

博士論文

微小管重合阻害薬の心毒性発現機序に関する研究

栃内 亮太

目次

要旨	5
第 1 章 序論	8
1-1. 微小管重合阻害薬の薬理効果	8
1-2. 臨床における抗がん剤の心毒性と微小管重合阻害薬の心毒性	9
1-3. 微小管と心臓の関連に関する研究	11
1-4. 本研究の目的	12
第 2 章 微小管重合阻害薬の心筋細胞に対する細胞毒性	14
2-1. 目的	14
2-2. 材料および方法	14
2-2-1. hiPS-CM のインピーダンス値の解析	
2-2-2. hiPS-CM を用いた細胞生存性の解析	
2-2-3. hiPS-CM を用いた心筋ミトコンドリア機能の解析	
2-3. 結果	18
2-3-1. hiPS-CM のインピーダンス値の解析	
2-3-2. hiPS-CM を用いた細胞生存性の解析	
2-3-3. hiPS-CM を用いた心筋ミトコンドリア機能の解析	
2-4. 考察	19
2-5. 付図・付表	22
第 3 章 微小管重合阻害薬によってラットに誘発される心電図変化	29
3-1. 目的	29
3-2. 材料および方法	30
3-2-1. colchicine 投与ラットを用いた心電図解析	
3-2-1-1. 供試動物	
3-2-1-2. 被験物質および投与溶液	
3-2-1-3. テレメトリー送信機の埋め込みおよび心電図解析	
3-2-1-4. 被験物質の投与	
3-2-2. CA4DP 投与ラットを用いた心電図解析	
3-2-2-1. 供試動物	
3-2-2-2. 被験物質および投与溶液	
3-2-2-3. テレメトリー送信機の埋め込みおよび心電図解析	

3-2-2-4. 被験物質の投与	
3-3. 結果	32
3-3-1. colchicine 投与ラットを用いた心電図解析	
3-3-2. CA4DP 投与ラットを用いた心電図解析	
3-4. 考察	33
3-5. 付図・付表	36
第 4 章 微小管重合阻害薬によってラットに誘発される自律神経活動の変化	40
4-1. 目的	40
4-2. 材料および方法	40
4-3. 結果	41
4-3-1. colchicine 投与ラットの心拍変動解析	
4-3-2. CA4DP 投与ラットの心拍変動解析	
4-4. 考察	41
4-5. 付図・付表	43
第 5 章 微小管重合阻害薬によって誘発される心臓の病理組織学的変化	45
5-1. 目的	45
5-2. 材料および方法	45
5-2-1. colchicine 投与ラットの花臓の病理組織学的解析	
5-2-1-1. 供試動物	
5-2-1-2. 被験物質および投与溶液	
5-2-1-3. 被験物質の投与および心臓の病理組織学的検査	
5-2-2. colchicine 投与ラットの花臓の電子顕微鏡学的解析	
5-2-2-1. 供試動物	
5-2-2-2. 被験物質および投与溶液	
5-2-2-3. 被験物質の投与および心臓の電子顕微鏡学的検査	
5-2-3. CA4DP 投与ラットの花臓の病理組織学的解析	
5-2-3-1. 供試動物	
5-2-3-2. 被験物質および投与溶液	
5-2-3-3. 被験物質の投与および心臓の病理組織学的検査	
5-2-4. colchicine 投与ラットの花臓における低酸素領域の検出	
5-2-4-1. 供試動物	
5-2-4-2. 被験物質および投与溶液	
5-2-4-3. 被験物質の投与および心臓の低酸素領域の検出	
5-3. 結果	49

5-3-1. colchicine 投与ラットの心臓の病理組織学的解析	
5-3-2. colchicine 投与ラットの心臓の電子顕微鏡学的解析	
5-3-3. CA4DP 投与ラットの心臓の病理組織学的解析	
5-3-4. colchicine 投与ラットの心臓における低酸素領域の検出	
5-4. 考察	51
5-5. 付図・付表	54
第 6 章 総合考察	61
謝辞	68
略号一覧	69
参考文献	70

要旨

微小管重合阻害薬は、炎症性疾患や悪性腫瘍の治療薬として応用されている。一方、微小管重合阻害薬には心毒性が存在する。特に、微小管上の colchicine バインディングサイトに結合する微小管重合阻害薬である combretastatin A4 disodiumphosphate (CA4DP) では顕著な心毒性が認められており、がん化学療法における大きなリスクファクターとなっている。しかしながら、微小管重合阻害薬の心毒性について発現機序を解析した報告はほとんどなく、詳細は明らかになっていない。そこで本研究では、CA4DP および CA4DP と同様に colchicine バインディングサイトに結合して微小管の働きを妨げる colchicine を用いて、心毒性発現機序を考察することとした。

微小管は心筋細胞の形態維持やミトコンドリアの配列および膜電位維持に重要な役割を果たしていることから、微小管重合阻害薬による心筋傷害に細胞形態の変化あるいは adenosine triphosphate (ATP) の産生抑制が関与している可能性が考えられた。そこで、まずは colchicine および CA4DP がヒト iPS 細胞由来心筋細胞 (hiPS-CM) の細胞形態、細胞生存性および ATP 産生に与える影響を評価することにより、微小管重合阻害薬が心筋細胞に直接的に与える毒性作用について考察した。その結果、colchicine および CA4DP は hiPS-CM の細胞形態を変化させることおよび拍動を亢進させることが示されたが、細胞生存性および ATP 産生には影響を与えないことが明らかとなった。これらのことから、微小管重合阻害薬によって誘発される心筋傷害は、心筋細胞に対する直接的な細胞毒性が原因ではなく、虚血あるいは自律神経系の異常などに起因した二次的な作用によって誘発されることが示唆された。

次に、微小管重合阻害薬の心毒性をラットを用いて考察可能であるかについて確認するために、ラットに colchicine および CA4DP の投与に起因した心電図変化を誘発することを試み、ヒトと共通する心電図変化が誘発されるか評価するとともに、検出された心電図変

化から心毒性発現機序を考察することとした。その結果、colchicine および CA4DP 投与ラットの心電図において、ST segment の明瞭化あるいは QT 間隔の延長といった ST-T 部分の異常が認められた。これらの変化は、ヒトにおいて報告されている ST-T 部分の異常と関連すると考えられ、CA4DP あるいは colchicine を投与したラットを用いて心毒性の発現機序を検討することによって、ヒトにおける心毒性の発現機序を考察できるものと考えられた。また、これらの変化は虚血あるいは自律神経系の異常に関連したものと推察された。

続いて、微小管重合阻害薬の心毒性発現機序に自律神経系の活動の変化が関与しているかについて考察するために、colchicine および CA4DP 投与ラットの心電図情報を用いてパワースペクトル解析による心拍変動解析を実施した。その結果、colchicine および CA4DP の投与によって副交感神経系の活動が亢進したことが明らかとなり、微小管重合阻害薬が自律神経系の活動バランスを変化させていることが考えられた。一方、心筋傷害を誘発するような交感神経系の明らかな活動亢進は検出されなかったことから、微小管重合阻害薬の投与によって生じる心筋傷害には、自律神経系の異常とは別の機序が関与している可能性が推察された。

最後に、colchicine および CA4DP をラットに投与することで心筋傷害を誘発し、病理組織学的解析を行った。また、電子顕微鏡学的解析を用いて、詳細な解析を実施した。さらに、心臓病変が虚血と関連している可能性が示唆されたため、心臓における低酸素領域の検出を試みた。その結果、colchicine 投与ラットの心臓において、心室中隔および左心室壁内層に好発する心筋細胞の空胞化および好酸性顆粒状変性および壊死が認められた。これらの変化はミトコンドリアの腫大が特徴的な変化であり、微小管重合阻害薬が骨格筋に誘発する病変とは異なる病態であることが明らかとなった。また、心筋細胞の変性・壊死領域と一致して、組織低酸素マーカーの pimonidazole が検出された。さらに、血管内皮細胞のアポトーシスが認められた。血管内皮細胞の変化は、心筋細胞の変化よりも低用量の colchicine によって誘発された。CA4DP を投与したラットの心臓においては、colchicine 投与ラット

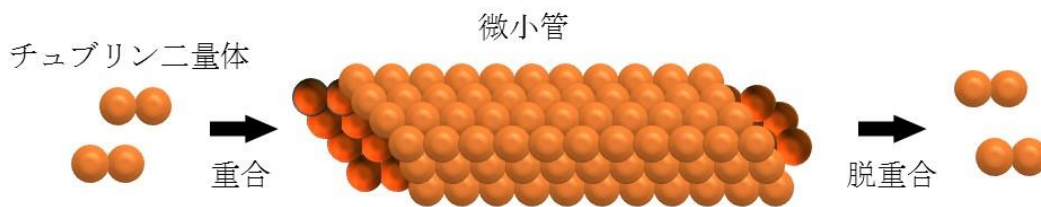
の心臓と共通した組織変化が認められ、観察された病変は微小管重合阻害薬に特徴的な変化であることが示唆された。これらのことから、微小管重合阻害薬によって誘発される心筋傷害は、毛細血管内皮細胞の障害による微小循環の障害に起因した虚血が原因となって生じる変化であると考えられた。

本研究を通じて、微小管重合阻害薬によってラットに誘発される心電図変化および心筋病変の毒性病理学的変化が明らかになった。また、心毒性発現機序の一端を考察できた。微小管重合阻害薬の投与によりラットの心電図に誘発された変化は、ST-T部分の変化という点でヒトと類似しており、ラットを用いた本研究成果をヒトに外挿できる可能性は高いと考えられた。また、微小管重合阻害薬を添加したhiPS-CMの拍動増加は、新生仔の心筋細胞で報告されている結果と類似していたことから、hiPS-CMを用いた微小管重合阻害薬の心毒性評価を成人に外挿する際には限界点もあると考えられた。しかしながら、本研究において、微小管重合阻害薬のヒトの心筋細胞に対する傷害性に関するポテンシャルを評価することは可能であると考えられ、本研究によりヒトにおける心毒性発現機序を考察する上で重要な情報を提供できたものと思われる。本研究を通じた心毒性発現機序の解明により、微小管重合阻害薬の非臨床試験における適切な心毒性評価手法の選択、さらには臨床における心毒性の対策方法の考案に繋がると期待され、本研究の成果が、抗がん剤など、微小管重合阻害薬の開発の効率化と安全性向上に貢献できると考えられる。

第 1 章 序論

1-1. 微小管重合阻害薬の薬理効果

微小管は真核生物の細胞骨格因子の一つであり、細胞分裂期における紡錘体の形成、細胞の形態維持、細胞内輸送や軸索輸送など、生体内で多くの重要な役割を担っている。微小管は α チュブリンおよび β チュブリンのチュブリン二量体を構成単位としており、外径が約 25 nm の線維状構造をとる (Morris and Fornier, 2008)。 α チュブリンおよび β チュブリンのチュブリン二量体が縦長に並んだ構造はプロトフィラメントと呼ばれ、プロトフィラメントが 13 本横方向に並んで中空の管を形成したものが微小管である。チュブリン二量体は重合と脱重合を繰り返すことによって微小管の構造を動的に維持しており、チュブリン二量体が結合して微小管が伸張する過程を重合、チュブリン二量体が乖離して微小管が短縮する過程を脱重合と呼ぶ。



参考図) 微小管におけるチュブリン二量体の重合と脱重合

微小管の重合を妨げる薬剤が微小管重合阻害薬である。微小管重合阻害薬としては、colchicine および colchicine と同様に微小管の β チュブリン上の colchicine バインディングサイトに結合する combretastatin A4、vinca alkaloid バインディングサイトに結合する vincristine および eribulin などの化合物が知られている (Woods *et al.*, 1995; Morris and Fornier, 2008; Smith *et al.*, 2010)。これらの微小管重合阻害薬はチュブリン二量体の重合を妨げることにより様々な薬理作用を発現する。例えば、colchicine は炎症シグナルを抑制し、抗炎症メディエーターを増加させることにより炎症を抑制することから、痛

風などの炎症性疾患の治療薬として古くから用いられている (Talbot, 1953)。また、種々の微小管重合阻害薬は紡錘糸の形成を妨げることにより細胞分裂を抑制するため、抗がん剤として応用されている (Islam and Iskander, 2004; Bhattacharyya *et al.*, 2008; Kawano *et al.*, 2016)。さらに、combretastatin A4 は腫瘍の血管新生を妨げることにより固形腫瘍の壊死を誘発するため、combretastatin A4 のプロドラッグである combretastatin A4 disodium phosphate (CA4DP) を固形腫瘍に対する抗がん剤として活用するための臨床試験が実施されている (Dark *et al.*, 1997; Tozer *et al.*, 1999)。抗がん剤としては、eribulin が上皮間葉転換の抑制や腫瘍の分化を促進することで悪性度を低下させることも報告されている (Yoshida *et al.*, 2014; Kawano *et al.*, 2016)。

1-2. 臨床における抗がん剤の心毒性と微小管重合阻害薬の心毒性

微小管重合阻害薬には魅力的な様々な薬理効果がある一方で、毒性作用も多く知られている。微小管重合阻害薬の毒性には、心毒性、消化管毒性、神経毒性、骨格筋毒性、血液毒性、肝毒性などが存在する (Dowlati *et al.*, 2002; Vaughn *et al.*, 2009; Finkelstein *et al.*, 2010; Takashima *et al.*, 2016)。この中でも心毒性は、colchicine の誤投与や colchicine を含んだ植物の摂取における中毒作用、vincristine や combretastatin A4 によるがん化学療法における副作用などにおいて報告されている (Mullins *et al.*, 2000; Calvo-Romero *et al.*, 2001; Dowlati *et al.*, 2002; Brvar *et al.*, 2004; Goli *et al.*, 2011)。微小管重合阻害薬の臨床使用の歴史は長く、古くは古代ギリシアのヒポクラテスの時代から使用されていたと考えられるが、末梢神経毒性や血液毒性が用量制限因子となることが多く、心毒性に注目が集まることは多くはなかった。しかしながら、最大耐用量まで投与するがん化学療法において心毒性が発現する事例が報告され (Subbiah *et al.*, 2011)、近年では微小管重合阻害薬の心毒性に対する関心が高まっており、心毒性を克服することが望まれている。

微小管重合阻害薬に限らず、薬剤によって誘発される心筋傷害に関する一般的な知見と

しては、抗がん剤による心毒性に関するものが多い。微小管重合阻害薬とは異なる抗がん剤における心毒性としては、抗がん性抗生物質である anthracycline の心毒性が代表的なものとしてよく知られている。Anthracycline の心毒性には、投与中または投与後短期間に出現する急性心毒性、投与後 2 から 3 週間で出現する亜急性心毒性および投与後 1 年以上経過して現れる慢性心毒性が存在するが、特に累積投与量に依存して発症する慢性心毒性における心筋症が臨床上の問題となっている (Yeh and Bickford, 2009)。この心筋症の発現機序としては、酸化ストレス、アポトーシス誘導、ミトコンドリアの機能障害、Ca 動態の変化などが考えられている (Yeh and Bickford, 2009)。また、ヒト上皮増殖因子受容体 2 型 (HER 2) 阻害薬である trastuzumab が心不全を誘発することも広く知られている。Trastuzumab の心毒性は anthracycline の心毒性とは異なり、蓄積投与量依存性ではない (清野 精彦, 2014)。心毒性発現機序には HER 2 が心臓の発達や心筋の機能維持に係わっていることが関係していると考えられるが、詳細は明らかになっていない (Minami *et al.*, 2010)。さらに、アルキル化剤である cyclophosphamide が投与後数日の間に心不全を誘発することや、血管新生を阻害する抗がん剤である bevacizumab や sunitinib が心不全を誘発することが知られており (Yeh and Bickford, 2009; Albini *et al.*, 2010)、これらの心毒性には血管内皮細胞の障害が関与していると考えられている。

一方、微小管重合阻害薬による心毒性に関するこれまでの臨床報告では、微小管重合阻害薬の投与後に心筋傷害マーカーである血中トロポニン I が検出された事例や (van Heyningen and Watson, 2005; Bhakta *et al.*, 2009)、心電図に変化が認められた事例について多く報告がなされている (Mendis, 1989; Dowlati *et al.*, 2002; van Heyningen and Watson, 2005; Bhakta *et al.*, 2009; Subbiah *et al.*, 2011; Lainé *et al.*, 2012)。特に、CA4DP の心毒性所見は投与後数十分から 1 日の間には発現することが報告されており (Dowlati *et al.*, 2002; Cooney *et al.*, 2004)、発現頻度も高頻度であることが知られている (Subbiah *et al.*, 2011)。心毒性に関する報告からは、微小管重合阻害薬によって心筋細胞が傷害され

ることに加え、ST 増高、ST 低下、ST segment の延長、QT 間隔の延長といった、ST 部分の変化が微小管重合阻害薬による心電図変化の特徴であることが見出される。これらの変化の原因については、冠動脈の異常に起因した虚血によって心筋細胞が傷害され、ST 部分の変化が誘発されている可能性が考えられる。しかしながら、微小管重合阻害薬によって誘発された ST 部分の変化の事例のなかには、冠動脈造影において冠動脈の狭窄が検出されなかった事例も存在することが報告されており (Bhakta *et al.*, 2009)、冠動脈の異常以外にも心筋細胞を傷害し、ST 部分を変化させる要因があると考えられる。

1-3. 微小管と心臓の関連に関する研究

微小管は心臓の発生、筋組織の形成、収縮制御などにおいて多くの生理的役割を果たしていると考えられている (Webster, 2002)。例えば、微小管は筋節の形成において、構成成分が一行に配列し、重合するための足場の役割を果たしている。また、微小管は、筋形質において粘性負荷を形成することにより、筋線維の収縮を妨げていると考えられている (Tagawa *et al.*, 1997; Webster and Patrick, 2000)。これらのことから、微小管重合阻害薬によって微小管の働きを妨げることにより心臓機能に影響が生じ、予期せぬ副作用が発現する可能性が考えられる。

微小管重合阻害薬と心臓の関連に関しては、ラットに colchicine を投与することにより心筋の収縮が減弱することが報告されている (Mery *et al.*, 1994)。さらに、低用量の vincristine をラットに投与することにより、isoproterenol によって誘発される心筋傷害が軽減されることが報告されている (Panda and Kar, 2015)。*In vitro* における知見としては、ラットの心筋細胞において、微小管の重合阻害によってミトコンドリアの心筋細胞内における位置および膜電位に変化が生じるとの報告がある (Kumazawa *et al.*, 2014; Miragoli *et al.*, 2016)。また、微小管重合阻害薬が培養心筋細胞の拍動数を増加させることおよび Na⁺および Ca²⁺電流を増強させることが報告されている (Lampidis *et al.*, 1992;

Gómez *et al.*, 2000; Motlagh *et al.*, 2002)。なお、この点に関しては、colchicine は心筋細胞の収縮および細胞内 Ca^{2+} 濃度に影響を与えないとする報告もあり (Calaghan *et al.*, 2001; Calaghan *et al.*, 2004; Cooper, 2006)、議論の余地が残されている。

微小管重合阻害薬が心筋細胞に直接的に与える影響に加え、血管機能に与える影響も、心臓機能に影響を与える可能性が考えられる。摘出された心臓の冠動脈あるいは骨格筋の微小血管において、微小管重合阻害薬は血流量依存性の血管拡張を阻害するとの報告がある (Liu *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2001)。また、微小管重合阻害薬は大動脈において低温曝露によって誘発される血管収縮を亢進させることも明らかとなっている (Chitaley and Webb, 2002)。さらに、CA4DP が血圧を上昇させることも報告されている (Subbiah *et al.*, 2011)。

