

厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）  
OECDプロジェクトでの成果物を厚生労働行政に反映させるための研究

令和3年度 分担研究報告書

*In vivo* と相関性のある *in vitro* 毒性評価系による AOP 及び TG の実験データ支援

研究分担者 中江 大

東京農業大学応用生物科学部食品安全健康学科 教授

### 研究要旨

本分担研究は、皮膚、肝臓並びに消化管組織の代替法において AOP の成立に寄与する知見を得ることを目的とした。本年度は、皮膚組織における代替法の検討として、3D 皮膚再構成系を用いて folpet 曝露の影響を評価した。肝臓における代替法の検討として正常肝細胞株と肝癌由来細胞株を用いて各種脂肪酸曝露の影響を評価した。さらに腸管上皮における毒性評価として *in vivo* と *in vitro* の試験系からえられる種々の結果を比較した。

その結果、3D 皮膚再構成系を用いた評価において、folpet は、OECD-TG439 による皮膚刺激性試験で陰性であったが、24 時間曝露条件下で濃度が高くなると、細胞生存率の低下と炎症性サイトカインの mRNA 発現の増加を示した。肝細胞株における脂肪毒性に対する評価においては、脂肪酸の種類において細胞毒性が異なることや、本実験で使用した正常と腫瘍細胞株において、特に多価不飽和脂肪酸曝露に対する細胞毒性が異なる可能性が示唆された。腸管に関する検討では、マウス、Caco-2 細胞及びマウス空腸由来オルガノイドで、DSS の曝露によりいずれも TJP-1 (tight junction protein-1) の変動、IL-1b の遺伝子発現減少を認め、AOP の成立に寄与する可能性が示された。

### 研究協力者

美谷島 克宏

東京農業大学

応用生物科学部食品安全健康学科 教授

煙山 紀子

東京農業大学

応用生物科学部食品安全健康学科 助教

化学物質による皮膚への影響を *in vitro* の実験系において評価することを目的とし、2次元培養として HaCaT 細胞を用い、3次元培養としてヒト 3D 皮膚再構成系を用いて folpet 曝露の影響を評価した。

肝臓における代替法の検討としては、化学物質による肝臓への影響を *in vitro* の実験系において評価することを目的とし、ラット正常肝細胞株 Clone 9 とヒト肝癌由来細胞株 HepG2 を用いて各種脂肪酸曝露の影響を評価した。

腸管由来組織における代替法の検討としては、化学物質による腸管への影響を *in vivo*・*in vitro* の各実験系において評価・比

### A. 研究目的

本研究は、皮膚、肝臓並びに消化管組織の代替法において AOP の成立に寄与する知見を得ることを目的として、以下の検討を行った。

皮膚組織における代替法の検討としては、

較することを目的とし、マウスに投与すると共に、2次元培養としてCaco-2細胞を用い、3次元培養としてマウス空腸由来のオルガノイドを用いてデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 曝露に対する影響を評価した。

## B. 研究方法

B.1. 皮膚組織における代替法の検討: ヒト3D皮膚再構成系及びヒト表皮角化細胞単層培養系を用いたfolpetに対する経皮毒性

ヒト3D皮膚再構成系としては、LabCyte EPI 24モデル(株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング)を、当該モデルに添付の培養液と共に用いた。単層培養系としては、ヒト表皮角化細胞株HaCaT細胞を適宜継代して用いた。

被験物質としては、皮膚刺激性試験で陰性を示すものの21日間反復投与毒性を示すfolpet(フタルイミド系殺菌剤)を使用した。

ヒト3D皮膚再構成系を用いた実験は、OECD TG439に従った皮膚刺激性試験(15分曝露・42時間後培養)と、24時間曝露の2条件で、同じ濃度のfolpet(0、100、300、1000、2000 µg/mL)による細胞毒性を(3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) アッセイにて細胞傷害率を測定し、比較評価した。また、濃度依存(0、100、300、1000 µg/mL、24時間)・時間依存(0、3、8、24時間、300 µg/mL)における各種炎症性サイトカイン関連遺伝子発現をqPCRにて解析した。

HaCaT細胞を用いた実験は、folpetを0、1、3、10、30、40、60、80、100、120 µg/mLの濃度で24時間曝露し、WST-8アッセイで細胞毒性を評価した。

B.2. 肝臓における代替法の検討: 正常または腫瘍肝細胞における脂肪毒性に対する検討

ラット正常肝細胞株Clone 9と、ヒト肝癌由来細胞株HepG2、マウス肝癌由来細胞株Hepa1-6を用い、各種脂肪酸(パルミチン酸、オレイン酸、エライジン酸、リノール酸、アラキドン酸、EPA、DHA)を1-1600 µMの濃度で24時間曝露し、WST-8アッセイで細胞毒性を評価した(表1)。

