

Figure 5 Phenytoin による遺伝子発現変化

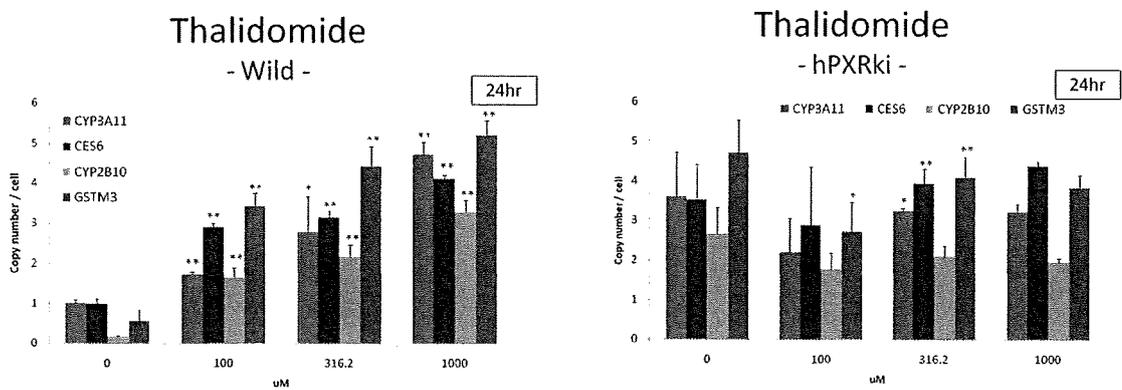


Figure 6 Thalidomide による遺伝子発現変化

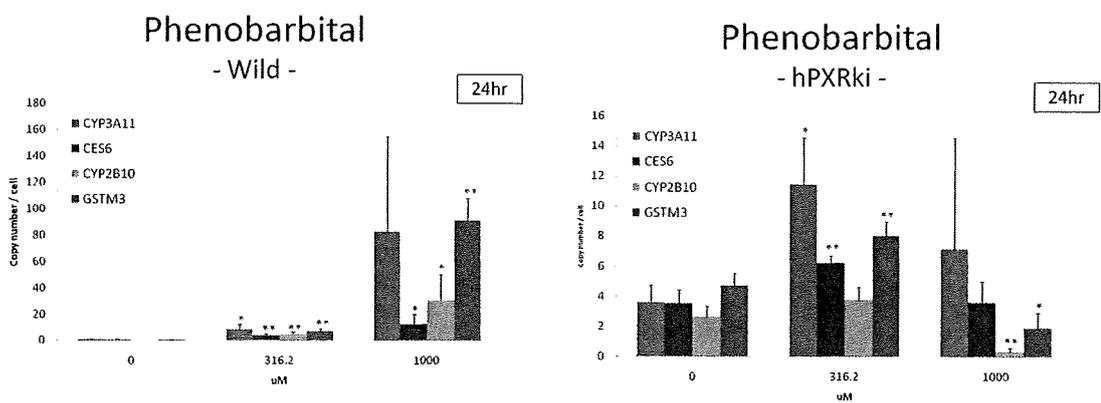


Figure 7 Phenobarbital による遺伝子発現変化

バイオマーカー候補遺伝子の検証

研究分担者 水川裕美子 同志社女子大学薬学部 特別任用助教

研究要旨

トキシコゲノミクス・インフォマティクスプロジェクト(TGP2)ではバイオマーカーの創出を目指して大規模データベースの解析を行っているが、選び出されたバイオマーカー候補遺伝子が真に創薬に役立つバイオマーカーとして利用可能になるためには各方面からの検証が必要である。そこで、本分担研究で *in vitro* を中心とした小規模実験を行い、毒性メカニズムの解析、裏付けの面から検証を行っている。

今年度は昨年度に引き続き、薬剤誘発性肝障害の主な原因の一つであるグルタチオン(GSH)枯渇を検出するバイオマーカー候補遺伝子の *in vitro* における検証およびラット末梢血単核細胞(PBMC)初代培養系の検討を行った。また、リン脂質症を検出するバイオマーカー候補遺伝子の検証を行うため、*in vitro* でのリン脂質症検出系を構築した。

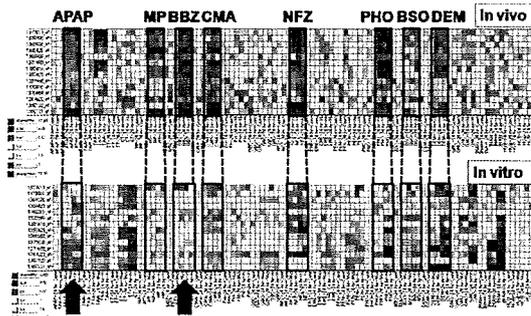
A. 研究目的

トキシコゲノミクス・インフォマティクスプロジェクト(TGP2)では平成 14~18 年度に行われたトキシコゲノミクスプロジェクト(TGPI)で構築した大規模データベース(TG-GATES)を活用したバイオマーカーの創出を目指して解析を行っている。しかし選び出されたバイオマーカー候補遺伝子が真に創薬に役立つバイオマーカーとして利用可能になるためには各方面からの検証が必要であり、医薬基盤研究所および TGP2 参加各企業において施設間でのデータバリデーションを行う一方、本研究では *in vitro* を中心とした小規模実験を行い、毒性メカニズムの解析、裏付けの面から検証を行っている。

薬剤誘発性肝障害の主要なメカニズムの一つとしてグルタチオン(GSH)枯渇による酸化ストレスが挙げられ、アセトアミノフ

エン(APAP)やプロモベンゼン(BBZ)など多くの薬物による肝障害に GSH 枯渇が関わっていると考えられている。昨年度、ラット肝臓において *in vivo* での化合物投与による GSH 枯渇時および枯渇後に発現変動のみられた遺伝子を抽出し検討したところ、GSH 枯渇時点に依らず投与 24 時間後での発現変動のみられた遺伝子が 14 プローブセット抽出された。この遺伝子セットは *in vivo* で GSH 枯渇を起こす化合物を対照群や陰性化合物とよく峻別し、GSH 枯渇時点がわからなくとも投与 24 時間後の遺伝子発現を測定すればよいというアッセイ上の利点を考えると、特に有用なバイオマーカー候補と考えられた。この遺伝子セットは *in vitro* における有用性も示唆されたが、陽性化合物でありながら *in vitro* での発現変動が一致しない例外的な化合物が一部みられた(図 1)ため、今年度はそれらについて

(図1) GSH枯渇バイオマーカー候補遺伝子の*in vivo*, *in vitro*比較
 毒性化合物によりGSH枯渇後に変動する遺伝子14プローブセットについて、対照群との比の値を色分けしヒートマップで示した。寒色系で発現低下、暖色系で発現上昇を示している。横1段が1プローブセットを、縦1列が1サンプルを表す。上段が*in vivo*、下段が*in vitro*であり、遺伝子の並び順は同じである。上段では高用量3例ずつ、下段では対照群、中用量、高用量各2例ずつ並んでおり、化合物の並び順は同じである。典型的なGSH枯渇毒性化合物を四角で囲んでおり、その多くは*in vitro*でも*in vivo*と似た傾向を示しているが、矢印で示したAPAPとBBZは*in vitro*で遺伝子発現変動がほとんどみられない、もしくは*in vivo*と逆の動きを示している。



さらに *in vitro* での検討を行った。

また、ヒトとラットのデータブリッジングの手段の一つとして血液サンプルを用いることを念頭に、その検証実験系として昨年度検討を行った血球系細胞の初代培養系の構築について、検討を進めた。

