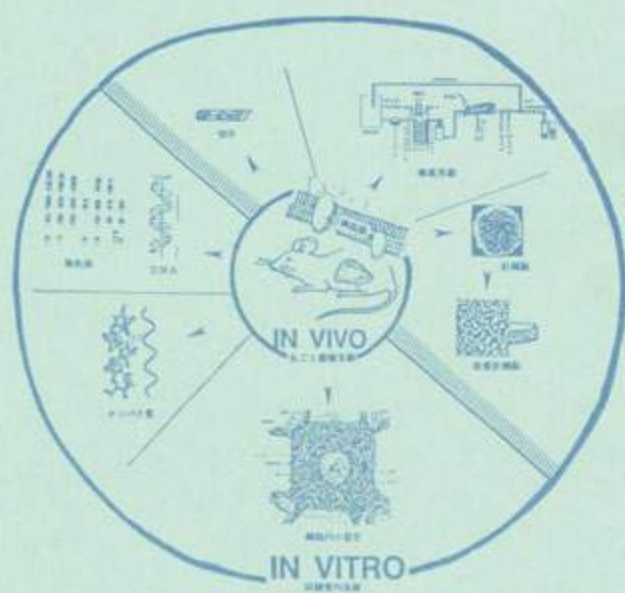


第20回 日本毒科学会学術年会 プログラム・要旨集



平成5年7月29日(木)・30日(金)

千葉大学薬学部

1993 千葉

正誤表

頁	行	誤	正
御挨拶	6行	強調	協調
御挨拶	下から9行	133題	134題
3	地図中右下	コソドモール	コリドモール
3	地図下文中	あります、	ありますので
9	表1行	プラザホニル	プラザホテル
9	O-301-304座長	増淵美子	増渕美子
12	SL2演題	Drug	Drugs
25	4行	(CsCT)	(sCT)

第20回日本毒科学会学術年会

会期：平成5年7月29日（木）～30日（金）

会場：千葉市民会館（〒260 千葉市中央区要町1-1 TEL 043-224-2431）

ロイヤルプラザホテル（〒260 千葉市中央区栄町2-5 TEL 043-224-6111）

会 長 佐 藤 哲 男

第20回日本毒科学会学術年会組織委員会

五十嵐 俊二	エーザイ（株）
井村 伸正	北里大学薬学部
遠藤 仁	杏林大学医学部
黒岩 幸雄	昭和大学薬学部
鈴木 和夫	千葉大学薬学部
高仲 正	国立衛生試験所
山添 康	慶応義塾大学医学部
上野 光一	千葉大学薬学部

（順不同）

第20回日本毒科学会学術年会事務局

〒263 千葉市稲毛区弥生町1-33

千葉大学薬学部薬物学研究室内

TEL 043-290-2919, 2920, 2921（ダイヤルイン）

FAX 043-290-2919（直通）, 043-255-1574（薬学部）

目 次

ご挨拶	1
会場ご案内	2
お知らせとお願い	6
年会日程	9
プログラム	12
特別講演	35
シンポジウム	43
パネルディスカッション	69
研究推進委員会ワークショップ	79
一般演題（口演）	95
一般演題（ポスター）	149
人名索引	243

御 挨 拶

昨今、わが国をはじめ世界各国において医薬品の安全性の確保が強く指摘され、また、環境化学物質の人体への影響が叫ばれております。このような情勢の中で、本年は日本毒科学会の設立20周年に当たり、この時に学術年会をお世話致すことについては大きな責任を感じております。一方、昨年から新しく企画されました日本毒科学会主催第2回サテライトシンポジウムにおいては、今日、国際的強調が求められているトキシコキネテックスを取りあげました。ここでは、世界における現状を十分に把握すると共に、国外の研究者を交えて核心にふれた討論を展開し、我が国における今後のこの問題についての指針を提示する場となることを期待しております。学術年会では、免疫毒性学の権威である米国 NIH の Lance Pohl 博士にこの領域の研究を解説して頂き、また、ミシシッピ大学の Ing K. Ho 教授には神経毒性学の現状と将来への展望について講演をお願いしました。さらに、シンポジウムとしては、「臨床におけるトキシコロジー」を、ワークショップでは、新たな毒性試験代替法として期待されている「“正常”不死化細胞」を取り上げました。また、パネルディスカッションとしては、従来多くの議論があるにも拘らず、未だ結論が得られていない「最大無毒性量」の解釈について種々の立場からその意味するところを発表して頂きます。これらの特別企画は、何れも基礎研究としての興味と共に、創薬の過程において日常関心の多い点でもあります。以上の特別企画に加えて、今回は一般演題として過去最高の133題の申込みがありました。また、国内からの参加者に加えて、韓国、タイ、台湾などアジア諸国からの参加申込や演題申込もあり、従来にもまして一段と活発な展開が期待されます。世界におけるトキシコロジーの進歩に日本毒科学会がその重要な一翼を担うため、本年の学術年会ならびにサテライトシンポジウムが実り多い集会となることを念じております。

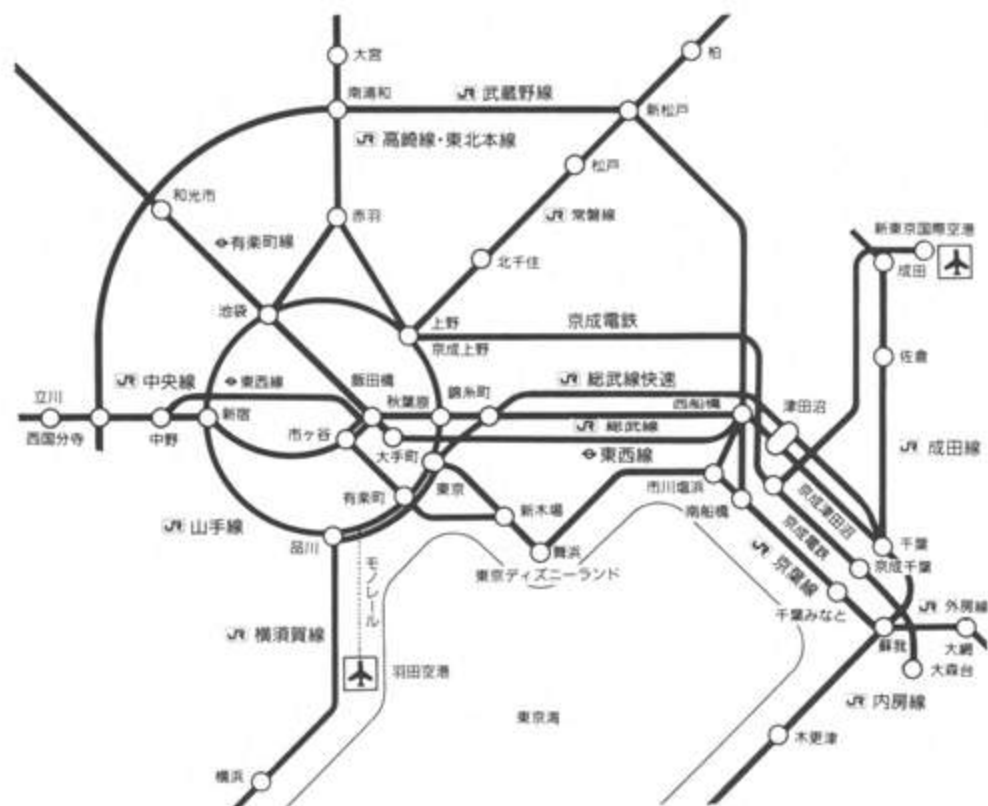
最後に、学術年会ならびにサテライトシンポジウムの企画を実現するに当り、多くのご助言やご協力を頂いた関係各位に厚く感謝致します。

第20回 日本毒科学会学術年会
会 長 佐藤 哲男

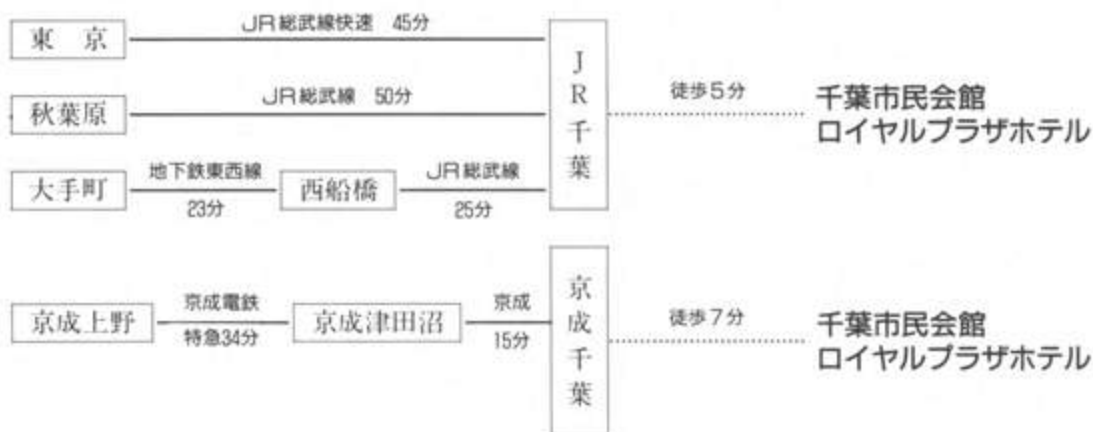
交通のご案内

鉄道利用主要アクセス駅

- JR 総武線……………JR 千葉駅 (会場まで徒歩5分)
- 京成電鉄線……………京成千葉駅 (会場まで徒歩7分)



◎東京都心方面から千葉



会場のご案内



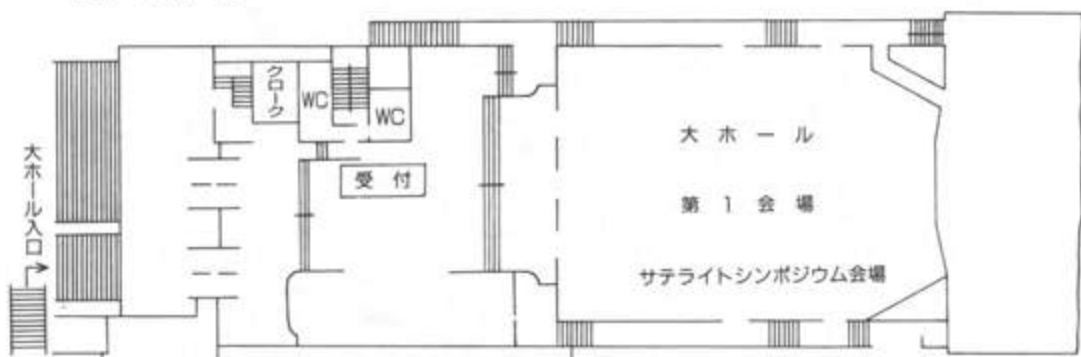
JR 千葉駅ロータリー周辺はモノレール及び地下道立体交差工事中です。
途中、会場までの通路が狭くなっている個所があります、ご注意ください。
千葉市民会館へは、モノレール千葉駅入口階段左側の狭い通路をお通り
下さい。

千葉市民会館

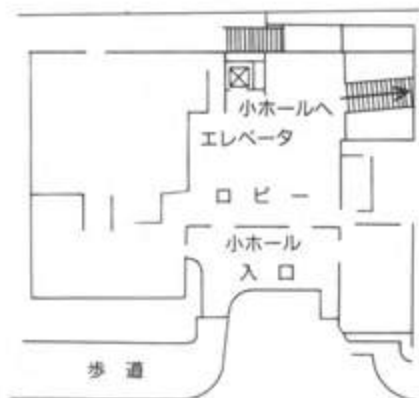
4F 休憩・談話室



2F 大ホール



1F ロビー

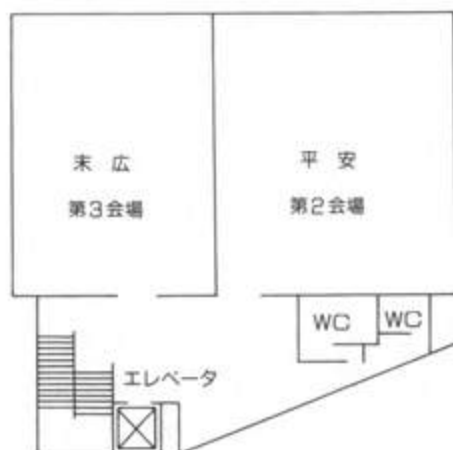


B-1 小ホール

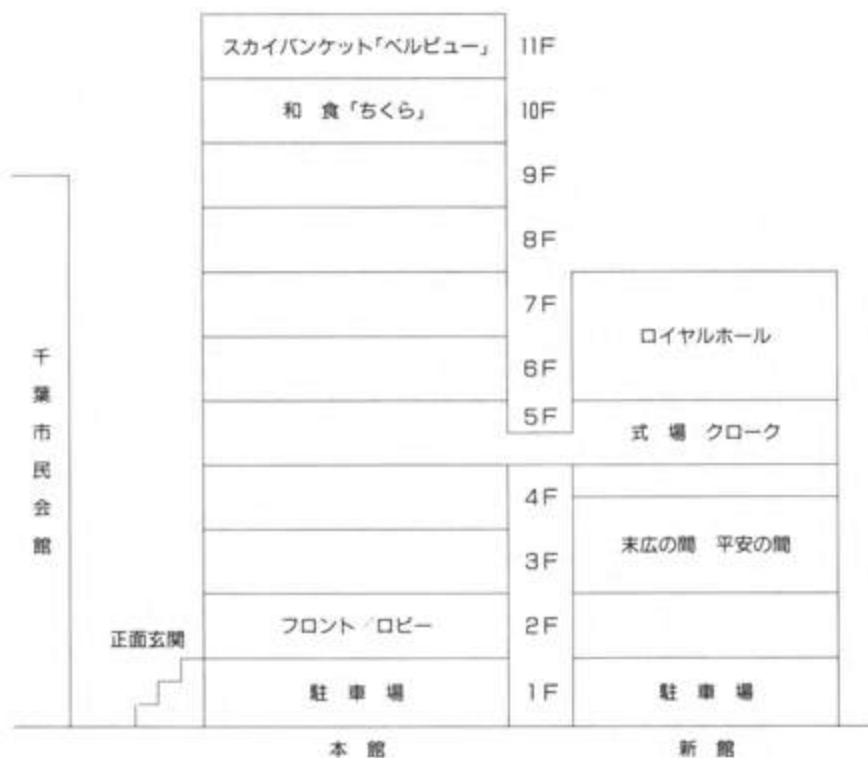
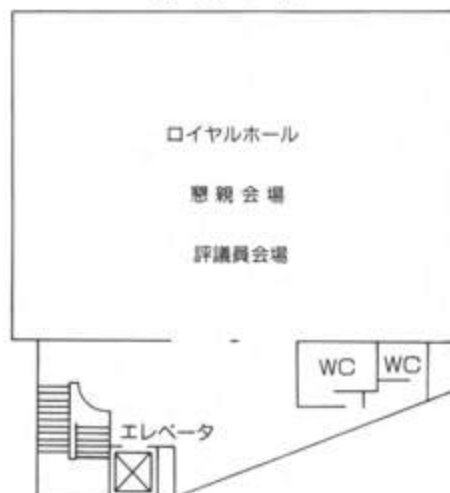


ロイヤルプラザホテル

新館 3階



新館 6階



お知らせとお願い

◆参加者の方へ

1. 受付： 7月28日（水）から7月30日（金）まで午前8時40分から受付を千葉市民会館大ホール入口にて行ないます。
事前登録されている方は受付を行いません。会場では、必ず参加章を胸ポケットにつけて下さい。胸ポケットのない方には、受付でクリップをお渡し致します。当日参加の方、及び参加章を紛失・お忘れになった方は受付にお申し出下さい。
2. 参加費： 当日参加（正会員、非会員、当日会員とも）
(1) 年会のみ参加の場合：6,000円
(2) 年会と懇親会に参加の場合：12,000円
(3) サテライトシンポジウムにも参加の場合：上記の金額に3,000円追加
(4) サテライトシンポジウムのみ参加の場合：6,000円
3. 呼び出し： 会場内に伝言板をご用意致します。緊急の場合で場内呼び出しが必要な時は、受付あるいは市民会館地階の年会事務局までお申し出下さい。
4. 喫煙： 所定の場所をお願い致します。
5. 駐車場： 利用出来ませんので、会場までは徒歩あるいはタクシーをご利用下さい。
6. 年会本部： 年会期間中の事務局は下記のとおりです。
千葉市民会館地階 Tel 043-224-2431

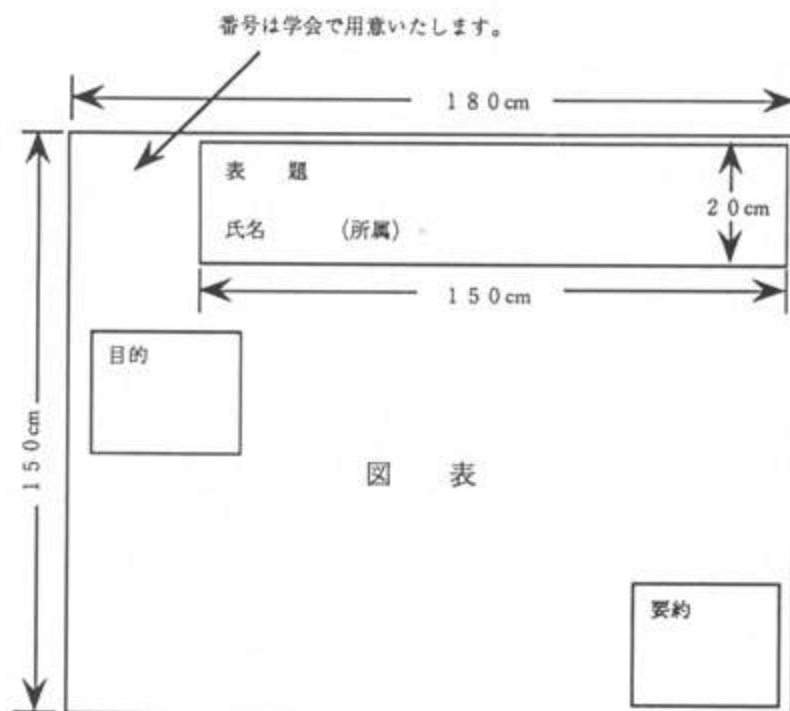
◆演者の方へ

A) 口演発表についての一般的な注意とお願い

1. 発表： 一般演題の口演時間は1題12分（発表8分、討論4分）です。シンポジウム、ワークショップ、パネルディスカッションについては予めオーガナイザーと打合せをしておいて下さい。
口演者は口演開始12分前までに次演者席にお着き下さい。
口演変更は原則として出来ません。やむを得ぬ理由により口演の取消、演者の変更が生じた場合は、直ちに年会事務局へ申し出て下さい。
2. スライド： スライドは35mmフィルム（ライカ版）に限ります。
プロジェクターは1会場1台です。2回以上使用するスライドは映写数と同じ枚数をご用意下さい。一般演題では1演題10枚以内とします。
スライド受付は各会場入口にあります。スライドは口演1時間前（午前10時以前の口演については20分前）までに各スライド受付にご提出願います。口演者は、口演終了後30分以内にスライド返却を受けて下さい。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。

B) ポスターセッションについての一般的な注意

1. 会場： 千葉市民会館小ホール。
2. 発表： プログラムに指定された1時間を各々質疑応答時間とします。演者はその間（1時間）、当方で用意したリボンをつけて説明に立つようお願いいたします。演題変更は原則として出来ません。やむを得ぬ理由により演題の取消、演者の変更が生じた場合は、直ちに年会事務局へ申し出て下さい。
3. 展示方法： ポスター受付で登録後、押しピン、リボンその他必要なものを受け取り、所定の場所にポスターを掲示して下さい。演題番号は展示場所のパネル面に表示してあります。指定のパネルの右上部に表題、氏名（演者に○印）、所属を記入したもの（縦20cm、横150cm）を、その下に説明文を付けた図表、「目的」および全体の「要約」を提示して下さい。
4. 展示および撤去について：
展示は展示時間に間に合うように行なって下さい。なお、朝は8時40分より展示が可能です。撤去は展示終了時間後10分以内に行なって下さい。展示物は必ず各自撤去して下さい。撤去されなかった展示物については、事務局にて処分いたしますのでご了承下さい。



◆座長の方へ

セッションの進行は座長におまかせしますので宜しくお願い致します。
一般演題（口演）、シンポジウムについては、それぞれ決められた時間を厳守願います。
会場のスライド受付にて来場の旨を係員にお伝え下さい。
次座長は**セッション開始15分前**までに次座長席にご着席下さい。

◆討論される方へ

一般演題（口演）並びにシンポジウムとも、質疑、追加討論は座長の指示に従い、所属・氏名を明らかにした上で行なってください。

◆理事・監事の方へ

理事会は7月27日（火）14時より17時まで、ロイヤルプラザホテル・新館5階・花の間で開催致します。

◆評議員の方へ

評議員会は7月29日（木）12時30分より13時50分まで、ロイヤルプラザホテル・ロイヤルホールで開催致します。昼食（1,000円）は、学会事務局で用意致します。

◆総会について

総会は7月29日（木）14時より15時まで市民会館大ホールで開催致します。

◆懇親会について

懇親会は7月29日（木）18時より、ロイヤルプラザホテル・ロイヤルホールにて、開催致します。懇親会に出席される方はマークの入った参加章をつけて下さい。なお、懇親会の参加申し込みは、定員に達するまで学会当日も受付にて行なっております。（当日会費は6,000円です）。

◆クローク

市民会館2階のクロークをご利用下さい。

◆休憩される方は千葉市民会館4階に談話室を設けてございますので、ご利用下さい。

◆機器・試薬・書籍等展示会

市民会館小ホールにて7月28日（水）午後から30日（金）午後まで行ないます。

7月28日

年会スケジュール・座長一覧表

	千葉市民会館 第1会場(大ホール)	ロイヤルプラザホール 第2会場(平安)	ロイヤルプラザホール 第3会場(末広)	千葉市民会館 展示会場(小ホール)	ロイヤルプラザ ロイヤルホール
9:25	開会挨拶				
9:30	サテライトシンポジウム 加藤隆一、五十嵐俊二			機器展示搬入開始	
12:00	休憩昼食				
13:00	サテライトシンポジウム 加藤隆一、五十嵐俊二			機器展示	
15:40	総合討論				
17:00	加藤隆一、五十嵐俊二				

7月29日

8:55	開会挨拶				
9:00	一般講演	一般講演	一般講演		
9:30	O-101-105 高山 敏 宮高宏彰 O-106-110 南 勝 高橋道人 O-111-116 田中栄之介 小栗一太	O-201-205 山本郁男 増田 裕 O-206-210 鈴木 勉 高仲 正 O-211-215 堀井郁夫 黒川雄二	O-301-304 増淵美子 松本治良 O-305-309 藤井憐子 佐藤孝彦 O-310-315 玄番宗一 野口英世	機器展示 ポスター展示 P-101-P145	
11:30					
12:00				ポスター討議 P-101-P145	
12:12		休憩昼食	休憩昼食	休憩昼食	
12:30	休憩昼食				
13:00					評議員会
14:00	総会			機器展示 ポスター展示 P-101-P145	
15:00	シンポジウム				
16:30	山下 衛、黒岩幸雄				
17:30					
18:00					懇親会
20:00					

7月30日

9:00					
9:30	ワークショップ 遠藤 仁、古沢 満			機器展示 ポスター展示 P-201-P243	
11:30				ポスター討議 P-201-P243	
12:30	休憩昼食			休憩昼食	
13:00	特別講演1 高島英伍				
14:00	特別講演2 福田英臣			機器展示 ポスター展示 P-201-P243	
15:00	パネルディスカッション 柳田知司、林 裕造				
17:30					

2017年10月19日(木) 第1456号(創刊40周年記念号) 全日本経済新聞社

田英高：員室

SL-1 13:00-14:00

[Metabolic and Immunologic Basis of Autoimmunity]

プログラム

田英高：員室

SL-2 14:00-15:00

[Neurotoxicology of Drug and Chemicals Present and Future Perspectives]

Qing K. HO and Anna M. Fan*

(Univ. of Mississippi Medical Center, USA)

California Environmental Protection Agency,

(USA)

特 別 講 演

S L 7 月 3 0 日 (金) 千葉市民会館大ホール 13:00-15:00

SL-1 13:00-14:00 座長：高島英伍

「Metabolic and Immunologic Basis of Autoimmune
Drug-Induced Hepatitis.」

○Lance R. POHL (NIH, USA)

SL-2 14:00-15:00 座長：福田英臣

「Neurotoxicology of Drug and Chemicals: Present and
Future Perspectives.」

○Ing K. HO and Anna M. Fan*

(Univ. of Mississippi Medical Center, USA,

*California Environmental Protection Agency,
USA)

シンポジウム

S 7月29日(木) 千葉市民会館大ホール 15:00-17:30

「臨床からみたトキシコロジー」

座長：山下 衛、黒岩幸雄

S-1 急性中毒発現状況

○新谷 茂 (日本中毒情報センター)

S-2 臨床薬物分析

○寺田 賢 (大阪大・医・法医)

S-3 農薬中毒

○鈴木康男 (東北大・薬)

S-4 医薬品の中毒 (有害反応)

○安原 一 (昭和大・医・薬理)

S-5 アルカロイドによる中毒 —特にトリカブトアルカロイドについて—

○大野曜吉 (日本医科大・法医)

パネルディスカッション

PD 7月30日（金）千葉市民会館大ホール 15:00-17:30

「毒性試験における毒性評価の問題点—最大無毒性量を中心に—」

座長：柳田知司、林 裕造

司会：柳田知司、幸嶋祥亘

パネラー：林 裕造、門田利人、
野口正義、増田 裕、
小泉治子

討論の骨子：

- PD-1 開催の経緯について
○柳田知司（前臨床医学研）
- PD-2 前回（製薬協基礎部会主催）のパネルディスカッションのあらまし
○幸嶋祥亘（スミスクライン・ピーチャム）
- PD-3 キーワードの解釈について
○柳田知司（前臨床医学研）
- PD-4 最大無毒性量判定基準の原則
○門田利人（プリストルマイヤーズ・スクイブ）
- PD-5 原則が適用されない特殊ケース
○小泉治子（前臨床医学研）
- PD-6 原則が適用されない特殊ケース
○増田 裕（三共）
- PD-7 特殊ケースの分類と問題点
○野口正義（エーザイ）
- PD-8 まとめ／パネルディスカッションを聞いて
○林 裕造（国立衛試）

研究推進委員会ワークショップ

W 7月30日(金) 千葉市民会館大ホール 9:00-11:30

["正常" 不死化細胞と毒性研究]

- 座長：遠藤 仁、古澤 満
- W-1 イントロダクション及び骨髄細胞
○帯刀益夫(東北大・加齢医学研)
- W-2 トランスジェニックマウスの作製方法：温度感受性SV40ラージT抗原
遺伝子導入マウスの作製とその維持
○鈴木 操(熊本大・医・遺伝研)
- W-3 tsSV40T遺伝子導入マウスからの肝細胞株の樹立とその性状
○矢内信昭(東北大・加齢医学研)
- W-4 "正常" 不死化細胞と毒性研究：腎臓
○細山田 真、遠藤 仁(杏林大・医・薬理)
- W-5 Oncogene導入トランスジェニックマウスからの胃表層粘液細胞株の樹立
とその応用
○杉山則文¹、田淵圭章²、堀内 正¹、帯刀益夫³、古澤 満¹
(1 第一製薬・分子生物研, 2 第一製薬・探索3研, 3 東北大・加齢医学研)

研究推進委員会ワークショップ

W 7月30日（金）千葉市民会館大ホール 9:00-11:30

「”正常”不死化細胞と毒性研究」

座長：遠藤 仁、古沢 満

W-1 イントロダクション及び骨髄細胞

○帯刀益夫（東北大・加齢医学研）

W-2 トランスジェニックマウスの作製方法

○鈴木 操（熊本大・医・遺伝研）

W-3 肝細胞

○矢内信昭（東北大・加齢医学研）

W-4 腎細胞

○細山田 真（杏林大・医・薬理）

W-5 胃細胞

○杉山則文（第一製薬・分子生物研）

一般演題（口演）

7月29日（木）

第1会場（千葉市民会館大ホール）

9:00-10:00

座長：高山 敏、宮嶋宏彰

O-101 09:00 尿沈渣の結晶鑑別法の検討

○中村美穂、高田早苗、加藤道幸、野村 護、高山 敏、中島光好*、
植松俊彦* （第一製薬・開発研・安全研、*浜松医大・薬理）

O-102 09:12 遺伝子組換えヒト塩基性線維芽細胞増殖因子におけるマウス皮膚腫瘍発生についての基礎的検討

○杉本 肇、中野好子、中村俊之、永田隆光、都筑優紀、斉藤勝弘、
奥隅淳一*、青池 晟**、川井啓市**、西野輔翼***
（科研製薬・安全研、京都府立医大・*第一外科、**公衆衛生、***生化学）

O-103 09:24 ラット α 1-酸性糖蛋白およびインターロイキン8の肺障害モデルにおける推移

○小田部耕二、鈴木雅実、有賀恭子、杉本哲朗、田村博志、山本静雄*
（中外製薬・安全研、*麻布大・環境保健）

O-104 09:36 テレメトリーシステムを用いた無麻酔、無拘束ビーグル犬における血圧、心拍数、心電図及び自発行動量の測定法の検討

○乾 嘉孝、中下富雄、西田信之、佐藤秀蔵 （武田薬品・薬剤安全研）

O-105 09:48 テレメトリーを用いたラット血圧・心拍数における日内変動の解析

○佐藤恵一朗、佐藤秀蔵 （武田薬品・薬剤安全研）

10:00-11:00

座長：南 勝、高橋道人

O-106 10:00 皮下埋め込み式生体医学研究器具、バスキュラアクセスポート(VAP)の基礎的検討 (Toxicokineticsへの応用)

○五十嵐 功、金原広幸、池田孝則、小林直美、古山佳子、中村聡子、
茨田享子、田内清憲 （動繁研）

O-107 10:12 トリブチル錫による初代培養肝細胞のカルシウム反応の阻害

○朝生裕樹*、畝山智香子、豊田和弘、松井 元、百瀬和享*、川西 徹、
高橋道人 （*昭和大・薬・薬理、国立衛試・病理）

- O-108 10:24 SHRおよびWKYラットの血圧に対するrhEPOの影響
○芹沢 功、天野健次 (キリンビール・安全研)
- O-109 10:36 腹部求心性迷走神経活動測定による制癌剤誘起性嘔吐の評価
○遠藤 泰、根本昌宏、南 勝、吉岡充弘*、齋藤秀哉*
(東日本学園大・薬・薬理、*北海道大・医・第一薬理)
- O-110 10:48 ニューキノロン剤の痙攣発現に必要なGABA受容体結合阻害量の解析
○都富友美、赤羽浩一、松林久一、関口正保、長田恭明
(第一製薬・探索一研)
- 11:00-12:12 座長：田中栄之介、小栗一太
- O-111 11:00 発癌性Arylhydroxamic Acid を活性化する肝ミクロソーム画分のN,O-Acetyltransferase
○曾根知道、磯部正和、高島英伍、Ching Y. Wang*
(摂南大・薬・毒性、*Michigan Cancer Foundation)
- O-112 11:12 分子軌道理論による薬物代謝研究—薬物の酸化的代謝部位の予測—
○小栗一太、山田英之 (九州大・薬・衛生裁判化学)
- O-113 11:24 高カタラーゼ活性HeLa細胞およびアミノトリアゾールを用いた細胞内過酸化水素生成の検出：バラコートと亜セレン酸によるH₂O₂生成
○瀬子義幸、北原 淳、井村伸正 (北里大・薬・公衆衛生)
- O-114 11:36 制癌剤アドリアマイシンの細胞毒性機序に関する研究 —アドリアマイシンを細胞質から核DNAに移行するためのcarrierの存在—
○清宮健一、田 光勲、松尾三郎、暮部 勝 (大阪府大・農・獣医・毒性)
- O-115 11:48 トキシコキネティクスにおける用量—血中濃度相関のnon-linearityの計量的評価方法について
○五十嵐俊二 (エーザイ・研開情報)
- O-116 12:00 ヒト肝薬物酸化能評価法 —カフェインとトリメタジオンを指標薬として—
○田中栄之介、石川韶雄*、山本祐二*、深尾 立*、三澤章吾
(筑波大・社会医学、*臨床医学)

第2会場（ロイヤルプラザホテル、平安の間）

9:00-10:00

座長：山本郁男、増田 裕

O-201 09:00 酵母に発現させた肝フラビン含有モノオキシゲナーゼ(FMO)によるパーキンソン病様症状誘発物質の代謝

○伊藤邦郎、千葉 寛*、木村晃之**、伊藤 進、鎌滝哲也
(北海道大・薬・代謝分析、*国立病院医療センター、**サンド薬品)

O-202 09:12 カンナビノイド活性代謝物のGABA Aレセプターに及ぼす影響

○木村敏行、渡辺和人、山本郁男、吉村英敏*
(北陸大・薬・衛生化学、*中村学園大)

O-203 09:24 LECラットにおける肝癌発症前後の異物代謝能の変動とその要因

○山本秀樹、白水 彩、升田真木彦、数坂昭夫、笠井憲雪*、藤田正一
(北海道大・獣医・毒性、*北海道大・医・動物実験施設)

O-204 09:36 β -Naphthoflavone処置による肝小葉内チトクロームP-450アイソザイムの誘導部位

○五十嵐 功、真鍋 淳、大橋芳彦、高岡雅哉、矢本 敬、寺西宗広、松沼尚史
(三共・安全研)

O-205 09:48 デヒドロエピアンドロステロン(DHEA)による肝（前）癌病変でのヘルオキシゾーム β 酸化系酵素の変化

○田村 浩、林 文彦、高城奈津子、山田純司、渡辺隆史、須賀哲弥
(東京薬大・臨床生化)

10:00-11:00

座長：鈴木 勉、高仲 正

O-206 10:00 ラット肝臓の虚血-再循環障害により惹起された血漿中脂質hydroperoxide体の分子種について

○高山房子、江頭 亨、山中康光
(大分医大・薬理)

O-207 10:12 有機リン系農薬および分解・代謝物の初代培養肝細胞におよぼす影響

○鎌内桃子、郭 新彪、宮島敦子、大野泰雄、高仲 正 (国立衛試・薬理)

O-208 10:24 キノロン薬のマウス痙攣誘発作用の検討

○赤羽一美、加藤道幸、高山 敏 (第一製薬・開発研・安全研)

O-209 10:36 トリフェニルスズの脳組織コリン作動性神経機構に及ぼす影響

野中邦夫、茂木 朗、○小林晴男、鈴木忠彦、増子かおり、笠嶋快周、小野菜穂子
(岩手大・農・家畜薬理)

- O-210 10:48 薬物依存の研究(第232報) Conditioned place preference法による薬物の精神依存性評価
○鈴木 勉、三澤美和 (星薬大・薬理)
- 11:00-12:00 座長：堀井郁夫、黒川雄二
- O-211 11:00 抗癌剤Cyclophosphamide(CPM)によって誘導される免疫毒性のArotinoid併用による改善作用 -細胞表面マーカーによる解析-
○井上智彰、窪田章子、金崎寛子、堀井郁夫 (日本ロシュ・研究所・毒性病理)
- O-212 11:12 アドリアマイシンの高分子化による骨髄毒性の変化
○入江弘之、木村和幸、内藤寿英、小山 守、小柴 博、花田秀一、岩井正和 (ミドリ十字・中研・安全研)
- O-213 11:24 チオウレア系ゴム加硫促進剤のモルモットにおける感作強度ならびに交差反応性
○門馬純子、鹿庭正昭*、関口裕巳、中村晃忠*、川崎 靖、津田充宥、黒川雄二 (国立衛試・毒性、*薬品)
- O-214 11:36 ゴム製品中のアレルギー性物質の確認：化学分析とGuinea Pig Maximization Testを用いた検索法の有用性
○鹿庭正昭、門馬純子*、関口裕巳*、伊佐間和郎、中村晃忠、津田充宥*、黒川雄二* (国立衛試・薬品、*毒性)
- O-215 11:48 ワクチンの免疫増強剤としてのリン酸カルシウムの溶血性について
○加藤博史、前山順一、柴野三智子*、斎藤卓也*、山口淳二*、後藤紀久 (国立予研・安全研、*近畿大・医)

第3会場（ロイヤルプラザホテル、末廣の間）

9:00-9:48

座長：増淵美子、松本浩良

- O-301 09:00 新規抗腫瘍性物質、塩酸irinotecan (CPT-11) のラットにおける排卵数増加作用と妊孕性に及ぼす影響
○佐々木哲哉、高田 信、渡辺敏樹、俵 克彦、高山 敏
(第一製薬・開発研・安全研)
- O-302 09:12 フロセマイドによるマウスおよびラット胎児波状肋骨出現頻度に及ぼす母動物子宮切開の影響
○中塚敏夫、藤掛 登、内田美紀、松本浩良 (萬有製薬・開発研)
- O-303 09:24 Etretinate (Aromatic retinoid)の器官形成期および授乳期投薬のラットF1児生存率および成育に及ぼす作用
○滝沢節子、深津信子、堀井郁夫、藤井儂子*
(日本ロシュ・研究所・毒性病理、*帝京大・医・薬理)
- O-304 09:36 Antiandrogen, AA560投与によるラットの副腎性Androgen合成促進作用
○増淵美子、渡辺 実*、永田良一、平井正直
(新日本科学・学術・臨床薬理研、*聖マリアンナ医大・薬理)

9:48-10:48

座長：藤井儂子、佐藤孝彦

- O-305 09:48 カルシウム拮抗薬のラットにおける胎児致死作用 ー全胚培養法による評価ー
○坂 芳樹、川名研一、中塚敏夫、松本浩良 (萬有製薬・開発研)
- O-306 10:00 全胚培養法によるConcanavalin Aのラット胚致死効果
○西田敏之、子林孝司、有行史男、中山良夫 (田辺製薬・安全研)
- O-307 10:12 動物実験代替法の組み合わせによる眼粘膜刺激性の予測
○小島肇夫、花村朝夫、宮本 悟、佐藤 淳、小西宏明、吉村 功*
(日本メナード・研究技術部門、東京理科大・工・経営工学)
- O-308 10:24 臭素系難燃化剤: Tetrabromobisphenol-A(TBBPA)の血液成分に対する影響
○渡辺一石、鬼頭英明、永瀬久光、佐藤孝彦 (岐阜薬大・公衆衛生)
- O-309 10:36 キノロン注射剤の血管毒性の検討
○吉田貢由、加藤道幸、高山 敏 (第一製薬・開発研・安全研)

10:48-12:00

座長：玄番宗一、野口英世

- O-310 10:48 ELISA法による腎障害ラットの血清・尿パラメータの測定
○北島俊一、中村隆広、光岡ちほみ、村田勇二、佐藤喜代隆
(バナファームラボラトリーズ・代謝薬理研)
- O-311 11:00 HX-1920の薬物性腎障害軽減効果における抗酸化作用の関与
○戸田正宏、玄番宗一、河合悦子、柴田健介*
(大阪薬大・第二薬理、*旭化成・ライフサイエンス総合研)
- O-312 11:12 ラットでのCd-メタロチオネイン投与時の尿中Cdの排泄および腎機能の変化について
○照井 潤、林 泰司、曾山桃子、深田 真、須藤純一、田辺恒義
(東日本学園大・薬・毒理)
- O-313 11:24 経気道的に石炭フライアッシュを投与したマウスにおける含有金属元素の挙動
○江坂文孝、高橋千太郎*、佐藤 宏*、菊地 正、古谷圭一
(東京理科大・理・応用化学、*放医研)
- O-314 11:36 高週齢ラットの血中成長ホルモン及びプロラクチン変動について
○藤井登志之、松本正博、義澤克彦、大石裕司、勝木昭次
(藤沢薬品・安全研)
- O-315 11:48 ラット肝細胞スフェロイドの小径化について
○遠藤健一、上野光一、竹澤俊明*、山崎 学*、森 有一*、佐藤哲男
(千葉大・薬・薬物、*グレース日本・中研)

一般演題（ポスター）

7月29日（木）

ポスター会場（千葉市民会館小ホール）

ポスター掲示時間： 9：30－16：30

質疑応答時間：11：30－12：30

- P-101 Neutrophil mediated cytotoxicity of cisplatin
○Hyuck Jai CHOI, Se-Young Choung (Kyung Hee University, College of Pharmacy)
- P-102 ニトロナフタレン類の還元特性－酵素化学的還元活性と電気化学的還元性との相関
○岩田修永、原 修一、遠藤任彦、福原 潔*、鈴木和博**、高橋 淳**、宮田直樹*
(東京医科大・法医、*国立衛試・有機化学、**代謝生化学)
- P-103 Toxic effects of butane gas to rats
○Dai Byung KIM, Jong Kwon LEE, Duck Joo RHIE, Pu Young KIM
(National Institute of Safety Research, Department of Toxicology)
- P-104 幼若および成熟ラットにおけるレボフロキサシン経口投与時の血清および軟骨内薬物濃度
○大川原 聡、高田早苗、加藤道幸、梶村哲世、高山 敏
(第一製薬・開発研・安全研)
- P-105 Effects of methamphetamine hydrochloride on neurological function in rats.
○Dae Hyun CHO, Se Jin HWANG, Won Yong LEE, Kang CHIN
(National Institute of Safety Research, Department of Toxicology)
- P-106 ジエチルニトロソアミンのラット肝毒性に与えるモリブデンの影響
○小泉利明、田島健一、恵美伸男、鈴木和夫 (千葉大・薬・衛生化学)
- P-107 Studies on values of procollagen type III peptide and hydroxyproline in the rat liver cirrhosis induced by dimethylnitrosamine
○Yong-Soon LEE, Jae-Jin CHO (Seoul National University, College of Vet. Med.)
- P-108 ラットにおけるインドメタシンの体内動態と潰瘍形成の関連性について
○浅野間久恵、田中剛太郎、藤岡秋生、犬伏正憲、丸伝 章
(大鷗薬品・製薬センター・安全研)

- P-109 哺乳動物肝カルボキシルエステラーゼによるAcetylaminofluorene水解活性の種差
○Rui MING、細川正清、佐藤哲男 (千葉大・薬・薬物)
- P-110 シリアンハムスターにおけるベンゾピレン代謝とP450分子種
○孫 歩祥、福原守雄、高仲 正* (国立公衆衛生院・衛生薬学、*国立衛試・薬理)
- P-111 分泌期エナメル芽細胞のゴルジ装置におけるコルヒチンの作用機序について
○松尾三郎、清宮健一、吉川亜貴、暮部 勝 (大阪府大・農・獣医・毒性)
- P-112 非A非Bおよび非Cのアルコール性肝障害における臨床病理学的検討
○別枝和彦、小林 幸*、丸伝 章、藤原睦憲* (大鷗薬品・製薬センター・安全研、*日赤医療センター・中央検査部)
- P-113 イヌの肝臓における薬物代謝酵素の誘導 Acetone投与に対する反応
○菅野昭永、真鍋 淳、大橋芳彦、矢本 敬、高岡雅哉、安田允也 (三共・安全研)
- P-114 甲状腺摘出ラットへのPhenobarbitalとFluconazole投与時の血中T4・T3量および肝ミクロゾーム活性
滝沢節子、○山本恭子、堀井郁夫 (日本ロシュ・研究所・毒性病理)
- P-115 ラットでのCd-メタロチオネイン投与による腎、肝、血漿中でのCdの動態について
○林 泰司、照井 潤、曾山桃子、深田真、須藤純一、田辺恒義 (東日本学園大・薬・毒理)
- P-116 変異原物質に対する感受性の加齢による変動
○升田真木彦、李 禎俊、数板昭夫、藤田正一 (北海道大・獣医・毒性)
- P-117 モルモット全身性アナフィラキシー反応の惹起抗原量に関する検討
○桑原 孝、朝波省吾、下野和之、植島基雄 (大塚製薬工場・鳴門研)
- P-118 モルモットを用いたMaximization Test と皮膚反応の比較検討
○服部浩之、山口文恵、大野広志、高山 敏 (第一製薬・開発研・安全研)
- P-119 特殊材料ガスの急性吸入毒性試験について
○廣瀬明彦、金子豊蔵、小川幸男、鈴木幸子、黒川雄二 (国立衛試・毒性)

- P-120 抗甲状腺作用物質の甲状腺腫瘍誘発用量と血中甲状腺刺激ホルモン(TSH)との関連性
○小野寺博志、三森国敏、安原加壽雄、下 武男、前川昭彦*、高橋道人
(国立衛試・病理、*佐々木研・病理)
- P-121 白血病細胞L1210のミトコンドリアに対するアスコルビン酸の作用について
○角崎英志、信岡大介、清宮健一、松尾三郎、暮部 勝
(大阪府大・農・獣医・毒性)
- P-122 イヌにおける十二指腸内連続投与法の確立とその応用
須山由美、○福井英夫、佐藤秀蔵 (武田薬品・薬剤安全研)
- P-123 イヌにおける硫酸銅誘発性嘔吐に対する末梢5-HT₄受容体の関与
○福井英夫、山本正樹、佐藤秀蔵、佐々木 啓 (武田薬品・薬剤安全研)
- P-124 硬組織沈着型鉛塩の腹腔内投与によるラット尿中 δ -アミノレブリン酸の変化について
○佐野恒吉、山田庄司 (昭和大・歯・歯科薬理)
- P-125 Mitomycin C及び5-Fluorouracil 投与ラットにおける骨髄中サイトカイン量測定の意義
○二村芳弘、松本清司* (東邦大・医・薬理、*信州大・医・動物実験施設)
- P-126 シスプラチンを用いた免疫毒性試験法の検討
○河内泰英、前田泰宏、岡 宏昭、大内田昭信、大沢基保*
(大鷗薬品・製薬センター・安全研、*帝京大・薬)
- P-127 キノロン薬の光毒性によるアルビノマウスの網膜変成および耳介炎症に及ぼす抗酸化剤の影響
○下田耕司、和賀井信彦、吉田貢由、宮本恵美、加藤道幸、高山 敏
(第一製薬・開発研・安全研)
- P-128 マイクロダイアリシス法を用いたラット心筋中の虚血一再灌流後のフリーラジカルの産生について
○小畑俊男、細川博司*、山中康光 (大分医大・薬理、*臨床薬理)
- P-129 カニクイザルを用いた肝生検後の経過について
○和泉博之、中間和浩、福崎厚一郎、永田良一 (新日本科学・安全性2研)

- P-130 遅延型アレルギー反応(2) 8種類のメタクリル酸誘導体の反応性の検討
小島幸一、○金澤由基子、山脇智子、松田 洋、岡田富士桜、横山雄一*、松澤 宏*
(食品薬品安全センター秦野研・免疫毒性、*HOYA・メディカル研)
- P-131 合成サケカルシトニン(CsCT)のラット副甲状腺機能に対する影響
○磯辺充成、堀内 敏、佐藤敦子、伊藤清子、牧野正雄、鈴木 稔、
(帝国臓器・安全研)
- P-132 リシノプリルの腎部分切除ラット高蛋白尿および腎病変に対する作用
○松井信志、村岡義博、中村益久 (塩野義製薬・研究所・神崎川分室)
- P-133 ラットにおける尿分析値の性差について(2) 血液分析値並びに腎組織内
酵素活性の性差と去勢による変化
山田久陽、○杉浦正幸、村上美穂子、大島 隆、中根貞雄
(大正製薬・総合研・安全研)
- P-134 ラットに特異的な免疫測定法キットを用いたフェリチンの測定
○一鬼 勉、浜村政夫、石井三和子、神谷光一、阿部真利子、井上秀顕
(パナファームラボラトリーズ・安全研)
- P-135 ウサギの培養関節軟骨細胞に対するキノロン薬の影響
○高田早苗、加藤道幸、高山 敏 (第一製薬・開発研・安全研)
- P-136 げっ歯目赤血球の分断と溶血
○金津赫生、望月雅裕*、諏訪浩一* (筑波大・医療短大、*ボゾリサーチ)
- P-137 血液生化学検査でのヒトと動物の至適測定条件の相違
○古川浩美、神谷光一、前田佳美、曾根久雄、佐藤喜代隆
(パナファームラボラトリーズ・安全研)
- P-138 硫酸化多糖体のプロタミン中和試験の検討
○東條宏子、山田昌男、中村美穂、野村 護、高山 敏
(第一製薬・開発研・安全研)
- P-139 アミノ酸投与による血中トランスアミナーゼの変動について
○幸下雅俊、姜 定克、澤本 修、金田信也、越谷 修、林 茂尚、長根芳文
(大塚製薬工場・鳴門研)
- P-140 末梢血好中球の採取および好中球走化因子に対する反応の動物種差
○宮本恵美、菅原正喜、加藤道幸、高山 敏 (第一製薬・開発研・安全研)

- P-141 サルにおけるエンドトキシン致死毒性の in vitro での予測性について
○高橋裕詞、山口文恵、大野広志、古濱和久、高山 敏
(第一製薬・開発研・安全研)
- P-142 N T P 試験法による自己免疫疾患を誘発する医薬品の免疫毒性検索
○筒井尚久、橋折幸子、小林 潔
(三菱化成・総合研・安全研)
- P-143 2-(2'-Hydroxy-5'-methylphenyl)benzotriazole(チヌビンP)の皮膚感作性試験
○五十嵐良明、土屋利江、中村晃忠
(国立衛試・療品)
- P-144 Endotoxin 投与ラットに認められた脾腫の免疫病理学的検討
○石島奈美、源田百合、山口文恵、柿畑耕司、高山 敏
(第一製薬・開発研・安全研)
- P-145 中鎖脂肪酸トリグリセリド乳剤の静脈内投与による昏睡等の症状発現機序の検討
○西澤弘幸、小柴 博、川畑好之康、花田秀一、岩井正和
(ミドリ十字・中研・安全研)

7月30日(金)

ポスター会場(千葉市民会館小ホール)

ポスター掲示時間: 9:30-15:00

質疑応答時間: 11:30-12:30

- P-201 マウス肝臓を用いた小核試験法の検討
○五十嵐美由紀、島田弘康 (第一製薬・開発研・安全研)
- P-202 ラットにおける尿生化学分析及び機器検査による腎毒性評価法ー酸性非ステロイド性抗炎症剤を用いた検討ー
山田久陽、○村上美穂子、杉浦正幸、大島 隆、中根貞雄
(大正製薬・総合研・安全性)
- P-203 5/6腎摘出ラットの腎機能について
○茨田享子、五十嵐 功、金原広幸、小林直美、古山佳子、中村聡子、外尾亮治、田内清憲 (動繁研)
- P-204 カニクイザルにおけるERG C波測定の基礎検討
○山本 隆、加島政利、下假賢二、岡崎啓幸、永田良一
(新日本科学・安全性2研)
- P-205 Sprague-Dawley系ラットの自然発生の眼科学的变化
○久野博司、加藤倫代、近藤秀男 (萬有製薬・開発研)
- P-206 コモンマーモセットの血液性状
○山本光雄、池永哲二、加藤 諒、納屋聖人、周藤勝一 (協和安全性研究所)
- P-207 ラット鼻腔容積に関する検討
○久保山靖仁、森 薫、鈴木一生、出口隆志、周藤勝一 (協和安全性研究所)
- P-208 グルコヘモグロビンの毒性試験における貧血診断への有用性
大野広志、○土屋俊也、丸 ちか子、東條宏子、野村 護、高山 敏
(第一製薬・開発研・安全研)
- P-209 ラットの簡便な無麻酔・無拘束の心電図測定法
○池田孝則、藤島奈保恵 (動繁研・薬理・代謝研)
- P-210 抗原性試験における抗原調製法についての検討 IーペニシリンGータンパク質結合物調製法に関する検討ー
○磯辺竹雄、井上智彰、大郷 豊、堀井郁夫 (日本ロシュ・研究所・毒性病理)

- P-211 抗原性試験における抗原調製法についての検討 II -Surfanilamideの抗原調製法に関する検討-
○大郷 豊、井上智彰、堀井郁夫 (日本ロシュ・研究所・毒性病理)
- P-212 がん原性試験と同様の混餌経口投与法による身体依存性試験の試み
○粟崎泰行、西田信之、佐々木 啓、佐藤秀蔵 (武田薬品・薬剤安全研)
- P-213 薬剤による骨髄毒性発現に関する解析方法
○黒沢 亨、桑原 紀、西山省二、浅岡宏康、藤田正敬
(明治製菓・薬品総合研・安全研)
- P-214 心筋障害犬における長時間心電図および血中CKの関連性について
○秋江靖樹、小尾 一、樋口芳克、市川敦子、清水憲次、日下部憲道*、内野富弥**
(富士生物科学研究所、*エムイー・ラボシステム、
**動物ME診断リサーチセンター)
- P-215 ラット尾静脈採血法のToxicokineticへの応用 -Phenobarbital-Naの血中動態-
○宮腰昶宏、戸塚繁夫、青木 一、高橋靖代、中村浩子、山下和男、木村邦男、
増田 裕 (三共・安全研)
- P-216 画像解析システムを用いた実験的Paraquat肺の結合組織性線維の計量評価
○白井明志、藤瀬 浩*、竹田真也、坪井利樹、政岡俊夫、赤堀文昭
(麻布大・獣医・薬理、*病理II)
- P-217 多臓器中期発癌性試験法を用いたヘテロサイクリックアミンの低濃度複合投与によるラット大腸発癌相乗作用の検討
○萩原昭裕、田中 光、河部真弓、長谷川良平、白井智之
(名古屋市大・医・第一病理)
- P-218 イヌの器官重量データの解析について
○小林和雄、橋口淳一、北島省吾、萩原 孝、広内康彦、岩田 聖、井上博之
(食品農医薬品安評センター)
- P-219 スペキュラーマイクロスコープによるサルの角膜内皮細胞の観察
○森田晴夫、佐久間善仁、河上喜之 (前臨床医学研)
- P-220 コリンエステラーゼ(ChE)阻害剤投与後にみられる気管内泡沫状粘液について
○渡辺正人、堀田真希、石崎誠一、伊藤博敏
(日本バイエルアグロケム・日野研・安全性評価)

- P-221 有機リン系農薬および分解・代謝物の遊離肝細胞に及ぼす影響
○宮島敦子、篠内桃子、郭 新彪、大野泰雄、高仲 正 (国立衛試・薬理)
- P-222 農薬41種類のラット肝中期発癌性試験法を用いた解析
○倉田 靖、柴田雅朗、宮田恵美子、長谷川良平、伊東信行
(名古屋市大・医・第一病理)
- P-223 アゾ系化合物の変異原性
○竹半伸一、木下浩一、戸川満里子、今田順次、天羽生秀夫*、楳本征也*
(大塚化学・鳴門研、*技術部)
- P-224 ラット肝中期発癌性試験におけるコーヒーおよびその各種含有物質の修飾作用
○佐野真士、武貞徳子、今井田克巳、小木曾 正、伊東信行
(名古屋市大・医・第一病理)
- P-225 成熟ラット心筋細胞初代培養法の確立と薬物の心毒性の評価への応用
○藤川康浩、炭麿秀二、見上 孝、山津清實 (エーザイ・安全研)
- P-226 マウス肺腺腫発生を制御する栄養因子について
○矢野友啓、石川 学*、萩原清和、市川富夫
(国立健康・栄養研・応用食品、*日本大・農獣医・食品化学)
- P-227 デーゼル排ガス微粒子 (DEP) のモルモット摘出各臓器に対する影響
○榊原充久、南 勝、森 洋樹*、柳本抄美華*、嵯峨井 勝**
(東日本学園大・薬・薬理、*微生物薬品化学、**国立環境研)
- P-228 ミョウバン(Alum)およびコチニール(Cochineal)のラットにおける90日間同時反復投与毒性試験
○川崎 靖、梅村隆志、佐井君江、長谷川隆一、門馬純子、斉藤 実、松島裕子、
中路幸男、津田充宥、黒川雄二 (国立衛試・毒性)
- P-229 難燃性可塑剤Tributoxyethylphosphate(TBEP)のラットにおける90日間反復投与毒性試験
○津田充宥、斉藤 実、梅村隆志、川崎 靖、門馬純子、松島裕子、松本真美、
伊佐間和郎*、鹿庭正昭*、黒川雄二 (国立衛試・毒性、*療品)
- P-230 O-Nitrotoluene のラットにおける28日間反復投与毒性
○金子豊蔵、下 武男*、安原加寿雄*、広瀬明彦、小川幸男、鈴木幸子、中路幸男、
黒川雄二 (国立衛試・毒性、*病理部)

- P-231 生分解性プラスチックのラットにおける28日間混餌投与毒性
 ○吉田秀信、鈴木幸子、高田幸一、齊藤 実、小川幸男、広瀬明彦、金子豊蔵、
 黒川雄二 (国立衛試・毒性)
- P-232 2,2-メチレンビス(4-エチル-6-tert-ブチルフェノール)のラットにおける
 長期反復投与毒性試験
 ○高木篤也、高田幸一、佐井君江、門馬純子、会田喜崇*、鈴木幸子、内藤克司、
 長谷川隆一、黒川雄二 (国立衛試・毒性、*総合評価)
- P-233 吸入暴露によるクロロホルムのBDF1マウスに対する毒性 その1-毒性作
 用の特徴
 ○山本静護、西沢共司、相磯成敏、笠井辰也、竹内哲也、松島泰次郎
 (中央労働災害防止協会・日本バイオアッセイ研究センター)
- P-234 雄ラットにおける生殖毒性評価法の検討1 スパームヘッドカウント法
 の検討一
 ○坂口ゆかり、島田 信、原田滋雄、俵 克彦、高山 敏
 (第一製薬・開発研・安全研)
- P-235 胎児骨・軟骨二重染色標本作製方法の検討
 ○下村和裕、森田 大、志村弘満 (前臨床医学研)
- P-236 ラット末期胎児の内部構造のMRIによる観察
 ○五十嵐 洋、川西広明、長谷川憲一*、大津真一*
 (動繁研・発生奇形、*日本電子・分析機器技術・第1研究開発)
- P-237 化学物質による精子の運動性、数および形態変化と雄性生殖障害に関する
 研究
 ○川島邦夫、宇佐見 誠、酒見和枝、高仲 正 (国立衛試・薬理)
- P-238 精子形成ステージの精細胞数計測によるCyclophosphamideの精巣毒性評
 価
 ○安原加壽雄、松井 元、三森国敏、小野寺博志、下 武男、高橋道人
 (国立衛試・病理)
- P-239 Ethane-1,2-dimethanesulfonateの精巣上体への直接障害作用について
 ○松井 元、豊田和弘、古田京子、畝山智香子、川西 徹、福原 潔*、宮田直樹*、
 高橋道人 (国立衛試・病理、*有機化学)

- P-240 自動送気型回転培養装置を用いたラット胎齢9.5日目からの胎児培養法の検討 -ミニバイアルによる酸素分圧について-
○秋田正治、横山 篤、西岡 修*、串田信夫* (鎌倉女子大、*埼玉医大)
- P-241 胎児培養における濁度測定装置 (TR705) を用いた培養液交換法
○横山 篤、秋田正治、乙田吉夫* (鎌倉女子大、*埼玉医大)
- P-242 セレン化合物の胚毒性に及ぼす内因性グルタチオンの作用
○田畑洋文、宇佐見 誠、酒見和枝、川島邦夫、高仲 正 (国立衛試・薬理)
- P-243 Skin2 培養モデルを使用した刺激性試験法の有用性確認のための共同研究
○谷口雄三、鈴木啓司¹、中島京也²、中島 圓³、三輪芳久⁴、山田恭史⁴、佐藤 全⁵、
武吉正博⁶、秋江靖樹⁷、森安真津子⁸、山本 仁⁹、片桐 稔¹⁰、風間明美¹⁰、
渡辺正己¹¹ (環境バイリス研、¹横浜市大医学部、²日本生物化学センター、
³安評センター、⁴バイオリサーチ、⁵化合物安研、⁶化学品検査協会、⁷富士生物研、
⁸バナファーム、⁹生活科学研、¹⁰オリエンタル酵母、¹¹長崎大学)

MITABOLIC AND IMMUNOLOGIC BASIS OF AUTOIMMUNE
DRUG-INDUCED HEPATITIS

Lance R. Poit

It has been estimated that more than 50% of drugs may cause hepatic injury. The type of lesion caused by these drugs may include hepatocellular necrosis, steatosis, cholestatic syndromes, chronic hepatitis and cirrhosis. Drugs that cause hepatotoxicity have been classified into two categories: those that cause hepatotoxicity and those that cause autoimmune hepatitis.

