

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7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(TK)

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 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。

このような世界的な動向に呼応し、本研究班は 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、肝臓・腸管を主たる対象とし、オルガノイドを含む再構築組織を用いて、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* 初回通過効果評価系構築に向けた検討を遂行している。

A. 研究目的

動物実験を用いない全身及び臓器曝露・毒性を評価するため、新たな動物実験代替法の概念として、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、肝臓・腸管を対象とし、初代培養並びに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* 初回通過効果の評価系を構築するための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。

1) 肝臓について

マウス初代肝細胞は培養数日で代謝活性が落ちることが知られているため、マウス初代肝細胞の代謝活性能を検討した。使用した曝露物質とその濃度は以下のようにした（誘導酵素及び処理最終濃度）。

- ① Phenacetin (CYP1A, 50 μ M/L)
- ② Diclofenac (CYP2C9, 5 μ M/L)
- ③ Mephenytoin (CYP2C19, 50 μ M/L)
- ④ Bufuralol (CYP2D6, 10 μ M/L)
- ⑤ Midazolam (CYP3A, 10 μ M/L)

①～⑤カクテル並びに⑤単独の調製液を曝露した。まずは、処理時間を決定するため、肝細胞播種後 5.5、24、48、72 及び 96 時間で細胞生存数を確認し、培地上清の採取を行った。その後、CYP 誘導に関する時間依存的な変動と薬物曝露時間の至適条

件を見出すため、曝露時間を 48 時間まで延長して検討した。上記の検討を通して、細胞播種から 24 時間後にカクテル溶液、コントロール溶液をそれぞれ曝露した。この時 LC-MS/MS による薬物濃度測定用に、曝露後、1、4、24 及び 48 時間で 100 μ L ずつ溶液を回収し、最終 48 時間後には細胞も採材し RNA 回収を行い、CYP 関連遺伝子の発現を解析した。

曝露物質を LC-MS/MS により定量的に解析するため、採取したそれぞれのタイムポイントで 100 μ L の培地に対しアセトニトリルを 200 μ L 添加し、ボルテックス混和、遠心分離（8000 g, 5 min, 4 $^{\circ}$ C）し、上清を HPLC 用の PP 製バイアルに分取した。濃度測定は、共同研究先である崇城大学に依頼した。LC-MS/MS を用いて、薬物曝露直後及び 2 時間後の Midazolam、Bufuralol、Diclofenac、Phenacetin、Mephenytoin の濃度及び各化学物質の代謝物の濃度を測定した。すべての薬物の薬物曝露直後の濃度と 2 時間後の濃度の群ごとの平均を求め、曝露直後の平均濃度から 2 時間後の平均濃度を差し引き、基質消失量として算出した。

2) 腸管について

2-1) Caco-2 細胞における細胞毒性確認試験（予備試験）

肝細胞と同様の被験物質①～⑤カクテル及び⑤単独の調製液を用いて、曝露による細胞毒性、バリア機能に対する影響、細胞中の遺伝子発現解析を実施した。まず、予備試験として Caco-2 細胞に調製液を曝露後、細胞生存率測定 WST-8、TEER 値測定、遺伝子発現解析、蛍光二重免疫染色を実施した。

2-2) オルガノイド作製・薬物代謝試験

C57BL/6J マウス（雄）小腸由来オルガノイドは、VERITAS(STEMCELL)から購入し、

マウス腸管オルガノイド培養プロトコルに従って作製・維持した。一定量培養したオルガノイドを平面化し、被験物質①～⑤カクテルと⑤単独溶液を曝露後、遺伝子発現解析を試みた。また、マウス腸管由来オルガノイドからの平面培養組織においてはバリア機能や堅牢性を示す TEER 値が増加せず、十分な値が得られなかったため、被験液によるオルガノイド組織に対する細胞毒性や遺伝子発現解析の検討については一旦、3D オルガノイド組織をそのまま用いて評価し、曝露濃度及び時間に関する至適条件を検討した。

(倫理面への配慮)

マウス腸管由来のオルガノイド組織の作製・維持にあたり、マウスを使用せず、VERITAS (STEMCELL)の市販のマウス腸管由来のオルガノイドを使用した。これにより本分担研究における規格の標準化を図るとともに使用動物数の削減に貢献した。

C. 研究結果

1) 肝臓について

LC-MS/MSを用いて、薬物曝露直後および2時間後の濃度および各化学物質の代謝物の濃度を測定において、Midazolam、Phenacetin、Mephenytoin、Bufuralolにおいて播種48時間後に薬物曝露した 0.35×10^6 個/well 群は、48時間後に薬物曝露した 0.2×10^6 個/well 群に対して基質の消失量が増加傾向を示したが、統計学的有意差は認められなかった。また、96時間後に薬物曝露した 0.5×10^6 個/well 群は 0.35×10^6 個/well 群、 0.2×10^6 個/well 群に対して増加傾向を示した。 0.35×10^6 個/well 群も 0.2×10^6 個/well 群に対して増加傾向を示したが、統計学的有意差は認められなかった。

