

	Agonist Coded Samples	Antagonist Coded Samples
Group A Vehicle Control	Vehicle	Vehicle – Voluntary in antagonists series
Group B Negative Treatment Control	Not applicable - provided by vehicle control (no additional group needed for agonist series)	TP dose used by the laboratory in Phase-2 (0.2 or 0.4 mg/kg/d)
Group C	Coded Agonist Test substance #1 ^a	TP dose used by the laboratory in Phase-2 (0.2 or 0.4 mg/kg/d) + Coded Antagonist Test substance #1 ^a
Group D	Coded Agonist Test substance #2 ^a	TP dose used by the laboratory in Phase-2 (0.2 or 0.4 mg/kg/d) + Coded Antagonist Test substance #2 ^a
Group E	Coded Agonist Test substance #3 ^a	TP dose used by the laboratory in Phase-2 (0.2 or 0.4 mg/kg/d) + Coded Antagonist Test substance #3 ^a
Group F	Coded Agonist Test substance #4 ^a	TP dose used by the laboratory in Phase-2 (0.2 or 0.4 mg/kg/d) + Coded Antagonist Test substance #4 ^a
Group G	Not applicable	TP dose used by the laboratory in Phase-2 (0.2 or 0.4 mg/kg/d) + Coded Antagonist Test substance #5 ^a
Group H	Not applicable	TP dose used by the laboratory in Phase-2 (0.2 or 0.4 mg/kg/d) + Coded Antagonist Test substance #6 ^a
Group I Positive Treatment Control	TP dose used by the laboratory in Phase-2 (0.2 or 0.4 mg/kg/d) Voluntary in agonist series	TP dose used by the laboratory in Phase-2 (0.2 or 0.4 mg/kg/d) + FLU 3 mg/kg/d Voluntary in antagonist series

^a The doses of each test substance will be prescribed in order to have comparable data for the analysis of variability among labs and for comparison to previous data.

Administration of doses

33. Subcutaneous injections will be on the dorsal surface of the animal after shaving or trimming of fur. Multiple injections sites may be used. The maximum limit on the volume administered per animal is approximately 0.5 ml/kg body weight per day.

34. Oral gavage will be the delivery of the test substance in vehicle by means such as intubation with an oral gavage syringe. The maximum limit on the volume administered per animal will be 5 ml/kg/day.

35. The animals will be dosed in the same manner and time sequence for ten consecutive

days at approximately 24 hour intervals. The dosage level will be adjusted daily based on the concurrent daily measures of body weight. The volume of dose and time that it is administered will be recorded on each day of exposure.

Good Laboratory Practice

36. Work should be conducted according to the principles of Good Laboratory Practice (OECD Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring) (8). In particular, data should have a full audit trail and be retained on file. Data will be collected in a manner that will allow independent peer review and written records maintained.

OBSERVATIONS

Clinical observations

37. Animals will be evaluated at least once daily for mortality, morbidity, and signs of injury as well as general appearance and signs of toxicity. Any animals in poor health will be identified for further monitoring.

38. Any animal found dead will be removed and disposed of without further data analysis. Any mortality of animals prior to necropsy will be included in the study record together with any apparent reasons for mortality.

Body weight and food consumption

39. Individual body weights will be recorded prior to start of treatment (to the nearest 1 g), on each day of administration period and prior to necropsy. Group means and standard deviations will be calculated.

40. Food consumption should be generally observed and any significant changes recorded.

Necropsy

41. Approximately 24 hours after the last administration of the test substance, the rats will be euthanized according to the normal procedures of the participating laboratory, and necropsy carried out. The method of humane killing will be recorded in the laboratory report.

42. The order in which the animals are necropsied will be designed such that one or two animals from each of the groups (e.g., one per cage if there are three animals per cage) are necropsied to achieve a randomisation of the groups. In this way, all the animals in the same treatment group are not necropsied at once, and any variation in the procedure over time will not unduly impact any particular group.

43. The five sex accessory tissues (VP, SVCG, LABC, COWS, and GP) are mandatory

measurements. The sex accessory tissues will be excised, carefully trimmed of excess adhering tissue and fat, and their fresh (unfixed) weights determined. Each tissue should be handled with particular care to avoid the loss of fluids and to avoid desiccation, which may introduce significant errors and variability by decreasing the recorded weights.

44. Several of the tissues may be very small or difficult to dissect, and this will introduce variability. Previous work has indicated a range of coefficient of variations that appears to differ based upon the proficiency of the laboratory. In a few cases during Phase-2, large differences in the absolute weights of the tissues such as the VP and COWS have been observed within a particular laboratory. Therefore, it is important that persons carrying out the dissection of the sex accessory tissues are familiar with standard dissection procedures for these tissues. A standard operating procedure (SOP) manual for dissection has been provided by the Lead Laboratory and was used in Phase-1 and Phase-2. This manual will remain the SOP reference for Phase-3. Careful training according to the SOP guide will minimise a potential source of variation in the study.

45. Each sex accessory tissues will be weighed without blotting to the nearest 0.1 mg, and the weights recorded for each identified animal.

46. Liver, paired kidney, and paired adrenal weights are optional measurements. Again, tissues should be trimmed free of any adhering fascia and fat. The liver will be weighted to the nearest 0.1 g, and the paired kidneys and paired adrenals will be weighted to the nearest 0.1 mg. All weights will be recorded for each animal.

47. If the evaluation of each chemical requires necropsy of more animals than is reasonable for a single day, the starting date may be staggered on two consecutive days so that the necropsy can be staggered. In this case the work could be divided so that necropsy of 3 animals per treatment per day (1 cage) takes place on the first day with the dosing and necropsy being delayed by one day in the second half of the animals. That is, each group should be split so that half of the animals are necropsied on each day in order to control variability among the groups.

48. Carcasses will be disposed of in an appropriate manner following necropsy.

Ability of the Hershberger Assay Protocol to Detect Thyroid Function Modulators

Abstract

In vivo screening methods for detection of thyroid function modulators are now under development in many research laboratories. We assessed the applicability of the Hershberger assay protocol to screen for thyroid function modulators. Castrated male BriHan WIST@Jcl (GALAS) rats were administered a potent thyroid peroxidase inhibitor, 3-amino-1,2,4-triazole (AT), in doses of 0, 40, and 200 mg/kg/day by gavage to 8 week old for 10 consecutive days. At necropsy, the thyroid glands and hypophysis were collected and fixed with 10% neutral buffered formalin. To avoid crushing during weighing because of their fragility, the thyroid glands and hypophysis were weighed approximately 24 hours after fixation with 10% neutral-buffered formalin. Intact male rats were also subjected to the same protocol to assess the effects of castration. All animals were sacrificed approximately 24 h after the final dose. After fixation, the thyroid glands of all animals were stained with hematoxylin and eosin for histological examination and morphometry of follicular epithelial height. The results showed a significant increase in thyroid weight in the 200 mg/kg groups of both castrated and intact rats. Hypophyseal weight was unaltered by AT, but comparison of greater the vehicle-treated groups showed that the hypophyseal weight of the castrated rats was greater than that of the intact rats. Enlarged thyroid glands were observed in the AT-treated rats at necropsy. Histological examination of the thyroid glands of all AT-treated animals showed hypertrophy and hyperplasia of the follicular epithelial cells, and the height of follicular epithelium of the thyroid glands increased in a dose-dependent manner in both of the castrated and intact rats. These results suggest that the effect of AT can be detected by the Hershberger assay 10-day administration protocol and may be useful for screening for thyroid function modulators regardless of whether the animals have been castrated.



