

第23回 日本毒科学会学術年会

プログラム・要旨集

平成8年7月25日(木)・26日(金)

九州大学薬学部

1996 福岡

7月26日(金)

訂正

A会場(電気ホール)	
9:00	9:00-9:50 田邊賞受賞講演
10:00	9:50-10:50 招待講演 1 Dr. Frank J. Gonzalez 座長 鎌滝哲也(北大・薬)
11:00	10:50-11:50 招待講演 2 Dr. Curtis Omiecinski 座長 小栗一太(九大・薬)
12:00	昼 休 み
13:00	13:00-17:30 シンポジウム 2 薬物間相互作用を回避するための、 医薬品開発段階における基本的戦略 オーガナイザー 渡部 烈 (東京薬大・薬)
14:00	
15:00	
16:00	
17:00	
18:00	

招待講演

7月26日(金) A会場 9:50~11:50

座長：鎌滝 哲也 (北大・薬)

- SL1. The role of the dioxin receptor, AHR, in animal development, physiological homeostasis and toxicity of TCDD

Dr. Frank J. Gonzalez
(Laboratory of Molecular Carcinogenesis, National Cancer Institute, National Institutes of Health)

座長：小栗 一太 (九大・薬)

- SL2. Phenobarbital induction of cytochrome P450 genes in primary hepatocyte and transgenic models

Dr. Curtis Omiecinski (Department of Environmental Health, University of Washington)

第23回 日本毒科学会学術年会

会期：平成8年7月25日（木）～26日（金）

会場：電気ビル（福岡市中央区渡辺通り1丁目）

会 長 小栗 一太

第23回 日本毒科学会学術年会組織委員会

石田 隆	福岡大学薬学部
江頭 亨	大分医科大学
重松 秀成	第一薬科大学
松野 康二	産業医科大学医学部
山田 英之	九州大学薬学部
山野 茂	福岡大学薬学部

事務局：石井祐次

事務局住所：〒812-82 福岡市東区馬出3-1-1

九州大学薬学部衛生化学・裁判化学教室

電話：092-641-1151 内線 6138

FAX：092-641-8154 (薬学部)

ご挨拶

今日ほどに医薬品の安全性に社会的な高い関心が寄せられている時代はなかったのかも知れません。医薬品に限らず、地下鉄サリン事件のように化学物質の高い毒性は、恐怖の念をもって見守られました。しかし、その背後には、生命現象についての最新の知識の急速な進展と、生体機能解明の革新的な技術の進歩を迎えた時代において、諦めの念ではなく、毒性学研究者による科学的な研究の進展によって安全性が追及されるであろうという期待感や信頼感を感じ取ることができます。このような時期に、第23回日本毒科学会学術年会と第5回日本毒科学会サテライトシンポジウムをお世話致しますことの責任の重さを強く感じています。この度の学会を開催するに当たって、信じられないほどに多くの先生方から積極的なご支援をいただきましたことに厚く御礼申し上げます。

サテライトシンポジウムのテーマは「毒性試験の国際化と今後の課題」に設定されました。昨年11月第3回医薬品規制に関する調和国際会議(ICH 3)が横浜において開催されました。安全性部門での主要な課題の討議がほぼ終わって、国際ガイドラインが起案、作成されました。これからの課題は、ガイドラインを如何に有効に運用するかにあるといわれています。ICHガイドラインの本質の理解を深める企画がもたれたことは意義深いことです。

学術年会の特別講演には、米国から著名な若手研究者を二人お迎えすることができました。Dr. Frank J. GonzalezとDr. Curtis Omiecinskiには、発現制御系を操作したトランスジェニック動物における毒性研究が発表されるものと期待しています。

最近の活性酸素種やレドックス制御をめぐる研究分野の進展は、目を見張るものがあります。シンポジウム1「活性酸素種とNOによる生体制御と毒性発現」では、このような分子種が生体制御と深く関わっていることの認識を深くするものと考えます。

ソリブジン薬害事件は、薬物間相互作用の問題の重要性を如実に提起しました。この問題についての議論の機会はすでに多く持たれてきました。今や、この問題に関する基本的戦略とは何かを議論する段階に至ったと考えられます。臨床薬理学、分子毒性学、薬物動態学などの各分野のオピニオンリーダーから提言をいただける機会をつくることができました。シンポジウム2「薬物間相互作用を回避するための、医薬品開発段階における基本的戦略」のねらいはそのようなところにあります。

今年度の学術年会には、125題の一般演題が寄せられました。会場の制約のために、一般演題のご発表の場が極めて過密になりましたことをお詫び申し上げます。この学会が基盤とする学問領域は今後ますます深く広く発展するものと期待されます。この会が活発な討論によって実り多いことを念じております。

小栗 一太

目 次

会場案内	6
お知らせとお願い.....	10
集会日程	13
プログラム	15
招待講演	43
シンポジウム 1	51
シンポジウム 2	59
一般演題	
口演	77
ポスターセッション	123
索引	207
協賛企業および団体御芳名	221

会場案内図



- ① ホテルニューオータニ ⑤ セントラルホテル福岡
- ② ソラリア西鉄ホテル ⑥ 福岡東映ホテル
- ③ ホテルセントラーザ ⑦ サンライフホテル
- ④ 福岡ビューホテル ⑧ グリーンホテル

J R 博多駅周辺図



天神周辺図



● 印はバスのりば

交通

A. 福岡空港、博多駅より

(1) 地下鉄 福岡空港 駅より、「姪浜」方面行の電車に乗車、地下鉄博多駅にて下車。4～8分間隔で運行。所要時間5分、料金220円。

地上に出て、J R 博多駅博多口側にある3番バスのりばからバスに乗車、渡辺通り1丁目バス停にて下車。1～2分間隔で運行。料金170円、所要時間約10分。

(2) 地下鉄 福岡空港 駅あるいは地下鉄博多駅より、「姪浜」方面行の電車に乗車、地下鉄天神駅にて下車。4～8分間隔で運行。所要時間6～11分、料金220円。

天神よりバスに乗車、渡辺通り1丁目バス停にて下車。5～8分間隔で運行。料金170円、所要時間5～7分。バスのりばおよび系統番号は、4 A 番 (系統番号25)、4 B 番 (系統番号49, 62)、5 A 番 (系統番号61, 55, 153)、5 B 番 (系統番号60, 63)、6 番 (系統番号20, 25, 44, 45, 45-1, 85) および9番 (系統番号25, 44, 45, 45-1, 61, 62, 63, 49, 85, 153) です。

B. 天神よりバスの利用 (所要時間は時間帯で変わります。)

上記Aの(2)に従ってバスに乗車、渡辺通り1丁目バス停にて下車。5～8分間隔で運行。料金170円、所要時間5～7分。

C. 天神より徒歩

天神、福ビル前より徒歩で約20分

D. タクシー利用の場合 (所要時間および料金は時間帯で変わります。)

1. 福岡空港～電気ビル前 約2,000円 (約15分)
2. J R 博多駅～電気ビル前 約700円 (約5分)
3. 天神～電気ビル前 約700円 (約5分)

電気ホール A会場

TEL 092-733-8643
(学会期間中のみ)

電気ホールのロビーにて機器および
書籍の展示を行います。





電気ビル本館 地下2階

B～G会場は7月25日（木）
のみ使用します。

お知らせとお願い

◆参加者の方へ

1. 受付：7月25日（木）から7月26日（金）まで午前8時30分から受付を会場入口にて行います。
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、および参加章を紛失・お忘れになった方は受付にお申し出ください。
2. 参加費：（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：6,000円
3. 呼び出し：会場内に伝言板をご用意致します。緊急の場合で場内呼出しが必要な時は、年会受付までお申し出ください。
4. 喫煙：所定の場所をお願い致します。
5. 駐車場：利用できませんので、会場までは公共交通機関をご利用ください。
6. 年会事務局：期間中は下記の通りです。
電気ホール TEL 092-733-8643

◆演者の方へ

口演発表の一般的注意とお願い

1. 発表：一般演題の発表時間は1題12分（発表9分、討論3分）です。
口演者は口演開始12分前までに次演者席にお着きください。
口演変更は原則として出来ません。やむを得ぬ理由により口演の取消、演者の変更が生じた場合は、直ちに学会事務局へ申し出てください。
シンポジウム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。

2. スライド：スライドはライカ版（35mm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、映写数と同じ枚数のスライドをご用意ください。スライドは、1演題10枚以内とします。スライド受付は各会場の入口にあります。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ください。口演者は、口演終了後30分以内にスライドの返却を受けてください。

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。

◆ポスター発表者の方へ

- ・ポスターは、7月25日（木）午前10時00分から11時00分の間に貼り付けてください。
- ・掲示に必要なチェスピンは、ポスター演者受付に用意してあります。
- ・掲示時間は午前11時00分から午後5時00分までとします。
- ・午後2時20分から午後3時10分までを質疑応答の時間とします。この時間帯に発表者は、必ずポスターの前に立っててください。
- ・ポスターは午後5時00分から午後5時30分の間に撤収し、チェスピンはポスター演者受付にお返しください。午後5時30分までに撤収されない場合には、事務局にて撤収し処分させていただきます。
- ・ポスター掲示の範囲は、ヨコ90cm x タテ180cmです。
- ・あらかじめボードの左上に、演題番号を明示しておきますので、自分の演題番号を確認の上掲示してください。
- ・J. Toxicol. Sci.に掲載する英文抄録は、ポスター受付の際に係員にご提出願います。

◆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）およびシンポジウムについては、それぞれ決められた時間を厳守願います。

会場のスライド受付にて来場の旨を係員にお伝えください。

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ください。

◆討論される方へ

一般口演なら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ください。

◆理事・監事の方へ

理事会は7月24日(水)16時30分より19時まで(サテライトシンポジウムの後)電気ビル地下2階2号会議室にて開催致します。

◆評議員の方へ

評議員会は7月25日(木)12時10分より13時10分までB会場にて開催致します。

◆総会について

総会は7月25日(木)13時20分より14時20分までA会場にて開催致します。

◆懇親会について

懇親会は7月25日(木)18時30分より、道路をはさんで向かい側のホテルニューオータニにて開催致します。電気ビルからは、地下連絡通路をご利用ください。懇親会に参加される方は、マークのついた参加章をつけて下さい。なお、懇親会の参加申込みは、定員に達するまで学会当日も受付にて行っております。

◆クロークについて

電気ホールのロビー奥のクロークをご利用ください。

◆書籍および機器展示会

電気ホールロビーにて行います。

第23回日本毒科学会学術年会スケジュール及び座長一覧

7月25日(木)

	A会場 電気ホール	B会場 8号会議室	C会場 7号会議室	DEFG会場 6,5,3,2号会議室
8:50	開会の辞			
9:00	9:00-10:00 活性酸素 A1~A5 内海英雄(九大・薬)	9:00-9:36 トキシコキネティクス B1~B3 渡辺和人(北陸大・薬)	9:00-9:48 生殖毒性 C1~C4 玄番宗一(大阪薬科大)	/
10:00	10:00-11:00 肝障害 A6~A10 江頭 亨(大分医大)	9:36-10:12 薬物代謝1 B4~B6 紅林秀雄(国立衛試)	9:48-10:36 毒性試験法 C5~C8 井上尚英(九大・医)	
11:00	11:00-12:00 免疫毒性 A11~A15 重松秀成(第一薬大)	10:12-11:00 薬物代謝2 B7~B10 上野光一(千葉大・薬)	10:36-11:24 腎毒性1 C9~C12 遠藤 仁(杏林大・医)	
12:00		11:00-11:48 肝毒性 B11~B14 吉田武美(昭和大・薬)	11:24-12:00 腎毒性2 C13~C15 高橋道人(国立衛試)	11:00-17:00 ポスター セッション
昼 休 み				
13:00	評議員会 (12:10-13:10、B会場・8号会議室)			
総 会				
14:00	(13:20-14:20、A会場・電気ホール)			
15:00	15:10-18:00 シンポジウム1 活性酸素とNO による生体制御と 毒性発現 オーガナイザー 竹重公一朗 (九大・医)	/	/	ポスター セッション 質疑応答 14:20~ 15:10
16:00				/
17:00				/
18:00	懇 親 会 (18:30~、ホテルニューオータニ)			
19:00				
20:00				
20:30				

7月26日(金)

	A会場(電気ホール)
9:00	
	9:30-10:20
10:00	田邊賞受賞講演
	休 憩
	10:30-11:30
11:00	招待講演 1 Dr. Frank J. Gonzalez 座長 鎌滝哲也(北大・薬)
	招待講演 2 Dr. Curtis Omiecinski 都合により講演中止
12:00	
	昼 休 み
13:00	
	13:00-17:30
14:00	シンポジウム 2 薬物間相互作用を回避するための、 医薬品開発段階における基本的戦略
15:00	オーガナイザー 渡部 烈 (東京薬大・薬)
16:00	
17:00	
18:00	

招待講演

7月24日(金) 大会場 10:30~11:30

プログラム

SL1. The role of the dioxin receptor, AhR, in animal development, physiological homeostasis and toxicity of TCDD

Dr. Frank J. Gonzalez

(Laboratory of Molecular Carcinogenesis, National Cancer Institute, National Institutes of Health)

SL2. Phenobarbital induction of cytochrome P450 genes in primary hepatocyte and transgenic models

Dr. Curtis Omiecinski (Department of Environmental Health, University of Washington)

都合により講演中止

招待講演

7月26日(金) A会場 10:30~11:30

座長：鎌滝 哲也 (北大・薬)

- SL1. The role of the dioxin receptor, AHR, in animal development, physiological homeostasis and toxicity of TCDD

Dr. Frank J. Gonzalez

(Laboratory of Molecular Carcinogenesis, National Cancer Institute, National Institutes of Health)

- SL2. Phenobarbital induction of cytochrome P450 genes in primary hepatocyte and transgenic models

Dr. Curtis Omiecinski (Department of Environmental Health, University of Washington)

都合により講演中止

シンポジウム 1

7月25日(木) A会場 15:10~18:00

「活性酸素種とNOによる生体制御と毒性発現」

オーガナイザー：竹重公一朗 (九大・医)

15:10-15:50 座長 竹重公一朗 (九大・医)

S1-1. レドックス制御と細胞死

淀井淳司 (京都大・ウイルス研・生体応答)

15:50-16:30 座長 内海英雄 (九大・薬)

S1-2. 活性酸素のクロストークと病態制御

井上正康 (大阪市立大・医・生化学)

休憩 (16:30-16:40)

16:40-17:20 座長 井上正康 (大阪市立大・医・生化学)

S1-3. 好中球の活性酸素発現機構

○竹重公一朗、伊藤隆司*、住本英樹
(九大・医・生化学、*東大・医科研・ヒトゲノム)

17:20-18:00 座長 淀井淳司 (京都大・ウイルス研・生体応答)

S1-4. 生体レドックス反応と生理・病態

○内海英雄、竹下啓蔵、市川和洋、鄭 然孫、韓 眞伊、
山田健一、藤原浩昭 (九大・薬)

シンポジウム 2

7月26日(金) A会場 13:00~17:30

「薬物間相互作用を回避するための、医薬品開発段階における基本的戦略」

オーガナイザー：渡部 烈 (東京薬科大・薬)

13:00-13:35 座長 石崎高志 (国立国際医療センター・臨床薬理)

S2-1. ソリブジン薬害に対する反省に基づく提言

渡部 烈 (東京薬科大・薬)

13:35-14:10 座長 鎌滝哲也 (北大・薬)

S2-2. 臨床薬理学からの提言

石崎高志 (国立国際医療センター・臨床薬理)

14:10-14:45 座長 杉山雄一 (東大・薬)

S2-3. 分子毒性学からの提言

鎌滝哲也 (北大・薬)

休憩 (14:45-15:00)

15:00-15:35 座長 野口英世 (第一化学薬品)

S2-4. 薬物動態学からの提言

杉山雄一 (東大・薬)

S2-5. 「非臨床ならびに臨床試験計画策定に関する提言」

15:00-15:35

座長 小沢直記 (アップジョン)

5.1. *In Vitro* 試験系をどのように活用すべきか

野口英世 (第一化学薬品)

16:10-16:45

座長 堀江 透 (エーザイ)

5.2. 非臨床試験成績は役に立つのか

小沢直記 (アップジョン)

16:45-17:20

座長 渡部 烈 (東京薬科大・薬)

5.3. 臨床試験計画はどうあるべきか

堀江 透 (エーザイ)

S2-6. 閉会に際して

小栗一太 (九大・薬)

7月25日(木)

A会場

9:00-10:00

活性酸素

座長：内海英雄（九大・薬）

- A1 MAO阻害剤によるラット心筋中のフリーラジカルの産生について
○小畑俊男、山中康光（大分医大・薬理）
- A2 銅のLECラット肝スフェロイドに対する細胞障害機構
○上野光一、吉沢正純、米田信次、佐藤哲男、千葉 寛、大道正義*、
鈴木和夫（千葉大・薬、*千葉市環境保健研究所）
- A3 ニワトリ胚子脳中のNO合成酵素活性に及ぼすシプロキサシンの影響
○夏木令子、田中政充、野崎正勝*（摂南大・薬・毒性、*生産開発科
学研究所・薬理）
- A4 ナフトキノン類のラット初代培養肝細胞に対する毒性発現機序に関する検討
○藤川康浩、築館一男、見上 孝（エーザイ・安全研）
- A5 抗酸化酵素遺伝子導入細胞を用いたクロロフェノール類の毒性発現の
解析
○鄭 然孫、市川和洋、瀬子義幸*、井村伸正*、内海英雄
（九大・薬、*北里大・薬）

10:00-11:00

肝障害

座長：江頭 亨(大分医大・薬理)

- A6 ガラクトサミン誘発急性肝炎ラットにおける細胞および細胞外基質(ECM)の動態
○鈴木道雄、上塚浩司、篠塚淳子、中山裕之、土井邦雄 (東大・農・獣医病理)
- A7 幼若ラットを用いた肝細胞小核試験の検討ー幼若法とPH法の比較ー
○白鳥 孝、宮川 誠 (三菱化学安全科学研・鹿島研)
- A8 ラットのlipopolysaccharide急性肝障害に対するキノロン系抗菌剤levofloxacinの影響
○都富友美、川畑貴美、加藤道幸、野村 護 (第一製薬・安全研)
- A9 *tert*-Butylated hydroxyanisole (BHA)投与ラットの肝臓および腎臓の変化
○瀬畑信哉、牧野俊彦、五十嵐 功、大橋芳彦、高岡雅哉、真鍋 淳、矢本 敬 (三共・安全研)
- A10 細胞内皮系機能抑制物質のラット肝に対する影響
○高田早苗、加藤道幸、野村 護 (第一製薬・安全研)

11:00-12:00

免疫毒性

座長：重松秀成 (第一薬大)

- A11 サンドイッチELISAによるアフラトキシンB₁-ヒト血清アルブミン付加体の測定
○奥村弘樹、林 志美、岸本成史、川村 理、陳 剛*、俞 順章*、上野芳夫 (東京理科大・薬・毒性学・微生物化学研、*上海医科大学・公衆衛生院)

- A12 ヒト免疫系への毒性評価系としてのヒトリンパ球移入SCID (hu-PBL-SCID)マウスの検討 -hu-PBL-SCIDマウスでのヒト免疫グロブリン産生-
- 井上智彰、志村賢一、鈴木弘美、堀井郁夫(日本ロッシュ・研究所・毒性病理)
- A13 *p*-Phenylenediamine系ゴム老化防止剤の皮膚感作性
- 門馬純子、川島邦夫、井上 達(国立衛試・毒性)
- A14 ヒト末梢血細胞に対するT-2 toxinの作用
- 吉野直人^{1,2}、滝沢万里³、田代文夫⁴、本多三男²、上野芳夫¹(¹東京理科大・薬、²国立予防衛生研・エイズ研究センター、³国立予防衛生研、⁴東京理科大学基礎工学部)
- A15 T-2 toxin投与マウスにみられたリンパ系組織のアポトーシス病変
- 篠塚淳子、李 冠民、上塚浩司、中山裕之、土井邦雄(東大・農・獣医病理)

B会場

9:00-9:36

トキシコキネティクス

座長：渡辺和人(北陸大・薬)

- B1 TRIS(2-CHLOROETHYL)PHOSPHATEのラットにおける代謝
- 紅林秀雄¹、大野泰雄¹、高橋 惇²、吉田賢二³、二宮真一³(国立衛試・¹薬理、²代謝生化学、³第一化学薬品・東海研)

- B2 Tris(2-chloroethyl)phosphate (TCEP)インハレーション後の体内動態
○吉田賢二¹、二宮真一¹、江角凱夫¹、嶺岸謙一郎²、紅林秀雄²、大野泰雄²、高橋 惇² (¹第一化学薬品・東海研、²国立衛試)
- B3 甲状腺阻害物質, 2-Mercaptobenzimidazole (MBI) 及びそのメチル誘導体のラットへの単回投与によるトキシコキネティクス (TK)
○酒見和枝¹、宇佐見 誠¹、伊藤理恵乃¹、川崎 靖²、斉藤 実²、梅村隆志²、伊佐間和郎³、大野泰雄¹、津田充宥¹ (国立衛試・¹薬理、²毒性、³療品)

9:36-10:12

薬物代謝 1

座長：紅林秀雄 (国立衛試・薬理)

- B4 マウス肝ミクロソームエステラーゼES46.5Kによる薬毒物の加水分解活性
○萱野勇一郎、渡辺和人、松永民秀、山本郁男、吉村英敏* (北陸大・薬・衛生化学、*中村学園大)
- B5 各種酵素阻害剤反復投与による代謝阻害動物作成の検討：アセトアミノフェンの代謝様式を指標として
○佐藤 玄、加藤 聡、炭竈秀二、本岡 覚、佐神文郎 (エーザイ・安全研)
- B6 毒性物質コレステロール7-ヒドロペルオキシドの加齢に伴うラット皮膚組織中での蓄積とグルタチオン依存的還元
○平塚 明、山根英史、山崎慎司*、小沢直記*、渡部 烈 (東京薬大・薬・第二衛生化学、*アップジョン・筑波総研)

- B7 F344ラットにおける肝代謝酵素の日内変動
○古川忠司、社領 聡、大橋芳彦、渡辺稔之、真鍋 淳、木村邦男、
岡田忠彦（三共・安全研）

10:12-11:00

薬物代謝 2

座長：上野光一（千葉大・薬）

- B8 リファンピシン投与によるイヌ肝薬物代謝酵素（CYP3A）の誘導ーラットとの比較ー
○西部泰宏、若林美津子、吉井景子、原内敏夫、大野浩司（塩野義製薬・新薬研）
- B9 ウサギ成獣においてCYP1A1の誘導を抑制する因子の解析
○高橋芳樹、中山佳都夫、藤井義明*、鎌滝哲也（北大・薬、*東北大・理）
- B10 薬毒物によるグルタチオン減少のラット肝ヘムオキシゲナーゼ遺伝子発現機構
○林 萌、小黒多希子、沼沢 聡、吉田武美（昭和大・薬・毒物学）

11:00-11:48

肝毒性

座長：吉田武美（昭和大・薬）

- B11 トリアジン系農薬の代謝と肝細胞毒性
○篠内桃子、宮島敦子、張宝旭、酒見和枝、大野泰雄（国立衛試・薬理）
- B12 ピペロニルブトキシドの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（都衛研・毒性部薬理研究科）

- B13 Wy-14,643誘発肝癌過程における肝内HGFの発現低下
○田村 浩、本木喜輝、渡辺隆史、須賀哲弥（東京薬大・薬・臨床生化学）
- B14 抗癌薬のラット門脈内投与による毒性の検討
○吉田貢由、東條宏子、鈴木 敦、川畑貴美、加藤道幸、野村 護（第一製薬・安全研）

C会場

9:00-9:48

生殖毒性

座長：玄番宗一（大阪薬科大・第二薬理）

- C1 トルエン吸入暴露のラットにおける生殖発生毒性 II. 妊娠前および妊娠初期暴露試験
○小野 敦¹、関田清司¹、広瀬明彦¹、小川幸男¹、鈴木幸子¹、斉藤実¹、安原加壽雄²、三森国敏²、内藤克司¹、川島邦夫¹、金子豊蔵¹、降矢 強¹、松本清司³、田中 悟¹、井上 達¹、黒川雄二¹（国立衛試・¹毒性、²病理、³信州大・医・動物実験施設）
- C2 塩化アリルによるマウス精巣障害の経時的評価
○大村 実、趙 満根、井上尚英（九大・医・衛生）
- C3 メタクリル酸2,3-エポキシプロピルエステルのラット精子に及ぼす影響
○田中亮太、坂本知恵子、伊藤圭一、山本利男、井上博之（食品農医薬品安全性評価センター）
- C4 トリブチルスズの妊娠初期投与によるラット母体及び胚に対する影響
○原園 景、江馬 眞、小川義之（国立衛試・大阪支所生物試験部）

- C5 化粧品原料の安全性評価のための眼刺激性試験代替法のバリデーション -1次から3次バリデーションまでのまとめ-
- 大野泰雄¹、井上 達²、金子豊蔵²、森川良広⁴、吉田武美⁵、藤井昭男⁴、増田光輝⁴、大野忠夫⁶、秋山純一⁴、池田紀和⁴、今西 豊⁴、板垣 宏⁴、宇佐美雅仁⁴、大越健自⁴、奥村秀信⁴、柿島 博⁴、笠井裕⁴、栗下昭弘⁴、小島肇夫⁴、西條 薫⁴、坂本一民⁴、簾内桃子¹、高野勝弘⁴、辰見 寿⁴、谷 尚子⁴、干場勝由⁴、中村恒彰⁴、林 真³、松川清治⁴、門馬純子²、渡辺理絵⁴ (国立衛試・¹薬理部、²毒性部、³変異遺伝部、⁴日本化粧品工業連合会、⁵昭和大・薬、⁶理研・細胞銀行)
- C6 細胞間結合蛋白シグナル伝達物質コネクシン32を用いたbenzimidazole系化合物の肝毒性評価
- 小野寺博志、三森国敏、竹川 潔、安原加壽雄、渡辺知幸*、高橋道人 (国立衛試・病理、*住友化学・生物環境科学研)
- C7 ヒトc-Ha-ras遺伝子導入マウスにおける短期発がん性試験-第1報-(4HAQOによる検討)
- 小泉治子^{1,2}、須永昌男²、浦野浩司¹、若菜茂晴¹、日置恭司¹、野村達次¹、山本 慧^{1,3} (¹実験動物中央研、²前臨床医学研、³慶應大・医・薬理)
- C8 毒性家の判断と統計解析の一致度の評価
- 浜田知久馬¹、吉野 慶²、松本一彦²、阿部いくみ³、野村 護⁴、吉村 功⁵ (¹東大、²日本たばこ、³三菱化学、⁴第一製薬、⁵東京理科大)

10:36-11:24

腎毒性 1

座長：遠藤 仁 (杏林大・医・薬理)

- C9 低タンパク飼料で長期飼育したラットの腎機能変化
○永薮徳久、田原紀子、神鳥仁志、西田信之、佐倉康文 (武田薬品・安全研・光支所)
- C10 加齢部分腎摘ラットの腎機能に関する基礎的検討
○山崎清美、村上善紀、坂内なるみ、野口 修、市村彰敏、塩野泰弘、坂口 弘、田内清憲 (日本レダリー・医薬研)
- C11 ラット腎障害時の腎クリアランスの有用性についての基礎的検討
○川端留美、箱井加津男、泉 勝彦、野中直樹、林 泰司 (大鵬薬品・製薬センター安全研)
- C12 ラット尿沈渣検査におけるTiO染色を用いた上皮細胞の鑑別
○中村美穂、菅原正喜、佐藤 洋、梶村哲世、野村 護 (第一製薬・安全研)

11:24-12:00

腎毒性 2

座長：高橋道人 (国立衛試・病理)

- C13 培養腎上皮細胞LLC-PK1のシスプラチン障害に対する肝細胞増殖因子(HGF)の軽減作用
○河合悦子、井上 優、玄番宗一 (大阪薬大・第二薬理学)
- C14 腎由来細胞株におけるシスプラチン誘導アポトーシスの細胞内機構
武田理夫、小林麻美、○遠藤 仁 (杏林大・医・薬理学)

- C15 CS-866のラット反復投与毒性試験における食塩補給の影響
○社領 聡、瀬畑信哉、匂坂秀樹、古川忠司、木村邦男、真鍋 淳（三共・安全研）

ポスターセッション（11:00-17:00）

D, E, F, G会場

14:20-15:10（質疑応答）

D会場（演題番号P01～P30）

- P01 末梢静脈栄養輸液の血管障害性とpH及び浸透圧の関係
○桑原 孝、朝波省吾、田村 工（大塚製薬工場 鳴門研）
- P02 Amurubicinのイヌ心機能への影響
○花井幸次、田澤真矢、渡辺知幸、尾崎正和、中野 実、甲田 彰、細川俊治（住友化学・生物環境科学研）
- P03 OXAZOLIDINONE系抗生物質U-100766の安全性評価 -I- ラットにおける4週間反復静脈内投与毒性試験
○石井 渉、友廣雅之、三浦秀樹、三井隆喜、John E. Lund（アップジョン・筑波総合研）
- P4 OXAZOLIDINONE系抗生物質U-100766の安全性評価 -II- イヌにおける4週間反復静脈内投与毒性試験
○中村良治、三井隆喜、福田武史、小林賢一、塚本和行、Daniel G. Branstetter（アップジョン・筑波総合研）

- P05 OXAZOLIDINONE系抗生物質U-100766の安全性評価 -III- ラットおよびイヌ4週間静脈内投与毒性試験トキシコキネティクス
○千葉康司、村田洋一、青山裕之、青山真樹子、G. W. Peng、小沢直記（アップジョン・筑波総合研）
- P06 キノホルム感受性ラットによるキノホルムの長期投与による神経障害の発症
○堀 真一郎、大谷幸子（都神経研、神経生化学）
- P07 Methotrexateの毒性発現に及ぼす葉酸の影響
○海野 隆^{1,2}、平川公昭¹、中村正典¹、佐藤直美¹、中村 孝²、下田実²、小久江栄一²（¹鐘紡・薬品安全研、²東京農工大・獣医）
- P08 Azidothymidine (AZT)長期投与による実験的骨髄異形成症候群—造血幹細胞動態と組織学的変化の検討—
○平林容子、梅村隆志、Eugene P. Cronkite*、井上 達（国立衛試・安全性生物試験研究センター、*米国ブルックヘブン国立研究所 医学部門）
- P09 マウス始原生殖細胞のENU処理による精巣毒性の発現
○和田あづさ、高島宏昌、森 千里（食品薬品安全センター・泰野研）
- P10 部分腎摘ラットを用いるメトトレキサート (MTX)の1ヵ月間反復経口投与毒性ならびにTK試験
○村上善紀、山崎清美、坂内なるみ、塩野泰弘、坂口 弘、小笠原裕之、田内清憲（日本レダリー・医薬研究所）
- P11 インドメタシン、パラコートおよびジクワットの動脈管収縮作用
○白井明志¹、政岡俊夫²、本谷真澄¹、高木博隆³、有嶋和義³、赤堀文昭¹（麻布大・獣医・¹薬理、²毒性、³解剖2）

- P12 アマライトおよびフェニルエーテル系農薬90日間投与によるイヌ肝臓および胆嚢への影響
○梅村隆志、小川幸男、児玉幸夫、小野 敦、関田清司、内藤克司、降矢 強、井上 達、黒川雄二、林 裕造* (国立衛試・毒性部、*北里大・薬)
- P13 ラット、マウスにおけるピレスロイド殺虫剤テフルトリンの急性毒性
○鈴木 学、高橋宏明 (残留農薬研究所)
- P14 Nefiracetam投与によるラットの精巣毒性—初期発生および回復性について—
○島田 信、鹿内ゆかり、原田滋雄、島田弘康、野村 護 (第一製薬・安全研)
- P15 低レベルメチル水銀による慢性暴露の生体影響
○安武 章、中野篤浩、宮本謙一郎、衛藤光明 (国立水俣病研究センター)
- P16 沃化メチルの高脂血作用
○本間健資、大谷勝己 (労働省産業医学総合研究所 職業病研究部)
- P17 D-Galactosamine感作マウスへのリポポリサッカライド投与により惹起される一酸化窒素生成増強と肝薬物代謝酵素阻害
○高山房子、江頭 亨、山中康光 (大分医大・薬理)
- P18 環境水汚染のラン藻由来肝臓毒マイクロシスチンのリスクアセスメント 第1報 高感度ELISAによる環境水中のマイクロシスチン汚染状況調査
○堤 智昭 (東京理科大・薬・毒性学・微生物化学研、東京理科大・生命研)

- P19 環境汚染のラン藻由来肝臓毒マイクロシスチンのリスクアセスメント
第2報 マウスに対するマイクロシスチン-LRの急性経口・腹腔毒性
及び免疫組織染色による肝細胞内分布
○上野芳夫^{1,2}、牧田祐樹¹、堤 智昭^{1,2}、永田諭志^{1,2}、吉田冬子²、関
島 勝^{2,3}、田村慎一⁴、吉田敏則^{2,5} (¹東京理科大・薬・毒性学・微
生物化学研、²東京理科大・生命研、³三菱化学BLC・筑波ラボ、⁴国
立予防衛生研・感染病理、⁵残留農薬研・毒性)
- P20 培養血管内皮に対する出血性ヘビ毒の細胞障害作用
○寺岡宏樹¹、横山 恵¹、丸山 豊¹、三木康宏¹、竹花一成²、平賀武
夫¹ (酪農学園大・獣医・¹毒性、²解剖)
- P21 イマザリルのマウスを用いた2世代毒性試験
○田中豊人 (都衛研・毒性部薬理研究科)
- P22 アスコルビン酸ナトリウムと亜硝酸ナトリウムの併用毒性試験
○高田幸一¹、内藤克司²、内田雄幸²、梅村隆志²、黒川雄二²、豊田和
弘¹、畝山智香子¹、正田俊之¹、高橋道人¹ (国立衛試・¹病理、²毒性)
- P23 The effects of green tea and red ginseng on CYP1A
○Mihi Yang、川本俊弘、児玉 泰 (産業医大・衛生学)
- P24 Benzalkonium chloride (BZC)の鼻腔粘膜に及ぼす影響
○久保山靖仁、鈴木一生、周藤勝一 (協和発酵・安全研)
- P25 Empenthrinによるペントバルビタール麻酔増強作用における種差
○辻 良三、花井幸次、磯部直彦、藪崎義康*、川崎 一 (住友化学・
生物環境科学研、*生命工学研)

- P26 副腎皮質ホルモン長期投与によるラット睪ラ氏島への影響
○古川文夫、西川秋佳、今沢孝喜、李 仁善、笠原健一郎、池崎信一郎、田中丸善洋、金 亨津、高橋道人（国立衛試・病理部）
- P27 防かび剤N-(Fluorodichloromethylthio)phthalimideのラット鼻腔粘膜および鼻咽頭管上皮への刺激作用
○松島裕子¹、内藤克司¹、斉藤 実¹、五十嵐良明³、津田充宥²、川崎靖¹、鈴木幸子¹、金子豊蔵¹、井上 達¹（国立衛試・¹毒性部、²薬理部、³療品部）
- P28 β -Aminopropionitrileおよびaminoacetonitrileによるラット骨変化の回復性に関する検討
○寺西宗広、佐藤里子、五十嵐 功、松本悦嗣、矢本 敬、真鍋 淳（三共・安全研）
- P29 高毒性3,3',4,4',5-pentachlorobiphenylのラット肝リン脂質脂肪酸組成に及ぼす影響について
○松末公彦、井上晴美、石井祐次、有吉範高、小栗一太（九大・薬衛生化学・裁判化学）
- P30 多発性硬化症マーモセットモデルの磁気共鳴画像解析および病理組織学的検索
○石原由美、佐藤 伸、井原真哉、赤井哲夫、藪内文恵、辻 孝司、影山明彦、山口基徳、矢ヶ崎 修、桑村 充*、佐久間貞重*（日本シエーリング・研究部安全性薬物動態研、*大阪府立大・農・獣医病理）

E会場（演題番号P31～P60）

- P31 肝硬変モデルラットにおける肝特異性MRI造影剤の肝での動態と安全性に関する検討
○佐藤 伸、井原真哉、辻本太一、橋元律子、加藤直樹、矢ヶ崎 修、山口基徳、山手丈至*、佐久間貞重*（日本シエーリング・研究部安全性薬物動態研、*大阪府立大・農・獣医病理）
- P32 回転培養法により作成したラット肝スフェロイドにおける *P. acnes*-LPS誘発肝障害について
○篠原洋子、小林明子、佐藤哲男、千葉 寛、上野光一（千葉大・薬）
- P33 ラット肝中期発癌性試験法でのフェノール系化合物の肝発癌抑制作用と長期試験結果との相関
○萩原昭裕¹、小久保百合子¹、田中 光¹、玉野静光¹、曾我立巳¹、広瀬雅雄²、白井智之²、伊東信行³（¹大雄会医科学研、²名市大・医・1病理、³名市大）
- P34 *N*-Nitrosopyrrolidine誘発ラットcholangiofibrosisに対するMESNAの抑制効果
○西川秋佳、古川文夫、今沢孝喜、池崎信一郎、田中丸善洋、李 仁善、金 亨津、笠原健一郎、高橋道人（国立衛試・病理部）
- P35 2-Nitropropaneの肝毒性における酸化的ストレスの関与：過酸化脂質の生成及び緑茶による抑制効果
○佐井君江、甲斐幸恵、梅村隆志、長谷川隆一、谷村顕雄、黒川雄二、井上 達（国立衛試・毒性部）

- P36 P450阻害作用が持続した際の肝臓の応答— α -Hederinのラットに対する反復投与によって惹起したP450阻害—
○五十嵐 功、渡辺稔之、古川忠司、山下和男、田中宏治、瀬畑 信哉、大橋芳彦、矢本 敬、木村邦男、真鍋 淳（三共・安全研）
- P37 Ca^{2+} 除去—再添加による赤血球破碎
○金津赫生、諏訪浩一、望月雅裕（筑波大・医療技術短大・ボゾリサーチセンター）
- P38 F344ラットにおける光障害網膜萎縮と網膜機能
○今井良悦、今若実穂、杉本眞次、渡辺武志、西条武俊（武田薬品・薬剤安全研）
- P39 フッ化ピリミジン系制癌剤のラット皮膚障害に対するビタミンB₆の軽減効果
○山口修司、岡田浩史、箱井加津男、林 修司、入村兼司（大鵬薬品・製薬センター安全性研究所）
- P40 rG-CSF大量投与ラット骨変化に対する週齢の影響
○鈴木雅実^{1,2}、坂牧義之¹、三好昌夫¹、足立健児¹、宇佐美正義¹、中山裕之²、土井邦雄²（¹中外製薬・安全研、²東大・農・獣医病理）
- P41 抗甲状腺物質投与ラットにおける下垂体TSH細胞肥大の推移に関する形態計測学的検討
○竹川 潔、三森国敏、小野寺博志、高橋正一*、下 武男、安原加壽雄、高橋道人（国立衛試・病理、佐々木研・病理）

- P42 モノクロタリン誘発マウス肺毒性病変に対するレシチン化SODの抑制作用
○安原加壽雄、三森国敏、竹川 潔、小野寺博志、山崎千尋*、星野二郎*、高橋道人（国立衛試・病理部、*生化学工業）
- P43 ラットにおけるエーテル及び炭酸ガス麻酔の生理的要因に及ぼす影響
○近藤貴雄、織田 茂、中井洋一、佐藤秀蔵（武田薬品・研究開発部・薬剤安全研）
- P44 Crj:CD (GS)ラットに関する背景データ及び低蛋白飼料飼育の影響
○松本 清、谷村勇次、北村紀子、大島洋次郎（武田薬品・医薬開発本部・薬剤安全研）
- P45 Monobenzyl phthalateによるラットにおける発生毒性の投与時期による変化
○江馬 眞、宮脇英美子、原園 景、小川義之（国立衛試・大阪支所生物試験部）
- P46 ニワトリ胚子の肢骨に対する催奇形性物質の影響
○平賀武夫、御家瀬 尚、寺岡宏樹（酪農学園大・獣医・毒性）
- P47 妊娠ウサギにおけるトキシコキネティクスに関する基礎検討
○飯田朋子、遠藤貴子、高橋弘樹、中島幹夫、佐々木眞敬、小林洋四郎（旭化成・ライフサイエンス総合研・安全研）
- P48 精子運動能解析装置 (CASA)による精子運動性の測定値に対する、超活性化現象の及ぼす影響について
○高島宏昌、和田あづさ、桑形麻樹子（食品薬品安全センター泰野研）
- P49 Aminoethyl nitrateのラット胎児の骨形成におよぼす影響について
○三分一所厚司、加藤康子、池谷純子、田嶋尚之*、田中頼久*（三共・安全研、*分析代謝研）

- P50 ラット培養胎児におけるチアベンダゾール (TBZ) の影響
○横山 篤、秋田正治、黒田行昭* (鎌倉女子大、*麻布大学・環境保健)
- P51 牛準胎児血清を用いたラット胎児の体外培養
○秋田正治、横山 篤、黒田行昭* (鎌倉女子大、*麻布大学・環境保健)
- P52 ラットにおける聴覚性驚愕反応
○河谷善則、藤 淳一郎、大島洋次郎 (武田薬品・薬剤安全研)
- P53 交尾後日数が雄ラットの生殖能に及ぼす影響
○和泉祐子、北村紀子、吉崎 宏、大島洋次郎、杉谷順康 (武田薬品・薬剤安全研)
- P54 ラットにおける雄性生殖能評価法の検討-2 CellSoft4000による精子検査方法の検討
○吉崎 宏、平山千束、藤本昭宏、三奈木隆史、大島洋次郎、杉谷順康 (武田薬品・薬剤安全研)
- P55 Kbl:JWウサギの背景データ -1984年~1995年-
○河村佳徳、瀬来俊明、三奈木隆史、大島洋次郎 (武田薬品・薬剤安全研)
- P56 Hypothermiaによる小核の誘発
○朝波省吾、下野和之 (大塚製薬工場 鳴門研究所)
- P57 免疫学的指標としての血清補体価 (CH50) 測定の検討
○古谷真美、、安達智子、金澤由基子、原田知子、小島幸一 (食品薬品安全センター泰野研)

P58 PFC測定に代わり得る特異抗体定量法の開発
○安達智子、河合祐二、金澤由基子、小島幸一 (食品薬品安全センター 泰野研)

P59 皮膚感作性試験における性差の検討
○加藤日路士、中村洋介、糟谷 環、岸田文雄、中塚 巖(住友化学・生物環境科学研)

P60 マウススポットテストと尾部白色斑の関係の検討
○中村 稔、鮫島顕二、茶谷文雄、一ッ町晋也 (武田薬品・医薬開発本部・薬剤安全研)

F会場 (演題番号P61～P71)

P61 嘔吐スクリーニングとしてのラット腹部求心性迷走神経活動における5-HT₄受容体の関与
○遠藤 泰、菅原 淳、菊池和彦、横田秀哉、玉飼博之、南 勝、吉岡充弘* (北海道医療大・薬・薬理、北大・医・第一薬理)

P62 摘出腸管からのセロトニン (5-HT)遊離量測定による制癌剤誘起性嘔吐の評価
南 勝、○遠藤 泰、井平恵美、小川隆志、浜上尚也、門間芳夫、平藤雅彦 (北海道医療大・薬・薬理)

P63 有機リン化合物による遅発性神経毒性と脳脊髄内 neuropathy target esterase (NTE)活性との相関について
○鎌田 亮、鈴木忠彦、齋藤真也、小林晴男 (岩手大・農・家畜薬理学)

- P64 制癌剤アドリアマイシンの特異的な核への輸送機序：アドリアマイシン-proteasome複合体の核への移行様式
○清宮健一、Guanxun Tian、松尾三郎、暮部 勝(大阪府立大・獣医・毒性)
- P65 ラットに有機燐殺虫剤ダイアジノンを静脈内投与した時の循環機能不全の解析
○高橋宏明、二川治子、田中直樹 (残留農薬研)
- P66 有機リン殺虫剤ダイアジノンの摘出血管平滑筋収縮抑制の解析
○二川治子、高橋宏明 (残留農薬研)
- P67 ゲンタマイシンのラットにおける貧血の発現機作
○苗代一郎、吉岡 勝、石村美祐、茶谷文雄、中井洋一、佐藤秀蔵(武田薬品・医薬開発本部・薬剤安全研)
- P68 化学発ガン物質によるグルタチオンS-トランスフェラーゼの活性化
○安仁屋洋子、田本佳寿江、新垣あやこ (琉球大・医・保健・生体機能)
- P69 安全性試験におけるラット先天性眼障害例について
○神谷隆信、下口幸夫、森 敬子、谷幡 務、橋本光也、木村裕則 (帝人バイオラボラトリーズ東松山研究所)
- P70 毒性用量でのペミロラストカリウム (TBX)の4週間反復経口投与の血漿中濃度推移の変化について
○平宮直樹、山本康弘、石田泰江、佐藤芳隆(東京田辺製薬・開発研・安全研)

P71 36箇月齢ラット骨における加齢変化の検討

- 吉岡直記¹、乾 公正²、永井由美子¹、田中弘光、真板敬三²、岩田
光夫¹、倉本和直³ (¹呉羽化学、²残留農薬研、³東京都老人総合研)

G会場 (演題番号P72~P81)

P72 ラット血漿アルブミン測定法についての検討

- 伊藤賀永子、苗代一郎、織田 茂、中井洋一 (武田薬品・薬剤安全
研)

P73 マウスの網膜電図記録法の検討 (2)ーモノヨード酢酸による有色マウ
スの網膜症への応用ー

- 杉本眞次、今若実穂、今井良悦、金丸健一、伊藤隆康、佐々木 啓、
安藤孝夫、西条武俊、佐藤秀蔵 (武田薬品・薬剤安全研)

P74 ラット リンパ球サブセットのFlow cytometryによる分析法の検討

- 鈴木弘美、井上智彰、進藤英俊、志村賢一、堀井郁夫 (日本ロシユ・
研究所・毒性病理部)

P75 ビーグル犬の失血後の赤血球系項目およびエリスロポエチンの変化

- 向井大輔、牧野江梨子、大石法男、藤島 敦、山川誠己、北島省吾、
渡 修明、井上博之 (食品農医薬品安全性評価センター)

P76 ラットの四塩化炭素反復投与による毒性発現における食餌制限効果

- 関 誠、大原直樹、関 剛幸、小島幸一、笠間菊子、今井 清 (食
品薬品安全センター泰野研・薬理・一般毒性学研)

P77 ビーグル犬における電気生理学的感覚機能検査法の検討

- 中山直樹、荒川恭子、佐々木正治、中村 勇、木村正明、樽本 保
男 (大正製薬・開発研・安全研)

- P78 視覚毒性評価におけるラット網膜電位図c波測定法の検討
○西矢剛淑、萩原美代子、北野 裕、高砂 浄、野村 護(第一製薬・安全研)
- P79 幼若カニクイザルの背景値-血液学および血液化学的検査-
○池田浩明、岡崎啓幸、鮫島秀暢、永田良一(新日本科学・臨床病理検査室)
- P80 実験動物のトランスアミナーゼ(AST, ALT)測定における至適条件
○豊田直人、荒井由美、稲元弘昭、井上芳巳、加藤 稔、神谷光一、近藤貴雄、高橋 守、寺坂美和子、水野三郎、望月文敏、渡辺計子、長瀬すみ(長瀬研生化学勉強会)
- P81 毒性試験における骨ミネラル密度測定の将来的利用
○ブライアン ブロックスアップ、スーザン Y. スミス
(バイオ・リサーチ ラボラトリーズ、カナダ モントリオール市)

The role of the aryl hydrocarbon receptor in animal development, physiological homeostasis and toxicity of TCDD

Frank J. Gonzalez, Pedro Fernandez-Fernandez and Jennid M. Ward

Division of Basic Sciences, National Cancer Institute, Bethesda Maryland, 20892 USA

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons are notorious environmental hazards causing acute and chronic toxicities and cancers (1-3). These chemicals all bind to a ligand-dependent transcription factor called the aryl hydrocarbon receptor (AHR) which in turn activates a battery of genes (4). To date, no endogenous ligand has been found. The AHR is ubiquitously expressed in vertebrates throughout the body and requires a dimerization partner called Arnt (5). The AHR and Arnt are members of a novel superfamily of basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors that also includes the proteins Per (Period) and Sim (Simple Minded), first identified in *Drosophila* as essential for development of the central nervous system, and the Hif1 α receptor, that mediates cellular response to growth (5). A conserved domain of 180-200 amino acids, designated PAS (Per, Sim, AHR, Sim), was identified that defines this superfamily. These proteins can be separated into two families on the basis of sequence comparisons across the PAS domain (Fig. 1). The AHR is most closely related to Sim and Hif1 α whereas Per, Arnt and a newly described Arnt2, are included in the second family. Similar to the AHR, Arnt also exhibits a ubiquitous localization while Arnt2 has a more restricted subcellular (6).

招待講演



Figure 1. PAM-genes were calculated from the sequence similarities across the PAS conserved regions of the five bHLH proteins shown. (Reference: from Hirose et al. (6). PAM is accepted point mutations per 100 residues.

The potential mechanism of action of the AHR is shown in figure 2. In the absence of exogenous ligand, the AHR is complexed in the cytoplasm of the cell with two molecules of heat shock protein 90 (HSP-90). Upon ligand binding, the HSP-90 molecules are displaced and the AHR enters the nucleus where it complexes with Arnt and binds to its DNA recognition elements to mediate increase in transcription of specific target genes such as *cyp1a1*. Hif1 α also uses Arnt as a dimerization factor, and may have a similar mode of action in mediating gene activation as a result of low oxygen tension. Similar to the AHR, an endogenous ligand for Hif1 α has not been described, but one is expected to exist.

The role of the aryl hydrocarbon receptor in animal development, physiological homeostasis and toxicity of TCDD

Frank J. Gonzalez, Pedro Fernandez-Salguero and Jerrold M. Ward
Division of Basic Sciences, National Cancer Institute, Bethesda Maryland, 20892 USA

2,3,7,8,-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons are notorious environmental hazards causing acute and chronic toxicities and cancers (1-3). These chemicals all bind to a ligand-dependent transcription factor called the aryl hydrocarbon receptor (AHR) resulting in the activation of a battery of genes (4). To date, an endogenous ligand for this receptor has not been found. The AHR is ubiquitously expressed in almost every organ and most cells in the body and requires a dimerization partner called AH receptor nuclear translocator (Arnt). Upon dimerization, the AHR binds to upstream DNA regulatory elements of target genes called AhREs (also DREs and XREs). Both AHR and Arnt are members of a small superfamily of basic-helix-loop-helix (bHLH) transcription factors that also include the proteins Per (Period) and Sim (Simple Minded), first identified in *Drosophila* as required for development of the central nervous system, and the Hif1 α receptor, that mediates cellular response to anoxia (5). A conserved domain of 200-350 amino acids, designated PAS (Per, Arnt, AHR, Sim), was identified that delineates this superfamily. These proteins can be separated into two families on the basis of sequence comparisons across the PAS domains (Fig. 1). The AHR is most closely related to Sim and Hif1 α whereas Arnt, Per and a newly described Arnt2, are included in the second family. Similar to the AHR, Arnt also exhibits a ubiquitous localization while Arnt2 has a more restricted localization (6).

