

別紙1

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

食品中の化学物質 および 食品中の化学物質と
医薬品との相互作用による肝毒性 ならびに
発生毒性の新規評価系の構築

平成 25 年度 総括研究報告書

研究代表者 中村 和昭

平成 26 (2014) 年 5 月

目 次

| | | |
|--|-------|---|
| I . 総括研究報告 | | |
| 食品中の化学物質および食品中の化学物質と医薬品との相互作用 による肝毒性ならびに発生毒性の新規評価系の構築 中村和昭 | ----- | 1 |
| II . 研究成果の刊行に関する一覧表 | ----- | 7 |
| III . 研究成果の刊行物・別刷 | ----- | 8 |

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

総括研究報告書

食品中の化学物質および食品中の化学物質と医薬品との相互作用による

肝毒性ならびに発生毒性の新規評価系の構築

研究代表者 中村 和昭 国立成育医療センター研究所薬剤治療研究部実験薬理研究長

研究要旨

食品中の化学物質と医薬品との相互作用は、医薬品との飲み合わせの観点から医薬品相互作用と同様の基準で評価される必要がある。しかし、食品中の化学物質について、医薬品との相互作用の観点に基づいたヒトを試験対象とした実験的な検討は十分に行われていない。また、化学物質暴露に対する脆弱性の高い胎児に対する食品中の化学物質曝露による影響は不明な点が多く、食品の安全の観点から、食品中の化学物質による発生毒性を明らかにする必要がある。本研究では、肝移植手術の際に生じる摘出肝から肝細胞の単離・培養を行い、ヒト肝細胞を用いた食品中の化学物質による肝機能への影響の評価系および食品中の化学物質単独および医薬品との併用による肝細胞毒性試験系を確立し、食品と医薬品の飲み合わせにおける食品の安全性評価系を構築することを目的とする。さらに、食品中の化学物質による発生毒性の評価系と食品中の化学物質と医薬品との相互作用による発生毒性が検討可能な評価系の構築を目指す。昨年度に引き続き、本年度においても健康食品として摂取される食品中の化学物質（ヒペルフォリン、ピロバリド、ギンコリド A、ギンコリド B、ギンコリド C）による発生毒性を検討し、さらに食品中の化学物質と医薬品の相互作用を考慮し得る発生毒性評価系の構築を試み、本研究成果を他の食品中の化学物質及び医薬品に応用するための知見を得た。

A. 研究目的

食品中の化学物質と医薬品との相互作用は、医薬品との飲み合わせの観点から医薬品相互作用と同様の基準で評価される必要がある。しかし、食品中の化学物質の発がん性等に関する動物や微生物等を用いた評価は行われているものの、ヒトを試験対象とした医薬品との相互作用の観点に基づいた実験的な検討は十分に行われていない。医薬品間の相互作用は代謝過程における相互作用が重要であり、そのほとんどが薬物代謝酵素チトクロム P450（CYP）の阻害または誘導に起因する。食品中の化学物質と医薬品との相互作用も同様の機構と考えられ、食品と医薬品の相互作用により有害事象を引き起こす代表的な例として、グレープフルーツ

ジュースや西洋弟切草による CYP の阻害・誘導作用が挙げられる。医薬品間の相互作用は処方時に留意されるのに対し、食品と医薬品との相互作用は消費者の食生活に依るところが大きく、日常生活において予期せず生じる可能性が高い。服用された薬物は体内へ吸収された後、その 90%以上が肝臓の CYP により代謝されることから、食品中の化学物質による CYP 発現変動は、服用する医薬品の薬物動態を変化させ、服用した医薬品の薬効の増減、あるいは副作用の増悪を引き起こす恐れがある。従って、食品中の化学物質による健康障害の予防の観点から、食品中の化学物質による CYP 発現への影響をはじめとする肝機能の評価系が必要である。また、肝臓は薬物代謝の主要な臓

器であるため、化学物質を含む薬物毒性を最も受けやすい臓器の一つである。したがって、肝臓に対する食品中の化学物質の毒性および食品と医薬品の複合摂取による肝毒性を評価することは、食品の安全を考える上でも、重要な課題である。

一方、化学物質の曝露に対する税癩性の高い胎児においては、化学物質による催奇形性等を検討することが、健全な胎児発育を考える上で重要である。妊婦における医薬品の摂取は、胎児への催奇形性の観点から処方時に留意されているが、食品中の化学物質による妊婦・胎児への影響については実験的な検証はほとんど行われておらず、また胎児への催奇形性が認められず安全だと考えられている医薬品においても、服用の際の食品の摂取状況によっては予期せぬ有害事象が生じる可能性を否定できない。

