

3次元培養系と次世代シーケンサーによる
変異解析手法（ec-NGS）を組み合わせた化学物質の遺伝毒性評価法の開発
分担研究項目：in vivo評価・オルガノイド

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：

本研究では、in vivo試験および in vitro試験により、肝毒性陽性対照物質を用いて肝臓に対する毒性学的影響を検討した。マウスへの反復投与による in vivo試験においては、肝臓に対する種々の影響が確認されたが、それは毒性物質の作用機序により異なることが明らかとなった。一方で、マウス肝臓由来オルガノイドを用いた in vitro試験では肝細胞に対する直接的な影響によると考えられる各毒性物質の影響が遺伝毒性を含めて認められた。両試験系の比較から、同一毒性物質において in vivoおよび in vitro評価系に共通すると考えられる毒性学的影響も観察された。in vitro試験では、オルガノイド構成肝細胞に対する直接的な影響が検出され、新たな肝毒性評価系としての有用性を示す検証結果が得られているものと考えた。

A. 研究目的

化学物質や医薬品の安全性評価において、肝毒性の評価は重要である。肝臓は生体内における主要な代謝・解毒臓器であり、多くの外来性化学物質の影響を受けやすく、肝障害の予測および早期検出は、医薬品開発や化学物質管理において不可欠である。

従来、肝毒性の評価には実験動物を用いた in vivo試験が広く用いられてきた。これらの試験は生体反応を包括的に評価できるという利点を有する一方で、動物実験削減の国際的要請が喫緊の課題となっており、近年 in vitro試験や New Approach Methodologies (NAMs)の開発および導入が進められている。

本分担研究では、新たな in vitro評価系として、自己組織化能を有し肝機能を保持している肝オルガノイドを用いて毒性評価系の確立を目指している。その毒性評価の妥当性については、既存の in vivo試験で得られた結果との比較検証を進めるため、マウス肝臓由来オルガノイドを用い、既知の肝毒性物質を曝露した際の変化を評価し、従来の in vivo試験の結果と対応検討することで、肝オルガノイドを用いた新規毒性評価系としての有用性を明らかに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 in vitro試験法の妥当性を検証するため、肝毒性陽性対照物質を用いてマウス in vivo毒性試験ならびにマウス肝臓由来オルガノイドを用いた in vitro評価を実施し、毒性学的影響に関するデータを取得した。

1) in vivo評価

マウスへの投与期間は2、4ないし13週間とし、雄性6週齢C57BL/6Jマウスを株式会社日本エスエルシーから購入し使用した。肝毒性プロファイルを明らかにするため、被験物質は、in vitro試験と共通にして、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)、アセトアミノフェン(APAP)をそれぞれ投与した。投与期間中は、一般状態観察、体重、摂餌量を測定し、それぞれの投与期間終了後に解剖し、採血・肝臓を摘出し、重量を測定後にサンプルとして病理組織学的検査、遺伝子発現解析を実施した。

2) in vitro評価

マウス肝臓由来オルガノイドの培養を行うにあたり、C57BL/6Jマウスから採取した肝臓を3-5 mm程度に切り崩し、Tissue Dissociation Cocktail (STEMCELL Technologies) および Advanced DMEM/F-12 (Gibco) を添加して細胞ペレットを得た。得られた細胞ペレットは 40% Matrigel® (Corning, Cat. No. 356231) に希釈し、24 ウェルプレートに播種した。その後、HepatiCult™ Organoid Growth Medium (STEMCELL Technologies) の通常バージョン (Basal Medium + Antibiotics : Supplement = 95 : 5) または改変バージョン (Basal Medium + Antibiotics : Supplement = 90 : 10 + Y-27632) を添加し、肝臓オルガノイドを培養した。培養条件の詳細は、STEMCELL Technologies 社のプロトコルを参考にした。

得られた肝オルガノイドを用いてトリパンブルー染色により被験物質の細胞毒性を確認した。それにより至適濃度を設定した後、小核試験を実施した。小核試験は、培地を除去後にトリプシン (Trypsin-EDTA solution, Code 35554-64) および30% BSA (Bovine Serum Albumin 溶液, Cat. No. A8412) を含む溶液を1 mL添加し、37℃で5分間インキュベートした。その後、細胞が十分に分散するまでピペッティングを行い、5 mLチューブに回収した。続いて、Advanced DMEM/F-12 (Gibco, Cat. No. 12634-010) +30% BSAを1 mL用いてウェル内を洗浄し、先のチューブに回収した。さらに、チューブが溢れない程度までDMEM+30% BSAを加え、290 gで5分間遠心した。上清を除去後、DMEM+30% BSAを1 mL加え

