

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）

国内外で開発されOECDで公定化されるNAMを活用した試験法の行政的な  
受け入れに対応するための研究

令和6年度分担研究報告書

肝臓並びに腸管オルガノイドを用いた*in vitro* toxicokinetics 評価系の構築

研究分担者 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

**研究要旨**

昨今、動物実験を用いないで全身毒性を評価するため、動物実験代替法の枠に捉われない概念として、New Approach Methodology (NAM) の開発が盛んである。NAM とは「動物実験の利用を避けた化学物質の有害性およびリスク評価における情報を用いるための技術、方法、アプローチ、またはその組み合わせ」と米国環境保護局 (EPA) により定義されている。経済協力開発機構 (OECD) の試験法ガイドライン (TG) プログラム各国調整官作業部会 (WNT) や 2023 年に新設された Advisory Group on Emerging Science in Chemicals Assessment (ESCA) では、NAM に用いる新興技術の公定化のためのバリデーションを加速するための基準や仕組みの改定を促している。

本研究班は、このような世界的な動向に呼応して NAM の開発を加速し、新興技術に基づく評価法を公定化させるとともに、他国が提案する OECD 大型プロジェクトに関与し、得られた成果を化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）や毒物及び劇物取締法（毒劇法）などの我が国の厚生労働行政に反映させることを目的とする。

本分担研究では、腸・肝を主たる対象とし、オルガノイドを含む再構成系を用いて、アウトカムと背景メカニズムの両面から *in vivo* と相関性のある *in vitro* 毒性評価系構築に向けた検討に取り組んでいる。

**A. 研究目的**

昨今、動物実験を用いないで全身毒性を評価するため、動物実験代替法の枠に捉われない概念として、New Approach Methodology (NAM) の開発が盛んである。NAM とは「動物実験の利用を避けた化学物質の有害性およびリスク評価における情報を用いるための技術、方法、アプローチ、またはその組み合わせ」と米国環境保護局 (EPA) により定義されている。経済

協力開発機構 (OECD) の試験法ガイドライン (TG) プログラム各国調整官作業部会 (WNT) や 2023 年に新設された Advisory Group on Emerging Science in Chemicals Assessment (ESCA) では、NAM に用いる新興技術の公定化のためのバリデーションを加速するための基準や仕組みの改定を促している。

本研究班は、このような世界的な動向に呼応して NAM の開発を加速し、新興技術に

基づく評価法を公定化させるとともに、他国が提案する OECD 大型プロジェクトに関与し、得られた成果を化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）や毒物及び劇物取締法（毒劇法）などの我が国の厚生労働行政に反映させることを目的とする。

そのうち、本分担研究では、腸・肝を主たる対象とし、オルガノイドを含む再構成系を用いて、アウトカムと背景メカニズムの両面から *in vivo* と相関性のある *in vitro* 毒性評価系構築に向けた検討に取り組んでいる。

## B. 研究方法

腸肝循環の animal MPS 構築のため、肝臓における検討として、初年度は、マウス肝オルガノイド培養の基礎データ取得に加え、生体マウスでの化学物質曝露時の CYP 誘導や毒性評価を行うこととした。

マウス肝臓由来オルガノイドは、5-10 週齢の雄性 C57BL/6J マウスより肝臓を単離し、コラゲナーゼ処理、セルストレーナーによる調製後、マトリゲル上にて三次元培養を行った。オルガノイド組織は得られたものの、増殖方法の安定化が求められた。得られたオルガノイドに対して、組織学的解析では、iPGell®を用いてオルガノイドをゼリー状に固め、パラフィン包埋ブロックを作製後、各種染色・観察を行った。遺伝子発現解析では、RNA 抽出、逆転写後、各種プライマーを

用いた *real-time PCR* を実施し、同系統マウス肝組織における遺伝子発現と比較検討を行った。また、肝線維化評価に対するオルガノイドの利用に関して検討した。オルガノイドに対し、TGFβ1 を 6, 30 ng/mL 24 時間の刺激を行い、肝線維化反応に対する各種解析を実施した。

8 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを用いて、*in vivo* と比較するための基礎的データ取得を目的とした薬剤投与試験を実施した。腸管と肝臓で共通した CYP アイソフォーム（CYP3A4 および CYP2C9）の基質となるデキサメタゾンおよびジクロフェナクを被験物質として選定し、それぞれメチルセルロース懸濁液を作製し、デキサメタゾン（500 mg/kg）、ジクロフェナク（45 mg/kg）の用量で 5 日間反復経口投与後に解剖した。