特 別 講 演

The majority of drugs that cause hepatotoxicity are dose-dependent and reproducible in animals. The majority of drugs that cause autoimmune hepatitis, however, appear to be idiosyncratic reactions. Their reactions are dose-independent and occur in humans.

It is difficult to predict which drugs will cause autoimmune hepatitis until the drug has been in general use for some time. The pathogenesis of autoimmune hepatitis is still unclear.

7月30日（金）

Drugs that cause autoimmune hepatitis are believed to be idiosyncratic reactions. In the case of intrinsically hepatotoxic agents, the mechanism appears to cause toxicity either directly by hepatocellular damage via cellular macromolecules or indirectly by activating cellular components through the intermediary of immune complexes.

千葉市民会館大ホール

Lipid peroxidation is a common pathway of oxidative metabolite formation. This may lead to the formation of crosslinks to the disruption of intracellular membranes. This may be a general kind of cellular membrane injury. In the case of intrinsically hepatotoxic drug-induced hepatitis, damage may also be attributed to similar processes. If this were the case, there would have to be some reason why the reactions are idiosyncratic. It could be due to pharmacokinetic factors.

演題番号 SL-1 ~ SL-2

Alternatively, an individual may have a genetically low level of activity of enzymes that convert reactive metabolites, such as

METABOLIC AND IMMUNOLOGIC BASIS OF AUTOIMMUNE DRUG-INDUCED HEPATITIS

Lance R. Pohl

It has been estimated that more than 600 drugs may cause hepatic injury. The type of lesion caused by these drugs may include hepatocellular necrosis, steatosis, cholestasis, granuloma, chronic hepatitis and cirrhosis. Drugs that cause hepatotoxicity have been classified into two categories; those that are intrinsic hepatotoxins and those that are idiosyncratic hepatotoxins. The hepatotoxicity caused by intrinsic hepatotoxins, such as chloroform and acetaminophen, is generally host independent, dose dependent, and reproducible in animals. The majority of drugs that cause hepatotoxicity, however, appear to be idiosyncratic hepatotoxins. Their reactions are host dependent, often apparently dose independent, and difficult to reproduce in animals. They are also hard to predict and usually are not recognized as a potential medical problem until the drug has been in general use for some time.

Drug-induced hepatotoxicities, whether intrinsic or idiosyncratic, are believed to be caused in many cases by reactive metabolites. In the case of intrinsically hepatotoxic agents, reactive metabolites appear to cause toxicity either directly by covalently altering cellular macromolecules or indirectly by oxidizing cellular components through the intermediacy of reactive endogenous oxygen species such as hydrogen peroxide, hydroxyl radical, or lipid peroxides that are products of the reactions of reactive metabolites of drugs. This may lead to the inactivation of enzymes, to the disruption of intracellular calcium homeostasis, or to a general loss of cellular membrane integrity by lipid peroxidation. Idiosyncratic drug-induced hepatic damage might also be attributed to similar processes. If this were the case, then there would have to be some reason why the toxicities are host dependent. It could be due to pharmacokinetic factors. For example, the individual might have abnormally high levels of enzymes that activate the drug into a reactive metabolite or possess a mutant form of the enzyme that is catalytically more active than the normal enzyme. Alternatively, an individual may have an abnormally low level or activity of enzymes that detoxify reactive metabolites, such as

glutathione transferases, glutathione peroxidase, catalase, or superoxide dismutase. Since these possibilities, however, have not yet been supported by human studies, the most currently accepted alternate mechanism for idiosyncratic drug-induced hepatotoxicity is an allergic or hypersensitivity reaction.

The diagnosis of a drug-induced allergic hepatitis, like all drug allergic reactions, relies on several criteria. Drug-induced allergic hepatitis usually occurs after repeated exposures and often appears to be dose independent. It may be manifested by blood and tissue eosinophilia and fever. If the patient is re-challenged with the drug, the same pathological condition should be observed. In most cases, the symptoms subside promptly when treatment with the drug is discontinued. The most convincing evidence that a drug-induced hepatitis has an allergic basis is the demonstration of specific antibodies or sensitized T lymphocytes in the patient's blood that react with the drug, its metabolites, normal liver tissue (autoantigen), or liver tissue that has been modified (neoantigen) by the drug or its metabolites. In most cases, however, these tests are not done or are found to be negative, possibly because the wrong test antigen is used in the assay. Finally, the best proof that a drug-induced hepatitis has an allergic basis is the demonstration of an immunopathological mechanism of toxicity in animals. Yet this type of proof has not been demonstrated for any drug-induced hepatitis that is believed to have an immunopathological basis. This is important to do because drug-induced antibodies or sensitized T lymphocytes do not have to cause tissue damage and can arise following tissue injury by nonimmunological mechanisms.

It is generally assumed that for most drugs to induce an immune response they must covalently alter an endogenous macromolecule and produce a drug-carrier conjugate. This structural modification is most likely produced by a reactive metabolite, since most drugs are chemically inert. The reactive metabolite may directly alter the macromolecule by covalently attaching to it. Alternatively, the reactive metabolite may indirectly alter the macromolecule by causing (1) an alteration in the splicing of the gene of the macromolecule, (2) a somatic mutation of the gene of the

macromolecule, (3) a biosynthetic posttranslational modification of the macromolecule, or (4) an oxidative modification of the macromolecule leading to oxidized residues or the formation of abnormal disulfide linkages. In any event, once a macromolecule has been covalently altered, it may act as an immunogen and elicit a specific humoral (antibody) response, a specific cellular (T lymphocyte) response, or both responses. The immune response could be directed against three general classes of antigenic determinants (epitopes) of the altered macromolecule. First, the antigenic determinants can include the bound derivative of the drug (haptenic epitopes), or at least portions of it. Second, they can represent novel epitopes of the carrier molecule (also known as new antigenic determinants or NAD) that result from its covalent modification. Third, they can be native epitopes or autoantigenic determinants, which are ordinarily seen as self. As a consequence of hapten binding or other covalent modifications of the macromolecule, however, tolerance is by-passed.

Probably the major reason why very little progress has been made in the understanding of how drugs produce allergic hepatitis is that until very recently, little was known of the identity of hapten-carrier conjugates associated with these diseases. In the past, the major way macromolecular targets of reactive metabolites were detected was with the use of radiolabeled parent compounds. This approach, however, is frequently insensitive and involves the hazards of working with radioactive materials. But because of our present knowledge of the structure and chemistry of reactive metabolites of many compounds, it is now possible to prepare antibodies that will recognize these metabolites when they are covalently bound to tissue macromolecules. These reagents can be used as sensitive probes for detecting the target macromolecules of reactive metabolites in tissues and cells and for purifying them. In this lecture, I will discuss how antibodies directed against covalently bound reactive metabolites have been used to characterize protein adducts associated with drugs that cause allergic hepatitis.

Dr. Lance R. Pohl, Laboratory of Chemical Pharmacology
National Heart, Lung, and Blood Institute
Bethesda, MD 20892, USA

NEUROTOXICITY OF DRUGS AND CHEMICALS: PRESENT AND FUTURE PERSPECTIVES

Ho, I. K. and Fan, Anna M.

Neurotoxicity is defined as "any adverse effect on the structure or function of the central and/or peripheral nervous system related to exposure to a chemical substance" (1-3). Any chemical substance which exerts neurotoxicity is a neurotoxicant.

Neurotoxic effects of a chemical *in vivo* are usually produced when the target site(s) within the nervous system is (are) exposed to a sufficient amount of the chemical or its toxic metabolite(s) for a duration of time that is sufficient to induce biological changes. These may be seen as changes in behavior, biochemistry, physiology, morphology, and pharmacology. The severity of toxicity induced by neurotoxicant is highly dependent upon the dose, route of administration, duration and frequency of exposure, environmental situations, sex, species, age, and health conditions, among others.

With the complexity of the nervous system, it is difficult to pinpoint where the exact sites of action of neurotoxicants are. Neurotoxicity induced by neurotoxicants can be direct or indirect action on the nervous system. Any chemical agents which interfere with non-neuronal processes such as maintaining integrity of the cell structure, may indirectly affect neuronal processes and produce neurotoxicity. The xenobiotics which disturb neuronal energy metabolism in the synthetic and degradative pathways of carbohydrates, lipids, nucleic acids, and proteins are in this category. The information transfer and processing by neurons are achieved by electrical current flowing across neuronal membranes and chemical transmission occurs at the synaptic junctions between neurons. It is clear that neurotoxicants could act on presynaptic events such as synthesis, storage, release, reuptake, receptors, and metabolism of neurotransmitters. They can also act on postsynaptic events such as receptors, degradation, and signal transduction of neurotransmitters. Any of these events interfered with by a potential neurotoxicant could result in neurotoxicity.

Neurotoxicity induced by a neurotoxicant will be evident when a certain amount of the agent reaches the target site. The study of toxicokinetics of a neurotoxicant has become one of the most important means of determining the toxicity of a suspected toxic compound. The study of toxicokinetics includes all aspects of chemical disposition in the body after administration. It includes absorption from the administration site, distribution into body compartments including

tissue depots such as adipose tissue, biotransformation or metabolism to active or inactive metabolites and excretion of parent compounds and/or metabolites from the body. These factors are often influenced by physical-chemical properties, dose forms and concentrations of the preparation, and the routes of exposure of the compound.

Neurotoxicity induced by neurotoxicants regardless of the sites of action (i.e., CNS or PNS), direct or indirect actions on the nervous system, and specificity of action on target sites, can be detected in terms of changes in four areas: behavior, biochemistry, pathology, and physiology. The current available testing procedures for assessing neurotoxicities (1) listed below are based on these four disciplines.

- I. Functional observational battery
- II. Motor activity
- III. Neuropathology
- IV. NTE neurotox assay
- V. Schedule-controlled operant behavior
- VI. Acute delayed neurotoxicity of organophosphorus substances
- VII. Subchronic delayed neurotoxicity of organophosphorus substances
- VIII. Peripheral nerve function

Although these procedures encompass behavior, functional, biochemical, pathological and electrophysiological endpoints, neurotoxicants do not usually produce single specific endpoint. Multiple systems are more likely to be involved. Therefore, neurotoxicity testing procedures used to assess acute toxicity, subacute toxicity and chronic toxicity of a given potential neurotoxicant should be able to evaluate chemically-induced neurotoxicity as specific as possible. Further perspectives regarding the importance of elucidating the mechanisms by which neurotoxic chemicals exert their effects on the nervous systems should be emphasized. Information obtained from such investigations can lead to the development of sensitive, reliable and simple detecting methods, e.g., *in vitro* testing, for the potential neurotoxicants. The problems associated with chemical-drug or chemical-chemical interactions which may exaggerate or potentiate neurotoxicity and the potential hazards induced by low-dose chronic exposure should also be emphasized. For better evaluation of neurotoxicity of drugs or chemicals, several points are listed below and deserve serious attention.

- I. Investigation on the mechanisms of action of neurotoxic agents
- II. Investigation on multiple systems involved in the actions of neurotoxic chemicals

- III. Alteration in susceptibility after repeated exposure to neurotoxic chemicals
- IV. Investigation of drug interactions, chemical-drug or chemical-chemical interactions
- V. Development of *in vitro* systems for neurotoxicity evaluation
- VI. Employment of techniques in molecular biology for the study of molecular mechanisms of neurotoxicity induced by drugs and chemicals

References

- 1. Health Effects Testing Guidelines. 1987. Environmental Protection Agency (EPA). CFR 798, 52 FR 26150, July 13, 1987. Chem. Reg. Reporter 31: 7001-7872.
- 2. Neurotoxicity: Identifying and Controlling Poisons of the Nervous System. 1990. U. S. Congress, Office of Technology Assessment. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C. (OTA-BA-436).
- 3. Environmental Neurotoxicology. 1992. Committee on Neurotoxicology and Models for Assessing Risk. National Research Council, National Academy Press, Washington, D.C.

I. K. Ho

Department of Pharmacology and Toxicology
University of Mississippi Medical Center
2500 North State Street
Jackson, Mississippi 39216-4505 USA

Anna M. Fan

Pesticide and Environmental Toxicology Section
Office of Environmental Health Hazard Assessment
California Environmental Protection Agency
2151 Berkeley Way, Annex 11
Berkeley, California 94704-1011 USA

シンポジウム

7月29日（木）

千葉市民会館大ホール

演題番号 S-1～S-5

1)急性中毒発生状況

(財)日本中毒情報センター 新谷 茂

はじめに

日本では近年救急医療体制が全国的規模でほぼ確立され、救急専門医や救命救急士制度も発足したが、臨床毒性学講座はなく臨床毒性学者は存在しない。わずかに救急医学講座のなかで、熱傷医学等とともに講義が行われているに過ぎない。それでも急性化学性中毒患者の治療に日夜取り組んでいる医師はかなり多い。しかし中毒患者専門施設は種々の理由で特定できず、それぞれの医師が入手した中毒関連情報にもとずいて救急処置を行っている状況である。

その上現代は化学物質氾濫時代であり、化学物質環境汚染対策がWHOで進められているが、この状態は21世紀も続くものと考えられている。

最近のChemical abstract の新規化合物収載状況調査によると、3年前ですでに1000万種となり、その後年間約70万件ずつ増加し続けている。これらの新規化合物の実用化や特性などに関する学会発表や論文あるいはその他の手段で発表されるデータ量はさらに膨大となることは容易に予想される。したがってこれらを原料とした化学製品の情報量は一層膨大となる。そして過量摂取を包含すれば、これらの膨大な化学物質のすべてが急性中毒の起因物質となり得るわけである。このようなおびただしい化学物質やそれらを原料とした化学製品の急性中毒に関する情報は、いまや個人はもちろん医師でも、収集し切れなくなっている。摂取物質の成分組成が解らなければ、不慮の事故であれ、意図的摂取であれ、適切な救急処置は不能となる。

中毒情報センターの役割と機能 (WHO・IPCS活動)

以上のような膨大な化学物質または化学製品の情報を専門的且集中的に収集・整理して、必要に応じて緊急に提供する役割と機能をもった施設が中毒情報センターである。WHOでは発展途上国にその設立指導を行い、各国特有の起因物質対策を支援するとともに、これらの情報の各国間の交流を計り、情報提供活動の充実を進めている。

日本中毒情報センターの活動経緯

日本に財団法人として日本中毒情報センター（J P I C）が設立されたのは、1986年7月である。そして同年9月に電話による急性中毒に関する情報提供活動を開始して6年が経過した。その結果、現在までに情報提供を行った件数は24万件を越える。緊急の場合、例えば幼児が間違っただけで家族の常用している鎮痛剤を吞込んだ場合に、その対応方法について電話で問い合わせを受けるところである。

電話受付の対象は、化学物質またはその製品を何らかの手段で大量摂取したかまたは誤って摂取した場合に限定している。この場合動植物に含まれる有毒成分も化学物質として対象の範囲としている。ただし細菌汚染食物による食中毒の場合は、電話による汚染細菌の種目同定が困難であるということで対象外としている。また医薬品の場合、その常用量の連用による有害作用についても、電話聴取のみではその有害作用の因果関係や危険性予測などの評価判定がむづかしいため、対象外としている。要するに、単回摂取した化学物質が体内に吸収されて、生体組織と化学反応を起こし、その結果として健康障害を来した状態を中毒（PoisoningまたはIntoxication）と定義され、その時の外来性化学物質を毒物（Poison またはToxin）ということになる。

電話での情報入手の場合、摂取直後の問い合わせが多く、健康障害が見られないケースが大部分（約85%）である。その場合には、

一応 摂取事故例 (Exposure case) と称して 中毒症例 (Poisoned case) と区別している。

なお30年以上の経験をもつ欧米の中毒センターの活動に比べれば、日本の活動は緒についたばかりでまだ十分軌道にのっていない状況である。しかしそれでも、日本独特の中毒発生状態もほぼ確認され、多くの課題も見いだされている。

話題提供内容

今回のシンポジウムのテーマは「臨床からみたToxicology」で、初の試みであると聞いている。基礎毒性学分野と臨床毒性学分野の両関係者間の討議の場としてのシンポジウムが開かれたことは、両分野の橋渡し役的存在と思っているJ P I Cとしても極めて意義深いものと考えている。

パネラーの1人としての私に与えられたサブテーマは、「急性中毒発生状況」であるが、それらのデータを理解し易くするためと、橋渡し役の1部としての役割も考慮して、次のような話の内容について紹介することになっている。

- 1) J P I Cの活動内容について
- 2) わが国の急性中毒発生状況 (1991年度受信統計による日米比較)
- 3) 急性化学性中毒情報の特殊性 (医薬品情報との収集と毒性危険性評価方法との比較)
- 4) 毒性危険性評価上の問題点と課題

すなはち、まずはじめにWHO提案の中毒情報センターの役割と機能を提示し、J P I Cの電話相談事業との関係を説明する。そして中毒情報提供活動の究極の目的である急性中毒発生予防のための啓蒙活動を進めるための「Toxicovigilance」の意義を、医薬品の場合のPMSと対比して解説する。次いでJ P I Cが電話相談から見たわが国の急性中毒発生状況を紹介した後に、急

性中毒情報の特殊性について、情報収集段階と毒性危険性評価の現状を紹介し、基礎毒性データからの臨床危険性評価における外挿法に関する問題について時間の許す範囲で触れる。最後に情報公開と救急処置上の基礎データの提供などについての要望事項を課題として提示し、参考に供したいと考えている。

臨床薬物分析

寺田 賢

大阪大学医学部法医学教室

臨床薬物分析は、処方された薬物の血中薬物モニタリングと急性中毒における中毒原因物質の分析に大別される。前者は中枢神経系用薬や循環器用薬などのいくつかの薬物はすでにその方法が確立化され、薬物治療を適切に行うことが可能となっている。しかし、後者は急性中毒患者の治療上不可欠な様にその重要性が著しく高いにもにもかかわらず、未だ確立されていないのが現状である。従って、本講演では、急性中毒における中毒原因物質の分析の手法に関してどの様な分析手段が用いられるかについて、主として最近の分析機器や分析方法で、今後の応用が期待できる分析法を述べると共に演者の経験例についても紹介する。

1. 急性中毒の診断法

急性中毒の診断には、中毒原因物質の早期同定が必須であり、原因物質が確実に判明してこそ適切な治療や予後が出来る。中毒原因物質は、問診、理学的所見、症状、一般臨床検査、薬毒物分析などから推定するが、なかでも、薬毒物分析は中毒原因物質の同定上不可欠であり、これによって始めて正確な中毒の診断を下すことができる。しかし、他の所見や情報も薬毒物分析上重要な参考資料となり得り、特に一般臨床検査ではある程度の中毒原因物質を推測することが可能な場合もあり、多くの情報、所見、検査データなどは収集するように努める。

2. 試料の採取と保存

薬毒物分析は試料を適切に採取することから始まるが、分析の専門家でない一般臨床医が行うため試料の採取や保存が分析に不適当な状態となっていることが多く、この場合には正確な分析結果は全く期待できないので注意を要する。分析の対象となる試料は、中毒発生現場周囲の薬毒物、生体では胃内容（吐物、洗浄液）、血液、尿（透析液）は全例採取する。特に血液や尿は治療前・後や経時的な採血・尿なども治療上重要である。又、毛髪、爪などの硬組織には長期にわたって薬毒物が蓄積されるため、特に麻薬や覚醒剤などの乱用者にはその既往歴が推測でき重要な試料となり得る。採取量は血液で10 ml、胃内容で50 ml、尿で50 ml、毛髪や爪で数10 mgなどは最低必要量である。

3. 分析上の問題点

最近の分析機器や分析方法の発展は著しく、微量な試料から薬毒物を高感度に分析することが可能になっているが、その反面、

それに比例して最終分析手段の妨害物質の感度も増加するため中毒原因物質の同定に種々の支障を来す場合が多々ある。分析上の問題点は、生体試料中の内在成分、外来成分などの不純物が混入しクロマトグラム上夾雑ピークとして出現する。また、目的物質の分解や回収率の低下、生体成分と反応し特異な化合物を形成する場合などがあり、同定の最終段階には特に注意を要する。

4. 抽出法

生体試料中の薬毒物の微量分析は、いかに生体由来の妨害物質を除去し、回収率が高く、簡便で迅速な抽出法（クリーンアップ）を用いるかが、分析の成否を左右する重要な要素となる。抽出法は、古くから繁用されているStas-Otto法などの液-液抽出法と、最近、開発・市販されているカートリッジタイプのミニカラムを中心とした液-固抽出法（カラム抽出法）に大別される。液-液抽出法は、未知試料中の薬毒物を系統的に抽出するには不可欠な抽出法であるが、エマルジョンが形成し抽出時間が長く、溶媒が多量となるなどの欠点もある。一方、カートリッジタイプのミニカラムによる液-固抽出法には、カラムに高純度の巨大細孔けいそう土を充填したExtrelut、Extube(Clin Elut、Chem Elut、Tox Elut)、HPLC用の化学結合型シリカゲルを充填したSep-Pak C18、Bond Elutなどがあり、簡便性、迅速性、回収率、再現性に優れているが、保持容量や試料量に制限があり、極性が高い代謝産物などは保持されにくいなどの難点もある。

6. 機器分析法

(1) 薄層クロマトグラフィー(TLC)

TLCは、安価な装置で短時間に多数の検体を一斉に同時分析でき、分離された各成分を選択的な発色反応によって目で識別できる。更に、各成分を抽出しGC、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、紫外吸収分析(UV)、GC-MSで再分析し、より高精度な分析ができる。従って、今日、薬毒物の日常検査に広く繁用されている分析法であり、特に、未知試料中の中毒原因物質のスクリーニング法としては、最も適した方法である。演者は未知検体の薬毒物検査に、TLC、UV、GC、GC-MSなどの分析手順で変死体中から各種の薬毒物を検索している。最近、TLC-MSなるTLCプレートからマススペクトルを直接取れるような分析技術が開発され定性能力が著しく向上した。又、アメリカ・マリオン社で開発されたTLCを基本とした多数の薬毒物を一斉分析できるスクリーニング用キット、TOXI-LAB(巴工業)が市販されている。但し、米国で開発されたため、わが国の急性中毒で頻度の高い薬毒物で欠けているものもあり、これをそのまま適用しても薬毒物の判明率は低いので注意を要する。又、検出限界は尿中で $0.1-5 \mu\text{g/ml}$ と

報告されており、胃内容、尿からのスクリーニング法には有益だが常用量が著しく低い向精神薬の血中スクリーニング法としては期待できない。

(2) Capillary GC

近年、GCは薬毒物の分析法として広く繁用されており、更に、感度や分解能を向上するために各種誘導体化試薬、検出器、カラムなどが開発されている。特に、カラムの開発は最も大きな進歩を遂げており、なかでも、Dandeneauらによって開発された溶融シリカキャピラリーカラムは、極めて高純度な二酸化ケイ素からでき(金属不純物0.1 ppm以下)、外壁をポリイミド膜で被膜保護し、不活性、しなやか、折れにくいなど、従来のガラスカラムの概念を打ち破った理想的なカラムであった。今日では、溶融シリカカラムの内面を処理しより不活性なカラムとし、固定相液体を架橋し、かつカラムのシリカ表面と化学的に結合した架橋・化学結合相溶融シリカキャピラリーカラムが開発され、現在最も理想的なカラムとして注目され、各社から開発・市販されている。一方、キャピラリーカラムは試料負荷量が小さいため、試料導入法は試料の1/100程度しか注入できないスプリット法のみであったが、その後、大量注入できるスプリットレス法、ダイレクト法、ムービングプレカラム法、クールオンカラム法、PTV(programmable temperature vaporizer)法など導入法が開発された。なかでも、クールオンカラム法、PTV法は試料を低温下で液状のまま直接カラム内に導入できるため、組成変化や熱分解が避けられ、微量分析、再現性、定量性などから最も優れた導入法であり。一方、GCにはKovatsが提唱した保持指標(RI)があり、GCの保持値の標準化に最も適した値である。キャピラリーカラムの出現によってより高精度なRIが得られ、更に数種の極性の異なるカラムを用いればより一層定性能力が高められる。但し、カラムによってRIが多少異なるので注意を要する。

(3) HPLC

HPLCは、GCでは困難であった難揮発性、熱不安定化合物なども比較的簡便に室温分析ができる優れた分析手段である。しかし、ピークから有力な情報が得られる特異的な検出器がなく、定性能力に難点があった。最近、ピークから有力な情報が得られる画期的な検出器としてフォトダイオードアレイ検出器(PAD)やMSが開発され定性能力が飛躍的に向上した。

1) HPLC-PAD

PADは、光センサーにフォトダイオードアレイを使用し、UV(紫外)-VIS(可視)全波長域の吸収スペクトルが瞬時に測定できる検出器である。後述するにMS比べ多少特異性は劣るが、実用化に

基本的問題点はなくすでに各社から市販されている。最近、HPLC-PADを基本とした、簡便な薬物同定システム (REMEDi) が BIO-RADから開発市販され中毒原因物質の同定に応用されている。

2) HPLC-MS

最近、HPLCにも高精度な情報が得られるように、MSを直結するため種々のインターフェース (サーモスプレー法、フリット高速原子法、太気圧化学イオン化法、エレクトロスプレーイオン化法) が研究・開発されている。各々一長一短があるが、なかでもサーモスプレー法は溶出液を減圧下、熱で気化・噴出し、同時にソフトなイオン化 (化学イオン化:CI) 法を起こす方法であり、インターフェースとして現在良く用いられている。しかし、HPLC-MSは、検出感度 (GC-MSの約1/10~1/50)、イオン化法 (主としてCI法)、マススペクトルのデータベース化、磁場型との直結などの種々の問題点があり、これらを克服すべく今後の益々の研究・開発が期待される。

(4) Capillary GC-MS

Capillary GC-MSは、GCのカラムに高分離能を有するキャピラリーカラムが直結され、高分離能、高選択性、超高感度な分析法として確立され、中毒原因物質の最終的な同定手段には極めて有益かつ不可欠な分析手段である。イオン化法には、化学構造の解析に有益な電子衝撃イオン化(EI)法、ソフトなイオン化で擬分子イオンが得られ分子量が推定できるCI法が薬毒物の分析に最も繁用されている。又、超高感度で (求電子化合物ではfg)、スペクトルが単純で特徴的なため類似化合物の同族体が推定できる負イオン化学イオン化(NCI)法もその応用が期待されている。特に、EI法で得られたマススペクトルは、ライブラリー (約30000の化合物) からコンピューターで瞬時に検索でき、未知の中毒原因物質を瞬時に同定することが可能であるが、ライブラリーサーチで得られた結果が絶対的でないので、更にCI法での確認が必要である。従って、今後はCI法やNCI法で得られたマススペクトルもライブラリーサーチできるようなシステムが開発されれば、未知の中毒原因物質をより一層瞬時に同定できる。一方、定量法には上記イオン化法で得られたフラグメントイオン(m/z)による選択的イオン検出法 (SIM)があり、微量な試料中から超高感度分析が可能である。演者の経験ではcapillary GC-EI-MSの検出限界はscanモードではレボメプロマジンで約2ng、トリアゾラムで約10~20ngのように数ng~20ngでスペクトルの測定が可能であり、SIMモードではメタンフェタミンのヘプタフルオロ誘導体で0.8fgの超高感度が得られた。

7. イムノアッセイ

イムノアッセイは、生体試料中の薬毒物を直接、迅速に分析で

きる方法であり、簡便で高感度、かつ多数の検体を短時間で処理できるなどの利点がある。その反面、得られた抗体に絶対的な特異性がなく類似化合物や代謝産物にも交叉反応を示すなどの最大の欠点がある。従って、既知試料には有益であるが、未知試料の中毒原因物質のスクリーニング法としては不適で最終的な同定手段には種々の機器分析に委ねなければならない。本法のアッセイシステムには、付属の測定機器と共にキット化されたEMIT (Syva社)、ELISA (MARKIT、大日本製薬社)、SLFIA (TDA-エーム、Ames社)、FPIA (TDX、ダイナボット社)などが市販され、テオフィリン、抗てんかん薬、カンナビノイド、麻薬類などの薬毒物検査に最も広く繁用されている。

おわりに

今日、分析技術の発展は日進月歩であり、微量な生体試料から信頼性の高い超高感度分析法が開発され、中毒原因物質の分析法にも応用されつつある。しかし、わが国では、欧米の中毒センターのように、中毒原因物質の分析を実施している公的な専門機関は設立されていないため、急性中毒患者やその疑いのある患者が一般救急医療施設に搬送される頻度は少なくないにもかかわらず、急性中毒の診断に中毒原因物質を積極的に分析している機関は極めて少なく、時に応じて、医療関係機関の分析専門家に個人的に依頼されているのが現状であり、欧米に比べ著しく立ち遅れている。従って、中毒治療上不可欠である中毒原因物質の分析に対処するため、1日も早く公的な中毒分析センターの設置を強く切望する。

文献

- 1) 寺田 賢：衛生化学、32、133 (1986)。
- 2) 黒岩幸雄、寺田 賢：中毒研究、1、67 (1988)。
- 2) 寺田 賢：月刊薬事、31、1539 (1989)。

シンポジウム

3. 農薬中毒

鈴木康男
東北大学薬学部

農薬中毒の危険性を考える場合、諸外国では、暴露の頻度はピラミッド形になることが予想されている。すなわち暴露の件数は、農薬の製造者、農薬の使用者、一般人の順に多くなるが、それによる障害の程度は逆に低くなるとされている。本報告では、日本における中毒もこの一般論にしたがっているかの問題を中心に考察し、将来の農薬中毒問題についての話題を提供する。

1. 農薬の生産・出荷

最近の日本の農薬の生産量を毒性別にまとめると表-1になる¹⁾。戦後の一時期に比べ、毒物や劇物の占める割合が減少し、普通物が中心となっていることが分かる。総生産量は常に殺虫剤が最大であり、平成3年度の内訳を総生産に対する比率でみると、有機リン剤(14.7%)、カーバメート剤(4.5%)、有機塩素剤(2.0%)、その他(16.8%)である。また毒物としての生産量がもっとも多いのは除草剤であり、これは以下に述べる中毒死亡例の多さと対応している。

表-1 平成3年度毒性別生産数量

(単位: t)					
種類\毒性	特定毒物	毒物	劇物	普通物	計
殺虫剤	57	5,271	97,397	105,410	207,765
殺菌剤		508	25,747	110,766	137,021
除草剤		7,768	4,781	119,515	132,064
その他	28	320	176	30,635	31,159
計	85	13,867	128,101	365,956	508,009
(%)	(0.0)	(2.7)	(25.2)	(72.0)	

(農薬要覧-1992-)

2. 使用者の中毒

厚生省の農薬中毒統計中には、農薬散布中の中毒と死亡数がまとめられており、この数年では年間数十名の中毒と数名の死亡者となっている（表-2）²⁾。しかし、死亡にまで至らない中毒者の数は極めて不明確であり、全国的な集計は全く行われていない。菅谷（平鹿総合病院）の調査によると、全国にまたがる13の県の41の病院を訪れた患者のうち、農薬中毒と診断された者の数は年間167例に達しており³⁾、全国を集計すればその数はかなりに及ぶことが予想される。一方現在登録されている農薬の件数は約6,000、主要原体に限っても数百あり、それぞれが異なった生体障害性を持っていると考えると、農薬中毒の診断や判定には多大な努力とデータの集積を必要とする。

表-2 日本における農薬中毒(厚生省薬務局)

年度	散布中		誤用		自・他殺		中毒・未遂 合計	死亡 合計	総計
	中毒	死亡	中毒	死亡	未遂	死亡			
1977	29	8	11	22	103	410	143	440	583
1978	100	3	17	16	76	323	193	342	535
1979	34	4	14	28	61	343	109	375	484
1980	39	5	9	20	49	328	97	353	450
1981	18	1	13	4	76	355	107	360	467
1982	25	4	10	23	78	498	113	525	638
1983	36	7	14	23	105	465	155	495	650
1984	37	4	13	22	93	490	143	516	659
1985	30	6	12	29	171	933	213	968	1,181
1986	34	4	19	13	182	927	235	944	1,179

3. 一般人の中毒

科学警察研究所による全国の中毒変死者の統計のうち、農薬中毒者の数をまとめた結果を表-3⁴⁾に示す。死亡者の大部分は自殺であるが、この10年間の推移をみると、除草剤パラコートによる中毒が常に一位を占めている。現在は規制の強化や剤形変更により減

少傾向にあるが、その危険性は依然として大きい。また有機リン剤による中毒も年間数百名に達し、最近の中毒事例としては、除草剤であるグリホサートやグルホシネートなどの増加が目立っている。またカーバメート中毒ではメソミル服用例が多い。

表 - 3 農薬による中毒事故の発生状況

種類 \ 年度	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991
有機リン剤										
マラソン	26	71	47	58	64	51	50	33	37	52
E P N	13									
DDVP	35	53	48	63	53	56	62	51	51	39
MEP		41	48	50	66	74	46	44	39	42
DEP		23	19	29	17	19	27	27	16	-
その他	109	125	124	134	158	154	134	124	111	123
カーバメート剤	35	46	49	71	62	56	74	67	72	70
有機塩素剤	6	13	12	17	10	9	8	5	5	10
パラコート	249									
//及びジクワット		398	551	957	1,202	1,043	729	577	471	479
その他	32	56	56	56	84	64	83	52	63	67
計	505	826	954	1,435	1,716	1,526	1,213	980	865	882

科学警察研究所資料，第26-35報(1983-1992)

4. 残留農薬の毒性と環境毒性

残留農薬による毒性の評価は環境科学の面からなされるべきであり、リスクについての適切な判断が必要である。近年の公害問題はいわゆる「おそれ公害」が問題となることが多く、中毒も「おそれ中毒」として科学的な対応をする必要に迫られている。農薬による発がん性の有無をどのように判断するか、規制中毒学の充実が求められている。

5. 農薬中の不純物、代謝物および毒性機構

1976年、マラリア撲滅計画として殺虫剤マラチオンを散布中、作業員7,500人中2,800人が中毒症状を呈し、5人が死亡した。調査の結果、使用した製品の銘柄によって中毒の出現率に差があることが分かり、中毒の原因物質は製品中の不純物、とくにイソマラ

チオンが主原因と結論されている⁵⁾。しかしこれら製品中には、イソマラチオン以外の多種類の不純物が検出されており、真の原因物質は明らかではない。その後マラチオン中の不純物のうち、S-メチル形のアルキルリン酸エステルには強い毒性があり、しかも遅延型の肺毒性を示すなど、従来のアセチルコリンエステラーゼ阻害とは全く異なる機構で毒性が発現することが分かっている⁶⁾。

演者らはトリアルキルチオリン酸エステル類の生物活性を調べている過程で、上記の S-アルキル形化合物の毒性発現を経験し⁷⁾、以後その毒性機構についての検討を行っている。その結果、化学構造の僅かな違い(表-4)によって毒性は大いに異なり、症状にも差が認められること、及び同族体の共存は顕著に毒性を軽減することが分かった(図-1)。これらの化合物は、低毒性農薬である製品中に混入する可能性が十分あり、毒性機構を明らかにして適切な治療法を確立することが必要であると考えている。

Table 4. Toxicities of alkyl phosphorothioates observed within 6 hr after administration of 1.4 mmoles/kg

(R = methyl to n-butyl)	Compound	Narcosis	Cholinergic symptoms	Serum ChEase activity (% of control)	Other symptoms	
					(a)	(b)
I	Me	++	-	95.3	-	-
	Et	+	-	104.0	-	-
	Pr	-	-	94.6	-	-
	Bu	-	-	96.9	-	-
	PB + Et	-	-	100.3	-	-
	3-MC + Et	-	-	102.9	-	-
II	Me	++	++	30.6	++	++
	Et	+	+	25.8	+	+
	Pr	-	-	22.1	+	-
	Bu	-	-	96.0	-	-
	PB + Et	-	++	26.5	++	-
	3-MC + Et	-	-	41.1	-	-
III	Me	-	-	92.2	-	-
	Et	-	-	97.7	-	-
	Pr	-	-	92.2	-	-
	Bu	+++	-	83.1	-	+(c)
IV	Me	-	-	N.D.	-	-
	Et	-	-	106.1	-	-
	Pr	-	-	N.D.	-	-
	Bu	++	-	92.2	-	+(c)

Toxicological signs are shown as follows: (+++, very serious and death occurred; ++, serious; +, observed; -, not observed). Serum ChEase activity is shown as the mean value of two or three rats at 6 hr after administration. ND: not determined. (a) Diarrhea or urination. (b) Bleeding in the gastrointestinal tract. (c) Inflammatory hyperemia probably due to chemical stimulus.

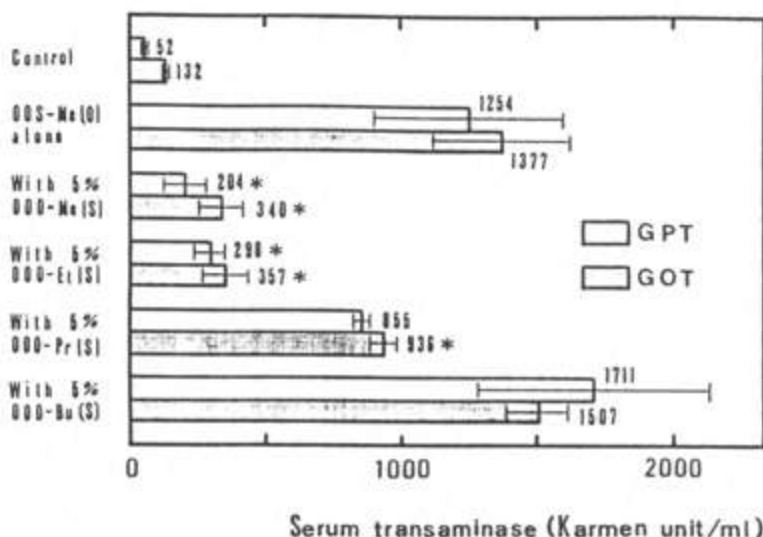


Fig. 1. Protective effects of four homologous O,O,O-tri-n-alkyl phosphorothioates on the liver damage produced by OOS-Me(O) at 24 hr after administration. Rats were treated with 0.5 mmole/kg of OOS-Me(O) with and without 5 mole % OOO-Me(S) or its homologs. Each column represents the mean S.E.M. (N=3). A single asterisk indicates $P < 0.05$ vs OOS-Me(O) alone (Ranking test).

(文献)

1. 農薬要覧-1992-, 日本植物防疫協会, p.61 (1992)
2. 農薬の毒性と健康障害, 公害研究対策センター, p.123 (1989)
3. 菅谷 彪, 農薬中毒(障害)臨床例全国調査, 昭和63年度厚生科学研究; 農業生産活動における化学物質の人体への影響に関する研究, p.9 (1989)
4. 化警研資料第24号-35号, 化学警察研究所(1983-1992)
5. E.L.Baker et al., Lancet, 31(1978)
6. W.N.Aldridge et al., Arch.Toxicol., 42, 95(1979)
7. N.Furukawa et al., Biochem.Pharmacol., 35, 1019(1986)

医薬品の中毒（有害反応）

安原 一

昭和大学医学部第二薬理学教室

薬物有害反応（adverse drug reaction）は、薬物療法においては避けることの出来ない合併症の一つである。それに対して、初期の診断や適切な対応をしないと死に至ることもある。そのため有害反応の正しい理解は、疾病のある薬物で治療するにあたり、その危険性と有効性の比をより適切に評価するために必須のこととなる。薬物有害反応を分類すると以下のようになる。

1. 薬物有害反応の分類

- Type A: この有害反応は薬物の主作用であろうと副作用であろうとその用量に相関し、その作用は予想が容易で、用量を増加すれば誰にでも起こる。用量を減ずることによりその作用は消失する。
- Type B: この有害反応は薬物に対する特異体質反応である。これには先天的な薬物代謝酵素異常と、後天的な薬物アレルギー（薬物過敏症）がある。これらは患者側の要因が大きいため、予想が困難で、単純な用量-反応相関性を示さず、特定な人にもみ起こる。そのため発生頻度は、Type Aより少ない。しかし最近、これら特異体質反応のうち、酸化代謝酵素、チトクロムP-450(CYP)の分子種の解明により、遺伝的多型を示すCYP(CYP2D6, CYP2C)の個人の phenotyping あるいは genotypingが可能になって来ている。
- Type C: 長期投与による薬物依存を示すもの。
- Type D: 発癌性や催奇形性のような遅発性に起こるもの。

ここでは特にType AおよびType Bについて述べる。

2. 老年患者における薬物有害反応

老年患者は特に肝代謝機能および腎排泄機能の低下による薬物濃度の上昇、臓器反応の亢進により、薬物有害反応が起こりやすくなる。また恒常性調節機能の低下により作用が強く現れる。さらに多くの疾患を有するため、それに対して多剤が処方され、薬物相互作用

用による薬物有害反応も増加する。多剤処方の結果、患者のコンプライアンスが悪くなり、そのことがまた薬物有害反応に結びつく。

ここで2つの例をあげる。まず半減期が長く、慢性疼痛疾患をもつ老年患者に長期間使用され、黄疸を伴い、死亡例を出し、市場から回収された非ステロイド性抗炎症薬 benoxaprofen の例を示す。

benoxaprofenの血中半減期は健常人で30~35hrに対し、老年者では111hrと長い。さらに老年患者に1日1回600mgを10日間連続投与すると、日毎に血漿中濃度は上昇し、10日目では初回投与時の6倍にも達した。この様な薬物動態を示すbenoxaprofenを80歳以上の老年患者に3~7ヶ月間という長期に投与した結果、黄疸を伴う肝障害で死亡例が出たわけである。その後、この肝障害の機序は高濃度benoxaprofenによる細胞膜に対する直接的な作用とする報告と、チトクロムP-450 1ファミリー酵素の誘導によりbenoxaprofenは反応性の高い親電子物質を生ずるとする報告、またチトクロムP-450 4ファミリー酵素の誘導とペルオキシゾームの増殖により H_2O_2 レベルの上昇、さらには過酸化脂質の増加を引き起こす可能性が示唆されている。

最近、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 感染症に塩酸バンコマイシンが使用されているが、腎機能の低下した患者においてはバンコマイシンの蓄積が生じ、腎毒性、聴器毒性が問題となる。そこで、老年患者におけるバンコマイシン反復投与時の薬物動態を検討した。対象は鼻汁もしくは咽頭粘液の培養によりMRSAが分離された6人の女性患者であり、年齢 78.5 ± 5.3 歳、体重 34.8 ± 9.4 kg、クレアチニンクリアランス 41.9 ± 19.8 ml/minである。10mg/kgを100mlの生理食塩水に溶解し、60分かけ点滴静注した。2~5日目は1日2回投与、1日目及び6日目は1回投与で行った。健常人に比して血中半減期は延長し、尿中排泄率も低下していた。反復投与により血中半減期はさらに延長した。特に、腎外クリアランスの低下が著明であった。今回の投与方法での最高血中濃度は $47.7 \mu\text{g/ml}$ 、trough値は $24.7 \mu\text{g/ml}$ であった。一般に腎毒性はtrough値が $30 \mu\text{g/ml}$ 以上、聴器毒性はピーク値が $50 \mu\text{g/ml}$ 以上で起こると言われている。1日2回の反復投与方法ではこれらのレベルに達する可能性がある。同様のことがゲンタマイシンをはじめとするアミノ配糖体抗生物質、ジゴキシンでも報告されている。

3. 薬物中毒

一般に薬物中毒は、薬物有害反応と異なり、通常量を越えた過量投与による毒性と定義される。薬物中毒は事故 (accidental)、故意 (intentional)、医原性 (iatrogenic) により起こる。中枢神経

系の毒性としては意識障害、運動障害、ケイレン、循環器系の毒性としては不整脈、血圧低下、その他呼吸障害、肝障害、腎障害、皮フ障害等があげられる。過量投与の結果、蛋白結合率の変化により組織への分布の増大、代謝酵素の飽和により薬物消失が一次速度過程からゼロ次速度過程を示し、その消失が遅延する。ここでアセトアミノフェンの薬物中毒の例を示す。

アセトアミノフェンは過量投与により、肝壊死を起こすことが知られている。過量投与後4時間でアセトアミノフェンの血漿濃度が250 μ g/mlを越えると起こる。通常量の投与では、ほとんどが硫酸抱合、グルクロン酸抱合され、一部酸化を受ける。アセトアミノフェンの過量投与では、二つの抱合系が飽和し、チトクロム P-450による酸化反応で非常に反応性に富む N-acetylbenzoquinoneimine (NABQI) が生成される。通常この代謝物はすぐにグルタチオン抱合されるが、この抱合が飽和(6g以上)すると、肝細胞内蛋白と非可逆的に結合し組織壊死を生ずる。

4. 薬物代謝酵素欠損と薬物有害反応

薬物代謝酵素研究および薬理遺伝学の進歩により、薬物代謝能にかなりの個人差があり、その一部には薬物代謝酵素の欠損者が存在することが明らかとなって来た。現在遺伝的多型を示す薬物代謝酵素反応には N-acetylation, S-mephenytoin oxidation, Debrisoquine/sparteine oxidation 等が知られている。これら酵素の欠損者の出現頻度には人種差が存在する。すなわちアセチル化多型における slow acetylator の出現頻度は日本人で7~12%、欧米人で52~62%である。メフェニトイン型多型における poor metabolizer の出現頻度は日本人で22.5%、欧米人で2~5%と日本人で高いのに対して、デブリソキン型多型における poor metabolizer のそれは、日本人で0~0.7%、欧米人で3~10%と日本人で低い。アセチル化の phenotyping における薬物有害反応の例として、末梢性ニューロパチーはイソニアジド、ヒドララジンの slow acetylator に起こりやすい。ループス様症候群はプロカインアミド、ヒドララジンの slow acetylator に起こりやすい。

日本人では、イソニアジドの肝障害が rapid acetylator に起こりやすい。

降圧薬であるデブリソキンはチトクロム P-450 2D6 (CYP2D6) により酸化されるが、この CYP2D6 が欠損している患者では、通常量のデブリソキン投与でも顕著な血圧低下が起こる。

抗不整脈薬であるフレカイニドの消失は CYP2D6 による代謝と腎排泄によっている。CYP2D6 の poor metabolizer の老年患者の場合、

フレカイニドの通常量の投与でも致死的な蓄積を起こす可能性がある。抗不整脈薬であるプロパフェノン[®]はCYP2D6により酸化される。CYP2D6のpoor metabolizerではプロパフェノンの代謝が障害され、プロパフェノンの血中濃度が高くなる。プロパフェノンのS-体には β 遮断作用が認められ、その作用がプロパフェノンのNaチャンネル阻害作用に加わり中枢性の副作用および心筋抑制作用を起こす。

抗狭心症薬である perhexiline はCYP2D6で酸化されるが、そのpoor metabolizer に肝障害が起こりやすい。

メフェニトインはCYP2Cにより酸化されるが、このCYP2Cの欠損している患者での薬物有害反応は、日本人にこの欠損者が多いにもかかわらず良く知られていない。この酵素で酸化される薬物にジアゼパム、イミプラミン、ヘキサバルピタール、メフェニトイン、オメプラゾールなどがある。

最近、多くの薬物の代謝に関与する CYPの分子種が同定されて来ており、共通した CYPサブファミリー酵素で代謝される薬物間での相互作用による有害反応も重要となろう。

5. 薬物有害反応（中毒）の対策

薬物有害反応（中毒）を防止するためには、まず第一に薬物がどのような体内動態を示すか、特にどのような代謝を受けるかを知ることが重要であり、CYP の分子種の同定は医薬品の開発において今後必要となるであろう。これらの情報は薬物相互作用を考える上で非常に有益である。上記遺伝的多型を示す薬物の場合には、可能であれば患者の phenotypingが最も有用であるが、現時点では実施が困難であろう。

今後、老年患者の増加に伴い、老年患者での薬物動態と薬物有害反応との関連性の理解と多薬主義の解消に努力する必要がある。

薬物中毒に対しては、中毒原因薬物の同定とその除去法、特異的解毒薬の早期の使用等が必要であろう。

大野 曜 吉

日本医科大学法医学教室

【はじめに】

今日まで、植物中には強い薬理活性を有する多数の物質が発見されているが、そのうち、アルカロイドと呼ばれる一群の物質が分類されている。これらのうち、*morphine* やその誘導体である *heroin* などのアヘンアルカロイド、コカアルカロイドである *cocaine*、バッカクアルカロイドから誘導された LSD-25 などは、欧米において、また近年日本においても依存性薬物として臨床・社会医学的に極めて重要な位置を占めている。また、例えば *atropine* や *ephedrine* など、その薬理活性が医薬品として古くから利用されているものも多い。ところで、アルカロイドによる中毒は、臨床医学においても法医学においても比較的稀な事例であり、従って一例報告されるケースも多いものと考えられる。その中で、毒性の特に強いアコニチン型アルカロイド（トリカブト毒）中毒の報告は、本邦においてもまた諸外国においても散見されている。そして、重篤な症状を呈し時として致死的であること、誤食事故が散見されることなどから、救急医学の分野でも注意を要する毒物の一つとして挙げられている。そこで、今回は自験例の概要を紹介し、法医学的・臨床医学的参考に供したい。

【アルカロイドとしてのトリカブト毒】

1806年、ドイツの Sertürner は阿片の塩基性主成分として *morphine* を分離し、1819年、Meissner は植物成分中、塩基性を有し、酸と結合して塩をつくる性質のあるものをアルカロイドと名づけた。すなわち、アルカロイドとは植物に含まれる塩基性物質であり、その分子中に窒素を含み、強い生理活性や毒性を有するものである。1939年、Henry はアルカロイドを「多かれ少なかれ中枢神経系に対して作用を及ぼすような薬理活性を有する、塩基性複素環窒素化合物で、アミノ酸あるいはその関連化合物に由来する植物成分」と定義した。その後、動物や微生物からもアルカロイドが発見され、また、必ずしも塩基性でないものも含まれるようになり、1966年、Hegnauer や山崎によって、生合成的側面からの分類がなされるようになった¹⁾。

キンポウゲ科 (Family Ranunculaceae) の多年草であるトリカブト (*Aconitum*) 属は、毒性の強い *aconitine*、*mesaconitine*、*hypaconitine*、*jesaconitine* といったアコニチン型アルカロイドと、*atisine* を代表とする低毒性のアミノアルコール型のアルカロイドとを含有している。トリカブトの毒成分であるアコニチン型アルカロイドは、生合成的には、アミノ酸由来でないブソイドアルカロイドであり、ステロイド母核を有するイソプレノイドアミンとして、ジテルペノイド C-19型に分類されている¹⁾。

