

令和7年度産業保安等調査研究事業
(化学物質規制対策(大学・公的研究機関と連携した化学物質管理
高度化推進事業(非遺伝毒性肝発がん性の核内受容体活性化プロフ
ファイルに基づく評価の有用性検討))
調査報告書

令和8年2月27日
静岡県公立大学法人

目次

1. 概要	2
2. 目的	2
3. 実施内容	3
4. 実施体制	3
5. 実験材料及び実験操作	4
5.1. PCLS の作製	4
5.2. PCLS への薬物処置および総 RNA 抽出	4
5.3. cDNA 合成および定量的逆転写 PCR	4
5.4. ラット初代培養肝細胞の播種及び薬物処置	5
5.5. 多項目同時解析装置を用いた mRNA レベルの測定	5
5.6. 解析に使用した農薬	6
5.7. 解析に使用した被験物質	7
6. 結果及び考察	9
6.1. PCLS 培養条件の検討	9
6.2. 培地条件の検討	9
6.3. PCLS を用いた肝細胞増殖の評価	11
6.4. PCLS を用いた肝がん陽性農薬の評価	12
6.5. HESS 収載化合物を用いた核内受容体活性化評価	13
6.6. PCLS を用いた核内受容体活性化作用を有する HESS 化合物の評価	14
6.7. ラット個体を用いた肝がんプロモーション作用の検証	15
7. 成果のまとめと今後の展望	16

1. 概要

本研究では、非遺伝毒性肝発がん性化学物質を核内受容体 CAR、PPAR α 及び AHR の活性化に基づいて分類し、各核内受容体依存的な肝発がんにおける遺伝子発現変動の解析を通じて、肝発がんプロモーション作用の毒性発現経路 (Adverse Outcome Pathway: AOP) の理解と、発がん性試験で認められる肝がんをインビトロで予測可能なマーカー遺伝子の同定、スループット性の高い *ex vivo* 評価系の構築を目指した。

令和 5 年度経済産業省化学物質規制対策「大学・公的研究機関と連携した化学物質管理高度化推進事業 (非遺伝毒性肝発がん性の核内受容体活性化プロファイルに基づく評価の有用性検討)」の事業では、遺伝子発現情報データベース Open TG-GATEs のラット初代肝細胞及びラット反復投与試験肝組織の遺伝子発現データを用いて、CAR、PPAR α 及び AHR 活性化物質を選定した。これら化学物質を文献調査に基づき肝発がん陽性物質及び陰性物質に分類し、ラット 28 日間反復投与試験の肝遺伝子発現データを用いて ROC 解析を行い、曲線下面積 (AUC) が高値を示す遺伝子群を抽出した。さらに、各核内受容体の活性化評価系を確立し、ラットにおける肝発がん陽性物質を用いて核内受容体活性化評価を実施した。その結果、肝発がん陽性物質の約 8 割が CAR 活性化物質であることが明らかとなった。これらの結果から、CAR 活性化依存的な肝発がんの AOP の解明が、多様な化学物質による肝発がんの予測に有用であると考えられた。

そこで本年度は、さらに、生体内で観察される肝細胞増殖応答を *ex vivo* で再現可能と考えられる Precision-cut liver slices (PCLS) 評価系を導入し、核内受容体活性化に依存して生じる肝がんプロモーション作用の初期イベントである肝細胞増殖を評価可能な実験系を確立した。培養条件の最適化を行った結果、高酸素分圧条件下での振盪培養及び培地組成の最適化により、核内受容体活性化依存的な酵素誘導及び細胞増殖関連遺伝子発現の増加を安定的に再現可能な条件を確立した。既知のラット肝がん陽性物質を用いた検証では、PCLS において *in vivo* と整合的な肝細胞増殖応答が確認された。

さらに、有害性評価支援システム統合プラットフォーム (HESS) 収載化合物 177 種を対象としてラット初代肝細胞における受容体標的遺伝子発現解析を行い、CAR 及び PPAR α 活性化プロファイルに基づくスクリーニングを実施した。その結果、複数の化合物において核内受容体活性化作用が確認され、PCLS を用いた解析により、肝発がんプロモーション作用との関連性を示唆する候補化合物を得た。

2. 目的

現在、医薬品、食品添加物、農薬、化粧品等の新規化学物質の安全性評価は、反復投与毒性試験及び長期発がん性試験等の動物実験結果に基づいて実施されている。発がん性試験は 1.5~2 年間にわたり被験物質を投与する長期試験であり、動物福祉、評価コスト及び開発効率の観点から、早期予測法及び動物実験代替法の開発が強く求められている。

化学物質による発がん性には、遺伝毒性 (発がんイニシエーション) と非遺伝毒性 (発がんプロモーション) が存在する。遺伝毒性は Ames 試験等の代替法で評価可能である一方、非遺伝毒性はその分子機序の多様性・複雑性から簡便な評価法が確立されておらず、現在も主として長期発がん性試験に依存している。

近年、動物実験代替法の妥当性及び透明性を担保するため、毒性の分子機序 (Mode of Action: MOA) 及び AOP に基づく試験系構築が重要視されている。本研究では、げっ歯類における肝発がんプロモーションの Molecular Initiating Events (MIEs) として同定されている異物応答性核内受容体 CAR、PPAR α 及び AHR に着目し、これら受容体活性化に基づく肝がん予測の可能性を検証することを目的とした。PCLS は、肝臓組織の三次元構造や細胞多様性を保持したまま培養可能な *ex vivo* モデルであり、肝実質細胞および非実質細胞間の相互作用を維持した状態で薬物応答を解析できる手法として注目されている。PCLS は、動物個体を用いた *in vivo* 試験に比べて実験操作性に優れ、かつ従来の *in vitro* 培養系では再現困難であった組織特異的応答の評価が可能であるという利点を有する。そこで、ラット AHR、

PPAR α 、CAR 活性化評価系を用いて核内受容体活性化プロファイルを体系的に評価することに加えて、化学物質による肝細胞増殖応答を再現可能な PCLS 評価系を確立することで、核内受容体活性化から肝発がんプロモーションに至る分子機序を統合的に理解し、発がん性試験結果をインビトロで予測可能な評価体系の構築を目指した。

