

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課題点

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)

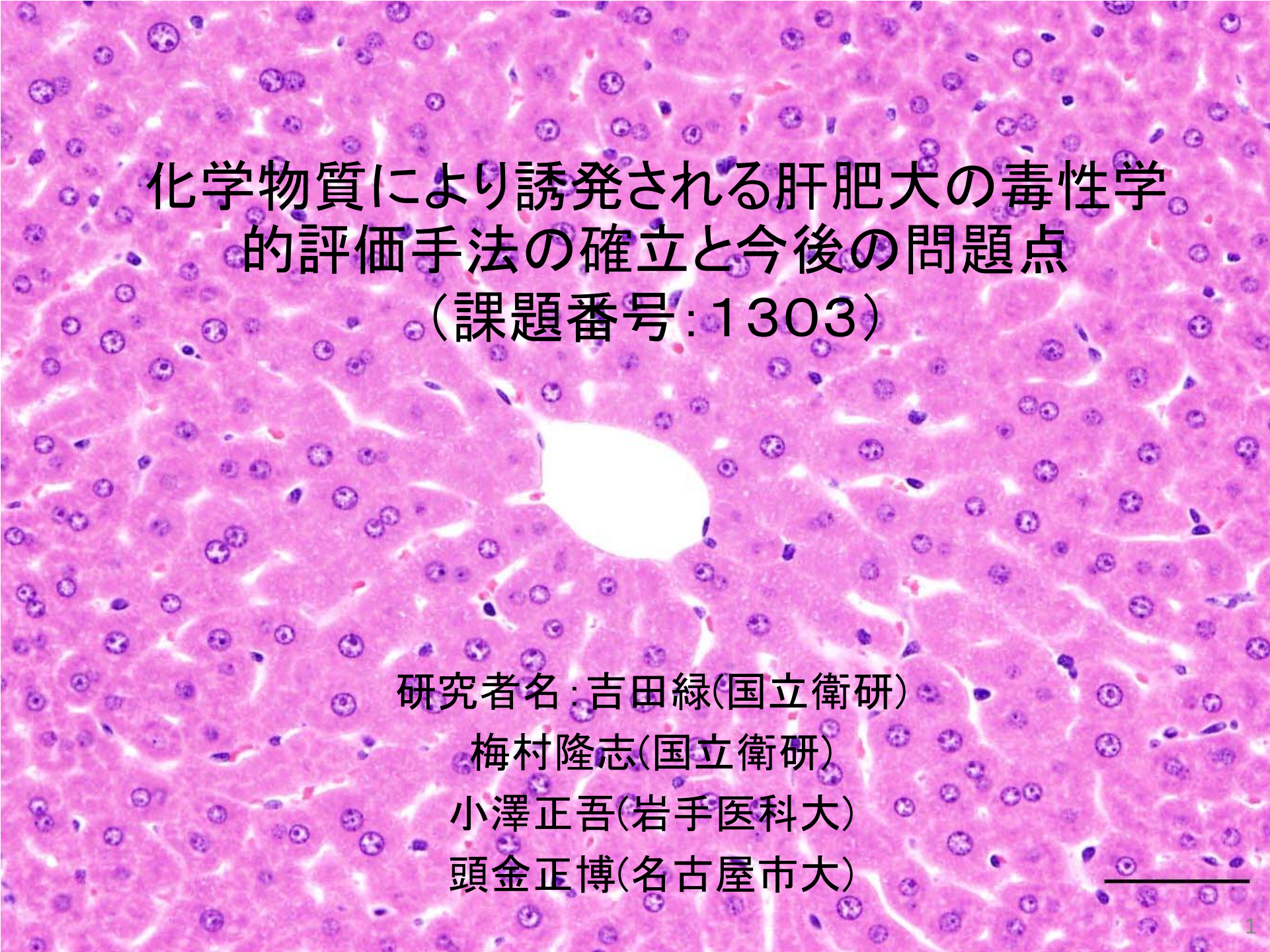
<研究成果概要>

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) 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

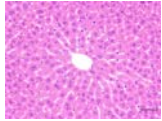
肝肥大評価上の
問題点の提起

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^{1*}、梅村隆志¹、小島弘幸²、井上薫¹、高橋美和¹、浦丸直人³、北村繁幸³、
安部賀央里⁴ 頭金正博⁴、小澤正吾⁵、吉成浩一⁶

