

課題名 C-1007 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

課題代表者名 菅野 純（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 部長）

研究実施期間 平成22～24年度

累計予算額 59,492千円（うち24年度15,129千円）
予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード（5～10個以下程度）
複合暴露影響評価、トキシコゲノミクス、パーセローム、相加相乗性、マウス

研究体制

- (1) 遺伝子発現情報解析、総括(国立医薬品食品衛生研究所)
- (2) 複合暴露実験(中央労働災害防止協会)

研究協力機関

なし

研究概要

1. はじめに(研究背景等)

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が、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。その理由として、複合暴露問題が現行の毒性学では扱いきれていないことが挙げられ、そこには、解決を要する2つの問題点が存在している。

第一点は、現在までの毒性学では、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の複合暴露に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。このため、複合暴露の評価には、化学物質や濃度毎の膨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、現実的に手が見つからないのである。

第二点は、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成されていないことである。毒性に閾値が有るということは、例えば、体の中に毒性に対抗する中和物質が備わっていて、ある量の毒性物質までは中和するためであると考えることが出来る。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ば、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。しかし、実際は中和物質の減少はこの閾値以下の量でも起こるので、個々が閾値以下の量であっても複合して作用した場合、中和物質が枯渇してしまい、毒性症状が現れる可能性がある。

これらの問題点は、毒性学の近代化を目指し我々が進めているパーセローム(Percellome)トキシコゲノミクス法により解決する事が可能である。この手法は、mRNA発現データの精度と定量的な取り扱い性能を格段に向上させたものであり、毒性症状が明らかになる前の段階から、且つ微量暴露の状態から化学物質影響を、網羅性を担保しつつ、高感度・定量的に観察するものである。その為、化学物質A+BをCとせず、AとBのそれぞれのPercellome情報からA+Bを科学的に予測することが可能になると期待される。

2. 研究開発目的

本研究の目的は、中央環境審議会からも指摘され国民や専門家からの常々の要望の対象となってきたものの、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により惹起される生体影響を正確かつ迅速に評価する技術の開発である。

そのためには、研究代表者の複合影響判定に関する数理統計学的基礎(Matsunaga et.al. Environmetrics (2009), 20:1-13, 東京医科歯科大学 佐久間昭教授、東京理科大学 吉村功教授との交流を経る)と、トキシコ

ゲノミクス、特に時間的・暴露量的に毒性発現の基礎となる定量的なmRNA変動を指標とした生体影響の評価を可能にするパーセローム (Percellome) トキシコゲノミクス手法 (Kanno et al. BMC Genomics (2006), 7:64、特許第4415079号) による分子毒性学的な有害性評価検討手法の応用が現実的かつ効率的であり、単体で暴露した際のPercellomeトキシコゲノミクス(高精度の網羅的遺伝子発現)情報が既に得られている環境化学物質から代表的な3対を選択し、複合暴露した際のPercellomeトキシコゲノミクス情報を得て、開発済みの分子毒性学的な有害性評価検討手法を基盤とした、分子メカニズムに基づく正確かつ迅速な複合暴露影響の安全性評価法の開発を目指す。

また複合影響の予測システム開発及び実用化に必須となる、複合暴露による遺伝子発現データベースを、網羅性と高い定量性を以て構築する。

3. 研究開発の方法

(1) 遺伝子発現情報解析

1) mRNA絶対量測定

サブテーマ「複合暴露実験」により採取したmRNA測定用サンプル(マウス肝(一部、肺・腎)、最大3臓器、4投与群(溶媒対照群、各単独投与群、及び複合投与群)、4時点、計16群(一群3匹))について、Affymetrix社 GeneChip Mouse Genome 430 2.0 ArrayにPercellome法(Kanno *et al.* BMC Genomics. 7, 64, 2006 / 特許第4415079号)を適用し、mRNA発現量を細胞1個当たりのコピー数として計測した。具体的にはサンプル破碎液中のDNA含量から細胞数を求め、濃度の異なる複数の外部標準RNA(スパイクRNA)を細胞1個当たり決まった分子数だけその破碎液に添加してから、RNA抽出、マイクロアレイ測定を行う。スパイクRNAの測定値が細胞1個当たり何コピーに由来するかが既知であることを利用し、サンプル中の全てのmRNA測定値を、細胞1個当たりのコピー数に換算した(SCal4.exe使用)。

2) データ解析

上記のGeneChipにより測定され、Percellome法によって絶対量化された約4万の遺伝子発現情報から、暴露条件(溶媒対照、各化学物質単独もしくは複合)、及び時間、発現量よりなる3次元曲面データを生成(MFAnalyzer.exe及びCreateSurface.exeを使用)し、主たる遺伝子の発現パターンを評価(MFSurface.exe及びMSV2.exeを使用)しつつ、RSort(特徴的な発現を示す遺伝子をその3次元曲面パターンを用いて自動抽出する独自アルゴリズム)によって、複合暴露影響を受けている可能性のある遺伝子候補を自動抽出した。複合暴露効果判定は、Matsunagaらの報告(Environmetrics 20 1 2009)を参考に、t検定およびWelch検定による単独ばく露群と複合ばく露群との間の有意差検定を適用した。

抽出した遺伝子群については、PercellomeExplorer.exe等を用いてPercellomeデータベースの単独投与時データと網羅的に比較すると共に、IPA(Ingenuity Systems社)によるPathway解析、Genomatix Suite(Genomatix社)、TRANSFAC(BIOBASE社)、GenExplain(GenExplain社)によるプロモーター解析を実施した。

(2) 複合暴露実験

化学物質の対として、①四塩化炭素(溶剤)とトルエン(溶剤)、②ディート(昆虫忌避剤)とペルメトリン(殺虫剤)、③フタル酸ビス(2-エチルヘキシル)(=DEHP, 可塑剤)とビスフェノールA(樹脂原料・可塑剤)の3対について、C57BL/6J系雄マウスに複合暴露を行い、mRNA測定用等の臓器を採取した。

複合暴露実験1: (A)四塩化炭素、(B)トルエン

| | |
|----------|------------------------|
| 溶媒 | コーンオイル |
| 溶媒対照群 | A=0mg/kg, B=0mg/kg |
| 複合暴露群 | A=3.5mg/kg, B=500mg/kg |
| 単独暴露群(A) | A=7.0mg/kg, B=0mg/kg |
| 単独暴露群(B) | A:=0mg/kg, B=1000mg/kg |

複合暴露実験2: (A)ディート、(B)ペルメトリン

| | |
|----------|-----------------------|
| 溶媒 | コーンオイル |
| 溶媒対照群 | A=0mg/kg, B=0mg/kg |
| 複合暴露群 | A=50mg/kg, B=0mg/kg |
| 単独暴露群(A) | A=100mg/kg, B=0mg/kg |
| 単独暴露群(B) | A:=0mg/kg, B=100mg/kg |

複合暴露実験3: (A)フタル酸ビス(2-エチルヘキシル)、(B)ビスフェノールA

| | |
|----------|------------------------|
| 溶媒 | 0.1%DMSO添加コーンオイル |
| 溶媒対照群 | A=0mg/kg, B=0mg/kg |
| 複合暴露群 | A=350mg/kg, B=150mg/kg |
| 単独暴露群(A) | A=700mg/kg, B=0mg/kg |
| 単独暴露群(B) | A:=0mg/kg, B=300mg/kg |

1) 動物

C57BL/6Jマウス(SPF、チャールス・リバー)、雄、12週齢

2) 被験物質の調製

コーンオイル(複合暴露実験1, 2)もしくは0.1%DMSO添加コーンオイル(複合暴露実験3)を溶媒に用い、用時調整した。なお液中の被験物質の濃度は、ガスクロマトグラフを用いて確認し、設定濃度に対して正確に調製されたことを確認した。

3) 投与方法

単回強制経口投与。概日リズムが、遺伝子発現値に大きく影響することから、馴化及び実験期間中の12時間明暗サイクルを厳守し、投与とサンプル採取は、定められた時刻に対して前後約20分以内に完了させた。

4) 試験群の構成及び動物数

試験群は下表の計4群とした。動物数は1群当たり3匹、経時的サンプリングを投与終了後4時点(2時間後、4時間後、8時間後、及び24時間後)に実施し、計48匹とした。

5) 動物の検査及び臓器の保存

投与後2、4、8、及び24時間目に深麻酔下に脱血後、臓器採取を行った。1匹当たり2分半から3分以内に脱血及び、肝、腎、肺の計3臓器採取を行った。臓器採取に際しては、特にmRNA分解を最小限に抑えるため、RNA保護試薬(RNAlater[®]、Applied Biosystems社)の肺内注入や肝・腎のRNAlater浸透処理を行った。

6) 倫理面への配慮

本動物実験は、平成18年4月28日付、環境省告示第88号「実験動物の飼育及び保管ならびに苦痛の軽減に関する基準」、平成18年6月1日付、厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本方針」及び平成18年11月27日付、日本バイオアッセイ研究センター制定「動物実験に関する指針」を遵守した。また本試験は日本バイオアッセイ研究センターの動物実験委員会で承認された。

4. 結果及び考察

(1) 遺伝子発現情報解析の結果

Percellome標準プロトコルに沿って、サブテーマ(2)「複合暴露実験」で採取したサンプルから低分解・高純度のRNAを抽出し、GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix)を用いて約4万種のmRNAの経時的発現量変動を細胞1個当たりのコピー数という絶対単位量として測定した。3件の複合暴露実験から延べ870万遺伝子の絶対量化発現変動データを得て、複合暴露評価・予測システムの専用標準データベースの構築を開始した。

複合暴露影響を受ける遺伝子の抽出及び分子機序に関する解析を行い、各複合暴露実験から以下の知見を得た。複合暴露実験1(四塩化炭素xトルエン)では、ヒトの肺疾患でも関連性が報告されているCyr61の相乗発現を肺において検出し、その発現制御ネットワークをプロモーター解析により推定した。また肺の線維化に関連し、PM2.5暴露でも惹起される遺伝子群の相乗発現も検出した。複合暴露実験2では肝においてミトコンドリア電子伝達系の遺伝子群の相殺発現を検出し、ヒトが複合暴露された場合に倦怠感などの不定愁訴に繋がる可能性を見出した。複合暴露実験3においては、肝におけるコレステロール合成遺伝子群の相殺発現を検出し、従来知られていなかった複合効果を発見した。

さらにこれらの複合暴露実験で相乗変化もしくは相殺変化を示した遺伝子のプロモーター解析から、複合効果の分子機序に関与すると考えられる転写因子結合部位の情報を得た。

以上により分子レベルでの複合作用の検出及び解析技術を生成し、これを基盤として複合影響の評価・予測解析システムの可能性を示した。

(2) 複合暴露実験の結果

Percellome遺伝子発現解析は毒性の初期応答の分子機序の解明を目的として行うものであり、最終結果としての表現型(毒性症状)の惹起に直接関わる遺伝子変動の混信が起こらない用量設定を行い、実際の動物実

験でも一般状態、体重、剖検、臓器重量及び病理組織学的検査では、いずれの条件でも被験物質投与の影響が検出されなかったことを確認する必要がある。

よって本研究で実施した3対の複合暴露実験では、一般状態の観察を投与直前、投与直後及び各解剖期の解剖直前に実施し、異常所見が見られないことを確認した。また、体重測定を各解剖時点の解剖直前に実施し、被験物質投与に関連すると考えられる体重の変動の無いことを確認した。剖検、病理組織学的検査及び臓器重量測定でも被験物質投与の影響と考えられるものは認められなかった。

また一般状態、体重、臓器重量及び後述の遺伝子発現データにおいても概日リズムの乱れを示す異常は検出されなかった。

以上により、いずれの複合暴露実験においても、Perccellome遺伝子発現解析に適した高品質のmRNA測定用サンプル採取が成されたことを確認した。

(3) 考察

複合暴露実験では複合投与の用量設定が問題になるが、本研究では1980年以前から継続的に進められてきた複合作用に関する議論(佐久間昭、吉村功らとの交流、医薬安全性研究会に於ける議論、Clinical Pharmacology, D.R.Laurence & P.N.Bennett, Churchill Livingstone, 1980など)を考慮し、相加効果を示す評価項目において、化学物質A,Bが等価のとき、加算性が成立することを評価できる実験設計を採用している。すなわち、単独投与で1容量を投与するとき、複合投与では0.5容量ずつ同時投与するモデルである(この設計においてのみ、双方の化学物質が実は同一であったとき、複合投与が同用量となる)。

