

非臨床 News

第3号

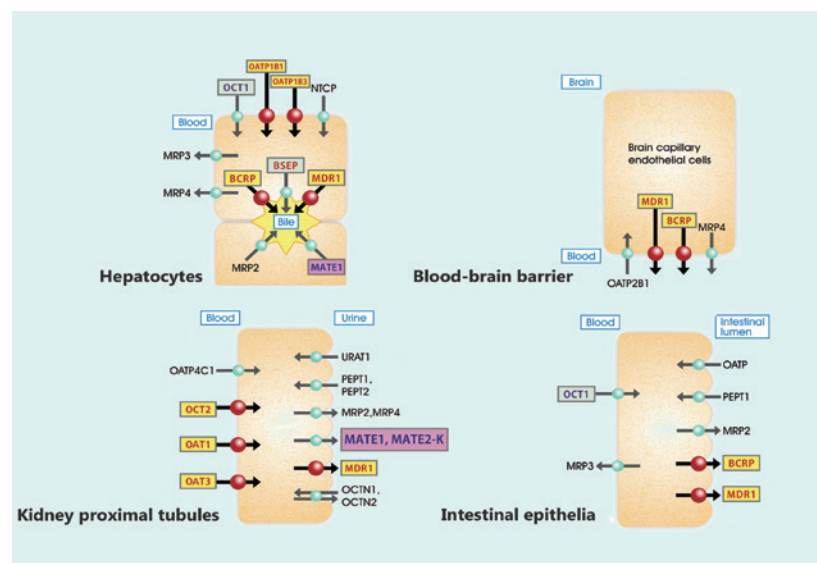
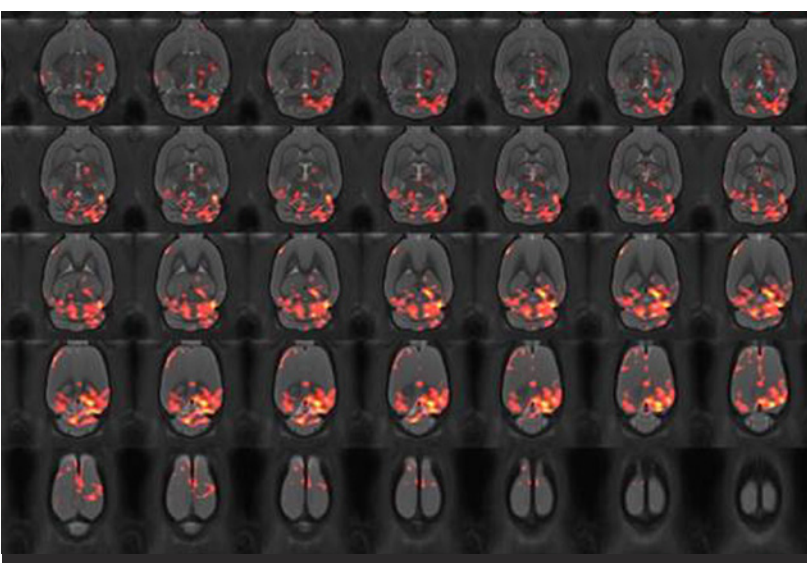
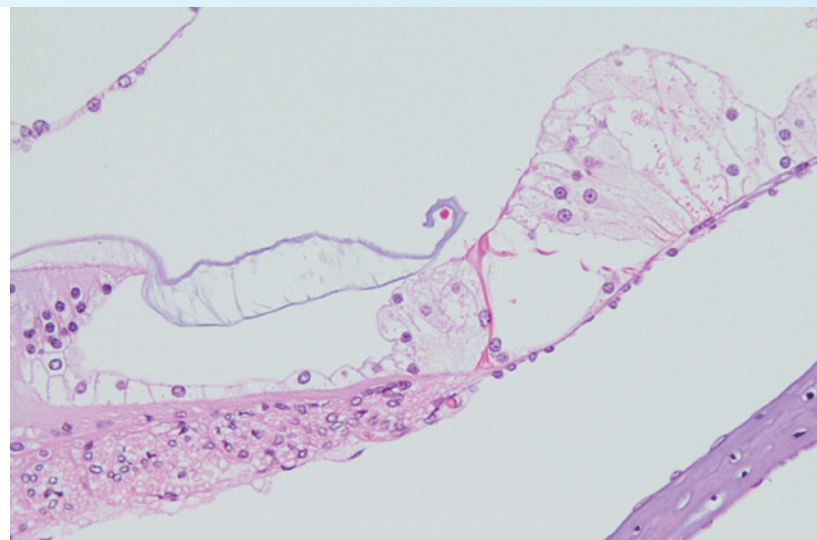
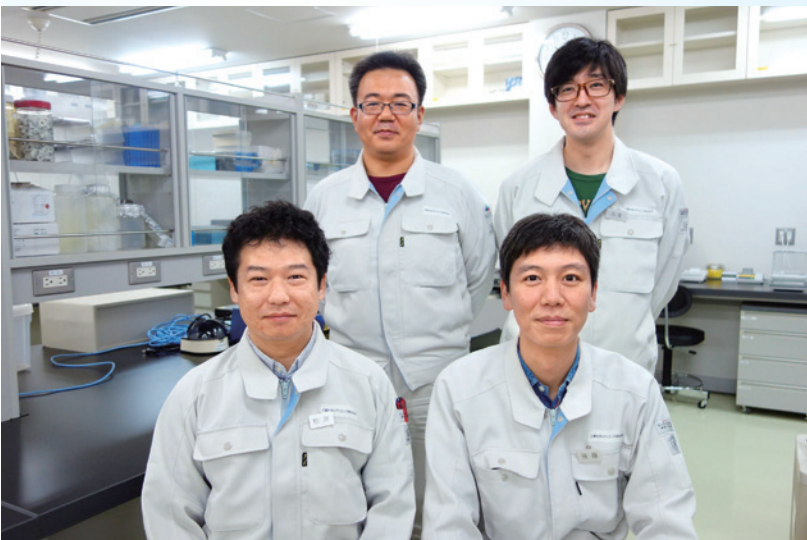
はじめに	試験研究センター長 平塚 秀明	2
	社名変更のお知らせ	2

最新研究紹介

◆ 遺伝毒性試験のガイドライン化を目指して (第6回 IWGT 参加報告)...	3
◆ 薬物トランスポーター試験系の確立	4
◆ 無拘束ラット酢酸誘発膀胱炎における行動指標を用いた膀胱痛の評価法...	6
◆ ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた安全性薬理試験の新規試験系開発...	8
◆ ヒト胆管体外誘導・培養法の開発	9
◆ ラット蝸牛の標本作製方法の確立	10

トピックス

1. マウス背景データ増強	11
2. 米国の信頼性保証専門家資格を取得	12
3. 基礎眼科学専門家資格を取得	12
4. Ellegaard 社(デンマーク)にてミニブタ実験研修に参加/ミニブタ飼育エリアの規模拡大...	12



はじめに



試験研究センター長
平塚 秀明

非臨床 News 第3号の発刊にあたり、一言ご挨拶を申し上げます。

製薬企業が掲げる「より良い医薬品を、それを待っている患者様により早く届ける」という崇高な理念は、時代を超えて受け継がれるべきと確信いたしております。しかし、製薬企業は現在、グローバルに展開される熾烈な開発競争、増大する研究開発費、大型医薬品の特許切れ問題、医療費抑制政策などに晒され、その経営環境はより厳しさを増しているものと推察いたしております。非臨床試験のアウトソーシング先である我々、受託試験機関（CRO）を取り巻く環境もその影響を少なからず受け、厳しい事業環境にあると認識いたしております。我々CROは様々なステークホルダーのご期待にお応えし、今後も事業を継続する責務がございますことから、このような外部環境の変化に対して、柔軟かつ適切に対応し、変化し続けなくてはなりません。そういった時期、当社は本年度を「事業再生元年」と位置づけ様々な事業改革に取り組んでおります。その改革の大きな柱としているのが「品質向上」と「コスト低減（＝適正価格）」であり、最終的にはそれら2つの掛け算が「顧客満足度の向上」に繋がると考えております。

我々の業務のベースは、品質であることは言うまでもありません。人命にも関わる医薬品開発の一翼を担うこの業務は、技術・信頼性・倫理性のいずれかが欠けても成り立たないと認識いたしております。業務改革のもう1つの柱はコスト低減であります。上述したように、増大する研究開発費が製薬企業の収益性を圧迫しているという側面もあることから、アウトソーシング先である当社も製薬企業を費用面でサポートする必要があると考えております。事業継続に見合うだけの収益を確保しつつ、費用面で製薬企業をサポートできるよう、コスト低減を間断なく推し進めたいと考えております。

