

Google translation/AEIC trial

The Journal of Toxicological Sciences Vol. 44(2019) No. 12 December

Original Article

[The amino acid derivative reactivity assay with fluorescence detection and its application to multi-constituent substances](#)

Sayaka Wanibuchi, Yusuke Yamamoto, Ayako Sato, Toshihiko Kasahara, Mas ...

J. Toxicol. Sci., 2019; 44(12): 821-832

Original	Google translation
<p>The Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA) is an <i>in chemico</i> alternative to animal testing for the prediction of skin sensitization potential. Although co-elution of test chemicals and nucleophilic reagents during HPLC analysis is sometimes problematic when using the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA), it rarely occurs when using ADRA. Nevertheless, the application of either of these tests to multi-constituent substances requires nucleophilic reagents capable of selective detection. With this issue in mind, the authors developed an ADRA fluorescence detection method (ADRA-FL), which utilizes the natural fluorescence of ADRA nucleophilic reagents. In this study, we demonstrate the efficacy of ADRA-FL by testing 82 test chemicals used in the development of both DPRA and the conventional ADRA (ADRA-UV) as well as establish a threshold value for distinguishing sensitizers and non-sensitizers. Our results show that not only are depletion</p>	<p>アミノ酸誘導体反応性アッセイ (ADRA) は、皮膚感作の可能性を予測するための動物試験の化学的代替法です。HPLC 分析中の試験化学物質と求核試薬の共溶出は、直接ペプチド反応性アッセイ (DPRA) を使用すると問題になる場合がありますが、ADRA を使用する場合はほとんど発生しません。それにもかかわらず、これらの試験のいずれかを多成分物質に適用するには、選択的検出が可能な求核試薬が必要です。この問題を念頭において、著者らは、ADRA 求核試薬の自然蛍光を利用する ADRA 蛍光検出法 (ADRA-FL) を開発しました。この研究では、DPRA と従来の ADRA (ADRA-UV) の両方の開発に使用される 82 種類のテスト化学物質をテストすることにより、ADRA-FL の有効性を実証し、増感剤と非増感剤を区別するためのしきい値を確立します。我々の結果は、ADRA-FL を使用して得られた枯渇値が ADRA-UV を使用して得られたものと実質的に同一であるだけでなく、いずれの試験の閾値も 4.9%であることを示しています。さらに、ADRA-FL の多成分物質への適用性を実証するために、10 種類の非増感剤と 10 種類の増感剤のいずれかを組み合わせたテストサンプルを準備</p>

Google translation/AEIC trial

values obtained using ADRA-FL virtually identical to those obtained using ADRA-UV, the threshold value for either test is 4.9%. Additionally, in order to demonstrate the applicability of ADRA-FL to multi-constituent substances, we prepared test samples that consisted of a set of 10 non-sensitizers combined with one of 10 different sensitizers and tested each using ADRA-FL. The test results were concordant with those obtained using ADRA-UV. Also, because ADRA-FL chromatograms showed a significant decrease in multiple peaks as well as extremely stable baselines, we conclude that ADRA-FL is a highly selective and highly accurate means of quantifying nucleophilic reagents that is applicable to a wide variety of chemical substances.	し、それぞれを ADRA-FL を使用してテストしました。テスト結果は、ADRA-UV を使用して得られた結果と一致しました。また、ADRA-FL クロマトグラムは複数のピークと非常に安定したベースラインの大幅な減少を示したため、ADRA-FL は、さまざまな化学物質に適用可能な求核試薬を定量化する非常に選択的かつ高精度の手段だと結論付けています。
---	---

Original Article

[Functional modulation of liver mitochondria in lipopolysaccharide/drug co-treated rat liver injury model](#)

Koichi Arakawa, Yugo Ikeyama, Tomoyuki Sato, Masahiro Segawa, Shuichi ...