本研究では、正しく複合効果を評価するための実験設計(図1下段)を採用し3対の複合暴露実験を実施し、網羅的で高精度のトランスクリプトームデータを得た。延べ870万遺伝子のデータであり、複合暴露評価、予測システムを稼働させるには不十分だが、その基本技術を開発し、システムのプロトタイプを構築し始めるには最小限ながら有用な情報となる。

これら3対の複合暴露実験結果を解析した結果、相加的な遺伝子発現挙動を示す遺伝子群が多数存在することが確認された。これは微量であっても多数の化学物質に複合暴露した場合、分子レベルではそれらの影響が加算され、ついには顕在化するリスクを示唆するものであり、今後の政策決定において、環境中化学物質の量的規制を取り扱う際、留意点となる結果であると考えられた。

単独投与に比べ、複合投与において有意に遺伝子発現が増強(相乗効果)、あるいは減弱(相殺効果)する遺伝子も多数同定されたが、その大半は残念ながら機能未知であり、その意義については今後の研究の進展を待たざるを得ない。しかし上述したとおり、抽出された遺伝子リストの中には疾病や健康障害に関わると報告されている遺伝子(群)が複数含まれていた。

本研究で得られた最も重要な知見は、3対の複合暴露実験結果において、共通して相乗・相殺効果を示す遺伝子が稀であったことである。これは複合効果に関与する分子が固定したのでは無く、化学物質の組合せによって責任遺伝子群が変化することを示唆している。よって、複合暴露影響の情報を迅速に政策決定へ反映させるには、本研究で基本技術を生成した複合効果の分子機序に基づく評価・予測システムの完成が必須である。

なお現段階で複合暴露評価・予測システムの実用化に不足しているのは、基盤となる標準データベースの情報量である。30対程度の複合暴露実験を追加すれば運用開始可能と推定される(本研究で使用した6化学物質の組合せを変えた複合暴露実験を実施しつつ、これらとは独立した作用を有する化学物質の新規組合せによる実験を実施し、情報追加することで、可能になる見込み)。

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

複合暴露は、生活環境、自然環境における生物(人や動植物)に対する化学物質暴露の一般的形態であるが、従来の毒性評価手法では対応が困難なため、新たな有害性評価技術の開

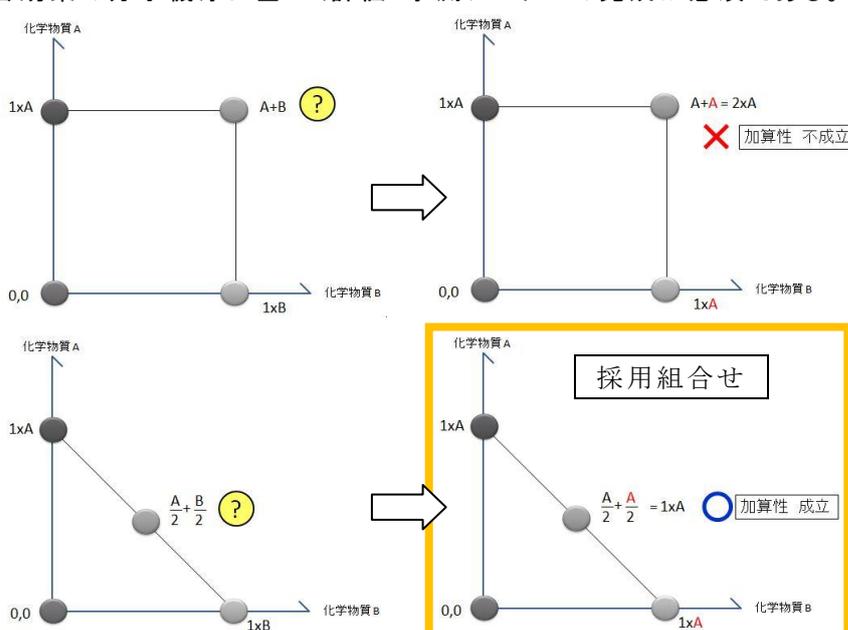


図1 適切な複合暴露実験設計

発が求められてきた。

本研究により、単一化学物質の分子毒性所見から、複数の化学物質暴露による複合影響の評価・解析、及び複合暴露影響を論理的に予測するインフォマティクス開発のための基盤を確立した。本研究で取得した複合暴露実験データは3対であるが、複合暴露解析に特化した高精度の網羅的トランスクリプトームデータは世界的にも稀であり、国際的なソフトウェアプラットフォームGARUDAを介したデータ公開(平成25年度中に開始予定)により、同種の研究活動の推進のみならず、今後の生命科学研究の進歩に伴う基礎医学研究の推進、新規化学物質の設計開発等に対しての貢献が期待される。

(2)環境政策への貢献

複数の併存する環境化学物質による複合暴露が日常化している状況下、複合暴露影響の評価、予測システムの構築は政策貢献上においても急務であるが、複合暴露問題が現行の毒性学では対応できていない上、本研究で明らかになったように、複合暴露影響に関与する分子が固定していない以上、現実的時間内に技術的に実現可能なアプローチは、トキシコゲノミクスを利用した本研究しかないと考えられる(現行の毒性評価方法では無限の組合せを試験せざるを得ず、現実的な時間内に解を求めることが出来ない)。

本研究で実施した複合暴露実験は3対のみではあるが、複合効果評価基準となる専用標準データベースの構築を開始し、基本的な解析・評価技術を開発した本研究の意義は大きい。

評価システム稼働のための必須条件となる標準データの追加取得は最短3年で実施可能(期間は研究予算に依存する)であり、その結果を加えることにより、複合暴露評価体制が確立し、立案した対応策が適切な提案か否か吟味することが可能になると見込まれる。これにより、人及び環境の安全・保全の質の向上とともに、被害の未然防止の結果としての除染、補償等の経費負担の回避が期待できる。

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない

<行政が活用することが見込まれる成果>

3対の環境化学物質の複合暴露実験により、相乗・相殺挙動をとる遺伝子以外の遺伝子の多くは相加的な挙動を示すことが判明した。この所見は複合暴露に普遍的なものである可能性が高い。注目すべきは低濃度(無症候用量)において有意な遺伝子発現変動が観察された点、すなわち個々の化学物質が微量であっても多数の化学物質が併存した場合には、相加的な遺伝子発現レベルの上昇により生体影響が顕在化する可能性を示唆していた。このような複数の化学物質に跨がる量的監視は現在、分子標的が唯一であることを前提としたダイオキシン類に限って実施されているが、今後、より多くの環境化学物質について複数の分子標的を考慮しての、同様の管理体制の導入を検討する必要がある。

6. 研究成果の主な発表状況

(1)主な誌上発表

<査読付き論文>

特に記載すべき事項はない

(2)主な口頭発表(学会等)

特に記載すべき事項はない

7. 研究者略歴

課題代表者:菅野 純

1955年生まれ、東京医科歯科大学大学院・医学研究科修了、医学博士、

東京医科歯科大学医学部病理学第二講座助手

米国国立衛生研究所NIH(NIEHS)実験病理部・客員研究員

東京医科歯科大学医学部感染免疫病理学講座講師

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・室長

現在 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・部長

研究参画者

(1):菅野 純(同上)

(2):加納 浩和

1962年生まれ、北里大学卒業、産業衛生修了、医学博士、
現在、中央労働災害防止協会・日本バイオアッセイ研究センター・
試験管理部 経口等試験室・室長 兼 生殖発生試験室・室長

C-1007 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

(1) 遺伝子発現情報解析、総括

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

平成22～24年度累計予算額：47,489千円

(うち、平成24年度予算額：11,128千円)

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

本研究は、中央環境審議会からも指摘され、国民の関心・不安も高いところの、環境中に於ける化学物質の複合暴露の健康リスクについて、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により、網羅性と定量性をもって複合影響の分子メカニズムの解明を可能とする基盤を構築するために実施するものである。典型的な環境化学物質の対として、①四塩化炭素(溶剤)とトルエン(溶剤)、②ディート(昆虫忌避剤)とペルメトリン(殺虫剤)、③フタル酸ビス(2-エチルヘキシル)(=DEHP、可塑剤)とビスフェノールA(樹脂原料・可塑剤)の3対について、マウスにおける複合暴露実験を実施し、GeneChip(Affymetrix社)によって約4万種のmRNAの経時的発現量変動を測定し、独自の特許技術Percellome手法を用いて細胞1個当たりのコピー数という絶対単位量を遺伝子毎に得て、複合暴露影響を受ける遺伝子の抽出及び分子機序に関する解析を行った。

組合せ①では、ヒトの肺疾患でも関連性が報告されているCyr61の相乗発現を肺において検出し、その発現制御ネットワークをプロモーター解析により推定した。またPM2.5暴露でも惹起される肺の線維化に関連する遺伝子群の相乗発現も検出した。

組合せ②では肝においてミトコンドリア電子伝達系の遺伝子群の相殺発現を検出し、ヒトが複合暴露された場合に倦怠感などの不定愁訴に繋がる可能性を見出した。

組合せ③においては、肝におけるコレステロール生合成遺伝子群の相殺発現を検出し、従来知られていなかった複合効果を発見した。さらにこれらの複合実験で複合効果を示した遺伝子のプロモーター解析から、特有もしくは共通する転写因子結合部位の情報を得た。以上により分子レベルでの複合作用の検出及び解析技術を生成し、これを基盤とした複合影響の評価・予測解析システム構築のための指針を示した。

[キーワード]

複合暴露影響評価、トキシコゲノミクス、パーセローム、相加相乗性、マウス

1. はじめに

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が、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。その理由として、複合暴露問題が現行の毒性学では扱いきれていないことが挙げられ、そこには、解決を要する2つの問題点が存在している。

第一点は、現在までの毒性学では、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の複合暴露による毒性を予測することが実質上困難であり、A+Bは、新物質Cとして改めて検討する必要がある。このため、複合暴露の評価には、歴大な組み合わせ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のである。

第二点は、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成されていないことである。毒性に閾値が有るということは、例えば、体の中に毒性に対抗する中和物質が備わっていて、ある量の毒性物質までは中和するためであると考えることが出来る。現行の規制では、個々の化学物質の暴露量が閾値以下であれば、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規定していることである。しかし、現実には中和物質が体内から減って行く現象は閾値以下の量でも起こるので、個々が閾値以下の量であっても複合して作用した場合、中和物質が枯渇してしまい、毒性症状が現れる可能性がある。

これらの問題点は、毒性学の近代化を目指し我々が進めているパーセローム (Percellome) トキシコゲノミクス法により解決する事が可能である。この手法は、mRNA発現データの精度と定量的な取り扱い性能を格段に向上させたものであり、毒性症状が明らかになる前の段階から、且つ微量暴露の状態から化学物質影響を、網羅性を担保しつつ、高感度・定量的に観察するものである。その為、化学物質A+BをCとせず、AとBのそれぞれのPercellome情報からA+Bを科学的に予測することが可能になると期待される。

2. 研究開発目的

本研究の目的は、国民や専門家からの常々の要望の対象となってきたものの、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により惹起される生体影響を正確かつ迅速に評価する技術の開発である。

その為には、研究代表者の複合影響判定に関する数理統計学的基礎（文献1および、東京医科歯科大学 佐久間昭教授、東京理科大学 吉村功教授との交流を経る）と、トキシコゲノミクス、特に時間的・暴露量的に毒性発現の基礎となる定量的なmRNA変動を指標とした生体影響の評価を可能にするパーセローム (Percellome) トキシコゲノミクス手法²⁾ (特許第4415079号)による分子毒性学的な有害性評価検討手法の応用が現実的かつ効率的であり、単体で暴露した際のPercellomeトキシコゲノミクス（高精度の網羅的遺伝子発現）情報が既に得られている環境化学物質から、代表的な3対を選択し、複合暴露した際のPercellomeトキシコゲノミクス情報を得て、開発済みの分子毒性学的な有害性評価検討手法を基盤とした、分子メカニズムに基づく正確かつ迅速な複合暴露影響の安全性評価法の開発を目指す。