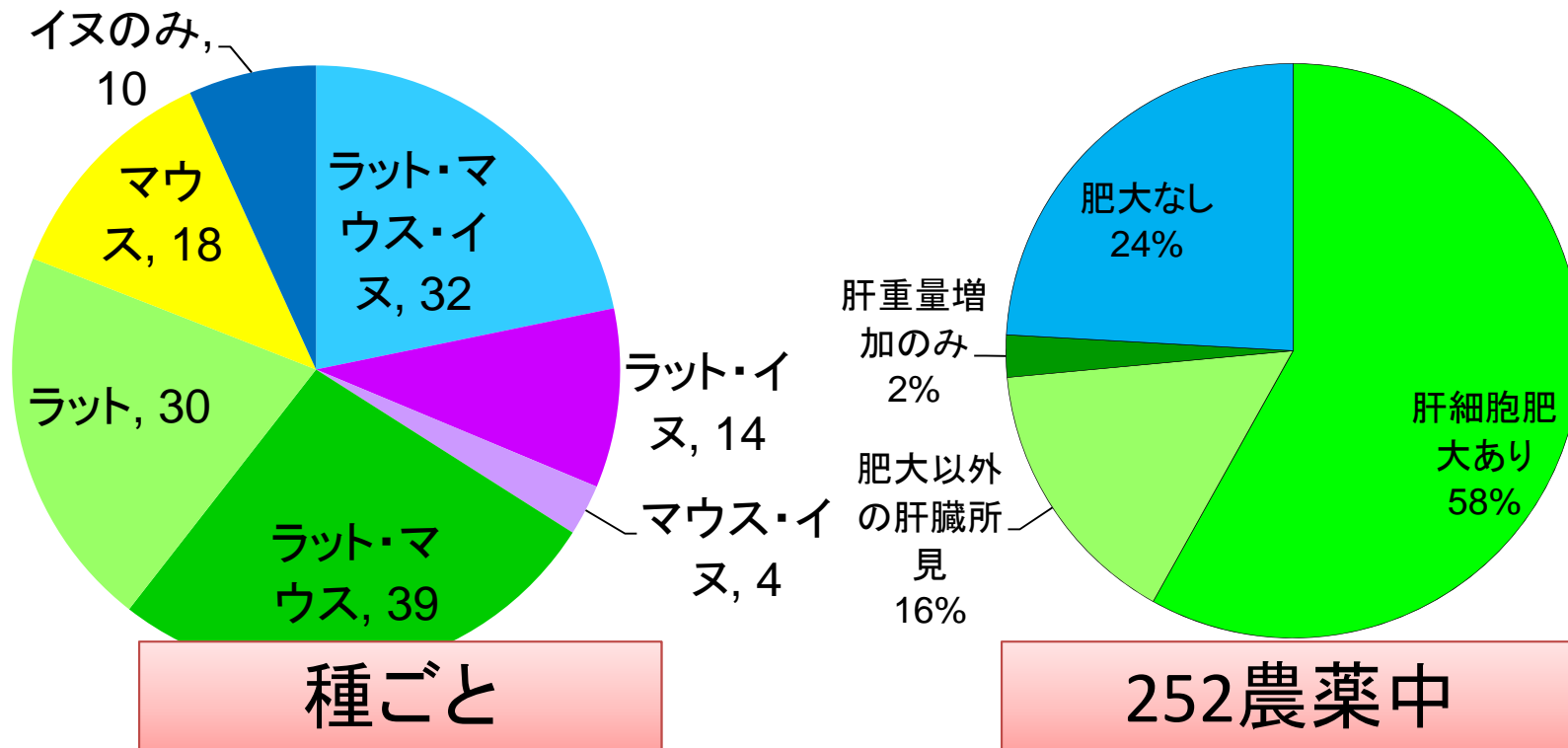
Basic principles on interpretation of hepatocellular hypertrophy in risk assessment in Japan

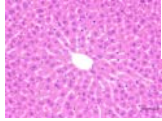
Midori YOSHIDA^{1*}, Takashi UMEMURA¹, Hiroyuki KOJIMA², Kaoru
INOUE¹, Miwa TAKAHASHI¹, Naoto URAMARU³, Shigeyuki KITAMURA³,
Kaori ABE⁴, Masahiro TOHKIN⁴, Shogo OZAWA⁵, Koichi YOSHINARI⁶