て再懸濁し、10 μ Lを計算盤に供して細胞数を測定した。別の5 mLチューブにDMEM+30% BSAを1 mL加え、細胞数測定結果に基づき、4 $\times$ 10⁴ cells/wellとなる量の細胞懸濁液を回収した。これを290 gで5分間遠心し、上清を除去後、先太チップを用いてマトリゲルを30 μ L/well加え、同量を各ウェル中央に播種した。CO₂インキュベーター内で10分間インキュベート後、HepatiCult™ Organoid Growth Medium (STEMCELL Technologies) にY-27632を添加した培地 (OGM+Y) を750 μ L/well添加し、CO₂インキュベーター内で培養した。培養3日後、培地量が800 μ L/wellとなるよう被験物質を積層した。被験物質曝露24時間後に培地を除去し、Advanced DMEM/F-12でウェル内を洗浄後、OGM+Yを750 μ L/well添加し、CO₂インキュベーター内でさらに2日間培養した。その後、培地を除去し、トリプシン+30% BSAを1 mL添加して37°Cで5分間インキュベートし、ピペティングにより細胞を分散させた。細胞は1ウェルごとにチューブへ回収し、290 gで5分間遠心した。上清を除去後、DMEM+BSAを少量加えて再懸濁し、トリプシン処理により単一細胞化した。再度遠心後、上清を除去し、軽くタッピングした後、0.075 M塩化カリウムを1 mL添加して転倒混和した。5分間静置後、再度タッピングし、冷却したメタノール/酢酸混合液 (3:1) を1 mL添加して転倒混和した。1000 rpmで5分間遠心後、上清を除去し、冷却したメタノール/酢酸混合液 (99:1) を1 mL添加して転倒混和する操作を2回繰り返した (1回目は遠心後に上清を除去)。最終的に細胞懸濁液をスライドガラス上に滴下して乾燥させ、ギムザ染色を行い、細胞数を計測した。

(倫理面への配慮)

マウスへの投与試験ならびにマウスからの肝臓由来のオルガノイド作製については、最少匹数の使用に留め、東京農業大学動物実験委員会承認を受けた申請内容に則り実施し、使用動物数をできる限り削減した。

C. 研究結果

1) *in vivo*評価

解剖時体重は、control群と比較し全肝毒性物質投与群において減少傾向にあった。

臓器重量では、PB投与群とCMR投与群において有意な増加が確認された。

血液生化学検査では、APAP投与群、CMR 4週投与群、MCT 2週投与群、EC投与群においてALT増加傾向が確認された。

細胞毒性を評価するためトリパンブルー染色を実施し、全肝毒性物質において、濃度依存的に増加ないし増加傾向が認められた。

病理組織学的解析では、HE染色においてAPAP投与群では小葉中心性壊死、PB投与群では小葉中心性肝細胞肥大、CMR投与群では小葉辺縁性肝細胞肥大、MCT投与群では2核細胞の増加、EC投与群においては明らかな影響が確認されなかった。

F4/80の免疫組織化学染色 (IHC) では、EC投与群において陽性マクロファージの増加が確認された。CaspaseのIHC染色では、APAP投与群、PB投与群において比較的弱い染色性が確認された。その他、肝毒性物質投与群では、明らかな影響は確認できなかった。FABP2のIHC染色では、CMR投与群、MCT2w投与群、EC投与群において強い染色性が確認された。

遺伝子発現解析では、TNF- α は、APAP低用量中用量投与群、CMR4週投与群、MCT 2週、4週 i.p. 投与群、EC投与群において増加傾向にあった。FABP1は、対照群と比較して、有意な変化はなかったが、APAP低用量と中用

量、CMR2500 ppm13週投与群、ECにおいて増加傾向が確認された。

2) *in vitro*評価

病理組織学的に、PB投与群ならびにCMR投与群では肝細胞肥大、MCT投与群では核数の多い細胞の増加、EC投与群では配列の乱れや核の濃染が確認された。

CaspaseのIHCでは、PB投与群、MCT投与群で染色性を確認された。FABP2のIHC染色では、EC投与群では強い染色性を示し、CMR投与群ならびにMCT投与群に

おいて部位差はあるものの染色性が確認された。

遺伝子発現解析では、TNF- α は、APAP高用量、MCT低用量において増加傾向にあった。FABP1は、PBのみで増加傾向にあった。

小核試験では、EC投与群、MCT投与群、CMR投与群において、小核数の増加ないし増加傾向が確認された。

D. 考察

本研究では、複数の肝毒性物質を用いて *in vivo* および *in vitro* における毒性変化を比較検討した。解剖時体重は全肝毒性物質投与群において減少傾向を示し、全身性の負荷が生じていた可能性が示唆された。一方で、PB投与群およびCMR投与群では臓器重量の有意な増加が認められ、病理組織学的にも肝細胞肥大が確認されたことから、これらの肝重量増加は酵素誘導や代謝適応に伴う肥大性変化に起因すると考えられた。