トリカブトは、約300種類がヨーロッパ・アジアなど北半球の温帯以北に広く分布し、また、日本では数十種類が沖縄を除いた全土の山野に自生している。秋には青紫色の美しい花を咲かせることから、その切り花は生け花でも用いられ、鑑賞用として珍重されている。しかし、その若芽はニリンソウ・モミジガサ・ゲンノショウコなどの山菜や薬草と間違われやすく、誤食事故を引き起こしている。一方、トリカブトの根は烏頭・附

子と呼ばれ、熱処理・加水分解により、aconitine を低毒性の aconine などに加工した上で、漢方薬として用いられているが、種類・産地・季節によって毒性成分の成分比や量が異なることが、医薬品としての品質管理上重要な問題点となっている。

トリカブトの毒性は極めて強く、成人に対してはその根約1g、aconitine 自体では約2~4mgが致死量といわれている。かつて、アイヌによって矢毒として用いられたことや伊達政宗の暗殺未遂事件などは有名な史実である。また、昭和39年から平成2年まで、有毒植物による食中毒は全国で約160件報告されているが、そのうち23件がトリカブトであり、6人の死者を含め63人の中毒者が発生している²⁾。

【トリカブト中毒事例】

トリカブト中毒の内外の事例として、岡田ら³⁾は18例23名の中毒例について臨床的観点から報告している。それによるとトリカブト中毒で顕著なのは不整脈の発生であり、不整脈治療の奏効の有無が予後を決定づけるとし、実際例の使用薬剤の効果を検討している。その結果、リドカイン・アトロピンが有効な可能性があり、それが無効な場合には、クラス1や2の抗不整脈剤を使用すると治療可能であるかもしれないとしている。ただ、摂取量が多ければ不整脈の停止は困難であると述べ、トリカブト中毒治療の特効薬はなく、治療法を一面的に論ずることはできないとしている。実際、臨床的には、ほとんどの症例で対症療法に追われざるを得ない現状であろうと推察される。

これ以外にも、文献的には多くの報告がみられているが、その中でやや変わったところでは、蜂蜜によるトリカブト中毒例⁴⁾がある。野生するミツバチの巣を発見した8人が蜜をなめ、中毒に陥った事例であり、同様の例は最近岩手県内でも発生している⁵⁾。

ところで、村上次男東北大名誉教授によれば、昭和17年頃から19年頃の戦時中、トリカブトを用いた殺人被疑事件あるいは殺人未遂被疑事件が東北地方で散発したという。しかしながら以来最近まで、殺人事件の報告例はみられず、法医学的にはいわば「忘れられた毒」であったということができよう。さて、岡田ら³⁾が自験例として紹介している上野のクズモチ事件(1989年8月)は、何者かによって郵送されたクズモチを食べた親子が中毒し、父親が死亡した殺人事件であるが、文献的には、血中濃度が測定された日本初の報告例である⁶⁾。また、海外で血中濃度を測定し得た事例としては、肛門内にトリカブト根を挿入して死亡したドイツの例⁷⁾が唯一であろう。そして、血中・尿中濃度を経時的に測定した、恐らく世界第1例として、倉沢ら⁸⁾が最近報告しているが、アコニチン型アルカロイドの体内動態や代謝経路については、やっと生体試料からの微量分析法が確立した段階であり、今後の解明が待たれる段階にあると考えられる。

【トリカブト事件】

沖縄では本土復帰以前、医学部がなく、従って法医学教室もなかったことから、昭和32年の新刑事訴訟法施行をにらんで、昭和31年から法医学顧問制度というものを独自に創設し、本土の法医学教室の助教授クラスを半年ないし2年交代で警察本部に招請し、異状死体の死体検案と犯罪死体の司法解剖とにあたらせていた。そして、非犯罪死体の死因究明のための承諾解剖システム(準行政解剖システム)が昭和49年から導入された。昭和57年4月、琉球大学医学部法医学教室が開設され、法医学顧問制度は解消したが、行政解剖に準じたこの承諾解剖システムは、そのまま琉球大学法医学教室に引き継がれることとなった。

昭和61年5月20日、33歳の新婚女性が、石垣島のホテルについて間もなく、激しい吐

気と嘔吐をし、手足のしびれを訴え、救急車で心肺停止に陥り、病院搬入後まもなく死亡した。病院では原因不明の急死として地元の八重山警察署に届出、翌日、承諾解剖が行われることとなった。その結果、肉眼的にはいわゆる急死の所見であり、死体検案書には死因を急性心筋梗塞とした。心臓と諸臓器の一部はホルマリン固定し、また、心臓血の一部を採取し、冷凍保存とした。解剖後、詳細な病理組織学的検査を行ったが、心筋梗塞を強く示唆する所見は得られなかった。そのうち、雑誌・新聞記者等からの種々の情報もあり、また、夫受け取りの1億8500万円の生命保険金の存在も次第に明らかになってきた。7月に至り、八重山署から死因などに関する鑑定嘱託を依頼され、承諾解剖は司法解剖に準じたものとなった。

我々は、病院の心電図に着目し、薬理学・薬剤学の専門家らの協力を得て、彼女にみられた心室細動を引き起こす薬剤をリストアップした。これらの一部については検査したところ（ジギタリス・キニジンについてTDX、重金属について発光分光分析）陰性であった。他のものについては血液試料が少なく、場当たりの検査はできなかった。一方、教科書類を検索していたところ、裁判化学の教科書にトリカブトについての記載があり、症状がよく似ていること、その毒成分である aconitine の致死量は、極少量であることを知った。また文献では、兄弟が漢方医にトリカブトエキスの原液数滴を投与され、1人が死亡したインドの例⁹⁾が印象的であった。

当時、アコニチン型アルカロイドの血中からの検出法については、内外の文献を当たっても報告がみられなかった。そこで、東北大学薬学部鈴木康男教授とも相談し、東北大学医学部薬剤部の水柿道直教授に分析を依頼することとなった。当時、東北地方ではトリカブトの誤食事故が散見されたことから、水柿教授は、臨床診断学的にも、アコニチン型アルカロイドの分析法の確立を重要と判断し、その開発に精力的に取り組まれた。高性能質量分析装置を用いた分析方法^{10) 11)}が確立されたのが、昭和61年の末であった。翌年2月、血液の一部を水柿教授に送付したところ、血中から aconitine (29.1ng/ml)、mesaconitine (53.1ng/ml) などのアコニチン型アルカロイドが検出され、その結果に基づいて、昭和62年5月、鑑定結果を沖縄県警に報告した。

一方、夫は保険請求したものの、支払いを拒否され、昭和61年12月、保険会社4社を相手に民事訴訟を提起した。平成2年2月、第1審判決が出され、夫は勝訴した。保険会社は控訴し、私に証言を依頼してきた。同年10月11日、東京高裁で「死因はトリカブト中毒による急性心不全」と証言し、その1ヶ月後、夫が訴訟自体を取り下げたことからマスコミが一斉に報道することとなった。その後、トリカブトの入手経路がマスコミによって判明するなどの経緯をたどり、平成3年6月9日、夫は横領容疑で警視庁に逮捕され、7月1日、殺人容疑で再逮捕、23日、東京地検によって起訴された。逮捕後、夫が猛毒のクサブグを購入していたことも判明し、東京大学農学部野口玉雄博士によって、被害者の血液からブグ毒も検出された。ここにいたり、我々は aconitine と tetrodotoxin の両毒について、死亡に及ぼす影響を検討する必要性に迫られた。

トリカブトに関する論文を再度読み直すうち、その中に tetrodotoxin の記載があることに気が付いた。そして、Catterall の総説¹²⁾にたどり着いた。それによると、興奮性細胞膜のナトリウムチャンネルに作用するトキシンはレセプターサイトから3群にわけられ（その後5群に分類されている¹³⁾）、第1群である tetrodotoxin は、細胞膜の興奮時のナトリウムの流入を阻害するが、第2群である aconitine は、逆にチャンネルを開き、ナトリウムの細胞内への流入を促進するとされる。従って、ブグ毒である tetrodotoxin とトリカブト毒である aconitine とは、非競合的拮抗物質ということに

なる。in vivo でこれら2つの毒物を同時に投与した実験は行われていないようであった。そこで、我々は、マウスを用いて aconitine と tetrodotoxin を混合投与したときの死亡時間等に及ぼす影響について検討した。

【トリカブト毒とフグ毒との複合作用に関する実験¹⁴⁾】

体重30～35gのICR系雄性マウスを用い、シグマ社製 aconitine 及び tetrodotoxin を 0.1M酢酸buffer (pH5.0) に溶解し、1回投与量 (0.4ml) 中、経口投与では、aconitine 2及び3mg/kgに対し、tetrodotoxin 0, 0.33, 0.67, 1.0mg/kg、腹腔内投与では、aconitine 0.4mg/kgに対し、tetrodotoxin 0, 2.5, 5, 10, 15, 20, 30, 40 μ g/kgになるように調整し、それぞれ混合投与した。

経口投与の結果は表1のようである。aconitine 2mg/kg投与群では、tetrodotoxin 0mg/kgの対照群で約半数が死亡し、tetrodotoxin 混合投与量が増すに従い、死亡率は増加するものの、死亡時間が延長した。aconitine 3mg/kg投与群では、tetrodotoxin 0mg/kgの対照群では全例が死亡するが、tetrodotoxin 0.33mg/kg混合投与群で、5例中2例が生存し、死亡時間も著明に延長した。tetrodotoxin 混合投与群では、aconitine 中毒に特徴的な、嘔吐様の開口運動や頭部の痙攣運動が明らかに軽減された。特に、aconitine 3mg/kgと tetrodotoxin 1.0mg/kg混合投与群では、経過中ほとんど aconitine 症状がみられず、突然、嘔吐・痙攣を起こして死亡する例が観察された。腹腔内投与の結果は表2のようである。tetrodotoxin 混合投与2.5～10 μ g/kgの範囲で死亡率が低下し、また、10及び15 μ g/kg群で死亡時間の明らかな延長がみられた。しかしながら、経口投与と比較して、aconitine 症状の軽減は著明ではなかった。

aconitine のマウスにおける半数致死量は経口投与で1.8mg/kg、腹腔内投与で0.308mg/kgとされる。一方、tetrodotoxin は、フグの肝臓・卵巣等に含まれる猛毒で、マウスにおける半数致死量は経口投与で0.33mg/kg、腹腔内投与で0.01mg/kgとされている。今回の動物実験において、aconitine 中毒による死亡時間が tetrodotoxin によって延長し、また、死亡率の低下も観察され、これらは興奮性細胞膜のナトリウムチャンネルにおける両毒物の拮抗作用によるものと解釈された。

【おわりに】

「トリカブト事件」の刑事裁判が平成3年10月から始まり、第2回と第3回公判に証人として出廷した。裁判の帰趨は平成5年6月現在、いまだ明らかではないが、日本の最南端で行った一つの承諾解剖から、7年以上の歳月をかけて事件は徐々に解明されてきた。法医学者の宿命として、高裁・最高裁、場合によると再審請求と、長くこの事件に関与していかなければならないであろう。本事例から、真相究明のための法医学の役割の実際と、法医学における毒物分析の重要性の一端を御理解いただけたなら幸いである。

【文献】

- 1)山崎幹夫・相見則郎:アルカロイドの生化学, 医歯薬出版, 1984.
- 2)東京都衛生局編:間違いやすい有毒植物, 1993.
- 3)岡田保誠ら:トリカブト, 中毒研究, 4, 135-141, 1991.
- 4)川尻直志, 高橋建吉:蜂蜜による集団中毒, 法医学の実際と研究, 13, 14-21, 1969.
- 5)朝日新聞:1992年7月7日付け.

- 6) 森 啓ら: トリカブトを用いた毒殺事例の臨床法医学的検討, 日法医誌, 44, 352-357, 1990.
- 7) Drasch, G., Kauert, G. v. and Meyer, L.: Rectal self-administering of aconite tuber (*Tuber Aconiti*, *Aconitum Napellus*). Bull. TIAFT, 20(2), 13-14, 1989.
- 8) 倉沢和成ら: 経時的に血中および尿中アコニチン系アルカロイドを測定し得たトリカブト中毒の1例. 中毒研究, 6, 185-188, 1993.
- 9) Agarwal, B. L. et al.: Malignant arrhythmias induced by accidental aconite poisoning. Indian Heart J., 29, 246-248, 1977.
- 10) 水柿道直ら: 日本法中毒学会第6回講演会, 1987年5月30日, 仙台.
- 11) 水柿道直ら: ガスクロマトグラフィ/セレクトッドイオンモニタリングによるアコニチン系アルカロイドの分析. 衛生化学, 34, 359-365, 1988.
- 12) Catterall, W. A.: Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 20, 15-43, 1980.
- 13) Catterall, W. A.: Structure and function of voltage-sensitive ion channels. Science, 242, 50-61, 1988.
- 14) Ohno, Y. et al.: The influence of tetrodotoxin on the toxic effects of aconitine in vivo. Tohoku J. Exp. Med., 167, 155-158, 1992.

Table 1. Time of death of mice treated orally with aconitine and different amounts of tetrodotoxin

Dose of aconitine (mg/kg)	Dose of tetrodotoxin (mg/kg)	Number of mice treated	Time of occurrence of death (min)							Number of mice that died
			1-5	-10	-20	-30	-45	-60	Mean \pm S.D.	
2	0	5	1	1					5.5 \pm 1.5	2
2	0.33	4			1	1			17.5 \pm 3.5**	2
2	0.67	5		1	2	1			18.3 \pm 7.3**	4
2	1.0	5		1	1	2	1		21.6 \pm 9.8**	5
3	0	5		3	1	1			13.0 \pm 7.3	5
3	0.33	5					2	1	30.7 \pm 10.3*	3
3	0.67	5		1	2	1	1		21.4 \pm 9.3	5
3	1.0	5		1	1	2		1	27.4 \pm 16.4	5

(** p<0.01; * p<0.05)

Table 2. Time of death of mice treated intraperitoneally with 0.4 mg/kg of aconitine and different amounts of tetrodotoxin

Dose of tetrodotoxin (μ g/kg)	Number of mice treated	Time of occurrence of death (min)							Number of mice that died
		1-5	-10	-20	-30	-60	60-	Mean \pm S.D.	
0	9	2	6	1				7.8 \pm 3.2	9
2.5	5		2					7.5 \pm 1.5	2*
5	5		2	1				9.7 \pm 2.9	3
10	9		2	2	1			15.0 \pm 5.2**	5*
15	5	1 [†]	1		1	1 [‡]		43.0 \pm 49.9	5
20	10	3 [†]	5(3 [†])	2				8.5 \pm 4.2	10
30	4	2 [†]	1 [†]	1 [†]				6.5 \pm 3.4	4
40	5	4 [†]	1 [†]					4.6 \pm 0.8**	5

(** p<0.01; * p<0.05)

[†] : Died at 140 min.

[‡] : The number determined to have died of tetrodotoxin poisoning.

パネルディスカッション「化学物質の安全管理と健康被害」
 「毒性試験における毒性評価の問題点―最大用量毒性を中心として―」

会場：千代田区立 有明（国立病院） 御膳前河川（前庭広場）
 司会：小川 功（自治医科大学） 前田知昭（前橋研究所）、中嶋新 昌（北野研究所）
 討論者：石川 博（自治医科大学） 野村 隆（国立病院） 藤田 謙（国立病院）
 中島 浩（自治医科大学） 中島 浩（自治医科大学） 中島 浩（自治医科大学）
 中島 浩（自治医科大学） 中島 浩（自治医科大学） 中島 浩（自治医科大学）

パネルディスカッション

7月30日（金）

千葉市民会館大ホール

化学物質の安全管理については、従来より安全性をより重視する
 ために無毒試験成績から客観的に決められるべきであるが、無
 毒試験の決定には、あらゆる反応が有害反応とみなしうるが母
 体の判断を必要とする。特に医薬品の場合は、あらゆる反応が
 薬効に関連する作用によるか毒性によるかの区別が困難な場合
 があり、薬物によっては薬効の発現順序と毒性の発現順序が異
 なる場合がある。このような問題があるため、毒性試験ガイド
 ラインでは、無作用量あるいは無毒性量大の投与を避けて、
 それ以下では有害影響ある場合は有害影響につながるという
 反応をみこさない最大量かという意味で無影響量（non-
 toxicologically influential dose）という用語が使われた。

したがって、無影響量は実際に無毒性量とはほとんど同義語で
 あるが、non-toxic doseと訳されて国際的に誤解されたため、
 ガイドラインの「無影響量」は「無毒性量」に置換されること
 になった。無毒性量の決定には、初期の反応を有害とみなす
 が否かの判断が重要となり、さらに個人や専門分野による見解
 の相違が生ずる。

パネルディスカッション

「毒性試験における毒性評価の問題点～最大無毒性量を中心に」

- 企画： 林 裕造(国立衛試)、柳田知司(前臨床研)
 司会： 柳田知司(前臨床研)、幸嶋祥亘(スミタイン・ビージャム)
 パネリスト：門田利人(リストライヤーズ・スクイ)、林 裕造(国立
 (発言順) 衛試)、小泉治子(前臨床研)、増田 裕(三共)、
 野口正義(エーザイ)

薬物(化学物質)の安全性および安全限界に関する指標として「(最大)無作用量あるいは「(最大)無毒性量」が用いられている。ここで無作用量とは、薬物による影響が全くみられなかった最大用量を指し、無毒性量とは、毒性学的影響がみられなかった最大用量を意味する。したがって、厳密にいうと無作用量(no-effect-dose)はno-observed-effect-level(NOEL)であり、無毒性量(no-toxic-effect-dose)はno-observed-adverse-effect-level(NOAEL)である。

食品添加物、農薬等については、従来、安全性をより重視するために無作用量が採用されていたが、最近は無毒性量も多く使われるようになった。医薬品については、安全係数の算出、類薬との比較、および臨床第1相試験での初回用量の設定などに無毒性量の方が指標として適切と考えられる。

無作用量は試験成績から客観的に決められる量であるが、無毒性量の決定には、みられた反応が有害反応とみなしうるか否かの判断を必要とする。特に医薬品の場合は、みられた反応が薬効に関連する作用によるか毒性によるかの区別が困難なことがあり、薬物によっては薬効の発現機序と毒性の発現機序が共通の場合がある。このような問題があるため、毒性試験ガイドラインでは、無作用量あるいは無毒性量という用語を避けて、「それ以下では有害影響あるいは有害影響につながると予想される反応をおこさない最大量」という意味で無影響量(no-toxicologically-influential-dose)という用語が使われた。したがって、無影響量は実際には無毒性量とほとんど同義語であるが、no-effect-doseと訳されて国際的に誤解されたため、ガイドラインの「無影響量」は「無毒性量」に置換えられることになった。無毒性量の決定には、問題の反応を有害とみなすか否かの判断が重要となり、ここに個人や専門分野による見解の相違が生ずる。

このような背景のもとに、昨年11月には大阪で「無毒性量について」というパネル討論会が日本製薬工業協会の基礎研究部会の主催で開かれ、判定基準として「薬物の生物作用に基づかない非特異的反応で、かつ、器質的変化や不可逆性変化を伴わない場合、および、薬理作用に基づく可逆性の反応である場合は、有害反応とはみなさない」という原則が具体例を基に検討された。今回は、その継続としてこの原則をさらに検討すると同時に、原則の例外例について考えてみたい。

企画は、林と柳田が佐藤会長や製薬協基礎研究部会ご関係者のご協力を得てすすめた。

討論の前半では、まず、幸嶋が先のパネル討論会のあらましを紹介する。次いで柳田が、討論の中で用語の解釈や使用に食違がないように「作用と効果」、「毒性と毒効果」、「無毒性量と無害(無毒)量」などについて本来の意味を英語と対比して考察する。次いで門田氏に上述の原則の説明をお願いする。討論では「非特異的反応で、かつ、器質的変化や不可逆性変化がない場合」が該当する具体例についても検討したいと考えている。また、薬物を大量反復投与した結果、胆汁排泄の鬱滞による臨床検査値の異常がみられるが他には形態的にも何の異常もみられない、などのケースがこの原則に該当するか否かなども討論したい。討論のあと、原則に関する林のコメントで前半の討論をしめくくる予定である。

後半は、この討論会の中心話題である原則の例外例について討論する。小泉氏と増田氏に「非特異的反応で、かつ、器質的変化や不可逆性変化がない場合」および「薬理作用に基づく可逆性の反応である場合」であっても有害反応とみなすべきと考えられる事例を挙げていただく。例えば、細菌感染に対する抵抗力が低下した結果二次的障害がみられる場合や、短期間の反復投与により薬理作用に基づく内分泌機能異常が原因で起る可逆性の形態的変化が、長期間反復投与では非可逆性の変化に移行する場合などの例が話題の中心になると考えられる。例外例の解釈では、いろいろな見解があると思われるので十分に討論したい。また、パネリストが触れなかった例外例と思われるケースをご存じの場合はご追加いただきたい。討論のしめくりとして野口氏にこのような例外例を分類整理していただく。

最後に、林が今回のパネルディスカッションに関する総括のコメントをして討論を終了とする予定である。是非ご参加の上活発なご討論をお願いしたい。

—MEMO—

— MEMO —

—MEMO—

イントロダクション及び開催趣旨
 慶応義塾大学大学院生命科学研究科

ヒトでは約200種に及ぶ異なる細胞をもつ多細胞化された動物があると推定され、その機能を知ることは重要である。一般的に細胞分化と増殖は対立する制御のもとにあり、分化促進剤を用いた細胞増殖を抑制する必要がある。我々は、

研究推進委員会ワークショップ

7月30日（金）

千葉市民会館大ホール

演題番号 W-1 ~ W-5

我々は、これら間質細胞群を用いて、人工骨髄とも言うべき試験管内での造血微環境の構築を試みるとともに、トランスゲニックマウスを用いて、多能性をもつ造血系細胞の不活化を試みている。

イントロダクション及び骨髄細胞
帯刀益夫（東北大学加齢医学研究所）

ヒトでは約200種に及ぶ異なる機能をもつ分化した細胞があると推定され、その機能を知ることは重要である。一般に細胞分化と増殖は対立する制御のもとにあり、分化機能を保持した細胞株を樹立することは困難である。我々は、癌遺伝子が細胞分化と増殖の決定に重要であることを示し、これをもとに、癌遺伝子を導入したトランスゲニックマウスを作出し、分化機能を保持した細胞株の樹立を試みた。温度感受性 (ts) Tアンチゲン遺伝子導入マウスより、肝細胞、腎尿細管細胞、骨髄間質細胞、血管内皮、血管平滑筋細胞、胃粘膜上皮細胞などの細胞株の樹立に成功した。これら細胞はいずれも、温度依存性の増殖能をもち、形態的にもまた機能的にも固有の分化形質をもつことが分かった。これら不死化した分化機能保持細胞株は、細胞分化、増殖、細胞死の制御の研究や、組織形成、臓器移植、実験動物代替法の研究、さらには毒性研究など広く利用できるものと期待される。

造血組織である骨髄は血液幹細胞、血液前駆細胞と、これら細胞の増殖と分化を支持する間質細胞から成り立っている。我々は、とくに骨髄間質細胞の役割を知る目的で、トランスゲニックマウスから約30クローンの間質細胞株の樹立を行ない、その造血支持機能を調べた。その結果、(1)骨髄間質細胞は、内皮細胞、繊維芽細胞、前脂肪細胞など多様な細胞種からなること (2) これら間質細胞は筋芽細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、内皮細胞、脂肪細胞などに分化する能力をもつ間葉系幹細胞の性状も備えていること (3) これら間質細胞は、顆粒球、マクロファージ、赤血球などの前駆細胞の分化増殖を細胞間相互作用により特異的に促進する性質をもつこと、さらに血液幹細胞の長期継代に促進作用を示すことが分かった。

我々は、これら間質細胞株を用いて、人工骨髄とも言うべき試験管内での造血微細環境の構築を目指すとともに、トランスゲニックマウスを用いて、多能性をもつ血液幹細胞の不死化も試みている。

トランスジェニックマウスの作製方法：温度感受性SV40
ラージT抗原遺伝子導入マウスの作製とその維持
鈴木操（熊本大学遺伝発生研）

臓器組織の形態・機能を *in vitro* で調べる方法として、組織培養法が極めて有力な手段となっている。しかし、細胞固有の分化形質を保持し、しかも、その発現を制御できる不死化細胞の株化は困難である。そこで、我々は、各種臓器に由来する機能を持続的に保持し、しかも、その増殖及び分化形質の発現が、培養温度を33°Cから39°Cにシフトすることによって、操作可能な不死化細胞株の樹立を目的として、温度感受性突然変異株SV40ラージT抗原遺伝子(tsSV40 large T-antigen gene)をマイクロマニピレーターによって、マウス受精卵の雄性前核に導入し、外来遺伝子導入マウス（トランスジェニックマウス）の作製を試みた。また、トランスジェニックマウスはすべての細胞の染色体上にトランスジーンを持っているので、同一のマウスから同時に、異なった組織より多くの不死化細胞株の樹立が可能と考えられる。生まれたマウス (Fo)、53匹の尻尾よりDNAを抽出し、southern blot解析の結果、4匹がトランスジェニックマウスであった。これら4匹はいずれも生後8週令までに大脳腫瘍が認められた。トランスジェニックマウスの系統維持のため、雄トランスジェニックマウス (No.19) とワイルドタイプ雌を用いて体外受精を行った。得られた、F1マウス、22匹のうち14匹 (雄6、雌8) がトランスジーンを正常に伝達していた。また、F1トランスジェニックマウスはFoと同様に、生後12

週令までに大脳腫瘍が認められた。現在、トランスジェニックマウスの維持は体外受精と受精卵の凍結保存によって行っている。これらトランスジェニックマウスを用いて、各組織からの不死化細胞株の樹立が試みられた。

tsSV40T遺伝子導入マウスからの肝細胞株の樹立とその性状

矢内信昭(東北大学加齢医学研究所、分子発生研究分野)

肝実質細胞は最も多様な機能を営む細胞のひとつである。それぞれの機能を実験的に解析していく際には、培養系の確立されていることが大きな助けとなる。多くの研究の蓄積により、肝細胞の初代培養系は確立しているが、継代により肝細胞としての機能は急激に減少するため、実験毎の初代培養が必要である。肝細胞の機能を保持した株細胞が得られれば、肝機能の解析、薬剤代謝の研究にとって非常に有用なものとなる。

細胞の株化には、初代培養がクライシスを乗り越えて不死化するステップが必要である。不死化遺伝子が同定されていない現在の段階では、クライシスを乗り越える作用のある遺伝子を導入することが次善の策として考えられる。この目的のため作成されたSV40ラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニックマウスから肝細胞株を樹立することができた。

樹立できた肝細胞株TLR2はアルブミンを産生し、形態的にも初代培養で観察されるものに近いものであった。また、再生肝や胎児肝でみられるアルファフェトプロテインの産生も見られた。薬剤に対する反応としては、メチルコラントレンによるP450IA1の誘導も観察され、肝癌由来の株細胞と比べると、極めて初代培養の肝細胞に近いものであった。

ここで用いたSV40ラージT抗原は、温度感受性の突然変異株由来のもので、許容温度(33°C)では機能するが、非許容温度(39°C)では機能しない。この性質はTLR2の性状にも反映し、33°Cでは良好な増殖を示したが、39°Cでは増殖を停止した。さらに39°Cでの培養を続けるとアポトーシスを引き起こすことが分かった。この増殖停止とアポトーシスは、T抗原との結合で知られているp53によるものと考えられた。

このように、温度感受性のSV40ラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニックマウスから、温度による増殖制御ができる肝細胞の機能を保持した細胞株を得ることができた。このような細胞株は、肝細胞の機能を解析するうえで、再現性のよい実験系を提供するものと考えられる。

“正常”不活化細胞と毒性研究

4) 腎臓

細山田 真、遠藤 仁 (杏林大 医薬理)

はじめに

腎臓は尿を生成する過程においてさまざまな化学物質に曝露されていて毒性学上ひとつの分野をなしている重要な臓器である。

こうした腎臓を研究する問題点としては、腎臓はネフロンと呼ばれる構造を単位としており、上流より大きく糸球体、近位尿細管、ヘンレ係蹄、遠位尿細管、集合尿細管と分かれていて、各部分は更に細かく分かれて機能、構造の異なる12種類ほどの分節に分かれている。そのため構造的に一様である肝臓などと異なり、器官を取り出したのちさらに各分節を分離してこなくてはその特徴ある機能を見ることは出来ない。

最近の動物実験に対する社会状況の変化により、あるいは毒性研究がますます細胞、分子レベルへと進んで行くのにもともない培養細胞を用いた研究が増えつつある。腎臓においても初代培養細胞や樹立株化細胞を用いて毒性研究が行なわれている。

しかし初代培養細胞の欠点は常に同じ形質を持つ細胞が得られるわけではなく、継代はできないのでクローンは得られないという点である。また株化細胞の欠点としてはその由来する分節がわからないという点であり、ブタの腎臓由来のLLC-PK1は近位尿細管の、イヌの腎臓由来のMDCKは遠位尿細管の機能を主に発現しているといわれるが、すべての機能が発現できているわけではなく他の分節の機能も認められ、ひとつの分節の機能を再現しているわけではない。さらに分節の中には株化細胞のないものもある。

こうした点を踏まえると由来した分節がはっきりした株化細胞が腎臓から得られれば腎毒性の研究にとって極めて有益であることがお分かり頂けると思う。

株化細胞の作成

トランスジェニックマウスは帯刀、鈴木両先生より提供された、2ヶ月齢前後のものを用いている。柳井先生の方法に準拠し培養

を行なった (Jpn.J.Cancer Res.82,1344,Dec.1991)。ペントバルビタール麻酔下にマウスを頸椎脱臼し無菌的に開腹した。腎臓は大動脈より1%コラゲナーゼ/ハンクス液にて灌流後、摘出してスライスを作成しコラゲナーゼ処理を30分間行ない。実体顕微鏡下で各ネフロン分節を単離し、全長10mm程度 (10^3 cell程度)を24ウェルの1穴においた。培養容器はコラーゲンコート、コラーゲンをういたが最終的にはすべてコラーゲンコートを用いた。培地はRITC-80培地に5% FBS、 $10 \mu\text{g/ml}$ transferrin、 $1 \mu\text{g/ml}$ insulin、 10ng/ml EGF、penicillin 100U/ml 、streptomycin $100 \mu\text{g/ml}$ を添加して用いた。培養は 33°C で95% Air-5% CO_2 下で行った。継代はトリプシン-EDTAを用いた。

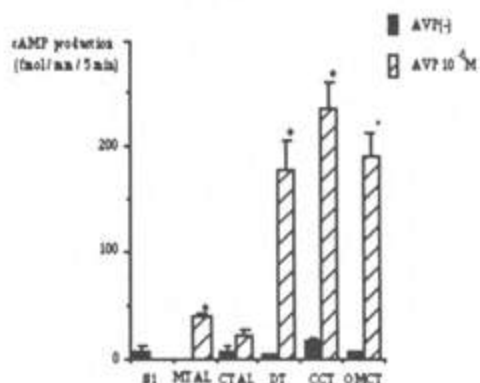
結果

糸球体、近位曲尿細管の起始部 (S1)、近位直尿細管の起始部 (S2) と終末部 (S3)、短いヘンレの下行脚と長いヘンレの下行脚、髓質部太いヘンレの上行脚、皮質部太いヘンレの上行脚、遠位尿細管、皮質部集合尿細管、髓質外層集合尿細管、髓質内層集合尿細管をそれぞれ単離し培養を行い、12種類すべてで細胞株が得られた。糸球体の一部、短いヘンレの下行脚のすべて、髓質内層集合尿細管の一部で紡錘形の細胞株が得られた他は、敷石上の上皮様形態をとる細胞株が得られた。増殖は温度感受性の増殖様式を示し、非許容温度である 39°C で増殖抑制を認めた。継代を重ねても上皮様の形態は保たれており、コンタクトインヒビションの性質は失われていない。

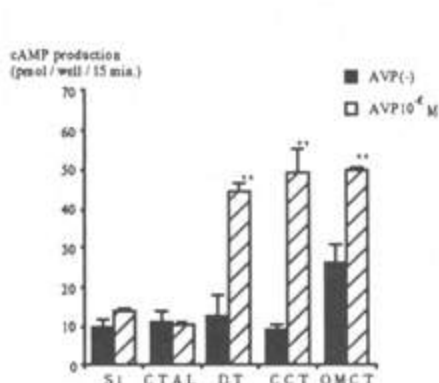
機能解析

Arginine-VasopressinによるcAMPの産生増加については、ヘンレの太い上行脚以外は新鮮ネフロンと同じ形質を示した。つまり近位尿細管で反応なく、遠位および集合尿細管でcAMPの産生亢進をみとめ、これらのセグメントについては形質が保たれている可能性が高くなった。

AVP-stimulated cAMP production in nephron segments

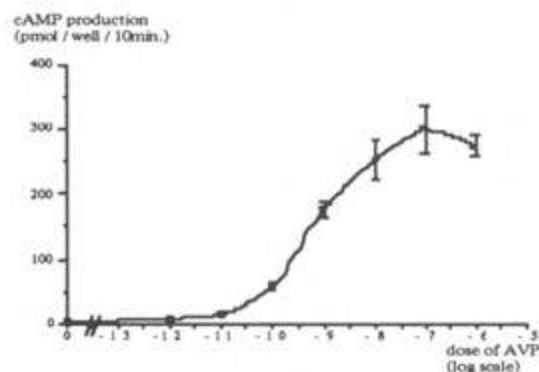


AVPstimulated - cAMP production in permeabilized cell



さらに皮質部集合尿細管より得られた細胞株ではコラーゲン膜上で培養すると、 10^{-9} MのAVPがcAMP産生におけるED50となり、新鮮ネフロンセグメントに近い反応性が認められた。

AVP dose - cAMP response curve in the CCT cell

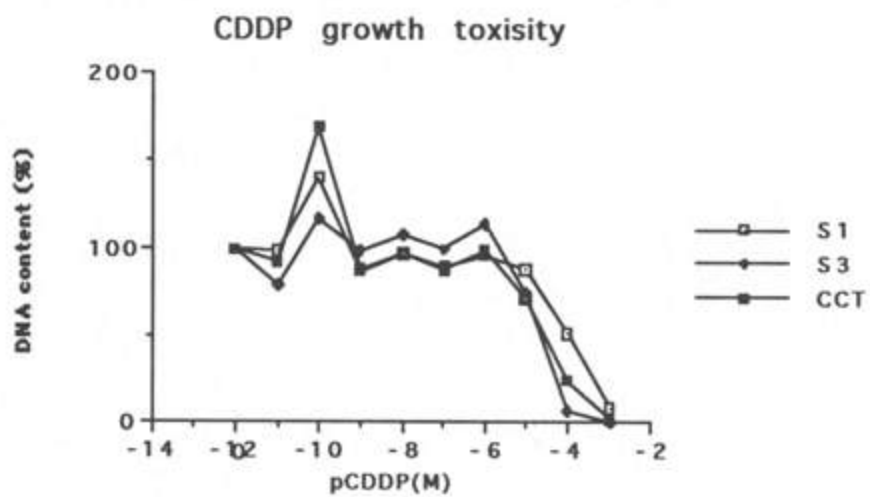


毒性研究

こうしてホルモン感受性において機能を保っている点から新鮮ネフロンセグメントの代替として毒性研究に用いることが期待される。

cis-Platinum(II)-Diammine Dichloride (CDDP) は腎毒性で有名な抗腫瘍剤だが、S3分節が強く障害されることが形態的にも生化学的にも示されている。培養細胞を用いると 10^{-4} MでS1、皮質部集合尿細管よりS3において強く障害されている傾向にあ

るようであり、さらなる実験を要すると思われる。



Oncogene導入トランスジェニックマウスからの胃表層粘液細胞株の樹立とその応用

○杉山則文¹、田渕圭章²、堀内 正¹、帯刀益夫³、
古澤 満¹

- 1 第一製薬(株)分子生物研究室
- 2 第一製薬(株)探索第3研究所
- 3 東北大学加齢医学研究所発生研究分野

温度感受性突然変異株(SV40tsA58)のSV40ラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニックマウスから、胃粘膜細胞の分離を行ない、胃表層粘液細胞(Gastric surface mucous cell)、2クローン(GSM06,GSM10)を樹立することに成功した。得られた細胞株は上皮様の形態を示し単層でconfluentに達すると増殖を停止する。また、細胞の増殖に関与するT抗原遺伝子の発現は共に認められ、うち1株(GSM06)の分裂は温度感受性であった。機能面では両細胞株共に、細胞中に貯留する粘液顆粒を放出した後、粘液が細胞表面を覆い、特にGSM10は更に培養を継続すると膜状に粘液層を形成する特徴を有し、正常な胃粘膜組織の形質とよく類似していた。

胃表層粘液細胞は消化、胃液に対する胃壁の保護に不可欠の存在であり、これらの細胞を培養系に移して胃粘膜機能を細胞レベルから解析することは有用だと思われる。

I 胃表層粘液細胞株の樹立

【方法】

トランスジェニックマウス(C57BL/6 Cr,8-12週齢)胃体部の反転胃を作成後、0.2%pronaseを含むHEPES緩衝液で消化し、単離胃粘膜細胞を得た(1)。細胞を2% FBS,10 ng/ml EGF及び1% ITES (2 mg/l insulin, 2 mg/l transferrin, 0.122 mg/l ethanalamine, 0.0094 mg/l

sodium selenite)を含む DME/F12培地で培養し(33℃)、コロニー形成法でクローニングした。粘液糖蛋白の検出には、PAS(Periodic acid-Schiff)及びconcanavalin Aパラドックス(Con A-HRP)染色法を用いた(2)。

【結果】

樹立した細胞株GSM06及びGSM10は confluent monolayerが形成されるまで増殖し、9ヶ月以上経過した現在も初期の形態及び機能を保持し増殖し続けている。これらの細胞株は、細胞表面に正常胃表層に見られる様なPAS陽性の粘液層を形成した。この粘液層はI型Con A-HRP法で染色されるが、III型Con A-HRP法(副細胞を特異的に認識する)では染色されなかった。したがって、得られた細胞株は、胃表層粘液細胞と同定された。

GSM06細胞株は、33℃及び37℃で増殖し、T抗原の発現を認めたが、39℃では消失し増殖は停止した。一方、GSM10細胞株は、33℃,37℃及び39℃の全ての温度で増殖し、全ての温度でT抗原の発現を認めた(Fig.1, Fig.2)。

II 応用—エタノールによる細胞傷害モデルの作成—

【方法】

1) 細胞傷害性実験

コラーゲン処理した96穴プレートに1 wellあたり 10^4 cellを2% FBS, 10 ng/ml EGF 及び1% ITESを含む Daigo's T培地(HEPES, Phenol Red 不含)を用いて33℃にて confluent に達するまで培養した。細胞を $10\mu\text{M}$ BCECF - AM [2,7-bis(carboxyethyl)

carboxyfluorescein tetra-acetoxymethyl ester)を含む Daigo's T緩衝液で37℃、40分間培養し、BCECF - AMを細胞内に取り込ませた。細胞を洗浄後、エタノール(7.5~17.5%)を添加し、15分後、上清(F_{super})または細胞中(F_{cell})に含まれるBCECF - AMを蛍光プレート

リーダーで測定した。細胞傷害性[cytotoxicity(%)]は以下の式で計算した(3,4)。

$$\text{cytotoxicity(\%)} = (F_{\text{super}} - F_{\text{spont}}) / (F_{\text{super}} + F_{\text{cell}} - F_{\text{spont}}) \times 100$$

2) 粘液量の測定

細胞の産生する粘液は alcian blue 量で表した(5, 6)。

【結果】

結果をFig.3に示す。GSM10細胞株は、培養日数に依存してエタノールに対する抵抗生が有意に上昇した。GSM06細胞株に於ても同様の結果が観察された。細胞の粘液産生量の増加に比例してエタノールによる細胞傷害が保護されることが明らかになった。

【結論】

胃粘膜細胞の単離、培養技術は未だ確立したものはなく、従来の初代培養や癌組織から樹立した株化細胞では粘液分泌機能等の発現や維持が困難であった。今回、トランスジェニックマウスから、限りなく正常に近い胃表層粘液細胞株を樹立することができた。今後は、胃体部を構成する他の様々な機能を保持した細胞(壁細胞、主細胞、副細胞、内分泌細胞等)を同様に樹立し、胃細胞分化や胃粘膜防御機構の解析等に有効な材料を提供したい。

- 1) Schepp, W. et al. Gastroenterology 97,1420 (1989)
- 2) Katsuyama, T. and Spicer, S. S. J. Histochem. Cytochem. 26, 233 (1987)
- 3) Kolber, M. A. et al. J. Immunol. Methods 108, 255 (1988)
- 4) Suzuki, M. et al. Am. J. Physiol. 263, G719 (1992)
- 5) Corne, S. J. et al. J. Physiol. 242, 116 (1974)
- 6) Kitagawa, H. et al. Arzneim. - Forsch. / Drug Res. 36, 1240 (1986)

Fig.1 Growth curve of cell line GSM06

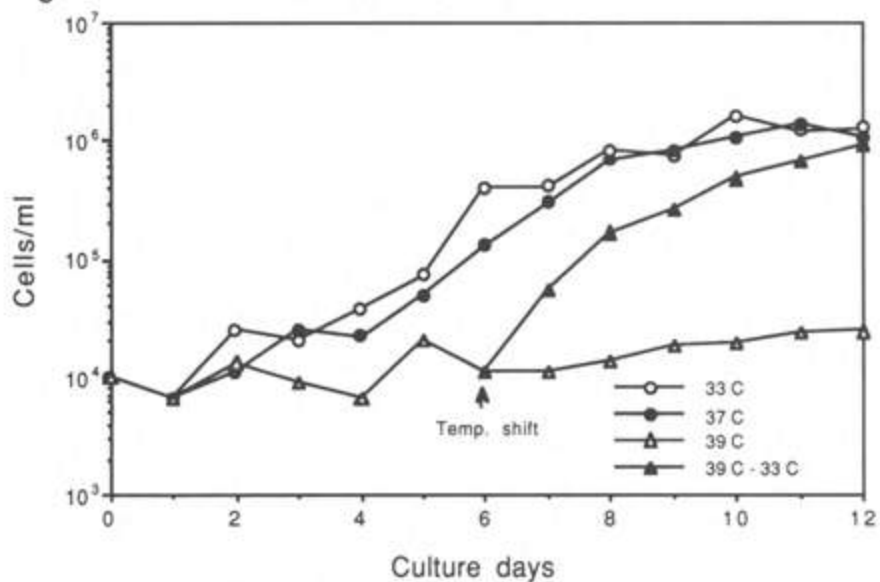


Fig.2 Growth curve of cell line GSM10

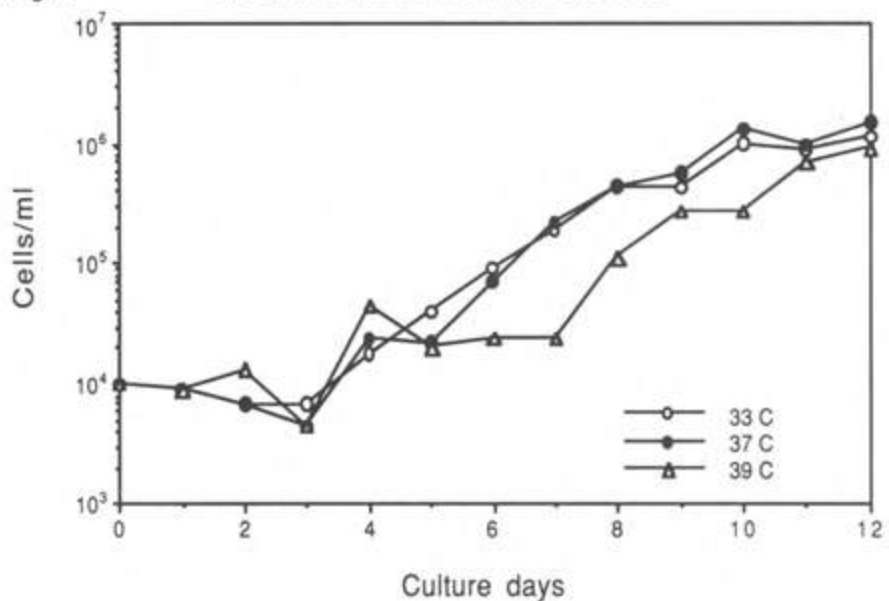
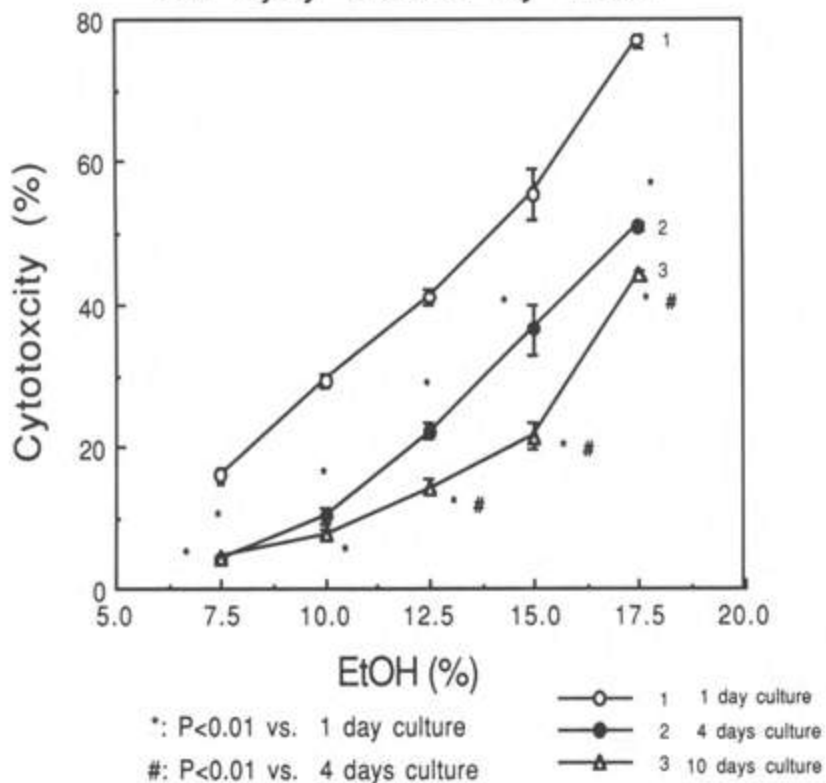


Fig.3 Effect of culture day on GSM10 cell injury induced by EtOH



中村 浩樹、高田 早苗、加藤 清洋、野村 謙、
 高山 隆
 千葉 元輝、林松 修志

第一環境科学会社 開発研究所 安全衛生研究センター
 〒105-8555 東京都港区 赤坂 5-1-1

一般演題(口演)

7月29日(木)

第1会場(千葉市民会館大ホール)

演題番号 O-101~O-116

尿沈渣の結晶鑑別法の検討

中村 美穂、高田 早苗、加藤 道幸、野村 護、
高山 敏
中島 光好*、植松 俊彦*

第一製薬株式会社 開発研究所 安全性研究センター
* 浜松医科大学 薬理学教室

外観が針状を呈する結晶は尿沈渣中数多く存在し、薬物結晶との鑑別は困難である。ニューキノロン系合成抗菌剤 (DU-6859a) の臨床第一相試験において尿沈渣中に結晶が認められ、その同定を針状結晶鑑別図 (今井、衛生検査、1982) を用いて検査した。また動物尿 (サル、イヌおよびラット) についても針状結晶鑑別図の導入を併せて検討した。

〔方法〕臨床第一相試験では、健常成人男子 (24~36才) 18名にDU-6859aを単回 (100mg、200mg) あるいは反復 (100mg 7日間) 経口投与した。投与後2、4および6 時間に採尿し、採尿直後および21時間放置後の各尿を1500rpm、5分間遠心して沈渣を作製後、針状結晶鑑別図に準じて光学顕微鏡により100倍で鏡検し、同定した。動物は、Crj:CD系雄ラット、雄ビーグルおよび雌カニクイザル各5匹を用い、自然排尿を採取し、採尿直後に1500rpm、10分間遠心して沈渣作製後、臨床第一相試験と同様に結晶を同定した。

〔結果〕臨床第一相試験で認められた結晶は尿酸結晶、シュウ酸カルシウム結晶等や健常者にも出現する棒状結晶であった。DU-6859aの再結晶尿を陽性対照として同定した結果、明らかに形態および溶解性が異なり、薬物結晶ではなかった。また、動物尿による鑑別図導入検討では、正常尿中に出現する結晶の他には、鑑別困難な結晶は見られなかった。

以上より、DU-6859a投与後の尿中に認められた結晶は非薬物結晶と結論され、結晶の確認に用いた針状結晶鑑別図は動物の尿沈渣においても応用が可能な方法と評価された。

遺伝子組換えヒト塩基性線維芽細胞増殖因子における
マウス皮膚腫瘍発生についての基礎的検討

¹杉本 肇, ¹中野 好子, ¹中村 俊之, ¹永田 隆光, ¹都筑 優紀
¹斉藤 勝弘, ²奥隅 淳一, ³青池 晟, ³川井 啓市, ⁴西野 輔翼

¹科研製薬(株) 安全性研究所
京都府立医科大学 ²第一外科, ³公衆衛生, ⁴生化学

【目的】増殖因子は創傷治療に促進効果が認められ、臨床での応用が期待されている。しかし上皮性腫瘍は上皮細胞増殖因子の投与によって促進することが報告されている。このような背景から塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)についても同様なことが考えられ、臨床応用に向けて詳細な研究が必要である。今回、bFGFについてマウス皮膚二段階発がん実験での腫瘍発生について検討した。

【方法】7週齢 ICR系マウスを用い、DMBA 100 μ gを背部皮膚に1回塗布することによりイニシエートした後、翌週よりTPA 4 μ gを週2回背部皮膚に20週間塗布した。bFGFはDMBA処置後、0.4および4.0 μ gを週2回背部に皮下投与を20週間行い、腫瘍の発生について検索した。

【結果】TPA処置群では、腫瘍発生が5週目より見られ、14週目には100%に達し、20週目において1匹当たり18.6個の腫瘍が認められた。一方、bFGFの0.4および4.0 μ g群では、腫瘍の発生を全く認めなかった。

【考察】プロモーターの作用発現マーカーであるリン脂質合成の増加およびODC活性の誘導は、TPAタイプのプロモーターでは認められるが、bFGFではそのマーカーに変化なく、TPAタイプのプロモーター活性はないものと考えられる。また、マウス皮膚二段階発がん実験結果においても全く腫瘍の発生を認めなかったことから、bFGFの発がんプロモーション活性はないことが示唆された。

ラット α 1-酸性糖蛋白およびインターロイキン8の肺障害モデルにおける推移

小田部耕二、鈴木雅実、有賀恭子、杉本哲朗
田村博志、山本静雄*

中外製薬(株)安全性研究所、*麻布大学環境保健学部

【目的】ラットにおいて α 1-酸性糖蛋白(α 1-AG)は急性相蛋白であり、インターロイキン8(IL-8)は炎症時の好中球走化因子である。今回、 α 1-AGおよびIL-8の炎症マーカーとしての臨床的意義について、肺障害モデルを用いて検討した。

【方法】6週齢のSD系雄ラットに生理食塩液、界面活性剤ポリオキシエチレン(9)ラウリルエーテル1%溶液(Laureth-9)およびプレオマイシン20mg/ml溶液(BLM)を単回経気管投与(100 μ l/head)し、投与前および投与後3, 6, 12, 24時間と2, 3, 5, 7日の各時期での血中 α 1-AGおよびIL-8濃度をEIA法(酶ハナフア-ムラネ'アトリス')にて測定した。また、肺について病理組織学的検索を行った。

【結果および考察】 α 1-AGはLaureth-9で投与後2日まで急速に上昇し、その後徐々に下降した。BLMでは投与後緩やかに上昇し、投与後3日をピークにそれ以降、緩やかに下降した。一方、IL-8はLaureth-9で投与後3時間に一過性の増加を示し、BLMでは投与後3時間より24時間まで軽度の上昇を示した。病理組織学的検査ではLaureth-9で気管支と周囲肺胞の炎症を主徴とする気管支肺炎が、BLMではびまん性肺胞障害に伴う間質性肺炎が認められた。

以上、血中 α 1-AGおよびIL-8濃度はいずれも肺障害により上昇し、IL-8は数時間後に、 α 1-AGは数日後にそれぞれピークを示した。また、これらの推移は肺障害の病態に応じて異なることが示唆された。よって α 1-AGおよびIL-8は肺障害の診断や経過観察に有用であると考えられた。

〇-104 テレメトリーシステムを用いた無麻酔、無拘束ビーグル犬における血圧、心拍数、心電図及び自発行動量の測定法の検討

〇乾 嘉孝 中下富雄 西田信之 佐藤秀蔵

武田薬品工業・医薬開発本部・薬剤安全性研究所

実験動物における血圧、心拍数などのパラメータは、拘束、麻酔などの実験操作によって著しく影響を受ける。このため、従来の拘束下あるいは麻酔下での測定では、薬物の作用が修飾され、その評価を困難にしていると思われる。一方、テレメトリーシステムを用いた方法では、無麻酔、無拘束下に循環系のパラメータを測定することができるため、薬物の作用は実験操作によって影響を受けにくいものと考えられる。今回、我々は上記のテレメトリーシステムを用いた方法の毒性評価への応用を検討する目的で、ビーグル犬の平均血圧、心拍数及び自発行動量ならびに $dP/dt \max$ 及び心電図を無麻酔、無拘束下に記録した。無処置動物の平均血圧、心拍数及び自発行動量を連続測定した結果、いずれのパラメータにも日内変動が認められた。また、同一個体においては、いずれのパラメータの平均値にも日間の差は認められず、長期間安定して記録できた。さらに、イソプロテレノール 0.01 mg/kg を皮下投与したところ、平均血圧の低下、心拍数及び $dP/dt \max$ の増加が認められ、同時に測定した心電図にも頻脈及びST-segmentの下降が認められた。以上の結果から、①テレメトリーシステムを用いて、無麻酔、無拘束下にビーグル犬から複数のパラメータを同時に、しかも長期間連続して測定することが可能であること、さらに、②薬物投与後のパラメータの変動について実験者が介在することなく測定可能であることが確認された。以上より、本システムの毒性評価における有用性が示唆された。

テレメトリーを用いたラット血圧・心拍数
における日内変動の解析

佐藤 恵一朗, 佐藤 秀蔵

武田薬品工業・薬安研

循環器系薬、特に降圧剤の毒性試験では、毒性発現が過度の薬理作用に起因することが多く、毒性発現用量における血行動態の把握が不可欠と考えられる。また、発現機序解明にあたっては可能な限り毒性試験での実験環境すなわち、無麻酔、無拘束、長期間等の条件を再現しうる実験系を用いることが望まれる。ラットの血圧測定法としては Tail-cuff法や Fluid-filled catheter法が一般的であるが、前者は拘束下での測定である事、後者は測定が短期間に限定される事が主な欠点であった。近年になりこれらの欠点を克服したテレメトリーによるラット血圧測定システムが開発され、それに関する実験報告がみられるようになったが^{1) 2)}、毒性試験に使用される正常血圧動物の詳細な背景データは報告されていない。

