

平成 23 年 9 月 13 日

受託研究経過報告

独立行政法人医薬基盤研究所

バイオ創薬プロジェクト

1. 海洋堆積物由来物質の安全性の評価（24 時間経口投与）について

【目的】

海洋堆積物由来物質をマウスに 24 時間摂食させた際の生体影響（急性毒性）を、主要な生化学的マーカーにより評価する。

【材料等】

- ・マウス
Balb/c 系統、オス、6 週齢、体重約 20g、SPF グレードのマウスを日本 SLC 社より購入した。
- ・試料
クリエイト社より提供された海洋堆積物由来物質粉末（H23.4.2 受領分）を、あらかじめ γ 線照射滅菌（30kGy、コーガアイソトープ社にて）して使用した。
- ・通常食飼料
滅菌済み粉末飼料（CRF-1、オリエンタル酵母社）を使用した。

【試験方法】

- ・試験は医薬基盤研究所 SPF 動物実験施設において実施した。
- ・通常食飼料、あるいは通常食飼料に海洋堆積物由来物質（CR と表記）を一定割合で混合（10w/w%、5%、2.5%）した飼料を、給餌缶（RodentCafe、オリエンタル酵母社）に入れて飼育ケージに配置し、マウスに自由摂食させた(5 匹/群)。
- ・1 匹あたりの総摂食量は 24 時間後の給餌缶の重量減少分を 5 で除した値とした（CR の投与量としては、混合比に基づいて、摂食量の 10%、5%、2.5%）。
- ・24 時間給餌の後、体重測定エーテル麻酔下で眼窩静脈より採血し、血液生化学マーカー測定に供した。測定には血液を遠心分離して回収した血清を使用し、自動分析装置（富士ドライケム 7000、富士フィルム社）にて行った。また、安楽死後に開腹し、主要臓器の外観等を観察した。
- ・評価項目
体重
主要臓器の外観観察（ホルマリン固定にて保存）
主要な血液生化学マーカー値

AST (アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、GOT)、ALT (アラニンアミノトランスフェラーゼ、GPT)、tBIL (総ビリルビン)、BUN (尿素窒素)

【結果】

- ・測定結果は別紙 **Fig.1~Fig.6** に記載の通り。
- ・経口投与はゾンデ等の定量的な投与器具の使用が一般的ではあるが、CR 粉末を水に懸濁するとゾンデの管に詰まり投与できないことから、自由摂食による投与で試験を行った。
- ・飼料の 1 匹あたりの総摂食量は 24 時間で 1.6~2.2g であり、CR の混合率による摂食量への影響は認められなかった。これに基づき、海洋堆積物由来物質 (CR) の 1 匹あたり 24 時間の摂食量は 10%群で 0.15g、5%群で 0.1g、0.25%群で 0.05g (マウスの体重 20g として、7.5g / kgbw、5g / kgbw、2.5g / kgbw) であった (**Fig. 1**)。
- ・体重変化について、各群間で大きな違いは認められなかった (**Fig. 2**)。
- ・24 時間時点でのマウスの行動・外観、あるいは開腹時の肝臓、腎臓、脾臓等に外観上目立った変化は認められなかった。
- ・肝機能障害のマーカーとして AST, ALT, tBIL を、腎機能障害のマーカーとして BUN を測定したが、いずれの群においてもコントロール群と比べて有意な変化は認められなかった。(なお AST 値について、採血時に明らかに溶血したサンプルでは不正確な値となるため該当サンプルは除外した) (**Fig.4~6**)。
- ・以上の結果から、CR 粉末 0.15g /mouse (マウスの体重 20g として、7.5g / kg)までの投与 (摂食) 量において、急性毒性 (24 時間) は認められなかった。

2. 海洋堆積物由来物質の安全性の評価 (4 週間経口投与) について

【目的】

海洋堆積物由来物質をマウスに 4 週間摂食させた際の生体影響 (亜急性毒性) を、主要な生化学的マーカーにより評価する。

【材料等】

- ・マウス
Balb/c 系統、オス、6 週齢、体重約 20g、SPF グレードのマウスを日本 SLC 社より購入した。
- ・試料
クリエイト社より提供された海洋堆積物由来物質粉末 (H23.4.2 受領分) を、あらかじめγ線照射滅菌 (30kGy、コーガイソトープ社にて) して使用した。