上述の観点から、本研究では、肝移植手術の際に生じる摘出肝から肝細胞の単離・培養を行い、ヒト新鮮肝細胞を用いた食品中の化学物質による肝機能への影響の評価系および食品中の化学物質単独あるいは医薬品との併用による肝細胞毒性試験系を検討し、食品と医薬品の飲み合わせにおける食品の安全性評価系の構築を試みる。さらに、食品中の化学物質による胎児への影響を検討するため、ES細胞を用いた発生毒性試験法である Embryonic Stem Cell Test (EST 法) および肝細胞毒性試験系と EST 法との組み合わせによる、食品中の化学物質単独および医薬品との

相互作用による胎児発育への影響について評価可能な新規試験系の構築を試みる。これまでにヒト肝細胞を用いた食品中の化学物質の安全性を評価する系は確立されておらず、本研究は新規の食品安全評価系の提案を念頭に、肝移植時に得られる摘出肝からの細胞単離に始まり胎児の発育における食品安全性の評価に至る一連の研究を遂行するものである。

B. 研究方法

1) ヒト新鮮肝細胞の継続的な分離・培養・保存

国立成育医療研究センター・病院臓器移植センター及び研究所先端医療開発室と連携し、肝移植時の摘出肝からの肝細胞の分離・保存を行った。

書面による同意あるいは保護者による代諾を頂いた提供者より、国立成育医療研究センターにて行われる小児生体肝移植手術の際生じる摘出肝組織（ドナー余剰肝組織及びレシピエント肝組織）のうち、移植術に用いずまた病理検査においても不要な廃棄予定の余剰肝組織を提供いただき、肝細胞の採取を行った。生体肝移植手術で摘出されたドナー肝組織は、手術室で執刀医が移植に必要な部位を確保した後の余剰廃棄部分を研究用として用いた。一方、摘出されたレシピエント肝組織においては、病理検査に必要な処理をした後の廃棄予定の組織を研究用として用いた。提供された肝組織は、一部を凍結保存あるいは組織観察用に固定し、残りは肝細胞分離に用いた。

肝細胞単離に当たっては、肝組織切断面より門脈もしくは中心静脈を確保し、血管腔へカニューレを挿入後血管周囲とともにカニューレを結索するこ

とにより固定し、灌流路を確保した後、37℃ 保温条件下でコラゲナーゼ液にて 20 分間灌流し、組織構造を消化した。コラゲナーゼ液処理後、組織を分散し、ガーゼとナイロンメッシュにて濾過することにより大型の細胞塊を除去し、肝細胞懸濁液を得た。

2) 食品中の化学物質による発生毒性試験

イチヨウ葉エキスの成分であるピロバリド、ギンコリド A およびギンコリド C の発生毒性をマウス ES 細胞を用いた発生毒性試験法である EST 法により検討した。ES 細胞および NIH/3T3 細胞を 3.2×10^4 個/ウェルにて 96 ウェルプレートへ播種した。ピロバリド、ギンコリド A あるいはギンコリド C を添加し、10 日間培養した後、WST-8 (DOJINDO) にて ES 細胞の細胞数を定量し、薬剤非添加条件の値を 100% としたときの細胞生存率を求めた。また、ピロバリド、ギンコリド A あるいはギンコリド C 暴露条件下で hanging drop 法により ES 細胞の胚様体を作成し、10 日間培養した後、ES 細胞を回収した。回収した ES 細胞から total RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を合成した。得られた cDNA を用いて、内胚葉、中胚葉および外胚葉分化マーカー遺伝子発現量を定量 PCR 法にて検討した。

3) 食品中の化学物質と医薬品との相互作用による発生毒性試験

食品中の化学物質と医薬品との相互作用による発生毒性を検討するため、EST 法と肝細胞培養系を組み合わせた Hep-EST 法を用いて、催奇形性が知られているバルプロ酸 (VPA) 並びに西洋弟切草の活性成分であるヒペルフォリンあるいはギンコリド B との複合曝露による ES 細胞に対する細胞毒性を検討した。薬物代謝を担うヒト肝細胞と

して肝細胞株 HepG2 細胞、対照としてヒト繊維芽細胞 WI-38 細胞をミリセル 96 セルカルチャーインサートプレート (Millipore) のフィルタートレイへ 9×10^3 個/ウェル播種した。翌日、マウス ES 細胞をミリセル 96 セルカルチャーインサートプレートのレシーバートレイへ 1.25×10^3 個/ウェル播種し、HepG2 細胞あるいは WI-38 細胞とともに培養した。培地には VPA およびヒペルフォリンあるいはギンコリド B を添加し、3 日目、5 日目にそれぞれ同濃度の薬物添加培地で培地交換を行い、7 日目に WST-8 (DOJINDO) にて ES 細胞の細胞数を定量し、薬剤非添加条件の値を 100% としたときの細胞生存率を求めた。同様に成熟細胞のモデルとして NIH/3T3 細胞と HepG2 細胞あるいは WI-38 細胞との共培養を試験化合物を添加した培地にて行い、7 日目の NIH/3T3 細胞の細胞生存率を求めた。

