環境省　環境研究総合推進費
成果報告会

『化学物質の複合暴露による健康リスク評価に関する分子毒性学的研究』(C-1007)

研究代表者
国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター　毒性部
菅　野　　純

研究実施期間:　平成22～24年度
累計予算額:　59,492 千円

研究体制

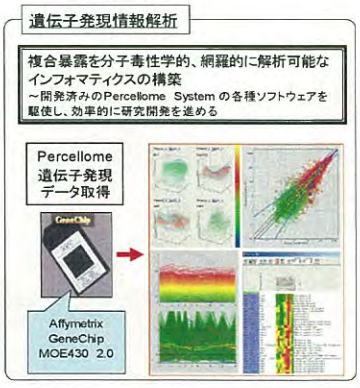
遺伝子発現情報解析
総括(菅野)

遺伝子発現解析結果のフィードバックにより動物実験を最適化

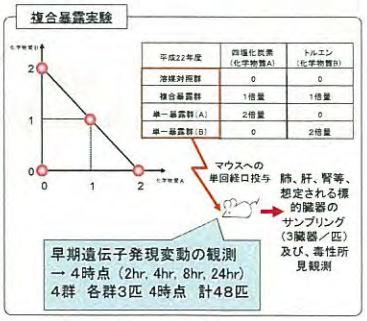
臓器サンプル提供

複合暴露実験
(加納)

- Percellome法を用いた網羅的遺伝子発現変動の測定。
- 発現データの複合作用解析と、その効率化のためのアルゴリズム開発。



- マウスに於いて、各々の化学物質単独投与、両者同時複合投与、及び溶媒対照の4つの実験群を設定し、暴露実験を実施。
- 標的臓器(肝、肺、腎など)の暴露後早期のmRNA測定用サンプルを採取。



研究開発目的

中央環境審議会からも指摘され国民の関心も高いが、現行の毒性評価法では技術的に対応困難であるところの、環境化学物質の複合暴露の健康リスク評価について、トキシコゲノミクスによる分子毒性学的な有害性評価検討手法を適用し、その網羅性、定量性、及び分子メカニズム解析能をもって、それを可能とする評価基盤を構築することを目的とする。

【背景】

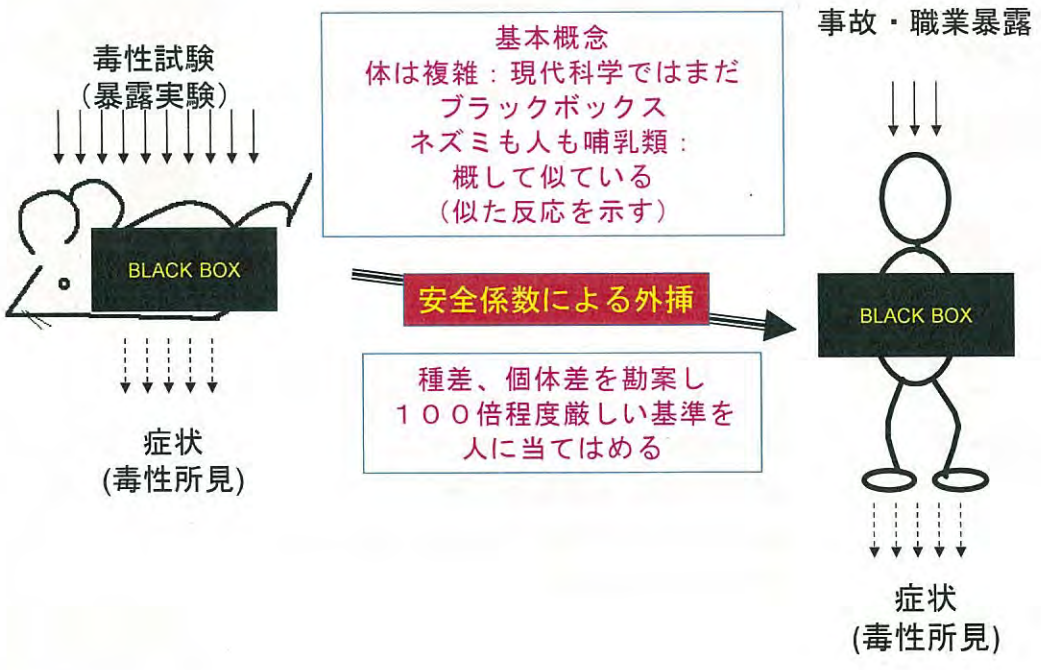
•現実には、人や野生動物は、環境中に意図的に散布された、或いは非意図的に分散した複数の化学物質の複合暴露を受けている。

- •法規制に関わる基準値は単独化合物についてしか検討されていない。
- •現行の法規制では、個々の化学物質の暴露量が閾値以下であれは、複数の化学物質に同時に暴露されても、毒性症状は現れないと仮定している。

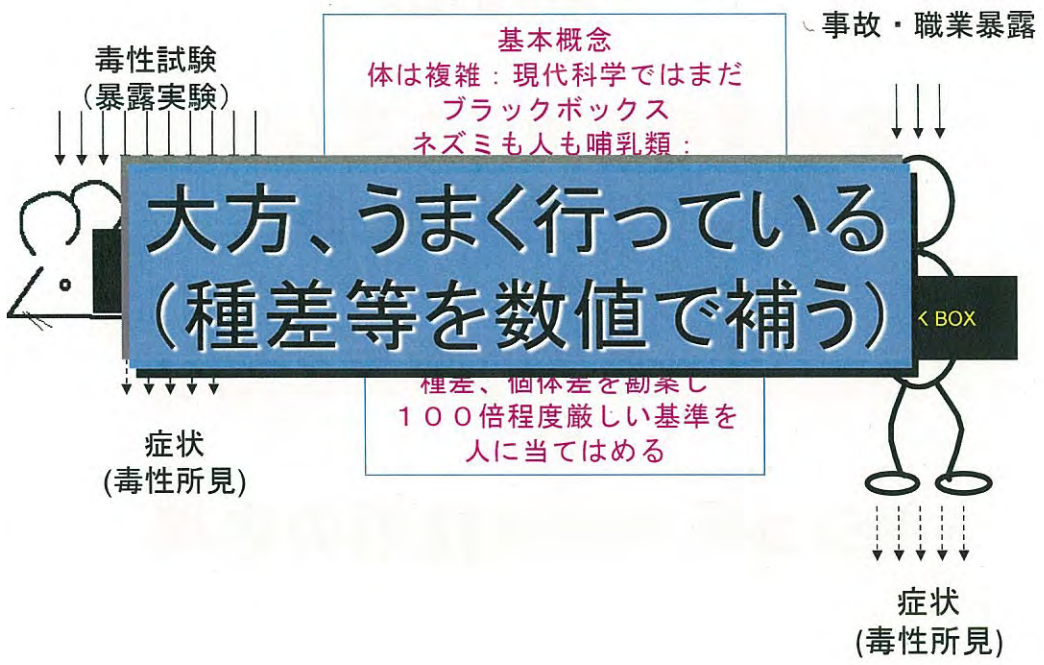
•複合暴露問題が現行の毒性学では扱いきれていない。

- •現行の毒性学では、化学物質Aの毒性情報と、化学物質Bの毒性情報が在ったとしても、それらが現象論的な情報であることから、A+Bの複合暴露よる毒性を予測することが困難であり、A+Bは、新物質Cとして改めて検討し直す必要がある。
- •複合暴露の評価には、化学物質や濃度毎の厖大な組み合わせ数の毒性試験を逐次実施しなければならない状況にあり、現実的に手がつかない。
- •複合暴露が起こった際の閾値が、個々の単一化学物質の閾値と同等であるかどうかの科学的検討がなされていない。
- •複合暴露影響の分子機序が未解明のままである。

動物実験（毒性試験）
齧歯類（ラット・マウス）などを用いる
＝人の身代わりとして



動物実験（毒性試験）
齧歯類（ラット・マウス）などを用いる
＝人の身代わりとして



動物実験（毒性試験）
齧歯類（ラット・マウス）などを用いる
＝人の身代わりとして

うまく行かなかった代表例
↓
サリドマイド

マウス・ラットでは催奇形性なし
人で催奇形性(アザラシ肢症）あり

症状
(毒性所見)