また、複合影響の予測システム開発及び実用化に必須となる、複合暴露による遺伝子発現デー

データベースを、網羅性と高い定量性を以て構築する。

3. 研究開発方法

(1) mRNA絶対量測定

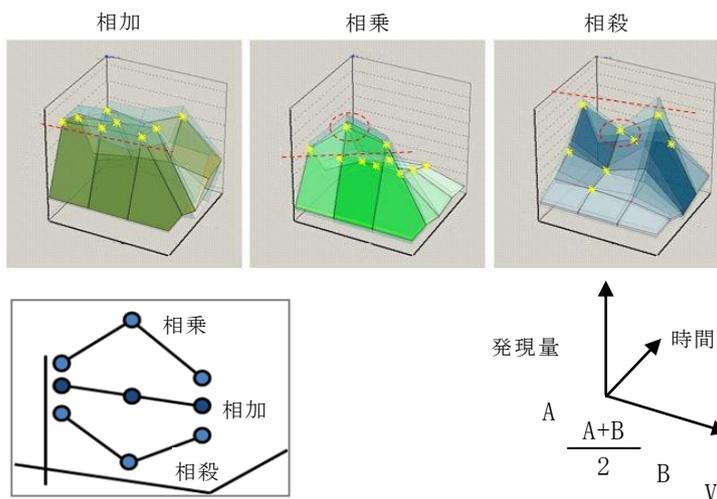
サブテーマ「複合暴露実験」により得られたmRNA測定用サンプル（マウス肝（一部、肺・腎）、4投与群（溶媒対照群、各単独投与群、および複合投与群）、投与後2, 4, 8, 24時間の4時点、一群3匹）について、Affymetrix社 GeneChip Mouse Genome 430 2.0 ArrayにPercellome法を適用し、遺伝子毎のmRNA発現量を細胞1個当たりのコピー数として計測した。具体的にはサンプル破碎液中のDNA含量から細胞数を求め、濃度の異なる複数の外部標準RNA(スパイクRNA)を細胞1個当たり決まった分子数だけその破碎液に添加してから、RNA抽出し、マイクロアレイ測定を行う。スパイクRNAの測定値が細胞1個当たり何コピーに由来するかが既知であることを利用し、サンプル中の全てのmRNA測定値を、細胞1個当たりのコピー数に換算した(SCa14.exe使用)。

(2) データ解析

上記のGeneChipにより測定され、Percellome法によって絶対量化された約4万の遺伝子発現情報から、暴露条件(溶媒対照、各化学物質単独もしくは複合)、および時間、発現量よりなる3次元曲面データを生成(MFAnalyzer.exe及びCreateSurface.exeを使用)し、主たる遺伝子の発現パターンを検討(MFSurface.exe及びMSV2.exeを使用)しつつ、RSort(特徴的な発現を示す遺伝子とその3次元曲面パターンを用いて自動抽出する独自アルゴリズム)によって、複合暴露影響を受けている可能性のある遺伝子候補を自動抽出した(図(1)-1)。

また抽出した候補遺伝子については、Percellomeデータベースの単独投与時データと比較すると共に、同単独投与時データに於いて特徴的な発現パターンを呈する遺伝子(RSortにより自動抽出)について、複合暴露時の発現パターンと比較して、相加性、相乗性、相殺性の判定をはじめとした、複合暴露プロファイルの詳細解析手法の検討を行った。複合暴露効果判定は、Matsunagaらの報告¹⁾を参考に、t検定およびWelch検定による単独ばく露群と複合ばく露群との間の有意差検定により実施した。

抽出された遺伝子群のパスウェイ解析はIPA (Ingenuity Systems社)を、遺伝子発現制御に関わるプロモーターの解析は、Genomatix Suite(Genomatix社)、TRANSFAC (Biobase社)、GenExplain (GeneExplain社)を用いて行った。



図(1)-1 3次元曲面における相加、相乗、相殺パターン

4. 結果及び考察

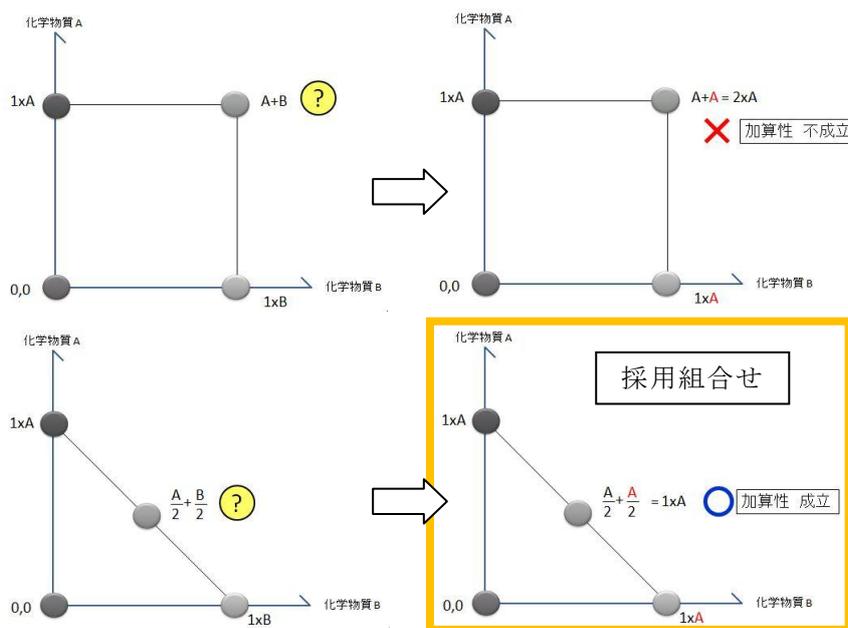
(1) 複合暴露実験における絶対量化遺伝子発現データの取得、および複合暴露評価・予測システムのための標準データベース

Percellome標準プロトコルに沿って、サブテーマ「複合暴露実験」で採取したサンプルから低分解・高純度のRNAを抽出し、GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Arrayを用いて約4万種のmRNAの経時的発現量変動を細胞1個あたりのコピー数という絶対単位量として測定した。標準的なデータ品質検証（ベースラインレベルを含む発現量（mRNAコピー数/細胞）の妥当性評価、トランスクリプトームの全体分布、概日リズム遺伝子等の発現パターンの正規性の確認など）し、不合格のデータは再測定して、以下のデータ解析の実施、および将来の複合暴露評価・予測システムのための標準データベースに収録するに足る品質を有するデータセットを生成した。

本研究で実施した3対の複合暴露実験から、延べ870万遺伝子の絶対量化発現変動データを得て、3次元曲面パターン及びその形状特徴抽出データ等の基本情報を生成し、複合暴露評価・予測システムの専用標準データベースの構築を開始した。

(2) 複合効果判定

複合暴露実験では複合投与の用量設定が問題になるが、本研究では1980年以前から継続的に進められてきた複合作用に関する議論（佐久間昭、吉村功らとの交流、医薬安全性研究会に於ける議論、文献1, 3など）を考慮し、相加効果を示す評価項目において、化学物質A, Bが等価の時、加算性が成立することを評価できる実験設計を採用している（図(1)-2）。すなわち、単独投与で1容量を投与するとき、複合投与では0.5容量ずつ同時投与するモデルである（この設計においてのみ、双方の化学物質が実は同一であったとき、複合投与が同用量となる）。



図(1)-2 適切な複合暴露実験

有意な変動を示した候補

遺伝子については、単独ばく露群とのt検定およびWelch検定による有意差検定を適用することで、相乗・相殺の自動判定が可能であることを確認した。

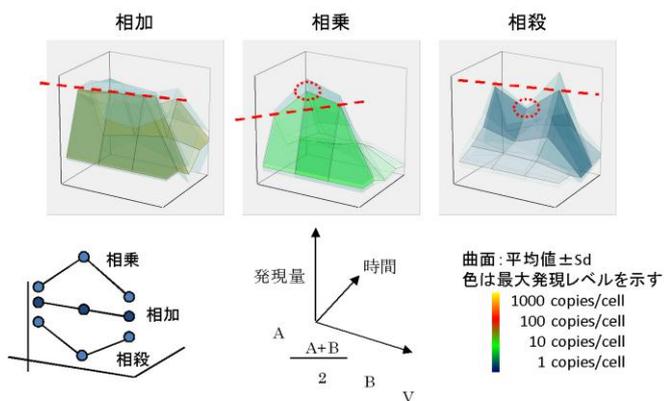
より高精度の複合効果（相乗・相殺）判定を行う場合は、単独投与と複合投与の用量を2セットに増やす必要がある¹⁾が、本研究では経時変化の把握を重視し（遺伝子発現制御ネットワーク抽出において、遺伝子要素間を結ぶベクトルの方向を決定する重要な要素であるため）、用量は1セットとなっている。このとき、各時点の複合効果判定の検出感度は半減するが、4時点の判定結

果を統合することで感度を回復し、さらにPercellomeプロジェクトで独自開発した解析ソフトウェアの活用により、生物学的にあり得ない発現パターンを排除することでfalse positiveの発生を低減させた。