(倫理面への配慮)

本研究実施においては、対象患者個人のプライバシーをはじめとした人権擁護を最優先とし、危険性の排除や説明と理解 (インフォームドコンセントおよびアセント) の徹底を図っている。

採取された肝組織を本研究に用いることは、国立成育医療研究センターの倫理審査委員会にて承認が得られている(「生体肝移植時に生じる余剰肝等からのヒト肝細胞の分離・培養・保存」(受付番号 385 平成 21 年 12 月 8 日承認)「ヒト肝細胞・組織を用いた創薬研究および肝疾患・病態に関する基礎研究」(受付番号 396))。本研究に用いている肝組織は国立成育医療研究センター病院臓器移植センターにおいて主治医から説明を受け同意

を得た後に提供されたドナー余剰肝およびレシピエント摘出肝であり、通常は医療廃棄物として廃棄される組織である。肝組織は国立成育医療研究センター病院にて匿名化された後に国立成育医療研究センター研究所に搬送され、肝組織の一部の保存と肝細胞分離の処理を行っている。国立成育医療研究センター研究所においては、連結可能匿名化され管理番号のみ附された検体を受け入れている。本研究は、平成10年厚生科学審議会答申が定める「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について」にも従い遂行した。

C. 研究結果

1) ヒト新鮮肝細胞の継続的な分離・培養・保存

本年度、成育医療研究センターにて実施した生体肝移植のうち、ドナー余剰肝およびレシピエント摘出肝より32例の肝検体より、肝組織の保存及び肝細胞の分離・培養・保存を行った。

2) 食品中の化学物質による発生毒性試験系の確立

ピロバリド、ギンコリドAおよびギンコリドC曝露によるES細胞に対する毒性を評価した結果、ギンコリドC曝露においては、細胞毒性は認められなかったが、ピロバリドおよびギンコリドA曝露において細胞毒性が認められ、ピロバリドにおいてはギンコリドAよりも強い細胞毒性が認められた。しかし、いずれもヒペルフォリンによる細胞毒性と比べ、その毒性は100~1000倍程度低かった。また、ピロバリドおよびギンコリドA曝露によりES細胞分化誘導過程において、内胚葉マーカー

遺伝子であるTTR (transthyretin) の発現低下が認められた。これらの結果は、ピロバリドおよびギンコリドはその毒性は低いものの、細胞毒性を有しており、また発生過程において内胚葉分化を抑制する可能性を示唆している。

3) 食品中の化学物質と医薬品との相互作用による発生毒性試験

VPA並びにヒペルフォリンあるいはギンコリドBとの複合曝露によるES細胞に対する細胞毒性を検討した結果、いずれの複合曝露においても、HepG2との共培養およびWI-38との共培養において、ES細胞に対する細胞毒性が観察された。しかし、ES細胞とHepG2細胞との共培養において、いずれの複合曝露においても、WI-38細胞との共培養と比べ細胞毒性の増悪は認められなかった。これまでの研究から、VPAは主にCYP2A6, 2B6および2C9により代謝され、活性中間体である4-en-VPAを生じることにより毒性を示すと考えられている。本研究により、ヒペルフォリンおよびピロバリドによるヒト肝細胞におけるCYP発現誘導作用を検討した結果、いずれの化学物質もCYP3A4の発現を惹起した。したがって、本研究による複合曝露の組み合わせにおいては、食品中の化学物質と医薬品との相互作用による細胞毒性の増悪は生じないと考えられたが、他の食品中の化学物質と医薬品との複合曝露に本検討を用いる有用性が示唆された。

D. 考察

「1) ヒト新鮮肝細胞の継続的な分離・培養・保存」において、手術摘出

検体より単離したヒト新鮮肝細胞を研究へ利用する体制の確立への知見が得られた。肝移植実施病院と研究機関が連携して、摘出後すぐに検体を研究に利用可能な体制を整えている国内研究機関は限られており、本研究は、今後の肝細胞を用いた研究における手術摘出検体の利用に關しての知見の蓄積に寄与するものである。ヒト肝細胞は創薬研究や毒性研究においてニーズが高く、本研究の知見を活用することにより、正常肝および疾患肝由来日本人肝細胞の研究利用に向けた体制構築が可能であると考えられる。

