

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

健康食品による健康被害情報を踏まえた安全性評価系の開発に関する研究

マウス肝初代培養細胞を用いた安全性評価系の検討

研究代表者 近藤 位旨

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 食品保健機能研究部 研究員

## 研究要旨

昨年度の情報調査から選抜された健康食品成分の肝毒性および肝臓薬物代謝酵素(CYP)への影響を細胞試験から検証を行った。灌流法を用いてマウスの肝臓初代培養細胞を調製し、肝毒性およびCYP3A4への影響を評価する条件を検討した結果、本細胞においていずれも陽性対照成分への応答が観察された。次に、この細胞を用いて、健康食品成分の肝臓への影響を検討した結果、肝臓毒性はクマリンでのみ観察され、肝臓薬物代謝酵素3A4はクロロゲン酸およびリナロールにおいて誘導されることが観察された一方、細胞の調製に用いたマウスの個体差により再現性が得られなかった。以上から、マウス由来の肝初代細胞は安全性評価系に適さない可能性が考えられる。

## 研究分担者

鈴木 一平

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所

国立健康・栄養研究所 食品保健機能研究部

研究員

東泉 裕子

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所

国立健康・栄養研究所 食品保健機能研究部、

室長

## A. 研究目的

本研究は健康食品による肝臓への影響を有害性情報も含めた情報をもとに細胞実験ならびに動物実験から検証し、健康食品と被害情報の因果関係を科学的に解析し、一連の研究から健康食品による健康被害情報を踏まえた安全性評価系の開発することである。

本年度の研究目的は、①研究計画1年目に選抜された健康食品成分の肝臓毒性および肝臓薬物代謝への

影響を科学的に検討すること、②細胞実験が安全性評価系の1つとして利用可能なのか否かを検討することである。

## B. 研究方法

### 1. マウス肝臓初代培養細胞の調製

8-14週齢のddY雄性マウスを用い、灌流法により肝初代培養細胞を調製した。すなわち、マウスをイソフルラン麻酔下で開腹後、門脈に留置針(24G)を挿管し、留置針を手術糸で門脈ごと固定した。次に、腹部大静脈を切開したのち、留置針とペリスタルティックポンプを接続し、前灌流液(PBS、0.5 mM EDTA、10 mM HEPES、pH7.2)およびコラゲナーゼ液(HBS S、コラゲナーゼ100 units/mL\*)を5mL/minの条件で、3または6分間送液した。前灌流液およびコラゲナーゼ液は37°Cに加温し、送液を行った。その後、肝臓を摘出し、William's E 培地(no phenol red, gibco) 5 mLを加えたガラスシャーレ内で細胞を懸濁した。この細胞懸濁液を濾過後(70 μm mesh)、濾液の遠心分離

を行い（室温、100 x g、2 min）、沈殿した細胞に先と同様の培地を20 mL加え、懸濁後、再度、同じ条件で遠心分離を行った。この洗浄操作を3回行った後、沈殿した細胞を肝臓初代培養細胞として用いた。細胞はトリパンブルー染色後、細胞数および生細胞は血球計算盤を用いて測定した。

\*コラゲナーゼタイプIV

## 2. 細胞の播種および試験培養

細胞は播種培地\*\*を用いて $1.5 \times 10^5$  cells/mLに調整後、96wellコラーゲンプレート（コラーゲンTypeI）に播種し（100 $\mu$ L/well、 $1.5 \times 10^4$  cells/well）、CO<sub>2</sub>インキュベーター内（37°C、CO<sub>2</sub> 5%）で培養した。培養6時間後、播種培地を交換し、さらに18時間の培養を行った。次いで、細胞をPBS（pH7.4）で2回洗浄後、試験培地\*\*\*を加え（100  $\mu$ L/well）、先と同様の培養条件下で24-78時間の培養を行った。なお、培地は24時間毎に交換した。

\*\*播種培地（CM3000, Thermo Fisher Scientific）

下記の試薬①-④を混合後、酢酸セルロースフィルター（0.2  $\mu$ m）でろ過滅菌処理を行った。②-④はPrimary Hepatocyte Thawing and Plating Supplements（Gibco™、CM3000）を用いた。