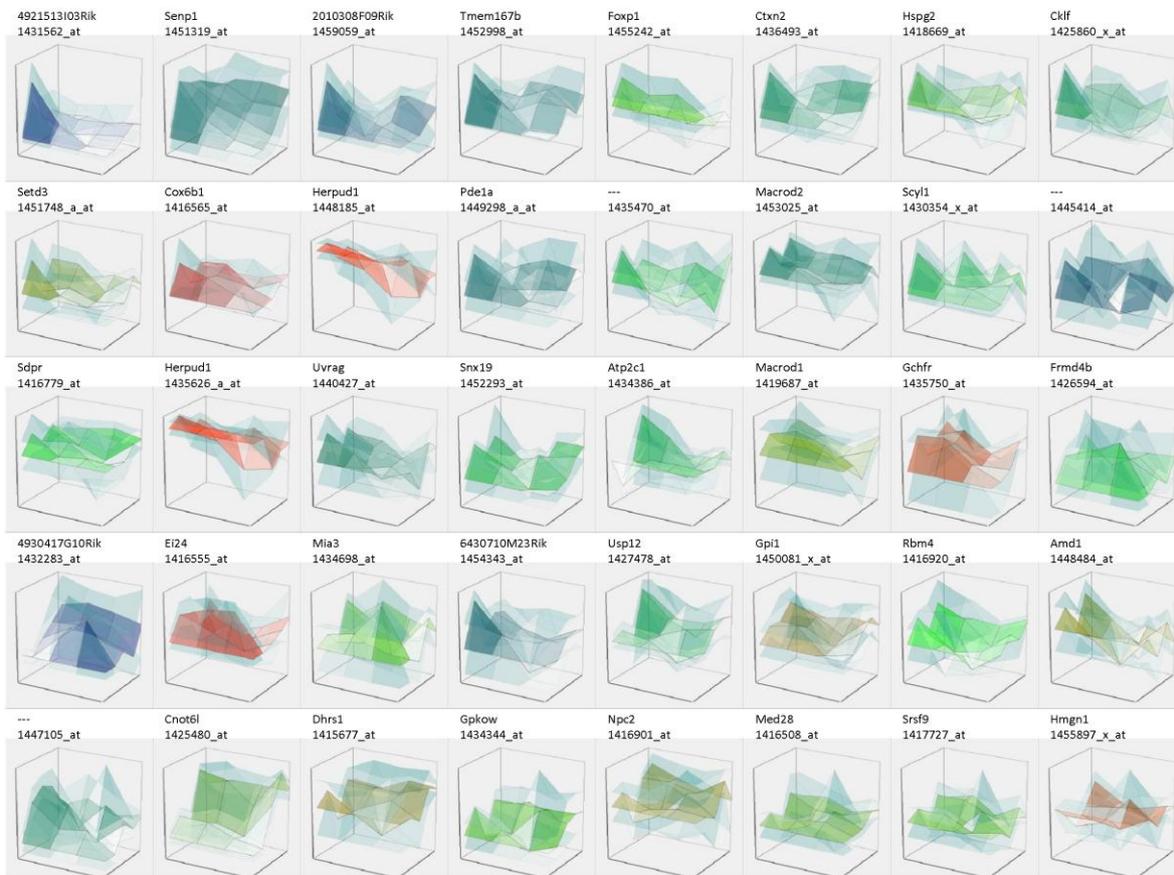
(3) 複合暴露実験1：四塩化炭素、トルエンの複合暴露による遺伝子発現変動

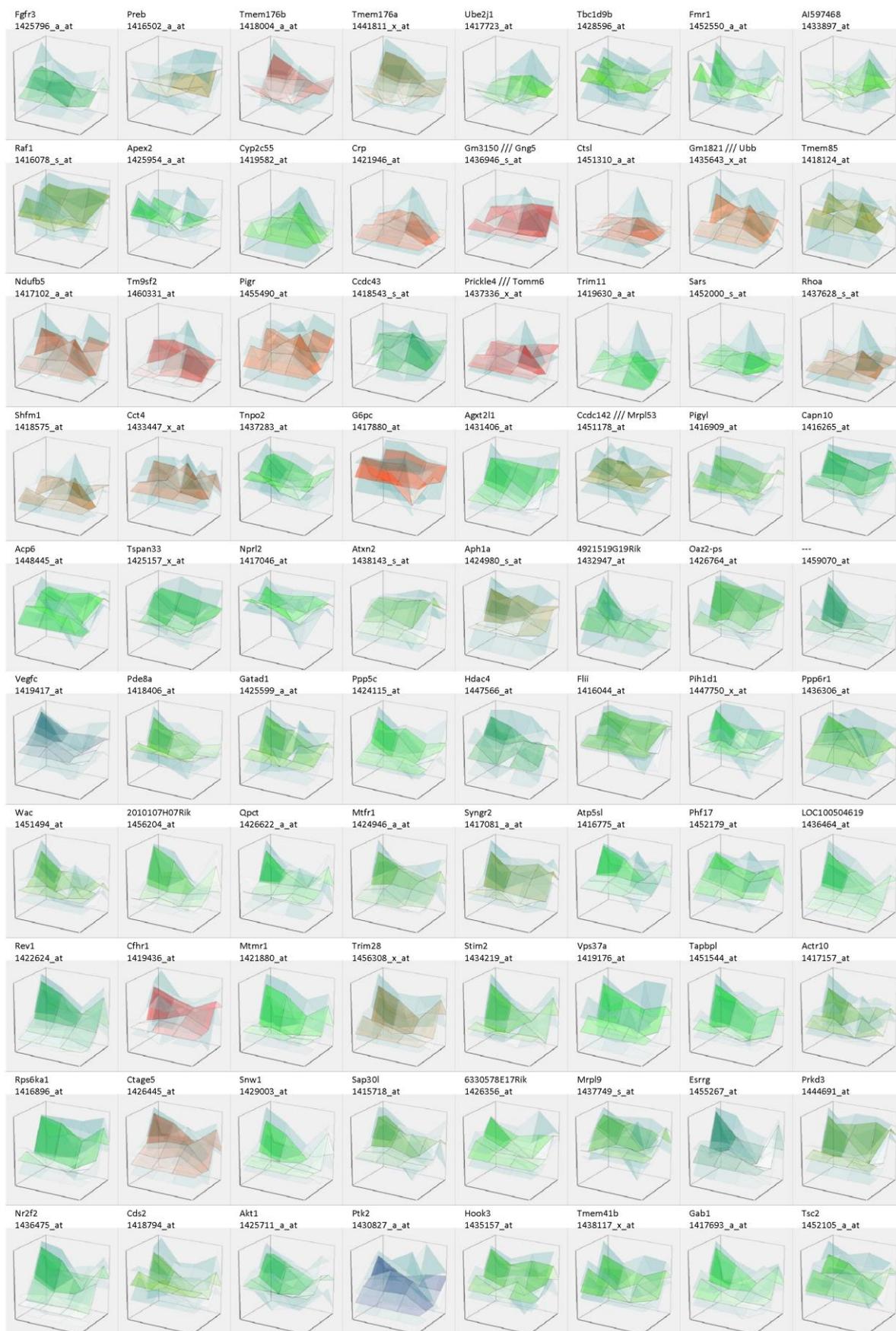
複合暴露実験1の絶対量化発現変動データより、2の方法によって相加（図（1）-3に抜粋）、相乗（図（1）-4）、相殺（図（1）-5）を示す遺伝子を抽出した。

