

研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	肝臓キメラマウスを用いたヒト型代謝プロファイルの外挿によるリスク評価 手法の開発（課題番号：1103）（研究期間：平成23年度～平成25年度）
主任研究者名	研究者名：末水 洋志 所属機関：公益財団法人実験動物中央研究所 実験動物研究部

薬物代謝酵素の特性がヒトとげっ歯類では大きく異なることから、マウスやラットなどの実験動物を利用してリスク評価を行う場合、ヒトではその有害物質がどのように代謝されるかを考慮することが重要である。このような問題を克服するため、本研究ではヒトと同等の薬物代謝能を持つヒト肝臓キメラマウスを用いて有害物質の毒性評価を行い、新たなリスク評価手法の確立を目指した。

雄性TK-NOGマウスの腹腔内にガンシクロビル（GCV）を投与し肝傷害を誘導した。GCV投与一週間後、肝傷害の程度を血清アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）活性で評価し、凍結ヒト肝細胞（ 1.0×10^6 細胞）を肝臓内に移植した。肝細胞移植の成否は血中ヒトアルブミンの上昇により確認した。このように作製したヒト肝臓TK-NOGマウスを用いて、2種類の有機リン農薬（アセフェート及びクロルピリホス）と肥育ホルモン剤（酢酸メレンゲステロール）について薬物動態解析と毒性評価を行った。

ヒト肝臓TK-NOGマウス及び対照マウスへのアセフェート経口投与（300 mg/kg）試験では、親化合物、代謝物メタミドホスのいずれの血漿中濃度にも差は認められなかった。一方、クロルピリホス（30 mg/kg）経口投与試験では、0.5及び2時間後の親化合物、主要代謝物trichloropyridinol（TCPy）の血漿中濃度がヒト肝臓TK-NOGマウスにおいて有意に上昇していた。しかし、クロルピリホスオクソン体はいずれのマウスからも検出されなかった。ヒト肝臓TK-NOGマウスを用いた酢酸メレンゲステロールの薬物動態試験の結果から、ヒトにおける酢酸メレンゲステロールの消失は、げっ歯類に比べ緩徐であると推定された。また、本研究において、マウスには存在量が少なく、ヒト肝臓TK-NOGマウスではヒトと同レベルに存在する生化学マーカーを見出し、有機リン農薬の投与によりその生化学マーカーが変動することを明らかにした。

ヒト肝臓TK-NOGマウスと対照マウス間で有意差が認められないアセフェートでは、一般的な安全係数により十分な「種差の考慮」を行えるが、酢酸メレンゲステロールやクロルピリホスのように血漿中濃度に有意な差が現れる化合物については慎重な「種差の考慮」が必要と思われた。ヒト肝臓TK-NOGマウスを用いることにより、安全係数による「種差の考慮」の妥当性を加味したリスク評価が可能となった。また、本研究ではヒト肝臓TK-NOGマウスにおける「種差」を利用し、薬物代謝研究以外にも用途を拡げること成功した。ヒト肝臓TK-NOGマウスの血液中に産生分泌される生化学マーカーの量はヒト標準量に匹敵し、その作用が有機リン農薬の摂取によって変動することを本研究で初めて明らかにした。これは経口摂取した有機リン農薬が血中に移行し、そこでヒト肝臓由来マーカータンパク質と直接作用する「ヒトを外挿した毒性モデル」と位置づけられ、現在、有機リン農薬

による中毒作用と本マーカートンパク質変動の関連を調べており、新たなリスク評価手法として確立を目指している。

本研究結果により、ヒト肝臓TK-NOGマウスが日本の食品や医薬品の安全性評価に有用な基盤実験動物モデルであることが明らかとなり、今後、広く利用される可能性が示された。

研究成果報告書（本体）

研究課題名	肝臓キメラマウスを用いたヒト型代謝プロファイルの外挿によるリスク評価手法の開発（研究期間：平成23年度～平成25年度）
主任研究者名	所属：公益財団法人実験動物中央研究所 実験動物研究部 氏名：末水 洋志（研究課題番号：1103）

I 研究の期間及び研究目標等

1 研究期間

平成23年度～平成25年度（3年間）

2 研究目的

ハザード物質は主として肝臓にある薬物代謝酵素群で処理され、解毒、また、ある場合には更に毒性が強化される。ハザード物質がヒト体内でどのように代謝されるかを正確に把握することは、ヒトへの健康影響を適確に推定する、すなわち、リスク評価の確度を高めるために極めて重要である。“くすり”の開発では、代謝酵素群の特性がヒトとは異なる動物を用いて安全性評価が行われたため、臨床試験の段階まで「ヒトでは想定外の毒性代謝物が生成される」ことに気が付かなかったことが知られる。「食」に残留するおそれのある化学物質の毒性評価も薬物代謝酵素群の特性がヒトとは異なる動物種で行われるため、このような事態が発生する危険性がある。薬物は代謝酵素だけでなく、排泄のための修飾（抱合酵素等）や輸送に関わるタンパク、これらの酵素を誘導するタンパク等が関与する複雑なシステムで処理されるが、その特性は、げっ歯類とヒトで大きく異なる。近年、薬物代謝酵素遺伝子が導入された遺伝子改変モデル動物が開発され、特定のハザード物質の毒性をより感度良く検出できるようになり、ハザード物質の定性的毒性評価への応用が期待されている。しかし、特定のハザード物質に対する高感受性がヒトの外挿として適当か、試験結果を過大評価しないか等の懸念が残る。これに対しキメラマウスの肝臓は代謝・排泄能もヒト型であり「ヒト肝臓」として機能している。薬物代謝機能がよりヒトに近いヒト型肝臓キメラマウスを用いることにより、ハザード物質自体の毒性評価が行えるだけでなく、従来の実験動物（マウスやラット）では得ることができなかったヒトに特有な代謝物（ヒト型代謝物）についても毒性評価が可能となる。本研究では1）薬物代謝機能がよりヒトに近いヒト型肝臓キメラマウスを用いた ハザード物質の毒性試験の実施、2）ヒト型代謝プロファイルを作成、3）従来のマウスの結果との比較によるヒトへの外挿性評価を行う。ヒト型肝臓キメラマウスと従来のマウスにおける毒性試験の結果から、ヒトにおける無作用量、無毒性量、あるいは最低毒性発現量を推定し、「種差」という不確定性要素による影響を低減したリスク評価手法の確立を目指す。

3 研究体制 (※研究項目ごと個別課題ごとに研究担当者及び所属機関名を記入すること。)

研究項目名	個別課題名	研究担当者名 (所属機関名)
1 : ヒト型肝臓キメラマウスを用いた毒性試験	ア : ヒト型肝臓キメラマウスを用いたアセフェートの毒性試験 イ : ヒト型肝臓キメラマウスを用いた酢酸メレンゲステロールの毒性試験	末水洋志 (実中研) 末水洋志 (実中研)
2 : ヒト型代謝物の測定及び分析	ウ : アセフェートのヒト型代謝物の測定及び分析 エ : 酢酸メレンゲステロールのヒト型代謝物の測定及び分析	山崎浩史 (昭和薬科大) 山崎浩史 (昭和薬科大)
3 : 病理学的解析による毒性評価	オ : アセフェートによる毒性の病理学的解析 カ : 酢酸メレンゲステロールによる毒性の病理学的解析	中村雅登 (東海大) 中村雅登 (東海大)

4 倫理面への配慮について

研究計画は研究機関のそれぞれの委員会 (研究倫理審査委員会、動物委員会、遺伝子組換え実験安全委員会等) による審査、承認を得た後、安全かつ適切な措置のもと実験を遂行する。キメラマウス作製に使用するヒト肝臓細胞は、一般市場から購入可能な欧米人由来の細胞で患者個人情報に結びつくものは無く、個人の人權、利益に支障を及ぼさない手続きがなされている。また、本研究では、すでに研究協力体制が構築されており、互いの研究倫理審査委員会における相互承認を取得している機関 (独立行政法人国立成育医療研究センター) から提供された日本人肝臓細胞を用いて作製した「ヒト肝キメラマウス」を毒性試験に利用することもある。使用するヒト生体材料はすべて、事前検査により HIV, HBV, HCV 等が陰性であることが確認されているが、標準感染予防策に準じた取り扱いを行う。また、これらの細胞により作製したヒト肝キメラマウスの取り扱いも標準感染予防策に準じ扱う。

II 研究内容及び成果等

1 研究内容及び方法

(1) 研究項目名 1 : ヒト型肝臓キメラマウスを用いた毒性試験

1) 個別課題名ア : ヒト型肝臓キメラマウスを用いたアセフェートの毒性試験
(研究担当者名 : 末水洋志 所属機関名 : 実中研)

- 有機リン系農薬メタミドホスの親化合物アセフェートの毒性について、ヒト型肝臓を有するキメラマウスで解析する。そのために、肝傷

害マウスの肝臓をヒト肝臓細胞で再構築したヒト型肝臓キメラマウスを作製し、アセフェートの毒性試験を実施する。

- 2) 個別課題名イ：ヒト型肝臓キメラマウスを用いた酢酸メレンゲステロールの毒性試験（研究担当者名：末水洋志 所属機関名：実中研）

- 家畜の肥育ホルモン剤酢酸メレンゲステロールの毒性について、ヒト型肝臓を有するキメラマウスで解析する。そのために、肝傷害マウスの肝臓をヒト肝臓細胞で再構築したヒト型肝臓キメラマウスを作製し、酢酸メレンゲステロールの毒性試験を実施する。

(2) 研究項目名2：ヒト型代謝物の測定及び分析

- 1) 個別課題名ウ：アセフェートのヒト型代謝物の測定及び分析（研究担当者名：山崎浩史 所属機関名：昭和薬科大）

- ヒト型肝臓を有するキメラマウスを用いて有機リン系農薬メタミドホスの親化合物アセフェートの毒性試験を実施し、病理学的解析結果から無作用量、無毒性量、あるいは最低毒性発現量を得ると同時に、用量・作用関係から定量的代謝物プロファイルを作成する。そのために、主任研究者が実施する「個別課題名ア：ヒト型肝臓キメラマウスを用いたアセフェートの毒性試験」で得た検体についてアセフェートおよびその主要代謝物の分析・評価を実施する。

- 2) 個別課題名エ：酢酸メレンゲステロールのヒト型代謝物の測定及び分析（研究担当者名：山崎浩史 所属機関名：昭和薬科大）

- ヒト型肝臓を有するキメラマウスを用いてヒトとマウスで代謝が異なる家畜の肥育ホルモン剤酢酸メレンゲステロールの毒性試験を実施し、病理学的解析結果から無作用量、無毒性量、あるいは最低毒性発現量を得ると同時に、用量・作用関係から定量的代謝物プロファイルを作成する。そのために、主任研究者が実施する「個別課題名イ：ヒト型肝臓キメラマウスを用いた酢酸メレンゲステロールの毒性試験」で得た検体について酢酸メレンゲステロールおよびその主要代謝物の分析・評価を実施する。

(3) 研究項目名3：病理学的解析による毒性評価

- 1) 個別課題名オ：アセフェートによる毒性の病理学的解析（研究担当者名：中村雅登 所属機関名：東海大）

- ヒト型肝臓を有するキメラマウスに対する有機リン系農薬メタミドホスの親化合物アセフェートの毒性について、病理学的に解析する。そのために、主任研究者が実施する「個別課題名ア：ヒト型肝臓キメラマウスを用いたアセフェートの毒性試験」で得た検体について組織、細胞の傷害・毒性を病理学的に解析する