Awareness-Flyer



REACH : The new chemicals policy in the EU

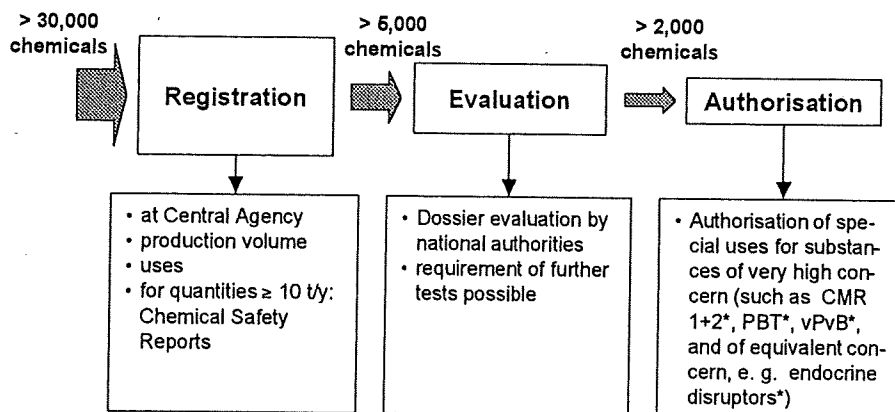
What is REACH? REACH stands for the regulation concerning the **Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals**. It is the new chemicals policy under development within the European Union (EU) with the following milestones:

2001, Feb	Publication of the White Paper for REACH by the EU Commission
2003, May – July	Internet consultation on the draft legislation for REACH
2003, Oct 29	EU Commission adopted REACH proposal
2004 / 2005	Reading and discussion of the REACH proposal by the EU Parliament and the EU Council
2006 Apr	Scheduled entry into force of REACH

REACH requires all manufacturers, importers, and downstream users to ensure and to prove that they only manufacture, place on the market, import or use such substances that do not adversely affect human health or the environment.

What does REACH mean for your and our business?

- You will have to register all chemicals manufactured or imported by you in quantities ≥ 1 t/y fulfilling the following obligations:
 - Prepare and submit a **technical dossier** to the Central Agency.
 - Provide additionally a **Chemical Safety Report** when the tonnage is ≥ 10 t/y.
- When the tonnage is ≥ 100 t/y a systematic **evaluation** of the dossier will be performed by the national authorities.
- Substances of very high concern, such as CMR*, PBT*, vPvB* or with equivalent concern, e. g. endocrine disruptors*, will need an **authorisation** before they can actually be used. In order to get an authorisation you will have to demonstrate to the granting authority that the risks are adequately controlled and that there are no suitable alternative substances or technologies.



Remarks:

- *CMR 1+2: carcinogenic, mutagenic, reprotoxic (CMR) category 1 + 2
- *PBT: persistent, bioaccumulative, toxic
- *vPvB: very persistent, very bioaccumulative
- *endocrine disruptors: environmental hormones



en
the
sustainability

Awareness-Flyer

BASF
The Chemical Company

REACH : The new chemicals policy in the EU

What about inter-mediates and polymers?

Intermediates shall be treated as follows:

- non-isolated intermediates are not in the scope of REACH, i. e. no registration is necessary.
- on-site isolated intermediates in quantities ≥ 1 t/y require a simplified registration
- transported isolated intermediates in quantities ≥ 1 t/y require the same simplified registration as on-site isolated intermediates. For quantities $\geq 1,000$ t/y additional information equivalent to the registration of substances in quantities from 1 to 10 t/y is necessary.

Polymers are for the time being exempted from the registration and evaluation.

How to prepare for REACH?

Start now the preparation work for REACH by updating your substance inventory , checking available test data, and identifying substances of concern.

Consider the strategic importance of your substances.

How can BASF help you?

As a major player BASF can assist in:

- **Portfolio screening:** Gain insight into the properties of your substances – identify problematic substances early
- **Assessing the threat of authorization:** Classify product ranges on the basis of CMR*, PBT*, and vPvB* criteria as well as endocrine disruptors*
- **Dossier preparation:** Prepare technical dossiers and Chemical Safety Reports
- **Task force management:** In co-operation with our legal partners set up a task force, agreements and assist in management issues
- **Planning and execution of testing:** Provide test strategies, minimize costs, minimize number of test animals, take care of all the necessary testing
- **Lobbying:** Communicate to the authorities

Information/References

- BASF-brochure „REACH – what are we facing“ (Jan. 2004)
- Internet: <http://corporate.basf.com/en/sustainability/dialog/chemikalienpolitik.htm>
- REACH proposal: http://europa.eu.int/eu-lex/en/com/pdf/2003/com2003_0644en.html

Contact

Central Coordination: Dr. Hubert Lendle, BASF AG , GUP/CL – Z570
☎ +49-621-60-44712, hubert.lendle@basf-ag.de

Information/References: Dr. Ingolf Kühn, BASF AG , GUP/CL – Z570
☎ +49-621-60-52838, ingolf.kuehn@basf-ag.de

III. 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	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
小野 宏	循環器毒性—心臓と血管の毒性学—		日本トキシコロジー学会教育委員会編, 「トキシコロジー」	朝倉書店	東京	2002	229-239
Nagao T., Kagawa N., Nakagomi M., Fujikawa K.	Increased incidence of malformations in the offspring of male mice prenatally exposed to synthetic estrogens.	Robaire B. and Holes BF.	Advances in Male Mediated Developmental Toxicity	Kluwer Academic/Plenum Publishers		2003	211-217
Hirabayashi Y, Inoue T	Chapter 24. Toxicogenomics Applied to Hematotoxicology	Jurgen Borlak	Handbook Toxicogenomics.	Wiley-VCH, Verlag GmbH, Weinheim		2005,	583-608
Tohru Inoue	Toxicogenomics—a new paradigm of toxicology	T. Inoue, W.D.Pennie	Toxicogenomics	Springer-Verlag	東京	2003	3-11
Inoue T	Potential applications of toxicogenomics in risk assessment.		The Fifth Princess Chulabhorn International Science Congress 、 InEvolving Genetics and Its Global Impact	Amarin Printing and Publishing Public Company Limited	Bangkok, Thailand	2004	255-257
井上 達	化学物質と健康—低用量問題	井口泰泉	環境ホルモンの最新動向と測定・試験・機器開発	株式会社シーエムシー出版	日本	2003	3-10
高木篤也	ヒト全MHC遺伝子導入マウス-染色体導入法によるヒト型モデル-	井上達、野田哲生、野本明男編集	ヒト型モデル動物	シュプリンガーフェアラーク社	日本	2003	79-82

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
小野 宏	OECD試験法ガイドラインにおける刺激性／腐食性試験の状況	フレグランス・ジャーナル	2	22-29	2005
Ono, H., Saito, Y., Imai, K., Kato, M	Subcellular distribution of di-(2-ethylhexyl) phthalate in rat testis	Journal of Toxicological	29	113-124	2004