J. Toxicol. Sci., 2019; 44(12): 833-843

Original	Google translation
Drug-induced liver injury is not readily detectable using conventional animal studies during pre-clinical drug development. To address this problem, other researchers have proposed the use of co-administration of lipopolysaccharide (LPS), an endotoxin	薬物誘発性肝障害は、前臨床薬物開発中に従来の動物研究を使用して容易に検出できません。この問題に対処するために、他の研究者は、リポ多糖 (LPS)、グラム陰性細菌によって産生されるエンドトキシン、および薬物の同時投与の使用を提案しています。このアプローチを使用すると、薬物投

Google translation/AEIC trial

produced by gram-negative bacteria, and a drug. Using this approach, liver injury that is otherwise not detected following drug administration alone can be successfully identified. Previous studies have demonstrated that such injury is suppressed by heparin; therefore, the mechanism may involve coagulation-dependent ischemia. However, it has not been established how LPS-induced ischemia might sensitize hepatocytes to a potentially hepatotoxic drug. In the present study, we aimed to determine the effect of LPS-induced ischemia on liver mitochondrial function and downstream toxicologic responses. Consistent with previous findings, plasma alanine transaminase (ALT) activity was higher in rats co-administered with LPS (1 mg/kg) and diclofenac (100 mg/kg), but reduced by heparin. Liver mRNA expression of *Hmox1*, encoding heme oxygenase-1, an oxidative stress indicator, was three times higher at 2 hr after LPS administration. Furthermore, respiratory activity via mitochondrial complex II, lipid peroxidation in mitochondria, and the susceptibility to mitochondrial permeability transition pore opening in response to diclofenac administration were significantly increased by LPS administration. The increase in plasma ALT activity and the sensitization to mitochondrial permeability transition pore opening were reduced by the co-

与のみでは検出されない肝障害を特定できません。以前の研究では、このような損傷はヘパリンによって抑制されることが実証されています。したがって、このメカニズムには凝固依存性虚血が関与している可能性があります。しかし、LPS 誘発虚血が肝細胞を潜在的に肝毒性のある薬剤に感作する方法は確立されていません。本研究では、肝臓のミトコンドリア機能と下流の毒物学的応答に対する LPS 誘発虚血の影響を判断することを目的とした。以前の発見と一致して、血漿アラニントランスアミナーゼ (ALT) 活性は、LPS (1 mg/kg) およびジクロフェナク (100 mg/kg) と同時投与されたラットでより高かったが、ヘパリンにより低下した。酸化ストレス指標であるヘムオキシゲナーゼ-1 をコードする *Hmox1* の肝臓 mRNA 発現は、LPS 投与後 2 時間で 3 倍高かった。さらに、ミトコンドリア複合体 II を介した呼吸活動、ミトコンドリアの脂質過酸化、およびジクロフェナク投与に応答したミトコンドリア透過性遷移孔開口に対する感受性は、LPS 投与により有意に増加した。ヘパリンの同時投与により、血漿 ALT 活性の増加およびミトコンドリア透過性移行孔の開口に対する感作が減少した。結論として、LPS 誘発一過性虚血は呼吸鎖複合体の活動を混乱させ、特にミトコンドリアでの活性酸素種の産生を促進し、肝毒性薬を *in vivo* で試験する際にミトコンドリアを透過性移行孔の開口に感作します。

Google translation/AEIC trial

administration of heparin. In conclusion, LPS-induced transient ischemia disrupts respiratory chain complex activities, enhances reactive oxygen species production, especially in mitochondria, and sensitizes mitochondria to permeability transition pore opening when testing a potentially hepatotoxic drug *in vivo*.

Letter

[Intracellular accumulation-independent cytotoxicity of pentavalent organoantimony compounds in cultured vascular endothelial cells](#)

Takato Hara, Shihoko Nakano, Yuki Kitamura, Chika Yamamoto, Shuji Yasu ..