Diclofenac において基質消失量は48時間後に薬物曝露した 0.35×10^6 個/well 群は、48時間後に薬物曝露した 0.2×10^6 個/well の群に対して増加傾向を示したが、統計学的有意差は認められなかった。また、96時間後に薬物曝露した 0.5×10^6 個/well 群は 0.35×10^6 個/well 群、 0.2×10^6 個/well 群に対して減少傾向を示した。 0.35×10^6 個/well 群も 0.2×10^6 個/well 群に対して減少傾向を示したが、統計学的有意差は認められなかった。

Midazolam において、細胞播種してから48時間後に薬物曝露した 0.2×10^6 個/well、 0.35×10^6 個/well、細胞播種してから96時間後に薬物曝露した 0.2×10^6 個/well の3群で代謝産物である OH-Midazolam が検出された(図1)。

Phenacetin において、細胞播種してから48時間後に薬物曝露した 0.2×10^6 個/well、 0.35×10^6 個/well、細胞播種してから96時間後に薬物曝露した 0.2×10^6 個/well の3群で代謝産物であるアセトアミノフェンが検出された。

代謝物産生の観点から、Diclofenac、Mephenytoin において、細胞播種してから48時間後に薬物曝露した 0.2×10^6 個/well の群で代謝産物である OH-Diclofenac、OH-Mephenytoin が検出された。

Bufuralol において、細胞播種してから48時間後に薬物曝露した 0.2×10^6 個/well、 0.35×10^6 個/well、細胞播種してから96時間後に薬物曝露した 0.2×10^6 個/well の3群で OH- Bufuralol が検出された。48時間後に薬物曝露した 0.2×10^6 個/well は、 0.35×10^6 個/well と比較して OH-Bufuralol が多く検出された。

さらに、Midazolam の基質消失量は播種から48時間後に薬物曝露した 0.35×10^6 個/well 群は、 0.2×10^6 個/well 群に対して、有意に増加した。(p<0.05) 播種から96時間

後に薬物曝露した条件では細胞個数による代謝量の違いに変化は認められなかった。また、代謝物に関しては、播種から 48 時間後に薬物曝露する条件では、 0.35×10^6 個/well 群が 0.2×10^6 個/well 群と比較して、わずかに多く生成されたが、統計学的有意差は認められなかった。播種から 96 時間後に薬物曝露する条件では、 0.2×10^6 個/well 群のみ、代謝物が生成された。

Phenacetin、Bufuralol の基質消失量は、播種から 48 時間後に薬物曝露した 0.35×10^6 個/well の群は、 0.2×10^6 個/well の群に対して、有意に増加した。播種から 96 時間後に薬物曝露した条件では細胞個数による基質消失量の違いに変化は認められなかった。また、代謝物に関しては、播種から 48 時間後に薬物曝露する条件では、 0.2×10^6 個/well の群が 0.35×10^6 個/well 群と比較して、有意に多く生成された。播種から 96 時間後に薬物曝露する条件では、 0.2×10^6 個/well 群のみ、代謝物が生成された。

Mephenytoin は基質消失量に関しては播種から 48 時間後に薬物曝露する群では、 0.35×10^6 個/well が 0.2×10^6 個/well と比較して、有意に増加し、播種から 96 時間後に薬物曝露する群では、 0.35×10^6 個/well が最も基質消失量が大きくなったが、ほかの細胞個数との統計学的有意差は認められなかった。しかし、代謝物は播種から 48 時間後に薬物曝露する群の 0.2×10^6 個/well 群のみ代謝物が生成された。

Dicrofenac の基質消失量は、播種から 48 時間後に薬物曝露した 0.35×10^6 個/well の群は、 0.2×10^6 個/well の群に対して、増加傾向を示したが、統計学的有意差は認められなかった。播種から 96 時間後に薬物曝露した条件では 0.5×10^6 個/well のみ代謝量が小さかったが、統計学的有意差は認められなかった。代謝物は播種から 48 時間後に薬

物曝露する群の 0.2×10^6 個/well 群のみ代謝物が生成された (図 2)。

曝露 48 時間後に RNA を回収し、薬物代謝酵素である CYP3A11、CYP2D9、CYP2C29、CYP2A5、CYP1A2 を計測した。CYP3A11 において Control 群に対してカクテル曝露群の発現量は減少傾向が認められたが統計学的有意差は認められなかった。CYP2A5、CYP1A2 において Control 群に対してカクテル曝露群の発現量が有意に増加した ($p < 0.05$)。CYP2C29、CYP2D9 において Control 群に対してカクテル曝露群の発現量は増加傾向が認められたが統計学的有意差は認められなかった (図 3)。

2) 腸管について

Caco-2 細胞での WST-8 では、Midazolam、カクテルともに生存率に明らかな変化はなく、明らかな細胞毒性は確認されなかった。Caco-2 細胞での TEER 値測定結果より、曝露後時間の経過と共に TEER 値は上昇傾向にあった (図 4)。

また Caco-2 細胞での遺伝子発現解析において、CYP3A4 は Midazolam 群で曝露 24 時間後に上昇した。その他の群においては時間の経過とともに発現量が減少した。ZO-1 はすべての群で曝露後時間の経過とともに発現量が上昇した (図 5)。Caco-2 細胞蛍光二重免疫染色の結果より、明らかな所見はなく、タイトジャンクションの形成には影響がないことが確認された。