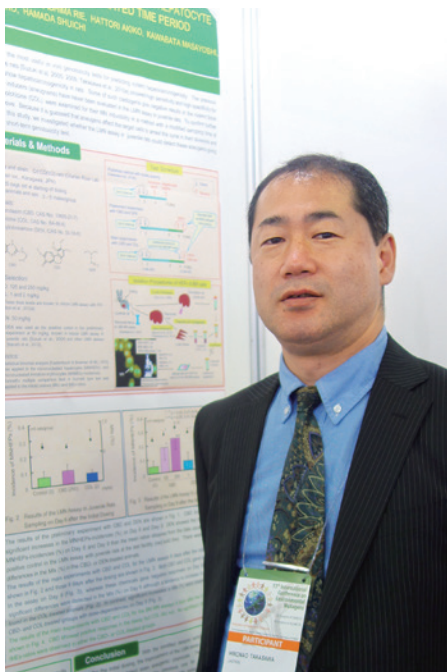
4月1日より新社体制となり、社名も株式会社LSIメディエンスに変更となりました。しかし、新社になったとしても私共が為すべきことに変更はございません。当社の経営ビジョンである「Medical Scienceによる健康で安心な社会の創造」に向け、ComplianceとQualityの2つをベースに、技術革新による新たな価値を創造するとともに、お客様にご満足いただける多彩なサービス・製品を提供し続ける所存でございます。非臨床事業に籍を置く私共も、この経営ビジョンを旗頭（目標）として掲げ、社員一丸となってビジョン達成のために日々行動することをお約束いたします。至らぬ点は多々あるかと存じますが、今後ともご指導、ご鞭撻を賜りますよう宜しくお願い申し上げます。

社名変更のお知らせ

株式会社三菱ケミカルホールディングス（以下「MCHC」）は、2014年4月1日付で、ヘルスケアに関する総合的なソリューションを提供し、KAITEKI社会の実現を目指す「株式会社生命科学インスティテュート（以下「LSII」）」を発足させました。この新体制発足に伴い、当社は2014年4月1日付で、MCHCの事業会社である三菱化学株式会社傘下からLSII傘下となるため、社名を「株式会社LSIメディエンス」に変更しました。

新 社 名：株式会社^{エルエスアイ}LSIメディエンス
（英文：LSI Medience Corporation）
社名変更日：2014年4月1日
新本社住所：東京都千代田区内神田一丁目13番4号
THE KAITEKIビル
（2014年3月末～5月末に順次移転いたします）

遺伝毒性試験のガイドライン化を目指して (第6回IWGT参加報告)



鹿島研究所
高沢博修チームリーダー

IWGT (International Workshop on Genotoxicity Testing) は、遺伝毒性の試験法や問題点ごとに、世界中からそれぞれの分野の専門家が招聘され、遺伝毒性試験に関する指針を作成する重要な会議です。IWGTの各ワーキンググループに参加した世界中の専門家の合意を得たのち、世界標準の遺伝毒性試験の方法や解釈の仕方として提案されます。1993年に第1回IWGTがメルボルンで開催されて以来これまでに5回開催されましたが、IWGTで合意が得られた内容はOECDの各遺伝毒性試験ガイドライン及びICH S2ガイダンスの改訂にも大きな影響を与えてきました。現在では4年に1度開催されるICEM (International Conference on Environmental Mutagens) のサテライトミーティングとして定着しています。2013年は10月31日から11月2日までブラジルのイグアスで開催され、コミットアッセイ、Pig-aアッセイ、生殖細胞の遺伝毒性試験、肝臓小核試験、遺伝毒性の定量評価の5つのグループに分かれて議論が行われました。当社からは肝臓小核試験のグループに2名（濱田修一、高沢博修）が招聘され、反復投与による方法（反復法）と幼若ラットを用いる方法（幼若法）について、それぞれの利点と欠点を含めた試験の特徴と現時点での標準的な試験方法について各々発表しました。これまで当社は肝臓小核試験に関して、幼若法、反復法ともに学会内での共同研究を提案し、共同研究の世話人としてその中心的な役割を果たしてきました。肝臓小核試験に深く関わってきた我々にとっての当面の目標は、肝臓小核試験の標準化／ガイドライン化です。この標準化／ガイドライン化により、お客様も含めて誰もが使い易く、科学的に

も成熟した試験が確立されることとなります。IWGTで合意が得られるということは、国際的なガイドライン化への大きな一歩であると言えますが、幼若法・反復法ともに今後検討すべき課題が示され、我々が説明した内容だけでは完全な合意は得られませんでした。今すぐにガイドライン化という訳にはいかないようですが、ガイドライン化に向けてクリアすべき課題が明確になり、確実に一歩前進したと感じています。2011年に遺伝毒性試験に関わるICH S2ガイダンスが改訂されたことを受け、哺乳動物細胞を用いる*in vitro*染色体異常試験で陽性結果が得られた化学物質に対するフォローアップ試験として、これまで実施されてきたUDS試験や最近話題のコミットアッセイとは異なり、*in vitro*試験と同じく染色体異常を検出する肝臓小核試験の重要性や期待がますます高まったように思われます。肝臓小核試験はどちらかと言えばこれまで国内での関心が高かった試験のように思われますが、骨髄小核試験では検出できない、特に肝臓を標的とする遺伝毒性がん原性物質を検出可能であり、今回IWGTでトピックスとして取り上げられ議論されたことにより、海外での関心も高まり、ガイドライン化への動きが加速化されると期待されます。また、今後の検討課題が残るとは言え、肝臓小核試験の有用性について多くの共通認識、合意が得られたことは今回のIWGTでの非常に大きな成果であったと考えています。

今回のIWGTでは、上記の幼若法と反復法以外に肝臓の部分切除術を行う方法も議論され、それぞれの方法にメリット、デメリットがあり、状況による使い分けが重要であることも認識されました。当社ではIWGTで議論されたこれらの肝臓小核試験の3つの方法いずれにも対応可能なGLPの受託体制を整えており、受託実績も豊富です。肝臓小核試験の適用をご検討の際には、ぜひお気軽にご相談ください。

(原稿執筆／高沢 博修 E-mail : Takasawa.Hironao@mg.medience.co.jp)



イグアスの大瀑布にて

分析代謝 薬物トランスポーター試験系の確立



鹿島研究所
前列左から江見、越川研究員、中列左から大塚、金子、鳥居研究員、後列左から間館、福田、松川、斎藤研究員

薬物トランスポーター (TP) は、様々な臓器に発現し、多くの薬物を輸送することが知られています (表1)*1。

そのため、医薬品開発候補化合物がTPに認識されるか否か (基質認識性) は、化合物の有効性・安全性を評価する上で重要です。また、TPに対する阻害作用の有無は、薬物相互作用のリスクを評価する上で重要となります。

このような背景の基、2012年に欧米の規制当局より薬物相互作用に関する規制文書*2,3が発行され、評価項目、評価方法が明文化されました (図1)。

更に、2013年、日本でも、厚労省薬物相互作用ガイドライン (案) (2013年12月発行)*4が発行され、TP評価の重要度は一層高まっています。

現在、当社で実施可能な評価系及びヒトTP分子種を表2に示します。

表1 薬物TPの基質となる薬物*1

分子種	薬物名
MDR1	Digoxin
BCRP	Rosuvastatin, Methotrexate
OATP1B1	Pravastatin, Rosuvastatin, Atorvastatin, Pitavastatin
OATP1B3	Telmisartan
OAT1	Cidofovir, Cephadrine, Ciprofloxacin
OAT3	Cimetidine, Cephadrine, Ciprofloxacin
OCT1, OCT2	Metformin, Lamivudine
MATE1, MATE2-K	Metformin

表2 薬物TP評価系ラインアップ

経細胞輸送実験評価系 (発現細胞)	MDR1 (ホスト細胞: LLC PK-1)
	BCRP (ホスト細胞: MDCK)
経細胞輸送実験評価系	Caco-2 (MDR1, BCRP)
発現膜ベシクル評価系	MDR1 BSEP BCRP MRP1, MRP2, MRP4, MRP8
ATPase測定系	MDR1 MRP2
取込実験評価系 (発現細胞)	OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, OCT2 OCT1 MATE1, MATE2-K (ホスト細胞: HEK293)
取込実験評価系 (遊離肝細胞)	OATP1B1, OATP1B3

