

日本毒科学会

中西ケミ子

第21回 日本毒科学会学術年会
プログラム・要旨集

New Horizon for Toxicology
—Drug Toxicity and Signal Transduction

平成6年6月9日(木)・10日(金)

北 海 道 大 学

1994 札幌

〒113 東京都文京区弥生2-4-16
学会センタービル 4F

日本毒科学会

TEL 03-3812-3093

第21回日本毒科学会学術会年会

会期：平成6年6月9日(木)～10日(金)

会場：クラーク会館、北海道大学学術交流会館、百年記念会館

札幌市北区北8条西5丁目 北海道大学構内

会 長 菅 野 盛 夫

第21回日本毒科学会学術年会組織委員会

顧問：田辺 恒義 北海道大学名誉教授

安孫子保	旭川医大・薬理	市原和夫	北海道薬大・薬理
大賀 皓	酪農学園大・酪農	大鹿英世	札幌医大・薬理
鎌滝哲也	北大・薬・代謝分析学	齊藤秀哉	北大・医・第1薬理
中里幸和	北大・獣医・家畜薬理	西村昌数	帯広畜産大・畜産・薬理
藤田正一	北大・獣医・毒性	藤平栄一	北海道薬科大・毒物
松本 章	北大・歯・薬理	南 勝	北海道医療大・薬・薬理
門間芳夫	北海道医療大・福祉看護		

実行委員委員会

数坂昭夫	北大・獣医・毒性	須藤純一	北海道医療大・薬・毒理
横井 毅	北大・薬・代謝分析学	久田 洋	北大・歯・薬理
平藤雅彦	北海道医療大・薬・薬理	星 勝治	北海道薬科大・薬理
服部裕一	北大・医・第2薬理	吉岡充弘	北大・医・第1薬理

事務局：服部 裕一（事務局長）、深尾 充宏、山崎 涼

事務局住所：〒060 札幌市北区北15条西7丁目

北海道大学医学部薬理学第二講座

電話：011-706-6920, 6921、011-717-1139

FAX：011-717-1139

御 挨拶

新緑の札幌において、第21回日本毒科学会学術年會を主宰出来ますこと、大変光榮に存じます。

生命科学が日進月歩の早さで進歩している現在、その影響は好むと好まざるを問わず、関連する学問領域に及んで来ております。トキシコロジーも例外ではありません。2年前、この年會を引き受けるにあたって、會長権限を最大限に利用して、独断でこの年會の主題を、「毒性と情報伝達系」とし、特別講演、シンポジウムやワークショップをこの線にそった形で設定しました。その当時に比べて飛躍的に情報伝達系に関する理解は深まってきました。トキシコロジーへの応用も可能になってきた感があります。

トキシコロジーは学際的色彩の強い学問ですから、今回の年會の主題は本質にアプローチする方法論の一つを表現しているに過ぎません。少しでも、日本のトキシコロジーの発展の一助になれば幸いと思っております。

年會を開催するにあたって、道内の関係する講座の教授及び助教授の先生方に組織委員会や実行委員会に加わっていただき、お手伝いいただくと共に、道外から参加される日本毒科学会会員の皆様方への歓迎の気持ちを表すことに致しました。

また、日本毒科学会理事会には、會長の我儘をお許しになり、絶大なるご支援を戴きましたこと厚くお礼申し上げます。

付け加えて、この年會にご協賛下さいました企業各位への感謝を忘れてはなりません。

何分にも慣れぬ私達がおこなう会ですので、不行届きの点が多いかと存じますが、ご寛容いただき、北の都での学術交流を楽しんでいただきたいと思いますと思っております。

参加者お一人お一人にとって、実り多い学術年會でありますことを念じつつ。

平成6年5月吉日

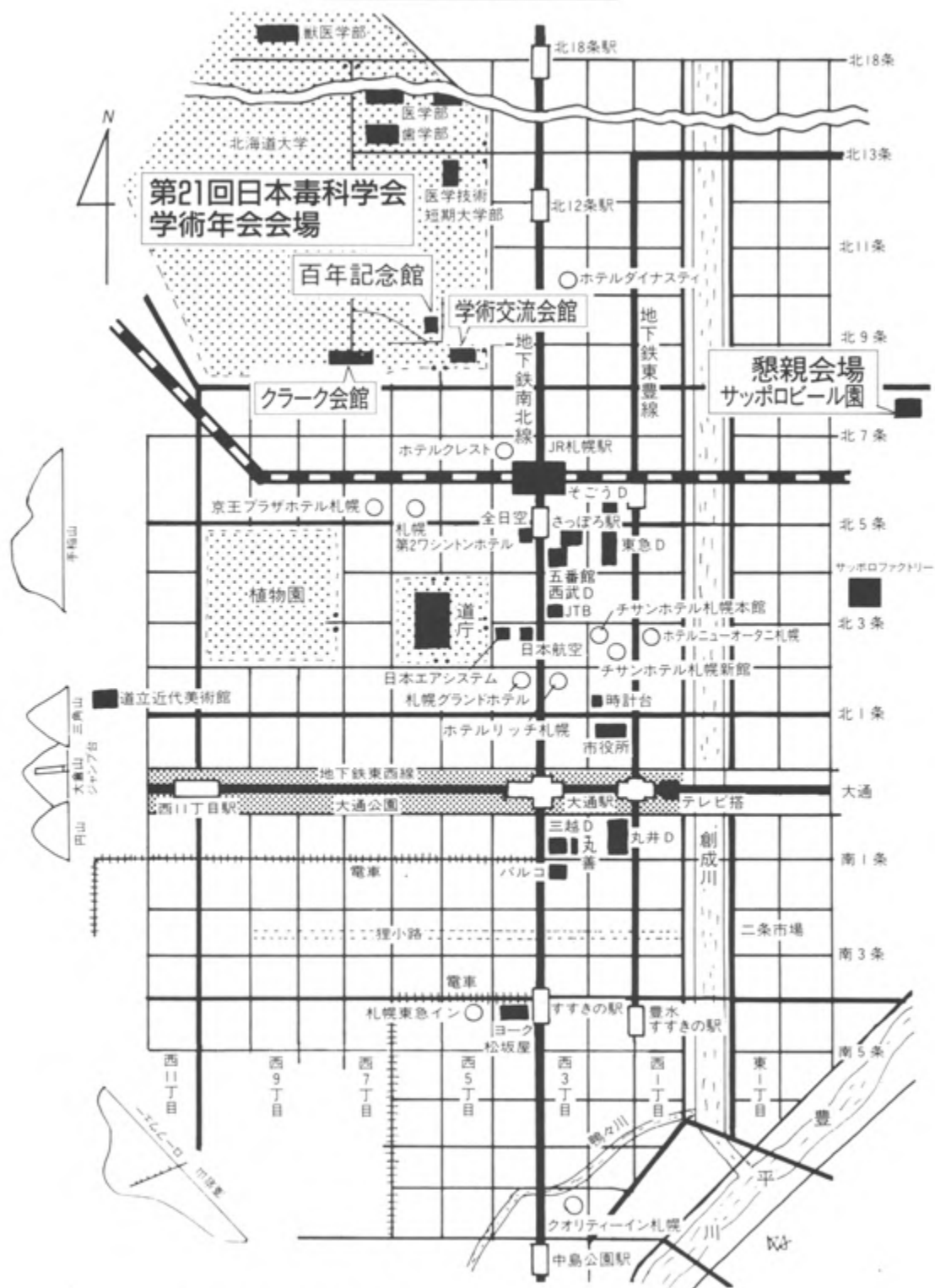
第21回日本毒科学会学術年會會長

菅野盛夫

目 次

会場案内	4
お知らせとお願い	8
集会日程	10
特別講演	33
シンポジウム	37
ワークショップ	47
研究推進委員会ワークショップ	61
一般口演	71
索引	195
協賛企業および団体御芳名	205

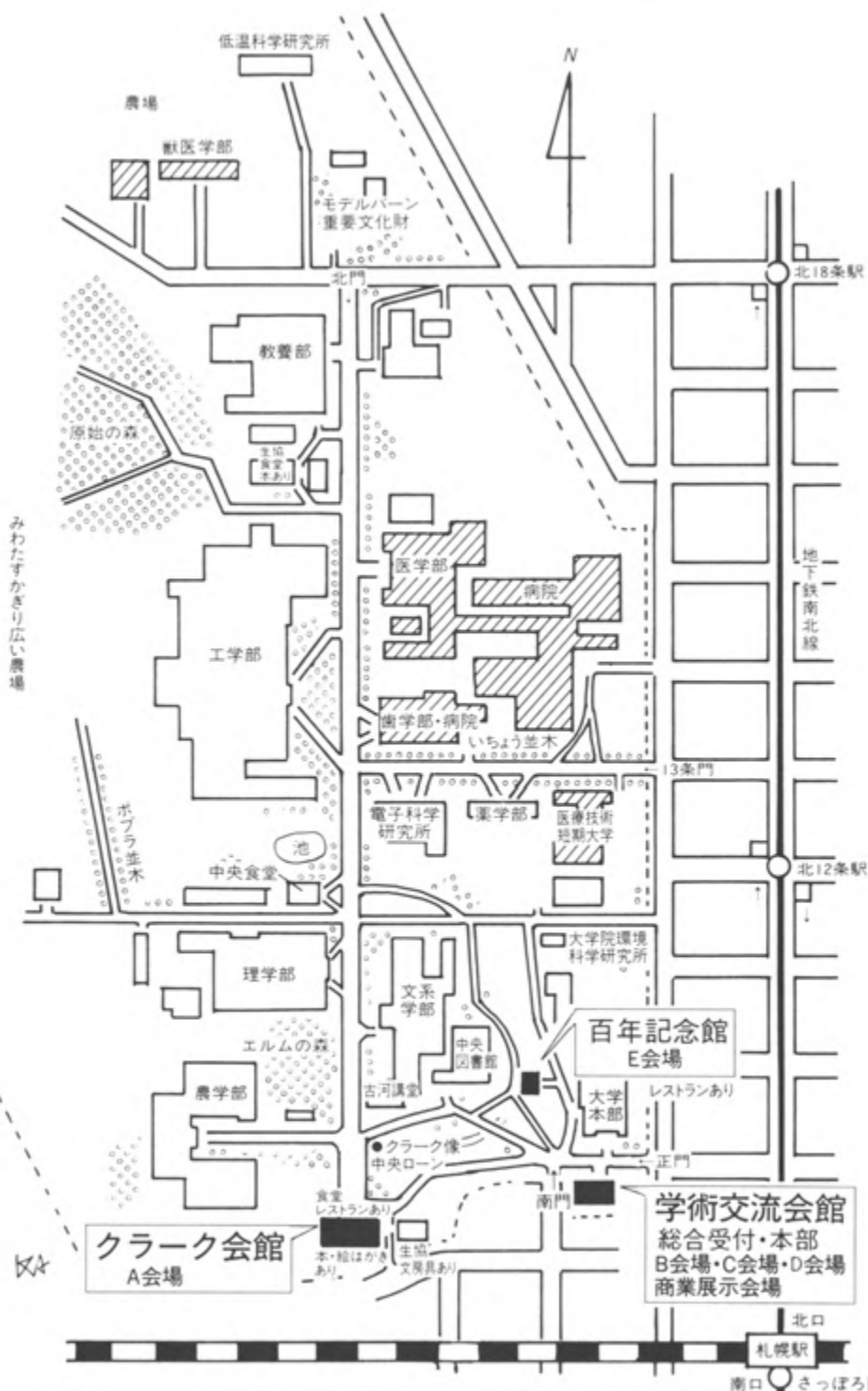
札幌市内案内図



新千歳空港－札幌間の交通

- バ ス: 所用時間70分、運行15～20分毎、750円 (各航空会社をむすぶ)
- JR快速エアポート: 所用時間36分、運行約15分毎、940円

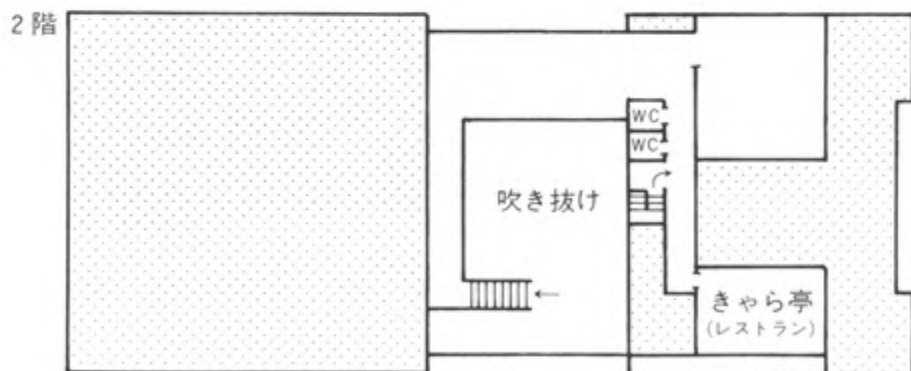
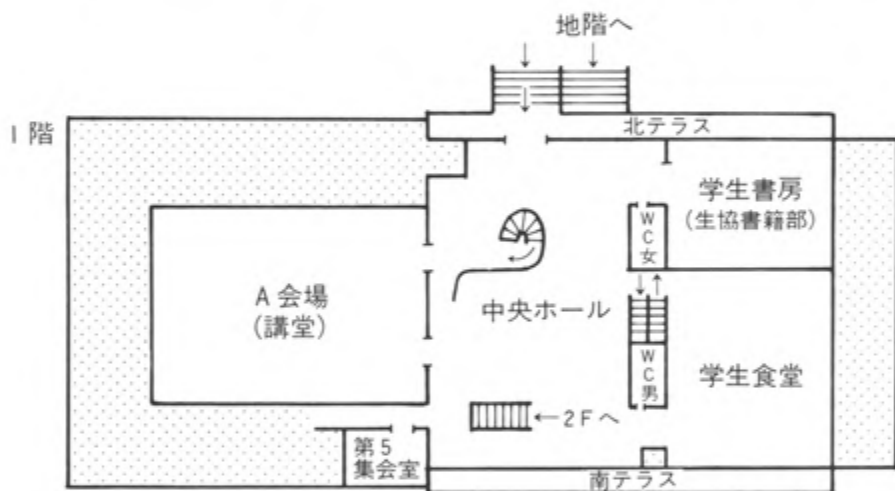
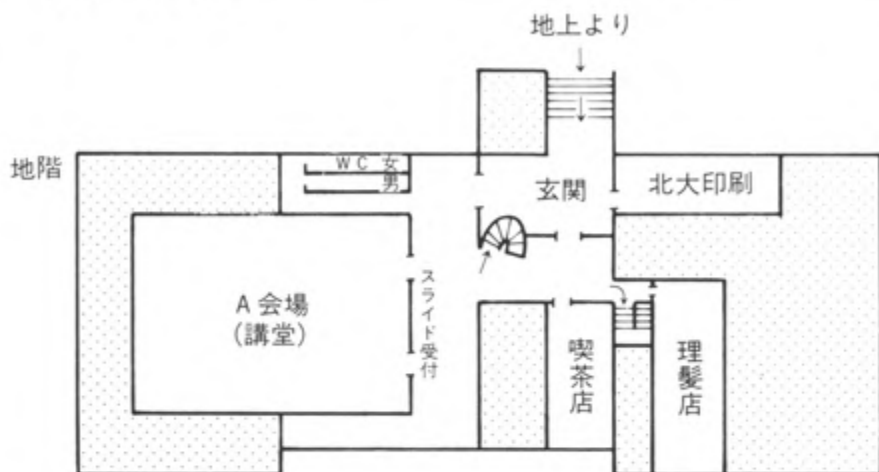
北海道大学キャンパス案内図



- 学会本部:北海道大学学術交流会館内
- 文 通:地下鉄南北線さっぽろ駅から徒歩約10分
北12条駅から徒歩約10分
JR札幌駅から徒歩約10分
- 大学構内には、自家用車のための駐車場はございません。
- 食 事:学内・大学周辺・札幌駅地下の食堂・レストランをご利用できます。

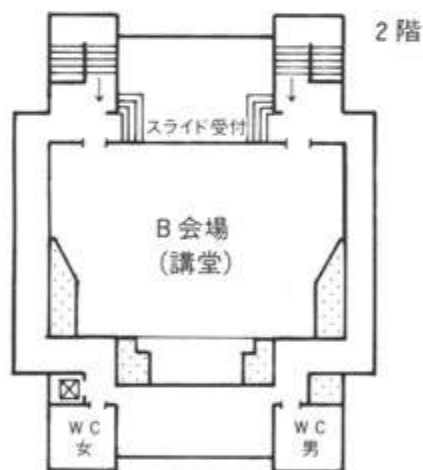
会場配置図

クラーク会館

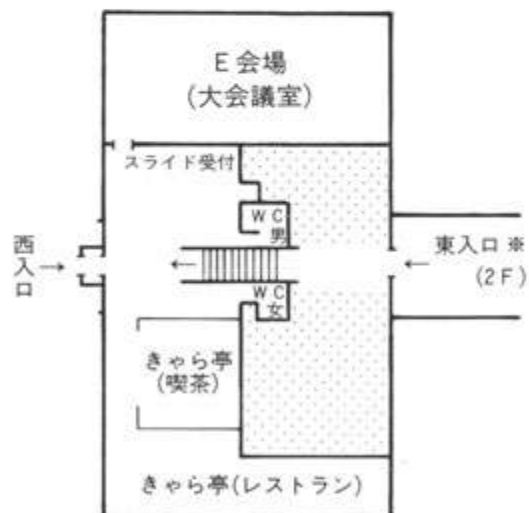


会場配置図

学術交流会館



百年記念館 (1階)



※百年記念館の東入口は、2階にあたります。入って中央の階段を降りると1階になります。

お知らせとお願い

◆参加者の方へ

1. 受付：6月8日（水）から6月10日（金）まで午前9時00分から受付を学術交流会館ホールにて行います。
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：8,000円
 - (2) 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
 - (3) サテライトシンポジウムのみ参加の場合：3,000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出が必要な時は、学術交流会館の年会受付あるいは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. 年会事務局：学術交流会館内 TEL.FAX(011)746-9642

◆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、ワークショップについては予めオーガナイザーと打ち合わ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り消し、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。

◆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）、シンポジウムおよびワークショップについては、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って下さい。

◆理事・監事の方へ

理事会は6月7日（水）14時30分より百年記念会館大会議室（E会場）にて開催致します。

◆評議員の方へ

評議員会は6月9日（木）12時30分より13時30分まで、学术交流会館第一会議室（D会場）で開催致します。昼食（1,000円）は、学内事務局で用意致しますので、昼食代を評議員会受付でお支払い下さい。

◆総会について

総会は6月10日（金）13時30分より14時30分までクラーク会館講堂（A会場）で開催致します。

◆懇親会について

懇親会は6月9日（木）17時より、サッポロビール園（札幌市東区北7条東9丁目 Tel 011-742-1531）において開催致します。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っております（当日会費は5,000円です）。A会場（クラーク会館講堂）前からバスで案内致します。乗車の際には参加章をお示し下さい。

◆クローク

学术交流会館第二会議室のクロークをご利用下さい。

◆休憩される方は、学术交流会館第3、第4会議室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

学术交流会館ホールにて6月8日（水）午後から10日（金）午後まで行います。

第21回日本毒科学会学術年会スケジュール及び座長一覧

6月7日 (火) 百年記念館

6月8日 (水)



B 会場
(学術交流会館講堂)

サテライトシンポジウム

幕部 勝(阪府大・農)・藤田正一(北大・獣医)

サテライト
シンポジウム

6月9日 (木)

10⁰⁰ ASIATOX 認定学会
百年記念館

13⁰⁰ ASIATOX
理検

18 ビール園

	A 会場 クラーク会館講堂	B 会場 学術交流会館講堂	C 会場 学術交流会館小講堂	D 会場 学交会館第1会議室	E 会場 百年記念会館講堂
09:20					
09:30		会長挨拶			
10:00	9:45-11:45 研究推進委員会 ワークショップ 1~4	9:30-10:42 毒性試験法(1) B01-B06 斉藤秀哉(北大医)	9:30-10:42 細胞毒性 C01-C06 上野芳夫 (東京理科大学)	9:30-10:30 肝細胞 D01-D05 数原昭夫(北大獣医)	9:30-10:30 重金属 E01-E05 須藤純一(道医大)
11:00	佐藤哲男(千葉大薬) 遠藤 仁(杏林大医)	10:42-11:54 毒性試験法(2) B07-B12 高山 敏(第一製薬)	10:42-11:54 血液・脾・他 C07-C12 五十嵐俊二 (エーザイ)	10:30-11:30 肝障害 D06-D10 上野光一(千葉大薬)	10:30-11:30 神経毒性 E06-E10 藤井優子(帝京大医)
12:00				12:30-13:30 評議員会	
13:00				車検の時間	
14:00	14:00-15:00 特別講演 菅野盛夫(北大医)				
15:00	15:15-17:45 ワークショップ WS-1-WS-6 大鹿英世(札医大) 南 勝(道医大)				
16:00					
17:00					
18:00					

懇親会：午後7時よりサッポロビール園(札幌市東区北7条東9丁目)にて開催致します。会場にはA会場前からバスで御案内致します。

懇親会に出席される方はマークの入った参加章をおつけ下さい。なお、懇親会の受付は学会当日も受付で行っております(当日会費 5,000円)。懇親会終了後、市内ホテル行きのバスを用意しております。

6月10日(金)

	A 会場 クラーク会館講堂	B 会場 学術交流会館講堂	C 会場 学術交流会館小講堂	D 会場 学文会館第1会議室	E 会場 百年記念会館講堂
09:00					
10:00	9:30-10:30 腎毒性 A01-A05 玄蕃宗一(大阪薬大)	9:30-10:06 毒性試験法(3) B13-B15 野口英世(藤沢薬)	9:30-10:30 抗原性試験 C13-C17 黒川雄二(国衛試)	9:30-10:30 薬物代謝酵素(1) D11-D15 横井 毅(北大薬)	9:30-10:06 生殖毒性(1) E11-E13 黒岩幸雄(昭和大薬)
11:00	10:30-11:30 感覚器毒性 A06-A10 佐藤秀哉(武田薬品)	10:06-11:18 毒性試験(1) B16-B21 市原 和夫(道薬大)	10:30-11:30 免疫毒性(1) C18-C22 宮島宏彰(武田薬品)	10:30-11:30 薬物代謝酵素(2) D16-D20 鎌倉哲也(北大薬)	10:06-10:54 生殖毒性(2) E14-E17 平井正直(新日本科)
12:00	11:30-12:42 発熱性 A11-A16 前川昭彦(佐々木研)	11:18-12:30 毒性試験(2) B22-B27 高橋直人(国衛試)	11:30-12:30 免疫毒性(2) C23-C27 野村 謙(第一製薬)	11:30-12:42 心毒性・特殊毒性 D21-D26 安孫子 保(旭医大)	10:54-12:18 胎仔毒性 E18-E24 菊池康基(P&G)
13:00					
14:00	13:30-14:30 総 会				
15:00	14:40-17:30 シンポジウム S1-S4				
16:00	長尾 拓(東大薬) 土井邦雄(東大薬)				
17:00					
17:30					

■プログラム■

特 別 講 演

6月9日(木) A会場 クラーク会館講堂 14:00-15:00

座長：菅野盛夫

ALTERATION OF SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAYS
BY DIOXIN AND RELATED Ah RECEPTOR LIGANDS.

Arleen B. RIFKIND, M.D.
(Cornell University Medical College)

シンポジウム

6月10日(金) A会場 クラーク会館講堂 14:40-17:30

「細胞死をめぐるトピックス」

座長：長尾 拓 (東大・薬・毒性薬理)

土井邦雄 (東大・農・実験動物)

- S-1) 細胞死について—とくに腎臓におけるNa, K-ATPase活性と細胞死
○宮鷹宏彰、伊藤隆康 (武田薬品・薬剤安全研)

- S-2) 培養細胞レベルでみた活性酸素障害発現と細胞死
○桑原幹典 (北大・獣医・放射線)

- S-3) 心筋細胞死の発生とCa overload
○金子昇 (東京女子医大・心研内科)

- S-4) ApoptosisとFas抗原
○米原伸 (京大・ウイルス研・生体発癌)

ワークショップ

6月9日(木) A会場 クラーク会館講堂 15:15-17:45

「毒科学研究における細胞内(間)情報伝達系の意義」

座長：南 勝 (東日本学園大・薬・薬理)

大鹿英世 (札医大・薬理)

- WS-1) 細胞内情報伝達系とくに神経毒によるニューロン死
○野村靖幸 (北大・薬・薬効)
- WS-2) 腎障害における細胞内情報伝達系の関与
○玄番宗一 (大阪薬科大・第二薬理)
- WS-3) 心筋障害と細胞膜情報伝達系
○川口秀明・北畠顕 (北大・医・循内)
- WS-4) アルコールによる中枢神経細胞情報伝達系の変化：チューブリンを含めたGTP結合蛋白質に対する影響
○八田慎一 (札医大・医・薬理)
- WS-5) 接着分子を介する細胞間及び細胞内情報伝達修飾に基づく生体防御反応の質的変換
○上出利光 (北大・免研・免疫病態)
- WS-6) 肝障害と細胞間コミュニケーション
○森道夫 (札医大・医・病理)

研究推進委員会ワークショップ

6月9日(木) A会場 クラーク会館講堂 9:45-11:45

「神経毒性ー受容体と輸送担体を介した毒性ー」

座長：佐藤哲男（千葉大・薬・薬物）

遠藤 仁（杏林大・医・薬理）

- 1) 神経毒性ー受容体と輸送担体を介した毒性ー
○直井信・丸山和佳子*（名古屋工大、*名大・医・神内）
- 2) グルタミン酸トランスポーターと神経細胞死
○金井好克、遠藤仁（杏林大・医・薬理）
- 3) 一酸化炭素(CO)の中樞神経毒性
○鍋島俊隆（名大・医・医療薬学・薬剤）
- 4) β -アミロイドペプチドの培養海馬神経細胞に対する毒性
○毛利哲郎（北陸大・薬・創薬研）

一般演題(口演)

6月9日(木)

B会場 (学術交流会館講堂)

9:30-10:42

毒性試験法(1)

座長: 斎藤秀哉(北大・医・第一薬理)

- B-01 マウスにおける絶食時間の検討—再給餌後の過食が要因となった死亡例—
○渡辺正人、堀田真希、佐竹聖人、伊藤博敏 (日本バイエルアグロケム
・日野研・安全評価)
- B-02 毒性試験の諸検査値に及ぼす摂餌量の影響
山田久陽、○村上美穂子、杉浦正幸、中川慎也、大島隆、中根貞雄 (大
正製薬・総合研・安全研)
- B-03 制限給餌による精巢の障害性
○島田信、坂口ゆかり、原田滋雄、柿畑耕司、野村護 (第一製薬・安全研)
- B-04 長期飼育ラットにおける食餌制限の影響
○関誠、山口一喜、関剛幸、吉村慎介、小島幸一、畔上二郎、今井清 (食
品薬品安全センター・秦野研)
- B-05 静脈周囲刺激性試験に関する基礎的検討
○中村裕行、根岸良吉、杉本武志、中井洋一 (武田薬品・薬剤安全研)
- B-06 ラットを用いた血管痛評価法の検討
○尾崎潤一郎、久世博、堀正樹 (田辺製薬・安全研)

10:42-11:54

毒性試験法(2)

座長: 高山 敏(第一製薬)

- B-07 マイクロダイアリシス法による薬物の毒性発現解析への応用
○山本正雄、貴志陽子、佐藤哲男 (千葉大・薬・薬物)
- B-08 イヌ毒性試験における血液化学的検査の背景データに関する統計学的処理の
試み
○小田部耕二、有賀恭子、松沢陽子、堀内美保、春日咲子、宇佐見正義
(中外製薬・安全研)
- B-09 ラットへの顆粒剤の経口投与における投与方法の差による作用発現時間の検
討
○木口雄夫、和田理穂、河村公太郎 (化合物安全研・薬理)

- B-10 輸液用製剤の毒性試験法の検討—高カロリー輸液の臨床用法試験の試み—
○池田陽一、寺村佳之、今井直人、花田秀一、岩井正和（ミドリ十字・中央研・安全研）
- B-11 ラットにおける明暗条件反転後の再同調に要する日数について—血中濃度測定に関する手技的検討—
○古川忠司、大橋芳彦、木村邦男、岡田忠彦（三共・安全研）
- B-12 化学発光法によるラット血清中IgEの高感度測定法の開発
○堀口恵子、安達智子、小島幸一（食品薬品安全センター・秦野研）

C会場（学術交流会館小講堂）

9:30-10:42

細胞毒性

座長：上野芳夫（東京理科大・生命科学研）

- C-01 DNAの断片化を指標とした有害微生物代謝産物の細胞毒性とそれに対する抗酸化剤の影響
○梅森清子、永田諭志、菅又昌雄^{*}、河合賢一^{**}、田沼靖一、上野郁子^{***}、上野芳夫^{*}（東京理科大・薬、^{*}東京理科大・生命科学研、^{**}星薬科大・薬、^{***}星薬科大・理化学研・生物物理化学）
- C-02 アントラサイクリン系制癌剤の二つの細胞内作用部位の解析
○角崎英志、清宮健一、松尾三郎、暮部勝（大阪府立大・農・獣医・毒性）
- C-03 制癌剤アドリアマイシン・レセプター複合体の核移行について
○清宮健一、松尾三郎、暮部勝（大阪府立大・農・獣医・毒性）
- C-04 ラット腹腔肥満細胞のヒスタミン放出に及ぼすカフェインの作用
○寺岡宏樹、秋葉洋江^{*}、高井了^{*}、種池哲郎^{*}、平賀武夫、大賀皓（酪農学園大・獣医毒性、^{*}獣医薬理）
- C-05 初代培養肝細胞における細胞間コミュニケーションに対する除草剤diquatの影響
○張宝旭、大野泰雄、宮島敦子、籾内桃子、高仲正（国立衛試・安全生物・薬理）
- C-06 副腎毒性スクリーニングにおけるin vitro系の応用
○須藤武、築館一男、見上孝、山津清實（エーザイ・安全研）

10:42-11:54

血液/臍/その他

座長：五十嵐俊二（エーザイ）

- C-07 薬物投与ラットにおける単球、骨髄マクロファージの酵素活性の変化
○二村芳弘、松本清司*（東邦大・医・薬理、*信州大・医・動物実験施設）
- C-08 Levofloxacinによるラット好中球減少の検討
○宮本恵美、加藤道幸、菅原正喜、野村護（第一製薬・安全研）
- C-09 ラットにおける血漿中エリスロポエチン濃度の週齢差、性差及び食餌の影響
○苗代一郎、吉岡勝、茶谷文雄、佐藤秀蔵、佐々木隆造*（武田薬品・薬安研、*京大・農・食化）
- C-10 分泌期エナメル芽細胞のゴルジ装置に対するフッ素の影響—HRP標識レクチンによる組織化学的研究—
○松尾三郎、清宮健一、暮部勝（大阪府立大・農・獣医・毒性）
- C-11 抗凝固薬DX-9065aの臍臓に及ぼす影響
土屋俊也、大野広志、樫田陽子、源田百合、吉池通晴、野村護（第一製薬・安全研）
- C-12 ハムスターBOP誘発臍萎縮に対するトリプシンインヒビターの影響
○古川文夫、西川秋佳、池崎信一郎、高橋道人（国立衛試・病理）

D会場（学術交流会館第1会議室）

9:30-10:30

肝細胞

座長：数坂昭夫（北大・獣医・毒性）

- D-01 カルバメート系農薬の遊離肝細胞およびSIRC細胞に及ぼす影響
○宮島敦子、籾内桃子、張宝旭、大野泰雄、高仲正（国立衛試・薬理）
- D-02 カルバメート系農薬の初代培養肝細胞におよぼす影響
○籾内桃子、宮島敦子、張宝旭、大野泰雄、高仲正（国立衛試・薬理）
- D-03 肝炎自然発症LECラット肝におけるカルボキシエステラーゼ発現と制御機構の特異性
○細川正清、西矢剛淑、佐藤哲男（千葉大・薬・薬物）
- D-04 肝炎自然発症LECラット肝細胞スフェロイドの作製とその長期培養について
○吉沢正純、上野光一、小林明子、遠藤健一、佐藤哲男（千葉大・薬・薬物）

- D-05 LECラットの肝における活性酸素種の生成機序とその影響
○山本秀樹*、升田真木彦、数坂昭夫、藤田正一 (*三共、北大・獣医
・毒性)

10:30-11:30

肝障害

座長：上野光一（千葉大・薬・薬物）

- D-06 ラット肝細胞スフェロイド培養法を用いたアレルギー性肝障害モデルの作製
遠藤健一、○小林明子、上野光一、吉沢正純、佐藤哲男（千葉大・薬・
薬物）
- D-07 肝細胞のBrdU取り組みに及ぼすT-2 toxinの影響
○李旻宰、河村晴次、板垣慎一、土井邦雄（東大・農・実験動物）
- D-08 KOSMART法（コラーゲン合成酵素の新測定法）により測定したラットの四塩化
炭素誘発線維症肝におけるProlylhydroxylase(PH)活性
○大林久雄、柴田徹一*、斎藤眞一**、大谷卓司、笹森裕子、大浦聖子、
長野嘉介、山内勝彦、奥平雅彦、松島泰次郎（日本バイオアッセイ、
*慶応大・医、**上智大・理工）
- D-09 四塩化炭素障害ラット肝における脂質過酸化生成物4-hydroxynonenalの局在
○西川秋佳、古川文夫、三井雅之、榎並倫宣、豊國伸哉*、内田浩二**、
高橋道人（国立衛試・病理、*京大・病理、**名大・食品）
- D-10 グルコースの過剰摂取は肝毒性を増強する？
○田中宏治、寺西宗広、高田雅哉、矢本敬、大橋芳彦、山下和男、木村邦男、
真鍋淳（三共・安全研）

E会場（百年記念会館講堂）

9:30-10:30

重金属

座長：須藤純一（北海道医療大・薬・毒理）

- E-01 塩化トリブチル錫の初代培養肝細胞に対する細胞毒性とカルシウム反応阻害
の性質
○朝生裕樹*、加藤誠司*、豊田和弘、畝山智香子、川西徹、百瀬和享*、
高橋道人（国立衛試・病理、*昭和大・薬・薬理）
- E-02 マウス脳組織コリン作動性神経機構に及ぼすトリブチルスズ投与の影響
増子かおり*、○小林晴男、鈴木忠彦、野中邦夫、笠嶋快周、茂木朗
（岩手大・農・家畜薬理、*杏林製薬）

E-03 カドミウム投与マウスの腎ミザンギウム細胞IL-6による腎尿細管細胞の増殖
○香山不二雄、吉田貴彦^{*}、児玉泰、Michael Elwell^{**}、Michael I. Luster^{**} (産業医大・衛生、^{*}東海大・医・環境保健、^{**}NIEHS)

E-04 Cd飽和メタロチオネインIIの静脈内単回投与時における血漿、肝および腎でのCdの動態について
○林泰司、照井潤、曾山桃子、須藤純一 (北海道医療大・薬・毒理)

E-05 急性腹症として船内で集団発生した急性鉛中毒の韓国人船員の一例
○石橋潤、秋久理真、荒木一夫 (聖母病院内科)

10:30-11:30

神経毒性

座長：藤井儔子 (帝京大・医・薬理)

E-06 排泄障害ラットにおけるキノロン薬による痙攣誘発の検討
○赤羽一美、加藤道幸、大河原聡、野村護 (第一製薬・安全研)

E-07 β -ラクタム系抗生物質によるマウス痙攣誘発作用およびGABA受容体結合阻害作用の検討
○都富友美、北野裕、西敏之、赤羽浩一 (第一製薬・探索第一研)

E-08 グルホシネート・アンモニウムへの乳児期あるいは胎児期暴露ラットにおけるカイニン酸への反応変化
藤井儔子、○大畑隆郎 (帝京大・医・薬理)

E-09 Neurotoxicological alterations induced by N-butyl benzenesulfonamide and aluminum chloride in Wistar rats
○Dae Hyun Cho, Se Jin Hwang, Won Yong Lee, Byung Woo Moon, Hwa Hwey Moon, Kang Chin, Tae Soon Cho^{*}, Jin Suk Kim^{**} (National Institute of Safety Research, ^{*}Sung Kyun Kwan University, ^{**}Kon Kuk University)

E-10 神経毒性学・神経薬理学研究での有用な動物モデルとしてのTHAラット
○吉田貴彦、相川浩幸、萩野智尉、重田定義、加藤秀樹^{*} (東海大・医・環境保健、^{*}実験動物中央研)

6月10日(金)

A会場 (クラーク会館講堂)

9:30-10:30

腎毒性

座長：玄番宗一(大阪薬科大・第二薬理)

A-01 5/6腎摘出ラットの腎機能の変化について-2

○茨田享子、最上昌輝、小林直美、中村聡子、吉田緑、川西広明、
外尾亮治、五十嵐章之(動繁研・安全研、実験動物研)

A-02 プロゲステロン及び酢酸メドロキシプロゲステロン長期投与によるF344系雌ラットの慢性腎症に及ぼす影響

○佐藤敦子、磯部充威、堀内敏、飯塚和弘、久田茂、伊藤清子、増田修治、
吉田信也、星野敏也、鈴木稔(帝国臓器製薬・安全研)

A-03 先天性水腎症ラットを用いたゲンタマイシン誘発腎障害の検討

○橋本英明、増田達樹、村上久子、高木英利、田内清憲(日本レダリー・
生物研)

A-04 セファロリジンのLLC-PK1細胞障害に対するプロテインキナーゼCおよびホスホジエステラーゼ阻害薬による軽減

○河合悦子、玄番宗一(大阪薬科大・第二薬理)

A-05 ラットにおける尿分析値の性差について(3)雄の去勢による尿分析値の変動に対するテストステロンの影響

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)

10:30-11:30

感覚器毒性

座長：佐藤秀蔵(武田薬品・薬安研)

A-06 Sodium iodateのラット網膜電図に及ぼす影響

○杉本眞次、今若実穂、尾崎晴茂、伊藤隆康、安藤孝夫、佐藤秀蔵(武田薬品・薬安研)

A-07 聴器毒性のスクリーニング法：ラット新生児に対する各種アミノ酸糖体系抗生物質反復投与による電気生理学的検討

○佐々木眞敬、古賀久視、中島幹夫、小林洋四郎(旭化成・ライフサイエンス総合研・安全研)

- A-08 ドレイズ眼粘膜刺激性試験代替法一次バリデーションのためのドレイズ試験とその病理組織学的検討
 ○金子豊蔵、井上達*、鈴木登志郎**、加藤利博**、杉山千生**、柿島博***、中村恒彰***、辰見寿****、萩野滋延**、増田光輝***、小林敏明****、門馬純子、高仲正*****（国立衛試・毒性、*横浜市大・医、**日本セイギケン総合研、***日本化粧品工業連合会、*鐘紡、**ライオン、***サンスター、****資生堂、*****国立衛試・薬理）
- A-09 眼粘膜刺激性試験における少容量法とDraize法の比較
 ○栗下昭弘、エシル・コーミエ、ロナルド・バーカー、ロバート・ブルース（プロクター・アンド・ギャンブル・ファー・イースト・インク）
- A-10 ドレイズ眼刺激性試験の統計的解析
 ○小島肇夫、森栄治、小西宏明、吉村功*（日本メナード化粧品・研究技術、*東京理科大・経営工学）

11:30-12:42

発癌性

座長：前川昭彦（佐々木研・病理）

- A-11 甲状腺二段階発がん実験における甲状腺増殖性病変発生と血中甲状腺ホルモンの関連性について
 ○下武男、三森国敏、小野寺博志、安原加壽雄、前川昭彦*、高橋道人（国立衛試・病理、*佐々木研・病理）
- A-12 甲状腺の増殖性病変に対する各種抗甲状腺物質の影響
 ○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）
- A-13 多臓器中期発癌性試験法を用いた農薬40種または20種のADI量での複合投与による発癌性の検討
 ○萩原昭裕、佐野真士、武貞徳子、白井智之、伊東信行（名市大・医・第一病理）
- A-14 20種類の有機リン系農薬の複合投与による肝発癌修飾作用
 ○河部真弓、倉田靖、萩原昭裕、今井田克己、伊東信行（名市大・医・第一病理）
- A-15 Dehydroepiandrosteroneについてのラット肝中期発癌性試験法での解析
 ○田中光、柴田雅朗、宮田恵美子、長谷川良平、広瀬雅雄、白井智之、伊東信行（名市大・医・第一病理）
- A-16 細菌での復帰変異誘発物質の作用発現におけるdiethyl maleate添加の影響
 佐久間聡子、佐藤全、○河村公太郎（化合物安全研・変異原性）

B会場（学術交流会館講堂）

9:30-10:06

毒性試験法（3）

座長：野口英世（藤沢薬品・安全研）

- B-13 サーベイランス用検体としてのラット及びイヌ血液—保存及び輸送条件の検討
○林裕、海野隆*、守田伸子**、大林繁夫***、山口真樹子*、松澤利明**、野村護***（富士レビオ、*鐘紡、**サンド薬品、***グレラン製薬、*アップジョン、**山之内製薬、***第一製薬）
- B-14 化学物質安全性評価支援システムの開発研究 I. 毒性試験データベースシステムの構築
○鎌田栄一、曾田喜崇、中館正弘、浅井義之*、鈴木彰*（国立衛試・総合評価研究室、*住商情報システム）
- B-15 毒性試験における臨床検査機器のメンテナンスおよび精度管理実施状況
○海野隆*、守田伸子**、斎藤実**、野村護***（日本製薬工業協会・基礎研、*鐘紡、**サンド薬品、***第一製薬）

10:06-11:18

毒性試験（1）

座長：市原和夫（道薬大・薬理）

- B-16 ビペロニルプトキシドの毒性 1. ラットにおける慢性毒性
○大石眞之、米山允子、田中豊人、藤谷知子、高橋省（都立衛生研・毒性・薬理）
- B-17 ビペロニルプトキシドの毒性 2. マウスにおける慢性毒性
○高橋省、大石眞之、米山允子、田中豊人、藤谷知子（都立衛生研・毒性・薬理）
- B-18 ビペロニルプトキシドの毒性 3. マウスおよびラットの発生毒性
○田中豊人、藤谷知子、高橋省、大石眞之（都立衛生研・毒性・薬理）
- B-19 Toxicological effect of sulfur dioxide on the respiratory tract of rats.
Jong Kwan Lee, Dai Byung Kim, Byeong Woo Ahn, ○Pu Young Kim
(National Insutitute of Safety Research)
- B-20 ジクロロメタンによる血中リボタンパクの変化
○本間健資、大谷勝己、宮川宗之（産業医学総合研・職業病研）

- B-21 合成抗菌剤オキシソリン酸の雄ラットにおける血中LH上昇の作用機作の検討
○山田智也、中村純、奥野泰由、細川俊治、松尾昌季（住友化学・生物環境研）

11:18-12:30

毒性試験（2）

座長：高橋道人（国立衛試・病理）

- B-22 ゴム老化防止剤2-Mercaptobenzimidazoleのラット28日間経口反復投与による甲状腺障害について
○川崎靖、梅村隆志、斎藤実、門馬純子、松島裕子、関口裕巳、松本真美、伊佐間和郎、津田充宥、黒川雄二（国立衛試・毒性、療品）
- B-23 甲状腺ホルモンの胆汁排泄に及ぼす各種薬剤の影響
○森下克美、細木英司、北浦敬介、神辺敏美（大塚・徳島研・毒性）
- B-24 LactitolのSD系雄性ラットに対する副腎髄質クロム親和細胞過形成誘発機序に関する検討
○吉川健一、浜州泰久、吉田勝、石橋成太良、中沢素邦、田村博信、河口和寛、鷲美信好（日本新薬・安全研）
- B-25 ラットにおけるビタミンD₃類縁化合物の長期投与の影響
○池崎信一郎、古川文夫、今沢孝喜、西川秋佳、高橋道人（国立衛試・病理）
- B-26 1 α , 25-dihydroxy vitamin D₃のラット表皮サイトケラチンおよび細胞動態に及ぼす影響
○松下智哉、三沢保幸、松永隆、杉本哲朗、二木力夫（中外製薬・安全研）
- B-27 C型肝炎におけるstellate cellおよび喫煙の関係
○別枝和彦、森田健一、藤原睦憲（大鵬薬品・安全研、日本赤十字・中央検査）

C会場（学術交流会館小講堂）

9:30-10:30

抗原性試験

座長：黒川雄二（国立衛試・毒性）

- C-13 モルモットを用いた医薬品の抗原性試験における原体および原体-タンパク質結合物のアナフィラキシー惹起容量に関する研究
○大郷豊、井上智彰、磯部竹雄、堀井郁夫（日本ロシュ・毒性病理）
- C-14 モルモットPCA反応の惹起抗原量に関する検討
○朝波省吾、桑原孝（大塚製薬・鳴門研）

- C-15 Adjuvant & Strip法を用いたNSAID外用剤の光感作性に関する検討
○桑原孝、朝波省吾、鶴田順一（大塚製薬・鳴門研）
- C-16 ホルムアルデヒドおよびグルタルアルデヒドのモルモットにおける皮膚感作性ならびに抗原性について
○門馬純子、関口裕巳、金沢由基子*、鹿庭正昭、川崎靖、津田充宥、黒川雄二（国立衛試・毒性、*食品薬品安全センター・免疫毒性）
- C-17 チオウレア系ゴム加硫促進剤の3種の感作性試験法による結果の比較
○五十嵐良明、土屋利江、門馬純子*、中村晃忠（国立衛試・療品、*毒性）

10:30-11:30

免疫毒性（1）

座長：宮嶋宏彰（武田薬品・薬安研）

- C-18 Doxifluridine(DFUR)のマウスにおける胎児胸腺分化に与える影響
○井上智彰、金崎寛子、堀井郁夫（日本ロシュ・毒性病理）
- C-19 制がん剤のラット脾臓における毒性発現とPFC反応抑制
○土井孝良、永井博文、佃良一、鈴木剛、宮嶋宏彰（武田薬品・薬安研）
- C-20 rG-CSFの抗体産生系における免疫毒性的検討
○原俊子、永牟田雅弘、横田忠、丸谷清*、田中公一（中外製薬・安全研、*岐阜大・農学研）
- C-21 rIL-2連続注入時の毒性変化と出現する単核細胞に関する検討
○矢原功、山県英弘、高野享弘、池内滋郎（塩野義製薬・新薬研）
- C-22 rIL-2連続注入部に集積する単核細胞の免疫細胞化学的検討
○山県英弘、矢原功（塩野義製薬・新薬研）

11:30-12:30

免疫毒性（2）

座長：野村 護（第一製薬・安全研）

- C-23 ラットを用いたリンパ球幼若化試験に関する基礎的検討
○中村裕行、中井洋一（武田薬品・薬安研）
- C-24 ヒトリンパ球を用いたIn vitro抗原性試験法への挑戦ー異種タンパク質を陽性対照とした培養系の確立ー
○井上智彰、大郷豊、堀井郁夫（日本ロシュ・毒性病理）

C-25 アカゲザルリンパ球の比重遠心法および全血法によるフローサイトメトリー解析

○小倉剛、富井靖志^{*}、渡辺さつき、杉本哲朗、寺尾恵治^{**} (中外製薬・安全研、^{*}東京免疫薬理研、^{**}国立予研・筑波霊長類センター)

C-26 遅延型アレルギー反応 (3)メタクリル酸誘導体の反応性の検討

○金澤由基子、小島幸一、山脇智予、岡田富士桜、横山雄一^{*}、平尾政則^{*} (食品薬品安全センター・秦野研・免疫毒性、^{*}HOYA・メディカル研)

C-27 マラリア原虫感染モデルを用いた生体防御機構評価の検討

○石島奈美、山口穂、大野広志、野村護 (第一製薬・安全研)

D会場 (学術交流会館第1会議室)

9:30-10:30

薬物代謝酵素 (1)

座長：横井 毅 (北大・薬・代謝分析)

D-11 ペントバルビタール麻酔に対するempenthrinの影響

○辻良三、磯部直彦、川崎一 (住友化学・生物環境科学研)

D-12 肝薬物代謝酵素誘導の性差—特に抱合系酵素誘導に注目して—

○五十嵐功、大橋芳彦、矢本敬、高岡雅哉、寺西宗広、真鍋淳 (三共・安全研)

D-13 イヌ肝ミクロソームの β -遮断薬水酸化酵素

○中村明生^{*}、升田真木彦、数坂昭夫、藤田正一 (^{*}日本新薬・薬剤研、北大・獣医・毒性)

D-14 リスザル初代培養肝細胞における薬物代謝酵素の誘導

○西部泰弘、原内敏夫、若林美津子、江口景子、平田雅春 (塩野義・新薬研)

D-15 ヒト成人及び胎児型P450(CYP3A4およびCYP3A7)を安定的に発現する細胞株の樹立とその毒性学的応用

○橋本尚、中川徹也、横井毅、沢田稔、伊東進、鎌滝哲也 (北大・薬・代謝分析)

10:30-11:30

薬物代謝酵素 (2)

座長：鎌滝哲也 (北大・薬・代謝分析)

D-16 多様なラット肝スルホトランスフェラーゼ(ST)による癌原性アリールメタノールの代謝的活性化

○小倉健一郎、奥田晴宏、渡辺烈 (東京薬科大・第二衛生化学)

D-17 癌原性アリアルメタノール類のSulfotransferase依存的なDNA付加体のラット肝における生成
○奥田晴宏、小倉健一郎、渡辺烈 (東京薬科大・第二衛生化学)

D-18 発癌活性代謝物アリアルメチルサルフェートを解毒するGlutathione S-Transferase Yrs-Yrs
○平塚明、小倉健一郎、奥田晴宏、渡辺烈 (東京薬科大・第二衛生化学)

D-19 低glutathione S-transferase犬とそのモニタリング法
○大橋芳彦、杉浦智美、真鍋淳、安田充也、中津川泰充、大西和、平野光一 (三共・安全研)

D-20 化学物質のラット肝実質細胞に対する小核誘発性について
○鈴木正明、野田圭介、野口忠、浅倉真澄、杉山淑江、松島泰次郎 (日本バイオアッセイ)

11:30-12:42

心毒性/特殊毒性

座長：安孫子 保 (旭川医大・薬理)

D-21 雄ウサギにカーバメート殺虫剤を静脈内投与した時のコリンエステラーゼ阻害によらない急性死
○高橋宏明、柿沼優子、二川治子 (残留農薬研究所)

D-22 ラット急性パラコート中毒による肺臓、肝臓、腎臓ならびに心臓における遊離脂肪酸蓄積におよぼすプロプラノロールとリドカインの作用
○三浦格、橋爪裕子、Nina Hoque、A. N. Ehsanul Hoque、安我子保 (旭川医大・薬理)

D-23 虚血再灌流による消化管粘膜障害とヒドロキシラジカルの産生
○小畑俊、平田孝浩、細川博司、山中康光、内田雄三 (大分医科大・薬理、第二外科)

D-24 ラットのカテコールアミンおよびコルチコステロンに対する吸入麻酔薬の影響
○増渕美子、永田良一、鮫島秀鴨、平田正直 (新日本科学・学術)

D-25 アドリアマイシン-酸化デキストラン複合体の心毒性軽減に関する一考察
○入江弘之、木村和幸、内藤寿英、小柴博、花田秀一、岩井正和 (ミドリ十字・中央研・安全研)

D-26 Protective effects of radical scavengers cisplatin nephrotoxicity in rats
○Choung Se Young (Kyung Hee University)

E会場（百年記念会館講堂）

9:30-10:06

生殖毒性（1）

座長：黒岩幸雄（昭和大・薬・臨床薬理）

- E-11 雄ラットにおける生殖毒性評価法の検討2 -ネフィラセタムの精子形成障害の作用機序の検討-
○坂口ゆかり、島田信、原田滋雄、柿畑耕司、野村護、田谷一善*（第一製薬・安全研、*東京農工大）
- E-12 化学物質によるマウス始原生殖細胞の突然変異
○渋谷徹（食品薬品安全センター・秦野研）
- E-13 SD系雌ラットの性周期の加齢性変化に関する研究
○渡辺千朗、代田真理子、和田和義、高島宏昌、清水ゆり、太田亮、和田あづさ、小川麻樹子、松本亜紀、佐藤昌子、長尾哲二（食品安全センター・秦野研）

10:06-10:54

生殖毒性（2）

座長：平井正直（新日本科学・学術）

- E-14 雄性生殖障害の検索法に関する研究（第1報）-Adriamycinを用いた形態学的精巣毒性評価-
○安原加壽雄、三森国敏、小野寺博志、川島邦夫*、高仲正*、高橋道人（国立衛試・病理、*薬理）
- E-15 雄性生殖障害の検索法に関する研究（第2報）-Adriamycinを用いた精子検査-
○川島邦夫、宇佐見誠、酒見和枝、高仲正（国立衛試・薬理）
- E-16 幼若カニクイザルにおける精巣および卵巣機能検査に関する検討
○鮫島秀鴨、尾根田暁、山本隆、伊原敏夫、増淵美子、平井正直、永田良一（新日本科学・学術）
- E-17 Macaca属サルにおける精液採取法の検討と精液性状の比較
○尾根田暁、鮫島秀鴨、山本隆、福田浩一、伊原敏夫、増淵美子、平井正直、永田良一（新日本科学・学術）

10:54-12:18

胎仔毒性

座長：菊池康基（P&G・ファー・イースト）

- E-18 ラット培養胎児の心拍動数への温度の影響
○秋田正治、横山篤、黒田行昭*（鎌倉女子大・家政、*麻布大・環境）

- E-19 ラット心室中隔欠損の胎児発育遅延との関連性及び生後の回復性
○山北修、今村健二、池渕一也、中川文雄、野中直樹、中川稔彦（大鵬薬品・安全研）
- E-20 パラコートのラット動脈管収縮作用－収縮作用の臨界期の検討－
○白井明志、高木博隆*、山本雅子*、有嶋和義*、政岡俊夫、赤堀文昭（麻布大・獣医・薬理、*第二解剖）
- E-21 未固定標本を用いたラット胎児内臓観察法－bisdiamine投与ラットにおける検討－
○山田雅之、森友彩、和田重次、林裕、寺本昭二*（富士レビオ・医薬研、*残留農薬研）
- E-22 Dimethyltinの催奇形作用に関する研究
○野田勉、森田茂（大阪市立環境研）
- E-23 ラット胎児にみられる胸腺頸部残留の評価について
○佐々齋、松本浩子、福村雅雄、木村亜由美、畠山義朗、田中千晶（資生堂・安全性分析）
- E-24 フロセマイドのマウス胎児波状肋骨誘発作用に及ぼす胎児骨格筋運動の影響について
○中塚敏夫、内田美紀、松本浩良（萬有製薬・開発研）

■特別講演■

●6月9日(休)●クラーク会館講堂

**ALTERATIONS OF SIGNAL TRANSDUCTION
PATHWAYS BY DIOXIN AND
RELATED Ah RECEPTOR LIGANDS**

Arleen B. Rifkind, M.D.

