

研究成果報告書（研究要旨）

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（課題番号：1302） （研究期間：平成25年度～平成26年度）
主任研究者名	研究者名：吉成 浩一 所属機関：静岡県立大学

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 *in vitro* 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, PPAR α) に対する作用を *in vitro* 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 PPAR α 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 *in vitro* 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。

研究成果報告書（本体）

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 (研究期間：平成25年度～平成26年度)
主任研究者名	所属：静岡県立大学 氏名：吉成 浩一（研究課題番号：1302）

I 研究の期間および研究目標等

1 研究期間

平成25年度～平成26年度

2 研究目的

本研究は、化学物質による肝肥大の毒性学的意義を明らかにして、その評価手法の開発を推進するための基盤情報の収集を目的とする。具体的には、公開されている毒性情報や文献情報から肝肥大を示す物質を選別し、これらについて、酵素誘導や肝細胞増殖との関連が報告されている核内受容体に対する作用の評価ならびに酵素誘導作用の評価をインビトロ試験により実施する。他方、被験物質の化学物質情報および毒性試験成績を収集し体系的にまとめる。これらにより、被験化学物質の「化学構造情報」、「インビボ肝肥大作用」、「インビトロ核内受容体活性化作用」、「インビボ・インビトロ酵素誘導作用」および「その他のインビボ毒性」の関連性を明らかにし、肝細胞肥大やそれを誘発する化学物質を、生物学的・毒性学的特徴から推測される作用機序により分類する。

また、インビトロ試験を用いた生化学的、分子生物学的解析（遺伝子発現解析）等により、肝肥大の主要因と考えられている酵素誘導が肝細胞機能に及ぼす影響を明らかにする。これにより、酵素誘導の毒性学的意義の解明を目指す。

必要性

化学物質が生体内に取り込まれると、肝臓はしばしば肥大する。肝肥大は肝細胞肥大と肝細胞増殖により起こり、後者は肝発がんとも関連するが、一般的にはいわゆる「肝肥大」の生理学的・毒性学的意義についてはほとんど分かっていない。化学物質のばく露を中止すると、多くの場合次第に肝肥大は消失する。また、肝肥大を示す化学物質の多くは化学物質の解毒排泄に重要な薬物代謝酵素を誘導する。これらのことから、化学物質による肝肥大の多くは、薬物代謝酵素誘導による適応反応と考えられており、毒性学的に重要な指標とは考えられていない。しかし、一部の化学物質は、肝細胞肥大だけでなく肝細胞増殖も引き起こし、発がん性を示すものがある。また、肝細胞肥大と様々な肝機能障害が同一の標的分子（核内受容体等）を介して平行して起こる可能性がある。このため、ある種の化学物質による肝肥大は、毒性と関連しており、他の指標と組み合わせることによって有益な毒性マーカーとなる可能性もある。これらのことから、肝肥大の作

用機序と毒性学的意義の解明は、化学物質の安全性評価において重要と考えられる。

この課題に取り組むに当たり、既知の化学物質の毒性情報を有効に利用して解析することは重要かつ有益と考えた。特に、作用機序の情報を得るために、いくつかのインビトロ試験を利用することは、既報の毒性情報を理解・解析する上で、非常に有益と考えられる。そして、肝肥大作用を示す既知の化学物質を、予想される作用機序に基づきクラス分け（カテゴリー化）することは、将来的な毒性評価研究の重要な基盤情報になると考えられる。

上述のように、現在、化学物質による肝肥大の主要な原因は、酵素誘導と考えられている。しかし、酵素誘導が本当に肝肥大の原因であるか否か、あるいは酵素誘導そのものの毒性学的意義については不明であり、解析もほとんど行われていない。したがって、酵素誘導の肝機能に対する影響、特に毒性発現と関連した作用を明確にすることは、肝肥大の毒性学的意義を解明する上で非常に重要な課題と考えられる。

期待される成果

化学物質による薬物代謝酵素誘導機構に関しては、近年その分子基盤がほぼ解明されつつある。酵素誘導作用を示す化学物質は、4つの化学物質応答性の転写因子、すなわち aryl hydrocarbon receptor (AHR)、constitutive active/androstane receptor (CAR)、pregnane X receptor (PXR) および peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) のいずれかまたは複数を活性化し、これら転写因子が薬物代謝酵素遺伝子の発現を転写レベルで亢進する。他方、これら転写因子は様々な肝機能と関連していることが明らかになっている。例えば、AHR、CAR および PPAR α はいずれも齧歯動物における肝細胞増殖や肝発がんと密接に関連している。実際、これら核内受容体（AHR は構造的には核内受容体ではないが、機能的類似性からここでは核内受容体として取り扱う）の活性化物質であるダイオキシン（AHR）、フェノバルビタール（CAR）、フィブラート薬（PPAR α ）は、齧歯動物において強く酵素誘導と肝細胞肥大を起こす一方で、肝細胞増殖も引き起こし、肝発がんプロモーターとして作用する。さらに最近主任研究者のグループでは、PXR の活性化物質は、マウスにおいて CAR や PPAR α 依存的な細胞増殖を増強することを見出しており（Shizu, et al., *PLoS ONE*, 2013）、PXR 活性化物質も、単に酵素誘導を引き起こすだけでなく、肝細胞増殖や肝発がんに関連している可能性がある。

本研究では、これまで肝肥大・肝細胞肥大を起こすことが知られていた化学物質について、上記核内受容体に対する作用の評価を行うと共に、化学物質の酵素誘導作用や遺伝子発現プロファイル解析を行う。これにより、複数の肝肥大性の化学物質について、インビボ毒性試験では得ることができない、作用機序に関する情報を得ることができる。これら情報は、これまで不明であった肝肥大（肝細胞肥大および肝細胞増殖）の作用機序の解明につながると期待される。

さらには、これらのインビトロ評価結果と公開されているインビボ毒性情報を総合的に解析することで、核内受容体活性化作用・酵素誘導作用と各種毒性情報との関連性が明らかになる。また、本申請研究ではインビトロ・インビボ作用に基づいて肝肥大性の化学物質を分類することから、将来的な肝肥大の毒性学的意義の解明、さらには毒性評価手法の開発に向けた基盤情報を提供できる。

また、これまで肝細胞肥大の原因として薬物代謝酵素誘導が考えられてきたが、分子機序に基づく科学的根拠はない。本研究では、酵素発現システムを利用して酵素誘導が肝細胞機能に与える影響を解析することから、本研究成果は、酵素誘導と肝細胞肥大の関連性に関する直接的な知見を提供するものであり、肝細胞肥大の毒性学的考察を行う上で非常に有益な情報を提供する。

3 研究体制 (※研究項目ごと個別課題ごとに研究担当者およ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)
化学物質による肝肥大の作用機序情報収集と分類	既知の肝肥大誘発性化学物質の情報収集	吉成浩一 (静岡県立大学)
化学物質による肝肥大の作用機序情報収集と分類	肝肥大誘発性化学物質の核内受容体活性化作用の評価分類	吉成浩一 (静岡県立大学) 小島弘幸 (北海道立衛生研究所) 北村繁幸 (日本薬科大学) 浦丸直人 (日本薬科大学)
化学物質による肝肥大の作用機序情報収集と分類	核内受容体作用のインビトロ・インビボ検証試験	吉成浩一 (静岡県立大学)
酵素誘導が肝機能に及ぼす影響の評価	培養細胞における酵素誘導影響評価	吉成浩一 (静岡県立大学)
酵素誘導が肝機能に及ぼす影響の評価	インビボにおける酵素誘導影響評価	吉成浩一 (静岡県立大学)

4 倫理面への配慮について

本研究においては不活化培養細胞および市販のヒト肝細胞を使用した。ヒト肝細胞の使用においては、得られる情報は人種、年齢、性別、死因等のみであり、提供者の人権が損なわれることはない。

遺伝子組換え実験に関しては、「遺伝子組換え生物等の使用の規制による生物の多様性確保に関する法律」および、これに基づく各研究施設の遺伝子組換え実験安全管理規則 (または相当する規則) に則って行い、関連委員会から承認を得て実施した。

動物実験に関しては、東北大学大学院薬学研究科および静岡県立大学の動物実験委員会の承認を得て実施した。

II 研究内容および成果等

1 研究内容および方法

- (1) 研究項目名：化学物質による肝肥大の作用機序情報収集と分類 (研究担当者名：吉成浩一 (静岡県立大学)、小島弘幸 (北海道立衛生研究所)、北村繁幸 (日本薬科大学)、浦丸直人 (日本薬科大学))

- 1) 個別課題名：既知の肝肥大誘発性化学物質の情報収集
 - ・ (独) 製品評価技術基盤機構で公開されている有害性評価支援システム (HESS) データベース、内閣府食品安全委員会で公開されている農薬評価書および食品添加物評価書から、肝肥大・肝細胞肥大、他の毒性兆候、化学物質の特徴を抽出する。これらをデータベースソフトウェア等で体系的に整理する。
 - ・ これらの情報を利用して、肝肥大・肝細胞肥大と他の毒性学的・化学的特徴の関連性を解析する。

- 2) 個別課題名：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 1) で抽出した化学物質のうち、入手可能なものについてラット核内受容体およびヒト核内受容体に対する作用をインビトロ試験により評価する。
 - ・ 評価結果を元に統計学的・情報科学的解析を行ない、肝肥大・肝細胞肥大誘発性化学物質をグループ化する。

- 3) 個別課題名：核内受容体作用のインビトロ・インビボ検証試験
 - ・ 上記 2) で得られたグループ化の妥当性を検証するため、典型的化学物質のラットおよびヒト肝細胞における作用を遺伝子発現プロファイルを基に評価する。
 - ・ 上記 2) の結果から、核内受容体活性化作用以外の機序で肝肥大・肝細胞肥大を起こすと考えられた化学物質について、齧歯動物肝細胞における遺伝子発現変動を解析する。さらに、マウス (野生型および核内受容体欠損マウス) やラット個体にこれらを投与し、組織化学的解析や遺伝子発現プロファイル等により、肝肥大・肝細胞肥大の発現機序を解析する。

- (2) 研究項目名：酵素誘導が肝機能に及ぼす影響の評価 (研究担当者名：吉成浩一 (静岡県立大学))
 - 1) 個別課題名：培養細胞における酵素誘導影響評価
 - ・ 肝細胞 (マウス、ラット、ヒト) にヒト CYP 分子種をアデノウイルスにより発現させ、遺伝子発現の変化を網羅的に解析し、酵素誘導が肝細胞機能に及ぼす影響を解析する。
 - 2) 個別課題名：インビボにおける酵素誘導影響評価
 - ・ マウスにアデノウイルスを感染させて薬物代謝酵素を強制発現し、遺伝子発現解析に加えて、肝の病理学的解析および血液生化学的解析を行う。

2 研究成果、考察、今後の課題

(1) 研究項目名：化学物質による肝肥大の作用機序情報収集と分類（研究担当者名：吉成浩一（静岡県立大学）、小島弘幸（北海道立衛生研究所）、北村繁幸（日本薬科大学）、浦丸直人（日本薬科大学））

