

# 医薬品の初期安全性評価における ゼブラフィッシュの有用性

大日本住友製薬株式会社 前臨床研究所  
山下 晃人 出口 二郎

## はじめに

医薬候補化合物に関しては、研究の初期段階においてその有効性のみならず、安全性の観点からもより望ましいプロファイルを有する化合物をスクリーニングすることが、その後の研究開発をより円滑に行う上で重要である。一方、化合物量の制限やアッセイ系のスループット性の観点から、研究の初期段階での安全性評価は培養細胞等を用いた *in vitro* 評価系にて実施されてきた。これら *in vitro* 評価系は特定の毒性表現型を検出するためには非常に有効な手段となる一方、複数の器官・組織が関与するような複雑な機序に基づく毒性を検出することは困難であることから、スクリーニングで求められる高いスループット性を有する新たな *in vivo* モデルの構築が期待されていた。

ゼブラフィッシュは体長が4-5cm程度の小型熱帯魚である。1970年代頃より基礎研究分野で用いられ始め、遺伝子介入技術が容易に適用できることなどから1990年代には発生学分野でモデル動物として汎用されるようになった。また近年、ゼブラフィッシュの稚魚をマイクロプレート中で維持し、スクリーニングレベルでのスループット性を維持した種々の評価手法が開発されたことにより、創薬研究の現場でも安全性評価を始め、その利用が広がりつつある<sup>2),3)</sup>。大日本住友製薬(株)ではこのゼブラフィッシュを用いた試験法の確立に取り組み、医薬候補化合物の初期安全性評価に活用しているため、今回その概要を紹介したい。

## ゼブラフィッシュの実験動物としての特性

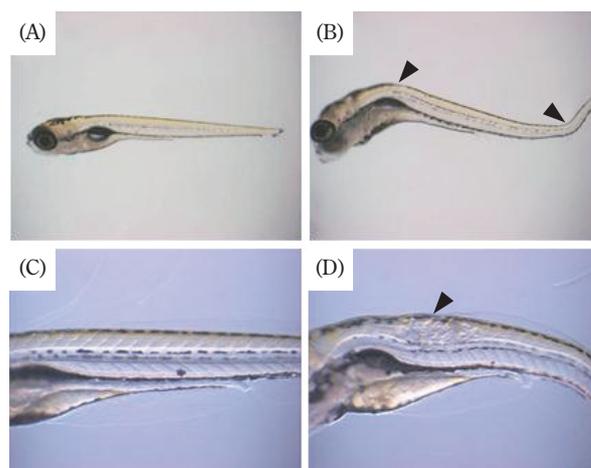
実験動物として汎用される他の動物種と比較したゼブラフィッシュの特性は、維持管理が容易で安価、胚や幼魚が透明なためイメージングが容易、稚魚が小型(2-3mm)でマイクロプレートでの飼育やデータ収集が可能、また遺伝子介入が容易等々が挙げられる。これら特性から、ゼブラフィッシュが創薬研究における薬剤スクリーニングにより適した動物種であると考えられる。

## 初期安全性評価系の確立

前記のゼブラフィッシュの有する特性を生かし、当社では催奇形性、痙攣誘発性及び心毒性評価系を確立し、医薬候補化合物の初期安全性評価に用いている。

### 1. 催奇形性

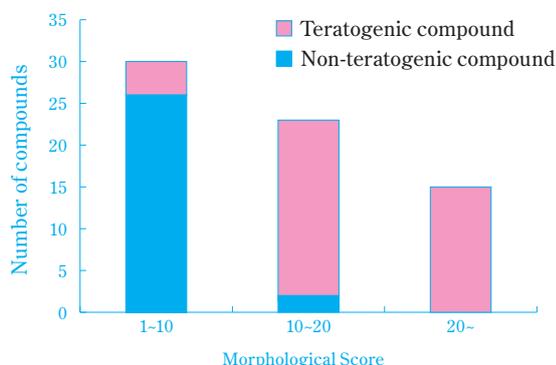
ゼブラフィッシュ受精卵にその器官形成期(受精後5時間~144時間)を通じて化合物を曝露させ、その結果生じる形態的な変化(表1)を数値(スコア)化し、化合物が有する催奇形性ポテンシャルを評価するものである。まず初めに代表的な催奇形性物質であるレチノイン酸及びバルプロ酸をゼブラフィッシュに曝露してその催奇形性誘発能を確認したところ、概ね哺乳動物と同様の表現型が観察された(図1)。続いて催奇形性の有無が既知の薬剤に関して当該評価系を用い、それら化合物の催奇形性ポテンシャルを評価したところ、概ねヒトを含む哺乳動物における催奇形性と



**Fig. 1** Bright field images of control (A, C), retinoic acid (B) or valproic acid (D) treated zebrafish larva. Arrow heads indicate kinked notochord or tail (B), and rhexis of notochord (D).