オルガノイド組織における遺伝子発現解析では、ZO-1 は Midazolam 群において曝露 1 時間後で Control 群と比較して発現量が増加したが、その後は Control 群より発現量が減少した。Cocktail 群では Control 群と比較して ZO-1 発現量が増加した。CYP3A4 は Midazolam 群においてはすべての時間で Control 群より高い発現量を示し

た (図 6)。

D. 考察

1) 肝臓について

カクテル曝露群において CYP2A5、CYP1A2、CYP2C29、CYP2D9 の増加傾向が認められた。これより薬物曝露により CYP 発現が誘導され、細胞の薬物代謝能が亢進した可能性が示唆された。しかしながらコントロール群と比較して、CYP3A11 のみ減少傾向が認められたが、細胞毒性が原因とは考えにくく更なる精査が必要と考えられた。また、今回の CYP 遺伝子発現解析の結果からは、代謝酵素活性の失活については把握できず、長時間曝露による核内受容体を介した変化として PXR/CAR の発現量または転写活性がダウンレギュレーションされ CYP3A11 発現が低下した可能性も推察された。しかし、本研究では受容体発現量を直接評価していないため、詳細な機序の解明は今後の課題であると考えられた。

LC-MS/MS の結果より、 0.2×10^6 個/well に時間経過に伴う発現量が同程度であったなかで、播種から 48 時間後に薬物曝露群で、代謝物が有意に増加し、 0.2×10^6 個/well かつ播種から 48 時間後に刺激を行った群がより生体内反応に近い条件と考えられた。また、遺伝子発現量については、播種から 96 時間後刺激群で有意に増加した。初代肝細胞は培養数日で代謝活性が落ちることが知られており、本実験の 96 時間培養では、CYP 遺伝子発現は上昇するものの、長時間培養に伴う細胞機能の低下などにより代謝能も低下したことにより、寧ろ、代謝産物は生成されなかったと考えられた。以上より、本分担研究において、細胞数が 0.2×10^6 個/well で、播種から 48 時間後に薬物曝露を行うことが至適条件に近い

と考えられた。

2) 腸管について

Caco-2 細胞を用いた予備検討において、WST-8 による細胞毒性試験の結果から、本実験で曝露する ①～⑤ Cocktail、⑤ Midazolam には、本実験条件下において、細胞毒性は見られないことが示された。Caco-2 細胞での薬物曝露前の TEER 値測定の結果より本実験は TEER 値の上昇が安定したところで薬物曝露がなされた。さらに、Control 群においても、曝露後の TEER 値の上昇が確認でき、遺伝子発現解析の結果、ZO-1 発現も時間経過とともに上昇していた。Control 群でも TEER 値と ZO-1 の発現が上昇したことから、本実験に用いた細胞は、曝露前に TEER 値が上がりきっていなかった可能性もあると考えられた。⑤ Midazolam 群においても、曝露後の TEER 値の上昇が確認でき、遺伝子発現解析の結果、ZO-1 の発現も時間経過とともに上昇した。Control 群と同様に細胞の分化や手技による可能性と Midazolam そのものによる影響の可能性が考えられた。①～⑤Cocktail 群においても、曝露後の TEER 値の上昇が確認され、ZO-1 の遺伝子発現も時間経過とともに上昇した。これには Cocktail 中の Dicrofenac による影響も推察され、文献情的には Dicrofenac が細胞間のタイトジャンクション発現に影響することが知られており、タイトジャンクションが刺激されバリア機能が強化された可能性も考えられた。また、遺伝子発現解析における Caco-2 細胞では、CYP3A4 は少量発現しているが、生体内と比較すると、その発現量は非常に低いとされている。そのため、本実験では CYP3A4 の結果については正しく確認できていない可能性があると考えられた。さらに、Caco-2 細胞における蛍光二重免疫染色

の結果からは、すべての群において時間経過による明らかな変化は見られなかった。

3Dオルガノイドによる薬物代謝試験において、Midazolam 群での遺伝子発現解析の ZO-1 の結果は、GABA-A 受容体を活性化し、膜電位が変化することで一時的にタイトジャンクションが強化することが知られており、オルガノイドにも GABA-A 受容体が存在するため、同影響による可能性が推察された。CYP3A11 についてはすべての時間において Control 群より高値を示した。小腸では主に CYP3A4 によって代謝が行われており、Midazolam は主に CYP3A4 によって代謝される薬物であることに起因したものと考えられた。Cocktail 群における ZO-1 の遺伝子発現は、ほとんどの時間において Control 群よりも高い発現量となった。Caco-2 細胞と同様、Cocktail 中のジクロフェナクの影響によるものと考えた。CYP3A11 の結遺伝子発現は、8 時間で Control 群より高い発現量を示し、これもカクテル中の Midazolam の影響によるものだと考えた。