- ・通常食飼料

滅菌済み粉末飼料（CRF-1、オリエンタル酵母社）を使用した。

【試験方法】

- ・試験は医薬基盤研究所 SPF 動物実験施設において実施した。
- ・通常食飼料、あるいは通常食飼料に海洋堆積物由来物質（CR と表記）を一定割合で混合（10w/w%、5%、2.5%）した飼料を、給餌缶（RodentCafe、オリエンタル酵母社）に入れて飼育ケージに配置し、マウスに自由摂食させた(5匹/群)。
- ・給餌缶の重量減少を経日的に計測し、1匹あたり、1日の摂食量を概算した（CR の投与量としては、混合比に基づいて、摂食量の 10%、5%、2.5%）。
- ・4週間の給餌の後、エーテル麻酔下で眼窩静脈より採血し、血液生化学マーカー測定に供した。測定には血液を遠心分離して回収した血清を使用し、自動分析装置（富士ドライケム 7000、富士フィルム社）にて行った。また、安楽死後に開腹し、主要臓器の外観等を観察した。

- ・評価項目

体重

主要臓器の外観観察（ホルマリン固定にて保存）

主要な血液生化学マーカー値

AST（アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、GOT）、ALT（アラニンアミノトランスフェラーゼ、GPT）、tBIL（総ビリルビン）、BUN（尿素窒素）

【結果】

- ・測定値は別紙 Fig.7～Fig.12 に記載の通り。
- ・24時間投与試験と同様に、自由摂食による投与で試験を行った。
- ・飼料の1匹あたりの1日摂食量は、急性毒性試験の場合とほぼ同量、平均 1.6g であった。それに基づき、海洋堆積物由来物質(CR)の1匹あたりの1日摂食量は10%群で約 0.16g、5%群で 0.08g、0.25%群で 0.04g、(それぞれ 8g / kgbw、4g / kgbw、2g / kgbw)、4週間での CR 総摂食量は、10%群で 4.4g、5%群で 2.2g、2.5%群で 1.1g であった (Fig.7)。
- ・体重変化について、各群間で大きな違いは認められなかった (Fig.8)。
- ・実験期間中のマウスの行動・外観、あるいは4週間(28日)での開腹時の肝臓、腎臓、脾臓等に外観上目立った変化は認められなかった。
- ・肝機能障害のマーカーとして AST, ALT, tBIL を、腎機能障害のマーカーとして BUN を測定したが、いずれの群においてもコントロール群と比べて有意な変化は認められなかった。(なお AST 値について、採血時に明らかに溶血したサンプルでは不正確な値となるため該当サンプルは除外した) (Fig.9～12)。

- 以上の結果から、4週間の経口投与において、CR粉末0.16g/mouse/day(8g/kgbw/day)までの投与(摂食)量では亜急性毒性は認められなかった。