■ : 厚労省、FDA、EMA DDI規制文書*2,3,4評価推奨分子種 ■ : 厚労省、EMA DDI規制文書*3,4評価推奨分子種 ■ : EMA DDI規制文書*3評価推奨分子種

青字: 2014年4月受託開始分子種

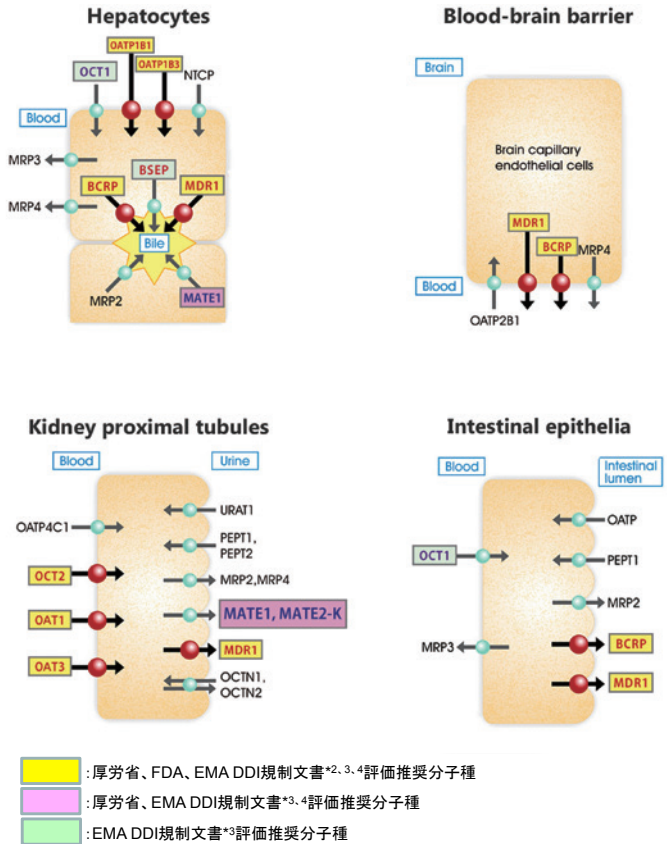


図1 日米欧の規制文書において評価が推奨されている薬物TP*2,3,4

略語

- MDR1 : Multidrug resistance 1
- BCRP : Breast cancer resistance protein
- OATP : Organic anion transporting polypeptide
- OAT : Organic anion transporter
- OCT : Organic cation transporter
- MATE : Multidrug and toxin extrusion

当社では既に、TP発現膜ベシクルやFDA薬物相互作用に関するドラフトガイダンス（2012年2月発行）*2に掲載されている重要7分子種（MDR1、OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT2、BCRP）の安定発現細胞の評価系を構築し、試験の実績を積んできました。更に、その後の規制当局の動向として、OCT1、MATE1、MATE2-Kが日本の規制文書（案）*4、EMA薬物相互作用に関するガイダンス（2012年6月発行）*3で、重要分子種として追加されました。これら3分子種についても、評価系を構築し、2014年4月、日米欧の規制文書に対応したTP評価が可能となりました。表3に、重要分子種に対する典型基質の輸送活性及び典型阻害剤による阻害作用の結果を示します。いずれも、既報の文献値と同等の値を示しており、評価系として妥当であることが確認されています。本評価系は細胞に、それぞれのTP分子種を安定的に発現させているため、一過性に発現させた場合と比較して、実験間差の小さなデータを得ることが可能です。安定発現株を用いて検討することは、International Transporter Consortium (ITC) から新たに発行された白書（2013年4月発行）*1においても推奨されています。

TPの研究は現在もお進捗しており、2013年4月に発行されたITC白書*1では、記載分子種の数は増加し、内容は、更に詳細なものとなってきました。今後も重要性の高い分子種が明らかになることが予想されるため、引き続き、TP評価系を充実させていきたいと考えています。原稿執筆/金子 健一 E-mail: kaneko.kenichi@ma.medience.co.jp

- *1. CLINICAL PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS 94 (1): 95-112, 2013, KLR Brouwer et al.
- *2. Guidance for Industry Drug Interaction Studies - Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations DRAFT GUIDANCE, FDA, February 2012, Clinical Pharmacology
- *3. Guideline on the Investigation of Drug Interactions, European Medicines Agency, 21 June 2012
- *4. 医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン（案），厚生労働省医薬食品局審査管理課，平成25年12月17日
- *5. Guidance for Industry Drug Interaction Studies -Study Design, Data Analysis, and Implications for Dosing, and Labeling DRAFT GUIDANCE, FDA, September 2006, Clinical Pharmacology
- *6. European Journal of Pharmacology 584: 57-65, 2013, Gui C et al.
- *7. Pharmacological Review 63:157-181, 2011, Niemi M et al.

- *8. Biopharmaceutics & Drug Disposition 31: 1-71, 2010, VanWert AL et al.
- *9. Pharmaceutical Research, 22 (2): 255-259, 2005, Kimura N et al.
- *10. CLINICAL PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS 89 (6): 837-844, 2011, Kusuha H et al.
- *11. Am J Physiol Renal Physiol 298: F997-F1005, 2010, Meyer zu Schwabedissen HE et al.
- *12. Biochemical Pharmacology 74: 359-371, 2007, Tanihara Y et al.
- *13. The Pharmacogenomics Journal 11, 400-411, 2011, Ahlin G et al.

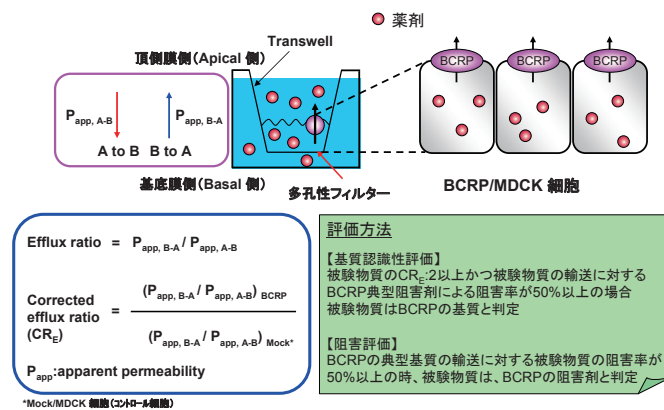


図2-1 経細胞輸送実験（例：BCRP）

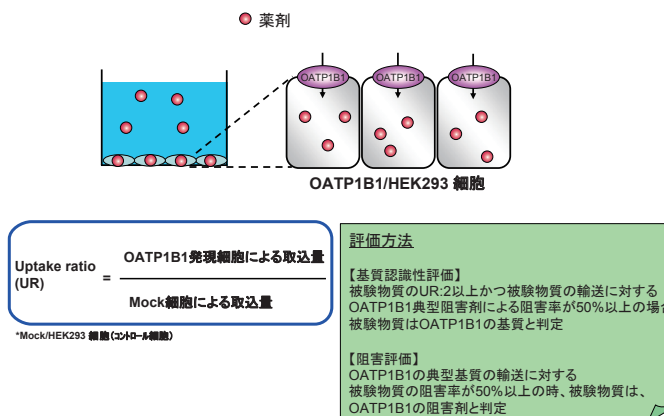


図2-2 取込実験（例：OATP1B1）

表3 薬物TP発現細胞評価系のパリエーションデータ

Transporter	Substrate	Substrate Concentration	Inhibitor	Time	IC ₅₀ (μmol/L)	K _m (μmol/L)	References			
							IC ₅₀ (μmol/L) No. #1	K _m (μmol/L) No. #1		
MDR1	[³ H]Digoxin	1 μmol/L	Verapamil	4 h	15.2	Not saturate	15	5	-	-
			Cyclosporin A	4 h	1.9		2.2	5	-	-
BCRP	[³ H]Prazosin	10 nmol/L	Ko143	2 h	0.00904	4.49	0.01	4	-	-
OATP1B1	[³ H]Estradiol 17β-D-glucuronide	50 nmol/L	Rifampicin	2 min	0.617	7.52	1.5	6	6.3 - 8.3	7
OATP1B3	[³ H]Estradiol 17β-D-glucuronide	50 nmol/L	Rifampicin	2 min	0.349	15.4	2.6	6	15.8	6
OAT1	[³ H]p-Aminohippuric acid	1 μmol/L	Probenecid	2 min	13.6	97.9	10.7, 11.9	8	20.1 - 47.8	8
OAT3	[³ H]Estrone 3-sulfate	10 nmol/L	Probenecid	2 min	3.79	16.8	3.6, 4.7	8	6.3 - 9.51	8
OCT2	[¹⁴ C]Metformin	5 μmol/L	Quinidine	2 min	38.7	823	17.4	9	1380	9
MATE1	[¹⁴ C]Metformin	20 μmol/L	Pyrimethamine	5 min	0.0259	165	0.093 #2	10	202	11
MATE2-K	[¹⁴ C]Metformin	5 μmol/L	Pyrimethamine	2 min	0.192	1073	0.059 #2	10	1980	12
OCT1	[¹⁴ C]Metformin	10 μmol/L	Verapamil	2 min	1.16	5720	0.62	13	5450	13

