

## 研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	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（課題番号：1405） （研究期間：平成26年度）
主任研究者名	研究者名：山手 丈至 所属機関：大阪府立大学

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。リポ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わることが分かった。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-

γ、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。

## 研究成果報告書（本体）

研究課題名	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 (研究期間：平成26年度)
主任研究者名	所属：大阪府立大学 氏名：山手 丈至（研究課題番号：1405）

### I 研究の期間及び研究目標等

#### 1 研究期間

平成26年度

#### 2 研究目的

肝には約20%の肝固有のマクロファージ（クッパー細胞やグリソン鞘樹状細胞）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、それに基づいた肝毒性発現機序は解明されていない。

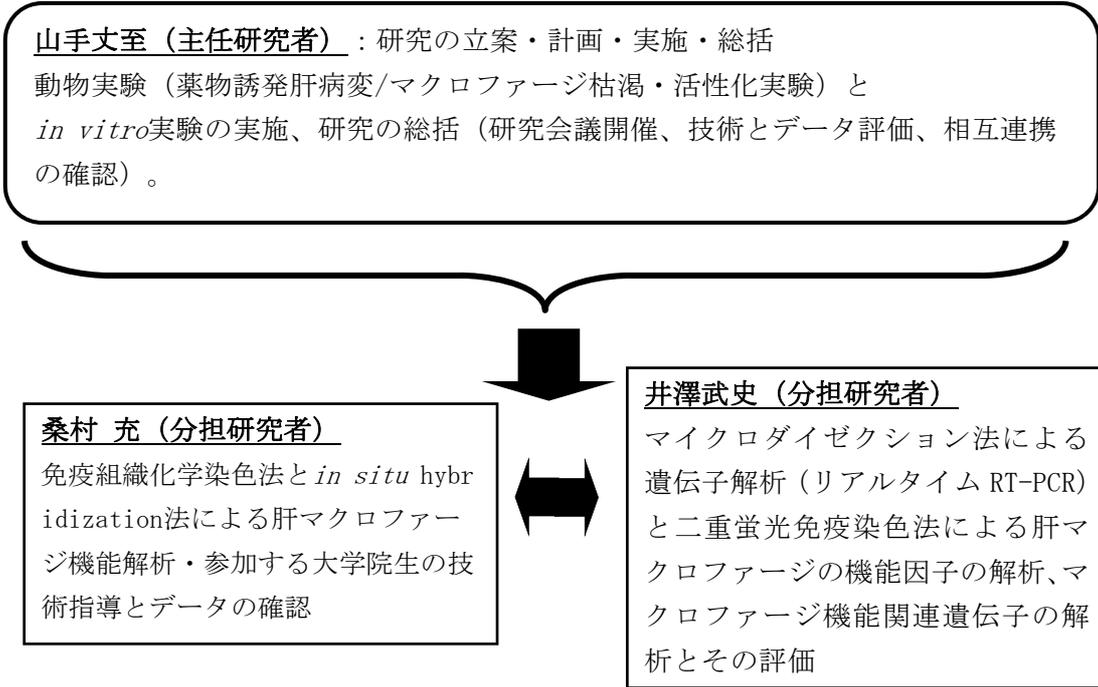
**本研究の目的**は、微小環境条件に応じて多彩な機能変化を現わす肝マクロファージの特性を、化学物質の肝毒性評価手法の一つの指標として、毒性病理学的な観点から新たに構築することを目指すとともに、その肝マクロファージの機能異常に起因する肝毒性発現メカニズム（肝細胞傷害性と免疫介在性肝細胞毒性）を*in vivo*と*in vitro*の実験系を用いて解明することである。

本課題の遂行は、化学物質に対して肝細胞よりは感受性の高い肝マクロファージの軽微な変化を早期に検出できることから、農薬などの化学物質により誘発される量反応性の肝毒性評価の緻密化につながる。この手法により、ADIの設定がより科学的になることからヒトへの健康影響評価（リスク評価）をより確実に担保することができると考える。本課題で試みる*in vivo*と*in vitro*の実験系とマクロファージの評価手法は、毒性試験のメカニズム解明において新たな評価手法になり得ると考える。

### 3 研究体制

研究項目名	個別課題名	研究担当者名（所属機関名）
(1) 動物実験の計画・実行	動物実験（発生過程の肝/薬物誘発肝病変の作製/マクロファージ枯渇・活性化実験）	主任研究者 山手丈至（大阪府立大学 生命環境科学研究科獣医学専攻）
(2) ラット肝マクロファージの基本的な評価手法の構築	免疫組織化学染色法と <i>in situ</i> Hybridization法による肝マクロファージの機能特性に関する手法の確立と解析	分担研究者 桑村充（大阪府立大学 生命環境科学研究科獣医学専攻）
(3) 肝マクロファージ介在性/非介在性の化学物質誘発性肝障害の発現機序の解明	マイクロダイゼクション法による遺伝子解析（リアルタイムRT-PCR）と二重蛍光免疫染色法による肝マクロファージの機能因子・特性の解析	分担研究者 井澤 武史（大阪府立大学 生命環境科学研究科獣医学専攻）
(4) ラット肝マクロファージ株HS-Pを用いた <i>in vitro</i> での肝毒性発現機序の解明	HS-P株を用いた <i>in vitro</i> 実験の実施	山手丈至（大阪府立大学 生命環境科学研究科獣医学専攻）
(5) 総括と今後の展望	実験成績の解析と総括、今後の展望	山手丈至（大阪府立大学） （他2名の分担研究者とともに討議）