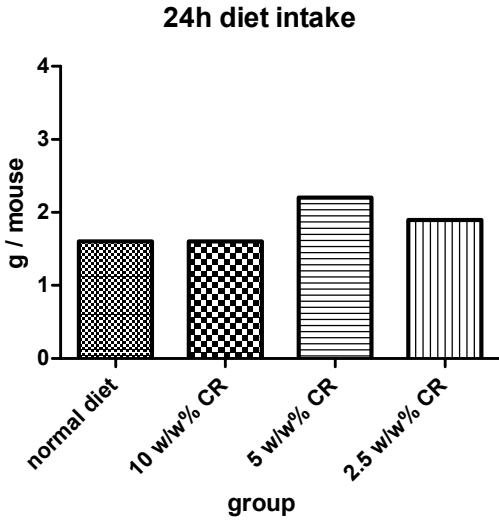
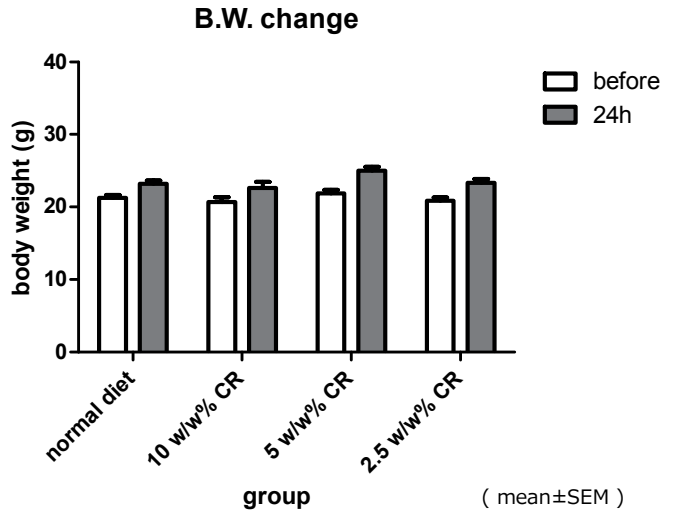
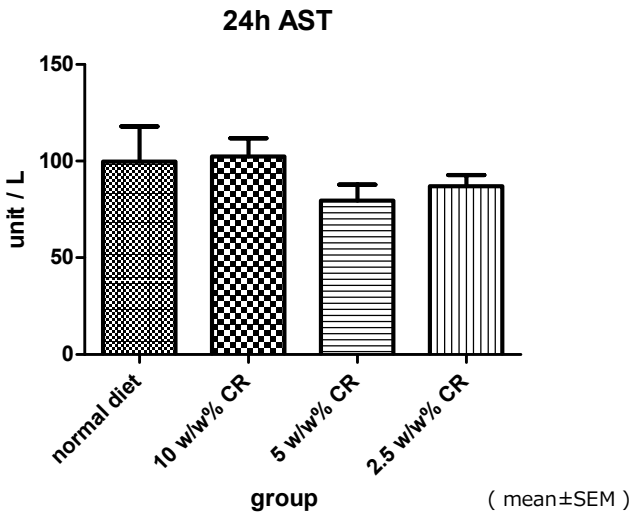
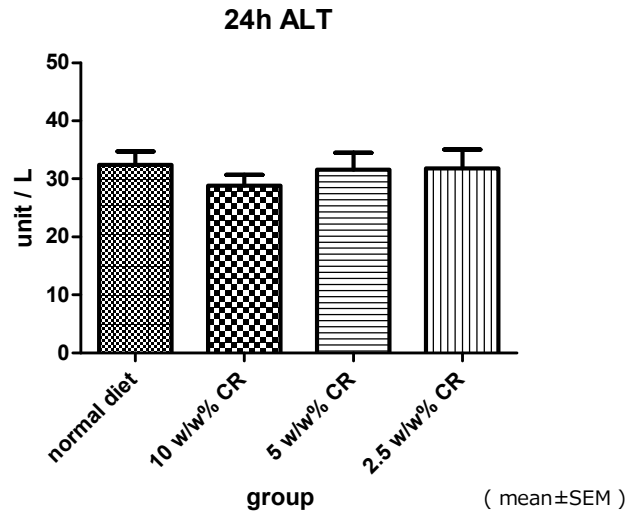
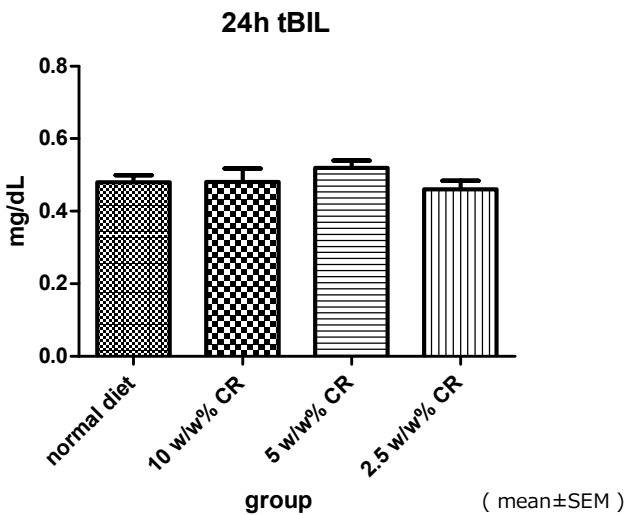
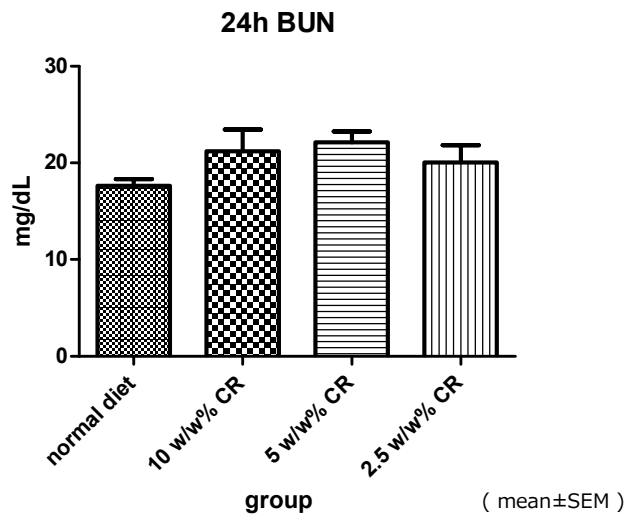
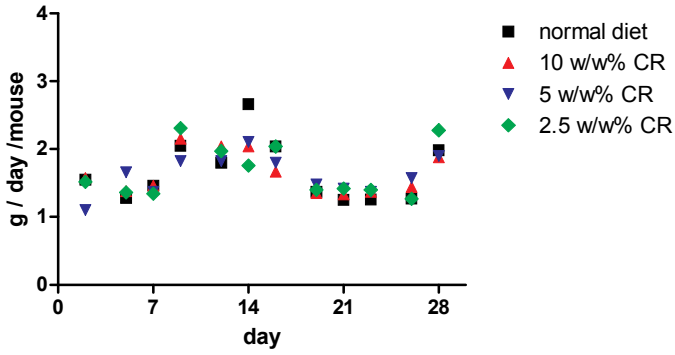
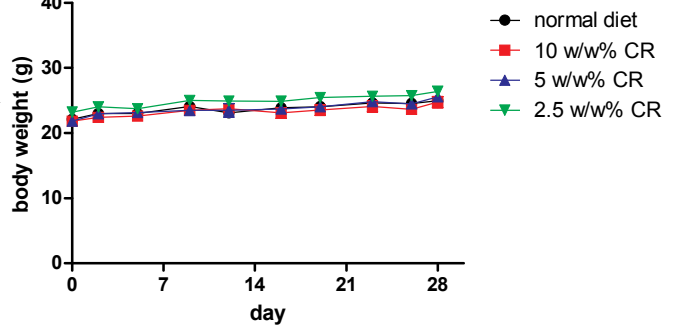
Fig. 1**Fig. 2****Fig. 3****Fig. 4****Fig. 5****Fig. 6**