3. 実施内容

核内受容体活性化に基づく非遺伝毒性肝発がん性予測手法の高度化を目的として、*in vitro* 評価と *ex vivo* 評価を統合した検討を実施した。

生体内で観察される肝発がんプロモーションの初期イベントである肝細胞増殖を *ex vivo* で評価可能とするため、Precision-cut liver slices (PCLS) 評価系を導入した。高酸素分圧条件下での振盪培養及び培地組成の最適化を行い、核内受容体活性化依存的な酵素誘導及び細胞増殖関連遺伝子発現を安定的に検出可能な実験条件を確立した。

さらに、2年間ラット発がん性試験において肝発がん性の有無が報告されている農薬について PCLS 評価を実施し、肝細胞増殖関連遺伝子発現を指標として肝発がんプロモーション作用を評価した。

有害性評価支援システム統合プラットフォーム (HESS) 収載化合物 185 種を対象とした核内受容体活性化スクリーニングを実施した。ラット初代肝細胞における受容体標的遺伝子発現解析を行い、強い CAR 及び PPAR α 活性化作用のみられた数種類の化学物質について、PCLS を用いた肝細胞増殖の評価を行った。PCLS で陽性を示した化合物についてはラット短期投与試験を行い、肝組織における細胞増殖指標との整合性を検証した。

これらの検討により、核内受容体活性化プロファイルと PCLS を用いた *ex vivo* 増殖評価を組み合わせることで、非遺伝毒性肝発がんプロモーション作用の予測可能性を検証した。

4. 実施体制

志津怜太 (静岡県立大学薬学部衛生分子毒性学分野・准教授)

担当：研究計画、データの取得・解析

吉成浩一 (静岡県立大学薬学部衛生分子毒性学分野・教授)

担当：アドバイザー

大岡央 (静岡県立大学薬学部衛生分子毒性学分野・助教)

担当：PCLS の培養、データの取得

学部学生 1 名、研究補助員 1 名

5. 実験材料及び実験操作

5.1. PCLS の作製

PCLS は、ビブラトーム VT1200 S (Leica Biosystems) を用いて作製した。C57BL/6J 系雄マウスあるいは SD 雄性ラットから肝臓を摘出し、ゼラチン包埋後、冷却したクレブス・ヘンゼライト緩衝液中で、切片厚 250 μm に切断した。得られた肝スライスには直径 5 mm に打ち抜き、Williams' E 培地 (Sigma-Aldrich) を用いて培養した。Williams' E 培地には Penicillin/Streptomycin、10% FBS、1 μM Dexamethasone、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Insulin、6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Transferrin、6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Selenous acid、1.25 mg/mL BSA、5.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ linoleic acid、2 mM GultaMax、15 mM HEPES、pH 7.4 を加えた。培養は 37°C、80% O_2 および 5% CO_2 条件下で、マルチガスインキュベーター MCO-50M-PJ (PHC Corporation) 内にて実施した。培養中は、酸素および栄養供給の均一化を目的として、シーソー型の振盪機である Wave-SI (TAITEC) 上で緩やかに振盪した。

5.2. PCLS への薬物処置および総 RNA 抽出

PCLS 培養開始 1 時間後に、被験物質を含有する培地に交換した。24 時間培養後、再度被験物質を含有する新しい培地に交換し、さらに 24 時間培養した後、総 RNA を回収した。PCLS に Sepasol® RNA I Super G (ナカライテスク) 500 μL を添加し、ダウンスホモジナイズによって十分に粉碎した。クロロホルム 100 μL を加えて転倒混和し、室温で 3 分間静置後、12,000 $\times g$ で 15 分間遠心分離した。遠心後の上清を新しい 1.5 mL チューブに回収し、2-プロパノール 300 μL を添加して 4°C で 10 分間静置し、RNA を析出させた。続いて 4°C、12,000 $\times g$ で 10 分間遠心分離し、上清をデカンテーションにより除去した。得られたペレットに 75% エタノール 500 μL を加えてボルテックス混和し、4°C、12,000 $\times g$ で 5 分間遠心分離した。上清を除去後、ペレットを風乾し、Nuclease-free water に溶解した。RNA 濃度は、微量分光光度計 DS-11 Spectrophotometer (DeNovix Inc.) を用いて測定した。

5.3. cDNA 合成および定量的逆転写 PCR

cDNA 合成には High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を使用した。RNA は Nuclease-free water を用いて希釈し、各反応あたり 1 μg となるように調製した。RNA 溶液 10 μL と RT Master Mix 10 μL を混合し、25°C で 10 分間、37°C で 120 分間、85°C で 5 分間の順に反応させ、cDNA を合成した。定量的 PCR には Go Taq qPCR Master Mix (Promega) を使用し、StepOnePlus (Applied Biosystems™) を用いて行った。反応は、95°C で 2 分間処理後、変性を 95°C で 15 秒間、アニーリングおよび伸長反応を 60°C で 1 分

間とし、これを 40 サイクル行った。核内受容体 CAR の標的遺伝子 *Cyp2b1* の mRNA レベルを測定し、*Actb* mRNA レベルで補正した。

5.4. ラット初代培養肝細胞の播種及び薬物処置

雄性 SD ラット（6-8 週齢）から調製されたラット初代培養肝細胞をコラーゲンコートされた 24-well plate に 2.0×10^5 cell/well で播種した。24 時間後に 100 μ M の被験物質を添加した。

