G-50によるゲルろ過, DEAE Sephadex A-25によるイオン交換クロマトグラフィーを行ない, MTを得た。ラジカル発生系としては, (1)H₂O₂とFeSO₄によるFENTON反応系, (2)XANTHINE-XANTHINE OXIDASE系, (3)4NQO-DIAPHORASE-NADH系を検討する対象とした。

(結果及び考察) FENTON反応系においてCd-Sc MT濃度の増加に伴い, DMP0-OHのシグナルが減弱したことからMTが・OHラジカルに対して消去作用を示すことが示唆された。一方, (2)の系においては発生するO₂⁻に対してCd-Sc MT消去作用は示さなかった。(3)4NQO系から発生する・OHラジカルに対しCd-Sc MTは(1)の場合と同様DMP0-OHのシグナルを濃度依存的に抑制した。BSAと比較した場合等重量でCd-Sc MTの方が抑制作用が強く現れた。

403 ケルセチンの変異原活性におよぼすメタロチオネインの影響

岡本章良¹⁾, 黒田孝一¹⁾, 圓藤吟史²⁾

川井信子¹⁾, 森田 茂¹⁾, 堀口俊一²⁾

¹⁾大阪市立環境科学研究所, ²⁾大阪市立大学医学部環境衛生学教室

フラボノイド化合物は、蕎麦や苺などの食用植物に含まれており、その多くに突然変異誘発活性のあることが報告されている。その中のケルセチンは、サルモネラ復帰変異試験株 T A 9 8 で高い変異原活性を示し、いくつかの物質によってその変異原性が増強されることが知られている。我々は低分子量の金属結合蛋白メタロチオネインによってもケルセチンの変異原活性が増強（約2倍）されることを見だし、同様な作用があるスーパーオキシドジスムターゼ（S O D）と比較検討しその増強効果の解明を試みた。還元作用を示すグルタチオンやアルブミンの効果についても調べた。S O Dのケルセチンに対する変異原活性増強効果はS O Dの $O_2 \cdot^-$ 異化反応に起因したもので、ケルセチンの $O_2 \cdot^-$ による酸化を阻害する。C d, Z n-メタロチオネインには、これに類似した効果が見られたが、グルタチオン、アルブミンにはそのような効果は見られなかった。そのメタロチオネインの効果はC u, Z n-S O Dの1 / 1 0 0程度であり、作用機構はS O Dとは異なるものと考えられる。その機構として $O_2 \cdot^-$ の O_2 への変換、すなわちラジカル電子の捕捉が考えられる。S O D、メタロチオネインのケルセチン変異原活性増強効果には飽和濃度があり、ケルセチンに対する濃度比がある値以上ではその増強効果は化学量論に従わなくなった。また、S 9によるケルセチン変異原活性増強効果はS O D、メタロチオネインの1. 2 ~ 1. 3倍以上あり、S 9中にはケルセチンの酸化防止作用を示す因子以外に代謝活性化によるケルセチンの変異原活性増強をもたらす因子の存在を示唆する結果が得られた。

○伊東悟、松浦由美子、服部千春、多田左知子、島田弘康

第一製薬株式会社・中央研究所

金属化合物の中には *in vitro* で染色体異常を誘発するものが多く知られており、その中でもクロム、セレン、ニッケル、コバルト、ヒ素、ベリリウム、鉛などは動物での発癌性試験あるいはヒトでの疫学的調査からその発癌性が疑われている。金属化合物のバクテリアあるいは培養細胞を用いた変異原性試験に関しては多くの報告がなされているが、動物個体を用いた検討についてはあまり報告されていない。今回我々は金属化合物のうち、クロム (K_2CrO_4)、マンガン ($MnCl_2, MnSO_4$)、セレン (H_2SeO_3)、ガドリウム ($GdCl_2$) およびニッケル ($NiCl_2$) について、マウスを用いた小核試験により *in vivo* での変異原性作用とキレート剤によるその抑制作用について検討したので報告する。

上記化合物を 1回あるいは 2回 ddY系雄マウスに投与して、骨髓細胞での小核誘発性について検討した。その結果、 K_2CrO_4 および H_2SeO_3 に顕著な小核誘発作用が認められた。薬物投与後末梢血を経時的にサンプリングして網状赤血球での小核頻度を調べた結果、 K_2CrO_4 では投与後 48時間目に、また H_2SeO_3 では投与後 24時間目に出現頻度のピークが認められた。これに等モルの EDTA を同時投与すると、ピーク時と比較して K_2CrO_4 では約 30% の、また H_2SeO_3 ではほぼコントロールレベルにまで小核出現頻度が低下した。

以上の成績をもとに、金属化合物の小核誘発作用の特徴とその毒性軽減のためのキレート剤併用効果について論ずる。

林 泰司, 鈴江 敏彦, 曾山 桃子, 須藤 純一

東日本学園大学薬学部毒理学講座

[目的] 生体試料での重金属の同時測定の目的で、試料の湿式灰化法および HPLC 法の改良を試み、以下の結果を得た。

[方法] 生体試料の湿式灰化：耐熱試験管に試料 0.5 ml を加え、100 °C、2 時間で蒸発乾固させる。70 %過塩素酸 0.5 ml および濃硝酸 5 ml を加え、80°C (12時間)、140 °C (2 時間)、180 °C (1 時間)、190 °C (1 時間)、連続的に加熱し、蒸発乾固させる。10 mM 硝酸 500 μl を加え、1 時間、回転振盪し、抽出する。抽出液 100 μl を以下の HPLC に使用する。

陽イオン交換 HPLC 法：陽イオン交換カラム (Tosoh TSK-Gel IC-Cation-SW) と溶離液 (0.35 M 乳酸/0.35M 乳酸ナトリウム (pH 3.0); 流速, 0.7 ml/min) で金属イオンを分離後、反応液 (100 mg/L 4-(2'-Pyridylazo)resorcinol および 40 g/L Na₂CO₃; 流速, 0.7 ml/min) を混入し、吸光度 520 nm でクロマトグラムに記録する。

[結果及び考察] クロマトグラム上、Fe³⁺の直後に Fe²⁺ が溶出され、以降、Cu²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Mn²⁺ の各イオンが溶出された。Fe³⁺および Fe²⁺ のピークは上記以外の金属のピークと重なり、加えて、Mn²⁺ の回収率は約20 %と低く、Fe³⁺, Fe²⁺および Mn²⁺は本系での測定から除外された。Cu²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Mn²⁺の各イオンの実用的な検出限界は 1~10 ppmであり、感度が高く、しかも、生体試料において適用可能であることが証明された。