		Sciences			
Ohshima, Y., Yokota, S., Kasama, K., <u>Ono, H</u>	Comparative studies on levels of proteins, bacterial endotoxins and nucleic acids in hyaluronan preparations used to treat osteoarthritis of the knee. — Could residual proteins and bacterial endotoxins relate to complications? —	Japanese Pharmacology and Toxicology (薬理と治療)	32	655-662	2004
Ohara, N., Matsuoka, C., Nagata, T., Kanazawa, Y., Inada, H., Horiuchi, S., Saegusa, K., Ono, H	Topical reactions against intracutaneous injection of three hyaluronan products, Artz, Synvisc and Durolane in guinea pig.	Japanese Pharmacology and Toxicology (薬理と治療)	32	663-677	2004
<u>Ono, H</u>	Validation studies in Japan: A report	Alternatives to Laboratory Animals	32 Suppl	631-634	2004
小野 宏	急性毒性試験法ガイドラインの改定とその意義	Journal of Toxicological Sciences	28	53-62	2003
Kusakabe, H., Yamakage, K., Wakuri, S., Sasaki, K., Nakagawa, Y., Watanabe, M., Hayashi, M., Sofuni, T., <u>Ono, H</u> , Tanaka, N	Relevance of chemical structure and cytotoxicity to the induction of chromosome aberrations based on the testing results of 98 high production volume industrial chemicals	Mutation Research	517	187-198	2002
Nagao, T., Saito, Y., Usumi, K., Yoshimura, S., <u>Ono, H</u>	Low-dose bisphenol A does not affect reproductive organs in estrogen-sensitive C57BL/6N mice exposed at the sexually mature, juvenile or embryonic stage.	Reproduction Toxicology	16	112-121	2002
Takahashi Y, Kitajima S, Inoue T, <u>Kanno J</u> , Saga Y.	Differential contribution of Mesp1 and Mesp2 to the epithelialization and rostro-caudal patterning of somites	Development	132	787-796	2005
Ishikawa A, Kitajima S, Takahashi Y, Kokubo H, <u>Kanno J</u> , Inoue T, Saga Y	Mouse Nkd1, a Wnt antagonist, exhibits oscillatory gene expression in the PSM under the control of Notch signaling	Mech Dev	121 (12)	1443-53	2004
Hirabayashi Y, Yoon BI, Li GX, <u>Kanno J</u> ,	Mechanism of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: current review with implication of microarray analyses.	Toxicol Pathol	32 Suppl 2	12-6	2004
Fujimoto N, Igarashi K, <u>Kanno J</u> , Honda H, Inoue T.	Identification of estrogen-responsive genes in the GH3 cell line by cDNA microarray analysis	J Steroid Biochem Mol Biol	91	121-9	2004
Tsuboi I, Morimoto K, Hirabayashi Y, Li GX, Aizawa S, Mori KJ, <u>Kanno J</u> , Inoue T.	Senescent B lymphopoiesis is balanced in suppressive homeostasis: decrease in interleukin-7 and transforming growth factor-beta levels in stromal cells of senescence-accelerated mice	Exp Biol Med (Maywood)	229	494-502	2004
Tetsuji Nagao, Kazuyoshi Wada, Makiko Kuwagata,	Intrauterine position and postnatal growth in Sprague-Dawley rats and ICR mice	Reprod Toxicol	18	109-120	2004

Madoka Nakagomi, Chiaki Watanabe, Shinsuke Yoshimura, Yoshiaki Saito, Kenji Usumi, Jun Kanno					
Yoon BI, Hirabayashi Y, Kawasaki Y, Tsuboi I, Ott T, Kodama Y, Kanno J, Kim DY, Willileeche K, Inoue T.	Exacerbation of benzene pneumotoxicity in connexin 32 knockout mice: enhanced proliferation of CYP2E1-immunoreactive alveolar epithelial cells.	Toxicology	195	19-29	2004
菅野 純、相崎健 一、五十嵐勝秀、小 野 敦、中津則之	トキシコゲノミクス、ゲノム研究実験ハン ドブック	実験医学 別冊		329-337	2004
菅野 純、相崎健 一、五十嵐勝秀、小 野 敦、中津則之	ゲノム毒性学形質非依存型トキシコゲノ ミクスの導入	細胞工学	23	685-693	2004
菅野 純	医薬品開発におけるわが国のトキシコゲノ ミクスの取り組み、医薬品開発におけるわ が国のトキシコゲノミクスの取り組み	月刊・薬事	46	45-49	2004
菅野 純	化学物質とリスク評価；化学物質の毒性	化学と教育	52	302-305	2004
K. Mizuo, M. Narita, T. Yoshida, M. Narita, T. Suzuki	Functional changes in dopamine D3 receptors by prenatal and neonatal exposure to an endocrine disruptor bisphenol-A in mice	Addiction Biol	9	19-25	2004
K. Mizuo, M. Narita, K. Miyagawa, M. Narita, E. Okuno, T. Suzuki	Prenatal and neonatal exposure to bisphenol-A affects the morphine-induced rewarding effect and hyperlocomotion in mice	Neurosci. Lett	356	95-98	2004
Katsumi Ohtani, Shigeru Yamazaki, Hisayo Kubota, Muneyuki Miyagawa and Junzo Saegusa	Comparative Investigation of Several Sperm analysis Methods for Evaluation of Spermatotoxicity of Industrial Chemical: 2-Bromopropane as an Example.	Industrial Health	42	219-225	2004
Takeshi Honma, Megumi Suda, Muneyuki Miyagawa	Inhalation of 1-Bromopropane Causes Excitation in the Central Nervous System of Male F344 Rats	Neurotoxicolog y	2	563-575	2003
Sumiko Watanabe, Rui-Sheng Wang, Muneyuki Miyagawa, Kenichi Kobayashi, Megumi Suda, Soichiro Sekiguchi, Takeshi Honma	Imbalance of Testosterone Level in Male Offspring Rats Perinatally Exposed to Bisphenol A	Industrial Health	41	338-341	2003
Kenichi Kobayashi, Muneyuki Miyagawa, Rui-Sheng Wang, Soichiro Sekiguchi, Megumi Suda, Takeshi Honma, Megumi Suda, Takeshi Honma.	Effects of in Utero and Lactational Exposure to Bisphenol A on somatic Growth and Anogenital Distance in F1 Rat Offspring	Industrial Health	40	375-381	2002
Takeshi Honma, Megumi Suda, Muneyuki Miyagawa	Synergic Effects of Exposure to Chlorinated Organic Compounds on Rat Hepatotoxicity	Arch Complex Environmental Studies	14	3-4	2002

