

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
(22KD1001)

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

本分担研究では、オルガノイドによる新規試験法との類似性を確認するため、毒性対照物質を用いてマウス in vivo 毒性試験を実施し、標的臓器における種々の毒性学的データを取得することを目的として実施した。

本年度は、肝臓毒性陽性対照物質を用いた in vivo 投与試験を実施し、標的臓器における毒性所見の発現を確認した。実際には肝臓を標的とした毒性発現化合物を新たにマウスに反復投与し、病理組織学的観察並びに遺伝子発現解析を実施した。本実験より得られた結果は、in vitro オルガノイドを用いた結果と比較し、新しい毒性学的指標を見出すための情報として班内の研究分担者に共有した。

本分担研究より得られた成果として、肝臓毒性を呈する陽性対照物質を用いた in vivo 投与試験を実施し、実際にマウス肝臓における毒性所見の発現を確認し in vitro 試験と比較対象となる材料を得ることが出来た。その結果は、in vitro オルガノイド試験による新たな毒性指標の開発に寄与し得るものと考えられた。

A. 研究目的

化学物質の開発には、安全性評価が不可欠であり、そのために実験動物を用いた反復投与試験等の実施が必要とされ、その結果が重視されることが多い。一方、動物愛護 3Rs (Replacement・Reduction・Refinement) の観点から、化学物質の発がん性予測等の安全性評価の動物実験代替法の開発・導入が求められている。本分担研究では、肝臓オルガノイド培養系を用いた化学物質の新規 in vitro 有害性評価系の確立を目指すため、実際にマウスを用いて in vivo 毒性評価を実施し、オルガノイドを用いた新規評価系の有用なエンドポイントとなり得るかについて検証することを目的とした。

B. 研究方法

分担研究者として、美谷島はオルガノイドによる新規試験法との類似性を確認するため、毒性対照物質を用いてマウス in vivo 毒性試験を実施し、標的臓器である肝臓についての毒性学的データを取得した。

1) In vivo 毒性試験

これまで本分担研究では、雄性C57BL/6Jマウスに、in vitro 試験と共通してフェノバルビタール(PB)、カルバミン酸エチル(EC)、クマリン(CMR)、モノクロタリン(MCT)を投与し、さらに、肝細胞壊死など顕著な肝毒性を示す化学物質としてアセトアミノフェン(APAP)を投与し、それぞれの化学物質の肝毒性プロファイルを明らかにしてきた。特に本年度のマウスへの投与は、CMR並びにMCTについて反復投与を行い、それぞれの肝臓毒性を評価した。

1-1) CMRを用いた検討

本分担研究では、マウスにCMRを短期間反復投与することにより生じる肝臓への影響を解析した。具体的な研究内容として、6週齢の雄性C57BL/6J系マウスに、CMRを5,000 ppmで4週間、2,500 ppm並びに5,000 ppmで13週間間断投与した。対照群には標準飼料として粉末CE-2を与えた。給餌期間終了後に解剖し、採血並びに臓器の採取を行った。肝臓については病理組織学的解析並び

に遺伝子発現解析を行った。

1-2) MCTを用いた検討

本分担研究では、マウスにMCTを2ないし4週間間断的に反復投与することにより肝臓への影響を解析した。具体的な研究内容として、6週齢の雄性C57BL/6J系マウスにpHを調整した生理食塩水に溶解してMCTを200 mg/kgの用量で2ないし4週間にわたり週1回の間断腹腔内投与を行った。対照群には同溶媒を投与した。飼料は固形標準食(CE-2)を用いた。投与期間中に体重及び摂水量を測定した。投与期間終了後に解剖し、臓器重量、血液生化学的検査、病理組織学的解析及び遺伝子発現解析を行った。

(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た。また、他実験で用いたサンプルも検討に用いるなど、使用動物数の低減に努めた。