なお、この研究は、同じ機関に所属する主任研究者と分担研究者が、以下の体制において相互に協力しあい行った研究であり、よって得られた成果は、個々の研究者毎ではなく、総合的に記載する。



#### 4 倫理面への配慮について

**1) 研究材料と動物実験倫理** : 「動物の愛護及び管理に関する法律」 (昭和48年法律第105号、平成17年一部改正) および「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」 (平成18年環境省告示代88号) を遵守するとともに、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」 (平成18年文部科学省告示第71号) に基づいて運用されている本学の「大阪府立大学生命環境科学研究科動物実験指針」に従い、動物実験計画申請書を事前に諮問委員会に提出し承認を得た上で行った。よって、動物福祉や愛護に対する社会的コンセンサスには問題はないと判断した。なお、ヒトの材料・資料は用いていない。

**2) 遺伝子組換え実験** : *In situ* hybridization解析で必要となる大腸菌を用いる遺伝子組換え実験に関しては、本学の遺伝子組換え委員会に実験計画書を申請し、承認を受けた上で実施した。

**3) 参画させる大学院生の実験倫理教育** : 本学の「動物実験教育」の講習会に参加させ、かつ動物実験に関する基本的な技術指導を行う。動物愛護に関する「3Rの重要性」を理解させた上で参画させた。また、主任と分担研究者も研究者倫理を遵守した。

## II 研究内容及び成果等

(1) 研究項目名 : 動物実験の計画・実行 ; 動物実験 (発生過程の肝/薬物誘発肝病変の作製/マクロファージ枯渇・活性化実験) (担当者名 : 山手丈至 所属機関名 : 大阪府立大学)

## 1 研究内容及び方法

以下の(2)と(3)の解析を行う上での動物実験を実施した。この材料を用いて、出現する肝マクロファージをM1/M2分極化の観点から評価した。

**動物実験**：用いた動物はF344ラットである。まず、ラットの発生過程の肝組織を用いて、発生に伴う肝マクロファージの基本的な機能特性を解析した。さらに、肝組織における異なる傷害部位のモデルとして、小葉中心性の肝細胞傷害をチオアセトアミド(TAA)により、グリソン鞘の小葉間胆管傷害を $\alpha$ -naphthylisothiocyanate (ANIT)により誘発した。この実験では単回投与後の組織傷害と、その後の修復過程の病態を解析した。この異なる傷害部位の二つのラットモデルにより、肝マクロファージの基本的な毒性発現機序の解明を試みた。また、TAAとANITの単回投与モデルにおいては、クロドロネートで処理した肝マクロファージ枯渇条件下での実験を実施し、肝マクロファージの病変形成への影響を詳細に解析した。さらに、TAAとANITを長期間反復投与することで、TAAでは肝硬変モデルを、ANITでは胆管線維症モデルを作製し、単価投与と同様の方法でマクロファージの機能特性を解析した。

**肝マクロファージの機能特性に基づいた肝毒性の評価法**：マクロファージは、体外性異物（化学物質など）に対して、最も感受性の高い生体反応細胞である。肝組織には、肝細胞の他に、既存の肝マクロファージ（クッパー細胞やグリソン鞘抗原提示マクロファージ）が重要な細胞として存在し、解毒/貪食作用としてその一義的な役割を担っている。しかし、肝マクロファージの多様な機能特性に基づいた肝毒性の評価手法や、毒性発現機序はこれまでほとんど検討されていない。そこで、化学物質誘発性の肝障害の毒性病理学的な評価基準に肝マクロファージの機能特性を含める必要があると考え、かつ、肝マクロファージに起因する基本的な毒性発現機序を解明することは化学物質の肝毒性評価の緻密化において重要であると判断し、本課題を設定した。

その理由として、化学物質による肝毒性（図1）には、①化学物質による直接的な肝細胞傷害作用、②CYPなどの代謝酵素により生成される活性代謝物を介した肝細胞傷害作用、③生体反応を介した一次的あるいは二次的な肝毒性発現機序があると考えている。③における、最も重要な生体反応細胞が肝マクロファージである（図1）。肝マクロファージは、活性酸素種などの因子を産生することで③-1肝細胞傷害性毒性を惹起（化学物質による軽微な肝細胞傷害を助長する影響も含める）し、さらに、化学物質そのもの、あるいは活性代謝物が抗原となり生じる③-2免疫介在性の肝細胞毒性を惹起すると考えている。①と②に関する研究は多いが、③の研究は未だ不十分である。

