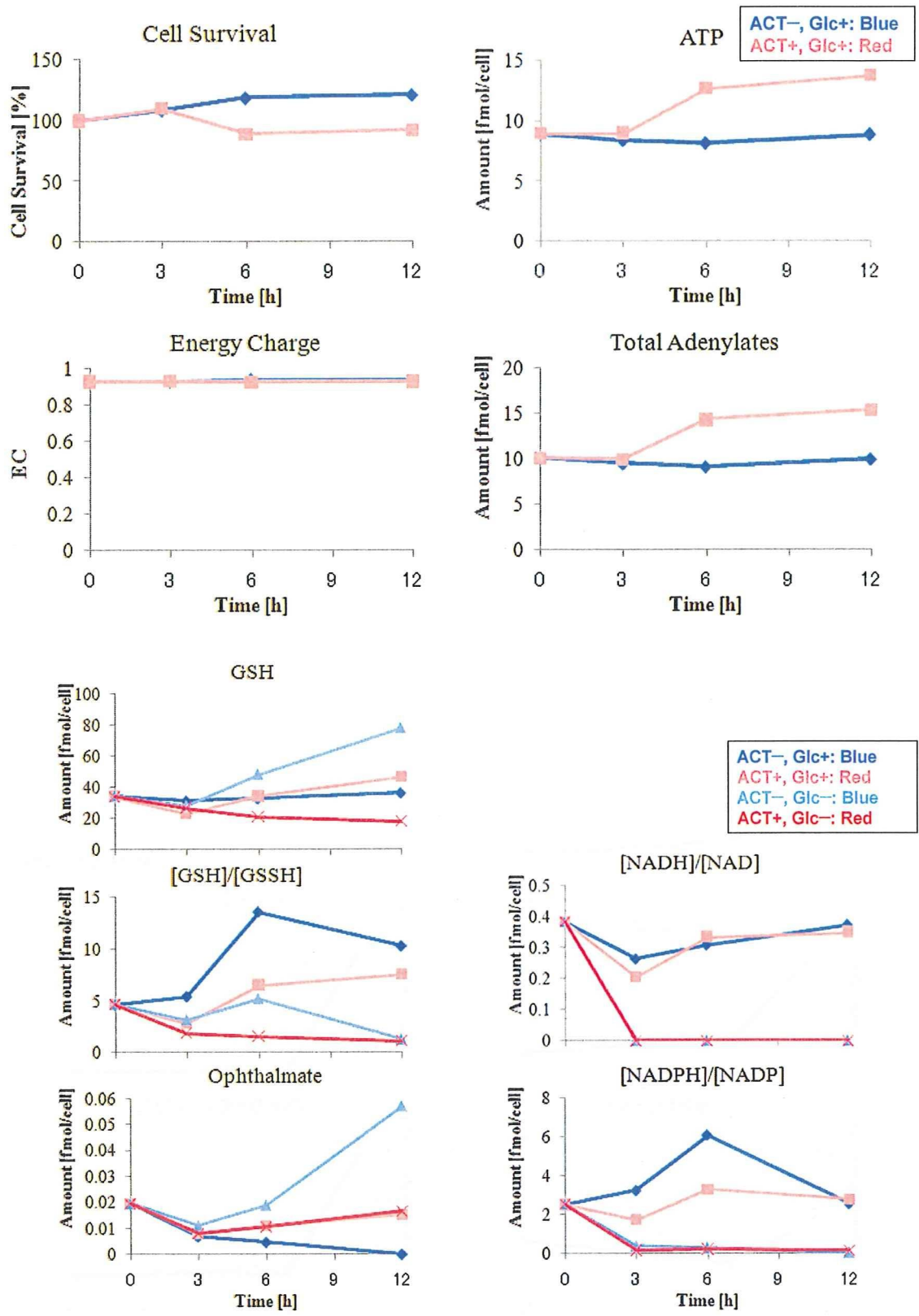
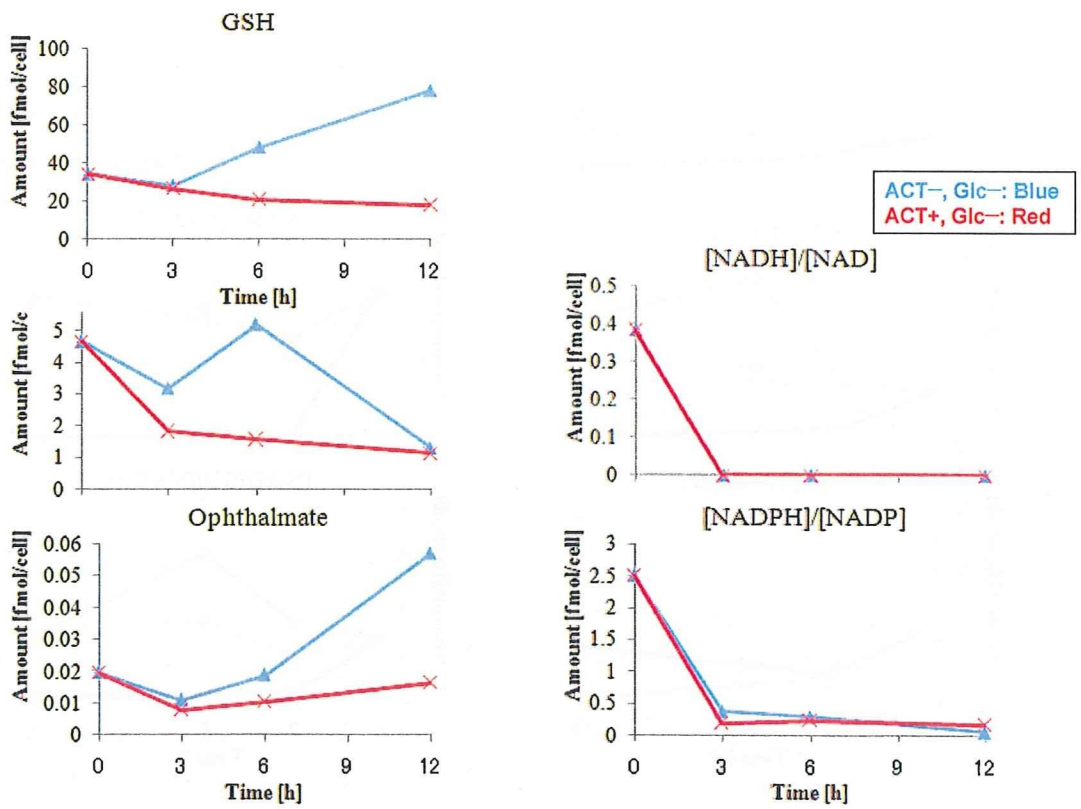
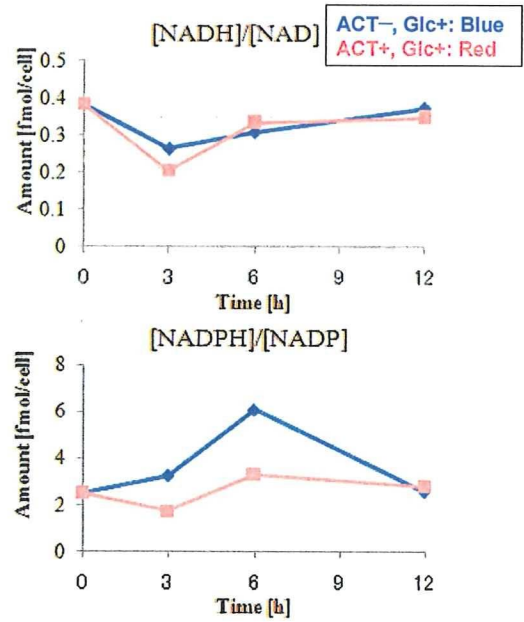
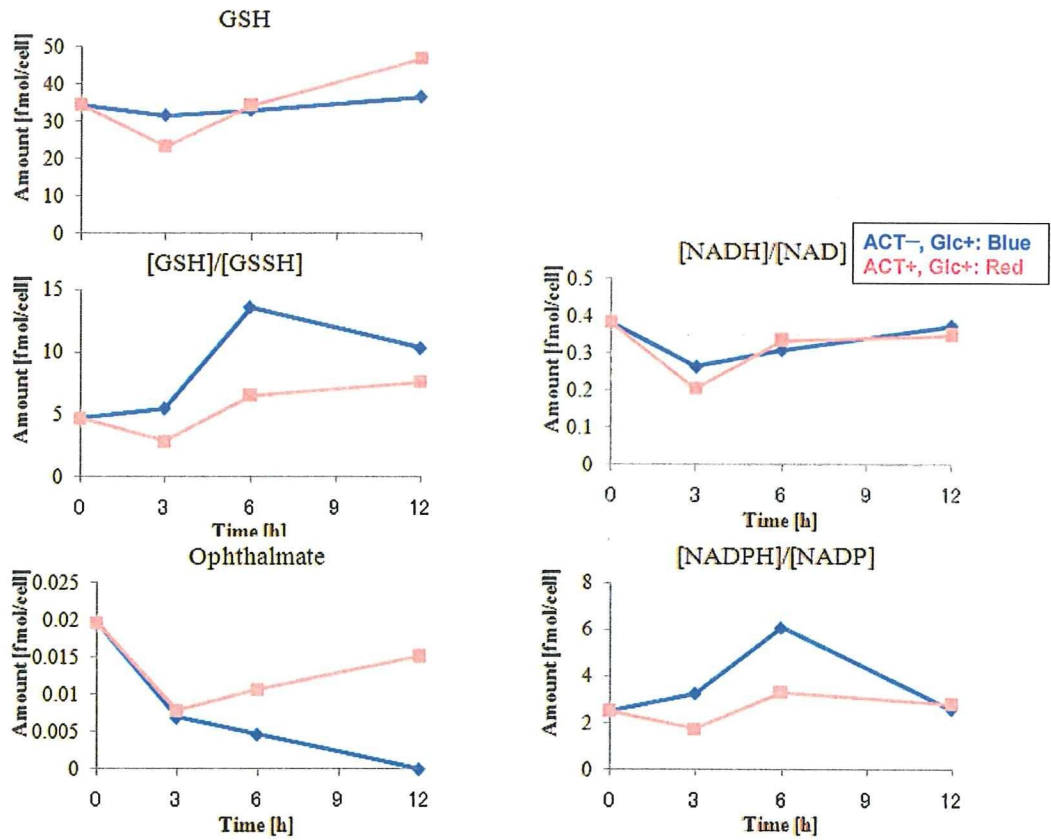