宮川宗之	化学品の有害性分類表示に関する国際調和システム	安全工学	41	84-93	2002
A.Maekawa, M.Yoshida, S. Katsuda and K. Imai	Toxicologic/Carcinogenic Effects of Endocrine Disrupting Chemicals on the Female Genital Organs of Rodents	J. Toxicol. Pathol	17	69-84	2004
Entesarian M, Matsson H, Klar J, Bergendal B, Olson L, Arakaki R, Hayashi Y, Ohuchi H, Falhat B, Bolstad AI, Jonsson R, Wahren-Herlenius M, Dahl N	Mutations in the fibroblast growth factor 10 gene are associated with aplasia of lacrimal- and salivary glands (ALSG).	Nature Genetics		in press	2005
Kuroda N, Mitani T, Takeda N, Ishimaru N, Arakaki R, Hayashi Y, Bando Y, Izumi K, Takahashi T, Nomura T, Sakaguchi S, Ueno T, Takahama Y, Uchida D, Sun S, Kajiura F, Mouri Y, Han H, Matsushima A, Yamada G, Matsumoto M	Development of autoimmunity against transcriptionally unrepressed target antigen in the thymus of Aire-deficient mice	J Immunol		in press	2005
Kobayashi M, Yasui N, Ishimaru N, Arakaki R, Hayashi Y	Development of autoimmune arthritis with aging via bystander T cell activation in the mouse model of Sjogren's syndrome	Arthritis Rheum	50	3874-3984	2004
Ishimaru N, Arakaki R, Katunuma N, Hayashi Y,	Critical role of cathepsin-inhibitors for autoantigen processing and autoimmunity.	Adv. Enzyme. Regul	44	309-320	2004
Hayashi Y, Ishimaru N, Arakaki R, Tsukumo S, Kishihara K, Shiota H, Yasutomo K, Hayashi Y,	Effective treatment of a mouse model of Sjogren's syndrome with eyedrop administration of anti-CD4 monoclonal antibody.	Arthritis Rheum	50	2903-2910	2004
Yoneda T, Ishimaru N, Arakaki R, Kobayashi M, Izawa T, Moriyama K, Hayashi Y	Estrogen deficiency accelerates murine autoimmune arthritis associated with receptor activator of nuclear factor- κ B ligand-mediated osteoclastogenesis.	Endocrino	145	2384-2391	2004
Hayashi Y, Arakaki R, Ishimaru N	Apoptosis and estrogen deficiency in primary Sjogren's syndrome	Cur. Opin. Rheumatol	16	522-526	2004
Maruyama T, Saito I, Hayashi Y, Kompfner E, Fox RI, Burton DR, Ditzel HI	Molecular analysis of the human autoantibody response to \square -fodrin in Sjogren's syndrome reveals novel apoptosis-induced specificity	Am. J. Pathol	165	53-61	2004
Ishimaru N, Arakaki R, Watanabe M, Kobayashi M, Miyazaki K, Hayashi Y	Development of autoimmune exocrinopathy resembling Sjogren's syndrome in estrogen-deficient mice of healthy background	Am. J. Patho	163	1481-1490	2003
Arakaki R, Ishimaru N,	Development of autoimmune exocrinopathy	Arthritis	48	3603-3609	2003

Saito I, Kobayashi M, Yasui N, Sumida T, <u>Hayashi Y</u>	resembling Sjogren's syndrome in adoptively transferred mice with autoreactive CD4+ T cell	<i>Rheum</i>			
Ogawa K, Nagahiro S, Arakaki R, Ishimaru N, Kobayashi M, <u>Hayashi Y</u>	Anti- α -fodrin autoantibodies in Moyamoya disease.	<i>Stroke</i>	34	244-246	2003
Katunuma N, Matsunaga Y, Himeno K, <u>Hayashi Y</u>	Insights into the roles of cathepsins in antigen processing and presentation revealed by specific inhibitors	<i>Biol. Chem</i>	384	883-890	2003
Saegusa K, Ishimaru N, Yanagi K, Arakaki R, Ogawa K, Saito I, Katunuma N, <u>Hayashi Y</u>	Cathepsin S-inhibitor prevents autoantigen presentation and autoimmunity	<i>J. Clin. Invest</i>	110	361-369	2002
Saegusa K, Ishimaru N, Yanagi K, Mishima K, Arakaki R, Suda T, Saito Y, <u>Hayashi Y</u>	Prevention and induction of autoimmune exocrinopathy is dependent on pathogenic autoantigen cleavage in murine Sjogren's syndrome	<i>J. Immunol</i>	169	1050-1057	2002
Azuma M, Aota K, Tamatani T, Motegi K, Yamashita T, Ashida Y, <u>Hayashi Y</u>	Suppression of tumor necrosis factor α -induced matrix metalloproteinase 9 production in human salivary gland acinar cells by cepharanthine occurs via down-regulation of nuclear factor κ B	<i>Arthritis Rheum</i>	46	1585-1594	2002
<u>Takeyoshi M</u> , Noda S, Yamasaki K	Differences in responsiveness of mouse strain against p-benzoquinone as assessed by non-radioisotopic murine local lymph node assay	<i>Exp Anim</i>	53	171-173	2004
<u>Takeyoshi M</u> , Noda S, Yamazaki S, Kakishima H, Yamasaki K, Kimber I	Assessment of the skin sensitization potency of eugenol and its dimers using a non-radioisotopic modification of the local lymph node assay	<i>J Appl Toxicol</i>	24	77-81	2004
<u>Takeyoshi M</u> , Sawaki M, Yamasaki K, Kimber I	Assessment of statistic analysis in non-radioisotopic local lymph node assay (non-RI-LLNA) with alpha-hexylcinnamic aldehyde as an example	<i>Toxicology</i>	191	259-263	2003
Takeyoshi M, Kuga N, Yamasaki K	Development of a high-performance reporter plasmid for detection of chemicals with androgenic activity	<i>Arch Toxicol</i>	77	274-279	2003
<u>Takeyoshi M</u> , Sawaki M, Noda S, Muroi T, Yamasaki K	Effect of gonadotropin-releasing hormone antagonist on ovarian and uterine weights in immature female rats	<i>Reprod Toxicol</i>	16	367-369	2002
<u>Takeyoshi M</u> , Yamasaki K, Sawaki M, Nakai M, Noda S, Takatsuki M	The efficacy of endocrine disruptor screening tests in detecting anti-estrogenic effects downstream of receptor-ligand interactions.	<i>Toxicol Lett</i>	126	91-98	2002
<u>Takeyoshi M</u> , Yamasaki K, Yakabe Y, Takatsuki M, Kimber I	Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation	<i>Toxicol Lett.</i>	119	203-208	2001

<u>Nagao T.</u> , Wada K., Ku wagata M., Nakagomi M., Watanabe C., Yoshimura S., Saito Y., Usumi K., Kanno J	Intrauterine position and postnatal growth in Sprague-Dawley rats and ICR mice	Reprod Toxicol	18	109-120	2004
Watanabe C., Ku wagata M., Yoshimura S., Azegami J., Kojima K., Ono H., <u>Nagao T.</u>	An improved technique for repeated gavage administration to rat neonates	Cong. Anom	43	177-179	2003
<u>T Nagao</u> , Y Saito, K Usumi, S Y Yoshimura, H Ono	Low-dose bisphenol A dose not affect reproductive organs in estrogen sensitive C57BL/6N mice exposed at the sexually mature, juvenile, or embryonic stage	Reprod Toxicol	16	123-130	2002
<u>T Nagao</u> , S Yoshimura, Y Totsuka and K Wakabayashi	Maternal and developmental toxicity in mice by aminophenyl- norharman, formed from norharman and aniline	Human Experim Toxicol	21	147-151	2002
<u>Yoshida M.</u> , Katashima, S., Ando, J., Tanaka, T., Uematsu, F., Nakae, D. and Maekawa, A.	Dietary indole-3-carbinol promotes endometrial adenocarcinoma development in rats initiated with N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, with induction of cytochrome P450s in the liver and consequent modulation of estrogen metabolism.	Carcinogenesis	25	2257-2264	2004
Katsuda, S., <u>Yoshida M.</u> , Saarinen, N., Smeds, A., Nakae, D., Santti, R. and Maekawa, A.	Chemopreventive effects of hydroxymatairesinol on uterine carcinogenesis in Donryu rats.	Experimental Biology and Medicine	229	417-424	2004
<u>Yoshida M.</u> , Shimomoto, T., Katashima, S., Watanabe, G., Taya, K. and Maekawa, A	Maternal exposure to low-doses of bisphenol A on development of the female reproductive tract and uterine carcinogenesis in Donryurats	J Reprod and Develop	50	349-367	2004
<u>Yoshida M.</u> , Shimomoto, T., Katashima, S., Shirai, T., Nakae, D., Watanabe, G., Taya, K. and Maekawa, A	Effects of maternal exposure to nonylphenol on growth and development of the female reproductive system and uterine carcinogenesis in rats	J Toxicol Path	16	259-266	2003
<u>Yoshida M.</u> , Katsuda, S., Tanimoto T., Asai, A., Nakae, D. and Maekawa, A	Differential Enhancement by neonatal exposure to p-tert-octylphenol of uterine carcinogenesis in Donryu rats depending on the administration period	Toxicol Path	31	141	2003
<u>Yoshida M.</u> , Kitani, T., Takenaka, A., Kudoh, K., Katsuda, S., Taya, K., Kurokawa, Y., and Maekawa	Lack of effects of oxolinic acid on spermatogenesis in young adult and aged Wistar rats.	Food and Chemical Toxicology	20	1815-1825	2002

