

発達初期ゼブラフィッシュにおける  
発生毒性物質の動態に関する研究

縄司 奨

発達初期ゼブラフィッシュにおける  
発生毒性物質の動態に関する研究

酪農学園大学大学院  
獣医学研究科  
獣医学専攻博士課程

繩司 奨

獣医薬理学  
指導教員 教授 寺岡 宏樹

2022 年度

## 目次

	頁
略語一覧	1
緒言	3
第I章 ゼブラフィッシュの発生毒性物質に対する生物応答	
1.1 序文	6
1.2 材料と方法	7
1.3 成績	13
1.4 考察	20
1.5 小括	22
第II章 発生毒性物質ばく露におけるゼブラフィッシュ胚中濃度の推移及び薬物分布	
2.1 序文	23
2.2 材料と方法	24
2.3 成績	32
2.4 考察	40
2.5 小括	44
第III章 発達初期ゼブラフィッシュにおけるシトクローム P450 (CYP) 発現及びヒト CYP 基質に対する代謝活性	
3.1 序文	45
3.2 材料と方法	47
3.3 成績	55
3.4 考察	63
3.5 小括	68

第IV章	ゼブラフィッシュ胚・仔魚における化学物質のばく露量指標	
4.1	序文	69
4.2	材料と方法	71
4.3	成績	72
4.4	考察	83
4.5	小括	86
	総括	87
	付録	90
	謝辞	91
	引用文献	92
	英文要旨	99

## 略語一覧

AUC	: 血中濃度-時間曲線下面積
BCF	: 生物濃縮係数
C <sub>e</sub>	: 胚・仔魚中の薬物濃度
C <sub>e</sub> (cal)	: 胚・仔魚中の薬物濃度の推定値
cDNA	: 相補的 DNA
C <sub>max</sub>	: 最高血中濃度
C <sub>w</sub>	: 水溶液中の薬物濃度
CYP	: シトクローム P450
DIG	: ジゴキシゲニン
DMSO	: ジメチルスルホキシド
DMX	: 1,7-ジメチルキサントシン
dpf	: 受精後日数
EFD	: 胚・胎児の発生に及ぼす影響
EFD 試験	: 胚・胎児の発生に及ぼす影響を調べる試験
hpf	: 受精後時間
HPLC	: 高速液体クロマトグラフィー
ICH	: 医薬品規制調和国際会議
ICH S5 陽性対照物質	: ICH S5 に記載された発生毒性陽性対照物質
LC-MS	: 液体クロマトグラフィー-質量分析法
LC-MS/MS	: 液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法
logD	: pH 7 における <i>n</i> -オクタノール/水分配係数の常用対数値
logP	: <i>n</i> -オクタノール/水分配係数の常用対数値
mRNA	: メッセンジャーRNA
MS	: 形態異常スコア合計の平均値
MS <sub>50</sub>	: 生存率 50%以上となる最高濃度区の形態異常スコア合計の平均値
NOEC	: 最大無影響濃度
ODS	: オクタデシルシリカ
OHTS	: 6β-ヒドロキシテストステロン

qPCR	: 定量的ポリメラーゼ連鎖反応
S5	: ICH 生殖発生毒性試験ガイドライン
TCDD	: 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ- <i>p</i> -ダイオキシン
TK	: トキシコキネティクス
UV	: 紫外光
UV-VIS	: 紫外可視分光
zAUC	: ZF 胚中濃度-時間曲線下面積
zAUC(cal)	: $C_e(\text{cal})$ に基づく ZF 胚中濃度-時間曲線下面積
ZF	: ゼブラフィッシュ
4'-OHDF	: 4'-ヒドロキシジクロフェナク
5-OHDF	: 5-ヒドロキシジクロフェナク
マトリクス	: ZF 胚・仔魚由来の夾雑物

## 緒言

ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*、ZF) の胚・仔魚は、ヒトと遺伝学的、組織学的に類似しており、低コストかつ少量の試験薬しか必要とせず、胚が透明で観察が容易で、スループット性が高い等の多くの利点を有することから、創薬プロセスの早い段階において *in vivo* の代替毒性スクリーニングモデルとして注目され、様々な研究や毒性試験に利用されている [9,16,18,38]。また、欧州では、科学的な目的のために使用される動物の保護に関する指令 (Directive 2010/63/EU) [45] に基づき、ZF 胚・仔魚は受精後 120 時間 (hpf) 付近の自立的な摂餌行動を取る段階までは動物保護の対象外とみなされているため、その使用は科学的な目的での動物利用における 3Rs [Reduction (削減)、Refinement (苦痛の軽減)、Replacement (代替)] アプローチに沿っている。そのため、近年特に重要視されてきている動物福祉の観点からも、ZF 胚を用いるメリットは大きい。

2020 年 2 月に、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) が改訂され、胚・胎児の発生に及ぼす影響 (EFD) を調べる試験 (EFD 試験) において、ラットやウサギ等の哺乳類を用いる動物試験の代替法の利用が可能となった [30]。現在までに、ZF 胚を用いて発生毒性を検出するフェノタイプベースの代替/スクリーニング法がいくつか報告されており、哺乳類を用いた *in vivo* 試験での結果と高い一致率 (81~90%) を示している [7,53,54,62]。これらのことから、ZF 胚を用いる発生毒性試験が創薬のレギュレーションへ活用されることが大いに期待されている。

しかし、ヒトや他の哺乳動物に対する種々の薬物の発生毒性をより正確に予測するためには、ZF 胚・仔魚における薬物動態 (吸収・分布・代謝・排泄) に関する情報がまだ不十分であるという問題点が残っている。薬物の取込 (吸収及び排泄) に関して、上記のフェノタイプベースの手法を用いた殆どの発生毒性評価は、濃度分析を実施しない設定濃度における水溶液中の薬物濃度 ( $C_w$ ) に基づいているが、薬物の脂溶性の程度によって生体組織への蓄積性が異なるため、 $C_w$  は発生毒性の発現に直接関連する薬物濃度を正確に反映しない [7,53,54,62]。これまでに、薬物濃度と毒性との関係性を説明するために、ZF の全身の胚・仔魚中の薬物濃度 ( $C_e$ ) を測定した結果が報告されているが [4,13,28]、その事例は少なく、脂溶性の程度に応じた  $C_e$  及び

C<sub>w</sub> の関係性を調査した報告例は知る限り無い。薬物分布に関しては、ZF 胚・仔魚の栄養源としてリポタンパク質等の脂質を多く保有する卵黄嚢とそれ以外の体部では、薬物濃度が異なることが考えられるが、部位毎の薬物濃度を測定した報告例は、我々が知る限り 1 報のみであり [24]、その論文で調査された 5 種の化合物のうち、発生毒性薬物はカルバマゼピンのみであるため、発生毒性薬物を対象とした解析を行うにはデータが不足している。代謝に関しては、ZF 胚・仔魚は母体や胎盤の障壁がないため、生体異物の解毒を自身の薬物代謝能力に依存しているが、哺乳類の胚・胎児は、母体の代謝を介して親化合物とその代謝物に曝されているという違いがある。特に、直接的な薬物代謝能力の有無の違いは、催奇形性を誘発するために代謝的活性化を必要とするプロテラトゲンの研究において非常に重要である [61]。したがって、プロテラトゲンを代謝する能力が ZF で欠如している場合、ZF 胚を用いる催奇形性検出系で偽陰性となる可能性がある。これらの懸念があるものの、ZF 胚・仔魚とヒト又は他の哺乳類との間の薬物代謝を比較した報告例はわずかである [13]。

薬物代謝は、主に薬物代謝酵素シトクローム P450 (CYP) によって行われる。CYP はヘムタンパク質のスーパーファミリーであり、そのうち、CYP1、CYP2、CYP3 及び一部の CYP4 ファミリーは生体異物の酸化的代謝に大きく関与している [8,21,61]。CYP は上市されている医薬品の代謝に関与する酵素の約 75% を占めている [22]。ZF において、CYP を介した薬物代謝に関する知見は限定的かつ断片的である [9,20]。また、ZF 胚・仔魚期における CYP 遺伝子におけるメッセンジャーRNA (mRNA) の発現量、臓器分布、酵素活性に関するデータは不足している。したがって、発達初期の ZF 胚・仔魚における CYP を介した薬物代謝の全容を把握するには、発生段階毎に CYP の発現における活性及び分布あるいは代謝活性のプロファイルを包括的に調べる必要がある。

ZF 胚を用いる試験系を発生毒性試験の代替法として用いる際の二点目の問題は、ZF 胚・仔魚で発生毒性が生じる体内の薬物ばく露量と、哺乳類における薬物ばく露量の関係性が不明であるという点である。ICH S5 ガイドラインでは、代替法で用いた濃度と、予測する動物種で毒性が生じるばく露量を関連付ける必要性が述べられている [30]。医薬品の哺乳類を用いる毒性試験では、動物への投与量及び全身的ばく露及びその時間経過との関係性を調べるトキシコキネティクス (TK) 試験を実施し、ばく露量の情報を毒性所見と関連づけ、ヒトの臨床上の安全性評価に役立てている

[66]。この TK 試験及びヒトの臨床試験では、全身的ばく露を調べるために血中の薬物濃度を測定するが、ZF 胚・仔魚は、形態観察を顕微鏡下で行うほど非常に微小であるために、血中濃度の測定は技術的に困難である。このような状況もあり、これまでに ZF 胚・仔魚における薬物ばく露量及びそれとヒト/哺乳類のばく露量の関係を報告した例は無い。

そこで本研究では、ZF 胚発生毒性試験の EFD 試験代替法への適用可能性を検討するために、発生毒性薬物をばく露した ZF 胚・仔魚中における薬物動態の各プロセスに関する知見を多角的に収集することに加え、発生毒性薬物の水溶液及び胚中濃度の関係性、及び ZF とヒト/哺乳類間の薬物ばく露量の関係性を調査することを目的とした。まず、第I章では、種々の薬物における ZF 胚・仔魚に対する発生毒性の濃度-生物応答を確認するため、ZF 胚を用いた発生毒性試験を実施した。第II章では ZF 胚・仔魚における薬物濃度の時間変化及び薬物の体内分布について調べるために、24 hpf 毎の全身の胚中濃度測定、並びに 48 hpf における全身、体部、卵黄囊の薬物濃度の測定を実施した。第III章では、ZF 胚・仔魚における薬物代謝に関する基礎的な知見を得るために、主要な薬物代謝酵素である CYP 遺伝子の発現量及び発現部位、及び薬物代謝活性についての特徴を調査した。第IV章では、ZF 胚・仔魚における発生毒性薬物のばく露量とヒト/哺乳類の薬物ばく露量の間関係性を調査するために、本研究で得られた知見を応用して、ZF 胚・仔魚における薬物ばく露量の指標値を算出し、ICH S5 に記載されている発生毒性陽性対照物質 (ICH S5 陽性対照物質) におけるヒト/哺乳類のばく露量データと比較した。

なお、本学位論文の内容の一部はすでに公表されている[41,42]。

## 第I章 ゼブラフィッシュの発生毒性物質に対する生物応答

### 1.1 序文

2020年2月に、ICH S5が改訂され、EFD試験については、哺乳類を用いる動物試験の代替法の利用が可能となった[30]。一方、ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*、ZF)の胚・仔魚は、ヒトと遺伝学的、組織学的に類似しており、低コストかつ少量の試験薬しか必要とせず、胚が透明で観察が容易で、スループット性が高い等の多くの利点を有することから、創薬プロセスの早い段階において *in vivo* の毒性スクリーニングモデルとして注目され、様々な研究や毒性試験に利用されている[9,16,19,39]。現在までに、ZF胚を用いて発生毒性を検出するフェノタイプベースの代替/スクリーニング法がいくつか報告されており、哺乳類を用いた *in vivo* 試験での結果と高い一致率(81~90%)を示している[7,53,54,62]。しかし、ヒトや他の哺乳動物に対する種々の薬物の発生毒性をより正確に予測するためには、ZF胚・仔魚における薬物動態(吸収・分布・代謝・排泄)に関する情報が不足している。また、ZF胚・仔魚における薬物ばく露量及びそれとヒト/哺乳類のばく露量の関係を報告した例は無い。ZF胚発生毒性試験のばく露状況における薬物の体内動態あるいはばく露量に関する知見を収集する上で、各薬物に対するZF胚・仔魚の発生毒性の感受性の有無、あるいは発生毒性が生じる濃度範囲を把握することは非常に重要である。そこで本章では、種々の薬物におけるZF胚・仔魚に対する発生毒性の濃度-生物応答を確認するため、ZF胚を用いた発生毒性試験を実施した。

## 1.2 材料と方法

### 1.2.1 ZF の飼育管理及び ZF 受精卵の採取

野生型の ZF (*Danio rerio*、NIES-R 系統) は国立環境研究所 (つくば) より入手し、一般財団法人化学物質評価研究機構 久留米事業所 (久留米) の飼育施設にて継代飼育されたものを用いた。親魚は 16 時間明/8 時間暗の照明周期にて、 $26\pm 1^{\circ}\text{C}$  に調温された脱塩素水道水 (活性炭を充填したポンベに水道水を通水して塩素を除去し、エアレーションを施したもの) で流水式により飼育された。給餌はソルトレイク産のアルテミアの 24 時間未満齢のふ化幼生 (EGGS-90、北村、京都) を用い、1 日 2~3 回の頻度で給餌した。ZF 受精卵を用いる実験を行う当日の朝に、雌成魚を 1 尾ずつ個別に飼育していたガラス製容器に、雄の成魚を 2 尾ずつ入れ、交配させて受精卵を得た。受精卵は、採取後、実体顕微鏡 SMZ800 (ニコン、東京) を用いて形態的に異常がみられない正常な発生段階のものを選別し、実験に用いた。

### 1.2.2 発生毒性試験

本章で用いた被験物質の名称、入手先、pH 7 における *n*-オクタノール/水分配係数の常用対数値 (logD) 及び設定濃度を表 1 及び表 2 に示す。ICH S5 陽性対照物質群から選定した医薬品 (表 1) 及び ZF 胚・仔魚において形態異常を及ぼすことが既知である薬物 (表 2) の各薬物について、以下に記載するばく露条件と同様の内容 (連数のみ 6 連/試験区) にて、事前に予備検討を行い、設定濃度を決定した。設定濃度は上限を  $10,000\ \mu\text{M}$  とし、濃度区数及び濃度設定における公比は固定せず、可能な限り、発生毒性の発生率として 100%あるいは 0%が得られる濃度を設定した。各濃度の薬物水溶液は、人工調製水 (ISO 6341-1982) [43] を用いて調製した。助剤としてジメチルスルホキシド (DMSO、ナカライテスク、京都) を用い、水溶液における DMSO の最終濃度の上限は 0.5% (v/v) とした。調製した薬物水溶液はポリスチレン製の 24 ウェルプレート (MS-80240、住友ベークライト、東京) に 1 ウェルあたり 2 mL ずつ添加し、ZF の受精卵を 12 連 (1 個/ウェル) で、5~120 hpf までばく露した。ばく露期間

中は、ウェルプレートに 14 時間明/10 時間暗の明暗周期、 $28\pm 1^{\circ}\text{C}$  の環境下でインキュベーター (MIW-450V、アズワン、大阪) 内に静置し、その間、薬物水溶液の交換 (換水) は実施しなかった。ばく露終了後、トリカインメタンスルホン酸 (MS-222、シグマアルドリッチ、St. Louis、MO、USA) を最終濃度 0.03% になるように添加して麻酔処理を行い、Yamashita らの論文 [62] を参考にして、各観察項目について倒立顕微鏡 (CKX53、オリンパス、東京) を用いて観察し、それを基に毒性評価を行った。生物の観察項目を表 3 に示す。生物の観察により、形態異常が 1 個体もみられない濃度を NOEC とした。上限濃度あるいは溶解度付近に設定した濃度で形態異常が 1 個体もみられない場合は、それらの濃度を NOEC とした。

### 1.2.3 発生毒性における陽性/陰性の判定方法

ICH S5 陽性対照物質 (表 1) についてのみ、観察された毒性所見に基づき、ヒト/哺乳類の発生毒性における陽性/陰性を判定した。陽性/陰性の判定方法を図 1 に示す。判定方法は、Yamashita ら [62] の手法を用いた。表 3 の観察項目で異常がみられた場合、1 個体、1 項目についてスコア 10 を付け、生存率が 50% 以上となった最高濃度区における合計スコアの平均値 ( $MS_{50}$ ) が 10 以上であれば「陽性」、10 未満であれば「陰性」と判定した [62]。

表 1. 第I章で使用した薬物及び設定濃度 [ICH S5 陽性対照物質 (無水物として)]

薬物名	入手先	logD	試験濃度 (μM)	試験濃度 (mg/L)
シタラビン	東京化成工業	-2.24 [5]	10000	2430
フルコナゾール	東京化成工業	0.50 [38]	1300, 2500, 5000, 10000	398, 766, 1530, 3060
イマチニブ	MedChem Express	0.81 [18]	25, 50, 100	12.3, 24.7, 49.4
カルバマゼピン	富士フィルム 和光純薬	2.45 [5]	50, 100, 200, 400	11.8, 23.6, 47.3, 94.5
フェニトイン	富士フィルム 和光純薬	2.47 [5]	75, 150	18.9, 37.8
アスピリン	富士フィルム 和光純薬	-2.57 [5]	200, 400, 800	36.0, 72.1, 144
シスプラチン	富士フィルム 和光純薬	-2.28 [32]	0.80, 4.0, 20, 100	0.240, 1.20, 6.00, 30.0
メトトレキサート	富士フィルム 和光純薬	-2.52 [5]	63, 130, 250, 500	28.6, 59.1, 114, 227
リバビリン	富士フィルム 和光純薬	-2.43 [5]	1300, 2500, 5000, 10000	317, 610, 1220, 2440
ヒドロキシ尿素	富士フィルム 和光純薬	-1.27 [68]	630, 1300, 2500, 5000, 10000	98.9, 190, 380, 761
5-フルオロウラシル	富士フィルム 和光純薬	-0.89 [5]	80, 400, 2000, 10000	10.4, 52.0, 260, 1300
ブスルファン	シグマアルドリッ チ	-0.52 [5]	63, 130, 250, 500	25.5, 32.0, 61.6, 123
サリドマイド	富士フィルム 和光純薬	0.25 [67]	400	103
シクロホスファミド 一水和物	富士フィルム 和光純薬	0.63 [5]	630, 1300, 2500, 5000	164, 339, 653, 1310 (無水物として)
ダサチニブ	富士フィルム 和光純薬	2.05 [18]	0.013, 0.025, 0.050, 0.1000	0.00634, 0.0122, 0.0244, 0.0488
13- <i>cis</i> -レチノイン酸	富士フィルム 和光純薬	4.23 [5]	0.0063, 0.013,	0.00189, 0.00391
アシトレチン	シグマアルドリッ チ	5.5 [25]	0.00016, 0.00031, 0.00063, 0.0013, 0.0025	0.0000522, 0.000101, 0.000206, 0.000424, 0.000816
トピラマート	東京化成工業	0.59 [65]	31, 63, 130, 250, 500	10.5, 21.4, 44.1, 84.8, 170
イブプロフェン	富士フィルム 和光純薬	0.81 [5]	31, 63, 130	6.39, 13.0, 26.8
all- <i>trans</i> -レチノイン 酸	富士フィルム 和光純薬	4.23 [5]	0.00031, 0.00063, 0.0013, 0.0025	0.0000931, 0.000189, 0.000391, 0.000751
トリメタジオン	シグマアルドリッ チ	0*	5000, 10000	716, 1430
バルプロ酸ナトリウ ム	富士フィル ム和光純薬	0.13 [5]	31, 63, 130, 250	4.47, 9.09, 18.7, 36.1 (無水 物として)

\* 文献値が無い場合、DrugBank (<https://go.drugbank.com>)の *n*-オクタノール/水分配係数の常用対数値 (log P) 値を引用

表 2. 第 I 章で使用した薬物及び設定濃度（その他の発生毒性物質）

薬物名	入手先	logD	設定濃度 (μM)	設定濃度 (mg/L)
スマトリブタン コハク酸塩	東京化成工業	-1.17 [5]	1300, 2500, 5000, 10000	538, 1030, 2070, 4130
ジクロフェナク ナトリウム	シグマアルドリッ チ	1.13 [5]	10.1	3.20
カフェイン	富士フイルム和光 純薬	-0.07 [5]	12.5, 50, 51.5, 200, 800, 3200	2.43, 9.70, 10.0, 38.8, 155, 621
テストステロン	富士フイルム和光 純薬	3.29 [38]	5.2, 10.4	1.50, 3.00
ジエチルスチル ベストロール	東京化成工業	5.07 [38]	0.25, 0.50, 1.0, 2.0	0.0671, 0.134, 0.268, 0.537

表 3. 発生毒性の評価項目

部位・器官	評価項目
心臓	心拍の異常
	心臓のサイズの異常
	心臓チャンバーの異常
顔面の形状	眼の形態異常
	耳の形態異常
	下顎の形態異常
体の形状	脊索の形態異常
	尾の形態異常
血液循環	顔の浮腫
	腹部（心臓周囲含む）の浮腫
	血流の異常
ふ化	ふ化の遅延

ふ化の遅延：72hpf 以降で未ふ化の場合に異常と判定重篤度は考慮せず、対照区との比較において明らかに差異が観察されたものを影響ありとした。

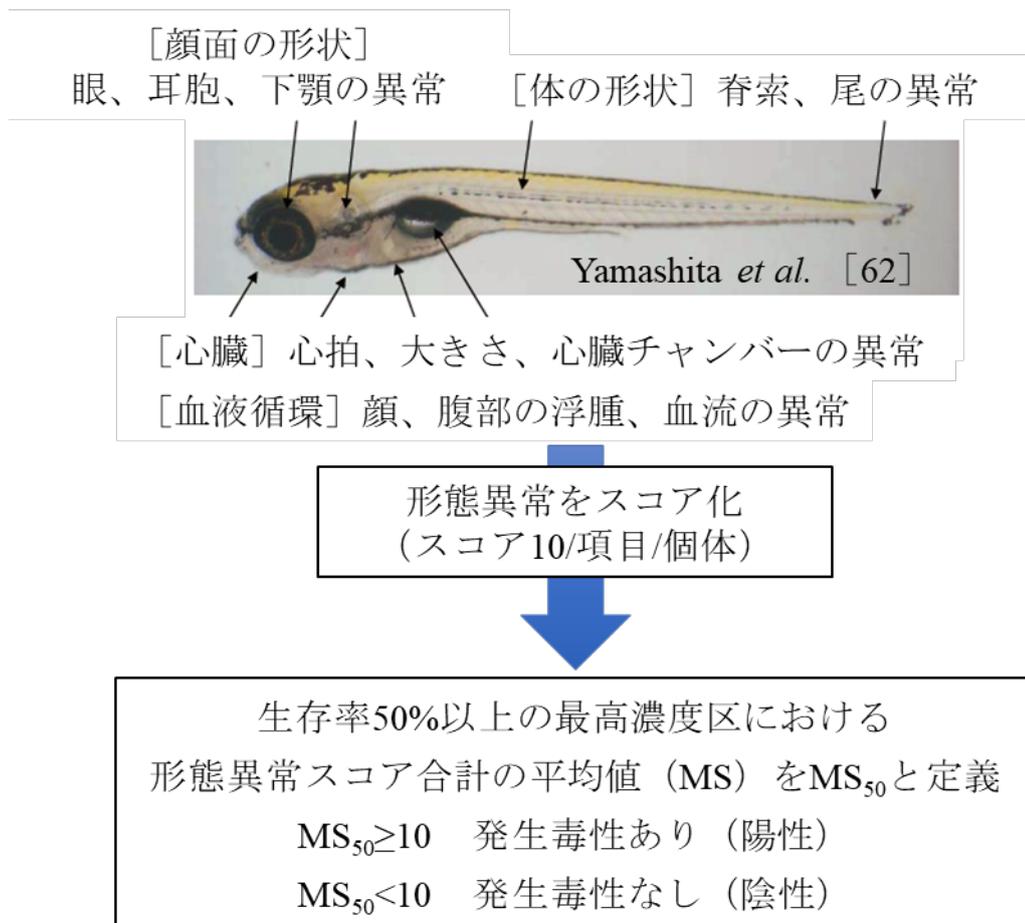


図 1. ゼブラフィッシュ胚発生毒性試験における  
ヒト/哺乳類の発生毒性陽性/陰性の判定方法

### 1.3. 成績

ばく露終了後に観察された形態異常の一例を図 2 に示す。all-*trans*-レチノイン酸では、心拍数の低下、心臓サイズの縮小（図 2B、黒矢印）、下顎の形態異常、脊索の形態異常、尾の形態異常、顔の浮腫（図 2B、黒矢頭）、腹部の浮腫（図 2B、白矢頭）及び血流速度の低下が観察された。イブプロフェンでは、心臓サイズの縮小（図 2C、黒矢印）、下顎の形態異常、脊索の形態異常、尾の形態異常、顔の浮腫、腹部の浮腫（図 2C、白矢頭）及び血流速度の低下がみられた。カルバマゼピンでは、ふ化の遅延、心臓サイズの縮小（図 2D、黒矢印）、脊索の形態異常（図 2D、白矢印）、尾の形態異常、顔の浮腫（図 2D、黒矢頭）、腹部の浮腫（図 2D、白矢頭）及び血流速度の低下がみられた。メトトレキサートでは、ふ化の遅延、心臓サイズの縮小、眼の形態異常（図 2E、アスタリスク）、脊索の形態異常（図 2E、白矢印）、尾の形態異常（図 2E、点線矢印）、顔の浮腫、腹部の浮腫（図 2E、白矢頭）及び血流速度の低下がみられた。

各薬物における発生毒性試験の結果を表 4、各薬物における最大無影響濃度（NOEC）を表 5 に示す。シタラビン及びトリメタジオンは上限濃度 10,000  $\mu\text{M}$  で発生毒性がみられなかった。また、フェニトイン及びサリドマイドについては、それぞれ水溶解度と思われる 150  $\mu\text{M}$  及び 400  $\mu\text{M}$  において発生毒性が認められなかった。これら以外の薬物については、発生毒性あるいは致死を誘発する濃度範囲が得られ、影響の発生率及び死亡率には濃度依存性が認められた。

ICH S5 陽性対照物質について、観察された毒性所見に基づき、ヒト/哺乳類の発生毒性における陽性/陰性を判定した結果を表 6 に示す。陽性対照物質 22 物質のうち、正しく陽性と判定されたのは 15 物質であり、残りの 7 物質については陰性と判定された。この結果から算出される陽性一致率（感度）は 68%（15/22）、偽陰性率は 32%（7/22）であった。



図 2. 受精後 120 時間における生物の形態異常の一例

(A) 溶媒対照、(B) *all-trans*-レチノイン酸 0.63 nM、(C) イブプロフェン 130  $\mu$ M、(D) カルバマゼピン 400  $\mu$ M、(E) メトトレキサート 400  $\mu$ M、スケールバー：200  $\mu$ m. 黒矢印は心臓サイズの縮小、白矢印は脊索の形態異常、黒点線矢印は尾の形態異常、黒矢頭は顔の浮腫、白矢頭は腹部の浮腫、アスタリスクは眼の形態異常を表す。

