

# 平成27年度 食品健康影響評価技術研究 成果発表会

～化学物質の肝毒性の評価のあり方について考える～

日時：平成27年10月1日（木）  
14：00～16：45

場所：食品安全委員会 中会議室  
東京都港区赤坂5-2-20  
赤坂パークビル22階

～プログラム～

ページ

- |   |    |
|---|----|
| (1) イントロダクション<br>(食品安全委員会：吉田 緑)   | 1  |
| (2) 核内受容体作用と酵素誘導解析を基盤とした、<br>化学物質による肝肥大の毒性学的評価に関する研究<br>(静岡県立大学：吉成 浩一)<br>14：25～14：55 | 3  |
| (3) 化学物質により誘発される肝肥大の毒性学的<br>評価手法の確立と今後の問題点<br>(国立医薬品食品衛生研究所：梅村 隆志)<br>14：55～15：25     | 25 |
| (4) 肝マクロファージの機能特性に基づいた肝毒<br>性の新規評価手法の構築と緻密化<br>(大阪府立大学：山手 丈至)<br>15：40～16：10          | 39 |
| (5) 総合討論<br>16：10～16：40   |    |




# 平成27年度食品健康影響評価技術研究成果発表会


はじめに






## 研究課題のねらい

-  食品健康影響評価において、肝臓の「絶対・相対肝臓重量の増加」を、直ちに悪影響(adverse)とする現在の判断を科学的見地から見直したい



そのために

-  具体的に悪影響と肝肥大作用を区別するための科学的な考え方を整理し、それをもとに科学的かつ一貫性のある評価を行うための基盤をまとめる

## 発表課題

-  核内受容体作用と酵素誘導解析を基盤とした、化学物質による肝肥大の毒性学評価に関する研究  
(主任研究者：吉成浩一 静岡県立大学)
-  化学物質により誘発される肝肥大の毒性学的評価手法の確立と今後の問題点  
(分担研究者：梅村隆志 国立医薬品食品衛生研究所)
-  肝マクロファージの機能特性に基づいた肝毒性の新規評価手法の構築と緻密化  
(主任研究者：山手丈至 大阪府立大学)

## 今後の方向性

-  どのような場合に、肝肥大を有害影響(adverse)あるいは有害影響ではないと判断するのか、関連する情報を研究成果から抽出
-  明確に有害影響ではないと判断するために必要な情報を具体的に整理する。  
さらに補足的に得られれば望ましい情報があればそれらも整理

きめ細かい評価が必要

## 核内受容体作用と酵素誘導解析を基盤とした、 化学物質による肝肥大の毒性学的評価に関する研究

吉成 浩一（よしなり こういち）

静岡県立大学薬学部衛生分子毒性学分野 教授



1993年 3月 東北大学薬学部卒業  
1995年 3月 東北大学大学院薬学研究科博士前期課程修了  
1998年 3月 東北大学大学院薬学研究科博士後期課程修了  
1998年 4月 米国国立環境衛生科学研究所（NIEHS/NIH）博士研究員  
2001年10月 静岡県立大学薬学部助手（臨床薬品学教室）  
2002年 4月 静岡県立大学薬学部講師（同上）  
2006年 4月 東北大学大学院薬学研究科講師（薬物動態学分野）  
2007年 3月 東北大学大学院薬学研究科助教授（同上）  
2007年 4月 東北大学大学院薬学研究科准教授（同上）  
2014年 4月 静岡県立大学薬学部教授（衛生分子毒性学分野）

厚生労働省薬事・食品衛生審議会（臨時委員）、内閣府食品安全委員会（専門委員）、東北大学客員教授、日本薬物動態学会（評議員）、日本毒性学会（評議員）、HAB研究機構（理事）

### <研究成果概要>

肝肥大および肝細胞肥大は、化学物質のばく露によりしばしば認められるが、その発現機序や毒性学的意義は明確ではなく、それらを毒性影響とすべきか否かは議論の余地がある。本研究の目的は、毒性試験情報を用いたデータ解析と、酵素誘導に関連する核内受容体活性化作用を評価するインビトロ試験を行なうことで、肝肥大および肝細胞肥大の毒性学的特徴を明らかにすることである。特に、これまで経験的に言われてきた肝細胞肥大と酵素誘導との関連性を明確にすることを主たる目的とした。

まず、（独）製品評価技術基盤機構で公開されているHESSデータベースおよび食品安全委員会で公開されている農薬評価書を利用して構築したラット毒性試験データベースを利用して、肝細胞肥大および肝肥大の毒性学的特徴の抽出を試みた。その結果、HESS-データベースおよび農薬評価書を用いたいずれの場合においても、中心性肝細胞肥大と甲状腺関連所見の関連性が認められた。関連が認められた甲状腺所見は、薬物代謝酵素誘導と強く関連するものであることから、中心性肝細胞肥大と薬物代謝酵素誘導との関連性が強く示唆された。一方、農薬評価書を用いた解析により、中心性肝細胞肥大とびまん性肝細胞肥大との間で関連する毒性所見に違いが認められ、両者の発現機序や毒性学的意義に違いがある可能性が示唆された。さらに、肝肥大や肝細胞肥大は必ずしも肝がんの初期病変ではないことが示された。

次に、小葉中心性肝細胞肥大を起こす化学物質をHESSデータベースおよび農薬データベースから選出し、酵素誘導と関連するラット核内受容体（AHR、PXR、CAR、PPARα）に対する作用をインビトロ試験で評価した。その結果、上記核内受容体活性化作用と小葉中心性肝細胞肥大の間に強い関連性が認められた。また、農薬を用いた評価において、中心性肝細胞肥大とびまん性肝細胞肥大を起こす農薬の間で上記核内受容体活性化作用に差が認められた。以上の結果は、上述のデータ解析で得られた結果と一致し、中心性肝細胞肥大は薬物代謝酵素誘導と関連していること、また中心性肝細胞肥大とびまん性肝細胞肥大では毒性学的特徴が異なることを支持している。

環境および食品汚染物質でありげっ歯動物で肝肥大を誘発するperfluorooctanoic acid (PFOA)による肝肥大におけるCARの寄与を、マウス個体および培養細胞を用いて解析した。その結果、PFOAはCAR活性化作用を有すること、またPFOAによる肝肥大におけるCARの寄与はPPARαと同程度であることが示唆された。

以上、本研究では、毒性試験データベースを用いた情報・統計学的解析により、肝肥大（肝重量増加）および肝細胞肥大は肝がんの初期病変ではないことが強く示唆された。さらに、情報・統計学的データ解析ならびにレポーターアッセイや酵素誘導評価などのインビトロ試験を用いた解析により、中心性の肝細胞肥大の多くは、薬物代謝酵素誘導と強く関連していることが実証された。また、中心性とびまん性の肝細胞肥大では発現機序や毒性学的意義が異なる可能性が示された。酵素誘導を伴う肝細胞肥大は、肝臓の適応反応であり、可逆性の反応であるとされている。したがって、酵素誘導試験や核内受容体活性化作用評価の実施は、肝細胞肥大の発現機序や毒性学的影響を推定する上で有用と思われる。

平成27年度食品健康影響評価技術研究成果発表会  
～化学物質の肝毒性の評価のあり方について考える～  
2015年10月1日

研究課題名：

## 核内受容体作用と酵素誘導解析を基盤とした、 化学物質による肝肥大の毒性学的評価に関する研究

研究領域：IV-5 化学物質による肝肥大の毒性学的評価手法の開発に関する研究

研究期間：平成25年-26年度(2年間)

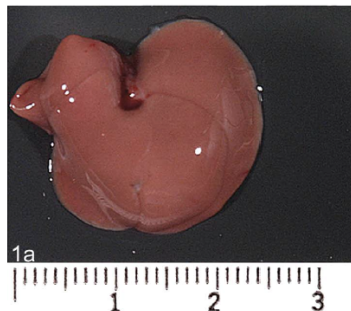
主任研究者 **吉成浩一**(静岡県立大学薬学部 衛生分子毒性学分野)

分担研究者 小島弘幸(北海道立衛生研究所食品科学部食品安全グループ)  
北村繁幸(日本薬科大学薬学部健康生命科学分野)  
浦丸直人(日本薬科大学薬学部健康生命科学分野)

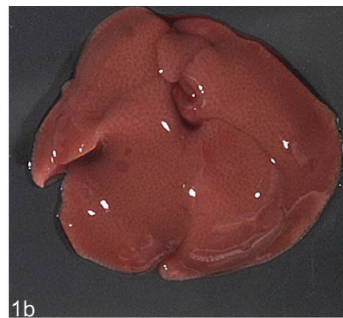
# 化学物質誘発性の肝肥大と肝細胞肥大

- ✓ 化学物質の暴露によりしばしば肝臓が肥大する。
- ✓ 肝肥大は、肝実質細胞の肥大(肝細胞肥大)と増殖に起因する。
- ✓ 多くの肝細胞肥大は中心性に見られるが、周辺性・門脈周囲性にも認められる。
- ✓ 肝細胞肥大・肝肥大の生理学的・毒性学的意義ならびに発現機序は不明である。

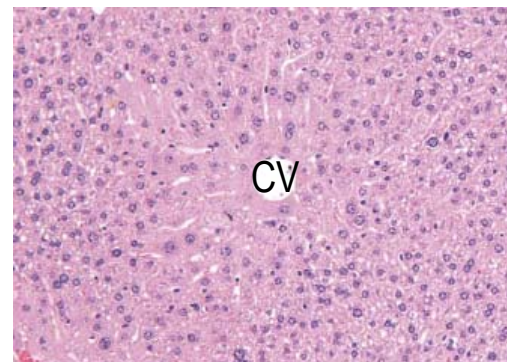
Mouse



Control



PB-treated



PB-treated

PB, phenobarbital  
CV, central vein



## 化学物質誘発性の肝肥大と肝細胞肥大(2)

---

- ✓ 化学物質による肝細胞肥大の多くは可逆的である。
- ✓ 化学物質による薬物代謝酵素の誘導は、中心性～びまん性に起こり、肝細胞肥大を伴う。
- ✓ これら化学物質による肝細胞肥大は、薬物酵素誘導に伴う**適応反応** *adaptive effect*と考えられている。
- ✓ 我が国における化学物質の安全性評価では、肝肥大・肝細胞肥大は**毒性影響** *adverse effect*とされ、NOAEL/ADIの設定根拠となることもある。
- ✓ 肝がんとの関連も指摘されている。

# 肝肥大と肝細胞肥大の理解に向けて

化学物質の安全性評価において、肝肥大及び肝細胞肥大の毒性学的理解が必要とされている。



実験的アプローチ: インビボ・インビトロ

- ✓ 酵素誘導と肝細胞肥大の関連性解析
- ✓ 動物個体を用いた発現機序解析、など

情報解析的アプローチ: インシリコ

- ✓ 関連文献情報の収集と整理、解析
- ✓ 既存の毒性試験情報からのデータマイニング、など

# 研究項目

## 1: 化学物質による肝肥大の作用機序情報収集と分類

### 1-1: 既知の肝肥大誘発性化学物質の情報収集

- ✓ 製品評価技術基盤機構NITEのHESS-DB、食品安全委員会の農薬評価書
- ✓ 肝肥大・肝細胞肥大、他の毒性兆候を抽出、整理
- ✓ 肝肥大・肝細胞肥大と他の毒性兆候との関連性解析

### 1-2: 肝肥大誘発性化学物質の核内受容体活性化作用評価と分類

- ✓ 上記化学物質のラット核内受容体作用評価(インビトロ試験)
- ✓ 情報科学的解析による肝細胞肥大誘発性化学物質のグループ化

### 1-3: 核内受容体作用のインビトロ・インビボ検証試験

- ✓ グループ化の検証(インビトロ試験)
- ✓ 肝細胞肥大の機序解明(インビボ試験)

## 2: 酵素誘導が肝機能に及ぼす影響の評価

### 2-1: 培養細胞における酵素誘導影響評価

- ✓ CYP発現に伴う肝細胞での遺伝子発現変動の網羅的解析(インビトロ試験)

### 2-2: インビボにおける酵素誘導影響評価

- ✓ CYP発現に伴うマウス個体での変化(インビボ試験)

# 研究項目

## 1: 化学物質による肝肥大の作用機序情報収集と分類

### 1-1: 既知の肝肥大誘発性化学物質の情報収集

- ✓ 製品評価技術基盤機構NITEのHESS-DB、食品安全委員会の農薬評価書
- ✓ 肝肥大・肝細胞肥大、他の毒性兆候を抽出、整理
- ✓ 肝肥大・肝細胞肥大と他の毒性兆候との関連性解析

### 1-2: 肝肥大誘発性化学物質の核内受容体活性化作用評価と分類

- ✓ 上記化学物質のラット核内受容体作用評価(インビトロ試験)
- ✓ 情報科学的解析による肝細胞肥大誘発性化学物質のグループ化

### 1-3: 核内受容体作用のインビトロ・インビボ検証試験

- ✓ グループ化の検証(インビトロ試験)
- ✓ 肝細胞肥大の機序解明(インビボ試験)

## 2: 酵素誘導が肝機能に及ぼす影響の評価

### 2-1: 培養細胞における酵素誘導影響評価

- ✓ CYP発現に伴う肝細胞での遺伝子発現変動の網羅的解析(インビトロ試験)

### 2-2: インビボにおける酵素誘導影響評価

- ✓ CYP発現に伴うマウス個体での変化(インビボ試験)

# 肝肥大、肝細胞肥大の毒性学的特徴の抽出 ～農薬評価書を用いた試み～

## 方法

- ✓ 食品安全委員会で公開されている**266の農薬評価書**のpdfファイルをダウンロード
- ✓ 評価書中の**ラット90日間反復投与毒性試験、2年間反復投与毒性試験**及び**発がん性試験**から、全毒性所見を抽出
- ✓ 投与量、雌雄別に各所見を含むデータシート(Microsoft Excel)を作成
- ✓ 類似所見を統合・整理
- ✓ 各所見に7桁のコード番号を付与
- ✓ 統計学的解析により、**肝肥大、肝細胞肥大**と他の毒性所見との関連性を解析

# 農薬評価書の情報収集

農薬評価書

メトコナゾール

(第2版)

2007年10月

食品安全委員会

# 農薬評価書の情報収集

農薬評

メトコナ

(第2)

2007年

食品安全

## 目次

・目次	1
・審議の経緯	3
・食品安全委員会委員名簿	3
・食品安全委員会農薬専門調査会専門委員名簿	4
・要約	6
I. 評価対象農薬の概要	7
1. 用途	7
2. 有効成分の一般名	7
3. 化学名	7
4. 分子式	7
5. 分子量	7
6. 構造式	7
7. 開発の経緯	7
II. 試験結果概要	8
1. 動物体内運命試験	8
(1) 薬物動態	8
(2) 排泄	8
(3) 胆汁排泄	8
(4) 体内分布	8
(5) 代謝物同定・定量	9
2. 植物体内運命試験	10
(1) コムギにおける植物体内運命試験①	10
(2) コムギにおける植物体内運命試験②	11
(3) ミカンにおける植物体内運命試験(予備試験)	11
(4) ミカンにおける植物体内運命試験	11
3. 土壌中運命試験	12
(1) 好氣的土壌中運命試験①	12
(2) 好氣的土壌中運命試験②	12
(3) 土壌吸着試験	13
4. 水中運命試験	13
(1) 加水分解試験(予備試験)	13
(2) 水中光分解試験	13
5. 土壌残留試験	14
6. 作物残留試験	14
7. 一般薬理試験	15
8. 急性毒性試験	16
9. 眼・皮膚に対する刺激性及び皮膚感作性試験	17

10. 亜急性毒性試験	17
(1) 90日間亜急性毒性試験(ラット)	17
(2) 90日間亜急性毒性試験(マウス)	19
(3) 90日間亜急性毒性試験(イヌ)	20
(4) 28日間亜急性神経毒性試験(ラット)	21
11. 慢性毒性試験及び発がん性試験	21
(1) 2年間慢性毒性試験(ラット)	21
(2) 1年間慢性毒性試験(イヌ)	22
(3) 2年間発がん性試験(ラット)	23
(4) 21カ月間発がん性試験(マウス)	24
12. 生殖発生毒性試験	26
(1) 2世代繁殖試験(ラット)	26
(2) 発生毒性試験(ラット)	27
(3) 発生毒性試験(ウサギ)①	27
(4) 発生毒性試験(ウサギ)②	27
(5) 発生毒性試験(ウサギ)③	28
(6) 発生毒性試験(ウサギ)④	28
(7) 発生毒性試験(ウサギ)⑤	28
13. 遺伝毒性試験	29
14. その他の毒性試験	30
(1) 急性毒性試験(ラット・異性体間比較)	30
(2) 90日間亜急性眼毒性試験(カニクイザル)	30
(3) ラットの妊娠後期における血清中ステロイドホルモン濃度及び肝薬物代謝酵素含量の測定	30
(4) 肝薬物代謝酵素誘導、細胞増殖及び活性酸素産生能試験(マウス)	31
(5) 文献における各種試験【代謝物トリアゾールアラニン(M35)の安全性】	31
(6) 文献における各種試験【代謝物1,2,4-トリアゾール(M20)の安全性】	31
III. 総合評価	32
・別紙1: 標識体及び原体一覧	36
・別紙2: 代謝物/分解物略称	37
・別紙3: 検査値等略称	38
・別紙4: 作物残留試験成績	40
・参照	41

# 農薬評価書の情報収集

表 10 90日間亜急性毒性試験（ラット）で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
3000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> <li>・食餌効率減少</li> <li>・Hb、Ht、MCV、MCH、MCHC、平均赤血球直径、PLT、プレートレットクリット、Cre 減少</li> <li>・ALP、AST、GGT 増加</li> <li>・限局性クッパー細胞色素沈着</li> <li>・脾髄外造血低下</li> <li>・白脾髄辺縁帯食細胞増生、白脾髄萎縮</li> <li>・APTT 短縮</li> <li>・脾比重量<sup>1</sup>増加、精巣絶対重量減少</li> <li>・前立腺及び精嚢の小型化</li> <li>・中等度の副腎皮質空胞化頻度増加</li> <li>・前胃/境界隆線部過形成/角化症増加</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・体重増加抑制、摂餌量減少、食餌効率減少</li> <li>・Ht、MCV、PLT、プレートレットクリット、TG、Glu 減少</li> <li>・ALP、AST、<math>\beta</math>-Glob 増加</li> <li>・限局性クッパー細胞色素沈着</li> <li>・脾髄外造血低下</li> <li>・白脾髄辺縁帯食細胞増生、白脾髄萎縮</li> <li>・卵巣絶対重量減少</li> <li>・肝小葉像明瞭、肝腫大</li> <li>・脾臓表面粗さ</li> <li>・子宮壁萎縮性菲薄化</li> <li>・小葉中心性肝細胞肥大</li> <li>・ごく軽度の副腎皮質空胞化頻度増加</li> <li>・子宮萎縮</li> </ul>
1000 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> <li>・体重増加抑制、摂餌量減少</li> <li>・肝絶対・比重量増加</li> <li>・肝臓退色</li> <li>・PT 延長</li> <li>・ALT 増加、T.Chol、TG 減少</li> <li>・<math>\beta</math>-Glob 増加</li> <li>・肝小葉像明瞭、肝腫大、小葉中心性肝細胞肥大</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・肝絶対・比重量増加</li> <li>・肝臓退色</li> <li>・Hb、MCH、MCHC、平均赤血球直径減少、GGT 増加</li> <li>・肝細胞脂肪化</li> </ul>
300 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> <li>・肝細胞脂肪化</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・脾絶対・比重量増加</li> </ul>
100 ppm 以下	毒性所見なし	毒性所見なし

10. 亜急性毒性試験	17
(1) 90日間亜急性毒性試験（ラット）	17
(2) 90日間亜急性毒性試験（マウス）	19
(3) 90日間亜急性毒性試験（イヌ）	20
(4) 28日間亜急性神経毒性試験（ラット）	21
11. 慢性毒性試験及び発がん性試験	21
(1) 2年間慢性毒性試験（ラット）	21
(2) 1年間慢性毒性試験（イヌ）	22
(3) 2年間発がん性試験（ラット）	23
(4) 21か月間発がん性試験（マウス）	24
12. 生殖発生毒性試験	26
(1) 2世代繁殖試験（ラット）	26
(2) 発生毒性試験（ラット）	27
(3) 発生毒性試験（ウサギ）①	27
(4) 発生毒性試験（ウサギ）②	27
(5) 発生毒性試験（ウサギ）③	28
(6) 発生毒性試験（ウサギ）④	28
(7) 発生毒性試験（ウサギ）⑤	28
13. 遺伝毒性試験	29
14. その他の毒性試験	30
(1) 急性毒性試験（ラット・異性体間比較）	30
(2) 90日間亜急性根毒性試験（カニクイザル）	30
(3) ラットの妊娠後期における血清中ステロイドホルモン濃度及び肝薬物代謝酵素含量の測定	30
(4) 肝薬物代謝酵素誘導、細胞増殖及び活性酸素産生能試験（マウス）	31
(5) 文献における各種試験【代謝物トリアゾールアラニン（M35）の安全性】	31
(6) 文献における各種試験【代謝物1,2,4-トリアゾール（M20）の安全性】	31
III. 総合評価	32
・別紙1：揮発体及び原体一覧	36
・別紙2：代謝物/分解物略称	37
・別紙3：検査値等略称	38
・別紙4：作物残留試験成績	40
・参照	41

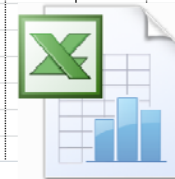


# 農薬毒性試験結果のデータ抽出：データシート作成

## 毒性所見

番号	2Y001		2Y002		2Y003		2Y004		2Y005		2Y006		2Y007		2Y008		2Y009		2Y010		
農薬名	1-ナフタレン酢酸		アバメクチン		アゼフェート		アセキメシル		アセタミプリド		アセトクロール		アシフルオルフェン		アラクロール		アルジカルブ		アミスルプロム		
雌雄	オス	メス	オス	メス	オス	メス	オス	メス	オス	メス	オス	メス	オス	メス	オス	メス	オス	メス	オス	メス	
1	5000		2.0 mg/kg/d		1500		1600		1000		5000		5000		126 mg/kg/d		30		20000		
2	1000		1.5 mg/kg/d		500		800		400		1500		2500		42 mg/kg/d		10		10000		
3	100		0.75 mg/kg/d		10		200		160		500		500		14 mg/kg/d		1		2000		
4							50						150						200		
5													25								
9														2		1	1			2	2
10																					
11		1		1										1	1	2	2			3	2,3
12																					
13																					
14																					
15																					
16																					
17																					
18																					
19																					
20																					
21																					
22																					
23																					
24																					
25																					
26																					
27																					
28																					
29																					
30																					
31																					
32																					
33																					
34																					
35																					
36																					
37																					
38																					

## 農薬名 性 投与量



農薬毒性試験で認められた全毒性所見について、農薬名と番号、ラットの雌雄、投与量がわかるよう入力した。

# コード番号の付与



類似・同一所見を整理後、各所見に7桁のコード番号を付与した。

**101 01 1 0 = 肝絶対重量増加**

大カテゴリー：臓器/組織、血液学、血液生化学、腫瘍/がん

中カテゴリー：所見/徴候、検査項目

小カテゴリー：部位/細胞、毒性学的特徴

予 備 : さらに細分化したいときに使用

毒性所見(日本語)をコード化することで、統計学的・情報学的解析をスムーズに行うことが可能

## コード番号の割り当て：大カテゴリー

コード番号	臓器等	コード番号	臓器等	コード番号	臓器等
101	肝臓/胆嚢	115	精巣/精嚢/精巣上体	129	ハーダー腺
102	肺	116	その他の雄性生殖器	130	耳
103	咽喉頭	117	卵巣/子宮	131	骨格筋
104	鼻腔	118	その他の雌性生殖器	132	骨/関節
105	歯	119	中枢神経	133	胸腔
106	唾液腺	120	坐骨神経	134	皮膚/皮下組織/毛
107	胃	121	骨髄	135	乳腺
108	小腸	122	リンパ節	136	脂肪組織
109	大腸	123	脾臓	201	血液学
110	膵臓	124	胸腺	202	血液生化学
111	血管	125	甲状腺	203	尿/便
112	心臓	126	上皮小体	301	体重
113	腎臓	127	副腎	302	外観/行動
114	膀胱/尿管/尿道	128	眼	401	腫瘍/がん

全2,052毒性所見を分類できるようなカテゴリー（大項目）に分けた。

101～：臓器/組織

201～：血液学，血液生化学，尿/便

301～：体重，外観/行動

401：腫瘍/がん

# コード番号の割り当て：中・小カテゴリー

コード番号	臓器等	コード番号	臓器等
101	肝臓/胆嚢	115	精巣/精嚢
102	肺	116	その他の臓器
103	咽喉頭	117	卵巣
104	鼻腔	118	
105	歯	119	
106	唾液腺	120	
107	胃	121	
108	小腸	122	
109	大腸	123	
110	膵臓	124	加齢
111	血管	125	甲状腺
112	心臓	126	上皮
113	腎臓	127	副
114	膀胱/尿管/尿道	128	目

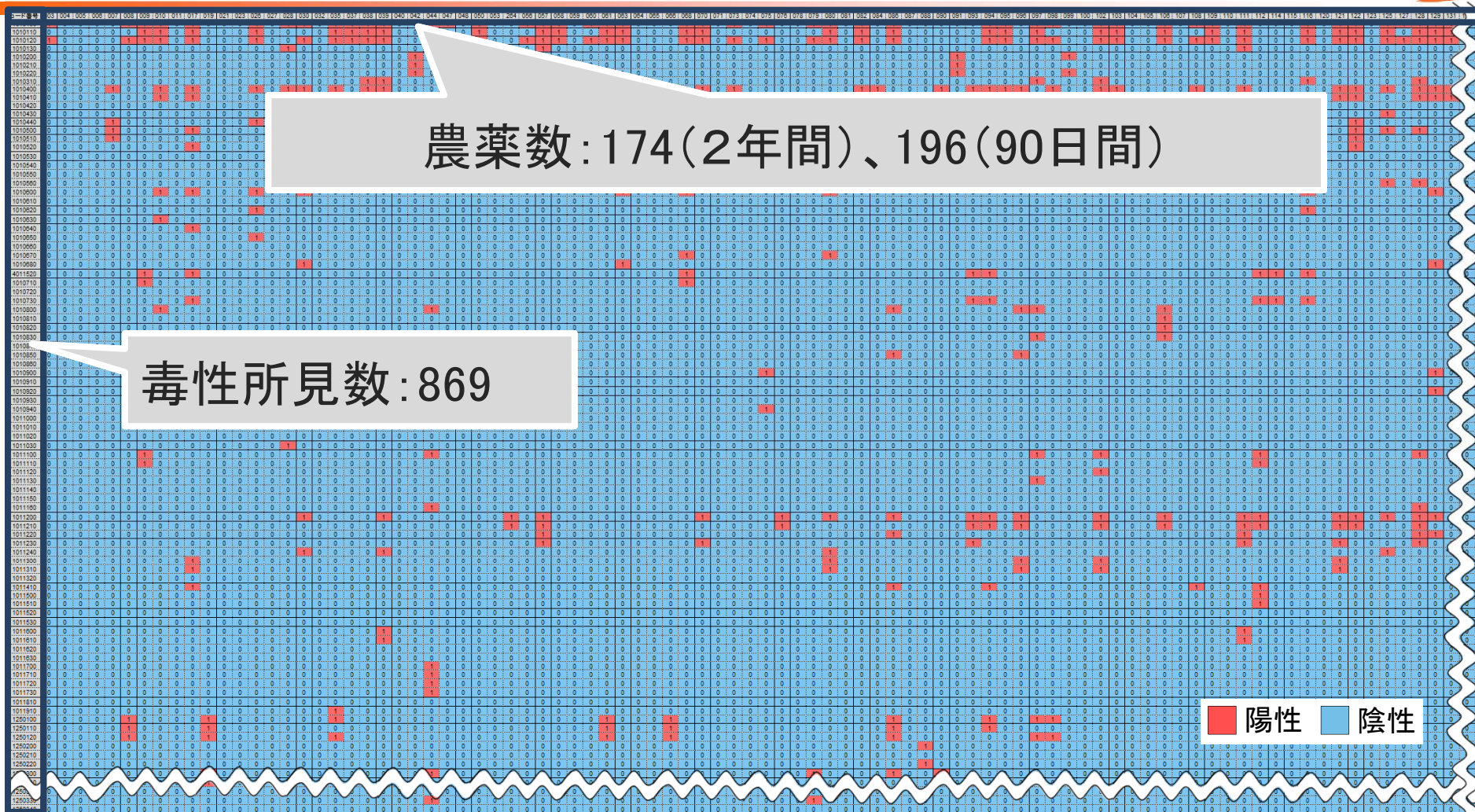
## 101：肝臓/胆嚢

コード番号	所見等	コード番号	部位等
01	重量増加	0	
01		1	絶対
01		2	相対
01		3	その他
02	重量減少	0	
02		1	絶対
02		2	相対
03	肝腫大	1	肝臓
04	肝細胞肥大	0	
04		1	中心性
04		2	中間性
04		3	周辺性
04		4	びまん性
05	脂肪化/空胞化	0	
05		1	中心性
05		2	中間性
05		3	周辺性
05		4	びまん性
05		5	限局性
05		6	その他
06	細胞死/炎症	0	
06		1	アポトーシス
06		2	単細胞
06		3	中心性
06		4	周辺性
06		5	びまん性
06		6	限局性
06		7	巣状
06		8	海綿状変性

### 類似所見のグループ化(肝臓の例)

肝臓での全169毒性所見について、19の所見等(中項目)、64の部位等(小項目)に分類することができた。

# 毒性所見の関連性解析



用量を考慮せず、各毒性所見の有無を1(陽性)又は0(陰性)としてデータシートを作成し、関連解析(カイ二乗検定)を行った。

## 肝相対重量増加と肝細胞肥大の関連性(90日間:196農薬)

雄				雄			
肝相対重量増加		肝細胞肥大		肝相対重量増加		肝細胞肥大	
有無	数 (%)	発現部位	数 (%)	有無	数 (%)	発現部位	数 (%)
あり	116 (59%)	小葉中心性	45 (39%)	あり	121 (62%)	小葉中心性	45 (37%)
		小葉中間性	1 (1%)			小葉中間性	1 (1%)
		小葉周辺性	5 (4%)			小葉周辺性	5 (4%)
		びまん性	32 (28%)			びまん性	33 (27%)
		なし	37 (32%)			なし	42 (35%)
なし	80 (41%)	小葉中心性	9 (11%)	なし	75 (38%)	小葉中心性	4 (5%)
		小葉中間性	0 (0%)			小葉中間性	0 (0%)
		小葉周辺性	0 (0%)			小葉周辺性	0 (0%)
		びまん性	3 (4%)			びまん性	2 (3%)
		なし	68 (85%)			なし	69 (92%)

- ✓約6割の農薬で肝相対重量の増加が認められた。
- ✓肝相対重量が増加しても、肝細胞肥大が認められない場合がある。

## 肝絶対重量増加と肝細胞肥大の関連性(90日間:196農薬)

雄				雄			
肝絶対重量増加		肝細胞肥大		肝絶対重量増加		肝細胞肥大	
有無	数 (%)	発現部位	数 (%)	有無	数 (%)	発現部位	数 (%)
あり	71 (36%)	小葉中心性	29 (41%)	あり	84 (43%)	小葉中心性	31 (37%)
		小葉中間性	1 (1%)			小葉中間性	1 (1%)
		小葉周辺性	3 (4%)			小葉周辺性	4 (5%)
		びまん性	21 (30%)			びまん性	26 (31%)
		なし	21 (30%)			なし	27 (32%)
なし	125 (64%)	小葉中心性	25 (20%)	なし	112 (67%)	小葉中心性	18 (16%)
		小葉中間性	0 (0%)			小葉中間性	0 (0%)
		小葉周辺性	2 (2%)			小葉周辺性	1 (1%)
		びまん性	14 (11%)			びまん性	9 (8%)
		なし	84 (67%)			なし	84 (75%)

- ✓ 約4割の農薬で肝絶対重量の増加が認められた。
- ✓ 肝絶対重量が増加しても、肝細胞肥大が認められない場合がある。
- ✓ 肝細胞肥大が認められても、絶対重量が増加しない場合がある。

## 肝細胞肥大と肝重量増加の関連性(90日間)

性	肝細胞肥大				絶対重量増加	相対重量増加
	発現	数(%)	発現部位	数	発現数(%)	発現数
雄	あり	91 (46%)	小葉中心性	54	50 (55%)	79 (87%)
			小葉中間性	1		
			小葉周辺性	5		
			びまん性	35		
	なし	105 (54%)	-		21 (20%)	37 (35%)
雌	あり	85 (43%)	小葉中心性	49	57 (67%)	79 (93%)
			小葉中間性	1		
			小葉周辺性	5		
			びまん性	35		
	なし	111 (57%)	-		27 (24%)	42 (38%)