B.3. 腸管由来組織における代替法の検討

B.3.1. 腸管上皮由来Caco-2細胞を用いた平面培養による検討

DSS(MP Biomedicals)を6週齢の雄性C57BL/6Jマウスに1週間飲水投与し、小腸及び大腸の病理組織学的解析、遺伝子発現解析を行い、同様に溶媒を投与した対照群のマウスと比較検討した(各群6匹)。

B.3.2. 腸管上皮由来Caco-2細胞を用いた平面培養による検討

DSSを通常培地(DMEM: Low Glu)に10%胎仔ウシ血清(FBS)、1%非必須アミノ酸溶液(NEAA)、1%ペニシリン・ストレプトマイシン添加)に各種の濃度%(w/v)で混じり、Caco-2に24時間曝露した。

B.3.2.1. 遺伝子発現解析

12-well plateの各wellにCaco-2を $4 \times 10^4$  cell/mLで播種して2日毎に培地交換を行い、コンフルエントになってから5日後に1、3、5%の濃度、別の12-well plateで5、10、15%の濃度のDSSを曝露した。

DSS 10、15%においてはRNA量、cDNA量共に測定できたにもかかわらず、内部標準遺伝子発現が僅かで、DSS 15%では内部因子を含めその他のターゲット遺伝子すべてに発現が見られなかった。従ってDSS

10%以上の曝露は、評価に適さない状況にあるものと考えられた。

#### B.3.2.2. 蛍光免疫組織学的染色

Cell culture slide (4-well タイプ) の各 well に Caco-2 を  $1.3 \times 10^5$  cell/mL で播種した。培地は 400  $\mu$ L/well とした。2 日毎に培地交換を行い、約 2 ヶ月後に DSS を 1、5、30% の濃度で曝露した。DSS 処理後に 3%パラホルムアルデヒドで固定し、0.2% Triton-X100 で透過処理を行い、更に 1% FBS でブロッキング後、E-cadherin rabbit polyclonal antibody (ProteinTech) を添加し一晩処理し、donkey anti-Rabbit IgG (H+L) highly cross adsorbed secondary antibody, Alexa Fluor 555 (Thermo Fisher Scientific) を反応させ、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 添加剤にて封入した。

#### B.3.2.3. 生細胞数測定 (WST-8)

96-well plate に Caco-2 を 8,000 cell/well で播種して 2 日毎に培地交換し、コンフルエントになってから 5 日後に 5、10、15、20、25 及び 30%の濃度の DSS を曝露した後、Cell Counting Kit-8 (同人化学:富士フィルム和光純薬株式会社) を添加してインキュベートした。

WST-8 アッセイによる細胞毒性評価においては、WST-8 試薬添加後のインキュベーション時間も考慮して、1 時間経過ごとに 4 時間まで、450  $\mu$ m (マルチモードプレートリーダー:バイオテックジャパン)にて吸光度測定を行った。

#### B.3.3. マウス空腸由来のオルガノイドを用いた検討

正常 C57BL/6J マウスに DSS 誘発大腸炎マウスの病理組織学的解析や遺伝子発現解析とそのマウスから作製した腸管オル

ガノイドの形成効率や増殖活性 (EdU アッセイ) などの結果を比較した。さらに Caco-2 細胞へ DSS 培地添加した際の影響や、通常の腸管オルガノイドに DSS を培地添加、マイクロインジェクションした際の影響も解析した。

#### B.3.3.1. 培地添加による曝露

0.5、1、3% DSS (in phosphate-buffered saline (PBS))を調製し、24-well plate に 0.5、1%濃度になるよう培地に添加した。Control 群においては、PBS を 1%になるように添加した。培地容量は、PBS 及び DSS 共に、400  $\mu$ L/well とした。

#### B.3.3.2. インジェクションによる曝露

15、30% DSS (in PBS)を調製し、オルガノイドにインジェクションした。オルガノイドの体積とインジェクションする液量の条件から、投与液は 30 倍希釈されることが明らかとなっている。そのため、インジェクション後オルガノイド中の DSS 濃度は、0.5、1%となった。Control 群には、PBS をインジェクションした。

(倫理面への配慮)

腸管組織における検討においては、マウス回腸由来のオルガノイド培養組織を実施するにあたりマウスを使用した。ただし、その使用は最少匹数に留め、東京農業大学動物実験委員会より承認を受けた申請内容に則り実施した。

