

小型サルのコモンマーモセットを用いた安全性評価

住友化学工業(株) 生物環境科学研究所
 福岡 俊文
 祝 迫 隆行
 松本 淳
 中野 実

Common Marmoset (*Callithrix Jacchus*) as an Experimental Animal in the Safety Evaluation

Sumitomo Chemical Co., Ltd.
 Environmental Health Science Laboratory
 Toshifumi FUKUOKA
 Takayuki IWASAKO
 Atsushi MATSUMOTO
 Minoru NAKANO

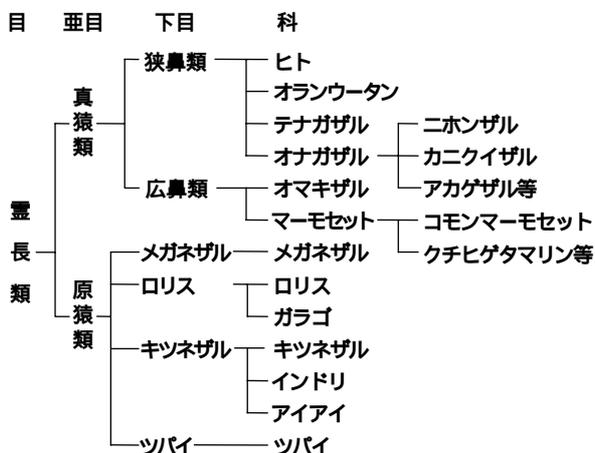
A tiny monkey, common marmoset (*Callithrix jacchus*), was examined its applicability to the safety evaluation. The investigation with common marmoset achieved the convenient bleeding procedure and the anesthetic method of longer duration, suggesting that this primate can be used in the various tests similarly to cynomolgus monkey. It was also demonstrated that marmoset made a good model for neuroleptic-induced extrapyramidal syndrome, which has been difficult to predict with other animal species so far. The advantage of employing this species is that the similar data to those in human can be obtained easily, so that it will be utilized not only in a safety study but also in an efficacy study.

はじめに

医薬品の開発研究においてサル類は系統発生的にヒトに最も近い動物種として重要な位置を占めてきた。これまで、医学研究分野で汎用されてきたサル類はニホンザルと同じマカカ属のアカゲザルやカニクイザルである。これらは長年使用されてきているため各種検査に関する背景値が豊富であり、実験値の解釈が比

較的容易であるという利点がある。その反面、取扱いに熟練を要する、人獣共通感染症、野生資源保護による供給の不安定さといった問題点も有している。一方、コモンマーモセットは実験動物として約30年前に使用され始めたが、小型で取扱いが容易であり人獣共通感染症の報告がないこと、また、実験動物としての様々な特性(後述)が紹介されるにつれ新たな実験用サル類として脚光を浴び始めた所に国内での供給体制が整ったことから、その需要が増大してきている。当所でも1992年に導入し、安全性評価研究への使用を行っている。

第1図 霊長類の系統図



コモンマーモセットとは

コモンマーモセット(英名 common marmoset、学名 *Callithrix jacchus*、以下、マーモセット)は第1図に示すとおり分類学上ヒトと同じ真猿類に属するサル的一种であり、原産地はブラジル東部の熱帯雨林である。外観は第2図に示すとおりで、耳の脇にモブサを有する。成熟個体の体重は200~500g、体長は25~35cmと小型でラットなみである。動作は非常に機敏で立体的な行動が多いため、実験室では体格に比べて大きめのケージにとまり木を設置して飼育

第2図 コモンマーモセット

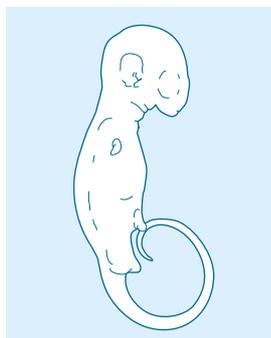


する。昼行性の雑食動物で虫や果実を好んで摂取するため、各研究機関や動物園では餌に様々な工夫を凝らしているが、当所では市販の固型飼料にビタミン類を添加するのみの給餌体制を確立している。