さらに、薬剤性リン脂質症予測のバイオマーカー候補遺伝子検証のための *in vitro* 検出系を構築した。肝臓、肺、腎臓などの細胞内にリン脂質が蓄積する薬剤性リン脂質症を引き起こす化合物は多数知られている。毒性との関係は明確ではないが、新薬のドロップアウトの原因ともなりかねないため、リン脂質症惹起を予測するバイオマーカーは非常に有用であり、TGP2でも *in vivo* における候補遺伝子セット3種が提案されている。そこで今回、フェノタイプと遺伝子発現の両方を測定できる *in vitro* の系で検証するため、ラット肝細胞初代培養のリン脂質症検出系を構築し、各種化合物について検討を行った。

B. 研究方法

1. ラット肝細胞 *in vitro* モデルを用いた GSH 枯渇マーカー候補遺伝子の検証 肝細胞初代培養と GSH 量測定

6週齢の雄性 Crl:CD(SD)ラットの門脈より灌流し、コラゲナーゼで消化後、肝臓を取り出し細切した。100 μ m ナイロンメッシュで濾過し、3回洗浄後 1×10^6 cells /well の濃度で6ウェルプレートに撒いた。培養開始20時間後に PHO(0, 0.1, 0.5 mM), APAP(0, 3, 10 mM), または BBZ(0, 0.4, 2 mM)の曝露を開始し、3, 6, 9, 24時間後に細胞を回収して Total GSH Quantification Kit (同仁化学) を用いて GSH 量を測定した。また曝露開始24時間後に細胞を回収して網羅的遺伝子発現解析に用いた。

網羅的遺伝子発現解析

One-cycle Target Labeling and Control Reagents (Affymetrix)を用い、メーカーのプロトコルに従って GeneChip Rat Genome 230 2.0 (Affymetrix) により網羅的遺伝子発現解析を行った。データ取得には MAS5.0 アルゴリズムを用い、各 Chip ごとの平均値を1としてノーマライズした値を遺伝子発現シグナル値として用いた。Gene Ontology 解析には DAVID functional annotation tool (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)を用いた。

2. 血球系 *in vitro* モデルとしてのラット末梢血単核細胞(PBMC)初代培養系の構築

6週齢または12週齢の雄性 Crl:CD(SD)ラットをエーテル麻酔し、腹部大動脈よりヘパリン存在下で全血採取してPBSで3倍に希釈した。溶血操作を行う場合は、この時点で ACK lysing buffer (Life Technologies) を用いて溶血させた。あらかじめ Lympholyte-Rat (CEDARLANE)を入れて遠心した Leucosep リンパ球分離チューブ(グライナー)にこれに加え、1,000 \times g で30分遠心した。PBMCの集積している層を回収し、3回洗浄後、 1×10^7 cells /dish の濃度で

10 cm カルチャーディッシュに撒いた。6, 24, 48 時間後に細胞を回収し、網羅的遺伝子発現解析を行った。遺伝子発現解析は 3' IVT Express kit (Affymetrix)を用いた以外はラット肝細胞における GSH 枯渇マーカー候補遺伝子の検証と同様に行った。

3. ラット肝細胞初代培養系におけるリン脂質症検出系の構築

GSH 枯渇マーカーの実験と同様に 6 週齢の雄性 Crl:CD(SD)ラットより肝細胞を単離した。これを 2×10^5 cells /well の濃度で 24 ウェルプレートまたは 4 ウェルチャンバースライドに、または 3×10^4 cells /well の濃度で 96 ウェルプレートに撒いた。培養開始 20 時間後に化合物の曝露を開始すると同時に HCS LipidTOX phospholipidosis detection reagent (Life Technologies)を加えた。曝露開始 24 または 48 または 72 時間後に 4%ホルムアルデヒドで固定し、共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 (カール・ツァイス) またはフルオロ・イメージアナライザー FLA5100 (富士フィルム) を用いてリン脂質症の検出を行った。表 1 に用いた化合物を示す。

(倫理面への配慮)

本研究は同志社女子大学動物実験委員会の承認を得て行っている。使用する動物の

(表 1) リン脂質症検出に用いた化合物

TGP pathology はラット肝臓 in vivo の試験で“vacuolization”を含む病理所見がみられた時点を示す。ND: not detected.

compound name	abbr.	L_dose (μM)	M_dose (μM)	H_dose (μM)	vehicle	TGP pathology (vacuolization)
propranolol	PPL	5	30	150	DMSO	-
amiodarone	AM	0.28	1.4	7	DMSO	day8-29
imipramine	IMI	4	20	100	DMSO	day8-29
amitriptyline	AMT	2.4	12	60	DMSO	day8-29
allyl alcohol	AA	0.8	4	20	culture medium	ND
allopurinol	APL	5.6	28	140	DMSO	ND
bromobenzene	BBZ	80	400	2000	DMSO	ND
clofibrate	CFB	12	60	300	DMSO	ND
diclofenac	DFNa	16	80	400	DMSO	ND
fluphenazine	FP	1.2	6	30	culture medium	ND
hydroxyzine	HYZ	6	30	150	culture medium	day15-29
clomipramine	CPM	1.6	8	40	DMSO	day29
promethazine	PMZ	3.2	16	80	DMSO	ND
perhexiline	PH	0.4	2	10	DMSO	ND
chloramphenicol	CMP	18	90	450	DMSO	ND
chlorpromazine	CPZ	0.8	4	20	DMSO	ND
rifampicin	RIF	2.8	14	70	DMSO	9-24h
phenylbutazone	PhB	16	80	400	DMSO	9h
ethionamide	ETH	24	120	600	DMSO	3,6,24h, day4-29
ketocoazole	KC	0.6	3	15	DMSO	day4-29

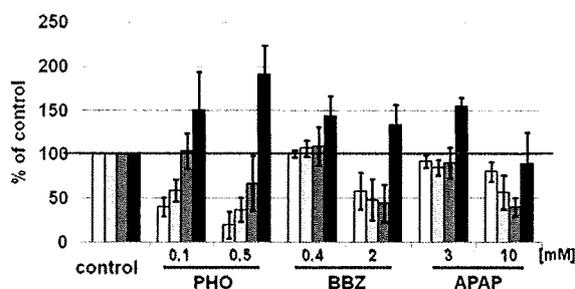
屠殺にあたっては、麻酔薬の使用で苦痛の少ない方法を用いるといった本学の実験動物取扱規定に従った対応を行っている。

C. 研究結果

1. ラット肝細胞 *in vitro* モデルを用いた GSH 枯渇マーカー候補遺伝子の検証

in vivo で投与 24 時間後に変動している 14 プローブセットについて、APAP と BBZ が GSH 枯渇陽性化合物の中で例外的に遺伝子発現変動が TGP1 の *in vitro* データで *in vivo* と一致しなかったことから、これらの化合物について *in vitro* で実際に GSH 枯渇が起こっていることを確認したうえで、その条件での遺伝子発現解析を行うこととした。陽性対照として、GSH 枯渇剤として頻用されるホロン(Pho)を用いた。まず、ラット肝細胞を単離・培養し、Pho(0, 0.1, 0.5 mM), APAP(0, 3, 10 mM), または BBZ(0, 0.4, 2 mM)を曝露した。この用量は、TG-GATEs 内データにおける用量と比較して Pho と APAP は同じ、BBZ は 10 倍である。曝露開始 3, 6, 9, 24 時間後の GSH 量を測定したところ、Pho では 3 時間で大幅な減少がみられ、徐々に回復して 24 時間では逆に増大がみられた (図 2)。BBZ と APAP では高用量でのみ 9 時間をピークとした GSH 量の減少

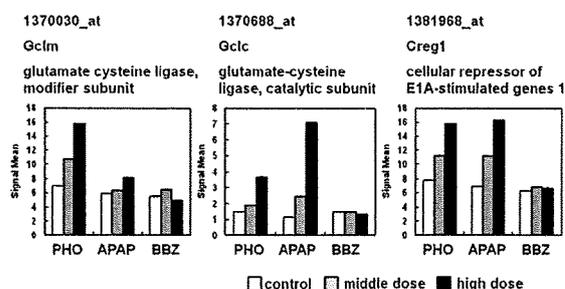
(図 2) ラット肝細胞中の総 GSH 量に対する各化合物の影響。各化合物の対照群の総 GSH 量の平均値を 100% として平均値 ± 標準偏差で表した。N=3, □: 3 時間, ◻: 6 時間, ◼: 9 時間, ■: 24 時間