背景

肝肥大

毒性試験で最も多く観察される誘発所見



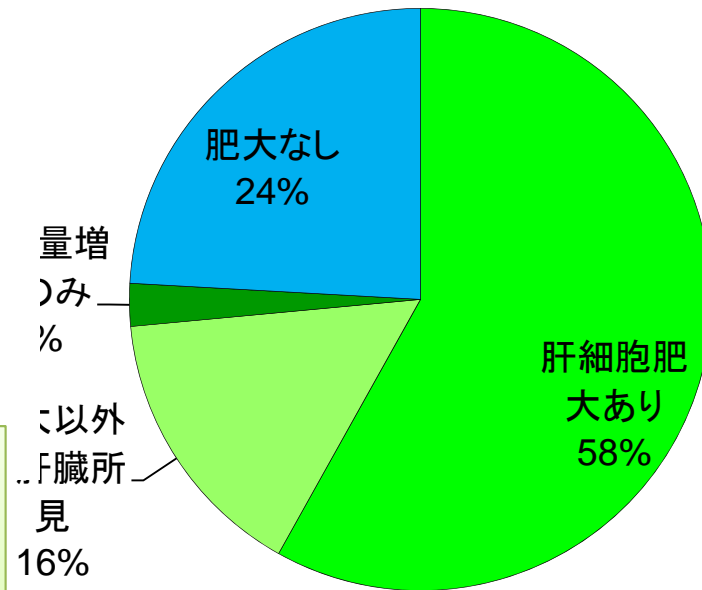
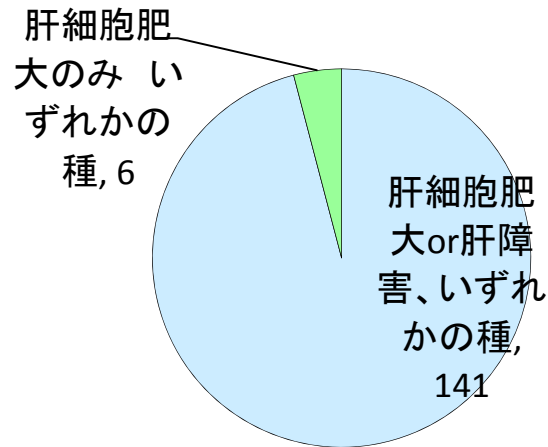


背景



肝肥大

毒性試験で最も多く観察される誘発所見

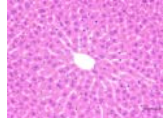


大部分の農薬で**いずれかの動物種に肝細胞肥大以外の所見**が肝臓にあり。

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

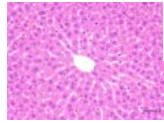
- 肝肥大
毒性試験で最も多く観察される誘発所見
- 肝肥大の考え方に関する国際的動向
肝傷害指標の異常がない限り、肝細胞肥大は適応性変化と考えるべき
By JMPR, 欧州・米国毒性病理学会, PMDA



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

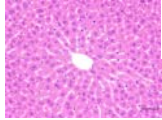
肝肥大とは、外的因子応答により肝細胞の機能が亢進した結果、

- 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

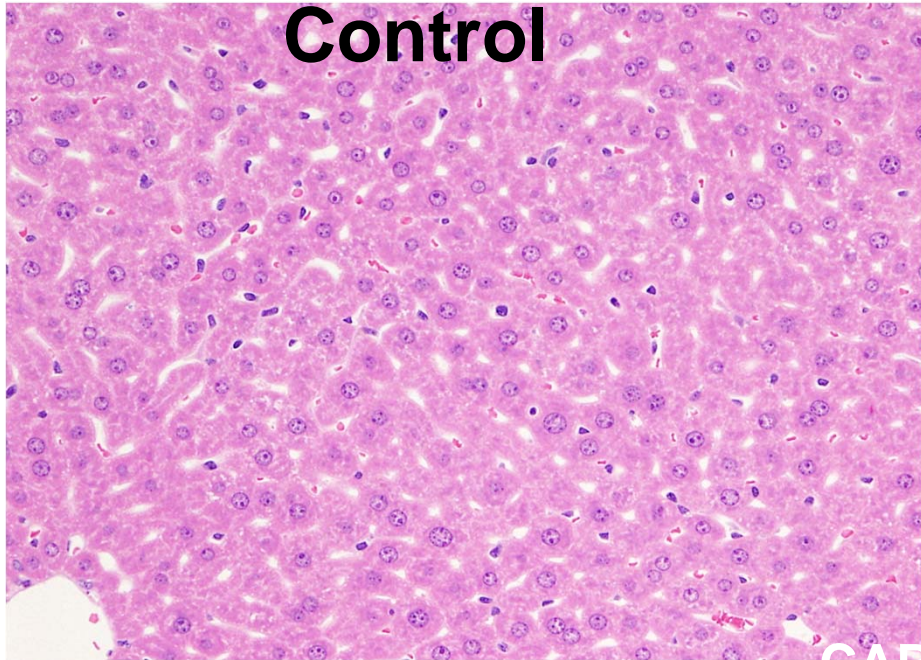
機能亢進性小胞体増生 hyperactive hypertrophic endoplasmic reticulum