○相良 奈美、西沢 理江、柿畑 耕司、古濱 和久、高山 敏、
小野寺 威

第一製薬(株) 開発研究所

リピドA はendotoxin の活性本体であるが、近年その興味ある生物活性が注目されている。その中でも E. coli 型合成リピドA、LA 15(506)は抗腫瘍活性あるいはIFN 誘発活性が高いことが知られている。しかしながら、これらの毒性に関しては十分な検討が行われていない。

そこで今回、ラットに LA 15を静注し、主に血小板数・凝固系への影響とともに死亡率及び主要臓器における血栓形成について調べた。また、数種の負荷動物を用いてendotoxin と毒性を比較した。実験には 7~8 週齢の雄 SD 系ラットを用いた。LA 15 は点滴静注(0.2~5 mg/30 ml/kg: 4時間)あるいはbolus 静注(0.2~5 mg/10 ml/kg: 4 ml/min) 投与し、投与後24、48、72時間の血小板数を測定して、腎、肝および肺を組織学的に検索した。また、galactosamine 併用投与、乳酸前処置あるいは肝切除ラットを用いて、死亡率あるいは血栓形成を endotoxin と比較した。

その結果、LA 15 では点滴投与のほうがbolus 投与より明らかに毒性が強く発現し、血小板数の著しい減少とともに高用量では死亡例が多発した。点滴投与時の死亡率から比較すると endotoxin のほうが LA 15 にくらべ約 2~3 倍毒性が強かった。

Galactosamine の併用投与では endotoxin の LD₅₀ 値 (129 ng/kg)は LA 15 (2,360 ng/kg) に比べ約18倍毒性が強かった。さらに乳酸あるいは肝切除ラットにおいてもほぼ同様に endotoxin で毒性が強く発現した。以上のことより、点滴投与あるいは負荷ラットを組み合わせれば、少量の検体で toxic potential を増幅して把握することが可能であり、また生物活性と毒性の解離を行う初期スクリーニングにも応用できると考えられた。

○小川幸男, 鈴木幸子, 内藤克司, 齊藤 実,
鎌田栄一, 広瀬明彦, 金子豊蔵, 黒川雄二

国立衛生試験所 安全性生物試験研究センター 毒性部

先端技術産業において種々の機能性材料に用いられているランタン及びイットリウム等の希土類元素は、亜急性毒性についての情報は皆無である。そこで、ラットを用いてこれらの塩化物の28日間反復経口投与毒性試験を行った。

〔実験方法〕5週齢のSlc:Wistarラット雌雄を用いて塩化ランタン7水和物($\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (La)及び塩化イットリウム6水和物($\text{YCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Y)のそれぞれ、0(対照群), 40(L群), 200(M群)及び1000(H群) mg/kgを28日間強制経口投与した。0及び1000mg/kgに回復群、及びペリフェリン(PF)群を別に設けた。臓器中のLa, Yおよび必須元素の分析はICP-AES(Thermo-Jarrel Ash)及びICP-MS(横河電機)を用いて行った。

〔結果〕La・Y投与の雌雄のH群で PF群と同様に体重増加抑制が認められ、雌のM群、La投与の雌のL群で摂餌量の減少に伴う体重の増加抑制が認められた。La・Y投与の雌雄で好酸球の増加が用量に依存して認められ、La・Y投与の雌雄のH群で血清のTP, Albの減少、雌のM及びH群でChEの減少、病理組織学的検査ではLa・Y投与の雌雄のH群で前胃の過角化症、粘膜下織に好酸球の浸潤、雄のH群で腺胃の糜爛が認められた。La投与群の雌雄のH群でALT, AsTの増加が認められたが、病理組織学的には肝臓に変化は認められなかった。必須元素の分析では、La・Y投与の雌雄の肝臓・腎臓及び脾臓のFe及び骨のBa, Sr量の減少が用量に依存して認められた。また肝臓・腎臓・脾臓及び骨のLa, Y量は用量に依存しており、Laは肝臓に、Yは腎臓及び骨に多く蓄積していた。

本研究の一部は国立機関公害防止等試験研究費で行った。

吉田貴彦、重田定義

東海大学医学部衛生学教室

免疫毒性の概念が確立されておよそ10年が過ぎようとしている。この間に様々の金属類についても、その免疫毒性が評価されてきた。

我々は主にヒツジ赤血球を抗原とした *in vitro* 抗体産生応答を指標として、培養系に各種金属化合物を溶解・添加することにより金属類の免疫毒性を評価してきた。

その結果、高濃度添加群においては当然のことではあるが、一般に免疫応答は低下し、これは金属による免疫担当細胞群への直接の細胞毒性によって起こるものであった。この細胞毒性発現を指標とすると、それぞれの金属化合物の免疫毒性は一般毒性評価法の基本となる LD_{50} の値とよく相関した。また同一金属であっても原子価、化学形態の違いによって大きく毒性が異った。また金属の種類によっては高濃度における免疫応答の抑制にいたる以前の低能度において応答を亢進するものがあることがわかった。それらのいくつかについて免疫応答の亢進のメカニズムを、抗体産生応答、リンパ球幼若化応答および FACS を用いた *in vitro* 実験と、一部 *in vivo* 実験を行ない解明を試みた。3価の砒素はTs細胞の前駆細胞を他の免疫担当細胞に先んじて傷害するためであることがわかった。5価およびジメチル化された砒素にも同様の応答の亢進が観察されたが、ガス体の砒素であるアルシン（砒化水素）には応答の亢進作用はなく、Th細胞を早期に傷害するとの示唆が得られた。鉛はTh細胞が活性化されること、B細胞・抗体産生細胞系の活性亢進により免疫応答が亢進するものと考えられた。この様に金属類の免疫毒性の発現とその発現機序にはかなりの違いが存在することがわかった。

坂内なるみ、市村彰敏、下地尚史、原田 寧

日本レダリー株式会社生物研究所

[目的]

環境中あるいはその他の発癌物質に関しては広範に研究が進められ、プロモーション活性を有する多数の化学物質がマウスの二段階皮膚発癌実験モデルを用いてスクリーニングされている。またこうした化学物質以外にも物理的な刺激の反復がプロモーターとして作用しうるとした報告もある。今回我々は、7,12-Dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) マウス皮膚発癌における反復的な創傷の影響を検索し、また12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)、レチノイン酸 (RA) などによって起こる皮膚炎症像と、外傷によるそれを組織学的に比較したので報告する。

[方法]

