

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 教授

## 研究要旨

化審法対象化学物質をマウスに28日間投与して *in vivo* 毒性試験としての毒性学的影響について標的臓器である肝臓ないし肺における毒性プロファイルを解析した

本実験で得られた結果を活用し、今後はオルガノイドへの毒性物質暴露により得られた新たな毒性指標についての検証を進める予定である。

### A. 研究目的

新たな毒性指標として一次線毛発現への影響を検証するため、マウスに各種の毒性物質を投与した *in vivo* 毒性試験の結果と、オルガノイドによる新規試験との類似性について精査する。

### B. 研究方法

オルガノイドによる新規試験と従来の *in vivo* 毒性試験との類似性について精査するため、マウスを用いて毒性陽性物質の反復投与毒性試験を実施した。

6週齢の雄性C57BL/6Jマウスに、カルバミン酸エチル(EC:ウレタン)を0, 300, 1000及び2000 ppm、アクリルアミドを0, 250, 500及び1000 ppmの用量で28日間飲水投与した(1群各5匹)。さらに、アセトアミノフェン(APAP)を0, 3100, 6200及び12400 ppmの用量で、フェノバルビタール(PB)を0, 500及び1000 ppmの用量で混餌投与した。さらに、PBは50 mg/kgの用量で腹腔内投与する群も設定した。いずれも28日間の投与期間終了後に解剖し、血液並びに主要臓器を採取した。採取された臓器は、定法に従いHE染色標本作製し、さらに未染パラフィン標本を用いて炎症関連の指標としてマクロファージ(F4/18)免疫組織化学的な染色を実施した。採取した凍結臓器を用いて肝臓及び肺の遺伝子発現解析を実施した。さらに解剖時の血清を用いて血液生化学検査を実施した。

(倫理面への配慮)

マウス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、使用動物数の低減に努めた。

### C. 研究結果

EC及びアクリルアミドの反復投与実験において、投与用量に依存して体重、摂餌量、摂水量並びに一般状態への影響が認められた。EC投与により、対照群と比較し、体重、摂水量共に減少傾向を示した。血液生化学検査により、血清中AST及びT-BILの増加傾向、TGの減少傾向が見られた。病理組織学的検査により、肺及び肝臓に明らかな変化は観察されなかった。しかし、高用量投与群の免疫組織化学的染色において、両臓器共にF4/80陽性マクロファージの増加が観察された。遺伝子発現解析では、肺においてMCP-1及びIL-6が、肝臓においてIL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$ 及びMCP-1が増加ないし増加

傾向にあった。一方、アクリルアミド投与により、血液生化学的検査では、肝障害の指標であるAST、ALTが500 ppmで高値を示したが、明らかな組織学的変化は伴っていなかった。さらに、APAPの反復投与により血液生化学的影響と肝臓における巣状壊死が認められた。PBの反復投与により肝臓重量の増加と病理組織学的に肝細胞肥大が観察された。

### D. 考察

今年度は肝臓並びに肺に毒性を発現することが報告されている4化合物についてマウスを用いた *in vivo* 反復投与毒性試験を実施した。EC投与では肝臓並びに肺において炎症の惹起を示唆する影響が発現しているものと考えられた。アクリルアミド投与では、肝障害は示唆される血液生化学データは得られたものの明らかな毒性学的影響は捉えられない状態にあるものと考えられた。APAP投与により、既報のとおり明らかな肝障害が惹起されているものと考えられた。PB投与により、既報のとおり酵素誘導に伴う肝臓への影響が発現しているものと考えられた。

### E. 結論

今年度はマウスを用いた *in vivo* 毒性試験を実施した。陽性対照物質の投与により標的臓器である肝臓において、いくつかの毒性パターンを有する病態が得られた。今後はオルガノイド試験より新たに得られた指標についても評価して、*in vitro* 評価系の妥当性を検証していく予定である。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

今年度はなし

#### 2. 学会発表

神野 涼平、上地 哲平、当摩 茉莉花、煙山 紀子、笹瀬 智彦、前川 竜也、中江 大、美谷島 克宏、マウス肝線維化病態の進行と血中 Mac-2 binding protein (Mac-2bp) 濃度の関連についての解析, 第40回日本毒性病理学会学術集会 (2024.01.23 川崎)

### G. 知的所有権の取得状況

該当なし