## C. 研究結果

### C.1. 皮膚組織における代替法の検討

ヒト 3D 皮膚再構成系を用いた folpet に対する経皮毒性評価において、OECD TG439 に従った皮膚刺激性試験では 2000  $\mu$ g/mL の最高濃度まで陰性であったのに

対し、24 時間曝露では同条件の対照群と比較して 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  より細胞毒性がみられた (図 1)。24 時間曝露における qPCR では、炎症性サイトカインの mRNA 発現が 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で有意に増加した (図 2)。また、濃度依存による検討では、3 時間あるいは 8 時間の曝露より炎症性サイトカインの上昇がみられた (図 3)。

HaCaT 細胞を用いた 24 時間曝露では、60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上で細胞毒性を示した。

## C.2. 肝臓における代替法の検討

Clone 9、HepG2、Hepal-6 において、パルミチン酸やリノール酸に比してオレイン酸やオレイン酸のトランス異性体であるエライジン酸の細胞毒性は弱かった (図 4)。多価不飽和脂肪酸は、Clone 9 と比較して HepG2 と Hepal-6 において、低濃度曝露で細胞毒性を示した (図 5)。

## C.3. 腸管由来組織における代替法の検討

### C3.1.1. DSS 曝露によるマウス腸管への影響

DSS 群の小腸では、病理組織学的に明らかな変化がなかったが、細胞接着関連因子 (TJP-1) 及び炎症関連因子 (IL-1b) の遺伝子発現の減少傾向が見られた (図 6-1、図 7)。DSS 群の大腸では、軽度の炎症性病変が誘発された。

### C3.2.1. Caco-2 の遺伝子発現解析

DSS 添加により control と比較し 1%濃度以上で、TJP-1 並びに IL-1b の遺伝子発現が減少傾向を示した (図 6-2、図 7)。DSS 5%濃度においては、e-cadherin と IL-1 $\beta$  の発現に加え、ZO-1、IL-6、TNF- $\alpha$  についても control と比較し、発現がやや低下する傾向が認められた。DSS 10、15%濃度においては、内部標準遺伝子の発現自体が少なく、

PCR の結果が得られなかった。このことから DSS 10%濃度以上では、細胞の死滅が生じているものと考えられた。

### C.3.2.2. Caco-2 の蛍光免疫組織学的染色及び遺伝子発現解析

2 週間培養し 24 時間 DSS を曝露したところ、10%では明らかな細胞の脱落・離開が見られた。5%では細胞培養の状態に control と差が見られなかったが、e-cadherin の免疫組織化学では細胞間の陽性部位の減弱が認められた。DSS 1 及び 3%濃度では、明らかな差が見られなかった。

### C.3.2.3. Caco-2 の生細胞数測定 (WST-8)

WST-8 試薬添加後のインキュベート 1 時間後の評価において、control に比較し、DSS 5%濃度以上で、細胞が死滅し毒性が生じているものと考えられた (図 8)。

### C.3.3.1. マウス空腸由来オルガノイドの培地中曝露

添加後 1 時間で、DSS 0.5、1%濃度培地で死滅しているオルガノイドが見られたことから、1 時間足らずでオルガノイドへの影響が確認できなくなり、マトリゲルが破壊され緩くなることから、さらに低濃度による検討を要することが明らかとなった。

### C.3.3.2. マウス空腸由来オルガノイドのインジェクションによる曝露

インジェクション後に DSS 1%濃度でもオルガノイドは死滅せず、大型化・変形した。TJP-1 の遺伝子発現は 0.5%濃度以上で一過性の顕著な増加を示したが、24 時間後には、control と差はなく 1%濃度では一転し発現が低下した (図 6-3)。さらに IL-1b の遺伝子発現は減少傾向を示した (図 7)

## D. 考察

### D.1. 皮膚組織における代替法の検討

ヒト 3D 皮膚再構成系を用いた評価において、folpet は、OECD TG439 による皮膚刺激性試験で陰性であったが、24 時間暴露条件下で濃度が高くなると細胞生存率が下降傾向を示し、炎症性サイトカインの mRNA 発現が 1000 µg/mL で有意に増加した。したがって、後者のプロトコルは、OECD TG439 による皮膚刺激性試験で陰性の化学物質の細胞傷害性や、*in vivo* の反復投与経皮毒性に相当する変化を検出できる可能性が示唆された。今後、表皮の毒性に鋭敏な因子の探索や、より簡便なスクリーニングを目指すための HaCaT 細胞を用いた検討を行う予定である。

### D.2. 肝臓における代替法の検討

正常または腫瘍肝細胞における脂肪毒性に対する評価において、本実験で使用した細胞株では、特に多価不飽和脂肪酸曝露に対する細胞毒性が異なることが明らかとなった。今後、正常または腫瘍肝細胞の種類を増やし、脂肪酸曝露による細胞毒性の差異を精査する予定である。