種差・個体差（胎児・小児・成人・老人の差を含む）を如何に科学的に取り扱うか？（近代化）

生体反応のメカニズムに
基づいた毒性評価
↓
ブラックボックスの中身の解明
||
トキシコゲノミクス技術の応用

Percellome 法

per-(one)-cell-ome

遺伝子発現を細胞1個あたりの
mRNAのコピー数（平均）として求める

BMC Genomics

BioMed Central

Methodology article

Open Access

"Per cell" normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays

Jun Kanno*†1, Ken-ichi Aisaki†1, Katsuhide Igarashi1, Noriyuki Nakatsu1, Atsushi Ono1, Yukio Kodama1 and Taku Nagao2

Address: 1Division of Cellular and Molecular Toxicology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan and 2President, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

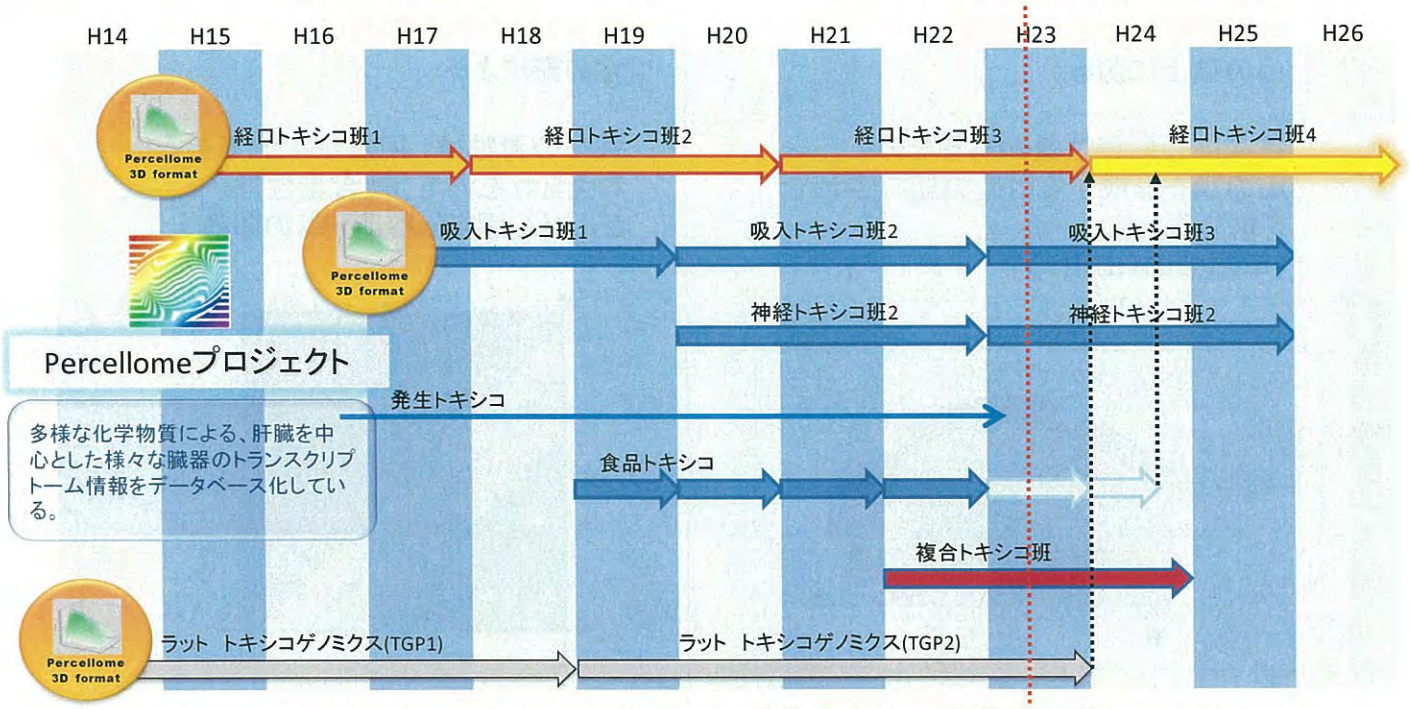
Email: Jun Kanno* - kanno@nihs.go.jp; Ken-ichi Aisaki - aisaki@nihs.go.jp; Katsuhide Igarashi - igarashi@nihs.go.jp; Noriyuki Nakatsu - n-nakatsu@nihs.go.jp; Atsushi Ono - Atsushi@nibio.go.jp; Yukio Kodama - kodama@nihs.go.jp; Taku Nagao - nagao@nihs.go.jp

* Corresponding author †Equal contributors

Open Access : BMC Genomics. 2006 Mar 29;7(1):64　　*PMID: 16571132*

特許第4415079号

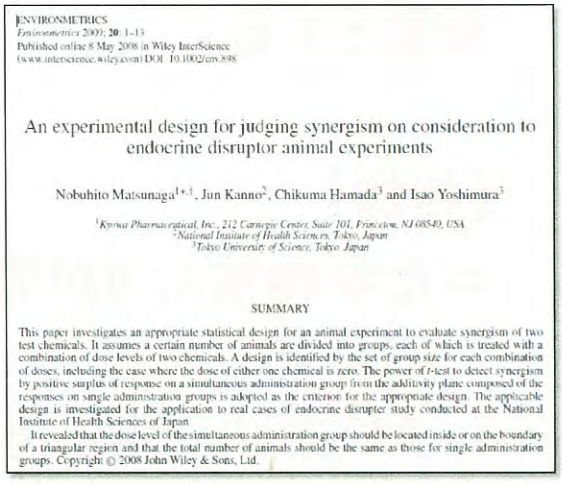
毒性部が展開するトキシコゲノミクス研究



これらすべての研究が絶対値化したデータを利用＝利点：相互の直接比較が可能である

複合作用に関する理論

(医薬安全性研究会モノグラフシリーズNo.3
サイエンティスト社　1998)



ENVIRONMETRICS
Environmetrics 2009; **20**: 1–13
Published online 8 May 2008 in Wiley InterScience
(www.interscience.wiley.com) DOI: 10.1002/env.898

An experimental design for judging synergism on consideration to endocrine disruptor animal experiments

Nobuhito Matsunaga[1*,†], Jun Kanno[2], Chikuma Hamada[3] and Isao Yoshimura[3]

[1]*Kyowa Pharmaceutical, Inc., 212 Carnegie Center, Suite 101, Princeton, NJ 08540, USA*
[2]*National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan*
[3]*Tokyo University of Science, Tokyo, Japan*

SUMMARY

This paper investigates an appropriate statistical design for an animal experiment to evaluate synergism of two test chemicals. It assumes a certain number of animals are divided into groups, each of which is treated with a combination of dose levels of two chemicals. A design is identified by the set of group size for each combination of doses, including the case where the dose of either one chemical is zero. The power of *t*-test to detect synergism by positive surplus of response on a simultaneous administration group from the additivity plane composed of the responses on single administration groups is adopted as the criterion for the appropriate design. The applicable design is investigated for the application to real cases of endocrine disrupter study conducted at the National Institute of Health Sciences of Japan.

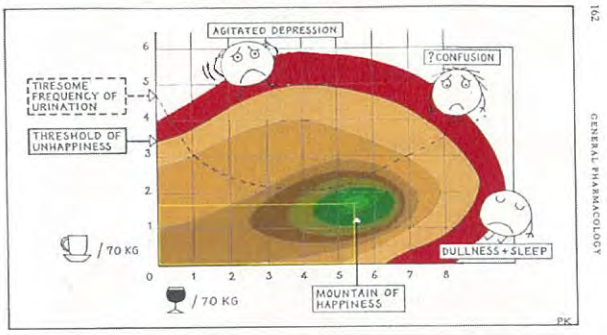
It revealed that the dose level of the simultaneous administration group should be located inside or on the boundary of a triangular region and that the total number of animals should be the same as those for single administration groups. Copyright © 2008 John Wiley & Sons, Ltd.