小腸に関する検討として以下の 3 項目を実施した。1) マウス小腸オルガノイド培養系による検討、2) MPS デバイスへの搭載に向けた検討、3) マウスを用いた代謝酵素基質の投与による基礎的データの確認

小腸における検討として、本年度はマウスの腸管上皮オルガノイド（STEMCELL 社）を購入し、IntestiCult™ M Organoid Growth Medium (Mouse) を用いて STEMCELL 社より提示された定法に従いマトリゲルドームを形成し、オルガノイド培養に着手した。引き続き、

MPS デバイスに搭載し被験物質を曝露するための必須条件であるマトリゲルドーム培養下の腸管オルガノイドからの平面培養化の検討にも取り組んでいる。肝臓の取り組みと同様に、被験物質はニフェジピンおよびジクロフェナクを用いた。なお、ニフェジピンおよびジクロフェナクの曝露条件を検討するため、腸管上皮由来の株化細胞である Caco-2 細胞の培養において被験物質の細胞毒性を検討した。

(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

得られたマウス肝オルガノイドは、管腔を形成し、Cytokeratin19 および SOX9、CD44 が陽性を示した。マウス正常肝組織では、Cytokeratin19 および SOX9 は胆管上皮細胞に染色され、CD44 は陽性細胞がほとんど見られなかった。遺伝子発現解析において、アルブミンおよび CYP3A11 は、マウス正常肝組織と比較してオルガノイドで非常に低値を示した。一方で、肝芽細胞マーカーである  $\alpha$ -fetoprotein は肝組織とオルガノイドで同程度の発現を示した (図 1)。

オルガノイドへの TGF $\beta$ 1 刺激では、TGF $\beta$ 1 の刺激によって、細胞質の微細な

空胞および、核の変性壊死像が管腔内に認められた。SOX9, CD44, collagen type 1, fibronectin の遺伝子発現は、Control と比較して有意に増加した (図 2)。一方で、肝細胞および肝芽細胞マーカーであるアルブミンおよび  $\alpha$ -fetoprotein は、Control と比較して著明に減少した (図 3)。

生体マウスを用いた薬剤経口投与における CYP 発現変動は、ヒトとの相同遺伝子として報告されている CYP サブタイプを中心に遺伝子発現変化を観察した。デキサメタゾン投与では、血清中 ALT 活性の増加、肝組織の空胞変性、肝臓における CYP3A11, CYP2A5, および CYP2C29 の遺伝子発現増加を認めた (図 4)。ジクロフェナク投与では、血清中 ALT 活性の増加傾向、肝組織の巣状壊死、CYP2C29 の遺伝子発現増加傾向を認めた (図 5)。

マウス腸管オルガノイドは、STEMCELL 社より提示されたマトリゲルドーム培養法により腸管由来組織は順調に増殖した。さらに、同法により培養された腸管オルガノイドを一定数集積し、平面培養化の検討を試みた。さらに、オルガノイド培養における細胞毒性を評価するための条件検討として Caco-2 細胞培養によるニフェジピンおよびジクロフェナクの細胞毒性を検討した。その結果、両化合物ともに顕著な細胞毒性は示さなかった (図 6)。この結果を受け、今後はマウス腸管オルガノイド由来の平面培養への被験物質の曝

露を進めていく。

生体マウスを用いた薬剤経口投与における CYP 発現変動は、肝臓における検討と同実験として実施した。ヒトとの相同遺伝子として CYP サブファミリーを中心に遺伝子発現変化を観察した。デキサメタゾン投与では、小腸における遺伝子発現において、CYP3A11 の増加並びに CYP2D9 の増加傾向を示し (図 7)、さらに、CYP3A4 の免疫組織科学染色において、マウス小腸上皮細胞の陽性像の増強を認めた (図 8)。ジクロフェナク投与によるマウス小腸の遺伝子発現解析では、CYP2D9 および CYP3A11 の増加ないし増加傾向、CYP2C9 の減少傾向を認めた (図 7)