- ① William's E medium (no phenol red) , 500 mL
- ② Fatal bovine serum (FBS) , 25 mL
- ③ Cocktail A, 18 mL
  - ・ Penicillin/streptomycin, 5/18 mL  
(10000 U/mL / 10000  $\mu$ g/mL)
  - ・ Human recombinant insulin 0.5/18 mL  
(4 mg/mL)
  - ・ GlutaMAX™ , 5/18 mL (200 mM/100 X)
  - ・ HEPES, 7.5/18 mL (1 M, pH 7.4)
- ④ Dexamethasone in DMSO (100 mM) 5  $\mu$ L

\*\*\*試験培地

各培地は調製後、酢酸セルロースフィルター（0.2  $\mu$ m）でろ過滅菌処理を行った。

対照培地

William's E medium (no phenol red), 0.1% DMSO

試験対象成分（カフェ酸、クマリン、クロロゲン酸、シネオール、リナロール、ルチン、ロスマリン酸）はDMSOを溶媒とし、1-100 mMの溶液として調製し、William's E mediumに添加した。試験対象成分の培地添加後濃度は1-100  $\mu$ Mとし、DMSOは終濃度0.1%となるように調製した。陽性対照成分は、肝臓毒性はDMSO（1-4%）、薬物代謝酵素3A4はDMSO（1-4%）、リファンピシン（12.5-25  $\mu$ M）およびオメプラゾール（25-50  $\mu$ M）を設定した。

## 3. 分析

### 3. 1 細胞活性の測定

試験培養終了後、PBS（pH7.4）を用いて2回洗浄後、MTS試薬\*を加え（120  $\mu$ L/well）、37°Cで4時間反応させた後、マイクロプレートリーダーを用いて、490 nmの吸光度を測定した。

\*MTS試薬

MTS試薬は、対照培地とMTS溶液（CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega）を10：2(v/v)の比率で混合し、調製した。

### 3. 2 薬物代謝酵素（CYP）3A4活性の測定

試験培養終了後、PBS（pH7.4）を用いて2回洗浄後、トリプシン・EDTA試薬を加え（100  $\mu$ L/well）、37°Cで加温し、細胞の剥離を経時的に観察した。細胞はプレートから剥離したことを確認した後、FBSを含む播種培地（100  $\mu$ L/well）を加えることでトリプシンの不活化を行い、2 mLチューブに回収した。次いで、遠心分離（4°C、2000 x g、5分）を行い、沈殿した細胞に50 mMトリスバッファー（pH 7.4）を500  $\mu$ L加え、氷冷下で細胞をホモジナイズし（25000 rpm、30秒）、このホモジナイズ液をCYP3A4活性測定に供した。CYP3A4活性の測定は、P450-Glo-CYP3A4-Assay-and-Screening-SystemおよびNADPH Regeneration

Systemを用い、CYP3A特異的な基質であるLuciferin-PXEの分解により生じるルシフェリンにルシフェラーゼを作用させ、その時に生じる発光度を測定した。この発光度は、Lowry法により測定したたんぱく質量で除し、播種により生じる細胞数のばらつきを補正した。

#### 4. データの表示

データは平均値または、平均値±標準偏差で示した。後述するように、再現性の観点から、本データは統計解析を行っていない。

### C. 研究結果

#### 1. マウス肝初代培養細胞の調製

マウス肝初代培養細胞の調製に用いたマウスは、体重が $48.1 \pm 10.2$  g、肝臓の湿重量は $3.36 \pm 0.63$  gであった。この肝臓を用いて得られた細胞は、肝臓1g当たりの細胞数が $1.9 \times 10^7 \pm 4.9 \times 10^6$ 、肝臓当たりの細胞数が $6.4 \times 10^7 \pm 1.8 \times 10^7$ 、生細胞率は $56.0 \pm 4.0\%$ であった。

#### 2. マウス肝初代培養細胞の陽性対照成分による影響

陽性対照成分による細胞への影響を、異なる2匹のマウスから調製した細胞を用いて、陽性対照成分の濃度および処置時間の検討を行った。その結果、細胞活性はマウスA、Bいずれも対照に比べ、DMSOにより低下し、濃度および時間に依存した応答が観察された (Table 1)。リファンピシンおよびオメプラゾールでは、細胞活性の増加が観察され、オメプラゾールでは対照の7-10倍の値を示した。