(Environmentrics 20 1-13 2009)

薬効の複合効果

複合2剤の相乗的な効果は
山の頂上にある。

各々に過剰毒性量があるため、
山の頂を形成する用量の組み合わせ
を求める。
【幸福の山（山頂）】

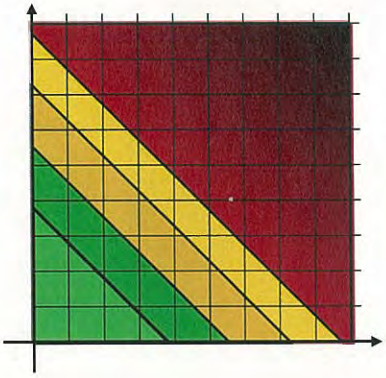


Clinical Pharmacology, D.R. Laurence & P N Bennett, Churchill Livingstone (1980)

毒性の複合影響

複合2剤の相乗効果は
谷の形による

各々の毒性は、用量依存的であると
考えられるので、複合毒性は、
どんどん深まる谷【不幸の断崖】



複合暴露効果の評価

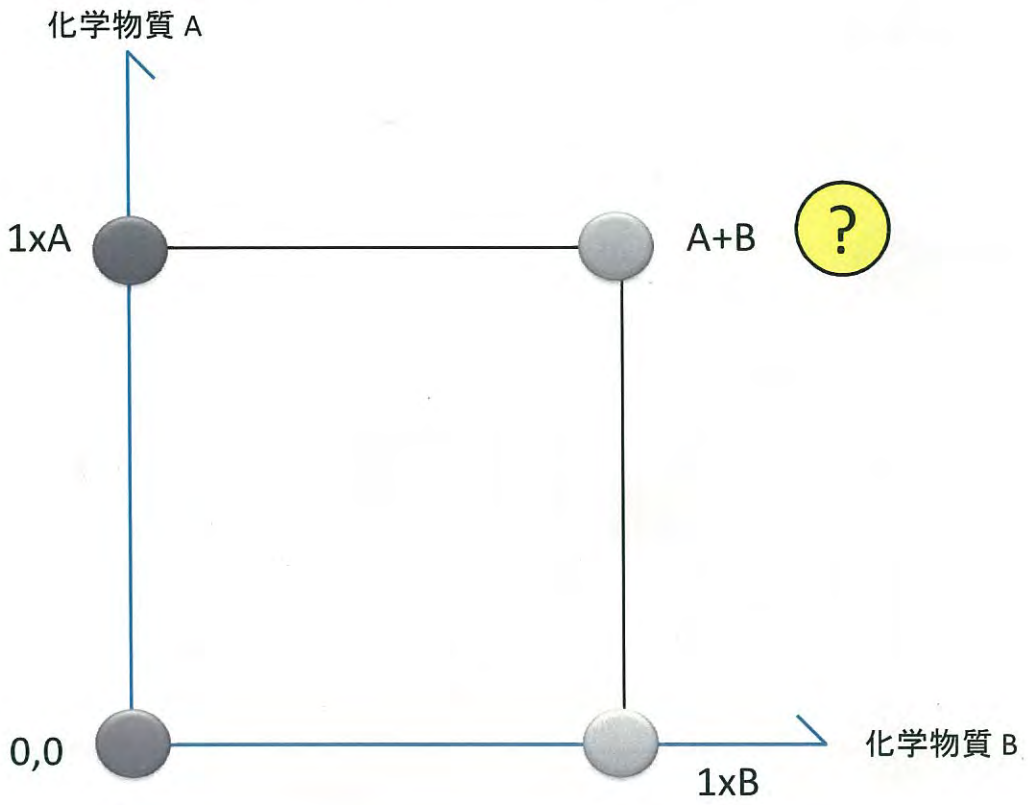
相加を定義し、それより上を相乗、それより下を相殺とする。

【相加】

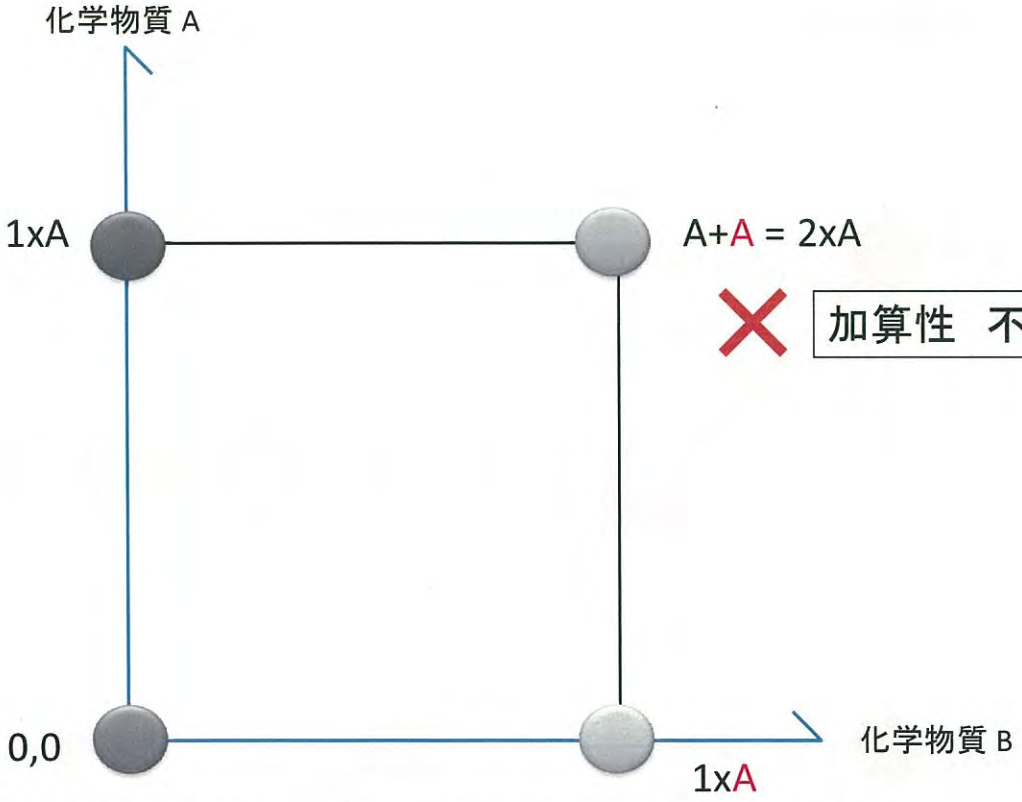
＝化学物質A、Bが等価のとき、加算性が成立する系。

＝ Bが実はAと同じものであった時にも成り立つ。

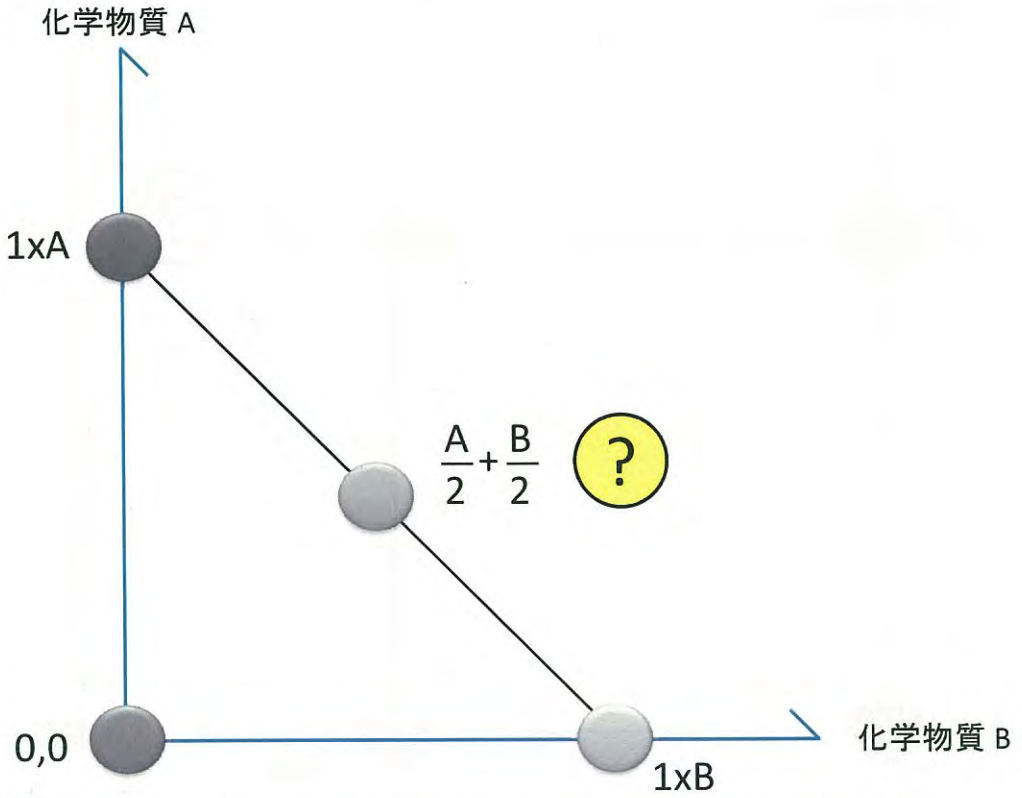
複合暴露実験の基本設計



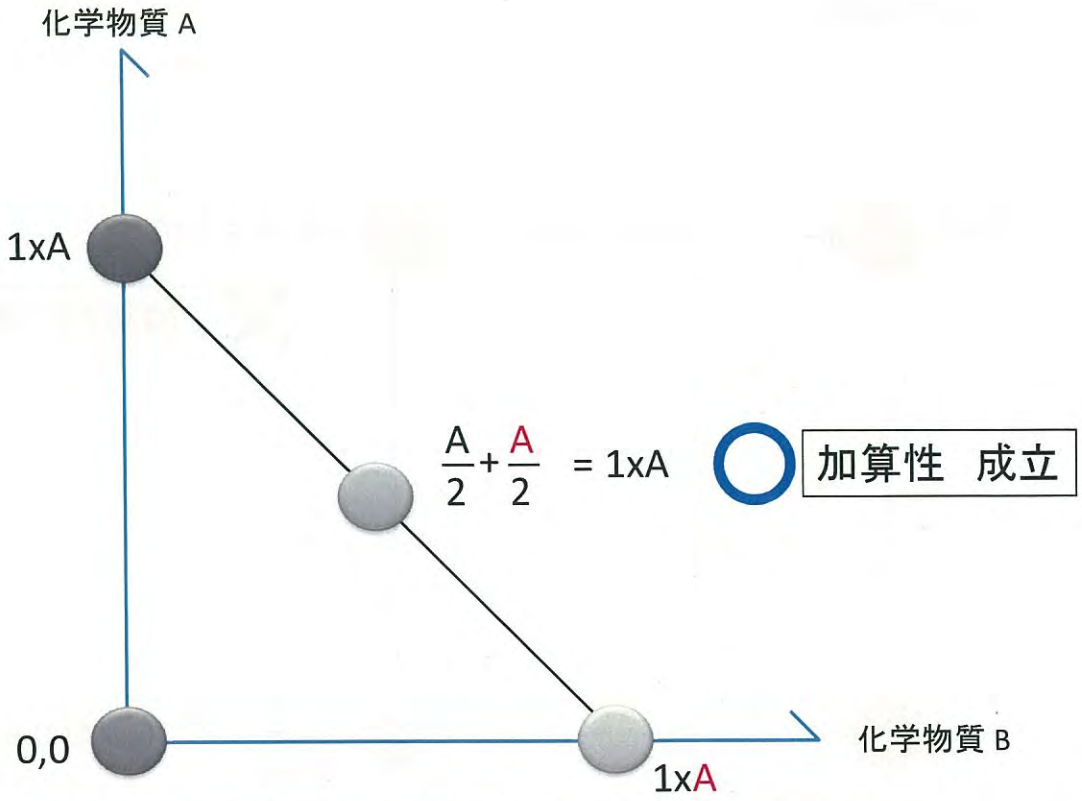
複合暴露実験の基本設計



複合暴露実験の基本設計

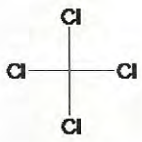
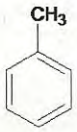
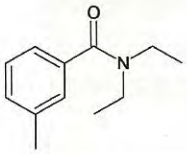
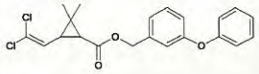
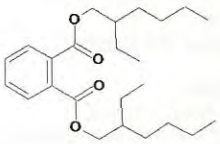
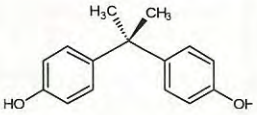


複合暴露実験の基本設計



単回複合暴露の設計

- 遺伝子発現ネットワークの修飾を解析する必要から、経時変化を重視した。
- 実験規模の制約から、1用量とした。
- 化学物質ペアは、Percellomeデータベース中から条件を検討し、選択した。

Chemical A	Chemical B
CCl4 溶剤 	**Toluene** 溶剤 