#1: See in References Section
#2: K₁ value

薬理

無拘束ラット酢酸誘発膀胱炎における行動指標を用いた膀胱痛の評価法



熊本研究所
前列左から村田、森田研究員、後列左から廣中研究員、水町
チームリーダー

【目的】

間質性膀胱炎は頻尿、残尿感、下腹部痛、膀胱痛などの症状によって患者のQOL (Quality of Life) を著しく低下させる難治性の疾患であり、患者数は日本で約25万人と推定されますが、根本的な治療薬はなく、新しい治療薬の開発が急がれています。開発には実験動物を用いた排尿機能の評価に加えて、膀胱痛に起因すると考えられる行動の変化を評価することが必要と考えます。そこで今回、ラットの膀胱内に酢酸を注入した酢酸誘発膀胱炎モデルを作製し、膀胱内酢酸注入がラットの自発運動に及ぼす影響を調べました。また、炎症性の生化学的マーカー (IL-1β、IL-6、PGE2: Prostaglandin E2) を測定したほか、少数例の動物ではfMRIによる脳機能解析を行い、自発運動測定の有用性を検討しました。

【方法】

SD系雌性ラットを用い、イソフルラン吸入麻酔下で以下①及び②の実験をしました。

①酢酸誘発膀胱炎モデルと対照群との比較

図1に示すスケジュールに従い、酢酸群 (0.3%酢酸を0.2 mL膀胱注) と対照群 (生理食塩水を膀胱注) の自発運動量を注入開始1.5時間後から44時間測定しました。

②ジメチルスルホキシド(DMSO)の効果

膀胱痛緩和効果のあるDMSOの効果を検討するため、図2に示すスケジュールに従い、酢酸 (0.3%、0.2 mL) 膀胱注後、生理食塩水を膀胱注した群 (酢酸-生食群) と酢酸膀胱注後DMSOを膀胱注した群 (酢酸-DMSO群) の自発運動量を18時間測定しました。

①及び②の測定には赤外線感知方式で全般的な体動を測定するDASシステムと、赤外線ビームセンサー方式で移所運動のみを測定するACTIMOシステムの両者を用いました。また、生化学的マーカーとして、膀胱組織中のIL-1β及びIL-6並びに尿中のPGE2を測定しました。fMRIでは酢酸による膀胱痛と後肢刺激による体性感覚痛を比較しました。

【結果】

①の実験では、膀胱内に酢酸を注入した後、一過性に活動が亢進し (図3)、その後、夜間の活動期にかけて活動は低下しました (図4)。②の実験では、酢酸-DMSO群でACTIMOでは酢酸-生食群と変わらず、

DASで低下が見られました (図5)。また、酢酸注入により膀胱では、いずれの炎症マーカーでも増加が認められました (図6)。fMRIでは、酢酸膀胱注後に脳の海馬周辺領域や中脳水道周辺灰白質の活動が認められた一方で前頭皮質の活動が見られず、体性感覚痛とは異なる部位が活動していることが示されました (図7)。病理組織学的検査では、酢酸の注入により炎症性細胞浸潤が認められました (図8)。

【まとめ】

以上のように、膀胱痛に関連すると見られる行動変化を自発運動量測定でとらえることができました。間質性膀胱炎のように不快感を伴う痛みの評価には、鎮痛試験で用いられてきた局所的な痛みの評価に加えて全身的な行動評価が必要と考えられます。今回、2種類の測定システムで酢酸注入による自発運動量の変化が見られました。DMSOの緩和効果は明らかではなく今後の検討が必要ですが、2種類の測定システムの結果には相違がありました。このことから、薬剤による膀胱痛の緩和効果を調べるには、移所運動と全般的な体動を分けて評価することが有用と考えられます。当社には排尿機能をリアルタイムでモニターするシストメトリー及びウロフロメトリーがあることから、今後、蓄尿時あるいは排尿時の行動と膀胱痛の関わり合いを明らかにし、更なる膀胱痛の評価系確立を目指したいと考えています。

(原稿執筆/森田 枝美 E-mail: Morita.Emi@ms.medience.co.jp)

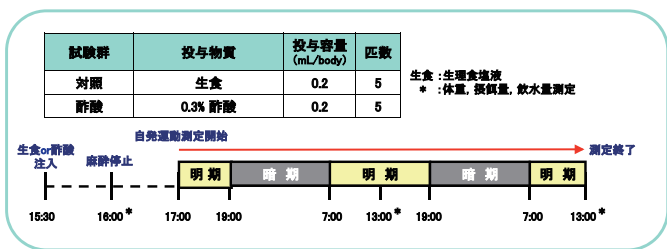


図1 酢酸膀胱注後の自発運動量測定のスケジュール

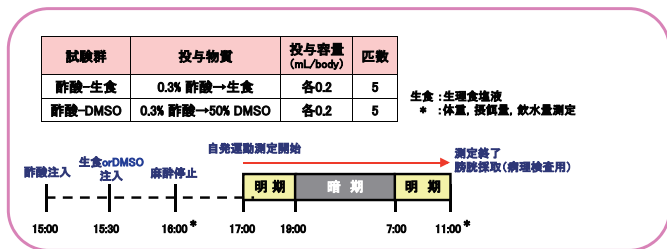


図2 酢酸-DMSO膀胱注後の自発運動量測定のスケジュール

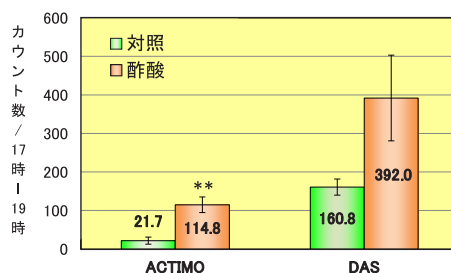


図3 ラットの自発運動量に及ぼす生理食塩液及び0.3%酢酸膀胱内注入の影響
注入後17時から19時までの自発運動量を示す。
結果は平均値±標準誤差で表示 (数値は平均値)
*: p<0.01、対照と比較して有意差あり (Student's t-test)

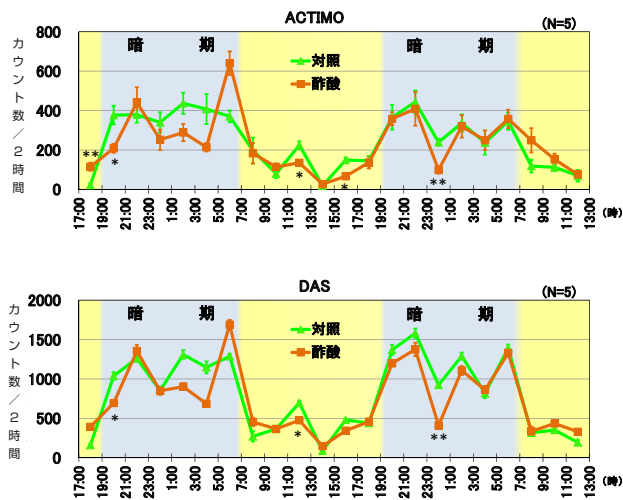


図4 ラットの自発運動量に及ぼす生理食塩液及び0.3%酢酸膀胱内注入の影響

注入後、17時から2日間の自発運動量を示す。
各ポイントは各群5例の平均値±標準誤差。
*:p<0.05、**:p<0.01、対照に対して有意差あり (Student's t-test)

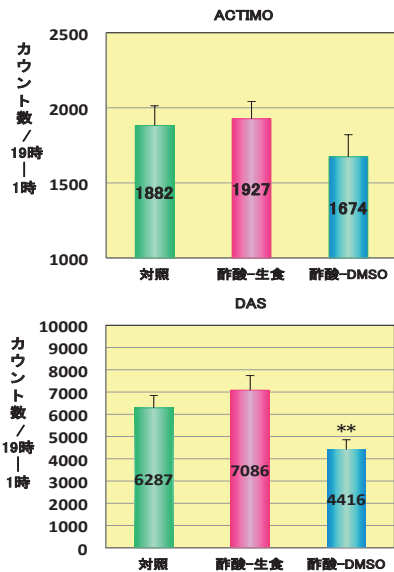


図5 膀胱痛モデルラットにおけるDMSOの効果
0.3%酢酸注入後、生理食塩液(酢酸-生食)または50%DMSO注入後(酢酸-DMSO)19時から1時までの自発運動量を示す。
結果は平均値±標準誤差で表示(数値は平均値)
**:p<0.01、対照に対して有意差あり(Student's t-test)

