

Table 1. Continued.

Affymetrix probe ID	Correlation coefficient		Gene Symbol	Annotation
	Spearman's	Pearson's		
1390208_at	-0.586	-0.522	Htatip2_predicted	HIV-1 tat interactive protein 2, homolog (human) (predicted)
1371995_at	-0.802	-0.762	Klhl21_predicted	kelch-like 21 (Drosophila) (predicted)
1374879_x_at	-0.525	-0.490	Larp5_predicted	La ribonucleoprotein domain family, member 5 (predicted)
1388709_at	-0.683	-0.558	LOC362703	similar to WD-repeat protein 43
1384101_at	-0.682	-0.722	LOC682507	similar to Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP)
1373761_at	-0.530	-0.535	LOC686611	similar to Protein FAM60A (Tera protein)
1373282_at	-0.596	-0.503	LOC686808	similar to mitochondrial carrier protein MGC4399
1372869_at	-0.554	-0.510	LOC689842	similar to Nucleolar GTP-binding protein 1 (Chronic renal failure gene protein) (GTP-binding protein NGB)
1373904_at	-0.749	-0.702	Lysmd2_predicted	LysM, putative peptidoglycan-binding, domain containing 2 (predicted)
1393239_at	-0.349	-0.462	Mtfr1_predicted	Mitochondrial fission regulator 1 (predicted)
1387950_at	-0.644	-0.629	Nip7	nuclear import 7 homolog (S. cerevisiae)
1373445_at	-0.732	-0.645	Nol8_predicted	nucleolar protein 8 (predicted)
1373737_at	-0.664	-0.674	ORF19	open reading frame 19
1376118_at	-0.603	-0.543	Otub2_predicted	OTU domain, ubiquitin aldehyde binding 2 (predicted)
1374438_at	-0.447	-0.460	Otud4	OTU domain containing 4
1374612_at	-0.669	-0.585	Papd5_predicted	PAP associated domain containing 5 (predicted)
1388355_at	-0.751	-0.650	Rbm17	RNA binding motif protein 17
1389065_at	-0.458	-0.498	Rbm34	RNA binding motif protein 34
1389228_at	-0.685	-0.607	RGD1304825_predicted	similar to RIKEN cDNA 2010309E21 (predicted)
1372185_at	-0.621	-0.634	RGD1306582	similar to RIKEN cDNA 2610205E22
1390392_at	-0.754	-0.718	RGD1309602_predicted	similar to RIKEN cDNA 2500001K11 (predicted)
1372329_at	-0.657	-0.627	RGD1311435	similar to hypothetical protein PRO0971
1373049_at	-0.492	-0.490	RGD1562136_predicted	similar to D1Ertd622e protein (predicted)
1388900_at	-0.719	-0.671	RGD1566118_predicted	RGD1566118 (predicted)
1372871_at	-0.717	-0.711	RGD735175	hypothetical protein MGC:72616
1375565_at	-0.513	-0.518	Timm22	translocase of inner mitochondrial membrane 22 homolog (yeast)
1390237_at	-0.573	-0.351	Timm8a	translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog a (yeast)
1373277_at	-0.624	-0.577	Tm2d3_predicted	TM2 domain containing 3 (predicted)
1374793_at	-0.518	-0.522	Wdr3_predicted	WD repeat domain 3 (predicted)
1371729_at	-0.473	-0.544	Ypel5	yippee-like 5 (Drosophila)
1390476_at	-0.740	-0.680	Zbtb39_predicted	Zinc finger and BTB domain containing 39 (predicted)
1373767_at	-0.634	-0.552	Zfand2a	zinc finger, AN1-type domain 2A

Glutathione-depletion responsive genes in rat liver.

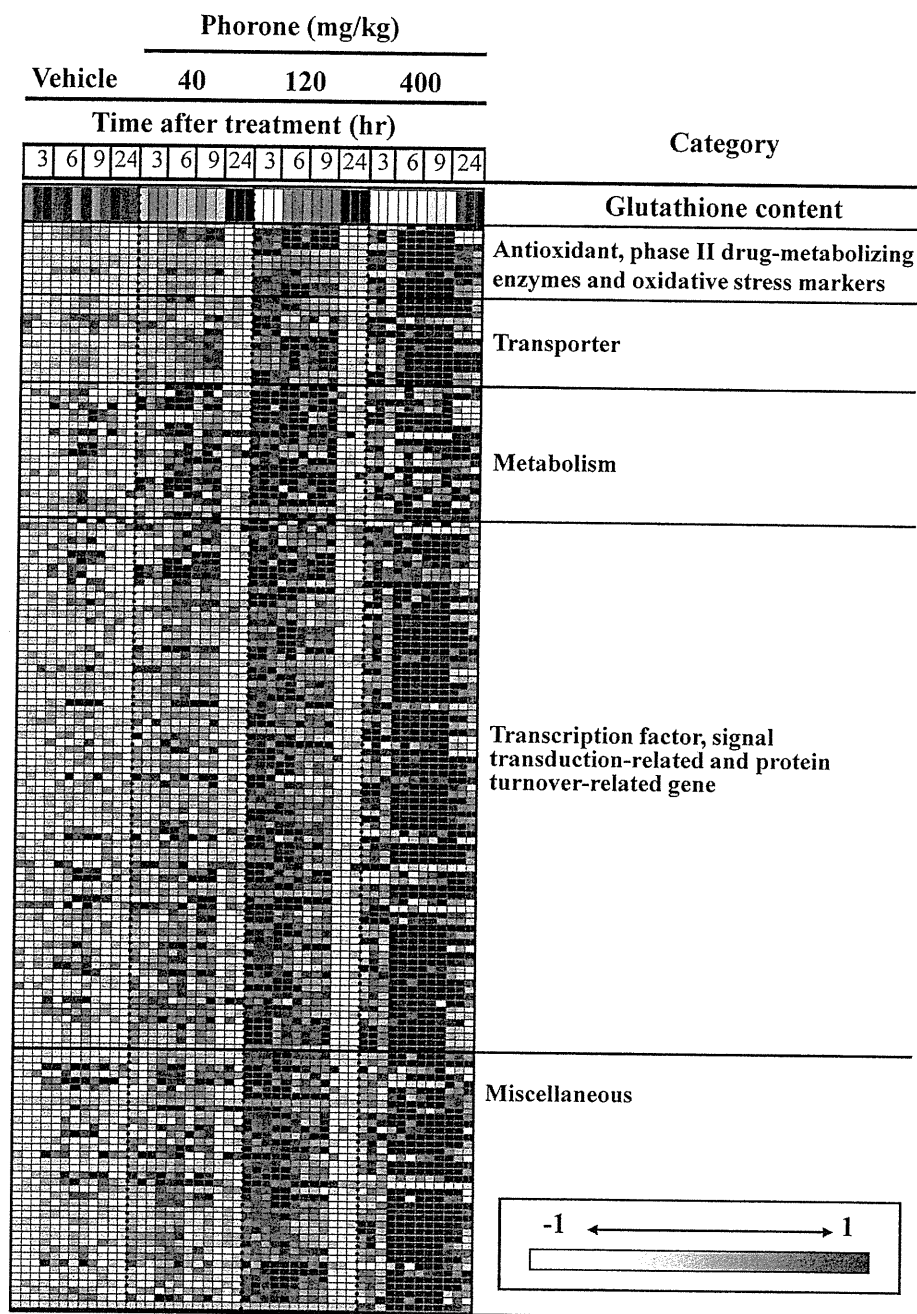


Fig. 3. Heat map representing glutathione content and gene expression level in rat liver treated with phorone.

Glutathione content and GeneChip signal data for GSH probe sets, obtained from rat livers treated with phorone or vehicle, are transformed to z-score by row, and are presented as a heat map where low and high scores are colored in white and black, respectively. Each row represents a probe set, and the vertical order of the probe sets is the same as that presented in Table 1. Each column represents individual rats treated either with phorone or vehicle.

Table 2. Plasma biochemistry and histopathological findings in rat liver treated with various prototypical hepatotoxicants.