イニシエーションとして、100 μ l のDMBAをマウス背部皮膚に1回塗布し、1週間後より、0.0025%TPA あるいは0.25%RAを週に2回、同一部位に6ヵ月間繰り返し塗布した。さらに傷については、週に1回マウス背部右側の皮膚に注射針の先で#型の切傷をつくる群と幅約1 cmのガムテープで5回表皮を剥離する群を設けた。尚、対照群としてアセトン投与群および非イニシエーション群を設けた。背部皮膚に生じた腫瘍について発生頻度および個体当たりの腫瘍個数を算出し、統計学的に群間の比較を行った。

[結果]

DMBA/TPA群では5週から、DMBA/RA 群では9週から多数の腫瘍の発生が認められた。しかしDMBA/ 創傷群においては、対照群に比べ有意な差はみられなかった。

前田泰宏・黒川光男・今村健二・大内田昭信

大鵬薬品工業(株) 安全性研究所

〔目的〕抗原性試験では被験薬剤と蛋白質との結合物を作製し、これを感作あるいは惹起に使用する場合が多い。その際に、薬剤と蛋白質の結合比が感作能や惹起能にどのように影響するかについては十分に検討されていない。

今回我々は結合比の異なる数種類のBenzylpenicilloyl (BPO)-蛋白質を作製し、これらのモルモットに対する感作能および惹起能について検討した。

〔材料と方法〕感作用として卵白アルブミン(OVA) 1分子に対しBPO基2および5、惹起用としてウシ血清アルブミン(BSA) 1分子に対しBPO基14、33および40の結合物を使用した。感作能の検討にはBPO基40の結合物を惹起に使用し、惹起能についてはBPO基5の結合物を感作に使用した。

Hartley系雄性モルモットに対し、各結合物をフロイントの完全アジュバント(CFA)とともに1週間間隔で3回皮下投与して感作した。最終感作投与の14日後に採血を行ない血清を得、受身皮膚アナフィラキシー反応(PCA反応)により血清中の抗BPO抗体(IgG₁抗体)を測定した。また、最終感作投与の17日後に全身性アナフィラキシー反応(ASA反応)を、18日後に皮膚反応をそれぞれ行った。

〔結果〕感作においては、BPO基2の結合物でも抗BPO抗体の産生を誘導し、PCA反応およびASA反応ともに十分な陽性反応が誘発されたが、遅延型の皮膚反応は弱かった。惹起においては、BPO基14の結合物を使用するとPCA反応では血清中の抗BPO抗体は低く測定された。また、ASA反応でもショック等の重篤な反応がみられず、陰性と判断される場合もあった。

PCA反応等で測定される血清中の抗体量とASA反応との間の相関性についても合わせて考察する。

田中 豊人, 大石 眞之, 高橋 省

東京都立衛生研究所 毒性部薬理研究科

食品添加物の防虫剤である Piperonyl Butoxide をマウスに混餌法により、0（対照群）、0.1、0.2、0.4、0.8 %、3世代にわたって自由摂取させ、繁殖及び後世代の機能と行動の発達に及ぼす影響について検討した。出生時における産仔数・仔体重・一腹仔の重さは F_1 ・ F_2 世代ともに投与群では減少し、授乳期における成長も抑制された。また、離乳率は F_1 ・ F_2 世代ともに0.8 %投与群の雄で著しく低下した。授乳期における機能と行動の発達では、 F_1 世代では嗅覚性指向反応が抑制された以外は特に顕著な影響は見られなかったが、 F_2 世代では正向反射・断崖回避・嗅覚性指向反応が投与群において抑制された。また、 F_0 ・ F_1 世代におけるOpen Field試験では、いくつかのパラメーターで有意差を示したものの、特定の傾向は見られなかった。これらのことから Piperonyl Butoxide は、本実験に用いられた濃度では繁殖及び機能と行動の発達に対して有意な影響を及ぼし、その効果は F_1 世代よりも F_2 世代に強く現れたことから、後世代ほど強い影響を受ける可能性が高いことが示唆された。

藤谷知子、樺島順一郎、高橋 省、大石真之、
米山允子、中野雅行*

東京都立衛生研究所 毒性部 薬理研究科

*千葉大医学部 真核微生物研究所 形態応答分野

<目的> ピペロニルブトキシド (PB) は、殺虫剤の補助剤として広く用いられ、日本では食品添加物として穀物への使用が許可されている。そこでラットを用いた亜急性毒性試験を行なった。

<方法> PB 0-2.4%を含む餌で、F344ラット雌雄を5週令から13週間飼育し、飼育期間中の体重の変化、餌・水の摂取量、試験終了後の体重・主要臓器重量を測定し、血清生化学検査・血液学的検査を行なった。さらに、肝・腎について、光学顕微鏡による病理学的検索を行なった。

<結果> 2.4% PB群の雌雄の摂餌量が投与開始直後に低下したが、2週めからは有意差はなかった。2.4% PB群の雌雄の体重増加は有意に抑制され、解剖時に肉眼的に肝の腫大・変色が見られ、肝実重量は対照群の1.6-1.9倍と有意に高かった。これらの動物は血清生化学検査で肝・腎の障害が示唆された。光顕観察では、肝細胞の腫大と細胞質の空胞変性が広く認められ、まれに凝固死が見られた。腎には、近位尿細管上皮細胞の凝固変性が見られた。

鈴木尋之，塚本久美子，池田祐三

花王(株)，生物科学研究所

pyrrole 骨格を持つ化合物は多く存在しているが，pyrroleそのものの毒性についてはあまり知られていない。今回我々は経皮投与によるpyrrole のラットの肝臓，腎臓，肺に対する影響を病理組織学的に検討したので報告する。

7週令のcrj-SD系ラット雄（各群 3~4匹）の背部皮膚を毛刈りした後にpyrrole を250mg/kgで24時間閉鎖貼付を行った。貼付開始後3，6，12時間，1，2，3，7，14日後に屠殺し肝臓，腎臓，肺を摘出，ホルマリンで固定後 H.E染色にて病理組織標本を作製し観察した。

その結果，病理組織学的に6時間後から肝臓で小葉中心性の変性が認められ，12時間後から肝臓では小葉中心性壊死及び単核球浸潤，肺では肺胞内出血，動脈周囲水腫及び炎症性細胞浸潤，腎臓では尿細管上皮の変性・壊死が認められた。1日後にはこれらの変化はさらに強くなり，加えて肺では末梢気管支上皮の変性が認められた。2日後では肝臓，腎臓，肺の変化は依然存在し，また腎臓では尿細管上皮の脱落も認められた。3日後には認められた変化は沈静化する傾向を示し，7日後以降ではこれらの変化はほぼ沈静化し肝臓，腎臓では再生が認められた。