補足資料図 1-1 HepG2 細胞へ APAP を投与した時の生細胞数および代謝物質の経時変化



補足資料図 1-2 HepG2 細胞へ APAP を投与した時の生細胞数および代謝物質の経時変化



補足資料図 1-3 HepG2 細胞へ APAP を投与した時の生細胞数および代謝物質の経時変化

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

メタボローム解析およびバイオマーカーを用いた化学物質の  
有害性評価手法の開発に関する研究

平成 21 年度 総括研究報告書

研究代表者 曾我 朋義 (慶應義塾大学環境情報学部)

平成 22 年 4 月

## 目次

### I. 総括研究報告書

|   |    |
|---|----|
| メタボローム解析およびバイオマーカーを用いた化学物質の有害性<br>評価手法の開発に関する研究 ..... | 59 |
|---|----|

### II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 91

### III. 研究成果の刊行物・別刷

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
総括研究報告書

メタボローム解析およびバイオマーカーを用いた化学物質の  
有害性評価手法の開発に関する研究

研究代表者 曾我 朋義 慶應義塾大学先端生命科学研究所 教授

研究要旨

メタボローム測定法を用いた化学物質の酸化活性毒性評価のための新規バイオマーカー探索や、新たな毒性予測システムの開発・構築を行った。脂溶性化学物質あるいはその代謝物が親電子毒性を示すことを、迅速に探索する評価システムの開発に取り組み、 $\gamma$ -Glu ペプチド類が有意に増加すれば、マウスに投与した化学物質が親電子毒性であることを示すシステムの基盤技術を確立した。また、動物試験に替わる *in vitro* 試験系として、ヒト肝培養細胞を用いた薬剤の評価系を構築し、メタボローム解析を適用した新たな薬剤毒性評価バイオマーカー探索を行い、これまでに報告の無い新規の毒性評価マーカーになりうる代謝物の同定に成功した。

A. 研究目的

化学物質は人類に多くの恩恵を提供するが、一部は生命体に予期せぬ被害をもたらす。体内に取り込まれた化学物質の多くは肝臓で解毒的に代謝され、易溶性の代謝物となって排泄される。しかし、数万種類ともいわれる化学物質およびそれらの代謝物の毒性を確認できる評価手法は未だ確立されておらず、そのリスク評価システムの早急な構築が望まれる。本研究では、化学物質の中で親電子毒性（酸化活性毒性）を持つ化合物を探索するリスク評価システムを開発する。

化学物質自体あるいは代謝で生じた物質が親電子性を持つ場合は生体に毒性を示すが、細胞に高濃度に存在するグルタチオンの抱合によって、おもに親電子性物質の解毒、排泄は行われる。しかし

グルタチオンが枯渇すると親電子性物質はタンパク質などの生体高分子と反応し細胞の機能を攪乱させ、様々な病態を惹起する。

研究代表者は、世界に先駆けてキャピラリー電気泳動-質量分析計（CE-MS）によるメタボローム測定法を開発し、解熱鎮痛剤であるアセトアミノフェン（APAP）の代謝で生じた親電子性物質 N-アセチル-*p*-ベンゾキノニン（NAPQI）を解毒するために肝臓のグルタチオンが枯渇することを見出した。また、この時にオフタルミン酸が肝臓および血中で増加すること、さらにその機序を解明した。つまり化学物質投与によって肝臓および血中のオフタルミン酸が増加すれば、投与化合物か代謝で生じた物質が酸化活性である可能性が高いことを突き止めた。

