

安全性評価における質量分析イメージング技術の活用

住友化学株式会社

生物環境科学研究所

松 永 光 平

安 部 潤



はじめに

化学物質のヒトに対する安全性を適切に評価する上で、その毒性作用機序の解明は必要不可欠である。化学物質と因果関係のある生体内の変化を分子、細胞、組織、個体レベルで解析することで、毒性発現に至る一連の重要な生物学的応答（キーイベント）を明らかにすることができる。特定した各キーイベントについて、分子・細胞を用いた *in vitro* 試験系を構築することができれば、開発初期の毒性スクリーニング評価における効率化や実験動物の削減につながる。加えて、各キーイベントにおける実験動物とヒトとの感受性を分子・細胞レベルで比較することで、実験動物でみられた毒性のヒトでの発現の有無やその程度を予測することが可能となる。このように、化学物質の毒性作用機序を明らかにしてそのヒト安全性をより精緻に評価することは、当研究所における重要な研究課題の一つである。

毒性作用の機序解析における一般的なアプローチとして、化学物質やその代謝分解物の中から「毒性本体」を特定し、その標的となった臓器中の毒性本体の曝露濃度を分析後、連動して変化する mRNA、タンパク質または生体内低分子等の毒性マーカーを探索する手法が用いられる。これまでも当研究所ではトキシコゲノミクスやメタボロミクス等、高度な機器分析技術を用いた毒性作用機序解析を実施してきた^{1), 2)}。通常、毒性本体や毒性マーカーの測定は、毒性を発現した組織を破碎・抽出して得られる抽出液を、液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) 等で分析する手法が取られ、破碎・抽出すると毒性本体や毒性マーカーの臓器内での位置情報は失われる。この問題を克服する新たな技術として、生体試料中の位置情報を保持したまま分析可能な質量分析イメージング (MSI) の活用が期待されている。本稿では MSI 技術の概要を紹介するとともに、本技術を用いて実施したエピリフェナシルによる肝毒性の機序ならびにヒトとの種差解析研究について紹介する。

質量分析イメージング (MSI) 技術

質量分析イメージング (MSI) は、肝臓や脳等組織の薄切片試料を用い、数 μm ~ 数十 μm 間隔の測定点で連続的に試料の質量分析を行い、化学物質や毒性マーカーの組織上の存在分布を可視化する手法である。代表的な手法であるマトリックス支援レーザー脱離イオン化を用いた MSI (MALDI-MSI) の概要を Fig. 1 に示す。MALDI-MSI では組織の凍結切片にマトリックスと呼ばれる試料のイオン化を促進する有機化合物を塗布した後、薄切片上へレーザーを照射し、イオン化した成分を質量分析計に取り込んで検出する。その後、全ての測定点で得られた MS スペク