肝臓薬物代謝酵素3A4活性は、マウスBでは、対照に比べ、DMSO、リファンピシンおよびオメプラゾールにより200%以上の誘導が観察された (Table 2)。この誘導は処置48時間後に高値を示すが、処置72時間後には低下した。一方、マウスAの細胞では、マウスBと同様の誘導および処置時間による影響は観察されなかった。

#### 3. 水溶性健康食品成分の細胞活性および薬物代謝酵素3A4活性への影響

陽性対照成分への影響を検討した結果をもとに、7種類の水溶性健康食品成分は、48時間の培養条件で、細胞活性および薬物代謝酵素3A4活性への影響を検討した。その結果、細胞活性は対照に比べ、2%DMSOおよび100  $\mu$ Mクマリンでのみ低下し、他の成分では変化は観察されなかった (Table 3)。一方、両者の応答は、採取した細胞で差異があり、マウスCでは活性の低下は観察されなかった。

薬物代謝酵素3A4活性は、マウスCおよびDにおいては、陽性対照成分、カフェ酸、クマリン、シネオールおよびロスマリン酸では、誘導は観察されなかった。クロロゲン酸、リナロールおよびルチンでは、対照に対して約150-260%の増加が観察された。一方、マウスEは他のマウスとは異なる結果であり、活性の誘導は観察されなかった。

### D. 考察

本研究では、ddY雄性マウスから肝初代培養細胞を調製し、肝毒性およびCYP3A4への影響を検討した。本細胞試験の安全性評価系への妥当性を、陽性対照成分への応答性から検証した。その結果、肝臓を採取したマウスによりその応答性に違いがあるものの、DMSOの処置により、細胞活性の低下、つまり、毒性による細胞死が観察された。また、CYP3A4は、DMSO、リファンピシンおよびオメプラゾールにより対照の200%以上の値を示した。肝初代培養細胞を用いた研究で報告されているように、個体差による応答性の差異が観察された一方、ddY雄性マウスから肝初代培養細胞を調製した場合でも、肝毒性およびCYP3A4の誘導が観察される結果が得られ、この細胞を用いて、健康食品成分による肝臓への影響を検討した。その結果、肝毒性はクマリンでのみ観察され、CYP3A4の誘導はクロロゲン酸およびリナロールで観察された。しかし、この時、陽性対照成分による応答は観察されなかった。本研究において、リファンピシンをCYP3A4

活性の陽性対照として選択したが、CYP3ファミリーへの応答性はヒトと齧歯類では異なる (PMID、22467028)。そのため、リファンピシンをCYP3A4の陽性対照成分として用いること自体が不適切であると考えられる。

マウスから肝初代培養細胞を調製する方法は、多数報告されており、(PMID: 22105762、33111119) その手法自体は成熟している。しかし、薬物代謝酵素活性に関しては、ヒト細胞であっても個体差が大きく、応答性を示す細胞を選択することが行われている(日薬理誌、134、330-333、2009)。肝臓への影響を細胞で検討する場合、このゴールドスタンダードはヒト由来の肝細胞が用いられている。前述のとおりヒト肝細胞であっても個体差があるため、その代替手法として、ヒト肝細胞様形態を示すHepaRGが積極的に用いられている(国会図書館；永続的識別子、info:ndljp/pid/11246077)。現在、肝毒性および肝臓薬物代謝酵素への影響は、新しい手法が開発され、ヒト由来肝細胞やヒト肝臓細胞を移植したキメラマウスなどを用いた手法が検討されている。

本研究から安全性評価系は構築できなかった。一方、本研究結果、現在の研究動向および文献の再調査から、健康食品の安全性評価系には、2つの方法が考えられる。1つ目は、従来の毒性評価試験を基盤に、健康食品の肝臓への影響に焦点を当てたin vivo評価系である。2つ目は、遺伝子発現を定量的かつ簡便に評価することで、因果関係を直接的に評価することを可能とするレポーターアッセイが挙げられる。つまり、安全性評価系は、1つの方法に絞ることはできない。

したがって、健康食品の安全性評価は、ヒトの健康被害を解析することを目的とした場合、ヒト細胞を用いたレポーターアッセイから因果関係を検証し、ヒトの肝臓を有するキメラマウスを用いて、その実証を行うことが直接的な解析手法として考えられる。