表 4. 薬物ばく露した ZF 胚の発生毒性及び致死の結果

薬物名	設定濃度 (μM)	設定濃度 (mg/L)	全個体数	発生毒性		死亡		観察された発生毒性所見
				個体数	発生率 (%)	個体数	死亡率 (%)	
シタラビン	10000	2430	12	0	0	0	0	-
スマトリブ	1300	538	12	0	0	0	0	
タンコハク	2500	1030	12	0	0	0	0	ふ化の遅延、心拍数の低下、 下顎の形態異常、腹部の浮腫
酸塩	5000	2070	12	0	0	0	0	
	10000	4130	12	6	50	0	0	
フルコナゾール	1300	398	12	0	0	0	0	ふ化の遅延、心拍数の低下、 心臓サイズの縮小、下顎の形 態異常、腹部の浮腫
	2500	766	12	0	0	0	0	
	5000	1530	12	0	0	0	0	
	10000	3060	12	11	92	1	8	
イマチニブ	25	12.3	12	0	0	0	0	心拍数の低下、心臓サイズの 縮小
	50	24.7	12	0	0	0	0	
	100	49.4	12	6	50	0	0	
ジクロフェ ナクナトリ ウム	10.1	3.20	12	0	0	0	0	ふ化の遅延、心拍数の低下、 心臓サイズの縮小、腹部の浮 腫、血流速度の低下
	20.1	6.40	12	11	92	0	0	
	40.2	12.8	12	-	-	12	100	
	80.5	25.6	12	-	-	12	100	
カルバマゼ ピン	50	11.8	12	0	0	0	0	ふ化の遅延、心臓サイズの縮 小、脊索の形態異常、尾の形 態異常、顔の浮腫、腹部の浮 腫、血流速度の低下
	100	23.6	12	0	0	0	0	
	200	47.3	12	0	0	0	0	
	400	94.5	12	12	100	0	0	
フェニトイ ン	75	18.9	12	0	0	0	0	-
	150	37.8	12	0	0	0	0	
テストステ ロン	5.2	1.50	12	0	0	0	0	ふ化の遅延、心拍数の低下、 心臓サイズの縮小、脊索の形 態異常、尾の形態異常、顔の 浮腫、腹部の浮腫、血流速度 の低下
	10.4	3.00	12	0	0	0	0	
	20.8	6.00	12	2	17	0	0	
	41.6	12.0	12	11	92	0	0	
	83.2	24.0	12	-	-	12	100	
ジェチル スチルバス トロール	0.25	0.0671	12	0	0	0	0	ふ化の遅延、心拍数の低下、 心臓サイズの縮小、眼の形態 異常、下顎の形態異常、尾の 形態異常、顔の浮腫、腹部の 浮腫、血流速度の低下
	0.5	0.134	12	0	0	0	0	
	1.0	0.268	12	0	0	0	0	
	2.0	0.537	12	12	100	0	0	
アスピリン	200	36.0	12	0	0	0	0	血流速度の低下
	400	72.1	12	1	8	0	0	
	800	144	12	-	-	12	100	
シスプラチ ン	0.8	0.240	12	0	0	0	0	ふ化の遅延、心拍数の低下、 心臓サイズの縮小、脊索の形 態異常、尾の形態異常、腹部 の浮腫、血流速度の低下
	4.0	1.20	12	9	75	0	0	
	20	6.00	12	12	100	0	0	
	100	30.0	12	12	100	0	0	

薬物名	設定濃度 ( $\mu\text{M}$ )	設定濃度 ( $\text{mg/L}$ )	全個 体数	発生毒性		死亡		観察された発生毒性所見
				個 体数	発生率 (%)	個 体数	死亡率 (%)	
カフェイン	12.5	2.43	12	0	0	0	0	心拍数の低下、心臓サイズの縮小、脊索の形態異常、顔の浮腫、腹部の浮腫、血流速度の低下
	50	9.70	12	0	0	0	0	
	51.5	10.0	12	0	0	0	0	
	200	38.8	12	4	33	0	0	
	800	155	12	12	100	0	0	
	3200	621	12	-	-	12	100	
メトトレキサート	63	28.6	12	0	0	0	0	ふ化の遅延、心臓サイズの異常、眼の形態異常、下顎の形態異常、脊索の形態異常、尾の形態異常、顔の浮腫、腹部の浮腫、血流速度の低下
	130	59.1	12	0	0	0	0	
	250	114	12	2	18	1	8	
	500	227	12	7	100	5	42	
リバビリン	1300	317	12	1	8	0	0	心拍数の低下、心臓サイズの縮小、下顎の形態異常、脊索の形態異常、尾の形態異常、顔の浮腫、腹部の浮腫
	2500	610	12	0	0	0	0	
	5000	1220	12	2	17	0	0	
	10000	2440	12	8	67	0	0	
ヒドロキシ尿素	630	47.9	12	0	0	0	0	心拍数の低下、心臓サイズの縮小、下顎の形態異常、脊索の形態異常、尾の形態異常、顔の浮腫、血流速度の低下
	1300	98.9	12	0	0	0	0	
	2500	190	12	1	8	0	0	
	5000	380	12	0	0	0	0	
	10000	761	12	8	100	4	33	
5-フルオロウラシル	80	10.4	12	0	0	0	0	ふ化の遅延、心拍数の低下、心臓サイズの縮小、眼の形態異常、下顎の形態異常、脊索の形態異常、尾の形態異常、腹部の浮腫、血流速度の低下
	400	52.0	12	0	0	0	0	
	2000	260	12	1	8	0	0	
	10000	1300	12	9	100	3	25	
ブスルファン	63	15.5	12	0	0	0	0	心拍数の低下、心臓サイズの縮小、下顎の形態異常、腹部の浮腫、血流速度の低下
	130	32.0	12	1	8	0	0	
	250	61.6	12	1	8	0	0	
	500	123	12	2	17	0	0	
トリメタジオン	5000	716	12	0	0	0	0	-
	10000	1430	12	0	0	0	0	
バルプロ酸	31	4.47	12	0	0	0	0	心拍数の低下、心臓サイズの縮小、下顎の形態異常、脊索の形態異常、尾の形態異常、顔の浮腫、腹部の浮腫、血流速度の低下
	63	9.09	12	1	8	0	0	
	130	18.7	12	9	82	1	8	
	250	36.1	12	12	100	0	0	

薬物名	設定濃度 (μM)	設定濃度 (mg/L)	全個体数	発生毒性		死亡		観察された発生毒性所見
				個体数	発生率 (%)	個体数	死亡率 (%)	
サリドマイド	400	103	12	0	0	0	0	-
	630	164	12	0	0	1	8	
シクロホスファミド	1300	339	12	0	0	0	0	心拍数の低下、心臓サイズの縮小、下顎の形態異常、脊索の形態異常、尾の形態異常、顔の浮腫、腹部の浮腫、血流速度の低下
	2500	653	12	0	0	0	0	
	5000	1310	12	12	100	0	0	
ダサチニブ	0.013	0.00634	12	0	0	0	0	心臓サイズの縮小、脊索の形態異常、顔の浮腫、腹部の浮腫、血流速度の低下
	0.025	0.0122	12	0	0	0	0	
	0.050	0.0244	12	0	0	1	8	
	0.10	0.0488	12	8	67	0	0	
13- <i>cis</i> -レチノイン酸	0.0063	0.00189	12	0	0	0	0	心拍数の低下、心臓サイズの縮小、下顎の形態異常、脊索の形態異常、尾の形態異常、顔の浮腫、腹部の浮腫、血流速度の低下
	0.013	0.00391	12	11	100	1	8	
アシトレチン	0.00016	0.0000522	12	0	0	0	0	ふ化の遅延、心拍数の低下、心臓サイズの縮小、下顎の形態異常、脊索の形態異常、尾の形態異常、顔の浮腫、腹部の浮腫、血流速度の低下
	0.00031	0.000101	12	7	58	0	0	
	0.00063	0.000206	12	12	100	0	0	
	0.0013	0.000424	12	12	100	0	0	
	0.0025	0.000816	12	10	100	2	17	
トピラマート	31	10.5	12	0	0	0	0	ふ化の遅延、心拍数の低下、心臓サイズの縮小、下顎の形態異常、脊索の形態異常、顔の浮腫、腹部の浮腫、血流速度の低下
	63	21.4	12	0	0	0	0	
	130	44.1	12	2	17	0	0	
	250	84.8	12	9	75	0	0	
	500	170	12	11	100	1	8	
イブプロフェン	31	6.39	12	0	0	0	0	心臓サイズの縮小、下顎の形態異常、脊索の形態異常、尾の形態異常、顔の浮腫、腹部の浮腫、血流速度の低下
	63	13.0	12	0	0	0	0	
	130	26.8	12	9	100	3	25	
all- <i>trans</i> -レチノイン酸	0.00031	0.0000931	12	0	0	0	0	心拍数の低下、心臓サイズの縮小、下顎の形態異常、脊索の形態異常、尾の形態異常、顔の浮腫、腹部の浮腫、血流速度の低下
	0.00063	0.000189	12	4	36	1	8	
	0.0013	0.000391	12	12	100	0	0	
	0.0025	0.000751	12	12	100	0	0	

表 5. 各薬物に対する最大無影響濃度 (NOEC)

薬物名	NOEC (mg/L)
シタラビン	2430
スマトリプタンコハク酸塩	2070
フルコナゾール	1530
イマチニブ	24.7
ジクロフェナクナトリウム	3.20
カルバマゼピン	47.3
フェニトイン	37.8
テストステロン	3.00
ジエチルスチルベストロール	0.268
アスピリン	36.0
シスプラチン	0.240
カフェイン	10.0
メトトレキサート	59.1
リバビリン	610
ヒドロキシ尿素	380
5-フルオロウラシル	52.0
ブスルファン	15.5
トリメタジオン	1430
バルプロ酸	4.47
サリドマイド	103
シクロホスファミド	653
ダサチニブ	0.0244
13- <i>cis</i> -レチノイン酸	0.00189
アシトレチン	0.0000522
トピラマート	21.4
イブプロフェン	13.0
<i>all-trans</i> -レチノイン酸	0.0000931

表 6. ICH S5 陽性対照物質における発生毒性陽性/陰性の判定結果

薬物名	判定に用いた濃度 (μM)	MS <sub>50</sub>	本研究での判定結果	既報の判定
シタラビン	10000	0	N	N [29]
フルコナゾール	10000	14.2	P	-
イマチニブ	100	5.8	N	N [29]
カルバマゼピン	400	25.5	P	P [29]
フェニトイン	300	0	N	-
アスピリン	400	0.8	N	N [62]
シスプラチン	250	15.7	P	P [62]
メトトレキサート	500	55.7	P	P [62]
リバビリソール	10000	13.3	P	N [62]
ヒドロキシ尿素	10000	28.8	P	N [29]
5-フルオロウラシル	2500	63.8	P	P [62]
サリドマイド	400	0	N	N [29]
シクロホスファミド	5000	20.0	P	-
ダサチニブ	50	63.6	P	P [29]
13- <i>cis</i> -レチノイン酸	0.050	73.6	P	-
アシトレチン	0.0025	53.0	P	-
トピラマート	500	57.3	P	P [29]
イブプロフェン	130	35.6	P	N [62]
<i>all-trans</i> -レチノイン酸	0.20	68.3	P	P [62]
トリメタジオン	10000	0.8	N	N [29]
バルプロ酸ナトリウム	310	53.3	P	P [62]
ブスルファン	100	5.8	N	N [29]

表中の P 及び N は、ZF 胚の毒性試験の結果、ヒト/哺乳類における発生毒性が陽性 (P) 若しくは陰性 (N) と判定されたことを表す。

#### 1.4. 考察

本章では、ICH S5 陽性対照物質 22 物質、その他の発生毒性薬物 5 物質、計 27 物質について、ZF 胚発生毒性試験を実施した。その結果、ほとんどの薬物について、発生毒性あるいは致死を誘発する濃度範囲が得られ、影響の発生率及び死亡率は濃度依存性が認められ、実験的に NOEC が得られた。例外として、シタラビン及びスマトリプタンコハク酸塩は上限濃度 (10,000  $\mu\text{M}$ ) で、サリドマイド及びフェニトインは溶解度付近の濃度で、全く影響がみられなかったため、10,000  $\mu\text{M}$  若しくは溶解度付近の濃度を NOEC とした。これらの物質は、上限濃度を変更すること等により正確な NOEC が得られる可能性がある。

本章において、ICH S5 陽性対照物質に対する発生毒性の有無を確認し、陽性/陰性を判定した結果、陽性一致率は 68% (15/22)、偽陰性率は 32% (7/22) であった。過去に報告された論文では、ばく露期間、観察項目及び陽性/陰性の判定方法等の条件がそれぞれ異なる部分があるものの、実施した薬物全体における陽性一致率は 81~90% であり [7,53,54,62]、本研究の成績より高い一致率であった。まず、本研究で陽性と判定された 15 物質のうち、過去に判定結果が報告されているのは 11 物質あるが、それらは全て既報論文 [29,62] でも陽性と判定されている (表 6)。また、本研究で陰性と判定された薬物のうち、フェニトイン以外の薬物については、既報文献 [29,62] でも陰性と判定されており、本章の判定結果と一致した (表 6)。さらに、既報文献で陰性と判定された 9 種のうち、3 種 (リバビリン、ヒドロキシ尿素、イブuproフェン) は本研究で正しく陽性と判定された (表 6) [29,62]。リバビリン及びヒドロキシ尿素については、既報 [61] よりも上限濃度を 10 倍高く設定したことによって正答できたと考えられる。つまり、本研究で用いた陽性対照物質のうち、過去に調べられている物質 (17 物質) については、既報論文の判定結果では陽性一致率は 47% (8/17) であり、我々の正答率の方が高い。したがって、本研究の陽性一致率が既報で報告された一致率 (81~90%) より低くなったのは、本研究で採用した観察項目、判定方法等の条件、あるいは観察技術が起因した可能性は低く、用いた物質群の違いが主たる原因であると思われる。そのことを踏まえると、本研究の試験系における本来の一致率を求めるためには、今後非常に多くの物質群について試験を実施し、

作用機序や薬物の構造式等のカテゴリー毎に適用可能性を検討する必要があると考えられる。

本研究で陰性と判定されたフェニトイン及びサリドマイドについては、水溶解度と思われる濃度（フェニトイン：150  $\mu\text{M}$ 、サリドマイド：400  $\mu\text{M}$ ）において発生毒性がみられなかったため、水溶解度が低いことが偽陰性となった原因である可能性が考えられる。なお、シタラピン、アスピリン、トリメタジオン及びブスルファンは、溶解度は低くなかったものの、死亡がみられた濃度域付近でも形態異常がみられておらず、過去論文の報告 [29,62] と一致することから、これらは ZF-ヒト/哺乳類間における毒性感受性の種間差が要因であると考えられる。また、一般的に、脂溶性が高い、つまり  $\log D$ （あるいは  $\log P$ ）が高いほど、魚体中への薬物の蓄積性が大きくなることが知られているが [3]、これら 4 物質の  $\log D$  は、 $-2.57 \sim 0$  と低い値であることから、薬物の胚・仔魚中への取込量が少ないことが予想され、そのことも毒性を検出できなかった要因の一つと考えられる。

## 1.5. 小括

本章では、種々の薬物における ZF 胚・仔魚に対する発生毒性の濃度-生物応答を確認するため、ZF 胚を用いた発生毒性試験を実施した。その結果、各薬物それぞれの濃度に依存して発生毒性あるいは致死がみられ、ZF 胚・仔魚に対する影響濃度範囲が明らかになった。また、ICH S5 陽性対照物質について、既報の手法を用いて、ヒト/哺乳類における発生毒性陽性/陰性を判定したところ、一部の薬物については既報の判定結果より良好な判定結果となった。一方で、一部の陽性対照物質において偽陰性となった原因については、水溶解度が低いこと、ZF-ヒト/哺乳類間における毒性感受性の種間差、薬物の胚・仔魚への取込量が少ないことが要因であると考えられた。

## 第II章 発生毒性物質ばく露におけるゼブラフィッシュ胚中濃度の推移及び薬物分布

### 2.1 序文

近年、ZF 胚を用いる発生毒性試験が創薬のレギュレーションへ活用されることが大いに期待されているものの、ZF 胚・仔魚における薬物動態（吸収・分布・代謝・排泄）に関する情報が不足している。これまで報告されているフェノタイプベースの手法を用いた殆どの発生毒性評価は、浸漬ばく露する薬物における  $C_w$  に基づいている [7,53,54,62]。一般的に、脂溶性が高い、つまり、 $\log P$  が高い薬物ほど魚体中で高蓄積性を示すため [3]、 $C_w$  は発生毒性の発現に直接関連する薬物濃度を正確に反映しないことが考えられる。これまでに、薬物濃度と毒性との関係性を説明するために、ZF の全身の  $C_e$  を測定した結果が報告されているが [4,13,28]、その事例は少なく、 $\log P$  に応じた  $C_e$  及び  $C_w$  の関係性を調査した報告例は無い。また、薬物分布に関しては、ZF 胚・仔魚が栄養源としておりリポタンパク質等の脂質を多く保有する卵黄嚢とそれ以外の体部では、薬物濃度が異なることが考えられるが、部位毎の薬物濃度を測定した報告例は、我々が知る限り 1 報のみである。この論文で調査された 5 種の化合物のうち、発生毒性薬物はカルバマゼピンのみであり、発生毒性薬物を対象とした解析を行うためのデータとしてはあまりにも少ない [24]。

生物蓄積は、あらゆる経路を介した有機体への化学物質の蓄積のことを指す [51]。ZF を含む典型的な魚の生物蓄積は、1-コンパートメントモデルに基づいて、取込と排泄という 2 つの一次速度論的プロセスで説明できることが報告されている [44]。ZF の胚・仔魚を使用した一次モデルに基づいて計算された速度論的パラメーターと生物濃縮係数 (bioconcentration factor, BCF) が、Sanz-Landaluze らによって報告されている [51]。 $\log P$  の値が異なる化合物は、ZF の体への透過性及び生物蓄積性に差があり、試験中の  $C_e$  の時間変化も異なると考えられるが、ZF 胚発生毒性試験と同様のばく露環境下における  $C_e$  データを実験的に示した報告例は無い。

そこで本章では、ZF 胚・仔魚における薬物濃度の時間変化（胚中濃度推移）及び薬物分布における基礎的な情報を収集するために、様々な脂溶性を持つ、つまり様々な  $\log D$  を示す発生毒性薬物を用いて、24 hpf 毎の全身の  $C_e$  測定、並びに 48 hpf における全身、体部、卵黄嚢の薬物濃度を測定した。

## 2.2 材料と方法

24 hpf 毎の全身の胚中濃度測定（胚中濃度推移）の実験及び部位毎の薬物濃度測定（薬物分布）の実験方法及び手順についての概略を図 3 に示す。

### 2.2.1 ZF 胚の薬物水溶液へのばく露

ばく露に用いる ZF 受精卵は 1.2.1 と同様の方法で用意し、薬物水溶液の調製は 1.2.2 と同様の方法で実施した。本章で使用した薬物及び設定濃度を表 7 に示す。調製した薬物水溶液は、500 mL 容あるいは 1000 mL 容のガラス製容器に添加し、そこに 5 hpf の ZF 受精卵を必要量（収容密度： $\geq 1$  mL/個）投入し、ばく露を開始した。ばく露期間中は、ガラス容器を 14 時間明/10 時間暗の明暗周期、 $28\pm 1^{\circ}\text{C}$  の環境下でインキュベーター（MIW-450V）内に静置した。水溶液中の薬物濃度を可能な限り維持させるため、テストステロンは 48 hpf において水溶液を新たに調製して換水し、ジエチルステルベストロールは 24 hpf 毎に水溶液を新たに調製して換水した。その他の薬物については、事前の検討において濃度低下が認められなかったため、換水は実施しなかった。

### 2.2.2 胚中濃度測定における個体の前処理

胚中濃度推移の実験では、2.2.1 でばく露した ZF 胚を 24、48、72、96 及び 120 hpf にそれぞれ必要量（3～100 個体/連、3 連）取り上げた。24 hpf の未ふ化の個体はピンセットで物理的に卵膜を除去し、48 hpf 以降のふ化個体はそのまま個体を取り上げ、前処理に供した（図 3）。薬物分布の実験では、2.2.1 でばく露した ZF 胚を 48 hpf の時点で必要量取り上げ、全身の測定では取り上げた個体をそのまま用い、体部の測定では取り上げた個体の卵黄嚢を、実体顕微鏡（SMZ800、ニコン）下にてタングステン製の針で物理的に除去したものを前処理に供した（図 3）。

前処理では、まず清浄な脱塩素水道水 500 mL が入った 4 つのビーカーに約 10 秒間ずつ順番に個体を移していくことにより、体表に付着した薬物を除去した。洗浄後の個体を 1.5 mL サンプリングチューブに移し、抽出溶液（後に濃度分析で使用する液体クロマトグラフィーの溶離液と同じ組成の混合溶液）を加え、ペッスルで物理的に

ホモジナイズし、遠心機（CR21N、日立工機、東京）で 20,000×g、10°Cの条件で 10 分間遠心した（図 3）。遠心後の上澄み液を採取し、メスフラスコに移した。上澄み液を採取した後のサンプリングチューブに再度抽出溶液を加え、同様にホモジナイズ、遠心操作を行い、その上澄み液を同じメスフラスコに移し、抽出溶液で 1 mL 若しくは 2 mL にメスアップした。メスアップ後の液を口径 0.2 μm の Millex-LG メンブランフィルター（Merck KGaA、Darmstadt、ドイツ）で加圧ろ過したろ液を分析用試料とした（図 3）。

### 2.2.3 薬物濃度の定量

事前の検討において、ZF 胚・仔魚由来の夾雑物（マトリクス）が分析結果に影響を及ぼすことが確認された薬物については、対照区（試験用水のみで飼育した区）の個体を分析試料の調製時と同様に処理したものをを用いて分析試料とマトリクスの含有量を合わせた標準溶液を調製し、検量線を作成した。マトリクスが分析結果に影響を及ぼさないことが確認された薬物については、マトリクスを含まない標準溶液を用いて検量線を作成した。

胚中濃度推移及び薬物分布の実験ではともに、ばく露した薬物水溶液の濃度を測定した。テストステロンはばく露開始時及び 48 hpf における調製時の新しい水溶液、そして 48 hpf の換水前及びばく露終了時の古い水溶液をそれぞれ採取した。ジェチルスチルベストロールは、新しく調製した水溶液及び換水前の古い水溶液をそれぞれ 2 回ずつ採取した。テストステロン及びジェチルスチルベストロール以外の薬物については、ばく露開始時及び終了時の水溶液を採取した。採取した薬物水溶液は、検量線の濃度範囲内になるように適宜溶媒で希釈したものを分析用試料とした。

分析用試料及び標準溶液は、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）あるいは液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法（LC-MS/MS）により測定した。薬物毎の分析手法及び分析条件を表 8 及び表 9 に示す。HPLC による測定では、分析用カラムとして L-column ODS（オクタデシルシリカ）（直径 150 mm、内径 4.6 mm、粒子径 5 μm、化学物質評価研究機構、東京）若しくは L-column2 ODS（直径 150 mm、内径 2.1 mm、粒子径 5 μm、化学物質評価研究機構）を取り付けた HPLC（LC-20AD、島津製作所、京都）を用いて、UV-VIS（紫外可視分光）検出器 SPD-20AV（島津製作

所)により各薬物を検出した。LC-MS/MSによる測定では、分析用カラム ACQUITY UPLC BEH C18 (直径 50 mm、内径 2.1 mm、粒子径 1.7  $\mu\text{m}$ 、日本ウォーターズ、東京)を取り付けた超高速液体クロマトグラフ Nexera X2 及びトリプル四重極質量分析計 LCMS-8060 (島津製作所)を用いた。

#### 2.2.4 全身、体部及び卵黄囊における $C_e$ の算出

全身、体部及び卵黄囊における  $C_e$  の算出方法の概略を図 3 に示す。まず、胚中濃度推移及び薬物分布の実験における各時点において、対照区における全身及び卵黄囊除去した個体について、マイクロ天びん Cubis MSU 6.6S-DM (ザルトリウス・ジャパン、東京)を用いて、それぞれの湿重量を 5 個体ずつ個別に測定し、全身及び体部の湿重量の平均値を算出した。次に、2.2.3 にて測定して算出した全身及び体部における薬物量を、それぞれの個体の湿重量の平均値で除して、全身及び体部の  $C_e$  をそれぞれ算出した。また、卵黄囊の  $C_e$  は、卵黄囊の薬物量を卵黄囊の湿重量で除して算出した。卵黄囊の薬物量は、全身の薬物量の平均値 ( $n=3$ ) から体部の薬物量の平均値 ( $n=3$ ) を差し引くことで求め、卵黄囊の湿重量は、全身の湿重量の平均値から体部の湿重量の平均値を差し引くことにより求めた。

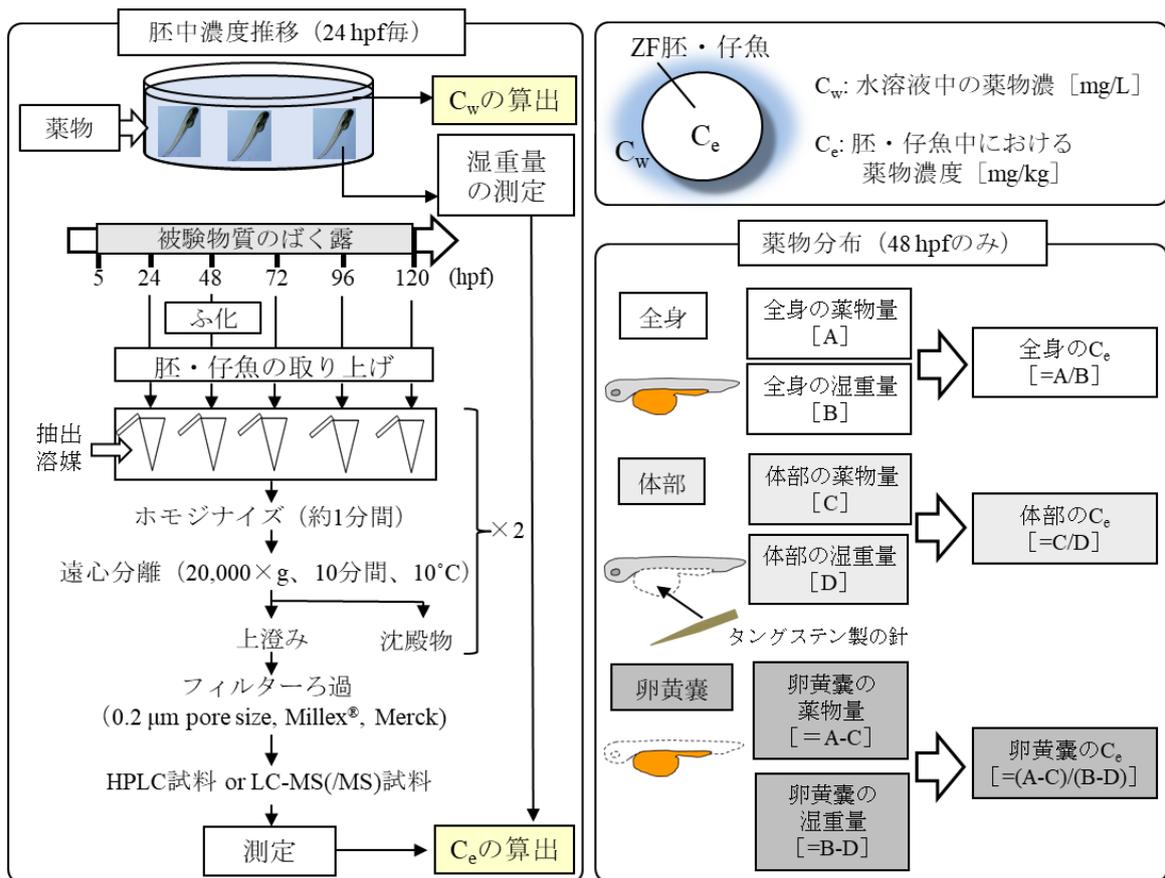


図 3. 胚中濃度推移及び薬物分布の実験方法及び手順

表 7. 第II章で使用した薬物及び設定濃度

薬物名	設定濃度 (mg/L)	
	胎中濃度推移	薬物分布
シタラビン	2430	
スマトリプタンコハク酸塩	2070	
カフェイン	5.00, 10.0	5.00, 10.0
フルコナゾール	1530	1530
イマチニブ	24.7	24.7
ジクロフェナクナトリウム	3.20	1.60, 3.20
カルバマゼピン	47.3	47.3, 94.5
フェニトイン	18.9, 37.8	18.9, 37.8
テストステロン	3.00	1.50, 3.00
ジエチルスチルベストロール	0.268	0.0671, 0.134