- ✓肝細胞肥大が認められても、絶対重量は増加しないことも多い。
- ✓肝細胞肥大が認められなくても、肝重量が増加することも多い。



## 肝相対重量増加と肝細胞肥大および肝がんの関連性(2年間)

性別	農薬数	肝相対重量増加		肝細胞肥大		肝がん 陽性数
		発現	数(%)	発現	数	
雄	174	あり	86 (49%)	あり	51	10
				なし	35	1
		なし	88 (51%)	あり	16	1
				なし	72	0
雌	174	あり	79 (45%)	あり	49	4
				なし	30	2
		なし	95 (55%)	あり	16	4
				なし	79	1

- ✓ 肝がんを誘発した農薬のほとんどでは肝細胞肥大が認められた。
- ✓ 肝細胞肥大を示した農薬のうち、肝がんを誘発したのは雄で16%、雌で12%であった。

## 肝相対重量増加と肝細胞肥大および肝がんの関連性(2年間)その2

性別	肝がん*1	肝重量増加		肝細胞肥大		
		絶対	相対	陽性	部位	数(%)
雄	12 (16%)	10 (83%)	11 (92%)	11 (92%)	小葉中心性	6 (50%)
					小葉中間性	0
					小葉周辺性	0
					びまん性	5 (42%)
雌	11 (12%)	5 (45%)	6 (55%)	8 (73%)	小葉中心性	5 (45%)
					小葉中間性	0
					小葉周辺性	1 (9%)
					びまん性	4 (42%)*2

\*1雌雄で共に肝がんを誘発したのは4農薬で、肝がん陽性農薬数は延べ19農薬(11%)。

\*2農薬では、小葉中心性、周辺性でも認められたため、合計数が10となっている。

✓ 肝がんを誘発した農薬のほとんどは、小葉中心性またはびまん性の肝細胞肥大を伴っていた。

## 肝相対重量増加と肝細胞肥大および肝がんの関連性(90日間)

性別	肝がん*1	肝重量増加		肝細胞肥大		
		絶対	相対	陽性	部位	数(%)
雄	11	7 (64%)	9 (82%)	9 (82%)	小葉中心性	6 (55%)
					小葉中間性	0
					小葉周辺性	0
					びまん性	3 (27%)
雌	9	6 (67%)	7 (78%)	4 (44%)	小葉中心性	4 (44%)
					小葉中間性	0
					小葉周辺性	0
					びまん性	0

\*1肝がんを生じた全19農薬のうち、17農薬で90日間の毒性試験データがあり、そのうち3農薬が雌雄で共に肝がんを誘発した。肝がん陽性農薬数は延べ20農薬。

\*22農薬では、小葉中心性、周辺性でも認められたため、合計数が10となっている。

✓ 肝がんを誘発した農薬のほとんどは、小葉中心性またはびまん性の肝細胞肥大を伴っていた。

# 関連性解析(90日間):肝、甲状腺、血液学、血液生化学

雄	毒性所見	肝細胞肥大	
		小葉中心性	びまん性
肝臓	肝重量増加	■	■
	肝絶対重量増加	■	■
	肝比重量増加	■	■
	肝脳比重量増加	■	□
	肝細胞死	□	■
	肝_色調変化	□	■
	肝暗調化	□	■
甲状腺	甲状腺ホルモン値変動	■	□
	TSH増加	■	□
	甲状腺肥大/過形成	■	□
	甲状腺ろ胞細胞径の増大	■	□
血液学	ヘモグロビン減少	□	■
	ヘマトクリット減少	□	■
	血小板増加	□	■
	赤血球ChE (AChE) 活性阻害(20%以上)	□	■
血液生化学	総タンパク増加	■	■
	総タンパク減少	■	■
	アルブミン増加	■	■
	アルブミン減少	■	□
	グロブリン増加	■	□
	AST増加	■	■
	GGT増加	■	□
	BUN増加	□	■
	総コレステロール増加	■	□
	TG減少	□	■
	リン脂質増加	□	■

雌	毒性所見	肝細胞肥大		
		小葉中心性	びまん性	
肝臓	肝重量増加	■	■	
	肝絶対重量増加	■	■	
	肝比重量増加	■	■	
	肝脳比重量増加	■	□	
	肝腫大/肥大	■	■	
	肝細胞死	□	■	
	肝_色調変化	□	■	
	肝暗調化	□	■	
甲状腺	甲状腺絶対重量増加	■	□	
	甲状腺比重量増加	■	□	
	甲状腺ホルモン値変動	■	□	
	TSH増加	■	□	
	甲状腺肥大/過形成	■	□	
血液学	甲状腺ろ胞細胞径の増大	■	□	
	血液学	血小板増加	□	■
	血液生化学	総タンパク増加	■	■
		アルブミン増加	■	■
アルブミン減少		■	□	
グロブリン増加		■	■	
AST増加		□	■	
GGT増加		■	■	
総コレステロール増加		■	■	
リン脂質増加		□	■	
Ca増加		■	□	
K上昇		□	■	
Cl減少	■	□		

✓小葉中心性肝細胞肥大と甲状腺所見に強い相関が認められた。

✓雌雄間、小葉中心性・びまん性間で、関連所見に差が認められた。

■:  $P < 0.001$    ■:  $P < 0.01$   
 ■:  $P < 0.05$    □: 有意差なし

# 農薬毒性所見の関連性解析:カイ二乗検定(2年間)

臓器	毒性所見名 (小・中カテゴリ)	コード	陽性数	肝細胞肥大		
				全て 1010400	中心性 1010410	びまん性 1010440
肝臓/胆嚢	重量増加	1010100	90	<0.001	<0.001	0.009
	重量増加_絶対重量	1010110	61	<0.001	<0.001	0.055
	重量増加_相対重量	1010120	86	<0.001	<0.001	0.015
	肝腫大_肝臓	1010310	11	<0.001	0.018	<0.001
	脂肪化/空胞化	1010500	28	<0.001	<0.001	0.003
	脂肪化/空胞化_その他	1010590	12	0.007	0.158	0.052
	変性/変化	1010800	23	0.005	0.001	0.846
	変性/変化_海綿状変性	1010860	14	0.001	0.003	0.993
	炎症/浸潤	1011000	10	0.005	0.056	0.147
	外観	1011100	14	0.039	0.320	0.018
	変異細胞巣	1011200	34	<0.001	0.003	0.025
	変異細胞巣_好酸性	1011210	20	<0.001	0.005	0.150
	変異細胞巣_その他	1011290	10	0.035	0.690	0.147
	腎臓	重量増加_絶対	1130110	26	0.081	0.777
	増殖/過形成	1130700	15	0.217	0.658	0.003
中枢神経	ChE活性阻害_脳	1190610	11	0.007	0.050	0.160
甲状腺	肥大/過形成	1250400	28	0.002	0.015	0.080
	肥大/過形成_ろ胞上皮細胞肥大	1250420	12	0.038	0.035	0.276
血液学	平均赤血球容積 (MCV)	2010500	36	0.018	0.632	0.041
	平均赤血球容積 (MCV)_減少	2010520	27	0.016	0.519	0.062
	平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH)	2010600	31	<0.001	0.125	0.002
	平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH)_減少	2010620	23	0.018	0.229	0.085
	血小板数 (PLT)	2010800	21	0.005	0.329	<0.001
	血小板数 (PLT)_増加	2010810	15	0.019	0.418	0.028
	赤血球ChE活性_阻害	2011910	14	0.002	0.025	0.110
	血液生化学	総タンパク (TP)	2020100	36	<0.001	0.002
	総タンパク (TP)_増加	2020110	22	<0.001	<0.001	<0.001
	アルブミン (Alb)	2020200	21	0.019	0.662	<0.001
	アルブミン (Alb)_増加	2020210	14	0.001	0.101	<0.001
	アルブミン・グロブリン (A/G) (比)	2020300	13	0.018	0.062	0.010
	グロブリン (Glob)	2020400	20	0.010	0.257	0.005
	グロブリン (Glob)_増加	2020410	11	0.002	0.355	0.002
	アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)	2020600	14	0.008	0.022	0.114
	アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)_増加	2020610	13	0.018	0.062	0.352
	ビリルビン (Bil)	2021100	11	0.077	0.355	0.032
	γ-グルタミントランスペプチターゼ (GGT)	2021200	32	<0.001	0.006	0.014
	γ-グルタミントランスペプチターゼ (GGT)_増加	2021210	32	<0.001	0.006	0.014
	中性脂肪 (TG)	2021800	23	0.057	0.870	0.018
	カルシウム	2022000	10	0.150	0.722	0.017
外観/行動	摂餌_減少	3021020	71	0.140	0.603	0.035
腫瘍/がん	肝臓	4010100	12	<0.001	0.035	0.005
	肝臓_肝細胞腫	4010110	12	<0.001	0.035	0.005

雌雄共にP < 0.001

臓器	毒性所見名 (小・中カテゴリ)	コード	陽性数	肝細胞肥大			
				全て 1010400	中心性 1010410	びまん性 1010440	
肝臓	重量増加	1010100	84	<0.001	<0.001	0.005	
	重量増加_絶対重量	1010110	52	<0.001	<0.001	0.174	
	重量増加_相対重量	1010120	79	<0.001	<0.001	0.002	
	脂肪化/空胞化	1010500	24	0.001	0.001	0.086	
	脂肪化/空胞化_その他	1010590	12	0.030	0.025	0.042	
	細胞死	1010600	10	0.028	0.042	0.126	
	色素沈着	1010900	19	<0.001	<0.001	0.094	
	色素沈着_クッパー細胞	1010930	9	0.010	0.020	0.081	
	色素沈着_その他	1010990	10	0.028	0.005	0.126	
	炎症/浸潤	1011000	14	<0.001	0.015	0.001	
	外観	1011100	12	0.005	0.003	0.765	
	変異細胞巣	1011200	24	<0.001	<0.001	0.281	
	変異細胞巣_好酸性	1011210	18	0.001	<0.001	0.273	
	腎臓	色素沈着	1130900	19	0.003	0.010	0.094
	色素沈着_尿管	1130910	17	0.014	0.003	0.628	
	腎症_腎	1132210	26	0.315	0.949	0.035	
中枢神経	ChE活性阻害_脳	1190610	12	0.031	0.198	0.151	
甲状腺	肥大/過形成	1250400	27	<0.001	0.001	0.439	
	肥大/過形成_ろ胞上皮細胞肥大	1250420	12	<0.001	<0.001	0.765	
	肥大/過形成_ろ胞上皮細胞過形成	1250440	14	0.006	0.076	0.094	
	コロイド変性	1250700	11	0.063	0.012	0.663	
血液学	平均赤血球容積 (MCV)	2010500	37	0.018	0.576	0.009	
	平均赤血球容積 (MCV)_減少	2010520	30	0.005	0.660	<0.001	
	平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH)_減少	2010620	25	0.037	0.572	0.026	
	血小板数 (PLT)	2010800	22	<0.001	0.002	0.009	
	血小板数 (PLT)_増加	2010810	19	<0.001	0.002	0.017	
	赤血球ChE活性_阻害	2011910	14	0.015	0.131	0.119	
	血液生化学	総タンパク (TP)	2020100	34	0.001	0.370	<0.001
		総タンパク (TP)_増加	2020110	24	<0.001	0.083	<0.001
	グロブリン (Glob)	2020400	25	0.003	0.572	<0.001	
	グロブリン (Glob)_増加	2020410	17	<0.001	0.230	<0.001	
	ビリルビン (Bil)	2021100	12	0.120	0.025	0.570	
	γ-グルタミントランスペプチターゼ (GGT)	2021200	22	0.001	0.040	0.523	
	γ-グルタミントランスペプチターゼ (GGT)_増加	2021210	22	0.001	0.040	0.523	
	血糖 (Glu)	2021600	12	0.120	0.409	0.004	
	血糖 (Glu)_減少	2021620	10	0.127	0.207	0.013	
	コレステロール (Chol)	2021700	62	<0.001	0.017	<0.001	
	コレステロール (Chol)_増加	2021710	49	<0.001	<0.001	0.002	
	カルシウム	2022000	17	0.014	0.550	0.007	
	カルシウム_増加	2022010	12	0.030	0.409	0.042	
尿/便	尿pH	2030300	11	0.223	0.765	0.025	
	尿中TP_増加	2030410	10	0.127	0.005	0.193	
体重	体重低下	3010100	140	0.008	0.175	0.041	
	体重低下_体重増加抑制	3010120	140	0.008	0.175	0.041	
腫瘍/がん	肝臓	4010100	11	0.012	0.077	0.025	
	肝臓_肝細胞腫	4010110	11	0.012	0.077	0.025	

- ✓ 肝以外の所見とも有意な関連性が認められた。
- ✓ 雌雄間、中心性・びまん性間で、関連する所見に差が認められた。

# 肝細胞肥大と薬物代謝酵素誘導の関連性解析 ～データベース情報を利用したインビトロ試験の試み～



- ✓ 中心性肝細胞肥大は、薬物代謝酵素誘導に伴ない起こると考えられている。
- ✓ 全ての農薬について、インビボでの酵素誘導作用を評価することは現実的でない。

**目的:** インビトロ・インシリコ手法により、これらの関連性を明らかにできるか？



- ✓ 酵素誘導の多くには、核内受容体 (AHR/CAR/PXR/PPAR $\alpha$ ) が中心的に働いている。
- ✓ CYP2E1誘導は、基質の結合により起こる。

**方法:** 肝肥大陽性物質、陰性物質 (毒性試験データベースを利用) について下記項目を評価

- 核内受容体活性化作用 (インビトロアッセイ)
- CYP2E1代謝予測 (インシリコ解析)



## 1. 試験化合物の選出

- ✓ ラット毒性試験結果データベース (HESS-DB) から選出
- ✓ 小葉中心性肝細胞肥大陽性物質: 81種
- ✓ 小葉中心性肝細胞肥大陰性物質: 90種

## 2. 評価系

- ✓ 核内受容体活性化作用の評価 (3、10、30  $\mu$ M)
  - ラットAHR/CAR/PXR/PPAR $\alpha$ レポーターアッセイ
  - ラットPPAR $\alpha$ ワンハイブリッドアッセイ
  - 陽性対照の活性化率に対する相対値を利用
  - 3濃度のうち、最も高値を示した値を利用
  - t検定による増加率判定 (カットオフ値の設定)
- ✓ CYP2E1の基質・非基質の判定
  - インシリコヒトCYP2E1代謝予測システムを使用
  - 基質を1、非基質を0と数値化







## 肝細胞肥大と単独の核内受容体活性化との関連性を評価

インビトロ評価結果		毒性試験データベース 小葉中心性肝細胞肥大		P値
		あり	なし	
AHR活性化作用	あり	44	42	0.36
	なし	37	48	
CAR活性化作用	あり	22	16	0.14
	なし	59	74	
PXR活性化作用	あり	45	37	0.07
	なし	36	53	
PPAR $\alpha$ 活性化作用	あり	47	41	0.21
	なし	34	49	

肝細胞肥大と単独の核内受容体活性化との間に、有意な関連は認められなかった。

# データ解析：決定木の作成



No.	肝細胞肥大	AhR	CAR	PXR	PPAR $\alpha$	PPAR $\alpha$ -1H	CYP2E1
1	N	0.0	0.0	0.0	0.0	29.5	1
2	N	0.0	0.0	0.0	0.0	22.2	1
3	N	76.7	0.0	0.0	10.8	21.8	1
4	N	29.0	0.0	12.0	61.2	36.3	1
5	N	44.4	0.0	0.0	7.3	23.8	1
6	N	0.0	0.0	46.3	46.7	30.6	1
...	...	...	...	...	...	...	...
166	Y	0.0	44.8	33.3	0.0	0.0	1
167	Y	0.0	77.8	11.4	12.7	18.3	0
168	Y	0.0	0.0	0.0	23.9	19.6	1
169	Y	82.9	36.2	18.9	70.8	50.6	1
170	Y	0.0	0.0	7.5	11.9	29.3	1
171	Y	22.1	0.0	54.4	43.6	30.8	1

目的変数

説明変数

目的変数：肝細胞肥大の有無（毒性試験DBから取得）

説明変数：核内受容体活性化作用、CYP2E1の基質判定

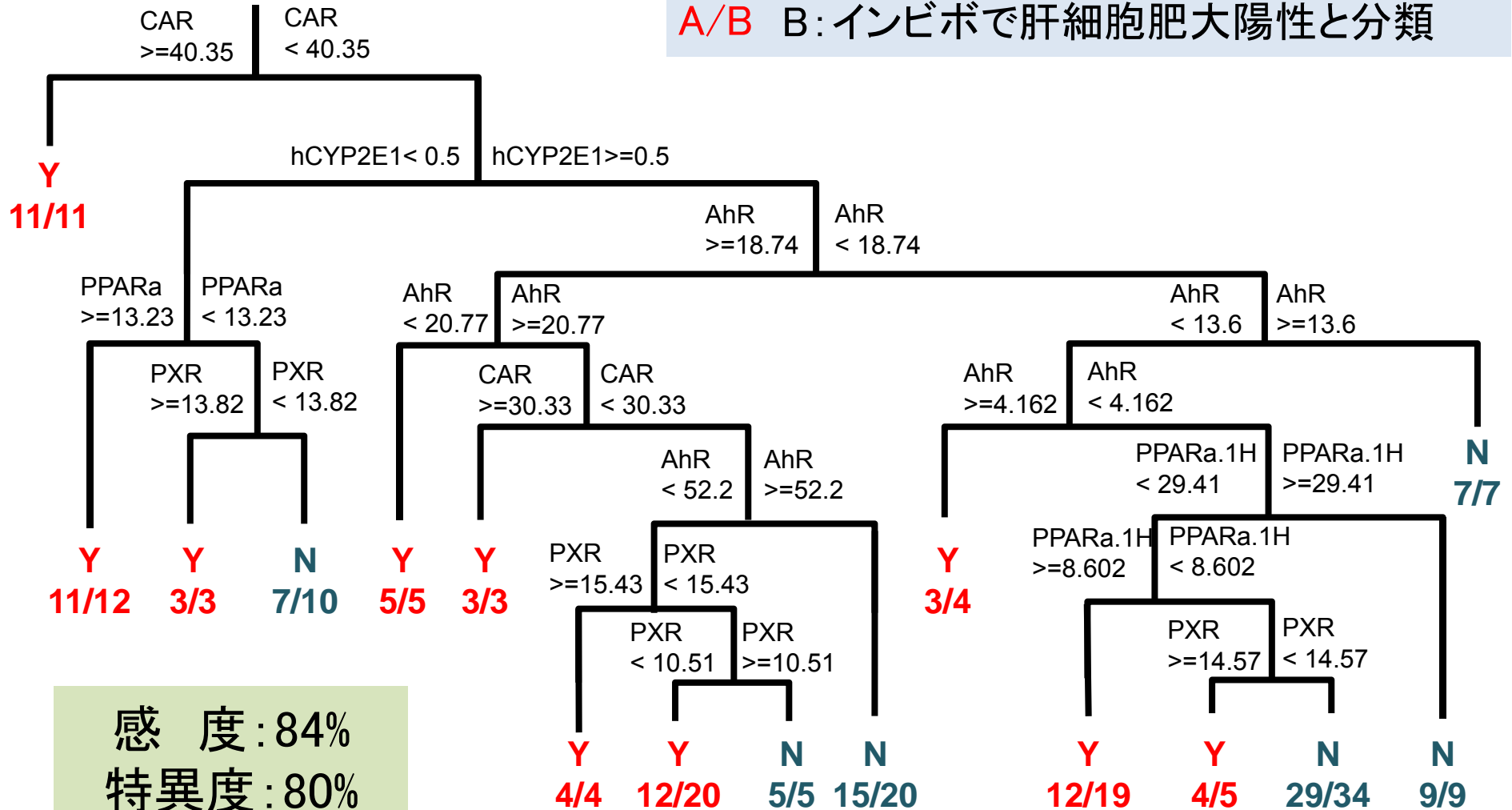


決定木解析（判別分析の一種）の実施

# 決定木

Y: 肝細胞肥大陽性  
N: 肝細胞肥大陰性

Y A: インビボで肝細胞肥大陽性  
A/B B: インビボで肝細胞肥大陽性と分類



感 度 : 84%  
特異度 : 80%  
一致率 : 82%



## 実験・解析方法

- ✓ 農薬評価書が公開されている農薬162種について、HESS-DB化合物と同様の手法で、ラットの4つの核内受容体(AHR、CAR、PXR、PPAR $\alpha$ )に対する作用をレポーターアッセイで評価した。
- ✓ 各農薬の濃度は3、10、30  $\mu$ Mとした。
- ✓ 化学物質の核内受容体活性化作用は、各アッセイの陽性対照物質処置によるレポーター活性の増加率を100%とした時の相対値として表した。20%以上の増加率を示した化合物を陽性とし、それ以外を陰性とした。
- ✓ これら農薬から細胞毒性等のため適切なレポーターアッセイが行えなかった5農薬を除き、毒性試験データ肝肥大および肝細胞肥大との関連性を解析した。

# 農薬の肝肥大、肝細胞肥大と核内受容体活性化作用の関連性(1)

90日間毒性所見 (全108農薬)			核内受容体活性化作用 (AHR, CAR, PXR or PPAR $\alpha$ )				
			陽性	陰性	オッズ	オッズ比	
所見	有無	数(%)	89 (82%)	19 (18%)	4.82	-	
絶対重量増加	有	56 (52%)	50	6	8.33	2.78	
	無	52 (48%)	39	13	3.00		
相対重量増加	有	79 (73%)	69	10	6.90	3.11	
	無	29 (27%)	20	9	2.22		
肝細胞肥大	すべて	有	60 (56%)	50	10	5.00	1.15
		無	48 (44%)	39	9	4.33	
	小葉中心性	有	37 (34%)	31	6	5.17	1.16
		無	71 (66%)	58	13	4.46	
	びまん性	有	23 (21%)	18	5	3.60	0.71
		無	85 (79%)	71	14	5.07	

- ✓いずれかの核内受容体を活性化する農薬では、肝相対重量・絶対重量増加を起こす可能性が高かった。
- ✓核内受容体活性化と肝細胞肥大には明確な関連が認められなかった。

## 農薬の肝肥大、肝細胞肥大と核内受容体活性化作用の関連性(2)

2年間毒性所見 (全99農薬)			核内受容体活性化作用 (AHR, CAR, PXR or PPAR $\alpha$ )				
			陽性	陰性	オッズ	オッズ比	
所見	有無	数(%)	82 (83%)	17 (17%)	4.82	-	
絶対重量増加	有	42 (42%)	39	3	13.00	4.23	
	無	57 (58%)	43	14	3.07		
相対重量増加	有	58 (59%)	50	8	6.25	1.76	
	無	41 (41%)	32	9	3.56		
肝細胞肥大	すべて	有	49 (49%)	44	5	8.80	2.78
		無	50 (51%)	38	12	3.17	
	小葉中心性	有	31 (31%)	27	4	6.75	1.60
		無	68 (69%)	55	13	4.23	
	びまん性	有	21 (21%)	20	1	20.00	5.16
		無	78 (79%)	62	16	3.88	
肝がん	有	15 (15%)	12	3	4.00	0.80	
	無	84 (85%)	70	14	5.00		
甲状腺がん	有	13 (13%)	11	2	5.50	1.16	
	無	86 (87%)	71	15	4.73		

✓いずれかの核内受容体を活性化する農薬では、肝重量増加、肝細胞肥大を生じる確率が高かった。

✓核内受容体活性化と肝がん、甲状腺がんには明確な関連が認められなかった。

# 農薬の肝肥大、肝細胞肥大と核内受容体活性化作用の関連性(3)

90日間毒性所見 (全108農薬)			核内受容体活性化作用																
			AHR				CAR				PXR				PPAR $\alpha$				
			陽性	陰性	オッズ (陽/陰)	オッズ比	陽性	陰性	オッズ (陽/陰)	オッズ比	陽性	陰性	オッズ (陽/陰)	オッズ比	陽性	陰性	オッズ (陽/陰)	オッズ比	
所見	有無	数 (%)	45 (42%)	63 (58%)	0.71	-	31 (29%)	77 (71%)	0.40	-	63 (58%)	45 (42%)	1.40	-	17 (16%)	91 (84%)	0.19	-	
絶対重量増加	有	56(52%)	26	30	0.87	1.51	19	37	0.51	1.71	35	21	1.67	1.43	12	44	0.27	2.56	
	無	52(48%)	19	33	0.58		12	40	0.30		28	24	1.17		5	47	0.11		
相対重量増加	有	79(73%)	32	47	0.68	0.84	23	56	0.41	1.08	49	30	1.63	1.75	13	66	0.20	1.23	
	無	29(27%)	13	16	0.81		8	21	0.38		14	15	0.93		4	25	0.16		
肝細胞肥大	すべて	有	60(56%)	26	34	0.76	1.17	18	42	0.43	1.15	31	29	1.07	0.53	8	52	0.15	0.67
		無	48(44%)	19	29	0.66		13	35	0.37		32	16	2.00		9	39	0.23	
	小葉中心性	有	37(34%)	16	21	0.76	1.10	11	26	0.42	1.08	17	20	0.85	0.46	5	32	0.16	0.77
		無	71(66%)	29	42	0.69		20	51	0.39		46	25	1.84		12	59	0.20	
	びまん性	有	23(21%)	8	15	0.53	0.69	8	15	0.53	1.44	11	12	0.92	0.58	2	21	0.10	0.44
		無	85(79%)	37	48	0.77		23	62	0.37		52	33	1.58		15	70	0.21	

各肝臓所見の場合分けをしない場合のオッズに比べて、1.25倍以上高いオッズを赤、低いオッズを青で示した。また、オッズ比が1.5以上を赤、0.67以下を青で示した。

- ✓ 肝**絶対重量**陽性農薬では、AHR、CAR、PPAR $\alpha$ 活性化作用陽性率が高かった。
- ✓ 肝**相対重量**増加陽性農薬では、PXR活性化作用陽性率が高かった。
- ✓ 肝細胞肥大**陽性**農薬ではPXR、PPAR $\alpha$ 活性化陽性率が低かった。
- ✓ 中心性とびまん性肝細胞肥大陽性農薬では、AHRやCARの陽性率に差が認められた。

# 農薬の肝肥大、肝細胞肥大と核内受容体活性化作用の関連性(4)

2年間毒性所見 (全99農薬)			核内受容体活性化作用																
			AHR				CAR				PXR				PPAR $\alpha$				
			陽性	陰性	オッズ (陽/陰)	オッズ比	陽性	陰性	オッズ (陽/陰)	オッズ比	陽性	陰性	オッズ (陽/陰)	オッズ比	陽性	陰性	オッズ (陽/陰)	オッズ比	
所見	有無	数 (%)	44 (44%)	55 (56%)	0.80	-	29 (29%)	70 (71%)	0.41	-	52 (53%)	47 (47%)	1.11	-	20 (20%)	79 (80%)	0.25	-	
絶対重量増加	有	56(52%)	19	23	0.83	1.06	16	26	0.62	2.08	26	16	1.63	1.94	14	28	0.50	4.25	
	無	52(48%)	25	32	0.78		13	44	0.30		26	31	0.84		6	51	0.12		
相対重量増加	有	79(73%)	26	32	0.81	1.04	20	38	0.53	1.87	32	26	1.23	1.29	14	44	0.32	1.86	
	無	29(27%)	18	23	0.78		9	32	0.28		20	21	0.95		6	35	0.17		
肝細胞肥大	すべて	有	60(56%)	23	26	0.88	1.22	16	33	0.48	1.38	28	21	1.33	1.44	11	38	0.29	1.32
		無	48(44%)	21	29	0.72		13	37	0.35		24	26	0.92		9	41	0.22	
	小葉 中心性	有	37(34%)	16	15	1.07	1.52	7	24	0.29	0.61	17	14	1.21	1.14	7	24	0.29	1.23
		無	71(66%)	28	40	0.70		22	46	0.48		35	33	1.06		13	55	0.24	
	びまん 性	有	23(21%)	9	12	0.75	0.92	9	12	0.75	2.18	14	7	2.00	2.11	4	17	0.24	0.91
		無	85(79%)	35	43	0.81		20	58	0.34		38	40	0.95		16	62	0.26	
肝がん	有	15(15%)	5	10	0.50	0.58	4	11	0.36	0.86	7	8	0.88	0.76	1	14	0.07	0.24	
	無	84(85%)	39	45	0.87		25	59	0.42		45	39	1.15		19	65	0.29		
甲状腺がん	有	13(13%)	5	8	0.63	0.75	4	9	0.44	1.08	9	4	2.25	2.25	3	10	0.30	1.22	
	無	86(87%)	39	47	0.83		25	61	0.41		43	43	1.00		17	69	0.25		

- ✓ 肝絶対・相対重量陽性農薬では、CAR、PXR、PPAR $\alpha$ 活性化作用陽性率が高かった。
- ✓ 中心性とびまん性肝細胞肥大の間に、核内受容体活性化作用に差が認められた。
- ✓ 甲状腺がん陽性物質では、PXR活性化作用陽性率が高かった。





決定木解析の結果より、試験化合物の一部(18%)はレポーターアッセイによる核内受容体活性化作用の評価では説明できないことが示された。

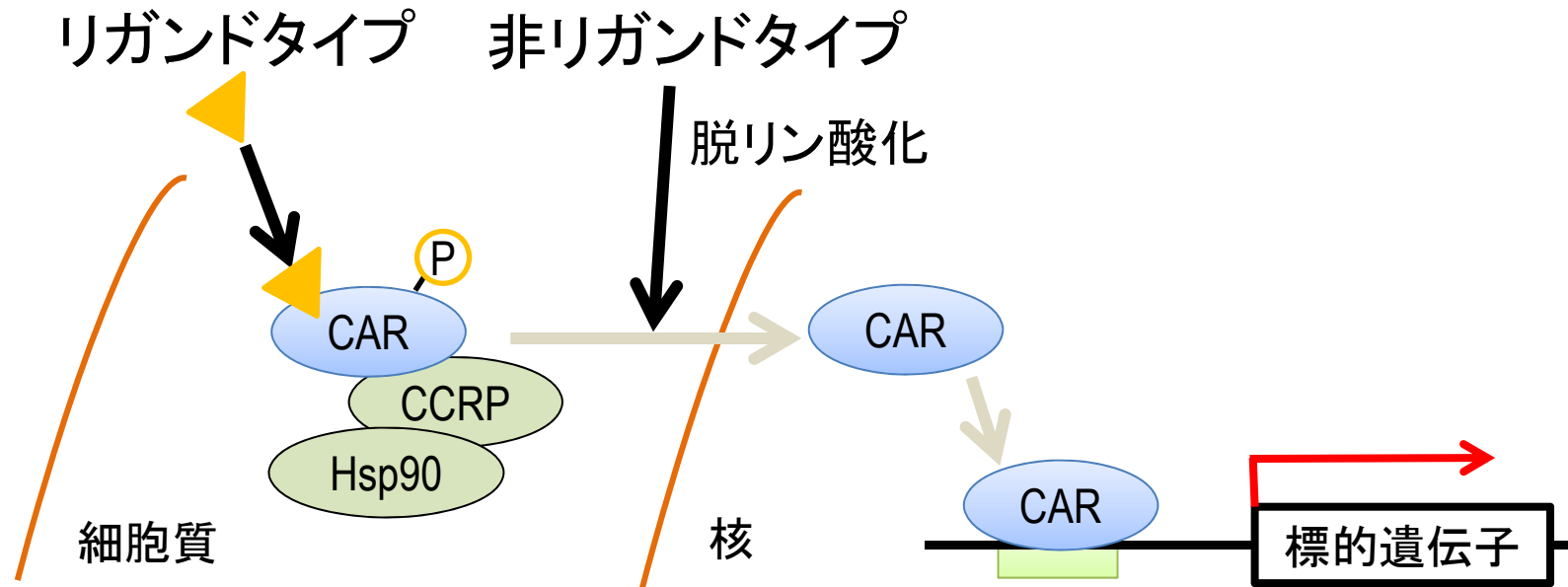
### 考えられる原因

- レポーターアッセイでは検出できない機序により核内受容体を活性化させる。
- 代謝により核内受容体活性化作用が変化する。
- 処置濃度で活性化作用を検出できない。
- 酵素誘導以外の機序で肝細胞肥大を起こす。