1) 個別課題名：既知の肝肥大誘発性化学物質の情報収集

1-1) HESS-DB を利用した解析

(独) 製品評価技術基盤機構で公開されている有害性評価支援システム (HESS) データベース内の 508 物質について、データベースソフトを利用して、肝臓および甲状腺に関する全毒性徴候の有無および臓器重量、血液生化学データを取得した。これらをマイクロソフトエクセルファイルとして整理した。抽出した項目は以下の通りであり、各農薬について、投与量を考慮せず、各所見について有意な変化が認められたか否か（有無）を 1（あり）または 0（なし）として入力した。

臓器重量：肝絶対重量増加、肝絶対重量低下、肝相対重量増加、肝相対重量低下、甲状腺絶対重量増加、甲状腺絶対重量低下、甲状腺相対重量増加、甲状腺相対重量低下

肝臓：accumulation、acidophilic change、adenoma、adhesion、altered foci、amorphous mass、angiectasis、anisonucleosis、apoptosis、arteritis、atrophy、atrophy (centrilobular)、atrophy (diffuse)、bacterium、basophilic change、basophilic materia、bile thrombus、catalase positive granule、ceroid deposition、cholangiofibrosis、chorangities、cirrhosis、cirrhosis peripotal、clear change、congestion、congestion centrilobular、congestion focal、cyst、cyst bile duct、cytomegaly、deformatio、degeneration、degeneration centrilobular、degeneration perilobular、diaphragmatic nodule、dilatation、dilatation bile duct、edema、eosinophilic inclusion body、erythrophagia、extramedullary hematopoiesis、extramedullary hematopoiesis foca、fatty change/vacuolation、fatty change/vacuolation centrilobular、fatty change/vacuolation diffuse、fatty change/vacuolation focal、fatty change/vacuolation modzonal、fatty change/vacuolation nodular、fatty change/vacuolation perilobular、fibrosis、fibrosis capsule capsule、fibrosis focal、fibrosis peripotal、glycogen depletion、glycogen storage、granulation tissue、granuloma、hemorrhage、hemorrhage focal、hepatitis、hydropic degeneration、hydropic degeneration bile duct、hydropic degeneration centrilobular、hydropic degeneration perilobular、hyperplasia、hyperplasia bile duct、hyperplasia kupffer's cell、hyperplasia oval cell、hypertrophy、hypertrophy bile duct、hypertrophy eosinophilic、hypertrophy hepatocyte、centrilobular、hypertrophy hepatocyte、perilobular、hypertrophy kupffer's cell、infarct、infiltration、inflammatory cell、infiltration、inflammatory cell focal、infiltration、inflammatory cell Glisson's sheath、infiltration、inflammatory cell lymphocyte、infiltration、inflammatory cell lymphoid cell、infiltration、inflammatory cell macrophage、infiltration、inflammatory cell mononuclear cell、infiltration、inflammatory cell neutrophil、inflammation、inflammation acute、inflammation chronic、inflammation focal、inflammation perilobular、karyomegaly、malformation、malignant lymphoma、megalocytosis、mineralization、mitosis、mobilization、multinucleated hepatocytes、necrosis、necrosis centrilobular、necrosis focal、necrosis massive、necrosis peripotal、necrosis single cell、peliosis、pericholangitis、pigment deposition、pigment deposition brown pigment、pigment deposition hemosiderin、pigment deposition Kupffer cell、pigment deposition macrophage、proliferation

ration、proliferation bile duct、proliferation kupffer's cell、proliferation oval cell、prominent nucleoli、thrombosis (計115項目)

甲状腺：adenoma、aplasia、unilateral、apoptosis、apoptosis focal、apoptosis follicular cell、apoptosis unilateral、columnar change、follicular epithelium、concretion、cyst、decrease、colloid、degeneration、dilatation、ectopic thymus、goiter、hyperplasia、hyperplasia focal、hypertrophy、hypoplasia、infiltration、inflammatory cell、infiltration、inflammatory cell focal、inflammation、irregularity in shape of follicles、mineralization、pigment deposition、ultimobranchial cyst、vacuolation (計26項目)

血液：ALT 増加、ALT 低下、AST 増加、ALT 低下、 γ -GTP 増加、 γ -GTP 低下、トリグリセリド増加、トリグリセリド低下、総コレステロール増加、総コレステロール低下、グルコース増加、グルコース低下 (計 12 項目)

これらデータを利用して、カイ二乗検定を行い、肝細胞肥大と関連する他の毒性所見の抽出を試みた。その結果、中心性肝細胞肥大(雄：59 物質 (11.6%)、雌：30 物質 (5.9%))と有意 ($P < 0.05$) な関連が認められた徴候は次の通りであった。なお、括弧内の分数の分母は当該徴候が認められた全化合物数を、分子はそのうち中心性肝細胞肥大が認められた化合物数を表している。

雄：

<肝>acidophilic change(1/1)、anisonucleosis(1/1)、basophilic change(1/1)、bile thrombus(1/1)、catalase positive granule(1/1)、extramedullary hematopoiesis(4/10)、fatty change/vacuolation(12/30)、fatty change/vacuolation perilobular(10/14)、granuloma(2/3)、hypertrophy(59/83)、infiltration、inflammatory cell(1/1)、infiltration、inflammatory cell macrophage(1/1)、necrosis centrilobular(2/2)、pericholangitis(1/1)、pigment deposition、kupffer's cell(4/14)

<甲状腺>adenoma(1/1)、columnar change、follicular epithelium(1/1)、hyperplasia(2/4)、hyperplasia focal(1/1)、hypertrophy(5/8)、vacuolation(1/1)

<臓器重量>肝絶対重量増加(32/139)、肝絶対重量低下(1/64)、肝相対重量増加(51/262)、甲状腺絶対重量増加(3/8)、甲状腺相対重量増加(6/15)

<血液>総コレステロール増加(29/77)、トリグリセリド低下(11/38)、グルコース低下(14/49)、 γ -GTP 増加(13/48)、ALT 低下(1/47)、AST 増加(10/30)

雌：

<肝>extramedullary hematopoiesis(2/7)、fatty change/vacuolation(3/14)、fatty change/vacuolation perilobular(3/8)、hypertrophy(30/48)

<甲状腺>adenoma(1/1)、hyperplasia(1/1)、hyperplasia focal(1/1)、hypertrophy(5/7)

<臓器重量>肝絶対重量増加(26/141)、肝相対重量増加(30/232)、甲状腺絶対重量増加(3/6)、甲状腺相対重量増加(3/7)

<血液>総コレステロール増加(18/61)、トリグリセリド増加(5/35)、グルコース増加(3/15)、グルコース低下(6/24)、 γ -GTP 増加(7/31)、ALT 増加(8/54)

予想通り、中心性肝細胞肥大と甲状腺所見との関連性が認められた。第 II 相薬物代謝

酵素のグルクロン酸抱合酵素（UGT）は甲状腺ホルモンの代謝に関与することが知られており、UGT 誘導に伴い、一過性の甲状腺ホルモンの代謝亢進、甲状腺刺激ホルモンの分泌亢進が起こり、甲状腺肥大・重量増加が起こることが知られている。UGT はチトクロム P450 と同様に核内受容体 CAR、PXR および AHR を介して誘導されることが知られており、上記甲状腺の所見は酵素誘導に伴うと考えられている。以上のことから、これまで病理組織学的な観察から中心性肝細胞肥大と酵素誘導の関連性が指摘されていたが、HESS-DB の毒性試験データを用いた関連性解析によっても、中心性の肝細胞肥大と薬物代謝酵素誘導の間の関連性を指示する結果が得られた。

1-2) 農薬評価書を利用した解析

食品安全委員会ウェブサイトで公開されている全226（2014年10月1日現在）の農薬評価書をダウンロードし、これら評価書のうち、ラット2年間反復投与毒性試験および発がん性試験の結果が適切に記載されている174の農薬評価書から、またラット90日間反復投与毒性試験の結果が適切に記載されている196の農薬評価書から、記載されている全ての毒性所見を抽出した。結果は、雌雄別に各徴候（所見）が認められたか否か（有無）を1（あり）または0（なし）としてマイクロソフトエクセルのデータシートに入力した。次いで、同一所見が異なる表記・表現で記載されていることが多かったことから、所見名の整理・統一を行った。現在までに肝臓、甲状腺、血液生化学、血液学、がん/腫瘍の整理が終了した（表1、表2）。これら統一後の所見には7桁のコード番号を割り当てた。7桁のうち、最初の3桁は臓器/組織、血液学、尿/便、外観/行動、腫瘍/がん等の大区分（例えば肝・胆嚢は101）、次の2桁は所見/徴候、検査項目等の中区分（例えば肝臓では、重量増加=01、肥大=04、脂肪化=05、壊死=06、等）、次の1桁は部位/細胞、毒性学的特徴等の小区分（例えば、肝臓101の肥大04では、小葉中心性=1、びまん性=4、等）、最後の1桁はさらなる細分化のための予備番号とした。

得られたデータシートを利用して、各種データ解析を行った。90日毒性試験における肝肥大（肝絶対重量増加および肝相対重量増加）と肝細胞肥大の解析結果を表3～表5に示した。全196農薬のうち、36-43%で肝絶対重量増加が、59-62%で肝相対重量増加が認められた。また、43-46%の農薬で肝細胞肥大が認められ、その多くで肝絶対重量増加（55-67%）および相対重量増加（87-93%）が認められた。これらの統計量に明確な性差は認められなかった。

2年間反復投与毒性試験のデータ解析の結果、肝細胞肥大を発現した農薬の割合は37-39%と90日間に比べて若干低値を示した（表6）。また、肝絶対重量増加は30-36%、肝相対重量増加は45-49%の農薬で認められ、これらの割合も90日間試験と比べて低かった（表7、表8）。

ラットでは、薬物代謝酵素誘導に伴い甲状腺の重量増加がしばしば認められる。そこで次に90日間試験のデータを用いて肝細胞肥大と甲状腺肥大（絶対または相対重量増加）の関連性を調べた。その結果、いずれかの部位の肝細胞肥大を発現した農薬の74%で甲状腺肥大も認められた。また中心性またはびまん性の肝細胞肥大においても65-86%の農薬で甲状腺肥大を認めた。これらのことから肝細胞肥大と甲状腺肥大の間に関連性があることが示唆された。

次に、肝肥大や肝細胞肥大と肝がんとの関連性を解析した（表7、表8）。2年間試験で肝がんを発現した農薬数は雄で12、雌で11であった。雌雄ラット間での重複は少なく、いずれかの性で肝がん・肝腫瘍を誘発した延べ農薬数は19であった（表10）。雄ではこのうち10農薬（83%）で肝絶対重量増加が、11農薬（92%）で肝相対重量増加が、11農薬（92%）で肝細胞肥大が認められた。一方、雌では若干異なる結果が得られた。すなわち、肝絶対重量増加は5農薬（45%）、肝相対肝重量増加は6農薬（55%）でしか認められなかった。肝細胞肥大は8農薬（74%）で認められた。なお、雌雄ラット共ににおいて、肝がんと甲状腺がんの発現の間に関連性は認められなかった（表11）。

肝細胞肥大と甲状腺関連所見の関連性をさらに調べるために、90日間試験データを用いて肝細胞肥大（全肝細胞肥大、中心性、びまん性）と甲状腺所見の関連性をカイ二乗検定により解析した（表12）。なお、解析にはJMP（ver. 11）を利用した。その結果、甲状腺の肥大（重量増加）やろ胞上皮細胞肥大などと、全肝細胞肥大および中心性肝細胞肥大との間に有意な関連性が認められた。一方、興味深いことに、これらの関連性はびまん性の肝細胞肥大では認められなかった。