Fig. 7

4week diet daily intake
(ave. 1.6 g / day / mouse)

**Fig. 8**

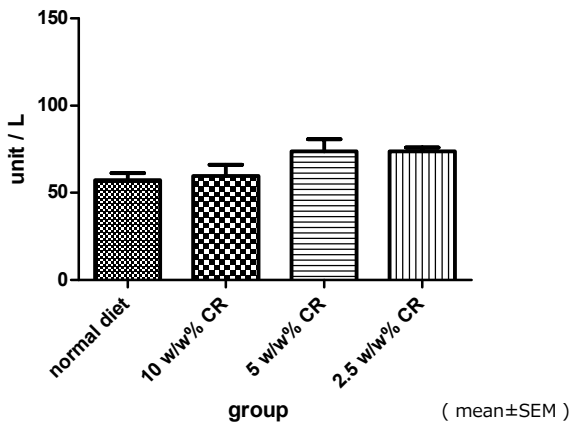
4week B.W. change



(mean±SEM)

Fig. 9

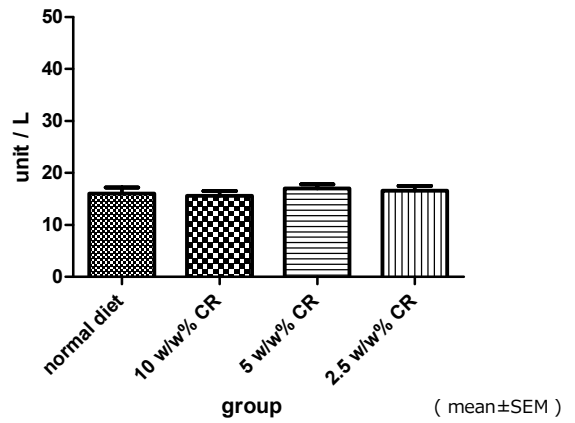
4week AST



(mean±SEM)

Fig. 10

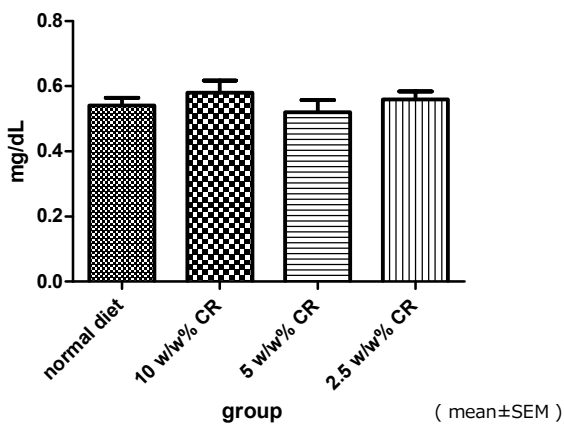
4week ALT



(mean±SEM)

Fig. 11

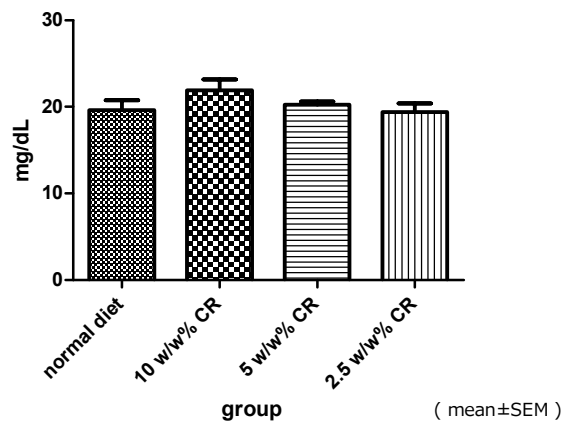
4week tBIL



(mean±SEM)

Fig. 12

4week BUN



(mean±SEM)