また平成 19 年度の本研究課題によって、親電子物質の解毒ためにグルタチオンが消費される際に、 $\gamma$ -Glu-X、 $\gamma$ -Glu-X-Gly (X:アミノ酸) 等ペプチド類が生合成されることも明らかにし、オフタルミン酸( $\gamma$ -Glu-2-Aminobutyl-Gly)を含めた $\gamma$ -Glu ペプチド類は、投与物質あるいはその代謝物が親電子毒性を持つことを示すバイオマーカーであることを発見した。

平成 20 年度に、その物質自身か代謝物が電子性を持つ acetaminophen (APAP)、diethylmalate (DEM), suforaphane 等の親水性化学物質をマウスに腹腔内投与したところ、予想通り肝臓内の $\gamma$ -Glu ペプチド類の濃度が有意に増加し、このバイオマーカーによって親電子毒性を持つ物質を測定できることを立証した。しかし、脂溶性化合物に関しては、腹腔内に投与するための肝毒性を示さない溶媒を見つけることができなかった。

現在投与されている医薬品の多くは、脂溶性化合物であるため、平成 21 年度は、脂溶性物質自体あるいは代謝で生じた物質が親電子毒性であることを示す方法論の開発を行った。

現在、数万種類存在するといわれる化学物質の毒性を確認できる評価手法は未だ確立されておらず、様々な毒性物質に対して、バイオマーカーによる正確で迅速な評価法を開発し、化学物質の毒性情報を提供すれば、国民の健康と環境への被害を未然に防ぐことが可能になる。

## B. 研究方法

### 1) 経口投与方法および $\gamma$ -Glu ペプチドバイオマーカーによる脂溶性化学物質

#### の親電子毒性評価システムの確立

化学物質をマウスに投与し、 $\gamma$ -Glu ペプチドバイオマーカーの濃度の増減から、投与した化学物質あるいは代謝で生じた物質が親電子物質であるか予測する方法を検討する。

経口投与する化学物質の量、経口投与後に肝臓から代謝物を抽出する時間を検討し、 $\gamma$ -Glu ペプチドバイオマーカーによる脂溶性化学物質の親電子毒性の測定法を開発する。

### 2-1) 培養細胞を用いた化学物質の *in vitro* 親電子毒性評価法の開発

動物を用いた毒性試験の代替法として培養細胞を用いたバイオマーカーの開発に取り組んだ。下記4種類の培養細胞系に、反応性代謝物による肝毒性が知られる化合物を曝露し、細胞毒性評価試験を行った。具体的には、WST-8 あるいは SRB 法を用いて細胞生存性を数値的に評価し、加えて顕微鏡による形態観察を行うことでメタボローム解析に適したアッセイ系の選択を行った。

#### 【肝培養細胞法】

##### ① ハムスター肝スライス法

#### 手法概要

ハムスターの肝臓から Tissue Corning Press を用いて直径 8 mm の円柱状組織片を作製した。肝スライスを 1 時間のプレインキュベーションの後、薬物曝露試験を行った(1-3hr)。細胞障害は LDH Cytotoxicity Detection Kit を使用して薬物曝露用インキュベーション溶液中の LDH 量を測定することで評価した。また肝スライス中の総グルタチオン量を

測定した。

## ② ラット肝初代培養法（浮遊培養）

### 手法概要

ラットの肝臓を Liver Digest Medium にて灌流し、肝臓を摘出後、Hepatocyte Wash Medium 中で細胞を分散させ細胞懸濁液を調製した。フィルターにより濾過し遠心分離の後、得られた沈渣に Hepatocyte Wash Medium を添加し、よく懸濁した後、再び遠心分離し調製した細胞懸濁液を 50  $\mu$ L ( $1 \times 10^4$  cells/well) ずつ 96 ウェルプレートに播種した。CO<sub>2</sub> インキュベーター(37° C, 5% CO<sub>2</sub> 存在下) 内で 10 分間静置した後、薬物含有培地を添加し 3 時間インキュベーションした。細胞生存率は WST-8 法を用いて試験を行った。WST-8 は細胞内脱水素酵素により還元され formazan を生成する。formazan の吸光度 (450 nm) を測定することで、生細胞数を測定できる。またグルタチオン測定キットを用いて細胞内 GSH の測定を行った。

## ③ HuH-7（ヒト肝培養細胞）

### 手法概要

HuH-7 細胞を 96 穴プレートに 40,000 cells/well、若しくは 80,000 cells/well で播き 2% FBS DMEM で 1 日間培養後、被検物質を添加し各時間処理後に細胞毒性評価を行った。WST-8 は被験物質溶解した細胞培養液に交換し各時間処理後に細胞毒性評価を行い、薬剤処理終了の 3 時間前に添加し、吸光度 (450 nm) を測定した。また顕微鏡による細胞形態観察によって、細胞における被験物質の細胞毒性を評価した。グルタチオン測定キッ

トを用いて細胞内 GSH の測定を行った。

## ④ HepaRG（ヒト肝培養細胞）

### 手法概要

HepaRG 細胞は、株式会社 KAC から購入し、納品日に培養液を Recovery and Tox Medium (100  $\mu$ L/well) に交換し 2 日間培養後、Maintenance and Metabolism Medium (100  $\mu$ L/well) で培養維持した細胞を使用した。培養は 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で行った。細胞生存率は SRB 法を用いて試験を行った。各 well から細胞培養液を除いた後、PBS 200 $\mu$ L で 1 回洗浄した。10%トリクロロ酢酸 200 $\mu$ L を分注し、4°C で 30 分間から 1 時間静置して細胞を固定した。10%トリクロロ酢酸を除去した後、水道水で 5 回洗浄した。4% Sulforhodamine B (SRB) 50 $\mu$ L を分注し室温で 30 分間細胞を染色した。4% Sulforhodamine B を除去した後、1%酢酸で 5 回洗浄した。Well 内の水分を完全に除去した後、10 mM Trizma base (unbuffered) を 200 $\mu$ L ずつ加え、室温で 30 分間放置し SRB 色素を溶出させ、吸光度 (540 nm) を測定した。また顕微鏡による細胞形態観察によって、細胞における被験物質の細胞毒性を評価した。グルタチオン測定キットを用いて細胞内 GSH の測定を行った。