今回我々は雌雄Jcl:Wistarラットにおける背景データ取得を目的として血圧・心拍数の日内変動の解析を行った。腹大動脈における収縮期圧、拡張期圧、心拍数及びdP/dt max を2分間毎に記録し、連続する4日間のデータをもとに、日内最大値及び最小値並びにそれらの発現時刻、明・暗期における12時間平均値及び24時間平均値を求めた。さらに、コサイナー分析(最小自乗法余弦回帰)を用いて、mesor(中位)及びamplitude(振幅)を算出した。その結果、いずれのパラメータにおいても暗期を頂点とする夜行性動物特有の日内変動を示し、心拍数において最も明確であった。これらの成績に加え、拘束下での測定を行い、非拘束下測定の有用性を検討したので併せて報告する。

1) Brockway BP et al. (1991): Clin Exp Hyper, A13(5), 885-895
2) Lange J et al. (1991): Lab Ani, 20(7), 28-33

皮下埋め込み式生体医学研究器具，バスキュラアクセス
ポート(VAP)の基礎的検討(Toxicokineticsへの応用)

○五十嵐功，金原広幸，池田孝則，小林直美，古山佳子，
中村聡子，茨田享子，田内清憲

財団法人 動物繁殖研究所

ICHでは，投与された薬物のToxicokineticsが，重要視されており，また，ECのガイドラインでは，そのデータが要求されている。従来，イヌおよびウサギ等の中動物では，同一個体からの繰り返し採血が可能であることから，Toxicokineticsが行われる傾向にあった。しかし，ラットを用いた反復投与毒性試験は，循環血液量が10ml程度と少ないことから投与終了時に検査を行うことが多く，薬物動態を調べるのが，一般的ではなかった。そこで，ラットにおけるToxicokineticsを行うために，市販されている皮下埋め込み式生体医学研究器具であるバスキュラアクセスポート(VAP)を用いて検討した。

方法：SD系ラットの雌雄を4週齢で入手し，1週間の検疫順化期間後，VAPのカニューレを右頸静脈から右心房に挿入し，本体を頸背部皮下に埋め込んだ。対照動物は，同週齢の無処置動物を用いた。体重および摂餌量は，手術前，手術後1週間毎に測定した。採血は手術後1週間毎に，手術動物はVAPから，対照動物はエーテル麻酔下で，頸部を切開した後頸静脈から行った。手術後5週間目に向精神薬のフェノバルビタールナトリウム(PB)を体重100gあたり10mgの用量で経口投与し，投与後30分，1，2，3，4，5および6時間の血漿中濃度をHPLCを用いて測定した。

結果：体重，摂餌量，血液学および血液化学的検査成績は，手術動物と対照動物との間に統計学的有意差を認めなかった。PBは，各ステージ共に，0.3mlずつ採血した血液中に認められ，投与後4時間目がピークであった。

トリブチル錫による初代培養肝細胞のカルシウム反応の阻害

朝生裕樹*、畝山智香子、豊田和弘、松井元、百瀬和享*、川西徹、高橋道人

国立衛生試験所・病理、*昭和大学・薬学・薬理

カルシウムイオンは細胞内において各種ホルモン、神経伝達物質、あるいは成長因子等のセカンドメッセンジャーとして働いており、このカルシウムイオン情報伝達系の異常により、細胞障害、とりわけ機能的な障害が生じることが予想される。近年、化学物質による細胞死と細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) との関係については数多くの研究がなされているが、環境中の化学物質のカルシウムイオン情報伝達系への影響についての報告は少ない。そこで肝細胞を用いて、トリブチル錫の影響について検討した。

【方法】コラゲナーゼ灌流法によりラット肝細胞を単離し、コラーゲン塗布カバーガラス上で一晚培養した。 $[Ca^{2+}]_i$ は細胞内に Fura-2 または indo-1 をとり込ませ、蛍光顕微鏡像を画像解析することによって測定した。

【結果】細胞をトリブチル錫 400 μ M で処置すると、5分から10分後に $[Ca^{2+}]_i$ はゆっくりと上昇し、やがてプレビングが生じた。トリブチル錫の濃度を 4 μ M に下げるとこの上昇は全く観察されなくなるが、30分処置後 α -アドレナリン作動薬であるフェニレフリン 2.5 μ M を与えたところ、12.5% の細胞においてのみスパイク状の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の繰り返し反応 (カルシウムオッシレーション) が観察された。一方、無処置の細胞では同様のフェニレフリン刺激で70%以上の細胞においてカルシウムオッシレーションが観察された。これらの結果より、トリブチル錫は肝細胞の $[Ca^{2+}]_i$ を正常値に維持する調節系に影響する濃度より低濃度において、カルシウムイオン情報伝達系を阻害することが示唆された。

SHRおよびWKYラットの血圧に対する rhEPOの影響

芹沢 功, 天野 健次

キリンビール(株) 安全性研究所

[目的]ラットに高用量のrecombinant human erythropoietin(rhEPO)を投与した時の造血過程および投与中断後における多血状態からの回復過程における血圧の変化を調べ、それら過程における血圧に対するrhEPOの作用を検討した。

[方法]WKYおよびSHRラットの皮下に10日間、600IU/0.3ml/ratのrhEPOを反復投与し、血圧、血液検査(ヘマトクリット(HCT)値・血液粘度)および血中erythropoietin濃度の測定を行った。

[成績]rhEPO投与によりSHRならびにWKYラットともHCT値の上昇が認められたが、血液粘度の上昇はSHRラットのみで認められ、血圧上昇のピークはSHRならびにWKYラットともday14(rhEPO投与終了5日後)であった。SHRラットにおいては血圧上昇の立ち上がり早く、また投与終了後も血圧の上昇傾向が継続した。血清erythropoietin値はday10(rhEPO投与終了翌日)のみでSHRならびにWKYラットともに高値を示したが、血圧上昇がピークとなったday14の時点でrhEPO投与群は対照群より有意に低値を示した。

[結論]今回ラットでみられた血圧上昇はrhEPO投与開始直後には認められず、HCT値の上昇期のみ認められる変化であった。また、投与終了後、多血状態が継続していて血清erythropoietin値が正常値よりむしろ減少した場合においても血圧の上昇が認められることから、その際の血圧上昇の成因にはrhEPOあるいは内因性erythropoietinは関与していなかったと考えられる。

腹部求心性迷走神経活動測定による制癌剤誘起性
嘔吐の評価

○遠藤 泰、根本昌宏、南 勝、吉岡充弘*、
齋藤秀哉*

東日本学園大・薬・薬理、* 北大・医・第一薬理

(目的) 従来制癌剤の副作用である嘔吐のスクリーニングには嘔吐のモデル動物であるフェレットをはじめイヌ、サルなどの動物を使用した行動観察によって行われてきた。制癌剤による嘔吐は腸管から脱顆粒したセロトニン(5-HT)が、迷走神経末端の5-HT₂受容体を刺激し、その刺激が求心性線維を介して嘔吐中枢に至り嘔吐を発現すると考えられている。今回フェレットならびに嘔吐を惹起しないラットを用いて求心性迷走神経活動を電気生理学的に直接測定し制癌剤誘起性嘔吐さらには制吐薬のスクリーニングに有用か否か検討した。

(方法) フェレットおよびラットをウレタンおよび α -クロラロースで麻酔し人工呼吸を施した。動物を腹臥位に固定し胸腔背面部を開創して迷走神経後枝を剥離し、その神経中枢断端を白金イリジウム双極電極にのせ自発放電を測定した。得られたパルスを増幅してパルスカウンターにより積算し、リアルデータとともに記録した。催吐薬として制癌剤のシスプラチン、シクロホスファミドならびに硫酸銅を使用した。

(結果) 今回用いた催吐薬において、フェレットおよびラットの求心性迷走神経活動は増加した。フェレットによる嘔吐の行動観察の E_{max} に一致して硫酸銅では投与直後、シクロホスファミドでは投与後20分さらにシスプラチンでは約80分ほどで神経活動の増加が見られた。これらの結果より、迷走神経活動の増加は催吐薬投与による嘔吐のmode of actionと密接に関連していることが示された。

(結論) 嘔吐を惹起しないラットにおいてもフェレット同様腹部迷走神経活動が増加したことより嘔吐のスクリーニングにラットの腹部求心性迷走神経活動の測定が有用であることが示された。

○都富 友美、赤羽 浩一、松林 久一、関口 正保、長田 恭明

第一製薬(株) 探索第一研究所

【目的】キノロン系抗菌剤は、非ステロイド性消炎鎮痛剤フェンブフェンとの併用によりまれに痙攣を誘発することが知られている。我々は、マウスにおける痙攣誘発作用が抑制性の神経伝達物質であるγ-アミノ酪酸(GABA)の受容体結合阻害と高い相関性を示すこと、その受容体阻害作用にキノロン剤のGABA様構造が関与していることをこれまでに明らかにした。今回は、キノロン剤の併用痙攣作用を発現するためにはGABA受容体結合をどの程度抑制することが必要であるかを調べるため、シプロフロキサシン(CPFX)およびオフロキサシン(OFLX)を用いて痙攣誘発能、GABA受容体結合阻害能および両薬剤の脳内濃度の関係を検討した。

【方法】痙攣誘発能：一晩絶食した雄のddY系マウスにフェンブフェンの活性代謝物であるBPA 50 mg/kgを経口投与し、30分後にCPFX 5～100 mg/kgおよびOFLX 100 mg/kgを静脈内投与した。以後、痙攣および死亡の発現時間と発現率を計測した。GABA受容体結合阻害能：ラット脳粗シナプス膜0.5 mg、³H-muscimol 10nM、CPFX、OFLX 10⁻⁷ M～10⁻⁴ MおよびBPA 10⁻⁶ M～10⁻⁴ Mを4℃で30分反応させる過法により特異的結合量を測定した。脳内濃度：雄のddY系マウスにCPFXまたはOFLXの20～100 mg/kgを単回静脈内投与し、30分後に採血して全脳を摘出した。血清中濃度はペーパーディスク法、脳内濃度は蛍光HPLC法により薬剤濃度を定量した。

【結果】痙攣誘発能：BPA 50 mg/kgとの併用において、CPFXは40 mg/kg以上の用量で痙攣を発現したが、OFLXは100 mg/kgにおいても痙攣を発現しなかった。GABA受容体結合阻害能：BPAの10⁻⁶ MおよびCPFXの10⁻⁷ M以上の併用、またBPAの10⁻⁴ MおよびOFLXの10⁻⁵ M以上の併用において、それぞれ用量依存的にGABA受容体結合阻害が生じた。

脳内濃度：CPFXおよびOFLXの脳内濃度は投与量に依存して直線的に増加し、OFLXの濃度はCPFXの約5倍に上昇した。併用痙攣を発現するCPFXの40 mg/kgを投与すると、脳内濃度は0.4 μg/g (= 1.1 × 10⁻⁶ M)に達した。このCPFXの痙攣閾値濃度およびBPAを50 mg/kg投与したときの脳内濃度を共存させたときの³H-muscimolの結合阻害量は、約40%と算出された。

【まとめ】BPA 50 mg/kg併用におけるCPFXの痙攣発現閾値は、0.4 μg/gの脳内濃度であった。また、³H-muscimolのGABA受容体結合を約40%抑制すると痙攣が誘発されることをCPFXを用いて明らかにした。さらに、可能な脳内濃度範囲においてはOFLXは併用痙攣を誘発しないことが示唆された。

発癌性 Arylhydroxamic Acid を活性化する 肝ミクロソーム画分の *N,O*-Acetyltransferase

○曾根知道, 磯部正和, 高島英伍, Ching Y. Wang*

摂南大・薬・毒性学, *Michigan Cancer Foundation

【目的】 演者らは, 発癌性 arylhydroxamic acids を活性本態に代謝する *N,O*-acetyltransferase をイヌおよびラットの肝ミクロソーム (Ms) 画分から精製し, それらの性状がウサギ肝 carboxylesterase form 1 に類似していることを報告した. さらに今回, Ms 画分に高い *N,O*-acetyltransferase 活性を持つハムスター (Syrian golden) から両酵素活性を指標に精製を行ない, それらの性状について比較検討した. また, 一次構造を比較するために cDNA クローニングを試みた.

【結果・考察】 1. 主要な carboxylesterase, CE-I (pI 5.9, MW 180kD, subunit 58 kD) と, 2種類の *N,O*-acetyltransferase, AT-I (pI 5.9, MW 61 kD) と AT-II (pI 5.4, MW 60 kD), を精製, 単離した. 2. AT-I と AT-II は *N,O*-acetyltransferase 活性の他に CE-I と同様に 4-nitro-phenyl acetate 水解活性も示した. 3. AT-I と AT-II の両活性は paraoxon で強く阻害された. 4. 抗AT-II 抗体は, AT-I と免疫交叉性を示したが, 抗CE-I 抗体は AT-I と AT-II に免疫交叉性を示さなかった. 5. AT-I と AT-II の N-末端アミノ酸配列は, 唯一ウサギ肝から精製されている carboxylesterase form 2 の配列と, また, CE-I は form 1 と高い相同性を示した. 6. さらに, 抗AT-II 抗体を用いてハムスター肝 cDNA ライブラリーからウサギ form 2 に高い相同性をもつタンパク質をコードしている cDNA を単離した.

以上の結果から, ハムスター肝 Ms 画分には, ウサギ form 1 に類似した CE-I の他に, ウサギ form 2 に類似した複数の carboxylesterase が存在しており, これらの酵素が発癌性 arylhydroxamic acid の代謝活性化に関与していることが判明した.

0-112 分子軌道理論による薬物代謝研究
—薬物の酸化的代謝部位の予測—

○小栗一太、山田英之

九州大学 薬学部 衛生化学裁判化学

【目的】最近、演者らは計算化学による理論的な薬物の酸化的代謝部位予測の可能性について検討を行なっている。薬物の部位選択的酸化は、P450の基質ポケットにおける基質の配向性によって第一義的に決定されるものと考えられるが、基質分子自身の電子状態によっても支配されると思われる。P450による酸化反応は、活性酸素種が求電子的センターとして基質に作用する反応であると考えられていることから、分子軌道理論による最高被占軌道（HOMO）の電子の密度分布の高い軌道に反応は起こるものと予測し、すでに演者らは、薬物の代謝部位はHOMO電子の広がりが多い部位と対応することを明らかにした。本研究では、さらに求電子反応によって生成する可能性のある基質ラジカルの安定性が代謝物生成の容易さを支配する可能性について検討した。

【方法】MOPACの汎用パッケージ中の半経験的ハミルトニアンPM3を用いて、代謝部位が判明している薬物とそのラジカルの生成熱を計算した。

【結果と考察】基質分子のHOMOもしくはそれに準ずる軌道のうち、ラジカルを生成させるに要するエネルギーの低い部位が、酸化反応の反応性が高いものと考えられた。すなわち、分子軌道理論では、P450による酸素添加反応は、基質分子の固有値エネルギーレベルの高い被占軌道の電子の広がりがあり、安定なラジカルを生成する部位に起こりやすいものと推定される。P450による酸化反応機構においては、オキシソフェリルカチオンラジカル ($\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{=O})\text{-Por}^+$) が活性酸素種の有効な候補として挙げられている。本研究結果は、そのようなラジカル活性酸素種による反応機構の存在を支持している。

高カタラーゼ活性 HeLa 細胞及びアミノトリアゾールを用いた細胞内過酸化水素生成の検出：パラコートと亜セレン酸による H_2O_2 生成

○瀬子 義幸、北原 淳、井村 伸正

北里大学薬学部公衆衛生学教室

【目的】過酸化水素の存在下で特異的にカタラーゼ (CL) を不活性化するアミノトリアゾール (AT) と、遺伝子工学的に作製した高CL活性を有するHeLa細胞を用いて、細胞内で活性酸素を産生する可能性が指摘されているパラコート (PQ) と亜セレン酸について細胞内過酸化水素(H_2O_2)生成の検出を試みた。また、遺伝子工学的手法を用いてCL活性と共にSOD活性も高い細胞も作製し、SOD活性の増加がPQによる過酸化水素産生を増加させるか否かについても検討した。

【材料と方法】細胞：①HeLa 細胞にマウスCLのcDNAを導入して得られた高CL活性を有する HeLa 細胞。② ①の細胞に更にマウスSODのcDNAを導入し、カタラーゼ活性と共にSOD活性の上昇した (対照細胞の約2倍) HeLa 細胞。培養方法：細胞をトリプシンで処理して単細胞浮遊液を調製し、 $1 \times 10^6/ml$ の濃度でロータリーインキュベータを用いて回転培養した。気相中の CO_2 濃度は5%、酸素濃度は95%とした。【結果と考察】PQならびに亜セレン酸はいずれもATを添加しない場合にはCL活性を低下させなかったが、ATの存在下 (10 mM) ではいずれの化合物もその添加濃度依存的にCL活性を低下させた。この時、細胞外の乳酸脱水素酵素の顕著な増加は認められなかったことから、このCL活性の低下はCLの細胞外への漏出によるものではなく、細胞内でのPQあるいは亜セレン酸による H_2O_2 生成を示唆している。SOD活性の増加した細胞でのPQによるCL活性低下の程度は、通常のSOD活性を有する細胞と同定度で、SOD活性の増加がPQによる H_2O_2 生成を増加させるとの結果は得られなかった。

0-114 抗癌剤アドリアマイシンの細胞毒性機序に関する研究
—アドリアマイシンを細胞質から核DNAに移行するための
carrierの存在—

清宮健一、田 光勲、松尾三郎、暮部 勝

大阪府立大学・農・獣医・毒性

抗癌剤アドリアマイシン (ADM) の細胞毒性機序の一つとして、ADMのDNA塩基へのintercalationが考えられるが、演者等は、殺癌細胞作用を伴わない細胞静止作用のみを惹起する低濃度 ($0.1 \mu\text{M}$) のADMが、核酸合成阻害、DNAのfragmentationおよび核クロマチンの形態変化等を特異的に発現することを観察した。癌細胞では正常細胞よりもそれら作用が強く発現し、また、ADMの核への移行がより高く認められた。従って、今回は、ADMの核への移行機序を明らかにするために、carrier存在の有無について検討した。低濃度ADMをマウスリンパ性白血病細胞L1210に添加すると、ADMが速やかに核内に高濃度に分布し、殆ど細胞質には局在しなかった。同細胞のcytosolから $[^{14}\text{C}]$ -ADMと結合する画分が得られた。この画分は、ヒドロキシアパタイトに吸着し、高濃度KClで溶出された。この画分をSephacryl S-300によりゲル濾過を行ったところ、高分子画分 (Peak I) と低分子画分 (Peak II) に分離された。Peak Iは、DNA celluloseへの結合能が高く、Peak IIは低かった。これら画分の結合は、KClによってPeak IよりPeak IIで、より強く影響を受けた。 $[^{14}\text{C}]$ -ADMに対する結合は、200倍モル量の未標識ADMの添加によって抑制された。以上の結果から、細胞内に取り込まれたADMは、cytosol中のcarrierと結合し、その複合体が核へ移行し、核DNAと結合することが示唆される。上記画分が核DNAへの移行carrierであることを実証するための実験を更に追加検討中である。

トキシコキネティクスにおける用量-血中濃度相関の
non-linearity の計量的評価方法について

エーザイ（株） 研開情報部

五十嵐俊二

医薬品の毒性試験法の質的向上を目指し、毒性試験の中で試験化合物の血漿中濃度を測定して試験動物が曝される Systemic Exposure を把握する、いわゆるトキシコキネティクスの実施が一般化しつつある。毒性試験における試験用量が広範に渡るので用量-血漿中濃度の相関は linear (L) ではなく、用量を増やしても相関した血漿中濃度の上昇の得られない場合 (A) や、逆に、用量増加以上に著しく血漿中濃度が上昇する場合 (B) が少なくない。個々の毒性試験において用量-濃度相関を把握することは、毒性所見の用量相関の考察において、また、後続の毒性試験のデザインにおいて極めて有用である。

A 型の non-linear は、例えば、腸管吸収に制約がある場合や酵素誘導が著しい場合に生じ、B 型は代謝や排泄が容易に飽和状態となる場合などに起こる。用量を x とすると、L や A、B 型における血漿中濃度 y は、例示として、次式で示される (X 、 Y は各々の対数変換値)。

$$\begin{array}{lll} \text{L 型:} & y = x & \text{従って、} \quad Y = 1.0 X \\ \text{A 型:} & y = x^{0.5} & \text{従って、} \quad Y = 0.5 X \\ \text{B 型:} & y = x^2 & \text{従って、} \quad Y = 2.0 X \end{array}$$

即ち、用量と濃度の両方を対数変換すると、A 型も B 型も直線回帰し、その non-linearity の程度は X の係数がどれだけ 1.0 よりも小さいか、あるいは大きいかによって表示できる。39 化合物に関するトキシコキネティクス 70 余試験の解析結果を紹介し、A、B 型各々の反復投与による血漿中濃度の特徴的变化について述べる。

ヒト肝薬物酸化能評価法 —カフェインとトリメタジオン
を指標薬として—

田中栄之介、石川詔雄¹、山本祐二¹、深尾 立¹、
三澤章吾

筑波大・社会医学系、臨床医学系¹

- 【目的】** カフェイン (CA) はヒトの CYP1A2 で主に代謝される事はすでに報告されている。また、我々は肝薬物酸化能を評価する方法として独自に開発した負荷試験の指標薬としてのトリメタジオン (TMO) はヒトで CYP2C および 3A で主に代謝されるが CYP1A2 では代謝されない事をすでに報告した。そこで、今回我々は肝硬変患者を対象にこの2つの代謝様式の異なる指標薬を同時に投与した場合、肝薬物酸化能がどの様に評価出来るか簡便法 (1回採血法) を用いて検討した。
- 【方法】** 同意を得た患者 (胆石症群 13例、肝硬変群 18例) を対象とした。CA は 2 mg/kg, TMO は 4 mg/kg を早朝同時に経口投与した。採血は経時的に行い、血中の CA および TMO とその代謝物 (CA: テオプロミン (TB), パラキサンチン (PX), テオフィリン (TP); TMO: ジメタジオン (DMO)) はそれぞれ HPLC/UV と GC/FTD で測定した。
- 【結果】** 肝硬変群においては、CA および TMO の代謝は対照群 (胆石症) に比較して有意に阻害された。また、それぞれの代謝物も生成が抑制された。同様に CA および TMO 投与後の 4 時間値の PX/CA 比と DMO/TMO 比も有意に肝硬変群で減少した。さらに喫煙群と非喫煙群に分類した時、対照群と同様に肝硬変群においても両者間で CA の代謝に有意の差が認められたが、TMO の代謝には差は認められなかった。
- 【結論】** CA と TMO の代謝にはそれぞれ異なる P450 サブファミリーが関与しており、両指標薬を同時投与することにより異なる肝薬物酸化能を評価する事ができる可能性が示唆された。

近年に発表された野々村ヒコ及びモリオキシキオード
(MFO)によるパーキンソン病の発症機序の代換

○講演 野々村ヒコ^{*}、モリオキシキオード^{*}、伊東 直、
藤岡 哲也

北大・薬、代換分析、型立明細薬理学・薬理学、薬学

一般演題(口演)

7月29日(木)

第2会場(ロイヤルプラザホテル 平安の間)

演題番号 O-201~O-215

酵母に発現させた肝フラビン含有モノオキシゲナーゼ (FMO) によるパーキンソン病様症状誘発物質の代謝

○伊藤 邦郎、千葉 寛*、木村 晃之**、伊東 進、
鎌滝 哲也
北大・薬・代謝分析、国立病院医療センター*、サ
ンド薬品**

フラビン含有モノオキシゲナーゼ (FMO) は NADPH 依存的に薬物を含む多くの生体外異物の酸化的代謝に関与する酵素であり、特に含窒素、含硫黄、含リン化合物を基質とすることが知られている。この酵素には、複数の分子種が存在しており、肝臓、肺、腎臓だけではなく脳にも本酵素が存在することを我々は明らかにしている。

パーキンソン病様症状を示す物質として 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) や、その類似体でありヒト脳内や食品中に存在している 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (TIQ) とその誘導体が注目されている。これらの物質を摂取後、生体内でどのように代謝 (解毒化) されるかを知るために我々は MPTP の代謝酵素であると推定されている FMO に着目した。

ラットおよびマウス肝 cDNA ライブラリーより FMO cDNA クローンを単離した。さらに FMO cDNA を酵母へ導入し酵母を用いた発現系の構築を行い、FMO としての機能を有する蛋白の発現に成功した。この FMO 発現酵母ミクロゾームを用い、MPTP, TIQ, N-methyl-TIQ や Benzyl-TIQ を FMO が代謝するか否かについて詳細に検討し有意な活性を認めた。

カンナビノイド活性代謝物のGABA_Aレセプター
に及ぼす影響

○木村敏行、渡辺和人、山本郁男、吉村英敏*

北陸大・薬、*中村学園大

【目的】大麻には幻覚、カタレプシー惹起、鎮痛、鎮静、鎮吐、眼圧低下作用などがあり、その作用本体はTetrahydrocannabinol (THC)によることが知られている。しかしながら、薬理作用発現にはTHCのみならず、活性代謝物の寄与があることが演者らによって明らかにされている。カンナビノイドの作用部位は中枢神経系にある生体膜と考えられており、近年その受容体の存在が明らかにされているが、カンナビノイドは中枢系に広範に作用することから、演者らは先にベンゾジアゼピンレセプターに及ぼす影響について検討、活性代謝物である11-OH体がベンゾジアゼピンレセプター結合を減少させることを報告した。本報告では活性代謝物11-OH- Δ^8 -THC, 11-Oxo体及び11-oic acid体のGABA_Aレセプターに対する影響についてin vitroで検討、母化合物 Δ^8 -THCとの比較から大麻の中枢作用発現メカニズムについて考察した。

【方法】常法に従い調製した牛大脳皮質シナプス膜 0.2 mg protein, [³H]muscimol 1 or 30 nM, 各カンナビノイド10 μ Mを50 mM トリス-クエン酸緩衝液中で4°C30分間反応させ、ろ過法によりタンパクとの結合量を測定した。非特異的結合はGABA 1 mMを添加して同様に測定した。【結果・考察】各カンナビノイドは[³H]muscimol 1 nMにおける特異的[³H]muscimol結合量を有意に変化させなかった。しかし、[³H]muscimol 30 nMにおける特異的結合量は11-OH体及び11-Oxo体添加時にコントロールに比べ有意に増加させ、大麻の薬理毒性発現における活性代謝物のGABA系への関与が示唆された。GABA_Aレセプターはベンゾジアゼピンレセプターと共役していることから、両レセプターにおいて関連性があるのかについても併せて考察する。

LECラットにおける肝癌発症前後の異物代謝能の
変動とその要因山本秀樹、白水彩、升田真木彦、数坂昭夫、笠井憲雪¹、藤田正一北大・獣医・毒性、¹北大・医・動物実験施設

LECラットは生後4ヶ月齢で重篤な黄疸を伴う急性肝炎を自然発症し、その後、慢性肝炎、肝癌という一連の肝疾患の発展をみせるヒト肝疾患の実験モデル動物として注目されているラットである。今回、我々は両性の肝炎発症前の9週齢、急性肝炎発症直後の4ヶ月齢、更に11ヶ月齢の胆管繊維症よりなる白色腫瘍とその周囲組織の異物代謝酵素の変動とその要因について調べたので報告する。

急性肝炎発症直後には、発症前に雄優位の活性をみせる Imipramine N-demethylase(ID), Aminopyrine N-demethylase(AD)活性が雄で顕著に減少し性差が消失した。また、性差の顕著でない Bunitrolol 4-hydroxylase(BH)活性にも減少が見られた。ID, AD活性の触媒寄与が大きいP450分子種であるP450 2C11、BH活性に触媒寄与が大きいP450 BTL、それぞれに対する抗体を用いたウエスタンブロット法においてもそれらの蛋白の減少が認められた。しかし、肝炎発症により雌ラットの方が雄ラットより活性の高いsteroid 5 α reductase活性は雄ラットで上昇せず、異物代謝酵素活性の性差の消失は老化に見られる機能的雌性化とは異なることが明かとなった。P450蛋白の減少の要因を明かにするためにcyp2D1遺伝子の発現をノーザンブロット法で調べたところ、肝炎発症により、そのmRNAへの転写が顕著に減少していた。

白色腫瘍においては、ID, AD, BH活性は認められたもののAniline 4-hydroxylase(AH)活性は認められなかった。周囲組織においては、雌でどの活性においても発症前と同程度の活性を示した。雄では、AH, BH活性は9週齢と同程度の活性を示すものの、ID, AD活性は9週齢の1/2程度の活性であった。

以上の結果より肝炎発症直後、及び白色腫瘍とその周囲組織では発現しているP450分子種が異なり、発症前に比べP450分子種の組成比が大きく変化していることが明かとなった。また、この変動はP450遺伝子の転写レベルでの抑制によることが明かとなった。

β -Naphthoflavone 処置による肝小葉内チトクローム
P-450アイソザイムの誘導部位

○五十嵐功, 真鍋淳, 大橋芳彦, 高岡雅哉,
矢本敦, 寺西宗広, 松沼尚史

三共欄・安全性研究所

〔目的〕チトクローム P-450(P-450)の各種誘導剤をラットに投与すると, P-450アイソザイムが肝小葉中心部で誘導されることが多い。しかし, β -naphthoflavone(BNF)を処置した場合にのみ, P-450IA1が小葉辺縁部で誘導された(第19回日本毒科学会)。この結果は, BNFの10 mg/kgを3日間連続腹腔内投与した際に観察されたものである。そこで, 投与量を変えることで誘導部位がどのように変化するのかを検索した。

〔方法〕ラットにBNFの1 mg/kg, 10 mg/kg, および30 mg/kgを3日間連続腹腔内投与した。肝臓中のP-450量, methoxycoumarin O-demethylase(MCOD), ethoxycoumarin O-deethylase(ECOD), propoxycoumarin O-depropylase(PCOD)活性を生化学的に測定した。また, P-450アイソザイム(IA1, IIB1, IIE1, IIIA)に対する抗体を用いそれぞれの肝小葉内誘導部位を免疫組織化学的に検索した。

〔結果および考察〕P-450量の増加, ECOD, PCOD活性の上昇が投与量に依存して認められた。P-450IA1の肝小葉内誘導部位は投与量の増加とともに小葉辺縁部から小葉中心部に広がり, 30 mg/kg投与群では小葉全域に及んだ。P-450IIIAの誘導部位はP-450IA1の結果と対照的で, 投与量に依存して小葉中心部から小葉辺縁部へと拡大した。P-450IIB1, P-450IIE1は誘導されなかった。BNF処置によりP-450IA1とP-450IIIAがそれぞれ肝小葉辺縁部と中心部で誘導されたことは, 両部位の肝細胞の誘導剤に対する反応性に差があることを示唆するものかも知れない。

デヒドロエピアンドロステロン(DHEA)による肝(前)癌病変でのペルオキシゾーム β 酸化系酵素の変化田村 浩, 林 文彦, 高城 奈津子, 山田 純司, 渡辺 隆史,
須賀 哲弥

東京薬大

【目的】 前回、我々は新規ペルオキシゾーム増殖薬であるデヒドロエピアンドロステロン(DHEA)が発肝癌性を持つことを報告した。近年、ペルオキシゾーム増殖薬によって誘発される肝(前)癌病変ではペルオキシゾーム β 酸化系酵素が著しく減少することが報告されている。今回、我々はDHEAによって誘発される肝癌が他のペルオキシゾーム増殖薬によって誘発される肝(前)癌病変と同様な特徴を持っているかどうかを検討した。

【方法】 F-344雄性ラットを用いてDHEA(0.5, 1%)を52週間まで混餌自由摂食させ、その肝臓を用いてペルオキシゾーム β -酸化活性を測定し、また抗ラットペルオキシゾーム二頭酵素(PBE)抗体、抗ラットアシル-CoA酸化酵素(AOX)抗体をもちいて免疫組織学的な観察を行った。

【結果・考察】 DHEAを投与したときのペルオキシゾーム β 酸化活性は投与10週間で0.5, 1%それぞれ4倍, 8倍に上昇しており、その活性上昇は52週間投与した場合でも維持されていた。免疫組織学的観察から、DHEA投与により抗PBE, 抗AOX抗体に対する染色性の著しい上昇が認められた。また、DHEAで誘発される肝癌組織は非癌部に比べて両抗体による染色性が著しく低下していた。さらにこれらの変化はWy-14,643によって誘発される肝癌の場合と同様であった。このことからDHEAによって誘発される肝癌は典型的なペルオキシゾーム増殖薬で誘発され肝癌と同様な特性を持っていると考えられる。

ラット肝臓の虚血—再循環障害により惹起された血漿中脂質hydroperoxide 体の分子種について

高山房子、江頭 亨、山中康光

大分医科大学薬理学教室

酸素ストレスによりフリーラジカルが産生され、これが細胞膜脂質を攻撃し、惹起される脂質過酸化が細胞障害を引き起こす事が知られている。我々は、以前よりラット肝臓の虚血—再循環モデルを用いて肝および血漿中に細胞膜構成脂質の過酸化第一次生成物である phosphatidyl hydroperoxide(PCOOH) を見だし、この含量が肝障害の程度を反映する事を報告している。しかし、酸素ストレスで産生され、またその後の障害を増大すると考えられる脂質hydroperoxide体の存在や種類に関しては諸説があり疑問が多い。そこで、今回、ラット肝臓の虚血—再循環障害モデルで発生する血漿中の脂質hydroperoxide 体の同定を試みた。

【方法】ウイスター系雄ラット(7週齢)に肝虚血—再循環処置を行い血漿を得た。血漿中の脂質hydroperoxide 体は化学発光検出—高速液体chromatography(CL-HPLC)で定量した。

【結果】CL-HPLCで血漿中のPCOOHを検出したところ、肝臓中のそれとは保持時間が相違した事から、血漿中には複数の脂質hydroperoxide体が存在する事が想像された。この血漿脂質hydroperoxide体はTLC分離および呈色反応によりリン酸とコリンを含む脂質であった。これらは、それぞれphosphatidylcholine(PC)、PCのLyso体およびsphingomyelin(SPH)のhydroperoxide体である可能性が考えられた。さらに、アルカリ性methanolysis、CL-HPLCの保持時間および赤外吸収による分析から、SPHOOHであった。これらの検討結果から、ラット肝臓の虚血—再循環障害時に上昇した血漿中のPCOOH様hydroperoxide体の大部分はSPHOOHである事が判明した。

有機リン系農薬および分解・代謝物の初代培養肝細胞におよぼす影響

○篠内 桃子, 郭 新彪, 宮島 敦子, 大野 泰雄, 高仲 正

国立衛生試験所・薬理

土壤中および植物における農薬の分解・代謝物には毒性を有するものもある。そこで、分解・代謝物をも含めた残留農薬の安全性に関する研究の一環として、薬物の比較的長時間の暴露が可能な初代培養肝細胞系を用いて、有機リン系農薬およびその分解・代謝物がおよぼす影響について検討した。

〔方法〕 SD系雄ラットよりコラーゲナーゼ環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牛胎児血清を含むWilliams'E培地 (2×10^6 cells/60 mm dish) で48時間培養した。有機リン系農薬およびその分解・代謝物は培養3時間目から添加した。細胞毒性の指標としてLDH活性を、薬物代謝酵素の指標として7-Ethoxycoumarin O-deethylation (EC) 活性を測定した。

〔結果と考察〕 農薬原体ではFenthion, Erusan, IBPおよびEdifenphosの各 $250\mu\text{M}$ でLDH活性の上昇とEC活性の低下が見られたが、Disulfotonではこれらの活性に変化は見られなかった。また分解・代謝物のうち、Fenthionのリンを含まない分解・代謝物であるFenthion phenol $500\mu\text{M}$ ではLDH活性の上昇とEC活性の低下が見られた。しかし、その他の分解・代謝物であるTrichloroethanol, Benzylmercaptan, Methyl acid phosphate, Ethyl acid phosphate, Isopropyl acid phosphate, Methyl thiophosphate, Ethyl thiophosphate およびPhenyl phosphoric acidではLDH活性におよぼす影響は見られなかった。また、Dimethyl phenyl phosphoric acidではEC活性の上昇が見られた。以上の結果から、有機リン系農薬の分解・代謝物であるリン酸エステル類が初代培養肝細胞におよぼす影響は少ないこと、原体で認められたEC活性の低下は細胞毒性に由来すること、Fenthionにおける作用はFenthion phenol部分に由来することが示唆された。

キノロン薬の Maus 痙攣誘発作用の検討

○赤羽一美、加藤道幸、高山敏

第一製薬株式会社・開発研究所・安全性研究センター

キノロン系抗菌薬の痙攣誘発作用に関して多くの研究が行われているが、その機序は明らかでない。そこで、我々は Maus 脊髄腔内投与法を用いて、レボフロキサシン(LVFX)の単独投与時またはフェンブフェンの活性代謝物(ピフェニル酢酸:BPAA)との併用投与時の痙攣発生に対する抑制性アミノ酸リセプターのアゴニストおよび興奮性リセプターのアンタゴニストの作用を観察した。LVFX の 10 μ l を ddY系 4 週齢の雄 Maus の脊髄腔内に 1回投与した。アゴニストまたはアンタゴニスト(10 μ l)はその 5分前に脊髄腔内に、またBPAA(400mg/kg)は30分前に経口投与した。動物の間代性痙攣および死亡の発生を観察するとともに、痙攣発生までの潜時を測定した。用いたアゴニストの間で、baclofen(BC)が LVFX による痙攣を強く抑制したが、GABA_A、muscioml、diazepam および 3-amino-propylphosphonic acid の抑制作用は弱かった。アンタゴニストでは、kynurenic acid(KA)の抑制作用が最も強く、潜時も延長した。次いで γ -D-glutamylaminomethylsulfonic acid(GAMS)の作用が強く、D(-)-2-amino-5-phosphonovaleric acid、DL-2-amino-7-phosphonoheptanoic acid および 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione(DNQX)の作用は弱かった。また、BPAAとの併用による LVFX の痙攣増強作用に対しても、BC、KA、GAMS および DNQXが明らかな抑制作用を示した。以上の成績から、Maus における LVFX の単独投与および BPAAとの併用投与による痙攣発生には、GABA_Aよりもむしろ glutamate および GABA_Bの関与が大きいことが示唆された。

トリフェニルスズの脳組織コリン作動性神経機構に及ぼす影響

野中邦夫, 茂木 朗, ○小林晴男, 鈴木忠彦,
増子かおり, 笠嶋快周, 小野菜穂子, 三浦暁美
岩手大学農学部家畜薬理学教室

アルキルおよびアリル有機スズが防藻・貝付着防汚剤として広く用いられており, 海洋汚染を介した毒性, とくに神経毒性が懸念される. 今回, 酢酸トリフェニルスズ(TPT)のマウス脳組織コリン作動性神経活性に及ぼす影響を *in vitro* および *in vivo* で検討した.

成熟ICR系雄マウスを使用し, *in vitro* では大脳皮質を, また *in vivo* では線条体, 海馬および大脳皮質をコリン作動性神経活性測定の実験に供した. *in vivo* では50 mg TPT(ゴマ油溶液)/kg/dayを3日間投与後24時間に屠殺して脳部位を摘出した.

① *In vitro*: TPTは 10^{-6} - 10^{-4} Mの濃度では, アセチルコリン(ACh)分解酵素AChE活性には影響を及ぼさなかったが, ACh合成酵素ChAT活性, シナプトソームへのコリンの高親和性取り込み(HACU)および低親和性取り込み(LACU)に対してTPTは用量依存的に阻害した. TPTはまた³H-quinuclidinyl benzilate(QNB)のムスカリニックAChレセプターへの結合を強力に阻害した. TPTは皮質切片からのK⁺誘発ACh遊離をわずかに抑制した. ② *In vivo*: AChE活性は線条体で約50%増加した. 3脳部位のChAT活性, ACh turnover rate, LACUおよびコリン含量には変化が認められなかった. 海馬においてHACUおよびACh含量の減少傾向が見られた.

TPTは, *in vitro* では 10^{-6} - 10^{-4} Mの濃度でACh合成系およびQNB結合能を強く阻害した. 50 mg TPT/kg/dayの3日間の投与によって, 24時間後のTPTの脳内濃度は 10^{-6} M以上になると推測されるが, *in vivo* では海馬でのみACh合成系の抑制傾向が見られた.

鈴木 勉、三澤美和

星薬科大学薬理学教室

【目的】薬物の精神依存形成能はこれまで主に自己投与法を用いて評価がなされてきた。しかし、本法での評価には長期間を要し、さらに熟練が必要である。最近 conditioned place preference (CPP) 法が開発され、現在精神依存の研究に広く使用されている。そこで、本研究では CPP 法を用いてこれまでに得られた精神依存形成薬物での結果の妥当性を証明するために、精神依存形成能のない抗精神病薬および抗うつ薬の評価を行った。

【方法】Sprague-Dawley 系雄性ラット(6週齢)を1週間予備飼育後、1群10匹として使用した。実験には白・黒 2-compartment box を使用した。動物に薬物あるいは溶媒を腹腔内投与し、白あるいは黒の box に50分間入れ、翌日はそれぞれの条件を逆にして同様の処置を行った。これを1セッションとし、3セッション繰り返した。また、対照群には薬物の代わりに溶媒を投与し、同様の訓練を行った。訓練終了24時間後に、薬物も溶媒も投与せずに試験を行った。すなわち、box 中央にプラットホームを設置し、この上に訓練動物を乗せ、ここから動物が降りてから15分間の白あるいは黒の box への滞在時間を自動測定し、対照群と比較した。使用薬物としては抗精神病薬として haloperidol と fluphenazine (0.03-1 mg/kg)、抗うつ薬として amitriptyline と maprotiline (0.3-10.0 mg/kg) を用いた。

【結果・考察】オピオイド、覚醒剤、cocaine、ベンゾジアゼピン、alcohol、nicotine などの依存形成薬物がいずれも本法で強化効果を示すことはすでに報告している。本研究において依存形成能のない抗精神病薬 (haloperidol と fluphenazine) および抗うつ薬 (amitriptyline と maprotiline) を検討したところ、いずれも有意な強化効果は示さなかった。したがって、CPP 法は薬物の精神依存性の1次評価法として有用と考えられる。すなわち、薬物の精神依存性は CPP 法でまず評価し、そこで問題がある場合には自己投与法で詳細な検討を行うのが良いと考えられる。

0-211 抗癌剤 Cyclophosphamide (CPM) によって誘導される免疫毒性の
Arotinoid 併用による改善作用 -細胞表面マーカーによる解析-

○井上智彰、窪田章子、金崎寛子、堀井郁夫

日本ロシュ薬 研究所・毒性病理部

Arotinoid: ARN (4-[2-[p-[(E)-2-(5,6,7,8-Tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthyl)propenyl]phenoxy]ethyl]-morpholine) は Retinoid 系の抗癌作用を有する化合物で、細胞増殖抑制作用を有する抗癌剤(CPM など)との併用療法が期待されている。今回は、CPM 単独投与で認められる免疫系への毒性作用に与える ARN 併用の影響についてマウスの系で評価した。【方法】BDF1系マウスに CPM 0.25または 50 mg/kg/day を腹腔内投与すると共に、ARN 0 または 100 mg/kg/day を併用で経口投与した。1~5週間投与後に一般病理検査(臨床検査およびHE染色による病理組織学)を行うと共に、免疫系臓器の凍結切片を作製し、免疫組織化学的に染色した(細胞表面マーカー:Thy1.2, Lyl-2, L3T4, Kappa chain, Ia, MAC-1)。【結果】ARN との併用により、CPM 単独投与で認められた以下の変化を軽減する作用が認められた。①胸腺、脾臓、精巣重量の低下。②血中7βカリネステラゼ、コリンエステラーゼの低下。③末梢血白血球数、赤血球数の低下。また、免疫組織化学的検索では、リンパ系組織(胸腺、脾臓、リンパ節)におけるリンパ球(T細胞:Thy1.2+, およびB細胞:Kappa chain+)の減少に対して ARN の保護作用が認められ、特に胸腺では Lyl-2(CD8)およびL3T4(CD4)+細胞(未成熟T細胞)の髄質における回復が ARN 併用により、著明に認められた。また、赤脾髄における MAC-1+細胞(好中球およびマクロファージ)の CPM による減少も、ARN との併用により軽減された。これらの結果より、ARN との併用により、CPM の免疫系に対する毒性は低く抑えられ、抗癌作用の相加効果に加え、毒性作用の改善が期待できるものと考えられた。

○入江弘之、木村和幸、内藤寿英、小山 守、

小柴 博、花田秀一、岩井正和

㈱ミドリ十字・中央研究所・安全性研究所

【目的】癌化学療法領域で汎用されているアドリアマイシン(ADM)は、総投与量に応じて致死的な心毒性を惹起することが知られている。しかし、酸化デキストランと結合させた高分子ADM(ADM-OXD)では体内動態が大きく変化し、一般毒性および心毒性が軽減することが確認されている。今回、ADM のもう一つの重篤な毒性である骨髄毒性が、ADM の高分子化によりどの様に変化するかを検討した。

【方法】*in vivo*での検討では、BALB/c系雄性マウスあるいは脾摘マウスにADM-OXD(ADM 量として35mg/kg)もしくはADM(14mg/kg)単回投与後の末梢血球数、骨髄有核細胞数、造血前駆細胞数等の経時的変動を精査した。一方、*in vitro*での検討では、両薬剤(80, 1280 nM)の骨髄造血前駆細胞に対する直接的な作用を検討した。

【結果】ADM-OXD のCFU-F を含めた造血前駆細胞に対する直接的な細胞毒性はADM より弱かった。しかし、*in vivo*では同程度の骨髄有核細胞数の減少がみられる用量に於いて、ADM 投与群と比較し、ADM-OXD 投与群で投与後4~6日目以降の血小板、AChE陽性細胞、CFU-GM、CFU-Meg およびCFU-F 数の回復遅延がみられ、特にCFU-F 数の回復遅延が顕著であった。

【結論】骨髄毒性の発現機作は両薬剤で相違はないが、ADM-OXD はADM より骨髄への分布量が多く、また、分布時間が長いため、各血球および前駆細胞数の減少により増殖サイクルに導入された造血の場がADM 群より強く障害を受け、造血前駆細胞等の回復が遅延したものと考えられた。なお、ADM-OXD の影響が血小板数に顕著にみられたのは各血球のカイネティックスの差によるものと推察された。

チオウレア系ゴム加硫促進剤のモルモットにおける
感作強度ならびに交差反応性

○門馬純子、鹿庭正昭*、関口裕巳、中村晃忠*、
川崎 靖、津田充有、黒川雄二

国立衛生試験所

毒性部、療品部*

【目的】 外科用手袋、長靴および水中眼鏡などのゴム製品によるヒトでの接触アレルギー皮膚炎が報告されている。今回、我々は、それらに含有すると考えられるチオウレア系ゴム加硫促進剤 Diethylthiourea (DETU)、Dibutylthiourea (DBTU)、Dilaurylthiourea (DLTU)、Diphenylthiourea (DPTU) および DPTU の熱分解生成物である Phenylisothiocyanate (PITC) の感作性ならびにその強度について検討した。さらに、アルキル基の異なるこれらチオウレア系ゴム加硫促進剤間での交差反応性についても併せて検討した。

【実験方法】 実験は、Maximization法 (Magnusson & Kligman, 1969) に準拠し、Hartley系雌性モルモット (4週齢、クリーン) を用いて行った。感作用量は、予備試験の結果を参考にし、DPTU および DBTU においては 2、20、200、2,000 ppm、DETU および DLTU においては 20、200、2,000、20,000 ppm、PITC においては 200、2,000 ppm とした。感作時溶媒は、DPTU においては ethanol/propylene glycol (20/80)、DETU、DBTU、DLTU および PITC においてはいずれもオリーブ油を用いた。惹起 (誘発) 用量は、一次刺激性を示さない濃度以下とした。惹起時溶媒は、いずれの感作群ともアセトンを用いた。感作性の強さの評価は、各々の最低感作濃度 (陽性反応が認められた最も低い感作濃度)、感作率および皮膚反応の平均評価点を総合して行った。

【実験結果と考察】 4種類のチオウレア系ゴム加硫促進剤および DPTU の熱分解生成物である PITC の最低感作濃度は、DETU では 2,000 ppm (惹起濃度 20 ppm)、DBTU では 20 ppm (惹起濃度 200 ppm)、DLTU では 200 ppm (惹起濃度 200 ppm)、DPTU では 20 ppm (惹起濃度 2 ppm) および PITC では 200 ppm (惹起濃度 20 ppm) であった。アレルギー性の強度は、それぞれの最低感作濃度、惹起濃度および皮膚反応の平均評価点を総合すると、DPTU > DBTU > PITC > DETU > DLTU の順であった。交差反応性について調べた結果、DPTU は、PITC、DBTU および DLTU との間で交差反応性を示したが、DETU に対しては交差反応性が認められなかった。なお、DBTU、PITC、DETU および DLTU などの間での交差反応性についても併せて報告する。

ゴム製品中のアレルギー性物質の確認：化学分析と
Guinea Pig Maximization Testを用いた検索法の有用性

○鹿庭正昭、門馬純子*、関口裕巳*、伊佐間和郎、
中村晃忠、津田充宥*、黒川雄二*

国立衛生試験所 療品部、毒性部*

ゴム長靴、手術用ゴム手袋などによるアレルギー性接触皮膚炎について、患者でのパッチテストの結果をもとに、従来ゴム添加剤（老化防止剤、加硫促進剤）が主要な原因と考えられてきた。しかし、原因ゴム製品中に、原因と考えられた化合物が含まれているか、またそれ以外のアレルギー性物質は含まれていないかはほとんどの場合確認されないままであった。そこで、化学分析とGuinea Pig Maximization Test(GPMT)を併用して、原因ゴム製品の抽出物中のアレルギー性物質の検索を試みた。

〔試験方法〕1) 抽出および分画：原因ゴム製品を室温下アセトン-クロロホルム(1:1)混液と振とうして得た抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィーで分画した。

2) ゴム添加剤の確認：ガスクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーにより、抽出物およびその分画中のゴム添加剤を定性定量した。3) GPMT: Hartley系雌性モルモット(4週令、クリーン)を抽出物で感作させ、それに抽出物およびその分画をパッチして、アレルギー性物質の有無を確認した。

〔実験結果および考察〕1) ゴム長靴による事例：患者でのパッチテストをもとにMercaptobenzothiazole(MBT), Dibenzothiazyl disulfide(MBTS)が原因と考えられたが、GPMTによりMBT, MBTSの他に、製造工程で生成したMBT系化合物および老化防止剤のStyrenated phenolもアレルギー性物質として含まれていたことを明らかにした。

2) 手術用ゴム手袋：Diphenylthiourea(DPTU)が配合されたゴム手袋について、GPMTにより、その抽出物がアレルギー性を有することを確認したが、アレルギー性物質であるDPTUおよびその分解生成物のphenylisothiocyanate(PITC)は抽出中には含まれていなかった。

3) 化学分析とGPMTを併用することにより、ゴム添加剤などの化学物質だけでなく、ゴム製品中の未知化合物についても、アレルギー性の有無を確認できた。

ワクチンの免疫増強剤としてのリン酸カルシウムの溶血性について

¹⁾加藤博史、¹⁾前山順一、²⁾柴野三智子、²⁾斎藤卓也、
²⁾山口淳二、¹⁾後藤紀久

¹⁾国立予防衛生研究所・安全性研究部、²⁾近畿大学・医学部

アルミニウム化合物はワクチンの免疫増強剤（アジュバント）として、長年にわたり多くの国々で用いられている。しかし、強い接種局所の組織反応、IgEの産生、アルツハイマー病や透析脳症の病因における役割等の好ましからぬ反応が指摘されており、アルミニウムに代わるアジュバントの開発は急務とされている。一方、フランスでは主としてカルシウム化合物をワクチンアジュバントとして用いており、IgEの産生もなく、安全なアジュバントであるとされている。こうした背景から、我々はアジュバント物質としての水酸化アルミニウムとリン酸カルシウムについて、各種細胞に対する毒性を比較検討し、リン酸カルシウムに強い溶血活性があることを見いだした。そこで今回はワクチンアジュバントによる溶血反応の機構について、若干の検討を行なったので報告する。

【材料および方法】リン酸カルシウムゲル(Ca-gel)、水酸化アルミニウムゲル(Al-gel)をそれぞれ3mg/ml、pH7.2に調製し、アジュバントサンプルとした。溶血反応はモルモット赤血球の2%懸濁液とアジュバントサンプルを等量混合し、37°Cインキュベーションすることにより行なった。溶血度はサンプリング後遠心上清を540nmでの比色により定量し、上清の一部について八木法により過酸化脂質を定量した。また、各サンプルの蛋白吸着能を卵白アルブミンを用いて検討した。赤血球の破壊は電子顕微鏡を用いて、形態学的にも観察した。

【結果および考察】反応開始後4時間の溶血度はCa-gelが90%、Al-gelが20%と顕著な差を示し、遠心上清中の過酸化脂質濃度についても同様の傾向が認められた。Ca-gelの溶血度はゲル濃度に依存し、吸着能と溶血度との間には高い相関が認められた。Ca-gelによる過酸化脂質の生成量は溶血度の上昇よりもより早くのピークを迎えた。また電顕像によっても、Ca-gelによる血球破壊は明確に認められた。以上の結果より、Ca-gelによる溶血は吸着と脂質過酸化の相互作用として生じることが示唆された。

新規抗原産生物質、塩酸1,1-dichloro-2,2,2-trifluoroethane (DT-11)のラットにおける肺野数増加作用と競争的に生じる影響

佐々木智敏、長田信、渡辺隆樹、渡立彦、高山誠

第一製薬(株)開発研究所、安全性研究センター

一般演題(口演)

本演題は、DT-11が肺野数の増加を誘発する作用を有することを明らかにした。今回はその中の一つであるDT-11が肺野数の増加作用に及ぼす影響についてより詳細に検討した。

材料と方法:4日のDT-11投与(100mg/kg)による肺野数の増加作用を明らかにした。投与経路は腹腔内、投与量を用いた肺野数を測定した。肺野数は顕微鏡下で測定した。

7月29日(木)

第3会場(ロイヤルプラザホテル 末廣の間)

演題番号 O-301~O-315

結果と考察:DT-11(100mg/kg)による肺野数の増加作用は、投与経路の1と経路2の差が認められた。2)さらに肺野数の増加作用は、投与量と投与回数に依存する。平均肺野数は投与量が増加すると増加した。またDT-11の750mg/kgの投与により肺野数の増加は投与量(100mg/kg)の増加に伴って顕著に増加した。以上より、DT-11が肺野数の増加を誘発する作用を有することが確認された。以上より、DT-11が肺野数の増加を誘発する作用を有することが確認された。以上より、DT-11が肺野数の増加を誘発する作用を有することが確認された。

以上より、DT-11が肺野数の増加を誘発する作用を有することが確認された。以上より、DT-11が肺野数の増加を誘発する作用を有することが確認された。以上より、DT-11が肺野数の増加を誘発する作用を有することが確認された。