これらの報告から、微小管重合阻害薬の心毒性には多くのメカニズムが関与していることが示唆される。しかしながら一方で、微小管重合阻害薬による心筋の傷害を実験的に誘発した報告はほとんどなく、微小管重合阻害薬によって心筋細胞が傷害されるメカニズムは不明である。

1-4. 本研究の目的

上述した通り、臨床で問題となっている微小管重合阻害薬の心毒性には、微小管の心臓における生理機能が関与している可能性が考えられる。しかしながら、微小管重合阻害薬による心筋傷害を実験的に誘発し、病態について詳細な解析を行った報告は少なく、心毒性の発現機序は明らかにされていない。

そこで本研究では、特に顕著な心毒性が報告されている CA4DP および CA4DP と同様に colchicine バインディングサイトに結合する colchicine を用いて微小管重合阻害の心毒性発現機序を明らかにすることで、非臨床試験における適切な心毒性評価方法の選択や臨床における心毒性の対策方法の考案に繋げることを目的とした。

第一段階として、ヒト細胞に対する微小管重合阻害薬の直接的な毒性について考察する

ために、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞 (hiPS-CM) に colchicine あるいは CA4DP を添加し、hiPS-CM のインピーダンス、細胞生存性および adenosine triphosphate (ATP) 産生量の変化について解析を行った。その結果、colchicine あるいは CA4DP の hiPS-CM に対する明らかな傷害活性は認められなかった。そこで、続いては実験動物にこれらの薬剤による心筋傷害を誘発し、心毒性発現機序を考察するために、ラットに微小管重合阻害薬を投与して実験を行った。まず、ラットにヒトと同様の心電図の ST 部分の変化を誘発することが可能であることを確認するために、ラットに colchicine あるいは CA4DP を投与した際の心電図変化について解析を行った。その結果、誘発された心電図変化に自律神経系の活動の変化が関与している可能性が考えられたため、自律神経系の関与について考察するために心拍変動解析を行った。次に、colchicine あるいは CA4DP を投与したラットの心臓を用いて病理組織学的解析を行い、心毒性発現機序を考察した。さらに、誘発された心筋病変と虚血の関連が疑われたことから、心臓における組織低酸素領域の検出を試みた。

第 2 章 微小管重合阻害薬の心筋細胞に対する細胞毒性に関する解析

2-1. 目的

第 1 章で述べた通り、微小管は心臓における生理機能に関与しているため、微小管重合阻害薬により、心筋細胞が直接的に傷害される可能性が考えられる。特に、微小管は細胞形態の維持に関与していると推察されるため、細胞形態の変化による物理的なストレスが微小管重合阻害薬の心毒性に関与している可能性がある。また、微小管重合阻害薬によって心筋ミトコンドリアの心筋細胞内における位置および膜電位に変化が生じるとの報告がある (Kumazawa *et al.*, 2014; Miragoli *et al.*, 2016)。このことから、微小管重合阻害薬によりミトコンドリアの機能が低下し、ATP の産生量が低下することによって心筋が傷害される可能性が考えられる。しかしながら、これまでの報告では微小管重合阻害薬による心筋細胞の形態変化と心筋細胞傷害活性の関係や心筋ミトコンドリア毒性については詳しく調べられていない。

そこで本研究では、微小管重合阻害薬の心毒性発現機序を考察するための第一段階として、微小管重合阻害薬が培養心筋細胞の細胞形態に与える影響および微小管重合阻害薬の心筋細胞傷害活性ならびに ATP 産生抑制作用を評価することによって、微小管重合阻害薬が心筋細胞に直接的に与える毒性作用について考察することを目的とした。

2-2. 材料および方法

2-2-1. hiPS-CM のインピーダンス値の解析

hiPS-CM として iCell Cardiomyocytes (Cellular Dynamics international) を用いた。凍結アンプルで入手した iCell Cardiomyocytes を培養キットに付属の plating medium で溶解および希釈し、フィブロネクチンでコートした xCELLigence Cardio システム専用の 96 ウェル E-plate (ACEA Bioscience) に、接着細胞数として 20,000 個

/well の密度となるよう播種した。E-plate を xCELLigence Cardio システム (ACEA Bioscience) に接続して 37°C、5%CO₂ の条件下で培養し、E-plate 中に流れる微弱電流に対する各ウェルのインピーダンス値を継続的に測定した。なお、インピーダンス値のサンプリングレートは 12.9 ミリ秒とし、各測定時点で 20 秒間の測定を行い、20 秒間の平均値を解析に用いた。培養期間中、培養 2 日目に plating medium から同じく iCell Cardiomyocytes 培養キットに付属の maintenance medium へと培地を交換し、その後は 2 あるいは 3 日おきに maintenance medium の交換を行った。hiPS-CM の拍動が安定化したことを確認した培養開始 14 日後に colchicine (Sigma-Aldrich、100 nM、1 μM、10 μM)、CA4DP (Sigma-Aldrich、100 nM、1 μM、10 μM) あるいは溶媒液 (vehicle; 0.1% H₂O or 0.1% Dimethyl sulfoxide [DMSO]) を培地中に添加した。

測定されたインピーダンス値を背景値で補正して (測定時点のインピーダンス値 - 背景値 / 15) インピーダンス値を相対的に比較できる指標とした Cell Index (CI)

(Kustermann *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2015) を算出し、経時的な CI の変化を解析した。なお、解析は被験薬剤の添加直前 (pre) の値を 100% とした変化量について行った。また、周期的なインピーダンス値の変化から拍動数 (Beating rate) を検出し、pre、添加後 15 分、3 時間および 24 時間における hiPS-CM の拍動の変化を解析した。解析は同一用量の被験物質を投与した 3 ウェルずつ (n = 3) について行った。拍動数の解析について、統計処理として Dunnett の多重比較検定を用いた有意差検定を行い、 $p < 0.05$ を有意な差として判断した。

2-2-2. hiPS-CM を用いた細胞生存性の解析

hiPS-CM として iCell Cardiomyocytes (Cellular Dynamics international) を用いた。凍結アンプルで入手した iCell Cardiomyocytes を培養キットに付属の plating medium で希釈し、タイプ I コラーゲンでコートした 96 ウェルディッシュ (IWAKI)

に、接着細胞数として 20,000 個/well の密度となるよう播種した。播種後、37°C、5%CO₂ の条件下で 2 日間培養し、plating medium から同じく iCell Cardiomyocytes 培養キットに付属の maintenance medium へと培地を交換し、その後は 2 日おきに maintenance medium の交換を行った。培養開始 14 日後に colchicine (Sigma-Aldrich、100 nM、1 μM、10 μM)、CA4DP (Sigma-Aldrich、100 nM、1 μM、10 μM)、心筋細胞傷害活性の陽性対照物質である doxorubicin hydrochloride (Sigma-Aldrich、100 nM、1 μM) あるいは溶媒液 (vehicle; 0.1% H₂O or 0.1% DMSO) を培地中に添加した。

被験薬剤の添加 24 時間後に、2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt (WST-8、キシダ化学) を付属のプロトコルに従って添加し、さらに 28 時間培養した。培養後、hiPS-CM の細胞生存性を測定した。なお、測定はプレートリーダー (spectraMax 190、Molecular Devices) を用いた吸光強度の測定 (450 nm) により行った。

得られた測定値について、溶媒液における値を 1 として変化量を解析した。解析は同一用量の被験物質を添加した 3 ウェルずつ (n = 3) について行った。統計処理として Dunnett の多重比較検定を用いた有意差検定を行い、 $p < 0.05$ を有意な差として判断した。

2-2-3. hiPS-CM を用いた心筋ミトコンドリア機能の解析

hiPS-CM として iCell Cardiomyocytes (Cellular Dynamics international) を用いた。凍結アンプルで入手した iCell Cardiomyocytes を培養キットに付属の plating medium で希釈し、タイプ I コラーゲンでコートした 96 ウェルディッシュ (IWAKI) に、接着細胞数として 20,000 個/well の密度となるよう播種した。播種後、37°C、5%CO₂ の条件下で 2 日間培養し、plating medium からグルコース添加 Dulbecco's

Modified Eagle's Medium (DMEM) (DMEM [グルコース非添加、和光純薬 042-32255] に 4.5 mg/ml のグルコース、1 mM のピルビン酸、5 mM の 4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid [HEPES]、25 µg/ml の gentamicin および 10% の非働化済みウシ胎子血清 [FBS、gibco 10437-028] を添加したもの) あるいはグルコース非添加 DMEM (DMEM [グルコース非添加、和光純薬 042-32255] に 10 mM のガラクトース、1 mM のピルビン酸、5 mM の 4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid [HEPES]、25 µg/ml の gentamicin および 10% の非働化済みウシ胎子血清[FBS、gibco 10437-028] を添加したもの) に培地を交換した。引き続き、37°C、5%CO₂ の条件下で 2 日間毎に培地交換をしながら 18 日間の前培養をした。なお、hiPS-CM をグルコース非添加の培地で 14 から 21 日培養することにより、hiPS-CM のエネルギー代謝が解糖系からミトコンドリアの酸化的リン酸化に移行することが報告されているため (Rana *et al.*, 2012)、前培養を 14 から 21 日間の 18 日とした。

前培養後、colchicine (Sigma-Aldrich、100 nM、1 µM、10 µM)、CA4DP (Sigma-Aldrich、100 nM、1 µM、10 µM)、心筋ミトコンドリア毒性の陽性対照物質である antimycin A (Sigma-Aldrich、10 nM、100 nM、1 µM) あるいは溶媒液 (vehicle; 0.1% H₂O or 0.1% DMSO) を培地中に添加した。

被験薬剤の添加 4 時間後に、Promega 社のプロトコルに従い、Mitochondrial ToxGlo™ Assay (Promega) を用いて ATP 産生量および細胞膜の完全性を指標にした細胞傷害活性を測定した。なお、測定はプレートリーダー (spectraMax Pro、Molecular Device) を用いた発光強度の測定 (ATP 産生量の測定) および蛍光強度の測定 (485 nm_{ex}/525 nm_{em}、細胞傷害活性の測定) により行った。

得られた測定値について、溶媒液における値を 1 として変化量を解析した。解析は同一用量の被験物質を添加した 3 ウェルずつ (n = 3) について行った。統計処理として Dunnett の多重比較検定を用いた有意差検定を行い、 $p < 0.05$ を有意な差として判断し

た。

2-3. 結果

2-3-1. hiPS-CM のインピーダンス値の解析

Colchicine (100 nM、1 μ M、10 μ M) を添加した hiPS-CM では、低用量の colchicine (100 nM) 添加直後から CI が減少し、CI の解析期間である 36 時間の間、減少を続けた (Fig. 1A)。

CA4DP (100 nM、1 μ M、10 μ M) を添加した hiPS-CM についても、同様に低用量の CA4DP (100 nM) 添加直後から CI の減少が認められた (Fig. 1B)。

また、拍動数については、colchicine を添加した hiPS-CM では添加 24 時間後に、CA4DP を添加した hiPS-CM では添加 3 時間後および 24 時間後に、それぞれ用量依存的な拍動数の増加が認められた (Fig. 2A, B)。

2-3-2. hiPS-CM を用いた細胞生存性の解析

hiPS-CM に colchicine (100 nM、1 μ M、10 μ M) あるいは CA4DP (100 nM、1 μ M、10 μ M) を添加した結果、hiPS-CM の細胞生存性に変化は認められなかった (Fig. 3A, B)。一方、doxorubicin については、1 μ M の添加で細胞生存性の低下が認められた (Fig. 3C)。

2-3-3. hiPS-CM を用いた心筋ミトコンドリア毒性の解析

グルコース添加 DMEM で培養した hiPS-CM に colchicine (100 nM、1 μ M、10 μ M) あるいは CA4DP (100 nM、1 μ M、10 μ M) を添加した結果、hiPS-CM の ATP 産生量に変化は認められなかった (Fig. 4A, B)。また、antimycin A (10 nM、100 nM、1 μ M) についても ATP 産生量の変化は認められなかった (Fig. 4C)。

グルコース非添加 DMEM で培養した hiPS-CM に colchicine (100 nM、1 μ M、10 μ M) あるいは CA4DP (100 nM、1 μ M、10 μ M) を添加した結果、hiPS-CM の ATP 産生量に変化は認められなかった (Fig. 5A, B)。一方、antimycin A (100 nM、1 μ M) を添加した hiPS-CM では、ATP 産生量の低下が認められた (Fig. 5C)。

グルコース添加 DMEM で培養した hiPS-CM に colchicine (100 nM、1 μ M、10 μ M) あるいは CA4DP (100 nM、1 μ M、10 μ M) を添加した結果、細胞傷害活性は認められなかった (Fig. 6A, B)。また、antimycin A (10 nM、100 nM、1 μ M) についても細胞傷害活性は認められなかった (Fig. 6C)。

グルコース非添加 DMEM で培養した hiPS-CM に colchicine (100 nM、1 μ M、10 μ M) あるいは CA4DP (100 nM、1 μ M、10 μ M) を添加した結果、細胞傷害活性は認められなかった (Fig. 7A, B)。一方、antimycin A (100 nM、1 μ M) を添加した hiPS-CM では、細胞傷害活性が認められた (Fig. 7C)。

2-4. 考察

hiPS-CM はヒトの心筋細胞が有する主要なイオンチャネル、受容体、トランスポーターおよび収縮タンパクを発現しており、種々の生理活性物質にヒトの心筋細胞と同様の応答を示すことが明らかになっている (Ma *et al.*, 2011; Babiarz *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2013)。このことから、hiPS-CM はヒトの臨床における心毒性予測に有用なツールであると考えられている。本研究では、微小管重合阻害薬が心筋細胞の形態および細胞生存性に影響を与える可能性が考えられたことから、hiPS-CM のインピーダンス値から算出される CI について着目した。心筋細胞を培養皿に播種すると、細胞の接着と広がりに応じてインピーダンス値から算出される CI が上昇する (Peters *et al.*, 2015)。この CI は、細胞の拍動に応じて 1% 程度の振れ幅で増減する。また、CI は細胞の形態変化あるいは細胞生存性の低下によって変化することが報告されている (Denelavas *et al.*, 2011;

Guo *et al.*, 2013; Kustermann *et al.*, 2013)。このことから、CI の大きな変化を解析することで心筋細胞の生存性および形態変化を、小さな周期的な変化を解析することで拍動を評価することが可能になる。今回、hiPS-CM に colchicine および CA4DP を添加したところ、いずれの薬剤においても CI の大きな低下および拍動数の増加が認められた。これらの結果から、colchicine および CA4DP は心筋細胞の形態変化あるいは細胞生存性の低下ならびに拍動の増加を誘発することが示唆された。

続いて、hiPS-CM および WST-8 を用いた細胞生存性の解析を行った。WST-8 は、水溶性テトラゾリウム塩であり、生細胞によって還元され、460 nm 付近に極大吸収を持つ水溶性ホルマザンを生じる。このホルマザン色素の量は生細胞数に比例することから、WST-8 を用いて細胞生存性を評価することが可能になる (Ishiyama *et al.*, 1997; Tominaga *et al.*, 1999)。実際、今回の実験において hiPS-CM に心筋細胞に対する傷害活性がある doxorubicin (心筋細胞傷害活性の陽性対照物質) を添加したところ、細胞生存性の低下が検出された。一方、colchicine および CA4DP を hiPS-CM に添加したところ、いずれの薬剤においても細胞生存性の低下は認められなかった。このことに加え、微小管は心筋細胞の細胞骨格の維持において重要な働きを担っていることから (Webster and Patrick, 2000)、colchicine および CA4DP で誘発された CI の低下は、細胞生存性の低下ではなく、細胞形態の変化が原因であると考えられた。細胞形態の変化は、colchicine および CA4DP の添加により微小管が障害され、細胞骨格に変化が生じた結果であると推察された。この細胞形態の変化および拍動数の増加は、生体内においては心筋細胞に物理的なストレスを発生させ、微小管重合阻害薬による心筋傷害を増悪させる要因になっている可能性が考えられるものの、少なくとも単独で心筋細胞の壊死を誘発するものではないと考えられた。

さらに、微小管重合阻害薬の ATP 産生抑制作用の有無について確認するために、hiPS-CM および Mitochondrial ToxGlo™ Assay を用いた解析を行った。Mitochondrial ToxGlo™ Assay では、ルシフェリン-ルシフェラーゼアッセイを用いて ATP 産生量を測定

し、細胞死に関連した「死細胞プロテアーゼ活性」を測定するための蛍光ペプチド基質 (bis-AAF-R110) を用いて細胞膜の完全性を指標とした細胞傷害活性を測定する (Niles *et al.*, 2007)。これまでに、Rana らは、心筋ミトコンドリア毒性化合物による ATP 産生抑制がグルコース非添加の条件で培養した hiPS-CM で検出され、グルコース添加の条件で培養した hiPS-CM では検出されないことを報告している (Rana *et al.*, 2012)。今回、心筋ミトコンドリア毒性物質である antimycin A (心筋ミトコンドリア毒性の陽性対照物質) をグルコース非添加あるいはグルコース添加の条件で培養した hiPS-CM に添加した結果、グルコース非添加で培養した hiPS-CM でのみ antimycin A による ATP 産生抑制および antimycin A の細胞傷害活性が検出された。hiPS-CM はグルコース添加の環境では解糖系から、グルコース非添加の環境ではミトコンドリアの酸化的リン酸化から ATP を得ていることから (Rana *et al.*, 2012)、グルコース非添加の環境でのみ antimycin A による ATP 産生抑制が検出されたことは、ATP 産生抑制はミトコンドリアの酸化的リン酸化に異常が生じた結果であることを示唆していた。一方、colchicine および CA4DP を hiPS-CM に添加したところ、グルコース非添加およびグルコース添加条件のいずれで培養した hiPS-CM においても、colchicine あるいは CA4DP による ATP 産生抑制および colchicine あるいは CA4DP の細胞傷害活性は認められなかった。今回の実験では、colchicine および CA4DP の最大濃度を 10 μM とした。ヒトにおける colchicine の心毒性発現用量での血中濃度は定かではないが、CA4DP の心毒性発現用量における最大血中濃度は 10 から 20 μM 程度である (He *et al.*, 2011)。このことから、今回の実験では hiPS-CM に同等の薬剤を曝露できたと考えられる。以上のことから、微小管重合阻害薬は、心筋細胞に対する ATP 産生抑制作用および細胞傷害活性はなく、微小管重合阻害薬による心筋傷害は心筋ミトコンドリア毒性による ATP 産生抑制あるいはその他の機序による直接的な細胞障害活性が原因ではなく、虚血あるいは自律神経系の異常などに起因した二次的な作用によって誘発されることが示唆された。

2-5. 付図・付表

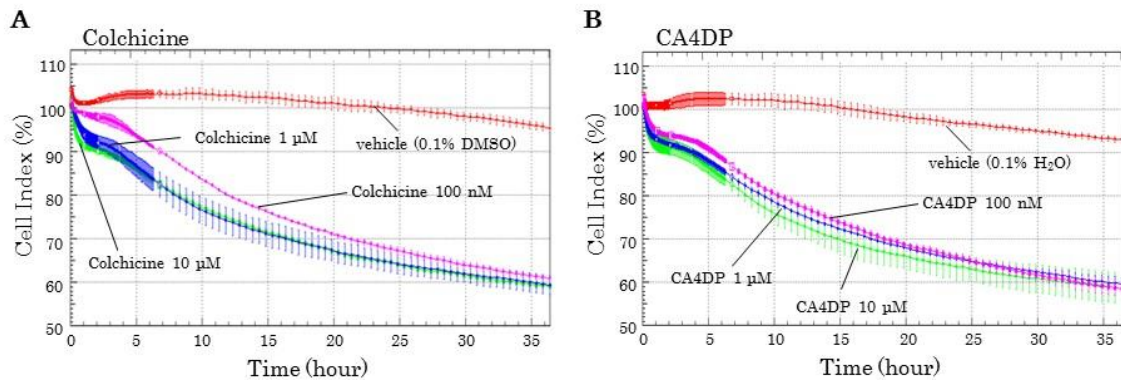


Fig. 1. Time-course changes of the cell index (CI) of hiPS-CM given colchicine, CA4DP or vehicle.