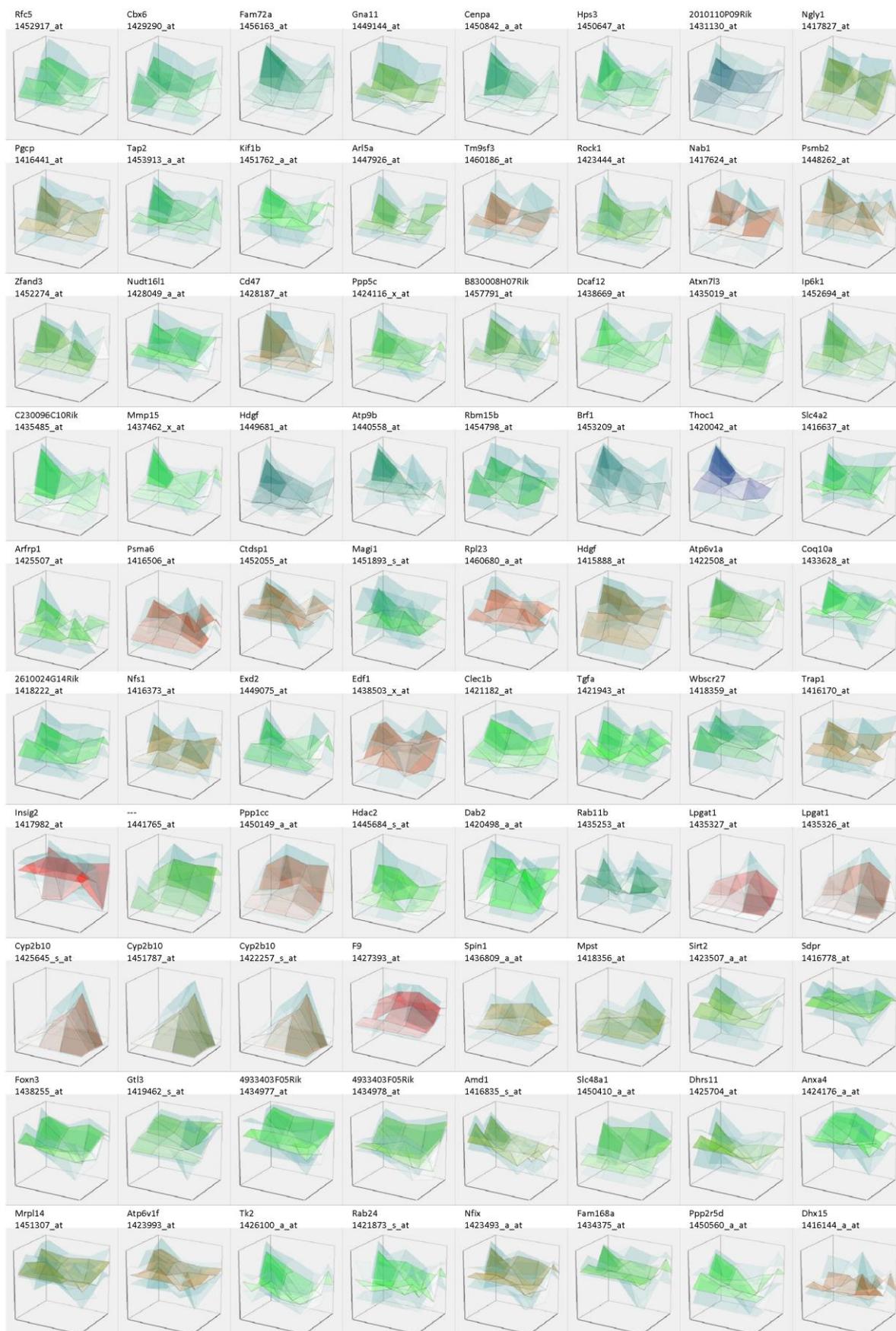
図(1)-3 複合暴露実験1 相加遺伝子リスト

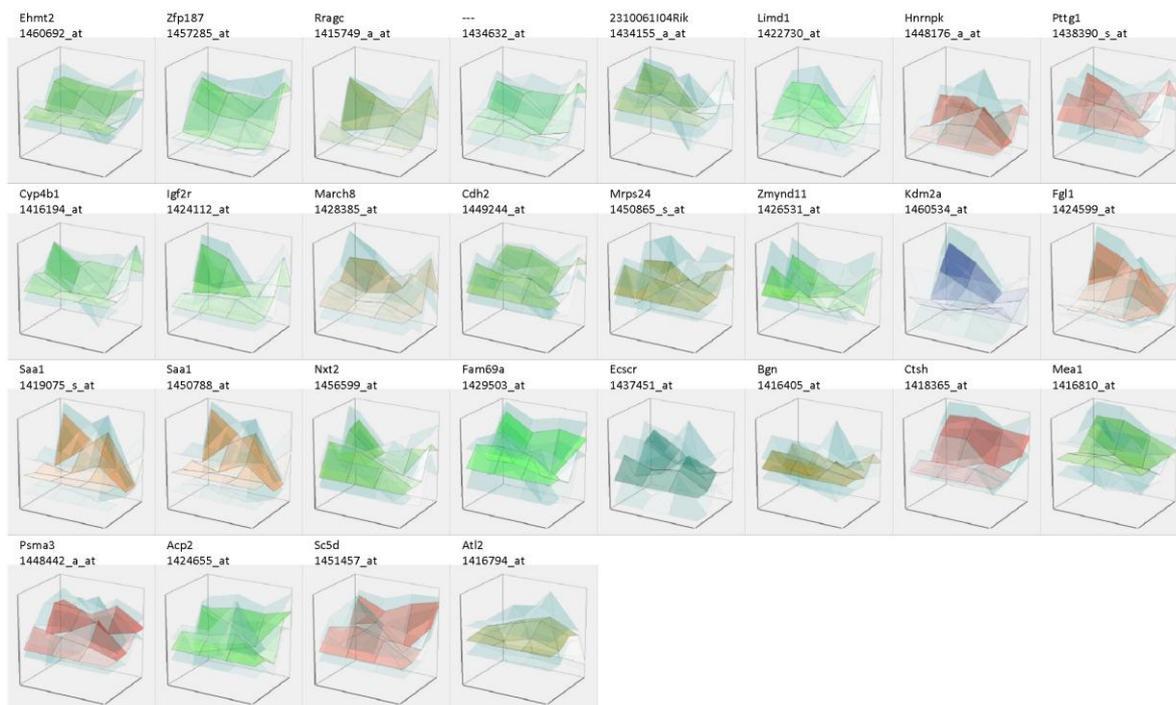


3次元曲面における相加、相乗、相殺パターン

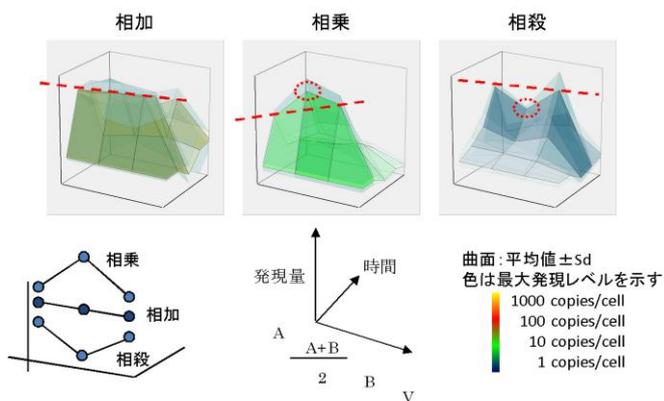




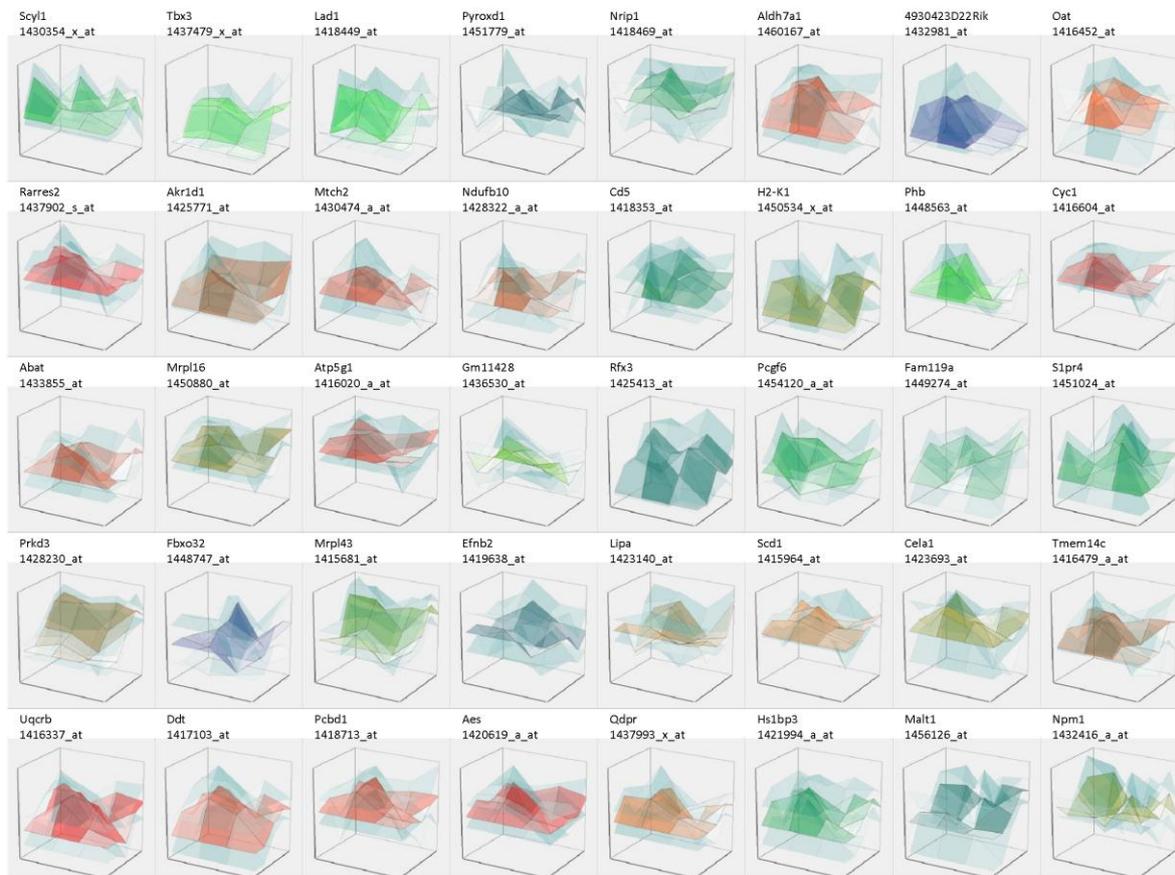


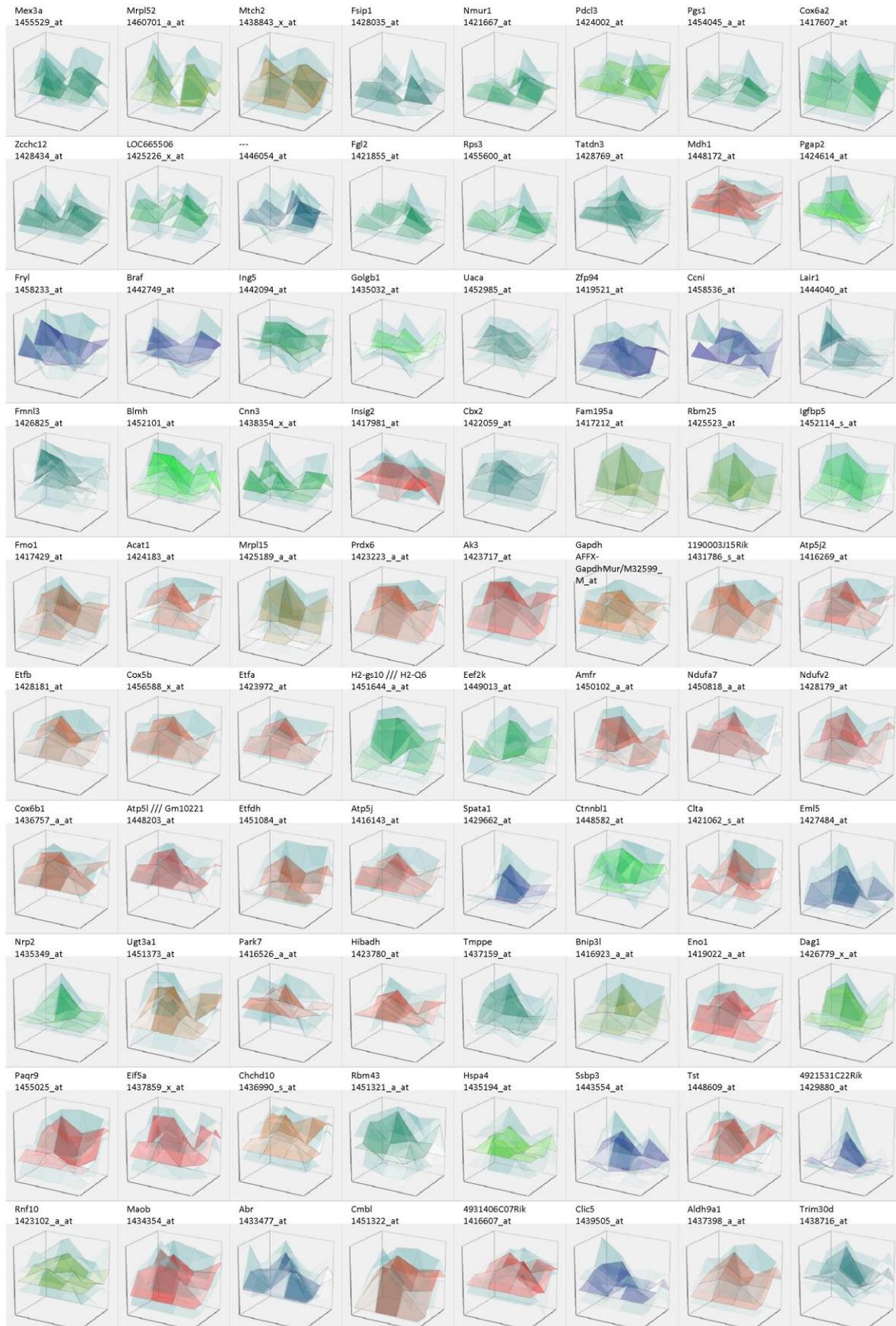