医科学実験におけるマーモセットの特性

マーモセット類は1970年前後に欧米で使用され始め、ヒトおよびチンパンジー以外では報告されなかったA型肝炎に対する感受性が注目され、ウイルスおよび感染症の研究に用いられてきた。以来、血圧関連の指標がヒトと高い類似性を示す循環器系の研究や免疫・内分泌・消化器系の研究等幅広い分野で用いられてきている¹⁾。新薬の開発では、薬物代謝酵素系のP-450のアミノ酸配列が解明され、ヒトとの高い相同性が紹介されてから使用が増大し、探索・開発、薬理・毒性学分野で多く使用されている。また、安全性研究については医薬品開発における安全性評価の重要性を世界に知らしめたサリドマイドに対してヒトと同じ反応を示すことが1972年に紹介された²⁾ことも、この動物が注目を集める契機となった。

第3図 サリドマイド投与によるマーモセット奇形胎児



左：サリドマイド投与
アザラシ肢を認める



右：無処置 正常

当所ではこの動物での安全性評価研究に必要な基礎的な各種SOP(Standard Operation Procedure)を作成し、GLP(Good Laboratory Practice)準拠試験の実施を可能としている。更に、幅広い分野へ展開するためこれらの特性の幾つかについて検討を行っている。第3図は妊娠50日前後にサリドマイドを1週間投与し、妊娠110日(妊娠期間は約150日)に帝王切開して摘出した胎児と同時期の正常胎児を示す。ヒトと同様に四肢のアザラシ肢と呼ばれる異常が認められる。このように胎児に関する背景値の集積を行っていくことにより、生殖発生毒性試験への展開も可能である。

マーモセットを用いた実験手技の開発

マーモセットを実験に使用するに当たり必要な基本的技術はすでに紹介されている^{3,4)}が、その中で投与、採血、麻酔について新たに当所で確立した技術⁵⁻⁷⁾を幾つか紹介する。

1. 採血および静脈内投与

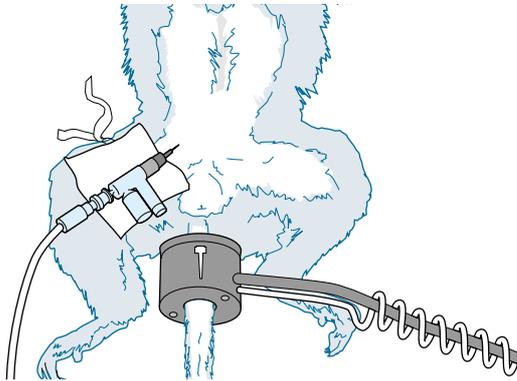
臨床検査や薬物の体内動態検査のためサンプルを採取する採血は必須の技術である。通常の血液・生化学検査には2~3mlの血液が必要である。この量の場合マーモセットでは一般的に大腿静脈を用いて採血するが、この部位での止血は手指圧迫法となり時間を要する。そこで市販の留置針(注射針にカニユーレを装着しており、挿入後に注射針を抜き去りカニユーレのみを血管内に留置でき、これに注射筒を装着する)を用いると、伏在静脈から3ml以上の採血も容易に可能であることを見出した。伏在静脈を用いることにより採血後に止血帯が使用可能となり、止血完了まで小型のケージ等に一旦確保して止血時間に要する操作を省略できた。また、静脈内投与の実施も容易である。保定器を用意することにより、動物が動いた場合にも投与中に針が抜けることなく確実に一人で投与可能である。動物が小型なこともあるが、サル類の採血や静脈内投与を作業員一人で短時間に多数例で実施可能としたことで実験実施に著しい効率化がもたらされた。この方法では、投与漏れがないため刺激性物質や放射能を含んだ物質の投与に有効で、また、保定に動物を順化させることで長時間持続投与(infusion)が可能となった。