表 8. HPLC における各薬物の分析条件

薬物名	シタラビン	スマトリプタンコ ハク酸塩	カフェイン	フルコナゾール	イマチニブ
機 器	ポンプ	LC-20AD (島津製作所)			
	紫外光 (UV) 検出器	SPD-20AV (島津製作所)			
	カラムオーブン	CTO-20AC (島津製作所)			
	オートインジェクター	SIL-20AC <sub>HT</sub> (島津製作所)			
	デガッサー	DGU-20A <sub>3R</sub> (島津製作所)			
カラム種類	L-column ODS (直径 150 mm、内径 4.6 mm、粒子径 5 μM、化学物質評価研究機構)				
ガードカラム	L-column2 ODS (直径 10 mm、内径 4.6 mm、粒子径 5 μM、化学物質評価研究機構)				
カラム温度 (°C)	40				
注入量 (μL)	50			100	50
溶離条件	メタノール (10 mM1-ペンタンスル ホン酸ナトリウム含 有) : 超純水 (10 mM1-ペンタンスル ホン酸ナトリウム含 有、pH3.0) =1:9	メタノール/リン 酸 (2000/1 v/v) : 超純水/リ ン酸 (2000/1 v/v) =5 : 95	メタノール : 超純 水=2 : 8	アセトニトリル : 超純水=15 : 85	メタノール/リン 酸 (1000/1 v/v) : 超純水/リ ン酸 (1000/1 v/v) =3 : 7
流量 (mL/min)	1.0				
UV 波長 (nm)	272	282	270	260	265

薬物名	カルバマゼピン	フェニトイン (胚中濃度推移)	フェニトイン (薬物分布)	テストステロン	ジエチルスチルベ ストロール (胚中濃度推移)
機 器	ポンプ	LC-20AD (島津製作所)			LC-2010A <sub>HT</sub> (島津製作所)
	UV 検出器	SPD-20AV (島津製作所)			
	カラムオーブン	CTO-20AC (島津製作所)			
	オートインジェクター	SIL-20AC <sub>HT</sub> (島津製作所)			
	デガッサー	DGU-20A <sub>3R</sub> (島津製作所)			
カラム	L-column ODS (直径 150 mm、内径 4.6 mm、粒子 径 5 μM、化学物質評価研究機構)		L-column2 ODS (直径 150 mm、内径 2.1 mm、粒子径 5 μM、化学物質評価 研究機構)		
ガードカラム	L-column2 ODS (直径 10 mm、内径 4.6 mm、粒子径 5 μM、化学物質評価研究機構)		無し		
カラム温度 (°C)	40				
注入量 (μL)	50		10	20	
溶離条件	アセトニトリ ル：超純水=3：7	メタノール：超純 水=5：5	メタノール：超純水 (50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 含 有)=5：5	アセトニトリ ル：超純水=5： 5	アセトニトリル： 試験用水=5：5
流量 (mL/min)	1.0		0.2		
UV 波長 (nm)	285	220		241	254

表 9. LC-MS/MS における各薬物の分析条件

薬物名		ジクロフェナクナトリウム	ジエチルスチルベストロール (薬物分布)
機器		液体クロマトグラフ : Nexera X2 (島津製作所) 質量分析計 : LCMS-8060 (島津製作所)	
LC 条件	カラム	ACQUITY UPLC BEH C18 (直径 50 mm、内径 2.1 mm、粒子径 1.7 μM、日本ウォーターズ)	L-column2 ODS (直径 150 mm、内径 2.1 mm、粒子径 5 μM、化学物質評価研究機構)
	カラム温度 (°C)	40	
	注入量 (μL)	10	5
	溶離条件	A : 超純水/ギ酸 (1000/1 v/v) B : アセトニトリル/ギ酸 (1000/1 v/v) 0~1 min : 80% A、1~35 min : 80→65% A	超純水 (5 mM 酢酸アンモニウム含有) : メタノール (25 mM 酢酸アンモニウム含有) =4:6
	流量 (mL/min)	0.3	0.2
MS 条件	イオン化法	エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)	
	検出イオン	正イオン	負イオン
	検出法	選択反応モニタリング (MRM)	
	測定イオン (m/z)	プリカーサーイオン : 296.10 プロダクトイオン : 215.10、250.00、278.00	プリカーサーイオン : 267.20 プロダクトイオン : 237.20、222.30
	インタフェース温度 (°C)	300	
	DL 温度 (°C)	240	
	ネブライザーガス流量 (L/min)	1.50	
	ヒーティングガス流量 (L/min)	10.00	
	ヒートブロック温度 (°C)	400	
	ドライイングガス流量 (L/min)	10.00	
コリジョンエネルギー (V) [対象イオン、m/z]	-19.0 [215.10]、-13.0 [250.00]、 -10.0 [278.00]	30.0 [237.20]、33.0 [222.30]	

## 2.3 成績

### 2.3.1 $C_w$ の算出結果

各実験及び各薬物における、ばく露した薬物水溶液の測定濃度 ( $C_w$ ) の時間加重平均値を算出した結果を表 10 に示す。各薬物の  $C_w$  は、それぞれの設定濃度の 86.9～110%であり、ほぼ設定濃度通りであった。

### 2.3.2 ZF 胚・仔魚全身における胚中濃度推移の結果

24 hpf 毎の ZF 胚・仔魚全身における  $C_e$  について、脂溶性が比較的低い ( $\log D < 1$ ) の薬物の算出結果を図 4 に示した。 $\log D < 1$  の薬物の  $C_e$  は、120 hpf まで経時的に増加した。これに対して、脂溶性が比較的高い ( $\log D > 1$ ) 薬物では、48～96 hpf で  $C_e$  の最大値に達し、それ以降は  $C_e$  が経時的に減少した (図 5)。

さらに、得られた各時点の  $C_e$  の結果について、 $\log[C_e/C_w]$  を縦軸に、薬物の  $\log D$  を横軸にとってプロットしたグラフを図 6 に示す。プロットの回帰分析による回帰式における決定係数  $R^2$  は 0.87～0.96 であった。なお、全ての時点において、カフェインのプロットだけが、回帰直線から大きく乖離し、どの時点でも回帰直線の上方に位置していた。理由は不明であるが、特別な機構が関与している可能性が考えられたため、回帰式の算出から除外した。

### 2.3.2 ZF 胚・仔魚における部位毎の薬物濃度 (薬物分布) の結果

ZF 胚・仔魚における全身、体部、卵黄囊それぞれの  $C_e$  の算出結果を図 7 に示す。全ての薬物について、 $C_e$  の大きさは、卵黄囊、全身、体部の順に小さくなる傾向を示した。また、例えば、 $\log D$  が 0.50 のフルコナゾールでは、卵黄囊の  $C_e$  (129 mg/kg) は体部の  $C_e$  (100 mg/kg) の約 1.3 倍高い値であったのに対し (図 7 B)、 $\log D$  が 5.07 のジエチルスチルベストロールでは、0.134 mg/L 区において卵黄囊の  $C_e$  (67.0 mg/kg) が体部の  $C_e$  (4.18 mg/kg) の 16 倍高い値を示した (図 7 H)。つまり、全体として、薬物の  $\log D$  が高いほど、体部の  $C_e$  に対する卵黄囊の  $C_e$  の比率が大きくなる傾向を示した。

さらに、得られた各部位の  $C_e$  の結果について、 $\log[C_e/C_w]$  を縦軸に、薬物の  $\log D$  を横軸にとってプロットしたグラフを図 8 に示す。両者の関係は直線の式に回帰できた。プロットの回帰分析による回帰式の決定係数  $R^2$  は 0.95~0.97 であった。なお、全ての部位において、カフェインのプロットは、回帰直線の上方に大きく乖離して位置していた。やはり特別な機構が介在する可能性があるため、回帰式の算出から除外した。

表 10. ばく露した薬物水溶液の測定濃度 (C<sub>w</sub>) の時間加重平均値

薬物名	胚中濃度推移		薬物分布	
	設定濃度 (mg/L)	測定濃度時間加重 平均値 (mg/L) (対設定濃度 %)	設定濃度 (mg/L)	測定濃度時間加重 平均値 (mg/L) (対設定濃度 %)
シタラビン	2430	2380 (98.1)	-	-
スマトリプタン コハク酸塩	2070	2270 (110)	-	-
カフェイン	5.00	5.18 (104)	5.00	5.18 (104)
	10.0	10.2 (102)	10.0	10.2 (102)
フルコナゾール	1530	1490 (97.6)	1530	1540 (101)
イマチニブ	24.7	27.0 (109)	24.7	27.0 (109)
ジクロフェナク ナトリウム	3.20	3.41 (107)	1.60	1.69 (106)
			3.20	3.30 (103)
カルバマゼピン	47.3	46.2 (97.6)	47.3	46.2 (97.6)
			94.5	94.3 (99.8)
フェニトイン	18.9	18.8 (99.5)	18.9	20.2 (107)
	37.8	36.9 (97.7)	37.8	38.0 (103)
テストステロン	3.00	2.80 (93.3)	1.50	1.30 (86.9)
			3.00	2.80 (93.3)
ジエチルスチル ベストロール	0.268	0.240 (89.7)	0.0671	0.0584 (87.0)
			0.134	0.118 (88.3)

-はデータが無いことを示す。

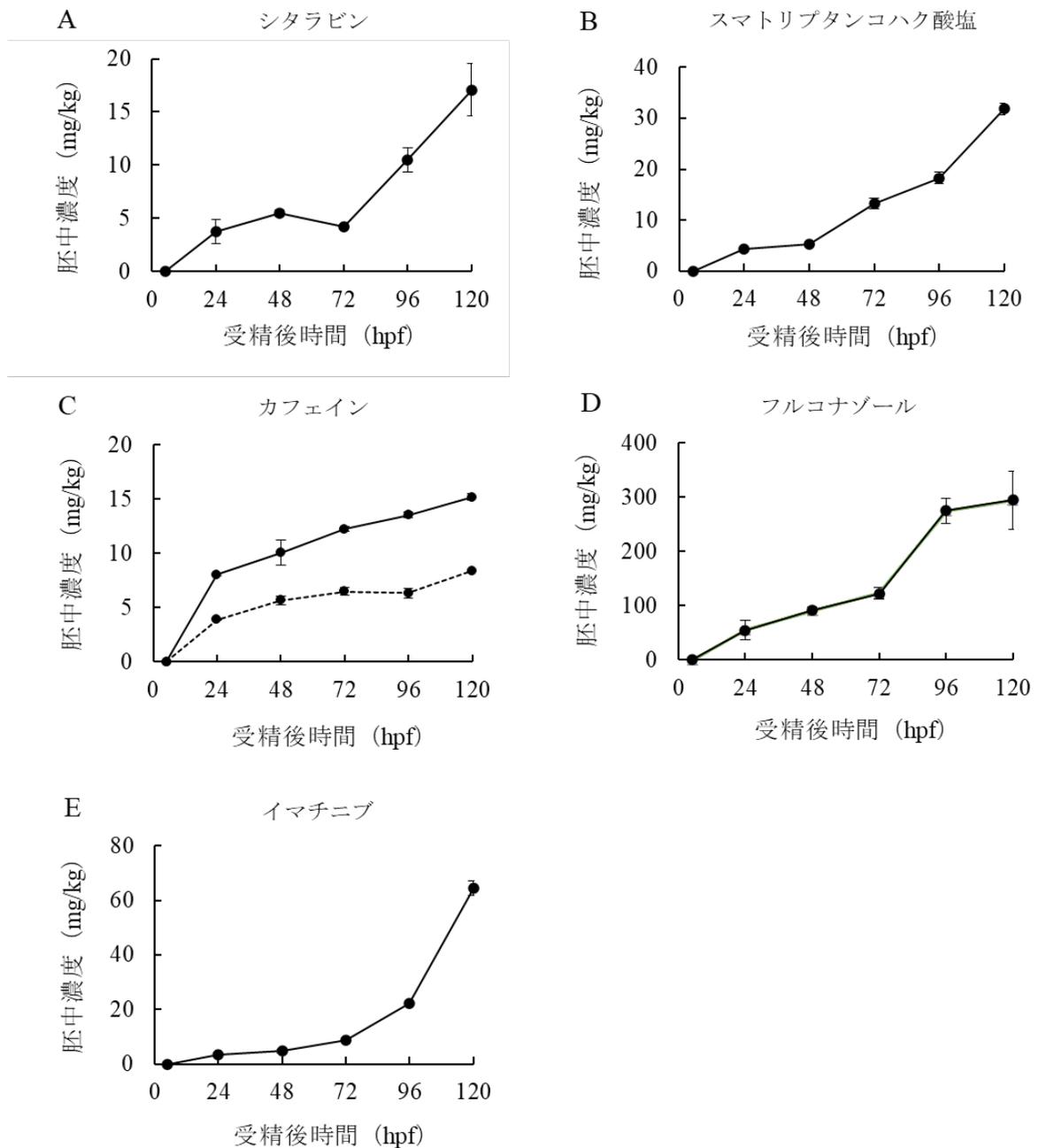


図 4. 脂溶性が比較的低い各薬物 ( $\log D < 1$ ) における全身の胚中濃度 ( $C_e$ ) の推移

各プロットは 3 連の測定値の平均、エラーバーはその標準偏差を表す。(A) シタラビン 2430 mg/L、(B) スマトリプタンコハク酸塩 2070 mg/L、(C) カフェイン (実線 : 10.0 mg/L、点線 : 5.00 mg/L)、(D) フルコナゾール 1530 mg/L、(E) イマチニブ 24.7 mg/L の水溶液 (全て設定濃度にて表示) の結果を表す。

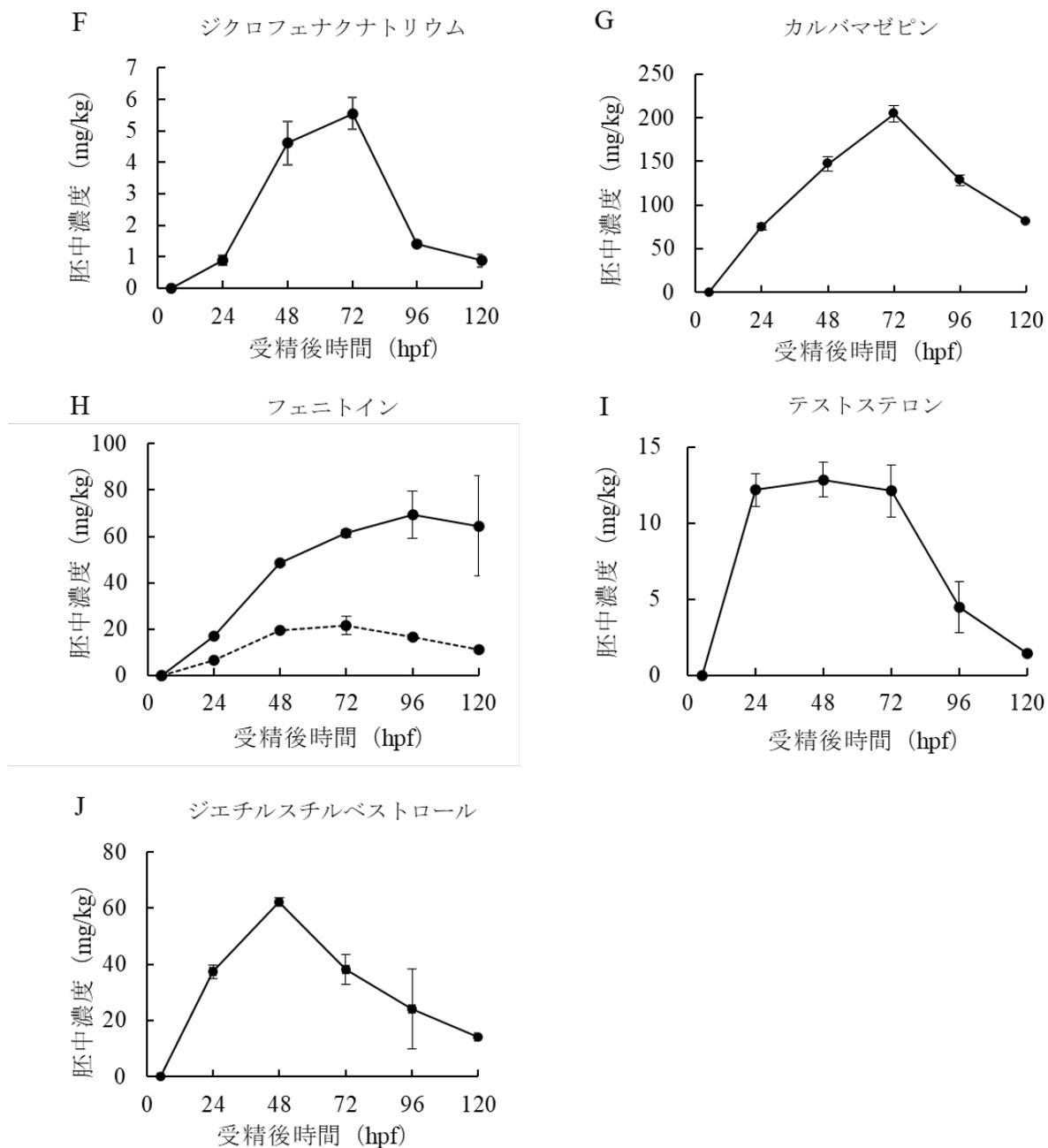


図 5. 脂溶性が比較的高い各薬物 ( $\log D > 1$ ) における全身の胚中濃度 ( $C_e$ ) の推移

各プロットは 3 連の測定値の平均、エラーバーはその標準偏差を表す。(F) ジクロフェナクナトリウム 3.20 mg/L、(G) カルバマゼピン 47.3 mg/L、(H) フェニトイン (実線 : 37.8 mg/L、点線 : 18.9 mg/L、(I) テストステロン 3.00 mg/L、(J) ジエチルスチルベストロール 0.268 mg/L の水溶液 (全て設定濃度にて表示) の結果を表す。

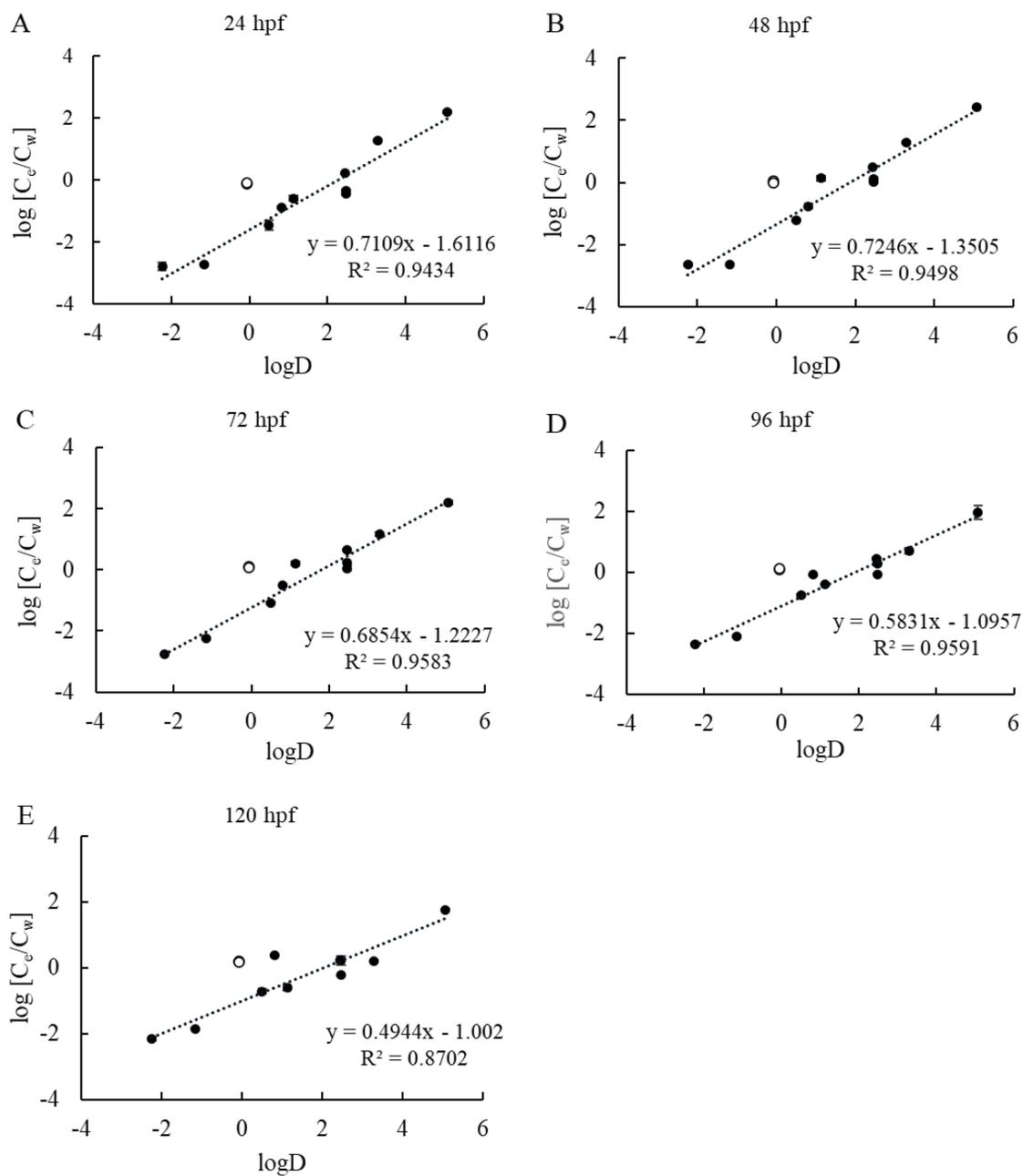


図 6. 各時点における  $\log[C_e/C_w]$  と  $\log D$  との関係

各プロットは 3 連の値の平均、エラーバーは 3 連の値の標準偏差を表す。回帰直線及び回帰式は●のプロットから求め、○はその算出から除外されたプロットを表す。(A) ~ (E) における○は全てカフェインのデータを表す。

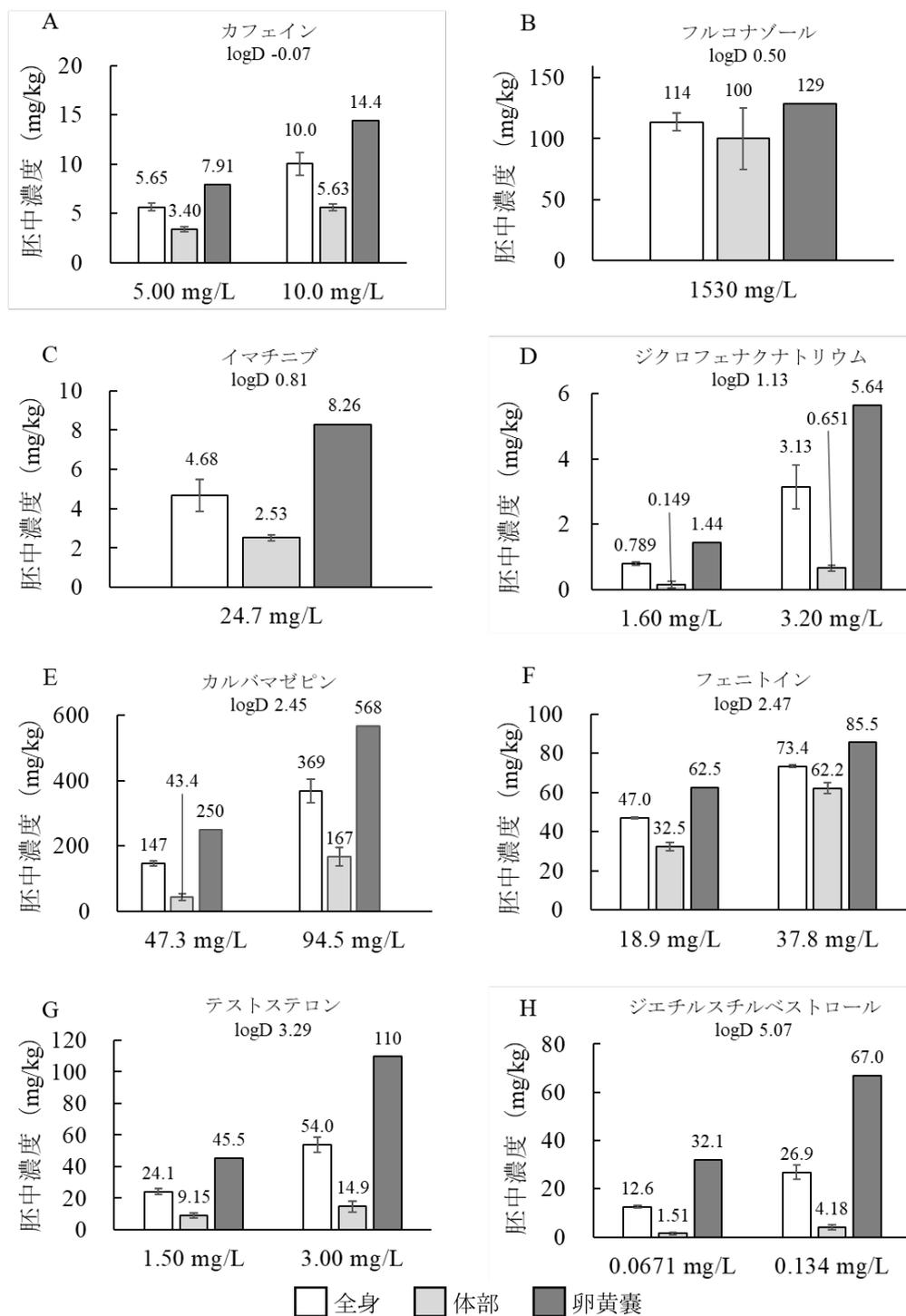


図 7. 部位毎の薬物の胚中濃度の測定結果

白のバーは全身 (n=3) の平均値、薄い灰色のバーは体部 (n=3) の平均値、濃い灰色のバーは卵黄囊 (n=1) の薬物濃度を表す。エラーバーは 3 連の値の標準偏差を表し、各グラフの横軸ラベルは、薬物水溶液の設定濃度を表す。

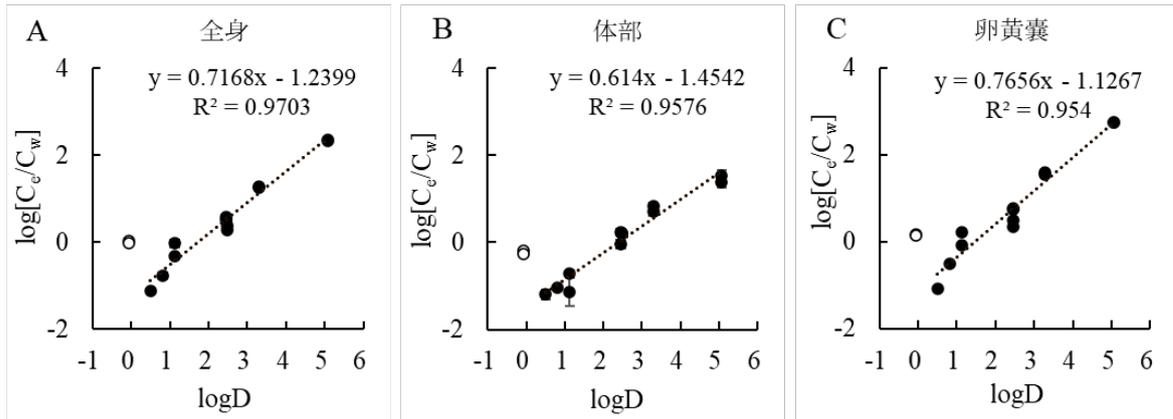


図 8. 各部位における  $\log[C_e/C_w]$  と  $\log D$  との関係

(A) 及び (B) の各プロットは 3 連の値の平均、エラーバーは 3 連の値の標準偏差、(C) の各プロットは 1 連の値を表す。回帰直線及び回帰式は●のプロットから求め、○はその算出から除外されたプロットを示す。(A) ~ (C) における○は全てカフェインのデータを表す。