腸管オルガノイドでは、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、評価に資するバリア機能を有する培養条件の確立が最優先と考えられた。引き続き、被験物質として①～⑤カクテル並びに⑤単独溶液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、曝露時間における上清中の化合物濃度の測定を実施する予定である。

以上、本年度の検討から、今後の小腸由来オルガノイド培養から平面培養による曝露検討に反映させ得る結果が見出された。

E. 結論

腸肝循環の Animal MPS 構築のため、マウスの肝臓細胞ならびに小腸由来オルガノ

イド培養を用いた基礎的データの蓄積を進めた。

肝臓に関する検討では、初回通過効果評価系の確立が目的であるため、代謝活性(基質消失量)よりも代謝物生成量を優先指標とした。これにより、代謝物生成量が最大となる至適条件が見出された。

小腸に関する検討では、予備検討として Caco-2 細胞を用いてバリア機能の確認、化合物曝露の手技的な条件を設定がなされた。これを踏まえ次年度は、マウス腸管由来オルガノイドの平面培養化を行い、より生体環境に近い状態で曝露試験を行う。

最終的に、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の評価系効果の構築や妥当性の証明に寄与する研究を進めていく予定である。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

(該当なし)

F.2 学会発表

- 井上瑠七, 竹田明梨, 大橋知紗, 佐野心優, 畠中理園, 宇野絹子, 煙山紀子, 前川竜也, 美谷島克宏. デキサメタゾン投与によるマウス in vivo 毒性評価と in vitro 腸管毒性評価系構築に向けた検討. 第 42 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2026. 1. 22)

G. 知的財産権の出願・登録状況

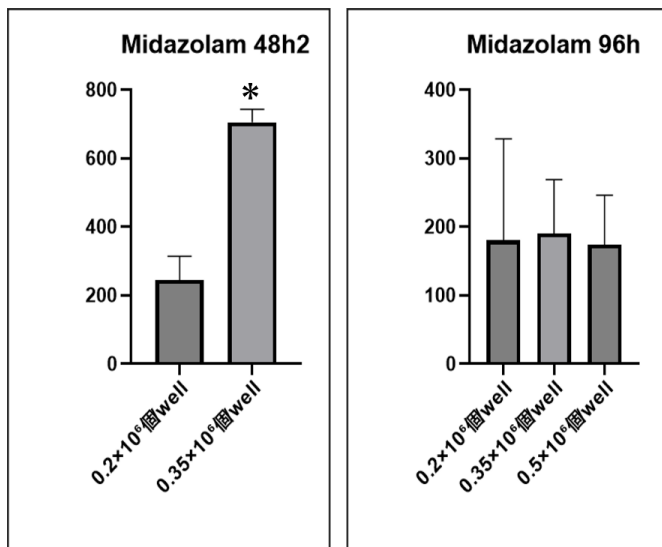
(該当なし)

(予定を含む。)

