

厚生科学研究研究費補助金

医薬安全総合研究事業

新しい実験動物系を利用した非臨床安全性試験及び薬
理試験による医薬品の評価に関する研究

平成 13 年度～平成 13 年度 総合研究報告書

主任研究者 小池 克郎

平成 14 年 4 月

目 次

I. 総合研究報告

新しい実験動物系を利用した非臨床安全性試験及び薬理試験による医薬品の評価に関する研究

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

III. 研究成果の刊行物・別刷

新しい実験動物系を利用した非臨床安全性試験及び薬理試験による医薬品の
評価に関する研究

主任研究者 小池克郎 (財) 癌研究会癌研究所部長

研究要旨： 本研究は、医薬品の有効性 (Pharmacology) および安全性 (Toxicology) の非臨床試験について、動物試験に新しい実験動物としてのミニブタの使用に関する現状を調査し、試行的研究を行い、今後の使用に役立てるものである。すでに欧米では、医薬品評価に際して、ヒトに類似点の多いミニブタが非齧歯類の選択肢の一つに加わり、ミニブタを用いた長期安全性試験もすでに実施されている。現在では、安全性のみならず有効性の評価にも使用され始めている。

申請者は、ヒトでのウイルス性慢性肝炎の発症に、免疫システムによる間接的な細胞傷害に加えて、ウイルス蛋白質による直接の細胞傷害がその要因になると考え、その詳細を明らかにする研究を長年に亘り行ってきた。ヒト培養肝細胞にB型肝炎ウイルス由来のX遺伝子を発現させると、X蛋白質がミトコンドリアに結合し、ミトコンドリアが凝集し、その機能に著しい変化 (膜電位の低下など) が生じ、ROS (活性酸素種) が生成され、その結果、細胞膜の変化 (ブレッキング) を伴う細胞死が起こることを明かにした。得られた結果は、ウイルスのX蛋白質が直接にミトコンドリアの機能障害を起こし、細胞死を惹起し、慢性肝炎の発症原因の一つになることを示している。そこで我々は、ROSの生成を伴う肝炎発症の抑制に薬剤の抗炎症作用による化学予防を考えている。ミニブタを用いた研究を行い、よりヒトに近い知見が得られることを検証し、医薬品の非臨床試験へのミニブタ使用に役立てる為の試行的研究を行った。

分担研究者：嶋津 務 (財団法人癌研究会)

A. 研究目的

本研究の目的は、医薬品開発における非臨床試験に際して、ヒトへの外挿が容易な動物種の選択、すなわち、ヒトとの類似点の多い動物種の選択が重要な鍵を握ることは言うまでもない。従って、薬物作用機序や毒性発現機構を解明する為の非臨床試験の実施に際し、動物種の選択がこれまで以上に重要な問題となっている。非齧歯類動物として、日本ではウサギあるいはイヌが第一選択肢であり、次いで、サルの順である。一方、欧米では、ヒトに類似点の多いミニブタ使用の必要性が強調され、ミニブタを用いた長期安全性試験もすでに実施され、現在では、安全性のみならず有効性の評価にも使用され始めている。さらに、医療用デバイスの評価にも使用されている。医薬品の有効性 (Pharmacology) および安全性 (Toxicology) について、中型実験動物としてのミニブタの使用に関する現状を調査し、試行的研究を行い、今後の使用に供するものである。

肝炎発症メカニズムについての我々の研究は、ミトコンドリアの機能障害がROSを生成させ細胞死を

誘起し、主な発症原因の一つになることを示している。得られた結果に基づくと、ROS生成を伴う肝炎に対する抗炎症剤あるいは類似の作用が期待される薬剤による化学予防が考えられる。これまで、非ステロイド系抗炎症剤の肝機能に与える効果についての非臨床試験は、マウス、ラット、犬などで研究されてきているが、ヒトへの作用を明らかにするには、どうしてもヒトに類似点が多い中型モデル動物、即ちミニブタの利用が不可欠である。本研究では、この為の試行的研究を目的としている。

B. 研究方法

肝炎モデルとしてのミニブタの有用性を検討する第一段階として、四塩化炭素による肝傷害について検討した。

(1) 試料および実験方法：

実際には種々の投与法を試行したが、ここでは、その中のいくつかの実験結果についてまとめて記載する。投与群として体重10.7-12.0 Kgのオス8頭を用い、類似の体重のオス8頭を対照群とした。投与量は、他の動物 (アカゲサル、ラット、マウス等) を用いた過去の実験報告に準じ、四塩化炭素 (Corn

oilに33.3% v/v溶かして用いた)を、グループ分けしたミニブタに、150mg/Kgを一回または複数回、150mg/Kgと450mg/Kgを組み合わせて一回または複数回経口投与した。第1回投与後24時間で採血、その後7日ないし8日まで採血を行い、実験の途中および終了時に肝臓組織等を採取した。血清の蛋白質、代謝産物および酵素活性について検討するとともに肝臓の組織学的検索を行った。