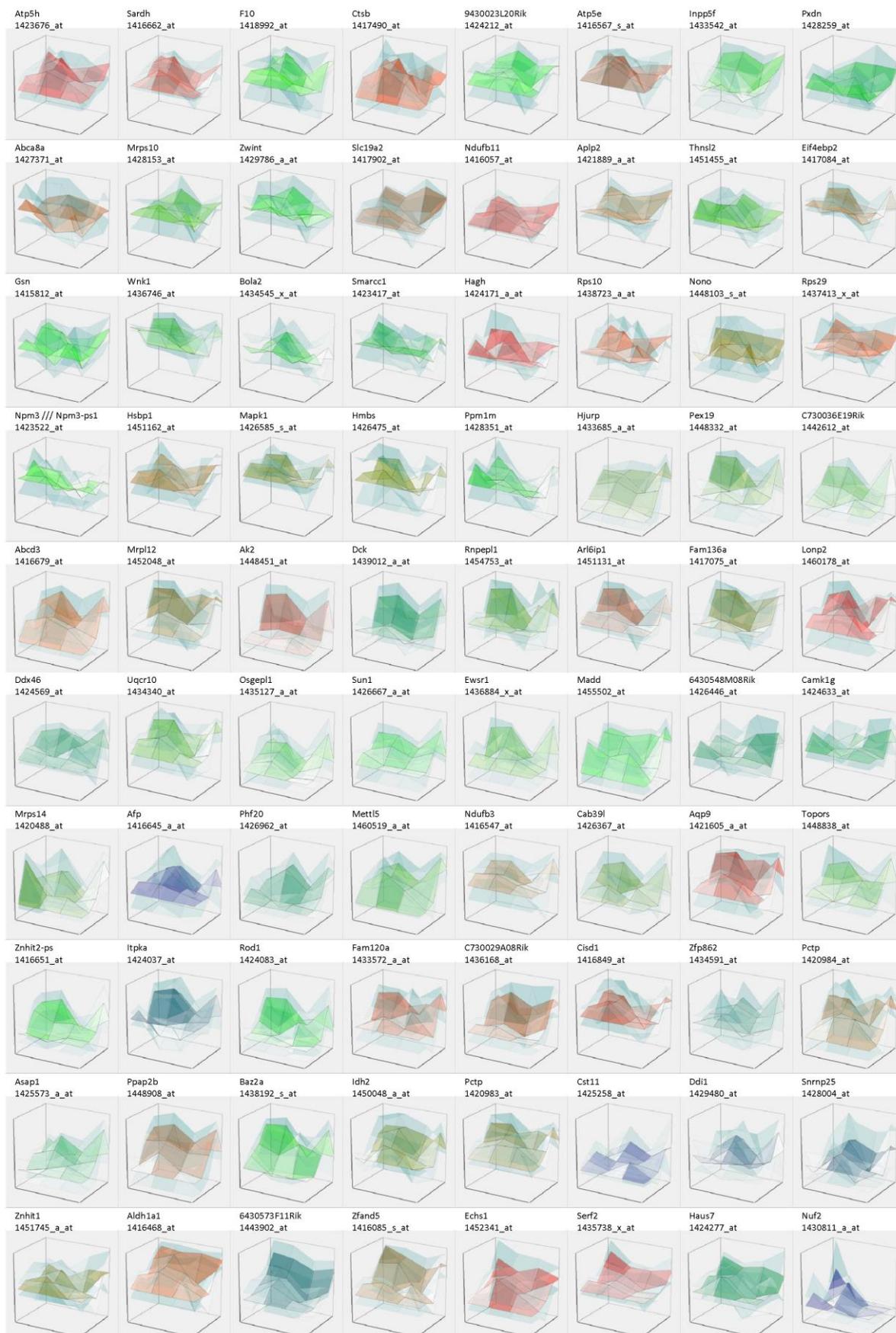
図(1)-4 複合暴露実験1 相乗遺伝子リスト

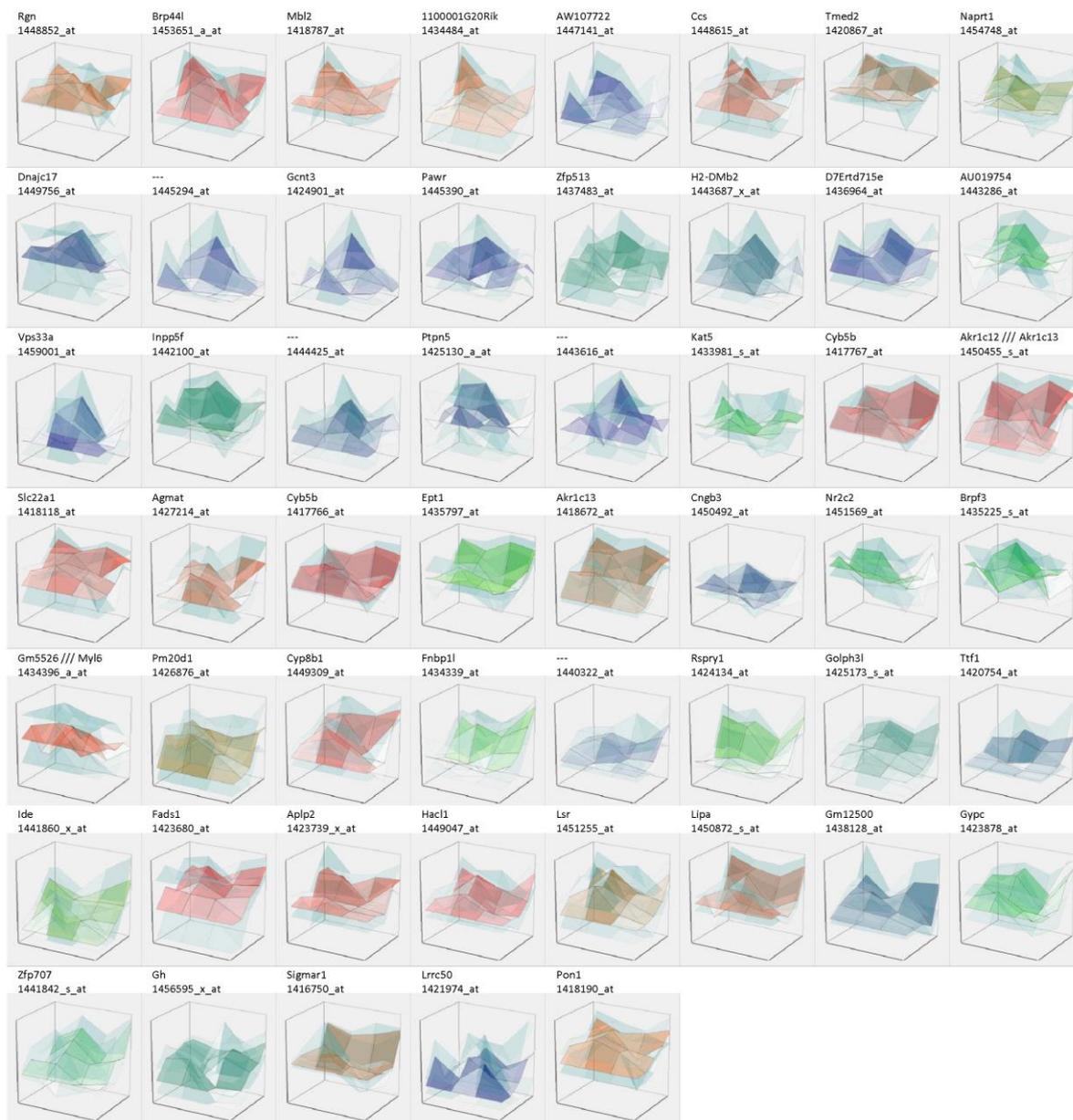


3次元曲面における相加、相乗、相殺パターン

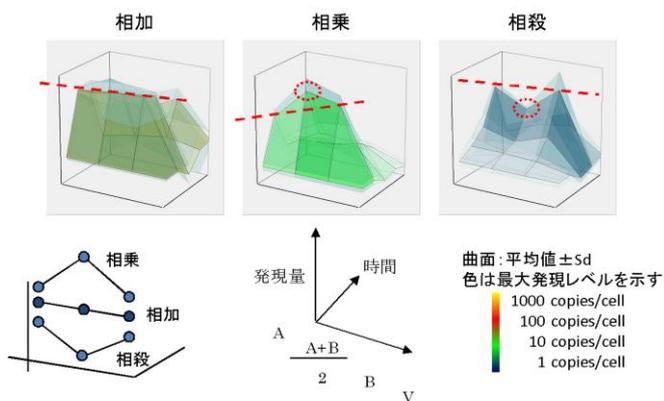




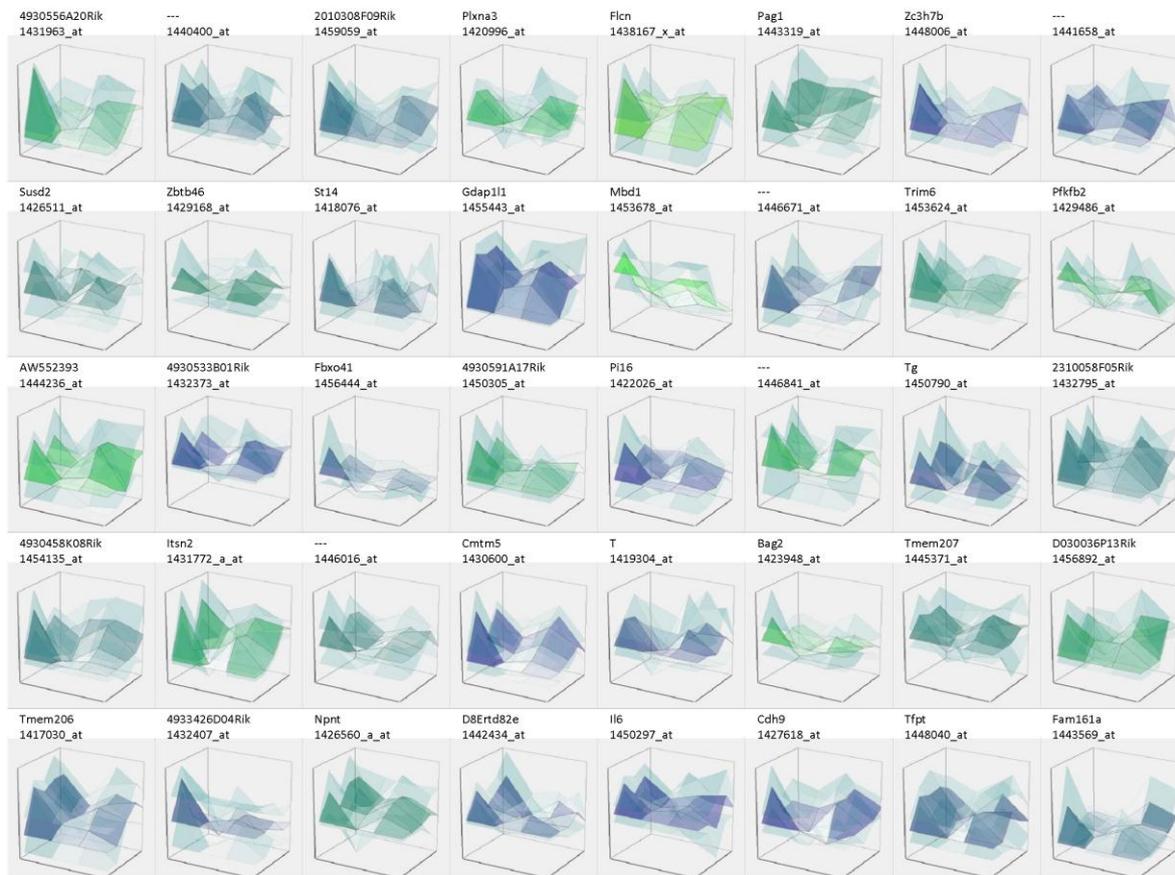


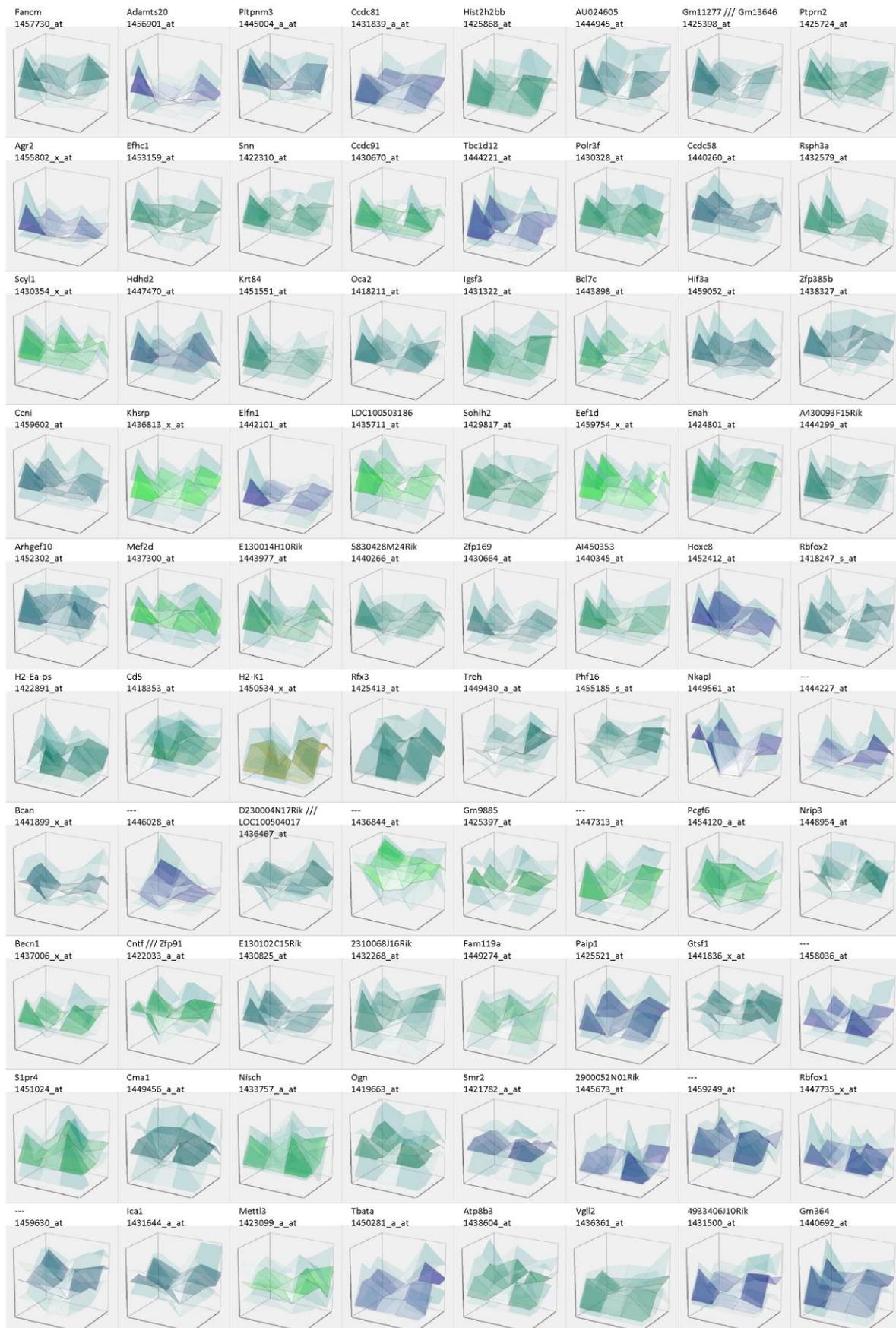