Jin, W., Herath, C.B., Yoshida, M., Arai, K.Y., Saita, E., Zhanquan, S., Ren L., Watanabe, G., Groome, N.P., and Taya, K	Inhibin B regulating follicle-stimulating hormone secretion during testicular recrudescence in the male golden hamster	J Andrology	23	845-853	2002
M Yoshida, a Takenaka, S Katsuda, Y Kurokawa, A Maekawa	Neonatal exposure to p-tert-octylphenol causes abnormal expression of estrogen receptor α and subsequent alteration of cell proliferating activity in the developing Donryu rat uterus	Toxicol Path	30	357-364	2002
Shimomoto, K., Yoshida, M., Takahashi, M., Maekawa, A	Sebaceous gland metaplasia in a mammary fibroadenoma developing in a female Donryu rats.	J Toxicol Path	15	73-77	2002
Katsuda, S., Yoshida, M., Kuroda, H., Takahashi, M., Kurokawa, Y., Watanabe, G., Taya, K., Maekawa, A	Uterine adenocarcinoma in N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-treated rats with high-dose exposure to p-tert-octylphenol during adulthood.	Jpn J Cancer Res	93	117-124	2002
S Umemura, H Itoh, M Ohta, Y Suzuki, M Kubota, Y Tokuda, T Tajima, RY Osamura	Immunohistochemical Evaluation of Hormone Receptor for Routine Practice of Breast Cancer: Highly Sensitive Procedures Significantly Contribute to the Correlation with Biochemical Assays	Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology	11	62-67	2003
Y Sekido, S Umemura, S Takekoshi, Y Suzuki, Y Tokuda, T Tajima, RY Osamura	Heterogeneous gene alterations in primary breast cancer contribute to discordance between primary and asynchronous metastatic/recurrent sites: HER2 gene amplification and p53 mutation	Internat J Oncology	22	1225-1232	2003
Kanayama, T., Kobayashi, N., Mamiya, S., Nakanishi, T., Nishikawa, J	Organotin compounds promote adipocyte differentiation as agonists of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ /retinoid X receptor (RXR) pathway	Mol. Pharm		in press	2005
Osada, S., Nishikawa, J., Nakanishi, T., Tanaka, K., Nishihara, T	Some organotin compounds enhance histone acetyltransferase activity	Toxicol. Lett	155	329-335	2005
Ohta, K., Osada, S., Nishikawa, J., Nishihara, T	Cloning and characterization of a cDNA encoding the histone acetyltransferase MOZ (monocyclic leukemia zinc finger protein) in the rat.	J. Health Sci		in press	2005
Nishikawa, J., Mamiya, S., Kanayama, T., Nishikawa, T., Shiraishi, F., Horiguchi, T	Involvement of the retinoid X receptor in the development of imposex caused by organotins in Gastropods	Environ. Sci. Technol.	38	6271-6276	2004
Nishizuaka, M., Heitaku, S., Maekawa, S., Nishikawa, J., Imagawa, M	Development of standardized in vitro assay system for estrogen receptors and species specificity of binding ability of 4-nonylphenol and p-octylphenol	J. Health Sci	50	511-517	2004

Maekawa, S., Nishizuka, M., Heitaku, S., Kunimoto, M., Nishikawa, J., Ichikawa, K., Shimada, K., Imagawa, M	Development of a competitive enzyme immunoassay for detection of capacity of chemicals to bind quail estrogen receptor α and β	<i>J. Health Sci</i>	50	25-32	2004
Jung, J., Ishida, K., Osada, S., Nishikawa, J., Nishihara, T	1-Chloro-2,4-dinitrobenzene stimulates the estrogenic activity in MCF-7 cells.	<i>J. Health Sci</i>	50	581-587	2004
E. Mikamo, S. Harada, J. Nishikawa & T. Nishihara	Endocrine Disruptors Induce Cytochrome P450 by Affecting Transcriptional Regulation via Pregnane X Receptor	<i>Toxicol. Appl. Pharmacol</i>	193	66-72	2003
T. Kanayama, S. Mamiya, T. Nishihara & J. Nishikawa	Basis of a High-Throughput Method for Nuclear Receptor Ligands	<i>J. Biochem</i>	133	791-797	2003
E. Mikamo, S. Harada, J. Nishikawa, & T. Nishihara	Methoxychlor Induces CYP2C11 to Convert Itself into Hormonally Active Metabolites	<i>J. Health Sci</i>	49	229-232	2003
Y. Kawamura, Y. Ogawa, T. Nishimura, Y. Kikuchi, J. Nishikawa, T. Nishihara, & K. Tanamoto	Estrogenic Activities of UV Stabilizers Used in Food Contact Plastics and Benzophenone Derivatives Tested by the Yeast Two-Hybrid Assay	<i>J. Health Sci</i>	49	205-212	2003
S. Takatori, Y. Kitagawa, G. Miwa, J. Nishikawa, T. Nishihara, H. Oda, H. Nakazawa, & S.Hori	Estrogenicity of metabolites of benzophenone derivatives examined by a yeast two-hybrid assay	<i>J. Health Sci.</i>	49	91-98	2003
Y Kitagawa, S Takatori, H Oda, J Nishikawa, T Nishihara, H Nakazawa, and S Hori	Detection of Thyroid Hormone Receptor-Binding Activities of Chemicals Using a Yeast Two-Hybrid Assay	<i>J. Health Sci</i>	49	99-104	2003
Shiraishi, F., Okumura, T., Nomachi, M., Serizawa, S., Nishikawa, J., Edmonds, J., Shiraishi, H., Morita, M.	Estrogenic and thyroid hormone activity of a series of hydroxy-polychlorinated biphenyls	<i>Chemosphere</i>	52	33-42	2003
西川 淳一、間宮 聡、金山知彦、西原 力	内分泌かく乱物質の核内受容体ファミリーを介する作用発現	環境バイオテクノロジー学会誌	3	37-42	2003
Yuko Matsuhima, Osayuki Uchida, Minoru Saitoh, Yasushi Kawasaki, Kazuo Isama, Masaaki Kaniwa, Tohru Inoue, Jun kanno	Twenty-eight day repeated dose oral toxicity test of synergist of a pyrethroid insecticide	Bull Natl Inst Health Sci	121	040-047	2003