近年、傷害組織に反応するマクロファージは、その機能特性によりM1とM2に分極化される（M1/M2マクロファージ分極化理論）。M1マクロファージは、傷害初期（あるいは傷害前）に出現し、貪食活性や活性酸素種の放出により組織傷害を誘起・助長する。一方、M2マクロファージは、傷害後の組織修復に関わるが、しかし、環境条件に応じ複雑な免疫反応を発現することで肝細胞の再生を抑制し、肝障害を増悪・遅延させる（図1）。

動物実験により得られた材料を用いて、肝マクロファージをM1/M2分極化の観点から解析した。

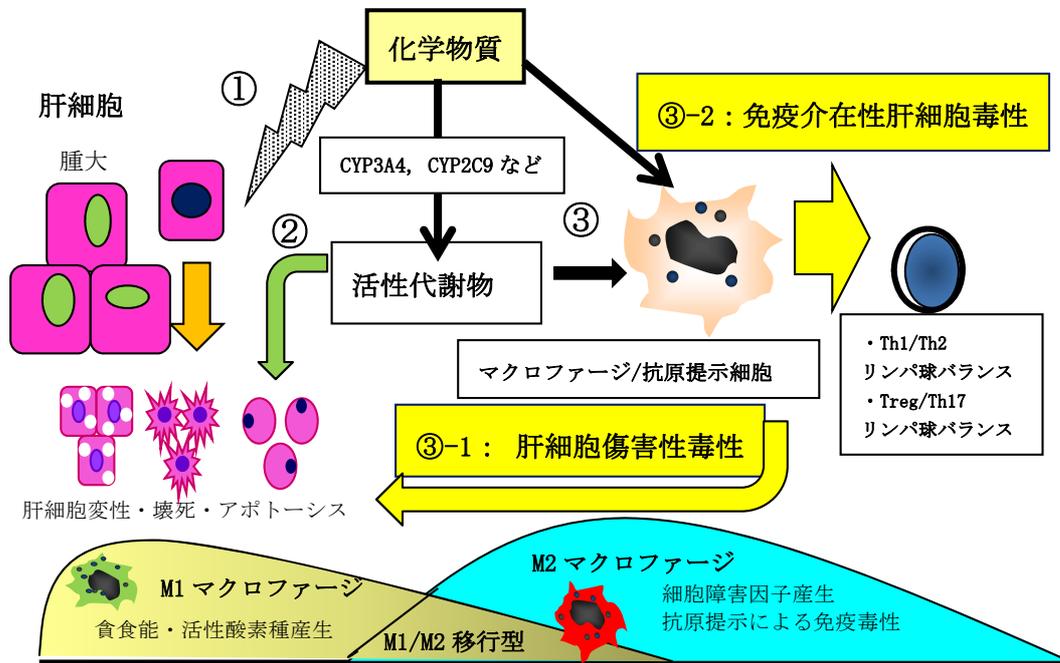


図1：化学物質による肝毒性発現機序

なお、M1とM2マクロファージに関連する因子として主に以下を解析した。

- ・M1マクロファージ関連因子：IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、MCP-1、など
- ・M2マクロファージ関連因子：IL-4、IL-10、IL-16、TGF- $\beta$ 、など

## 2 研究成果、考察、今後の課題

### ・発生過程の肝組織における肝マクロファージの特性：

まず、発生過程の肝マクロファージの特性を基礎データとして確立することを目的に、胎子、新生子、成体の肝組織における肝マクロファージの機能性状を解析した。その結果、胎子では食食活性の高いCD68M1マクロファージ（胎子性マクロファージ）が増加し、組織構築に係ることが分かった。また、新生子から成体（4-5週齢）では抗原提示（MHCクラスII発現）マクロファージが出現しはじめることが分かった。さらに、肝固着マクロファージであるCD163M2クッパー細胞は生後に現れ始め、肝組織の分化・成熟に係るとともに、脂質代謝機能に関連するCD204（M2マクロファージ）を発現することが分かった。肝組織の分化・成熟過程において、MHCクラスII発現マクロファージはグリソン鞘に、CD163とCD204発現マクロファージ（どちらもクッパー細胞を認識）は類洞に沿って出現することが示された。

肝発生過程で出現するマクロファージの特性は、胎生期にはM1マクロファージが、生後の新生子期にはM2マクロファージが主体に出現することから、発生ステージに依存してマクロファージの機能特性が異なることが分かった。また、部位特異的なマクロファージ（ク

ツパー細胞やグリソン鞘抗原提示マクロファージ)が存在することが示された。肝マクロファージの発生をM1/M2分極化により評価した研究はない。胎子毒性や新生子毒性においてどのようなマクロファージが化学物質による毒性に一次的あるいは二次的に影響を与えるのかは今後の研究課題である。

**(2) 研究項目名：ラット肝マクロファージの基本的な評価手法の構築；免疫組織化学染色法と *in situ* Hybridization法による肝マクロファージの機能特性に関する手法の確立と解析** (担当者名：桑村 充 所属機関名：大阪府立大学)

