

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15404

研究課題名(和文)薬毒物の動態特性および薬物間相互作用を考慮した中枢・心臓毒性モデルの構築

研究課題名(英文)Development of neuro and cardiac toxicity models considering disposition and interactions of toxic chemicals

研究代表者

太田 茂(Ohta, Shigeru)

広島大学・医歯薬保健学研究科(薬)・教授

研究者番号：60160503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：薬毒物の中毒死の原因には、意識障害、痙攣、不整脈や心不全などがあり、脳や心臓における毒性発現メカニズムを考える必要がある。さらには肝臓で生成される代謝物についてもその毒性の寄与も考慮しなければならない。本研究では、心筋細胞、神経細胞、肝細胞を用いて、3次元培養系のような生体の機能を反映したin vitro毒性評価系を構築し、薬毒物の毒性発現やそのメカニズムに関する研究を行った。

研究成果の概要(英文)：The main causes of poisoned to death by toxic chemicals are consciousness disorder, convulsions, arrhythmia and heart failure. Therefore, it is necessary to consider toxicity mechanism in the brain and the heart. Moreover, it is also necessary to consider the contribution of the metabolites formed in the liver to toxicity. In this study, we have constructed an in vitro toxicity evaluation system that reflected the in vivo function, such as three-dimensional culture system using myocardial cells, neurons, and hepatocytes, and have studied the toxicity mechanism of toxic chemicals.

研究分野：毒性学

キーワード：薬毒物 毒性 代謝 心筋細胞 神経細胞 肝細胞 スフェロイド

### 1. 研究開始当初の背景

医薬品 (向精神薬、解熱鎮痛剤など)、覚せい剤および農薬の摂取による意識障害、痙攣、不整脈、悪性症候群などによる中毒死は大きな社会問題のひとつである。特に医薬品は生活と密接しており、中毒原因物質としての報告は多い。一般に薬物中毒は、「曝露濃度×毒性ターゲットにおける作用」で説明できるとされ、単一薬物の中毒濃度、致死濃度が明らかとなっているものも多い。しかし実際は、摂取量、摂取日時が不明で、多くは多剤併用であり、生体内で代謝変換された代謝物の寄与も想定しなければならない。種々の薬毒物の複合影響、毒性メカニズムについての統合的理解は完全にはなされておらず、薬毒物の毒性メカニズムを解明し中毒原因を特定することは、法医診断学上極めて重要であり急務である。

### 2. 研究の目的

これまで、「肝臓にヒト型の薬物代謝酵素が発現するヒト肝細胞移植キメラマウスを用いた医薬品 (イブプロフェン、ミダゾラムなど) のヒト代謝物や血中動態予測に関する研究 (Sanoh et al., 2012, 2015)」、「肝細胞 3 次元培養を用いたアセトアミノフェンの代謝的活性化による肝毒性評価に関する研究 (Sanoh et al., 2014)」を通して、医薬品の肝臓における体内動態と肝毒性の関連性について研究してきた。

中毒死の原因となる薬物は、中枢に作用するものが多く、また不整脈や心不全によって中毒死に至るケースも多いことから、肝臓だけでなく脳や心臓における毒性発現メカニズムを考える必要がある。そこで、これまでの肝細胞の 3 次元培養系を用いた医薬品の毒性評価に関する研究成果を発展させ、神経細胞や心筋細胞の *in vivo* の機能を反映した 3 次元培養系の構築を目指し、その毒性メカニズムを解明し、法医診断学向上を図ることを研究目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) ラット心筋細胞の単離・培養

ラット新生仔 (Cr1: CD (SD)) より心臓を取り出し心室を切り取り、心筋細胞を単離した。心筋細胞は、Cell matrix (セルマトリックス, Type I-, 新田ゼラチン) でコーティングした Elplasia プレート (GC 85 25 20, slit type, 24 well, 株式会社クラレ) に  $5 \times 10^5$  cells/mL, 500  $\mu$ L/well の細胞密度で播種した (図 1)。

#### (2) 心筋細胞における細胞内 ATP assay

CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay detection reagent (Promega) を用いて ATP 量を蛍光にて測定した。

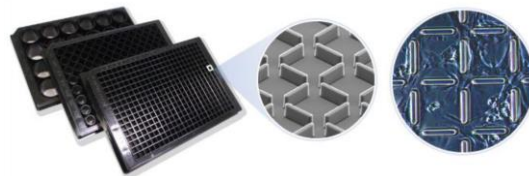


図 1, Elplasia プレート

(<http://www.elplasia.com/products/slit/>より引用)