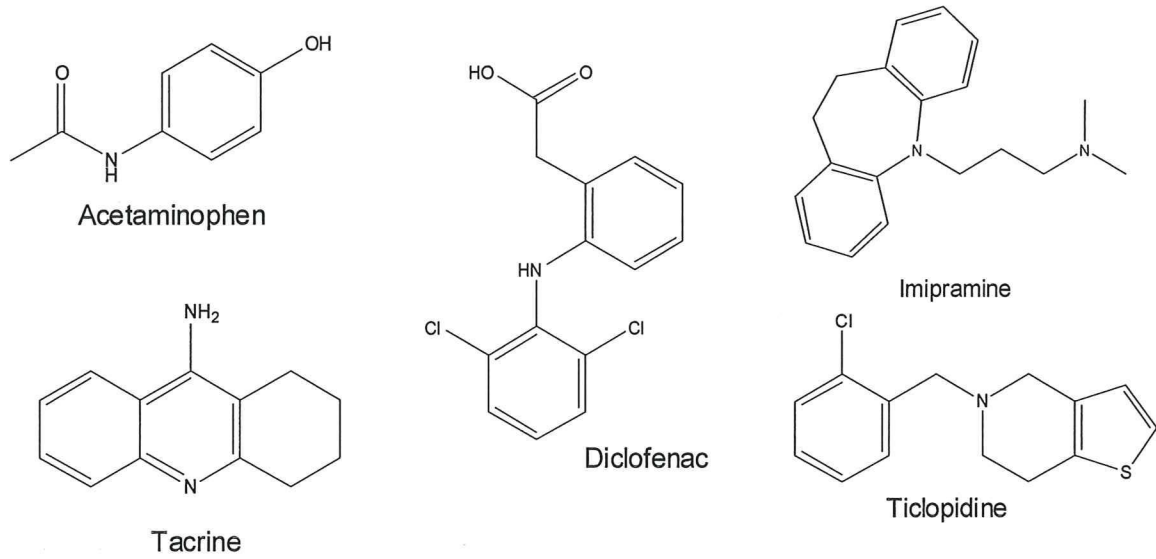
## 2-2) 培養細胞を用いたメタボローム解析による毒性評価マーカー探索

各培養細胞試験系において APAP を曝露し、濃度依存的・時間依存的に細胞障害を確認できた場合には他の肝障害が報告されている薬剤も同様に曝露し、CE-TOFMS によるメタボローム解析を

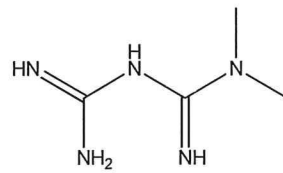


行った。細胞内代謝物は  $5 \times 10^6$ - $1 \times 10^6$  個の細胞から抽出した。サンプリングは、試験 2-1 より GSH の低下がみられ（おおよそ 50-60%）、且つ細胞生存率の低

下が極力抑えられている薬剤濃度・曝露時間を設定し、代謝物回収を行った（図 2）。



a) 肝毒性の報告がある物質



Metformin

b) ネガティブコントロール

図1. 培養細胞での毒性試験に用いた薬剤

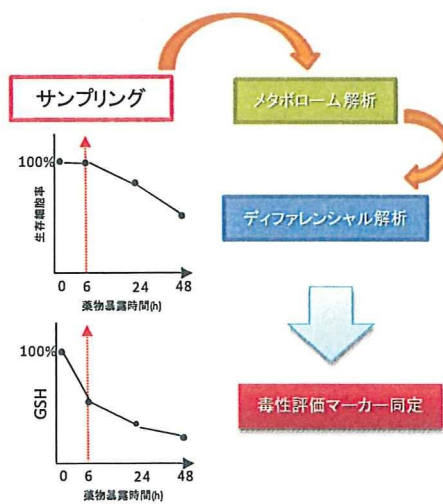


図2. 培養細胞を用いたメタボローム解析の流れ

## C. 研究結果

### 1) 経口投与方法および $\gamma$ -Glu ペプチドバイオマーカーによる脂溶性化学物質の親電子毒性評価システムの確立

脂溶性化学物質を溶解し、かつ肝毒性を示さない腹腔内投与を可能にする溶媒を見い出すことができなかった。そこで脂溶性化学物質を分散させて経口投与する方法を検討した。代謝物質が親電子物質になる Sulfamethoxazole, Metronidazole, Clozapine, 5-Aminosalicylic acid, APAP, それ自体が親電子物質である Sulforaphene, 肝毒性を示す Diclofenac に対して, 分散剤に使われるベニ花油、20% Hydroxy-propyl  $\beta$ -cyclodextrin, 0.5% Methylcellulose 400 を用いて、各化学物質が溶解あるいは分散するか確かめた。その結果、0.5% Methylcellulose (MC)400 のみが、全ての化学物質を溶解あるいは分散したため、この試薬を分散溶媒に用いることに決定した。

次に①0.5% MC400 水溶液(control)、②300mg/ml APAP-0.5%MC400 水溶液、③480 mg/ml- Metronidazole-0.5%MC400 水溶液、④12mg/ml Diclofenac-0.5% MC400 水溶液をマウスに経口投与後、1,2,4,8 時間後に肝臓中の  $\gamma$ -Glu ペプチド類を含む代謝物質を一斉に測定した。APAP 投与マウスは、幾つかの  $\gamma$ -Glu ペプチド類が 2,4 時間後に急増し、Metronidazole は、一部の  $\gamma$ -Glu ペプチド類が 4 時間後に急増した(図 3)。しかし、Diclofenac に関しては、大きな変動は観察されなかったため、①各化学物質の投与量と②化学物質投与後に肝毒性が現れる時間について詳細に検討した。①に関しては各種の量を投与後、GOT、GPT、 $\gamma$ -GTP の肝障害を示す血液中の生化学値を測定した結果、マウスの経口の半数致死量である LD<sub>50</sub> 値が多く化学物質で最適であることが判明した。しかし、投与後肝障害が現れる時間は化学物質によってバラツキがあることが判明した。