### D.3. 腸管由来組織における代替法の検討

腸管由来組織における動物実験代替法の確立を目的として、今年度は、マウスへの DSS の投与、腸管由来の株化細胞 Caco-2 を用いた 2 次元培養による影響を検討し、マウス空腸由来のオルガノイドを用いた 3 次元培養による評価について検討した。いずれの実験系も陽性対照物質として DSS を用いた。

DSS を投与したマウスにおいて、回腸に明らかな影響は認められなかった。遺伝子発現解析では、TJP-1 の発現が DSS 群において減少傾向にあった。その他 IL-1b など

の炎症促進に関与するサイトカインの遺伝子発現量も低下した。

2 次元培養において、遺伝子発現解析の結果では、DSS 10%濃度以上で細胞が離開し、毒性が生じているものと考えられた。また、WST-8 アッセイの結果、DSS 5%濃度以上で死滅が生じているものと考えられた。今後は、死細胞数測定 (lactic acid dehydrogenase (LDH) assay) も行い、実際に細胞死について検討することで、2 次元培養条件下における毒性兆候をより明らかにする予定である。

マウス空腸由来のオルガノイドを用いた DSS の評価では、培地中への曝露により DSS 0.5、1% といった低濃度からオルガノイド組織の死滅を示唆する変化が認められた。一方、オルガノイド管腔内にインジェクション曝露した場合には、オルガノイド自体に大型化など形態的变化を認めたものの、組織が死滅に至るような傷害性変化を観察しなかった。このことから、DSS を同濃度に設定して曝露したにもかかわらず、上記のように結果に差が生じたことから、腸管管腔側 (インジェクション曝露) よりも基底膜側 (培地内曝露) からの DSS 処理による影響が大きいことが明らかとなった。

0.5%濃度以上の DSS のインジェクションにより TJP-1 遺伝子発現の変化や IL-1b 遺伝子発現の低下が見られた。

以上、腸管に関連したいずれの実験系においても DSS の曝露により TJP-1 遺伝子発現への影響や IL-1b 遺伝子発現低下が認められた。これは新たな腸管毒性評価における AOP となり得る可能性を示唆するものと考えた。

## E. 結論

本研究は、皮膚組織・肝臓・腸管由来組

織における動物実験代替法の確立に向けた検討を2次元培養ないし3次元培養条件下で実施し、それぞれ、代替法の開発に資する基礎的情報を得た。今後は、実験条件の精査や *in vivo* 試験で得られる結果との比較検討を行うと共に、表現型の背景メカニズムの解析を行い、具体的な代替法開発に取り組む予定である。

## F. 研究発表

### F.1. 論文発表

なし

### F.2. 学会発表

1. 宍戸健太、煙山紀子、美谷島克宏、中江大、他、単層培養系および3D再構成系における二酸化チタンナノ粒子のヒト表皮細胞毒性評価、第48回日本毒性学会学術年会（2021年7月7日、兵庫県神戸市）

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

表 1.

脂肪酸曝露濃度

脂肪酸	濃度[ $\mu\text{g/mL}$ ]
パルミチン酸	0/50/100/200/400/600/800/1000
オレイン酸	0/200/400/800/1000/1200/1400/1600
エライジン酸	0/200/400/800/1000/1200/1400/1600
リノール酸	0/200/400/800/1000/1200/1400/1600
アラキドン酸	0/0.62/12.5/25/50/100/200/400
DHA	0/0.62/12.5/25/50/100/200/400
EPA	0/0.62/12.5/25/50/100/200/400

図 1.

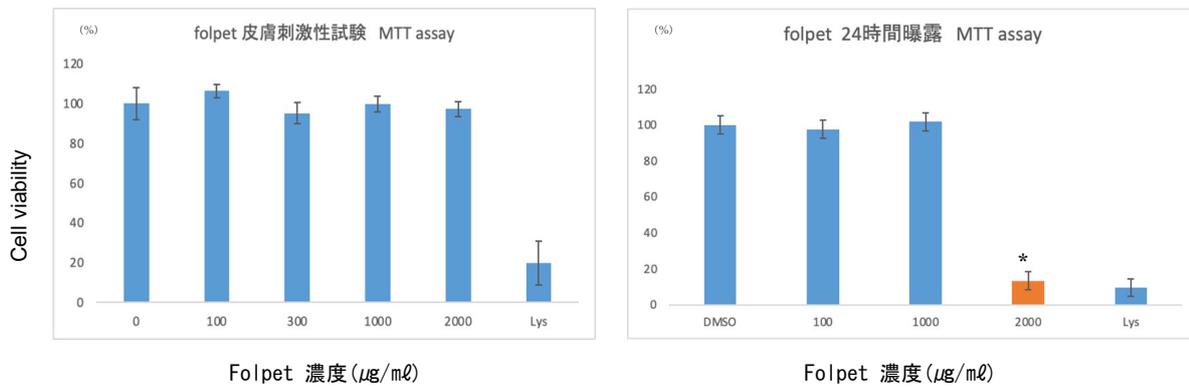


図 2.