*Department of Pharmacology
Cornell University Medical College*

Dioxin and other Ah receptor ligands are reported to cause significant changes in signal transduction pathways. In this lecture, I will specifically cover the effects of dioxin and related Ah receptor ligands on cytochrome 450 related arachidonic acid metabolism, intracellular calcium, early response genes, growth factors and cytokines, and on down-regulation of hormone and epidermal growth factor receptors. I will also try to integrate the findings and discuss how the changes in signal transduction could participate in the diverse toxic manifestations and carcinogenicity of this class of environmental toxins.

■シンポジウム■

●6月10日(金)●クラーク会館講堂

細胞死について - とくに腎臓におけるNa, K-ATPase活性と細胞死

宮嶋 宏彰, 伊藤隆康
武田薬品・薬剤安全性研究所

(はじめに)

細胞の死はネクロシス(necrosis)とアポトーシス(apoptosis)に大別される。ネクロシスは組織または細胞が予期せぬ病的な環境でおきる受動的な死を指し、アポトーシスはプログラム細胞死(programmed cell death)にみられるように、あたかもあらかじめプログラムされた過程に従うように、細胞が死に至る生理的な環境でおきる積極的な死をいう。しかし、アポトーシスとプログラム細胞死は同義語ではない。アポトーシスは枯死、自爆死、細胞自滅、縮小壊死ともいわれ、ネクロシスとは異なる形態をとる細胞死を指し、プログラム細胞死はアポトーシスに含まれ、生体の形態形成の過程で必然的に起こる機能的な細胞死をいう。しかし、この区別は定義上はともかく、実際にはかなり困難なことが多い。

(死後にみられる細胞死)

我々は、ネクロシスの例として、死後の虚血によるラット腎臓の細胞死を取り上げ、ネクロシスの進行に関係する因子について検討した。虚血は死後の臓器では血行の停止による酸素及び栄養分の供給の停止と二酸化炭素などの老廃物の蓄積などの多様なできごとの総和として表現される。

方法： 8～10週齢の雄Jcl:Wistarラットをエーテル麻酔死させ、室温 22 ± 3 ℃に伏臥位で放置し、0, 1, 5, 10, 15及び20時間後に腎臓を採取し、通常のHE染色、酵素組織化学的染色及び電子顕微鏡で検討した。

結果：死後の組織のネクロシスは死後5時間から顕著になり、中でも遠位尿細管及びヘンレ上行脚太い部の上皮細胞では明らかな核濃縮、細胞質空胞化、ミトコンドリアの膨化及び基底陥入の乱れなどが認められ、死後10時間以降ではこれらの変化が一層顕著になった。しかし、近位尿細管の上皮細胞では死後5時間で核濃縮、軽度なミトコンドリアの膨化及び刷子縁の乱れが認められた程度で、死後20時間においても核濃縮が僅かに強くなった程度であった。

正常の腎臓について、Na, K-ATPase活性の局在と強さを酵素組織化学的にみると、遠位尿細管及びそれに次いでヘンレ上行脚太い部の上皮細胞で最も強く、酵素活性を示す反応産物はいずれも上皮細胞の基底陥入膜の細胞質側にみられ、その他の尿細管各部位にはごく弱い活性しかみられなかった。また、Na, K-ATPaseの特異的阻害剤のウワバインで処理して細胞内のATPの消費を抑制したり、Caチャンネルブロッカーで処理したり、EDTAで細胞外Caをキレートして細胞外Ca濃度を低下させて、細胞内へのCa流入を抑制するといずれもネクロシスの進行が遅延した。

考察：死後における細胞のネクロシスの進行は、同一環境下の同一組織内においても細胞によって異なり、腎臓の場合は、Na, K-ATPase活性の強さと密接に関連し、活性の強い細胞ほどネクロシスが速やかに進行することが示された。また、細胞内のATPの消費やCaの流入を抑制するとネクロシスの進行が遅延することから、ネクロシスの進行を規定している細胞側の要因として、少なくともATP及びCa濃度が考えられる。

結論：ラット腎臓の室温における死後の細胞のネクロシスの進行は部位によって異なり、その速さは細胞内のNa, K-ATPase活性の強さと密接な関連があり、細胞内ATPの減少及び細胞内へのCaの流入に依存していると考えられる。

培養細胞レベルでみた活性酸素障害発現と細胞死

桑原幹典

北大・獣医・放射線

近年、培養細胞レベルでの活性酸素による細胞死の研究が盛んになっている。培養細胞レベルで研究する場合、活性酸素種、使用する細胞種、細胞死の判定法などにより結果が大きく影響を受ける。以下、それぞれについて問題点を列挙してみたい。

(1) 活性酸素源：培養細胞の場合、活性酸素源として次のようなものが多く用いられる。

X (γ) 線・・・OHラジカル

H_2O_2 ・・・OHラジカル、フェリルイオン($Fe^{IV}O$)⁺⁺

近紫外線・・・一重項酸素(1O_2)、スーパーオキシド(O_2^-)

メナジオン・・・スーパーオキシド(O_2^-)

tert-but-OOH・・・アルコキシラジカル

このうち、X線などの放射線は水の分解を通してOHラジカルを生成し、細胞構成成分にラジカル、すなわち酸化的損傷を誘発する。この作用はランダムであるため、細胞全体に均一に損傷を与えるが、核内DNAでの酸化障害が細胞質の他の損傷に比べ、100倍以上の感受性で細胞死をもたらすため、もっぱらDNA損傷のみをもたらすものと考えて差し支えない。しかも、OHラジカル生成量は放射線量により正確にコントロールでき、また、このラジカル以外の反応は少なく、さらに 10^{-9} 秒でDNA 2本鎖切断を誘発し、その修復半減期は30分位であるので、アポトーシスなどの細胞死開始時期との時間的な比較が可能になり、細胞死発現における初期DNA損傷の役割を調べるのに優れた性質を有している。一方、 H_2O_2 の場合、細胞を処理する濃度により酸化障害をもたらす活性種が異なる。低濃度処理では、OH除去剤の効果が少なく、OHラジカル以外の活性種が考えられ、高濃度処理ではフェントン反応によるOH生成が主要と考えられ、作用面での問題点が存在している。また、 H_2O_2 は形質膜、ミトコンドリア、ER、核膜などの脂質・蛋白質に酸化的損傷を与える反応が主で、DNA損傷は直接というよりは間接的に誘発されている可能性がある。この際、細胞内NAD、ATPプールの変化、 Ca^{++} 濃度上昇、mRNA、蛋白質合成、エンドヌクレアーゼの活性化等複雑なプロセスが誘起され、細胞死をもたらすプロセス、特にDNA損傷との関係の解析には困難な面が多い。

(2) 細胞種に依存した活性酸素障害発現：細胞死には2つのタイプがみられる。増殖死と間期死である。後者はアポトーシスあるいはプログラム死とも考えられている。活性酸素により細胞死が起

こるとき、どちらのタイプの様相を示すかは用いる細胞種に依存しているように思われる。チャイニーズハムスターV79などのような分裂性線維芽細胞の場合、一般的に増殖死の様相を示すが、非分裂性の胸腺細胞などは間期死（アポトーシス）を示す。また、T細胞由来の腫瘍細胞やハイブリドーマなどは同様にアポトーシスを示す。結局、細胞が有る種の刺激に対し、アポトーシスの様相に対応すべく遺伝的プログラムがされているか否かによりその様相の違いとなって現れるものと考えられる。活性酸素に対しアポトーシスを起こす細胞はT細胞リンパ球関連細胞に多く、このようなプログラムが存在するように思われ、チャイニーズハムスターV79細胞などにはそのようなプログラムが存在しないように推察される。

(3)細胞死の判定からみた活性酸素障害発現：活性酸素由来細胞死の判定にはトリパンブルー、エリスロシン染色、LDH遊離、細胞増殖、コロニー形成率等様々であるが、それらは用いる細胞種に依る。一般的に、増殖性細胞はコロニー形成率で、非増殖性細胞は色素染色で判定する。しかし、近年上述した増殖死（ネクローシス）とアポトーシスが厳密に区別されるようになり、この2つの観点から判定されることが多い。特徴的なのは、増殖死は活性酸素作用後数回の細胞分裂すなわち、1周期を越える時間を経、次世代に至って障害が発現する。X線の場合、 G_1/S ボーダーを通過したときにDNA損傷が固定され、染色体異常に至り、最終的には生化学・代謝過程の不均衡により死がもたらされるとされている。一方、 H_2O_2 の場合、 Ca^{++} キレーターの添加が細胞毒性を抑制すると報告され、 Ca^{++} ホメオスタシスの乱れが本質と考えられているが、 Ca^{++} 濃度上昇を抑制せず、エンドヌクレアーゼ阻害だけで細胞毒性が緩和されるという報告もあり、また、NADレベル低下を抑制しても致死抑制が無いことなど、複雑な結果が得られている。脂質過酸化とDNA切断の両方を同時に抑制する化合物を用いて実験を行ったところ、X線では防護は無く、 H_2O_2 でのみ防護が観察された。 Ca^{++} キレーターも類似の結果を与えた。このことは、 H_2O_2 の場合DNAより細胞質における脂質過酸化がより重要であることを示している。アポトーシスの場合、活性酸素以外でも起こす因子が存在し、それら全てに共通する細胞内変化を見つけることは難しい。X線と分裂性細胞を用いた研究では、照射された細胞の世代、すなわち照射後10時間程度で発現が開始する。DNA損傷が初期誘発因子と考えられているが、DNA損傷修復の半減期（30分）と比較すると、発現するまでにさらに2次的な因子が必要と考えられている。

心筋細胞死の発生とCa overload

金子 昇

東京女子医大・心研内科

カルシウムイオン (Ca^{++}) は細胞内情報伝達物質として、筋収縮の制御に重要な役割を担っているが、 Ca^{++} の過量な細胞内流入は心筋細胞障害を引き起こす。一方、従来より病理学的に凝固壊死として理解されてきた心筋細胞死に、壊死形態、発生機序の異なる二種類の細胞死を区別出来る。その1つはKinetic cell deathで過収縮により突然に細胞が破壊する。他の1つはStatic cell deathで冠血流の途絶による細胞死であり、心筋横紋構造が保たれた状態で、一定時間経過後に細胞死に至る。両者は組織学的に横紋が良く染色される Heidenhain-Iron-Hematoxylin (HH) 染色で容易に鑑別できる。これまで心筋梗塞は発症後数時間経過しなければ壊死を確認できないとされてきたが、HH染色により、ヒト心筋梗塞あるいは突然死で、Kinetic cell deathを高率に確認できる。

Kinetic cell deathを実験的に作成することが可能である。イヌ、家兎、ラットで一定時間 Ca^{++} 負荷を行い、その後それぞれ単独では障害を与えない量のカフェイン、カテコラミン、あるいは Ca^{++} を投与すると心筋細胞は突然、過収縮、過伸展により破壊する。

光顕では過収縮、過伸展により横紋構造の破壊を認め、電顕ではグリコーゲン顆粒が豊富に存在し、ミトコンドリアの内部構造も保たれた状態でmyofilamentの破壊が起こる。Fura2による検討では、カルシウム負荷時、細胞内 Ca^{++} の増加を認め、またX線アナライザーで、ミトコンドリア内でのカルシウム増加を確認できる。

過収縮を起こす現象として、Calcium-Paradox、reperfusion-injuryが知られている。Calcium-paradoxは、ラット、ランゲンドルフ灌流心であらかじめ Ca^{++} -free液で灌流後、 Ca^{++} を含む液に戻すと心筋細胞が瞬時に過収縮を起こす現象である。reperfusion-injuryは虚血後再灌流すると、contraction bandを形成して細胞が破壊する。これらの現象はKinetic cell deathと類似した現象であるが、Kinetic cell deathとCalcium-paradox, reperfusion-injuryとの違いは、Kinetic cell deathは心筋細胞が収縮、弛緩している状態から発生するのに対して、後2者は収縮、弛緩が停止した状態から、心筋細胞の過収縮が起こる点である。

高エネルギーリン酸の測定では、reperfusion-injury発生前で高エネルギーリン酸は対照に比し有意に減少を示すが、 Ca^{++} 負荷後のKinetic cell death発生前では対照と比べ有意の変化を示さず、Kinetic cell death 発生後に急激な減少を示した。

心筋カリウムはreperfusion-injury発生前にすでに減少していたが、Kinetic cell death発生前には減少を示さず、発生後に減少した。一方、心筋マグネシウムはKinetic cell death発生前にすでに減少していた。以上の結果はKinetic cell death発生に前準備状態があることを意味している。

最近、我々はビーグル犬心筋から分子量32KDaの蛋白質を分離、精製し、部分アミノ酸配列よりこの蛋白質がカルシウム結合蛋白質、アネキシンVであることを同定した。この蛋白質を用い、抗イヌアネキシンVウサギ抗体を作成し、ラットの心筋細胞内局在を調べると、アネキシンVは虚血心筋で細胞膜、介在板に早期に移行し、さらにその後、細胞外へ逸脱し、細胞内から消失するのに対し、心筋細胞の過収縮では細胞外の早期逸脱に加えて、細胞内での集積が起ることを確認した。この蛋白質の免疫組織学的ならびに遠心沈澱法による検討結果についても併せて述べる。

ApoptosisとFas抗原

米原 伸

京大・ウイルス研・生体発癌

我々の体が正常に発生・維持されるには、生体を構成する細胞一つ一つの増殖・分化の制御だけでなく、細胞の生死の制御も重要な役割を担っている。細胞死は大きくは二つに分けられる。一つは悪環境(高熱・栄養不足・細胞膜の障害等)のために起こるaccidental cell deathで、形態学的にnecrosis(ネクロシス)と呼ばれる細胞死と重なることが多い。もう一つが生体の恒常性の維持に重要なprogrammed cell deathで、積極的にコントロールされているように見受けられ、まわりの環境が悪くもないのに認められる細胞死である。これは、形態学的にapoptosis(アポトーシスorアポプトーシス)と呼ばれる細胞死と重なることが多い。apoptosisは細胞核の染色体凝集・細胞核断片化・細胞表層微絨毛の消失といった形態学的特徴や染色体DNAの断片化といった生化学的特徴によって定義されてきた。個体発生の途中ではapoptosisで死ぬ細胞が多く認められ、これらの細胞は予め死ぬようにプログラムされているかのようである。また免疫系では、自己に反応する細胞はapoptosisによって除かれる。生体が生き続けるためには、不必要となった細胞や悪い影響を与えるようになった細胞は死ぬ必要があるが、そのときに認められる細胞死がapoptosisである。

我々はapoptosisの積極的な誘導機構を分子のレベルで解析できる系を見いだした。我々が発見した細胞表層Fas抗原は抗Fasモノクローナル抗体の処理で細胞にapoptosisを直接誘導する分子である。Fas抗原は神経成長因子(NGF)や腫瘍壊死因子(TNF)のレセプターと同じレセプタースーパーファミリーに属する分子であり、最近Fas抗原に結合して細胞に直接apoptosisを誘導するFasリガンドも見いだされている。Fas抗原が自己反応性免疫細胞の除去に関与することは、自己免疫疾患のモデルマウス*lpr*がFas遺伝子のミュータントであることなどから示唆されてきた。しかし、Fas抗原が関与して除去される細胞、除去の起こる場所については不明である。一方、自己反応性T細胞は胸腺や末梢で除かれるが、その分子レベルのメカニズムも明かではない。そこで、ヒト胸腺や末梢でのclonal deletionにおけるFas抗原の関与を解析した。

T細胞は胸腺で分化するが、その分化段階は表面抗原で追跡できる。即ち、CD4⁺CD8⁻からCD4⁺CD8⁺へ分化し、最終的にはCD4⁺CD8⁻またはCD4⁺CD8⁺に分化する。CD4⁺CD8⁻からCD4⁺CD8⁺の未分化細胞でFas

抗原の発現が認められ、より分化するとその発現は低下していた。また、CD4強陽性・CD8弱陽性細胞(CD4⁺CD8⁺後期)の一部において、Fas抗原の強い発現が認められた。胸腺細胞を *in vitro* で抗CD3で刺激(抗原刺激に等しい)すると、Fas抗原の発現誘導が認められる。Fas抗原が強く誘導される細胞はCD4⁺CD8⁺後期の細胞であり、より長い抗CD3刺激後にはこの細胞が抗Fasの処理によって消失した。抗原刺激によってCD4⁺CD8⁺後期の胸腺細胞にFas抗原の強い発現が誘導され、引続く抗原刺激によって抗Fas感受性となる。

次に、スーパー抗原によるnegative selectionへのFas抗原の関与を示した。ヒト胸腺の断片をスーパー抗原SEB存在下に器官培養すると、SEB反応性のV β 3陽性細胞が消失したが、SEB非反応性V β 2陽性細胞には変化がなかった。この時、antagonisticな抗Fas mAb ZB4の影響を解析したが、ZB4はV β 3陽性細胞の消失を阻止できなかった。しかし、SEB処理によってV β 3 T細胞レセプターがdownregulationを受け、ZB4存在下ではこの細胞は死んでいないと考えることができた。そこで、SEBとZB4存在下に胸腺を24時間培養した後、さらにZB4のみの存在下で20時間器官培養を行った。その結果、V β 3陽性細胞が再び出現してきた。SEBだけで24時間培養し、SEB非存在下でさらに培養した胸腺ではV β 3陽性細胞の再出現は認められないので、ZB4によってV β 3陽性細胞の除去(細胞死)が抑制されたと解釈できる。スーパー抗原反応性T細胞レセプターを発現する胸腺細胞は、スーパー抗原によって抗原レセプターのdownregulationをとまなう“clonal suppression”に陥り、その後Fasのシステムを用いた“clonal deletion”が引き起こされることが示された。

胸腺で分化したヒトT細胞はFas抗原陰性となって末梢へ出ていく。ヒト末梢血細胞に抗原刺激を加えると、2~3日でT細胞にFas抗原が強く発現する。スーパー抗原を用いた実験の結果、T細胞抗原レセプターからの刺激が直接Fas抗原の発現を誘導することが示された。しかし、抗原レセプターからの刺激でFasが誘導されたT細胞は抗Fas非感受性であり、感受性となるには引き続き長時間の抗原レセプターからの刺激が必要であった。胸腺と同じ様に抗原刺激でFasが誘導されても、引き続き抗原刺激がないとFas抗原からのapoptosis誘導シグナルに感受性とはならない。自己反応性細胞とは長期間の抗原刺激を受ける細胞とすることができ、長時間の刺激でFas抗原が機能的になることは非常に興味深い。

ここでは、さらにAIDSとFasを介するapoptosis、発癌機構とFasを介するapoptosisなどについても解説したい。

■ワークショップ■

●6月9日(木)●クラーク会館講堂

『毒科学研究における細胞内(間)
情報伝達系の意義』

細胞内情報伝達系とくに神経毒によるニューロン死

野村 靖幸
北大・薬・薬効学

細胞内情報伝達系に関する最近の進歩は著しい。神経伝達物質、ホルモン、サイトカインなどにより刺激を受けた受容体応答系が作動し、イオンチャンネル、G蛋白質、2次メッセンジャー産生酵素、プロテインキナーゼ、転写制御因子などの機能分子間のカスケード反応、およびフィードバック反応が惹起され細胞応答が生ずるといふ基本的機構に関し着実に新知見が得られている。とくに最近、サイトカイン受容体応答系における受容体のサブユニット構成、新規チロシンキナーゼ(JAKファミリー)の発見と同定、それらの関与による転写因子の直接的活性化などが示され注目されている。

一方、endothelium-derived relaxing factor, guanylyl cyclase activating factorそしてmacrophage-derived cytotoxic factor と呼ばれその化学的自体が注目されていた未知分子は一酸化窒素(NO)と同定され、その生理作用、毒作用に関する研究がここ2~3年急進展している。

私たちは、脳におけるNOの神経生理学的役割とともに細胞毒科学的役割についても検討を進め、次に述べる新知見を得た。すなわち図に示すように、1) 新生期ラット脳より調製したグリア細胞標本に細菌内毒素(LPS)を作用させると持続的に誘導型NO synthase (iNOS)が誘導されること、2) LPS(その他IL-1 β やTNF α などのサイトカイン)によるiNOSの誘導にはherbimycin A感受性のチロシンキナーゼとそれによるリン酸化基質として110 kDaの蛋白質が関与すること、3) このグリア由来iNOSは無刺激時でもニューロンに存在する構成型NOS(cNOS)とは異なりCa²⁺やカルモジュリンによって活性化の制御を受けないこと、4) iNOSによって持続的且つ大量に産生されたNOは拡散して近傍のニューロン内に入りその作用を発現すること、5) ニューロンとグリア細胞の共存培養標本にLPS処理するとニューロン死が生ずるが、これはN^G-monomethyl-L-arginine (NOS阻害薬)により抑制されること、一方、8-bromo cGMPを添加してもニューロン死は惹起されないことより、NOのニューロン死効果にはcGMPは関与しないことが示唆された。NOはラット脳由来の可溶性および膜の両画分において37 kDaの蛋白質(おそらくglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)をモノADPリボシル化し(またはNADを結合させ)、その活性を抑制することによりNOが細胞の糖代謝(ATP産生系)を抑制することもニューロン死誘発に一部関与すると推定された。NOはまた、約110 kDa蛋白質のポリADPリボシル化(おそらく核内のpoly ADP-ribose synthetase (PARS)のオートADPリボシル化)も促進する。ラジカルであるNOによって傷ついたDNAがPARSを活性化し、NAD代謝、ATP産生系に影響を及ぼすことも細胞死誘発に関わると考えられ、さらに検討を続けている。

上述したように脳内でグリア細胞由来iNOSによってもNOは産生されるが、グルタミン酸(Glu)のNMDA受容体刺激に伴い上昇する

[Ca²⁺]_iにより活性化されたcNOSによってもNOは産生される(図)。これが脳虚血に伴う神経細胞死の機序とも考えられる。近年、HIV感染に伴い発症するAIDS痴呆にもNOの関与が推定されている。すなわち図に示すようにHIV(およびgp120)がグリア細胞・マクロファージに作用すると産生されるサイトカイン、NOまたは未知因子がNMDA受容体/Caチャンネルに対し、またニューロンに対し細胞毒性的に作用する可能性も考えられている。

NOは脳ニューロン死に関与するとともに海馬における長期増強、小脳における長期抑圧などの神経生理学的役割も担うことが示されている。NOのこの両作用の機構がどのように異なるか、そして薬物によりどのように制御できるかを明らかにすることは、今後に残された重要な毒科学、薬理学の課題であろう。

文献

- 1) Nomura, Y. & Kitamura, Y.: Inducible nitric oxide synthase in glial cells. *Neurosci. Res.* **18**, 103-107 (1993).
- 2) 野村靖幸: 神経毒によるニューロン死の機構—アポトーシス関与の可能性—。 *実験医学* **11**, 2306-2311 (1993).

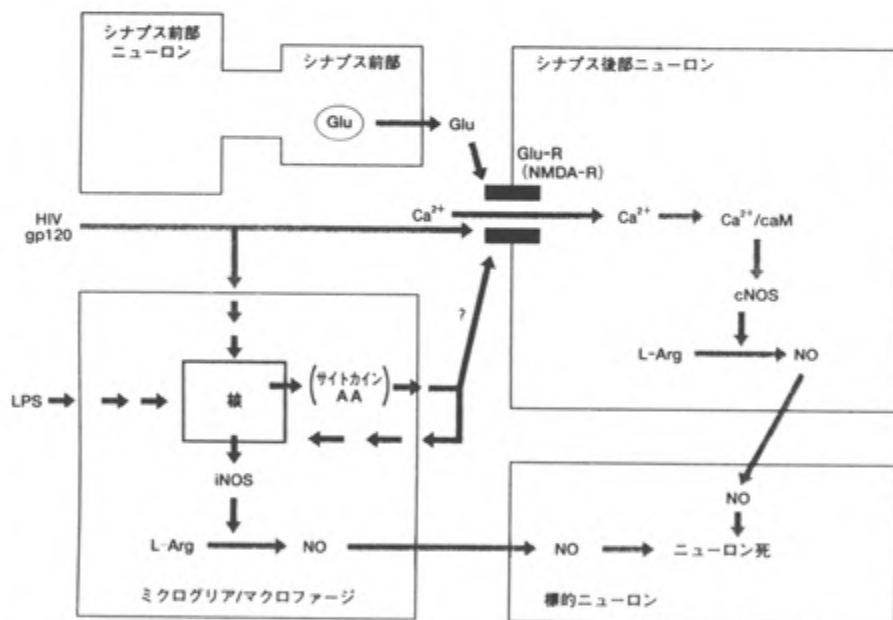


図 脳ニューロン死へのグルタミン酸レセプター/Caチャンネル、NO合成酵素とNOの関与
HIV: エイズウイルス, Glu: グルタミン酸, R: レセプター, CaM: カルモジュリン, LPS: リポ多糖, AA: アラキドン酸, iNOS: NO合成酵素(inducible型), cNOS: NO合成酵素(constitutive型), L-Arg: L-アルギニン

腎障害における細胞内情報伝達系の関与

玄番 宗一

大阪薬科大・第2薬理

心拍出量の約20%余りに達する豊富な腎血流量や、尿生成などのネフロン機能は、腎臓に薬物等による毒性を生じやすくさせる。ネフロンは、ボウマン嚢に包まれた糸球体と尿細管からなり、前者は毛細血管やメサンギウムなどに、後者は、12の異なる分節に分けられる。このような多様な細胞群は、多様な機能を有するが、各々の細胞機能の調節に細胞内情報伝達系が関与すると考えられる。腎細胞機能への細胞内情報伝達系の関与についての報告数は増えつつあるが、しかしながら、その詳細については十分とは言えない。腎尿細管機能への細胞内情報伝達系のかかわりについて、これまでに、主に以下の事が知られている。

サイクリックAMP(cAMP)とこれにより活性化されるプロテインキナーゼAが、副甲状腺ホルモン(PTH)作用の近位尿細管におけるリン再吸収抑制や遠位部尿細管でのCa再吸収増加、およびバゾプレッシン(ADH)作用における集合尿細管での水透過性・Na再吸収亢進(抗利尿)に関わっていることが良く知られている。cAMP系は、カルシトニン、グルカゴン、 PGE_2 や adenosineにおける情報伝達にも関与している。サイクリックGMP(cGMP)やチロシンキナーゼ系の腎尿細管機能への関与の報告はあまり多くない。最近、イノシトールリン脂質代謝系の亢進にともなうプロテインキナーゼC(PKC)活性化が、種々の腎尿細管機能の調節に重要な役割を果たすことが、明らかになりつつある。腎では、 α -PKCは近位尿細管(特に、 S_3)及び乳頭部集合尿細管に密に分布する。前述のPTHによるリン再吸収抑制には、cAMP系よりもPKC活性化を介するとの報告がある。ナトリウム利尿作用を有するトパミンは、近位尿細管において Na^+ , K^+ -ATPアーゼを抑制するが、PKCを介してその作用を発現するとされている。遠位尿細管様性質を有するMDCK細胞において、ブラジキニンによる PGE_2 生合成促進にはPKCの活性化をともなう。皮質部集合尿細管におけるPKCの活性化は、cAMPによる水透過性やNa再吸収亢進を抑制することから、2つの細胞内情報伝達系の間に相互の干渉機構(cross-talk)が存在すると考えられている。

以下に、腎臓細胞におけるフリーラジカル障害への細胞内情報伝達物質の関与について述べたい。腎障害については、ここでは尿細管障害による急性腎不全のモデル系として、培養腎上皮細胞株における薬物性細胞障害および低酸素後再酸素化障害を取り上げる。

薬物性腎細胞障害

実験動物のみならず、腎臓の切片、単離尿細管フラグメント、培養細胞や細胞小器官などを用いた実験系においても、薬物性腎障害にフリーラジカルが関与するとされている。ブタ腎由来で近位尿細管様性質を有するLLC-PK1細胞を、cisplatinやcephaloridine(CER)のような腎障害性薬物存在下で培養すると、細胞障害を生ずる。このような障害は、GSH合成阻害剤によりGSHを低下させると増強され、ヒドロキシルラジカルスカベンジャーにより抑制される。このことは、cisplatinやCERによる腎細胞障害に、最も主要なフリーラジカルである活性酸素の関わりを示唆する。肝細胞におけるフリーラジカル障害時にPKCが細胞質から細胞膜に移行しその障害に関与するとされている。Miyanoshitaらは、単離系球体において、PKCの活性化が活性酸素を増大させ、cAMPは活性酸素の産生とPKCの細胞膜への移行を抑制すると報告し、活性酸素産生に2つの情報伝達系のcross-talkが存在することを示唆している。これらのことをもとに、わたしたちは、前述したcisplatin及びCERによるLLC-PK1細胞障害へのcAMPやPKCの関与について検討した。ホスホジエステラーゼ阻害薬による細胞内cAMPの上昇は、このような障害を顕著に抑制した。PKC阻害薬 H-7 もこれらの薬物によるLLC-PK1障害を軽減した。以上のことから、腎尿細管上皮細胞におけるフリーラジカル障害に対して、cAMPは防御的に、PKCは促進的に作用すると考える。

低酸素後再酸素化による腎細胞障害

腎臓を虚血後再灌流することによる急性腎不全の発症に、活性酸素が関わりとされている。わたしたちは、虚血性急性腎不全のインビトロモデルとして、LLC-PK1細胞を用いて低酸素（酸素濃度2%未満）下で培養後空気相下で培養（再酸素化）することによる細胞障害モデルを作成した。このような障害は、ラジカルスカベンジャーにより軽減された。心虚血後再灌流障害がadenosineにより、また腎のそれがcAMPにより軽減されるとの報告がある。上に述べたLLC-PK1細胞における低酸素後再酸素化障害は、adenosineにより抑制された。このようなadenosineの作用は、A₂受容体を介するものであり、cAMPの増大を伴った。これらのことから、腎尿細管上皮細胞において、adenosineは、cAMP系を介して、フリーラジカルが関与する低酸素後再酸素化障害を軽減する可能性がある。

腎細胞障害については、わたしたちの知見を中心に述べたために、話題の内容が限局されたきらいがある。これも、腎毒性と細胞内情報伝達系についての報告が極めて乏しいことによる。細胞内情報伝達系の解明が進歩をとげている今日、これらの知見との関わりを深めることにより腎毒性学の発展につながると考える。

心筋障害と細胞膜情報伝達系

川口 秀明、北島 顕
北海道大学医学部循環器内科

細胞は外界から種々の刺激を受けると、細胞膜受容体を介して細胞内に特異的情報を伝達する。 β アドレナリン受容体刺激は、細胞膜受容体に結合し受容体刺激を細胞内に伝達する、促進性のGTP結合蛋白質Gsに伝えられアデニレートシクラーゼを活性化する。この刺激はさらにAキナーゼ^{*}を介して細胞膜カルシウムチャンネル、トロポニン、ホスフォランパン等の機能蛋白質に伝達される。それに対して α アドレナリン受容体刺激やムスカリン受容体刺激などは、抑制性のGTP結合蛋白質Giに伝達されアデニールシクラーゼ系を抑制する。またこれとは別に α 受容体刺激は別のGTP結合蛋白質Gpを介して細胞内イノシトールリン脂質の代謝回転によって情報を伝達することが明らかにされてきた。ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼC (PI-PLC)はその中心的役割をはたす酵素で、イノシトールリン脂質 (PI, PIP, PIP₂)を迅速に分解し、ジアシルグリセロール(DG)とイノシトール3リン酸(IP₃)などのイノシトールリン酸を生成する。DGとIP₃はそれぞれセカンドメッセンジャーとしてCキナーゼ(PK-C)を活性化し、細胞内カルシウムの遊離をもたらすことが知られている。

われわれは肥大型心筋症および拡張型心筋症の発症要因を研究する目的で、肥大型心筋症モデルハムスターとしてBio14.6を、また拡張型心筋症モデルハムスターとしてBio53.58を用い、細胞膜レセプターとアデニレートシクラーゼとを共役するG蛋白質およびアデニールシクラーゼ活性の変化について検討を行った。またノルエピネフリンに対する細胞膜カルシウム透過性およびIP₃によるミクロソームよりのカルシウム遊離を測定し、肥大型心筋症および拡張型心筋症の細胞障害と細胞内カルシウム調節機構に関して検討した。

〔結果〕 心筋症ハムスターにおいて、 β レセプターの数が心肥大期から心不全期にかけて減少する傾向にあった。また生後8週、11週、23週における、アデニレートシクラーゼ^{*}活性はコントロール、肥大型心筋症ハムスターともに週齢による変化は見られなかった。拡張型心筋症ハムスターでは週齢とともに有意に減少する傾向にあった。GTP結合タンパク質はコントロール、肥大型心筋症ハムスターともに週齢による変化は見られなかった。しかし拡張型心筋症ハムスターではGiは週齢と共に増加する傾向があった。すなわち心不全時にカテコールアミンが増加するが、その過剰刺激(カルシウムチャンネルをリン酸化し細胞内へのカルシウム流入を促進する)が、細胞内に伝わり過ぎないようにG蛋白質のレベルでcAMP産生を制御していると考えられた。

PI-PLCは肥大型心筋症および拡張型心筋症ハムスターともにコントロール(F1 β)に比して亢進していた。しかし週齢による大きな変化はいずれの場合にも認められなかった。IP3キナーゼ活性は両者共に増加していたがする、Bio 5358でより亢進していた。IP4ホスファターゼ活性はBio 14.6 ではF1 β に比し各週令で高い傾向を示したがBio 5358では週齢が増すにつれコントロールとの差が小さくなり、23週齢ではほぼF1 β と差がなかった。

α 1受容体刺激によるPLC活性を β 1遮断薬(メブロール)存在下にノルエピネフリンを単離心筋細胞に添加し、あらかじめ心筋細胞膜にラベルした[3H]イノシトールの細胞培養液への遊離を測定したところ、PLC活性はBio 14.6およびBio 53.58にてコントロール(F1 β)よりも亢進した。

PLCにより水解された、イノシトールリン脂質はDGおよびIP3を遊離し、IP3はさらにIP4へとリン酸化され共に細胞内Ca²⁺濃度調節に関与すると考えられている。拡張型心筋症ハムスターでは肥大型心筋症ハムスターに比し、IP3キナーゼ活性が増加しIP4ホスファターゼ活性が低下することから、IP3からリン酸化されてできたIP4は増加の状態にあり、拡張型心筋症ハムスターでは細胞内Ca²⁺濃度が持続的に上昇しやすい状態にあると考えられた。ノルエピネフリン添加に伴うCa²⁺-influxは8週齢のBio14.6ではコントロールより高かった。しかし週齢が増すとノルエピネフリンに対する反応性がコントロールで増加し、Bio 14.6と差がなくなった。Bio5358ではコントロールに比してCa²⁺-influxが各週齢で高かった。ミクロゾーム(SR)へのカルシウムの取り込みはBio14.6ではコントロールと大きな違いが、Bio5358では著しく低下していた。一方IP3刺激によるSRよりのカルシウム遊離はBio14.6では強く、Bio5358ではコントロールよりも低下していた。これらの結果は細胞内カルシウム濃度が高くなったときに、Bio14.6ではSRが正常に機能し細胞内カルシウム濃度を調節できるが、Bio53.58ではSR機能が低下しているため、カルシウム濃度を調節できず、細胞障害をひきおこす可能性のあることを示している。

〔考案および結語〕 心筋症において心筋細胞内Ca²⁺過負荷の状態が観察され、その機序として α 受容体-PLC-IP3-SRからのCa²⁺遊離の増加が想定される。しかし肥大型では細胞内Ca²⁺をSRへ取り込む働きが十分機能しているが、拡張型心筋症ではその機能が低下しており、心筋細胞障害をおこしやすい状態にあると考えられた。一方、 β 受容体刺激によるAC活性は低下し細胞内へのCa²⁺過負荷を抑える方向に働いていると考えられた。しかしcAMP産生が低下するためA β -セ¹による種々の蛋白質のリン酸化が抑えられるため、心筋の収縮力が低下し、心不全の病態を示すと考えられた。

アルコールによる中枢神経細胞情報伝達系の変化：
 チューブリンを含めた GTP 結合蛋白質に対する影響
 八田 慎一
 札幌医科大学・医学部・薬理学講座

薬物（化合物）によって細胞応答異常を含めた情報伝達系の変化が生じる際、GTP 結合蛋白質（G 蛋白質）の量的あるいは機能的変化がその原因の一つとしてあげられる。また G 蛋白質の突然変異と疾病との関連もいくつか報告されている。細胞情報伝達系において G 蛋白質が果たしている役割の重要性はよく知られており、薬物による G 蛋白質の量的および機能的な面への影響を検討することは、細胞応答の変化を解析する上で重要な要因となるものと思われる。

我々はこれまでにアルコール（エタノール）による中枢神経系アデニル酸シクラーゼ情報伝達系の変化について検討を加えてきた。エタノールの急性処置によってアデニル酸シクラーゼの活性化の増強が生じ、さらに慢性処置では適応的な機序を介してアデニル酸シクラーゼ活性化の減弱が生じる。エタノールによって生じるこのような情報伝達系の変化は、エタノールの長期間の摂取（動物モデルでは慢性投与）の結果生じるアルコール依存状態の形成と関連していることが示唆されている。エタノールには特異的な受容体が存在せず、その作用機序としてエタノールによる G 蛋白質機能の修飾が考えられている。

エタノールの G 蛋白質への影響は、量的変化については G 蛋白質サブユニットに対する特異的抗体を用いた immunoblotting によって、さらに機能的変化については光親和型非水解性 GTP 類似体である $P^3-(4\text{-azidoanilido})-P^1-5'-GTP$ (AAGTP) を用いたグアニンヌクレオチド光親和標識結合によって検討された。エタノールのラット大脳皮質膜への急性処置 (in vitro) によって Gs、Gi でのグアニンヌクレオチド結合は増強された。一方、G 蛋白質レベルでの変化は認められなかった。さらに、Gs、Gi でのグアニンヌクレオチド結合の増強と一致してアデニル酸シクラーゼの促進性および抑制性調節での増強がみられた。ヒト死後脳大脳皮質膜を用いて in vitro の系で検討した結果では、健常者死後脳ではエタノールの急性処置によって Gs および Gi でのグアニンヌクレオチド結合の上昇が認められた。対照的に、アルコール依存症者死後脳ではエタノールによるグアニンヌクレオチド結合の増強はみられなかった。G 蛋白質レベルの変化ではアルコール依存症者死後脳で Gs レベルの減少が認められた。このように、G 蛋白質の量的および機能的変化についての解析によって、エタノールは急性期には G 蛋白質機

能の活性化を生じるが蛋白質レベルには影響しないこと、一方、慢性的な状態ではGsおよびGi機能の低下を生じ、さらにGsでは蛋白質レベルの減少も生じることが知られた。これらの結果は、これまでアデニル酸シクラーゼ活性の変化から推測されていたこととよく適合している。

細胞骨格微小管構成成分蛋白質であるチューブリン(2量体)はGTP結合蛋白質の一種であり、近年、チューブリンがGiあるいはGsと共役し、チューブリンからG蛋白質へのグアニンヌクレオチドの転移を介してG蛋白質の活性化を生じることが示された。このことは、チューブリンがG蛋白質の細胞内調節因子として機能している可能性を提起している。これまでに我々は、チューブリン-Gi連関を介したGiの活性化が老化モデルラット大脳皮質で低下し、そのことと一致してGi-アデニル酸シクラーゼ抑制性反応が減弱していることを報告した。前述したようにチューブリンはGsとの連関を介して、アデニル酸シクラーゼ促進性調節にも関与している。この系に対するエタノールの影響を検討したところ、エタノールはチューブリンによるアデニル酸シクラーゼの活性化を増強することが知られた。このことは、エタノールはG蛋白質のみならず、G蛋白質と関連した調節因子に対してもその影響を及ぼしている可能性を示している。

エタノールのみならず細胞情報伝達系に対してその影響を及ぼしている種々の薬物が知られている。薬物がどのような様式でG蛋白質に影響を及ぼしているのかまだ不明な点も残されている。しかしながら、薬物のG蛋白質あるいは関連調節因子への影響を検討することで、情報伝達系の変化、すなわち細胞応答異常(毒性)の発現機序がさらに詳細に解明されることを期待したい。

接着分子を介する細胞間及び細胞内情報伝達修飾に基づく
生体防御反応の質的変換

上出 利光
北大・免研・免疫病態

生体における炎症反応は、外因性及び内因性の刺激に対する宿主の防御反応である。この反応の主体は免疫系の細胞であるが、炎症細胞の種類、炎症の場、炎症の強度、期間等を決定するためには、免疫細胞間あるいは免疫細胞と血管内皮細胞及び細胞外基質との細胞間相互作用が不可欠である。近年接着分子と総称される一連の細胞表面抗原が種々の細胞間相互作用を媒介し、細胞内への情報伝達を制御していることが明らかになってきた。従って本ワークショップでは、炎症反応の2つの局面における接着分子の機能について私どもの研究室で行っている仕事を例に話を進めていく。