1 研究内容及び方法

上記する(1)の発生過程の肝組織と(3)に記載する薬物誘発病変を用いて、肝マクロファージの機能特性を解析する手法を構築した。手法としては、マクロファージの機能特性に特異的な抗原に対する免疫組織化学染色法や二重蛍光免疫染色法、さらにマクロファージから産生される因子を検出する *in situ* hybridization 法やレーザーマイクロダイゼクションによる RT-PCR 法による M1 因子あるいは M2 因子の解析を試みた。

2 研究成果、考察、今後の課題

2-1. ラット肝マクロファージの機能特性の評価手法の構築(免疫組織化学的評価)：

- 1) CD68 (M1マクロファージ：リソソーム膜抗原・貪食活性の指標)：組織切片での検出法を確立した。
- 2) CD163 (M2マクロファージ：ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体に対するレセプター抗原で、炎症性サイトカイン産生の指標)：組織切片での検出法を確立した。
- 3) MHCクラス II (M1/M2マクロファージ：抗原提示マクロファージ/樹状細胞に発現し、免疫毒性に関与)：組織切片での検出法を確立した。
- 4) CD204 (M2マクロファージ：スカベンジャーレセプタータイプA抗原で、脂質代謝異常の指標)：組織切片での検出法を確立した。
- 5) ガレクチン-3 (M1/M2マクロファージ：ガラクトース結合性レクチン・炎症性サイトカインの産生)：組織切片での検出法を確立した。
- 6) カルシウム結合型蛋白 (Iba1：M2マクロファージの遊走能と機能特性の増加)：組織切片での検出法を確立した。

2-2. M1とM2マクロファージの発現機能の検出法の確立：

- 1) マクロファージ因子を検出する *in situ* hybridization法：重要な炎症性因子である IL-6について確立した。
- 2) レーザーマイクロダイゼクションによる RT-PCR法：INF- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-4、TG F- $\beta$  1、MCP-1などの因子について、ラット特有のプライマーの作製に成功し、RT-PCR法による検出系を確立した。

マクロファージの機能特性を解析するための免疫組織化学的手法とM1/M2因子発現を解析するRT-PCR法を確立することができた。このような多彩な手法を確立した報告はこれまでにない。これらの手法を多くの研究者に紹介することで、化学物質の毒性病理学的評価やメカニズム解明のための試験評価の精度をより向上させることができる。科学的なADI設定につながると考える。

(3) 研究項目名：肝マクロファージ介在性/非介在性の化学物質誘発性肝障害の発現機序の解明；マイクロダイゼクション法による遺伝子解析（リアルタイムRT-PCR）と二重蛍光免疫染色法による肝マクロファージの機能因子・特性の解析（担当者名：井澤武史 所属機関名 大阪府立大学）

1) 小葉中心性の肝細胞傷害による毒性発現機序：

#### 1 研究内容及び方法

TAA 単回投与による小葉中心性の肝病変の推移に伴う M1/M2 マクロファージの特性を解析した。また、機能特性の重複性を二重蛍光免疫染色法により肝障害の経過を追って追究した。さらに、TAA を連回投与することにより誘導した肝硬変モデルについても、同様の方法で解析した。

#### 2 研究成果、考察、今後の課題

・小葉中心性の肝細胞傷害モデルにおけるマクロファージ機能の解析： TAA単回投与による小葉中心性の肝病変の推移を投与後10日間に亘り観察し、経過に伴うM1/M2マクロファージの特性を解析した。その結果、M1マクロファージ誘導に関わるINF- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6と、M2マクロファージ誘導に関わるIL-4の発現が、肝細胞傷害に先立ちすでに増加していること、そしてこれら因子はグリソン鞘既存のMHCクラスIIとCD204発現マクロファージ、さらにgranzymeB陽性のNK細胞（リンパ球）から産生される可能性を示した。この初期反応に続いて、CD68M1マクロファージとCD163M2マクロファージが、肝小葉中心部の傷害部位に誘導され、それに一致してM2マクロファージから線維化に係わるTGF- $\beta$  1やIL-10が産生され、傷害組織が修復されることが分かった。さらに、傷害部位に出現するマクロファージの機能特性を二重蛍光免疫染色法で解析したところ、M1マクロファージでは、CD68に加えて、MHCクラスIIとIba1が発現すること、M2マクロファージでは、CD163に加えて、CD204とガレクチン-3が発現することを見出した。

・TAA連回投与による肝硬変の病態におけるマクロファージの特性解析：TAAを35週間週2回投与することで作製された肝硬変にみられる多様な病態をマクロファージのM1/M2分極化の観点から解析した。このモデルでは15週以降に線維性架橋による偽小葉の形成が始まること、その組織学的特性はヒトの小結節性肝硬変に類似することが分かった。偽小葉と線維性架橋との比較、アディポフィリン発現（脂肪性肝炎状態）と非発現の偽小葉との比較、胎盤型グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST-P）発現（前腫瘍性病変）と非発現の偽小葉との比較では、線維性架橋、アディポフィリン陽性偽小葉、GST-P陽性偽小葉において、それぞれの比較対照に比べ、より多くのマクロファージが出現することが分かった。また、それらのマクロファージはM1型とM2型の双方の特性を同時に発現し、かつM1マクロファージとM2マクロファージ関連因子も連動して増加していることが示された。肝硬変は、M1とM2マクロファージが相互に複雑に関連することで形成されることが分かった。

