

オルガノイドおよびその共培養系を用いた化学物質の新規 in vitro 有害性評価手法の確立

In vivo 毒性試験

研究分担者： 美谷島 克宏 東京農業大学応用生物科学部

**研究要旨**

本年度は、化審法対象化学物質のウレタンやアクリルアミドを毒性陽性対照物質としてマウスを用いた 28 日間反復経口投与毒性試験を実施した。これより in vivo 実験において、標的臓器に毒性学的変化が惹起されることを確認した。特にウレタンでは、投与用量に依存した毒性学的変化が見出された。さらに、マウス正常組織を用いて一次線毛関連因子に対する免疫組織化学染色法を確立した。これより in vivo のマウス正常組織において陽性像が認められ、一次線毛が検出可能であることを確認した。

次年度は、上記のマウス毒性試験より得られた病態組織において、一次線毛への影響の有無を確認し、in vivo 毒性試験とオルガノイド新規試験法の類似性を解析していく予定である。

**A. 研究目的**

In vivo 毒性評価を実施し、標的臓器における毒性所見の発現と一次線毛への影響の有無を確認するため、化審法対象化学物質のカルバミン酸エチル（ウレタン）やアクリルアミドを毒性陽性対照物質としてマウスに反復投与した。その採取臓器を用いて in vivo 毒性試験とオルガノイド新規試験法の類似性を解析することとした。

**B. 研究方法**

in vivo 毒性評価実験として下記のマウス 28 日間投与毒性試験を実施した。同実験で得られたサンプルを用いて病理組織学的に毒性学的影響を観察し、一次線毛の発現への影響を解析した（進行中）。さらに、別途実施したマウスを用いた毒性試験より得られた正常組織について、パラフィン包埋未染色標本を作製し、一次線毛の免疫組織化学的染色法の確立に向けた検討を実施した。

1. ウレタンのマウスを用いた 28 日間反復投与毒性試験

6 週齢（入荷時 5 週齢）の雄性 C57BL/6J マウス（日本エスエルシー株式会社）、1 群各 5 匹、合計 20 匹にウレタン（カルバミン酸エチル：富士フィルム和光純薬（株））を 0, 300, 1000 及び 2000 ppm の用量で 28 日間飲水投与した。投与量は、参考資料（National Toxicology Program, Toxicology Report Series #52）より、13 週間の飲水投与で、3300, 10000 ppm では死亡動物が認められ、330, 1100 ppm では肺病変が観察されていたことから、本試験系が 4 週間投与ということを考慮し、若干濃度を上げ、毒性兆候が捉えられると考えられる用量 2000 ppm を最大投与量とした。以下、

300, 1000 ppm を設定した。投与液の調製は、必要量のウレタンを秤量し、水道水を加え、スターラーで攪拌して溶解させた後にメスアップした。調製は 3 ないし 4 日に 1 回の頻度で行なった。

観察及び測定項目：

一般状態は、実験開始後、1 日 2 回、すべての動物について一般状態、臨床症状、生死などを観察し、個体別に記録した。

体重は、実験開始時及びその後、毎週 2 回、全動物について個体別に体重を測定した。また、計画屠殺時に各動物の体重（剖検日体重）を測定した。

摂水量は、実験開始後、毎週 1 回、2 日間の摂水量をケージ単位で測定し、1 日平均摂水量（mL/animal/day）を算出した。なお、1 日平均摂水量より、1 日平均被験物質摂取量（mg/kg/day）を算出した。

血液生化学的検査は、投与期間終了後の全動物について下記の検査を実施した。検査試料（血液）の採取は、実験小動物用簡易吸入麻酔装置を用いてイソフルラン麻酔下で開腹し、腹部大動脈から行なった。採取した血液を遠心分離して得た血清を用いた。

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、アルカリフォスファターゼ（ALP）、総ビリルビン（T-BIL）、尿素窒素（BUN）、クレアチニン（CRE）、グルコース（GLU）、総コレステロール（T-CHO）、トリグリセリド（TG）

肺胞洗浄液（BALF）：採血後に放血致死させた動物について、BALF を採取した。採取は、開胸後、左肺の気管支を木綿糸で結紮した後、気管よりチューブをカニューレションし、常温の滅菌生理食塩液 1 mL をチューブから右肺に、自然落下により注入・排出する操作を 2 回行って採取した。採取した BALF について乳酸脱水素酵素（LDH）及びマイクロ蛋白（ $\mu$ -TP）を測定した。

剖検は、全生存動物について、全身諸器官・組織の肉

眼的病理学観察を実施し、下記の器官・組織を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液に保存した。

心臓、脾臓、リンパ節（頸部、腸間膜）、胸腺、下垂体、甲状腺（上皮小体を含む）、鼻腔（鼻甲介）、副腎、気管、肺（気管支を含む）、舌、唾液腺（顎下腺、舌下腺）、食道、胃（前胃、腺胃）、小腸（十二指腸、空腸、回腸）、大腸（盲腸、結腸、直腸）、肝臓、胆嚢、膵臓、腎臓、膀胱、精巣、前立腺（凝固腺、腹葉、背側葉）、精嚢、精巣上体、脳（大脳、小脳）、脊髄（胸部）、坐骨神経（右）、大動脈、眼球（視神経を含む）、ハーダー氏腺、涙腺、皮膚（右鼠径部）、骨及び骨髄（右大腿骨、胸骨）、骨格筋（大腿筋、右）