現在のCARレポーターアッセイでは検出できない、フェノバルビタール型の間接的CAR活性化作用について、ラット肝細胞を用いて解析した。

# CARの活性化機序



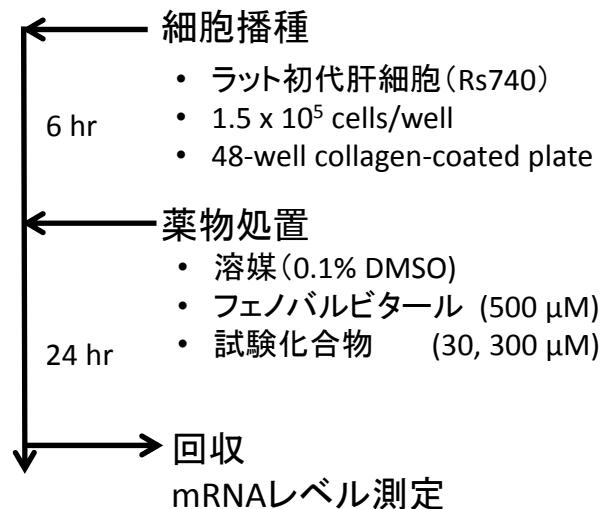
- CARには、リガンド結合による活性化の他に、リン酸化シグナル経路を介し核内移行を促進する活性化経路が存在する。
- 原因は明らかとなっていないが、現在のCARレポーターアッセイでは、非リガンドタイプの活性化物質を検出できない。

肝細胞肥大陽性物質の中に、非リガンドタイプのCAR活性化物質が存在する可能性がある。

# ラット初代肝細胞を用いた酵素誘導能の評価



## プロトコール

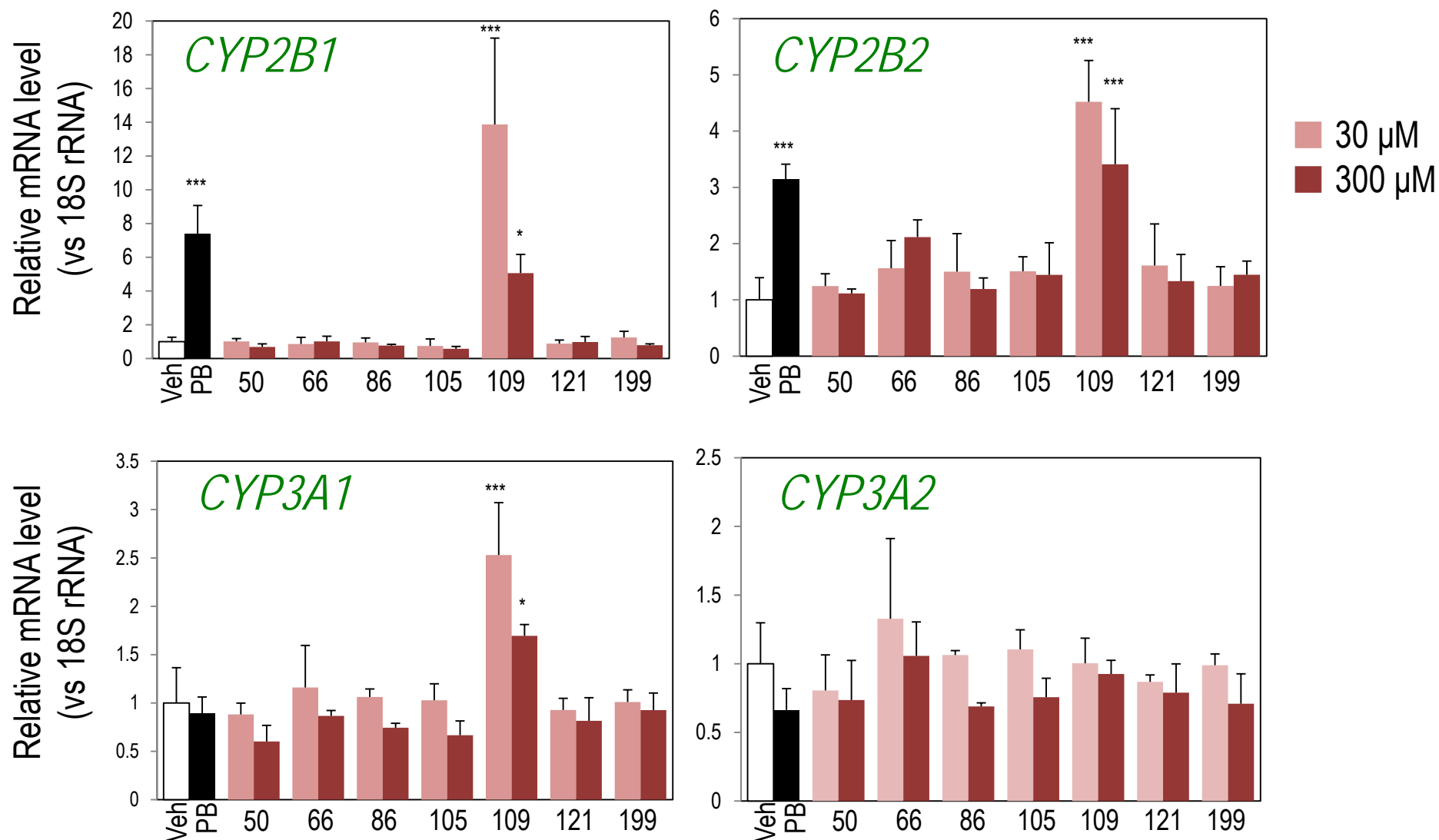


## 試験化合物

No.	Name
50	Nicotinonitrile
66	4,4'-Sulfonyldiphenol
86	1-Bromo-3-chloropropane
105	1,1,2,2-Tetrabromoethane
109	3,3-Bis(p-dimethylaminophenyl)-6-dimethylaminophthalide
121	4-Ethylmorpholine
199	Thiophene

- レポーターアッセイでいずれの核内受容体に対しても活性化作用を示さない肝細胞肥大陽性物質について評価した。
- CARの標的である薬物代謝酵素CYP2B1、2B2、3A1および3A2遺伝子のmRNAレベルを測定した。

# ラット肝P450 mRNAレベルの変動



Data are shown as mean  $\pm$  SD (n=3). The significant differences were assessed by Dunnett's test. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ . PB: phenobarbital.

# まとめ

- ✓ 肝肥大・肝細胞肥大の毒性学的意義の解析に有用な反復投与毒性試験及び発がん性試験結果のデータベースを構築した。
- ✓ データベースを用いた解析により、肝肥大(肝重量増加)及び肝細胞肥大は肝がんの初期病変ではないことが示唆された。
- ✓ 情報・統計学的データ解析及びレポーターアッセイや酵素誘導評価などのインビトロ試験を用いた解析により、中心性の肝細胞肥大の多くは、薬物代謝酵素誘導と強く関連していることが示唆された。
- ✓ ただし、一部の化合物は酵素誘導を伴わずに中心性肝細胞肥大を起こす可能性が示された。
- ✓ 中心性とびまん性の肝細胞肥大では発現機序が異なる可能性が示された。

## 結語

- 肝肥大及び中心性肝細胞肥大の多くは、薬物代謝酵素誘導に伴うと考えられた。
- 一方、酵素誘導とは異なる機序で起こる肝肥大や肝細胞肥大の存在も示唆された。
- 肝肥大及び肝細胞肥大の毒性学的影響の評価には、酵素誘導試験や核内受容体作用評価を行い、発現機序を推定することが有用と考えられる。

# 化学物質により誘発される肝肥大の毒性学的評価手法の確立と今後の問題点

梅村 隆志 (うめむら たかし)

国立医薬品食品衛生研究所病理部 室長



1986年4月 国立衛生試験所毒性部研究官  
1989年4月 米国ネーラーダナ研究所毒性病理研究部客員研究員  
1995年4月 国立衛生試験所毒性部主任研究官  
2007年6月 国立医薬品食品衛生研究所病理部室長  
2007年10月 国立大学法人東京農工大学非常勤講師 (獣医毒性学)  
2012年4月 国立大学法人岐阜大学大学院客員准教授 (応用獣医学特論)

厚生労働省 (安衛法GLP査察専門家)、内閣府食品安全委員会 (専門委員)、世界保健機構・国連食糧農業機関合同食品添加物専門家会議 (エキスパート)、厚生労働省化学物質安全性評価委員会 (委員)、厚生労働省化学物質GLP評価会議 (委員)、日本獣医学会 (評議員)、日本毒性学会 (評議員)、日本毒性病理学会 (評議員)

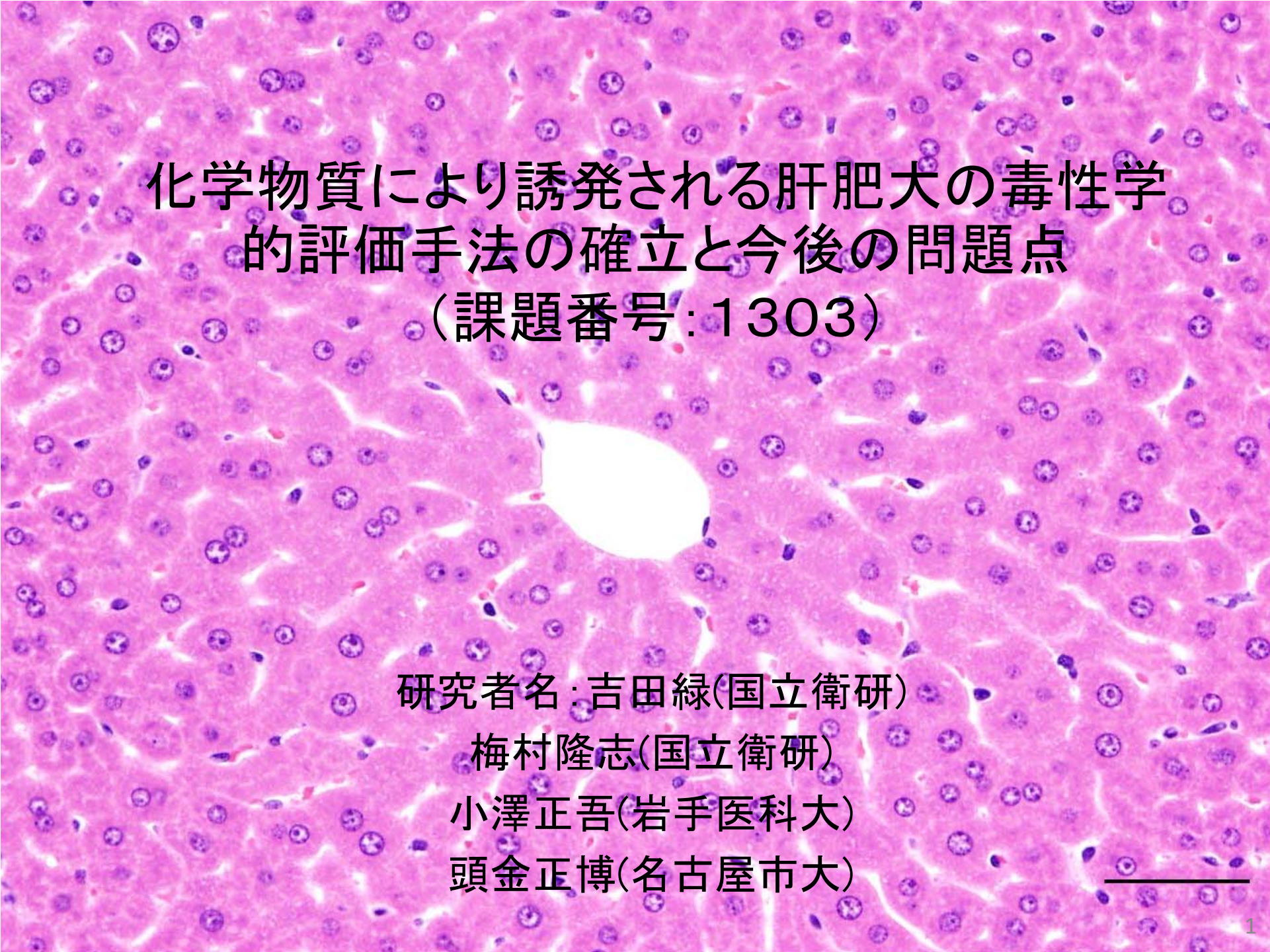
## <研究成果概要>

肝重量の増加および肝細胞肥大として定義される肝肥大は、げっ歯類およびイヌを用いた毒性試験において最も一般的な投与に起因した変化である。この化学物質で誘発される肝肥大は毒性評価において肝毒性あるいは肝発がん性の早期のキーイベントであるか否か議論されてきた。一方、肝細胞は内部あるいは外部因子からのストレスに対して生体恒常性維持する機能を有していることがよく知られており、この状態は生体の望ましい適応反応であると考えられている。

本研究は、日本の毒性評価において化学物質で誘発された肝肥大が、生体の適応反応か、毒性 (悪影響) かを判断するための科学的な考え方を示すことを目的とし、食品安全委員会が公表している農薬評価書から肝肥大に関する項目の抽出や解析を中心としてまとめた。

検索した多くの農薬にとって肝肥大はげっ歯類およびイヌで最も一般的な投与起因性の変化であったが、毒性試験に用いた全ての動物種で肝肥大のみ誘発する化学物質は稀で、多くの農薬が肝肥大だけでなく、肝細胞の障害や肝脂肪化、胆道系の変化、色素沈着等を引き起こしていた。興味あることに、肝肥大発現用量はこれらの肝障害の誘発用量と同程度あるいは高い用量であったことから、肝肥大は肝障害に先立ち生ずる事象ではないと考えられた。肝肥大を示す40以上の農薬ではイヌにおいても甲状腺重量増加等の変化が認められ、肝肥大に伴う二次的影響としての甲状腺の変化はげっ歯類だけでなくイヌにおいても認められる変化であると考えられた。またConstitutive Androstane/Active Receptorノックアウトマウス (CARKO) を用いて肝腫瘍誘発量のトリアゾール系農薬3剤を投与する2段階発がん実験を行ったところ、肝肥大はCARを経由しないが、肝腫瘍形成にはいずれの剤もCARが重要な役割を果たしていたことから、肝腫瘍形成において肝肥大は早期キーイベントではないと考えられた。アソシエート因子とするのが適切かもしれない。また検索したトリアゾール系農薬の肝腫瘍形成はマウスCAR活性化によるものであり、ヒトには外挿されない変化である可能性が推察された。CARは現在その他の農薬を用いた同様の実験が進行中である。

肝肥大の考え方については静岡県立大学の吉成浩一教授のグループと共同でとりまとめを行った。要約すると、肝細胞が外的因子に対して生体の恒常性が維持されている範囲内の肝肥大 (肝細胞肥大および肝重量増加) は適応性変化であり、毒性影響ではない。同時に生体の恒常性保持機能の限界を越し、破たんを来した場合の肝細胞肥大は毒性と判断すべきである。具体的には以下の変化を伴う肝肥大は毒性影響の可能性を考える起点になる。: (1) 肝細胞の壊死と関連する指標や炎症性変化、(2) 胆道系の変化、(3) 脂質代謝系の変化、(4) 色素沈着、(5) タイプや部位の異なる肝細胞肥大の誘発を指す。



化学物質により誘発される肝肥大の毒性学的評価手法の確立と今後の問題点  
(課題番号:1303)

研究者名:吉田緑(国立衛研)

梅村隆志(国立衛研)

小澤正吾(岩手医科大)

頭金正博(名古屋市大)



# 研究項目と研究計画

化学物質により誘導された肝肥大に対する考え方の基本方針決定

肝肥大誘発用量  
肝肥大の種差  
肝肥大と関連血液生化学的変化  
肝肥大と甲状腺  
肝肥大と肝腫瘍  
その他

肝肥大と関連項目に関するデータベース  
公開されている農薬評価書

基本指針の検証  
肝肥大  
プロフィール解析

機序研究成果より

肝肥大とCAR  
肝肥大感受性差  
肝薬物代謝の種差

肝肥大機序と  
ヒトへの外挿性の研究

化学物質により誘導された肝肥大に対する考え方の基本方針案

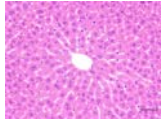
肝肥大評価上の  
問題点の提起

化学物質により誘発される肝肥大の毒性学的評価手法の確立と今後の問題点



## 本研究期間中の成果(論文発表)

1. Yoshida M, Umemura T, Kojima H, Inoue K, Takahashi M, Uramaru N, Kitamura S, Abe K, Tohkin M, Ozawa S, Yoshinari K. Basic principles of interpretation of hepatocellular hypertrophy in risk assessment in Japan. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. 2015;56(2):42-8. Japanese.
2. Gamou T, Habano W, Terashima J, Ozawa S. A CAR-responsive enhancer element locating approximately 31 kb upstream in the 5'-flanking region of rat cytochrome P450 (CYP) 3A1 gene. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2015 Apr;30(2):188-97.
3. Tamura K, Inoue K, Takahashi M, Matsuo S, Irie K, Kodama Y, Gamo T, Ozawa S, Yoshida M. Involvement of constitutive androstane receptor in liver hypertrophy and liver tumor development induced by triazole fungicides. *Food and Chemical Toxicology*. 2015. 78:86-95, 2015
4. 井上 薫、高橋美和、梅村隆志、吉田緑\* Note 食品安全委員会により公開されている農薬評価書において用いられた肝臓の病理組織学的所見名の分類とシソーラス構築: 毒性病理用語・診断基準国際統一化 International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria との照合への試み. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. 2015; In press.



Shokuhin Eiseigaku Zasshi. 2015;56(2):42-8. Japanese.

資料

## 化学物質のリスク評価における肝肥大の取扱いの基本的考え方

吉田緑<sup>1\*</sup>、梅村隆志<sup>1</sup>、小島弘幸<sup>2</sup>、井上薫<sup>1</sup>、高橋美和<sup>1</sup>、浦丸直人<sup>3</sup>、北村繁幸<sup>3</sup>、  
安部賀央里<sup>4</sup> 頭金正博<sup>4</sup>、小澤正吾<sup>5</sup>、吉成浩一<sup>6</sup>

## Basic principles on interpretation of hepatocellular hypertrophy in risk assessment in Japan

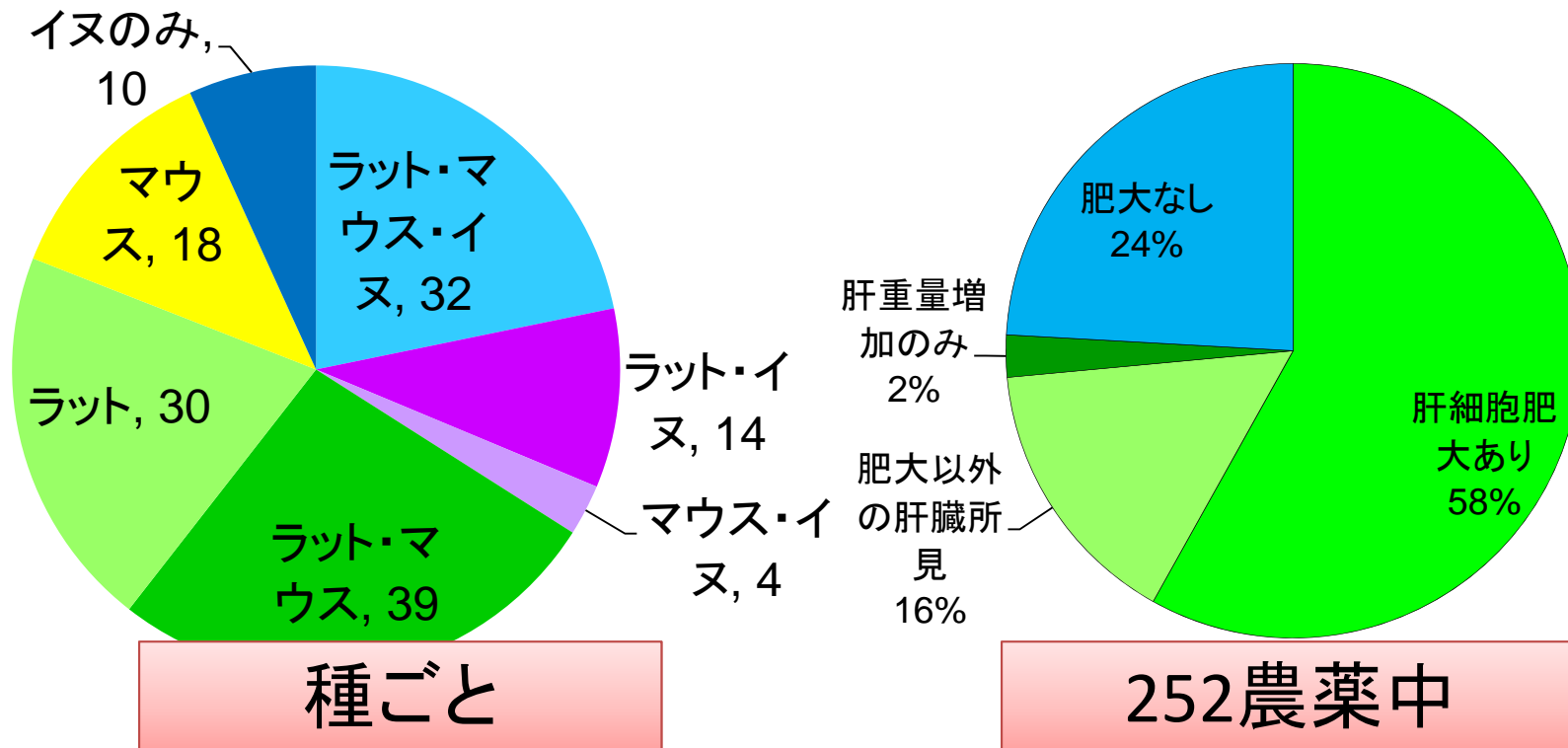
Midori YOSHIDA<sup>1\*</sup>, Takashi UMEMURA<sup>1</sup>, Hiroyuki KOJIMA<sup>2</sup>, Kaoru  
INOUE<sup>1</sup>, Miwa TAKAHASHI<sup>1</sup>, Naoto URAMARU<sup>3</sup>, Shigeyuki KITAMURA<sup>3</sup>,  
Kaori ABE<sup>4</sup>, Masahiro TOHKIN<sup>4</sup>, Shogo OZAWA<sup>5</sup>, Koichi YOSHINARI<sup>6</sup>

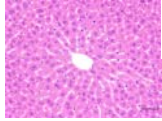
# 背景



## 肝肥大

### 毒性試験で最も多く観察される誘発所見



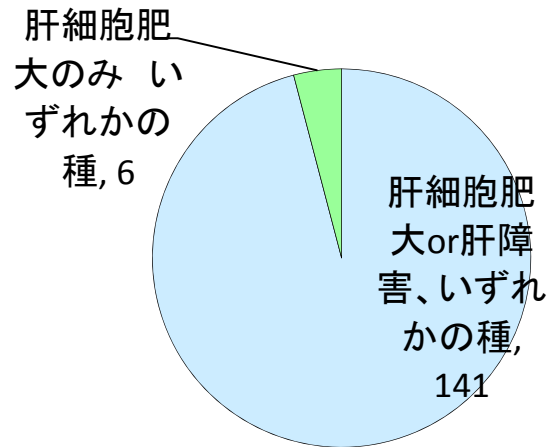


# 背景



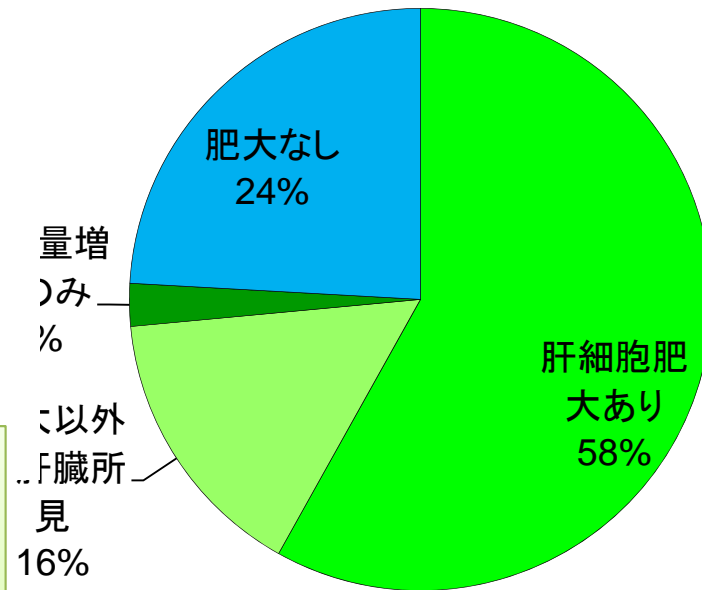
## 肝肥大

### 毒性試験で最も多く観察される誘発所見

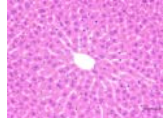


大部分の農薬で**いずれかの動物種に肝細胞肥大以外の所見**が肝臓にあり。  
肝細胞肥大のみを根拠にADI設定は

- クロラントラニリプロール
- フルチアニル



252農薬中




## 背景

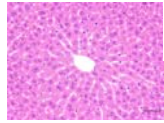
- 肝肥大  
毒性試験で最も多く観察される誘発所見
- 肝肥大の考え方に関する国際的動向  
肝傷害指標の異常がない限り、肝細胞肥大は適応性変化と考えるべき  
By JMPR, 欧州・米国毒性病理学会, PMDA



## 目的

肝肥大 Liver hypertrophy

 化学物質の 毒性評価 において、生体の適応反応なのか、毒性影響なのか判断する 科学的な考え方 を提示



## 肝肥大の定義

肝肥大とは、外的因子応答により肝細胞の機能が亢進した結果、

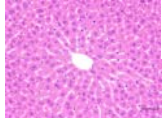
- 肝細胞の細胞質が肥大し、
- その結果、肝臓の重量が増加

肝細胞肥大 hepatocellular hypertrophy



水腫性変性、脂肪化やグリコーゲン蓄積、ミトコンドリア過形成、小胞体変性の肝細胞大型化とは区別





## 形態的な肝肥大の定義

### 光学顕微鏡

- 肝細胞の大きさの増大
- すり硝子状/微細顆粒状の好酸性細胞質

### 電子顕微鏡

- 肝細胞質内滑面小胞体smooth Endoplasmic Reticulum(sER)/マイクロボディmicrobody増加

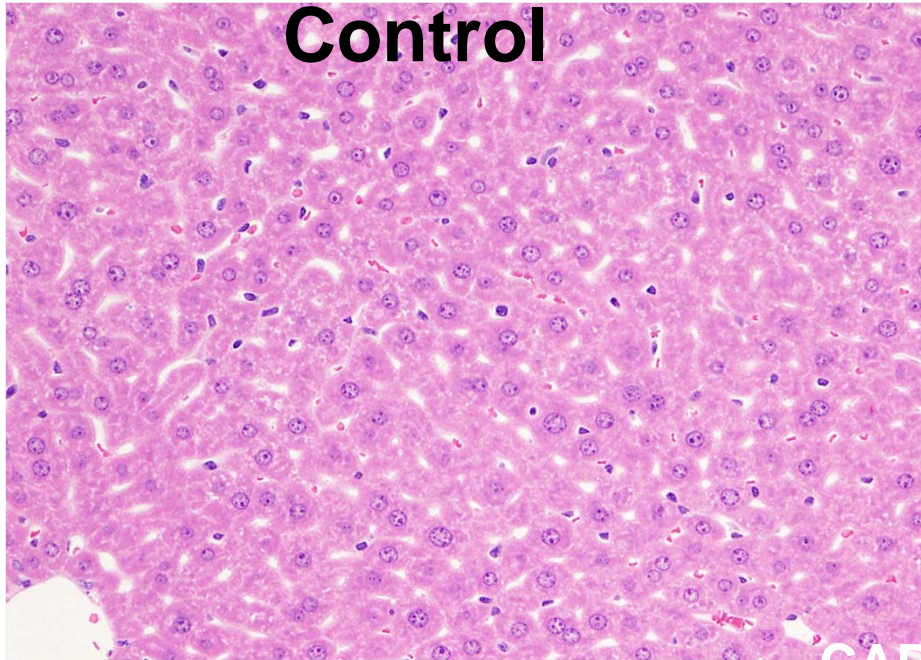
機能亢進性小胞体増生 hyperactive hypertrophic endoplasmic reticulum

-森道夫 毒性病理組織学総論-

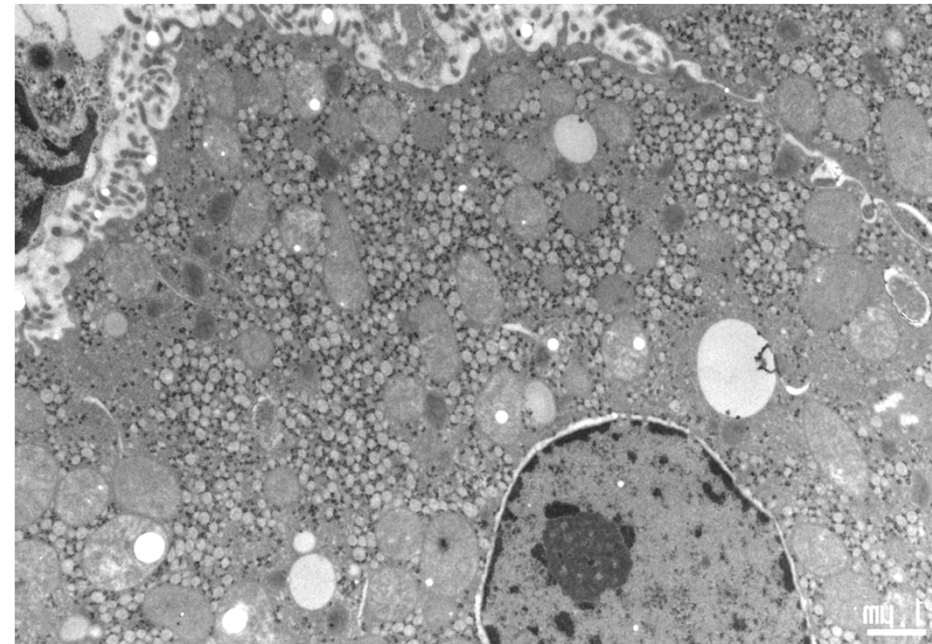
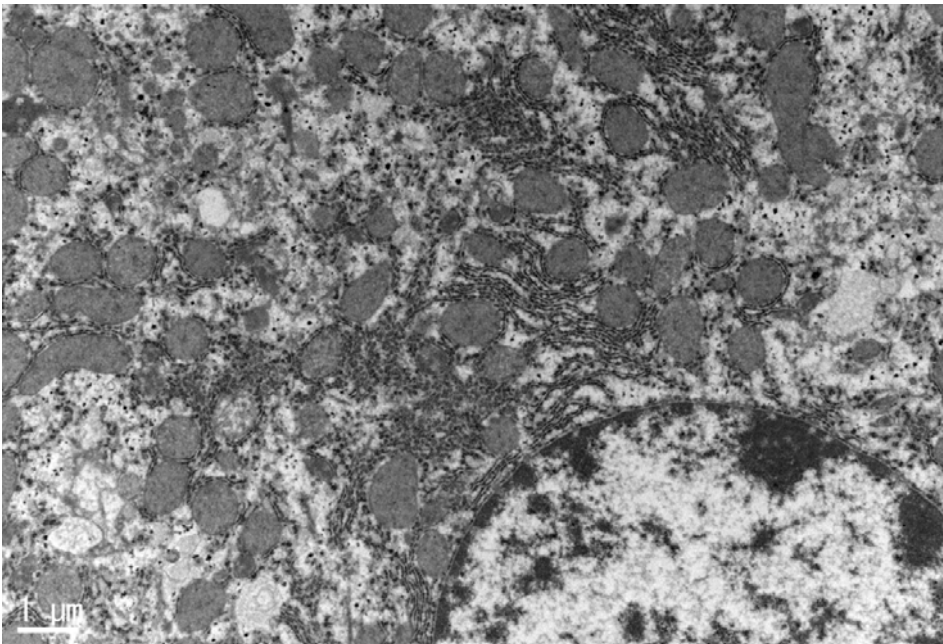
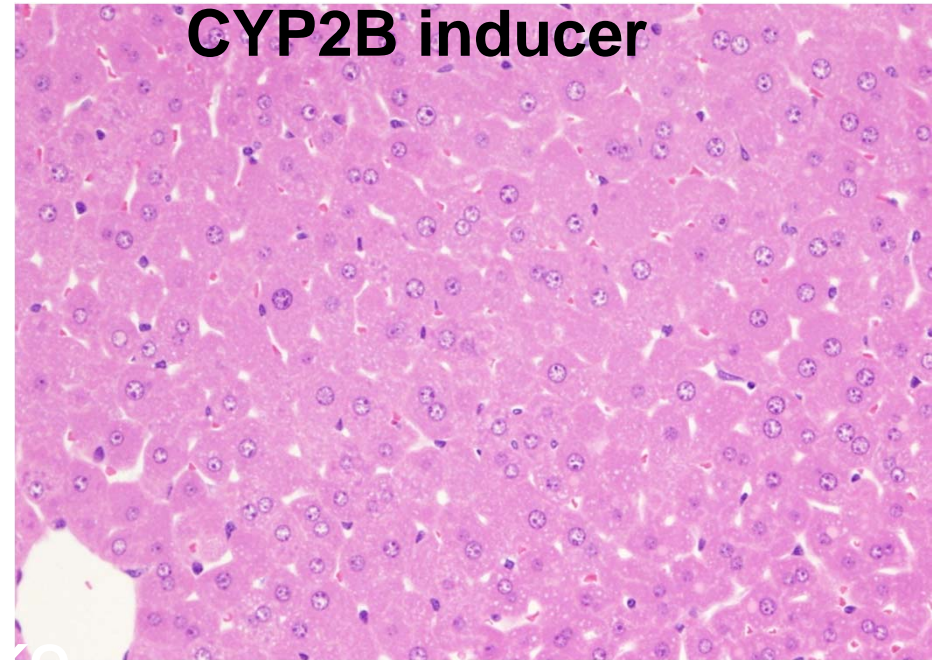