以上よりpyrrole をラット雄に経皮的に投与した結果，肝臓では小葉中心性の変性・壊死，肺で肺胞内出血，動脈周囲水腫及び炎症性細胞浸潤，腎臓では尿細管上皮の変性・壊死が認められた。現在種差の検討も行っており合わせて報告する。

○永田貴久¹，政岡俊夫¹，赤堀文昭¹，永田良一²，河野猪三郎²

1. 麻布大学，2. 新日本科学

Paraquat (PQ) を0 (対照)，0.06，0.17および0.50mg/kgの用量で各群雄3頭，雌3頭のビーグルに4週間反復皮下投与し，その反復毒性を調べ，その後4週間および8週間の休薬群を設け回復性も検討した．一般状態は主に0.50mg/kg投与群に自発運動および栄養状態の低下，病的肺胞音の聴取，食塊嘔吐の初期発現，投与部位の硬結，潰瘍が見られた．眼科検査では回復4週目に0.50mg/kg投与群1例の左眼底に軽度な出血，尿検査ではタンパクの陽性，血液学的検査は白血球数，フィブリノーゲン，網状赤血球の増加，血清生化学検査ではPL，BUN，CPKの増加が主に0.50mg/kg投与群に認められた．剖検では0.06および0.17mg/kg投与群には特に異常は見られず，0.50mg/kg投与群の切迫屠殺例に無気肺が見られ，その光顕像は肺に局所的無気肺巣，胸膜と肺胞壁の肥厚，線維芽細胞様細胞の増殖，拡張した間質および肺胞内に豊富な線維増殖，肝臓では胆嚢壁近辺に帯状出血，肝細胞の腫大，軽度な変性，腎臓では尿細管の軽度な変性が見られ，電顕では肺に肥厚した肺胞壁に豊富な膠原線維，線維芽細胞，筋線維芽細胞，lamellar bodyの蓄積を伴うⅡ型肺胞上皮細胞の軽度な増殖，少数の肥満細胞，紡錘形細胞の分裂像が少数，間質内には崩壊した細胞小片が見られた．腎臓では上皮細胞の軽度な崩壊，基底膜の肥厚と層状化，拡張した間質内には豊富な線維と崩壊した細胞小片が見られ，肝臓では蓄積したグリコーゲン顆粒，ミトコンドリアの軽度な腫大がそれぞれ見られた．従って，0.50mg/kg以上の投与量では完全な肺線維症は発現できなかったものの肺線維症誘発の可能性が示唆された．

鈴木雅実 小林智子・杉本哲朗 鈴木繁生 蒲池信一・辻 紘一郎**

中外製薬㈱ 安全性研究所, *中外製薬㈱ 試験研究センター, **シー・エス・ケー実験動物研究所

β_2 -microglobulin(β_2 -m)は、血液など種々の体液中に微量存在する低分子タンパク質である。今回、我々は、尿中 β_2 -mの腎障害指標としての臨床的意義に注目し、ラット β_2 -mの分離精製、測定法の確立、ならびに薬剤性腎障害における尿中 β_2 -m測定の臨床的意義について検討を行った。

1. β_2 -mの分離精製：クロム酸ナトリウム単回投与により作製した尿細管障害ラット(Slc:SD)の尿約12 μ lを用い、ゲル濾過、陰イオン交換クロマトグラフィー、クロマトフォーカシングならびにハイドロフォービッククロマトグラフィーを組み合わせ分離精製した。その結果、約18ngの β_2 -mを精製した。

2. β_2 -m測定法の確立：精製 β_2 -mをウサギに免疫して抗 β_2 -m抗体を作製し、抗体結合ビーズを用いたEIA法による β_2 -m測定法の確立を行った。この測定法は、測定感度が2.5~160ng/nlであり、尿中 β_2 -m濃度の測定が可能であった。

3. 薬剤性腎障害における尿中 β_2 -mの変動：Cisplatin単回投与(2,4,8ng/kg)による腎障害ラット(Slc:SD)の尿中 β_2 -mを経時的に測定し、その臨床意義の検討を行った。尿中 β_2 -m排泄量は、同時に測定した血清生化学パラメータ(BUNなど)、尿中パラメータ(NAGなど)とほぼ同様に、腎障害を示唆する増加を示した。また、形態的に再生像が観察され、尿中酵素が異常値を示さない時期においても、尿中 β_2 -m排泄量は継続的に異常値を示した。したがって、他のパラメータの測定に加え、尿中 β_2 -mを測定することは、腎障害の検出ならびに解析に有効であるものと考えられた。

2,2'-メチレンビス(4-メチル-6-*tert*-ブチルフェノール)(MBMBP)のラットにおける急性及び亜慢性毒性試験

○高木篤也、佐井君江、門馬純子、会田喜崇、高田幸一、
内藤克司、中路幸男、黒川雄二
国立衛生試験所 毒性部

MBMBPはアルキルフェノール系抗酸化剤でプラスチック、合成ゴムの老化防止剤として用いられ、0.42%MBMBP添加飼料1週間投与ラットで血液凝固能低下¹⁾、10カ月間ラット慢性毒性試験(経口投与:50mg/kg/day)で精巣萎縮及びヒトADIは2.5mgとの報告が有る²⁾。今回、MBMBPの急性及び亜慢性毒性試験を行なったので報告する。

5週齢Slc:Wistarラットを用い、急性毒性試験ではオリーブ油に懸濁したMBMBPを雌雄の各群10匹に単回強制経口投与した。亜慢性毒性試験では雌雄各群10匹とし、MBMBPを0.12(L)、0.6(M)及び3.0(H)%の濃度で飼料に添加後、固形飼料とし、3カ月間自由に摂取させ、1及び3カ月目に各群5匹または生存動物を屠殺、血液学的、血清生化学的、病理組織学的検査を行なった。

急性毒性試験の結果、LD50値は雌雄共5g/kg以上であった。主症状として下痢を認めた。亜慢性毒性試験の結果、雌雄M、H群で顕著な体重増加抑制、雄M、H群、雌H群で鼻腔からの出血を伴った死亡、雌雄のM、H群で胸腺萎縮、骨髓細胞数減少、雄のL、M、H群で精細管萎縮、精子形成不全、巨細胞増加、間質水腫、M、H群でさらに精囊腺、前立腺萎縮、雌M、H群で卵巣、子宮萎縮が認められた。

出血を伴った死亡には血液凝固能低下作用¹⁾との関連が示唆された。また、精巣障害作用は体重増加抑制の認められないL群でも認められることから単なる栄養障害の結果ではなく、MBMBPが直接的に関与していると思われた。

1)Takahashi, O. et al., Toxicol. Lett., 7, 405-408, 1981.