Deet 昆虫忌避剤 	**Permethrin** 殺虫剤 
DEHP 可塑剤 	**Bisphenol A** 樹脂原料・可塑剤 

本研究により得られた主な成果

- 複合暴露による遺伝子発現変動データベース*の構築開始

  *最終目標である複合暴露影響評価・予測システムの基盤DBとなる。

- トキシコゲノミクス技術による複合暴露評価手法の確立
- 健康影響に関与する可能性のある遺伝子発現レベルの複合暴露影響の発見

CCl4 x トルエンの複合暴露影響の解析
　肺におけるCry61遺伝子の相乗発現
　肺における細胞外マトリックス関連遺伝子（amphiregulin等）の相乗発現

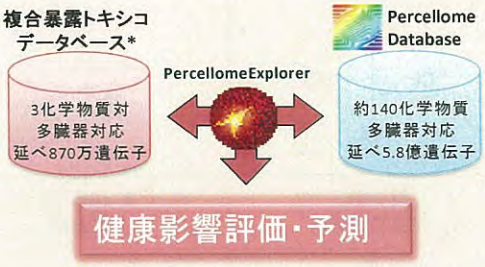
ディート x ペルメトリンの複合暴露影響の解析
　肝におけるミトコンドリア電子伝達系遺伝子群の相殺発現

DEHP x ビスフェノールAの複合暴露影響の解析
　肝におけるコレステロール生合成遺伝子群の相殺発現
　肝における薬剤耐性トランスポーター遺伝子（Abcc3）の相乗発現

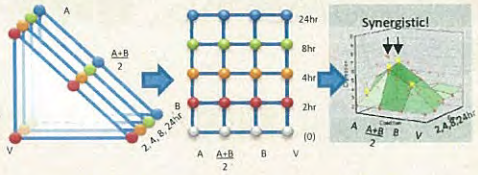
- 複合暴露影響の分子機序解析

研究成果のポンチ絵

複合暴露による遺伝子発現変動データベース*の構築開始
*最終目標である複合暴露影響評価・予測システムの基盤DBとなる。



トキシコゲノミクス技術による複合暴露評価手法の確立



RSortと統計パラメータによる候補遺伝子の自動抽出

- PercellomeExplorerによる複合暴露トキシコDB & PercellomeDBの一括参照
- *in silico* プロモータ解析等による健康影響評価や分子毒性機序解析

健康影響に関与する可能性のある遺伝子発現レベルの複合暴露影響の発見

CCl4 x トルエンの複合暴露影響の解析
　肺におけるCry61遺伝子の相乗発現
　肺における細胞外マトリックス関連遺伝子（amphiregulin等）の相乗発現

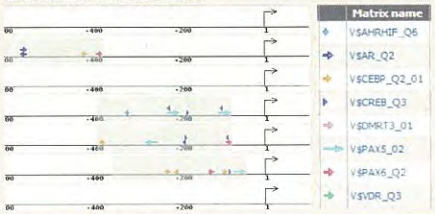
ディート x ペルメトリンの複合暴露影響の解析
　肝におけるミトコンドリア電子伝達系遺伝子群の相殺発現

DEHP x ビスフェノールAの複合暴露影響の解析
　肝におけるコレステロール生合成遺伝子群の相殺発現
　肝における薬剤耐性トランスポーター遺伝子（Abcc3）の相乗発現