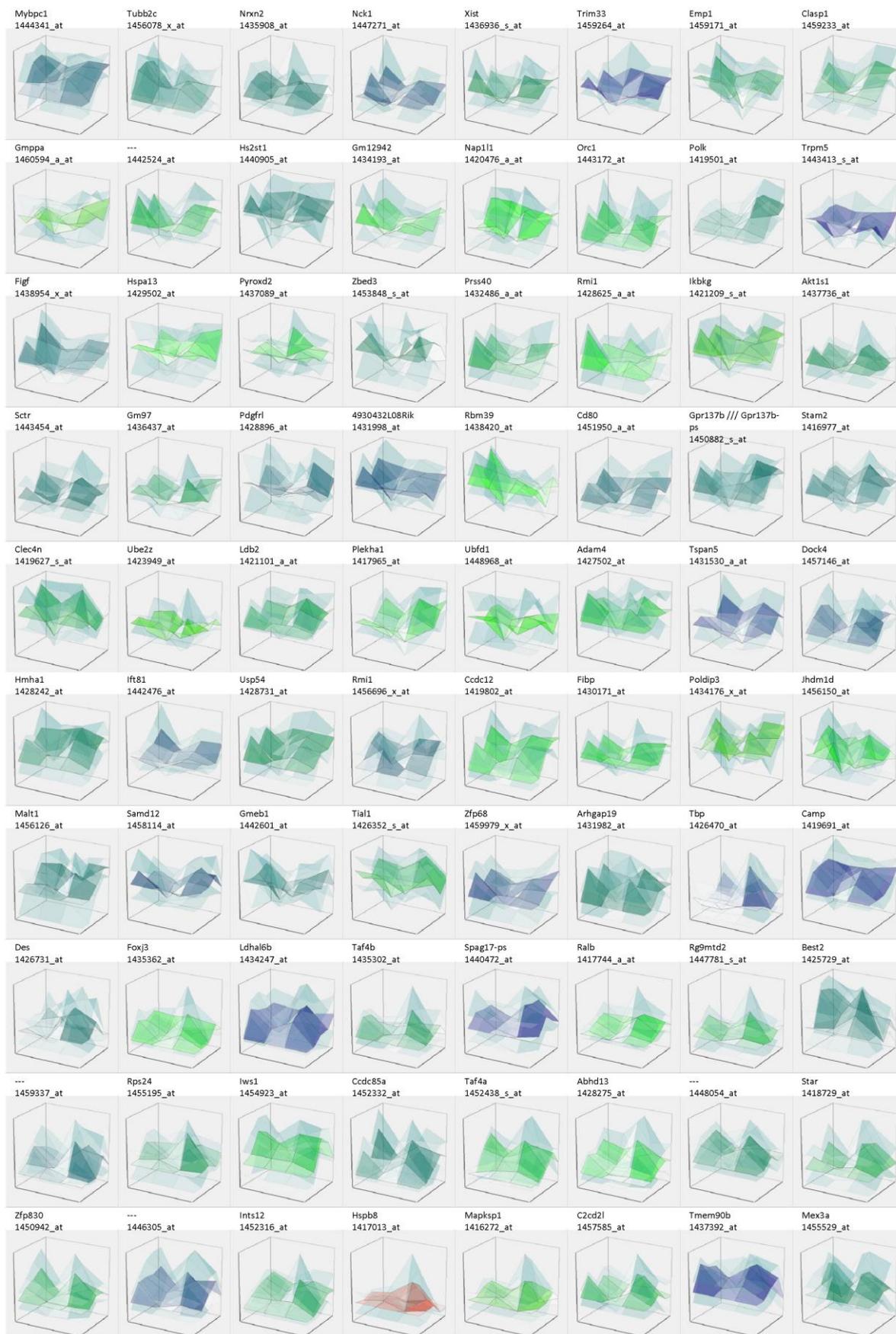
図(1)-5 複合暴露実験1 相殺遺伝子リスト

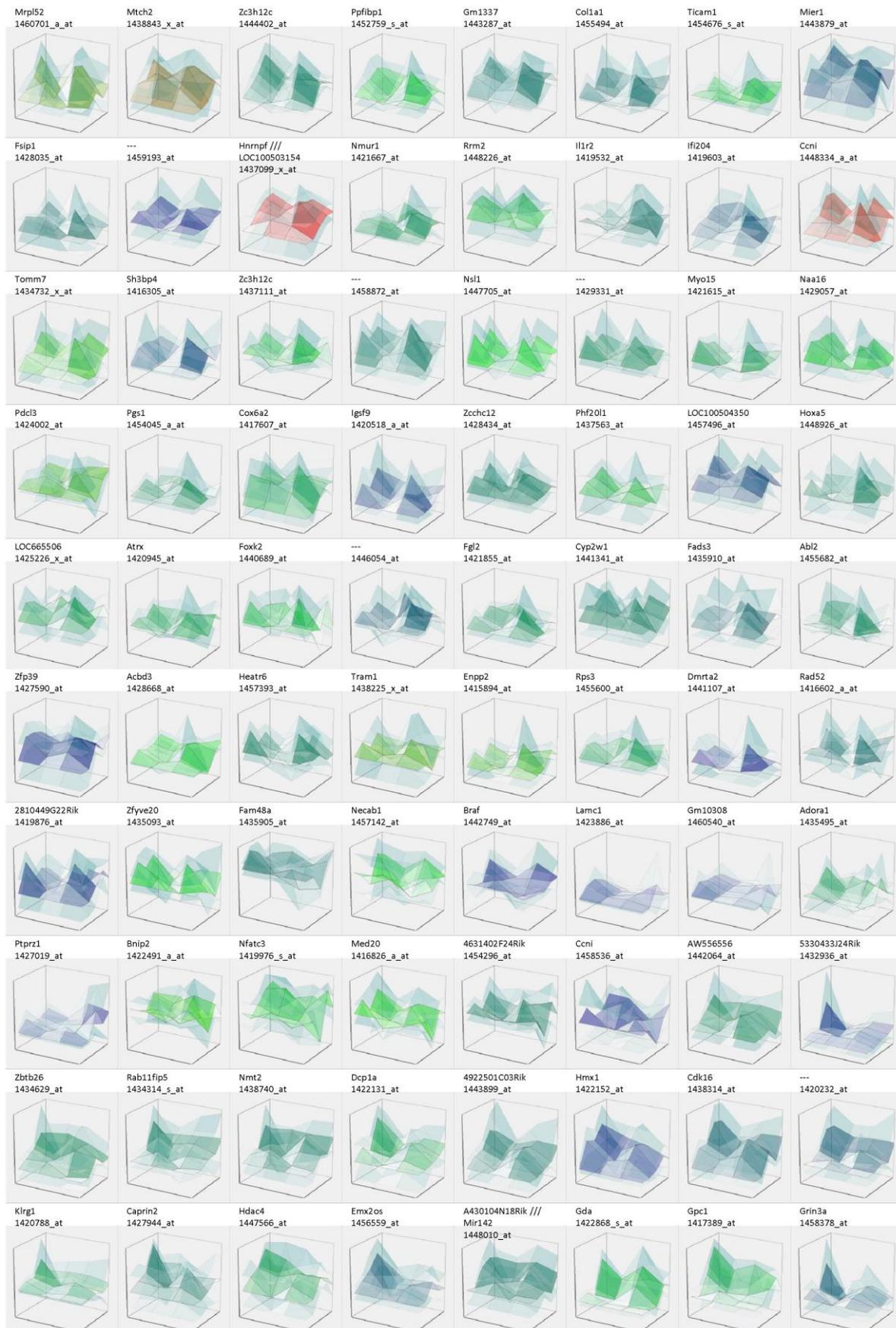


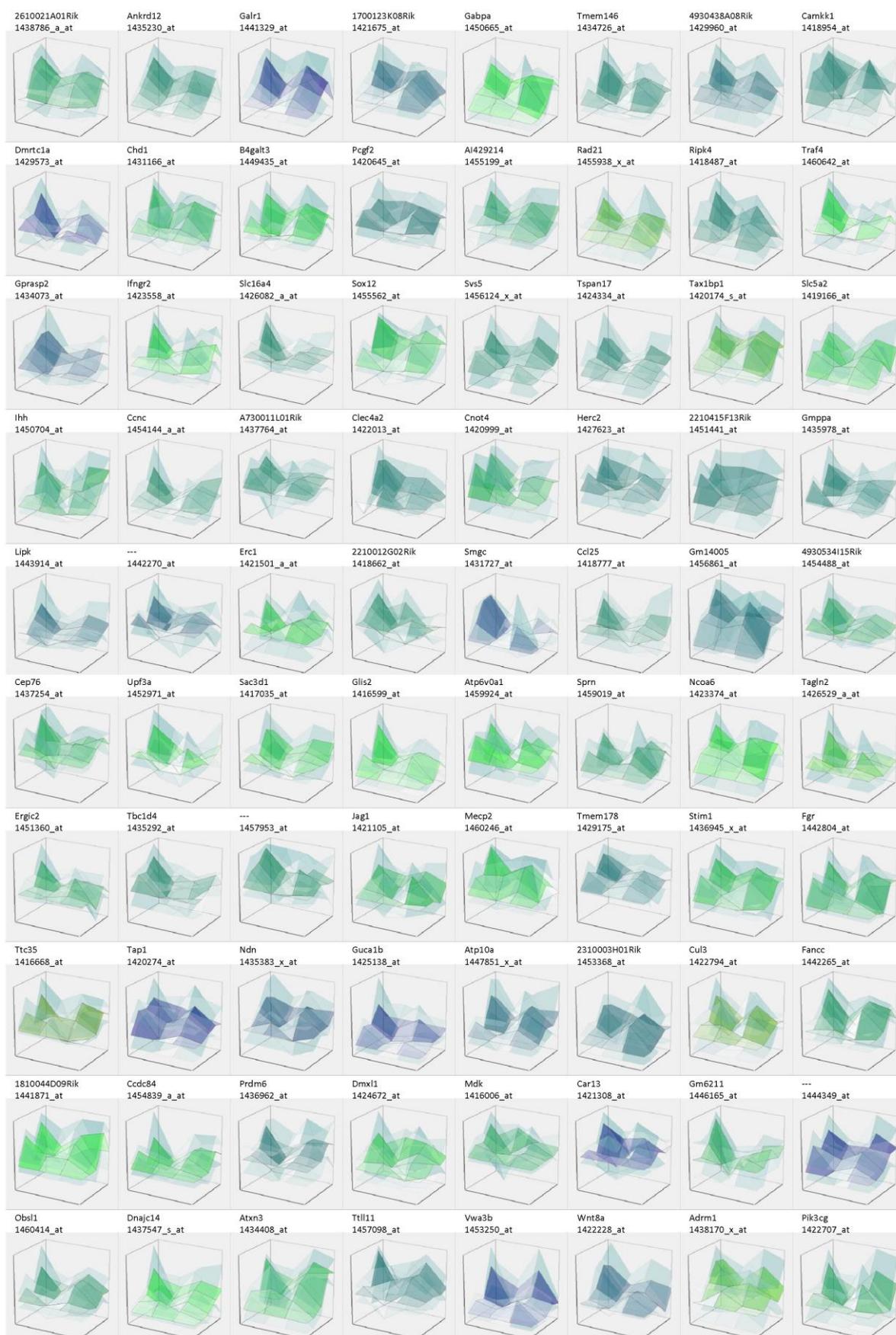
3次元曲面における相加、相乗、相殺パターン

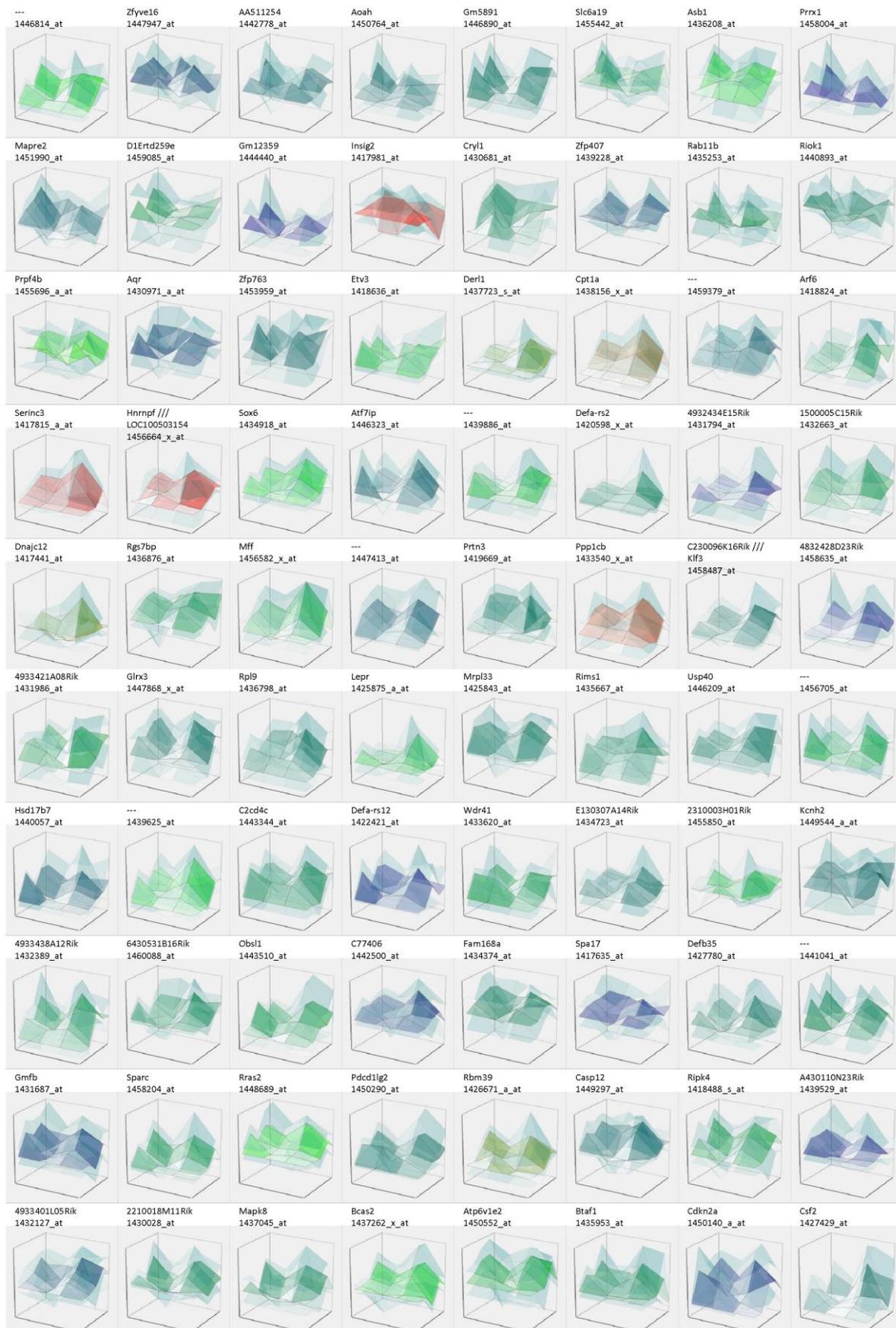


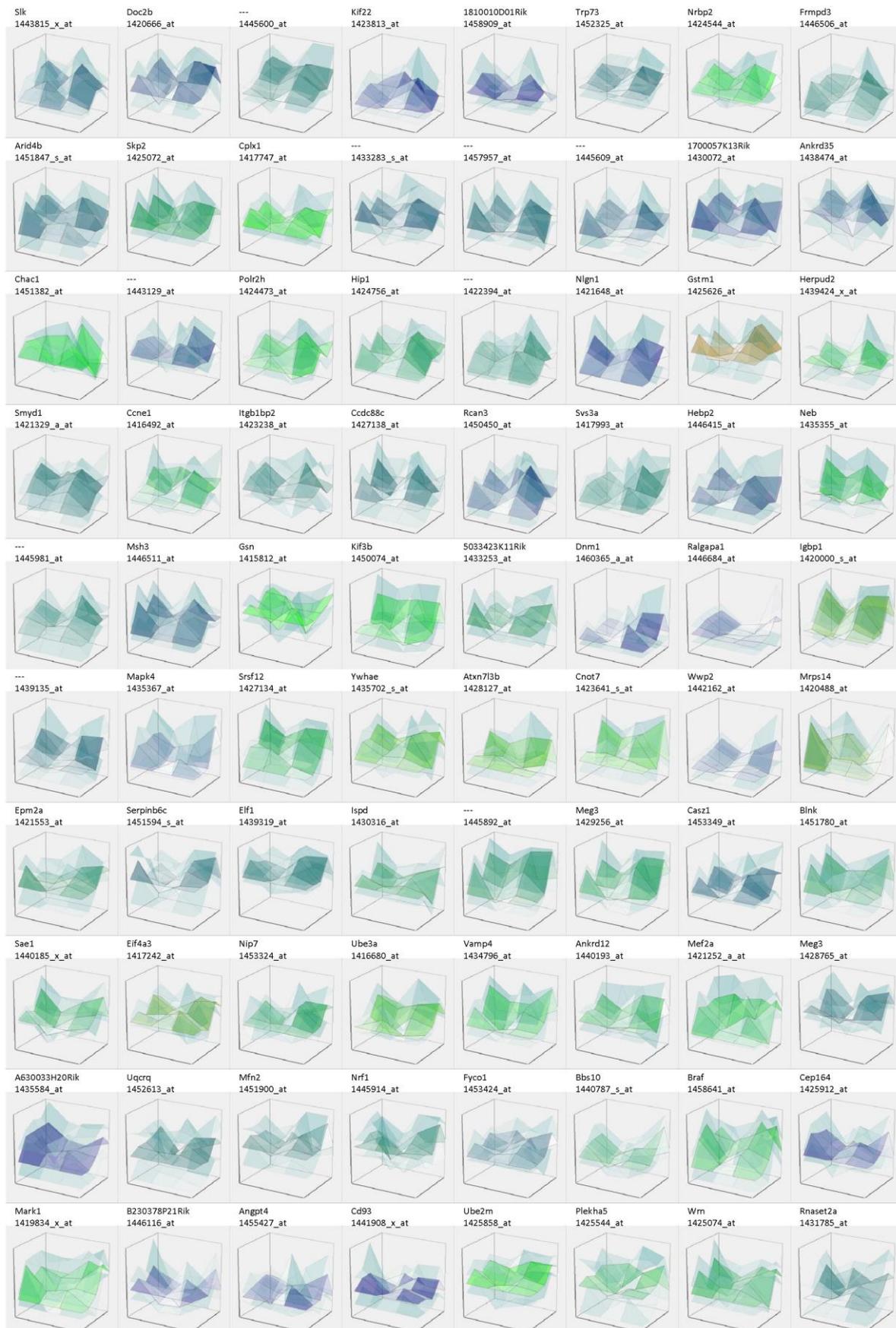




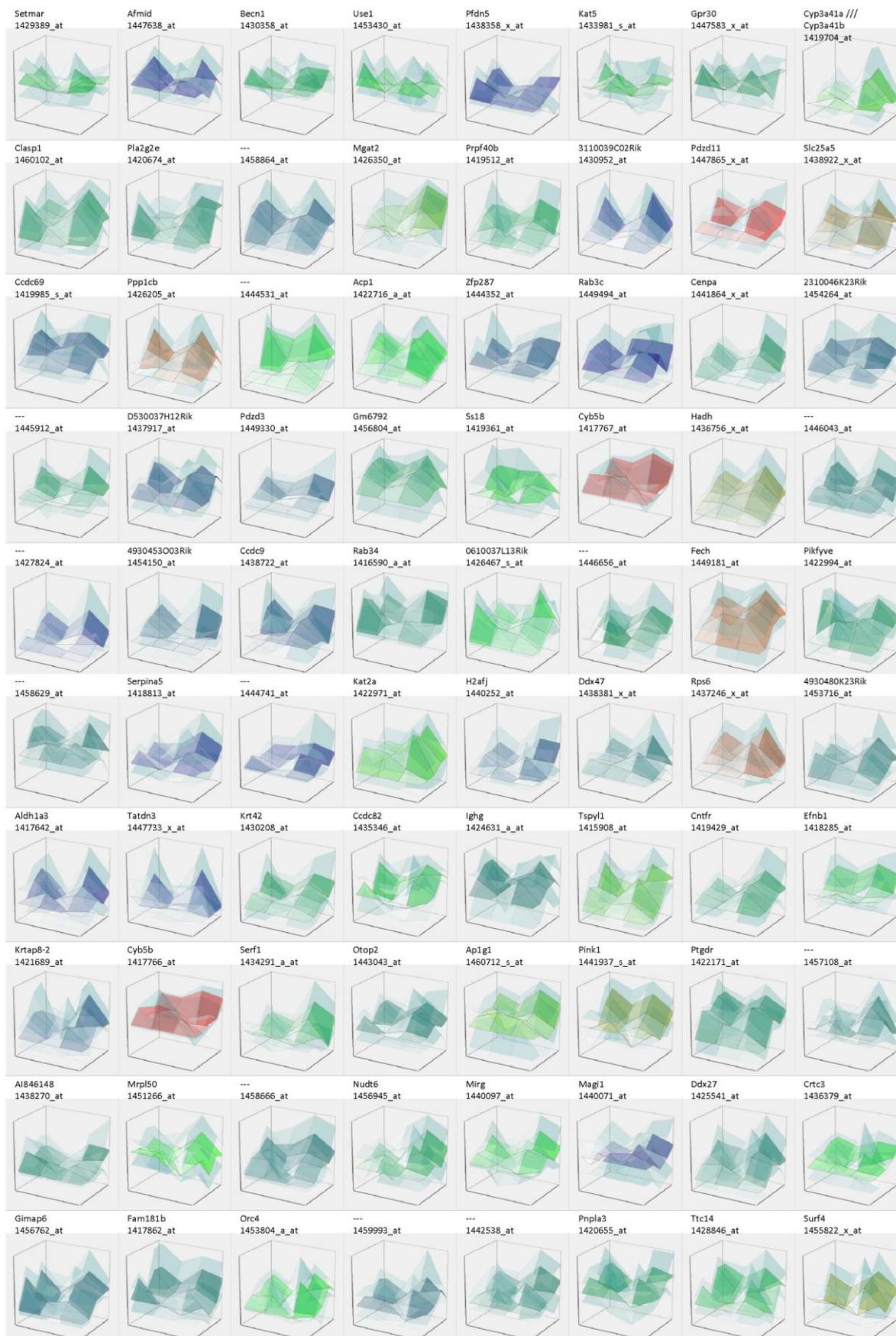