5.5. 多項目同時解析装置を用いた mRNA レベルの測定

薬物処置 24 時間後に、細胞に Lysis buffer を添加し 37°C で 30 分インキュベーションし細胞溶解液を得た。96well プレートにて、Working Bead Mix 20 μ L と細胞溶解液 80 μ L を混合し、600 rpm、20 時間、54°C \pm 1°C で振盪した。振盪終了後、全量を Magnetic Separation Plate に移し、Handheld Magnetic Plate Washer に取り付け 1 分間静置して溶液をデカンテーションで除去した。1 \times Wash Buffer を 100 μ L ずつ加え、15 秒間静置後、デカンテーションを除去した。これを 3 回繰り返した。その後、Pre-Amplifier Solution を 100 μ L ずつ添加し、600 rpm、1 時間、50°C \pm 1°C で振盪した。Handheld Magnetic Plate Washer に取り付け 1 \times Wash Buffer で 3 回洗浄した。Amplifier Solution を 100 μ L ずつ添加し、600 rpm、1 時間、50°C \pm 1°C で振盪した。Handheld Magnetic Plate Washer に取り付け 1 \times Wash Buffer で 3 回洗浄した。Label Probe Solution を 100 μ L ずつ添加し 600 rpm、1 時間、50°C \pm 1°C で振盪した。Handheld Magnetic Plate Washer に取り付け 1 \times Wash Buffer で 3 回洗浄した。SAPE Working Reagent を 100 μ L ずつ添加して、600 rpm、30 分間、室温で振盪した。Handheld Magnetic Plate Washer に取り付け SAPE Wash Buffer で 3 回洗浄した。MAGPIX (Luminex) を用いて *cyp2b1*、*Cyp4a1*、*Hprt1* の mRNA レベルを測定した。

5.6. 解析に使用した農薬

#	農薬名
1	1,3-dichloropropene
2	acetochlor
3	ametryn
4	amisulbrom
5	benfluralin
6	benthiavalicarb isopropyl
7	carbaryl
8	cyclanilide
9	cyhexatin
10	dichlobenil
11	fluacrypyrim
12	fluopicolide
13	fluopyram
14	flupyrimin
15	fluxapyroxad
16	isopyrazam
17	isoxaflutole
18	kresoxim methyl
19	malathion
20	mepanipyrim
21	metaldehyde
22	metolachlor
23	metominostrobin
24	oxadiazon
25	oxaziclomefone
26	propanil
27	propyzamide
28	pymetrozine
29	pyraziflumid
30	pyriminobac methyl
31	quizalofop P tefuryl
32	simeconazole
33	sulfoxaflor
34	tebufenpyrad
35	tepraloxydim

5.7. 解析に使用した被験物質

# 被験物質	# 被験物質
1 n,n-diethyl-m-toluamide	46 acetyl tributyl citrate
2 3,3-bis(p-dimethylaminophenyl)-6-dimethylaminophthalide	47 4-phenylbutenone
3 1,3,5-tris(2-propenyl)isocyanuric acid	48 1-chloronaphthalene
4 1,4-benzenediamine	49 n-methylaniline
5 2-naphthalenthiole	50 tert-pentylbenzene
6 biphenyl-2-ylamine	51 benzenesulphonamide
7 n-methylacetanilide	52 3,5-xylidine
8 dibenzothiophene	53 2,3-dimethylaniline
9 phenobarbital	54 decahydronaphthalene
10 leucomalachite green	55 tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decane
11 crotamiton	56 2,4-dibromophenol
12 trityl chloride	57 2,2',6,6'-tetra-tert-butyl-4,4'-methylenediphenol
13 3-bromophenol	58 3-phenoxytoluene
14 2-ethylhexyl diphenyl phosphate	59 n-ethylaniline
15 3,4-dimethylaniline	60 n,n'-(3,3'-dimethylbiphenyl-4,4'-ylene)di(acetoacetamide)
16 dicumyl peroxide;peroxide	61 4-ethyl-1,1'-biphenyl;p-ethylbiphenyl
17 1,2-bis(2-chloroethoxy)ethane	62 1-o-octyl -β-d-glucopyranoside
18 4-nitro-o-anisidine;benzenamine	63 4-chlorophenol
19 ethynlestradiol	64 n,n-dimethylbenzylamine
20 4-ethoxybenzenamine	65 methacrylonitrite
21 p-tert-octylphenol	66 p-(acetylamino)benzenesulfonyl chloride
22 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol	67 m-ethylphenol
23 2,4-dimethylaniline	68 2-(di-n-butylamino)ethanol
24 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol	69 2-tert-butylphenol
25 p-(α,α-dimethylbenzyl)phenol	70 acenaphthene
26 dibenzofuran	71 2-mercaptobenzimidazole
27 1-naphthalenamine	72 4,4'-isopropylidenebis(2,6-dibromophenol)
28 2,5-dimethylaniline	73 monosodium 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonate
29 2-propenamide	74 1,3,5-trihydroxybenzene
30 acenaphthylene	75 2-hydroxy-4-(octyloxy)benzophenone
31 2-chlorobenzoic acid	76 tetrahydrofurfuryl alcohol
32 reactive blue 19	77 3-aminophenol
33 2-ethylanthraquinone	78 3-nitrobenzenamine
34 tris(2-butoxyethyl) phosphate	79 dibutyl adipate
35 1,10-dibromodecane;decane	80 benzoanthrone
36 1,8-dichlorooctane	81 triallylamine
37 1-chloro-2,5-dimethoxybenzene	82 2-chlorophenol
38 4,4'-methylenediphenol	83 1,3-diphenylguanidine
39 vinclozolin	84 n-cyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide
40 hexanedioic acid bis 2-(2-butoxyethoxy)ethyl ester	85 1-naphthylacetic acid
41 2-isobutoxynaphthalene	86 tetrabromoethane
42 disperse yellow 42	87 4,4'-sulfonyldiphenol
43 bis(2,3,3,3-tetrachloropropyl) ether	88 4-(1-methylpropyl)phenol
44 2-nitro-p-cresol	89 2,4-di-tert-butylphenol
45 2,3,6-trimethylphenol	90 ethyl cyclohexane

5.7. 解析に使用した被験物質 (続き)