## 2.4 考察

24 hpf 毎の胚中濃度を測定した結果において、 $\log D < 1$  の高水溶性の薬物では経時的に  $C_e$  が増加し (図 4)、一方で  $\log D > 1$  の高脂溶性の薬物では 48~96 hpf で  $C_e$  のピークを持つような山型の推移を示した (図 5)。ジエチルスチルベストロールを含む高脂溶性薬物が発生途中から経時的に  $C_e$  が低下する原因として最も寄与している要因は、胚の発達やエネルギー消費によって胚・仔魚中における総脂肪濃度が経時的に減少するために、体内に高脂溶性薬物が保持できなくなり、結果として胚中濃度が減少したものと推測した。この仮説を検証するため、0.268 mg/L のジエチルスチルベストロールにばく露した ZF 胚・仔魚全身の総脂肪量を推定した (図 9)。総脂肪量の推定には、Fraher ら [17] が報告した体部及び卵黄における 365 種 (24 グループ) の様々な脂質含有量データを引用した (算出方法は図 9 に記載)。その結果、算出した総脂肪濃度は、72 hpf 以降に顕著に減少し、120 hpf における総脂肪濃度は、24 hpf 時点の濃度の 63% にまで減少した。したがって、ジエチルスチルベストロールの  $C_e$  は、48 hpf までは鰓又は体表を介した吸収、又は胚・仔魚中の脂肪への分配によって増加し、それ以降は、胚・仔魚中の総脂肪濃度の減少に伴って  $C_e$  が減少したものと考えられた。また、その他の  $\log D > 1$  の薬物でみられた  $C_e$  の経時的变化のパターンについても、 $\log D$  に応じて濃度減少における量やタイミングの違いがあるものの、ジエチルスチルベストロールと同様の原因で引き起こされたと考えられる。本章における全薬物の水溶液及び胚・仔魚サンプルの濃度測定において、ばく露中に水溶液中の薬物濃度は設定濃度をほぼ維持しており、また、クロマトグラム上で代謝物や変化物と思われる目的ピーク以外のピークは検出されなかった (データ非掲載)。これらのことから、生体内における薬物代謝や代謝酵素が介在しない加水分解等の変化は、高脂溶性薬物の  $C_e$  の減少に寄与している可能性は低いと考えられる。

また、120 hpf までの 24 hpf 毎の全ての時点において、 $\log[C_e/C_w]$  と薬物の  $\log D$  との間に高い相関性 ( $R^2 : 0.87 \sim 0.96$ ) があることが明らかになった (図 6)。このような結果となった理由は、薬物の胚・仔魚への濃縮の割合は、一般的に総脂肪濃度 (脂質含量) に強く依存するため [44]、また、同じ胚の発生段階において、ZF 胚・仔魚中の総脂肪濃度がほぼ同条件となっていたためであると考えられる。全ての時点において、カフェインのプロットは、回帰直線から上方に大きく乖離しており、他の薬物

と比較して ZF 胚・仔魚中により高濃縮していた。本研究におけるカフェインのばく露実験は、ばく露させた水溶液濃度が 5.00 mg/L 区及び 10.0 mg/L 区の 2 条件で実施しており、いずれの時点においても、3 連の  $C_e$  のばらつきは少なく (図 4 C)、また、両条件における  $C_e/C_w$  比はほぼ同じであった (図 6) ことから、回帰直線からの乖離が実験操作上の誤差等によって引き起こされた可能性は低いと思われる。したがって、カフェインの物理化学的性状若しくは生体における何らかの機構の介在が回帰直線からの乖離の主要因であることが考えられた。そこで、カフェインに関しては回帰式の算出から除外した (図 6)。これまでカフェインが ZF を含む動物組織へより多く蓄積する傾向を示すことについての知見は報告されておらず、カフェインが他の薬物よりもより高濃縮される原因は不明である。今後、カフェインと同様の  $\log D$  を持つ複数の薬物について、あるいはカフェインと同様の機構を持つ薬物について解析することで、当該原因の特定に繋がるかもしれない。

本章で得られた各時点における  $\log[C_e/C_w]$  と  $\log D$  の相関関係の回帰式を用いて、発生毒性薬物の  $\log D$  及びばく露する水溶液濃度が既知であれば、ZF 胚・仔魚中の薬物濃度を推定することが可能であると考えられる。また、その解析で用いられた薬物は、それぞれ様々な作用機序によって薬効を示す医薬品であり、かつ、発生毒性がみられない濃度域における解析結果であることから、この相関関係は、多種多様な薬物についても成り立つ可能性が高い。そのことを検証するために、今後、様々なカテゴリーの薬物を用いて、さらにデータを取得していく必要があると考えられる。

本章では、ZF 胚・仔魚における薬物分布を調べる実験において、全身、体部、卵黄囊それぞれの  $C_e$  を算出し、全身の場合と同様に、 $\log[C_e/C_w]$  と薬物の  $\log D$  との間に高い相関性を示すことが明らかになった。このような結果となった理由は、上述の内容と同様に、同部位における総脂肪濃度がほぼ同条件となっていたためであると考えられる。ここで、全身、体部、卵黄囊において、カフェインのプロットは、回帰直線からの乖離が大きい結果となったが、乖離の程度は部位間で大きな差は無かった

(図 7)。このことから、カフェインは特定の部位特異的により高濃度で蓄積するのではなく、濃縮の割合は生体組織全体でほぼ同様である可能性が示唆された。また、本研究では 48 hpf の時点におけるふ化仔魚でのみ部位毎の  $C_e$  を測定したが、体部、卵黄囊の  $C_e$  についても 24 hpf 毎に測定することによって、薬物分布が経時的にどのよ

うに変化するかを把握することができ、ZF 胚・仔魚における薬物動態のさらなる理解に繋がると考えられる。

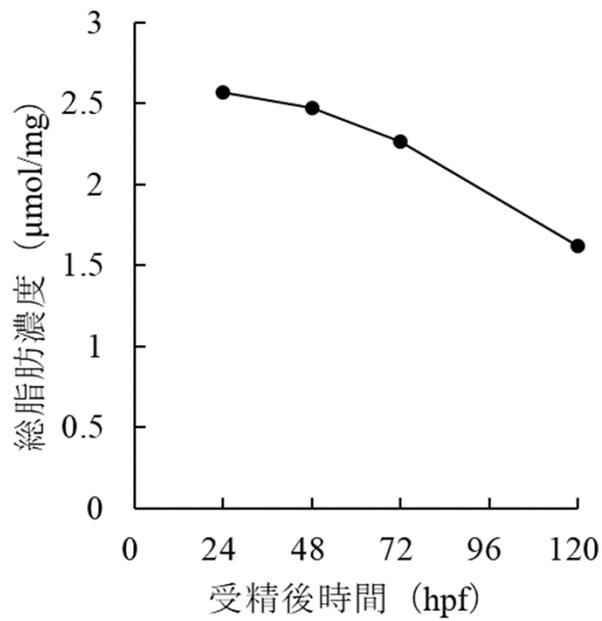


図 9. ジエチルスチルベストール 0.268 mg/L にばく露した ZF 胚・仔魚における総脂肪濃度の経時的変化の推定

総脂肪濃度は、総脂肪量を個体湿重量で除して算出した。総脂肪量は、Fraherら [17] に記載された、各時点の ZF 胚・仔魚中の卵黄囊及び体部における計 365 種の脂質の合計モル数を用いた。個体重量は、ジエチルスチルベストール 0.268 mg/L にばく露した ZF 胚・仔魚について測定した湿重量の平均値 (24 hpf : n=5 ; 48、72、120 hpf : n=9) を用いた。各プロットは n=1 の値。

## 2.5 小括

本章では、ZF 胚・仔魚における薬物濃度の時間変化及び薬物の体内分布について調べるために、24 hpf 毎の全身の  $C_e$  測定、並びに 48 hpf における全身、体部、卵黄囊の薬物濃度の測定を実施した。24 hpf 毎の全身の  $C_e$  測定の結果、 $\log D < 1$  の薬物は、経時的に  $C_e$  が増加する傾向を示し、 $\log D > 1$  の薬物は、48-96 hpf でピークを持ち、以降  $C_e$  が減少する傾向を示した。部位毎の  $C_e$  測定の結果、全ての薬物について、 $C_e$  の大きさは、卵黄囊、全身、体部の順に小さくなる傾向を示し、薬物の  $\log D$  が高いほど、体部の  $C_e$  に対する卵黄囊の  $C_e$  の比率が大きくなる傾向を示した。これらの  $C_e$  の結果について、時点毎、あるいは部位毎で、 $\log[C_e/C_w]$  は薬物の  $\log D$  と高い相関性を示した。このような相関関係を示した理由は、薬物の胚・仔魚への濃縮の割合は、一般的に総脂肪濃度（脂質含量）に強く依存し、また、同じ発生段階又は同じ部位における総脂肪濃度がほぼ同条件となっていたためであると考えられた。本章で得られた全身の  $C_e$  と  $\log D$  との相関関係における回帰式を用いることで、薬物  $\log D$  値及び  $C_w$  から  $C_e$  を推定することが可能となった。

### 第III章 発達初期ゼブラフィッシュにおけるシトクローム P450 (CYP) 発現及びヒト CYP 基質に対する代謝活性

#### 3.1 序文

ZF 胚発生毒性試験が医薬品の EFD 試験の代替法として期待されているが、ZF 胚・仔魚の薬物動態に関する知見が不足している状況である。薬物動態のうち、代謝については、胎生と卵生という大きな違いが影響していることが考えられる。つまり、哺乳類の胚・胎児は、母体の代謝を介して親化合物とその代謝物に曝されている一方で、ZF は卵生のため、ZF 胚・仔魚は生体異物の解毒を自身の薬物代謝能力に依存している。特に、直接的な薬物代謝能力の有無の違いは、催奇形性を誘発するために生物活性化を必要とするプロテラトゲンの研究において非常に重要である [61]。プロテラトゲンを代謝する ZF 固有の能力が欠如することで、ZF 胚を用いる発生毒性を検出する系で偽陰性の結果につながる可能性がある。これらの懸念があるものの、ZF 胚・仔魚とヒト又は他の哺乳類との間の薬物代謝を比較した報告例はわずかである [13]。

薬物代謝は、主に薬物代謝酵素シトクローム P450 (CYP) によって行われる。CYP はヘムタンパク質のスーパーファミリーであり、そのうち、CYP1、CYP2 及び CYP3 及び一部の CYP4 ファミリーは生体異物の酸化的代謝に大きく関与している [8,21,61]。CYP は上市されている医薬品の代謝に関与する酵素の約 75% を占めている [22]。ヒトゲノムにコードされている 57 の CYP のうち、5 つの CYP ファミリー、つまり CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4/5 が、CYP による代謝の約 95% を占めている [22]。ヒトにおいて、ホメオスタシス及び生体異物からの防御に重要な肝臓では、最も一般的に発現する 3 種の CYP アイソフォームは CYP1A2、CYP2C9 及び CYP3A4/5 であり、それぞれの含有率はそれぞれ全体の 12~13%、12% 及び 29% である [26,37,56,64]。

ZF において、CYP を介した薬物代謝に関する知見は限定的かつ断片的である [9,50]。これまで報告された論文において、ZF の肝原基の形成は 28 hpf、肝臓の発達は 60~72 hpf に始まり、CYP 代謝を含む肝機能は 120 hpf までにほぼ完了する [10,31,59]。発達初期の 48 hpf における ZF 胚及び ZF 成魚肝臓における CYP 遺伝子の完全相補配列の転写プロファイリングが報告されている [20,36]。しかし、48 hpf

以降の ZF における CYP 遺伝子の発現に関する包括的なデータはまだ報告されていない。さらに、ZF における CYP 転写産物の活性と臓器分布に関するデータは不足したままである。一部の薬物は、特定のシグナル伝達経路を介して CYP 酵素タンパク質の生合成を誘導することにより、CYP を介した代謝を活性化するため、基質にばく露された ZF の代謝活性は、ばく露されていない ZF とは異なる可能性がある [46]。また、ZF 胚・仔魚期における CYP 遺伝子における mRNA の発現量、臓器分布、酵素活性に関するデータは不足している。したがって、発達初期の ZF 胚・仔魚における CYP を介した薬物代謝の全容を把握するには、発生段階毎に CYP の発現における活性及び分布あるいは代謝活性のプロファイルを包括的に調べる必要がある。

本章では、様々な薬物代謝 CYP の発達初期 ZF 胚・仔魚における mRNA の発現及び体内分布、及び代謝活性のプロファイルを収集することを目的として、以下の実験を行った。まず、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) を使用して、ZF 成魚肝臓と比較して、胚・仔魚全身の薬物代謝 CYP の転写レベルを分析した。次に、肝臓発達の開始前から化学誘導剤で処理された ZF 仔魚の CYP 転写産物の分布を解析するために、ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションを実施した。さらに、ヒトと ZF 胚・仔魚の間の代謝機能の類似性を調査するために、CYP 基質にばく露した ZF 胚・仔魚について、ヒト CYP を介した代謝産物を測定した。この実験では、ヒトの薬物代謝で主要な役割を担っている 3 つのヒト CYP (CYP1A2、CYP2C9 及び CYP3A4/5) の基質として、それぞれカフェイン、ジクロフェナクナトリウム及びテストステロンを使用した。ヒトでは、1,7-ジメチルキサンチン (DMX) の産生は CYP1A2、4'-ヒドロキシジクロフェナク (4'-OHDF) の産生は CYP2C9、5-ヒドロキシジクロフェナク (5-OHDF) 及び 6 $\beta$ -ヒドロキシテストステロン (OHTS) の産生は CYP3A4/5 が媒介することが知られている [34,47,55,63]。

## 3.2 材料と方法

### 3.2.1 ZF 受精卵の採取及び薬物へのばく露

本章では野生型の ZF (*Danio rerio*) を使用し、代謝活性を調べる実験及び qPCR 実験では NIES-R 系統、*in situ* ハイブリダイゼーションでは long-fin 系統 (我々の施設にて維持されたもの) を用いた。ZF の飼育管理及び受精卵の採取は、1.2.1 と同様の手法で実施した。

qPCR 及び *in situ* ハイブリダイゼーションでは、100  $\mu\text{M}$  の  $\beta$ -ナフトフラボン (シグマアルドリッチ)、1.0 ppb の 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-*p*-ダイオキシン (TCDD、Cambridge Isotope Laboratories、Andover、MA、USA)、100  $\mu\text{M}$  のリファンピシン (富士フィルム和光純薬、大阪) 若しくは 100  $\mu\text{M}$  のフェノバルビタール (東京化成工業、東京) となるように、fish water (38.7 mM NaCl、1.0 mM KCl、1.7 mM HEPES-NaOH pH 7.2、2.4 mM  $\text{CaCl}_2$ ) を用いてそれぞれ調製し、プラスチックシャーレにそれぞれ 3 mL 添加し、10 個体の ZF 胚を 30~55 hpf の間ばく露した。ZF 胚は、高浸透性を示す TCDD へのばく露の場合を除き、卵膜を除去した。

ZF 胚・仔魚における代謝活性を調べる実験で用いるために、カフェイン、ジクロフェナクナトリウム、テストステロン、アセトン、アセトニトリル、メタノールは富士フィルム和光純薬から、DMX、4'-OHDF、5-OHDF、OHTS はシグマアルドリッチから、DMSO はナカライテスクから購入した。CYP 基質 (カフェイン、ジクロフェナクナトリウム、テストステロン) 及びそれらのヒト CYP 代謝物 (DMX、4'-OHDF、5-OHDF 及び OHTS) の構造式及び対象のヒト CYP アイソフォームを表 11 に示す。ZF 胚・仔魚 1 個体あたりの薬物量を測定するために、ばく露期間中に形態異常や行動異常がみられない最大の水溶液濃度として、カフェインは 10 mg/L、ジクロフェナクナトリウムは 3.2 mg/L、テストステロンは 3.0 mg/L を設定した。カフェイン及びジクロフェナクナトリウムの水溶液は人工調製水 (ISO 5341-1982) [41] のみで調製し、テストステロンの場合は、上記人工調製水に 0.01% の DMSO が含有するように調製した。5 hpf の正常な ZF 胚を、ガラス容器内に入れたそれぞれの薬物水溶液に移し、ばく露を開始した (収容密度 : >1 mL/個体)。ガラス容器には揮発を防ぐためにプラスチックの蓋を設置し、14 時間明/10 時間暗の照明周期、 $28\pm 1^\circ\text{C}$  の条件下で 120 hpf ま

でばく露した。暴露期間中、カフェイン及びジクロフェナクナトリウムの水溶液は交換せず、テストステロンの水溶液は、水溶液中濃度を維持するために 48 hpf の時点で換水を実施した。

### 3.2.2 qPCR

様々な CYP アイソフォームの発現量を調べるために、qPCR 測定を実施した。TRI-Reagent (シグマアルドリッチ) を用いて、胚、仔魚及び雌雄の成魚の肝臓から、それぞれ total RNA を抽出し、ReverTra Ace qPCR キット (東洋紡、大阪) を用いて、製造元の取扱説明書に従って相補的 DNA (cDNA) を調製した。それぞれの cDNA サンプルを調製するために 15~20 個の胚・仔魚を使用し、発生段階ごとに 6 つの cDNA サンプルを調製した (n=6)。また、成魚肝臓については、12 個体分の肝臓から、12 個の DNA サンプルを調製した (雌雄で 6 個体ずつ)。qPCR 測定は、Thunderbird® qPCR Mix (東洋紡) を用いて、LightCycler480 System II (日本ジェネティクス、東京) の機器を使用した。qPCR 分析において使用したプライマーセットを表 12 に示す。なお、全てのプライマーセットは、予備検討において、融解曲線で単一のピークを生成すること、アガロースゲル電気泳動により単一のバンドを生成することが確認されたものを用いた。

### 3.2.3 ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション

ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションは過去に論文にて報告した方法で実施した [60]。ZF 胚は、パラホルムアルデヒドで固定し、ジゴキシゲニン (DIG) RNA 標識キット (シグマアルドリッチ) を用いて、DIG を組み込んだ CYP サブタイプのアンチセンス RNA プローブを作成し、それを 65°C で一晩ハイブリダイズさせた。CYP プローブを得るために、CYP DNA を表 13 で示したプライマー、及び KOD FX Neo enzyme 溶液 (東洋紡) を用いた PCR 反応によって増幅させた。次に、pTAC2 TA ベクター (バイオダイナミクス、東京) へのサブクローニング及び SP6 RNA ポリメラーゼ (New England Biolabs、Ipswich、MA、USA) による *in vitro* 転写を行った。ハイブリダイゼーション及び洗浄後、胚を、アルカリホスファターゼと結合した抗

DIG 抗体（シグマアルドリッチ）と 4°Cで一晩インキュベートした。発色反応は、基質として BM Purple 基質（シグマアルドリッチ）又は Fast Red（シグマアルドリッチ）を用いて行った。

#### 3.2.4 ZF 胚・仔魚 1 頭あたりのヒト CYP 代謝物量の測定

3.2.1 と同様の方法でカフェイン、ジクロフェナクナトリウム及びテストステロンをそれぞればく露した ZF 胚について、DMX 及び OHTS の測定は 50 及び 120 hpf に、4'-OHDF 及び 5-OHDF の測定は 120 hpf まで 24 hpf 毎に実施した。DMX 及び OHTS では、ばく露した ZF 胚を必要量（200~1000 個体/連、3 連/時点）取り上げ、遠心管に移した後、アセトンを加え、ポリトロンホモジナイザー（PT3100、Kinematica AG、Lucerne、Switzerland）を用いてホモジナイズした。その後、遠心機 CR21N（日立工機）で 20,000×g、10°Cの条件で 15 分間遠心した。遠心後の上澄み液を採取し、サンプリングチューブに移した。上澄み液を採取した後のサンプリングチューブに再度アセトンを加え、同様にホモジナイズ、遠心操作を行い、その上澄み液を同じサンプリングチューブに移し、窒素ガスを吹き付けてチューブ内の混合溶液を乾固させた。その後、抽出溶液（後に濃度分析で使用する液体クロマトグラフィーの溶離液と同じ組成の混合溶液）500µL をサンプリングチューブに加えたものを、口径 0.2 µm の Millex-LG メンブランフィルター（Merck）で加圧ろ過したろ液を抽出溶媒で 2 倍に希釈したものを分析用試料とした。DMX の定量では、事前の検討において、ZF 胚・仔魚由来の夾雑物（マトリクス）が分析結果に影響を及ぼすことが確認されたため、対照区（試験用水のみで飼育した区）の個体を分析試料の調製時と同様に処理したものをを用いて分析試料とマトリクスの含有量を合わせた標準溶液を調製し、検量線を作成した。

DMX は、液体クロマトグラフィー質量分析法（LC-MS）により分析した。分析機器は、ACQUITY UPLC BEH C18 カラム（直径 50 mm、内径 2.1 mm、粒子径 1.7 µm、日本ウォーターズ）を取り付けた Nexera X2（島津製作所）及び LCMS-8060（島津製作所）を使用した。分析用試料の機器への注入量は 5 µL、溶離条件はメタノール：超純水=2：8、流速は 0.20 mL/min で行った。イオン化法は ESI で実施し、データは MRM を使用して正イオンモードで取得した。カラム温度は 40°C、インタフェ

ース温度は 300°C、DL 温度は 240°C、ヒートブロック温度は 400°Cで行い、ネブライザーガス流量は 1.50 L/min、ヒーティングガス流量は 10.00 L/min、ドラインガス流量は 10.00 L/min で実施した。DMX の測定のために、1 つのトランジション（プリカーサーイオン： $m/z$  181.20、プロダクトイオン： $m/z$  124.20、コリジョンエネルギー： $-20.0$  V）をモニターした。

OHTS は、LC-MS により分析した。分析機器は、ACQUITY UPLC BEH C18 カラム（直径 50 mm、内径 2.1 mm、粒子径 1.7  $\mu$ M、日本ウォーターズ）を取り付けた Nexera X2（島津製作所）及び LCMS-8060（島津製作所）を使用した。分析用試料の機器への注入量は 10  $\mu$ L、溶離条件はアセトニトリル（0.1% ぎ酸含有）：超純水（0.1% ぎ酸含有）=3：7、流速は 0.20 mL/min で行った。イオン化法は ESI で実施し、データは MRM を使用して正イオンモードで取得した。カラム温度は 40°C、インタフェース温度は 300°C、DL 温度は 240°C、ヒートブロック温度は 400°Cで行い、ネブライザーガス流量は 1.50 L/min、ヒーティングガス流量は 10.00 L/min、ドラインガス流量は 10.00 L/min で実施した。OHTS の測定のために、2 つのトランジション（①プリカーサーイオン： $m/z$  305.00、プロダクトイオン： $m/z$  269.40、コリジョンエネルギー： $-16.0$  V、②プリカーサーイオン： $m/z$  305.00、プロダクトイオン： $m/z$  287.30、コリジョンエネルギー： $-15.0$  V）をモニターした。

4'-OHDF 及び 5-OHDF は、ジクロフェナクナトリウムの C<sub>6</sub> 算出のための測定と同じ試料を用いて LC-MS/MS により分析した（2.2.3、表 9 参照）。事前の検討において、マトリクスが分析結果に影響を及ぼさないことが確認されたため、マトリクスを含まない標準溶液を用いて検量線を作成した。モニタリングする目的イオン以外の機器及び分析条件は、ジクロフェナクナトリウムの C<sub>6</sub> 算出のための測定と同じ内容で実施した（表 9）。4'-OHDF 及び 5-OHDF の測定では、共通の 3 つのトランジション（①プリカーサーイオン： $m/z$  312.10、プロダクトイオン： $m/z$  231.10、コリジョンエネルギー： $-21.0$  V、②プリカーサーイオン： $m/z$  312.10、プロダクトイオン： $m/z$  266.00、コリジョンエネルギー： $-13.0$  V、③プリカーサーイオン： $m/z$  312.10、プロダクトイオン： $m/z$  294.00、コリジョンエネルギー： $-11.0$  V）をモニターした。

### 3.2.5 分析用試料の定量

本定量方法の有効性を確認するために、標準溶液を用いて検量線（最小二乗法による回帰式： $Y=aX+b$ 、 $Y$ ：応答量、 $X$ ：薬物濃度）を作成した。その結果、クロマトグラム上のピーク面積と濃度により作成した検量線の相関係数  $r$  は 0.995 以上であり、切片  $b$  の絶対値は応答量の最大値の 5%以内であったことから、検量線は原点を通過する直線とみなし、被験物質の定量は 1 濃度の標準溶液を用いた絶対検量線法で行った。4'-OHDF 及び 5-OHDF 以外の測定対象物質については、クロマトグラムから得られる目的ピークにおけるピーク面積を応答量とした。4'-OHDF 及び 5-OHDF については、上記分析条件にて両者のピークを完全に分離できなかったことから、ベースからピークトップまでの高さ（ピーク高さ）を応答量とした。

### 3.2.5 統計解析

qPCR の実験では、結果は平均 $\pm$ SEM ( $n=6$ ) で表示した。CYP アイソフォームの遺伝子発現レベルは、一元配置分散分析に続いて、Statcel 4 (OMS Publishing、東久留米) による Dunnett 検定を使用して、それぞれの対照群と比較群の間で発現レベルを比較した ( $p<0.05$ )。C<sub>e</sub> 値の測定結果は平均値 $\pm$ SD ( $n=3$ ) として表示され、2 つの特定の C<sub>e</sub> 値の間の有意差は、SPSS 統計バージョン 22 (IBM、Armonk、NY、USA) を使用した両側の  $t$  検定 ( $p<0.05$ ) によって決定した。

表 11. 実験に使用した CYP 基質及びヒト CYP 代謝物

CYP 基質		ヒト代謝物			
名称	構造式	名称	略称	構造式	ヒト CYP
カフェイン		1,7-ジメチル キサンチン	DMX		CYP1A2
ジクロフェナク ナトリウム		4'-ヒドロキシ ジクロフェナク	4'- OHDF		CYP2C9
		5-ヒドロキシ ジクロフェナク	5- OHDF		CYP3A4/5
テストステロン		6β-ヒドロキシ テストステロン	OHTS		CYP3A4