A: Time-course changes of CI in response to administration of colchicine or vehicle (0.1% DMSO). B: Time-course changes of CI in response to administration of CA4DP or vehicle (0.1% H₂O). A, B: The CI of colchicine-treated hiPS-CM and CA4DP-treated hiPS-CM decreased rapidly within 1 hour. From 4-5 hours after administration, the CI began to decrease gradually, and it continued to do so for the remainder of once again throughout the recording period. A, B: Each dot represents a mean \pm SD. (n = 3)

Fig. 1B: Reproduced with permission of the Japanese society of Toxicologic Pathology from Tochinal, et al. Combretastatin A4 disodium phosphate-induced myocardial injury. J Toxicol Pathol 29: 163-171, 2016.

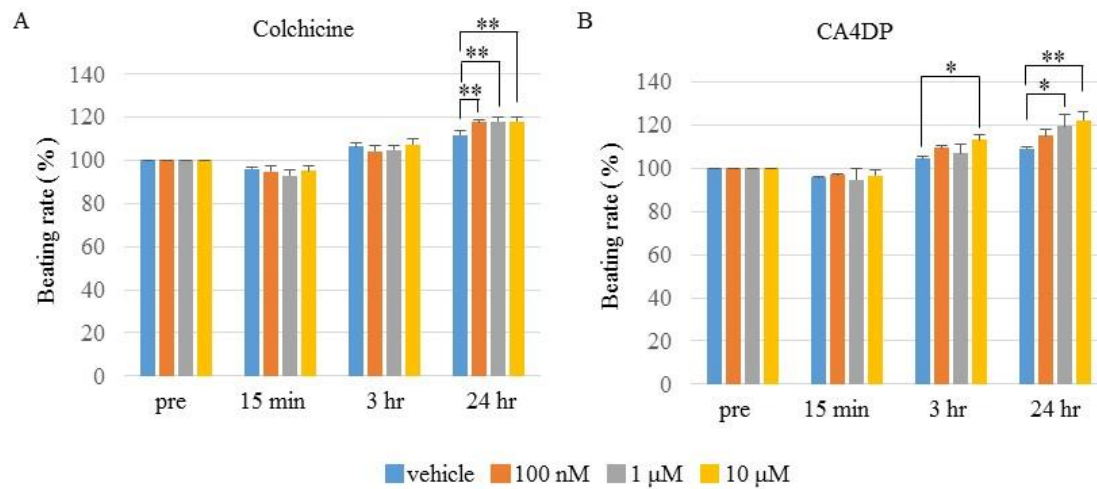


Fig. 2. Changes of beating rate of hiPS-CM in response to colchicine, CA4DP and vehicle.

A: Changes of beating rate in response to colchicine and vehicle (0.1% DMSO). B: Changes of beating rate in response to CA4DP and vehicle (0.1% H₂O). A, B: Beating rate of colchicine-treated hiPS-CM and CA4DP-treated hiPS-CM increased 3 hours or 24 hours after administration. A, B: Each Bars represents a mean \pm SD. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$. (n = 3)

Fig. 2B: Reproduced with permission of the Japanese society of Toxicologic Pathology from Tochinnai, et al. Combretastatin A4 disodium phosphate-induced myocardial injury. J Toxicol Pathol 29: 163-171, 2016.

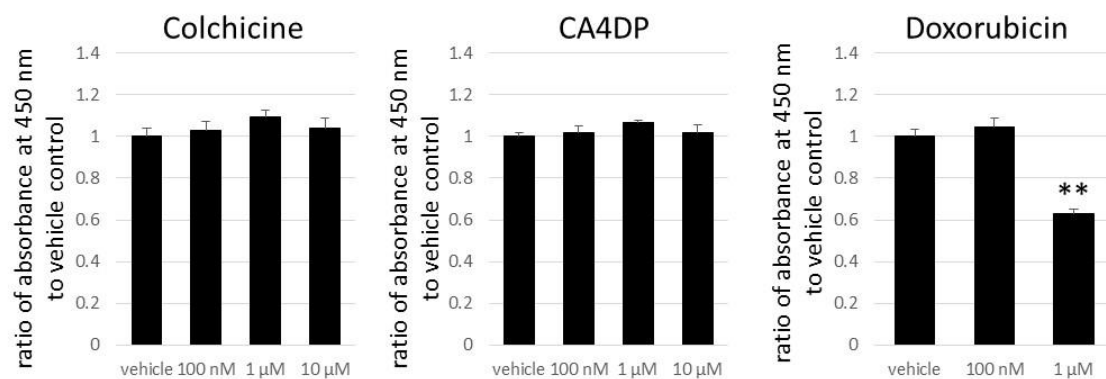


Fig. 3. Cell viability of hiPS-CM treated by colchicine, CA4DP, doxorubicin and vehicle.

A: Cell viability of hiPS-CM treated by colchicine and vehicle (0.1% DMSO). B:

Cell viability of hiPS-CM treated by CA4DP and vehicle (0.1% H₂O). C: Cell

viability of hiPS-CM treated by doxorubicin and vehicle (0.1% H₂O). A, B: Cell

viability of hiPS-CM did not affected by administration of colchicine or CA4DP.

C: Cell viability of hiPS-CM decreased by administration of doxorubicin 1 μM. A-

C: Each bar represents a mean ± SD. **: $p < 0.01$. (n = 3)

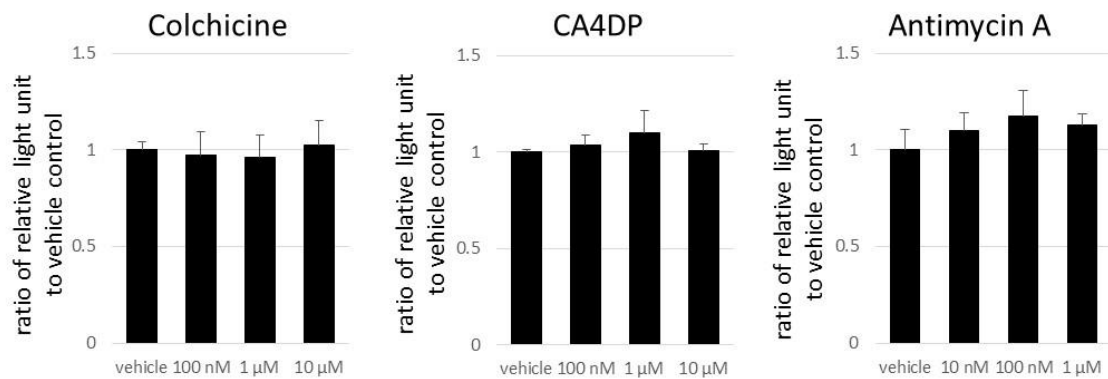


Fig. 4. ATP production of hiPS-CM treated by colchicine, CA4DP, antimycin A and vehicle, grown in DMEM with glucose.

A: ATP production of hiPS-CM treated by colchicine and vehicle (0.1% DMSO). B: ATP production of hiPS-CM treated by CA4DP and vehicle (0.1% H₂O). C: ATP production of hiPS-CM treated by antimycin A and vehicle (0.1% DMSO). A-C: ATP production of hiPS-CM grown in DMEM with glucose did not affected by administration of colchicine, CA4DP or antimycin A. A-C: Each bar represents a mean \pm SD. (n = 3)

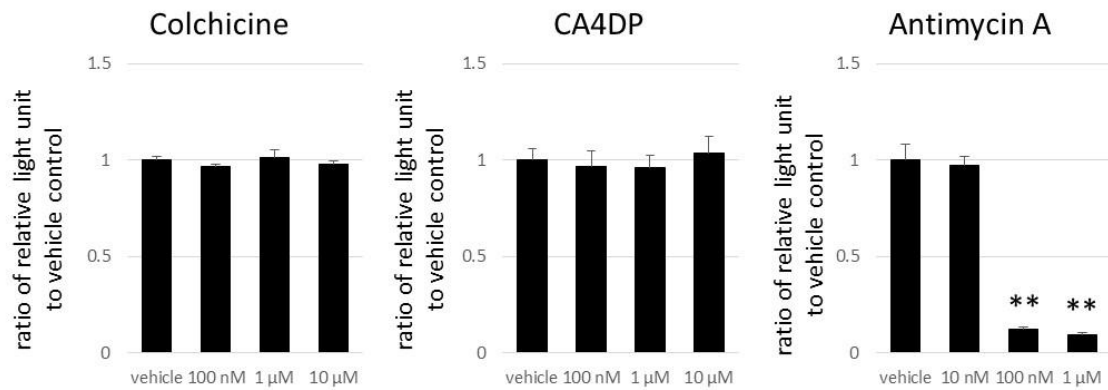


Fig. 5. ATP production of hiPS-CM treated by colchicine, CA4DP, antimycin A and vehicle, grown in DMEM without glucose.

A: ATP production of hiPS-CM treated by colchicine and vehicle (0.1% DMSO). B: ATP production of hiPS-CM treated by CA4DP and vehicle (0.1% H₂O). C: ATP production of hiPS-CM treated by antimycin A and vehicle (0.1% DMSO). A, B: ATP production of hiPS-CM grown in DMEM without glucose did not affected by administration of colchicine or CA4DP. C: ATP production of hiPS-CM grown in DMEM without glucose decreased by administration of antimycin A 100 nM and 1 μM. antimycin A. A-C: Each bar represents a mean ± SD. **: $p < 0.01$. (n = 3)

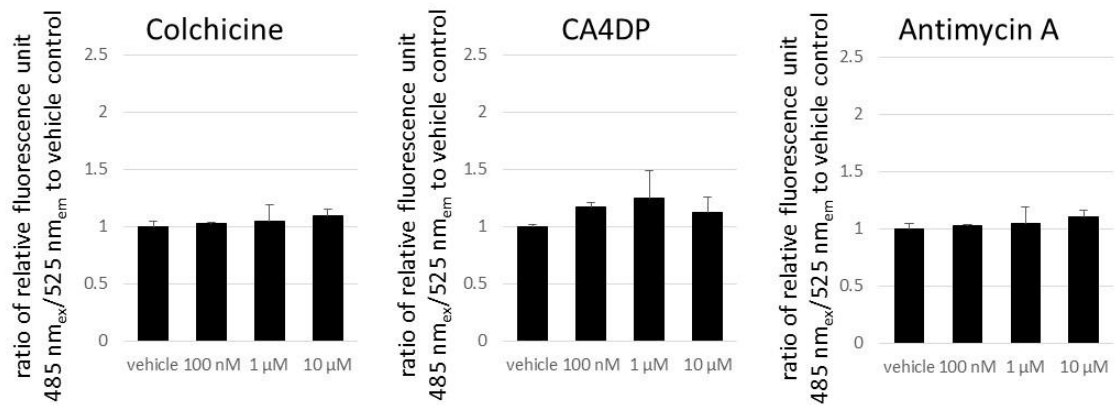


Fig. 6. Cytotoxicity of colchicine, CA4DP and antimycin A in hiPS-CM grown in DMEM with glucose.

A: Cytotoxicity of colchicine. B: Cytotoxicity of CA4DP. C: Cytotoxicity of antimycin A. A-C: Cytotoxicity of colchicine, CA4DP and antimycin A in hiPS-CM grown in DMEM with glucose did not detected. A-C: Each bar represents a mean \pm SD. (n = 3)

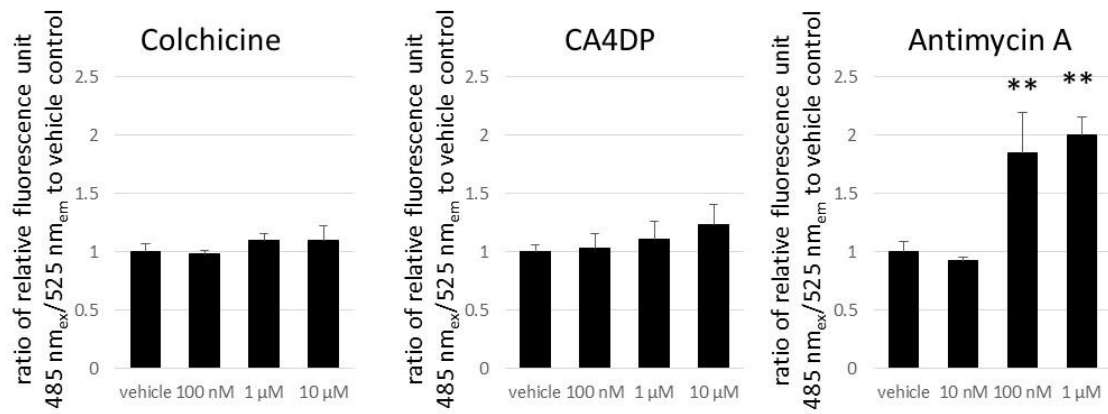


Fig. 7. Cytotoxicity of colchicine, CA4DP and antimycin A in hiPS-CM grown in DMEM without glucose.

A: Cytotoxicity of colchicine. B: Cytotoxicity of CA4DP. C: Cytotoxicity of antimycin A. A, B: Cytotoxicity of colchicine and CA4DP in hiPS-CM grown in DMEM without glucose did not detected. C: Cytotoxicity of antimycin A in hiPS-CM grown in DMEM without glucose was detected at 100 nM and 1 μM. A-C: Each bar represents a mean \pm SD. **: $p < 0.01$. (n = 3)

第3章 微小管重合阻害薬によってラットに誘発される心電図変化

3-1. 目的

第2章の結果から、微小管重合阻害薬による心毒性は薬剤の心筋細胞に対する直接作用ではなく、虚血あるいは自律神経系の異常などに起因した二次的な作用によって誘発されることが示唆された。しかしながら、心筋傷害の原因となるプライマリーな変化については、依然として不明である。

第1章で述べた通り、微小管重合阻害薬のヒトにおける心毒性では、ST 増高、ST 低下、ST segment の延長および QT 間隔の延長といった、ST 部分の心電図変化が誘発される (Mendis, 1989; van Heyningen and Watson, 2005; Bhakta *et al.*, 2009; Subbiah *et al.*, 2011; Lainé *et al.*, 2012)。こうした心電図変化が生じる原因を考察するにあたっては、動物モデルを用いた実験が有用であると考えられる。

ラットの心筋細胞における外向きカリウム電流は I_{to} に依存しており (Suzuki *et al.*, 1994)、 I_{Kr} および I_{Ks} に依存しているヒトとは異なる。しかしながら、心臓に異常が生じた際、ヒトとラットでは多くの共通した心電図変化が誘発されることが報告されており、毒理学領域の研究におけるラットの心電図解析の有用性が主張されている (Farraj *et al.*, 2011)。このことから、微小管重合阻害薬を投与したラットの心電図変化の解析からヒトの臨床における心毒性の病態を解析するにあたって有用な情報を得られると考えられる。しかしながら、微小管重合阻害薬をラットをはじめとする実験動物に投与し、心毒性変化を誘発した報告はこれまでにない。そこで、本章では、微小管重合阻害薬の心毒性をラットを用いて考察可能であるかについて確認するために、ラットに微小管重合阻害薬の毒性に起因した心電図変化を誘発することを試み、ラットにヒトと共通する心電図変化を誘発されるか評価するとともに、検出された心電図変化から心毒性発現機序を考察することとした。

3-2. 材料および方法

3-2-1. Colchicine 投与ラットを用いた心電学的解析

3-2-1-1. 供試動物

4 週齢の雄性 CrI:CD(SD) ラット（日本チャールス・リバー）を入手し、約 1 週間の馴化の後、実験に供した。馴化期間中および実験期間中は明暗サイクル 12/12 時間、温度 20 ~ 26 ° C の環境で飼育した。飼育期間中はラット用の基礎飼料および自家水道水を自由摂取させた。ラットの飼育および取り扱いについては、「ヤクルト本社中央研究所における動物実験等実施に関する規定」、「東京大学動物実験実施規則」および「東京大学大学院農学生命科学研究科・農学部動物実験委員会規則」に従い、東京大学大学院農学生命科学研究科・農学部動物実験委員会の承認の下で実験を行った。

3-2-1-2. 被験物質および投与溶液

Colchicine を和光純薬工業から購入した。購入後、colchicine を 5% glucose 水溶液に溶解し、投与溶液として準備した。

3-2-1-3. テレメトリー送信機の埋め込みおよび心電図解析

馴化を終えたラット 3 匹に pentobarbital sodium を腹腔内投与して麻酔を施した後、心電図計測用テレメトリー送信機本体 (TA10ETA-F20、Data Science International) をラットの頸背部皮下に外科的に埋入した。心尖-心底誘導 (A-B 誘導) の心電図が測定できるように、送信機本体に接続された記録電極 (リード線の先端) はプラス側を左脇腹部の皮下に、マイナス側を右肩甲部の皮下に設置した。

テレメトリー送信機埋入手術から約 1 週間の回復期間後に心電図の測定を開始した。なお、心電図のサンプリングレートは 1 ミリ秒とした。得られた心電図の情報を、テレメーター送信機から受信ボード (RA1610、Data Science International) に無線で伝送し、アナ

ログ・デジタルコンバータを介して受信ボードに接続されたハードディスク上に記録した。記録した心電図をソフトウェア（ECG processor analyzing system : SRV2W および SP-2000、ソフトロン）にて解析した。解析では、解析時点における連続した 9 拍の心電図波形について、RR 間隔、QRS 持続時間、PR 間隔および QT 間隔を計測し、平均値を算出した。

3-2-1-4. 被験物質の投与

投与前の心電図を 24 時間以上記録した後に、colchicine 1.25 mg/kg を 1 回/日の頻度で 2 日間、尾静脈内に投与し、投与期間中の心電図を解析した。投与容量および投与速度は 1 mL/kg および約 0.1 mL/秒とした。なお、予備試験で最大耐用量（1.25 mg/kg, 2 日間）が明らかになり、1.25 mg/kg の用量が本試験で設定された。

3-2-2. CA4DP 投与ラットを用いた心電学的解析

3-2-2-1. 供試動物

3-2-1-1 と同様に 4 週齢の雄性 CrI:CD(SD) ラットを入荷、飼育し、約 1 週間の馴化の後に実験に供した。ラットの飼育およびの取り扱いについては、「ヤクルト本社中央研究所における動物実験等実施に関する規定」、「東京大学動物実験実施規則」および「東京大学大学院農学生命科学研究科・農学部動物実験委員会規則」に従い、東京大学大学院農学生命科学研究科・農学部動物実験委員会の承認の下で実験を行った。

3-2-2-2. 被験物質および投与溶液

CA4DP を MedKoo Bioscience から購入した。購入後、CA4DP を生理食塩水に溶解し、投与溶液として準備した。

3-2-2-3. テレメトリー送信機の埋め込みおよび心電図解析

馴化を終えたラット 2 匹 (Animal No.1 および Animal No. 2) に 3-2-1-3 と同様に心電図計測用テレメトリー送信機本体をラットの頸背部皮下に外科的に埋入し、心尖-心底誘導 (A-B 誘導) の心電図を測定、解析した。解析では、解析時点における連続した 4 秒間の心電図波形を平均化し、RR 間隔、QRS 持続時間、PR 間隔および QT 間隔を計測した。