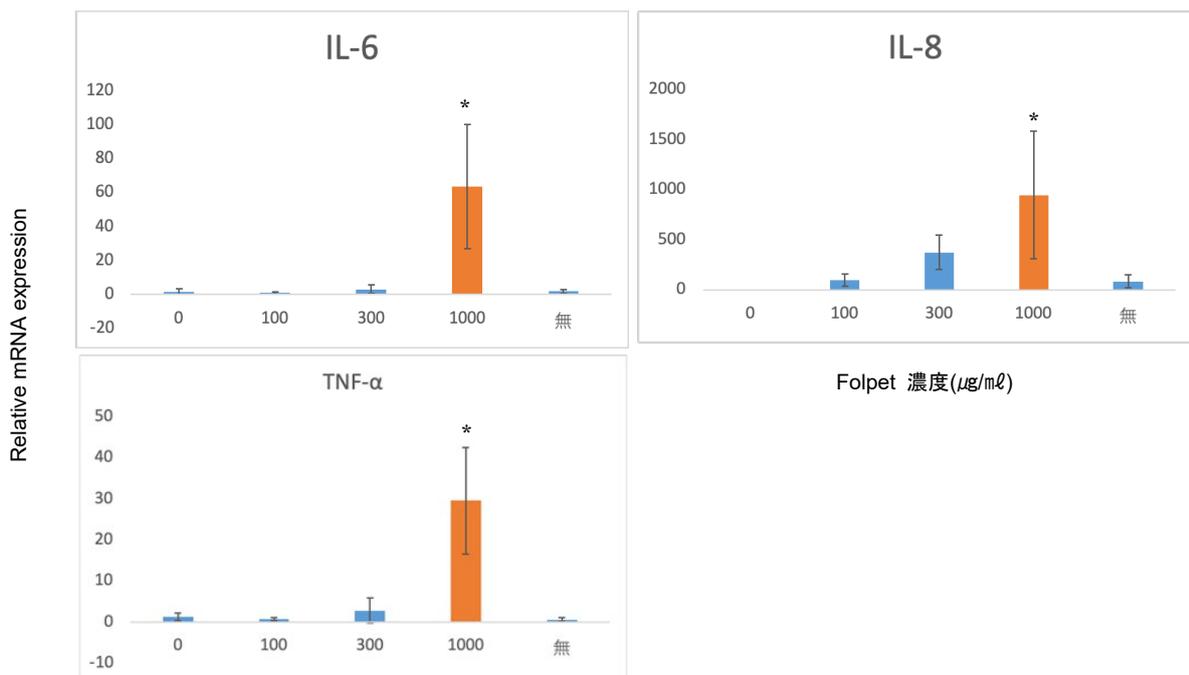


図 3.

