

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)

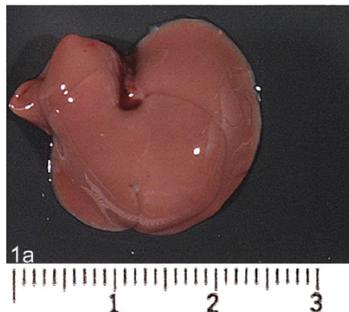
主任研究者 **吉成浩一**(静岡県立大学薬学部 衛生分子毒性学分野)

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)

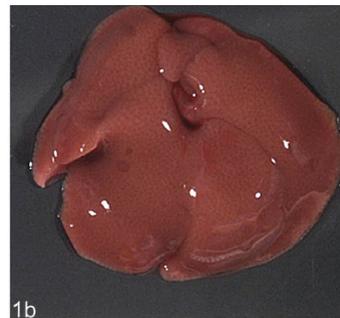
化学物質誘発性の肝肥大と肝細胞肥大

- ✓ 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。

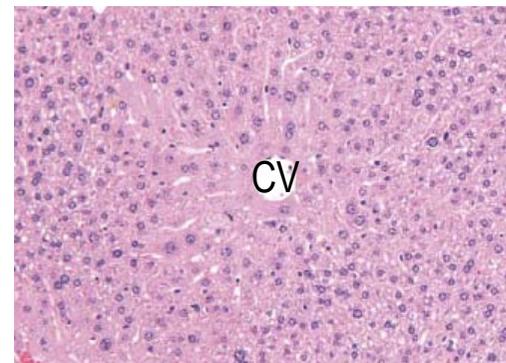
Mouse



Control



PB-treated



PB-treated

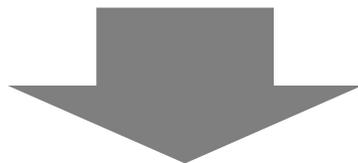
PB, phenobarbital
CV, central vein

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		アセフェート		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
111	血管	125	甲
112	心臓	126	上皮
113	腎臓	127	副
114	膀胱/尿管/尿道	128	目