3-2-2-4. 被験物質の投与

投与前の心電図を 24 時間以上記録した後に、CA4DP 50 mg/kg を 1 回/日の頻度で 3 日間、尾静脈内に投与し、投与期間中の心電図を解析した。投与容量および投与速度は 10 mL/kg および約 0.1 mL/秒とした。なお、CA4DP の最大耐用量は 50 mg/kg (300 mg/m²) であることが報告されており (Rustin *et al.*, 2003)、50 mg/kg の用量が本試験で設定された。

3-3. 結果

3-3-1. Colchicine 投与ラットを用いた心電学的解析

Colchicine 投与ラットの心電図を観察した結果、肉眼的に変化は認められなかった (Fig. 8)。波形解析の結果、colchicine 1.25 mg/kg の 2 回目投与 1 時間後以降において、RR 間隔および QT 間隔の延長傾向が認められた (Fig. 9A, C)。また、投与期間を通じて QRS 持続時間および PR 間隔が徐々に延長していく傾向も認められた (Fig. 9B, D)。RR 間隔が 150 から 175 ミリ秒付近の QT 間隔同士で比較すると、colchicine 1.25 mg/kg の投与後の QT 間隔は投与前の QT 間隔より延長しており、QT 間隔の延長は RR 間隔の変化に必ずしも相関しないことが確認された (Fig. 9E)。

3-3-2. CA4DP 投与ラットを用いた心電学的解析

CA4DP 投与ラットの心電図を観察した結果、CA4DP 50 mg/kg の 3 回目投与前から、ST segment の明瞭化が認められた (Fig. 10)。波形解析の結果、CA4DP 50 mg/kg の 2 回目および 3 回目投与 1 から 3 時間後において、投与前と比較して RR 間隔および PR 間隔の延長傾向が認められた (Fig. 11A, C)。これらの変化は特に 2 回目および 3 回目投与後に顕著であった。また、投与期間を通じて QT 間隔が徐々に延長していく傾向も認められた (Fig. 11D)。RR 間隔が 150 ミリ秒付近の QT 間隔同士で比較すると、CA4DP 50 mg/kg の投与後の QT 間隔は投与前の QT 間隔より延長しており、QT 間隔の延長は RR 間隔の変化に必ずしも相関しないことが確認された (Fig. 11E)。一方、QRS 持続時間については、CA4DP の投与による明らかな影響は認められなかった (Fig. 11B)。

3-4. 考察

CA4DP を投与したラットの心電図において、ST segment の明瞭化が認められた。通常、成熟したラットの正常な心筋細胞においては、外向きのカリウムチャネルである I_{To} の電流が大きく、内向きのカルシウムチャネルである I_{si} の電流は小さい。そのため、活動電位波形のプラトー相 (第 2 相) がほとんど形成されず、心電図上に ST segment は認められない (山本 龍生, 1983; Suzuki *et al.*, 1994)。このことから、CA4DP を投与したラットで認められた ST segment の明瞭化は、CA4DP の投与に起因した毒性変化であると考えられた。成熟ラットにおける ST segment の明瞭化については、これまでにその毒性学的な意義について十分な議論はなされていない。しかしながら、ヒトの心電図における一般的な ST-T 部分の異常については、一次性と二次性の原因が存在することが知られており (秋山 俊雄, 2012)、ラットで認められた ST segment の明瞭化とヒトの ST-T 部分の変化に共通した原因があると考えられる。一次性の原因に起因した異常は、心筋虚血や心筋梗塞などの際に心室内に活動電位波形の異なる領域が存在することで起きる。二次性の原因に起因し

た異常は、脚ブロックの際に心室脱分極過程に変化が生じることに起因する。今回認められた変化が、一次性と二次性の原因のどちらに起因するかについては、QRS 持続時間に着目することが有意義であると考えられる。二次性の原因である脚ブロックが生じた際には、一般的に QRS 持続時間が延長する。しかしながら、CA4DP 投与ラットに認められた心電図変化では、QRS 持続時間に明らかな変化は認められなかった。このことから、今回認められた心電図変化は、一次性の原因に起因している可能性が考えられた。また、イヌにおいては ST-T 部分の偏位が自室神経系の活動の変化によって非虚血性に生じることも報告されている (Iinuma *et al.*, 1993)。以上のことから、CA4DP 投与ラットで認められた ST segment の変化は虚血などの一次性的の変化に関連した心筋傷害や非虚血性に生じる自律神経の活動変化に関連した現象である可能性が考えられた。

CA4DP の投与によって QT 間隔の延長が認められた。この QT 間隔の延長は、ST segment の明瞭化に関連した ST 部分の波形変化が一因であると推察された。Colchicine を投与したラットにおいては、ST segment の明瞭化は肉眼的には認められなかったものの、QT 間隔の延長が認められたことから、CA4DP を投与したラットと同様に ST-T 部分の異常が生じており、虚血に関連した心筋傷害や自律神経の活動変化に関連した心電図変化が生じた可能性が考えられた。

また、colchicine および CA4DP の投与において RR 間隔および PR 間隔の延長が認められた。これらの変化は、副交感神経の活動亢進が原因である可能性が考えられた。

本章では、微小管重合阻害薬を投与したラットの心電図を解析することにより、微小管重合阻害薬の心毒性の検出を試みた。ラットの心筋細胞における活動電位は、I_{to} の電流に依存しているため、同じく外向きのカリウムチャネルである I_{Kr} の阻害によってヒトに生じる torsade de pointes のリスク評価にラットは適さないことは広く知られている。その一方、ラットとヒトに心電図には共通する点も多く見られ、I_{Kr} の阻害以外の評価においては、ラットの心電図評価がヒトへの毒性評価に有用になりうることを主張されている (Farraj

et al., 2011)。今回の実験で CA4DP あるいは colchicine を投与したラットに誘発された ST-T 部分の異常は、ヒトで認められている ST-T 部分の異常と関連した変化であることが考えられ、CA4DP あるいは colchicine を投与したラットを用いて心毒性の発現機序を検討することによって、ヒトにおける心毒性の発現機序を考察できるものと期待される。

ST-T 部分の変化ならびに RR 間隔および PR 間隔の延長には、いずれも自律神経系の活動変化が関与している可能性が考えられた。しかしながら、微小管重合阻害薬の投与と自律神経系の活動の関係について解析した報告はほとんどないため、詳細は不明であり、今回認められた変化の原因について考察するにあたっては、自律神経系の活動に関する解析が必要であると考えられた。そこで次章では、微小管重合阻害薬を投与したラットの自律神経系の活動について評価を行うことで、心筋傷害の原因を考察することとした。

3-5. 付図・付表

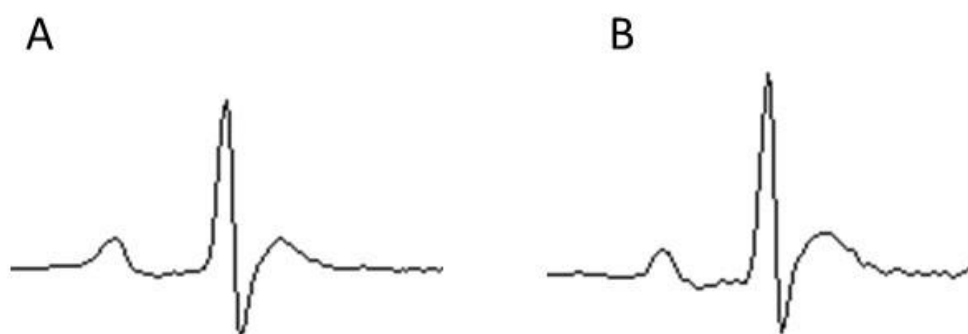


Fig. 8. Representative wave form of ECG traces before (A) and after (B) administration of colchicine.

A: Normal ECG of a rat before administration of colchicine. B: ECG of a rat after administration of colchicine 1.25 mg/1 mL/kg. This trace was obtained 12 hours after the second administration of colchicine 1.25 mg/1 mL/kg. Abnormality was not observed.

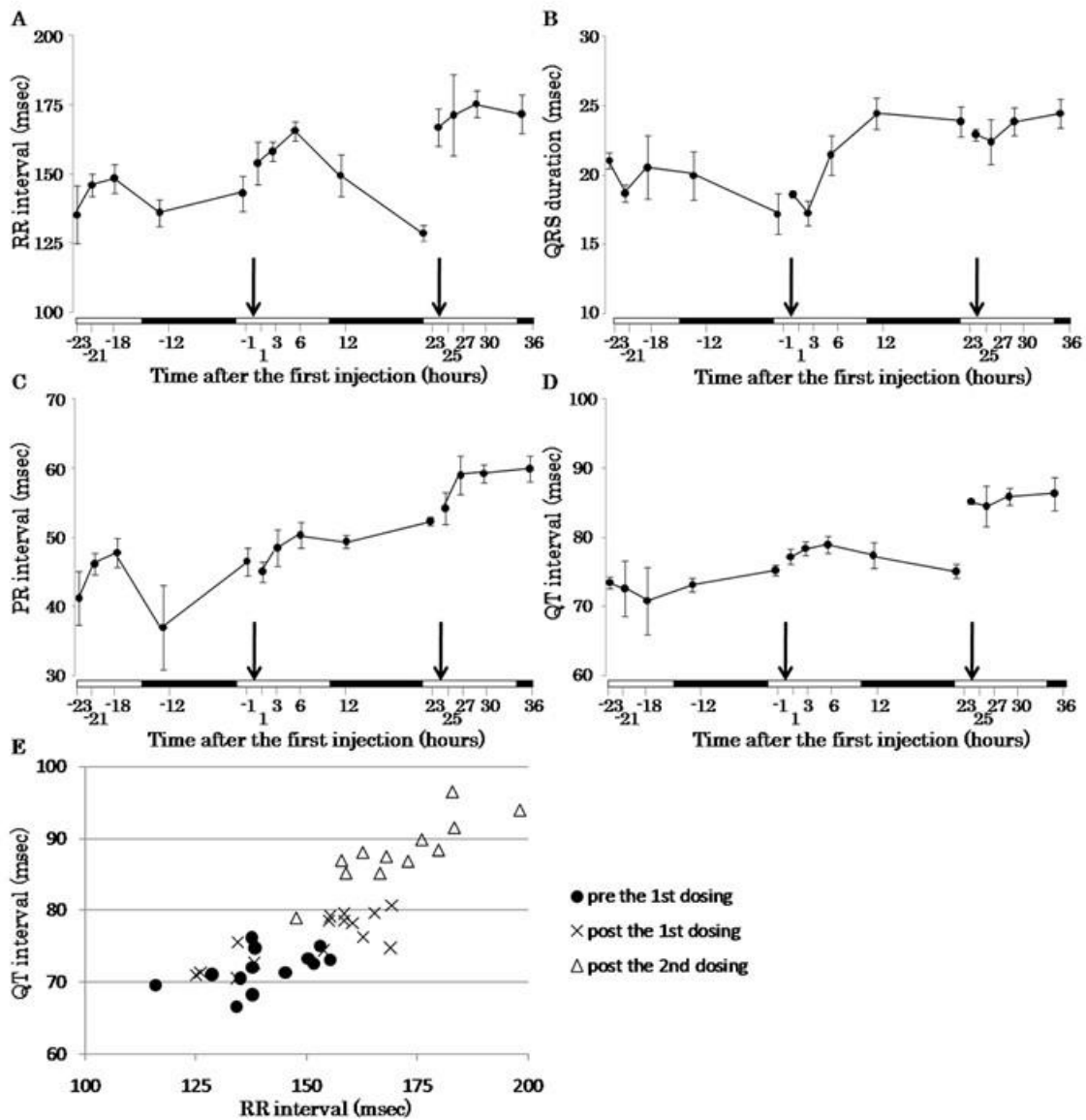


Fig. 9. Temporal changes of RR interval (A), QRS duration (B), PR interval (C), QT interval (D) and QT-RR plot (E) before and after injections of colchicine.

Arrows indicate time points of colchicine injection. White bars and filled bars on horizontal axes indicate light period and dark period, respectively. Error bars indicate S.E. (n = 3)

Fig. 9: Reproduced with permission of the Japanese society of Toxicologic Pathology from Tochinal, et al. Cardiotoxic changes of colchicine intoxication in rats: electrocardiographic, histopathological and blood chemical analysis. *J Toxicol Pathol* 27: 223-230, 2014.

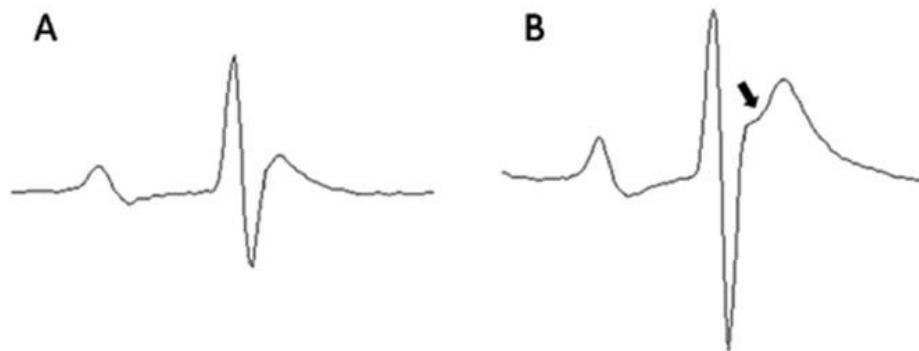


Fig. 10. Representative averaged traces of ECG traces before (A) and after (B) administration of CA4DP.

A: Normal ECG of a rat before administration of CA4DP. The ST junction is not obvious. B: ECG of a rat after administration of CA4DP 50 mg/10 mL/kg. This trace was obtained 23 hours after the second administration of CA4DP. In this ECG, the ST junction is obvious (arrow).

Fig. 10: Reproduced with permission of the Japanese society of Toxicologic Pathology from Tochinal, et al. Combretastatin A4 disodium phosphate-induced myocardial injury. *J Toxicol Pathol* 29: 163-171, 2016.

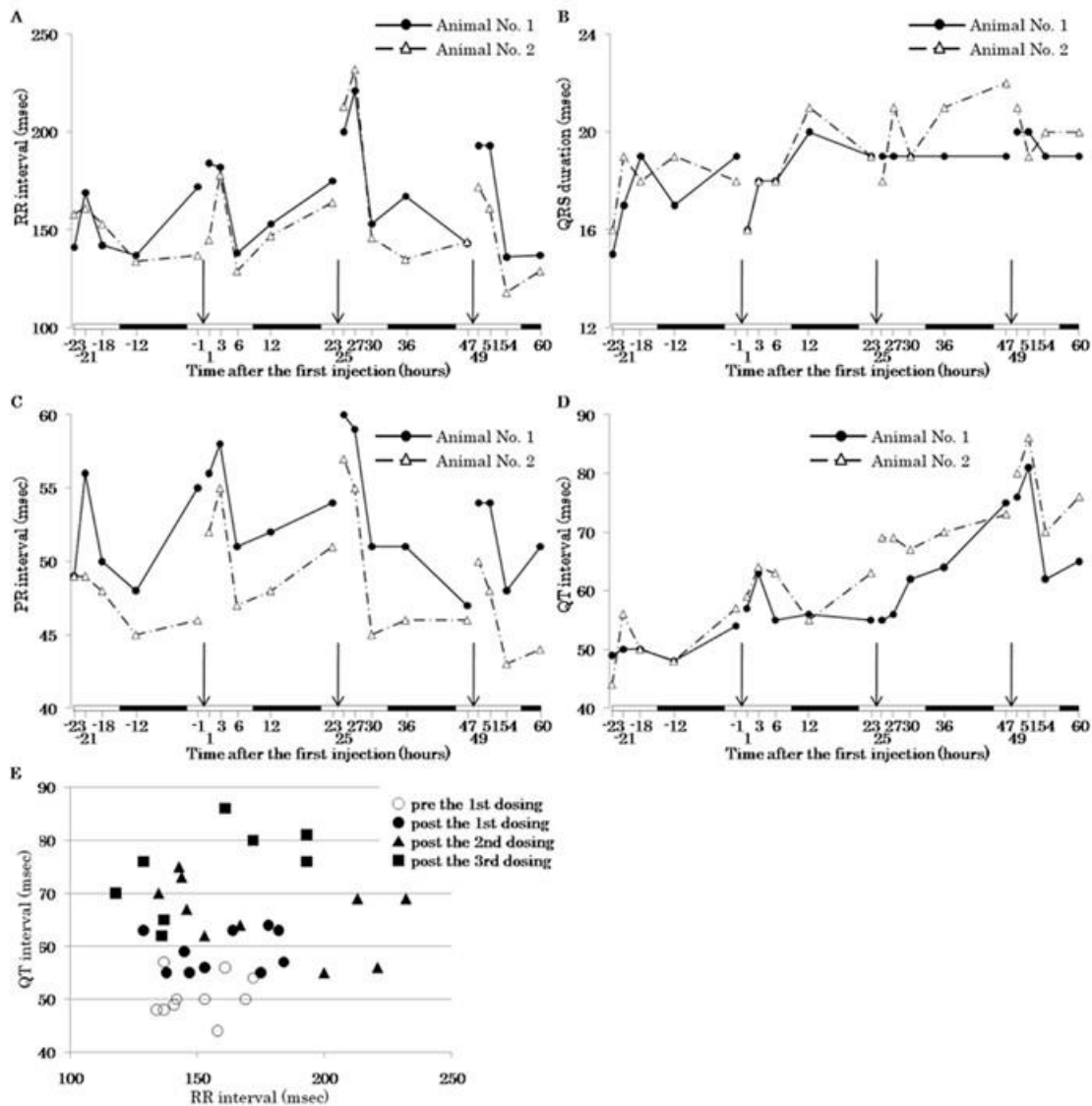


Fig. 11. Temporal changes of the RR interval (A), QRS duration (B), PR interval (C), QT interval (D), and QT-RR plot (E) before and after administration of CA4DP.

A-D: The solid line indicates the result of animal No. 1, and the dashed line indicates the result of animal No. 2. Both animal No. 1 and No. 2 were administered CA4DP 50 mg/10 mL/kg. (n = 2) Arrows indicate time points of CA4DP injection. White bars and filled bars in horizontal axes indicate the light period and dark period, respectively.

Fig. 11: Reproduced with permission of the Japanese society of Toxicologic Pathology from Tochinal, et al. Combretastatin A4 disodium phosphate-induced myocardial injury. *J Toxicol Pathol* 29: 163-171, 2016.