# 被験物質	# 被験物質
91 4-aminobenzenesulfonamide	136 tert-butyl methacrylate
92 2-naphthalenesulfonic acid	137 1,2,3-trimethylbenzene
93 4-ethylphenol	138 n-(aminoethyl)ethanolamine
94 4-aminophenol	139 3-methoxy-n-butylacetate
95 4-chloro-o-cresol	140 methylcyclohexane
96 p-tert-butyltoluene	141 sodium 4-vinylbenzenesulphonate
97 4-ethylmorpholine	142 1-chloro-2-phenylethane
98 1-naphthol-4-sulfonic acid sodium salt	143 1,3-dioxolan-2-one
99 1,3-dicyanobenzene	144 1,2-dichlorobenzene
100 1-methoxynaphthalene	145 diheptyl phthalate
101 3-nitrophthalic acid	146 benzonitrile
102 1,2,4-trimethylbenzene	147 o-toluenesulfonamide
103 beta-bromostyrene	148 2,5-dimethyl-2,5-bis(t-butylperoxy)-hexane
104 2-imidazolidinethione	149 tetrahydrothiophene-1,1-dioxide
105 n-hexadecane	150 1-bromo-3-chloropropane
106 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diaminodiphenylmethane	151 (methacryloyloxyethyl)trimethylammonium chloride
107 3-methoxy-3-methyl-1-butanol	152 triisobutylene
108 4-chloro-3-methylphenol	153 n-pentadecane
109 4-methylbenzoic acid	154 tris(2-ethylhexyl)phosphate
110 p-nitrophenol sodium salt	155 sodium 4-amino-1-naphthalenesulfonate
111 1,3-ditolyguanidine	156 nitrobenzene
112 3-methylphenol	157 2-vinylpyridine
113 1,3-dibromopropane	158 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid
114 dodecyldimethylamine	159 2-ethylhexyl vinyl ether
115 phenylurea	160 1,2-dichloro-4-(chloromethyl)benzene
116 hydantoin	161 para acetaldehyde
117 3,6-dichloropyridazine	162 4,4'-(1-methylethylidene)bis-phenol
118 3-hydroxy-2-naphthanilide	163 3-cyanopyridine
119 4-chlorobenzaldehyde	164 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane
120 4,4'-oxybis(benzenesulfonylhydrazide)	165 5-ethylidene-2-norbornene
121 benzyltrimethylammonium chloride	166 3-acetotetrahydrofuranone-2
122 terephthalonitrile	167 bis(2-ethylhexyl) fumarate
123 propylthiouracil	168 1,2,4-benzenetricarboxylic acid tris(2-ethylhexyl) ester
124 sodium p-toluenesulfonate	169 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol)
125 n,n-diethylhydroxylamine	170 1,3-bis(aminomethyl)benzene
126 4-(1-methylethenyl)phenol	171 ethyl carbamate
127 2-amino-5-chloro-4-methylbenzenesulfonic acid	172 sodium 3-nitrobenzenesulfonate
128 1,4-dibromobenzene	173 methacrylamide:methacryamide
129 sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate	174 2-butanone oxime
130 3,3'-thiobispropionic acid	175 dicyclohexylamine
131 fumonisin b1	176 trimethoxyphosphine
132 4-vinylpyridine	177 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol
133 2-(1-methylethoxy)ethanol	
134 3-aminobenzenesulfonic acid	
135 2,3-dibromosuccinic acid	

本表に示した被験物質は、6.5. HESS 収載化合物を用いた核内受容体活性化評価において、ラット初代肝細胞における Cyp2b1 誘導の大きさに基づき、降順に整理している。

6. 結果及び考察

6.1. PCLS 培養条件の検討

PCLS を用いた評価系を構築するにあたり、培養期間中に肝組織の生存性を十分に維持できる培養条件を確立することが重要である。そこで、PCLS 作製および培養条件が生存性に及ぼす影響について検討した。

ビブラトームを用いてマウス肝から切片厚 250 μm 、直径 5 mm の PCLS を作製し、CO₂ 分圧 5%、O₂ 分圧 80%、37°C の条件下で培養した。培養中におけるシーソー振盪の有無ならびに培養プレートのサイズ (96 well、48 well および 24 well プレート) について比較検討した。培養開始 1 時間後に培地を交換し、その後 24 時間培養した PCLS を回収し、WST-8 アッセイ (CCK-8) を用いて生存細胞数を評価した。その結果、培養中にシーソー振盪を行わず、96 well プレートをを用いた条件では、培地の色調変化はほとんど認められず、吸光度は約 0.02 と低値を示した。一方、シーソー振盪を行い、24 well プレートをを用いた条件では、吸光度は約 0.65 と著しく増加し、生存性が大きく改善した。

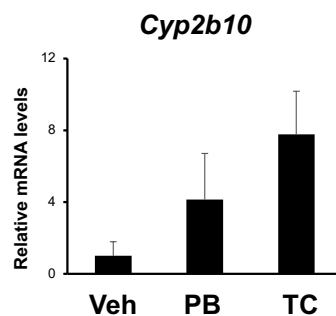
以上より、PCLS の生存性は、培養中の振盪による培地対流および培養液表面積を介した酸素供給条件に大きく依存することが明らかとなった。以降の PCLS 実験は、酸素供給およびシーソー振盪を行い、24 well プレートをを用いた条件で実施した。

6.2. 培地条件の検討

PCLS における CAR 活性化評価に適した培養条件を確立することを目的として、培地に添加するサプリメント条件の検討を行った。前節までの培養には、10% FBS を含有する Williams' E 培地に、デキサメタゾン、ペニシリン/ストレプトマイシン、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ インスリン、2 mM GlutaMAX™、15 mM HEPES (pH 7.4) を終濃度で添加した培地を用いた。本検討では、これらに加えて、6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ トランスフェリン、6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ セレン、1.25 mg/mL BSA、5.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ リノール酸を含有した培地条件を設定した。本サプリメント含有条件下で PCLS を培養し、フェノバルビタール (PB) および TCPOBOP 処置後の *Cyp2b10* mRNA 発現量を解析した。その結果、サプリメントを添加した培地条件では、従来条件と比較して *Cyp2b10* の誘導がより強く認められた (Fig. 1)。以上より、核内受容体活性化評価に適した培地条件として、これらのサプリメントを含有した培地を採用した。