-森道夫 毒性病理組織学総論-

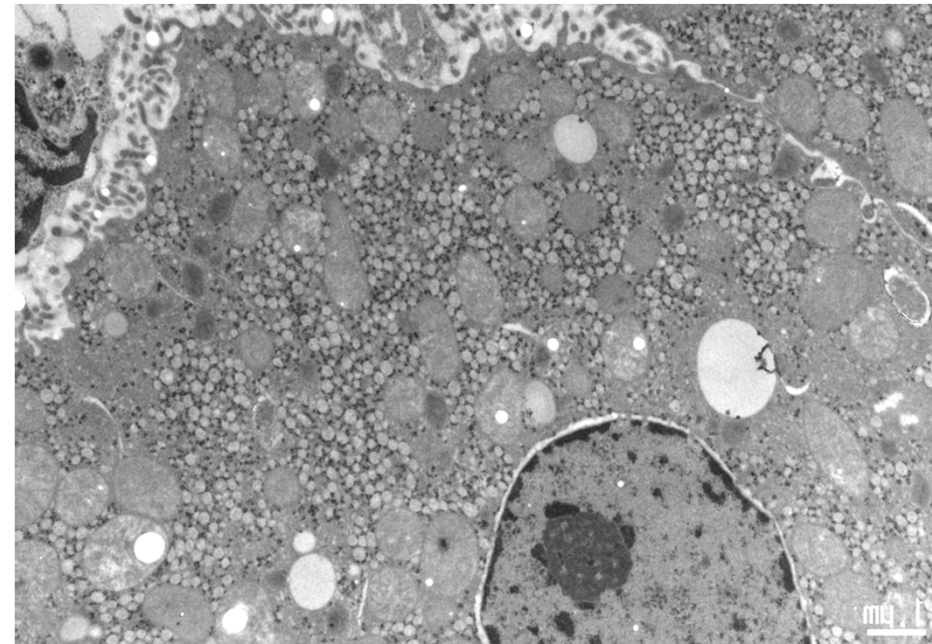
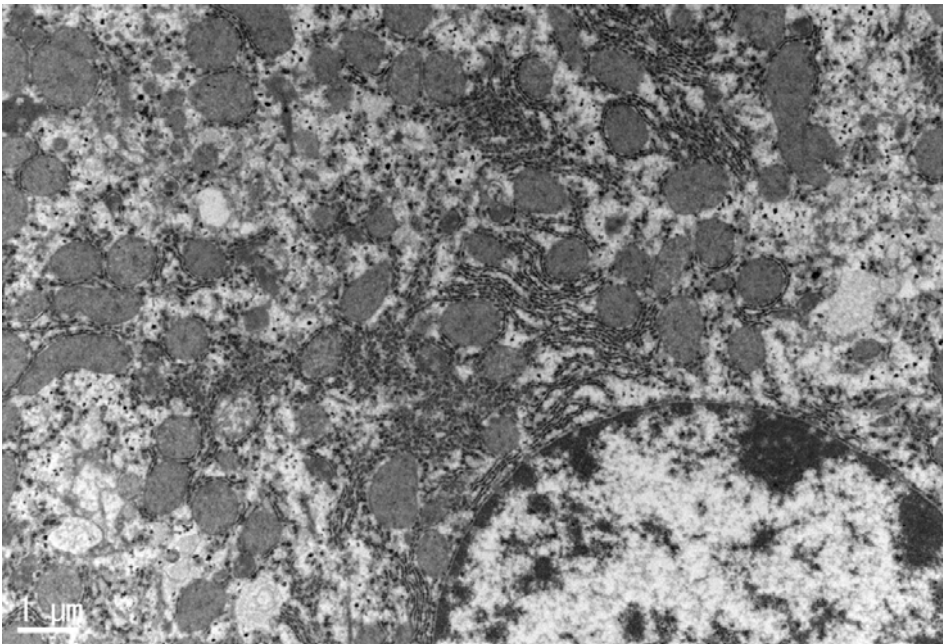
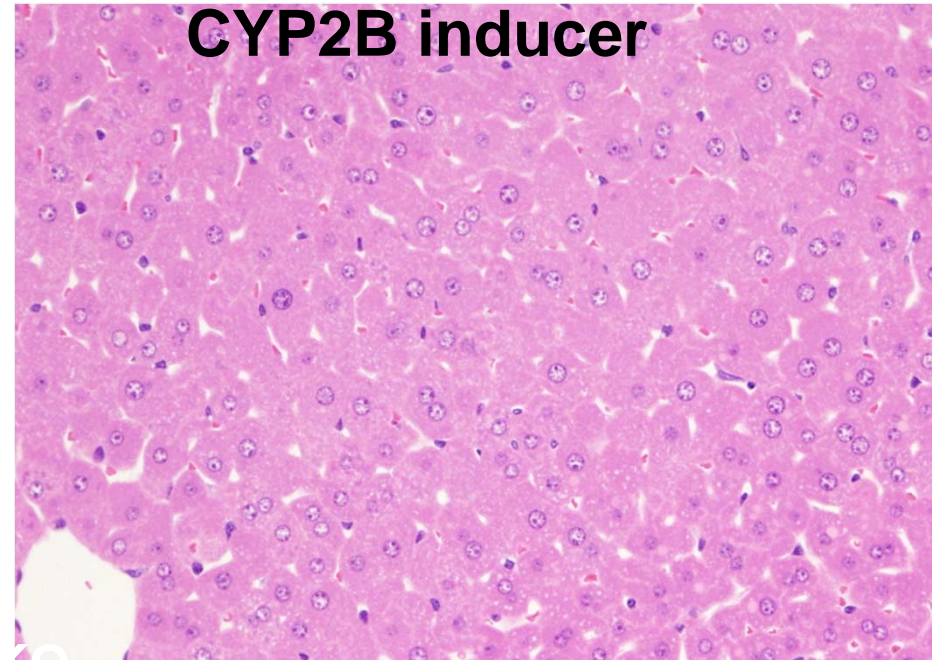