2)Stasenkova, K.P. et al., Kauch. Rezina, 1, 24-26, 1977.

○小倉剛、野口規子、小倉昌子、有賀恭子、田村博志、
松本清司*

中外製薬・安全研、信州大・医*

【目的】バイオテクノロジー応用医薬品の開発に伴い、安全性試験における骨髄検査実施の機会が増えているが、使用動物の週齢や性が骨髄検査値にどう影響するかについての報告は少ない。今回、血液毒性評価のための基礎的検討として、ラットに化学物質を投与し、血液学的な毒性の強さが動物の週齢や性により、どの様に異なるかを調べた。

【方法】安全性試験で多く用いられる、6および10週齢の雌雄ラット(S1c:SD)に、フェニルヒドラジン(PHZ)8mg/kg(s.c.)、アザチオプリン(AZ)50mg/kg(p.o.)あるいは5-フルオロウラシル(5-Fu)45mg/kg(s.c.)を4日間投与し、投与開始後2日に血液学的検査を、4日に血液・骨髄検査を行い、無処置群と比較した。

【結果と考察】<無処置群>網状赤血球比率(Reti)は10週齢に比べて6週齢が、また、両週齢とも雄が高値を示した。全骨髄細胞数(BMC)は、雄では6週齢が高値を示したが、雌では明らかな週齢差は認められなかった。骨髄赤芽球数(Eb1)は、雌雄とも6週齢が高値を示した。このことから、今回調べた週齢では6週齢が、また、性別では雄の方が赤血球系の造血機能が未完成であると考えられた。

<PHZ>RetiとEb1の増加の程度は10週齢が強く、性別では雌で強くみられた。貧血に対応する骨髄造血機能は、6週齢より10週齢が、また、雄より雌が勝っていると推察された。<AZ>Eb1の減少の程度は6週齢が強く、末梢リンパ球数の減少は雄で強かった。

<まとめ>以上の結果より、薬物によっては、10週齢に比べて骨髄の造血機能が未完成な6週齢で投与を始めた場合、ならびに、骨髄の成熟が遅いと思われる雄を用いた場合、血液や骨髄に対する毒性が強く現われる可能性があると考えられた。5-Fuについては検討中であり、これらの結果も併せて報告する。

一般演題 (口演)

平成3年7月25日(木)

第2会場

演題番号 232-241

1. 採材条件

松澤利明

日本製薬工業協会基礎研究部会

山之内製薬(株)安全性研究所

毒性試験では同一試験施設内で同一条件で実施した無処置対照動物のデータを集積して背景データとして、毒性評価に活用される場合が多い。背景データは本来、各試験施設内で目的にかなった方法にしたがって集積し利用するものであるが、医薬品の毒性試験に関してG L P規範及び試験法ガイドラインが最近10年間に施行され、各施設ともハード及びソフト面が充実されていると考えられる。当協会では最近5年間の背景データを集積し解析するため、加盟80社にアンケート調査を行ない67社からマウス(約60匹/性)、ラット(約7500匹/性)、雄ウサギ(約200匹)、イヌ(約5000匹/性)、雄ミニブタ(28匹)及びサル(約700匹/性)の正常値データが寄せられた。ここでは、臨床検査の採材条件について報告する。

ラット採血時の麻酔は、エーテル麻酔が最も多く、次いでペントバルビタール麻酔であり、無麻酔での採血は全体の1割未満であった。一方、イヌでは、ほとんどが無麻酔採血であった。

ラット血液学的検査試料の採血部位は、動脈が約47%、静脈が約49%、血液化学検査試料の採血部位は動脈が約65%、静脈が約31%、その他に心臓が用いられていた。ラット動脈は腹大動脈が、静脈は後大静脈、眼窩静脈叢、頸静脈、尾静脈、大腿静脈が用いられた。イヌではほとんどが前肢の橈側皮静脈あるいはその付近の静脈から採血されていた。

血液の抗凝固剤は、血液学的検査の非凝固系試料にはE D T Aが最も多く、凝固系試料には3.8%クエン酸ナトリウムが最も多く使用されていた。血液化学的検査では血清を用いる割合が血漿より多かった。この検査での抗凝固剤はヘパリンが最も多く使用され、また検査項目毎に抗凝固剤の種類を違えた施設もあった。抗凝固剤を使い分ける検査項目はLDH、CPK、蛋白質、電解質等であった。

尿検査試料は、ラット、イヌとも排泄尿が用いられた。採尿時間は0~6時間と16~24時間蓄尿に分けられた。前者は主に定性試験と尿沈渣に、後者は主に尿量、浸透圧、電解質等の検査に用いられた。なお、その他の動物種及び採材条件についても報告する。

野村 護

日本製薬工業協会 基礎研究部会

第一製薬(株) 安全性研究センター

日本製薬工業協会基礎研究部会加盟80社に毒性試験における臨床検査の正常値についてアンケート調査した。血液学的検査では赤血球数(RBC)、ヘモグロビン濃度(Hb)、ヘマトクリット値(Ht)、白血球数(WBC)、白血球百分率(Dif)、血小板数(Plt)、血沈(ESR)、プロトロン時間(PT)、部分 tromboplastin 時間(APTT)およびフィブリノーゲン(Fbg)等を調査対象とした。

その結果、70社から回答が寄せられたうちの67社 123件のデータを集積した。各社で測定されている項目のうちRBC、Hb、Ht、WBCは全社で測定されていたが、Pltは99.2%、Difは87.8%、網状赤血球(Ret)78.0%、PTおよびAPTTはそれぞれ76.4および59.3%であった。Fbgは22.8%と低率であり、ESRは僅か2.4%の測定率でしかなかった。このことは、各社とも毒性試験の血液学的検査においてFbgやESRは未測定化が、未だ少ないものと推測された。また、測定機器は各社ともに自動計測機器の導入率が高く、測定精度の向上と省力化に注力されているが、Ret計測の自動化率は14.5%、Difは22.7%であり、未だ用手法が主流であった。各項目の解析結果から、種差、系統差、性差、年齢差および施設間差の比較を以下に要約した。

1. 赤血球数ではマウス、ラットはイヌ、サルに比べ高値を示し、種差が顕著であった。
2. Hb、Htではラット、イヌはマウス、ウサギに比べ高値を示し、雄でやや高い傾向を示した。
3. 白血球数ではラットはマウスより高値を示し、ラットの系統ではSD、Wistar系はF344に比べ高く、また雄で高値がみられ種差、系統差、性差が認められた。白血球百分率ではイヌはマウス、ラットに比べN/L比が高く、ラットでは加齢により増加した。
4. 血小板数ではマウス、ラットはウサギ、イヌ、サルに比べ高値を示し、ラットではSD、Wistar系はF344に比べ高く、種差、系統差が認められた。
5. PT、APTTではイヌはラット、サルに比べ凝固時間が短く種差が認められた。
6. 各項目の値に施設間のバラツキがみられ、共通の精度管理が必要と考えられた。