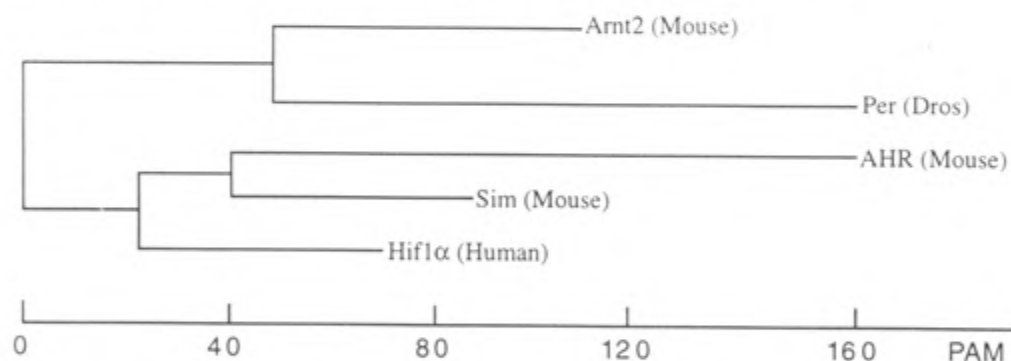


Figure 1. Phylogenetic tree calculated from the sequence relatedness across the PAS conserved regions of the five bHLH proteins shown. Redrawn from Hirose *et al.* (6). PAM is accepted point mutations per 100 residues.

The putative mechanism of action of the AHR is shown in figure 2. In the absence of exogenous ligand, the AHR is complexed in the cytoplasm of the cell with two molecules of heat shock protein 90 (HSP-90). Upon ligand binding, the HSP-90 molecules are displaced and the AHR enters the nucleus where it complexes with Arnt and binds to its DNA recognition elements to mediate increase in transcription of specific target genes such as *cyp1a1*. Hif1 α also uses Arnt as a dimerization factor and may have a similar mode of action in mediating gene activation as a result of low oxygen tension. Similar to the AHR, an endogenous ligand for Hif1 α has not been described, but one is expected to exist.

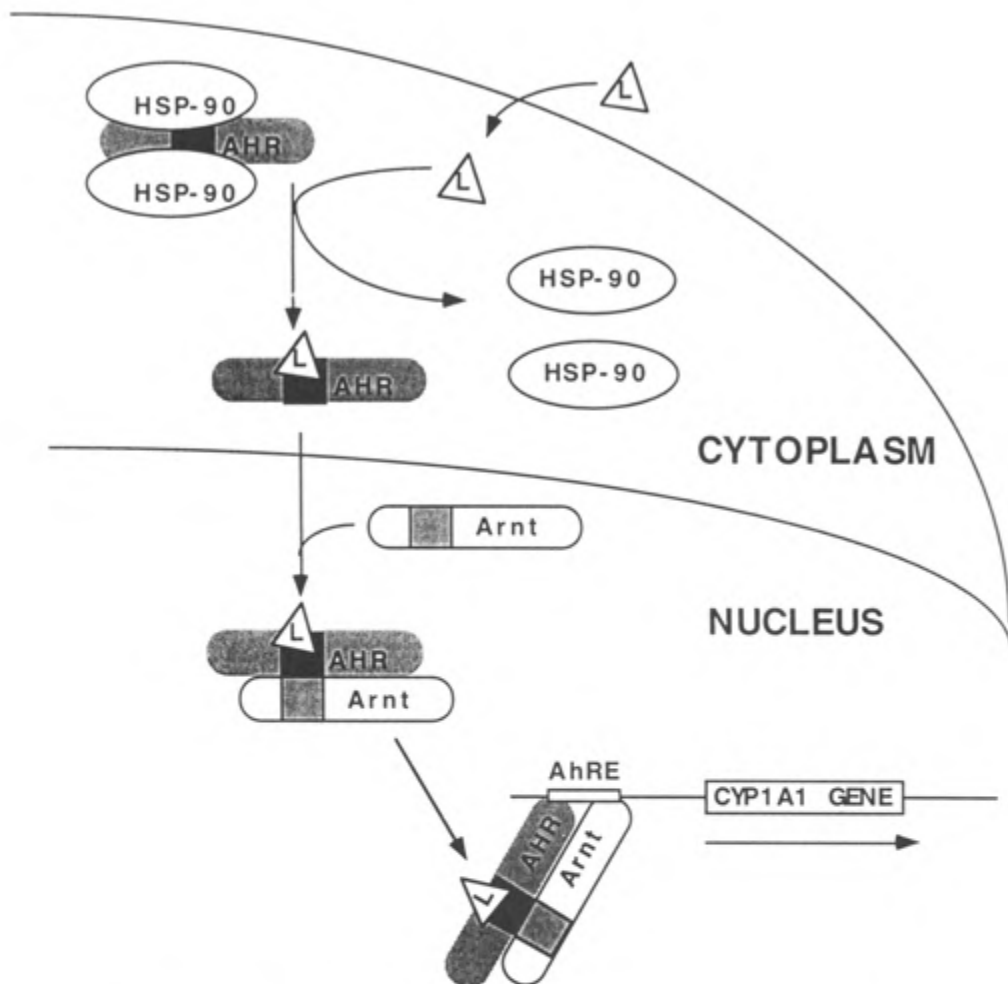


Figure 2. Schematic model of the putative mechanism of action of the AHR. L represents the exogenous ligand such as TCDD and the solid boxes in the AHR and Arnt proteins represent the PAS domains required for dimerization.

In order to determine the physiological role, if any, of AHR, gene knockout mice were generated (7). The region encoding the bHLH motif of the AHR was disrupted by insertion of the gene cassette encoding phosphoribosyltransferase II (Neo), a bacterial protein that mediates resistance to the toxin G418. This was used as a selection marker in pluripotent embryonic stem (ES) cells to generate, by homologous recombination, the knockout mice designated *Ahr*^{-/-}. *Ahr*^{-/-} mice do not express receptor protein and transcriptional activation of AHR-target genes by TCDD is abolished. In addition, basal expression (in the absence of exogenous ligand) of certain genes including CYP1A2 and UGT1*06 is markedly decreased. *Ahr*^{-/-} mice exhibited a large number of phenotypic abnormalities that include peripheral immune system deficiency mainly affecting B and T cells in the spleen. This is most notable in newborn pups and older animals and this deficiency is believed to be at least partially responsible for the premature deaths observed in young *Ahr*^{-/-} mice. Numerous other phenotypic changes, many of which are manifest

only as the animal ages (usually over 6-8 months) are noted. These include cardiac hypertrophy with the presence of some lymphocytic infiltration, fibrosis and that exhibits a similar pattern to that found in mice over-expressing TGF β 1 (8). In the skin, severe localized epidermal hyperplasia, hyperkeratosis and an altered expression of cytokines TGF β 1 and TGF β 2, keratins K1 and K10, and integrins α 3 and α 6 were observed; marked dermal fibrosis and hyperproliferation of hair follicles that exhibit both an abnormal localization deep in the epidermis and orientation pattern was also evident. Studies performed on primary cultures of keratinocytes isolated from the epidermis of newborn *Ahr*^{-/-} mice indicate that upon increase in the concentration of Ca in the medium (Ca switch) no significant induction in the expression pattern of the keratin markers was observed, as opposed to keratinocytes isolated from control heterozygous newborns (*Ahr*^{+/-}). *Ahr*^{-/-} mice develop a pronounced rectal prolapse associated with the presence of a *Helicobacter* organism, probably reflecting the inability of their defective immune system to control opportunistic bacterial infections. Hyperplasia is found in the gastric pylorus that develops into massive polyps in animals at around 10 months of age; this was observed at an incidence of over 80-90% in *Ahr*^{-/-} mice. A significantly smaller liver size with hyperproliferation of blood vessels in the portal areas and the presence of fibrosis not only in the portal tract but also within the hepatic parenchyma was observed in all *Ahr*^{-/-} mice analyzed. This liver fibrosis is present in neonates and adults, thus reflecting a developmental origin. Massive calcifications in the uterus are present in *Ahr*^{-/-} mice that is thought to affect their ability to carry pregnancies to term after 3-4 deliveries. Tumors in the liver and lung, identified as adenomas and adenocarcinomas, were also observed in some of the older (11-12 months) *Ahr*^{-/-} mice. These observations indicate that the AHR plays a fundamental role in cell and organ physiology and homeostasis and lend further support for the existence of an endogenous ligand. The clear correlations found between lack of AHR expression and an altered cytokine expression in skin suggest that this mechanism could also be involved in the fibrosis found in other organs such as heart and liver.

Acute exposure of mammals to the environmental pollutant TCDD results in a diverse set of toxicologic and pathologic effects. The mechanism of some of these effects have been extensively studied *in vitro* and correlative studies have indicated the involvement of the AHR. However, a definitive association of the AHR with TCDD-mediated toxicity has been difficult to establish due to the diversity of effects of the toxin and the ubiquitous expression of this receptor. In an effort to distinguish AHR-mediated TCDD toxicities from those resulting from alternative pathways, we have made use of the *Ahr*^{-/-} mouse. The results demonstrate that *Ahr*^{-/-} mice are relatively unaffected by doses of TCDD (2000 μ g/kg) 10-fold higher than that found to induce severe toxic and pathologic effects in littermates expressing a functional AHR. Analyses of liver, thymus, heart, kidney, pancreas, spleen, lymph nodes, lungs and uterus from *Ahr*^{-/-} mice identified no significant TCDD-induced pathology. The resistance of *Ahr*^{-/-} mice to develop TCDD-induced thymic atrophy and cortical lymphocyte depletion appears restricted to processes involving AHR since the corticosteroid dexamethasone, suggested to induce thymic atrophy by a pathway unrelated to the AHR (9), rapidly and efficiently induced cortical depletion in both *Ahr*^{-/-} and normal littermate control mice. Taken together, these results suggest that the pathological changes induced by TCDD in the liver and thymus are mediated entirely by the AHR. However, it is important to note that at high doses of TCDD, *Ahr*^{-/-} mice displayed limited vasculitis and scattered single cell necrosis in their lungs and livers, respectively. The mechanism(s) responsible for these apparently receptor-independent processes remain unclear but may involve novel, alternative pathways for TCDD-induced toxicity.

Finally, the results obtained to date using the *Ahr*^{-/-} mice as a model clearly suggest the involvement of this receptor in many more cellular processes than those associated with TCDD-mediated toxicity (Fig. 3) and indicate that there are a number of possible roles for

this transcription factor in regulating physiological and developmental functions in mammals.

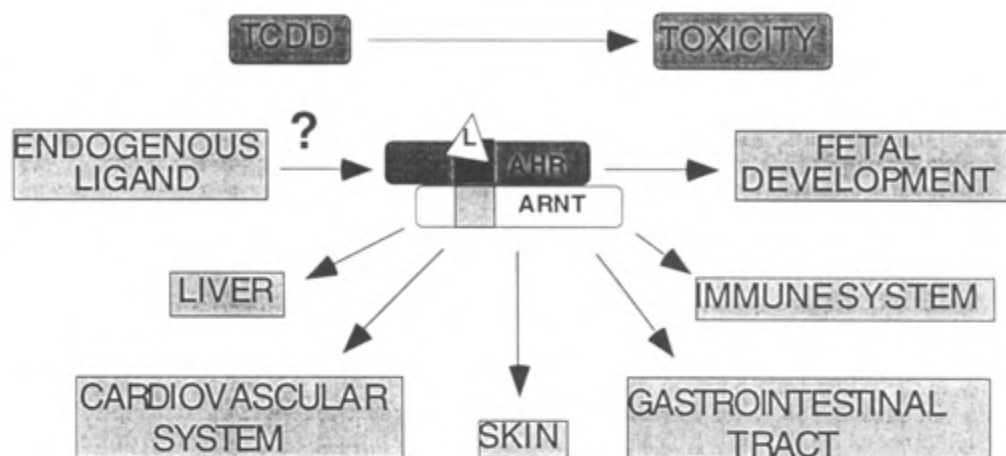


Figure 3. Schematic diagram of the AHR functions.

References:

1. Dohr O, Vogel C, Abel J. Modulation of growth factor expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Exp Clin Immunogenet.* 1994; 11: 142-148.
2. Pohjanvirta R, Tuomisto J. Short-term toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in laboratory animals: effects, mechanisms, and animal models. *Pharmacol Rev.* 1994; 46: 483-549.
3. Kerkvliet N. Immunological effects of chlorinated dibenzo-*p*-dioxins. *Environ Health Perspect.* 1995; 103: 47-53.
4. Swanson HI, Bradfield CA. The Ah-receptor: genetics, structure and function. *Pharmacogenetics.* 1993; 3: 213-230.
5. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92: 5510-5514.
6. Hirose K, Morita M, Ema M, Mimura J, Hamada H, Fujii H, Saijo Y, Gotoh O, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y. cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS factor (Arnt2) with close sequence similarity to the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt). *Mol Cell Biol.* 1996; 16: 1706-1713.
7. Fernandez-Salguero P, Pineau T, Hilbert DM, McPhail T, Lee SS, Kimura S, Nebert DW, Rudikoff S, Ward JM, Gonzalez FJ. Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science.* 1995; 268: 722-726.
8. Sanderson N, Factor V, Nagy P, Kopp J, Kondaiah P, Wakefield L, Roberts AB, Sporn MB, Thorgeirsson SS. Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92: 2572-2576.
9. Silverstone AE, Frazier DE, Jr., Fiore NC, Soultis JA, Gasiewicz TA. Dexamethasone, β -estradiol, and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin elicit thymic atrophy through different cellular targets. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1994; 126: 248-259.

Phenobarbital Induction of Cytochrome P450 Gene in Primary Hepatocyte and Transgenic Models

Curtis J. Omiecinski

Department of Environmental Health, University of Washington, Seattle, WA 98195 USA

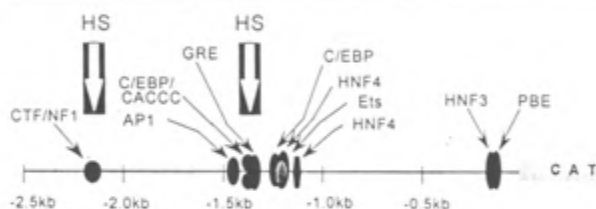
Introduction. Phenobarbital (PB) is well-known for its pleiotropic nature of effects produced in mammalian systems including CNS sedation, anti-seizure activity, perturbation of gap-junction communication, tumor promotion, and hepatic gene induction. The mechanisms underlying most of these effects remain largely unknown. Our laboratory has been focusing on the potent gene induction properties of PB, with the objective of delineating the molecular events responsible. The rat CYP2B1 and CYP2B2 genes have been well-studied in this regard and exhibit dramatic transcriptional activation in response to PB exposures. The induction phenomenon is largely liver-specific, although certain other select cell types, for example gastrointestinal enterocytes and certain regions of the central nervous system, appear to be PB-inducible as well.

Primary hepatocyte cultures. Historically, PB induction has been difficult to reproduce *in vitro*. Hepatoma cell lines are largely refractive to the PB induction process. In efforts to study the liver-selective effects of PB, we have developed the use of primary rat hepatocyte cultures with extracellular matrix overlay that preserves *in vivo*-like P450 induction character and hepatocyte-specific expression responses.¹ Using this system, we have investigated potential signal transduction cascades involved in the mediation of the PB induction process, in particular protein kinase and phosphatase pathways using a battery of specific pharmacological modifiers and inhibitors. Elevation of intracellular cAMP/protein kinase A activity resulted in a dramatic concentration-dependent inhibition of PB-inducible P450 gene expression.² In addition, low concentrations of okadaic acid, a potent inhibitor of serine/threonine-specific protein phosphatases PP1 and PP2A, also abolished the PB-induction process. Similar results were obtained with tautomycin and calyculin A, other specific phosphatase inhibitors, but not with negative analogs of okadaic acid which lack phosphatase activity. These results suggest that protein kinase A and phosphatases PP1 and PP2A play important but opposite roles in mediating the intracellular signaling of PB. Identification of the molecular targets of these pathways should shed further light on the nature of the PB induction signaling pathway.

Transgenic Mouse Models. To identify critical genetic regions regulating PB-inducibility and tissue-specific control of the rat CYP2B genes, several lines of transgenic mice were produced and evaluated. The initial lines of mice were constructed using the entire length of the CYP2B2 gene as its own reporter, but differing in the extent of 5'-flanking sequence included. Two lines of mice containing a 20 kb CYP2B2 transgene were characterized.³ The 20 kb transgene extended from -800 bp, relative to the transcription initiation site, to 4 kb downstream of the polyadenylation signal. One line harboring this construct contained 20 copies of the transgene, the other, 8 copies. Neither of these lines exhibited transgene inducibility by PB. Unlike the endogenous genes of the rat, these transgenes were expressed constitutively in the mice at very high levels. The normal liver-specific expression character of the 2B2 transgenes also was disrupted, with extremely high levels of expression evident in kidney and, to a lesser extent, liver. Two other lines of mice were constructed containing the identical transgene but with the inclusion of an additional 20 kb of 5'-flanking sequence. These longer 40 kb constructs were present in each line at 1 copy and 3 copies per genome, respectively. Both of the latter lines of mice exhibited CYP2B2 expression character highly reflective of the endogenous rat gene. These constructs were not transcribed constitutively, were highly responsive to PB pretreatment, and manifested appropriate liver-specific expression. These results led us to conclude that important PB and tissue-selective regulatory sequences existed upstream of -800 bp in the 5'-flanking region. Several additional lines of transgenic mice were produced subsequently in an attempt to delineate the requisite control regions more precisely. For ease of manipulation, the new constructs employed a CAT gene reporter and an SV40

polyadenylation site in lieu of the 2B2 structural region. CAT transgenes containing 800 bp, 1.7 kb, and 2.3 kb of CYP2B2 5'-flanking sequence were produced and used for establishing transgenic mice. Several lines harboring each of the 3 new constructs were produced and their expression character evaluated. The CAT reporter genes were not expressed at high levels in any of the mice but CAT expression was evaluated using semi-quantitative RT-PCR analyses. Although interindividual variation was observed in the lines examined, evidence for PB inducibility was obtained only in several mice containing the 2.3 kb construct. The results generated to date are consistent with the interpretation that an important PB genetic element resides between 1.7 and 2.3 kb upstream of the CYP2B2 transcriptional start site. In addition to these experiments, we have conducted DNase I hypersensitive site mapping and DNA footprinting analysis of the 5'-regions of the CYP2B1 and CYP2B2 genes.⁴ The results of these studies are summarized below:

CYP2B1/2 Genes: Potential Regulatory Motifs



Recently, several additional lines of transgenic mice have been produced using both CYP2B2 and human growth hormone reporter genes and are being evaluated for PB induction potential. The results from these and concurrent *in vitro* experiments should more precisely define the molecular nature of the PB induction response and its tissue-specific control.

References.

1. Sidhu JS, Farin FM, Kavanagh TJ, Omiecinski CJ. Effect of tissue-culture substratum and extracellular matrix (ECM) overlay on liver-specific and xenobiotic inducible gene expression in primary rat hepatocytes. *In Vitro Toxicology* 7: 225-242, 1994.
2. Sidhu JS, Omiecinski CJ. cAMP-associated inhibition of phenobarbital-inducible cytochrome P450 gene expression in primary rat hepatocyte cultures. *J Biological Chemistry* 270: 12762-12773, 1995.
3. Ramsden R, Sommer K, Omiecinski CJ. Phenobarbital induction and tissue-specific expression of the rat CYP2B2 gene in transgenic mice. *J Biological Chemistry* 268: 21722-21726, 1993.
4. Sommer KM, Ramsden R, Sidhu J, Costa P, Omiecinski CJ. Promoter Region Analysis of the Rat CYP2B1 and CYP2B2 Genes. *Pharmacogenetics*, 1996, in press.

S1-1 レドックス制御と細胞死

定井博司

シンポジウム 1

京都大学ウイルス研究所 生体応答学研究部門

「活性酸素種とNOによる生体制御と 毒性発現」

7月25日（木）

A会場（電気ホール）

演題番号 S1-1～S1-4

近年、細胞におけるレドックス調節機構の重要性が、細胞の生と死の調節に重要な役割を担っていることが明らかになっている。ヒト・チオレドキシンの発現異常による成人T細胞白血病(ATL)細胞の悪性化、異常増殖に関与する因子として我々が報告したADF(ATL-DERIVED FACTOR)の発見、種々のサイトカイン様因子としてこれまで知られていなかった。我々は、ADF/TRXが酸化ストレスで誘導されるレドックス制御タンパク質であることを明らかにしているが、さらに最近では Azoxathiin、Nleomydin をはじめとする活性酸素種誘導される薬剤耐性分子である。本シンポジウムでは、活性酸素種誘導によるタンパク質分子の高次構造調節は、酵素・転写因子・シグナル伝達分子など種々の分子の活性調節に重要であることが従来より知られているが、今回はADF/TRXの標的分子群の探索と、ADF/TRXを介するレドックス・シグナルネットワークの重要性について、構造生物学的視点から報告する。また、こうしたレドックス制御機構に対するレチノイドやサイクロスポリンなどの薬剤及びカドミウム・白金・砒素など金属の作用についての最近の我々の知見と、その臨床医学的応用の可能性についても紹介する予定である。

S I-1 レドックス制御と細胞死

淀井淳司

京都大学ウィルス研究所 生体応答学研究部門

近年、細胞におけるレドックス調節機構の重要性が、細胞の生と死をはじめ様々な生物現象に関与するものとして特に注目されている。ヒト・チオレドキシン(TRX)は、HTLV-1による成人T細胞白血病(ATL)細胞の悪性化、異常増殖に関与する因子として我々が報告したADF(ATL-DERIVEDFACTOR)を初め、種々のサイトカイン様因子としてこれまでに解析、報告されてきた。我々は、ADF/TRXが酸化ストレスで誘導されるレドックス制御タンパク質であることを明らかにしているが、さらに最近ではCisplatin、Bleomycinをはじめとする活性酸素産生を伴う抗がん剤で著明に誘導される薬剤耐性分子であることが明らかとなった。チオール基の修飾によるタンパク質分子の高次構造調節は、酵素・転写因子・シグナル伝達分子など種々の分子の活性調節に重要であることが従来より知られているが、今回はADF/TRXの標的分子群の探索と、ADF/TRXを介するレドックス・シグナルネットワークの重要性について、構造生物学的視点から報告する。また、こうしたレドックス制御機構に対するレチノイドやサイクロスポリンなどの薬剤及びカドミウム・白金・砒素など金属の作用についての最近の我々の知見と、その臨床医学的応用の可能性についても紹介する予定である。

S 1-2 活性酸素のクロストークと病態制御

井上正康

大阪市立大学医学部第1生化学教室

ヒトの生命維持に不可欠なATP合成には毎日約500 Lの酸素が必要であり、これを溶かすには約100トンもの体液を要する。2.5 Lの血漿しかない成人は、ヘモグロビンへの濃縮結合と速やかな血液循環によりこれを確保している。酸素消費は臓器、細胞および個体の状態（摂食、運動、休息、体位、精神活動、睡眠など）により大きく異なり、時々刻々と変化する代謝の量と質を組織特異的に調節して臓器相関の基に生命機構を統合制御する。しかし、血液循環単位から見ると臓器間には歴然とした階層性が存在し、低酸素状態に陥った脳は他臓器を犠牲にしても自己の酸素供給を確保する。多細胞生物の生命線である心血管系は酸素運搬を最重要機能とし、その根幹は酸素代謝により制御されている。

酸素の～10%は平時でもスーパーオキシドやNOなどの活性酸素に変換され、生体チオールや金属酵素系などに作用してその機能を動的に制御し、多彩な生理活性と病理活性を示す。解析の結果、これまでは短寿命の生理活性分子と考えられてきたNOが、生理的低酸素濃度(10～25 μM)では極めて長時間作用し、組織局所の酸素分圧センサーとしてミトコンドリアのエネルギー代謝を制御していることが判明した。特に、極低酸素空間である腸管内、腹腔内、虚血病巣などではNOが強く作用し、殺菌作用や癌細胞のアポトーシス誘起作用を発揮する。本会では、NOやスーパーオキシドラジカルなどの活性酸素を分子言語とし、脳および全身組織のエネルギー代謝、血液循環およびシグナル伝達系を統合制御するNeurovascular Networkが個体の生と死の決定に重要な役割を果たしている様相を述べる。

好中球の活性酸素発現機構

竹重公一朗、伊藤隆司*、住本英樹

(九州大・医・生化学2、*東京大・医科研・ヒトゲノム)

活性酸素の生成は、多くの場合細胞あるいは組織の障害を引き起こすように作用するが、一方では細胞の生理機能の一部として利用されている場合もある。後者の代表的な例の1つが、好中球による活性酸素の生成とその殺菌への利用である。

好中球は、微生物の生体への侵入に際し、その侵入部位へ集まり（ケモタキシス）、微生物を貪食し殺す。この好中球の殺菌にはスーパーオキシド (O_2^-) を生成するNADPHオキシダーゼが重要な役割を演じている。本酵素は、細胞が休止時には不活性型であるが、微生物などの貪食時や種々の可溶性刺激剤（走化性因子のFMLPやホルボルエステルのPMAなど）によって細胞が刺激された時、活性型となり O_2^- を生成するようになる。生成した O_2^- から派生してできる種々の活性酸素や酸化剤が、取り込んだ微生物を殺すわけである。NADPHオキシダーゼを欠損した慢性肉芽腫症（Chronic Granulomatous Disease; CGD）患者の好中球は、活性酸素を生成できず、そのため殺菌能が著減している。

NADPHオキシダーゼに関与する因子として、酵素活性を示す細胞膜貫通性のフラボシトクロム b_{558} （FADをもつgp91phoxとヘムをもつp22phoxからなる。phoxはphagocyte oxidaseの略）、活性化に必須な細胞質因子のp47phoxとp67phoxおよび低分子量GTP結合タンパク質rac、さらに細胞休止時にp67phoxと複合体を形成しているp40phoxが見出されている。NADPHオキシダーゼの活性化は、これらの細胞質因子が細胞膜上のフラボシトクロム b_{558} と複合体を形成することにより起こると考えられている。最近、我々はこの複合体形成にp47phoxとp67phoxのもつSrcホモロジー3（SH3）領域（両者とも2つ

ずつ有する) を介するタンパク質-タンパク質相互作用 (SH3 領域は標的タンパク質のプロリン・リッチ領域と結合する) が重要な役割を果たすことを明らかにした。本講演では、NADPH オキシダーゼ各因子による複合体形成機構を中心に紹介したい。刺激によって p47phox の高次構造変化が起こると、分子内に隠れていた SH3 領域が露出し、N 末側の SH3 領域が p22phox の細胞質部位のプロリン・リッチ領域に結合する。この結合は特異的であり、NADPH オキシダーゼ活性化に必須である。同時に、p67phox の高次構造変化も起こり p47phox と結合するが、この結合は p67phox の C 末側 SH3 領域と p47phox のプロリン・リッチ領域の相互作用による。p22phox のプロリン・リッチ領域に変異をもつ CGD 患者好中球では、p47phox との結合が起こらないために O_2^- 生成 (NADPH オキシダーゼの活性化) が誘導されないものと考えられる。p47phox と p67phox の高次構造変化は、好中球が刺激された時生成するアラキドン酸によって、あるいは活性化されたタンパク質キナーゼによってリン酸化されることによって引き起こされると考えられている。複合体形成には SH3 領域以外にも、p47phox の N 末側領域も重要である。また、p40phox はタンパク質間相互作用を司る新規モチーフを介して p67phox と結合し、NADPH オキシダーゼの活性化を制御しているものと考えられる。Rac に関しては、p67phox の N 末側部分と結合することや、rhoGDI や smgGDS により制御されていることなどが知られているが、その NADPH オキシダーゼ活性化における役割については不明の部分が多い。

このように、フラボシトクロム b_{558} に細胞質因子が会合することにより、フラボシトクロム b_{558} の高次構造変化が誘導され、NADPH からの電子がフラビン (FAD)、ヘムそして分子状酸素へと伝達され O_2^- が生成するのであろう。

生体レドックス反応と生理・病態

-*in vivo* ESRによる無侵襲解析-

内海英雄, 竹下啓蔵, 市川和洋, 鄭 然孫,

韓 眞伊, 山田健一, 藤原浩昭

九州大学・薬学部・薬品物理化学

【はじめに】 活性酸素やフリーラジカルが生理現象や病態・毒性発現に重要な関わりを有することが種々示されている。フリーラジカルとは不対電子を有する分子の総称で、一般的に不安定で反応性が高く、 $\cdot\text{NO}$ や $\cdot\text{O}_2$, $\cdot\text{OH}$ などが属する。多くの培養細胞や生体分子を用いた研究から遺伝子の突然変異、遺伝子転写への関与あるいは $[\cdot\text{NO}-\cdot\text{O}_2]$ 他の生体成分間のクロストーク反応などが明かになりつつある。一方、生体内フリーラジカル反応は多くの生体分子の影響を受け多様に変化すること、試験管内反応と生物個体での研究結果に不一致が見られることなどが明かになり、生物個体での無侵襲解析の必要性が認識されるようになった。フリーラジカル反応は電子の移行を伴う酸化還元反応（レドックス反応）であることから、生体レドックス反応をベクトル的に捉える考えが提唱されている。

ESRとは電子スピン共鳴 (electron spin resonance) の略称で磁気共鳴法の一つである。NMRがプロトンや炭素などの核を見ているのに対しESRでは不対電子のスピンを対象にしており、フリーラジカルを特異的に検出する測定系である。ここでは、*in vivo* ESRについて原理・装置の概略を概説すると共に生体レドックスと生理現象、病態・毒性発現に関して我々の研究例を中心に述べる。

【*in vivo* ESRによる生体レドックスの解析】 通常のXバンド ESR分光器では水分子がマイクロ波を吸収し、電子レンジ中の水のように発熱を起こす為、水分量が0.1 ml以下という少量の試料しか測定できない。*in vivo* ESRでは水によるマイクロ波の吸収を防ぐために、(i) 低周波数帯域 (300~1300MHz) のマイクロ波と、(ii) ループギャップ共振器を用いている。現在市販されている装置ではラット頭部程度まで測定可能で、生体内ラジカルの無侵襲測定やラジカルの体内分布も画像化できる。最近開発された大型*in vivo* ESR装置ではヒト下腕部も測定可能である。

現在の*in vivo* ESR装置は感度が低く生理条件下あるいは病態・毒性発現と関連してフリーラジカル産生を直接測定するのは困難で、プローブのシグナル変化から間接的に評価する方法がとられている。ニトロキシドラジカルは活性酸素自身や生体レドックス系と反応すると還元され、その常磁性(ESRシグナル)を失う。そこでニトロキシドラジカルのESRシグナルの消長から、生体内レドックス反応を解析する。

実際に、ニトロキシドラジカルの水溶液をマウスなどに投与し、頭部、胸部、腹部などを中心に測定すると、ニトロキシドラジカルの窒素核による3本の鋭い超微細分裂吸収が見られる。シグナル強度の経時変化を片対数プロットすると直線的に一

次反応に従って減衰する。このシグナルの減衰、即ちスピנקリアランスは生体内での常磁性の消失、代謝、排泄等が総合的に反映されたものだが、初期でのスピנקリアランスはニトロキシドラジカルがヒドロキシルアミンへ電子還元されることによる常磁性消失が主要因で^{1, 2)}、減衰速度はその程度を反映している。

【*in vivo* ESRによる生理機能、病態・毒性発現の解析】 ビタミンCを前投与したマウスにニトロキシドラジカルを尾静脈投与し頭部や胸部でのスピנקリアランスを調べると減衰速度は投与量に依存して有意に大きくなる。従って、減衰速度は生体の「還元力」を反映していると考えられる。減衰速度が部位によって異なりビタミンCの生体内「還元力」への作用に臓器依存性が示唆された。この還元力と老齢化および食餌制限との関係に関しては、老齢化に伴い還元力は低下するが、食餌制限すると幼若状態を維持すること等を既に示している³⁾。

酸化的ストレスを与え活性酸素を発生させた場合には、ニトロキシドラジカルのESRシグナルの減衰速度は活性酸素の生成量に依存して増大する。既に、高酸素暴露や虚血再灌流障害によるスピנקリアランスの亢進が抗酸化剤の投与により抑制されることを明らかにしてきた^{4, 7)}。また、アジュバント関節炎を惹起させたラット足趾部でのレドックス反応を関節腔内と末梢血管内に分けて経時的に解析した結果、関節腔内と末梢血管内共にニトロキシドラジカルの減衰速度は関節炎惹起群で有意に亢進すること、足趾部の浮腫に先だってレドックス反応の亢進が起こること、抗酸化剤の投与によりこの亢進が抑制されることが明確に示された。また、減衰速度を画像解析することで、レドックス反応が顕著に変化する部位の特定化も可能となりつつある。

一方、毒性発現との関係では四塩化炭素の経口投与や鉄過剰摂取による肝障害マウスでニトロキシドラジカルの還元反応の亢進が認められ、レドックス反応の関与が示された⁸⁾。また、培養細胞を用いた解析からクロロフェノールによる細胞毒性へのレドックスの関与等も示されつつある。これら酸化ストレスを与えた状態での*in vivo* ESRによる生体レドックスの無侵襲解析は抗酸化剤が生体内で有効に働いているか否か、即ち抗酸化剤の生体内活性の評価に有用である。

肺は直接空気にされており、最も酸化的ストレスを受けやすい組織である。ニトロキシドラジカルの水溶液をマウスに経気投与し、肺におけるシグナル変化を解析すると、肺から血中へのプローブ移行やニトロキシドラジカルの還元系がマウス肺胞の実質細胞に存在することが示された。また、酸化的ストレスを与えると肺内でのシグナル消失速度は亢進し、抗酸化剤の投与により抑制されることも示されており、*in vivo* ESRによる解析は揮発性物質による肺毒性発現での生体内レドックス反応の関与を無侵襲評価する上でも有用と思われる。

【参考文献】 1) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **172**, 1342-1348 (1990), 2) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **177**, 874-880 (1991), 3) *Life Sci.*, **52**, 2027-2033 (1993), 4) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **182**, 1108-1114 (1992), 5) *Free Rad. Res.*, **22**, 209-214 (1995), 6) *Free Rad. Res. Commun.*, **19**, s219-225 (1993), 7) *Jap. J. Toxicol. Environ. Health*, **40**, 213-223(1994), 8) *Toxicol. Letters*, **82/83**, 561-565 (1995)

S2-1 薬物間相互作用を回避するための基本的戦略：ソリブジン薬害に対する反省に基づく提言

シンポジウム 2

1993年8月に、強い痛みをともなうライネス性皮膚炎症である薬疹症候群に物く新薬として、抗ウイルス薬ソリブジン (SRV) がわが国において発売された。ところが、発売後40日間で約500名(発表)の患者が報告されたために、SRVは急きょ医療現場から撤退した。

「薬物間相互作用を回避するための、医薬品開発段階における基本的戦略」

7月26日 (金)

A会場 (電気ホール)
演題番号 S2-1～S2-6

1. ソリブジン薬害は回避できなかったが一言

言える理由は、明らかに結果論ではなく、その薬物動態学的による、SRV0効果に表れた発光透過は、SRVと3FU投与の同時投与期間の投与により、全ラットが短時間で死んだ原因のメカニズムを明らかにできなかった(表の第3項の経路図参照)。従って、3FUの投与プロトコール (SRVと3FU投与の投与スケジュール) の変更(3FUの投与内投与) により、SRVとSRVを投与内投与すると、ラットにおけるSRV濃度の異常上昇が起こらないことを示しているが、SRVの場合このプロトコールを使用することは明らかに困難である。なぜならば、SRVの体内レベルを測定する抗ヒドロキシリソソルブジンヒドロキシターゼ (hDH) の不可逆的阻害をきたすSRVの代謝物BVLは、腸内細菌によって生成されるため、体内に吸収されることになり、投与回数による血中濃度試験によって明らかにされているからである。

S 2- 1 薬物間相互作用を回避するための基本的戦略： ソリブジン薬害に対する反省に基づく提言

渡部 烈

東京薬科大学・薬学部

1993年9月に、強い痛みをともなうウイルス性皮膚疾患である帯状疱疹に効く新薬として、抗ウイルス薬ソリブジン（SRV）がわが国において発売された。ところが、発売後40日間で15名（公式発表）の患者が死亡したために、SRVは急きょ医療現場から回収され、それ以上の中毒死の発生が回避された。中毒（公式発表8名）および死亡例（実数16名）の全ては、癌の再発予防の目的で抗癌薬5-フルオロウラシル（5-FU）製剤を日常的に服用していた患者達であった。5-FU製剤服用者以外は、SRV服用により、何らの中毒症状を示していない。SRV中毒患者は、下痢、下血、口腔粘膜の強度な萎縮、白血球および血小板の著しい減少などを示していたことが伝えられており、明らかに動物実験で認められる大過量の5-FU製剤の経口投与時の中毒致死症状に似ていた。SRVのみの大量投与によっては、動物はこのような症状を呈することはない。

これまでも、薬物間相互作用による重篤な副作用は、主として欧米においてある頻度で報告されてきたが、短期間でこれ程激しい中毒症が発生した例は医薬品の歴史上初めてである。これを契機に厚生省は新薬の申請に際して薬物間相互作用に関する臨床試験成績を添付することを直ちに義務づけたが、併用薬が余りにも多すぎるわが国の薬物療法の実状に、製薬企業の研究者達は途方に暮れていると言っても過言ではないであろう。ソリブジン薬害像を正確に把握しようとする筆者らの動物実験の成果をふまえ、その反省に基づき薬物間相互作用を回避するためのいくつかの提言をする。

1. ソリブジン薬害は回避できなかつたか一否！

否とする理由は、けっして結果論ではなく、次の客観的な諸点による。SRVの開発に携わった研究者達は、SRVと5-FU製剤の同時反復併用経口投与によって、全ラットが短期間で死んだ原因のトキシコキネティクスを究明すべきであった（次項の筆者らの研究成果参照）。彼らはベルギーの Desgranges らのプロトコール（5-FUと5-プロモピニルウラシル（BVU）の腹腔内併用投与）に準じて、5-FUとSRVを腹腔内投与すると、ラットにおける5-FU濃度の異常上昇が起らないことを示しているが、SRVの場合このプロトコールを使用することは明らかに誤りである。なぜならば、5-FUの体内レベルを支配する肝ジドロピリミジンデヒドロゲナーゼ（DPD）の不可逆的阻害をひき起こすSRVの代謝物BVUは、腸内細菌によって生成したのち、体内に吸収されることが、彼ら自身による非臨床試験によって明らかにされているからである。

下記に示す筆者らと同様なトキシコキネティクス試験成績が彼らによって明らかにされていれば、わが国の医療の現状——つまり、癌患者に対するインフォームドコンセントが普遍的でなく、したがってどのような薬物を服用しているか不明な（ソリブジン薬害以後は改善されつつあるが）患者が多数存在する現状——を考えると、SRVの開発計画ならび製造販売承認は厳しく見直されて当然であつたろうし、SRVの第II相臨床試験における死亡例の原因究明も適確に行われていたであろう。また当然、ユースビル（SRVの商品名）の使用説明書の5-FU製剤との併用に関する注意書きも、あのような生易しいものではなく、併用による死の可能性をも推察させる内容の「警告」文とすべきであつたろう。経口抗ウイルス薬SRVの適用症、帯状疱疹、は良く知られているように、高齢者のみならず、免疫機能の低下した癌患者が発症しやすい疾患であることは、SRV開発計画の初期段階ならびに承認に至る審議の過程で当然視野に入っていたであろうから。

しかし以上は、飽くまでもSRVの開発計画を、非臨床および臨床試験段階で“科学的な視点から正しく実施”しようとする意図があればの話である。そして、行政が正しい判断力を示し得ていればの話でもある。

II. トキシコキネティクスおよび酵化化学的方法によるソリブジンと5-フルオロウラシル系抗癌薬の相互作用による致死毒性発現メカニズムの解明

1. 要約——ラットにおいて5-FU系抗癌薬テガフル（FT）とSRVの薬物間相互作用による致死毒性発現は、肝酵素DPDがSRVの腸内細菌代謝物BVUより生成する活性代謝物ジヒドロBVUによって共有結合的に修飾を受け、失活したために、FTより生成した5-FUの組織（特に骨髄）中濃度が異常に上昇し、造血機能が著しく抑制されたためであることが明らかになった（Fig.1）。

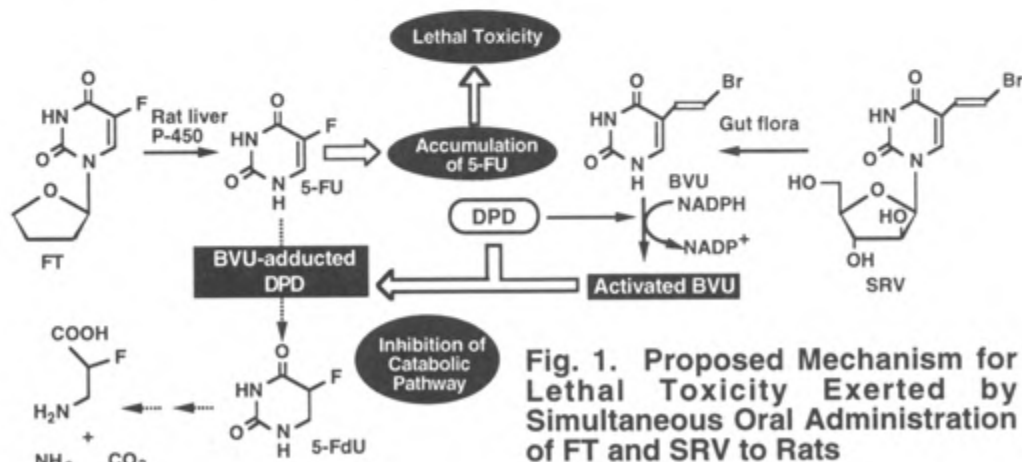


Fig. 1. Proposed Mechanism for Lethal Toxicity Exerted by Simultaneous Oral Administration of FT and SRV to Rats

2. 結果

2-1. SRVとFT（それぞれ30および60 mg/kg/日、臨床用量の12および3倍）を1日1回6日間ラットに単独または同時併用経口投与すると、単独投与群ラットは2週間後においても、対照群と同じ体重増加曲線を示し、異常は示さなかった。しかし、両薬物併用投与群ラットは3日目より著しく摂餌量が減少しはじめ、6日目の体重は対照群の約60%となり、その間に下痢と下血を起こし、2週間以内に全個体が死に至った。

2-2. 併用投与群ラットでは、投与後4日目で、すでに小腸粘膜の顕著な萎縮が起きており、骨髓中の血球前駆細胞は投与後2日目ではほぼ完全に分化増殖能を喪失していた。この群では、投与後6日目で、白血球と血小板数はFT単独投与群（対照群に比べて有意な変化なし）の約20%にまで低下していた。

2-3. 併用投与群ラットでは、1日目より血漿、肝、骨髓、および小腸粘膜中の5-FU濃度は顕著に上昇した（Fig. 2）。とくに、骨髓中の5-FU濃度は、FT単独投与では検出レベル以下であったが、併用投与によって血漿中のレベルよりも高い値を示していた。

2-4. 併用投与群ラットでは、肝DPD活性は投与後1および6日目でそれぞれ対照群の34および9%にまで低下しており、肝中BVUレベルはin vitroにおいて精製DPDを完全に失活させるに十分な濃度に達していた。

2-5. ラット肝より精製したDPDは $[^{14}C]$ BVUとNADPH存在下でインキュベートすると、速やかに共有結合的に放射能をとり込むとともに、完全に失活した。失活と放射能のとり込みとの間には化学量論的關係が存在していた。NADPH不在下では、失活も放射能のとり込みも起らなかった。SRVはNADPH存在下でもDPDを失活させなかった。

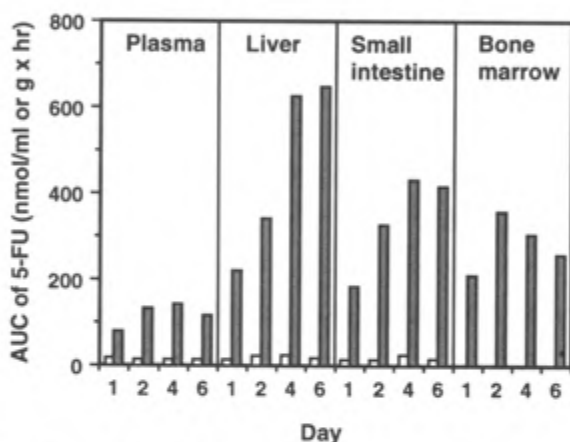


Fig. 2. AUC of 5-FU in Plasma and Various Tissues of Rats Orally Given FT Alone (Open Bars) or FT and SRV (Solid Bars)

III. 5-フルオロウラシルの体内濃度を支配するジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼのヒトにおける遺伝的多型と5-FU製剤による抗癌療法の問題点

ヒトおよびラットにおいて、DPD活性の組織分布は、肝において圧倒的に大きい。血中には僅かではあるが、白血球（単核）にも分布し、活性測定の対象にされてきた。血中DPD活性には大きな個体差があり、ほぼ正規分布を示すことが知られている。ヒト血中DPD活性に性差、年齢差および人種差は殆ど無いと報告されている。平均DPD

活性値の30%以下（人口の約 2.5%と推定されている）のヒトをDPD欠損者とみなすべきであり、これらの患者は5-FUによる点滴静注治療に際して、異常に高い血中5-FUレベルを示すので、厳重な注意が必要であるとされている。はたして血中のDPD活性のレベルが、肝のそれとどれ程の相関性があるのかについては未だ十分なデータが無いが、5-FUで治療（点滴静注）を受けていて死に至った数例の患者の血中のDPD活性はいずれも低く、平均DPD活性値の10%以下（人口の約 0.5%）であり、その内1名の肝DPD活性を調べたところ、平均値の15%であったと報告されている。

DPD活性の完全欠損者（人口の約0.1%）の一人の肝DPDは、正常DPDサブユニット（Mr 約111,000）のアミノ酸配列の一部（55残基）が欠失しており、家系的な調査結果は、遺伝的な要因であることを示している。もし、日本人においても、DPD欠損者が上記の比率で存在するとすれば、従来は画一的に行われてきた経口5-FU製剤による治療が患者数の約0.5%に対しては、中毒症を発症させる結果となっている可能性があることを「ソリブジン薬害」は改めて私たちに教えてくれた。これら約0.5%のDPD欠損患者を現行の5-FU製剤による治療（経口）からはたして除外する必要があるか否か、およびこれらの患者を選別するための適確なスクリーニング法の開発に関する研究成果が待たれる。

〔薬物間相互作用を回避するための基本的戦略に関する提言〕

1. 開発途上薬の適用症から予想される併用薬リスト中から、有効血中濃度域が狭く、「活性体」の高血中濃度が重大な副作用につながる薬物を選別し、併用したときの両者の動物とヒトにおける血中濃度を測定し、代謝競合の有無を調べる。
2. 開発途上薬のみならず競合関係にある選別された上記併用薬の「活性体」の動物とヒトにおける代謝律速段階酵素の種類と分子種を同定する。
3. 大多数の市販薬の代謝酵素が不明である現状を打開するために、行政はヒト臓器が創薬のために使用できる環境を早急に整備し、有効血中濃度域が狭い薬物については直ちに、それ以外の薬物については薬効再評価時に、血中濃度を支配する律速段階酵素を同定することを義務づける。このことが行われなければ、開発途上薬の相互作用試験は理論的根拠を大きく欠き、中毒発生の防止はきわめて困難である。
4. 行政と製薬企業は、疾患の治療に際して、明確な理由の無い薬物の併用を避けるための一大キャンペーンを行い、現状の改善を図る。

〔付記〕上記Ⅱ項の酵素化学的試験は、筆者の研究室の奥田晴宏、小倉健一郎、西山貴仁の各氏によって、そしてトキシコキネティクスと病理学的試験は、筆者のプロトコールに基づき、大鵬薬品工業（株）製薬センターにおいて、永山績夫、池田和正、山口修司、川口安郎の各氏を中心にして実施された。

医薬品開発段階において薬物相互作用を予見して効能書に明記されたものは殆ど過去には存在しないと思われる。つまり相互作用の中でも古い例としてはワルファリンと他薬物による出血死に見るように多くの患者に繁用され犠牲者を生じて後にその機序が研究され明らかにされた。最近話題のソリブジンとフルオロウラシル、テルフェナジンと抗真菌剤やマクロライド抗生物質との相互作用も発売後に生じており、医薬品開発段階である臨床薬理試験第Ⅰ～Ⅲ相の段階で少しでも察知されたならば予見的に効能書に因果関係はそれ程強いとは言えないまでも、記すことができたはずである。しかし医薬品開発段階（臨床薬理試験第Ⅰ～Ⅲ相）で相互作用を予見できないいくつかの理由が存在する：1)薬物相互作用は全ての患者では起こらず、限られた臨床的背景を有している患者で生ずる事が多いが、臨床薬理試験相に参加する健常者や患者数には限りがある；2)過去において発売後に臨床的にリアリティのある併用療法を考慮した薬物相互作用研究が医薬品開発段階で全て行われてはいない；3)致命的薬物相互作用は仮に予測されても、早期臨床薬理試験相では倫理的理由から行われにくい（例えば骨髄抑制を生ずる様な相互作用）；4)ヒト肝ミクロゾームを用いたインビトロ試験が行われてこなかった；5)薬理遺伝学的パネルスタディが医薬品開発段階で行われなかった、等をあげることができる。

「薬物間相互作用を回避するための基本的戦略に関する提言」

1)臨床的にリアリティを有する薬物併用を考えたヒト肝ミクロゾームを用いた阻害実験を行う（ヒト肝組織の入手が困難であるときはヒトCYPイソフォーム発現系を用いる）。

2)非致命的相互作用（骨髄抑制などが予測される以外）の予測は早期臨床薬理試験第Ⅰ相に取り入れ1)と同様の研究を行う。

3)臨床薬理試験第Ⅱ相では1)と同様の研究デザインを積極的に取り入れ、慎重な観察を臨床薬理学者を入れたチーム研究として行う。

当シンポジウムでは演者の上記の提言を示唆する研究例を提示する。しかし結論として医薬品開発段階で全ての相互作用を予見することは不可能であろう。肝における代謝阻害機序が関与する相互作用把握は進歩したものの、薬力学的相互作用 (pharmacodynamic drug interaction) は患者に繁用されるまでは正確にはその情報把握は困難であると思われる。

S 2- 3

薬物間相互作用を回避するための、医薬品開発段階における 基本的戦略：分子毒性学からの提言

北海道大学薬学部代謝分析学講座

鎌滝哲也

はじめに

薬物間相互作用の機構を解明すること、その予知をして薬物相互作用による医療事故を未然に防ぐことは薬に関係する研究者の使命である。

薬物間相互作用と一口に言っても、極めて困難な問題がある。最大の難点は医療に数多くの医薬品が用いられており、その組み合わせは無限であることである。その中から、数種の組み合わせを想定して研究しても全ての可能性を検証できるわけではない。我が国の医薬品の開発はことにヒトにおける試験の困難さから世界的に厳しい局面に立たされている。そこで我が国の製薬企業の共有の財産を作ることを以下に提案したい。