J. Toxicol. Sci., 2019; 44(12): 845-848

Original	Google translation
As the field of utilization of organic-inorganic hybrid molecules expands, the toxicology of these compounds is becoming more important. We have shown previously that there is a strong correlation between cytotoxicity and intracellular accumulation detected as metal content, which is modulated by the substituents, of organic-inorganic hybrid molecules. In this study, we investigated the cytotoxicity of pentavalent organoantimony compounds with three phenyl groups on cultured vascular endothelial cells. The results indicated that the cytotoxicity of pentavalent organoantimony compounds was not correlated with the hydrophobicity and intracellular accumulation of these	有機無機ハイブリッド分子の利用分野が拡大するにつれて、これらの化合物の毒物学がより重要になりつつあります。我々は以前に、細胞毒性と有機-無機ハイブリッド分子の置換基により調節される金属含有量として検出される細胞内蓄積との間に強い相関があることを示しました。本研究では、培養血管内皮細胞上の3つのフェニル基を有する五価有機アンチモン化合物の細胞毒性を調査しました。結果は、五価有機アンチモン化合物の細胞毒性がこれらの化合物の疎水性および細胞内蓄積と相関していないことを示した。したがって、疎水性と細胞内蓄積は必ずしも有機無機ハイブリッド分子の細胞毒性を予測するものではないことを示唆しています。

Google translation/AEIC trial

compounds. Therefore, we suggest that hydrophobicity and intracellular accumulation are not necessarily predictive of cytotoxicity in organic-inorganic hybrid molecules.

Letter

[Simultaneous profiling of organic and inorganic impurities in \$\alpha\$ -pyrrolidinopentiophenone \(\$\alpha\$ -PVP\)](#)

Natsumi Hattori, Asuka Kaizaki-Mitsumoto, Kyoko Hataoka, Satoshi Numaz

J. Toxicol. Sci., 2019; 44(12): 849-857

Original	Google translation
Abuse of recreational drugs (i.e., synthetic chemicals with the structure or expected neurotropic effects, or both, similar to those of controlled substances) is a serious and continuous social harm. Designer drugs are often manufactured or synthesized in small-scale clandestine laboratories with impure starting materials, poor handling skills and inferior storage conditions. Therefore, in addition to the objective compound, diverse impurities may be present, for example, from the starting material, intermediates, catalytic metals formed during chemical synthesis, and materials from the environment. Impurity profiling of drug seizures is a useful scientific tool to obtain information on the clandestine manufacturers and drug trafficking networks. 1-Phenyl-2-(1-pyrrolidinyl)-1-pentanone (α -PVP), a novel psychoactive substance of the	レクリエーションドラッグ（管理された物質と類似した構造または予測される神経向性効果、またはその両方を備えた合成化学物質）の乱用は、深刻かつ継続的な社会的害です。デザイナードラッグは、多くの場合、不純な出発材料、不十分な取り扱いスキル、劣悪な保管条件を備えた小規模の秘密研究所で製造または合成されます。したがって、目的化合物に加えて、例えば、出発物質、中間体、化学合成中に形成される触媒金属、および環境からの物質など、さまざまな不純物が存在する可能性があります。麻薬発作の不純物プロファイリングは、秘密の製造業者と麻薬取引ネットワークに関する情報を取得するための有用な科学的ツールです。1-フェニル-2-(1-ピロリジニル)-1-ペンタノン (α -PVP) は、多くの国で禁止されているカチノンタイプの新規精神活性物質であり、依然として違法薬物市場で供給および流通されています。GC-MS および ICP-MS を使用して、15 バッチの α -PVP のバルクパウダーに含まれる有