Chemical	Dose (mg/kg)	Serum ALT activity (IU/L)		Serum AST activity (IU/L)		Histopathological findings observed in rat livers (number of animals)
		Control	Treated	Control	Treated	
Acetaminophen	1000	37.0 ± 3.1	51.0 ± 17.2	59.0 ± 6.3	76.4 ± 14.1*	Increased eosinophilia of hepatocyte: central (3/5) Inflammatory infiltration: central (5/5)
Bromobenzene	300	50.8 ± 6.4	113.6 ± 49.9*	79.6 ± 7.0	481.0 ± 377.8	Hypertrophy, eosinophilic granular change (5/5) Cellular infiltration, centrilobular (5/5) Swelling, centrilobular (4/5) Necrosis, centrilobular (4/5)
Clofibrate	300	34.0 ± 5.5	38.0 ± 6.3	66.4 ± 8.0	79.0 ± 14.2	No findings
Chlorpromazine	45	32.4 ± 4.9	31.8 ± 1.8	62.2 ± 4.9	74.6 ± 8.4*	No findings
Glibenclamide	1000	32.2 ± 4.5	35.6 ± 2.9	61.4 ± 3.8	69.2 ± 4.7*	No findings
Methapyrilene	100	41.6 ± 9.5	68.4 ± 17.6*	71.8 ± 6.8	109.6 ± 25.7*	Single cell necrosis, hepatocyte (5/5) Hypertrophy, hepatocyte (5/5) Cellular infiltration, mononuclear cell, periportal (5/5) Anisonucleosis, hepatocyte (5/5)
Phenylbutazone	200	34.8 ± 4.8	49.4 ± 18.4	67.0 ± 6.3	76.6 ± 7.6	No findings
Aspirin	450	34.8 ± 5.3	44.2 ± 15.6	63.8 ± 4.5	75.6 ± 12.6	No findings
Carbon tetrachloride	300	37.2 ± 2.7	42.2 ± 4.6	66.6 ± 4.0	75.0 ± 13.3	Degeneration, hydropic: centrilobular (4/5) Cellular infiltration: centrilobular (3/5) Degeneration, fatty: centrilobular (4/5)
Coumarin	150	37.0 ± 3.9	40.2 ± 8.4	64.4 ± 8.6	85.8 ± 26.3	Hypertrophy, centrilobular (3/5)
Hexachlorobenzene	300	40.2 ± 8.7	47.0 ± 7.1	66.6 ± 3.3	69.2 ± 4.8	No findings
Perhexiline maleate	150	42.6 ± 5.9	50.0 ± 5.8	66.4 ± 5.1	71.6 ± 7.4	No findings
Thioacetamide	45	32.5 ± 3.4	137.2 ± 37.8**	63.5 ± 3.0	713.8 ± 542.6	Hypertrophy: centrilobular (5/5) Cellular infiltration, inflammatory (5/5) Change, eosinophilic hepatocyte (5/5) Necrosis, centrilobular (5/5)

Rat groups consisting of 5 animals were administered with the compounds listed in the table and euthanized 24 hr after treatment. Both blood chemistry and histopathology data are summarized using the 5 rats. Note that microarray analysis was conducted using 3 rats out of the 5. The data are presented as mean ± S.D. * and **, p<0.05 and p<0.01, respectively, determined by two-sample *t*-test.

Glutathione-depletion responsive genes in rat liver.

hexachlorobenzene or perhexiline maleate did not show any histopathological changes.

Gene expression analysis for rat liver treated with various hepatotoxicants

PCA was performed using GSH probe sets for GeneChip data obtained from rat livers 24 hr after treatment with various prototypical hepatotoxicants (Fig. 4). It was obvious from the figure that a few compounds were distributed to the direction of the first principal component (PC 1) with relatively high contribution (57.6%), i.e., 300 mg/kg bromobenzene, 150 mg/kg coumarin, 1000 mg/kg acetaminophen, and 45 mg/kg thioacetamide, in that order. Rats treated with other chemicals or corresponding vehicles showed no apparent shift toward the PC 1 axis, but showed dispersed distributions along the PC 2 axis.

Glutathione content in rat livers treated with bromobenzene

From PCA using GSH probe sets, we found that bromobenzene was the most potent GSH-depletor among the compounds tested. In order to confirm this, hepatic glutathione content in the liver treated with this compound was actually quantified. It was found that the contents were significantly reduced 3, 6 and 9 hr after 300 mg/kg bromobenzene treatment (Fig. 5). It appeared that some of the treated rats showed recovery or rather rebound of GSH contents 24 hr after treatment since the mean value recovered to the control level with large variance.

Time-course of gene expression profile in rat liver treated with bromobenzene

In order to analyze the time dependent correlation between GSH contents and gene expression changes, PCA was performed by adding the data of 3, 6, and 9 hr after bromobenzene treatment to the same

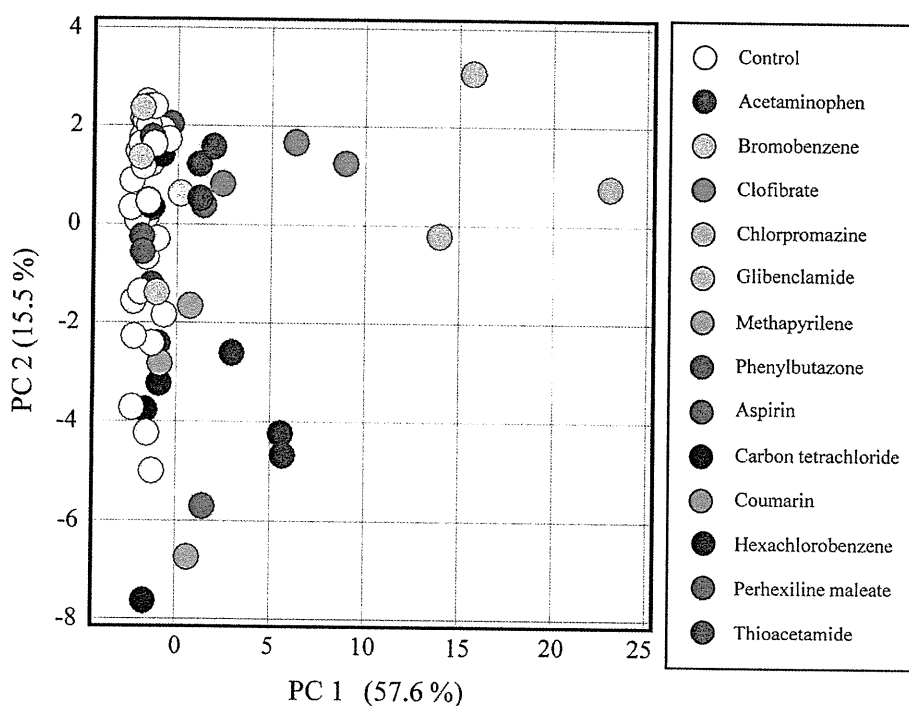


Fig. 4. PCA for GeneChip data of rat liver 24 hr after treatment with various hepatotoxicants. PCA was performed using GSH probe sets for GeneChip data of rat livers 24 hr after treatment with various hepatotoxicants. Each spot, colored by chemical type, represents individual samples. Bromobenzene, coumarin, and acetaminophen showed apparent shift from control, suggesting a perturbation of glutathione homeostasis in the liver after treatment.

data in Fig. 4. Fig. 6 shows that signal profiles of GSH probe sets did not apparently differ from those of controls, 3 and 6 hr after 300 mg/kg bromobenzene treatment. After 9 hr, they shifted away toward both PC1 and PC2 axis, approaching the position of 24 hr on PC1 axis.

DISCUSSION

Hepatic total glutathione content was significantly decreased in all the phorone-treated groups 3 hr after treatment (Fig. 2). After acute glutathione depletion, the hepatic glutathione content gradually recovered from 6 hr in the phorone-treated group (40 and 120 mg/kg), resulting in a significantly higher glutathione content, compared to the vehicle-treated rats

24 hr after treatment. Plasma ALT activity was elevated from 9 hr after 400 mg/kg phorone treatment, suggesting slight hepatocellular injury. Since secondary undesirable effects caused by slight hepatotoxicity (other than glutathione depletion) might affect the gene expression profile, we excluded GeneChip data of the 400 mg/kg phorone-treated rats from analysis for identification of the glutathione depletion-responsive gene probe sets. Previously, candidate marker genes whose mRNA levels were inversely correlated with hepatic glutathione content were identified using L-buthionine-[S,R]-sulfoximine (BSO) as a glutathione-depleting agent (Kiyosawa *et al.*, 2004). In the present study, we used phorone as a glutathione-depleting agent instead of BSO. We identified a total of 161 probe sets, referred to as 'GSH probe sets', whose signal showed

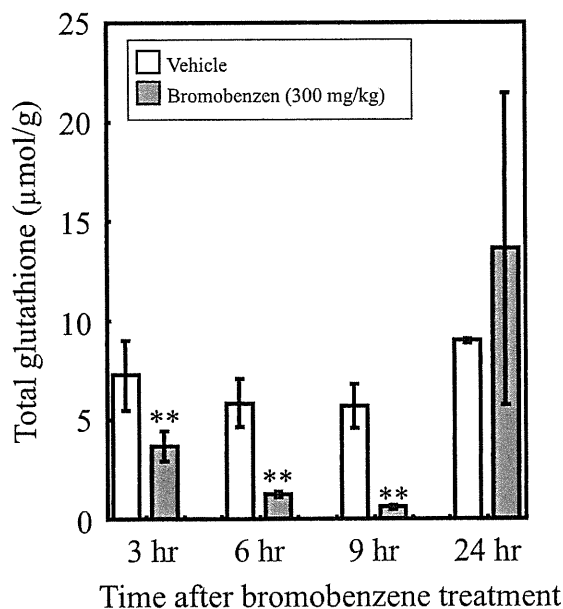


Fig. 5. Glutathione content in rat liver treated with bromobenzene.