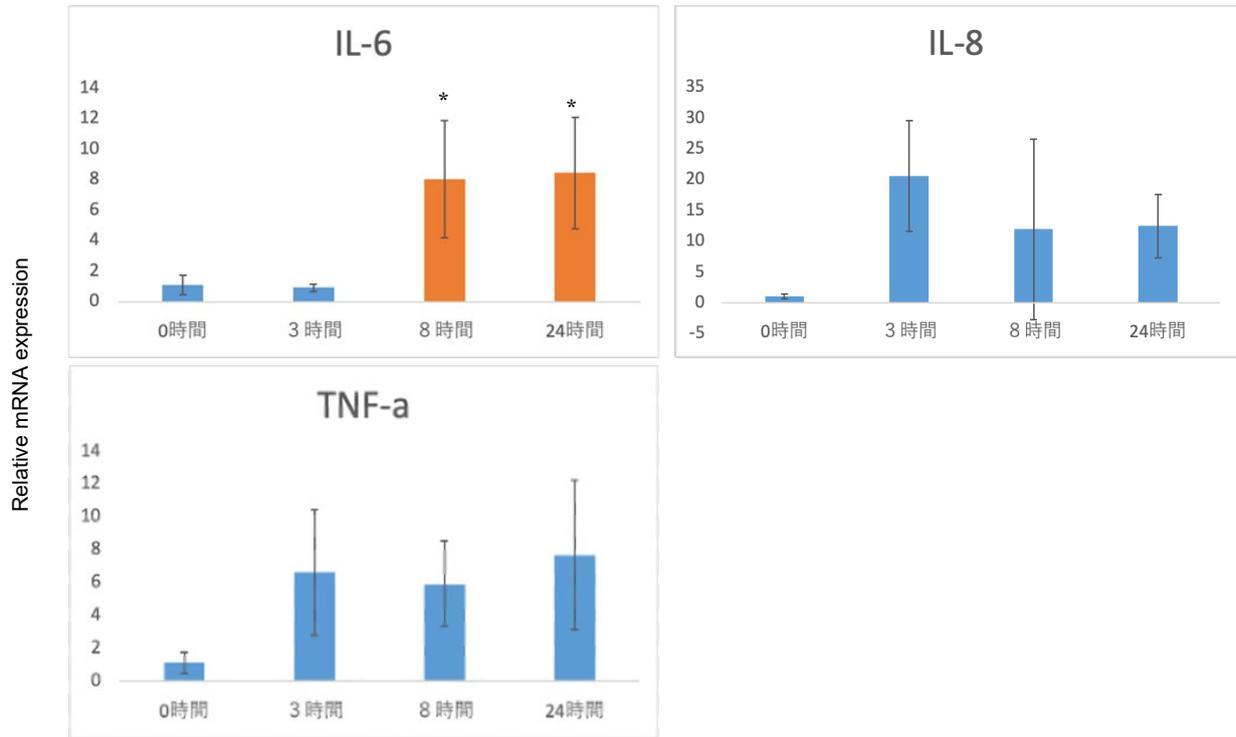


図 4.

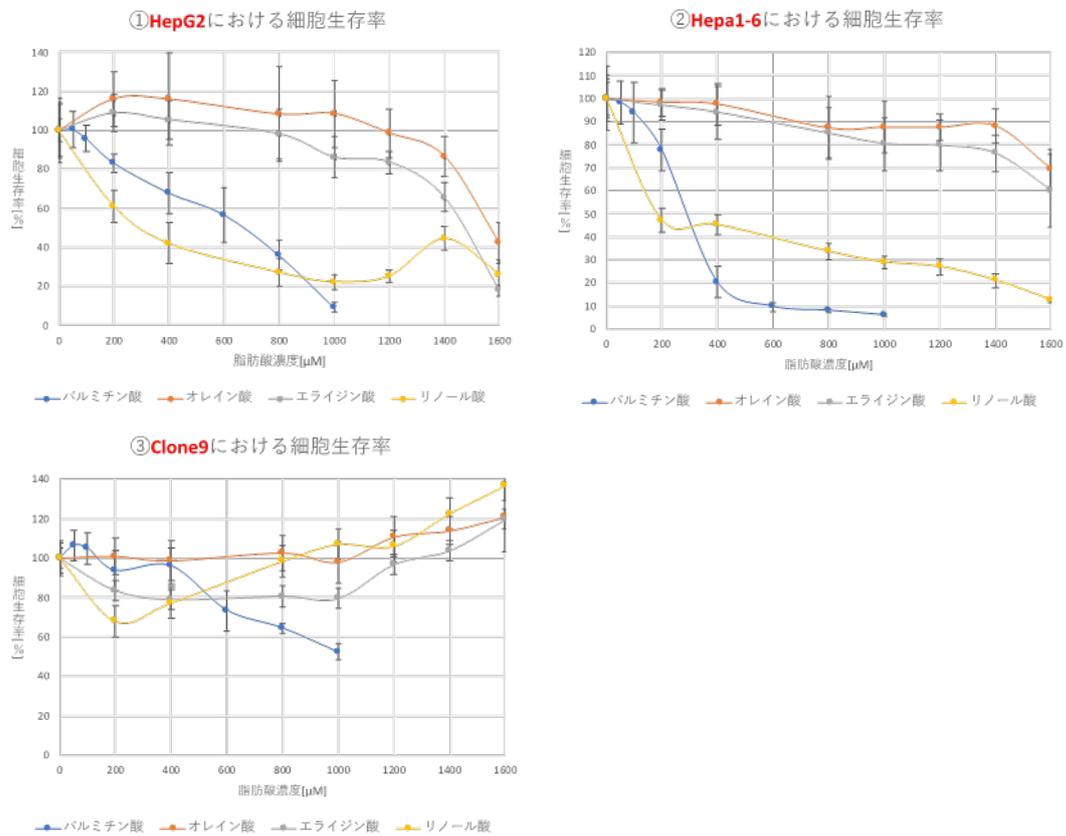


図 5.