提言 1

新しい医薬品の開発においては、調べるべき薬物間相互作用を臨床の現場の意見を聞いて決定することが多いとされる。すなわち、開発中の医薬品の薬効から併用される可能性の強い薬物を抽出し、その薬物の中から更に絞り込んで相互作用の有無を調べるというやり方である。この方法は現段階では最も合理的ではあるものの、それでも予測できない相互作用の危険性を無視できるわけではない。当該薬物の薬効領域から、併用される可能性が高い薬物群を推定することは各製薬企業で行っていることで、いわゆるノウハウに属することであろうが、製薬企業の情報を集め誰でも利用できる情報として、公開できるように出来ないだろうか。この点に関する議論は一企業の問題ではなく、患者に対する医薬品の安全性の確保という点からも真剣に考えても良いのではないかと思われる。

提言 2

薬物間相互作用の可能性を予測するにも、薬物の組み合わせが無限に存在することが大きな問題である。そのことを完璧にクリアする方法はない。しかしながら、薬物代謝関連の薬物相互作用をある程度予測する方法は無いわけではない。すなわち、1) 種々の酵素が遺伝子工学的な手法によって容易に人工的に作れるようになってきた。2) 人工的に作った酵素の品質は均一であり、しかも大量に作ることが出来る。3) 遺伝子を導入した発現系は長期間の保存も可能で、発現酵素は商業的にも供給可能である。などの理由を踏まえ、もし簡便な方法で薬物と酵素の親和性を調べることが出来れば、その情報は貴重な参考資料となる。現在、その目的もあって演者らはヒト肝チトクローム P 4 5 0 の大量発現系のラインアップを進めている。具体的に達成したい目的は、1) 開発候補薬物が、どのチトクローム P 4 5 0 分子種によってどのような構造の代謝物に代謝されるのか。さらに、2) それぞれの代謝物がどのチトクローム P 4 5 0 分子種によって、どの程度の親和性をもって生成されるのかを調べようとするものである。これらの目的のために、ヒト肝チトクローム P 4 5 0 と P 4 5 0 還元酵素を同時に発現する大腸菌の発現系を構築している。現在の時点で7種のヒト肝チトクローム P 4 5 0 分子種が発現できている。P 4 5 0 還元酵素を同時に発現する大腸菌は、薬物を加えて培養するとヒト肝で生成する代謝物と同じ代謝物を生成することが期待できる。さらに、薬物がヒト肝チトクローム P 4 5 0 によって代謝される時の、薬物と酵素の親和性は大腸菌に発現した酵素を部分精製し、P 4 5 0 還元酵素などの存在下アッセイすれば容易に推測できる。本講演までの期間に、その構想が完全に達成されていないかも知れないが、一部得られたデータを示しつつ、構想を紹介したい。

薬物間相互作用を回避するための基本的戦略に関する提言

- 1) 臨床で併用される頻度が高い薬物の組み合わせに関する情報の公開。
- 2) 相互作用の予測を可能にする新しいアッセイ法の開発。

杉山雄一

東大・薬・製剤

(はじめに)

薬物相互作用により体内動態が変動する原因として、以下のことを挙げるができる。(1) 薬物吸収に関する相互作用、(2) 血漿蛋白結合に関する相互作用、(3) 輸送担体による生体膜透過過程における相互作用(肝、腎への取り込み、胆汁、尿中排泄過程を含む)、(4) 代謝過程における相互作用。本発表においては、臨床上特に問題となる(4)を中心に、ヒト肝組織を用いたin vivoでの薬物間相互作用の定量的予測がどの程度可能であるかについて、文献情報の解析を基に議論したい。最後に、相互作用を回避するための基本的戦略について、薬物動態学の観点から提言したい。この予測においては、いわゆるクリアランス理論が基礎になが、その詳細は他の論文、成書(1,2)を参照されたい。また、最近、本題に関する特集号(3,4)が出版されているので、併せて参照されたい。

(代謝過程における薬物相互作用の予測)

近年、in vitro系の代謝阻害実験の実施の必要性が提唱されている。しかしながら、in vitro実験により代謝阻害が観察されたからといって、in vivoでも相互作用が生じるとは限らない。従って、薬物相互作用に関する"in vitro/in vivo補外"ができない限り、いたずらに相互作用を恐れすぎるという問題が生じることになる。薬物相互作用がin vivoで生じることにより全身クリアランス(CL_{tot})が低下し C_{ss} 、AUC値が上昇するかどうかは、次の要因により決定される。(i) CL_{tot} における肝クリアランス(CL_h)の割合(fh)、(ii) CL_h において阻害の生じる代謝過程の占める割合(fm)、(iii) 酵素の存在部位における阻害剤の非結合型濃度(I_u)、(iv) 阻害定数(K_i)、(v) 阻害を受ける薬物の血中非結合型濃度($C_{u,ss}$)、(vi) 阻害を受ける薬物の K_m 値。

fm の概略は尿中への各代謝物の回収率から推定可能である。また、 K_i 値はヒト酵素分画(ヒト肝ミクロソームや酵素発現系)を用いたin vitro代謝実験により実測できる。厳密に言うと I_u の推定は容易でないが、概略値(最大値)については、循環血中の非結合型濃度及び、投与量、消化管からの吸収速度定数の値より推定可能である。当日はこうした理論に基づいて文献値をretrospectiveに探索することにより、薬物相互作用に関する"in vitro/in vivo補外"の可能性について述べたいと思う。今後、予測確率を上昇させるために解明されなければならない問題として、次の事柄を挙げることができる。(1) 肝臓で阻害剤が能動輸送によって取り込まれる場合の細胞内非結合型阻害剤濃度の推定、(2) 薬物が経口投与されるときに小腸での薬物代謝の寄与率および小腸での代謝阻害率の推定。前者については、ヒト肝細胞、肝スライスなどを使用する方法論の開発が期待される。また、後者についても、ヒト小腸を用いたin vitroデータからin vivoでの小腸初回通過代謝を予測する方法論の開発が期待される。

(新規薬物の既存の併用薬による代謝阻害の有無の予測手順の提言)

上記の検討結果をふまえて開発中の新規薬物のin vivoにおいて併用されることの予想される他剤による代謝阻害の可能性を予測する手順下記のように提言したい。今後種々の情報を得ることによって、本方法論をより予測性の良いものに改良していくことが必要であると考えているが、著者の推測を許して頂けるならば、現状でも、この方法論で相互作用の心配がないという判断をくだすものについては、その判断は正しいものであると考えている。今回の方法論は、“危険性を捨てることを重要と考え（言い換えれば、false negativeを出さないように注意して）”提唱したものである。薬物間相互作用に限らず、予想を行う場合には、自分がどこに中心をおいて予想を行うのかについて明瞭な意識をもって行うべきである。

併用薬によるin vivoにおける代謝阻害の有無を予測する方法の提言

-
- 1) P-450 関与の実証 (in vitro代謝実験、ヒトミクロソーム、肝細胞) ;
SKF-525AやCOによる阻害
 - 2) P-450 isozyme の同定 (in vitro代謝実験) :
ヒトP-450発現系、抗体、特異的阻害剤を用いた阻害実験
 - 3) 併用他剤 (阻害剤) の最大血中非結合型濃度 (lin, max, u) の推定 :
併用他剤のin vivoにおけるpharmacokinetics情報の検索。
 - 4) 肝臓における能動的取り込み能力の推定 :
 - (i) 実験動物 (ラット) 遊離肝細胞を用いた測定 ;
ラットで得られた濃縮率の2倍のマージン
 - (ii) ヒト肝細胞、肝スライスを用いた実測
 - (iii) 何も情報が無い場合 : 濃縮率として10倍のマージン
 - 5) 阻害剤の K_i 値の実測 (ヒトミクロソーム, ヒトP-450発現系)
 - 6) 代謝阻害の可能性の判断 :
 lin, max, u と K_i の比較 ($lin, max, u / K_i > 0.5^*$)
-

* in vivoにおける限界値として、今回は0.5を提言しているが、本来この値は、薬のpharmacodynamics, toxicodynamics の特性によって変えるべきものである。

(参考文献)

- (1) 杉山雄一、大家 毅: In vitro試験管内でのデータを基にした薬物体内動態の予測 “ファーマコキネティクス研究の方法と技術” —前臨床から臨床第1相へ— 杉山雄一 編, pp.87-108, 日本薬物動態学会 (1993),
- (2) 杉山雄一、岩坪隆史: 薬物相互作用に伴う体内動態変動; 薬物動態学会フォーラム1995 「新医薬品開発にかかわる諸問題: 薬物相互作用の機作と予測」 プロシーディング; 薬物動態, 印刷中
- (3) ファルマシア特集「薬物相互作用」、ファルマシア 31 (9) 1995
- (4) 薬物間相互作用と医薬品の適正使用; 沢田康文 編、月刊薬事臨時増刊号、月刊薬事 38(3), 1996

S 2-5.1 「非臨床ならびに臨床試験計画策定に関する提言」

In vitro試験系をどのように活用すべきか

野口英世

第一化学薬品

医薬品を開発する際には上市した薬剤が多くの併用薬とともに治療に用いられる事を予想しなければならない。即ち、併用薬によって開発品の作用が減弱したり、副作用が増強されたり、予期しない副作用が現れる可能性に留意し、同時に、併用薬に対する影響も考慮する必要がある。薬物治療において併用される可能性のある薬剤は無数に存在するが、治療の場では医師、歯科医師、薬剤師などの専門家が介在するので、新薬を開発した者はこれら専門家に的確な情報を提供することによって医薬品の安全使用に対する義務を果たすことになる。

薬物相互作用には物理化学的相互作用、薬物動態学的相互作用、薬理学的相互作用、毒性学的相互作用などが考えられるが、毒作用の増強や、予期しない副作用などは回避すべき相互作用として注意をはらう必要がある。多くの薬物は体内で代謝されて消失するが、代謝に関与する酵素反応が阻害されると血漿中濃度が高くなって毒作用が増強される。また、代謝経路が変化して毒性代謝物が増加すると全く予期しなかった副作用が現れることもある。

薬物代謝には多数の分子種の酵素が関与するが、併用薬による被験薬の代謝阻害を調べるためには、代謝に関与する酵素を同定し、阻害定数や阻害反応の可逆性、非可逆性を明らかにする必要がある。相互作用が臨床的に有意となるのは被験薬が有する毒性の種類とその強さによるので、毒性学的考察も重要である。代謝阻害によって薬物の代謝経路が変化し、毒性代謝物が生成する場合には予測が困難となるが、動物では存在しない代謝物がヒトで生成して、毒性の原因となる場合には動物を用いた安全性評価は無意味となるので、ヒトに特有の代謝物の生成には特に注意する。これらの基礎的データを得るにはヒト組織またはヒトと同じ分子種の酵素を用いたin vitro試験が役立つものと考えられる。

近年、cDNAを用いた発現系で種々の分子種のヒトのチトクロームP450が作られる様になり、ヒトにおける代謝をin vitroで予測することが容易となってきた。

また、欧米ではヒト肝の初代培養細胞、スライス、浮遊細胞、S-9、マイクロゾーム画分などを用いた試験も行われおり、FDAはヒト組織を用いた試験のガイドライン案を作成している。

わが国でも、これらヒトの酵素を用いた薬物代謝試験を標準化して、代謝阻害による薬物相互作用の予測を医薬品の安全性評価の一環として確立する必要がある。その際、代謝酵素ごとの典型的な阻害剤と、治療領域ごとに選択した併用薬に対する阻害作用を調べる必要があるため、その供給と標準化が望まれる。

また、問題とすべき副作用として、致死的な副作用、非可逆的転機をたどる副作用、患者に重篤な影響が現れる副作用などについての毒性学的考察とその取扱いについても定められる必要があろう。

さらに、毒性代謝物やヒト特有の代謝物の存在など、被験薬ごとに対応されるべき問題や、ヒトにおける酵素誘導の予測の様にヒト肝培養組織を用いた試験系を確立するなど、今後の検討に待たなければならない問題もある。

「薬物間相互作用を回避するための基本的戦略に関する提言」

1. ヒトにおける主代謝経路（毒性代謝物、ヒト特有の代謝物の生成を含む）を推定する
2. ヒトにおける主代謝経路、ヒト特有の代謝経路などに関与する酵素系を推定する
3. 併用薬による、及び併用薬に対する代謝阻害を調べる
4. ヒト組織を用いたin vitroでの酵素誘導試験系を開発し、被験薬の酵素誘導を予測する試験系を確立する

これらin vitroによる検討結果が臨床的に有為な副作用として反映される可能性については、さらに注意深く検討する必要があるため、医薬品の『使用上の注意』と『科学的情報』の提供とは明らかに区別して取扱われなければならない。

S 2-5.2

薬物間相互作用を回避するための、医薬品開発段階における基本的戦略：
非臨床並びに臨床試験計画策定に関する提言 --非臨床試験成績は役に立つのか

小沢 直記

アップジョン ファーマシューティカルズ リミテッド 筑波総合研究所 代謝分析研究部

Sorivudine薬害以来、薬物間相互作用に関する認識が大きく改められ、医薬品の探索段階・前臨床開発段階・臨床開発段階・申請時・上市後など医薬品開発の多局面において十分な対応が為されることが、種々の意味において必須になってきた。

薬物間相互作用の機構は、pharmacodynamicsやphysicochemicalなものなど多岐に亘っており、薬物動態に関連する薬物間相互作用に関しても、吸収・分布・代謝・排泄の各過程において知られている。しかし、sorivudine、terfenadine、cyclosporine A等が例として挙げられるように、薬物間相互作用の重篤な例は薬物代謝酵素に関連するものが殆どである。本発表においては、アメリカ系一企業の医薬品開発研究所における、薬物動態を中心とした薬物間相互作用に対する考え方と基本的戦略を幾つかの事例とともに紹介する。

(1) 薬物動態関連試験と薬物間相互作用

当社における主要薬物動態試験のプロセスは、1) 動物における探索関連試験（動物における血中薬物動態・生物学的利用率、動物及びヒト臓器を用いた予備的*in vitro*代謝等lead selectionに必要な試験）、2) Toxicokinetics試験（安全性試験のvalidation、毒性の種差・機構に関する情報提供）、3) 動物におけるpharmacokinetics-ADME関連試験（薬物動態における動物種間の比較）、4) ヒト臓器を用いた*in vitro*代謝試験（動物/ヒト相関の予測、薬物間相互作用に関する推測）、5) 健常人におけるpharmacokinetic試験（ヒト代謝物の同定、薬物間相互作用試験を含む）、6) 患者におけるpharmacokinetic試験等の順である。

上記の各段階において薬物間相互作用に関する情報が得られてくるが、現在までに報告されている薬物動態関連の薬物間相互作用の機構から考えると、ヒトにおける他薬物との併用試験開始の以前に、1) 代謝酵素阻害（特に不可逆的なもの）、2) 代謝酵素誘導（増加・減少）、3) 薬物吸収抑制・促進、4) 薬物腎排泄抑制・促進、5) 薬物肝移行阻害、6) 薬物血漿タンパク結合阻害等に関する情報等が明らかになっていることが必須であろう。

実際の疾病治療の過程における薬物間相互作用は、必ずしもすべての薬物において一律に重要な問題ではなく、注意すべき薬物の典型的な例は1) 治療係数が小さく、2) その毒性が重篤・致命的なものであると考えられる。これは、当該開発薬物に関してのみではなく、併用される相手方薬物についても同様の考慮が必須である。また、特に注意が必要と考えられることは、薬物併用投与対象者における薬物動態に関する生理的特徴（肝障害や老齢による薬物代謝機能低下、代謝酵素欠損等々）を考慮に入れることであろう。

（2）薬物間相互作用試験に関する当社の例

Tirilazadは当社開発中のクモ膜下出血治療薬であるが、ヒト肝ミクロゾームを用いた代謝研究より、その代謝反応は広範であるにも拘らず、殆どCYP3A4で触媒されており、代謝に依存した薬物相互作用が憂慮された。健常人における*in vivo*薬物間相互作用試験において、nimodipine、nifedipine、cimetidineはtirilazad血中濃度に対して相互作用を示さなかったが、ketoconazoleはtirilazadのAUCを約2倍に増加させた。Phenobarbitalやphenytoinによりtirilazadのクリアランスはそれぞれ25%、50%増大した。これらの結果から、今後さらに相互作用における*in vitro-in vivo*相関に関する実例を蓄積し、その予測・算定方法を構築していくことが必要と考えられる。

Bropirimineは、当社にて抗癌剤として開発中のインターフェロン誘導作用を持つ核酸誘導体であり、治療において5-FUとの併用が考えられる。さらに、その分子骨格にBrを含有し、sorivudineと同様にdihydropyrimidine dehydrogenase (DPD)を阻害する可能性が考えられたので、ヒト肝可溶性画分を用いた*in vitro*試験を行った結果、5-(2-bromovinyl)uracil (sorivudine代謝物)はDPD阻害作用及び5-FU代謝阻害作用を示したのに対し、bropirimineは作用を示さなかった。

「薬物間相互作用を回避するための基本的戦略に関する提言」

1. これまでに知られている薬物間相互作用の機構に照らし合わせて、当該薬物が相互作用を示す可能性を推測する。
2. 治療係数が小さく、毒性が重篤な薬物の薬物間相互作用には注意をする。
3. 薬物被投与者の生体要因を考慮に入れ薬物間相互作用を推測する。
4. 薬物間相互作用を否定し得ない結果が得られた場合は、その機構を不明のままにしておかない。
5. 安全性を確保しつつ、ヒトにおける薬物間相互作用試験を行う。

S 2-5.3

薬物間相互作用を回避するための医薬品開発段階における基本的戦略： 非臨床ならびに臨床試験計画策定に関する提言 —臨床試験計画はどうあるべきか

堀江 透

エーザイ株式会社 品質政策部

探索代謝研究における薬物相互作用回避の基本的戦略

薬物相互作用の予測を新医薬品の研究開発のどの段階で実施するかによってその意義は大きく変わる。医薬候補品の薬物代謝酵素の誘導および阻害の代謝特性は、その化合物固有のもので、化合物が選択された時点で、すでに決定されているわけであるから、薬物動態研究の一環として、その医薬候補品の薬物代謝酵素の誘導、阻害試験を実施し、誘導あるいは阻害が薬効用量あるいは推定臨床用量近くで認められ、ヒトで薬物相互作用が懸念されたとしても、その時点では、もはやどうすることもできない。ただ、臨床で薬物相互作用が起きないことを祈るだけである。

医薬候補品を探索する過程で、その化合物の薬効評価と同時に、薬物代謝酵素の誘導、阻害試験を実施し、早期に評価することが必要である。探索初期段階に誘導あるいは阻害が認められたならば、どのようなドラッグデザインをすればそれが回避できるのかを模索することが創薬研究には重要なことである。薬物代謝酵素の誘導、阻害は薬物相互作用の側面ばかりでなく、毒性とのかかわりも強く、安全性の高い新薬の創出にも繋がる。

探索研究の初期段階で、薬効評価と同時に有望な化合物については、薬物代謝酵素の誘導、阻害をチェックして、誘導、阻害のない化合物を選択することが重要である。もし仮に、誘導、阻害を示す化合物を選択せざるを得ない場合には、その投与量と薬効用量の中、推定臨床用量との中、種差、誘導、阻害するP450分子種の特定など、ラットおよび⁶-ゲル犬の薬物動態研究の成績と合わせて考察し、臨床での薬物相互作用の有無を予測することが重要である。誘導、阻害を示す化合物を選択しないためには、探索研究の初期段階に誘導、阻害と構造活性相関研究を実施し、誘導、阻害を回避する探索代謝研究を展開することが望まれる。

臨床における薬物相互作用の予測

実際に臨床で起きている薬物相互作用は、P450の誘導あるいは阻害に基づく相互作用がほとんどである。それ故、新医薬品のP450の誘導および阻害をチェックすることにより、臨床での薬物相互作用を予測できる。

私たちは非臨床試験の初期段階に、ラットおよび⁶-ゲル犬におけるアンチピリンクリアランステストを実施し、薬効用量付近での薬物代謝酵素の阻害の有無を判定している。また、薬物代謝酵素の誘導に関しては、ラットおよび⁶-ゲル犬における1週間反復投与安全性試験の中で、トキシコキネティクスを実施し、auto-inductionを観察する一方、最終投与後24時間後の肝薬物代謝酵素活性を測定し、酵素誘導の有無を判定している。薬効用量および推定臨床用量付近で、誘導あるいは阻害が認められた場合には、そのP450分子種を明らかにして、Phase I 試験のプロトコールに反映させる。たとえば、CYP1A2が誘導あるいは阻害された場合は、カフェインのクリアランステストを実施する。また、CYP3A4が誘導あるいは阻害された場合は、Phase I 試験

のプロトコールの中に尿中の6b-ヒドロキシコルチゾールの測定項目を入れる。これらの評価により、少なくともPhase I 試験の段階で、CYP1A2およびCYP3A4の誘導および阻害は判定できる。

薬物相互作用研究の進め方

ヒト肝ミクロゾームにおけるin vitro 代謝試験から、in vivo における薬物相互作用を予測するには限界があると思われる。その際、相互作用試験のin vivoモデルを構築する必要がある。大動物の薬物動態試験の動物種としてビゲル犬が用いられているが、ビゲル犬における肝ミクロゾーム中のP450分子種のサブファミリーの量的質的關係はラットやヒトと大きく異なるようである。また、ラットやヒトではCYP3Aで代謝される薬物がビゲル犬ではCYP2Dで代謝される場合がある。このことは代謝種差の説明の根拠となる一方、薬物相互作用試験にビゲル犬は使用できないことを示唆している。そこで、ヒトに最も類似しているチンパンジーを薬物相互作用試験に用いることはできないだろうか？それには、チンパンジーの薬物代謝酵素系および蛋白結合率などが種々の薬物でヒトに近い成績を得る必要があるのは言うまでもない。非臨床試験において薬物相互作用を予測する in vivo モデルの構築を進める一方で、臨床での薬物相互作用試験を実施する必要がある。

欧米では、すでに薬物相互作用試験はマニュアル化されており臨床試験の重要な試験項目になっている。薬物相互作用の可能性が考えられる併用薬物についての情報はPhase III 試験成績から収集し、該当する併用薬物について、健康成人男子における薬物相互作用試験を実施する。その際、予測される副作用に対する対応策を十分に考慮しておかなくてはならないことは言うまでもない。その結果を添付文書に記載する。

「薬物間相互作用を回避するための基本的戦略に関する提言」

1. 探索研究の初期段階に薬物代謝酵素の誘導、阻害と構造活性相関研究を実施し、誘導、阻害を回避する探索代謝研究を展開する。
2. 薬効用量あるいは推定臨床用量で薬物代謝酵素の誘導、阻害が認められた場合、種差、誘導、阻害するP450分子種を特定し、臨床での薬物代謝酵素の誘導、阻害を予測する。
3. phase I 試験のプロトコールにカフェインテストあるいは、尿中の6b-ヒドロキシコルチゾールの測定項目に入れ、臨床でのCYP1A2 あるいはCYP3A4の誘導、阻害をチェックする。
4. P450の誘導あるいは阻害がPhase Iで認められた場合には、Phase III 試験のプロトコールの中に該当するP450分子種によって主として代謝される薬物の併用はしないことを明示する。
5. また、Phase III 試験の成績から、薬物相互作用の可能性が示唆される薬物が認められた場合は健康成人男子による薬物相互作用試験を実施する。その結果を添付文書に記載する。

A | MAO阻害剤によるラット心筋中のフリーラジカルの産生について

小畑俊男、山中麗子

一般演題 (口演)

大分医大・薬理

心筋障害の発生病因の一つとしてフリーラジカル説が有力と考えられているが、その発生

7月25日 (木)

は *in vivo* マイクロダイアリシス法を用いてそのメカニズムについて検討した。ラットを麻酔した後、人工呼吸器を装着し、開胸して心臓のう膜を切開し、心臓を露出して左心室腔内にマイクロダイアリシスのプローブを挿入し、心臓を灌流することにより連続に検出する。

A会場 (電気ホール)

演題番号 A1~A15

ル液に溶かした 0.5 mM フェリチン液を灌流させ、フェリチンと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) と 2,5-DHBA の濃度を測定した。

B会場 (8号会議室)

演題番号 B1~B14

NE) の測定を行った。ラット心臓に 0.1 N HClO₄ を入り回収用チューブに凍水中で凍め、すぐに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。使用したプローブの相対回収率は 90% 以上であった。

C会場 (7号会議室)

演題番号 C1~C15

プローブ装着後 NE の濃度は非常に高くその後 150 分で定常状態となった。ラットの心臓は A型 MAO を主に含むことより、A型 MAO の特異的阻害剤である clorgyline をプローブより灌流したところ、NE 濃度は高くなり同様に 2,3-DHBA 及び 2,5-DHBA のレベルも有意に上昇した。そして、それぞれ 0.5, 15, 50 μ M の NE を灌流したところ、用量依存的に 2,3-DHBA ($R^2=0.983$) および 2,5-DHBA ($R^2=0.983$) のレベルは上昇した。以上の結果よりラット心筋中に放出される NE はヒドロキシラジカルを産生させるものと思われる。

A | MAO 阻害剤によるラット心筋中のフリーラジカルの產生について

小畑俊男、山中康光

大分医大・薬理

心筋障害の発生原因の1つとしてフリーラジカル説が有力と考えられているが、その発生機序として未だ不明な点が多い。そこで我々は *in vivo* マイクロダイアリシス法を用いてそのメカニズムについて検討した。ラットを麻酔した後、人工呼吸器に装着し、開胸して心のう膜を切開し、心臓を露出して左心室筋層にマイクロダイアリシスのプローブをセットした後、軸に固定し、半回転させることにより複雑に拍動する運動のエネルギー及び摩擦を分散させた。リンゲル液に溶かした 0.5 mM サリチル酸を灌流させ、サリチル酸とヒドロキシラジカルとの反応によって生成する 2,3-dihydroxybenzoic acid (DHBA) と 2,5-DHBA および心筋中に放出されるノルエピネフリン (NE) の測定を行った。それぞれの灌流液は 15 分ごとに 0.1 N HClO₄ 入り回収用チューブに氷水中で集め、すぐに電気化学検出による高速液体クロマトグラフ (HPLC-EC) 法により測定した。使用したプローブの相対回収率は 16.5±0.66 % であった。そこでプローブより薬物を投与したときの拡散率を求めたところ 17.0±0.70 % であった。プローブ装着後 NE の濃度は非常に高くその後約150分で定常状態となった。ラットの心臓は A型 MAOを主に含むことより、A型 MAO の特異的阻害剤である clorgyline をプローブより灌流したところ、NE 濃度は高くなり同様に 2,3-DHBA 及び 2,5-DHBA のレベルも有意に上昇した。そして、それぞれ 0, 5, 25, 50 μM の NE を灌流したところ、用量依存的に 2,3-DHBA ($R^2=0.985$) および 2,5-DHBA ($R^2=0.983$) のレベルは上昇した。以上の結果よりラット心筋中に放出される NE はヒドロキシラジカルを産生させるものと思われる。

A 2 銅のLECラット肝細胞スフェロイドに対する細胞障害機構

○上野光一、吉沢正純、米田信次、佐藤哲男、千葉 寛、
*大道正義、鈴木和夫

千葉大・薬、*千葉市環境保健研究所

【目的】我々は昨年日本毒科学会学術年会において、LECラット肝細胞スフェロイドにおける銅蓄積性とその蓄積形態について報告した。今回、銅暴露によるLECラット肝細胞スフェロイド細胞障害性とその発現機構について検討したので報告する。

【方法】8週齢のLECラット（日本チャールスリバー）より単離した肝細胞を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コートしたディッシュ上に播種し、接着伸展させた。その後培地温度を下げることで得られる細胞シートを回収し、疎水性ディッシュに再播種し、3日間血清含有のChee's培地で培養した。4日目以降、無血清Chee's培地で培養を行い、培養5日目のスフェロイドに銅を48時間暴露した。銅蓄積量は高周波誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)により測定し、銅蓄積形態はHPLC/ICP-MSにより測定した。また、走査型電子顕微鏡(SEM)によりLECラット肝細胞スフェロイドの内部構造の観察も行った。

【結果および考察】50 μ M以上の銅を暴露した7日目のLECラット肝細胞スフェロイドの銅蓄積量はSD系ラット肝細胞スフェロイドに比べ高かったものの、100 μ M以上の銅を暴露したLECラット肝細胞スフェロイドでは9日目以降、著しい銅含量の低下が認められた。このことから、LECラット肝細胞スフェロイドでは銅を過剰に蓄積することにより、これまでin vitro実験系では報告のないLECラット肝炎発症時に良く似た銅の逸脱が認められ、この銅逸脱がマンニトールおよびカタラーゼの前処置により抑制されることからCu-MTの酸化にヒドロキシラジカルおよび過酸化水素の関与が示唆された。さらに、銅添加によりSOD活性や脂質過酸過量の上昇もin vivo同様認められた。

A 3

ニワトリ胚子脳中のNO合成酵素活性に及ぼすシプロフロキサシンの影響

○夏木 令子、田中 政充、野崎 正勝^{a)}

(摂南大・薬・毒性、生産開発科学研究所・薬理^{a)})

【目的】脳内NO合成酵素(NOS)活性は中枢に作用する薬物によって変動することが考えられる。演者らは、先に、ニワトリ胚子脳ミクロソーム(Ms)およびサイトゾール(Cyt)のNOS活性は長期エタノール処理により著しく上昇することを報告した。今回、中枢系の副作用を有するとされるキノロン薬の一つであるシプロフロキサシンのニワトリ胚子脳(大脳および小脳)NOS活性に及ぼす影響について検討した。

【方法】ニワトリ受精卵を37°でインキュベーション開始し、胚形成期3日目にシプロフロキサシン2.5mg/eggをair sacに投与後、14日~17日齢の胚子大脳および小脳MsおよびCytを調整した。NOS活性はNOS活性の指標とされるニトロブルーテトラゾリウム(NBT)を基質とし、NADPHを補酵素とするNADPH diaphorase活性を測定した。Cyt内NO₂はGreiss試薬を用いて測定した。

【結果および考察】ニワトリ胚子小脳MsおよびCytにおいてシプロフロキサシン群は対照群に比べNADPH diaphorase活性が顕著に上昇し、また、Cyt内NO₂濃度の顕著な増加も観察された。一方、大脳においては、シプロフロキサシン群にCyt内NO₂の増加が観察されたが、両群間に小脳に見られるような著しい変化は観察されなかった。小脳NOS活性のシプロフロキサシンによる上昇は膜構造の変化または酵素誘導あるいはその両者が考えられ、キノロン薬の副作用と思われる頭痛、めまい、不眠、痙攣などの障害に、NMDA受容体などの変化による疾患と共に、NOを介するシナプスの可塑性および細胞死などが関係する可能性が示唆された。

A 4 ナフトキノン類のラット初代培養肝細胞に対する 毒性発現機序に関する検討

藤川康浩、築館一男、見上 孝

エーザイ株式会社 安全性研究所

ナフトキノン類による毒性の発現には、Redox cyclingにより生成されるフリーラジカルが重要であることが知られている。今回我々は、還元に対する反応性の指標である一電子還元電位と細胞毒性との関連性について、ラット初代培養肝細胞を用いて検討し、ナフトキノン類による毒性発現機序に関する知見を得たので報告する。

実験には、一電子還元電位がそれぞれ-5mV、-50mV、-160mV、-240mVであるDichlone, Naphthazalin, 1,4-NQ, Menadioneの4種のナフトキノンを使用した。培養肝細胞に対する毒性の強さは、Dichlone, Naphthazalin, 1,4-NQがほぼ同程度であり、一電子還元電位との間に相関はみられなかった。毒性発現機序に関して、Dichloneによる毒性は鉄キレート剤であるDeferoxamineで完全に抑制された。Deferoxamineはまた、Naphthazalin, 1,4-NQ, Menadioneによる毒性を約50%抑制した。また、Menadioneによる毒性はFructoseによって約40%抑えられた。抗酸化剤のDPPDならびにCaキレート剤のEDTAは、いずれのナフトキノンによる毒性も抑制しなかった。加えてDT-ジアホラーゼの阻害剤であるDicumarolを併用することにより、Naphthazalin, 1,4-NQ, Menadioneの毒性が増強された。しかし、Dichloneの毒性には影響を及ぼさなかった。細胞死がみられる用量で、いずれのナフトキノンにおいてもMalondialdehydeの生成はなく、脂質の過酸化は認められなかった。一方、ナフトキノンによる細胞死に先行してATPの低下がみられた。

以上のことから、一電子還元電位と細胞毒性強度には相関がないことが明らかとなった。毒性発現機序に関しては、最も一電子還元電位の低いDichloneによる毒性は完全に鉄依存的であり、Redox cyclingによるスーパーオキシドアニオン(O₂⁻)を経て生成されるヒドロキシラジカル(・OH)が、脂質の過酸化を伴わずミトコンドリアに障害をきたして発現するものと考えられた。Naphthazalin, 1,4-NQについては、Dichloneと同様の機序および未知の機序により毒性を発現するものと考えられた。4種のうち最も高い一電子還元電位をもつMenadioneについては、Dichloneと同様の機序とFructoseによって抑制されるミトコンドリアへの障害による機序が考えられた。

A 5

抗酸化酵素遺伝子導入細胞を用いたクロロフェノール類の毒性発現の解析

○鄭然孫¹、市川和洋¹、瀬子義幸²、井村伸正²、内海英雄¹

¹九州大学薬学部、²北里大学薬学部

【序論】最近環境中の微量汚染物質の毒性発現に活性酸素類が関与しているとの報告が多く出されている。トリクロロフェノール等のクロロフェノール類は細胞毒性及び遺伝毒性を持つといわれているが、活性酸素の関与を含めその毒性発現機序があまり明らかになっていない。そこでクロロフェノール類の毒性発現とラジカル反応の関連性を抗酸化酵素遺伝子導入細胞株を用いた小核試験で調べた。

【方法】細胞は親株であるHeLa細胞と薬物耐性遺伝子、カタラーゼ遺伝子、SOD遺伝子などの導入株を用いた。クロロフェノール類はDMSOに溶かし、それぞれ最終濃度が1mMになるように前培養細胞にS9mix存在下で添加し、37℃、5% CO₂条件下で1時間培養した。培地交換後さらに24時間培養し、小核試験を行った。

【結果及び考察】クロロフェノール類によるHeLa細胞そのものの小核形成はS9mix添加により3倍程度増大し、この増大はカタラーゼあるいはSODにより有意に抑制された。遺伝子導入株で見るとHeLa細胞及び薬物耐性のみを導入した細胞に比べ、抗酸化酵素（カタラーゼ、カタラーゼ及びSOD）遺伝子導入細胞において有意に小核形成が抑制された。以上の結果からクロロフェノール類の遺伝毒性発現にO₂⁻やH₂O₂が関与している可能性が示唆された。

A 6

ガラクトサミン誘発急性肝炎ラットにおける細胞および細胞外基質(ECM)の動態

○鈴木道雄, 上塚浩司, 篠塚淳子, 中山裕之, 土井邦雄

東大・農・獣医病理

ガラクトサミン誘発肝炎ラットにおける肝組織形態の変化を, ガラクトサミン単回投与による急性系モデルを用いて, 病理組織学的, 免疫組織化学的に検索した。

(方法) 動物は5週齢のWistarラットの雄を用いた。実験群にはガラクトサミン500mg/kgまたは1000mg/kg, 対照群には生理食塩水をそれぞれ腹腔内投与した。投与1, 2, 3日後, および1週間後に剖検し, 肝の病理組織学的観察およびフィブロネクチン, ラミニン, I・IV型コラーゲン, デスミン, ビメンチンに対する免疫染色を行った。またin situ DNA end labeling (TUNEL法) とPCNA抗体を用いて細胞動態の検索を行った。

(結果) ラット肝では, 1~3日後にリンパ球, 肥満細胞, 好酸球を主とする炎症細胞浸潤が見られ, 好酸性小体の出現, 胆管増生が観察された。500mg/kg群よりも1000mg/kg群でより強い病変が見られ, 500mg/kg群では1週間後に病変がほぼ消退したが, 1000mg/kg群では胆管増生, 炎症細胞浸潤が若干残存していた。TUNEL法陽性像は肝細胞, 好酸性小体で散在性に認められ, 1, 2日後に多数観察された。PCNA陽性細胞は1日後に既に増加傾向が見られ, 肝細胞では両群とも3日後にピークとなり, 全期間を通じて陽性細胞が観察された。胆管上皮細胞では2日後がピークで, 1週間後には1000mg/kg群で陽性細胞が見られたが, 500mg/kg群では対照群と変わりなかった。ECMの免疫染色では, フィブロネクチンは炎症の惹起, 胆管増生に伴いグリソン鞘から周囲類洞壁にかけて沈着の増加が観察された。ラミニンも同様に胆管増生に伴いグリソン鞘から周囲類洞壁で染色性の増強が見られた。これらの染色性は炎症の消退とともに減少した。デスミン, ビメンチン陽性細胞は全期間を通じて観察され, 2~3日後にピークとなった。陽性細胞数は500mg/kg群よりも1000mg/kg群で多く観察された。

(まとめ) ガラクトサミン誘発急性肝炎ラットでは, 比較的早期にみられるTUNEL法陽性細胞を含む細胞死に引き続いて, 肝細胞および胆管上皮細胞でPCNAにより示される細胞増殖活性が上昇した。この増殖活性上昇はまず胆管上皮細胞で認められ, 肝細胞ではそれよりやや遅れて認められた。この増殖性変化に伴い, フィブロネクチンとラミニンの増加も観察され, 投与から1週間後に病変が消退する500mg/kg群では対照群とほぼ同程度までフィブロネクチンとラミニンは減少したが, 1000mg/kg群では胆管増生に関連して沈着の持続が観察された。

A 7

幼若ラットを用いた肝細胞小核試験の検討 —— 幼若法とPH法の比較 ——

白鳥 孝, 宮川 誠

(株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所

【目的】がん原性物質の約半数が肝臓を標的臓器とすることから、骨髄を標的とした小核試験の妥当性が論議されつつある。一方、部分肝切除(PH)を利用した肝細胞小核試験は、生体内、特に肝臓での薬物代謝を考慮した検出試験として注目され、多くの研究者がその有用性を報告している。今回、我々は肝細胞の分裂増殖が盛んな幼若ラットを利用した肝細胞小核試験を開発し、肝がん原性物質のジエチルニトロソアミン(DEN)を用いて既存のPH法と小核誘発性について比較検討したので報告する。

【方法】幼若法：動物は3週齢のCrj:CD(SD)系雄性ラットを使用した。DEN投与後、経時的にコラゲナーゼ灌流法により肝細胞を単離した。肝細胞をアクリジン・オレンジにより蛍光染色し、塗抹標本として観察した。また、同一個体より経時的に末梢血を採取し、網状赤血球中の小核を観察した。

PH法：動物は6週齢のSD系雄性ラットを使用した。DEN投与後7日目にPHを行い、その後、幼若法と同様に経時的に標本を作製し観察した。

【結果および結論】幼若法、PH法ともに小核を有する肝細胞数は、各々の対照群と比較して有意な増加が見られた〔小核出現率(幼若法：対照群の10倍、PH法：対照群の6倍)〕。一方、末梢血では小核の増加は見られず、発がん標的臓器(肝臓)に一致した結果が得られた。これらの結果から本法がPH法の代替法として、有用なことが示唆された。現在、系統差についても検討中であり、この結果についても合わせて報告する。

A 8

ラットの lipopolysaccharide 急性肝障害に対するキノロン系 抗菌剤 levofloxacin の影響

○都富 友美、川畑 貴美、加藤 道幸、野村 護

第一製薬（株） 安全性研究所

【目的】

感染症患者において、抗菌薬投与により死滅した細菌から放出される endotoxin の影響が懸念されている。また、この endotoxin と投与薬物の相互作用による副作用発現の可能性も考えられる。そこで、今回ラットを用いて lipopolysaccharide (LPS) の肝障害に対するキノロン系抗菌薬 levofloxacin (LVFX) の影響を検討した。

【方法】

7週齢の雄 Slc : SD ラットに LVFX 30, 100 または 300 mg/kg を経口投与し、30分後に LPS (*E. coli* 0127 : B8) 2 mg/kg を静脈内投与した。また、LVFX 300 mg/kg と LPS 4 mg/kg の投与も行った。翌日に動物を屠殺し、血液生化学的検査および肝の組織学的検査を行った。

【結果】

LPS 投与群では、血清 GPT レベルの上昇とともに肝細胞の多発性巣状壊死が認められた。血清 GPT レベルは、LPS 2 mg/kg 群で対照群の約 5 倍に上昇したが、LVFX 30, 100 および 300 mg/kg 前処置群ではそれぞれ対照群の約 3 倍、4 倍および 2 倍に低下した。しかし、これは LPS 単独投与群で非常に高い値を示した個体が散見されたことによるもので、LVFX による明らかな軽減作用はみられなかった。一方、LPS 4 mg/kg により GPT は対照群の約 10 倍に上昇し、これは LVFX 300 mg/kg 併用により約 4 倍にまで低下した。両群間で有意差は認められなかったが、併用群では正常レベルの GPT を示す例が散見された。

【まとめ】

今回の実験条件下では、LVFX は LPS 肝障害を増強することはなく、LVFX の大量投与でむしろ軽減傾向を示した。また、その作用は個体により顕著に異なることが示された。

○瀬畑信哉, 牧野俊彦, 五十嵐功, 大橋芳彦, 高岡雅哉,
真鍋淳, 矢本敬

三共(株)安全性研究所

【目的】

tert-Butylated hydroxyanisole(BHA)をラットあるいはマウスに投与すると、肝臓で第Ⅰ相酵素を誘導することなく第Ⅱ相酵素のみを誘導する事が知られている。今回、第Ⅱ相酵素が誘導された時の肝臓および腎臓の形態学的変化と生化学的変化の相関を検索する目的で BHA をラットに投与した。

【方法】

8週齢の雄 F344 ラットに BHA (0.75%) を7日間混餌投与した。投与終了後、肝臓および腎臓を採材し病理組織学的検査、免疫組織化学的検査 (P450, GST), 微細形態学的検査, 生化学的検査 (P450, GST, UDPGT) および Northern blot 解析 (P450, GST) を実施した。

【結果および考察】

病理組織学的検査では、BHA 投与による肝臓および腎臓の変化は明らかではなかった。免疫組織化学的検査では、投与群の肝臓で GST が誘導されていたが、その他については肝臓、腎臓ともに投与による誘導は確認されなかった。生化学的検査では、投与群の肝臓で P450 含量が減少し、UDPGT および GST-D, GST-C 活性の上昇が認められた。Northern blot 解析では、投与群の肝臓で GST Yal mRNA の発現が増強されていたが、CYP 2B1 mRNA は肝臓、腎臓とも発現に変化は認められなかった。

以上、BHA 投与により第Ⅱ相酵素のみが誘導されたが、酵素誘導を反映するような肝臓および腎臓の形態学的変化は明らかではなかった。これらの結果は、第Ⅰ相酵素と第Ⅱ相酵素の誘導剤である phenobarbital の場合とは異なり、第Ⅰ相酵素が誘導されないと肝臓および腎臓に明らかな形態学的な変化を生じないことを示唆している。しかし、投与用量が低いことや投与期間が短期間であるために形態学的な変化が生じなかったことも考えられるため、現在、投与用量を 0.35%、0.7%として 28 日間混餌投与する実験を行っており、この結果についてもあわせて報告する。

○高田 早苗、加藤 道幸、野村 護

第一製薬（株）安全性研究所

<目的>

薬物の副作用は高齢患者に発現することが多く、それを動物で再現することは困難である。加齢に伴い変化する機能の一つに細網内皮系機能の低下が知られている。そこで、細網内皮系機能低下モデルの作製を目的として、今回はこれまでに報告されている種々の抑制物質の主に肝機能に対する影響をラットで検討した。

<方法>

6週齢の雄 Slc : SD ラットに、gadolinium chloride (Gad) 20 mg / kg, methyl palmitate (MP) 1500 mg / kg, praseodymium nitrate (PN) 80 mg / kg または Perican ink (PI) 5 ml / kg を単回静脈内投与し、1 および 2 日後に動物を屠殺して、血液生化学的検査および肝の組織学的検査を行った。

<結果>

対照群と比較して、1 - 2 日後の血清 GPT レベルの群平均値は Gad 群 1.64* - 1.44 倍、MP 1.44 - 0.92、PN 3.24* - 23.4* および PI 1.36 - 1.04 であった (*, 有意に上昇)。組織学的には、1 日後には全ての群において明らかな肝細胞壊死は認められなかった。しかし、2 日後には PN 群で肝細胞の微細空胞化および壊死がみられた。

<まとめ>

今回用いた細網内皮系抑制物質は共通して、ラットで明らかな肝細胞壊死を伴わない血清 GPT レベルの上昇または上昇傾向を起こすことが示された。

○奥村弘樹¹⁾, 林志美¹⁾, 岸本成史¹⁾, 川村 理¹⁾, 陳 剛²⁾, 俞 順章²⁾,
上野芳夫¹⁾

¹⁾東京理科大学・薬・毒性学・微生物化学研 ²⁾上海医科大学・公衆衛生院

【目的】アフラトキシンB₁ (AFB₁) は *Aspergillus flavus* などの真菌が産生するマイコトキシンでヒト肝発がん物質の1つと考えられている。AFB₁ 暴露の生体指標としては、代謝産物である AFM₁ などの測定が報告されているが、半減期が短い。半減期の長いAFB₁-ヒト血清アルブミン (HSA) のリジン残基付加体 (AF-Lys) に注目し、AF-Lys に対し比較的特異的なモノクローナル抗体 (mAb) AL.1, AL.2 を作製し、サンドイッチ酵素免疫測定法 (sELISA) を開発し、中国の肝がん多発地区などの肝がん患者および対照血清中の AF-HSA の測定に応用した。

【方法】AF-Lysに対し比較的特異的なAL.2mAbをELISAプレートに固相化し、標準AF-HSAまたは検体を加え、洗浄後、ビオチン標識抗HSA、ストレプトアビジン標識西洋ワサビペルオキシダーゼ、および発色剤としてテトラメチルベンチジンを用いた。硫酸分画をpH5沈澱でHSAを回収し、sELISAに適用した。

【結果および考察】検出限界は5 pg AF-Lys/mg HSA、平均回収率は約101%であった。Haimen 地区の肝がん患者とその対照血清を測定したところ、1994年では、肝がん患者4.4% (3/68)、対照1.4%陽性で、平均濃度はそれぞれ 5.7 ± 0.3 , 5.1 pgAF-Lys/mg HSA であり、有意差は認められなかった。また、HBsAg、HBcAb、HBeAg陽性率は肝がん患者が有意に高かった。1995年では、肝がん患者57% (32/56)、対照32%陽性 (14/44) で、平均濃度はそれぞれ 9.2 ± 5.1 , 8.8 ± 3.4 pgAF-Lys/mg HSA であり、陽性率は肝がん患者の方が有意に高かったが、AF-HSA濃度には有意差は認められなかった。なお日本の健康人20名の血清は陰性であった。以上の結果より、Haimen 地区における肝がん多発は、AFB₁暴露およびHBV感染が原因である可能性が示唆された。従来、AF-HSA付加体は、プロナーゼ処理後、精製し、HPLC や ELISA で測定する手法がとられてきた。しかし本sELISA 法は、酵素処理を必要とせず、高感度で短時間で、多数検体処理が可能であり、今後、AFB₁暴露の疫学研究に有用な手法になると期待される。

A 12 ヒト免疫系への毒性評価系としてのヒトリンパ球移入 SCID (hu-PBL-SCID) マウスの検討 - hu-PBL-SCID マウスでのヒト免疫グロブリン産生 -

井上智彰、志村賢一、鈴木弘美、堀井郁夫

日本ロシュ(株)・研究所・毒性病理部

C.B-17 scid/scid (SCID) マウスは、機能的な T リンパ球および B リンパ球を欠損しており、移植片拒絶能が低下しているために、ヒト細胞等の移入実験に使用されている。また、遺伝子組換え医薬品等の種特異性が問題となる場合の毒性評価には、ヒトの系を用いて評価することが有用であると考えられる。今回は、ヒトリンパ球を SCID マウスに移入することにより作製した hu-PBL-SCID マウスの生体内で、ヒト免疫グロブリン産生が認められる条件について検討したので報告する。

[方法] 健常人末梢血より単核球を比重遠心分離し、Leucil leucine methyl ester 処理した後、SCID マウス腹腔内に約 2×10^7 cells/mouse を移入し、Ovalbumin (OVA) による免疫を行なった。ヒトリンパ球移入後 2~8 週目に採血を行い、血液学的検査を行なうと同時に、マウスおよびヒトの総免疫グロブリンおよび OVA 特異的免疫グロブリンを測定した。SCID マウスの前処理として、1~3 Gy の Irradiation、Anti-asialo GM1 の投与を検討した。また、ヒトリンパ球の SCID マウスに移入後の処理として、ヒト リコンビナント インターロイキン-2 投与を検討した。

[結果] Anti-asialo GM1 による前処理および Irradiation を行なった群では、ヒト免疫グロブリンが hu-PBL-SCID マウス血中に認められており、OVA の免疫により OVA 特異的なヒト免疫グロブリンも認められた。この系を更に精査することにより、ヒトにおける免疫原性の評価およびヒト免疫系への影響を評価する試験系の確立につながるものと考えられる。

○ 門馬純子、川島邦夫、井上 達

国立衛生試験所 安全性生物試験研究センター 毒性部

【実験目的】：自動車部品、タイヤ、あるいは農作業用長靴等のゴム製品に使用されており、ヒトにおける感作性既知の p-Phenylenediamine系ゴム老化防止剤の皮膚感作性の特徴を化学構造相関の面からモルモットを用いて解析した。

【実験材料】：3種類のゴム老化防止剤、すなわち p-Aminodiphenylamine (PADPA)、N-Isopropyl-N'-phenyl-p-phenylenediamine (IPPD)、および N-1,3-Dimethyl-butyl-N-phenyl-p-phenylenediamine (DMBPPD) を用いた。対照として、3種類のゴム老化防止剤に関わらない構造相関対照物質をおいた。すなわち、基本骨格物質としての p-Phenylenediamine (PPD) および Diphenylamine (DPA)、更に DPA の第3位にアルキル基のついた 4-Methyldiphenylamine (4-MDPA) を用いた。尚、4-MDPA は、PADPA などのアミノ基をメチル基に置換することによる感作性変化が予測された官能基置換対照物質である。

【実験方法】：1) 感作方法は、モルモットを用いる M&K法 (Magnusson & Kligman法) に準じて行った。2) 感作濃度および惹起濃度は、PADPA、IPPD、DMBPPD および PPD では 3.5mM ~ 0.0035mM 濃度を、DPA および 4-MDPA では 33.5mM ~ 3.5mM 濃度を用いた。3) 皮膚感作性強度の評価方法は、最低感作濃度 (MIC) および最低標準惹起濃度 (MSCC) を求めて行った。