水腫性変性、脂肪化やグリコーゲン蓄積、ミトコンドリア過形成、小胞体変性の肝細胞大型化とは区別

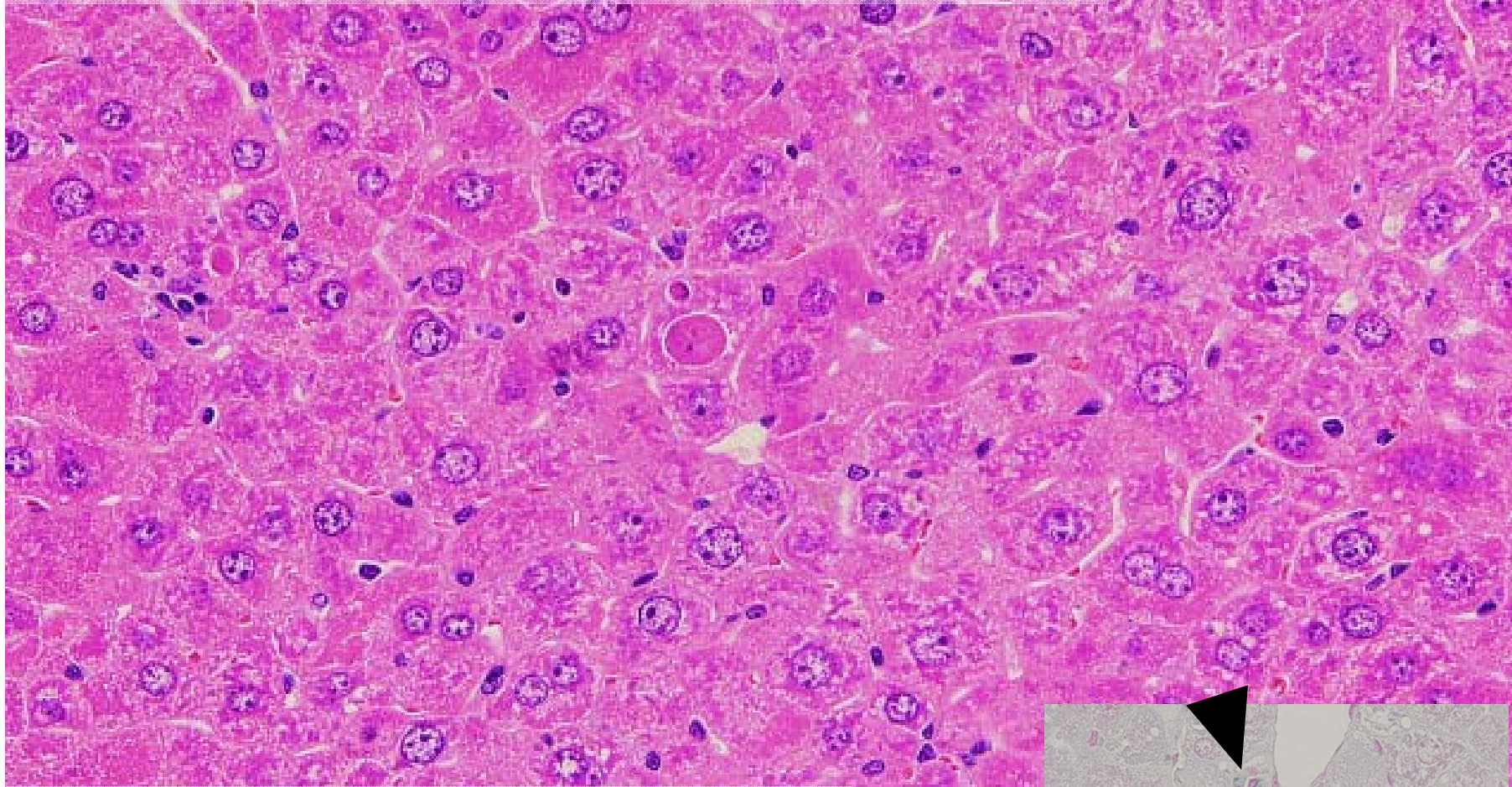
Control



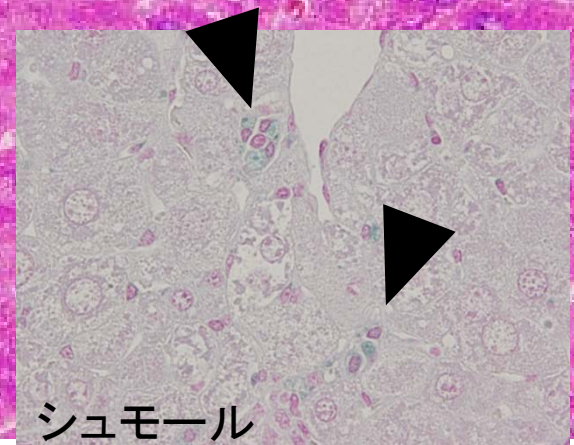
CYP2B inducer



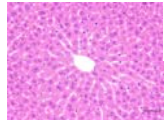
Protox阻害剤 マウス4週間混餌投与



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)

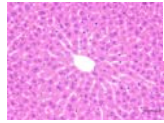


シュモール



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 α)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

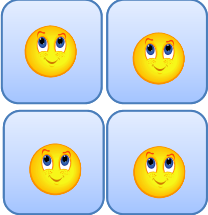
形態学的・薬物代謝酵素誘導における
定義から、生体の恒常性が維持されて
いる限りにおいて肝細胞肥大は適応性
変化と考えるのが妥当である