複合暴露影響の分子機序解析

- 各々の複合暴露実験の候補遺伝子群において共通する転写因子結合部位の抽出
- 各々の複合暴露実験の候補遺伝子群における転写因子コンビネーション解析

→単回複合投与による毒性分子機序の解明

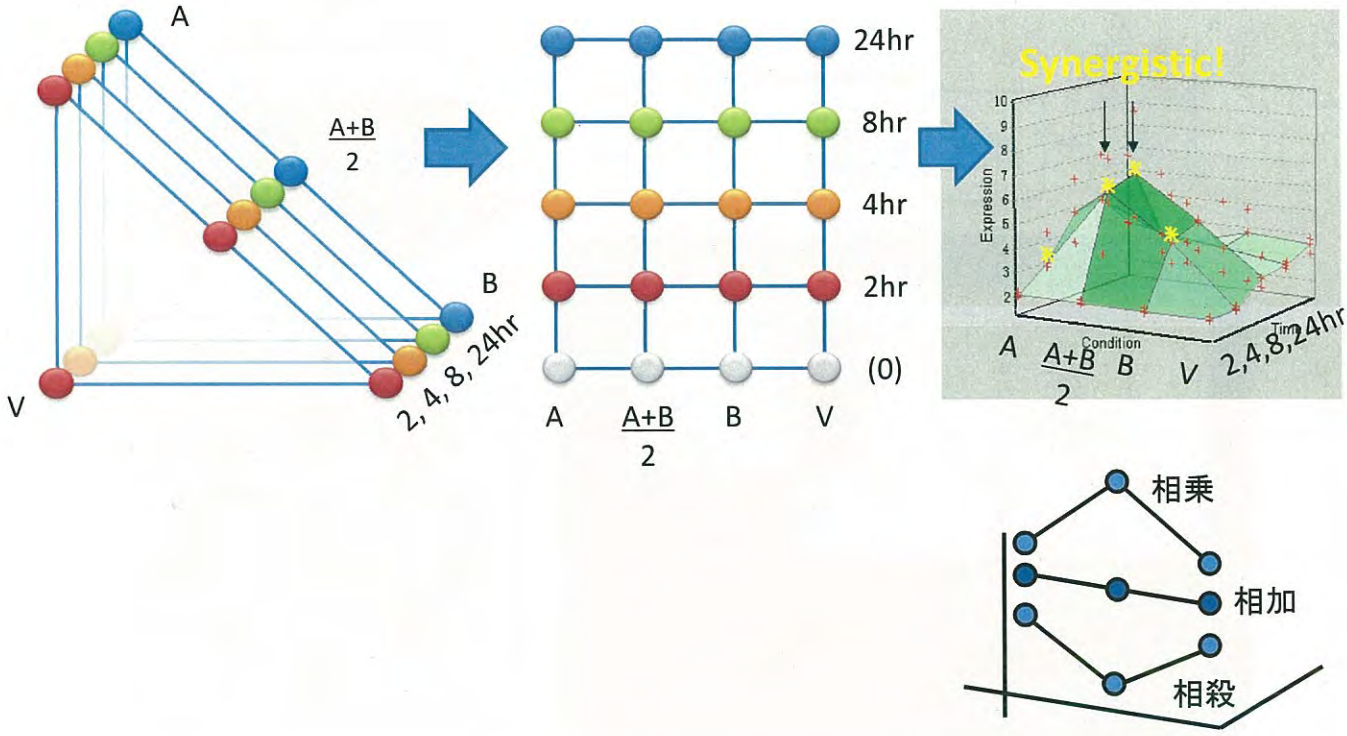


複合暴露トキシコデータベース

3化学物質対(多臓器対応)、延べ870万遺伝子

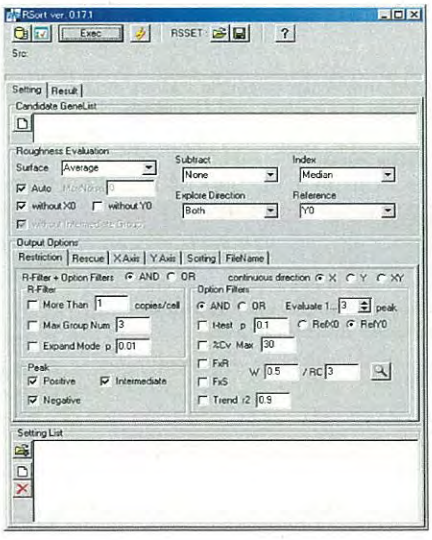
type	vehicle	Chemical A	Chemical B	dosage (mg/kg)		time
single	corn oil	CCl4 溶剤	Toluene 溶剤	A: B: (A+B)/2:	7 1000 A:3.5+B:500	2,4,8,24hr
single	corn oil	Deet 昆虫忌避剤	Permethrin 殺虫剤	A: B: (A+B)/2:	100 100 A:50+B:50	2,4,8,24hr
single	corn oil	DEHP 可塑剤	Bisphenol A 樹脂原料・可塑剤	A: B: (A+B)/2:	700 300 A:350+B:150	2,4,8,24hr

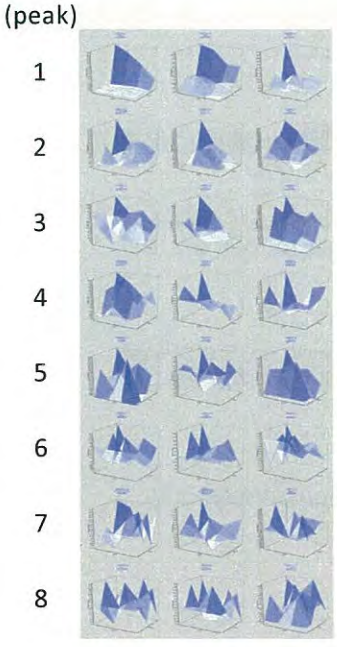
経時的な複合暴露影響データの3Dグラフ化



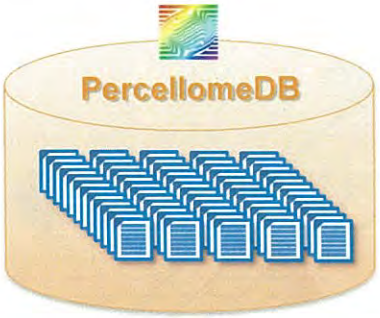
RSort

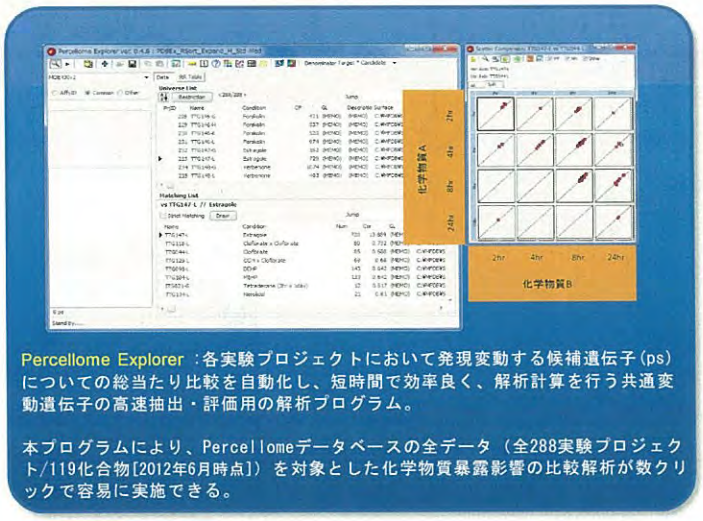
発現パターンの凹凸の程度・特徴点の位置(=実験条件)を評価する。
→ 特定の実験条件において、明確な発現誘導パターンを呈する遺伝子を自動抽出する。





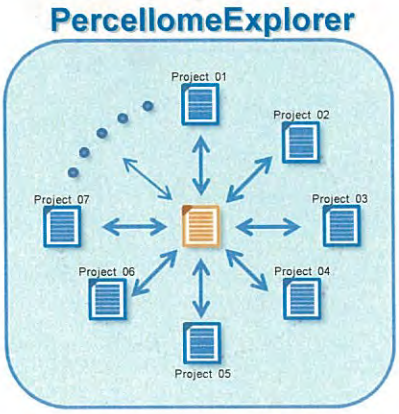
PercellomeExplorer





Percellome Explorer ：各実験プロジェクトにおいて発現変動する候補遺伝子(ps)についての総当たり比較を自動化し、短時間で効率良く、解析計算を行う共通変動遺伝子の高速抽出・評価用の解析プログラム。

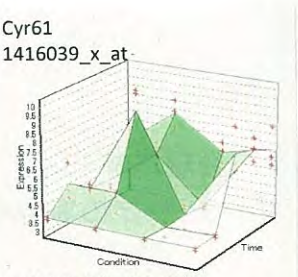
本プログラムにより、Percellomeデータベースの全データ（全288実験プロジェクト/119化合物[2012年6月時点]）を対象とした化学物質暴露影響の比較解析が数クリックで容易に実施できる。