最後に、肝細胞肥大の毒性学的特徴を明らかにするため、また中心性とびまん性肝細胞肥大の異同を明らかにするため、2年間毒性試験データを用いて肝細胞肥大（全肝細胞肥大、中心性、びまん性）と全毒性所見（中カテゴリーを含む）との関連性をカイ二乗検定により解析した（表13）。その結果、肝重量や甲状腺重量だけでなく、腎臓、中枢神経、血液学、血液生化学などの複数の所見が、肝細胞肥大と有意な関連を示した。血液生化学所見のうち、コレステロール増加や γ -GTP増加はHESS-DBデータを用いた解析においても中心性肝細胞肥大と有意に関連していた。興味深いことに、中心性とびまん性肝細胞肥大の間で、共通して関連が認められた所見といずれかに特異的に関連性が認められた所見が検出された。なお、大きな性差は認められなかった。

表1 毒性所見大カテゴリーリスト

コード	大項目	コード	大項目	コード	大項目
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	末梢神経	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	腎臓	128	副腎	401	腫瘍/がん

表2 肝臓/胆嚢（コード番号 101）の中および少カテゴリー毒性所見リスト

中カテゴリー	小カテゴリー
重量増加	絶対、相対、その他
重量減少	絶対、相対
肝腫大	肝臓
肝細胞肥大	中心性、中間性、周辺性、びまん性
脂肪化/空胞化	中心性、中間性、周辺性、びまん性、限局性、その他
細胞死/炎症	アポトーシス、単細胞、中心性、周辺性、びまん性、限局性、巣状、海綿状変性
増殖/過形成	肝細胞、クッパー細胞、胆管
変性/変化	中心性、中間性、周辺性、びまん性、限局性、その他
色素沈着	中心性、びまん性、クッパー細胞、その他
浸潤/集簇	単核細胞、泡沫細胞、その他
外観	褐色、暗調化、小葉像明瞭化、斑点、表面、その他
変異細胞巣	好酸性、好塩基性、明細胞、その他
嚢胞	肝細胞、胆管
胆管異常	胆管
うっ血	類洞拡張、うっ血、紫斑病
腫瘍	腫瘍、肉芽種、結節
酵素	EH 増加、UDPGT 増加、GST 増加
萎縮/解離	細胞索

表 3. 肝絶対重量増加と肝細胞肥大の関連性 (90 日間)

性別	農薬数	肝絶対重量増加		肝細胞肥大	
		発現	数 (%)	発現	数 (%)
雄	196	あり	71 (36%)	中心性	29 (41%)
				中間性	1 (1%)
				周辺性	3 (4%)
				びまん性	21 (30%)
				なし	20 (28%)
		なし	125 (64%)	中心性	25 (20%)
				中間性	0 (0%)
				周辺性	2 (2%)
				びまん性	14 (11%)
				なし	85 (68%)
雌	196	あり	84 (43%)	中心性	31 (37%)
				中間性	1 (1%)
				周辺性	4 (5%)
				びまん性	25 (30%)
				なし	26 (31%)
		なし	112 (67%)	中心性	18 (16%)
				中間性	0 (0%)
				周辺性	1 (1%)
				びまん性	9 (8%)
				なし	85 (76%)

表 4. 肝相対重量増加と肝細胞肥大の関連性 (90 日間)

性別	農薬数	肝相対重量増加		肝細胞肥大	
		発現	数 (%)	発現	数 (%)
雄	196	あり	116 (59%)	中心性	45 (39%)
				中間性	1 (1%)
				周辺性	5 (4%)
				びまん性	32 (28%)
				なし	36 (31%)
		なし	80 (41%)	中心性	9 (11%)
				中間性	0 (0%)
				周辺性	0 (0%)
				びまん性	3 (4%)
				なし	67 (84%)
雌	196	あり	121 (62%)	中心性	45 (37%)
				中間性	1 (1%)
				周辺性	5 (4%)
				びまん性	33 (27%)
				なし	42 (35%)
		なし	75 (38%)	中心性	4 (5%)
				中間性	0 (0%)
				周辺性	0 (0%)
				びまん性	2 (3%)
				なし	69 (92%)

表 5. 部位別肝細胞肥大・肝重量増加発現農薬数 (90 日間)

性別	農薬数	肝細胞肥大				肝絶対重量増加		肝相対重量増加	
		発現	数 (%)	部位	延べ数	発現	数 (%)	発現	数 (%)
雄	196	あり	91 (46%)	中心性	54	あり	50 (55%)	あり	79 (87%)
				中間性	1				
				周辺性	5	なし	41 (45%)	なし	12 (13%)
				びまん性	35				
		なし	105 (54%)	-	あり	21 (20%)	あり	37 (35%)	
なし				なし	84 (80%)	なし	68 (55%)		
雌	196	あり	85 (43%)	中心性	49	あり	57 (67%)	あり	79 (93%)
				中間性	1				
				周辺性	5	なし	28 (33%)	なし	6 (7%)
				びまん性	35				
		なし	111 (57%)	-	あり	27 (24%)	あり	42 (38%)	
なし				なし	84 (76%)	なし	68 (62%)		

表 6. 部位別肝細胞肥大発現農薬数 (2 年間)

性別	農薬数	肝細胞肥大			
		発現	数 (%)	部位	延べ数
雄	174	あり	68 (39%)	中心性	44
				中間性	1
				周辺性	6
				びまん性	25
		なし	106 (61%)	-	
雌	174	あり	65 (37%)	中心性	41
				中間性	1
				周辺性	5
				びまん性	24
		なし	109 (63%)	-	

表 7. 肝絶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	肝絶対重量増加		肝細胞肥大		肝がん陽性数
		発現	数 (%)	発現	数	
雄	174	あり	61 (35%)	あり	41	10
				なし	20	0
		なし	113 (65%)	あり	27	1
				なし	86	1
雌	174	あり	52 (30%)	あり	36	4
				なし	16	1
		なし	122 (70%)	あり	29	4
				なし	93	2

表 8. 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	85 (49%)	あり	52	10
				なし	33	1
		なし	89 (51%)	あり	16	1
				なし	73	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

表 9. 肝細胞肥大と甲状腺肥大の関連性 (90日間)

性別	農薬数	肝細胞肥大部位	甲状腺肥大陽性数		
			あり (%)	なし (%)	計
雄	196	全て	67 (74%)	24 (26%)	91 (100%)
		中心性	35 (65%)	19 (35%)	54 (100%)
		中間性	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)
		周辺性	4 (80%)	1 (20%)	5 (100%)
		びまん性	29 (83%)	6 (17%)	35 (100%)
雌	196	全て	63 (74%)	22 (26%)	85 (100%)
		中心性	33 (67%)	16 (33%)	49 (100%)
		中間性	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)
		周辺性	3 (60%)	2 (40%)	5 (100%)
		びまん性	30 (86%)	5 (14%)	35 (100%)

表 10. 発がん性試験で肝がんを誘発した農薬

性別	大カテゴリー	小カテゴリー	コード	アセトクロール	アミスルフロム	ベンフルラリン	ベンチアバリカルブイソプロピル	ジクラニリド	ジクロベニル	フルアクリピリム	フルオピラム	フルキサピロキサド	インピラザム	インキサフルトール	メタアルデヒド	メトラクロール	メトミノストロビン	オキサジアゾン	オキサジクロメホン	ピメトロジン	ピリミノバックメチル	シメコナゾール	
				雄	肝重量増加	絶対	1010110	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1
相対	1010120	1	1			1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1
肝細胞肥大		1010400	0		1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
	中心性	1010410	0		1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1
	中間性	1010420	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	周辺性	1010430	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	びまん性	1010440	0		0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0
腫瘍・がん		4010100	1		1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1
	肝細胞腺腫	4010110	1		1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1
	肝細胞がん	4010120	1		0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
雌	肝重量増加	絶対	1010110	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1
		相対	1010120	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1
	肝細胞肥大		1010400	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
		中心性	1010410	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1
		中間性	1010420	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		周辺性	1010430	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		びまん性	1010440	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0
	腫瘍・がん		4010100	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0
		肝細胞腺腫	4010110	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0
		肝細胞がん	4010120	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0

表 11. 肝細胞肥大と肝がんの関連性（2年間）

性別	農薬数	肝細胞肥大		がん陽性数	
		発現	数	肝がん	甲状腺がん
雄	174	あり	68	11	8
		なし	106	1	11
雌	174	あり	65	8	3
		なし	109	3	5

表 12. 肝細胞肥大と甲状腺所見の関連性解析（90日間）

コード	中カテゴリー	小カテゴリー	雄				雌			
			肝細胞肥大 農薬数	全体	中心性	びまん性	肝細胞肥大 農薬数	全体	中心性	びまん性
				1010400	1010410	1010440		1010400	1010410	1010440
			91	54	35		85	49	35	
1250100	重量増加		24	0.092	0.244	0.684	17	0.018	0.028	0.523
1250110		絶対	20	0.079	0.431	0.379	15	0.058	0.044	0.822
1250120		相対	22	0.030	0.137	0.527	17	0.018	0.028	0.523
1250190		その他	1	0.282	0.536	0.640	0			
1250200	重量減少									
1250210		絶対								
1250220		相対								
1250300	ホルモン値変動		12	0.147	0.014	0.912	12	0.093	0.006	0.912
1250310		T3増加	4	0.030	0.001	0.706	5	0.010	0.004	0.190
1250320		rT3増加								
1250330		T3減少	5	0.770	0.702	0.899	3	0.724	0.737	0.416
1250340		T4増加	3	0.061	0.005	0.416	3	0.046	0.003	0.416
1250350		T4減少	8	0.836	0.520	0.590	6	0.739	0.632	0.315
1250360		T4結合能増加	1	0.351	0.536	0.640	1	0.380	0.563	0.640
1250370		TSH 増加	9	0.213	0.007	0.589	9	0.149	0.003	0.589
1250380		T4結合能低下	1	0.351	0.536	0.640	1	0.380	0.563	0.640
1250390		その他								
1250400	肥大/過形成		29	0.000	0.000	0.666	26	0.000	0.000	0.844
1250410		甲状腺	5	0.127	0.008	0.291	5	0.094	0.004	0.291
1250420		る胞上皮細胞肥大	23	0.000	0.000	0.521	20	0.000	0.000	0.725
1250430		る胞増加/肥大	5	0.770	0.702	0.899	5	0.447	0.433	0.899
1250440		る胞上皮細胞過形成	7	0.034	0.008	0.451	5	0.010	0.004	0.190
1250450		勝る胞細胞過形成								
1250460	る胞性嚢胞	1	0.282	0.104	0.032	0				
1250510	空胞化	る胞細胞	2	0.186	0.381	0.507	2	0.214	0.412	0.507
1250600	細胞死/炎症									
1250610		炎症								
1250620		壊死								
1250700	コロイド変性		4	0.885	0.908	0.706	3	0.724	0.314	0.416
1250710		塩基性化								
1250720		凝集	2	0.919	0.381	0.233	1	0.380	0.563	0.640
1250730		欠乏	2	0.919	0.475	0.507	2	0.849	0.412	0.507
1250790		その他								
1250800	色素沈着									
1250810		甲状腺	1	0.282	0.104	0.640	1	0.252	0.082	0.640
1250820		る胞細胞								
1250900	色調変化									
1250910		甲状腺								
1250920		甲状腺	1	0.282	0.104	0.640	1	0.252	0.082	0.640
1251000	鉱質沈着									
1251010		る胞細胞								
1251020		コロイド								
1259900	その他									
1259910		甲状腺								
1259920		甲状腺	1	0.351	0.536	0.640	1	0.380	0.563	0.640