[I] 抗原に対するT細胞の反応

抗原刺激によって抗体産生増加、マクロファージの活性化、あるいはキラーT細胞の活性化等様々な反応が惹起され、その結果として抗原の排除という防御反応に帰結したり、共通抗原性ゆえの自己組織の破壊という結果に帰結する。しかしこの一連の免疫反応を開始するにあたり通常ヘルパーT細胞の活性化、増殖が必須となる。マクロファージや樹状細胞等の抗原提示細胞(APC)によって抗原提示を受けたT細胞は抗原受容体(TCR)を介して抗原を認識する。TCRを介する抗原との結合あるいは、抗TCR抗体を用いたTCR刺激では、細胞内Ca²⁺増加、フォスファチジルイノシトールの分解によるDG(ジアシルグリセロール)の産生という、細胞内セカンドメッセンジャーの活性化をきたす。しかしIL-2 mRNAの転写、安定性が不十分でT細胞の増殖反応はみられない。この状態ではある種のT細胞はその時作用した抗原に特異的に無反応(アナジー)となってしまう。T細胞が増殖するためには、APC上のB7とT細胞上のCD28やCTLA-4との結合による細胞内シグナル(補助シグナル; costimulatory signal)が必須である。補助シグナルはAPC上の他の接着分子であるICAM-1とT細胞上のLFA-1の結合によっても伝達され得る。TCRを介する刺激と補助シグナルが同時に加わるとCa²⁺カルモジュリンによってセリン/スレオニンホスファターゼの1つであるカルシニューリンを活性化し、IL-2の転写調節因子であるNFATの脱リン酸化を介して、核内移行を促進し、IL-2の転写を促進し、T細胞の増殖をきたす。サイクロスポリンAやFK506等の免疫抑制剤は、その結合蛋白質であるイムノフィリンと複合体を形成し、カルシニュー

ーリンの活性化を阻害することが知られている。しかしCD28を介する補助シグナルはサイクロスポリンAに非感受性であり、これがいかなるメッセンジャーを介してIL-2 mRNAの転写、安定性にきよしているか不明である。このメカニズムを明らかにすることができれば、これまでにない方法で臓器移植、アレルギー反応の調節を行うことが可能となるかもしれない。B7は2個の免疫グロブリン様構造をもっている。オルタナティブスプライシングによって1個の免疫グロブリン構造の欠損したB7（以下MB7-2）を発現することを我々は最近報告した。MB7-2は、B7同様T細胞上のCD28やCTLA-4に結合することができるが、CD28に対する親和性が低下する。この結果としてMB7-2を発現するAPCによって抗原提示を受けたT細胞は補助シグナルが存在するにもかかわらず増殖できない。しかし活性化したT細胞ではCTLA-4が発現しているためMB7-2でも増殖を惹起する。APCがB7を発現するかMB7-2を発現するか、あるいは両者を欠損するかによって抗原刺激を受けたT細胞の反応性が異なることになる。

〔II〕虚血後再灌流障害

出血性ショック、狭心症、臓器移植等では臓器は一時的な血流停止に伴う虚血状態に陥る。虚血による臓器障害を予防するために再灌流を行う。しかしながら虚血が一定時間をこえると、再灌流によってかえって臓器障害が進行する病態がある。これが虚血後再灌流障害である。ラット心移植モデルを用いて解析すると、摘出心ではすでにIL-6、IL-8、TNF- α 、IFN- γ mRNAの発現があり、25分間の虚血によってIL-1 β 、IL-1 receptor antagonist mRNAの発現がみられ、IL-6、IL-8の発現が増強した。虚血におちいった心筋を再灌流すると、IL-1 α mRNAの発現が認められた。IL-1は血管内皮に作用し、接着分子の発現を促進する。再灌流後早期に好中球の血管内皮への接着が認められ、時間経過とともに心筋内へと浸潤する。2週以内に虚血後再灌流によって心筋変性をきたし心拍動は停止した。虚血によって心筋ATP含有量は虚血前値の12%に低下するが、再灌流によって38%にまで回復する。これは再灌流による再酸素化によって代謝が部分的に回復したことを示している。再灌流時に好中球と血管内皮との接着に關与する接着分子であるLFA-1やICAM-1に対する単クローン抗体を投与すると61%及び54%と著明な改善を示す。tissue water content量は、虚血により前値より5~6%上昇し、再灌流により16%上昇する。抗LFA-1やICAM-1抗体の投与により、その上昇は3%、6%と抑制された。この心筋代謝低下及び血管内皮障害によりでも冠動脈血管抵抗の上昇、左心収縮力の低下がもたらされるが、これらも抗接着分子抗体により予防された。

肝障害と細胞間コミュニケーション

森 道夫

札幌医大・医・病理

生体は、約40兆の細胞から構成されているが、そのほとんどは、同種の細胞と細胞間結合装置で結合して細胞集団を作り、細胞間のコミュニケーション(情報交換)を行って、生体のホメオスタシスに従っている。肝臓を例にとると、肝臓は、肝細胞同士が強固に結合して穴のあいた板状の肝細胞索が基本で、その類洞面を、基底膜のない無数の小孔を持つ類洞内皮が被って、血液との密な交流を可能にした臓器ということが出来る。

肝細胞と肝細胞は、ギャップ結合(gap junction)で結ばれている。ギャップ結合は、コネクシン(connexin, 以下 CX)と呼ばれる蛋白が6個集まって作る内径約2nmの膜貫通チャネルで、1000個以上のチャネルが集合して形成された結合装置である。ギャップ結合のチャネルを通して、分子量1000以下の小分子は隣接する細胞間を行き来し、ギャップ結合で結ばれた細胞同士は電氣的に共役(electric coupling)している。

ギャップ結合を構成するCX蛋白は、動物種や臓器によって異なるが、ラットの肝細胞では、CX32が主体で、これにCX26が加わる。ラット心筋細胞ではCX43が主体である。

ギャップ結合の機能を調べるには、培養細胞に微量注入(micro-injection)された物質の、隣接細胞への移行を検索する方法が用いられる。このような方法で、ギャップ結合を通過することが確かめられた物質の中には、カルシウムイオン、 IP_3 などのセカンドメッセンジャーがあり、生体の中でも、ギャップ結合を介したシグナル伝達が行われていると考えられている。

肝細胞は、毛細胆管の周囲に存在するアクチンの働きによって毛細胆管を周期的に収縮させ、胆汁を小葉間胆管に向けて輸送する。毛細胆管の収縮は、細胞内カルシウムの動員を伴い、増加したカルシウムは、ギャップ結合を介して、隣りの肝細胞に移行する。このようなカルシウムの伝達は、生体内の肝細胞に起こる毛細胆管収縮の波の形成に関わっていると思われる。培養ラット心筋細胞にみら

れる同調性の収縮とカルシウム濃度の上昇は、ギャップ結合を閉じるとされる多価アルコール（ヘプタノール）で、CX43のアンチセンスRNA 投与時と同じように阻害される。一方、肝の類洞内皮細胞は、エンドセリンなどの生理活性物質を産生し、肝細胞毛細胆管の収縮に関与し、細胞外基質の産生を介して、肝細胞の分化機能の維持に働く。逆に、正常な肝細胞との相互作用が、血管内皮細胞を類洞内皮化する。

肝細胞間のギャップ結合は、肝細胞の再生や増殖に先立って著しく減少し、肝癌では、癌細胞同士の細胞間コミュニケーションだけではなく、周囲の正常肝細胞とのコミュニケーションも低下する。一方、急激に壊死に陥った肝細胞では、先ずギャップ結合を閉じ、次いでギャップ結合の消失（分解）が起こって、隣接する肝細胞との交通が阻止される。慢性の肝障害では類洞内皮細胞に毛細胆管化capillarizationが起こる。

参考文献

森 道夫：細胞骨格の機能病理学 — 肝臓を中心として —
日病会誌, 80, 21-41 (1991)

森 道夫他：癌の悪性化、転移とgap junction. 癌の悪性化と転移
(清木元治編), 中外医学社, 89-99 (1993)

Oyamada, M. et al.: The expression and localization of connexin 43 and gap junctional intercellular communication during the establishment of a synchronized contraction of cultured neonatal rat cardiac myocytes. *Exp.Cell Res.*, in press.

Kojima, T. et al.: Sequential changes of hepatic gap junctions during the course of acute liver injury and restoration after thioacetamide treatment. *Virchows Arch B*, in press.

■研究推進委員会

ワークショップ■

●6月9日(木)●クラーク会館講堂

『神経毒性—受容体と
輸送担体を介した毒性—』

神経毒性—受容体と輸送担体を介した毒性—

直井 信¹⁾、丸山 和佳子²⁾

1)名古屋工業大学、2)名古屋大学医学部神経内科

パーキンソン病(PD)は高齢者に発症する神変性疾患である。PDの病理所見は脳の黒質線条体ドパミン神経細胞の選択的な脱落であり生化学的な変化はドパミン生合成の低下である。1983年に人工ヘロイン meperidine の合成中誤って合成された 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyridine (MPTP) がヒトにパーキンソン病様の症状を発症させることが報告されてより、PDの病因の研究は長足の進歩を遂げた。MPTP惹起性PDは臨床症状、動物モデルにおける病理所見においてヒト idiopathic PDに酷似していた。MPTPのドパミン神経細胞に対する特異的傷害の機構に毒物の細胞内取り込み、蓄積の機構が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。[³H]でラベルされたMPTPのヒト脳への結合をオートラジオグラフで見たところ黒質、青斑核、尾状核のグリアに放射性活性が見られ、これはモノアミン酸化酵素のB型の分布と一致した。MPTPは脳内でモノアミン酸化酵素により 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) に酸化され、さらにMPP⁺がドパミンの輸送担体により細胞内に取り込まれることによりドパミン神経に特異的に蓄積されることが明らかとなった。このことを証明するために以下の様な *in vivo*, *in vitro* の実験が行われた。*in vivo* の実験ではドパミンとノルエピネフリンの輸送の阻害剤 mazindol はマウスに対するMPTPの毒性を防止できるが、ノルエピネフリン輸送の阻害剤 desipramine は防止できないことが報告された。*in vitro* の系ではドパミン細胞へのMPP⁺の取り込みがドパミン輸送担体を介したものであることが脳より調製したシナプトソーム、脳スライス、培養細胞を用い証明された。取り込みはドパミン、ノルエピネフリンや mazindol, nomifensine により阻害された。しかし、ドパミン受容体遮断薬である sulpiride, haloperidol では阻害されなかった。この輸送は Michaelis-Menten の式に一致する輸送担体によるエネルギー依存性の輸送であり、ドパミンとほぼ同程度の Michaelis 定数がえられた。一方還元型である MPTP はドパミン輸送担体による取り込みを受けなかった。細胞内にとりこまれた MPP⁺ はさらにミトコンドリア内に濃縮され ATP 産生を阻害し energy crisis を起こす。また活性化酸素を産生し

oxidative stressから細胞を死に至らしめる。最終的にMPP⁺はドパミン神経終末において1000 から10000 倍に濃縮される。

さて、MPTP類似の自然界に存在する神経毒がPDの原因ではないかとの仮説にたった研究が進められている。我々のグループは最近内在性の神経毒である6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (DHTIQ)を中心に研究を行ってきた。

DHTIQはドパミン由来のイソキノリンであり、ドパミン神経近傍でN-メチル化されさらに自動酸化とモノアミン酸化酵素による酸化を受け酸化体となる。N-メチル-DHTIQとその酸化体はそれぞれMPTPおよびMPP⁺に構造が類似している。事実我々はDHTIQ誘導体がラットにパーキンソン病様の症状を発症することを証明することができた。MPTP、MPP⁺の結果からドパミン神経細胞への特異的取り込みがPDを惹起する神経毒に必須であると考えられたため、ドパミン細胞のモデルとして培養細胞を用い細胞内への輸送の実験を行った。ヒト神経芽細胞腫より分離したSH-SY5Yを用いた。1-methyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (salsolinol) には(R)と(S)の光学異性体があり、ヒト脳内では主に(R)salsolinolが生成される。(R)salsolinol, (S)salsolinol, N-methyl-(R)salsolinol, N-methyl-(S)salsolinol, N-methylsalsolinium ionの細胞内への取り込み機構を検討したところ、N-methyl-(R)salsolinolのみがドパミン再取り込み機構により取り込まれることが明らかとなった。これはMPP⁺の場合と同じくMichaelis-Mentenの式に従う、エネルギー依存性の取り込みであった。このことから神経毒の特定の細胞の取り込みと蓄積には神経伝達物質の輸送担体が関与すること、しかも神経毒の側には光学的構造をはじめとする厳密な構造が要求されるということが示唆される。以上最近の我々の成果を中心に述べる。

グルタミン酸トランスポーターと神経細胞死

金井 好克、遠藤 仁
杏林大・医・薬理

グルタミン酸は興奮性神経伝達物質として脳内のグルタミン酸作動性シナプスにおいて信号伝達を行う物質であるが、その濃度が持続的に上昇するとグルタミン酸受容体を介して神経細胞を死に至らしめる（神経興奮毒性）。神経細胞をこのグルタミン酸の興奮毒性から保護する機構として、グルタミン酸輸送担体（グルタミン酸トランスポーター）が神経終末及びグリア細胞膜に存在し、グルタミン酸を細胞内へ取り込むことにより細胞外グルタミン酸濃度を低値に保っている¹⁾。

最近グルタミン酸トランスポーターのcDNAがクローニングされ、その分子の実体が明らかになった¹⁾。グルタミン酸トランスポーターは、6-10の膜貫通部位を持つ糖蛋白であり、異なる遺伝子によってコードされる3種のアイソフォームが知られている。脳のみを発現するGLT-1、及びGLASTは、グリア細胞型であり、われわれが小腸から単離したEAAC1は、上皮及び中枢神経に広く分布し、脳では神経細胞に発現する²⁾。これらは、それぞれ異なった機能的特徴、異なった薬物感受性を有している。

トランスポーターにおいては、輸送の化学量論は、その濃縮能力を評価するうえで重要な情報となる。グルタミン酸輸送の化学量論はイモリの網膜グリア細胞において詳細に調べられたが、それによると1分子のグルタミン酸が、2分子の Na^+ と共輸送され、1分子の K^+ 、1分子の OH^- と対向輸送される³⁾。従って、1分子のグルタミン酸の取り込みとともに正電荷が1個細胞内へ動くことになり、起電性の輸送を示す。グルタミン酸トランスポーターは、このような無機イオンの輸送と共役することによりグルタミン酸の能動輸送を行っている。EAAC1においても、*Xenopus*卵母細胞に発現させてイオン輸送との結合比を調べたところ、網膜グリアと同様な化学量論が成立することがわかった。以上の化学量論より計算されるグルタミン酸トランスポーターの濃縮能力は、細胞外のグルタミン酸濃度を $0.6\mu\text{M}$ まで低下させることができるものであり、これは実際の脳脊髄液中のグルタミン酸濃度とおおよそ一致する³⁾。従って、グルタミン酸トランスポーターが、細胞外のグルタミン酸濃度調節の目標値を設定していると考えられる。

脳虚血や低酸素状態では、細胞内外のイオン勾配を維持できなくなり、結果として病変局所の細胞外の Na^+ が低下し、 K^+ が上昇し、細胞膜が脱分極する。この条件下では、グルタミン酸トランスポー

ターが、グルタミン酸能動輸送のための推進力を失い、細胞内に高濃度に存在するグルタミン酸に動かされて逆向きに働き出す（グルタミン酸トランスポーターの逆向き輸送）⁴⁾。NMDA受容体拮抗薬により神経細胞死が抑えられることから、急激な細胞外のグルタミン酸濃度の上昇が脳虚血から神経細胞死に至る過程の1ステップとして重要であると考えられる⁴⁾。Xenopus卵母細胞に発現させたEAAC1においても、生理的条件下ではグルタミン酸により内向き電流が流れるが、脳虚血の状態を模する電解質溶液中では、外向き電流として逆向き輸送を観察することができる。脳虚血においては、この逆向き輸送が、細胞外のグルタミン酸濃度の上昇に重要な寄与をしていると考える。

グルタミン酸は神経興奮毒性を持つことから神経変性疾患との関係が従来より議論されてきた。特に筋萎縮性側索硬化症（ALS）、アルツハイマー病、ハンチントン病の初期において、脳脊髄液中のグルタミン酸濃度の軽度の上昇が報告されていることから、グルタミン酸輸送の低下による局所のグルタミン酸濃度上昇、それに続く興奮毒性の発現が神経細胞脱落のひとつの機序として想定されていた¹⁾。最近報告されたALSの剖検脳の病変部でのグルタミン酸取り込みの低下、及びラット脊髄スライス片のグルタミン酸トランスポーター阻害薬による運動ニューロンの選択的脱落は、上の仮説を裏付ける⁵⁾。この神経細胞死の細胞内機序としては、non-NMDA受容体刺激に続く電位差依存性Ca²⁺チャネルの活性化、Ca²⁺流入、そしてXanthine oxidase活性化を介する活性酸素の生成がひとつの可能性として考えられる。

グルタミン酸トランスポーターは、神経細胞をグルタミン酸の興奮毒性から保護する機能を持ち、その機能異常は、脳血管障害や神経変性疾患にともなう神経細胞脱落と関わっている。cDNAのクローニングを契機に、新しい方向性からの神経細胞死の研究の展開が期待される。

参考文献

- 1) Kanai Y. et al., FASEB J., 7, 1450-1459, 1993.
- 2) Kanai Y. et al., Nature, 360, 467-471, 1992.
- 3) Bouvier M. et al., Nature, 360, 471-474, 1992.
- 4) Nicholls D. et al., Trends Pharmac. Sci., 11, 462-468, 1990.
- 5) Rothstein J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 6591-6595, 1993.

一酸化炭素(CO)の中枢神経毒性

鍋島 俊隆

名大・医・医療薬学・薬剤部

脳虚血により中枢神経系の障害が惹起されることが報告されている。たとえば、ラットにおいて脳虚血後24時間目に受動的回避反応課題の学習・記憶障害が認められる。さらに、スナネズミとラットにおいて、一過性の脳虚血により、海馬のCA1領域の神経細胞が不可逆的に障害されることが明らかとなった。脳虚血では、脳血流の障害により脳への酸素およびブドウ糖の供給が低下するため、ATPの産生すなわちエネルギー代謝が低下する。ATPの産生には、酸素およびブドウ糖が必要なため、脳が低酸素状態になるだけでも学習・記憶機能が障害される。たとえば、COにより低酸素状態となったヒトにおいてCO中毒から回復したにもかかわらず、その数週間後に学習・記憶障害や神経精神障害が惹起されることがよく知られている。さらに、大脳皮質、海馬、黒質および淡蒼球に壊死が惹起されていることが、解剖学的研究、コンピューター断層撮影および磁気共鳴映像法で証明されている。サルでも、多発性脳硬塞による健忘のモデルとしての脳虚血モデルだけでなく、低酸素モデルでも海馬の神経壊死が惹起されていることが報告されている。したがって、低酸素健忘動物は、ヒトでのガス中毒後の学習・記憶障害のモデルとなると思われる。脳虚血モデルの作製には、熟練した手術手技と時間が必要となるが、低酸素モデルは、比較的簡単に初心者でも作製でき、しかも安価なマウスを使うことができる利点があるので、COを使った低酸素誘発健忘動物モデルを作製した。さらに、COの中枢神経毒性を検討するため、健忘動物モデルの脳組織学的および生化学的変化について検討し、COの毒性発現機序を検討した。

急性健忘：マウスをプラスチック製の容器に入れて、COガスを35 ml/minの流速で、マウスが喘ぎ呼吸反応(gasping)をするまで注入した。gasping直後に容器より取り出した。ステップダウン型受動的回避反応学習課題を用いて、マウスがプラットホームからステップダウンした時に電撃ショック(1 Hz, 500 msec, 45 VDC)を15秒間負荷するスケジュールで訓練し、訓練の前後にCOに曝露し、その24時間後に、保持試行をしたところ、COは、記憶の獲得過程を障害するが、獲得された記憶の保持には影響をおよぼさなかった。

遅発性健忘とMNDA受容体：マウスが記憶を獲得した後に、COを曝露しても、健忘が惹起されないが、興味あることに、ヒトでのCO中毒の場合とよく似て、中毒から回復後数日後に健忘が惹起されることを見つけこれを遅発性健忘(delayed amnesia)と呼ぶことにした。すなわ

ち、マウスを受動的条件回避反応の訓練1日後にCOに曝露し、その1、3、5および7日後に保持試行を行ったところ、1および3日後には健忘が認められなかったが、5および7日後にはStep-down latency (SDL)が著しく短くなり健忘が認められた。さらに、マウスを訓練の5および7日前にCOに曝露した群ではSDLの短縮が認められ、健忘が惹起された。しかし、1および3日前に曝露した群では、健忘が惹起されなかった。遅発性健忘は、NMDA受容体拮抗薬(+)-MK-801、(-)-MK-801、フェンシクリジンをCO曝露1時間前に投与しておくこと、発現しなかった。

CO健忘モデルの神経化学的变化：COに曝露1日後に前頭皮質において、ACh含量が有意に減少した。しかし、他の部位では変化が認められなかった。曝露3および5日後では、全ての部位においてACh含量の変化が認められず、ACh含量は一過性のものであった。しかし、7日後では、前頭皮質および線条体のACh含量が有意に減少していた。また、海馬では減少する傾向が見られた。従って、これらの部位では遅発性の変化が惹起されることがわかった。一方、Ch含量は、曝露1および7日後に海馬において、増加していた。他の部位では変化が認められず、3および5日後では全ての部位において変化が見られなかった。また、訓練1日後にCOに曝露し、その7日後に断頭したマウスの大脳皮質および線条体での $[^3\text{H}]$ QNB結合量が有意に増加していた。しかし、 $[^3\text{H}]$ Gluおよび $[^3\text{H}]$ Glyの結合量は変化しなかった。

CO曝露後、一過性にドパミンの遊離量が増加し、その代謝産物含量は減少した。セロトニンの遊離量は若干増加し、その代謝産物含量は変化しなかった。

CO健忘モデルでの神経細胞の萎縮、壊死とNMDA受容体：海馬のCA1領域の錐体細胞の数はCOの曝露3日後から非曝露群に比べて有意に減少した。5日後の方が3日後よりも細胞数が減少する傾向が見られたが、7日後との間には差が見られなかった。曝露時間を一定にして単回、二回および三回負荷し、細胞脱落の程度を比較したところ、負荷回数に依存して傷害が悪化した。同じ三回負荷群では、負荷の間隔が30分より1時間の方が脱落の程度がひどくなった。体温保温群のマウスの細胞傷害の程度は非保温群に比べて約3倍ひどかった。この脳傷害は、NMDA受容体の非競合的拮抗薬MK-801によって保護されること、低体温では虚血による海馬におけるGluの遊離が低下することから、脳傷害は、COによりGluが遊離され、このGluがNMDA受容体に結合することが引き金となって惹起されることが考えられる。

以上の結果からCOにより惹起される急性健忘は、記憶獲得段階での障害であり、遅発性健忘は記憶の保持および呼び出し段階での障害であると思われる。また、後者は脳虚血の場合と同様に遅発性細胞壊死を伴い、NMDA受容体を介した神経毒性であることが明らかとなった。

β-アミロイドペプチドの培養海馬神経細胞に対する毒性

毛利 哲郎

北陸大・薬・創薬研

Alzheimer型痴呆症 (AD) 患者脳組織に特徴的に多く見られる老人斑から分離される不溶性の蛋白質、amyloid β-protein (AP)、のモノマーは、アミノ酸残基数は39-43で、その合成したてのものは水に可溶性であるが、溶液を放置したり、塩類溶液に加えると、繊維状、あるいはそのaggregateとなって、再び溶けることはない。X線解析などからこの多量体は、一部 β-sheet構造をした、cross-β-conformation をとり、組織では更に何らかの架橋構造を有しているものと考えられる。

一方APの前駆体 (APP) に相当するDNAと蛋白質が、種々の細胞に見いだされ、APPは細胞の正常成分であること、これが一定のアミノ酸部位で切断されて、N末側が分泌されるものであることがわかった。それに対してAPは、APPが異常な分解を受けて、その一部が形質膜周辺に沈着したものであると考えられるが、今のところ正常分泌物の生理的な役割も、APの形成と痴呆症の関係も明らかではない。

1990年に Yanknerらにより合成AP、あるいは合成APペプチド断片のラット海馬培養細胞に対する毒性が発表されたが、その後この実験結果の再現性について批判があり、公開実験がなされて、現在では分化した培養神経細胞 (海馬または大脳皮質由来) に対して、処理 (1-20 μg/mlのAPあるいは特定のそのペプチド断片) 数日から十数日後には、細胞の生存維持が著しく阻害されることが認められている。しかしこの毒性は蛋白質が可溶性の状態では現れにくくて、ストック溶液 (蒸留水、acetonitrile, dimethyl sulfoxide 中) である程度そのaggregateが形成されているもの、あるいは培地に希釈添加した後に繊維状の沈殿が生ずるような合成ロットの場合に、よく見られるのである。この繊維状のaggregate生成と神経毒性との相関は、種々のペプチド断片でも凡そ認められ、ペプチドがaggregateを形成し、なおかつ毒性を示すには、その一次構造に疎水性コアがあり、さらにβ-turn構造が必要なようである。

我々はAPの25-35位と同じペプチド (β25、Yanknerらにより毒性があるとされた) と、同じく22-35位のペプ

チド ($\beta 22$ 、アミノ酸配列 EDVGSNKGAI IGLM) , さらに25-35位の逆配列のペプチド ($\beta 25R$) と $\beta 22$ のC末をアミド化したもの ($\beta 22N$) を合成し、ラット胎児海馬由来の神経細胞に対する毒性をしらべ、その発現条件、他のペプチド共存の影響を検討した。 $\beta 22$ 、 $\beta 25$ はそれぞれbetaine buffer (pH8) , またはPBSのストック溶液中で既にaggregation がおこる。ある $\beta 22$ のサンプルでは、アミノ酸分析により約80%は溶けていることがわかった。生じた沈殿を電子顕微鏡で観察すると、いずれの場合も径5-10 nm、長さ200 nm以上の、針様のfibrilと、その大きな集合体が見られ、合成APのaggregate、あるいは老人斑のコア蛋白質の電顕像と極めてよく似ている。Congo red や thioflavin-Sによる染色法により、 β 構造の特徴も見られた。

それに対して、 $\beta 25R$ は可溶性であり、また $\beta 22N$ は、betaine buffer中でaggregateを作り β 構造をとるが、沈殿は短い、よじれた繊維の集合体であった。

海馬神経細胞は、17-19日目のラット胎児脳の花馬細胞を、trypsin処理により分散し、24well culture plateで 10^6 /wellの細胞を、calf serum 10%含むDulbecco's modified Eagle medium で6日間培養した後、cytosine arabinoside 24 h処理して得た。無血清培地で5日間培養後、ペプチドを添加した無血清培地を加えてさらに培養した。 $\beta 22$ と $\beta 25$ の20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加の細胞群で3日後、対照群に対して有意に lactate dehydrogenaseのrelease が増え、trypan blue による染色も著しくなった。 $\beta 22$ では10-40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲で、毒性の濃度依存性が見られた。 $\beta 22N$ では40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で有意の酵素releaseがあり、また $\beta 25R$ では全く毒性が認められなかった。

これらの結果は、APの特定のアミノ酸配列とその構造が神経細胞毒性と関連があり、またペプチドのfibrillar aggregate の形成能と毒性発現との間に相関があることを支持している。しかし aggregate そのものが毒性の本体であるかどうかは不明である。

substance P, insulin, insulin-like growth factor I, II, cAMP などの共存の効果も併せて報告する。

■一般口演■

●6月9日(休)

演題番号/B-1)~B-12)
C-1)~C-12)
D-1)~D-10)
E-1)~E-10)

マウスにおける絶食時間の検討
—再給餌後の過食が要因となった死亡例—

○渡辺 正人、堀田 真希、佐竹 聖人、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

絶食マウスに対する硫酸アトロピン（A t）投与で再給餌直後に食塊による気管閉塞が原因となる死亡例に相遇した。そこで我々は5週齢のICR系マウスを用い、絶食時間の差による再給餌後の摂餌状況をしらべ、A tを投与した際の症状観察を行った。また、絶食後の胃内容物重量と胃壁の形態観察を経時的にしらべマウスの毒性試験における絶食時間について検討を加えた。

再給餌1時間の摂餌量は、18時間絶食では4時間絶食に比べ2～3倍を示した。しかし、外徴及び行動には異常はみられなかった。A t投与を行った場合、18時間絶食し投与直後あるいは30分後に再給餌した10例中9例が呼吸困難を呈し、うち1例が死亡した。剖検の結果、食塊が咽頭部から食道上部にあり気管閉塞状態が確認された。しかし、A t投与3時間後の再給餌では異常は認められず、また非絶食及び4時間絶食マウスではA t投与直後に再給餌を行ってもこの所見は認められなかった。この食塊による気管閉塞は、A tの抗コリン作用による唾液分泌減少、消化管運動低下に加え、長時間の絶食による再給餌時の過食が重なったことによると考えられる。

次に絶食後の胃内容物重量を経時的にしらべた結果、絶食開始に約1.0gであったが、3時間後には約0.3gまでに減少していた。これは前日から18時間絶食したマウスの胃内容物（殆どが床敷や糞）と同量であった。また4時間絶食後の胃壁に異常はみられなかったが、18時間絶食では肉眼的に出血斑を散見し光顕観察では腺腔拡張等の所見がみられた。

以上のことからマウスの絶食時間は3時間で十分であり、また再給餌時間も被験物質の性質を可能な限り考慮して決めることが必要と思われた。

毒性試験の諸検査値に及ぼす摂餌量の影響

山田久陽, ○村上美穂子, 杉浦正幸, 中川慎也
大島 隆, 中根貞雄

大正製薬(株) 総合研究所 安全性研究部

〔目的〕摂餌量の変動は臨床検査をはじめとする諸検査値に影響を及ぼすことが報告されている。このため検査値の変動が被験物質による特異的变化か、または摂餌量の変動を介した二次的な変化であるかを明確に判断しなければならない。そこで14日間の制限給餌が諸検査値に及ぼす影響を雌雄のラットを用いて検討し、さらに剖検前日の絶食の影響についても合わせ検討した。

〔方法〕6週齢のWistar系雌雄ラットを使用した。実験群は飽食群、1日摂餌量を通常の80%、60%及び40%に制限した制限給餌群、剖検前日より約18時間絶食させた絶食群の計5群とし、14日間処置を行った。検査項目は体重、試験紙法による尿検査、血液生化学的検査ならびに臓器重量とした。

〔結果〕摂餌量の減少に伴い、体重減少及び増加抑制、赤血球数、Hb、Hct、Cl及びA/Gの増加、TG及びALPの減少がみられた。湿重量はほとんどの臓器で減少し、心臓、肺、肝臓、腎臓、精囊、卵巣及び子宮の変化が顕著であった。比重量は肝臓、卵巣及び子宮で顕著に減少した。絶食ではA/Gの増加、尿蛋白、T-BIL、TG、ALP、PLの減少が、湿及び比重量では、副腎の増加、肝臓の減少が顕著であった。

〔考察〕摂餌量の減少は諸検査値に著しい影響を及ぼした。その成因として尿及び血液 H^+ ラメータの摂餌に起因した成分供給の減少、栄養不良に起因した器官発育の抑制、摂餌量に対応した摂水量の減少によると思われる脱水状態を反映した赤血球系 H^+ ラメータの増加等が考えられた。以上より、毒性試験において摂餌量の減少がみられた場合、特異的な毒性の他に摂餌量を介した変動の可能性が考えられ、データの解釈には十分に注意する必要があるものと考えられた。なお、摂餌量の減少に起因した諸変化は、剖検前日の絶食でも多くは同様に認められ、絶食処置が摂餌の影響を軽減する有用な手段となる可能性が推察された。

制限給餌による精巣の障害性

○島田 信、坂口 ゆかり、原田 滋雄、柿畑 耕司、野村 護

第一製薬（株）開発研究所安全性研究センター

ラットに薬物を投与し、精子形成障害が認められる場合、体重減少を伴っていることが多い。しかし、精子形成障害が、薬物投与に起因するか、あるいは体重減少に伴う非特異的な変化であるかを明確に区別することは困難である。そこで、今回我々はラットを制限給餌により飼育し、精子形成障害の発現に対する体重減少の影響について検討した。

【材料および方法】11週齢のSlc:SD系雄ラット20匹を使用した。1群5匹で4群を設けた。1群5匹の動物は飽食させ、残りの3群には同週齢雄ラットの平均摂餌量の75、50および25%を毎日与えて4週間飼育した。屠殺時に精巣重量および片側精巣の精巣内精子数（スパームヘッドカウント法）を測定した。他側の精巣はブアン固定後、パラフィン切片を作製し、PAS染色を施し、組織学的に検討（ステージ分類等）した。

【結果および考察】制限給餌をした動物の4週間後の体重は、飽食群の平均値を100%とすると75%群で90%、50%群で70%、25%では約55%であった。また25%群では精巣重量の有意な減少が認められた。しかし、スパームヘッドカウントにはいずれの制限給餌群でも飽食群と比べて有意な差はみられなかった。一方、精巣の組織検索では25%群で精細胞の変性した精細管の増加が認められ、更に各ステージの精細管の各種精細胞とセルトリ細胞との比率を算出したところ、ステージ7の精母細胞の減少が認められた。これらのことから4週間で体重が飽食群の55%にまで減少する条件では精子形成障害が発現するが、体重が飽食群の70%に減少する制限給餌では精子形成に障害を及ぼさないことが明らかになった。

長期飼育ラットにおける食餌制限の影響

関 誠、 山口 一喜、 関 剛幸、 吉村 慎介、
小島 幸一、 畔上 二郎、 今井 清、

(財) 食品薬品安全センター 秦野研究所

ラットに長期間食餌制限を行うと寿命の延長のみならず、腫瘍の発生、加齢性病変の発生も抑制される。そこで、ラットの長期飼育において、生体機能に障害を及ぼすことなく、効果的に加齢性病変を抑制し得る食餌条件を求める目的で、6週齢のSprague-Dawley系ラット雌雄各40匹に13週間にわたり供給量を約85%、70%および55%に減じた食餌制限を施し、自由摂取群を対照群として、体重、運動量、性周期に及ぼす影響について検討した。また最終解剖時の血液学的、血液生化学的、および病理学的検査から検討を加えた。その結果、体重増加抑制が食餌制限量に依存してみられ、併せて運動量の増加が各食餌制限群に認められ、特に70%以下給餌群においては、明期の運動量増加が顕著であった。また性周期については、70%以下給餌群では周期の消失した例が著明に増加した。最終解剖時の各検査結果にみられた食餌制限に伴う主な変化としては、70%以下の給餌群に雌雄の白血球数の減少、総蛋白質濃度、血糖値および過酸化脂質濃度の減少、ナトリウム濃度の増加、雌のアルカリフォスファターゼ活性の上昇などがみられた。さらに、食餌制限群では殆どの器官の絶対重量が自由摂取群と比較して低値を示したが、各体重毎の器官相対重量は、子宮、卵巣、前立腺、雌の肝臓を除いて概ね高値を示した。今回の成績から、すべての食餌制限群で、腫瘍等の加齢性病変の発生に関連すると考えられる脂質過酸化を著明に抑制している可能性が示唆された。このことから、食餌量を自由摂取の85%程度に制限する食餌条件は、生体機能に障害を及ぼすことなく加齢性病変の発現を抑制するに有効な条件の一つと考えられる。

静脈周囲刺激性試験に関する基礎的検討

○中村 裕行、根岸 良吉、杉本 武志、中井 洋一

武田薬品工業・薬剤安全性研究所

〔目的〕制癌剤の静脈内投与時に制癌剤が静脈周囲に漏出すると重篤な局所変化を生じることがあり、これは制癌剤の副作用の2-7%を占めることが報告されている。静脈周囲に薬液が漏れた場合の局所刺激性を評価する方法は未だ確立されていないので、静脈周囲刺激性試験法を確立し、制癌剤およびbromosulfophthalein(BSP)の静脈および静脈周囲に対する刺激性について検討したので報告する。

〔方法〕ウサギ後耳介静脈内に薬液を1 ml/minの速度で3分間あるいは静脈近傍皮下に0.3 ml注射した。経時的に投与部位の紅斑を0～4の評点で記録し、投与前後の耳介の厚みから腫脹率を算出した。また血栓については透過光を用いて観察し、その長さを測定した。

〔結果・結論〕BSPを静脈内に投与した場合、投与1ないし2日後をpeakとする強い紅斑、腫脹および血栓がみられたが、いずれの制癌剤を静脈内投与しても、投与部位に変化はみられなかった。BSPを静脈周囲に投与した場合、投与1日後をpeakとしその後減弱する腫脹がみられた。一方、制癌剤のなかでも刺激性が弱いことが知られているcyclophosphamideやmethotrexateでは一過性の軽度な紅斑および腫脹がみられたのみであるが、刺激性が強いことが知られているactinomycin Dやmitomycin Cでは3日後をpeakとする紅斑と持続性の強い腫脹が認められた。以上、本研究室で確立した静脈周囲刺激性試験法はヒトの臨床成績と一致すること、また制癌剤の静脈周囲刺激性はBSPに比べて遅延性であることが明らかとなった。

ラットを用いた血管痛評価法の検討

○尾崎 潤一郎, 久世 博, 堀 正樹

田辺製薬株式会社 安全性研究所

【目的】輸液あるいは注射剤の投与時に生じる血管痛について、医薬品開発段階で動物を用いて推測認知出来ることは有意義と思われる。今回、ラットを用いた鎮痛剤の薬効評価モデルの一つを応用して、これら実験系確立について検討した。

【使用動物ならびに実験手技】Slc:SD系の雄ラットを用い、E-テルで導入麻酔後、フロペンで麻酔を維持し、オリエル製カニューレを左大腿動脈内に逆行性に挿入し、その先端がほぼ総腸骨動脈内に達するようにし、結紮固定した。手術創は局所麻酔薬を塗布した後、縫合し、水平につるした筒状の布の中へラットを入れ、速やかに穴から四肢、カニューレを外に出し、宙ぶり状態にして保持した。四肢は下方に緩く拘束しておいた。カニューレを挿入した対側後肢(右後肢)に糸をかけ、F Dビッカアプ(日本光電;TB611T)を介して、ひずみ圧力用アンプ(日本光電;AP601G)に接続した。動物をセット後、まず、生理食塩液を0.2 ml動脈内注射(動注)し、後肢屈曲反射の無いことを確認した。引き続き約5分間隔で各被験液(酢酸緩衝液;pH4.8~5.9, 浸透圧比 1.04~1.30および3.5)を0.2 ml動注し、屈曲反射をビデオで描記し、その直後に生理食塩液を0.1 ml動注することによりウォッシュアウトした。被験液の投与順はランダムに決め、最後に指標物質として0.425W/V%の酢酸0.1ml、その直後に生理食塩液0.1 mlを動注した。

【評価方法】各動物で、0.425W/V%酢酸液0.1 mlの動注で記録された屈曲反射の振幅を指標とし、下記の如くスコアを付けて評価した。

-	; 反応なし	0
+vw	; 極めて弱い反応(酢酸 $\times 0.5 >$)	0.5
+w	; 弱い反応 (酢酸 $\times 0.5 \leq$, 酢酸 $\times 0.8 >$)	1
+	; 酢酸と同等(酢酸 $\times 0.8 \leq$, 酢酸 $\times 1.2 >$)	2
#	; 中等度 (酢酸 $\times 1.2 \leq$, 酢酸 $\times 1.5 >$)	3
##	; 強度 (酢酸 $\times 1.5 \leq$)	4

【結論】pH 5.6以上の被験液で、仮性疼痛反応の減弱あるいは消失がみられた。また、浸透圧比が1.04~1.3のはほぼ等張の被験液と、浸透圧比を3.5に調整した高張液との間で各pH液において差はみられず、本試験条件下においては、仮性疼痛反応を引き起こす要因として、pHが大きく関与していることが判明した。現在、酢酸緩衝液以外にも他の酸を用いて、pHと仮性疼痛反応との関係について検討中である。

本実験系で得られた結果から、vocalizationなど主観的な疼痛評価法に対して、スコア評点化で疼痛反応を客観的に捉え得る試みは、ある程度の信頼性を得たものと考えられた。本評価法がヒトにおける血管痛をどの程度まで反映できるものなのかは明かではないが、輸液あるいは注射剤の開発の一助となり得る可能性は大きい。

マイクロダイアリシス法による薬物の毒性発現
解析への応用

○山本 正雄、貴志 陽子、佐藤 哲男

千葉大・薬・薬物

【目的】薬物の毒性は、その発現部位における薬物量と生体側の感受性により決定される。このため、毒性発現部位への薬物の到達量を知ることが大切である。しかし、実際にはそれは測定し難いため、これと密接な関連を有している血中濃度や組織内濃度が測定される。今回、同一個体の複数の組織から経時的にサンプリングが可能なマイクロダイアリシス法を用い、薬物の毒性と体内動態について検討を行った。

【方法】動物としては、SD系雄性ラット(250-350g)を用いた。ペントバルビタール麻酔下、マイクロダイアリシス法を用いて血中および肝臓中薬物濃度を10分毎に2時間までHPLCを用いて測定した。薬物としては、エステル型薬物であるプロカインを用い、5用量(50-250mg/kg)をそれぞれ腹腔内投与し、その経時的变化を測定した。また、プロカインエステラーゼを誘導または阻害した時の血中および肝臓中薬物量を経時的に測定した。さらに、プロカイン毒性発現量を投与し、脳内および血中濃度を測定することにより、薬物代謝の立場から脳内毒性発現量と血中濃度との関係を検討した。

【結果および考察】ラットにプロカインを5用量投与した結果、血中プロカイン濃度は、100-200mg/kgで用量依存性が見られた。また、プロカインの代謝酵素を誘導又は阻害し、血中および肝臓中プロカイン濃度を測定したところ、酵素活性の変動によりプロカインの生体内動態が直接影響されることが示唆された。また、毒性発現量(250mg/kg)を投与し、血中および脳内プロカイン濃度を測定したところ、両者の変動には直接の相関が見られ、さらに生体内薬物量は代謝酵素活性により大きく影響されることが認められた。以上の結果より、生体に投与された薬物の毒性を考える上で、血中薬物濃度を測定することにより、ある程度毒性発現を推測することが出来、さらに毒性発現には代謝酵素活性の個体差が大きく影響することが示唆された。

イヌ毒性試験における血液化学的検査の背景データに関する統計学的処理の試み

小田部耕二、有賀恭子、松沢陽子、堀内美保、春日咲子、宇佐美正義

中外製薬・安全性研究所

【目的】 イヌを用いた毒性試験では、群内の動物数が少ないことから群間比較の検出力が充分でなく、それを補う為には供試動物の母集団の背景データ（正常値）が把握されていることが望ましい。一般的に背景データは平均値±2SDで簡略的に算出されているが、近年、臨床領域ではより正しい正常値の算出の為に種々の統計学的処理法が考案されている。そこで今回、統計学的処理法の一つである最尤変換法（飯塚・久米法）を用いてイヌの血液化学的検査の正常値を求めたので報告する。

【方法】 最近5年間に当社安全性研究所において毒性試験に供したビーグル犬の投薬前もしくは対照群のデータを1歳未満（平均8カ月齢、雌雄各227匹）と1歳以上（平均16カ月齢、雌雄各36匹）の2つのグループに分けてそれぞれ雌雄別に血液化学的検査（GOT、GPT、ALP、LAP、LDH、ChE、 γ -GTP、CPK、糖、遊離コレステロール、総コレステロール、リン脂質、トリグリセリド、遊離脂肪酸、尿素窒素、クレアチニン、尿酸、総ビリルビン、直接ビリルビン、間接ビリルビン、総タンパク、アルブミン、A/G比、無機リン、カルシウム、鉄、Na、K、Cl、タンパク分画）の検査値について正常値を求めた。

【結果および考察】 正常値を算出するにあたり、検査データの標本分布について正規性を調べたところ、全ての項目が裾広がりいわゆる対数正規分布を示した。算出した正常値は平均値±2SDと大きくかけ離れた値ではなかったが、正常値の算出において分布型の選択（ $\log x$ 、 \sqrt{x} 、 $\sqrt[3]{x}$ 、 x 、 x^2 、 x^3 ）や異常値の除去（Smirnov-Grubbsの棄却検定）が行われた結果、上限および下限値が縮小する傾向にあった。また、個体差の大きい項目においても適切な値が求められた。すなわち、確立された正常値により異常値に対する判断は著しく確実化した。なお、年齢差として1歳未満と1歳以上の正常値を比較したところ、加齢変化がみられるALP、CPK、無機リン、鉄などの項目で大きな差が認められ、性差としては1歳以上のグループの雌で遊離コレステロール、総コレステロール、リン脂質、トリグリセリドが僅かに高値を示した。

ラットへの顆粒剤の経口投与における投与方法の差による作用発現時間の検討

木口 雅夫、和田 理穂、河村 公太郎

株式会社化合物安全性研究所 薬理研究室

顆粒剤の経口投与時の投与方法の差による作用発現への影響をラットを用いて検討した。投与方法は、溶液投与、経口ゾンデの利用による顆粒状投与及びカプセル投与とし、無拘束、安静下における心拍数及び血圧の変化を作用発現の指標とした。

SD系雄性ラット(378~486 g)の腹部大動脈へ麻酔下にてポリエチレンチューブを挿入した後頸背部に一端を固定し、2日後にそのチューブを利用し無拘束、安静下の血圧及び心拍数を直接法で測定した。Nifedipineの3 mg/kg 相当量の顆粒製剤を非絶食下で以下の3種の方法で投与した。A群：水溶液投与(1.5 ml/body)。B群：ディスポーザブル経口ゾンデ(CL-4595、日本クレア)内に製剤を充填し、水を60秒間接触させた後、1.5 mlの水の追い打ちにより投与。C群：マイクロカプセル(外径約 2.5 mm、エランコ社)に製剤を充填しカプセル投与器で投与し、水1.5 mlを追加投与。

Nifedipineの投与により、A群及びB群共に投与数分後より心拍数の増加と血圧の下降がみられた。両群共、投与後5~10分で最大変化に達した。一方、カプセル投与では、心拍数は投与6~20分前後で増加し、最大変化到達も10~30分後となり巾が認められた。また、A及びB群に比べ心拍数の増加程度が小さい傾向がみられ、血圧の下降も軽度であった。

顆粒剤の経口投与において、ディスポーザブルゾンデを利用し顆粒状態を維持した投与方法で溶液投与とほぼ同等の作用発現がみられた。カプセル投与では、作用発現の遅延と、作用の減弱傾向がみられ、即効性の薬剤の評価においては考慮が必要と考えられた。

輸液用製剤の毒性試験法の検討

— 高カロリー輸液の臨床用法試験の試み —

○池田陽一、寺村佳之、今井直人、花田秀一、岩井正和

○ミドリ十字 中央研究所 安全性研究所

輸液は各構成成分自体、安全性の高い配合剤である。しかし、通常の毒性試験では手技上及び作業性の点で臨床投与速度からは掛け離れた高速投与を余儀なくされることから、特に高カロリー輸液では浸透圧等の物理的な影響のみならず、耐糖能をはるかに越えた糖の急速負荷により、本質的な毒性検索が不可能となる。よって、臨床での安全性の予測をより確かなものとするには栄養学的な検索を盛り込んでの臨床用法に準じた試験により、安全性と有効性の両面を同時に評価することが有益であると考えられる。今回、高カロリー輸液のイヌにおける通常の毒性試験法による問題点を検証し、1ヵ月TPN管理による臨床用法試験の有用性を検討した。

【検討1】手技的影響：懸垂式保定器による拘束（6時間保定）により、顕著な血清GOT、GPTおよびCPK活性の上昇が認められた。一方、TPNの術式および維持管理時の荷重負荷（約2kg）に対しては、何ら生理学的パラメーターの変動は認められなかった。

【検討2】高カロリー輸液の急速投与による影響（40ml/40Cal/kg/dayを1ml/kg/minの速度にて1ヵ月間反復投与）：投与中に多量の排尿（一部血尿）、嘔吐等が認められ、痙攣、昏睡を呈して死亡する例もみられた。また、多量の尿糖排泄も確認された。

【検討3】TPN管理による臨床用法試験（無脂肪ならびに脂肪加TPN用輸液を80ml/80Cal/kg/dayの用量にて無拘束下で1ヵ月経中心静脈内持続注入）：両輸液ともに高張性ならびに糖の急速負荷に起因した毒性徴候は認められることなく、良好に維持管理された。また、脂肪配合の有無による脂質挙動の違い等の本質的な毒性および栄養面での検索が可能であった。

以上の如く、高カロリー輸液においては臨床と同様のTPN管理による試験を行うことで、通常の毒性試験法による非特異的な変化が排除されて本質的な生体への影響を検索することが可能となり、さらに毒性・薬効両面でのデータ評価が可能であると考えられた。

ラットにおける明暗条件反転後の再同調に要する日数について
— 血中濃度測定に関する手技的検討 —

○古川忠司, 大橋芳彦, 木村邦男, 岡田忠彦

三共株式会社・安全性研究所

近年, 毒性試験における血中濃度測定の実施が一般的になりつつある. 被験物質の血中濃度推移をラットでの経餌投与試験で調べる場合, 被験物質の摂取は暗期に集中することから, 血中濃度推移を把握するためには明期のみならず暗期(夜間)の採血が必要となり, 作業上の困難を伴うことになる. しかし, 通常の照明条件と同時に, 明暗を反転させた条件も設定しておき, 両条件下の動物から同時に経時的採血を実施すれば, 24時間にわたる血中濃度推移を明期の時間帯のみで把握することが可能である. ただしこの場合, 投与に先立って動物を反転照明条件に同調させておくことが必要である. 新たな明暗環境への再同調に要する日数を行動学的パラメータについて調べた報告は存在するが, 代謝の側面から調べた報告は見あたらない. そこで今回, ラットにおける明暗条件反転後の再同調に要する日数を, 行動学的パラメータ(自発行動量, 飲水量, 摂餌量)について確認するとともに, 代謝的パラメータとして肝臓のチトクローム P-450 酸化系酵素(P-450) および肝臓中のグリコーゲン量について調べた.