2. 動脈への適応

動脈から連続的に採血する場合は大腿部切開による動脈確保により、カニユーレーションを施す場合が多いが、このような外科的処置は動物に負荷をかけ、術後処置も必要となる。ここで留置針を使用すると

外科的処置が不要で、通常の採血と同様の操作が可能となる。すなわち、留置針を大腿部に穿刺し、大腿動脈にカニューレ部分を挿入して、三方活栓を装着し固定する。また、同時に伏在静脈にも留置針でカニューレーションを行い、同様に固定することで、任意の時間に動脈・静脈より採血が可能であり、投与薬物の詳細な体内クリアランスを知ることができる。採取後は両穿刺部位とも通常の採血時と同様の圧迫のみでよい。この技術を使用して動脈に挿入したカニューレ部にトランスデューサーを接続すれば、観血的な血圧測定も容易に可能であり(第4図)、幅広い循環器系の研究が可能である。

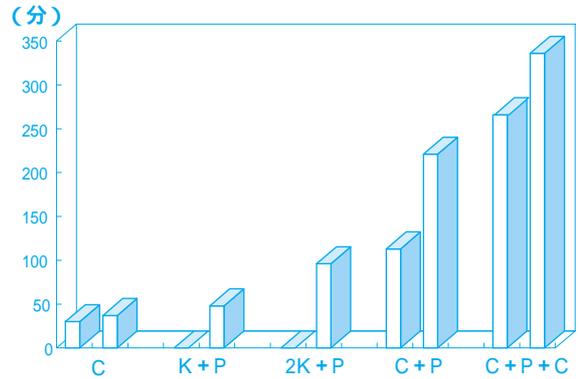
第4図 トランスデューサー(大腿動脈)およびテールカフ(尾動脈)による観血のおよび非観血的血圧測定



3. 麻酔方法

麻酔方法には吸入麻酔と注射麻酔があり、動物に対する侵襲や深度調節などの安全性を考慮して最近ではサル類での吸入麻酔の使用も広まってきているが、これまで汎用されてきた経験やその簡便性から現在も注射麻酔が多用されている。サル類に用いられる麻酔薬として短時間麻酔(鎮静)には塩酸ケタミンが代表的なものであるがマームセットでは塩酸ケタミンの単独投与はカニクイザルなどほかのサル類ほど有効でなく⁸⁾、塩酸ケタミンと塩酸キシラジンの混合投与が良好な短時間の麻酔効果を生むことが知られている³⁾。また、比較的長時間の麻酔にはペントバルビタールナトリウムが用いられるが、さらに長時間の麻酔効果を得る場合、この薬剤は作用域と呼吸停止域が接近しているため、追加投与は避けた方がよい。我々はこれら3剤を組み合わせることで簡便に約6時間の麻酔効果を得ることを見いだした。方法は塩酸ケタミンと塩酸キシラジンの混合液を筋肉内投与した30分後にペントバルビタールを腹腔内投与し、その1~2時間後に再度混合液を1回追加投与するというものである(第5図)。バイタルサイン(血圧、体温、脈拍数)

第5図 薬物の組合せによる麻酔時間の比較



各左のカラムは痛覚消失時間、右は不動化時間(n=20)

K : 塩酸ケタミン10mg / kg

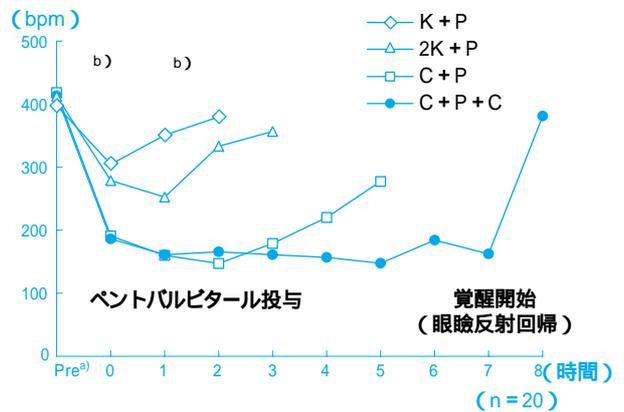
2K : 塩酸ケタミン20mg / kg

C : 混合液

塩酸ケタミン : 塩酸キシラジン = 3 : 1
(容量比・塩酸ケタミン10mg / kg)