Three rats per group were treated with 300 mg/kg bromobenzene or vehicle, and the livers were removed 3, 6, 9 and 24 hr after treatment. Hepatic glutathione content (total) was measured and the data are presented as mean \pm S.D. Hepatic glutathione content was significantly decreased 3, 6 and 9 hr after bromobenzene treatment, and recovered 24 hr after treatment, although the glutathione level showed a high variability at this time point. **, $p < 0.01$ determined by two-sample *t*-test.

Glutathione-depletion responsive genes in rat liver.

an inverse correlation with hepatic glutathione content.

The present study had two advantages compared with the BSO study previously reported. First, the glutathione-depleting mechanism differs from phorone (a reactor to GSH thiol) and BSO (an inhibitor of gamma-glutamylcysteine synthetase). Comparing the two glutathione-depleting mechanisms, the phorone-induced one is thought to be more similar to drug-induced glutathione depletion (as in the acetaminophen overdose-induced one) where hepatic glutathione is depleted by elevated elimination, not by inhibition of glutathione synthesis. Second, the present study set multiple dose ranges and time points. The total number of rats tested in the phorone study was 36 (twelve 400 mg/kg phorone-treated rats were excluded from the gene selection procedure), whereas the previous BSO study used only 8 rats (Kiyosawa *et al.*, 2004). Thus, the GSH probe sets identified in the present study would give us more

reliable information for evaluation of the potential risk of drug-induced glutathione depletion.

The GSH probe sets contained antioxidant/phase II drug-metabolizing enzymes, oxidative stress markers, transporters, metabolism-related genes, transcription factors and signal transduction-related genes, and others. GSH probe sets contain a modifier subunit of glutamate cysteine ligase gene, which encodes a key enzyme for glutathione synthesis (Moinova and Mulcahy, 1999). In addition, a prototypical oxidative stress-responsive gene, heme oxygenase I, which is reported to be regulated by oxidative stress sensor Nrf2 (Nguyen *et al.*, 2003), was identified as GSH probe sets. Furthermore, several genes were found to be in common with previously reported gene sets identified from the BSO-induced glutathione depletion model rat, such as GTP cyclohydrolase I and HMG-CoA reductase (Kiyosawa *et al.*, 2004). On the other hand, a

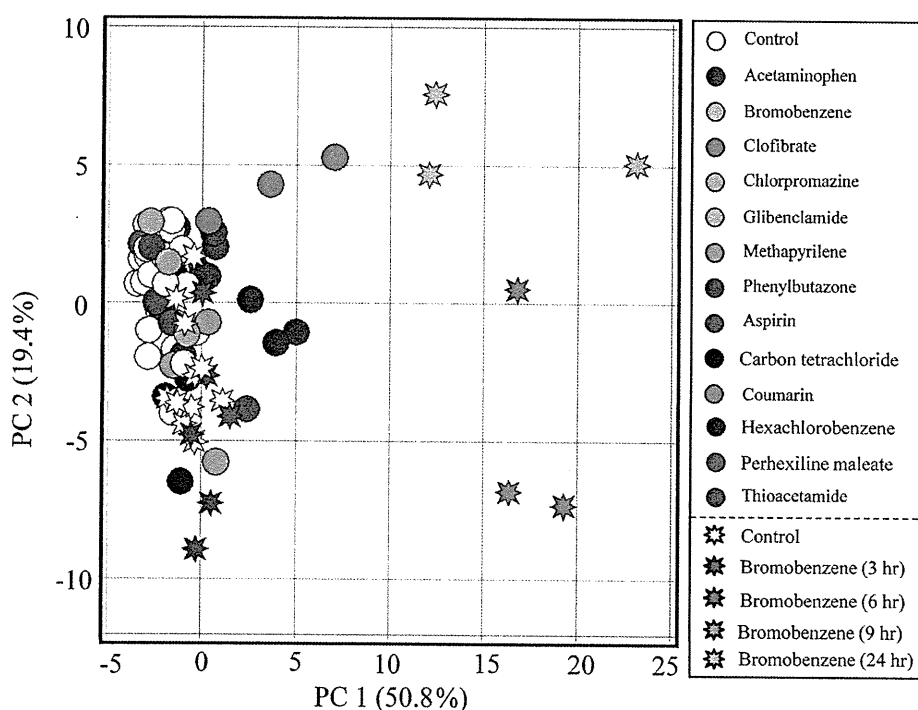


Fig. 6. Time-course of gene expression profile in rat liver treated with bromobenzene. PCA was performed using GSH probe sets for GeneChip data of rat livers 3, 6, 9 and 24 hr after 300 mg/kg bromobenzene treatment, as well as those 24 hr after treatment with hepatotoxicants, which are the same as those shown in Fig. 4. Each spot colored by chemical types represents individual samples. Gene expression profiles of rats treated with bromobenzene did not show an apparent shift away from corresponding controls 3 and 6 hr after treatment. Those 9 and 24 hr after treatment showed an apparent shift from the controls.

difference in the content of probe sets, compared with that identified from BSO-treated rats was observed, for instance, glutathione *S*-transferase genes or metallothionein genes, which were induced by BSO but not by phorone (Kiyosawa *et al.*, 2004). Although the strain and the age of the rats were not matched between the two studies (6 week old male Crj:CD(SD)IGS rats vs. 9 week old male F344Cu/Drj rats) the difference could be mainly due to the difference of the GSH-depleting mechanism between phorone and BSO.

To examine the toxicological significance of the GSH probe sets, we conducted PCA on GeneChip data obtained from rats treated with 13 prototypical hepatotoxicants (Fig. 4). On the PCA map, rats treated with bromobenzene, coumarin, and acetaminophen showed apparent changes in hepatic gene expression profiles, and those treated with thioacetamide showed slight changes (Fig. 4). Bromobenzene-treated rats showed the most notable change in gene expression. Bromobenzene was reported to be oxidized to a reactive metabolite in liver, depleting hepatic glutathione (Chakrabarti, 1991; Heijne *et al.*, 2004).

Coumarin-treated rats showed the second most affected gene expression profile in PCA. It was reported that a single coumarin treatment reduced the hepatic content of non-protein sulfhydryl groups (Lake *et al.*, 1989), and this is thought to reflect the decrease in glutathione content. Furthermore, coumarin was shown to decrease glutathione content in rat hepatocyte as well (Lake *et al.*, 1989). Reactive metabolites generated from coumarin oxidation in liver were thought to play a role in coumarin-induced glutathione depletion and hepatotoxicity (Lake, 1984; Lake *et al.*, 1989). Since no apparent hepatotoxicity was evident in both the histopathology and plasma biochemistry data (Table 2), the PCA result would reflect the potential risk of coumarin-induced glutathione-depletion.

Acetaminophen and thioacetamide are known to deplete or reduce glutathione in liver when overdosed (Mesa *et al.*, 1996). In the present study, acetaminophen- or thioacetamide treated rat showed no dramatic change in the gene expression profile compared to bromobenzene. Considering the plasma chemistry data, rats treated with acetaminophen or thioacetamide did not show apparent hepatotoxicity within 24 hr after single dose, whereas those treated with bromobenzene apparently showed it, suggesting that glutathione depletion, expression profile of GSH probe sets, and toxicological phenotype are well correlated with each other.

We also investigated the time-course of glu-

tathione content and gene expression profile in rat livers treated with bromobenzene, and this showed the most notable gene expression change of all of the examined hepatotoxicants (according to the PCA result). Bromobenzene rapidly depleted hepatic glutathione 3 hr after treatment, and the glutathione content was the lowest 9 hr after treatment (Fig. 5). Hepatic glutathione content recovered from initial depletion until 24 hr after the bromobenzene treatment, and such recovery has been previously reported (Chakrabarti, 1991; Heijne *et al.*, 2004). On the other hand, gene expression changes had not been apparent 3 and 6 hr after the bromobenzene treatment, but appeared 9 and 24 hr after treatment. Although hepatic glutathione content was recovered at 24 hr after the bromobenzene treatment, a changed level in gene expression was most prominent at this time point. This result depicts a characteristic of the gene expression profile in that it does not reflect the status of hepatic glutathione content itself, but the nuclear activity to maintain glutathione homeostasis in the liver against bromobenzene-induced glutathione depletion. It should be noted, that although the hepatic glutathione content was recovered 24 hr after bromobenzene treatment, the potential risk of bromobenzene-induced glutathione depletion does exist. In general, hepatic glutathione depletion caused by chemical treatments occurs immediately, followed by rapid recovery by glutathione re-synthesis (Meister and Anderson, 1983). Since the time point of sacrifice in ordinal toxicity studies is set to 24 hr after chemical treatment in many cases, measurement of glutathione content might overlook the risk of the glutathione-depleting potential of the tested chemicals, because 24 hr is enough time for the recovery of glutathione content after acute glutathione depletion. Instead, gene expression profiling is considered to be appropriate for evaluating the glutathione-depleting potential of chemicals, rather than measuring glutathione content, especially in later time points of chemical treatment. This characteristic of gene expression profiling, namely toxicogenomics analysis, would allow for safety assessment of chemicals in drug development.