2) 個別課題名カ：酢酸メレンゲステロールによる毒性の病理学的解析（研究担当者名：中村雅登 所属機関名：東海大）

- ヒト型肝臓を有するキメラマウスに対する家畜の肥育ホルモン剤酢酸メレンゲステロールの毒性について、病理学的に解析する。そのために、主任研究者が実施する「個別課題名イ：ヒト型肝臓キメラマウスを用いた酢酸メレンゲステロールの毒性試験」で得た検体について組織、細胞の傷害・毒性を病理学的に解析する。

2 研究成果、考察、今後の課題

(1) 研究項目名1：ヒト型肝臓キメラマウスを用いた毒性試験

1) 個別課題名ア：ヒト型肝臓キメラマウスを用いたアセフェートの毒性試験（研究担当者名：末水洋志 所属機関名：実中研）

ヒト肝キメラマウスを用いた研究を計画的に進めるため、基盤となる2系統の肝傷害マウス、A) *uPA-NOG* マウス, B) *TK-NOG* マウスについて生産システムの構築を行い、生産性、簡便性、計画性などを指標に本試験に適した系統の選抜を行った。

A) *uPA-NOG* マウス

- ・ 自然交配法：ヒト肝キメラマウス（雄性ホモ接合型 *uPA-NOG*）を作製するための繁殖コロニー（雌性ヘテロ接合型 *uPA-NOG* マウスと雄性ホモ接合型 *uPA-NOG* マウス）を構築し、交配により産仔を得た。
- ・ 体外受精/胚移植法：自然交配で作製した雌性ヘテロ接合型 *uPA-NOG* マウスより卵子を採取し、雄性ホモ接合型 *uPA-NOG* マウスの精子と体外受精・胚移植を行い、産仔を得た。

各方法により作製した雄性 *uPA-NOG* マウスについて、生後6～8週齢時に眼底静脈叢から微量採血を行い、血清ALT活性を指標とした肝傷害モニタリングを実施し、肝傷害レベルを比較した（図1）。体外受精/胚移植法では計画的な生産が行える反面、肝細胞移植に必要な肝傷害レベルに達する個体が少なく、ヒト肝細胞の生着性も高くないことがわかった（図2）。一方、自然交配法で作製した個体は体外受精/胚移植法に比し高値を示し（図1）、ヒト肝細胞の生着性も体外受精/胚移植法で作製した個体より高い（図2）ことが判明したが、出産異常、育児放棄、食殺等が多く、計画生産が可能な繁殖コロニーを構築することはできなかった。

B) *TK-NOG* マウス

TK-NOG マウスは雄性不妊であるため、雌性トランスジェニック *TK-NOG* マウスと雄性非トランスジェニックマウスによる繁殖コロニーの構築を行った。計画的な自然交配により産仔を取得し、離乳したマウス（生後約3～4週齢）についてテール先端を採取し、DNA抽出を行いPCR法にて導入遺伝子の検出を行った。選抜されたトランスジェニック *TK-NOG* マウス（生後4, 8週齢）

に核酸類似体ガンシクロビル（GCV）を 6 mg/kg の用量で隔日 2 回、腹腔内に投与した。1 回目のガンシクロビル投与から 7 日後に眼底静脈叢から微量採血を行い、ドライケム自動測定装置により血清 ALT 活性を測定したところ、幼若齢の TK-NOG マウスでは著しく肝傷害が誘導されにくいことがわかった（図 3）。一方、8 週齢 TK-NOG マウスでも GCV 6 mg/kg の 2 回投与では肝細胞移植に使用できる個体が約 4 割しか得られず、半数以上が実験に使用されないことになる。ALT 活性が 200U/L に満たなかった個体に GCV 50 mg/kg を単回追加投与したところ、その内、9 割のマウスで肝傷害が認められ、ヒト肝臓細胞移植のレシピエントマウスとして使用することができた（図 4）。凍結ヒト正常肝細胞を速やかに解凍し、密度勾配遠心法により死細胞を除去し、精製肝細胞として上記方法により肝傷害を誘導した高応答性・応答性 TK-NOG マウスの肝臓に移植した。移植 4 週間後から 4 週毎に血中ヒトアルブミン量(hAlb)を ELISA 法にて測定し、ヒト肝細胞の生着程度を高応答性と応答性群で比較した。肝傷害レベルが高い応答性群の TK-NOG マウスの方がより高い血中ヒトアルブミン値を示した（図 5）。

自然交配法、体外受精/胚移植法のいずれの方法でも高率にヒト肝キメラマウスを作製することが困難な uPA-NOG マウスではなく、計画生産、および、肝傷害誘導の至適条件が決定された TK-NOG マウスを用いてヒト肝キメラマウスを作製し、個別課題名ア（ヒト型肝臓キメラマウスを用いたアセフェートの毒性試験）を実施した。

農薬評価書に記載されたアセフェートのマウス経口投与による LD₅₀値（雄性 ICR マウスでは概ね 300 mg/kg 以上）を参考に、ヒト肝キメラマウスが超免疫不全マウスであること、マウスとは異なる代謝能を持つことを考慮し、報告されている LD₅₀値の半量（150 mg/kg）を高用量、その 1/6 量の 25 mg/kg を低用量として設定した。高用量の投与では体重 10 g あたり 0.1 ml の 15 mg/ml アセフェート水溶液をディスポーザブル経口ゾンデにてヒト肝キメラマウスと対照マウスに経口単回投与を行った。投与から 0.5, 1, 2, 4, 7 時間後に眼底静脈叢から血液採取を行い、遠心分離により血漿を調製した。150 mg/kg アセフェート投与から 24 時間以内に致死性は現れなかったことから、300 mg/kg に用量を増やし、観察期間を 14 日に延長した。300 mg/kg 投与では体重 10 g あたり 0.1 ml の 30 mg/ml アセフェート水溶液をディスポーザブル経口ゾンデにてヒト肝キメラマウスと対照マウスに経口単回投与を行った。アセフェート投与から 0.5, 1, 2, 4, 7 時間後に眼底静脈叢から血液採取を行い、遠心分離により血漿を調製した。これら生体試料を用いてアセフェートのヒト型代謝物の測定及び分析を実施した。また、投与試験実施個体の主要臓器を摘出し、アセフェートによる毒性の病理学的解析を実施した。

本研究課題である「ヒト型代謝プロファイル」に加え、肝臓キメラマウスの新たな利点（ヒトを外挿できる点）を見いだすことに成功した。ヒト肝キメラマウスの血中にはヒト肝臓が産生する（ブチル）コリンエステラーゼ（血清コリンエステラーゼ）が豊富に存在し、そのレベル（酵素活性量）は、ほぼヒト

と同等であり、ヒト肝細胞による置換率と相関することを明らかにした。血清コリンエステラーゼ活性を富士ドライケム自動測定装置にて測定したところ、対照マウス血液中の本酵素活性は平均 28 U/L であり、富士ドライケムによる測定範囲 (5~400U/L) の下限近傍での評価となることがわかった。一方、キメラマウスの血清コリンエステラーゼ活性は有意に高く、血中ヒトアルブミン濃度と相関していた。ヒトアルブミン濃度が 1 mg/mL の個体でも血清コリンエステラーゼ活性が 150U/L 前後であることから、ヒトアルブミン濃度が 1 mg/mL に達した低~中置換率のヒト肝キメラマウスでも十分、有機リン農薬による血清コリンエステラーゼ活性阻害試験が行えることがわかった。

初めに有機リン系農薬のコリンエステラーゼ活性阻害効果をヒト肝キメラマウスを用いた動物実験モデルとして外挿可能か検証を行った。致死性が認められなかった用量 (300 mg/kg) のアセフェートを経口投与し、0.25, 0.5, 1, 7, 24, 48 時間後に採血を行い、血清コリンエステラーゼ活性を測定した。その結果、投与 15 分後には血清コリンエステラーゼ活性の低下が認められ、7 時間後には完全に酵素活性が消失することが明らかとなった。投与 24 時間後には酵素活性の上昇が認められ、48 時間後には約 50%まで酵素活性が回復した。これはヒト肝細胞から新生されたコリンエステラーゼが血液中に供給されたことによるものと思われる。本知見は有機リン系農薬評価におけるキメラマウスの新たな有用性を示すデータとして重要な知見である。

本知見に対し中間評価では「コリンエステラーゼ阻害を起こす有機リン剤の毒性評価の確立に集中し、他の代表的な有機リン剤を選出して毒性試験を実施」するよう指摘を受けた。この指摘に基づき、有機リン系農薬クロルピリホスについてコリンエステラーゼ活性阻害を指標とした毒性試験を実施した。

まず、至適投与量の決定には高価なキメラマウスではなく、非移植マウスを用いた。キメラマウスは毒性評価に日常的に使用される ICR マウスとは異なり、重度免疫不全マウスである。そのため、報告されているクロルピリホスの毒性用量を参考に設定幅を広げ、1, 3, 10, 30, 100, 300 mg/kg の 6 群を設定した。1 群 3 匹を使用し、毒性、及び致死性を同条件で比較した。最高用量では投与 1 時間以内に死亡個体が複数現れ、7 時間で全例が死亡した。最高用量の 3 分の 1 用量では 7 時間で死亡 1 例、24 時間以内に全例の死亡が確認された。更に用量を 3 分の 1 減じた群においては、24 時間以内に 1 例のみ死亡が確認された。このようにクロルピリホス投与量に依存した致死性 (用量依存性)、及び、経過時間に応じた致死性が確認できた。24 時間以内に 1 例のみ死亡個体が出現した 30 mg/kg 投与群について、臨床症状を詳細に解析した。24 時間以内の死亡は 1 例しか観察されなかったが、全てのマウスで投与 2 時間以降自発運動量の低下が認められ、そのほとんどが流涙を伴うことを確認した。また、中には流涎や振戦を呈する個体も見られた。キメラマ

ウスにも同用量 (30 mg/kg) を投与し、毒性発現を確認したところ、24 時間以内の死亡は 4 例中 2 例であったが、投与 2 時間以降から臨床、異常症状を呈する個体が認められた。全個体で自発運動量の低下が認められ、そのほとんどが振戦や流涙を伴うことを確認した。

キメラマウスでは 30 mg/kg 投与で 50% が死亡したことから、血清コリンエステラーゼ活性阻害効果の検討は用量を下げ 10 mg/kg で実施した。キメラマウスにおいても 10 mg/kg クロルピリホスでは致死性は見られなかった。10 mg/kg 経口単回投与後、30 分でキメラマウスでは大幅な酵素活性低下が認められた (90% $\leq$)。一方、非移植マウスにおいても酵素活性低下は認められたが、その阻害効果を効果的に評価できるほど十分な酵素活性ではないことが示された。10 mg/kg クロルピリホス経口単回投与されたキメラマウスでは 30 分以降も低値を示したが、24 時間後には上昇し回復傾向を示した。これはアセフエートによる酵素活性阻害で見られたものと同様、ヒト肝細胞によるコリンエステラーゼの新生を反映するもので、血清コリンエステラーゼ活性阻害はヒト血清コリンエステラーゼタンパクと阻害物質の直接作用によること示唆している。また、クロルピリホス投与により消失した酵素活性はヒト肝細胞による新生により、1 週間で定常レベルに回復することが確認された。化合物がヒト肝細胞に障害を引き起こす物質の場合、酵素活性の回復遅延が予想され、キメラマウスがヒト肝毒性の有用な予測動物となる可能性も高い。