C. 研究結果

1) In vivo 毒性試験

1-1) CMRを用いた検討

CMRの反復投与により、体重は対照群に対し4及び13週間群ともに減少傾向にあった。肝臓重量は、対照群に対し13週間5,000 ppm群で増加傾向にあった。肝臓の病理組織学的検査では、4週間投与による明らかな変化は見られなかったが、13週間5,000 ppm群で、小葉周辺性の肝細胞肥大、巣状壊死及び炎症性細胞浸潤が認められた。血液生化学的検査では、対照群に対し5,000 ppm群でALT活性が増加ないし増加傾向にあった。FABP2の免疫組織化学染色では、全CMR投与群でより広範囲に陽性肝細胞が確認された。遺伝子発現解析では、肝細胞分化の指標となる因子であるHptr, Alb, CYP 3A11, Krt19, Hnf4aは4週間5,000 ppm群で減少傾向を示し、Sox9は4及び13週間5,000 ppm群で増加傾向を示した。

1-2) MCTを用いた検討

MCTの反復投与により、体重は、対照群に対し4週間投与群で減少傾向を示した。摂餌量は、対照群に対し2週間投与群で減少傾向を示した。血液生化学的検査では、対照群に対しALT及びASTが2週間投与群で増加傾向を示

したが、4週間投与群では明らかな変化は見られなかった。臓器重量では、両投与期間で明らかな影響は見られなかった。病理組織学的解析では、2週間投与群で巣状性肝細胞壊死、4週間投与群で、主に小葉中心性肝細胞のグリコーゲン蓄積の減少が認められた。さらに、対照群に対し両投与期間において2核肝細胞の増加が見られた。さらに、細胞増殖に関わるPCNAの免疫組織化学染色において、対照群に対し両投与期間において陽性細胞が増加傾向を示し、それは2週間投与群でより顕著であった。これに加え、胆管上皮細胞の増殖も認められた。遺伝子発現解析では、TNF α が対照群と比較し、両投与期間において増加傾向を示した。

D. 考察

1) In vivo 毒性試験

1-1) CMR を用いた検討

CMR は、シナモンなど多くの植物に含まれる芳香物質であるが、過剰摂取により肝障害を引き起こすとの報告もある。本分担研究では、マウスに CMR を短期間反復投与することにより生じる肝臓への影響について解析した。その結果、本実験条件において、4週間投与では明らかな組織学的変化は見られなかったが、肝細胞への分化の指標となる遺伝子発現に影響が見られた。一方、13週間投与では組織学的に明らかな肝障害が認められたが、Sox9を除き上記の遺伝子発現に明らかな変化は見られなかった。

1-2) MCT を用いた検討

MCT は、マウスやラットに投与することにより肺高血圧症を誘発することが知られている。肝臓の血流が障害されることで低酸素血症が生じ、肺高血圧症が誘発されるとされている。本分担研究では、マウスに MCT を2ないし4週間間歇的に反復投与することにより肝臓への影響を解析した。その結果、本実験条件において、MCTによる明らかな肝傷害は認められなかった。しかし、2核肝細胞並びに PCNA 陽性肝細胞は増加傾向を示し、さらに、胆管増生を示唆する変化も認められ、MCT反復投与による肝臓への影響が見出された。これより、

両化合物のマウスへの反復投与により、いずれも異なる肝毒性プロファイルを示す結果が得られた。これは今後の *in vitro* 毒性評価系の構築において、新たな評価指標の確立するための研究支援材料が得られたものと考えられた。

E. 結論

PB処置による肝臓由来オルガノイド(*in vitro*)と肝臓(*in vivo*)のメチル変化の比較では共通する1塩基レベルの変化部位、また変化領域は同定されなかった。メチル化を指標とする *in vitro* 有害性評価手法の確立において、暴露方法、共培養の活用などさらなる条件検討が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

1. 大橋 清佳、田中 あかり、竹田 結菜、神野 涼平、煙山 紀子、笹瀬 智彦、前川 竜也、美谷島 克宏、クマリンの反復投与毒性試験におけるマウス肝臓の病態解析、第41回日本毒性病理学会総会及び学術集会(2025.1.31)

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし