

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

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、肝毒性対照物質を用いてマウス *in vivo* 反復投与毒性試験を実施し、標的臓器における種々の毒性学的データを取得した。実際には、3年間にわたり肝臓を標的とした毒性発現化合物を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、各種物質の毒性プロファイルを明確にした。

本分担研究により、*in vitro* オルガノイドを用いた試験より得られた毒性指標を比較検証するための毒性所見を呈する材料を得ることが出来た。本成果は、*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について検証することを目的とした。

B. 研究方法

本分担研究では、肝臓由来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、マウスを用いて肝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、*in vitro* 試験と共通してカルバミン酸エチル(EC)、アクリルアミド(AA)、フェノバルビタール(PB)、クマリン(CMR)、モノクロタリン(MCT)を反復投与した。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)も反復投与した。

それぞれの化合物の投与用量並びに投与期間を以下に示す。

ECは、0, 300, 1000及び2000 ppmの用量で4週間飲水投与した（1群各5匹）。

AAは、0, 250, 500及び1000 ppmの用量で4週間飲水投与した（1群各5匹）。

PBは、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、いずれも4週間とした（1群各6匹）。

CMRは、5,000 ppmで4週間、2,500 ppm並びに5,000 ppmで13週間混餌投与した（1群各6匹）。

MCTは、pHを調整した生理食塩水に溶解して0, 200 mg/kgの用量で2ないし4週間にわたり週1回の間歇腹腔内投与を行った（1群各5匹）。対照群には同溶媒を投与した。

APAPは、0, 3100, 6200及び12400 ppmの用量で、い

ずれも4週間混餌投与した。

いずれも、対照群の飼料は標準食(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、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染色標本を作製し、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)、FABP(Fatty Acid Binding Protein)の免疫組織化学的な染色を実施した。採取した凍結肝臓を用いて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) ECの反復投与により、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 β 、TNF α 及びMCP-1が増加ないし増加傾向にあった。これよりEC投与が標的臓器において炎症の惹起に影響しているものと考えられた。

2) AAの反復投与により、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。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、明らかな病理組織学的変化は伴っていなかった。これより肝障害は示唆されるものの明らかな毒性学的影響は捉えられなかった。

3) PBの反復投与により、体重並びに摂餌量に明らかな影響は見られなかった。用量依存的な肝重量増加、小葉中心性肝細胞肥大、血液生化学的検査による肝臓パラメータの上昇が認められた。

4) 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活性が増加しない増加傾向にあった。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 3 A11, 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。5) 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。

6) APAPの反復投与により、高用量の12400 ppm投与により、体重増加抑制が認められた。肝臓重量には明らかな影響は見られなかった。同高用量群において、血液生化学的には、対照群に対しALT及びASTの顕著な上昇が見られた。病理組織学的には肝小葉中心性の壊死が広範囲にわたり認められた。さらに、壊死が無い領域においては肝小葉中心性の肝細胞肥大も伴っていた。

さらに、FABP (Fatty Acid Binding Protein)の免疫組織化学染色により、EC, PB, CMR, APAP投与群において染色性の増加が認められた。

D. 考察

肝臓に毒性が発現することが報告されている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の反復投与では、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。

AAの反復投与では、肝障害は示唆される血液生科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。

PB反復投与では、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。

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。本分担研究の反復投与では、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。

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。本分担研究の反復投与では、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、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認められた。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。

APAPの投与では、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。

以上より、AAを除くいずれの化合物もマウスへの反復投与により、それぞれ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していく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

本分担研究では、3年度にわたり肝毒性が報告されている陽性対照物質を実際にマウスに反復投与し、標的臓器である肝臓において、種々の毒性パターンを有する病態が得られた。本成果は、オルガノイド培養による in vitro 毒性評価系における新たな毒性指標の妥当性を検証していく上で重要な役割を担うものと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

1. 大橋 清佳、梶川 明音、前川 竜也、煙山 紀子、戸塚 ゆ加里、美谷島 克宏、カルバミン酸エチル（ウレタン）のマウス反復投与毒性試験における病態解析、第51回日本毒性学会学術年会、福岡（2024.7.3-5）

2. 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）

G. 知的所有権の取得状況

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