新規抗腫瘍性物質，塩酸irinotecan(CPT-11)のラットにおける排卵数増加作用と妊孕性に及ぼす影響

佐々木哲哉，島田信，渡辺敏樹，俵克彦，高山敏

第一製薬（株）開発研究所，安全性研究センター

各種癌化学療法剤が排卵数増加作用を示すことを前回の大会で報告した。今回はその中の一つであるCPT-11が排卵機能および妊孕性に及ぼす影響についてより詳細に検討した。

材料と方法：4日の発情周期を示すSlc:SD系の成熟ラットを使用した。投与経路は静脈内とし，排卵の観察は排卵予定日（発情期）に卵管内卵子について行った。

結果と考察：1)CPT-11の6mg/kg/dayを排卵予定日前4，8および16日間投与したところ，平均排卵数は対照群（生理食塩液16日間投与）の13.8に対して，CPT-11投与群ではいずれの投与期間でも17.9-18.0と同程度の排卵数の増加が認められた。2)さらに排卵前4日間に7時点をとり，CPT-11の12mg/kgを単回投与したところ，CPT-11はおもに排卵3日前（発情後期）に働いて排卵数増加作用を示すことが確認された。3)つぎに排卵3日前14:00hにCPT-11の0，3，6，12，24および48mg/kgを投与したところ，平均排卵数はそれぞれ13.5，15.0，16.4，18.3，19.5および8.0と，24mg/kgまでは用量依存的な増加が認められた。またCPT-11の24mg/kgの投与により増加した排卵数は投与後2回目（投与7日後）の排卵時には通常の水準に回復することが確認された。4)排卵3日前14:00hにCPT-11の12および24mg/kgを雌ラットに投与して，雄と交配させ，妊娠20日に胎児の観察を行って妊孕性に及ぼす影響について検討したところ，排卵数の増加に対応して，着床数および生存胎児数の増加が認められ，受精，着床，および胎児の発育に対する抑制的な影響は認められなかった。

以上より，CPT-11が排卵数の増加を示す条件を明らかにしたが，演者らはCPT-11投与後，血中FSH濃度が上昇することを確認しており，このことが排卵数増加の主因であると考えられる。

〇—302 フロセマイドによるマウスおよびラット胎児波状肋骨出現頻度に及ぼす母動物子宮切開の影響

萬有製薬株式会社 開発研究所

〇中塚敏夫 藤掛登 内田美紀 松本浩良

「波状肋骨」は、げっ歯類胎児に特異的にみられる骨格異常である。この骨格異常の成立には胎児化骨障害と胎児内外からの物理的圧力が関与していると考えられている。今回、Muneokaら(1986)の子宮切開法を用い、波状肋骨出現頻度に及ぼす母動物子宮筋の影響について検討したので報告する。ICR系マウスおよびSD系ラットを交配し(交尾確認日=妊娠0日)、マウスでは妊娠13日、ラットでは妊娠17日に麻酔下に開腹し、左子宮角の着床部位を輪状に切開後、胎児を子宮外に露出させた。右子宮角については処置をせず、そのまま左子宮角とともに腹腔内に戻し腹壁を縫合した。マウスでは手術翌日の妊娠14日に、ラットでは手術前日の妊娠16日に波状肋骨誘発物質であるフロセマイドの200 - 250 mg/kgを経口投与した。マウス、ラットそれぞれ妊娠18日および20日に母動物を屠殺し、胎児を左右子宮角別に取り出した。生存胎児についてアリザリン赤染色透明骨格標本作製し、波状肋骨の有無について調査した。その結果、マウスおよびラットとも子宮外環境で発育した胎児では同腹の子宮内胎児に比べ、いずれも波状肋骨の頻度がおよそ1/4に減少した。これらの結果は波状肋骨発現のメカニズムに母動物子宮筋の収縮が関与している可能性を支持している。しかし、子宮外胎児でも波状肋骨が低頻度ながら出現したことから、子宮筋収縮以外の物理的要素(胎児骨格筋運動)が関与していると考えられる。

Etretinate (Aromatic retinoid) の器官形成期および授乳期投薬のラットF1児生存率および成育に及ぼす作用

○滝沢節子¹⁾、深津信子¹⁾、堀井郁夫¹⁾、藤井儂子²⁾

¹⁾日本ロシュ(株)研究所, 毒性病理、²⁾帝京大, 医・薬理

Etretinate(E)の妊娠前・妊娠期・授乳期の連続投与は、出生時F1児の外形および体重に著変が認められないにもかかわらず、以後の生存率の低下および発育遅延を引き起こした。これらの影響が器官形成期または授乳期どちらの投薬に起因しているのか、また、F1児が発育に伴いどのような生体内変化を示すのか、Cross-fostering 法を用いて検討した。

[方法] SDラットに Etretinate 6mg/kg を妊娠7日目より授乳20日目まで投与した。分娩時に F1 児の半数を対照群と投薬群間で交換し、0-0群 (対照群親; Cdamより生まれCdamが哺育)、E-0群 (投薬群親; Edamより生まれCdamが哺育)、0-E群 (Cdamより生まれEdamが哺育)および E-E群 (Edamより生まれEdamが哺育)を設定した。F1 児の生存率および体重増加等を調べると共に、生後 21と 49日目に血清中の成長ホルモン (GH) および IGF-1 を RIA により測定した。

[結果・考察] E-0群および E-E群に、生存率低下および体重増加抑制が認められ、器官形成期の投薬がこれらの変化の主要因であることが示された。しかし、E-E群がより影響を受けていたことから、授乳期の投薬はその作用をさらに増強すると考えられる。発育に影響が認められた E-0群 および E-E群 F1 児では、生後 21日目の検査で、血清 GH および IGF-1 の増加が認められた。これらの結果より、Etretinate の器官形成期投与は、これら成長に関係したホルモンが増加するような異常を引き起こすと共に、標的組織の受容体数の減少、あるいは他の機序による非反応性変化の誘発が推測された。

Antiandrogen, AA560 投与によるラットの副腎性 androgen合成促進作用

増淵美子¹・渡辺 実²・永田良一¹・平井正直¹新日本科学 臨床薬理¹・聖マリ医大 薬理²

〔目的〕 Antiandrogenは、androgen過剰産生の疾患に対し頻度高く使用される、一方、前立腺癌の治療には必須である。20MCで発癌させた実験的前立腺移植癌の研究において、antiandrogenのAA560を用い前立腺癌の発育抑制を報告した。今回、AA560投与による副腎性androgen産生の生体への毒作用を検討した。

〔方法〕 Donryu雄ラットのの前立腺前葉由来の前立腺癌(prostatic squamous cell carcinoma ;P癌)と、去勢ラットにこの前立腺癌を継代移植して得られたsublineのPC癌(前立腺再燃癌モデル)を用いた。癌は44日齢に前立腺前葉内に移植した。PC癌は移植前日に去勢したラットを用いた。移植8日後からAA560(10mg/rat/day, s.c.)を11日間投与し断頭した。副腎内及びplasma中androgenはジクロロメタンで抽出後HPLCにて単離定量した。

〔結果〕 AA560投与で、(1) P癌の発育は抑制されたが、PC癌は抑制されなかった。(2) P癌移植ラットは、testosterone(To)は精巣、副腎内及びplasma中で有意高値、 Δ^4 -androstenedione(Δ^4 -A)とdihydrotestosterone(DHT)は精巣内及びplasma中高値傾向、副腎内で変化がなかった。PC癌移植ラットは、Toと Δ^4 -Aが副腎内及びplasma中で有意高値、DHTに変化はなかった。

〔考按・結語〕 AA560投与は、(1)内因性Toのfeed backをreceptorレベルで抑制し、下垂体gonadotropin(GTH)の放出を促進する。その結果、精巣が存在する生体では、精巣のandrogen産生の亢進が見られた。しかし、(2)去勢された生体では、副腎性androgen産生を顕著に促進するが、去勢後にみられたandrogen依存器官の萎縮が、AA560投与で増悪する傾向が認められた。

○坂 芳樹、川名研一、中塚敏夫、松本浩良

萬有製薬株式会社 開発研究所

カルシウム拮抗薬である diltiazem および verapamil を雌ラットに妊娠 11 日から 14 日のいずれかの妊娠日に単回腹腔内投与すると胎児死亡が発現する。こうした *in vivo* における胎児死亡に関する作用機序を調べるため、また両薬剤の胎児への影響を直接比較するために全胚培養法を用いて以下の実験を行った。

妊娠 11 日(腔栓確認日=妊娠 0 日)のラットより胎児を摘出し、New (78) の方法に従い全胚培養下で 2 時間の前培養後、diltiazem および verapamil をそれぞれ 20 時間暴露した。培養液中の薬剤濃度は diltiazem 0.3, 1, 3, 6 $\mu\text{g/ml}$ および verapamil 0.1, 0.3, 1, 2 $\mu\text{g/ml}$ とし、各々の対照群の培養液には生理食塩水を添加した。各薬剤暴露より最初の 4 時間胎児の心拍数を計測し、培養終了時には胎児の発育および形態学的異常を Brown と Fabro (81) の方法に従い観察した。

Diltiazem 暴露群では 1 $\mu\text{g/ml}$ 以上で、verapamil 暴露群では 0.3 $\mu\text{g/ml}$ 以上で濃度依存的に心拍数の減少が認められた。培養終了時の形態学的観察においては、diltiazem の 3 および 6 $\mu\text{g/ml}$ 群、verapamil の 1 および 2 $\mu\text{g/ml}$ 群の胎児で発育遅延および心嚢膜、心房の拡張を含む形態学的異常が濃度依存的に認められた。

以上の結果は、両薬剤により惹起された心拍数の減少および胎児の循環障害に起因すると考えられる形態学的異常が *in vivo* で認められる胎児死亡に関連すると推察された。さらに verapamil は diltiazem と比較して胎児に対してより影響が強いことがわかった。

○ 西田敦之、子林孝司、有行史男、中山良夫

田辺製薬(株)安全性研究所

【目的】我々は concanavalin A (Con A) をラットの妊娠8.0日から9.0日に静脈内投与することによって神経管形成不全を、妊娠9.5日に投与することによって重篤な胚致死を誘発することを報告した(第31回日本先天異常学会)。そこで、妊娠9.5日投与に特異的にみられた Con A の胚致死作用の詳細を全胚培養法により検討した。

【方法】Slc:SD系ラットの胎齢9.5日胚 (plug day=0) を Con A (100、200、300 および 400 μ g/ml) を含む培養液中で48時間回転培養後、胚の生死判定(卵黄囊に血液循環のみられるものを生存として判定)、卵黄囊長径と頭腎頂の測定、体節数の算定、外表異常の観察および組織学的観察を行った。

【結果および考察】400 μ g/ml群では培養開始後24時間より卵黄囊および羊膜が萎縮・白濁化し、培養終了時には全胚が死亡した。その他のCon A 暴露群では、卵黄囊長径、頭腎頂および体節数が用量依存的に減少し、卵黄囊長径および頭腎頂は200 および 300 μ g/ml群で、体節数は300 μ g/ml群で対照群に比して有意に低値を示した。また、300 μ g/ml群ではおよそ80%の胚に終脳部の低形成あるいは脳胞の形成不全といった神経管形成不全が認められ、その型は妊娠ラットへの静脈内投与によって誘発された異常と類似していた。以上のことから、Con A 誘発の胚致死は胎児膜の変性による機能障害に起因したものであることが示唆された。

小島肇夫¹、花村朝夫¹、宮本 悟¹、佐藤 淳¹、小西宏明¹、吉村 功²

¹日本メナード化粧品(株)研究技術部門、²東京理科大学・工・経営工学

(目的) 眼粘膜刺激性試験の代替法として報告されている試験結果は、In vivo試験と高い相関を示すが、Falseの結果を示す物質も存在し完全な代替法は存在しない。これらのリスクをより減らし、眼粘膜刺激性の予測を的確に行うためには代替法の組み合わせによる評価が不可欠である。そこで今回、我々は代替法として確立されつつある7種の試験結果を組み合わせ、眼粘膜刺激性の予測法について検討した。

(材料および方法) 被験物質としては界面活性剤19点、7セト、7°ロビ°レングリコール、イタノールおよびネルマリンの計23物質を用いた。

In vivo試験は日本白色種家兎を用い、被験物質10%溶液を左眼に滴下した。洗浄を行わず、滴下1~168時間にDraize基準により評価した。得られた評価点から最大平均評価点(MADS)を比較に用いた。

試験に用いた代替法としては、①ヒト皮膚腺維芽培養細胞(NB1RGB)を用いたMTTアッセイ法、②チャイニーズ・ハスター肺由来培養細胞株CHL-IUを用いたニュートラルレット°(NR)法、③受精鶏卵試験(HET-CAM)、④ラット赤血球を用いた赤血球溶血試験、⑤牛血清アルブミンを用いた蛋白変性試験(HDR)、⑥日本白色種家兎の健常皮膚を用いた皮膚一次刺激性試験、⑦10%水溶液におけるpHおよび中和度測定を行った。

(結果) HET-CAMおよびHDRにおいて、MADSと高い正の相関(相関係数0.7以上)が認められた。また、MTTアッセイ法、NR法および溶血試験において大きい負の相関(相関係数-0.7以上)が認められた。さらに試験結果を組み合わせ、変数選択法で自由度2重相関調整済み重相関計数を基準にして回帰式を求めた結果、最適な予測式として以下の式が得られた。この時の寄与率は約88.6%であった。

$$MADS=74.00-12.624\text{Log.}(NR-EC_{50})+0.853\text{HDR}\%$$

臭素系難燃化剤：Tetrabromobisphenol-A(TBBPA)

の血液成分に対する影響

渡辺一石 鬼頭英明 永瀬久光 佐藤孝彦

岐阜薬科大学：公衆衛生学教室

現在、プラスチック、衣類、自動車部品等は火災に対する安全性を確保するため難燃化処理が義務付けられており、それらに対して広範に用いられている難燃性可塑剤の37%('91)を占める臭素系難燃化剤は、使用から廃棄に至る過程を通じて製品から溶出、或はガス化して環境中に負荷され、近年これによる環境汚染が指摘されてきている。この臭素系難燃化剤の中でも特に汎用されているTetrabromobisphenol-A(TBBPA)は、脂溶性が非常に高く、添加されている製品(衣類等)との関連から、経皮吸収による人体への影響が考えられ、この化合物の血液に対する毒性について、検討を行なった。

まず、日本白色うさぎの赤血球を用いた溶血性試験を行なったところ、得られた50%溶血濃度(EC50)が35.2 μ Mと極めて強く強い溶血性を示した。TBBPAは代謝されにくいことから*in vivo*でも強い溶血性を示すことが示唆された。そこでSD雄性ラットを用いてTBBPAを0.1-1,000mg/kg.dayで経口的に強制投与し、4週間の毒性試験を行なった。その結果、投与群と非投与群に於て、体重、hematocrit値、血液凝固時間、血清ChE活性、血清Cholesterol、BUN、それぞれについて有意な結果が示された。特に、hematocrit値の減少は、*in vitro*での結果を裏づけるものであり、又、血液凝固時間の短縮は、凝固因子に関わる何等かの影響によるものと考えられる。一方、その他の血中成分の有意な差は、肝、腎機能障害に起因しているものと考えられる結果となった。

○吉田貢由、加藤道幸、高山 敏

第一製薬(株)、開発研究所、安全性研究センター

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障害性が懸念される。我々は、第18回日本毒科学会において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血管毒性評価法を発表した。今回はさらに方法を簡便化するために、放射性同位元素の血管透過性を指標とした評価法を応用し、キノロン系注射剤の血管障害性を検討した。同時に、投与液の pH、浸透圧および投与速度の影響についても検討した。実験には 5~6 週齢の雄性 BALB/C 系マウスを用いた。尾根部から約 5 cm 離れた尾静脈に、27G 注射針を用いて ^{125}I -human serum albumin 0.02 μCi を含む薬液 0.5 ml/mouse を投与した。30 分後に動物を放血屠殺し、尾根部を含み約 2 cm の尾を採取してその γ 線量を測定した。

その結果、薬液の投与速度 (1 および 4 ml/min) および浸透圧 (0~1200 mOsm/kg) は血管透過性を亢進しなかった。投与液の pH 2~10 では影響はなかったが、pH 12 では血管透過性が軽度増加した。一方、キノロン薬において血管透過性亢進作用の現れた濃度は 0.05% 以上であった。その薬液の浸透圧および pH は血管透過性に影響しない範囲内であったことから、今回用いたキノロン薬の血管透過性亢進は、薬物の血管壁に対する直接的な障害作用によるものと思われた。

北島 俊一、中村 隆広、光岡ちほみ、村田 勇二、
佐藤 喜代隆

(株) パナファーム・ラボラトリーズ

腎臓は各種化合物の標的臓器となることが多く、腎臓の機能的変化を正確かつ早期に検出することは有害作用の評価に重要な意義を有している。そこで、ラットのアルブミン、ヘモグロビン、 β_2 -マイクログロブリン、 α_1 -酸性糖蛋白およびIL-8(CINC/gro)に対する特異抗体を用いたELISA法を確立し、腎機能検査への応用を試みた。

雌雄のSD系ラットに市販のシスプラチン製剤8 mg/kgを1回腹腔内投与して腎障害を惹起し、ELISA法および通常法による血清・尿パラメータの測定を行った。

シスプラチンの投与3日後には血清尿素窒素およびクレアチニンの顕著な増加とともに、血清 α_1 -酸性糖蛋白および β_2 -マイクログロブリンが増加し、6日後にも高値を示した。血清IL-8では雌雄で3日後にのみ増加がみられた。血清アルブミンの変化は認められなかった。尿検査では3日後に雌雄で尿中アルブミンが著明に増加し、ヘモグロビンも高値を示した。雄では尿中 β_2 -マイクログロブリンおよび α_1 -酸性糖蛋白の増加も認められた。これらの尿の変化はいずれも6日後にほぼ回復した。ELISA測定で得られた血清・尿の変化では一般に消長が速く、明らかな性差がみられ、腎臓の器質的变化にもよく符合していた。

したがって、ELISA法による血清・尿の定量的測定は腎障害の推移および程度の評価に有用であるものと考えられた。

HX-1920 の薬物性腎障害軽減効果における
抗酸化作用の関与

戸田 正宏、玄番 宗一、河合 悦子、柴田 健介*

大阪薬大第2薬理、*旭化成工業(株)ライフサイエンス総合研

〔目的〕セファロリジンや制癌剤シスプラチンなどの薬物は、主に腎尿細管を障害することにより有害作用を発現することが知られている。今回、新規化合物である HX-1920の薬物性腎障害に対する作用を検討した。さらに、腎皮質切片を用いて、シスプラチンなどによる過酸化脂質増大に対する HX-1920の影響についても調べた。

〔方法〕ラットにシスプラチン (5 mg/kg, i. v.)、セファロリジン (1 g/kg, i. p.) 又は HgCl₂ (1 mg/kg, i. p.) 及び HX-1920 (250 mg/kg, p. o. for 3 days) を投与し、尿中に排泄される酵素やブドウ糖を腎障害の指標として測定した。また、腎皮質切片をインキュベートし、反応液に遊離する過酸化脂質量を TBA法により測定した。

〔結果〕シスプラチンの投与は尿中への酵素 (LDHやNAG) およびブドウ糖の排泄を増大した。ラットにあらかじめ HX-1920を投与することにより、シスプラチンによる尿中への LDHやブドウ糖の排泄増大は軽減された。しかし、このような軽減効果は、シスプラチン投与後における HX-1920処置では観察されなかった。セファロリジンや HgCl₂投与による尿中酵素やブドウ糖排泄増大に対しても、HX-1920は顕著な抑制作用を示した。腎皮質切片において、シスプラチンのみならずセファロリジン又は HgCl₂は過酸化脂質を増大し、この増大は HX-1920により抑制された。

〔結論〕これらのことから、HX-1920は抗酸化作用を有すると考えられる。それ故、HX-1920前処置が、シスプラチン、セファロリジン又は HgCl₂の投与にともなうフリーラジカルの発生を消去することにより、それらの腎障害を軽減する可能性が示唆される。

0-312 ラットでの Cd-メタロチオネイン投与時の尿中 Cd の排泄および腎機能の変化について

照井 潤, 林 泰司, 曾山桃子, 深田 真, 須藤純一, 田辺恒義

東日本学園大学薬学部毒理学講座

〔目的〕 Cdによる腎障害機序の解明のため、CdCl₂ あるいは Cd-メタロチオネイン II (Cd-MT-II) の静脈内投与時の尿中 Cd の排泄および腎機能の変化について調べた。

〔方法〕 麻酔した雄性 S.D. 系ラット (200 g) に尿管カテーテルを施し、CdCl₂ あるいは Cd-MT-II (0.3 mg Cd/kg) を静脈内投与し、10分毎に尿を採取した。必要時には血液を採取した。尿中 Cd は原子吸光光度計により、腎機能は尿量、血中および尿中のイヌリンおよびパラアミノ馬尿酸を測定することにより調べた。

〔結果〕 尿量は Cd-MT-II 投与により増加した。糸球体ろ過率は、CdCl₂ 投与により増加した。尿中 Cd 濃度は、Cd-MT-II 投与の際は、投与直後が最も高く、その後漸減した。イヌリン補正した尿中 Cd 濃度は、同様の傾向を示したが、その補正濃度は未補正濃度に比べ、約 1/10 であった。CdCl₂ 投与の際は、尿中では Cd は極めて低値を示し、検出されない場合もあった。

〔考察〕 静脈内投与された CdCl₂ の Cd はほとんどがアルブミンに結合することが知られている。したがって、CdCl₂ 投与の際に、尿中では Cd は極めて低値を示したことは、Cd-結合アルブミンがその分子量が大きいために糸球体基底膜での通過が阻止されることによると推測された。また、Cd-MT-II 投与の際の尿中 Cd 濃度はイヌリン補正した尿中 Cd 濃度の約 10 倍であり、集合尿細管末端では極めて高濃度の Cd に曝されることが証明された。それにもかかわらず、遠位側尿細管では Cd による障害が報告されていないことから、その Cd に対する抵抗性が大きいことが判明した。加えて、Cd-MT-II は水の再吸収を抑制し、また、CdCl₂ は糸球体ろ過率を増加させることが証明された。

経気道的に石炭フライアッシュを投与したマウス
における含有金属元素の挙動

江坂文孝, 高橋千太郎*, 佐藤宏*, 菊地正, 古谷圭一

東京理科大・理 *放医研

〔はじめに〕 火力発電所等における石炭燃焼により大気中へ放出されるフライアッシュを吸入することにより, 呼吸器に種々の障害が発生し, その毒性発現に含有される種々の重金属が関与していることが明らかにされている。しかし, 石炭フライアッシュを吸入した後の生体内における粒子からの金属元素の溶解, および各臓器でのそれらの金属元素の蓄積については十分に検討されていない。本実験では, 粒径-密度分離法によって粒子組成を均一にした石炭フライアッシュ粒子をマウスの肺に気管内挿管法にて投与し, 肺, 腎臓, 脾臓および肝臓中の金属元素濃度を測定して, 石炭フライアッシュ含有金属元素の生体内での挙動について検討を行った。

〔方法〕 石炭フライアッシュとしては, オーストラリア炭を工業燃焼炉で燃焼させた後, バッグフィルターで捕集した粒子を著者らの開発した方法⁽¹⁾で粒径-密度分離したものをを用いた(粒径 $1-5\mu\text{m}$, 密度 $2.4-2.8\text{g/cm}^3$)。この粒子を生理食塩水(10%エタノール)に懸濁した後, 1分間超音波で分散させ, C3H/He系マウスの肺に気管内挿管法で投与した。投与後, 1, 2, 4, 8, 16週目に放血屠殺した動物から肺, 腎臓, 脾臓および肝臓を摘出し, HF-HNO₃-HClO₄酸分解法により溶解して分析に供した。金属元素の定量はICP発光分光分析装置(Jarrell Ash Plasma Atom Comp 90-975型)および原子吸光度計(Hitachi Z-8000型)を用いて行った。

〔結果〕 各臓器中の金属元素の定量は石炭フライアッシュに含有されるAl, Ca, Fe, Mg, Ti, MnおよびNiについて行った。まず, 肺における金属元素の挙動を各金属元素のAlに対する比を用いて検討したところ, Fe, TiおよびMgが16週にわたってほぼAlと同様の挙動を示し, 元素量はそれぞれ投与後16週で約50%に減少した。これに対し, Ca, MnおよびNiの比は投与後の時間経過に伴って減少する傾向を示し, 難溶性とされる石炭フライアッシュ粒子からもこれらの金属元素が溶出していることが示唆された。肺以外の臓器では, Al, FeおよびTiの濃度は各臓器において変化はみられなかったが, Ca, Mg, MnおよびNiの濃度が各臓器において上昇した。特に, Niは腎臓に, Mnは肝臓に集積する傾向が認められた。したがって, 肺に取り込まれた石炭フライアッシュ粒子はマクロファージなどにより体外に粒子として除去されるが, NiやMnなどの一部の金属元素は肺において粒子から溶出し他の臓器に運ばれる可能性が示唆された。しかし, 各臓器におけるこれらの金属元素の濃度の上昇は必ずしも大きくはなく, また, これらの金属元素の毒性も比較的小さいことから臓器に対する影響はほとんど無視できる程度と考えられる。

(1) Furuya, K. et al. (1987): Environ. Sci. Technol., 21(9), 898

高週齡ラットの血中成長ホルモン及びプロラクチン
変動について

藤井登志之，松本正博，義澤克彦，大石裕司，勝木昭次

藤沢薬品工業株式会社 安全性研究所

高週齡（26，52，78及び104週齡）ラットの血中growth hormone（GH）及びprolactin（PRL）濃度をradioimmunoassay法で測定し，同時に下垂体の組織学的観察を行ったので，その結果を報告する。GH濃度：各週齡とも雄に比べ雌で高値を示した。雄では78週齡まで減少する傾向がみられたが，雌では殆ど変動を認められなかった。雌雄とも104週齡で増加傾向がみられ，期間中の最も高い値を示した。PRL濃度：26週齡では雌雄に差はみられなかった。雄では78週齡まで著変を示さなかったが，雌では52週齡で著明な増加がみられ以降，加齡とともに更に増加する傾向を示した。雄は104週齡で急激な増加がみられ，雌雄いずれもこの時点で期間中の最高値を示した。組織学的所見：26週齡では雌雄とも特に著変は認められなかった。雌雄とも52週齡以降で異常所見がみられた。すなわち，52週齡雄で過形成及び腺腫各1例，雌で大部分の例で過形成を，104週齡雌雄の約半数例に腺腫を認めた。以上の結果より，今回用いたラットでは生後1年前後より雌雄とも下垂体を形成している細胞に形態学的あるいは数量的に変化がみられ，雌ではほぼ同時期より血中PRL濃度の著明な増加を示した。また，生後2年では雌雄ラットに下垂体細胞の腫瘍性変化を示す例数が増加し，同時に血中GH及びPRL濃度に異常な高値を示す例が増加することが確認出来た。但し血中GHあるいはPRL濃度の増加と下垂体の細胞増殖の関係は必ずしも一致するものではなかった。

ラット肝細胞スフェロイドの小径化について

遠藤健一、上野光一、竹澤俊明*、山崎 学*、森 有一*、
佐藤哲男

千葉大・薬・薬物、*グレース日本・中研

【目的】我々は昨年日本毒科学会学術年会において、温度感受性ポリマーを用いることによるラット肝細胞スフェロイド形成法と、本スフェロイドを用いた実験的急性肝障害モデルの作製について報告した。本スフェロイド形成法はスフェロイド構成細胞数の調節が容易であり、任意にスフェロイド粒子径を制御することが可能である。そこで本研究では、径の異なる3種のスフェロイドを簡便に作製する方法を開発し、その生化学的差異について検討したので報告する。

【方法】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とI型コラーゲンの均一混合物を基質として、単離したラット肝細胞をその基質上に播種し、接着させた。その後培地温度を下げることで得られる細胞シートを浮遊培養し、自発的にスフェロイドへと収縮凝集させた。また、粒子径の異なるスフェロイドは、予め任意の直径で溝を入れた細胞接着用器財を用い、大きさの異なる細胞シートを回収することで作製した。

【結果および考察】直径5、8、18mmの3種の細胞シートから得られたスフェロイドについて検討した結果、回収した細胞シートは剥離直後から急速に収縮しはじめた。剥離5日後ではほぼ収縮凝集が完了し、シート径の約1/10程度の径を持つスフェロイドが形成された。いずれのシートもその収縮速度には差が見られなかったが、直径18mmのシートは剥離24時間以内でのDNA含量の低下、LDHの漏出が他の2種よりも大きく、形成されたスフェロイドの内部は大半が壊死していると考えられた。また、C.parvum-LPSによる実験的急性肝障害モデルにおけるLPSに対する応答性は、3種の細胞径シートのいずれもがその収縮凝集が進行するにつれて、応答性を増す傾向を示した。肝障害モデルにおける肝細胞スフェロイドの小径化の有用性について併せて考察する。

一般演題(ポスター)

7月29日(木)

(千葉市民会館小ホール)

演題番号 P-101 ~ P-145

Neutrophil Mediated Cytotoxicity of Cisplatin

Hyuck Jai Choi, Se-Young Choung

College of Pharmacy, Kyung Hee University

Cisplatin, an antitumor agent with a dose limiting adverse effect of nephrotoxicity has been widely used in clinical treatment. Therefore, the investigation of the nephrotoxic mechanism of cisplatin was the most important key on the development of nephrotoxicity reducing agent. To clarify that the cisplatin induced nephrotoxicity was cell mediated or not, we compared the cytotoxicity of cisplatin to primary cultured proximal tubular cells of rabbit kidney with or without neutrophils. Neutrophil mediated cytotoxicity of cisplatin was 20 times higher than that of cisplatin alone. And, the addition of radical scavengers to the incubation medium almost completely inhibited neutrophil mediated cytotoxicity. Also, the increase of malondialdehyde level in primary cultured kidney cells with cisplatin and neutrophil treatment was greatly inhibited by radical scavengers. Additionally, we determined the quantitative change of phospholipids by the measurement of lipid phosphorus. In cisplatin and neutrophils treated kidney cell, amount of total phospholipid and that of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine were greatly reduced in a dose dependent manner. These decrease were recovered to normal level by the treatment of radical scavengers.

Above results suggested that free radicals generated by cisplatin treated neutrophils may interact with membrane phospholipids to cause the production of lipid peroxides that damage membrane function of renal tubular cells

ニトロナフタレン類の還元特性—酵素化学的還元活性と電気化学的還元性との相関

岩田修永、原 修一、遠藤任彦、福原 潔¹、鈴木和博²、高橋 博²、宮田直樹¹東京医科大学・法医学教室、国立衛生試験所・¹有機化学部、²代謝生化学部

【目的】

ニトロ芳香族炭化水素類（ニトロアレーン）の代謝的活性化において、その初発段階に関与するニトロ基の還元反応は、*o*-アセチル化反応と共に重要な因子の一つと考えられる。今回我々は、ニトロアレーンでは最も基本的な構造を有するモノ-(1-, 2-)、ジ-(1,3-, 1,5-, 1,7-, 1,8-)、トリ-(1,3,5-, 1,3,8-) ニトロナフタレンの酵素的還元性と酸化還元電位との相関性について検討した。

【方法】

ラット肝臓より、常法に従って肝ミクロソーム画分および可溶性画分を調製した。各種ニトロナフタレン類に対するニトロ還元活性は、ミクロソーム画分の場合は電子供与体としてNADPHを、可溶性画分の場合はNAD(P)Hまたはヒポキサンチンを用いてサクシニル化チトクローム *c* の還元速度より測定した。ニトロナフタレン類の一電子酸化還元電位は、過塩素酸テトラエチルアンモニウムを含むジメチルホルムアミド溶液に溶解して、サイクリックボルタンメトリー法により測定した。

【結果および考察】

ニトロナフタレン類の還元活性は、酵素標品としてラット肝臓ミクロソーム画分および可溶性画分のいずれを用いても、トリ->ジ->モノニトロナフタレンの順に高かった。NADPHを電子供与体としたミクロソーム画分のトリニトロナフタレン類に対するニトロ還元活性は、いずれの電子供与体を用いた可溶性画分中のニトロ還元活性よりも著しく高かった。可溶性画分によるニトロ還元活性には、電子供与体としてNADPHよりもNADHおよびヒポキサンチンがより効果的であった。また、ナフタレンの構造上 β 位にニトロ基を有するものは、 α 位のものよりも還元され易かった。これらの酵素化学的還元性は、サイクリックボルタンメトリー法によって測定した一電子酸化還元電位と良い相関性を示した。

Ref.) Iwata *et al.* Chem. -Biol. Interact. 85, 187-197 (1992)

TOXIC EFFECTS OF BUTANE GAS TO RATS

Dai Byung KIM, Jong Kwon LEE, Duck Joo RHIE, Pu Young KIM

Department of Toxicology, National Institute of Safety Research,
5-Nokbung dong, Eunpyungku, Seoul, Korea

ABSTRACT—This study was carried out to investigate the effect of butane inhalation on behavior and cardiovascular system with wistar rats. Rats consist of acute 2hrs exposure group and subchronic group exposed 2 hrs a day, 5 days a week for 4 weeks in the 0.5 m³ whole body exposure chamber. The changes of locomotor activity, conditioned active avoidance and cardiovascular system were tested. Locomotor activity was increased initially in butane exposure group compared with control in acute exposure and calmed down to the control after 20mins. In repeated exposure one, locomotor activity was rapidly increased initially from butane exposure compared with control and kept higher until cessation of butane exposure. Conditioned active avoidance was not significantly changed compared with control. Mean blood pressure and pulse pressure were significantly decreased compared with control in acute exposure group ($p < 0.01$). However, significant change of heart rates was not observed. In subchronic exposure group, mean blood pressure and pulse pressure was significantly decreased compared with control same as acute exposure one. But significant difference between two groups was not observed. Hypoxic effect of N₂ induced decrease of mean blood pressure. However, there was no significant difference compared with that of butane.

幼若および成熟ラットにおけるレボフロキサシン
経口投与時の血清および軟骨内薬物濃度

○大川原聡、高田早苗、加藤道幸、梶村哲世、高山敏

第一製薬（株）開発研究所 安全性研究センター

レボフロキサシン(LVFX)は当社で開発中のキノロン系合成抗菌剤である。キノロン系抗菌剤の副作用の一つとして関節毒性がよく知られており、その毒性発現には週齢差が認められている。

LVFX(300 mg/kg/day)を1週間経口投与したところ、関節軟骨病変が幼若ラットのみに認められた。週齢差の要因の一つとして、関節軟骨への薬物移行性の差が考えられたので、今回、幼若(4週齢)および成熟SDラット(12週齢)にLVFXの100または300 mg/kg/dayを単回または1週間反復経口投与し、投与後1時間および24時間に血清および大腿骨遠位端関節軟骨内の薬物濃度を測定した。測定にはHPLC法を用いた。

単回投与1時間後の血清中および軟骨内薬物濃度は、幼若ラットと成熟ラットの間で有意な差はなく、幼若でやや低い値を示した。単回投与24時間後の薬物濃度は幼若・成熟ラットともに定量限界付近であった。

反復投与1時間後の血清中および軟骨内濃度は、成熟ラットでは、単回投与時とほぼ同じ値を示したが、幼若ではやや低かった。また、幼若・成熟ともに反復投与24時間後の軟骨内濃度は、単回投与後24時間の値より高い傾向を示し、軟骨内への薬物の蓄積が示唆された。

以上のように、血清および軟骨内薬物濃度には用量相関性が認められたが、幼若ラットと成熟ラットとの間には著しい差は認められず、むしろ関節毒性の発現しない成熟ラットの方が高い薬物濃度を示した。また、反復投与による軟骨への薬物の蓄積も同程度であった。

これらのことから、LVFXによる関節毒性発現の週齢差に、薬物の組織移行性は関与しないことが示唆された。

**EFFECTS OF METHAMPHETAMINE HYDRO-
CHLORIDE ON NEUROLOGICAL FUNCTION IN RATS**

Dae Hyun CHO, Se Jin HWANG, Won Yong LEE, Kang CHIN

National Institute of Safety Research, Seoul, Korea

Methamphetamine(MAP) is known to be a CNS stimulant which increases the release of dopamine at dopaminergic nerve terminal. To investigate the neurotoxic effects of MAP on dopaminergic system, monitoring of spontaneous motor activity(SMA), quantitative light microscopic analysis of tyrosine hydroxylase(TH) immunoreactivity in substantia nigra pars compacta(SNPC), corpus striatum(CS), ventral tegmental area(VTA) and nucleus accumbens(NA), and electron microscopic observation of dopaminergic nerve terminals in CS and NA were performed. SMA was increased by 2hrs after single dose(5mg/kg) of MAP and decreased by repeated dose(5mg/kg, every 12hrs for 10 consecutive days). Nigrostriatal TH immunoreactivities were increased by single dose(10mg/kg) and decreased by repeated doses(10mg/kg, every 12hrs for 10 consecutive days) of MAP. Degenerative changes in axon terminals and dendrites induced by repeated doses(10mg/kg, every 6hrs for 30hrs) were observed. It is consequently suggested that dopaminergic system is activated by single dose of MAP but depressed by repeated doses, and these changes may be related to terminal degeneration.

Keywords: methamphetamine, neurotoxicity, spontaneous motor activity,
dopaminergic system, immunohistochemistry, electron microscopy

ジエチルニトロサミンのラット肝毒性
に与えるモリブデンの影響

小泉利明、田島健一、恵美伸男、鈴木和夫

千葉大・薬

【目的】モリブデンはある種のニトロソ化合物により誘導される食道癌、乳腺癌などを抑制することが知られているが、その機序は明かでない。しかし、モリブデンはラット肝臓においてジエチルニトロサミン(DEN)の代謝を促進するので、薬物代謝活性と関連して、またその細胞毒性を抑制することにより、発癌を抑制することが考えられる。本報告ではそれらニトロソ化合物による発癌に対するモリブデンの抑制機序を明かにするため、DEN投与後の肝傷害および単離肝細胞におけるDENのDNA損傷能に対するモリブデンの影響を検討した。

【方法】モリブデン酸ナトリウム(Mo) 10 ppmを含む飲料水を3週間与えた後、50 mg/kg体重のDENを1回腹腔内投与し、1、3および5日後に血清中LDH活性、肝臓中過酸化脂質濃度を測定した。また、フェノバルビタールナトリウム80 mg/kg体重を1日1回3日間腹腔内投与したラットから単離した肝細胞をMoで前処理(20 μ Mを含む37 CのHanks溶液中で20分incubation)した後、DENに暴露させDNA損傷能、細胞内遊離カルシウム濃度の変化などを測定した。

【結果】Mo前処理群ではDENを投与しても血清中LDH活性は実験期間中上昇しなかったが、未前処理群では1日後から上昇した。しかしMo前処理群では3日後、過酸化脂質濃度が未前処理群より上昇した。

インビトロにおいてMoの前処理をしない肝細胞ではDEN処理により、DNA損傷や細胞遊離カルシウム濃度の上昇が起きたが前処理をした細胞では起きなかった。

【考察】DENによる肝傷害の発現機構の一つとして、代謝過程で発生する活性酸素が細胞内カルシウム代謝を攪乱する結果、カルシウム依存の核内エンドヌクレアーゼを介したDNA損傷が起こることが考えられる。Moはそのようなカルシウム代謝の攪乱を抑制することにより、細胞傷害や発癌性を抑制すると思われる。

Studies on Values of Procollagen type III Peptide and hydroxyproline in the Rat Liver Cirrhosis Induced by Dimethylnitrosamine

Yong-Soon Lee, Jae-Jin Cho

College of Vet. Med., Seoul National University

This study was carried out to investigate whether the level of serum procollagen type III peptide and hydroxyproline contents in the liver were correlated to fibrosis during development of cirrhosis in rat livers

Two groups of rats were dosed with dimethylnitrosamine (10 μ l/kg body weight) intraperitoneally three times a week for 3 weeks and another two groups of rats were given carbon tetrachloride once a week for 10 weeks (initial dose was 0.08 ml per rat). Serum procollagen type III peptide levels and hydroxyproline contents in the liver of the rats given dimethylnitrosamine and carbone tetrachloride were examined and the fibrotic livers were also observed with light microscope.

The results obtained were as follows:

1. Liver cirrhosis was developed within 3 weeks by dimethylnitrosamine while it was possible within 10 weeks by carbon tetrachloride in the rats.
2. Procollagen type III peptide levels in dimethylnitrosamine treated rat sera were 3 times higher than those of control and carbon tetrachloride treated rats.
3. Hydroxyproline contents in dimethl nitrosamine treated rat liver tissues were also 3 times lager than those of control and carbon tetrachloride treated rats.
4. Procollagen type III peptide was clearly detected immunohistochemically in the liver of rat given dimethylnitrosamine or carbon tetrachloride.

Those results indicate that dimethylnitrosamine rapidly induces liver cirrhosis and the levels of the serum procollagen type III peptide and hydroxyproline contents in the liver are diagnostic markers in the liver cirrhosis of rats.

Key words: Liver Cirrhosis, procollagen type III peptide, hydroxyproline, carbon tetrachloride, dimethylnitrosamine, rats.

ラットにおけるインドメタシンの体内動態と潰瘍形成の関連性について

浅野間久恵，田中剛太郎，藤岡秋生，犬伏正憲，丸伝章

大鵬薬品工業（株）製薬センター安全性研究所

〔目的〕非ステロイド系抗炎症剤であるインドメタシン（IND）を絶食ラットに投与し，血漿中のIND濃度と消化管の潰瘍発生の関連性について検討した。

〔方法〕7週齢の絶食したSD系雄ラットにINDを5，10および20mg/kgの用量で単回静脈内および単回経口投与し，経時的に血漿中IND濃度をHPLCにより測定した。投与後4，8および24時間後にエーテル麻酔下で屠殺し，消化管の潰瘍を実体顕微鏡下で観察した後20%中性緩衝ホルマリン溶液で固定し，常法によりHE染色し光学顕微鏡下で観察した。

〔結果および考察〕血漿中IND濃度およびAUCは静脈内および経口投与ともに用量相関が認められ，投与量に対して線形性であった。一方，消化管においては投与後4および8時間では静脈内および経口投与とも主に腺胃に潰瘍がみられた。投与後24時間では静脈内投与は腺胃～大腸に，経口投与は主に空腸以下の消化管に潰瘍がみられた。潰瘍発生の強さは静脈内投与の方が経口投与より強く，小腸～大腸潰瘍の発生時期も早かった。光学顕微鏡下の観察においても経口投与ではびらん（主に出血性びらん）であったのに対し，静脈内投与では潰瘍がみられ進行度においても明かな差がみられた。これは静脈内投与における血漿中IND濃度およびAUCが経口投与の値より高かったことによると考えられた。血漿中IND濃度あるいはAUCと潰瘍発生の強さの相関をみると，静脈内投与の4および8時間では相関が認められなかったが，静脈内投与の24時間，経口投与の4，8および24時間では相関が認められた。このように血漿中IND濃度が高く投与から解剖までの時間が短いと病変にまで至らず，血漿中IND濃度に相当する潰瘍発生在みられなかったが，総じて血漿中IND濃度およびAUCは投与量と相関し，さらにこれらは潰瘍発生の強さとも相関することがわかった。

哺乳動物肝カルボキシルエステラーゼによる
Acetylamino fluorene 水解活性の種差

○Rui MING、細川 正清、佐藤 哲男

千葉大学薬学部薬物学研究室

【目的】カルボキシルエステラーゼ (CEase) は、エステル結合やアミド結合を効率良く加水分解する酵素として知られており、薬物や毒物の代謝活性化機構に重要な役割を果たしている。演者らはこれまでラットを初めとする多くの哺乳動物肝ミクロゾーム画分よりアイソザイムを精製し、諸性質について検討してきた。今回、これらの精酵素の有するAcetylamino fluorene(AAF)水解活性について検討を行なったので報告致します。

【方法】AAF水解活性は、SD系ラット、ICR系マウス、Golden Syrian系ハムスターおよびHartley系モルモット肝ミクロゾーム画分および、これらの哺乳動物肝より精製したアイソザイムを用いて測定した。

【結果・考察】AAF水解活性を、上記4種の哺乳動物肝ミクロゾーム画分を用いて調べたところ、比活性はハムスター>>モルモット>ラット>マウスの順で、種差が認められた。つぎに、これら肝ミクロゾーム画分のAAF水解活性について、セリン水解酵素の阻害剤であるDFP、およびCEaseの特異的な阻害剤であるBNPPを用いて検討したところ、両阻害剤ともに顕著な阻害が認められ、この水解にCEaseが関与している可能性が示唆された。また、BNPPを用いて阻害様式を調べたところ、競合阻害の様式を示した。さらに、精製肝CEaseを用いてAAF水解活性を比較したところ、ラットCEase RL2 アイソザイムで最も高いAAF水解活性が認められた。また、各アイソザイムの抗体を用いて阻害実験を行なったところ、抗RL2-IgGでは約80%、抗H1-IgGでは約40%の活性阻害が認められた。以上の結果より、哺乳動物種肝ミクロゾーム画分中のAAF水解活性の種差は、CEaseの特性の差異を反映している可能性が考えられ、AAF水解を介した毒性の発現機構における本酵素の関与が示唆されたので、現在、肝CEaseによるAAFの代謝活性化の種差について変異原性試験法も含めて検討中である。

シリアンハムスターにおけるベンゾピレン代謝と
P450分子種

○孫歩祥¹⁾、福原守雄¹⁾、高仲正²⁾

¹⁾ 国立公衆衛生院・衛生薬学 ²⁾ 国立衛生試験所・薬理

発癌物質の代謝活性化を担うチトクロムP450についての種差を調べるために、シリアンハムスターにおけるベンゾピレンに対する代謝特性を調べた。

まずベンゾピレン代謝活性の誘導についてみるために、種々の誘導剤を投与したハムスター雄の肝ミクロゾームにおけるBenzo[a]-pyrene 3-hydroxylase活性とAmes試験による代謝活性化能の測定を行った。次に各種のP450分子種に対する抗体を用いて、これらの活性の抑制度とウエスタンブロットによる分子種の誘導をみた。

Benzo[a]pyrene 3-hydroxylaseは3-MethylcholanthreneよりはむしろPhenobarbitalにより誘導された。突然変異原性活性に関しては3-MethylcholanthreneおよびPhenobarbitalによって誘導されたが、Dexamethasone、Ethanol等では誘導は起きなかった。抗体抑制実験よりハムスターでベンゾピレンの代謝に関与しているP450分子種はCyp1A2、Cyp2A、Cyp3A等に相当するものであることが推定された。

分泌期エナメル芽細胞のゴルジ装置における
コルヒチンの作用機序について

松尾三郎、清宮健一、吉川亜貴、暮部 勝

大阪府立大学・農・獣医・毒性

コルヒチンが、微小管を破壊することで分泌を抑制し、細胞内での分泌顆粒や小胞の蓄積およびゴルジ装置の断片化を引き起こすことは、よく知られている。しかし、断片化したゴルジ装置の機能的変化についての研究は少なく、まだ明かではない。本研究では、コルヒチンにより導かれるゴルジ装置の機能的変化および、その毒性機序を明らかにするための一助として、コルヒチン存在下で器官培養したラット下顎臼歯歯胚の分泌期エナメル芽細胞を用いて、 OsO_4 染色性、TPPase活性、Acpase活性の分布変化を組織化学的に観察し、ゴルジ装置のcompartmentの確立に対する影響を調べた。さらに、 3H -prolineのautoradiographyによりコルヒチンで導かれる細胞内輸送系の変化を調べ、ゴルジ装置で見られる変化の作用機序を考察した。(材料・方法)前記歯胚を、50% O_2 を含む混合気体下で、BGJb培地を用いて最大6時間培養した。コルヒチン処理は10 μ M/mlの濃度で行った。 OsO_4 染色は Friend (1969)、TPPase活性は Novikoff and Goldfisher (1961)、Acpase活性は横山 (1980)の方法により行い電顕観察した。Autoradiographyは、2時間の予備培養後 3H -prolineの30分pulse、0, 30, 90分chaseを行い、電顕観察により形態計測した。(結果)対照群の歯胚では、ゴルジ装置の各compartmentに一致して OsO_4 染色性、TPPase活性、Acpase活性がそれぞれ、cis, trans compartmentおよびTGNで特異的に見られたが、コルヒチン群ではゴルジ装置内での各compartmentの確立は消失し、 OsO_4 染色では、全てのsacculeが染色性を示すstackや、全く染色性を示さないstackが見られた。TPPaseやAcpase活性もコルヒチン処理により多くのstackで消失していた。autoradiographyではコルヒチンによりrERからゴルジ装置への輸送が阻害されることが示された。これらの結果は、コルヒチンによりゴルジ装置は各compartmentの区分を消失することが示され、その機序としてrERからの輸送阻害の関与が示唆された。

非A非Bおよび非Cのアルコール性肝障害における
臨床病理学的検討別枝 和彦¹⁾、小林 幸²⁾、丸伝 章¹⁾、藤原 陸憲²⁾¹⁾ 大鵬薬品工業(株)製薬センター安全性研究所²⁾ 日本赤十字社医療センター中央検査部

【緒言】近年、我国ではアルコール飲酒量の増加に伴いアルコール性肝障害(以下、ALD)が増加している。その障害はC型肝炎(以下、C-CH)との合併が多いとされてきたが、最近HCV抗体検査の精度向上(第2世代)により、C-CHとの合併の有無を正確に鑑別診断できるようになった。そこで、我々は純粋なALDの臨床病理学的パラメーターを検討した。

【対象および方法】非A非Bおよび非CのALDと臨床診断された患者20例(男性19例、女性1例、平均年齢 45.7 ± 9.2 歳)について、顕微鏡的観察を行い、線維化の程度からALDを軽度、中等度および高度にわけ、臨床検査および電顕的所見の比較検討を行った。また、ALD患者20例とC-CH患者10例(男性5例、女性5例、平均年齢 51.2 ± 12.8 歳)の比較も行った。

【結果】ALDにおける線維化の程度による比較については、線維化が高度になるに従い、肝細胞内ミトコンドリア結晶体の増加、伊東細胞数の減少およびICG停滞率の増加がみられた。ALDおよびC-CHの比較については、ALDのほうがC-CHよりも、hexagonal crystal、肝細胞小胞体拡張、リホフスチン集積、毛細胆管microvilliの平低化が高頻度にみられ、伊東細胞に含まれるビタミンA顆粒の大きさおよび数が、小型で多い傾向を示し、 γ -GTP活性の増加がみられた。なお、ミトコンドリア結晶体および伊東細胞数には差がみられなかった。

【考察】ミトコンドリア結晶体、伊東細胞およびICG停滞率は、線維化の程度と関連があり、hexagonal crystal、小胞体、リホフスチン、microvilli、伊東細胞ビタミンA顆粒および γ -GTP活性は、ALDとC-CHの診断上意義深いと思われた。

イヌの肝臓における薬物代謝酵素の誘導
Acetone 投与に対する反応

○菅野昭永, 真鍋淳, 大橋芳彦, 矢本敬, 高岡雅哉, 安田充也

三共(株)安全性研究所

[目的] イヌにおける肝薬物代謝酵素誘導の報告は少ない。昨年本学会において phenobarbital 投与後の反応を報告した。今回, acetone(AT)をイヌに投与し誘導される肝薬物代謝酵素の基質特異性および誘導されるチトクローム P-450(P-450)のアイソザイムを調べてラットと比較した。

[方法]

供試動物 : 三共(株)安全性研究所生産の雌雄各4例のビーグル犬

動物群 : 5% AT 水溶液 100 ml/body 投与(雌雄各2例)

無処置(雌雄各2例)

投与方法 : 9日間連続強制経口投与

肝臓の生化学的検査: P-450量,

methoxycoumarin 0-demethylase(MCOD)活性,

ethoxycoumarin 0-deethylase(ECOD)活性,

propoxycoumarin 0-depropylase(PCOD)活性

P-450の免疫学的特異性: ラットP-450の各アイソザイムに対する抗体を用いてウエスタンブロッティング法にて検索

[結果および考察] 対照群に比較して AT 投与群では P-450 量が有意に増加し, MCOD, ECOD および PCOD 活性が有意に高く肝薬物代謝酵素の誘導が確認された。この反応は AT をラットに投与した場合と類似していた。さらに, ラット P-450 の各アイソザイム (P-450IA1, IIB1, IIE1, IIIA) に対する抗体を用いて, 本実験で誘導されたイヌ P-450 の免疫学的特異性を検索した結果, イヌで誘導された P-450 はラットの P-450IIE1 と免疫学的に交差反応を示すことが明らかとなった。

P-114 甲状腺摘出ラットへのPhenobarbitalとFluconazole
投与時の血中 T4・T3 量および肝ミクロゾーム活性

滝沢節子、○山本恭子、堀井郁夫

日本ロシュ(株)研究所、毒性・病理部

Phenobarbital(PB) やある種の抗真菌剤は、長期投薬により肝細胞腫大・腫瘍と共に、甲状腺腫大・腫瘍をも引き起こすことが知られている。その機構は薬物の直接的な癌原性作用ではなく、肝臓での著明な酵素誘導(ミクロゾーム酵素増加)を介して甲状腺ホルモンの排泄が増加し、甲状腺が過剰の TSH刺激を受ける事に起因していると考えられている。しかし、抗真菌剤 Fluconazole (FC) の投薬においては、肝臓の腫大は認められたが、甲状腺には変化を及ぼさなかった。今回、フィードバックがかからず、甲状腺ホルモン分泌量が一定であると想定されるモデル動物(甲状腺摘出+浸透圧ミニポンプでT4・T3注入)を用いて、血中甲状腺ホルモン量および肝ミクロゾーム活性について PB と FC 投薬群を比較した。

[方法] 甲状腺摘出ラットの皮下にミニポンプの埋め込みを行い (Day-3)、3日後 (Day0)に PB (75mg/kg) および FC (100mg/kg)の投薬を開始した。Day10 に肝ミクロゾームを調製し、T4に対する UDP-glucuronosyltransferase 活性 (GT) を求めた。血中甲状腺ホルモン濃度測定を、Day-3, 0, 4, 7 および 10の血清について RIA で実施した。

[結果] PB群および FC群共に対照群に比べ、血中 T4 濃度の減少および GT 活性の増加を示し、両薬物間に程度の差は認められなかった。しかし、血中 T3 濃度については Day4 において、FC群の方がPB群よりも減少率が低かった。この事より、FCでは血中 T3 濃度の減少率が低いことが、甲状腺の異常につながらないことの一因ではないかと考えられた。

ラットでの Cd-メタロチオネイン投与による腎、肝、血漿中での Cd の動態について

林 泰司, 照井 潤, 曾山桃子, 深田 真, 須藤純一,
田辺恒義

東日本学園大学薬学部毒理学講座

〔目的〕 Cdによる腎障害機序の解明のため、CdCl₂あるいは Cd-メタロチオネイン II (Cd-MT-II) の静脈内投与時の腎、肝、血漿中での Cd の動態について調べた。

〔方法〕 雄性S.D.系ラット (200 g)に CdCl₂ならびに Cd-MT-IIを 0.3 mg Cd/kg体重で尾静脈より投与した。投与後、10, 20, 30, 45, 60, 120 分目、そして1, 2, 3, 5, 7 日目にラットをエーテル麻酔下、開腹し、腹部大動脈より血液を採取し、肝および腎を摘出した。各臓器および血漿中の Cd 含量 (濃度) は湿式灰化後、原子吸光光度計により測定した。さらに、投与後 1および 5日目に腎および肝の病理組織学的検査を行った。