本年度研究成果「2）食品中の化学物質による発生毒性試験系の確立」においては、昨年度と合わせ、ヒペルフォリン、ピロバリド、ギンコリドAおよびCについて、EST法による食品中の化学物質による発生毒性の評価を行った。EST法は動物を用いない*in vitro*発生毒性試験系として注目されており、今後発生毒性の評価が必要とされる分野での活用が期待される。本研究における知見を、今後より精度の高い発生毒性評価系の構築へ応用することにより、食品中の化学物質による発生毒性試験系の構築が可能であると考えられた。

また、昨年度に引き続き、Hep-EST法を用いて、食品中の化学物質と医薬品との相互作用による発生毒性評価系の検討を行った。発生毒性を考える上では、母体による化学物質の吸収・代謝・排出等の薬物動態および胎盤移行性など様々な要因を考慮する必要がある。本研究では、薬物の薬効・副作用発現において最も重要な過程の一つである肝代謝を*in vitro*発生毒性試験系へ導入するため、Hep-EST法を考案し、

その有用性を検証した。これにより、本研究「3）食品中の化学物質との医薬品の相互作用による発生毒性試験」の成果で示したような、食品中の化学物質と医薬品との相互作用による発生毒性評価系の確立が見込まれる。本評価系を他の化学物質へ応用することで、食品中の化学物質と医薬品の相互作用による発生毒性試験系の構築が可能であると考えられる。

E. 結論

本研究の成果により食品中の化学物質による肝機能への影響の評価系および食品中の化学物質単独および医薬品との併用による肝細胞毒性試験系ならびに発生毒性試験系の確立が可能であると考えられ、今後これら試験系をさらに発展させ、より精度の高い評価系の構築を目指すとともに、構築した評価系の活用・提供を通じ、本研究が食品の安全性確保の一助となる事を期待する。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Enosawa S, Horikawa R, Yamamoto A, Sakamoto S, Shigeta T, Nosaka S, Fujimoto J, Tanoue A, Nakamura K, Umezawa A, Matsubara Y, Matsui A, Kasahara M. Hepatocyte transplantation using the living donor reduced-graft in a baby with ornithine transcarbamylase deficiency: a novel source for hepatocytes. Liver Transplantation.

2014 20, 391-393.

(2) Nakamura K*, Aizawa K, Yamauchi J, Tanoue A. *; corresponding author. Hyperforin inhibits cell growth and differentiation in mouse embryonic stem cells. *Cell Proliferation*. 2013 46, 529-537.

(3) Nakamura K*, Aizawa K, Nakabayashi K, Kato N, Yamauchi J, Hata K, Tanoue A. *; corresponding author. DNA methyltransferase inhibitor zebularine inhibits human hepatic carcinoma cells proliferation and induces apoptosis. *PLOS ONE*. 2013 8, e54036.

2. 学会発表

(1) 中村和昭、相澤和子、堀尚子、田上昭人、肝代謝活性を考慮した in

vitro 発生毒性試験法の検討、日本動物実験代替法学会第 26 回大会(ポスター発表) 2013 年 12 月・京都

(2) 中村和昭、中林一彦、秦健一郎、田上昭人、DNA メチル化阻害剤ゼブラリンのヒト肝細胞癌に対する抗腫瘍活性、第 36 回日本分子生物学会年会(ポスター発表) 2013 年 12 月・神戸

(3) 中村和昭、中林一彦、秦健一郎、田上昭人、DNA メチル化阻害剤ゼブラリンによるヒト肝細胞癌に対する細胞毒性、第 40 回日本毒性学会学術年会(口頭発表) 2013 年 6 月・幕張

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

別紙 4

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の 編集者名 | 書 籍 名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|------|---------|---------------|-------|------|-----|-----|-----|
| | 該当なし | | | | | | |

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|--|----------------------------|----|---------|------|
| Enosawa S, Hori kawa R, Yamamoto o A, Sakamoto S, Shigeta T, No osaka S, Fujimo to J, Tanoue A, Nakamura K, Um ezawa A, Matsub ara Y, Matsui A, Kasahara M. | Hepatocyte transplan tation using the liv ing donor reduced-gr aft in a baby with o rnicithine transcarb ylase deficiency: a novel source for hep atocytes. | Liver Transp lantation. | 20 | 391-393 | 2014 |
| Nakamura K, Aiz awa K, Yamauchi J, Tanoue A. | Hyperforin inhibits cell growth and diff erentiation in mouse embryonic stem cell s. | Cell Prolife ration. | 46 | 529-537 | 2013 |
| Nakamura K*, Ai zawa K, Nakabay ashi K, Kato N, Yamauchi J, Ha ta K, Tanoue A. | DNA methyltransferas e inhibitor zebulari ne inhibits human he patic carcinoma cell s proliferation and induces apoptosis. | PLOS ONE. | 8 | e54036 | 2013 |