(2) 研究対象とした項目および方法:

① 蛋白質: IgG, AFP, ALB, ZTTの量を測定した。② 代謝産物: 総胆汁酸、ヒアルロン酸、T-CHO, T-BILの量を測定した。③ 酵素活性: GOT, GPT, GGT, γ -GPT, ALP, Ch-Eの活性を測定した。④ 組織: パイオプシーにより検討した。⑤ ゲノム: ミトコンドリアDNAの全塩基配列を決定し、個体差を検討した。⑥ その他: 体重測定等を行った。

C. D. 研究結果と考察

ミニブタを用いたパイオプシーの技術がまだ不十分であったが、予備的な肝臓の組織学的検討の結果では、肝小葉の中心部に傷害が見られ、アカゲザル、ラット、マウス等の場合と大差はなかった。体重については、投与前と8日後に行った。一例に死亡例があったが、その他についてはとりわけ体重減少あるいは増加はみられなかった。血清中の酵素活性の変動については、一つ一つのデータについて詳述する事は省略する。しかし、全体として明らかになった事として、GOT, GPTの変動およびGGTの活性の変動が、ヒトの場合と同様の傾向を示した。これらの結果は、肝細胞の傷害を示している。また、酵素によっては個体間のバラツキが大きく、特に、GOTでは、投与群中の一頭が他よりもきわめて高値を示したが、この個体は6日後に死亡した。実験群と対照群でGOTおよびGPTに大きな差の認められたことから、肝臓酵素の血中への逸脱が明らかである。

今回得られた結果から判断すると、ヒトに類似点の多い中型実験動物としての、ミニブタを用いた急性肝炎モデル系が作成出来たと考えられる。即ち、急性肝傷害による酵素GOT, GPTおよびGGTの活性の変動は、ヒトやアカゲザル等と同様であった。個体差が大きいことも、ヒトに類似しており、遺伝子の多型を検討するには、格好の材料である。現在、ミトコンドリアDNAの全塩基配列を決定し、さらに、

薬物代謝に関係する遺伝子の配列決定が進行している。各種の肝傷害等について、さらには、肝傷害に対する薬剤の改善効果を判定するのに良い実験動物系が出来たと考えられる。医薬品の安全性や有効性を検討するには、ヒトに類似した系として、非常に有効であると考えられるので、さらに継続して検討を行いたいと考えている。

E. 結論

本研究により、ヒトに類似した中型実験動物、ミニブタを用いた急性肝炎モデルが作成出来たと考えられる。即ち、急性肝傷害による血清中の酵素、GOT, GPTおよびGGTの活性の変動は、ヒト等と同様であった。個体差が大きいことも、ヒトに類似しており、遺伝子の多型を検討するには、格好の材料である。現在、ミトコンドリアDNAの全塩基配列が決定されている。得られた成果を総合すると、肝傷害に対する薬剤の効果を判定するのに良い実験動物系が出来たと考えられる。医薬品の安全性や有効性を検討するにあたって、ヒトに類似した中型動物を用いた新しい系として非常に有効であると考えられるので、さらに継続して検討をおこない、ミニブタを用いた系をより一層開発し、広く普及したいと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

Chong Feng Gao, Shuo Ren, Lilin Zhang, Takuma Nakajima, Shizuko Ichinose, Toshiko Hara, Katsuro Koike and Nobuo Tsuchida. Caspase-dependent cytosolic release of cytochrome c and membrane translocation of Bax in p53-induced apoptosis. *Exp. Cell Res.*, 264:145-151, 2001

Katsuro Koike, Hepatitis B Virus Infection, Cellular Transformation and Oncogenesis. Proceedings of the 4th International Conference of Asia-Pacific International Molecular Biology Network. p.36, 2001. Taipei, Taiwan.

Yumiko Shirakata and Katsuro Koike. Cytochemical characterization of cell death caused by HBV X protein. 2001 Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. p.98, 2001, Amherst, USA

Katsuro Koike, Hepatitis B Virus Infection and Liver Carcinogenesis. Proceedings of The 25th AMBO International Training Course 2002: Approach to Supra-Molecular Complexes and Their Functions-- Glycobiology, Lipid Biology and Microbiology--. p.7, Riken Frontier and Riken Institute, March, 2002.