がみられ、24 時間では回復もしくは若干の増大がみられた。中用量では GSH 量の減少はほとんどみられなかったが、24 時間での増大が観察された。今回の用量で GSH 枯渇が起こることが確認されたので、同じ用量で曝露開始 24 時間後の遺伝子発現解析を行った。その結果、APAP では PHO と同様、バイオマーカー候補 14 プローブセットが *in vivo* に近い応答を示したのに対し、BBZ では応答が弱かった。特に他の化合物で大きな発現増大がみられた glutamate cysteine ligase modifier subunit (Gclm), glutamate

cysteine ligase catalytic subunit (Gclc), cellular repressor of E1A-stimulated genes 1 (Creg1) などの変動が全くみられなかった (図 3)。この原因を探るため、BBZ による発現変動遺伝子の Gene Ontology 解析を行った。発現増大遺伝子で有意にヒットの多かった GO タームには免疫・炎症関連と DNA 複製関連が多く、発現低下遺伝子では転写関連の GO タームが複数含まれていた (表 2)。このことから、BBZ により転写関連遺伝子の発現低下が起こり、バイオマーカー候補遺伝子の発現増大が起こりにくくなっていた可能性が考えられた。

(図 3) BBZ で発現変動の小さかった遺伝子



(表 2) BBZ による発現変動遺伝子の Gene Ontology ラット初代培養肝細胞の系において、PHO, APAP, BBZ を 24 時間曝露したすべてのサンプルでシグナル値が 0.1 以下または Absent call であったプローブセットを除き、対照群と比較して 1.5 倍以上(A)増加または(B)減少したプローブセットを DAVID functional annotation tool で解析し、gene ontology level 5 の GO タームのうち、 $p < 0.05$ のものを p 値の低い順に示した。

A

Category	Term	Count	%	PValue
GOTERM_CC_3	GO:004634-nucleus	89	17.35%	2.87E-05
GOTERM_CC_3	GO:004573-nuclear part	33	6.23%	3.24E-04
GOTERM_BP_3	GO:0046770-DNA replication initiation	6	1.17%	3.64E-05
GOTERM_CC_3	GO:0046384-chromosomes	18	3.51%	8.84E-05
GOTERM_CC_3	GO:0042331-intracellular membrane-bound organelle	122	23.78%	1.83E-04
GOTERM_CC_3	GO:0044437-chromosomal part	16	3.12%	2.34E-04
GOTERM_CC_3	GO:0044454-nuclear chromosome part	8	1.55%	2.82E-04
GOTERM_CC_3	GO:004308-origin recognition complex	4	0.78%	2.82E-04
GOTERM_BP_3	GO:0059778-positive regulation of immune response	9	1.75%	3.04E-03
GOTERM_BP_3	GO:005286-positive regulation of immune system process	9	1.75%	3.04E-03
GOTERM_BP_3	GO:0051541-inactivation of plasma proteins during acute inflammatory response	7	1.35%	5.78E-04
GOTERM_BP_3	GO:005776-regulation of immune response	9	1.75%	1.02E-03
GOTERM_BP_3	GO:0051529-acute inflammatory response	9	1.75%	1.02E-03
GOTERM_BP_3	GO:0051535-chromatin	9	1.75%	1.51E-03
GOTERM_CC_3	GO:0002228-nuclear chromosome	8	1.55%	1.44E-03
GOTERM_BP_3	GO:0043198-RNA processing	15	2.92%	1.65E-03
GOTERM_CC_3	GO:0042229-intracellular organelle	124	24.12%	2.17E-03
GOTERM_BP_3	GO:0042490-DNA replication	11	2.14%	2.41E-03
GOTERM_BP_3	GO:0018724-B cell mediated immunity	6	1.17%	3.05E-03
GOTERM_BP_3	GO:0022283-activation of immune response	7	1.35%	3.37E-03

B

Category	Term	Count	%	PValue
GOTERM_BP_3	GO:0046357-regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	35	3.85%	1.13E-05
GOTERM_CC_3	GO:0045737-cytoplasm	184	18.84%	1.80E-05
GOTERM_BP_3	GO:0045937-positive regulation of cell differentiation	11	1.11%	1.64E-04
GOTERM_BP_3	GO:0015718-mono-carboxylic acid transport	7	0.71%	1.68E-04
GOTERM_BP_3	GO:0022787-mono-carboxylic acid metabolic process	22	2.23%	2.51E-04
GOTERM_MF_3	GO:0002707-steroid hormone receptor activity	3	0.31%	3.68E-04
GOTERM_BP_3	GO:0031321-negative regulation of cellular metabolic process	23	2.33%	5.98E-04
GOTERM_CC_3	GO:0003887-integral to plasma membrane	54	5.47%	6.80E-04
GOTERM_MF_3	GO:0005506-iron ion binding	23	2.33%	6.82E-04
GOTERM_BP_3	GO:0008202-steroid metabolic process	16	1.62%	7.40E-04
GOTERM_MF_3	GO:0005939-Rho guanyl nucleotide exchange factor activity	3	0.31%	8.33E-04
GOTERM_CC_3	GO:0031226-intrinsic to plasma membrane	54	5.47%	9.29E-04
GOTERM_BP_3	GO:0017916-regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway	6	0.61%	9.95E-04
GOTERM_CC_3	GO:0005792-microsome	19	1.93%	1.00E-03
GOTERM_MF_3	GO:0008270-zinc ion binding	72	7.28%	1.06E-03
GOTERM_BP_3	GO:0021990-response to corticosteroid stimulus	8	0.81%	1.07E-03
GOTERM_CC_3	GO:0041939-estriol fraction	19	1.93%	1.26E-03
GOTERM_CC_3	GO:0016323-basolateral plasma membrane	12	1.22%	1.40E-03
GOTERM_BP_3	GO:0043827-response to estrogen stimulus	8	0.81%	1.75E-03
GOTERM_BP_3	GO:0048941-positive regulation of transcription	22	2.23%	2.16E-03

2. 血球系 *in vitro* モデルとしてのラット末梢血単核細胞(PBMC)初代培養系の構築

血球系細胞の *in vitro* モデルとして検証に用いるため、昨年度に引き続き PBMC の初代培養を試みた。培養した細胞から抽出される total RNA 量が少なかったため、微量 RNA で実験可能な新キットを使用した。まず培養の時間経過による発現変動について検討したところ、6 週齢、12 週齢由来の細胞ともに時間経過を追って発現が増大した遺伝子数の方が減少した遺伝子数よりも多かった。6 週齢由来の細胞と 12 週齢由来の細胞での遺伝子発現を比較すると、12 週齢由来の細胞よりも 6 週齢由来の細胞での発現が高かった遺伝子数とその逆よりも若干多かった。Gene Ontology 解析を行ったところ、12 週齢由来の細胞でより発現が高かった遺伝子ではアポトーシス関連の GO タームに多くヒットした。一方 6 週齢由来の細胞でより発現が高かった遺伝子では陽イオン輸送関連の GO タームに多くヒットし、またアポトーシスの負の制御に関する GO タームにもヒットした (表 3)。溶血操作の

(表3)PBMCでの発現に週齢差のあった遺伝子のGene OntologyラットPBMC初代培養の系において、すべてのサンプルでシグナル値が0.1以下またはAbsent callであったプローブセットを除き、12週齢由来の細胞で6週齢由来の細胞と比較し、培養6, 24, 48時間後共通に1.5倍以上発現が(A)高かったまたは(B)低かったプローブセットをDAVID functional annotation toolで解析し、gene ontology level 5のGOタームのうち、p値トップ20のGOタームを示した。