次に *in vivo* において、クロルピリホス投与量と酵素活性阻害の関係を明らかにするため、クロルピリホス投与前後の血清コリンエステラーゼ活性測定を行った。既に 10 mg/kg クロルピリホス投与実験で、投与後 30 分ではほぼ完全に血清コリンエステラーゼ活性が消失し、投与 1 週間後には元のレベルに回復することを確認している。このことから、同一個体にて繰り返し実験を計画し、使用する動物数削減に努めた。すなわち、低用量クロルピリホス投与実験を実施した 1 週間後に、別用量のクロルピリホス投与実験を実施した。最高用量を 3 mg/kg に設定し、1, 0.3, 0.1 mg/kg の 4 用量の投与を行い、酵素活性を測定した。キメラマウス 5 匹に対しクロルピリホス投与前、投与 30 分後に採血を行い、活性測定を行った。最低用量の 0.1 mg/kg から開始し、1 週間後に血清コリンエステラーゼ活性の回復を確認し、次の用量で実験を行った。血清コリンエステラーゼ活性の定常値は個体間で異なるが、いずれの個体においても酵素活性の低下が認められ、用量依存性があることを確認した。これらのデータから *in vivo* における血清コリンエステラーゼ活性の Half maximal (50%) inhibitory concentration IC₅₀ を算出した。キメラ

マウスを用いた場合、ヒト血清コリンエステラーゼ活性が 50%低下する投与用量（暴露量）は 0.86 mg/kg であることがわかった。上記試験の際、毒性、臨床症状の変化も併せて観察したが、10 mg/kg 以下の用量で臨床症状項目に異常は認められなかった。

実験動物（特にマウス）を用いた有機リン農薬の毒性評価では血清コリンコリンエステラーゼの活性阻害は毒性の指標とされてこなかったが、キメラマウスを用いることにより初めてヒト臨床での診断指標（バイオマーカー）が実験動物モデルにも適用できる可能性を本年度の研究結果は示した。致死性の現れない 3 mg/kg クロルピリホス投与でもコリンエステラーゼ活性はほぼ完全に消失しており、コリンエステラーゼ活性の低下は必ず毒性（致死性）に先んじて起こることがわかった。キメラマウス・非キメラマウスのいずれにおいても、クロルピリホス投与初期から現れる臨床症状として「自発運動量の低下」に着目し、観察者の主観ではなく、科学的、客観的評価を行うため、自発運動量の定量解析を行った。解析対象のキメラマウス（最大 6 匹）を並べ、動画を撮影する（図 6 A）。撮影した動画をテレビモニターに映し、各ケージを点線で示すよう 4 区画に分割し、区画の移動回数を 1 分毎にカウントした。致死性は現れないがコリンエステラーゼ活性がほぼ完全に消失する用量（3 mg/kg）のクロルピリホス投与後の自発運動量を毎分計測し、3 分毎の平均値をプロットした（図 6 B）。無処置、溶媒投与に比し、クロルピリホス投与後に運動量が低下したことがわかる。各群 30 分間の平均運動量で比較すると、無処置、溶媒投与間で有意差は無いが、クロルピリホス投与後の運動量は無処置、溶媒投与のいずれと比較してもほぼ半分に低下しており、統計学的に有意差が確認できた（図 6 C）。致死性や主観的な臨床症状を指標とした毒性評価では血清コリンコリンエステラーゼ活性阻害を毒性の Predictor とすることは困難であったが、定量化された自発運動量を指標とした評価では、血清コリンコリンエステラーゼ活性の低下が毒性の Predictor として有用であることが示された。

2) 個別課題名イ：ヒト型肝臓キメラマウスを用いた酢酸メレンゲステロールの毒性試験（研究担当者名：末水洋志 所属機関名：実中研）

合成プロゲステロン的一种である酢酸メレンゲステロールは、肉牛の成長促進を目的として混餌投与される動物用医薬品である。国内においては動物用医薬品、および、ヒト用医薬品として承認されていないが、ポジティブリスト制度に基づき、酢酸メレンゲステロールの残留基準値が設定された。げっ歯類を用いて得たデータを参考にヒトへの安全性を適切に評価するためには、ヒトと実験動物の肝代謝の種差を把握することが重要となる。そこで本研究ではヒト型代謝能を有するヒト肝キメラマウスを用いた研究を進める。前項1)「個別課題名ア：ヒト型肝臓キメラマウスを用いたアセフェートの毒性試験」で確立した2系統の肝傷害マウス（uPA-NOG, TK-NOG）のうち、計画的な生産が可能なTK-NOGキメラマウスを用いて、個別課題名イ（ヒト型肝臓キメラマウスを用いた酢酸メレンゲステロールの毒性試験）を実施した。

動物用医薬品評価書に記載されているマウスにおける酢酸メレンゲステロールの急性毒性用量（ICRマウス・腹腔内投与）は1,000 mg/kg以上である。酢酸メレンゲステロールがヒトCYP3A4で代謝されることを考慮し、ヒト肝キメラマウスでは100 mg/kgを高用量として設定した。ヒトCYP3A4には代謝能に個人差があることから、6ロット（L社2ロット、S社4ロット）のヒト肝細胞を用いてヒト肝TK-NOGキメラマウスの作製を行った。各ロットについて移植4週間後から4週毎にELISA法にて血中ヒトアルブミン量（hAlb）を測定したが毒性試験に使用する置換率約50%（hAlb 4 mg/ml）に達したのは1ロットのみであった。このヒト肝細胞を用いて作製したキメラマウスと対照マウスに酢酸メレンゲステロールの経口単回投与（100 mg/kg）を行った。すなわち、0.5%メチルセルローズにて10 mg/ml酢酸メレンゲステロール懸濁液を調製し、マウス体重10 gあたり0.1 mlをディスポーザブル経口ゾンデにて経口単回投与を行った。投与から0.5, 1, 2, 4, 7, 24時間後に眼底静脈叢から採血し、微量高速遠心機にて血漿分離を行った。これら生体試料を用いて酢酸メレンゲステロールのヒト型代謝物の測定及び分析を実施した。また、投与14日後に主要臓器を摘出し、酢酸メレンゲステロールによる毒性の病理学的解析を実施した。

(2) 研究項目名2：ヒト型代謝物の測定及び分析

1) 個別課題名ウ：アセフェートのヒト型代謝物の測定及び分析（研究担当者名：山崎浩史 所属機関名：昭和薬科大）

個別課題名ア：ヒト型肝臓キメラマウスを用いたアセフェートの毒性試験で実施し、採取された検体について血漿中アセフェートとメタミドホスを定量するため、液体クロマトグラフ質量分析法（LC-MS/MS）を確立して薬物血中濃度を測定した（図7）。設定した二用量（25, 150 mg/kg）のうち、高用量

(150 mg/kg) では体重 10 g あたり 0.1 ml の 15 mg/ml アセフェート水溶液をディスポーザブル経口ゾンデにてヒト肝キメラマウスと対照マウスに経口単回投与を行い、投与から 0.5, 1, 2, 4, 7 時間後に眼底静脈叢から血液採取し、遠心分離により血漿を調製した。アセフェート単回経口投与した後のヒト肝キメラマウス、および、対照マウス血漿中アセフェート、および、メタミドホス濃度は 0.5 時間で最高濃度を示し、その後 7 時間まで低下を続けた。血漿中メタミドホス濃度はアセフェート濃度より低値を示した (図 8)。ヒト肝キメラマウスの血漿中アセフェート、および、メタミドホス濃度は対照マウスと比較し、本条件下では有意な差は認められなかった。更に高用量のアセフェート (300 mg/kg) をマウスに経口投与し、0.5, 1, 7, 24 時間後の血漿中アセフェートとメタミドホスについて、液体クロマトグラフ質量分析法 (LC-MS/MS) にて薬物血中濃度を測定した。経口投与後の血漿中アセフェート、およびメタミドホス濃度は、0.5 時間で最高濃度を示し、その後 24 時間まで低下した。血漿中メタミドホス濃度は原体アセフェート濃度より低値を示した (図 9)。ヒト肝キメラマウスの血漿中アセフェート、およびメタミドホス濃度は対照マウスに比し、有意な差は認められなかった。

アセフェートとは異なる有機リン系農薬クロルピリホスについて、原体、および、その主要代謝物の分析系を確立した。クロルピリホス (30 mg/kg) をヒト肝キメラマウスと対照マウスに経口単回投与し、24 時間までの血漿中クロルピリホス、クロルピリホスオクソン体について、液体クロマトグラフ質量分析法 (LC-MS/MS) にて測定した結果、クロルピリホスの大部分はクロルピリホスの分解物 trichlorpyridinol (TCPy) に変換されていた (図 10 A)。ヒト肝キメラマウスのクロルピリホス血漿中濃度はマウスと比較して消失が緩やかであり、投与 0.5 時間および 2 時間後に有意な差が認められた ($p < 0.05$)。クロルピリホスオクソン体は検出限界以下であった。

これまでにヒト肝キメラマウスを含む実験動物で取得したクロルピリホスの代謝データを用いて、農薬の生理学的薬物動態モデル (PBPK) を構築し、体内動態の種差を *in vivo* および *in vitro* 実験系で検証し、代謝物を考慮したヒト推定血漿中濃度に基づきリスク評価を行った。また、アセフェートについても生理学的薬物動態モデル (PBPK) 構築のためアセフェート投与後の血漿中濃度推移データを取得した。マウスおよびヒト肝キメラマウスに 150 mg/kg のアセフェートを経口単回投与し、経時的な血漿中濃度を液体クロマトグラフ質量分析法 (LC-MS/MS) で測定した結果、アセフェートおよび代謝物メタミドホスが検出された (図 11 A)。アセフェートおよびメタミドホスの血漿中濃度は投与後 0.5 時間で最高血漿中濃度に達し、血漿中濃度推移はヒト肝キメラマウスとマウスではほぼ一致した。メタミドホスはアセフェートのおよそ 1/100 の濃度で検出された。薬物の肝代謝消失速度および各代謝物生成を *in vitro* 実験より算出した (表 1)。ヒト肝およびヒト肝キメラマウス肝のクロルピリホス代謝消失速度はそれぞれ 0.330 および 0.520 nmol/min/mg protein であった。ラット肝およびマウス肝のクロルピリホス代謝消失速度はそれぞれ

2.88 および 0.901 nmol/min/mg protein であり、ヒト肝のそれと比較しそれぞれ約 9 倍および 3 倍高値を示し、クロルピリホスオクソン体は検出限界以下であった。TCPy 生成速度はラット肝およびマウス肝において、それぞれ 0.150 および 0.251 nmol/min/mg protein であった。ラット肝およびマウス肝の TCPy 生成速度はそれぞれ 2.80 および 0.691 nmol/min/mg protein であり、ヒト肝と比較しそれぞれ約 18 倍および 4 倍高値を示した。クロルピリホスのヒト肝およびヒト肝キメラマウス肝の代謝変換率はそれぞれ 0.46 および 0.48 であり、両者はほぼ一致した。ラット肝およびマウス肝の代謝変換率はそれぞれ 0.97 および 0.77 と算出され、ヒト肝より高値を示した。一方、ヒト肝のアセフェート代謝消失速度は、ラット、マウスあるいはヒト肝キメラマウス肝のいずれの場合もほぼ同様であった。いずれの肝ミクロゾームを用いた場合においてもアセフェートから代謝物メタミドホスは検出されなかった。