第 4 章 微小管重合阻害薬によってラットに誘発される自律神経活動の変化

4-1. 目的

第 3 章の結果から、ラットに微小管重合阻害薬を投与することによって ST-T 部分の変化を特徴とした心電図変化が誘発されることが明らかとなった。この心電図変化は、虚血や自律神経活動の変化が原因である可能性が考えられたが、詳細は不明であった。

そこで本章では、微小管重合阻害薬の心毒性発現機序に自律神経系の活動の変化が関与しているかについて考察することを目的として、微小管重合阻害薬を投与したラットの自律神経系の活動レベルを評価することとした。評価にあたっては、第 3 章で記録した微小管重合阻害薬を投与したラットの心電図を用いて、ラットの自律神経機能の評価方法として報告されているパワースペクトル解析を用いた心拍変動解析を実施した (Kuwahara *et al.*, 1994)。

4-2. 材料および方法

第 3 章の 3-2-1 および 3-2-2 で記録した colchicine 1.25 mg/kg あるいは CA4DP 50 mg/kg を投与したラットの心電図の各解析時点の 30 分間における RR 間隔について、ソフトウェア (ECG processor analyzing system : SRV2W、ソフトロン) を用いて Cooley-Tukey の高速フーリエ変換法 (Cooley and Tukey, 1965) によるパワースペクトル解析を用いた心拍変動解析を行い、低周波数成分 (LF: 0.1 -1.0 Hz) および高周波数成分 (HF: 1.0 - 3.0 Hz) を検出した。検出された LF 成分と HF 成分の比である LF/HF を交感神経と副交感神経のバランスの指標、HF 成分を副交感神経活動レベルの指標として (Kuwahara *et al.*, 1994)、自律神経機能の評価を行った。

4-3. 結果

4-3-1. Colchicine 投与ラットの心拍変動解析

Colchicine を投与したラットの心電図を用いて心拍変動解析を行った結果、交感神経と副交感神経のバランスの指標である LF/HF に関して、colchicine 1.25 mg/kg の 2 回目投与 6 時間後以降に減少が認められた (Fig. 12A)。一方、副交感神経活動レベルの指標である HF に関しては、colchicine 1.25 mg/kg の 2 回目投与 1 時間後以降に増加が認められた (Fig. 12B)。

4-3-2. CA4DP 投与ラットの心拍変動解析

CA4DP を投与したラットの心電図を用いて心拍変動解析を行った結果、LF/HF に関して、CA4DP 50 mg/kg の投与に起因した著明な変化は認められなかった (Fig. 13A)。一方、HF に関しては、Animal No. 2 において、CA4DP 50 mg/kg の 2 回目投与 1 時間後から 3 時間後に顕著な増加が認められた (Fig. 13B)。

4-4. 考察

イヌにおいては交感神経刺激により ST 下降が、迷走神経刺激により ST 上昇がそれぞれ非虚血性に生じることが報告されている (Iinuma *et al.*, 1993)。前章では、colchicine あるいは CA4DP を投与したラットの心電図において、ST 下降あるいは ST 上昇が生じているかについて考察するには至らなかったが、少なくとも ST-T 部分の変化として CA4DP 投与ラットでは ST segment の明瞭化が生じていることが確認された。この ST segment の明瞭化は、イヌの ST 下降あるいは ST 上昇と共通する原因を有する可能性も考えられたことから、本章では、瞬間的な RR 間隔の変動性を解析することで、colchicine および CA4DP 投与ラットの自律神経系の活動レベルを評価した。RR 間隔の変動性の評価にあたって、ラットの自律神経機能の評価方法として有用性が報告されているパワースペクトル解析を用

いた心拍変動解析を実施した (Kuwahara *et al.*, 1994)。その結果、colchicine および CA4DP の投与により HF の増加が認められたことから、副交感神経の活動亢進があったことが示唆された。この副交感神経の活動亢進は、colchicine および CA4DP 投与ラットで認められた RR 間隔および PR 間隔の延長にも関与していると考えられた。

微小管は神経細胞の軸索輸送において重要な役割を果たしており、微小管の重合阻害により神経毒性が発現することが広く知られている。ヒトにおける過去の解析報告では、微小管重合阻害薬である vincristine の投与により、迷走神経の遠心性の活動が障害されることが示唆されている (Hirvonen *et al.*, 1989)。今回の実験では、微小管重合阻害薬の投与によって副交感神経系が優位になっており、迷走神経の活動にどれほどの障害があったのかは不明であったが、微小管重合阻害薬が自律神経系の活動に障害を与え、自律神経系の活動バランスを変化させている可能性があると考えられた。

本章では、微小管重合阻害薬をラットに投与することにより、副交感神経系が優位になることが示された。一方で、交感神経系の明らかな活動亢進は検出されなかった。一般的に、交感神経系が過度に優位になった場合には、心筋の仕事量の増大により心筋細胞が傷害されると考えられるが、今回の実験で認められた副交感神経活動の亢進が、心筋の傷害を発現させるとは考えにくい。このことから、微小管重合阻害薬の投与によって生じる心筋傷害には、自律神経系の異常とは別の機序が関与している可能性が推察された。第 3 章の結果からは、虚血が微小管重合阻害薬の心毒性に関与している可能性も挙げられたことから、この可能性について検討していくことが必要であると考えられた。そこで次章では、ラットに微小管重合阻害薬を投与し、病理組織学的解析を行うことで、心筋傷害と虚血の関係を考察することとした。

4-5. 付図・付表

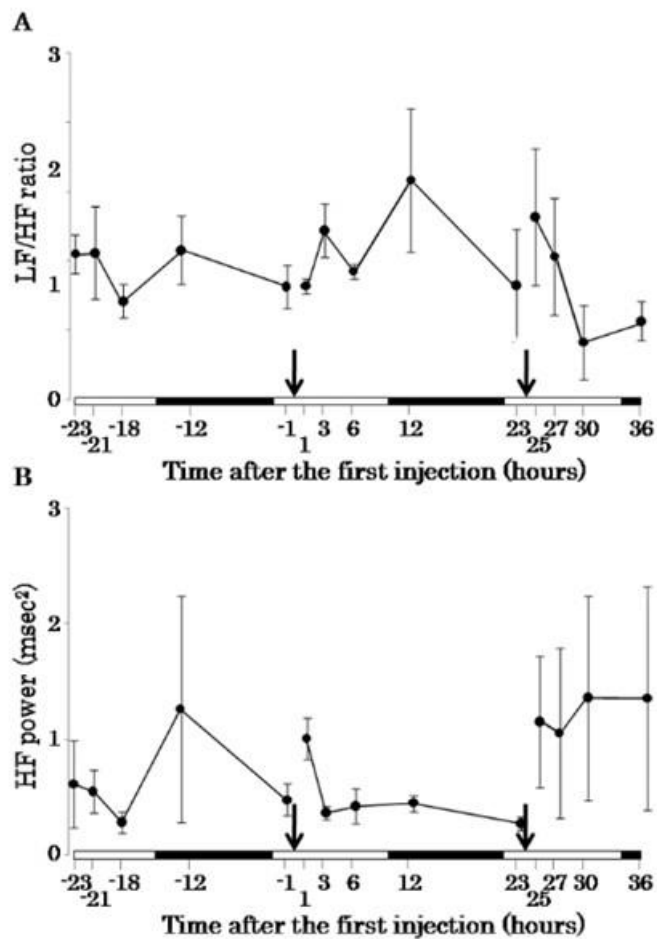


Fig. 12. Time-response curves of LF/HF ratio (A) and HF power (B) before and after injections of colchicine.

LF/HF ratio is an index of balance between sympathetic and parasympathetic nervous activity and HF power is an index of parasympathetic nervous activity. Arrows indicate time points of colchicine injection. White bars and filled bars on horizontal axes indicate light period and dark period, respectively. Error bars indicate S.E.

Fig. 12: Reproduced with permission of the Japanese society of Toxicologic Pathology from Tochinal, et al. Cardiotoxic changes of colchicine intoxication in rats: electrocardiographic, histopathological and blood chemical analysis. J Toxicol Pathol 27: 223-230, 2014.

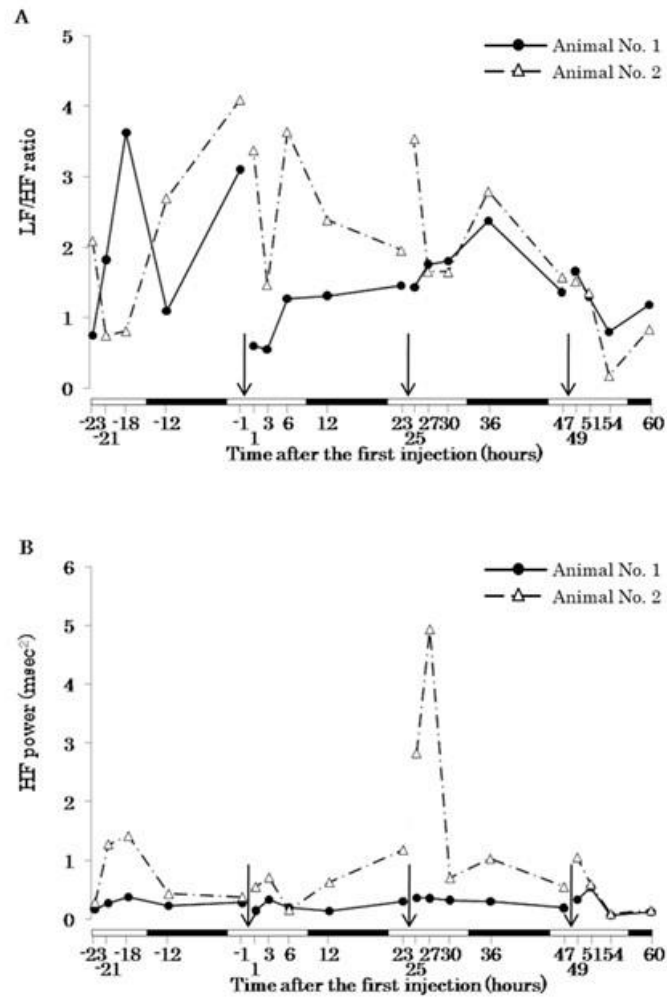


Fig. 13. Time-response curves of LF/HF ratio (A) and HF power (B) before and after injections of CA4DP.

LF/HF ratio is an index of balance between sympathetic and parasympathetic nervous activity and HF power is an index of parasympathetic nervous activity.

A-D: The solid line indicates the result of animal No. 1, and the dashed line indicates the result of animal No. 2. Both animal No. 1 and No. 2 were administered CA4DP 50 mg/10 mL/kg. Arrows indicate time points of CA4DP injection. White bars and filled bars in horizontal axes indicate the light period and dark period, respectively.

第5章 微小管重合阻害薬によってラットに誘発される心臓の病理組織学的変化

5-1. 目的

第3章の結果から、微小管重合阻害薬をラットに投与することによって、心電図に ST segment の明瞭化が誘発されることが明らかとなった。この変化は、第4章の結果から副交感神経系の活動亢進と関与している可能性が推察されたが、副交感神経系の活動亢進のみでは微小管重合阻害薬によって誘発される心筋の傷害を説明することは困難であり、虚血などの心筋を傷害する他の要因が微小管重合阻害薬によって誘発されていると考えられた。

そこで本章では、ラットに微小管重合阻害薬を投与することで心筋傷害を誘発し、病理組織学的解析を行うことで、病理組織学的特徴から心筋傷害のメカニズムを考察することとした。また、病理組織学的解析の結果、心筋細胞および心臓の間質細胞において変化が認められたため、電子顕微鏡学的解析を用いて、詳細な解析を実施した。さらに、心臓病変が虚血と関連している可能性が示唆されたため、心筋病変と組織低酸素の関連を考察するために、心臓における低酸素領域の検出も試みた。

5-2. 材料と方法

5-2-1. Colchicine 投与ラットの心臓の病理組織学的解析

5-2-1-1. 供試動物

5 週齢の雄性 CrI:CD(SD) ラットを入荷、飼育し、約 1 週間の馴化の後に実験に供した。ラットの飼育および取り扱いについては、「ヤクルト本社中央研究所における動物実験等実施に関する規定」に従い、ヤクルト本社中央研究所動物実験委員会の承認の下で実験を行った。

5-2-1-2. 被験物質および投与溶液

Colchicine を Sigma-Aldrich から購入した。購入後、colchicine を 5% glucose 水溶液に溶解し、投与溶液として準備した。

5-2-1-3. 被験物質の投与および心臓の病理組織学的検査

馴化を終了したラット 15 匹を 1 群 5 匹の 3 群に分け、colchicine 1.00 mg/kg、1.25 mg/kg あるいは溶媒液を尾静脈内に 2 日間連続で急速静注した。最終投与の翌日に、pentobarbital sodium による麻酔下で腹大静脈から放血を行った。放血致死させたラットから心臓を摘出し、10% 中性緩衝ホルマリン液を用いて 3 日間浸漬固定した。固定後、心室および心房を横断するように約 5 mm の厚さで切り出し、2 日間再固定した。再固定した組織を常法に従いパラフィン包埋した後、作製されたパラフィンブロックを約 4 μm の厚さに薄切し、HE 染色、TdT-mediated dUTP-biotin nick-end labeling (TUNEL 染色) および抗 CD34 抗体を用いた免疫組織化学染色を実施した。染色した標本は、光学顕微鏡 (BX-51、オリンパス) を用いて鏡検した。

5-2-2. Colchicine 投与ラットの心臓の電子顕微鏡学的解析

5-2-2-1. 供試動物

5 週齢の雄性 CrI:CD(SD) ラットを入荷、飼育し、約 1 週間の馴化の後に実験に供した。ラットの飼育および取り扱いについては、「ヤクルト本社中央研究所における動物実験等実施に関する規定」に従い、ヤクルト本社中央研究所動物実験委員会の承認の下で実験を行った。

5-2-2-2. 被験物質および投与溶液

Colchicine を Sigma-Aldrich から購入した。購入後、colchicine を 5% glucose 水溶液

に溶解し、投与溶液として準備した。

5-2-2-3. 被験物質の投与および心臓の電子顕微鏡学的検査

馴化を終了したラット 4 匹を 1 群 2 匹の 2 群に分け、colchicine 1.25 mg/kg あるいは溶媒液を尾静脈内に 2 日間連続で急速静注した。最終投与の翌日に、pentobarbital sodium による麻酔下で腹大静脈から放血を行った。放血致死させたラットから心臓を摘出した。摘出した心臓は、心室中隔部位から組織を約 5 mm 四方に切り出し、2.5% グルタルアルデヒド液および 1% 四酸化オスミウム液にて固定後、常法に従ってエポン樹脂に包埋した。その後、超薄切片を作製し、1% 酢酸ウランおよびクエン酸鉛染色液による二重染色を行った。染色した標本は、透過型電子顕微鏡 (JEM1200EX、日本電子) を用いて観察した。

5-2-3. CA4DP 投与ラットの心臓の病理組織学的解析

5-2-3-1. 供試動物

5 週齢の雄性 CrI:CD(SD) ラットを入荷、飼育し、約 1 週間の馴化の後に実験に供した。ラットの飼育および取り扱いについては、「ヤクルト本社中央研究所における動物実験等実施に関する規定」に従い、ヤクルト本社中央研究所動物実験委員会の承認の下で実験を行った。

5-2-3-2. 被験物質および投与溶液

CA4DP を MedKoo Bioscience から購入した。購入後、CA4DP を生理食塩水に溶解し、投与溶液として準備した。

5-2-3-3. 被験物質の投与および心臓の病理組織学的検査

馴化を終了したラット 14 匹を Table 1 の通り 4 群に分け、CA4DP 30 mg/kg あるいは 60 mg/kg を 4 日間連続、または CA4DP 120 mg/kg あるいは溶媒液を中 3 日間で 2 回、尾静脈内に急速静注した。最終投与の翌日に、5-2-1-3 と同様に心臓を採取し、パラフィン包埋したブロックを薄切後、HE 染色を実施した。染色した標本は、光学顕微鏡 (BX-51、オリンパス) を用いて鏡検した。また、CA4DP 120 mg/kg あるいは溶媒液を投与したラットの各 1 例については、大脳、肝臓、膵臓、腎臓、皮膚、腓腹筋および精巣も採取した。これらの組織については、10% 中性緩衝ホルマリン液を用いて 3 日間浸漬固定 (大脳、肝臓、膵臓、腎臓、皮膚および腓腹筋) あるいはホルマリン-スクロース-酢酸液を用いて 3 日間浸漬固定 (精巣) を行った後に切り出しを行い、10% 中性緩衝ホルマリン液による 2 日間以上の再固定を行った。その後、心臓と同様にパラフィン包埋したブロックを薄切し、HE 染色を実施して鏡検した。なお、CA4DP 60 mg/kg を 4 日間連続投与したラットの 1 例は、最終投与後、翌日までに死亡した。死亡ラットについては、発見後速やかに心臓を採取し、生存例と同様に HE 染色標本を作製し、観察を行った。

5-2-4. Colchicine 投与ラットの心臓における低酸素領域の検出

5-2-4-1. 供試動物

5 週齢の雄性 Crl:CD(SD) ラットを入荷、飼育し、約 1 週間の馴化の後に実験に供した。ラットの飼育および取り扱いについては、「ヤクルト本社中央研究所における動物実験等実施に関する規定」に従い、ヤクルト本社中央研究所動物実験委員会の承認の下で実験を行った。

5-2-4-2. 被験物質および投与溶液

Colchicine を Sigma-Aldrich から購入した。購入後、colchicine を 5% glucose 水溶液

に溶解し、投与溶液として準備した。

5-2-4-3. 被験物質の投与および心臓の低酸素領域の検出

馴化を終了したラット 2 匹に、colchicine 1.25 mg/kg あるいは溶媒液を尾静脈内に 2 日間連続で急速静注した。最終投与の翌日に、低酸素マーカーである pimonidazole 60 mg/kg (Durand and Raleigh, 1998) を腹腔内投与し、90 分後に pentobarbital sodium による麻酔下で腹大静脈から放血を行った。放血致死させたラットから心臓を摘出し、5-2-1-3 と同様にパラフィンブロックから薄切方を作成し、抗 pimonidazole 抗体を用いた免疫組織化学染色を実施した。染色した標本は、光学顕微鏡 (BX-51、オリンパス) を用いて鏡検した。

5-3. 結果

5-3-1. Colchicine 投与ラットの心臓の病理組織学的解析

Colchicine 1.25 mg/kg を投与したラットに心臓において、心筋細胞の変性および壊死が認められた (Fig. 14)。これらの病変は心室中隔および左心室壁内層において広範囲に多巢性に認められた。変性した心筋細胞は、筋形質内に空胞および好酸性顆粒を有していた (Fig. 14B, C)。また、収縮帯の形成も認められた (Fig. 14C)。Colchicine 1.00 mg/kg を投与したラットにおいては心筋細胞の変化は認められなかった。また、colchicine 1.00 mg/kg あるいは 1.25 mg/kg を投与したラットの心臓の間質細胞および心内膜細胞において、核濃縮および核崩壊像が認められた (Fig. 15)。これらの間質細胞は、血管内皮細胞マーカーである CD34 に陽性であり、TUNEL 染色陽性であった (Fig. 15 B, C)。一方、中および大血管において血管内皮細胞の変化は認められなかった。

5-3-2. Colchicine 投与ラットの心臓の電子顕微鏡学的解析

5-3-1 で認められた心筋細胞の変化および間質細胞の変化について詳細な観察を行うために、電子顕微鏡学的検査を実施した。Colchicine 1.25 mg/kg を投与したラットの心筋細胞においては、ミトコンドリアの腫大および収縮帯の形成が認められた (Fig. 16)。収縮帯周囲のミトコンドリアにおいては、高電子密度の沈着物が認められた (Fig. 16C)。また、間質細胞における核濃縮および核崩壊像が認められた (Fig. 17)。これらの間質細胞は、基底膜を有しており、赤血球を取り囲んでいた。

5-3-3. CA4DP 投与ラットの心臓の病理組織学的解析

CA4DP 30 mg/kg を 4 日間連続投与したラットの心臓において、心室の毛細血管周囲への炎症性細胞浸潤が認められた (Fig. 18A)。CA4DP 60 mg/kg を 4 日間連続投与した生存例のラットの心臓においては、毛細血管周囲の水腫および血管内皮細胞の核濃縮が認められた (Fig. 18B)。CA4DP 60 mg/kg を 4 日間連続投与した死亡例のラットおよび 120 mg/kg を 2 回間歇投与したラットの心臓においては、顕著な心筋細胞の多巣性壊死および炎症性細胞浸潤ならびに毛細血管の拡張が認められた (Fig. 18C)。これらの心筋病変は、心室中隔および左心室壁内層において好発していた (Fig. 18D)。一方、CA4DP を投与したいずれのラットにおいても、中および大血管の変化は認められなかった。