A (12w>6w)

Category	Term	Count	%	PValue
GOTERM_BP_5	GO:0042881-regulation of apoptosis	32	5.17%	3.27E-07
GOTERM_BP_5	GO:0043077-regulation of programmed cell death	32	6.17%	4.64E-07
GOTERM_CC_5	GO:0005234-nucleus	102	18.48%	2.89E-08
GOTERM_BP_5	GO:0006916-apoptosis	36	6.63%	3.91E-06
GOTERM_BP_5	GO:0042197-cell death	36	6.63%	4.48E-06
GOTERM_CC_5	GO:0042331-intracellular membrane-bound organelle	148	23.91%	6.03E-06
GOTERM_BP_5	GO:0012822-induction of programmed cell death	17	2.75%	6.83E-08
GOTERM_BP_5	GO:0042116-macrophage activation	7	1.13%	7.12E-08
GOTERM_BP_5	GO:0043065-positive regulation of apoptosis	19	3.07%	1.10E-08
GOTERM_BP_5	GO:0043068-positive regulation of programmed cell death	19	3.07%	1.23E-08
GOTERM_BP_5	GO:006355-regulation of transcription, DNA-dependent	64	8.72%	2.99E-05
GOTERM_BP_5	GO:0018500-acidic amino acid transport	7	1.13%	3.01E-06
GOTERM_BP_5	GO:0051955-regulation of amino acid transport	6	0.97%	3.09E-05
GOTERM_BP_5	GO:0051953-negative regulation of amine transport	6	0.97%	3.09E-05
GOTERM_BP_5	GO:0051952-negative regulation of amine transport	6	0.97%	3.09E-05
GOTERM_BP_5	GO:0043323-regulation of neuron apoptosis	9	1.43%	3.21E-08
GOTERM_BP_5	GO:0026171-positive regulation of transmission of nerve impulse	7	1.13%	3.88E-08
GOTERM_BP_5	GO:0051846-positive regulation of neurological process	7	1.13%	4.49E-06
GOTERM_BP_5	GO:0048325-negative regulation of glucose import	6	0.97%	6.39E-05
GOTERM_BP_5	GO:0019219-regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	68	9.37%	8.30E-09

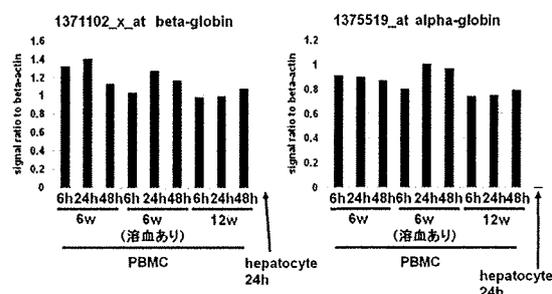
B (12w<6w)

Category	Term	Count	%	PValue
GOTERM_BP_5	GO:005082-cellular chemical homeostasis	24	2.62%	1.15E-05
GOTERM_BP_5	GO:005082-ion homeostasis	24	2.73%	1.81E-05
GOTERM_CC_5	GO:000737-cytoplasm	173	19.84%	2.41E-05
GOTERM_BP_5	GO:005082-cellular chemical homeostasis	19	2.07%	3.24E-04
GOTERM_BP_5	GO:0050822-defense response to fungus	4	0.44%	4.09E-04
GOTERM_BP_5	GO:0005002-cell morphogenesis	32	3.49%	5.17E-04
GOTERM_BP_5	GO:0043066-negative regulation of apoptosis	18	2.07%	8.84E-04
GOTERM_BP_5	GO:0030081-metal ion transport	28	3.06%	9.79E-04
GOTERM_BP_5	GO:0043069-negative regulation of programmed cell death	19	2.07%	9.79E-04
GOTERM_BP_5	GO:0044489-synaptic vesicle transport	8	0.87%	1.17E-03
GOTERM_BP_5	GO:0050729-synaptic transmission	27	2.93%	1.20E-03
GOTERM_MF_5	GO:0031402-sodium ion binding	10	1.09%	1.89E-03
GOTERM_CC_5	GO:0044459-plasma membrane part	74	8.08%	1.81E-03
GOTERM_BP_5	GO:0006012-sation transport	22	2.49%	1.82E-03
GOTERM_CC_5	GO:0031228-intrinsic to plasma membrane	61	6.67%	1.88E-03
GOTERM_BP_5	GO:001932-second-messenger-mediated signaling	21	2.29%	2.01E-03
GOTERM_BP_5	GO:001505-regulation of neurotransmitter levels	19	1.42%	3.00E-03
GOTERM_CC_5	GO:0016323-basolateral plasma membrane	11	1.20%	3.83E-03
GOTERM_BP_5	GO:004879-hormone secretion	8	0.87%	3.85E-03
GOTERM_CC_5	GO:000587-integral to plasma membrane	49	5.35%	4.11E-03

効果についても検討するため、グロビン遺伝子の発現をbeta-actinに対するシグナル値の比として比較したところ、溶血操作の有無にかかわらずグロビン遺伝子の発現は肝細胞と比較して非常に高く、今回の方法では赤血球は除ききれていないことがわかった(図4)。

3. ラット肝細胞初代培養系におけるリン脂質症検出系の構築

(図4) PBMCと肝細胞サンプルにおけるグロビン遺伝子の発現beta-actin(1398835_at)に対するシグナル値の比の平均値を示した。N=2。

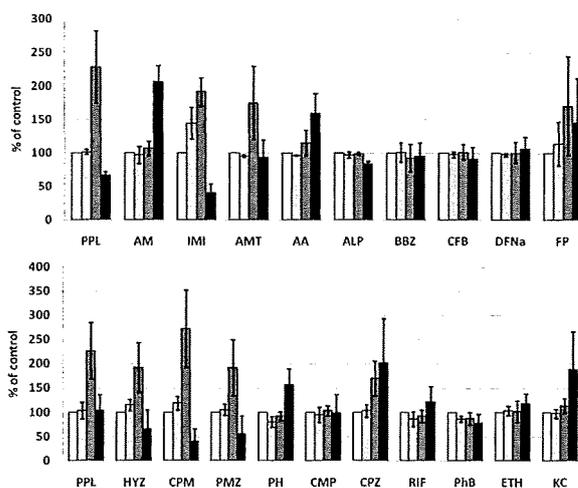


TGP2ではリン脂質症に関するバイオマーカー候補遺伝子セットが3種報告されているが、これらに共通する遺伝子は数少ない。そこでリン脂質症バイオマーカーについて検討を行うこととした。これら3種の遺伝子セットはいずれもラット*in vivo*肝臓データに適用されるものであり、*in vitro*の系を構築してこれらと合わせ検証を行うことを目指した。ラット肝臓より肝細胞を単離・培養し、リン脂質症を起こすことが知られているプロプラノロール(PPL; 30μM)投与24, 48, 72時間後のリン脂質を蛍光染色し共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察したところ、24時間でバックグラウンドが少なく最も明確に観察されたため、以降この時間で測定を行った。次に多くの化合物で測定できるようにスループットを改善する目的で、蛍光イメージアナライザーを用いることにした。96ウェルプレートと24ウェルプレートで検討したところ、24ウェルの方が安定した結果が得られたため、以降24ウェルを用いることとした。

リン脂質症を起こすことが知られている化合物、起こさないと考えられる化合物を含めてリン脂質症検出アッセイを行った。結果を図5に示す。PPLのほか、アミオダロン(AM)、イミプラミン(IMI)などリン脂質症を起こすことが知られる化合物で実際にリン脂質の蓄積が起こっていることが確認できた。一方リン脂質症を起こすとはされていないBBZ、クロフィブラート(CFB)などではリン脂質の蓄積を示す蛍光強度の上昇はみられなかった。TG-GATEsのデータにおけるラット*in vivo*肝臓での病理所見と一致して陽性であった化合物はAM、IMI、アミトリプチリン(AMT)、ヒドロキシジン