Yoshimura, S., Yamaguchi, H, Konno, K., Ohsawa, N Noguchi, S., Chisaka, A	Hypospadias and incomplete preputial separation in male rats induced by prenatal exposure to an anti-androgen, flutamide.	J. Toxicol. Pathol.	17	113-118	2004
Inoue T.	Hormonally active agents and plausible relationships to adverse effects on human health.	Pure Appl. Chem.,	75	2555-2561	2003
Tohru Inoue, Katsuhide Igarashi, Jun Sekizawa	Health hazards of endocrine disrupting chemicals on humans as examined from the standpoints of their mechanisms of action	Endocrine Disruptors	46	97-102	2003
Ema, M., Hara, H., Matsumoto, M., Hirose, A. and Kamata, E.	Evaluation of developmental toxicity of 1-butanol given to rats in drinking water throughout pregnancy.	Food Chem Toxicol.,	43	325-331	2005
Hirose A, Hasegawa R, Nishikawa A, Takahashi M and Ema M.	Revision and establishment of japanese drinking water quality guidelines for di(2-ethylhexyl) phthalate, toluene and vinyl chloride - differences from the latest who guideline drafts -	J. Toxicol. Sci	29	535-539	2004
高橋美加、平田睦子、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、長谷川隆一、江馬眞	OECD化学物質対策の動向 (第5報)	国立医薬品食品衛生研究所報告	122	37-42	2004
広瀬明彦, 江馬 眞	生殖発生毒性を指標としたダイオキシンの耐容1日摂取量 (TDI) 算定の考え方について	国立医薬品食品衛生研究所報告	122	56-61	2004
高橋美加・平田睦子・松本真理子・広瀬明彦・鎌田栄一・長谷川隆一・江馬眞	OECD化学物質対策の動向 (第6報) -第14回OECD高生産量化学物質初期評価会議 (2002年パリ)	化学生物総合管理学会誌	1	46-55	2004
Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Muroi T, Takakura S, Mitoma H, Sakamoto S, Nakai M, Yakabe Y	Comparison of the Hershberger Assay and Androgen Receptor Binding Assay of Twelve Chemicals.	Toxicology	195	177-186	2004
Yamasaki K, Sawaki M, Ohta R, Okuda H, Katayama S, Yamada T, Ohta T, Kosaka T, Owens W	OECD validation of the Hershberger assay in Japan: Phase 2-Dose response of methyltestosterone, vinclozolin and p,p'-DDE	Environ Health Perspect	111	1912-1919	2003
Yamasaki K, Takeyoshi M, Yakabe Y, Sawaki M, Imatanaka M, Shinoda K and Takatsuki M.	Immature Rat Uterotrophic Assay of 18 Chemicals and Hershberger Assay of 30 Chemicals.	Toxicology	183	95-115	2003

書

籍

6.11 循環器毒性

—心臓と血管の毒性学—

6.11.1 循環器毒性学概説

循環器毒性学では、心臓および血管系に対する薬物、化学物質、天然毒等の毒性とその影響を取り扱う。循環器系は血液循環のためにその構成要素が統合的に機能しているもので、ここでは便宜的に心と血管とを分けて述べるが、それぞれ単独の影響にはとどまらず、循環器系全体に変化を起こすものであり、さらに循環の変化を通じて他の器官、とくに肺や腎などに続発的な影響を及ぼす。また、心血管系に直接の作用がなくても、中枢神経系、自律神経系あるいは内分泌系に作用するものがそれらの器官の変化を通じて心血管系に影響を及ぼすことがある。一方、循環器の機能は各種の調節機能で支えられており、細胞レベルで異常が生じたとしても、少々の異常は補償されて、全身循環の機能異常の症状が現れないことがある。

6.11.2 心毒性学総論

a. 心毒性物質の影響の様式

i) 機能的影響：生理学・薬理学の記述では、心機能に対する外来の（心以外の体内体外からの）刺激の影響を次の4種の作用＝効果に分類している。

①変力作用（inotropic action）：収縮力を変化させる作用。収縮力の増強を陽性の、減弱を陰性の変力作用とする。

②変閾作用（bathmotropic action）：興奮の閾値を変化させる作用。閾値の低下（興奮性の亢進）を陽性の、閾値の上昇（興奮性の抑制）を陰性の変閾作用とする。

③変時作用（chronotropic action）：心拍動の頻度を変化させる作用。頻度の上昇（拍動数の増加）を陽性の、頻度の低下（拍動数の減少）を陰性の変時作用とする。

④変伝導作用（dromotropic action）：興奮伝導速度を変化させる作用。伝導の促進を陽性の、遅延を陰性の変伝導作用とする。

ii) 代謝・生化学的影響

①心筋の酸素必要量と冠循環：心臓が全身に向けて血液を拍出する仕事には、ATPのエネルギーが使用される。ATPは主として酸素を消費する好気

性代謝によって産生される。心筋への酸素の供給は冠血管系を通じての冠循環によって行われる。心筋酸素必要量を直接規定するものは、血圧と心拍数である。心筋には多量のATPおよびクレアチンリン酸の貯蔵があるが、短時間で消費されてしまうので、それを酸化的リン酸化によって供給するミトコンドリアが筋細胞内に多数存在する。心筋では嫌気性の解糖によるエネルギー供給も行われるが、それによる供給量は正常では全体の1%程度であり、心筋虚血時には比率が上昇するが、10%程度までである。

冠動脈の動脈硬化性病変を基盤として起こる虚血性心疾患は、動脈の狭窄によって血液供給の制約がある状態で心筋酸素必要量を増大するような変化が起こると、心筋虚血すなわち心筋の酸素欠乏が誘発される。変化の程度によって、心筋細胞の傷害が発生し、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ（GOT）、クレアチン〔ホスホ〕キナーゼ（C〔P〕K）、乳酸脱水素酵素（LDH）等の酵素の血中への放出が起こる。変化が持続的で高度であれば心筋の壊死を伴う梗塞を起こし、重大な心機能の障害、時には死に至る。

②酸化ストレス：心筋は好氣的代謝を行い、ミトコンドリアの電子伝達系の活動によってATPを補給させるために盛んに酸素を消費しているので、活性酸素の生成する機会が多い。組織中には、スーパーオキシドディスムターゼ（SOD）、カタラーゼ（CAT）、グルタチオンペルオキシダーゼ（GP）等の抗酸化酵素やグルタチオン、アスコルビン酸、トコフェロール等の低分子の抗酸化物質による抗酸化機構が備わっているが、過酸化物がその処理能力を上回って生成すると組織傷害が生じる。さらに、心筋傷害には活性酸素が膜などの脂質に働いて生じる過酸化脂質が関与することが多い。過酸化物は細胞の種々の部分と反応し、機能を阻害し構造を破壊する。心筋仮死（myocardial stunning）や心筋壊死が発生する。この影響は臨床的には不整脈の形で現れることが多い。

③虚血再灌流傷害とカルシウム過負荷：冠動脈の異常や心停止による心筋虚血で、心筋は酸化的代謝が阻害され、細胞内アシドーシス、ATP枯渇の状態に陥るが、これに血流を再開するとかえって組織傷害が増悪し、細胞死を招くことがある。これが〔虚血〕再灌流傷害（reperfusion injury）である。