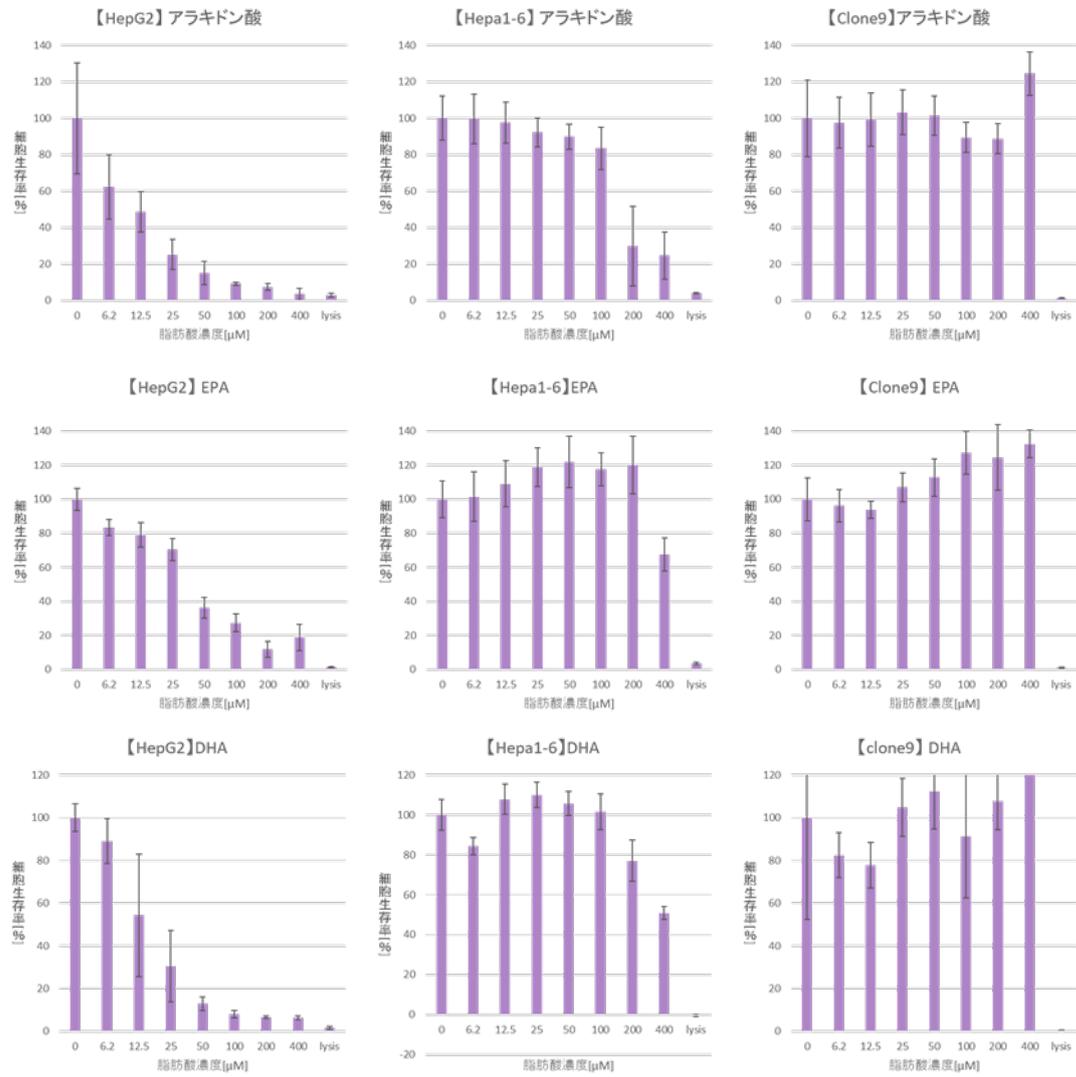


図6-1. マウス小腸の遺伝子発現解析 (TJP-1)

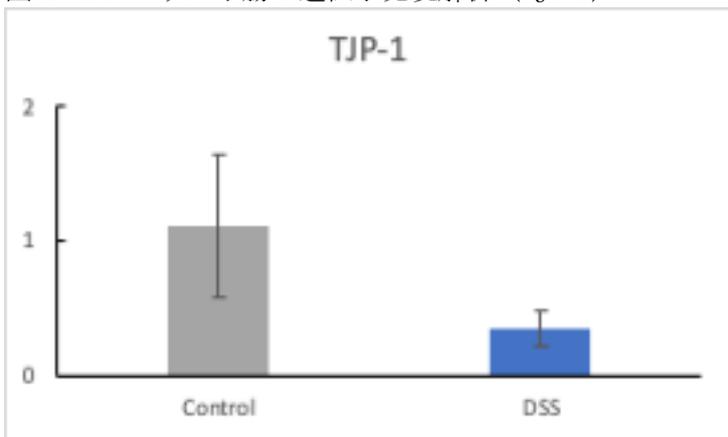


図6-2. Caco-2細胞の遺伝子発現解析 (TJP-1)