#### D. 考察

増殖過程で得られた肝オルガノイドは、胆管および肝芽細胞マーカーが強く、アルブミンや CYP の発現が弱かった。今後、増殖の安定化およびオルガノイドの成熟化が課題とされた。今後は、CYP 活性を有する成熟肝培養細胞を用いて、被験物質投与の代謝について評価を進めるとともに、オルガノイドとの比較検討を行うことで、それぞれの適性について考察する予定である。

肝オルガノイドに TGFβ1 刺激を行うと、collagen や接着分子の遺伝子発現が増加したことより、細胞の分化や形質の転換が評価できる可能性が示唆された。よって、従来の平面培養や生体では得られない線維化メカニズムの評価系が構築できる可能性が示唆された。

生体マウスを用いた薬剤経口投与において、デキサメタゾンおよびジクロフェ

ナク投与後に CYP 発現が上昇するなどの明らかな変化を認め、基礎的データが取得できた。今後、薬物動態を *in vitro* と比較するうえでの対照サンプルとなり得るもの考えられた。また、CYP 発現変動に関しては、CYP サブタイプは必ずしもヒトと一致せず、相同遺伝子として報告されている CYP サブタイプを考慮する必要があると考えられた。

腸管オルガノイドの分担研究においては、十分なオルガノイドを取得し、平面培養化を安定化させるための手技を確立した。引き続き、被験物質としてニフェジピン並びにジクロフェナクを曝露して腸管上皮由来の CYP 発現に関する遺伝子発現解析を実施する。

生体マウスを用いた薬剤経口投与において、小腸においても、基質となる薬剤であるデキサメタゾン並びにジクロフェナクの投与による遺伝子発現並びに免疫組織科学染色における発現変動が見出された。この内容は、今後の小腸由来オルガノイド培養からの平面培養による曝露検討に反映させ得る結果を見出した。

#### E. 結論

腸肝循環の animal MPS 構築のため、マウスの肝臓ならびに小腸を由来とするオルガノイド培養を用いた基礎的データの蓄積に着手した。引き続き、肝臓および小腸オルガノイドに被験物質を曝露することによる CYP 誘導を含む初回通過効果の指標となる結果の蓄積を進め、MPS 系の構築や妥当性の証明に寄与する研究を進めていく。

#### F. 研究発表

##### F.1. 論文発表

該当なし

## F.2 学会発表

煙山紀子，畠中理園，佐野心優，大橋清佳，前川竜也，中江大，美谷島克宏，マウス肝臓オルガノイドを用いた毒性評価系の開発に向けた検討，第41回日本毒性病理学会総会および学術集会（2025.1.30）