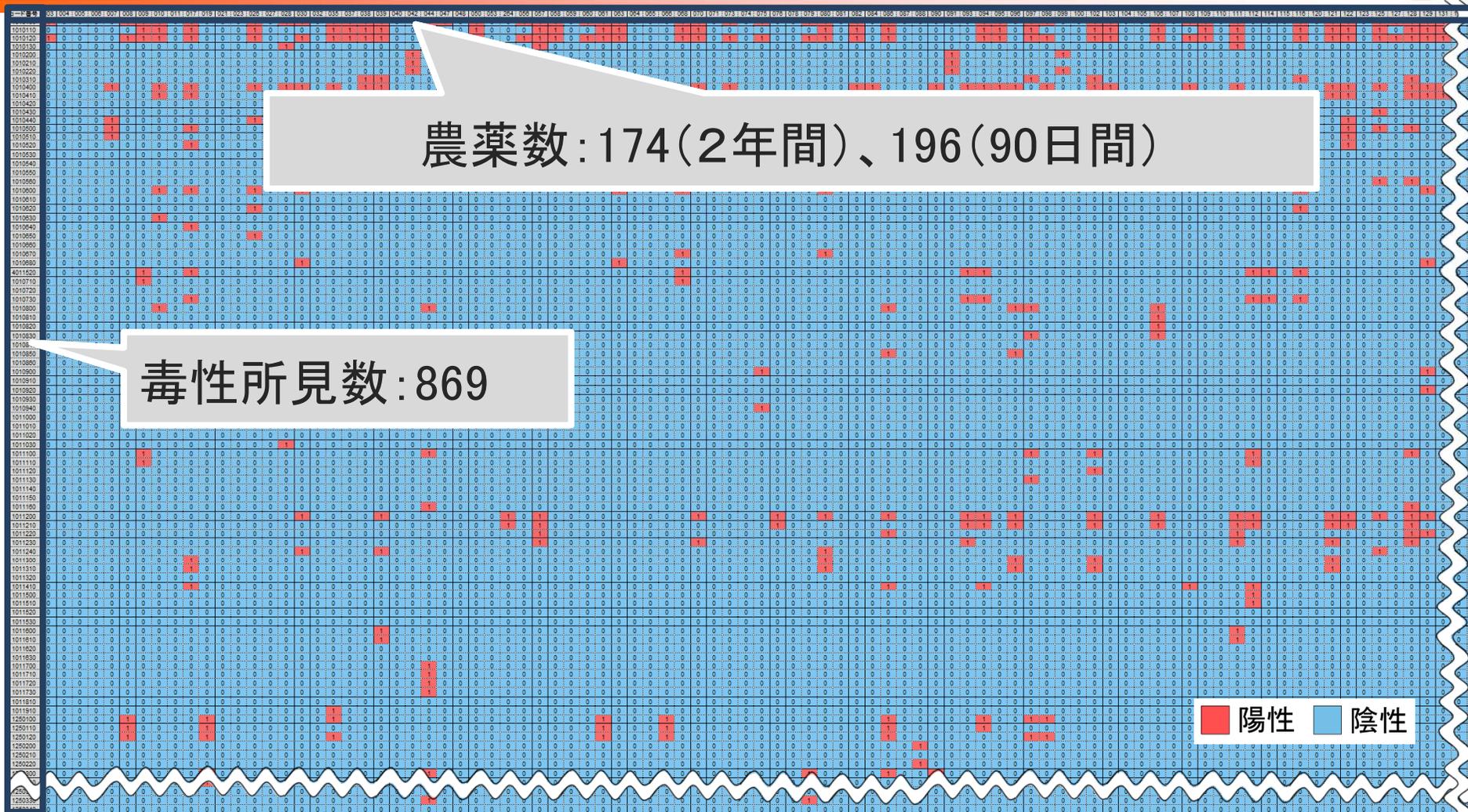
101：肝臓/胆嚢

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	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
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	
	総タンパク (TP)	2020100	34	0.001	0.370	<0.001	
血液生化学	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 α) 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 μ M)
 - ラットAHR/CAR/PXR/PPAR α レポーターアッセイ
 - ラットPPAR α 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 α 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 α	PPAR α -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