## E. 結論

研究計画1年目に選抜された健康食品成分の肝臓毒

性および肝臓薬物代謝への影響を科学的に検討することおよび、細胞実験が安全性評価系の1つとして利用可能なのか否かを検討することを目的に、ddY雄性マウスから肝初代培養細胞を調製し、健康食品成分による肝臓への影響を検討した。しかし、本細胞実験は、安全性評価として敵うものではないと考えられる。今後は、ヒト細胞などを用いた手法から健康食品に特化した安全性評価系の検討を行う予定である。

## F. 健康危険情報

本研究から、健康食品に関する健康危険情報の提供はない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Kondo T, Ishimi Y, Takebayashi J, Tousen Y. Assessment of safety and efficacy of pine bark extract in normal and ovariectomized mice. *Journal of Food Science*. 85,1956-1962, 2020.5

### 2. 学会発表

近藤位旨、東泉裕子、健康食品による健康被害情報を踏まえた安全性評価系の開発に関する研究、第67回日本栄養改善学会学術総会、2020年9月2日。

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

該当なし。

### 2. 実用新案登録

該当なし。

### 3. その他

該当なし。

Table 1 Cell viabilities treated by positive controls

		24 hours	48 hours	72 hours
		AU (vs. each control)		
Mouse A	Control	100 ± 19	100 ± 10	100 ± 9
	1%DMSO	99 ± 13	87 ± 6	60 ± 1
	2%DMSO	82 ± 10	95 ± 7	48 ± 5
	4%DMSO	96 ± 3	59 ± 13	42 ± 12
	Rifampicin 12.5 µM	100 ± 14	121 ± 1	101 ± 9
	Rifampicin 25 µM	120 ± 10	160 ± 17	90 ± 6
	Omeprazole 25 µM	146 ± 39	154 ± 16	78 ± 1
	Omeprazole 50 µM	99 ± 9	161 ± 25	97 ± 7
Mouse B	Control	100 ± 13	100 ± 10	100 ± 4
	1%DMSO	103 ± 2	87 ± 10	65 ± 2
	2%DMSO	87 ± 4	76 ± 4	54 ± 6
	4%DMSO	73 ± 5	45 ± 2	41 ± 8
	Rifampicin 12.5 µM	97 ± 2	116 ± 10	129 ± 16
	Rifampicin 25 µM	106 ± 4	113 ± 12	148 ± 21
	Omeprazole 25 µM	101 ± 11	764 ± 585	103 ± 11
	Omeprazole 50 µM	92 ± 4	1009 ± 67	95 ± 9

Values are expressed mean ± SD ( $n = 3$ ).

Table 2 CYP3a4 activities treated by positive controls

		24 hours	48 hours	72 hours
		AU (vs. each control)		
Mouse A	Control	100 ± 9	100 ± 17	100 ± 19
	1%DMSO	137 ± 32	64 ± 9	51 ± 27
	2%DMSO	113 ± 34	86 ± 12	118 ± 24
	4%DMSO	120 ± 63	87 ± 21	133 ± 28
	Rifampicin 12.5 µM	131 ± 32	91 ± 23	126 ± 58
	Rifampicin 25 µM	136 ± 6	90 ± 11	136 ± 30
	Omeprazole 25 µM	118 ± 38	147 ± 18	176 ± 47
	Omeprazole 50 µM	95 ± 14	187 ± 66	125 ± 32
Mouse B	Control	100 ± 60	100 ± 22	100 ± 75
	1%DMSO	84 ± 7	162 ± 34	166 ± 39
	2%DMSO	134 ± 15	211 ± 11	141 ± 37
	4%DMSO	137 ± 23	221 ± 98	172 ± 68
	Rifampicin 12.5 µM	193 ± 42	314 ± 195	168 ± 29
	Rifampicin 25 µM	84 ± 44	241 ± 63	121 ± 70
	Omeprazole 25 µM	62 ± 54	307 ± 102	164 ± 29
	Omeprazole 50 µM	73 ± 63	333 ± 111	160 ± 96

Values are expressed mean ± SD ( $n = 3$ ).