## G. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

### 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

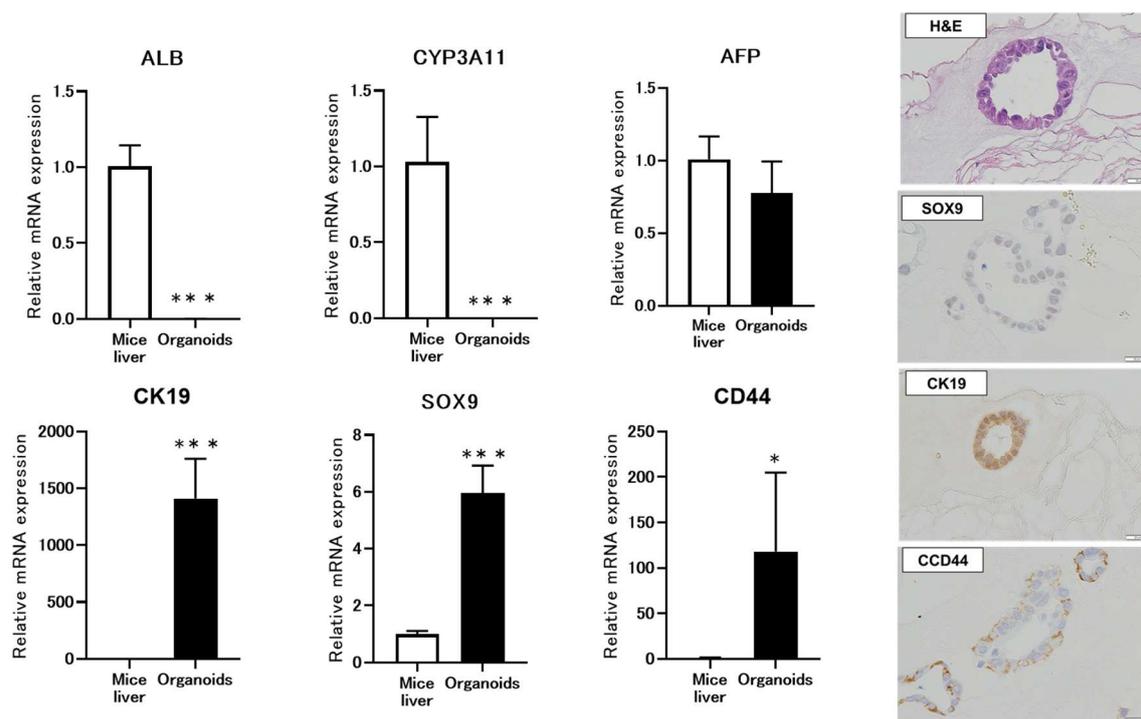


図1 マウス肝オルガノイド培養と生体との比較