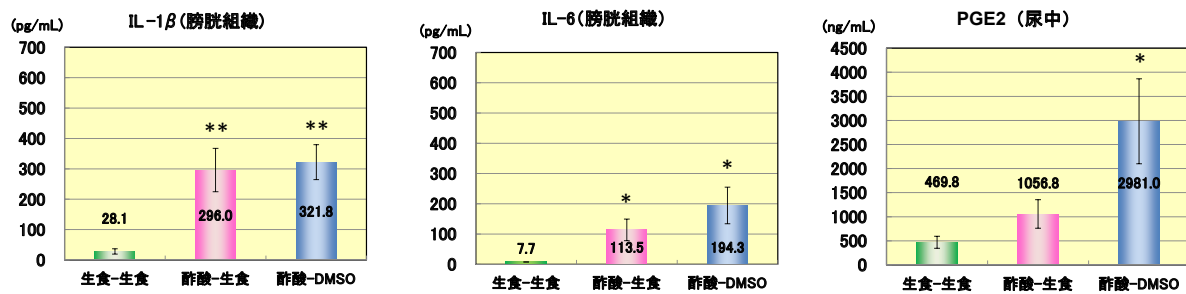


図6 膀胱痛モデルラットにおける膀胱組織のIL-1β及びIL-6と尿中PGE2
結果は平均値±標準誤差で表示(数値は平均値)
*:p<0.05、**:p<0.01、生食-生食群に対して有意差あり(Student's t-test)

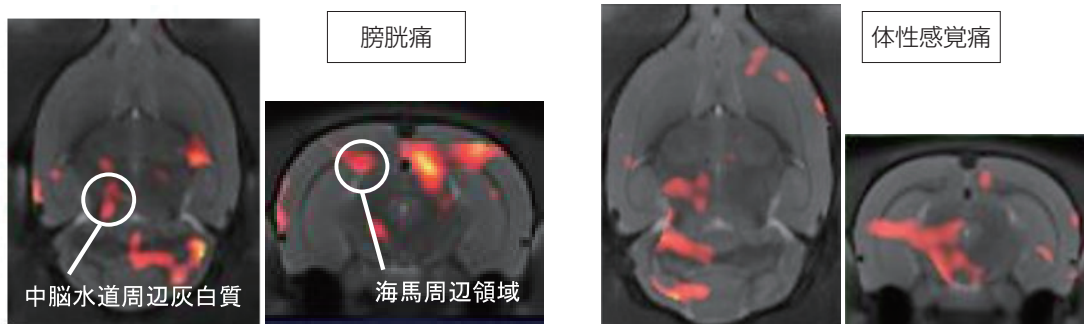


図7 膀胱痛及び体性感覚痛時のfMRIによる脳機能解析画像
膀胱痛：膀胱内に酢酸注入 体性感覚痛：後肢に刺激
処置前より有意(p<0.01)に信号強度が上昇した領域を赤～オレンジ色で示す。

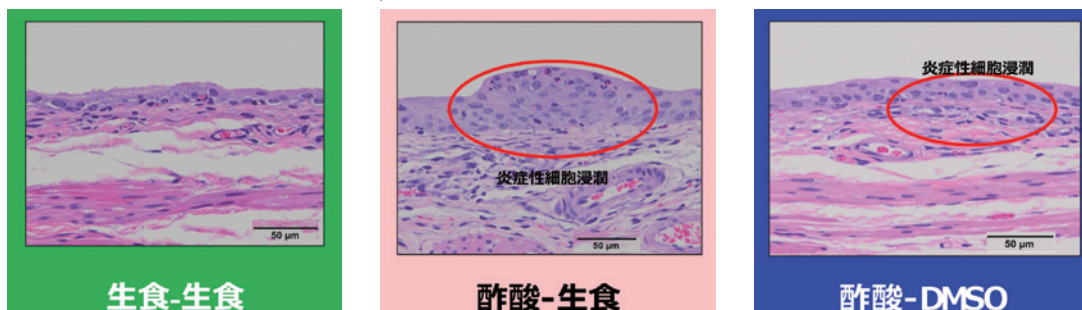


図8 病理組織学的検査(膀胱組織のHE染色)

先端技術

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた 安全性薬理試験の新規試験系開発



鹿島研究所
前列左から藤崎、小坂橋、梶山、武内研究員、後列左から北村、南、榊原、大槻研究員

[背景]

iPS細胞が開発されてから今日に至るまで、世界で盛んにiPS細胞の実用化に向け様々な応用研究が進められています。医薬品開発において心臓への有害事象は致死性不整脈など生死に関わることから、その毒性評価には高い信頼性が求められます。また、試験のコストを低減する意味でも、スループットに優れた評価系が望まれます。以上の課題を克服できる評価系として、本試験系の開発に取り組んでいます。

[方法]

複数の電極が密集している電極チップ(図1)に、iPS細胞由来心筋細胞を播種しシート状の細胞集団を形成させます。電極上に接着した細胞から発生する活動電位を細胞外の電位変化として捉えることで、心筋細胞の電気生理学的検査を実施します。

[結果]

不整脈を誘発することが知られている陽性対照薬では、細胞外電位測定から得られる幾つかの数値指標を用い、不整脈様の電気生理学的特徴を示す結果が得られました。例えば、心筋の活動電位持続時間を延長させる作用を持つdl-sotalolでは細胞外電位持続時間 (FPD) が延長し、一方、心筋の活動電位持続時間を短縮させる作用を持つ verapamilではFPDの短縮が捉えられました(図2)。陰性対照薬では、電気生理学的異常は示さない結果が得られました。

が延長し、一方、心筋の活動電位持続時間を短縮させる作用を持つ verapamilではFPDの短縮が捉えられました(図2)。陰性対照薬では、電気生理学的異常は示さない結果が得られました。

[まとめ]

これまでに、既知作用薬を中心に試験系のバリデーションを進めてきました。今後は心臓に発現する各イオンチャネルの阻害剤や臨床で不整脈が報告されている薬剤について体系的に背景データを取得していきます。心毒性評価におけるiPS細胞由来心筋細胞のメリット・課題を明確にすることで、お客様からの信頼が得られる受託試験としてご提供したいと考えています。

(この成果は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)の委託業務の結果得られたものです。)

(原稿執筆/榊原 基嗣 E-mail:Sakakibara.Mototsugu@mx.medience.co.jp、北村 哲生 E-mail: Kitamura.Tetsuo@mh.medience.co.jp)

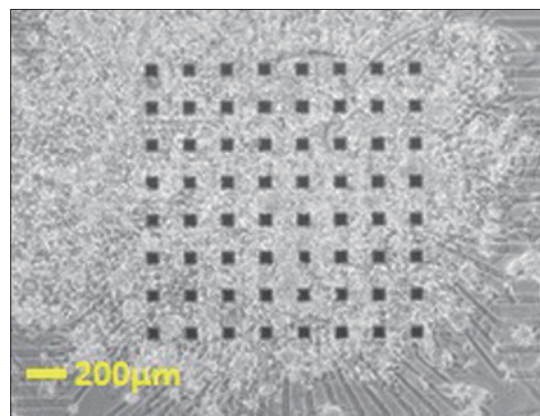


図1 多電極チップ上に接着したiPS細胞由来心筋細胞シート (■:電極)
細胞を電極上に播種するだけで、非侵襲的に電気生理学的実験が可能であるため、非常に簡便な計測が可能。