実験には, F344 ラットの雌雄を用いた. ただし, P-450 およびグリコーゲン量は雄についてのみ調べた. 行動学的パラメータは, 明暗環境反転前および反転後を通して, スリーポイントメータ(小原医科産業)を用いて連続的に測定した. P-450 およびグリコーゲン量は明暗環境反転前, 反転後一週目, および反転後二週目で, 明期と暗期について調べた.

その結果, 各行動学的パラメータは, 明暗反転後ほぼ一週間で反転前と逆の変動を示し, 既報のものとはほぼ一致した. また, 今回の検討において, P-450 およびグリコーゲン量も, 明暗反転後一週目以降で反転前と逆の変動を示すことが明らかとなった. 以上の結果から, F344 ラットは行動学的パラメータのみならず, 代謝酵素活性なども明暗反転後ほぼ一週間で新たな環境に再同調できることが確認できた. したがって, 明暗条件を反転させた環境に一週間以上馴化させれば, 上述の方法による血中濃度測定が実施可能であると思われた.

化学発光法によるラット血清中IgEの高感度測定法の開発

○堀口恵子 安達智子 小島幸一

（財）食品薬品安全センター 秦野研究所 生化学研究室

安全性試験においては、より広く毒性をとらえようとする動きがあり、従来の各種の試験項目に加えて免疫学的な考察を行うとするOECDのガイドライン案も出ている。その1つとして、我々は動物試験において重要な意味をもつラットIgEの測定法を確立することを試みた。

まず、通常の酵素免疫測定法(EIA)の測定系を確立したが、比色法では微量のIgEを測定するには限界があったため、高感度な化学発光法を用いての検討を行い、所期の目的を達する測定法を確立したので報告する。

【方法】 EIAは、サンドイッチイムノアッセイで行った。抗体は各種市販品を検定し、特異性の高いモノクローナル抗体を使用した。化学発光法を用いる系は、比色法で酵素標識抗体を用いるところをビオチン標識抗体を用い、これにアルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジンを反応させ、ルミホス530で発光させた。測定には、化学発光・生物発光測定用マイクロプレートリーダーLuminous CT-9000D(ダイアヤトロン)を用いた。

【結果および考察】比色法を用いた系では5~500ng/mlが定量範囲であったのに対して、化学発光法を用いた系では0.1~10ng/mlまで定量が可能となった。また、日内変動、日差変動はともに良好で日常的な測定に充分対応できるものであった。比色法と化学発光法の両者の相関は極めて良好であり、ラット血清の希釈曲線および市販ラットIgEの添加回収率からみて目的とするIgEを正確に測定する方法であることが確認された。

以上の通り、通常のEIAでは検出感度以下となり、数値的取扱いが困難であったものが、化学発光法を用いることにより格段に改善された。さらに、本法の応用が期待され、検討を行っている。

DNAの断片化を指標とした有毒微生物代謝産物の細胞毒性とそれに対する抗酸化剤の影響

○梅森清子¹⁾ 永田諭志¹⁾ 菅又昌雄²⁾ 河合賢一³⁾
田沼靖一¹⁾ 上野郁子⁴⁾ 上野芳夫^{1, 2)}

¹⁾東京理科大学薬学部 ²⁾東京理科大学生命科学研究所
³⁾星薬科大学薬学部 ⁴⁾理化学研究所生物物理化学部

微生物由来の諸種有毒代謝産物が示す細胞致死効果に、アポトーシスが関与しているか否かをDNAの断片化を指標として検討した。

アントラキノンのluteoskyrin(LS), skyrin(SR), rugulosin, emodin, chrysophanol、トリコテセン系のT-2toxin, roridin A, nivalenol, deoxynivalenol、ジケトピペラジン系のemethallicin A, emestrin、イソクマリン系のochratoxin A、環状ペプチド系のphalloidin, cyclochlorotin, microcystin-LR、その他fumonisin B₁などを、ヒト骨髓性白血病細胞(HL60)に作用させた後、DNAを抽出し、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片化を検出した。その結果、LS, SR, トリコテセン系4種、ジケトピペラジン系2種、ochratoxin Aで、DNAラダーが観察された。

これらの化合物のうち、タンパク合成阻害能を有するT-2について、毒性発現の経時変化を調べたところ、DNAのラダーはT-2添加後2~3時間から観察された。一方、この時の細胞障害は、MTT法、トリパンブルー染色法などでは観察されなかつたので、DNAの断片化はこれらの方法で検出可能な障害よりも早期に生じると考えられた。

また我々は、LSが活性酸素種を介して、8-OH-dGを生成し、細胞を障害することを明らかにしてきた。そこで、LSによる毒性発現への活性酸素スカベンジャーの影響を調べたところ、L-ascorbic acid, cysteamine, benzylidene ascorbate sodiumなどにより、DNAラダーの発現が抑制された。これはDNAラダーの発現に活性酸素が関与していることを示唆した。

アントラサイクリン系制癌剤の二つの細胞内作用部位の解析

○角崎 英志、清宮 健一、松尾 三郎、暮部 勝

大阪府立大学・農・獣医・毒性

【目的】アントラサイクリン系制癌剤アドリアマイシン (ADM) は、広域な抗腫瘍スペクトルを有するが、心毒性のために臨床使用が制限される。一方、同系制癌剤のピラルビシン (THP) は、心毒性が弱いと報告されている。従って、これら薬剤の作用の質的差異を比較することによって、その毒作用機序や制癌作用機序の解析を二・三検討した。【方法】癌細胞としてマウスリンパ性白血病細胞のL1210を、正常分化細胞としてブタ腎上皮株化細胞のLLC-PK₁を用いて両薬剤の作用を比較検討した。【結果】L1210およびLLC-PK₁細胞の増殖抑制作用やL1210細胞DNAへの³H]thymidine取り込み抑制作用は、THPでADMよりも約5～8倍高く発現したが、LLC-PK₁細胞に対する殺細胞作用は両者で大差が無かった。両細胞およびラット心臓から調製したミトコンドリアおよび小胞体画分におけるO₂⁻産生は、THPよりもADMの方が高く、心臓 \geq LLC-PK₁>L1210の順であった。L1210およびLLC-PK₁細胞内へのTHPの取り込みは、ADMよりも約5～10倍高く認められた。L1210細胞へのADMおよびTHPの取り込みは、LLC-PK₁細胞よりも多く認められた。L1210細胞から単離調製した核へのADMおよびTHPの取り込みは、両者間で大差は無かった。L1210細胞から調製した細胞質中の[¹⁴C]ADM-レセプター結合に対する未標識THPの阻害濃度は、未標識ADMのそれよりも約5倍低かった。

【考察】THPは、ADMよりも細胞内移行およびその核内移行レセプターに対する親和性が高いために、核内移行し、DNAに結合して細胞静止作用がより強く発現するが、分化細胞におけるミトコンドリアでのラジカル産生が低いために、細胞内移行量が多いにもかかわらず、その細胞障害性は比較的弱く発現するものと考えられる。

制癌剤アドリアマイシン・レセプター複合体の核移行について

○清宮 健一、松尾 三郎、暮部 勝

大阪府立大学・農・獣医・毒性

【目的】 演者らは、マウスリンパ性白血病細胞L1210の細胞質中に $[^{14}\text{C}]$ アドリアマイシン (ADM) と特異的に結合し、核へ移行させるためレセプターが存在することを報告した。今回は、ADMの核移行機序を明らかにするために、 $[^{14}\text{C}]$ ADM-レセプター複合体の核移行について二・三検討した。

【方法】 対数増殖期のL1210細胞から細胞質を調製し、 $[^{14}\text{C}]$ ADMと水中で一定時間インキュベーションを行なった。その後、Sephacryl S-300ゲル濾過によって、 $[^{14}\text{C}]$ ADM-レセプター複合体画分を分離した。この画分に分離調製核を添加し、複合体の核移行について調べた。

【結果】 $[^{14}\text{C}]$ ADM-レセプター複合体は、free $[^{14}\text{C}]$ ADMよりも高い核への移行能を示した。 $[^{14}\text{C}]$ ADM-レセプター複合体の核移行は、低温 (0°C) 下ではfree $[^{14}\text{C}]$ ADMの移行よりも顕著に低下した。低温下での複合体の核移行は、複合体を 37°C で前処置することによって一部回復した。 $[^{14}\text{C}]$ ADM-レセプター複合体およびfree $[^{14}\text{C}]$ ADMの核移行は、SH-阻害剤のp-chloromercuribenzoic acidによって抑制された。 $[^{14}\text{C}]$ ADM-レセプター複合体の核移行は、ATP, Ca^{++} , Mg^{++} によって抑制されたが、free $[^{14}\text{C}]$ ADMでは影響されなかった。 $[^{14}\text{C}]$ ADM-レセプター複合体の核移行後のADMのeffluxは、ATP, Ca^{++} , Mg^{++} によって促進された。

【考察】 $[^{14}\text{C}]$ ADM-レセプター複合体の核移行は、温度 (37°C) に依存し、また、ADMの核内移行の調節因子の一つとして、ATPを介した系が関与している可能性が示唆される。

ラット腹腔肥満細胞のヒスタミン放出に及ぼす
カフェインの作用

○寺岡宏樹、秋葉洋江*、高井 了*、種池哲朗*、
平賀武夫、大賀 皓

酪農学園大学 獣医毒性学教室、獣医薬理学教室*

アレルギー反応に関わる肥満細胞からのヒスタミン (His) 放出には細胞内ストアからの Ca^{2+} 放出も寄与していると考えられているが、その機構については充分理解されていない。今回、 Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 放出 (CICR) の活性薬であるカフェイン (Caf) の作用を検討した。

1. Wistar ラット由来の腹腔肥満細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) を Fura2法を用いて測定した。Compound 48/80 (48/80) は濃度依存性 (0.08-2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を上昇させた。EGTA (5mM) の添加により静止レベルは低下したが、48/80の作用は一部残存した。2. 20mMまでのCafは栄養液中の Mg^{2+} 、 Ca^{2+} の存在に関わらず、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を増加させなかった。逆にCafは、48/80による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加を濃度依存性 (0.5-20mM) に抑制した。3. CICR活性作用を持つハロタンは1mM以上で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加を起こし、この作用はEGTA添加後も一部残存した。しかしその時間経過はCICRに比べ非常に遅く、かつCICRを抑制する5 μM ライアノジンの存在下でも全く影響を受けなかった。4. 48/80は濃度依存性 (0.1-3 μg) にHis放出を起こしたが、20mMまでのCafは全く刺激作用は見られなかった。Cafは $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に対する作用と類似の濃度依存性で48/80によるHis放出を抑制した。5. フォルスコリン (-10 μM) は静止時および48/80刺激時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ とHis放出に影響を与えなかった。

以上の成績は、ラット腹腔肥満細胞にはCaf感受性の Ca^{2+} 放出機構は存在せず、Cafは分泌抑制作用を持っていることを示唆している。現在、同細胞におけるCICR機構存在の有無について ^{45}Ca トレーサー法を用いて更に検討中である。

初代培養肝細胞における細胞間コミュニケーションに対する
除草剤diquatの影響

張 宝旭 大野泰雄 宮島敦子 篠内桃子 高仲 正

国立衛生試験所 安全生物研 薬理部

【目的】ギャップ結合を介した細胞間コミュニケーション(GJIC)の異常と化学物質による毒性発現との関連が注目されるようになり、催奇性や発癌プロモーションなどの関連が議論されてきた。また、我々は初代培養肝細胞 GJIC 酸化コレステロールによる抑制への活性酸素の関係を示唆した (Guo et al. 1993)。そこで今回は、肝毒性を有し、活性酸素を生成する除草剤diquatのGJICに対する影響を検討した。

【方法】肝実質細胞はSD系の雄ラットより、コラーゲナーゼ灌流法で調製し、10%牛新生児血清とデキサメサゾンを追加したLeibovitz's L-15培地で、コラーゲン塗布プラスチックディッシュに培養した。GJICは蛍光色素であるLucifer Yellow CHを、微小ガラスピペットを用いて肝細胞に注入し、5分後に隣接細胞への色素の移動(色素カップリング率)を調べることで測定した。

【結果および考察】Diquatの0.25 mM - 1.0 mMの2時間処置は肝細胞GJICを用量依存的に抑制した。同時に、diquatの細胞毒性を調べたところ、これらの濃度では細胞からのLDH漏出は増加しなかったが、細胞内のGSHは用量依存的に低下した。一方、diquatによるGJICの抑制は時間依存的であり、0.5mM diquatでは暴露6時間まで抑制が強まった。また、この作用は可逆的であり、diquatで2時間暴露した後に、新しい培地を交換したところ、洗浄後4時間で、GJIC能が回復していた。Diquatは細胞内で代謝を受け、フリーラジカルと活性酸素を産生することが報告されており(Degray et al. 1991; Boutin et al. 1989)、diquatのGJICの抑制には、これらが関与しているものと思われる。

副腎毒性スクリーニングにおける *in vitro* 系の応用

○須藤 武、築館一男、見上 孝、山津清實

エーザイ（株） 安全性研究部

ACAT阻害を主作用とする脂質低下・抗動脈硬化剤の創出に際し、ラットにおいて強い副腎毒性を示す一連の化合物が認められた。この副腎毒性を回避するために *in vitro* での毒性スクリーニングを実施し、その有用性を示唆する結果が得られたので今回報告する。

【材料及び方法】① *in vitro* 実験：SD雌ラットより摘出した副腎をコルチナールで処理し皮質細胞を単離した。24穴マイクロプレートで72時間培養後、ACTH 10^{-9} M刺激下で6時間化合物と反応させ、培養上清のコルチステロン量およびLDH値を測定した。② *in vivo* 実験：SD雄ラットに300mg/kgを1週間連投し、副腎の病理組織検査を実施した。

【結果および考察】*in vitro* 試験では、いずれの化合物においても最高濃度である10 μ MまでLDH値に変化は認められなかった。次に、化合物濃度10 μ Mでのコルチステロン分泌抑制率を調べ軽度（0~20%:L群）、中等度（20~50%:M群）、重度（50%以上:H群）に分けて副腎病理組織所見と比較した。L群の化合物では *in vivo* 実験で、副腎に病理組織学的変化が認められないか、あるいは軽度な皮質細胞内の空胞増加が認められたにすぎなかった。M群では束状帯~網状帯細胞に著明な空胞増加が認められ、さらに束状帯細胞では大型空胞が認められた。最も抑制作用の強かったH群の化合物では、束状帯~網状帯細胞の空胞増加や束状帯細胞に大型空胞がみられさらに、細胞の変性・壊死が認められた。この様に、*in vitro* でのコルチステロン分泌抑制作用と *in vivo* における病理組織所見の程度の間には相関が認められた。*in vivo* において認められた副腎毒性は、ステロイドホルモンの合成・分泌抑制に基づく脂質代謝異常に起因していると考えられた。

薬物投与ラットにおける単球、骨髄マクロファージ
の酵素活性の変化

二村 芳弘、松本 清司*

東邦大・医・薬理、*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る。我々は薬物の血液・骨髄毒性を多角的に評価する目的で薬物投与ラットの末梢単球及び骨髄マクロファージについて酵素活性を中心に測定、検討した。

〔方法〕Slc:Wistar雄ラット(7週齢)にmitomycin C(MMC, 1mg/kg, ip)、5-fluorouracil(5FU, 3mg/kg, sc)又はphenylhydrazine(PHZ, 10mg/kg, sc)を7日間投与した。投与後、麻酔下で血液及び大腿骨骨髄を採取し、血球数及び骨髄細胞数、骨髄像、単球及び骨髄マクロファージの遊走能(ケモタキシス法)、Ca量(fura-2を用いる蛍光法)、cAMP量(イムノアッセイ法)、プロテインキナーゼ(PKA及びPKC, いずれもイムノアッセイ法)活性値、ペルオキシダーゼ(POD), エステラーゼ(EST)並びに酸性ホスファターゼ(ACP)活性値(いずれも比色法)を測定した。

〔結果と考察〕末梢血:MMC及びPHZ投与により貧血、5FU投与により白血球及び血小板数の減少が認められた。骨髄:MMC投与により有核細胞数及び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及び赤芽球系細胞数の減少(G/E比の上昇)、PHZ投与により有核細胞数及び赤芽球系細胞数の増加(G/E比の低下)が認められた。末梢単球:MMC投与により遊走能、cAMP量、Ca量、PKC及びACP活性値の上昇並びにEST活性値の低下、5FU投与により遊走能、PKA、PKC、POD及びACP活性値の低下、並びにPHZ投与によりEST及びACP活性値を除く各パラメータの上昇が認められた。骨髄マクロファージ:MMC投与により遊走能、Ca量、PKA活性値及びACP活性値の上昇並びにEST活性値の低下、5FU投与により遊走能、PKC、POD、EST及びACP活性値の低下並びにPHZ投与では単球と同様の変化が認められた。

このように、単球及び骨髄マクロファージの酵素活性値は薬物によって異なる変動を示し、MMC及びPHZでは活性化されるが、5FUでは抑制されていると考えられた。

Levofloxacin によるラット好中球減少の検討

○宮本 恵美、加藤 道幸、菅原 正喜、野村 護

第一製薬、開発研究所、安全性研究センター

キノロン薬のラット経口反復投与毒性試験において、用量相関性がなく、骨髓の異常を伴わない末梢血好中球数の低下が認められるが、サルやイヌではみられない。その原因の一つとして、好中球マージナルプールの増加が疑われる。そこで、私達はラットからなるべく多くの好中球を回収する方法を検討し、それを levofloxacin (LVFX) 投与ラットに応用した。

【材料および方法】実験には Slc:SD 系の 7 週齢雌ラットを 1 群当たり 5 匹用いた。(実験 1) Pentobarbital 麻酔下で、頸静脈からまず 0.5 ml、続いて 1 ml を連続的に採血した。(実験 2) 0.5 ml を採血した後、左頸静脈からヘタスターチを 1.5 ml/min の速度で灌流しながら、右頸静脈から 5 ml ずつ連続的に採血した。(実験 3) 対照群には 0.5% CMC を、投薬群には LVFX 300 mg/kg を 1 週間経口投与し、実験 2 と同様に、0.5 ml および 20 ml 採血した。各実験で採取血液中の白血球数および好中球数を測定した。

【成績】採血可能量は、実験 1 では 5 ml、実験 2 では 20 ml であった。両実験で連続採血に伴い、白血球数および好中球数は低下したのに対して、好中球比率は上昇した。回収できた平均総好中球数およびその体重換算流血中総好中球数に対する割合は、実験 1 では 3.56×10^6 および 27.9%、実験 2 では 6.33×10^6 および 57.1% であった。実験 3 では、血液 0.5 ml 中の好中球数は LVFX 群では対照群の約 1/2 に低下したが、20 ml 中の総好中球数は両群で同等であった。

【まとめ】連続採血による好中球比率の上昇は、マージナルプールからの好中球の動員を示唆するものと思われる。今回の成績から、LVFX はラットで好中球のマージナルプールを増加させる可能性が示唆された。

ラットにおける血漿中エリスロポエチン濃度の
週齢差、性差及び食餌の影響

苗代一郎，吉岡 勝，茶谷文雄，

佐藤秀蔵，佐々木隆造*

武田薬品・薬安研，*京都大学・農・食化

【目的】 エリスロポエチン(EPO)は糖蛋白質ホルモンであり、赤血球の産生を調節する最も重要な因子である。それゆえ、薬剤による貧血の発現機序を調べる場合には、血漿中EPO濃度の動きを把握することが重要であると考えられる。そこで、我々は、基礎的検討として、ラットにおける血漿中EPO濃度の週齢差、性差及び食餌の影響について検討した。さらに、溶血性貧血を惹起するフェニルヒドラジン(PH)投与後の血漿中EPO濃度の変動についても調べた。

【方法】 5～19週齢のF344/Jc1雌雄ラットを用いて、血漿中EPO濃度をEIA法(イムノリット・EPO, 東洋紡)により測定した。また、PHの30mg/kgを7週齢の雄性ラットに単回皮下投与して、赤血球数、網状赤血球数及び血漿中EPO濃度を経日的に調べた。

【結果】 血漿中EPO濃度は雄の方が雌に比べて高く、絶食により速やかに低下した。雄性ラットにおいて、成長期には体重の増加と共に赤血球数の増加がみられ、一方、EPO濃度は5週齢から10週齢にかけて低下し、10週齢以降19週齢までほぼ一定の値を示した。また、PHの単回皮下投与により、投与24時間後に赤血球数の低下並びに血漿中EPO濃度の著しい上昇が認められた。その後、EPO濃度は徐々に低下し、2週間後にはほぼ投与前のレベルに回復した。

これらの成績から、薬剤による貧血の発現機序検討のひとつとして、血漿中EPO濃度の推移を調べるのが有用であることが示唆された。また、その際にはラットの週齢、性及び食餌条件を充分に考慮する必要があることが確認された。

分泌期エナメル芽細胞のゴルジ装置に対するフッ素の影響
—HRP標識レクチンによる組織化学的研究—

○松尾三郎、 清宮健一、 暮部 勝

大阪府立大・農・獣医・毒性

エナメル質の石灰化不全を伴う斑状歯が地域性に見られ、その原因物質が地域の飲水を汚染しているフッ素であることは古くから知られている。以来、多くの研究がなされてきているが、その作用機作はまだ不明である。ラットを用いたNaF投与によるエナメル芽細胞の形態変化に関しては、細胞質内での異常な顆粒や空胞の形成が一致して見られているが、ゴルジ装置の変化については一致していない。本研究では、フッ素の細胞毒性を明かにする一端として、NaFを投与したラット切歯の分泌期エナメル芽細胞を用いて、ゴルジ装置に対するフッ素の影響をレクチン細胞組織化学により調べた。〈材料および方法〉8週齢Wistar系ラットを用い、6.31mMおよび12.62mMの割合でNaFを含む水道水溶液を飲水として4週間与えた。投与後切歯歯胚を固定・脱灰し実験に供した。レクチン染色は、70umのピプラトーム切片をHRP標識レクチン(Con A, GS-I, SBA, PNA, WGA)と4°Cで一晩反応させた後にDAB反応を行い可視化した。〈結果と結論〉NaFを投与した個体の分泌期エナメル芽細胞では、Golgi stackの走行の乱れや小片化が一部で見られ、小片化したGolgi stackではsaccule数が減少し、その周辺で小胞の集積を伴うものも見られた。また、一部のGolgi stackではGolgi sacculeの拡張や断片化もみられ、ゴルジ装置のcisおよびtrans野においてGS-I, SBA, PNAに陽性を示す小胞や空胞が見られることもあった。細胞質内に貯留した異常な顆粒や空胞でのレクチンの染色性は、顆粒の性状により異なり、Con Aは大型空胞で、GS-IやSBAは電子密度の高い大型顆粒でも強い染色性を示した。さらに、ゴルジ装置周辺での小胞の集積も見られた。これらのことは、NaFがゴルジ装置を障害することを示し、このNaFによるゴルジ装置の障害には、 AlF_4 により活性化されるtrimeric G蛋白の小胞輸送に対する作用が関与しているものと考えられる。

抗凝固薬DX-9065aの膵臓に及ぼす影響

土屋俊也、大野広志、樫田陽子、源田百合、吉池通晴、
野村 護

第一製薬（株） 開発研究所 安全性研究センター

<目的> トリプシン阻害剤をラットに経口投与するとfeedback機構が発動し、血中に分泌されたコレシストキニン（CCK）の栄養効果により、膵の肥大、外分泌亢進がおこることが知られている。また、この作用はイヌ、サルでおきにくく、ヒトでもおきにくいと考えられている。抗凝固薬として開発中のDX-9065aは、相対的に軽度ではあるがトリプシン阻害活性も有していることが明らかとなっている。そこで、今回、本薬剤の膵臓に及ぼす影響について、蛋白分解酵素阻害剤であり、膵炎の治療剤として使用されているcamostatと比較検討した。

<方法> ラット膵液を用い、in vitroにおけるトリプシン阻害作用をBAPNAを基質として測定し、Dixon-plotから阻害定数を算出した。CD系ラットにDX-9065aおよびcamostatを経口反復投与し、膵臓重量、膵臓中の蛋白量、酵素活性（trypsin, chymotrypsin, lipase, amylase）の測定および組織学的検査を行った。膵外分泌への影響を評価するためラットの総胆管の肝接合部および十二指腸開口部にカテーテルを挿入し、膵液を胆汁と分離して採集し、膵液量および蛋白量を測定した。また、消化管ホルモンであるCCKの血中濃度をRIAを用いて測定した。

<結果> DX-9065aのラット膵液中のトリプシンに対する阻害定数は約 $1 \mu\text{M}$ であった。DX-9065aの経口反復投与により、用量依存的な膵臓重量の増加および組織学的には膵腺房細胞の肥大が認められた。この変化は休業により回復傾向が認められ、可逆的な変化であった。DX-9065aおよび等モル量のcamostatの投与により、膵臓中の蛋白量、trypsin、chymotrypsin、lipase活性の増加が認められ、その程度はcamostatの方がやや強い傾向であった。DX-9065a投与により覚醒ラットにおいて膵液量および蛋白分泌量が増加した。また、血中CCK濃度を経時的に測定した結果、投与後30分より増加し、3時間においても高値を示した。

<まとめ> DX-9065aの経口投与による膵の肥大作用は、camostatと同様にトリプシン阻害作用によるCCKを介したfeedback機構が関与しており、膵臓の障害性を示すものではないことが明らかとなった。

ハムスターBOP誘発膵萎縮に対するトリプシンインヒビターの影響

古川文夫、西川秋佳、池崎信一郎、高橋道人

国立衛生試験所 病理部

ラットにトリプシンインヒビター(TI)を投与すると膵腺房細胞のチモーゲン顆粒、DNA量、RNA量、蛋白量等が増加し、膵は腫大する。また、TIはラットの膵腺房細胞腫瘍の発生を促進し、ハムスター膵管癌の発生を抑制することが明らかにされている。一方、ニトロソアミン投与ハムスターには膵管腫瘍の発生のほかに、脂肪浸潤を伴った高度の外分泌組織の萎縮が認められる。この萎縮がTIによって影響を受けるか否かを究明する目的で、大豆粗製トリプシンインヒビター(SBTI)ないし合成トリプシンインヒビター(camostat)をニトロソアミンと併用投与することにより検討した。

動物は5週齢の雌シリアンゴールデンハムスターを用いた。実験は5週間にわたり5%SBTI添加飼料を与えた群と500ppm camostatを与えた群を設け、各群の約半数の動物に10mg/kg N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP)を週1回、5回投与した。その他に、BOPのみの群を設け、実験開始から30週間後に屠殺・解剖し、膵を中心に病理組織学的に検索した。一方、外分泌腺の萎縮の程度は脂肪浸潤を指標として画像解析装置にて計測した。その結果、外分泌腺の萎縮はBOP群に比しBOP+SBTI群では有意に軽減したが($p<0.01$)、SBTI群とBOP+SBTI群との間に差は認められなかった。一方、BOP群とBOP+camostat群では差はみられなかった。

TI作用はSBTIに比してcamostatの方が遙かに強く、また膵管癌の抑制効果も強い。しかし、外分泌組織の萎縮に対してはSBTIにのみ抑制効果が認められたことから、SBTIのTI以外の含有成分が外分泌腺の萎縮に対して影響を与えた可能性が示唆された。

カルバメート系農薬の遊離肝細胞およびSIRC細胞に及ぼす影響

○宮島 敦子, 簾内 桃子, 張 宝旭, 大野 泰雄, 高仲 正

国立衛生試験所・薬理

カルバメート系農薬は、殺菌・殺虫・除草剤として用いられており、その作用機序として神経伝達阻害、細胞分裂阻害等が知られている。一方、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いる。そこで、これらの分解・代謝物を含めた安全性評価法開発の一環として、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、カルバメート系農薬の作用を検討し、ウサギ眼角膜由来細胞株(SIRC細胞)への作用と比較することにより、直接または代謝活性化を介する毒性の有無を考察した。

〔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農薬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。GSH含量はo-Phthalaldehydeを用いた蛍光法により測定した。SIRC細胞に対する毒性は、96 well plateを用い、Crystal Violet 染色法により測定した。

〔結果・考察〕Swep(MCC), Diethofencarb(DFC)およびその代謝物である3-OH DFCはいずれも、1 mMでは遊離肝細胞の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Benfuracarb(BFC), Alanicarb(ALC)では、投与直後から遊離肝細胞のGSH含量が減少し、続いてViabilityが低下した。またSIRC細胞においても細胞増殖が強く抑制された。これらはGSHがBFC, ALCと直接化学的に反応したためと考えられた。遊離肝細胞においてEthiofencarb(ETC), Isoprocarb(MIPC)ではGSH含量のみが減少し、Mefenacet(MFC)ではGSH含量の減少に遅れてViabilityが緩やかに低下した。SIRC細胞に対しては、ETC, MIPC, MFCはいずれもほとんど影響を与えなかった($EC_{50} > 1\text{mM}$)。このことからMFCの肝細胞毒性の発現の機構には代謝活性化が関与している可能性が示唆された。また、農薬の細胞毒性発現コリンエステラーゼの阻害作用は直接結びつくものではないと考えられた。以上より遊離肝細胞とSIRC細胞を用いて細胞毒性を比較検討することは、代謝活性化を含めた毒性の評価に有用であると思われた。

カルバメート系農薬の初代培養肝細胞におよぼす影響

○簾内 桃子, 宮島 敦子, 張 宝旭, 大野 泰雄, 高仲 正

国立衛生試験所・薬理

農薬は散布後、日光や植物あるいは微生物によって分解されるが、農薬とその分解・代謝物の一部は農作物、大気および土壤中に残留するため、人体と他の生態系への影響が懸念されている。そこで、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、カルバメート系農薬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ゲナーゼ灌流法により調製した遊離肝細胞をコラーゲン塗布培養皿上で牛胎児血清を含むWilliam's E倍地 (2×10^6 cells/60 mm dish)で培養した。カルバメート系農薬は培養3時間目から添加した。細胞毒性の指標として培養液中のLDH活性を、薬物代謝酵素の指標として細胞ホモジネートの105,000gで60分間、超遠心分離した沈澱画分の7-Ethoxycoumarine O-deethylation(EC)活性を測定した。

[結果と考察] 培養48時間における総LDH活性は、Alanicarb(ALC)とSwep(MCC)において特に高く、ALCは62.5 μ Mから、MCCとDiethofencarb(DFC)は250 μ Mから用量依存的に活性の上昇が認められた。DFCの3位水酸化体(3-OH DFC)とMefenacet(MFC)は、500 μ MでLDH活性の上昇が認められた。また、Isoproc carb(MIPC)とEthiofencarb(ETC)では1000 μ MにおいてLDH活性の上昇傾向が認められた。培養48時間で高い総LDH活性が見られたALC, MCCおよびDFCは、培養24時間において既に高い活性が認められていた。一方EC活性は、ALCでは62.5 μ Mから強い低下が見られ、LDH活性の結果との間に密接な関係が認められた。使用した他のカルバメート系農薬においてもEC活性の低下が観察された。以上の結果から、ALCによるEC活性の低下は、細胞毒性に由来すること、また、MCCとDFCに関しては、遊離肝細胞系と異なり、初代培養肝細胞系において細胞毒性が認められた。

肝炎自然発症LECラット肝におけるカルボキシル エステラーゼの発現と制御機構の特異性

○細川 正清、西矢 剛淑、佐藤 哲男

千葉大・薬・薬物

【目的】 演者らは、これまで哺乳動物肝ミクロゾーム画分よ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カルボキシルエステラーゼ (CEase) を精製し諸性質について詳細に検討してきた。今回、新たに肝炎自然発症モデルであるLECラット肝より2種のCEaseアイソザイム (RHlec, RLlec) の精製に成功し、諸性質について検討するとともに、発育段階や肝炎発症時における含量の変化およびLECラットにおけるCEaseアイソザイムの特異的発現に関して詳細に検討した。

【方法】 動物は、LECラットその他、対照としてLEA, SD およびF344系ラットを用いた。酵素の精製は、肝ミクロゾーム画分をコール酸で可溶化後、Sephadex G-150 ゲル濾過、DE -52イオン交換、クロマトフォーカシングおよびHypatite Cを用いて行った。また、CEaseの定量は Western blot 法により行なった。

【結果・考察】 CEaseのアイソザイムパターンをPAGE-Esterase 活性染色法により比較したところ、LECラットにおいて他の系統では検出されない新規アイソザイムの存在が示された。また、CEase RH1 についても、LECラットとSDラットでは移動度に差異が認められた。そこで、差異を示す2種のCEaseアイソザイム(RLlec, RHlec)の精製を行ない特性を調べた。その結果、新規アイソザイムRLlecはSD系ラットにおいてペルオキシゾーム増殖剤により新たに発現するCEaseRL4と、物理化学的特性において高い相同性を示し、SD系では誘導型のアイソザイムがLECラットでは常在型として存在していることが明らかとなった。また、RHlecについてもRH1とN-末アミノ酸配列を含めて高い相同性を示した。これら2種のCEaseについて、発育段階や肝炎発症時における変動を調べたところ著しい差異が認められ、制御機構が互いに異なる可能性が示された。さらに、RLlecの発現量は、肝炎発症直前の14週齢で最大となることから、RLlecの発現と肝炎発症との間には共通の機構が存在する可能性が示され、肝炎発症のマーカーとしての有用性が期待されている。

肝炎自然発症LECラット肝細胞スフェロイドの
作製とその長期培養について

○吉沢正純、上野光一、小林明子、遠藤健一、佐藤哲男

千葉大・薬・薬物

【目的】 演者らはこれまで本会学術年会において、温度感受性ポリマーを用いたラット肝細胞スフェロイド形成法について報告してきた。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、肝細胞の長期間培養が可能である。今回、肝炎自然発症LECラット肝細胞を用いた長期間スフェロイド培養法を開発し、銅添加による障害性についても検討したので報告する。

【方法】 8～9週齢のLECラット（日本チャールスリバー）を用い、コラゲナーゼ灌流法および遠心分離法により単離肝細胞を実質細胞(PC)と非実質細胞(NPC)とに分けて分取した。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PC:NPC=1:5の比率で直径8mm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疎水性培養皿中で浮遊培養し、自発的にスフェロイドへと収縮凝集させた。細胞シート剥離後5日目のLEC肝スフェロイドに0～1mMの塩化銅を暴露し、その肝障害性を検討した。

【結果および考察】 8～9週齢のLECラット肝より回収されるNPCは、同週齢のSD系ラットのその1/3以下であったが、細胞シートの収縮はやや遅いもののスフェロイドは形成され、2か月の長期培養が可能であった。しかるに、11週齢以上のLECラット肝細胞はスフェロイドを全く形成しなかった。このことから、LECラットは、肝炎発症以前から肝細胞に変異が生じていることが示唆された。一方、塩化銅2日間暴露による肝障害性を検討した結果、LECラット肝細胞スフェロイドの銅による障害性は、SD系ラット肝細胞スフェロイドのそれよりも重篤であった。この結果、培養系においてもLECラットは銅に対する感受性がSD系ラットに比べてより高いことが分かった。

LEC ラットの肝における活性酸素種の 生成機序とその影響

山本秀樹¹、升田真木彦、数坂昭夫、藤田正一

北大・獣医・毒性、¹三共（株）

〔目的〕 LEC ラットは、北海道大学で樹立されたミュータントストレインであり、肝炎、肝癌を自然発症する。最近、この肝炎の発症が、肝での銅の蓄積と関係することが明らかにされている。今回、我々は銅の過剰蓄積により生成されてくると考えられる活性酸素種（ROS）に着目し、その生成機序の解明を目的とした。

〔方法〕 グルタチオン（GSH）含量とその関連酵素である γ -Glutamyltranspeptidase（GGT）、Glutathione Reductase（GSSG-R）、Glutathione Oxidase（GSH-Ox）活性、抗酸化酵素である Glutathione Peroxidase（GSH-Px）、Catalase 活性を常法により測定した。また、脂質過酸化量は TBA 法により求めた。

〔結果及び考察〕 LEC ラットでは血清 GOT、GPT 値の上昇に伴い、肝での GSSG/GSH 比、GGT、GSSG-R 活性が上昇しており、GGT 活性と GSSG/GSH 比は高い相関を示した。また GSH-Ox 活性も対照の Wistar ラットに比べ高値を示した。これらから、LEC ラットでは肝傷害の進行に伴い GGT または 2 価の銅の触媒によって GSH が GSSG に酸化される過程で生じる $O_2^{\cdot -}$ の生成量が上昇していること、また GSH-Px、Catalase 活性が低下していることから $O_2^{\cdot -}$ から生じる H_2O_2 が蓄積することが考えられた。

さらに、肝傷害度の高い LEC ラットでは、肝サイトソル画分で過酸化脂質量が増加しており、EDTA、抗酸化酵素、ラジカルスカベンジャーを用いた阻害実験と ESR 解析による結果から OH^{\cdot} が脂質の過酸化を起こしているものと考えられた。

以上の結果より、LEC ラットでは銅の過剰蓄積により誘導されてくると考えられる GGT により GSH が分解されて生成する cysteinylglycine、または GSH が銅の触媒により酸化される過程で生じる ROS、特に OH^{\cdot} の上昇により、サイトソル画分で過酸化脂質量が増加するものと推測された。さらに、この増加が肝炎発症ひいては肝癌発症に関連している可能性が考えられた。

ラット肝細胞スフェロイド培養法を用いたアレルギー性肝障害モデルの作製

遠藤健一、小林明子、上野光一、吉沢正純、佐藤哲男

千葉大・薬・薬物

【目的】 演者らは昨年の本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Corynebacterium parvum (C. parvum)-LPS誘発による実験的急性肝障害モデルの作製について報告した。今回、C. parvumと同様な作用を示すことが知られているPropionibacterium acnes (P. acnes)を用い、P. acnes-LPS誘発アレルギー性肝障害を作製し、その生化学的性質について検討したので報告する。

【方法】 9週齢のSD系ラットを用いた。P. acnes 1 mg静注4日後に型通りに肝細胞を実質細胞(PC)と非実質細胞(NPC)とに分けて分取した。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PC: NPC=1:5の細胞比率で播種し、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疎水性培養皿中で浮遊培養し、自発的にスフェロイドへと収縮凝集させた。LPSは、細胞シート剥離後5日目に培地中に添加し、P. acnes-LPS誘発による肝障害性を評価した。

【結果および考察】 C. parvumと同様な作用を持つことが知られているP. acnesを用いて感作した場合、in vivoではP. acnes 1 mg以上の投与量で、4日後にLPS 10 µg静注により重篤な肝障害が誘発された。in vitroにおいても、P. acnes前処置ラット肝細胞スフェロイドに対して、LPS 10 µg/ml添加により培地中へのGOT, GPTおよびLDHの著しい漏出がみられた。この結果、in vitroモデルにおいても、P. acnes-LPS肝障害モデルをC. parvum-LPS肝障害モデルに代わる系として用いることが可能であることが分かった。さらに、本肝障害モデルを用いて種々の薬物の抗肝炎作用を検討したので、併せて報告する。

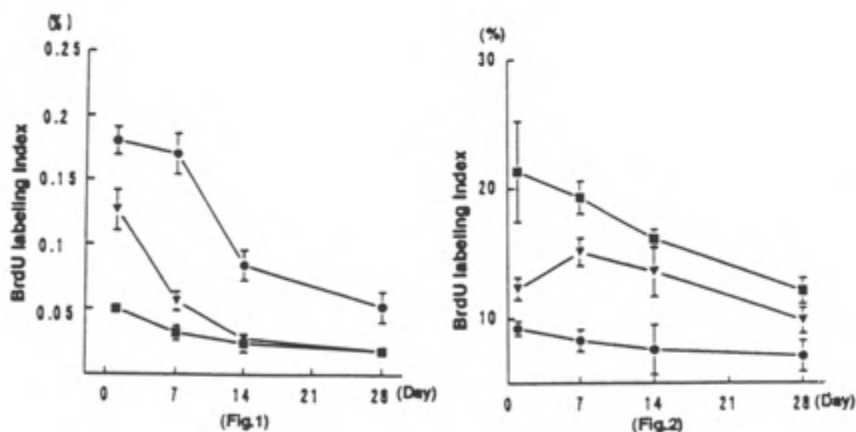
肝細胞のBrdU取り込みに及ぼすT-2 toxinの影響

李 旻宰、河村晴次、板垣慎一、土井邦雄

東京大学 農学部 実験動物学教室

我々は第3回日韓毒学会シンポジウムで、2つの実験系（肝部分切除および四塩化炭素誘発小葉中心性壊死）を用いて、T-2 toxinの肝細胞増殖抑制効果について報告した。今回、T-2 toxin (0, 2, 4 mg/kg)をマウス (ICR:CD1, 雄5週齢)に最高28日間連続経口投与し、その間経時的に屠殺して、肝臓の組織 (in vivo) およびそれぞれの時点でマウスから分離した肝細胞の初代培養 (in vitro, 24時間) でBrdUの取り込みを調べた。

in vivoではどの時点でも用量依存性にBrdUの取り込みの抑制が見られた (Fig.1)。それに反して、in vitroでは用量依存性のBrdUの取り込みの増加が観察された (Fig.2)。このようにT-2 toxinを投与されたマウスから分離した肝細胞で、BrdUの取り込みが用量依存性に増加したことは非常に興味深い。現在その機序について検討中である。



(● : 0、 ▼ : 2、 ■ : 4 mg/kg)

KOSMART法 (コラーゲン合成酵素の新測定法)
により測定したラットの四塩化炭素誘発線維症肝
における Prolylhydroxylase (PH) 活性

○大林久雄¹⁾ 柴田徹一²⁾ 齊藤眞一³⁾ 大谷卓司¹⁾ 笹森裕子¹⁾
大浦聖子¹⁾ 長野嘉介¹⁾ 山内勝彦¹⁾ 奥平雅彦¹⁾ 松島泰次郎¹⁾

1)日本バイオアッセイ研究センター, 2)慶應義塾大学医学部,
3)上智大学理工学部

【目的】 我々は、型別コラーゲン代謝の酵素学的研究で分解酵素に較べ遅れている合成酵素の問題点の克服を目的とし、まずコラーゲン合成を律速する酵素 (PH) の新測定法を開発した (KOSMART法と命名:114回日本薬学会に発表)。本研究は KOSMART法の最初の応用例である。即ち、四塩化炭素誘発線維症肝に於てPHの経時的活性変化量を測定し、病理組織学的所見での線維化進捗状況と比較した。

【方法】 9週齢のSD系雄性ラット (BW:約300g) 50匹を実験群と対照群の2群に分けた。実験群には四塩化炭素とオリーブ油の1:1(v/v)混合液を1ml/kg, 対照群にはオリーブ油のみを1ml/kg, 週2回, 3~15週間皮下注射した。3週間隔で両群5匹ずつ屠殺し、肝臓を摘出後保存 (-80℃) した。それらのPH活性を KOSMART法で測定した。基質はI型コラーゲンを合成するラット尾腱より調製した。

【結果・考察】 各週の肝PH活性 (対照群PH活性/実験群PH活性 (t検定危険率):単位;THO-dpm/mg. protein) は、3週で2430/2680, 6週で2450/3030 (p<0.01), 9週で2430/3070 (p<0.001), 12週で2580/3180 (p<0.01), 15週で2530/3730 (p<0.05)であった。実験群のPH活性値は四塩化炭素の投与回数と経過日数に対応した増加を示した。肝の病理組織診断では、投与3週目には中心静脈周囲の脂肪化と軽度な線維化が早くも観察され、投与回数を増すごとに線維化は顕著となり典型的な肝線維症像がみられた。最終の15週目で肝のほぼ全域に偽小葉形成を認める肝硬変像を呈する例も認められた。以上の様に、四塩化炭素の投与回数に対応して肝のコラーゲン合成能は増加し、線維蓄積の増加が認められ、従来報告とよく一致した結果であった。本法 (KOSMART法) は従来法の30倍 (600検体) 処理可能で、系統的に線維症や変性疾患に於けるコラーゲン合成能の定量的把握が可能となった。

四塩化炭素障害ラット肝における脂質過酸化生成物
4-hydroxynonenalの局在

○西川秋佳¹、古川文夫¹、三井雅之¹、榎並倫宣¹、
豊國伸哉²、内田浩二³、高橋道人¹

¹国立衛試・病理、²京大・病理、³名大・食品機能

【目的】肝毒性物質である四塩化炭素は、その毒性発現に脂質過酸化が関与することが示唆されており、脂質過酸化の過程で生成する幾つかの代謝産物が実験動物において生化学的に証明されている。4-hydroxynonenal(HNE)は脂質過酸化の主要な最終産物の一つであり、四塩化炭素により傷害された肝組織においても著明に増加することが示されているが、毒性発現との因果関係については明らかにされていない。今回、四塩化炭素を投与したラット肝の組織学的変化を経時的に観察するとともに、HNEの蛋白付加体に対する抗体を用いてその局在について検討した。【材料と方法】13週齢のF344雄ラットを各群30匹ずつ3群に分けた。第1群と第2群には、オリーブ油に溶解した四塩化炭素を、体重kg当たり3200mg及び1600mgの用量で強制経口投与し、第3群にはオリーブ油のみを投与した。投与2,4,6,24,48および72時間後に各群5匹ずつを経時屠殺し、肝をメタカーン固定後、病理組織学的に検索するとともに、抗HNE/KLH抗体を用いて免疫組織化学的に検索した。【結果と考察】実験期間中に死亡動物はみられなかった。好中球の浸潤を伴う明らかな肝壊死は、24時間後に観察され、以後回復の傾向を示した。HNEは正常の肝実質においては、小葉中心性にやや強いが、ほぼびまん性の軽度の染色性を示した。一方、四塩化炭素を投与したラット肝では、2時間後において既にHNEの局在の変化、即ち小葉辺縁部ないし中間帯への移行が観察された。以上より、HNEの免疫組織化学的証明は、肝障害の発現に対する早期の有用な指標になり得ることが示唆された。