TAA 投与により誘発された急性肝傷害病変と慢性病変である肝硬変におけるマクロファージの特性を比較した。その結果、急性病変では、初期の傷害過程とそれに続く線維化の治療過程では、それぞれ M1/M2 マクロファージ分極化に基づいて病理発生機序を解析できること、一方、肝硬変では、線維性架橋、アディポフィリン陽性偽小葉、GST-P 陽性偽小葉

において、M1 と M2 マクロファージとそれぞれの関連因子が同時に増加し複雑に関連することで肝硬変の増悪病態である線維化、脂肪化、腫瘍化が誘導されることが分かった。

## 2) 胆管上皮傷害性モデルにおけるマクロファージ機能特性の解析：

### 1 研究内容及び方法

ANITの単回投与により誘発された胆管上皮傷害後のグリソン鞘に出現するM1/M2マクロファージの機能特性を、10日間に亘り解析した。また、ANITを19週間に亘りラットに週2回投与し、慢性的に形成されるグリソン鞘の線維化病変に出現するマクロファージ特性を解析した。

### 2 研究成果、考察、今後の課題

・**グリソン鞘の胆管上皮傷害にともなうマクロファージの特性解析**：ANITを単回投与し、10日間に亘り観察した。その結果、MHCクラスII発現マクロファージが初観察期間を通じて常に増加し、それに続いてCD68M1マクロファージとCD204M2マクロファージがやや遅れて増加し始めることが分かった。なお、CD163M2マクロファージの増加は一過性で、CD68M1マクロファージの増加は持続性があった。また、組織傷害後にM2マクロファージから産生されるTGF- $\beta$ により誘導される筋線維芽細胞は、前半はビメンチンとデスミンを、後半からは $\alpha$ -SMAを発現することが示された。さらに、MCP-1はM1マクロファージの出現と、TGF- $\beta$ 1は $\alpha$ -SMA陽性の筋線維芽細胞の形成と関連することが分かった。また、傷害後に再生する胆管上皮と筋線維芽細胞などの間質細胞がネスチンを発現することを明らかにした。

・**慢性的な胆管上皮傷害によるグリソン鞘の胆管線維症におけるマクロファージ機能の特性解析**：ANITを19週間に亘ってラットに週2回投与し、慢性的に形成されるグリソン鞘の線維化病変を解析した。その結果、MHCクラスII発現マクロファージは観察期間を通じ常に高頻度で出現し、CD68M1マクロファージとCD204M2マクロファージがそれに続いて増加し、CD163M2マクロファージは後期のみに一過性に出現することが分かった。さらに、デスミン陽性の筋線維芽細胞の出現は少なく、ビメンチンと $\alpha$ -SMA陽性の筋線維芽細胞が線維化病変の形成に深く係わることが示された。

ANITの単回投与による急性胆管上皮傷害と連回投与による胆管線維症では、ともにMHCクラスII発現マクロファージ/樹状細胞が線維化の病変形成に極めて重要であることが分かった。さらに、TAAによる肝小葉中心性の肝細胞傷害とANITによるグリソン鞘の胆管傷害におけるマクロファージの出現には違いがあった。特に、CD68M1マクロファージ/CD163M2マクロファージとMHCクラスII発現マクロファージの出現パターンは異なっていた。すなわち、ANIT投与による胆管上皮傷害においては、MHCクラスII発現マクロファージ/樹状細胞が病変形成に極めて重要であり、一方、AAによる小葉中心性肝細胞傷害では、CD68M1マクロファージとCD163M2マクロファージが重要な役割を演じることが示された。異なる化学物質による異なる傷害組織に依存して、機能の異なるマクロファージが出現することが分かったが、しかしなぜ異なるマクロファージが出現するのかは今後の検討課題である。しか

し、異なるマクロファージが機能特性を指標として、化学物質の特異的な肝毒性が評価できる可能性が示された。肝毒性をM1/M2マクロファージ分極化の観点から評価する際において、本研究は有用なデータを提示していると考ええる。

### 3) クロドロネート投与による肝マクロファージ枯渇試験：

#### 1 研究内容及び方法

リポソームに含包されたクロドロネートは、肝マクロファージに特異的に取り込まれることで、アポトーシスを惹起させる。その結果、肝マクロファージが枯渇する。クロドロネート投与による肝マクロファージ枯渇試験を、TAAとANITの単回投与による急性モデルに適用することで、肝マクロファージが介在する/介在しない状態での肝毒性を評価した。以下の3つの実験を行った。

