P-83 薬物探索研究早期の *in vivo* 安全性スクリーニング試験，*in vivo* Mini-tox studyの紹介(2) 非定型抗精神薬Xの中枢作用，循環器，消化器，生殖器変化

Introduction of the *in vivo* Mini-tox study as an effective tool to improve confidence in safety in the early stage of drug development (2) Effects of atypical antipsychotics X

○佐藤 靖，藤川 真章，白井 真紀，飯高 健，山田 弘，堀井 郁夫

ファイザー（株）中央研究所

○Yasushi SATO, Masaaki FUJIKAWA, Maki SHIRAI, Takeshi IIDAKA, Hiroshi YAMADA, Ikuo HORII

Pfizer Global Research & Development, Nogoya Laboratories

背景　近年，創薬初期でのminiaturizeされたげっ歯類の*in vivo*毒性試験が展開されてきている。我々は，*in vivo* Mini-tox studyを探索研究早期の*in vivo*毒性スクリーニング試験として立ち上げ，毒性情報の乏しい新規化合物の多面的安全性評価を進めている（第31回日本トキシコロジー学会）。今回，一連のバリデーション試験のうち，多臓器変化を示した非定型的抗精神薬Xの試験結果を示す。
材料および方法　動物：頚静脈カニュレーション(JVC)施術済みのCrj:CD(SD)IGSラット（8週齢，雄）を溶媒対照群，低用量群(L)，高用量群（H:Lx10 mg/kg）の各群に3例づつ振り分け，化合物Xを単回経口投与し，投与翌日にネンブタール麻酔下で放血，安楽殺し，剖検した。検査項目：体重(毎日)，機能観察総合評価法(FOB；投与前，投与後0.5, 4hr)，自発運動測定Motor Activity (MA；投与前，投与後1，4hr)，心拍数・血圧測定（HR，BP with BP Monitor MK-200；投与前，投与後1，4hr)，薬物血中濃度測定（TK；0.5，2，4，24hr)，尿検査（投与後6-20hr)，血液・血液生化学的検査（24hr)，剖検，臓器重量および病理組織学的検査を行った。
結果および考察　試験において死亡例は認められなかったが，行動異常，散瞳，体温低下，自発運動抑制，循環器変化，白血球減少，肝機能系逸脱酵素上昇，血糖値上昇，胃粘膜障害等が観察された。これらの結果は臨床で危惧されている非定型的抗精神薬の変化（J. Clin. Psychiatry, 59, suppl. 12: 17-22, 1998）と一致し，単回投与試験でも検出力を上げることにより毒性予測性が高まることが期待された。

P-84 ホルマリン固定-パラフィン包埋標本からのRNA抽出法の検討

Method for RNA Extraction from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues

○崎村 雅憲，浜田 悦昌，堀井 郁夫

ファイザー株式会社 中央研究所 安全性研究統括部

○Masanori SAKIMURA, Yoshimasa HAMADA, Ikuo HORII

Worldwide Safety Sciences, Global Research & Development Nagoya Laboratories, Pfizer Japan Inc.

（目的） 10%中性緩衝ホルマリン液で1日，7日および2週間固定したラットの肝臓からパラフィンブロックを作製し，RT-PCRでmRNAの増幅が得られるRNAを抽出するための条件を検討した。**（材料と方法）** 雄性IGSラットの肝臓を採取して一部を10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し，1日後，7日後および2週間後に，常法にしたがってパラフィン包埋した。その後10 μmに薄切し，Optimum FFPE RNA Isolation Kitを用いて切片2枚からRNAを抽出した。それとは別に，凍結保存した肝臓からTrizolを用いてRNAを抽出した。得られたRNAの1 μgを逆転写し，内部標準遺伝子であるGAPDH，β-actinおよび酵素CYP3A1についてABI PRISM 7000を用いてリアルタイムPCRを実施した。**（結果）** Kit標準のRNA抽出プロトコル（脱パラフィン→37℃ 3時間でproteinase K処理→フィルターに吸着→洗浄→溶出→DNase I処理）では，ホルマリン液での固定時間として24時間以内が推奨されており，本検討のような長時間の固定標本では良好なRNAは得られなかった。そこで，proteinase Kの処理温度と時間を変更（温度：45または60℃，時間：3，8，16または24時間）し，最適な抽出条件を調べた。その結果，ホルマリン1日固定のブロックでは60℃ 8時間，7日および2週間固定のブロックでは60℃ 16時間のproteinase K処理条件でmRNAが最も高率に検出された。mRNAの定量値は，ホルマリン固定時間が1日→7日→2週間と長くなるほど低下し，凍結標本との比較でそれぞれ7-17%，2-5%，1-2%であった。しかし，内部標準遺伝子との比率（GAPDHとCYP3A1，β-actinとCYP3A1の比）に，固定時間の延長による影響はみられなかった。**（結論）** ホルマリン固定時間の延長により経時的なmRNA定量値の低下が認められたが，各遺伝子の定量値の比率は保たれていたことから，適切な抽出条件では2週間固定後のパラフィンブロックでもmRNA発現量を調べることが可能であると考えられた。