

総合化学物質安全性研究費；
安全性試験法開発等研究費による研究報告(平成7～9年度)

研究課題名：担当者

BrdU と近紫外線照射を用いた鋭敏な幹細胞毒性障害検知システムの開発：毒性部長 井上達

トキシコキネティクスを用いた化学物質の毒性評価に関する基礎研究：薬理部長 大野泰雄

神経毒性検出のための病理学的評価手法の確立に関する研究：病理部長 高橋道人

マウスリンフォーマ細胞を用いた突然変異と染色体異常の検出に関する研究：変異遺伝部長
祖父尼俊雄

構造活性相関による毒性の予測に関する研究：総合評価研究室長 中館正弘

研究統括者：安全性生物試験研究センター 黒川雄二

From FY1990, studies aimed at development and improvement of toxicity guidelines have been conducted at the Biological Safety Research Center, in collaboration with the Environmental Health Bureau. To date, researches have focused on acute toxicity, antigenicity, reproductive toxicity, immunotoxicity, etc. In this report, brief summary of studies on cytotoxicity, toxicokinetics, neurotoxicity, genetic toxicity and structure-activity relationship performed during FY1995-97, is presented.

平成2年度より、当所の研究費として総合化学物質安全性研究費があり、①安全性点検体制支援システム経費、②安全性試験法開発等研究費、③生活環境暴露評価基礎研究費とからなる。このうち、②の研究費によって、主として生活衛生局と安全性生物試験研究センターの協力の下に、OECDをはじめとする国内外の毒性試験ガイドラインの改良及び開発に資する研究が行われてきた。これまでに、急性毒性・感作性・生殖毒性・免疫毒性試験法等における手法の開発・改良を行って来たところであるが、本報では最近3年間の細胞毒性、トキシコキネティクス、神経毒性、遺伝毒性、構造活性相関に関する安全性生物試験研究センターでの研究成果について概略する。

BrdU と近紫外線照射を用いた鋭敏な幹細胞毒性障害検知システムの開発 (毒性部)

本研究は、造血幹細胞の数量的・機能的評価を行うことによる造血・免疫毒性に対する評価系を樹立することを目的としている。種々の血球やリンパ球に対する薬物障害が前臨床試験段階で検出できず、臨床試験段階になって明らかとなることが少なくない。このため、新たな評価系を樹立する必要性が充ち、昨年欧州連合や米国医薬品局(FDA)が主体となって国際血液毒性学会が発足した。このような造血・免疫毒性の新たな評価系を樹立する試みとして、昨年6月の第一回国際造血毒性シンポジウムでは、ヒト培養性造血前駆細胞の毒性研究への応用が提唱された。

他方、本研究において示した *in vivo* と *in vitro* とでは造血幹細胞の性質が大きく異なるという結果から、齧歯類を用いたモデル実験の必要性もあらためて認識されつつある。これまで、正常並びに種々の状態における造血幹細胞の性質を明らかにし、また、*in vivo* での造血幹細胞動態解析法として、プロモデオキシユリジンを取り込んだ細胞が紫外線高感受性になる性質を利用した、これまでにない全く新しい方法を樹立しつつある。本法は造血幹細胞の造血幹細胞動態の認識を一新し、引いては、諸々の幹細胞動態の理解を大きく進展させる意義を持つものである。すでに予備実験にて示唆的に得られたモデルの検証に努め、細胞動態に関与すると考えられる生理病理的負荷条件下(加齢、カロリー制限等)や、細胞動態に変化の期待される遺伝子改変マウス(c-myc, c-Ha-ras, p53など)における造血幹細胞動態解析を進め一定の成果を得ることが出来た。なお、本検出系は、これまで脾コロニー形成単位(CFU-S)で観察しているが、培養性造血前駆細胞でも測定できるよう、系の樹立を進めてきた。現在、CFU-Sと培養性造血前駆細胞とで、紫外線感受性が異なることが判明するなど、測定条件変更の足がかりを得ることが出来、これを基にさらなる開発を進めると共に、今後は、参考化学物質として、造血障害や遺伝毒性の有無などにより、カテゴリカルに参考化学物質を選定し、これらの投与下での経時的な幹細胞動態解析を進め、今後の医薬品の有効性・安全性の評価に資する基礎データを得るべく努める。