#### (3) ラット神経細胞の単離・培養

ラット SLC:Wistar/ST 妊娠 18 日齢ラット胎仔を取り出し、大脳皮質を単離し、細胞密度 8000 cells/spheroid ( $1.36 \times 10^6$  cells/mL) の割合で、液滴内で細胞凝集体をつくるハンギングドロップ用プレート (Elplasia™ Multiple Pore Type, 6well, 株式会社クラレ) に播種した (図 2)。

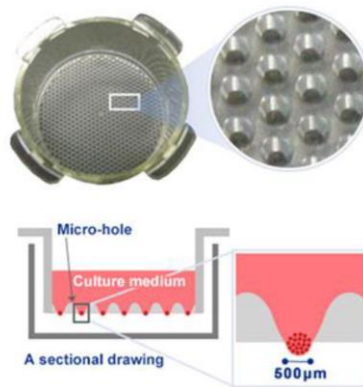


図 2, ハンギングドロップ法の概要

([http://www.elplasia.com/products/multiple\\_pore/](http://www.elplasia.com/products/multiple_pore/)より引用)

#### (4) スフェロイド凍結切片の作成及び免疫染色

ハンギングドロップ法にて形成させたスフェロイドに OCT コンパウンド液を加え、液体窒素で凍結させ、Leica CM3050 S にて切片 (厚さ 10  $\mu$ m) を作成した。1 次抗体 (TUJ1 抗体 1000 倍希釈、GFAP 抗体 400 倍希釈)、2 次抗体 (500 倍希釈) にて免疫染色後、ProLong Diamond で封入し共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000-D Confocal Laser Scanning Biological Microscope) にて観察した。

#### (5) mRNA 発現量の評価

TRIZol® reagents を用いて totalRNA を抽出した。DNase 処理サンプルを、ReverTraAce によって逆転写反応させ、cDNA を得た。Real-time RT PCR は、Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mixes (Agilent technology) を使用した。各遺伝子発現量を、PikoReal を用いて定量、 $\Delta\Delta$ -Ct 法にて解析した。内部標準遺伝子として用いた RPL13a の遺伝子発現量により補正した。

(6) 神経細胞における細胞内 ATP assay  
DIV 8 のスフェロイドに化合物を曝露 24 時間後、CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay detection reagent (Promega) を用いて ATP 量を蛍光にて測定した。

(7) 走査型電子顕微鏡によるスフェロイドの観察

スフェロイドを回収し、グルタルアルデヒドを用い固定した。サンプルを洗浄後、四酸化オスmiumにより固定しさらに洗浄後タンイン酸にサンプルを浸し、再び四酸化オスmiumで処理した。脱水、乾燥を行った後、走査型電子顕微鏡 JSM-7800F にて観察した。SEM の評価は広島大学自然科学研究開発センターにて行った。

(8) ラット肝細胞の単離・培養

Cr1: CD (SD) 雄性ラット 7 週齢を用いて Two-step collagenase 灌流法 (Berry and Friend, 1969) に従い、ラット初代新鮮肝細胞を単離した。細胞密度 400 cells/spheroid (8.6x10<sup>4</sup> cells/mL) の割合で、ハンギングドロッププレート (Elplasia™ Multiple Pore Type, 6well, 株式会社クラレ) に播種した。走査型電子顕微鏡によるスフェロイドの観察は、(7)と同様の方法で行った。

4. 研究成果

(1) 心筋細胞を用いた評価

(1-1) 検証化合物

検証化合物にはジフェンヒドラミンを用いた。初期に作られた抗ヒスタミン薬の一つで抗アレルギー薬に用いられていた。強い眠気の副作用があるが、現在は副作用を利用した睡眠改善薬として多く使われている。これは市販されるようになったことで入手が容易になり、近年、多量摂取による中毒報告が増えている。

図 3 はジフェンヒドラミンの代謝経路である。ジフェンヒドラミンの中毒患者において、Dinor 体はほとんどみられないが Nor 体や Acid 体は血中でみられている (Pragst et al., 2006)。代謝物が毒性に寄与している可能性があるものの、現時点で代謝物も含めた毒性メカニズムはわかっていない。

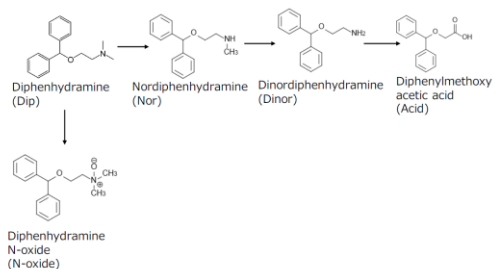


図 3, Diphenhydramine とその代謝物

(1-2) ジフェンヒドラミンのラットにおける動態

ジフェンヒドラミンをラットに投与後の組織分布を LC-MS/MS で評価したところ、肝臓、心臓と脳でわずかに Nor 体がみられたが、Dinor 体はいずれの組織においてもほとんどみられなかった (図 4)。

