

## 博士学位論文

### 学位論文内容の要旨および審査結果の要旨

氏 名 縄司 奨

学 位 の 種 類 博士（獣医学）

学位授与の条件 酪農学園大学学位規程第3条第3項に該当

学位論文の題目 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

### 審 査 委 員

主査 教 授 寺岡 宏樹（獣医薬理学）

副査 教 授 翁長 武紀（獣医生理学）

副査 教 授 岩野 英知（獣医生化学）

## 学位論文要旨

### 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

獣医薬理学 縄司 奨

ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*, ZF) の胚・仔魚を用いる試験系は、欧州では非動物試験と取り扱われるため動物福祉の観点で有利であり、簡便性、コスト面等数多くの利点を有することから、動物試験の代替法としての利用が注目されている。一方、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ったことから、ZF胚を用いる発生毒性試験のEFD試験代替法への適用が期待されている。しかしながら、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、ヒト/哺乳類との間の類似性あるいは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。

第I章では、ICH S5 陽性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。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。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pH7における $n$ -オクタノール/水分配係数の常用対数値 ( $\log D$ ) 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、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、受

精後 24 時間 (24 hpf) から 24 時間毎に全身における 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 ふ化仔魚について、全身、体部、卵黄嚢それぞれの  $C_e$  を算出した。その結果、時点毎、あるいは部位毎で、 $\log[C_e/C_w]$  ( $C_w$ : 水溶液中の薬物濃度) は  $\log D$  と高い相関性を示した。さらに、各時点における ZF 全身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。

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、発現部位及び代謝活性についての特徴を調べた。まず、ヒト異物代謝 CYP アイソフォームのホモログを含む 14 種の ZF 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。ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションにより、CYP 誘導剤をばく露した 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、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、発達初期の ZF 胚・仔魚が、肝臓の器官形成に依存することなく、少なくとも一部の化学物質に対して、ヒト CYP1A2、CYP2C9 及び CYP3A4/5 と同様の代謝機能を持っていることが示された。

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、ウサギの無毒性量及びヒトの有効量における血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) と比較した。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。このことから、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。

本研究で得られた、発達初期 ZF 胚・仔魚における発生毒性物質の動態、及び薬物ばく露量に関する知見は、ZF 胚発生毒性試験を EFD 試験代替法に適用する際の試験の有用性や適用範囲を考慮するための基礎的かつ極めて重要な情報である。

## 論文審査の要旨および結果

### 論文審査の要旨および結果

審査は、1) 体裁を整え、新規性があり、明確に十分な根拠があるか、2) 科学および獣医学の発展に寄与する内容であるかの2点を重点に行われた。その結果、縄司氏から提出された本学位論文は十分な根拠に基づいた多くの新知見について、本学獣医学研究科が定める学位論文の体裁を守ってまとめられていた。本申請研究の成果は科学および獣医学の発展に寄与することが期待される。

### 論文の概要について

今もなお、世界的に膨大な新規化合物が登録され続けているにも関わらず、哺乳動物を用いた動物実験は動物福祉の観点からますます厳しくなっている。ゼブラフィッシュ (Danio rerio, ZF) の胚・仔魚を用いる試験系は、欧州では非動物試験と取り扱われるため動物福祉の観点で有利であり、簡便性、コスト面等数多くの利点を有することから、動物試験の代替法としての利用が注目されている。本申請論文では毒性影響に比較して遅れている、化合物の取り込みおよび代謝に関して検討した。このうち、化合物の脂溶性とZFの取り込みとの関係を明らかにしたこと、肝臓ができる前にもヒトと類似した化合物の代謝活性を持つなどについては特に重要な発見であると考えられる。

### 研究の背景と目的

ZFの胚・仔魚を用いる試験系は、欧州では非動物試験と取り扱われるため動物福祉の観点で有利であり、簡便性、コスト面等数多くの利点を有することから、動物試験の代替法としての利用が注目されている。一方、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ったことから、ZF胚を用いる発生毒性試験のEFD試験代替法への適用が期待されている。しかしながら、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、ヒト/哺乳類との間の類似性あるいは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。

### 研究の成果

第I章では、ICH S5 陽性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。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。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 pH 7 における n-オクタノール/水分配係数の常用対数値 ( $\log D$ ) 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、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、受精後 24 時間 (24 hpf) から 24 時間毎に全身における 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 ふ化仔魚について、全身、体部、卵黄嚢それぞれの  $C_e$  を算出した。その結果、時点毎、あるいは部位毎で、 $\log[C_e/C_w]$  ( $C_w$ : 水溶液中の薬物濃度) は  $\log D$  と高い相関性を示した。さらに、各時点における ZF 全身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。

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、発現部位及び代謝活性についての特徴を調べた。まず、ヒト異物代謝 CYP アイソフォームのホモログを含む 14 種の ZF 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。ホールマウント in situ ハイブリダイゼーションにより、CYP 誘導剤をばく露した 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、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、発達初期の ZF 胚・仔魚が、肝臓の器官形成に依存することなく、少なくとも一部の化学物質に対して、ヒト CYP1A2、CYP2C9 及び CYP3A4/5 と同様の代謝機能を持っていることが示された。

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、ウサギの無毒性量及びヒトの有効量における血中濃度-時間曲線下面積 ( $AUC$ ) と比較した。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。このことから、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。

以上から、発達初期 ZF における発生毒性薬物の体内動態に関する重要な知見が得られた。

## 研究の評価

本研究で得られた、発達初期 ZF 胚・仔魚における発生毒性物質の動態、及び薬物ばく露量に関する知見は、ZF 胚発生毒性試験を EFD 試験代替法に適用する際の試験の有用性や適用範囲を考慮するための基礎的かつ極めて重要な情報である。

## 学位論文の一部を公表した論文

- 1) Nawaji, T., Mizoguchi, N., Ono, M., Matuuta, T., Seki, M. and Teraoka, H. 2018. Comparing time-series of chemical concentrations in zebrafish (*Danio rerio*) embryos/larvae exposed to teratogens with different hydrophobicity; caffeine, sodium valproate, and diethylstilbestrol. *J. Toxicol. Sci.* 43: 267-273.
- 2) 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.

## 2 最終試験の結果

審査委員 3 名が最終試験を行った結果、合格と認める。

2023 年      2 月   8 日

### 審査委員

主査 教 授 寺岡 宏樹

副査 教 授 翁長 武紀

副査 教 授 岩野 英知