【結果および考察】：1) 被験物質の PADPA、IPPD および DMBPPD と、対照物質のうち PPD は、感作濃度 3.5mM 以下で皮膚感作性が認められ、それらの最低感作濃度 (MIC) は、DMBPPD > IPPD = PADPA > PPD の順であった。残りの対照物質の DPA および 4-MDPA は、感作濃度 33.5mM ではじめて皮膚感作性が認められた。2) PADPA、IPPD、および DMBPPD の皮膚感作性の強さは、DPA の第3位のアミノ基やアミノ・アルキル基に関連しているようであった。3) DPA および 4-MDPA は、感作濃度を高くすることによって感作性が認められたが、この時の MIC と MSCC から求められる $(MIC \times MSCC)^{-1}$ の値は非感作性物質に分類された。以上のことから、DPA の第3位のアミノ基は皮膚感作性に要求される官能基のようにみえた。

A 14 ヒト末梢血細胞に対するT-2 toxinの作用

○吉野 直人¹⁾²⁾, 滝沢 万里³⁾, 田代 文夫⁴⁾, 本多 三男²⁾, 上野 芳夫¹⁾

¹⁾東京理科大学薬学部, ²⁾国立予防衛生研究所エイズ研究センター,

³⁾国立予防衛生研究所, ⁴⁾東京理科大学基礎工学部

第22回本学会(東京、1995年7月)で、我々はトリコテセン系マイコトキシンの一種、T-2 toxin(T-2)がヒト前骨髄性白血病細胞HL-60に対してアポトーシスを誘導することを明かにし、そのアポトーシス誘導の機構を細胞分子学的に検討した。即ち、T-2によるアポトーシスは細胞内カルシウム濃度がT-2添加後4-8分後に一過性に上昇することにより誘導され、この細胞内カルシウム濃度の変化は、数種のシグナル伝達阻害剤では阻害されず、細胞内カルシウムキレート剤であるBAPTA-AMや、エンドヌクレアーゼを阻害する塩化亜鉛で阻止された。

T-2のヒトに対する影響として免疫抑制を誘導することが知られており、そこで今回我々は、HL-60細胞株を用いて得られた結果をもとに、実際にヒト正常末梢血リンパ球(PBLs)に対するT-2の作用を*in vitro*で検討した。T-2 100ng/mlの条件下でのアポトーシス誘導は、HL-60では暴露後3時間で約80%観察されたのに対し、PBLsでは殆どアポトーシスは誘導されなかったが、培養時間を1日、3日、5日としたとき、それぞれ、14%、29%、79%でアポトーシスが誘導された。同一条件でT-2非存在下ではいずれも10%以下のアポトーシス率であった。また、PBLsの細胞表面抗原の表出の変化をCD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD28, CD38, CD45RA, CD45RO, CD56, CD62L (L-selectin), CD95 (Fas/APO-1), HLA-DRの各抗体を用い、フローサイトメーターにより測定したところ、T-2非存在下の条件のPBLsとT-2存在下でのPBLsにその陽性細胞率に差は認められなかった。即ちPBLsの何れかのサブセットにT-2が特異的にアポトーシスを誘導しているのではないと判断された。細胞内カルシウム濃度の変化およびサイトカイン産生への影響についても併せて報告する。

○篠塚淳子, 李冠民, 上塚浩司, 中山裕之, 土井邦雄

東大・農・獣医病理

Fusarium 属の真菌が産生するT-2 toxinは、リンパ系組織や造血組織に強い細胞毒性を示し、リンパ球形成や造血機能を抑制し、致死的な白血球減少症を引き起こすことが知られている。今回は、T-2 Toxin投与後のリンパ系組織の変化を経時的に観察し、アポトーシスの出現の有無を形態学および生化学的に検索した。

(方法) 動物は5週齢のICRマウスのメスを用いた。一晩絶食後、T-2 toxin 処置群には20%アルコールで溶解したT-2 Toxin 10mg/kg BWを、対照群には20%アルコールのみを投与した。投与1, 3, 6, 9, 12, 24, 48時間後(HAI)にエーテル麻酔下でマウスをと殺し、胸腺、脾臓の病理組織学および電顕的観察を行った。また、*in situ* DNA end labeling (TUNEL法) およびアガロース電気泳動法で断片化DNAの検出を行った。

(結果) T-2 toxin 投与群では、胸腺重量、脾重量ともに投与後の時間の経過とともに減少した。胸腺皮質の萎縮は6HAIから認められ、以後、徐々に進行し、48HAIでは対照群の約半分に萎縮していた。胸腺のTUNEL陽性細胞数は6HAIから増加し、24HAIでピークとなり、48HAIに減少した。電顕では3HAIから核膜の不整、核クロマチンの凝集などの変化を示すリンパ球の増加が認められ、以後、核の断片化やアポトーシス小体の形成が顕著になった。胸腺DNA電気泳動法によるラダーは9, 12, 24HAIで認められたが、48HAIには検出されなかった。

脾の変化は胸腺よりも遅れて出現し、9HAIから脾濾胞の萎縮およびTUNEL陽性細胞の増加が認められ、48HAIがピークであった。

(まとめ) T-2 toxin 投与マウスのリンパ組織では投与数時間後にリンパ球のアポトーシスが認められ、時間の経過とともに進行した。とくに胸腺では、アポトーシスは電顕で最も早く検出され、その後、TUNEL法、HE染色標本およびDNA電気泳動法でも観察された。脾の変化は胸腺よりも遅れて出現した。

紅林秀雄¹, 大野泰雄¹, 高橋 惇²

吉田賢二³, 二宮真一³

国立衛試・薬理¹, 代謝生化学² 第一化学東海研³

【目的】ラットおよびマウスにおいて弱い発ガン性が報告されているTris(2-chloroethyl)phosphate (TCEP)の安全性を検討する一環として、そのラットでのin vivoおよびin vitroの代謝試験を実施した。

【方法および結果】

F 344ラットにTCEP (250mg/kg)を経口投与し、その24時間尿を塩酸酸性下で酢エチ抽出しジアゾメタンでメチル化後、ガスクロマトグラフィー(GC)で測定した(FPD)。またこれをGC/MSで測定することにより、bis(2-chloroethyl) hydrogen phosphate、bis(2-chloroethyl) carboxymethyl phosphateおよびthiodiacetic acidの尿中代謝物が確認された。

一方、in vitro試験は、標識化合物(¹⁴C-TCEP: DuPont製)を用い、ラットの肝臓より調製した上清またはミクロソーム(Ms)画分とGSHまたはNADPH存在下でインキュベートし、ラジオ液体クロマトグラフィーを用いて、その代謝速度を求めた。MsによるTCEPの代謝活性はNADPH存在下で高く、その速度は雄性未処理ラット(Control)で 1.25 ± 0.32 nmol/mg protein/minとなり、Phenobarbital処理で4倍、ついでClofibrate処理で2.3倍、Dexamethasone処理で1.6倍、Acetone処理で1.3倍、3-Methylchranthrene処理で0.5倍の順であり、未処理ラットでの性差はみられなかった。肝上清による代謝実験の結果も合わせて報告する。

B 2 Tris(2-chloroethyl)phosphate(TCEP)の インハレーション後の体内動態

○吉田賢二¹⁾、二宮真一¹⁾、江角凱夫¹⁾
嶺岸謙一郎²⁾、紅林秀雄²⁾、大野泰雄²⁾、高橋 惇²⁾

第一化学薬品株式会社 東海研究所¹⁾
国立衛生試験所²⁾

【目的】 Tris(2-chloroethyl)phosphate(TCEP)は、合成樹脂の難燃剤で、可塑剤としての効果もあり、防炎加工剤として添加されている。本化学物質の毒性試験では経口投与時の肝・腎重量増加、死亡率増加、脳の高馬の壊死、腎臓の尿細管上皮細胞の腫瘍の増加等が報告されているが、TCEP を吸入させた場合の毒性試験および薬物動態試験に関する報告はない。そこで TCEP 吸入暴露時の安全性評価の一環として、TCEP を吸入した場合の薬物動態試験を実施した。

【方法】 1 時間に 10ml の水溶液をミストにするネブライザーを装置した鼻部暴露装置（柴田科学）を用いて、¹⁴C で標識した TCEP (¹⁴C-TCEP)のミストを 15 分間ラットに吸入暴露させた。投与薬物量および放射エネルギーは 30.75 μ g/6.85MBq/body とした。このとき大気中の濃度は 167mg/m³と計算された。

【結果】 ¹⁴C-TCEP 暴露終了後、血漿中濃度は 5 分から 4 時間まで半減期 1.62 時間、6 時間から 24 時間まで半減期 12.4 時間で消失した。¹⁴C-TCEP の組織からの消失は速やかであり、海馬、腎臓等に残留性は見られなかった。¹⁴C-TCEP の体外への排泄も速く、暴露終了後 48 時間までにはほぼ終了した。

また、¹⁴C-TCEP の吸入暴露時と経口投与時(44mg/kg)での薬物動態の比較も行った。

B 3

甲状腺障害物質, 2-Mercaptobenzimidazole(MBI)
及びそのメチル誘導体のラットへの単回投与による
トキシコキネティクス (TK)

- 酒見和枝¹, 宇佐見 誠¹, 伊藤理恵乃¹, 川崎 靖², 齊藤 実²
梅村隆志², 伊佐間和郎³, 大野泰雄¹, 津田充有¹

国立衛生試験所, 安全性生物試験研究センター
薬理¹, 毒性², 療品³

【目的】 MBIは, ゴム長靴、手術用手袋等に使用されるゴム老化防止剤である。演者らは, MBIのラットへの反復経口投与による顕著な甲状腺障害を報告した。一方, Methyl-2-mercaptobenzimidazole(MMBI)のLD₅₀値(300mg/kg)はMBIとほぼ同等であったが、反復経口投与による甲状腺障害は極く軽微であった。本研究では、MBIとMMBIの甲状腺障害発現における差を検討する目的でTKを実施した。

【実験方法】 Wistarラット(♂, 4W)をSLCより購入, 1週間の馴化後, 実験に供した。MBIまたはMMBIをコーン油に懸濁し, 2(L), 10(M1), 50(M2)及び250(H)mg/kg(1群6匹)を絶食下に強制経口投与した。投与後0.5, 1, 2, 4, 6, 10 及び24hに、エーテル麻酔下で眼窩静脈叢より採血, 血清をQC試料と共に分析時まで凍結保存した。薬物の血清中濃度は、各々の未変化体を μ Bondapak C₁₈カラムによるHPLCを用い, 300nmのUV吸収強度により測定した。

【結果及び考察】 MBIの血中濃度は, 投与30分後には, C_{max}に近い値まで上昇し, 10~24h持続した後, 減少した。一方、MMBIでは, 投与4h後にC_{max}を示した後, 徐々に減少, M2以下の用量群では24h後には検出されなかった。投与後24hまでのAUCの比較ではMBIがMMBIの約2倍大きかった。MBI及びMMBIのH群では共に, 投与直後より自発運動の著しい低下, 腹臥及び知覚麻痺を呈し, 24h後も持続した。単回投与における甲状腺腫大は, MBI, MMBI共に見られなかったが, MMBIのH群で顕著な肝腫大が見られた。以上の結果からは, MBIとMMBIの単回投与時の血中濃度の差と毒性の差の関係は明らかにされなかったが, 血中濃度推移からMBIでは反復投与時の濃度蓄積が示唆された。

B 4 マウス肝ミクロソームエステラーゼ ES46.5K による 薬毒物の加水分解活性

○萱野勇一郎、渡辺和人、松永民秀、山本郁男、吉村英敏*

北陸大・薬、*中村学園大

【目的】我々は先にマウス肝ミクロソーム中より新規エステラーゼ(ES46.5K)を精製しその性質について報告した¹⁾。本酵素は大麻成分カンナビノイドのエステル類など高脂溶性の基質に対して親和性があることが判明している。今回、環境汚染物質であるフタル酸エステル類をはじめアセチルアミノフルオレン、フェナセチンなどエステルやアミドを有する薬毒物に対する水解活性についてミクロソームとの比較から速度論的解析を行った。またフタル酸エステルについては2つのカルボキシル基に違ったエステルを持った基質を反応させその加水分解選択性についても検討を行った。

【方法】側鎖の異なったフタル酸エステル類はモノブチルフタル酸を原料に、オクチルアルコール、2-エチルヘキシルアルコール、シクロヘキシルアルコールと反応させ合成した。これらを基質として二つのエステルの加水分解活性の Kinetics をマウス肝ミクロソームおよびES46.5Kで比較し側鎖選択性を検討した。またアセチルアミノフルオレン、フェナセチンについてもミクロソームとES46.5Kとの比較を行った。加水分解生成物の定量はGCにより行った。

【結果・考察】ブチルオクチルフタレート(120 μ M)の脱ブチル活性は、ミクロソーム及びES46.5Kで各々5.0、0.08 μ mol/min/mg、脱オクチル活性は各々20.6、0.30 μ mol/min/mgであり側差の加水分解に選択性が認められた。また、アセチルアミノフルオレン加水分解活性は各々0.52、0.013 μ mol/min/mgであり、フェナセチンでは各々0.61、0.022 μ mol/min/mgだった。本酵素はミクロソームの活性に比較して30~120倍の高い活性を有しており薬毒物の加水分解に重要な役割を演じていることが示唆された。

1)K. Watanabe, Y. Kayano et al., Biochem. Mol. Biol.Int., 31, 25(1993).

B 5

各種酵素阻害剤反復投与による代謝阻害動物作成の検討 ：アセトアミノフェンの代謝様式を指標として

○佐藤 玄, 加藤 聡, 炭電 秀二, 本岡 覚, 佐神 文郎

エーザイ株式会社 安全性研究部

【目的】実験動物における薬物の代謝経路は、必ずしもヒトと一致せず、とくに種々の抱合体形成の割合は動物種間で大きく異なることが知られている。本研究では、sulfotransferase (ST) の阻害剤として知られる2,6-dichloro-4-nitrophenol (DCNP) およびpentachlorophenol (PCP) またはUDP-glucuronosyltransferase (UDP-GT) の阻害剤として知られるranitidine (RA) をそれぞれラットに2週間反復投与し、一つの抱合体経路を抑制できるかどうか検討した。

【材料および方法】SD系ラットに、2週間にわたってDCNP (5, 10mg/kg, i.p), PCP (2.5, 5mg/kg, i.p), あるいはRA (50, 100mg/kg, p.o) を処置し、毎日その45分後にアセトアミノフェン (APAP) の50mg/kgを経口投与した。投与初日と14日目に、APAPの投与30分後に採血し、血漿中APAPおよびAPAP-sulfate, APAP-glucuronideの濃度を測定した。APAP量はHPLCを用いて測定し、APAP-sulfate およびAPAP-glucuronide濃度は、血漿をsulfataseあるいは β -glucuronidase処理することにより、未変化体に変換して検出した。

【結果】投与初日、ST阻害剤による阻害の度合いはDCNP (10) > PCP (5) > DCNP (5) > PCP (2.5) の順に強く、DCNP (10) では、血漿中APAP-Sulfate量はControlに比べて約40%に低下した。この傾向と阻害の度合いは14日目も同様であった。一方、UDP-GT阻害剤であるRA (100) の投与では、投与初日および14日目ともに、血漿中APAP-Glucuronide量はControlに比べて約70%まで低下した。

【考察】アセトアミノフェンの代謝を指標にした場合、今回の条件でラットに阻害剤を投与することにより、特異的な抱合体経路が期待通り抑制させることができた。今後、ヒトと実験動物間で代謝様式が異なった場合、この動物モデルを応用することで、有用な情報が得られると考えられた。

B 6

毒性物質コレステロール7-ヒドロペルオキシドの加齢に伴うラット皮膚組織中での蓄積とグルタチオン依存的還元

○平塚 明、山根英史、山崎慎司*、小沢直記*、渡部 烈

東京薬科大学・薬学部・第二衛生化学教室、*アップジョン・筑波総研

【目的】既に演者らは細胞膜リン脂質の過酸化に伴い細胞膜中のコレステロール (Ch) からそのエポキシドとともに有毒な Ch 7-ヒドロペルオキシド (Ch 7-OOH) が生成すること、さらにラット皮膚組織中では Ch 7-OOH が比較的安定で加齢に伴い蓄積し (1-45 週齢、相関係数 $r = 0.889$)、良好な加齢指標物質となることを見出した¹⁾。今回演者らは、Ch 7-OOH がラット皮膚組織内において、脂質過酸化の化学的記憶素子となる理由を解明する一環として皮膚組織における Ch 7-OOH 含量に大きな影響を与えると予想される GSH 依存的還元酵素系を明らかにすることを目的とした。

【方法】用いた6種のGST分子種 (Ya-Ya, Yc-Yc, Yb1-Yb1, Yb2-Yb2, Yp-Yp および Yrs-Yrs) および Se-GSH Px の精製は SD 系雄性ラット肝および腎可溶性画分を用いそれぞれ既報に準拠した。

【結果・考察】1) SD ラット皮膚 (背部) への UVB 照射により、皮膚中 Ch 7-OOH 量は、照射量依存的に上昇した。2) 上記6種の GST 分子種中 *alpha* クラスの GST Ya-Ya のみが Ch-OOH 類に対し GSH Px 活性を示した。3) Se-GSH Px の Ch-OOH 類に対する還元活性は GST Ya-Ya の 1/4~1/10 であった。4) ラット皮膚組織中には、*alpha*, *mu*, および *pi* クラスの GST 分子種の存在が認められたが、GST Ya-Ya は存在しなかった。5) ラット皮膚組織中の Se-GSH Px による Ch 7-OOH に対する還元活性は肝の 1/40 と低値であった。以上の結果より、Ch 7-OOH がラット皮膚組織で蓄積する理由の一端、および皮膚組織内においては UVB 照射で促進される脂質過酸化の化学的記憶素子となることが明らかになった。

【文献】1) Ozawa, N., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 178, 242 (1991).

○古川忠司, 社領 聡, 大橋芳彦, 渡辺稔之,
真鍋 淳, 木村邦男, 岡田忠彦

三共(株)安全性研究所

薬物の効力や毒性は投与時刻によって変化することが古くから知られており, その要因の一つとして薬物代謝酵素における日内変動の存在が考えられている. 実際に, hexobarbitalなどを基質とする肝臓の薬物代謝酵素の活性に日内変動が認められることが報告されている. しかしながら, P450 含量の変動に言及した報告は少なく, 7-alkoxycoumarinを基質とする代謝酵素活性についてもまだ調べられていない. そこで我々は, 飽食および絶食条件下でのF344 ラットの肝臓における7-alkoxycoumarin dealkylase 活性およびP450 含量の日内変動について調べた.

実験には, F344/DuCrj ラットの雄を10週齢で用いた. 飽食群, 絶食群とも30匹で構成し, 肝臓の採材は9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 1:00, 5:00に相当する時刻に, 各時点5匹の動物より実施した. なお, 暗期に相当する21:00, 1:00, 5:00の時点での採材は, 逆転照明条件に馴化させた動物より行った. また, 絶食群については肝臓の採材開始時点である9:00に相当する時刻より絶食を実施した. 肝臓は採材後, 直ちに液体窒素を用いて凍結させた. すべての動物からの採材が終了した後に, 肝臓中のP450 含量, 7-methoxycoumarin 0-demethylase 活性, 7-ethoxycoumarin 0-deethylase 活性, 7-propoxycoumarin 0-depropylase 活性の測定を行った.

その結果, 飽食条件下におけるラットの7-alkoxycoumarin dealkylase 活性は, 暗期に高く明期に低い日内変動を示した. 同様の傾向は絶食条件下でも認められ, 7-alkoxycoumarinを基質とする代謝酵素活性は摂餌条件に左右されない日内変動を示すことが明らかとなった. さらに, 飽食条件下におけるP450 含量は明期の前半に高値となり, 代謝酵素活性とは異なる時刻にピークとなる日内変動を示した.

B 8

リファンピシン投与によるイヌ肝薬物代謝酵素 (CYP3A)の誘導—ラットとの比較—

西部泰弘、若林美津子、吉井景子、原内敏夫、大野浩司

塩野義製薬（株）新薬研究所

抗結核薬リファンピシン(Rif)はヒトで薬物代謝酵素(CYP3A)を誘導し、薬物相互作用を引き起こすことが知られているが、イヌでは酵素誘導の有無は明らかにされていない。今回、ビーグル犬にRifを投与してヒトと同様にCYP3Aの誘導が認められるかどうかを検討し、ラットの場合と比較した。同時にフェノバルビタール(PB)及び β -ナフトフラボン(β -NF)の酵素誘導についても検討した。

[実験方法] RifをCSKビーグル犬に10mg/kg(臨床用量とほぼ同用量)、Jcl:SDラットに10, 200mg/kgの用量で7日間反復経口投与した後、肝臓を採取してミクロゾームを調製した。P450分子種(ELISA法)の定量及び総P450含量、アルコキシマリニン O-脱アルキル化酵素、テストステロン 6 β -水酸化酵素(6 β -OHT)、エトキシレゾルフィン O-脱エチル化酵素活性を測定して酵素誘導の指標とした。なお、PB及び β -NFについても同様に実験を行った。

[結果] Rif投与により、イヌではCYP3A12含量の著しい増加と6 β -OHT活性の著明な上昇が認められた。一方、ラットでは10mg/kg投与でP450分子種、酵素活性に変動はみられず、200mg/kgの大量投与でのみCYP3A含量の軽度な増加と6 β -OHT活性の僅かな上昇が認められ、イヌとラットでCYP3Aの誘導に著しい用量差が認められた。PB及び β -NF投与では、イヌ、ラット共に夫々特有のP450分子種(PB: CYP2B, 3A, β -NF: CYP1A)の増加とそれに依存した酵素活性の上昇がみられ、両動物間に大きな差異はなかった。

以上の結果から、イヌは臨床用量とほぼ同用量のRif投与によりヒトと同様にCYP3Aが誘導されることが明らかになった。

○高橋芳樹¹、中山佳都夫¹、藤井義明²、鎌滝哲也¹

¹北大・薬、²東北大・理

【目的】ベンゾ [a] ピレンや3-メチルコランスレンなどの芳香族炭化水素は、CYP1A1の誘導や腫瘍のプロモーションを引き起こし催奇形性を示す。しかし、ウサギ成獣では芳香族炭化水素によるCYP1A1の誘導が認められず発癌感受性が低下することが知られている。ウサギにおけるCYP1A1誘導の抑制機構を解明することは毒性学の面からも重要であると考えられる。そこで今回我々はウサギ成獣の肝臓の核内においてCYP1A1の誘導的発現を抑制する因子について解析したので報告する。【方法・結果】ウサギにおいて誘導に関与するXREに注目し、Ahリセプター(AhR)とXREの相互作用に抑制的に働く因子が存在しているか否かゲルシフトアッセイにより解析した。その結果、ウサギ成獣の肝臓より調製した核抽出液ではXRE3,5にシフトバンドが認められた。AhRおよびArntの抗体を用いて調べたところ、この因子にはAhRやArntは含まれていないことがわかった。またこの因子の結合は新生仔では非常に弱いものであった。このことからこの因子がウサギCYP1A1の誘導の抑制に関与しているのではないかと考え、実際にAhRとこの因子が競合しているか否か*in vitro*で合成したAhR/Arnt複合体を添加し、バンドが消失するか調べた。その結果、AhRの三者複合体が形成される通常量ではこのシフトバンドはやや減少したがAhR/Arnt複合体のXREへの結合は認められなかった。さらに、過剰量の複合体を加えた場合でのみこのシフトバンドは完全に消失し、AhR/Arnt複合体とXREの結合が認められた。このことからウサギ成獣の肝臓の核内にはAhR/Arnt複合体によるCYP1A1遺伝子のトランス活性化に拮抗する因子が存在しているため、ウサギではCYP1A1が誘導されないと推測される。

B 10

薬毒物によるグルタチオン減少のラット肝 ヘムオキシゲナーゼ遺伝子発現機構

林 萌、小黒 多希子、沼沢 聡、吉田 武美

昭和大学薬学部毒物学教室

＜目的＞当教室では、グルタチオン (GSH) 低下作用を有する種々の薬毒物が、ラット肝臓ヘムオキシゲナーゼ (HO) を著しく誘導することを報告している。またそのHO mRNA誘導と共に、c-jun mRNAの増加が認められること、さらにこの時転写因子AP-1の結合活性が上昇することを明らかにしている。今回我々は、GSH低下剤であるフォロンを用い、HO-1遺伝子発現の機序をさらに明らかにする目的でHOおよびc-jun mRNAの変動とAP-1の結合活性を中心に検討した。＜方法＞フォロンをラットに腹腔内投与し、肝臓のGSH含量の測定を行った。また、肝臓よりtotal RNA抽出を行いノーザンブロット解析によりHO-1およびc-jun mRNAの発現量を調べた。さらに同じラットの肝臓より粗核抽出液を得、ゲルシフトアッセイを行った。＜結果＞フォロンは、投与直後に顕著なGSH低下を生ずると共にc-jun およびHO-1 mRNAを著しく誘導し、投与4時間後にピークを示した。また、AP-1結合活性も、投与2から4hr後にピークを示した。フォロンによるGSH減少を抑える目的でGSH isopropylesterを前投与したところc-junおよびHO-1 mRNAの増加は、フォロン単独よりも減少した。また、AP-1の結合活性も抑えた。GSHの低下をさらに増強する目的で、GSH合成阻害剤であるブチオニンスルフォキシミンを前投与したところ、c-jun およびHO-1 mRNAはフォロン単独よりも強い発現量を示した。また、AP-1の結合活性も共に増強した。以上のことよりフォロンによるGSHの低下がAP-1の結合活性増加を引き起こし、HO-1遺伝子発現を導いていることが示唆された。

B II トリアジン系農薬の代謝と肝細胞毒性

○ 簾内桃子、宮島敦子、張宝旭、酒見和枝、大野泰雄

国立衛生試験所・薬理

農薬の分解・代謝物を含む残留農薬の肝毒性の有無を、少量の検体でかつ短期間に行える *in vitro* の系を用いて検討した。*in vitro* スクリーニング系の確立の一環として、肝の特異的機能の多くを保持しているラット遊離肝細胞と薬物の比較的長時間曝露が可能な初代培養肝細胞、さらに肝に由来しないウサギ角膜由来細胞株(SIRC細胞)を組み合わせた系を用い、トリアジン系農薬が及ぼす影響について検討した。

【方法】SD系雄ラットよりコラーゲナーゼ灌流法により調製した遊離肝細胞を農薬とともにインキュベートし、LDH漏出法で Viability を、OPTを用いた蛍光法でGSH含量を測定した。同様に調製した遊離肝細胞をコラーゲン塗布培養皿上で、牛胎児血清を含むWilliams' E培地で培養した。農薬は培養3時間目から添加した。培養48時間目に、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沈澱画分のエトキシクマリン脱エチル化(ECDE)活性とNADPH-cytochrome P450(P450)還元酵素活性を測定した。SIRC細胞に対する毒性は、Crystal violet法により測定した。

【結果と考察】トリアジン系除草剤であるAmetryn(AME)とPrometryn(PRO)は、0.125mM以上で遊離肝細胞のGSH含量を急速に低下させ、1時間後には対照群の13%以下に低下した。これに遅れViabilityは2時間後(>0.5mM)から低下した。1mMのMetryapone添加はこれらの変化を強く抑制した。初代培養肝細胞では、AME(>0.125mM)とPRO(>0.0625mM)はともに、LDH活性を用量依存的に上昇させたが、ECDE活性とP450還元酵素活性を用量依存的に低下させた。一方、SIRC細胞に対するAMEとPROのEC50値は各々0.74mMと>1mMであった。以上の結果からAMEおよびPROで見られた細胞毒性には、主に肝薬物代謝酵素系が関与し、肝細胞に特異的であることが示唆された。

○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＞食品添加物であるピ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、マウスを用いて慢性毒性試験を行った。なお♂については第21回日本毒科学会学術年会において発表した。今回は♀の結果を加えてその全体を報告する。

＜方法＞1匹飼育Crj:CD-1(ICR)マウス 52, 53, 100匹(以上♂), 51, 52, 104匹(以上♀)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♂♀とも投与群において認められた。早期死亡は♂では観察されなかったが、♀1.2%群で36/104匹認められた。後期死亡のうち肝細胞癌によると考えられるものは♂♀1.2%群でそれぞれ10/19, 4/5匹であった。生存動物のうち肝細胞癌が認められたのは♂0.6, 1.2%群で11.5, 53.1%, ♀1.2%群で38.1%であり、肝細胞腺腫を有するものは♂対照, 0.6, 1.2%群で2.0, 13.5, 25.9%, ♀1.2%群で15.9%であった。また♂♀とも高用量群で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。血液検査では軽度貧血、生化学検査ではGOT, GPT, γ -GTPの上昇が投与群において観察された。

＜結論＞以上の結果から高用量のPBはマウスに対して肝発癌性を有し、♀に対する作用は♂に対するより弱いことが分かった。肝発癌性については概ねラットに対する作用と同等である。

○田村 浩, 本木 喜輝, 渡辺 隆史, 須賀 哲弥

東京薬大・薬・臨床生化学

【目的】 ペルオキシソーム増殖薬は遺伝子毒性を示さない発肝癌性物質である。しかし、その発肝癌機構はいまだ明確にされていない。演者らはペルオキシソーム増殖薬誘発肝癌組織において肝細胞増殖因子（HGF）の発現レベルが著しく低下することを報告し、ペルオキシソーム増殖薬によるHGFの発現低下がこの発肝癌の促進に重要な要因となる可能性を示した。そこで今回、ペルオキシソーム増殖薬による発肝癌とHGFの関係をさらに明らかにするため、ペルオキシソーム増殖薬を長期間まで投与し、その時のHGFの発現の経時的な変動を調べた。また、ペルオキシソーム増殖薬誘発肝癌より癌細胞を調製し、この癌細胞の増殖に及ぼすHGFの影響をコロニーアッセイ法を用いて検討した。

【方法】 実験動物としてF-344雄性ラットを用い、Wy-14,643 (0.1%) をラットに2-80週間まで混餌自由摂食させた。その後、肝臓よりpoly(A)⁺RNAを調製し、ノーザンブロット解析を行った。また、コロニーアッセイはWy-14,643誘発肝癌組織より調製した肝(前)癌細胞を用いて行った。HGF (5アミノ酸欠失体, 雪印乳業株式会社より供与) は3日毎にアガープレートに添加し、培養開始2週間後にそのコロニー数を計測した。

【結果・考察】 Wy-14,643を1-5日間投与しても肝内HGF mRNA量に変化は認められなかったが、投与1週間よりHGF mRNA量の低下が見られ、投与2週間ではその量は対照の約60%に低下していた。Wy-14,643を長期間投与した時、肝内HGF mRNA量はさらに低下し、そのmRNA量は対照の約40%であった。さらに、Wy-14,643によって誘発された肝(前)癌細胞のコロニーの成長はHGFの処理で著しく抑制され、この抑制効果はHGFの濃度に依存して認められた。以上のことから、Wy-14,643処置によるHGFの発現低下は肝(前)癌細胞の増殖に有利な環境を与え、この薬物による癌化促進の重要な要因になると考えられる。

B 14 抗癌薬のラット門脈内投与による毒性の検討

○吉田貢由 東條宏子 鈴木敦 川畑貴美 加藤道幸 野村護

第一製薬株式会社 安全性研究所

臨床では肝細胞癌の治療に抗癌薬の肝動脈内投与が行われている。しかし、それにより重篤な副作用が現れることがあり、その投与法に注意が喚起されている。そこで、我々はラットを用いて肝動脈内投与に変えて門脈内投与による抗癌薬の毒性を検討した。

7～8週齢の雄性Slc:SDラットをペントバルビタール麻酔下で開腹し、27G注射針を用いて門脈内にトポテシン（CPT-11）20、40または60mg/kgおよびシスプラチン（CDDP）5mg/kgを単独および同時投与した後、接着剤を用いて止血した。24時間後に動物を放血屠殺し血液学的検査、血清生化学的検査を行った。さらに、CPT-11の静脈内投与と門脈内投与の成績を比較した。

その結果、CPT-11 60mg/kgの静脈内投与および門脈内投与により、同程度の白血球減少が認められた。これに加えて、門脈内投与では血清GOTの上昇もみられた。CDDPの門脈内投与では白血球減少、血清尿素窒素およびクレアチニンが上昇した。CPT-11とCDDPの同時投与ではGOT、血清尿素窒素およびクレアチニンの上昇が増強される傾向を示し、さらに血清GPTが上昇した。しかし、CPT-11の20および40mg/kgの門脈内投与では血清生化学的検査値に変化は認められなかった。

これらのことからCPT-11の大量門脈内投与により、本薬物の毒性が若干増強され、また、CPT-11とCDDPの同時門脈内投与により、それぞれの毒性を増強することが示唆された。

- 小野 敦、関田清司、広瀬明彦、小川幸男、鈴木幸子、斉藤 実、安原加寿雄*、三森国敏*、内藤克司、川島邦夫、金子豊蔵、降矢 強、松本清司#、田中 悟、井上 達、黒川雄二

国立衛試・毒性部、*病理部、#信州大・医・動物実験施設

[目的]我が国では、有機溶剤乱用が大きな社会問題となっており、特に乱用の中心が青少年であることからその次世代に及ぼす影響が危惧されている。我々は有機溶剤の中でも特に乱用者の多いトルエンの生殖発生に及ぼす影響を検討するため、妊娠前から離乳期にいたる生殖発生過程の期間を3区分してラットにトルエンの吸入暴露を行い、胎児の器官形成期における影響について昨年の本学会¹⁾において報告した。今回、妊娠前および妊娠初期暴露による生殖および胎児への影響とあわせて、雄ラット90日間暴露による生殖系への影響および亜急性毒性について検討を行った。

[方法]Slc:SDラット(雌雄各15匹/群)にトルエン(0, 600及び2000ppm)を1日6時間、雄では精子形成に要する期間を考慮して交配前60日から交配期間を含む90日間、雌では排卵から着床にいたる期間(交配前14日～妊娠7日)暴露した。交配の成立した雌については妊娠20日に、黄体数、着床数および胎児数を調べ、生存胎児について外形異常、性別、体重の記録を、死亡胎児については死亡状態の分類を行った。雄については90日間暴露後、精巣の計測形態学的解析、精子検査、血液形態学・血清生化学的検査、骨髄検査及び主要臓器について重量測定と病理組織学的検査を行った。

[結果及び考察]母動物では、2000ppm群で暴露に伴う流産が暴露開始20日頃より観察された。交配成績にはトルエン暴露の影響は認められなかった。2000ppm群で死胚率および死亡胚を有する母動物数の増加傾向を認めトルエン暴露による胚・胎児毒性が示唆された。一方、2000ppmを90日暴露した雄では精巣上体重量の低下と精子数の減少を認めトルエンの雄生殖系への影響が示唆された。さらに同群では腎臓重量の増加と尿細管の壊死が認められ、高濃度トルエンの長期暴露による腎毒性が示唆された。

1)小野 敦,第22回日本毒科学会学術年会プログラム要旨集 117 (1995)

C 2 塩化アリルによるマウス精巣傷害の経時的評価

○大村 実, 趙 満根, 井上 尚英

九州大・医・衛生

エピクロヒトリン[®]の製造に使用される塩化アリルをマウスの皮下に単回投与し、それによる精巣傷害を病理組織検査によって経時的に評価した。

実験方法：9週令の雄マウス（Crj:cd-1）を50匹ずつ2群に分け、塩化アリル群には塩化アリル124 mg/kg（LD₅₀の1/5量）を皮下に1回投与し、対照群には溶媒のジメチルスルホキシド[®]を同様に投与した。投与4日後、9日後、14日後、22日後、39日後に両群10匹ずつマウスを生殺し、精巣の病理組織検査を行った。病理組織検査では精細胞の形状によって精細管をステージI-XIIに分類したが、精細胞の形状による分類が困難な場合は精祖・精母細胞の種類によって精細管をステージI-VI, VII・VIII, IX-XI, XIIの4つに分類した。

結果および考察：対照群ではいずれの生殺時点においても精巣の明かな病理組織変化を認めなかったが、塩化アリル群では塩化アリル投与4日後にステージIX-XIのパキテン期精母細胞、9日後にステージI-VIIIの円形精細胞、14日後にステージIX-XIの精細胞の完全消失または部分消失を認めた。マウスの精子発生の1サイクルを233.6時間とすると、これらの病理組織変化は塩化アリル投与によってステージII・III-VIIのパキテン期精母細胞が傷害された結果であると考えられた。また、塩化アリル群ではいずれの生殺時点においても精細管の高度の委縮、生殖細胞の広範な変性・剥脱、多核巨細胞の出現^等の重度の病理組織変化を認めたことから、塩化アリル124 mg/kgのマウス皮下への単回投与による精巣傷害は、投与39日後までには回復しないことが示唆された。

C 3

メタクリル酸 2, 3-エポキシプロピルエステルのラット精子に及ぼす影響

○田中亮太、坂本知恵子、伊藤圭一、山本利男、井上博之

(財) 食品農医薬品安全性評価センター

メタクリル酸 2, 3-エポキシプロピルエステル (MEE) は硬化アクリル樹脂の接着剤として使われている。今回、MEEの発生毒性をラットを用いて検討した結果、雄性生殖能に対して特異的な影響を及ぼすことが示唆されたので報告する。

MEEの10、30および100mg/kgを1日1回雌雄ラットに交配前14日間および交配期間を通じ投与し、さらに雄ラットでは解剖前日まで(45日間)、雌ラットでは妊娠期間を通じて投与した。その結果交尾率に変化は認められなかったが、100mg/kg群の受胎率が有意に低下した。投与終了時の器官重量測定で同群の精巣、精巣上体および卵巣重量には変化は認められなかった。

受胎率の低下が雌雄のどちらに起因するか確認するために雌雄それぞれ溶媒対照群、100mg/kg群および無処置群を設け(各群6例)14日間投与した後、①♂対照群×♀対照群、②♂100mg/kg群×♀100mg/kg群、③♂100mg/kg群×♀無処置群、④♂無処置群×♀100mg/kg群の組み合わせで交配を行った。雌雄ともに交配期間中および交尾成立後の解剖前日まで投与を継続した。雄では解剖時に精子検査(精子活力、精子生存性、精子数および精子形態)を行い、雌では妊娠20日に帝王切開を実施した。この結果、①の受胎率が100%に対し、②が20% ③が16.7% ④が50%であった。また、精子生存性、精子数および精子形態に変化は認められなかったが100mg/kg群の精子活力が有意に低下した。現在、投与期間と精子活力の低下との関連について検討中である。また、精巣の病理組織学的検査の結果についても併せて報告する。

C 4

トリブチルスズの妊娠初期投与による ラット母体及び胚に対する影響

○原園 景、江馬 眞、小川義之

国立衛生試験所大阪支所生物試験部

有機スズ化合物は農業や工業の分野で広く使われており、そのうちトリブチルスズは殺生物作用を有していることから、船底や漁網の防染剤、農業用殺菌剤として使われてきた。我々は塩化トリブチルスズ (TBTCI) をラットの妊娠10-12日または13-15日に投与したとき、口蓋裂を有する胎児の発現頻度が有意に上昇することを報告した。有機スズ化合物を器官形成期以前に与えたときの影響については詳しく調べられていない。そこで今回、ラットの妊娠初期にTBTCIを与えたときの母体と胚に及ぼす影響について検討した。

ラットの妊娠0-7日にTBTCIを0、25、37.5、50 μ mol/kg/dayの用量で経口投与し、妊娠20日に開腹して胚-胎児に対する影響を調べた。交配後妊娠の成立したラット数は、対照群の10例中10例に対し、25、37.5、50 μ mol/kg投与群ではそれぞれ11例中9例、14例中5例、13例中3例と用量依存的に減少した。しかし、妊娠の成立した母体においては黄体数、着床数及び生存胎児数に対照群とTBTCI投与群との間の差はみられなかった。また、TBTCI投与群における生存胎児の外表奇形の発現頻度の上昇はみられなかった。以上のことから、TBTCIは妊娠初期に投与したとき不妊効果を示すことが明らかになった。また、TBTCIは着床を阻害するがその後の胚の生存には影響が少ないことから、着床前の期間において母体または胚のTBTCIに対する感受性が高いことが示唆された。

なお、TBTCIの投与により飼料摂取量の有意な減少がみられたので、摂餌制限群をもうけてTBTCIの作用を確認中である。

C 5

化粧品原料の安全性評価のための眼刺激性試験代替法のバリデーション -1次から3次バリデーションまでのまとめ-

○大野泰雄¹、井上 達²、金子豊蔵²、森川良広⁴、吉田武美⁵、藤井昭男⁴、増田光輝⁴、大野忠夫⁶、秋山純一⁴、池田紀和⁴、今西 豊⁴、板垣 宏⁴、宇佐美雅仁⁴、大越健自⁴、奥村秀信⁴、柿島 博⁴、笠井 裕⁴、栗下昭弘⁴、小島肇夫⁴、西條 薫⁶、坂本一民⁴、籾内桃子¹、高野勝弘⁴、辰見 寿⁴、谷 尚子⁴、千葉勝由⁴、中村恒彰⁴、林 真³、松川清治⁴、門馬純子²、渡辺理絵⁴
¹国立衛試・薬理部、²毒性部、³変異遺伝部、⁴日本化粧品工業連合会、⁵昭和大・薬学部、⁶理研・細胞銀行

(目的) 眼刺激性試験代替法の化粧品原料評価系としての妥当性を1-3次にわたる段階的な施設間バリデーションで検討した。

(方法) 受精鶏卵漿尿膜法 (HET-CAM、CAM-trypan blue (TB))、溶血法、ヘモグロビン変性法、人工皮膚モデル法 (MATREX、SKIN² (ZK1100))、培養細胞法 (HeLa - MTT、SIRC-neutral red (NR)、CHL-crystal violet (CV)、ComePack)、及び無生物試験法 (EYTEX) について、それぞれほぼ4-9機関で検討した。被験物質は主に化粧品原料の内から選定し、コード化し、参加機関に送付した。最終的に解析が可能であった物質数は38であった。

(結果) 1) ドレイズ評点との対応は血清使用培養細胞法及びCAM試験法で他の方法より良かった (直線回帰での相関係数はHeLa-MTT、SIRC-NR、CHL-CV、CAM-TBでそれぞれ-0.799、-0.816、-0.729及び0.732)。2) 培養細胞法では酸、アルカリ、1級アルコールの結果は他の物質の結果からずれた。それらを除くと相関係数はHeLa-MTTが-0.922、SIRC-NRが-0.916、CHL-CVが-0.864となった。3) ドレイズ評点のばらつきと比べ、代替法のばらつきは全般的に小さかった。不溶性物質ではばらつきが相対的に大きかった。4) CAM-TBでは液体と粉末を分けることにより相関係数がそれぞれ0.801と0.926へと増加した。5) 個々の代替法の特徴が明らかになった。

この研究は一部厚生科学研究費の補助を受けた。

○小野寺博志¹, 三森国敏¹, 竹川 潔¹, 安原加壽雄¹,
渡辺知幸², 高橋 道人¹

¹国立衛生試験所・病理、²住友化学・生物環境科学研

【はじめに】動物の内寄生虫駆除薬として用いられている Fenbendazole(Fen)はラットに長期間投与することにより肝腫瘍を誘発することが知られている。一方、Fenの親化合物である Febantal(Feb)や両薬剤の代謝物である Oxfendazole(Ox)については発癌性は報告されてない。しかし、これらの薬剤をラットに投与することにより用量に差はあるものの肝肥大が誘発されることが知られている。そこで、今回我々は肝腫瘍プロモーションメカニズムの一つとして知られている、細胞間結合蛋白シグナル伝達物質のコネクシン32(Cx32)を指標として、3薬剤投与ラット肝におけるその変動を比較検討した。

【材料および方法】動物は5週齢の雄F344ラットを用い、Diethylnitrosamine(DEN)を100mg/kg一回腹腔内投与、その一週間後より、Fenを3600, 1800, 600, 200および70ppm、Febを2000, 1000, 500および100ppm、Oxを500, 250, 100および10ppm含有粉末飼料を自由に与え、8週後に屠殺した。用量の選択は各群とも、既に報告されている慢性毒性試験のNOELを最低用量とし、次に肝肥大を誘発する最低量を設定した。対照群はDEN投与のみとした。解剖時、肝の重量を測定し、凍結肝については、Cx32抗体による免疫蛍光染色を施し、病理画像解析装置IPAPを用いてその陽性数と面積を計測した。

【結果および考察】肝の実重量はFebとOxの最高用量群で有意に増加した。肝の相対重量はFebの最高用量群、Oxの250ppm以上およびFenの600ppm以上の群で有意に増加した。Cx32の数/面積は各投与群において対照群と比べいずれも減少ないし減少する傾向が認められた。文献上肝肥大を起こすとされていた用量で今回肝肥大が認められなかったことは、今回の投与期間が短いことが関与しているものと考えられた。以上の成績から、これらの物質は長期投与されることにより肝腫瘍プロモーション作用を示す可能性が考えられ、このCx32の抑制が肝腫瘍プロモーターのスクリーニングに有用であることが示唆された。今回、NOELと報告されている用量においてもCx32の数/面積が減少したことについては、今後さらに検討する必要がある。

C 7

ヒト c-Ha-ras 遺伝子導入マウスにおける短期発がん性試験 —第1報— (4HAQOによる検討)

小泉治子^{1,2)}、須永昌男²⁾、浦野浩司¹⁾、若菜茂晴¹⁾、
日置恭司¹⁾、野村達次¹⁾、山本慧^{1,3)}

1)実験動物中央研究所、2)前臨床医学研究所、3)慶應大・医・薬理

[目的]ヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子を導入したトランスジェニック (Tg)マウスは種々の発がん物質の投与により、3~6カ月という短期間で腫瘍を形成する。我々は、このマウスを用いた短期発がん性試験法の確立を目的として、多種類の化学物質を用い発がん性の検索を行っている。今回は4HAQOを用いて行った実験について報告する。

[方法]ラットの膵腺房細胞に腫瘍を誘発することが知られている 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide (4HAQO)を、7週齢のTgマウス及び対照のnon-Tgマウスのオス・メス各15匹ずつに10 mg/kgおよび20 mg/kg を尾静脈内に単回投与し、その後無処置で26週間飼育した。死亡例は死亡発見時に、生存例は26週間観察終了時に剖検して、標的臓器の組織学的検索を行った。同時に腫瘍については導入遺伝子の変異をPCR-RFLP法、PCR-SSCP法およびダイレクトシーケンシング法で検索した。

[結果]4HAQO投与群のTgマウスで、前胃の乳頭腫が惹起され、皮膚にも乳頭腫が認められた。一部の乳頭腫では導入遺伝子のコドン12に変異が見られたが、コドン61には変異は見られなかった。尚、膵臓には腫瘍は認められなかった。非投与群ならびに4HAQOを投与したnon-Tgマウスには腫瘍はほとんど認められなかった。

[結論]ヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子を導入されたTgマウスは4HAQOに対する発がん感受性が高く、極めて短期間で腫瘍が形成されることが示された。尚、一部の腫瘍の形成には導入遺伝子の変異が関与していることが示唆された。

C 8 毒性家の判断と統計解析の一致度の評価

浜田知久馬*, 吉野慶**, 松本一彦**,
阿部いくみ***, 野村護****, 吉村功*****

*東京大学 **日本たばこ ***三菱化成
****第一製薬 *****東京理科大学

1. 目的:

一般毒性試験においては、各項目ごとに各用量群と対照群の対比較を行うことによって、統計学的な評価がなされることが多い。しかしながらこの試験では用量反応関係を評価するのが重要な目的であり、現状の方法は必ずしも適切とはいえない。そこで用量相関性を調べるためのいくつかの既存の統計手法と毒性家の判断の一致度を評価し、その結果を踏まえていくつかの提言を行う。

2. 方法:

1) ラット雌雄18試験の一般毒性試験データ(血液・生化学・臓器重量(絶対・相対))を入手した(延べ2001項目)。

2) 無作為に割り付けられた3~4人の毒性家が、グラフ・生データ・平均値から、個々の項目について、異常値、用量相関性、変化を起こしている用量を独立に評価した。

3) 統計学的な評価

- ① skewness kurtosis による外れ値・異常値の評価
- ② 回帰分析・対数変換後の回帰分析・ボンフェローニ検定による用量相関性の評価
- ③ Dunnett 検定による変化を起こしている用量の評価

3. 結果:

用量相関性について統計学的評価と毒性家の判断の一致度は期待したほど高くなかった。この原因として毒性家の間で用量相関性についての認識に大きな幅があったことが上げられる。しかしながら変化が起きている用量の判断(最高用量での変化の有無)については、統計解析との高い一致度を示した。

4. 提言

1) 用量相関性は重要な概念でありながら、実務的な定義が曖昧で解釈が人によって異なっている。用語・概念の正確な定義とコンセンサス作りが必要である。

2) 用量相関性の検定のみでは、用量反応関係の解析としては不十分であり、毒性家はより詳細な用量反応関係の解析を必要としている。単に統計学的に有意な変化をとらえるだけではなく、用量反応曲線が、直線あるいはS字に近いような形状か、低用量あるいは中用量ですでに飽和しているのか、頭打ちはあるのか、最高用量でのみ変化が起きているのか等を明らかにする必要がある。

3) 用量反応関係の解析法として最大対比法を提案する。

C 9 低タンパク飼料で長期飼育したラットの腎機能変化

○永藪徳久、田原紀子、神鳥仁志、西田信之、佐倉康文

武田薬品工業(株) 薬剤安全性研究所 光支所

[目的] 慢性毒性試験及びがん原性試験では加齢性変化により毒性及びがん原性の評価が妨げられることがある。特に18カ月齢を超えるF344ラットでは腎症が多発し、がん原性試験の生存率にも影響を与える。低タンパク飼料は自然発症腎症の発生を抑えラットの生存率を改善することが知られている。そこでF344ラットを低タンパク飼料で長期飼育し、通常飼料で飼育した場合と加齢による腎機能変化を比較した。

[方法] 6カ月齢のF344/Jc1ラットに通常飼料(タンパク質含量24%, 日本クレア, CE-2)もしくは低タンパク飼料(タンパク質含量18%, 日本クレア, CE-7)を給餌し、3カ月毎に尿検査、血液検査、血圧測定及び腎機能検査(腎血漿流量及び糸球体濾過率)を実施した。さらに12及び18カ月齢時に一部の例を剖検して、腎の重量測定及び病理組織学的検査を実施した。

[結果] 12カ月間の飼育期間中(6~18カ月齢)、尿検査、血液検査及び血圧測定において、通常飼料と低タンパク飼料との間に差はみられなかった。低タンパク飼料群では、飼育期間の初期から尿量及び飲水量が通常飼料群と比較して低値を示し、飼育期間が長くなるにつれて糸球体濾過率の低下傾向がみられた。さらに、低タンパク飼料群では通常飼料群に比べ18カ月齢時に腎重量が低値を示し、また腎尿細管の好塩基性化の程度及び発生頻度に減少が認められた。

[まとめ] 低タンパク飼料で飼育したラットでは尿量及び糸球体濾過率が低値を示し、腎への負担が低いことが示唆された。さらに18カ月齢では腎症の発生が抑制されていた。