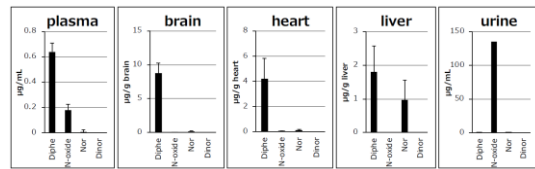


図 4, ラット各組織における Diphenhydramine と代謝物の濃度

(1-3) ジフェンヒドラミンを心筋細胞に曝露後の細胞内 ATP 濃度

心筋細胞にジフェンヒドラミンおよび各代謝物 (10, 100 µM) を 2 時間曝露後の細胞内 ATP に与える影響を調べたが、この濃度域では、いずれも ATP には変動を与えなかった (図 5)。

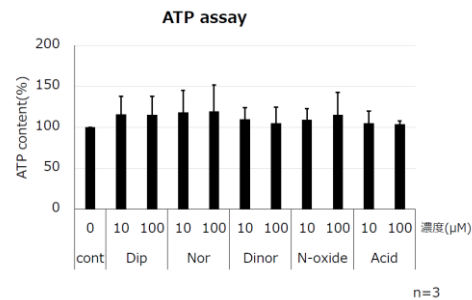


図 5, Diphenhydramine および代謝物曝露の細胞生存率への影響

(1-4) ジフェンヒドラミンを心筋細胞に曝露後の拍動数に与える影響

心筋細胞にジフェンヒドラミンおよび各代謝物 (10, 100 µM) を 2 時間曝露後の細胞内 ATP に与える影響を調べたところ、ジフェンヒドラミンと Nor 体では 10 µM から拍動に顕著な影響を与えた (図 6)。

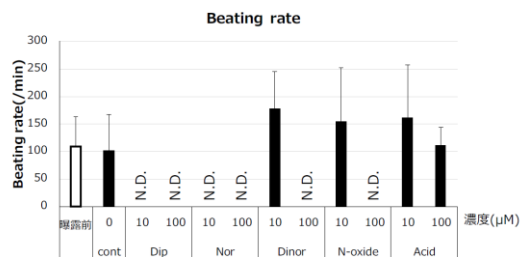


図 6, Diphenhydramine および代謝物曝露の拍動数への影響

(1-5) ジフェンヒドラミンの心筋、神経、肝細胞における ATP 量に与える影響

ジフェンヒドラミンをラット心筋、神経、

肝細胞に2時間曝露し、細胞内ATP濃度に対する影響を調べた。心筋細胞、神経細胞、肝細胞におけるIC50は、617.7、464.6、1297  $\mu$ Mとなり、組織において感受性が異なることが示唆された(図7)。

また、ジフェンヒドラミン以外の中毒物質についても、神経細胞、肝細胞と比較しながら心筋細胞における毒性評価が本培養系にて評価できる可能性がある。

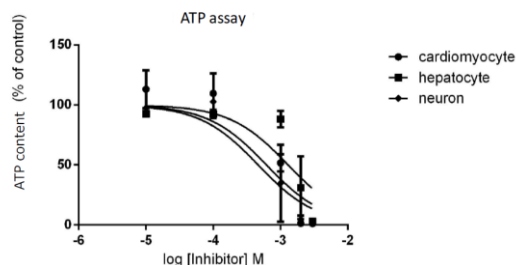


図7, ジフェンヒドラミンを心筋細胞、神経細胞、肝細胞に曝露後の細胞内ATP変化

## (2) 神経細胞を用いた評価

### (2-1) 神経細胞の3次元培養系の構築

ハンギングドロップ法で形成させたスフェロイド表面の形態、構造をより詳細に観察する為に走査型電子顕微鏡(SEM)を用いた。8000 cells/spheroidの密度で直径約200  $\mu$ mのスフェロイドを安定的に形成させ、スフェロイドの大きさもほぼ同じであった。また、拡大すると球形のスフェロイド表面において樹状突起や軸索など神経突起と思われる繊維状の構造と推定される画像も確認できた。このことから、ニューロンが周囲のアストロサイトをはじめとするグリア細胞と相互作用し、神経突起を伸長させ神経回路を構成している可能性が示唆された(図8)。