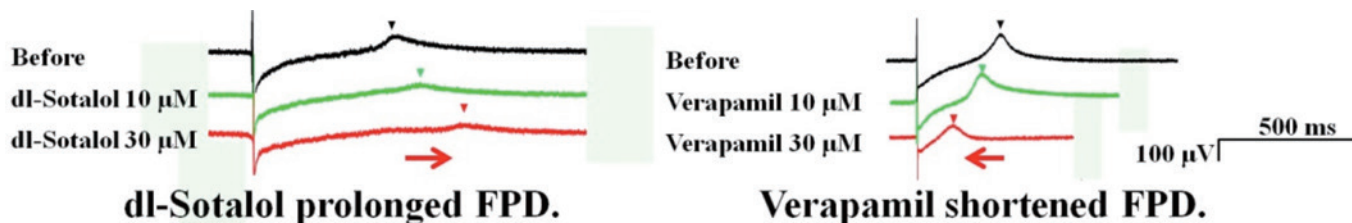
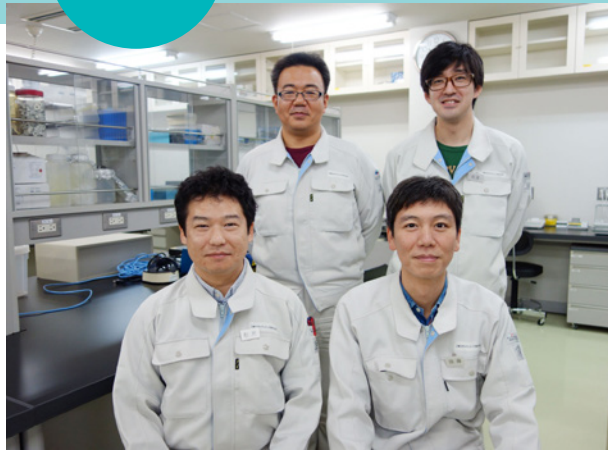


図2 dl-SotalolとVerapamilの細胞外電位持続時間(FPD)におよぼす影響
dl-Sotalolは、細胞外電位持続時間を濃度依存的に延長させる結果が得られている。Arrow headの位置が右にずれていくことから、FPDが延長していることがわかる。Verapamilは、細胞外電位持続時間を濃度依存的に短縮させる結果が得られている。Arrow headの位置が左にずれていくことから、FPDが短縮していることがわかる。

先端技術 ヒト胆管体外誘導・培養法の開発



鹿島研究所
前列左から松井、後藤研究員、後列左から笠神、向後研究員

初代培養肝細胞は医薬品候補物質の毒性や代謝を予測する系として有用なモデルです。しかしながら、従来の培養方法では生体肝組織の胆管構造や代謝輸送機能を長期間維持することが不十分であったため、肝細胞調製直後、又は2、3日程度の短期培養によって行える試験に限定されており、ヒトへの影響を予測するための生体肝組織モデルとしては課題があります。

肝細胞培養の課題を克服するアプローチの一つとして、生体肝組織内と同等の酸素を培養肝細胞に供給することで、肝細胞の機能を高める研究が行われています。当社は、NEDOプロジェクトに参画し、酸素を効率よく透過させることができる「酸素透過性膜」を活用した新しい培養方法(酸素透過膜法)を確立しました(図1)。

この方法を用いることにより、従来法に比べて胆管形成及び胆汁排出活性が増強されることが分かりました^{*1,2}。更に、胆汁排泄能や従来では減少してしまう薬物代謝遺伝子の一部を維持したまま最大2週間の長期間培養をすることができました(2013年第40回日本毒性学会学術年会及び2013年日本薬物動態学会第28回年会にて発表)。

我々が開発中の肝細胞培養方法は、生体に近い胆管構造と薬物排出などの肝細胞機能を比較的長期間維持させることができる技術です。従来では困難であった、試験管内での長期間の薬剤暴露による薬剤性肝障害予測試験や、胆管に排泄される代謝物の予測試験(図2)など、ヒトでの薬剤性肝障害や肝薬物代謝をより高精度に予測可能な受託試験としてご提供することを計画しています。

(この成果は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)の委託業務の結果得られたものです。)

*1: Biochemical Engineering Journal 52:255-262,2010

*2: Lab on a Chip 12:1857-1864,2012

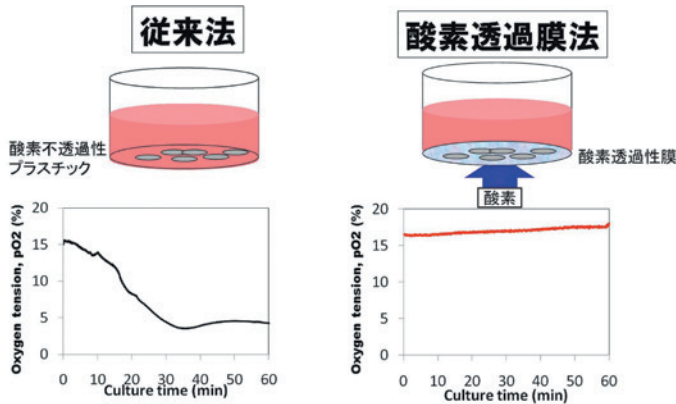


図1 従来法(左)及び酸素透過膜法(右)の概念図(上段イラスト)及び培養液中の酸素濃度(下段グラフ)

(原稿執筆/松井 等 E-mail: matsui.hitoshi@mn.medience.co.jp)

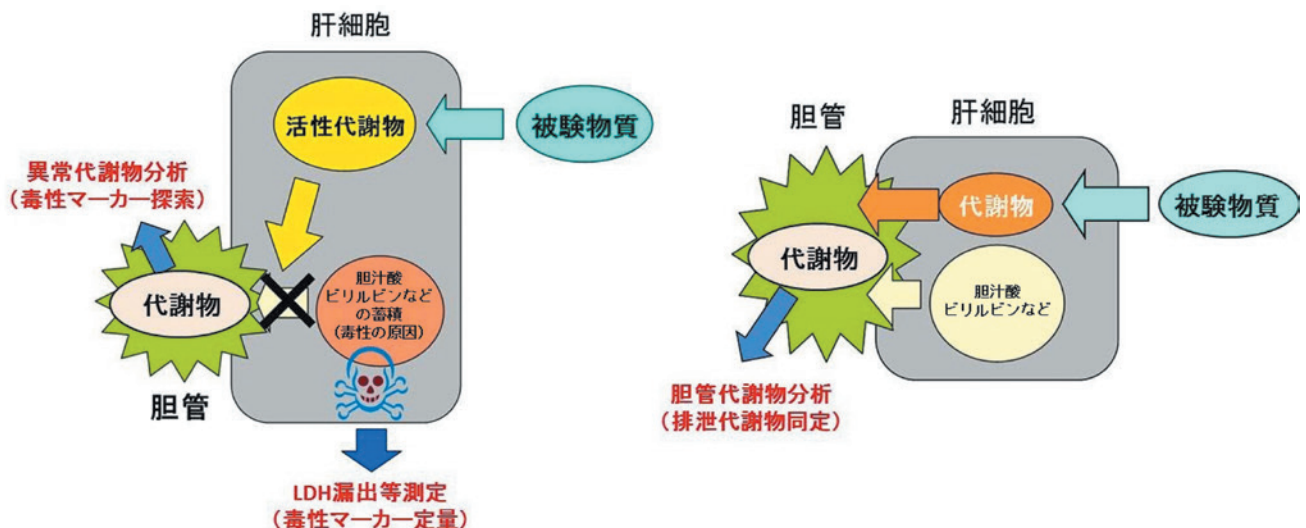


図2 本培養法の活用が考えられる、薬剤性肝障害予測試験(左)と胆管排泄代謝物予測試験(右)の概念図

病理

ラット蝸牛の標本作製方法の確立



熊本研究所

前列左から小林研究員、菅野グループリーダー、河上研究員、
後列左から可徳、押方研究員、満石チームリーダー

蝸牛はカタツムリの貝殻状の外観を呈することから、この名があります。蝸牛の内部には聴覚感受装置である蝸牛管が納まっており、らせん状に旋回しています。蝸牛管の中はリンパ液で満たされており、外界の音は鼓膜から耳小骨を経て、このリンパ液へと伝わり、蝸牛管の上皮が高度に分化してできたラセン器と呼ばれる細胞群から蝸牛神経を通じて中枢神経へ送られます。このように蝸牛は聴覚の中心的役割を担っている器官です。また、ストレプトマイシン、フロセミドやシスプラチンなどの薬剤はラセン器の細胞に傷害を起こすことが知られており^{*1}、薬剤の耳毒性を評価するうえで、蝸牛の病理組織学的検査は大変有効な方法です。しかしながら、蝸牛管(ラセン器)は骨組織で覆われていること、ラセン器は非常に脆弱な組織であることから、病理組織学的検査に耐えうる標本作製は容易ではありません。このため、一般毒性試験では通常、蝸牛は検査されていません。当社では、これまで蝸牛の病理組織学的検査の経験はなく、標本作製方法が確立していなかったことから、今回、病理組織学的検査に耐えうるラット蝸牛の標本作製方法の確立を目指し、検討しましたので、その内容を紹介します。