：各所見の農薬数が9(196農薬の5%)以上、かつP<0.05

表 13. 肝細胞肥大と全毒性所見の関連性解析 (2年間)

A. 雄

臓器	所見名 (中・小カテゴリー)	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	89	< 0.001	< 0.001	0.012
	絶対重量増加	1010110	60	< 0.001	< 0.001	0.085
	相対重量増加	1010120	84	< 0.001	< 0.001	0.017
	腫大	1010310	12	< 0.001	0.035	< 0.001
	脂肪化/空胞化	1010500	28	< 0.001	< 0.001	0.002
	脂肪化/空胞化その他	1010560	12	0.006	0.158	0.042
	細胞死/炎症	1010600	16	0.008	0.014	0.546
	外観変化	1011100	14	0.034	0.320	0.013
	変異細胞巣	1011200	34	< 0.001	0.003	0.017
	好酸性変異細胞巣	1011210	20	< 0.001	0.005	0.122
	変異細胞巣その他	1011240	10	0.031	0.690	0.126
	肝腫瘍/がん	4010100	12	< 0.001	0.035	0.004
	肝細胞腺腫	4010110	12	< 0.001	0.035	0.004
腎臓	重量増加	1130100	43	0.330	0.879	0.038
	絶対重量増加	1130110	24	0.027	0.586	0.003
	相対重量増加	1130120	42	0.262	0.799	0.031
	増殖/過形成	1130700	15	0.466	0.658	0.022
精巣	精巣腫瘍/がん	4010810	10	0.890	0.722	0.720
中枢神経	脳ChE 活性阻害	1190610	11	0.007	0.050	0.170
甲状腺	重量増加	1250100	19	0.917	0.462	0.662
	相対重量増加	1250120	16	0.563	0.978	0.875
	肥大/過形成	1250400	26	< 0.001	0.006	0.035
	る胞上皮細胞肥大	1250420	10	0.005	0.008	0.126
	る胞上皮細胞過形成	1250440	14	0.034	0.320	0.094
	コロイド変性	1250700	9	0.068	0.028	0.451
	甲状腺腫瘍/がん	4011000	20	0.839	0.560	0.868
甲状腺る胞細胞腺腫	4011010	19	0.691	0.462	0.789	
血液学	平均赤血球容積 (MCV)	2010500	36	0.014	0.632	0.029
	MCV 減少	2010520	27	0.013	0.519	0.047
	平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH)	2010600	31	< 0.001	0.125	0.001
	MCH 減少	2010620	23	0.015	0.229	0.066
	平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC) 減少	2010720	13	0.525	0.599	0.863
	血小板数	2010800	21	0.016	0.329	0.006
	赤血球ChE 活性低下	2011910	14	0.002	0.025	0.119
血液生化学	総タンパク	2020100	36	< 0.001	0.002	0.006
	総タンパク増加	2020110	22	< 0.001	< 0.001	< 0.001
	アルブミン	2020200	21	0.016	0.662	< 0.001
	アルブミン増加	2020210	14	0.001	0.101	< 0.001
	アルブミン・グロブリン比	2020300	13	0.016	0.062	0.007
	グロブリン	2020400	20	0.031	0.257	0.025
	グロブリン増加	2020410	9	0.011	0.538	0.006
	ALT	2020600	14	0.007	0.022	0.094
	ALT増加	2020610	13	0.016	0.062	0.313
	ビリルビン	2021100	11	0.069	0.355	0.025
	γ-GTP	2021200	32	< 0.001	0.006	0.009
	γ-GTP 増加	2021210	32	< 0.001	0.006	0.009
	コレステロール	2021700	44	0.023	0.095	0.638
中性脂肪	2021800	22	0.086	0.766	0.050	
尿/便	尿比重	2030200	16	0.563	0.562	0.875
外観/行動	外観変化	3021000	83	0.271	0.864	0.045
	削瘦	3021020	71	0.107	0.603	0.020

B. 雌

臓器	所見名 (中・小カテゴリー)	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	84	< 0.001	< 0.001	0.008
	絶対重量増加	1010110	52	< 0.001	< 0.001	0.298
	相対重量増加	1010120	79	< 0.001	< 0.001	0.003
	脂肪化/空胞化	1010500	24	0.001	0.001	0.066
	脂肪化/空胞化その他	1010560	12	0.026	0.025	0.033
	細胞死/炎症	1010600	12	0.026	0.025	0.212
	色素沈着	1010900	19	< 0.001	< 0.001	0.074
	クッパー細胞色素沈着	1010930	9	0.009	0.020	0.067
	色素沈着その他	1010940	10	0.025	0.005	0.107
	外観変化	1011100	11	0.011	0.012	0.616
	変異細胞巣	1011200	24	< 0.001	< 0.001	0.235
	好酸性変異細胞巣	1011210	17	< 0.001	< 0.001	0.186
	肝腫瘍/がん	4010100	11	0.011	0.077	0.019
	肝細胞腺腫	4010110	11	0.011	0.077	0.019
腎臓	重量増加	1130100	40	0.109	0.857	0.048
	相対重量増加	1130120	39	0.079	0.935	0.039
	色素沈着	1130900	19	0.002	0.010	0.074
	尿細管色素沈着	1130910	17	0.012	0.003	0.570
	腎症	1132110	26	0.283	0.949	0.025
中枢神経	脳ChE 活性阻害	1190610	12	0.034	0.198	0.161
甲状腺	重量増加	1250100	16	0.250	0.168	0.929
	相対重量増加	1250120	16	0.250	0.168	0.929
	肥大/過形成	1250400	25	< 0.001	< 0.001	0.279
	る胞上皮細胞肥大	1250420	11	< 0.001	< 0.001	0.616
	る胞上皮細胞過形成	1250440	13	0.002	0.046	0.052
	コロイド変性	1250700	9	0.009	0.002	0.413
副腎	重量増加	1270100	13	0.466	0.470	0.275
	相対重量増加	1270120	13	0.466	0.470	0.275
血液学	平均赤血球容積 (MCV)	2010500	37	0.014	0.576	0.005
	MCV 減少	2010520	30	0.004	0.660	< 0.001
	平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH)	2010600	33	0.121	0.919	0.038
	MCH 減少	2010620	25	0.031	0.572	0.018
	血小板数	2010800	22	< 0.001	0.002	0.006
	血小板数増加	2010810	19	< 0.001	0.002	0.012
	赤血球ChE 活性低下	2011910	14	0.016	0.131	0.128
血液生化学	総タンパク	2020100	34	0.003	0.370	< 0.001
	総タンパク増加	2020110	24	< 0.001	0.083	< 0.001
	グロブリン	2020400	25	0.009	0.572	< 0.001
	グロブリン増加	2020410	14	< 0.001	0.264	< 0.001
	ビリルビン	2021100	12	0.109	0.025	0.605
	γ-GTP	2021200	22	0.001	0.040	0.462
	γ-GTP 増加	2021210	21	0.002	0.094	0.400
	血糖	2021600	12	0.109	0.409	0.003
	血糖減少	2021620	10	0.117	0.207	0.010
	コレステロール	2021700	62	< 0.001	0.017	< 0.001
	コレステロール増加	2021710	49	< 0.001	< 0.001	0.006
コレステロール減少	2021720	13	0.466	0.161	0.052	
カルシウム	2022000	17	0.047	0.550	0.038	
尿/便	尿比重	2030200	12	0.325	0.903	0.715
	尿中pH 上昇	2030410	10	0.117	0.005	0.204
体重	低下	3010100	140	0.010	0.175	0.049
	増加抑制	3010120	140	0.010	0.175	0.049
	摂水	3021100	11	0.207	0.301	0.676

2) 個別課題名：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

本個別課題では、毒性試験データとインビトロレポーターアッセイを利用して、肝細胞肥大と酵素誘導との関連性を実験的手法により解析した。

薬物代謝酵素の誘導機構の概要はほぼ解明されており、核内受容体と呼ばれる転写因子が重要な役割を果たしている。すなわち、CYP1A 酵素の誘導には AHR、CYP2B/2C/3A 酵素の誘導には PXR および CAR、CYP4A 酵素の誘導には PPAR α が中心的に働く。またグルクロン酸抱合酵素の誘導には AHR、CAR および PXR が関与することも知られている。そこで、ラット個体を用いた毒性試験において肝細胞肥大を示した化合物について、これらの酵素誘導関連核内受容体 (AHR、PXR、CAR、PPAR α) に対する作用をインビトロで評価し、酵素誘導作用を推定することとした。また、CYP2E1 では、上記酵素とは異なり、基質のばく露により酵素タンパク質が安定化され、酵素誘導が起こることが知られている。

HESS-DB 化合物を利用した解析

HESS-DB から小葉中心性肝細胞肥大を起こす化学物質を 81 種、起こさない化学物質 90 種を選出した。これら化合物について、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。また、本研究で用いた PPAR α レポーターアッセイでは、内因性 PPAR γ による転写活性化作用が認められたことから、PPAR α リガンド活性を評価可能なラット PPAR α ワンハイブリッドアッセイも行った。被験物質濃度は 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。また溶媒処置群と対照群で t 検定を行い有意差がつかなかった場合、および増加率が負の値を示した場合、増加率を「0」とした。なお、3 濃度の増加率のうち、最も高い値を核内受容体活性化作用として後の解析に利用した。

CYP2E1 基質の判定は、当研究室で開発されたインシリコヒト CYP2E1 代謝予測システムを用いて行った。なお CYP2E1 の基質特異性にはヒトとラットの間に大きな種差がないことが知られている。本評価により基質と判定された場合には「1」、非基質と判定された場合には「0」とデータシート上で表した。

レポーターアッセイの結果を図 1 に示した。小葉中心性肝細胞肥大陽性物質 81 種中、いずれかのアッセイで陽性となった化学物質は 78 種であり、小葉中心性肝細胞肥大陰性物質では、90 種中 80 種がレポーターアッセイで陽性となった。

小葉中心性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するためにカイ 2 乗検定を行った (図 2)。その結果、PXR で $P = 0.07$ と関連傾向が認められたが、小葉中心性肝細胞肥大と単独の核内受容体活性化との有意な関連性は認められなかった。さらに、ROC 解析を行ったところ、いずれのアッセイにおいても強い関連性は認められなかった (図 3)。

そこで次に、複数の核内受容体活性化作用ならびに CYP2E1 基質予測結果を利用して、小葉中心性肝細胞肥大と酵素誘導の関連性を解析することとした。解析には、決定木解析 (R の mvpart パッケージを使用) を利用し、小葉中心性肝細胞肥大の有無 (HESS-DB 毒性試験データ) を目的変数として、核内受容体活性化作用および CYP2E1 基質予測結果を説明変数とした。その結果、感度 (陽性物質を正しく陽性と判断できる確率) は 84%、