この成因は、急激な酸素供給による過酸化物の過剰生成（酸素逆説, oxygen paradox）、細胞内カルシウムイオン (Ca^{2+}) の過剰による各種細胞機能の異常活性化（カルシウム逆説, calcium paradox）、アシドーシスの急激な是正による障害（pH paradox）などで説明されている。

Ca^{2+} は各種細胞機能の重要な調節因子であり、心筋においてはとくに、収縮発生の機能を担っている。細胞には細胞内カルシウム濃度 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を調節する機構が備わっており、静止（弛緩）時の心筋細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は 10^{-8} M 以下に調節されている。虚血による低酸素状態や化学物質の毒作用によってこの調節が障害されると、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の異常な持続的上昇が起こり、エネルギー代謝系の破壊、細胞膜の泡状変形（blebbing）、カルシウム依存性酵素（ホスホリラーゼ類やプロテアーゼ類）の活性化による細胞内物質の分解、DNA の分断が起こる。組織学的には筋原線維の過収縮による濃縮した横紋も観察される。

iii) 構造（形態）的影響

①心筋の肥大と心室の肥大・拡張：持続的な高血圧や血液流出路障害（弁膜狭窄など）あるいは頻脈（甲状腺機能亢進症など）があって心筋への仕事量負荷が増大すると、心筋は代償的に肥大し、心筋線維の肥大とともに心室壁も肥厚する。肥大した心筋は酸素供給が不十分になりやすく、負荷が大きく長期に及ぶ場合には心不全に進展する。カテコールアミン類、甲状腺ホルモン、成長ホルモン、あるいは高血圧を誘発する薬物はこうした状態を誘発することがある。

②心筋の変性と心筋症：心筋における化学物質の毒性影響には、急性の変化として心筋の巣状壊死がある。大量のイソプロテレノールでは、血管の異常に基づいて起こる梗塞状の心筋壊死がみられる。これは高度の頻脈と収縮刺激が重なるため、酸素需要が増し、アデニルシクラーゼの活性化とカルシウムイオンの過剰の流入が起こり、さらに活性酸素の産生が加わって起こす変化と考えられる。他のカテコールアミン類（ノルエピネフリン、エピネフリン、ドパミン等）でも大量に投与すると心筋の巣状壊死を生じる。この壊死は心室内膜側心筋により著明に起こるが、梗塞様の病変を生じるのはイソプロテレノールのみであるため、これには血管系の異常も加

味されていると考えられる。

心筋細胞に対する直接の毒作用によって心筋の肥大や変性が起こることがある。大量のエタノールで誘発されるアルコール心筋症はその1つである。エタノール自体は陰性変力作用があるが、回復性は良好である。心筋障害はエタノールの肝における代謝物であるアセトアルデヒドによってタンパク合成やミトコンドリアの呼吸が抑制されるため生じる。ただし、慢性アルコール中毒に伴う心筋障害には、栄養不良の影響（ビタミン B_1 欠乏による脚気心など）、喫煙、高血圧の影響なども加味されるので、その成因にはまだ不明な点がある。また、アルコール飲料に加えられた添加物の影響による場合もあり、コバルトの添加されたビール飲用者に心不全が発生して問題になった事例もある。

心筋炎の形で細胞浸潤と線維化を伴う毒性には、過敏症による心筋障害が挙げられる。免疫機序が関与して起こると考えられる過敏性心筋炎は、スルホンアミド類、ペニシリン、ストレプトマイシン等で知られており、間質に好酸球や単核球の浸潤を認める。

iv) 他器官經由の間接的影響：自律神経系に影響する化学物質は、心機能にも影響を及ぼす。喫煙に伴う頻脈はニコチンの自律神経節興奮作用による。しかし、長期的な喫煙で生じる冠循環に対する悪影響は血管に対する直接の毒性によると考えられる。フィゾスチグミンや有機リン系殺虫剤のようなコリンエステラーゼ阻害剤は徐脈を起こす。

また、肺線維症のような肺病変が肺高血圧を併発するとき、右心の肥大、肺性心が続発する。肺線維症を起こす薬物には、ある種の制がん剤（ブレオマイシン等）などがある。

内分泌系の異常に続発する心異常としては、副腎髄質褐色細胞腫に伴う高血圧によるもの、甲状腺病変に伴うもの、がある。甲状腺製剤の過剰投与で甲状腺機能亢進症の、抗甲状腺剤（メチルチオウラシル、放射性ヨード剤）の過剰投与で甲状腺機能低下症の病態が誘発される。

b. 心毒性の表現（徴候と検査） 毒性試験において、心毒性の表現として観察すべき一般状態の項目としては、心不全の症状として姿勢や態度の異常、呼吸の変化、皮膚や粘膜の色調（蒼白、充血、チアノーゼ）、体表温度の低下、浮腫や腹水の発生

がある。尿所見（尿量，比重）も参考になる。心拍動の異常（数，調律，拍出力）を観察することは基本的である。脈拍の触診によって不整脈，高血圧，低血圧が判定できる（規則性，強弱の所見による）が，小動物では詳細な観察は困難である。

心電図検査も行われ，とくに不整脈の診断に有用である。血液化学検査所見の異常として，心筋細胞の保有する酵素の血液中への遊離が心筋傷害の指標となり，クレアチン〔ホスホ〕キナーゼ（C[PK]），アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST，GOT），乳酸脱水素酵素（LDH）が実際に利用されている。

6.11.3 心筋の興奮と不整脈

a. 解剖生理の基礎 心臓は，興奮性膜と収縮能をもつ心筋細胞（心筋線維ともいう）を主たる構成要素とする器官であり，血液の拍出という機能を果たすために，興奮伝導をすみやかに系統的に行う特殊心筋（プルキンエ線維）の興奮伝導系が固有心筋の間に組み込まれている。心筋の興奮はまず，自動的に周期的興奮を起こす洞房結節の細胞で起こり，その興奮が心房全体に波及した後，房室結節の興奮を経てヒス束，その左右の分枝（左脚と右脚），そしてプルキンエ線維を通して心筋全体に興奮が拡がる。心筋細胞はすべて自動的に興奮する性質をもっているが，通常は洞房結節細胞がもっとも速い頻度で興奮してペースメーカーとなり，他の細胞はそれに続いて興奮している。

心筋細胞の興奮は，細胞膜を通してのイオンの出入りを伴う急速な変化で，活動電位という電気的な変化として捉えられる。哺乳類の心室筋細胞では静止時には細胞膜の内側は外側に対し $-80 \sim -90$ mVの陰性に分極している。この電位差は膜内外のイオン分布の差によって生じている。膜のナトリウム/カリウム交換ポンプの働きで，細胞内にはカリウムイオン（ K^+ ）が多くナトリウムイオン（ Na^+ ）が少ないが，細胞外液には Na^+ が多く K^+ が少ない。隣接する細胞の電位変化などの影響で膜電位が減少して（浅くなって） $-60 \sim -70$ mV（閾電位）に達すると，電位依存性 Na^+ チャンネルが開いて興奮が誘発される。興奮ではまず， Na^+ の大量の細胞内流入が起こり，膜電位は急速に脱分極して 0 mVを超えてオーバーシュートする（活動電位の 0 相）が，電位依存性 K^+ チャンネルが開いて K^+ の流出が起こ