(図5) ラット初代培養肝細胞における各種化合物曝露後のリン脂質量

培養開始20時間後より化合物とリン脂質染色試薬を24時間曝露し、固定後、蛍光イメージアナライザーで測定、解析した。Duplicateの平均値を1回の実験の値とし、3回実験した。対照群の3回の平均値を100%とし、平均値±標準偏差で表した。
□：対照群，▢：低用量群，▣：中用量群，■：高用量群



(HYZ), クロミプラミン(CPM), ケトコナゾール(KC), リファンピシン(RIF) (ただし弱い)であった。また病理所見と一致して陰性であった化合物はアロプリノール(ALP), BBZ, CFB, ジクロフェナク(DFNa), クロラムフェニコール(CMP)であった。病理所見では陰性であったが今回陽性であった化合物はアリアルアルコール(AA), フルフェナジン(FP), プロメタジン(PMZ), パーヘキシリン(PH), クロルプロマジン(CPZ)であった。一方病理所見で陽性所見があったが今回陰性であった化合物はフェニルブタゾン(PhB)とエチオナミド(ETH)であった。

D. 考察

1. ラット肝細胞 *in vitro* モデルを用いた GSH 枯渇マーカー候補遺伝子の検証

In vivo のデータから抽出したバイオマーカー候補遺伝子セットが他の陽性化合物では *in vitro* でも *in vivo* に近い遺伝子発現応答を示すのに対して APAP, BBZ では応答が異なっていたため、そもそも GSH 枯渇が起こ

っていない恐れもあると考えて測定したところ、いずれも高用量で GSH 枯渇は起こった。APAP に関しては TG-GATEs のデータと用量が変わっていないにもかかわらず、新たな実験では *in vivo* に一致した応答が複数回みられたことから、TG-GATEs のデータの方に何らかの不具合があった可能性が考えられた。それに対して BBZ では GSH 枯渇が起こる条件でも遺伝子発現変動が弱かった。このことから、この遺伝子セットの *in vitro* における有用性は限定的と考えられた。また BBZ による遺伝子発現増大が弱かった理由として、Gene Ontology 解析の結果から、転写に異常をきたしていることが関与している可能性が考えられた。

2. 血球系 *in vitro* モデルとしてのラット末梢血単核細胞(PBMC)初代培養系の構築

今年度は初代培養 PBMC の遺伝子発現について大まかな解析を行った。12 週齢と 6 週齢由来の PBMC を比較したところ、12 週齢の方がアポトーシス関連遺伝子の発現が高く、よりアポトーシスが起こりやすいことが示唆された。また赤血球の影響を除くために溶血操作を行ってみたが今回の方法では赤血球がかなり残っていることがわかった。最初の段階では赤血球が非常に多いので、一旦 PBMC を採取してから溶血操作を行うと改善するかもしれない。

今回培養 PBMC からは僅かな RNA しか取れなかったが、細胞がディッシュに貼り付いてロスした部分もかなりあった。今後接着性の低いディッシュを用いることで少し回収率が改善するかもしれない。

さらに手法の改善を重ね、*in vivo* の系と比較しつつ検証を行っていきけるようになっていきたい。

3. ラット肝細胞初代培養系におけるリン脂質症検出系の構築

リン脂質症に関するバイオマーカー候補遺伝子検証のために *in vitro* の系を構築し、各種化合物を曝露してリン脂質の蓄積を測定した。多くの化合物で TG-GATEs のラット *in vivo* 肝臓における病理所見と一致した結果が得られたが、一致しない化合物がいくつかあった。病理所見で陰性だったが今回陽性だった AA, FP, PMZ, PH, CPZ のうち、FP, PMZ, PH, CPZ については文献的にリン脂質症を起こすという報告がある。従ってこれらについては用量の違いや *in vivo* における臓器分布による違いが出たものと考えられ、今回陽性だったのは適切な結果といえる。AA に関してはリン脂質症を起こすという報告は今回検索した限りでは見つからなかったため、今後の検証が必要である。また病理所見で陽性だったが今回陰性だった PhB と ETH についても、今回検索した限りではリン脂質症を起こすという情報は見つからなかった。病理所見では“vacuolization”を含む所見を陽性としているので、これらについては中性脂肪の蓄積などリン脂質症以外の空胞化を起こしている可能性もある。また PhB については *in vivo* の所見は単回投与のみであり、たとえリン脂質症を起こすとしても非常に弱いかもしれない。全体的にみると、今回構築した系は相当信頼性の高いリン脂質症の検出系であると考えられる。

E. 結論

昨年度の研究により、GSH 枯渇時点がわからなくても *in vivo*, *in vitro* とも利用可能なマーカー候補として有望なものが得られ

ていたが、今年度の検討により、残念ながら *in vitro* での有用性については限定的であることが判明した。この遺伝子セットは *in vivo* での有用なバイオマーカー候補として提案していくことになる。

また、PBMC の初代培養系について遺伝子発現データを得て大まかな解析を行ったところ、用いるラットの週齢により遺伝子発現に差がみられた。今後条件検討を重ね、バイオマーカー候補遺伝子の検証に用いていきたい。

リン脂質症バイオマーカーの検証のため *in vitro* 検出系を構築し、20 化合物についてリン脂質蓄積を測定したところ、陽性、陰性対照化合物での適切な結果が確認でき、適切なフェノタイプ検出系の構築ができたと考えられた。今後この系を用いて TG-GATEs のデータの判別分析などにより *in vitro* のバイオマーカー候補遺伝子を抽出し、*in vivo* のマーカー候補として提案されている遺伝子セットと比較しつつ検証を進めていきたい。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし。
2. 学会発表
なし。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

研究報告書

病理学的診断の検証

研究分担者 三森国敏

東京農工大学大学院 教授

研究要旨：73 化学物質のラットの毒性試験における肝臓と腎臓のヘマトキシリン・エオジン染色標本から診断された病理組織所見およびその組織写真 640 件についてレビューを実施した結果、用語の統一が不十分であること、誘発された病変に対して適切な診断用語が使われていないこと、誘発された病変が見逃されていることなどが発見され、これらの所見の不備について、用語の統一や整合性をとる作業を実施した。

A. 研究目的

トキシコジェノミクス・インフォマティクスプロジェクトにより実施された 73 化学物質のラットにおける毒性試験における肝臓と腎臓のヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色標本から診断された病理組織所見およびその組織写真 640 件についてレビューを行い、組織写真で示される変化とそれに対して取られた所見の妥当性についての確認を行った。

B. 研究方法

各化学物質により誘発された肝臓と腎臓における毒性病変の組織診断とその組織所見が撮影された組織写真 640 件をレビューし、診断名の適切性および写真との整合性を調査した。また、研究成果報告書に記載された所見について、同じ病変について同一用語を用いて診断しているかについても調査した。全体の統一をお願いする。組織写真から病理診断が適切になされているか否か判定が難しいものについては、その HE 染色標本を取り寄せ、顕微鏡を用いて、その診断が適切であるか否かを確認した。さらに、HE 染色標本のみでは、診断困難なものについては、パラフィンブロックを取り寄せ、組織切片を作成して、種々の抗体を用いて免疫組織化学的解析を行った。

(倫理面への配慮)

特になし

C. 研究結果

組織写真 640 件をレビューした結果、以下のような不備が認められた。

毒性試験を実施した試験実施施設間で、用語の統一がされていなかった。そのため、同じ病変にもかかわらず、いろいろな用語が使用されており、これらの用語の統一を実施した。

肝臓については、肝細胞肥大を所見として取った上で、小胞体増生の特徴である「ground glass appearance (すりガラス状変化)」を所見として付記している試験実施施設とそうでない施設があり、これらについては、別途チクロム P450 (CYP) などの免疫染色を実施して、所見を特定化する作業を実施した。さらに、Fatty (脂肪) や Hydropic (水腫性) に細区分した試験実施施設と、統一的に「Degeneration, vacuolar (空胞変性)」を使用する施設があり、