In vivo 実験の結果をもとに、クロルピリホスについて、マウスおよびヒト肝キメラマウスの PBPK モデルを構築した。PBPK モデルは吸収、代謝および全身循環ならびに代謝物の代謝、全身循環の計 5 つのコンパートメントからなる簡略化 PBPK モデルを用いた。各薬物の物性値は *in silico* で予測した。マウスの生理学的数値は文献情報 (Davies et al. 1993; Hurst et al., 1999; Clewell et al., 2000; Sweeney et al., 2008) より設定した。ヒト肝キメラマウスの生理学的数値はマウスのそれらと同値とした。マウスおよびヒト肝キメラマウスから構築した 2 種のヒト PBPK モデルを用いて、30 mg/kg のクロルピリホスを経口単回投与した場合のクロルピリホスおよび TCPy の血漿中濃度推移の予測を行った (図 10 A)。マウス *in vivo* データから、*in vitro* 肝代謝消失の種差を考慮し、構築したヒト PBPK モデルの薬物血漿中濃度推移の予測結果はヒト肝キメラマウスの *in vivo* データを活用し、直接生体側の生理学的パラメータをヒト用にして構築したヒト PBPK モデルの予測結果と一致した。マウスおよびヒト肝キメラマウスから算出したパラメータを用いて、構築したヒト PBPK モデルにより薬物を単回経口投与した場合のヒト血漿中濃度推移を予測した。これらの予測血漿中濃度と報告値とを比較した。クロルピリホスをヒトに 214.3 mg/kg 単回経口投与した時のクロルピリホスおよび TCPy 血漿中濃度推移を 2 種類のヒト PBPK モデルを用いて予測した結果は報告値 (Drevenkar et al., 1993) とおおむね一致した (図 10 B)。

In vivo 実験の結果をもとに、アセフェートについて、マウスおよびヒト肝キメラマウスの PBPK モデルを構築した。アセフェートの *in vitro* 肝代謝消失実験においてメタミドホスの生成が認められなかったため、代謝変換率をマウスおよびヒト肝キメラマウスで統一し、0.5 として PBPK モデルを構築した。アセフェートをヒトに 0.7 mg/kg 単回経口投与した時のアセフェートおよびメタミドホス血漿中濃度推移を 2 種類のヒト PBPK モデルを用いて予測した結果は報告値 (Pesticide residues in food -2002- Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues acephate (<http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2002pr02.htm>, 2002) と

おおむね一致した（図 2 0 B）。

2) 個別課題名エ：酢酸メレンゲステロールのヒト型代謝物の測定及び分析（研究担当者名：山崎浩史 所属機関名：昭和薬科大）

個別課題名イ：ヒト型肝臓キメラマウスを用いた酢酸メレンゲステロールの毒性試験で実施し、採取された検体について血漿中酢酸メレンゲステロール原体、およびヒト主要代謝物を定量するため、液体クロマトグラフ質量分析法（LC-MS/MS）を確立して薬物血中濃度を測定した。ヒト、マウス、ラットの肝ミクロソームをメレンゲステロールと反応後、高速液体クロマトグラフィーで分析した典型的なクロマトグラムを図 1 2 に示す。検出された M1 から M4 代謝物のうち、ヒトでは M3 代謝物の生成が急速に起こることが試験管内での実験で示され、LC-MS/MS を用いた代謝物の構造推定の結果、ヒトで特徴的な代謝物 M3 は 2-水酸化体であると推定された。そこで生体内における代謝を調べる目的でキメラマウス、および対照マウスに 100 mg/kg 酢酸メレンゲステロールを経口投与し、0.5, 1, 2, 4, 7, 24 時間後の酢酸メレンゲステロール原体、およびヒト主要代謝物 2-水酸化体を確立した液体クロマトグラフ質量分析法（LC-MS/MS）にて分析した。酢酸メレンゲステロールの血漿中濃度はヒト肝キメラマウスと非移植マウスの間に有意な差が見られた（図 1 3）。一方、ヒト主要代謝物 2-水酸化体の生成にキメラマウスと対照マウスの間で差は見られなかった。投与 24 時間が経過してもキメラマウス血中には大量の原体が残存したことから、肥育用ステロイドホルモンである酢酸メレンゲステロールのリスク評価には 種差を十分考慮する必要性 が示唆された。本成果は毒性物などのリスク評価の専門誌 Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2013, Volume 65; 316-324 に掲載された。

(3) 研究項目名 3：病理学的解析による毒性評価

1) 個別課題名オ：アセフェートによる毒性の病理学的解析（研究担当者名：中村雅登 所属機関名：東海大）

個別課題名ア：ヒト型肝臓キメラマウスを用いたアセフェートの毒性試験で提供された検体の病理解析を行った。すなわち、アセフェート 150 mg/kg をキメラマウス、および、対照マウスに経口単回投与し、7 時間後に肝臓を採取し、アセフェートによる毒性の病理学的解析を行った。採取した生体試料を 20% 中性緩衝ホルマリンに浸漬し、24 時間振盪固定を行った後、組織片を密閉式自動固定包埋装置にてパラフィン浸漬まで行い、組織包埋ブロックを作製した。ミクロトームにて薄切したパラフィン連続切片を H&E 染色（図 1 4）、あるいは、免疫組織染色（図 1 5）し、病理組織解析を行った。ヒト肝キメラマウスについては抗 HLA 抗体、抗サイトケラチン 8/18 (CK8/18) 抗体、抗ヒトアルブミン抗体で染色を行い、ヒト肝細胞の同定を行った。いずれの抗体によってもヒト肝細胞が検出できた。免疫組織染色にてヒトと判定された領域の

細胞は、H&E 染色では周辺のマウス肝細胞より細胞質の染色性が低いか、ほとんど認められなかった。これはヒト肝細胞の細胞質にはグリコーゲン顆粒の蓄積が多く、今回の染色条件（ホルマリン固定・パラフィン切片）では描出されないという従来の報告と一致した。アセフェート 150 mg/kg の経口単回投与 7 時間後の条件では、ヒト肝キメラマウスのヒト肝細胞、および、対照マウスの肝細胞に傷害、病変は認められなかった。投与量を 300 mg/kg に増やし、観察期間を 14 日に延長し再度、病理組織学的を実施した。アセフェート 300 mg/kg をヒト肝キメラマウス、および、対照マウスに経口単回投与し、14 日後に脳、肝臓、腎臓などの主要臓器を採取し、アセフェートによる毒性の病理学的解析を行った。300 mg/kg アセフェート経口単回投与 2 週間後の脳病理所見はヒト肝キメラマウス、および、対照マウスではほぼ同様で、1) 脳には組織学的の著変は認められなかった。2) 神経細胞の脱落、壊死などは認められなかった。3) 血管周囲の浮腫性の変化は明らかではなかった。4) NOG マウスでは基本的に炎症反応は無いことを差し引いても著変は認められなかった（図 1 6 左）。肝臓は 150 mg/kg 投与時と同様、ヒト細胞領域は H&E 染色では周辺のマウス肝細胞より細胞質の染色性が低いか、ほとんど認められなかった（図 1 6 中；ボックス領域の拡大図を示す）。しかし、アセフェートに起因すると思われる細胞の傷害は確認できなかった。腎臓においてもヒト肝キメラマウス、対照 TK-NOG マウス間で著変は認められず、1) 糸球体には沈着物などは認められなかった。2) 所謂腎炎の所見は認められなかった。3) 近位尿細管、遠位尿細管には拡張、円柱の所見は認められなかった。4) 間質浮腫などの所見は認められなかった（図 1 6 右）。以上のことから、本条件下ではアセフェートによる組織学的に明らかな細胞傷害は無いものと思われた。今回の検討では、経口投与したアセフェートの血液中への移行が比較的速やかに起こることから、150 mg/kg アセフェート投与後、ヒト肝キメラマウスのヒト肝細胞部について解析を行ったが、本条件で細胞傷害・組織病変は認められなかった。アセフェート、および、主要代謝物であるメタミドホスによる神経毒性発現において、ヒト肝キメラマウスと対照マウスでは違いがあるのかについて、血漿コリンエステラーゼ活性の変動や、貧血症の有無、脳のアセチルコリンエステラーゼ染色等の検討も必要と思われる

2) 個別課題名カ：酢酸メレンゲステロールによる毒性の病理学的解析（研究担当者名：中村雅登 所属機関名：東海大）

個別課題名イ：ヒト型肝臓キメラマウスを用いた酢酸メレンゲステロールの毒性試験から提供された検体の病理解析を行った。すなわち、酢酸メレンゲステロール 100 mg/kg をキメラマウス、および、酢酸メレンゲステロール非投与キメラマウスに経口単回投与し、14 日後に主要臓器（肝臓、腎臓、肺など）を採取し、酢酸メレンゲステロールによる毒性の病理学的解析を行った。100 mg/kg 酢酸メレンゲステロール経口単回投与 2 週間後の腎臓、肺の所見は投与群、非投与群ではほぼ同様で、組織学的な著変は認められなかった。キメラマウ

スの肝臓は対照マウスの定常状態と組織像が大きく異なり、ヒト細胞領域はH&E染色で周辺のマウス肝細胞より細胞質の染色性が低い。この領域でも、組織学的な著変は認められず、細胞増殖マーカーKi67抗原染色にも著変は認められなかいことから増殖能の亢進作用はないものと思われた（図17）。

(2) 研究全体の成果、考察及び結論

ヒト化肝キメラマウスは薬物代謝だけでなく毒性研究でも有用性が期待される一方、未だ、誰しもが利用できる実験モデルには至っていないことから、未知なる実験動物モデルとして見られることが多い。本研究では我々が開発した2系統のヒト肝キメラマウス (uPA-NOG, TK-NOG) を生産性・再現性・実用性などの観点から比較を行い、本邦における食薬の安全性評価研究の基盤実験動物モデルとして位置づけられるヒト肝キメラマウスを選択した。安定的生産システムを確立し、本研究課題「肝臓キメラマウスを用いたヒト型代謝プロファイルの外挿によるリスク評価手法の開発」ではヒト型代謝能を有するヒト肝キメラマウスを用いて毒性試験を実施し、ヒト型代謝物の *in vivo* における影響を明らかにした。本研究で実施したヒト肝キメラマウスを用いたアセフェート、クロルピリホス、酢酸メレンゲステロールの *in vivo* 実験の結果をもとにマウス、およびヒト肝キメラマウスの PBPK モデルを構築した。それぞれの化合物について、単回、あるいは連続投与した時の血漿中濃度推移を構築した PBPK モデルを用いて予測した結果、いずれも報告値とおおむね一致した。

「ヒト肝キメラマウスの安定生産」についての取り組み

ヒト肝キメラマウスはヒト肝細胞による置換率が一定でなく、作出も安定しないとの指摘が多く、その改善がヒト肝キメラマウス用いたヒト型毒性試験の実現には必須である。本研究では以下3項目を実施し、最終年度後半に安定的なヒト肝キメラマウスの生産を実現した。

1) ヒト肝細胞の追加移植

自然交配で作製した uPA-NOG マウス (8-12 週齢) について肝細胞傷害を確認後、 1×10^6 個のヒト肝細胞を脾臓経由で移植した。その際、脾臓は摘出せず残した。移植4週間後に hAlb 量を測定し、生着が確認できた個体に、再度、同ロットの細胞を同数、脾臓経由で肝臓に移植した。その後の定期的に hAlb 量を測定したが、単回移植した個体との間に有意な生着性向上が認められなかったことから、追加移植の効果は期待できないと結論づけ終了した。

2) 肝機能を保持した細胞株 (ヒト肝がん HepaRG 細胞株) 移植によるキメラマウスの作製

キメラマウスの作製に使用する凍結ヒト正常肝細胞は臨床材料に由来するため有限であり、同じ細胞でヒト肝キメラマウスを作製し続けることができない 問題がある。フランス国立衛生医学研究所 (INSERM) で開発された HepaRG 細胞はヒト肝細胞様形態を呈し、ヒト肝細胞の各機能を保持、発現する細胞として、酵素誘導試験や薬物代謝試験、細胞毒性試験、