表 12. リアルタイム PCR のために使用したプライマー

Primers	Sequence (5'-3')
<i>cyp1a</i> -F	TGCCGATTCATCCCTTCC
<i>cyp1a</i> -R	AGAGCCGTACTGATAGTGTC
<i>cyp1b1</i> -F	TCAGCTCGGTAACACTCCTC
<i>cyp1b1</i> -R	GGAATGAAGCAAAGTCGGGT
<i>cyp1c1</i> -F	GCGTAATTGAGCACGGGA
<i>cyp1c1</i> -R	CATCCATTGCATTGCTGTT
<i>cyp1c2</i> -F	TGGTGTAAATGGATCATGCAG
<i>cyp1c2</i> -R	GCAGAAGCATCCAATTAAGC
<i>cyp1d1</i> -F	CGCCCTGACCTCTATACCTT
<i>cyp1d1</i> -R	GGATCAATCCCAGAGTCTCC
<i>cyp2ad2</i> -F	TGATCCAAACGAATGGGAAACC
<i>cyp2ad2</i> -R	TCACTTTGTTCTAACGTACAGAG
<i>cyp2k18</i> -F	CAACAGCAGCCTCTCTTTCTC
<i>cyp2k18</i> -R	AGCGTCTGATTGCACACAG
<i>cyp2n13</i> -F	GCTTCATCCCAAAGGGCA
<i>cyp2n13</i> -R	CAGATCTTGAACGGGTGTGG
<i>cyp2r1</i> -F	CCGAGCCTCTCAGCGAAATTGG
<i>cyp2r1</i> -R	GTCAACATCAGAGGTCAG
<i>cyp2y3</i> -F	TGGAATGGGACGCAAACGAA
<i>cyp2y3</i> -R	CACCAGAGAGCAGATGACGT
<i>cyp3a65</i> -F	GGTACTTCAAGAAGCTGGGC
<i>cyp3a65</i> -R	GGTCACCACATCCATACTGTACG
<i>cyp3c1</i> -F	TAGAACTCCGTGTTGAGGAGCGG
<i>cyp3c1</i> -R	GCCTTCCATCATAGATCCCCC
<i>cyp3c2/3</i> -F	GCAAGCGAGGCATTTTACA
<i>cyp3c2/3</i> -R	TAAACACATCCACAAGGCCA
<i>cyp3c4</i> -F	CATTTCTGTCTGTGACCTGG
<i>cyp3c4</i> -R	ATTTTAACTGGCTGCTCCGGG

表 13. ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションで使用したプライマー

Primers	Sequence (5'-3')
<i>cyp2n13</i> -F	GCTTCATCCCAAAGGGCA
<i>cyp2n13</i> -R	CAGATCTTGAACGGGTGTGG
<i>cyp2r1</i> -F	CCGAGCCTCTCAGCGAAATTGG
<i>cyp2r1</i> -R	GTCAACATCAGAGGTCAG
<i>cyp2y3</i> -F	TGGAATGGGACGCAAACGAA
<i>cyp2y3</i> -R	CACCAGAGAGCAGATGACGT
<i>Cyp3a65</i> -F	GGTACTTCAAGAAGCTGGGC
<i>Cyp3a65</i> -R	GGTCACCACATCCATACTGTACG

### 3.3 成績

#### 3.3.1 ZF 胚・仔魚全身における薬物代謝 CYP アイソフォームの発現量

ヒト異物代謝 CYP アイソフォームのホモログを含む 14 個の CYP は、発生中に mRNA 発現パターンに様々な変化を示した (図 10-12)。多くの CYP 転写産物の発現は、肝臓の増殖が進行する約 96 hpf で急激に増加した。ただし、一部の *cyp1* (*1b1*、*1c1*、*1c2*、*1d1*) (図 10B-E) および *cyp2r1* (図 11D) の発現は、肝臓が完全に発達する前に 48 又は 72 hpf でピークに達した (図 10 及び 11)。多くの CYP、すなわち *cyp1b1*、*1c1*、*2n13*、*3a65*、*3c2/3*、及び *3c4* の転写レベルは、144 hpf までの期間のさまざまな時点で雌雄の成魚肝臓よりも有意に高かった ( $p < 0.05$ )。 *cyp1c2* 及び *cyp1d1* の発現レベルは、いくつかの時点で仔魚よりも雌雄の成魚肝臓が常に有意に高い結果にはならなかった (図 10D、E)。96~144 hpf の仔魚における *cyp3a65* の発現は、*cyp3c1* および他の *cyp3c* サブタイプよりもはるかに大きかったのに対し、*cyp3c1* の発現は他の *cyp3* サブタイプよりも成魚肝臓で高かった (図 12)。144 hpf までの胚仔魚において、*cyp3a65* の発現量は *cyp3c1-4* に比べて明らかに高かった。

#### 3.3.2 ふ化仔魚 (55 hpf) における CYP アイソフォームの mRNA 発現部位の特定

3.3.1 で対象とした CYP アイソフォームの体内での局在化について調べるために、肝臓の成長が始まる前に、55 hpf の仔魚でホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションを実施した。*cyp2y3* (図 13K) を除いて、助剤処置区 (図 13E、G、J、N) で発現は検出されなかった。

調査した CYP サブタイプの発現は助剤対照区の仔魚ではほとんど検出されなかったため、胚に 30 hpf から CYP 誘導剤 [リファンピシン、フェノバルビタール及び TCDD] をそれぞればく露し、55 hpf での *in situ* ハイブリダイゼーションのために固定した。*cyp2n13* mRNA 発現は、リファンピシン (図 13F) 及びフェノバルビタール (データ非掲載) をそれぞればく露した仔魚で検出された。局在化は、浮袋の原基マーカーである *elov1a* の局在化と一致した (図 13A、B)。*cyp2r1* mRNA の発現は、TCDD (図 13H)、フェノバルビタール (図 13I)、及びリファンピシン (データ非記

載)をそれぞればく露した仔魚において、*foxa3* mRNA 発現 (図 13C、D) によって示される肝臓に相当する部位で検出された。*cyp2y3* mRNA の発現は、リファンピシン (図 13L) 又はフェノバルビタール (図 13M) 及び何例かの助剤処置区の仔魚 (図 13K) で検出された。*cyp2y3* mRNA の発現部位は、*foxa3* mRNA の発現と比較して明らかのように、肝臓と腸の位置に類似していた (図 13C、D)。*cyp3a65* mRNA の発現は、TCDD 及びリファンピシンをそれぞればく露した仔魚で検出された (図 13O、P)。発現部位は *foxa3* (図 13C、D) 及び *cyp2y3* (図 13L、M) mRNA の発現部位と類似していた。

一方、55 hpf の仔魚において、リファンピシン及びβ-ナフトフラボン (TCDD 様 CYP 誘導剤 [35]) による *cyp2n13*、*2r1*、*2y3* 及び *3a65* の有意な誘導は、qPCR では認められなかった (図 14)。

### 3.3.3 CYP 基質をばく露した ZF 胚・仔魚 1 頭あたりの代謝物量の測定

カフェインあるいはジクロフェナクナトリウムへのばく露期間中に、肝臓機能が開始する前後の胚・仔魚でそれぞれの代謝物である DMX あるいは 4'-OHDF 及び 5-OHDF が検出され、定量された (図 15)。胚・仔魚 1 個体当たりのカフェインの薬物量は 50 hpf で  $2.69 \pm 0.14$  ng、120 hpf で  $5.15 \pm 0.31$  ng であった (図 15A)。胚・仔魚 1 個体当たりのカフェイン代謝物 DMX の薬物量は 50 hpf で  $0.0161 \pm 0.0025$  ng、120 hpf で  $0.0355 \pm 0.0069$  ng であった (図 15B)。胚・仔魚 1 個体当たりの 4'-OHDF の薬物量は、ジクロフェナクナトリウム DF と同様の経時変化を示し、72 hpf で最大値 ( $8.90 \pm 0.21$  ng/個体) に達したが、以降は経時的に減少し、120 hpf には  $1.34 \pm 0.52$  ng にまで減少した (図 15C)。胚・仔魚 1 個体当たりの 5-OHDF の薬物量は、96 hpf で最大値  $2.80 \pm 0.31$  ng に達したが、以降は経時的に減少し、120 hpf には  $0.601 \pm 0.178$  ng にまで減少した (図 15C)。OHTS は、テストステロンへのばく露期間中、50 及び 120 hpf の胚・仔魚で検出されなかった (データ非掲載)。

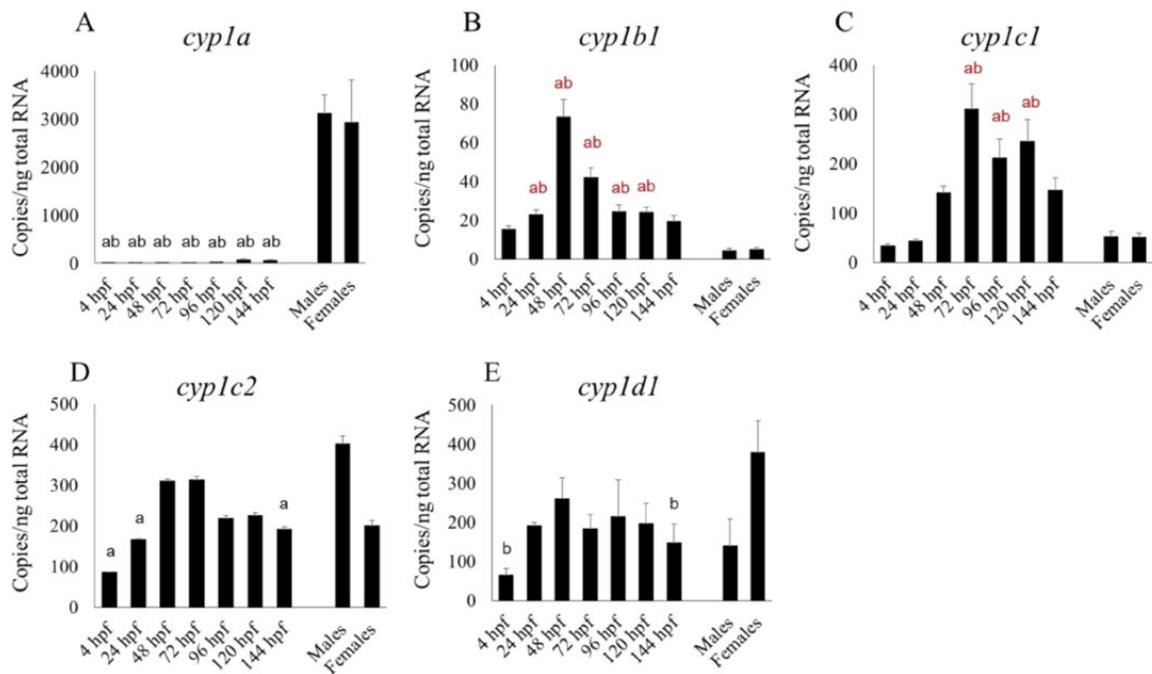


図 10. 受精後 4～144 時間 (hpf) の ZF 胚・仔魚における CYP1 アイソフォーム mRNA の発現量

各時点の ZF 胚・仔魚全身及び雌雄の成魚肝臓における 5 種の CYP1 アイソフォームの発現量測定の結果。 a は雄成魚の肝臓と比較して有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められたことを示し、 b は雌成魚の肝臓と比較して有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められたことを示す (黒字は胚・仔魚の発現量が成魚肝臓より低かったことを示し、赤字は胚・仔魚の発現量が成魚肝臓より高かったことを示す)。

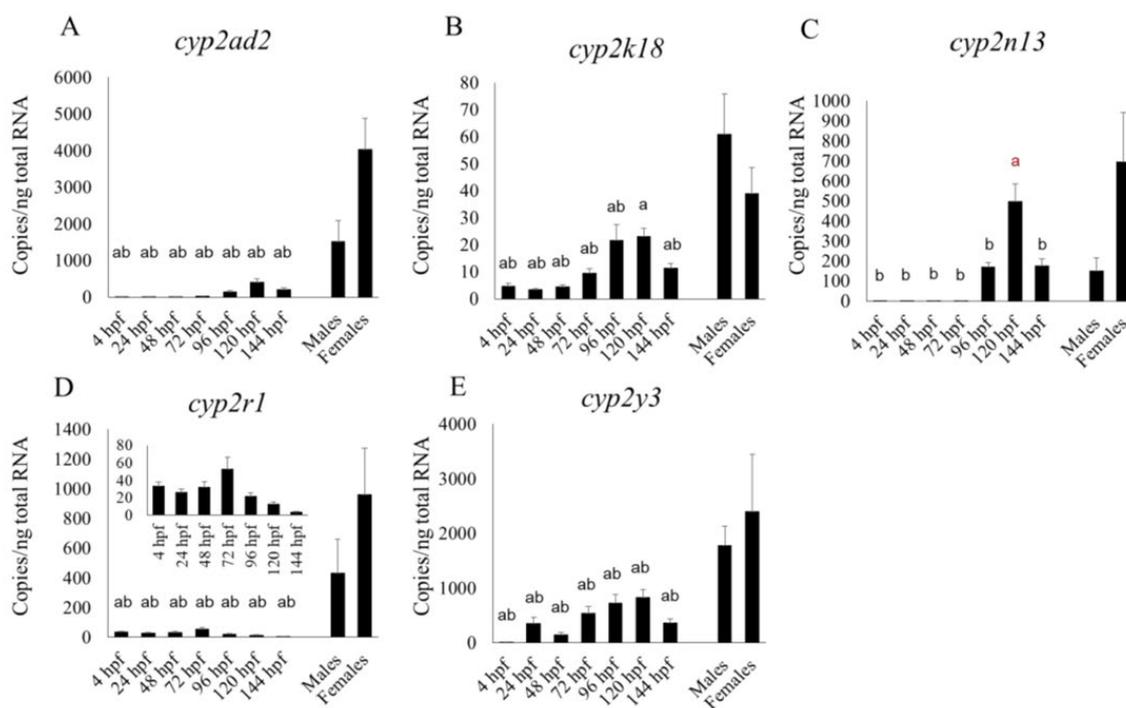


図 11. 受精後 4~144 時間 (hpf) の ZF 胚・仔魚における CYP2 アイソフォーム mRNA の発現量

各時点の ZF 胚・仔魚全身及び雌雄の成魚肝臓における 5 種の CYP2 アイソフォームの発現量測定の結果。D で挿入されたグラフは、胚・仔魚における CYP2R1 の発現量を拡大したものである。a は雄成魚の肝臓と比較して有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められたことを示し、b は雌成魚の肝臓と比較して有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められたことを示す (黒字は胚・仔魚の発現量が成魚肝臓より低かったことを示し、赤字は胚・仔魚の発現量が成魚肝臓より高かったことを示す)。

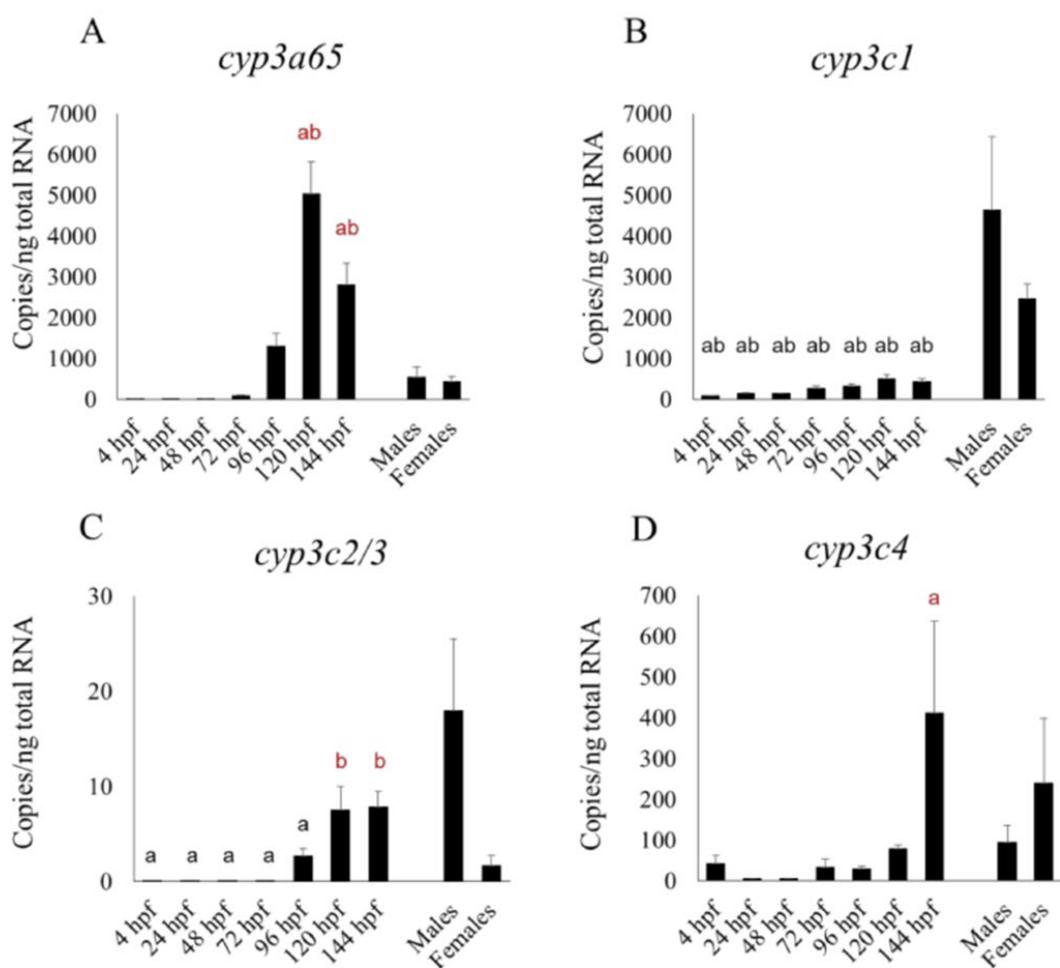


図 12. 受精後 4～144 時間 (hpf) の ZF 胚・仔魚における CYP3 アイソフォーム mRNA の発現量

各時点の ZF 胚・仔魚全身及び雌雄の成魚肝臓における 4 種の CYP3 アイソフォームの発現量測定の結果。 a は雄成魚の肝臓と比較して有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められたことを示し、b は雌成魚の肝臓と比較して有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められたことを示す (黒字は胚・仔魚の発現量が成魚肝臓より低かったことを示し、赤字は胚・仔魚の発現量が成魚肝臓より高かったことを示す)。

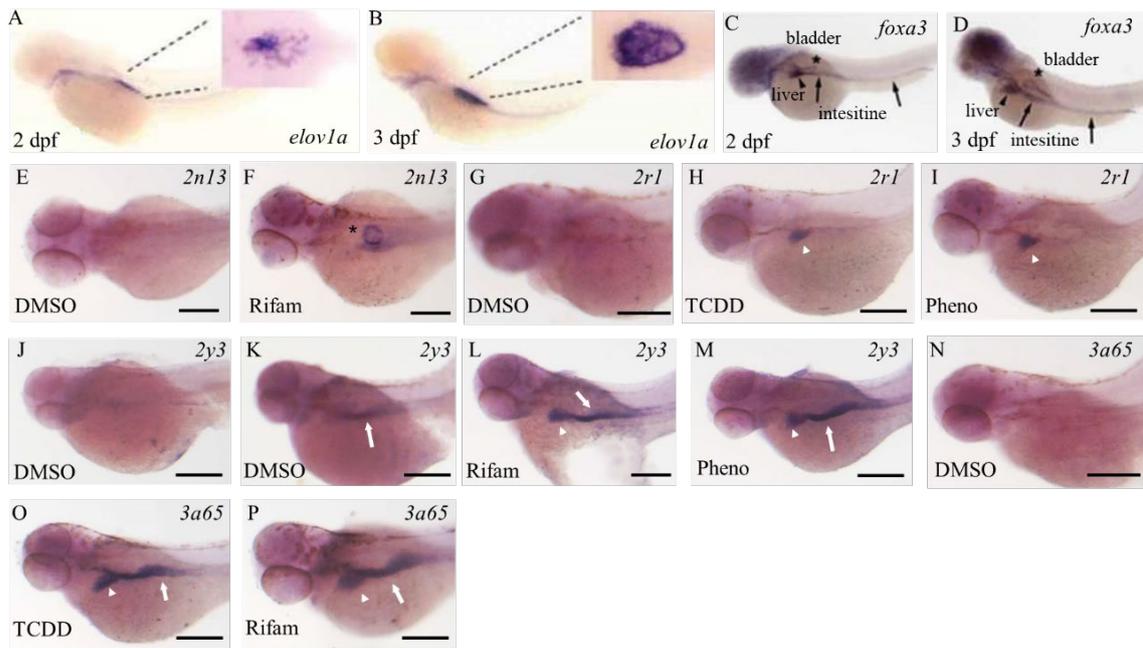


図 13. CYP サブタイプ mRNA の空間的発現

100  $\mu$ M のリファンピシン (E、F、K、N)、100  $\mu$ M のフェノバルビタール (I、L)、1.0 ppb の TCDD (G、H、M) にばく露した ZF 胚について測定した。A 及び B は浮袋原基のマーカである *elov1a* を示した既報の図 (A: 受精後 2 日 [dpf]、B: 3 dpf) [6] を表す。C 及び D は肝臓原基 (黒矢頭)、腸管原基 (黒矢印) 及び浮袋原基 (\*) のマーカである *foxA3* を示した既報の図 (C: 2 dpf、D: 3 dpf) [56] を表す。CYP2N13 (E、F)、CYP2R1 (G、H、I)、CYP2Y3 (J、K、L) 及び CYP3A65 (M、N) の RNA プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーションには、ZF 仔魚 (55 hpf) を使用した。E 及び F におけるアスタリスクは浮袋原基と思われる器官、G~N における白矢頭及び白矢印はそれぞれ肝臓原基及び腸管原基と思われる器官を表す。A、B、C 及び D は過去文献より再利用した (A 及び B: 文献 [6]、C 及び D: 文献 [56])。

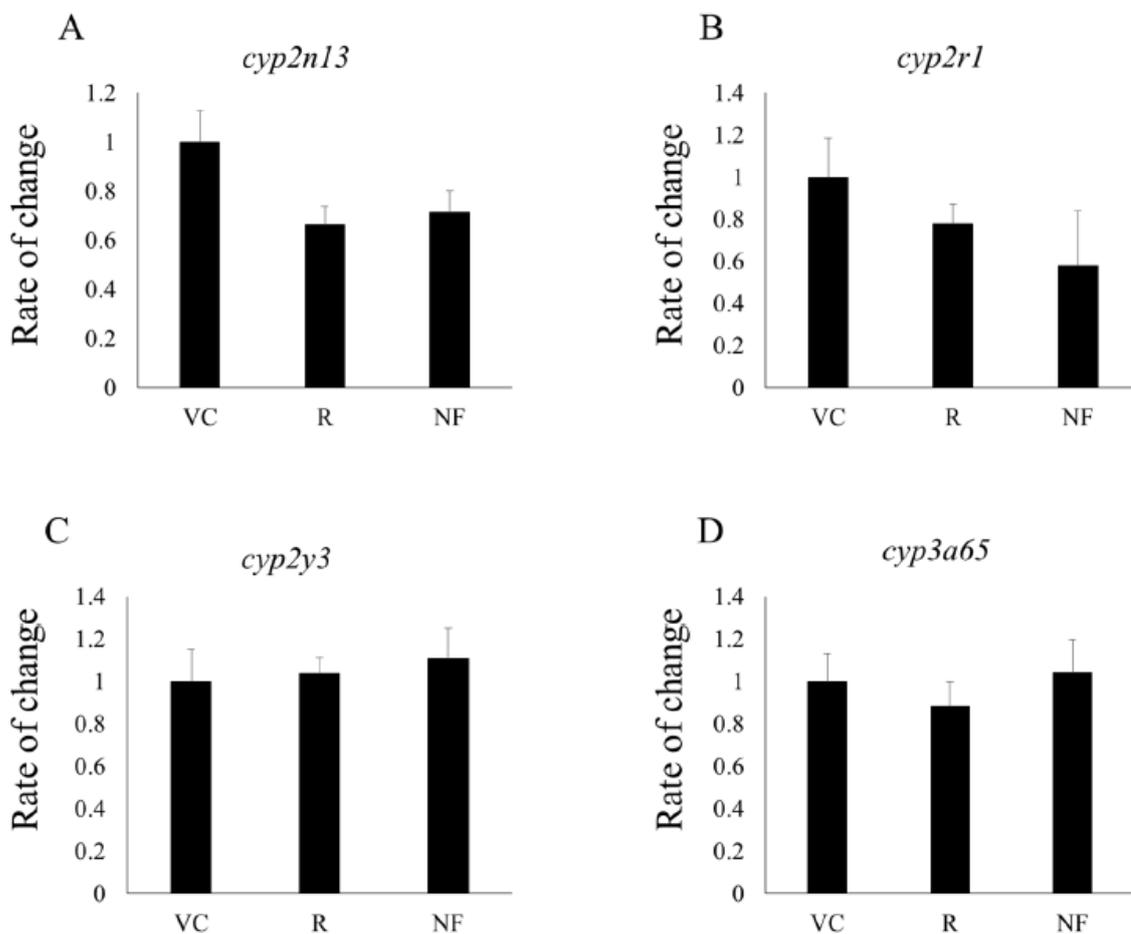


図 14. 4 種の CYP サブタイプ発現に対する CYP 誘導剤の効果

ZF の胚・仔魚は、26 hpf から 100  $\mu$ M リファンピシン (R) 及び 100  $\mu$ M  $\beta$ -ナフトフラボン (NF) をばく露した。VC は助剤対照区 (0.1% DMSO) を表す。qPCR 測定のために、*in situ* ハイブリダイゼーションで用いた誘導剤処置によって発現シグナルを示した 4 種の CYP サブタイプについて、55 hpf の ZF 仔魚の cDNA を調製して測定した。

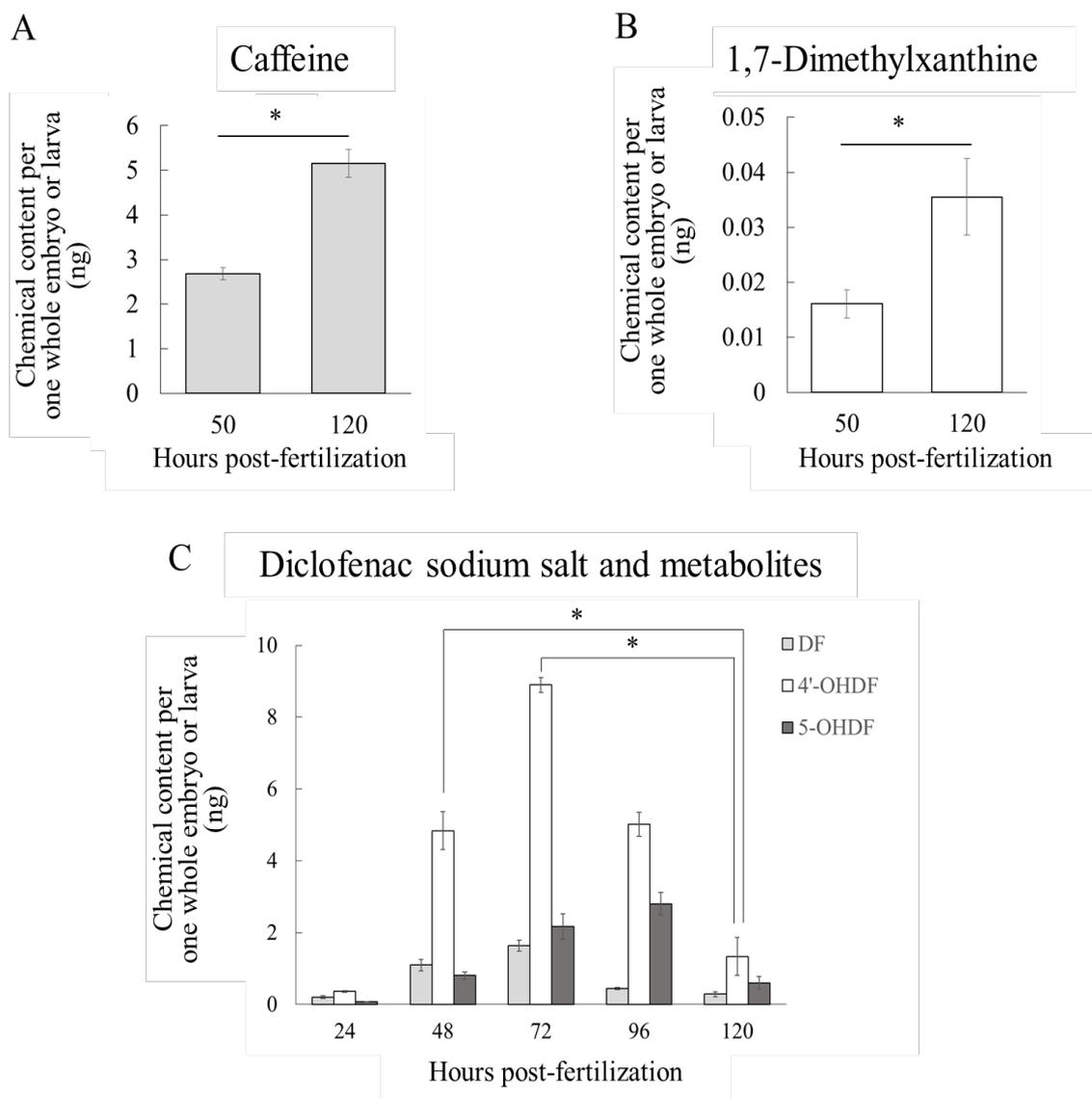


図 15. 薬物（ヒト CYP 基質）をばく露した ZF 個体あたりの胚中における基質及び代謝物量

ZF1 個体あたりの (A) カフェイン、(B) DMX、(C) ジクロフェナクナトリウム、4'-OHDF 及び 5-OHDF における胚中薬物量を表す。それぞれのバーは 3 連の測定値の平均、それぞれのエラーバーは標準偏差を表す。2 つのデータ間の有意差は t 検定（両側）により決定した (\* :  $p < 0.05$ )。統計解析はアスタリスクで示されたデータ間についてのみ実施した。