○山崎清美、村上善紀、坂内なるみ、野口修、市村彰敏、
塩野泰弘、坂口弘、田内清憲

日本レダリー株式会社医薬研究所

ラットは片腎を摘出すると、残された腎は糸球体硬化などによって、機能低下に陥ることが知られている。

今回我々は、加齢腎摘ラットおよび加齢ラットの腎機能について検討を行ったので報告する。

方法) 動物は雌雄のSDラットを用いた。

7週令で片側腎臓を外科的に摘出した腎摘動物、偽手術動物を、約1年間バリア施設内で飼育した動物を加齢動物とした。加齢および腎摘による影響を10週齢の若齢群と比較した。

動物は代謝ケージを用いて16時間尿を採取し、尿量、試験紙を用いての半定量検査、尿沈渣検査および尿中NAG、LDH、クレアチン(Cr)、蛋白(TP)、グルコース(Glu)、Na、K、Cl濃度の測定を行った。同時に、血清中のGlu、尿素窒素(UN)、Cr、TP、アルブミン(Alb)、無機リン(IP)、Na、K、Cl濃度の測定を行った。また、血漿濃度および尿中排泄率測定によるPSP試験を実施した。

結果) 加齢動物および加齢腎摘ラットでは雌雄とも体重あたりの飲水量・尿量および血清中のNa、K、Cl濃度は若齢動物と比較して、大きな差は認められなかったことから、体液の恒常性は概ね正常に保たれていることが推察された。一方でGFRが高値を示す個体が加齢雌雄に、また加齢腎摘動物の雄に高尿素窒素血症を示す個体が散見され、加齢ないし腎摘の影響と考えられた。PSP排泄は、概して加齢動物で遅延し、腎摘動物で顕著であった。

○川端留美、箱井加津男、泉勝彦、野中直樹、林泰司

大鵬薬品工業(株)製薬センター 安全性研究所

【目的】雄性ラットに Puromycin aminonucleoside(PAN)あるいは Cephloridine(CER)を単回投与することにより、実験的に腎の糸球体あるいは尿細管障害を発症させた。この腎障害モデルを用いて内因性クレアチンクリアランス(C_{cr})および各種再吸収分画(FR)を測定し、腎障害評価における腎クリアランスの有用性について検討した。

【方法】6週齢の雄性 Crj:CD(SD)ラットを対照群(無処置)、PAN(150mg/kg, ip)および CER(1000mg/kg, iv)の3群に各群18匹を振り分け、投与後2, 7および14日に各6例を解剖した。各群の投与後14日解剖例について、体重、摂餌量、摂水量、尿量および尿生化学的検査(グルコース, 尿素窒素, クレアチニン, カルシウム, 無機リン, 蛋白, ナトリウム, カリウム, 塩素)を連日測定した。各解剖日には尿および血液生化学的検査(上記項目に同じ)を実施し、 C_{cr} および FR(H_2O , グルコース, 尿素窒素, カルシウム, 無機リン, 蛋白, ナトリウム, カリウム, 塩素)を算出した。腎臓は、腎重量測定後、HE染色標本を作製し病理組織学的検査を実施した。

【結果および考察】 C_{cr} は、PAN および CER 群の病理組織学的変化がみられた時期によく一致して減少を示し、腎機能低下の把握に有用であった。さらに、FR_{glucose} の減少は、CER 群の尿細管機能低下をよく反映し、尿細管障害の指標として有用であった。一方、 C_{cr} , FR がともに減少した場合、尿中排泄量に変化がみられないこともあり、腎障害の評価には、尿中排泄量と血中濃度を総合的に評価する C_{cr} および FR が有用であると考えられた。

○中村美穂、菅原正喜、佐藤洋、梶村哲世、野村 護

第一製薬(株) 安全性研究所

ラット尿沈渣の細胞成分の鑑別を容易にするために、尿沈渣の染色法を検討した。また、各種泌尿器系の毒性モデルを作製し、病態と尿沈渣所見との関連性を解析した。

材料および方法：薬物による腎障害モデルとして、SD 系ラットに重クロム酸カリウム (K_2CrO_4 , sc)、cefaloridine (CER, iv)、hexachloro-1,3-butadiene (HCBd, po) あるいは 2-bromoethylamine (2-BEA, ip) を投与し、また膀胱炎のモデルとして LPS を膀胱内に投与した。その後、絶食、絶水条件下で代謝ケージを用いて 4 時間尿を採取し、試験紙による定性試験を行った後、遠心により得た尿沈渣に染色液を添加し、細胞成分を鏡検した。一部緩衝化した染色液を用いて、pH による染色性の違いを検討した。また、血清中の尿素窒素およびクレアチニンを測定すると共に、腎を組織学的に検査した。

成績：検討した染色法の中で最も良好な染色性を示したものは、TiO 染色であった。特に、扁平上皮細胞、移行上皮、尿細管上皮の識別が容易になった。また、HEPES 添加により中性に緩衝化された染色液は、病態モデルの尿でも安定した染色性を示した。 K_2CrO_4 、CER および HCBd を投与した動物では投与翌日に尿細管上皮細胞が増加し、2-BEA を投与した動物では移行上皮がわずかに増加し、組織的な病変部位の特異性と一致した。

以上のことから、TiO 染色により尿上皮細胞の識別が容易になり尿沈渣検査で腎障害をより正確に診断できる可能性が示された。

河合悦子、井上 優、玄番宗一

大阪薬科大学 第二薬理学

【目的】肝細胞に対する強力な細胞増殖因子として発見された HGF が、薬物あるいは虚血-再灌流によって引き起こされる腎障害を軽減するとの報告がある。そこで我々は、腎障害性制ガン薬シスプラチンの腎細胞障害に対する HGF の効果について培養腎上皮細胞 LLC-PK1 を用いて検討した。

【方法】ブタ腎由来の培養腎上皮細胞 LLC-PK1 に、継代直後から 24 時間毎に HGF (10, 25, 50, 75, 100 ng/ml) を培養 3 日目まで (計 4 回) 添加した。LLC-PK1 細胞がコンフルエンスに達した培養 4 日目に新鮮な培地と交換し、その 3 時間後にシスプラチン (15 μ M) を添加した。シスプラチン添加 36 時間後、細胞障害の指標として細胞からの LDH の遊離率と細胞内の蛋白性および非蛋白性 SH 含量を測定した。また、HGF 添加後の細胞数も測定した。

【結果】培地への 10 ng/ml の HGF の添加は、コントロールに比べて細胞数を増大させた。しかし、HGF の添加濃度を上げててもそれ以上の増大はみられなかった。シスプラチン添加は、細胞からの LDH 遊離を増大させた。この増大を HGF は用量依存的に抑制した。シスプラチンは、細胞内の蛋白性 SH 量を減少させる傾向を示した。HGF は、シスプラチン存在下で蛋白性 SH 量や非蛋白性 SH 量を増大させた。

【考察】培養腎上皮細胞 LLC-PK1 において、HGF はシスプラチンによる腎細胞障害を軽減した。その軽減効果には、HGF による細胞増殖の促進作用以外に細胞内の蛋白性および非蛋白性 SH の保護も関与する可能性が考えられる。

武田理夫, 小林麻美, 遠藤 仁

杏林大医学部薬理学教室

抗腫瘍薬シスプラチンは世界的に広く用いられているが、近位直尿細管(S₃)を主要障害部位とした急性腎不全を始めとする重篤な腎障害はその使用をしばしば制限している。この腎障害の発症機序を明らかにすべく、我々はSV-40largeT抗原遺伝子導入トランスジェニックマウス由来S₃細胞を用いて、シスプラチンによるアポトーシス誘導の細胞内機構について検討した。1. シスプラチンによりS₃細胞において、アポトーシスに特徴的な生化学的および形態学的変化を認めた。2. アポトーシス誘導に先行して、*c-fos* mRNA発現の亢進が認められた。そしてトロンボキササンA₂受容体拮抗薬により、この*c-fos* mRNA発現およびアポトーシス誘導はともに抑制された。3. アポトーシス誘導は*bcl-2*遺伝子導入により抑制され、*bax*遺伝子導入により促進された。4. アポトーシスの実行に関与するInterleukin-1 β -converting enzyme(ICE)およびICE様プロテアーゼの阻害物質(Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-H, Z-Asp-CH₂-DCB)の添加、およびICEの阻害タンパク質である*CrmA*の強制発現によりにより当該アポトーシスは抑制された。5. 細胞周期上は、低濃度(10⁻⁵M)のシスプラチンでは既に他臓器での報告と同様にG₂+M集積に続いてアポトーシス細胞が認められたのに対して、高濃度(10⁻⁴M)ではアポトーシス細胞の集積のみを認めた。すなわち用いるシスプラチン濃度によりアポトーシス誘導の細胞内機構が異なることが示唆された。(結論) シスプラチン腎障害に伴いアポトーシスが誘導され、*c-fos*, TXA₂, *bcl-2*, *bax*およびICEなどがこの誘導に関与する細胞内因子として同定された。今後さらにシスプラチン誘導アポトーシスの意義および細胞内制御経路の全貌が明らかにされることは、薬物性腎障害の病態解明および対策手法の開発を可能にすることが期待される。

○社領 聡，瀬畑信哉，匂坂秀樹，
古川忠司，木村邦男，真鍋 淳

三共(株)安全性研究所

レニン-アンジオテンシン系に作用する多くの降圧剤のラット反復投与毒性試験において，赤血球数の減少，血中尿素窒素の増加，心重量の低下などが認められ，これらの変化は生理食塩液の補給により回復あるいは減弱することが報告されている。当社でアンジオテンシンⅡ(AⅡ)受容体拮抗作用を持つ降圧剤として開発中のCS-866のラット反復投与毒性試験でも上記の種々の変化が認められた。今回，CS-866による変化も生理食塩液(食塩)の補給により回復するかを調べた。さらに，腎臓の形態学的変化(傍糸球体細胞顆粒指数:JGI)と機能的変化(糸球体濾過量:GFRと濾過率:FF)に注目し，本剤の大量投与が腎臓に及ぼす作用とそれに対する食塩補給の影響を検討した。

CS-866をF344雄ラットに1箇月間反復経口投与した結果，上述した種々の変化が出現したが，GFRを含むこれらのほとんどは食塩の補給により回復した。この結果は，レニン-アンジオテンシン系に作用する従来の降圧剤での報告に一致するものであり，ラットで認められる変化が本剤の薬効に関連して出現することを強く示唆するものである。一方，JGIの増加とFFの低下は食塩の補給によっても回復しなかった。JGIの増加については，傍糸球体細胞1個当たりのレニン顆粒数に著変がなかったことから，傍糸球体細胞自体の数の増加に起因するものと考えられた。したがって，本剤の薬効であるAⅡ受容体拮抗作用に対するフィードバックを介したレニン産生刺激は食塩補給の影響を受けないと推察された。また，FFの低下は本剤の薬効に伴う腎臓からのナトリウム排泄の増加を反映した変化と考えられたが，この変化も食塩補給により回復することはなかった。すなわち，今回採用した飲水を介した食塩補給は体液中にナトリウムを補給する結果になったと推察されるが，これは本剤の薬効に伴う腎臓からのナトリウム排泄の増加に影響しないと考えられた。

以上の結果は，CS-866の高量投与がラットに惹起する変化が，他の本系統の降圧剤と同様，毒性を示唆するものではないとの考え方を支持するものであった。さらに，JGIとFFの検索結果は，食塩補給下でも本剤の薬効が強く発現していることを示唆するものである。

○森原 幸、新井 美穂、田村 工

一般演題 (ポスター)

〔投〕大塚製薬工場 薬門研究所

7月25日 (木)

11:00~17:00

質疑応答 14:20~15:10

D会場 (6号会議室)

演題番号 P01~P30

E会場 (5号会議室)

演題番号 P31~P60

F会場 (3号会議室)

演題番号 P61~P71

F会場 (2号会議室)

演題番号 P72~P81

○桑原 孝, 朝波 省吾, 田村 工

(株)大塚製薬工場 鳴門研究所

【目的】末梢静脈栄養法(P P N)において最も問題となる副作用は静脈炎であり, 静脈炎を引き起こす要因として輸液の高張性及び酸性であることがあげられている。今回, P P N用混合輸液の素材であるアミノ酸液, 糖加電解質液及びその混合液の血管障害性について, ウサギを用いて病理組織学的に検討した。

【方法】10%グルコース加電解質液(G E, pH 4.9, 727mOsm/kg), 10%アミノ酸液(A A, pH 6.9, 929mOsm/kg), G EとA Aを5:2の比率で混合したもの(G E A A, pH 6.4, 779mOsm/kg), A Aの代わりに他の10%アミノ酸液(A B, pH 6.0, 867mOsm/kg)を混合したものの(G E A B, pH 5.7, 758mOsm/kg)を, ウサギ耳介静脈内に10ml/kg/hrの速度で6時間投与した。投与終了の24時間後に投与静脈を採取し, 病理組織学的に検査した。

【結果及び考察】G E投与群及びA A投与群では投与静脈に対する障害性が認められたが, 混合液G E A A投与群ではほとんど認められなかった。混合液G E A AのpH及び浸透圧は, 投与静脈が許容できる範囲に是正されたものと考えられた。したがって, 単剤での投与により認められた血管障害性は, G Eはその酸性度(pH 4.9)に, A Aはその高張性(929mOsm/kg)に起因するものと推察され, 混合することにより互いの血管障害性を打ち消しあったと考えられた。一方, やや酸性(pH 6.0)のアミノ酸液A BとG Eを混合したG E A Bでは, 血管障害性が認められた。その浸透圧はG E A Aより低いことから, 障害性はその酸性度(pH 5.7)に起因するものと考えられた。以上, アミノ酸液のpHはP P N用混合液の血管障害性に大きく影響し, 中性に近いアミノ酸液を用いれば酸性の影響を消し去ることが可能であることが示された。

花井幸次、田澤真矢、渡辺知幸、尾崎正和、
中野実、甲田彰、細川俊治

住友化学工業株式会社生物環境科学研究所

【緒言】 演者らは、anthracycline 系制癌剤である Doxorubicin (DXR) により心毒性を発現させたイヌの心機能の変化を、心エコーを用いて検討してきた。今回、住友製薬(株)で開発中の同系の制癌剤 Amurubicin (AMR) について、主に心エコーによる心機能の変化を DXR と比較して検討したので報告する。

【方法】 ビーグル犬 12 頭(1 群雌雄各 2 頭)を用い、対照群(無処置)、DXR 群(1.5mg/kg)、AMR 群(2.5mg/kg)の 3 群を設定した。3 週間に 1 回の頻度で、DXR 群には 6 回、AMR 群には 9 回静脈内投与を行い、初回投与後(投与)27 週まで観察した。検査として、3 週間隔で心エコー検査、心電図、血圧測定を実施した。投与 27 週後に動物を屠殺し、心臓を病理組織学的に検討した。

【結果】 死亡：投与 17 および 22 週に、DXR 群の雌雄各 1 頭で死亡が発現した。心エコー検査：DXR 群では、投与 12 週から左室収縮率の低下が認められ、投与 15 週からは僧帽弁口部のカラードプラ像で拡張早期の color flow の減退が認められた。更に投与 18 週からは、収縮期僧帽弁逆流も認められた。一方、AMR 群では、対照群と差は認められなかった。心電図・血圧：DXR 群では、投与 18 週以降に QRS 時間の延長、心拍数の増加、血圧の低下が認められた。AMR 群には明らかな変化は認められなかった。病理組織学的検査：DXR 群では、空胞化などの心筋変性が認められたが、AMR 群には明らかな変化は認められなかった。

【結語】 AMR は DXR に比較して心機能に対する影響が弱く、これは器質的变化が心機能に反映されているものと考えられた。

○石井 渉、友廣 雅之、三浦 秀樹、三井 隆喜、John E. Lund

アップジヨン ファーマシューティカルズ リミテッド 筑波総合研究所

U-100766 は、新しい構造を有する oxazolidinone 系抗生物質であり、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA)、バンコマイシン耐性腸球菌 (VREF) およびペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) に対しても良好な抗菌力を有する。作用機序は蛋白合成の開始を阻害することによると考えられている。

U-100766 の安全性評価の一環として、0、20、60 および 200 mg/kg/day の投与量で Sprague-Dawley Crj:CD (SD) 系ラットに 1 日 2 回 6 時間間隔で、雄は 28 日間、雌は 29 日間反復静脈内投与した。投与液量は 20 mL/kg/dose (40 mL/kg/day) とした。溶媒対照としてデキストロースを 4.6% 含む 0.01 M クエン酸ナトリウムおよび塩酸緩衝液 (pH 4.8) を用いた。雌雄各 15 匹からなる 0、60 および 200 mg/kg/day 群には 4 週間の回復期間を設け、始めの 10 匹を投与期間終了時に、残る 5 匹を回復期間終了時に剖検した。20 mg/kg/day 群の雌雄各 10 匹は投与期間終了時に剖検した。20、60 および 200 mg/kg/day 群には血漿中薬物濃度測定のために各群雌雄 3 匹ずつのサテライト群を設け、投与期間終了時に剖検した。試験期間を通して瀕死あるいは死亡はみられなかった。認められた変化は流涎、体重増加の抑制、摂餌量の減少、網状赤血球数および好中球数の減少を伴う貧血、血清尿素窒素の増加、血清トリグリセライドの減少、腹腔内脂肪の減少、皮質の肥厚を伴う副腎の大型化、胸腺重量の減少およびリンパ節の萎縮であり、標的臓器は骨髄 (細胞密度、赤血球造血および巨核球数の減少) および脾臓 (赤血球造血および巨核球数の減少) であった。これらの変化は、4 週間の回復期間終了時には回復していた。抗生物質である U-100766 の薬理学的作用に基づく影響として、盲腸の大型化に伴う腹部膨満、ならびに血清グロブリンの減少に伴う血清総蛋白の減少およびアルブミン/グロブリン比の増加が認められたが、回復期間終了時にはこれらの変化は回復あるいは回復傾向を示した。

本試験条件下での毒性学的無影響量 (NOAEL) は 20 mg/kg/day であり、NOAEL における最高血漿中薬物濃度 (ただし、投与 1 および 3 時間後の血漿中薬物濃度からの推定値) は、雄 11.4 ~ 13.1 µg/ml、雌 10.4 ~ 13.8 µg/ml であった。NOAEL における AUC は、雄 41.8 ~ 52.1 µg*h/ml、雌 49.0 ~ 58.4 µg*h/ml であった。

○中村良治、三井隆喜、福田武史、小林賢一、塚本和行、Daniel G. Branstetter

アップジョン ファーマシューティカルズ リミテッド 筑波総合研究所

新規 oxazolidinone 系の抗生物質である U-100766 をビーグル犬（投与開始時：約 7 カ月齢）に 1 日 2 回 1 カ月間（雄：30 日間、雌：31 日間）反復静脈内投与し、その毒性を調べた。さらに、その後 6 週間（42 日間）休薬し本薬に起因する毒性の回復性についても検討した。投与量は 0、10、20 および 40 mg/kg/day とし、これを 1 日 2 回（約 6 時間間隔）に分割し、午前および午後に静脈内投与した。投与液量は 5 ml/kg/dose (10 ml/kg/day) とした。使用動物数は全群 6 匹/性/群とし、うち 2 匹/性を回復試験に供した。溶媒対照として 4.567% テキストロースを含む 0.01M クエン酸ナトリウムおよび塩酸緩衝液 (pH 4.8) を用いた。本試験の観察・検査項目は生死・一般状態、体重測定、心電図検査、眼科学的検査、血液・血液生化学的検査、尿検査、血中薬物濃度の測定、剖検、臓器重量および病理組織学的検査であった。

その結果、いずれの群にも死亡例は認められなかった。40 mg/kg/day 群には、投与期間後期に軟便、軽度の食欲不振および体重増加抑制が認められた。20 および 40 mg/kg/day 群には、赤血球数、白血球数（好中球および単球）、網状赤血球数および血小板数の減少、骨髓における萎縮および分離した核を有する巨核球の出現、脾臓の巨核球細胞の低形成、さらに腎臓の近位尿細管上皮細胞における空胞変性が認められた。その他の毒性変化として尿比重およびアルブミン/グロブリン比の増加、血清総蛋白量、グロブリン量およびヘモグロビン濃度の減少が認められた。40 mg/kg/day 群における薬物投与に関連した臨床病理学的あるいは病理組織学的変化は 20 mg/kg/day より著しい変化であった。10 mg/kg/day 群の一般状態には試験期間を通じて異常は認められず、各検査で得られた結果は対照群あるいは投与前の値とほぼ同様であった。なお、投与局所における変化は対照群を含め各投与群間に差が認められなかったことから U-100766 に局所刺激作用はないと考えられた。6 週間の休薬期間終了時までには本薬に起因した変化は対照動物と同程度までに回復した。

本試験条件下での無毒性量 (NOAEL) は 10 mg/kg/day であり、10 mg/kg/day における投与第 28 日午後の投与 2 分後血漿中濃度 ($C_{(6.033)}$) は、雄 $10.40 \pm 1.20 \mu\text{g/ml}$ 、雌 $8.29 \pm 1.59 \mu\text{g/ml}$ であった。同日の血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC) は雄 $52.7 \pm 7.1 \mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ 、雌 $55.6 \pm 2.6 \mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ であった。

○千葉康司、村田祥一、青山裕之、青山真樹子、G.W.Peng、小沢直記

アップジョン ファーマシューティカルズ リミテッド筑波総合研究所

新規oxazolidinone系抗生物質 U-100766 のラットおよびイヌにおける4週間反復静脈内投与試験のトキシコキネティクスについて検討した。

雌雄Sprague-Dawley系ラットを用いた試験では、U-100766の10、30、および100 mg/kgをサテライト群のラット(n=3)に1日2回6時間間隔にて投与(20、60、200 mg/kg/day)後、初日および28日目の投与直前、投与後1、3、6、7、9、12、24時間および13日目の24時間に血液を採取し、遠心分離後血漿中U-100766濃度を測定した。雄ラットにおける20、60、200 mg/kg/day投与群のAUCは投与初日にはそれぞれ41.8、150、856 $\mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$ 、28日目には52.1、199、909 $\mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$ であった。高投与量群ではAUCは用量との比例関係から予想される値よりも僅かに高値を示し、U-100766の代謝または排泄の飽和が示唆された。また、投与初日と28日目の間に有意な差が見られなかったことから、4週間反復投与により薬物動態の変化は生じないものと考えられた。雌のAUCは雄の1.0~1.6倍の値を示し、性差が示唆された。蓄積性について投与後24時間値(Cmin)を用いて検討したところ、投与13日目までには雌雄ラット共に定常状態にはほぼ到達しているものと推察された。

ビーグル犬を用いた試験では5、10、および20 mg/kgを1日2回6時間間隔にて投与(10、20、40 mg/kg/day)後、本試験群に用いた6匹中3匹のイヌより初日および28日目の投与直前、投与後0.033、1、3、6、6.033、7、9、14、24時間および14日目の投与直前(13日目の24時間)、投与後0.033、1時間に血液を採取し、遠心分離後血漿中U-100766濃度を測定した。雄イヌにおける10、20、40 mg/kg/day投与群のAUCは投与初日にはそれぞれ41.1、112、261 $\mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$ 、投与28日目には52.7、128、325 $\mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$ であった。高投与量群ではAUCは用量との比例関係から予想される値よりも僅かに高値を示し、ラットと同様にイヌにおいても高投与量における代謝または排泄の飽和が示唆された。また、イヌにおいては投与28日目のAUCは初日より有意に高値を示したことから、4週間反復投与によるクリアランスの変化が示唆された。Cmin値は、投与後13日目までにはほぼ定常状態に到達しているものと推察された。雌における薬物動態パラメータは雄と同様であった。
[結語]ラットおよびイヌのU-100766の全身的暴露量は投与量の増加と共に増加した。本薬のMRSAに対するMIC₉₀は4 $\mu\text{g/ml}$ であり、ラットの20 mg/kg/dayおよびイヌの10 mg/kg/day投与群の1時間値はこれと同程度ないしそれ以上であった。

堀 眞一郎、大谷 幸子

(財)東京都神経研、神経生化学

[目的] スモンの病因はキノホルム(Cf)の副作用による神経障害である。しかし、ラットではCfによる神経障害は発症しにくいと言われてきた。そこで私達はCfの毒性に感受性の高いラットにCfを長期間投与して神経障害の発症を試みた。

[実験方法] 発症実験；Cfの毒性に感受性の高いラット(CfS)と低いラット(CfR)を使用した。生後1日より25-32日まではCfを4% Tween20に懸濁した状態で30-300 mg/kg体重を皮下投与した。引続いて、300 mg/kg体重に増量し経口的に強制投与した。投与量は個体の体重に対する影響を観察しながら増減した。

代謝実験；エーテル麻酔下に股静脈血管および動脈血管にホリエチレンを挿入し、ラット血清に溶解したCfを静脈より1 mg投与し、経時的に動脈血を採取した。これらに含まれる遊離、グルクロン酸抱合および硫酸抱合のCfを抽出GC-MS法によって定量した。

[結果及び考察] Cfを長期間(1年以上)、大量投与することにより後肢の上げ下げが緩慢になったものが出た。後肢の脱力はあるものの麻痺症状は完全ではなかった。CfRでは体重が対照と比べ少ないこと以外には外見状全く異常が認められないものがいた。

ラットにCfを血中投与した場合血中のCfは極めて速やかに血中から消失した。ラットで障害を発症させることが難しいのはこの事によっているのであろう。

[結論] 麻痺症状は完全ではないもののCfSで発症しているようにみえるラットが認められた。

P 07 Methotrexate の毒性発現に及ぼす葉酸の影響

海野隆^{1) 2)}、平川公昭¹⁾、中村正典¹⁾、佐藤直美¹⁾、
中村孝²⁾、下田実²⁾、小久江栄一²⁾

1) 鐘紡(株)薬品安全研、2) 東京農工大学獣医

抗ガン剤、抗リマチ薬として知られている methotrexate(MTX)の副作用軽減には従来 Leucovorin®(LV)が使用されている。Stewart ら(1991),Morgan ら(1990,1993,1993)は薬力学的考察からこの目的に葉酸(FA)の使用を提唱している。しかし、MTX と同じ dihydrofolate reductase である pyrimethamine はラット胎児発育抑制と催奇形性(口蓋裂)を示し、FA の併用投与はむしろこれを増強する(工藤ら 1988)ことから、MTX と FA の併用投与にも毒性増強が懸念される。

今回、MTX,FA,LV を粉末飼料に混じ 10ppm とし Jcl:Wistar 系雄性ラット(12-15 週齢)に 1 ヶ月間投与したところ以下の結果が得られた。

MTX 単独、MTX+FA 併用投与では投与 10 日で赤血球数(RBC)、ヘマトクリット値、ヘモグロビン値が有意に減少し、網状赤血球(RET)も消失し、大腿骨骨髓の造血像も MTX 単独、MTX+FA 併用投与において著明に抑制された。しかし MTX+LV 併用投与では血液検査値の変動、骨髓組織の異常は認められなかった。

主要な血漿中 folate である 5-methyltetrahydrofolic acid(5-MF)濃度は MTX 単独、MTX+FA 併用投与において明らかに低下し、骨髓機能抑制との関連が示唆された。

以上の成績から、MTX の副作用軽減のために FA を LV の代用として使用することは危険であると判断される。

	Control	MTX 単独	MTX+FA 併用	MTX+LV 併用
RBC($10^4/mm^3$)	877±39	775±18**	734±22***	891±27
RET(%)	30.3±12.1	0	0	24.7±7.0
5MF(ng/ml)	49.1±17.3	4.8±1.9**	3.7±2.6**	44.5±7.9

Mean±SD (n=6) **;p<0.01 vs Control, ##;p<0.01 vs MTX group (t-test)

平林容子¹、梅村隆志¹、Eugene P. Cronkite²、井上 達¹

¹国立衛生試験所 安全性生物試験研究センター、

²米国ブルックヘブン国立研究所 医学部門

アズイドチミジン(AZT)は、ヒト獲得性免疫不全症候群ウイルス(HIV)を含むウイルスの複製を阻害するチミジン誘導体である。AZTの長期にわたる治療を受けたAIDS患者では、大細胞性貧血が見られること、AZTをマウスに反復投与すると脾重量が減少し、中等度の貧血と白血球減少を引き起こすことなどが報告されている。これは、チミジンキナーゼによって三リン酸化物に変換されたAZTは、チミジンのかわりにゲノムDNAに挿入されると、リン酸水素結合が阻害されてDNA伸長反応を停止するので、造血前駆細胞の増殖が、分化の初期段階で抑制されることによるものと理解されている。我々はAZTをマウスに長期投与したモデル動物を作成し、造血幹細胞動態の解析と病態の組織学的検索を行った。

【方法・結果】 CBA/Caマウスの雄にAZT 0.75 mg/ml H₂Oを84日齢から687日齢まで飲水投与した後に以下3群に分けた。即ちA. 0.5mg/ml H₂Oに投与量を減少する群、B. 投与を中止し回復状態の観察に供する群、C. 0.75 mg/ml H₂Oのまま持続する群である。血小板数はAZT投与687日齢時点の平均 $2.5 \times 10^5/\text{mm}^3$ で、剖検で血小板減少を伴う10匹中9匹に骨髓異形成症候群(MDS)に一致する変化を認めた。内訳は、低細胞性骨髓異形成2例、過分葉を伴う骨髓異形成顆粒球症2例、bizarreな核を有する異常巨核芽球を伴う巨核芽球性骨髓增多像2例、高細胞性骨髓異形成を伴う巨核球性骨髓症1例、ヘモジデロシス及びdyserythropoiesisを伴う低細胞性骨髓所見2例であった。AZT投与により、造血幹細胞CFU-S数が60%に減少しているマウスでのMDS誘発機構について、造血前駆細胞動態解析を用いた結果を併せて報告する。

○和田あづさ¹⁾、高島宏昌¹⁾、森 千里²⁾

1) 食品薬品安全センター、2) 京都大学大学院医学研究科

我々は先に、マウスを始原生殖細胞(PGC)期(胎齢10日)に ethylnitrosourea (ENU) で単回処理し、出生後、成獣を観察した結果、25 mg/kg処理では軽度な精細管萎縮、50 mg/kg処理では授胎率および精巣重量の低下、病理組織学的には精細管の萎縮、精細管内の生殖細胞の減少およびライディッヒ細胞の増殖がみられ、これらはENUのPGCに対する細胞致死作用の結果と考えられることを報告した(Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis 14: 271-279 (1994))。そこで、同様に処理した幼若期マウス(出生後0日~20日)の精巣組織像(ヘマトキシリン・エオジン染色標本)を観察し、精巣分化の異常の有無について無処理動物(対照群)と比較検討した。その結果、出生日の精巣には、対照群と25 mg/kg群で差は認められなかったが、50 mg/kg群では精祖細胞の減少がみられ、50 mg/kg処理でのPGCの早期細胞致死作用が確認された。また、出生後6日以降のどの日齢においても、ENU処理群では精細管内腔の層構造の形成が阻害され、50 mg/kg群ではほとんど全ての精細管で単層構造を示した。精祖細胞あるいは精母細胞の数はいずれの日齢でも、対照群>25 mg/kg>50 mg/kgであった。以上のことから25 mg/kg処理は成獣の生殖能力に影響を示さなかったが、精巣の分化に影響をおよぼすことが示唆された。また、25 mg/kg処理においてもPGCへの細胞致死作用が疑われた。

部分腎摘ラットを用いるメトトレキサート(MTX)の
1ヵ月間反復経口投与毒性ならびにTK試験

○村上善紀、山崎青美、坂内なるみ、塩野稔弘、坂口 弘、小笠原裕之、田内清憲

日本レダリー株式会社医薬研究所

メトトレキサート(MTX)は抗悪性腫瘍薬であるが、近年、諸外国では慢性関節リウマチ(RA)治療薬としても使用されており、高い治療効果をあげている。MTXのヒトおよびラットにおける主要な排泄経路は腎臓であるため、腎の予備能を片側腎臓を摘出することにより低下させた動物を用いて毒性を検討することは、ヒトにおける腎機能低下時の副作用発現の危険性を予測する上で有用と考えられる。そこで片側腎臓を摘出(腎摘)したラットおよび比較のために腎臓を摘出せず、偽手術を施した(偽手術)ラットを雌雄各10例ずつ用いて、MTXの28日間反復経口投与毒性・TK試験を実施した。投与量は0.06、0.2、0.6mg/kgとし、1日1回28日間反復経口投与を行った。死亡ないし瀕死例は、偽手術ラット0.2mg/kg群で雄1例、0.6mg/kgで雄3例、雌4例であり、腎摘ラットの0.6mg/kgで雄9例、雌6例と0.6mg/kg群では腎摘群での死亡数が多かった。0.2mg/kg以上の用量で蒼白、耳介や上顎の腫脹などが認められ、その発現は0.6mg/kg群では腎摘ラットの方が早く出現した。両処置群とも白血球数および赤血球数の用量に依存した減少が認められ、減少の程度は腎摘群で著しかった。0.2mg/kg群で28回投与後のMTXおよび代謝物7-OH-MTXの血漿中濃度を測定した。MTXのAUCは腎摘ラットの方が偽手術ラットより高く、雌では約2倍の差があった。血清中クレアチニンは腎摘ラットの方が偽手術ラットより高いことから、糸球体濾過量の低下によりMTXの排泄が遅延し、MTXの血中濃度が高く推移することにより、腎摘ラットでMTXの毒性が強く発現したものと推察した。

P11 インドメタシン、パラコートおよびジクワットの動脈管収縮作用

白井明志¹、政岡俊夫²、本谷真澄¹、高木博隆³、有嶋和義³、赤堀文昭¹

麻布大学 獣医学部 ¹薬理、²毒性、³解剖 2

動脈管は、胎生期において肺動脈と大動脈を結ぶバイパスである。近年、この動脈管がインドメタシンなどの抗炎症薬によって収縮が引き起こされるとの報告がなされてから種々の化学物質の動脈管に対する作用が注目されている。そこで演者らは、除草剤であるパラコート (PQ) およびジクワット (DQ) の動脈管に対する作用およびこれらの除草剤の動脈管収縮作用機序についてインドメタシンと比較検討を行ったので報告する。

Wistar 系ラットを用いた。母体の妊娠日数は、交配の翌朝、膈垢中に精子の確認された日を妊娠 0 日として起算した。インドメタシン 1 mg/kg, p.o.、PQ 25 mg/kg, s.c. または DQ 7 mg/kg, s.c. を妊娠 21 日目の母体に投与し、投与後 3 時間に剖検を行った。胎子動脈管の観察は、全身急速凍結法を用いて行った。また、インドメタシンの動脈管収縮作用機序が、プロスタグランジン (PG) E₂ の合成阻害であると考えられていることから、インドメタシン、PQ および DQ の PG 合成酵素 (シクロオキシゲナーゼ) に対する作用を *in vitro* で検討した。

インドメタシン、PQ あるいは DQ を母体に投与すると、その胎子動脈管は対照とくらべて有意に収縮していた。一方、インドメタシンはシクロオキシゲナーゼを著しく阻害したのに対し、PQ および DQ では阻害作用はみられなかった。

以上の結果から、妊娠末期のラットに対して PQ および DQ は動脈管収縮作用を示すものの、その作用機序は PQ および DQ ではインドメタシンなどで考えられているシクロオキシゲナーゼ阻害による PGE₂ の合成阻害と異なることが示された。

- ¹梅村隆志、¹小川幸男、¹児玉幸夫、¹小野 敦、¹関
田清司、¹内藤克司、¹降矢 強、¹井上 達、¹黒川
雄二、²林 裕造

¹国立衛生試験所毒性部、²北里大学薬学部

目的：水田の除草剤として広く用いられてきたフェニル系農薬のクロ
ニトロフェン（CNP）は近年、疫学的調査によりヒト胆嚢癌との関連性が
指摘された。一方、タニ駆除剤として使用されてきたアミト（Arm）は
イヌの胆嚢癌を誘発する事が知られている。そこで、CNPの胆嚢催腫
瘍性の可能性を探る目的でArm、CNPおよび他のフェニル系農薬であ
るニトロフェン（Nif）、クロトキシニル（Chr）、ビフェノックス（Bif）をそれぞれイ
ヌに90日間投与して肝臓、胆嚢および胆管への影響を比較検討した。
方法：18匹の雌のビーグル犬を6群に分け、フェニル系農薬を何れも
1g/body/day、Armは400mg/body/day毎日飼料に混じて90日間投与し
た。投与前4および1週目、投与開始後の30、60および90日目に血液
を採取して血液学および血清生化学的検査を実施した。また、解剖
2時間前にBrdUrdを投与し、麻酔下放血殺後、肝臓、腎臓および脾臓
重量を測定し、肝臓、胆嚢および胆管はホルマリウム固定後、BrdUrdの免
疫染色を含めた病理組織学検索を行った。
結果・考察：血液学および血清生化学的検査では、投与30日目より、
Arm群でアミノアミノトランスフェラーゼ（ALT）およびγ-グルタミルトランスアミナーゼ
（γ-GT）活性が有意に上昇した。臓器重量では各検体投与群の肝比
重量が有意に上昇した。病理組織学的には、肝細胞の軽度の腫脹が
NifおよびChr群で観察された。また、Arm群の胆嚢および肝外胆管で
は粘膜上皮の肥厚と共に上皮細胞の配列の乱れ、細胞分裂亢進、粘
膜固有層の浮腫、細胞浸潤、リンパ小節の活性化が顕著に認められた。
しかし、フェニル系農薬ではこれらの変化は観察されなかった。
BrdUrdの細胞標識率ではArm群の胆嚢上皮細胞、肝外胆管上皮細胞で
有意の高い値を示した。今回、陽性対照として胆嚢への催腫瘍性が
報告されているArmの投与により胆嚢および胆管上皮に増殖性病変が
認められたが、CNPを含めたフェニル系農薬にこの種の変化は観察さ
れなかった。

○鈴木学，高橋宏明

残留農薬研究所

哺乳動物に対する毒性が低いことから、近年多くのピレスロイド殺虫剤が開発されている。ピレスロイド殺虫剤は化学構造からタイプ I と II に分類され、哺乳動物に投与した場合にもタイプによる症状の違いが報告されている（タイプ I では振戦，タイプ II では痙攣，流涎）。一方，タイプ I に属するテフルトリンは急性毒性が強いとの報告はあるが（経口投与でラットの LD₅₀ は 22 mg/kg，マウスの LD₅₀ は 45~46 mg/kg），その症状の特徴，急性死の原因については報告がない。本研究ではラット，マウスを用いてテフルトリンの症状，急性死の特徴，解毒剤について検討した。

初め，SD 系雄性ラットを用いて検討した。テフルトリンを静脈内投与すると，0.38 mg/kg 以上で振戦，痙攣，流涎等が発現し，1.5 mg/kg で全例が投与数分以内に死亡した。ウレタン麻酔下のラットにテフルトリンの致死用量を投与すると，投与約 1 分後に筋収縮の発現とともに血圧，心収縮力，呼吸数の増加がみられ，投与 10~12 分後に呼吸が停止し，その後に血圧が低下して死亡した。これらの呼吸，循環系変化と死亡はペントバルビタール前処置により拮抗されたが，人工呼吸により呼吸を確保しても拮抗されなかった。次に ICR 系雄性マウスを用いて検討した。マウスにテフルトリンを静脈内投与しても痙攣を主徴とする症状，死亡がみられた。痙攣と死亡に対する各種薬物処置の影響を調べると，メフェネシン，ペントバルビタール，ウレタン，ハロセン，ジアゼパムにより死亡時間の延長がみられた。

以上より，テフルトリンはタイプ I と II の症状を混在して発現し，急性死は非特異的な呼吸，循環機能の障害によることが推測された。その解毒剤として，中枢性筋弛緩薬，全身麻酔薬，ジアゼパム等が有効であると考えられた。

○島田 信、鹿内 ゆかり、原田 滋雄、島田 弘康、
野村 護

第一製薬（株）安全性研究所

雄性ラットに脳機能改善薬であるnefiracetamを4週間経口投与すると、精巣の生殖細胞の変性および消失が広範囲に認められた。そこで、精巣障害の初期変化をとらえるため、雄性ラットにnefiracetamを1週間経口投与し、精巣のステージを考慮した組織検査を実施した。また、併せて回復性についても検討した。

【材料および方法】1500 mg/kgのnefiracetamを10週齢のラットに1週間経口投与し、投与終了直後、1、2、3、6、12および16週間後に屠殺して、生殖臓器重量測定後、精巣内精子数を計数し、精巣、精巣上体および前立腺について組織学的検査を実施した。また、生殖細胞数を計数した。加えて電子顕微鏡を用いて、胚細胞とセルトリ細胞の関係について観察した。

【結果および考察】投与直後の変化は精巣、精巣上体および前立腺重量の減少が認められた。また、精巣内精子数も減少した。しかし、組織学的検査では変化は認められなかった。回復性については、投与終了から1週間後では精巣重量と精巣内精子数の減少傾向が認められ、精巣上体の重量は減少した。しかし、前立腺の重量は対照群と同程度であった。その後、生殖臓器重量は12週まで減少、もしくは減少傾向が認められた。精巣内精子数は6週まで減少傾向を示した。組織学的検査では、精子細胞のretentionが投与後2および3週に、精子細胞の消失が6週に認められた。しかし、いずれの変化も投与終了後16週間ですべて回復した。

以上の成績からnefiracetamを1週間投与してみられる精巣障害は可逆性変化と考えられた。

安武 章、中野篤浩、宮本謙一郎、衛藤光明

国立水俣病研究センター

低レベルのメチル水銀による慢性曝露が生体にどのような影響を与えうるかについて検討するために、ラット（Wistar、オス、8週齢）を0、1および5 ppm Hgのメチル水銀を含む18%蛋白飼料（16 g/ラット/日 x 6日/週）で飼育した。半年おきに解剖し、各組織の水銀値の他、グルタチオン、過酸化脂質、メタロチオネインのレベルと抗酸化酵素活性の測定と組織化学的観察を行った。

上記の給餌スケジュールにより、ラットの体重は2.5年の間緩やかに400 g近くまで増加したが、群間には差がみられなかった。メチル水銀中毒の指標とされている後肢屈曲交差現象は2年目までは全く観察されなかったが、2.5年目には3群全てに擬似的な現象がみられ、この現象は水銀毒性ではなく、加齢に起因するものと推察された。各組織の水銀値は最初の半年で急速に上昇し、その後の上昇は小さかった。1 ppm群の総水銀値は、腎臓を除いて5 ppm群の約1/5の値を示した。腎臓では、両水銀曝露群において、グルタチオン、過酸化脂質、メタロチオネインの各レベルの上昇とグルタチオンペルオキシダーゼ活性の低下が顕著であった。5 ppm群の腎臓は、組織学的には近位尿細管の肥厚と混濁および強度の水銀沈着が認められ、免疫組織学的手法でより、糸球体への免疫グロブリンとフィブリノーゲンの沈着も確認された。血液生化学的には、血中尿素、クレアチニンの上昇といった腎機能障害を示す変化が認められ、エリスロポエチンの生成能の低下に起因すると思われる貧血も観察された。

以上の結果から、5 ppm Hgまでのメチル水銀を含む飼料では生涯を通じて曝露してもラットに神経症状は観察されないが、腎臓に種々の障害を引き起こしうるということが判明した。

P16 沃化メチルの高脂血作用

○本間 健資¹⁾、大谷 勝己²⁾

労働省・産業医学総合研究所 職業病研究部¹⁾

人間環境工学研究部²⁾

沃化メチル (CH_3I) は、主にメチル化剤として産業用あるいは研究室内で多用されている。沃化メチルは中枢神経毒性を有する事が知られており、作業環境中の濃度は 2 ppm 以下とする事を目標としている。神経毒性の他に、沃化メチルを取り扱う作業者に高脂血症が見いだされたので、沃化メチルと高脂血症との関係を動物実験で検討した。沃化メチルによる実験的高脂血症は従来ウサギでのみ報告がある。しかし、他の実験動物では報告が無いので、沃化メチルをオリーブ油に溶解し、種々の実験動物に腹腔内投与して検討したところ、マウス・ラット・ハムスターでは高脂血症が発現しなかったが、モルモットでは発現した。但し、週令の高い成獣では、高脂血症をおこす投与量と死亡する dose が近接していて、実験的に難があった。そこで、若いモルモットを使用したところ、死亡例をみずに高脂血症を発現することができた。この条件でモルモットの血中脂質およびリポタンパクの分析をおこなったところ、沃化メチルにより増加するリポタンパクの大部分はカイロミクロンであって、VLDL (超低比重リポタンパク)・LDL (低比重リポタンパク)・HDL (高比重リポタンパク) の変化は小さかった。このとき、血漿あるいは血清には白濁が生じており、リポタンパク分析の結果はこの所見と一致した。沃化メチルによる実験的高脂血症は、ヒトにおけるある種の高脂血症のモデルとなりうるのではないかと考えて検討している。

○高山房子、江頭 亨、山中康光

大分医科大学 薬理学教室

肝炎などでは一般的に内因性エンドトキシン血症の発症頻度が高く、これが病態の進展に関与する。また、リポポリサッカライド (LPS; エンドトキシン) 投与により、生体内での活性酸素種産生が亢進しフリーラジカル関与の肝障害が惹起されることが知られている。一方、LPSにより一酸化窒素 (NO) 合成が誘導され、そのNOは鉄を活性中心に持つ酵素と結合し失活させることや、また細胞障害性で多くの疾患に関与するとの仮説も唱えられている。そこで、NOと肝炎病態との関連性を、劇症肝炎様の病態を示すD-Galactosamine (GalN) とLPS投与動物を用いて検討した。

【方法】実験動物として雌性ICRマウスを用い、LPSとGalNを腹腔内投与した。NOS阻害剤としてN-monomethyl-L-arginine(L-NMMA)、NOS阻害および活性酸素消去剤としてaminoguanidine(AG)を用いた。投与一定時間経過後血液および肝臓を採取して、NO生成[鉄-N-(dithiocarboxy) sarcosine錯体(Fe-DTCS)との7ダクトをESRで定量]、肝ミクロソーム cytochrome P450の変性[NO-cytochrome P450に特有なシグナルの有無を肝S9画分の液体窒素温度ESR測定で検出]、ネクロシスなどの肝障害[ライソソーム酵素 β -d-glucuronidase活性の血中での上昇]を検討した。

【結果】LPSは用量依存的に血液および肝臓中NO-Fe-DTCS濃度を上昇させ、GalNはこれをさらに増強した。肝ミクロソーム cytochrome P450の変性は、10mg/kg LPS群および1mg/kg LPS+GalN群で、投与十数時間～20時間経過後に初めて認められ、その程度は后者で著しかった。L-NMMAやAGでLPS誘導のNO生成およびcytochrome P450の変性は抑えられたが、肝機能障害はL-NMMAで増悪しAGで軽減された。

○堤 智昭^{1, 2)}、吉田冬子²⁾、永田論志^{1, 2)}、上野芳夫^{1, 2)}

¹⁾ 東京理科大学・薬・毒理学・微生物化学研、²⁾ 東京理科大学・生命研

【目的】ラン藻類が産生する環状ペプチド、マイクロシスチン (MC) は強力な肝臓毒であり、肝発癌プロモーター作用も有することが明らかとなっている。飲料水源やレクリエーション地域の湖沼やダム湖など、人が暴露する可能性の高い環境水中の MC を測定し汚染状況を把握する事は、MC のリスクアセスメントのために緊急の課題となっている。我々は既に環境水中の MC を 20 pg/ml の検出感度で直接測定が可能な ELISA 法の開発を報告した。そこで今回、この ELISA 法を用いて世界各国の環境水中の MC を測定したのでここに報告する。

【方法・結果】採取した環境水は 2 回凍結融解を行いグラスファイバーフィルターでろ過した後、抗 MC モノクローナル抗体を用いた ELISA 法により測定した。日本各地の 25 ヶ所の湖沼から採取した環境水 72 検体を測定したところ 57 検体に MC が検出され、その中の一つ京葉都市部の飲料水源である印幡沼ではラン藻類が多量に発生する 6 ~ 9 月の約 3 ヶ月間にわたり 41 ~ 52,000 pg/ml の MC が検出された。さらに、ドイツの 37 検体、ポルトガルの 30 検体、タイの 10 検体について測定したところ、それぞれ 35、29 および 7 検体に MC が検出された。また、肝発癌と MC 汚染との関連が疫学的に示唆されている中国海門県の池、川、などの飲料水約 1000 検体について測定したところ、多くの検体に MC が検出された。

【考察】我々が開発した ELISA 法により世界各国の環境水中の MC 汚染状況が明らかにされた。本法は膨大な数の環境水の MC 汚染状況を把握する方法として有用であった。今後更に広範囲における MC 汚染状況の調査への応用が期待できる。

P19 環境水汚染のラン藻由来肝臓毒マイクロシスチンのリスクアセスメント 第2報 マウスに対するマイクロシスチン-LRの急性経口・腹腔毒性及び免疫組織染色による肝細胞内分布

- 上野芳夫^{1, 2)}、牧田祐樹¹⁾、堤 智昭^{1, 2)}、永田諭志^{1, 2)}、吉田冬子²⁾、関島 勝^{2, 3)}、田村慎一⁴⁾、吉田敏則^{2, 5)}

¹⁾ 東京理科大学・薬・毒性学・微生物化学研 ²⁾ 東京理科大学・生命研 ³⁾ 三菱化学BLC・筑波ラボ ⁴⁾ 国立予防衛生研・感染病理 ⁵⁾ 残留農薬研・毒性

〔目的〕肝毒性・肝発癌プロモーター活性を示す有毒環状ペプチド、マイクロシスチン(MC)のヒトに対する危険度評価を最終目的として、代表化合物MC-LRを用いてマウスでの急性致死毒性を経口及び腹腔内投与で比較し、病理変化を検索し、肝細胞局在性及び障害機構を免疫組織化学的に検討した。

〔実験方法〕MC-LR(純度90%以上)は諏訪湖から採取したアオコより精製した。MC-LRを6週齢の雌性Balb/Cマウスに経口又は腹腔投与し、LD₅₀値を算出し、血清生化学検査とHE染色による病理組織学的検査を行った。抗MC-LR抗体を用いた免疫組織染色では、プロナーゼ処理後ビオチン化抗MC抗体とALP標識ストレプトアビジン複合体を順次反応させ、ALP基質で発色して細胞内分布を検討し、DNA断片化はTunel法で検索した。

〔結果及び考察〕MC-LRのLD₅₀値は経口で10.9 mg/kg、腹腔で65.4 µg/kgであり、経口での急性致死毒性は腹腔に比して約170倍弱い。血清検査ではGOTなどの上昇を認め、死亡例での病理学的検索では小葉中心静脈周辺の出血、肝細胞索の解離と肺胞壁への脱落肝細胞による塞栓が観察された。生存例の肝組織で、限局性一塊状肝細胞壊死に加えて、単細胞壊死が中心静脈周辺に多発した。免疫組織染色では、出血領域に一致し、MC-LR陽性像が細胞質に加えて核でも顕著であり、特に核は染色陽性と陰性像が認められ、肺の塞栓物も陽性であった。二重染色では、抗MC抗体陽性顆粒状物にTunel法陽性の単細胞壊死を示す肝細胞が確認された。これらの知見から投与されたMC-LRは肝細胞に取り込まれ、肝細胞の解離を促すと共に、一部は核内に移行しアポトーシス様の細胞死を齎すと推測された。しかし、広範な壊死領域はMC-LR陰性であり、その発現機序との関連性は明らかでなかった。

○寺岡宏樹¹、横山 恵¹、丸山 豊¹、三木康宏¹、竹花一成²、
平賀武夫¹

酪農学園大・獣医・毒性¹、解剖²

ヘビ毒はコブラなどの神経毒とガラガラヘビなどの出血性毒に二分される。神経毒はニコチン受容体の阻害薬としての機序がよく知られているが、出血性毒の方は不明である。今回、ウシ大動脈由来の培養内皮細胞に対するガラガラヘビ毒 (RSV) の作用を検討した。

①RSV (Latoxan) は曝露後 6 - 8時間までに濃度依存性に ($1-3 \mu\text{g/ml}$)、エリスロシン B 染色陽性率と LDH 放出率を増加させた。この作用は血清の存在に関わらず発現した。

②RSV の作用は強い温度依存性を示し、 20°C 以下では大幅に低下した。RSV の 56°C , 30min 処置、強酸および強アルカリなどの前処置により、RSV の細胞毒性は殆ど失活した。

③蛋白合成阻害薬 (cycloheximide)、エンドヌクレアーゼ阻害薬 (フクシン酸)、細胞内外の Ca^{2+} 除去 (EGTA, BAPTA-AM)、プロテインキナーゼ C アクチベーター (PMA)、および cAMP 含量の増加 (forskolin + IBMX) はいずれも RSV による細胞毒性に影響を与えなかった。

④電顕観察より、RSV は比較的早期に核クロマチンを変化させ、最終的に核濃縮を起こした。

以上の成績は、ガラガラヘビ毒は細胞内 Ca^{2+} やプロテインキナーゼ C とは無関係の機序で、血管内皮細胞に強い毒性作用を持つことを示唆する。

田中 豊人

東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科

食品添加物の防かび剤であるイマザリルをマウスに混餌法により、0（対照群）、0.012、0.024、0.048 %、2世代にわたって自由摂取させ、繁殖及び次世代の機能と行動の発達に及ぼす影響について検討した。

〔方法〕各群雄雄各10匹のF₀マウスに5週齢から実験飼料を投与して、8週齢時にF₀マウスの行動量をANIMATE AT-420で測定した。9週齢時に雄雄を同居交配させてF₁マウスを得た。出生時に産仔数、一腹仔の重さ、新生仔の体重を測定し、出生時を0日齢として4、7、14、21日齢時に仔体重を測定した。行動発達の測定は、正向反射、背地走性、断崖回避、水泳試験、嗅覚性指向反応を授乳期に測定した。3週齢時にF₁マウスの行動量を測定し、4週齢時にF₁マウスを離乳し、各腹雄雄1匹ずつ選択し、継続して実験飼料を投与した。7週齢時に多様式T型水迷路試験を行ない、8週齢時に行動量の測定を行なった。

〔結果〕F₀マウスの8週齢時の行動量は、雄マウスにおいて高濃度投与群で増加した。出生時の測定項目には投与によると見られる影響は観察されなかった。授乳期間中の仔体重の増加は、授乳期間の初期に中高濃度投与群で抑制されたが、その後回復した。行動発達では、正向反射と水泳試験の頭角度が投与群で抑制された。

〔結論〕本実験における投与量では、イマザリルはマウスの行動発達に対して抑制的に作用することがわかった。

○高田幸一、内藤克司、内田雄幸、梅村隆志、黒川雄二、豊田和弘、畝山智香子、正田俊之、高橋道人

国立衛生試験所、病理、・毒性

〔目的〕食品添加物の毒性については主に単品として検討されているが、複合作用による影響については組み合わせが無限に存在することから、懸念されるほど十分に検討されていない。今回、我々は亜硝酸ナトリウム(NaNO_2)とアスコルビン酸ナトリウム(NaAsA)を併用した場合の毒性について検討した。

〔材料および方法〕5週齢Slc:Wistarラット雌雄各50匹を10群に分け、1群を対照群とし、2~4群には0.075%、0.15%、0.3%の NaNO_2 を単独に飲水投与し、5~7群には1%、2%、4%の NaASA を単独に混餌投与した。8~10群にはそれぞれ低、中、高用量どうしを併用投与し、6カ月間の慢性毒性試験を実施した。実験終了時に血液学的検査、血液生化学的検査、臓器重量および病理組織学的検査を行った。

〔結果および考察〕併用-高用量群では投与期間中の体重抑制、雌雄ともにTPの減少、BUNの増加、臓器重量では雌雄ともに腎臓の相対重量の有意の増加が認められた。また NaNO_2 投与群では血中メトヘモグロビン濃度が雌雄ともに用量相関性をもって増加したが、併用群ではその増加がごく僅かに抑制された。病理組織学的検査では雌雄ともに前胃における扁平上皮の過形成が認められ、0.3% NaNO_2 群で少数例に、併用-中用量群では全例にいずれも軽度にみられた。さらに併用-高用量群では中等度ないし高度の過形成が認められた。これらの変化は吉田ら¹⁾が0.3% NaNO_2 +1% NaASA の52週間投与により高頻度に乳頭腫をみとめるとの報告と一致しており、これらの変化を誘発する最小量は併用-中用量(0.15% NaNO_2 +2% NaASA)と考えられた。

¹⁾ Y. YOSHIDA et al.: Int. J. Cancer 56, 124-128 (1994)

Mihi Yang, Toshihiro Kawamoto, Yasushi Kodama

産業医科大学、衛生学教室

Some natural compounds show their chemopreventive effects through the inhibition or induction of cytochrome P450. The chemopreventive effects of green tea (GT) and red ginseng (RG) have been known. Polycyclic hydrocarbons or arylamines become carcinogenic after bioactivation by the metabolism of cytochrome P4501A (CYP1A). However, it is still obscure the chemopreventive mechanism of GT and RG. Focusing on the changes of CYP1A, we investigated the effects of GT and RG on hepatic and pulmonary CYP1A in mice (in vivo). As results, GT or RG inhibited the induced pulmonary CYP1A1 enzyme- and protein-levels by 3-methylcholanthrene. In liver, GT or RG inhibited the induced CYP1A enzyme-level. From these results, the fact that GT or RG inhibits the induced CYP1A-level, is suspected as one of the mechanisms which are related with the chemopreventive actions of GT and RG.