グルコースの過剰摂取は肝毒性を増強する？

- 田中宏治，寺西宗広，高岡雅哉，矢本 敬，大橋芳彦，
山下和男，木村邦男，真鍋 淳

三共（株）安全性研究所

グルコースを過剰摂取（負荷）したラットではアセトアミノフェン（APAP）の毒性が著明に増強する（LD₅₀ 値にして約 2 倍）との報告が昨年の米国毒性学会でなされた（Mehendale ら，1993）。そこで、① グルコース負荷が APAP 以外の肝毒性物質（プロモベンゼン：BB）の毒性を増強する可能性、② Mehendale ら（1993）が毒性増強の原因と考えている、グルコース負荷の肝細胞再生に対する抑制作用を検索した。

（材料および方法） グルコース負荷：飲水として 15% グルコース溶液をラットに 1 週間自由に摂取させた。その後、以下の 2 種の実験（BB 投与、肝切除）を行い解剖時点まで飲水投与を継続した。対照群には水道水を与えた。BB 投与：0、100、200、400、及び 800 mg/kg を腹腔内投与後、24 時間目に採血し、血清生化学的検査を実施した。肝切除：肝臓の約 2/3 を部分的に切除（PH）後 0、2、4 及び 7 日目に採血後解剖し、血清生化学的検査、肝臓重量測定、肝臓の生化学的検査及び肝細胞再生に注目した病理組織学的検査（BrdU 染色）を実施した。

（結果） BB 投与：肝細胞障害の指標である血清 GOT、GPT は、対照群（水道水投与群）と比較してグルコースを負荷した全 BB 投与群において高値を示した。また、グルコース負荷により肝細胞障害が増強されることが病理組織学的にも確認された。肝切除：対照群と比較してグルコース負荷群では PH 処置後の肝重量の増加が抑制され、分裂期肝細胞数が有意に少なかった。

（結論） Mehendale ら（1993）が報告したグルコース負荷の条件下では APAP のみならず BB の肝毒性が増強されることが明らかとなった。また、同条件は、彼らが毒性増強の主原因と考えている肝細胞の再生を抑制するだけでなく、再生に先行する肝細胞障害自体をも増強することが示された。

塩化トリブチル錫の初代培養肝細胞に対する細胞毒性と
カルシウム反応阻害の性質

朝生裕樹*、加藤誠司*、豊田和弘、畝山智香子、
川西 徹、百瀬和享*、高橋道人

国立衛生試験所・病理、*昭和大学・薬学・薬理

我々は昨年の本学会で、塩化トリブチル錫が肝細胞の細胞内遊離カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) を上昇させるとともに細胞毒性を示すこと、また、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を生じさせない低濃度の処置でもホルモン刺激による肝細胞のカルシウム反応を阻害することを報告した。今回、この細胞毒性とカルシウム反応阻害の性質についてさらに詳細に検討した。

【方法】コラゲナーゼ灌流法によりラット肝細胞を単離し、コラゲン塗布カバーグラス上で一晚培養した。 $[Ca^{2+}]_i$ は細胞内にfura-2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。細胞内ATP量はルシフェリン-ルシフェラーゼ法で測定し、細胞死はfura-2の漏出あるいはプロピジウムイオダイド染色法で判定した。

【結果】細胞を塩化トリブチル錫 $4\mu\text{M}$ で処置すると、10分から30分後に $[Ca^{2+}]_i$ はゆっくりと二層性に上昇し、30分以降に細胞死が観察された。細胞外の Ca^{2+} を除くと $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は抑制されたが、細胞死は抑制されなかった。一方、細胞内ATP量の変化を測定したところ、細胞死に先だって減少した。これに対し、塩化トリブチル錫 $0.1\mu\text{M}$ を30分間処置した細胞では $[Ca^{2+}]_i$ の上昇、形態変化、細胞死および細胞内ATP量の減少は認められなかったが、フェニレフリン $1.0\mu\text{M}$ および $100\mu\text{M}$ 、バソプレシン 10nM 、あるいはATP $1.0\mu\text{M}$ 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は抑制された。この抑制は処置時間を1分に短縮した場合は観察されず、また、トリブチル錫を洗浄除去して40分を経過しても回復しなかった。以上の結果より、

(1) 肝細胞におけるトリブチル錫の細胞毒性は $[Ca^{2+}]_i$ の上昇によるのではないこと、(2) 低濃度のトリブチル錫によるカルシウム反応の抑制は刺激剤に特異的なものではなく、生理的なカルシウム上昇反応の共通メカニズムに対する不可逆的な阻害であることが示唆された。

マウス脳組織コリン作動性神経機構に及ぼすトリブチルスズ投与の影響

増子かおり*、○小林晴男、鈴木忠彦、野中邦夫、
笠嶋快周、茂木 朗
岩手大・農・家畜薬理、*杏林製薬

アルキルおよびアリル有機スズが藻、貝類の付着を防ぐ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が懸念される。マウスに塩化トリブチルスズ(TBT)を経口投与し、脳組織コリン作動性神経活性に対する影響をin vitroでの作用と比較した。

成熟ICR系雄マウスにTBTを40 mg(ゴマ油溶液)/kg/dayを3日間投与した後24時間に屠殺して線条体、海馬および大脳皮質を摘出した。in vitroの実験は大脳皮質を用いた。

in vitroでは、TBTは 10^{-6} - 10^{-4} Mの濃度においてアセチルコリン(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)、同低親和性取り込み(LACU)、 ^3H -quinuclidinyl benzilate (QNB)のムスカリニックAChレセプターへの結合能および切片からのACh遊離に対して阻害作用を示したが、ACh分解酵素(AChE)活性には影響しなかった。TBT単回投与のLD₅₀値は471 mg/kgであった。致死量の投与によってマウスは後肢運動失調などの症状を示したが、40 mg/kg/dayの処置によっては体重の変化を含めて外見的变化は観察されなかった。コリン作動性神経活性は、線条体においてACh含量の低下およびAChE活性の上昇、海馬においてACh turnover rateの増加が認められた。ChAT活性、HACU、LACUおよび ^3H -QNB結合能はいずれの脳部位においても有意な変化は認められなかった。

TBT 40 mg/kgの1回投与後24時間の脳内TBT濃度は 10^{-6} - 10^{-5} Mであると考えられるが(Iwai et al., 1981)、今回の投与によって観察されたコリン作動性神経活性の変化は、TBTの直接的作用を示すには至らなかった。

カドミウム投与マウスの腎メザンギウム細胞IL-6による
腎尿細管細胞の増殖

○香山不二雄 1、吉田貴彦 2、児玉泰 1、Michael Elwell 3
Michael I.Luster 3

1 産業医大・衛生、2 東海大・医・環境保健、3NIEHS/NIH

目的：腎メザンギウム細胞は、IL1, TNF, IL6を産生するなど、腎炎発症・進展に深く関与している。今回、Cdによる腎病変と炎症性サイトカインの関与を明らかにするために、本研究を行なった。

方法：B6C3F1雌マウスおよびF344雌ラットにCdCl₂を急性および慢性投与し、腎臓の薄切培養培養上清中のTNFおよびIL6を測定した。病理組織はHE、PCNA、免疫組織化学染色(IL-6)を行なった。RT-PCR法にて腎臓サイトカインmRNAの発現を調べた。In Vitro実験では、メザンギウム細胞株(SV40MES13)からのIL-6、TNFの産生をELISAにて、豚近位尿細管細胞株(LLC-PK1)のIL-6による増殖反応を3H-thymidineの取り込みで調べた。

結果：急性および慢性実験でCd投与群の腎薄切培養上清中のIL6産生がLPS刺激により相乗的に上昇した。IL6およびTNFのmRNAが腎臓に発現され、免疫組織染色によりIL6がメザンギウム細胞由来であることが明らかとなった。慢性実験にて、腎重量比がCd群にて上昇していた。PCNA染色により陽性細胞が約80%増加していた。CdによりMES13からのIL6, TNFの産生増強、IL6によりLLC-PK1の増殖が誘導された。

考察：IL6はB細胞の成熟のほか、種々の細胞群の増殖因子としても知られており、Cd投与により腎メザンギウム細胞の炎症性サイトカイン産生が亢進し、Cdによる尿細管壊死後の尿細管上皮細胞修復機転にIL6が深く関与していることが示された。

Cd飽和メタロチオネインⅡの静脈内単回投与時における血漿、肝および腎でのCdの動態について

林 泰司，照井 潤，曾山 桃子，須藤 純一

北海道医療大学薬学部毒理学講座

〔目的〕 CdCl₂ あるいはCd飽和メタロチオネインⅡ (Cd-MT-Ⅱ) の静脈内投与時の血漿、肝および腎でのCdの動態の解析を行い、Cdによる腎障害機序の解明を試みた。

〔方法〕 ラットにCdCl₂ あるいはCd飽和メタロチオネインⅡ (Cd-MT-Ⅱ) を0.3 mg Cd/kg体重で静脈内投与し、経時的に血液（血漿）、肝および腎組織を得、Cd濃度（含量）を原子吸光光度計により測定し、Cdの動態を血漿では2-コンパートメント・オープン・モデル法そして肝および腎ではモデルに従属しないモーメント法を用いて解析した。

〔結果〕 血漿中のCdは投与後5分以内に急速に、それ以降は徐々に消失するのが認められた。 対照群に比し、Cd-MT-Ⅱ投与群はCdの分布容積、体クリアランスおよびβ相での半減期に関しては大きな値を示した。 Cdの取り込みは肝ではCdCl₂ 投与の方が大であり、逆に、腎ではCd-MT-Ⅱ投与の方が大であった。 Cd-MT-Ⅱ投与群では、腎のCd含量は投与後1日目で最大を示し、それ以降漸減した。 対照群に比し、Cd-MT-Ⅱ投与群ではCd含量-時間曲線下面積は大きく、滞留時間は短いことが判明した。 腎の病理組織学検査では、Cd-MT-Ⅱ投与群のCd含量が最も高く認められた投与後1日目で近位尿細管細胞の壊死および脱落が著しく認められた。

〔考察〕 以上の所見より、Cd-MT-Ⅱを投与した場合、腎の近位尿細管細胞に取り込まれたCdはその細胞の壊死および脱落により腎から消失するものと考えられた。

急性腹症として般内で集団発生した急性鉛中毒の
韓国人般員の一例

石橋 潤、秋久理真、荒木一夫

社会福祉法人聖母会聖母病院 内科

慢性の鉛中毒は職業曝露として報告例はみられるが急性鉛中毒の報告は本邦では希である。今回我々は韓国貨物船内で集団発生したと思われる急性鉛中毒の一例を経験したので報告する。症例は54才韓国人船長、既往症に特記すべきものなし、現病歴は平成元年3月15日頃にフィリピンに向け航海中13人の全クルー中数名のクルーと同様の腹痛、四肢筋肉痛出現する。5日後に痛みはピークに達し約2週間後に東京に到着するまで3、4名のクルーは途中下船し他院に入院していた。某救命救急センターに入院するが急性の腹部所見ないため本院内科に転院となる。入院時、意識清明で発熱なくバイタルサインも安定し腹部身体所見にも異常はみられなかった。画像診断も異常なく胃カメラも正常であったが、GOT102、GPT145、TB2.2mg/dlと軽度の肝障害がみられた。入院後も腹部所見に乏しい激しい腹痛が続くこと、Hbが12.8g/dlより8.8g/dlへ低下し塩基性斑点が出現したことなどより血中鉛濃度が測定され54 μ g/dlと明らかな上昇を示したことより急性鉛中毒と診断された。EDTAが3クール投与され血中濃度は正常化、尿中鉛排泄は最大7.2mg/日みられ徐々に腹痛軽快した。今まで調べた範囲で船内の急性鉛中毒集団発生の報告は本邦海外にみられず本例が第一例と思われる。船は、三か月前にドックにて修理を受けていたがその原因は不明であった。急性腹症が今回の集団発生の主症状であったが急性腹症の鑑別上、身体所見、画像診断上所見に乏しく頑固な腹痛が持続する場合には代謝性急性腹症のひとつとして急性鉛中毒も考慮すべき疾患と思われ報告する。

排泄障害ラットにおけるキノロン薬による痙攣誘発の検討

○赤羽 一美、加藤 道幸、大川原 聡、野村 護

第一製薬、開発研究所、安全性研究センター

キノロン薬は、臨床で肝や腎の障害をもつ患者にも投与され、その時の副作用が懸念される。そこで、本薬物の副作用としてよく知られている痙攣をとりあげ、その発現を正常ラットと排泄障害ラットの間で比較した。

【材料および方法】実験には 6 週齢の Slc:SD 系雄ラットを用いた。正常ラット（正常）は無処置とし、排泄障害モデル（排障）として、胆管を結紮し片腎を切除したラットを作製した。これらの動物に levofloxacin (LVFX) または ciprofloxacin (CPF) を単回静脈内投与（1 ml/min）または痙攣発生まで静脈内持続投与（0.5、1 または 2 ml/min）し、痙攣発生用量および死亡率を比較した。さらに、排障において投与速度の影響も検討した。

【成績】単回投与において、LVFX は 368 mg/kg で正常および排障で 0/7、1/7 例、450 mg/kg で 1/7、7/7 例に、一方 CPF は、368 mg/kg でそれぞれ 0/7、2/7 例、450 mg/kg で 4/7、4/7 例に痙攣を誘発した。死亡率は、CPF の方が LVFX よりも高く、また排障の方が正常よりも高かった。正常での持続投与において、痙攣誘発用量は投与速度の上昇に伴い低下し、両薬物間で差は認められなかった。しかし、2 ml/min での CPF 群の死亡率は LVFX よりも高かった。一方、排障における痙攣誘発用量および死亡率は、CPF では正常とほぼ同じであったが、LVFX では 1 および 2 ml/min で正常よりも低下した。

【まとめ】今回用いた排泄障害ラットにおいて、キノロン薬による痙攣は正常ラットよりも、また投与速度の増加により低用量で発現することが示された。また、LVFX と CPF の痙攣誘発に差が認められた。

β -ラクタム系抗生物質によるマウス痙攣誘発作用および
GABA 受容体結合阻害作用の検討

○都富 友美、北野 裕、西 敏之、赤羽 浩一

第一製薬(株) 探索第一研究所

〔目的〕近年、 β -ラクタム系抗生物質である Imipenem による痙攣の誘発が臨床において報告され、 β -ラクタム剤の中枢毒性が問題となっている。我々は、キノロン系抗菌剤とフェンブフェン併用における痙攣誘発作用に抑制性の神経伝達物質である γ -アミノ酪酸 (GABA) の受容体結合阻害が関与していることをこれまでに明らかにした。今回は、 β -ラクタム剤による痙攣誘発作用にも GABA 受容体結合阻害作用が同様に関与しているかを調べるために、大槽内投与方法によるマウス痙攣誘発作用および GABA 受容体結合阻害作用を用いて検討した。

〔方法〕痙攣誘発作用：3週齢の雄の ddY 系マウスを各群 8 匹使用した。マウスの大槽内に被験薬を $10 \mu\text{l}$ ずつ投与し、以後 3 時間、痙攣および死亡の発現時間と発現率を計測した。GABA 受容体結合阻害作用：ラット脳から調製した粗シナプス膜 (0.5 mg)、 ^3H -muscimol (10 nM) および被験薬 ($10^{-6} \text{ M} \sim 10^{-3} \text{ M}$) を 4°C で 30 分反応させ、ろ過法により特異的結合量を測定した。

〔結果〕強い GABA 受容体阻害作用を示したカルバペネム剤をマウスの大槽内に投与すると、 $0.5 \mu\text{g}$ の用量において全例が間代性痙攣を誘発し、そのほとんどが死亡した。また、中等度の GABA 受容体阻害作用を示した薬剤 (Imipenem, Cefazolin) を同様にマウスに投与すると、 $15 \mu\text{g}$ 以上の用量で用量に依存して間代性痙攣が誘発され、 $50 \mu\text{g}$ でほとんどが間代性痙攣を誘発して死亡した。一方、GABA 受容体阻害作用が弱かった薬剤 (Meropenem, AMA-3176, DX-8739 等) は、 $150 \mu\text{g}$ の高用量で一部に間代性痙攣を誘発したが、死亡は認められなかった。痙攣および死亡が発現するまでの時間は、薬剤の用量に依存して短くなり、投与直後から 3 分後および 1 ~ 10 分後にそれぞれの症状が発現した。

〔まとめ〕 β -ラクタム剤のマウス大槽内投与における痙攣誘発作用と、GABA 受容体結合阻害作用には高い相関が得られたことから、 β -ラクタム剤の痙攣誘発作用に GABA 受容体阻害作用が関与していることが示唆された。

グルホシネート・アンモニウムへ乳児期あるいは胎児期暴露ラットにおけるカイニン酸への反応変化

藤井儔子, ○大畑隆郎

帝京大学医学部薬理学教室

広く使用されている除草剤の1つグルホシネート・アンモニウム (GLA) はグルタミン合成酵素阻害作用を有することが報告されているので、幼若期あるいは胎児期にGLAに暴露したラットについてカイニン酸 (KA) への反応を検討した。

【方法】Wistar今道ラットを使用。1群は7日齢雌ラットに1日1回2 or 5 mg/kgのGLA (HPLC用標準品, 林純薬) 水溶液を7日間皮下注射し3週齢で離乳し6週齢でKAテストを行った。2群は妊娠13日から7日間2 mg/kg GLA皮下注射親の出生児雌雄につき5週齢でKAテストを行った。対照群には生理食塩液を皮下注射した。

【結果】①幼若期GLA 2 mg/kg群, 5 mg/kg群ともにKAによるwet dog shakes発現頻度が対照群より有意に減少した。2 mg/kgと5 mg/kg群間に差を認めなかった。KA投与60分後頃から発現するlimbic seizureがGLA群ではほとんど認められなかった。GLA 5 mg/kg群の体重は有意に小であった。②GLA-F₁の体重に変化を認めなかったがKA投与後60分間のwet dog shakes頻度は有意に減少した。また、痙攣発現時間と頻度は対照群とほぼ同じであったにもかかわらず24時間後の死亡例が多かった。

【考察・結語】ラットにおける経口LD50が約1.5 g/kgであるGLAの比較的低用量に乳児期1週間暴露3週後、あるいは大脳・海馬におけ神経形成期から出生前までの胎児期にGLA暴露をうけ5週齢に達した児が明らかなKAへの反応変化を示した。グルタミン代謝系の変化による脳機能発達の変化を示唆するものとする。

Neurotoxicological Alterations Induced by N-butyl benzenesulfonamide and Aluminum Chloride in Wistar Rats

Dae Hyun CHO, Se Jin HWANG, Won Yong LEE, Byung Woo MOON

Hwa Hwey MOON, Kang CHIN, Tae Soon CHO* and Jin Suk KIM**

*National Institute of Safety Research, *Sung Kyun Kwan University,*

***Kon Kuk University, Seoul, Korea*

N-butylbenzene sulfonamide(NBBS) and aluminum have been reported to induce various neurotoxicological alterations related with amyotrophic lateral sclerosis(ALS) and Alzheimer's disease(AD) in some experimental animals. To investigate the short and long term neurotoxic effects of NBBS and aluminum chloride in rats, male Wistar rats were treated with NBBS(300mg/kg, i.p., every 6 hour, for 30 hours), and long-term administrations of NBBS(300mg/kg, i.p., 3 times/week), aluminum chloride and calcitriol(0.1% in drinking water and 200ng/kg, s.c., respectively) and combined administrations of NBBS, aluminum chloride, and calcitriol(300mg/kg, 3 times/week, 0.1% in drinking water, 200ng/kg, s.c., every day, respectively) for 3 and 6 months were also performed. Neurological alterations in experimental animals were evaluated with clinical symptoms, monitoring of spontaneous motor activity, quantitative light microscopic image analyses of immunoreactivities of ChAT(choline acetyltransferase) in ventral horn of lumbar spinal cord, MAP-2(microtubule associated protein 2) in frontal cortex, and GFAP(glial fibrillary acidic protein) in dentate gyrus of hippocampus. Various neurotoxic symptoms including hindlimb paresis, decrease of motor activities and marked increase of ChAT immunoreactivities and decrease of MAP-2 were observed in short-term treatments of NBBS. Combined long-term administrations of NBBS and aluminum chloride induced the increase of ChAT and GFAP and decrease of MAP-2 immunoreactivities. It is consequently suggested that short-term treatments of NBBS induce marked neurotoxic effects on cholinergic lower motor neurons, however, neurotoxic effects of long-term administrations of NBBS and aluminum chloride are not related with cholinergic lower motor neurons, but related with long-term glial reactions in hippocampus in rats.

神経毒性学・神経薬理学研究での有用な
動物モデルとしてのTHAラット

吉田貴彦、相川浩幸、萩野智尉、重田定義、加藤秀樹*

東海大学医学部環境保健学部門、*実験動物中央研究所

我々はWistar ratからSidman avoidance学習試験に高学習成績を示す個体どうしの兄妹交配により生得的に高学習能力を示し、かつ個体差が小さい近交系を作成し、Tokai High-Avoider (THA) と命名した。このTHAは他の学習試験(shuttle avoidance, water maze)でも高成績・小個体差を示すことも確認しており、生得的に学習・記憶能力に優れた系であることが確認されている。同時に他施設で作成された同じWistar ratを母系とするWS ratが学習行動が低いことも我々によって明らかにされた。また、自由行動下においたratの線条体および大脳皮質のmicro dialysisによる各種中枢神経系伝達物質の測定の結果、アセチルコリンおよびモノアミン代謝物の放出量が両ラット系間に有意な差があることも判明した。さらに、in vitro中枢神経細胞培養系においても両ラット系には培養細胞生存性、軸策伸展性、神経ネットワーク形成性に有意な差が観察されている。現在THAとWSの両系ratを比較し高学習成績を示す機序について形態学的、生化学的および分子生物学的な検索中である。

我々はこのTHAラットを化学物質の神経毒性の研究に用いてきた。THAラットは生得的に高学習成績を示すので化学物質曝露前の学習訓練が不要なばかりか、個体差が小さいので感度良く神経毒性が検出できた。また特筆すべきことに、胎児後期から哺乳期にかけての中枢神経の発育期に対する化学物質曝露による神経毒性を検出することも可能となった。また、THAラットへのマイネルト核の破壊によって作成した実験的アルツハイマー型痴呆様ラットを用いた痴呆治療薬剤の効果判定実験にも、高学習成績かつ小個体差を示すTHAラットならではの優位性が確認されている。このようにTHAラットは神経毒性学的実験においての有害因子の感度良い検出、また神経薬理学的実験での模擬痴呆発症以前のレベルへの回復を観察することによる的確な治療効果判定を可能とし、非常に有用な動物モデルであると言えよう。

■一般口演■

●6月10日(金)

演題番号/A-1)~A-16)
B-13)~B-27)
C-13)~C-27)
D-11)~D-26)
E-11)~E-24)

5/6腎摘出ラットの腎機能の変化について-2

○ 灰田享子¹⁾, 最上昌輝¹⁾, 小林直美¹⁾, 中村聡子¹⁾, 吉田緑¹⁾,
川西広明¹⁾, 外尾亮治²⁾, 五十嵐章之²⁾

財団法人 動物繁殖研究所 ¹⁾安全性試験研究センター
²⁾実験動物研究センター

我々は、第20回本大会において慢性腎不全実験モデルの高度腎摘出ラットについて報告した。今回は、高度腎摘出ラットの死に至るまで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-Imanichiラット（雄）20例に、左腎の2/3と右腎の全摘手術（計5/6腎摘出）を1度に行った。この内の10例について術後26週目までの腎機能の変化を検討した。また、残りの10例については、術後26週目以降の臨床症状の経過と生存状況を観察した。

結果とまとめ：

- 1) 術後26週目まで全例が生存した。術後38週目までに、10例中8例が死亡した。
- 2) 5/6腎摘手術後2週目で糸球体濾過率（GFR）の低下および水分の再吸収率（FR(H₂O)）の低下が認められ、早期に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。術後4週目では、電解質（Na、k、Cl）の再吸収率の低下も認められた。
- 3) 術後6週目から10週目は、GFR、FR(H₂O)および電解質（Na、k、Cl）の再吸収率に回復傾向が認められた。
- 4) 術後10週目以降は再びGFRおよび水分および電解質の再吸収率が漸減に転じ、これにともない再び血清中の尿素窒素、クレアチニンおよびK濃度が漸増し腎不全に至る経過を示唆した。また、術後22週目以降では、血清中のIPが顕著な高値に転じた。
- 5) 一方、尿中のアルブミンを主体とする蛋白排泄量は、術後4週目以降に顕著に漸増し、糸球体の濾過機能にかかわる膜の異常が術後かなり早期から生じ、経時的に進行していることが明らかになった。
- 6) この他、術後26週目以降で一般症状の悪化により切迫殺した例では、高UN血症の他に著しい高IP血症と高Na血症が共通して認められた。よって、重篤な腎機能の障害が生じていることが推察された。死亡例では、腎臓の硬化と腎臓および心臓の白色沈着物が共通して認められた。さらに、病理組織学的検査についても報告する予定である。

プロゲステロン及び酢酸メドロキシプロゲステロン長期投与によるF344系雌ラットの慢性腎症に及ぼす影響

佐藤敦子、磯部充威、堀内敏、飯塚和弘、久田茂、伊藤清子、増田修治、吉田信也、星野敏也、鈴木稔

帝国臓器製薬株式会社 安全性研究部

【目的】慢性腎症はラットで自然発生する加齢性病変であり、グルココルチコイドやテストステロン等のホルモン、及び高蛋白飼料が病変の進行に関与すると考えられている。今回我々は、ゲスターゲンであるプロゲステロン(Pro)及び酢酸メドロキシプロゲステロン(MP)の長期投与がラットの慢性腎症に及ぼす影響を、生化学的及び病理組織学的に検討したので報告する。

【方法】試験には、5週齢のFischer344(F344)系雌ラットを用いた。Proは、胡麻油に懸濁して100mg/kg及び200mg/kgの用量で週に2回、104週間皮下投与し、対照群には胡麻油を同様に投与した。MPは300ppmの濃度で飼料に混入して104週間経口投与し、対照群には無添加飼料を与えた。投与期間中、定期的に24時間尿を採取し、総蛋白及びアルブミンを定量した。104週間投与終了後にペントバルビタールNa麻酔下で腹部大動脈より採血して血液生化学検査を行い、腎臓を摘出して病理組織学的検査を行った。

【結果及び考察】Pro投与群及びMP投与群で共に体重増加を認めた。尿中蛋白及びアルブミン排泄量は対照群でも加齢に伴い増加傾向を認めたが、両投与群では対照群を上回る増加を認め、特にMP投与群で顕著であった。血液生化学検査ではPro投与群で総コレステロールの上昇を、MP投与群で総蛋白及びアルブミンの低下、尿素窒素及び総コレステロールの上昇を認めた。病理組織学的には、Pro投与群で用量に依存して軽度から中等度、MP投与群で中等度から高度の慢性腎症の発現を認めた。以上より、Pro及びMPの長期大量投与は、F344系雌ラットの慢性腎症を増悪させることが判明した。

先天性水腎症ラットを用いたゲンタマイシン誘発腎障害の検討

○橋本英明、増田達樹、村上久子、高木英利、田内清憲

日本レダリー（株）生物研究所

腎臓は各種化合物の標的臓器になることが多く、腎の機能的変化を鋭敏かつ早期に検出することは腎毒性を評価するうえで重要な意味がある。生理的負荷を高める目的で人為的にネフロン数を減少させる部分腎摘出あるいは薬剤前処理動物も腎毒性を鋭敏に検出する実験系として使用されている。

今回我々は、腎実質組織が高度に欠損するにも拘わらず、正常腎にほぼ匹敵する糸球体濾過量および尿細管再吸収能を示す先天性水腎症ラットに対しゲンタマイシンを処置し、その腎毒性を正常ラットと比較したので報告する。

（方法）13週齢の片側性水腎症（UHN）、両側性水腎症（BHN）および対照（NC）としての正常Wistar-ImamichiラットにGentamicin 40mg/kg/dayを頸部皮下に14日間連続投与した。この間代謝ケージを用いて24時間尿を毎日採取し、尿量、ALP、LDH、NAG活性、グルコース、タンパク、クレアチニン濃度を測定した。また、投与前および最終投与終了翌日にエーテル麻酔下で採血し、血清クレアチニン濃度を測定し、クレアチニン・クリアランスを算出した。腎臓はH-E染色標本作製し、病理組織学的検査を実施した。

（結果）投与期間中の死亡率は、BHN:6/7例（85.7%）UHN:2/7例（28.6%）およびNC:0/7例（0%）であった。ALPの尿中排泄活性値は投与期間中2峰性のピークを示した。LDHおよびNAGの尿中排泄活性値のピークは、BHN、UHN、NCの順に早く現れ、1日当たりの排泄量もBHNおよびUHNでは明らかにNCを上回っていた。タンパクおよびグルコースの尿中排泄はUHNで最も著しく、ピークを示した投与8日および10日における排泄量はそれぞれ約170mg/dayおよび300mg/dayに達した。

（結論）以上の結果から、先天性水腎症ラットはゲンタマイシンに対し、高い感受性を示すことが明らかになった。従って、本症ラットは腎毒性の鋭敏な検出系として、および腎障害患者における薬物の安全性情報を得るうえで有用なモデル動物であると考えられた。

A-4)

セファロリジンのLLC-PK1細胞障害に対するプロテインキナーゼCおよびホスホジエステラーゼ阻害薬による軽減

○河合悦子、玄番宗一

大阪薬科大学第二薬理学教室

〈目的〉セフェム系抗生物質セファロリジン(CER)による腎障害にフリーラジカルの関与が考えられている。最近、肝細胞や腎糸球体において、フリーラジカルや過酸化脂質の生成に、サイクリックAMP(cAMP)やプロテインキナーゼC(PKC)が影響すると報告されている。そこで、今回我々は培養腎上皮細胞株LLC-PK1細胞を用いて、CER細胞障害に対するPKC阻害薬H-7とホスホジエステラーゼ阻害薬isobutylmethylxathine(IBMX)の効果について検討した。

〈方法〉LLC-PK1細胞を培養しコンフルエンスに達してから、CERを培養液中に添加した。障害の指標としての細胞から培養液中への乳酸脱水素酵素(LDH)の遊離量、細胞内グルタチオン(GSH)量及びcAMP量を測定した。なお、H-7はCER添加30分前から、IBMXはCER添加2時間前から培養液中に存在させた。

〈結果〉培養液中にCERを添加すると、細胞から培養液中へのLDH遊離の増大がみられ、細胞内GSH量は低下した。CERによる障害は、細胞内GSHを減少させると増強されラジカル捕捉剤dimethylthioureaにより軽減された。H-7は、CERによるLDH遊離の増大を著しく抑制しGSH量の低下を回復させた。IBMXは、細胞内cAMP量を増大させ、CERによるLDH遊離の増大を、H-7と同様に著しく抑制した。

〈考察〉培養腎上皮細胞株LLC-PK1細胞において、CERによる障害にフリーラジカルが関与すると思われる。このような障害がH-7やIBMXにより軽減されたことから、酸化的ストレスによる腎細胞障害に対して、cAMPは防御因子として、PKCは障害因子として作用すると考えられる。

ラットにおける尿分析値の性差について (3) 雄の去勢による尿分析値の変動に対するテストステロンの影響

山田久陽, ○杉浦正幸, 村上美穂子, 大島 隆, 中根貞雄

大正製薬(株) 総合研究所 安全性研究部

毒性試験に用いられるラットにおいてテストステロン(TS)が肝臓の α_2 -globulin合成を促進し, 雄で特徴的な尿タンパク排泄を示すなど, 尿生化学分析値に性差がみられることが知られている. 我々は尿分析値の加齢に伴う変化, 性差, 去勢による影響について検討し, 性ホルモン, 特にアンドロゲンが影響を及ぼしていることを明らかにした. 今回, アンドロゲンのなかでTSの尿分析値に対する影響について検討した. 6週齢で去勢した雄ラットに, TS 0.5及び2.0mg/kg/dayを4週間皮下投与し経日的に尿分析を行った. さらに, 最終の採尿後に血液分析, 腎組織内酵素活性の測定と, クレアチニンクリアランスを算出した. また, TSの曝露量を確認するため, 最終投与24時間後のTSの血中濃度をRIA法により測定した.

尿中排泄において総タンパク, アミノ酸, LAP, γ -GTP, LDH, ALP及びNAGは去勢により減少し, TS投与により対照群と同レベルあるいはそれ以上に増加し, 一方, Ca及びA/Gでは去勢により増加し, TS投与により減少した. 血液分析ではALPのみに尿分析と同様な変動がみられた. 腎組織内酵素活性ではLAP, γ -GTP及びALPが去勢により減少し, TS投与により増加した. クレアチニンクリアランスは去勢により減少はみられなかったが, TS投与により増加した. TSの血中濃度は0.5mg/kgが対照群と同レベルであり, 2.0mg/kgでは対照群の5倍の高値を示した.

今回の検討より, TSは尿分析値に影響を及ぼすことが明かとなった. この機序として, TSは尿中酵素活性の起源となる腎局所での酵素の合成及び分泌に対し促進的に作用していることが考えられた.

Sodium iodate のラット網膜電図に及ぼす影響

杉本眞次, 今若実穂, 尾崎晴茂, 伊藤隆康,
安藤孝夫, 佐藤秀蔵

武田薬品・医薬開発本部・薬剤安全性研究所

ラットの網膜電図(electroretinogram, ERG)を指標とした長期間の視覚毒性試験の実施にあたり、コンタクトレンズ型電極を用いたERGの記録条件を設定した。次いで、網膜毒として知られるsodium iodate (SI)の12.5, 20, 25及び50mg/kgをラット尾静脈内に単回静注した後経日的にERGを記録し、投与10日後に網膜の病理組織学的検査を実施し、その影響を調べた。

- 1) ケタミン麻酔下で光刺激強度 1.2 joule, 光刺激間隔 0.5 Hz, 加算回数 32 回, 暗順応時間90~120 分においてERG上のa波b波及び律動様小波を比較的安定して記録することができた。
- 2) SI 12.5mg/kg投与群ではERG各波に変化は認められなかった。20mg/kg以上の投薬群においては投与2ないし24時間後より律動様小波及びa波の減弱が、次いで1ないし2日後よりb波の減弱が認められた。
- 3) 投与10日後に実施した網膜の病理組織学的検査では、20mg/kg以上の群で外顆粒層の皺曲、杆・錐状体層の配列の乱れ、網膜色素上皮細胞の腫大・脱落が認められ、25mg/kg以上の群ではこれらの変化はより著明であった。これら網膜の病理組織学的障害の程度は、上記ERGの変化の程度と良く一致していた。
- 4) 以上より、コンタクトレンズ型電極を用いてラットERGを比較的安定して記録できること、既知網膜毒であるSI投与によるERGの変化を確認できたこと、更に、網膜の病理組織学的検査からERGの変化を裏付ける結果を得たことから、本ERG記録法は視覚毒性試験法として有用な方法であることが確認された。

聴器毒性のスクリーニング法：ラット新生児に対する各種アミノ配糖体系抗生物質反復投与による電気生理学的検討

佐々木真敬、古賀久視、中島幹夫、小林洋四郎

旭化成工業(株)ライフサイエンス総合研究所安全性研究所

実験動物における聴器毒性の評価には耳介反射、病理組織学的検査、電気生理学的検査などの方法が用いられている。一方、ラット新生児の聴器毒性の感受期は生後10日齢頃からであることが報告されている。今回、ラット新生児の聴器毒性感受期に各種アミノ配糖体系抗生物質を反復投与後、聴覚脳幹応答(ABR)を観察し、耳毒性のスクリーニング方法としての有用性を検討した。

各群5例のJcl:Wistarラット新生児に対して、amikacin(AMK)50~150mg/kg、gentamicin(GM)20~40mg/kg、isebamycin(ISP)100~200mg/kg、kanamycin(KM)50~100mg/kg、micronomicin(MCR)100~200mg/kg、sisomicin(SISO)50~100mg/kg、streptomycin(SM)100~200mg/kg、tobramycin(TOB)50~100mg/kgを生後10~19日齢まで連続皮下投与した。生後8~9週齢において、ペントバルビタール麻酔下で、誘導電極を左右側頭部に、不関電極を頸背部に刺入し、ABRを記録した。音刺激は4000Hz、2周期のパルスを用い、刺激音圧は100dB SPL、刺激頻度は毎秒2回とした。誘発応答は200回平均加算し、得られたABRのピークの振幅、潜伏時間を測定した。

ABRの振幅は薬物投与群で用量依存的に減少し、消失するものもみられ、潜伏時間にも延長傾向がみられた。ABRの中で最も振幅の大きいP3波の振幅の減少あるいは減少傾向は、AMK 100mg/kg、GM 40mg/kg、ISP 150mg/kg、KM 100mg/kg、MCR 200mg/kg、SISO 75mg/kg、SM 150mg/kg、TOB 75mg/kg以上の投与群で観察され、これら薬物の聴器毒性が認められた。また、この結果はアミノ配糖体系の抗生物質の一般的な聴器毒性の評価とほぼ同様と思われた。

ドレイズ眼粘膜刺激性試験代替法一次バリデーションのためのドレイズ試験とその病理組織学的検討

金子豊蔵¹、井上 達²、鈴木登志郎³、加藤利博³、杉山千生³、柿島 博^{4,5}、中村恒彰^{4,6}、辰見 寿^{4,7}、萩野滋延^{4,8}、増田光輝^{4,6}、小林敏明^{4,8}、門馬純子¹、高仲 正⁹
¹国立衛試・毒性、²横浜市大・医、³(株)日本セイゲケン総合研究所、⁴日本化粧品工業連合会、⁵鐘紡(株)、⁶ライオン(株)、⁷サンスター(株)、⁸(株)資生堂
⁹国立衛試・薬理

我々は、化粧品原料の眼粘膜刺激性評価試験系として、*in vitro* 代替試験法がどこまで使えるのかを明らかにすることを目的として、12の方法について、一次バリデーションを行ないその結果について第7回日本動物実験代替法学会で報告した。一方、*in vivo* の眼粘膜刺激性試験そのものについての知見を得るために、並行して行なったドレイズ眼粘膜刺激性試験のスコアと病理組織学的変化とを比較し、ドレイズ試験の問題点についても若干の検討を行なった。

〔方法〕 13週令のウサギ(ニュージランドホワイト、雄、日本ESL社)を用い、生理食塩水とブラインド化した9種の界面活性剤の注射用蒸留水10%希釈液それぞれ0.1mlを7例の右眼に点眼し、そのうち3例についてはドレイズの方法で観察を行ない、4例については24時間目と7日目に病理組織学的に検索した。また、投与後24、72時間および7日後の検査終了時にフルオル試験紙による角膜蛍光面積と角膜白濁の強度および面積と比較した。

〔結果〕 ドレイズ法の評価と病理組織学的な評価との間に高い順位相関性が認められた。しかし、観察部位により若干の食い違いが見られた。対照とした生理食塩水やドレイズ評点が0であったポリオキシフェン硬化ヒマシ油、モノラウリン酸ポリオキシフェンソルビタンでも球・瞼結膜に細胞浸潤や濾胞減少、角膜に結合織変性や細胞浸潤等が軽度に認められた。角膜のドレイズ評点が低かったラウロイルカルコシナトリウム(S-5)、N-硬化牛脂脂肪酸-L-グルタミン酸ナトリウム(S-6)、ラウリル硫酸ナトリウム(S-7)、ポリオキシフェンオクチル7エニルエーテル(S-9)では組織学的には中等度の変化を示した。虹彩においても同様な相違がS-6やS-9、ベンザルコニウムクロライド(S-10)で見られた。角膜蛍光面積と白濁面積はほぼ一致しており、中等度の刺激性を示したS-5やS-7の24時間で蛍光面積が広く、回復傾向が見られると逆に蛍光面積が狭くなった。強度の刺激性を示したS-10では面積が一致していた。

なお、ドレイズ試験にはニュージランドホワイトと日本白色在来種が多く使われているが、系統差についても検討を加えたので報告する。

眼粘膜刺激性試験における少容量法とDraize法の比較

栗下昭弘、エシル・コーミエ、ロナルド・パーカー、ロバート・ブルース

プロクター・アンド・ギャンブル・ファー・イースト・インク

〔緒言〕 Draize法による眼粘膜刺激性試験は、化学物質や化粧品などがヒトの目に曝露した場合の影響を予め評価するために広く用いられている。しかし、この方法で観察されるウサギの眼所見は、ヒトでの事故症例と比較して過度に誇張されていることが多く、以前から問題点として指摘されてきた。この点を改善するために開発されたのが、Griffithらが1980年に報告した少容量法による眼粘膜刺激性試験である。ここではP&Gが現在までに蓄積したデータに基づいて、少容量法とDraize法の最大平均スコアを比較し、合わせて試験法の再現性についても検討する。

〔方法・結果〕 P&Gの毒性データベースから得られた情報に基づいて分析を実施した。53種類の製品からの70種類の被験物質について、少容量法とDraize法の両方のデータが存在した。これらの最大平均スコアをプロットした場合の相関係数は0.73 ($p=0.0001$)であり、Draize法での最大平均スコアとの関係は次式の通りであった。

少容量法最大平均スコア = $0.522 \times$ Draize最大平均スコア

施設間および施設内の試験結果にも標準偏差および変動係数を求めて、Weiland Scalia(1971)のDraize法のバリデーション研究と比較したが、特に違いは認められなかった。

〔結論〕 以上の結果は、少容量法がDraize法と同じく信頼できる試験系であることを示している。少容量法はDraize法で問題とされる過度の誇張を軽減化して、より現実的な影響評価を行うための有用な方法となるであろう。また、この方法は動物愛護の観点からも、in vitro代替法が確立するまでの過渡的な方法としての応用が考えられる。

ドレイズ眼刺激性試験の統計的解析

小島肇夫、森 栄治、小西宏明、吉村 功*

日本メナード化粧品（株）研究技術部門、*東京理科大
経営工学科

動物実験代替法として、ドレイズ眼刺激性試験代替法の開発および評価研究が国内外で盛んに行なわれている。しかし、*in vitro*の結果が物質固有の値となる細胞毒性試験などの EC_{50} 値（細胞毒性が陰性コントロールに対し50%認められる濃度）と被験物質適用後の時間および適用濃度により異なる*in vivo*結果を比較することはできない。*in vivo*結果においても、統一した条件での結果を比較の対照に用いなければ、的確に*in vitro*において物質の刺激性を予測できない。

この問題を解決するため、我々はホルマリン、アセトンおよびラウリル硫酸ナトリウム（SLS）の各種濃度水溶液をウサギ眼に適用し、各濃度当りのドレイズスコアを統計的に解析した。その結果、10%水溶液の適用24時間後におけるスコアを相対的な刺激性の目安とし、眼刺激性を分類することにより最も合理的な評価ができることが明らかになった。

さらに、数種の界面活性剤において評価した解析結果について報告するとともに、これらの数値と*in vitro*試験との対応性についても報告する。

甲状腺二段階発がん実験における甲状腺増殖性病変発生
と血中甲状腺ホルモンの関連性について

○下武男、三森国敏、小野寺博志、安原加壽雄、

*前川昭彦、高橋道人

国立衛試・病理 *佐々木研・病理

【目的】ラットを用いた抗甲状腺物質の1週間投与実験では血中TSHが高値を示すが、二段階甲状腺発がんモデルを用いた19週間投与実験ではTSH値は正常レベルまで低下したことを既に報告した（第20回本学会）。今回、血中TSHが抗甲状腺物質投与のいずれの時期より低下するかを検討すると共に、甲状腺増殖性病変の発生との関連性について経時的に検索した。

【実験方法】60匹のF344雄ラットにN-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) 2000mg/kg体重を単回皮下投与し、その1週間後より thiourea (TU) 群には0.1% TU含有水、対照群には蒸留水を自由摂取させ、投与1、2、4、8、12および16週目にそれぞれ5匹を屠殺し、血中T3、T4、TSHの測定ならびに甲状腺の病理学的検索を行った。

【結果】TU投与群において血中T4値は投与1週目で顕著に低下したが、投与期間の経過と共に対照群の値に近づく傾向にあった。一方、血中TSH値は投与4週目頃まで高値を示したが、その後減少傾向を示した。甲状腺重量は、いずれの時期においても有意に増加し、投与期間の遷延と共に増加する傾向を示した。病理組織学的には、TU投与群で投与初期に甲状腺濾胞上皮の著明な肥大が認められ、投与2週目以降より濾胞上皮の増殖性病変が出現し、これらの病変の発生率は投与期間に依存して増強した。

【結語】血中TSH値は抗甲状腺物質の投与初期に明らかに高値を示し、その後低減したことから、二段階発がんモデルにおける甲状腺増殖性病変の進展過程には持続的な血中TSHの上昇が必ずしも不可欠ではないものと考えられた。

甲状腺の増殖性病変に対する各種抗甲状腺物質の影響

○ 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】甲状腺二段階発がんモデルを用いた抗甲状腺物質(ATD)の増殖性病変に対する反応は一様ではない。この理由としてATDの作用機序の違いや、用量が関与すると思われるが、詳細は明らかではない。また、これらATDの短期投与で甲状腺ホルモン(TH)の変動の程度から甲状腺腫瘍誘発の強度を予測することができるか否かについては不明である。これらの点を解明するために、ヨード取り込みを阻害するPotassium thiocyanate(KSCN)、THの合成過程を阻害するThiourea(TU)とTHの代謝排泄を亢進させるphenobarbital(PB)の作用機序の異なるATDを用いて以下の検討を行った。【実験方法】実験 I では、KSCN(1%, 0.5%)および TU(0.2%, 0.1%)は飲料水として、PB(0.1%, 0.05%)は混餌で一週間雄ラットに投与し、血清中のTHを測定した。実験 IIでは、N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine(DHPN) 2800mg/kg体重を一回皮下投与し、一週間後より実験 I と同物質を同様の方法で19週間投与し、TH測定と組織学的検索を行なった。

【結果】実験 I では、KSCN とTU 群で用量に相関したT4の減少がみられた。PB ではその程度は軽微であった。実験 IIでは、KSCN 群で増殖性病変が発生したが、癌の発生はなかった。TU 群では腫瘍性病変が高率に発生し癌も認められた。PB 群では増殖性病変の発生は低かった。【結語】抗甲状腺作用を有する物質でも作用機序が異なることにより甲状腺腫瘍誘発の程度に違いがあることが確認された。また、短期投与での甲状腺ホルモンの変動の程度は誘発される増殖性病変の程度と必ずしも相関しなかった。

多臓器中期発癌性試験法を用いた農薬40種または20種のADI量での複合投与による発癌性の検討

萩原昭裕、佐野真士、武貞徳子、白井智之、伊東信行

名市大・医・第一病理

【目的】生産量の多いと考えられている農薬40種類および発癌性を示すあるいは疑われている農薬20種類についてADI（一日許容摂取量）での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110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）、農薬を24週間投与した。農薬40種（殺虫剤9種、除草剤10種、殺菌剤12種、生育調節剤1種）または20種（それぞれ9, 5, 6, 0種）のADI量での複合投与群および陽性対照としてcaptafolの発癌量投与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。また、肝臓については免疫組織学的検索も実施した。

【結果】農薬40種あるいは20種のADI量複合投与群では、対照群と比較して体重には影響は見られず、肝、腎および脾臓重量にも差異は認められなかった。また、両群では肝臓のGST-P陽性細胞巢の単位面積当たりの数および面積にも影響は見られず、病理組織学的検査においても発癌性ないし発癌促進作用は認められなかった。

【結論】現在大量に生産され使用されている農薬、あるいは発癌性の疑われている農薬をADI量で同時に摂取しても発癌性を示唆する変化は全くみられず、ADI量の意義とその有用性が明らかとなった。