トキシコキネティクスを用いた化学物質の毒性評価に関する基礎研究 (薬理部)

ゴムの老化防止剤として使用されている2-Mercapto-benzimidazole (MBI) 及び 2-mercaptomethylbenzimidazole (MMBI, 4MeMBI と 5MeMBI の 1 : 1 混合物) は、ともに LD50 値は約 300 mg/kg と同等であるが、ラットへの 28 日間反復経口投与において MBI は著しい甲状腺毒性を誘発するのに対して、MMBI ではその作用は極めて軽微である。この甲状腺毒性の顕著な差を明らかにする目的で両物質をラットへ単回及び 15 日間反復投与し、そのトキシコキネティクスを比較検討した。方法として、Wistar 系雄ラット (5W) に絶食下で両物質を 2 ~ 250 mg/kg (B.W. コーン油に懸濁) 単回経口投与し、症状観察、採血、採尿及び解剖を行なった。さらに、Wistar 系雄ラットに両物質 0.3 mmole/kg (B.W.) を 15 日間反復強制経口投与し、症状観察、体重測定、摂餌・飲水量測定、並びに投与 1・15 日目には採血、採尿及び解剖 (臓器重量測定) を行なった。生体試料中の未変化体及び代謝物濃度は HPLC を用いて測定した。また、血清中甲状腺ホルモン量を測定した。その結果、両物質とも用量・血中濃度関係は線形性を示し、明確な ADME の飽和は認められなかった。単回投与実験では血中未変化体濃度に依存して四肢麻痺、流涙、腹・横臥、昏睡、死亡が観察された。反復投与では、MBI 群で甲状腺が著しく肥大し (対照群の 7 倍) 且つホルモン量の変動したのに対して、MMBI 群 (0.6 mmole/kg 用量においても) では有意な変化は認められず、両物質の甲状腺毒性の差が顕著に現れた。両物質投与群の血中未変化体濃度は投与 1 日目において MBI 群で C_{max} ($\mu\text{g}/\text{ml}$) が 8.2, AUC_{0-24} ($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$) が 101.1, MMBI 群ではそれぞれ 4.2, 21.4 と AUC に 4.7 倍の差が見られた。一方、投与 15 日目において MBI 群ではそれぞれ 15.0, 269.4, MMBI 群で 2.3, 27.8 と AUC の差は 9.7 倍と反復投与により更に増大した。一方、尿中では未変化体の他に脱硫黄代謝物を検出した。MBI 群では反復投与により尿中未変化体排泄量 ($\mu\text{g}/\text{day}$) が 523 から 1832 に増加、脱硫代謝物 (BI) 排泄量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) は 379 から検出不能になったことから反復投与による代謝経路の変化または阻害が推測された。これに対して MMBI 群では未変化体排泄量 ($\mu\text{g}/\text{day}$) が 188 から 275 になり、脱硫代謝物 (4Me-BI 及び 5Me-BI) 排泄量 ($\mu\text{g}/\text{day}$) は 814 から 1015 へと増加傾向を示したが、その排泄パターンは変動しなかった。MBI 及び MMBI 共にペルオキシダーゼ活性阻害能を有していることから、両物質とも甲状腺におけるホルモン合成阻害能が推測されるのにもかかわらず、MBI の反復投与によってのみ著しい甲状腺毒性を示すのは、反復投与によって MBI では AUC が増大する一方、

MMBI では逆に減少することからそれぞれの未変化体に対する全身の暴露の差の増大に起因すると説明された。本チオウレア化合物の毒性評価においてトキシコキネティクスを用いた解析は極めて有用であると結論された。

神経毒性検出のための病理学的評価手法の確立に関する研究 (病理部)