P : ペントバルビタール20mg / kg

第6図 長時間麻酔時の脈拍数の推移



a) : 無処置時

b) : 混合液あるいは塩酸ケタミン投与

K : 塩酸ケタミン10mg / kg

2K : 塩酸ケタミン20mg / kg

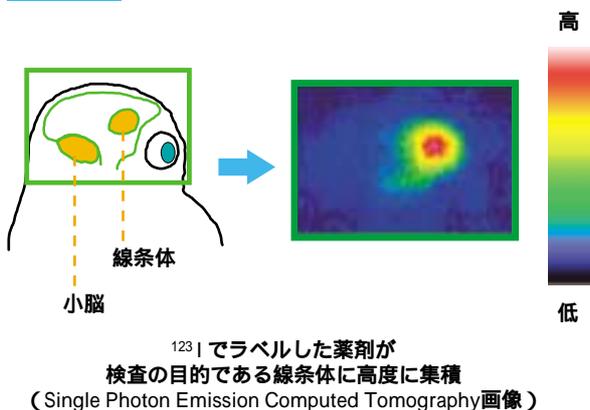
C : 混合液

塩酸ケタミン : 塩酸キシラジン = 3 : 1
(容量比・塩酸ケタミン10mg / kg)

P : ペントバルビタール20mg / kg

は麻酔後低下するが、その後は比較的低値で安定し、覚醒とともに回復してくるため、同時にこれらをモニターしておけば覚醒状態が容易に把握できる(第6図)。処置の翌日には自発運動は回復しており、嘔吐などの副作用もほとんど認められず、動物に与える負担も少ないと考えられた。注射麻酔は投与後の深度調節が困難であるが、動物の負担軽減のためにも目的に応じた深度を得られることは重要である。このように、十数分から6時間まで目的に応じた麻酔時間を選択できることで、様々な検査にマームセットの使用が可能となった。例えば、上述の長時間麻酔方法を使用することにより、近年急速な進歩を遂げている画像診断の実施も可能である(第7図)。

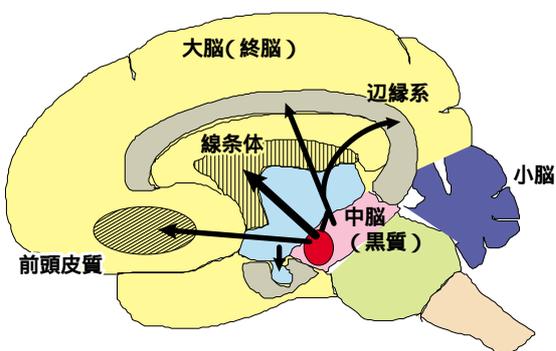
第7図 マーマセットの脳画像診断



安全性高次評価への応用

新薬の開発において発現する副作用を予測して量的・質的にヒトへ外挿することが安全性評価研究の主たる目的である。このため、各種毒性・動態試験が実施されているが、既存薬での経験からヒトでの副作用発現が正常動物ではそれが誘発できない場合には、その目的に応じたモデル動物を作出することにより、ヒトでの予測が可能となり、新薬の既存薬との差別化ができる。精神分裂病に効果を示す薬物として精神科領域で使用されている抗精神病薬 (Neuroleptic, NLP) の開発がこれに該当する。過去約 50 年にわたり多くの NLP の開発が進められており、分裂病の陽性症状はドーパミン D₂ 受容体を遮断する作用が中心であると考えられてきた(第8図)⁹⁾。すなわち、脳内ドーパミン作動性ニューロンの経路のうち、中脳 - 辺縁系および中脳 - 大脳皮質系が抗精神病作用に関連すると考えられてきた。一方、NLP の服用により生じる代表的な副作用に、錐体外路症状 (Extrapyramidal syndrome, EPS) と呼ばれるジストニアやパーキンソニズムなどに代表される行動や姿勢の異常がある。この EPS 発現は、主作用と同じ脳内ドーパミン作動性ニューロンの経路の1つである黒質 - 線条体系に関連するとされ、これが原因