特異度（陰性物質を正しく陰性を判断できる確率）は 80%、一致率（陽性と陰性を共に正しく判断できる確率）は 82%と、試験物質を精度よく分類することができた（図 4）。

さらに、決定木解析の結果から、小葉中心性肝細胞肥大を起こす 10 種の条件を見出した（図 5）。レポーターアッセイの結果から明らかになったように、1 つの化合物が複数の核内受容体活性化作用を示す場合が多く（図 1）、図 5 の結果からも、酵素誘導作用の有無は複数の核内受容体作用の組合せで決定されていると考えられた。

一方で、決定木解析（図 4、図 5）の結果から、一部の化合物はインビボで肝細胞肥大陽性であるにも関わらず、インビトロで核内受容体活性化作用を示さないことが明らかになった。したがって、これら化学物質は酵素誘導に関連しない機序で肝細胞肥大を誘発する可能性がある。一方で、以下に述べるようなアッセイ系ならびにデータ解析手法の不十分さによる偽陰性の可能性も否定できない。例えば、①Nrf2 等の他の転写因子を介した酵素誘導機序が存在すること、②2 進木の決定木では解析（分類）が不十分である可能性、③レポーターアッセイの弱点である化学物質の脂溶性（物理化学的性状）を考慮していないこと（インビボでの吸収とインビトロでの細胞内取り込み効率の違い）、④データ処理方法の不適切さ（t 検定の使用）、⑤CAR 活性化評価系の不十分さ、などが考えられる。

今回得られた決定木では、CAR 活性化作用が第 1 決定要因となっていることから、⑤の CAR 活性化評価系の問題についてさらなる解析を行なうこととした。CAR の活性化は、リガンドによる直接的な受容体への結合によるもの、また phenobarbital などの非リガンド型化合物による細胞内リン酸化シグナルを介した間接的なものの 2 種類がある。現在、後者の活性化物質を検出可能な CAR 活性化評価系は存在しないため、本研究で用いた評価系はリガンド型の活性化物質のみを検出可能である。そこで、本研究で用いた核内受容体作用陰性物質を初代培養ラット肝細胞に 24 時間処置し、CAR の標的である CYP2B1 遺伝子の mRNA レベルの変化を解析した（図 6）。その結果、用いた 7 化合物のうち、1 化合物には CYP2B 誘導作用があることが明らかになった。この化合物はおそらく間接型の CAR 活性化物質であると考えられた。今後、酵素誘導作用陰性であった 6 化合物を用いたインビボ解析などを進めることで、酵素誘導と関連しない新たな肝細胞肥大発現機序の解明に繋がる可能性がある。

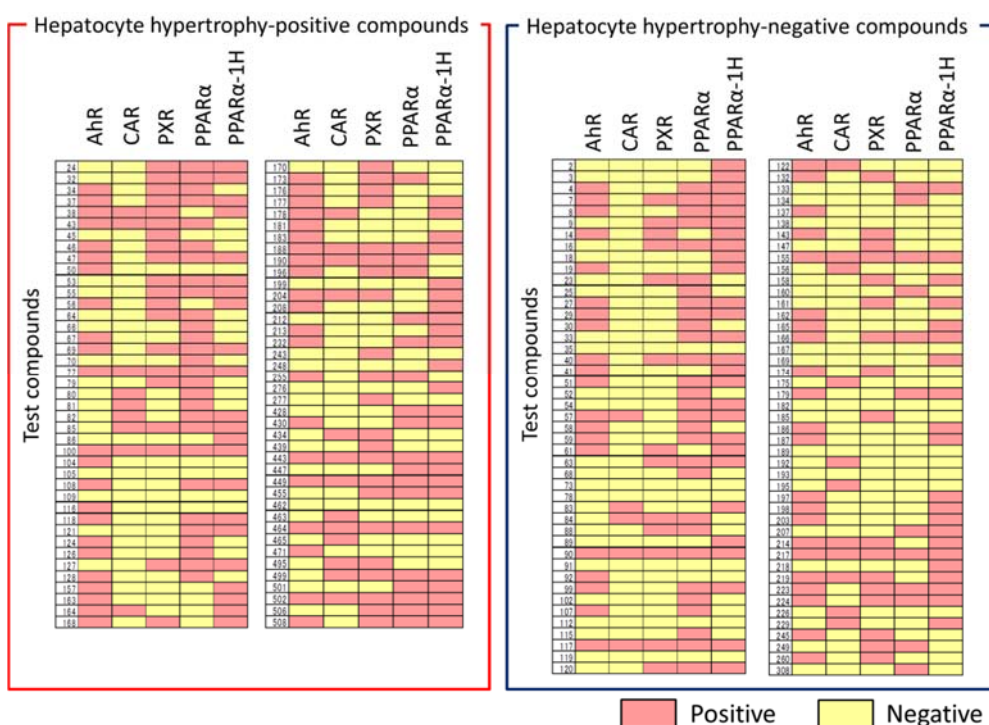


図 1. HESS-DB化合物の核内受容体活性化作用

各核内受容体評価系の陽性対照物質は以下の通り：AHR；1 M 3-MC、CAR；30 μM ART、PXR：1 μM PCN、PPARα：30 μM bezafibrate (BZF)、PPARα-1H；3 μM BZF. PPARα-1H；PPARα one-hybrid assay.

		Hepatocyte hypertrophy		p値
		Positive	Negative	
Activation of AhR	Positive	44	42	0.36
	Negative	37	48	
Activation of CAR	Positive	22	16	0.20
	Negative	59	74	
Activation of PXR	Positive	45	37	0.07
	Negative	36	53	
Activation of PPARα	Positive	47	40	0.09
	negative	34	49	
Activation of PPARα(1H)	Positive	46	55	0.53
	negative	35	35	

図 2. 肝細胞肥大と核内受容体活性化作用の関連性解析：カイ二乗検定

カイ二乗検定にはPrismを使用した。

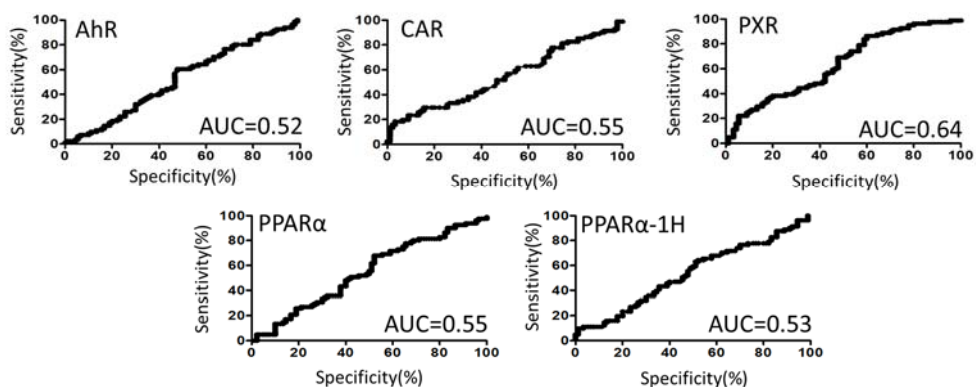


図3. 肝細胞肥大と核内受容体活性化作用の関連性解析：ROC解析
Prismを使用した。

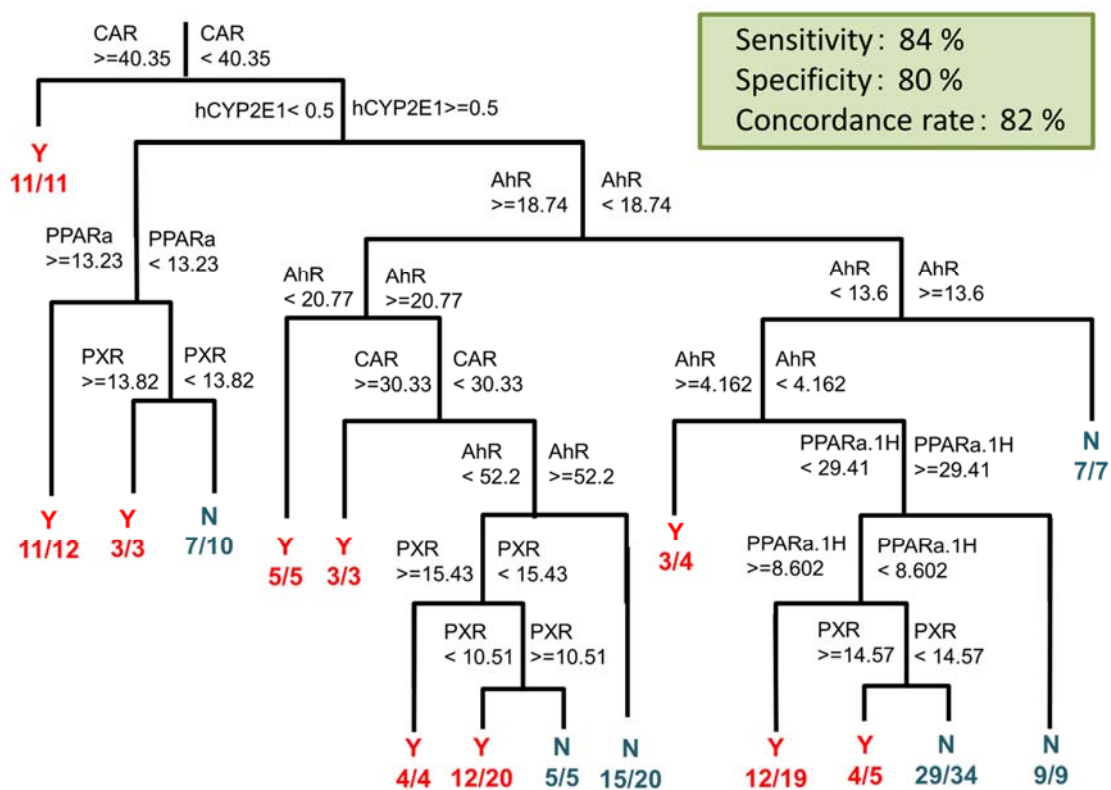


図4. HESS-DB化合物による決定木

Y：肝細胞肥大陽性、N：肝細胞肥大陰性。YまたはNの下のは、分母が決定木により各枝に分類された化学物質の総数を表し、分子はそのうちHESS-DBの結果からインビボで肝細胞肥大を起こすことがわかっている化学物質の数を表している。

No.	CAR activation	PPAR α activation	PXR activation	AhR activation	PPAR α -1H activation	CYP2E1
1	Strong	—	—	—	—	—
2	<Moderate	>Moderate	—	—	—	Non-substrate
3	<Moderate	<Weak	>Moderate	—	—	Non-substrate
4	<Moderate	—	—	Weak	—	Substrate
5	Moderate	—	—	>Moderate	—	Substrate
6	<Weak	—	>Moderate	Moderate	—	Substrate
7	<Weak	—	<Weak	Moderate	—	Substrate
8	<Moderate	—	—	Weak	—	Substrate
9	<Moderate	—	—	non	Moderate	Substrate
10	<Moderate	—	>Moderate	non	<Weak	Substrate