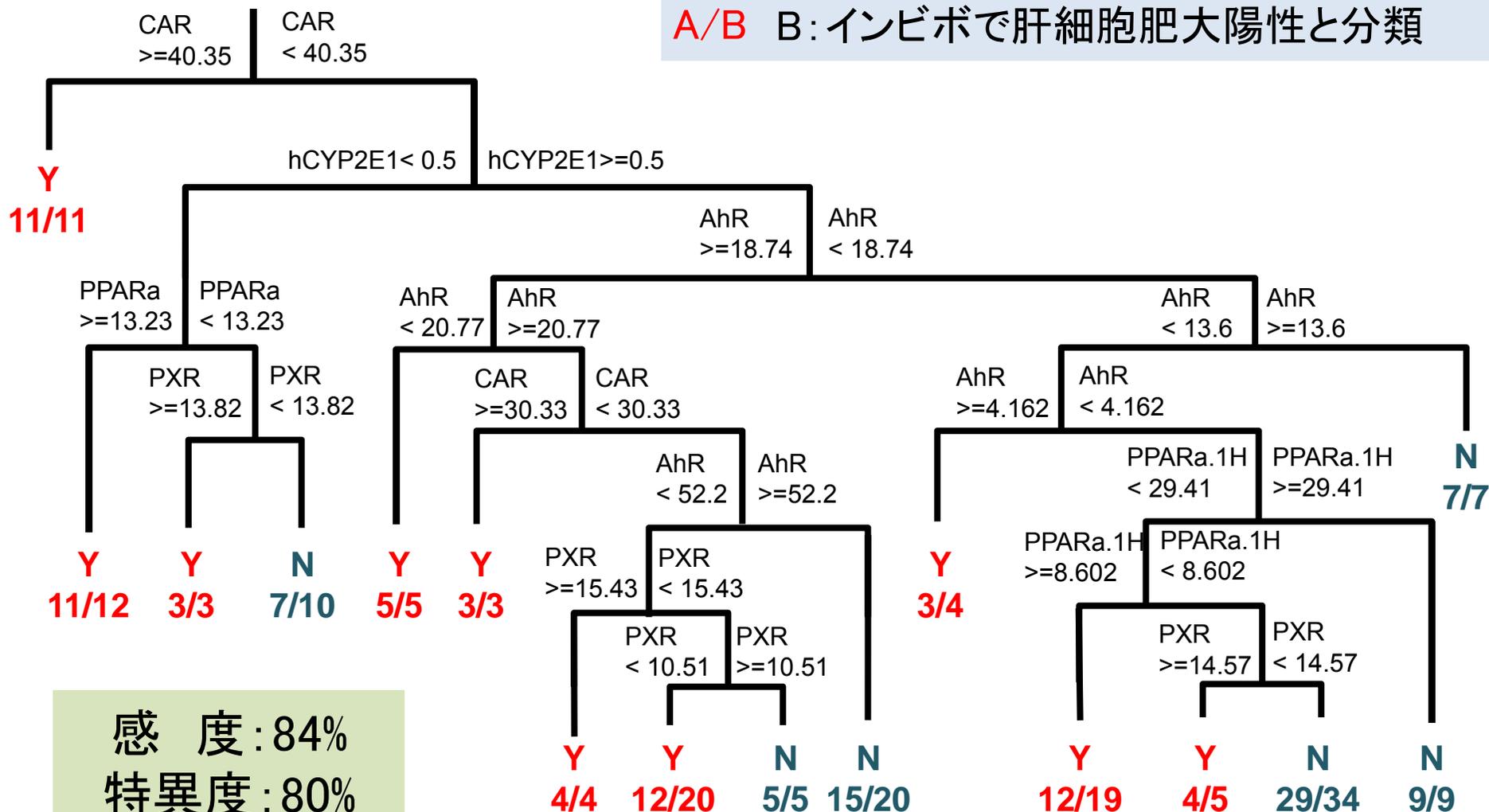
決定木

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 α)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 μ 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 α)				
			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 α)				
			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 α				
			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 α 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 α 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 α				
			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 α 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。