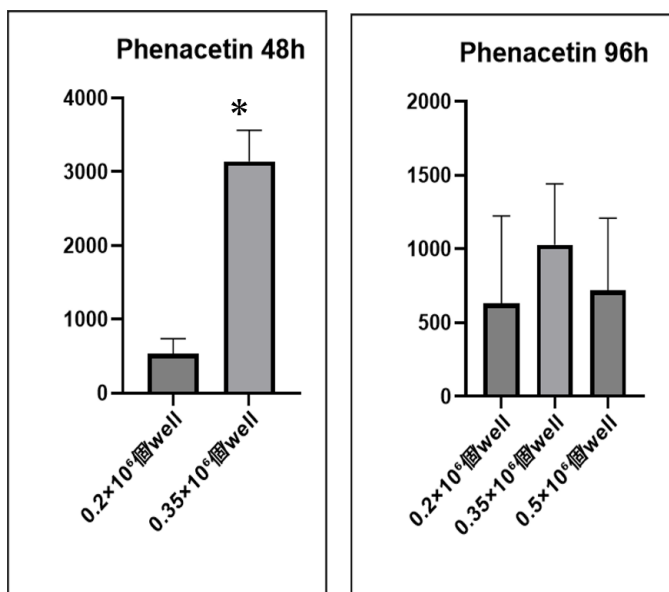
- 特許取得
- 実用新案登録
- その他

図1 LC-MS/MSによる基質消失量測定

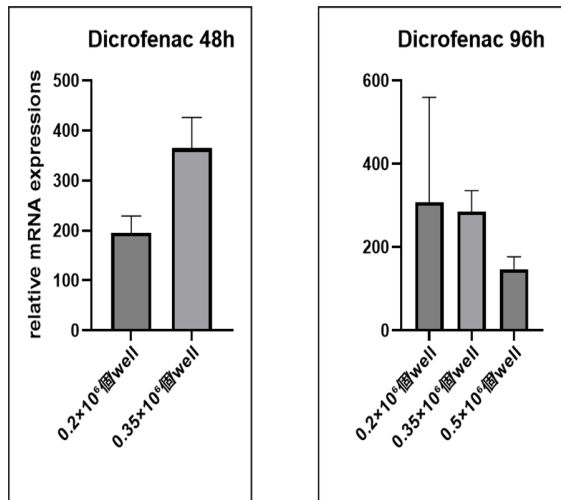
a) Midazolam の基質消失量



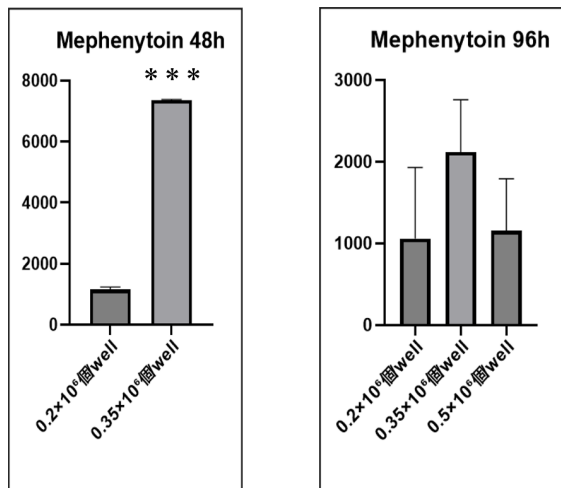
b) Phenacetin の基質消失量



c) Diclofenac の基質消失量



d) Mephenytoin の基質消失量



e) Bufuralol の基質消失量

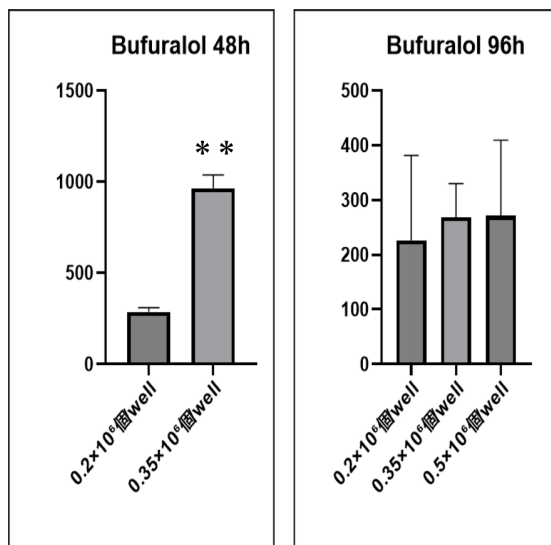
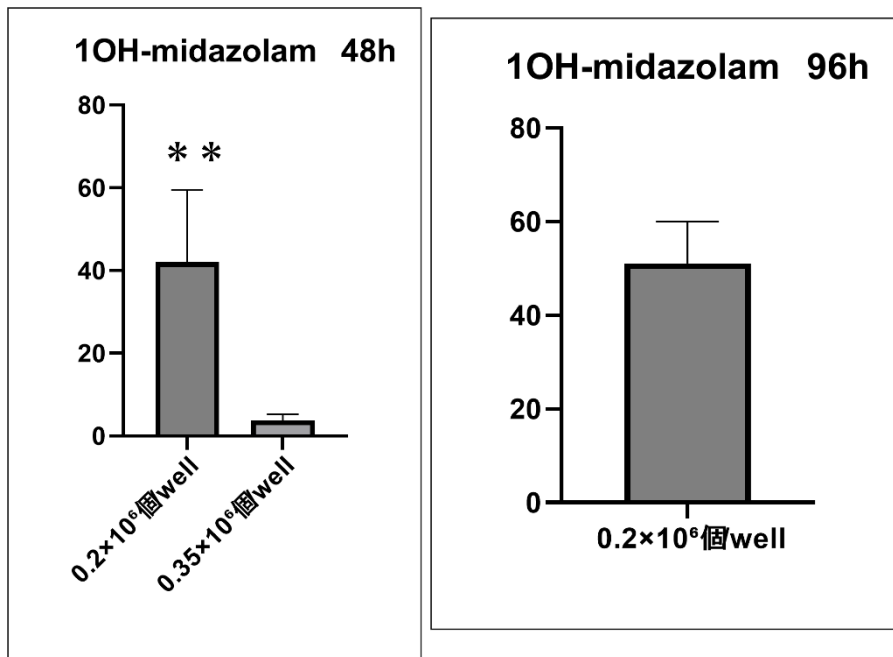
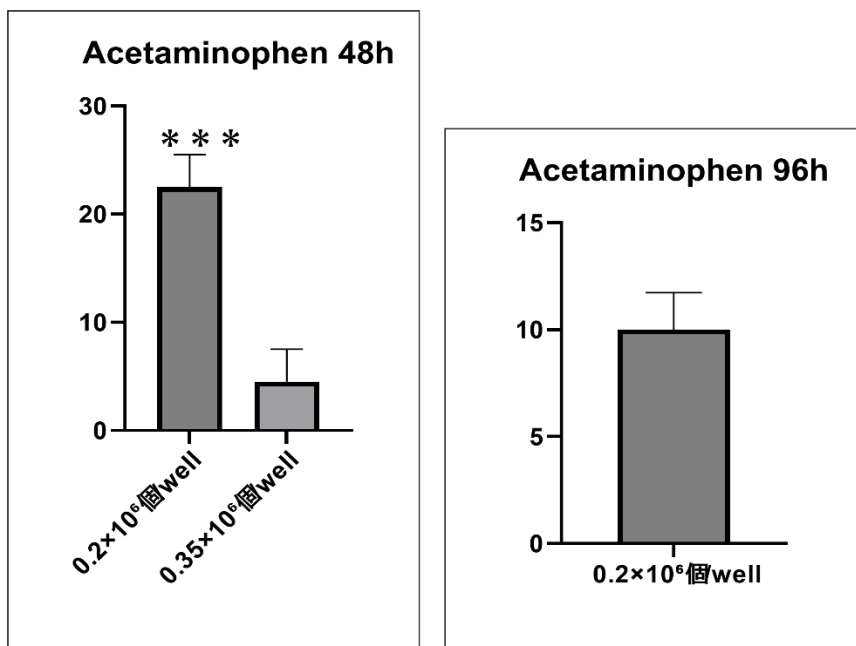