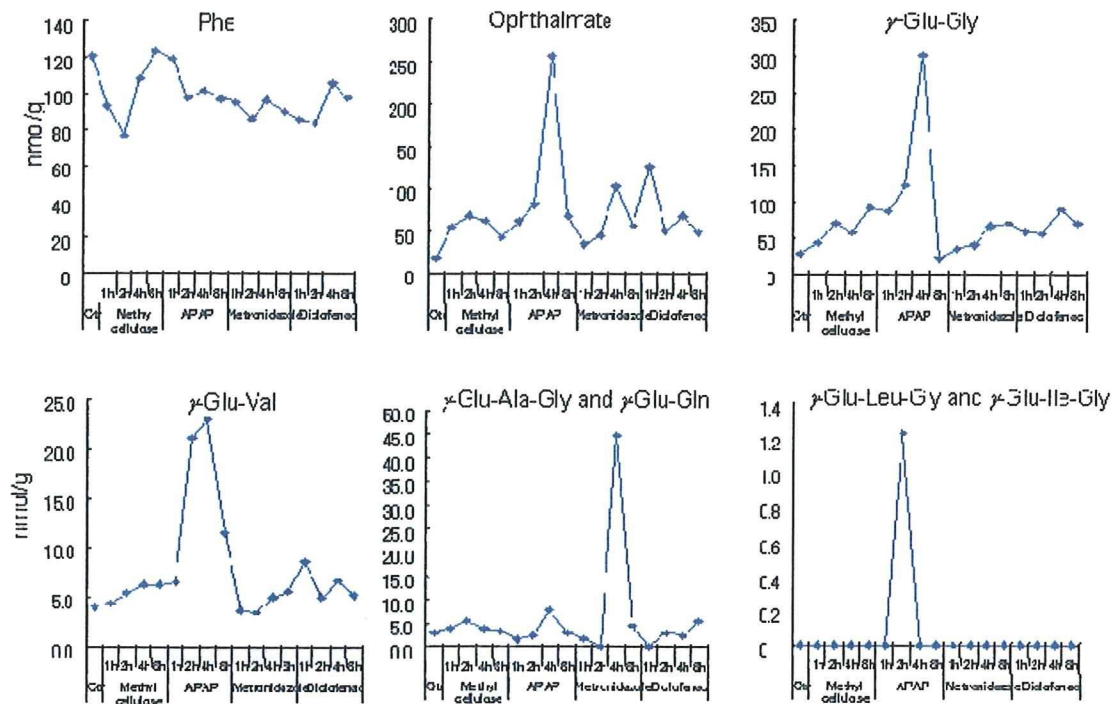


図3. 各化学物質を経口投与後のマウス肝臓中の代謝物量.

Pheなどのほとんどの代謝物で大きな変化は無かったが、一部の $\gamma$ -Gluペプチド類がAPAP投与2,4時間後、Metronidazole投与4時間後に急増し、APAPとMetronidazoleが親電子性物質を生成することを本法により示すことができた。

2-1) 培養細胞を用いた化学物質のin vitro毒性評価法の開発

① ハムスター肝スライス法  
細胞毒性試験

肝スライスに APAP を曝露し、GSH を測定し細胞毒性を評価した(図 4, 5)。10mM APAP、1 時間後の GSH の減少が

見られたが、時間依存的な変化が確認できなかった。またインキュベーション溶液中に放出された LDH 量についても測定した。その結果、APAP 非曝露肝スライスに比べ、10mM APAP 曝露肝スライスの培地の方が、LDH 放出量が低い結果となった。

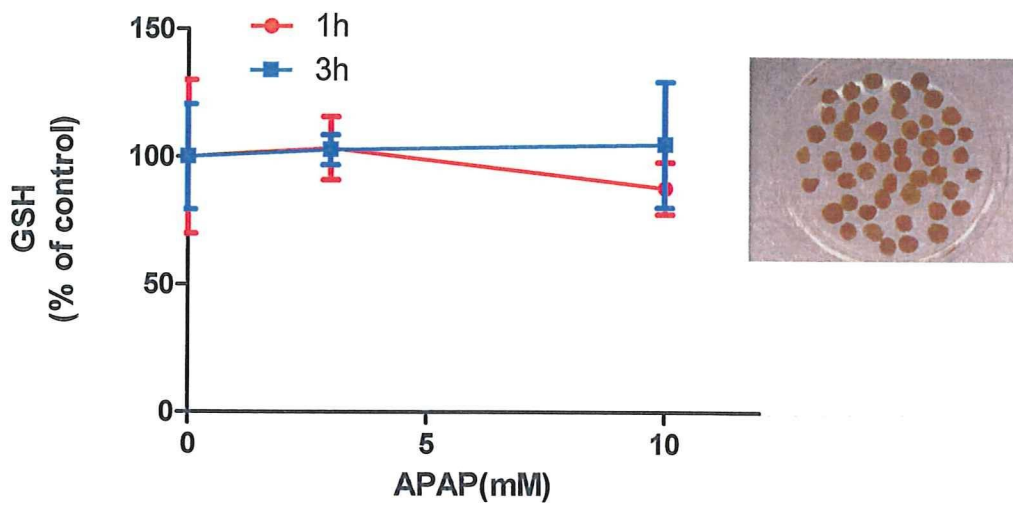


図 4. ゴールデンハムスター肝スライス培養を用いた APAP 添加後の GSH 量の変化

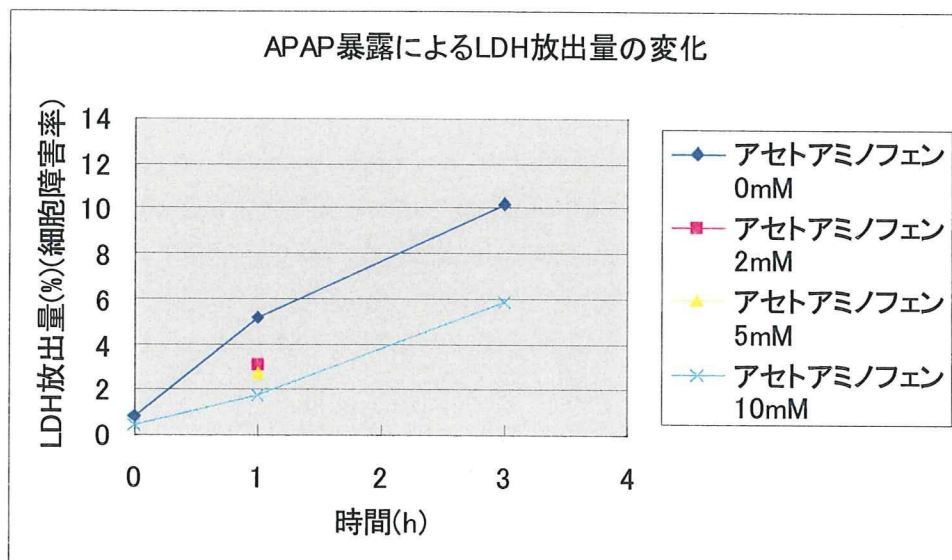


図 5. ゴールデンハムスター肝スライス培養を用いた APAP 添加後の培養液中の LDH 量の測定

② ラット肝初代培養法 (浮遊培養)  
細胞毒性試験

肝臓より肝実質細胞を単離後、APAP(3, 10, 30mM)と Diclofenac(0.1, 0.3, 1.0mM)による毒性試験を行った。3 時間以降の培養は生存性や代謝活性が減少してしまうため、すべて3時間の曝露時間にて毒性試験を行った(図 6,7)。10mM APAP では、細胞死を伴わず GSH の減少(60%)が確認された。また 0.3mM Diclofenac でも同様に GSH の減少(65%)

が確認されたことから、この濃度設定にてメタボローム解析を行った。

メタボローム解析

上記の条件にて GSH を含む 143 化合物標準品を用いた CE-TOFMS 解析を行った。約 70 種の細胞内代謝物を同定し、ディファレンシャル解析を行ったが APAP と Diclofenac に共通して 2 倍以上の変動( $p < 0.05$ ,  $n=4$ )を認める代謝物はなく、また GSH も検出感度外であった。