図5. 決定木により分類された肝細胞肥大性物質グループの特徴

—: 分類に必要としない。

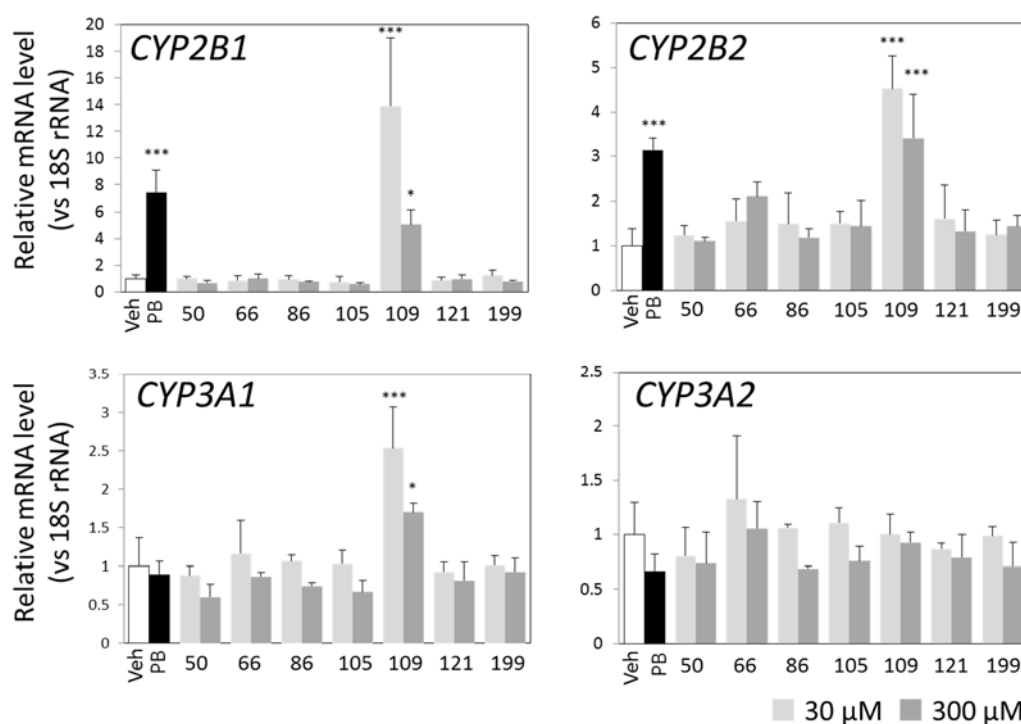


図6. ラット肝細胞における酵素誘導作用

ラット肝細胞を 48-well プレートに播種し、6 時間後に被験物質 (50: nicotinonitrile、66: 4,4'-sulfonyldipehnl、86: 1-bromo-3-chloropropane、105: 1,1,2,2-tetra-bromoethane、109: 3,3-bis(*p*-dimethylaminophenyl)-6-dimethylaminophthalidine、121: 4-ethylmorphine、199: thiophene) を 30 または 300 μ M で処置した。陽性対照には 0.5 mM phenobarbital (PB) を用いた。データは平均 \pm SD (n=3)。*, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$ (Dunnett's test, vs. 溶媒群)。Veh, vehicle.

農薬を利用した解析

食品安全委員会から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。溶媒処置群の標準偏差 (SD) の 2 倍の値 (2SD: 約 20%) を超えた場合に有意な変化とし、それ以外は有意な変化なしとした。これら農薬のうち、農薬評価書の 90 日反復投与毒性試験の結果が適切に記載されている 113 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 農薬を除く 108 農薬について、肝肥大および肝細胞肥大との関連性を解析した (表 14、表 15)。なお、解析においては、雌雄いずれかのラットでいずれかの投与量で肝重量増加または肝細胞肥大が見られたか否かで解析した。また、AHR、CAR、PXR および PPAR α 活性化作用陽性率は、それぞれ、41%、39%、70% および 31% であった (表 14)。また、82% の農薬がいずれかの核内受容体を活性化した (表 15)。

まず、単一の核内受容体活性化作用との関連性を解析した (表 14)。その結果、肝絶対重量増加陽性農薬と相対重量増加陽性農薬では、共に CAR 活性化作用陽性率は低かったのに対し、他の核内受容体に対する作用は異なった。すなわち、絶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のに対し、肝相対重量陽性農薬では、AHR 活性化作用陽性率は高く、また PPAR α 活性化作用陽性率は低かった。

肝細胞肥大陽性農薬では、PPAR α 活性化作用陽性率が低いのみであった。一方、肝細胞肥大の発現部位別に解析を行なうと、中心性肝細胞肥大陽性農薬とびまん性肝細胞肥大陽性農薬では、各核内受容体に対する作用が著しく異なった。AHR 活性化作用陽性率は、中心性肝細胞肥大陽性農薬で高かったのに対し、びまん性肝細胞肥大陽性農薬で低かった。また、中心性陽性農薬では他の 3 つの核内受容体陽性率に著しい特徴は認められなかったのに対し、びまん性肝細胞肥大陽性農薬では CAR 活性化陽性率は高く、PXR および PPAR α 活性化作用陽性率は低かった。

次に、いずれかの核内受容体活性化作用の有無でグループ分けして解析した (表 15)。その結果、肝細胞肥大陽性農薬では、核内受容体活性化作用陽性率が高いことが示された。興味深いことに、肝細胞肥大を部位別に分けて解析したところ、中心性肝細胞肥大陽性農薬では、核内受容体活性化作用陽性率は高かったのに対して、びまん性肝細胞肥大陽性農薬では、著しい核内受容体活性化作用陽性率の上昇は認められなかった。

以上の結果から、中心性肝細胞肥大陽性の農薬では、本研究で使用した 4 つの核内受容体のいずれかを活性化することが示されたことから、中心性肝細胞肥大と薬物代謝酵素誘導との関連性が示唆された。一方、びまん性肝細胞肥大陽性の農薬では、核内受容体活性化作用陽性率の著しい増加は認められなかったことから、個別の核内受容体作用の結果と併せて考えると、中心性とびまん性肝細胞肥大の発現では、酵素誘導に関連する 4 つの核内受容体に対する作用が異なり、両部位での肝細胞肥大と酵素誘導との関連性に違いがあることが強く示唆された。

表 14 農薬の肝肥大・肝細胞肥大作用と核内受容体活性化作用の関連性（個別解析）

毒性所見 (全 108 農薬)	核内受容体活性化作用																
	AHR				CAR				PXR				PPARα				
	所見名	数 (%)	有無	オックス比	オックス比 (標準)	オックス比	オックス比 (標準)	オックス比	オックス比 (標準)	オックス比	オックス比 (標準)	オックス比	オックス比 (標準)	オックス比	オックス比 (標準)		
絶対重量増加	所見名	46 (41%)	62 (59%)	0.74	-	42 (39%)	66 (61%)	0.64	-	76 (70%)	32 (30%)	2.38	-	34 (31%)	74 (69%)	0.46	-
	あり	24	31	0.77	1.09	19	36	0.53	0.69	40	15	2.67	1.26	17	38	0.45	0.95
	なし	22	31	0.71		23	30	0.77		36	17	2.12		17	36	0.47	
相対重量増加	あり	80 (71%)	45	0.78	1.20	28	52	0.54	0.54	56	24	2.33	0.93	23	57	0.40	0.62
	なし	28 (29%)	17	0.65		14	14	1.00		20	8	2.50		11	17	0.65	
	あり	59 (55%)	33	0.79	1.14	24	35	0.69	1.18	41	18	2.28	0.91	17	42	0.40	0.76
肝細胞肥大 (全て)	あり	49 (45%)	29	0.69		18	31	0.58		35	14	2.50		17	32	0.53	
	なし	37 (34%)	20	0.85		14	23	0.61	0.93	26	11	2.36		11	26	0.42	0.88
	あり	71 (66%)	42	0.69	1.23	28	43	0.65		50	21	2.38	0.99	23	48	0.48	
びまん性 肝細胞肥大	あり	23 (21%)	8	0.53	0.66	12	11	1.09	2.00	14	9	1.56	0.58	6	17	0.35	0.72
	なし	85 (79%)	47	0.81		30	55	0.55		62	23	2.70		28	57	0.49	
	あり	8	15	0.53		12	11	1.09	2.00	14	9	1.56	0.58	6	17	0.35	0.72

各肝臓所見と各核内受容体活性化作用のオックス比を計算した。各肝臓所見の場合分けをしない場合のオックス比に比べて、2割以上高いオックス比を赤、低いオックス比を青で示した。また、オックス比が 1.2 以上を赤、0.8 以下を青で示した。

表 15 農薬の肝肥大・肝細胞肥大作用と核内受容体活性化作用の関連性（全体解析）

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 (陽性/陰性)	オッズ比
所見名	有無	陽性数 (%)	93 (82%)	15 (18%)	6.20	-
絶対重量増加	あり	55 (49%)	47	8	5.88	0.90
	なし	53 (51%)	46	7	6.57	
相対重量増加	あり	80 (71%)	69	11	6.27	1.05
	なし	28 (29%)	24	4	6.00	
肝細胞肥大 (全て)	あり	59 (52%)	52	7	7.43	1.45
	なし	49 (48%)	41	8	5.13	
中心性 肝細胞肥大	あり	37 (33%)	33	4	8.25	1.51
	なし	71 (67%)	60	11	5.45	
びまん性 肝細胞肥大	あり	23 (20%)	20	3	6.67	1.10
	なし	85 (80%)	73	12	6.08	

各肝臓所見と各核内受容体活性化作用のオッズ比を計算した。各肝臓所見の場合分けをしない場合のオッズに比べて、2割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1.2以上を赤、0.8以下を青で示した。

3) 個別課題名：核内受容体作用のインビトロ・インビボ検証試験

フッ素化合物 perfluorooctanoic acid (PFOA)は、フッ素樹脂の製造助剤として工業的に広く用いられてきたが、難分解性・高蓄積性を有し、野生生物中や環境水中に広範囲に存在すること、さらに、PFOA は齧歯動物において肝肥大および肝がんを引き起こすことが報告されている。このため、食事などを介したヒトへの PFOA およびその類縁化合物のばく露が懸念され、各国で調査や規制の取り組みが行われている。これまでに、PFOA の肝肥大および肝がんは PPAR α の活性化を介していると考えられてきた。しかし、CAR 標的遺伝子である CYP2B 遺伝子の肝 mRNA レベルが PFOA 処置により上昇するという報告がある。そこで本研究では、PFOA による肝肥大における CAR の寄与を解析した。

野生型 (C57BL/6) または CAR 欠損型の雌雄マウス (8~12 週齢) に溶媒 (コーン油) または PFOA (20 mg/kg) を 3 日間連続で腹腔内投与し、最終投与 24 時間後に屠殺し、体重および肝重量を測定した。その結果、雌雄野生型マウスでは PFOA の投与により肝相対重量は 1.9-2.1 倍になったが、CAR 欠損マウスでは 1.5 倍程度にしかならなかった (表 16)。この時の CAR および PPAR α の活性化の程度を調べるために、*Cyp2b10* および *Cyp4a10* の mRNA レベルを測定した (図 7)。その結果、野生型マウスでは *Cyp2b10* 肝 mRNA レベルの顕著な増加が認められたが、CAR 欠損マウスではそのような増加は認められなかった。一方、*Cyp4a10* 肝 mRNA レベルは野生型および CAR 欠損マウスのいずれにおいても PFOA 投与により増加した。以上の結果から、PFOA による肝肥大には PPAR α だけでなく、CAR の寄与も大きいことが示された。