図 2 LC-MSMS による代謝物量測定

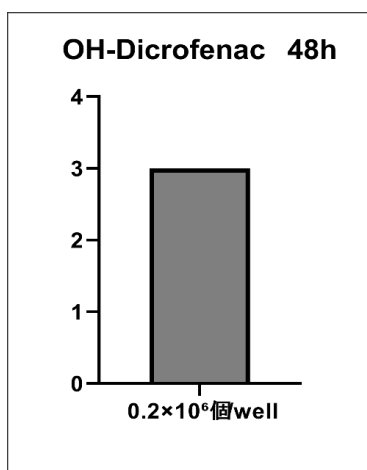
a) Midazolam の代謝物量



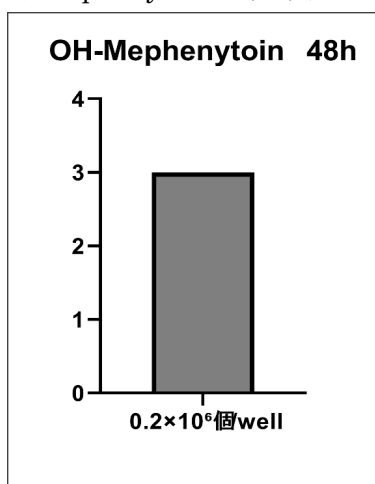
b) Phenacetin の代謝物量(Acetaminophen)



c) Diclofenac の代謝物量



d) Mephenytoin の代謝物量



e) Bufuralol の代謝物量

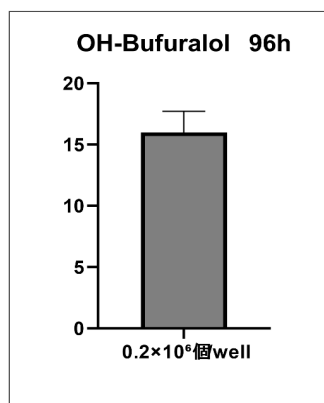
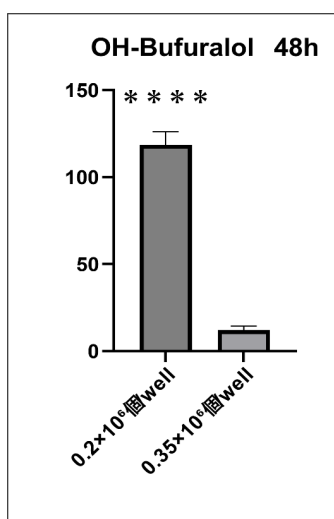
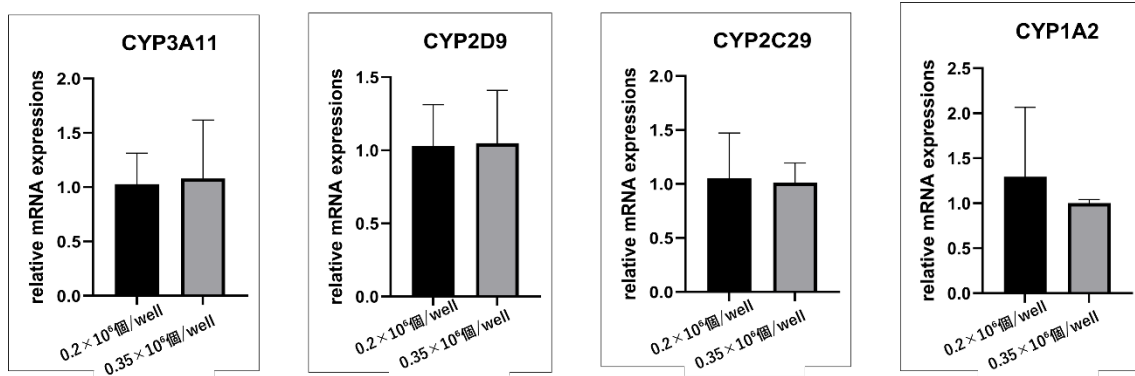