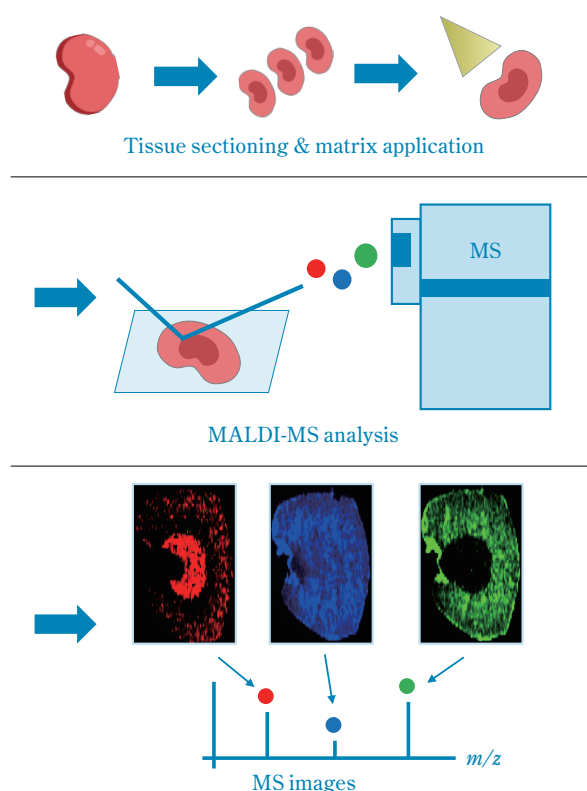


Fig. 1 MALDI-MSI workflow

トルを統合し、存在量を強度として二次元上に表示させることで、各成分の組織上の分布を画像化する。当該手法は毒性本体に加えて、毒性本体の作用によって変動する生体内の毒性マーカーの存在量や分布を、特別なラベル処理を必要とせずに検出することが可能である。近年、医薬品等で本技術の活用事例が報告されつつあるが^{3), 4)}、本技術は測定対象組織の凍結切片の作製、測定対象物質に適したマトリックスの選定、イオン化手法および測定条件の設定、測定後のデータ解析等にさまざまなノウハウの蓄積が必要であり、高感度かつ高精度なデータの取得には高いスキルが要求される。当研究所では本技術を活用した開発化合物の精緻な安全性評価を目指し、種々の検討を行って技術導入を早期に完了した。

エピリフェナシル肝毒性の種差解析におけるMSI技術の活用

1. エピリフェナシルとその肝毒性作用機序

当社が現在開発中の新規除草剤エピリフェナシル (Epyrifencil, 開発コード：S-3100) は、植物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (PPO) 阻害を作用機序とする。PPOは植物のクロロフィル生合成経路中のプロトポルフィリノーゲンIX (Protogen) からプロトポルフィリンIX (PPIX) への反応に触媒として作用する酵素である。PPO阻害により、基質であるProtogenが葉緑体膜から細胞質へと漏出し、自動酸化によりPPIXとなって細胞内に蓄積した後、これに光があたることで生体膜の過酸化損傷が起これ殺草作用を示す。

哺乳動物体内においてもPPOはヘム生合成酵素の一つとして存在しており、これが阻害されると主な毒性として、PPIX蓄積に起因する肝臓・腎臓での細胞障害などが生じることが報告されている^{5), 6)}。エピリフェナシルについてもマウスおよびラットを用いた90日間亜急性毒性試験において、PPO阻害の影響と考えられるPPIX (肝毒性マーカー) の蓄積と肝細胞障害が主な毒性として確認された。一方、ラットよりもマウスで肝毒性が強く発現し、明らかな種差が認められた⁷⁾。

2. エピリフェナシル肝毒性の種差発生要因

エピリフェナシルは哺乳動物体内で極めて速やかにS-3100-CAへと代謝され、これが毒性本体として肝臓に取り込まれ、毒性標的分子であるPPOを阻害す

ることにより、PPIX蓄積に起因する肝細胞障害を引き起こす (Fig. 2)。肝毒性に種差が生じた要因究明と、ヒトに対する肝毒性影響を予測するため、「S-3100-CAの肝臓取り込み量 (曝露量)」および「S-3100-CAのPPO阻害活性 (感受性)」について、それぞれマウス・ラット・ヒトの *in vitro* 評価系を構築した⁷⁾。

初代肝細胞を用いた *in vitro* 取り込み試験において、マウス肝細胞への単位時間当たりのS-3100-CA取り込み量はラット肝細胞の約6倍、ヒト肝細胞の約13倍であった (Table 1)。また、肝ミトコンドリア画分を用いた *in vitro* PPO阻害試験では、50%阻害濃度 (IC₅₀) を指標としたマウス肝のPPO阻害活性は、ラット肝の約8倍、ヒト肝の約14倍の強い感受性が認められた (Table 2)。すなわち、毒性本体のS-3100-CAはマウス肝細胞へ著しく多く取り込まれ、かつ取り込まれたS-3100-CAはマウスPPOにおいて、より低濃度から酵素阻害を引き起こしてPPIXを蓄積させることが明らかとなった。以上のことから、マウス・ラット間で認められた肝毒性の種差は、毒性本体の曝露量および毒性標的分子の感受性の両面が要因となっていることが示唆された。加えて、いずれの *in vitro* 評価系においてもヒトは最も低いポテンシャルを示したこ