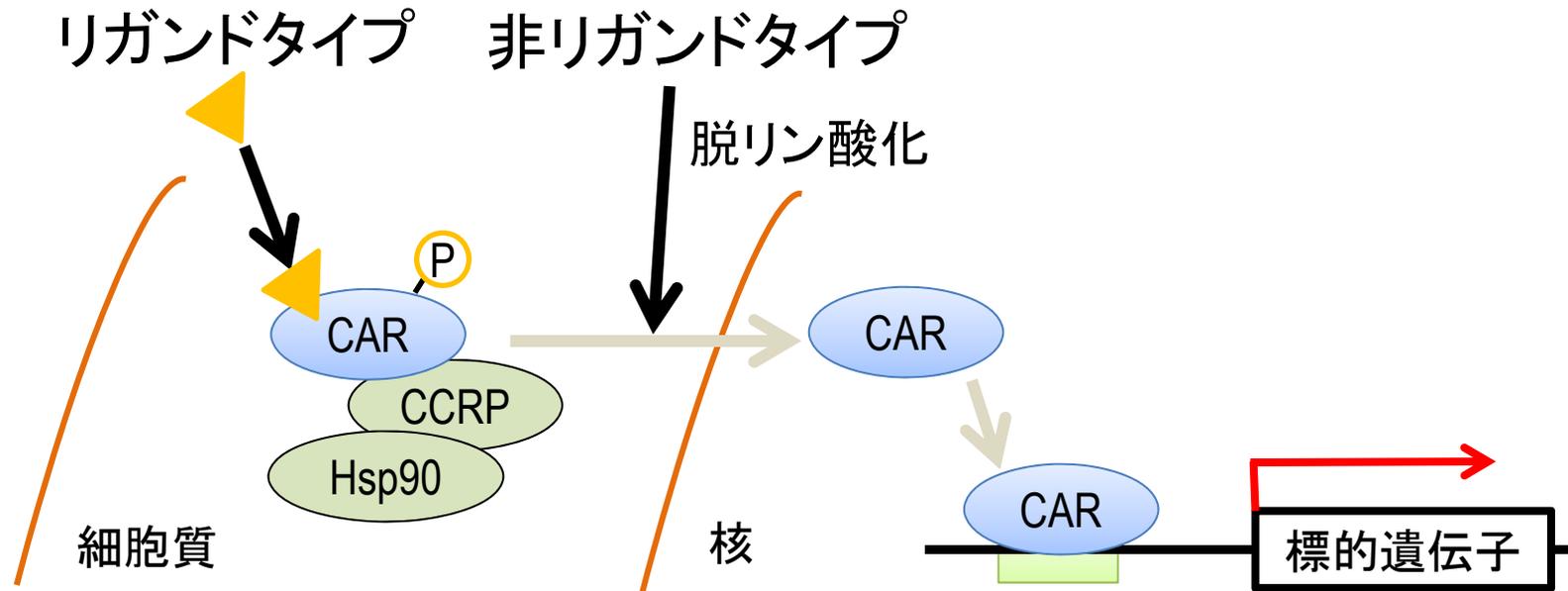
考えられる原因

- 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



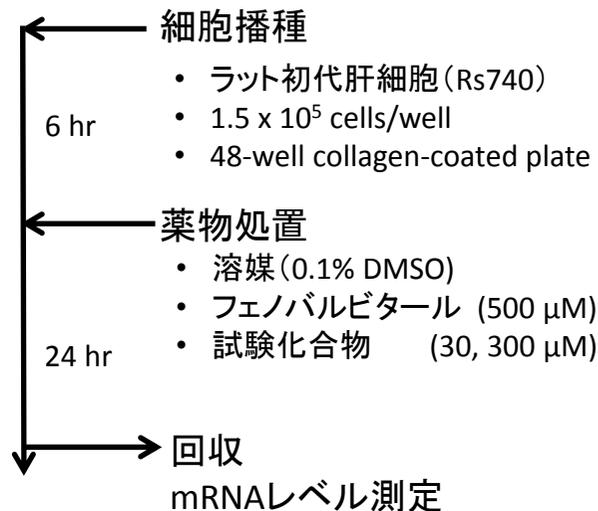
- CARには、リガンド結合による活性化の他に、リン酸化シグナル経路を介し核内移行を促進する活性化経路が存在する。
- 原因は明らかとなっていないが、現在のCARレポーターアッセイでは、非リガンドタイプの活性化物質を検出できない。

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

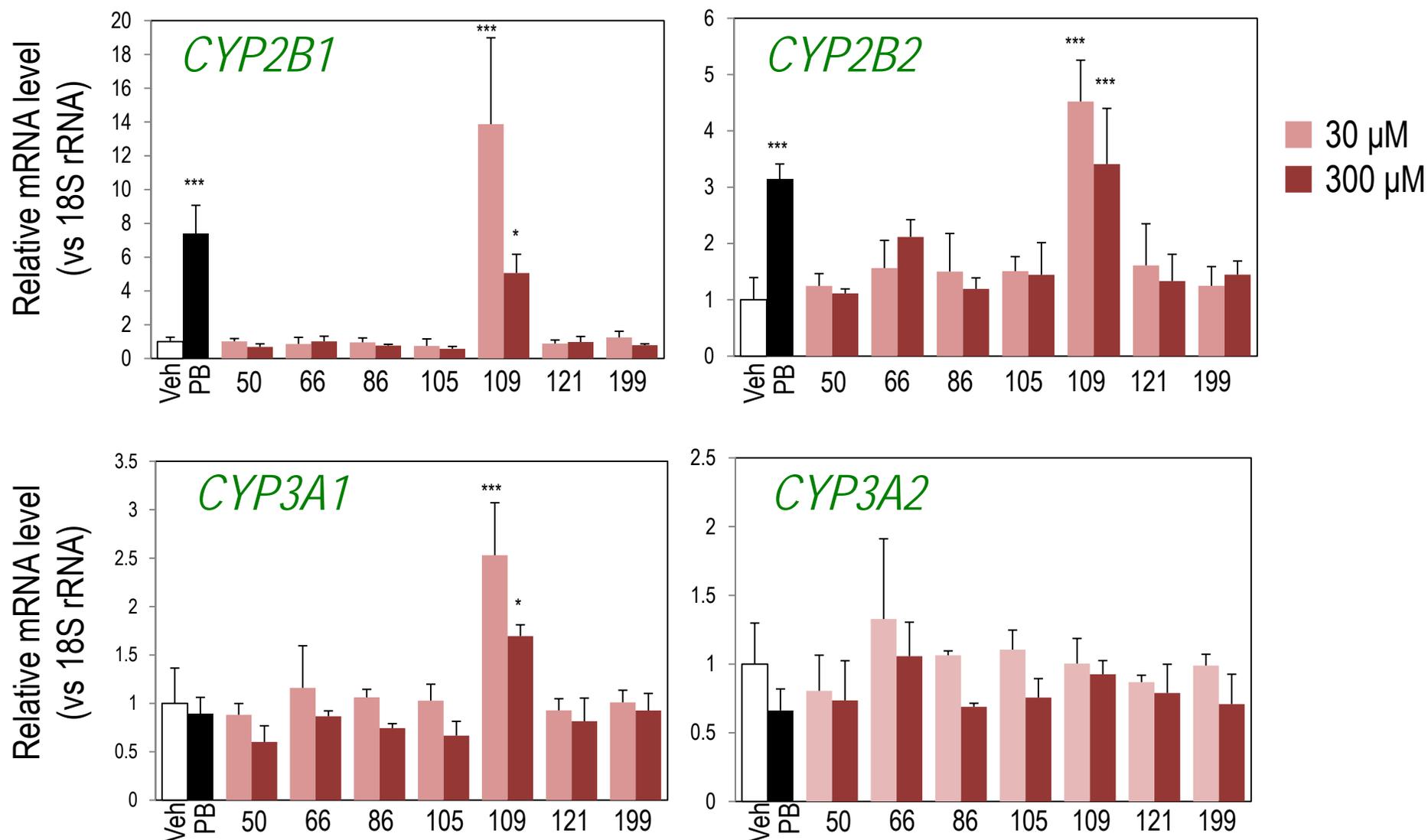


試験化合物

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。