3. 血液化学的検査

海野 隆

日本製薬工業協会 基礎研究部会
鐘紡株式会社 薬品安全性研究所

日本製薬工業協会基礎研究部会加盟80社に対し行なった毒性試験における臨床検査 アンケート調査で、67社より 122件50項目の血液化学的検査背景 データが寄せられた。

ラットではGOT, GPT, AIP, 総蛋白, BUN, コレステロール, 血糖, NaおよびKが全社で、アルブミン, A/G, クレアチニン, Cl, Ca, 無機リンが 90%以上、中性脂肪, ビルビンが 80%以上の会社で測定され、イでの実施率もほぼ同様であった。イ, ヌでのICG, BSP, ICG など負荷試験の実施率は 10%前後と低かった。動物種により検査方法を変えている施設はあったが、ChEのように基質特異性に種差が知られている項目で測定方法を変えている施設はなかった。

今回の アンケート結果を種差についてみるとGOT, 血糖ではラット が、総蛋白, AIP, ChE ではヌが、K ではウス が、リン脂質ではイがそれぞれ他種動物に比べ高い傾向を示した。また コレステロールは ラットで、BUN, LDH はイで、無機リンはヌで低い傾向にあった。

性差に関してはラット において中性脂肪, 無機リンが雄で高値を、ChE, リン脂質が雌で高値を示す傾向があった。またAIP は ラット, ヌにおいて雄で高値を示す傾向がみられた。

加齢により ラットではAIP, アルブミン分画, 無機リンが低下し、ChE, コレステロール、中性脂肪, リン脂質がそれぞれ増加する傾向にあった。イではAIP, CPK, 無機リンに低下傾向がみられ、ヌではAIP に低下傾向が、LDH に増加傾向がみられた。

このように多くの検査項目で種差、性差、加齢による変動がみられたほか、測定方法の差に起因する値のばらつきもみられ、毒性試験血液化学的検査成績の比較には注意が必要と考えられた。

樽見千利, 山下和男, 永田健一, 鈴木和美, 寺西宗広, 村松敦子,
小柳藤夫, 岡本真理子, 木村邦男, 増田 裕

三共, 安全性研究所

毒性試験で比較的発現頻度が高い溶血性貧血を6種類の動物で血液学的に比較した。

〔材料および方法〕F344ラット、コモンマーモセット、カニクイザル、日本在来種黒猫、ビーグル犬およびシバヤギを各4-5頭用いた。これらの動物に、アセチルフェニルヒドラジンの5mg/kgを、イヌおよびネコにはゼラチンカプセルで、また他の4種の動物には水溶液で7週以上毎日連続して経口投与した。検査は原則として7日毎に行い、RBC数および恒数(MCV, MCH, MCHC), Hb, Ht, reticulocyte, WBCおよびPLT数を測定したが、ヤギではreti, PLT数は測定しなかった。採血はネコ、イヌおよびヤギでは頸静脈から、サルおよびマーモセットでは内股静脈叢からいずれも無麻酔下で、またラットではエーテルによる軽麻酔下で眼窩静脈叢から行った。

〔結果〕ヤギ2頭が投与10日までに極度の貧血により死亡したが、そのほかの動物に臨床的な異常は見られなかった。RBC数は投与7日目に全種動物で軽度の低下を示し、14-21日目に最低値が見られた。ネコおよびイヌではそれぞれ投与前の 824 ± 80 および $599 \pm 55 \times 10^4 / \text{mm}^3$ から投与14日目に63および53%の値まで低下し、その後21日目には68および77%まで軽度に上昇し、以後同程度の値で推移した。これに対してラットでは投与前の $893 \pm 5 \times 10^4 / \text{mm}^3$ が投与14日目に62%となり、以下同様にマーモセット; $624 \pm 41 \times 10^4 / \text{mm}^3$ 、40%、サル; $563 \pm 56 \times 10^4 / \text{mm}^3$ 、44%、ヤギ; $1357 \pm 100 \times 10^4 / \text{mm}^3$ 、23%と14日目に低値が認められたが、21日目に上昇は見られず比較的長い期間、14日目に近似する低値が持続した。MCVは投与後高値となり、投与前と14日目の値はラット $50 \rightarrow 73 \mu^3$ 、マーモセット $77 \rightarrow 108 \mu^3$ 、サル $72 \rightarrow 93 \mu^3$ 、ネコ $48 \rightarrow 62 \mu^3$ 、イヌ $76 \rightarrow 86 \mu^3$ 、ヤギ $27 \rightarrow 58 \mu^3$ であった。MCHCは投与前動物間で近似値を呈したが、投与後の変化は異なった。すなわち、ネコ、イヌでは高値で推移したのに対し、マーモセット、サルでは投与7日目に一旦高値を呈した後低値となり、またラット、ヤギでは漸次低値となった。その中でヤギでは投与前の33%が投与14日目に23%となり全動物中で最低値が見られた。Reticulocyteは全動物で上昇した。WBC数はラット、サル、ネコで変化程度は異なったが上昇した。また、PLT数はネコ、イヌで上昇した。

〔まとめ〕RBC数の低下はヤギ>マーモセット>サル>イヌ>ネコ>ラットの順に著しく、動物種差が認められた。供試動物間における共通点として、ネコおよびイヌではRBC数を一定に保とうとするself limiting反応が他の動物に比較して早期に且つ明瞭に認められ、また、マーモセットおよびサルでは高色素性貧血から低色素性貧血への変化が認められた。

○井上 智彰、堀井 郁夫

日本ロシュ研究所 毒性・病理部

〔目的〕

医薬品の免疫毒性評価において、細胞表面マーカーに対する抗体を用いた免疫系細胞の解析は、用いる抗体によりT細胞、B細胞、抗原提示細胞のそれぞれの変化を検出できるという点で重要である。今回、rIL-2を投与したマウスの免疫系臓器について、免疫組織化学及びフローサイトメトリ(F C)により免疫系細胞の変化を解析し、両解析結果の比較を行った。