図 3 遺伝子発現解析

a) 濃度比較検討(左 : 0.2×10^6 個/well、右 ; 0.35×10^6 個/well) 播種から 48h 後に曝露



b) 播種から曝露までの時間比較検討 0.2×10^6 個/well

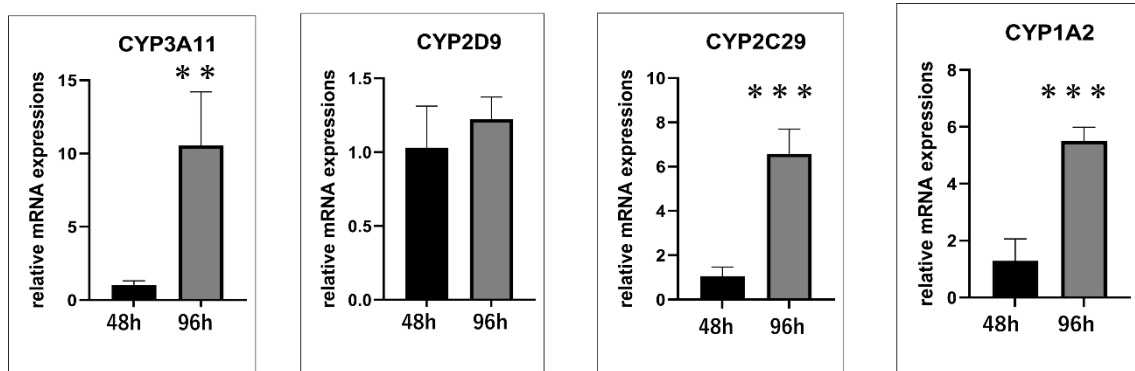


図 4 Caco-2 細胞 TEER 値

図 4-1 Caco-2 TEER 値 薬物曝露前

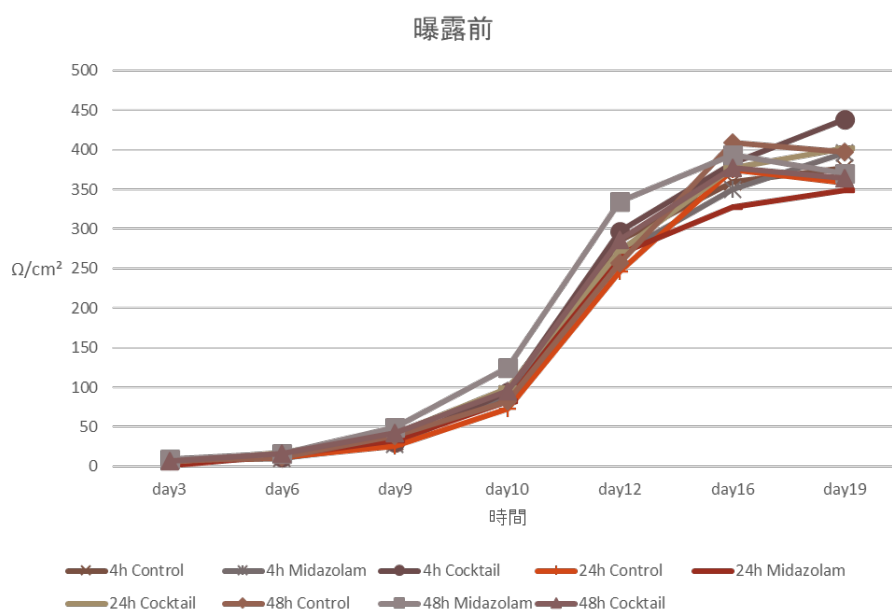


図 4-2 TEER 値 薬物曝露後 Control

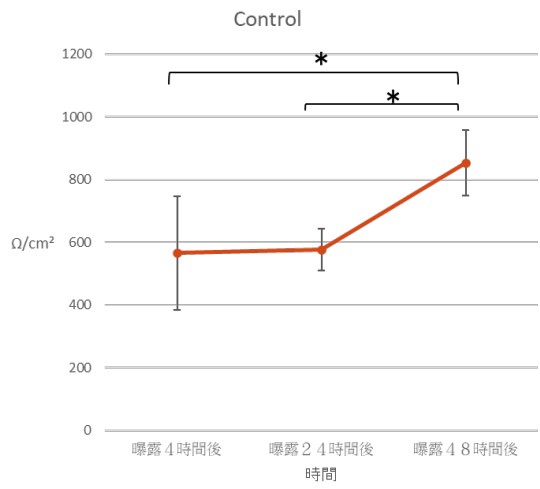


図 4-3 TEER 値 薬物曝露後 Midazolam

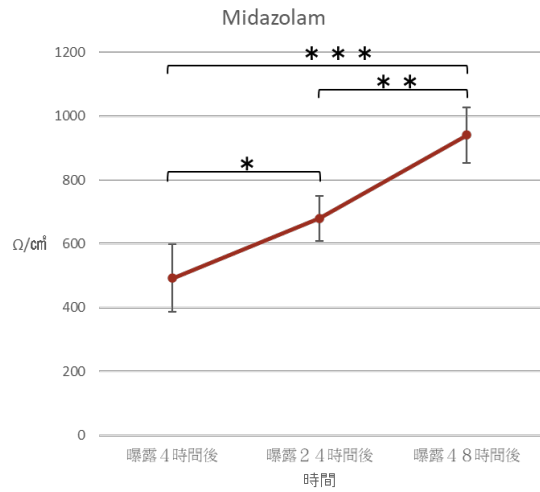


図 4-4 TEER 値 薬物曝露後 Cocktail