Chemical

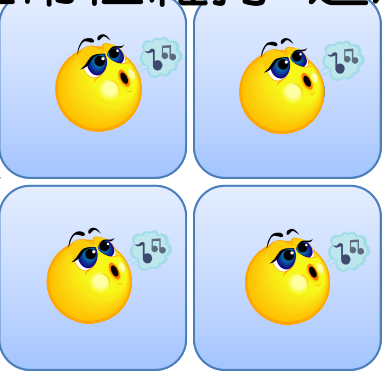


恒常性の破たん

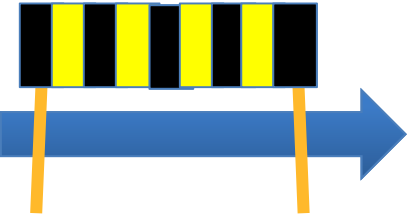
正常細胞



恒常性維持=適応



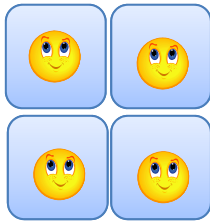
恒常性維持



Chemical

恒常性の破たん

正常細胞

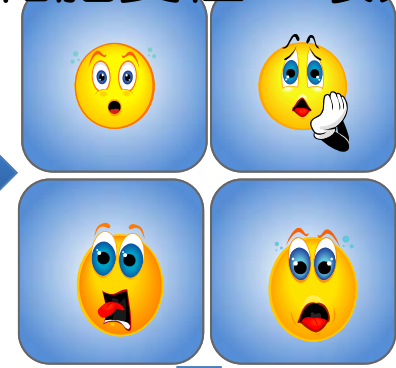


恒常性維持=適応



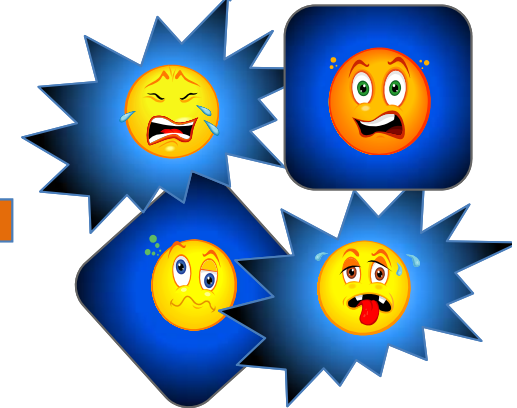
恒常性破綻

細胞変性・壊死

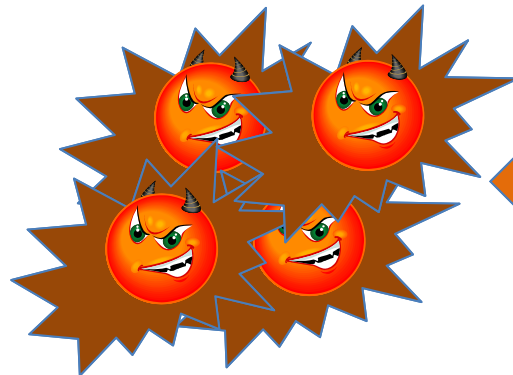


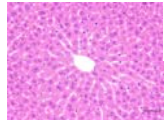
恒常性の破綻=毒性の入り口

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

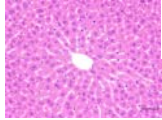
肝肥大 + 肝細胞壊死/炎症性反応

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

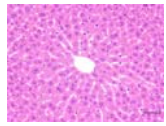
絶対および相対重量増加

- 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)