〔方法〕

10週令、BDF1系雄マウスに Vehicle(1mg/mlマウス血清アルブミン生理食塩水溶液)あるいは、5または10 μ g/マウスの rIL-2を2回/日、4日間腹腔内投与し、最終投与翌日に脾臓、胸腺、リンパ節を摘出し、Thy1.2、L3T4、Lyt-2、免疫グロブリン、Ia、Mac-1、asialo GM1、IL-2レセプターについて、ABC法を用いた免疫組織化学及びF Cによる解析を行った。

〔結果〕

rIL-2投与により、asialo GM1陽性細胞、及びIL-2レセプター陽性細胞が各臓器で増加した。その詳細は以下のごとくであった。免疫組織化学的検索において、asialo GM1陽性細胞は、Vehicle投与マウスで、脾臓のT細胞領域及び赤脾髄に分散して認められるが、rIL-2投与マウスでは特に赤脾髄において著明な増加が認められた。rIL-2レセプター陽性細胞は、Vehicle投与マウスでは、脾臓のT細胞領域に散見され、胸腺(特に皮質)に分散して認められるが、rIL-2投与マウスでは、脾臓のT細胞領域で増加及び赤脾髄に出現し、胸腺の髄質(特に皮質との境界領域)で著明な増加が認められた。F Cによる解析でもほぼ同様の結果が得られたが、免疫組織学では細胞構築の変化が評価できる点で有利であると考えられた。

勝谷 成男, 塩野谷 博

エーザイ株式会社 安全性研究部

薬剤アレルギーの発現を、実験動物を用いて予知しうるシステムの開発は、安全性の高い医薬品の開発にとって、重要課題のひとつである。我々は、臨床において薬剤誘発性ループスや過敏性を高率で発現することが知られている薬剤に対する免疫応答を、モルモットおよびマウスを用いて検討した。

[方法] 被験薬剤としてPenicillin G(PC), Procainamide(PA), Hydralazine(HA), Isoniazid(IN), α -Methyldopa, D-Penicillamine, Sulfamethoxazole(SM)および2,4-dinitrochlorobenzene(DNCB)を用いた。モルモットには25mg/animalを70ポイントの完全アジュバント(FCA)とともに背部皮下に、マウスには2mg/animalをFCAまたは水酸化アルミニウムゲルを用いて腹腔内に、2週間隔で2回投与した。2回目の投与の2週後に採血を行い、その後にモルモットでは全身性のアナフィラキシー(ASA)と遅延型アレルギー(DTH)反応を観察した。血清中の薬剤に対する抗体は、ELISAで測定した。マウスの血清は、ELISAのほかにラットを用いた受身皮膚アナフィラキシー反応を検討した。

[結果および考察] モルモットでは、抗体を薬剤蛋白結合抗原を用いてELISAで測定した結果、PC, PA, HA, IN, SM, DNCBに対する抗体が検出された。ASA反応では、薬剤蛋白結合抗原で惹起することによって、PC, IN, DNCBが陽性となり、DTH反応ではPA, HA, INが陽性になった。しかし、マウスではDNCB以外の薬剤では、免疫応答は認められなかった。これらの結果より、モルモットに薬剤をFCAとともに投与し、その薬剤に対する免疫応答を調べることによって、臨床における免疫異常の誘発や過敏性の発現の可能性の予測に、有用であると考えられた。

福島昭治¹, 柴田雅朗², 高田信康¹, 村井 隆¹, 大年辰幸¹

1. 大阪市大・医・1病理, 2. 名市大・医・1病理

ラットの肝、前胃、腺胃、甲状腺、膀胱、肺等の多臓器に腫瘍に関連する増殖性病変を出現させるという多重癌モデルを用いて、低濃度の発癌物質ないし発癌修飾物質を組合わせて投与した場合の発癌複合効果を検討した。

6週齢のF344雄ラット190匹に、DEN, MNU, DHPNを4週間内に順次投与後(DMD処置)、下記の組合わせの化合物を投与し、全経過20週で屠殺、標的臓器における腫瘍性病変の発生を病理組織ならびに免疫組織学的に検索し、DMD処置のみの対照群と比較検討した。A群: BHA, catechol, propyl gallate, TBHQなどの4種の酸化防止剤, H群: 2-AAF, DMN, 3'-Me-DAB, phenobarbital, thioacetamide など5種の化合物, N群: BBN, DBN, EHEN, MNNG, PNUなど5種のニトロソ化合物, さらにそれらを複合したA+H群, A+N群, H+N群, A+H+N群で、それぞれ発癌量の1/10を与えた。

その結果、肝過形成結節および癌の発生率はH群では各々40%, 0%であったが、HN群では100%, 86%と増加を、AH群では15%, 0%と逆に減少を示し、同様の減少はAHN群でも観察された。膀胱の乳頭腫および癌の発生はN群では33%, 13%であったが、AN群で93%, 27%, AHN群で57%, 36%と増加した。腺胃のPg1変異幽門腺出現率はAまたはNを含むすべての群で高率であった。

以上、発癌に対する化合物の複合効果は、低濃度であっても発揮され、しかも一個体レベルでみると臓器によって増強、あるいは抑制といった相反する効果を示す事が多重癌モデルにおいて明らかとなった。

○佐野真士、高場克己、岩崎省吾、萩原昭裕、
白井智之、伊東信行

名市大・医・第一病理

ラット肝中期発癌試験法（DEN-PH法）で陰性を示した肝以外に標的性を有する発癌物質や発癌性未知物質について多臓器中期発癌試験法（DMD法）を用いて発癌性の早期検出を試みた。【方法】6週齢F344雄ラット190匹を用い、DEN（100mg/kg b.w.）を1回、その2日後よりMNU（20mg/kg b.w.）を3日間隔で4回、それぞれ腹腔内投与し、ついで0.1%DHPN含有飲料水を2週間投与した（DMD処置）。その後、被験物質として3-MC（0.02%）、DMBA（0.01%）、BHA（1%）、catechol（0.8%）、propineb（0.1%）、folpet（0.2%）、daminozide（1%）、Na-ascorbate（5%）および caprolactam（1%）を飼料中に、MNNG（0.005%）を飲料水中に混合して16週間与えた。また、DMD処置のみの対照群を設け全経過20週で屠殺、全身諸臓器の腫瘍性変化を病理組織学的に検索した。【結果】発癌性あるいは発癌修飾作用が明らかな物質では、肺、甲状腺、前胃、腺胃、肝、膀胱のいずれかの臓器において腫瘍性病変の発生が対照群に比較して有意に上昇した。一方、BHAでは肝腫瘍性病変の発生に対して抑制作用を示した。なお、発癌性未知物質ではNa-ascorbateが膀胱で発癌促進効果を発揮したのに対し、daminozide、caprolactamは種々の臓器に対し何らの効果を及ぼさなかった。【結論】DEN-PH法で肝に対して発癌性が陰性を示した物質でもDMD法により20週の実験期間でその発癌性が有効に検出された。さらに、発癌性の予知と同時に標的臓器の検索も可能であり、この試験法は長期発癌試験の成果を比較的短期間に予測しうる有用な方法であると結論される。