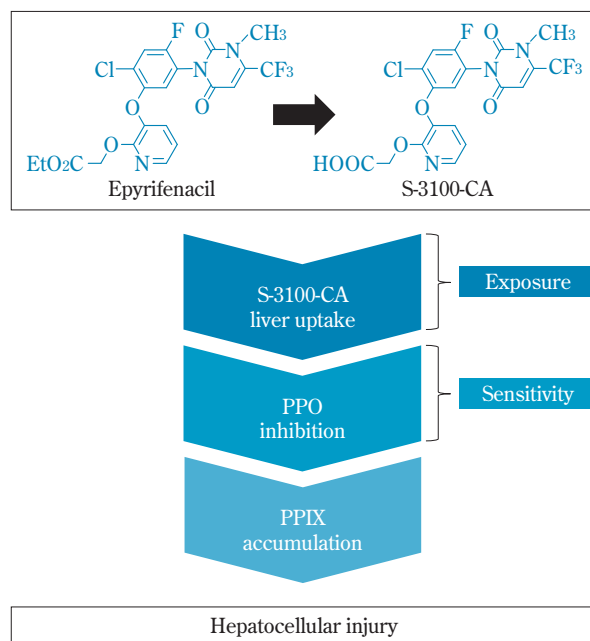


Fig. 2 Postulated mode of action for Epyrifencil-induced hepatotoxicity

Table 1 Active uptake rate of S-3100-CA into hepatocytes

Species*1	Uptake rate*2 ($\mu\text{L}/10^6$ cells/min)
Mouse	50.0 \pm 2.78
Rat	8.10 \pm 1.29
Human	3.83 \pm 0.536

*1 Pooled male mouse hepatocytes, male rat hepatocytes and human hepatocytes (mixed-gender) were used in this study.

*2 Data represent the mean \pm standard deviation of 3 runs.

とから、マウスやラットと比較して当該毒性はヒトでは生じ難いと推測された。

3. ヒト肝キメラマウスを用いたヒト安全性評価におけるMSI技術の活用

エピリフェナシルのヒト肝臓影響をより精緻に評価することを目的に、ヒト肝キメラマウスを用いたヒト安全性評価にMSI技術を活用することとした。ヒト肝キメラマウスは肝臓の大部分がヒト肝細胞へと置換されたマウスであり、化学物質のヒトにおける体内動態や毒性を予測するためのモデル動物として急速に利用が進んでいる^{8),9)}。ヒト肝キメラマウスを用いる試験では、通常、約85-90%の高いヒト肝置換率を呈するキメラマウスを使用することでヒト肝臓影響の評価とするが、肝臓中に残る宿主マウス肝細胞の影響を完全に排除することは困難である。一方で、キメラ肝に混在するヒト肝細胞と宿主マウス

Table 2 Inhibitory activity of S-3100-CA against mitochondrial PPO fractions

Species*1	IC ₅₀ (nM)*2
Mouse	0.89 \pm 0.30
Rat	1.5 \pm 0.36
Human	13 \pm 2.1

*1 Pooled male mouse fraction, male rat fraction and human fraction (mixed-gender) were used in this study.

*2 Data represent the mean \pm standard deviation of 3 runs.

肝細胞を区別して評価することができれば、投与量、投与期間、血中曝露量等が揃った*in vivo*条件下で、マウス肝とヒト肝への化合物影響の程度を直接比較することが可能である。ここにMSI技術を組み合わせることで、キメラ肝切片上のマウスとヒトの肝細胞領域の位置情報を失うことなく、毒性本体S-3100-CAと肝毒性マーカーPPIXの存在量やその分布を測定することができる考えた。

全肝細胞のうち約50-60%がヒト肝細胞に置き換わった低置換キメラマウスに、エピリフェナシルを40 ppmの用量で7日間混餌投与した後、採取した肝臓の連続切片を作製し、S-3100-CAおよびPPIXの肝切片上の存在量と分布をMSIにより可視化した¹⁰⁾。また、測定後の肝切片をヘマトキシリン・エオジン染色(HE染色)することにより、マウスあるいはヒトの肝細胞領域を判別した。取得したHE染色画像およびMSI画像をFig. 3に示す。HE染色画像(Fig. 3(a))の解析