Google translation/AEIC trial

<p>cathinone type that is banned in many countries, is still supplied and distributed within the illicit drug market. By using GC-MS and ICP-MS, we identified and estimated the relative contents of organic and inorganic impurities in the bulk powder of 15 batches of α-PVP. We then conducted multivariate data analyses to reveal characteristic patterns of the profiles. Hierarchical cluster analysis of both the organic and inorganic impurities revealed two groups that showed similar impurity profiles, which suggested that the batches in these groups were synthesized in similar routes under similar synthetic environments. The initial groups revealed by the organic impurities were further divided when combined with the data from the inorganic impurities. The present study, therefore, demonstrated the effectiveness of integrated analyses of organic and inorganic impurities for the accurate clustering of designer drugs, to provide precise information to drug investigation authorities.</p>	<p>機および無機不純物の相対含有量を特定および推定しました。次に、プロファイルの特徴的なパターンを明らかにするために多変量データ分析を実施しました。有機不純物と無機不純物の両方の階層クラスター分析により、類似の不純物プロファイルを示す2つのグループが明らかになり、これらのグループのバッチは類似の合成環境下で類似のルートで合成されたことが示唆されました。有機不純物によって明らかにされた最初のグループは、無機不純物のデータと組み合わせるとさらに分割されました。したがって、本研究では、薬物調査当局に正確な情報を提供するために、デザイナー薬物の正確なクラスター化のための有機および無機不純物の統合分析の有効性を実証しました。</p>
--	--

Original Article

[Cardiac safety assessment with motion field imaging analysis of human iPS cell-derived cardiomyocytes is improved by an integrated evaluation with cardiac ion channel profiling](#)

Takehito Isobe, Masaki Honda, Ryuichi Komatsu, Mitsuyasu Tabo

J. Toxicol. Sci., 2019; 44(12): 859-870

Original	Google translation
----------	--------------------

Google translation/AEIC trial

We validated a motion field imaging (MFI) assay with human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (hiPS-CMs) as a model to assess multiple cardiac liabilities by comparing the guinea-pig Langendorff heart with hiPS-CMs using 4 reference compounds and 9 internal compounds. We investigated repolarization duration, beating rate (BR), conduction speed, contractility, and inhibitory profile of three cardiac ion channels: hERG, Cav1.2, and Nav1.5. For repolarization, the contraction-relaxation duration (CRDc) of hiPS-CMs was generally consistent with the QTc interval of Langendorff heart. However, 2 internal compounds shortened CRDc despite QTc prolongation in Langendorff heart. Cardiac ion channel profiling revealed that hiPS-CMs could not be used to detect QTc prolongation when the value of Cav1.2 IC₅₀ / hERG IC₅₀ for a compound was between 1 and 10, whereas hiPS-CMs showed responses largely consistent with Langendorff heart when Cav1.2 IC₅₀ / hERG IC₅₀ was below 1 or above 10. The accuracy of hiPS-CMs for the BR was not high, mainly because the BR of hiPS-CMs was increased by an inhibition of Cav1.2. The hiPS-CMs were highly sensitive to conduction speed and contractility, able to detect QRS widening caused by Nav1.5-inhibition, as well as decreased LVdP/dt_{max} caused by the inhibition of

モルモットのランゲンドルフ心臓と hiPS-CM を 4 つの参照化合物と 9 を使用して比較することにより、複数の心臓の負債を評価するモデルとして、ヒト誘導多能性幹細胞由来心筋細胞 (hiPS-CM) を用いたモーションフィールドイメージング (MFI) アッセイを検証内部化合物。3 つの心臓イオンチャネル: hERG、Cav1.2、および Nav1.5 の再分極期間、拍動速度 (BR)、伝導速度、収縮性、および抑制プロファイルを調査しました。再分極の場合、hiPS-CM の収縮緩和時間 (CRDc) は、ランゲンドルフ心臓の QTc 間隔とほぼ一致していました。ただし、2 つの内部化合物は、ランゲンドルフ心臓の QTc 延長にもかかわらず CRDc を短縮しました。心臓イオンチャネルプロファイリングにより、化合物の Cav1.2 IC₅₀ / hERG IC₅₀ の値が 1 から 10 の場合、hiPS-CMs を使用して QTc 延長を検出できないことが明らかになりましたが、hiPS-CMs は Cav1.2 IC₅₀ / hERG IC₅₀ は 1 未満または 10 を超えていた。主に hiPS-CM の BR が Cav1.2 の障害により増加したため、BR の hiPS-CM の精度は高くなかった。hiPS-CM は伝導速度と収縮性に非常に敏感で、Nav1.5 障害による QRS の広がり、および Cav1.2 および / または Nav1.5 の障害による LVdP / dt_{max} の減少を検出できました。結論として、hiPS-CM を使用した MFI アッセイは、複数の心臓の負債を評価するのに役立ちます。イオンチャネルプロファイルは、MFI アッセイの結果を解釈し、心臓のリスクを正しく評価するのに役立ちます。そのため、MFI とイオンチャネルプロファイリングを備えた統合された心臓安全性評価が推奨されま