**Table 1** Scoring points of teratogenic screening assay using zebrafish larva

Organs	Parameters
Heart	Heartbeat, size or chamber anomalies
Facial Shape	Eyes, otic vesicle or lower jaw anomalies
Body Shape	Notochord or tail anomalies
Blood Circulation	Facial or abdominal edema, and blood circular anomalies

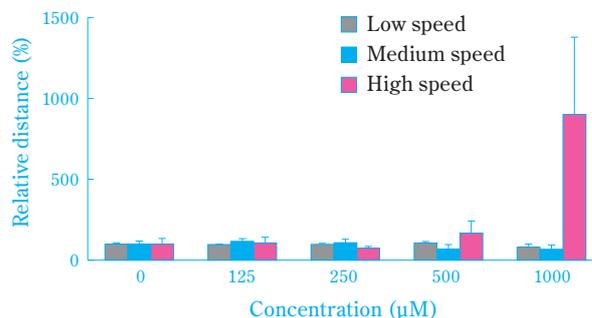


**Fig. 2** Morphological score of teratogenic or non-teratogenic compounds

当該評価系において得られたスコアが相関することが確認された<sup>4)</sup> (Fig. 2)。

## 2. 痙攣誘発性

ゼブラフィッシュの稚魚（生後7日齢）を用い、その行動量を指標として化合物の痙攣誘発能を評価するものである<sup>5)</sup>。まず初めにその痙攣誘発能が知られているペンチレンテトラゾール（PTZ）を用いて当該評価系の妥当性を確認したところ、PTZがゼブラフィッシュ

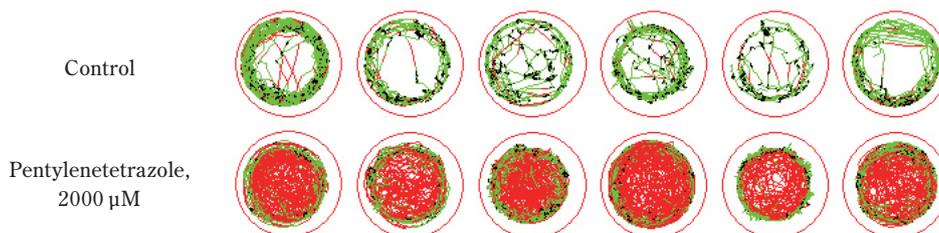


**Fig. 4** Effects of pentylenetetrazole on movement distance at low (<5mm/sec.), medium (5–20mm/sec.) or high speed (>20mm/sec.) (Mean+SD)

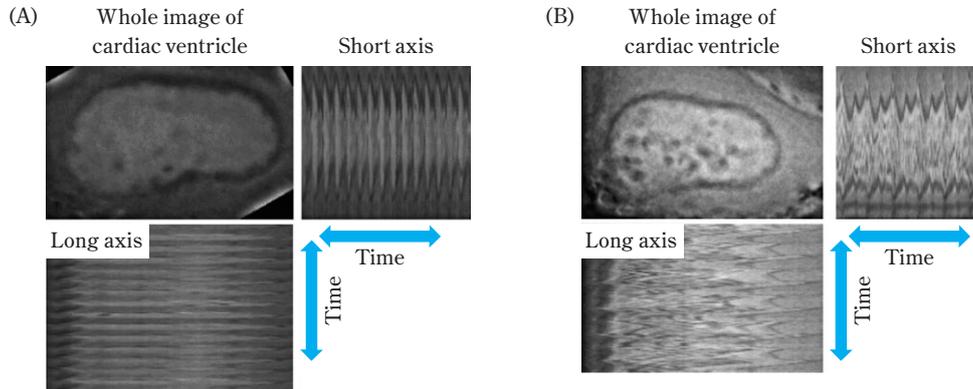
の高速遊泳量を増加させることが判明した (Fig. 3, 4)。次に哺乳動物における痙攣誘発能が既知の化合物群を用いて当該評価系のバリデーションを行ったところ、その検出感度に改良の余地はあるものの、当該評価系にて陽性判定された化合物は全て痙攣誘発能を有する化合物であり、全体の予測率も69%と良好であった<sup>6)</sup>。

## 3. 心毒性

ゼブラフィッシュの稚魚（生後3日齢）を用い、化合物の心房及び心室の拍動数への影響を検討すると共に、蛍光色素を用いてイメージングされた画像から心室内腔容積を算出し、化合物の心筋収縮能への影響を評価するものである (Fig. 5)<sup>7,8)</sup>。ヒトを含む哺乳動物における心機能への影響が既に知られている化合物群を用いて検討を行ったところ、Astemizole等で認められる哺乳動物でのQT延長やTdP (Torsades de pointes) に関連した房室ブロック (Fig. 6)、さらにVerapamil等で認められる収縮能低下等 (Table 2)、哺乳動物で得られている心機能への影響に関する既知情報と今回



**Fig. 3** Typical trace patterns of larval zebrafish treated with pentylenetetrazole. Green or red lines exhibit medium (5–20mm/sec.) or high speed (>20mm/sec.) movements, respectively.