水腫性変性、脂肪化やグリコーゲン蓄積、ミトコンドリア過形成、小胞体変性の肝細胞大型化とは区別

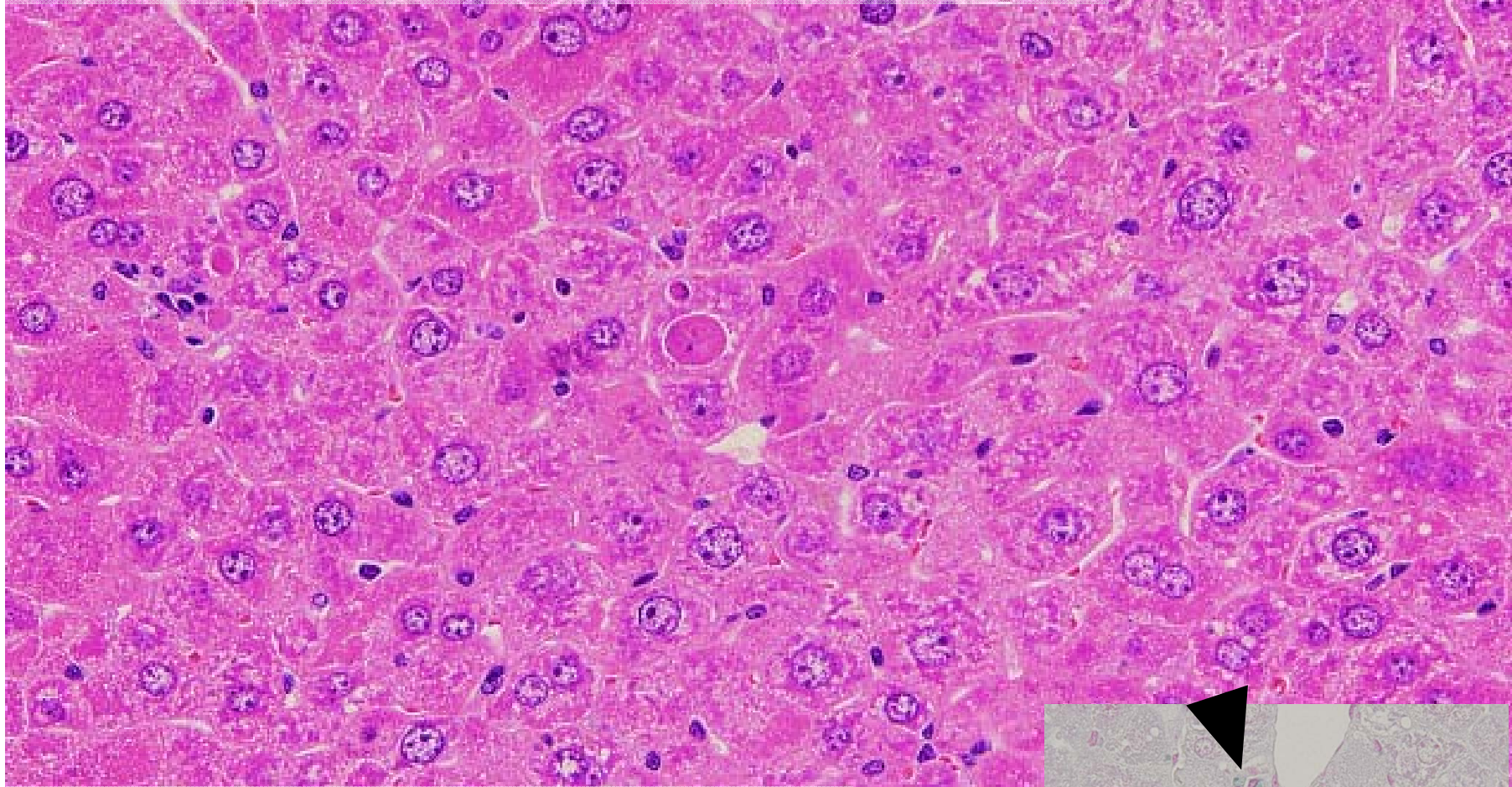
**Control**



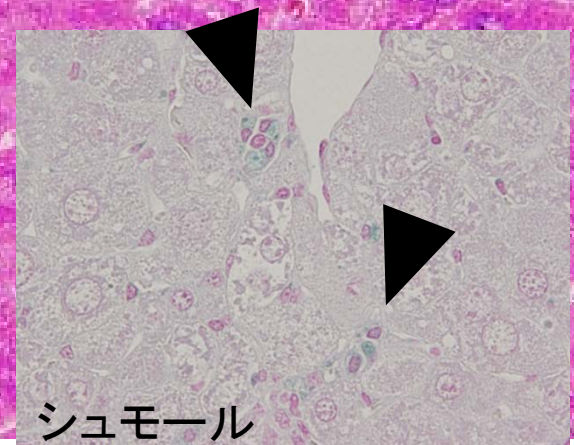
**CYP2B inducer**



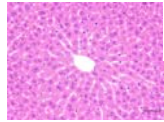
# Protox阻害剤 マウス4週間混餌投与



びまん性肝細胞肥大(好酸性顆粒状)  
(電顕にてmicrobody増加確認)  
単細胞壊死  
類洞内炎症細胞浸潤  
クッパー細胞内褐色色素沈着(リポフスチン)

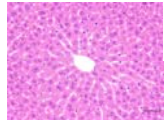


シュモール



## 化学物質と薬物代謝酵素誘導

- 酵素誘導そのものは生体の恒常性維持のための適応反応であり、一般的に毒性反応とは考えられない。
- Constitutive androstane/active receptor(CAR), pregnane X receptor (PXR), peroxisome proliferating activated receptor alpha(PPAR $\alpha$ )等核内受容体を活性化する経路が多い(複数種が誘導)



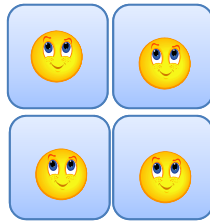
## 肝細胞肥大の意義に関する基本的考え方

形態学的・薬物代謝酵素誘導における  
定義から、生体の恒常性が維持されて  
いる限りにおいて肝細胞肥大は適応性  
変化と考えるのが妥当である

**Chemical**



正常細胞



恒常性維持=適応



恒常性維持

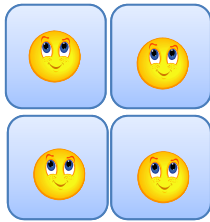


恒常性の破たん

**Chemical**

# 恒常性の破たん

正常細胞

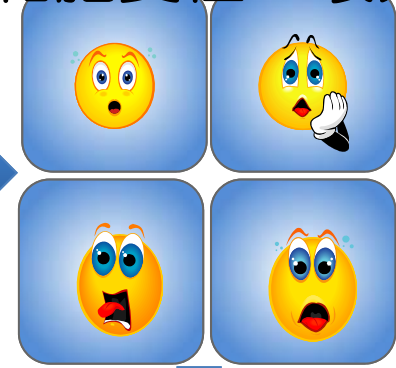


恒常性維持=適応



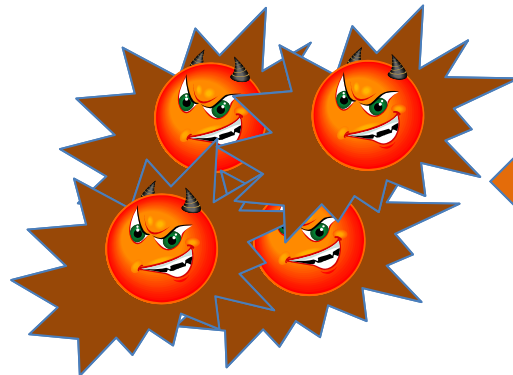
恒常性破綻

細胞変性・壊死

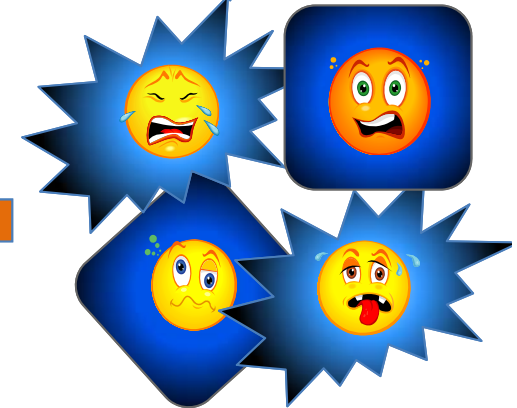


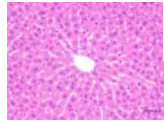
恒常性の破綻=毒性の入り口

障害



増悪化





恒常性破たん = 毒性とすべき肝肥大

肝肥大 + 肝障害指標 = 毒性と判断

肝肥大 + 肝細胞壊死/炎症性反応

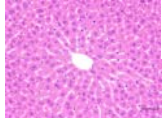
肝肥大 + 胆道系変化

肝肥大 + 脂質代謝系変化

肝肥大 + 色素沈着等

小葉中心/びまん性以外の肝細胞肥大





## 肝臓重量との関連性

 肝肥大の有無は相対重量で判定可能

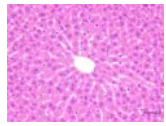
 絶対および相対重量増加

- 対照群のばらつきが小さい
- 投与群の体重の減少がほとんどない
- 顕著な肝肥大(通常は他の変化も出現)

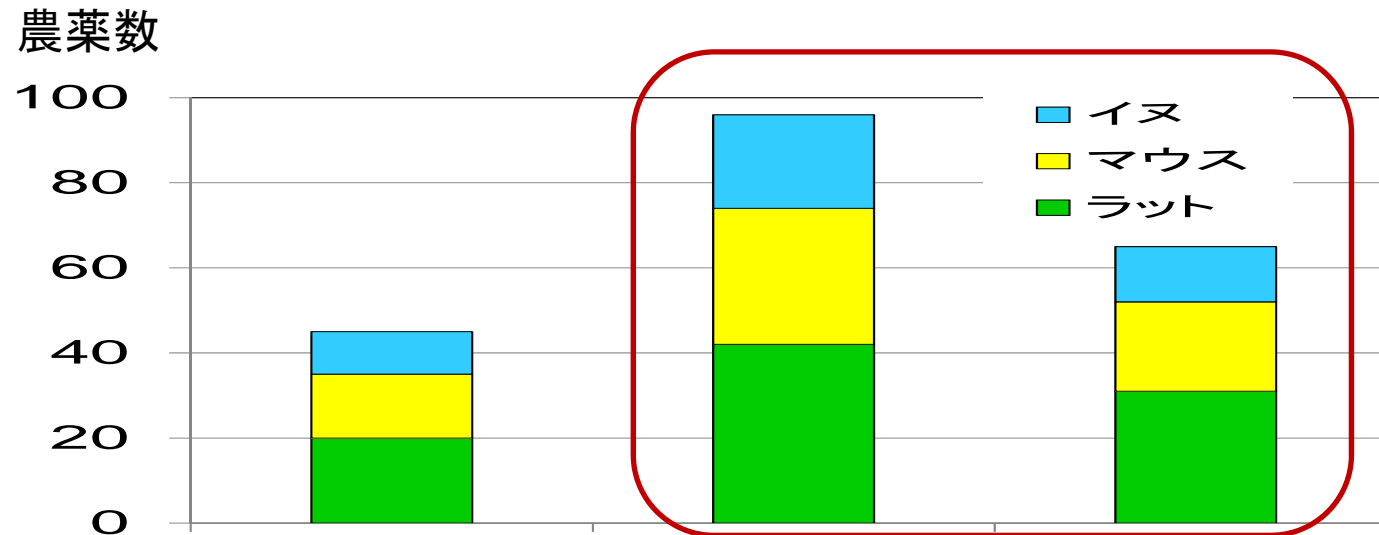
重量のみの変化であれば毒性とするのは難しい



イヌは個体差が大きいので絶対値のみの増加も注意すべき。個別対応



高用量で肝障害が認められた場合、低用量の**肝肥大は肝障害の初期変化**として毒性とすべきか？



肝肥大が肝障害より低用量から発現

肝肥大と肝障害が同用量から発現

肝肥大が肝障害より高用量で発現

肝肥大は必ずしも**肝障害の初期変化**でない



肝肥大/肝障害の発生機序の解明が大切!!

- ❖ 肝臓重量増加を伴わない肝細胞肥大
- ❖ 非げっ歯類で観察される肝肥大
- ❖ 一過性の肝肥大

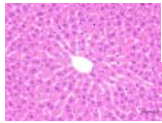


血液生化学的検査/形態学的検索  
肝障害指標を伴わない → 毒性とせず

- ❖ 甲状腺の変化を伴う場合の肝肥大



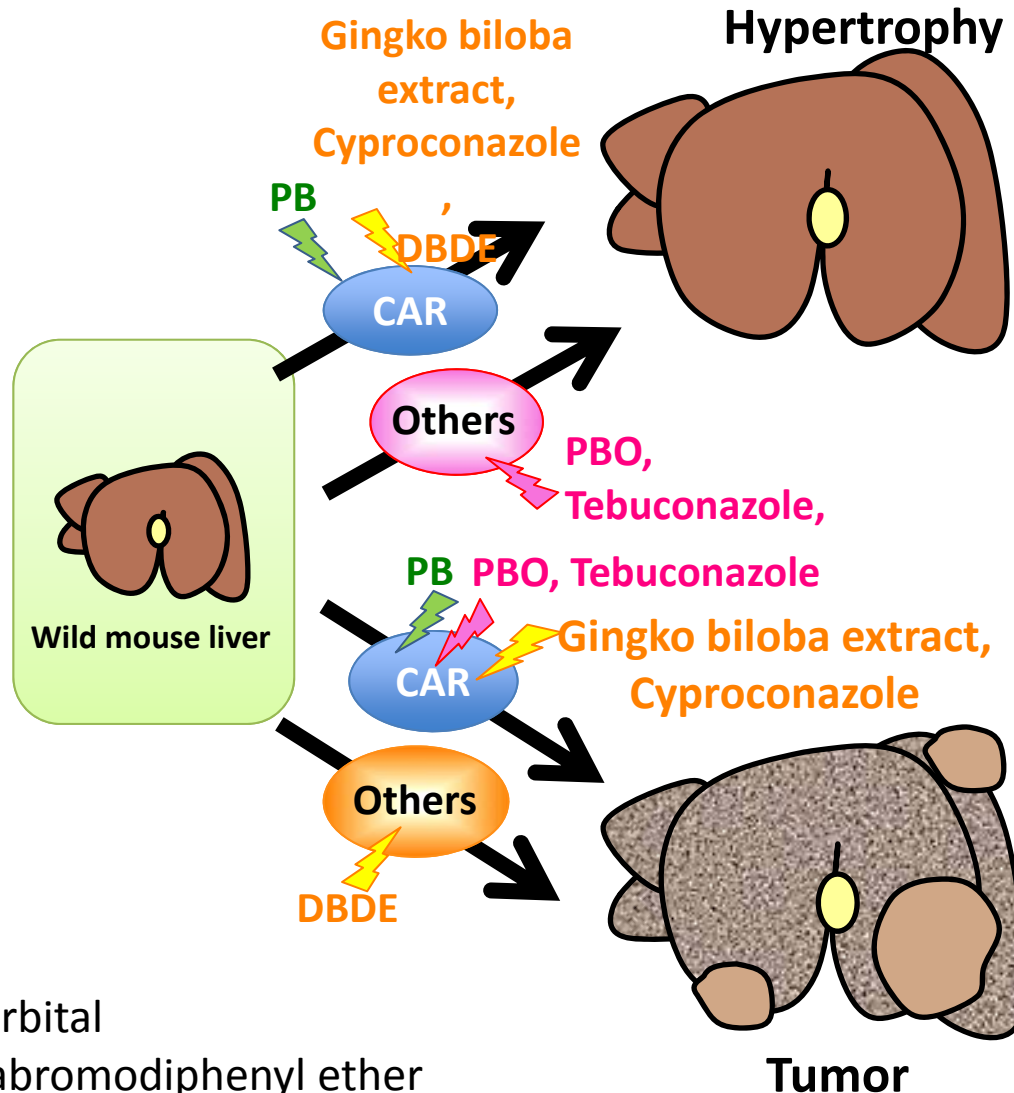
全身のホメオスターシスの異常 = 毒性  
In hazard identification



# 肝肥大は肝腫瘍の初期変化?

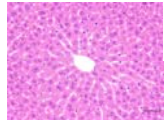
**NO!**

CARKOマウスの実験より、肥大と肝腫瘍は異なる機序と考えられる



PB, Pheobarbital

DBDE, Decabromodiphenyl ether



より明瞭な評価をするために申請者からの提供が望ましいデータ

- 明快な病理形態学的判定
- 薬物代謝酵素(第一相, 第二相)の測定\*
- および主要代謝物の同定
- 肝肥大機序の積極的検索\*
- 背景データの提示の有用性

\*ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いたCYPsの免疫染色

CYP2B (CAR), CYP3A (PXR), CYP4A (PPAR $\alpha$ ), CYP1A (AhR)

肝肥大に関与する核内受容体のタイプの同定→肝肥大機序の予測

# 肝マクロファージの機能特性に基づいた肝毒性の新規評価手法の構築と緻密化 山手 丈至 (やまて じょうじ)

大阪府立大学生命環境科学研究科獣医学専攻獣医病理学教室 教授



1981年 3月 山口大学農学研究科獣医学専攻修士課程修了  
1981年 4月 (財)日本生物科学研究所(東京都青梅市) 入所  
1991年 9月 博士(農学)取得 (東京大学)  
1992年 4月 大阪府立大学農学部獣医学科 助手  
1995年 2月 大阪府立大学農学部獣医学科 講師  
1997年 7月 カナダグエルフ大学オンタリオ獣医学部 研究員  
2000年 4月 日本獣医学会賞(第88号) 受賞  
2000年10月 大阪府立大学農学生命科学研究科獣医学専攻 助教授  
2007年 4月 大阪府立大学生命環境科学研究科獣医学専攻 准教授  
2009年 4月 大阪府立大学生命環境科学研究科獣医学専攻 教授  
2013年 4月 大阪府立大学生命環境科学研究科 副研究科長  
2015年 4月 大阪府立大学 学長補佐・国際交流機構副機構長

日本獣医学会(理事・評議員)、日本毒性病理学会(理事・評議員)、日本獣医病理学専門家協会(副理事長)、IATP(副理事長)、医薬品医療機器総合機構(専門委員)、内閣府食品安全委員会(専門委員)

## <研究成果概要>

肝には約20%の肝固有のマクロファージが存在し、肝機能の恒常性維持に係わるとともに、その機能異常は化学物質による肝障害に一次的あるいは二次的に影響を与えている。しかし、肝マクロファージの機能特性に基づいた肝毒性の評価手法の構築や、肝毒性の発現メカニズムは解明されていない。近年、病変部位に出現するマクロファージをM1とM2に分けて評価する概念が提唱された(M1/M2分極化)。M1は、炎症初期に誘導され、高い貪食活性を示し、一方、M2は、線維化を導き組織の修復に関与する。

本研究では、化学物質誘発性肝障害を評価する新たな手法を構築する目的で、多彩な機能特性を現す肝マクロファージに着目し、その機能を見極める検出系を確立するとともに、その検出系を用いて、化学物質の肝毒性発現メカニズムを、M1/M2分極化に基づいて解明することを目的とした。

まず、肝マクロファージの基本性状を得るために、発生過程の肝マクロファージの特性を解析した。その結果、胎子では貪食活性の高いCD68 M1マクロファージが、新生子から成体では肝常在マクロファージであるCD163M2クッパー細胞が現れ、肝組織構築に係わることが分かった。次に、肝恒常性に係わるクッパー細胞の役割を解析した。リボソームを投与すると、それを貪食したCD163クッパー細胞が活性化し、ASTとALTが減少した。一方、クロドロネート投与によるクッパー細胞枯渇下では、ASTとALTは増加した。クッパー細胞は肝逸脱酵素のクリアランスに関与することが分かった。すなわち、肝毒性においてクッパー細胞の機能状態を把握しておくことの重要性が示された。

化学物質による肝障害の解析において、チオアセトアミド(TAA)投与の小葉中心性肝細胞傷害では、M1機能に関わるINF- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6と、M2機能に関わるIL-4の発現が、組織傷害に先立ちすでに増加しており、これに続いて、CD68M1とCD163M2マクロファージが傷害部位に誘導され、同時に修復に係わるTGF- $\beta$ 1やIL-10が上昇した。CD68M1は、MHCクラスIIとIba1を、CD163M2は、CD204とGal-3を表出することが分かった。クロドロネート前投与によるマクロファージ枯渇下でのTAA病変を解析したところ、初期では肝小葉中心部の凝固壊死の形成が遅延し、修復期では異栄養性石灰沈着が生じ、治癒が遅延した。また、 $\alpha$ -naphthylisothiocyanate (ANIT)投与によるグリソン鞘の胆管上皮傷害では、MHCクラスII発現マクロファージが病変形成に極めて重要であることが示された。クロドロネート前投与によるANIT病変では、胆管周囲の線維化が遅延した。肝毒性では小葉中心部とグリソン鞘領域の傷害において異なるマクロファージが機能することが分かった。ラットマクロファージ株HS-Pを用いた *in vitro*でのマクロファージ機能解析により、M1因子であるINF- $\gamma$ 、あるいはM2因子であるIL-4を添加することで、*in vivo*で生じるマクロファージ機能の現象が再現できることが分かった。HS-Pは試験管内での肝毒性メカニズム解析において有用であることが示された。

マクロファージのM1/M2分極化に基づいた肝毒性病変の評価手法は、薬物誘発性病変の新たな病理発生機序の解明につながると考える。これは、また、肝毒性評価において用いられる肝機能パラメーターの緻密化と精度の高いend-pointを導くことができることから、食品健康影響評価でのより科学的なADI(一日摂取許容量)設定が可能となる。本課題で得られた成績はその基礎情報を提供する。

# 肝マクロファージの機能特性に基づいた肝毒性の 新規評価手法の構築と緻密化

「研究者からの提案に基づく研究（課題番号：1405）」

（単年度）

鋭敏に反応する肝マクロファージの多様な機能特性を一つの指標として、  
化学物質による肝毒性を、毒性病理学的（形態学的）な観点から、  
より科学的に評価する手法を構築する。

⇒ 肝毒性評価の緻密化 ⇒ メカニズム研究 ⇒ より精度の高いADI設定

2015.10.1

大阪府立大学 生命環境科学研究科 獣医病理学教室

代表研究者

・山手 丈至

分担研究者

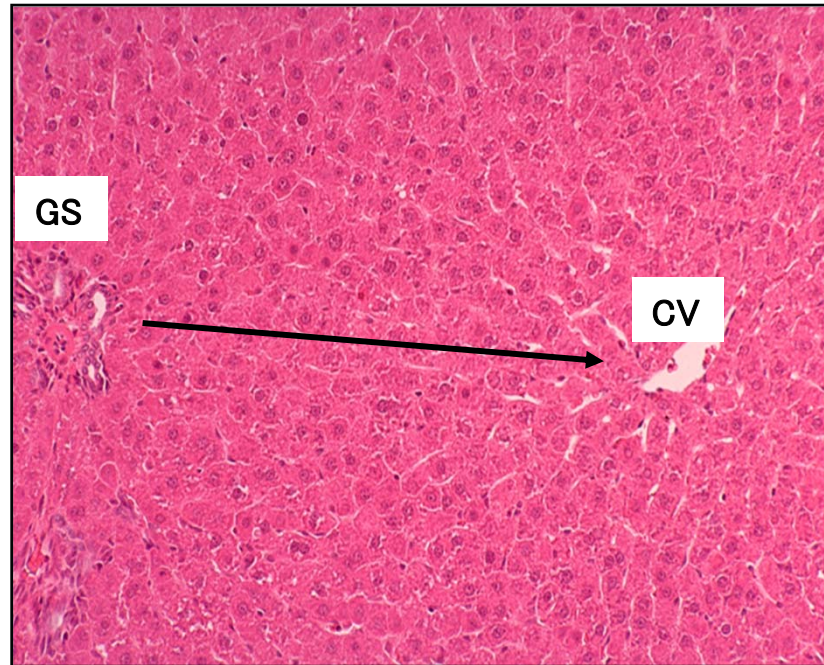
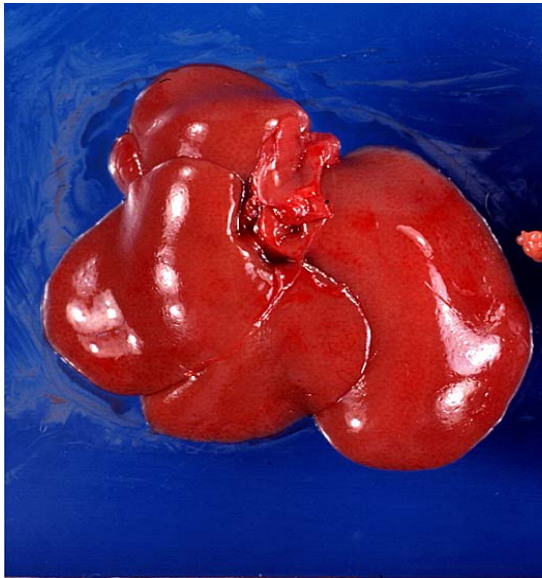
・桑村 充 ・井澤 武史



F344ラット

肝マクロファージ(クッパー細胞・樹状細胞): 約20% ⇒ 恒常性

ラットの肝臓



CV: 中心静脈; GS: グリソン鞘

門脈-肝バリアー

高い感受性

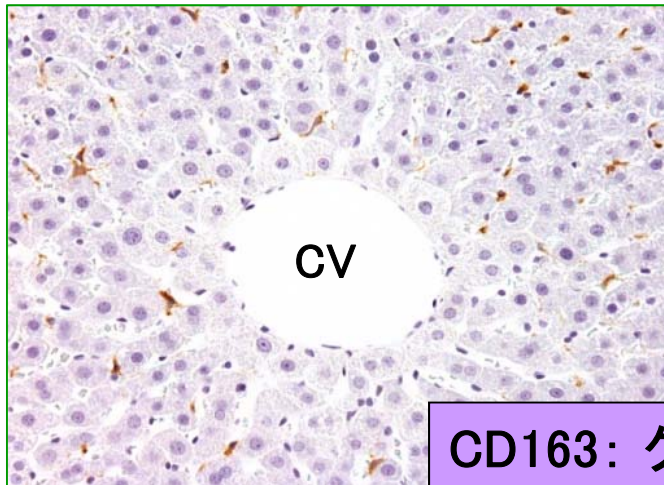


- ・異物貪食
- ・解毒
- ・免疫応答
- ・増殖因子産生

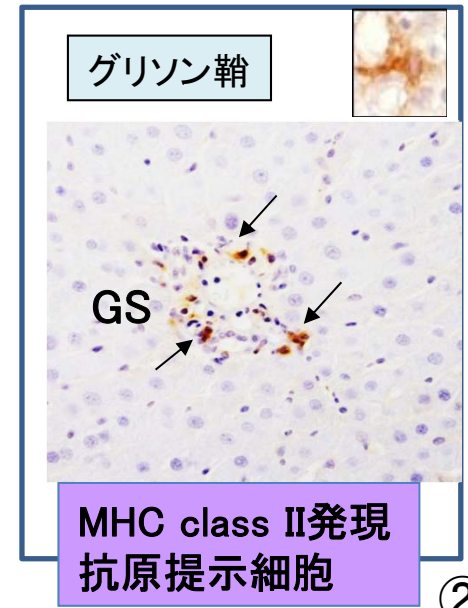
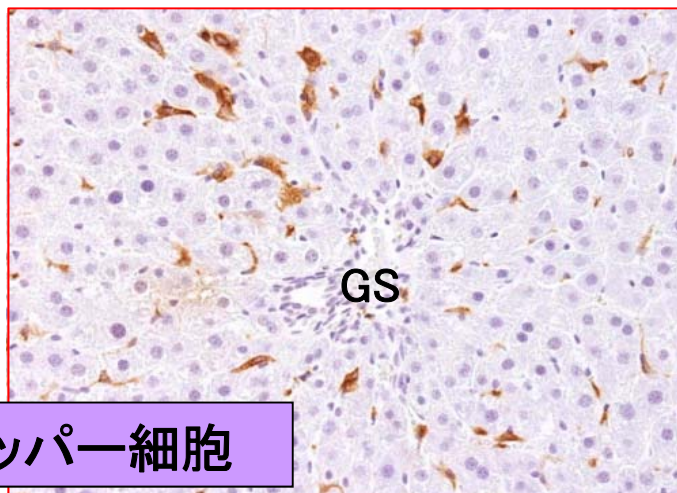


恒常性

肝マクロファージの肝毒性への係わり?