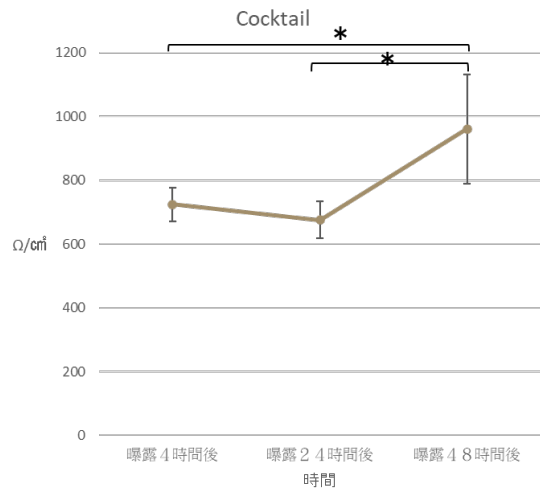


図 5 Caco-2 細胞 遺伝子発現解析 ZO-1

図 5-1 Caco2 PCR ZO-1 Control

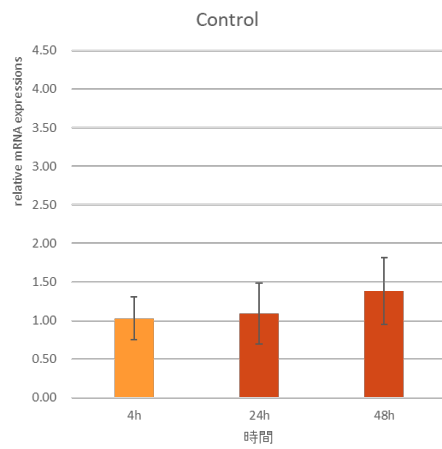


図 5-2 Caco2 PCR ZO-1 Midazolam

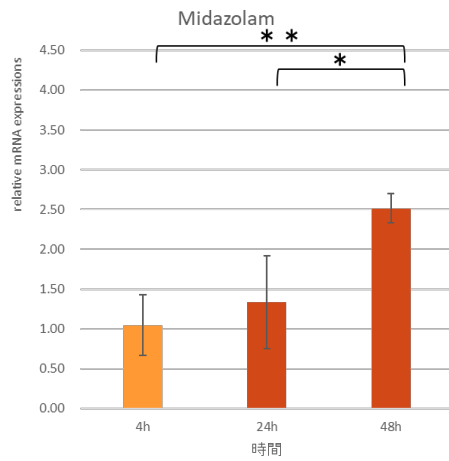


図 5-3 Caco2 PCR ZO-1 Cocktail

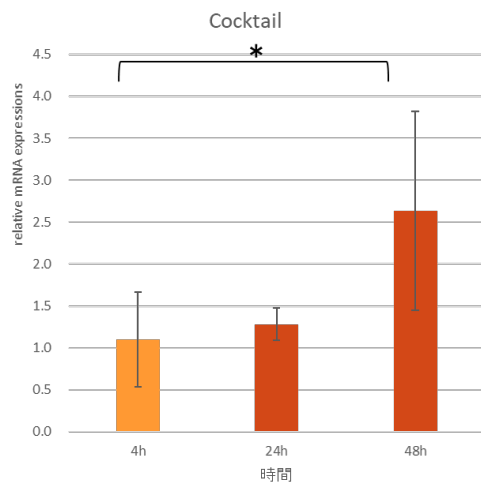


図6 3Dオルガノイド 遺伝子発現解析 CYP3A4

図6-1 3Dオルガノイド CYP3A4 Cocktail

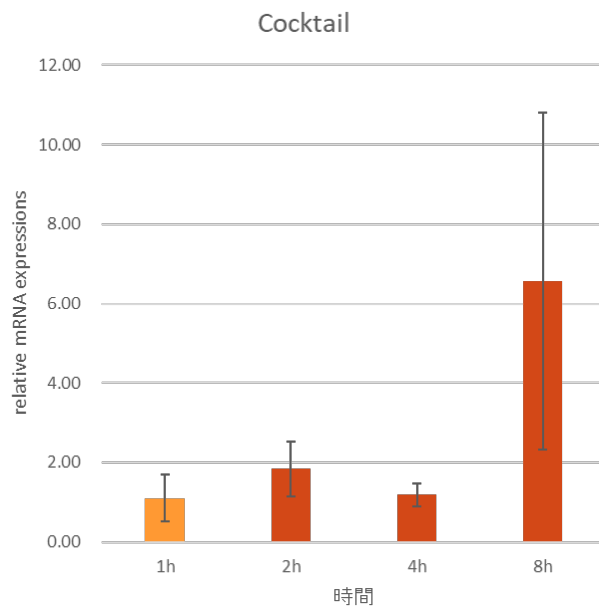


図6-2 3Dオルガノイド CYP3A4 8時間