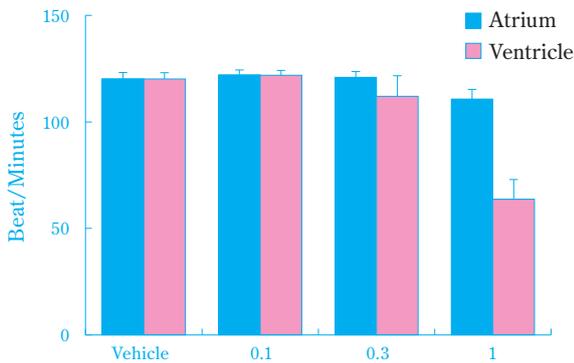


**Fig. 5** Typical cardiac imaging of larval zebrafish using fluorescence probes of control zebrafish (A) and zebrafish which has drug induced arrhythmia (B)

**Table 2** Summary of cardiac toxicity observed in zebrafish

Drugs	Class	Zebrafish		Clinical adverse effects		
		Contractility	Beat Rate	Contractility	Beat Rate	Adverse QT
Flecainide	Na channel blocker	↓	↓	↓	→	QT prolong
Mexiletine	Na channel blocker	→	→	→	→	
Amiodarone	K channel blocker	→	↓ (H:block)	→	↓	QT prolong
Verapamil	Ca channel blocker	↓	↓	↓	↓	
Diltiazem	Ca channel blocker	↓	↓	↓	↓	
Nifedipine	Ca channel blocker	↓	↓	↓	↓	
Terfenadine	H <sub>1</sub> receptor antagonist	↑	AV block		→	QT prolong/TdP
Astemizole	H <sub>1</sub> receptor antagonist	→	AV block	↓	→	QT prolong/TdP
Fexofenadine	H <sub>1</sub> receptor antagonist	→	→		→	
Isoproterenol	Beta stimulant	↑	↑	↑	↑	
Propranolol	Beta blocker	↓	↓	↓	↓	

Blank: There is no available information.



**Fig. 6** Effects of Astemizole on cardiac beat rate in zebrafish larva (Mean+SD)

ゼブラフィッシュで得られた結果は概ね一致することが判明した。

### 新たなモデル動物としてのゼブラフィッシュの可能性

ゼブラフィッシュへの遺伝子介入技術の適用が容易であることから、特定の臓器・組織に特異的に蛍光蛋白質を発現させることにより、標的臓器で生じる毒性をライブイメージを用いて可視化/定量化することが可能と考えられる<sup>9)</sup>。さらに、近年、急速にその利用が広がっているCRISPR/Cas9やTALEN等のゲノム編集技術をゼブラフィッシュに応用した例が報告されており<sup>10)</sup>、これらゲノム編集技術を用いて特定の遺伝子を欠失/ノックインすることにより、毒性発現メカニズムの解析や化合物が誘発する毒性をより高感度に検出できるモデル系の樹立などが今後発展していくものと思われる。

## おわりに

ゼブラフィッシュが創薬研究に用いられ始めてから、まだ日は浅い。しかしながらその利便性や拡張性などから創薬研究への応用は急速に広まっており、*in vivo* フェノタイプスクリーニングの選択肢の一つとして今後もその利用は進むものと思われる。さらに蛍光イメージングやゲノム編集等の技術を活用することにより、従来の実験動物を超えるモデル動物としての可能性も秘めており、今後の発展に期待したい。

## 引用文献

- 1) P.M. Eimon and A.L. Rubinstein, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **5**, 393 (2009).
- 2) L.I. Zon and R.T. Peterson, *Nat.Rev.Drug Discov.*, **4**, 35 (2005).
- 3) A.J. Rennekamp and R.T. Peterson, *Curr.Opin.Chem. Biol.*, **24**, 58 (2015).
- 4) A. Yamashita, H. Inada, K. Chihara, T. Yamada, J. Deguchi and H. Funabashi, *J.Toxicol.Sci.*, **39**, 453 (2014).
- 5) M.J. Winter, W.S. Redfern, A.J. Hayfield, S.F. Owen, J-P. Valentin and T.H. Hutchinson, *J.Pharmacol. Toxicol.Methods*, **57**, 176 (2008).
- 6) N. Koseki, J. Deguchi, A. Yamashita, I. Miyawaki and H. Funabashi, *J.Toxicol.Sci.*, **39**, 579 (2014).
- 7) N. Umemoto, Y. Nishimura, Y. Shimada, Y. Yamanaka, S. Kishi, S. Ito, K. Okamori, Y. Nakamura, J. Kuroyanagi, Z. Zhang, L. Zang, Z. Wang, N. Nishimura and T. Tanaka, *Mol.Biotechnol.*, **55**, 131 (2013).
- 8) 本田 弥生, 出口 二郎, 国松 武史, 三野 照正, 船橋 齊, 第40回日本毒性学会学術年会, P-106 (ポスター) (2013).
- 9) C.G. Burns, D.J. Milan, E.J. Grande, W. Rottbauer and C.A. Macrae, *Nat.Chem.Biol.*, **1**, 263 (2005).
- 10) T.O. Auer and F.D. Bene, *Methods*, **69**, 142 (2014).