〔結果〕 Cdは、投与直後より血漿中から消失し始め、Cd-MT-II 投与群は CdCl₂投与群に比し、低値を示した。1-コンパート・モデルによる動力学的解析の結果は、Cd-MT-II 投与群は CdCl₂投与群に比し、Cd の体クリアランスは約 2倍であるにもかかわらず、半減期は約 2倍であることから、Cdの臓器から血中へのメタル・シフトが盛んに行われていることが認められた。肝での Cd 含量は、CdCl₂ 投与群の方が高値であり、腎では逆にCd-MT-II 投与群の方が高値を示した。とくに腎では投与後 1日目でピークとなり、その後漸減した。Cd-MT-II の投与の際の腎の病理組織学的検査では、投与後 1日目では近位尿細管の壊死性変化が、5 日目では再生性の変化が顕著に認められた。

〔考察〕 得られた結果は、Cd-MT-II の投与により、Cd-MT-II あるいは Cdは腎の近位尿細管細胞に取り込まれ、Cdの腎からの消失は近位尿細管の壊死および脱落によって為されることが判明した。

○升田真木彦、李 栢俊、数坂昭夫、藤田正一

北大・獣医・毒性学

〔目的および方法〕老人に癌が多発し、あわせてヒトの癌の80%以上が化学物質によるといわれている事実は、老化に伴う解毒能の低下を示唆する。我々は、ラット肝ミクロソームを用いて、加齢によってその異物代謝酵素活性が低下すること、特にチトクロームP-450分子種のいくつかが著しく低下することを明らかにした。老化に伴って発癌物質の毒性作用が増強されるか否かは、その代謝的活性化と無毒化のバランスが加齢によってどのように変動するかによると考えられる。そこで3カ月齢から24カ月齢のラット肝S-9を用いて、代謝的活性化によって変異原性が発現するBenzo(a)-pyrene(BP)、直接変異原物質のFurylfuramide(AF2)およびP-450によって解毒代謝される直接変異原物質Nitrofluorene(NF)の変異原性の変動をAmes法の通常のpreincubation法とそのS-9 mixに抱合反応の補酵素であるGSH(30mM)またはUDPGA(15mM)を加えたpreincubation法によって調べた。

〔結果〕BPの代謝的活性化によるrevertant数は加齢とともに減少し、24カ月齢では3カ月齢の約1/10まで減少した。補酵素UDPGAを加えると各々の月齢でrevertant数は減少し、GSHを加えるとBPを添加していないcontrol levelに近い値まで減少した。AF2では、各月齢ではrevertant数に差はなく、UDPGAを加えても変化は観測されなかったが、GSHを加えると各月齢で一様に約1/2に減少した。Nitrofluoreneでは、3カ月齢S-9でのrevertant数は24カ月齢より少なく、UDPGAあるいはGSHを加えても両方の月齢でRevertant数の減少は僅かであった。

〔考察〕(1)benzo(a)pyreneの代謝速度(活性代謝中間体→抱合体)は老化により顕著に減少し、BPの体内滞留時間が延長する可能性がある。(2)AF2の変異原性に対する感受性には年齢差が無い。(3)Nitrofluoreneの変異原性に対する感受性は老化に伴って上昇する。以上のことから老化に伴い化学物質による発癌のリスクの上昇が示唆された。

モルモット全身性アナフィラキシー反応の惹起抗原量
に関する検討

桑原 孝, 朝波 省吾, 下野 和之, 植島 基雄

(株)大塚製薬工場 鳴門研究所

【目的】モルモット能動全身性アナフィラキシー(ASA)反応は、医薬品の抗原性試験において最も汎用される反応系であり、その惹起抗原量は結果を左右する重要な要因である。一般に、1~10mg/body程度が用いられているが、惹起抗原量設定の根拠となる情報はほとんどない。今回、我々は、卵白アルブミン等を用いて、感作状態の異なる動物を作製し、ASA反応に必要な惹起抗原量を検討した。

【方法】Freund's Complete Adjuvant(FCA)使用の有無により血中抗体価の高い感作動物、低い感作動物を作製した。また、少量の抗血清の静脈内投与により、血中抗体がほとんど無いと思われる受身感作動物を作製した。これらの感作動物について、10~5000 μ g/bodyの抗原によって惹起されるアナフィラキシー症状を観察し、陽性率及び死亡率を求めた。

【結果及び考察】感作時にFCAを使用した感作群では、5000 μ g/bodyの惹起で全例死亡したが、400 μ g/bodyでは反応が減弱し、陰性結果もみられた。FCAを使用しなかった感作群では400 μ g/body、受身感作群では100 μ g/bodyで、それぞれ全例が死亡に至る強い反応が惹起された。しかし、いずれも惹起抗原量を減らすと反応の減弱が認められた。以上、ASA反応は、感作状態が強いほど多量の惹起抗原が必要であり、惹起抗原量が不十分の場合には、血中の抗体で抗原が中和されるためか、反応の減弱やFalse Negativeが起こると考えられた。したがって、惹起には5mg/body以上の十分量を投与すべきであり、PCA反応等で血中抗体がほとんど無いことが確認されている場合でも、最低100 μ g/body以上は必要と考えられた。

P-118 モルモットを用いた maximization test と皮膚反応の比較検討

服部 浩之、山口 文恵、大野 広志、高山 敏

第一製薬(株) 開発研究所 安全性研究センター

モルモットを用いた maximization test (MT) は化学物質の皮膚感作性を評価する感度の高い方法として汎用されている。しかし、MT は外用剤を対象とした試験法で、閉塞貼付による経皮感作を用いることから、医薬品全般の抗原性評価法としては問題がある。一方、皮膚反応 (SR) は抗原性評価の一つとして用いられる方法であり、しかも第 17 回本学会でも報告したとおり、全身性アナフィラキシー反応 (SA) や受身皮膚アナフィラキシー反応 (PCA) よりも検出感度が高い方法である。今回我々は、 β -ラクタム剤である cefmetazole (CMZ)、ceftizoxime (CZX) および cefuroxime (CXM) を用い MT および SR を実施し、その成績を比較して SR の有用性について検討した。MT は Magnusson らの方法に従って実施した。SR は感作物質を FCA とともに 2 週間隔で 2 回皮下投与して感作し、7 日後に感作物質を皮内投与して反応を誘発した。その結果、MT では CMZ、CZX および CXM とともに陽性反応が発現した。SR は、CMZ と CXM で陽性反応が見られたが、CZX は陰性であった。両試験における 3 剤の反応の強さは CMZ > CXM > CZX であり一致した。一方、MT で感作したモルモットで、反応の誘発 7 日後に SA を、また、6 日後に採取した血清を用いて PCA および ELISA を行ったところ、全試験において CMZ のみが陽性であった。

以上の成績から、SR は MT に比較して検出感度は劣るものの、反応傾向は一致することが明らかとなり、化学物質の抗原性評価法として SR が MT と同様に有用であると考えられた。一方、MT の感作方法でも SA、PCA および ELISA の様な、抗体産性に対する評価も行えることが示唆された。

廣瀬明彦、金子豊蔵、小川幸男、鈴木幸子、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

近年の半導体産業の発展、拡充により半導体材料ガスの生産及び輸入量が多くなっている状況の一方で、これら特殊材料ガスによる事故も多くなっている。爆発事故等に対しては、高圧ガス取締法等の改正によりこれら特殊材料ガスにたいする規制が強められているが、毒性に関する情報はその性質からまったく調べられていないものもある。本研究では毒性データの無い物質からジクロロシラン及び四フッ化珪素を選び、急性吸入毒性試験を行なった。

実験動物には、雌雄のWistar/Slcラット（5週齢）を用いた。実験施設は、法改正及び安全性を考慮し、設備の拡充を行なった。設備は、シリンダーボックス、制御盤とドラフトチャンバーに大きく分けられ、各設備内部は既設給排気系を利用して陰圧に保たれる構造とした。シリンダーボックスには、検体ボンベを収納し、ラインには逆止弁を設置した。ドラフトチャンバーには、小型の吸入チャンバーとその排気ラインに除害装置を収納し、チャンバー内圧力もドラフト内に対し陰圧となるようにした。

ジクロロシラン、四フッ化珪素共に刺激性の物質であり、曝露中には、流涙、流せん、呼吸抑制等の刺激による症状が観察された。ジクロロシランのLC₅₀は約200ppmであるのに対し、四フッ化珪素は約2400ppmであった。両物質共に、空気中の水分により加水分解することが知られ、生体中に取り込まれても加水分解すると考えられるが、ジクロロシランと四フッ化珪素の分解産物の違いがLC₅₀の違いに対して大きな影響を与えていることが推測された。

抗甲状腺作用物質の甲状腺腫瘍誘発用量と血中甲状腺刺激ホルモン (TSH) との関連性

○ 小野寺 博志、三森 国敏、安原 加壽雄、下 武男、
*前川 昭彦、高橋 道人
国立衛試・病理、*佐々木研・病理

【目的】抗甲状腺作用物質は、その投与により血中TSHの上昇をきたし、ラット二段階発がん実験で15-20週で甲状腺腫瘍を誘発する。しかし、血中TSHの持続的上昇が腫瘍の発生・進展において不可欠であるか否かは明確にされている訳ではない。今回我々は、これらの関連性を調べるためThiourea (TU) と Sulfadimethoxine (SDM) を用いて以下の実験を行なった。【実験方法】F344雄ラットを用い、実験Iとして、0.1%あるいは0.05% TU、0.025%あるいは0.0125% SDM を含有する蒸留水を一週間投与し、血清中の T_3 、 T_4 およびTSHを測定した。実験IIでは、N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) 1500mg/kg 体重量を一回皮下投与し、一週間後より実験Iと同一用量のTUあるいはSDMを20週間投与し、 T_3 、 T_4 およびTSHの測定と甲状腺の病理組織学的検索を行なった。【結果】実験Iでは、TUとSDM投与全群で T_4 は対照群に比べ有意に低下し、TUとSDMの高用量群で T_3 の低下がみられた。TSHはTUの低用量群以外で有意に上昇した。実験IIにおいて0.0125% SDM群を除いた各投与群で甲状腺重量の有意な上昇が認められた。甲状腺濾胞上皮の増殖性病変の発生率はTUとSDMの高用量群で90%以上に、TUの低用量群で約50%であったのに対し、SDMの低用量群では10%と低率であった。TUの高用量群において T_4 の有意な低下とTSHの上昇がみられたが、その他の投与群でのTSHは対照群と同程度か、むしろ低値を示した。【結語】甲状腺腫瘍発生にはTSHの恒常的刺激が必要とされているが、短期で血中TSHを上昇させる用量の全てが必ずしも増殖性病変を高頻度に誘発するとは限らず、腫瘍発生を認める個体の血中TSHは必ずしも高値を示さないことが判明した。

P-121 白血病細胞L1210のミトコンドリアに対するアスコルビン酸の作用について

角崎英志、信岡大介、清宮健一、松尾三郎、暮部 勝

大阪府立大学・農・獣医・毒性

演者等は、アスコルビン酸 (AA) が癌細胞に対して特異的な殺細胞作用を惹起することを報告してきた。このAAによる殺細胞作用は、AAラジカルの形成によるものではなく、AAの受動拡散による癌細胞内への高い移行に基づく、他の細胞内作用機序に基因すると示唆された。また、AA処置によって細胞壊死に先立って、ミトコンドリアの形態変化が惹起されたことから、今回は、AAの殺細胞機序を明らかにするために、AAのミトコンドリアに対する作用について二、三検討した。癌細胞には、AAに最も感受性の高かったマウスリンパ性白血病細胞L1210を用いた。カチオン性蛍光プローベのローダミン123を用いてミトコンドリア膜電位へのAAの影響を細胞レベルおよび単離ミトコンドリア・レベルでフローサイトメーター法によって観察した。AA (0.5~1.0 mM) をL1210細胞に作用させると、ミトコンドリア膜電位が増加した。なお、このミトコンドリア膜電位増加は、殺細胞作用発現よりも先行した。単離ミトコンドリアでは、ミトコンドリア膜電位は陽性対照のコハク酸 (5 mM) によって有意に増加したが、AA (0.1~5.0 mM) によって影響されなかった。以上の結果から、癌細胞レベルではAAが細胞質に高濃度分布し、ミトコンドリア障害を惹起し、殺細胞作用を発現すると示唆されるが、この作用は還元型AAのミトコンドリアへの直接作用に基づくものではないと考えられる。AAのミトコンドリア障害作用について更に検討する予定である。

須山由美 ○福井英夫 佐藤秀蔵

武田薬品・薬剤安全性研究所

【目的】 消化管障害を誘起する薬物は比較的多い。この消化管障害の発現機序が粘膜に対する直接刺激作用か否かを検討することは薬物の開発上極めて重要である。今回、我々はイヌの十二指腸内に慢性的にカニューレを留置することによって、十二指腸内に直接連続投与できる方法を確立した。更に、本方法を用いてアスピリン(ASA)及びインドメタシン(IM)によって誘起される胃粘膜障害が直接刺激作用か否かについて検討したので報告する。

【方法】 体重8.8~12.5 kgの雄のビーグル犬を1群当り2-3頭、計12頭用いた。十二指腸内へのカニューレの留置手術を行い、術後2週間で実験に供した。ASA (300 mg/kg)あるいはIM (30 mg/kg)は1日1回7日間、胃内あるいは十二指腸内に連続投与した。上部消化管障害の程度は胃内視鏡検査、胃粘膜血流量測定及び剖検により判定し、同時に血漿中薬物濃度を測定した。

【結果】 ASAの代謝物であるサリチル酸の血漿中濃度は経口投与と比較して十二指腸内投与の方が高かった。他方、ASAによる上部消化管障害は経口投与では明確に発現したが、十二指腸内投与では認められなかった。一方、IMIによる胃及び十二指腸粘膜障害及び胃粘膜血流量の低下はいずれの投与によっても強く発現した。これらの結果は、ASAは主に消化管粘膜に対する直接刺激作用により、IMIは直接刺激以外の血中を介した作用により粘膜障害を誘起することを示唆している。以上の結果から、本方法を用いることにより、十二指腸内に連続して投与可能なこと、また薬物による胃粘膜障害の発現機作の解析に応用可能であることが確認された。

イヌにおける硫酸銅誘発性嘔吐に対する末梢5-HT₄受容体の関与

○福井英夫 山本正樹 佐藤秀蔵 佐々木啓

武田薬品・薬剤安全性研究所

【目的】 硫酸銅の経口投与による嘔吐は末梢神経の刺激によって惹起されることは一般によく知られている。今回、我々はその発現機序を解明するために、硫酸銅及び5-HT₄作動薬である5-Methoxytryptamine (5-MOT) による嘔吐に対する5-HT₃あるいは5-HT₄受容体遮断並びに腹部内臓神経切断の効果を検討した。

【方法】 体重6.8~12.8 kgの雌雄のビーグル犬を用いた。硫酸銅及び5-MOTはいずれも100 mg/kgを単回経口投与した。5-HT₃受容体遮断にはICS205930の低用量 (0.01-0.1 mg/kg) 及びMDL72222を、5-HT₄受容体遮断にはICS205930の高用量 (1-3 mg/kg) を用い、いずれの場合も催吐剤の30分前に静脈内投与した。更に、これらの嘔吐に対する迷走神経及び大内臓神経切断の効果について検討した。

【結果】 硫酸銅による嘔吐はICS205930の高用量で有意に抑制されたが、低用量及びMDL72222 (0.5-5 mg/kg, i. v.) では抑制されなかった。5-MOTにより嘔吐が発現し、この嘔吐はICS205930の高用量で有意に抑制されたが、低用量では抑制されなかった。また、これらの嘔吐は腹部迷走神経及び大内臓神経切断により著明に抑制された。

以上の結果から、硫酸銅の経口投与により誘発される嘔吐は非特異的な反射によって発現するのではなく、末梢の5-HT₄受容体を介して惹起されることが示唆された。

硬組織内沈着型鉛塩の腹腔内投与によるラット尿中
 δ -アミノレブリン酸の変化について

○佐野恒吉・山田庄司

昭和大学・歯学部・歯科薬理学教室

我々は歯や骨などの硬組織の成長を観察するために、動物の硬組織内に時刻描記を行うことがある。それには、硬組織を脱灰切片として観察する鉛塩投与の方法と研磨切片として観察するテトラサイクリン(TC)投与による方法などを用いている。この鉛塩による方法はTCよりも組織切片上で細い線状に観察できるため、硬組織形成量の計測が比較的正確に行える。しかし、鉛はSH基と親和性が強く、種々の酵素阻害を示し、特にヘム代謝系などに強い影響を及ぼす。そこで、我々は硬組織内時刻描記法に使用されている酢酸鉛、Pb-EDTA、Pb-NTAによるこれらの影響をみるため、鉛中毒検査の一つの指標とされている尿中 δ -アミノレブリン酸(ALA)の定量を行った。

【方法】雄のWistarラット200g前後を10匹ずつの4群に分け、テフロンコーティングしたステンレスの代謝ケージで各1匹ずつ飼育した。各群は生理的食塩液、酢酸鉛、Pb-EDTA、Pb-NTA投与群として、鉛塩についてはPbとして5mg/kgの割合で、すべてのラットに1回のみ腹腔内投与した。水は蒸留水を餌はオリエンタル酵母社のMFを自由摂取させた。1週間の予備飼育の後、鉛塩投与前24時間、投与後24時間、そして、2日目と3日目の尿を採取し、採取毎に直ちにイオン交換樹脂による厳密な方法でALAを分光光度計にて測定し、更に鉛による δ -アミノレブリン酸脱水素酵素阻害を想定し、垂鉛と鉛を原子吸光光度計にて測定した。

【結果及び考察】酢酸鉛投与群のみ最初の24時間に有意に高いALAの排泄がみられ、2日後は他の群との有意な差はなかった。垂鉛の排泄については有意な差はなく、鉛は酢酸鉛投与群で排泄量が少なかった。以上のように硬組織内時刻描記法に使用されている各鉛塩の中では酢酸鉛に最も強い毒性が見られた。しかし、現在、硬組織内時刻描記法における酢酸鉛の投与量は、通常今回の約1/5(Pbとして1.1mg/Kg)静脈内投与である。Pb-EDTAはPbとして10.1mg/kg、Pb-NTAはPbとして2mg/kgの割合で腹腔内に投与されている。したがって、鉛塩を用いた硬組織内時刻描記はALAを指標とするかぎりほとんど毒性を示さないと考えられる。

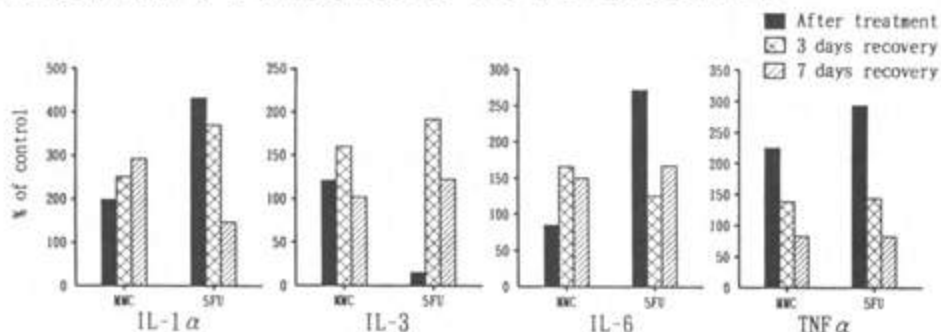
Mitomycin C及び5-fluorouracil投与ラットにおける
骨髄中サイトカイン量測定の意味二村 芳弘¹、松本 清司²

1. 東邦大・医・薬理、2. 信州大・医・動物実験施設

〔目的〕安全性試験において血液系に異常がみられた場合、一般に骨髄検査が実施され、血液及び骨髄像の把握が可能になった。しかし、骨髄における薬物の作用機構は今のところ、十分調べられていない状況にある。そこで、Mitomycin C(MMC)及び5-fluorouracil(5FU)について従来の血液・骨髄検査結果と骨髄中サイトカイン量の変動との関連性について検討した。

〔方法〕Slc:Wistar雄ラット(7週齢)にMMC(0.2mg/kg、ip)または5FU(3mg/kg、sc)を各群5匹ずつ7日間連続投与した。投与後および休薬(3または7日)後、麻酔(ペントバルビタールナトリウム、50mg/kg、ip)下で得た血液及び大腿骨骨髄について血球数、骨髄細胞数及び骨髄像を検索し、骨髄中サイトカイン(IL-1 α 、IL-3、IL-6及びTNF α)量をイムノアッセイ法により求めた。

〔結果と結論〕末梢血：MMC投与により貧血、5FU投与により白血球および血小板数の減少が認められた。これらの変化はいずれも可逆的であった。骨髄：MMC投与により有核細胞数、特に、顆粒球系細胞の減少(G/E比の低下)、5FU投与により有核細胞数、特に、赤芽球系細胞の減少(G/E比の上昇)がみられたが、休薬により回復像を示した。骨髄中サイトカイン量の変動は下図のとおりであった。以上の結果から、骨髄中サイトカイン量の測定は骨髄細胞分別の結果を補足する有用な検索法であると考えられた。



シスプラチンを用いた免疫毒性試験法の検討

河内泰英¹、前田泰宏¹、岡 宏昭¹、大内田 昭信¹、
大沢 基保²

¹大鵬薬品工業(株)・安全性研究所、²帝京大・薬

[目的] 抗悪性腫瘍剤の cisplatin(cis-diamminedichloro-platinum, CDDP)は、高用量ではマウスにおいて免疫抑制作用を示すことが知られている。今回、比較的 low 用量の CDDP をマウスに連投し、体液性及び細胞性免疫に対する影響を数種の免疫機能試験を用いて検討した。

[方法] CDDP の 8, 40, 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を ICR系マウスに10日間、腹腔内に連投し、免疫系への影響を調べた。抗体産生能はヒツジ赤血球を用いた *in vivo* の plaque forming cell (PFC) 反応で調べ、細胞性免疫は oxazolone (OX) を用いたマウス ear swelling 法で接触性遅延型アレルギー反応に対する影響を調べた。さらに、リンパ球の増殖反応に対する影響は LPS および ConA を用いた mitogen 反応試験を行って検討した。なお、陽性対照物質として cyclophosphamide (CP) を用い、CP は 200 mg/kg の単回腹腔内を行った。

[結果] CDDP の 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群で体重抑制と胸腺重量の有意な減少が認められた。PFC 反応において CDDP は T 細胞依存性の抗体産生には影響を及ぼさなかった。一方、CP の投与では抗体産生の有意な抑制がみられた。OX に対する接触性遅延型アレルギー反応に対して CDDP は、有意ではないが用量依存的な抑制作用を示した。*In vivo* mitogen 反応試験において、CDDP 投与群で、T 細胞の mitogen である ConA および B 細胞の mitogen である LPS の刺激によりリンパ球増殖の抑制がみられ、ConA に対する抑制反応の方が LPS より強い傾向を示した。また、*in vitro* の mitogen 反応試験においても同様の傾向を示した。以上の結果から、今回用いた免疫機能試験によって低用量での CDDP の免疫抑制作用を明らかにすることができた。

キノロン薬の光毒性によるアルビノマウスの網膜変性
および耳介炎症に及ぼす抗酸化剤の影響

○下田 耕司、和賀井 信彦、吉田 貢由、宮本 恵美、
加藤 道幸、高山 敏

第一製薬（株）開発研究所 安全性研究センター

〔目的〕キノロン薬による光毒性は临床上重要な問題である。アルビノマウスにキノロン薬を投与し、UVA を照射すると網膜変性および耳介皮膚の炎症が惹起されるが、有色マウスでは非常に軽度な変化しか認められない。これは、メラニン色素の抗酸化作用による可能性が考えられる。そこで、アルビノマウスを用いて惹起された網膜変性および耳介炎症に及ぼす抗酸化剤の影響を検討した。〔材料および方法〕6～8週齢の Balb/c 系雌マウスに各種抗酸化剤を腹腔内または皮下投与し、30分～2時間後にキノロン薬を1回経口投与した。対照動物には抗酸化剤の溶媒を投与した。その直後からUVA(1.5mW/cm²)を4時間照射し、耳介厚を測定するとともに、耳介および眼球を採取し、組織学的に観察した。〔結果および考察〕キノロン薬を投与した動物では、厚さの増加を伴う耳介の炎症および網膜杆錐状体層の崩壊が観察された。β-カロチン、カタラーゼ、ジメチルスルフォキサイドおよび大豆トリブシンインヒビター投与群では網膜変性および耳介炎症が抑制された。一方、アロプリノールおよびアデノシン投与群では耳介炎症は抑制されたが、網膜変性は抑制されなかった。これらのことから、キノロン薬の光毒性による網膜変性および耳介炎症の発生において活性酸素の関与が考えられる。しかし、これら病変の発生機序はわずかに異なるものと思われる。

マイクロダイヤリシス法を用いたラット心筋中の虚血-再灌流後のフリーラジカルの産生について

○小畑俊男、*細川博司、山中康光、

大分医大・薬理、*臨床薬理、

心臓外科手術などで一時的に虚血状態におかれた心臓に血液が再灌流すると、その際しばしば障害が発生し患者の予後を悪くしている。その発生機序としては、フリーラジカル説が有力と考えられている。しかし心筋障害に伴うフリーラジカルを *in vivo* で直接測定されたことはない。そこで今回、我々は *in vivo* マイクロダイヤリシス法を用いてそのメカニズムについて検討した。遷移金属やカテコールアミンなどの酸化還元物質などによって引き起こされるヒドロキシラジカルの産生および虚血-再灌流後の心筋中のヒドロキシラジカルの動態と虚血領域の大きさおよび血行動態との関係を検討した。血行動態および不整脈の発生におよぼす影響を血圧および心電図 (ECG) により記録した。ラットを開胸した後、心のう膜を切開して心臓を露出して針付き糸を用いて、左前下行枝 (LAD) の起枝部に糸をまわした。針を糸から切断した後、糸の両端を揃えてポリエチレンチューブの中を通し、他端から導出した。そして、心筋に我々の開発したプローブをセットし、リング液に溶かした 0.5 mM サリチル酸を灌流させることにより、サリチル酸とヒドロキシラジカルとの反応によって生成する 2,3-DHBA と 2,5-DHBA およびカテコールアミンの測定を行った。それぞれの灌流液は 15 分ごとに 15 μ l の 0.1 N HClO₄ の氷冷水に集め、すぐに HPLC-EC法により測定した。虚血後 15 秒で不整脈が ECG により確認された。動脈血中のガス分析を行ったところ、pH 7.3 \pm 0.1, PCO₂ 33.4 \pm 1.3 mmHg, PO₂ 103.9 \pm 18.1 mmHg であった。心筋にプローブをセットしても心拍数および血圧には変化はなかった。15 分間虚血した後、再灌流すると心拍数および血圧は減少した。ノルエピネフリン (NE) の濃度は非常に高く、プローブをセットした後 90 分で急激に減少し、その後定常状態になった。NE, 2,3-DHBA および 2,5-DHBA のレベルは有意に上昇した。以上の結果はヒドロキシラジカルにより心筋の NE が遊離されることを示唆する。

和泉博之, 中間和浩, 福崎好一郎, 永田良一

株式会社新日本科学 安全性第2研究室

〔目的〕 カニクイザルに肝生検を施し, 術後の経過について血液学的検査, 血液生化学的検査および肝機能検査値を指標として調べた。

〔方法〕 4~7歳齢のインドネシア産カニクイザル雄6匹(体重3.9~5.2kg)を用いた。動物は塩酸ケタミン麻酔下(10mg/kg, i.m.)で左側臥位に保定し, 剣状突起の尾側より1~2cm開腹し, 腹腔鏡(オリンパス)を用いて肝臓を肉眼的に観察した後, 生検鉗子を用いて肝組織(約200mg)を採取した。対照群には肉眼的観察と開腹手術のみを施した。それぞれの動物について術前, 術後24, 72時間および7日目に血液3.5mlを採取し, 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, MCV, MCH および MCHC) および血液生化学的検査(GOT, GPT, γ -GPT, ALP, LDH, LAP, 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, トリグリセリド, コリンエステラーゼおよびたんぱく分画)を実施した。術前および術後7日には肝機能検査(ICG検査, 3mg/0.6ml/kg, i.v., 15分後血液採取)を実施した。

〔結果〕 術後7日目には全ての検査値は, ほぼ術前値まで回復した。本学会では7日目までの各種検査値の変動についてまとめるとともに, 長期試験における肝生検の有用性について報告する。

遅延型アレルギー反応(2) 8種類のメタクリル酸
誘導体の反応性の検討

小島幸一 ○金澤由基子 山脇智予 松田洋
岡田富士桜 横山雄一* 松澤宏*

勸食品薬品安全センター秦野研究所 免疫毒性学研究室
*HOYA株式会社 メディカル研究所

昨年の本学会において、我々は5種類のメタクリル酸誘導体の遅延型アレルギー反応について、モルモットを用いた Maximization Testでの結果を報告した。今回は、メタクリル酸誘導体の置換基や分子量などを変えた場合の構造と反応性の関連性について、また、用いた物質の物性との関連性についても検討を加えたので報告する。

【方法】Hartley系雌性モルモット(4週齢クリーン)を用い、Magnussonらの方法に準じてMaximization Testを実施した。メチルメタクリル酸を母核物質として、脂肪鎖長の異なる誘導体5種類と、メチル基をハロゲンで置換した誘導体2種類を用いた。

感作用量はそれぞれ皮膚一次刺激を示さない最大濃度を最高用量として3用量を設定した。誘発は一次刺激を示さない最大濃度を用いて行った。

【結果】脂肪鎖長の違いによって反応性が異なり、炭素数12(C₁₂)が最も強く、これより炭素数が短くても、長くても反応性は弱くなる傾向が認められた。また、これら相互の交叉反応性は、どの脂肪鎖長のメチルメタクリル酸誘導体においてもC₁₂に対して最も強い反応性を示し、短くなっても長くなっても反応性は弱くなった。

同じ骨格を有するアルキル置換体とハロゲン置換体とを比較した結果、ハロゲン置換体の方が強い感作性を示した。また、これらの交叉反応性をみると、ハロゲン置換体はアルキル置換体と良く反応するが、アルキル置換体はハロゲン置換体とはあまり反応しないという結果が得られた。

合成サケカルシトニン (sCT) のラット副甲状腺機能
に対する影響

磯部充威, 堀内敏, 佐藤敦子, 伊藤清子, 牧野正雄, 鈴木稔

帝国臓器製薬株式会社安全性研究部

【緒言】 血液中のCa濃度は主に副甲状腺ホルモン (PTH) と甲状腺より分泌されるカルシトニンにより調節されている。したがって、ラットでカルシトニン投与時に見られる血液中Ca濃度の低下は二次的にPTHの分泌を亢進し、hyper parathyroidismを誘発する可能性があると考えられている。そこで、sCT投与後の血液中Ca、PTH濃度推移ならびに副甲状腺に於ける細胞増殖動態を調べ、カルシトニンの副甲状腺機能に対する影響について検討した。

【方法】 sCTを 0.75, 7.5, 30, 120IU/kg/dayの用量で雌雄SD系ラットに単回あるいは29回反復皮下投与し、投与0, 2, 12, 24時間後に屠殺採血して血清Ca濃度 (OPCP法) を測定した。反復皮下投与した個体についてはPTH濃度 (抗ラットPTH-MM抗体、RIA法) も測定した。また、sCTを120IU/kg/dayの用量で雄性SD系ラットに3, 7, 14回反復皮下投与し、副甲状腺の細胞増殖動態をDNA複製合成を指標に観察した。すなわち、屠殺の72時間前にbromodeoxyuridine (BrdU) 溶液を充填したAlzetミニポンプを腹腔内に移植してS期細胞を標識し、屠殺時に摘出した副甲状腺について抗BrdU抗体を用いた免疫染色を施して、BrdU標識率を求めた。

【結果及び考察】 sCT単回投与により血液中Ca濃度は雌雄ラットで用量に依存して低下した。Ca濃度の低下は29回反復投与後も同様に認められた。一方、sCT反復投与後の血液中PTH濃度の上昇は認められなかった。また、sCTを3, 7, 14回皮下投与した場合のBrdU標識率にも変化を認めなかった。したがってsCTを大量長期間反復投与してもhyper parathyroidismを誘発することは無いと考えられた。

リシノプリルの腎部分切除ラット高蛋白尿および腎病変に対する作用

松井信志, 村岡義博, 中村益久

塩野義製薬(株)研究所 神崎川分室

アンジオテンシンII変換酵素阻害薬, リシノプリル(LP)の5/6腎部分切除ラット(PNX)にみられる高蛋白尿排泄および進行性糸球体病変に対する作用を検討した。

雄ウイスターラット(9週齢)の左腎全体及び右腎の2/3を切除し, 5/6PNXを作製した。術後翌日よりLP 0.3および3 mg/kg/日を8週間経口投与した。対照群には, 擬手術群と5/6PNX群を置いた。経時的に血圧, 尿中の蛋白質, クレアチニン, 電解質, NAG活性および血漿中のクレアチニン, 尿素窒素を測定すると共にクレアチニークリアランスを算出した。解剖前(8週後)には血漿中レニン活性を測定した後, 残存腎を摘出し, 諸染色, 糸球体の形態計測により病理検査を行った。

5/6PNX対照群に較べて, LP投与群では血圧下降, 6週以後に尿蛋白減少がみられ, NAG活性は0.3 mg/kg群で8週後, 3 mg/kg群では2週以降に低下がみられた。8週後のレニン活性は, 3 mg/kg群で上昇し, 擬手術群とほぼ同じ値にまで回復した。他の項目には著差がなかった。腎の病理検査では, PNX対照群にみられる糸球体の硬化性病変, 尿細管変性, 間質の炎症性病変に対して抑制効果を示した。これらの腎病変抑制効果を確認するために行った, LP 3 mg/kg/日をより長期の16週間にわたって投与した場合の腎病変抑制効果は顕著であった。

このようにLPは, 予防的投与においてPNX腎病変の進行を著しく抑制したが, 腎病変が進行してから投与を開始した治療的投与では, 蛋白尿は抑制されたが, 腎病変の改善は殆どみられなかった。

ラットにおける尿分析値の性差について (2) 血液分析
値並びに腎組織内酵素活性の性差と去勢による変化

山田久陽, ○杉浦正幸, 村上美穂子, 大島 隆, 中根貞雄

大正製薬㈱ 総合研究所 安全性研究部

前回,我々はWistar系ラットの尿分析値における性差及び去勢による影響を検討し,性ホルモン,特にアンドロジェンの関与を明らかにした。尿分析は腎組織由来の酵素類,血中由来のタンパク,グルコース等をパラメーターとして測定するもので,性ホルモンがこれらを変動させている可能性が考えられる。今回は,11週齢のWistar系ラットを用い,尿及び血液分析,腎組織内酵素,クレアチニンクリアランスについて性差と去勢による影響について検討した。

尿中総タンパクは雄が高く,雄の去勢により減少した。A/Gは尿,血液とも雄が低値を示した。グルコースは血液で性差が認められないが,尿では雄で高値を示した。また,酵素のうちLAPは雄で尿及び腎組織中が高値を示し,去勢により減少した。 γ -GTP及びLDHは尿で雄が高く,去勢により減少しが,腎組織中の γ -GTPには性差及び雌雄の去勢による変化はみられなかった。一方,腎組織中のLDHは逆に雌が高く,雄の去勢により増加した。クレアチニンクリアランスは雄が高く,雄の去勢により減少した。

今回の検討から,血液分析値及び腎組織内酵素にもアンドロジェンの関与が認められ,これらの変化が尿分析値に影響を及ぼしているものとみなされた。A/G及びLAPは尿,血液及び組織内酵素のいずれにも性差及び去勢による変化が認められ,これは,アンドロジェンが肝での $\alpha_2\text{U-globulin}$ 合成並びに尿細管細胞におけるLAPの合成及び分泌に影響を及ぼすものと思われた。その他のパラメータでは必ずしも同一の挙動を示さず,各パラメーターの尿細管再吸収,分泌,更にGFRを含む腎機能に対しても何らかの影響を及ぼすものと推察された。

ラットに特異的な免疫測定法キットを用いた
フェリチンの測定一鬼 勉、浜村政夫、石井三和子、神谷光一、阿部真利子、
井上秀顕

(株) パナファーム・ラボラトリーズ

【目的】鉄貯蔵蛋白であるフェリチンは、血液中にも存在しており、その血中濃度は貧血、肝疾患、悪性腫瘍等の診断上あるいは生体内の鉄貯蔵状態を知る上で有用な指標となっている。今回我々は、自社で開発したラットフェリチンの免疫測定法キットを用い、バックグラウンドデータを得る目的で瀉血によるラット貧血モデルを作製し、の血清中フェリチンの経時的变化を検索したので報告する。

【材料及び方法】7週齢の雄性SD系ラット28匹を用いた。2日おきに頸静脈から1mlずつ採血する群(I群)及び4mlずつ採血する群(II群)並びに同様の処置を行う1週間前に摘脾した群(III及びIV群)を設け、採取した血液を用いて経時的に血液学的検査及びフェリチンの測定を行った。更に、II及びIV群については血清鉄も同様に測定し、採血開始後24日目の剖検時に採取した肝臓、脾臓、骨髄等について病理学的検索を行った。

【結果及び考察】II及びIV群では血液学的検査結果及び血清鉄の減少から鉄欠乏性貧血が明らかであったが、血清中のフェリチンはII及びIV群とも採血開始後6日目から上昇し、実験終了まで高値を示した。組織学的にはII群の脾臓は著しい髓外造血亢進を示し、脾臓重量も増加した。II及びIV群の肝臓では明瞭な髓外造血がみられた。ヒトの鉄欠乏性貧血においてはフェリチンは低下することが知られているが、ラットでは逆に増加し、その程度は脾臓の有無に関係しない事が明らかになった。現在、より長期間の貧血でのフェリチンの挙動について検討中である。なお、肝臓、脾臓、骨髄等でのフェリチンの免疫組織化学染色結果についても報告したい。

ウサギの培養関節軟骨細胞に対するキノロン薬の影響

○ 高田 早苗、加藤 道幸、高山 敏

第一製薬、開発研究所、安全性研究センター

キノロン系抗菌薬が幼若動物の関節軟骨を障害することはよく知られている。その病変発生のメカニズムにおいて、軟骨細胞および軟骨基質の障害の関与が報告されている。今回、我々はウサギの培養関節軟骨細胞を用いて、キノロン薬に起因する主に機能的変化について検討した。3週齢のNZW系雄ウサギの大腿骨遠位端から採取した関節軟骨を37°Cでトリプシン、ヒアルロニダーゼおよびコラゲナーゼによりそれぞれ30分、30分および18~22時間消化し、軟骨細胞を分離した。細胞を96穴のウェルに入れ(7.5×10^3 個/ウェル)、37°C、95%O₂、5%CO₂の条件下で1週間培養した。次いで、レボフロキサシン(LVFX)20~1000μg/mlをメディウムに加え、さらに細胞を24時間培養した。ミトコンドリアの機能状態と同時に細胞の生存率および死亡率をみるために、MTTアッセイおよびLDH濃度測定を実施したが、いずれも明らかな変動は認められなかった。一方、薬物と同時に³H-thymidineをメディウムに加え培養した結果、DNA合成能はLVFXの高濃度で抑制された。このことから、軟骨細胞障害の一つの原因としてDNA合成抑制の関与が疑われる。なお、現在他のパラメーターについても検討中である。

金津赫生¹・望月雅裕²・諏訪浩一²¹ 筑波大学医療短大部 ²ボゾリサーチC

マウスやラットの赤血球は血漿蛋白を含まない等張緩衝溶液中で比較的短時間内に分断を伴い、あるいは伴わずに溶血する。前々回マウス赤血球の溶血が分子量60kD以上のデキストランにより抑制されることを、前回、溶血に到るまでの形態変化ならびに種差、飼育環境差を報告した。今回、赤血球をあらかじめビタミンEで処理しておくことにより溶血がほぼ完全に抑制されることを見たのでその形態像を報告する。ICRマウスまたはSDラットからヘパリン採血し、血漿分離後、ビタミンE添加生理食塩水で4回洗浄した赤血球100 μ lをpH7.4のトリス・マレイン酸緩衝液5mlに浮遊させ、血球形態を経時的に観察した。ラットおよびマウスいずれの場合も時間とともに分断赤血球が増加した。浮遊血球をスライドガラス上に放置すると、また、pHをアルカリ側に移動させると分断が促進された。アセチルフェニルヒドラジン添加はマウスおよびラット赤血球の分断をさらに促進し、塩化カルシウムおよび

Ionophore A 23187の添加はラット赤血球の分断を促進した。

ラットおよびマウスのヘモグロビンは可変SH基を4個有するとされ、グロビンSH基の酸化が赤血球内カルシウムイオンの動員と組み合わせると、分断に到るものと推測される。非浸透圧性溶血に見られる種差・飼育環境差の一部はビタミンE栄養状態の違いに帰することができよう。マウス、ラットにおける赤血球外カルシウムイオンに対する反応の違いは溶血についても見られ、カルシウムチャンネル制御機構の種差に基づくものと思われる。なお、オキシダントによる分断促進はヒト赤血球においても見ることができる。

古川 浩美、神谷 光一、前田 佳美、曾根 久雄、
野中 浦雄*、北川 俊之*、佐藤 喜代隆

(株) バナファーム・ラボラトリーズ
* (株) ビーエル

動物の血液生化学検査では測定感度や特異性が検討されることなく、ヒト用測定試薬・方法がそのまま導入されており、その問題点が指摘されている。そこで、動物種によって反応条件が著しく異なることが知られている酵素に注目し、特にその活性に大きな影響を与えるpHおよび基質濃度の至適条件について、ヒトとラットとの間で比較検討した。

日本臨床化学会(JSCC)標準法を用いて、各種のpHおよび基質条件下でヒトおよびラットのLDH、GOTおよびGPT活性を測定した。アミラーゼ活性はCM-アミロース-DEX法に従って測定した。

ラットのLDH測定では至適pHが酸性側にシフトし、ヒト標準法で用いられているTris緩衝液の緩衝範囲外であった。LDHの基質(ピルビン酸)の至適濃度はラットで2mM、ヒトで1.6mMであり、これを越えた濃度の基質では著明な活性阻害がみられた。GOT測定では α -ケトグルタル酸の至適濃度はラットで24mM、ヒトで10mMあったが、L-アスパラギン酸の至適濃度はヒトと同様であった。GPT測定でも基質の α -ケトグルタル酸は濃度不足であり、L-アラニンの至適濃度は逆にラットで400mM、ヒトで500mMあった。さらにGOT、およびGPTではヒトに比較して高いpH 8.6および8.2で最大の活性が得られた。アミラーゼ測定での至適基質濃度はラットで1mM、ヒトで3.3mMであった。ラットのアミラーゼではpH 7.0で最大活性が得られ、ヒトでの至適pH 7.5では活性阻害がみられた。

したがって、ヒトとラットとでは血液生化学パラメーターの至適測定条件が明らかに異なり、正確な測定と評価には動物種ごとに適切な測定試薬・方法を用いることが重要であるものと考えられた。

硫酸化多糖体のプロタミン中和試験の検討

東條 宏子、山田 昌男、中村 美穂、野村 護、
高山 敏

第一製薬(株)開発研究所安全性研究センター

血栓治療あるいは高脂血症治療に適用されているデキストラン硫酸などの硫酸化多糖体は、大量投与で抗凝固作用に基づく出血傾向が起こることが知られている。また最近、ペントサン硫酸、Arthrobacter菌から分離した硫酸化多糖体(DS-4152)は血管新生抑制活性が認められ、抗腫瘍領域への応用が考えられている。臨床ではヘパリン療法時の拮抗剤としてプロタミンが用いられているが、プロタミンとこれらの硫酸化多糖体の大量投与による出血時の中和作用についてヘパリンを対照に比較検討した。

【方法】In vitro試験：直接比較では各薬剤の溶解液に各濃度の硫酸プロタミンを加え、比濁法で最小透過率を中和点とした。またヒト血漿に各薬剤を添加し、各濃度のプロタミンを加え、最短の凝固時間を中和点とした。In vivo試験：7週齢Crj:CD系雄ラットにAPTTが2倍および10倍に延長する濃度の各薬剤を静注した。その15分後に中和量のプロタミンを静注し、5分後に採血しAPTTを測定した。

【結果】In vitroの抗凝固作用をヘパリンと比較すると、ペントサン硫酸およびデキストラン硫酸は1/5、DS-4152は1/14~1/19であり、各薬剤1mgはプロタミン約1~1.5mgで中和された。In vivoの抗凝固作用をヘパリンと比較すると、DS-4152はAPTTの2倍延長濃度(2.0mg/kg)で1/5、10倍延長濃度(65.0mg/kg)で1/93であった。プロタミンにより、DS-4152の2倍延長濃度は中和されたが、10倍延長濃度では凝固時間は短縮したが完全な中和はされず、プロタミンの毒性である自発運動低下、腹部着床、チアノーゼ、徐脈、顔面浮腫等の毒性症状が認められた。

アミノ酸投与による血中トランスアミナーゼの変動
について

幸下 雅俊, 姜 定克, 澤本 修, 金田 信也, 越谷 修
林 茂尚, 長根 芳文

(株)大塚製薬工場 鳴門研究所

【目的】近年、経中心静脈栄養法の進歩により、各種アミノ酸輸液が開発されている。しかし、個々のアミノ酸に関する毒性報告は少なく、イヌを用いた静脈内投与による報告はほとんどない。また、我々は、先にイヌを用いた総合アミノ酸輸液の毒性試験において、組織学的変化を伴わないGOT及びGPT活性の上昇を経験した。そこで今回、これらトランスアミナーゼの上昇と個々のアミノ酸との関連を検討するため、イヌに個々のアミノ酸を単回投与し、GOT及びGPT活性の変動をみた。

【方法】市販アミノ酸輸液の臨床使用における約10倍量のアミノ酸をキャリカポンプにより10ml/kg/hrの速度でイヌに単回静脈内投与した。採血は投与前、投与直後、投与1、3、5及び24時間後に行い、GOT、GPT及びALP活性、総ビリルビンを測定した。

【結果及び考察】GOT及びGPT活性の上昇は、His、Lysに特異的にみられ、その他のアミノ酸において上昇はみられなかった。また、GOT及びGPT活性の上昇は投与直後よりみられ、最高値は前値に比べ、HisでGOT 20.0倍、GPT 9.6倍、LysでGOT 3.9倍、GPT 2.3倍であった。なお、ALP及び総ビリルビンの変動はみられなかった。

以上、GOT及びGPT活性の上昇において特異的なアミノ酸の関与が示唆された。

末梢血好中球の採取および好中球走化因子に対する
反応の動物種差

○宮本 恵美、菅原 正喜、加藤 道幸、高山 敏

第一製薬(株) 開発研究所 安全性研究センター

好中球は生体防御で重要な役割を担っているが、その機能の動物種差に関する報告は少ない。今回、私達はマウス、ハムスター、ラット、ウサギ、イヌおよびヒトの好中球を末梢血から高率に単離する方法を確立し、この好中球を用いて走化因子に対する反応性を動物種間で比較した。

[実験方法]好中球分離:[マウス、ハムスター、ラット]ヘタスターチ交換輸血法で採取した静脈血とヘタスターチの混合液を静置し、赤血球を沈降させた。上清中の細胞を1.081-1.097g/mlの5段階に調製したPercoll密度勾配上に重層し、遠心後、各層の境界面に分離した細胞層を分取した。[ウサギ]静脈血にヘタスターチを加え、上清からPercoll法で好中球を分離した。[イヌ]ビーグル犬の静脈血から1.077および1.119g/mlのFicol-Paque液を用いて好中球を分離した。[ヒト]静脈血からMono-Poly Resolving Mediumを用いて好中球を分離した。化学走化:48穴ケモタキシスチャンバーを用いたポイデン法により、フィルター下面に遊走した細胞数を算定した。[成績]ヒトおよび全ての動物種において、90%以上の純度で好中球が単離できた。細菌由来の走化因子formyl-Met-Leu-Pheに対して、ラット、ウサギおよびヒトの好中球は 10^{-7} Mをピークとした用量反応性を示した。しかし、マウスおよびハムスターの好中球は反応が弱く 10^{-8} M以上で走化反応を示し、イヌの好中球は 10^{-5} Mまで全く走化しなかった。

[結論]末梢血の好中球は、走化因子に対する反応性に、動物種差があることが示された。

P-141 サルにおけるエンドトキシン致死毒性のin vitroでの
予測性について

高橋 裕詞、山口 文恵、大野 広志、古濱 和久、高山 敏

第一製薬(株) 開発研究所 安全性研究センター

エンドトキシン(LPS)は、反応性に種差、系統差あるいは個体差があり、毒性研究を行うためには多くの動物が必要となる。こうした背景から実験前に反応性を予測できれば、使用動物の条件を整えられ、数の削減なども可能となる。そこで個体差がしばしば観察されるサルを用いて、LPSに対する反応性をin vivoとin vitroで調べ、両者の相関性を検討した。4歳以上の雌リスサル(使用時体重 540~700 g)11匹を用いた。In vitro試験では微量全血培養法を用い、各動物から採取した血液(25 μ l)にLPSの最終濃度0.63、1.25、2.50、10および40 μ g/mlを添加し、³H-サイミジンの取り込み量で反応性を調べた結果、LPS濃度に依存した反応性を示したものが4例、示さなかったものが7例であった。さらに、これらの動物にin vivo試験として、LPS 0.3 mg/kg (LD50値相当)を14日間皮下投与したところ、in vitroで反応性を示した4例は全例死亡、示さなかった7例は2例が死亡、5例が生存した。これらの結果、in vitroでin vivoのLPSに対する反応性を8割以上の確率で予測することが出来た。

次に、エンドトキシンによる死因には、産生されたサイトカインの関与が示唆されているので、サイトカインのうち、TNF、IL1ならびにIL6について、微量全血培養上清中の産生量を免疫酵素抗体法によって調べた。全血培養法でLPS濃度に依存した反応性を示した場合にはTNFあるいはIL6の産生促進が認められたが、反応性を示さなかった場合、産生促進は観察されなかった。これらのサイトカインは、直接あるいは間接的にリンパ球などの活性化を促すことから、今回、LPS反応性の個体差の一因として、サイトカイン産生の差による可能性が考えられた。

NTP試験法による自己免疫疾患を誘発する医薬品の
免疫毒性検索

筒井尚久, 栃折幸子, 小林潔

三菱化成株式会社 総合研究所 安全性研究所

医薬品による免疫毒性の中で、薬剤性自己免疫疾患は数多くの薬物で臨床上問題になっているが、実験動物を用いて毒性学的に評価する試験方法は未だない。一方、NTPが1988年に発表した免疫毒性試験法はすでに数多くの物質で試され、免疫抑制作用を有する環境化学物質や医薬品の毒性評価に役立っている。そこで、今回我々は、NTP試験法が自己免疫疾患を誘発する医薬品の免疫毒性の検索に有用であるかどうかを検討する目的で、以下の実験を行ったので、その結果を報告する。

臨床で自己免疫様反応に基づく副作用が多数報告されているペニシラミン、フェニトインおよびアジマリンを、各々 25mg/kgおよび125mg/kgの用量で6週齢のB6C3F₁雌マウスに14日間連続経口投与し、最終投与後24時間目に屠殺し、NTP試験法に準じて免疫病理検査および免疫機能検査を実施した。ペニシラミンおよびアジマリンにおいては、脾臓、胸腺および腸間膜リンパ節に病変は認められなかったが、ペニシラミンでは、リンパ球幼若化反応、ブラック形成応答および血清中イムノグロブリン量で、アジマリンではリンパ球幼若化反応において変化がみられた。フェニトインでは、一般状態が悪化した125mg/kgで、脾臓および胸腺に萎縮が認められるとともに各種免疫機能パラメーターが変動し、25mg/kgではリンパ球幼若化反応でのみ変化がみられた。

これらの結果より、NTP試験法は、自己免疫疾患を誘発する医薬品の免疫機能への毒性学的影響を評価する上で、一つの有用な手段であると考えられた。

○五十嵐良明、土屋利江、中村晃忠

国立衛生試験所 療品部

【緒言】プラスチックの紫外線吸収剤として用いられている2-(2'-hydroxy-5'-methylphenyl)benzotriazole (チヌビンP)の皮膚感作性をマウスを用いたlocal lymph node assay (LLNA)およびmouse ear swelling test (MEST)で試験した。またチヌビンPと他のbenzotriazole化合物との交叉反応性についても検討した。

【実験方法】動物：BALB/c系、雌性マウス、6～8週齢を用いた。LLNA：Kimberらの方法¹⁾に従った。マウスの両耳にアセトン-オリーブ油に溶解したチヌビンPを3日間連続塗布し、翌日所属リンパ節を取り出し、リンパ球を³H-thymidineと24時間培養して増殖度を測定した。MEST：(感作)Gadらの方法²⁾を改良した。チヌビンPとFreund's complete adjuvant (FCA)のエマルジョンを腹部皮下注射し、次に両耳にチヌビンPを3日間連続塗布した。(惹起)最終塗布から7日目にチヌビンPを耳に塗布し、耳の厚さの増加率(%)を求めた。(交叉反応試験)上記方法によって感作されたマウスに対して、各種benzotriazole化合物を塗布し、24時間後の耳の厚さを測定した。

【結果】種々の濃度のチヌビンPを連続塗布しても溶媒塗布の場合と比較してリンパ球増殖反応に変化はなく、LLNAではその感作性を検出できないことがわかった。しかし、チヌビンPおよびFCAの注射と塗布を組み合わせる処理されたマウスは、チヌビンPの惹起によって耳の厚さが著しく増加した。この耳の腫脹は24時間後に最高になり、濃度依存的な反応を示した。さらに、チヌビンP感作マウスは他の5種のbenzotriazole化合物と交叉反応を示さなかった。

1) I.Kimber, C.Weisenberger (1989) Arch.Toxicol., 63, 274.

2) SC.Gad et al. (1986) Toxicol.Appl.Pharmacol., 84, 93.