さらに、スフェロイドを回収、固定し、TUJ11とGFAPで免疫染色したところ、ニューロンとアストロサイトが染色された(図9)。

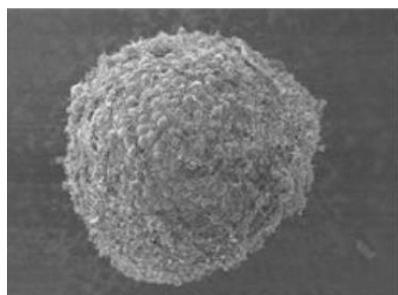


図8, ハンギングドロップ法で形成させた神経細胞スフェロイドのSEM観察像

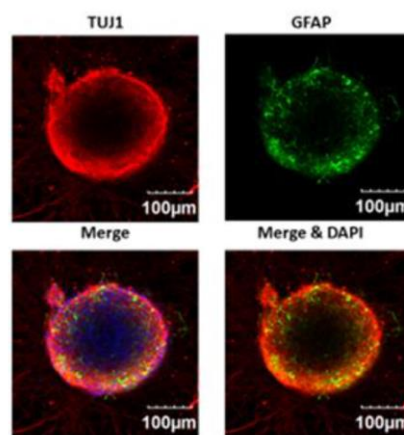


図9, ハンギングドロップ法により形成されたスフェロイドの免疫染色像  
赤色:ニューロン 緑色:アストロサイト  
青色:細胞核

### (2-2) 検証化合物

トリブチルスズ(TBT)は船底塗料や魚網の防汚剤として用いられていた。現在は先進国の多くで禁止されているが、海洋中、魚類の体内に蓄積されている。当グループでは、TBTの神経毒性メカニズムに関する研究を行っており、ラット大脳皮質由来初代神経細胞培養系においてTBTがグルタミン酸神経毒性を引き起こすことなどを明らかにしている(Nakatsu et al. 2006)。しかしながら、アストロサイトをはじめとするグリア細胞へのTBTの影響、またそれを介した神経細胞への影響に関する研究はほとんど分かっていない。そこで神経細胞・グリア細胞共培養スフェロイドを用いて、TBTの中枢神経系への毒性影響を検討した。

### (2-3) 3次元神経細胞・グリア細胞共培養系におけるTBT曝露による細胞生存率への影響評価

3次元共培養系においてTBTを24時間曝露し、神経細胞細胞生存率を、ATPアッセイによって調べた。その結果、NMDA型グルタミン酸受容体アンタゴニストMK-801の共曝露においても、細胞生存率の回復は認められなかった。したがって、3次元共培養系におけるTBT曝露による細胞生存率の低下は、すでに見出しているグルタミン酸毒性だけでなく、アストロサイトをはじめとするグリア細胞を介して引き起こされているのではないかと考えられた(図10)。

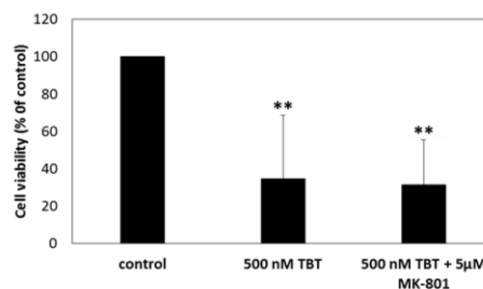


図 10, 3次元共培養系における TBT 曝露による細胞生存率への影響

(2-3) 3次元神経細胞・グリア細胞共培養系における TBT 曝露による細胞生存率への影響評価

3次元共培養系への TBT 曝露時にニューロン、アストロサイトに、どのような影響を与えているか調べる目的で免疫染色にてスフェロイドの内部の様子を観察した。アストロサイトの骨格タンパク質である GFAP を免疫染色したところ、TBT 曝露によりスフェロイド内の GFAP の発現量が上昇していることが確認された。GFAP の発現上昇はアストロサイトが反応性アストロサイトへ変化した際の指標とされることから、TBT による細胞生存率の低下に反応性アストロサイトが関与しているのではないかと考えられた。(図 11)。

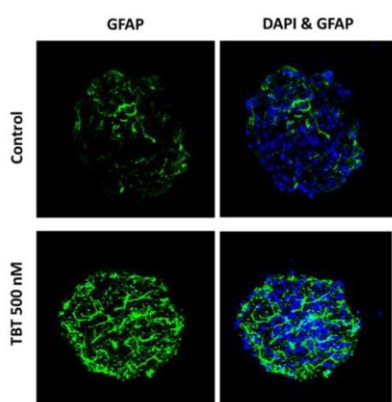


図 11, 3次元共培養系における TBT 曝露による GFAP 免疫染色画像

反応性アストロサイトを誘導することが既知であるリポサッカライド LPS をポジティブコントロールとして、TBT による GFAP の発現上昇を、real-time PCR 及びウエスタンブロットにて検討しました。その結果、mRNA とタンパク質いずれにおいてもポジティブコントロールである LPS と同程度の上昇が認められた (図 12)。