さらに、下記の器官については重量を測定し、剖検日体重を用いて器官重量体重比（相対重量）を算出した。心臓、腎臓、肝臓、肺、脾臓、胸腺

病理組織学的検査は、定法に従い下記の臓器についてHE（ヘマトキシリン・エオジン）染色標本を作製し、組織学的に観察した（進行中）。

肝臓、肺、腎臓、脾臓、胸腺、小腸、大腸、腸間膜リンパ節

さらに、未染パラフィン標本を用いて一次線毛関連因子に対する一次抗体を用いて免疫組織化学的な染色を施している（進行中）。

## 2. アクリルアミドのマウスを用いた28日間反復投与毒性試験

6週齢（入荷時5週齢）の雄性C57BL/6Jマウス（日本エスエルシー株式会社）、1群各5匹、合計20匹にアクリルアミド（富士フィルム和光純薬（株））を0、250、500及び1000ppmの用量で28日間飲水投与した。投与量は、同物質の毒性情報より設定した。投与液の調製は、必要量のアクリルアミドを秤量し、蒸留水を加え、スターラーで攪拌して溶解させた後にメスアップした。調製は週2回の頻度で行なった。

観察及び測定項目：

上記のウレタンの実験と同項目を設定した。

病理組織学的検査では、定法に従い下記の臓器についてHE染色標本の作製、一次線毛関連因子に対する一次抗体を用いて免疫組織化学的な染色をしている（組織標本作製中）。

肝臓、肺、腎臓、脾臓、胸腺

## 3. マウス正常組織を用いた一次線毛の免疫染色系の確立

上記の毒性物質より得られた臓器において一次線毛の免疫組織化学染色を実施するのに先立ち、マウス正常組織を用いて下記の一次線毛発生・線毛形成に関与するタンパク質の免疫染色系の確立を試みた（いずれもProteintech Group, Inc）。

Acetylated Tubulin (Lys40, Proteintech: No. 66200-1-Ig), IFT88 (Proteintech: No. 13967-1-A), ADCY3 (Proteintech: No. 19492-1-AP), ARL13B (ARL2L1, Proteintech: No. 17711-1-AP)

本検討では、いずれもマウスの実験の正常対照群から得られた各種臓器：脳、肺、腎臓、心臓、小腸、大腸及

び肝臓についてのパラフィン包埋切片を用いた。

（倫理面の配慮）

当該投与実験は、実施施設により動物実験計画書が審査され、承認を受け遂行した。

## C. 研究結果

マウス28日間反復投与実験において、ウレタンでは投与用量に依存した毒性学的影響が肺並びに肝臓に認められた。アクリルアミドでは、体重、摂水量並びに一般状態に顕著な影響が認められたが、それに伴うストレスに起因する変化が主体であった。これよりさらに低用量群を設定したマウスの反復投与実験を追加した（解析中）。さらに、マウス正常組織を用いて一次線毛関連因子の発現についての免疫組織化学法を確立した。その結果、特定の組織において陽性像を示すことを確認した。

### 1. ウレタンのマウスを用いた28日間反復投与毒性試験

死亡例は認められなかった。一般状態に明らかな変化は認められなかった。

体重は、高用量の2000ppm投与群において投与20日目以降から対照群に対し有意な減少が認められた。

摂水量は、投与3週目の300及び2000ppm投与群において有意に低下した。摂水量から算出されたウレタン投与量の平均は、300ppm:82.9mg/kg/day, 1000ppm:280.0mg/kg/day, 2000ppm:555.7mg/kg/dayであった。

血液生化学的検査では、対照群に対し2000ppm投与群において有意なALTの増加、T-BIL, BUNの増加傾向、TGの減少傾向が見られた。

BALF上清を使用した生化学的解析では、対照群に対し2000ppm投与群においてLDHの減少傾向、 $\mu$ -TPの有意な増加が認められた。

剖検では、肉眼的な異常所見は認められなかった。

臓器重量では、対照群に対し2000ppm投与群において心臓、肝臓、脾臓及び胸腺の有意な減少が見られた。相対重量では、対照群に対し2000ppm投与群において脾臓及び胸腺で減少、肝臓では全被験物質投与群で減少、さらに肺では1000ppm以上の投与群で有意な増加が見られた。

### 2. アクリルアミドのマウスを用いた28日間反復投与毒性試験

投与7日目以降に1000ppm群で死亡例が認められ（2例）、投与9日目に同群の残動物の切迫解剖を実施した。投与14日目以降に500ppm群で死亡例が認められ（1例）、投与21日目に同群の切迫解剖を実施した。250ppmについては、最終的に28日間まで投与されたものの、対照群に対して明らかな体重減少並びに摂水量の減少が認められ、歩行異常など一般状態への影響も認められた。投与期間終了後の剖検において250ppmでは、個体の削瘦、ストレスに関連すると考えられる胸腺の萎縮、脾臓、精嚢及び前立腺の小型化が認められた。