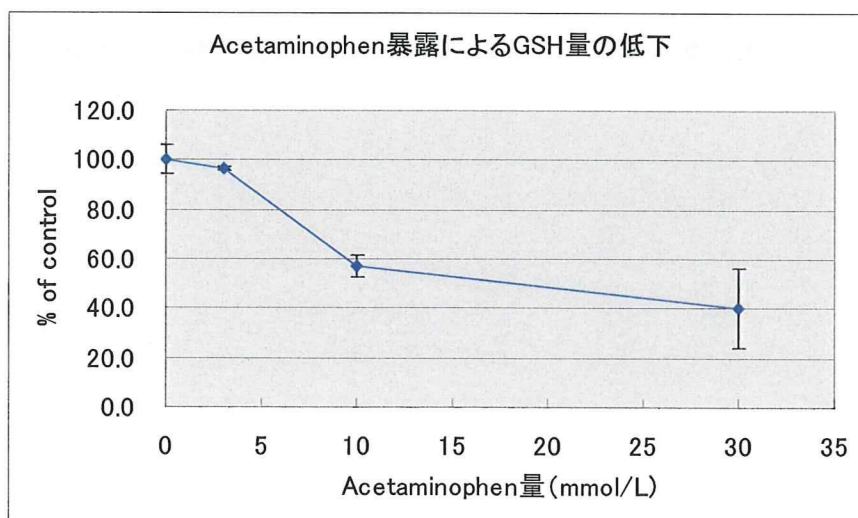
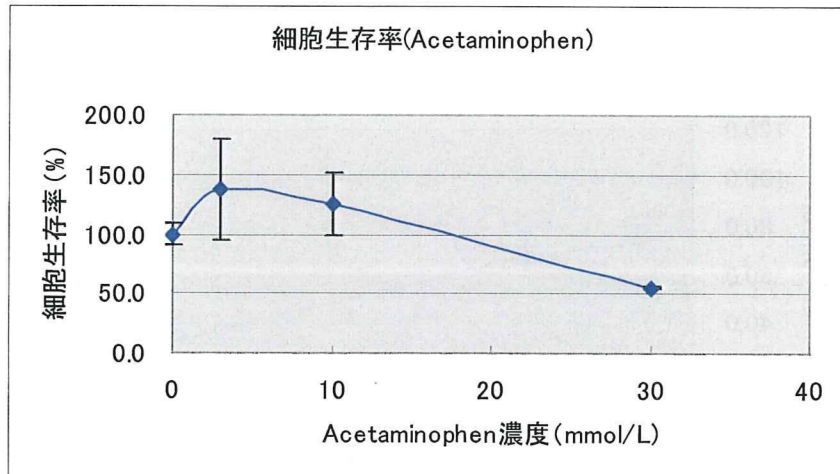


図 6. ラット肝初代培養を用いた APAP 添加後の細胞生存率と GSH 量

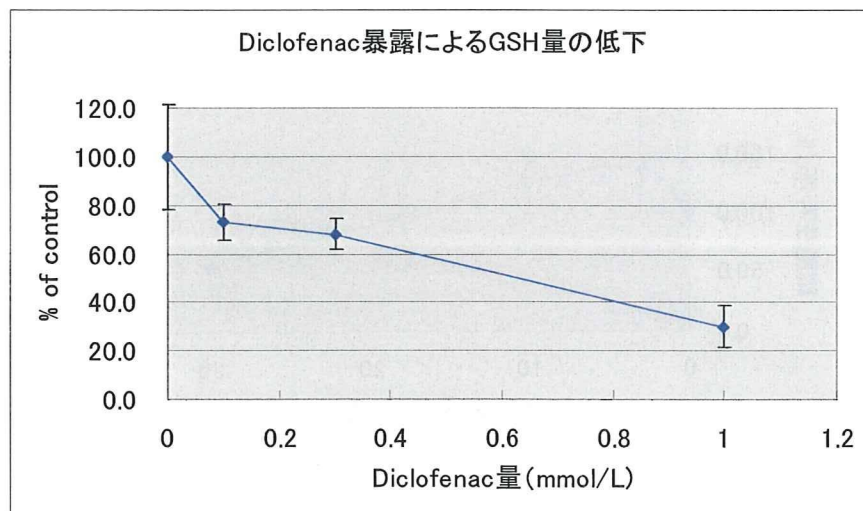
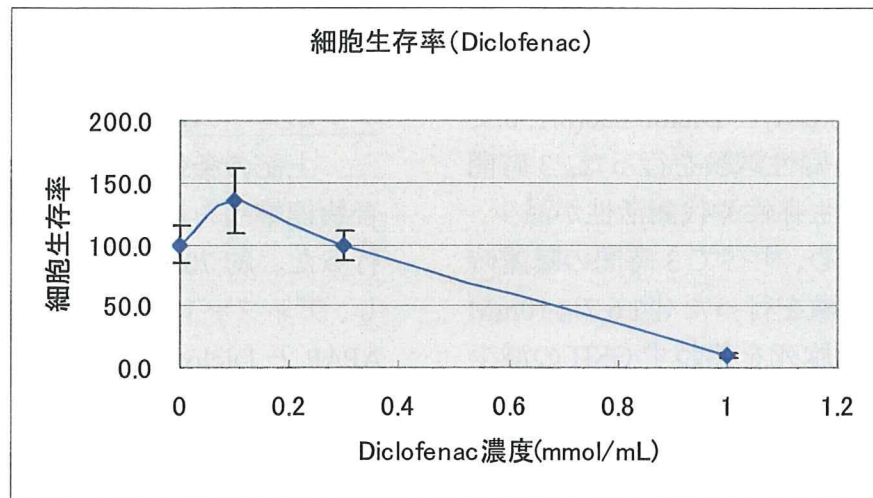


図 7. ラット肝初代培養を用いた Diclofenac 添加後の細胞生存率と GSH 量

③ HuH-7 (ヒト肝培養細胞)

Acetaminophen

細胞毒性試験

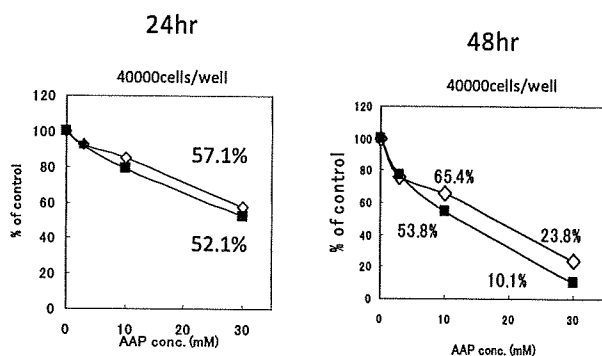
3、10、30mM APAP を添加し、6、24、48 時間後の細胞生存性を WST-8 アッセイで評価した。10 mM 以上の APAP 濃度、24 時間以上処理した細胞において細胞生存性の低下が顕著であり、細胞毒性が