Google translation/AEIC trial

<p>Cav1.2 and/or Nav1.5. In conclusion, the MFI assay with hiPS-CMs would be useful for evaluating multiple cardiac liabilities. The ion channel profile helps to interpret the results of MFI assay and correctly evaluate cardiac risks. Therefore, an integrated cardiac safety assessment with MFI and ion channel profiling is recommended.</p>	
--	--

Letter

[In vitro genotoxicity analyses of colibactin-producing *E. coli* isolated from a Japanese colorectal cancer patient](#)

Masanobu Kawanishi, Yuuta Hisatomi, Yoshimitsu Oda, Chiaki Shimohara,

J. Toxicol. Sci., 2019; 44(12): 871-876

Original	Google translation
<p>Colibactin is a polyketide-peptide genotoxin produced by enteric bacteria such as <i>E. coli</i>, and is considered to contribute to the development of colorectal cancer. We previously isolated <i>E. coli</i> strains from Japanese colorectal cancer patients, and in the present study we investigated the genotoxic potency of the colibactin-producing (<i>clb</i>⁺) <i>E. coli</i> strains that carry the polyketide synthases “<i>pks</i>” gene cluster (<i>pks</i>⁺) and an isogenic <i>clb</i>⁻ mutant in which the colibactin-producing ability is impaired. Measurement of phosphorylated histone H2AX indicated that DNA double strand breaks were induced in mammalian CHO AA8 cells infected with the <i>clb</i>⁺ <i>E. coli</i> strains. Induction of DNA damage</p>	<p>コリバクチンは、大腸菌などの腸内細菌によって産生されるポリケチドペプチドのジェノトキシンであり、結腸直腸癌の発症に寄与すると考えられています。以前に日本人の結腸直腸癌患者から大腸菌株を分離し、本研究では、ポリケチドシンターゼ「<i>pks</i>」遺伝子クラスター (<i>pks</i>⁺) を含むコリバクチン産生 (<i>clb</i>⁺) 大腸菌株の遺伝毒性効力を調査しました。コリバクチン産生能力が損なわれている同質遺伝子の <i>clb</i>-変異体。リン酸化ヒストン H2AX の測定により、<i>clb</i>⁺大腸菌株に感染した哺乳類 CHO AA8 細胞で DNA 二本鎖切断が誘導されたことが示されました。<i>clb</i>⁺株の粗抽出物による DNA 損傷応答 (SOS 応答) の誘導は、<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535 / pSK1002 テスター株を用いた <i>umu</i> アッセイにおける <i>clb</i>⁻ <i>E. coli</i> の 1.7 倍でした。CHO AA8</p>

Google translation/AEIC trial

response (SOS response) by crude extract of the *clb*⁺ strains was 1.7 times higher than that of the *clb*⁻ *E. coli* in an *umu* assay with a *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 tester strain. Micronucleus test with CHO AA8 cells revealed that infection with the *clb*⁺ strains induced genotoxicity, *i.e.*, the frequencies of micronucleated cells infected with *clb*⁺ strain were 4–6 times higher than with the *clb*⁻ strain. Since the intestinal flora are affected by dietary habits that are strongly associated with ethnicity, these data may contribute to both risk evaluation and prevention of colorectal cancer in the Japanese population.

細胞を用いた小核試験により、*clb*⁺株の感染は遺伝毒性を誘発した、すなわち *clb*⁺株に感染した小核細胞の頻度は *clb*⁻株よりも4~6倍高いことが明らかになりました。腸内細菌叢は、民族性に強く関連する食習慣の影響を受けるため、これらのデータは、日本人集団のリスク評価と結腸直腸癌の予防の両方に寄与する可能性があります。