Cultured in Williams's E medium containing with:

- Penicillin/Streptomycin
- 10% FBS
- 1 μ M Dexamethasone
- 4 μ g/mL Insulin
- 2 mM GultaMax
- 15 mM HEPES, pH 7.4



- Penicillin/Streptomycin
- 10% FBS
- 1 μ M Dexamethasone
- 4 μ g/mL Insulin
- 6.25 μ g/mL Transferrin
- 6.25 μ g/mL Selenous acid
- 1.25 mg/mL BSA
- 5.35 μ g/mL linoleic acid
- 2 mM GultaMax
- 15 mM HEPES, pH 7.4

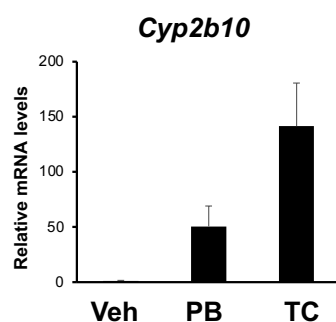


Fig. 1. 異なる培地条件を用いた *Cyp2b1* mRNA レベルの測定

マウス PCLS を図内に示すサプリメントを含有した Williams'E 培地を用いて培養し、1 時間後にラット CAR 活性化物質である Phenobarbital (PB)、TCPOBOP (TC) を処置した。48 時間後に RNA を回収し qRT-PCR 法により、*Cyp2b1* の mRNA レベルの測定を行った。*Actb* をハウスキーピング遺伝子として溶媒対照群の mRNA レベルを 1 とした相対的な *Cyp2b1* の mRNA レベルを算出した。

6.3. PCLS を用いた肝細胞増殖の評価

マウス由来 PCLS を用い、細胞増殖関連遺伝子 (*Birc5*、*Ccna2*) の mRNA 発現量を定量的逆転写 PCR により解析した。その結果、CAR 活性化薬処置に伴う *Birc5* および *Ccna2* 発現の有意な増加が確認され、細胞増殖作用が観察可能であることが明らかとなった (Fig. 2A)。次いで、ラット由来 PCLS を用い、CAR 活性化薬処置後の *Cyp2b1*、*Cyp4a1* および *Ccna2* の mRNA レベルを調べた。その結果、ラット由来 PCLS でも同様に CAR の活性化と肝細胞増殖の誘導を確認した (Fig. 2B)。以上より、PCLS は CAR 活性化依存的な肝細胞増殖応答を種横断的に再現可能な評価系であることが示された。

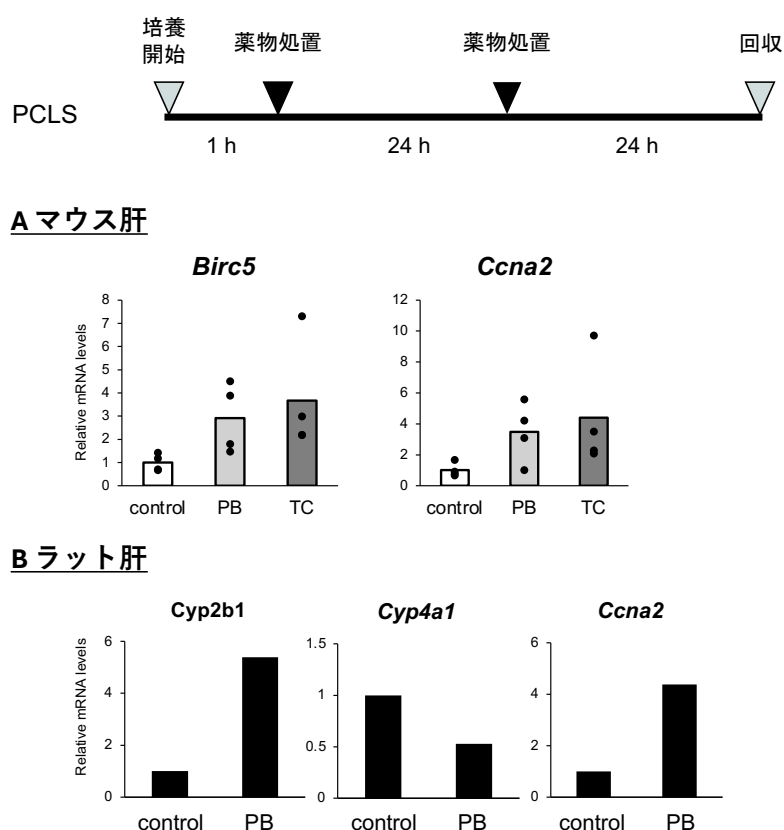


Fig. 2. PCLS を用いた細胞増殖関連遺伝子 mRNA レベルの測定

(A) マウス PCLS を培養し、1 時間後に CAR 活性化物質である Phenobarbital (PB)、TCPOBOP (TC) を処置した。48 時間後に RNA を回収し qRT-PCR 法により mRNA レベルの測定を行った。

(B) ラット PCLS を培養し、1 時間後に CAR 活性化物質である Phenobarbital (PB) を処置した。48 時間後に RNA を回収し qRT-PCR 法により mRNA レベルの測定を行った。

6.4. PCLS を用いた肝がん陽性農薬の評価

PCLS 評価系の有用性を検証するため、2年間ラット発がん性試験において肝がん陽性と報告されている農薬を対象として検討を行った。

内閣府食品安全委員会が公開する農薬評価書（441種）を精査し、2年間発がん性試験においてラットの雌雄いずれかで肝がん陽性と判定された農薬32種を選定した。これらのうち、ラット初代肝細胞を用いた核内受容体活性化評価において CAR 活性化陽性であった農薬は19種、PPAR α 活性化陽性は2種であった（Fig. 3）。対照として、発がん性試験において肝がん陰性と判定された農薬3種を選定した。