次に PFOA が CAR 活性化作用を有するか否かを確かめるために、雄性 C57BL/6 マウスに溶媒 (コーン油)、PFOA (20 mg/kg)、マウス CAR リガンドの TCPOBOP (3 mg/kg : 陽性対照物) を腹腔内投与し、4 時間後に肝臓を摘出して、核内 CAR タンパクレベルをウェスタンブロットにより調べた (図 8)。その結果、TCPOBOP と同様に PFOA 投与により CAR の核内レベルは増加し、PFOA は CAR 核内移行を促進することが示唆された。さらに、PFOA がマウス CAR リガンドとして作用するか否かを、マウス CAR 発現プラスミドと CAR 応答配列を組み込んだレポータープラスミドを用いたレポーターアッセイにより解析した。その結果、TCPOBOP 処置ではレポーター活性の上昇が認められたが、PFOA (100 μ M) 処置ではそのような上昇は認められなかった (データ示さず)。本レポーターアッセイ系では、phenobarbital に代表される間接型の CAR 活性化物質は検出されない。このことを考慮すると、本研究結果は、PFOA が phenobarbital と同様に間接型の CAR 活性化物質であることを示唆している。

表 16 PFOA 投与が肝重量に及ぼす影響

性	系統	投与薬物	体重 (g)	肝重量 (g)	肝相対重量	肝相対重量比 (PFOA/溶媒)
雄性	野生型	溶媒	24.5 ± 1.2	0.95 ± 0.09	3.87 ± 0.21	2.12
		PFOA	24.5 ± 1.0	2.01 ± 0.04	8.21 ± 0.29	
	CAR 欠損型	溶媒	27.9 ± 2.5	1.39 ± 0.12	5.00 ± 0.11	1.52
		PFOA	25.2 ± 2.0	1.92 ± 0.35	7.59 ± 0.58	
雌性	野生型	溶媒	21.0 ± 1.1	0.98 ± 0.08	4.67 ± 0.14	1.89
		PFOA	21.3 ± 1.1	1.88 ± 0.09	8.83 ± 0.30	
	CAR 欠損型	溶媒	22.9 ± 0.9	1.05 ± 0.16	4.61 ± 0.63	1.50
		PFOA	21.4 ± 0.7	1.48 ± 0.21	6.92 ± 0.98	

データは平均 ± SD (n=3-4)

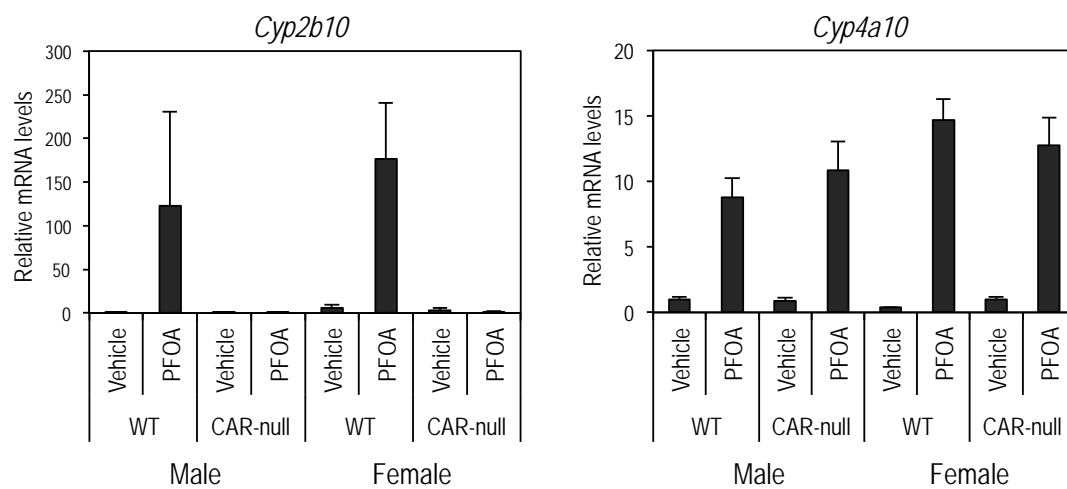


図 7 PFOA 投与に伴う肝 *CYP* mRNA レベルの変動

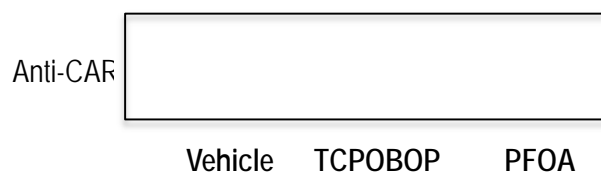


図 8 PFOA 投与に伴う肝の CAR タンパク質核内レベルの変動

マウスに溶媒（コーン油）、TCPOBOP（3 mg/kg）または PFOA（20 mg/kg）を腹腔内投与し、4 時間後に屠殺して肝を摘出した。各群 4 匹の肝をプールして核タンパク質を抽出し、抗 CAR 抗体を用いた Western blotting を行った。

(2) 研究項目名：酵素誘導が肝機能に及ぼす影響の評価（研究担当者名：吉成浩一（静岡県立大学））

1) 個別課題名：培養細胞における酵素誘導影響評価

不死化マウス肝細胞株 AML12 細胞（ATCC）に、CYP3A4 を発現するアデノウイルス（AdCYP3A4）を 10 または 30MOI で、CYP1A2 を発現するアデノウイルス（AdCYP1A2）を 30 MOI で、コントロールとしてβガラクトシダーゼを発現する AdLacZ を 30 MOI で感染させた。48 時間後に総 RNA を抽出し、SurePrint G3 Mouse GE 8x60K Microarray (Agilent) を用いたマイクロアレイ解析を行った（タカラバイオへ委託）。

10 MOI または 30 MOI の AdCYP3A4 の感染により、mRNA レベルが 2 倍または 1/2 以下となった遺伝子は表 17 に示した通りであった。これら遺伝子のほとんどは CYP1A2 の発現によっても同様の発現変化を示し、AdCYP3A4 感染と AdCYP1A2 感染で 2 倍以上の発現変化が認められた遺伝子は 4 遺伝子であった。これらの解析結果から、薬物代謝酵素の高発現に伴う特定の毒性発現との関連性を見出すことはできなかった。このため、ヒト肝細胞を利用した以下の 2) インビボにおける酵素誘導影響評価を実施しないこととした。

表 17 P450 過剰発現に伴う遺伝子発現変動

Gene Symbol	Log2 Ratio			Primary Accession #
	CYP3A4		CYP1A2	
	10 MOI	30 MOI	30 MOI	
<i>6330408A02Rik</i>	2.86	2.45	-0.28	ENSMUST00000137574
<i>Mfap4</i>	-1.38	-1.00	1.03	NM_029568
<i>Copg1</i>	-1.16	-1.00	-1.22	NM_201244
<i>Clec4a2</i>	-1.43	-1.01	0.09	NM_001170333
<i>Inpp5b</i>	-1.19	-1.08	-1.27	NM_008385
<i>Cstf1</i>	-1.03	-1.12	-0.94	ENSMUST00000116375
<i>3830403N18Rik</i>	-1.02	-1.12	-0.72	NM_027510
<i>1700066D14Rik</i>	-1.25	-1.19	-1.44	BU962914
<i>Csnk1g3</i>	-1.29	-1.20	-1.16	AK163441
<i>Cog8</i>	-1.12	-1.20	-1.47	NM_139229
<i>Gm13247</i>	-1.16	-1.22	-1.13	NM_001243138
<i>Cep192</i>	-1.71	-1.23	-1.03	AK158414
<i>Scml4</i>	-1.79	-1.27	-0.81	NM_172938
<i>Nox4</i>	-1.32	-1.32	-1.51	NM_015760
<i>Sufu</i>	-1.41	-1.35	-1.82	NM_015752
<i>Pnpla8</i>	-1.26	-1.36	-1.06	NM_026164
<i>Nrn1</i>	-2.33	-1.38	-1.39	NM_153529
<i>Ndfip2</i>	-1.16	-1.42	-1.76	NM_029561
<i>Olf521</i>	-1.61	-1.43	-1.48	NM_146356
<i>A530064N14Rik</i>	-1.56	-1.44	-1.18	AK080119
<i>Rhox2h</i>	-1.56	-1.50	-1.18	NM_001100465
<i>Tmeff2</i>	-1.65	-1.55	-1.38	NM_019790
<i>Dph1</i>	-1.59	-1.60	-1.81	NM_144491
<i>Tcte1</i>	-1.39	-1.64	-1.47	NM_013688
<i>Ahi1</i>	-1.89	-1.78	-1.16	NM_026203
<i>Ube2d1</i>	-2.05	-1.83	-1.80	NM_145420

<i>Rgs10</i>	-1.89	-1.92	-1.78	NM_026418
<i>Unc13d</i>	-2.09	-1.95	-1.82	NM_001009573
<i>Tmem241</i>	-2.10	-2.04	-2.34	NM_178801
<i>Skint10</i>	-1.87	-2.16	-2.05	NM_177668
<i>Nts</i>	-2.79	-2.17	-2.17	NM_024435
<i>Btbd11</i>	-2.12	-2.18	-1.88	NM_028709
<i>Tmem201</i>	-2.09	-2.19	-1.94	NM_177672
<i>Pbx4</i>	-2.17	-2.28	-2.26	NM_001024954
<i>Astn2</i>	-3.10	-2.54	-2.90	NM_207109
<i>Trav3n-3</i>	-2.75	-2.57	-1.60	AK037357
<i>Zfp169</i>	-2.60	-2.66	-2.55	NM_026450
<i>Acta2</i>	-2.79	-2.74	-2.45	NM_007392
<i>Iqck</i>	-2.38	-2.82	-2.57	NM_001081446
<i>Ear6</i>	-2.75	-3.24	-2.49	NM_053111
<i>Dtd2</i>	-2.99	-3.35	-1.85	NM_029545

2) 個別課題名：インビボにおける酵素誘導影響評価

1) のマウス肝細胞を用いた解析から、アデノウイルスを利用した酵素発現系では、特定の有害作用経路との関連性を解析することが困難であることが示唆されたため、本個別課題を実施しないこととした。

(3) 研究全体の成果、考察および結論

製品評価技術基盤機構で公開されている HESS-DB 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、ラット毒性試験データベースを構築し、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-DB 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再確認された。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他の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、肝細胞肥大や肝肥大と肝がんとの関連性を解析した結果、雄性ラットでは肝肥大や肝細胞肥大は、肝がんの必要条件ではあるが十分条件ではなく、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。農薬評価書を用いた解析では性差が認められ、肝肥大や肝細胞肥大が関わる安全性評価において性差を踏まえた考察をする必要性が示された。

肝細胞肥大と酵素誘導との関連性を実験的手法により解析するために、ラットにおいて小葉中心性肝細胞肥大を起こす化学物質 (HESS-DB 化合物) を選定し、酵素誘導関連核内受容体 (ラット AHR、PXR、CAR、PPAR α) に対する作用を評価した。評価結果の統計学的データ解析の結果から、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。上記核内受容体の活性化は、酵素誘導以外の作用も有していることを考慮する必要があるが、本結果からも、薬物代謝酵素誘導と中心性肝細胞肥大と