○久保山靖仁、鈴木一生、周藤勝一

協和発酵工業（株）安全性研究所

目的：Benzalkonium chloride(以下、BZC)は、強力な殺菌作用を有した第4級アンモニウム塩である。BZCは一般に殺菌剤や消毒剤として使用されるほか、点眼薬や軟膏など外用剤の保存剤としても使用されている。その一方で、BZCの一次刺激性による結膜炎や皮膚炎の障害例も多い。このことから、点鼻薬に含有されるBZCも鼻腔粘膜に対して障害を与える可能性が考えられる。そこで、BZCの鼻腔粘膜に及ぼす影響をラットを用いて検討した。

方法：7週齢のWistar系ラットに対して、外鼻孔よりマイクロピペットを用いて0.01, 0.05, 0.10 W/V%のBZC水溶液を左側鼻腔内に投与した。投与期間は1日、投与頻度は1時間毎の8回/日、投与容量は20 μ l/回とし、投与翌日に解剖した。鼻腔の病理組織学的検査は長野らの方法に従い、切歯の後端部（レベル1）、切歯乳頭部（レベル2）および第一臼歯の前端部（レベル3）の3断面を切り出し後に、HE標本を作製し光学顕微鏡下で観察した。

結果および考察：0.01 W/V%BZCのレベル1、レベル2およびレベル3において病理組織学的変化は認められなかった。しかし、0.05 W/V%BZCおよび0.10 W/V%BZCのレベル1およびレベル2においては呼吸上皮の剥離や浮腫などの刺激性を示唆する病理組織学的変化が認められた。これらのことから、BZCは0.05 W/V%以上の濃度になると鼻腔粘膜に対して障害を与えることが示唆された。

辻 良三、花井幸次、磯部直彦、薮崎義康*、川崎 一

住友化学 生物環境科学研究所、*生命工学研究所

【目的】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を有することが報告されている。この作用はペントバルビタール代謝阻害によると考えられるが、ラットにおいては認められない。今回、種差についてさらなる検討を実施したので報告する。

【方法】動物にempenthrin(0, 100, 300mg/kg)を経口投与し、その2時間後にペントバルビタール(25~45mg/kg)腹腔内投与による睡眠時間を測定した。イヌにはempenthrin(1g/kg)経口投与の2時間後にペントバルビタール(50mg/kg)を静脈内投与し、経時的にペントバルビタール血中濃度を測定した。インビトロ代謝実験では、肝ミクロゾームおよびヒトP-450分子種発現酵母ミクロゾームにおけるペントバルビタール代謝に対するempenthrin(0~20 μ M)の阻害作用について検討した。

【結果および考察】マウスにおいてはempenthrinによる睡眠時間の延長が認められたが、ラット、モルモットおよびハムスターでは延長は認められなかった。イヌにおけるペントバルビタール血中濃度の推移に対してempenthrinは無影響であった。肝ミクロゾームを用いたペントバルビタールのインビトロ代謝実験において、empenthrinはマウスでペントバルビタールの水酸化を競合的に阻害したが、ラット、モルモット、ハムスターおよびウサギでは阻害しなかった。各種ヒトP-450分子種を発現させた酵母のミクロゾームを用いた検討においては、ペントバルビタール代謝に関与する分子種でempenthrinによる阻害は認められなかった。以上の結果から、empenthrinはマウスにおいてペントバルビタール代謝を阻害することにより睡眠時間を延長するが、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、イヌおよびヒトにおいては代謝阻害は認められず、マウスに特異的であると考えられた。

P 26 副腎皮質ホルモン長期投与によるラット膵ラ氏島への影響

○古川文夫、西川秋佳、今沢孝喜、李 仁善、笠原健一郎
池崎信一郎、田中丸善洋、金 亨津、高橋道人

国立衛生試験所 病理部

【目的】 ヒトで蛋白同化ホルモンと副腎皮質ホルモン治療を施された際に、膵ラ氏島が大型化することを報告した。このような膵臓の変化がラットにおいても発生するのか否か、そのメカニズムを解明する目的で実験を行った。

【実験方法】 実験は8週齢の雄F344ラット30匹を2群に分け、第一群(20匹)には2.5 mg/kg cortisol acetate (CA)を生理食塩水に溶解後、週1回、背部皮下に、第二群(10匹)には生食のみを同様に76週間投与した。実験は76週後に屠殺・剖検し、膵臓を中心に病理組織学的に検索した。また、空腹時血糖も測定した。

【結果】 実験終了時の体重は、一群で446.1 g、第二群で458.2 gであった。血糖は第一群で168.1 mg/dl、第二群で166.7 mg/dlであり、体重および血糖とも両群間に差は認められなかった。膵の病理組織学的検索の結果、ラ氏島の腺腫および過形成が第二群に比し第一群で増加傾向が、同様に第一群でラ氏島は大型化する傾向がみられた。そのラ氏島の形態は第二群で円形～楕円形を示すのに対して、第一群では不整形のラ氏島が増加し、円形度の低下が認められた。

【考察】 CA投与により膵のラ氏島が大型化し、腺腫や過形成の発生が増加する傾向が示された。増殖細胞の多くはその分布からinsulin陽性細胞であった。副腎皮質ホルモンが膵の内分泌細胞に影響を与えたと考えられた。今回の成績は、切除膵にcortisone、growth hormone、glucagonなどを投与するとラ氏島におけるinsulin陽性細胞の増殖活性が高くなるとの報告に関連が深いものと思われる。

防かび剤 N-(Fluorodichloromethylthio)phthalimideの
ラット鼻腔粘膜および鼻咽頭管上皮への刺激作用

○松島裕子¹，内藤克司¹，斉藤 実¹，五十嵐良明³
津田充宥²，川崎 靖¹，鈴木幸子¹，金子豊蔵¹，井上 達¹

国立衛生試験所・¹毒性部・²薬理部・³療品部

N-(Fluorodichloromethylthio)phthalimide (以下fluor-folpet)は防かび剤，殺菌塗料剤，殺藻剤として広く用いられている。ラットに28日間反復強制経口投与した結果，腎尿細管上皮，乳頭管および集合管上皮に空胞変性，前胃上皮に過形成がみられた。更に，投与期間中，継続して鼻音を発する動物，呼吸困難の症状を呈し死亡する動物が多発したが，気管，肺に剖検および病理組織学的検査で異常はみられず，原因が不明であった。この呼吸器系障害の原因を精査するため，10日間の反復経口投与を実施し，呼吸困難のみられた動物は速やかに屠殺剖検し，鼻腔，鼻咽頭管，咽頭，気管および肺の病理組織学的検査を行った。その結果，気管および肺に異常はみられなかったが，鼻腔上皮の空胞変性，剥離，分泌液の貯留，鼻咽頭管上皮の剥離，分泌液の貯留，粘膜下組織への炎症細胞浸潤等，顕著な急性障害がみられた。更に，この急性障害はfluor-folpetの直接影響によるものか，あるいは，その代謝産物によるものかを検討するために，単回点鼻投与と単回腹腔内投与を実施した。点鼻投与では，投与直後に呼吸困難を発症し，病理組織学的には，鼻腔上皮の剥離，分泌液貯留がみられた。腹腔内投与では，呼吸困難を起こす動物はみられず，鼻腔に病理組織学的な異常はみられなかったが，繊維索性癒着を伴う腹膜炎がみられた。更に，fluor-folpetは，ニュートラルレッドによる細胞障害度試験で，土屋らの評価基準により「強い細胞毒性」に分類された。以上により，fluor-folpetは，強い刺激性物質であることが明らかとなったが，in vitroとの評価と組織学的所見がよく平行している点に注目された。

○ 寺西宗広, 佐藤里子, 五十嵐 功, 松本悦嗣, 矢本 敬, 真鍋 淳

(三共・安全性研究所)

β -Aminopropionitrile (BAPN) および aminoacetonitrile (AAN) は骨ラシリズム (osteolathyrism) と称される骨の変化を成長期の動物に誘発する lathyrogen として知られている。この骨ラシリズムはコラーゲンの分子架橋に必要な lysyl oxidase を lathyrogen が阻害することにより発症すると考えられている。しかし、lathyrogen による骨の変化の回復性に関する詳細な報告はない。そこで、若齢ラットに BAPN, AAN を投与し、休薬による骨変化の回復性について調べた。

[材料および方法]

被験物質: BAPN (β -aminopropionitrile free base; 東京化成)

AAN (aminoacetonitrile sulfate; 東京化成)

溶媒対照 (生理食塩液; 大塚製薬)

実験動物: F344/DuCrj ラット (雄, 5-6 週齢; 日本チャールスリバー)

投与用量・投与方法: 皮下投与 (背部)

BAPN 350, 700 mg/kg/day, AAN 75, 150 mg/kg/day

<投与期間・群構成>

動物数 (匹)	試験期間			
	7 日	14 日	7 日+休薬 7 日	7 日+休薬 14 日
各群	4	4	3	3

体重, 摂餌量: 試験前と試験期間中週 2 回, 個体別に測定。

血液生化学的検査: 各試験終了時にエーテル麻酔下で腹大動脈より血液を採取。
測定項目 - GOT, GPT, ALP, T.BIL, GLU, T.CHOL, GLU, T.PRO, ALB, A/G, UN,
CRE, Ca, IP, K, Na, Cl病理学的検査: 上腕骨, 尺骨, 大腿骨, 脛骨, 胸椎を中心に検索。常法に従い
光顕標本 (HE 染色その他) を作製し観察。統計処理: 体重, 摂餌量, 血液生化学検査値について, F 検定 ($p < 0.05$) および t
検定 ($p < 0.05$, $p < 0.01$) を実施。

[結果および考察]

AAN 75 mg/kg 群を除き, BAPN, AAN の各投与群で投与期間中に用量依存性の
体重減少・増加抑制を認めた。なお, これらの変化は休薬期間終了時までには回
復あるいはその傾向を示した。血液生化学的検査では BAPN, AAN の毒性を示唆
する変化は認められなかった。

BAPN, AAN の投与に起因した肉眼的異常は骨の外骨症 (exostosis) であり, BAPN
350 mg/kg の 7 日投与後 14 日休薬を除く全ての BAPN, AAN 投与群で認められた。
組織学的には AAN, BAPN の 7, 14 日投与後に, 外方性の骨膜下骨新生である外骨
症と柱状配列の乱れを伴う成長板軟骨層の拡大が認められ, これらの程度は用
量と投与期間に依存した。また, これらの変化は休薬 7, 14 日後に軽減ある
いは回復することが確認された。

以上より, BAPN, AAN で誘発される外骨症および成長板軟骨層の拡大は可逆性
であることが示唆された。休薬により外骨症が軽減した一因として, モデリン
グ/リモデリングにより骨が整形された可能性が考えられる。

○松末公彦、井上晴美、石井祐次、有吉範高、小栗一太

九大・薬

【目的】多塩素化芳香族化合物による脂質代謝異常は、ヒトを含め広く動物種に認められる毒性の一つである。我々は、すでに3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PenCB) 処理ラットにおいて、肝臓全体の脂肪酸組成が著しく変動していることを報告した。すなわち、PenCB 処理肝の脂肪酸組成は、アラキドン酸、リノール酸、オレイン酸など不飽和脂肪酸において顕著な変動が認められた。リン脂質における不飽和脂肪酸の割合は、膜の性質に大きく影響する。また、プロスタグランジンなどの各エイコサノイドは、リン脂質中のアラキドン酸より生成されることが知られている。そこで本研究は、膜の主成分であるグリセロリン脂質 (GLP) 中の脂肪酸組成が PenCB 処理により変動するか否かについて明らかにすることを目的とした。【方法】Wistar 系雄性ラットを free-fed control 群 (corn oil)、pair-fed control 群 (corn oil) および PenCB 処理群 (25 mg/kg) の3群に分けた。投与5日後の肝ホモジネートから全脂質を抽出し、TLCにてホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、ならびにホスファチジルセリンを分離した。各GLP分画は、ケン化し、得られた脂肪酸を、HPLCにて分離定量した。【結果】個々のGLP分画において脂肪酸組成のプロフィールに違いはあるものの、いずれのGLP分画においてもPenCB処理によるアラキドン酸の割合に有意な低下が認められた。逆にリノール酸の割合に、有意な上昇が認められた。【考察】PenCBは、ラット肝GLP中の脂肪酸組成に変動をもたらすことが明らかになった。特にPenCB処理によりその割合が低下するアラキドン酸は、多彩な生理活性を示すエイコサノイドの前駆体であるためPenCBの毒性を考える上で興味深い。すなわち、PenCB処理によりエイコサノイド生合成が攪乱される可能性がある。また、アラキドン酸生合成のfirst stepであるリノール酸から γ -リノレン酸の生成は、小胞体に局在する $\Delta 6$ desaturaseによって触媒される。本研究では、PenCB処理によりGLP中のアラキドン酸の割合の減少に加え、リノール酸の上昇が認められた。このことは、既に報告した肝臓全体の結果と共にアラキドン酸減少のメカニズムとして、PenCB処理により $\Delta 6$ desaturase 活性の減少が引き起こされている可能性を示唆している。

多発性硬化症マーマセットモデルの 磁気共鳴画像解析および病理組織学的検索

○石原 山美、佐藤 伸、井原 真哉、赤井 哲夫、藪内 文恵、
辻 孝司、影山 明彦、山口 基徳、矢ヶ崎 修、桑村 充¹⁾、
佐久間 貞重¹⁾

日本シエーリング(株)・研究部、大阪府立大学・農学部¹⁾

【目的】多発性硬化症(MS)は、脳および脊髄白質部の血管周囲への炎症細胞の浸潤、脱髄およびグリオシスなどを主な病理学的特徴とし、運動障害、感覚異常、視覚障害などを臨床症状とする難治性の中枢性脱髄疾患である。その診断基準のひとつとして、磁気共鳴画像(MRI)が用いられているが、MRIによるMS病変の経時的な観察およびMRI画像と病理組織所見との関連は十分に検討されていない。そこで、本研究ではコモンマーマセットを用いてMSモデルを作製し、MRIによって経時的に病変を観察すると共に、得られたMRI画像と病理組織像について比較検討した。

【方法】モデルの作製：雌雄各2匹のコモンマーマセット(2~3年齢、360~440g)にFCAを添加したヒト白質ホモジネート(HWM)を皮内投与し、感作当日および2日後に百日咳ワクチンを静脈内投与した。一般症状：感作後3~4日ごとに体重測定および神経症状の観察を行った。MRI：感作後2週ごとにMRI装置(GE社製)を用いて、T1およびT2強調画像、造影剤(Magnevist[®];0.3 mmol/kg)投与下のT1強調画像(造影T1強調画像)を撮影し、脳内病変の数および面積を計測した。病理組織学的検索：MRI最終撮影後、脳を摘出し、常法で得た切片に、HE染色、Luxol Fast Blue染色およびGlial fibrillary acidic protein免疫染色を施した。

【結果】一般症状：感作7日より握力および筋緊張の低下、四肢の感覚麻痺、刺激時の運動性の低下等の神経症状が発現した。その後症状は悪化し、2例では寛解が認められた。体重は、神経症状の悪化と共に徐々に減少するが、寛解期にはわずかながら増加も認められた。

MRI：造影T1強調画像およびT2強調画像では、感作4週より脳白質部に異常信号領域が検出されはじめた。感作6~8週の造影T1およびT2強調画像では、4週後に検出された病変に加え病変数の増加および病変部の拡大が認められた。これらの病変のうち一部は、6週よりT1強調画像でも検出された。造影T1強調画像における経時的病変数および拡大病変総数の変化は、いずれも神経症状の変化とほぼ一致していた。

病理検索：脳白質の血管周囲にリンパ球、形質細胞、ミクログリアなどの炎症性細胞の浸潤、脱髄が認められた。造影T1強調画像でのみ異常信号が検出された領域では、活性化したアストロサイトが多数認められたが、炎症性細胞の浸潤は軽度であり、脱髄はほとんど認められなかった。一方、前述のいずれのMRI強調画像においても異常信号が検出された領域では、著しい炎症性細胞の浸潤および脱髄が認められ、一部病変の中心部にグリオシスが認められた。

【結語】MRI画像で異常信号が検出された領域と対応した部位に、MS病変の特徴を示す組織像が確認された。従って、各MRI像の解析により病変部に起きている障害を推定しうる事が示唆された。

肝硬変モデルラットにおける肝特異性MRI造影剤の
肝での動態と安全性に関する検討

○佐藤 伸、井原 真哉、辻本 太一、橋元 律子、加藤 直樹、矢ヶ崎 修、
山口 基徳、山手 丈至¹⁾、佐久間 貞重¹⁾

日本シエーリング株式会社・研究部、大阪府立大・農学部¹⁾

【目的】磁気共鳴画像(MRI)造影剤マグネタイトは、超常磁性酸化鉄コロイド製剤であり、肝細胞内皮系細胞に取り込まれることによりコントラストをつけ、肝腫瘍部の検出に寄与する。一般に、原発性の肝腫瘍は肝硬変を併発していることが知られているが、肝硬変におけるマグネタイトの肝への影響は明らかではない。一方、前臨床試験における安全性の検討は主に健康動物を用いて行われていて、疾患動物における知見は少ない。本研究では、肝硬変モデルラットにおけるマグネタイトの肝での動態と安全性について検討した。

【方法】SD系雌ラット(4週齢)に0.03%チオアセトアミド(TAA)水を4あるいは12週間連続投与し肝線維化を誘発させ、肝硬変モデルを作製した。肝での動態 (1)MRI装置を用いた *in vivo* 試験；マグネタイト(10 $\mu\text{mol Fe/kg}$)を単回静脈内投与後、直ちに4.7T動物用装置(Omega, CSI-II, BRUKER)を用いて、肝の信号強度(Relative signal intensity; RSI)を経時的に測定した。(2)肝灌流系試験；Krebs-Henseleit bicarbonate buffer(95%O₂/5%CO₂, pH 7.4, 32°C)で灌流し、次いでマグネタイト(1 $\mu\text{mol Fe/ml}$)を注入した。経時的に流出液を採取し、ICP-AESを用いてFe濃度を測定した。血液生化学・組織学的検査 肝硬変ラットに100 $\mu\text{mol Fe/kg}$ のマグネタイトまたは生理食塩水を投与後、4、24および48時間ごとに屠殺し、血漿中GOT、GPT、ALP、ChEおよび総ビリルビン(T-Bil)を測定した。さらに、常法に従い肝の切片を作製し、H.EおよびAzan染色を施した。

【結果および考察】肝での動態 TAA処置ラットでは、RSIの減少程度は無処置ラットに比して小さかった。また、12週間処置ラットのRSI減少程度は4週間処置に比べてより小さかった。これらは、マグネタイトの肝への取り込みが肝線維化により低下することを示している。灌流肝でも12週間TAA処置ラットのFeの取り込みは、無処置ラットに比べて低下していた。血液生化学・組織学的検査 12週間TAA処置ラットにマグネタイトを投与したところ、TAA処置-生理食塩水投与群と比して48時間後の血漿GOTレベル(59 \pm 9 vs 42 \pm 8 U/L, $p < 0.01$)およびGPTレベル(34 \pm 6 vs 24 \pm 5 U/L, $p < 0.01$)は上昇したが、ALP、ChE、T-Bilレベルには変化がなかった。また、肝組織像は両群ともに同様な変化を示していた。4週間処置では、いずれの検査においてもTAA処置-生理食塩水投与群と同様であった。

【結論】肝硬変ラットの場合、マグネタイトの取り込みは正常ラットに比して低下するが、十分な造影効果は得られることが明らかになった。また、十分な造影効果が得られる量の10倍の投与量でも、肝障害をほとんど悪化させないと考えられた。

○篠原洋子、小林明子、佐藤哲男、千葉 寛、上野光一

千葉大・薬

【目的】我々は昨年の本会学術年会において、肝実質細胞(PC)と非実質細胞(NPC)より構成されるラット肝細胞スフェロイドを用い、エンドトキシン誘発劇症肝炎モデルの作製ができることを明らかにし、活性化されたKupffer細胞がスフェロイド中で放出するCINC-1/gro/KC(IL-8)などの細胞障害性サイトカインが肝細胞障害に関与することを報告した。今回、さらにNOの関与も含め本肝障害発現機構の解明を試みたので報告する。

【方法】9週令のSD系雄性ラットに*Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) 1mg静注4日後に、コラゲナーゼ灌流法および遠心分離法によりPCとNPCを単離した。PCとNPCを1:1の比率で培養ボトルに播種し24時間回転培養してスフェロイドを作成した。培地交換に続いてLPS10mg/ml培地中に暴露し、48時間培養後培地中逸脱酵素活性値を測定することで肝障害性を定量的に評価した。さらに、LPS暴露2時間前に培地中にセリンプロテアーゼ阻害剤フェニルメタンスルフォニルフロリド(PMSF)を添加し、肝障害抑制効果を検討した。一方、スフェロイド培地中のNO₂量はGriess法により定量し、IL-1活性はC3Hマウスの胸腺細胞を用いたバイオアッセイにより、TNF- α およびIL-8量はELISA法により測定した。また、培地中のIL-8による好中球遊走活性を改良型Boyden chamberを用いて検討した。

【結果および考察】LPS暴露後の著しい培地中逸脱酵素活性値の上昇はPMSFの培地中添加により有意に抑制され、*P. acnes*とLPSの二段階活性化機構によりKupffer細胞などの肝内マクロファージ中でセリンプロテアーゼ活性が亢進していることが分かった。また、本モデルにおいてNO産生が確認されたが、NO産生阻害薬前処置でNO産生は抑制されたが、肝障害の抑制は見られなかった。一方、本*in vitro*肝炎モデルにおいてLPS暴露後経時的な培地中サイトカイン定量から、IL-1-TNF- α -IL-8系などの*in vivo*と同様なサイトカインネットワークの構築が示唆された。さらに、LPS添加後の培地には好中球遊走活性も認められ、これらは*in vivo*での知見と一致した結果であり、本結果は*in vitro*で肝障害発現機構を解明する材料としてのスフェロイドの有用性を示す重要な知見と考える。

萩原昭裕¹、小久保百合子¹、田中 光¹、玉野静光¹
曾我立巳¹、広瀬雅雄²、白井智之²、伊東信行³

¹ 大雄会医科学研究所、² 名市大・医・1 病理、³ 名市大

【目的】いくつかのフェノール系化合物は、ラット肝中期発癌性試験法において、発癌抑制作用を示す事が知られている。一方、F344系ラットを用いた通常の発癌性試験では自然発生肝細胞腫瘍の発生頻度が低いため、発癌抑制作用の検討は不可能である。そこで、過去に実施した発癌試験における肝臓について、免疫組織学的に前癌病変の定量的解析を行いその相関性を検討した。

【方法】6週齢のF344系雄ラットを用いた caffeic acid(2%), sesamol(2%), hydroquinone(0.8%), catechol(0.8%), 4-methoxyphenol(2%)の5つの化合物の発癌性試験における、肝臓のパラフィン包埋ブロックを再薄切し、免疫組織学的に胎盤型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、画像処理装置を用いて測定し、各々の対照群と比較検討した。更に、今回得られた結果と肝中期発癌性試験法の結果とを比較検討した。なお、肝中期発癌性試験法では上記化合物をそれぞれ1, 0.5, 2, 1, 2%の飼料中濃度で投与している。

【結果】長期発癌性試験における各物質の肝におけるGST-P 陽性細胞巢の単位面積当たりの数および面積を各対照群値との比率で表すと、caffeic acidではそれぞれ53および58%, sesamol では52, 55%, hydroquinoneでは82, 73%, catecholでは66, 186%, 4-methoxyphenol では58, 51%と有意に抑制されており肝中期発癌性試験法の結果とほぼ一致した。

【結論】肝中期発癌性試験で発癌抑制作用を示した5種のフェノール系化合物は、2年間の発癌性試験においても自然発生性前癌病変の発生を抑制しており、発癌性試験においても肝発癌抑制作用の検討が可能である。

N-Nitrosopyrrolidine 誘発ラット cholangiofibrosis に対する MESNA の抑制効果

○西川秋佳・古川文夫・今沢孝喜・池崎信一郎・
田中丸善洋・李仁善・金亨津・笠原健一郎・高橋道人

国立衛生試験所 病理部

【目的】ラット肝における cholangiofibrosis は、異型を伴う強い胆管の増殖と線維増生により特徴づけられ、*N*-nitrosopyrrolidine(NPYR)などの肝毒性物質による慢性障害として誘発される。今回、合成チオールの一つである 2-mercaptoethane sulfonate (MESNA)を NPYR と併用投与することにより、cholangiofibrosis の発生に及ぼす影響について検討した。

【方法】8週齢の F344 雄ラット 90 匹を 3 群に分け、第 1 群(30 匹)には生理食塩水に溶解した NPYR(72mg/kg)及び MESNA(80mg/kg)を週 3 回 14 週間にわたって強制経口投与した。第 2 群(20 匹)及び第 3 群(20 匹)にはそれぞれ NPYR のみ及び MESNA のみを同様に投与した。対照群(20 匹)には生食水のみを投与した。投与終了翌日に全動物を剖検し、肝を中心に病理組織学的に検索した。肝は左葉、中間葉(左・右)、右葉(頭・尾部)および尾状葉(頭・尾部)の 7 切片を組織標本とした。

【結果】実験期間中に死亡動物はみられなかったが、最終体重は第 1 群と第 2 群が第 4 群に比して有意な低値を示した。しかし、相対肝重量は第 1 群と第 2 群の間に有意差はなかった。cholangiofibrosis は第 1 群と第 2 群の全例に観察されたが、第 3 群と第 4 群には認められなかった。部位的には、左葉>尾状葉>右葉の順に発現頻度が高く、その程度も強い傾向がみられた。高度の病変では、腺腫と組織学的に鑑別困難な異型的胆管増生も認められた。第 1 群は第 2 群に比し、いずれの部位においても cholangiofibrosis の程度が軽度であった。【まとめ】MESNA は NPYR 誘発によるラット cholangiofibrosis の発生に対し抑制的に作用した。

2-Nitropropaneの肝毒性における酸化ストレスの
関与：過酸化脂質の生成及び緑茶による抑制効果○佐井君江, 甲斐幸恵*, 梅村隆志, 長谷川隆一, 谷村顕雄*,
黒川雄二, 井上達

国立衛生試験所・毒性部, *昭和女子大学・生活機構研究科

【目的】肝障害性を有する2-nitropropane(2-NP)をラットに単回腹腔内投与すると、肝毒性の発現とともに肝過酸化脂質レベルが上昇し、また種々の抗酸化成分を含む緑茶の前投与によりこれらの変化が有効に抑制されることから、この毒性発現機序には酸化ストレスが関与すると推測される。本実験では、さらに長期間投与による2-NPの肝毒性発現と酸化ストレスの関わりを調べるため、2-NPの2週間の間欠経口投与を行い、肝毒性と脂質過酸化の関連及びそれらに対する緑茶の抑制作用を検討した。

【実験方法】ラット(F344, 雄, 5週齢)に2%緑茶浸出液を1週間飲水で前投与し、その後も緑茶投与を併行して2-NPの60mg/kg/dayまたは120mg/kg/dayを週3回2週間(計6回)強制経口投与した。最終投与の4時間後に採血及び肝を摘出し、血清中のGOT、GPT活性及びトリグリセライドレベル、肝の過酸化脂質およびグリコーゲンレベルの測定、ならびに肝の病理組織学的検索を行った。

【結果】2-NP投与により血清GOT、GPT活性は肝過酸化脂質レベルとともに投与量依存的に上昇し、緑茶の飲水投与はこれらの変化をコントロールレベルまで有意に抑制した。また肝グリコーゲン及び血清トリグリセライドレベルは投与量依存的に減少し、緑茶はこれらの減少も有意に抑制した。病理組織学的検索の結果、2-NP高用量群では肝全体にわたり肝細胞の著しい腫脹とともに変性壊死した肝細胞も散見された。これらに対し緑茶投与はその程度を明らかに軽減した。以上のように、2-NPの肝毒性の発現と肝脂質過酸化との関連性及びこれらに対する緑茶の抑制効果が認められたことから、2-NPの肝毒性発現に酸化ストレスが重要である可能性が示唆された。

三共(株) 安全性研究所

○五十嵐功, 渡辺稔之, 古川忠司, 山下和男, 田中宏治, 瀬畑信哉, 大橋芳彦, 矢本敬, 木村邦男, 真鍋淳

【目的】サポニン的一种である α -hederin はチトクローム P450(P450) に対する阻害作用を有する。しかし、その作用は *in vitro* の実験および本化合物をマウスに短期間投与した実験で確認されているに過ぎない。本実験では、ラットでの阻害作用を検討すると共にこの作用が持続した際の肝臓の応答を調べた。

【材料および方法】F344 ラット(8 週齢, 雄)に α -hederin の 10 μ mol/kg あるいは溶媒対照として 2% Tween80 生理食塩液を 1, 3, 7, 14 および 21 日間連続皮下投与した。投与終了後に血液生化学的検査を実施すると共に、肝臓を摘出し、肝臓中 P450 含量および 7-methoxycoumarin O-demethylase(MCD), 7-ethoxycoumarin O-deethylase (ECD), 7-propoxycoumarin O-depropylase(PCD)活性あるいは UDP-glucuronosyltransferase(UDPGT)および glutathione S-transferase(GST)活性をそれぞれ生化学的に測定した。また、CYP2B1/2, 2C6, 2E1, 3A2, 4A1 の免疫プロットティングおよび肝臓の病理組織学的検査を実施した。

【結果および考察】MCD, ECD, PCD 活性は、いずれも 1 日から 7 日間投与にかけて低下し、14 および 21 日間投与でもその状態が継続した。UDPGT および GST 活性は、いずれの投与期間でも変化しなかった。したがって、反復投与によっても本化合物は P450 に対する選択的な阻害作用を発揮した。しかし、血液生化学的検査と病理組織学的検査に著変はなく、P450 の持続的な阻害が肝毒性に結びつくことはなかった。一方、P450 含量は本化合物の 1 日投与において最も減少し、投与期間の延長と共に増加回復する傾向を示した。免疫プロットティングで確認した各 P450 蛋白量も、この変化と同様に変動した。これらの結果は、持続的な P450 阻害に対して P450 合成が促進したこと、いわゆる生体の適応反応が出現したことを示唆する。

金津赫生 諏訪浩一 望月雅裕

筑波大医療技術短大 ポゾリサーチセンター

ラットおよびマウスの赤血球は生理的条件下 (pH 7.40 , 37°C 等張溶液中) で容易に分断を起こして溶血する。一方、ヒト赤血球は比較的安定であるが、アセチルフェニルヒドラジンを加えてレドックス反応を起こすとげっ歯類赤血球と同様活発な分断を生じる。この場合、2時間以上経過するとレドックス反応を起こさない対照赤血球においてもわずかながら分断がみられたことから、脱カルシウムの先行が分断に不可欠ではないかとの仮説を立て以下の実験を行った。〔方法〕健康人静脈血をクエン酸塩処理採血し、クエン酸塩溶液で3回洗浄後、赤血球沈渣を、EGTA (0, 1, 3, 10 mM) を加えたトリスHCl 緩衝食塩液 (pH 7.40 280 mOsm/kg) に1%に浮遊させ、37°Cにふ置した。経時的にその一部を別の試験管にとり、遠心後、沈渣に1 mM CaCl₂ 加トリスHCl 緩衝食塩液を同量加えて再浮遊させ、スライドガラスにとり、カバーガラスを掛けて光学顕微鏡で観察した。〔結果〕EGTA 1 mM 以下の前ふ置では著変が見られなかったが、EGTA 3 mM 溶液に15分、前ふ置しカルシウムを再加30分後には著明な分断が見られた。EGTA 10 mMでは遠心後赤血球の凝集が見られた。〔結語〕これまでの知見を総合すると、赤血球の分断にはカルシウムの除去相の先行が不可欠であり、続いてカルシウムの流入ないし動員が起こると分断に至るものと思われる。レドックス反応などはカルシウム流入ないし動員に関与するものと思われる。分断・溶血に見られる種差がカルシウム除去-再流入/動員のいずれの相に存在するかは今後の検討課題である。

今井良悦、今若実穂、杉本眞次、渡辺武志、西条武俊

武田薬品工業株式会社・薬剤安全性研究所

F344 ラットは加齢に伴い網膜が障害され、機能的にも抑制されることは第 22 回本学会で報告した。今回は加齢性の変化と光障害による変化の違いを明らかにすることを目的として、26-30 週齢の F344 ラットを恒常明の条件下（1200-1500 lx）で 7 あるいは 14 日間飼育したときの網膜について電気生理学および病理組織学的に調べた。

1. 眼底観察では光障害により眼底色の蒼白化がみられ、網膜電図（ERG）および視覚誘発電位（VEP）は著明に抑制された。
2. 病理組織学的には杆・錐状体層および外顆粒層の萎縮がみられ、この変化は加齢性の変化と異なり網膜周辺部に比べ中心部で顕著であった。免疫染色の結果、抗 S-100 抗体陽性細胞には変化がみられず、抗グリア線維性酸性蛋白（GFAP）抗体陽性の線維の出現が観察された。一方、外顆粒層に Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling（TUNEL）染色陽性の核が散見された。
3. 以上の結果から、光障害による網膜障害は加齢性の網膜障害に類似しているものの障害される部位に違いがあることが明らかとなった。また、その過程にアポトーシスが関与している可能性が示唆された。

フッ化ピリミジン系制癌剤のラット皮膚障害に対する
ビタミンB₆の軽減効果

○山口修司、岡田浩史、箱井加津男、林修次、入村兼司

大鵬薬品工業(株) 製薬センター 安全性研究所

フッ化ピリミジン系制癌剤は、ラット反復投与により皮膚炎、表皮の角化亢進などの皮膚障害を発現させることが知られている。またビタミンB₆ (VB₆)は、その欠乏がラットに同様の皮膚炎を発生させる一方、VB₆投与が制癌剤の皮膚障害を抑制する報告もある。今回、新規開発中のフッ化ピリミジン系制癌剤である S-1のラット反復投与時に VB₆を併用投与し、発現した皮膚障害に対する VB₆の効果を検討した。

【材料および方法】6週齢の Crj:CD(SD)ラット 30匹を用い、S-1を 15 mg/kgの用量で8週間反復経口投与した。また、VB₆ (塩酸ピリドキシン)は 0.1 ~ 1.0%の濃度で飲料水に混じ、連日自由摂取させた。群構成は S-1単独投与群、S-1と VB₆併用投与群および VB₆単独投与群の3群とし、各群の動物数は10匹とした。全動物は投与終了後屠殺し、手掌、足底および尾部の皮膚について病理組織学的検査を行い、各群を比較した。

【結果】S-1投与群では、投与2週以降に手掌、足底および尾部の表皮に角化および落屑が観察され始め、その後、腫脹や角化部の亀裂による出血などが認められた。病理組織学的には、角化層および有棘層の肥厚、基底細胞の壊死・変性、表皮下の浮腫・毛細血管拡張・炎症性細胞浸潤、皮脂腺の萎縮・減少などの諸変化が認められた。VB₆の併用により、上記諸変化はいずれも程度あるいは分布が著明に減少した。VB₆単独投与群では皮膚障害は認められなかった。

【結論】VB₆はフッ化ピリミジン系制癌剤である S-1のラット皮膚障害に対して軽減作用を有することが明らかとなった。

○鈴木雅実^{1,2}, 坂牧義之¹, 三好昌夫¹, 足立健児¹,
宇佐美正義¹, 中山裕之², 土井邦雄²

¹中外製薬・安全研, ²東大・農・獣医病理

【目的】 Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) は、主に顆粒球系に作用する造血因子である。先に我々は、recombinant human G-CSF (rG-CSF) を成長期ラットへ大量(ヒト臨床用量の50~500倍相当)反復投与することにより、末梢血白血球数の増加など造血系の変化に加え、骨組織に変化が認められることを報告した(第83回日本病理学会, 第11回日本毒性病理学会)。今回、rG-CSF大量投与ラット骨変化に対する週齢の影響を病理組織学的に検討した。

【材料および方法】 6ならびに14週齢のSD系雄ラットにrG-CSFの100, 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (臨床用量の50~500倍相当)を28日間反復静脈内投与した。剖検後、大腿骨~趾骨を20%中性緩衝ホルマリン固定し、EDTA脱灰を施した後、常法に従いHE染色標本を作製した。

【結果および考察】 6週齢ラットでは、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の2/10例、1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の8/10例に骨の変化が認められ、病変は骨幹端ならびに骨端の海綿骨および骨幹の皮質骨骨内膜部にみられた。14週齢ラットでは、1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の6/10例にのみ変化が認められ、病変は骨幹端の海綿骨のみに限局してみられた。また、病変の程度を病理組織学的に比較した結果、6週齢群が14週齢群より高値を示した。組織学的に病変は、破骨細胞性骨吸収の亢進像と膜内骨化による骨形成像より構成されており、組織像に週齢による差異はみられなかった。

以上、rG-CSFの大量投与により骨吸収ならびに骨形成を特徴とする骨病変が週齢に関係なく認められるが、成長期ラットは成熟ラットに比べ病変が形成されやすく、週齢(成長)に伴う骨の生理的状態が病変発現に関与するものと考えられた。

○竹川潔¹⁾、三森国敏¹⁾、小野寺博志¹⁾、高橋正一²⁾、
下武男¹⁾、安原加壽雄¹⁾、高橋道人¹⁾

¹⁾ 国立衛試・病理, ²⁾ 佐々木研・病理

【目的】抗甲状腺物質sulfadimethoxine (SDM) は甲状腺ホルモンの合成阻害によって下垂体からのTSH分泌を亢進させることが知られている。しかし、我々の行った二段階発癌実験では、血中TSH値はSDM投与開始後8週でピークに達し、以後徐々に低下する成績が得られたが、このような現象を下垂体TSH細胞における形態から証明した報告はない。今回は、下垂体におけるTSH細胞面積を形態計測し、血中TSH値との相関性を検討した。

【方法】6週齢の雄性F344/DuCrjラットにN-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine(DHPN) 2800mg/kgを一回皮下投与し、1週間後より0.1% SDMを飲料水として16週間自由に与えた。対照群にはDHPN処置後水道水を自由に摂取させた。SDM投与開始後1, 4, 8, 12, 16週に屠殺し、血中TSH値を測定した。抗TSH抗体を用いて下垂体を免疫染色し、画像解析装置により陽性細胞の面積を計測した。

【結果】血中TSH値はSDM投与開始後1週から上昇し、8週で最高値に達した。その後徐々に低下したが、対照群より高い値で推移した。下垂体のTSH細胞は免疫染色の結果、濃染するタイプと淡染するタイプに分けられた。濃染するタイプの面積はSDM投与開始後4週に最低値を示し、12週まで対照群に比べて低値を示した。濃染するタイプの全陽性細胞に対する比率も4週に最低値を示し、16週まで低値を示した。全陽性細胞の面積は対照群に比し高い値で推移した。

【結論】血中TSH値とTSH免疫染色により濃染するTSH細胞の面積との間には逆相関性を示す傾向がみられた。この所見から、濃染するTSH細胞の少ない場合にはTSHの血中への放出が盛んに行われていることが示唆されたが、濃染TSH細胞が最低値を示した時期と血中TSH値が最高値を示した時期に何故4週間のずれが生じるのかについてはさらに検討が必要である。今回の検討から、下垂体のTSH細胞の画像解析による形態計測は血中TSHレベルの推移を判断する手法として有用であると考えられた。

安原加壽雄, 三森国敏, 竹川潔, 小野寺博志, 山崎千尋¹⁾,
星野二郎¹⁾, 高橋道人

国立衛試・病理部, ¹⁾生化学工業(株)

【目的】Pyrrolizidine alkaloidであるmonocrotaline(MCT)は選択的に肺胞毛細血管の内皮細胞を障害することが報告されている。我々はマウスにMCTを投与することによりびまん性間質性肺炎ならびに肺線維症が実験的に誘発されることを見出した。一方、肺の線維化過程に活性酸素が増悪因子として関与する事が報告されている。今回、活性酸素の産生を抑制すると、肺毒性病変の進展が抑制されるか否かを明らかにするため、細胞膜親和性が高く、かつ、血中半減期が長いレシチン化superoxide dismutase(PC-SOD)をマウスに投与し、MCT誘発肺毒性病変に対するPC-SODの修飾作用を検討した。

【方法】6週齢の雄性ICRマウス30匹に150 mg/kgのMCTを週1回計3回背部皮下に投与した。実験開始5週目にMCT投与動物を3群に分け、Ⅰ群(11匹)に30,000 U/5 ml/kg、Ⅱ群(9匹)に3,000 U/5 ml/kgのPC-SODを週2回計8回、尾静脈に投与し、最終投与後1週目に屠殺、剖検した。Ⅲ群(10匹)は無処置のまま飼育し同時期に剖検した。肺は摘出後メチルアルコール・カルノア固定液を気管支内に注入・固定し組織学的に観察した。また、各群7匹の右葉は肺組織中のhydroxyproline(HP)量測定のため、固定に先だって採取した。

【結果】組織学的にⅢ群では小線維化巣やマクロファージからなる小炎症巣が散見され、エオジンに好染するフィブリン様物質の沈着が小線維化巣の肺胞壁内ならびに肺胞腔内に認められた。この病変はⅢ群で10匹中9例に認められたが、Ⅱ群では2/9例、Ⅰ群では2/11例であり、ⅡとⅠ群の発生頻度は有意に減少した。発現個数においては、Ⅲ群では1個体当たり 3.9 ± 3.4 個、Ⅱ群では 1.1 ± 3.0 個、Ⅰ群では 0.2 ± 0.4 個認められ、Ⅰ群のそれはⅢ群に比し有意に減少した。肺組織中のHP量では群間に差は認められなかった。

【結語】MCT投与後PC-SODを投与された群ではMCT単独投与に比し肺毒性病変の発生率が低下したことからPC-SODがMCT誘発肺病変の進展を抑制する可能性が示唆された。

○近藤貴雄、織田 茂、中井洋一、佐藤秀蔵

武田薬品・研究開発本部・薬剤安全性研究所

【目的】ラットを用いた非臨床試験における採血時麻酔にはエーテルが広く使用されている。今回、我々は炭酸ガス(CO₂)による麻酔を試み、血液学的検査、血液生化学的検査、胃内容排出速度(GER)及び薬物血中濃度に及ぼす影響について無麻酔及びエーテル麻酔下と比較、検討した。

【方法】ラットはJcl:Wistar及びF344/Jcl(雌雄、8-10週齢)を用いた。CO₂麻酔はCO₂と酸素あるいは空気との混合ガス(混合比 60:40~70:30)を麻酔箱に導入し、採血時にはマスク型給入器で麻酔を維持した。エーテル麻酔は常法に従った。採血は頸静脈又は腹部大動脈よりヘリ処理注射器で行った。血液学的及び血液生化学的検査は自動分析装置を用い、赤血球中のATP含量は生物発光法により測定した。GERはフェノールレッド法により測定し、血漿中薬物濃度(フェニバルブیتال(PB), pKa=7.4, 30mg/kg, i. v.)はHPLC法により測定した。

【結果】CO₂麻酔は導入と覚醒がエーテル麻酔に比べて速く、採血時には麻酔の維持等迅速な対応が必要であった。単回麻酔下で実施した血液学的及び血液生化学検査ではCO₂麻酔は無麻酔及びエーテル麻酔に比べてヘマトクリット値及びナトリウム等の血液無機イオンの高値並びに赤血球中のATPの低値がみられた。さらに、重炭酸イオンの増加に伴うpHの低値が顕著であった。この傾向はCO₂混合組成(酸素または空気)に差なくみられた。一方、エーテル麻酔では無麻酔と比較して大きな差はなかった。血中薬物濃度測定とはほぼ同一の間隔(7回/4h, 繰り返し麻酔)で麻酔を行った場合、GERはCO₂では無麻酔に比べて大きな差はみられなかったが、エーテルでは遅延した。PB静注後の血漿中濃度はCO₂麻酔下ではエーテル麻酔下に比較して低値であった。

【考察】エーテル麻酔下での採血は血液学的及び血液生化学的検査値に殆ど影響を及ぼさないが、GERを遅延させる為、経口投与後の薬物吸収を遅延させる可能性がある。CO₂麻酔では多くの血液検査値に影響がみられ、背景データの十分な吟味が必要である。また、CO₂麻酔ではGERへの影響が少なく、薬物吸収の遅延は少ないと推測されるが、中性付近にpKaを有する薬物では血液pHの低下により分子型とイオン型の比率が変動し、血中濃度に影響を及ぼすと考えられる。

○松本 清、谷村 勇次、北村 紀子、大島 洋次郎

武田薬品工業・医薬開発本部・薬剤安全性研究所

日本チャールス・リバーの New Strain である Crj:CD(GS)ラットを使用して Segment I タイプの試験を実施し、生殖機能及び胚・胎児の発生に関する背景データを収集し、当施設の生殖試験への導入を検討するとともに、欧米で主流である低蛋白飼料で飼育し、生殖機能に及ぼす影響について調べ、同飼料の使用の可否についても検討した。