CCl4 x トルエンの複合暴露影響の解析
1) 肺におけるCyr61遺伝子の相乗発現

Cyr61プロモータ

Cyr61
1416039_x_at



cysteine rich protein 61

Cyr61発現（相乗的に促進）

Jun, Junb, Jund, Fos, Fosl1, Dnaja4, Dnajb1, Hspa1a, Egr1, Ier2, Ier5

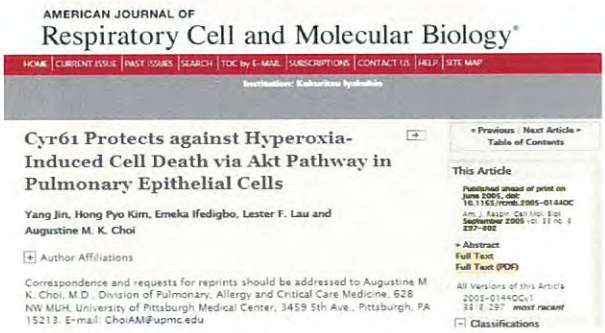
↓

Jun, Junb, Jund, Fos, Fosl1からなるAp1複合体がEgr1の発現を上昇

↓

Egr1がCyr61の発現を上昇

Cyr61は “molecular targets in various models of lung injury and human lung diseases.”として既報

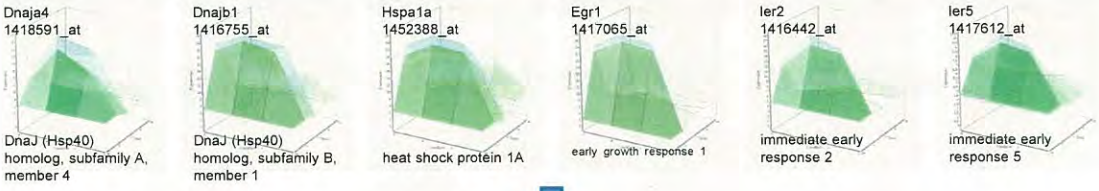

AMERICAN JOURNAL OF
Respiratory Cell and Molecular Biology

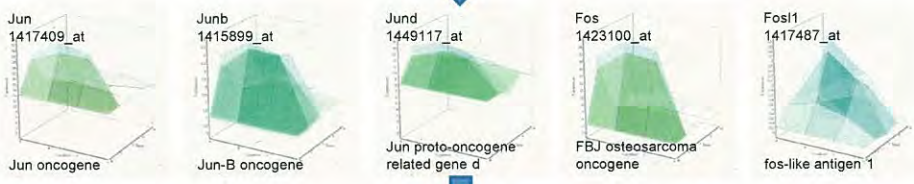
Cyr61 Protects against Hyperoxia-Induced Cell Death via Akt Pathway in Pulmonary Epithelial Cells

Yang Jin, Hong Pyo Kim, Emeka Ifedigbo, Lester F. Lau and Augustine M. K. Choi

(Am J Respir Cell Mol Biol. 2005 Sep;33(3):297-302. Epub 2005 Jun 16.)

Cyr61発現制御関連遺伝子





Cyr61プロモータ

Cyr61 promoterには、以下の91種類の転写因子結合配列が見出されている。

(O$MTEN, O$TF2B, O$TF2D, O$VTBP, O$XCPE, V$ABDB, V$AHRR, V$AP1R, V$ATBF, V$BARB, V$BRAC, V$BRN5, V$CART, V$CDEF, V$CHOP, V$CIZF, V$CLOX, V$CP2F, V$CREB, V$CTCF, V$E2FF, V$E4FF, V$EBOX, V$EGRF, V$ETSF, V$FKHD, V$GABF, V$GATA, V$GCMF, V$GFI1, V$GLIF, V$GREF, V$GRHL, V$HAML, V$HAND, V$HASF, V$HBOX, V$HEAT, V$HESF, V$HMTB, V$HNF1, V$HNF6, V$HOMF, V$HOXC,V$HZIP, V$INSM, V$KLFS, V$LEFF, V$LHXF, V$MAZF, V$MOKF, V$MYBL, V$MYT1, V$MZF1, V$NF1F, V$NFAT, V$NKXH, V$NOLF, V$NR2F, V$NRF1, V$NRSF, V$P53F, V$PARF, V$PAX3, V$PAX5, V$PAX9, V$PBXC, V$PDX1, V$PERO, V$PLAG, V$PLZF, V$PRDF, V$RORA, V$RREB, V$RUSH, V$SMAD, V$SNAP, V$SORY, V$SP1F, V$SPZ1, V$SREB, V$SRFF, V$STAT, V$TEAF, V$WHNF, V$XBBF, V$ZF02, V$ZF03, V$ZF04, V$ZF07, V$ZF5F)

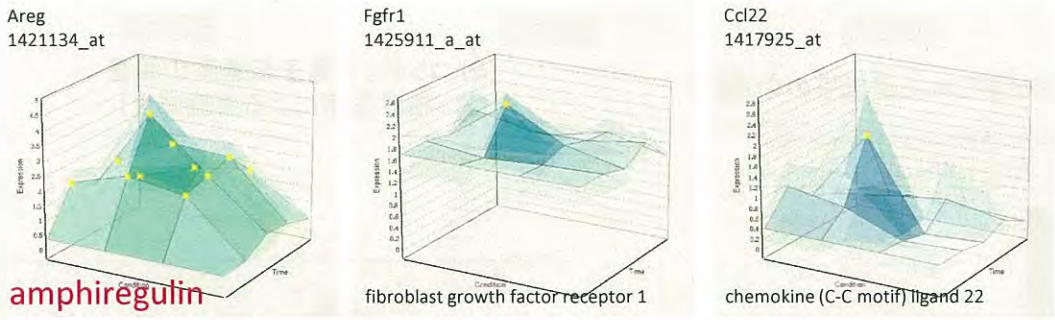
Jun, Junb, Jund, Fos, Fosl1は複合体を形成し、V$AP1Fに結合する。Egr1はV$EGRFに結合する。
Cyr61 promoterに見出された転写因子結合配列の中に、V$AP1Fは無く、V$EGRFは認められた。

Egr1プロモータ

Egr1 promoterには、以下の91種類の転写因子結合配列が見出されている。

(O$MTEN, O$TF2D, O$VTBP, O$XCPE, V$AHRR, V$AP1F, V$AP1R, V$AP2F, V$AP4R, V$ARID, V$BCL6, V$BNCF, V$CAAT, V$CARE, V$CART, V$CDEF, V$CEBP, V$CHRE, V$CLOX, V$CP2F, V$CREB, V$CTCF, V$DEAF, V$DICE, V$DMTF, V$E2FF, V$E4FF, V$EBOX, V$EGRF, V$ETSF, V$EVI1, V$GCMF, V$GLIF, V$GRHL, V$HAML, V$HAND, V$HDBP, V$HEAT, V$HESF, V$HICF, V$HIFF, V$HNF6, V$HOMF, V$HOXF, V$IKRS, V$KLFS, V$LEFF, V$MAZF, V$MEF2, V$MEF3, V$MOKF, V$MTF1, V$MYBL, V$MYOD, V$MZF1, V$NFAT, V$NFKB, V$NOLF, V$NR2F, V$NRF1, V$NRSF, V$OCT1, V$OSRF, V$PARF, V$PAX5, V$PAX6, V$PCBE, V$PERO, V$PLAG, V$PURA, V$RBP2, V$RORA, V$RREB, V$RUSH, V$RXRF, V$SP1F, V$SPZ1, V$SRFF, V$STAF, V$STAT, V$THAP, V$XBBF, V$YBXF, V$YY1F, V$ZF01, V$ZF02, V$ZF06, V$ZF07, V$ZF5F, V$ZFHX, V$ZICF)

CCl4 x トルエンの複合暴露影響の解析
2) 肺の線維化に関連する遺伝子（amphiregulin等）の相乗発現



PM2.5暴露影響により惹起される遺伝子として既報

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Toxicology Letters 168 (2007) 155–164
Toxicology Letters
www.elsevier.com/locate/toxlet
ELSEVIER

Effects of $PM_{2.5}$ components in the release of amphiregulin by human airway epithelial cells

Mélina Rumelhard*, Kiran Ramgolam, Floriane Auger, Anne-Catherine Dazy, Sophie Blanchet, Francelyne Marano, Armelle Baeza-Squiban