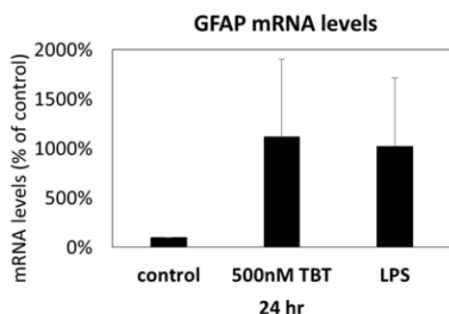


図 12, TBT 曝露時の GFAP 発現量への影響評価

(2-4) 炎症性サイトカインの発現量評価  
LPS による反応性アストロサイトの誘導は、

炎症性サイトカインを介して引き起こされるとされている。そこで、TBT で認められた GFAP の上昇も、炎症性サイトカインを介したものではないかと考えた。代表的な炎症性サイトカインである TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 の 3 つの炎症性サイトカインの遺伝子発現量の変化を検討したところ、ポジティブコントロールである LPS 曝露群では、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  の発現量の上昇が認められた。一方で TBT 曝露群では、遺伝子発現量の上昇は認められなかった (図 13)。

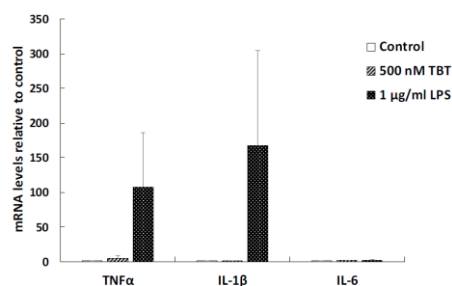


図 13, 短時間 TBT 曝露による炎症性サイトカイン mRNA 発現量への影響

炎症性サイトカインの増加は認められなかったものの、今後 TBT により誘導された反応性アストロサイトが神経細胞にどのように影響しているのかを詳細に検討することで、TBT の中枢神経毒性の詳細が明らかとなることが期待される。

また、少なくとも 3次元共培養系は中枢神経系の免疫応答機能を保持しており、神経炎症を介した毒性評価を行うことができる可能性が示され、ミクログリアやアストロサイトへの影響も考慮した、化学物質の神経毒性評価系となることが期待される。

### (3) 肝細胞の 3次元培養

ラット肝細胞についても、ハンギングドロップ法で形成させたスフェロイド表面の形態、構造を SEM で観察した。表面は神経細胞と異なり細胞と細胞の接着がタイトであった (図 14)。今後、ハンギングドロップ法で作製した肝細胞スフェロイドを用いても化学物質の毒性評価を行い、評価系の構築を目指す。

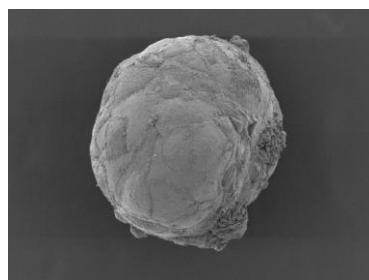


図 14, ハンギングドロップ法で形成させた肝細胞スフェロイドの SEM 観察像

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

### ① 佐能正剛

3次元培養やヒト肝細胞キメラマウスを用いた薬物代謝反応を考慮に入れた肝毒性評価  
日本薬物動態学会第32回年会, 2017年11月29日～2017年12月1日, タワーホール船堀(東京)

### ② 采洋太郎, 古武弥一郎, 江尻洋子, 佐能正剛, 太田茂

毒性評価系構築を目指した3次元神経細胞培養系の検討  
フォーラム 2016 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2016年9月10日～2016年9月11日, 昭和大学薬学部(東京)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

広島大学大学院医歯薬保健学研究科生体機能分子動態学研究室

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/kotake-1/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

太田 茂 (OHTA, Shigeru)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科(薬)・教授

研究者番号: 60160503

### (2) 研究分担者

奥田 勝博 (OKUDA, Katsuhiko)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号: 00389115

佐能 正剛 (SANOH, Seigo)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科(薬)・助教

研究者番号: 00552267

古武 弥一郎 (KOTAKE, Yaichiro)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科(薬)・准教授

研究者番号: 20335649

清水 恵子 (SHIMIZU, Keiko)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号: 90312462