第8図 抗精神病薬の作用点



で臨床の場で薬剤の使用に制限が加わる等の問題が生じている。よって、NLP の開発には主作用の発現と副作用の EPS 発現との量的な乖離が重要な課題の一つである。

1. EPS 発現モデル作出の背景

EPS 発現ポテンシャルは主にラットを用いたカタレプシー誘発作用等の薬理学的評価によりその予測がなされてきたが、その結果は必ずしもヒトでの副作用発現を良好に予測しているとは言い難く、また、医薬品の開発に必須の一般毒性試験も同様の成績であることから、EPS は動物実験での予測とヒトでの副作用発現が乖離する例としても知られている。これまで精神分裂病の治療は、主として陽性症状への効果に主眼が置かれていたが、各種薬剤の開発により治療効果が得られるに従いほかの陰性症状や副作用にも眼が向けられるようになり、新薬ではその EPS 発現ポテンシャルが弱いあるいはないことが望まれるようになった。そこで、サル類を EPS の予測モデルとすることが一部で試みられている¹⁰⁾。すなわち、サル類に NLP を反復投与することにより、その NLP に感作された状態が形成され、EPS の一種であるジストニア様症状の発現が誘発されるため、この感作ザルに新薬を投与することでその発現ポテンシャルが予測できるというものである。この感作モデルには、実験用サル類として代表的な旧世界ザルのアカゲザルやカニクイザルはモデルとして成立しないかその反応が鈍く、新世界ザルのオマキザルやリスザルが使用されている。我々は、マーマセットが新世界ザルの一種であることに着目し、EPS 予測モデルとして成立するか否か検討した¹¹⁾。

2. EPS 発現モデル作出方法

モデルの作出方法は代表的な NLP であるハロペリドールの 1.25 mg / kg を週 2 回経口投与し、発現する症状を詳細に観察するというものである。EPS 発現モデルを作出する際の症状観察は、自発運動およびジストニア様症状の異常行動と異常姿勢がポイントとなる。観察時点は毎投与前、投与後 15、30 分、1、2、3、6、8 時間、非投与日は 1 日 1 ~ 3 回とし、毎回の観察時間は 4 ~ 6 分間とした。

ハロペリドールの投与開始後は自発運動減少のみが認められた。その後、間歇的に投与を継続していくとともに、自発運動減少の発現時間が短縮していき、それに伴い異常姿勢・異常行動の発現が認められてきた。発現したジストニア様症状は、異常姿勢として、四肢の伸展・頸部~体幹の捻転・腰高、また、異常行動として、頭部でケージ壁や天井を押しつづける・旋回・歩行異常・ケージを嘔む・舌の突出

であった。これらの症状は、一度発現すると、ハロペリドールの投与後約1～2時間で必ず発現し、翌朝には回復した。これらの症状が投与後に安定して発現するには個体差があり、早い個体で投与開始後6週間(12回投与)、遅い個体では25週間程度必要であった(第1表)。

第1表 EPSモデルマーモセット作出の経過

症状	動物番号	雄			雌		
		1	2	3	1	2	3
体幹捻転		12	26	18	12	9	17
体幹および四肢伸展		18	28	8	28	16	10
口腔異常(舌突出など)		22	6	9	17	10	25
異常歩行		6	8	8	26	11	6
異常行動 ^{a)}		22	-	12	27	16	19
その他の神経症状							
運動亢進		10	25	8	-	-	-
鎮静		1	1	1	1	1	1
閉眼		1	1	1	1	1	1
振戦		1	1	1	1	1	1
カタレプシー		1	1	1	1	1	1