HBV 感染試験等の研究に使われはじめているヒト肝腫瘍由来の培養細胞株である。HepaRG 細胞株は維持培地中では接触阻害が起こるまで増殖するが、その時点から 2% DMSO を含む分化培地に交換することにより、徐々に形態が肝細胞様に変化し、その後も培養を継続すると更に肝細胞様細胞の数が増加する (図 1 8)。分化誘導開始から 21 日後の HepaRG 細胞の遺伝子発現をキメラマウス作製に用いるヒト正常肝細胞 (4 ロット) と比較した結果、アルブミン遺伝子をはじめ、多くの薬物代謝関連酵素遺伝子の発現がヒト肝細胞とほぼ同レベルであることが確認できた (図 1 9)。ヒト正常肝細胞に極めて近い性質 (遺伝子発現レベルでは) を持つ HepaRG 細胞でキメラマウスを作製することが可能になれば「キメラマウスの安定生産」につながる重要な課題である。そこで、分化誘導 21 日後の HepaRG 細胞 (1×10^6 個) を肝傷害 uPA-NOG マウスと TK-NOG マウスにそれぞれ移植し、移植 4 週間後から 12 週間まで経時的に hAlb 量を測定した。uPA-NOG マウス、TK-NOG マウス、いずれも ELISA で検出できるレベルの hAlb 産生は認められなかった。HepaRG 細胞の生着を組織レベルで確認するため、移植 12 週後に肝臓を採取し、抗 HLA 抗体によるヒト細胞の検出を行ったところ、uPA-NOG マウス (5 匹) では肝臓切片を入念に調べたがヒト細胞を検出することはできなかった。一方、HepaRG 細胞が移植された全ての TK-NOG マウス (5 匹) では、肝臓の所々で HLA 陽性のヒト正常肝細胞様コロニーが認められた (図 2 0 右)。図 2 0 左にヒト正常肝細胞を移植した TK-NOG マウス肝臓 H&E 染色 (上段) と HLA 染色 (下段) を示す。ヒト肝臓細胞の特色は、HLA 染色が陽性、かつ H&E 染色で対応する細胞の細胞質は染色されずに明瞭になることである。当該細胞は H&E 染色では染色されない細胞質の明るい細胞であることから、HepaRG 細胞に由来するヒト肝臓細胞であると考えられた。更にこれらの細胞では成熟肝細胞の特徴であるグリコーゲンの蓄積が Periodic Acid-Schiff (PAS) 染色により明らかとなった。また、これらの細胞では主要な薬物代謝酵素である Cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) タンパクも発現し、胆汁排泄を行う Multidrug Resistance Protein 2 (MRP2) の発現も認められた (図 2 1 上段、下段は正常ヒト肝細胞)。ヒト正常肝細胞に極めて近い性質を持つ HepaRG 細胞でキメラマウスを作製することが可能になれば「キメラマウスの安定生産」につながる重要な結果であり、本成果は *Xenobiotica* 誌 Volume 44, Number 2 (January 2014) 号 Chimeric and Genetically Modified Mice for DMPK and Toxicology 特集 (146-153 頁) に掲載された。

3) ガンシクロビル投与法 (用量・方法) の再検討

ガンシクロビルの投与量、および、方法を見直したことで、従来、細胞移植に使用できる個体数が約 4 割から 9 割に延び、多くのヒト肝細胞移植マウスを作製することが可能となった。移植されるマウス数の増加に伴い、

成功例、すなわちキメラ率の高い動物の作製数も増加したが、とりわけ、生着性の極めて高いヒト肝細胞を入手できたことが安定的な生産に大きく貢献した。傷害の程度が比較的強い肝傷害マウスにこの細胞を移植するとレスキューすることも可能であり、短期間で高置換ヒト肝キメラマウスを作製することが実現した。

有機リン農薬の神経毒性はアセチルコリンエステラーゼ活性阻害により引き起こされるが、有機リン農薬は 血清中の（ブチル）コリンエステラーゼにも同等に作用し酵素活性を阻害する ことが知られ、ヒトにおいては有機リン農薬中毒の鋭敏なバイオマーカーと位置付けられ、確定診断検査となっている。それにもかかわらず、実験動物（マウス）を用いた有機リン農薬の毒性評価では血清コリンエステラーゼの活性阻害は毒性の指標とされてこなかった。その理由として、1）血清コリンエステラーゼ自身は神経毒性発揮に関与しないと考えられていること、2）代表的な実験動物種であるマウスでは本酵素の活性が極めて低く、酵素活性の変動を鋭敏に捉えられないこと、更に、3）毒性化合物が結合する血清コリンエステラーゼタンパクの構造がヒトとマウスで異なるため、阻害効果が同等かどうか不明であること等があげられる。ヒトとマウスでアミノ酸の相同性は 80%、有機リン農薬の毒性評価で一般に使用されるニワトリとは 70%の相同性である。キメラマウスの血中に存在するコリンエステラーゼはヒト肝細胞から産生されるためヒトコリンエステラーゼタンパクそのものであり、毒性化合物との相互作用は 100%ヒトを外挿することができる。更にキメラマウスでは化合物原体のみならず、ヒト肝臓による代謝物との相互作用を評価できる利点もある。

有機リン農薬の「毒性の指標」としてアセチルコリンエステラーゼ活性が適当とされているが、毒性と平行に変動するマーカーは毒性の程度を正確に反映するものの、リスクを予測する指標とはならない。一方、致死性や主観的な臨床症状を指標とした毒性評価では血清コリンエステラーゼ活性阻害は「毒性の指標」として適当ではないが、定量化された自発運動量を指標とした評価では、血清コリンエステラーゼ活性の低下は毒性を事前に予測できる **Surrogate marker**、あるいは、**Predictor**として有用であることを本研究成果は示している。中間評価でのコメント（「コリンエステラーゼ阻害を起こす有機リン剤の毒性評価の確立に集中し、他の代表的な有機リン剤を選出して毒性試験を実施」）は、ヒト肝キメラマウスのリスク評価への応用と実用化への方策を示してくれたものと受け止めている。本研究で実施したアセフェート、および、クロルピリホスの血清コリンエステラーゼ活性を指標とした毒性評価を元に、以下の手順で実験データを取得することにより、有機リン系農薬の定型的なリスク評価手法が確立できるものとする。現在、有機リン農薬は国内だけでも約 40 種類、有機リン農薬と同様にコリンエステラーゼ活性の阻害により毒性を引き起こすカーバメイト系農薬が 15 種類ほど使用されているが、これらについて、本法による毒性試験を実施することで各化合物に対するリスク評価が行えると

考えられる。

「キメラマウスを用いた有機リン系農薬の新たなリスク評価法」手順

A) 至適投与量の決定 (Dose finding)

- 高価なヒト肝キメラマウスではなく、非移植マウスを用いる。ヒト肝キメラマウスは毒性評価に日常的に使用される ICR マウスとは異なり、重度免疫不全マウスである。そのため、報告されている毒性用量を参考に設定幅を広げ 6 群を設定する。1 群 3 匹を使用し、毒性、及び致死性を同条件で比較する

B) 酵素活性の経時的変化 (Time course)

- A) で決定した非致死性毒性用量を 5 匹のヒト肝キメラマウス (血清コリンエステラーゼ活性が約 170 U/L 程度、あるいはヒトアルブミン濃度が約 2 mg/mL 程度) に投与し、0, 0.5, 1, 2, 4, 7, 24, 48 時間後に採血を行い血清コリンエステラーゼ活性を測定し、阻害効果を判定する。毒性などの症状観察を継続し 1, 2 週間後に再び血清コリンエステラーゼ活性を測定し、酵素活性の回復状況を確認する

C) 用量-応答効果 (Dose-response effect)

- A) で決定した非致死性毒性用量を最高投与量として段階的に減量した用量 (3-5 段階) を低用量から 5 匹のヒト肝キメラマウスに投与し、B) で決定した最も阻害効果が現れた時間について採血を行い、血清コリンエステラーゼ活性を測定し、阻害効果を判定する。同時に毒性などの症状観察を行う

D) 自発運動量の定量観察

- C) で用いた用量について低用量から投与し、自発運動量の定量観察を行う

E) 血清コリンエステラーゼ活性阻害を指標としたリスク評価

- C) で取得した血清コリンエステラーゼ活性阻害効果と D) で取得した自発運動量変化の関係を解析することにより、有機リン農薬の毒性用量を算出する
- また、C) で取得したデータを解析し、*in vivo* における血清コリンエステラーゼ活性の Half maximal (50%) inhibitory concentration IC50 を算出する。あるいは The U.S. Environmental Protection Agency (EPA) が提供する Benchmark Dose Software (BMDS) を用いてベンチマークドーズを算出する

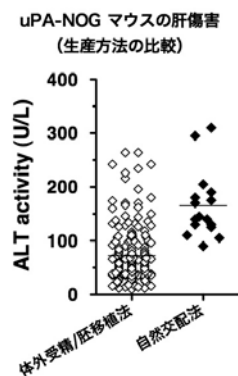


図 1

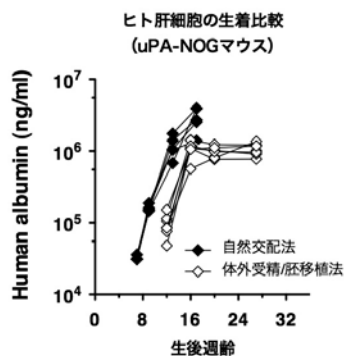


図 2

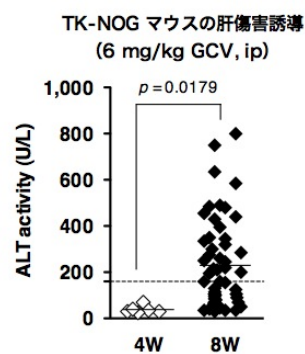


図 3

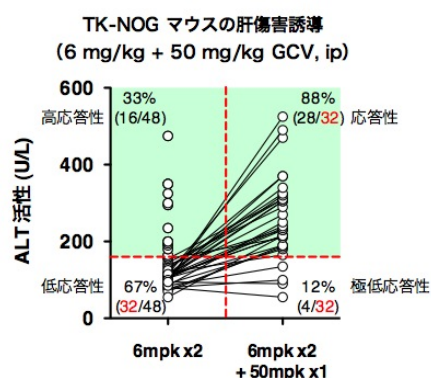


図 4

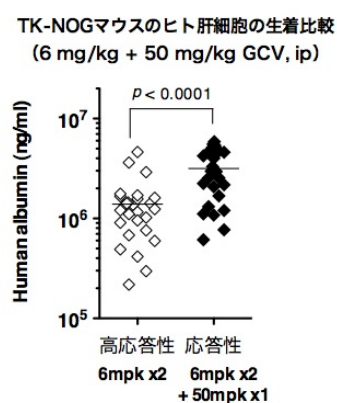


図 5

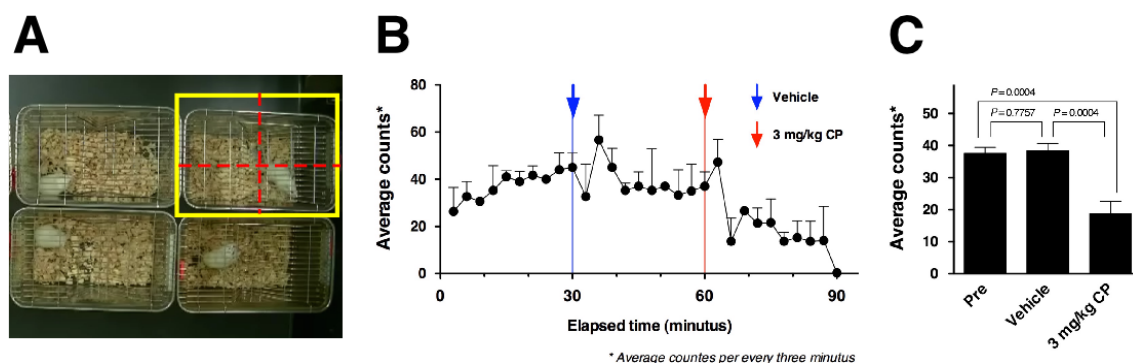


図 6 クロルピリホス投与による自発運動量の変化

(A) 計測対象、(B) マウス運動量 (3 分毎平均)、(C) マウス運動量 (積算値)