Crj:CD(GS)雌雄ラットを入手後 2 群に分け、それぞれ通常飼料 (CRF-1、蛋白質 23%含有)及び (CR-LPF、蛋白質 18%含有)を与え、交配前 4 週間、交配期間、妊娠期間を通して飼育し、一般及び生殖機能に関する諸検査を実施した。

親動物の観察では、低蛋白飼料群で雄の体重増加量に高値傾向がみられ、雄並びに雌の妊娠中期以降の摂餌量に高値傾向がみられた。しかし、交尾率、受(授)胎率、性周期及び精子検査には特筆すべき変化はみられず、飼料の差も認められなかった。帝王切開及び F1 児の観察においても、生存胎児数、胚・胎児死亡率及び胎児の発育並びに胎児の外形・内臓・骨格検査においても特筆すべき変化はなく、飼料の差も認められなかった。また、当施設で使用経験のある Crj:SD ラットとの比較を行った結果、大きな差は認められなかった。

以上の結果、Segment I 試験の実施に関して、本系統及び低蛋白飼料の導入に支障はないと思われた。

江馬 真、宮脇英美子、原園 景、小川義之

国立衛生試験所大阪支所 生物試験部

可塑剤butyl benzyl phthalate (BBP) をラットの妊娠前半に投与したときには強い胚致死作用を示し、妊娠7-9日または妊娠13-15日に投与したときには催奇形作用を示すことを我々はすでに報告した。今回はラットにおけるBBPの主要な代謝物の一つであるmonobenzyl phthalate (MBeP) のラットにおける発生毒性、さらに投与時期による発生毒性の変化をWistarラットを用いて調べ、BBPの発生毒性におけるMBePの役割について検討した。妊娠7-15日（精子発見日＝妊娠0日）に250, 313, 375, 438または500 mg/kgのMBePを経口投与し、妊娠20日に妊娠ラットを開腹して胚-胎児への影響を調べた。438 mg/kg以上の投与量において着床後の胚-胎児死亡率が有意に上昇し、313 mg/kg以上の投与量において奇形胎児の発現頻度が有意に上昇した。次に、MBePの投与時期による発生毒性の変化を調べるために、妊娠7-9日、妊娠10-12日または妊娠13-15日に250, 375, 500または625 mg/kgのMBePを経口投与して胚-胎児に対する影響を検討した。MBePの投与日にかかわらず、500 mg/kg以上の投与量で着床後の胚-胎児死亡率が有意に上昇した。妊娠7-9日または妊娠13-15日の375 mg/kg以上の投与量において奇形胎児の発現頻度が有意に上昇した。妊娠7-9日の投与では頸椎、胸椎、腰椎、肋骨の奇形、妊娠13-15日の投与では口蓋裂、胸骨分節癒合等が多く観察された。これらの結果から、MBePの発生毒性は投与時期によって変化することが明らかになった。MBePによる発生毒性の変化および奇形の型はBBPを投与したときのそれらとよく類似していることから、BBPの発生毒性発現にはMBePまたはその代謝物が関与していることが示唆された。

○平賀武夫、御家瀬尚、寺岡宏樹

酪農学園大・獣医・毒性

哺乳動物を用いた催奇形性試験の代替法としてニワトリ胚子を使用することが可能かどうかを検討しているが、今回、6-Amino-nicotinamide(AN)を白色レグホーン種のニワトリ受精卵に投与し、骨格系、とくに肢骨の発育におよぼす影響を観察した。孵卵3日から8日の受精卵の気室内にANを投与し(3日~8日投与群)、孵卵20日で胚を採取し、体重の測定と外形の観察を行った。その後骨・軟骨二重染色を行い、実体顕微鏡下で各骨を観察した。

①3日投与群で最も高い死亡率が得られ、その後8日投与群まで急激に死亡率は低下した。②体重の減少は4日投与群で顕著にみられた。③奇形の発生率は5日投与群で最も高く、次いで4日投与群で高く、その他の投与群ではわずかであった。④奇形は前肢骨より後肢骨に多くみられ、前肢では指骨に、後肢では中足骨に最も多くみられた。⑤骨の奇形には彎曲、癒合、欠損など様々な種類がみられたが、個々の骨あるいは投与日と奇形の種類との間には明瞭な関係はみられなかった。⑥AN投与により、ほとんど全ての骨において発育の抑制がみられ、この抑制効果は骨の長さには強く影響するものの、幅に対しては弱かった。また、骨端軟骨への影響は軽度であった。⑦肢骨以外では筋肉あるいは腱の短縮によると思われる関節彎曲も多くみられ、また一部の例では、頭蓋にも異常がみられた。

以上のことから、ANはニワトリ胚子に対しても致死作用および催奇形性を有することが示され、とくに肢骨に対して強い影響を与えることが明らかになった。

飯田朋子、遠藤貴子、高橋弘樹、中島幹夫、佐々木眞敬
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

【目的及び方法】

ウサギの生殖・発生毒性試験においてトキシコキネティクス（TK）を実施するため、保定・採血の母動物及び胚・胎児に対する影響を検討した。Kbl:NZW ウサギを押田式固定器を用いて保定し、妊娠 6 及び 18 日の 0、1、5 及び 23 時間（4 回採血群）あるいは 0 及び 5 時間（2 回採血群）に各 0.5ml を耳介静脈より採血した。また、採血は行わず、同じ時間に保定し注射針を耳介静脈に約 2 分間刺入する群を設けた（2 回あるいは 4 回保定群）。対照群は無処置とし、妊娠 28 日に剖検し、胚・胎児について観察を行った。

【結果及び考察】

妊娠 6～8 日の体重増加量は 2 回保定群、4 回保定群及び 4 回採血群で抑制傾向がみられた。妊娠 18～20 日の体重増加量は 4 回保定群及び 4 回採血群で抑制傾向が、摂餌量は 2 回保定群、4 回保定及び 4 回採血群で抑制傾向が認められた。すなわち、繰り返し保定・採血により体重増加量と摂餌量の抑制傾向がみられ、4 回群でよりその傾向が強くみられた。また、保定群と採血群の体重・摂餌量の抑制の程度はほぼ同じであることから、今回の採血量による影響はみられなかった。妊娠末期観察の結果、母動物、胎児に対する影響は認められなかった。以上の結果、1 日数回の保定、採血により体重増加・摂餌量に影響がみられたことからウサギの生殖・発生毒性試験においては、被験物質の母動物への一般毒性学的、生殖及び次世代への影響を正確に評価するため、TK のみのサテライト群を設けることが望ましいと考えた。

高島宏昌, 和田あづさ, 桑形麻樹子

(財) 食品薬品安全センター秦野研究所

精子の超活性化現象は、子宮内での受精能獲得に伴って起こる運動性の極めて亢進する現象であるが、*in vitro*においても希釈液中で時間的経過に伴って自然に誘起されることが知られている。近年、精子運動能解析装置(CASA)を用いた精子運動性の測定が多用されつつあり、超活性化現象に伴う精子運動性の変化が、CASAでの精子運動性の測定結果にいかなる影響を与えるかについて検討する必要性が考えられる。今回我々は、Hamilton-Thorne社製HTM-IVOSを用いて、ラットにおいて超活性化現象に伴う精子運動性の変化が、測定結果に与える影響を検討した。

まず、超活性化した精子の運動性について検討するため、精巣上体精子希釈液を37℃で3時間、前培養した後、Ca ionophore A23187を10 μ Mとなるよう添加し、1時間後に超活性化した精子の運動を測定して、精子運動性の各因子 [精子進行方向性速度(VAP), 精子直線地点移動速度(VSL), 精子進行速度(VCL), 頭部振幅(ALH), 頭部振り周波数(BCF), 直線係数(STR), 直線性(LIN)] を検討した。その結果、Ca ionophore添加群では非添加群と比較して、精子の移動距離および直線性が増加した。特にVAP, VCL等の精子の移動距離に関する因子の増加が顕著であった。さらに、Ca ionophore添加群の精子の運動と、精子希釈直後の著明な前進運動を示している精子の運動とを比較した結果、Ca ionophore添加群では、LINおよびSTRといった、直線性に関する因子が低値を示した。以上の結果から、超活性化した精子の鑑別基準を、VAP, VCL, LINおよびSTRから設定した。また、CASAを用いた運動性の測定においては、超活性化現象を起こした精子と、活力が低下した精子との鑑別は困難であることが判明した。

先に設定した基準により、測定時間の経過に伴って自然に誘起された超活性化した精子の割合を求めた結果、精子採取直後は3.2%であったが、時間の経過とともに増加し、採取2時間後には7.0%、4時間後では10.2%であった。以上のことから、CASAを用いた運動性の測定においては、超活性化した精子と活力が低下した精子との混同により、良好精子生存率等の測定項目に誤差を生じる可能性があることが、明らかとなった。

三分一所厚司¹⁾，加藤康子¹⁾，池谷純子¹⁾，田嶋尚之²⁾，田中頼久²⁾

三共株式会社 ¹⁾ 安全性研究所，²⁾ 分析代謝研究所

〔目的〕骨代謝に障害を与える薬物として β -aminopropionitrile 等，aminonitrile 類は，Lathrogenic agents として知られ，ラットの妊娠 15～18 日に投与すると胎児に口蓋裂や脊柱の弯曲等の異常を誘発する。構造的に類似した aminoethyl nitrate(AEN)のラット胎児の骨形成におよぼす影響について検討した。

〔方法〕Crj:CD(SD)ラットの妊娠 13～15，15，16 日に AEN を 500，1000 mg/kg 経口または皮下投与し，妊娠 20 日に解剖した。胎児は外形観察をした後，骨格標本を作製し骨格異常について調べた。AEN の濃度測定について妊娠 15 日に AEN を 500，1000 mg/kg 皮下または経口投与し，尾静脈より投与後 0.5，1，2，4，6 時間に採血し測定した。また同様に投与した動物の血中および胎児，羊水中の濃度を投与後 1，6 時間後に採取し，測定した。肝臓での代謝を調べるため，妊娠 15 日のラットに AEN を 1000 mg/kg 経口投与し門脈血および肝静脈血を投与後 10，20，30，60 分に採血し，測定した。

〔結果および考察〕妊娠 20 日に解剖した胎児の外形異常として口蓋裂が経口投与の妊娠 13～15 日の 500 mg/kg 投与群で，78.2%，妊娠 15 日の 1000 mg/kg 投与群で 100%見られたが，皮下投与の妊娠 13～15 日の 500 mg/kg 投与群で 9.9%，妊娠 15 日の 1000 mg/kg 投与群で 3.0%であった。骨格観察では脊柱の弯曲が経口投与の妊娠 13～15 日の 500 mg/kg 投与群で 25.5%，妊娠 15 日の 1000 mg/kg 投与群で 81.6%，妊娠 16 日の 1000 mg/kg 投与群で 100%であった。皮下投与ではそれぞれの投与群で 0.0 および 6%であった。血中濃度は経口投与の 500 mg/kg 投与群で C_{max} が $21.7 \pm 5.9 \mu\text{g/ml}$ ，1000 mg/kg 群で $62.9 \pm 19.0 \mu\text{g/ml}$ ，皮下投与ではそれぞれ $134.1 \pm 10.5 \mu\text{g/ml}$ ， $331.4 \pm 20.5 \mu\text{g/ml}$ であった。経口投与の 1 時間後の胎児中の濃度が 1000 mg/kg 投与群で $59.5 \mu\text{g/g}$ ，羊水中が $34.2 \mu\text{g/ml}$ ，母体血中濃度が $38.2 \mu\text{g/ml}$ であり皮下投与ではそれぞれ $265.2 \mu\text{g/g}$ ， $179.1 \mu\text{g/ml}$ ， $264.1 \mu\text{g/ml}$ ，であった。門脈血と肝静脈血の比較では，10 分後の門脈血が $648.0 \pm 117.5 \mu\text{g/ml}$ ，肝静脈血が $58.7 \pm 4.9 \mu\text{g/ml}$ であり，60 分後ではそれぞれ $157.5 \pm 38.5 \mu\text{g/ml}$ ， $99.6 \pm 12.6 \mu\text{g/ml}$ であった。

以上より Aminoethyl nitrate は妊娠ラットに投与すると口蓋裂および脊柱の弯曲等の異常が誘発されるが，経口投与が皮下投与に比較していづれの妊娠日齢においても高い頻度で異常が認められ投与経路の違いにより差が認められた。しかし血中，胎児，羊水の濃度では，経口投与の方が皮下投与より極めて低い値を示し，胎児の異常の発現頻度と相反することが明らかになった。また肝静脈血中濃度は門脈血に比べて著しく低く，低分子化合物であるにもかかわらず肝初回通過効果を受けることが示された。

ラット培養胎児における
チアベンダゾール (T B Z) の影響横山 篤¹、秋田正治¹、黒田行昭²¹鎌倉女子大学、²麻布大学 (環境保健)

【目的】

輸入柑橘類の大量入荷が行われているわが国の現状において、防カビ剤として使用が許可されている T B Z (Thiabendazole) は、安全性についていまだに問題点を残している。T B Z 本体の影響は第 1 回日本薬学合同セミナー、第 108 回日本薬学会 毒性学部会において培養ラット、マウス胎児で各々報告した。また肝フラクシヨンの前処理の結果は、ヨーロッパ毒性学会で発表した。今回は、T B Z の 5 位に 1 個水酸基がついた代謝物である 5-OH- T B Z の培養胎児に対しての直接作用を観察したので報告する。

【方法】

胎齢 11.5 日目 (plug day = 0) のラット胎児を、48 時間回転培養を行った。培養液は 100% ラット血清を用い、気相は 95 % O₂ + 5 % CO₂ 混合ガスを 100 ~ 120 ml/min. の割合で送気した。薬物は 5-OH- T B Z を T B Z の再奇形用量の当モル濃度である 40 µg/ml を培養液に加えその影響をしらべた。

【結果および考察】

培養開始時の胎齢 11.5 日目の胎児は総体節数 33 ± 1、頂殿長 3.9 ± 0.1 mm であった。培養 24 時間後の培養胎児は、5-OH- T B Z 処理群では卵黄囊表面および胎児の血液循環が低下したが、その他は対照群と同様の培養成績を示した。そして培養 48 時間後の胎児は、対照群で心拍動数 180 ± 12 beat/min.、総体節数 51 ± 1、頂殿長 7.9 ± 0.1 mm に対して、処理群では心拍動数は変化が認められなかったが、総体節数は 7%、頂殿長は 8% の低値を示し全身の成長抑制が認められ、血液循環も低下していた。

以上の結果より、T B Z 本体は *in vivo* で認められた催奇形性を持つが、5-OH- T B Z (水酸化体) は、胎児致死効果が強いと考えられた。死亡胚形成に水酸基がどのように関わるかを現在検討中である。

P51 牛準胎児血清を用いたラット胎児の体外培養

○秋田正治¹⁾、横山 篤¹⁾、黒田行昭²⁾

¹⁾ 鎌倉女子大学、²⁾ 麻布大学・環境保健

【目的】

発生毒性試験の代替法の1つの候補として考えられている胎児培養は、培養液として通常 100% ラット血清を使用しているため大量に動物を使用することが最大の問題と考えられる。血清を使用する場合でも、その動物を死亡させることなく血清を採取できれば、少なくともこの問題は解決できる。現在われわれは様々な血清を胎児培養に使用しその培養成績を検討しており、今回は三菱化学(株)から販売されている牛準胎児血清を用いた培養成績について報告する。

【方法】

三菱化学(株)が製造、販売している中標津牛準胎児血清(PFCS)をラット血清に 50%、80% および 100% の割合で混合した。そして対照群に 100% ラット血清を用い、胎齢 11.5 日目(plug day = 0)のラット胎児を 48 時間回転培養した。

【結果および考察】

培養 24 時間後の胎児は、全ての培養胎児群で同様な成績を示した。さらに培養 48 時間後は、PFCS 50% 混合した培養液群は心拍動数 180 ± 11 回/分、総体節数 49 ± 1 、頂殿長 7.7 ± 0.1 mm となり対照群と比較して有意差は認められなかった。しかし PFCS 80% 混合した培養液群は心拍動数および頂殿長においては差はなかったが、総体節数において対照群よりも平均 10% 低い値を示し、さらに外表形態において前頭部の発育遅延が確認され、100% PFCS 群は全身性の萎縮が認められた。以上の結果より、三菱化学(株)の PFCS は、ラット胎齢 11.5 日齢からの胎児培養には卵黄囊開放前の 24 時間まではラット血清と同様に使用でき、さらに PFCS を 50% ラット血清に混合することで、48 時間培養にも使用可能であることが示唆された。

P 52 ラットにおける聴覚性驚愕反応

○河谷善則、藤淳一郎、大島洋次郎

武田薬品工業（株） 薬剤安全性研究所

現在、当社ではラット出生児の機能試験として、聴覚に関しては Preyer 反射を、情動性に関してはオープンフィールド試験を行っている。今回、我々はこれらの機能試験に代わり得るものとして、サンディエゴ社製の聴覚性驚愕反応装置を用い、ラット出生児の週齢による驚愕反応の変化及び Methylazoxymethanol acetate (MAM) 投与により誘発された小頭症ラットの驚愕性を調べた。また、同じ動物を用いて、ホームケージ内の自発運動量及びオープンフィールド試験を実施し、驚愕性との関連性を調べた。

75dB のホワイトノイズ下で 120dB あるいは 100dB の音刺激を交互に 30 回行い、動物の驚愕性を刺激に対するラットの振動の大きさと時間を積算した数値で表し、10 回毎に平均してその変化を調べた。

無処置ラットを用いて 3～6 週齢時に測定した結果、3 及び 4 週齢では繰り返しによる変化はみられなかったが、5 及び 6 週齢では 120dB 音の繰り返しによる驚愕性に低下がみられた。また、MAM 誘発小頭症ラットを 5 週齢時に検査した結果、無処置群に比べ雄では変化は見られなかったが、雌では 120dB 音の繰り返しによる驚愕性に低下がみられなかった。したがって、MAM 誘発小頭症ラットでは音刺激に対する habituation の低下が示唆された。

同時に行った自発運動量の測定では雄で暗期の行動量の増加が、オープンフィールドでは潜時の延長及び立ち上がり回数の増加がみられており、これらの成績との関連性が示唆された。

◎和泉祐子、北村紀子、吉崎宏、大島洋次郎
杉谷順康
武田薬品、薬剤安全性研究所

〔目的〕交尾直後の雄ラットは生殖能が低下することから、生殖能と生殖器重量及び精子検査パラメーターの変化を経日的に比較検討した。

〔方法〕15～17週齢のJcl:Wistarラットを交配させ、交尾確認日（腔栓確認日）を0日として0、1、2、3、4、5、6及び8日後の雄動物について、生殖器重量（精巣、精巣上部、前立腺腹葉、精嚢）を測定し、精巣上部尾部の精子を用い、CellSoft-4000による精子検査を行った。対照として、同週齢の未交配動物についても同様に検査した。また、交尾後の雄生殖能の回復性を発情雌との交配により調べた。交配させた雌動物の妊娠確認は妊娠中期の帝王切開により行った。

〔結果〕生殖器重量は、交尾後0～2日で精嚢重量が低下したが、他の生殖器重量に大きな変化はみられなかった。精子検査では、精子数の減少が交尾後0～3日に顕著にみられ、以後回復し交尾後6日には未交配動物の値とほぼ同じ値を示した。その他の精子検査パラメーターについては運動精子率が精子数の減少のみられた交尾後0～5日の間で低下する傾向がみられ、精子数及び運動精子率以外のパラメーターは交尾後1日で軽度低下する傾向がみられた他に差はみられなかった。また、交尾後の生殖能（交尾率及び授胎率）の回復は2日後にみられた。

◎吉崎 宏、平山千束、藤本昭宏、三奈木隆史
大島洋次郎、杉谷順康
武田薬品、薬剤安全性研究所

[目的]

精子の運動性を客観的に評価する手段として自動精子解析装置 (CellSoft4000) を導入するため、用手法とCellSoftの測定値の比較を行った。また、我々は昨年度の本学会において、ホウ酸を投与したラットの精子検査結果を報告したが、今回はホウ酸を投与したラットの授胎能及びCellSoftによる精子検査結果について調べた。

[方法]

精子の希釈液はM-199 Hanks' salt加(0.5%BSA添加、pH7.2)とし、精子液の採取部位は精巣上体尾部、浮遊液の調製は運動性用に拡散法及び精子数用に細切法をそれぞれ用いた。用手法とCellSoftの測定値の比較には、9~20週齢のJcl:Wistarラットを使用した。ホウ酸は14週齢のJcl:Wistar雄ラットに50, 150及び500 mg/kg/日を3週間投与して、CellSoftによる精子検査を行った。なお、2週間投与後に無処置雌との交配を実施した。

[結果]

運動精子率と精子数について、用手法及びCellSoft解析データの比較を実施したところ、CellSoftデータは用手法に比べて運動精子率は約10%、精子数は約20%低値であった。

ホウ酸を投与したラットの交配では、いずれの群においても授胎率、着床数及び生存胚数に投薬の影響は認められなかった。3週間投与後の精子検査では、500 mg/kg 群の運動精子率、精子数、移動速度(直線)及び頭部振幅の各パラメーターが低値を示した。直線性、運動精子中の旋回精子の割合及び移動速度(曲線)の各パラメーターについては、ホウ酸投与による変化はみられなかった。

○河村佳徳、瀬来俊明、三奈木隆史、大島洋次郎

武田薬品工業（株） 薬剤安全性研究所

当研究所で催奇形性を調べるため使用している Kb1:JW ウサギに関して最近 12 年間の黄体数、着床数、生存児数、性比、胎児体重並びに外形、内臓及び骨格変異または奇形発生率等のパラメーター及びそれらの推移を G L P 適用試験の対照群のデータをもとに検討した。

その結果、上記のパラメーターそれぞれの平均値及び S. D. は、黄体数： 10.9 ± 0.9 、着床数： 9.2 ± 1.1 、生存児数： 8.4 ± 1.0 、性比： 50.4 ± 5.6 、胎児体重： 37.8 ± 1.9 であり、それらの値に 12 年間大きな変動はみられなかった。

また、1988 年及び 1995 年にサリドマイドの $300\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ をウサギの器官形成期(妊娠 6~18 日)に連日経口投与し、妊娠 28 日に剖検し、母動物及び胎児のを観察した。その結果、1988 年と 1995 年では、黄体数(1988： 10.6 ± 3.2 、1995： 10.3 ± 2.1)、着床数(7.1 ± 3.6 、 8.3 ± 1.5)、生存児数(5.1 ± 3.0 、 6.0 ± 1.6)、性比(43.7 ± 31.6 、 56.9 ± 16.8) 及び外形異常発生率(90.8 ± 12.0 、 88.9 ± 23.6)等に大きな違いはみられず、また、得られたウサギ胎児の奇形の型も類似していた。

これらのデータから、Kb1:JW ウサギは上記のパラメーターが安定しており、催奇形性試験に適した実験動物であることが確認された。

○朝波 省吾, 下野 和之

(株) 大塚製薬工場 鳴門研究所

【目的】マウス小核試験は、in vivo染色体異常検出系であり、その結果は化学物質の生体に対する遺伝毒性の評価及び発癌性の予測に大きな影響を与える。したがって、その試験結果に影響を与える要因を把握することは重要である。我々は、すでに体温上昇による小核誘発性を発表している(1994年及び1995年 日本環境変異原学会)が、低体温状態(hypothermia)においても小核の誘発、すなわち染色体異常の誘発を示唆する結果を得たので報告する。

【方法】マウスの体温を下げるために1~1000mg/kgのレセルピンを雄性ddYマウスの腹腔内に単回投与し、投与後96時間まで観察した。骨髄細胞を用いた小核試験については、24、48、72及び96時間後にそれぞれ標本採取した。

【結果及び考察】10mg/kg以上の用量で、顕著な体温低下(24時間後で26~30℃)が観察され、96時間後まで低体温状態が続いた。小核の誘発については、体温低下が観察された10mg/kg以上の広い用量範囲かつ48時間以降の標本採取時間において有意な小核の誘発(4~12.3%)が観察された。さらに、低体温による影響を確認する目的で、レセルピン100mg/kgを腹腔内投与したマウスを温熱暴露して正常体温範囲内に維持させた結果、温熱暴露しない群においては有意な小核頻度の上昇が観察された(5.5%)が、温熱暴露した群では小核誘発性は認められなかった(2.2%)。また、誘発された小核の約39.5%は細胞質の1/4以上の大きな小核であった。

したがって、hypothermiaにおいても小核が誘発される可能性があることが示唆され、その生成メカニズムのひとつとして、紡錘体機能の阻害が考えられた。

○古谷 真美 安達 智子 金澤 由基子 原田 知子
小島 幸一

(財)食品薬品安全センター 秦野研究所

補体系の因子は、免疫系の変動を捉えるうえで重要であると考えられているが、一般毒性試験にはほとんど応用されていない。昨年までに我々は、補体の C3 たんぱく質の測定系を開発し、その応用を試みてきた。今回はラットにおける補体系の活性を調べる目的で、血清補体価(CH50)の測定を試みた。また、免疫抑制剤であるサイクロフォスファミド(CY)を投与したラットにおける CH50 の変動を調べ、免疫学的指標としての利用を検討した。

[方法] CH50 はリボソームを用いたヒト用の測定キット「補体価-HA テストワコー」(和光純薬工業株)を用いて行った。SD ラットに CY を 0、1.5、3、6mg/kg の用量で 14 日間腹腔内投与し、その 4 日後に解剖した。脾細胞を用いた溶血斑形成細胞(PFC)測定、血液学的ならびに血液生化学的検査と C3 たんぱく質量を測定し、CH50 と比較検討した。

[結果および考察] CH50 は、ラット血清およびヘパリン加血漿で測定が可能であった。CY を投与したラットでは、PFC 測定において投与量に依存して抗体産生細胞数が減少し、CY の免疫抑制効果が認められた。この時、血液学的検査では白血球は減少したが、血液生化学的検査と C3 たんぱく質量には変化は見られなかった。CH50 は、投与量に依存して上昇した。CH50 は血漿中の残存補体活性を測定しているため、その値が高いということは定常状態より補体の消費量が減少しているということを示している。従って、この結果は CY による免疫抑制効果を反映していると考えられた。CH50 は他の免疫機能の変化を調べる方法と同程度以上に鋭敏に変化を捉えられる可能性が認められ、毒性試験への応用が期待された。

○安達 智子、河合 祐二、金澤 由基子、小島 幸一

(財) 食品薬品安全センター 秦野研究所

免疫機能の試験方法として溶血斑形成細胞 (PFC) 測定は従来より広く用いられてきたが、操作が煩雑であることから、最近これに代わる方法として ELISA を用いたヒツジ赤血球 (SRBC) に対する IgM の抗体価の測定が報告されている。しかし、抗体価の測定には希釈を重ねるため、多くの試料と時間を要する。そこで我々は、あらかじめ SRBC に特異的なラットの IgM (anti-SRBC IgM) を精製し、これを標準物質とした ELISA によって、特異抗体を定量する方法を確立した。そして、サイクロフォスファミド (CY) による免疫抑制作用の検出を行い、その有用性を確認したので報告する。

[方法] SRBC を静脈内投与したラットの血清から、SRBC 膜をリガンドとしたアフィニティクロマトグラフィとゲルろ過によって anti-SRBC IgM を精製した。ELISA は常法に従って行い、精製した anti-SRBC IgM を用いて検量線を作製し、試料中の anti-SRBC IgM 濃度を定量した。ラットに CY を 0、1.5、3、6mg/kg の用量で 14 日間腹腔内投与した後、SRBC を静脈内投与し、その 4 日後に解剖した。そして、PFC 測定における抗体産生細胞数、抗体価、anti-SRBC IgM 濃度の比較検討を行った。

[結果および考察] Anti-SRBC IgM ELISA では 0.1~5ng/ml の濃度間で良好な検量線が得られた。再現性および PFC 測定、抗体価との相関も良好であった。CY の投与によって anti-SRBC IgM 濃度は用量依存的に低下し、PFC 測定や抗体価と同様に CY による免疫抑制作用を検出することが可能であった。

Anti-SRBC IgM 濃度を直接定量するこの ELISA は、迅速かつ簡便に少量のサンプルで測定が可能なることから、毒性試験等へ広く応用ができると考えられた。

○加藤日路士、中村洋介、糟谷 環、岸田文雄、
中塚 巖

住友化学工業株式会社 生物環境科学研究所

【目的】

皮膚感作性試験は新規化合物の登録申請に必須の毒性試験の一つであるものの、各ガイドラインでは本試験系に対する性差の影響については述べていない。そこで、今回、皮膚感作性試験における性差の影響を検討するために、各ガイドラインで推奨されている感作性試験である Maximization Test を用い、OECD ガイドラインで奨励されている陽性対照化合物を用いて試験を実施した。

【方法】

Maximization Test は、OECD ガイドラインに準じて実施し、雌雄各10匹を1群として、 α -Hexylcinnamicaldehyde (HCA) 感作群、2-Mercaptobenzothiazole (MBT) 感作群、Benzocaine 感作群、2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB) 感作群および非感作群を設けた。なお、各化合物の感作濃度および惹起濃度は予備試験の結果に基づき決定した。雌雄各群の感作性の強さの比較は、観察期間中に認められた紅斑および浮腫の平均評点および Magnusson and Kligman の判定基準に基づき比較した。

【結果および考察】

各化合物の平均評点は、雌雄ともに有意差は認められず、ほぼ同等であった。また、各化合物の感作率から Magnusson and Kligman の判定基準を基に評価した結果、雌雄いずれも HCA 感作群は極度、MBT 感作群は中等度、Benzocaine 感作群は軽度、DNCB 感作群は極度の感作性であることが判明した。以上の結果から、皮膚感作性試験において、性差は影響しないことが示唆された。

P 60 マウススポットテストと尾部白色斑の關係の検討

○中村 稔, 鮫島 顕二, 茶谷 文雄, 一ツ町 晋也

武田薬品工業(株) 薬剤安全性研究所

マウス体細胞における遺伝子突然変異を毛色の変異で検索するマウススポットテストにおいて、変異原物質投与後の異色斑(RS)及び色素細胞の致死を示す腹部白色斑(WMVS)の誘発頻度の増加と尾に現れる白色斑(TWS)の量的な変化との関係及び TWS を含む尾部の病理組織学的な検討を行った。

P W雄マウスをテスター系統とし、C57BL/10 雌マウスと交配後、妊娠 10 日目の母体に変異原物質の ENU(25 又は 50), EMS(100), MMS(50 又は 100)あるいは 5-FU(12.5mg/kg), 陰性対照群として溶媒の蒸留水又はリン酸緩衝液 10 ml/kg を 1 回腹腔内投与した。F₁ 個体を用いてスポットの観察を行い、生後 42 日目前後に尾の全長及び TWS の長さを測定し、個体ごとに WMVS 及び RS の有無と TWS の尾の全長に対する比率について雌雄間及び投与群間で比較した。

その結果、尾の全長及び TWS の長さについて雌雄間では有意差が認められなかったため投与群間で比較した。変異原物質投与群では TWS の長さが溶媒対照群に比べ有意に増加し、ENU 及び MMS 投与群では用量依存的に増加した。遺伝子突然変異の指標である RS の増加が認められなかった EMS 100, MMS 50 及び 5-FU 12.5 mg/kg 投与群でも TWS の長さは有意に増加した。しかし、WMVS 及び RS の有無と TWS の長さについては相関関係が認められなかった。また、TWS の病理組織学的検討の結果、TWS 部位ではメラノサイトの欠如あるいはメラニン産生の低下が認められた。

以上の結果から、RS 及び WMVS に加えて TWS の出現及び長さの変化もマウススポットテストにおいて有効な補助指標と考えられる。

嘔吐スクリーニングとしてのラット腹部求心性迷走神経活動
における5-HT₄受容体の関与

○遠藤 泰, 菅原 淳, 菊池和彦, 横田秀哉, 玉飼博之,
南 勝, 吉岡充弘*

北海道医療大(薬)薬理, 北大(医)第1薬理*

〔目的〕我々はこれまで嘔吐のモデル動物フェレットを用いて制癌剤のシスプラチンや硫酸銅による腹部求心性迷走神経活動上昇の時間経過は嘔吐の時間経過と一致すること。またラットの迷走神経活動の変化もフェレットの嘔吐行動に一致した時間推移をとることを見出している。硫酸銅誘起性嘔吐はセロトニン(5-HT)₃受容体拮抗薬の大量を用いないと抑制できない。最近5-HT₃受容体および5-HT₄受容体拮抗薬であるトロピセトロンが硫酸銅誘起性嘔吐を抑制するとの報告が発表された。また5-HT₄作動薬の5-メトキシトリプタミン(5-MT)がイヌに嘔吐を誘発させたとの報告もある。今回、5-HT₄受容体の嘔吐への関与を検討すべくラットの腹部迷走神経活動を測定した。

〔方法〕ラットを麻酔後、気管カニューレを挿管し、呼吸を管理した。吉岡らの方法に準じて腹腔背面部から迷走神経後枝を剥離切断し、その末梢断端を白金イリジウム双極電極上にのせ腹部求心性迷走神経活動を測定した。薬物はすべて生理食塩液に溶解し、大腿静脈より投与した。

〔結果〕5-HT₃受容体作動薬である2-メチルセロトニンは静脈内投与の用量に依存してフェレットおよびラットの迷走神経活動を亢進させた。5-HT₄受容体作動薬5-MTも用量に依存して迷走神経活動を亢進させた。5-MTによる迷走神経活動の上昇は、5-HT₄受容体拮抗薬であるGR113808の用量に依存して抑制されたが、5-HT₃受容体拮抗薬であるオンダンセトロンあるいはグラニセトロンでは抑制されなかった。アトロピンおよびヘキサメトニウムの前処置は、5-MTによる迷走神経活動の上昇に対し有意な抑制を示さなかった。

〔結論〕これらのことから薬物誘起性嘔吐の発現には5-HT₃受容体以外に5-HT₄受容体も関与することが示唆された。

南 勝, ○遠藤 泰, 井平恵美, 小川隆志, 浜上尚也,
門間芳夫, 平藤雅彦

北海道医療大学 薬学部 薬理学教室

[目的] 制癌剤の副作用である嘔吐のスクリーニングには嘔吐のモデル動物を使用した行動観察によって行われてきた。制癌剤誘起性嘔吐の発現は腸管のエンテロクロマフィン (EC) 細胞からのセロトニン (5-HT) の脱顆粒が起因している。遊離した 5-HT は EC 細胞の周辺に分布する迷走神経末端の 5-HT₃ 受容体に作用し, その刺激が嘔吐中枢へ伝達し嘔吐を惹起すると考えられている。今回, フェレットならびに嘔吐を惹起しないラット摘出腸管を用いて 5-HT 遊離が 5-HT 受容体作動薬や拮抗薬で変化するかを先ず検討し, ついでいまだ報告のない制癌剤シクロホスファミドの嘔吐に 5-HT 遊離が関与しているのか検討した。

[方法] 実験はフェレットおよびラットをウレタン・ α -クロラロースにて麻酔後, 回腸を摘出し Milano らの方法を改良して行った。薬物は 1 時間のインキュベーション後 栄養液中に混和灌流し, 3 時間後まで 20 分毎の 5-HT 遊離量を HPLC-ECD を用いて測定した。

[結果] フェレットおよびラットにおいて 5-HT₃ 作動薬の 2-メチルセロトニンは用量に依存して腸管からの 5-HT 遊離を増加させた。この 5-HT 遊離は 5-HT₃ 拮抗薬のグラニセトロンおよびオンダンセトロンにより有意に抑制された。さらに 5-HT₄ 作動薬の 5-メトキシトリプタミンもラット腸管からの 5-HT 遊離を増加させた。シクロホスファミドは摘出腸管からの 5-HT 遊離を増加させた。このシクロホスファミドによる 5-HT 遊離の増加をグラニセトロンおよびオンダンセトロンは有意に抑制した。

[結論] 嘔吐の発現に関与する腸管からの 5-HT 遊離がフェレットと同様, 嘔吐をおこさないラットの摘出腸管を用いても再現されたことより, 消化管毒性のスクリーニングにこの実験系が有用であると思われる。

○鎌田 亮, 鈴木忠彦, 齊藤真也, 小林晴男

岩手大学農学部家畜薬理学教室

【目的】遅発性神経毒性 (organophosphorus-induced delayed neuropathy, OPIDN) を誘発する有機リン化合物は, 中枢および末梢神経内 neuropathy target esterase (NTE) の活性を抑制することが知られている. 本研究では, 感受性に差のある2種の動物: ニワトリ (高感受性) およびウズラ (低感受性) を用いて, DFP および fenthion の NTE 活性に対する影響ならびに OPIDN 発現能の有無を比較検討した.

【方法】雌性白色レグホン (1-2.2 kg) に DFP (1 mg/kg, sc) または fenthion (5 mg/kg, sc) を投与し, 24 時間後の脳脊髄内 NTE 活性を測定した. 雌性日本ウズラ (80-160 g) には DFP (6 mg/kg, sc) または fenthion (8 mg/kg, sc) を投与し, 24 時間後の脳脊髄内 NTE 活性を測定するとともに, 一般症状を 3 週間こわって観察した. 次に, OPIDN の症状を悪化させるといわれている NTE 阻害剤 phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) の影響を調べる目的で, ニワトリおよびウズラに DFP または fenthion を投与した後 (24 時間) PMSF (30 mg/kg, sc) を投与して NTE 活性の測定と症状の観察を行った. また, 連続投与の影響を調べる目的で, ウズラに DFP (3 mg/kg/day, sc) または fenthion (5 mg/kg/day, sc) を 1 週間連続投与し, 症状の観察を行った.

【結果】ニワトリ DFP 投与群において, 脳および脊髄内 NTE 活性は有意に抑制されたが (抑制率, 脳 89%, 脊髄 93%), fenthion 投与群では NTE 活性に著明な変化は認められなかった. ウズラ DFP 投与群において, NTE 活性は有意に抑制されたが (抑制率, 脳 87%, 脊髄 82%), OPIDN の症状は認められなかった. ウズラ fenthion 投与群では NTE 活性および症状に著明な変化は認められなかった. PMSF 後処置実験において, ニワトリの NTE 活性は PMSF 未処置群に対して有意に抑制され, DFP+PMSF 投与群で OPIDN に特徴的な進行性の後肢の麻痺が顕著に認められた. ウズラの NTE 活性は PMSF 未処置群に対して有意に抑制されたにもかかわらず, OPIDN の症状は観察されなかった. ウズラ連続投与実験において, DFP 投与群では軽度の OPIDN 様症状が認められたが, fenthion 投与群では認められなかった.

【結論】本実験では, ヒトにおいて報告されている fenthion による OPIDN 様症状はニワトリおよびウズラには認められなかった. また, OPIDN 低感受性動物ウズラにおいて, DFP 投与群および PMSF 後処置群の NTE 活性が顕著に抑制されたにもかかわらず OPIDN の症状が現れなかったことから, NTE の抑制が OPIDN の発現の原因であるという学説は, 本実験の結果からは支持されなかった.

制癌剤アドリアマイシンの特異的な核への輸送機序：アドリアマイシン-proteasome複合体の核への移行様式

○清宮 健一、Guanxun Tian、松尾 三郎、暮部 勝

大阪府立大学・獣医・毒性

【目的】演者らはマウスリンパ性白血病細胞のL1210のcytosol画分中に制癌剤アドリアマイシン (ADM) と特異的に結合する蛋白を単離し、それがproteasomeであることを同定した。また、ADMと同様の薬理作用を持つ光架橋剤を導入した *N*-(*p*-azidobenzoyl)-ADM (NAB-ADM) でL1210細胞を *in situ* photoaffinity labelingすると、核およびcytosol画分から単離したproteasomeがNAB-ADMでlabelされていたことから、proteasomeがADMを細胞質から核内へ移行させるためのtranslocatorであると示唆した。Proteasomeは細胞増殖制御に関連した蛋白質を分解する蛋白質分子複合体で、その分子内に核局在化シグナルを有することから、特に癌細胞等の増殖の活発な細胞の核に局在することが知られている。これらのことから、proteasomeがADMの核移行translocatorであることを立証するために、ADM-proteasome複合体の核移行について検討した。

【方法】L1210細胞のcytosol画分からproteasomeをイオン交換、ヒドロキシアパタイトおよびゲル濾過クロマトグラフィーにより精製後、NAB-ADMでphotoaffinity labelingした。L1210細胞に低濃度のdigitoninを処置し、細胞膜に特異的に孔をあけ、核蛋白輸送能を維持したsemi-intact cellsを作製した。この細胞にNAB-ADMとproteasomeの複合体を添加し、その複合体の核移行を調べた。

【結果および考察】NAB-ADMとproteasomeの複合体は、ATPの存在下で、digitonin処置L1210細胞の核に移行した。その移行はATP非存在下または低温処置によって減少した。ATP存在下におけるNAB-ADMとproteasomeの複合体の核移行は、staurosporine、H-7、genistein等の各種protein kinases阻害剤によって顕著に影響されなかった。以上の結果から、proteasomeはADMを細胞質から核内へ移行させるための特異的なtranslocatorであると考えられる。また、proteasomeの核移行は、他の核局在性蛋白とは異なり、核移行に細胞質因子を必要とせず、蛋白リン酸化以外のATPを介した系によって調節されると推定される。

○高橋宏明，二川治子，田中直樹

残留農業研究所

有機燐殺虫剤は化学構造から P=S 型と P=O 型に大別され、その毒作用はコリンエステラーゼ活性の抑制による。P=S 型は生体内で P=O 型に代謝活性化されてコリンエステラーゼ活性を抑制することが知られる。しかしながら、ラットに P=O 型有機燐殺虫剤（クロルフェンビンホス、ジクロルボス）を経脈内投与するとコリン作動性神経興奮を介する呼吸停止により急性死を生ずるのに対して、P=S 型有機燐殺虫剤（ダイアジノン、フェンチオン）ではコリン作動性神経興奮を介さない循環機能不全により急性死を生ずることを報告した（Fund. Appl. Tox., 16, 459-468, 1991）。本報告では、P=S 型と P=O 型の作用機構の違いを明確にするためにダイアジノンとその P=O 型誘導体であるダイアジノンオキシソンの用いて、経脈内投与した時の循環パターンの違い、P=S 型有機燐殺虫剤による循環機能不全の機序を調べた。

ウレタン麻酔下の SD 系雄性ラットにダイアジノンを経脈内投与すると、投与直後に用量に依存した一過性の血圧低下がみられた。一方、ダイアジノンオキシソンを経脈内投与すると、用量に依存した血圧上昇がみられた。アトロピン前処置により、ダイアジノンオキシソンの血圧上昇と急性死は拮抗されたが、ダイアジノンの血圧低下と急性死は拮抗されなかった。ダイアジノン投与後の循環パラメータを解析すると、血圧低下とともに心拍数、心収縮力（左心室内圧の $dp/dt \max$ ）の低下がみられたが、末梢血管抵抗の低下はみられなかった。次に、摘出心房筋の拍動数と収縮、摘出心室筋の電気刺激による収縮、摘出胸部大動脈のノルアドレナリン収縮に対するダイアジノンの影響を調べた。摘出心房の拍動は約 4×10^{-5} M 以上で停止した。心房筋と心室筋の収縮は濃度に依存して抑制された（心房筋の IC_{50} は約 4×10^{-4} M、心室筋の IC_{50} は約 10^{-4} M）。動脈の収縮も濃度に依存して抑制された（ IC_{50} は約 4×10^{-5} M）。

以上より、ダイアジノンオキシソンはコリン作動性神経興奮を介する血圧上昇を生ずるが、ダイアジノンはコリン作動性神経を介さない循環機能不全を生じた。ダイアジノンは摘出心臓の自動能と収縮、摘出血管の収縮を抑制する作用を有しており、循環機能不全には心臓の自動能、心収縮力の低下が重要と思われた。

○二川治子, 高橋宏明

残留農薬研究所

ダイアジノン (P=S 型有機リン殺虫剤) とダイアジノンオキソン (ダイアジノンの P=O 型誘導体) をラットに静脈内投与すると, 全く異なる循環反応が認められることを報告した (本年会)。すなわち, ダイアジノンオキソンはアトロピンにより拮抗される血圧上昇を生じるのに対して, ダイアジノンはアトロピンで拮抗されない血圧低下を生じた。さらに, ダイアジノンは摘出心臓の自動能と収縮を抑制するとともに, 摘出血管のノルアドレナリン収縮を強く抑制することも報告した。本報告ではダイアジノンの循環機能不全の原因を探るために, 摘出血管平滑筋収縮に対するダイアジノンの抑制機構を解析した。解析にあたり, ダイアジノンオキシソンの作用も比較検討した。

実験には SD 系雄性ラットの摘出胸部大動脈を用いた。ダイアジノンはノルアドレナリン ($1\mu\text{M}$) 収縮に比べて高濃度カリウム (40 mM) 収縮を強く抑制した (IC_{50} はそれぞれ約 $4 \times 10^{-5}\text{ M}$, $2 \times 10^{-5}\text{ M}$)。一方, ダイアジノンオキソンもノルアドレナリン, 高濃度カリウム収縮を抑制したが, 抑制程度はダイアジノンに比べて約 10 倍弱かった。これらの収縮抑制は外液の Ca^{2+} 濃度を下げることによって増強された。ダイアジノンとダイアジノンオキソンは高濃度カリウムによる収縮と細胞内 Ca^{2+} レベル (fura-2 を指示薬として F340/F380 を測定) を平行して減少させた。ダイアジノンによる高濃度カリウム収縮の抑制は Bay k 8644 (100 nM) によって拮抗された。一方, ダイアジノンは Ca^{2+} -free 液中でのノルアドレナリン ($1\mu\text{M}$) あるいはカフェイン (20 mM) による収縮を抑制しなかった。

以上より, ダイアジノンは血管収縮を強く抑制し, この抑制は L 型 Ca^{2+} チャンネルを介する細胞内への Ca^{2+} 流入の抑制による可能性が推測された。ダイアジノンに比べてダイアジノンオキシソンの抑制程度が小さいことから, 抑制には P=S 型の化学構造が重要と思われた。

○苗代一郎，吉岡 勝，石村美祐，
茶谷文雄，中井洋一，佐藤秀蔵

武田薬品・医薬開発本部・薬剤安全性研究所

ゲンタマイシンの100 mg/kg/日を6週齢の雄性F344/Jc1ラットに3週間皮下投与して、血漿中エリスロポエチン(Epo)濃度を測定すると共に血液学的、血液生化学的検査及び病理組織学的検査を実施し、ゲンタマイシンを反復投与した際に認められる貧血の発現機作について検討した。

ゲンタマイシンを反復投与すると、投薬3週間後に赤血球数、ヘマトクリット値及びヘモグロビン濃度の低値が認められた(対照群と比較して15~17%の低値)。また、投薬1及び2週後にEpo濃度の低値並びに投薬2及び3週後に網状赤血球数の低値が認められた。血液学的検査、血液生化学的検査、剖検並びに病理組織学的検査では出血性、溶血性及び骨髄性貧血あるいは造血亢進を示唆する変化は認められなかった。赤血球の形態学的検査並びに浸透圧脆弱性検査でも赤血球に異常は認められなかった。一方、腎臓の病理組織学的検査では尿細管及び間質細胞に壊死、変性あるいは再生が認められた。

以上の結果及びEpo産生細胞が尿細管の間質細胞であるとの報告から、ゲンタマイシンによる貧血はEpo産生細胞が障害を受けたことによるEpo産生抑制に起因する腎性貧血であると考えられた。また、薬物による腎性貧血を検討する場合、血漿中Epo濃度及び網状赤血球数は有用なパラメータとなることが示唆された。

○安仁屋洋子, 田本佳寿江, 新垣あや子

琉球大・医・保健・生体機能

多くの化学発ガン物質が生体内変化を受けて反応性の高い最終発ガン物質に変わるが、グルタチオンS・トランスフェラーゼ(GST)はそれら代謝物のグルタチオン抱合を行う重要な解毒酵素である。肝ミクロソームGSTは、サブユニット当たり1個のシステイン残基を含有し、このSH基が修飾されると活性化されることが知られている。本研究では、代謝的活性化を受ける化学発ガン物質のミクロソームGSTならびにチトクロムP-450活性への影響について *in vitro*, *in vivo* で検討した。

〔実験方法〕 雄性ICRマウス(6週令)にフェノバルビタール(75 mg/kg, 2日間, i.p.)またはエタノール(15%液, 3日間, 飲用)を投与後、一夜絶食ののち、肝を摘出し、ミクロソームを調製した。化学発ガン物質をNADPH生成系存在下にこれらのミクロソームに作用させ、GST活性とP-450活性(アニリン水酸化活性, アミノピリン脱メチル化活性)を測定した。また、エタノール投与後、ジメチルニトロソアミン(DMNA, 60 mg/kg, i.p.)を投与し、24時間後に肝を摘出し、各酵素活性を測定した。

〔結果・考察〕 DMNAによりミクロソームGST活性は *in vitro*, *in vivo* ともに2~3倍に増加し、P-450活性は著明に減少した。アフラトキシンB1およびアセチルアミノフルオレンは *in vitro* でわずかにGST活性を増加させ、P-450活性を減少させた。これらの結果は、ミクロソームGSTのSH基に化学発ガン物質の活性代謝物が結合することにより、GSTを活性化させたことを示唆している。

○神谷隆信, 下口幸夫, 森 敬子, 谷幡 務,
橋本光也, 木村裕則

(株) 帝人バイオ・ラボラトリーズ 東松山研究所

はじめに；安全試験で眼科学的検査は、一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査および病理学的検査と同じく実施されている。しかし、眼検査の結果から報告されるデータの多くは白内障の発生である。今回、我々は安全性試験を行うために購入したラットで眼底カメラ検査で4例に異常像が観察されたので、組織学的検査と合わせて報告する。

方法；検査した動物は、5ないし6週齢のSDラット雌雄各180匹を日本Slc（株）より入手した。1週間の順化飼育を行った後、それぞれ試験に供した。眼底検査は、眼底カメラ(Kowa RC-2)を用い、左右の眼底について少なくとも投与前と投与終了時の2回行った。動物は、試験終了時にペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血致死いたらしめた。眼球は、摘出後デビットソン液で固定し、常法に従ってパラフィン包埋、薄切、H-E染色を施し検索した。

結果および考察；眼底検査では網膜反射低下、神経乳頭部境界不鮮明、血管内径狭窄あるいは撮影不能がみられた。組織学的には内網状層および内顆粒層の萎縮、外顆粒層の消失、神経細胞層の紡垂細胞増殖、神経線維層の萎縮などが観察された。これらの所見はいずれも片側性の発生であるが、薬物の影響を評価するに当たっては、投与開始前の検査を十分に把握する必要があるものと考えられる。