これら計35種の農薬を、最適化した培養条件（O₂分圧80%、シーソー振盪、サプリメント含有 Williams' E 培地）下で培養した PCLS に処置し、48時間後に総 RNA を回収した。肝がんプロモーションの初期イベントである肝細胞増殖を評価するため、CAR および PPAR α の標的遺伝子 *Cyp2b1* および *Cyp4a1* に加えて細胞増殖関連遺伝子 *Ccna2* の mRNA 発現量を定量的逆転写 PCR により解析した。その結果、肝がん陽性農薬の多くにおいて *Ccna2* の発現増加が認められた。一方、肝がん陰性農薬ではこれら遺伝子の明確な誘導は認められなかった（Fig. 3）。

以上の結果から、PCLS を用いた ex vivo 評価系は、核内受容体活性化に基づく非遺伝毒性肝がんプロモーション作用を一定程度識別可能であることが示唆された。

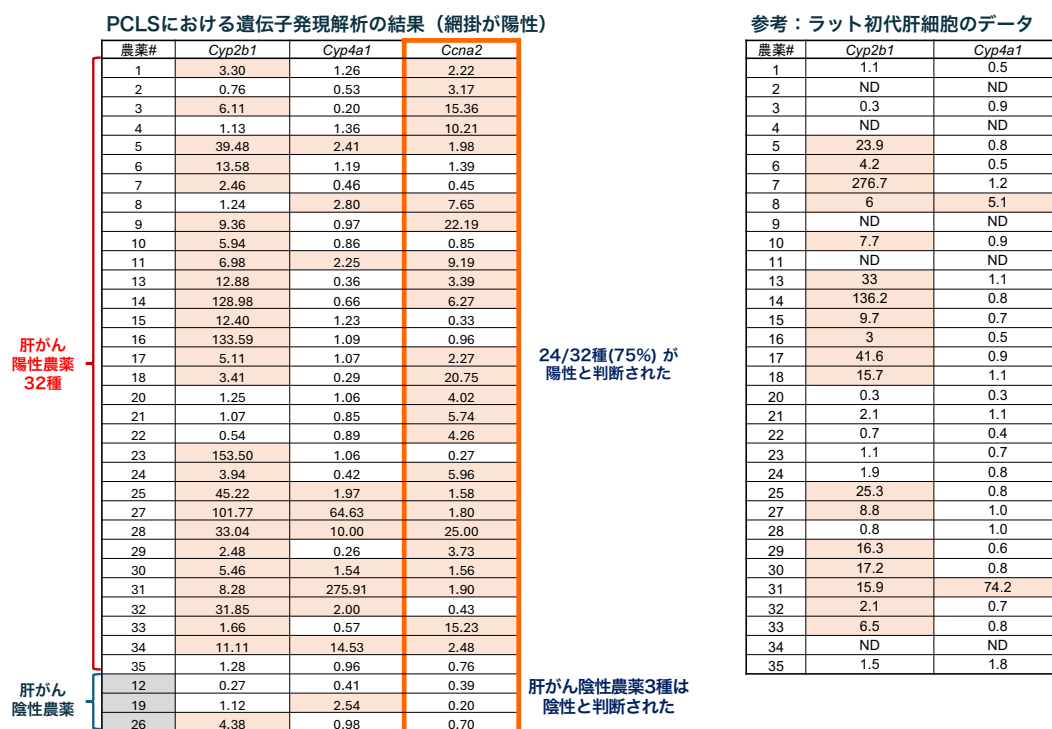


Fig. 3. PCLS を用いた細胞増殖関連遺伝子 mRNA レベルの測定

ラット PCLS に肝がん陽性農薬を処置し、48時間培養後に総 RNA を回収し定量的逆転写 PCR 法により細胞増殖関連遺伝子の mRNA 発現レベルを解析した。網掛けは、陽性判定基準（1.5 倍）を上回る発現誘導が認められたことを示す。

6.5. HESS 収載化合物を用いた核内受容体活性化評価

当研究室で所有し、当研究室における予備調査により、ラット初代肝細胞に対して明らかな毒性を示さない有害性評価支援システム統合プラットフォーム (HESS) 収載化合物 177 種を対象として、核内受容体活性化プロファイルの解析を行った。ラット初代肝細胞に各化合物を処置し、CAR および PPAR α の標的遺伝子発現を指標として受容体活性化を評価した。Fig. 4 に示すように HESS 収載化合物の約半数において CAR 標的遺伝子 *Cyp2b1* の有意な誘導が認められ、CAR 活性化作用を有する化合物が多数抽出された。また、PPAR α 標的遺伝子 *Cyp4a1* の誘導を示す化合物も複数確認された。この中でも、CAR 活性化作用の強力であった上位 10 種をラットに腹腔内投与し、24 時間後の肝における標的遺伝子 mRNA レベルの増加によって、*in vivo* における CAR (あるいは PPAR α) 活性化作用を調べた。その結果 6 種の化合物において、明らかな *Cyp2b1* mRNA の増加が認められたため、これらを *in vivo* における CAR 活性化物質とした (Fig. 5)。

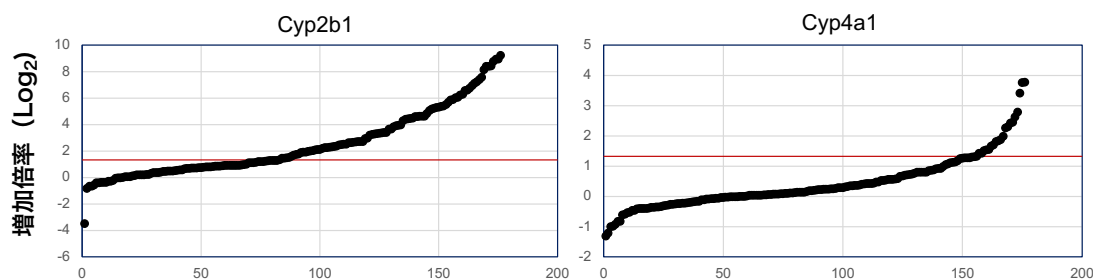


Fig. 4. ラット初代肝細胞を用いた CAR および PPAR α 標的遺伝子の mRNA レベルの測定

ラット初代肝細胞を播種し、48 時間後に総 RNA を回収し多項目同時解析法により *Cyp2b1* および *Cyp4a1* の mRNA 発現レベルを解析した。赤線は、陽性判定基準とした 2.5 倍の誘導倍率を示す。