### 3.4 考察

本章では、ZF 成魚肝臓におけるこれらのアイソフォームの発現と比較して、受精直後から 144 hpf までの ZF の体全体で、そのほとんどがヒト代謝 CYP アイソフォームとホモログの関係にある 14 種の CYP アイソフォーム [20] の発現変動プロファイルを明らかにした。0~144 hpf までの期間は、この種の薬理的および毒物学的実験に最も一般的に使用される。ZF の胚・仔魚は、個体のサイズが非常に小さいため、このような全身代謝の研究に理想的なモデルである。Goldstone ら [20] は非統計的なマイクロアレイ分析により、最大 48 hpf の胚・仔魚の転写レベルを示したが、このステージにおける我々のデータは彼らとほぼ同様であった。しかし、*cyp2r1* は、彼らのマイクロアレイ実験において、24 hpf で明らかにシャープなピークを示していたのに対し、我々の qPCR 実験では、その発現レベルは 4~48 hpf の間で一定であったが、72 hpf でわずかに上昇した (図 11D)。一部の CYP サブタイプ (*cyp2ad2*、*2k18*、*2n13*、*3a65*、*3c2/3* 及び *3c4*) の転写レベルは 96 hpf 付近から急激に上昇する傾向を示したが、生体異物代謝は 5 dpf で完全に機能するという報告 [10] があることから、これらの CYP サブタイプの増加は肝細胞由来であることが示唆された。それにもかかわらず、胚・仔魚における *cyp2n13* の発現は、成魚の肝臓における発現よりも高いか、同程度であった (図 11C)。さらに、雌雄の成魚肝臓における *cyp3a65* の発現は、120 及び 144 hpf の仔魚よりも有意に低かった (図 12A)。ヒト及びげっ歯類における成体及び胎児で、肝臓における CYP 発現プロファイルが大きく異なることはよく知られている [33]。CYP1A2、2C、2E 及び 3A4 の発現はヒト成人の肝臓で優勢であるのに対し、CYP3A7 の発現はヒト胎児の肝臓で優勢であり、CYP1A2、2C、2D6 及び 3A5 は新生児の肝臓で最も一般的に発現している CYP サブタイプである [23]。我々の研究は、仔魚期と成魚の間の主要な CYP サブタイプの変換が魚類でも発生することを示唆している。特に、*cyp3a65* は 96~144 hpf の仔魚で優勢な *cyp3* サブタイプであり、*cyp3c1* は雌雄の成魚の肝臓で優勢な *cyp3* サブタイプであった。我々は以前、RIKEN WT (野生型) 系統の成魚肝臓におけるさまざまな CYP サブタイプの包括的な発現プロファイルを報告し、雌雄のゼブラフィッシュ成魚の肝臓において、*cyp3a65* が他の *cyp3* サブタイプよりも豊富であることを、RNA 配列決定技術を用いて示した [36]。しかし、CYP は食餌内容によって大きく変動することがよく知られ

ていることから、最終的な結論を出すには、同じエサを与えた異なる ZF 系統を使ったさらなる実験が必要と思われる。

また、ほとんどの *cyp1* サブタイプ (*cyp1b1*、*1c1*、*1c2* 及び *1d1*) と一部の *cyp2* サブタイプ (*cyp2r1*、*2y3*) の 48 及び 72 hpf での mRNA 発現は、96~144 hpf の mRNA 発現に匹敵する、あるいはそれよりも高いこともわかった。144 hpf までの胚・仔魚期の様々な時点で、*cyp2n13*、*3a65* 及び前文で述べた CYP サブタイプ (*cyp2r1* を除く) の mRNA 発現は、成魚肝臓と同程度、あるいはそれよりも高かった。

ほとんどの代謝 CYP アイソフォームをコードする mRNA の発現レベルは、たとえば CYP2E の場合を除いて、ヒト肝臓内のタンパク質の量を厳密に反映している [15]。CYP2E の場合、哺乳動物では比較的多くの量の mRNA が存在するが、タンパク質量としては少ない [40]。我々が知る限り、発達初期の ZF において、CYP アイソフォーム mRNA の相対的な発現およびタンパク質産生に関する情報は無い。したがって、今後、ZF の代謝 CYP アイソフォームのタンパク質の存在量についての包括的な研究が必要と考えられる。

ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションにより、*cyp2n13*、*2r1*、*2y3* 及び *3a65* の陽性シグナルを認識することができたが、助剤対照区の個体でこれらの CYP サブタイプの陽性発現はほとんど検出されなかった。本研究においてリファンピシン及び TCDD の処置により *cyp3a65* の陽性シグナルが検出されたが、既報において、これらの薬物が ZF の芳香族炭化水素受容体 2 (AhR2) を介して *cyp3a65* の発現を誘導することが報告されているため、既報の知見に沿っている [48]。また、フェノバルビタールが ZF の *cyp2aa2* を誘導することが報告されているが [48]、本研究で発現誘導が認められた *cyp2n13*、*2r1*、*2y3* についての報告例はない。さらに、本研究においてリファンピシン処置による *cyp2n13*、*2r1*、*2y3* の発現誘導並びに TCDD 処置による *cyp2r1* の発現誘導が確認されたが、これらについての知見はこれまで報告されていない。誘導剤処置によって検出されたこれらの CYP サブタイプの陽性シグナルは、CYP 誘導剤にばく露された仔魚の浮袋、肝臓及び腸の原基と思われる箇所で確認されたが、それらの誘導は qPCR 実験では有意な発現量ではなかった (図 14)。これは、発現誘導部位が限定的であったことが原因と考えられる。肝臓原基と腸原基は約 36 hpf に形成される [12]。我々は以前、TCDD 暴露中の 50 hpf の ZF 仔魚において、*cyp1c1/2* の mRNA 発現は鰓原基と胸鰭原基に限定されていたのに対し、*cyp1a* の転写産物は全身

の皮膚及び血管系に局在していることを報告した [14,35]。 *cyp1b1* は、網膜、中脳と後脳の境界及び間脳領域で恒常的に転写される [27]。したがって、多くの CYP サブタイプは、肝臓原基と思われる箇所だけでなく、ZF 胚・仔魚の肝臓以外の組織でも発現すると思われる。CYP の肝臓外発現は CYP1A などによく知られているが、本研究は肝臓完成前の時期において、いくつかの CYP 分子種が肝臓あるいは腸管、鰾原基で発現することを示唆した。

肝臓が完全に発達する前の ZF 胚・仔魚が、ヒトと同様の代謝活性を持っていることを確認するために、ZF 胚・仔魚に 3 種のヒト CYP アイソフォームの基質をばく露し、肝臓が完全に発達する前後の ZF 胚・仔魚における、基質とその代謝産物 DMX、4'-OHDF 及び 5-OHD を定量した。ZF の胚・仔魚又は成魚での DMX の検出に関するデータはこれまで報告されていない。Alderton らはタクリンとフェナセチンのヒト CYP1A2 を介した代謝産物が、これらの薬物とインキュベートしたゼブラフィッシュで 7 dpf に検出されたことを報告した [1]。また、既報では、ジクロフェナクの 2 つの代謝産物 (4'-OHDF 及び 5-OHDF) が ZF 成魚肝臓のマイクロソーム及び 96 hpf の ZF 胚仔魚全身の 5 つのバッチのうち 2 つのマイクロソームで検出され、5、24、48、72、120 hpf のマイクロソームでは代謝産物は検出されなかった [50]。しかし、我々の実験では胚・仔魚は、C<sub>0</sub> 測定用にサンプリングするまで継続的にジクロフェナクナトリウムにばく露したが、既報では、マイクロソームがジクロフェナクナトリウムにばく露された時間は 1 時間だけであった [50]。したがって、*in vitro* 実験と *in vivo* 実験の違いによる CYP の代謝活性の違い、又はジクロフェナクナトリウム暴露の時間等の実験条件の違いによって、我々の結果が他の研究結果と違いが生じたと考えられる。本研究において、発生初期の ZF 胚・仔魚が、肝臓の器官形成に依存することなく、ヒト CYP1A2、CYP2C9 及び CYP3A4/5 と同様の代謝機能を持っている可能性が高いということとは新たな発見であると考えられる。

DMX、4'-OHDF 及び 5-OHDF の胚中薬物量の定量では、ZF 胚・仔魚におけるそれらの代謝活性の特性の違いが示された。DMX の C<sub>0</sub> は、50 及び 120 hpf どちらにおいても、カフェインの約 5% に過ぎず、ZF 胚・仔魚がヒト CYP1A2 と同様の代謝活性を持っているものの、その代謝活性は低いことが示唆された。この代謝活性が低いという傾向は、ZF 胚・仔魚における Cyp1A 活性のエトキシレゾルフィン-O-デエチラーゼアッセイの過去の知見と一致している [49]。一方、4'-OHDF 及び 5-OHDF の胚中

薬物量の最大値がそれぞれジクロフェナクナトリウムの 543%及び 171%であったため、ZF 胚・仔魚はヒトの CYP2C9 あるいは CYP3A4/5 を介した代謝と同様の代謝機能を高い活性で有していることが示唆された。我々の知る限り、ジクロフェナクナトリウムへばく露した ZF 胚・仔魚の 4'-OHDF 及び 5-OHDF の胚中薬物量を経時的に測定したのは本研究が初めてである。これらの値の経時的变化は、72 hpf (4'-OHDF) あるいは 96 hpf (5-OHDF) でピークに到達し、その後 120 hpf まで低下したという点で類似していた。一般に酵素反応では、基質濃度が高いほど代謝物が多く生成される。さらに、ジクロフェナクの代謝を媒介する CYP アイソフォームの mRNA 発現レベルの変化も、4'-OHDF 及び 5-OHDF の胚中薬物量を経時的变化に影響を与える可能性がある。したがって、これら 2 つの代謝産物の胚中薬物量は、ジクロフェナクナトリウムの胚中濃度を経時的变化と、ジクロフェナク代謝を媒介する CYP アイソフォームの発現レベルの経時的变化の組み合わせの結果であると考えられる。*cyp1c1*、*1c2* 及び *2r1* の発現量の経時的变化は、4'-OHDF 及び 5-OHDF の胚中薬物量の時間経過と類似していたが、*cyp2r1* 発現量は他の発現量よりもはるかに低かった。一部の CYP1 アイソフォーム、CYP3A65 及び CYP3C1 は、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 発現系で比較的良好に研究されているが、カフェインおよびジクロフェナク以外の基質での代謝活性に関する情報は限定的である [11,52,57]。*Escherichia coli* あるいは酵母を用いた ZF の CYP アイソフォームタンパク質の発現系を利用した *in vitro* アッセイなど追加実験を将来的に行うことで、どのアイソフォームがゼブラフィッシュの 4'-OHDF と 5-OHDF の生産に重要な役割を果たすかが明らかになるだろう。

上記結果とは対照的に、ヒト CYP3A4/5 を介したテストステロンの代謝産物である OHTS は、テストステロンへのばく露期間中における 50 及び 120 hpf の ZF 胚・仔魚からは検出されなかった。この OHTS の不検出の結果は、最大 120 hpf ZF 胚・仔魚及び ZF 成魚についての既報のデータと一致している [50]。一方で、他の研究では、7 dpf の ZF 仔魚及び ZF 成魚において OHTS が検出された [1,9]。Chng らは、ZF において、OHTS を含むテストステロンの 7 つのモノヒドロキシル化代謝物を検出した [9]。OHTS の検出の有無の違いは、基質とマイクロソームの反応時間、胚・仔魚の発生段階、ZF 系統といった実験方法又は条件の差異によって引き起こされたと推測される。ZF の胚、仔魚及び成魚におけるテストステロンの代謝を明らかにするには、より詳細な研究が必要と思われる。

ZFにおける Cyp3A サブファミリーの活性については、依然として議論を呼ぶ状況である。本研究において、ZF 胚・仔魚で、ヒトと同じ CYP3A4/5 を介した代謝産物である 5-OHDF と OHTS の生成の有無の結果が分かれた。ヒトの CYP3A4/5 を介したデキストロメトルファン代謝産物である 3-メトキシモルヒナンは、成熟した ZF の肝臓ミクロソームで検出されているが、この代謝産物は 5、24、48、72、96 及び 120 hpf の全身の胚・仔魚のミクロソームからは検出されなかった [50]。また、ヒトの CYP3A4/5 を介したミダゾラムの代謝産物である 1-ヒドロキシミダゾラム及び 4-ヒドロキシミダゾラムはどちらも 7 dpf までの成魚肝ミクロソーム、胚・仔魚のミクロソームあるいはホモジネートで検出されていない [1,50]。これらのデータは、ヒトと ZF の基質特異性に違いがあることを示唆していると考えられる。さらに、ヒト CYP3A4/5 を介した代謝産物が ZF の胚・仔魚あるいは成魚で検出されたとしても、発生段階によって、ヒトのホモログに相当する ZF CYP アイソフォームの代謝活性の強度には差異が生じることが考えられる。

### 3.5 小括

ZF 胚・仔魚における薬物代謝に関する基礎的な知見を得ることを目的として、主要な薬物代謝酵素である CYP の mRNA 発現量、発現部位及び代謝活性についての特徴を調べた。まず、ヒト CYP アイソフォームのホモログに相当する、ZF 胚・仔魚における代表的な 14 種の CYP アイソフォームは、4~144 hpf の間で様々な発現パターンの変化を示した。多くの CYP 転写産物は、肝臓発達が進行する約 96 hpf で急激に増加した。一方、一部の CYP1 (1B1、1C1、1C2、1D1) および CYP2R1 の発現は、肝臓の発達が完了する前に、48 若しくは 72 hpf でピークに達した。また、ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションにより、30~55 hpf にリファンピシン、フェノバルビタール若しくは TCDD にばく露した ZF 仔魚について CYP2Y3、2R1 及び 3A65 の mRNA の発現部位を特定した。さらに、ジクロフェナクから 4'-ヒドロキシジクロフェナク及び 5-ヒドロキシジクロフェナクへの代謝、カフェインから 1,7-ジメチルキサンチンへの代謝が、24 hpf 若しくは 50 hpf という発達段階の早期に検出された。4'-ヒドロキシジクロフェナクの生成率は、肝臓の発達がほぼ完了した後の 120 hpf よりも、肝臓の発達が未熟な 48 hpf や 72 hpf の方が顕著に多かった。このように、ヒト CYP1A2、2C9 及び 3A4/5 を介して生成される代謝物が、肝臓発達に関わらず、CYP 基質にばく露した ZF 胚・仔魚中から検出されたことから、発生初期の ZF 胚・仔魚が、肝臓の器官形成に依存することなく、ヒト CYP1A2、CYP2C9 及び CYP3A4/5 と同様の代謝機能を持っている可能性が示唆された。一方で、テストステロンを含むヒト CYP3A4/5 を介した代謝産物が ZF 胚・仔魚からは検出されなかった報告例もあることから、CYP 代謝活性におけるヒトと ZF の基質特異性を明らかにするために、今後さらなる研究が必要である。

## 第IV章 ゼブラフィッシュ胚・仔魚における化学物質のばく露量指標

### 4.1 序文

2020年のICH S5の改訂により、医薬品のEFD試験の代替法が利用可能となった[30]。ICH S5では、非臨床試験において（明らかな母動物毒性が発現しない条件下）又はヒトにおいて、形態異常又は胚・胎児致死性を誘発することが明らかとなっている29種の陽性対照物質が記載されており、この陽性対照物質群はEFD試験代替法の適格性を確認するための裏付けのために使用される[30]。また、代替法の適格性の条件として、代替法で用いた濃度と、予測する動物種で毒性が生じるばく露量を関連付けるデータを提示する必要性が述べられている[30]。

哺乳類を用いる医薬品の毒性試験では、動物への投与量、全身的ばく露、及びその時間経過との関係性を調べるトキシコキネティクス（TK）試験を実施し、ばく露量の情報を毒性所見と関連づけ、ヒトの臨床上の安全性評価に役立てている[66]。一般的に、このTK試験及びヒトの臨床試験では、全身的ばく露を調べるために血中の薬物濃度を経時的に測定し、ばく露量に関するパラメーターとして最高血中濃度（maximum plasma concentration,  $C_{max}$ ）又は血中濃度-時間曲線下面積（area under the curve, AUC）を算出して毒性評価に用いている[66]。

一方、動物福祉の観点で有利となる他にも、コスト、簡便性等多くの利点があるZF胚を用いる発生毒性試験がEFD試験の代替法として注目されている。しかし、ICH S5ガイドラインの規定に沿うと、ばく露量におけるZF胚・仔魚と予測する動物種との間の関係性に関するデータを提示する必要があるものの、ZF胚・仔魚は、形態観察を顕微鏡下で行わなければならないほど非常に微小であるために、血中濃度の測定は技術的に困難である。このような状況から、これまでにZF胚・仔魚における薬物ばく露量及びそれとヒト/哺乳類のばく露量の関係性は重要であるが、実測した報告例は無い。

そこで本章では、発生毒性薬物をばく露したZF胚・仔魚における薬物ばく露量とヒト/哺乳類の薬物ばく露量との間の関係性を推定することを目的として、第II章で得られた、各時点の全身の $C_e$ における $\log[C_e/C_w]$ と $\log D$ の関係式（回帰式）を用いて、ICH S5陽性対照物質21物質のNOECにおける全身の胚中濃度 $[C_e(\text{cal})]$ 及び

それに基づく胎中濃度-時間曲線下面積 (zAUC) の推定値 zAUC(cal)を算出し、ICH S5 に記載されているラット、ウサギの無毒性量、ヒトの有効量投与下における AUC と比較した。

## 4.2 材料と方法

### 4.2.1 回帰式を用いた $C_e(\text{cal})$ の算出及び $C_e$ との比較

第II章 図 6 で示された、各時点における  $\log[C_e/C_w]$  と  $\log D$  とのプロットから得られた回帰式を用いて、プロットとして採用した 9 物質（表 7、カフェインを除く）を対象として  $C_w$  が NOEC の場合の  $C_e(\text{cal})$  を算出した。回帰式に代入する各薬物の  $\log D$  は表 1 の値を用い、NOEC は、第 I 章における ZF 胚発生毒性試験の結果を基に決定された、表 5 に示す値を用いた。各薬物について推定した  $C_e(\text{cal})$  は、 $C_e$  と比較し、 $\log[C_e(\text{cal})]$  vs.  $\log[C_e]$  のプロットの決定係数を算出し、予測精度を確認した。その後、ICH S5 陽性対照物質 21 物質（表 1、ICH S5 でヒト/哺乳類 AUC データの記載が無いメトトレキサートは除外）を対象として  $C_w$  が NOEC の場合の  $C_e(\text{cal})$  を算出した。回帰式に代入する値は各薬物の  $\log D$  は表 1 の値を用い、NOEC は、第 I 章における ZF 胚発生毒性試験の結果を基に決定された、表 5 に示す値を用いた。

### 4.2.2 ZF とヒト/哺乳類における ICH S5 陽性対照物質の薬物ばく露量の比較

4.2.1 で推定した ICH S5 陽性対照物質 21 物質の各時点（24、48、72、96 及び 120 hpf）の  $C_e(\text{cal})$  を用い、台形法 [64] に基づく式①により 120 hpf における  $z\text{AUC}(\text{cal})$  を求めた。

$$z\text{AUC} = \frac{(24-5)(C_e^5 + C_e^{24}) + 24(C_e^{24} + C_e^{48}) + 24(C_e^{48} + C_e^{72}) + 24(C_e^{72} + C_e^{96}) + 24(C_e^{96} + C_e^{120})}{2} \dots \textcircled{1}$$

$C_e^t$ : 受精後 t 時間における  $C_e$

その後、第I章において陽性と判定された薬物群（14 物質）及び陰性と判定された薬物群（7 物質）それぞれの薬物における  $z\text{AUC}(\text{cal})$  について、ICH S5 に記載されたラット、ウサギ及びヒトにおける AUC と比較した。比較に用いる AUC は、ラット及びウサギについては無毒性量投与下、ヒトについては有効量投与下における数値とした。また、この比較において、 $C_e$  の実測値を用いて式①により求めた  $z\text{AUC}$  も同時にプロットし、 $z\text{AUC}(\text{cal})$  との乖離を確認した。

## 4.3 成績

### 4.3.1 $C_e(\text{cal})$ の算出結果及び実測値との比較の結果

各時点における  $\log[C_e/C_w]$  と  $\log D$  とのプロットから得られた回帰式 (図 6) を用いて、プロットとして採用した 9 物質の各時点の  $C_e(\text{cal})$  を算出した数値を表 14 に、物質毎における計算値及び実測値の  $C_e$  の経時的変化を図 16 に示す。各薬物の  $C_e(\text{cal})$  の経時的変化のパターンは、実測値  $C_e$  と概ね同様であった。一方、イマチニブ (図 16C) 及びジクロフェナクナトリウム (図 16G) の  $C_e(\text{cal})$  の経時的変化のパターンの一部が実測値と一致しなかった。

次に、 $C_e(\text{cal})$  の予測精度を確認するために、各時点における  $\log[C_e(\text{cal})]$  vs.  $\log[C_e]$  をプロットした結果を図 17 に示す。いずれの時点においても、両者の関係は直線の式に回帰できた。全体として、回帰式の決定係数  $R^2$  は、0.72~0.89 であった。

さらに、ICH S5 陽性対照物質 21 物質のうち、ZF 胚発生毒性試験において陽性と判定された 14 物質における  $C_e(\text{cal})$  の算出結果を表 15、陰性と判定された 7 物質における  $C_e(\text{cal})$  の算出結果を表 16 に示す。算出された  $C_e(\text{cal})$  の経時的変化のパターンは、実測値の  $C_e$  の特徴 (図 5) と同様に、 $\log D < 1$  の薬物の  $C_e$  は 120 hpf まで経時的に増加し、脂溶性が比較的高い ( $\log D > 1$ ) 薬物では、48~96 hpf で最大値に達し、それ以降経時的に減少した (表 15、16)。

### 4.3.2 $zAUC(\text{cal})$ 、 $zAUC$ 及びヒト/哺乳類 AUC の比較

ICH S5 陽性対照物質における  $zAUC(\text{cal})$ 、 $zAUC$  及びヒト/哺乳類 AUC を表 17、18 に示す。また、 $zAUC$  (計算値及び測定値) とヒト/哺乳類 AUC の常用対数を比較した結果を図 18 に示す。ZF において陽性と判定された 14 物質の  $\log[zAUC(\text{cal})]$  について、ラット、ウサギ及びヒトの  $\log[AUC]$  との決定係数  $R^2$  は、それぞれ 0.73、0.92 及び 0.74 であった (図 18A、B、C)。一方、ZF において陰性と判定された 7 物質の  $\log[zAUC(\text{cal})]$  について、ラット、ウサギ及びヒトの  $\log[AUC]$  との決定係数  $R^2$  は、それぞれ 0.49、0.032 及び 0.31 であった (図 18D、E、F)。また、 $C_e$  実測値が得られた ICH S5 陽性対照物質 (5 物質) について、算出した  $zAUC$  と  $zAUC(\text{cal})$  のプロッ

トは近接していた（図 18）。さらに、この 5 物質の  $\log[\text{zAUC}(\text{cal})]$  vs.  $\log[\text{zAUC}]$  のプロットの回帰分析を行った結果、回帰式の決定係数  $R^2$  は 0.92 であった（図 19）。

表 14.  $\log[C_e/C_w]$ - $\log D$  回帰分析に用いた 9 物質における  $C_e(\text{cal})$  の算出結果

薬物名	NOEC 水溶液濃度 [mg/L]	$C_e(\text{cal})$ [mg/L]					
		5 hpf	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf	120 hpf
シタラビン	2430	0	1.49	2.53	4.16	9.45	18.5
フルコナゾール	1530	0	82.8	153	197	234	263
イマチニブ	24.7	0	2.48	4.65	5.80	6.42	6.75
カルバマゼピン	47.3	0	62.3	123	132	99.4	74.8
フェニトイン	37.8	0	51.5	102	109	81.7	61.2
スマトリプタンコハク酸塩	2070	0	8.20	14.4	21.5	37.9	59.8
ジクロフェナクナトリウム	3.20	0	0.531	1.00	1.22	1.25	1.23
テストステロン	3.00	0	14.9	30.2	30.1	18.6	11.8
ジエチルスチルベストロール	0.268	0	23.6	50.6	43.0	17.4	7.68