6頭のマーモセットにハロペリドール(1.25mg/kg)を週2回、約30週経口投与した時に神経症状が最初に発現した週数を示す。
a): 頭部でケージを押す、腰高などが含まれる。

3. モデル動物によるEPS発現ポテンシャル評価

このジストニア様症状発現モデルは通常の行動は正常であるが、適当量以上のNLP投与により必ず異常姿勢や異常行動を示す。よって、各種NLPを用量段階を設定して投与し、誘発されるジストニア様症状の有無、程度、時間を比較することによりそのEPS発現ポテンシャルを測ることが可能である。実際このモデルに各種NLPを投与した結果を第2表に示す。方法は、6頭のモデルマーモセットにヒトでのEPS発現が既知の各剤の臨床用量を基準とした数用量を順次投与し、発現する症状を観察・比較した。

その結果、EPS発現頻度が高いとされる¹²⁾古典的NLPであるハロペリドールやプロムペリドールは臨床用量付近の用量で全例に発現が認められた。また、比較的新しい薬剤でEPS発現頻度が比較的弱いとされる¹²⁾チオリダジンやスルピリドでは、比較的高用量の投与で発現が認められた。新世代のNLPであり臨床でEPS発現率が低いとされているリスベリドンではハロペリドールと同じ結果が得られた。リスベリドンは、薬効発現量とEPS発現量の差がハロペリドールに比べて大きいためにEPS発現は見かけ上低頻度であるが、臨床においても投与量を増加すると本モデルと同様にEPSが発現してくることが知られている^{13,14)}。主作用の抗D₂作用が弱いためEPS

第2表 モデルマーモセットにおけるEPS発現比較(各種抗精神病薬投与)

薬物	基準投与量 (mg/kg) ^{b)}	ジストニア発現例数(n=6)				
		0.3	1	3	10	30(倍) ^{c)}
ハロペリドール	0.12		2	6	6	
プロムペリドール	0.36	0	6	6		
クロルプロマジン	2.00	0	5	6	6	
チオリダジン	1.80	0	0	6		
スルピリド	12.00	0	1	6		
チアプリド	2.50	0	1	5	6	
リスベリドン	0.12	3	6	6	6	
クロザピン	9.00	0	0	0		
ジアゼパム	0.40	0	0	0		
溶媒 ^{c)}	0	0				
トリヘキシフェニジル ^{d)}	0.20	6		2		

注 a): 臨床用量の最大量
b): 基準投与量の倍数で表示
c): 0.5%メチルセルロース水溶液
d): トリヘキシフェニジルはハロペリドールの1.25mg/kg投与30分前に投与(併用)

発現も弱いとされている¹⁵⁾チアプリドでは、臨床用量の30倍で全6例に発現が認められた。EPSの発現がほとんどないとされる¹⁶⁾クロザピンでは、本モデルでもジストニア様症状の発現は認められなかった。また、この症状がNLP特異的であることを確認するため投与した抗不安薬であるジアゼパムではジストニア様症状の発現は認められなかった。さらに、臨床ではNLPによるEPSの治療に抗コリン剤の併用がなされている。本モデルに抗コリン剤のトリヘキシフェニジルを投与し、その30分後にハロペリドールの投与を行うと、ハロペリドールに誘発される異常姿勢・異常行動の発現が明らかに抑制された。溶媒では異常症状の発現は認められなかった。