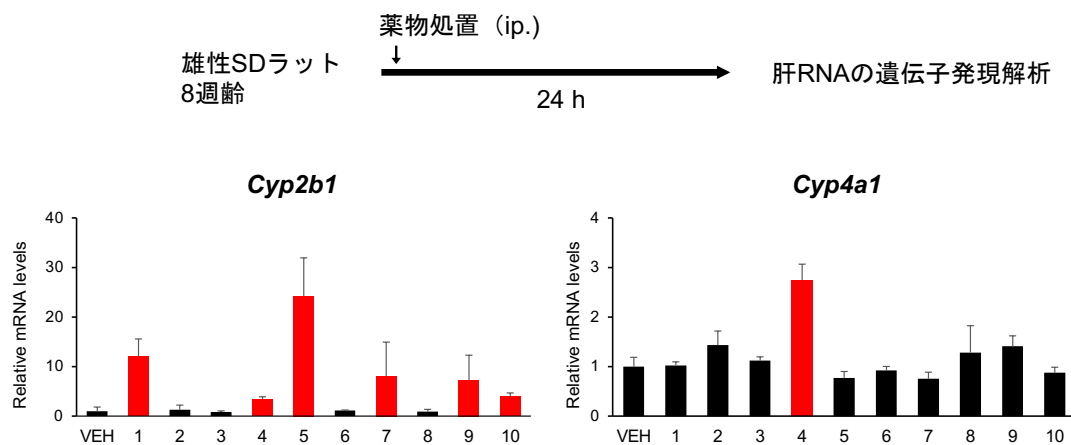


Fig. 5. ラット個体を用いた CAR および PPAR α 標的遺伝子の mRNA レベルの測定

雄性 SD ラットに被験物質を投与し、24 時間後に肝組織から総 RNA を回収した。定量的逆転写 PCR 法により細胞増殖関連遺伝子の mRNA 発現レベルを解析した。有意な発現増加が認められたものを赤色で示す。化合物番号は、5.7.解析に使用した被験物質に対応する。

6.6. PCLS を用いた核内受容体活性化作用を有する HESS 化合物の評価

ラット初代肝細胞および個体を用いた核内受容体活性化評価により CAR 活性化陽性と判定された化合物を対象として、PCLS 評価系における肝細胞増殖応答の検証を行った。最適化した培養条件（O₂分圧 80%、シーソー振盪、サプリメント含有 Williams' E 培地）下でラット PCLS を培養し、各化合物を 48 時間処置後に総 RNA を回収した。*Cyp2b1*、*Cyp4a1* および *Ccna2* の mRNA 発現量を定量的逆転写 PCR 法により解析することで各受容体の活性化と肝細胞増殖誘導作用を調べた。

CAR 活性化陽性 HESS 化合物の一部において *Ccna2* の有意な発現増加が認められた。一方、ラット PCLS において核内受容体活性化を示さなかった化合物では、これら遺伝子の明確な誘導は観察されなかった。

以上の結果から、HESS 化合物を対象とした核内受容体活性化スクリーニングと PCLS を用いた *ex vivo* 増殖評価を組み合わせることで、非遺伝毒性肝発がんプロモーション作用を有する候補物質の抽出が可能であることが示唆された。

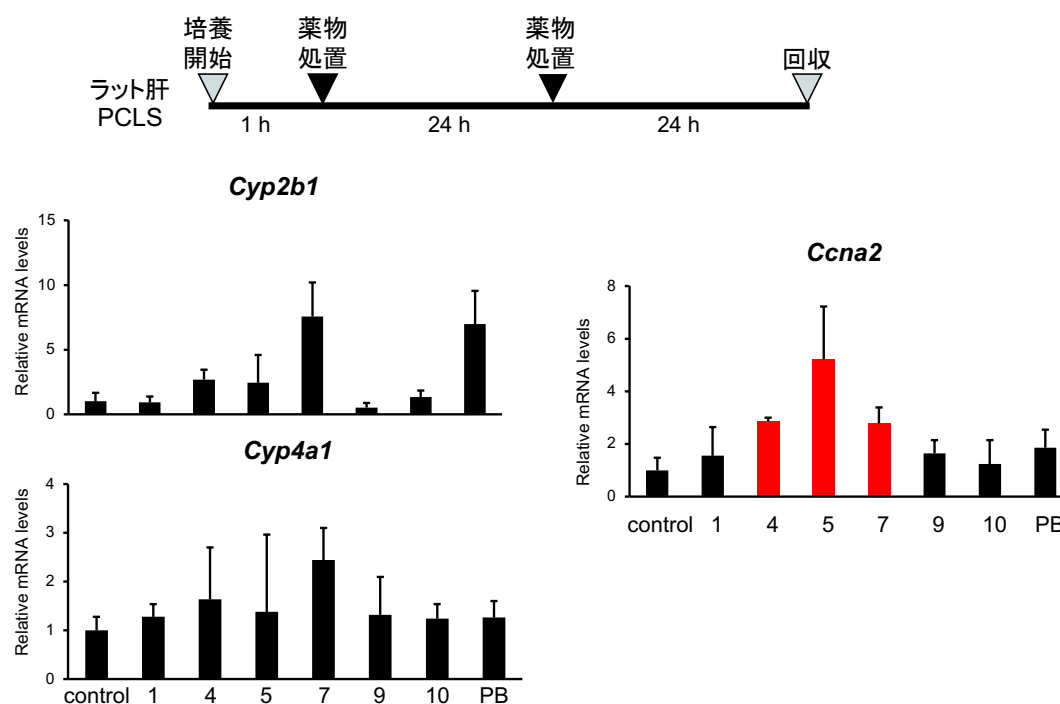


Fig. 6. PCLS を用いた細胞増殖関連遺伝子 mRNA レベルの測定

ラット PCLS に、ラット初代肝細胞およびラット個体を用いた核内受容体活性化評価により CAR 活性化陽性と判定された化合物を処置し、48 時間培養後に総 RNA を回収した。定量的逆転写 PCR 法により細胞増殖関連遺伝子の mRNA 発現レベルを解析した。*Ccna2* において明らかな発現誘導が認められた 3 種の化合物を赤色で示す。化合物番号は、5.7.解析に使用した被験物質に対応する。