CD163: クッパー細胞



MHC class II発現  
抗原提示細胞



## 報告内容

### 1. 肝マクロファージと恒常性

1-1: 肝マクロファージ活性化実験

1-2: 肝マクロファージ枯渇実験

### 2. 肝マクロファージを介した肝毒性の評価手法の構築

2-1: M1/M2マクロファージ分極化

2-2: チオアセトアミド(TAA)誘発肝細胞傷害実験

(1) CD68 (M1マクロファージ) と CD163 (M2マクロファージ)の出現

(2) ラットマクロファージ株(HS-P)を用いたCD68/CD163発現機序

(3) MHCクラスIIとCD204発現マクロファージのM1/M2分極化

(4) Iba1とGalectin-3発現マクロファージのM1/M2分極化

(5) 肝マクロファージの初期誘導とM1/M2分極化

2-3: 肝マクロファージ枯渇状態におけるTAA誘発病変

### 3. まとめ

# 1. 肝マクロファージと恒常性

## 1-1: 肝マクロファージ活性化実験

F344 雄ラット, 6 週齡 (体重 150-160 g)

リポソーム (Lip) 単回投与 : 50 mg/kg 体重, 静注

リポソーム (Lip)  
単回投与

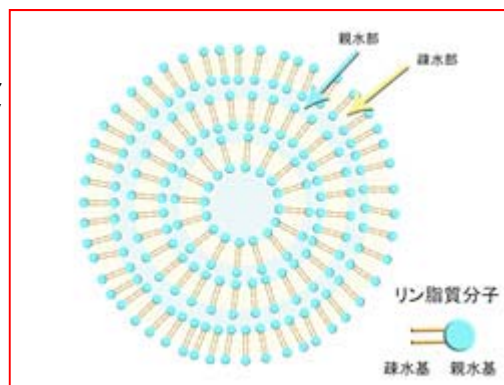


対照: PBS

1日



リン脂質膜に包まれ  
マクロファージに貪食  
されやすい。

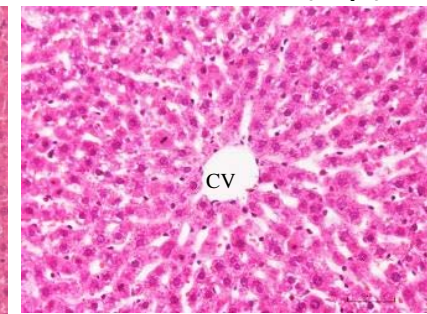


<http://www.kose.co.jp/jp/ja/research/secretstory/liposome.html>

対照



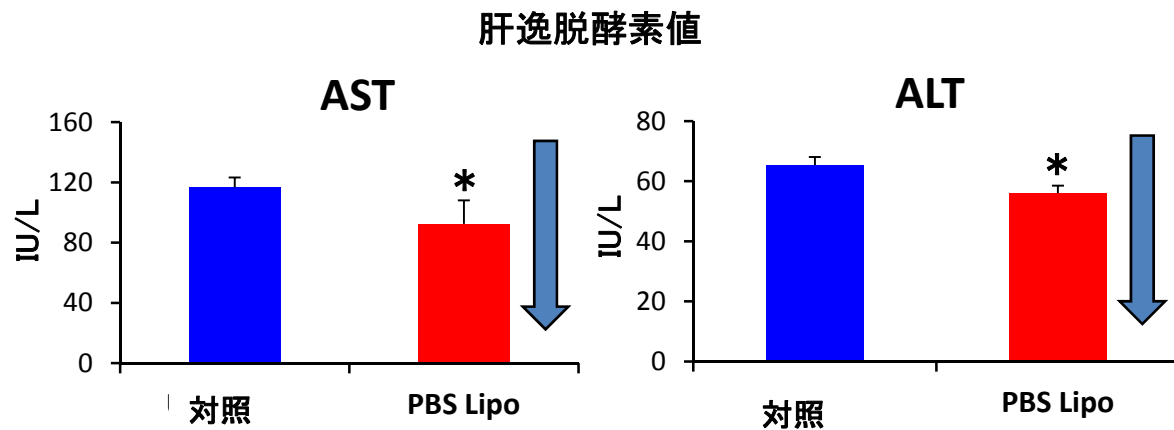
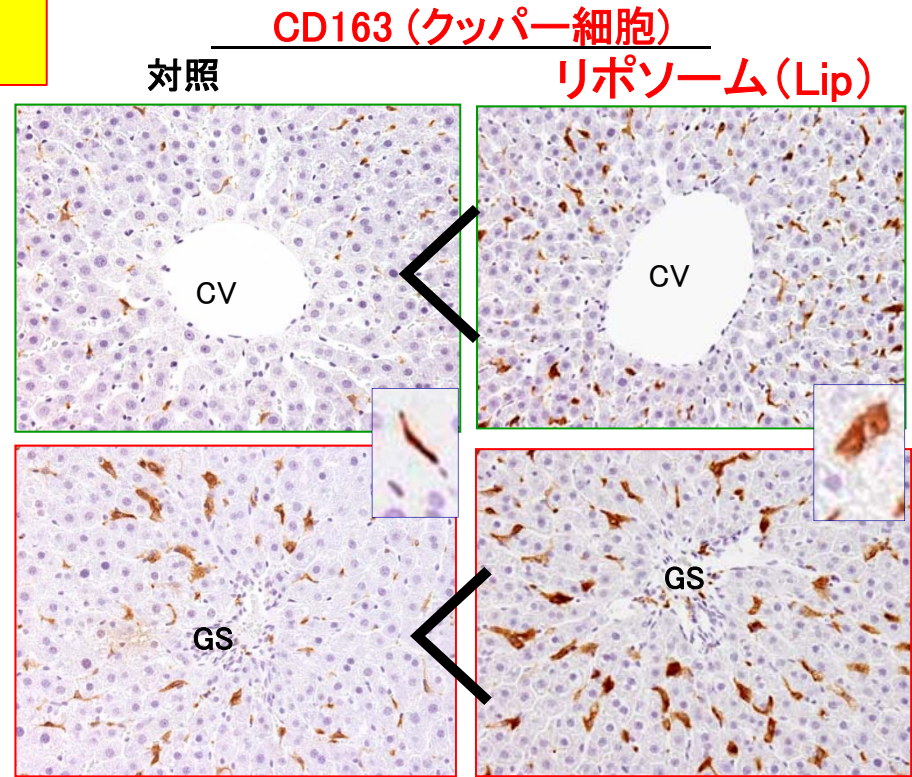
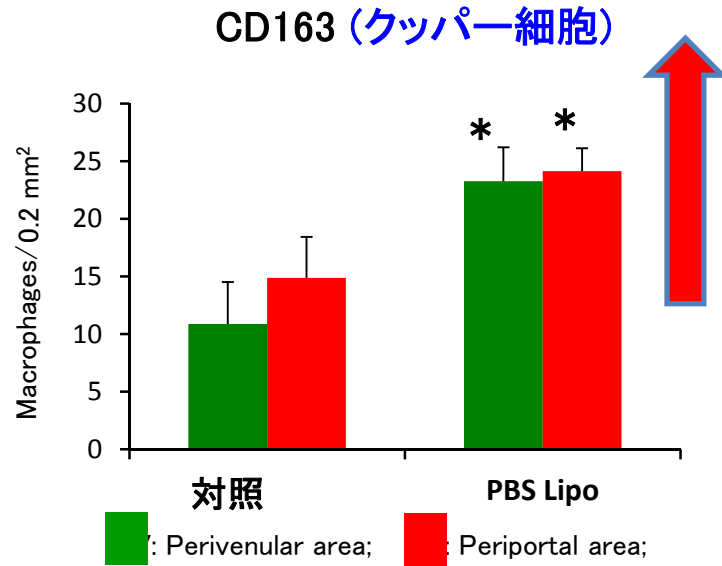
リポソーム (Lip)



組織学的な異常はみられない

CV: 中心静脈

# 1-1: 肝マクロファージ活性化実験



- ・クッパー細胞増加
- ・肝逸脱酵素値の低下

\*,  $P < 0.05$

## 例：ラットの3か月間毒性試験

用量 (mg/kg/day)	雄	雌
16	<ul style="list-style-type: none"> <li>・体重増加抑制</li> <li>・AST とALT低下(↓↓)</li> <li>・肝絶対・相対重量の増加</li> </ul> <p>(組織学的変化なし)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・体重増加抑制</li> <li>・AST とALT低下(↓↓)</li> </ul> <p>(組織学的変化なし)</p>
4	<ul style="list-style-type: none"> <li>・AST とALT低下(↓)</li> </ul>	著変なし
1	著変なし	

### 意義：

⇒ 毒性所見としてどう捉えるか？

⇒ 化学物質により肝マクロファージ機能が亢進していないか？

⇒ 肝マクロファージ機能特性の免疫組織化学的評価！

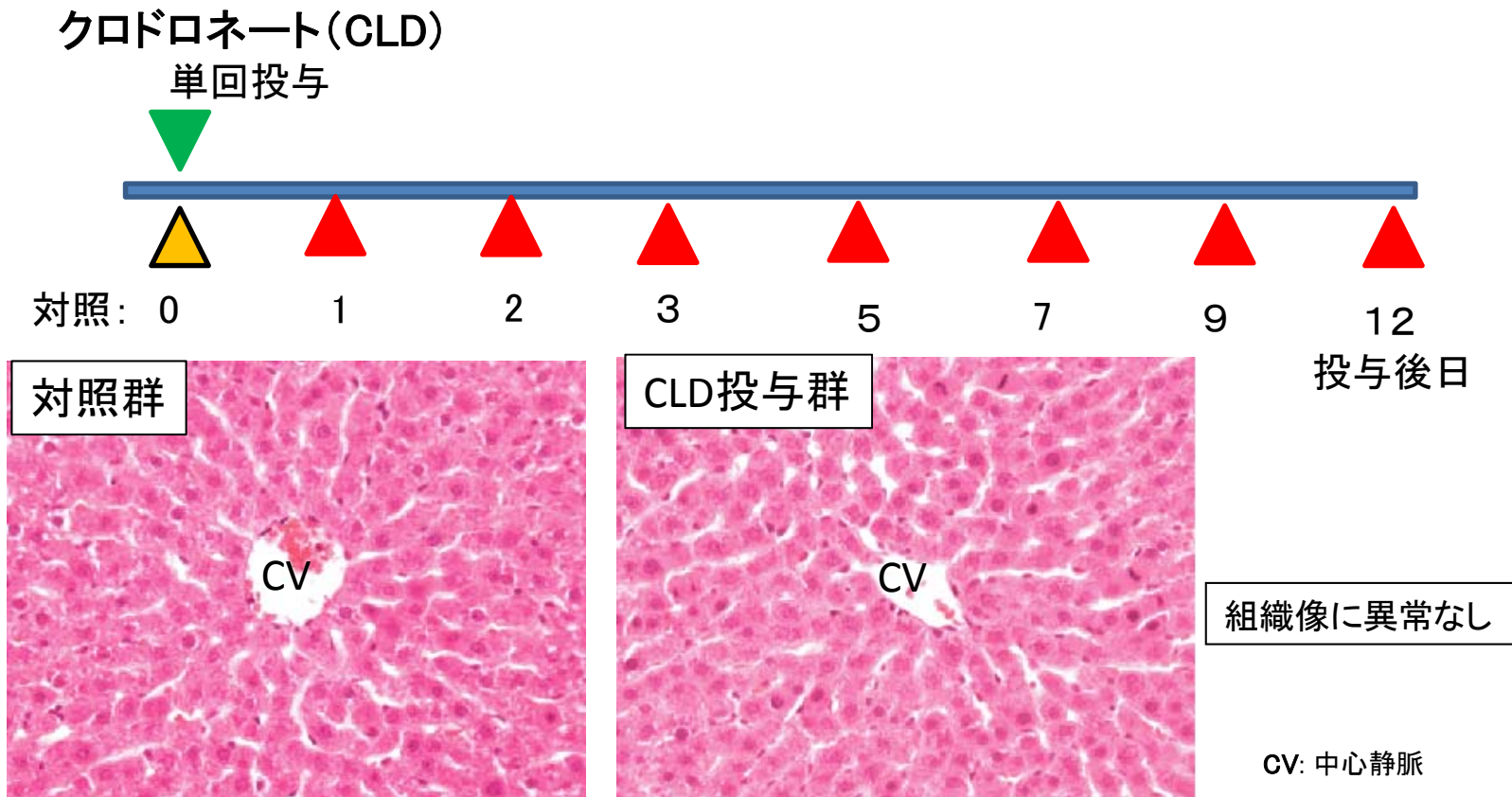
# 1. 肝マクロファージと恒常性

## 1-2: 肝マクロファージ枯渇実験

F344雄ラット, 6週齢(体重150-160 g)

クロドロネート(CLD)単回投与: 50 mg/kg体重、静注

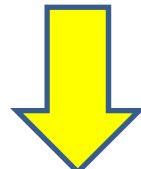
CLD: liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate clodronate



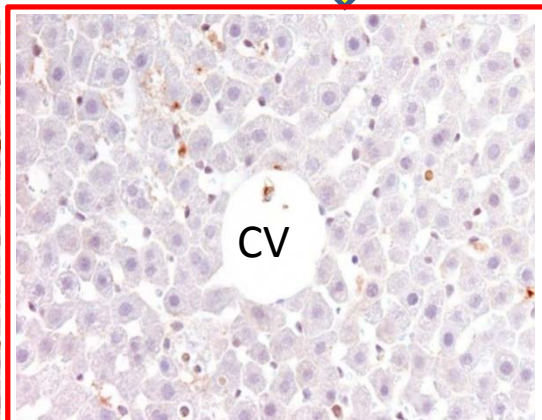
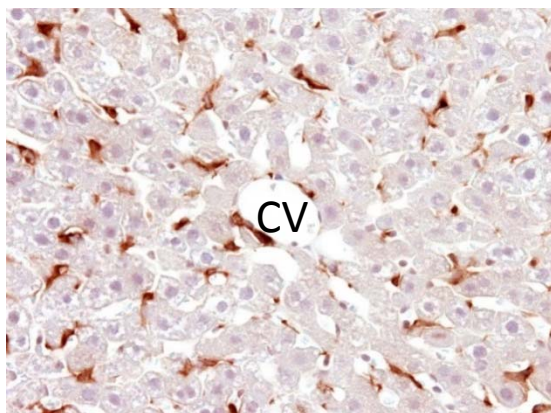
## 1-2: 肝マクロファージ枯渇実験

クロドロネート (CLD) 投与により、肝組織像には傷害はないが、クッパー細胞が枯渇する。

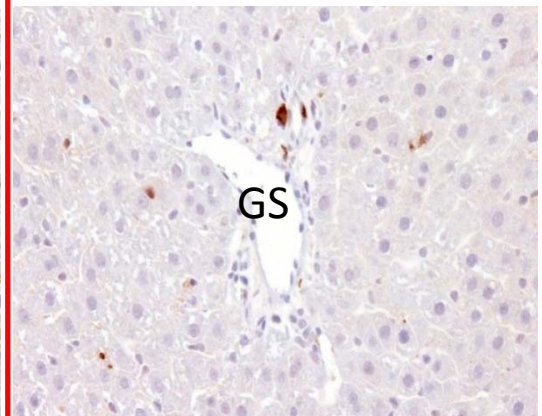
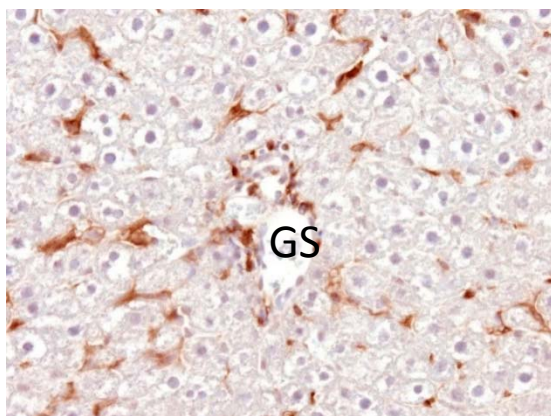
### CD163クッパー細胞



中心静脈周囲



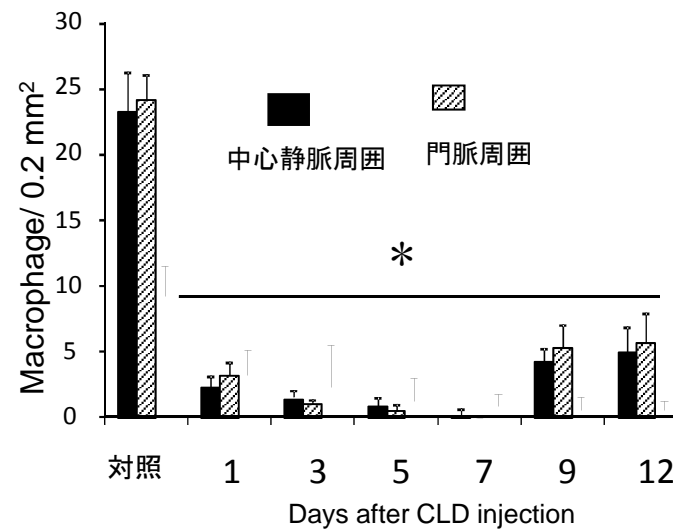
門脈野周囲



対照

CLD投与

### CD163クッパー細胞

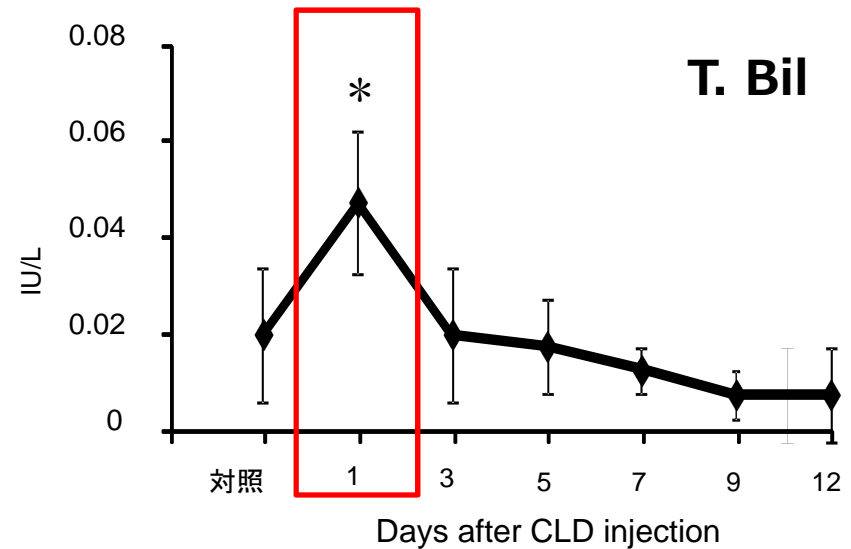
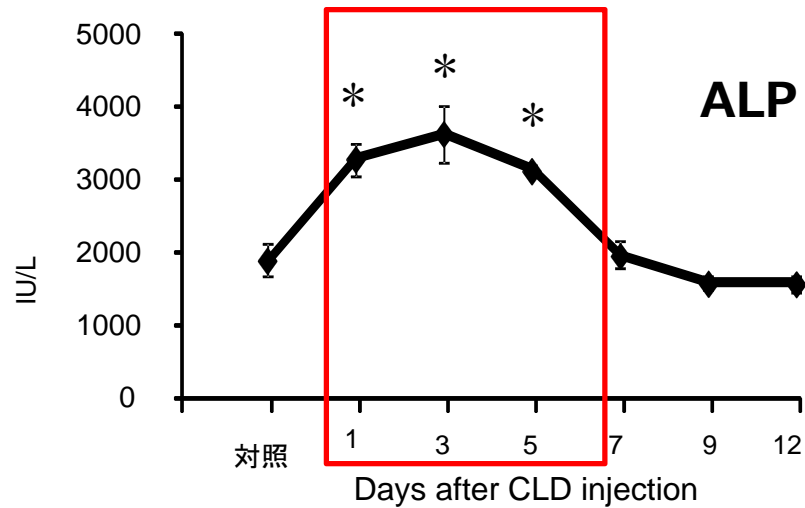
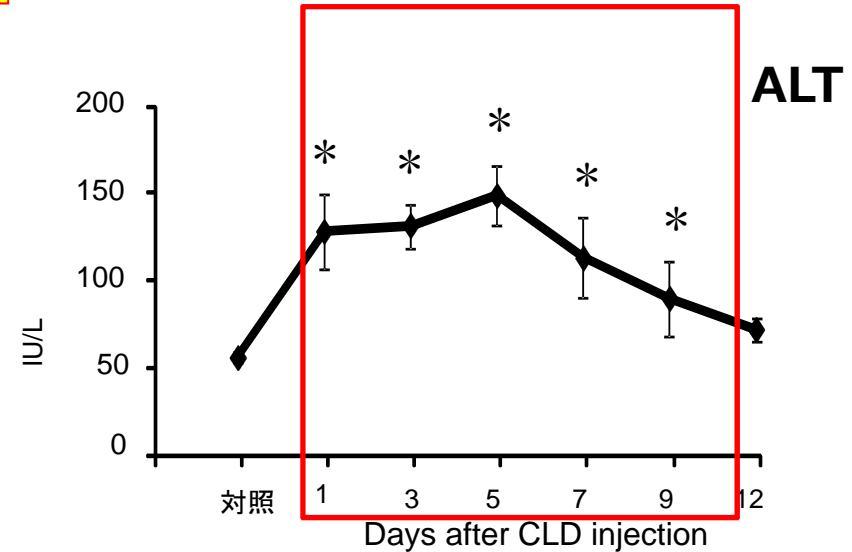
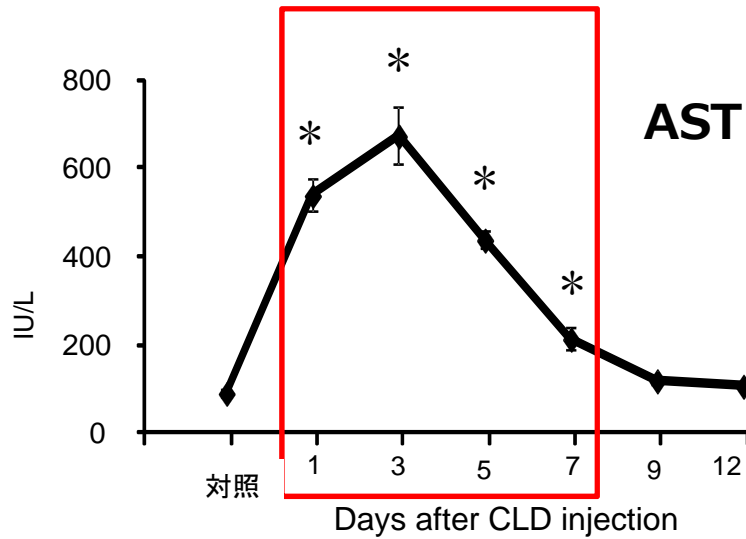


\*,  $P < 0.05$

CV: 中心静脈; GS: グリソン鞘

# 1-2: 肝マクロファージ枯渇実験

## 肝酵素値



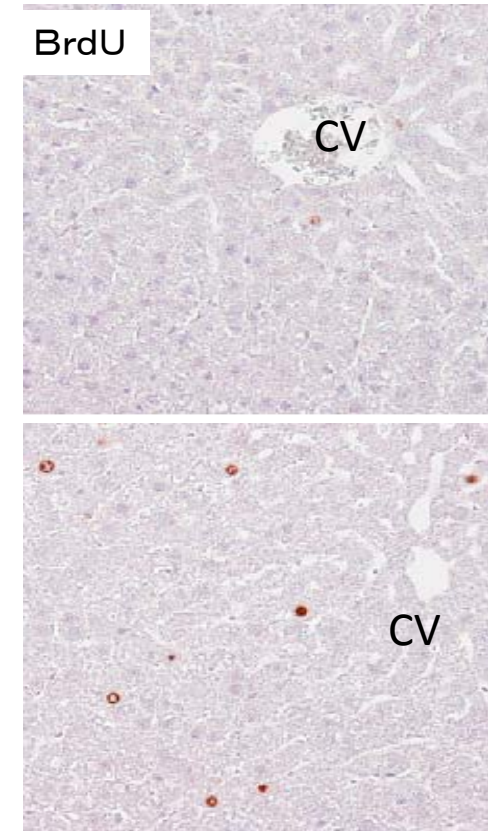
肝マクロファージの枯渇により肝酵素値が上昇

\*,  $P < 0.05$

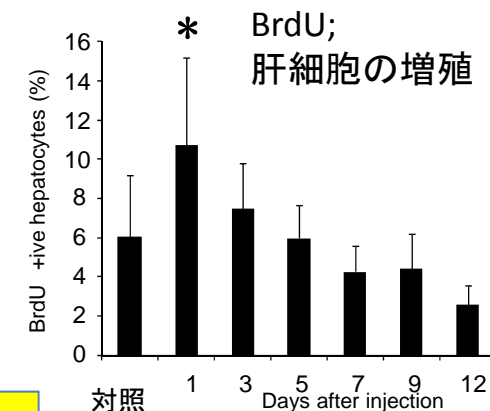
クッパー細胞枯渇により肝酵素のクリアランスが低下?

## CLD投与ラット肝の遺伝子プロファイル (>2 fold change)

Functional categories	Gene symbol	Gene description	Fold change
Cell proliferation	Lcn2	Rattus norvegicus lipocalin 2 (Lcn2), mRNA [NM_130741]	16.56
	Map3k5	Rattus norvegicus mitogen-activated protein kinase kinase 5 (Map3k5), mRNA [NM_001277694]	7.58
	Rab27b	Rattus norvegicus RAB27B, member RAS oncogene family (Rab27b), mRNA [NM_053459]	5.57
	Tgfb2	Rattus norvegicus transforming growth factor, beta 2, mRNA (cDNA clone IMAGE:7938703), complete cds. [BC100663]	5.02
	Sphk1	Rattus norvegicus sphingosine kinase 1 (Sphk1), transcript variant 6, mRNA [NM_133386]	4.66
	Pdgfd	Rattus norvegicus platelet derived growth factor D (Pdgfd), mRNA [NM_023962]	3.98
	Dbp	Rattus norvegicus D site of albumin promoter (albumin D-box) binding protein (Dbp), mRNA [NM_012543]	3.91
	Map4k3	Rattus norvegicus mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3 (Map4k3), mRNA [NM_133407]	2.92
	Wnt5b	Rattus norvegicus wingless-type MMTV integration site family, member 5B (Wnt5b), mRNA [NM_001100489]	2.41
	Wsb1	Rattus norvegicus WD repeat and SOCS box-containing 1 (Wsb1), transcript variant 1, mRNA [NM_001042561]	2.20
	Cdca7	Rattus norvegicus cell division cycle associated 7 (Cdca7), mRNA [NM_001025693]	2.09
Cell surface and structural protein	Krt1	Rattus norvegicus keratin 1 (Krt1), mRNA [NM_001008802]	12.43
	Krt1	Rattus norvegicus keratin 12 (Krt12), mRNA [NM_001008761]	4.52
	Orm1	Rattus norvegicus orosomucoid 1 (Orm1), mRNA [NM_053288]	3.13
	H19	Rattus norvegicus H19, imprinted maternally expressed transcript (non-protein coding) (H19), long non-coding RNA [NR_027324]	2.72
Signal transduction	Hnf4g	Rattus norvegicus hepatocyte nuclear factor 4, gamma (Hnf4g), mRNA [NM_001108939]	5.18



CV: 中心静脈



\*,  $P < 0.05$

肝マクロファージの枯渇により肝細胞増殖亢進



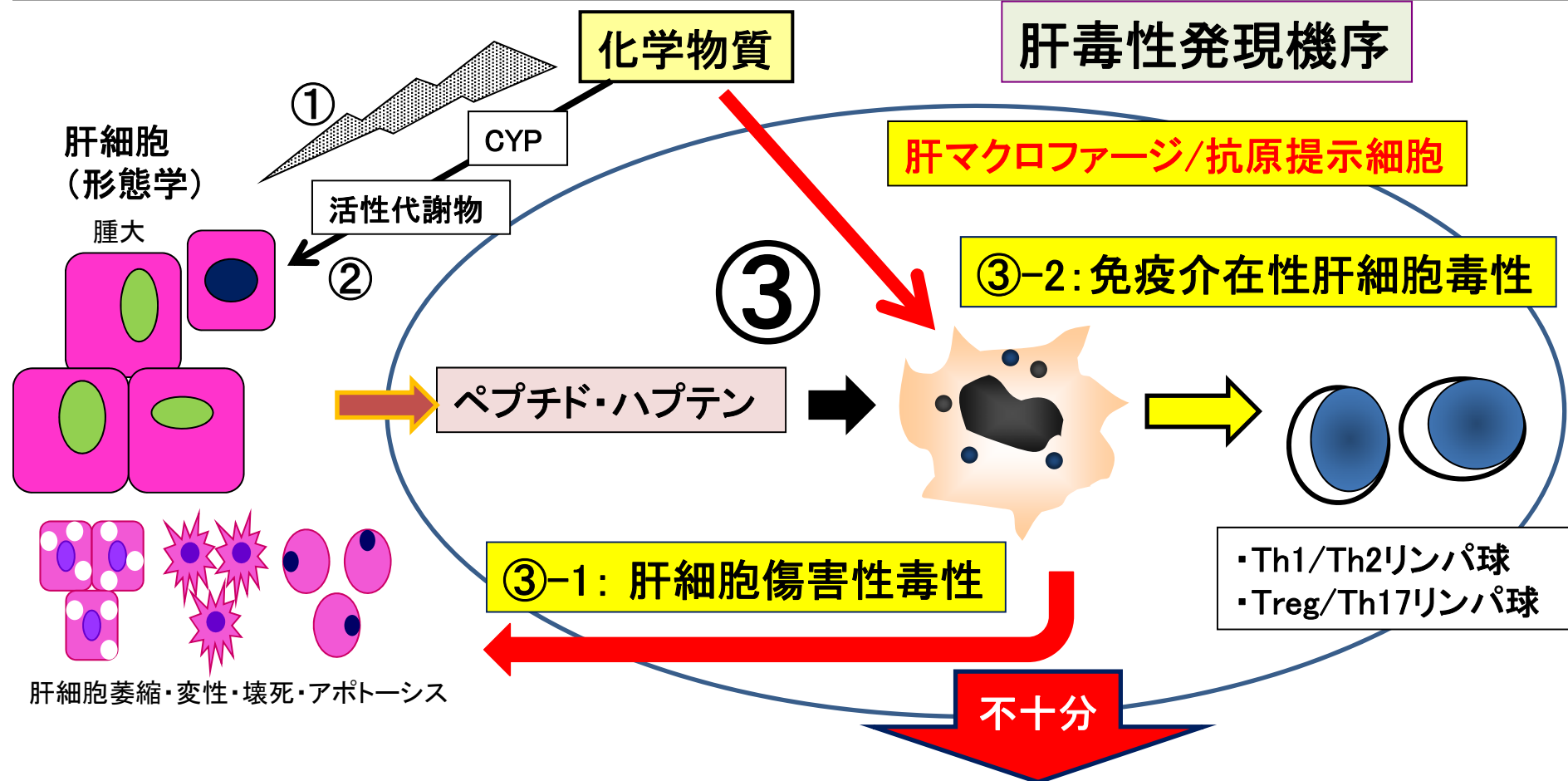
## 例：ラットの6か月間毒性試験

用量 (mg/kg/day)	雄	雌
8	<ul style="list-style-type: none"> <li>・体重増加抑制</li> <li>・肝絶対・相対重量増加</li> <li>・中心静脈周囲肝細胞腫大</li> <li>・AST とALT増加(↑↑)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・体重増加抑制</li> <li>・肝絶対・相対重量増加</li> <li>・中心静脈周囲肝細胞腫大</li> <li>・AST とALT増加(↑)</li> </ul>
2	<ul style="list-style-type: none"> <li>・中心静脈周囲肝細胞腫大</li> <li>・AST とALT増加(↑)</li> </ul>	著変なし
0.5	<ul style="list-style-type: none"> <li>・AST とALT増加(↑)</li> <li>(組織学的変化なし)</li> </ul>	

### 意義

- ⇒化学物質による肝マクロファージの機能抑制はないか？
- ⇒肝細胞肥大と肝マクロファージ機能抑制との係りは？
- ⇒肝マクロファージ機能特性の免疫組織化学的評価！

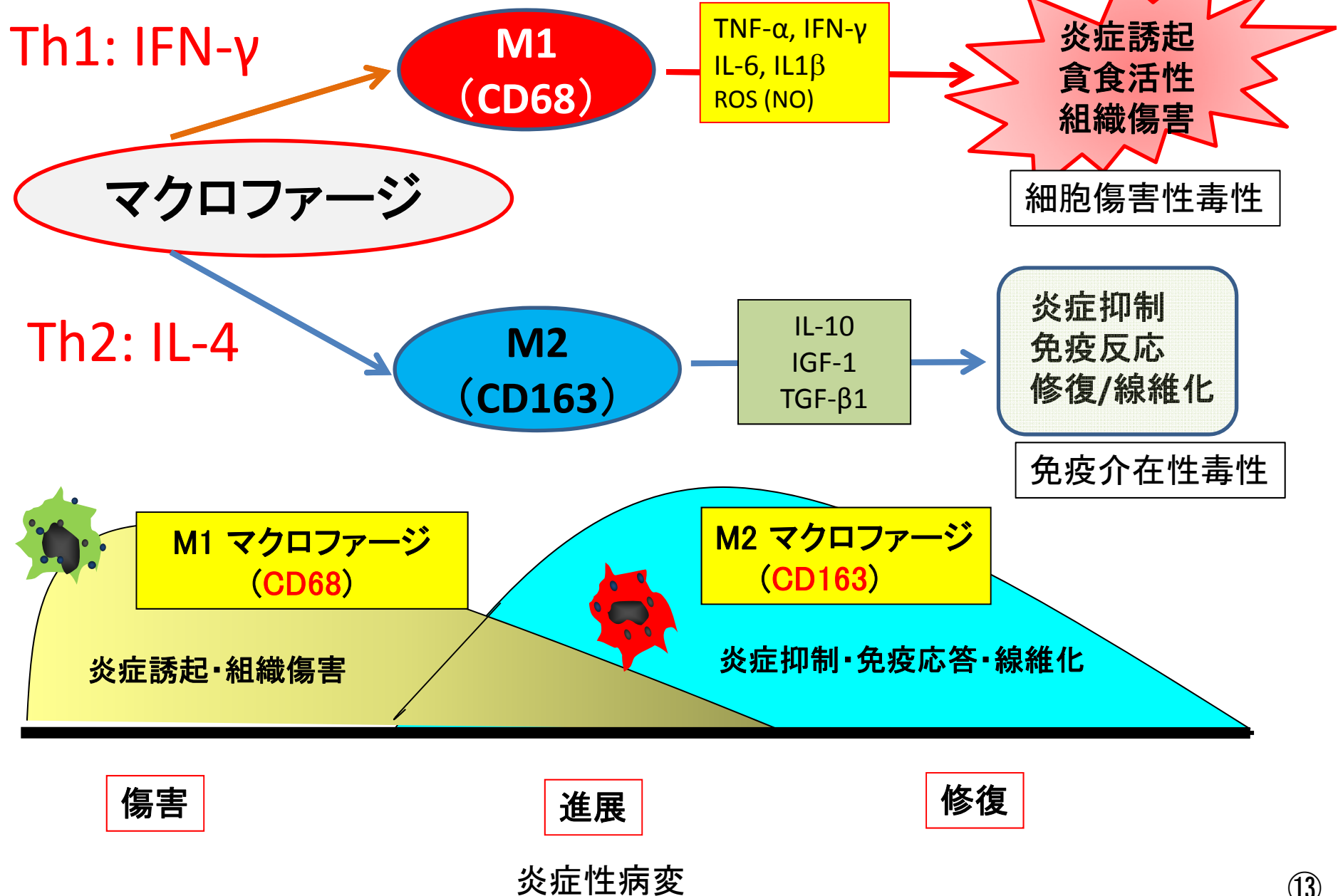
## 2. 肝マクロファージを介した肝毒性(肝細胞傷害機序)の評価手法



### 肝マクロファージの機能特性を指標とした肝毒性評価手法の構築の必要性

- ①直接的な肝細胞傷害作用(膜、小器官、核酸)
- ②活性代謝物を介した肝細胞傷害作用
- ③肝マクロファージを介した肝毒性発現機序
  - ③-1: 活性化マクロファージによる傷害因子産生に起因する肝細胞傷害性毒性
  - ③-2: MHC クラスII発現マクロファージによる免疫介在性肝細胞毒性