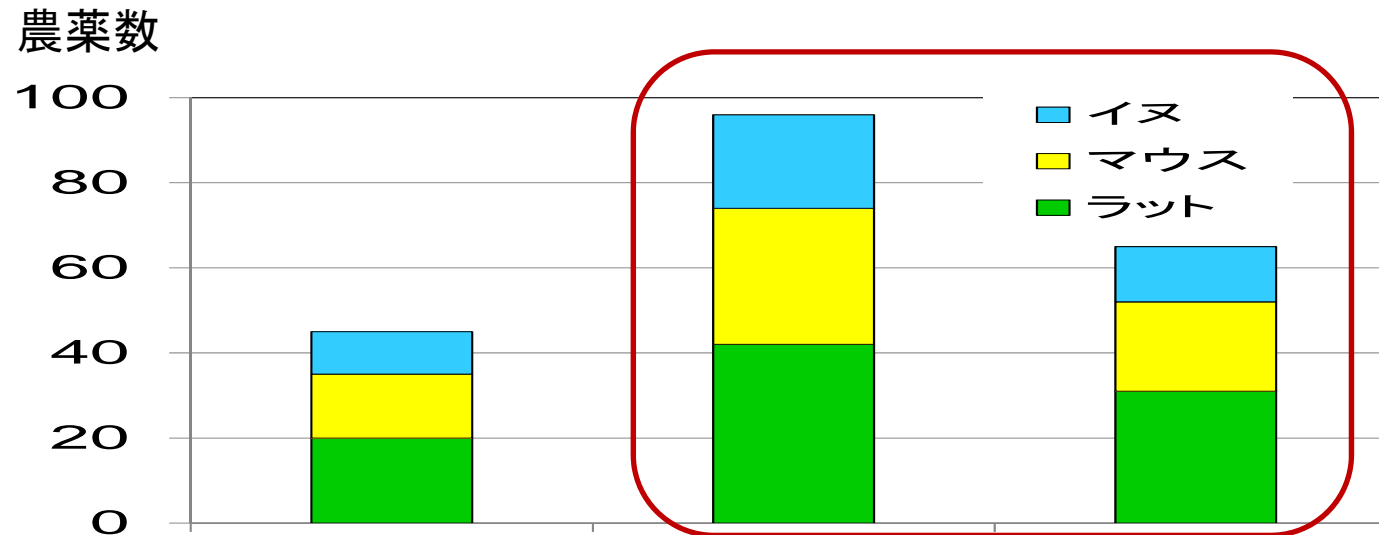
重量のみの変化であれば毒性とするのは難しい



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

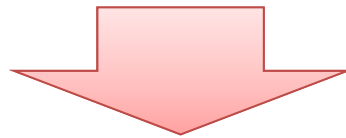
肝肥大が肝障害より高用量で発現

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

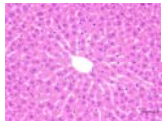


血液生化学的検査/形態学的検索