CA4DP 120 mg/kg を投与したラットの 1 例については、大脳、肝臓、膵臓、腎臓、皮膚、腓腹筋および精巣の病理組織学的検査も実施し、心臓と同様の毛細血管病変が認められるか、確認を行った。しかしながら、このラットの大脳、肝臓、膵臓、腎臓、皮膚、腓腹筋および精巣においては、毛細血管病変は認められず、循環障害を示唆する組織傷害像も観察されなかった。

5-3-4. Colchicine 投与ラットの心臓における低酸素領域の検出

Colchicine 1.25 mg/kg を投与したラットの心臓では、心室中隔および左心室壁内層において組織低酸素マーカーである pimonidazole に陽性の心筋細胞が認められた (Fig. 19B)。一方、溶媒液を投与したラットの心臓では、pimonidazole に陽性の心筋細胞は認められなかった (Fig. 19A)。

5-4. 考察

本章の実験によって、colchicine を投与したラットの心筋傷害は、心筋細胞の筋形質における空胞化と好酸性顆粒状変性が特徴であることが明らかとなった。電子顕微鏡学的解析によって、これらの空胞および好酸性顆粒は腫大したミトコンドリアであることも示された。

Colchicine を投与したラットで認められた心筋細胞の変化は、筋形質の空胞化が認められるという点で、anthracycline によって誘発される心筋症と類似していた。しかしながら、anthracycline によって誘発される心筋症における空胞は、小胞体と横行管の拡張によって形成されている一方で (Dodd *et al.*, 1993; Olson *et al.*, 1974)、colchicine によって誘発された心筋細胞の空胞化は、腫大したミトコンドリアによって形成されていた。さらに、この心筋病変は、リン脂質症で認められる光顕像とも類似していた。しかしながら、リン脂質症の心筋細胞においては、電子顕微鏡学的検査によってミエリン様に観察されるリン脂質の蓄積が認められる一方で (Greaves, 1990)、colchicine 投与ラットの心筋細胞においてはミエリン様物質の蓄積は認められなかった。これらのことから、colchicine によって誘発される心筋傷害は、anthracycline 心筋症やリン脂質症とは異なるメカニズムで誘発されていると考えられた。

微小管重合阻害薬は、骨格筋に spheromembranous myopathy と呼ばれる空胞化を誘発することが知られている (Anderson *et al.*, 1967; Clarke *et al.*, 1972; Seiden, 1973;

Slotwiner *et al.*, 1966)。この骨格筋病変は、オートファゴソームの蓄積によって生じる。興味深いことに、colchicine によって心筋細胞に誘発された空胞化では、オートファゴソームはほとんど観察されず、腫大したミトコンドリアが多く認められた。これらのことから、colchicine は同じ横紋筋細胞に対してであっても、心筋細胞と骨格筋細胞では異なる毒性作用を示すことが示唆された。

間質細胞の核濃縮および核崩壊が顕微鏡観察によって認められた。TUNEL 染色の結果から、これらの細胞はアポトーシス細胞であることが明らかとなった。また、抗体 CD 34 抗体を用いた免疫組織化学染色および電子顕微鏡学的解析により、これらの細胞は血管内皮細胞であることが示された。さらに、colchicine によって誘発された血管内皮細胞の変化は、毛細血管に好発しており、中および大血管には認められなかったことから、毛細血管の血管内皮細胞が colchicine に対して高い感度を有していると考えられた。毛細血管の血管内皮細胞にアポトーシスが誘発された原因については、本実験の結果から特定するには至らなかったが、微小管重合阻害薬が血管内皮細胞の分裂および毛細血管のネットワーク形成を阻害することが報告されており (Bayless and Davis, 2004)、これらの作用が血管内皮細胞の変化に関与していると推察された。

Colchicine 投与ラットの心臓では、ミトコンドリアの腫大に加えて収縮帯の形成が認められた。収縮帯は、心筋虚血後の再還流時に形成されることが広く知られている (Slezak *et al.*, 1992)。また、組織低酸素マーカーである pimonidazole を用いた実験においては (Durand and Raleigh, 1998)、心筋病変の好発部位と一致して pimonidazole が検出された。さらに、心筋病変の好発部位は心室中隔および左心室壁内層であった。この部位は、心臓の栄養血流の末梢側に位置しており、血液還流量と心筋の仕事量の不均衡が生じた際に容易に傷害される部位とされている (Berridge *et al.*, 2016)。これらのことから、colchicine の投与によって心筋虚血が誘発された可能性が考えられた。心筋細胞の傷害と比較して血管内皮細胞の変化がより低用量の colchicine によって誘発されることから、虚血の原因は

血管内皮細胞の傷害に起因した微小循環の障害であると考えられた。

CA4DP を投与したラットの心臓においては、colchicine 投与ラットよりもより顕著な心筋壊死が認められた。心筋壊死の分布は、colchicine 投与ラットと共通していた。また、colchicine 投与ラットと同様に血管内皮細胞の核濃縮が認められ、さらには水腫および毛細血管の拡張が認められたことから、微小循環が傷害されていたことが推察された。これらのことから、CA4DP および colchicine を投与したラットの心臓では、同様の変化が誘発されたと考えられ、認められた病変は微小管重合阻害薬に特徴的な変化であることが示唆された。

5-5. 付図・付表

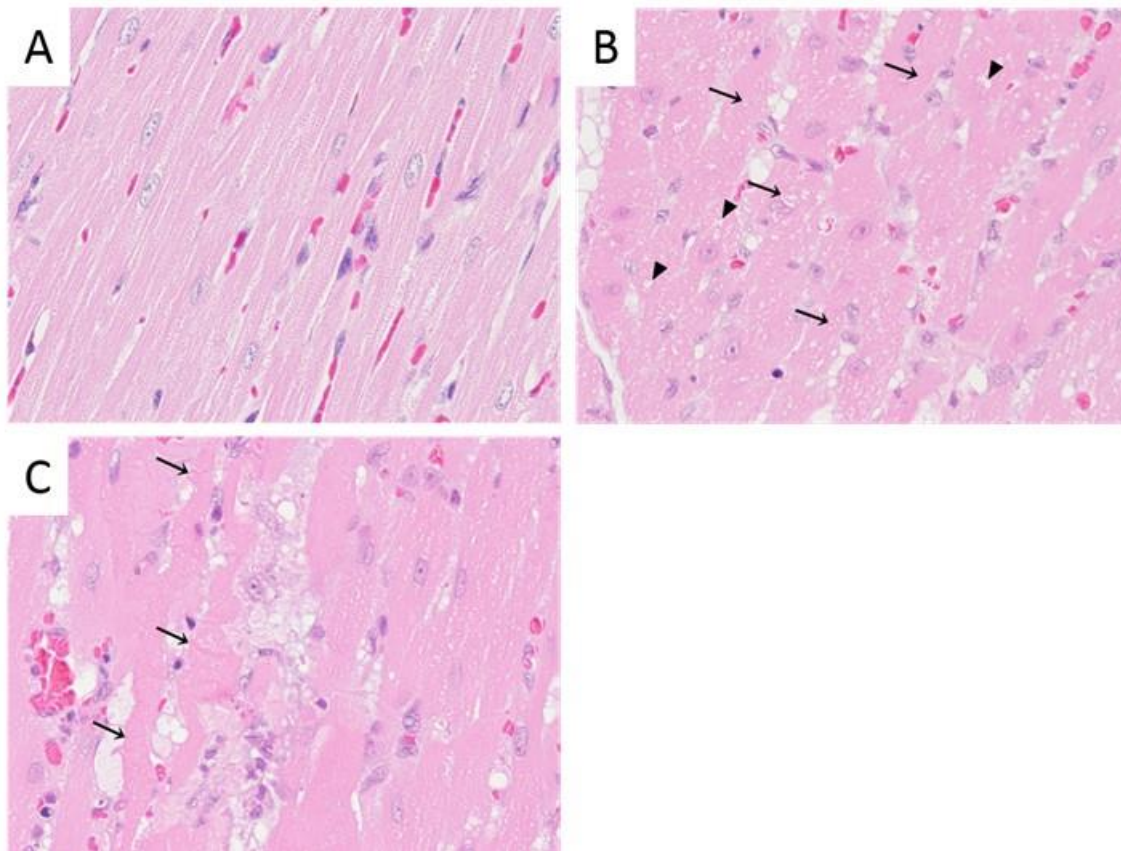


Fig. 14. Micrographs of myocardial lesions in rats administered colchicine.

A) Heart of a rat given 5% glucose shows no remarkable findings. B) Heart of a rat given colchicine at 1.25 mg/kg shows degeneration with eosinophilic granules (arrows) and vacuolation (arrow heads) in the sarcoplasm of myocardial cells. C) Heart of a rat given colchicine at 1.25 mg/kg shows vacuolation of the myocardium, and contractile bands (arrows) in myocardial cells around the necrotic cells. A-C) H-E staining x400.

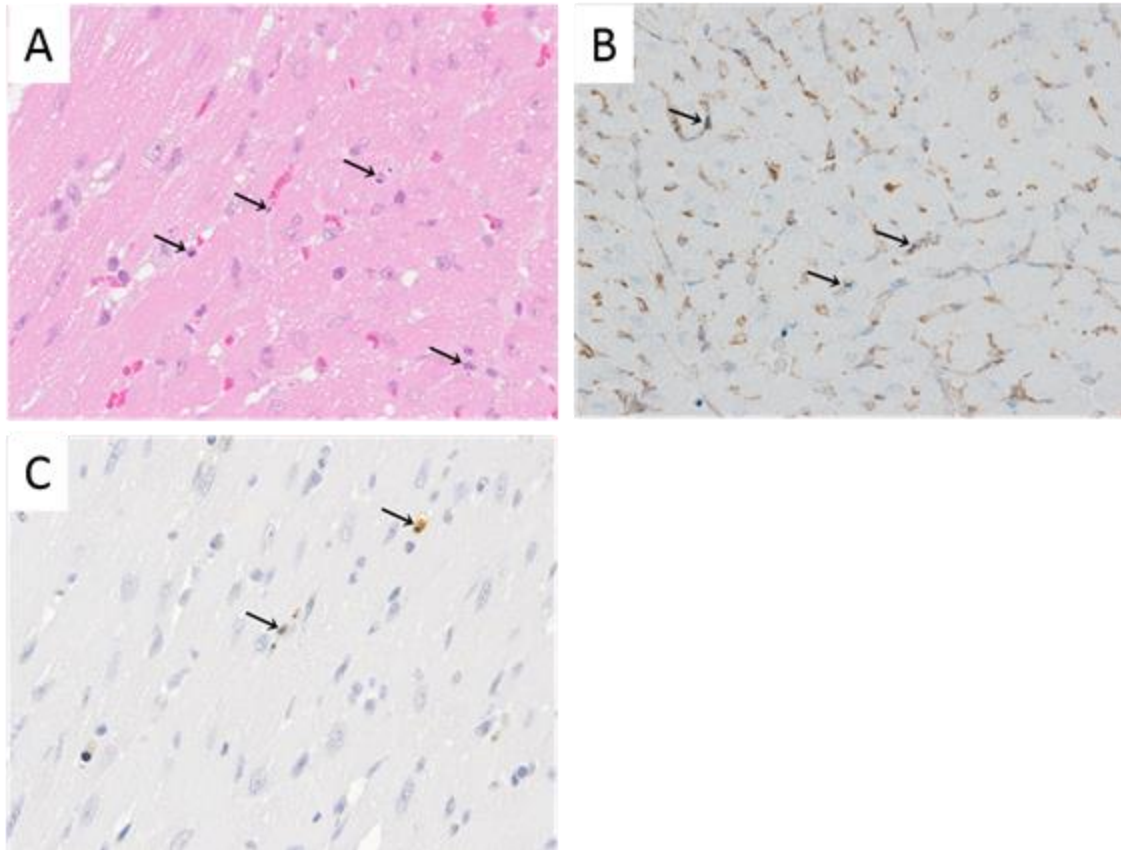


Fig. 15. Micrographs of interstitial lesions in hearts of rats given colchicine.

A) Heart of a rat administered colchicine at 1.25 mg/kg shows pyknosis, karyorrhexis and mitotic figures (arrows) in interstitial cells. B) Heart of a rat given colchicine at 1.25 mg/kg shows cells with pyknosis and karyorrhexis which are positive for CD34 (arrows). C) Heart of a rat given colchicine at 1.25 mg/kg shows cells with pyknosis and karyorrhexis which are positive for TUNEL staining (arrows). A) H-E staining x400, B) immunohistochemical staining for CD34 x400, and C) TUNEL staining x400.

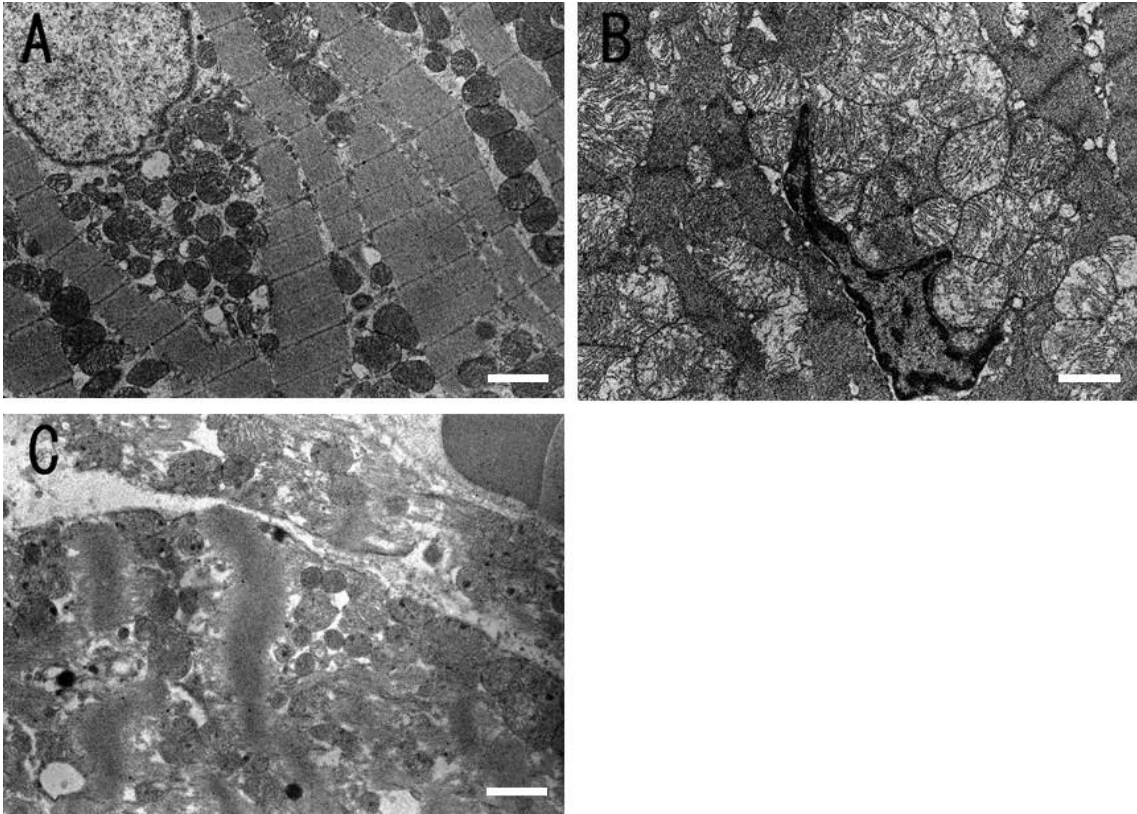


Fig. 16. Transmission electron micrographs of myocardial cells in rats given colchicine. A) Heart of a rat administered 5% glucose shows just no change. B) Heart of a rat given colchicine at 1.25 mg/kg shows swelling of mitochondria. C) Heart of a rat given colchicine at 1.25 mg/kg shows contractile bands. A-C) Bar, 2 μ m.

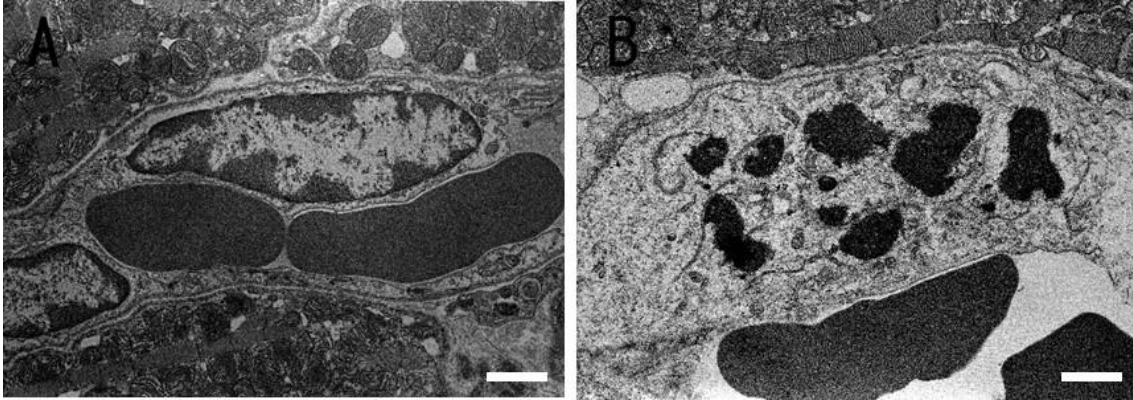


Fig. 17. Transmission electron micrographs of vascular endothelial cells in hearts from rats given colchicine.

A) Heart of a rat administered 5% glucose shows no remarkable changes. B) Heart of a rat given colchicine at 1.25 mg/kg shows karyorrhexis of interstitial cells, with basement membranes, surrounding erythrocytes. A, B) Bar, 2 μ m.

