

ゼブラフィッシュ胚発生毒性試験における 薬物動態－ヒト及び他の哺乳類との 薬物ばく露量の比較－

発表者：縄司 奨（久留米事業所）

共同研究者：溝口 直洋（日田事業所）

安達 竜太（久留米事業所）

1. 背景及び目的

生殖発生毒性試験は、化学物質が親世代の生殖機能や次世代の発生に及ぼす影響を調べる試験である。ヒト健康影響評価のための生殖発生毒性試験では一般的に哺乳類が用いられるが、近年、動物福祉及び費用・期間の観点からこれらの削減が求められている。2020 年に、医薬品規制調和国際会議（ICH）の生殖発生毒性試験ガイドライン（S5）の改訂版 ICH S5(R3)¹⁾が発行され、胚・胎児の発生に関する試験（EFD 試験）において代替法の利用が可能になった。欧州において受精後 120 時間（hpf）までのゼブラフィッシュ（ZF）胚は保護動物の対象外として取り扱われるため、ZF 胚を用いる発生毒性試験は動物福祉の観点で有利である。また、ヒト及び他の哺乳類との組織学的、遺伝学的な類似性等の利点から、ZF 胚発生毒性試験が EFD 試験の代替法として注目されている。しかし、ZF 胚発生毒性試験では、実際に胚に取り込まれている薬物の胚中濃度（Ce）が不明であることに加え、毒性に係る薬物ばく露量が ZF 胚とヒト及び他の哺乳類との間で類似しているか否かが不明であることが課題である。そこで本研究では、水溶液濃度（Cw）と Ce における薬物の脂溶性との関係性を明らかにすること及び毒性に係る薬物ばく露量におけるヒト及び他の哺乳類との関係性を明らかにすることを目的とした。

2. 実験方法

本研究では、以下の Step 1～Step 3 の手順で実験及び解析を実施した。

2.1 [Step 1] 発生毒性が既知の薬物に対する ZF 胚の生物応答の確認

ヒト又は他の哺乳類への発生毒性が既知である薬物 27 物質（ICH S5 陽性対照物質 22 物質及びその他の発生毒性既知物質 5 物質）に対する ZF 胚発生毒性試験（図 1）を実施し、ZF 胚・仔魚に対する濃度-生物応答を確認した。得られた受精卵を受精後 5 時間～120 時間までばく露した後、既報²⁾を参考にした 12 項目について顕微鏡下で形態観察し、発生毒性を評価した。なお、試験の上限濃度は 10,000 $\mu\text{mol/L}$ とした。ICH 陽性対照物質 22 物質については、形態観察結果を基に、既報²⁾の手法に従ってスコア化し、

生存率 50%以上の最高濃度区における形態異常スコアの平均値を MS_{50} と定義し、 $MS_{50} \geq 10$ を陽性、 $MS_{50} < 10$ を陰性と判定した²⁾。

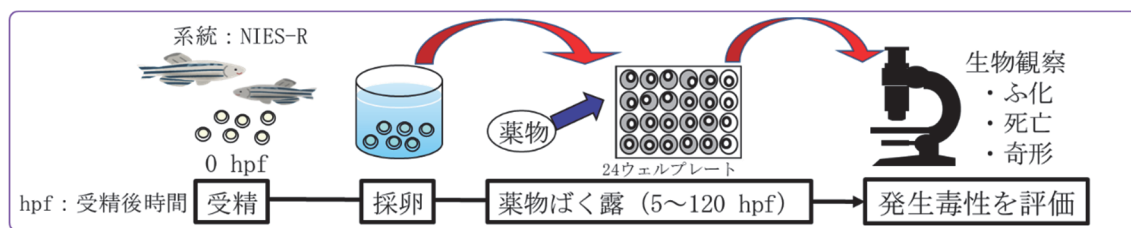


図1 ZF 胚発生毒性試験の概要

2.2 [Step 2] 脂溶性が異なる発生毒性薬物の胚中濃度及び水溶液濃度の測定・解析

様々な脂溶性 [logD (pH 7 におけるオクタノール/水分配係数の常用対数) 値] を示す発生毒性既知物質 10 種 (図 3 中の表) を用いて、最大無影響濃度 (NOEC) 付近の薬物水溶液に ZF をばく露して Cw 及び 24 時間ごとに上げた ZF 胚の Ce を測定し、各薬物における logD、Cw 及び Ce の間の関係性を調べた。

2.3 [Step 3] 毒性に係る薬物ばく露量における ZF 胚とヒト及び他の哺乳類との比較

ICH S5 陽性対照物質 21 物質について、薬物の logD 及び NOEC における Cw を Step 2 で得られた各時点の回帰式に代入して胚中濃度の推定値 [Ce(cal)] を算出した。さらに、各時点の Ce(cal) を用いて、ZF 胚におけるばく露量の指標として胚中濃度-時間曲線下面積 (zAUC) を求め、ICH S5 (R3) に記載されているラット・ウサギにおける無毒性量又はヒトの有効量における血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) と比較した。