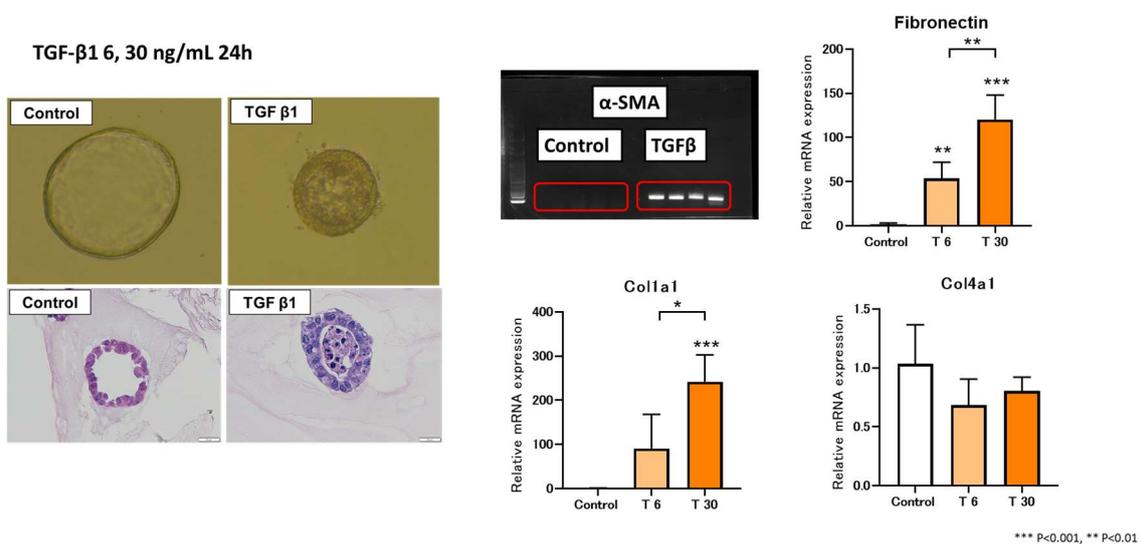


図2 肝オルガノイドTGF-β1刺激による形態変化と線維化関連遺伝子発現

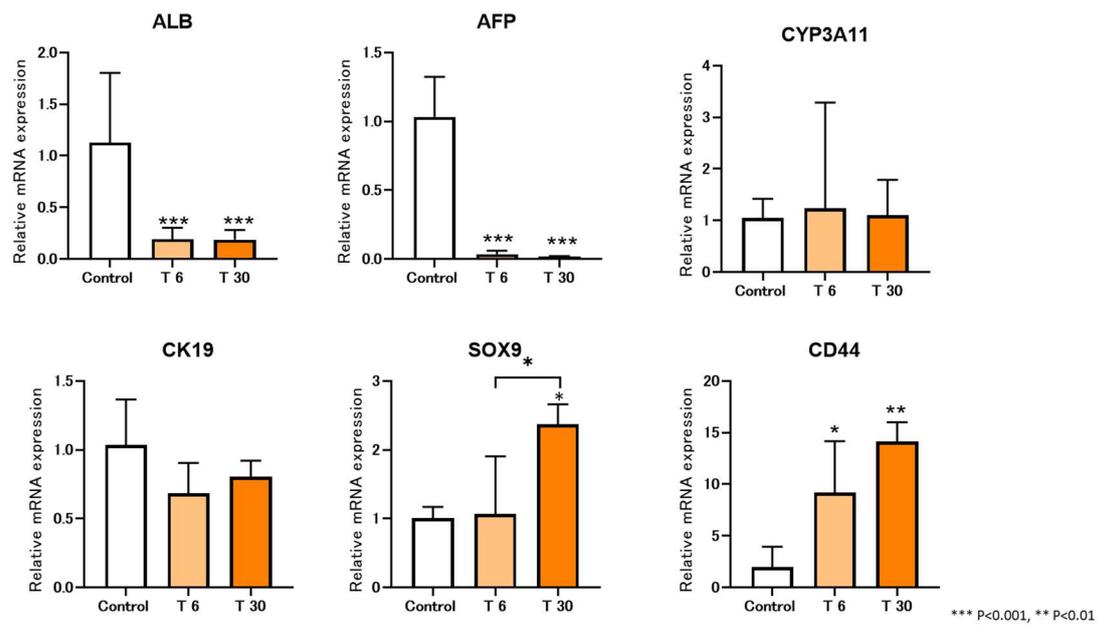


図3 肝オルガノイドTGF-β1刺激による肝細胞マーカーの変化