In conclusion, a total of 161 probe sets of RAE 230A GeneChip, referred as GSH probe sets, were identified using phorone-treated rats for evaluation of drug-induced glutathione depletion. The significance of the identified GSH probe sets was evaluated using the TGP database, where prototypical glutathione depletors successfully showed characteristic changes in the signal levels of GSH probe sets. The time-course

of glutathione content and the gene expression profile showed that gene expression profiling could detect the glutathione-depleting potential of chemicals in later time points, e.g., 24 hr after chemical treatment, where hepatic glutathione content had recovered from acute and transient depletion at earlier time points. Therefore, toxicogenomics analysis using identified GSH probe sets would be an invaluable methodology for assessing a drug's potential risk of glutathione depletion, possibly leading to hepatotoxicity.

ACKNOWLEDGMENT

This study was supported in part by a grant from the Ministry of Health, Labor and Welfare (H14-Toxico-001).

REFERENCES

- Boverhof, D.R. and Zacharewski, T.R. (2006) : Toxicogenomics in risk assessment: Applications and needs. *Toxicol. Sci.*, **89**, 352-360.
- Boyland, E. and Chasseaud, L.F. (1967) : Enzyme-catalysed conjugations of glutathione with unsaturated compounds. *Biochem. J.*, **104**, 95-102.
- Chakrabarti, S.(1991): Potential tolerance against bromobenzene-induced acute hepatotoxicity due to prior subchronic exposure. *Arch. Toxicol.*, **65**, 681-684.
- Dahlin, D.C., Miwa, G.T., Lu, A.Y. and Nelson, S.D. (1984): *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine: a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **81**, 1327-1231.
- Heijne, W.H., Slitt, A.L., Van Bladeren, P.J., Groten, J.P., Klaassen, C.D., Stierum, R.H. and Van Ommen, B. (2004): Bromobenzene-Induced Hepatotoxicity at the Transcriptome Level. *Toxicol. Sci.*, **79**, 411-422.
- James, L.P., Mayeux, P.R. and Hinson, J.A. (2003): Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug. Metab. Dispos.*, **31**, 1499-1506.
- Kaplowitz, N.(2004): Drug-induced liver injury. *Clin. Infect. Dis.*, **38**, Suppl. 2, S44-48.
- Kiyosawa, N., Ito, K., Sakuma, K., Niino, N., Kanbori, M., Yamoto, T., Manabe, S. and Matsunuma, N. (2004): Evaluation of glutathione deficiency in rat livers by microarray analysis. *Biochem. Pharmacol.*, **68**, 1465-1475.
- Lake, B.G. (1984): Investigations into the mechanism of coumarin-induced hepatotoxicity in the rat. *Arch. Toxicol., Suppl.* **7**, 16-29.
- Lake, B.G., Gray, T.J., Evans, J.G., Lewis, D.F., Beamand, J.A. and Hue, K.L. (1989): Studies on the mechanism of coumarin-induced toxicity in rat hepatocytes: Comparison with dihydrocoumarin and other coumarin metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **97**, 311-323.
- Li, A.P. (2002): A review of the common properties of drugs with idiosyncratic hepatotoxicity and the "multiple determinant hypothesis" for the manifestation of idiosyncratic drug toxicity. *Chem. Biol. Interact.*, **142**, 7-23.
- Liu, G., Loraine, A.E., Shigeta, R., Cline, M., Cheng, J., Valmeekam, V., Sun, S., Kulp, D. and Siani-Rose, M.A. (2003): NetAffx: Affymetrix probesets and annotations. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 82-86.
- Lu, S.C. (1999): Regulation of hepatic glutathione synthesis: Current concepts and controversies. *FASEB J.*, **13**, 1169-1183.
- Meister, A. and Anderson, M.E. (1983) Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.*, **52**, 711-760.
- Mesa, M.L., Carrizosa, R., Martinez-Honduvilla, C., Benito, M. and Fabregat, I. (1996): Changes in rat liver gene expression induced by thioacetamide: Protective role of S-adenosyl-L-methionine by a glutathione-dependent mechanism. *Hepatology*, **23**, 600-606.
- Mitchell, J.R., Jollow, D.J., Potter, W.Z., Gillette, J.R. and Brodie, B.B. (1973): Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **187**, 211-217.
- Moinova, H.R. and Mulcahy, R.T. (1999): Up-regulation of the human gamma-glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene involves binding of Nrf-2 to an electrophile responsive element. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **261**, 661-668.
- Nguyen, T., Sherratt, P.J. and Pickett, C.B. (2003): Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **43**, 233-260.
- Orphanides, G.(2003): Toxicogenomics: Challenges and opportunities. *Toxicol. Lett.*, **140-141**, 145-148.
- Parkinson, A. (2001): Biotransformation of xenobiotics. In (Klaassen, C.D., ed.), pp. 133-224, Casarett and Doull's Toxicology, McGraw-Hill,

- New York.
- Rockett, J.C. and Dix, D.J. (2000): DNA arrays: Technology, options and toxicological applications. *Xenobiotica*, **30**, 155-177.
- Snedecor, G.W. and Cochran, W.G. (1989): *Statistical Methods*, 8th ed., Iowa State University Press.
- Takashima, K., Mizukawa, Y., Morishita, K., Okuyama, M., Kasahara, T., Toritsuka, N., Miyagishima, T., Nagao, T. and Urushidani, T. (2006): Effect of the difference in vehicles on gene expression in the rat liver-analysis of the control data in the Toxicogenomics Project Database. *Life Sci.*, **78**, 2787-2796.
- Urushidani, T. and Nagao, T. (2005): Toxicogenomics: the Japanese initiative. In (Borlak, J., ed.), pp. 623-631, *Handbook of Toxicogenomics-Strategies and Applications* Wiley-VCH.
- van Doorn, R., Leijdekkers, C.M. and Henderson, P.T. (1978): Synergistic effects of phorone on the hepatotoxicity of bromobenzene and paracetamol in mice. *Toxicology*, **11**, 225-233.

Drug Metab. Pharmacokinet.

Vol. 22, No. 2, April, 2007

レクチャーノート：
トキシコゲノミクスプロジェクト(2)
研究戦略

独立行政法人医薬基盤研究所
トキシコゲノミクスプロジェクト,
同志社女子大学薬学部病態生理
漆谷徹郎

レクチャーノート：

トキシコゲノミクスプロジェクト(2) 研究戦略

独立行政法人医薬基盤研究所
トキシコゲノミクスプロジェクト、
同志社女子大学薬学部病態生理
漆谷徹郎

前回述べたような経緯でトキシコゲノミクスプロジェクトの基本コンセプトが決定されたわけであるが、プロジェクト発足の2002年当時、マイクロアレイ技術は発展途上にあったものの、すでに米国では、その2年前にNational Center for Toxicogenomicsのプロジェクトが開始されており、ベンチャー企業の動きも盛んであった。また我が国でも、前年度から、新エネルギー・産業技術総合開発機構によって、マイクロアレイ技術による化学物質の発がん性予測を企図したプロジェクトが開始されていた。それらの先行プロジェクト、特にマイクロアレイデータを用いた安全性予測を請け負うとする欧米のバイオベンチャーに対抗して、本プロジェクト特有のメリットを付加する必要があった。そこで立てられた戦略は以下の4点であった。

- 1) 定量性に優れた Affymetrix 社 GeneChip を採用し、DNA 量に基づいた Spike RNA を添加して細胞1個あたりの mRNA 量を評価する手法(percellome)¹⁾を採用する。
- 2) 全被検化合物150は標準的医薬品を中心とし、副作用によって開発・市販中止となった薬物や、参加企業提供の独自化合物を含める。
- 3) 実験動物としてラットを採用し、単回・反復それぞれ4時点・4用量と、十分な用量・時間設定のもとに得られた各種毒性学的データのフルセットを、遺伝子発現データとリンクさせ、かつ関連情報と有機的に結びつけ、統合データベースとして構築する。
- 4) ラット一次培養肝細胞とヒト凍結肝細胞の系を用いて、種差のブリッジングを考慮する。

5年が経過した現在、データのデータベースへの格納が完了し、解析・予測システムとして、TG-GATEs: Genomics Assisted Toxicity Evaluation System developed by Toxicogenomics Project Japan がほぼ完成した。そこで、これらについて振り返って検証してみたい。

1)については、厳密なQCプロトコルを確立し、信頼性のある定量的遺伝子発現データが得られ、検証済のデータの格納が完了した。マイクロアレイデータは所詮信頼性に乏しく、最終的には定量PCRによって確認すべきであるとの意見が旧来の研究者から聞かれることがあるが、少