「Degeneration, vacuolar」に用語統一する作業を行った。「Change, eosinophilic」と「Degeneration, granular, eosinophilic (好酸性顆粒状変性)」の区別があいまいであり、鑑別基準をどこに置くか問題が残った。

腎臓については、病変が発現している部位がどこであるのか (どの部位の尿細管なのか?) 明記されていないものが多かった。例えば、「renal tubule」のみ記載されているが、写真を見ると、「Proximal tubule, convoluted」であることがわかるものが多々あり、このような所見のつけ方では、病変発現部位を特定することができず、毒性の特徴を考える上では不十分であった。このような病変発現部位を特定していない写真については、HE 切片を鏡検して、病

変部位を特定した。また、尿細管の「Regeneration(再生)」を「Degeneration(変性)」や「Necrosis(壊死)」と誤診しているものが目立った。その他、「Hyaline droplet(硝子滴)」と「Eosinophilic body(好酸性小体)」の区別があいまいであり、鑑別基準をどこに置くべきか疑問が残った。また、「Swelling(肥大：肉眼所見用語)」の表記が多く、「Hypertrophy(肥大：組織所見用語)」に統一した。

組織写真には、組織所見に記載されている所見以外に、さらに他の所見がみられているものがあり、整合性に欠けるものがあった。このような写真については、HE切片を鏡検して、それらの所見を確認して、追加所見として組織所見表に記載した。

組織写真の質が悪く、認められた所見がうまく撮影されていないものがみかけられた。これらについては、HE切片を取り寄せ、より適切な写真を撮影し直した。

組織写真のみでは、記載されている病変の特徴をつかむことができないものがあった。そのような写真については、HE切片を取り寄せて、病変を再度確認した。

D. 考察

以上のように、毒性試験を実施した試験実施施設間で、用語の統一がなされていないことが明確となり、誘発された毒性病変の質が同一にも関わらず、異なった用語が使用されていたことについては、非常に驚くべき事象であった。日本毒性病理学会が「毒性病理専門家」という認定制度を設置しているが、それらの専門家が共通した病理診断用語を使うべきであることを痛感した。

化学物質により誘発された病変の内、数種類の所見が混在する場合があるが、試験実施施設により、それらの所見を全て記載する機関と、それらの所見を総括して一つの診断名にする機関が見受けられ、これらについても整合性をもたせるべきである。特に、肝細胞肥大と「ground glass appearance」は、小胞体が増生する場合に頻繁に見られる変化であるが、肝細胞肥大は、いろいろな細胞内小器官が増加した場合に見ら

れる変化であるので、肝細胞肥大のみ所見として取るべきではなく、「ground glass appearance」を付記すべきである。

今回のレビューで驚いた点は、HE染色標本での病変の見逃しが多々認められたことである。貼付されている組織写真をみた場合、所見として記載されている病変に加えて、他の所見が認められており、明らかに鏡検担当者の所見の見逃しがあつたことを否定できない。このような不備については、試験実施施設の鏡検担当者の資質が問われるものであり、今後、このような不備が起こらないような防止策が必要である。

E. 結論

73 化学物質のラットの毒性試験での肝臓と腎臓の HE 染色標本から診断された病理組織所見とその組織写真 640 件についてレビューを実施した結果、用語の統一が不十分であること、誘発された病変に対して適切な診断用語が使われていないこと、誘発された病変を見逃していることなどが発見され、大幅な用語の統一や所見の整合性を計る作業が今後も必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

なし

2) 雑誌

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

別添 5

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
大野泰雄	日本薬理学会の動物実験指針と動物実験の第三者評価について	日本薬理学会	実践行動薬理学	金芳堂	京都	2010	337-347

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
Takeki Uehara, Atsushi Ono, Mitsuhiro Hirode, Naoki Kiyosawa, Ko Omura, Toshinobu Shimizu, Yumiko Mizukawa, Toshikazu Miyagishima, Taku Nagao and Tetsuro Urushidani.	A Toxicogenomics approach for early assessment of potential non-genotoxic hepatocarcinogenicity of chemicals in rats.	Toxicology	250	15-26	2008
漆谷徹郎	トキシコゲノミクス	日薬理誌	133	112-114	2009
M. Hirode, A. Horinouchi, T. Uehara, A. Ono, T. Miyagishima, H. Yamada, T. Nagao, Y. Ohno, T. Urushidani.	Gene expression profiling in rat liver treated with compounds inducing elevation of bilirubin.	Human Exp. Toxicol.	28	231-244	2009
Mitsuhiro Hirode, Ko Omura, Naoki Kiyosawa, Takeki Uehara,	Gene expression profiling in rat liver treated with various	J. Toxicol. Sci.	34	281-293	2009

Toshinobu Shimuzu, Atsushi Ono, Toshikazu Miyagishima, Taku Nagao, Yasuo Ohno and Tetsuro Urushidani.	hepatotoxic-compounds inducing coagulopathy.				
Chiaki Kondo, Yosuke Minowa, Takeki Uehara, Yasushi Okuno, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono, Toshiyuki Maruyama, Ikuo Kato, Jyoji Yamate, Hiroshi Yamada, Yasuo Ohno and Tetsuro Urushidani.	Identification of genomic biomarkers for concurrent diagnosis of drug-induced renal tubular injury using a large-scale toxicogenomics database.	Toxicology	265	15-26	2009
Uehara T, Ono A, Maruyama T, Kato I, Yamada H, Ohno Y, Urushidani T.	The Japanese toxicogenomics project: Application of toxicogenomics.	Mol Nutr Food Res.	54	218- 227	2010
A. Sanbuissho, M. Yoshida, S. Hisada, F. Sagami, S. Kudo, T. Kumazawa, M. Ube, S. Komatsu, Y. Ohno.	Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity by repeated-dose and fertility studies in female rats.	J. Toxicol Sci.	34	SP1- SP22	2009
M. Yoshida, A. Sanbuissho, S. Hisada, M. Takahashi, Y. Ohno, A. Nishikawa.	Morphological characterization of the ovary under normal cycling in rats and its viewpoints of ovarian toxicity detection.	J. Toxicol Sci.	34	SP189- SP197	2009

大野泰雄	マイクロドーズ臨床試験に必要な非臨床試験データ	臨床薬理	41	9-16	2010
Matsunaga N, Kanno J, Hamada C, Yoshimura I.	An experimental design for judging synergism on consideration to endocrine disruptor animal experiments.	Environmetrics	20	1-13	2009
Ishimaru N, Takagi A, Kohashi M, Yamada A, Arakaki R, Kanno J, Hayashi Y.	Neonatal exposure to low-dose 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin causes autoimmunity due to the disruption of T cell tolerance.	J. Immunol.	182	6576-6586.	2009
Upham BL, Park JS, Babica P, Sovadinova I, Rummel AM, Trosko JE, Hirose A, Hasegawa R, Kanno J, Sai K.	Structure-activity-dependent regulation of cell communication by perfluorinated fatty acids using in vivo and in vitro model systems.	Environ. Health Perspect.	117	545-551	2009