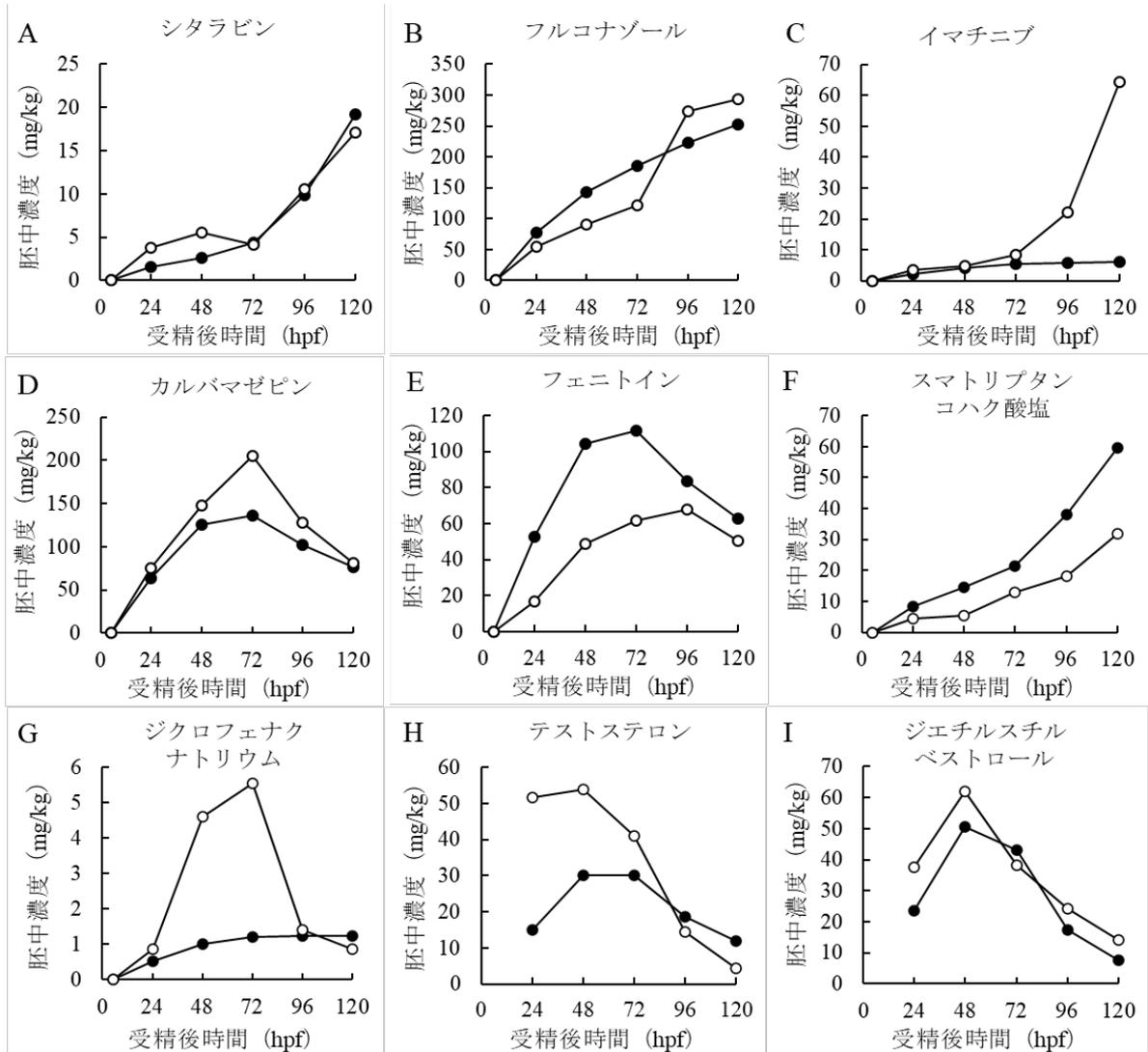


図 16.  $\log[C_e/C_w]$ - $\log D$  回帰分析に用いた 9 物質における胚中濃度（計算値及び実測値）の比較

●は計算値、○は実測値の平均値を表す。

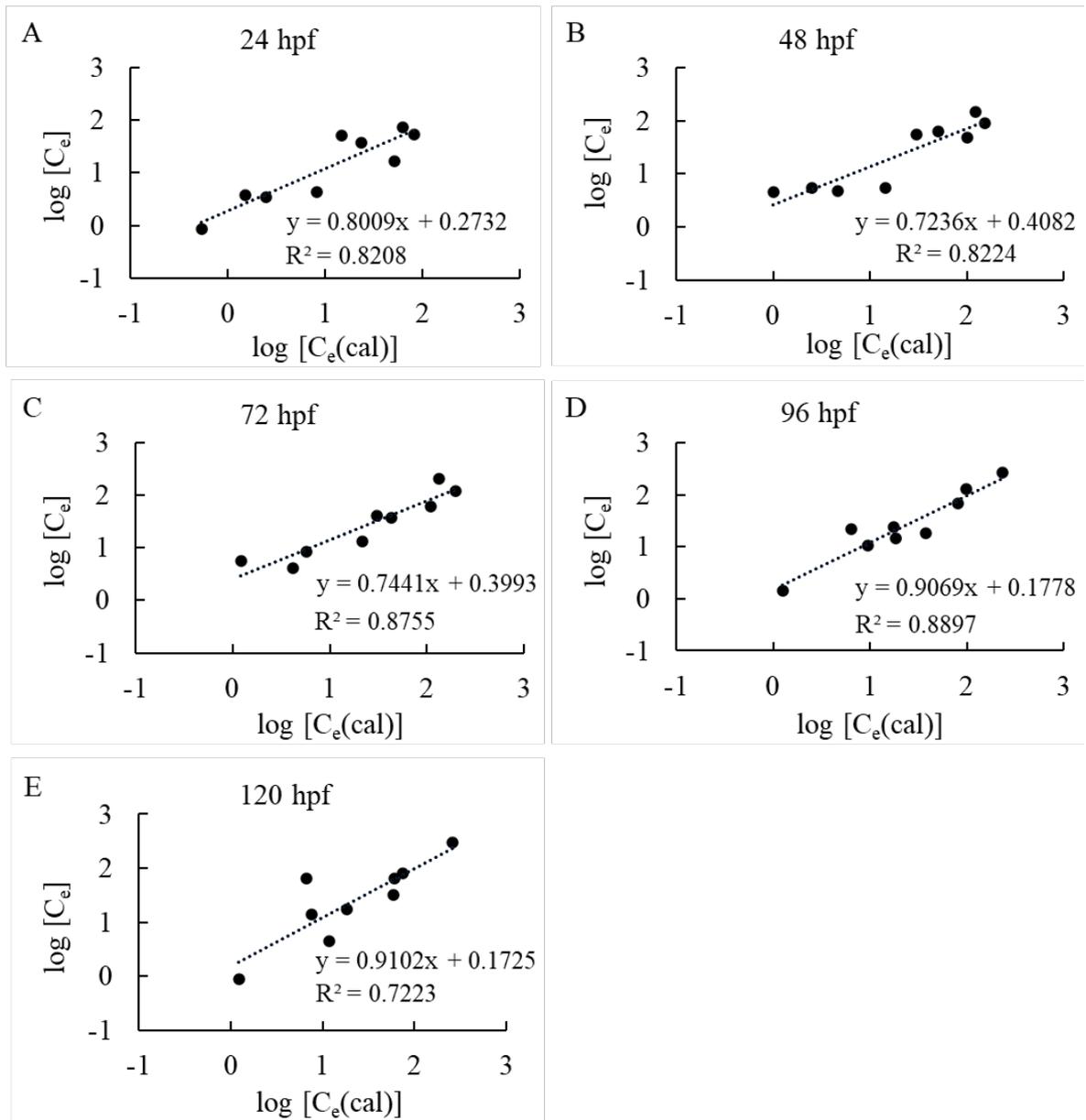


図 17. 胚中濃度 ( $C_e$ ) の計算値及び実測値の回帰分析

表 15. ICHS5 陽性対照物質における  $C_e(\text{cal})$  (ZF : 陽性、ヒト/哺乳類 : 陽性)

薬物名	logD	NOEC 水溶液濃度 [mg/L]	$C_e(\text{cal})$ [mg/kg]					
			5 hpf	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf	120 hpf
シスプラチン	-2.28	0.240	0	$9.65 \times 10^{-5}$	$1.60 \times 10^{-4}$	$2.70 \times 10^{-4}$	$6.58 \times 10^{-4}$	$1.37 \times 10^{-3}$
リバビリン	-2.43	610	0	0.289	0.481	0.804	1.91	3.89
ヒドロキシ尿素	-1.27	380	0	0.503	0.855	1.35	2.77	4.96
5-フルオロウラシル	-0.89	52.0	0	0.303	0.533	0.775	1.28	1.90
バルプロ酸	0.13	4.47	0	0.138	0.250	0.332	0.431	0.521
フルコナゾール	0.24	1530	0	78.1	143	185	223	253
トピラマート	0.59	21.4	0	1.42	2.62	3.33	3.87	4.25
シクロホスファミド	0.63	653	0	45.4	84.0	107	123	134
ダサチニブ	2.05	0.0244	0	0.0172	0.0334	0.0372	0.0308	0.0251
カルバマゼピン	2.45	47.3	0	64.0	126	136	102	76.5
all- <i>trans</i> - レチノイン酸	4.23	$9.31 \times 10^{-5}$	0	$2.30 \times 10^{-3}$	$4.81 \times 10^{-3}$	$4.40 \times 10^{-3}$	$2.17 \times 10^{-3}$	$1.14 \times 10^{-3}$
13- <i>cis</i> -レチノイン酸	4.23	$1.89 \times 10^{-3}$	0	0.0467	0.0975	0.0893	0.0441	0.0230
アシトレチン	5.5	$5.22 \times 10^{-5}$	0	0.0102	0.0223	0.0182	$6.66 \times 10^{-3}$	$2.69 \times 10^{-3}$
イブプロフェン	0.81	13.0	0	1.21	2.26	2.82	3.12	3.27

表 16. ICHS5 陽性対照物質における  $C_e(\text{cal})$  (ZF : 陰性、ヒト/哺乳類 : 陽性)

薬物名	logD	NOEC 水溶液濃度 [mg/L]	$C_e(\text{cal})$ [mg/kg]					
			5 hpf	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf	120 hpf
アスピリン	-2.57	72.1	0	0.0272	0.0450	0.0762	0.187	0.393
シタラビン	-2.24	2430	0	1.57	2.63	4.32	9.82	19.2
ブスルファン	-0.52	15.5	0	0.165	0.294	0.413	0.626	0.864
トリメタジオン	0	1430	0	35.6	64.5	86.5	116	144
サリドマイド	0.25	103	0	4.39	8.04	10.5	13.0	15.0
イマチニブ	0.81	24.7	0	2.31	4.29	5.35	5.92	6.22
フェニトイン	2.47	37.8	0	52.9	104	112	83.6	62.6

表 17. ICH S5 陽性対照物質 (ZF : 陽性) における zAUC(cal)、zAUC 及びヒト/哺乳類 AUC

薬物名	zAUC(cal)	zAUC	AUC [ $\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$ ] *		
	[ $\mu\text{g} \cdot \text{h/g}$ ]	[ $\mu\text{g} \cdot \text{h/g}$ ]	ZF	ラット	ウサギ
シスプラチン	0.0612	-	0.25	-	-
リバビリン	127	-	0.00828	-	-
ヒドロキシ尿素	387	-	-	-	184
5-フルオロウラシル	90.2	-	3.89	-	11.5
バルプロ酸	33.2	-	230	690	4180
フルコナゾール	19400	16400	380	521	135
トピラマート	310	-	893	67	229
シクロホスファミド	10000	-	-	-	798
ダサチニブ	3.10	-	-	0.834	-
カルバマゼピン	11000	14100	547	-	232
all- <i>trans</i> -レチノイン酸	0.338	-	0.25	0.207	0.537
13- <i>cis</i> -レチノイン酸	6.86	-	4.8	12.2	7.52
アシトレチン	1.40	-	6.6	-	3.6
イブプロフェン	260	-	597	80.5	839

\* ICH S5(R3)より引用 [30]

表 18. ICHS5 陽性対照物質（ZF：陰性）における zAUC(cal)、zAUC 及びヒト/哺乳類 AUC

薬物名	zAUC(cal)	zAUC	AUC [ $\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$ ] *		
	[ $\mu\text{g} \cdot \text{h/g}$ ]	[ $\mu\text{g} \cdot \text{h/g}$ ]	ZF	ラット	ウサギ
アスピリン	6.21	-	16.0	-	48.3
シタラビン	654	771	15.9	-	6.6
ブスルファン	45.3	-	-	-	0.529
トリメタジオン	8800	-	203	10.8	1000
サリドマイド	909	-	10.8	4.18	4.9
イマチニブ	494	1700	39.3	700	-
フェニトイン	9060	5440	205	193	291

\* ICH S5(R3)より引用 [30]

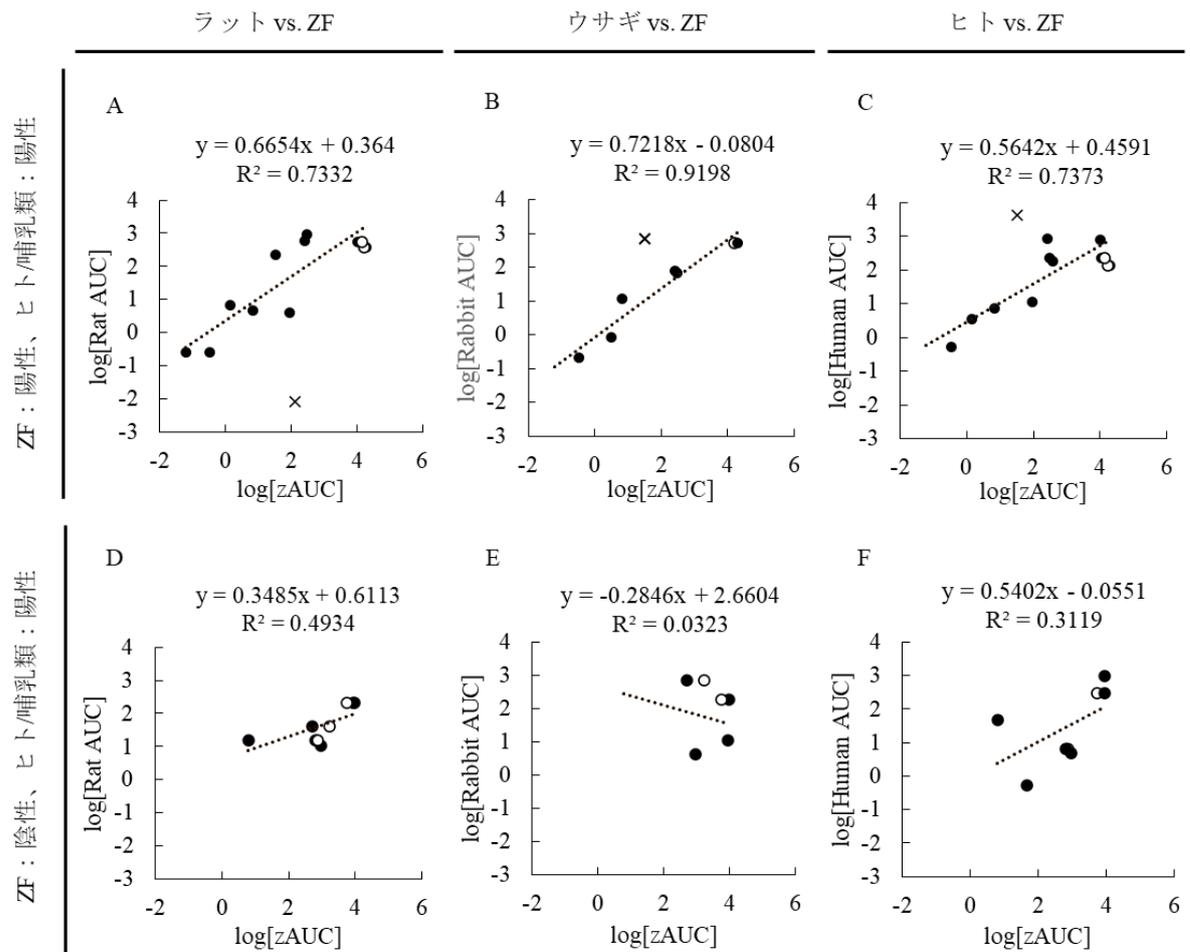


図 18. zAUC とヒト/哺乳類 AUC との関係

A～C は ZF で陽性と判定された陽性対照物質、D～F は ZF で陰性と判定された陽性対照物質における比較。●及び×は胚中濃度の推定値に基づく zAUC [zAUC(cal)]、○は胚中濃度の実測値の平均値に基づく zAUC におけるプロット。回帰直線及び回帰式は●のプロットから求め、×はその算出から除外した。A における×はリバビリン、B 及び C における×はバルプロ酸のデータを表す。

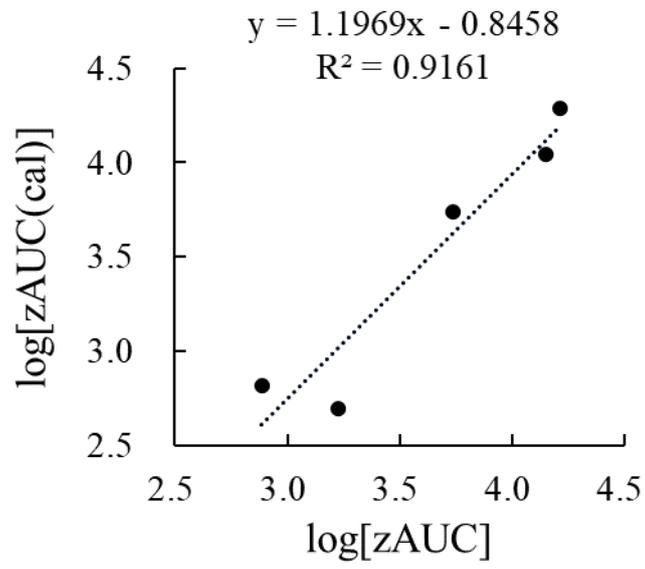


図 19. zAUC(cal)と zAUC の回帰分析

#### 4.4 考察

まず、ICH S5 陽性対照物質 21 物質の NOEC における全身の胚中濃度の推定値である  $C_e(\text{cal})$  を算出するために、各時点の全身の  $C_e$  における  $\log[C_e/C_w]$  と  $\log D$  の間の回帰式 (図 6) を用いて、回帰式算出に用いた 9 物質 (ICH S5 陽性対照物質は 5 物質) における計算値及び実測値の  $C_e$  の経時的変化を比較した。各薬物の  $C_e(\text{cal})$  の経時的変化のパターンは実測値  $C_e$  と概ね同様であり、 $C_e(\text{cal})$  の予測精度を確認するために実施した  $\log[C_e(\text{cal})]$  vs.  $\log[C_e]$  の回帰分析により求められた回帰式の決定係数  $R^2$  は、0.72~0.89 と比較的高精度な回帰式が得られたことから、 $C_e$  を概ね見積もることが可能であると考えられた。なお、イマチニブ及びジクロフェナクナトリウムの  $C_e(\text{cal})$  の経時的変化のパターンの一部が実測値と一致しなかった (図 16)。プロットが一致しなかった原因は、 $\log[C_e/C_w]$  vs.  $\log D$  の回帰式からの残差が他よりも大きかったために生じたものと考えられる。

次に、ICH S5 陽性対象物質 21 物質における 24 hpf 毎の  $C_e(\text{cal})$  を算出し、それに基づき  $z\text{AUC}(\text{cal})$  をそれぞれ求め、ラット、ウサギの無毒性量、ヒトの有効量投与下における血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) と比較した。その結果、第 I 章において陽性と判定された 14 物質における  $z\text{AUC}(\text{cal})$  の常用対数値は、ラット、ウサギ及びヒトの AUC の常用対数値との間において比較的高い正の相関性を示した (図 18A~C)。この解析では、ラット AUC との比較におけるリバビリン、また、ヒト AUC との比較におけるバルプロ酸の 2 点のプロットを外れ値として除外した。まず、核酸アナログであるリバビリンは、ラット AUC が他の薬物に比べて非常に低い数値 ( $0.00828 \mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$ ) であり、ZF と比較して毒性の感受性が非常に高いことを示している。Yamashita らは、哺乳類特異的に赤血球に蓄積されたリバビリン三リン酸 (ribavirin triphosphate、RTP) によるリバビリンの長期にわたる全身ばく露によって、ヒト/哺乳類でリバビリン毒性の感受性が高くなり、ZF との感受性差を引き起こしている可能性を述べている [62]。哺乳類の赤血球では、ほとんどすべてリン酸化し、RTP に変換されるが、哺乳類の脱核赤血球には RTP をリバビリンに加水分解する 5'-ヌクレオチダーゼとアルカリホスファターゼがないため、赤血球内で RTP が長期蓄積することが確認されている [46]。一方、ZF を含む硬骨魚の成熟赤血球は、脱リン酸化活性が維持される可能性のある核を持っているため、赤血球内の RTP 蓄積が起きない可能

性が高いことが予想される。以上のことから、ZF とラットとの比較においてリバビリンが回帰直線から大きく逸脱したと考えられる（ウサギ及びヒトについては、ICH S5 にリバビリンの AUC データが記載されていないため不明）。次に、抗てんかん薬であるバルプロ酸は、ヒト、哺乳類、ZF いずれにおいても重篤な発生異常を引き起こす代表的な発生毒性陽性薬物として知られている [2]。ヒトと ZF の比較においてプロットが外れたが、なぜヒトでバルプロ酸の血中濃度が高いかは不明である。特定の組織との結合親和性等により蓄積性が高くなる可能性も考えられるが、バルプロ酸がプロットから逸脱した原因を特定するためには、今後更なる研究が必要である。

上述したように、プロットから乖離した薬物群を除けば、ZF 及びヒト/哺乳類が共に発生毒性陽性であった場合には、zAUC を ZF のばく露量の指標として利用できる可能性がある。また、発生毒性薬物において、ZF がラット、ウサギ及びヒトと類似した用量-反応関係を有している可能性が示唆されたことから、ZF を代替法として利用する上で非常に重要な知見である可能性がある。ここで、 $C_e$  実測値が得られている 5 物質について zAUC の実測値を算出し、zAUC(cal)と比較したところ、大きな乖離は無く、 $\log[zAUC(cal)]$  vs.  $\log[zAUC]$  の回帰分析による回帰式の決定係数  $R^2$  は 0.91 と高い数値を示した（図 17）ことから、少なくとも ICH S5 陽性対照物質（5 物質）については、 $C_e(cal)$  と  $C_e$  実測値の乖離が zAUC と AUC の比較解析に及ぼす影響は小さかったと考えられる。

一方、第 I 章において陰性と判定された 7 物質については、zAUC(cal) の常用対数値は、ラット、ウサギ及びヒトの AUC の常用対数値との間の相関性は低かった（図 18D~F）。本研究の実験結果及び既報文献から、陰性と判定された原因は、水溶解度が低いこと、ZF-ヒト/哺乳類間における毒性感受性の種間差、薬物の胚・仔魚中への取込量が少ないことが考えられた（1.4 参照）が、zAUC は最大無影響濃度（NOEC）におけるばく露量であり、上記の様々な要因で各薬物の NOEC が本来の毒性発現範囲から乖離した値をとることで、ヒト/哺乳類 AUC との低相関性に繋がったものと考えられる。また、本研究では、解析した物質数が 7 物質と少なく、プロットの範囲が狭いことから、ZF で陽性の物質群のケースと比較して、全体の大小関係の本来の傾向が表れていない可能性もあるため、相関関係の完全な理解のためには更なる実験が必須である。

本章では、ZF で陽性と判定された、ICH S5 陽性対象物質 14 物質における zAUC(cal)の常用対数値がラット、ウサギ及びヒトの AUC の常用対数値との間において比較的高い正の相関性を示した。このことから、ZF 胚・仔魚における発生毒性薬物のばく露量指標として zAUC が有用である可能性が示唆され、ZF がラット、ウサギ及びヒトと類似した用量-反応関係を有している可能性を示唆する知見が得られた。しかし、あくまで zAUC(cal)は回帰式に基づく計算値であるため、今後、実測の  $C_e$  データ、そして実測の  $C_e$  に基づく多くの zAUC データを収集して同様の相関関係が成り立つのかどうかを検証していくことが必要であると考えられる。

#### 4.5 小括

発生毒性薬物をばく露した ZF 胚・仔魚における薬物ばく露量とヒト/哺乳類の薬物ばく露量との間の関係性を調べることを目的として、第II章で得られた、各時点の全身の  $C_e$  における  $\log[C_e/C_w]$  と  $\log D$  の間の関係式（回帰式）を用いて、ICH S5 陽性対照物質 21 物質の NOEC における全身の胚中濃度 [ $C_e(\text{cal})$ ] 及びそれに基づく胚中濃度-時間曲線下面積 (zAUC) の推定値 zAUC(cal)を算出し、ラット、ウサギの無毒性量、ヒトの有効量投与下における血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) と比較した。その結果、第I章において陽性と判定された 14 物質における zAUC(cal)の常用対数値は、ラット、ウサギ及びヒトの AUC の常用対数値との間において比較的高い正の相関性を示した。一方で、第I章で陰性と判定された 7 物質における zAUC(cal)の常用対数値は、ラット、ウサギ及びヒトの AUC の常用対数値との間のいずれにおいても高い相関性は認められなかった。これらの結果から、(1) ZF 胚・仔魚における発生毒性薬物のばく露量指標として zAUC が有用である可能性があること、及び (2) ZF 及びヒト/哺乳類で発生毒性が陽性となる場合において、ZF がラット、ウサギ及びヒトと類似した用量-反応関係を有している可能性が示唆された。今後、実測の  $C_e$  データ、そして実測の  $C_e$  に基づく多くの zAUC データを収集して同様の相関関係が成り立つのかどうかを検証していくことが必要である。

## 総括

2020年2月に医薬品規制調和国際会議（ICH）の医薬品における生殖発生毒性試験のガイドライン（S5）が改訂され、胚・胎児の発生に及ぼす影響（EFD）を評価する試験（EFD試験）の代替法が利用可能となり、多くのメリットを有するゼブラフィッシュ（ZF）の胚を用いる発生毒性試験がEFD試験の代替法として適用できる可能性があり、大いに期待されている。しかし、現状として、ZFの胚・仔魚期における薬物動態（吸収・分布・代謝・排泄）に関する知見は非常に限定的かつ断片的であり、薬物動態の特性におけるZFとヒト/哺乳類との間の類似性については不明な点が多い。またこれまで報告されているZF胚の発生毒性試験系では、ZF胚・仔魚への取込量が明らかでないまま試験が実施されている場合が殆どであり、ZFとヒト/哺乳類の間の薬物ばく露量の関係性は不明である。

そこで本研究では、ZF胚発生毒性試験のEFD試験代替法への適用可能性を検討するために、発生毒性薬物をばく露したZF胚・仔魚中における薬物動態の各プロセスに関する知見を多角的に収集することに加え、発生毒性薬物の水溶液及び胚中濃度の関係性、及びZFとヒト/哺乳類間の薬物ばく露量の関係性を調べた。

1. 第I章では、ICH S5 対照物質を含む種々の薬物に対するZF胚発生毒性試験を実施し、薬物に対する発生毒性の生物応答を確認した。また、その結果を基に、既報の判定手法を用いて、ヒト/哺乳類における発生毒性陽性/陰性を判定した。試験を実施した結果、各薬物における最大無影響濃度（NOEC）が得られ、本研究で陰性と判定された薬物は、全て既報文献の判定結果と一致した。陽性対照物質において既報で陰性と判定された9種のうち、3種（リバビリン、ヒドロキシ尿素、イブプロフェン）は本研究で正しく陽性と判定され、リバビリン及びヒドロキシ尿素については、既報よりも上限濃度を10倍高く設定したことにより検出力が上がったものと考えられる。偽陰性となった原因については、水溶解度が低いこと、ZF-ヒト/哺乳類間における毒性感受性の種間差、 $\log D$ が低いことにより薬物の胚・仔魚中への取込量が少ないことが考えられる。

2. 第II章では、ZF 胚・仔魚における薬物濃度の時間変化及び薬物の体内分布について調べるために、まず、薬物の取込（吸収及び排泄）に関する知見を得る実験として、様々な発生毒性薬物をばく露した ZF 胚・仔魚を、受精後 24 時間（24 hpf）から 24 時間毎に取り上げ、全身における ZF 胚・仔魚中の薬物濃度（ $C_e$ ）を経時的に測定した。また、ZF 胚・仔魚の薬物分布に関する知見を得る実験として、様々な発生毒性薬物をばく露した 48 hpf の ZF 孵化仔魚について、全身及び物理的に卵黄嚢を除去したものについて薬物量をそれぞれ測定し、全身、体部、卵黄嚢それぞれの  $C_e$  を算出した。全身における  $C_e$  については、各時点における  $C_e$  を水溶液濃度（ $C_w$ ）で除した値の常用対数値は、薬物の pH 7 における  $n$ -オクタノール/水分配係数の常用対数値（ $\log D$ ）と非常に高い正の相関性を示した。また、体部及び卵黄嚢における  $C_e$  においても、全身の場合と同様に、 $\log[C_e/C_w]$  は  $\log D$  と非常に高い正の相関性を示した。さらに、本章で得られた、各時点における全身の  $C_e$  についての回帰式を用いて、 $\log D$  及び  $C_w$  から  $C_e$  を見積もることが可能となった。