3. 結果及び考察

3.1 [Step 1] 発生毒性が既知の薬物に対する ZF 胚の生物応答の確認

ICH S5 陽性対照物質 22 物質について発生毒性を判定した結果、正しく陽性と判定されたのは 15 物質であり、残りの 7 物質は陰性と判定された (表 1)。

陰性と判定された要因は、薬物の水溶解度が低い、胚への取込み量が少ない、あるいは代謝機能等の差異による毒性感受性の種差が考えられた。得られた NOEC 及び陽性・陰性の判定結果は、以降の条件設定及び解析に用いた。

表 1 ZF 胚発生毒性試験の判定結果
(P: 陽性、N: 陰性)

No.	薬物名	判定	No.	薬物名	判定
1	シタラビン	N	12	サリドマイド	N
2	フルコナゾール	P	13	シクロホスファミド	P
3	イマチニブ	N	14	ダサチニブ	P
4	カルバマゼピン	P	15	13- <i>cis</i> -レチノイン酸	P
5	フェニトイン	N	16	アシトレチン	P
6	アスピリン	N	17	トピラマート	P
7	シスプラチン	P	18	イブプロフェン	P
8	メトトレキサート	P	19	all- <i>trans</i> -レチノイン酸	P
9	リバビリン	P	20	トリメタジオン	N
10	ヒドロキソ尿素	P	21	バルプロ酸ナトリウム	P
11	5-フルオロウラシル	P	22	プスルファン	N

研究発表 1

3.2 [Step 2] 脂溶性が異なる発生毒性薬物の胚中濃度及び水溶液濃度の測定・解析

Ce 測定の結果、脂溶性が比較的低い ($\log D < 1$) 物質では Ce が経時的に増加する傾向を示した (図 2(a))。一方、脂溶性が比較的高い ($\log D > 1$) 物質では、Ce は受精後 48～96 時間で最高値に到達した後、経時的に減少する傾向を示した (図 2(b))。これは、胚の発達に伴い卵黄が縮小し、個体当たりの総脂肪濃度が減少したことが原因であると推測された。さらに、 $\log[\text{Ce}/\text{Cw}]$ ($\log$ は常用対数) を縦軸、薬物の $\log D$ 値を横軸に取ってプロットした結果、全ての時点で高い相関性を示し、精度の高い回帰式が得られた (図 3、決定係数 R^2 : 0.87～0.96)。一方、カフェインは全ての時点において回帰直線から乖離したが、原因は不明であり、今後更なる実験及び解析が必要と考えられる。

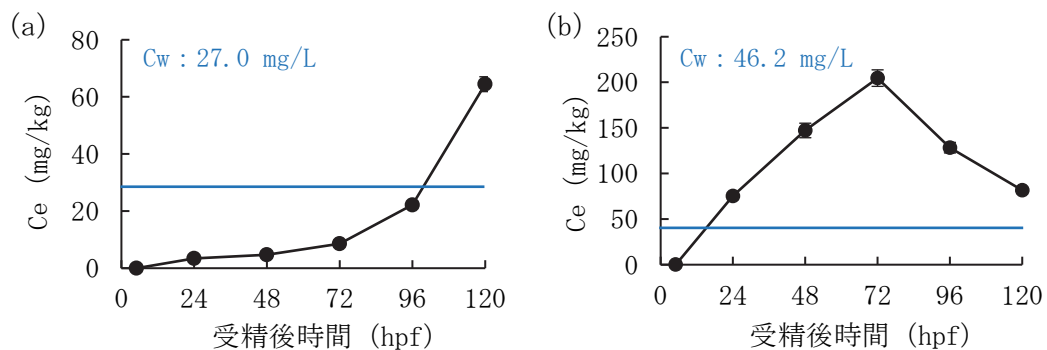
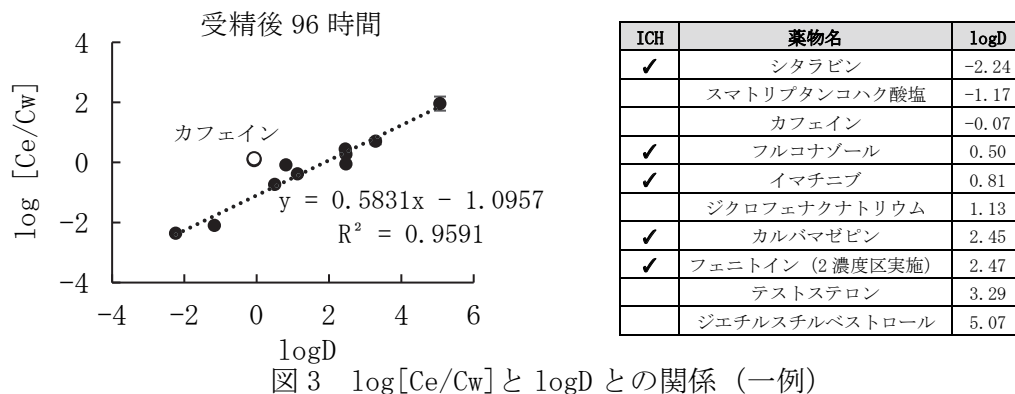