以上のように、マーモセットのEPS発現モデルは臨床での成績を良好に反映していると考えられ、新規NLPの副作用発現ポテンシャルの予測に有用であると考えられた。病態モデル動物は病態の発症要因・原因の解明や治療法の確立に大きく貢献してきたが、新薬開発においても多方面にわたるモデル動物が開発され、主として薬効スクリーニングに用いられている。実際、良好なモデル動物が確立されている疾患に対しては有効な薬剤が多く開発されている。安全性評価研究もより精度の向上が図られてきているが、正常な動物の使用に加えて、ヒトに近いサル類をモデル動物として安全性評価に適用することで副作用の観点からも開発候補品の選抜がよりヒトに近いデータを持って行える。さらに毒性の発現機序を探索する上でも有用と考えられるため、より良質の薬剤を早期に選抜し開発できると期待される。ここで示したモデルのほか、パーキンソン病¹⁷⁾、造血幹細

胞移植・遺伝子治療、リウマチ¹⁸⁾などでもマーモセットは良好な病態モデルになることも報告され、その幅広い有用性が示されている。

おわりに

小型でヒトに近いマーモセットは、使用する薬物量が大型のサル類やイヌと比較して著しく少量で済むため、高価な蛋白製剤の開発に加えてスクリーニングなど開発初期の段階においても容易にヒトに近いデータを得るといった大きなメリットをもたらす。また、既存の機器や手法を改良することで、小型であるとはいえカニクイザル等と同様の幅広い検査が実施できること、さらに、様々な病態モデルとしての有用性も示され、毒性のみならず薬効評価にも有用であることが示された。今後、医薬品の開発においてマーモセットがますます重要な役割を果たしていくものと期待されるが、さらに新たな実験手技や特性の検索を行い、高度な安全性評価研究に用いていきたいと考えている。

引用文献

- 1) 谷岡 功邦：アニテックス, 11, 3(1999)
- 2) D. E. Poswillo, W. J. Hamilton, et al. : *Nature*, 239, 460(1972)
- 3) 野村 達次監修, 谷岡 功邦編：コモンマーモセットの特性と実験利用, ソフトサイエンス社(1989)
- 4) 谷岡 功邦編：マーモセットの飼育繁殖・実験手技・解剖組織, アドスリー社(1996)
- 5) 福岡 俊文：アニテックス, 11, 19(1999)
- 6) 祝迫 隆行, 福岡 俊文ら：日本実験動物技術者協会第30回総会, 講演要旨集, 66(1996)
- 7) 祝迫 隆行, 福岡 俊文ら：日本実験動物技術者協会第32回総会, 講演要旨集, 56(1998)
- 8) C. J. Green, J. Knight, et al. : *Laboratory Animals*, 15, 163(1981)
- 9) 田中 千賀子, 加藤 隆一編：NEW薬理学, 南江堂, 260(1989)
- 10) N. M. J. Rupniak, P. Jenner, et al. : *Psychopharmacology*, 88, 403-419(1986)
- 11) T. Fukuoka, M. Nakano, et al. : *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 58, 947(1997)
- 12) 稲永 和豊, 田中 正敏編：向精神薬, 医歯薬出版, 148(1988)
- 13) D. G. C. Owens : *J. Clin. Psychiatry.*, 55(suppl) 29(1994)
- 14) D. E. Casey : *Psychopharmacology*, 124, 134(1996)
- 15) 佐藤 壽：診療と新薬, 24, 439(1986)
- 16) 出村 信隆, 深谷 公昭ら：神経精神薬理, 17, 665(1995)
- 17) 安東 潔：アニテックス, 11, 14(1999)
- 18) 日比野 仁ら：アニテックス, 11, 7(1999)

PROFILE



福岡 俊文
Toshifumi FUKUOKA
住友化学工業株式会社
生物環境科学研究所
主任研究員



松本 淳
Atsushi MATSUMOTO
住友化学工業株式会社
生物環境科学研究所
研究員



祝迫 隆行
Takayuki IWAISAKO
住友化学工業株式会社
生物環境科学研究所
研究員



中野 実
Minoru NAKANO
住友化学工業株式会社
生物環境科学研究所
主席研究員