Endotoxin 投与ラットに認められた脾腫の免疫病理学的検討

○石島 奈美、源田 百合、山口 文恵、柿畑 耕司、高山 敏

第一製薬㈱ 開発研究所 安全性研究センター

Endotoxin は、種々の生物活性を持つことで知られている。我々は第17・18回本学会において、Endotoxin の活性本体であるリピドA のラットでの毒性学的特徴を報告した。今回はこれらの動物で認められた脾臓の腫大に着目し、免疫病理学的に検討を加えた。

実験には8週令の雄SD系ラットを用いた。投与量は各々のLD₅₀近似値を用い、合成リピドA LA-15、LPS では5 mg/kg、リピドA 誘導体 DT-5461a では40 mg/kg を静脈内投与し、経時的に各種検査を行った。脾臓は重量を測定し、組織検査ならびにTおよびBリンパ球の表面抗原を用いた免疫組織染色を行った。一部の脾臓は、single cell として、細胞数、分画を調べ、さらにフローサイトメトリー (EPICS :Becton Dickinson 社) でTおよびBリンパ球を測定した。同時に mitogen (LPS、Con A、PHA) に対する反応性も検討した。その結果、LA-15、LPS は同様の傾向を示した。すなわち、脾腫は投与後24時間より出現し、72時間がピークであった。24時間では脾細胞数は軽度の増加を示したが、TおよびBリンパ球数は減少傾向にあった。組織学的にもT、Bリンパ球領域(白脾髄)でのリンパ球の減少あるいは壊死が認められた。しかし、ピーク時の脾細胞数は脾のTおよびBリンパ球ならびに赤血球数の増加により、有意に変動した。組織学的には白脾髄、赤脾髄でのリンパ球あるいは赤血球の増加が認められた。この時、リンパ球の mitogen 反応性は低下しており、量的変動とは異なった反応を示した。一方、DT-5461aではすべての反応がLPSおよびLA-15より弱く認められた。以上のことからEndotoxin による脾腫は、リンパ球系の増加だけでなく、脾臓の赤血球系細胞の増加も関与することが示された。さらに免疫組織学的ならびに機能的検査を併用することで、免疫担当細胞の量的、質的な動態の把握が可能となり、免疫毒性の評価に有用と考えられた。

中鎖脂肪酸トリグリセリド乳剤の静脈内投与による
昏睡等の症状発現機序の検討

西澤弘幸、小柴博、川畑好之康、花田秀一、岩井正和

㈱ミドリ十字 中央研究所 安全性研究所

中鎖脂肪酸であるオクタン酸($C_8H_{16}O_2$)の血清中濃度が上昇すると、ラットに昏睡が、イヌに嘔吐、催眠および昏睡が惹起されることは、1956年から1991年までにFrederick E. SamsonらやJ. M. Milesらにより報告されているが、症状発現機序については解明されていない。今回、我々は中鎖脂肪酸トリグリセリド乳剤による昏睡等の症状発現機序について検討したので報告する。

【方法】中鎖脂肪酸トリグリセリド(オクタン酸/デカン酸=3/1)10%乳剤をF-344系ラット(雄、体重81.3~97.3g)に投与量:20ml/kg、投与速度:4ml/min/animalにて投与した。投与前、投与後10分、30分、1時間および2時間目に脳を摘出し、脳湿重量を測定後、ホモジナイズし、アセチルコリン濃度を電気化学検出器を装着した高速液体クロマトグラフにて測定した。

【結果】中鎖脂肪酸トリグリセリド乳剤の急速大量投与により、ラットに一過性の昏睡が認められ、昏睡が観察されている時間帯に限りアセチルコリン含量の有意な増加が認められた。アセチルコリン含量は症状が最も重い時にピークを示し、症状が回復した時にはアセチルコリン含量も投与前値にまで回復した。

【考察】中鎖脂肪酸乳剤の投与による昏睡等の症状発現の原因は、脳内アセチルコリン含量の増加である可能性が示唆された。我々は、血清中のオクタン酸が増加するとその一部が脳脊髄液へ移行することを確認している。この移行したオクタン酸が脳細胞内にてアセチルCoAに代謝され、過剰分のアセチルCoAからアセチルコリンが合成されるものと推測している。

一般演題(ポスター)

【目的】

のびより

肝臓癌の検出に有用なマウス肝臓癌検出法を開発し、各種の肝臓癌検出法について比較を行った。

7月30日(金)

【方法】動物は3週齢のマウス(体重20g)を用いた。動物は24時間毎に、肝臓癌を誘発するためにD-Gal(100mg/kg)に試して、

(千葉市民会館小ホール)

肝臓癌の検出に有用なマウス肝臓癌検出法を開発し、各種の肝臓癌検出法について比較を行った。

肝臓癌の検出に有用なマウス肝臓癌検出法を開発し、各種の肝臓癌検出法について比較を行った。

演題番号 P-201 ~ P-243

肝臓癌の検出に有用なマウス肝臓癌検出法を開発し、各種の肝臓癌検出法について比較を行った。

肝臓癌の検出に有用なマウス肝臓癌検出法を開発し、各種の肝臓癌検出法について比較を行った。

肝臓癌の検出に有用なマウス肝臓癌検出法を開発し、各種の肝臓癌検出法について比較を行った。

肝臓癌の検出に有用なマウス肝臓癌検出法を開発し、各種の肝臓癌検出法について比較を行った。

肝臓癌の検出に有用なマウス肝臓癌検出法を開発し、各種の肝臓癌検出法について比較を行った。

肝臓癌の検出に有用なマウス肝臓癌検出法を開発し、各種の肝臓癌検出法について比較を行った。

五十嵐 美由紀、 島田 弘康

第一製薬（株）開発研究所 安全性研究センター

【目的】骨髄小核試験は染色体障害性の評価法として優れた試験法のひとつであるが、一般に骨髄の標的臓器としての妥当性などの問題点が指摘されている。今回Tates のモデル(1980)を基に、より簡便なマウス肝臓小核試験法を開発し、各種の特性を持つ変異原物質について評価を行ったので報告する。

【方法】動物は8週齢のSlc:ddY系雄性マウスを用いた。薬物投与後24時間目に、分裂刺激を与えるためにHigginsとAndersonの方法(1931)に従って、肝臓の部分切除(PH)を行った。小核を有する肝細胞の出現頻度はPH後5日目に解析した。摘出した肝臓に後大静脈からcollagenase 液を直接注入し大まかに切断した後、5分間のincubation及び振盪によって肝細胞を分離した。この細胞を塗抹標本とし、acridine orangeによる蛍光染色を行った。同時に薬物投与後24、48並びに72時間目の末梢血を尾部より採取し、網状赤血球中の小核を観察して、肝臓における成績と比較した。評価に用いた物質は、2-acetylaminofluorene, benzene(BEN), N-ethyl-N-nitrosourea, 3'-methyl-dimethylaminoazobenzene(3'-Me-DAB), diethylnitrosoamine(DEN), H_2SeO_3 , K_2CrO_4 並びにmitomycin Cの8種類である。

【結果および結論】被験物質のうち、末梢血で陰性、肝臓で陽性を示したものはDEN及び3'-Me-DABであり、逆に末梢血で陽性、肝臓で陰性を示したのはBENのみであった。また、これら以外の5物質はどちらにも陽性を示した。肝臓に特異的に発癌性を有するDEN及び3'-Me-DABが肝臓にのみ小核誘発性を示したことは、本法がこれらの薬物に対して極めて有用であることを示唆するものである。

マウスにおける尿生化学分析及び機能検査による腎毒性
評価法 — 酸性非ステロイド性抗炎症剤を用いた検討 —

山田久陽, ○村上美穂子, 杉浦正幸, 大島 隆, 中根貞雄

大正製薬㈱ 総合研究所 安全性研究部

尿生化学分析は腎障害検出のための簡便かつ鋭敏な方法と考えられており、薬剤による腎毒性評価法として広く取り入れられている。今回、長期投与により腎乳頭壊死の発現増加が知られている酸性非ステロイド性抗炎症剤(非ステロイド)を雌マウスに短期経口投与し、尿生化学分析を実施するとともに別に尿濃縮能試験を行い、乳頭部を含む遠位部障害の検出法について検討した。非ステロイドとしてインドメタシン(IM) 5mg/kg, ジクロフェナック(DF) 8mg/kg及びロキソプロフェン(LP) 10mg/kgを投与した。なお、投与量は消化管障害等により動物が極度の衰弱をみない量を設定した。28日間経口投与によりIMでは近位尿細管(PCT)に局在する γ -GTP, LAP及びALP活性の増加, DFではTP排泄及びPCTに局在するNAG活性の増加, LPではALB排泄, LAP, NAG及びPT並びに遠位尿細管(DCT)に局在するLDH活性の増加が認められた。他の検査ではIMで腎重量の増加, 軽度な近位尿細管上皮の再生, 間質の細胞浸潤及び円柱の増加が観察された。LPでは尿量及び摂水量の顕著な増加, 尿比重及び浸透圧の低下, 近位尿細管上皮の再生, 間質の細胞浸潤が観察された。DFでは尿分析以外に顕著な変化はみられなかった。尿濃縮能の検査では、LPでは絶水下で尿量の増加が認められなかったことから、尿量の増加は摂水量の増加に起因したものと考えられた。今回の実験から、PCTの組織学的変化と局在酵素の変動は一致しておりPCTの障害検出における有用性が確認された。しかし、非ステロイドの長期投与で出現する乳頭部の変化を短期間投与により再現もしくは尿分析で検出することはできなかった。また、尿濃縮能の欠損は簡便な機能検査により摂水量の増加に伴う変化と分別可能と考えられた。

5/6腎摘出ラットの腎機能について

○茨田享子, 五十嵐功, 金原広幸, 小林直美, 古山佳子,
中村聡子, 外尾亮治, 田内清憲

財団法人 動物繁殖研究所

腎機能の低下はネフロン数の減少とされることから、慢性腎不全の実験モデルとしては、高度腎摘出ラットが広く用いられている。本モデルは、ネフロン数減少下における化学物質の腎毒性評価上有用である他、残存ネフロンの代償性糸球体肥大に引き続き糸球体硬化症(FGS)を発現すること、および高血圧が認められることから、糸球体疾患の進行と抑制および腎性高血圧の研究に有用であり、腎疾患を対象とした医薬品の開発にも有用な動物と考える。

そこで我々は、今回ラットによる5/6腎摘出の術式および手術後の腎機能の変化について検討したので報告する。

方法：生後7から8週齢のWistar-Iwamichiラット(雄)20匹に、両腎からの同時5/6腎摘出を施し、術後の生存率を観察し、その内の7匹について腎機能の変化を検討した。

術後2週間目以降、経時的に飲水量、尿量、尿中クレアチニン、尿素窒素、Na、K、Cl、蛋白、浸透圧および血中のクレアチニン、尿素窒素、Na、K、Cl、浸透圧、赤血球数(RBC)、白血球数(WBC)、ヘマトクリット(Ht)、平均赤血球容積比(MCV)を測定した。また、同時期に血圧も測定した。

結果：1)術後6週間まで全例生存している。以後、観察を継続中である。

2)糸球体濾過率(GFR)が、正常ラットに比較してほぼ30%程度低下し、GFRの低下によると考えられる血液中の尿素窒素とKの増加が認められた。

3)尿量およびNa、K、Clの尿中排泄量の増加が、術後2週間目から認められ、これに関連するとみられる飲水量の増加および尿の浸透圧の低下が認められた。

4)尿中の蛋白の排泄量の増加が、術後2週間目で認められ、さらに4週間目では顕著に増加した。

5)血圧は、術後2週間目では変化が認められなかったが、4週間目以降顕著に増加した。

6)術後2週間目でRBC、Htの低下とMCVの増加が認められたが、術後4週間目以降回復する傾向にあった。

まとめ：術後2週間でGFRの低下が認められ腎不全の傾向を示すことおよび水分喪失性の腎障害を示すことが明らかになった。また、尿蛋白の排泄量の増加が術後2週間目から認められることから、術後比較的早期に糸球体濾過機能に関連した異常が認められることが明らかになった。6週間目以降の成績については、現在検討を継続中である。

山本 隆, 加島政利, 下假賢二, 岡崎啓幸, 永田良一

株式会社新日本科学 安全性第2研究室

〔目的〕近年, ある種の薬剤が網膜色素上皮に高い親和性を有し, 長期間の投与による蓄積性が示唆されることから, その眼毒性の発現が危惧されている. この網膜色素上皮の障害を電気生理学的に検査するためには ERG の c 波測定が必要である. 今回, 我々はカニクイザルを用いて ERG の c 波測定について基礎検討を行い, 若干の知見を得たので報告する.

〔材料および方法〕インドネシア産カニクイザル雄 37 匹雌 29 匹 (3~5 才, 体重 2~5 kg) を用いた. 麻酔 (塩酸ケタミンおよび塩酸キシラジン併用) 下で, 散瞳剤 (トロピカミドおよび塩酸フェニレフリン併用) で散瞳させた. 右眼角膜に閉電極, 前頭部中央に不閉電極を置き, 5 分間の明順応 (1,000 lux), 次いで 30 分間の暗順応後, 10 秒間 (50 lux) の刺激光を 5 分間隔で繰り返し照射し, 直流アンプで増幅した電位変化を誘発電位検査装置で記録した. また, 4 週間以上経過後再度測定し, 再現性をみた. c 波あるいは陰性波の認められる動物に c 波を特異的に消失させるヨウ素酸ナトリウム (70 mg/kg) を静脈内投与し, 波形の変化を検索した.

〔結果〕カニクイザルにおける c 波測定 of 技術を確立した. c 波の認められた動物は雄 37 例中 23 例, 雌 29 例中 18 例で, いずれも測定動物の 62% であった. 残りの動物は陰性波を示した. 電位および頂点潜時 (平均値 \pm 標準誤差) は雄で $267.1 \pm 44.9 \mu\text{V}$, 7.9 ± 0.1 秒, 雌で $337.3 \pm 44.4 \mu\text{V}$, 8.0 ± 0.1 秒であり, 測定時期による比較で再現性がみられた. ヨウ素酸ナトリウム投与後 c 波は消失し, 陰性波はさらに陰性側にシフトした.

久野博司、加藤倫代、近藤秀男

萬有製薬(株) 開発研究所

ラットにおけるいくつかの眼の自然発生病変は、化学物質により惹起される眼科学的变化に類似することが知られている。日本で繁殖されている Crj:CD Sprague-Dawley (SD)ラットについて眼科学的検査を実施し、その変化の頻度および特徴を調べた。ラットは日本チャールスリバー、厚木または日野生育所から1990年から1993年に購入し、検査した動物数は、4-7週齢が雄896匹、雌768匹、9-14週齢が雌雄各220匹、4-7週齢が雄145匹、雌134匹であった。

動物は室温 22 ± 2 ℃、相対湿度 55 ± 10 %に維持された動物室で個別にステンレス製金網ケージで飼育した。ラット用固形飼料(ピュリナ5002)および水道水を常時与えた。眼の前部、中間透光体、眼底について倒像検眼鏡(ナイツ、IO-H、非球面レンズ 28 または 20 D)を用いて検査した。なお、前部および中間透光体の異常について精査する必要がある場合は細隙燈顕微鏡(コーワ、SL-5)を用いた。

4-7週齢のラットには、0.3-2%の頻度で虹彩炎、虹彩癒着、瞳孔膜遺残、水晶体の前部包膜または包膜下の混濁、硝子体出血、網膜の褶曲形成、および脈絡膜の欠損が認められた。一方、硝子体動脈遺残、および核性白内障は5-8%の動物に観察された。角膜の結晶沈着は40-55%と高頻度に観察された。

他の2つの週齢群にも、同様な変化が観察された。これらの変化のうち脈絡膜の欠損は加齢により、僅かであるが頻度の増加が認められた。しかし、加齢による特徴的な病変は今回の調査では認められなかった。

前臨床安全性試験において被験物質の眼科学的变化を評価する際、使用するコロニーについて眼科学的变化の背景データを集積することが必要であると考えられる。

○山本光雄，池永哲二，加藤譲，納屋聖人，周藤勝一

協和安全性研究所

目的：コモンマーモセットは系統発生的にヒトに近縁な真猿類に属し，繁殖効率がよく，小型でかつ取扱いが容易であることから，大型サル類に替わる実験動物として開発が進められており，医薬品の薬効薬理，安全性試験への利用が期待されている。今回，コモンマーモセットの長期安全性試験への応用の可能性を検討するため，血液性状を1年間測定した。

方法：生後約1歳齢のコモンマーモセット雌雄各5匹を同居させた状態で飼育し，毎月1回16時間絶食後，大腿静脈より1.0～1.5 mlの血液を採血し，血液および血液生化学的検査を実施した。

結果：赤血球数，白血球数，血小板数は1年間ほぼ一定に推移した。雄のアルカリホスファターゼは1.5歳齢まで減少が認められた。試験期間中に妊娠した雌3匹においては総蛋白質の増加が認められた。また，雌雄ともラット，イヌ，カニクイザルに比ベトランスアミナーゼが2～5倍，ロイシンアミノペプチダーゼが100倍の高い活性を示した。

結論：アルカリホスファターゼ活性の変化など一部の变化を除き，血液および血液生化学的検査値は1年間ほぼ一定に推移した。また，経時的採血が可能であった。従って，安全性試験にマーモセットを使用し，血液および血液生化学的検討を充分に行われることが示唆された。

○久保山靖仁，森 薫，鈴木一生，出口隆志，周藤勝一

協和安全性研究所

目的：薬物を鼻腔内に投与する毒性試験では，適当な投与容量を設定することが重要である。しかし，これまでは経験的に設定されることが多く，明確な根拠が乏しいと思われた。そこで4週齢から14週齢のラット(Slc:SD, Slc:Wistar)を用いて，成長期における鼻腔容積の推移を測定し，週齢・体重・投与容量の関係を検討した。

方法：鼻腔内に樹脂を注入し鋳型標本を作製した。左右鼻腔の合流部にて鼻腔を分割し，その重量を測定した。また，同樹脂の重量をもとに鼻腔鋳型標本の重量-体積換算を行った。

結果：本試験条件下において，鼻腔容積はほぼ直線的に増加し，体重および週齢との間には良好な相関($r>0.80$)が認められた。同一週齢では，SD系がWistar系に比べ鼻腔容積が大きく，また，同一体重では，Wistar系がSD系に比べ鼻腔容積が大きい傾向を示した。

考察：これまでの鼻腔内投与毒性試験において経験的に適当とされていた投与容量は，本試験において求められた鼻腔容積の約30%に相当すると思われた。また，成長期における鼻腔容積は直線的に増加することが示唆された。これらの結果をもとに，鼻腔内投与毒性試験では，体重に応じて適当な投与容量を設定することが望まれると考えられた。

大野 広志、土屋 俊也、丸 ちか子、東條 宏子、野村 護、
高山 敏

第一製薬(株)開発研究所 安全性研究センター

グリコヘモグロビン (GHb)はヘモグロビンとグルコースがシッフ塩基結合し、さらにケトアミンを形成したもので、赤血球のGHb濃度は寿命に伴い増加する。そこで、今回、ラットまたはイヌに、溶血性貧血を誘発するアセチルフェニルヒドラジン (APHZ)および骨髄抑制性の貧血を起こすアドリアマイシン (ADM)の投与または瀉血処置(PBT)して、GHbへの影響をしらべ、毒性試験での貧血診断における有用性を検討した。

「方法」5週令のCD系ラット(7匹/群)にAPHZ(15 mg/kg, po)の7日間投与、ADM(7 mg/kg, iv)の単回投与またはPBT(2日に1回 1ml瀉血)を行い、血液学的検査、赤血球GHbおよび血清グルコース(GLU)を測定した。また、8カ月令の雄ビーグル(6匹/群)にAPHZ(4 mg/kg, po)またはDQ-2511(600mg/kg, po)を4週間投与後4週間休薬して、ラットと同様の項目を検査した。

「結果」ラットでは、赤血球数の減少が、PBT群では3日目より、APHZ群およびADM群では7日目に見られた。GHbは貧血の出現とほぼ一致して、APHZ群およびPBT群では7日目および3日目より低下し、ADM群では逆に3日目より増加した。網状赤血球数(RET)はAPHZ群およびPBT群では増加し、ADM群では殆ど見られなくなった。イヌでも、投薬群では貧血と一致してGHbの低下、RETの増加が見られたが、DQ-2511群では軽度のRBCの減少が見られた14日目に、GHbは低下傾向を示したのに対し、RETには変化は見られなかった。4週間の休薬により、貧血、RETの増加は消失したが、GHbはまだ低下しており、貧血があったことを示していた。

「結論」毒性試験における溶血および失血による貧血と骨髄抑制による貧血の鑑別にGHbは有用であることが示された。また、GHbは、貧血の回復時や軽度の貧血時でRETの変化が明らかでない時にも有用であると考えられた。

池田 孝則, 藤島 奈保恵

(財)動物繁殖研究所 薬理・代謝研究室

薬理・毒性試験において、薬物の循環器系に対する影響を調べる一般的な方法として心電図測定がある。しかしながら小動物での心電図の測定には、拘束あるいは麻酔が必要とされ、それらが心電図に影響を与えることが懸念される。また毒性試験での多数の動物の心電図の測定には長時間を要し、さらに拘束や麻酔による他の測定結果への影響の可能性も無視できない。そこで、簡便で、かつ無拘束・無麻酔下の心電図を測定する方法を考案したので簡単に報告する。

方法：ラットの、頸背部の被毛をバリカンで剪毛し、その部位に人用ディスプレイ電極を張り付けた。ラットを一般的な金属製個別飼育ケージに収容し、頸背部の電極を陰極とし、ケージを陽極として心電図を誘導した。今回の実験には、SD系雄性ラットを用いた。上記方法で、誘導記録した心電図と、拘束下または麻酔下の心電図を比較した。

結果および考察：無麻酔下の心電図は、拘束、無拘束を問わず筋電図の混入が認められ、この解析にはある程度の波形の加算平均化が必要であった。無拘束の心電図は、拘束下の心電図（肢第II誘導）とほぼ相似形を示したが、R-R間隔は拘束下と比較して長い傾向が認められた。麻酔下では、筋電図は消失するが、麻酔薬投与からの時間により心電図は徐々に変化した。

無拘束の方法は、当然ながら心電気軸の傾きは解析不能であるが、その他の解析（心拍数やPQRST波の解析）には応用可能であり、また多くの動物を短時間に測定する場合や、長期の測定に適し、毒性試験の検査法の一つとして利用可能と思われた。

P-210 抗原性試験における抗原調製法についての検討 I

—ペニシリンG-タンパク質結合物調製法に関する検討—

○磯部竹雄、井上智彰、大郷 豊、堀井郁夫

日本ロシュ薬 研究所・毒性病理部

低分子医薬品の抗原性試験において、抗原の調製法は試験の結果を大きく左右する可能性があり、動物は感作状態にあってもそれを検出できない可能性もある。よって、抗原の調製法によってどのように結果が異なるかを把握することは、医薬品の抗原性評価に重要なことである。本試験では、ペニシリンG (PCG) を陽性対照医薬品として取り上げ、キャリアタンパク質 (P) との結合物の調製法の違いによる免疫原性およびアレルギー-誘発原性の誘導能力および検出能力の違いについて調べた。抗原として PCG-P 結合物 (7日間条件下でイキエット) の PCG/P 結合分子比が40および4のもの、PCG-P 混合物 (生理的食塩水中でイキエット) の PCG/P 結合比が4のもの、およびPCG単体を用い、モットにおけるASA試験、PCA試験、ELISA、マウスにおけるPCA試験 (マウス-ラットPCA)、ELISAを行った。その結果、PCG-P 結合物とPCG-P 混合物では交差反応性が低く、PCGのPへの結合様式が異なることが示唆された。PCG単体の感作に対しては、PCG-P 結合物の方が混合物より検出感度が高かった。PCG-P 結合物の結合分子比は4より40のものの方が免疫原性、誘発原性ともに高かったが、ELISAでは4でも問題はなかった。マウスにおけるアジュバントについては、結合分子比の40の結合物に対しては、FCA よりもアジュバの方がIgEをより誘導したが、結合分子比が4の結合物に対しては低用量 (2μg/マウス) ではアジュバの方がIgEをより誘導した。この結果より、薬物-P 結合物の調製法またはアジュバントにより、抗原性が異なる可能性が有ること、アジュバのPに対する結合様式により、in vivo を反映していない場合も考えられ、注意を要することが分かった。

○大郷 豊、井上智彰、堀井郁夫

日本ロシュ(株) 研究所・毒性病理部

抗原性を持つ低分子医薬品は、原体またはその代謝物のタンパク質結合性が高い場合が多い。本試験では、動物を用いた抗原性試験において抗原調製時に代謝物を生成する反応系を加えることによって、抗原性がどのように検出されるかについて Surfanilamide (SAM) を陽性対照医薬品として取り上げ、検討したので報告する。抗原としては、S9mixとインキュベートした SAM (S9-SAM)、UV照射した SAM (UV-SAM)、Diazo-coupling により作製した SAM-タンパク質結合物、SAM 単体、SAM の代謝物として知られる 4-hydroxylaminobenzensulfonamide (HABSA) を用い、モルモットにおける ASA 試験、PCA 試験、ELISA、マウスにおける PCA 試験 (マウス-ラット PCA)、ELISA を行った。その結果、モルモットでは HABSA 単体を投与した場合、ELISA で抗体が検出され、HABSA を CFA と共に投与した場合、SAM-タンパク質結合物での惹起で ASA 反応・PCA 反応陽性および ELISA で抗体を検出することができ、HABSA の免疫原性が高いことが示唆された。また、UV-SAM を CFA と共に投与した場合、モルモット PCA 反応陽性例を認めた。マウスでは、S9-SAM を CFA と共に投与した場合、HABSA での惹起でマウス-ラット PCA 反応陽性例を認め、SAM を S9mix とインキュベートすることにより、生体内でも認められている代謝物である HABSA が生成し、免疫反応が誘導されたものと考えられた。また、HABSA 単独での惹起でもアヒライキリ-反応が誘導されたことから、HABSA の惹起原性は高いものと考えられた。以上の結果より、S9mix などの *in vitro* での代謝活性化の系を抗原の調製時に加えることにより、原体単独または原体-タンパク質結合物で検出できなかった抗原性を検出できる可能性が示唆された。

がん原性試験と同様の混餌経口投与方法による
身体依存性試験の試み

○栗崎泰行 西田信之 佐々木啓 佐藤秀蔵

武田薬品・薬剤安全性研究所

ラット等の小動物に身体依存を形成させる方法として薬物混入飼料法はよく知られている。本法は、薬物を混入した飼料を動物に摂取させる方法で飼料中の薬物濃度を段階的に増加させている。一方、がん原性試験でも通常、薬物混入飼料を動物に摂取させる方法を用いているが、飼料中の薬物濃度は動物の体重あたり所定の投与量となるように設定している。がん原性試験では本試験に先立ち、13週以内の予備試験を行っており、がん原性予備試験の一部として身体依存を評価できれば効率向上に寄与できると考えられる。そこで、今回、がん原性予備試験と同じ混餌経口投与方法でも身体依存性が評価可能であるか否かについて検討した。

ジアゼパム (200 及び 400 mg/kg/day) またはモルヒネ (40 mg/kg/day) を 4 週間混餌経口投与した後、基礎飼料に替えて自然休業したところ、ジアゼパム及びモルヒネのいずれの群においても体重減少等の退薬症候が認められた。さらに、ジアゼパム (10, 30, 100 及び 300 mg/kg/day) を F344/Jcl 及び Jcl:Wistar ラットに 4 週間混餌経口投与後、休業したところ、両系統とも用量依存的な体重減少を示した。その程度は Jcl:Wistar よりも F344/Jcl ラットの方が、さらに両系統とも雄よりも雌の方が強かった。以上の成績から、ジアゼパム及びモルヒネのいずれも 4 週間のがん原性予備試験と同一条件である単位体重あたり同一用量の混餌経口投与によりラットに身体依存を形成できることが確認できた。

黒沢 亨、桑原 紀、西山省二、浅岡宏康、藤田正敬

明治製菓（株） 薬品総合研究所 安全性研究所

骨髄毒性を明確に示す制癌剤アドリアマイシン（ADM）とAN1006を用い、骨髄毒性の発現機構について検討した。

[実験方法]

in vivo ; ICR系雄マウス、SD系雄ラット、雄性ビーグル犬及び雌雄カニクイザルにADMまたはAN1006を単回静脈内投与し、概略のLD50値、白血球数50%減少用量、白血球分類、骨髄細胞分類等を検討した。*in vitro* ; ラット、イヌ及びサルの骨髄細胞を培養し、DNA合成の50%抑制濃度を指標として骨髄細胞障害性を検討した。

[結果及び考察]

ADM及びAN1006の白血球数50%減少用量はラット>サル>イヌの順であり、ADMのそれはイヌではラットの約1/3であったが、AN1006では約1/40と明かな種差が認められた。ADM、AN1006ともに好中球とリンパ球が同率で減少した。骨髄中有核細胞数は末梢白血球数と同様の変化を示した。ADM及びAN1006ともに骨髄中の赤芽球系細胞、幼弱または成熟顆粒球系細胞及びリンパ球系細胞の減少程度は各細胞系でほぼ同率であることから、ADMとAN1006の作用点は同様であり、全血液細胞系に及ぶと考えられた。一方、*in vitro*において、ADM及びAN1006の50%抑制濃度はラット、サル及びイヌで近似していたことから、*in vivo*で認められたAN1006の骨髄毒性の種差はAN1006の代謝能の差によることが推測された。以上の様に、*in vivo*において薬物の作用点を判定すると同時に、骨髄培養細胞を用いることにより骨髄における毒性作用点と種差発現機構を解析できることが示された。

心筋障害犬における長時間心電図および血中CKの関連性について

○秋江靖樹、小尾 一、樋口芳克、市川敦子、清水憲次¹⁾
日下部憲道²⁾、内野富弥³⁾

(株)富士生物科学研究所¹⁾、EMイー・ラボシステム(株)²⁾、(株)動物ME診断リサーチセンター³⁾

毒性試験における心臓への影響の検索には、長時間心電図のほかに血中CK、LDH、GOT等の酵素ならびに組織学的検査が重要な指標となる。このうち長時間心電図および血中酵素の測定は、毒性の発現時期ならびにその経過を推測するためにきわめて有効であるにもかかわらず、実験動物においてそれらの関連性について検討した報告は少ない。そこで我々は、ビーグル2頭を用いて心筋障害が予想されるイソプロテレノールを大量皮下投与(10mg/kg)し、3日間の長時間心電図検査、経時的な血中総CKおよびアイソエンザイムを測定、さらに比較のためピーズ法による心筋梗塞モデル4頭についても同様の検査を行い、心電図および酵素活性変化の関連性について検討した。

その結果、イソプロテレノール投与により、心電図では投与直後から心拍数の増加と心室性拍動が認められ、心拍数は6～8時間から漸減、心室性拍動は8時間前後および16時間以降にピークがみられる二峰性の変化が認められた。心室性拍動を波形パターン別に解析したところ各ピークを中心として異なる波形が観察された。また、総CKおよびCK-MBは8～24時間をピークとする増加が認められ、発現からピークまでは心室性拍動の後半の出現と相関を示した。このことから、心室性拍動の前、後半では発現の機序が異なるものと推測された。一方、心筋への障害機序が明らかな心筋梗塞モデルでは、心室性拍動は硬塞数時間後から24時間をピークとして出現し、総CKおよびCK-MBの増加と相関を示し、心室性拍動が心筋の器質的障害に起因したものであることが示唆された。なお、現在心臓の組織学的検査を実施中であり、合わせて報告したい。

ラット尾静脈採血法のToxicokineticへの応用
- Phenobarbital-Naの血中動態 -

宮腰昶宏, 戸塚繁夫, 青木 一, 高橋靖代, 中村浩子
山下和男, 木村邦男, 増田 裕

三共株式会社 安全性研究所

(目的)

ラットから採血する手法として翼付静注針を用いるラット尾静脈採血法がある。今回、この採血法が短時間内で頻回採血を必要とする血中動態試験に応用可能か否か、またラットへの影響はどの程度であるのかを Phenobarbital-Na(PB)の単回および反復投与を例に検討した。

(方法)

実験 1. 7週齢の雄 F344ラットに単回経口(50 mg/kg, n=5)および静脈内(25 mg/kg, n=3)投与した。投与後 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 7, 24, 48, 72時間に各時点 300 μ l採血し血漿中 PB濃度を測定し動態パラメータを求めた。

実験 2. 7週齢の雄 F344ラットに 0, 25, 50, 100 mg/kg(n=5)を 14日間反復経口投与した。投与 1日, 7日, 14日は投与後 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 7, 24時間, 3, 6, 13日は投与後 24時間に採血(300 μ l)して血漿中 PB濃度を測定するとともに動態パラメータを求めた。また、ラットへの影響を調べるため体重, 摂餌量, ヘマトクリット値, 主要臓器重量の測定および血清生化学的検査を行った。

(結果)

各個体からの採血は量および時間を厳守し計画通り遂行できた。採血によるラットへの影響として採血の翌日に摂餌量, 体重およびヘマトクリット値に一過性の減少が認められたがいずれも軽度であった。一方、血清生化学的検査値に変化は認められなかった。血漿中 PB濃度およびその値から計算した動態パラメータの各個体によるバラツキは小さかった。反復投与後の動態パラメータでは AUCと $t_{1/2}$ の値が投与 1日に比較し投与 7日および 14日目に小さかった。

(考察)

翼付静注針を用いたラット尾静脈採血法によって同一個体から 24時間以内に経時的に計 7時点の採血が可能であった。採血による影響は認められたがその程度は軽く反復投与時の血中動態試験に応用できると考える。PBの反復投与による AUCと $t_{1/2}$ の減少は肝薬物代謝酵素の誘導を反映したものと考えられる。

画像解析システムを用いた実験的 paraquat 肺の結合組織性線維の計量評価

○白井明志・藤瀬 浩*・竹田真也・坪井利樹・政岡俊夫・赤堀文昭

麻布大・獣医・薬理、病理Ⅱ*

化学物質の毒性学的研究において、病理組織学的評価が行われているが、この評価には熟練を必要としている。そこで、画像解析システムを用いて、簡便でかつより客観的に paraquat(PQ) 肺線維化の程度を計量評価することを試みた。

SD 系ラットを 1 群 9 匹ずつ無作為に割り付けし、PQ 0 (生食投与)、7、25 mg/kg の各用量を投与した。投与日を 0 日として 3、6 および 9 日目にラットを屠殺し、速やかに肺を採取した。なお、25 mg/kg 群では PQ 投与後 7 日以内に全例死の転機をとったため 9 日目の試料は採取できなかつた。右肺後葉を 10%ホルマリン固定、パラフィン包埋した後、5 μ m の薄切切片を作成、これにアザン染色を施し計測用の試料とした。計測は、画像解析システム(Olympus-Avio Color Image Analyzer SP 500)によってアニリンブルーで染色された結合組織性線維の面積を単位面積あたりの面積比として算出した。

結合組織性線維の面積比は投与後 6 日目において、対照群 (生食投与群) の $1.12 \pm 0.059\%$ に比べ、25 mg/kg 投与群では $1.99 \pm 0.180\%$ と有意に高い値を示した。また、光学顕微鏡による観察でも投与後 6 日目の 25 mg/kg 投与群は結合組織性線維の増加が観察された。一方、投与後 3 日目の 25 mg/kg 投与群、投与後 3、6 および 9 日目の 7 mg/kg 投与群では対照群とほぼ同等の値を示していた。

以上のように、画像解析システムによる組織学的計測方法は肺の線維化を計量的に評価する場合に有用であることが判明した。

多臓器中期発癌性試験法を用いたヘテロサイクリックアミンの低濃度複合投与によるラット大腸発癌相乗作用の検討

萩原昭裕、田中 光、河部真弓、長谷川良平、白井智之

名古屋市大・医・第1病理

【目的】加熱食品中に含まれているヘテロサイクリックアミン(HA)のうち、発癌性を示す5種類について低濃度複合投与の影響を多臓器中期発癌性試験法を用いて検討した。

【方法】6週齢のF344系雄ラット440匹を用い、複数の臓器に発癌イニシエーションを行う目的で、最初の4週間に5種類の発癌物質(DEN, MNU, BBN, DHPN, DMH)を投与後(DMBDD処置)、HAを24週間投与した。HAとしてラット大腸に標的性を示すPhIP(300ppm), Glu-P-1(300ppm), Glu-P-2(600ppm), IQ(300ppm), Me-IQ(200ppm)を選択し、各々の発癌量とその1/5および1/25量を投与する群と、5種類を1/5, 1/25の濃度で複合投与する群を設けて検討した。また、DMBDD処置のみの対照群、DMBDD無処置各投与群も設定した。28週経過後に、屠殺剖検し、全身諸臓器を病理組織学的に検索した。

【結果】大腸および小腸の腺癌の発生頻度および個体当りの発生個数は、いずれのHAでも用量相関性に増加した。1/5および1/25濃度の複合投与群における大腸癌の個体当りの発生数には、加算効果を認めたが相乗効果は見られなかった。一方、小腸癌の発生個数においては、1/25濃度の複合投与群において相乗効果が認められた。同様の発癌相乗効果が肝臓および外耳道腺においても観察された。

【結論】肉などの焼け焦げ中に含まれるHAは、個々の含有量は低くても複数を同時に摂取することにより相乗的に発癌の危険性が増す可能性のあることが示された。

小林和雄、橋口淳一、北島省吾、萩原 孝、広内康彦
岩田 聖、井上博之

(財)食品農医薬品安全性評価センター

器官重量の増減は、被験物質の安全性を評価する上で重要な要素である。実験用ビーグルの成長期の体各部の計測値の推移と臓器重量の推移については、福井らおよびAndersenらによって成書として記述されている。今回、我々は安評センターで安全性試験のために対照動物として使用した雄59例、雌55例について体重と各器官重量の相関関係について調べたのでその結果について報告する。

〔方法〕 使用動物は、LRE（米国）から生後5ヵ月齢の動物を購入し、一定の検疫および馴化飼育を行った後、それぞれ目的によって試験に供した。各動物は、試験終了時にペントバルビタールナトリウム麻酔下で、頸動脈あるいは液下動脈切断により致死せしめた。各器官については、摘出後直ちに重量を測定した。これらの測定値を7、8-9、10-11および18-19ヵ月齢に区分し、体重と器官重量の相関係数を求めた。

〔結果〕 雄では体重と器官重量の関係は、7-11ヵ月齢では主要器官、すなわち心、肺、肝、脾および腎は体重と器官重量との間に相関性あるいはその傾向がみられた。しかし、脳、下垂体、甲状腺、副腎、精巣、精巣上体および前立腺では相関性はみられなかった。また18-19ヵ月齢では測定した殆どの器官が相関性あるいはその傾向を示した。雌では、各時期を通じて明らかな相関性を示すものはなかった。

〔考察〕 イヌの器官重量は、若齢動物では個体差および性差が大きく、その評価に当たっては十分な組織学的検査の結果との相互評価が必要と考える。

スペキュラーマイクロスコープによるサルの角膜内皮細胞の観察

○森田晴夫, 佐久間善仁, 河上喜之

(株)前臨床医学研究所

スペキュラーマイクロスコープを用いて角膜内皮細胞を生体下で観察する方法は、眼科領域における手術や治療法の安全性評価に重要な検査項目となっている。今回、サルの角膜内皮を観察する機会に遭遇し、興味ある知見が得られたので報告する。

＜材料と方法＞

動物：カニクイザルのオス15頭およびメス16頭（正常例）。

別に、オス1頭（角膜損傷例）。

いずれも、推定2～7才（一部7才以上）。

スペキュラーマイクロスコープ：

全身麻酔後サルの頭部を固定し、接触型のスペキュラーマイクロスコープ（SP-5500, 甲南カメラ研究所）を用いて、両眼の角膜内皮細胞を観察・撮影した。フィルム現像後、拡大プリント（X200）を作製し、Fix frame 法を用いて、角膜内皮の細胞密度を算出した。

＜結果および考察＞

角膜内皮の観察では、ヒトとは異なり、大きさの均一な六角形の細胞がきれいに並んでいるのがみられた。内皮細胞の密度（cells/mm²）には、ヒト¹⁾と同様に左右の差、性差は明らかでなかった。また、ヒト¹⁾では、加齢により細胞密度の減少、内皮細胞の大小不同、六角形細胞の出現率の低下がみられるが、今回観察したカニクイザルの年齢範囲でも、加齢によると考えられる細胞密度の減少傾向が7才以上のサルにみられた。また、角膜損傷例では、右眼球損傷部の近接部位に明らかに大型の角膜内皮細胞が散見された。

＜参考文献＞

- 1) Uemura, Y. 1990. Specular microscopy of corneal endothelium. pp39-97. In Specular Microscopy, Nanzando, Tokyo (in Japanese).

コリンエステラーゼ(ChE)阻害剤投与後にみられる
気管内泡沫状粘液について

○渡辺正人、堀田真希、石崎誠一、伊藤博敏

日本バイエルアグロケム(株) 日野研究所 安全性評価研究部

〔目的〕有機リン・カーバメイト剤投与後、死亡動物の剖検で見られる気管内泡沫状粘液がどのように生成されるか、またこれが致死性にどれほど関与しているかをしらべた。

〔材料及び方法〕供試薬剤として Eserine を使用し、SD 系ラットに対し致死量投与後の気管内の泡沫状粘液出現の肉眼観察と呼吸・心拍の変化、さらに総唾液分泌量を経時的にしらべた。更に SD 系ラット及び ICR 系マウスにおける Eserine の急性毒性に対する気管切開及びアスピレーターを用いての口腔洗浄の効果をしらべた。

〔結果〕Eserine 投与後出現する気管内泡沫状粘液はその多くが口腔に分泌された唾液の誤嚥によるものであった。また呼吸曲線の変化から投与後の呼吸数の減少と呼吸深度の増大、さらに続いて気管内泡沫状粘液の貯留によると思われる不規則な呼吸が認められた。心拍については一過性の増加傾向の後、前述の呼吸障害に追従しての徐脈がみられた。また、総唾液分泌量については用量相関的な増加がみられた。更にラット、マウスにおける Eserine の LD₅₀ 値は気管切開することにより 3~5 倍近く増加し、アスピレーターによる口腔洗浄によっても 1.2~1.5 倍増加した。

〔考察・まとめ〕今回の実験で ChE 阻害剤の急性中毒死亡例にみられた気管内泡沫状粘液が主に唾液の誤嚥で生じていることがわかった。この誤嚥は ChE 阻害による嚥下反射不全などによると考えられる。更に、気管切開や口腔洗浄により、Eserine の急性 LD₅₀ 値が大きく増加したことから、ChE 阻害剤による急性中毒ではこの気管内泡沫状粘液の存在がその致死性に大きく影響していることが示唆された。

有機リン系農薬および分解・代謝物の遊離肝細胞に及ぼす影響

○宮島 敦子, 篠内 桃子, 郭 新彪, 大野 泰雄, 高仲 正

国立衛生試験所・薬理

農薬の植物体での分解・代謝物の中には毒性の強いものも見いだされてきており、残留農薬の安全性評価に際してはこれらの分解・代謝物を含めて評価を進めていく必要が生じてきている。そこで、薬物代謝活性が生体位の場合に近い、肝より分離した直後の細胞（遊離肝細胞）を用いて、有機リン系農薬および分解・代謝物の肝細胞への直接または代謝活性化を介する毒性について検討を行なった。

〔方法〕雄ラットからコラゲナーゼ還流法により調製した遊離肝細胞を有機リン系農薬および分解・代謝物と共にインキュベートし、Viability (LDH遊離法) およびGlutathion (GSH)含量を測定した。なおGSH含量は細胞を生理食塩水で1回洗浄、4% PCAで除蛋白した後、その上清についてo-phthalaldehydeを用いた蛍光法により測定した。

〔結果・考察〕有機リン系農薬原体はEdifenphos, EPN, IBP, Erusan, Diazinonのように、1 mMで細胞のViabilityの低下およびGSH含量が減少したものと、Fenthion, Trichlorfon, DisulfotonのようにGSH含量は減少したものの細胞のViabilityの低下はほとんど観察されなかったものに大別された。有機リン系農薬の分解・代謝物のうちリン酸エステル(Methyl acid phosphate, Ethyl acid phosphate, Isopropyl acid phosphate) はいずれも、1 mMでは細胞のViabilityおよびGSH含量に対しほとんど影響を与えなかった。これに対して、IBPの代謝物であるBenzylmercaptanでは、GSH含量の減少と緩やかなViabilityの低下が観察された。また、Viabilityの低下およびGSH含量の減少の時間的な関係についてはIBP, Erusan, EdifenphosはGSH含量の減少がViabilityの低下に先行していたが、EPN, Diazinonではそのような様相は認められなかった。以上より、有機リン系農薬の主要分解・代謝物であるリン酸エステルでは肝細胞毒性を示したものはなかった。また農薬原体の遊離肝細胞への毒性はコリンエステラーゼ阻害剤としての共通の性質と直接結びつくものではないと考えられた。

農薬41種類のラット肝中期発癌性試験法を用いた解析

倉田靖、柴田雅朗、宮田恵美子、長谷川良平、伊東信行

名古屋市大・医・第一病理

【目的】41種類の農薬の発癌性について肝中期発癌性試験法を用いて検討した。

【方法】6週齢のF344系雄ラットを用い、diethylnitrosamine (DEN) 200 mg/kg b.w.を1回、腹腔内投与し、2週後より被験物質を6週間混餌投与した。全群第3週に肝部分切除を行ない8週で屠殺剖検した。各群に発生した肝の前癌病変であるglutathione S-transferase 胎盤型 (GST-P) 陽性細胞巢の単位面積あたりの個数および面積を画像解析装置を用いて解析しDEN投与のみの対照群と比較検討した。尚、農薬として広範に使用されており文献的に毒性等が知られているものを被験物質とした。

【結果】発癌性が知られている19種類の農薬のうち既知肝発癌物質では10種類 [aldrin, captafol, chlorobenzilate, p,p'-DDT, dieldrin, hexachlorobenzene (HCB), α -hexachlorocyclohexane (α -HCH), propiconazole, triadimefon, trifluralin] が陽性 (10/12, 83%) であり、2種類のものが陽性傾向 (17%) を示した。肝以外に標的性を持つものではalachlorおよびcaptanに陽性 (2/7, 28%) が認められた。しかし、これら本試験法で陽性となった12例の物質のうちAmes test 陽性のものは3例のみであった。

一方、発癌性が陰性と報告されている物質のうち2種類の化合物、malathion と vinclozolinが陽性を示し、発癌性が未知の物質においても9例に陽性結果が見られた。

【結論】本試験法は、二段階発癌説に基づいており、陽性物質は肝発癌物質あるいは肝発癌プロモーターと理解される。したがって、本試験法は肝を標的とする発癌物質探索に優れ、今回検索した農薬についてはAmes test に比較して極めて高い検出率を発揮した。また、肝には標的性がないと報告されている発癌物質も低率ながら陽性となり、それらは肝発癌プロモーターである可能性が高い。

アゾ系化合物の変異原性

○竹半伸一¹ 木下浩一¹ 戸川満里子¹ 今田順次¹ 天羽生秀夫² 楳本征也²大塚化学(株)¹鳴門研究所²技術部

アゾ系重合触媒は高分子のラジカル重合の触媒として幅広く用いられている。今回我々は、変異原性に関する報告例がほとんどない6種類のアゾ系化合物〔①2,2'-Azobis(isobutyronitrile)[AIBN], ②2,2'-Azobis(2,4-dimethylvaleronitrile)[ADVN], ③2,2'-Azobis(2-methylbutyronitrile)[AMBN], ④1,1'-Azobis(1-cyclohexanecarbonitrile)[ACHN], ⑤4,4'-Azobis(4-cyanovaleric acid)[ACVA], ⑥1,1'-Azobis(1-acetoxy-1-phenylethane)[AAPE]〕について変異原性を調べたので報告する。

変異原性の検索には、*in vitro*試験系の復帰突然変異試験および*in vivo*試験系の小核試験を用いた。復帰突然変異試験はAmesらの方法を一部改良した37°C-20分のプレインキュベーション法で実施した。供試菌株には*S. typhimurium* 4菌株と*E. coli* WP2uvrA菌株を用い、S9Mixの存在下、非存在下で復帰変異コロニー数を調べた。小核試験では、8週齢のS1c:ddYマウスに2回経口投与し、最終投与後24時間後および48時間後に骨髓塗抹標本を作製した。細胞はアクリジンオレンジ液で染色し、小核を観察した。

その結果、復帰突然変異試験では代謝活性化の有無にかかわらず、AIBN, AMBN, ADVN, ACHN, ACVAおよびAAPEとも、いずれの菌株およびいずれの用量においても復帰変異コロニー数の有意な増加は認められなかった。マウスを用いた小核試験においても、いずれの化合物とも小核出現頻度の有意な増加はみられず、小核誘発能は認められなかった。

ラット肝中期発癌性試験におけるコーヒーおよびその各種含有物質の修飾作用

佐野真士、武貞徳子、今井田克己、小木曾正、伊東信行

名市大・医・第一病理

今回、我々はGST-P陽性細胞巣を指標としたラット肝中期発癌試験法を用いて、コーヒーおよびその各種含有物質について肝に対する発癌修飾作用を検索した。

【方法】6週齢F344系雄性ラット230匹を用い、実験開始時にDEN(200mg/kg)を腹腔内投与し、2週後よりインスタントコーヒー(5%)、インスタントコーヒー・デカフェインタイプ(5%)、ドリップ式抽出コーヒー(8g/140ml)、caffeine(0.1%)、methylglyoxal(0.2%)、glyoxal(0.2%)、theophylline(0.3%)をそれぞれ飲料水に、theobromine(0.4%)は飼料中に混和し6週間自由摂取させた。また、DEN投与のみの対照群をそれぞれ設け、全群実験開始3週経過後2/3肝部分切除を行った。動物は8週経過後屠殺し、肝のGST-P染色標本を作成しGST-P陽性細胞巣の数と面積を測定した。

【結果】methylglyoxalでは、単位面積あたりの個数が7.97個/cm²と対照群(5.92個/cm²)と比較して有意に増加し、glyoxalで数が6.06個/cm²、面積が0.40mm²/cm²、theobromineでは数が5.29個/cm²、面積が0.33mm²/cm²といずれも対照群(数7.83個/cm²、面積0.55mm²/cm²)と比較して有意な減少が観察された。他の物質には修飾作用はみられなかった。

【結論】methylglyoxalには軽度の肝発癌の促進を、glyoxalとtheobromineには抑制作用をみたが、いずれも対照群の変動範囲内の値でありコーヒーおよび関連物質の肝発癌に対する明らかな修飾作用は確認できなかった。

成熟ラット心筋細胞初代培養法の確立と
薬物の心毒性の評価への応用

○藤川 康浩、炭竈秀二、見上 孝、山津清實

エーザイ（株）安全性研究部

【目的】薬物のもつ心毒性を *in vitro* 実験で評価する手段の一つとして心筋細胞の初代培養を実施した。心筋細胞の初代培養については胎仔の心臓より単離した心筋細胞を用いたものが多いが、本研究では、成熟ラットより単離した心筋細胞での初代培養の条件の確立を目的に実験を行い、併せて薬物の影響を検討した。【方法】培養条件の検討：心筋細胞はランゲンドルフ標本として、コラゲナーゼ溶液を灌流する方法によってラットの摘出心臓より単離した。培養条件としては、培養液のpH、細胞接着因子の有無、播種細胞数について各々2~4の条件を設定し、プレートへの接着率を指標に最適な培養条件について検討した。薬物の影響：培養条件の検討結果より選択した条件で心筋細胞の初代培養を行い、薬物を培養11日目に処置した。薬物は、*in vivo* で心筋毒性があるアミトリプチリン(ATP)とアドリアマイシン(ADR)を用いた。薬物処置後、培養液中の酵素活性(LDH, CPK, GOT)の測定およびMTTアッセイを行い、指標とした。【結果ならびに考察】培養条件は、培養液のpHが7.1、1ウェルあたりの播種細胞数は 3×10^3 が、また、細胞接着因子ではラミニンをプレートにコーティング($2.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)する組み合わせにより最も良好な接着率が得られた。薬物処置した際の指標のうち、CPKとGOTにはいずれの薬物においても著変は見られなかった。これに対しLDHは、ATPおよびADR処置(10^{-4}M)により著しく上昇した。また、MTTアッセイにおいてもATP, ADR処置ではMTTフォルマザンの生成量が著しく減少し、この結果から両薬物の心筋細胞毒性が本実験系でも示された。以上成熟ラットの心筋細胞初代培養法により心毒性をもつ薬物についての評価が可能であることが明らかとなった。

矢野友啓¹、石川学²、萩原清和¹、市川富夫¹国立健康・栄養研・応用食品¹、日大・農獣医・食品化学²

4-ニトロキノリン1-オキサイド(4NQO)によって誘発される肺腫瘍発生は、グリセロール同時処理により促進されることが知られている。昨年の本学会でグリセロールによる肺腺腫発生の促進要因の1つとして、肺における活性酸素発生能の上昇とそれに伴った核への酸化ストレスの増大が関与している可能性を報告した。今回、肺腺腫発生を制御する栄養因子としてのビタミンEと鉄の関与を検討した。実験には、6週齢のddY系雄性マウスを用い、森の方法に従って4NQOを10 mg/kg体重の用量で実験開始日に1回皮下投与した。グリセロールは5%水溶液として実験開始日より4週間自由に摂取させた。コントロール食の20倍のビタミンE及び5倍の鉄を含んだ食餌をそれぞれビタミンE添加食、鉄添加食として用いた。そして、実験開始4週間後に、各群における肺の核画分のTBARS、ビタミンE及びDNA単鎖切断(DNA-SSB)レベルを測定し、実験開始23週間後に、肺に発生した腺腫を形態学的に計測した。

その結果、ビタミンEはグリセロールにより誘発された核への酸化ストレス及びDNAの酸化損傷を有効に抑制し、また、グリセロール処理により増加した肺腺腫の発生も有意に抑制した。さらに、鉄はグリセロールにより誘発された核への酸化ストレス及びDNAの酸化損傷をさらに増大させた。これらの結果から、活性酸素が関与した肺腺腫の発生に対し、核への酸化ストレスを制御する事を介してビタミンEは抑制因子として、鉄は促進因子として働く可能性が示唆された。

ディーゼル排ガス微粒子 (DEP) のモルモット摘出
各臓器に対する影響

○榊原充久¹⁾、南 勝¹⁾、森 洋樹²⁾、柳本抄美華²⁾、
嵯峨井勝³⁾

¹⁾東日本学園大・薬・薬理、²⁾同・微生物薬品化学
³⁾国立環境研

(目的) ディーゼルエンジン車は多くのメリットがある反面ガソリンエンジン車に比べると30-100倍の粒子状物質を排出し、大気汚染源として問題視され疫学的研究がなされている。本研究ではディーゼル排ガス微粒子 (DEP: diesel exhaust particles) の臓器への直接的障害を明らかにする目的でモルモットの摘出標本を用いて以下の実験を行った。(方法) DEP は総排気量2730cc、4気筒直噴式ディーゼルエンジンを運転しグラスファイバーフィルター上に捕捉したものをDMSOに溶解して用いた。標本は37℃で95% O₂と5% CO₂の混合ガスを通気したLocke-Ringer、Tyrodeまたは Modified-Krebs 液中に一定の張力を付加して懸垂し、回腸は等張性張力変化、ほかは等尺性張力変化を増幅記録した。なお左心房標本には1Hz、パルス幅5msec 矩形波の電気刺激を加え駆動した。DEP の濃度は栄養液槽内での最終濃度 (g/ml) で表した。(結果) 1) 回腸標本はDEP の 5×10^{-4} g/ml により収縮反応を示した。気管標本は同濃度では弛緩反応を示した。2) DEP は左心房標本において 10^{-5} - 10^{-3} g/ml の範囲で用量依存的に、はじめ陽性ついで陰性の2相性変力作用を示し心停止に至った。この反応はプラゾシン、ヨヒンビン、プロプラノロール、アトロピン、ベラパミル、インドメタシン、ジフェンヒドラミン、ケタンセリンおよびSOD前処置によっては抑制されなかった。

(結語) DEP は高濃度において摘出モルモット心筋標本に対して2相性の変力作用を示し心停止を惹起した。現在のところ、このDEPによる心毒性発現機序は不明である。

ミョウバン (Alum) およびコチニール (Cochineal) の
ラットにおける90日間同時反復投与毒性試験

○川崎 靖、梅村隆志、佐井君江、長谷川隆一、門馬純子、
斎藤 実、松島裕子、中路幸男、津田充宥、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