Table 3 Cell viabilities treated by health-food ingredients

	Mouse C	Mouse D	Mouse E
	AU (vs. each control)		
C	100 ± 16	100 ± 10	100 ± 12
2%DMSO	95 ± 17	68 ± 5	59 ± 3
Rifampicin 12.5 µM	113 ± 8	90 ± 6	113 ± 5
Omeprazole 25 µM	119 ± 5	102 ± 2	102 ± 10
Caffeic Acid 1 µM	97 ± 6	89 ± 7	91 ± 12
Caffeic Acid 10 µM	110 ± 13	111 ± 12	110 ± 16
Caffeic Acid 100 µM	126 ± 7	111 ± 8	120 ± 29
Coumarin 1 µM	119 ± 4	104 ± 3	97 ± 3
Coumarin 10 µM	107 ± 6	95 ± 8	88 ± 4
Coumarin 100 µM	91 ± 7	56 ± 6	40 ± 7
Chlorogenic acid 1 µM	110 ± 7	95 ± 3	104 ± 9
Chlorogenic acid 10 µM	93 ± 8	86 ± 11	95 ± 13
Chlorogenic acid 100 µM	137 ± 6	107 ± 1	138 ± 9
Cineole 1 µM	97 ± 18	103 ± 3	105 ± 13
Cineole 10 µM	108 ± 12	109 ± 6	105 ± 7
Cineole 100 µM	111 ± 5	106 ± 7	95 ± 11
Linalool 1 µM	122 ± 7	115 ± 3	111 ± 11
Linalool 10 µM	114 ± 14	99 ± 2	108 ± 8
Linalool 100 µM	110 ± 3	99 ± 2	102 ± 5
Rutin 1 µM	103 ± 20	107 ± 19	119 ± 9
Rutin 10 µM	123 ± 4	110 ± 12	119 ± 13
Rutin 100 µM	118 ± 6	95 ± 5	109 ± 9
Rosmarinic acid 1 µM	114 ± 7	105 ± 10	108 ± 3
Rosmarinic acid 10 µM	111 ± 13	93 ± 8	103 ± 2
Rosmarinic acid 100 µM	108 ± 10	90 ± 7	98 ± 12

Values are expressed mean ± SD ( $n = 3$ ).

Table 4 CYP3A4 activities treated by health food ingredients

	Mouse C	Mouse D	Mouse E
	AU (vs. each control)		
C	100 ± 77	100 ± 5	100 ± 10
2%DMSO	97 ± 45	105 ± 7	67 ± 25
Rifampicin 12.5 µM	106 ± 40	126 ± 55	27 ± 7
Omeprazole 25 µM	68 ± 11	109 ± 28	19 ± 10
Caffeic Acid 1 µM	102 ± 48	75 ± 52	69 ± 20
Caffeic Acid 10 µM	80 ± 29	105 ± 24	49 ± 1
Caffeic Acid 100 µM	82 ± 33	74 ± 27	63 ± 23
Coumarin 1 µM	165 ± 55	65 ± 17	77 ± 6
Coumarin 10 µM	97 ± 12	145 ± 22	63 ± 8
Coumarin 100 µM	102 ± 50	147 ± 19	63 ± 10
Chlorogenic acid 1 µM	152 ± 57	146 ± 15	7 ± 2
Chlorogenic acid 10 µM	143 ± 47	225 ± 34	43 ± 28
Chlorogenic acid 100 µM	164 ± 62	192 ± 35	89 ± 20
Cineole 1 µM	53 ± 16	105 ± 6	104 ± 44
Cineole 10 µM	140 ± 51	145 ± 42	44 ± 14
Cineole 100 µM	133 ± 29	138 ± 30	90 ± 9
Linalool 1 µM	204 ± 40	218 ± 73	83 ± 24
Linalool 10 µM	262 ± 120	214 ± 26	129 ± 12
Linalool 100 µM	255 ± 45	178 ± 59	98 ± 12
Rutin 1 µM	139 ± 76	140 ± 81	70 ± 27
Rutin 10 µM	172 ± 48	110 ± 9	74 ± 17
Rutin 100 µM	213 ± 43	118 ± 9	137 ± 12
Rosmarinic acid 1 µM	110 ± 22	184 ± 53	28 ± 13
Rosmarinic acid 10 µM	73 ± 34	130 ± 33	57 ± 10
Rosmarinic acid 100 µM	105 ± 14	118 ± 43	52 ± 20

Values are expressed mean ± SD ( $n = 3$ ).