高橋 智, 星谷 達, 箱井加津男, 柴田雅朗, 河部真弓
長谷川良平, 伊東信行

名古屋市大・医・第一病理

我々は環境中に存在する化学物質の肝発癌ならびに、発癌修飾作用をラット肝の前癌病変である胎盤型glutathione S-transferase(GST-P)陽性細胞巢の発生を指標として8週間で判定できる*in vivo*中期発癌試験法を開発してきた。今回は今までに検索した181種の化学物質のデータについて検討を加えると共に2年間の発癌試験との相関性についても検討した。

【方法】6週齢のF344雄ラットを用い、実験開始時にdiethylnitrosamine(DEN)(200mg/kg bw)を1回腹腔内投与した後、2週後より被験物質を6週間投与した。また、第3週に2/3部分肝切除を施行した。動物は全経過8週で屠殺し肝を冷アセトン固定した後、GST-Pの免疫組織化学的染色を行い陽性細胞巢について定量的解析を行った。さらに6種の化学物質について8週以降基礎食にて104週まで観察した群を設け、長期観察結果との比較検討を行った。

【結果】肝発癌物質では変異原性のあるもので21/22(95%)、ないもので18/20(90%)と極めて高率に検出することができ、肝以外の発癌物質では8/34(24%)と低率ではあるが検出可能なものがみられた。一方、非発癌物質では0/37(0%)と偽陽性を呈するものは認めなかった。また長期観察における肝細胞癌の発生率と8週時点でのGST-P陽性細胞巢の発生率との間には極めて高い相関性が認められた。

【結論】ラット肝の前癌病変であるGST-P陽性細胞巢を指標とする8週の検索法は高感度に肝発癌物質を検出することができ長期試験との相関性も高いこと、さらに発癌物質の多くが肝を標的とする事実から本法は極めて有用な中期発癌試験法であることが示された。

BHA およびCatecholの各種臓器に対する発癌の促進
および抑制効果

○玉野静光、浅川恵美子、小木曾 正、田中 光、
広瀬雅雄（名市大・医・1病理）

【目的】前胃または腺胃に発癌性を示すBHA またはCatechol(CC)の発癌修飾効果を種々の二段階発癌法を用いて検討した。

【方法】6週齢の雄F344、Wistarあるいは雌SD系ラットを用い、1群 15~25匹の実験群と、1群 11~26匹の対照群を設定した。実験群には、MNNG(150 mg/kg, 1回強制経口)投与後51週間、DBN(0.05%飲料水, 4週)投与後32週間、MNAN(25 mg/kg, 週1回計3回腹腔内)投与後50週間、BBN(0.05%飲料水, 4週)投与後32週間、DMH(20 mg/kg, 週1回計4回皮下)投与後37週間、EHEN(0.1%飲料水, 2または3週)投与後30週または37週間、DHPN(0.1%飲料水, 2週)投与後30週間、またはDMBA(25 mg/kg, 1回強制経口)投与後33週間、BHA(0.5, 1.0 または2.0%) あるいはCC(0.8%)を基礎食に混合してそれぞれ投与した。対照群にはそれぞれの発癌物質投与後基礎食のみを与えた。実験終了後、各発癌物質の標的臓器を中心に病理組織学的に検索した。【結果】BHA は前胃(乳頭腫、扁平上皮癌) および膀胱(PN過形成、乳頭腫、移行上皮癌)の発癌を促進し、肝臓(過形成巣、過形成結節、肝癌)、肺(腺癌) および乳腺(線維腺腫、腺癌)の発癌を抑制した。一方、CCは前胃(扁平上皮癌)、腺胃(過形成、腺癌) および食道(扁平上皮癌)の発癌を促進し、結腸(腺癌) および乳腺の発癌を抑制した。両者ともに腎臓 および甲状腺には修飾効果を示さなかった。【結論】フェノール系化合物は発癌性に加え、種々の臓器に対し発癌の促進あるいは抑制という複雑な修飾作用を有することが明かとなった。

第18回日本毒科学会学術年会
プログラム・要旨集

発行日 平成3年7月1日
発行者 堀口俊一
発行所 大阪市立大学医学部環境衛生学教室
〒545 大阪市阿倍野区旭町1-4-54
Tel. (06)645-2056 Fax. (06)646-0722

第18回日本毒科学会学術年会

協賛会社一覧 (順不同)

日本農薬株式会社大阪工場	株式会社大阪鉛錫精錬所
日本ロシュ株式会社	株式会社三宝化学研究所
塩野義製薬株式会社	小野薬品工業株式会社
日本クレア株式会社	協和発酵工業株式会社
エーザイ株式会社研究開発本部	株式会社パナファーム・ラボラトリーズ
沢井製薬株式会社	武田薬品工業株式会社
全星薬品工業株式会社	ブリistol・マイヤーズスクイブ株式会社
萬有製薬株式会社	キリンビール株式会社
アイ・シー・アイファーマ製薬株式会社	三共株式会社
日本化薬株式会社	藤沢薬品工業株式会社
山之内製薬株式会社	東洋醸造株式会社
参天製薬株式会社	日本メジフィジックス株式会社
株式会社ツムラ	吉富製薬株式会社
第一製薬株式会社	鐘紡株式会社
大日本製薬株式会社	サンド薬品株式会社
株式会社日本医学臨床検査研究所	明治製菓株式会社
エーザイ株式会社大阪支店	住友化学工業株式会社
日本チバガイギー株式会社	藤本製薬株式会社
日研化学株式会社	日本ルセル株式会社
田辺製薬株式会社	日本ワイス株式会社
フクダエム・イー工業株式会社	大塚製薬株式会社
大鵬薬品工業株式会社	大正製薬株式会社
八州薬品株式会社	株式会社資生堂
ヘキストジャパン株式会社	富士レビオ株式会社
	生活科学研究所

展示会社一覧 (順不同)

サラヤ株式会社	三洋貿易出版株式会社
株式会社エビア	株式会社新日本科学
株式会社三菱化成安全科学研究所	フクダエム・イー工業株式会社
東洋産業株式会社	田辺医理科器械株式会社
エルゼビアサイエンスパブリッシャーズ	丸善ブックメイツ株式会社
	湯浅商事株式会社
	株式会社 H B J