なくとも適切に管理された環境で取得された GeneChip データに関しては、PCR と同等、あるいはそれを凌駕する定量性と再現性が得られるというのが我々の感触であり、これは国際的にも認められつつある²⁾。また、実験開始当初、毒性発現時のような極端な条件下では遺伝子発現が極端に変動し、グローバル補正では発現値を標準化できないのではという危惧があり、percellome 補正を併用して解析を行ってきた。しかしながら、データが蓄積されるにつれ、明瞭なフェノタイプが認められる条件下であっても、少なくとも *in vivo* の肝臓における薬物影響を対照群との比較において解析する場合は、グローバル補正で問題なく行えることが確認できた。従って本プロジェクトの基本的な解析はグローバル補正法に基づいて行なわれている。ただし、組織や器官が異なる場合の解析には percellome 補正法が有用である場合もあり³⁾、必要に応じて細胞(DNA)当たりの発現量を計算できる環境を整えてある。

2)に関しては、前回述べたとおり、選択した化合物のターゲットは広範な治療領域をカバーし、典型的な薬物はほぼ網羅されている。世界的にも、実際に使用された、また現在も使用されている医薬品のトランスクリプトームデータをこの規模で揃えたデータベースは他に類を見ない。ただしここで問題となるのが「毒性とは何か」という問題である。環境毒性物質であれば No Observed Effect Level (NOEL) と No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) を区別して定義できる。しかしながら医薬品を対象にした場合、原理的に NOEL はあり得ず、観測された効果が adverse effect か否か、あるいは、期待される薬効と比較して許容範囲か否か、を決定する必要がある。トランスクリプトームデータに基づいて新規開発候補品の毒性発現を避けるのは、ある意味で簡単なことである。「疑わしい」遺伝子の動きを示した薬物の開発をすべて中止すればよいのである。しかしこのようなことをすれば、有用な医薬品が世に出ることがなくなり、人類の福祉にとって逆効果となるのは明らかであろう。この問題に対しては現在明確な答えをもっていないが、プロジェクトでは、毒性発現機序に基づいた解析を可能とするために、典型的な肝・腎毒性物質(四塩化炭素、ヘキサクロロベンゼンなど)や、毒性パスウェイが分子レベルで解明されつつある物質類(サイトカイン、タンパク合成阻害薬、グルタチオン枯渇薬など)のデータも取得してきた。TG-GATEs を活用して、毒性メカニズムが分子レベルで明らかになっていくことにより、将来、この問題に解答が得られることが期待される。

3)の用量・時間水準の充実であるが、この点が本プロジェクトの最大のメリットであると考えられる。マイクロアレイによって実質的に全遺伝子(5桁のオーダーの数)の発現変動を一気に測定できるとしても、コストを考

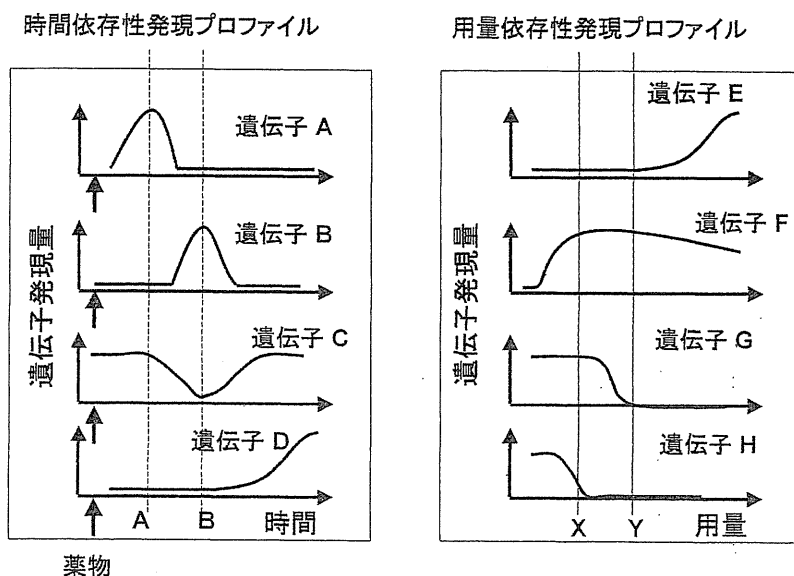


図 仮想的な遺伝子発現パターン

と、時点や用量水準は制限される。各測定点における例数は通常一桁であり、数万の遺伝子の変動解析に対して統計学は無効である。遺伝子発現解析において、個々の遺伝子の生物学的重要性は大きく異なるため、一律の統計学的処理では重要な変化を見逃す確率が高い。また、仮に各測定点における変動を正確に把握できたとしても、大きな問題が残される。図に、仮想的な遺伝子発現パターンを示した。遺伝子発現は、ある事象に次々に応答する連続的なパターンを示すことが予想され、図左側の時点 A と B の測定では、連続した事象のある断面しか得られない。また、用量反応性に関しても同様のことが成り立ち、用量 X と Y では異なった効果のように見えてしまう。仮に時点 A、用量 X のデータから予測アルゴリズムを構築できたとしても、これは時点 B、用量 Y のものとは全く異なるはずである。毒性メカニズムが同一の薬物ならば同様の時間・用量依存性を示す、ということが成り立つのであれば補正が可能であろうが、容易に推測できるように、メカニズムが同一でも、例えば薬物動態が異なっていれば、全く違う像が見えてしまうであろう。

本プロジェクトの目標が「医薬品の開発初期段階における肝・腎毒性の予測」である以上、いつ、何が起こるかわからない毒性を予測する場合、前もって用量や時点を制限してしまったようなデータベースの利用価値は限られたものになってしまう。実際、毒性学的に重要な多くの遺伝子発現が、同じ薬物であっても、種々の条件によって応答時間・用量に大きな差が出るが見出されてきている⁴⁾。この問題を計算科学的にどう克服していくかはこれからの課題であるが、少なくとも、リファレンスとなる薬物群について、充実した用量・時点でのデータを集積した

今回のデータベースの価値は非常に高いといえるであろう。

4) 種差のブリッジングの問題は、計画当初から困難が予想されていた。人体実験が不可能である以上、人型組織を持つ動物が *in vitro* のモデル系の 2 つしか可能性がない。前者はモデル系としてまだ未成熟であると考え、*in vitro* のモデル系を選択することとした。cell line は、系の均一性・再現性という点では優れているが、正常組織と cell line の遺伝子発現パターンはあまりにも異なるため、結果的に一次培養細胞を選択せざるを得なかった。すなわち、肝毒性に関して、ラット *in vivo* → ラット一次培養細胞系 → ヒト凍結肝細胞培養系 → ヒト臨床、というブリッジングを企図したのである。データが集積され、解析を行ってみると、種差も大きい、*in vitro* と *in vivo* の差も非常に大きく、単純なブリッジングの戦略は通用しないことが次第に明らかとなってきた。これはトキシコゲノミクス手法の限界というよりも、生物学的な限界である。しかしながら、フェノタイプや毒性パスウェイそれぞれについて、「種差を越えた適用可能」「種差が大きい」「*in vivo* と *vitro* のブリッジング不可能」などの分類・評価は可能であり、それだけでも有用な情報といえる。

生体は複雑系であり、それに対する薬物影響は実質上計算不能な事象である。最初からある生物学的応答に注目した場合は、絞られたプロトコルから得られた絞られた遺伝子の発現値を用いた定型的な予測アルゴリズムが設定可能であるかもしれないが、「新規化合物の未知の毒性」という、全く手がかりのない状態からの予測の場合、現在の生物学のレベルからいって、定型的アルゴリズムは設定不可能であるし、むしろ、採用してはならない戦略であろう。本プロジェクトで構築した TG-GATEs は、それぞれ

の化合物の特徴を多方面から捉え、それぞれの特徴がデータベース中でどのような位置づけにあるかを概観した後、研究者がそれぞれの切り口・視点で効率的に解析・予測して行くことを可能としたシステムである。予測困難な「毒性」という曖昧な実体を、研究者が多方面からの gates をくぐって探索することにより、理想的な薬物創製に役立てる — TG-GATEs にはそのような思いがこめられている。今回は、この TG-GATEs の内容を紹介する。

引用文献

- 1) Kanno J. et al., "Per cell" normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays. *BMC Genomics*. 7:64, 2006.
- 2) Canales, RD. et al., Evaluation of DNA microarray results with quantitative gene expression platforms. *Nature Biotech.* 24: 1115-1122, 2006.
- 3) Tamura, K. et al., Comparison of gene expression profiles among papilla, medulla and cortex in rat kidney. *J. Toxicol. Sci.* 31: 449-470, 2006.
- 4) Morishita, K. et al., Gene expression profile in liver of differing ages of rats after single oral administration of acetaminophen. *J. Toxicol. Sci.* 31: 491-508, 2006.