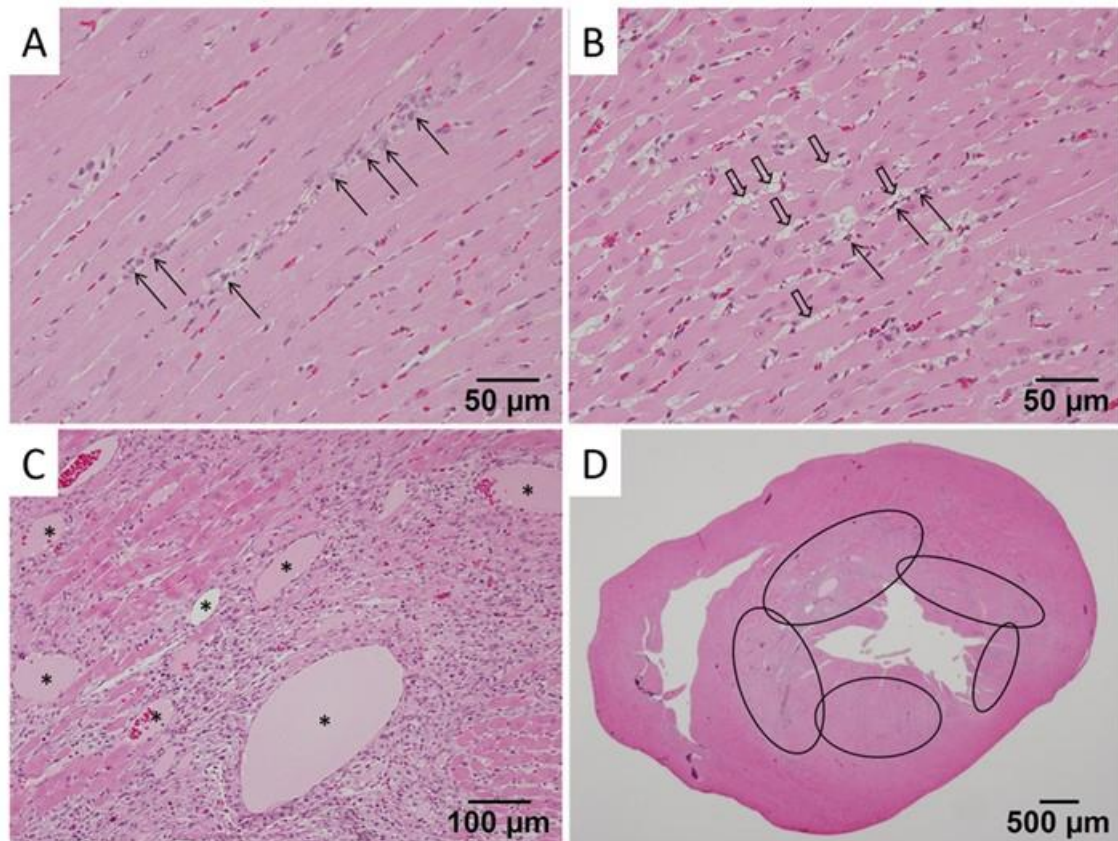


Fig. 18. Micrographs of myocardial lesions in rats administered CA4DP.

A: Infiltration of inflammatory cells (arrows) around capillaries in the ventricle of a rat given four doses of CA4DP 30 mg/10 mL/kg at intervals of 24 h. B: Edema (open arrows) around capillaries and pyknosis of capillary endothelial cells (linear arrows) in the ventricle of a surviving rat given four doses of CA4DP 60 mg/10 mL/kg at intervals of 24 h. C: Multifocal necrosis of the myocardium, infiltration of inflammatory cells, and dilatation of capillaries (*) in the ventricle of a rat given two doses of CA4DP 120 mg/10 mL/kg at an interval of 72 h. D: Site of predilection of myocardial lesions induced by two doses of CA4DP 120 mg/10 mL/kg at an interval of 72 h. Myocardial lesions were prominent in the interventricular septum and subendocardial regions of the apex of the left ventricular wall (ellipses). A-D) H-E staining.

Fig. 18: Reproduced with permission of the Japanese society of Toxicologic Pathology from Tochinali, et al. Combretastatin A4 disodium phosphate-induced myocardial injury. *J Toxicol Pathol* 29: 163-171, 2016.

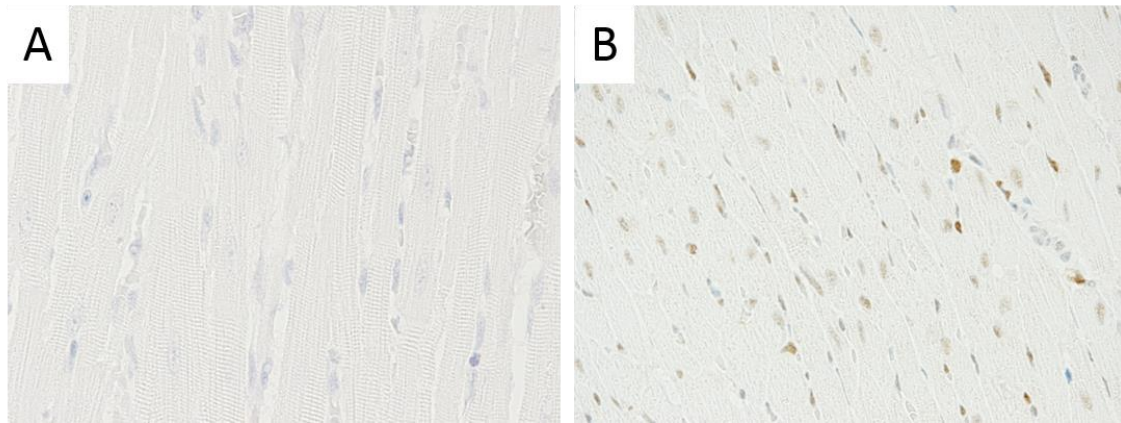


Fig. 19. Micrographs of hearts of rats administered pimonidazole to reveal hypoxic lesions after treatment with colchicine.

A) Heart of a rat treated with 5% glucose shows no cells positive for pimonidazole. B) Heart of a rat given colchicine at 1.25 mg/kg contains cells positive for pimonidazole stained brown on the photograph around the interventricular septum and left ventricle. A, B) x400, immunohistochemical staining for pimonidazole.

Table 1. Group design of the histopathological evaluation

	Test article			
	Saline 10 mL/kg 2 times 72 h interval	CA4DP 30 mg/10 mL//kg 4 times 24 h intervals	CA4DP 60 mg/10 mL/kg 4 times 24 h intervals	CA4DP 120 mg/10 mL/kg 2 times 72 h interval
Number of animals	5	2	2*	5

*one rat died after the last administration

第 6 章 総合考察

本研究においては、微小管重合阻害薬のなかでも、CA4DP が特に顕著な心毒性を有することが報告されていることから (Subbiah *et al.*, 2011)、CA4DP および CA4DP と同じく微小管の colchicine バインディングサイトに結合する colchicine に着目し、心毒性発現機序を考察した。

第 2 章においては、colchicine および CA4DP が hiPS-CM の細胞形態に影響を与える一方、細胞生存性および ATP 産生には影響を与えないことを明らかにした。このことから、微小管重合阻害薬によって誘発される心筋細胞の形態変化が物理的なストレスとなる可能性も考えられたものの、細胞生存性に変化がなかったことから、微小管重合阻害薬によって誘発される心筋傷害の発現において形態変化の影響はおそらく限定的であると推察された。さらに、心筋傷害には薬剤の心筋細胞に対する直接作用ではなく、虚血あるいは自律神経異常などの二次的な作用が関与していることが示唆された。そこで本研究では、動物モデルを用いて二次的な作用の正体を明らかにするべく、ラットに微小管重合阻害薬を投与して以降の実験を行った。

第 3 章においては、colchicine および CA4DP を投与したラットの心電図変化を評価した。その結果、微小管重合阻害薬は ST-T 部分の異常ならびに RR 間隔および PR 間隔が延長を誘発することが示された。微小管重合阻害薬を投与したラットに誘発された ST-T 部分の異常は、ヒトで認められている ST-T 部分の異常と関連した変化であり、ラットを用いた心毒性発現機序の解析がヒトにおける心毒性を考察する上でも有用であると考えられた。また、微小管重合阻害薬によって誘発された心電図変化は、虚血あるいは自律神経の活動変化に関連している可能性が考えられた。そこで第 4 章では、微小管重合阻害薬を投与したラットの自律神経系の活動について評価を行うことで、心筋傷害の誘発要因について考察することとした。

第 4 章においては、colchicine および CA4DP を投与したラットの心電図情報を用いて心拍変動解析を行い、自律神経系の活動レベルの変化を評価した。第 4 章の結果から、微小管重合阻害薬の投与によって副交感神経系の活動レベルが優位になることが示された。これらの変化は、微小管重合阻害薬を投与したラットの心電図に認められた ST segment の明瞭化ならびに RR 間隔および PR 間隔の一因である可能性が考えられた。一方、微小管重合阻害薬の投与によって交感神経系の活動亢進は認められなかったことから、微小管重合阻害薬による心筋傷害の原因には、自律神経系の活動変化とは異なり、虚血などが関与している可能性が考えられた。そこで第 5 章では、微小管重合阻害薬を投与したラットを用いて病理組織学的解析を行うことで、病理組織学的特徴から心筋傷害のメカニズムを考察することとした。

第 5 章においては、ラットに微小管重合阻害薬を投与することで心筋傷害を誘発し、病理組織学的解析を行った。また、電子顕微鏡学的解析を用いて、詳細な解析を実施した。さらに、心臓病変が虚血と関連している可能性が示唆されたため、心臓における低酸素領域の検出を試みた。その結果、colchicine 投与ラットの心臓において、心室中隔および左心室壁内層に好発する心筋細胞の空胞化および好酸性顆粒状変性および壊死が認められた。これらの変化はミトコンドリアの腫大が特徴的な変化であり、微小管重合阻害薬が骨格筋に誘発する病変とは異なる病態であることが明らかとなった。また、心筋細胞の変性・壊死領域と一致して、組織低酸素マーカーの pimonidazole が検出された。さらに、血管内皮細胞のアポトーシスが認められた。血管内皮細胞の変化は、心筋細胞の変化よりも低用量の colchicine によって誘発され、微小循環の障害による虚血の原因となっている可能性が考えられた。CA4DP を投与したラットの心臓においては、colchicine 投与ラットの心臓と共通した組織変化が認められ、観察された病変は微小管重合阻害薬に特徴的な変化であることが示唆された。

以上の結果から、微小管重合阻害薬は心臓の毛細血管の血管内皮細胞を障害することで

心臓の微小循環に異常を生じさせ、心筋細胞に虚血性の変化を誘発することで心毒性を発現させると考えられた。第 5 章の結果では、CA4DP の投与によって心臓の毛細血管の傷害が誘発されたものの、心臓の中および大血管や、大脳、肝臓、膵臓、腎臓、皮膚、腓腹筋および精巣の血管の傷害は誘発されなかった。これらのことから、微小管重合阻害薬が全身の血管のなかでも心臓の微小血管に対して特に強い毒性作用を示すと考えられた。この理由については、今回の研究から明らかにするには至らなかった。しかしながら、CA4DP はコンフルエントのヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) よりも増殖期の HUVEC においてより顕著な形態変化を誘発すること (Galbraith *et al.*, 2001) および心臓の血管内皮細胞は他の組織の内皮細胞と比較して高い増殖活性を有していること (Heron and Rakusan, 1995; Fernandez *et al.*, 2001) が報告されている。これらの報告から、細胞増殖活性の高さが心臓の血管内皮細胞が他の組織よりも微小管重合阻害薬に対する高い感受性を有している一因であることが考えられた。また、血管機能の障害に関しては、動物種差も考慮する必要があると考えられる。今回の実験ではラットを用いたが、一般的にイヌでは冠動脈の病変が生じやすいことから、イヌに微小管重合阻害薬を投与した際には冠動脈にも変化が生じる可能性もある。微小循環の障害に加え、冠動脈の障害が心筋傷害にどれほど関与しているのかについて精査するにあたっては、イヌなどの非げっ歯類を用いた研究を行う必要がある。

血管内皮細胞の障害を誘発し、心毒性を発現させると考えられる薬剤としては、今回の微小管重合阻害薬の他にも、アルキル化剤の cyclophosphamide や代謝拮抗剤である 5-fluorouracil、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の阻害により血管新生を阻害する抗がん剤である bevacizumab や sunitinib などが考えられる (Yeh and Bickford, 2009; Albini *et al.*, 2010)。しかしながら、これらの薬剤によって誘発される血管の病理組織学的変化の類似性や、全身それぞれの血管内皮細胞に対する毒性の特異性については、十分に議論されていない。そのため、微小管重合阻害薬で認められた心臓の毛細血管の傷害が、微小管重合阻害薬に特徴的な変化であるのか、血管内皮細胞に対する毒性を有する薬剤に一般的に認め

られる所見であるのかについては、議論の余地が残った。今後、心臓の毛細血管あるいはその他の血管から単離された内皮細胞を用いて、微小管重合阻害薬やその他の毒性化合物に対する感受性を比較することにより、毒性発現機序のより詳細が明らかになると期待される。

また、第 5 章の実験では、colchicine および CA4DP のいずれも最大耐用量までの用量で投与実験を行った。両剤の投与スケジュールが同一ではないため、一様の比較はできないものの、両剤の投与ラットで認められた心臓の病理組織学的変化は、colchicine 投与ラットよりも CA4DP 投与ラットでより顕著なものであった。毛細血管の傷害が低用量から誘発され、心筋虚血を示唆する心筋細胞の変性・壊死が認められたという点から、両剤によって誘発された病変は共通した病態形成機序を有していると考えられ、colchicine よりも CA4DP の方が強く心臓の毛細血管を障害する可能性が考えられた。この理由についても、今回の研究からは明らかにするには至らなかった。しかしながら、colchicine が痛風などの炎症性疾患に主に用いられているのに対し、CA4DP は固形腫瘍の血管新生阻害薬・血管遮断薬として開発されていることから、CA4DP は血管内皮細胞に作用しやすい形で構造の最適化がなされている可能性があり、これがより強い心毒性を誘発することに繋がっているものと推察された。CA4DP が血管内皮細胞に強い作用を示す分子メカニズムについては、今後の研究課題である。

CA4DP は、carboplatin や bevacizumab、paclitaxel、放射線療法などと併用された臨床試験が実施され、それぞれの試験においても心毒性が報告されている (Subbiah *et al.*, 2011)。これらの薬剤との併用が、CA4DP の心毒性をどれほど増強しているのかは明らかになっていない。しかしながら、特に bevacizumab や paclitaxel は単独でも心毒性が報告されている薬剤であり (Albini *et al.*, 2010)、bevacizumab は血管新生阻害薬であること、paclitaxel は微小管脱重合阻害薬であり微小管重合阻害薬と類似した心毒性を有する可能性があることから、これらの薬剤が微小管重合阻害薬による心臓毛細血管の障害を増

強する可能性が考えられ、注意を払う必要がある。また、HER2 阻害薬や anthracycline と CA4DP を併用したヒト試験に関する報告は見受けられないが、HER2 阻害薬や anthracycline は微小血管内皮細胞のバリア機能を障害するといった報告があることから (Wilkinson *et al.*, 2016)、CA4DP との併用にはリスクが伴うと推察される。さらに、今回の研究では CA4DP の急性毒性については評価できたと考えられるものの、長期投与の影響については明らかにできていない。長期投与によって誘発される毒性のプロファイルによっては、血管内皮細胞に作用する薬剤以外にも併用に注意が必要な薬剤が存在する可能性があるため、CA4DP の開発が進み、長期投与されるようになった場合には、より一層の注意が必要であると考えられる。第 3 章で CA4DP の投与によりラットの心電図に誘発された ST segment の変化は、第 5 章の結果から、心筋細胞が虚血性に傷害されたことにより生じたものであると推察された。ヒトにおいては、微小管重合阻害薬を投与することにより心電図の ST-T 部分における異常が誘発されており、ラットとヒトでは ST-T 部分に異常が生じるという点で類似している。このことから、ラットを用いた微小管重合阻害薬の心毒性評価をヒトに外挿できる可能性は高いと考えられる。ST-T 部分の変化にイオンチャネルの機能変化が関与している可能性については、今後の研究課題である。第 3 章の実験では、QT 間隔の延長が認められたことから、特に脱分極に関与しているイオンチャネルへの微小管重合阻害薬の作用について、精査する必要がある。今回認められた QT 間隔の延長は、被験物質の投与が複数に渡った後や投与後の時間が経た後に特に顕著であったことから、イオンチャネル電流への直接的な影響のみならず、チャネルの細胞膜へのトラフィックングに対する影響についても検討することが有用であると考えられる。

第 2 章では、hiPS-CM を用いた実験を行った。心筋細胞に対する影響を評価するにあたっては、ラット等から初代培養心筋細胞を単離して実験を行う方法も考えられたが、今回は hiPS-CM を使用し、hiPS-CM の中でも、iCell Cardiomyocytes (Cellular Dynamics international) を使用した。この理由として、以下の二つがある。一つ目は、微小管重合阻

害薬が増殖細胞の分裂を阻害する可能性が考えられたことから、線維芽細胞などの増殖細胞の割合が極めて低く、ほぼ純粋な心筋細胞から構成されている iCell Cardiomyocytes を用いることが、細胞の細胞生存性の評価において適当であると考えられたことである。ラット等から初代培養心筋細胞を単離した場合や、一部の hiPS-CM 製品では、線維芽細胞等の増殖細胞の混入率が高くなってしまふことが懸念される。二つ目は、微小管重合阻害薬では、torsades de pointes の発現は報告されていないものの、QT 間隔の延長が報告されていることから、早期後脱分極や撃発活動を経て torsades de pointes に移行するリスクについても情報を得る必要があると考え、薬物誘発性の脱分極遅延および不整脈の評価に幅広く使用されている iCell Cardiomyocytes を用いた (Guo *et al.*, 2011, Nakamura *et al.*, 2014)。実験の結果、colchicine および CA4DP に起因した細胞生存性の低下や早期後脱分極や撃発活動は認められなかった。Torsades de pointes のリスクについては、hERG チャネル阻害に関するアッセイなどを含め、より詳細な評価を行う必要があるが、今回得られた結果は、臨床で torsades de pointes が認められていないこととは矛盾しないものと考えられた。また、今回の実験では、colchicine および CA4DP が hiPS-CM の拍動を亢進させることが明らかとなった。これまで、微小管重合阻害薬が新生仔由来の心筋細胞の拍動を亢進させる一方で、成熟個体由来の心筋細胞の拍動は亢進させないことが報告されている (Webster, 2002)。このことから、hiPS-CM における微小管の機能は、成熟個体よりも新生仔の心筋細胞に近いことが示唆された。この点については、hiPS-CM を用いた微小管重合阻害薬の心毒性評価を成人に外挿する際の限界点になるが、hiPS-CM を用いた本研究では、ヒトの心筋細胞に対する影響、という観点から、微小管重合阻害薬の細胞傷害性に関するポテンシャルを評価できたものと考えられる。今後、微小管重合阻害薬が hiPS-CM やその他の心筋細胞の微小管形態や細胞形態、ミトコンドリアの細胞内配置について与える影響について、蛍光免疫染色や透過型電子顕微鏡を用いた実験によって解析することで、微小管重合阻害薬の心筋細胞に対する直接作用がより具体的に明らかになると思われる。

本研究を通じて、微小管阻害薬によってラットに誘発される心電図変化および心筋病変の毒性病理学的変化が明らかになった。また、心毒性発現機序の一端を考察できた。心毒性発現機序の解明により、微小管重合阻害薬の非臨床試験における適切な心毒性評価手法の選択、さらには臨床における心毒性の対策方法の考案に繋がると期待され、本研究の成果は、抗がん剤など、微小管重合阻害薬の開発の効率化と安全性向上に貢献できると考えられる。

謝辞

本論文を作成するにあたり、御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました東京大学大学院 農学生命科学研究科 獣医衛生学研究室 桑原 正貴 教授、関澤 信一 准教授に厚く御礼申し上げます。

また、多大なるご協力を頂戴しました、東京大学大学院 農学生命科学研究科 獣医衛生学教室の皆様には深く感謝申し上げます。

本研究の機会を与えて下さいました、株式会社ヤクルト本社 中央研究所 石川 文保 所長、南野 昌信 副所長に深謝いたします。

本研究の遂行にあたり、数多くの御指導、御鞭撻を頂戴しました、株式会社ヤクルト本社 中央研究所 金子 公幸 審議役、小林 稔秀 安全性研究所所長、角 将一 安全性第二研究室室長、元ヤクルト本社 中央研究所 内田 和美 博士に深く感謝申し上げます。また、永田 百合子 主任研究員、安藤 稔 指導研究員、鈴木 倫 指導研究員、吉澤 和彦 主事補、小松 加代子 主事補、鈴木 勝也 指導研究員、浅川 直之 指導研究員、畑 千恵 研究員、長橋 幸恵 氏には数多くの御助言をいただきました。さらに、日ごろから親身なるご協力を頂戴しました、株式会社ヤクルト本社 中央研究所 安全性研究所の皆様には深謝いたします。