【標本作製方法】

ラットの蝸牛を採材し、以下の固定液及び固定方法で保存した後、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色標本を作製しました。

- ▷ 採材方法：頭蓋の側頭骨を取り除き、蝸牛を露出させた後、蝸牛を傷付けないように周囲の余計な骨を取り除きました(Fig. 1)。
- ▷ 固定液の検討：10%リン酸緩衝ホルマリン液、ブアン液、ダビドソン液及びWittmaack液を用いて、各々、蝸牛窓からの灌流固定及び浸漬固定を実施しました(Fig. 2)。
- ▷ 切り出し方法：ギ酸・ホルマリン液で脱灰後、底部(Fig. 3、白線)に対して直角となるように外耳道の対側(白矢印)を切り出しました。
- ▷ 薄切方法：1個体について切り始めから切り終わりまで、準連続標本を作製しました(Fig. 4)。その後の個体では作製した準連続標本を横に置いて、それと薄切中のパラフィンブロックを見比べることで、薄切中に目視でラセン器を確認できるようにしました。ラセン器が少なくとも3つ以上認められれば良好な標本であると判断し、3つ以上のラセン器を出せるよう目視で確認しながら標本を作製しました。薄切後、HE染色を施し、鏡検しました(Fig. 5)。

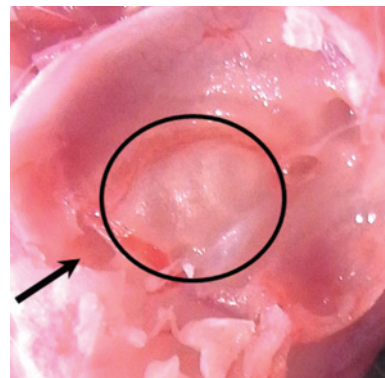


Fig. 1 蝸牛の肉眼像。円内は蝸牛を示す。矢印は蝸牛窓を示す。側頭骨を取り除くと蝸牛が現れる。

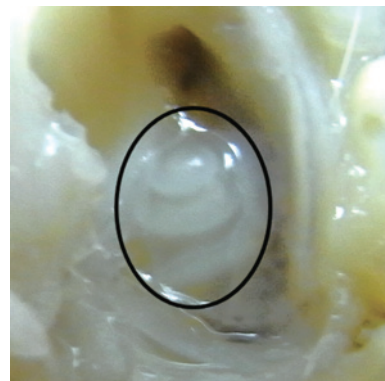


Fig. 2 固定後の蝸牛。蝸牛管がらせん状に旋回している(円内の白いところが明瞭に認められる)。

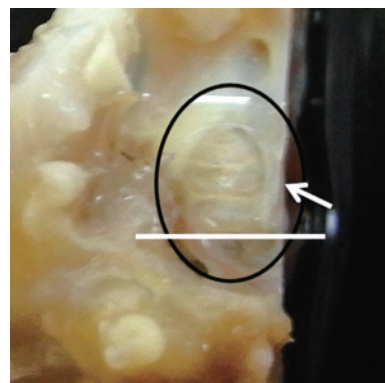


Fig. 3 蝸牛底(白線)に対して直角となるように外耳道の対側(白矢印)から切り出した。

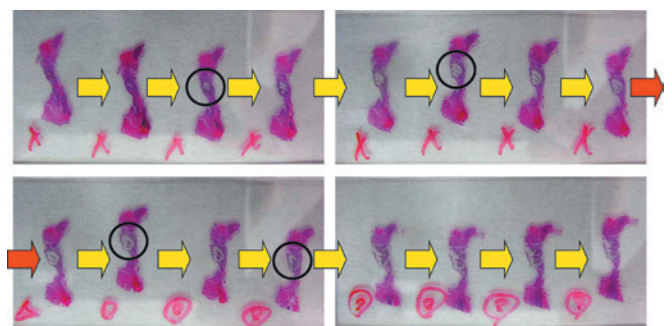


Fig. 4 蝸牛の準連続HE染色標本。切り進むにつれ、ラセン器(黒丸)が明瞭となる。標本上の赤丸はラセン器が少なくとも3つ以上認められているところを示す。

【結果】

ラセン器の組織学的形態を比較的良く保っていた固定液はブアン液であり、固定方法は蝸牛窓からの灌流固定のほうが浸漬固定よりも形態を良く保持していました。ただし、ラセン器を構成する蓋膜や細胞質にはアーティファクト(空胞)が見られました(Fig. 5A)。10%リン酸緩衝ホルマリン液では、いずれの固定方法でもアーティファクトが強く、検査に耐えうる標本ではありませんでした(Fig. 5B)。ダビドソン液(Fig. 5C)及びWittmaack液は10%リン酸緩衝ホルマリン液よりは形態を保持していましたが、蓋膜の濃縮や細胞質の空胞がやや強めに見られ、ブアン液よりも劣る結果となりました。

【最後に】

検討の結果、ブアン液の灌流固定によりラセン器の組織学的形態を比較的良好に保持した標本を作製することができました。検査に耐えうる標本を作製することができるようになりましたが、更に良好な標本作製を目指して創意工夫に努めていきたいと考えています。耳毒性の病理組織学的評価をご検討の際には、ぜひお気軽にご相談ください。

(原稿執筆/菅野 剛 E-mail:Kanno.Takeshi@me.medience.co.jp)

*1: Histopathology of the preclinical toxicity studies. 3rd. ed.:909-913,2007

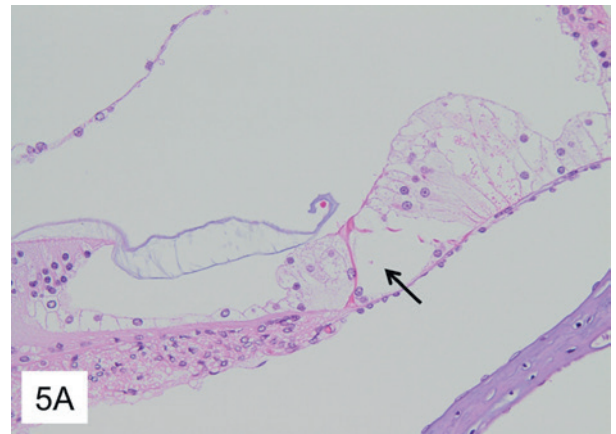


Fig. 5A:ブアン液固定ではラセン器の全体的な構造が保たれており、内トンネル(矢印)も明瞭に認められる。

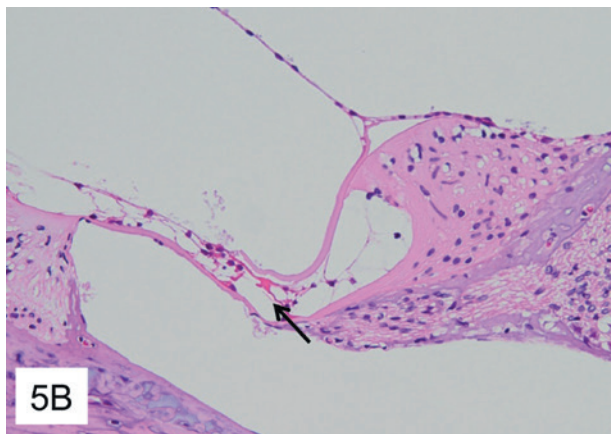


Fig.5B:ホルマリン液固定では、全体的にアーティファクトが強く、内トンネル(矢印)が不明瞭である。また、核や細胞質が濃縮している。

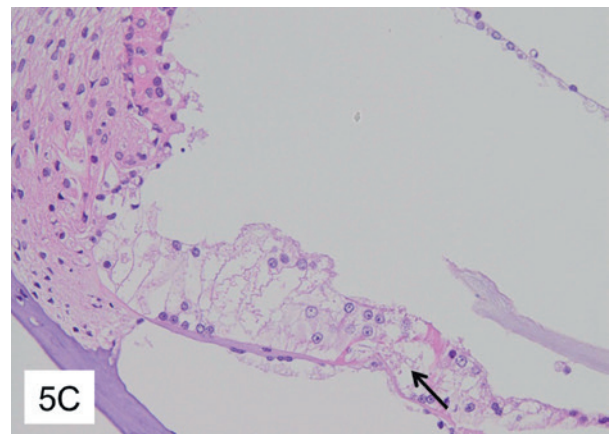


Fig.5C:ダビドソン液固定では全体構造は比較的保たれているが、細胞質の空胞や内トンネル(矢印)が不明瞭である。

Topics 1

マウス背景データ増強

当社では、CB6F1-Tg rasH2マウス雌雄各30例×2ロット(雌雄各60例)の背景データを、新たに収集しました。これまでのデータと合計すると、背景データ数は雌雄各150例となります。Tgマウスを用いた短期発がん性試験は、2年間のがん原性試験に比べて実験期間の短縮や使用動物数の削減が大きな利点ですが、一方で、1群当たりの動物数が少ないため、投薬による腫瘍発生率を評価するうえでは、腫瘍の自然発生率のデータを数多く蓄積することが欠かせません。引き続きデータ収集・蓄積に努めてまいります。