【目的】ミョウバンは食品添加物として保色剤や膨張剤等に広く使用されている。一方、コチニールはメキシコおよび中央アメリカ原産のサボテン (*Opuntia coccinellifera*) に寄生する妊娠した昆虫 (*Dactylopius coccus* Costa, 燕脂虫の一種) を乾燥、粉末にした天然色素である。我国ではコチニールはレーキ色素としてミョウバンとの製剤の形にして使用されることが多い。両食品添加物はその使用量も多く、同時摂取される可能性も高い。今回我々は、両物質の90日間同時反復投与毒性について検討した。

【実験方法】5週齢のSlc:Wistar系ラット一群雌雄各々15匹からなる5群を設け、0、0.75%Alum + 0.75%Cochineal (1.5%AC), 1.5%Alum+1.5% Cochineal (3.0%AC), 3.0% Alum (3.0%A) および3.0% Cochineal (3.0%C) の混合飼料を90日間自由摂取させ、4週および13週目に血液学的、血清生化学的および病理組織学的検査を行った。

【結果および考察】一般状態は雌雄の各群ともに実験期間中、検体投与による特異的な症状の発現は認められず、死亡動物例も認めなかった。雄3.0%A群で2週目以降有意な体重増加の抑制がみられた。血清生化学的には雄の3.0%AC群、3.0%A群および3.0%C群が13週目でTGの有意な減少を示した。臓器重量では13週目に雄の3.0%AC群および雌雄の3.0%A群で脾臓がいずれも有意の減少を示したが、病理組織学的には変化が認められなかった。

以上の結果から、ミョウバンおよびコチニールの90日間同時混餌投与において、4週および13週目に見られた血液学的、血清生化学的および病理組織学的変化はいずれも散発的で用量相関性もないことから、同時投与による影響とは考えられない。

難燃性可塑剤 Tributoxyethylphosphate (TBEP) のラット
における 90 日間反復投与毒性試験

○津田充有、斉藤 実、梅村隆志、川崎 靖、門馬純子、
松島裕子、松本真美、伊佐間和郎^{*}、鹿庭正昭^{*}、黒川雄二

国立衛生試験所 安全性生物試験研究セ・毒性部、^{*}療品部

【目的】TBEPはプラスチックや合成ゴムの可塑剤、難燃剤、床磨き添加剤等として家庭用品にも広く使用されており、環境中からも検出されている。LD50値（ラット、経口）として3000mg/kgが知られている。Laham等は、SDラットに対する強制経口投与による毒性試験（0.25及び0.5ml/kg, 18週）を実施しているが、ヒトの安全性評価に必要なNOAELの報告はみあたらない。本研究では、TBEPのNOAEL及びADI値を評価する目的で、ラットに対する90日間反復経口投与による毒性試験をOECDガイドラインに準じて実施した。

【方法】5週令Wistar系ラットを1群15匹とし、雌雄各対照を含む4群を設けた。飼料中のTBEP濃度は、0, 0.03 (L), 0.3 (M) 及び3.0% (H) とした。動物は金網ケージで個別飼育し、水道水を自由摂取させた。体重及び摂餌量は週1回測定した。投与1カ月及び3カ月目に各半数を、エーテル麻酔下で採血、血液学的、血清生化学的測定、屠殺後、臓器重量測定及び病理組織学的検索を行った。

【結果及び考察】雌雄共に、H群で体重増加抑制、雄のM、H群、雌H群で肝臓及び甲状腺の比重量増加がみられた。血清生化学的には、雌雄共に総bilirubinの減少（M、H群）、 γ -GT及び膵臓amylase活性が上昇、肝臓及び膵臓障害を示唆した。また、有機リン化合物に予測されるcholine esterase活性阻害が、雌雄共に M、H群でみられ、雌H群で50%低下した。しかし、神経障害を想起させる症状は、H群で軽度な自発運動の減少がみられた以外は観察されなかった。現在、病理組織学的検査が進行中であるが、この結果を待ってTBEPのNOAEL及びADIを評価する予定である。

金子豊蔵¹⁾、下武男²⁾、安原加寿雄²⁾、広瀬明彦¹⁾
小川幸男¹⁾、鈴木幸子¹⁾、中路幸男¹⁾、黒川雄二¹⁾
国立衛生試験所安全性生物試験研究センター-毒性部¹⁾
病理部²⁾

〔目的〕染料中間体および有機合成に使用されているo-Nitrotoluene(o-NT)について、その毒性を評価するためにラットでの反復投与試験を行なった。併せて、構造類似化合物であるNitrobenzene(NB)と比べ毒性の質と程度に差があるか否か、既存データに基づいて比較検討した。

〔方法〕5週令のSlc:Wistarラットにo-NTの0(対照)、3.6、18、90または450mg/kgを28日間反復経口投与し、一般状態の観察、体重と摂餌量の測定、血液学的検査、血液生化学的検査および病理学的検査を行なった。なお、対照と450mg/kgには14日間の回復群を設けた。

〔結果および考察〕o-NTによる主な毒性所見は、90あるいは450mg/kgで発現した赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値の減少、脾臓のヘモジデリン沈着、うっ血、髄外造血などの溶血性貧血に加えて、90mg/kg以上での血清蛋白の減少や450mg/kgでの肝細胞腫大、胆管増生などの肝障害であった。

一方、NBによる溶血性貧血はメトヘモグロビンの形成に基づいて発現することが判明していることから、o-NTの場合も同様の機序で発現したものと推察される。両化合物の毒性比較において、o-NTでは貧血の程度は著減し、かつ精巣や中枢神経系の障害が発現していないことから、NBのベンゼン環にメチル基1個が置換されることにより毒性が減弱することが示唆された。

回復試験では溶血性貧血と肝障害は減弱ないし消失したことから、これらは可逆的性質の変化と考えられた。

無影響量は18mg/kgと推定された。

生分解性プラスチックのラットにおける28日間混餌投与毒性

吉田秀信、鈴木幸子、高田幸一、斉藤実、小川幸男、
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

〔目的〕近年、環境保護の目的から生分解性プラスチックが使用され始めているが、これらの安全性に関する報告はほとんど見られない。今回、生分解性プラスチックの安全性を調べる目的でこれらの一つであるアジコートA-2000 (Poly- γ -methylglutamic acid: 以下アジコート) のラットによる28日間の混餌投与毒性試験を行なった。

〔方法〕5週令のSlc:Wistarラットにアジコートを0(対照), 0.2, 1.0および5.0%になるようにF-2粉末飼料(船橋農場)に添加し28日間自由に摂取させ、一般状態の観察、体重と摂餌量の測定、血液学的検査、血液生化学的検査および病理学的検査を行なった。なお、対照と5.0%群には14日間の回復群を設けた。また、腸管内で分解されることが考えられ、比較のためグルタミン酸の5%およびアジコートの0.05と5.0%を混餌する同様の試験を追加した。

〔結果および考察〕血液学的検査において雌の全投与群と雄の5.0%群においてリンパ球の軽度な減少とこれに伴う白血球数の軽度な減少が認められ、同じ群で脾臓体重比重量と実重量に低値が認められた。また、グルタミン酸の雌の5%群でも同様の変化が認められた。これはアジコートがグルタミン酸の γ 位メチルエステルを構成単位とするポリペプチッドであり、また、生体内においてペプチダーゼあるいはエステラーゼの作用によりグルタミン酸を生じると考えられることから、アジコート大量投与により、生体内でグルタミン酸が生じ、生体内の栄養状態が変化したことによる二次的影響と考えられた。この白血球の変化のほかに投与による明らかな影響は認められなかった。

2,2'-メチレンビス(4-エチル-6-tert-ブチルフェノール)
のラットにおける長期反復投与毒性試験

○高木篤也、高田幸一、佐井君江、門馬純子、会田喜崇*、
鈴木幸子、内藤克司、長谷川隆一、黒川雄二

国立衛試・安全研・毒性部、*総合評価研究室

2,2'-methylenebis(4-ethyl-6-tert-butylphenol) (MBEBP)は、アルキルフェノール系抗酸化剤でプラスチックおよび合成ゴムの老化防止剤として用いられている。その毒性に関しては、1%MBEBP添加飼料を3カ月間投与したラット雄で精巣萎縮が、雌で上皮小体の空胞化が起こることを報告した¹⁾。今回、MBEBPの長期毒性を調べるため、ラットを用いた18カ月間の長期反復投与毒性試験を行なったので報告する。

【方法】一群30匹の雌雄Slc:Wistarラット(5週齢)にMBEBPを0.03(L)、0.1(M)及び0.3(H)%の各濃度で飼料に添加して固形飼料とし、18カ月間自由に摂取させ、6、12及び18カ月目に血液学的、血清生化学的、病理組織学的検査を行なった。

【結果】雄H群、雌M、H群で有意な体重増加抑制が認められた。死亡率は各投与群とも対照群と比較して差は認められなかった。血液学的検査では雌雄ともH群で軽度の貧血が認められた。血清生化学的検査では雌雄H群でBUNの有意な増加が認められた。病理組織学的検査では雄の対照群及びL群で腎尿細管拡張、同基底膜肥厚等の加齢性変化が認められ、M、H群でこれらの変化が有意に増強された。また、雌L、M、H群で亜急性試験と同様に上皮小体の空胞化が認められ、さらに、亜急性試験で上皮小体の変化が認められなかった雄でも長期投与によりH群で上皮小体の空胞化が認められた。一方、亜急性試験で認められた精巣障害作用(1%MBEBP)はH群(0.3%)でも全く認められず、長期間曝露による精巣毒性の増強は少ないものと推定される。

1) Takagi et al., J. Toxicol. Sci., 17, 135-153, 1992.

吸入暴露によるクロロホルムのBDF1マウスに対する毒性
その1-毒性作用の特徴

山本静護、西沢共司、相磯成敏、笠井辰也、竹内哲也、
松島泰次郎

中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター

クロロホルムの毒性を検討する目的でBDF1マウスを用いて、種々の条件で28日間及び3ヶ月の吸入暴露試験を行った結果、死亡状況について興味深い毒作用が示されたので報告する。

3ヶ月試験は1群雌雄各10匹で、1対照群、5投与群（12, 25, 50, 100, 200ppm）で暴露を行った。その結果、雌では各群とも全匹生存したのに対し、雄ではその生存数は、12ppm群 8匹、25ppm群 1匹、50ppm群 0匹、100ppm群 2匹、200ppm群 0匹であり、生存数に著しい性差を示した。死亡は暴露開始後1週間以内で発生し、この期間生存し得た個体は試験終了まで生存した。死因は腎の近位尿細管壊死であった。

次に、28日間試験では雄の感受性を調べるため、暴露期間の前期と後期で2段階に暴露濃度を変化させ試験を実施した。第1段階の14日間は1群10匹、3群の構成でそれぞれ5, 10, 15ppmの濃度で暴露を行った。この結果、5, 10ppm群は全匹生存したが、15ppm群では4匹死亡した。第2段階の14日間は5, 10ppm群の10匹を5匹づつに分け、各々30, 90ppmで、15ppm群の6匹は全匹90ppmで暴露を行った。この結果、暴露濃度を5ppmから30ppm及び90ppmへ上げた群ではそれぞれ1, 4匹が死亡したが、10ppmから30, 90ppmに上げた群、15ppmから90ppmに上げた群ではすべて生存した。

これらのことから、あらかじめ低濃度で暴露することにより、それよりも高濃度での暴露でもその生存率を上げ得ることが明らかとなった。なお、現在、耐性獲得の機序を明らかにするために酵素動態を検討中である。

雄ラットにおける生殖毒性評価法の検討1
-スパームヘッドカウント法の検討-

坂口 ゆかり 島田 信 原田 滋雄 俵 克彦 高山 敏

第一製薬株式会社開発研究所安全性研究センター

生殖・発生毒性試験では、雄の生殖毒性評価法として雄ラットに被験物質を60日間以上連投した後雌と交配させ、交配率や妊娠率、生存胎児数などを指標とする方法が一般的に用いられている。しかし、ラットなどのげっ歯類では精子数が50%減少しても生存胎児数は変化せず、さらに90%減少しても妊娠率には影響しないなどの報告もあり、現行の試験法の感度を向上させることが、生殖発生毒性試験を担当する者にとって重大な感心事である。そこで今回、我々は一つの方法としてラット精巢中の精子数を簡便にカウントすることができるスパームヘッドカウント(SHC)法について検討した。SHC法はMeistrichの方法(J. of THE AMERICAN COLLEGE OF TOXICOLOGY 8, 551, 1989)に準じて行い、まず加齢とSHCの関係を調べた。4週齢から14週齢まで週齢をおって雄性SD系ラットにおける精巢中の精子数をカウントした結果、4週齢では精子は認められず、5, 6, 7, 8, 9週と週齢が進むにつれ、 6.8×10^7 , 13.1×10^7 , 19.6×10^7 , 19.4×10^7 , 25.5×10^7 と精子数は増加し、9週目から14週目にかけてはいずれも 30.0×10^7 程度であった。次に、抗癌剤Cyclophosphamide(CY)のSHCに及ぼす影響について調べた。10週齢のSD系雄ラットに100mg/kgを7日おきに3回腹腔内投与し、最終投与の14日または35日後に屠殺し、精子数をカウントした。その結果、14日後の観察では投薬の影響は認められなかったが、35日後の観察で精子数は1/3程度に減少していた。このことからCYは精祖細胞の分化過程に作用して精子形成を障害することが確認された。以上の結果、SHC法は薬剤の精巢に対する作用を感度よく判定でき、また投与ならびに観察時期を工夫すれば薬剤の作用点も明確にできるなど雄性生殖毒性の評価法として有用な方法の一つであると考えられた。しかし、本法にも限界があり、これについても言及したい。なお、CYなど薬剤投与による精巢毒性についてはSHCと共に組織中トランスフェリンの変化などについても併せて述べてみたい。

下村和裕, 森田 大, 志村弘満

(株) 前臨床医学研究所

胎児の骨格観察は生殖・発生毒性試験の重要な検査項目である。骨格標本の作製方法は骨のみ染色を施す方法および骨・軟骨二重染色を施す方法の2種類の方法が一般的に知られている。骨・軟骨二重染色法は骨のみの染色に比べてより多くの情報が得られることから有用性が数多く指摘されている。

しかし、現在、行われている骨格観察はほとんどの場合が骨のみの染色標本で行われている。その理由として、骨は胎児の剥皮なしで染色可能であるのに対し、軟骨は非常に手間のかかる作業である剥皮をしなければ染色できないことがあげられる。そこで、短時間に多量の標本を処理することが可能な簡便な剥皮方法を検討した。

標本作製手順は、まず胸・腹部臓器を除去し、次いで胎児の頸背部を切開した。剥皮は体軀を温水に浸した後、強い水圧の冷水をかけることにより行った。以下、INOUEの方法に従い固定、染色、浸軟化、弁色を行った。

従来、剥皮は表皮、真皮、皮下組織の皮膚すべてを除去していたが、今回の剥皮方法では真皮、皮下組織はそのまま、表皮だけを除去した。しかし、骨・軟骨ともに良好に染色された標本が得られた。温水の条件は、55°Cで60秒間、60°C以上では15秒間浸すことで剥皮可能であった。作業時間は従来剥皮に比べ、大幅に短縮でき、ラット1腹約20匹の胎児なら数分で行うことができた。また、標本を破損する危険性もなくなった。

以上、本法によれば骨・軟骨二重染色法の問題点であった剥皮の困難さが解決されると思われた。

ラット末期胎児の内部構造のMRIによる観察

○五十嵐洋¹⁾、川西広明¹⁾、長谷川憲一²⁾、大津真一²⁾¹⁾:財団法人 動物繁殖研究所 発生奇形学研究室²⁾:日本電子株式会社 分析機器技術本部 第1研究開発部
NMカナル7° 3課

器官形成期におけるラットの胎児臓器は急速に発達する。この発達過程を詳細に観察することは、発生学の研究に不可欠のものである。また、この時期に発達する胎児の形態学的な観察は、レントゲンや超音波法では限界があり、主として解剖学的・光学顕微鏡的に行われてきた。しかし、この方法は、試料作成と観察に熟練と時間を要し、3次元の考察が困難であった。

最近、核磁気共鳴を応用したMagnetic Resonance Imaging (MRI)を用いることにより、生体の内部構造を非侵襲的にしかも3次元的に計測可能になり、医学分野でも内臓疾患や腫瘍の診断に威力を発揮している。

そこで我々は、この方法をラット胎児の発達の研究に応用することを考え、妊娠18.0日のラット胎児の内部構造を、厚さ1mmの矢状断でMRI(JEOL AIM 270およびImage Work Station DEC DE 5000/125)により観察した。胎児の内臓は、それぞれの臓器の持つ¹Hプロトンの量および緩和時間の差により、濃度差のある白色から灰色の画像として示された。実質臓器は、細胞密度が高い部位では濃い白色の色調、細胞密度の低い部位では濃い灰色の色調で表現された。管腔臓器は、周囲は白色の輪郭で、内部の管腔は灰色として表現された。

MRIによる胎児の内部構造の観察は、まだほとんど検討されていない。今回、胎児の内部器官の解析にMRIを応用できる結果が示唆された。より鮮明な像を得るためには、MRIの画像と組織学的検索との比較検討が必要と思われた。

化学物質による精子の運動性、数および形態変化と
雄性生殖障害に関する研究

川島邦夫、宇佐見誠、酒見和枝、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
後世代影響研究室

生殖毒性試験において雄性生殖能への影響を授胎能で評価しているが、直接精子への影響を調べることは重要である。今回は、被験物質を交配前に何日くらい投与すれば精子の運動性、数、形態などに影響が現れ、授胎能が障害されるかについて、精巣毒性および生殖毒性が認められている nitrobenzene (NTB) を用いて検索した。

SD系SPF雄ラットにNTBの60mg/kgを10週齢時から投与を開始し、投与7、14、21、28、42、56および精子形成期間全体をカバーする70日目に、無処置発情前期雌と1対1で終夜同居させた。翌朝腔垢を採取して交尾の有無を調べた。腔垢中に精子が観察された日を妊娠0日とした。交尾成立雌は妊娠20日に屠殺し妊娠の有無を確認した。雄について交尾確認後、精巣および精巣上体重量を測定し、採取した精巣上体精子について運動性（精子活力、精子前進性）、数、生存率、形態（奇形精子率）を調べた。

7日間の投与では精巣および精巣上体重量、全精子検査指標、交尾率、授胎率にNTB投与の影響は認められなかった。精巣および精巣上体重量の有意な低下、精子の数、前進性の有意な減少、活力の低下が14日間の投与から認められた。精子生存率の有意な低下および奇形精子率の有意な増加、授胎率の有意な低下が21日間の投与から認められた。授（受）胎は28日間の投与から1例も成立しなくなった。交尾率は70日間の投与でも影響を受けなかった。

NTBを用い精子の性状、授胎能への影響を検索した結果、精子運動性の減弱、数の減少、形態異常による授胎障害を惹起するためには28日間の投与が必要なことを明かにした。

精子形成ステージの精細胞数計測による
Cyclophosphamideの精巣毒性評価

○安原 加壽雄、松井 元、三森 国敏、小野寺 博志、
下 武男、高橋 道人
国立衛生試験所・病理部

【目的】抗腫瘍剤、Cyclophosphamide(CP)は精祖細胞の分裂を抑制するため、精巣毒性を引き起こすとされている。しかし、ライディヒ細胞およびセルトリ細胞には障害を及ぼさないことから、毒性変化を形態学的に把握することは困難なことが多い。我々は、CPの精巣毒性を明確に評価するため、精子形成サイクルの4つのステージにつき、経時的にラットの精細胞数を計測し、定量的に検索した。

【方法】動物は性成熟に達した9週齢の雄性SD系ラットを用い、第1群にはCP 100mg/kgを単回経口投与し、第2群にはCP 100mg/kgを2日間、その後50mg/kgを3日間、計5日間反復経口投与した。第1群では投与後1、7、14、21日目に、第2群では最終投与後1、4日目に動物を屠殺し、精巣はブアン液固定、パラフィン包埋した。H-EおよびPAS染色を施し、各動物ともステージII、V、VII、XIIの輪切りの精細管について精細胞数を、セルトリ細胞当りの精細胞数として算定した。

【結果】第1群では、7日目にpreleptotene spermatocyte(PI)の減少が、14日目にはPIおよびzygotene spermatocyteの減少が、21日目にはpachytene spermatocyteの減少が認められた。第2群では、最終投与後1日目からspermatogoniaの減少が認められた。

【まとめ】今回実施した精子形成サイクルの4つのステージを計測することにより、単回投与においても7日目より明かな障害性変化が検出できた。また、反復投与を行うことにより、より明瞭に精巣毒性を評価できることが示された。

Ethane-1,2-dimethanesulfonateの精巣上体への
直接障害作用について

松井 元¹、豊田和弘¹、古田京子¹、畝山智香子¹、
川西 徹¹、福原 潔²、宮田直樹²、高橋道人¹
国立衛生試験所・¹病理、²有機化学

【目的】Ethane-1,2-dimethanesulfonate(EDS)は成熟ラット精巣のLeydig細胞を特異的に障害する代表的な物質とされている。EDSによるLeydig細胞に対する障害のため低テストステロン状態となり、精巣、副生殖器及び生殖能力等に対し、二次的な影響を引き起こすと考えられている。しかし我々の観察によれば、EDSの作用はLeydig細胞のみならず、精巣上体にも影響を及ぼすことが示唆された。今回、EDSの精巣上体に対する影響について病理組織学的に検討を行った。

【方法】EDSはC.M.Jacksonらの方法(1984)に従って合成した。

実験Ⅰ：成熟雄性SD系ラットにEDS 100 mg/kgを単回腹腔内投与して、投与後1、3、7、14及び28日目に屠殺、剖検し、精巣、精巣上体、前立腺、精嚢を摘出した。実験Ⅱ：精巣摘除動物を作成し、EDSを同様に投与し、対照群にはvehicleのみを投与した。投与後3日目に屠殺、剖検し、精巣上体、前立腺、精嚢を摘出した。実験Ⅰ、Ⅱ共、摘出臓器のHE染色標本を作製し、病理組織学的に検索した。

【結果】実験Ⅰ：EDSを投与すると1日目に精巣のLeydig細胞の変性がみられるが、同時に精巣上体においても上皮の変性、壊死が観察された。3日目にはLeydig細胞はほとんど消失し、精巣上体管上皮の傷害は更に強くなった。7日目から14日目にかけてLeydig細胞は依然認められなかったにもかかわらず、精巣上体管上皮の傷害は軽減していった。実験Ⅱ：精巣摘除動物においては、EDS投与群の精巣上体に実験Ⅰと同様に精巣上体管上皮の傷害が観察されたが、対照群では精巣上体に強い傷害像は認められなかった。以上の結果より、EDSは精巣上体に対し直接的に障害を及ぼすものと考えられた。

○秋田正治¹⁾、横山 篤¹⁾、西岡 修²⁾、串田信夫²⁾鎌倉女子大学¹⁾、埼玉医科大学²⁾

【目的】

近年動物実験代替法に関する研究が重要視され、現在多くの研究者がこの開発に取り組んでいる。その中で特に発生毒性試験の代替法として注目されているのが、哺乳類全胚培養法である。諸外国においてこの方法は、ラット胎齢 9.5日目から48時間まで培養を行うものが多く用いられている。しかし日本で比較的多く市販されている培養装置は、持続的に大量の気相が挿入されるためラット胎齢 9.5日目の胎児を培養した場合、浮腫などが誘発されやすい装置である。そこで我々は培養液中に溶け込む気相量を微量に調節し、浮腫が起きず正常な状態で胎児を培養するために、特殊な培養ビン（ミニバイアル）を開発したので、その培養結果について報告する。

【方法】

胎児培養装置は、自動送気型回転培養装置を用いた。ミニバイアル（堀池田理化製）は、培養液1.5mlで胎児を培養できるようにし、内部をコラーゲンで特殊コーティングした。そしてラット胎齢 9.5日目の胎児を培養し、48時間後の胎児の発育状態を観察するとともに、培養液中の酸素分圧（ PO_2 ）を生体内酸素分圧連続測定装置とマイクロニードル型センサーを用いて測定した。

【結果・考察】

培養開始時の胎齢 9.5日目の胎児・・・総体節数 7 ± 1 、卵黄嚢長径 2.0 ± 0.3 mm 短径 1.0 ± 0.1 mm、この時期はまだ心拍動数は認められず、反転も開始されていなかった。

48時間培養目の胎児・・・総体節数 32 ± 1 卵黄嚢は長径 3.7 ± 0.2 mm、短径 3.4 ± 0.2 mm、頂殿長 3.3 ± 0.2 mm まで発育し、外表形態に浮腫などの異常は認められなかった。これは *in vivo* における胎齢11.5日目の胎児と比較し、同様の発育状態を示した。また、胎児心拍動数は、培養17時間目より微動が認められ、培養36時間目には 154 ± 18 回/分という拍動数が得られた。さらに胎児の反転は、培養32時間目で完了した。そして培養終了時における培養液中の PO_2 は平均180mmHg であり、25ml容量のバイアル使用時の PO_2 平均219 mmHg と比べ、明らかに低い値を示した。

以上の結果より持続的に送気される回転培養装置において、ラット胎齢 9.5日目からの培養を行う場合は、このミニバイアルを用いることにより、初めて正常な胎児が培養できた。この原因は、培養液中の PO_2 を低下させたことが、主な要因と示唆された。現在、この点についてさらに詳細な検討を加えるとともに、新たな培養装置も開発中である。

胎児培養における濁度測定装置(TR705)を用いた培養液交換法

横山 篤、秋田 正治、乙田 吉夫(●)

鎌倉女子大学・栄養、(●):埼玉医大

(目的)ラット胎児を母体より取り出し、試験管の中で培養する方法は、生殖発生毒性試験の代替法(in vitro化)として大変注目を集めている方法である。しかし、培養液にラット血清を大量に使うため、培地換えを早々、頻繁に行うことはできない。また、あまり培養液を交換しないで培養を続けると、急激に弱って胎児は死亡したり、神経管の閉塞不全などの奇形を誘発する。これらの弱点を補強しないかぎり、毒性試験に胎児培養を導入することは不可能といえる。そこで、我々は長期間ラット胎児を培養して行くと培養液が濁ってくる点に注目し、濁度測定装置(TR705)を利用して濁りの度合いを基本にして、培養液を交換する方法を試みたので報告する。(方法)ラットの胎児は胎齢12日に母体より取り出し、48時間の回転培養を行った。培養液交換の時期を培養24時間後(A)、28時間後(B)および32時間後(C)の3時点に設定し、培養液の濁度(白濁の度合い)を測定した。測定装置は笠原理工工業のモデルTR705を用いて少量採取した培養液の濁度を測定した。(結果)培養液の濁度は(A)47.0±6.5ppm、(B)98.3±9.4ppm、(C)151.2±13.6ppmという値を示した。培養の進行と共に濁度が上昇した。一方、胎児の心拍動数は濁度の上昇とは逆に(A)群に対して、(B)群は18%の、(C)群は30%の低下が認められた。胎児血液循環も(A)に比べ(B)(C)共に低下した。また、培養48時間後の胎児の状態は(C)群で前頭部の発育抑制が発現し、頂殿長と体節数においては(A)群に比べ(B)(C)両群共有意に低下した。以上の結果より培養液の濁度を指標にした培養液の交換時期の推定は充分利用できると考えられた。

セレン化合物の胚毒性に及ぼす内因性グルタチオンの作用

○田畑 洋文, 宇佐見 誠, 酒見 和枝, 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

哺乳類においてセレン化合物は肝臓の機能障害および腫瘍, 並びに妊娠動物の流産を起こすことが知られている。また, これらの発現機構に内因性グルタチオンが関与していることも示唆されている。一方, セレン化合物は催奇形性を有することが示唆されているにもかかわらず, 動物実験では母体毒性が強いため, 胎児への影響は明確に検索されていない。我々はこれまでに, 胎芽培養法を用いてセレン化合物がラット胚の発育を抑制すること, および形態異常を起こすことを明らかにした。本研究では, セレン化合物の胚毒性発現に及ぼす内因性グルタチオンの作用について, ラット胚のグルタチオン量を減少させて検討した。グルタチオン枯渇剤としてブチオニンスルホキシミン 0.1 mM を含む培養液に, 10 ~ 100 μ M のセレン酸ナトリウムまたは亜セレン酸ナトリウムを混じて, 胎齢 9.5 日のラット胚を 48 時間回転培養した。その結果, 低グルタチオン状態のラット胚において, セレン酸ナトリウムによる眼および脳の形態異常発生率の増加が認められた。一方, 亜セレン酸ナトリウムの胚毒性は低グルタチオン状態では抑制され, 胚の発育が回復するとともに眼および脳の形態異常発生率が減少した。これらの結果から, セレン酸ナトリウムおよび亜セレン酸ナトリウムのラット胚における発育抑制および形態異常の発現には内因性グルタチオンが関与すると考えられた。

Skin² 培養モデルを使用した刺激性試験法の有用性確認
のための共同研究

○谷口雄三¹，鈴木啓司²，中島京也³，中島 園⁴，
三輪芳久⁵，山田恭史⁵，佐藤 全⁶，武吉正博⁷，
秋江靖樹⁸，森安眞津子⁹，山本 仁¹⁰，片桐 稔¹¹，
風間明美¹¹，渡辺正己¹²

¹環境研，²横浜大・医，³日本生物化学センター，
⁴安評センター，⁵バイオリサーチ，⁶化合物安研，
⁷化学品検査協会，⁸富士生物研，⁹パナファーム，
¹⁰生活科学研，¹¹オリエンタル酵母，¹²長崎大学

化学物質の刺激性試験は広く実施されているが，近年医薬品，化粧品メーカー等は動物を使わない検査方法の導入に迫られている。動物実験の代替としてin vitro試験法の開発がなされているが，特に細胞培養を使用したin vitro試験の進歩はすさまじい。Skin² Dermal Model ZK1100 はヒトの皮膚を多層構造に細胞を培養した粘膜刺激性試験の代替用キットである。今回，我々は有用性確認のための共同研究を，国内11試験機関が参加し，共同のプロトコールに従って実施したので報告する。被験物質はSodiumdodecyl sulfate, 1-n-hexadecyl-pyridinium chloride monohydrate, ethanol, dimethyl sulfoxideを用いた。Skin²は所定の方法で培養に移した。次いで上清を除去し，MTT 色素抽出液で色素を抽出し各ウエルの吸光度を540 nmの波長で測定した。未処理対照群と被験物質の各濃度処置群の吸光度を測定し，併せてグラフよりMTT-50値を求めた。各試験機関の平均MTT-50値は，SDSで50±10 μg/ml，CCで4.7 ±1.5 μg/ml，EtOHで4.4 ±1.5%，DMSOで13±1%であった。反復試験結果ではバラツキも少なく再現性がみられた。また，施設間差異は少なかった。Skin²による刺激性試験は，操作が簡単でしかも定量的に測定することができた。

索 引

白 水書	O-229
Kaiy CHIN	P-104
Dai Hyei CHOI	P-103*
Ho-Sai CHOI	P-101*
Ho-Yung CHOI	P-101*
Anna MIFAN	
洪 不蘭	
洪 不蘭	O-230
Ho K. HO	O-230
Sa-Ho HWANG	P-105
Dai-Ping KIM	P-105
Pu-Yung KIM	P-105
金 宜英	P-105
Jung Kwan LEE	P-104*
李 國賢	P-104
Wai Yung LEE	P-105
Yang-San LEE	P-107*
Lam R. POH	O-11*
Dock Joo RHEE	P-103
Ro MING	P-109*
羅 永祥	P-109*
田 文卿	O-114
Chang W. WANG	O-111
王 文卿	O-111
王 文卿 著	
王 文卿 著	O-112
王 文卿 著	O-113
王 文卿 著	P-113
合田 一壽	P-112
天沼生 清次	P-113
青野 義	O-110
清水 一壽	P-114
水野 一秀	O-203*

索 引

水野 一秀	O-110
本橋 文雄	P-216
北村 隆敏	P-214*
杉江 隆敏	P-243
伏田 正治	P-240*
	P-241
	P-213
	O-114
	P-111
辻野武 大憲	P-120*
西島 真知子	P-114
天野 豐次	O-113
東宮 浩子	O-115
森行 元秀	O-204
森田 進行	P-212*
五十嵐 一壽	O-108*
五十嵐 一壽	O-202*
五十嵐 一壽	P-107
五十嵐 信二	O-119*
五十嵐 信	P-116*
五十嵐 英治郎	P-104*
五十嵐 義男	P-117*
池田 幸四郎	P-204*
池田 幸四郎	O-120
池田 信二	P-120*
伊佐野 忠雄	O-214
伊佐野 忠雄	P-220
石井 三知子	P-114
石井 信雄	O-118
石橋 武一	P-221
石橋 宗英	P-114*
新島 謙之	P-120*

(本 索引)

索 引

白 水彩	O-203
Kang CHIN	P-105
Dae Hyun CHO	P-105*
Jae-Jin CHO	P-107
Hyuck Jai CHOI	P-101*
Se-Young CHOUNG	P-101
Anna M. FAN	SL-2
郭 新彪	P-221
郭 新彪	O-207
Ing K. HO	SL-2*
Se Jin HWANG	P-105
Dai Byung KIM	P-103
Pu Young KIM	P-103
姜 定克	P-139
Jong Kwon LEE	P-103*
李 禎俊	P-116
Won Yong LEE	P-105
Yong-Soon LEE	P-107*
Lance R. POHL	SL-1*
Duck Joo RHIE	P-103
Rui MING	P-109*
孫 歩祥	P-110*
田 光勲	O-114
Ching Y. WANG	O-111

あ

相磯 成敏	P-233
会田 喜崇	P-232
天羽生 秀夫	P-223
青池 晟	O-102
青木 一	P-215
赤羽 一美	O-208*

赤羽 浩一	O-110
赤堀 文昭	P-216
秋江 靖樹	P-214*
秋江 靖樹	P-243
秋田 正治	P-240*
秋田 正治	P-241
浅岡 宏康	P-213
朝生 裕樹	O-107*
朝波 省吾	P-117
浅野間 久恵	P-108*
阿部 真利子	P-134
天野 健次	O-108
有賀 恭子	O-103
有行 史男	O-306
粟崎 泰行	P-212*

い

五十嵐 功	O-106*
五十嵐 功	O-204*
五十嵐 功	P-203
五十嵐 俊二	O-115*
五十嵐 洋	P-236*
五十嵐 美由紀	P-201*
五十嵐 良明	P-143*
池田 孝則	P-209*
池田 孝則	O-106
池永 哲二	P-206
伊佐間 和郎	O-214
伊佐間 和郎	P-229
石井 三和子	P-134
石川 詔雄	O-116
石崎 誠一	P-220
石島 奈美	P-144*
和泉 博之	P-129*

(* : 演者)

磯辺 竹雄	P-210*
磯部 正和	O-111
磯辺 充威	P-131*
伊東 信行	P-222
市川 敦子	P-214
市川 富夫	P-226
石川 学	P-226
伊藤 清子	P-131
伊藤 邦郎	O-201*
伊東 進	O-201
伊東 信行	P-224
伊藤 博敏	P-220
乾 嘉孝	O-104*
犬伏 正憲	P-108
井上 智彰	O-211*
井上 智彰	P-210
井上 智彰	P-211
井上 秀顕	P-134
井上 博之	P-218
茨田 享子	O-106
今井田 克巳	P-224
今田 順次	P-223
井村 伸正	O-113
入江 弘之	O-212*
岩井 正和	P-145
岩井 正和	O-212
岩田 修永	P-102*
岩田 聖	P-218

う

植島 基雄	P-117
上野 光一	O-315
植松 俊彦	O-101
宇佐見 誠	P-237

宇佐見 誠	P-242
内田 美紀	O-302
内野 富弥	P-214
畝山 智香子	O-107
畝山 智香子	P-239
梅村 隆志	P-228
梅村 隆志	P-229

え

江頭 亨	O-206
江坂 文孝	O-313*
恵美 伸男	P-106
遠藤 健一	O-315*
遠藤 任彦	P-102
遠藤 仁	W-座長
遠藤 泰	O-109*

お

大石 裕司	O-314
大内田 昭信	P-126
大川原 聡	P-104*
大郷 豊	P-211*
大郷 豊	P-210
大沢 基保	P-126
大島 隆	P-202
大島 隆	P-133
大津 真一	P-236
大野 広志	P-208
大野 広志	P-118
大野 広志	P-141
大野 泰雄	P-221
大野 泰雄	O-207
大野 曜吉	S-5*

(* : 演者)

大橋 芳彦	P-113
大橋 芳彦	O-204
岡崎 啓幸	P-204
岡田 富士桜	P-130
岡 宏昭	P-126
小川 幸男	P-230
小川 幸男	P-119
小川 幸男	P-231
小木曾 正	P-224
奥隅 淳一	O-102
小栗 一太	O-112*
小栗 一太	座長
長田 恭明	O-110
小田部 耕二	O-103*
乙田 吉夫	P-241
小野寺 博志	P-120*
小野寺 博志	P-238
小野 菜穂子	O-209
小畑 俊男	P-128*
帯刀 益夫	W-1*
小尾 一	P-214

か

柿畑 耕司	P-144
角崎 英志	P-121*
笠井 憲雪	O-203
笠井 辰也	P-233
笠嶋 快周	O-209
風間 明美	P-243
加島 政利	P-204
梶村 哲世	P-104
数坂 昭夫	P-116
数坂 昭夫	O-203
片桐 稔	P-243

勝木 昭次	O-314
加藤 倫代	P-205
加藤 博史	O-215*
加藤 道幸	P-104
加藤 道幸	P-135
加藤 道幸	P-140
加藤 道幸	O-208
加藤 道幸	P-127
加藤 道幸	O-309
加藤 道幸	O-101
加藤 譲	P-206
門田 利人	PD-4*
金崎 寛子	O-211
金澤 由基子	P-130*
金津 赫生	P-136*
鹿庭 正昭	O-214*
鹿庭 正昭	O-213
鹿庭 正昭	P-229
金子 豊蔵	P-230*
金子 豊蔵	P-119
金子 豊蔵	P-231
金田 信也	P-139
金原 広幸	O-106
金原 広幸	P-203
鎌滝 哲也	O-201
神谷 光一	P-134
神谷 光一	P-137
河合 悦子	O-311
川井 啓市	O-102
河上 喜之	P-219
川崎 靖	P-228*
川崎 靖	O-213
川崎 靖	P-229
川島 邦夫	P-237*
川島 邦夫	P-242

(* : 演者)

川名 研一 O-305
 川西 徹 O-107
 川西 徹 P-239
 川西 広明 P-236
 川畑 好之康 P-145
 河部 真弓 P-217

き

菊地 正 O-313
 北島 俊一 O-310*
 北島 省吾 P-218
 北原 淳 O-113
 鬼頭 英明 O-308
 木下 浩一 P-223
 木村 晃之 O-201
 木村 和幸 O-212
 木村 邦男 P-215
 木村 敏行 O-202*
 清宮 健一 O-114*
 清宮 健一 P-111
 清宮 健一 P-121

く

日下部 憲道 P-214
 串田 信夫 P-240
 久野 博司 P-205*
 窪田 章子 O-211
 久保山 靖仁 P-207*
 倉田 靖 P-222*
 暮部 勝 P-111
 暮部 勝 O-114
 暮部 勝 P-121

黒岩 幸雄 S-座長
 黒岩 幸雄 S-座長
 黒川 雄二 P-232
 黒川 雄二 O-214
 黒川 雄二 O-213
 黒川 雄二 P-230
 黒川 雄二 P-119
 黒川 雄二 P-231
 黒川 雄二 P-228
 黒川 雄二 P-229
 黒川 雄二 座長
 黒沢 亨 P-213*
 桑原 紀 P-213
 桑原 孝 P-117*

け

源田 百合 P-144
 玄番 宗一 O-311
 玄番 宗一 座長

こ

小泉 利明 P-106*
 小泉 治子 PD-7*
 幸下 雅俊 P-139*
 幸嶋 祥亘 PD-3*
 河内 泰英 P-126*
 椿本 征也 P-223
 越谷 修 P-139
 小柴 博 P-145
 小柴 博 O-212
 小島 幸一 P-130
 小島 肇夫 O-307*
 後藤 紀久 O-215

(* : 演者)

小西 宏明	O-307
小林 和雄	P-218*
小林 潔	P-142
小林 幸	P-112
子林 孝司	O-306
小林 直美	O-106
小林 直美	P-203
小林 晴男	O-209*
小山 守	O-212
近藤 秀男	P-205

さ

佐井 君江	P-232
佐井 君江	P-228
斎藤 勝弘	O-102
斎藤 卓也	O-215
斎藤 秀哉	O-109
斎藤 実	P-231
斎藤 実	P-228
斎藤 実	P-229
嵯峨井 勝	P-227
榎原 充久	P-227*
坂口 ゆかり	P-234*
酒見 和枝	P-237
酒見 和枝	P-242
坂 芳樹	O-305*
佐久間 善仁	P-219
佐々木 啓	P-123
佐々木 哲哉	O-301*
佐々木 啓	P-212
佐藤 敦子	P-131
佐藤 喜代隆	O-310
佐藤 喜代隆	P-137
佐藤 恵一朗	O-105*

佐藤 淳	O-307
佐藤 全	P-243
佐藤 孝彦	O-308
佐藤 孝彦	座長
佐藤 哲男	P-109
佐藤 哲男	O-315
佐藤 秀蔵	P-123
佐藤 秀蔵	O-104
佐藤 秀蔵	P-122
佐藤 秀蔵	O-105
佐藤 秀蔵	P-212
佐藤 宏	O-313
佐野 恒吉	P-124*
佐野 真士	P-224*
澤本 修	P-139

し

柴田 健介	O-311
柴田 雅朗	P-222
柴野 三智子	O-215
下田 耕司	P-127*
島田 弘康	P-201
島田 信	P-234
島田 信	O-301
清水 憲次	P-214
志村 弘満	P-235
下假 賢二	P-204
下 武男	P-230
下 武男	P-238
下 武男	P-120
下野 和之	P-117
下村 和裕	P-235*
白井 明志	P-216*
白井 智之	P-217

(* : 演者)

新谷 茂	S-1*
	す
須賀 哲弥	O-205
菅野 昭永	P-113*
菅原 正喜	P-140
杉浦 正幸	P-133*
杉浦 正幸	P-202
杉本 哲朗	O-103
杉本 肇	O-102*
杉山 則文	W-5*
鈴木 一生	P-207
鈴木 和夫	P-106
鈴木 和博	P-102
鈴木 啓司	P-243
鈴木 幸子	P-232
鈴木 幸子	P-230
鈴木 幸子	P-119
鈴木 幸子	P-231
鈴木 忠彦	O-209
鈴木 勉	O-210*
鈴木 勉	座長
鈴木 雅実	O-103
鈴木 操	W-2*
鈴木 稔	P-131
鈴木 康男	S-3*
須藤 純一	O-312
須藤 純一	P-115
周藤 勝一	P-206
周藤 勝一	P-207
須山 由美	P-122
諏訪 浩一	P-136

	せ
関口 裕巳	O-214
関口 裕巳	O-213
関口 正保	O-110
瀬子 義幸	O-113*
芹沢 功	O-108*
	そ
外尾 亮治	P-203
曾根 知道	O-111*
曾根 久雄	P-137
曾山 桃子	O-312
曾山 桃子	P-115
	た
田内 清憲	O-106
田内 清憲	P-203
高岡 雅哉	P-113
高岡 雅哉	O-204
高木 篤也	P-232*
高城 奈津子	O-205
高田 幸一	P-232
高田 幸一	P-231
高田 早苗	P-135*
高田 早苗	P-104
高田 早苗	O-101
高仲 正	P-237
高仲 正	P-110
高仲 正	P-221
高仲 正	O-207
高仲 正	P-242

(* : 演者)

高仲 正	座長
高橋 惇	P-102
高橋 千太郎	O-313
高橋 道人	P-238
高橋 道人	P-120
高橋 道人	O-107
高橋 道人	P-239
高橋 道人	座長
高橋 靖代	P-215
高橋 裕詞	P-141*
高畠 英伍	O-111
高畠 英伍	座長
高山 敏	P-208
高山 敏	P-118
高山 敏	P-141
高山 敏	P-234
高山 敏	O-301
高山 敏	P-104
高山 敏	P-135
高山 敏	P-140
高山 敏	O-208
高山 敏	P-127
高山 敏	O-309
高山 敏	P-138
高山 敏	O-101
高山 敏	P-144
高山 敏	座長
高山 房子	O-206*
滝沢 節子	O-303*
滝沢 節子	P-114
竹内 哲也	P-233
武貞 徳子	P-224
竹澤 俊明	O-315
竹田 真也	P-216
竹半 伸一	P-223*

武吉 正博	P-243
田島 健一	P-106
田中 栄之介	O-116*
田中 栄之介	座長
田中 剛太郎	P-108
田中 光	P-217
田辺 恒義	O-312
田辺 恒義	P-115
谷口 雄三	P-243*
田畑 洋文	P-242*
田村 浩	O-205*
田村 博志	O-103
俵 克彦	P-234
俵 克彦	O-301
炭竈 秀二	P-225

ち

千葉 寛	O-201
------	-------

つ

津田 充宥	P-229*
津田 充宥	O-214
津田 充宥	O-213
津田 充宥	P-228
土屋 利江	P-143
土屋 俊也	P-208*
筒井 尚久	P-142*
都筑 優紀	O-102
坪井 利樹	P-216

て

(* : 演者)

出口 隆志	P-207
寺田 賢	S-2*
寺西 宗広	O-204
照井 潤	O-312*
照井 潤	P-115

と

東條 宏子	P-138*
東條 宏子	P-208
戸川 満里子	P-223
戸田 正宏	O-311*
栃折 幸子	P-142
戸塚 繁夫	P-215
都富 友美	O-110*
豊田 和弘	O-107
豊田 和弘	P-239

な

内藤 克司	P-232
内藤 寿英	O-212
中下 富雄	O-104
中島 京也	P-243
中島 圓	P-243
中島 光好	O-101
永瀬 久光	O-308
永田 隆光	O-102
永田 良一	P-204
永田 良一	P-129
永田 良一	O-304
中塚 敏夫	O-302*
中塚 敏夫	O-305
中根 貞雄	P-202
中根 貞雄	P-133

長根 芳文	P-139
中野 好子	O-102
中間 和浩	P-129
中路 幸男	P-230
中路 幸男	P-228
中村 晃忠	O-214
中村 晃忠	O-213
中村 晃忠	P-143
中村 聡子	O-106
中村 聡子	P-203
中村 隆広	O-310
中村 俊之	O-102
中村 浩子	P-215
中村 益久	P-132
中村 美穂	O-101*
中村 美穂	P-138
中山 良夫	O-306
納屋 聖人	P-206

に

西岡 修	P-240
西澤 弘幸	P-145*
西沢 共司	P-233
西田 敦之	O-306*
西田 信之	O-104
西田 信之	P-212
西野 輔翼	O-102
西山 省二	P-213

ね

根本 昌宏	O-109
-------	-------

の

(* : 演者)

野口 英世	座長
野口 正義	PD-5*
野中 邦夫	O-209
信岡 大介	P-121
野村 護	P-208
野村 護	P-138
野村 護	O-101

は

萩原 昭裕	P-217*
萩原 清和	P-226
萩原 孝	P-218
橋口 淳一	P-218
長谷川 憲一	P-236
長谷川 隆一	P-232
長谷川 隆一	P-228
長谷川良平	P-217
長谷川 良平	P-222
服部 浩之	P-118*
花田 秀一	P-145
花田 秀一	O-212
花村 朝夫	O-307
浜村 政夫	P-134
林 茂尚	P-139
林 泰司	P-115*
林 泰司	O-312
林 文彦	O-205
林 裕造	PD-2*
林 裕造	PD-座長
原 修一	P-102
茨田 享子	P-203*
原田 滋雄	P-234

ひ

樋口 芳克	P-214
一鬼 勉	P-134*
平井 正直	O-304
広内 康彦	P-218
廣瀬 明彦	P-119*
広瀬 明彦	P-230
広瀬 明彦	P-231

ふ

深尾 立	O-116
深田 真	O-312
深田 真	P-115
深津 信子	O-303
福井 英夫	P-123*
福井 英夫	P-122*
福崎 好一郎	P-129
福田 英臣	座長
福原 潔	P-102
福原 潔	P-239
福原 守雄	P-110
藤井 登志之	O-314*
藤井 儂子	O-303
藤井 儂子	座長
藤岡 秋生	P-108
藤掛 登	O-302
藤川 康浩	P-225*
藤島 奈保恵	P-209
藤瀬 浩	P-216
藤田 正一	P-116
藤田 正一	O-203

(* : 演者)

藤田 正敬	P-213
藤原 睦憲	P-112
二村 芳弘	P-125*
古川 浩美	P-137*
古沢 満	W-座長
古田 京子	P-239
古濱 和久	P-141
古谷 圭一	O-313
古山 佳子	O-106
古山 佳子	P-203

へ

別枝 和彦	P-112*
-------	--------

ほ

細川 博司	P-128
細川 正清	P-109
細山田 真	W-4*
堀田 真希	P-220
堀井 郁夫	O-211
堀井 郁夫	P-210
堀井 郁夫	P-211
堀井 郁夫	O-303
堀井 郁夫	P-114
堀井 郁夫	座長
堀内 敏	P-131

ま

前川 昭彦	P-120
前田 泰宏	P-126
前田 佳美	P-137
前山 順一	O-215

牧野 正雄	P-131
政岡 俊夫	P-216
増子 かおり	O-209
増田 裕	P-215
増田 裕	PD-6*
増田 裕	座長
升田 真木彦	P-116*
升田 真木彦	O-203
増測 美子	O-304*
増測 美子	座長
松井 元	P-239*
松井 元	P-238
松井 元	O-107
松井 信志	P-132*
松尾 三郎	P-111*
松尾 三郎	O-114
松尾 三郎	P-121
松澤 宏	P-130
松島 泰次郎	P-233
松島 裕子	P-228
松島 裕子	P-229
松田 洋	P-130
松沼 尚史	O-204
松林 久一	O-110
松本 清司	P-125
松本 浩良	O-305
松本 浩良	O-302
松本 浩良	座長
松本 正博	O-314
松本 真美	P-229
真鍋 淳	P-113
真鍋 淳	O-204
丸 ちか子	P-208
丸伝 章	P-108
丸伝 章	P-112

(* : 演者)

み

三浦 暁美	O-209
見上 孝	P-225
三澤 章吾	O-116
三澤 美和	O-210
光岡 ちほみ	O-310
三森 国敏	P-238
三森 国敏	P-120
南 勝	O-109
南 勝	P-227
南 勝	座長
宮腰 昶宏	P-215*
宮島 敦子	P-221*
宮島 敦子	O-207
宮脇 宏彰	座長
宮田 恵美子	P-222
宮田 直樹	P-102
宮田 直樹	P-239
宮本 恵美	P-140*
宮本 恵美	P-127
宮本 悟	O-307
三輪 芳久	P-243

む

村岡 義博	P-132
村上 美穂子	P-202*
村上 美穂子	P-133
村田 勇二	O-310

も

望月 雅裕	P-136
茂木 朗	O-209
百瀬 和享	O-107
森 薫	P-207
森田 大	P-235
森田 晴夫	P-219*
森安 眞津子	P-243
森 有一	O-315
森 洋樹	P-227
門馬 純子	O-213*
門馬 純子	P-232
門馬 純子	O-214
門馬 純子	P-228
門馬 純子	P-229

や

矢内 信昭	W-3*
安田 充也	P-113
安原 一	S-4*
安原 加壽雄	P-238*
安原 加寿雄	P-230
安原 加壽雄	P-120
柳田 知司	PD-1*
柳田 知司	PD-座長
柳本 抄美華	P-227
矢野 友啓	P-226*
山口 淳二	O-215
山口 文恵	P-118
山口 文恵	P-141
山口 文恵	P-144
山崎 学	O-315
山下 衛	S-座長
山下 和男	P-215

(* : 演者)

山田 久陽	P-202
山田 久陽	P-133
山田 恭史	P-243
山田 純司	O-205
山田 庄司	P-124
山田 英之	O-112
山田 昌男	P-138
山津 清實	P-225
山中 康光	P-128
山中 康光	O-206
山本 郁男	O-202
山本 郁男	座長
山本 恭子	P-114*
山本 靜雄	O-103
山本 仁	P-243
山本 靜護	P-233*
山本 隆	P-204*
山本 秀樹	O-203*
山本 正樹	P-123
山本 光雄	P-206*
山本 祐二	O-116
山脇 智子	P-130
矢本 敬	P-113
矢本 敬	O-204

よ

横山 篤	P-241*
横山 篤	P-240
横山 雄一	P-130
吉岡 充弘	O-109
吉川 亜貴	P-111
義澤 克彦	O-314
吉田 貢由	O-309*
吉田 貢由	P-127

吉田 秀信	P-231*
吉村 功	O-307
吉村 英敏	O-202

れ

籾内 桃子	O-207*
籾内 桃子	P-221

わ

和賀井 信彦	P-127
渡辺 一石	O-308*
渡辺 和人	O-202
渡辺 隆史	O-205
渡辺 敏樹	O-301
渡辺 実	O-304
渡辺 正人	P-220*
渡辺 正己	P-243

(* : 演者)

協賛企業および団体御芳名

- | | |
|-----------------------------|---------------------|
| アップジョンファーマシュー
テイカルズリミテッド | 大鵬薬品工業 (株) |
| アマーシャムジャパン (株) | 武田薬品工業 (株) |
| エーザイ (株) | トーアエイヨー (株) |
| 大塚製薬 (株) | 東洋紡績 (株) |
| 小野薬品工業 (株) | 富山化学工業 (株) |
| 鐘紡 (株) | 日産化学工業 (株) |
| キッセイ薬品工業 (株) | 日本グラクソ (株) |
| キリンビール (株) | 日本チャールズブリパー (株) |
| 興和 (株) | 日本たばこ産業 (株) |
| 三共 (株) | 日本マリンクロット (株) |
| 参天製薬 (株) | 日本ロシュ (株) 研究所 |
| サントリー (株) | 日本レダリー (株) |
| サンド薬品 (株) | バイエル薬品 (株) |
| (株) 三和化学研究所 | 萬有製薬 (株) |
| 塩野義製薬 (株) | 藤沢薬品工業 (株) |
| (株) 実生研筑波研究所 | 藤永製薬 (株) |
| 昭和薬品化工 (株) | (株) プリストルマイヤーズ・スクイブ |
| シェーリング・ブラウ (株) | 富士レビオ (株) |
| (株) 生体科学研究所 | 北陸製薬 (株) |
| ゼリア新薬工業 (株) | (株) 三菱化成安全科学研究所 |
| 田辺製薬 (株) | 三菱化成 (株) |
| 第一化学薬品 (株) | 明治製菓 (株) |
| 第一製薬 (株) | 持田製薬 (株) |
| 大正製薬 (株) | 持田記念医学薬学振興財団 |
| 大日本製薬 (株) | 山之内製薬 (株) |
| 帝人 (株) | 吉富製薬 (株) |
| | ローヌブーラン・ローラ (株) |
| | (株) 新薬開発研究所 |

(平成5年6月24日現在：五十音順)

第20回日本毒科学会学術年会
プログラム・要旨集

発行日 平成5年7月8日

発行人 佐藤 哲男

発行所 千葉大学薬学部薬物学研究室
〒263 千葉市稲毛区弥生町1-33
TEL 043-290-2919, 2920, 2921
(ダイヤルイン)
FAX 043-255-1574