実験薬理学

実践行動薬理学

編集 社団法人日本薬理学会

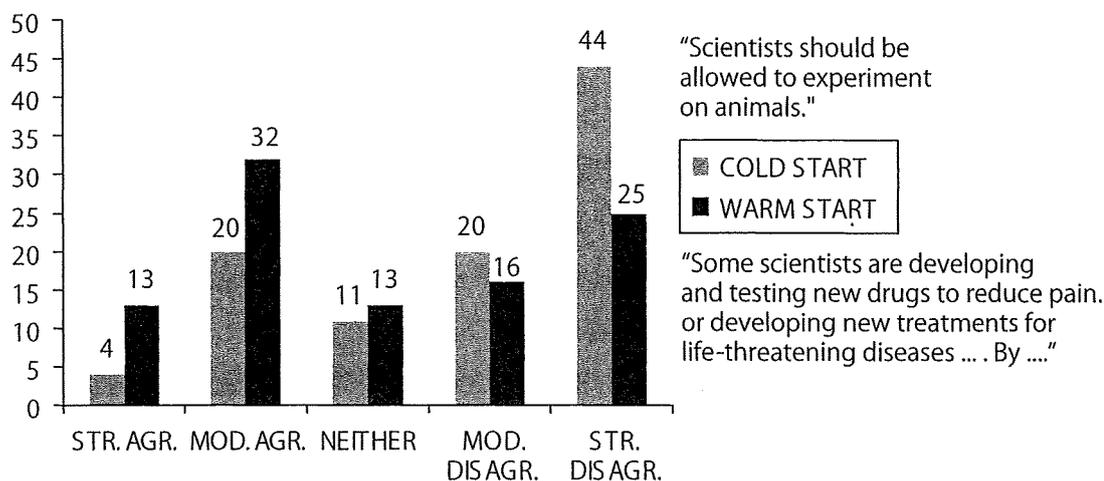
編集責任者 国際医療福祉大学教授
武田弘志
国際医療福祉大学准教授
辻 稔
京都大学大学院教授
赤池昭紀

5 日本薬理学会の動物実験指針と動物実験の第三者評価について

(大野泰雄)

はじめに

最近の薬理学では確立された細胞株等を用いる in vitro 研究が多くなっている。しかし、依然として、動物実験や実験動物から採取した試料を用いた研究は薬理学研究に不可欠である。動物福祉や権利に対する社会の関心が高まり、動物実験への反対運動もたびたび報道されている。一方、現在の科学研究には多額の費用が必要であり、公的な資金なしに研究を進めることはできない。日本薬理学会はこのような状況に適切に対応しなければならない。一方、動物実験の必要性についての説明が十分になされることにより、科学的に必要な動物実験に賛同する者が確実に増加する(図1)。薬理学研究においても、動物実験の必要性とその意義を社会に示し、科学的に必要かつ倫理的に妥当な実験を行うことにより、我々の研究への社会の支持を得ることが不可欠である。



From Dr Rowan (2005)

From New Scientist, 22 May, 1999, pp. 26-31

図1 動物実験への一般人の反応 (New Scientist, 1999 May 22; 162(2187):26-31. 英国での調査結果)

Cold Start: “Scientists should be allowed to experiment on animals.” と説明した場合の反応。

Warm Start: “Some scientists are developing and testing new drugs to reduce pain or developing new treatments for life-threatening diseases ... By” と説明した場合の反応。

STR.AGR.: Strong Agreement, MOD.AGR.: Moderate Agreement, NEITHER: Neither,

MOD.DISAGR.: Moderate Disagreement, STR.DISAGR.: Strong Disagreement.

なお、縦軸は該当する回答の割合(%)を示す。

1 動物実験についての法的規制

平成17年6月に改訂された「動物の愛護及び管理に関する法律」(動愛法)は、「動物の虐待の防止、動物の適正な取扱いその他動物の愛護に関する事項を定めて国民の間に動

物を愛護する気風を招来し、生命尊重、友愛及び平和の情操の涵養に資するとともに、動物の管理に関する事項を定めて動物による人の生命、身体及び財産に対する侵害を防止する」ことを目的とし、「動物が命あるものであることにかんがみ、何人も、動物をみだりに殺し、傷つけ、又は苦しめることのないようにするのみでなく、人と動物の共生に配慮しつつ、その習性を考慮して適正に取り扱うようにしなければならない。」という基本原則を示している。また、動物を科学上の利用に供する場合に関し、「科学上の利用の目的を達することができる範囲において、できる限り動物を供する方法に代わり得るものを利用すること、できる限りその利用に供される動物の数を少なくすること」、また、「その利用に必要な限度において、できる限りその動物に苦痛を与えない方法」をとること、さらに、使用后、回復の見込みのない状態に陥っている場合には、「直ちに、できる限り苦痛を与えない方法によってその動物を処分しなければならない。」と規定している。さらに、「愛護動物をみだりに殺し、又は傷つけた者は、一年以下の懲役又は百万円以下の罰金に処する。」といった罰則規定が設けられていることにも留意する必要がある。なお、愛護動物には薬理実験に日常的に用いられているイヌなどの哺乳類に加え、鳥類、爬虫類も含まれている(資料1)。

即ち、薬理学分野においても、研究や教育、生産などに使用される動物を用いる方法を生きた動物を用いないものに置き換え、当初の目的を達すること(Replacement)、特定の量と質を有するデータを得るために使用する動物を必要最小限にすること、あるいは、同じ数の動物からより多くの情報を得ること(Reduction)、また、避けられない動物実験にあっては、動物に与える痛みや苦痛、不快感を最低限にし、動物の福祉を向上させること(Refinement)、という動物実験における3Rの原則を尊重すべきことが法的に義務づけられた。

更に、環境省、文部科学省、厚生労働省、および農林水産省では、それぞれ所管する分野を対象に動物実験に関する基本指針を作成し、平成18年4月から6月に通知・施行した(1-4)。また、日本学術会議も動物実験に関する詳細指針「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」を作成した(5)。上記、省庁毎の基本指針の内容は、対象とする機関の相違に基づく、若干相違があるものの、要点はほとんど同じである。詳細については、それぞれの原本を参照されたい。ここでは、厚生労働省および農林水産省が指針を作成する際のモデルとされた文部科学省の指針を示した(資料2)。その要点は以下のとおり。

- 1) 研究機関等の長は、実施機関における動物実験等の実施に関する最終的な責任を有し、本指針に定める措置その他動物実験等の適正な実施のために、機関内規程の策定や動物実験委員会の設置、動物実験計画の承認、動物実験計画の実施結果の把握、教育訓練等の実施、自己点検及び評価、動物実験等に関する情報公開などについて、必要な措置を講じる責務を有する。
- 2) 動物実験委員会は、実施機関の長の諮問を受け、動物実験計画が本指針及び機関内規程等に適合しているか否かの審査を行い、その結果を実施機関の長に報告すると

ともに、動物実験計画の実施結果について、実施機関の長より報告を受け、必要に応じ助言を行う。

- 3) 動物実験等の実施においては、科学的合理性の確保とともに安全管理、代替法における3Rの原則を遵守する。
- 4) 実験動物の飼養及び保管においては、動愛法及び飼養保管基準に従う。

なお、文部科学省および農林水産省の指針では動物実験の第三者による検証に努めるよう、勧められているが、厚生労働省の指針には言及されていない。一方、厚生労働省の指針では、動物実験責任者に関する項を設け、その責務についても記載されている。

2 日本薬理学会の動物実験指針

日本薬理学会では上記の法的規制を踏まえて、従来の動物実験指針を改訂した(資料3)。その要点は以下のとおり。

- 1) 薬理学研究における動物実験の意義を明示した。
- 2) 薬理学研究が社会に受け入れられるためには、科学的・倫理的に適正な動物実験を行う環境を醸成し、実施することが不可欠であることを明示した。
- 3) 「動物が命あるものであることにかんがみ、何人も動物をみだりに殺し、傷つけ、又は苦しめることのないようにするのみでなく、人と動物の共生に配慮しつつ、その習性を考慮して適正に取り扱うようにしなければならない」という動愛法第2条に示された基本原則を明記した。
- 4) 3Rの原則を明示した。
- 5) 日本薬理学会は本指針に反する研究の成果は学会誌から排除することを明示した。
- 6) 動物実験を適切に行うために必要な研究機関の責任者や実験動物の専門家等の役割を明示した。
- 7) 動物実験委員会の役割を明示した。