認められた。30mM APAP で 24 時間処理した細胞の細胞生存性は control 細胞に対しそれぞれ 55%に低下した。

メタボローム解析サンプル

上記の結果より、細胞生存率が高い 10mM、6 時間曝露 (GSH: 61%) を条件として代謝物を回収した。

| Condition (cell density) | Acetaminophen (mM) | Mean Cell Viability (% of control) |      |      |
|--------------------------|--------------------|------------------------------------|------|------|
|                          |                    | 6hr                                | 24hr | 48hr |
| 40000cells/well          | 3                  | 107                                | 92   | 77   |
|                          | 10                 | 108                                | 79   | 54   |
|                          | 30                 | 81                                 | 52   | 10   |
| 80000cells/well          | 3                  | 101                                | 85   | 128  |
|                          | 10                 | 111                                | 78   | 104  |
|                          | 30                 | 89                                 | 57   | 27   |



| Acetaminophen (mM) | Glutathione contents (% of control) |     |      |      |
|--------------------|-------------------------------------|-----|------|------|
|                    | 3hr                                 | 6hr | 16hr | 24hr |
| 3                  | 93                                  | 103 | 100  | 139  |
| 10                 | 67                                  | 61  | 49   | 119  |
| 30                 | 60                                  | 43  | 44   | 50   |

図 8. HuH-7 細胞における Acetaminophen の細胞生存性への影響 (WST-8 アッセイ) と細胞内グルタチオン量への影響



## Diclofenac

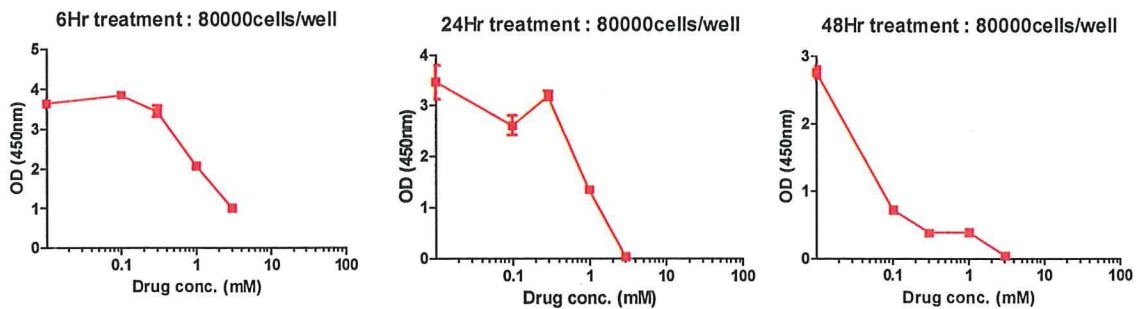
0.1、0.3、1.0、3.0mM Diclofenac を添加し、6、24、48 時間後の細胞生存性を評価した。Diclofenac は 1.0mM 以上で6 時間以上処理すると強い細胞毒性を示し、更に 48 時間処理では 0.1mM Diclofenac においても強い細胞毒性を示

した。

## メタボローム解析サンプル

上記の結果より、0.3mM、6 時間曝露 (細胞生存率: 95%, GSH: 53%) を条件として代謝物を回収した。

| Condition (cell density) | Diclofenac (mM) | Mean Cell Viability (% of control) |      |      |
|--------------------------|-----------------|------------------------------------|------|------|
|                          |                 | 6hr                                | 24hr | 48hr |
| 40000cells/well          | 0.1             | 100                                | 136  | 25   |
|                          | 0.3             | 84                                 | 94   | 95   |
|                          | 1               | 58                                 | 39   | 14   |
|                          | 3               | 28                                 | 3    | 2    |
| 80000cells/well          | 0.1             | 106                                | 76   | 26   |
|                          | 0.3             | 95                                 | 93   | 14   |
|                          | 1               | 57                                 | 39   | 14   |
|                          | 3               | 28                                 | 1    | 2    |



| Diclofenac (mM) | Glutathione contents (% of control) |     |      |      |
|-----------------|-------------------------------------|-----|------|------|
|                 | 3hr                                 | 6hr | 16hr | 24hr |
| 0.1             | 91                                  | 64  | 78   | 87   |
| 0.3             | 66                                  | 53  | 50   | 61   |
| 1.0             | 72                                  | 57  | 50   | 50   |

図9. HuH-7 細胞における Diclofenac の細胞生存性への影響 (WST-8 アッセイ) と細胞内グルタチオン量への影響

## Tacrine

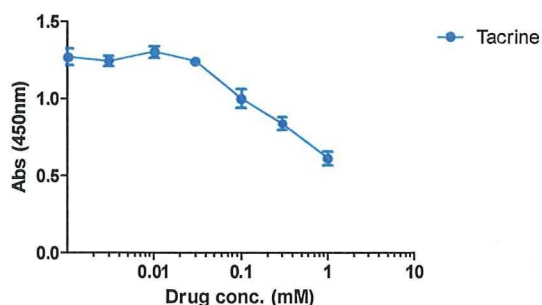
0.1、0.3、1.0、3.0mM Tacrine を添加し、6、24、48 時間後の細胞生存性を評価した。Tacrine は 0.1 mM 以上で 6 時間以上処理することで細胞毒性を示した。

## メタボローム解析サンプル

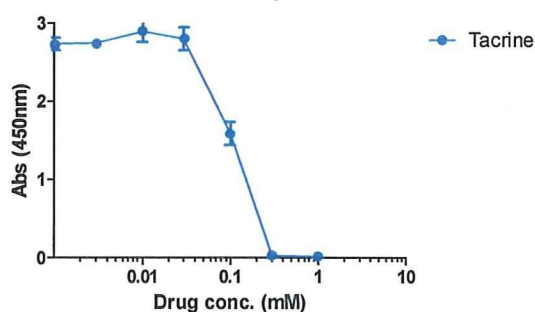
上記の結果より、0.1mM、6 時間曝露においては GSH の低下率は 29%と小さいことから、0.3mM、6 時間曝露（細胞生存率: 69%）を条件として代謝物を回収した。

| Condition<br>(cell density) | Tacrine (mM) | Mean Cell Viability (% of control) |      |      |
|-----------------------------|--------------|------------------------------------|------|------|
|                             |              | 6hr                                | 24hr | 48hr |
| 40000cells/well             | 0.1          | 76                                 | 48   | 33   |
|                             | 0.3          | 69                                 | 0    | 3    |
|                             | 1            | 45                                 | 0    | 1    |
|                             | 3            | 9                                  | 2    | 5    |
| 80000cells/well             | 0.1          | 76                                 | 76   | 37   |
|                             | 0.3          | 63                                 | 2    | 2    |
|                             | 1            | 41                                 | 4    | 2    |
|                             | 3            | 5                                  | 7    | 4    |

6Hr treatment : 2% FBS, 40000cells/well



24Hr treatment : 2% FBS, 40000cells/well



| Tacrine (mM) | Glutathione contents (% of control) |     |      |      |
|--------------|-------------------------------------|-----|------|------|
|              | 3hr                                 | 6hr | 16hr | 24hr |
| 0.003        | 84                                  | 101 | 96   | 107  |
| 0.01         | 95                                  | 97  | 101  | 93   |
| 0.03         | 90                                  | 104 | 98   | 105  |
| 0.1          | 95                                  | 71  | 74   | 62   |