加えて、CrI:CD1(ICR)マウス(一般名:ICR(IGS))の背景データ収集も実施しました。2週、4週、13週間の反復投与試験を想定し、体重、摂餌量、眼科学的検査、尿検査、血液及び生化学的検査などの各種検査データを取得しました。従来のICRマウス(一般名:ICR(CRJ))に代わって毒性試験に使用することが可能です。

(原稿執筆/三木 篤子 E-mail: miki.atsuko@mk.medience.co.jp)

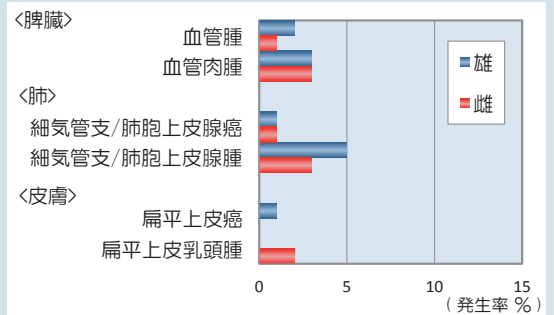
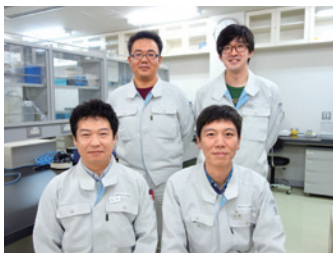
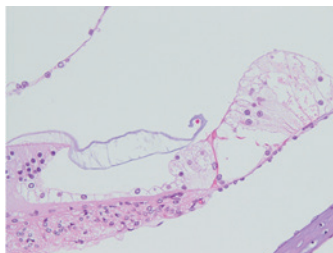


図 rasH2マウスで見られる主な増殖性病変(当社背景データ、媒体投与時)

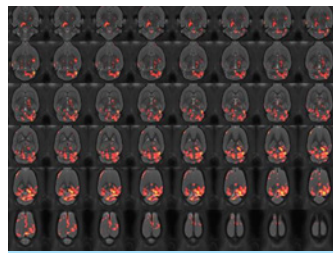
表紙写真紹介



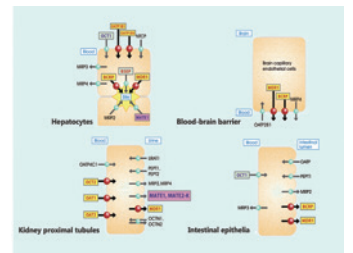
鹿島研究所
前列左から松井、後藤研究員、
後列左から笠神、向後研究員



ラット蝸牛のラセン器
ラセン器の組織学的形態が良好に
保たれている (HE染色、ブアン液
灌流固定)



酢酸誘発膀胱炎モデルラットにお
ける脳のfMRI画像(酢酸投与後
30分)



日米欧にて評価が推奨されている
薬物トランスポーター

Topics
2

米国の信頼性保証 専門家資格を取得



米国におけるQA専門家団体 (SQA : Society of Quality Assurance ; 30カ国、2300人以上の会員数) 主催のRQAP-GLP資格試験 (Registered Quality Assurance Professional in Good Laboratory Practice) を、石丸照美が2013年10月17日に受験し、合格しました。

試験では、各国のGLP要件 (OECD、FDA、EPAなど) に関連した信頼性保証業務についての問題が出題され、グローバルな専門的知識が要求されます。この試験で一定の水準を満たすと、

RQAP-GLPの資格が付与されますが、各国で受験が可能であり、世界的なGLP信頼性保証専門家の資格とされています。

近年、医薬品・農薬・化学物質等の業界において多様化・国際化が進み、QAにおいても国際的な視点が必要となってきたと感じています。

今回の資格取得により、委託者様からの各種国際的なGLPに従った試験のご要望に対しても、更に充実した対応が可能になると思われまます。

今後も、お客様に安心して試験をご依頼いただける施設・組織となるように努力していく所存です。何卒、ご指導ご鞭撻のほど宜しくお願い申し上げます。

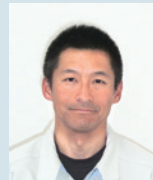
(原稿執筆/石丸 照美 E-mail:ishimaru.terumi@mh.medience.co.jp)

Topics
3

基礎眼科学 専門家資格を取得

比較眼科学会が認定する基礎眼科学専門家 (Diplomate of Japanese College of Fundamental Ophthalmologists) の資格を、2013年に大竹誠司、和田聰、2014年に樋口剛史が取得しました。3名の資格取得は国内CROにおいて最多となります。

基礎眼科学専門家は、実験動物の眼科学に関する専門家として認定される本邦唯一の資格です。眼に対する毒性はヒトのQOL



(Quality of Life) に及ぼす影響が大きく、非臨床試験の段階でより正確な検査・評価が重要であると考えられます。今回の資格取得により、これまで以上に信頼性の高いデータの提供が可能となりました。

資格を取得した3名は一般毒性試験の試験責任者を務めており、眼に対する毒性が疑われる化合物の様々な試験立案及び適切な結果解釈が可能です。今後もお客様のご要望にお応えすべく精進してまいります。

(原稿執筆/和田 聡 E-mail:Wada.Sou@mw.medience.co.jp)

Topics
4

Ellegaard社 (デンマーク) にて ミニブタ実験研修に参加

2013年12月に、ミニブタ (Göttingen minipigs) のブリーダーであるデンマークのEllegaard社にて、ミニブタ実験研修を受講しました。研修は実験が1日半、座学が半日の計2日あり、経口・経皮などの基本的な投与技術、採血法や麻酔・鎮静法、カテーテル留置法について、大変分かり易く説明していただきました。また、ブタ実験をスムーズに実施するために、餌とクリックカーと棒を用いた調教方法を教わりました。調教は比較的簡単にでき、動物が実験に協力してくれるという新たな感覚を体験しました。

座学は、ミニブタの行動研究や取扱い方法、動物福祉をメインとした内容で、様々な動画や画像でミニブタの習性について紹介いただきました。

専門的な技術や最新の情報などの収集方法について質問したところ、欧州のミニブタ実験研究会であるMinipig Research Forumを紹介されました。会員になると、ミニブタ実験に関する種々の発表資料の閲覧が可能となり、会員との情報交換も自由出来るようです。会員登録は簡単に出来ますので、アクセスしてみてください (<http://minipigresearchforum.org>)。

ミニブタ飼育エリアの規模拡大

2012年に、ミニブタ (Göttingen minipigs) 用小規模施設 (12頭) を立上げ、一般毒性試験で用いられる手技や検査法を確立してきました。今般、ミニブタ試験の問い合わせも増えて



きたことから、お客様のニーズに応えられるよう、規模を拡大してミニブタ収容可能頭数を最大92頭としました。これにより、反復投与毒性試験は同時に最大4試験が実施可能となり、安全性薬理試験 (心血管系テレメトリー試験) が実施可能な設備も整いました。今後も順次拡大していく予定です。

引き続き、お客様のニーズにお応えすべく、背景データ収集や技術検討を実施してまいります。

(原稿執筆/石井 宏幸 E-mail: Ishii.Hiroyuki@mc.medience.co.jp)

株式会社LSIメディエンス 創薬支援事業本部

- ◆試験研究センター 鹿島研究所 〒314-0255 茨城県神栖市砂山 14 番地 1 ☎ 0479-46-2871 FAX 0479-46-2874
- ◆試験研究センター 熊本研究所 〒869-0425 熊本県宇土市栗崎町 1285 番地 ☎ 0964-23-5111 FAX 0964-23-5122
- 【関東】創薬第1営業部 第1グループ 〒101-8517 東京都千代田区内神田一丁目13番4号 THE KAITEKIビル ☎ 03-5577-0807 FAX 03-5577-0857
- 【関西】創薬第1営業部 第2グループ 〒541-0044 大阪市中央区伏見町四丁目 1 番 1 号 ☎ 06-6204-8411 FAX 06-6204-8716

<http://www.medience.co.jp/>

株式会社LSIメディエンス 非臨床 News 第3号 2014年4月発行