3 動物実験の第三者評価

動物実験に対する社会的な関心が高まるなか、その適切性について自己点検のみでは、必ずしも社会に受け入れられない。そこで、文部科学省および農林水産省の指針では動物実験の第三者による検証に努めるよう勧めている。日本学術会議は第三者認証組織が持つべき性格は以下のようなものであると提言している(6)。

- 1) 任務：認証を求める機関の申請に対し、書類審査と実地審査を実施し、施設の認証、是正勧告または認証の取り消しを行なう。
- 2) 評価基準：上記の全国統一の動物実験ガイドラインに基づいて評価と認証を行なう。その認証は諸外国の類似認証制度との間の相互認証を目指す。
- 3) 評価対象：上記の全国統一の動物実験ガイドラインが定める基準項目を対象として評価する。この場合、認証を求める機関の責任体制、管理組織、施設・設備、動物

実験委員会、実験計画の審査方法、実験動物の健康、福祉、実験終了後の処置、労働安全管理など動物実験を適正に行なうための要件、などを対象として審査することになると考えられる。

- 4) 普及と実効性：本案の第三者評価制度は動物実験実施機関の自主的な申請によるものであり、その普及と実効性を高めるためには、第三者評価機関は社会的にも高い評価と理解が得られるものでなければならない。

現在、これらを満たす機関としては、AAALAC International (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International, 国際実験動物愛護評価認証協会) の認証 (国際認証) があり、1965年に設立されて以来、米国のILAR (Institute for Laboratory Animal Research) の基準に従い、研究所規範と責任、動物の環境、住居および管理 (CARE)、獣医学的管理 (動物の搬入、輸送、疾病の予防、外科処置、疼痛、鎮痛、麻酔、安楽死)、および施設について検証し、2008年の時点で30カ国、750研究機関以上 (我が国は5機関) が認定された (黒澤努、私信)。一方、文部科学省関連のものとしては、大学に対する第三者評価機関として、国立大学法人動物実験施設協議会・公私立大学実験動物施設協議会による相互認証制度がある (www.kokudoukyou.org/kensyou/iken_bosyu/sougokensyou_03.doc)。また、農林水産省関連のものとしては、実験動物生産者に対する日本実験動物共同組合の制度がある。

一方、厚生労働省傘下の機関においても、第三者評価機関の必要性が認識され、ヒューマンサイエンス振興財団に動物実験実施施設認証センターが設立され、2008年8月より業務を開始し、これまでに6機関が認証された。この調査は、動愛法および厚生労働省や環境省の動物実験に関する基本指針 (飼養・保管基準を含む) を根拠法令とし、動物愛護に配慮しつつ、科学的観点に基づく適正な動物実験等の実施の推進を図るための自主管理に関する外部評価・検証することを目的としている。実際の審査においては、1) 施設の規程や動物実験委員会活動等、2) 動物実験計画の立案状況、3) 実験動物の飼養・保管、記録、内部監査の状況に関する書類審査と、その後に行われる実地調査による、1) 実施機関における動物実験実施にかかる運用、2) 機関の長の実務の状況、3) 実験責任者の実務状況、4) 動物実験委員会の審査・助言の状況等、5) 動物実験に関連する他法令の実施状況、6) 飼育管理・実験者の管理状況、7) 自己点検、公開情報等の文書における確認、8) ラボツァーによる動物実験の状況の確認、および9) 実施機関の長、動物実験委員会委員長等とのヒアリングを基礎としている。また、評価のポイントは、以下のように説明されている。

- 1) 実施機関における自主管理体制の整備

実施機関の長の指名、機関内規程の制定、動物実験委員会の任命、自主点検、自主点検結果の公表、飼養保管管理体制の構築等。

- 2) 動物実験委員会の機能発揮状況

実効性のある委員会の運用、審査の記録、機関の長への助言 (国内外の状況を勘案

し、飼養保管管理体制も含めて対応を考慮)。

3) 透明性, 説明責任への配慮

当事者でない者からみて, 理解できるものであることも考慮すべき

4) 施設の目的・規模, 実施する動物実験の種類等種々の要因を踏まえた適切な方法での実施

外部評価・検証を行うことは, 科学的・倫理的に適切な動物実験の実施につながる。また, 動物実験に関して3省から通知された基本指針や「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(日本学術会議)に示された「当該機関等以外の者による検証を行うことを考慮する」とされた内容の遵守につながるとともに, 基本指針に示された自主管理に係る透明性を確保できる。更に, 動物実験実施者が社会的責任を果たしていることを, 社会に明示できるというメリットがある。薬理学会会員においても, 法令および薬理学会の動物実験に関わる指針に研究機関が誠実に対応し, 第三者評価によりそれが保証されることは, 不必要な実験動物使用の回避や動物に与える苦痛の削減に対する努力が一般の人々に認められ, 科学者に対する社会の信頼を得, 研究に必要な動物実験への理解を高めるのに役立つものと考えられる。

謝辞: AAALACに関する情報は大阪大学医学部附属実験動物施設の黒澤努先生より, ヒューマンサイエンス振興財団の動物実験施設第三者認証に関わる情報は, 当財団の佐々木弥生ヒューマンサイエンス技術移転センター長より提供を受けた。ここに感謝する。

文 献

- 1) 環境省告示第88号: 実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(平成18年4月28日)
- 2) 文部科学省告示第71号: 研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月1日)
- 3) 厚生労働省通知 科発0601002号: 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月1日)
- 4) 農林水産省通知: 農林水産省の所管する研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月1日)
- 5) 日本学術会議: 動物実験の適正な実施に向けたガイドライン(平成18年6月1日)
- 6) 日本学術会議第7部報告: 動物実験に対する社会的理解を促進するために(提言)(平成16年7月15日)

資料1

「動物の愛護及び管理に関する法律」抜粋

最終改正：平成18年6月2日法律第50号

第一章 総則

(目的)

第一条

この法律は、動物の虐待の防止、動物の適正な取扱いその他動物の愛護に関する事項を定めて国民の間に動物を愛護する気風を招来し、生命尊重、友愛及び平和の情操の涵養に資するとともに、動物の管理に関する事項を定めて動物による人の生命、身体及び財産に対する侵害を防止することを目的とする。

(基本原則)

第二条

動物が命あるものであることにかんがみ、何人も、動物をみだりに殺し、傷つけ、又は苦しめることのないようにするのみでなく、人と動物の共生に配慮しつつ、その習性を考慮して適正に取り扱うようにしなければならない。

第五章 雑則

(動物を科学上の利用に供する場合の方法、事後措置等)

第四十一条

動物を教育、試験研究又は生物学的製剤の製造の用その他の科学上の利用に供する場合には、科学上の利用の目的を達することができる範囲において、できる限り動物を供する方法に代わり得るものを利用すること、できる限りその利用に供される動物の数を少なくすること等により動物を適切に利用することに配慮するものとする。

- 2 動物を科学上の利用に供する場合には、その利用に必要な限度において、できる限りその動物に苦痛を与えない方法によってしなければならない。
- 3 動物が科学上の利用に供された後において回復の見込みのない状態に陥っている場合には、その科学上の利用に供した者は、直ちに、できる限り苦痛を与えない方法によってその動物を処分しなければならない。

第六章 罰則

第四十四条

愛護動物をみだりに殺し、又は傷つけた者は、一年以下の懲役又は百万円以下の罰金に処する。

- 2 愛護動物に対し、みだりに給餌又は給水をやめることにより衰弱させる等の虐待を行った者は、五十万円以下の罰金に処する。
- 3 愛護動物を遺棄した者は、五十万円以下の罰金に処する。
- 4 前三項において「愛護動物」とは、次の各号に掲げる動物をいう。
 - 一 牛、馬、豚、めん羊、やぎ、犬、ねこ、いえうさぎ、鶏、いえばと及びあひる
 - 二 前号に掲げるものを除くほか、人が占有している動物で哺乳類、鳥類又は爬虫類に属するもの