3. 第III章では、ZF 胚・仔魚における薬物代謝に関する基礎的な知見を得ることを目的として、主要な薬物代謝酵素であるシトクローム P450（CYP）の mRNA 発現量、発現部位についての特徴を調べた。まず、ZF 胚・仔魚における代表的な 14 種の CYP アイソフォームは、4~144 hpf の間で様々な発現パターンの変化を示した。多くの CYP 転写産物は、肝臓発達が進行する約 96 hpf で急激に増加した。一方、一部の CYP1 (1B1、1C1、1C2、1D1) および CYP2R1 の発現は、肝臓の発達が完了する前に、48 若しくは 72 hpf でピークに達した。また、ホルマウント *in situ* ハイブリダイゼーションにより、30~55 hpf にリファンピシン、フェノバルビタール若しくは 2,3,7,8-テトラクロロジベンズ-*p*-ダイオキシシン（TCDD）にばく露した ZF 仔魚について CYP2Y3、2R1 及び 3A65 の mRNA の発現部位を特定した。

4. 第III章ではさらに、ヒトと ZF 胚・仔魚の間の代謝機能の類似性を調査するために、CYP 基質にばく露した ZF 胚・仔魚について、ヒト CYP を介した代謝産物を測定した。結果として、ジクロフェナクから 4'-ヒドロキシジクロフェナク及び 5-ヒドロキシジクロフェナクへの代謝、カフェインから 1,7-ジメチルキサンチンへの代謝が、24 hpf 若しくは 50 hpf という発達段階の早期に検出された。4'-ヒドロキシジクロフェ

ナクの生成率は、肝臓の発達がほぼ完了した後の 120 hpf よりも、肝臓の発達が未熟な 48 hpf や 72 hpf の方が顕著に多かった。これらの結果によって、肝臓発達完了前の ZF 胚・仔魚においても、薬物代謝に関与する様々な CYP が発現し、一部の基質については、ヒトと類似した代謝活性を有していることが示唆された。

5. 第IV章では、発生毒性薬物をばく露した ZF 胚・仔魚における薬物ばく露量とヒト/哺乳類の薬物ばく露量との間の関係性を調べることを目的として、第II章で得られた、各時点の全身の  $C_e$  における  $\log[C_e/C_w]$  と  $\log D$  の間の回帰式を用いて、ICH S5 陽性対照物質 21 物質の NOEC における全身の  $C_e$  及びそれに基づく胚中濃度-時間曲線下面積 (zAUC) の推定値 zAUC(cal)を算出し、ラット、ウサギ及びヒトの無毒性量における血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) と比較した。その結果、第I章において陽性と判定された 14 物質における zAUC(cal)の常用対数値は、ラット、ウサギ及びヒトの AUC の常用対数値との間において比較的高い正の相関性を示した。一方で、第I章で陰性と判定された 7 物質における zAUC(cal)の常用対数値は、ラット、ウサギ及びヒトの AUC の常用対数値との間のいずれにおいても高い相関性は認められなかった。これらの結果から、(1) ZF 胚・仔魚における発生毒性薬物のばく露量指標として zAUC が有用である可能性があること、及び (2) ZF 及びヒト/哺乳類で発生毒性が陽性となる場合において、ZF がラット、ウサギ及びヒトと類似した用量-反応関係を有している可能性が示唆された。

本研究では、発生毒性薬物をばく露した ZF 胚・仔魚の薬物の吸収、分布及び排泄に関する特徴、及び CYP 依存的薬物代謝の機能・活性の特徴及びヒト/哺乳類との類似性に関する重要な知見を得た。さらに、これまで報告例の無い、ZF 試験系における独自のばく露量指標を用いて、ヒト/哺乳類の薬物ばく露量との関係性を明らかにした。本研究で得られたこれらの知見は、ICH S5 ガイドラインで EFD 試験の代替法として求められる「代替法で用いた濃度と、予測する動物種で毒性が生じるばく露量との関係性」に関する重要な情報となると考えられる。

付録

付表 各章で使用した薬物の一覧

薬物名	使用した章	薬物名	使用した章
シタラビン	I,II,IV	ヒドロキシ尿素	I,IV
スマトリプタンコハク酸塩	I,II	5-フルオロウラシル	I,IV
フルコナゾール	I,II,IV	ブスルファン	I,IV
イマチニブ	I,II,IV	トリメタジオン	I,IV
ジクロフェナクナトリウム	I,II,III	バルプロ酸ナトリウム	I,IV
カルバマゼピン	I,II,IV	サリドマイド	I,IV
フェニトイン	I,II,IV	シクロホスファミド一水和物	I,IV
テストステロン	I,II,III	ダサチニブ	I,IV
ジエチルスチルベストロール	I,II	13- <i>cis</i> -レチノイン酸	I,IV
アスピリン	I,IV	アシトレチン	I,IV
シスプラチン	I,IV	トピラマート	I,IV
カフェイン	I,II,III	イブプロフェン	I,IV
メトトレキサート	I	<i>all-trans</i> -レチノイン酸	I,IV
リバビリン	I,IV		

## 謝辞

本研究の遂行及び本論文作成にあたり、終始丁寧かつ適切なお指導及びご助言を賜りました酪農学園大学獣医学群獣医学類の寺岡宏樹教授に心より御礼申し上げます。また、本博士論文の審査を快くお引き受けいただき、多くのご示唆をいただきました酪農学園大学の翁長武紀教授、岩野英知教授に深く感謝の意を表します。

進学のお機会を与えていただきました一般財団法人化学物質評価研究機構の細川幹夫名誉理事長をはじめ、今田中伸哉理事長、屋形直明理事、菊島江理奈久留米事業所長に厚く御礼申し上げます。また、研究へのご助言だけでなく、日々の業務の面からも私の研究を支えて下さいました関雅範副所長、吉川真弓課長、研究にご協力下さいました久留米事業所の生態毒性試験関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。

また、第III章において、定量 PCR 及び *in situ* ハイブリダイゼーション実験を実施し、ご意見をいただいた、酪農学園大学獣医学群の北澤多喜雄名誉教授、山下夏未氏、梅田春佳氏、Shuangyi Zhang 氏に心から感謝の意を表します。

## 引用文献

1. Alderton, W., Berghmans, S., Butler, P., Chassaing, H., Fleming, A., Golder, Z., Richards, F. and Gardner, I. 2010. Accumulation and metabolism of drugs and CYP probe substrates in zebrafish larvae. *Xenobiotica* **40**: 547–557.
2. Alsdorf, R. and Wyszynski, D.F. 2005. Teratogenicity of sodium valproate. *Expert Opin. Drug Saf.* **4**: 345–353.
3. Arnot, J.A. and Gobas, F.A.P.C. 2006. A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. *Environ. Rev.* **14**: 257–297.
4. Ball, J.S., Stedman, D.B., Hillegass, J.M., Zhang, C.X., Panzica-Kelly, J., Coburn, A., Enright, B.P., Tornesi, B., Amouzadeh, H.R., Hetheridge, M., Gustafson, A.L. and Augustine-Rauch, K.A. 2014. Fishing for Teratogens: A consortium effort for a harmonized zebrafish developmental toxicology assay. *Toxicol. Sci.* **139**: 210–219.
5. Benet, L.Z., Broccatelli, F. and Oprea, T.I. 2011. SDDCS applied to over 900 drugs. *AAPS J.* **13**: 519-547.
6. Bhandari, S., Lee, J.N., Kim, Y.I., Nam, I.K., Kim, S.J., Kim, S.J., Kwak, S., Oh, G.S., Kim, H.J., Yoo, H.J., So, H.S., Choe, S.K. and Park, R. 2016. The fatty acid chain elongase, Elovl1, is required for kidney and swim bladder development during zebrafish embryogenesis. *Organogenesis* **12**: 78–93.
7. Brannen, K.C., Panzica-Kelly, L.N., Danberry, T.L. and Augustine-Rauch, K.A. 2010. Development of a zebrafish embryo teratogenicity assay and Quantitative prediction model. *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.* **89**: 66–77.
8. Chang, G.W. and Kam, P.C. 1999. The physiological and pharmacological roles of cytochrome P450 isoenzymes. *Anaesthesia* **54**: 42–50.
9. Chng, H.T., Ho, H.K., Yap, C.W., Lam, S.H. and Chan, E.C. 2012. An investigation of the bioactivation potential and metabolism profile of zebrafish versus human. *J. Biomol. Screen.* **17**: 974–986.
10. Chu, J. and Sadler, K.C. 2009. New school in liver Development: Lessons from zebrafish. *Hepatology* **50**: 1656–1663.

11. Corley-Smith, G.E., Su, H.T., Wang-Buhler, J.L., Tseng, H.P., Hu, C.H., Hoang, T., Chung, W.G. and Buhler, D.R. 2006. CYP3C1, the first member of a new cytochrome P450 subfamily found in zebrafish (*Danio rerio*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **340**: 1039–1046.
12. Cox, A.G. and Goessling, W. 2015. The lure of zebrafish in liver research: Regulation of hepatic growth in development and regeneration. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **32**: 153–161.
13. Diekmann, H. and Hill, A. 2013. ADMETox in zebrafish. *Drug Discov. Today Dis. Models* **10**: e31–e35.
14. Dong, W., Teraoka, H., Yamazaki, K., Tsukiyama, S., Imani, S., Imagawa, T., Stegeman, J.J., Peterson, R.E. and Hiraga, T. 2002. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxicity in the zebrafish embryo: Local circulation failure in the dorsal midbrain is associated with increased apoptosis. *Toxicol. Sci.* **69**: 191–201.
15. Drozdziak, M., Busch, D., Lapczuk, J., Müller, J., Ostrowski, M., Kurzawski, M. and Oswald, S. 2018. Protein abundance of clinically relevant drug transporters in the human liver and intestine: A comparative analysis in paired tissue specimens. *Clin. Pharmacol. Ther.* **104**: 515–524.
16. Eimon, P.M. and Rubinstein, A.L. 2009. The Use of In Vivo Zebrafish Assays in Drug Toxicity Screening. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **5**: 393–401.
17. Fraher, D., Sanigorski, A., Mellet, N.A., Meikle, P.J., Sinclair, A. and Gibert, Y. 2016. Zebrafish embryonic lipidomic analysis reveals that the yolk cell is metabolically active in processing lipid. *Cell Reports* **14**:1317-1329.
18. Giannoudis, A., Davies, A., Lucas, C.M., Harris, R.J., Pirmohamed, M. and Clark, R.E. 2007. Unlike imatinib, dasatinib uptake into chronic myeloid leukaemia cells is independent of hOCT1 expression. *Blood* **110**: 3458.
19. Gibert, Y., Trengove, M.C. and Ward, A.C. 2013. Zebrafish as a genetic model in pre-clinical drug testing and screening. *Curr. Med. Chem.* **20**: 2458–2466.
20. Goldstone, J.V., McArthur, A.G., Kubota, A., Zanette, J., Parente, T., Jonsson, M.E., Nelson, D.R. and Stegeman, J.J. 2010. Identification and developmental expression

- of the full complement of Cytochrome P450 genes in Zebrafish. *BMC Genom.* **11**: 643.
21. Guengerich, F.P. 2006. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS J.* **8**: E101–E111.
  22. Guengerich, F.P. 2008. Cytochrome P450 and chemical toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* **21**: 70–83.
  23. Hakkola, J., Tanaka, E. and Pelkonen, O. 1998. Developmental expression of cytochrome P450 enzymes in human liver. *Pharmacol. Toxicol.* **82**: 209–217.
  24. Halbach, K., Ulrich, N., Goss, K.U., Seiwert, B., Wagner, S., Scholz S., Luckenbach, T., Bauer, C., Schweiger, N. and Reemtsma, T. 2020. *Environ. Sci. Technol.* **54**: 10159-10169.
  25. Hansen, S., Selzer, D., Schaefer, U.F. and Kasting, G.B. 2010. An extended database of keratin binding. *J. Pharm. sci.* **100**: 1712-1726.
  26. Hewitt, N.J., Lechón, M.J.G., Houston, J.B., Hallifax, D., Brown, H.S., Maurel, P., Kenna, J.G., Gustavsson, L., Lohmann, C., Skonberg, C., Guillouzo, A., Tuschl, G., Li, A.P., LeCluyse, E., Groothuis, G.M.M. and Hengstler, J.G. 2007. Primary hepatocytes: Current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies. *Drug Metab. Rev.* **39**: 159–234.
  27. Hou, C.Y., Hua, P.T., Hsin, Y.C., Chin, Y.K., Wen, S.T., Donald, R.B. and Chin, H.H. 2008. Influence of TCDD on zebrafish CYP1B1 transcription during development. *Toxicol. Sci.* **103**: 158–168.
  28. Huang, H., Huang, C., Wang, L., Ye, X., Bai, C., Simonich, M.T., Tanguay, R.L. and Dong, Q. 2010. Toxicity, uptake kinetics and behavior assessment in zebrafish embryos following exposure to perfluorooctanesulphonic acid (PFOS). *Aquat. Toxicol.* **98**: 139–147.
  29. Inoue, A., Nishimura, Y., Matsumoto, N., Umemoto, N., Shimada, Y., Maruyama, T., Kayasuga, K., Morihara, M., Katagi, J., Shiroya, T., Hirota, Y., Kim, S. and Tanaka, T. 2016. Comparative study of the zebrafish embryonic toxicity test and mouse

- embryonic stem cell test to screen developmental toxicity of human pharmaceuticals drug. *Fundam. Toxicol. Sci.* **3**:79-87.
30. International Conference on Harmonization [ICH]. 2020. Final Version ICH Harmonised Guideline S5(R3): Detection of Reproductive and Developmental Toxicity for Human Pharmaceuticals. ICH, Geneva.
  31. Isogai, S., Horiguchi, M. and Weinstein, B.M. 2001. The vascular anatomy of the developing zebrafish: An atlas of embryonic and early larval development. *Dev. Biol.* **230**: 278–301.
  32. Jagodinsky, J.C., Sulima, A., Cao, Y., Poprawski, J.E., Blackman, B.N., Lloyd, J.R., Swenson, R.E., Gottesman, M.M. and Hall, M.D. 2015. Evaluation of fluorophore-tethered platinum complexes to monitor the fate of cisplatin analogs. *J. Biol. Inorg. Chem.* **20**: 1081-1095.
  33. Kitada, M. and Kamataki, T. 1994. Cytochrome P450 in human fetal liver: Significance and fetal-specific expression. *Drug Metab. Rev.* **26**: 305–323.
  34. Kot, M. and Daniel, W.A. 2008. Caffeine as a marker substrate for testing cytochrome P450 activity in human and rat. *Pharmacol. Rep.* **60**: 789–797.
  35. Kubota, A., Stegeman, J.J., Woodin, B.R., Iwanaga, T., Harano, R., Peterson, R.E., Hiraga, H. and Teraoka, H. 2011. Role of zebrafish cytochrome P450 CYP1C genes in the reduced mesencephalic vein blood flow caused by activation of AHR2. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **253**: 244–252.
  36. Kubota, A., Kawai, Y.K., Yamashita, N., Lee, J.S., Kondoh, D., Zhang, S., Nishi, Y., Suzuki, K., Kitazawa, T. and Teraoka, H. 2019. Transcriptional profiling of cytochrome P450 genes in the liver of adult zebrafish, *Danio Rerio*. *J. Toxicol. Sci.* **44**: 347–356.
  37. Lin, J.H. and Lu, A.Y. 1998. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin. Pharmacokinet.* **35**: 361–390.
  38. Lombardo, F., Shalaeva, M.Y., Tupper, K.A. and Gao, F. 2001. ElogD<sub>oct</sub>: A tool for lipophilicity determination in drug discovery. 2. Basic and Neutral Compounds. *J. Med. Chem.* **44**:2490-2497.

39. MacRae, C.A. and Peterson, R.T. 2015. Zebrafish as tools for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**: 721–731.
40. Mohri, T., Nakajima, M., Fukami, T., Takamiya, M., Aoki, Y. and Yokoi, T. 2010. Human CYP2E1 is regulated by miR-378. *Biochem. Pharmacol.* **79**: 1045–1052.
41. Nawaji, T., Mizoguchi, N., Ono, M., Matuuta, T., Seki, M. and Teraoka, H. 2018. Comparing time-transition of chemical concentrations in zebrafish (*danio rerio*) embryo/larva exposed to teratogens with different hydrophobicity; caffeine, sodium valproate and diethylstilbestrol. *J. Toxicol. Sci.* **43**: 267–273.
42. Nawaji, T., Yamashita, N., Umeda, H., Zhang, S., Mizoguchi, N., Seki, M., Kitazawa, T. and Teraoka, H. 2020. Cytochrome P450 Expression and Chemical Metabolic Activity before Full Liver Development in Zebrafish. *Pharmaceuticals* **13**: 456.
43. OECD. 1992. OECD Guidelines for testing of chemicals; No. 203, Fish, Acute Toxicity Test. OECD Publishing, Paris, France.
44. OECD. 2012. OECD Guidelines for testing of chemicals; No. 305, Bioconcentration in fish: Aqueous and dietary exposure. OECD Publishing, Paris, France.
45. Official Journal of the European Union, DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. L276, 20.10.2010, pp.33-79. Available online: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:-2010:276:0033:0079:en:PDF> (accessed on 27 September 2022).
46. Page, T. and Connor, J.D. 1990. The metabolism of ribavirin in erythrocytes and nucleated cells. *Int. J. Biochem.* **22**: 379-383.
47. Patki, K.C., Von Moltke, L.L. and Greenblatt, D.J. 2003. In vitro metabolism of midazolam, triazolam, nifedipine, and testosterone by human liver microsomes and recombinant cytochrome P450: Role of CYP3A4 and CYP3A5. *Drug Metab. Dispos.* **31**: 938–944.
48. Saad, M., Cavanaugh, K., Verbueken, E., Pype, C., Casteleyn, C., Ginneken, C.V. and Cruchten, V. 2016. Xenobiotic metabolism in the zebrafish: a review of the

- spatiotemporal distribution, modulation and activity of cytochrome P450 families 1 to 3. *J. Toxicol. Sci.* **41**: 1-11.
49. Saad, M., Verbueken, E., Pype, C., Casteleyn, C., Ginneken, C.V., Maes, L., Cos, P. and Cruchten, S.V. 2016. In vitro CYP1A activity in the zebrafish: Temporal but low metabolite levels during organogenesis and lack of gender differences in the adult stage. *Reprod. Toxicol.* **64**: 50–56.
50. Saad, M., Matheuseen, A., Bijttebier, S., Verbueken, E., Pype, C., Casteleyn, C., Ginneken, C.V., Apers, S., Maes, L., Cos, P. and Cruchten, S.V. 2017. In vitro CYP-mediated drug metabolism in the zebrafish (embryo) using human reference compounds. *Toxicol. In Vitro* **42**: 329–336.
51. Sanz-Landaluze, J., Pena-Abaurrea, M., Munoz-Olivas, R., Camara, C. and Ramos, L. 2015. Zebrafish (*Danio rerio*) eleutheroembryo-based procedure for assessing bioaccumulation. *Environ. Sci. Technol.* **49**: 1860-1869.
52. Scornaienchi, M.L., Thornton, C., Willett, K.L. and Wilson, J.Y. Cytochrome P450-mediated 17beta-estradiol metabolism in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Endocrinol.* 2010. 206: 317–325.
53. Selderslaghs, I.W.T., Van Rompay, A.R., De Coen, W. and Witters, H.E. 2009. Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo. *Reprod. Toxicol.* **28**: 308–320.
54. Selderslaghs, I.W.T., Blust, R. and Witters, H.E. 2012. Feasibility study of the zebrafish assay as an alternative method to screen for developmental toxicity and embryotoxicity using a training set of 27 compounds. *Reprod. Toxicol.* **33**: 142–154.
55. Shen, S., Marchick, M.R., Davis, M.R., Doss, G.A. and Pohl, L.R. 1999. Metabolic activation of diclofenac by human cytochrome P450 3A4: Role of 5-hydroxydiclofenac. *Chem. Res. Toxicol.* **12**: 214–222.
56. Shimada, T., Yamazaki, H., Mimura, M., Inui, Y. and Guengerich, F.P. 1994. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: Studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **270**: 414–423.

57. Stegeman, J., Behrendy, L., Woodin, B.R., Kubota, A., Lemaire, B., Pompon, Goldstone, J.V. and Urban, P. 2015. Functional characterization of zebrafish cytochromeP450 1 family proteins expressed in yeast. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1850**: 2340–2352.
58. Stuckenholz, C., Lu, L., Thakur, P., Kaminski, N. and Bahary, N. 2009. FACS-Assisted Microarray Profiling Implicates Novel Genes and Pathways in Zebrafish Gastrointestinal Tract Development. *Gastroenterology* **137**: 1321–1332.
59. Tao, T. and Peng, J. 2009. Liver development in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Genet. Genom.* **36**: 325–334.
60. Teraoka, H., Dong, W., Ogawa, S., Tsukiyama, S., Okuhara, Y., Niiyama, M., Ueno, N., Peterson, R.E. and Hiraga, T. 2002. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxicity in the zebrafish embryo: Altered regional blood flow and impaired lower jaw development. *Toxicol. Sci.* **65**:192–199.
61. Verbueken, E., Alsop, D., Saad, M.A., Pype, C., Peer, E.M.V., Casteleyn, C.R., Ginneken, C.J.V., Wilson, J. and Cruchten, S.J.V. 2017. *In Vitro* Biotransformation of Two Human CYP3A Probe Substrates and Their Inhibition during Early Zebrafish Development. *Int. J. Mol. Sci.* **18**: 217.
62. Yamashita, A., Inada, H., Chihara, K., Yamada, T., Deguchi, J. and Funabashi, H. 2014. Improvement of the evaluation method for teratogenicity using zebrafish embryos. *J. Toxicol. Sci.* **39**:453–464.
63. Zanger, U.M. and Schwab, M. 2013. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol. Ther.* **138**: 103–141.
64. Zuber, R., Anzenbacherova, E. and Anzenbacher, P. 2002. Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *J. Cell. Mol. Med.* **6**: 189–198.
65. 協和キリン株式会社 2022. トピナインインタビューフォーム **7**.
66. 日本毒性学会教育委員会編. 2018. トキシコロジー 第3版. 朝倉書店. 東京.
67. 藤本製薬株式会社 2021. サレドカプセルインタビューフォーム **12**.
68. ブリストル・マイヤーズ スクイブ株式会社 2022. ハイドレアカプセルインタビューフォーム **9**.

## Studies on kinetics of developmental toxicants in early developing zebrafish

Veterinary pharmacology, Doctoral course of Veterinary Medicine,  
Graduate School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University

Tasuku Nawaji

Test systems using zebrafish embryos are treated as non-animal tests in Europe, so they are advantageous from the viewpoint of animal welfare, and because they have many advantages in terms of simplicity and cost, they are attracting attention as an alternative to animal tests. In February 2020, the International Conference on Harmonization (ICH) guideline on reproductive toxicology: detection of toxicity to reproduction for human pharmaceuticals (S5) were revised, and tests to evaluate effects on embryo-fetal development (EFD) has become available, it is expected to be applied to an alternative method of the EFD test. However, the information on the pharmacokinetics (absorption, distribution, metabolism, excretion) of ZF during the embryonic and larval stages is very limited and fragmentary. Therefore, the similarity between humans/mammals and the relationship between ZF and human/mammals drug exposure is hard to be considered. In this study, to examine the applicability of the ZF embryo developmental toxicity test to an alternative method to the EFD test, we will multilaterally collect knowledge on each process of pharmacokinetics in ZF embryos and larvae exposed to developmental toxicity drugs. In addition, we investigated the relationship between aqueous and embryonic concentrations of developmentally toxic drugs, and the relationship between ZF and human/mammal drug exposure.

In Chapter I, developmental toxicity tests using ZF embryos were conducted against various drugs, including positive control reference compounds described in ICH S5, to confirm developmental toxic biological responses to drugs. Based on the results, the positive/negative judgement of developmental toxicity in humans/mammals was performed using a method described in the previous report. Of the 22 ICH S5 positive control reference compounds, 15 drugs were correctly identified as positive

(concordance: 68%) and the remaining 7 drugs were identified as negative (false negative rate: 32%). All the drugs judged as negative in this study were consistent with the judgment results of the published literature. False-negative results are considered to be due to the low water solubility, or low uptake by low logD or interspecies differences in toxicity sensitivity between ZF and humans/mammals.

In Chapter II, to investigate the temporal behavior and the distribution of the drug in ZF embryos/larvae, first, as an experiment to obtain information on drug uptake (absorption and excretion), 24 hours after fertilization (24 hpf), the drug concentration in whole ZF embryos/larvae ( $C_e$ ) was measured over time every 24 hours. In addition, as an experiment to obtain information on drug distribution in ZF embryos/larvae,  $C_e$ s in whole embryo/larva, body without yolk sac, and yolk sac of 48 hpf ZF hatched larvae exposed to various developmental toxicants were calculated. As the results,  $\log[C_e/C_w]$  was highly correlated with logarithm of n-octanol/water partition coefficient at pH 7 (logD) for each time point or site. Furthermore, results suggest that it is possible to estimate  $C_e$  from logD and  $C_w$  using the regression equation for ZF whole embryo/larva at each time point.

In Chapter III, to obtain basic knowledge about drug metabolism in ZF embryos and larvae, we profiled the mRNA expression levels, organ distribution, and metabolic activity of various drug-metabolizing cytochrome P450s (CYPs) in developing zebrafish embryos and larvae were investigated. First, 14 ZF CYP isoforms, including homologues of human xenobiotic metabolism CYP isoforms, showed various expression pattern changes between 4 and 144 hpf. By whole-mount *in situ* hybridization, we identified the expression sites of CYP2Y3, 2R1 and 3A65 mRNAs in ZF larvae exposed to CYP inducers. Furthermore, metabolites via three most commonly expressed CYPs in human, CYP1A2, 2C9 and 3A4/5, were detected in ZF embryos and larvae exposed to the CYP substrates in possible primordia of the liver, intestine and air sac, before full liver development. Some expressions of CYP isoforms including *cy1b1*, *1cs*, *1d1* and 3A65 were higher or comparable to those in adult liver. It was suggested that larval fish may have metabolic functions like those of human CYP1A2, CYP2C9 and CYP3A4/5 without depending on full liver organogenesis.

In Chapter IV, to investigate the relationship between amount of drug exposure in ZF embryos and larvae exposed to developmental toxicants and drug exposure in humans/mammals, using the regression equation between  $\log[C_e/C_w]$  in  $C_e$  of whole embryos or larvae and  $\log D$  at each time point, whole  $C_e$ s in in the NOECs of the 21 positive control reference compounds described the ICH S5 guideline calculated. Additionally, the area under the drug concentration-time curve in the embryos or larvae (zAUC) based on the calculated values of  $C_e$ s, zAUC(cal), was calculated and compared with the area under the plasma drug concentration-time curve (AUC) at the no observed adverse effect level in rats or rabbits, or at the effective dose in humans. As a result, the logarithm values of zAUC(cal) for the 14 drugs judged positive in Chapter I showed a relatively high positive correlation with the logarithm values of AUC in rats, rabbits, and humans. This suggests the possibility that ZF has a dose-response relationship like that of rats, rabbits, and humans when developmental toxicity is positive in ZF and humans/mammals.

We consider that the findings obtained in this study on the kinetics of developmental toxicants in early developing ZF embryos and larvae and on the amount of drug exposure provide basic and extremely important information for considering the usefulness and scope of the test when applying the ZF embryonic developmental toxicity test to an alternative EFD test.