#### 2 研究成果、考察、今後の課題

・**クロドロネート投与によるクッパー細胞枯渇状態における肝逸脱酵素の変化**：リポソームに含包されたクロドロネートはCD163発現M2クッパー細胞に特異的に取り込まれ、枯渇させることが分かった。さらに、CD68M2マクロファージやMHCクラスII発現マクロファージもクッパー細胞の枯渇程度ではないがクロドロネートにより減少することが分かった。このような肝マクロファージの減少は、クロドロネートの単回投与後1週間持続し、その後は徐々に回復することが分かった。興味ある所見として、クロドロネート投与によるクッパー細胞枯渇条件下では、肝細胞には組織学的な異常がないにも拘わらず、肝逸脱酵素であるASTとALTが有意に増加した。これは、肝細胞から放出される肝逸脱酵素のクッパー細胞によるクリアランスが不十分であったためと考えられる。一方、クロドロネートを含まないリポソームのみを投与すると、それを貪食したCD163発現M2クッパー細胞が増加・活性化し、ASTとALT値が減少した。これらの成果は、肝恒常性維持において、クッパー細胞が重要な役割を演じていることを示す。

以上の成果から、すなわち、毒性試験において、クッパー細胞の機能状態（投与された化学物質による機能の亢進、あるいは抑制状態）を把握しておくことは、肝毒性の解析において重要であることが分かった。

・**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TAA誘発の肝小葉中心性肝細胞傷害の病態解析**：クロドロネート前投与による肝マクロファージ枯渇条件下でのTAA誘発急性肝細胞傷害病変を解析したところ、初期にはCD163M2クッパー細胞やCD68M1マクロファージが著しく減少することが分かった。組織傷害に反応するマクロファージが枯渇していることから、M1マクロファージ関連の起炎因子（TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ ）の産生が低下し、その結果M1マクロファージによる細胞傷害性の低下により肝小葉中心部の凝固壊死の形成が遅延した。また肝細胞傷害と関連する肝逸脱酵素ALTとASTが遅れて増加した。一方、修復過程においては、M2マクロファージから産生されるTGF- $\beta$ 1が減少していることに加え、M1とM2マクロファージによる傷害組織の貪食・排除が不十分であることから、その為凝固壊死部位に異栄養性石灰沈着が生じ、その結果傷害部位の修復が遅延することが分かった。

肝病変形成におけるマクロファージ機能の二面性 (M1型による傷害の助長vs. M2型による組織修復亢進) が明らかとなった。

・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ANIT誘発の小葉間胆管上皮傷害の病態解析：クロドロネートを前投与し、その後胆管上皮を傷害するANITを単回投与した。その結果、グリソン鞘に浸潤するCD68M1マクロファージとCD163M2マクロファージがクロドロネート投与により減少し、さらにMHCクラスII、Iba-1、ガラクチン-3そしてCD204発現マクロファージも同様に減少した。ASTとALTは、クロドロネート投与によりマクロファージが枯渇したことから増加した。また、M1関連因子 (MCP-1、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6) や線維化 (修復) に関連するM2因子 (TGF- $\beta$ 1、IL-1 $\beta$ 、TIMP-1、IL-10) は、クロドロネート投与により低下した。ANITによる組織傷害後の修復過程においては、マクロファージが枯渇していることから、TGF- $\beta$ 1により誘導される筋線維芽細胞が減少したためにグリソン鞘に生じる線維化が軽減していた。

肝マクロファージの状態を把握しておくことは、化学物質、特に肝マクロファージの機能低下を生じさせる物質の肝毒性を評価する際には、極めて重要であることが示された。

(4) 研究項目名：ラット肝マクロファージ株HS-Pを用いた*in vitro*での肝毒性発現機序の解明；HS-P株を用いた*in vitro*実験の実施 (担当者名：山手丈至 所属機関名 大阪府立大学)

#### 1 研究内容及び方法

M1あるいはM2マクロファージ誘導因子をHS-P株に添加し、肝マクロファージを介した細胞傷害性と免疫介在性の毒性発現機序の解明を試みた。さらに、化学物質により傷害された組織リガンドをHS-Pに添加し、M1とM2マクロファージ関連因子を解析することで、化学物質によるM1/M2マクロファージ機能に与える影響を検討する目的で、*in vivo*での肝傷害組織に発現するリガンドを解析した。

#### 2 研究成果、考察、今後の課題

・マクロファージ誘導因子添加によるHS-P株の特性変化 (*in vitro*実験系の確立)：HS-Pは、ラットの肝臓に自然発生した組織球性肉腫から代表研究者が確立したマクロファージ株である。M1マクロファージ誘導因子であるIFN- $\gamma$ をHS-Pに添加したところ、マクロファージの誘導や分化に関わる因子MCP-1、CSF-1、CSF-2、そして炎症誘起に係わるTNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10が増加した。さらに、抗原提示マクロファージの機能特性であるTLR-4やRT1Baの発現が増加した。一方、M2マクロファージを誘導するIL-4を添加するとIL-10やIL-12aが増加した。さらに、INF- $\gamma$ の刺激によりガラクチン-3とIba-1のマクロファージ抗原が増加した。この現象は、*in vivo*における肝細胞傷害の病態を反映していると考えられた。ラット由来のマクロファージ株はこのHS-Pのみであることから、*in vivo*でのラットを用いた毒性試験の成果を*in vitro*で検証する上で、このHS-P株は有用な実験系になり得ると考える。