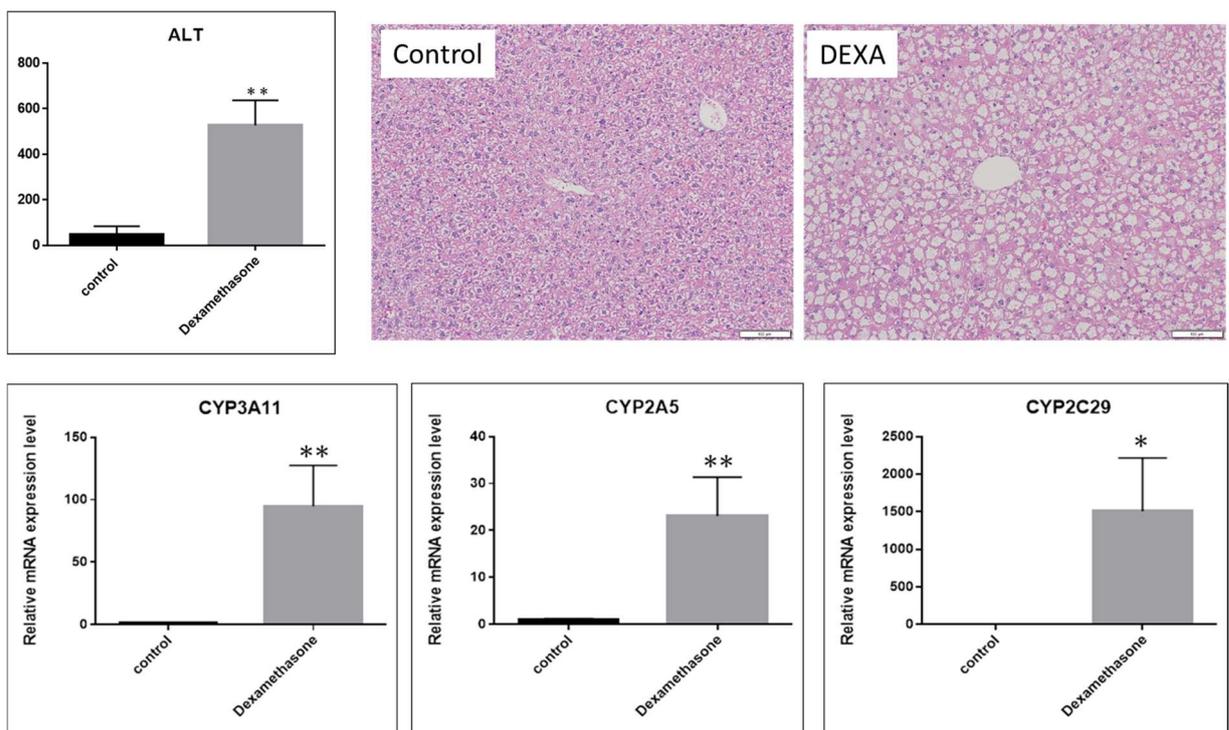


図4 生体マウスへのデキサメタゾン投与による肝組織への影響

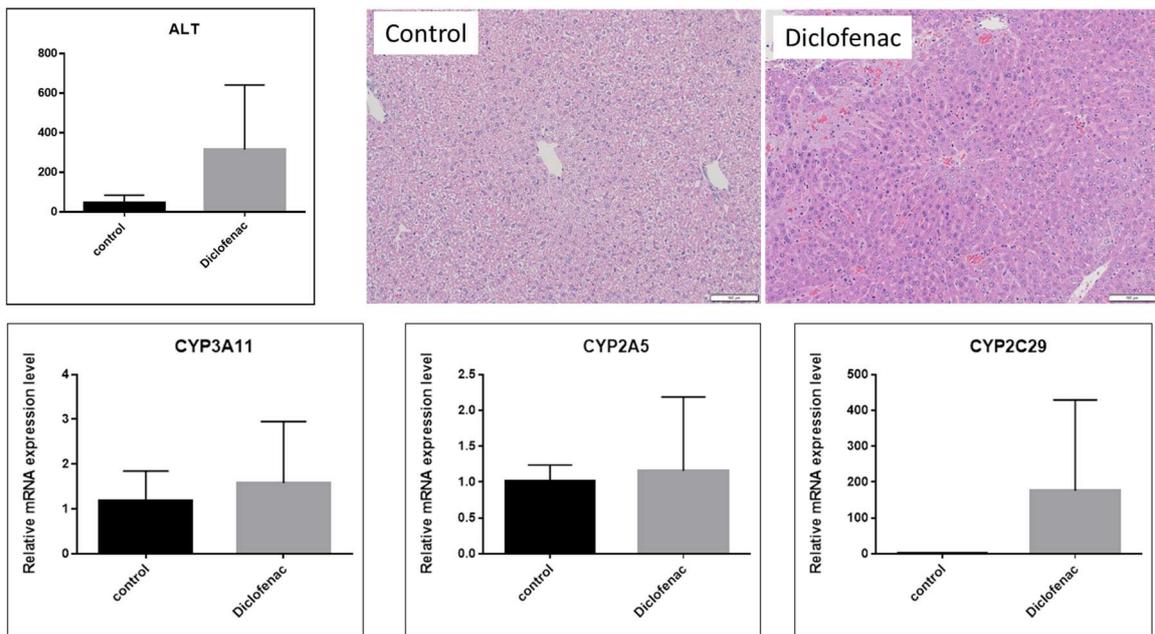


図5 生体マウスへのジクロフェナク投与による肝組織への影響

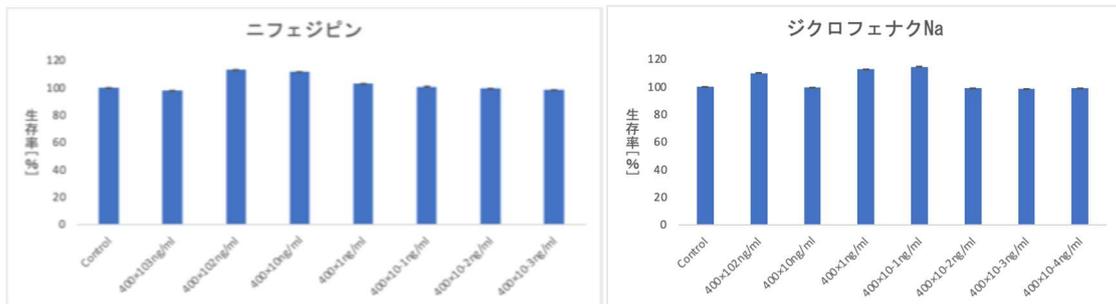