図 2 胚中濃度及び水溶液濃度の測定結果（一例）

[(a) はイマチニブ、(b) はカルバマゼピンの結果。プロットは N=3 の平均、エラーバーは N=3 の標準偏差を表す。Cw は水溶液濃度実測値の時間加重平均値を表し、青線は $\text{Ce}/\text{Cw}=1$ となるラインを表す。]

図 3 $\log[\text{Ce}/\text{Cw}]$ と $\log D$ との関係（一例）

[プロットは N=3 の平均、エラーバーは N=3 の標準偏差を表す。回帰直線及び回帰式は●のプロットから求め、○（カフェイン）はその算出から除外されたプロットを表す。]

3.3 [Step 3] 毒性に係る薬物ばく露量における ZF 胚とヒト及び他の哺乳類との比較

zAUC とラット、ウサギ及びヒトの AUC の常用対数をそれぞれ比較した結果、ZF 胚発生毒性試験で陽性と判定された物質群では、比較的高い正の相関性を示した (図 4)。このことから、発生毒性発現に係るばく露量レベルは ZF とヒト及び他の哺乳類間で類似していることが示唆された。なお、ラットとの比較においてリバビリンが回帰式から乖離した原因は、赤血球内でリン酸化されたリバビリンが特異的に哺乳類の赤血球に長期

蓄積することが原因であると考えられた。また、ウサギ及びヒトとの比較においてバルプロ酸が回帰式から乖離した原因は不明であるため、今後更なる実験及び解析が必要と考えられる。一方、陰性と判定された、すなわち偽陰性となった 7 物質では、高い相関性は認められなかった。これは、毒性感受性の種差により毒性が発現しなかったことその他に、一部の偽陰性物質は水溶解度又は設定上限濃度で毒性が認められずにその濃度が NOEC と決定されたことにより、本来の NOEC と乖離した結果、乖離した zAUC が算出されたことが原因であると考えられた。

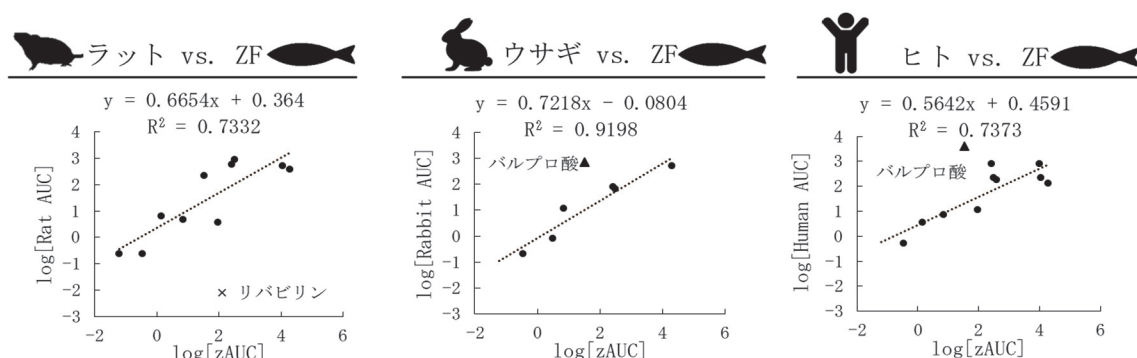


図 4 zAUC とヒト・哺乳類 AUC の比較 (ZF: 陽性、ヒト・哺乳類: 陽性)

[× (リバピリン) 及び ▲ (バルプロ酸) は回帰式の算出から除外した。]

4. まとめ及び今後の展望

本研究において、ZF 胚発生毒性試験における薬物の $\log D$ 、 C_w 及び C_e の関係性を見出し、精度が高い回帰式を得ることができた。また、ZF 胚の C_e を基に算出した zAUC を用いることで、ZF 胚で陽性と判定された薬物において、ZF 胚とヒト及び他の哺乳類の発生毒性に係る薬物ばく露量における関係性を明らかにした。今後、 C_e 実測値に基づく zAUC データを収集して zAUC とヒト及び他の哺乳類の AUC との関係性の裏付けをすることにより、ZF 胚発生毒性試験の EFD 試験代替法としての価値向上を目指したい。

5. 謝辞

本研究の実験及びデータ解析について多くのご助言、ご指導をいただきました、酪農学園大学獣医学群の寺岡宏樹教授をはじめとする諸先生方に深く感謝申し上げます。なお、本研究の一部は、令和 2~3 年度 CERI 提案型共同研究「ヒト代謝酵素発現系ゼブラフィッシュの創製及び薬物動態に対する影響解析」(酪農学園大学 寺岡宏樹教授との共同研究) で得られた成果である。

6. 参考文献

- 1) ICH (2020) Detection of Reproductive and Developmental Toxicity for Human Pharmaceuticals S5(R3)
- 2) Yamashita, A. et al. J. Toxicol. Sci. 2014, 39(3), 453-464.