図 10. HuH-7 細胞における Tacrine の細胞生存性への影響（WST-8 アッセイ）と細胞内グルタチオン量への影響

### Imipramine/ Ticlopidine

0.003-3.0mM Imipramine、0.01-10mM を添加し、6、24、48 時間後の細胞生存性を評価した。

Imipramine は 0.1mM、24 時間以上で強い毒性を示した。Ticlopidine は 0.3mM、24 時間以上の曝露で強い毒性を示した。

### メタボローム解析

Imipramine は 0.1mM、6 時間（細胞生存率: 86%、GSH: 62%）、Ticlopidine は 0.3mM、6 時間（細胞生存率: 82%、GSH: 55%）処理後の代謝物を回収した。

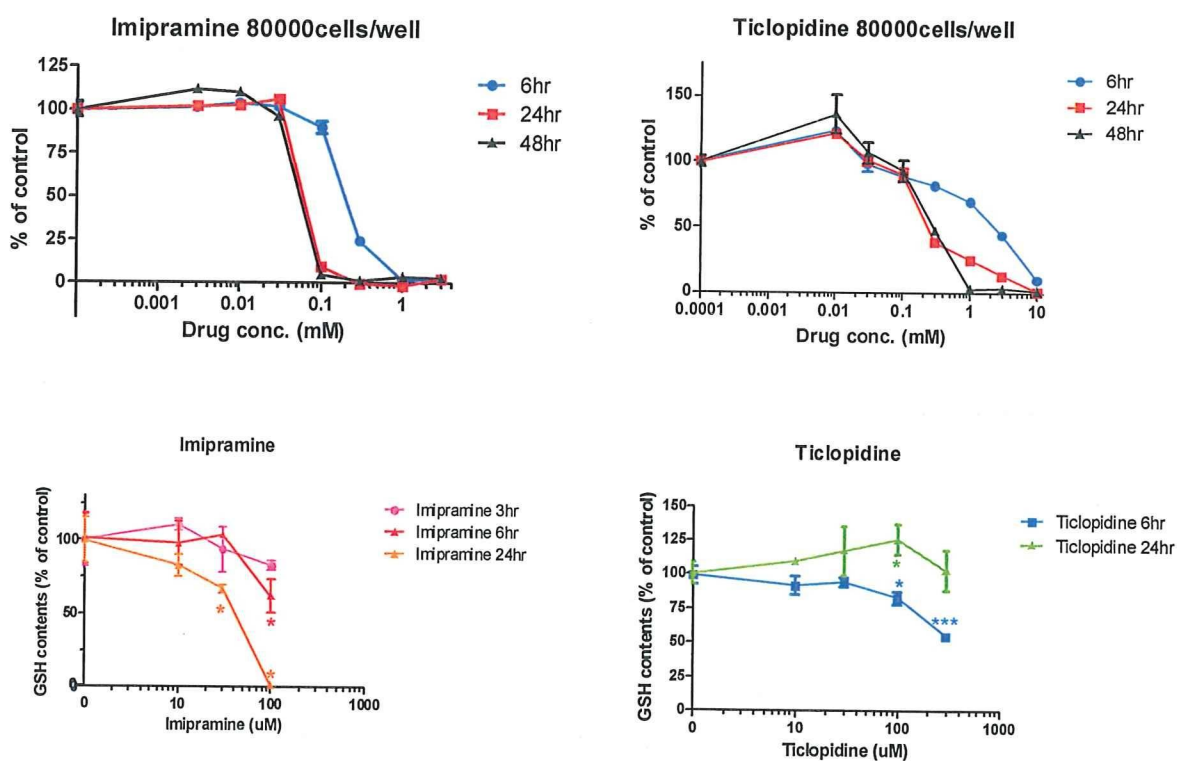


図 11. HuH-7 細胞における Imipramine と Ticlopidone の細胞生存性への影響 (WST-8 アッセイ) と細胞内グルタチオン量への影響

④ HepaRG (ヒト肝培養細胞)

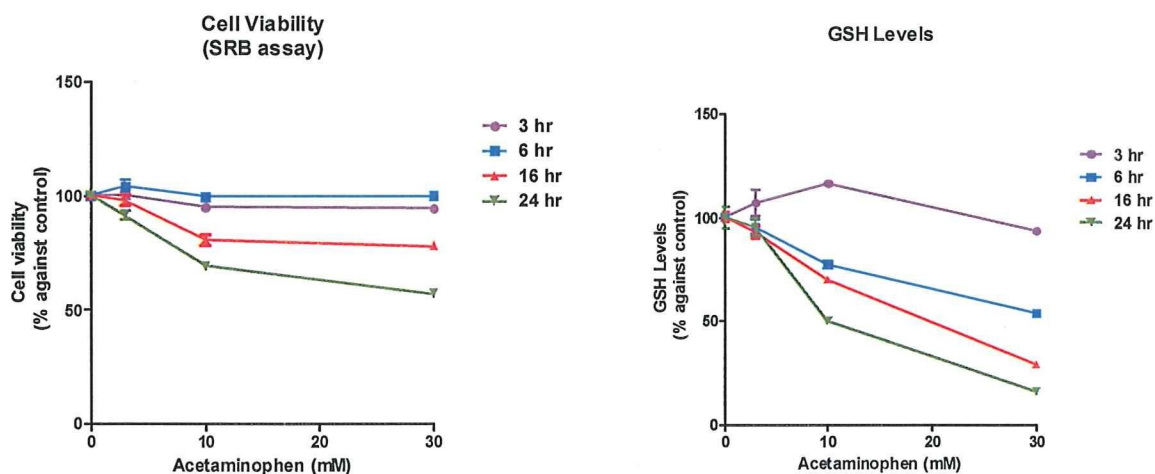
Acetaminophen

HepaRG 細胞を 3、10、30mM APAP で 3、6、16、24 時間処理し、SRB 法で細胞生存性を測定した。10mM 以上の薬物濃度で 16 時間以上処理すると細胞毒性が認められた。

メタボローム解析サンプル

30mM, 6 時間 (細胞生存率: 100%、GSH: 55%) 処理後の代謝物を回収した。

| Acetaminophen (mM) | Mean Cell Viability (% of control) |     |      |      |
|--------------------|------------------------------------|-----|------|------|
|                    | 3hr                                | 6hr | 16hr | 24hr |
| 3                  | 100                                | 104 | 98   | 91   |
| 10                 | 95                                 | 100 | 81   | 69   |
| 30                 | 94                                 | 100 | 78   | 57   |



| Acetaminophen (mM) | Glutathione contents (% of control) |     |      |      |
|--------------------|-------------------------------------|-----|------|------|
|                    | 3hr                                 | 6hr | 16hr | 24hr |
| 3                  | 107                                 | 96  | 93   | 95   |
| 10                 | 116                                 | 77  | 70   | 50   |
| 30                 | 94                                  | 54  | 29   | 16   |

図 12. HepaRG 細胞における Acetaminophen の細胞生存性への影響 (SRB アッセイ) と細胞内グルタチオン量への影響