日本薬理学会の奨める動物実験 —苦痛の評価と軽減— 「はじめに」および日本薬理学会の新動物実験指針

大野 泰雄

要約：動物実験に対する社会の関心の高まりに伴い、平成 17 年 6 月に「動物の愛護及び管理に関する法律」が改正され、動物実験における 3R の原則を組み込まれた。また、文部科学省等の関連指針が改訂された。これらを考慮し、日本薬理学会は倫理的な動物実験を推進するために動物実験指針を作成した。本稿ではこれを紹介した。

最近の薬理学では細胞株等を用いる *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 (表 1)。しかし、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

表 1 第 77 回日本薬理学会でのポスター発表で用いられた試験系

試験系の種類	例数
In vivo 実験	185
薬物等で処理した動物から組織試料を採取して研究	32
動物から抽出した試料を用いて研究	118
	(335 69.6%)
In vitro 研究 (細胞株等を用いた研究)	95
屠殺場から入手した試料を用いた研究	17
ヒト試料を用いた研究	19
アフリカツメガエル卵母細胞を用いた研究	7
	(138 28.7%)
その他 (臨床試験, 情報研究等)	8
	(8 1.7%)
合計	481

(2005 年 3 月 8 日および 9 日に発表されたものについての調査結果)

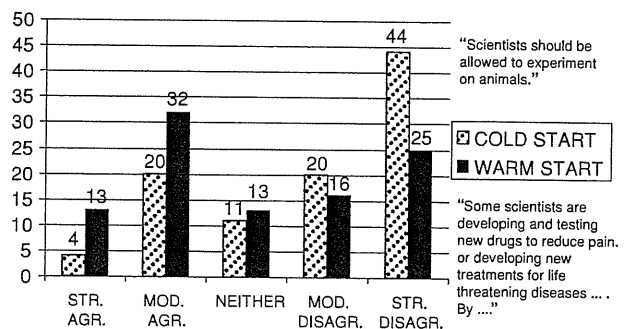


図 1 動物実験への一般人の反応 (New Scientist, 22 May, 1999, pp. 26-31, 1999 年英国での調査結果)

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

適切に対応しなければならない。即ち、薬理学研究における動物実験の意義を社会に示し、科学的に必要な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。図 1 に示したように、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。

日本薬理学会企画教育委員会では平成 16 年度より谷山紘太郎委員長の基、著者と昭和大学医学部の安原一教授および東京大学農学部尾崎博教授からなるワーキンググループ (WG) が組織された。WG では、

キーワード：動物実験, 薬理学会動物実験指針

国立医薬品食品衛生研究所 (〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1)

e-mail: ohno@nihs.go.jp 原稿受領日: 2006 年 10 月 2 日, 会誌編集委員会依頼原稿

Title: Animal experiments recommended by the Japanese Pharmacological Society (evaluation and decrease of pain): introduction and new guidelines for animal experiments for the Japanese Pharmacological Society. Author: Yasuo Ohno

適宜、企画教育委員会の意見を求めながら、Bologna宣言（表2）で代表されるような動物実験に関する外国の状況や国内外の指針等を参考に、学会の動物実験指針の見直しを進めてきた。

一方、平成17年6月動物実験に関する3Rの原則が「動物の愛護及び管理に関する法律」（動愛法）に組み込まれ、薬理実験においても、研究や教育、生産などに使用される動物を用いる方法を他のものに置き換え、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、また、同じ数の動物からより多くの情報をうること（reduction）、また、避けられない動物実験にあっては痛みや苦痛、および不快感を最低限にし、動物の福祉を向上させること（refinement）、が法的に義務づけられた（表3）。

更に、文部科学省、厚生労働省、および環境省ではそれぞれ所管する分野を対象に動物実験指針を作成し、平成18年4月-6月に通知した（環境省：「実験動物の飼育およ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、環境省告示第88号）」、文部科学省：「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、文部科学省告示第71号）」、厚生労働省：「厚生労働省の所管す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、厚生労働省通知科発0601002号）」が示された。また、日本学術会議も動物実験に関する詳細指針を作成し、通知した（平成18年6月1日、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」）。日本薬理学会ではこれらを踏まえて、従来の動物実験指針を改訂した。平成18年3月の薬理学会総会では、平成17年12月13日の理

表2 ポロニア宣言

動物実験の削減、純化、および置き換え 代替法および実験動物法
<p>第三回生命科学における代替法と動物使用に関する世界会議 において採択（1999, 8,31 イタリア, ポロニア）</p>
<p>Russell and Burch の「三つのR」、即ち削減（Reduction）、純化（Refinement）、および置き換え（Replacement）の源は1954年に開始された動物福祉のための大学連合（University Federation of Animal Welfare : UFAW）の活動にある。これが1959年にW.M.S. Russell and R.L. Burch (1) による「人道的な実験技術の原則（The Principles of Humane Experimental Technique）」の公刊につながっている。1978年にDavid Smythが代替法を三つのRとして定義して使用した (2)。</p>
<p>著書の中で、RussellとBurchは「科学における最も偉大な業績は常に最も人道的であり、かつ最も美的に引きつけるものであり、最も成功した時には科学の概要である美しさと優雅さを感じさせるものである」と述べている。彼らは以下のように定義している。</p>
<p>代替法における削減（Reduction Alternatives）とは科学的手法においてより少ない動物から同等の情報を得るための方法、あるいは同じ数の動物からより多くの情報を得るための方法である。</p>
<p>代替法における純化（Refinement Alternatives）とは痛みや苦痛、および不快感を弱めたり、最少限にし、動物の福祉を向上させるものである。</p>
<p>代替法における置き換え（Replacement Alternatives）とは動物を用いた実験や他の科学的な手段を用いずに当初の目的を達成するものである。</p>
<p>1. Russell WMS & Burch RL (1959). The Principles of Humane Experimental Technique. p.238. London: Methuen. 2. Smyth D (1978). Alternatives to Animal Experiments. p. 218. London: Scholar Press.</p>
<p>第三回生命科学における代替法と動物使用に関する世界会議の参加者は1959年にRussell & Burchにより提起された原則を承認するとともに再確認するものである。人道的な科学とは善なる科学のための前提であり、かつ実験動物手法に関しては、三つのRを強力に推進し、適用することにより達成されるものである。</p>
<p>三つのRは、全ての種類の科学、経済および人道主義的な便益を得るに際しての統一概念として、挑戦目標として、また、それらを得る機会として役立つべきである。</p>

表3 改訂「動物の愛護及び管理に関する法律」抜粋

<p>第41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。</p>
<p>2 科学上の利用に供する場合には、その利用の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。</p>
<p>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。</p>

事会で承認を受けた案をもとに説明したが、今回、各省庁の通知を踏まえて、新指針を作成したので、ここに紹介する。旧指針との対象を表4に示したが、大きなところは以下のとおり。

- 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本会の刊行する学術雑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。

なお、平成18年3月のシンポジウムではこの動物実験指針改訂案を示すとともに、適切な実験を行うための参考とするために、奈良先端科学技術大学院大学の佐藤公道先生（現：安田女子大学）に苦痛の薬理学と薬理実験法について、秋田大学医学部実験動物施設松田幸久先生に痛み・苦痛・安楽死の評価と基準について、昭和大学医学部第二薬理安原一先生と倉田知光先生に動物実験倫理委員会での審査の状況について、最後に大阪大学医学部動物実験施設黒澤孝先生に欧米で一般化してきている動物実験施設の第三者による査察について報告していただいた。

著者プロフィール

大野 泰雄（おおの やすお）

◇東京大学薬学系大学院博士過程修了，
国立医薬品食品衛生研究所副所長，第六
回国際動物実験代替法会議会長。
◇専門：薬物代謝と毒性，動物実験代替
法。◇薬剤師，日本トキシコロジー学会
認定トキシコロジスト。



表4 日本薬理学会動物実験指針新旧比較

	旧 指 針	新 指 針
前 文		<p>生命科学の急速な発展と社会に与える影響の著しい拡大により、一般社会にとっても、生命科学がより身近なものになっている。また、研究は多額の公的資金によって支えられており、薬理学を含む生命科学研究の推進において社会の支持が不可欠の要素となっている。</p> <p>一方、動物を用いた研究は薬理学の発展に大きな役割を果たして来たとし、今後もその意義が失われることはないと考えられる。しかし、動物実験については、社会に様々な考え方が存在することも事実である。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。</p> <p>そこで、日本薬理学会では「動物実験ガイドラインの策定に関する勧告」（昭和55年11月5日 総学庶第1513号日本学術会議会長）および「大学等における動物実験について（通知）」（昭和62年5月25日 文部省第141号文部省学術国際局長）に定められている事項のほか、日本薬理学会員（以下、会員という）が動物実験を計画、実施する際に、遵守すべき基本的事項を定め、平成4年と13年に「動物実験に関する日本薬理学会指針」を学会員に通知し、科学的、倫理的観点から適正な実験動物の飼養と動物実験の実施に努めてきた。一方、動物福祉への社会の関心が更に高まり、平成17年6月15日に「動物の愛護及び管理に関する法律（動愛法）」が改正され、動物実験に関する3Rの原則*の尊重が盛り込まれた。また、平成18年4月28日に「実験動物の飼育及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（環境省告示第88号）」が、平成18年6月1日に「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（文部科学省告示 第71号）」、「厚生労働省の所管する動物実験等の実施に関する基本指針（厚生労働省通知 科発0601002号）」、並びに日本学術会議から「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」が示されたことなど、わが国内外の動向も鑑み、指針を刷新することとした。</p> <p>日本薬理学会は本指針に従った動物実験が行われることを期待するとともに、これに反する研究の成果は本会の刊行する学術雑誌から排除する所存である。</p> <p>なお、遺伝子組換え動物に関しては、自然界への拡散を防止するため、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（平成15年法律第97号）」ならびに「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律施行規則（平成15年財務・文部科学・厚生労働・農林水産・経済産業・環境省令第1号）」が定められているが、これらの規制に関わる事項は対象外とした。</p> <p>*：充分な倫理的配慮を行った上、科学上の利用の目的を達する事が出来る範囲において、動物に与える苦痛を最小限にし（refinement）、動物使用数を削減し（reduction）、また、動物を用いない代替法がある場合にはそれを利用すること（replacement）。</p>