小池克郎、新ミレニアムへのメッセージ：二つの提案、蛋白質 核酸 酵素、Vol.46 No.12, 1872-1875, 2001, 共立出版

小池克郎、ウイルス感染、「血液・免疫・腫瘍」特集：炎症制御 Vol.6 (No.2), 25-31 (135-141), 2001 メディカル・レビュー社

小池克郎、肝炎の遺伝子診断、小児科診療 Vol. 64 10, 47(1487-1491), 2001, 診断と治療社

小池克郎、X遺伝子の組み込みと肝発癌、「21世紀への肝発癌の治療」2002年、アークメディア社

2. 学会発表

Yumiko SHIRAKATA, Katsuro KOIKE, Hepatitis B Virus X Protein Causes Cell Death by Disrupting Mitochondrial Membrane Potential. Singapore-Japan Symposium on Biomedical Sciences From Academia to Industry in Genomic Medicine, November, 2001, Singapore

原 俊子、高 嵩峰、土田信夫、小池克郎。p53蛋白質のミトコンドリア上での機能。第74回日本生化学会大会抄録p.629 (S16-6)、平成13年10月、京都

白形由美子、林 正行、小池克郎。B型肝炎ウイルスX遺伝子による細胞傷害。第60回日本癌学会総会記事 p.81 (61) 平成13年9月、横浜

原 俊子、小池克郎。p53のミトコンドリア上での機能におけるプロテアーゼの関与。第60回日本癌学会総会記事 p.91 (101) 平成13年9月、横浜

林 恭行、小池克郎。B型肝炎ウイルスDNAが組み込まれやすい細胞DNA領域。第60回日本癌学会総会記事 p.148 (328) 平成13年9月、横浜

嶋津 務、小池克郎。出生後に新たに発現する2.1kb EF-1 α mRNAの転写後調節。第60回日本癌学会総会記事 p.418 (1385) 平成13年9月、横浜

米山春子、原 俊子、松浦悦子、矢守隆夫、小池克郎。各種ヒト癌細胞株に見られる mtDNA D-loop 領域での塩基置換。第24回日本分子生物学会年会要旨 p. 405, (1P-290) 平成13年12月、横浜

福嶋真太郎、嶋津 務、小祝 修、小池克郎。TNF- α mRNAの転写調節。第24回日本分子生物学会年会要旨 p.518, (2P-227) 平成13年12月、横浜

嶋津 務、小池克郎。出生後に発現される2.1kb 伸長因子EF-1 α mRNAレベルの転写後調節機構。第24回日本分子生物学会年会要旨 p. 532, (2P-307) 平成13年12月、横浜

林 正行、白形由美子、小祝 修、小池克郎。TAT融合蛋白質導入法を用いたHBV X蛋白質の増殖促進活性の解析。第24回日本分子生物学会年会要旨 p.362, (3P-152) 平成13年12月、横浜

白形由美子、林 正行、小池克郎。B型肝炎ウイルスX遺伝子による細胞傷害の機構。第24回日本分子生物学会年会要旨 p.362, (3P-153) 平成13年12月、横浜

林 恭行、小池克郎。B型肝炎ウイルス産生細胞においてウイルスDNAが高頻度に組み込まれる細胞DNA領域。第24回日本分子生物学会年会要旨 p. 640, (3P-203) 平成13年12月、横浜

原 俊子、小池克郎。ミトコンドリア異常における癌抑制遺伝子p53のミトコンドリア上での役割。第1回日本ミトコンドリア研究会年会要旨 p.34. 平成14年1月、川崎

G. 知的所有権の取得状況

なし

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表
書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍名	出版者名	出版地	出版年	ページ
Katsuro Koike	Hepatitis B Virus Infection, Cellular Transformation and Oncogenesis	Proceedings of the 4th International Conference of Asia-Pacific International Molecular Biology Network	Univ. of Taipei	Taipei	2001	36
Yumiko Shirakata Katsuro Koike	Cytochemical characterization of cell death caused by HBV X protein	2001 Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses	Amherst USA	2001	98	
Katsuro Koike	Hepatitis B Virus Infection and Liver Carcinogenesis	Proceedings of The 25th AMBO International Training Course 2002				
		Approach to Supra-Molecular Complexes and Their Functions - Glycobiology, Lipid Biology and Microbiology	Riken Frontier and Riken Institute	Saitama	2002	7
小池克郎	X遺伝子の組み込みと肝発癌	「21世紀への肝発癌の治療」	アークメディア社	東京	2002	

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
C. F. Gao S. Ren L. Zhang T. Nakajima S. Ichinose T. Hara K. Kolke N. Tsuchida	Caspase-dependent cytosolic release of cytochrome c and membrane translocation of Bax in p53-induced apoptosis	Exp. Cell Res.	264	145-151	2001
小池克郎	新ミレニアムへのメッセージ： 二つの提案	蛋白質 核酸 酵素	46 (12)	1872- 1875	2001
小池克郎	ウイルス感染	「血液・免疫・ 腫瘍」特集：炎 症制御	6 (2)	25-31 (135-141)	2001
小池克郎	肝炎の遺伝子診断	小児科診療	64 (10)	47-51 ()	2001

III. 研究成果の刊行物・別刷

20010966

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。