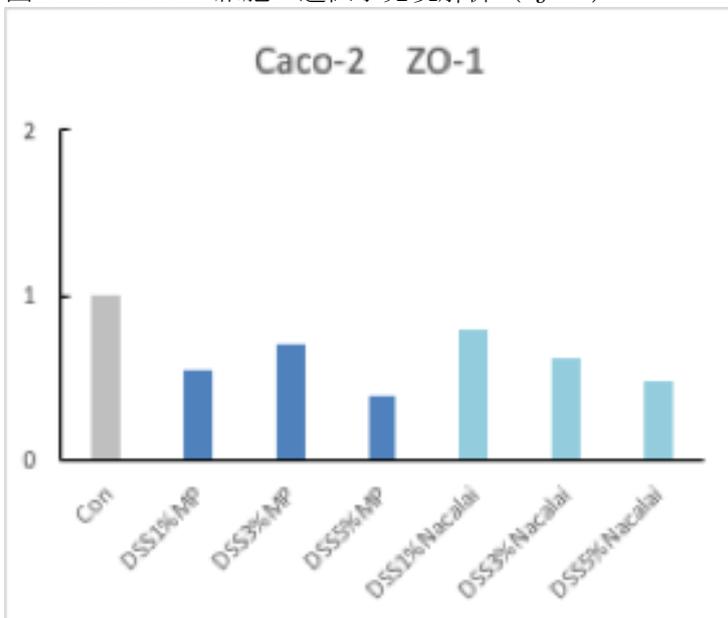


図6-3. マウス由来小腸オルガノイドの遺伝子発現解析 (TJP-1)

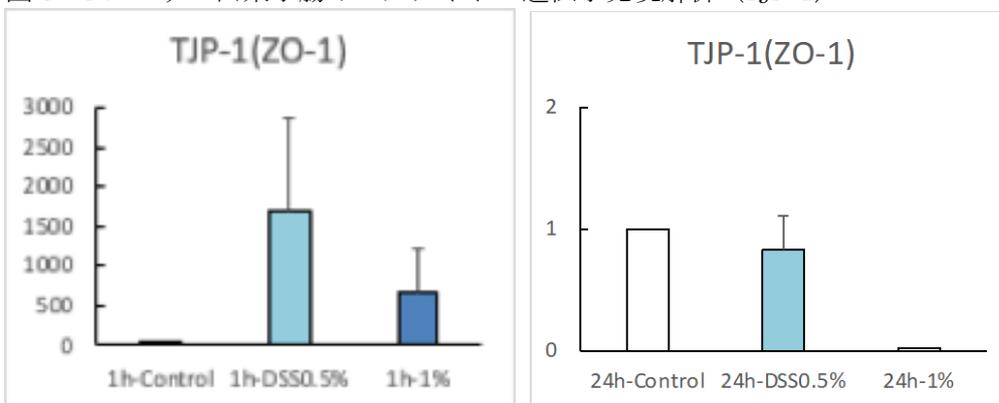
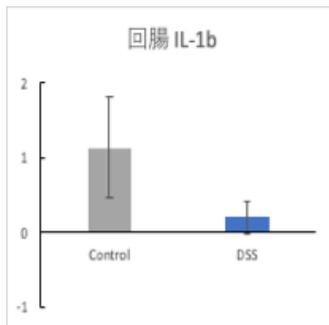
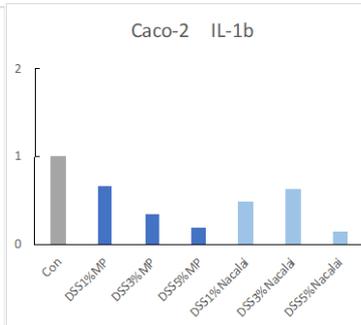


図7. 遺伝子発現解析 (IL-1 $\beta$ )  
マウス小腸



Caco-2細胞



マウス由来小腸オルガノイド

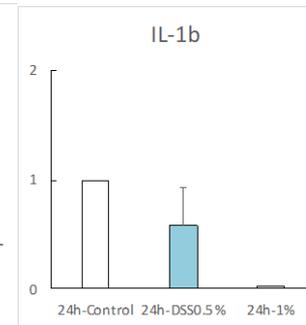


図8. 生細胞数測定 (WST-8)