	旧 指 針	新 指 針
目 的	動物実験に関する日本薬理学会指針(以下、指針という)は、日本薬理学会員(以下、会員という)が動物実験を計画、実施する際に、「動物実験ガイドラインの策定に関する勧告」(昭和55年11月5日 総学庶第1513号日本学術会議会長)および「大学等における動物実験について(通知)」(昭和62年5月25日 文部省学術国際局長)に定められている事項のほか、遵守すべき基本的事項を定め、科学的、倫理的観点から適正な実験動物の飼養と動物実験を実施することを目的とする。	この指針は、大学およびその他の研究機関において行われる薬理学研究のための動物実験を計画し、実施する際に遵守すべき事項を示すことにより、科学的にはもとより、動物福祉の観点からも適正な動物実験の実施を促すことを目的とする。
適 用 範 囲	この指針は、会員によって行なわれる実験動物を用いるすべての動物実験に適用されるものとする。	この指針は、会員によって行なわれる実験動物*を用いるすべての動物実験に適用されるものとする。 *：考慮の対象とする実験動物の範囲は基本的に生命を有する脊椎動物とその胚であるが、無脊椎動物が含まれることもある。また、これら以外も本指針を参考にする。
基 本 原 則		会員は「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深く胸に刻み、ここに定められた事項を遵守するよう努めるとともに、動物実験に対する社会の動向や規制の移り変わりに留意し、常に適切な動物実験を実施するよう努めなくてはならない。 会員はヘルシンキ宣言のヒトを対象とする医学研究の倫理的原則(2002年追加)第12項に示された「研究に使用される動物の健康を維持し、または生育を助けるためにも配慮」や動愛法に示された動物実験に関する3Rの原則を尊重しなくてはならない。 薬理学研究を行う研究機関の責任者は、動物が適正に飼養され、適正な動物実験が行われるよう、施設を整備するとともに、研究機関毎の動物実験指針を策定し、研究者を教育しなければならない。また、動物実験委員会を設置し、研究機関内で行われる動物実験の法令や機関の定めた指針への適合性や科学的・倫理的妥当性を審査させるとともに、動物実験の実施結果の報告を受け、必要に応じて適正な動物実験実施のための改善措置をとらなければならない。 本指針の目的を達成することは、会員のみでの努力では困難である。研究機関の責任者や実験動物の専門家等の協力を得るよう努めなければならない。
実 験 者		動物実験を行おうとする研究者は動物実験を行うに際しての法令や規制・基準、倫理、麻酔法、鎮痛法、動物実験代替法についての教育、また、動物実験手技について訓練を受けていなければならない。
動 物 実 験 委 員 会		会員の属する研究機関においては、平成18年6月1日に示された文部科学省および厚生労働省の動物実験の実施に関する基本指針により、動物実験委員会を設置しなければならない。この委員会は動物実験が関係法令や機関の定めた指針に従い、科学的かつ倫理的に実施されるために動物実験計画を審査し、必要な助言を与え、また、適正な実施の監視を行う組織である。委員会は倫理的かつ科学的に妥当な動物実験を行う上で必要な知識と経験を有する実験動物の専門家、動物実験に関して優れた識見を有する者、その他必要と思われる者によって構成しなければならない。
動 物 実 験 場 所	動物実験は、適正に整備、管理された施設において、必要な設備のもとで行なわなければならない。	動物実験は、動物実験委員会が承認した、適正に整備、管理された施設において、必要な設備のもとで行なわなければならない。
実 験 動 物 飼 育 と 管 理	実験動物の取り扱いにあたっては、実験動物の生理、生態、習性ならびに飼育、管理方法に関する知識を十分にもたなければならない。	実験動物の入荷の際の検疫とそれ後の飼養については、そのための専門的な知識を有する動物管理責任者の協力を得て、適切な実験動物を確保すべきである。 動物実験の際の実験動物の取り扱いにあたっては、実験者自身も実験動物の生理、生態、習性ならびに飼育、管理方法に関する知識をもたなければならないが、それらの知識を十分にもつ専門家の助言を得ることも重要である。疾患モデル動物の作成や使用の場合においても同様である。

	旧 指 針	新 指 針
実験計画の立案	動物実験計画の立案にあたっては、その研究目的の達成に必要な最小限の実験にとどめ、適正な動物の選択および実験方法についての十分な配慮が必要である。また、適切な飼育環境（ケージの大きさ、収容動物数、温湿度、照明など）のもとに実験が実施できるよう実験計画を立案しなければならない。	動物実験計画の立案にあたっては、動物を用いないで、その研究目的を達成できる代替法の有無を考慮しなければならない。動物を用いる場合は、適正な動物種や系統を選択し、使用動物数と動物に与える苦痛を必要最小限にとどめるよう、実験方法についての十分な配慮が必要である。また、適切な飼育環境（ケージの大きさ、収容動物数、温湿度、照明など）のもとに実験が実施できるよう実験計画を立案しなければならない。 なお、実験計画は研究機関内の動物実験委員会による審査と承認を受けなければならない。
実験実施上の配慮	実験実施にあたっては、動物福祉の立場から、動物の不安や苦痛を、極力軽減するように努めなければならない。	動物実験は動物実験に熟達した者により、あるいはその指導のもとに行うべきである。また、動愛法および関連する規制・基準を遵守し、動物福祉の立場から、動物の不安や苦痛を、極力軽減するように努めなければならない。この際、国立大学法人動物実験施設協議会、NIH あるいは OECD の作成した安全性試験における人道的な指標に関するガイドラインが良い参考となる。 実験終了後の動物の取り扱いについては、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」(昭和 55 年 3 月 27 日 総理府告示第 6 号 平成 14 年 5 月 28 日 一部改正) に従い、動物をすみやかに苦痛から解放するように努めなければならない。実験途中であっても、研究目的達成上不適切な強い苦痛が現れた場合には、動物をすみやかに苦痛から解放するように努めなければならない。 安楽死の方法については、国立大学法人動物実験施設協議会(2004)や日本獣医師会の解説(2000)を参照されたい。 動物実験および本指針遵守に関わる記録は適切に保管されなければならない。
実験終了後の処置	実験終了後の動物の取り扱いについては、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」(昭和 55 年 3 月 27 日 総理府告示第 6 号) に従い、動物をすみやかに苦痛から解放するように努めなければならない。	
安全管理上の配慮	物理的、化学的に注意を要する試料、または病原体を用いた動物実験を実施する場合には、施設管理者と協力し、一般留意事項、関係規則等を遵守して、安全の確保および環境汚染の防止のため十分な処置を講じなければならない。	物理的、化学的に注意を要する試料、または病原体を用いた動物実験を実施する場合には、施設管理者と協力し、一般留意事項、関係規則等を遵守して、安全の確保および環境汚染の防止のため十分な処置を講じなければならない。
その他	この指針に示されていない必要事項については、会員の所属する各研究機関における動物実験に関する諸規定、および「大学等における動物実験について(通知)」(昭和 62 年 5 月 25 日 文部省学術国際局長)を遵守するものとする。	この指針に示されていない必要事項については、会員の所属する研究機関における動物実験に関する諸規定、および「大学等における動物実験について(通知)」(昭和 62 年 5 月 25 日 文部省学術国際局長)を遵守するものとする。 日本学術会議第 7 部は 2004 年に「動物実験・施設の第三者評価機構の設置について」の提言を行っており、動物の飼育や管理、また、動物実験が適正に行われていることについて、第三者による認証を得ることも考慮しておく必要がある。 なお、動愛法の改正に伴い、文部科学省において動物実験指針の検討が始まった。それが完成した場合には、必要に応じて本指針も改正しなければならない。
引用文献		国立大学法人動物実験施設協議会：動物実験処置の苦痛分類に関する解説、平成 16 年 6 月 4 日 (http://www.med.akita-u.ac.jp/~doubutu/kokudou/rinri/pain.pdf) NIH：Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (http://www.nap.edu/readingroom/books/labrats/) OECD：Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19 (2000.11). 日本実験動物環境研究会：「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」についての日本実験動物環境研究会改正案。実験動物と環境 Vol.12 (1), 71-74, 2004. 鈴木真、黒澤努：日本獣医師会雑誌、一解説・報告—米国獣医師会：安楽死に関する研究報告 Vol.58(5)301-304, (6)357-359, (7)443-446, (8)521-524, (9)581-583, (10)649-651, (11)719-721, 2000.