肝障害指標を伴わない → 毒性とせず

- ❖ 甲状腺の変化を伴う場合の肝肥大



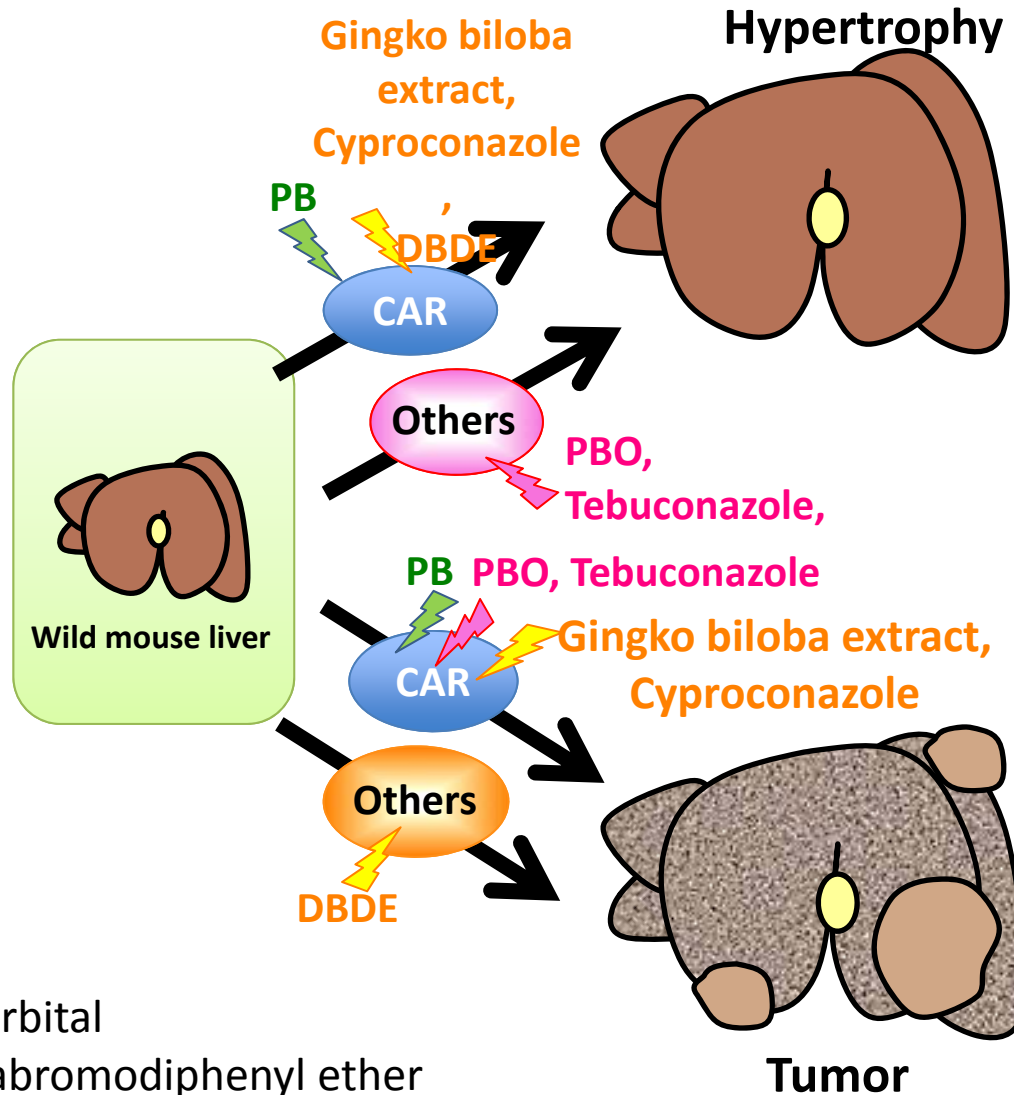
全身のホメオスターシスの異常 = 毒性
In hazard identification



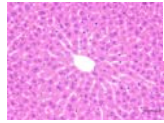
肝肥大は肝腫瘍の初期変化?

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 α), 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