の関連性が強く示唆された。また、CARの活性化は肝細胞肥大において重要な因子であるが、現在のレポーターアッセイでは phenobarbital に代表される間接型の CAR 活性化物質を検出することができず、実際、レポーターアッセイでは陰性であったが、ラット肝細胞で CYP2B を誘導した化合物が存在した。これらのことから、ラット個体あるいは培養肝細胞を用いた酵素誘導評価は、肝肥大や肝細胞肥大の発現機序を考察する上で重要と考えられる。一方で、一部化合物は酵素誘導とは関連しない機序により酵素誘導を引き起こす可能性も示され、これら化合物を利用することで、肝細胞肥大の新たな機序が明らかになると期待される。

さらに、農薬を用いたレポーターアッセイの結果と毒性試験データの関連性を解析したところ、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に、酵素誘導に関連する4つの核内受容体 (AHR、CAR、PXR および PPAR α) に対する作用に大きな違いが認められた。個別の核内受容体に対する作用の比較では、機序の推定はできなかったが、いずれかの受容体の活性化作用の有無で解析したところ、びまん性肝細胞肥大陽性農薬では、中心性肝細胞肥大陽性農薬に比べて、核内受容体活性化作用陽性率が顕著に高かった。このことは、HESS-DB 化合物を用いた解析と同様に、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強く示唆している。

環境および食品汚染物質として近年注目されている 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、これまで PFOA による肝肥大および毒性発現には PPAR α が重要とされてきたが、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 PPAR α と同程度であることが示唆された。これまで、CAR と PPAR α を共に活性化する化合物は知られていなかったが、本研究結果から、肝肥大や肝細胞肥大の機序解析を行う上で PFOA のように両受容体を共に活性化する化合物の存在に注意する必要があることが示された。他方、両受容体を介した肝細胞肥大や肝肥大の機序解析のモデル化合物として PFOA を利用できる可能性が示された。

結論

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。しかし、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、また、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。酵素誘導に伴う肝細胞肥大は、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。以上のことから、肝細胞肥大の有無が NOAEL の決定に影響を与える場合には、酵素誘導試験や核内受容体活性化作用評価を実施し、その肝細胞肥大の発現機序を推定することが有用であると思われる。

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) 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、梅村隆志、小島弘幸、井上薫、高橋美和、北村繁幸、浦丸直人、安部賀央里、頭金正博、小澤正吾、吉成浩一。 *食品衛生学雑誌*、印刷中
- 2) Tange S., Fujimoto N., Uramaru N., Sugihara K., Ohta S., Kitamura S., In vitro metabolism of cis- and trans-permethrin by rat liver microsomes, and its effect on estrogenic and anti-androgenic activities. *Environment Toxicol Pharmacol*, **37**, 996-1005 (2014).
- 3) Uramaru N., Inoue T., Watanabe Y., Shigematsu H., Ohta S., Kitamura S., Structure-activity relationship of a series of 17 parabens and related compounds for histamine release in rat peritoneal mast cells and skin allergic reaction in guinea pigs. *J Toxicol Sci*, **39**, 83-90 (2014).

2 本研究を基にした学会発表の実績

招待講演

- 1) インビボ毒性データベースとインビトロ試験を利用した化学物質の肝毒性の機序解明、評価、予測。 吉成浩一、CBI学会 2013年大会、日本動物実験代替法学会 スポンサーシンポジウム、2013年10月、東京都
- 2) 化学物質誘発性肝細胞肥大・肝肥大の特徴～毒性試験データからの考察： 吉成浩一、安部賀央里、頭金正博、シンポジウム「食品中の化学物質による肝肥大の発現機序と毒性学的意義:現状・課題・展望」第41回日本毒性学会学術年会、2014年7月、神戸市
- 3) 化学物質の核内受容体活性化作用と肝肥大作用；In vitro 試験を用いた解析： 小島弘幸、北村繁幸、浦丸直人、吉成浩一、シンポジウム「食品中の化学物質による肝肥大の発現機序と毒性学的意義:現状・課題・展望」第41回日本毒性学会学術年会、2014年7月、神戸市
- 4) 化学物質による肝毒性の評価に向けた in vitro および in silico 研究：肝肥大を例に：吉成浩一、日本動物実験代替法学会 第27回大会、2014年12月、横浜市

一般発表（国外）

- 1) Comparative study on human and mouse nuclear receptor activities of hepatomegaly-inducing perfluorooctanoic acid and its related compounds: Kojima H., Takeuchi S., Sata F., Nakajima H., Noomote C., Fujino C., Uramaru N., Kitamura S., Yoshinari K.: International Conference of Asian Environmental Chemistry (ICAEC2014), Bangkok (Thailand), November 25, 2014.
- 2) Characterization of human and mouse PXR- and CAR-mediated transcriptional activation by bisphenol A and its related compounds. Kojima H., Sanoh S., Takeuchi S., Sugihara K., Yoshinari K., Kitamura S.: The 54th Annual Meeting of the Society of Toxicology (SOT2015) San Diego (USA), March 24, 2015.

一般発表（国内）

- 1) 化学物質による肝細胞肥大と薬物代謝酵素誘導の関連性：核内受容体活性化作用に着目した解析. 中島宏之、吉成浩一、第 40 回日本毒性学会学術年会、2013 年 6 月、千葉市
- 2) 薬物代謝を考慮したレポーターアッセイの開発. 吉成浩一、中島宏之、野表知世、日本薬物動態学会第 28 回年会、2013 年 10 月、東京
- 3) 核内受容体活性化作用に基づく肝細胞肥大作用を持つ化合物のクラスタリング. 中島宏之、吉成浩一、第 52 回日本薬学会東北支部大会、2013 年 10 月、仙台市
- 4) 薬物代謝を反映するインビトロレポータージーンアッセイの開発. 吉成浩一、中島宏之、野表知世、日本動物実験代替法学会 26 回大会、2013 年 12 月、京都市
- 5) ピレスロイドおよびカルバメート系農薬の代謝的活性変動を加味した核内受容体活性の評価. 藤野智恵里、渡部容子、浦丸直人、小島弘幸、吉成浩一、北村繁幸、第 16 回環境ホルモン学会研究発表会、2013 年 12 月、東京
- 6) 肝細胞肥大作用を持つ化学物質の酵素誘導関連核内受容体に対する作用. 中島宏之、吉成浩一、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月、熊本市
- 7) 薬物代謝を反映するレポーターアッセイ系の構築. 野表知世、中島宏之、吉成浩一、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月、熊本市
- 8) 肝肥大誘導性ペルフルオロオクタン酸とその類縁化合物によるヒトおよびラット核内受容体活性の比較. 小島弘幸、武内伸治、中島宏之、野表知世、藤野智恵里、浦丸直人、北村繁幸、吉成浩一、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月、熊本市
- 9) ピレスロイド系およびカルバメート系農薬のラット PXR、CAR および PPAR α 活性と肝代謝による影響. 藤野智恵里、渡部容子、浦丸直人、小島弘幸、吉成浩一、北村繁幸、フォーラム 2014 衛生薬学・環境トキシコロジー、2014 年 9 月、つくば市
- 10) 毒性試験公開データを用いた肝細胞肥大の毒性学的特徴の解析：増田雅美、関本征史、根本清光、吉成浩一、日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会、2014 年 11 月、静岡市
- 11) 肝細胞肥大と薬物代謝酵素誘導の関連性の解析：中島宏之、松沢厚、吉成浩一、日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会、2014 年 11 月、静岡市
- 12) *in vitro* レポーターアッセイによるラットインビボ肝細胞肥大の予測：中島宏之、松沢厚、吉成浩一、日本動物実験代替法学会 第 27 回大会、2014 年 12 月、横浜市
- 13) 肝細胞肥大の毒性学的特徴の解析に向けた農薬の毒性試験結果データベースの構築：増田雅美、関本征史、根本清光、吉成浩一、日本動物実験代替法学会 第 27 回大会、2014 年 12 月、横浜市
- 14) 毒性試験公開データを用いた肝細胞肥大の毒性学的特徴の解析：増田雅美、吉成浩一、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月、神戸市

- 15) パーフルオロオクタン酸(PFOA)のマウス CAR 活性化作用の詳細な解析：高橋美玲、阿部太紀、吉成浩一、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月、神戸市
 - 16) 化粧品香料のヒトおよびラット PXR、CAR、PPAR α 、AhR に対するアゴニスト活性：渡部容子、小島弘幸、浦丸直人、杉原数美、吉成浩一、太田茂、北村繁幸、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月、神戸市
 - 17) 抗菌剤パラベン類のヒトおよびラット PXR、CAR、PPAR α 活性：藤野智恵里、渡部容子、浦丸直人、小島弘幸、吉成浩一、北村繁幸、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月、神戸市
- 3 特許およ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	<p>これまでに肝細胞肥大と薬物酵素誘導の間には関連性があることが経験的に示唆されていたが、本研究において、データ解析およびインビトロ試験の異なる2つのアプローチにより、両者の関連性を明確にできた。また肝細胞肥大は肝臓の様々な部位で起こり、それらの意義は異なると考えられてきたが、農薬評価書を用いたデータ解析から、中心性とびまん性の肝細胞肥大の毒性学的特徴の違いを示すことができた。これまで、肝細胞肥大の発現機序および毒性学的意義に関する研究の必要性は指摘されていたが、研究は不足していた。本研究では、これらの課題に取組み、科学的・客観的に肝肥大・肝細胞肥大に関するいくつかの知見を示すことができたことから、当初の目的を十分に達成できたと考えている。</p>
2 研究目標の達成度	4	<p>農薬評価書を用いた解析において、データ入力、毒性所見の整理（異なる表現による同一所見のグループ化）に時間を要し、十分な統計学的解析を行うことができなかった。また、上記理由のため、レポーターアッセイ評価結果とインビボ毒性試験結果の関連性の統合的な解析が十分に行えなかった。しかし、データベースは完成し、インビトロ評価結果も得られたことから、今後解析を継続し、得られた知見を報告していく予定である。</p>
3 研究成果の有効性	4	<p>薬物代謝酵素誘導と肝細胞肥大の間の関連性、一部の例外的な肝細胞肥大の存在の可能性、肝肥大と肝がんの関連性の低さに関する知見の提示は、肝肥大および肝細胞肥大の毒性学的解釈において有用であると考えている。また、これらの知見から、酵素誘導評価の有効性が示されたことから、今後農薬等の安全性評価において、酵素誘導試験を実施すること提唱し、それにより、食品安全委員会等の化学物質の安全性評価機関において、より効率的な評価が可能になると考えている。</p> <p>他方、農薬評価書の毒性試験結果データベースは、肝肥大・肝細胞肥大以外の他の毒性所見に関するデータ解析にも有用であると考えられる。また、化学構造等の物理化学的情報とリンクさせることで、毒性予測にも有用となる可能性を秘めている。今後さらなる研究を展開し、学術論文等として公開していく予定である。</p>
合計	4	<p>上記の通り、やや解析が不十分な点もあるが、当初の</p>

		目標をほぼ達成でき、肝肥大の毒性学的理解が進み、また今後のさらなる研究展開が期待される成果が得られたことから4点とする。
--	--	--

総合コメント

肝肥大および肝細胞肥大の実験科学的研究および情報解析研究により、肝細胞肥大や肝肥大と酵素誘導、肝がんと関連性に関する科学的証拠が得られた。これらの成果は、食品中化学物質の安全性評価において、実施すべき安全性試験の提案をするものであり、またエキスパートジャッジをサポートする上で有用である。

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。