20種類の有機リン系農薬の複合投与による肝発癌修飾作用

河部真弓、倉田靖、萩原昭裕、今井田克己、伊東信行

名市大・医・第一病理

20種類の有機リン系農薬を各々のADI量（一日許容摂取量）で複合投与した場合の肝発癌に対する影響を、肝中期発癌試験法を用いて検討した。

【方法】6週齢のF344系雄性ラット110匹を用い、実験開始時にDEN(200mg/kg体重)を腹腔内投与し、2週後より20種類の有機リン系農薬を各々のADI量および各々のADI量の100倍の濃度で20種全てを混合した飼料を作製し、6週間自由摂取させた。対照群にはDEN投与後基礎食を与えた。全動物について3週経過後に2/3肝部分切除を行った。動物は8週経過後に屠殺剖検し、肝のGST-P染色標本を作製しGST-P陽性細胞巢の数と面積を測定した。また、確認のため、100倍ADI混合飼料中の各農薬の含有量を測定した。

【結果】体重および肝重量ではADI群およびADIの100倍群とも対照群と比較して有意差は認められなかった。ADIの100倍群でのGST-P陽性細胞巢の単位面積当りの個数および面積は4.51個/cm²、面積が0.44mm²/cm²といずれも対照群（数3.50個/cm²、面積0.28mm²/cm²）と比較して有意な増加を示した。しかしながら、ADI群では肝発癌修飾作用は観察されなかった。なお、飼料中濃度分析の結果、使用した飼料中にはほぼ設定値に近い値の農薬が検出できた。

【結論】20種類の有機リン系農薬をADI量の100倍で複合投与すると、肝発癌に対して軽度ながら促進作用を示したが、ADI量で複合投与した場合には肝発癌に対し全く促進作用を示さないことが明瞭に見出された。

Dehydroepiandrosteroneについてのラット肝中期発癌性
試験法での解析

田中 光, 柴田雅朗, 宮田恵美子, 長谷川良平,
広瀬雅雄, 白井智之, 伊東信行

名市大・医・第一病理

【目的】副腎皮質で合成されるホルモン dehydroepiandrosterone (DHEA)の肝臓に対する影響を、肝中期発癌性試験法を用いて検索した。

【方法】6週齢のF344系雄ラットを用い、開始時に diethylnitrosamine (DEN) を200mg/kg体重の濃度にて1回腹腔内投与し、2週経過後よりDHEAを0.6, 0.3, 0.15あるいは0%の濃度で6週間混餌投与した。全群3週経過後に2/3肝部分切除を行い、8週経過後に屠殺剖検した。各群に発生した胎盤型glutathione S-transferase (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測定し、対照群と比較検討した。また、HE染色およびenoyl CoA hydratase (ECH)染色による検索も併せて実施した。

【結果】肝重量は用量に相関した有意な増加が示された。GST-P陽性細胞巢の単位面積あたりの個数および面積は、0.6%群でそれぞれ5.2個/cm²および0.7mm²/cm²であり、対照群の3.6個/cm²および0.3mm²/cm²と比較して有意な増加が認められた。0.3および0.15%群には差異はみられなかった。HE染色標本では、好酸性、明細胞性、好塩基性および混合型小増殖巢の出現が観察され、これらをまとめた発生個数は0.6, 0.3および0.15%群でそれぞれ9.1, 7.1および5.4個/cm²であり、対照群の3.3個/cm²と比べるといずれも有意な増加を認めた。肝細胞におけるECHの染色性は0.6%群で強陽性を示した。

【結論】DHEA投与によるGST-P陽性細胞巢の有意な増加は0.6%群のみであったが、HE染色標本では小増殖巢の増加が投与群全てに認められた。したがって、dehydroepiandrosteroneは肝発癌物質もしくは肝発癌プロモーターであり、ベルオキシゾーム増生物質であるためその発現が弱いと考えられる。

細菌での復帰変異誘発物質の作用発現における diethyl maleate 添加の影響

佐久間 聡子、佐藤 全、河村 公太郎

株式会社化合物安全性研究所 変異原性試験室

復帰変異試験において、細菌の代謝系の欠如を補う目的で酵素誘導後のラット肝ホモジェネイトを加える代謝活性化法が常用されている。一方、グルタチオン代謝系の酵素は細菌内に十分量存在し、特定の化合物の復帰変異活性がそのグルタチオン代謝によることが示されて来ている。今回我々は、基質であるグルタチオン含量を低下させる目的で diethyl maleate (DEMA) を使用し、種々の復帰変異誘発物質の作用発現に及ぼす影響を検討した。

Salmonella typhimurium TA 98、TA 100、TA 1537 の 10 時間の前培養を行った。密栓下で試験物質及び上記培養菌株溶液及び一部の試験では一定濃度の DEMA を加え混和し、37°C で 20 分のプレインキュベーションを行い、最少グルコース寒天培地上に重層した。個々のプレートをポリ塩化フィルムで密封し 37°C で 48 時間の静置培養を行った。試験物質として、dibromomethane (DBM)、N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (ENNG)、2-nitrofluorene (2-NF)、9-amino-acridine (9-AA) 及び 2-aminoanthracene (2-AA) を使用した。

細菌の増殖に影響しない DEMA 濃度で、TA 100 の自然発生復帰変異数は減少した。DBM の復帰変異誘発活性は DEMA により軽度抑制された。2-AA の復帰変異誘発活性は代謝活性化法において DEMA により濃度依存的に増強され、ENNG、2-NF 及び 9-AA の活性も代謝活性化法において DEMA により軽度増強された。

以上、代謝活性化法では、試験物質の活性発現においてグルタチオン代謝系による解毒作用の関与が考えられた。DBM の復帰変異誘発にはグルタチオン代謝系による活性化が推察された。

サーベイランス用検体としてのラット及びイヌ血液
— 保存及び輸送条件の検討 —

- 林 裕¹⁾、海野 隆²⁾、守田伸子³⁾、大林繁夫⁴⁾、
山口真樹子⁵⁾、松澤利明⁶⁾、野村 護⁷⁾
1) 富士レビオ、2) 鐘紡、3) サンド薬品、
4) グレラン製薬、5) アップジョン、6) 山之内製薬、
7) 第一製薬（日本製薬工業協会）

【目的】臨床検査の精度管理を目的とする血液サーベイランスは、人においては種々の団体により大規模に実施されているが、動物の検体を用いた研究は本邦では未だ実施されていない。動物、特にラット又はイヌの血液は溶血し易く保存に耐えないため、サーベイランス検体としては不適との情報もある。製薬協基礎研究部会では、加盟各社が分担し、ラット及びイヌの血液が、サーベイランス検体として適当であるか、その保存及び輸送条件を検討した。

【方法】7週齢～42週齢のSD系ラット及び7箇月～20箇月齢のビーグル犬を用いた。ラットは麻酔下、腹大静脈又は大動脈よりEDTA2K添加血液を採取し5匹分をプールした。イヌはとう側皮静脈よりEDTA2K添加血液を採取した。各プール血液を2mlずつ試験管に分注し、血液検査実施後、半数を冷蔵庫に24時間保存した。残りを保冷剤入りの発泡スチロール製ボックスに入れ、オートバイ、車、バスなどの輸送条件下、24時間保存し、各々血液検査を実施し、保存前値に対する冷蔵保存又は輸送後の検査値を比較した。

【結果及び考察】ラット血液では、RBC、WBC、HCT、HGB、PLTの保存前後の値は冷蔵保存及び輸送後各々97～101%及び98～106%であり、いずれも影響は認められなかった。一方、イヌ血液では、RBC、HCT、HGBの冷蔵保存及び輸送後の値は各々101～102%及び100～103%であり、いずれも影響は認められなかった。WBCは各々117及び118%、PLTは各々79及び80%で条件による差はなかったものの、前値に比し高値又は低値を示した。

以上の結果は、ラット血液は冷蔵又は輸送条件に少なくとも24時間は耐えられることを示すもので、サーベイランス検体として使用することは可能と考えられた。一方、イヌ血液はPLTの低値と凝集に伴うと考えられるWBCの高値が認められることから、サーベイランス検体としては必ずしも適当でないと考えられた。なお、イヌのPLTには各施設の変動が大であることから、他の要因も含まれている可能性は否定出来ないと考えられた。

化学物質安全性評価支援システムの開発研究
I. 毒性試験データベースシステムの構築

鎌田 栄一、 會田 喜崇、 中館 正弘、 浅井 義之*、
鈴木 彰*

国立衛生試験所 総合評価研究室
*住商情報システム部

化学物質の安全性に関する施策として、昭和61年度に「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」の一部改正が行われ、新規化学物質については、種々の毒性試験等によりその安全性を確認した後、市場に出されることとなつたが、一方従来から安全性が確認されないままに使用されていく既存化学物質の安全性の確認は、国の責任で重点的に行うこととなつていく。また、OECD加盟国間での分担点検事業も進められている。我々は既存化学物質の安全性点検によって得られるデータを迅速に整理保存し、安全性評価や評価手法の研究に利用することが重要と考へ、毒性試験データベースシステム（以下「DB」とする）を開発中である。本研究は、このDBに蓄積された各試験の発生データをもとに各種データ間の関連性や化学構造の相関等について検討するなどの安全性評価を支援するためのシステムの開発を目的としている。本学会では、開発したDBの概要について報告する。

本DBはVAX 4300 / VMS及びDECステーション / UNIXを使用し、外部試験機関とはモデスラムで、国立衛生試験所内はイーサネットで各端末と接続して、データの収集、利用を行っている。また、データベース管理システムとしてORACLEを使用している。システム設計を行い、統計計算ソフトにはSASを使用している。データの入出力は今回開発した統一フォーマットによる入力システムで各試験機のPC 98端末からモデムを介して行う。データの出力は編集、加工機能を利用して端末から行う。本システムは化審法で定められている28日間反復投与毒性試験、変異原性試験、慢性毒性試験、世代試験、代謝試験等に加え、OECDの点検で実施されている反復投与/生殖発生毒性併合試験や簡易生殖試験の生データをデータベース化し、試験項目間で加工、統計処理、帳票出力が容易に行うことが可能である。

毒性試験における臨床検査機器の
メンテナンスおよび精度管理実施状況

海野 隆¹⁾ 守田伸子²⁾ 斎藤 実²⁾ 野村 護³⁾

日本製薬工業協会 基礎研究部会

¹⁾ 鐘 紡 ²⁾ サンド薬品 ³⁾ 第一製薬

毒性試験に使用する臨床検査機器メンテナンスおよび精度管理の実施状況について日本製薬工業協会基礎研究部会第2分科会加盟65社を対象にアンケート調査を実施し、53社より回答が寄せられた。

メンテナンス実施状況：血球系検査機器については1社を除いて、凝固系検査機器についても3社を除いて何らかの方法によって実施していた。血液化学的検査機器では全施設がメンテナンスを実施していたが、尿検査機器では約半数であった。メンテナンスの内容は、業者・社内担当者による定期点検は半数以上の施設で実施され、社内担当者による使用時点検は大多数の施設でおこなわれていた。

精度管理の実施状況：血液検査、血液化学的検査では、ほとんどの施設が何らかの方法で実施していたが、尿検査では約半数の施設で実施されるにとどまった。精度管理の実施状況をRBC, BUN, 尿中蛋白を例に示すと下表のとおりであった。

方 法	RBC	BUN	尿蛋白
サンプルサーベイなどの検査室間精度管理	36%	12%	7%
精度管理用サンプルを用いたX-R 管理図法	38%	44%	7%
精度管理用サンプルを用いた変動係数法	3%	13%	0%
管理用サガ表示値と実測値との比較確認	92%	66%	96%

以上、メンテナンスおよび精度管理はほとんどの施設で実施されていた。しかし、その内容はまちまちであり、臨床検査機器を用いたデータの質に施設間のばらつきの存在が推定された。

ピペロニルブトキシドの毒性

1. ラットにおける慢性毒性

大石眞之、米山允子、田中豊人、藤谷知子、高橋省

東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科

<目的> ピペロニルブトキシド(PB)は防虫用食品添加物として穀類に24ppmの添加が認められ、またピレトリン系殺虫剤の増強剤として広く使用されている。PBの毒性についてはこれまでに亜急性的には肝及び腎障害が報告されているが、変異原性及び発癌性は無いとされている。我々はラットで約二年間にわたる慢性毒性試験を行い、発癌性を確認したので報告する。

<方法> 実験にはF344/DuCrj系SPFラットを用い、バリアシステム動物室で懸架式ステンレスケージ内に一匹飼いた。日本クレアCE-2飼料にPBを0.6, 1.2及び2.4%混合し、雄は95週、雌は96週間摂取させた後屠殺解剖し、血液学的、血清生化学的及び病理組織学的検査を行った。

<結果> 体重増加は用量依存的に減少し、2.4%群では雌雄とも60週以降漸減した。途中死亡は約40週以後にみられ、投与群での死亡原因は主に盲腸出血であり、74週以後の死亡動物では肝細胞癌による死亡がみられた。実験終了時の屠殺解剖した動物には全群で下垂体、精巣等に腫瘍が見られたが、PB投与に関係していると考えられるものは雌雄の肝の結節と雄の本態性血小板血症であった。肝の結節は全葉に発生し、用量依存的に数及び大きさが増加した。病理組織学的検索では主にtrabecular typeの肝細胞癌であり、また血管肉腫も見られた。血清生化学的变化ではこれら肝臓の変化と対応した γ -GTP、コリンエステラーゼ等に大きな変動がみられた

<結論> PBは高用量ではラットに対して発癌性を有すると結論した。

ビペロニルブトキシドの毒性

2. マウスにおける慢性毒性

○高橋 省、大石眞之、米山允子、田中豊人、藤谷知子

東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科

＜目的＞食品添加物であるビペロニルブトキシド(PB)はラットに対し肝発癌性を有するが、その種差を検討する目的で、雄マウスを用いて慢性毒性試験を行った。

＜方法＞1匹飼いた雄Crj:CD-1(ICR)マウスそれぞれ52, 53, 100匹に、PBを0, 0.6, 1.2%経飼料的に12か月与え、症状観察、途中死亡の剖検を行い、終了後屠殺し定法通り組織、血液、生化学検査を行った。

＜結果＞体重増加の抑制が投与群において認められたが、死亡例は全群において6か月間はまったく観察されなかった。1.2%群で9.5～12か月に19匹の死亡が認められ、そのうち10匹は肝細胞癌による死亡と考えられた。PBを投与した大部分のマウスの肝臓には多くの結節が存在した。結節は用量依存的に数と大きさを増し、生存マウスのうち肝細胞腺腫を有するものは、対照群、0.6%群、1.2%群でそれぞれ2.0%, 13.5%, 25.1%であり、肝細胞癌を有するものはそれぞれ0%, 11.5%, 53.1%であった。また、高用量群では血管内皮肉腫が認められ、0.6%群では結節性の過形成が高頻度で観察された。血液検査では、ラットにおいて発症した血小板血症の誘発はなく、生化学検査では、 γ -GTP, GPTの軽度上昇が認められた。

＜結論＞以上の結果からPBはマウスに対して肝発癌性を有することが分かった。24か月齢の雄CD-1マウスの自然発生肝細胞癌は5.7%と報告されているので、それと比較しても本実験の結果の有意性は明確である。

ビペロニルブトキシドの毒性

3. マウスおよびラットの発生毒性

田中 豊人, 藤谷 知子, 高橋 省, 大石 眞之

東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科

食品添加物の防虫剤であるビペロニルブトキシドを強制経口投与により、妊娠9日齢のマウスに 0-1800mg/kg bw 投与し、胎仔の発生に及ぼす影響について検討した。

8週齢時にマウスを交配させ、交尾を確認した雌性マウス80匹を各20匹の4群に分けて、妊娠9日齢時にビペロニルブトキシドをそれぞれ 0 (対照群), 1065, 1385, 1800 mg/kg bw 投与した。妊娠18日齢時に帝王切開を行ない、胚の吸収や胎仔の状態などを観察・記録した。

その結果、初期死胚および後期死胚数が投与群において増加し、総吸収率も増加した。また、これらの影響は用量依存的であった。胎仔の平均体重は、雌雄共に投与群において抑制された。胎仔の外表奇形の発生は各群で見られたが、前肢の欠指は特に高濃度投与群において高率で観察され、その影響は用量依存的に増加した。

また、ラットについても同様の手法により、ビペロニルブトキシドが発生に及ぼす影響について検討したので、その結果についても合わせて報告する。

Toxicological effect of sulfur dioxide on the respiratory tract of rats

Jong Kwon Lee, Dai Byung Kim, Byeong Woo Ahn, and Pu Young Kim

National Institute of Safety Research, Seoul, Korea

Abstract - In order to investigate the toxicological effect of SO₂ gas, 7 weeks old SD rats were used. Exposure was performed at a concentration of 1000 ppm by whole body inhalation method 4 hours a day two times. Pathological changes of respiratory tract and hematological parameters were examined. Animals exposed to SO₂ gas began to demonstrate severe dyspnea and some of animals were dead. Rats treated with SO₂ showed severe weight loss at 2nd and 3rd day. As a result of hematological findings, SO₂ treated group showed higher ($p < 0.01$) hematoerit percentage than that of control group. In the trachea of the treated group, desquamation of tracheal epithelium, loss of cilia and goblet cells, exduation of neutrophil, lymphocyte into the lumen were found. In the bronchi of rats, desquamation of bronchial epithelium, loss of cilia and goblet cell, infiltration of neutrophil, lymphocyte, alveolar macrophage into the lumen were found but the lesions in the bronchioles weakened. In the lung, alveolar wall thickness, emphysema, hemorrhage and infiltration of neutrophil, increase of alveolar macrophage in the alveoli were found.

Keywords : Sulfur dioxide, inhalation exposure, hematocrit, cilia, desquamation, alveolar macrophage, emphysema,

ジクロロメタンによる血中
リポタンパクの変化

本間 健資・大谷 勝巳・宮川 宗之

産業医学総合研究所（労働省）・職業病研究部

有機塩素溶剤を取り扱う作業者の健康診断において、血中リポタンパクの変化など脂質代謝の乱れとおもわれる例がみられるので、いくつかの有機塩素系の溶剤をラットに投与して血中リポタンパクの変化をしらべたところ、ジクロロメタンの投与により著るしいLDLの増加が観察され、このような変化は他の有機塩素溶剤ではみられなかった。腹腔内へのジクロロメタン一回投与では、VLDLの減少とLDLの顕著な増加が観察され、このときのVLDL・LDL・HDLなどのリポタンパク分画のコレステロール・トリグリセライド・磷脂質などの脂質組成およびB₁・B_s・E's・A-I・C'sなどのアポタンパク組成には投与による大きな変化は認められなかった。また、リポタンパク代謝において中心的役割をはたす肝臓を調べたところ、肝内トリグリセライドとグルタチオンの減少および肝重量の軽度減少はあるものの、肝臓内の他の脂質や過酸化脂質などに大きな変化はみられなかった。肝臓からのVLDL分泌速度は投与により大きく減少するので、VLDLの減少はこのためとおもわれるが、リパーゼ活性などに著変はみられず、LDL増加の原因はいまのところ明らかでない。

合成抗菌剤オキシリン酸の雄ラットにおける血中LH 上昇の作用機作の検討

○山田智也、中村純、奥野泰由、細川俊治、松尾昌季

住友化学工業株式会社、生物環境科学研究所

合成抗菌剤であるオキシリン酸はラットにおいて性腺刺激ホルモンである黄体形成ホルモン(LH)を持続的に上昇させることが判明した(第32回米国毒性学会、1993年)。今回、オキシリン酸による血中LHの上昇の作用機作について検討したので報告する。

【方法】高齢雄ラット(約10カ月齢)にオキシリン酸3000ppmを8週間にわたり混餌投与した後、血清中LHおよびプロラクチン濃度、血清・精巣中テストステロン濃度を測定し、さらに*in vitro*精巣器官培養におけるテストステロン産生能、性腺刺激ホルモン放出ホルモン(LHRH)の最大刺激(1 μ g/rat, sc)に対する下垂体の応答性およびオキシリン酸による血中LH上昇に及ぼすドーパミン受容体の阻害剤ハロペリドール(2mg/kg, ip)の影響を検討した。ホルモン濃度はRIAにより測定した。精巣器官培養は牛血清アルブミン添加MEM溶液中で37 $^{\circ}$ C、95%O₂-5%CO₂の条件のもとに、ヒト性腺刺激ホルモン(HCG、100IU/ml)の存在・非存在下で6時間培養を行い、溶液中のテストステロン濃度を測定した。

【結果】(1)オキシリン酸投与により血清中LH濃度は有意に上昇した。(2)血清および精巣中テストステロン濃度ならびに器官培養におけるテストステロン産生能は、オキシリン酸投与により影響されなかった。(3)LHRH投与後の血清中LH濃度の上昇は、オキシリン酸投与により影響されなかった。(4)オキシリン酸投与により血清中プロラクチン濃度は有意に低下した。(5)ハロペリドール投与により対照群およびオキシリン酸投与群において、血清中プロラクチン濃度は上昇し、一方、血清中LH濃度は低下して両群間の差は認められなくなった。

【結語】以上の結果から、オキシリン酸は、精巣間細胞の機能を低下してフィードバック抑制系に影響するのではなく、視床下部のドーパミン作動性神経系を介してのLHRH産生を促進し、下垂体のLH分泌を増加した結果、LHの末梢血中レベルを上昇させることが示唆された。

ゴム老化防止剤 2-Mercaptobenzimidazoleのラット
28日間経口反復投与による甲状腺障害について

○川崎 靖、梅村隆志、斉藤 実、門馬純子、松島裕子、
関口裕巳、松本真美、*伊佐間和郎、津田充有、黒川雄二

国立衛生試験所 毒性部、*療品部

[目的] 2-Mercaptobenzimidazole(MBI)は、ゴム長靴および手術用ゴム手袋等の老化防止剤として使用されている。Gaworskiらは、本化合物のラットによる90日間の吸入毒性試験を行い、甲状腺障害を報告している。今回、家庭用品に使用される化学物質の安全性評価の一環としてMBIのラットによる28日間経口反復投与試験および14日間回復試験を実施するとともに、14日間経口反復投与による甲状腺機能障害について検討した。

[実験方法] 5週令のSlc:Wistarラット(一群10匹)にMBIを0(対照群)、2(L)、10(M)および50(H)mg/kgの用量でcorn oilに懸濁させ、金属性胃ゾンデを用いて28日間反復強制経口投与し、一般状態、体重および摂餌量の測定、血液学的および血清生化学的検査、臓器重量および病理組織学的検査を行った。なお、対照群とH群には、回復群を設けた。14日間反復強制経口投与では、25 mgおよび50 mg/kgのMBIを投与し、血清中のT4、T3 およびTSHを測定した。

[結果および考察] 一般状態では雌雄ともに毒性徴候は認められなかった。体重および摂餌量では、雌雄ともにH群で1-2週目以降著大な増加抑制並びに減少が認められた。血液学的検査では雌のWBCがH群で減少、回復期14日では、雌雄のH群で貧血傾向が見られた。血清生化学的検査では、雌雄ともに BUN, TChol, FChol, γ -GTがH群で増加を示した。臓器重量では雌雄ともにM群以上で甲状腺が著明な増加を、投与群で胸腺が用量に依存して減少した。回復期14日では、H群でTChol, FChol値、甲状腺および胸腺重量を除き、いずれもほぼ回復を示した。甲状腺の組織像は、H群で濾胞内コロイドが殆ど消失し、上皮が立方ないし円柱状を呈した小型の濾胞が増殖するびまん性過形成の像を呈していた。また、被膜には腺維性肥厚が認められた。14日間反復投与試験では、T4およびT3の著しい減少とTSHの著しい上昇が認められた。

MBIのラットへの反復経口投与により、著しい甲状腺肥大に伴って強い甲状腺機能低下が明らかとなった。さらに、胸腺の萎縮は2 mg/kgでも認められ、MBIの強い免疫抑制作用を示した。

甲状腺ホルモンの胆汁排泄に及ぼす各種薬剤の影響

森下克美, 細木英司, 北浦敬介, 神辺敏実

大塚製薬(株) 徳島研究所 毒性研究部

【目的】ラットを用いた反復投与毒性試験では、しばしば血中甲状腺ホルモンの低下を伴った甲状腺の肥大が認められることがある。血中甲状腺ホルモン濃度の低下の原因としては、甲状腺でのホルモン合成の抑制や、血中甲状腺ホルモンの代謝、排泄の亢進等が考えられるが、すべての可能性を検討するには多くの実験必要である。本実験は、これらの原因の判別に有効な実験系を確立することを目的として、血中甲状腺ホルモンを低下させることが知られている各種薬剤〔Phenobarbital(PB)、Propylthiouracil(PTU)、Sodium salicylate(SA)〕が、甲状腺ホルモンの胆汁排泄に対してどのような影響を及ぼしているかについて検討した。

【方法】10~13週齢のSD系雄ラットを各群8匹ずつ割り付け、各種薬剤(PB: 80mg/kg/day × 7日間ip)、PTU;15mg/kg/day × 7日間po)、SA;200mg/kg × 単回iv)を投与した後、麻酔下で総胆管から胆汁を採取した。この胆汁について、一部はそのまま、残りは β -glucuronidase/arylsulphatase処理した後に、RIA法により甲状腺ホルモン濃度を測定した。

【結果】PBは胆汁分泌量を増加させることにより、甲状腺ホルモンの胆汁中排泄量を増加させた。PTUは胆汁分泌量を減少させ、さらに甲状腺ホルモンの胆汁中濃度及び排泄量ともに低下させた。SAは胆汁分泌量には影響を与えず、甲状腺ホルモンの胆汁中濃度、排泄量ともに著明に増加させた。

【結論】血中甲状腺ホルモン濃度の低下を引き起こす各種薬剤について、胆汁中の甲状腺ホルモンを測定したところ、薬剤の作用機序によってホルモンの動態に差異が認められた。本方法により、血中甲状腺ホルモン濃度の低下を引き起こす未知の薬剤についても、簡便に作用機序の推測が可能であると考えられた。

LactitolのSD系雄性ラットに対する副腎髄質クロム親和細胞過形成誘発機序に関する検討

吉川健一、浜州泰久、吉田 勝、石橋成太良、中沢素邦、田村博信、河口和寛、鷺見信好

日本新薬株式会社 安全性研究所

lactoseあるいはsorbitol、mannitol、xylytol等のpolyol類はラットの反復投与毒性または癌原性試験において副腎髄質クロム親和細胞に増殖性変化を誘発することが知られており、この変化に腸管からのカルシウム吸収促進が関与していることが推察されている。

(方法) polyol類の一つであるlactitolをSD系雄性ラットに13週間反復経口投与(lactitol投与群:15g/kg、対照群:注射用蒸留水)した後、血中カルシウム、血中及び副腎髄質中カテコールアミンの測定、副腎髄質の病理組織学検査を実施し、副腎髄質クロム親和細胞過形成誘発機序に関する検討を行った。

(結果) lactitol投与群では血漿中カルシウムイオン、総カルシウム濃度に対照群と有意な差は認められなかったが、尿中カルシウム排泄はlactitol投与群で有意な増加が認められ、カルシウムの腸管からの吸収が促進している可能性が示唆された。さらに、副腎髄質中のエピネフリン含量、血漿中エピネフリン、ノルエピネフリン濃度の増加傾向、副腎髄質クロム親和細胞の細胞性肥大及び細胞増殖率の増加傾向がlactitol投与群で認められ、副腎髄質クロム親和細胞の機能亢進ならびに増殖性変化を示唆する変化が認められた。以上の結果より、lactitolのラットに対する長期反復投与においてもlactoseないしは他のpolyol類投与時と同様の機序(腸管からのカルシウム吸収促進→血中カルシウムレベルの一過性の上昇→副腎髄質クロム親和細胞刺激・機能亢進)を介し副腎髄質クロム親和細胞の増殖性変化が誘発される可能性が強く示唆された。

ラットにおけるビタミンD₃類縁化合物の長期
投与の影響

○池崎信一郎、古川文夫、今沢孝喜、西川秋佳、
高橋道人

国立衛生試験所 病理部

【はじめに】

ビタミンD₃の重要な活性代謝産物のひとつに1 α ,25-(OH)₂-D₃があるが、その他いくつかのビタミンD₃類縁化合物も生理活性を示すという報告がある。しかし、それらがもつ本来の生理作用は明らかでなく、長期大量投与による影響も知られていない。今回、ビタミンD₃類縁化合物をラットに長期間経口投与し、その影響を検索した。

【材料および方法】

14週齢の雄Wistar系のラット20匹に、5ppmのビタミンD₃類縁化合物を57週間混餌投与し、また対照として20匹に基礎飼料のみを同様に与えた。投与期間中は、体重および摂餌量の測定を行い、尿中のCa値とP値を3週、22週、56週の3回測定した。投与終了後、全動物をエーテル麻酔下で採血後剖検し、臓器重量（肺、心臓、肝臓、副腎、腎臓、大腿骨）を測定し、主要臓器については10%緩衝ホルマリンで固定後、常法に従いH.E.染色を施し病理組織学的に検索した。採取した血液は、血液生化学的検査に供した。

【結果と考察】

被験物質投与群の体重および摂餌量は、対照群とほぼ同様に推移し、有意差はみられなかった。尿中のCa値および血中P値は、被験物質投与群で有意な高値を示したが、血中Ca値の有意な変動は認められなかった。また、被験物質投与群では副腎、腎臓、大腿骨重量の有意な増加がみられた。以上のように、ビタミンD₃類縁化合物はビタミンD₃と異なり、明かな血中Ca値の上昇を示すことなく、骨質の増加に対し促進的に作用すると考えられる。

1 α ,25-dihydroxy vitamin D₃のラット表皮サイトケラチンおよび細胞動態に及ぼす影響

○松下智哉、三沢保幸、松永 隆、杉本哲朗、二木力夫

中外製薬・安全性研究所

【目的】1 α ,25-dihydroxy vitamin D₃(Calcitriol)をモルモットの正常皮膚に外用すると表皮が肥厚することが知られている。そこで今回、Calcitriolの表皮に及ぼす影響を解析する目的で、中間径フィラメントであるサイトケラチンおよび細胞動態について検討した。

【方法】6週齢のSD系雄性ラットの背部皮膚3x4cmにCalcitriolの1000 μ g/ml/kgまたは溶媒対照としてエタノールを1ml/kg単回経皮投与し、投与後1,3,4および5日に表皮を採取した。表皮は可溶性タンパクを除去後、2% SDSを含む抽出液によりサイトケラチンに富む分画を得た。次いでSDS-PAGE法で分離後、サイトケラチン抗体(AE1/AE3,Boehringer Mannheim Biochemica;ヒトK1~8,10,14,15,16および19サブユニットに反応)によるウェスタンブロット解析を行った。また、Calcitriol投与1時間前にBrdUを腹腔内投与し、免疫組織化学的に表皮の細胞動態を検討した。

【結果および考察】SDS可溶性分画においては約68,65,59,56および52kDにサイトケラチンと考えられるバンドが認められ、Calcitriol投与後3日より56kDに比して52kDが増加した。52kDの増加は、ウェスタンブロット解析の結果からヒトにおける基底細胞型のK14もしくは分子量の近接する過増殖型のK16に相当するサイトケラチンの増加あるいは発現によるものと考えられた。組織学的にはCalcitriolにより表皮角化細胞の増生が見られるとともに、BrdU標識された基底細胞が顆粒細胞層に達する時間が短縮された。サイトケラチンサブユニットの変化は細胞動態と密接に関連しているものと推察され、Calcitriolの表皮の分化および増殖に及ぼす影響を考察する上で興味深い知見と考えられた。

C 型肝炎における stellate cell および喫煙の関係

別枝 和彦¹⁾、森田 健一¹⁾、藤原 睦憲²⁾¹⁾大鵬薬品工業㈱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】ビタミン A は癌細胞の増殖抑制、上皮細胞の増殖と分化等に重要な役割を果たしている。また、体内のビタミン A 量は喫煙等により影響を受けると言われている。我々は、ビタミン A を多量に貯蔵している肝の stellate cell (伊東細胞) に着目して、C 型肝炎の病態の進行における stellate cell 数および喫煙の関係を検討した。

【対象および方法】C 型肝炎と診断された患者 83 例の肝生検について、顕微鏡でヨーロッパ分類に準じ chronic active hepatitis (CAH) の moderate (2A) および severe (2B) に分類し、さらに喫煙群および非喫煙群に分類した。全例について電検用に通常のごとく処理しエボン包埋後、1 μ m 切片をメチレンブルー染色し、門脈域を中心として 1 mm² あたりの stellate cell 数および Vitamin A rich stellate cell (Vitamin A 顆粒を豊富に含む stellate cell) 数を測定し、2A および 2B 間の比較、2A および 2B における喫煙群および非喫煙群間の比較をおこなった。

【結果】病態の進行につれて、stellate cell 数および Vitamin A rich stellate cell 数の減少がみられた。2A においては、喫煙群で非喫煙群に比べ、stellate cell 数および Vitamin A rich stellate cell 数の減少が有意にみられた。2B においては、喫煙群および非喫煙群間に差はみられなかった。

【考察】C 型肝炎では、病態の進行につれて、stellate cell 数および Vitamin A rich stellate cell 数の減少がみられたが、病態の軽度な段階 (2A) において、その減少に喫煙の関わる可能性が高いと思われた。

モルモットを用いた医薬品の抗原性試験における原体および
 原体-タンパク質結合物のアナフィラキシー惹起用量に関する研究

大郷 豊、井上智彰、磯部竹雄、堀井郁夫

日本ロシュ（株）・研究所・毒性病理部

モルモットを用いた医薬品の抗原性試験法は広く行われているが、感作および惹起の投与用量・投与方法に関しては統一性がないのが現状である。今回は Penicillin G (PCG) を例にとり、能動全身アナフィラキシー (ASA) 試験および、受け身皮膚アナフィラキシー (PCA) 試験における PCG 単独および PCG-タンパク質結合物のアナフィラキシー惹起能を示す用量について検討をしたので報告する。

【方法】 Hartley 系雄モルモットに PCG 30 mg/body を70日間の7日、1回ずつと共に2週間隔で3回免疫し、最終免疫後1週目に採血および ASA 試験を行った。ASA 試験では、PCG 単独または PCG-A (albumin) 結合物を惹起注射した。採取した血液からは血清を分離し、Homologous PCA 試験を行った。PCA 試験では、希釈血清を皮内注射し、2日後に PCG 単独または PCG-A 結合物を惹起注射した。

【結果】 ASA 試験の結果、PCG-A 結合物 1 mg/body 惹起では全例が死に至り、強いアナフィラキシー反応が認められたが、PCG 単独では 30mg/body で弱いアナフィラキシー反応が認められたが、死に至る動物は認められなかった。PCA 試験の結果、1/1000 希釈血清では、PCG-A 結合物 1mg/body の惹起で陽性反応が認められたが、PCG 単独 30 mg/body の惹起では陽性反応は認められなかった。一方 1/5 希釈血清では、PCG 単独 30 mg/body の惹起で陽性反応を認め、PCG-A 結合物での惹起では受け身全身アナフィラキシーによる症状が認められ、Blue spots は判別が難しかった。このように PCG の場合、PCA 試験において血清の希釈倍率を低くすることにより、PCG 単独での惹起で Blue spots が認められ、ASA 試験より感度良く薬物単独での惹起能を検出できる可能性が示唆された。

モルモットPCA反応の惹起抗原量に関する検討

○朝波 省吾, 桑原 孝

(株)大塚製薬工場 鳴門研究所

【目的】モルモットPCA(受身皮膚アナフィラキシー)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、蛋白抗原として卵白アルブミン(OA)、ハプテンとしてペニシリンG(PcG)を用いてPCA反応に必要な惹起抗原量を検討した。

【方法】モルモットにPcG 25mg/bodyまたはOA 5 μ g/bodyをFreund's Complete Adjuvantとともに2週間隔で3回皮下投与し、最終感作の2週間後に採取した抗PcG血清及び抗OA血清を受身感作用抗血清として使用した。受身感作時間は、抗OA血清の場合4時間、抗PcG血清の場合24時間とし、抗PcG血清に対する惹起抗原としてはモルモット血清アルブミン1分子あたり12個、18個及び24個のPcGを結合させたPcG₁₂-GpSA、PcG₁₈-GpSA及びPcG₂₄-GpSAを使用した。

【結果及び考察】抗PcG血清に対して1000 μ g/bodyのPcG₁₂-GpSA、PcG₁₈-GpSA及びPcG₂₄-GpSAで惹起した結果、結合数が少ないほどPCA titerは低下し、ハプテン-蛋白結合物の場合、ハプテン結合数が少ないと検出感度が低下するものと考えられた。また、惹起抗原量については、OA及びPcG₂₄-GpSAともに、抗原量を減らすと若干検出力が落ちるものの、50 μ g/bodyでも陽性反応が得られた。

よって、惹起抗原量としては1000 μ g/body以上が望ましいが、十分な量を使用できない場合には、50 μ g/body程度の微量での惹起も有用であると考えられた。

Adjuvant & Strip法を用いたNSAID外用剤の光感作性 に関する検討

○桑原 孝，朝波 省吾，鶴田 順一

(株)大塚製薬工場 鳴門研究所

【目的】佐藤らのAdjuvant & Strip法は，Adjuvantの皮内投与及び粘着テープでのStrippingを組み合わせるにより検出感度を上げた優れた方法であるが，その外挿性に関する報告は少ない。一方，医薬品の中ではNSAID(非ステロイド性抗炎症薬)外用剤に光アレルギーの副作用報告が多いが，他の方法で実施された前臨床試験ではいずれも光感作性は陰性となっている。そこで今回，市販のNSAID外用剤の光感作性について，Adjuvant & Strip法を用いて検討したので報告する。

【方法】佐藤らのAdjuvant & Strip法に準じて行った。感作用の検体としては，ケトプロフェン，ピロキシカム，インドメタシン及びフェルビナクの各市販外用製剤を用い，惹起用の検体としては，この他にチオサリチル酸の3%溶液を用いた。

【結果及び考察】臨床で光アレルギーの報告が多いケトプロフェン製剤については，全例で陽性反応が認められ明確な光感作性が確認された。ピロキシカム製剤感作群では，製剤に対しては全例陰性となったが，臨床で交差性が知られているチオサリチル酸に対しては1例が強い陽性反応を示した。一方，光アレルギーの報告がほとんどないインドメタシン製剤及びフェルビナク製剤については全例陰性となった。

以上，Adjuvant & Strip法は他の方法に比べ検出感度がよいこと及び外挿性のよいことが確認された。したがって，前臨床試験として外用医薬品の光感作性試験を実施する際には，Adjuvant & Strip法を用いるべきと考えられた。

ホルムアルデヒドおよびグルタルアルデヒドのモルモット
における皮膚感作性ならびに抗原性について

○ 門馬純子、関口裕巳、金沢由基子^{*}、鹿庭正昭、
川崎 靖、津田充宥、黒川雄二

国立衛生試験所・毒性、^{*}食品薬品安全センター・免疫毒性

【目的】ホルムアルデヒド (FA) およびグルタルアルデヒド (GA) は、医療用器具の滅菌・消毒剤として、あるいは病理および電顕標本などの組織固定液として広く使用されている。これら化合物は皮膚に接触する機会が比較的高い物質で、これまでにヒトでの接触アレルギー性皮膚炎が報告されている。今回、安全性評価の一環として、モルモットを用いた皮膚感作性を調べると共に、その強度、これら化合物間における交差反応性、さらに、抗原性についても併せて検討した。

【実験方法】皮膚感作性試験は Maximization法に準拠し、実験群 10匹、溶媒対照群および陽性対照群各5匹の Hartley系雌性モルモット (5~6週齢) を用いて実施した。感作用量は、予備試験の結果を参考にし、FAは10,000, 1,000および10 ppm、GAは 5,000, 500, 50および 5 ppmとした。感作時溶媒は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最大無刺激濃度以下とし、FAでは10,000, 1,000, 100, 10および1 ppm、GAでは5,000, 500, 50および5 ppmの希釈段階を用いた。なお、惹起時溶媒はアセトンを用いた。感作性の強さの評価は、最低感作濃度 (陽性反応が認められる最も低い感作濃度) のほか、最高感作濃度における皮膚反応の平均評価点がおおよそ1.0を示すところの最低惹起濃度、および感作率を求め、総合的な評価を行った。交差反応性試験は、FA感作動物にはGAで、GA感作動物にはFAで惹起を行った。抗原性試験は能動的全身アナフィラキシー (ASA) 反応および受動的アナフィラキシー (PCA) 反応より検討した。

【実験結果】FAの最低感作濃度は10 ppm以下、GAは5 ppm以下であった。最高感作濃度における皮膚反応の平均評価点が1.0を示す最低惹起濃度は、FAが1,000 ppm、GAが500 ppmであった。100%の感作率は、FAでは1,000 ppm以上の感作群、惹起濃度10,000 ppmで、GAでは50 ppm以上の感作群、惹起濃度500 ppm以上で認められた。また、FAおよびGA化合物間での交差反応性が認められた。抗原性試験では、両化合物共に軽度のASA陽性反応が認められたが、PCA反応は陰性であった。

【結論】モルモットを用いた皮膚感作性試験において、FAおよびGAは強い感作性を示すことが明らかとなった。

チオウレア系ゴム加硫促進剤の3種の感作性試験法による結果の比較

○五十嵐良明、土屋利江、門馬純子*、中村晃忠

国立衛生試験所 療品部、* 毒性部

【目的】最近我々は、マウスを用いた高感度の感作性試験法 (Sensitive mouse lymph node assay、SLNA)を開発した。今回はこの方法を用いて、チオウレア系ゴム加硫促進剤4種 (diethylthiourea (DETU), dibutylthiourea (DBTU), dilaurylthiourea (DLTU) および diphenylthiourea (DPTU)) の感作性について検討した。またモルモット Maximization test (GPMT) および Local lymph node assay (LLNA) でも試験を行い、これらの結果を比較した。

【方法】動物：BALB/c系マウス、雌性、6～8週齢およびHartley系モルモット、4週齢を用いた。SLNA：マウスの腹部皮内に試験物質と Freund's complete adjuvant とのエマルジョンを注射し、5日目から両耳に試験物質を3日間連続で塗布した。最終塗布の翌日に耳介リンパ節を取り出し、細胞浮遊液を調製し、細胞数を数えた。細胞は³H-thymidineと共に18時間培養した。溶媒のみで処置した Control 群と比較したときの実験群における細胞数および増殖反応の増加率を求め、これらからリンパ節活性化反応の増加率 (SI_{total}) を算出した。LLNA：Kimberらの in vitro法に従って行った。すなわち、マウスに試験物質を3日間連続で塗布し、リンパ節の活性化反応の増加率を求めた。GPMT：Magnusson & Kligmanの方法に準拠して行い、各々の物質の最低感作濃度、感作率を求めた。

【結果】LLNAとSLNAでは、SI_{total}が3を越える物質をpositiveと判定した。この評価基準を用いたところ、LLNAではDLTUのみの感作性しか検出できなかった。一方、SLNAではすべてのチオウレアがpositiveと評価された。DPTUは試験した4つのチオウレアの中では最も強い反応を引き起こし、2%皮内注射と5%の経皮塗布によって最高SI_{total}=32.2という値を示した。DLTUも同様に強い反応を示した。SLNAで、SI_{total}≥3を引き起こす皮内注射の濃度およびSI_{total}の値の大きさから感作強度を順序づけると、DPTU>DLTU>DBTU>DETUであった。GPMTではいずれのチオウレアも高い感作率を示した。各々の物質の最低感作濃度および惹起濃度から判定した感作強度の順序は、SLNAでの結果とほぼ同等であった。

Doxifluridine (DFUR) のマウスにおける胎児胸腺分化に与える影響

井上智彰、金崎寛子、堀井郁夫

日本ロシュ（株）・研究所・毒性病理部

DFUR は抗悪性腫瘍薬として開発された 5-FU 誘導体である。今回は、DFUR の胸腺細胞成熟過程への影響を評価するために、妊娠マウスに DFUR を投与することによって誘導される胎児胸腺への影響を細胞表面マーカーを解析することにより調べたので報告する。

【方法】 C57BL/6 系マウスを交配確認後、交配確認日を妊娠 0 日目 (GD0) とし、GD6 から GD14 までの器官形成期に DFUR (0-100 mg/kg/day) を母獣に連日 p.o. 投与し、GD18 および生後 1、2、4 週目の胸腺細胞を細胞表面マーカーに対する抗体 (CD4, CD8, J11d) を用いて フロ-サイトメトリ- (FACScan) により解析、および凍結切片を免疫組織化学的に検索した。また、生後 6 週目には脾細胞を用いたりンパ球幼若化反応、Cytotoxic T-cell 応答、および T 依存性抗原に対する抗体産生応答の *In vitro* 免疫機能試験を行った。

【結果】 GD18 の胎児胸腺では、重量および細胞数が DFUR により減少していた。CD4/CD8 の 2 重染色の結果、成熟過程の進んだ CD4+CD8+ (DP) 胸腺細胞数が減少しており、その中でも最も成熟過程の進んだ Small DP の減少が著明であった。一方、最も未熟な CD4-CD8- 胸腺細胞数はほとんど変化していなかった。生後 1、2、4 週目の胸腺では、変化はほとんど回復していた。また、免疫系が成立した生後 6 週目の免疫機能試験の結果、明確な免疫機能の変化は認めなかった。これらの結果より、マウスにおいて胎児の器官形成期に母獣に DFUR を投与することにより胎児に認められた胸腺細胞成熟過程の抑制は、生後ほとんど認めず、免疫機能的にも変化を認めなかった。よって、DFUR による胸腺細胞成熟過程の抑制は一過性のものであり生後まで残らないことが考えられた。

制ガン剤のラット脾臓における毒性発現とPFC反応抑制

○土井 孝良、永井 博文、佃 良一、鈴木 剛、宮崎 宏彰

武田薬品工業(株) 薬剤安全性研究所

〔目的〕近年、薬剤の免疫毒性の評価法の確立が望まれている。演者らは既に液性免疫の評価法であるplaque forming cell (PFC) 法のラットにおける最適条件について報告した¹⁾。本研究では、免疫毒性が最もよく知られている制がん剤のうち、アルキル化剤および代謝拮抗薬のラット脾臓における毒性発現用量とPFC反応を抑制する用量とを比較検討した。

〔方法〕アルキル化剤であるサイクロホスファミド、メルファラン、ナイトロミンおよび代謝拮抗薬であるアザチオプリン、6-メルカプトプリンをFischer 344ラットに単回あるいは7日間投与し、脾臓の重量およびcellularityの測定、病理組織学的検査ならびにPFC反応の測定を行った。

〔結果〕免疫抑制剤としても用いられるサイクロホスファミド以外の制がん剤による毒性、脾臓の重量およびcellularityの減少はPFC反応の抑制よりも高感度に検出された。また、PFC反応の抑制がみられる用量では、病理組織学的検査により、サイクロホスファミドで縁帯(B細胞領域)の細胞密度の低下、メルファランでは縁帯および動脈周囲リンパ組織鞘(T細胞領域)の細胞密度の低下、他の3種の制がん剤では単純萎縮(脾臓の縮小)というように、それぞれの薬剤に特徴的な所見が認められた。

〔結論〕制がん剤による脾臓への毒性、重量およびcellularityの減少ならびに病理組織学的変化はPFC反応の抑制より低用量あるいは少なくとも同じ用量で検出されること、また通常の毒性試験の中で検出が可能であることが明らかになった。

1) T. Doi, et al. J. Toxicol. Sci., 17, 225 (1992)

rG-CSFの抗体産生系における免疫毒性的検討

原俊子¹、永牟田雅弘¹、横田忠¹、丸谷清^{1,2}、田中公一¹

中外製薬（株）安全性研究所¹、岐阜大学大学院連合農学研究科²

炎症反応が免疫応答を増幅することから、炎症性サイトカインの抗体産生系への影響が危惧される。そこで我々は、炎症性サイトカインの一つであり、近年臨床治療において急速に普及してきたrG-CSF(以下、CSF)に注目し、その抗体産生系における免疫毒性の有無を検討した。