・**肝傷害組織から産生されるリガンドの特性解析**：化学物質により傷害された組織から多様なリガンドが放出されマクロファージ、特に抗原提示マクロファージが活性化されることで、複雑な肝毒性病変が誘起されると考えられている。TAAによる小葉中心性の肝細胞傷害では、HSP-A1Bが初期に、続いてHMGB1 HMGB2、そしてS100A4などの組織リガンドが増加することが分かった。HS-P株を用いたリガンド添加に対する解析は今後の課題である。

**(5) 研究項目名：総括と今後の展望（担当者名：山手丈至 所属機関名 大阪府立大学；他2名の分担研究者とともに討議）**

1 研究内容及び方法

肝毒性病変に出現するM1/M2マクロファージの多様な機能特性とその誘導因子を検出する評価手法を構築し、それを利用した肝マクロファージによる肝細胞傷害性と免疫介在性の毒性発現機序の解明を試みた。得られたデータは、学会発表や論文等で早急に公表する（一部は論文としてすでに公表している）。また、今後さらに検討すべき問題点をクローズアップし、この課題のさらなる展開を図る。究極的には、以下に記載するように食品健康影響評価における本研究課題の応用性・有用性を追究した。

2 研究成果の応用性・有用性

・**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**：本研究において確立した肝マクロファージの機能特性を指標とした肝毒性を評価する手法（免疫組織化学染色法、*in situ* hybridization法やマイクロダイゼクション法によるRT-PCR法によるmRNA解析など）は、化学物質の量反応性の軽微な肝毒性変化を把握する上で有用な新規評価手法になると考える。

・**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**：化学物質の肝毒性を評価する際に、肝マクロファージが関与することが示された。そのような肝毒性のメカニズム解析において、今回提示した*in vivo*と*in vitro*の実験系を用いたデータ解析は、肝毒性を評価するパラメーターの緻密化につながると考える。毒性試験におけるこれらの実験系の有用性が示された。

・**食品健康影響評価への応用性**：本研究で得られたデータから、化学物質による肝障害の発生には、マクロファージが極めて重要な役割を演じることが分かった。毒性試験においてマクロファージの出現程度や機能（M1/M2 分極化による解析）を評価する実験系を加えることで、データの緻密化を図ることができると考える。これは、肝毒性発現のメカニズム解明に加え、精度の高い科学的なADI 設定につながると考える。

3 今後の課題：

時間的な制約の大きい単年度の研究課題であったが、研究者間の相互の協力により、目標とした研究成果は得られた。この課題を遂行する過程で、以下の3点については今後さらに検討が必要であると考えられた。

・**M1とM2マクロファージ分極化に基づいたフェノバルビタールによる肝細胞肥大と、アセ**

トアミノフェン誘発免疫介在性肝傷害病変におけるマクロファージ機能解析：フェノバルビタールは、肝細胞肥大を惹起することが知られる。CAR遺伝子が、その肥大に関与することが明らかにされつつあるが、肝細胞の周囲を取り巻く肝マクロファージから肝細胞を肥大させる刺激因子（増殖因子や細胞周期関連因子など）が産生されている可能性がある。肝細胞肥大モデルを作製し、肝マクロファージの機能特性を、肝細胞肥大との関連で今後解析する必要がある。また、アセトアミノフェンは免疫介在性の肝毒性が疑われている。すでに完了したTAAモデルでの肝細胞傷害性の肝毒性発現機序と、このアセトアミノフェンの免疫介在性の肝障害を、M1/M2マクロファージ分極化の観点で解析し、両者を比較することで、新たな肝毒性発現機序が解明できると考えている。肝マクロファージの枯渇と活性化条件下における実験を含め、アセトアミノフェンの肝毒性実験は今後遂行すべき研究である。これは本課題の検証実験にもつながる。

・マクロファージ活性化状態での肝毒性の発現機序の解析：クロドロネートによるマクロファージ枯渇条件下でのTAAやANITの肝毒性発現機序の評価については終了し、肝マクロファージの枯渇が肝病変形成に影響を与えるとする新たな知見を得た。しかし、一方で、肝マクロファージ(クッパー細胞)を活性化した状態での肝毒性発現機序の解析については、検討課題として残った。特に、腸内細菌から産生される因子が肝毒性に副次的に影響を与えていることが推測されることから、大腸菌の内毒素LPS(毒性発現に至らない用量で刺激)による肝マクロファージ活性化状態における、TAA誘発肝障害の発生機序は今後検討すべきである。化学物質によっては、直接的あるいは間接的に肝マクロファージを活性化する可能性があり、そのような状態での肝毒性の発現機序は、これまで全く検討されていない。新たな肝毒性の発現機序の解明と、得られたデータの緻密化につながる。