化学物質の毒性を特徴づけるため、通常、単回投与毒性試験がまず最初に実施される。この試験の高用量群において歩行異常や後肢失調などの神経症状が発現する場合がある。しかし、これらの殆どの場合、病理組織学的検査では異常は神経・筋組織に認められない。これは、神経末端の運動終板やその近傍部、筋紡錘および自律神経等が光学顕微鏡検査では観察が困難であることに起因するものである。特に、神経筋接合部は種々の神経毒性物質による distal axonopathy (遠位軸索障害) が生ずる可能性が高いところであるが、通常の光顕観察では発現した神経障害を見逃している可能性が高い。本研究では、陽性対照として、神経筋接合部に障害を誘発することが明らかにされている 2,4-dithiobiuret (DTB) をラットに投与し、虫様筋の運動終板を超微形態学的に検索した。また、短期投与により神経症状が発現するが、光顕的には神経病変が認められないとされている diethyl dithiocarbamate (DDC) および 2,5-di(tert-butyl)-1,4-hydroquinone (DTBHQ: 酸化防止剤) を投与し、以下の成績を得た。DTB 1 mg/kg を 2 ~ 3 日に 1 回腹腔内投与したところ、2 回目の投与後から後肢運動失調や麻痺を示すラットが出現した。運動終板では、軸索終末の腫脹が頻繁にみられ、萎縮から崩壊を示すものも認められた。腫脹した軸索終末においては、大小不同のシナプス小胞の増加、神経細線維や神経微小管の増加がみられた。麻痺が持続した動物では、筋線維の萎縮、アクチンやミオシンフィラメントの配列の乱れおよび Z 線の streaming 等の変性が認められた。DDC 1500 mg/kg を毎日 1 回強制経口投与したところ、投与 4 週頃より、軽度の歩行異常を示すラットが認められた。これらの動物における運動終板では、DTB 投与ラット程強くはなかったが、シナプス小胞や小管構造物の増加による軸索終末の腫脹がみられた。その他、軸索終末内にグリコーゲン顆粒の蓄積が観察された。虫様筋には異常はみられなかった。DTBHQ 80 mg/kg を毎日 1 回強制経口投与したところ、2 回目の投与後から下痢、流涙、筋脱力等が発現し、4 回目以後では後肢運動失調を示すラットが発生した。これらの動物の運動終板では、シナプス小胞やミトコンドリアの消失が認められ、軸索終末の変性・萎縮がみられた。以上の結果から、DDC や DTBHQ によって神経障害が誘発されるが、その障害初発部位が運動神経終末部であることが示され、これらの部位における障害の解析は通常の光顕観

察では困難であり、超微形態学的解析が不可欠であることが強く示唆された。

マウスリンフォーマ細胞を用いた突然変異と染色体異常の検出に関する研究（変異遺伝部）

マウスリンフォーマ試験（MLA）はチミジンキナーゼ遺伝子（tk）を指標とした遺伝子突然変異検出系であるが、遺伝子突然変異を誘発する物質に加えて染色体異常を誘発する物質も検出できるという特徴がある。しかしながら、染色体異常試験との比較を行った国際共同研究の結果から、通常の短時間（3～4時間）処理を用いた場合には十分に染色体異常誘発物質を検出できないことが明らかになった。MLAで検出できない染色体異常の多くは、短時間処理ではなく、長時間の連続処理（24時間など）で陽性となっていることから、MLAに24時間の連続処理を取入れることにより、染色体異常試験との一致性が高まることが期待される。本研究では、MLA国際共同研究で陰性あるいは非常に弱い反応が得られた15物質について、24時間処理法を用いて試験を行った。15物質のうち11物質が24時間処理で陽性となった。これらにはヌクレオチド類似物質（2-deoxycoformycin, dideoxycytidine）、塩基類似物質（1,3-dimethylxanthine）および紡錘体阻害剤（colchicine, vinblastine sulfate, thiabendazole）が含まれていた。これらは直接DNAに障害を与えるものではなく、DNA合成の阻害や細胞分裂障害によって遺伝子毒性が誘起されるものである。これらDNAを直接標的としない物質の作用は細胞周期に依存することから、長時間処理が有効になるものと考えられる。24時間処理で細胞毒性が高まると共に明らかな陽性反応を示したもの（dideoxycytidine, 1,3-dimethylxanthine, phenacetine, thiabendazole）もあるが、短時間処理と同様の細胞毒性を示しながら、陽性となったもの（p-tertbutylphenol, 2'-deoxycoformycin, isopholone, zearalenone）があることから、細胞毒性とは関連なく24時間処理が有効となる物質のあることが明らかになった。MLAに24時間連続処理法を併用することによって、染色体異常物質のおよそ90%が検出可能となったことから、24時間連続処理法を組み入れることによりMLAが染色体異常試験の代替となりうると結論することができた。