## 2-1: M1/M2マクロファージ分極化

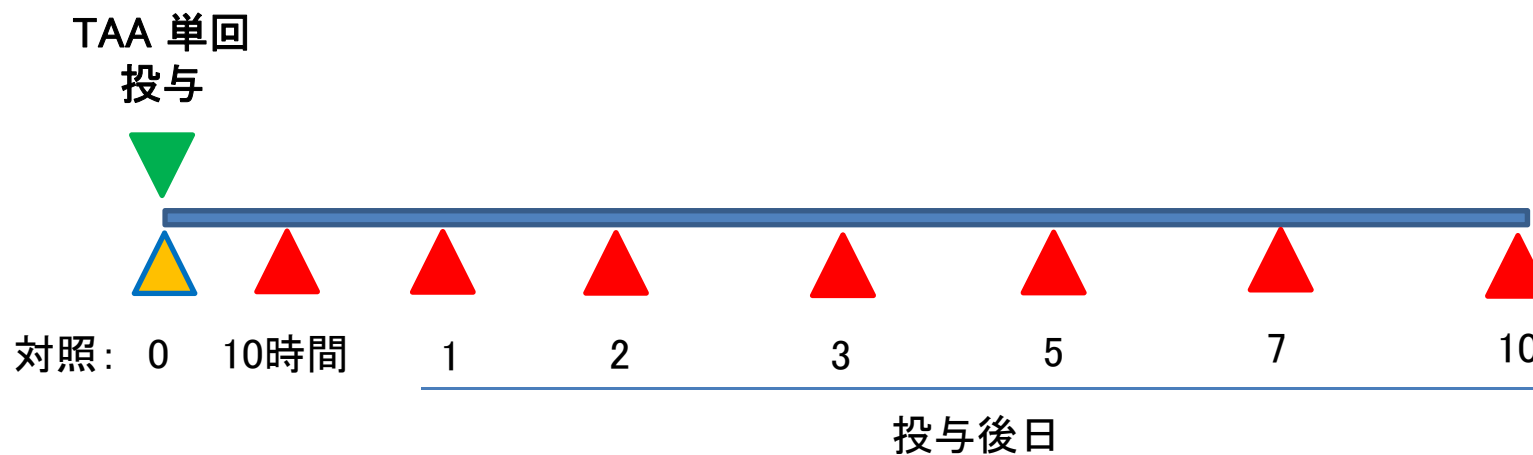


## 2-2: チオアセトアミド (TAA) 誘発肝細胞傷害実験

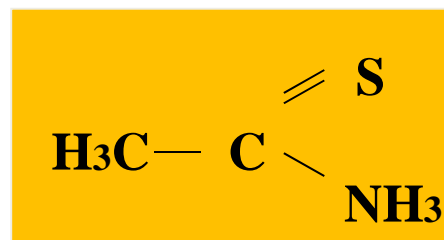
M1/M2マクロファージ分極化に基づいた評価手法の確立

F344 雄ラット, 6 週齢 (BW 150-160 g)

TAA, 単回腹腔内投与: 300 mg/Kg BW



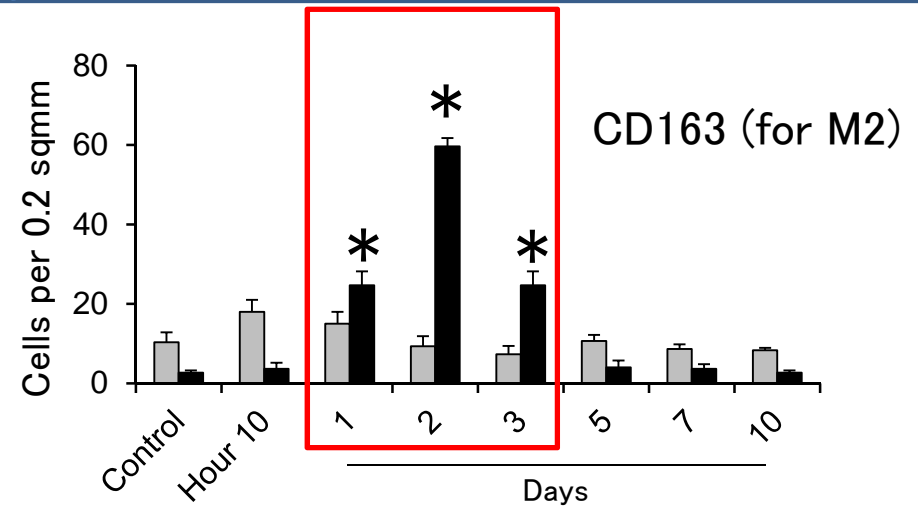
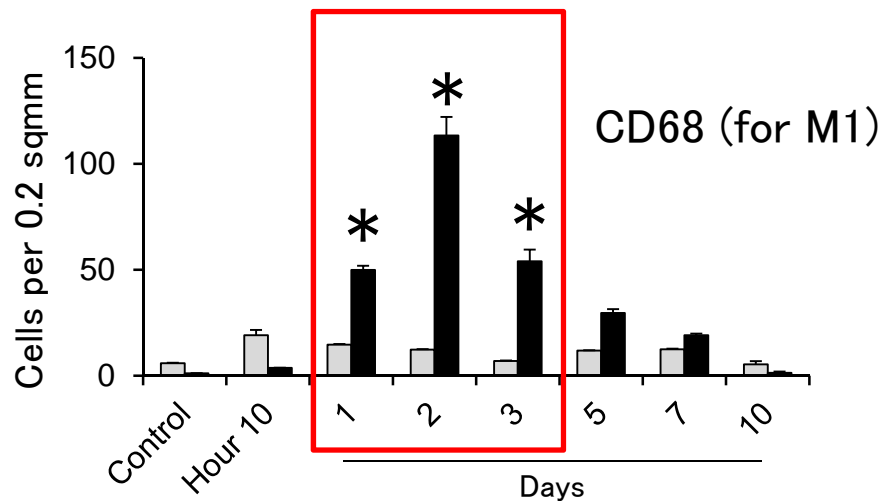
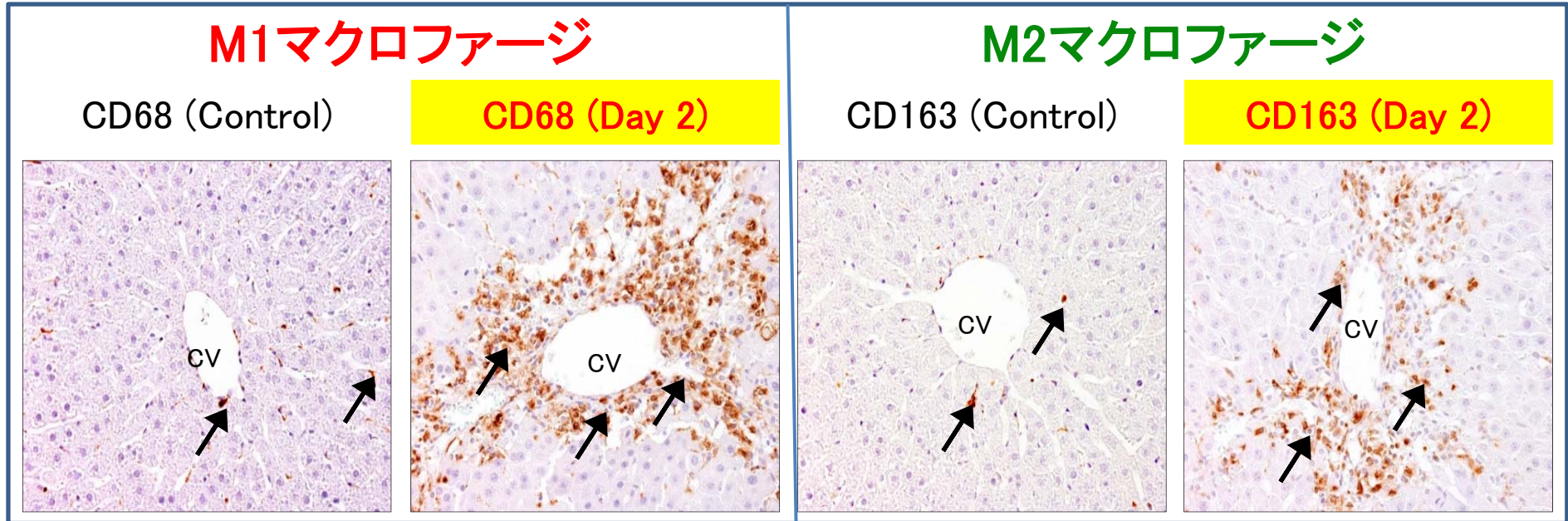
TAA





## 2-2: チオアセトアミド (TAA) 誘発肝細胞傷害実験

### (1) CD68 (M1マクロファージ) と CD163 (M2マクロファージ) の出現

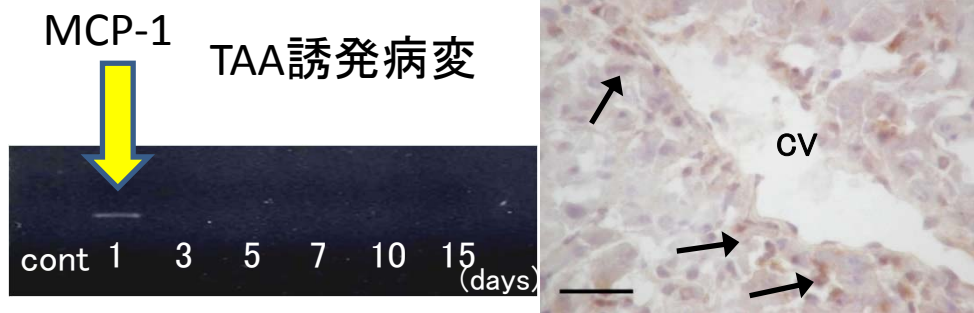


■ グリソン鞘;

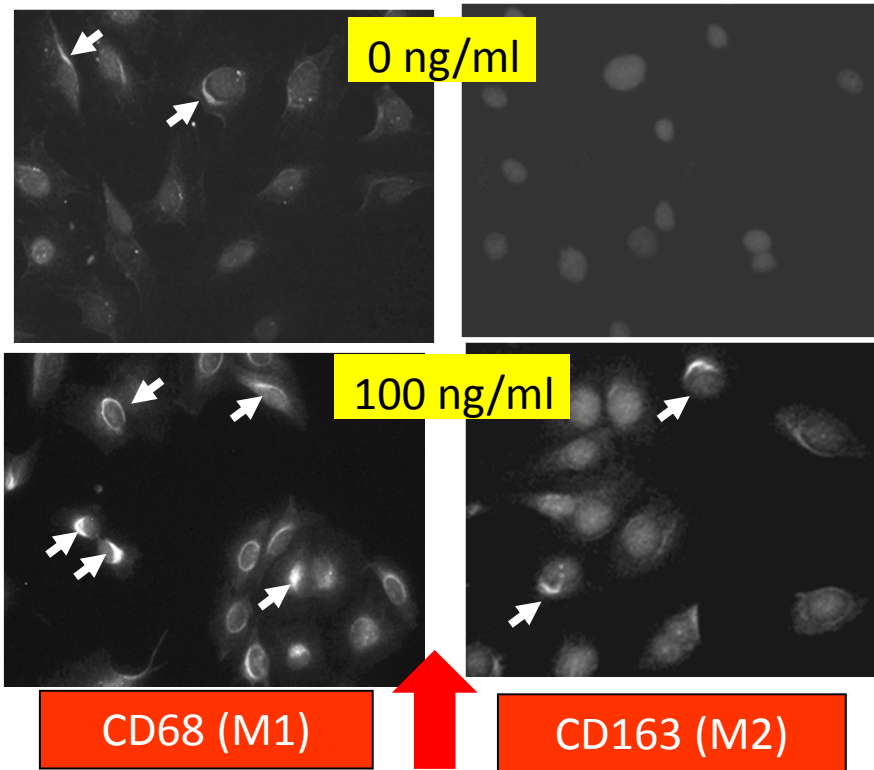
■ 中心静脈周囲

\*,  $P < 0.05$

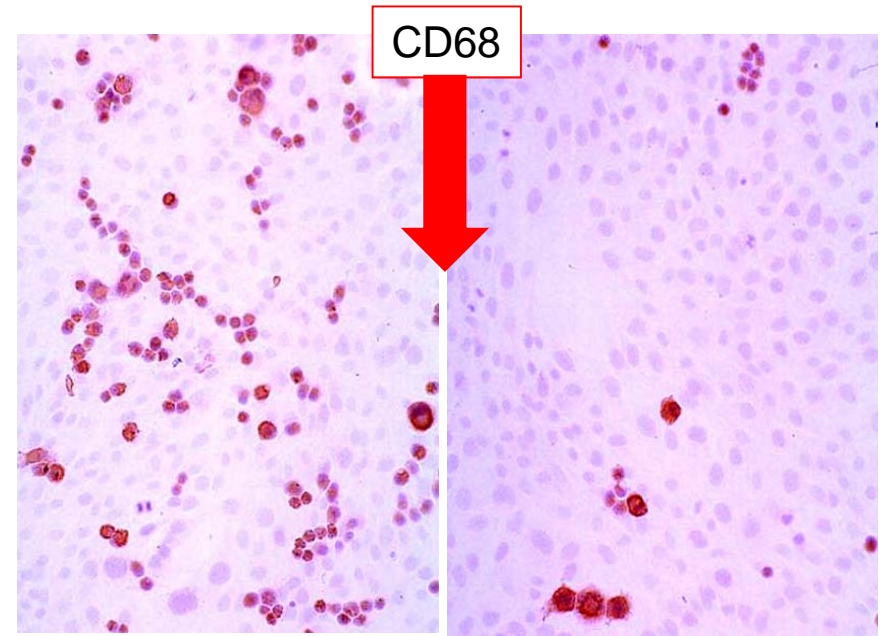
## (2) ラットマクロファージ株(HS-P)を用いたCD68/CD163発現機序: MCP-1



### CD68やCD163の発現増加



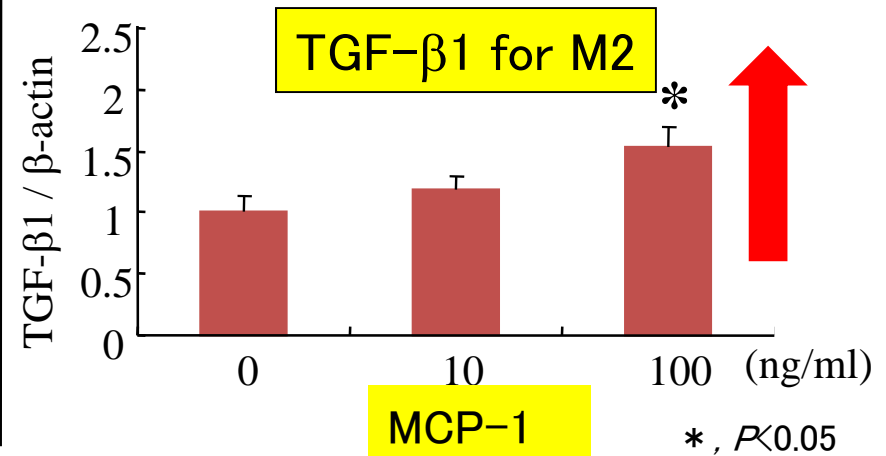
ラットマクロファージ株(HS-P)



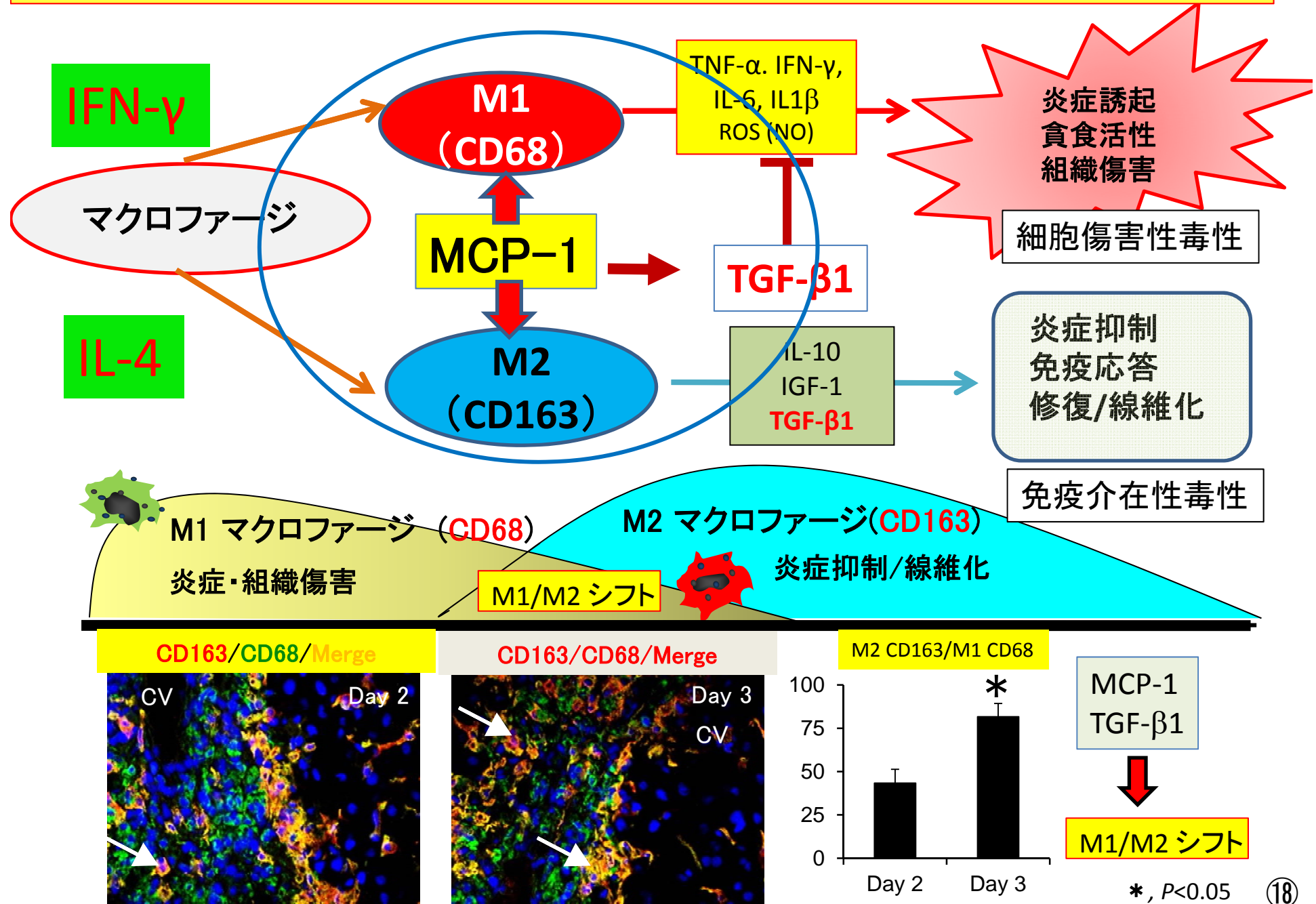
TGF- $\beta$ 1 (0 ng/ml)

TGF- $\beta$ 1 (1 ng/ml)

CD68/CD163発現の低下



## 2-2: チオアセトアミド(TAA)誘発肝細胞傷害実験: M1/M2マクロファージの出現

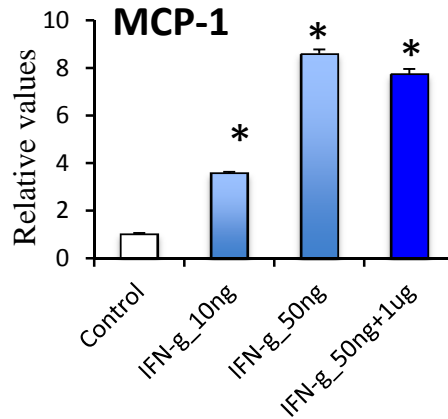
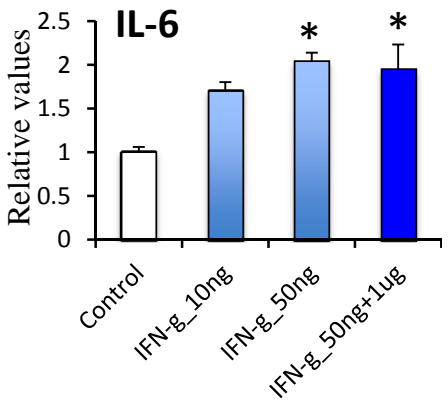
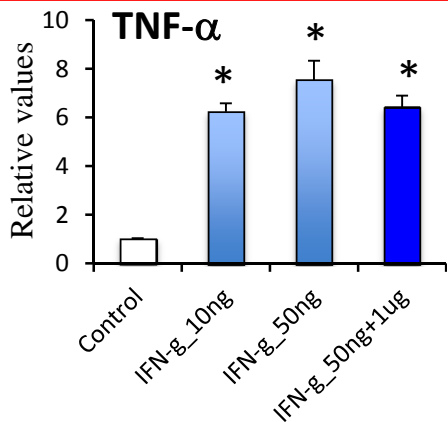




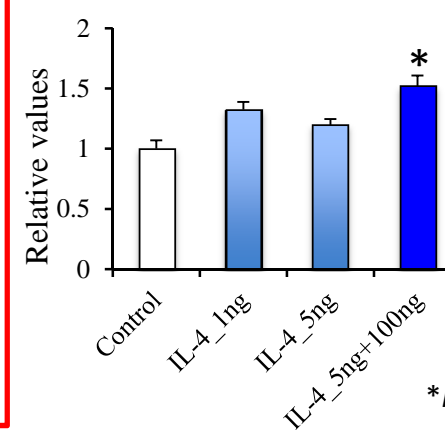
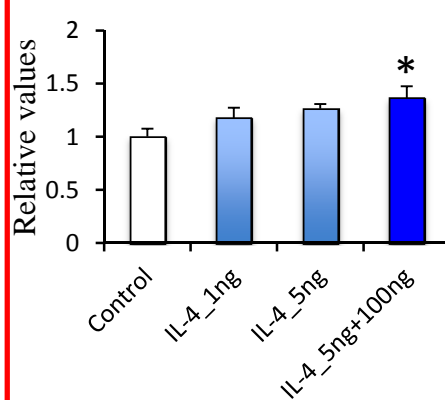
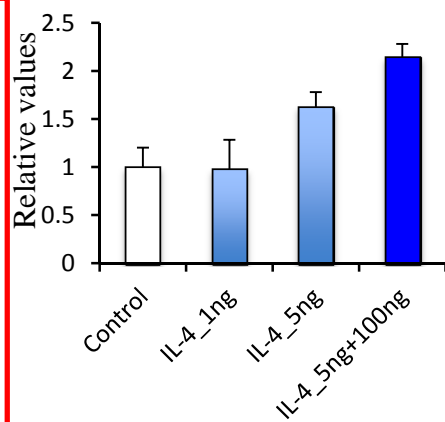
# IFN- $\gamma$ (M1誘導因子)とIL-4(M2誘導因子)を添加したラットマクロファージ株HS-P

## M1因子

### IFN- $\gamma$

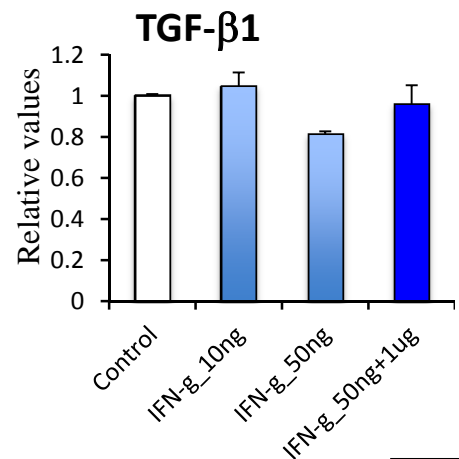
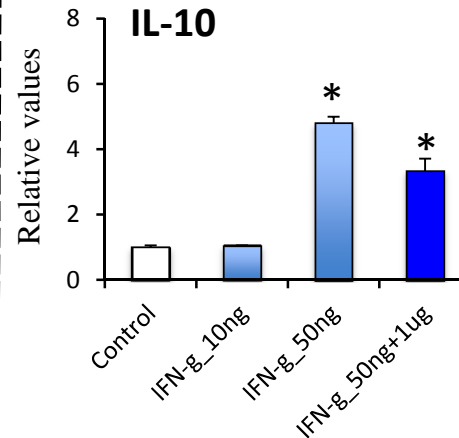


### IL-4

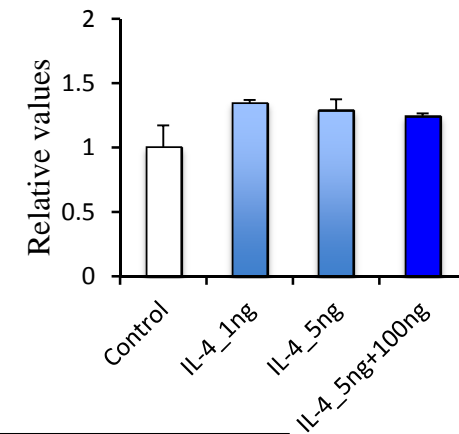
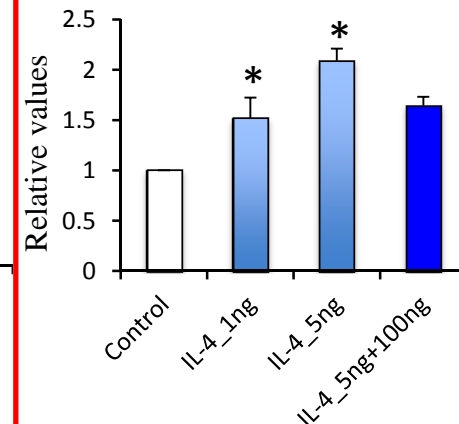


## M2因子

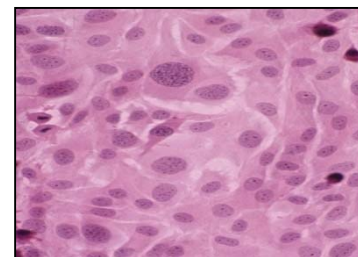
### IFN- $\gamma$



### IL-4

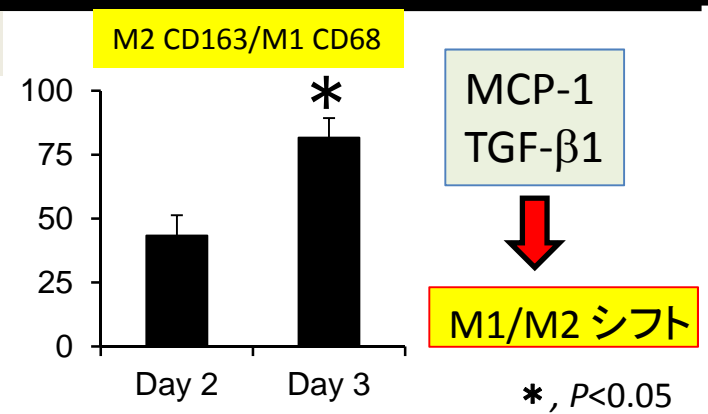
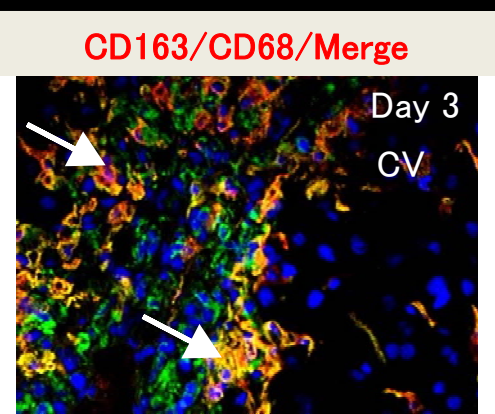
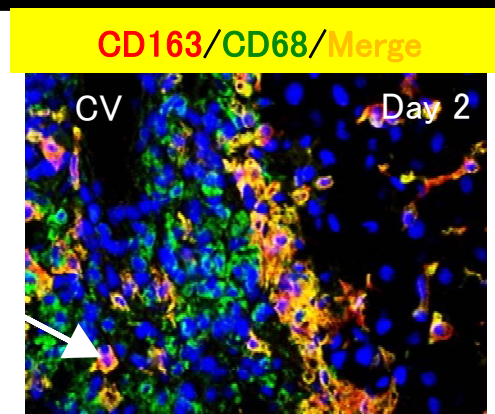
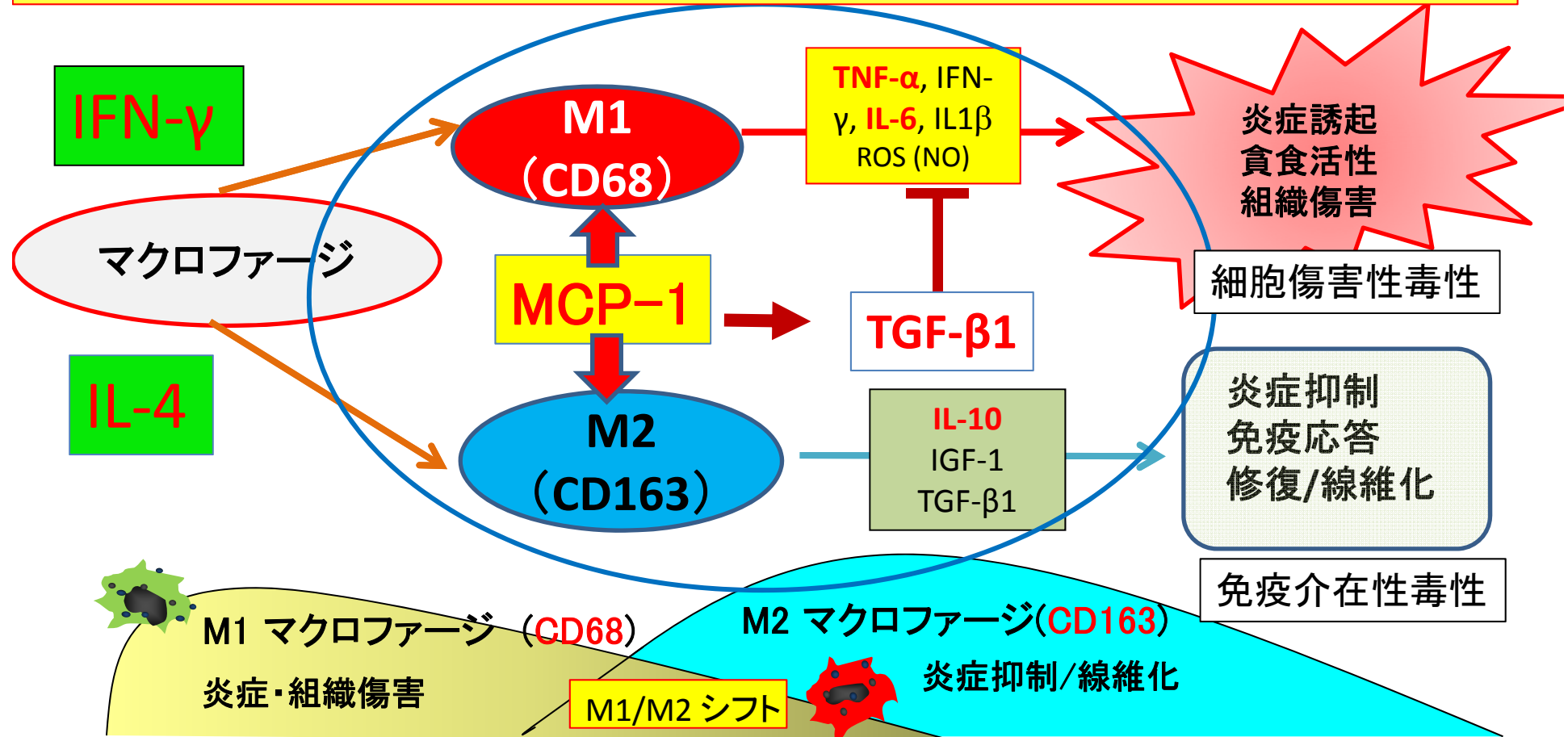