図6 Caco-2細胞による処理濃度検討

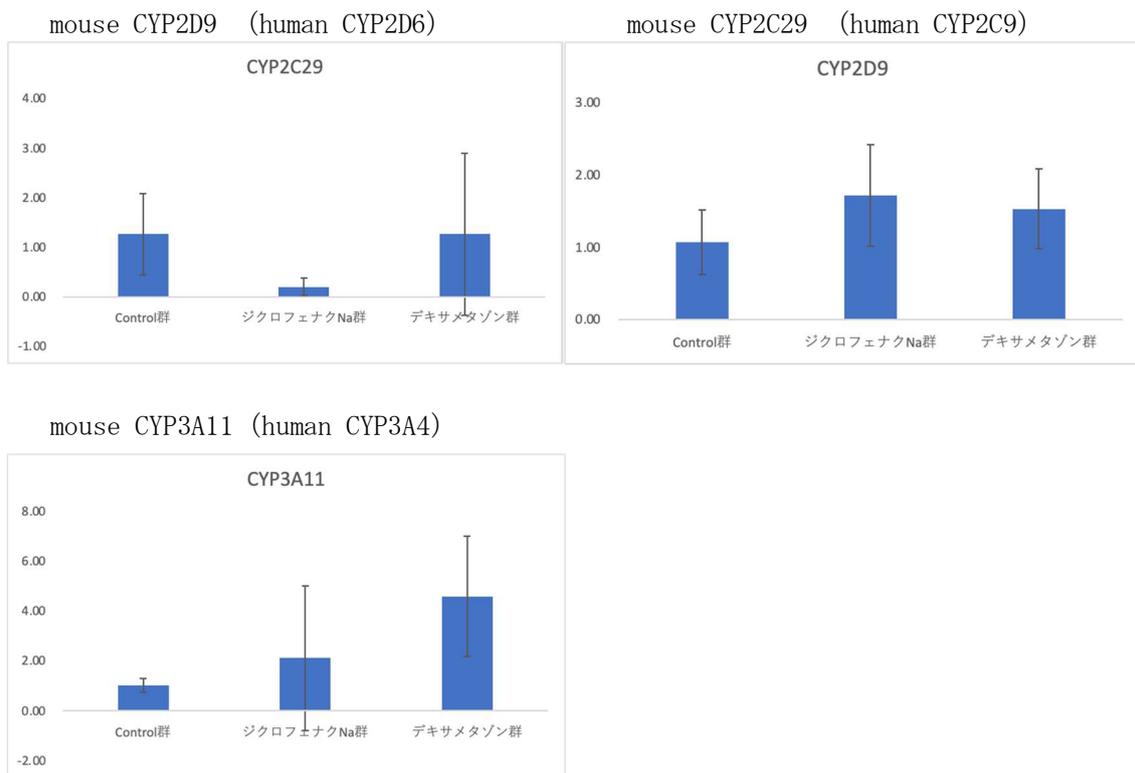


図7 マウス小腸における CYP の遺伝子発現解析 (PCR)

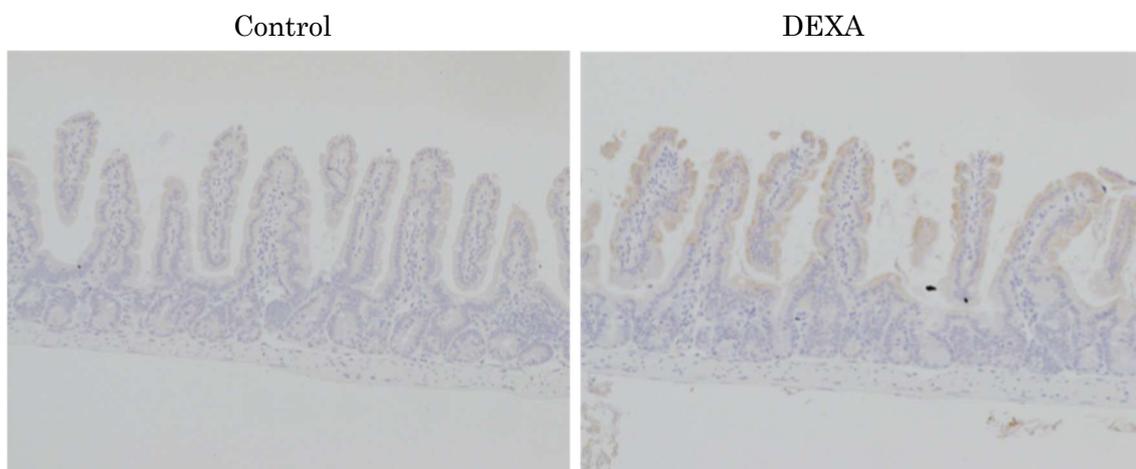


図8 デキサメタン投与による小腸上皮の CYP3A4 発現 (免疫組織化学染色)