・化学物質による肝細胞傷害組織からのリガンドと抗原提示マクロファージに発現するToll-like receptor (TLR)の肝毒性誘起における役割：化学物質による肝障害の一つの機序として、傷害組織から抗原性を獲得したリガンドと、それに反応するMHCクラスII発現の抗原提示マクロファージ(特にTLR-2やTLR-4)が深く関わることで新たに分かってきた。しかし、肝での傷害組織特異的なリガンド発現や、抗原提示マクロファージにおけるTLRの発現機序はほとんど解明されていない。この研究の遂行は、免疫介在性肝毒性の病理発生機序の解明にもつながる。TAAとアセトアミノフェン誘発肝障害モデルを中心とした*in vivo*実験と、さらには、ラット肝マクロファージ株HS-Pを用いたリガンドとTRL発現との相互の関連性を分子レベルで*in vitro*の実験系で追究する必要がある。

### III 本研究を基に発表した論文等（平成26年度の研究期間（単年度 2014年度）に行ったもの）

#### 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（2編）

K. K. Wijesundera, T. Izawa, A. H. Tennakoon, H. Murakami, H. M. Golbar, C. Katou-Ichikawa, M. Tanaka, M. Kuwamura and J. Yamate, M1- and M2-macrophage

polarization in rat liver cirrhosis induced by thioacetamide (TAA), focusing on Ibal and galectin-3. *Experimental and Molecular Pathology* 96 (3): 382-392, 2014.

K. K. Wijesundera, T. Izawa, H. Murakami, A. H. Tennakoon, H. M. Golbar, C. Katou-Ichikawa, M. Tanaka, M. Kuwamura and J. Yamate. M1- and M2-macrophage polarization in thioacetamide (TAA)-induced rat liver lesions; a possible analysis for hepato-pathology. *Histology and Histopathology* 29 (4): 497-511, 2014.

(本研究から派生して得られた研究成果の論文:肝マクロファージ解析とは関連しないが、作製したモデルを用いた研究)

H. M. Golbar, T. Izawa, K. K. Wijesundera, A. H. Tennakoon, C. Katou-Ichikawa, M. Tanaka, M. Kuwamura and J. Yamate. 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.

T. Izawa, H. Murakami, K. K. Wijesundera, H. M. Golbar, M. Kuwamura and J. Yamate. Inflammatory regulation of iron metabolism during thioacetamide-induced acute liver injury in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* 66 (2-3): 155-162, 2014.

## 2 本研究を基にした学会発表の実績 (4回)

H. M. Golbar, T. Izawa, B. Alexandra, K. K. Wijesundera, A. H. Tennakoon, C. Katou-Ichikawa, M. Tanaka, M. Kuwamura and J. Yamate. 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.

M. Pervin, H. M. Golbar, B. Alexandra, M. Uemura, T. Izawa, M. Kuwamura and J. Yamate. 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. B0-56. September 9-12, 2014.

M. Pervin, H. M. Golbar, B. Alexandra, K. K. Wijesundera, T. Izawa, M. Kuwamura, and J. Yamate. 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.

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）

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）：なし

#### 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	5	化学物質による肝障害については、一次的なダイレクトな肝細胞傷害に関する研究は多いが、肝マクロファージを介した二次的な肝障害機序の研究は少ない。肝マクロファージの機能特性を M1/M2 分極化の観点から解析する試みは新たな肝毒性の評価手法の構築と、肝毒性のメカニズム解明につながることから、本課題の遂行には妥当性があると考えられる。
2 研究目標の達成度	4	単年度の研究課題で、時間的な制約があったにも拘わらず、分担研究者とは同一の機関に所属していたことから、2つの異なる化学物質の単回と反復投与の動物実験を精力的に進めることができた。かつ、肝マクロファージの新たな解析法とそれに基づいた肝毒性の評価手法を確立するための基礎データを十分に得ることができた。免疫介在性の肝毒性発現機序の解析が一部検討課題として残ったが、当初の目標は達成できたと考える。
3 研究成果の有用性	5	肝マクロファージの出現状態により肝毒性病変の程度(広がり・出現経過)が変化することが分かった。特に、肝逸脱酵素は、肝マクロファージの状態を把握して評価すべきであることが提言できた。毒性試験において肝マクロファージの機能の評価する実験手法を加えることで、肝毒性発現のメカニズム解明とデータの緻密化、それに基づく精度の高いADI設定につながる事が分かった。今後、異なる化学物質による検証実験が必要であるが、この研究課題から得られた成果は有用なデータを提供すると考える。
合計	14	
<p>総合コメント: 微小環境因子に応じて多彩な機能変化を現わす肝マクロファージの特性を、肝毒性評価手法の一つの指標として、毒性病理学的な観点から構築することができたとともに、肝マクロファージの機能異常に起因する肝毒性発現メカニズムの一端を解明することができた。この手法は、毒性試験における肝毒性のメカニズム解明への応用が可能で、かつその手法を応用することで精度の高いend-pointを導くことができる。これは、毒性試験の肝機能パラメーターの緻密化につながり、その結果食品健康影響評価における科学的なADI設定が可能となる。本課題は、有用な情報を提示している。</p>		

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。

この報告書は、食品安全委員会の委託研究事業の成果について取りまとめたものです。本報告書で述べられている見解及び結論は研究者個人のものであり、食品安全委員会としての見解を示すものではありません。