これより本実験系では、アクリルアミド自体の毒性学

的变化のみでなく、一般状態の悪化に伴うストレス性の変化が伴うと考えられたことから、一次線毛の発現を観察する条件を見出すため、新たに低用量群を追加設定した28日間試験を追加することとした。よって、病理組織標本作製以外の各種解析については一旦中断することとした。

### 3. マウス正常組織を用いた一次線毛の免疫染色系の確立

下記の一次線毛に関連する因子に対する免疫組織化学染色法を確立し、検索した各種臓器における特定組織において陽性反応が見られた。

#### (1) Acetylated Tubulin (Lys40)

$\alpha$ -チューブリンのK40残基のアセチル化は、正常な微小管の特徴であり、正常な線毛の免疫蛍光染色を行う際のコントロール実験にも選択される。 $\alpha$ -チューブリンのアセチル化残基はK40(40番目のリジン残基)であり、 $\alpha$ -チューブリンアセチルトランスフェラーゼ( $\alpha$ -TAT)によって触媒される。後述のIFT88と併用して、線毛の退縮を評価することが可能とされている。

本抗体を用いて検討したところ、脳(海馬)、肺(気管支上皮)、腎臓(尿細管上皮)、心臓(心筋細胞)、肝臓(胆嚢上皮)、小腸(上皮、筋層神経)、大腸(筋層神経)で陽性所見が認められた。

#### (2) IFT88

鞭毛内輸送タンパク質88(別名: TG737、TTC10)は、線毛の形成に必要なIFT粒子の構成要素とされている。多くの生物において、IFT88はその他の分子モーターやIFT粒子と共に、一次線毛、運動性線毛、鞭毛の形成や維持に必須の重要なプロセスである線毛内輸送を仲介する。また、IFT88は、有糸分裂の際に紡錘体極に局在し、紡錘体の配向に必要とされている。IFT88の欠損は、進行性嚢胞の発生と両腎の肥大を特徴とする、多発性嚢胞腎を引き起こす。本因子は、免疫蛍光染色でIFT88抗体をアセチル化チューブリンと共に線毛の退縮を観察するマーカーとして利用されている。IFT88のシグナルが、線毛の形状を可視化し、アセチル化チューブリンのシグナルが、微小管の長さを可視化していると報告されている。

本抗体を用いて検討したところ、脳(海馬)、肺(気管支上皮)、腎臓(尿細管上皮)、心臓(心筋細胞)、肝臓(小葉中心部)、大腸(粘膜基底部、筋層・筋層神経)で陽性所見が認められた。

#### (3) ADCY3

本遺伝子は、膜結合型酵素であり、二次メッセンジャーである環状アデノシンリン酸(cAMP)の形成を触媒するアデニルシクラーゼ3をコードしている。本因子は、ヒトの様々な組織で広く発現しており、多くの生理的及び病態生理学的な代謝過程に関与している可能性があり、この遺伝子は、異なるアイソフォームをコードする2つの転写バリエーションが見つかっている。

本抗体を用いて検討したところ、脳(海馬)、肺(気管支上皮)、腎臓(尿細管上皮)、心臓(心筋細胞)、肝臓(胆嚢上皮)、小腸(粘膜上皮、筋層)、大腸(粘膜上皮、筋層)で陽性所見が認められた。

#### (4) ARL13B(別名: ARL2L1)

Rasスーパーファミリーに属する低分子量線毛Gタンパク質であり、線毛に局在し、線毛の形成やソニックヘッジホッグシグナル伝達に必要とされる因子で、ARL13Bを標的とする抗体は線毛の標識に使用されている(PMID: 22072986)。ARL13Bの欠損は、小脳の異常を特徴とする常染色体劣性疾患であるジュベール症候群(JBTS)を引き起こすことが知られている。

本抗体を用いて検討したところ、脳(海馬)及び肺(気管支上皮)で陽性所見が認められた。

## D. 考察

陽性対照物質であるウレタンを用いたマウスin vivo毒性試験を実施し、標的臓器において毒性病変が惹起されることが確認された。さらに、一次線毛の発現を検出可能とする免疫組織化学染色法を確立し、in vivo正常組織において線毛関連因子が種々の組織に発現していることが確認された。

## E. 結論

本年度は、マウスを用いた毒性陽性対照物質の28日間投与毒性試験を実施し、in vivoにおいて明らかな毒性学的変化が認められることを明らかにした。また、マウスの正常組織について、新たな毒性学的指標になり得る一次線毛の発現について免疫組織化学的染色法を確立し、一次線毛が検出可能であることを確認した。

次年度は、上記のマウス毒性試験より得られた病態組織において一次線毛の発現への影響を観察する。これより一次線毛発現への影響の有無が、新たな毒性指標となり得る可能性について追求していく予定である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## 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