毒性用量でのペミロラストカリウム (TBX) の4週間
反復経口投与の血漿中濃度推移の変化について

平宮直樹, 山木康弘, 石田泰江, 佐藤芳隆

東京田辺製薬㈱ 開発研究所 安全性研究室

〔目的〕 毒性の発現するような過大量を反復投与した時のトキシコキネティクス (TK) が, ファーマコキネティクスや単回投与の血漿中濃度推移と異なる挙動を示すことが知られている。今回我々は, TBXの軽度毒性発現量をラットに4週間反復経口投与し, 血漿中濃度推移の変化について検討するとともに, 反復投与のTKの予測について考察したので報告する。

〔方法〕 Crj:CD系雄性ラットに, TBXの50mg/kgを5週齢より4週間反復経口投与し, 1回投与時, 1および4週投与時に, 投与前と投与0.5, 1, 2, 3, 4, 8および24時間後に採血を行い, 血漿中濃度からAUCと平均血漿中濃度推移を求め比較した。

〔結果および考察〕 平均血漿中濃度推移は, 1回投与では1時間と4時間後にピークが認められたのに対し, 反復投与では2時間と8時間後にピークが認められた。ピークの濃度は, 1回投与時では各々1.8 μ g/ml, 4.4 μ g/ml, 反復投与の1週投与時では各々19.4 μ g/ml, 16.4 μ g/ml, 4週投与時では各々22.9 μ g/ml, 40.0 μ g/mlであった。また, AUCの平均値は, 1回投与時が76.8 μ g \cdot hr/ml, 1週反復投与時が246.9 μ g \cdot hr/ml, 投与4週時が499.6 μ g \cdot hr/mlであった。

以上の如く, TBXでは, 血漿中濃度推移は1回投与時と反復投与時では異なる傾向を示すこと, AUC_{0-24hr}は投与を反復することにより増加することが示された。このことから, 毒性発現用量付近の反復投与での採血点およびTKの予測は, 単回投与の結果からでは不適当な場合があり, 4週間の反復投与の採血点およびTKの予測には1週間程度の反復投与の結果が必要と思われた。

○吉岡 直記¹⁾、乾 公正²⁾、永井 由美子¹⁾、田中 弘光¹⁾、
真板 敬三²⁾、岩田 光夫¹⁾、倉本 和直³⁾

¹⁾ 呉羽化学工業株式会社、²⁾ (財) 残留農薬研究所

³⁾ (財) 東京都老人総合研究所

【緒言】ラットの加齢に伴う変化は組織別に多々報告されている。しかし、3年以上飼育された動物の報告例は少なく、特に骨に関する情報は乏しい。今回、約36箇月齢の老齢ラットにおける骨について、形態学的、血清化学的に検索する機会を得たので、これを報告する。

【方法】(財)東京都老人総合研究所より導入した、約36箇月齢のWistar(Slc:Wistarを近交系育成中)系雌ラット3例(Wistar 1-3)、Fischer F344(F344/DuCrj)系雌ラット1例を用いた。これらの動物について、①臓器・組織の病理組織学的検査②血清化学的検査、尿検査③DXA法による大腿骨、脛骨の骨密度測定④骨標識剤としてカルセインを剖検前に10日間隔で2回皮下投与し、脛骨近位端非脱灰薄切標本(Villanueva Goldner染色、未染)ならびに非脱灰酵素組織化学標本(酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ(TRAP)、アルカリフォスファターゼ(ALP))観察を実施した。また骨に関しては、17週齢のWistar系雌性ラット6例と比較検討を行った。

【成績】骨以外の組織における病理組織学的検査の結果、老齢ラット全例に通常観察される慢性腎症、甲状腺C細胞腺腫/過形成が、また、F344に上皮小体腺腫、Wistar 2に乳腺線維腺腫がみられた。

老齢ラットの脛骨近位端骨密度を17週齢ラットと比較したところ、Wistar 1では18%の増加、Wistar 2において9%の減少がみられたが、残り2例は17週齢ラットと同程度の骨密度を示した。脛骨近位端非脱灰薄切標本による観察では、老齢ラットに共通して、成長軟骨層及び成長軟骨細胞の明らかな減少と、1次海綿骨の消失がみられた。さらに4個体とも、骨梁の連続性などに骨梁構造の変化が認められた。

カルセイン二重骨標識による観察では、わずかしこ標識されておらず、骨形成は極めて低下しているものと考えられた。TRAP及びALP酵素染色においては破骨細胞及び骨芽細胞の数、活性ともに低下していることが示唆された。

骨密度減少がみられたWistar 2において、血清PTH、尿中Ca、P、cAMPの上昇がみられた。これに対して骨密度の増加していたWistar 1と、骨密度に変化のみられなかったWistar 3、F344については、血清化学、尿検査値に大きな変化はなかった。

【考察】以上のことから、今回観察した36箇月齢ラットの骨において、成長軟骨の減少及び1次海綿骨の消失は加齢による特徴であること、また骨量の変化は骨代謝回転が著しく低下していたことから、検討以前に既に変化していたものと考えられた。

伊藤賀永子，苗代一郎，織田 茂，中井洋一

武田薬品工業株式会社・薬剤安全性研究所

〔目的〕 毒性試験において、アルブミンの測定にはブロムクレゾールグリーン (BCG)を用いたヒト用キットが頻用されている。しかし、ラットの場合、BCG法で測定したアルブミン値は電気泳動法に比較して高値であるなどの問題点があった。そこで、ラット血漿アルブミンをBCG法で測定する際の最適条件を見出すため、市販されている8種のアルブミン測定用キットを用いて比較検討を行った。

〔材料及び方法〕 市販ラット血清(アルブミン，グロブリンⅡⅢ，グロブリンⅣ-1，グロブリンⅣ-4及び γ -グロブリン)を生理食塩液で約4g/dlに調製し、自動分析装置(日立7150)を用いて吸光度変化を経時的に調べた。また、ラットアルブミンとの反応性を、測定時の標準として用いるヒトアルブミンと比較した。

〔結果〕 1. BCGはアルブミンの他にグロブリンとも反応するが、ラットグロブリンとの反応速度はアルブミンよりも遅かった。

2. BCGに対するラットグロブリンの反応性をキット間で比較したところ、約2倍の違いがみられた。

3. BCGに対するアルブミンの反応性は、ヒトとラットで異なり、最大約40%の違いがみられた。

〔結論〕 ラット血漿のアルブミンをBCG法で測定した場合に、測定値が見掛け上高値を示した原因として、①従来から言われてきたグロブリンとの反応性の他に、②アルブミンとBCGとの反応性がヒトとラットで異なることも考えられた。このことから、前者については、反応時間を適切に設定した上でラットグロブリンとの反応性が低いキットを用い、後者については、測定時の標準としてラットアルブミンを用いることで、定量の正確性を改善できることが明らかとなった。

—モノヨード酢酸による有色マウスの網膜症への応用—

○杉本眞次, 今若実穂, 今井良悦, 金丸健一,
伊藤隆康, 佐々木 啓, 安藤孝夫, 西条武俊, 佐藤秀蔵

武田薬品工業株式会社・薬剤安全性研究所

網膜電図 (ERG) を指標とした有色マウスの視覚毒性試験法の確立を目的として本実験を実施した。ERGの記録は先の白色マウスの方法¹⁾ に準じて行い、今回は、有色マウス (C57BL系) での記録条件、特に、麻酔薬及び暗順応時間について検討した。次いで、既知網膜毒としてマウスにおいて殆ど報告のみられないモノヨード酢酸 (IAA) を用い、その30、45及び60 mg/kgを有色マウスに単回静脈内投与した場合のERGの変化を経目的に記録し、更に投与15日後に網膜の病理組織学的検査を実施し、以下の成績を得た。

- 1) 無麻酔下でのERG波形と比較して、ペントバルビタール麻酔では律動様小波が不明瞭となった。ケタミン・キシラジンの併用麻酔あるいは、ウレタン・キシラジン・ケタミンの併用麻酔では無麻酔下でのERG波形との間に差が認められなかったことから、本検討ではケタミン・キシラジンの併用麻酔を選択した。また、40分以上の暗順応で、比較的安定したERGを記録することができた。
- 2) IAAの 30 及び 45 mg/kg 投与群では、投与1～3日後に a、b 及び c 波振幅の軽度な減少を認めたが、投与7日後にはいずれの波もほぼ回復した。60 mg/kg 投与群では投与1日後よりERG各波の著明な減弱を認め、14日後においても回復しなかった。
- 3) 病理組織学的検査においては、IAAの60 mg/kg投与群で顕著な視細胞の減少、杆・錐状体層及び外網状層の菲薄化が認められた。
- 4) 以上より、今回設定したERGの記録条件で、有色マウスにおいて比較的安定したERG波形が記録できること、また、網膜毒である IAA のERG に及ぼす影響を検出できたこと、更に、ERG の変化を裏付ける網膜の病理組織学的所見を得たことから、本ERG 記録法は有色マウスにおいても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。

【引用文献】 1) 杉本眞次 他(1996):マウスの網膜電図記録法の検討及びそのヨード酢酸ソーダによる網膜症への応用. J.Toxicol. Sci., 21, Supplement I (印刷中)

鈴木弘美、井上智彰、進藤英俊、志村賢一、堀井郁夫

日本ロシュ(株)・研究所・毒性病理部

ラット細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体 (mAb) は、市販されるものが増えてきたが、マウス、ヒトに比べると陽性細胞の範囲が特定されていないものがある。今回は、ラットリンパ球サブセットを検索するにあたって重要であると考えられる mAb について、その染色性について検討したので報告する。

[方法] 正常 SD 系ラットの末梢血を比重遠心分離した単核球、および脾細胞を、ラット細胞表面抗原に対する mAb (CD4;OX-38, CD5;OX-19, CD8a;OX-8, CD11b;WT.5, CD45RA;OX-33, Kappa light chain (Kappa); MRK-1) を用いて 2 重染色し、FACScan にてその染色性を検討した。

[結果] CD4/CD8a の 2 重染色では、マウスの場合の様に 4 つの集団には別れず、CD4+CD8_{low} のブロードな集団が存在した。CD4/CD11b の 2 重染色では CD4+CD11b+ の細胞集団が認められたので、CD4+CD8_{low} の細胞集団は、マクロファージ系であると考えられた。CD5/CD8a の 2 重染色では、CD5+細胞が CD5+CD8a-(Th) と CD5+CD8a+ (Ts/c) の細胞集団に別れ、マクロファージ系および NK 細胞を含まない集団として、Th、Ts/c の割合を求めることができるものと考えられた。CD5/Kappa の 2 重染色では CD5-Kappa+ の B 細胞を CD5-Kappa- の細胞集団と分離でき、CD5-Kappa+ の B 細胞と CD5+Kappa- の T 細胞の割合を求めることができるものと考えられた。以上のように、ラットにおいては、マウスおよびヒトの場合によく用いられる CD4/CD8 の 2 重染色ではなく、ラットに特異的な染色法を行なうことにより、より細胞集団を絞りこんだ解析ができるものと考えられた。

○向井大輔、牧野江梨子、大石法男、藤島敦、山川誠己、北島省吾、
渡修明、井上博之

(財) 食品農医薬品安全性評価センター

〔目的〕ビーグル犬の失血後の造血反応を末梢赤血球、骨髓像およびエリスロポエチンを指標として追跡する。加えてエリスロポエチン抑制作用を持つといわれる Carboplatin を投与した時の反応も調べる。

〔方法〕ビーグル犬雌雄各2頭から体重の2%量の瀉血を行った。赤血球系項目、網赤血球率および血清エリスロポエチンの測定を瀉血前および瀉血後28日まで2日おきに行った。加えて瀉血前および瀉血後14日目に骨髓穿刺を行い、骨髓細胞の分類を行った。

さらに、ビーグル犬雌雄各2頭を用い、Carboplatin 4 mg/kg/day を瀉血後5日間投与し、同様の測定を行った。

〔結果〕血清エリスロポエチンは、雄では瀉血前の8.4~13.0 mIU/ml に対し瀉血後2日に34.9~47.1 mIU/ml まで増加した。一方、雌では瀉血前の11.6~14.2 mIU/ml に対し瀉血後2日に123.0~145.3 mIU/ml まで増加した。網赤血球率は、雄では瀉血後6~8日に瀉血前の4~6倍まで増加、雌では瀉血後4~6日に瀉血前の2~4倍まで増加した。HCT、HGB、RBCの各項目は、瀉血後2~4日に、瀉血前に対し雄では65~87%、雌では70~83%の値を示し、以後緩やかに回復した。MCV、MCH、MCHCの各項目ならびに骨髓検査では、明確な変化は認められなかった。Carboplatin 投与例では、雌で瀉血後2日に血清エリスロポエチンの増加量の低下が認められたが、雄では明瞭な差は認められなかった。

〔結論〕体重の2%量の瀉血を行うと血清エリスロポエチンは急速に増加を始め、そのピークは瀉血後2日であった。血清エリスロポエチンの増加量は雄よりも雌の方が大であった。網赤血球率は瀉血後6日前後まで増加し、その後回復に向かった。末梢血のHCT、HGB、RBCの各項目は、瀉血後6日以後回復に向かった。なお、雌ではCarboplatinによる血清エリスロポエチンの抑制作用が明瞭に認められた。本手法は、ビーグル犬における薬剤投与の負荷による貧血の推移のモニタリングに有用と考えられる。

関 誠、大原 直樹、関 剛幸、
小島 幸一、笠間 菊子、今井 清

(財) 食品薬品安全センター 秦野研究所

ラットでは、適度な食餌制限により延命や加齢性病変軽減効果が得られることが知られている。今回、これらの効果が期待できる飼育条件下での化学物質投与による毒性発現について精査するべく、四塩化炭素 (CCl_4) 投与によるラットの肝および腎臓病変に及ぼす食餌制限の効果について検討した。

雌雄各42匹の Sprague-Dawley 系ラットを、不断給餌と制限給餌(自由摂取量の約75%を毎日給餌)のグループに分け、これらのグループにそれぞれ溶媒(コーン油)対照群、 CCl_4 の 0.1 または 0.2 ml/kg 投与群を設定した。いずれも1日1回(1週6回)の反復強制経口投与を8週間にわたって実施し、肝機能障害に関する臨床化学的変化、肝および腎臓の病理学的変化について検討し、以下の結果を得た。

- ① 血漿中の過酸化脂質濃度は、溶媒対照群では制限給餌例の方が低値を示したが、 CCl_4 投与群では、逆に制限給餌例の方が自由給餌例を上回る傾向を示した。
- ② CCl_4 投与による血漿中トランスアミナーゼ活性およびビリルビン濃度の上昇、肝臓内 p-450 含量の低下が認められたが、これらの変化は雌では制限給餌例の方がより著明であった。
- ③ 組織学的な変化として、肝線維症ないし肝硬変が認められたが、雌雄ともに制限給餌例の方が重篤であった。
- ④ 腎臓では、制限給餌により糸球体係蹄の肥厚が増強された。

これらの結果から、制限給餌により CCl_4 の反復強制経口投与による毒性が増悪することが明らかとなった。

○中山直樹，荒川恭子，佐々木正治，中村勇，木村正明
樽本保男

大正製薬株式会社 開発研究所 安全性研究室

【目的】電子医療機器の発達により，ヒトの臨床の間では電気生理学的機能検査が広く普及している．我々はこの手法を薬物の安全性評価の一環として，ビーグル犬の感覚機能検査に取り入れるべく検討した．

【方法】雄ビーグル犬，約10箇月齢，体重8～11kgを13匹用い，キシラジン(約2.0mg/kg)及び硫酸アトロピン(約0.05mg/kg)の皮下投与による鎮静状態にて視覚，聴覚及び体性感覚の各誘発電位を測定し，個体間の変動及び再現性を確認した．視覚機能検査はフラッシュ刺激による網膜電図(ERG)及びフラッシュ(F-VEP)＋パターンリバーサル(P-VEP)刺激による視覚誘発電位(VEP)，聴覚機能検査はトーンパース音刺激による聴性脳幹反応(ABR)，体性感覚検査は正中神経・尺骨神経経路上を電気刺激による体性感覚誘発電位(SEP)を測定した．

【結果及び考察】ERGはa波，b波及び3個の律動様小波が再現性良く認められた．F-VEPは100msec前後に波形が認められたが再現性はあまり良くなかった．P-VEPは50～80msecの間に波形が再現性良く認められた．ABRは1～6msecの間に5つの波形が再現性良く認められた．SEPは刺激部位の違いに大きく左右され，個体によってはほとんど波形を記録することができなかった．今回の結果より，ERG，VEP(F-VEPよりもP-VEPの方が有用)及びABRはビーグル犬の感覚機能検査として取り入れことが可能と考えられた．しかし，SEPに関しては個体間の差が大きく再度詳細に検討する必要があると考えられた．

○西矢 剛淑、萩原 美代子、北野 裕、高砂 浄、野村 護

第一製薬株式会社 安全性研究所

【目的】網膜電位図（ERG）は網膜の機能検査法として有用な方法であり、視覚毒性試験において実施されているが、その測定は比較的簡便に実施できる a、b 波および律動様小波に限定して行われることが多い。しかしながら、これらの各波は網膜色素上皮細胞の機能は反映しない。そこで、視覚毒性試験における網膜色素上皮細胞の機能評価法の確立を目的に、ERG c 波測定法をラットを用いて検討した。

【方法】動物には雄性 BN/Crj ラットを用いた。ERG 測定は、コンタクト型塩化銀電極および直流増幅器を用い、ケタミンおよびキシラジン併用麻酔下に行った。光刺激には、オプティカルファイバーによって眼前に導出された白色光の単回照射を用い、刺激時間はシャッターの開閉により制御した。

【結果】1) コンタクト型塩化銀電極を用いることによって、c 波を安定して測定することが可能となった。暗順応時間および光刺激条件による c 波に及ぼす影響を検討した結果、暗順応時間 60 分以上、光刺激強度 15 lux 以上（光刺激時間 10 sec）でほぼ最大振幅を示した。また、光刺激時間 10 sec 以上（光刺激強度 15 lux）で最大振幅が得られ、かつ c 波への off 応答の影響が排除できた。2) 色素上皮細胞毒の sodium iodate 30 mg/kg 静脈内投与により、投与後 1 時間から c 波の減弱および陰性化が認められ、投与後 24 時間においてはさらに陰性化が進行した。

【まとめ】1) 直流増幅およびコンタクト型塩化銀電極を用いることによって、ラットにおいて ERG c 波を安定して測定することが可能となった。2) ERG c 波の測定条件を検討した結果、ラットにおいては暗順応時間 60 分以上、光刺激強度 15 lux 以上、光刺激時間 10 sec 以上が至適であることが示された。3) 色素上皮細胞毒の sodium iodate 投与により ERG c 波の顕著な減弱および陰性化が認められた。以上、本測定法は網膜色素上皮細胞の機能評価法として有用であることが示唆された。

池田浩明, 岡崎啓幸, 鮫島秀暢, 永田良一

株式会社 新日本科学 臨床病理検査室

小児を対象とした医薬品の開発には, 幼若動物を用いた安全性試験が必要である。その対象動物としてはラットまたはビーグルが一般的であるが, バイオ技術の発達に伴い幼若ザルの試験も必要となってくる。一方, 臨床試験において高齢者による試験を行う場合に, その予備検討としてサルを用いた試験が時に重要とされる。また, 小児での治験は難しく, これらの代替としてもサルの利用が考えられる。

そこで, 当研究所において生産された7カ月齢までのカニクイザルについて, 週齢または月齢に伴う血液学および血液化学的検査値の推移を調べるとともに, 成熟ザルとの比較を行った。

体重は雌雄とも出生後ほぼ直線的に増加し, 180日齢の体重は出生翌日(雄:0.22~0.34 kg, 雌:0.25~0.33 kg)の約3倍であり, 雌雄差はなかった。

血液学的検査では, 雌雄の RBC, Hct と雌の Hgb が週齢と負の相関, 雌雄の MCH, MCHC と雄の MCV が正の相関を示した。成熟カニクイザルの基準値との比較では, 雌雄に共通した有意差は MCHC のみであった。

血液化学的検査では, 雌雄の Ca が負の相関を, 雌雄の Fe が正の相関を示した。成熟ザルの基準値との比較においては, 幼若動物の方が有意に高値であった項目は雌雄の ALP, Ca, P, 雄の BUN, 雌の AST, LDH, γ -GTP, 低値であった項目は雌雄の CRNN, 雌の cholesterol であった。

以上の結果から, 血液学的検査では幼若ザルで特徴的な値を示す項目はなく, 血液化学的検査では ALP, P, Ca および CRNN が幼若ザルで特徴的な値を示し, 評価する上でも特に注意する必要があると考えられた。

実験動物のトランスアミナーゼ (AST, ALT) 測定 における至適条件

○豊田直人, 荒井由美, 稲元弘昭, 井上芳巳, 加藤 譲,
神谷光一, 近藤貴雄, 高橋 守, 寺坂美和子, 水野三郎,
望月文敏, 渡辺計子, 長瀬すみ

長瀬研生化学勉強会

実験動物を用いた毒性試験において血液化学検査を実施する場合、ヒト用に開発されたキット試薬を用いることが多い。しかし、動物種によって試薬の至適条件は異なると思われ、かならずしもヒトの測定試薬で満足できるかは不明である。今回、ラットおよびイヌについて、酵素活性測定条件決定に重要である基質に対するKm値および至適pHについて検討したので報告する。

[方法]日本臨床化学会(JSCC)のヒト血清中酵素活性測定の勧告法試薬に準拠し検討した。試料測定には無処置動物および薬物(CCl₄など)投与動物の血漿および血清を用いた。また、ヒト血清も同時に測定した。Km値算出はHofstee-plotを用い、最小二乗法を適用した。pHの至適条件は測定値および近似曲線から求めた。

[結果]それぞれの基質に対するKm値は、動物の血漿と血清で差はなかったが、動物種差はみられた。しかし、ヒトのKm値と比べほぼ同等であった。活性値とpHの関係は、動物種によって異なるパターンを示したが、その至適pH域はヒトの至適pH域を含むものであった。各試料のKm値(Max.-Min.)および至適pH域を示す。

	AST			ALT		
	2-オキソグルタル酸 Km (mM)	アスパラギン酸 Km (mM)	至適 pH域	2-オキソグルタル酸 Km (mM)	L-アラニン Km (mM)	至適 pH域
イヌ	0.17-0.39	3.9-7.7	7.5-8.0	0.42-0.76	8-22	7.0-7.5
ラット	0.09-0.53	1.3-4.6	7.5-8.0	0.32-0.75	10-26	7.0-8.0
ヒト	0.25-0.53	3.2-8.0	7.5-8.0	0.33-0.59	14-16	7.0-7.5

[結論]イヌおよびラットのトランスアミナーゼ測定はJSCC準拠の基質濃度およびpHで問題ないと判断した。むしろ各施設の装置および試薬における各動物の測定検出限界を確認することが重要である。

ブライアン ブロックスアップ、スーザン Y. スミス

バイオ・リサーチ ラボラトリーズ 株式会社、カナダ モントリオール市

1993年、米国FDAは、閉経に起因する骨粗鬆症の阻止および治療に使用される薬剤の前臨床および臨床試験に係るガイドライン（案）を発表した。このガイドライン（案）における動物試験は、薬効評価を目的としているが、また、厚生省も昨年、同様なガイドラインを発表している。これらガイドラインの中で興味ある点は、比較的新しい技術や試験方法の使用を薦めていることである。

骨イメージング（映像）や血中および尿中生化学マーカーは、骨の形成や減少検査に使用されるが、特に骨量測定方法としてのDPA、DEXA、QCTなどのイメージング技術の利点として、体外診断のため動物を傷つけることなく多くの部位について評価出来、また、同一動物について何度も繰り返し検査が出来ることにある。前臨床試験において係る装置を使用し、厚生当局への申請資料とすることあたり、いくつかの点を満たさなければならない。それは、検査の信頼性を保証するための装置およびシステムのバリデーションであり、機械の精度や試験評価のためのデータベースが整っていることである。

また、一日に相当数の動物を検査することも実際的な重要要因であり、装置の耐用性と整備も不可欠である。我々は、猿のBMD（骨密度）測定において、Hologic QDR 2000 PLUS を使用し異なった複数の骨部位について体系的に標準化された測定方法を開発した。

例として、アカゲ猿の測定における精度（CV）は、次のとおりであり、
腰椎：1.0%、大腿骨頸部：3.1%、前腕骨：0.8%、これらの結果は、人での測定結果とはほぼ同様なものであった。

毒性試験における骨イメージング技術の使用は、ケース・バイ・ケースに決定されているが、いうまでもなく薬効として、または副作用的に骨形成や減少を生じさせる薬剤についての所見は、被験物質の毒性プロファイルに有意義なデータとして加えられるものであり、以降の試験における臨床適用量設定などの際の参考にもなり、薬理本試験前に必要な用量設定試験の省略も可能になると考える。

しかし現在は、ただ少数の限られた骨薄切片のみが屠殺後に病理学者によって評価されており、係る評価も質的なもののみとなっている。

今後、イメージング技術を使用していくようになれば、より広範囲な量的評価も出来ることになり、また、これら技術で繰り返し測定することにより、試験結果そのものの評価もより信頼性の高いものとなる。

索引

あ

青山裕之	P05
青山真樹子	P05
赤井哲夫	P30
赤堀文昭	P11
秋田正治	P50
	P51
秋山純一	C5
朝波省吾	P01
	P56
足立健児	P40
安達智子	P57
	P58
安仁屋洋子	P68
阿部いくみ	C8
荒井由美	P80
荒川恭子	P77
有島和義	P11
有吉範高	P29
安藤孝夫	P73

い

飯田朋子	P47
五十嵐 功	A9
	P28
	P36
五十嵐良明	P27
池崎信一郎	P26
	P34
池谷純子	P49

池田紀和	C5
池田浩明	P79
伊佐間和郎	B3
石井祐次	P29
石井 涉	P03
石崎高志	S2-2
	座長
石田泰江	P70
石原由美	P30
石村美祐	P67
泉 勝彦	C11
和泉祐子	P53
磯部直彦	P25
板垣 宏	C5
市川和洋	A5
	S1-4
市村彰敏	C10
伊藤賀永子	P72
伊藤圭一	C3
伊藤隆司	S1-3
伊藤隆康	P73
伊東信行	P33
伊藤理恵乃	B3
稲元弘昭	P80
乾 公正	P71
井上 優	C13
井上 達	A13
	C1
	C5
	P08
	P12
	P27
	P35
井上智彰	A12

	P74		P19
井上尚英	C2	宇佐美雅仁	C5
	座長	宇佐見 誠	B3
井上晴美	P29	宇佐美正義	P40
井上博之	C3	内田雄幸	P22
	P75	内海英雄	A5
井上正康	S1-2		S1-4
	座長		座長
井上芳巳	P80	畝山智香子	P22
井原真哉	P30	梅村隆志	B3
	P31		P08
井平恵美	P62		P12
今井 清	P76		P22
今井良悦	P38		P35
	P73	浦野浩司	C7
今沢孝喜	P26	海野 隆	P07
	P34		
今西 豊	C5		え
今若実穂	P38		
	P73	江頭 亨	P17
井村伸正	A5		座長
入村兼司	P39	江角凱夫	B2
岩田光夫	P71	衛藤光明	P15
		江馬 眞	C4
	う		P45
		遠藤貴子	P47
上塚浩司	A6	遠藤 泰	P61
	A15		P62
上野光一	A2	遠藤 仁	C14
	P32		座長
	座長		
上野芳夫	A11		お
	A14		
	P18	大谷幸子	P06

大石法男	P75		S2-6
大石眞之	B12		座長
大越健自	C5	小黒多希子	B10
大島洋次郎	P44	尾崎正和	P02
	P52	小沢直記	B6
	P53		P05
	P54		S2-5.2
	P55		座長
大谷勝己	P16	織田 茂	P43
大野浩司	B8		P72
大野忠夫	C5	小野 敦	C1
大野泰雄	B1		P12
	B2	小野寺博志	C6
	B3		P41
	B11		P42
	C5	小畑俊男	A1
大橋芳彦	A9	Dr. Curtis Omiecinski	SL2
	B7		
	P36		か
大原直樹	P76		
大道正義	A2	甲斐幸恵	P35
大村 実	C2	柿島 博	C5
岡崎啓幸	P79	影山明彦	P30
小笠原裕之	P10	笠井 裕	C5
岡田浩史	P39	笠原健一郎	P26
岡田忠彦	B7		P34
小川隆志	P62	笠間菊子	P76
小川幸男	C1	梶村哲世	C12
	P12	糟谷 環	P59
小川義之	C4	加藤 聡	B5
	P45	加藤 穰	P80
奥村秀信	C5	加藤直樹	P31
奥村弘樹	A11	加藤日路士	P59
小栗一太	P29	加藤道幸	A8

	A10	菊池和彦	P61
	B14	岸田文雄	P59
加藤康子	P49	岸本成史	A11
金澤由基子	P57	北島省吾	P75
	P58	北野 裕	P78
金津赫生	P37	北村紀子	P44
金丸健一	P73		P53
金子豊蔵	C1	金 亨津	P26
	C5		P34
	P27	木村裕則	P69
鎌滝哲也	B9	木村邦男	B7
	S2-3		C15
	座長		P36
鎌田 亮	P63	木村正明	P77
神谷光一	P80	清宮健一	P64
神谷隆信	P69		
萱野勇一郎	B4		<
河合祐二	P58		
河合悦子	C13	久保山靖仁	P24
川崎 一	P25	倉本和直	P71
川崎 靖	B3	栗下昭弘	C5
	P27	紅林秀雄	B1
川島邦夫	A13		B2
	C1		座長
河谷善則	P52	暮部 勝	P64
川畑貴美	A8	黒川雄二	C1
	B14		P12
川端留美	C11		P22
川村 理	A11		P35
河村佳徳	P55	黒田行昭	P50
川本俊弘	P23		P51
神鳥仁志	C9	Eugene P. Cronkite	P08
		桑形麻樹子	P48
		桑原 孝	P01

桑村 充	P30	西條 薫	C5
		齋藤真也	P63
	け	齊藤 実	C1
			B3
玄番宗一	C13		P27
	座長	坂内なるみ	C10
			P10
	こ	坂口 弘	C10
			P10
小泉治子	C7	坂牧義之	P40
甲田 彰	P02	酒見和枝	B3
御家瀬 尚	P46		B11
小久江栄一	P07	佐神文郎	B5
小久保百合子	P33	坂本一民	C5
小島肇夫	C5	坂本知恵子	C3
小島幸一	P57	匂坂秀樹	C15
	P58	佐久間貞重	P30
	P76		P31
児玉 泰	P23	佐倉康文	C9
児玉幸夫	P12	佐々木眞敬	P47
小林明子	P32	佐々木 啓	P73
小林麻美	C14	佐々木正治	P77
小林賢一	P04	佐藤 玄	B5
小林晴男	P63	佐藤里子	P28
小林洋四郎	P47	佐藤 伸	P30
Dr. Frank J. Gonzalez	SL1		P31
近藤貴雄	P43	佐藤哲男	A2
	P80		P32
		佐藤直美	P07
	さ	佐藤秀蔵	P43
			P67
佐井君江	P35		P73
西条武俊	P38	佐藤 洋	C12
	P73	佐藤芳隆	P70

関 誠	P76		P41
瀬子義幸	A5		P42
瀬畑信哉	A9		座長
	C15	高橋芳樹	B9
	P36	高山房子	P17
		滝沢万里	A14
		竹川 潔	C6
曾我立巳	P33		P41
			P42
		竹重公一朗	S1-3
			座長
田内清憲	C10	竹下啓藏	S1-4
	P10	武田理夫	C14
高岡雅哉	A9	竹花一成	P20
高木博隆	P11	田澤真矢	P02
高砂 浄	P78	田嶋尚之	P49
高島宏昌	P09	田代文夫	A14
	P48	辰見 寿	C5
高田幸一	P22	田中宏治	P36
高田早苗	A10	田中 悟	C1
高野勝弘	C5	田中豊人	B12
高橋正一	P41		P21
高橋 惇	B1	田中直樹	P65
	B2	田中 光	P33
高橋 省	B12	田中弘光	P71
高橋宏明	P13	田中政充	A3
	P65	田中丸善洋	P26
	P66		P34
高橋弘樹	P47	田中頼久	P49
高橋 守	P80	田中亮太	C3
高橋道人	C6	谷 尚子	C5
	P22	谷幡 務	P69
	P26	谷村顕雄	P35
	P34	谷村勇次	P44

田原紀子	C9		て
玉飼博之	P61		
玉野静光	P33	Guanxun Tian	P64
田村 工	P01	寺岡宏樹	P46
田村慎一	P19		P20
田村 浩	B13	寺坂美和子	P80
田本佳寿江	P68	寺西宗広	P28
樽本保男	P77		
			と
	ち		
		土井邦雄	A6
千葉康司	P05		A15
千葉 寛	A2		P40
	P32	東條宏子	B14
茶谷文雄	P60	友廣雅之	P03
	P67	豊田和弘	P22
張 宝旭	B11	豊田直人	P80
趙 満根	C2		
鄭 然孫	A5		な
	S1-4		
陳 剛	A11	内藤克司	C1
			P12
			P22
			P27
塚本和行	P04	苗代一郎	P67
築館一男	A4		P72
辻 孝司	P30	永井由美子	P71
辻本太一	P31	中井洋一	P43
辻 良三	P25		P67
津田充宥	B3		P72
	P27	中島幹夫	P47
堤 智昭	P18	長瀬すみ	P80
	P19	永田諭志	P18
都富友美	A8		P19

永田良一	P79	野口 修	C10
中塚 巖	P59	野口英世	S2-5.1
中野篤浩	P15		座長
中野 実	P02	野崎正勝	A3
中村 孝	P07	野中直樹	C11
中村恒彰	C5	野村達次	C7
中村正典	P07	野村 護	A8
中村 稔	P60		A10
中村美穂	C12		B14
中村 勇	P77		C8
中村洋介	P59		C12
中村良治	P04		P14
永薮徳久	C9		778
中山佳都夫	B9		
中山直樹	P77		は
中山裕之	A6		
	A15	萩原昭裕	P33
	P40	萩原美代子	P78
夏木令子	A3	箱井加津男	P39
			C11
	に	橋本光也	P69
		橋元律子	P31
二川治子	P65	長谷川隆一	P35
	P66	花井幸次	P02
西川秋佳	P26		P25
	P34	浜上尚也	P62
西田信之	C9	浜田知久馬	C8
西部泰宏	B8	林 志美	A11
西矢剛淑	P78	林 修司	P39
二宮真一	B1	林 真	C5
	B2	林 萌	B10
沼沢 聡	B10	林 泰司	C11
		林 裕造	P12
	の	原内敏夫	B8

原園 景	C4	ブライアン ブロックスアップ	
	P45		P81
原田滋雄	P14	Daniel G. Branstetter	P04
原田知子	P57	古川忠司	B7
韓 眞伊	S1-4		C15
			P36
	ひ	古川文夫	P26
			P34
日置恭司	C7	降矢 強	C1
一ッ町晋也	P60		P12
平賀武夫	P20	古谷真美	P57
	P46		
平川公昭	P07		へ
平塚 明	B6		
平林容子	P08	G. W. Peng	P05
平藤雅彦	P62		
平宮直樹	P70		ほ
平山千束	P54		
広瀬明彦	C1	星野二郎	P42
広瀬雅雄	P33	干場勝由	C5
		細川俊治	P02
	ふ	堀井郁夫	A12, P74
		堀江 透	S2-5.3
Pedro Fernandez-Salguero			座長
	SL1	堀 眞一郎	P06
福田武史	P04	本多三男	A14
藤井昭男	C5	本間健資	P16
藤井義明	B9		
藤川康浩	A4		ま
藤島 敦	P75		
藤 淳一郎	P52	真板敬三	P71
藤谷知子	B12	牧田祐樹	P19
藤本昭宏	P54	牧野江梨子	P75
藤原浩昭	S1-4	牧野俊彦	A9

政岡俊夫	P11		P42
増田光輝	C5	宮川 誠	A7
松尾三郎	P64	宮島敦子	B11
松川清治	C5	宮本謙一郎	P15
松島裕子	P27	宮脇英美子	P45
松末公彦	P29	三好昌夫	P40
松永民秀	B4		
松本清司	C1		む
松本悦嗣	P28		
松本一彦	C8	向井大輔	P75
松本 清	P44	村上善紀	C10
真鍋 淳	A9		P10
	B7	村田洋一	P05
	C15		
	P28		も
	P36		
丸山 豊	P20	望月雅裕	P37
		望月文敏	P80
	み	本岡 覚	B5
		本木喜輝	B13
三浦秀樹	P03	本谷真澄	P11
見上 孝	A4	森川良広	C5
三木康宏	P20	森 敬子	P69
水野三郎	P80	森 千里	P09
三井隆喜	P03	門馬純子	A13
	P04		C5
三奈木隆史	P54	門間芳夫	P62
	P55		
南 勝	P61		や
	P62		
嶺岸謙一郎	B2	矢ヶ崎 修	P30
三森国敏	C1		P31
	C6	安武 章	P15
	P41	安原加壽雄	C1

る

John E. Lund P03

わ

若菜茂晴	C7
若林美津子	B8
和田あづさ	P09, P48
渡辺稔之	B7
	P36
渡辺和人	B4
	座長
渡辺計子	P80
渡辺隆史	B13
渡辺武志	P38
渡辺知幸	C6
	P02
渡辺理絵	C5
渡部 烈	B6
	S2-1
	座長
渡 修明	P75
Jerrdd M. Ward	SL1

賛助企業御芳名

小野薬品工業株式会社

キリンビール株式会社

三共株式会社

塩野義製薬株式会社

パナファーム・ラボラトリーズ株式会社

ブリストル・マイヤーズスクイブ株式会社

大正製薬株式会社

大鵬薬品工業株式会社

第一化学薬品株式会社

第一製薬株式会社

帝国製薬株式会社

帝人株式会社

日研化学株式会社

日本イーライリリー株式会社

日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社

日本ロシュ株式会社

ファイザー製薬株式会社

藤沢薬品工業株式会社

明治製菓株式会社

山之内製薬株式会社

ヤンセン協和株式会社

吉富製薬株式会社

(平成8年6月14日現在、五十音順)

電気泳動装置の Renaissance

全く新しい発想から生まれた全自動電気泳動装置
「エパライザ」。生化学検査室の必需品です。

- コンパクトな卓上型ボディ
- Windows 版ソフト搭載
- 信頼の支持体「クイタンIII」使用
- 血清蛋白&アイソザイムの多項目泳動

エパライザ

全自動電気泳動分析装置

HELENA™



株式会社ヘレナ研究所

本社 〒336 埼玉県浦和市東盤9-21-19
Tel: 048-833-3208 (代) Fax: 048-833-3273

大阪支社 〒540 大阪市中央区豊人橋 2-1-13 第6和尾ビル7F

Tel: 06-945-1070 Fax: 06-945-1055

KYUDO CO., LTD.

緑の環境

厳しい品質管理の中から

九動の実験動物は

供給されます。



▲Hr7/Kud (ヘアレス マウス)

取扱品目

実験動物

- マウス…ddY・ICR・C3H/He
C57BL/6・MRL・ヘアレス
- ラット…Wistar・SD・SHR
- ハムスター…シリアンハムスター
- モルモット…Hartley
- ウサギ…日本白色種
ニュージーランドホワイト種
- その他…ビーグル犬・蛙・ネコ・サル 他

実験動物飼料

- 一般動物用飼料
マウス・ラット…CA-1・CE-2,7・CL-2
ハムスター用…BF・OA-2
ウサギ用…CR-1,2,3
モルモット用…CG-7
イヌ用…CD-1,5,チキンミール
ネコ用…CFE-2,CF
サル用…CMK-1
- 家畜・家禽試験用飼料
ニワトリ レイヤー系用…SDLNo.1~4

- ニワトリ プロイラー系用…SDBNo.1~2
ブタ用…SDSNo.1~4
ミニブタ用…M-16
- 特殊飼料 添加飼料・精製飼料
滅菌飼料・丸粒飼料 他
- その他 各種飼料

飼育器具機材

各種ケージ、ラック、給水瓶・固液分離機・オートクレーブ・各種洗浄機 他

※飼育スペース等条件に応じラック、ケージ他特別注文に応じます。

焼却炉

雑芥焼却炉・動物焼却炉・医療用器具（ディスボザブル）廃棄物焼却炉・有機廃液焼却装置

その他関連商品

理化学機器・床敷・消毒洗浄剤・各種ディスプレイ商品 他

動物血清

獣血清・臓器・抗血清（ウサギ・マウス・ラットモルモット 他）

九動 株式会社

鳥栖事業所 〒841 佐賀県鳥栖市立石町惣楽883-1
TEL 0942-82-6519 (代)
FAX 0942-85-3175

熊本事業所 〒861-55 熊本県熊本市西槐尾町367
TEL 096-245-0145 (代)
FAX 096-245-0144

本社 〒861-02 熊本県鹿本郡植木町今藤395

生育所 今藤生育所・北部生育所

出張所 つくば・東京

私たちは MSI

MITSUBISHI CHEMICAL SAFETY INSTITUTE LTD.

医薬、農薬、各種化学物質に関し、薬理・毒性・代謝のそれぞれの視点から、薬物のプロフィールを総合的に評価します。



薬理試験

- 一般薬理試験
- 薬効薬理試験
- 生体の機能に及ぼす影響(農薬)

鹿島研究所

毒性試験

- 一般毒性 発癌性試験^{*1, *2}
- 特殊毒性試験
- 生殖発生毒性試験^{*3}
- 変異原性試験^{*4}

総合評価

代謝試験

- 薬物動態試験
- 生物学的同等性試験
- 薬物相互作用試験
- 生体内運命(農薬)試験

*1 トキシコキネティクス分析/バリデーションも実施しております。

*2 吸入暴露技術も高い評価を得ております。代謝・薬理試験にも応用可能です。

*3 ICHガイドライン対応試験も実施しております。

*4 UDS試験、複製DNA合成試験(RDS試験)も受託しております。



株式
会社

三菱化学安全科学研究所

本社 〒105 東京都港区芝二丁目1番30号 TEL.(03)3454-7571(代) FAX.(03)3454-7573

新サービス

Human肝臓新鮮組織の In Vitroモデルが使えます!!



日本チャールス・リバーが、
Human組織を用いた代謝・毒性試験
の受託を開始しました。
(米国 In Vitro Technologies社と提携)

- このIn Vitroモデルにより、医薬品開発の各段階で、次のステップへ進むか否かを効率よく判断することができます。



- In Vitroモデルを使った4つの領域でサービスを提供します(詳しくは、下記までお問合せください)

1. 薬物および化学物質代謝に関する受託試験
代謝プロファイルの動物種による比較

2. 目的臓器の毒性に関する受託試験
眼、皮膚、肝臓、腎臓、心臓に対する毒性評価

3. 経皮吸収および代謝に関する受託試験
新鮮なHumanの皮膚および動物の皮膚を用いた経皮吸収と代謝

4. トレーニング
組織のスライス作成および、その応用に関するワークショップ

- その他の医薬開発サポートサービスも、日本チャールス・リバーにおまかせください。

- 遺伝子治療関連安全性試験(治療用vectorの精製も承ります) **新サービス**
- モノクローナル抗体受託生産(マウス腹腔増殖法によるIn Vivo法)
- 動物細胞の安全性検査(各種ウイルス検査、プロセス安全性評価など)

あらゆるBio Technical Serviceは、まず当社にご相談ください

お問合せは



先端医療開発のパートナー

日本チャールス・リバー株式会社

第二営業部 222 横浜市港北区新横浜2-3-8東伸24新横浜ビルB-4F
TEL. 045(474)9340 FAX. 045(474)9341

HITACHI

これからは、日立のHPLCをラ・クロムと呼んでください。

HPLC



「高品質、高性能、高機能」な
HPLC (高速液体クロマトグラフ)を、



日立が「知恵を絞り、ていねいにつくったら、



LaChrom



LaChrom(ラ・クロム)になりました。

LaChrom(ラ・クロム)について

HPLCは製薬、環境、バイオテクノロジーなどの各分野における研究開発の必需品です。LaChromは、明日の実験室、研究室を、視野に入れた未来指向のHPLCです。その特長は…

- 「ISO9001規格をクリアした高品質体制」
製造・搬入付け・最終検査・試験・付帯サービスにいたるまで、万全の体制で高品質を支えています。
- 「GLP」に対応し、精度管理の効率化を支援
各モジュールの動作や保守管理、性能評価、データ管理、分析条件管理などの情報を提供する機能を搭載。
- 「設置きバイルアップとオンラインコミュニケーション」
モジュールの信号をデジタル化し、接続を一本のケーブルに集約、ノイズの影響を受けない高精度分析が可能になりました。
- 「Windows NT™」に対応するHPLCマネージャ
操作環境が快適なうえ、ネットワークの構築も容易に行うことができます。また市販のアプリケーションソフトとのデータ交換も簡単です。

● GLP: Good Laboratory Practice (医薬品開発分野などで試験データの信頼性を求める基準)の略称です。
● Windows NT™は米国マイクロソフト社の商標です。

日立高速液体クロマトグラフ



日立理化学機器特約店

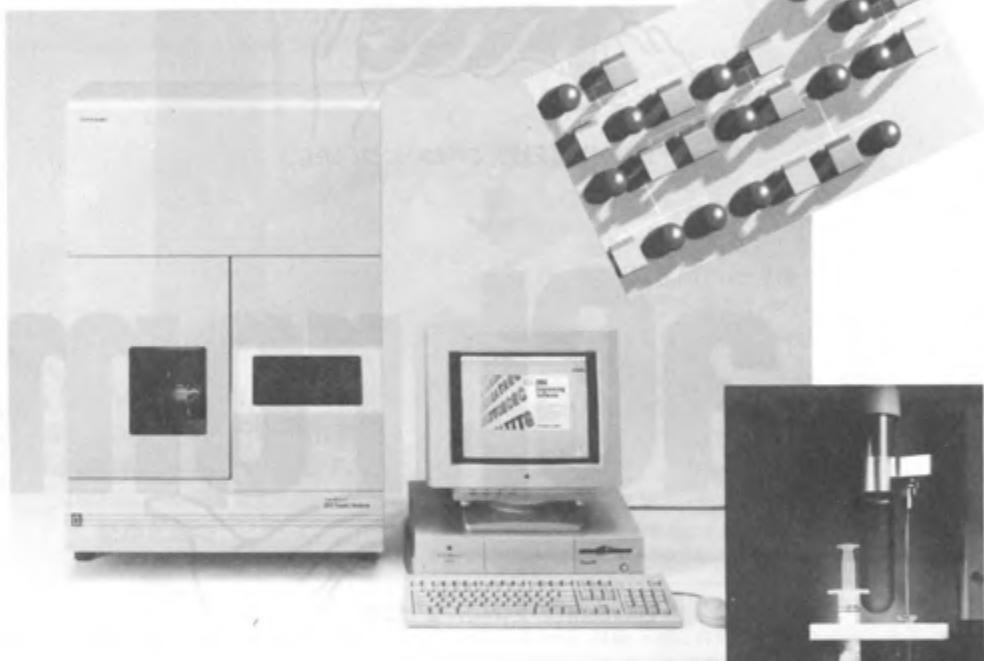
井本医科器械株式会社

〒813 福岡市東区多の津5-21-10
電話 (092) 623-6622

DNAシーケンシング & DNAフラグメント解析

ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer

医学、農業、法医学など…遺伝子解析技術は、
もはや、基礎研究分野だけにとどまりません。



サンプル自動インジェクション用トレイ

ABI PRISM™ 310 ジェネティックアナライザは、多色蛍光標識技術とキャピラリー電気泳動技術を統合した、サイズ決定・定量などの遺伝子解析および核酸の配列解析を行える、初めての自動システムです。

- 使いやすく、データの再現性が抜群
- 特許の多色蛍光標識法により、シングルキャピラリーによる解析を実現
- フラグメント解析では、多様なアプリケーションに対応し、泳動時間も約20~40分と大幅に短縮



ポリマー自動充填用シリンジポンプ

PE Applied Biosystems 株式会社 パーキンエルマー ジャパン
アプライド バイオシステムズ 事業部

本 社 ● 〒279 千葉県浦安市美浜1-9-2
名古屋 ● 〒464 愛知県名古屋市千種区池下町2-15
大 阪 ● 〒564 大阪府吹田市豊津町5-3
福 岡 ● 〒810 福岡県福岡市中央区赤坂1-16-10

☎ 0473 (80) 8500/FAX 0473 (80) 8505
☎ 052 (764) 1201/FAX 052 (764) 1202
☎ 06 (389) 1201/FAX 06 (389) 1206
☎ 092 (771) 2755/FAX 092 (771) 2756

Confidence

創業以来40年、
確かな品質で皆様の
健康に御奉仕いたして
おります。



ヒューマンな化学への
信念で広く、学術、医療に
貢献しております。

Contribution

正晃株式会社

本社 福岡市東区松島3丁目34番33号
Tel(092)621-8199代

福岡第一営業所 福岡市東区松島3丁目34番33号 Tel(092)611-8131

福岡第二営業所 福岡市東区松島3丁目34番33号 Tel(092)611-5335

北九州営業所 北九州市小倉北区宇佐町2丁目1-13 Tel(093)521-9008

久留米営業所 久留米市山川杵形町3-30 Tel(0942)45-1331

大分営業所 大分市萩原4丁目7-5 Tel(0975)58-0025

佐賀営業所 佐賀市鍋島町大字八戸1843 Tel(0952)22-7841

筑豊営業所 田川市桜町13番33号 Tel(0947)42-6545

山口営業所 山口県吉敷郡小郡町大江町7-8 Tel(08397)2-0215

下関営業所 下関市秋根南町1-6-15 Tel(0832)56-6001

徳山営業所 徳山市桜木3丁目5-71 Tel(0834)29-2930

福岡配送センター 福岡市東区松島3丁目34番33号 Tel(092)611-5339

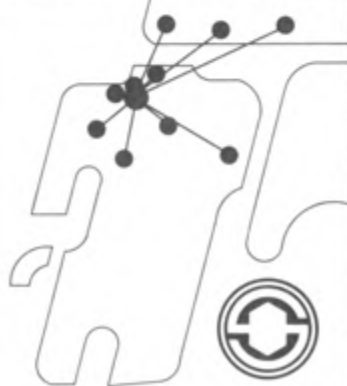
宇部配送センター 宇部市明神町3丁目3-26 Tel(0836)22-0923



事業内容/分析用試薬、研究用試薬、体
外診断用医薬品、高純度原料化学
薬品、化学工業用薬品、分析用精密
機器、診断検査用機器、理化学用器
具、理化学用精密機器、各種マイク
ロフィルター、各種濾紙、オルガノ
式小型純水装置、動物生鮮血液、動
物用固型飼料、化学用特殊洗剤、各
種培地、冷暖房用機器具、家庭用電
気製品、OA機器、健康食品等の卸
販売

Service

即応する品揃えと
充実した情報網で
御客様のニーズに
お応えします。



第23回 日本毒科学会学術年会 プログラム・要旨集

●発行日/平成8年7月10日 ●発行人/小栗 一太

●発行所/九州大学薬学部 衛生化学・裁判化学講座 〒812-82 福岡市東区馬出3-1-1 TEL (092)641-1151 内線6136-6138 FAX (092)641-8154

●印刷所/コロニー印刷 TEL (092)962-0764