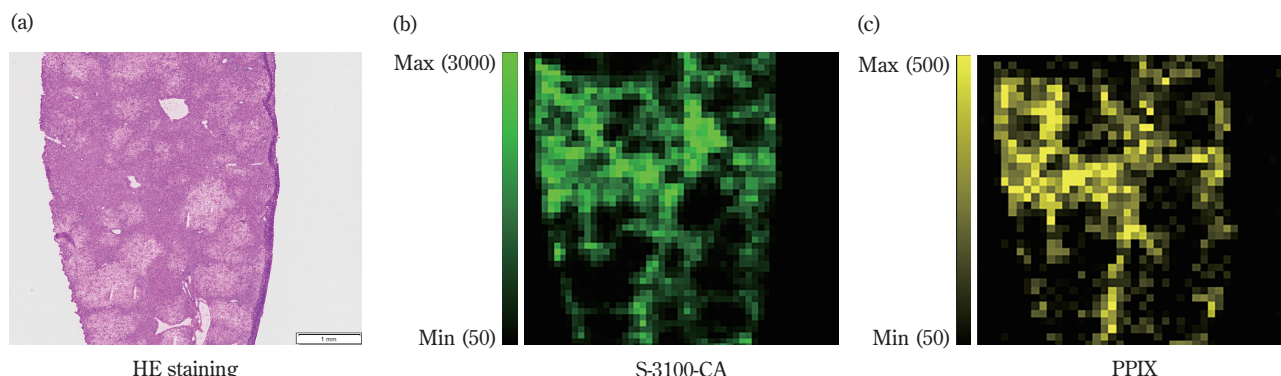


Fig. 3 Comparison of MS and the histological images of liver sections obtained from epryifenacil-treated chimeric mice.

(a) The histological image of HE-stained sections after MSI analysis: human hepatocyte regions show clearer cytoplasm compared to mouse hepatocyte regions. (Scale bar = 1 mm) (b) (c) The MS image of S-3100-CA and PPIX: the scale bar indicates the range of target compound signal intensity.

により、キメラ肝では濃紫色を呈するマウス肝細胞領域と、薄紫色を呈するヒト肝細胞領域が斑状に混在する様子が観測された。HE染色画像とS-3100-CAのMSI画像 (Fig. 3(b)) を比較したところ、S-3100-CAの存在量が多い領域はマウス肝細胞領域と一致し、ヒト肝細胞領域におけるS-3100-CAの存在量はマウス肝細胞領域よりも有意に低いことが明らかとなった。これは前述の*in vitro*肝細胞取り込み試験で得られた、取り込み能種差の結果と一致していた。さらに、PPIXについてもマウス肝細胞領域にその蓄積は局在化しており、その蓄積量はヒト肝細胞領域と比較して著しく低いことが明らかとなった (Fig. 3(c))。すなわち、S-3100-CA取り込み量の種差ならびにPPO阻害能の種差が相乗的に働いた結果、肝毒性マーカーであるPPIX蓄積性に顕著なマウス-ヒト間の種差が存在することを、初めて*in vivo*で捉えることができた。

MSI技術とヒト肝キメラマウス技術を組み合わせることにより、従来は個々の*in vitro*試験でしか捉えることができなかった毒性本体の曝露量 (S-3100-CAの肝細胞取り込み能) および毒性標的分子の感受性 (S-3100-CAのPPO阻害能) の種差を、肝毒性マーカー (PPIX蓄積) の生体中の変化として一度に捉え、かつマウスとヒトにおける存在量や分布を可視化して直接比較することが可能となった。エピリフェナシルの安全性評価に本技術を活用した結果、ヒト肝細胞領域におけるPPIX蓄積量はマウスと比較して極めてわずかであり、PPIX蓄積に起因して生じる細胞障害等の肝毒性は、ヒトでは生じ難いという証左を得ることができた。

おわりに

MSI技術を活用することで、エピリフェナシルによる肝毒性はヒトでは生じ難いことを明らかにした。取得したデータはエピリフェナシルのヒト安全性評価のための科学技術文書として、各国の農薬登録申請に活用する。化学物質の毒性作用機序の解明やヒト化モデル動物を利用したヒト安全性研究におけるさまざまな課題の解決に向け、本技術は今後も幅広く活用していきたいと考える。

引用文献

- 1) F. Yamada *et al.*, J. Appl. Toxicol., 33 (11), 1284 (2013).
- 2) K. Sumida *et al.*, Rapid Commun. Mass Spectrom., 29 (7), 695 (2015).
- 3) A. Nilsson *et al.*, PLOS ONE, 7 (10), e47353 (2012).
- 4) J. M. Kampa *et al.*, Toxicol. Lett., 325 (1), 43 (2020).
- 5) European Food Safety Authority, EFSA J., 13 (2), 4001 (2015).
- 6) United States Environmental Protection Agency, Memorandum from USEPA, D291514 (2003).
- 7) K. Matsunaga *et al.*, J. Pestic. Sci., 46 (4), 333 (2021).
- 8) S. Sanoh and S. Ohta, Biopharm. Drug Dispos., 35 (2), 71 (2014).
- 9) T. Yamada, J. Toxicol. Pathol., 34 (4), 283 (2021).
- 10) K. Matsunaga *et al.*, J. Toxicol. Sci., 46 (12), 601 (2021).