available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/brainresBRAIN
RESEARCH

Research Report

β -Estradiol induces synaptogenesis in the hippocampus by enhancing brain-derived neurotrophic factor release from dentate gyrus granule cells

Kaoru Sato^{a,*}, Tatsuhiro Akaishi^b, Norio Matsuki^c, Yasuo Ohno^a, Ken Nakazawa^a^aDivision of Pharmacology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan^bLaboratory of Pharmacology, Faculty of Pharmacy and Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Musashino University, 1-1-20 Shinmachi, Nishitokyo-shi, Tokyo 202-8585, Japan^cLaboratory of Chemical Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 28 February 2007

Available online 13 March 2007

Keywords:

 β -Estradiol

Organotypic hippocampal slice culture

Dentate gyrus

CA3

Synaptogenesis

BDNF

ABSTRACT

We investigated the effect of β -estradiol (E2) on synaptogenesis in the hippocampus using organotypic hippocampal slice cultures and subregional hippocampal neuron cultures. E2 increased the expression of PSD95, a postsynaptic marker, specifically in stratum lucidum of Cornu Ammonis 3 (CA3SL) in cultured hippocampal slices. E2 also increased the spine density at the proximal site of CA3 apical dendrites in CA3SL and PSD95 was clustered on these spine heads. The effects of E2 on the expression of PSD95 and the spine density disappeared when the dentate gyrus (DG) had been excised at 1 day in vitro (DIV). FM1-43 analysis of subregional hippocampal neuron cultures which were comprised of Ammon's horn neurons, DG neurons, or a mixture of these neurons, revealed that E2 increased the number of presynaptic sites in the cultures that contained DG neurons. K252a, a potent inhibitor of the high affinity receptor of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), and function-blocking antibody to BDNF (BDNFAB) completely inhibited the effects of E2 in hippocampal slice cultures and subregional neuron cultures, whereas ICI182,780 (ICI), a strong antagonist of nuclear estrogen receptors (nERs), did not. Expression of BDNF in DG neurons was markedly higher than that in Ammon's horn

* Corresponding author. Fax: +81 3 3707 6950.

E-mail address: kasato@nihs.go.jp (K. Sato).

Abbreviations: ACM, astrocyte-conditioned medium; ANOVA, analysis of variance; AraC, cytosine β -D-arabino-furanoside; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; BDNFAB, function blocking antibody to BDNF; BSA, bovine serum albumin; CA1, Cornu Ammonis 1; CA3, Cornu Ammonis 3; cAMP, 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate; CNS, central nervous system; CREB, PKA/cAMP-responsive element binding protein; DG, dentate gyrus; DIC, differential interference contrast; DiI, 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate; DIV, day(s) in vitro; DMSO, dimethylsulfoxide; E2, β -estradiol; ECL, enhanced chemiluminescence; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; ELISA, enzyme linked immunosorbent assay; ER, estrogen receptor; FM1-43, (N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(4-(dibutylamino)styryl)pyridinium dibromide; GABA, γ (gamma)-aminobutyric acid; HBSS, Hank's balanced salt solution; HS, horse serum; ICI, ICI182,780; IgG, immunoglobulin G; LDCVs, large dense-core vesicles; L-Glu, L-glutamate; LTP, long-term-potential; MEK, MAP kinase kinase; MEM, minimal essential medium; mER, membrane estrogen receptor; NB, neurobasal medium; nER, nuclear estrogen receptor; NeuN, neuronal nuclear antigen; OD, optical density; P3, postnatal day 3; P8, postnatal day 8; PB, phosphate buffer; PBS, phosphate buffered saline; PDZ, PSD-95-Disks large-zona occludens 1/2; PFA, paraformaldehyde; PKA, cAMP-dependent protein kinase A; PSD95, postsynaptic density protein of 95 kDa; Rp-cAMP, Rp-adenosine 3', 5'-cyclic monophosphorothioate triethylammonium salt; SDS, sodium dodecyl sulphate; S.E.M., standard error of the mean; SL, stratum lucidum; SO, stratum oliens; SP, stratum pyramidale; SR, stratum radiatum; TBS, Tris-buffered saline; TrkB, the high affinity receptor for several neurotrophins; TTX, tetrodotoxin

neurons and E2 did not affect these expression levels. E2 significantly increased the BDNF release from DG neurons. KT5720, a specific inhibitor of 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-dependent protein kinase A (PKA), and Rp-adenosine 3', 5'-cyclic monophosphorothioate triethylammonium salt (Rp-cAMP), a non-hydrolyzable diastereoisomer and a potent inhibitor of PKA, completely suppressed the E2-induced increase in BDNF release, whereas ICI and U0126, a potent inhibitor of MAP kinase kinase (MEK), did not. These results suggest that E2 induces synaptogenesis between mossy fibers and CA3 neurons by enhancing BDNF release from DG granule cells in a nER-independent and PKA-dependent manner.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Estrogens have diverse effects on structure and function of the central nervous system (CNS) (for review, McEwen et al., 2001; Scharfman and MacLusky, 2005; Segal and Murphy, 2001). These effects include enhancement of glutamate-mediated transmission (Woolley, 1998), decreased afterhyperpolarization (Kramar et al., 2004), facilitation of memory (Tyler et al.,

2002), increased dendritic spine and spine synapse numbers (Segal and Murphy, 2001), promotion of DG neurogenesis (Tanapat et al., 1999), and increased seizure susceptibility (Woolley and Schwartzkroin, 1998). Such diversity arises because estrogens have multiple mechanisms of action. They modulate gene transcription by interacting with 2 types of nERs, ER α and ER β . In addition, recent reports clarified nongenomic mechanisms that act via receptors associated

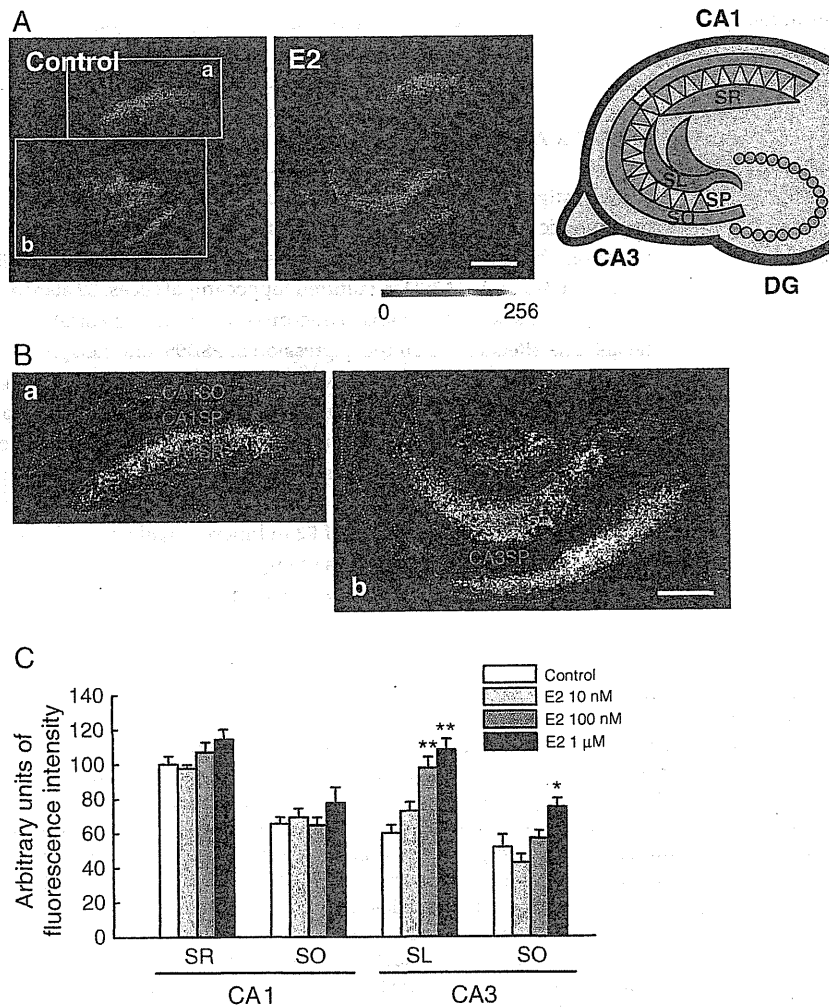


Fig. 1 – Effects of E2 on the expression of PSD95 in cultured hippocampal slices. (A) PSD95 immunoreactive signals in the control slice (left) and the slice treated with E2 (1 μ M, 24 h) (middle). Bar = 500 μ m. (B) Magnified gray-scale images of a and b in A. CA1SR, CA1SO, CA3SL, and CA3SO appeared as fluorescent compartments. Bar = 250 μ m. (C) Effects of E2 (10 nM–1 μ M, 24 h) on the expression of PSD95. E2 increased the expression level of PSD95 dose-dependently in CA3SL. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs. the control group in each region. $N = 8$, Tukey's test following ANOVA.