Pre: 無処置・Vehicle: 溶媒・3 mg/kg CP: クロルピリホス投与

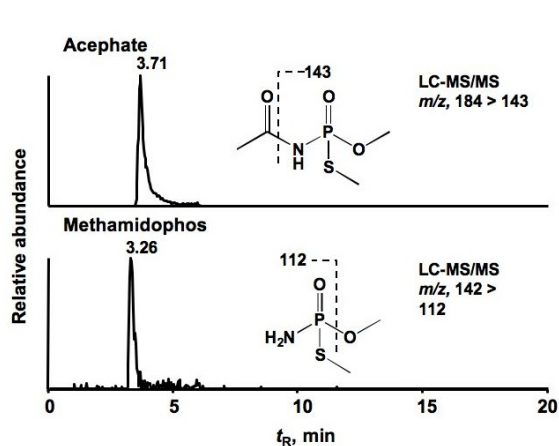


図7 ヒト化キメラマウスによる検出
推移

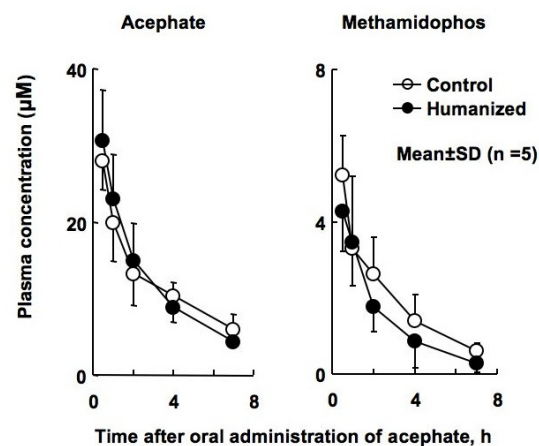


図8 150 mg/kg Acephate投与後の血中

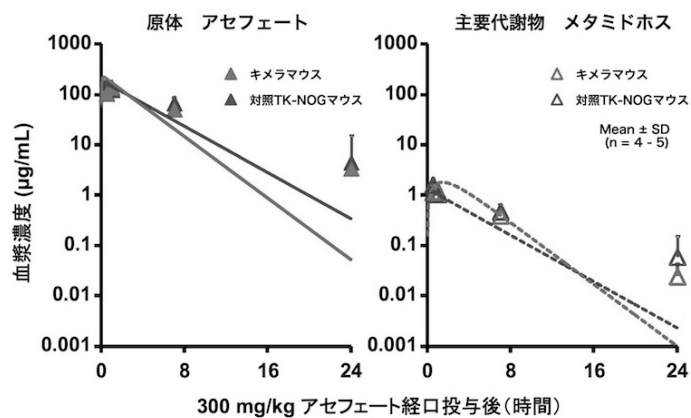


図9 Acephate投与後の血中推移

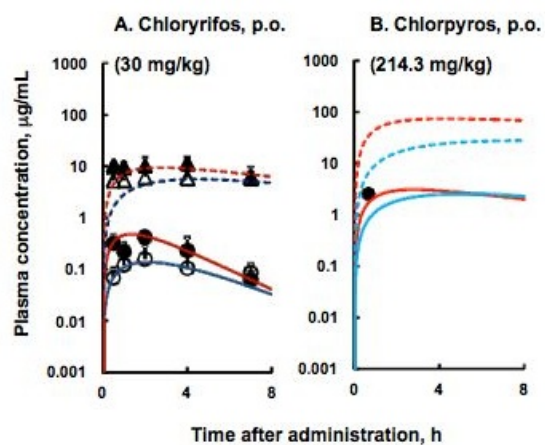


図10 Measured (symbols) and estimated (lines) plasma concentrations of chlorpyrifos (circles, solid) and TCPy (triangles, dotted) in mice with (open) and without (closed) humanized liver and humans in literatures after single oral administration of chlorpyrifos.

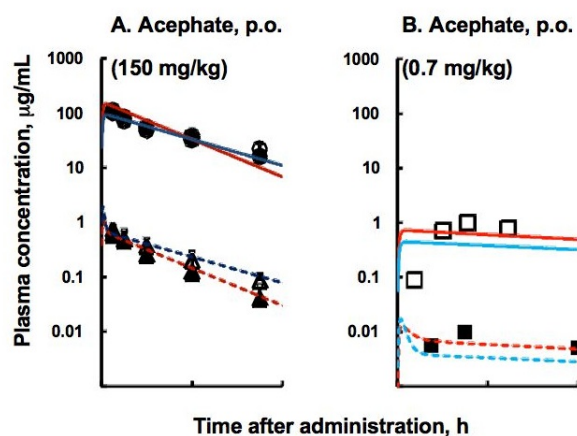


図 1-1 Measured (symbols) and estimated (lines) plasma concentrations of acephate (circles) and methamidophos (triangles) in mice with (open) and without (closed) humanized liver and humans in literatures after single oral administration of acephate.

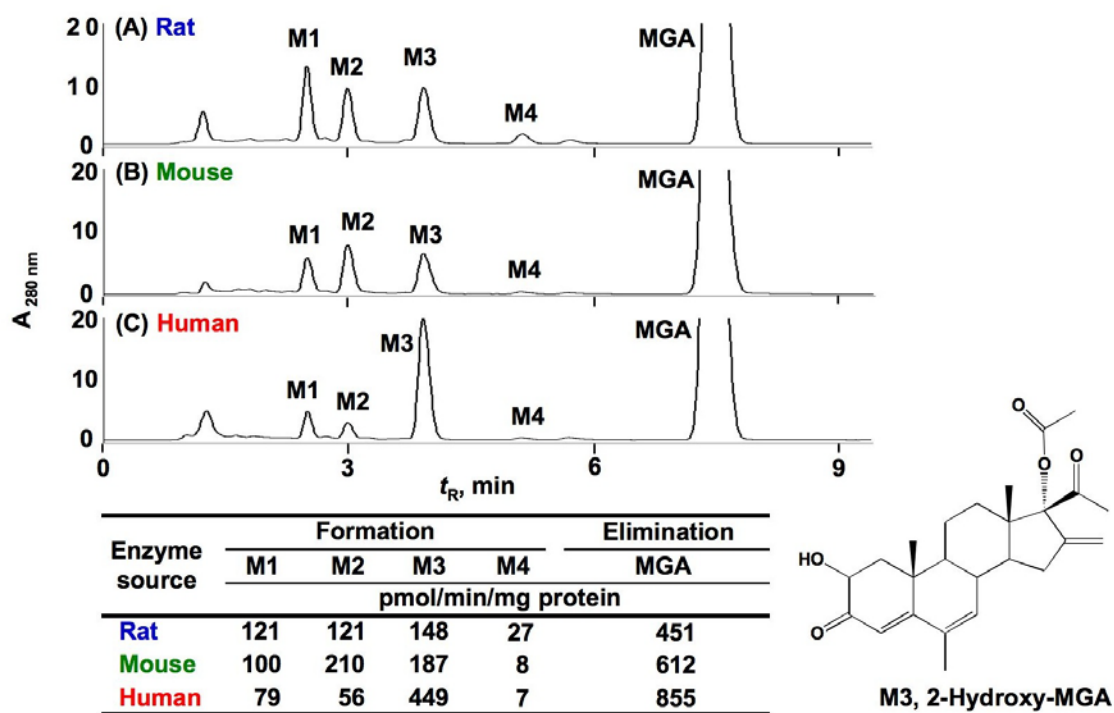


図 1-2 肝ミクロソームによるメレンゲステロール代謝の典型的なクロマトグラム図

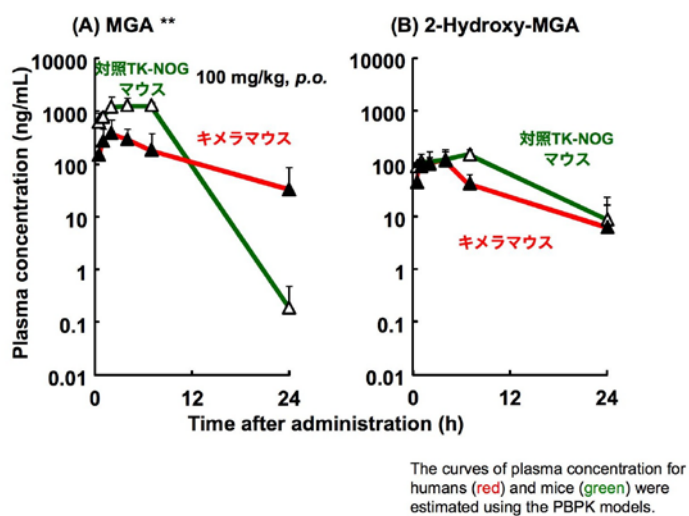


図 1 3 ヒト肝キメラマウスによるメレンゲステロールの代謝

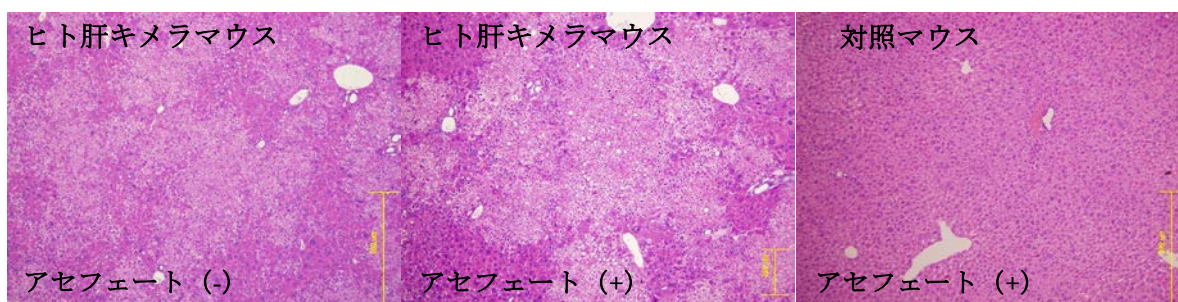


図 1 4 アセフェート投与後のヒト肝キメラマウス肝臓組織像
ヘマトキシリン&エオジン (H&E) 染色

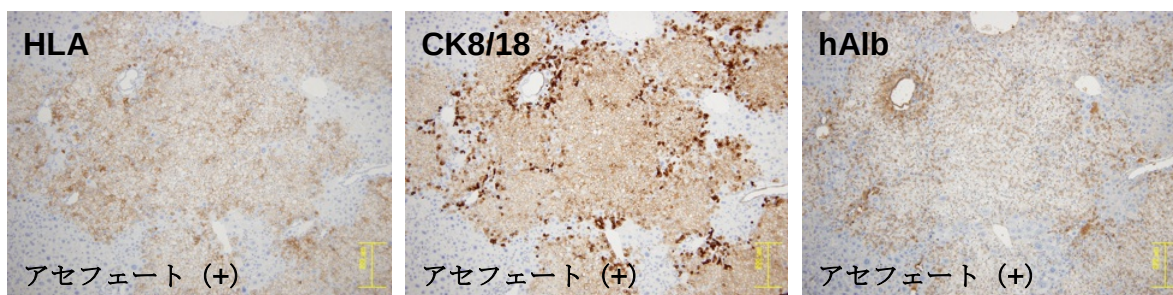


図 1 5 アセフェート投与後のヒト肝キメラマウス肝臓組織像
抗 HLA 抗体 (HLA)、抗サイトケラチン 8/18 抗体 (CK8/18)、
抗ヒトアルブミン抗体 (hAlb) による免疫組織染色 (褐色部がヒト肝細胞をあらわす)