HS-P



\*P<0.05, different from control

## 2-2:チオアセトアミド(TAA)誘発肝細胞傷害実験:M1/M2マクロファージの出現

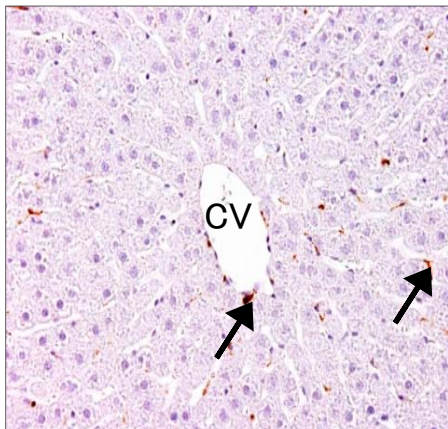


## 2-2: チオアセトアミド (TAA) 誘発肝細胞傷害実験

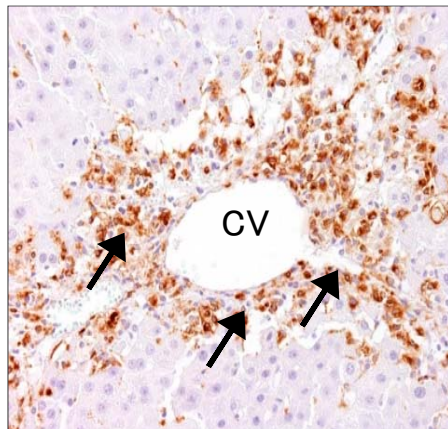
### (3) MHC クラスIIとCD204発現マクロファージのM1/M2分極化

#### M1マクロファージ

CD68 (Control)

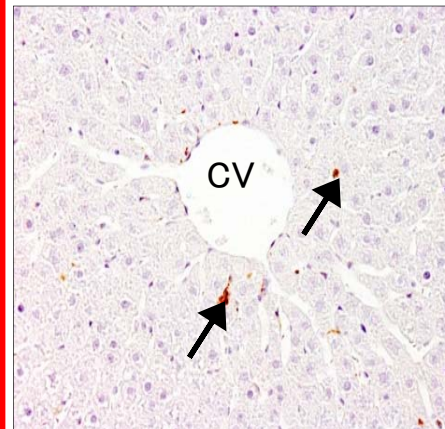


CD68 (Day 2)

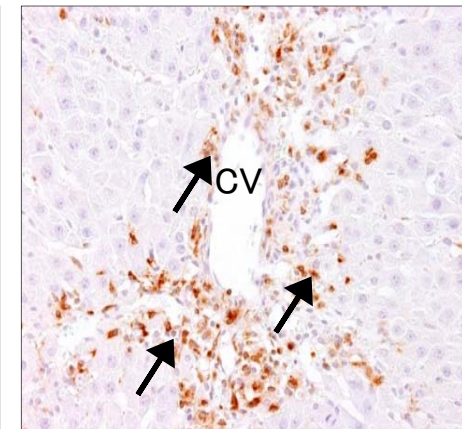


#### M2マクロファージ

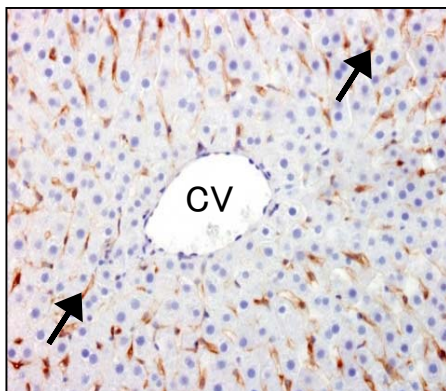
CD163 (Control)



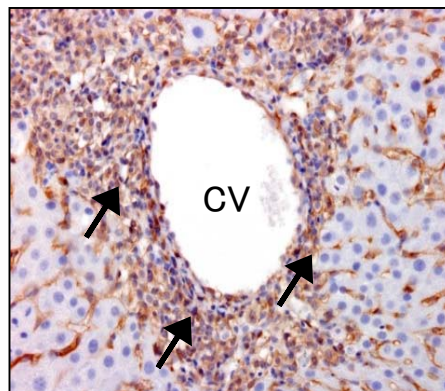
CD163 (Day 2)



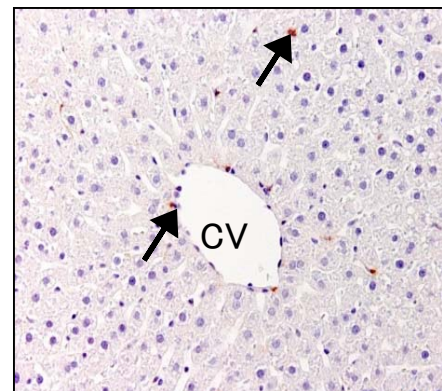
CD204 (Control)



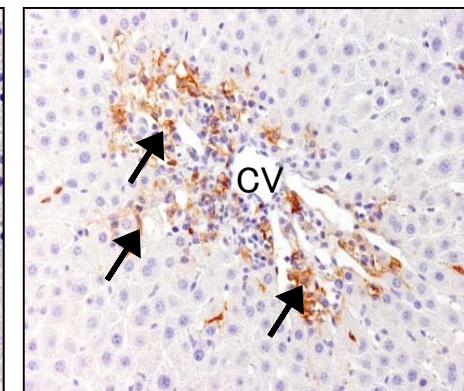
CD204 (Day 2)



MHC class II (Control)



MHC class II (Day 2)

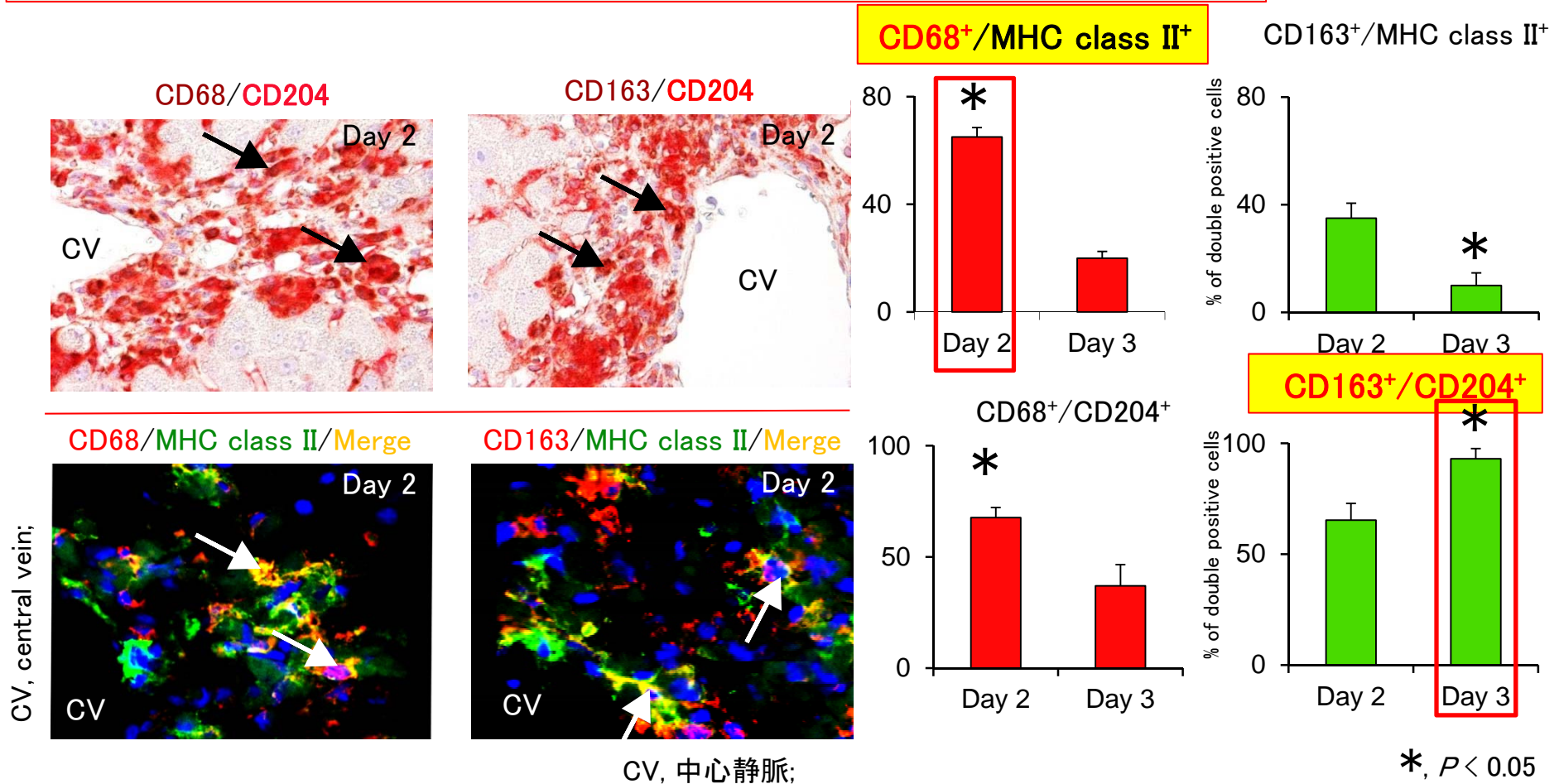


CV, 中心静脈

## 2-2: チオアセトアミド (TAA) 誘発肝細胞傷害実験: 分極化の解析

### 二重免疫染色:

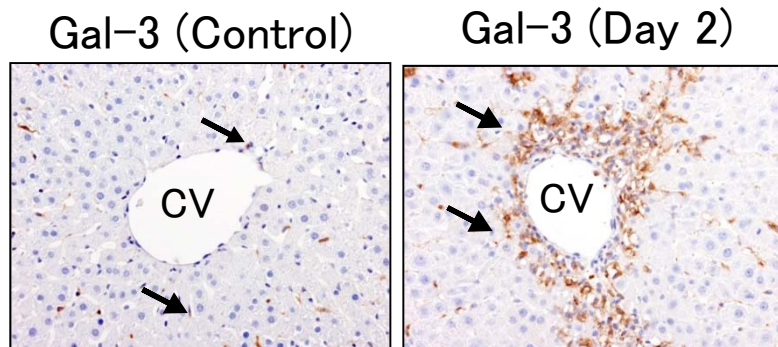
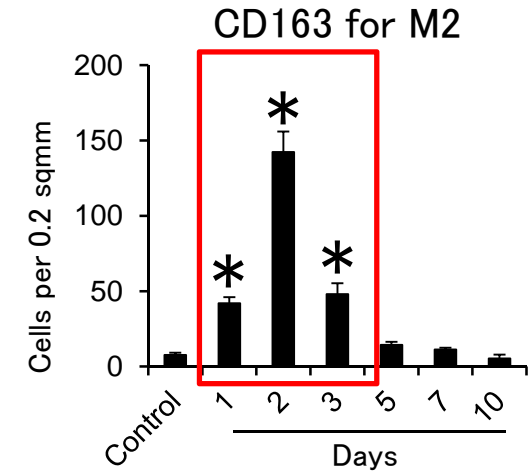
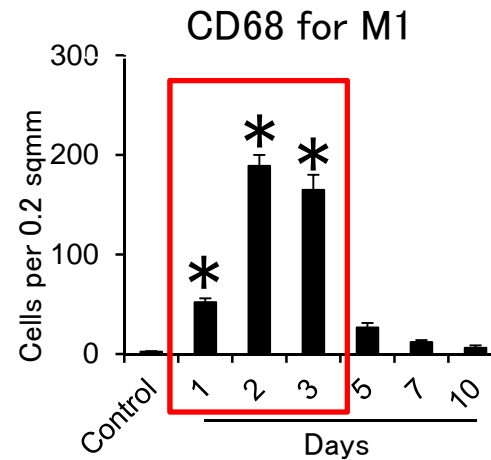
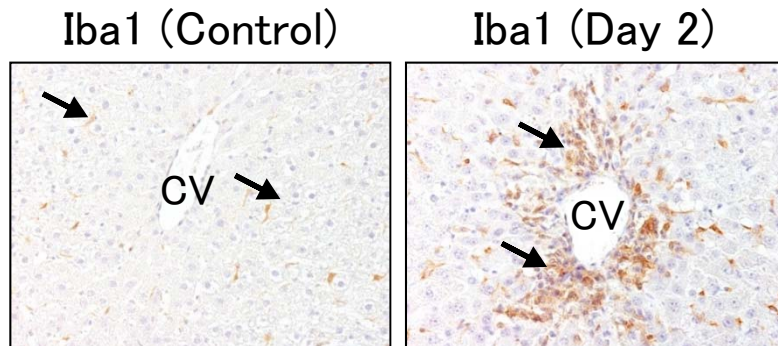
- CD68 (M1) 陽性細胞に対するMHCクラスIIあるいはCD204発現
- CD163 (M2) 陽性細胞に対するMHCクラスIIあるいはCD204発現



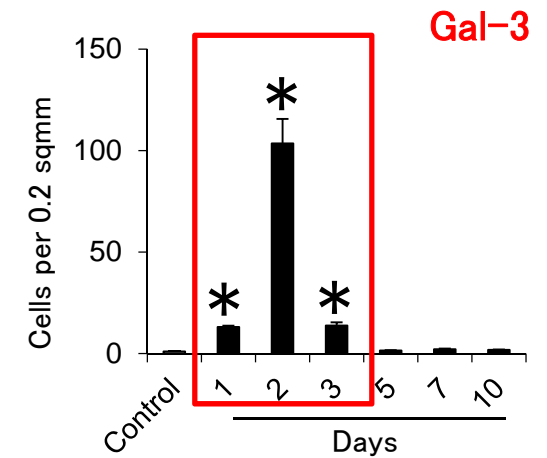
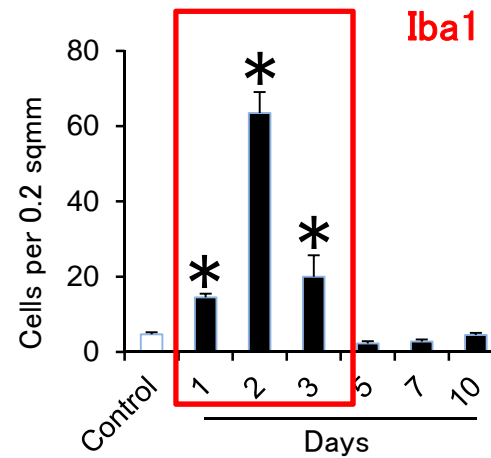
- MHC クラス II細胞はM1分極化
- CD204細胞はM2分極化

## 2-2: チオアセトアミド (TAA) 誘発肝細胞傷害実験

### (4) Iba1とGalectin-3(Gal-3)発現マクロファージのM1/M2分極化



CV, central vein



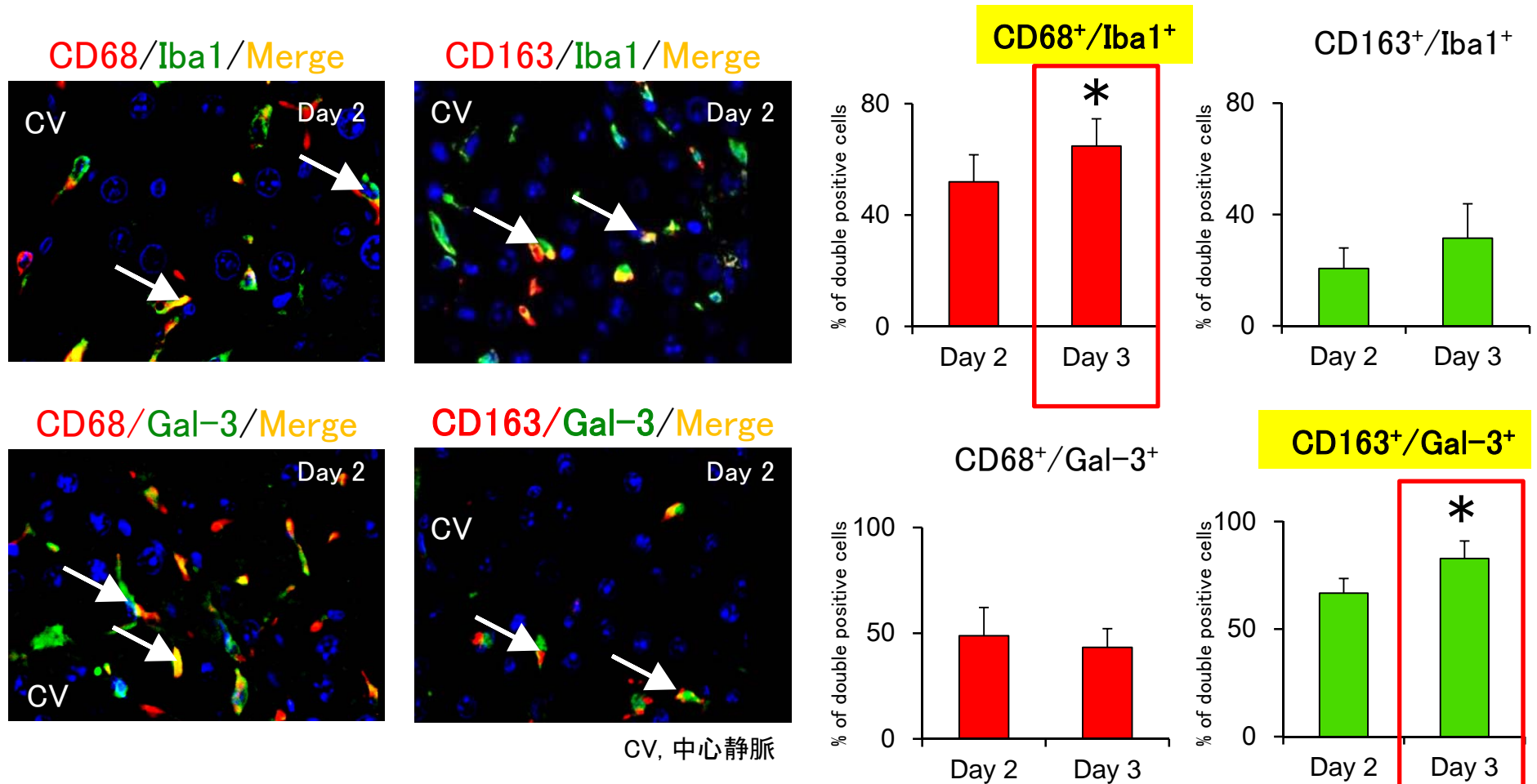
\*,  $P < 0.05$

### M1/M2分極化の解析

## 2-2: チオアセトアミド (TAA) 誘発肝細胞傷害実験: 分極化の解析

### 二重蛍光免疫染色:

- ・CD68 (M1) 陽性細胞に対するIba1あるいはGal-3発現
- ・CD163 (M2) 陽性細胞に対するIba1あるいはGal-3発現

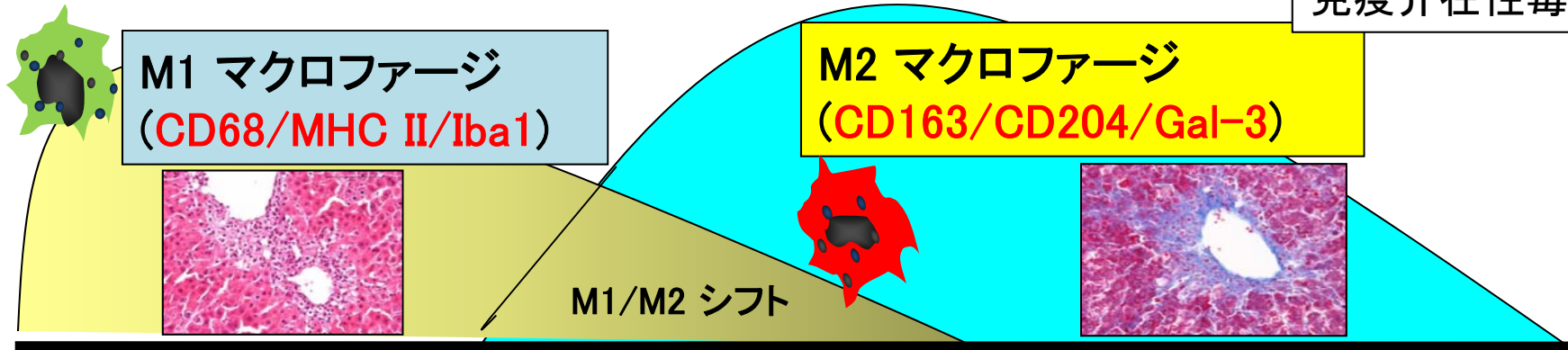
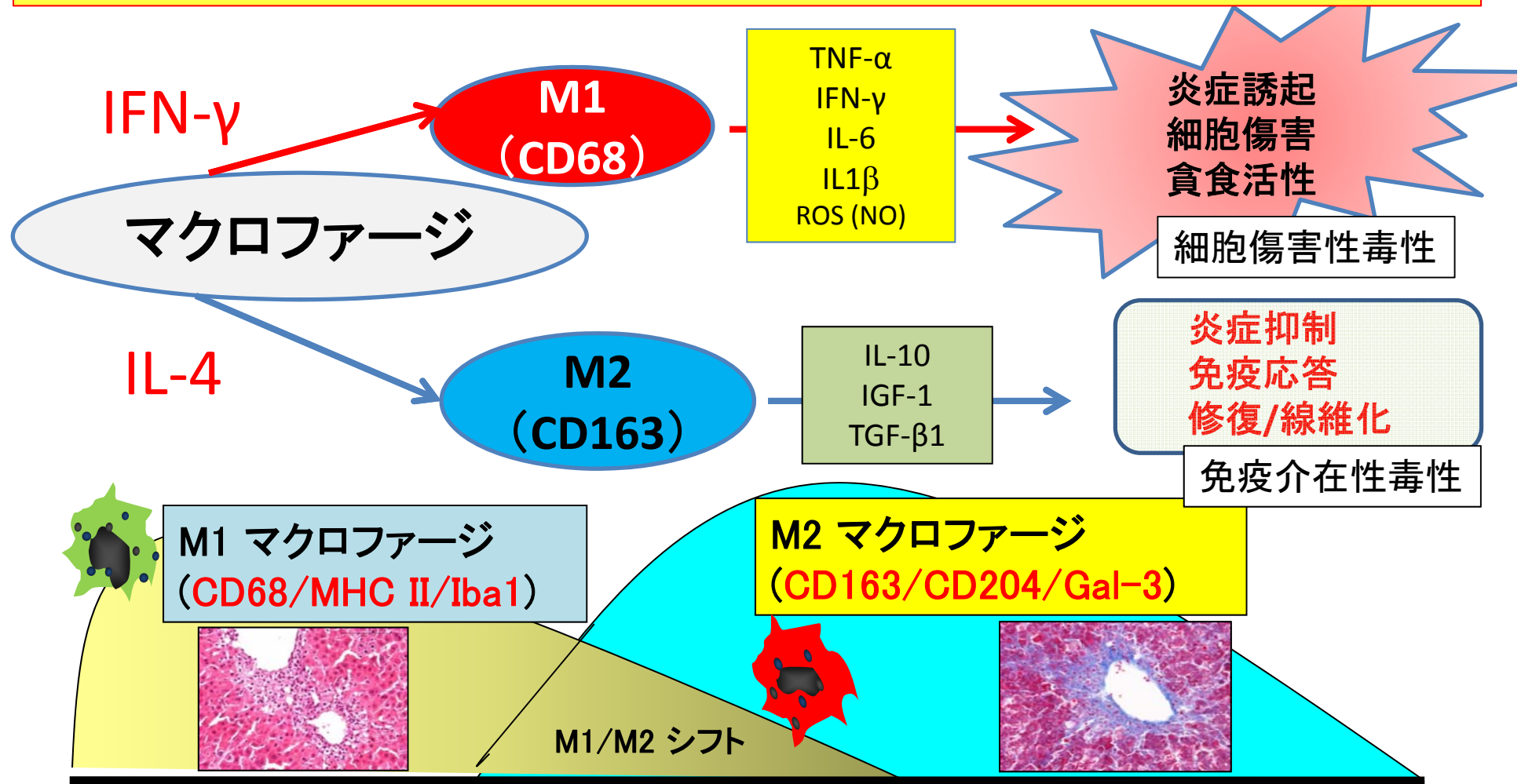


・Iba1細胞は M1分極化

・Gal-3細胞はM2分極化

\*, P < 0.05

## 2-2: チオアセトアミド (TAA) 誘発肝傷害実験: M1/M2分極化(まとめ)

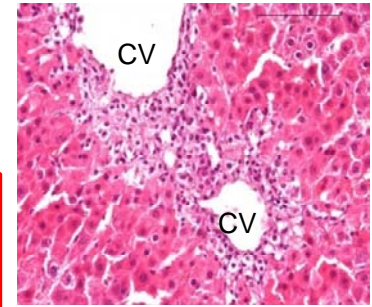


M1: ・貪食活性/傷害因子産生(CD68) ・抗原提示能(MHC クラスII)  
 ・細胞活性・遊走(Iba-1)

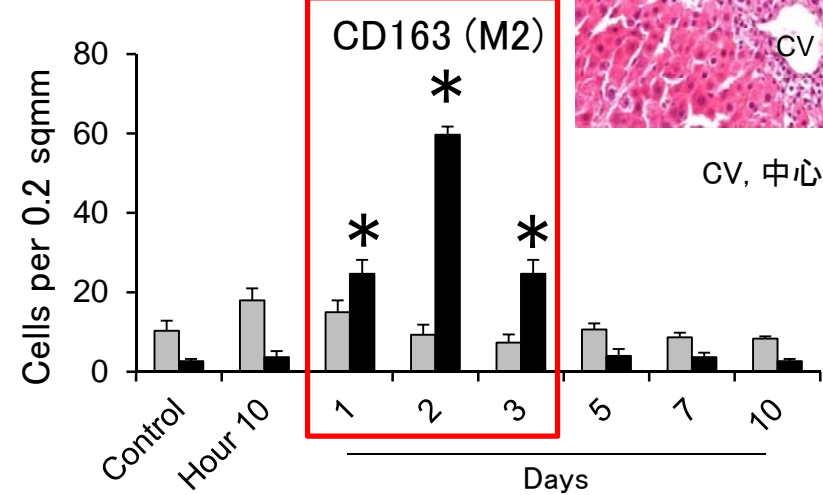
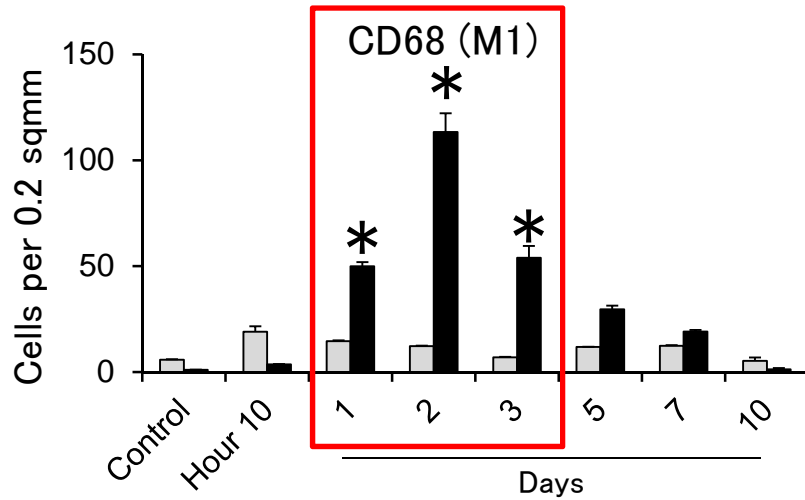
M2: ・炎症抑制因子産生TGF- $\beta$ (CD163) ・線維化/組織修復 (Gal-3)  
 ・貪食活性/脂質代謝(CD204)

## 2-2: チオアセトアミド (TAA) 誘発肝細胞傷害実験

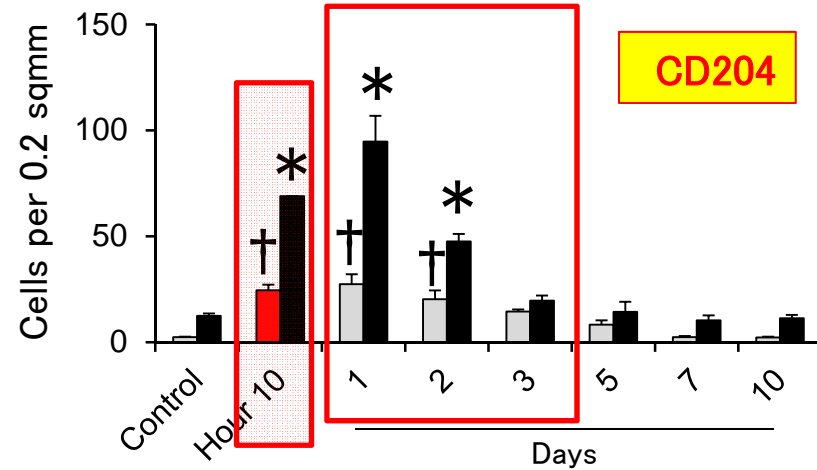
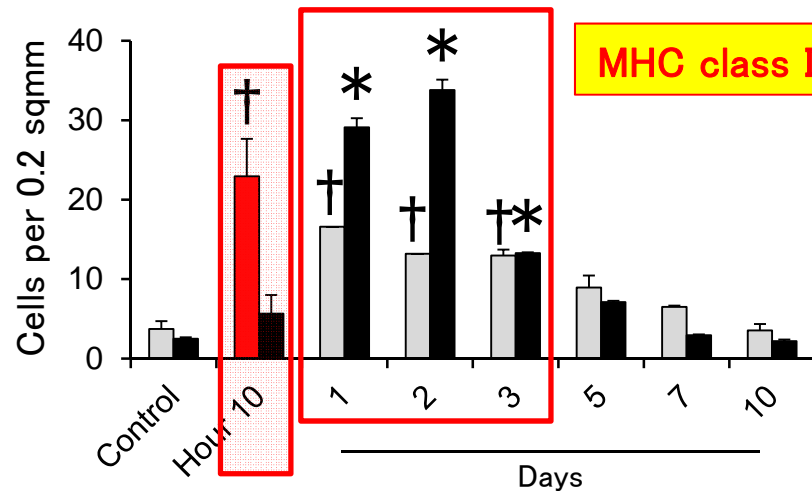
### (5) 肝マクロファージの初期誘導とM1/M2分極化



CV, 中心静脈



### グリソン鞘におけるマクロファージの出現



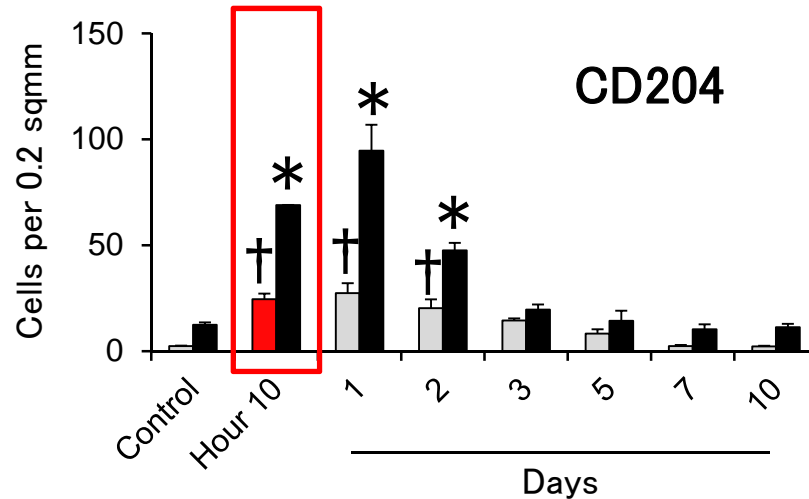
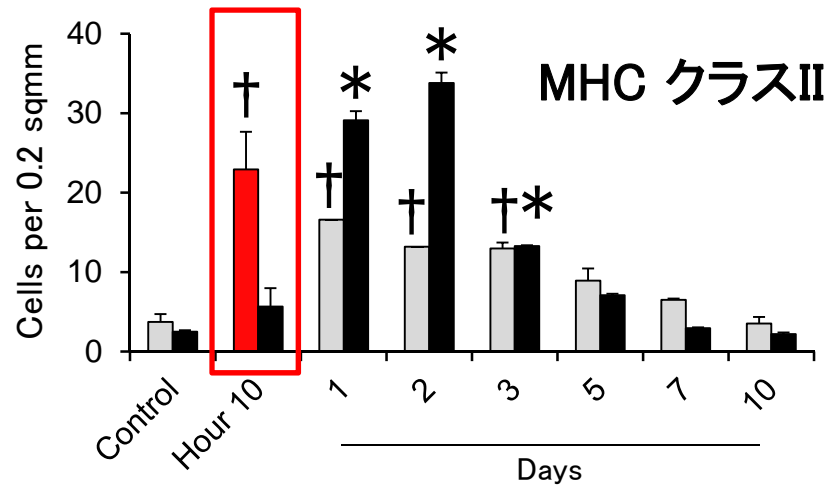
■ グリソン鞘; ■ 中心静脈