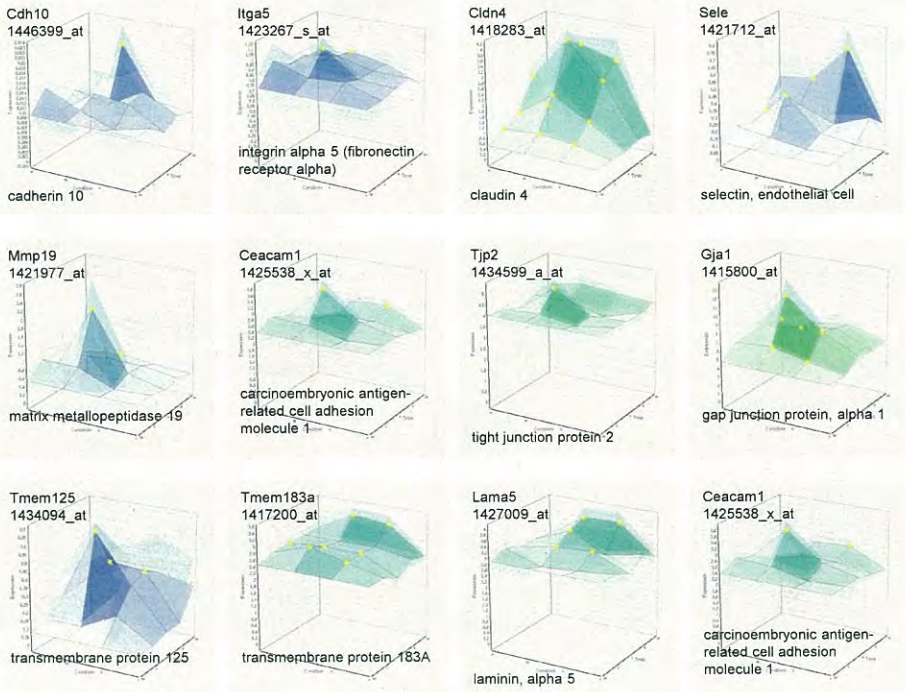
Laboratoire de Cytophysiologie et de Toxicologie Cellulaire, Tour 53-54, 3e étage, Case Courrier 7073, Université Paris 7, 2 Place Jussieu, 75251 Paris Cedex 05, France

Received 10 July 2006; received in revised form 21 November 2006; accepted 27 November 2006
Available online 30 November 2006

(Toxicology Letters 168 155-164 2007)

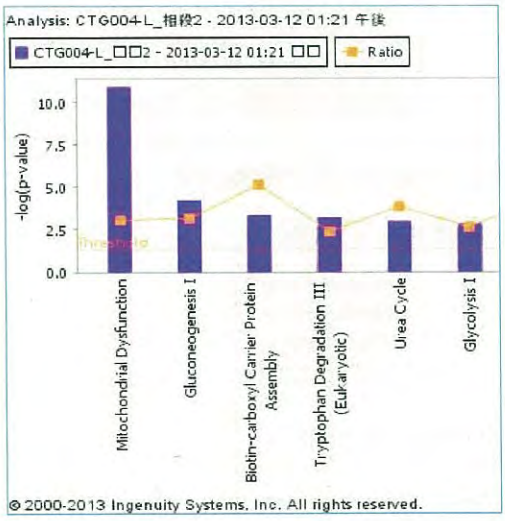
CCl4 x トルエンの複合暴露影響の解析
2) 肺の線維化に関連する遺伝子（amphiregulin等）の相乗発現

細胞接着分子　及び　細胞外マトリクス分子の相乗発現

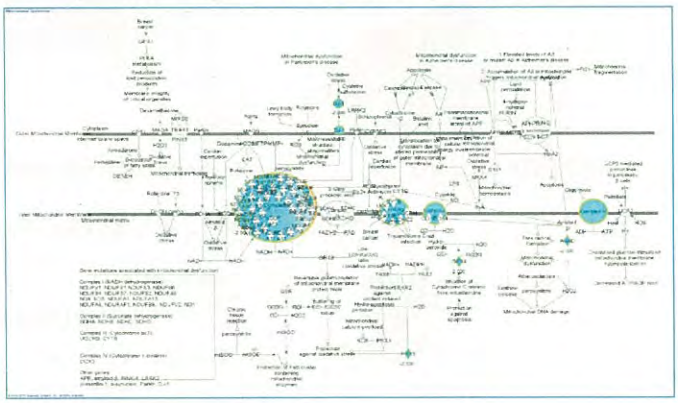


ディート x ペルメトリンの複合暴露影響の解析
肝におけるミトコンドリア電子伝達系遺伝子群の相殺発現

相殺作用が見られた遺伝子のGO解析



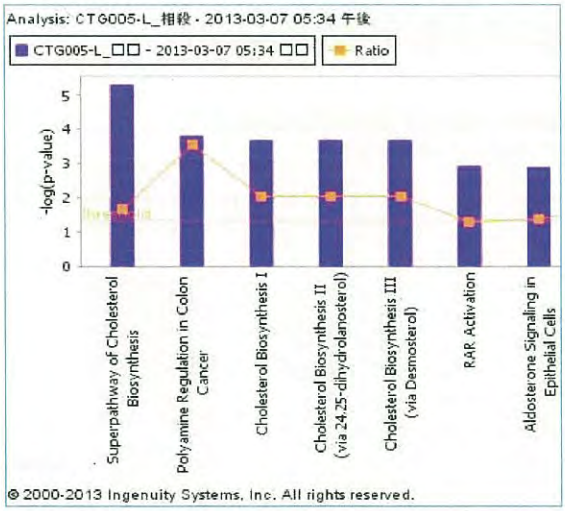
ミトコンドリア電子伝達系の障害
[青：相殺作用による発現減少]



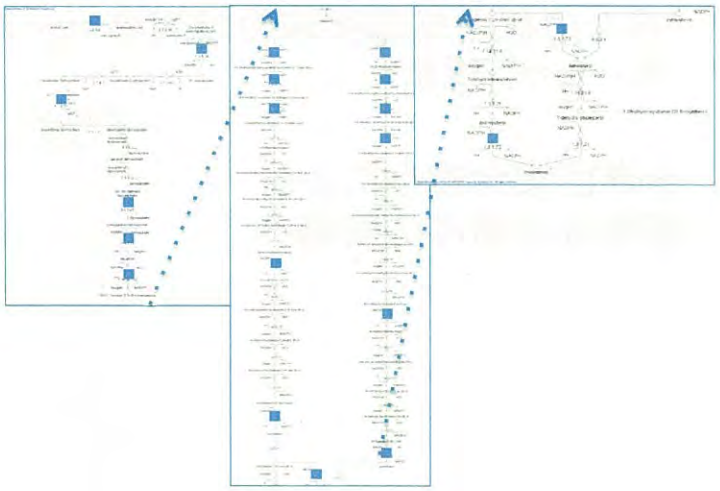
ディート x ペルメトリンの複合暴露影響の解析
肝におけるミトコンドリア電子伝達系遺伝子群の相殺発現