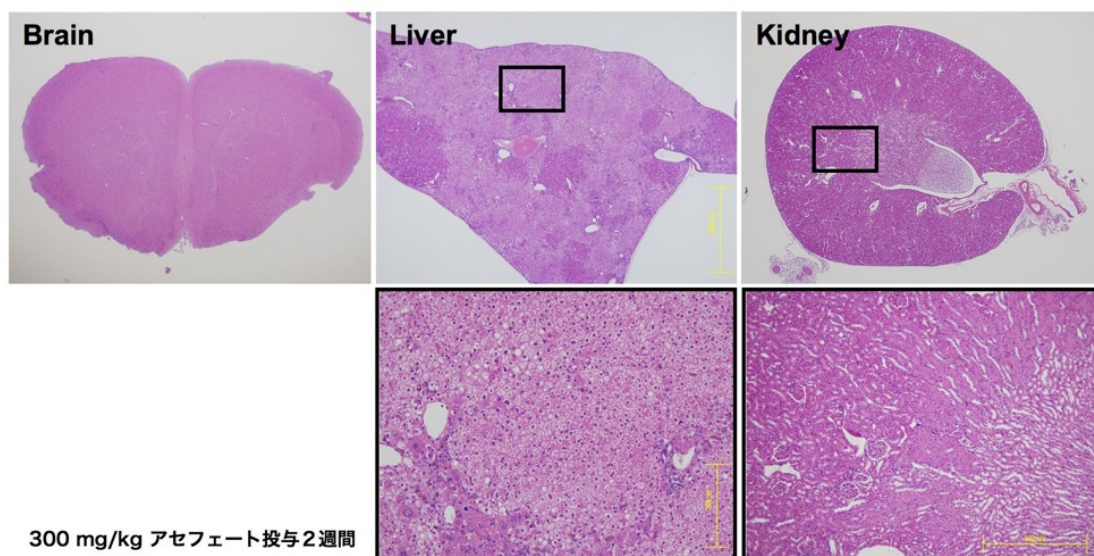


図 1 6 アセフェート投与によるヒト肝キメラマウスにおける病理組織解析 (H&E染色)

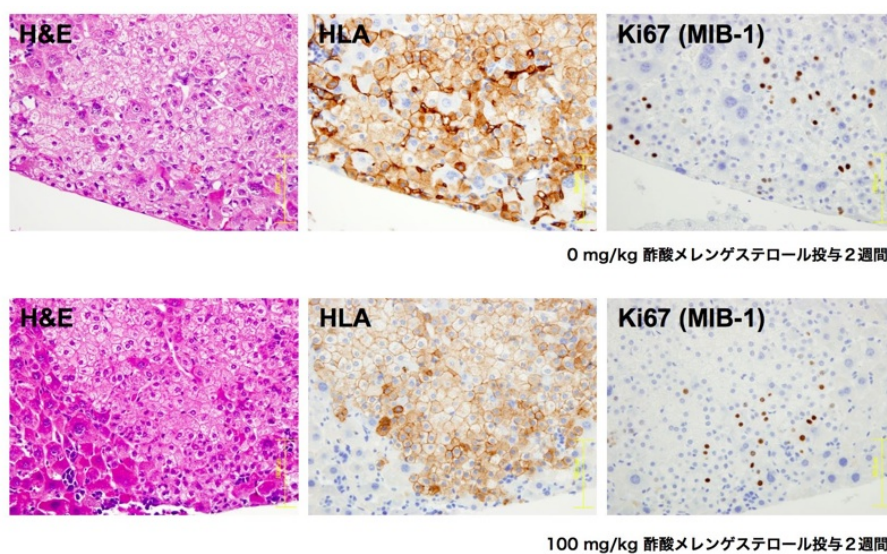


図 1 7 酢酸メレンゲステロール投与後のヒト肝キメラマウス肝臓組織像

ヘマトキシリン・エオジン染色 (H&E) 、

抗 HLA 抗体 (HLA ; 褐色部がヒト肝細胞をあらわす) 、抗細胞増殖抗原抗体 (Ki67)

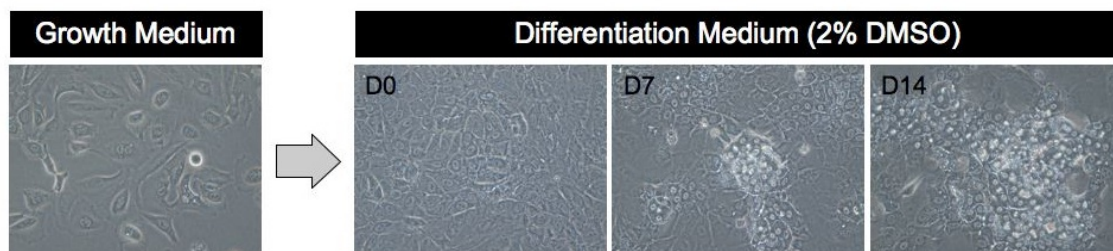


図 1 8 HepaRG細胞の正常肝細胞様分化

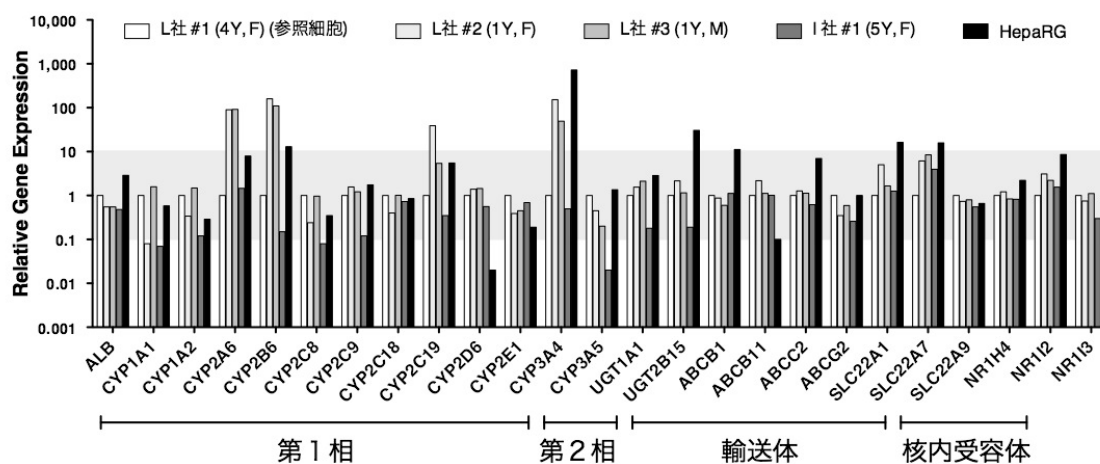


図 1 9 肝細胞分化したHepaRG細胞と凍結ヒト正常肝細胞の薬物代謝関連酵素遺伝子の発現比較

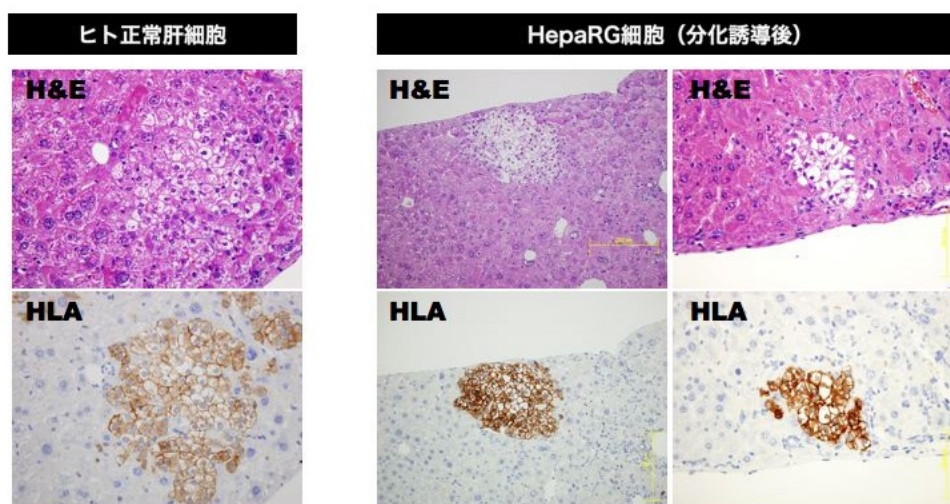


図 2 0 TK-NOGマウスに生着した肝細胞分化したHepaRG細胞の免疫染色 1
上段：ヘマトキシリン・エオジン染色、下段：抗HLA抗体染色

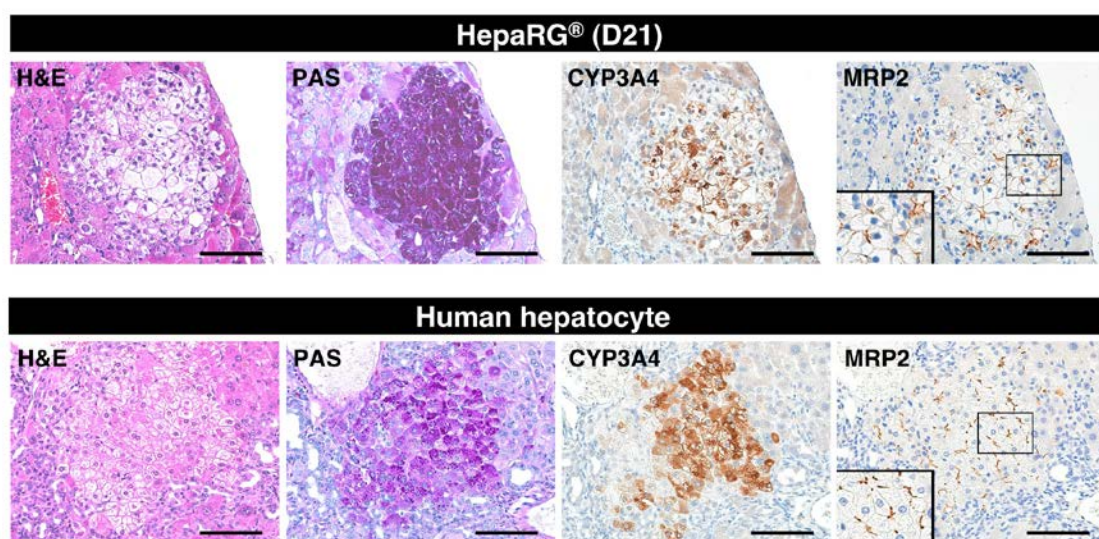


図 2 1 TK-NOGマウスに生着した肝細胞分化したHepaRG細胞の免疫染色 2
 上段：肝細胞分化誘導21日の細胞を移植したTK-NOGマウスの肝臓、下段：凍結ヒト肝臓細胞をを移植したTK-NOGマウスの肝臓 Periodic Acid-Schiff (PAS)、Cytochrome P450 3A4 (CYP3A4)、Multidrug Resistance Proten 2 (MRP2)

表 1 *In vitro* rates of parent compound elimination and metabolite formation.