るため電位は小さく戻る（第I相）。このとき電位依存性 Ca^{2+} チャンネルも活性化され， Ca^{2+} の細胞内流入が起こる。活性化された Na^+ チャンネルはすぐに閉じ，細胞内 Na^+ は再び低下し始めるが， Ca^{2+} チャンネルが開いているので，電位はしばらく保持され，プラトーを形成する（第II相）。遅延整流 K^+ チャンネルが開いて K^+ の流出を促進し，膜電位は再分極に向かい， Ca^{2+} チャンネルが閉じ（第III相），静止膜電位を回復する（第IV相）。

一方，洞房結節細胞は自動的に脱分極する自動能を有する。第IV相の膜電位が静止せず，自動的に浅くなって閾電位に達し，自発的に活動電位を発生する。これが他の心筋細胞に波及して行って興奮が心臓全体に伝導される。もっとも早く興奮する細胞の興奮が心臓全体の興奮を支配するので，その細胞をペースメーカー（歩調取り）細胞といい，自発的に変化する第IV相をペースメーカー電位という。

b. 心電図 現在毒性試験における心電図検査はほとんどイヌ，サルに限られており，小動物ではあまり行われていない。技術的な困難さがあるほか，心電図の形態も相違していて，同一には論じられないという問題もある。

心電図検査でわかるものは次のようである。

①調律の異常：心拍の数と規則性の異常を含み，興奮の発生と伝導の異常を示す。自動能異常，心内興奮伝導障害，自律神経異常を反映する。

②位置の異常：心臓の電気軸の変位は，心臓の形または位置が変化する異常があることを示す。心周辺（肺，中隔）の異常による圧迫または牽引，先天異常による形態の異常，心室の肥大・拡張による変位もある。

③波形の異常：低電位は，起電力の低下（心不全）または心臓から体表の電極までの電気伝導の障害（心嚢水腫，皮下浮腫）を示す。波形の変化は，心筋の虚血・梗塞，あるいは電解質代謝異常や内分泌異常などでそれぞれ特徴的な変化を現す。

c. 心臓の調律異常：不整脈 不整脈には単に不規則な調律だけではなく，調律の速度の異常すなわち頻脈と徐脈も含めてというのが通例である。

i) 心筋の興奮性と拍動数の異常：頻脈と徐脈：安静時心拍数の正常範囲は動物種によって相違するが，それを超えて多い場合に頻脈，少ない場合に徐脈という。洞房結節細胞がペースメーカーになって

いる洞調律の場合、洞性頻脈、洞性徐脈という。心拍数の異常はペースメーカー細胞の自動性の変化によって起こる。すなわち、その静止膜電位の深さと、活動電位の第IV相の変化いわゆるペースメーカー電位の勾配によって変わる。

洞房結節細胞に対し陽性変時作用を有し、洞性頻脈を起こす物質は、交感神経刺激または副交感神経（迷走神経）抑制と同等の効果を現すもので、 β -アドレナリン受容体刺激物質（ノルエピネフリン、エピネフリン等交感神経作用アミン類）、ムスカリン受容体遮断物質（アトロピン、スコポラミン等抗コリン作用薬類）である。また、血圧低下を起こすものは自律神経反射によって頻脈を起こす。本来陰性変時作用をもつカルシウム拮抗薬でも臨床的には徐脈よりは頻脈が観察されることが多い。これは血管拡張薬の一般的性質である。甲状腺ホルモンは交感神経活動への感受性を高め頻脈を起こすが、これは β -アドレナリン受容体の発現が増加するためと考えられている。この他、頻脈は薬品、化学物質の影響以外にも、精神的興奮、発熱、高温環境、疼痛で起こり、コーヒー、タバコ、アルコールの影響でも起こる。

陰性変時作用によって洞性徐脈を起こすものは、交感神経抑制または副交感神経（迷走神経）刺激を行うもので、 β -アドレナリン受容体遮断物質（プロプラノロール等）、ムスカリン受容体刺激物質（アセチルコリン等）、コリンエステラーゼ阻害物質（有機リン系殺虫剤等）である。カルシウム拮抗薬（ベラパミル、ジルチアゼム、ニフェジピン等）はペースメーカー細胞に直接作用し、自動能にかかわるカルシウム電流を抑制して徐脈を起こす。ただし、これらの物質の多くは血圧低下を起こすので自律神経反射による頻脈が起こり、変化を修飾する。一方、血圧上昇を起こすものは反射によって徐脈を起こす。ジギタリスは（治療用量で）迷走神経刺激による徐脈を起こす。ただし、ジギタリス中毒においては心ブロックによる徐脈の状態や心室性頻拍など他の形の不整脈を起こす。

洞房結節のペースメーカー活動が抑制され、徐脈が高度になると、下位の心筋細胞の自動能が先んじて、異所性の興奮が発生するようになる。とくに心筋に傷害部位があれば、そこが焦点になって異所性興奮を起こす。異所性興奮は不規則で単発の期外収

縮が多いが、複数の焦点からの期外収縮が頻発することもある。規則的な興奮を起こし続け、心臓全体の新しいペースメーカーになる場合もある。房室結節がその機能を取って代われば房室結節調律（単に結節調律ともいう）、心室内の一部にペースメーカーが生じれば心室調律という。これら異所性興奮焦点は、房室結節以外は自律神経の調節を受けない。

異所性興奮は、自動能の亢進あるいは興奮閾値の低下によって増加する。 β -アドレナリン作用にはこの陽性変時作用があり、イソプロテレノールやエピネフリンは期外収縮を誘発する。また、クロロホルムはかつて全身麻酔薬として用いられたが、カテコールアミンの不整脈誘発作用を増強することが知られた。その後、一般にハロゲン化炭化水素にはこの作用があることがわかり、注目されている。この作用は吸入麻酔剤として用いられたハロゲン化炭化水素各種に認められ、トリクロロフルオロメタンがもっとも強力であった。現在も吸入麻酔剤として用いられているハロタンにもこの作用がある。ハロゲン化炭化水素は、有機溶剤として工業的に用いられることが多く、不整脈誘発には注意が必要である。

ii) 興奮伝導の異常：興奮の伝導が途絶するのは、発生する電位が弱い、伝導を受ける細胞の興奮性が低い、伝導経路に障害があるかの理由による。心臓の興奮伝導が生理的に遅延する房室結節（心房と心室の収縮の時期を調整している）の細胞の活動電位は、カルシウムイオン (Ca^{2+}) チャネルに依存しており、 Ca^{2+} 拮抗薬の影響を強く受ける。この薬剤の主要な副作用として房室ブロックが起こるのはこのためである。

房室伝導時間は心電図のPQ（またはPR）時間に反映される。ヒトの場合、PQが0.2秒を超えると第1度の房室ブロック（または第1度心ブロック）といい、病的であるが、これのみでは心機能に不都合は生じない。房室結節の部位で一部の心房興奮の伝導が中断され、心室の拍動が脱落するものを不完全（または第2度）房室ブロック、すべての興奮伝導が房室結節で途切れてしまうものを完全（または第3度）房室ブロックという。上述の Ca^{2+} 拮抗薬のほかに、ジギタリス類強心配糖体や β -アドレナリン受容体遮断薬がこの種の異常を起こす。 Ca^{2+} 拮抗薬は Ca^{2+} 電流を抑制して結節細胞の興奮を抑制する。ジギタリスは細胞の不応期を延長して伝導