構造活性相関による毒性の予測に関する研究（総合評価研究室）

化学物質の有害性評価やリスク評価においては、各種毒性に関する十分な試験データが必要となるが、新規に開発される化学物質については化審法においてもスクリーニング毒性と称される2種の変異原性試験と28日間反復投与毒性試験のみが要求されている。したがって、これらスクリーニング毒性試験からヒトへの有害性を評価するのは、か

りの困難が伴っている。この困難さを解消するための一つの解決策として、既存のデータ及び情報を有効利用し、また、これらの情報を基とした毒性の予測が重要である。本研究においては、既存情報の有効利用を図るためのデータベース開発とこれを利用した28日間反復投与毒性試験での神経毒性および精巣毒性など化学構造と毒性の相関からの毒性予測について検討した。

データベースの開発については、すでに本研究費により新規化学物質データベースシステムを開発したが、さらに改良を加えた。特に本研究においては、化学構造の表示機能と検索機能の充実化を図りつつ構造活性相関の検討を行った。現在まで、約1,000物質の試験結果に関する情報を蓄積し、利用している。

神経毒性の指標となる流涎については、検索総数706化合物中、その23.1%（153物質）に流涎が報告され、流涎と同時に観察された一般状態について検索した結果、33物質に自発運動の減少等の一般症状の変化が観察されている。構造活性相関については、triazoleにdichlorophenyl基が結合した化合物とpyrimidineが基本骨格中に存在する化合物の場合、化合物投与により流涎が見られる可能性が高いことが判明した。したがって、新規化学物質がtriazoleにdichlorophenylが結合している化合物、pyrimidine骨格を有している化合物や文献的に神経毒性、特に副交感神経刺激又は交感神経抑制作用を示す物質に類似する場合には、真性コリンエステラーゼ活性の測定や流涎の発現匹数や頻度等の一般状態観察を詳細に行う必要性が示唆された。

さらに、精巣毒性については、これまで20の化合物に、精巣重量減少または組織学的変化が見られている。これらの化合物について、文献等を参考にしてその構造的特徴を検討した結果、精巣毒性を発現させる化学構造として、ビスフェノールA類縁化合物、アゾ化合物、フェニルエーテル化合物、アミド化合物、ニトロ化合物、脂肪族ハロゲン化合物、脂肪族アミン化合物、フタル酸エステル化合物が特徴的であることが判明した。

次に、コレステロールの変化について検討した結果、データベースに入力されている970化合物中189の届出物質にCHOの変化がみられ、このうち、142化合物にCHO値の増加が、残り45化合物にCHO値の減少が観察された。CHO値の増減の原因と成りうる肝毒性との関係については、CHO値が増加した化合物では、97化合物で肝重量と組織学的検査に変化が報告され、21化合物ではどちらか一方に変化が報告されている。CHO値の減少が観察された化合物では、25物質に肝重量、組織学的変化がともに見られた。さらに、内分泌障害物質として知られるビスフェノールAで代表されるジフェニルメタン誘導体を基本骨格に持つ多くの化合物にCHOの減少が主として見られた。

これらジフェニルメタン誘導体については、精巣重量や

組織学的所見に変化が見られなくとも、CHO が明確に低下する場合は、ビスフェノール A と同様な評価をすることの必要が示唆された。また、構造類推の観点から内分泌攪乱物質と云われている化学物質の構造を有している届出物質の場合は、精巣や卵巣等の生殖器ばかりでなく甲状腺

やその他の内分泌を含めた総合的な検査を実施する必要性が示唆された。今後、この様な既存のデータを利用した毒性予測手法は、試験法の改良や有害性評価等に大いに役立つことが期待される。