【方法および結果】免疫低下作用を有するサイクロフォスファミド(CPA:100mg/kg)を腹腔内投与したマウス(CPA投与マウス)では、末梢血中の白血球の減少が認められたにもかかわらず、OVAを抗原として免疫した際の抗OVA抗体(IgG+IgM)産生能は低下しなかった。一方、CPA投与マウスの脾細胞を、*in vitro*でOVA感作した際の抗体産生は著明に低下する事が判明した。従って、本*in vitro*の抗体産生系は、*in vivo*に比べCPA投与による免疫系の抑制状態を強く反映していると考えられた。そこで、CSFの抗体産生系への作用の有無をみるために、予めCSF(30 μ g/animal)を1日1回で3日間皮下投与したマウスの脾細胞を用いた際の抗体産生量を調べた。その結果、CSFの投与により抗体産生量は変化しなかった。しかし、無処置マウスの脾細胞にCSFを添加すると有意ではないが抗体産生量が増加する傾向が認められた。これについては現在詳細に検討を加えている。更に、LPSを用いて誘導した非特異的抗体産生系、および*in vivo*での抗原(OVA)特異的な抗体産生系においてCSFの作用を調べたが、抗体産生量の変化はみられなかった。

【結論】マウスの抗体産生系を用いた本検討結果より、CSFの抗体産生系における免疫毒性は極めて低いことが示唆された。

rIL-2連続注入時の毒性変化と出現する単核細胞に関する検討

○矢原 功, 山県英弘, 高野享治, 池内滋郎

塩野義製薬(株)・新薬研究所

インターロイキン2 (IL-2) 過剰投与時の毒性を検討する目的で、マウスに連続皮下注入した結果、興味ある所見を得たので報告する。

〔方法〕遺伝子組み換え型ヒト・IL-2 (rIL-2: 塩野義製薬) を充填したミニ浸透圧ポンプ (Alza) をマウスの皮下に挿入し、5000, 17000, 50000U/マウス/日を8日間連続注入した。同時に、1日1回8日間皮下投与 (bolus) 群を設けて諸臨床検査と病理検査を行い、比較した。さらに、経時変化と回復性についても検討した。

〔結果〕連続注入群では、好酸球が全群で増加し、17000U以上の群でvascular leakによる体重増加と脾臓が早期より発現した。さらに、注入部皮下の出血・水腫、肝臓の重量増加が用量依存的にみられ、経時的に増強した。50000U群では、ほかに、リンパ球増加、貧血、GOT、GPTの上昇が明らかであった。これに対し、bolus群では、好酸球が増加したのみで、 $1/10$ 量の連続注入群と同程度の反応であった。rIL-2連続注入部皮下には、単核細胞が集まって徐々に大型化し、PAS陽性顆粒をもつ好塩基性細胞質、大きい核と核小体を有する特徴的な細胞 (PGLと仮称) となって集積した。PGLは脾臓、肝臓にも多くみられるようになり、高度浸潤部に一致して血管壁や周辺組織の破壊が観察された。これらの多様な変化は注入を中止すると速やかに消退する反応性変化であった。

〔結論〕連続注入法により、ヒトで知られている副作用の多くをマウスでごく短期間に再現し得た。PGLが最も重要な毒性発現因子であると考えられたが、反応性変化であった。

rIL-2連続注入部に集積する単核細胞の免疫細胞化学的 検討

○山根英弘, 矢原 功

塩野義製薬(株)・新薬研究所

遺伝子組み換え型ヒト・インターロイキン2 (rIL-2) をマウスに連続注入すると, PAS陽性顆粒をもつ特徴的な大単核細胞が注入部に集積することが見出された。今回, 本細胞の特性を明らかにする目的で, 免疫細胞化学的に検討したのでその成績を報告する。
〔方法〕 rIL-2 (塩野義製薬) を充填したミニ浸透圧ポンプ (Alza) をBALB/c及びC57BL/6マウスの腹腔内あるいは皮下に挿入した。挿入7-9日目に腹腔内注入例から腹腔浮遊細胞 (PEC) を採取した。皮下注入例からは皮下小結節を採取し, 酵素法により細胞浮遊液を調製した。単クローン抗体として, FITC又はPEを結合した抗CD3 ϵ , L3T4, Lyt2, NK1.1, CD45R/B220及びF4/80抗体のほか, 抗asGM1抗血清を用いてFACScanにより表面表現型を検索した。さらに, PECのPercoll低密度分画よりサイトスピン標本を作製して抗Thy1.2, L3T4, Lyt2, F4/80抗体を用いてABC法で染色後, 分類した。

〔結果〕 rIL-2腹腔内注入例のPEC総数は無処置例PECの10倍を越え, Lyt2⁺及びNK1.1⁺細胞がとりわけ顕著に増加したほか, asGM1⁺, asGM1⁺NK1.1⁺細胞も増加した。皮下注入部の細胞はPECに比し, L3T4⁺, Lyt2⁺, NK1.1⁺及びasGM1⁺細胞の比率が高かった。PECではThy1.2⁺細胞が80%を占め, 無処置マウスPECに比し, L3T4⁺及びLyt2⁺細胞比が上昇し, F4/80⁺細胞はごく低率であった。

〔結論〕 PECでは, 細胞傷害性T細胞及びNK細胞が顕著に増加し, 皮下注入部ではこれらのほかヘルパーT細胞も高率であった。

ラットを用いたリンパ球幼若化試験に関する 基礎的検討

○中村 裕行、中井 洋一

武田薬品工業・薬剤安全性研究所

リンパ球幼若化反応は抗原等の投与が不要であることから、種々の免疫毒性検査の中でも通常の反復投与毒性試験に組み込むことが可能な数少ない検査の一つである。今回、ラットを用いたリンパ球幼若化反応について基礎的な検討を行ったので報告する。

F344雄ラットより分離した脾細胞にmitogen(concanavalin A, phytohemagglutinin, pokeweed mitogen, lipopolysaccharide)を加えて72時間培養し、培養終了6時間前に $[^3\text{H}]$ thymidineを添加して、脾細胞内に取り込まれた $[^3\text{H}]$ thymidine量を測定した。摘出後の脾臓を4℃で4時間保存した場合はviabilityおよび幼若化反応に保存の影響がみられなかったが、24時間保存した場合はviabilityには影響がなかったものの幼若化反応は低下していた。サンプリングする脾臓の部位について検討したところ、腹側部、中央部、背側部のいずれの脾細胞を用いてもmitogenに対する反応性には差は認められなかった。週齢差について検討したところ6~19週齢のラットでは週齢差は認められなかった。F344、WistarおよびSDラットについて系統差を検討した結果、SDラットが最も反応性が高く、次いでWistar、F344ラットの順に反応性が低下した。F344ラットに免疫機能を低下させることが知られているdexamethason(DXM)およびcyclophosphamide(CYP)を単回経口投与したところ、両薬物はいずれのmitogenを用いた場合でも、リンパ球幼若化反応を著明に抑制した。しかし、両薬物をin vitroで作用させたところ、DXMはリンパ球の幼若化を著明に抑制したが、CYPは抑制効果を示さなかった。

ヒトリンバ球を用いた *In vitro* 抗原性試験法への挑戦
—異種タンパク質を陽性対照とした培養系の確立—

井上智彰、大郷 豊、堀井郁夫

日本ロシュ（株）・研究所・毒性病理部

現在、医薬品の抗原性試験の多くは、モルモットおよびマウスを用いた試験系で行われているが、組換えDNAを用いて合成されたタンパク質製剤の抗原性評価には適していないと考えられる。今回は、ヒト末梢血リンパ球を用いた *in vitro* の抗原性試験法を開発するために、異種タンパク質に対して一次免疫応答を示す培養条件およびその検出系について検討したので報告する。

【方法】 健常男子より末梢血を採取し、Ficoll-paque 比重遠心分離により末梢血単核球 (PBM) を分離し培養に用い、抗原として Key-hole Limpet Hemocyanin, Ovalbumin, または種々の血清アルブミンを添加した。培養は、37°C 5% CO₂ 湿潤条件下で4~7日間行った。培養終了後に細胞を回収し、Filter Immunoplaque Assay (FIPA) にて、抗原特異的な抗体産生細胞を検出し、その数をカウントした。培養条件を検討するために、培養系には Muramil dipeptide (MDP), Interleukins, 2-Mercaptoethanol, Pokeweed mitogen などを添加し、その効果を調べた。また、PBM を Leucyl leucine methyl ester (LL) で処理することによる効果も調べた。

【結果】 培養条件としては、抗体産生に抑制的に働く細胞を LL 処理により不活化し、アジュバント成分である MDP および抗体産生を亢進させる Interleukins を培養系に添加することによって抗原特異的な抗体産生細胞を高率に誘導することができた。また、FIPA は培養上清中の抗体の検出の様に、添加抗原による産生抗体の中和を考えなくて良く、可溶性成分に対する抗体産生細胞の検出には感度の面でも有用であると考えられた。

アカゲザルリンパ球の比重遠心法および全血法による
フローサイトメトリー解析

○小倉 剛、富井靖志*、渡辺さつき、杉本哲朗、寺尾恵治**

中外製薬・安全性研究所、東京免疫薬理研究所*、
国立予研・筑波霊長類センター**

【目的】免疫毒性の評価において、フローサイトメトリー(FCM)によるリンパ球表面マーカーの解析は有効な方法のひとつである。解析にあたり、ヒト臨床領域ではリンパ球の分離方法によって測定結果に差があることが指摘されているが、実験動物、特にサルのリンパ球FCM解析に関する知見は乏しい。そこで今回、アカゲザルのリンパ球FCM解析における測定試料調製法を確立するため、比重遠心法と全血法を比較検討したので報告する。

【方法】アカゲザル(5~6歳齢、雌雄各6頭)よりヘパリン加採血を行い、Ficol-paque(Pharmacia, $d=1.077$)を用いた比重遠心法、および NH_4Cl を溶血剤とした2種類の全血法(A:溶血後に抗体反応、B:溶血前に抗体反応)によって、リンパ球あるいは白血球分画を分離した。その後、赤血球残存率とリンパ球回収率を算定するとともに、得られたリンパ球のCD4(Leu3a)、CD8(Leu2a)、CD16(Leu11a)、CD20(Leu16)陽性細胞比率をFACScanにて測定した。

【結果および考察】比重遠心法では、各マーカーの平均±標準偏差(%)はCD4⁺: 36.9 ± 8.1 、CD8⁺: 40.1 ± 8.7 、CD4⁺・CD8⁺: 2.6 ± 1.8 、CD16⁺: 10.7 ± 6.7 、CD20⁺: 9.8 ± 5.6 であった。比重遠心法に比べて、全血法BではCD4⁺が $43.4 \pm 9.3\%$ と有意に高値を示した。また、全血法Bでは、CD16⁺は検出されなくなった。ヒトではCD16が血中IgG-Fcレセプターと反応していることが推察されているが、詳細は明らかではない。赤血球残存率(%)は、比重遠心法: 0.1 ± 0.1 、全血法A: 4.3 ± 2.0 、全血法B: 5.3 ± 2.7 であった。個体によっては赤血球の沈降や溶血が不十分で、特に12例中2例では、赤血球の残存が顕著であった。リンパ球回収率に差はみられなかった。

以上、比重遠心法と全血法によるFCM解析の結果については、全血法BでCD16⁺細胞が検出されなかったことを除いて、予想したほどの大きな差は認められなかった。

遅延型アレルギー反応 (3) メタクリル酸誘導体の
反応性の検討○金澤由基子 小島幸一 山脇智予 岡田富士桜
横山雄一* 平尾政則*(働)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

メタクリル酸誘導体をモデルとした遅延型アレルギー反応について、その分子量や構造の違いと、モルモットを用いたMaximization Testの最大無刺激濃度での反応性の強さとの関連について、昨年の本学会等において報告してきた。今回は、化学物質の感作性の評価に最近利用されている最低感作濃度あるいは最低惹起濃度と上述の従来法との比較、さらに物理化学的性質との関連性について検討したので報告する。

【方法】 Hartley 系雌性モルモットを用い、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、メチル基をハロゲンで置換した誘導体など計20種類を用いた。最低感作濃度は感作濃度を公比10で設定し、惹起濃度を一定にした場合に陽性反応を示した最低濃度とした。同様に、最低惹起濃度は感作濃度を一定にし、惹起濃度を変えた場合に陽性反応が認められた最低濃度とした。物理化学的性質の指標としては、Octanol/Water 分配係数の対数值(logP)、脂肪鎖の炭素数等を用いた。

【結果】 従来最大無刺激濃度での反応は、誘導体の種類にかかわらず陽性率が100%付近に収束した。最低惹起濃度は、すべてが $10^0 \sim 10^{-2}$ Mの範囲に入り、構造との相関は認められなかった。最低感作濃度は、炭素鎖が6以下では最低惹起濃度とほぼ同値を示したが6を超えると感作性が強まり炭素数12でピークが認められた。logP値と最低感作濃度は炭素数6以上で良い相関が認められた。

化学物質の感作性の有無の評価法としてはどの評価法を用いても良いが、感作性の強さの比較や物理化学的性質との関連性を知るためには、最低感作濃度が有用であると考えられた。

マラリア原虫感染モデルを用いた生体防御機構評価の検討

○石島 奈美、山口 文恵、大野 広志、野村 護

第一製薬㈱ 開発研究所 安全性研究センター

免疫毒性評価において、生体防御機構への作用を調べる目的で、細菌（リステリア、ストレプトコッカス）、ウィルス（インフルエンザ）あるいは原虫（旋毛虫、マラリア）感染モデルを用いて宿主抵抗性が検討されている。今回、宿主特異性が高く、非経口ルートのみで感染が成立するマラリアに着目して検討を行なった。すなわち、免疫毒性評価には、主に近交系のマウスを使用することから、 $B_6C_3F_1$ マウスを用いた免疫毒性評価に応用できるよう、感染条件を吟味した。

感染源にはマウスのマラリア原虫 *Plasmodium berghei* をマウス腹腔内接種により継代しているものを、感染宿主には 7~8 週齢の雌 $B_6C_3F_1$ 系マウスを用いた。採取した感染血液は 0.1 ml 中に $10^4 \sim 10^8$ 個の感染赤血球を含有するように生理食塩液で調整し、マウスの腹腔内に接種した。感染状況は死亡および体重推移ならびに血液塗抹標本より赤血球 1000 個あたりのマラリア寄生率を求めることにより行った。死亡は感染後 7 日より散見され、50 % 死亡が認められるまでの日数は、 10^8 感染で 13 日を要し、感染量の減少に伴って延長し、 10^4 感染では 23 日となった。体重は、感染量に相関して減少した。寄生率は 50 % 寄生が認められるまでの日数でみると感染量の減少に伴って延長し、 10^8 感染が 10 日であったのに対し、 10^4 感染では 28 日となった。これらの成績から、感染量増加に伴い感染状況の悪化が確認されたが、薬物の影響を調べるには感染経過に持続性があり、ある程度の死亡率、寄生率を確認出来る量が有用と考えられたので、 10^6 感染を用いることとした。次に免疫抑制作用を持つサイクロフォスマイドで影響を調べたところ、死亡ならびに寄生率が強まり、宿主抵抗性の低下が本モデルでも再認された。

今回の条件検討により $B_6C_3F_1$ マウスにおけるマラリア感染モデルを免疫毒性の生体防御機構評価に活用できるものと考えられた。

ペントバルビタール麻酔に対する empenthrin の影響

辻 良三、磯部直彦、川崎一

住友化学 生物環境科学研究所

一部のピレスロイド系殺虫剤にはマウスにおいてペントバルビタールによる麻酔作用を増強する作用があることが報告されている。本発表ではピレスロイド系殺虫剤である empenthrin のペントバルビタール麻酔作用に対する影響を明らかにするとともに、そのメカニズムおよび種差について検討したので報告する。

雄性マウスに empenthrin を経口投与し、その 2 時間後にペントバルビタールを腹腔内投与してそれによる睡眠の時間を測定した。その結果、用量依存性でかつ一過性の睡眠時間の延長を認めた。エーテルによる麻酔作用に対しては延長作用を認めなかった。次に、ペントバルビタールの血中濃度の推移に対する影響を調べた。Empenthrin は覚醒時におけるペントバルビタールの血中濃度には影響を及ぼさなかったが、血中濃度半減期の延長作用を認めた。ラットについては高用量の適用においても麻酔時間の延長はみられず、また、ペントバルビタールの血中濃度の推移にも無影響であった。肝ミクロゾームを用いたインビトロの系において、empenthrin はマウスでペントバルビタールの代謝阻害を認めたが、ラット、モルモット等の動物種では代謝に影響を認めなかった。

以上の結果から、empenthrin のマウスにおけるペントバルビタール麻酔増強作用は中枢抑制によるものではなくペントバルビタールの代謝阻害によることが示唆された。また、この作用はマウス以外の動物種には認められず、ヒトにおいて発現する可能性は低いと考えられた。

肝薬物代謝酵素誘導の性差—特に抱合系酵素誘導に注目して—

○五十嵐 功, 大橋芳彦, 矢本 敬,
高岡雅哉, 寺西宗広, 真鍋 淳

三共(株)安全性研究所

化学物質による肝薬物代謝酵素誘導には性差がある。今回、F344ラットの雌雄に6種類の誘導剤を投与し、従来よく調べられているチトクロームP-450に加え、抱合系酵素誘導の性差に注目した。

(材料および方法) 3-methylcholanthrene(3-MC;10mg/kg), phenobarbital(PB; 60mg/kg), β -naphthoflavone(BNF;10mg/kg), pregnenolone 16 α -carbonitrile(PCN;50mg/kg), isosafrole(ISO; 150 mg/kg)を3日間連続腹腔内投与あるいはacetone(AT;5%溶液)を10日間飲水投与した。その後、肝臓を採取して肝臓中P-450量, 7-alkoxycoumarin O-dealkylase(ACD), UDP-glucuronosyltransferase(UDPGT), glutathione S-transferase(GST)活性をそれぞれ測定した。また、5種類のGSTサブユニット(Ya, Yb1, Yb2, Yc, Yp)に対する抗体を用い、免疫ブロッティングによりGST誘導の性差を検討した。

(結果および考察) P-450量およびACD活性を指標とするP-450の誘導反応に性差が明確でないのに比べ、UDPGT, GST活性の誘導に著明な性差がみられた。すなわち、PCNとAT投与群の雄ではUDPGTが誘導されたが、雌では誘導は認められなかった。GSTはPB投与群では雌、AT投与群では逆に雄で誘導が確認された。しかし、PB投与群とAT投与群で検出されたGST誘導の性差に注目して、GSTサブユニットに対する抗体を用いた免疫ブロッティングを実施した結果、PB群の雌およびAT群の雄で誘導されたGSTサブユニットを同定することはできなかった。すなわち、今回検索した5種(Ya, Yb1, Yb2, Yc, Yp)以外のGSTサブユニットの誘導に性差があるものとする。

イヌ肝ミクロソームの β -遮断薬水酸化酵素中村明生¹⁾、升田真木彦²⁾、数坂昭夫²⁾、藤田正一²⁾

1) 日本新薬 薬剤研究所 2) 北大 獣医学部

(目的) CYP2Dはヒトの遺伝的多形が報告されているP450種のひとつである。CYP2Dにより主として代謝される薬物の副作用はCYP2Dを遺伝的に欠損するpoor metabolizerで増強する可能性があるため、CYP2Dはヒトにおける医薬品の安全性という観点から重要である。現在までに多くの医薬品(デブリスキン等)がこのCYP2Dによって代謝されることが確認されている。 β -遮断薬であるブニトロロール(BTL)の4位の水酸化反応は、ラットではCYP2D(P450BTL)によって触媒されることが明かにされている。今回、我々はイヌの肝ミクロソームのBTLの4位水酸化活性を検討し、さらにBTLの4位水酸化反応を触媒するP450(P450CF1)を精製したので報告する。

(方法) BTLの4位の水酸化活性はHPLC法にて測定した。P450CF1はラットのP450BTL抗体との免疫交叉性を指標に、薬物未処理のビーグル犬の肝臓から、 ω -オクチルアミノセファロース4B、DEAE-5PW及びヒドロキシアパタイトカラムを用いて精製した。(結果及び考察) (1) イヌの肝ミクロソームのBTLの4位水酸化反応はKm値が異なる2つのMichaelis-Menten式で解析されることから複数の酵素の関与が示唆された。

(2) P450CF1はSDS-PAGE上単一にまで精製され、見かけの分子量は49kDaであった。N末端のアミノ酸配列と先に報告したイヌのCYP2DのcDNAの塩基配列¹⁾とを比較すると、N末端から4個のアミノ酸が欠落している以外は両者は一致していた。(3) P450CF1は、再構成実験においてBTLの4位水酸化反応を触媒した。

以上の事実から、P450CF1はイヌ肝ミクロソームにおいてBTLの4位水酸化反応に関与するP450種のひとつであり、CYP2Dのサブファミリーに属することが示唆された。

1) 田崎隆史、伊東進、鎌滝哲也、藤田正一、第117回日本獣医学会

リスザル初代培養肝細胞における薬物代謝酵素の誘導

西部泰弘、原内敏夫、若林美津子、江口景子、平田雅春

塩野義製薬(株)新薬研究所

〔目的〕 医薬品の開発過程において、薬物代謝酵素系に対する影響を調べることは、その薬物の薬効や毒性及び薬物相互作用を知る上で重要である。我々はリスザル初代培養肝細胞を用いて、薬物代謝酵素誘導能をin vitro で評価出来る試験系を確立することを試み、すでに報告したイヌ初代培養肝細胞と比較した。

〔実験方法〕 雄性リスザル 2-4歳を用い、コラゲナーゼ灌流法で肝細胞を単離、Williams' E培地を用いて単層培養し、フェノバルビタール(PB)、 β -ナフトフラボン(β -NF)及びリファンピシン(Rif)の影響を調べた。酵素誘導の指標として肝細胞中の7-methoxycoumarin, 7-ethoxycoumarinのO-dealkylase(MCOD, ECOD), 7-ethoxyresorufin O-deethylase(EROD), testosterone 6β -, 16β -hydroxylase (6β -OH-T, 16β -OH-T)活性を測定した。また、誘導されたP450分子種をimmunoblotting法により同定した。

〔実験結果〕 リスザル肝細胞の薬物代謝酵素活性は経時的に低下し、培養72時間目には初期値の45-50%となった。PB 0.5mMで MCOD, ECOD活性ともに経時的に上昇し、培養72時間目にはcontrolの約7倍の活性を示した。 β -NFではEROD活性の上昇、Rifでは 6β -OH-T活性の僅かな上昇が認められた。Western blotting法により、PB処理ではP4502B及び3A、 β -NFではP4501A、RifではP4503Aサブファミリーの誘導が確認された。

以上の結果から、リスザル初代培養肝細胞はイヌ初代培養肝細胞と同様に薬物代謝や酵素誘導を調べるためのモデルとなる可能性が示唆された。

ヒト成人及び胎児型P450 (CYP3A4及びCYP3A7) を安定的に発現する細胞株の樹立とその毒性学的応用

北大・薬・代謝

○橋本 尚、中川徹也、横井 毅、沢田 稔、伊東 進、鎌滝 哲也

【目的】 CYP3A4及びCYP3A7は、成人及び胎児肝でそれぞれ特異的に発現しているチトクロームP450分子種であり、変異原・癌原性物質の代謝的活性化にも関与している。そこで両酵素のcDNAをそれぞれ培養細胞に導入し安定的に発現する細胞株の樹立を行った後、AFB₁等の変異原物質に対するCYP3A4及びCYP3A7発現細胞の感受性について比較、検討を行った。

【実験・考察】 モルモットP450還元酵素cDNAを導入したCHL細胞株(CR119)に、CYP3A4、CYP3A7cDNAを導入し、安定的にそれぞれのP450を発現する細胞株を樹立した。これらの細胞株にAFB₁を添加し、48時間培養後の50%致死率でAFB₁に対する感受性を比較したところ、ともに親株(CR119)の10倍以上の感受性の増大が認められた。さらにCYP3A活性化剤である α -ナフトフラボン(α -NF)又は阻害剤であるトロレアンドマイシン(TAO)を添加して同様の検討を行ったところ、AFB₁に対する感受性はともに無添加の場合に比べ、 α -NFでは約7倍増大、TAOでは約1/4倍低下した。また阻害剤によるAFB₁感受性の低下は、TAO以外の14員環マクロライド系抗生物質を用いても同様に認められた。

次に、他の変異原物質に対する感受性の有無を検討したところ、両P450発現細胞ともにステリグマトシスチン、AFG₁に対しても感受性の増大が見られた。

以上のことよりCYP3A4とCYP3A7は毒性学的に類似した機能をもっていることが示唆された。

多様なラット肝スルホトランスフェラーゼ(ST)による癌原性アリールメタノールの代謝的活性化

○小倉健一郎、奥田晴宏、渡部 烈

東京薬科大学・第二衛生化学教室

【目的】我々は既にラット肝可溶性画分から癌原性アリールメタノール類を抱合活性化するヒドロキシステロイドST(HST)の主アイソザイム(STa)を単離・精製し、そのcDNAクローニングに成功している。本研究ではさらにcDNAクローニングならびにcDNAの大腸菌中における発現を進め、ラット肝HSTの多様性を明らかにすることを目的とした。

【方法】雌SD系ラット肝 λ gt11 cDNA ライブラリーのスクリーニングは抗STa抗体ならびに合成オリゴヌクレオチドプローブを用いて行った。HSTをコードするcDNAの大腸菌中における発現は大腸菌発現ベクターpKK223-3を用いて行った。

【結果・考察】上記ライブラリーよりSTaをコードするST-40 cDNAの他に ST-41, -20, -21, -60 と命名したcDNAが単離され、いずれのcDNAもSTaのそれとほとんど同じサブユニット分子量 (M_r 33,084-33,535)ならびにSTaと高い相同性(>83%)を示すアミノ酸配列を持つタンパク質をコードしていた。得られた各cDNAを発現ベクターを用いて大腸菌中で発現させ、調製した大腸菌可溶性画分について抗STa抗体を用いたimmunoblot分析ならびに活性測定を行った結果、いずれのcDNAの発現系においてもSTaサブユニットと同一易動度(30.5 kDa)に免疫交差性を示すタンパク質が検出され、またHSTの特異的基質であるdehydroepiandrosteroneに対する活性を示した。以上により、ラット肝可溶性画分中には、互いにほとんど同一分子量、免疫交差性ならびに同等性の高い一次構造を有する少なくとも5種類のHSTサブユニットが存在することが強く示唆された。

癌原性アリールメタノール類のSulfotransferase依存的な
DNA付加体のラット肝における生成

○奥田晴宏、小倉健一郎、渡部 烈

東京薬科大学・第二衛生化学教室

【目的】癌原性アリールメタノール類は、ラット肝sulfotransferase (ST)によって反応性に富む硫酸エステルへと活性化されDNAを修飾することを我々は主に仔牛胸腺DNAを用いるin vitro実験により明らかにしてきた。本研究では強癌原性物質7,12-dihydroxymethylbenz-[a]anthracene (DHBA)および5-hydroxymethylchrysene (5-HCR)のラット肝におけるST依存的なDNA修飾を³²P-ポストラベル分析を用いて明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】1) 12日齢雌性ラットにDHBAならびに5-HCRの活性硫酸エステルを投与(0.25 μmol/g body wt)したラット肝DNA付加体は、仔牛胸腺DNAをin vitroでそれぞれ対応する活性硫酸エステルで修飾して得られたDNA付加体と極めて一致していた。肝DNA中の主な付加体はグアニン残基の環外アミノ基との付加体DHBA-dpGpおよびアデニン残基の環外アミノ基との付加体5-HCR-dpApであり、HPLCにより合成標品と同定された。2) DHBAおよび5-HCRを同様にラットに投与した場合にもDHBA-dpGpおよび5-HCR-dpApがそれぞれ主付加体として検出された。3) DHBA-dpGpの生成はhydroxysteroid ST (HST)の内因性基質dehydroepiandrosteroneの前投与により顕著に抑制されたことからHST依存的であることが明らかになった。本付加体は投与3日目までは速やかに減少するものの、その後の減少は緩やかであり、投与28日目においてもなお肝内に残存していた。

【結語】癌原性アリールメタノール類はラット肝内においてHST依存的にDNA中のプリン塩基と付加体を形成することが³²P-ポストラベル分析を用いて明らかになった。

発癌活性代謝物アリールメチルサルフェートを解毒する
Glutathione S-Transferase Yrs-Yrs

○平塚 明、小倉健一郎、奥田晴宏、渡部 烈

東京薬科大学・第二衛生化学教室

【目的】 演者らはこれまで、発癌性アリールメタノール類はいずれもラット肝細胞質の sulfotransferase (STa) によって反応性に富む硫酸エステル体へ代謝されること、そしてこれら活性硫酸エステル体はGSH及び肝可溶性画分共存下GSH 抱合体へ解毒されることを併せて明らかにしてきた。本研究では、ラット肝可溶性画分において上記活性硫酸エステル類を無毒化するGSTを解明することを目的とした。

【方法】 GSTの精製は、7週齢雄性SDラット肝細胞質画分より、5-hydroxymethylchrysene sulfate (5-HCRS) GSH 抱合活性を指標とし、各種クロマトグラフィー (DE-52, S-hexyl-GSH Sepharose 6B, chromatofocusing, blue Sepharose, TSK Gel 3000SW) により行なった。GST分子種のHPLC分析は逆相分配カラムを用い行なった。

【結果・考察】 5-HCRS-GSH 抱合活性を有するGSTはpIの異なる3種の分子種(7.9, 7.8, 7.7)として精製され、下記に列挙する諸性質をそれぞれ有していた。1) SDS-PAGEでそれぞれ同一分子量(Mr. 26 KDa)を与えた。2) 逆相HPLCより、2種のサブユニットからなるホモ(pI 7.9 および pI 7.7)あるいはヘテロ二量体(pI 7.8)であることが明らかとなった。3) N-末端アミノ酸配列ならびに免疫化学的にラットの既知の全ての分子種とは同等性を持たず、HPLCによってもラット肝GST分子種とは異なることが明らかとなった。4) 5-HCRSの他、数種の活性硫酸エステルならびに ethacrynic acid に対するGSH抱合活性ならびに cumene hydroperoxide ならびに各種脂肪酸のモノヒドロペルオキシドに対するGSH peroxidase 活性を有したが、CDNB, DCNB, EPNP 等に対するGSH抱合活性は示さなかった。

【結語】 SD系雄性ラット肝より、癌原性アリールメチルサルフェートを解毒する新種(⊙クラス)のGST分子種が精製された。得られた3種の分子種は"reactive sulfate"を解毒するYタンパクの意で等電点の高い順に Yrs-Yrs, Yrs-Yrs', および Yrs'-Yrs' と命名された。

低 glutathione S-transferase 犬とそのモニタリング法

○大橋芳彦・杉浦智美・真鍋淳・安田充也・中津川泰充・大西和
平野光一

三共（株）安全性研究所

Glutathione S-transferase (GST) はアミノ酸の構造解析から alpha, mu, pi, theta の 4 つに分類される。犬の GST サブユニットとしては Yd1, Yd2, Yd3 および Ydf が知られ, theta に属する GST Ydf Ydf は 1,2-dichloro-4-nitrobenzene (DCNB) に基質特異性を示す。

我々は 2 カ所の実験動物施設で生産された犬(ビーグル)の肝臓サイトソル中 GST 活性を調べた結果, DCNB 基質に対して非常に低い活性しか示さない個体が存在することを見出した。今回, その経過と GST 活性の生体モニタリング法について検討を行ったので報告する。

実験 1: 毒性試験の対照群に使用した A 生産と B 生産の犬の肝臓を用いてホモジネートを作製した。遠心によって得られたサイトソル (105,000×g 上清) 中 GST 活性を測定した。GST 活性の測定は基質に DCNB と 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) を用い Habig らの方法によって行った。

実験 2: GST 活性の測定基質である DCNB を C 生産の犬に 100mg/kg, B 生産の犬に 5mg/kg, 経口投与して DCNB の血中濃度を HPLC を使用してモニターした。また, その犬の肝臓サイトソル中 GST 活性を測定した。

結果と考察: DCNB に対する肝臓サイトソル中での GST 活性は A 生産犬では 8.1~103.3 nmole/min/mg protein, B 生産犬では 1.2~144.7 nmole/min/mg protein を示し, A 生産で 20 例中 1 例, B 生産で 29 例中 6 例に 10 nmole/min/mg protein 以下を示す低 GST 活性犬が認められた。また CDNB 基質に対しても低い傾向が認められた。そこで, この低 GST 活性犬の選別を目的として, B 生産と C 生産の犬に DCNB を投与した結果, 血中における DCNB クリアランスに大幅な遅延の認められる例が B 生産に 5 例中 2 例, C 生産の犬に 4 例中 1 例認められた。これらの例の肝臓サイトソル中 GST 活性は低く, DCNB 基質ではいずれも 10 nmole/min/mg protein 以下であった。すなわち, 肝臓中 GST 活性の低い例では DCNB を投与した場合, これを代謝することができず血中の DCNB が高い状態に維持されたものと思われる。

以上のことから, DCNB の血中動態を解析することにより, 低 GST 犬 (低 GST Ydf) の選別が可能となった。

化学物質のラット肝実質細胞に対する小核誘発性
について○鈴木正明、野田圭介、野口 忠、浅倉真澄、
杉山淑江、松島泰次郎

日本バイオアッセイ研究センター

【目的】骨髄を用いる小核試験が *in vivo* 変異原性試験として主に用いられているが、代謝活性化により変異原性を示す物質に対する感受性が低い。昨年、骨髄を用いる小核試験で陰性の発癌性ニトロソアミン類の小核誘発性をラット肝を用いる小核試験で証明した（日本環境変異原学会 22回大会）。ラット肝を用いる小核試験法は感受性が高くかつ簡便で有用性の高い方法である。今回ラット肝でのDiethylnitrosoamine (DEN)の小核誘発性の経時的变化を検討した。

【方法】F344雄ラットにDENを12.5mg/kg単回腹腔内投与し、1、2、3、7、15または30日後に部分肝切除（PH）を行った。また部分肝切除後0、1、2または3日目にDENを投与する試験も行った。部分肝切除後4日目に肝細胞をコラゲナーゼ灌流法で分離し、中性ホルマリンで固定した後、4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)で染色し、蛍光顕微鏡で小核を有する肝実質細胞を観察した。

【結果】全ての投与時期においてDENはラット肝で明らかに小核を誘発した。投与7日後に部分肝切除を行った場合に最も高率に小核が誘発された。部分肝切除2、3日後にDENを投与した場合は他の投与時期と比較して小核の誘発は低い値を示した。DEN投与後30日目に部分肝切除を行った場合でも小核の誘発が認められた。DENの代謝は非常に早くDNAに対する作用はパルス的に起こるので、そのDNAの傷は30日間完全には修復せず存在していることが推察される。現在、DNAに対する作用の異なる物質についても検討を行っており併せて報告する。

雄ウサギにカーバメート殺虫剤を静脈内投与した時の
コリンエステラーゼ阻害によらない急性死

○高橋宏明、柿沼優子、二川治子

残留農業研究所

コリンエステラーゼ (ChE) 阻害剤を哺乳動物に投与した時の急性死の経過として、中枢性の血圧上昇に続き呼吸麻痺に移行し死亡することが知られる。ウサギは急性毒性反応解析に繁用されるにも関わらず、ChE 阻害剤を投与した時の急性死の経過は十分に検討されていない。本研究ではphysostigmine とカーバメート殺虫剤 (PHC、BPMC) をウサギに静脈内投与した時の急性死の経過に違いがあるか検討した。

体重2.5 ~3.7 kgの雄性日本白色ウサギにChE 阻害剤を投与するとChE 活性の抑制を示唆する症状と全身ChE 活性の抑制がみられた。症状、ChE 活性の抑制程度にChE 阻害剤の違いは認められなかった。一方、循環系に対する作用はChE 阻害剤によって異なっていた。physostigmine を投与すると投与数分後に最大に達する血圧上昇がみられ呼吸停止した。PHC では血圧は投与中に若干低下したあと上昇に転じ、その後はphysostigmine と同様の変化を示した。BPMC では血圧は投与中から著明に低下し呼吸停止に到った。アトロピン前処置によりphysostigmine とPHC の血圧上昇、死亡は有意に拮抗されたが、BPMCの血圧低下、死亡は拮抗されなかった。心電図変化をみると、physostigmine とPHC では血圧上昇期にQRS電位、RR時間、TP時間の増加がみられたが、BPMCではQRS電位の減少がみられた。アトロピン前処置によりBPMCのQRS電位減少以外の心電図変化は拮抗される傾向にあった。一方、ノルアドレナリン静脈内投与による血圧上昇はBPMC前処置では著明に、PHC前処置では軽度抑制されたが、physostigmine前処置では抑制されなかった。

以上より、physostigmine とPHCの急性死の発現にはChE 阻害作用が重要と思われた。しかしながら、BPMCはChE 活性の抑制以外の要因によって循環反応を生じて急性死を発現すると推測された。

ラット急性パラコート中毒による肺臓、肝臓、腎臓ならびに心臓における遊離脂肪酸蓄積におよぼすプロプラノロールとリドカインの作用

○三浦 格、橋爪 裕子、Nina Hoque、A.N. Ehsanul Hoque、
安孫子 保

旭川医科大学・薬理学教室

パラコート(PQ)は、除草を目的として広く撒布されている農薬であるが、いったん生体に接触したり吸収されたりすると、いろいろな臓器に甚大な障害をもたらす。このPQ中毒は、PQによって発生するフリーラジカルが細胞膜を障害して起こると考えられているが、その詳しいメカニズムは未だ不明である。我々は細胞膜を構成するリン脂質(PL)におよぼすPQの作用を明らかにする目的で、ラットにPQ(50 mg/kg, s.c.)を投与し、24時間後に肺臓、肝臓、腎臓、心臓を摘出して各臓器中の遊離脂肪酸(NEFA)含量を、液体高速クロマトグラフィーを用いて測定した。またPQによるNEFA含量変化におよぼすプロプラノロール(1 mg/kg, s.c.)とリドカイン(10 mg/kg, s.c.)の作用についても検討した。PQの投与により、肺臓、腎臓、心臓において特にバルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノレイン酸の増加がみられたが、肝臓では大きな変化はなかった。プロプラノロールは、肺臓、腎臓、心臓におけるPQによるNEFAの増加を抑制した。またリドカインは肺臓と腎臓において、PQによるNEFAの増加を抑制したが、心臓においては抑制しなかった。以上の結果からPQは、肺臓、腎臓、心臓において細胞膜のPLを障害してNEFAの蓄積をもたらす可能性が示唆された。またプロプラノロールとリドカインは、このPQによるNEFAの蓄積を一部抑制することが明らかになった。

虚血再灌流による消化管粘膜障害とヒドロキシラジカルの
産生

○小畑俊男、*平田孝浩、細川博司、山中康光、内田雄三*

大分医大・薬理、*外科第二

各種病態とフリーラジカルとの関係が報告されているが、一般に組織は虚血によって障害されるが小腸粘膜に与える影響は十分に解明されていない。そこで我々は *in vivo* マイクロダイヤリシス法を用いて臨床上血栓などによる虚血をおこしやすい小腸に注目し、再灌流後の粘膜の機能的変化とフリーラジカルとの関係を検討した。ラットを麻酔した後、腹部正中線に沿って下方へ皮膚、腹筋を切開し、大腸より約 10 cm 程上部の空腸の粘膜に我々の開発した手製のマイクロダイヤリシスプローブをセットした。0.5 nmole/ μ l/minでリンゲル液に溶かしたサリチル酸を灌流させ、10分毎に 0.1 N HClO₄ 入り回収用チューブに氷水中で集めた。空腸粘膜中に発生するヒドロキシラジカルとの反応によって生成する 2,3-dihydroxybenzoic acid (DHBA) を電気化学検出による高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法により測定した。腸管膜動脈をそれぞれ10分、20分、30分虚血し再灌流したところ、2,3-DHBA のレベルは 10分で最も高く、30分では最も低かった。そこでレーザードップラー血流計を用いてそれぞれの虚血時間における虚血および虚血後の血流を測定したところ、10分虚血では再灌流直後、虚血前に比べて上昇し、その後徐々に虚血前のレベルに戻った。しかし30分虚血では再灌流後の血流の上昇は認められなかった。光顕的所見では 30分虚血で最も腸管膜粘膜の破壊が認められた。以上の結果より10分虚血後再灌流するとフリーラジカルは増加するが、30分虚血では腸管膜粘膜が破壊し、再灌流による血流が充分再開通しなかったためフリーラジカルの上昇は少なかったものと思われる。

ラットの catecholamine および corticosterone に対する吸入麻酔薬の影響

増淵美子・永田良一・鮫島秀暢・平井正直

新日本科学 学術部門

臨床使用の sevoflurane (Sevo)、isoflurane (Iso) 麻酔及び吸入麻酔下の外科的侵襲時の catecholamine (CA) 及び corticosterone (B) の動態を調べた。全身麻酔器はテキサス 5R-F、気化器は Sevotec 3、Isotec 3 および小動物人工呼吸器を用いた。16 および 30 週齢 Donryu 雄を、Intact (Int)、麻酔群、麻酔+開腹群とし、CA は HPLC-ECD 法で測定した。海馬と視床下部は Glowinski 法で分取した。Plasma 中の norepinephrine (NE) は Int 群に比し、Sevo 或は Iso 麻酔下の全ての群で有意低値を示したが epinephrine は軽度低下した。海馬の NE は Int 群に比し Sevo で有意低値 Iso で低値傾向、dopamine は有意変動は無かった。視床下部の NE は Int 群、Sevo 群、Iso 群間に差なく Sevo+開腹で低値を示した。副腎内 B は HPLC 法で測定、Sevo 及び Iso 麻酔に於て Int 群に比し有意高値を示したが麻酔後経時変動はなかった。Plasma 中 B は Int 群に比し Sevo、Iso 麻酔共に基準点 (15 分) に於て夫々高値傾向を示し、30 分後更に有意高値を示し、経時的上昇を示した。開腹では Iso で有意高値を示した。吸入麻酔薬は、plasma 中 CA を抑制し又最小肺胞内濃度 (MAC) が小さいもの、すなわち麻酔効果の強い麻酔薬ほど生体反応は小さく出現した。麻酔下での開腹ストレスによる CA は麻酔のみに比べ有意高値を示し、外科的ストレスに対する生体防御機構は吸入麻酔下においても十分対応出来ることを証明した。吸入麻酔薬で B は有意上昇を示した。この場合 1MAC の値が小さいものほど麻酔効力が強く、B の上昇が抑制された。吸入麻酔下の開腹ストレスでは下垂体-副腎皮質系は反応を示し、生体防御機構は十分に作動することを証明した。

アドリアマイシン-酸化デキストラン複合体の
心毒性軽減に関する一考察○入江弘之、木村和幸、内藤寿英、小柴 博、
花田秀一、岩井正和

(株)ミドリ十字・中央研究所・安全性研究所

【目的】当社で開発されたアドリアマイシン-酸化デキストラン複合体(ADM-OXD)は、アドリアマイシン(ADM)と比較し、慢性心毒性(Jpn. J. Pharmacol., 58, 1992.)のみならずラット胎仔心筋初代培養細胞(日本薬学会第111年会)に対する直接的な心毒性も軽減されている。今回、ADM-OXDが低心毒性を示す原因を解明すると同時にADMの心毒性発現機序を*in vitro*で検討した。

【方法】Wistar系ラット胎仔(14~18日齢)より心室を摘出し、トリプシン消化により得た単離心筋細胞を10%FBS添加Ham's F-12培地で2日間前培養した後、10~320 μ MのADM-OXDあるいはADMに24時間まで暴露させ、細胞内GSH、GSSG、LPO、ATP量、 $[Ca^{2+}]_i$ を測定したほか、 Na^+ 、 K^+ -ATPase阻害活性を測定し、両物質の影響を比較検討した。

【結果】ADM暴露により*in vitro*でみられた心筋細胞の頻脈ならびに空胞形成に先んじた変化として $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が認められ、それに続きATP量の減少がみられた。しかし、GSH、GSSG、LPO量の変化は遅延的に認められたのみであった。一方、ADM-OXD暴露では $[Ca^{2+}]_i$ の上昇はみられず、また、他のパラメーターの変化も軽微なものであった。さらに、ADMは直接的に Na^+ 、 K^+ -ATPase活性を阻害したが、ADM-OXDではこの作用は認められなかった。

【結論】ADMの心毒性は Na^+ 、 K^+ -ATPase活性阻害作用を介した $[Ca^{2+}]_i$ の上昇により誘発されると考えられた。また、ADM-OXDとADMの心筋細胞に対する障害性の相違は Na^+ 、 K^+ -ATPase活性に対する阻害作用の差に起因する可能性が示唆された。

Protective Effects of Radical Scavengers on Cisplatin Nephrotoxicity in Rats

Choung Se Young

Kyung Hee University, Korea

Cis-dichlorodiamminoplatinum (cisplatin) is one of the most effective antitumor agents currently available for cancer therapy. However, its clinical use has been limited by its severe side effects, especially nephrotoxicity. therefore, 2(3)-tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA), Vitamin C and brazilin were given intraperitoneally to evaluate the protective effect of these compounds to the cisplatin nephrotoxicity in rats. Remarkable protective effects of radical scavengers against nephrotoxicity of cisplatin were observed when BHA was administered to rats 1hr after cisplatin injection, Vitamin C was administered to rats with cisplatin. On the other hand, pretreatment with BHA 1hr prior to cisplatin elevated weight loss, blood urea nitrogen and creatinine levels. These may be concerned with enzyme induction. Hepatotoxicity induced by combination treatment of cisplatin and radical scavengers was evaluated by measuring serum glutamic pyruvate transaminase and serum glutamic oxalate transaminase. Combination treatment did not affect the levels of sGPT and sGOT except 1hr pretreatment of BHA and any combination treatment did not induce metallothionein in kidney. These compounds which has radical scavenging effect directly reduced nephrotoxicity of cisplatin. Thus, it seems that nephrotoxicity of cisplatin was caused by free radicals. Combination treatment except brazilin did not reduce anticancer activity of cisplatin. The present results indicate that radical scavengers, when it is given with cisplatin, may provide protection against cisplatin nephrotoxicity without reducing anticancer activity.