血液生化学検査では、APAP、CMR、MCT、EC投与群でALTの増加傾向が認められ、肝細胞障害の発現が示唆された。特にAPAPは小葉中心性壊死を呈しており、既知の肝毒性機序と一致する結果であった。

トリパンブルー染色による細胞毒性評価では、全物質で濃度依存的な細胞死の増加が認められ、*in vitro* 系においても肝毒性を捉えられることが示唆された。

病理組織学的解析では、*in vivo* においてAPAPで小葉中心性壊死、PBおよびCMRで肝細胞肥大、MCTで2核細胞の増加が確認された。*in vitro* においてもPBおよびCMRで肥大、MCTで核数の多い細胞の増加が認められ、形態学的変化の再現性が示唆された。一方、EC投与群では *in vivo* で明らかな形態変化は認められなかったが、*in vitro* では配列の乱れや核濃染が観察されており、培養系特有の感受性や評価指標の差が影響した可能性が考えられた。

免疫組織学的解析では、EC投与群においてF4/80陽性マクロファージの増加が確認され、炎症反応の関与が示唆された。TNF- α 遺伝子発現も複数群で増加傾向を示しており、肝障害に伴う炎症応答の誘導が示された。Caspase染色では一部群で弱い陽性が認められたものの顕著ではなく、壊死主体の毒性機序が関与している可能性が考えられる。また、FABP2およびFABP1の発現変動から、CMR、MCT、ECにおいて脂質代謝異常の関与が示唆され、*in vitro* においても類似した染色性が確認されたことから、脂質関連毒性の再現性が示された。

染色体異常の検出を目的とした小核試験では、EC、MCT、CMR投与群で増加ないし増加傾向が認められ、これら物質が染色体異常を有することによる遺伝毒性リスクが示唆された。

全体を通し、本分担研究で用いた *in vitro* 系は、肝

細胞肥大や多核化などの構造的変化および一部の分子応答を *in vivo* と同様の傾向で再現し得ることが示された。一方で、全身性要因に依存する反応は完全には再現されず、本評価系の限界も明らかとなった。

以上の検討より、肝臓オルガノイドを用いた *in vitro* 毒性試験法が既存の *in vivo* 肝毒性試験を一定程度は補完し得る評価手法であることが示された。動物実験代替法として発展させるため、さらなる検証が重要と考えられた。

E. 結論

本研究では、*in vivo* 試験および *in vitro* 試験により、肝毒性陽性対照物質を用いて肝臓に対する毒性学的影響を評価した。その結果、肝臓における応答は毒性物質の作用機序により異なることが明らかとなった。

in vivo 試験では、各毒性物質に応じて肝組織の形態学的変化や炎症応答を評価することが可能であり、生体内での代謝や免疫応答を含めた多様な影響を反映した結果が得られた。一方で、*in vitro* 試験では肝細胞に対する直接的な影響により、各毒性物質において特性が明確に示された。

両試験系の比較から、同一毒性物質において *in vivo* および *in vitro* 評価系に共通すると考えられる毒性学的影響も観察された。*in vitro* 試験では、オルガノイド構成肝細胞に対する直接的な影響が検出され、新たな肝毒性評価系としての有用性を示す検証結果が得られているものと考えた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

1. 宮崎 飛翔, 石ケ守 里加子, 長谷川 晋也, 藤岡正喜, 加藤 孝一, 美谷島 克宏, 戸塚 ゆ加里, マウス肝臓由来オルガノイドを用いた新規 *in vitro* 毒性試験法の開発、第 38 回発癌病理研究会 (2025 年 8 月、九十九里、千葉)
2. 宮崎 飛翔, 石ケ守 里加子, 長谷川 晋也, 藤岡正喜, 加藤 孝一, 美谷島 克宏, 戸塚 ゆ加里, マウス肝臓由来オルガノイドを用いた新規遺伝毒性試験法の開発、第 54 回日本環境変異原ゲノム学会大会 (2025 年 11 月、静岡)
3. 大橋 清佳, 天田 佳秀, 煙山 紀子, 前川 竜也, 戸塚 ゆ加里, 美谷島 克宏, 肝毒性物質の投与によるマウス肝臓における FABP 発現の変動に関する解析、第 42 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、ウイंकあいち (愛知県産業労働センター) 2026 年 1 月 23 日
4. 宮崎 飛翔, 石ケ守 里加子, 長谷川 晋也, 藤岡正喜, 吉田 健一, 大野 麻理奈, 小川 誠司, 垣内 伸之, 川口 駿, 渡部 光一, 中馬 新一郎, 加藤 孝一, 美谷島 克宏, 樋口 裕一郎, 上原 正太郎, 戸塚 ゆ加里, マウス肝臓由来オルガノイドを用いた新規 *in vitro* 遺伝毒性試験法の開発、日本薬学会第 146 年会 (2026 年 3 月、大阪)

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