Enzyme sources	nmol/min/mg protein			
	Chlorpyrifos	TCPy	Acephate	Methamidophos
	Elimination	Formation	Elimination	Formation
Rat	2.880	2.800	0.417	<0.001
Mouse	0.901	0.691	0.540	<0.001
Humanized mouse	0.520	0.251	0.700	<0.001
Human	0.330	0.150	0.600	<0.001

Ⅲ 本研究を基に発表した論文等

1 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト

1. Yamazaki, H., Suemizu, H., Igaya, S., Shimizu, M., Shibata, N., Nakamura, M., Chowdhury, G., Guengerich, FP. In Vivo Formation of a Glutathione Conjugate Derived from Thalidomide in Humanized uPA-NOG Mice Chem Res Toxicol 24;287-289:2011.
2. Yamazaki, H., Suemizu, H., Shimizu, M., Igaya, S., Shibata, N., Nakamura, M., Chowdhury, G., Guengerich, FP. In Vivo Formation of Dihydroxylated and Glutathione Conjugate Metabolites Derived from Thalidomide and 5-Hydroxythalidomide in Humanized TK-NOG Mice Chem Res Toxicol 25;274-6:2012.
3. Nishimura, T., Hu, Y., Wu, M., Pham, E., Suemizu, H., Elazar, M., Liu, M., Idilman, R., Yurdaydin, C., Angus, P., Stedman, C., Murphy, B., Glenn, J., Nakamura, M., Nomura, T., Chen, Y., Zheng, M., Fitch, WL., Peltz, G. Using Chimeric Mice with Humanized Livers to Predict Human Drug Metabolism and a Drug-Drug Interaction J Pharmacol Exp Ther 344;388-396:2013.
4. Yamazaki, H., Suemizu, H., Murayama, N., Utoh, M., Shibata, N., Nakamura, M., Guengerich, FP. In vivo Drug Interactions of the Teratogen Thalidomide with Mid-azolam: Heterotropic Cooperativity of Human Cytochrome P450 in Humanized TK-NOG Mice Chem Res Toxicol 26;486-489:2013.
5. Tsukada, A., Suemizu, H., Murayama, N., Takano, R., Shimizu, M., Nakamura, M., Yamazaki, H. Plasma concentrations of melengestrol acetate in humans extrapolated from the pharmacokinetics established in in vivo experiments with rats and chimeric mice with humanized liver and physiologically based pharmacokinetic modeling Regul Toxicol Pharmacol 65;316-324:2013.
6. Higuchi, Y. & Kawai, K. & Yamazaki, H. & Nakamura, M. & Bree, F. & Guguen-Guillouzo, C. & Suemizu, H. The human hepatic cell line HepaRG as a possible cell source for the generation of humanized liver TK-NOG mice Xenobiotica 44;146-153:2013.

2 本研究を基にした学会発表の実績

1. 清水 万紀子, 曾田 重人, 末水 洋志, 中村 雅登, 村山 典恵, 山崎 浩史. ヒト肝移植マウスを用いたアセフェートの代謝消失 (日本薬学会第132年会、平成24年3月、札幌)
2. 塚田 藍, 村山 典恵, 山下 真直, 高野 良治, 末水 洋志, 中村 雅登, 清水 万紀子, 山崎 浩史. 肥育用ステロイドホルモン剤の肝代謝消失速度の種差 (日本薬学会第 132 年会、平成 24 年 3 月、札幌)
3. 村山 典恵, 山下 真直, 高野 良治, 末水 洋志, 中村 雅登, 清水 万紀子, 山崎 浩史. チオカルバメート系除草剤モリネートの代謝消失における種差の検討 (日本薬学会第 132 年会、平成 24 年 3 月、札幌)

4. Hiroshi Yamazaki, Ai Tsukada, Ryohji Takano, Hiroshi Suemizu, Masato Nakamura, Makiko Shimizu, and Norie Murayama. Synthetic growth promoter Melengestrol Concentrations Modeled in Humans. (The 18th North American ISSX Meeting, October, 2012. Dallas, Texas, USA)
5. 末水洋志. 免疫不全マウスを用いたヒト化肝臓モデルの開発 (第 29 回日本毒性病理学会総会および学術集会シンポジウム、平成 25 年 2 月、つくば)
6. Hiroshi Yamazaki, Hiroshi Suemizu, Ai Tsukada, Shigeto Sota, Norie Murayama, Ryohji Takano, Makiko Shimizu, Masato Nakamura, Drug metabolism and disposition of melengestrol acetate in humans extrapolated from the pharmacokinetics in chimeric mice with humanized liver and physiologically based pharmacokinetic modeling. (The 10th International ISSX Meeting, September, 2013. Toronto, CA)
7. Norie Murayama, Hiroshi Suemizu, Kanako Yajima, Masahiro Utoh, Masato Nakamura, and Hiroshi Yamazaki, Potential of thalidomide for induction of drug metabolism enzymes in human livers. (The 10th International ISSX Meeting, September, 2013. Toronto, CA)
8. Hiroshi Suemizu, Yuichiro Higuchi, Kenji Kawai, Hiroshi Yamazaki, Françoise Bree, Christiane Guguen-Guillouzo, and Masato Nakamura, The human hepatic cell line HepaRG as a possible cell source for the steady generation of humanized liver TK-NOG mice. (4th International Workshop on Humanized Mice, September, 2013. Seoul)
9. 山下真直、西山咲弥子、小林健太、菅原大輔、杉山洋介、高野良治、村山典恵、清水万紀子、末水洋志、山崎浩史、ラットおよびヒト肝移植マウスを用いた農薬の実測および推定血漿中濃度に基づくリスク評価に関する研究 (第57回日本薬学会関東支部大会；帝京大学板橋キャンパス平成25年10月26日)
10. 曾田重人、宮口貴守、志田聡美、鈴木佑貴、安達昂一郎、高野良治、清水万紀子、村山典恵、末水洋志、山崎浩史、ヒト肝移植マウスを活用した生理学的薬物動態モデルによる医薬・化学品のヒト血中濃度推移予測 (第57回日本薬学会関東支部大会；帝京大学板橋キャンパス平成25年10月26日)
11. Yuichiro Higuchi, Kenji Kawai, Hiroshi Yamazaki, Françoise Bree, Christiane Guguen-Guillouzo, Masato Nakamura and Hiroshi Suemizu, HepaRG細胞を用いたヒト化肝臓マウスの作製 (第13回日本再生医療学会総会；国立京都国際会館平成26年3月4-6日)

3 特許及び特許出願の数と概要

なし

4 その他 (各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等)

化学工業日報 (平成 23 年 1 月 13 日付)

IV 主任研究者による研究全体の自己評価

項目	評価結果	評価コメント
1 研究の妥当性	4	ヒト化肝キメラマウスは薬物代謝だけでなく毒性研究でも有用性が期待される一方、未だ、誰しものが利用できる実験モデルには至っていない。ヒトの健康に悪影響を及ぼす恐れのあるハザード物質の毒性評価をヒト型代謝動物モデル、ヒト肝キメラマウスを用いて行う本研究は、「種差」を単に安全係数で補正するのではなく、ヒトとの違い把握し、よりの確にヒトに対する毒性予測ができるシステムの構築をめざしている。本研究の成果により、ヒト肝キメラマウスが本邦における食薬の安全性評価研究の基盤実験動物モデルとして位置づけられることが期待できる。
2 研究目標の達成度	4	本研究で掲げた目標は1) 安定的なヒト肝キメラマウスの作製、2) 候補ハザード物質のヒト型薬物代謝プロファイル取得と毒性評価によるヒト肝キメラマウスの有用性証明、3) ヒト肝キメラマウスと従来のマウスとの比較試験から、ヒトにおける無作用量、無毒性量、あるいは最低毒性発現量を推定し、「種差」という不確定性要素による影響を低減したリスク評価手法を確立することであった。研究2年度には生産性・実用性などの点で2系統 (uPA-NOG, TK-NOG) のヒト肝キメラマウスの内、TK-NOG マウスに絞り込むことができ、計画的な動物の作出にヒト肝細胞の移植法確立が伴い、最終年度内に安定的な生産体制を整備することができた。候補ハザード物質として、有機リン農薬アセフェート、クロルピリホス、動物用肥育ホルモン剤酢酸メレンゲステロールについて毒性評価を実施することができた。アセフェート代謝において、ヒト肝キメラマウスと通常マウスで差が認められないことから、種差の考慮は安全係数 10 で必要十分とする判断材料となった。一方、クロルピリホスや酢酸メレンゲステロールでは、ヒト肝キメラマウスにおいて通常マウスよりも消失が遅延することから、想定以上に残留する恐れがあることを示し、種差を十分考慮するよう促すことができた。 本研究ではヒト肝キメラマウスが代謝研究以外でも「種の違い」を利用し、新たな用途を見いだすことができた。すなわち、ヒト肝細胞が産生・分泌した血中のコリンエステラーゼ酵素活性はヒトとほぼ同等に達することを発見

		し、それを利用して有機リン農薬の酵素活性阻害効果を再現可能か検証した。その結果、ヒト肝キメラマウスを用いることで有機リン農薬による血清コリンエステラーゼ活性阻害はヒトを外挿し、新たな肝リスク評価手法の開発につながる可能性を示した。
3 研究成果の有用性	5	ヒト肝キメラマウスではヒト型代謝物の <i>in vivo</i> における悪影響の評価のみならず、血清コリンエステラーゼ活性のようにヒトとマウスで質・量が異なる（種差）ものや、核内受容体の応答など種差があるものを評価対象とすることができる。本研究成果により、ヒト化肝キメラマウスを本邦における食薬の安全性評価研究の基盤実験動物モデルとして広く利用できる体制が構築できた。
合 計	13	
総合コメント 現在、世界には3種類のヒト肝キメラマウスが存在し、それぞれ薬物代謝研究に応用されている。Yecuris Corporation（米国）が特許を持ち販売するフマリルアセト酢酸ヒドラーゼ欠損モデル（FRG マウス）、KMT Hepatech（米国）が特許を持つアルブミン-ウロキナーゼタイププラスミノーゲンアクチベータ Tg モデル（Alb-uPA/scid マウス）、そして、我々が特許を取得している TK-NOG モデルである。科学的に信頼性の高いデータを得るためには適切な動物実験モデルを選択することが最も重要であるが、更に同じ尺度で繰り返しハザード物質の毒性評価が実施できることも重要である。本研究の成果として確立したヒト化肝キメラマウスの安定的な生産体制により、毒性研究を行う研究者に基盤実験動物モデルとしてヒト化肝キメラ TK-NOG マウスを提供することが可能となり、本邦における食薬の安全性評価研究に貢献できると確信する。 本研究計画の立案時には、ヒト肝キメラマウスが有するヒト肝細胞の主たる機能“ヒト型薬物代謝”に焦点をあて、種差を反映したヒト特有の代謝物検出をめざした。種差のあるハザード物質については「慎重な種差の考慮」を促し、種差の見られないハザード物質については、従来マウスで実施した毒性評価の妥当性を検証することができた。 3年間の研究期間の初年度、2年度はヒト化肝キメラマウスの安定的作製技術が未完成であったことに加え、アセフェートの毒性評価では原体・代謝物共に種差が見られず、期待に満たない成果に思えた。しかし、最終年度にはヒト化肝キメラマウスの安定的作製技術が確立し、メレンゲステロールの毒性評価ではヒト体内では想定以上に残留する危険性があることを示すことができ論文発表に至った。更にヒト肝キメラマウスの血清コリンエステラーゼ活性が有機リン農薬の毒性を事前に予測できる <u>Surrogate marker</u>、あるいは、<u>Predictor</u>として有用であることを示し、ヒト肝キメラマウスを利用した新たな評価手法の確立へと発展する貴重な成果を得ることができた。		

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で記述する。