最後に、暖かい励ましとともに本研究を蔭から支えてくれた家族に心より感謝します。

略号一覧

ATP : adenosine triphosphate

CA4DP : combretastatin A4 disodium phosphate

CI : cell index

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO : Dimethyl sulfoxide

HER 2 : ヒト上皮増殖因子受容体 2 型

HF : 高周波数成分

hiPS-CM : ヒト iPS 細胞由来心筋細胞

HUVEC : ヒト臍帯静脈内皮細胞

LF : 低周波数成分

VEGF : 血管内皮細胞増殖因子

WST-8 : 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt

参考文献

- 秋山 俊雄. (2012). 心電図講義 VII. ST 上昇・T 波増高による心機能評価と予後の予測. *JPN J ELECTROCARDIOLOGY*. 32(4): 367-387.
- Albini A, Pennesi G, Donatelli F, Cammarota R, De Flora S, Noonan DM. (2009). Cardiotoxicity of anticancer drugs: the need for cardio-oncology and cardio-oncological prevention. *J Natl Cancer Inst*. 102(1): 14-25.
- Anderson PJ, Song SK, Slotwiner P. (1967). The fine structure of spheromembranous degeneration of skeletal muscle induced by vincristine. *J Neuropathol Exp Neurol*. 26: 15-24.
- Babiarz JE, Ravon M, Sridhar S, Ravindran P, Swanson B, Bitter H, Weiser T, Chiao E, Certa U, Kolaja KL. (2012). Determination of the human cardiomyocyte mRNA and miRNA differentiation network by fine-scale profiling. *Stem Cells Dev*. 21: 1956-1965.
- Bayless KJ, Davis GE. (2004). Microtubule depolymerization rapidly collapses capillary tube network in vitro and angiogenic vessels in vivo through the small GTPase Rho. *J Biol Chem*. 279: 11686-95.
- Berridge BR, Mowat V, Nagai H, Nyska A, Okazaki Y, Clements PJ, Rinke M, Snyder PW, Boyle MC, Wells MY. (2016). Non-proliferative and proliferative lesions of the cardiovascular system of the rat and mouse. *J Toxicol Pathol*. 29(3 Suppl): 1S-47S.
- Bhakta S, Flick SM, Cooney MM, Greskovich JF, Gilkeson RC, Remick SC, Ortiz J. (2009). Myocardial stunning following combined modality combretastatin-based chemotherapy: two case reports and review of the literature. *Clin Cardiol*. 32(12): E80-84.
- Bhattacharyya B, Panda D, Gupta S, Banerjee M. Anti-mitotic activity of colchicine and the structural basis for its interaction with tubulin. (2008). *Medicinal Research Reviews*. 28: 155-83.
- Brvar M, Ploj T, Kozelj G, Mozina M, Noc M, Bunc M. (2004). Case report: fatal poisoning with *Colchicum autumnale*. *Crit Care*. 8(1): R56-59.

Calaghan SC, Le Guennec JY, White E. (2001). Modulation of Ca²⁺ signaling by microtubule disruption in rat ventricular myocytes and its dependence on the ruptured patch-clamp configuration. *Circ Res.* 88: E32-E37.

Calaghan SC, Le Guennec JY, White E. (2004). Cytoskeletal modulation of electrical and mechanical activity in cardiac myocytes. *Prog Biophys Mol Biol.* 84: 29-59.

Calvo-Romero JM, Fernandez-Soria-Pantoja R, Arrebola-Garcia JD, Gil-Cubero M. (2001). Ischemic heart disease associated with vincristine and doxorubicin chemotherapy. *Ann Pharmacother.* 35: 1403-1405.

Chitaley K, Webb RC. (2002). Microtubule depolymerization facilitates contraction of rat aorta via activation of Rho-kinase. *Vascul Pharmacol.* 38(3): 157-161.

Clarke JTR, Karpati G, Carpenter S, Wolfe LS. (1972). The effect of vincristine on skeletal muscle in the rat. A correlative histochemical, ultrastructural and chemical study. *J Neuropathol Exp Neurol.* 31: 247-66.

Cooley JW, Tukey JW. (1965). An algorithm for the machine calculation of complex Fourier series. *Math Comp.* 19: 297-301.

Cooney MM, Radivoyevitch T, Dowlati A, Overmoyer B, Levitan N, Robertson K, Levine SL, DeCaro K, Buchter C, Taylor A, Stambler BS, Remick SC. (2004). Cardiovascular safety profile of combretastatin a4 phosphate in a single-dose phase I study in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res.* 10: 96-100.

Cooper G. (2006). Cytoskeletal networks and the regulation of cardiac contractility: microtubules, hypertrophy, and cardiac dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 291: H1003-H1014.

Dalbeth N, Lauterio TJ, Wolfe HR. (2014). Mechanism of action of colchicine in the treatment of gout. *Clin Ther.* 36(10): 1465-1479.

Dark GG, Hill SA, Prise VE, Tozer GM, Pettit GR, Chaplin DJ. (1997). Combretastatin A-4, an agent that displays potent and selective toxicity toward tumor vasculature.

Cancer Res. 57: 1829-1834.

Denelavas A, Weibel F, Prummer M, Imbach A, Clerc RG, Apfel CM, Hertel C. (2011). Real-time cellular impedance measurements detect Ca²⁺ channel-dependent oscillations of morphology in human H295R adrenoma cells. *Biochem Biophys Acta.* 1813(5): 754-762.

Dodd DA, Atkinson JB, Olson RD, Buck S, Cusack BJ, Fleischer S. (1993). Doxorubicin cardiomyopathy is associated with a decrease in calcium release channel of the sarcoplasmic reticulum in a chronic rabbit model. *J Clin Invest.* 91: 1697-705.

Dowlati A, Robertson K, Cooney M, Petros WP, Stratford M, Jesberger J, Rafie N, Overmoyer B, Makkar V, Stambler B, Taylor A, Waas J, Lewin JS, McCrae KR, Remick SC. (2002). A phase I pharmacokinetic and translational study of the novel vascular targeting agent combretastatin a-4 phosphate on a single-dose intravenous schedule in patients with advanced cancer. *Cancer Res.* 62(12): 3408-3416.

Durand RE, Raleigh JA. (1998). Identification of nonproliferating but viable hypoxic tumor cells in vivo. *Cancer Res.* 58(16): 3547-50.

Farraj AK, Hazari MS, Cascio WE. (2011). The utility of the small rodent electrocardiogram in toxicology. *Toxicol. Sci.* 121: 11-30.

Fernandez E, Siddiquee Z, Shohet RV. (2001). Apoptosis and proliferation in the neonatal murine heart. *Dev Dyn.* 221: 302-10.

Finkelstein Y, Aks SE, Hutson JR, Juurlink DN, Nguyen P, Dubnov-Raz G, Pollak U, Koren G, Bentur Y. (2010). Colchicine poisoning: the dark side of an ancient drug. *Clin Toxicol.* 48: 407-414.

Galbraith SM, Chaplin DJ, Lee F, Stratford MR, Locke RJ, Vojnovic B, Tozer GM. (2001). Effects of combretastatin A4 phosphate on endothelial cell morphology in vitro and relationship to tumour vascular targeting activity in vivo. *Anticancer Res.* 21(1A): 93-102.

Guo L, Abrams RM, Babiarz JE, Cohen JD, Kameoka S, Sanders MJ, Chiao E, Kolaja

KL. (2011). Estimating the risk of drug-induced proarrhythmia using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Toxicol Sci.* 123(1): 281-289.

Guo L, Coyle L, Abrams RMC, Kemper R, Chiao ET, Kolaja KL. (2013). Refining the human iPSC-Cardiomyocyte arrhythmic risk assessment model. *Toxicol Sci.* 136(2): 581-594.

Guo L, Eldridge S, Furniss M, Mussio J, Davis M. (2015). Use of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (hiPS-CMs) to monitor compound effects on cardiac myocytes signaling pathways. *Curr. Protoc. Chem. Biol.* 7: 141-185.

Gómez AM, Kerfant BG, Vassort G. (2000). Microtubule disruption modulates Ca²⁺ signaling in rat cardiac myocytes. *Circ Res.* 86: 30-36.

Greaves P. (1990). Cardiovascular system. In: *Histopathology of preclinical toxicity studies.* Amsterdam: Elsevier; p. 229-77.

He X, Li S, Huang H, Li Z, Chen L, Ye S, Huang J, Zhan J, Lin T. (2011). A pharmacokinetic and safety study of single dose intravenous combretastatin 4 phosphate in Chinese patients with refractory solid tumors. *Br J Clin Pharmacol.* 71(6): 860-870.

Heron MI, Rakusan K. (1995). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) detection of cellular proliferation in hyperthyroid rat hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 27: 1393-403.

Hirvonen HE, Salmi TT, Heinonen E, Antila KJ, Välimäki IA. (1989). Vincristine treatment of acute lymphoblastic leukemia induces transient autonomic cardioneuropathy. *Cancer.* 64(4): 801-805.

Iinuma H, Sagara K, Sekiguchi A, Takahashi N, Kato K. (1993) Non-ischemic ST-T changes induced by autonomic nerve stimulation. *JPN J ELECTROCARDIOLOGY.* 13(2): 148-154.

Ishiyama Y, Miyazono Y, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. (1997). A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta.* 44: 1299-1305.

Islam MN, Iskander MN. (2004). Microtubulin binding sites as target for developing anticancer agents. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 4: 1077-104.

Kawano S, Asano M, Adachi Y, Matsui J. (2016). Antimitotic and Non-mitotic Effects of Eribulin Mesilate in Soft Tissue Sarcoma. *Anticancer Res*. 36(4): 1553-61.

Khan JM, Lyon AR, Harding SE. (2013). The case for induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in pharmacological screening. *Br J Pharmacol*. 169: 304-317.

Kumazawa A, Katoh H, Nonaka D, Watanabe T, Saotome M, Urushida T, Satoh H, Hayashi H. (2014). Microtubule disorganization affects the mitochondrial permeability transition pore in cardiac myocytes. *Circ J*. 78(5): 1206-1215.

Kustermann S, Boess F, Buness A, Schmitz M, Watzele M, Weiser T, Singer T, Suter L, Roth A. (2013). A label-free, impedance-based real time assay to identify drug-induced toxicities and differentiate cytostatic from cytotoxic effects. *Toxicol. in Vitro*. 27(5): 1589-1595.

Kuwahara M, Yayou K, Ishii K, Hashimoto S., Tsubone H, Sugano S. (1994). Power spectral analysis of heart rate variability as a new method for assessing autonomic activity in the rat. *J Electrocardiol*. 27: 333-337.

Lainé M, Mourissoux G, Camou F. (2012). Early onset cardiogenic shock in acute colchicine overdose. *J Clin Toxicol*. 2(5): 134.

Lampidis TJ, Kolonias DK, Savaraj N, Rubin RW. (1992). Cardiostimulatory and antiarrhythmic activity of tubulin-binding agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1256-1260.

Liu Y, Li H, Bubolz AH, Zhang DX, Gutterman DD. (2008). Endothelial cytoskeletal elements are critical for flow-mediated dilation in human coronary arterioles. *Med Biol Eng Comput*. 46(5): 469-78.

Ma J, Guo L, Fiene SJ, Anson BD, Thomson JA, Kamp TJ, Kolaja KL, Swanson BJ, January CT. (2011). High purity human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: Electrophysiological properties of action potentials and ionic currents. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 301: H2006-H2017.

- Mendis S. (1989). Colchicine cardiotoxicity following ingestion of *Gloriosa superba* tubers. *Postgrad Med J.* 65(768): 752-755.
- Mery P, Riou B, Chemla D, Lecarpentier Y. (1994). Cardiotoxicity of colchicines in the rat. *Intensive Care Med.* 20: 119-23.
- Minami M, Matsumoto S, Horiuchi H. (2010). Cardiovascular side-effects of modern cancer therapy. *Circ J.* 74: 1779-1786.
- Miragoli M, Sanchez-Alonso JL, Bhargava A, Wright PT, Sikkell M, Schobesberger S, Diakonov I, Novak P, Castaldi A, Cattaneo P, Lyon AR, Lab MJ, Gorelik J. (2016). Microtubule-Dependent Mitochondria Alignment Regulates Calcium Release in Response to Nanomechanical Stimulus in Heart Myocytes. *Cell Rep.* 14(1): 140-151.
- Morris PG, Fornier MN. (2008). Microtubule Active Agents: beyond the taxane frontier. *Clin Cancer Res.* 14: 7167-7172.
- Motlagh D, Alden KJ, Russell B, García J. (2002). Sodium current modulation by a tubulin/GTP coupled process in rat neonatal cardiac myocytes. *J Physiol.* 540: 93-103.
- Mullins ME, Carrico EA, Horowitz BZ. (2000). Fatal cardiovascular collapse following acute colchicine ingestion. *J Toxicol Clin Toxicol.* 38(1): 51-54.
- Nakamura Y, Matsuo J, Miyamoto N, Ojima A, Ando K, Kanda Y, Sawada K, Sugiyama A, Sekino Y. (2014). Assessment of testing methods for drug-induced repolarization delay and arrhythmias in an iPS cell-derived cardiomyocyte sheet: multi-site validation study. *J Pharmacol Sci.* 124(4): 494-501.
- Niles AL, Moravec RA, Eric Hesselberth P, Scurria MA, Daily WJ, Riss TL. (2007). A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. *Anal Biochem.* 366(2): 197-206.
- Olson HM, Young DM, Prieur DJ, LeRoy AF, Reagan RL. (1974). Electrolyte and morphologic alterations of myocardium in adriamycin-treated rabbits. *Am J Pathol.* 77: 439-54.

Panda S, Kar A. (2015). Combined Effects of Vincristine and Quercetin in Reducing Isoproterenol-Induced Cardiac Necrosis in Rats. *Cardiovasc Toxicol.* 15(4): 291-299.

Peters MF, Lamore SD, Guo L, Scott CW, Kolaja KL. (2015). Human stem cell-derived cardiomyocytes in cellular impedance assays: bringing cardiotoxicity screening to the front line. *Cardiovasc Toxicol.* 15: 127-139.

Rana P, Anson B, Engle S, Will Y. (2012). Characterization of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: Bioenergetics and utilization in safety screening. *Toxicol. Sci.* 130(1): 117-131.

Rustin GJ, Galbraith SM, Anderson H, Stratford M, Folkes LK, Sena L, Gumbrell L, Price PM. (2003). Phase I clinical trial of weekly combretastatin A4 phosphate: clinical and pharmacokinetic results. *J Clin Oncol.* 21(15): 2815-2822.

Seiden D. (1973). Effect of colchicine on myofilament arrangement and the lysosomal system in skeletal muscle. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 144: 467-73.

清野 精彦. (2014). 癌化学療法による心毒性-アントラサイクリンおよびトラスツズマブ心毒性について. *心臓.* 46: 322-329.

Slezak J, Tribulova N, Ravingerova T, Singal PK. (1992). Myocardial heterogeneity and variations in response to injury. *Lab Invest.* 67: 322-30.

Slotwiner P, Song SK, Anderson PJ. (1966). Spheromembranous degeneration of muscle induced by vincristine. *Arch Neurol.* 15: 172-6.

Smith JA, Wilson L, Azarenko O, Zhu X, Lewis BM, Littlefield BA, Jordan MA. (2010). Eribulin binds at microtubule ends to a single site on tubulin to suppress dynamic instability. *Biochemistry.* 49(6): 1331-1337.

Subbiah IM, Lenihan DJ, Tsimberidou AM. (2011). Cardiovascular Toxicity Profiles of Vascular-Disrupting Agents. *Oncologist.* 16: 1120-1130.

- Sun D, Huang A, Sharma S, Koller A, Kaley G. (2001). Endothelial microtubule disruption blocks flow-dependent dilation of arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 280(5): H2087-H2093.
- Suzuki J., Sugano S, Tsubone H. (1994). The Genesis of QT on ECGs in Experimental Animals –Based on the Ionic Currents in Ventricular Myocytes-. *Adv. Anim. Cardiol.* 27(2): 52-59.
- Tagawa H, Wang N, Narishige T, Ingber DE, Zile MR, Cooper GI. (1997). Cytoskeletal mechanics in pressure-overload cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 80: 281-289.
- Takashima T, Tokunaga S, Tei S, Nishimura S, Kawajiri H, Kashiwagi S, Yamagata S, Noda S, Nishimori T, Mizuyama Y, Sunami T, Tezuka K, Ikeda K, Ogawa Y, Onoda N, Ishikawa T, Kudoh S, Takada M, Hirakawa K. (2016). A phase II, multicenter, single-arm trial of eribulin as first-line chemotherapy for HER2-negative locally advanced or metastatic breast cancer. *Springerplus.* 5: 164.
- Talbott JH. (1953). Diagnosis and treatment of gouty arthritis. *Calif Med.* 79(3): 220-226.
- Tominaga H, Ishiyama Y, Ohseto F, Sasamoto K, Hamamoto T, Suzuki K, Watanabe M. (1999). A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Anal. Commun.* 36: 47-50.
- Tozer GM, Prise VE, Wilson J, Locke RJ, Vojnovic B, Stratford MR, Dennis MF, Chaplin DJ. (1999). Combretastatin A-4 phosphate as a tumor vascular-targeting agent: early effects in tumors and normal tissues. *Cancer Res.* 59: 1626-1634.
- van Heyningen C, Watson ID. (2005). Troponin for prediction of cardiovascular collapse in acute colchicine overdose. *Emerg Med J.* 22(8): 599-600.
- Vaughn DJ, Srinivas S, Stadler WM, Pili R, Petrylak D, Sternberg CN, Smith DC, Ringuette S, de Wit E, Pautret V, George C. (2009). Vinflunine in platinum-pretreated patients with locally advanced or metastatic urothelial carcinoma: results of a large phase 2 study. *Cancer.* 115(18): 4110-4117.

Webster DR, Patrick DL. (2000). Beating rate of isolated neonatal cardiomyocytes is regulated by the stable microtubule subset. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 47: H1653-H1661.

Webster DR. Microtubules in cardiac toxicity and disease. (2002). *Cardiovasc Toxicol.* 2: 75-89.

Wilkinson EL, Sidaway JE, Cross MJ. (2016). Cardiotoxic drugs Herceptin and doxorubicin inhibit cardiac microvascular endothelial cell barrier formation resulting in increased drug permeability. *Biol Open.* 5(10): 1362-1370.

Woods JA, Hadfield JA, Pettit GR, Fox BW, McGown AT. (1995). The interaction with tubulin of a series of stilbenes based on combretastatin A-4. *Br J Cancer.* 71(4): 705-711.

山本 龍生. (1983). 新産仔および成体ラット心室筋の電気的特性. *家畜の心電図.* 6: 21-30.

Yeh ET, Bickford CL. (2009). Cardiovascular complications of cancer therapy: incidence, pathogenesis, diagnosis, and management. *J Am Coll Cardiol.* 53: 2231-2247.

Yoshida T, Ozawa Y, Kimura T, Sato Y, Kuznetsov G, Xu S, Uesugi M, Agoulnik S, Taylor N, Funahashi Y, Matsui J. (2014). Eribulin mesilate suppresses experimental metastasis of breast cancer cells by reversing phenotype from epithelial-mesenchymal transition (EMT) to mesenchymal-epithelial transition (MET) states. *Br J Cancer.* 110(6): 1497-1505.