雄ラットにおける生殖毒性評価法の検討2
 -ネフィラセタムの精子形成障害の作用機序の検討-

〇坂口 ゆかり¹⁾ 島田 信¹⁾ 原田 滋雄¹⁾ 楠雄 耕司¹⁾ 野村 護¹⁾ 田谷 一善²⁾

第一製薬(株)開発研究所安全性研究センター¹⁾ 東京農工大²⁾

前回、本学会において雄ラットにおける生殖毒性評価法の検討1としてスパームヘッドカウント(精巢中精子頭部計数)およびセルトリ細胞から分泌される鉄結合性蛋白質で、増殖盛んな精細胞に鉄を運搬することにより精子発生過程に関与するtransferrin濃度測定が精巢毒性を評価するうえで有用な方法であることを報告した。

今回、大量投与によってラットの精子形成障害を起こすことが明らかになっている脳機能改善薬のネフィラセタムについて、これらの測定法および血中と精巢中のtestosterone濃度の測定を行い、本剤投与による精子形成障害の作用機序の検討を行った。

雄ラットにネフィラセタムの1500mg/kgを4週間経口投与後、交配させ、精巢重量、スパームヘッドカウント、精巢中transferrinの測定および胎児検査を行った。その結果、精巢重量が有意に低下し、精子頭部数は、対照群の 3.5×10^8 に対し、 1.0×10^8 と有意に減少しており、精子形成障害作用が認められた。しかし、transferrinには変化が認められず、セルトリ細胞の機能は障害されていないと推察された。交配成績は、交尾率78%、授胎率57%であったが、胎児には影響は認められなかった。

次に、同一量のネフィラセタムを単回投与後4, 8, 12時間に採血を行い血中と精巢中testosterone測定を行った結果、4および8時間でtestosteroneの減少が認められた。これらの成績から、ネフィラセタムによる精子形成障害にはtestosterone分泌抑制が介在していることが示唆された。

化学物質によるマウス始原生殖細胞の突然変異

○澁谷 徹

(財) 食品薬品安全センター 秦野研究所

マウス始原生殖細胞 (PGC) は発生中期に生殖巣外に出現し、増殖しながら生殖巣に移動し、すべての生殖細胞の根幹細胞となる。もし、1個のPGCに突然変異が誘発されれば、それに由来するすべての生殖細胞は同様の突然変異を有することになり、遺伝的に大きな影響を与える可能性がある。1960年にCarter およびSearleは電離放射線によるPGCの遺伝子突然変異をマウス特定座位試験によって調べ、PGCは電離放射線に対し、生体の精祖細胞 (stem-cell spermatogonia、SCG) に比べて突然変異が誘発されにくいとの結果を発表している。

演者らは強力なアルキル化剤である、N-エチル-N-ニトロソ尿素(ENU)によるマウス特定座位試験をPGCとSCGにおいて実施し、それらの感受性の比較を行なった。その結果、同一用量で比較すると、ENUは、電離放射線とは逆に、PGCにおいて高い突然変異誘発能を示した。PGCにおける突然変異の誘発については、時期特異性が認められ、8.5日および10.5日胚において高い誘発突然変異率を示した。

他の化学物質のPGCに対する突然変異誘発性については、まだ結果を得ていないが、精祖細胞に突然変異を誘発することが知られている化学物質を、10.5日胚に経胎盤投与された雄の精巣重量が非常に減少することを認めている。そのため、これらが、PGCに突然変異を誘発する可能性は十分に考えられる。PGCは上に述べたように遺伝的に重要な細胞であるので、今後、多くの化学物質について突然変異誘発能を検討する必要がある。

SD系雌ラットの性周期の加齢性変化に関する研究

渡辺 千朗 代田 真理子 和田 和義 高島 宏昌 清水 ゆり 太田 亮
 和田 あづさ 小川 麻樹子 松本 亜紀 佐藤 昌子 長尾 哲二

(勸食品薬品安全センター秦野研究所)

生殖・発生毒性試験に汎用される、ラットの2系統 {Crj:CD(SD)系 (以下Sと略) 及びJcl:Wistar系 (以下Wと略) } について性周期の加齢性変化として認められる連続発情 (以下EEと略) の発現時期を比較検討した。

Sラット36匹とWラット22匹は、同一条件下で7週齢から飼育し、40週齢まで連日腔垢像を観察した。3日以上連続して角化細胞あるいは有核上皮細胞が観察されたものをEEと分類すると、Wでは40週齢に至ってもEEを示す動物は認められなかったのに対し、Sでは15週齢ですでにEEが観察され、それ以後増加して40週齢では18例がEEを示した。40週齢から、正常に性周期を回帰している両系統の動物を発情期に順次剖検して、自然排卵数を数えた。また、EEを示したSラットについては、HCGを10 i.u.静脈内投与して、翌日排卵検査を行い、排卵可能な卵胞数を調べた。その結果、Wでは、全例が発情期に排卵したのに対し、Sでは、正常に性周期を回帰していた10例中5例に排卵が認められなかった。しかし、排卵の認められた5例の平均排卵数は14個と通常と差はなかった。また、EEであったSラットはHCGの投与により8例中7例が排卵したが、平均排卵数は7.9個と少なかった。

以上の結果からSラットはWラットに比べて著しく若齢でEEとなるが、EEに至る以前に腔周期は正常でも、排卵周期が異常である時期が存在すること、および、EEに至ると排卵可能な卵胞数が減少することが示唆され、SラットはWラットと比較して性周期の加齢性変化が早期に進行しているものと考えられた。

雄性生殖障害の検索法に関する研究（第1報）
—Adriamycinを用いた形態学的精巣毒性評価—

○安原 加壽雄，三森 国敏，小野寺 博志，
川島 邦夫*，高仲 正*，高橋 道人
国立衛生試験所・病理部，薬理部*

【目的】生殖毒性試験において，雄性生殖能の適切な評価法が求められている。現在，これを評価するに当り，受胎能ばかりでなく精子形成能を主体とした形態学的評価法および精子への影響を調べることに注目されている。我々は精祖細胞を障害するとされているAdriamycin (ADM) を用い，精巣に対する影響を形態学的に検討した。

【方法】動物は10週齢の雄性SD系ラットを用い，ADM 1，0.5，0.25および0mg/kgを1日1回腹腔内に実験終了時まで反復投与した。投与14，21，28，42，56，70日目に各群5匹の動物を屠殺し，精巣重量測定後，ブアン液に固定，パラフィン包埋した。H-EおよびPAS染色を施し，精子形成サイクルに基づき形態学的に検索した。

【結果】1mg群では14日目に精祖細胞の消失および精母細胞の減少がみられた。28日目には精母細胞は消失，精子細胞(roundとelongate)のみとなり，42日目には一部の精細管にelongate精子細胞がみられるのみであった。0.5mg群は1mg群と同様の推移を示したが，1mg群に比べ障害の程度は軽度であった。0.25mg群では21日目から精祖および精母細胞の減少がみられた。42日目では精母およびround精子細胞が減少し，56日目ではelongate精子細胞のみが認められた。

【まとめ】以上より，精巣に対する障害は1および0.5mg群では14日目で，0.25mg群では21日目より形態学的に認められた。精細管では，セルトリ細胞を除く精細胞の脱落が経時的にみられたが，精子細胞は1mg群で28日目まで，0.5および0.25mg群では42日目まで認められた。これは分裂後の精細胞には影響を与えないためと考えられた。

雄性生殖障害の検索法に関する研究
(第2報) Adriamycinを用いた精子検査

川島邦夫、宇佐見誠、酒見和枝、高伸 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

精巣の組織学的検査において精子形成能の障害が認められた場合、精子自体の機能を調べ、受胎能への影響を確認することは重要である。今回は、adriamycin(ADM)を用いて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、受胎能が障害されるかについて検索した。

SD系SPF雄ラットにADMの0.25, 0.5 および1.0mg/kgを10週齢時から投与を開始し、投与14、21、28、42、56 および70日目に、無処置発情前期雌と1対1で終夜同居させた。翌朝陰垢を採取して交尾の有無を調べ、陰垢中に精子が観察された日を妊娠0日とした。交尾確認後、雄について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)および数を調べた。交尾成立雌は妊娠15日に屠殺し妊娠の有無を確認した。

1.0mg群では精巣重量の低下が14日間投与から、精巣上体重量および精子活力の低下が21日間投与から、精子の前進性、交尾率および受胎率の低下が28日間投与から、精子数の減少が42日間投与から観察された。0.5mg群では精巣重量の低下が14日間投与から、精巣上体重量の低下が21日間投与から、精子の数・活力・前進性、交尾率および受胎率の低下が42日間投与から観察された。0.25mg群では精巣重量の低下が21日間投与から、精子活力の低下が42日間投与から、精巣上体重量、精子の数・前進精、交尾率及び受胎率の低下が56日間投与から観察された。

以上の結果から、精子運動性の減弱による受胎障害の検索において、薬物の作用が強い場合には交配前投与期間は28日間で十分であるが、弱い場合にはより長期の投与が必要なことが明となった。

幼若カニクイザルにおける精巣および卵巣機能検査に関する検討

○鮫島秀暢, 尾根田暁, 山本 隆, 伊原敏夫, 増渕美子,
平井正直, 永田良一

新日本科学

近年, バイオ技術により開発された医薬品はその生理活性が霊長類に限定される場合が多く, 生殖・発生毒性試験の分野でもサルの利用が増えている。周産期および授乳期投与試験 (Seg.III) では F1 の生殖能に及ぼす影響の検索が 1 つの課題とされているが, サルが成熟するには少なくとも 3 年以上の長期間を要する。したがって, その簡便法として幼若カニクイザルにおける性腺刺激ホルモンに対する精巣と卵巣の反応を血中の testosterone (T) と estradiol-17 β (E) を指標として調べることを試みた。

試験動物は新日本科学霊長類繁殖施設で出生した 6 ヶ月齢のカニクイザルを使用した。採血は無麻酔下で外頸静脈より行い, ホルモンの測定は RIA で実施した。

1. 精巣に対する反応: hCG 1000 IU を単回および反復筋肉内投与した結果, 単回投与においても幼若カニクイザルの血中 T 濃度は増加し, 反復投与によってその濃度はさらに増加した。
2. 卵巣に対する反応: hCG 500 IU, hCG 500 IU + hMG 15 IU, hMG 15 IU をそれぞれ単回筋肉内投与した結果, いずれにおいても投与後一過性に血中 E 濃度は増加した。

結論として, 幼若カニクイザルであってもその精巣と卵巣は外来の性腺刺激ホルモンに対して反応することが明らかとなり, F1 の生殖能を調べる簡便法となり得ると考える。また, 雌幼若カニクイザルへの hMG の反復投与による E 値の変動についても報告する。

Macaca 属サルにおける精液採取法の検討と精液性状の比較

○尾根田暁，鮫島秀暢，山本 隆，福田浩一，伊原敏夫，
増渕美子，平井正直，永田良一

新日本科学

生殖・発生毒性試験の分野で生殖能を調べる方法としては，これまで主としてラットが汎用されてきた．最近，ヒトと生殖生理学および解剖学的に近いカニクイザルを用いた雄生殖能試験を実施する機会を得た．そこで，カニクイザルでの精液採取法を検討し，精液性状を調べた．雄生殖能試験にサルを用いることにより，testosterone の変化を経時的に測定できること，さらに直接精液性状について検査できることが大きな利点といえる．

サルからの精液採取法に関しては，直腸電気刺激法，陰茎電気刺激法，用手法あるいは人工腔法などが既に報告されているが，中でも直腸電気刺激法および陰茎電気刺激法は精液を安定して得られる有効な方法である．今回，カニクイザルを用いて直腸電気刺激法および陰茎電気刺激法で精液を採取し，採取法の違いによる精液性状の差を調べた．さらに，毒性試験によく用いられるアカゲザルおよびエイズ研究の面から需要の増加が予想されるブタオザルについても同様の検討を行い，系統間の差異についても調べたので報告する．

ラット培養胎児の心拍動数への温度の影響

○秋田正治, 横山篤, *黒田行昭

鎌倉女子大(家、栄), *麻布大(環保)

【目的】ラットの胎児培養で培養中の胎児の生存を確認する方法のひとつとして培養バイアル外より胎児の心拍数を直接測定する方法がある。この方法を用いた場合、培養装置の扉を解放するため装置内の温度が急激に低下する。培養胎児の心拍動数は環境温度の変化に影響を受け易く、温度の低下とともに心拍動数も低下する。そこで、我々は今回の実験において装置内の温度低下と心拍動数の低下の関係について調査し、この生理機能の低下が胎児の形態形成にどのような影響を及ぼすか検討したので報告する。

【方法】ラットの胎齢11.5日目の胎児を用いて、回転培養装置により48時間培養を行った。また、培養装置内の温度は培養開始時に37.5℃とした。気相は95%O₂+CO₂5%混合ガスを100~120ml/min.の速度で送気した。そして培養開始2時間目から8時間目まで30分間隔、1時間間隔、2時間間隔に心拍動数を測定し、その時点の培養装置内温度による影響を比較検討した。

【結果及び考察】培養2時間目の装置内の温度は、すべて37.5℃であった。そして2時間間隔で胎児の心拍動数を測定した群は、心拍動数は常に平均165±10回/min.と安定し、装置内の温度も37.5±0.1℃と一定の値を示した。しかし30分間隔で測定した群の心拍動数は、2時間間隔で測定した値と比較し約17%の低下を示し、その時の装置内温度は35.8±0.3℃であった。さらに1時間間隔で測定した群においても、2時間間隔で測定した群と比較すると心拍動数は約5%は増加し、装置内温度も0.5%低い値を示した。また48時間後の胎児においては、30分間隔で測定を行った群で2例の発育遅延が認められた。以上の結果より、心拍動数の測定を繰り返し行うためには、2時間程度の間隔を開けることが必須になると考えられた。

ラット心室中隔欠損の胎児発育遅延との関連性
及び生後の回復性

山北 修, 今村健二, 池渕一也, 中川文雄, 野中直樹, 中川稔彦

大鵬薬品工業(株) 安全性研究所

〔緒言〕心臓奇形は、ヒト及び動物の奇形の中で、その自然発生頻度が高い部類に入り、中でも心室中隔欠損(VSD)は最も頻発する奇形の1つである。VSDは心臓中の発現する部位によって分類され、膜性VSDと呼ばれるものはヒトでは生後発育とともに自然閉鎖する例が多数報告されている。我々が実施してきた薬物の催奇形性試験で見られる胎児のVSDの中には、薬物の発育遅延作用と関連して発現したと思われるものが含まれており、生後発育とともに修復する例があるのではないかと考え、以前より検討を行っている。本試験では、胎児発育遅延作用を有しており、かつVSD頻度が増加した抗リウマチ薬の1,1,3-trimethyl-5-phenyl-biuret(ST-281)をJcl:Wistarラットの器官形成期に投与して、VSDの経時的な発現頻度の推移を検討した。

〔材料・方法〕11-13週齢のJcl:Wistarラットの妊娠9および10日の2日間ST-281の600及び1200mg/kgを経口投与し、妊娠末期(19・20日)及び分娩0-21日に母児を経時的に屠殺し、心臓内部を顕微解剖法で観察した。

〔結果及び考察〕内臓検査の結果、600mg/kg群では、全観察期間を通じてVSDの発現頻度は約6%であり、かつその時の体重は軽度な低値を示したのみであった。1200mg/kg群での発現率は妊娠末期では低かったが、分娩0日を最高に(約12%)生後発育とともに低下する傾向がみられた。体重は分娩0日前後に最も影響がみられており、その後対照群との差異が小さくなっていった。以上のことより、妊娠期間中に薬物投与により引き起こされた発育遅延とそれに伴うVSDが、発育遅延状態が回復するとともに、VSDも修復する可能性が示された。

パラコートのラット動脈管収縮作用
—収縮作用の臨界期の検討—

○白井明志・高木博隆*・山本雅子*・有嶋和義*・
政岡俊夫・赤堀文昭

麻布大・獣医・薬理、解剖Ⅱ*

パラコート (PQ) の毒性については数多く報告されているが、胎子に対する影響は十分な検索がなされていない。また、PQ の標的器官のひとつが肺であり、プロスタグランジンの合成や代謝に影響を及ぼすことが知られている。そこで、今回、胎生期においてプロスタグランジンによってその拡張が維持されている胎子動脈管に対する PQ の作用、とくに収縮作用とその臨界期について Wistar 系ラットを用いて検討した。

母体の妊娠日数は交配の翌朝、腔垢中に精子の確認された日を妊娠 0 日として起算した。剖検日時を、妊娠 19 日の午後 1 時および 4 時、妊娠 20 日の午後 1 時および妊娠 21 日の午後 1 時とし、母体への PQ 25 mg/kg の投与は剖検時間の 3 時間前とした。対照として、生理食塩水を同様に投与した。剖検に際し、胎子は無呼吸のもとで冷却器により $-45^{\circ}\text{C} \sim -50^{\circ}\text{C}$ に調節されたアセトン溶液中に速やかに投入し凍結した。凍結した胎子は、 -20°C の冷凍庫中に保存した。観察にあつたては、凍結した胎子を簡易凍結器 ($-20^{\circ}\text{C} \sim -40^{\circ}\text{C}$) に固定し、実体顕微鏡下でメスを用いてフリーハンドにて薄切した後、動脈管の内径を測定した。

胎齢 19 日の午後 1 時に剖検した胎子では、動脈管の収縮はみられなかったが、胎齢 19 日の午後 4 時、胎齢 20 および 21 日の午後 1 時に剖検した胎子では有意 (有意水準 0.01%) な動脈管の収縮がみられた。

以上の結果から、PQ は胎子動脈管に対し収縮作用をもち、その収縮の臨界期は胎齢 19 日の前半であることが明らかとなった。

未固定標本を用いたラット胎児内臓観察法
 - bisdiamine投与ラットにおける検討 -

○山田 雅之, 森友 彩, 和田 重次, 林 裕,
 寺本 昭二*

富士レビオ株式会社 医薬研究所

* 残留農薬研究所

【目的】ラット胎児の内臓観察法はブアン液などで固定を行った後に観察する方法が一般的である。しかし、胎児の観察を行うまでに時間を要するあるいは固定により臓器固有の色調がみられなくなるなどのデメリットもある。今回、未固定標本を用いるStuckhardtらの方法(1984)を、心臓及び大血管系を中心とした内臓異常を生じるbisdiamine投与ラットで検討した。

【方法】動物は11週齢のCrj:SD系ラットを用い、交尾確認日を妊娠0日として妊娠10日にbisdiamine 400mg/kg を1回経口投与した。ラットは妊娠20日に帝王切開し、1腹の約1/2を未固定標本を用いた実体顕微鏡下での内臓観察法(未固定法)で、残り約1/2をブアン固定後、Wilson法及び西村法に準じた方法(ブアン固定法)で内臓観察を行った。

【結果】bisdiamine投与により、ラット胎児に内臓異常が高率に認められた。未固定法では心室中隔欠損(81.9%), 右大動脈弓(23.2%), 動脈幹遺残(74.0%), 心血管の起始異常(74.0%), 肺動脈低形成(43.5%)などの心臓及び大血管系を中心とした内臓異常が認められた。一方、ブアン固定法でも心室中隔欠損(100.0%), 右大動脈弓(6.2%), 動脈幹遺残(66.7%), 心血管の起始異常(70.9%), 肺動脈低形成(28.4%)などが認められた。未固定法とブアン固定法との内臓異常の出現率に差は認められなかった。

【結論】未固定標本を用いたラット胎児内臓観察法による内臓異常の出現率は、ブアン固定法と同程度であった。さらに、未固定法は技術面での習得が容易であり、迅速に観察可能で、観察終了後ホルマリン固定すれば、固定後の観察あるいは病理組織学的な観察も可能であることから、ラット胎児の内臓観察法として有用であると考えられた。

Dimethyltin の催奇形作用に関する研究

○野田 勉、森田 茂

大阪市立環境科学研究所

有機スズ化合物の催奇形作用検索の一環として今回は dimethyltin dichloride(DMTC) の作用を検討した。DMTC は塩化ビニル樹脂の安定剤として使用されており、環境中では魚介類や海の底質から検出されている。その毒性としては中枢神経系障害作用を有することが知られているが、催奇形作用に関する報告はない。

【方法】 DMTC を Jcl:Wistar 系の妊娠ラットに妊娠 7-17 日にわたって強制経口投与した。投与量は 0, 5, 10, 15, 20mg/kg とした。妊娠 20 日の妊娠動物について脳および胸腺重量を測定後、帝王切開し胎児の外表を観察した。さらに骨格および内臓異常の有無を調べた。

【結果と考察】 妊娠動物の体重増加量は DMTC の 15 および 20mg/kg 投与群で有意に減少した。20mg/kg 投与群は妊娠 16 日頃から臍からの出血と痙攣が見られ、その後 2 例が死亡した。妊娠 20 日における妊娠動物の胸腺重量は 20mg/kg 群で有意に減少したが、脳重量には影響は認められなかった。生存胎児の体重は雌雄とも 15 および 20 mg/kg 群で有意に減少した。外表観察では 20mg/kg 群の観察胎児 95 例中 21 例に口蓋裂が見られたが、DMTC 投与によると考えられる骨格および内臓奇形は認められなかった。

口蓋裂の認められた DMTC 20mg/kg 投与群では 2 例の妊娠動物が死亡するなど妊娠動物にかなりの影響が見られたことから、ここに見られた口蓋裂が DMTC の作用であるとは結論出来ない。しかし DMTC の催奇形作用は第 19 回本学会で報告した di-*n*-butyltin の催奇形作用(下顎裂、舌癒着、外脳、肋骨癒合等)とは明らかに異なっていた。現在、DMTC の催奇形作用についてさらに検討中である。

ラット胎児にみられる胸腺頸部残留の評価について

佐々 齊, 松本浩子, 福村雅雄, 木村亜由美,
 島山義朗, 田中千晶

(株)資生堂 安全性・分析センター

【目的】生殖・発生毒性試験においてラット胎児の内部器官観察時にみられる胸腺頸部残留 (TRN) の評価は、各試験施設で一定しておらず、一般に異常または変異として扱われている。そこで、TRN の適切な評価を行うことを目的として検討を行った。

【方法】動物は Crj:CD ラット (厚木飼育センター) を用いた。妊娠 15, 16 および 20 日に帝王切開にて摘出した胎児は 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定後、当施設で出生した F₁ は生後 4 および 60 日齢で解剖し、実体顕微鏡下で胸腺を観察した。一方、催奇形性物質の TRN に及ぼす影響を調べるために、妊娠 10 日に 6-Amino-nicotinamide (6-AN) を 4.0~8.0 mg/kg の用量で皮下投与し、妊娠 20 日に帝王切開で胎児を摘出して 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定後、胸腺の観察を行った。なお、いずれの観察においても TRN は胸腺の上端が甲状腺に達しているものとし、遺残索状組織型 (PC 型) と副胸腺組織型 (AT 型) とに区分して、さらに各型を左右別に細分した。

【結果】1990~1993 年に観察した胎齢 20 日胎児の TRN の出現率は 9.4~18.7% (PC 型: 6.4~14.4%, AT 型: 3.0~5.3%) であり、発現の特徴として、左側が右側に比べ高率であった。また、出生後における TRN の出現率は生後 4 日で 10.5% (PC 型: 7.3%, AT 型: 3.2%), 生後 60 日で 13.6% (PC 型: 10.4%, AT 型: 3.2%) の値を示した。胎齢 15 日から 16 日にかけて胸腺は索状から妊娠末期と同様の形態に変化し、胸腔内へ下降している例は胎齢 15 日で 2.4%, 胎齢 16 日では 100% であった。一方、6-AN の母体への投与により、胎児の TRN の出現率は用量相関的に増加し、自然発生とは異なる型の TRN および出現型の割合の変化が認められた。

【考察】Crj:CD ラットにおいて TRN は自然発生的にも比較的高率に認められ、しかも胎生期のみの一過性の形態ではなく出生後も継続すること、ならびにこの形態が正常のものと連続性を有していること等を考慮すると、生殖・発生毒性試験の胎児内部器官観察においては変異として扱うことが適切であると考えられた。

フロセマイドの Maus 胎児波状肋骨誘発作用に及ぼす胎児骨格筋運動の影響について

萬有製薬株式会社 開発研究所

○中塚敏夫 内田美紀 松本浩良

胎児骨格異常である「波状肋骨」の発現メカニズムに母動物の子宮筋収縮が関与していることを前回の本学会で発表した。しかし、子宮切開法により子宮外で発育させた胎児でも低頻度ながら波状肋骨が出現したことから、子宮筋収縮以外の物理的要素も関与していると考えられた。今回、胎児骨格筋運動の関与について検討したので報告する。妊娠13日のICR系雌マウスに波状肋骨誘発物質であるフロセマイドを500 mg/kg経口投与した。これらの動物を一群15-21匹からなる3群に分け、第1群はその後の処置を行わずフロセマイド単独群とした。第2群の動物には妊娠14日に胎児の骨格筋運動を抑制するため10%ウレタン水溶液を午前(0.4 ml)と午後(0.2 ml)の2回、皮下注射した。第3群の動物には妊娠15日に同様なウレタン処置を実施した。各ウレタン注射後、母動物の鎮静あるいは活動性の減少、胎児における骨格筋の自発運動および外刺激に対する反応性の消失が少なくとも6時間、観察された。妊娠18日にすべての母動物を屠殺し、胎児について透明骨格標本作製し、波状肋骨の有無を調査した。その結果、フロセマイド単独群での波状肋骨出現頻度は43.8%であったが、妊娠15日ウレタン処置群では12.5%と波状肋骨の出現頻度が有意($P \leq 0.05$)に減少した。一方、妊娠14日にウレタンを処置した群での波状肋骨出現頻度は31.4%と、フロセマイド単独群に比べ有意差は認められなかった。今回用いた系統のマウスでは妊娠15日から肋骨の化骨が始まることから、化骨開始時期における胎児骨格筋運動が波状肋骨の発現に関与していると考えられる。

索引

あ

相川浩幸	E-10
赤羽浩一	E-07
赤羽一美	E-06
赤堀文昭	E-20
秋田正治	E-18
秋葉洋江	C-04
秋久理真	E-05
浅井義之	B-14
朝生裕樹	E-01
浅倉真澄	D-20
朝波省吾	C-14
	C-15
安達智子	B-12
安我子保	D-22
	座長
荒木一夫	E-05
有賀恭子	B-08
有嶋和義	E-20
安藤孝夫	A-06
Ahn, Byeong Woo	B-19

い

飯塚和弘	A-02
五十嵐功	D-12
五十嵐俊二	座長
五十嵐章之	A-01
五十嵐良明	C-17
池内滋郎	C-21
池崎信一郎	C-12
	B-25
池田陽一	B-10
池淵一也	E-19
伊佐間和郎	B-22
石島奈美	C-27
石橋 潤	E-05
石橋成太良	B-24

磯部直彦	D-11
板垣慎一	D-07
市原和夫	座長
伊東 進	D-15
伊藤博敏	B-01
伊藤隆康	A-06
伊東信行	A-13
	A-14
	A-15
伊藤清子	A-02
井上智彰	C-13
	C-18
	C-24
井上 達	A-08
茨田享子	A-01
伊原敏夫	E-16
	E-17
今井清	B-04
今井田克己	A-14
今井直人	B-10
今沢孝喜	B-25
今村健二	E-19
入江弘之	D-25
岩井正和	B-10
	D-25

う

上出利光	WS-5
上野光一	D-04
	D-06
	座長
上野郁子	C-01
上野芳夫	C-01
	座長
宇佐美誠	E-15
宇佐美正義	B-08
内田浩二	D-09
内田雄三	D-23

内田美紀	E-24
畝山智香子	E-01
海野 隆	B-13
	B-15
梅村隆志	B-22
梅森清子	C-01

え

江口景子	D-14
榎並倫宣	D-09
遠藤健一	D-04
	D-06
遠藤 仁	研推W-2
	研推W-座長
Elwell, Michael	E-03

お

大石真之	B-16
	B-17
	B-18
大浦聖子	D-08
大賀 皓	C-04
大河原聡	E-06
大郷 豊	C-13
	C-24
大鹿英世	WS-座長
大島 隆	B-02
	A-05
大谷卓司	D-08
大谷勝巳	B-20
太田亮	E-13
大西和	D-19
大野泰雄	C-05
	D-01
	D-02
大野広志	C-11
	C-27

大橋芳彦	B-11
	D-10
	D-12
	D-19

大畑隆郎	E-08
大林久雄	D-08
大林繁夫	B-13
岡田富士桜	C-26
岡田忠彦	B-11
小川麻樹子	E-13
奥田晴宏	D-16
	D-17
	D-18

奥野泰由	B-21
奥平雅彦	D-08
小倉健一郎	D-16
	D-17
	D-18

小倉 剛	C-25
尾崎潤一郎	B-06
尾崎晴茂	A-06
小田部耕二	B-08
尾根田暁	E-16
	E-17

小野寺博志	A-11
	A-12
	E-14
小畑俊男	D-23
重田定義	E-10

か

柿島 博	A-08
柿沼優子	D-21
柿畑耕司	B-03
	E-11
角崎英志	C-02
笠嶋快周	E-02

檜田陽子	C-11
春日咲子	B-08
数坂昭夫	D-05
	D-13
	座長
加藤誠司	E-01
加藤利博	A-08
加藤秀樹	E-10
加藤道幸	C-08
	E-06
金井好克	研推W-2
金澤由基子	C-16
	C-26
金子豊蔵	A-08
金子昇	S-03
金崎寛子	C-18
鎌田栄一	B-14
鎌滝哲也	D-15
	座長
河合悦子	A-04
河合賢一	C-01
河口和寛	B-24
川口秀明	WS-3
川崎靖	B-22
	C-16
川崎一	D-11
川島邦夫	E-14
	E-15
川西徹	E-01
川西広明	A-01
河部真弓	A-14
河村晴次	D-07
河村公太郎	B-09
	A-16
神辺敏美	B-23
き	
菊池康基	座長

木口雅夫	B-09
北浦敬介	B-23
北野裕	E-07
北畠颯	WS-3
木村和幸	D-25
木村亜由美	E-23
木村邦男	B-11
	D-10
清宮健一	C-02
	C-03
	C-10
Kim, Jin Suk	E-09
Kim, Dai Byung	B-19
Kim, Pu Young	B-19
	<
曾田喜崇	B-14
倉田靖	A-14
栗下昭弘	A-09
暮部勝	C-02
	C-03
	C-10
黒岩幸雄	座長
黒川雄二	B-22
	C-16
	座長
黒田行昭	E-18
桑原孝	C-14
	C-15
桑原幹典	S-02
	け
源田百合	C-11
原内敏夫	D-14
玄番宗一	A-04
	WS-2
	座長

こ

香山不二雄	E-03
古賀久視	A-07
小柴 博	D-25
小島肇夫	A-10
小島幸一	B-04
	B-12
	C-26
児玉 泰	E-03
小西宏明	A-10
小林晴男	E-02
小林洋四郎	A-07
小林敏明	A-08
小林明子	D-04
	D-06
小林直美	A-01
今若実穂	A-06
コーミエ、エシル	A-09

さ

斎藤 実	B-15
斎藤秀哉	座長
斎藤真一	D-08
斎藤 実	B-22
坂口ゆかり	B-03
	E-11
洒見和枝	E-15
佐久間聡子	A-16
佐々 齋	E-23
佐々木真敬	A-07
佐々木隆蔵	C-09
笹森裕子	D-08
佐竹聖人	B-01
佐藤 全	A-16
佐藤敦子	A-02
佐藤哲男	B-07

佐藤秀蔵

佐藤昌子
佐野真士
鮫島秀鴨

沢田 稔
山津清實

鹿庭正昭
茂木 朗
柴田徹一
柴田雅朗
渋谷 徹
島田 信

清水ゆり
下 武男

白井智之

白井明志
代田真理子

菅又昌雄
菅原正喜
杉浦正幸

杉浦智美

D-03
D-04
D-06
研推W一座長

C-09
A-06
座長

E-13
A-13
D-24
E-16
E-17
D-15
C-06

し

C-16
E-02
D-08
A-15
E-12
B-03
E-11
E-13
A-11
A-12
A-13
A-15
E-20
E-13

す

C-01
C-08
B-02
A-05
D-19

杉本武志 B-05
杉本真次 A-06
杉本哲朗 B-26
C-25
杉山千生 A-08
杉山淑江 D-20
鈴木正明 D-20
鈴木忠彦 E-02
鈴木登志郎 A-08
鈴木 彰 B-14
鈴木 剛 C-19
鈴木 稔 A-02
須藤純一 E-04
座長
須藤 武 C-06

せ

関 誠 B-04
関剛 幸 B-04
関口裕巳 B-22
C-16

そ

外尾亮治 A-01
磯部充威 A-02
磯部竹雄 C-13
曾山桃子 E-04

た

田内清憲 A-03
高井了 C-04
高木英利 A-03
高木博隆 E-20
貴志陽子 B-07
高島宏昌 E-13
高岡雅哉 D-10

高仲正 D-12

C-05

D-01

D-02

A-08

E-14

E-15

高野享弘 C-21

高橋 省 B-16

B-17

B-18

高橋宏明 D-21

高橋道人 C-12

D-09

E-01

A-11

A-12

B-25

E-14

座長

座長

高山 敏 A-08

辰見 寿 B-16

田中豊人 B-17

B-18

田中 光 A-15

田中公一 C-20

田中宏治 D-10

田中千晶 E-23

田沼靖一 C-01

種池哲郎 C-04

田村博信 B-24

田谷一善 E-11

ち

築館一男 C-06

茶谷文雄 C-09

張宝 旭 C-05

Chin, Kang D-01
 Cho, Tae Soon D-02
 Cho, Dae Hyun E-09
 Cho, Dae Hyun E-09
 Cho, Dae Hyun E-09

つ

佃 良一 C-19
 辻 良三 D-11
 津田充宥 B-22
 C-16
 土屋俊也 C-11
 土屋利江 C-17
 都富友美 E-07
 鶴田順一 C-15

て

寺尾恵治 C-25
 寺岡宏樹 C-04
 寺西宗広 D-10
 D-12
 寺村佳之 B-10
 寺本昭二 E-21
 照井 潤 E-04

と

土井邦雄 D-07
 S-座長
 土井孝良 C-19
 富井靖志 C-25
 豊國伸哉 D-09
 豊田和弘 E-01

な

内藤寿英 D-25

苗代一郎 C-09
 直井 信 研推W-1
 永井博文 C-19
 中井洋一 B-05
 C-23

長尾 拓 S-座長
 長尾哲二 E-13
 中川徹也 D-15
 中川愼也 B-02
 中川文雄 E-19
 中川稔彦 E-19
 中沢泰邦 B-24
 中島幹夫 A-07
 永田良一 D-24
 E-16
 E-17

永田諭志 C-01
 中館正弘 B-14
 中塚敏夫 E-24
 中津川泰充 D-19
 中根貞雄 B-02

A-05
 長野嘉介 D-08
 永牟田雅弘 C-20
 中村聡子 A-01
 中村恒彰 A-08
 中村 純 B-21
 中村晃忠 C-17
 中村明生 D-13
 中村裕行 B-05

鍋島俊隆 研推W-3

に

二川治子 D-21
 二木力夫 B-26
 西川秋佳 C-12
 D-09

	B-25
西 敏之	E-07
西部泰弘	D-14
西矢剛淑	D-03
二村芳弘	C-07

ね

根岸良吉	B-05
------	------

の

野口 忠	D-20
野口英世	座長
野田圭介	D-20
野田 勉	E-22
野中邦夫	E-02
野中直樹	E-19
野村靖幸	WS-1
野村 護	B-03
	C-08
	C-11
	E-06
	B-13
	B-15
	C-27
	E-11
	座長

は

萩野智尉	E-10
萩野滋延	A-08
萩原昭裕	A-13
	A-14
橋爪裕子	D-22
橋本 尚	D-15
橋本英明	A-03

長谷川良平	A-15
畠山義朗	E-23
花田秀一	B-10
	D-25
浜州泰久	B-24
林 泰司	E-04
林 裕	B-13
	E-21
原 俊子	C-20
原田滋雄	B-03
	E-11
畔上二郎	B-04
パーカー、ロナルド	A-09

ひ

久田 茂	A-02
久世 博	B-06
平井正直	D-24
	E-20
	E-21
	座長
平尾政則	C-26
平賀武夫	C-04
平田雅春	D-14
平田孝浩	D-23
平塚明	D-18
平野光一	D-19
広瀬雅雄	A-15

ふ

福田浩一	E-17
福村雅雄	E-23
藤井儂子	E-08
	座長
藤田正一	D-05
	D-13
藤谷知子	B-16

	B-17
	B-18
藤原睦憲	B-27
武貞徳子	A-13
古川文夫	C-12
	D-09
	B-25
古川忠司	B-11
ブルース、ロバート	A-09
へ	
別枝和彦	B-27
ほ	
星野敏也	A-02
細川正清	D-03
細川俊治	B-21
細川博司	D-23
細木英司	B-23
堀田真希	B-01
堀正樹	B-06
堀井郁夫	C-13
	C-18
	C-24
堀内敏	A-02
堀内美保	B-08
堀口恵子	B-12
本間健資	B-20
Hoque, A. N. Ehsanul	D-22
Hoque, Nina	D-22
Hwang, Se Jin	E-09
ま	
前川昭彦	A-11
	A-12
	座長

政岡俊夫	E-20
増子かおり	E-02
升田真木彦	D-05
	D-13
増田修治	A-02
増田達樹	A-03
増田光輝	A-08
増渕美子	D-24
	E-16
	E-17
松尾三郎	C-02
	C-03
	C-10
松尾昌季	B-21
松澤利明	B-13
松沢陽子	B-08
松下智哉	B-26
松島泰次郎	D-08
	D-20
松島裕子	B-22
松永 隆	B-26
松本清司	C-07
松本真美	B-22
松本浩子	E-23
松本亜紀	E-13
松本浩良	E-24
真鍋 淳	D-10
	D-12
	D-19
丸谷 清	C-20
丸山和佳子	研推W-1
み	
三浦 格	D-22
見上 孝	C-06
三沢保幸	B-26
簾内桃子	C-05
	D-01

	D-02
三井雅之	D-09
南 勝	WS-座長
三森国敏	A-11
	A-12
	E-14
宮川宗之	B-20
宮島敦子	C-05
	D-01
	D-02
宮田恵美子	A-15
宮嶋宏彰	C-19
	S-01
	座長
宮本恵美	C-08
	む
村上久子	A-03
村上美穂子	B-02
	A-05
Moon, Byung Woo	E-09
	も
毛利哲郎	研推W-4
最上昌輝	A-01
百瀬和享	E-01
森 栄治	A-10
森 友彩	E-21
森 道夫	WS-6
森下克美	B-23
守田伸子	B-13
	B-15
森田健一	B-27
森田 茂	E-22
門馬純子	A-08
	B-22
	C-16

	C-17
	や
安田充也	D-19
安原加壽雄	A-11
	A-12
	E-14
八田愼一	WS-4
矢原 功	C-21
	C-22
山内勝彦	D-08
山県英弘	C-21
	C-22
山北 修	E-19
山口一喜	B-04
山口真樹子	B-13
山口 穂	C-27
山下和男	D-10
山田智也	B-21
山田久陽	B-02
	A-05
山田雅之	E-21
山中康光	D-23
山本秀樹	D-05
山本雅子	E-20
山本 隆	E-16
	E-17
山本正雄	B-07
山脇智子	C-26
矢本 敬	D-10
	D-12
Young, Choung Se	D-26
	よ
横井 毅	D-15
	座長
横田 忠	C-20

横山 篤	E-18
横山雄一	C-26
吉池通晴	C-11
吉岡 勝	C-09
吉川健一	B-24
吉沢正純	D-04
	D-06
吉田 緑	A-01
吉田 勝	B-24
吉田信也	A-02
吉田貴彦	E-03
	E-10
吉村慎介	B-04
吉村 功	A-10
米原 伸	S-04
米山允子	B-16
	B-17

ら

Luster, Michael I.	E-03
--------------------	------

り

李 旻宰	D-07
Rifkind, Arleen B	特講
Lee, Jong Kwan	B-19
Lee, Won Yong	E-09

わ

若林美津子	D-14
鷲美信好	B-24
和田重次	E-21
和田あづさ	E-13
和田和義	E-13
渡部 烈	D-16
	D-17
	D-18
渡辺さつき	C-25

渡辺千朗	E-13
渡辺正人	B-01
和田理穂	B-09

協賛企業および団体御芳名

エーザイ（株）	日本シェーリング（株）
札幌市	日本たばこ産業（株）
札幌市医師会（株）	日本チバカイギー（株）
三共（株）	日本ベーリンガー
参天製薬（株）	インゲルハイム（株）
サンド薬品（株）	バイエル薬品（株）
塩野義製薬（株）	萬有製薬（株）
（株）新薬開発研究所	富士レビオ（株）
ゼネカ薬品（株）	ヘキストジャパン（株）
第一製薬（株）	北陸製薬（株）
大鵬薬品工業（株）	北海道
武田薬品工業（株）	北海道医師会
田辺製薬（株）	ムトウ（株）
中外製薬（株）	持田製薬（株）
トーアエイヨー（株）	ワーナー・ランバート
富山化学工業（株）	（株）パーク・デービス

（平成6年5月6日現在：五十音順）

Rat cytochrome P450 ECL ウエスタンブロットイングキット

より安全性の高い開発を目指すため、誘導されたcytochrome P450をアイソザイムごとに検出したデータの有用性が高まっています。アマシャムは7種類のcytochrome P450アイソザイムの検出を迅速かつ簡便に行うためのウエスタンブロットイングキットを開発しました。

特長

- 抗体の高い特異性
- 高感度な検出
- 迅速かつ簡便そして安全なECL
- ミニゲル使用

Rat cytochrome P450 1 A 1 ECL Western Blotting kit	RPN.256
<small>NEW</small> Rat cytochrome P450 1 A 2 ECL Western Blotting kit	RPN.264
Rat cytochrome P450 2 B1/2 ECL Western Blotting kit	RPN.257
Rat cytochrome P450 3 A ECL Western Blotting kit	RPN.258
Rat cytochrome P450 2 E 1 ECL Western Blotting kit	RPN.259
Rat cytochrome P450 4 A ECL Western Blotting kit	RPN.260
Rat NADPH-cytochrome P450 Reductase ECL Western Blotting kit	RPN.261

'94年5月よりお求めやすい価格になりました。

ECLは化学発光を用いてフィルム上に結果を検出する、アマシャム独自のシステムです。

ECL

ECL、ECL+device and Amersham are trademarks of Amersham International plc.

Amersham LIFE SCIENCE

詳細は下記までお問い合わせ下さい。

アマシャム株式会社

ライフサイエンス事業部

〒112 東京都文京区白山5丁目1番3 東京富士会館
受注専用: TEL.03-3816-6161 FAX.03-3816-6190
営業/技術: TEL.03-3816-1091 FAX.03-3816-1096

新発売!!

ラットP-450分子種抗体

特徴

- 8種類のラットP-450分子種に対する抗体がラインナップ
- ポリクローナル抗体（ヤギ抗血清）
- 各抗体共、定量用スタンダードが添付
- イムノブロットングによるP-450分子種の同定と定量が可能
- 10種類のP-450分子種の測定が可能（交差反応性を利用）

電気泳動および
ウェスタンブロットングによる
測定方法の詳しいプロトコルを
用意しております。
ご希望の方は第一化学薬品株式会社
までご連絡ください。

応用

- 薬物による酵素誘導の研究
- 発癌性とP-450誘導との相関性の研究
- 病態におけるP-450分子種の研究
などのP-450分子種レベルの研究に!

製品名	添付スタンダード	測定可能な分子種
Anti-CYP1A1	肝マイクロゾーム (MC処理ラット)	CYP1A1, CYP1A2
Anti-CYP2B1	肝マイクロゾーム (PB処理ラット)	CYP2B1, CYP2B2
Anti-CYP2C6	肝マイクロゾーム (PB処理ラット)	CYP2C6
Anti-CYP2C11	肝マイクロゾーム (雄性ラット)	CYP2C11
Anti-CYP2C13	肝マイクロゾーム (雄性ラット)	CYP2C13
Anti-CYP2E1	肝マイクロゾーム (アセトン処理ラット)	CYP2E1
Anti-CYP3A2	肝マイクロゾーム (PB処理ラット)	CYP3A2
Anti-CYP4A1	肝マイクロゾーム (CF処理ラット)	CYP4A1

注) MC:3-Methylcholanthrene, PB:Phenobarbital, CF:Clofibrate



第一化学薬品株式会社

試薬営業部：〒103 東京都中央区東日本橋二丁目8番3号 TEL.03(5820)9408(代表)
本社：〒103 東京都中央区日本橋三丁目13番5号 TEL.03(3272)0671(代表)

前臨床試験のシステム化は 富士通グループの富士ファコム制御(株) にご用命ください

富士ファコム制御(株)では、お客様のニーズにお応えするシステムの企画・開発・導入・運用支援をいたします。



豊富な経験を持つ専門スタッフによるシステム化提案

当社パッケージの適応による低コスト・短納期でのシステム構築

- 安全性試験システム (LATOX-F)
- 病理試験システム (PATHOTOX)
- 変異原性試験システム
- 薬物動態システム
- 代謝試験システム
- 製剤安定性試験システム
- その他 (抗腫瘍試験システム、動物管理システム・・・)

ご連絡先

富士ファコム制御(株)	東京地区	第二営業部	03-5351-3308
	大阪地区	大阪営業所	06-344-0609
	名古屋地区	名古屋営業所	052-222-1561
富士通(株)	東京地区	化学産業第一営業部第三営業課	03-3216-8111
	大阪地区	特定システム担当課	06-344-1101

人間には、
年齢を超えた若さがある。



健康づくりは幸せづくり
ゼリア新薬工業

身のこなしがきびきびと若々しい人の、本当の年齢を聞いて驚かされることよくあります。疲れを感じさせない「若さ」を羨ましく思う私達にとってはその秘訣が気になるころ、とこころ、強壮剤やビタミン剤、栄養剤、点眼剤等にも配合され、最近注目されているのがコンドロイチン。そのコンドロイチン300mgを始めとしローヤルゼリー、人参エキス、ゴウウ、イカリ草エキスなどを配合したハイゼリー-B。ここいちばん、という時に飲んでください。

ここいちばんに、この一本。

医薬品

滋養強壮、肉疲労時の栄養補給に

ハイゼリー-B

「成人病薬研究店」のマークのある薬局で
ご相談ください。

エレフトロニクスで発展に貢献
NIHON KOHDEN



運動指導の実践に最適

心拍数をモニター&インターバルトレーニング。

運動処方、運動の能力を知った上で行うことが大切。
トレッドミルを使い、何段階かの速度で、実際に「歩く」、「走る」、
その時の「心拍数を測る」ことにより、
運動能力を測定し、至適速度を決められます。

“歩く”“走る”能力が測れる
Aeromill 心拍数計付トレッドミル
STM-1420

- 心拍数と速度の関係を測定、そのデータを運動処方に生かします。
- 歩幅を自動的に測定・表示。トレーニングモードは一回20分、
多人数でも使えます。
- 測ったデータはプリンタでしっかり記録します。
- 風を受けながら爽快なトレーニングができます。

※具体的な運動処方の実態について解説した小冊子「インストラクターのための
“歩く”“走る”運動処方」を用意しています。
最寄りの当社営業所、または右記宛、ご請求下さい。

日本光電 日本光電北海道株式会社
〒001 札幌市北区北13条西3丁目
☎011(747)5585

詳しい資料を用意しております。当社までお気軽にご請求下さい。

理化学機器・医療機器



株式
会社 **ムトウ**

取扱品目 理化学機器・医療機器・ME機器・病院設備
放射線機器・メディカルコンピューター・貿易業務・歯科器械

代表取締役社長 田尾延幸

本社 / 札幌 / 東京
支店 / 札幌中央・札幌西・札幌白豊・新札幌・旭川・函館
釧路・帯広・北見・室蘭・苫小牧・小樽・千歳・岩見沢
仙台・茨城・埼玉・千葉・神奈川
営業所 / 稚内・名士・空知・遠紋・日高・八雲・多摩・青森
栃木・日立・福岡

科学の発展と 新たなる創造

- 精密等分析試薬の販売
- 実験用・分析用・研究用機器の販売
- 計量計測・公害測定機器の販売

● カタログのご請求
お問い合わせは



北海道和光純薬株式会社

札幌市北区北15条西4丁目
TEL 代表 747 - 2 8 1 1 番
FAX 747 - 2 9 3 4 番

“信頼と真心” をモットーに ニーズにお応えします。

- ◎ 実験用動物
 - ◎ 実験動物用固型飼料
 - ◎ 実験動物用飼育器具・機材
 - ◎ 実験動物飼育管理受託
 - ◎ 動物実験受託・実験動物維持・生産
 - ◎ 実験動物の微生物モニタリング
 - ◎ 実験動物施設のクリーンアップ
 - ◎ 検査・研究用動物血液・血清

BIOLOGICAL TEST
Techno Support Mass



三協ラボサービス株式会社

SANKYO LABO SERVICE CORPORATION, INC.

- | | | |
|--------|---------|--|
| 本 社 | 〒132 | 東京都江戸川区西一之江2-13-16
TEL 03-3656-5559(代) FAX 03-3656-5599 |
| 北陸営業所 | 〒939 | 富山県富山市黒瀬115
TEL 0764-25-8021 FAX 0764-91-1107 |
| 札幌営業所 | 〒004 | 北海道札幌市豊平区里塚2条-4-9-12
TEL 011-881-9131 FAX 011-883-1176 |
| つくば営業所 | 〒300-22 | 茨城県つくば市真瀬940-1
TEL 0298-38-1227 FAX 0298-38-1269 |

第21回 日本毒科学会学術年会 プログラム・要旨集

●発行日/平成6年5月23日 ●発行人/菅野 盛夫

●発行所/北海道大学医学部 薬理学第二講座 〒060 札幌市北区北15条西7丁目 TEL(011)706-6921 FAX(011)707-1139

●印刷所/株アド・シイシイアイ TEL(011)552-4134