\* , †,  $P < 0.05$



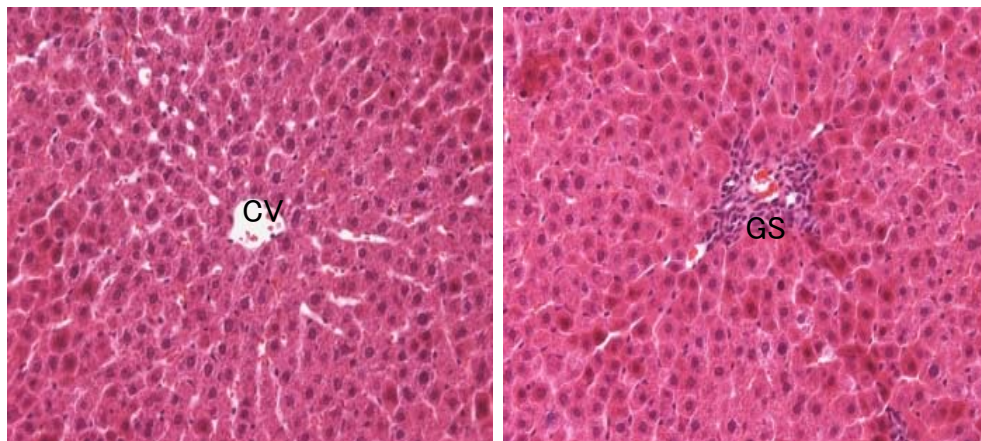
## 2-2: チオアセトアミド (TAA) 誘発肝傷害実験

### (5) 肝マクロファージの初期誘導: MHC クラス II と CD204 マクロファージ

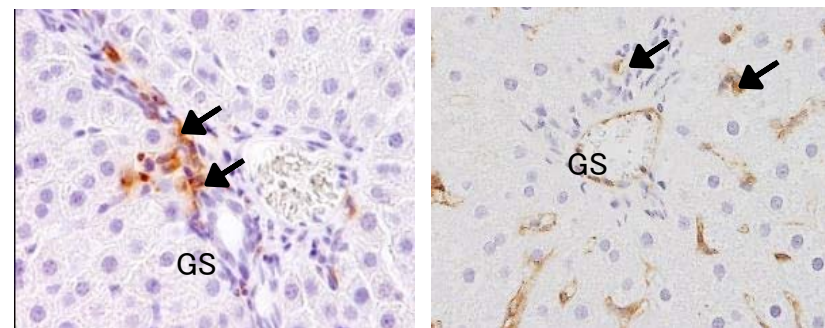


■ グリソン鞘    ■ 中心静脈

\*, †,  $P < 0.05$



10 時間 (HE)

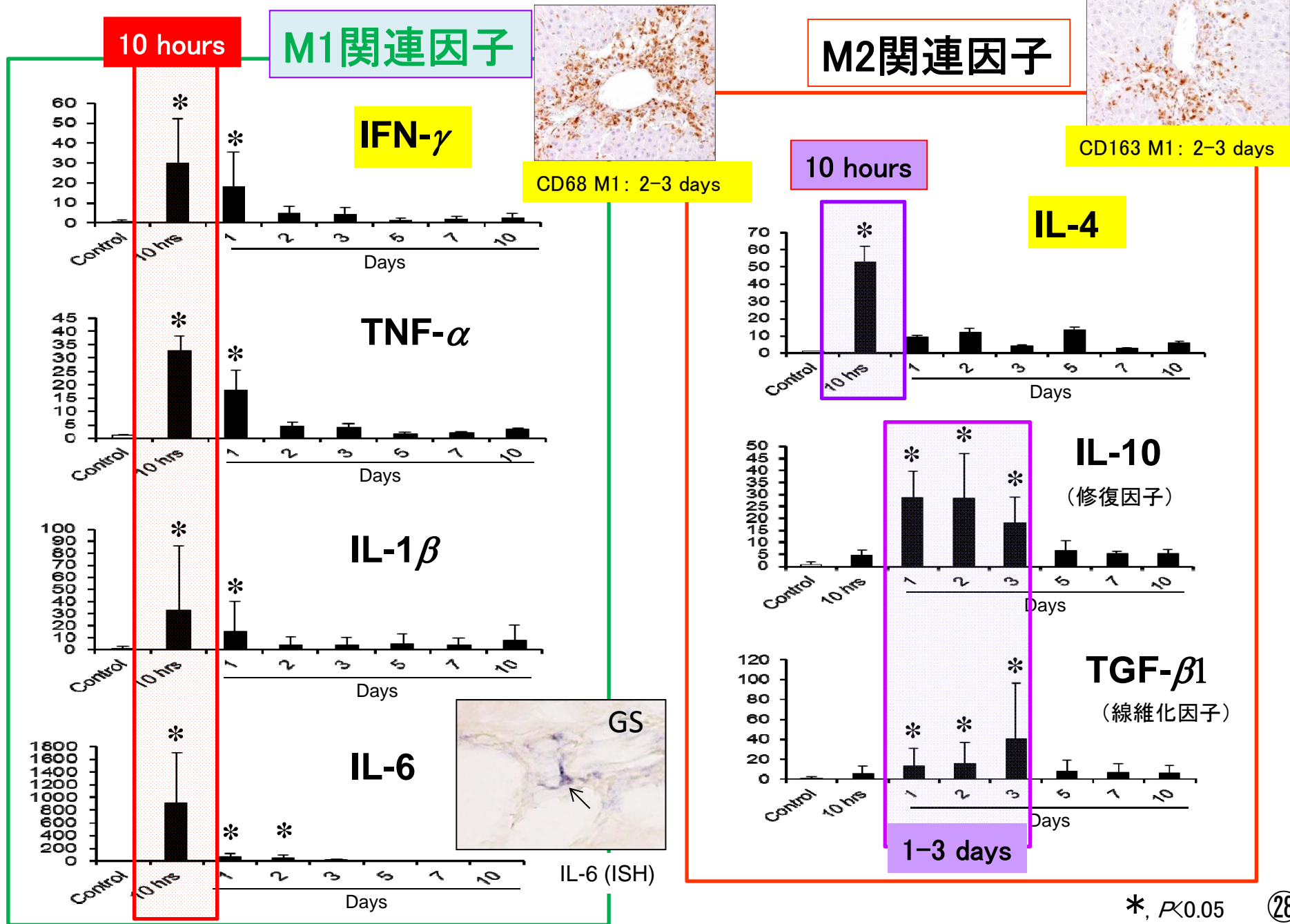


MHC class II

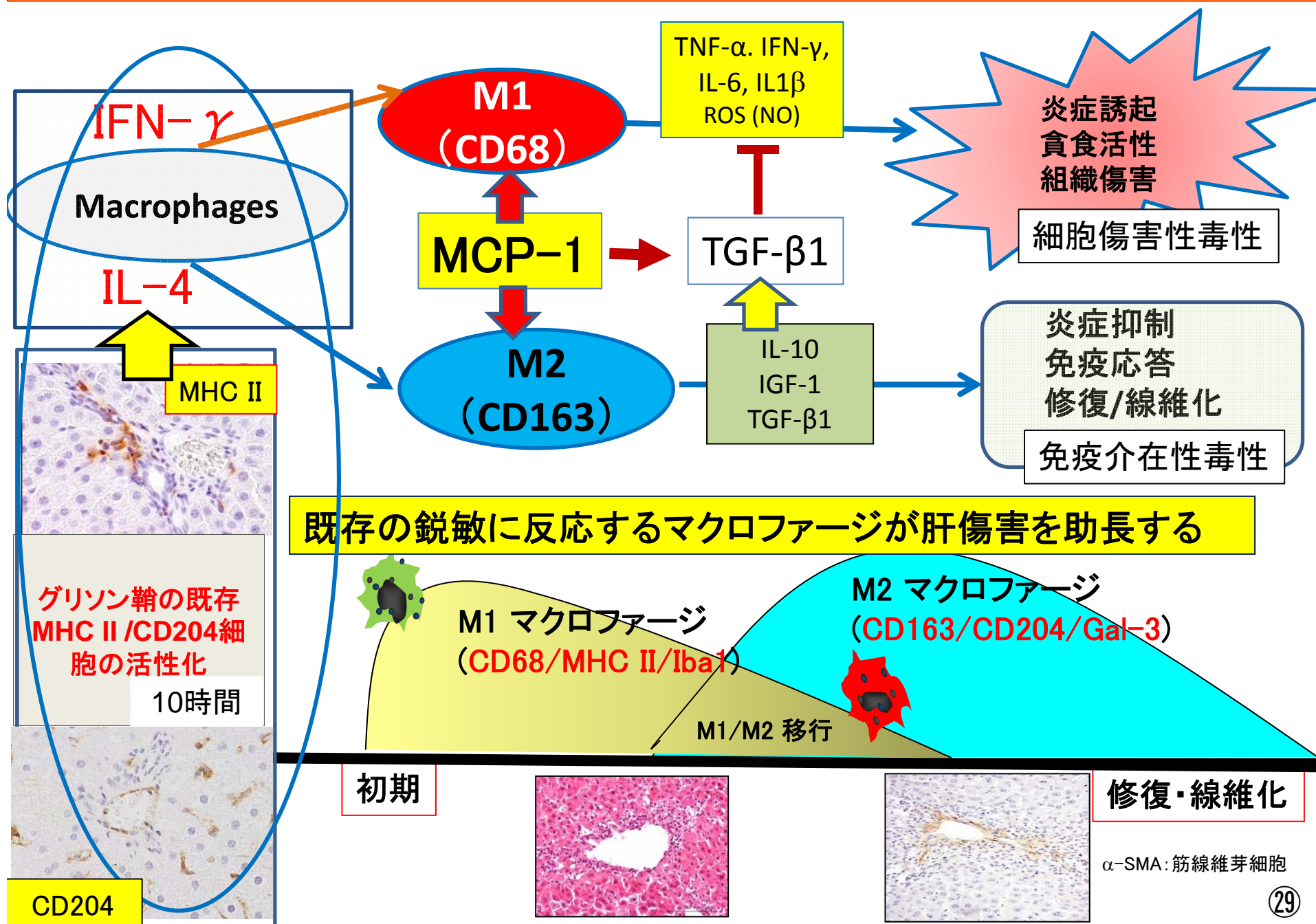
CD204

CV: 中心静脈; GS: グリソン鞘

# (5) 肝マクロファージの初期誘導とM1/M2分極化



## 2-2: チオアセトアミド(TAA)誘発肝細胞傷害実験: M1/M2分極化と肝毒性発現



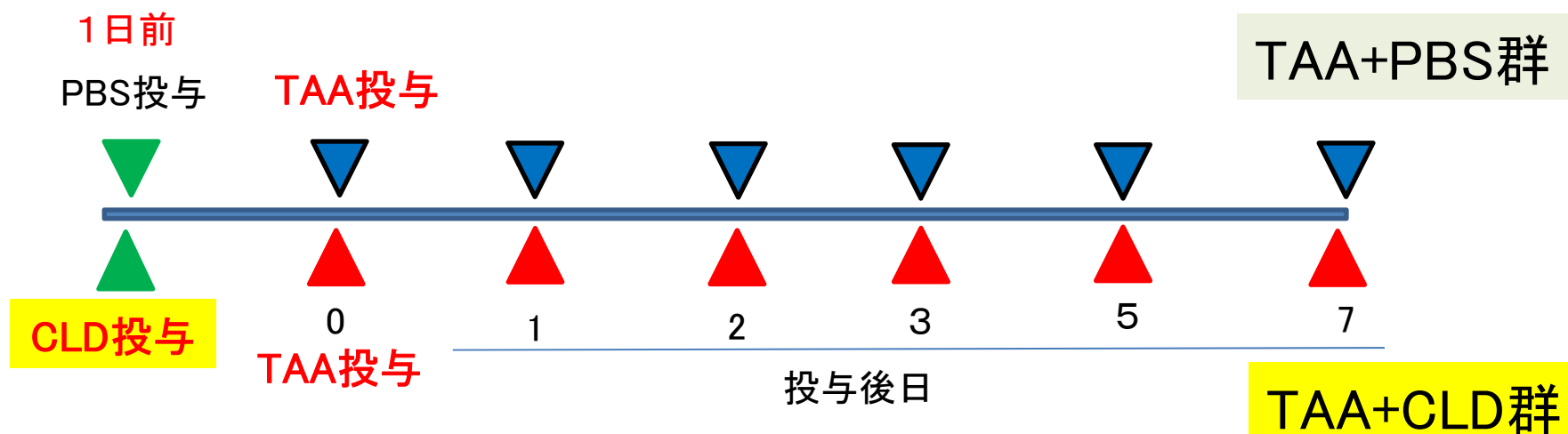
## 2-3: 肝マクロファージ枯渇状態におけるTAA 誘発病変

### クロドロネート(CLD)投与実験

F344 雄ラット, 6 週齢 (体重 150-160 g)

クロドロネート投与 (CLD): 50 mg/kg 体重, 静注

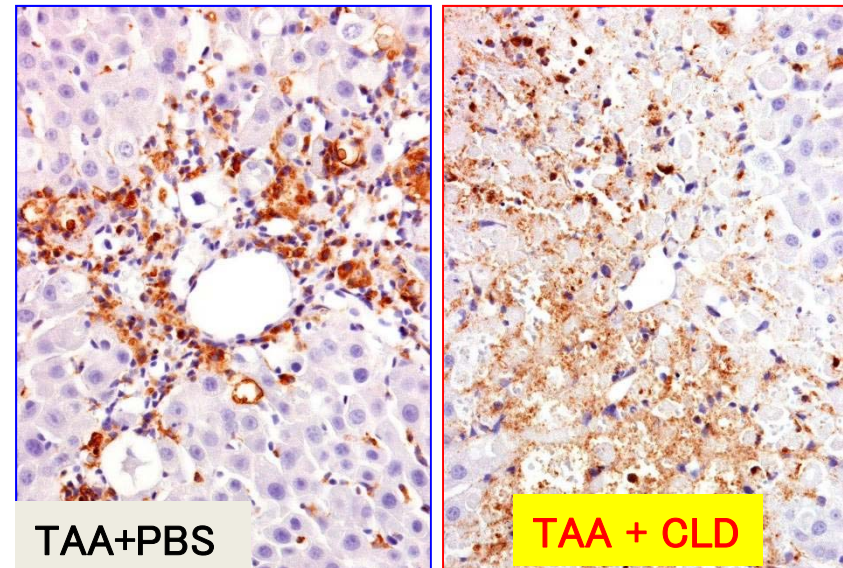
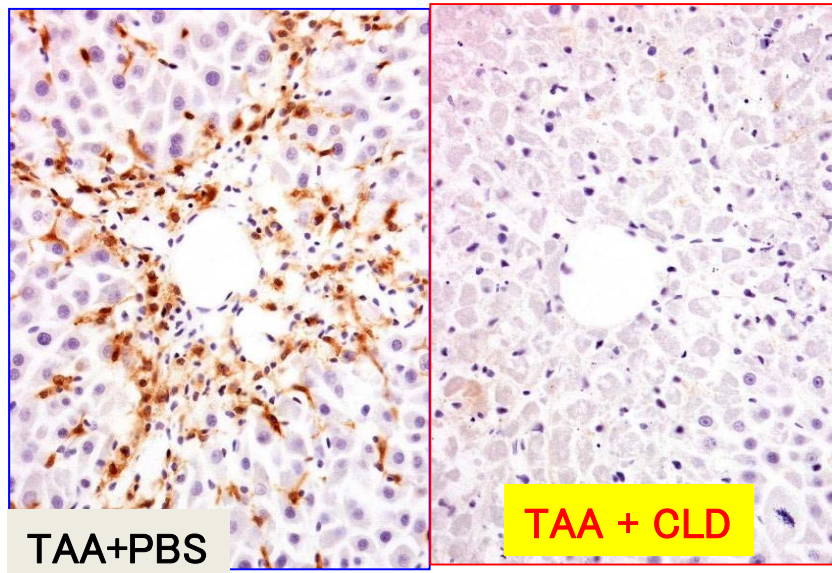
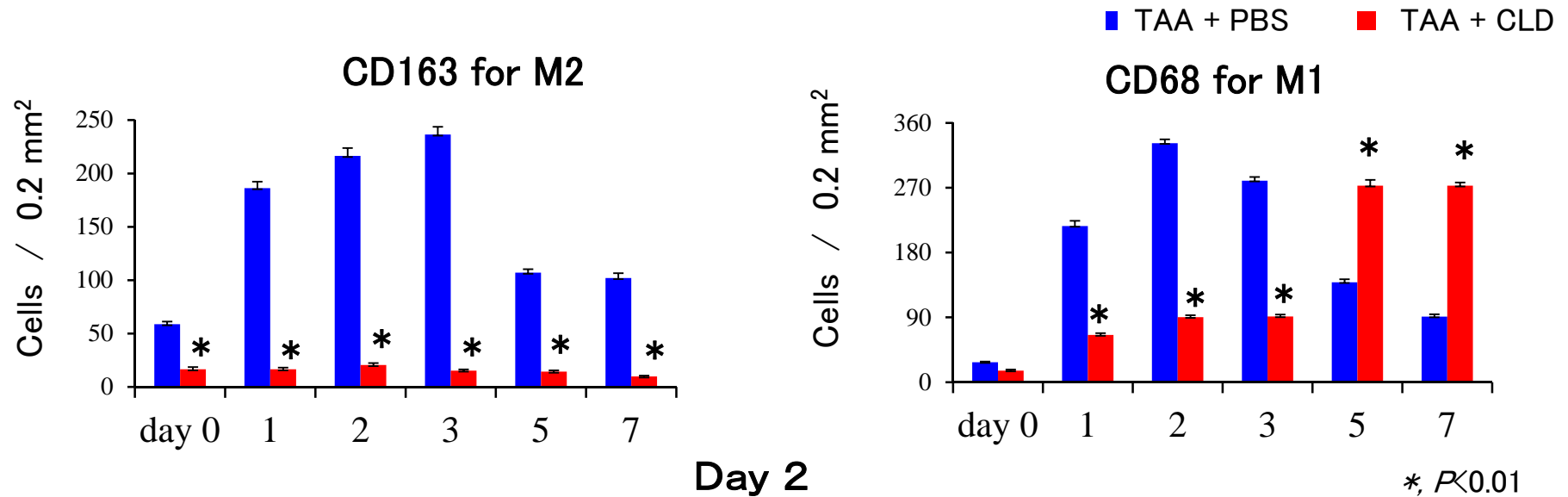
TAA, 腹腔投与・単回 : 300 mg/Kg 体重



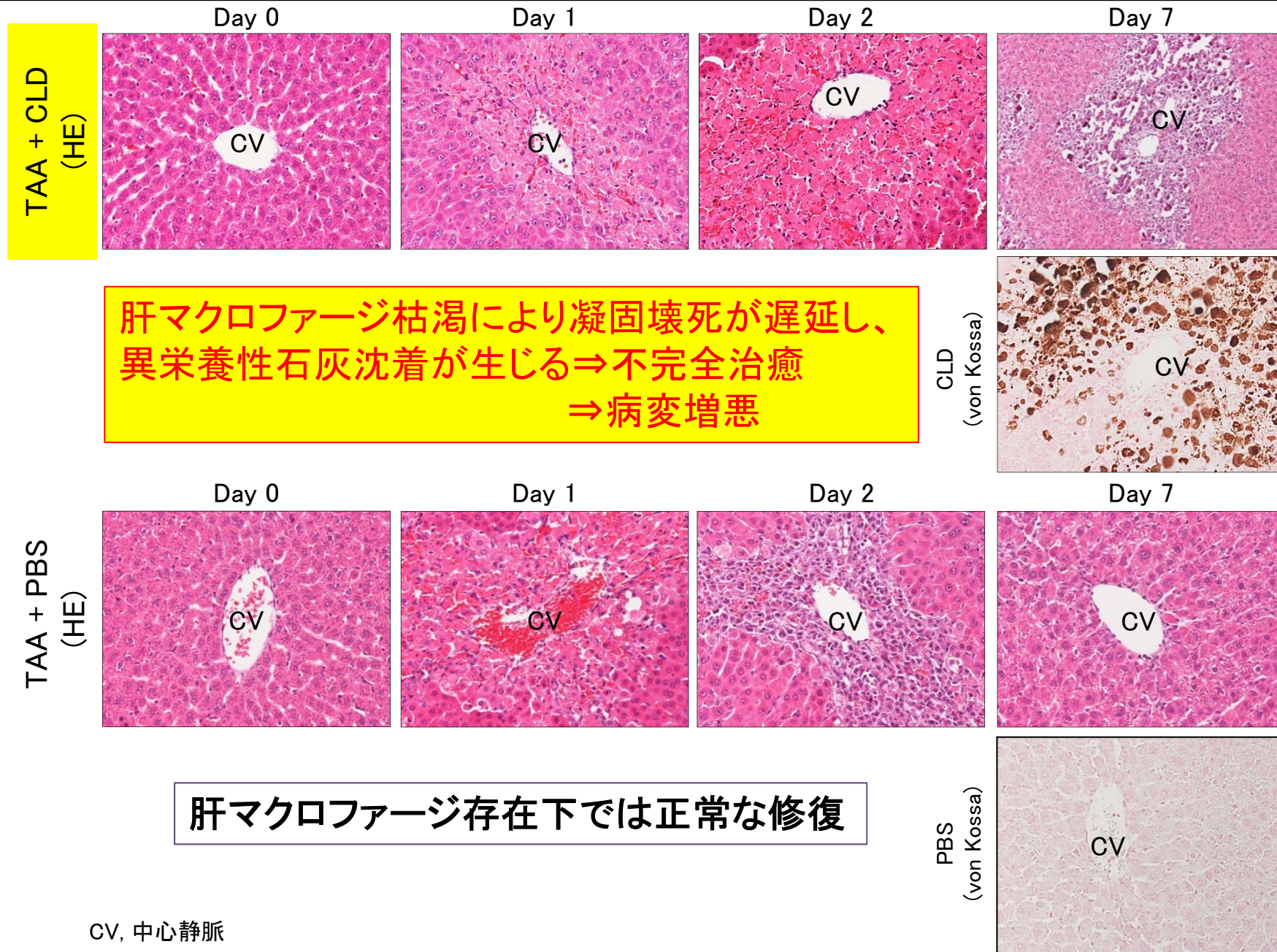
肝マクロファージの枯渇は1週間持続

## 2-3: 肝マクロファージ枯渇状態におけるTAA 誘発病変

傷害部位に出現するCD68M1マクロファージとCD163M2マクロファージが激減

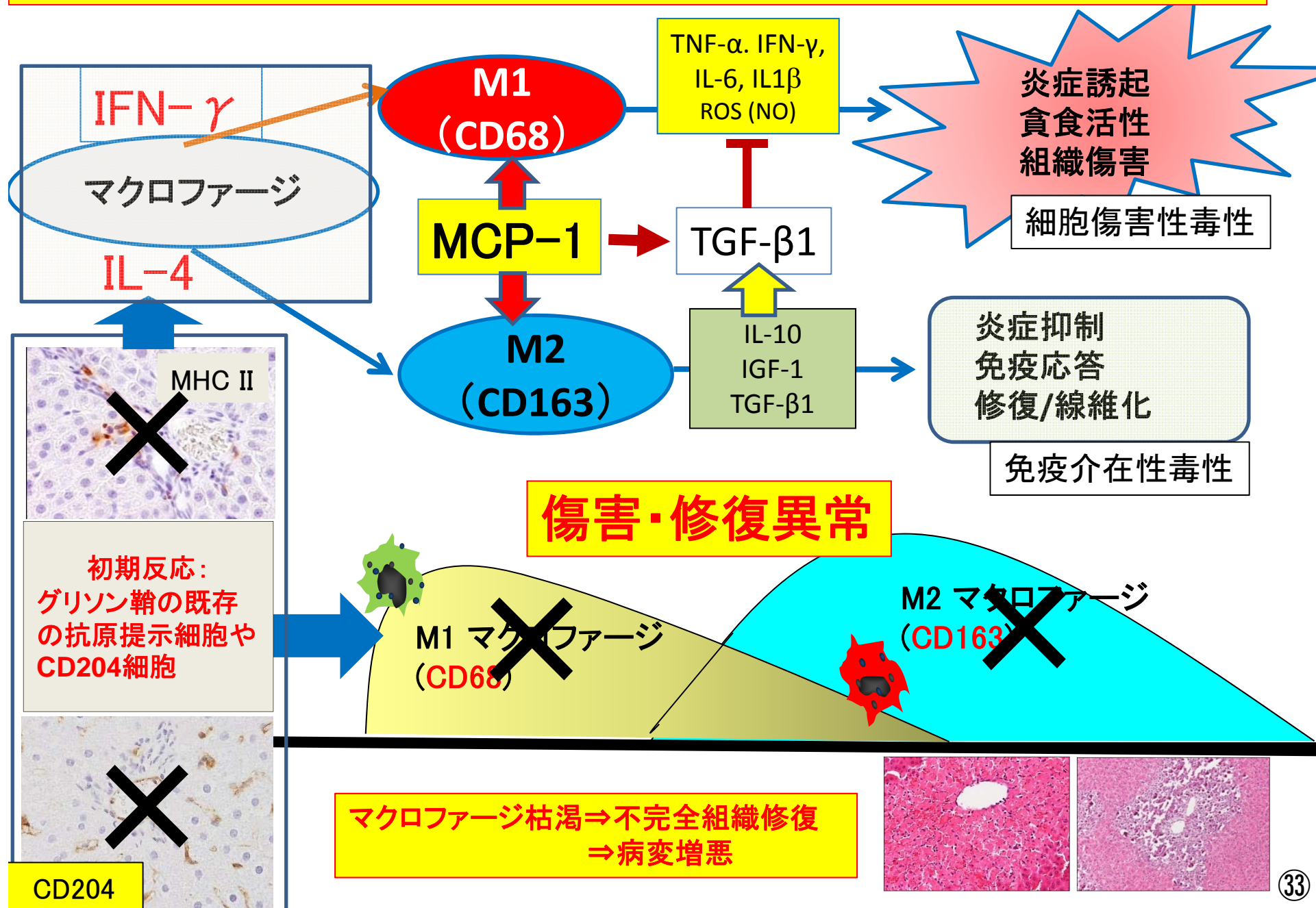


## 2-3: 肝マクロファージ枯渇状態におけるTAA 誘発病変



CV, 中心静脈

## 2-3: 肝マクロファージ枯渇状態におけるTAA 誘発病変



## まとめ

1. 肝マクロファージは恒常性維持に重要である。
  - ・活性化状態では、肝逸脱酵素が低下する。
  - ・枯渇状態では、肝逸脱酵素が増加し、かつ肝細胞が増殖する。
2. 薬物誘発肝細胞傷害病変(TAA誘発肝病変)はM1/M2マクロファージ分極化に基づいて解析できる。
  - ・傷害初期にはM1マクロファージ(CD68/MHC II/Iba-3)が、修復時にはM2マクロファージ(CD163/CD204/Gal-3)が出現する。
  - ・肝細胞傷害前に、グリソン鞘既存のマクロファージからM1/M2マクロファージ誘導因子が産生される。



- ・肝マクロファージの多様な機能特性に基づいた新規肝毒性評価手法の構築
  - ・肝マクロファージ機能を基軸とした*in vivo*と*in vitro*の実験系の構築
- ⇒マクロファージの出現状況を免疫組織化学染色法あるいは培養系を用いて評価することで肝毒性病変の発生機序の一端を解明できる。⇒メカニズム解析



食品健康影響評価への応用性: より精度の高いADI設定



## その他の実験（継続中）

1. **肝組織発生におけるM1/M2マクロファージの特性**に関する研究  
⇒胎生期にはCD68<sup>+</sup>M1マクロファージがアポトーシス細胞の貪食活性に、  
生後においては CD163<sup>+</sup> M2マクロファージが組織・機能分化に係ることが分かった。
2. TAA反復投与により作出した**肝硬変におけるGST-P陽性前腫瘍性病変におけるM1/M2マクロファージ特性**に関する研究  
⇒GST-P陰性偽小葉に比べ、GST-P陽性偽小葉ではM1/M2マクロファージが、  
より多く、しかも混在して出現していた。⇒前腫瘍性病変の形成に両マクロファージ  
が複雑に係ることが分かった。
3. TAA誘発肝病変におけるDanger Associated Molecular Patterns (**DAMPs**)による  
**免疫介在性肝毒性発現機序**に関する研究  
⇒S100A4などのDAMPsが傷害部位に発現し、TLR-4を介し抗原提示マクロファージ  
を活性化することで、免疫介在性の肝細胞傷害が生じる可能性が示された。
4. クロドロネート投与による肝マクロファージ枯渇条件下での  $\alpha$ -naphthylisothiocyanate  
誘発の**小葉間胆管上皮傷害とその後の線維化形成の病態解析**  
⇒グリソン鞘の胆管上皮傷害病変の形成には、MHCクラスII発現マクロファージが重要  
であること、そして肝マクロファージ枯渇条件下では、胆管上皮傷害後の線維化が遅延  
することが分かった。

**Articles;**

1. Wijesundera KK, Izawa T, Murakami H, Tennakoon AH, Golbar HM, Katou-Ichikawa C, Tanaka M, Kuwamura M, Yamate J. M1- and M2-macrophage polarization in thioacetamide (TAA)-induced rat liver lesions; a possible analysis for hepato-pathology. *Histology and Histopathology*. 29: 497-511, 2014.
2. Wijesundera KK, Izawa T, Tennakoon AH, Murakami H, Golbar HM, Katou-Ichikawa C, Tanaka M, Kuwamura M, Yamate J. M1- and M2-macrophage polarization in rat liver cirrhosis induced by thioacetamide (TAA), focusing on Iba1 and galectin-3. *Experimental and Molecular Pathology*. 96: 382-392, 2014.
3. Wijesundera KK, Izawa T, Tennakoon AH, Murakami H, Golbar HM, Katou-Ichikawa C, Tanakawa M, Kuwamura M, Yamate J. M1-/M2-macrophages contribute to the development of glutathione S-transferase placental form (GST-P)-positive pseudolobules in thioacetamide-induced rat cirrhosis. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 67: 467-475. , 2015.
4. Pervin M, Golbar MD, Bondoc A, Izawa T, Kuwamura M, Jyoji Yamate. Immunophenotypical characterization and influence to liver homeostasis of depleting and repopulating hepatic macrophages in rats injected with clodronate. (submitted), 2015.

**Presentation ;**

1. Golbar HM, Izawa T, Alexandra B, Wijesundera KK, Tennakoon AH, Katou-Ichikawa C, Tanaka M, Kuwamura M, Yamate J. Macrophage-derived galectin-3 is the key regulator of acute hepatic fibrogenesis in rats. *Proceedings of the 33rd Annual Symposium of the Society of Toxicologic Pathology (STP)*. Marriott Wardman Park Hotel, Washington DC, USA. Poster Presentation. Poster No. 19. June 22-26, 2014.
2. Pervin M, Golbar HM, Alexandra B, Uemura M, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J. Characterization of repopulating macrophages in liver after depletion with liposomal clodronate in rats. 第157回日本獣医学会学術集会. 口頭発表. 札幌. Abstract No. BO-56. September 9-12, 2014.
3. Pervin M, Golbar HM, Alexandra B, Wijesundera KK, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J. Analyses of hepatic macrophages depleted by clodronate in rat liver. *Proceeding of the American College of Veterinary Pathologists (ACVP)*, Poster Presentation. Abstract T-9. Atlanta, GA, USA. November 9-11, 2014.
4. 山手丈至: 教育講演「マクロファージと毒性病理学」: 第31回日本毒性病理学会学術集会 2015年1月29-30日 (東京)

**Related Articles;**

1. Golbar HM, Izawa T, Wijesundera KK, Tennakoon AH, Katou-Ichikawa C, Tanaka M, Kuwamura M, Yamate J. Nestin expression in remodelling of  $\alpha$ -naphthylisothiocyanate (ANIT)-induced acute bile duct injury in rats. *Journal of Comparative Pathology* 151(2-3), 255-263, 2014.
2. Tennakoon AH, Izawa T, Wijesundera KK, Katou-Ichikawa C, Tanaka M, Golbar HM, Kuwamura M, Yamate J. Analysis of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-expressing ductular cells in a rat liver cirrhosis model induced by repeated injections of thioacetamide (TAA). *Experimental and Molecular Pathology*, 98: 476-485, 2015.