DEHP xビスフェノールAの複合暴露影響の解析
肝におけるコレステロール生合成遺伝子群の相殺発現

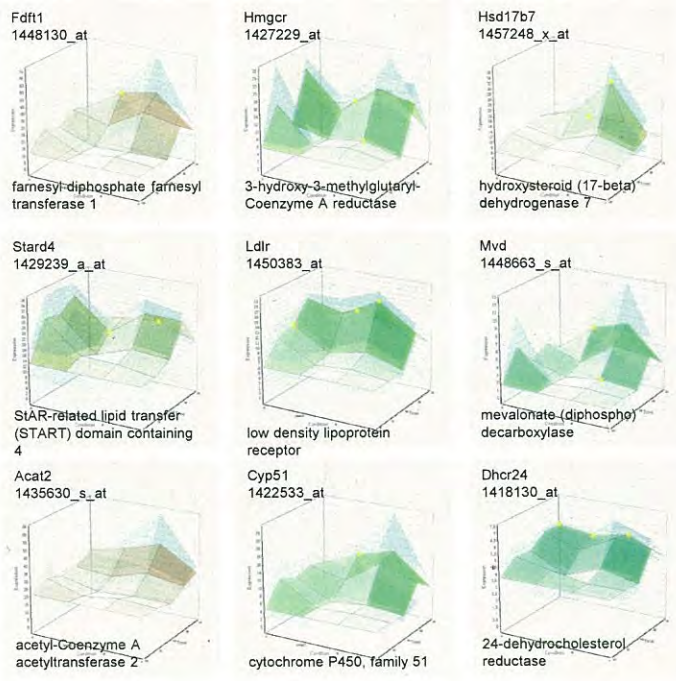
相殺作用が見られた遺伝子のGO解析

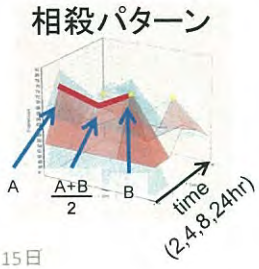


コレステロール生合成　［青：　発現減少］



DEHP xビスフェノールAの複合暴露影響の解析
肝におけるコレステロール生合成遺伝子群の相殺発現





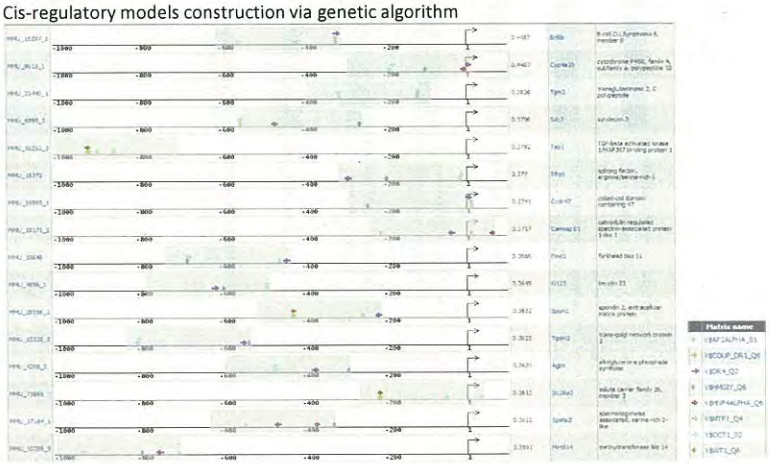
複合暴露影響の分子機序解析

- 各々の複合暴露実験の候補遺伝子群において共通する転写因子結合部位の抽出

- 各々の複合暴露実験の候補遺伝子群における転写因子コンビネーション解析

→単回複合投与による毒性分子機序の解明へ

Composite model construction (TF combinations)
Cis-regulatory models construction via genetic algorithm



複合暴露影響の分子機序解析

各々の複合暴露実験の候補遺伝子群における転写因子結合部位

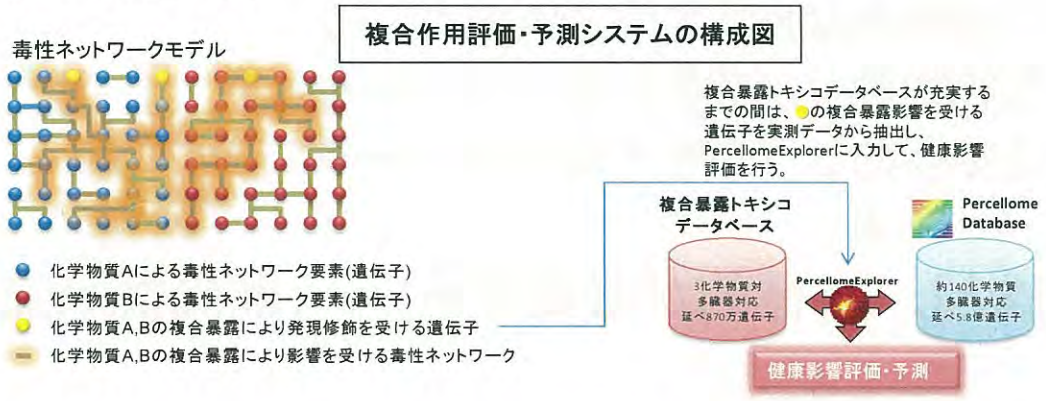
		特有	共通	転写因子コンビネーション
CCl4 x トルエン	相乗	V$P300_01	V$GATA4_Q3, V$NKX25_02, V$PPARG_02, V$HOXA4_Q2, VDBP_Q6, VHAND1E47_01, V$PAX2_02, V$GEN_INI3_B	V$AP2ALPHA_01, V$BCL6_Q3, V$BRCA_01, V$DR3_Q4, V$DR4_Q2, V$HNF4ALPHA_Q6, V$PPARG_02, V$YY1_Q5
	相殺	V$ZIC3_01, V$IK_Q5	VDBP_Q6, VHMGIY_Q6, V$HAND1E47_01	V$COREBINDINGFACTOR_Q6, V$ETF_Q6, V$FOXJ2_02, V$HNF4ALPHA_Q6, V%PPARG_02, V$TAXCREB_01, V$TCF11_01, V$YY1_01
ディート x ペルメトリン	相乗	V$CEBP_Q2_01	V$NKX25_02, V$DBP_Q6, V$PPARG_02, V$HMGIY_Q6, V$PAX8_01	V$CEBPG_Q6, V$CP2_02, V$DR1_Q3, V$FAC1_01, V$HNF3B_01, V$P53_02, V$PAX3_01, V$SREBP_Q3
	相殺	V$SREBP_Q6	V$PPARG_02, V$GATA4_Q3, V$PAX2_02, V$SREBP1_01, V$NKX25_02, V$DBP_Q6, V$PAX8_01, V$HOXA4_Q2, V$HAND1E47_01, V$CHOP_01	V$AHRARNT_01, V$CEBPD_Q6, V$CREB_02, V$DR1_Q3, V$HSF2_01, V$PPARG_01, V$SMAD3_Q6, V$YY1_Q6
DEHP x ビスフェノールA	相乗	V$GATA_C, V$OCT4_02, V$NF1_Q6_01, V$TBP_Q6, V$POU3F2_02	V$NKX25_02, V$GATA4_Q3, V$PAX8_01, V$PAX6_01, V$HOXA4_Q2, V$GEN_INI3_B, VDBP_Q6, VHMGIY_Q6, V$CDPCR3_01, V$GRE_C	V$AP2ALPHA_01, V$COUP_DR1_Q6, V$DR4_Q2, V$HMGIY_Q6, V$HNF4ALPHA_Q6, V$MTF1_Q4, V$OCT1_02, V$WT1_Q6
	相殺	V$MYOGNF1_01	V$DBP_Q6	V$AHRHIF_Q6, V$AR_Q2, V$CEBP_Q2_01, V$CREB_Q3, V$DMRT3_01, V$PAX5_02, V$PAX6_Q2, V$VDR_Q3

精密な複合作用評価・予測技術の完成の条件

20～30対の化学物質*の複合暴露データの追加**により、実用的なリファレンスデータベースの構築と、それによる相加、相乗、相殺予測が網羅的に実施可能になる予定。

* 複合作用予測に有用な化学物質ペアの選択は、別途構築済みのPercellomeデータベースを参照することで可能。

** 現在、Percellome Projectにおいて、GeneChipから次世代高速シークエンサへの移行と、マイクロRNAなどの網羅性の拡大を検討中であり、近いうちに更なる精度とコストパフォーマンスの向上が期待される。



複合暴露トキシコデータベース拡充のための候補化学物質対リスト

物質A			物質B		
物質名	CAS No.	用途/特徴	物質名	CAS No.	用途/特徴
Carbon tetrachloride	56-23-5	有機溶剤	Bis(2-ethylhexyl)phthalate [DEHP]	117-81-7	プラスチック可塑剤
Toluene	108-88-3	有機溶剤	Bis(2-ethylhexyl)phthalate [DEHP]	117-81-7	プラスチック可塑剤
Carbon tetrachloride	56-23-5	有機溶剤	Imidacloprid	138261-41-3	ネオニコチノイド系殺虫剤
Acephate	30560-19-1	有機リン系殺虫剤	Pentachlorophenol	87-86-5	除草剤(1990年に農薬登録が失効)
Acephate	30560-19-1	有機リン系殺虫剤	Paraquat dichloride	1910-42-5	除草剤
Pentachlorophenol	87-86-5	除草剤(1990年に農薬登録が失効)	Paraquat dichloride	1910-42-5	除草剤

結　論(現段階での)

- 個々の物質が及ぼす影響と、複合影響との間に、
  - ①共通のものが有る(共通のネットワーク)
  - ②異なったものがある(異なったネットワーク)
- いずれについても、
  - ①相乗的な反応をするネットワーク
  - ②相加的な反応をするネットワーク
  - ③相殺的な反応をするネットワーク
    がある。
- 結論として、標的が移動する　―　網羅性が重要