6.7. ラット個体を用いた肝がんプロモーション作用の検証

PCLS 評価系において細胞増殖関連遺伝子 *Ccna2* の明確な誘導が認められた被験物質について、肝がんプロモーション作用の初期イベントである肝細胞増殖の発現が見られるか否かを *in vivo* で検証した。雄性 SD ラットに被験物質を 24 時間間隔で 3 回投与し、最終投与 24 時間後に肝組織を摘出した。肝から総 RNA を抽出し、細胞増殖関連遺伝子 *Ccna2* の mRNA 発現量より肝細胞増殖を解析した。

その結果、PCLS において増殖関連遺伝子の誘導が認められた化合物は全て、ラット肝においても明らかな肝細胞増殖の誘導が確認された (Fig. 7)。

これらの結果から、PCLS で観察された核内受容体活性化依存的な肝細胞増殖応答は、ラット個体においても再現されることが示され、本評価系の *in vivo* 予測妥当性が支持された。

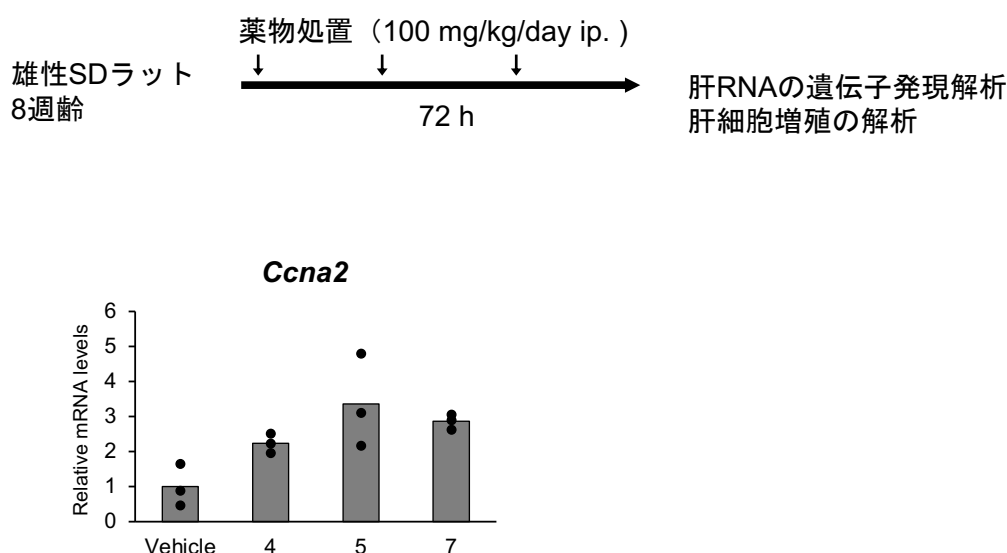


Fig. 7. ラット個体を用いた肝細胞増殖の検証

8 週齢雄性 SD ラットに被験物質 (100 mg/kg/day, i.p.) を 24 時間間隔で 3 回投与し、最終投与 24 時間後 (計 72 時間) に肝組織を回収した。肝 RNA の定量的逆転写 PCR 法による細胞増殖関連遺伝子 *Ccna2* の mRNA 発現量を示す。化合物番号は、5.7.解析に使用した被験物質に対応する。

7. 成果のまとめと今後の展望

本研究では、非遺伝毒性肝発がんプロモーション作用に着目し、核内受容体活性化に基づく機構論的評価体系の構築を行った。生体内肝細胞増殖を *ex vivo* で再現可能な PCLS 評価系を確立した。培養時の高酸素分圧条件、シーソー振盪、培地組成の最適化により、核内受容体活性化依存的な酵素誘導および細胞増殖関連遺伝子の発現増加を安定的に検出可能とした。

さらに、食品安全委員会農薬評価書に基づき選定したラット肝がん陽性農薬 32 種および陰性農薬 3 種を用いた検証により、本 PCLS 評価系が肝がん陽性物質を一定の精度で識別可能であることを示した。また、HESS 収載化合物を対象とした核内受容体活性化スクリーニングと PCLS 評価を組み合わせることで、肝がんプロモーション作用を有する候補物質の抽出が可能であることを示した。

加えて、PCLS で増殖関連遺伝子誘導が確認された化合物についてラット個体での反復投与検証を行い、*in vivo* においても肝細胞増殖応答が再現されることを確認した。これにより、本評価体系の生体内予測妥当性が支持された。

以上本研究では、核内受容体活性化に基づく機構論的評価と PCLS を用いた *ex vivo* 増殖評価を統合することで、非遺伝毒性肝発がんプロモーション作用を短期間で予測可能な評価体系を構築した。本成果は、長期 2 年間発がん性試験に依存してきた従来の評価枠組みに対し、機構論的エビデンスを補完的に提供し得るものである。本評価系を化審法審査における補完的判断材料として位置付けることで、長期発がん性試験の効率化および審査迅速化への貢献が期待される。これにより、企業における安全性評価の高度化と開発期間短縮を両立させ、我が国の化学産業の国際競争力強化に資する基盤技術となる可能性がある。また、本研究は 3Rs の推進と規制科学の高度化を両立するものであり、動物使用数削減と科学的妥当性の確保を同時に実現する評価体系として、今後の化学物質管理政策における基盤技術となることを目指す。

今後は、まず化合物を用いた検証を拡充し、感度・特異度を定量化することで、本評価系の識別性能を客観的に明確化する。さらに、本 PCLS を用いた分子機序解析により、CAR 活性化から肝細胞増殖、腫瘍形成に至る分子機構を AOP として体系化し、OECD AOP フレームワークとの整合を図ることで、機構論的評価手法としての国際的受容性を高めることが期待される。