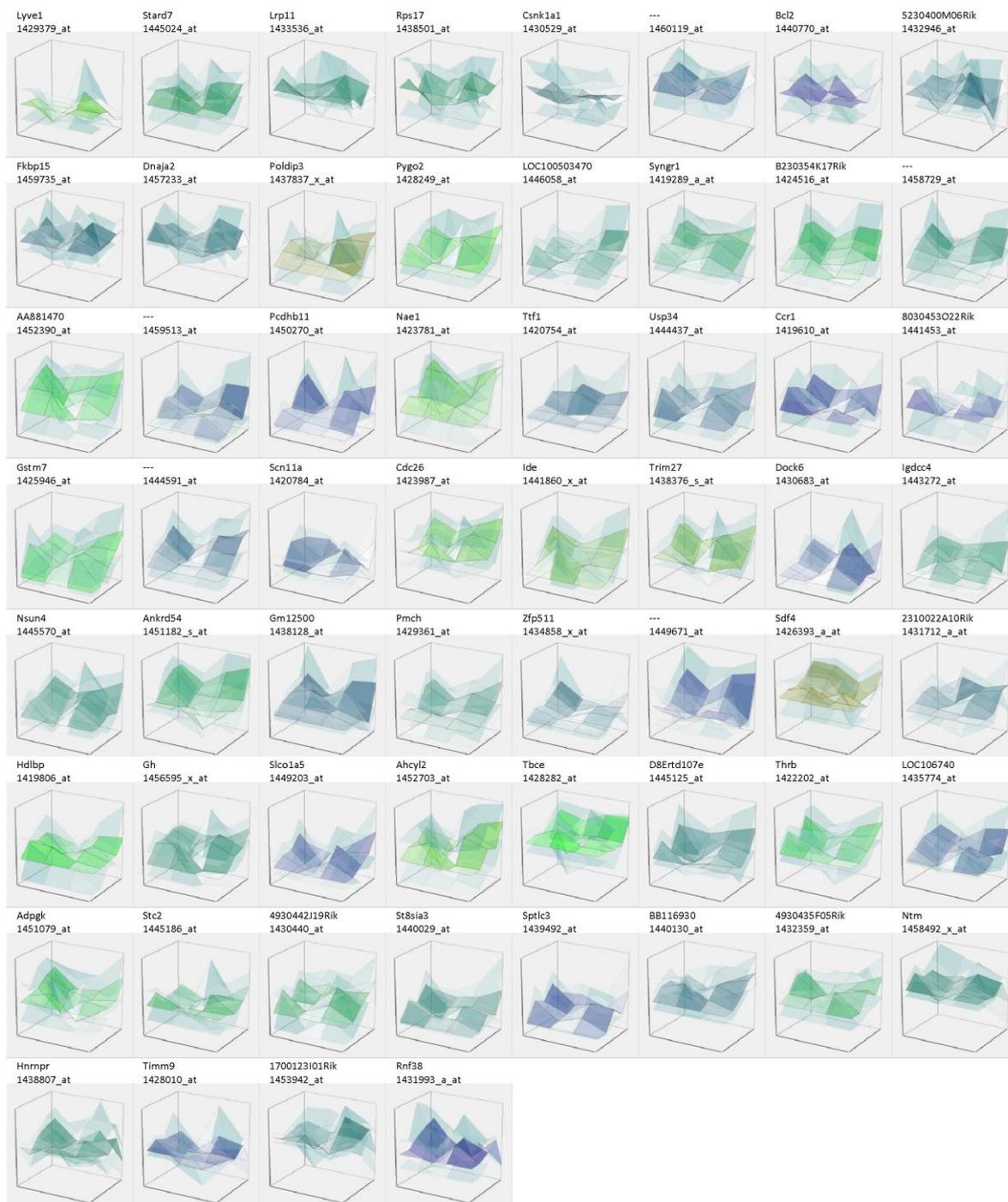












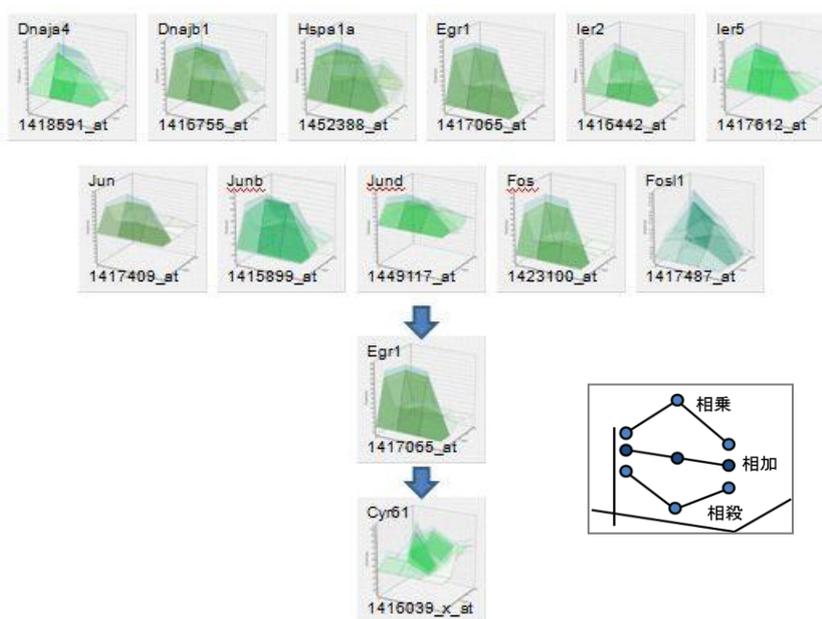
これらの遺伝子の機能解析を実施したところ、ヒトの肺疾患でも関連性が報告⁴⁾されているCyr61の相乗発現を肺において検出した。その相乗発現は投与後4時間で特に顕著だが、2～24時間を通じて相乗性を維持していた。同様の相乗発現を呈する遺伝子を抽出

(Jun, Junb, Jund, Fos, Fos11, Dnaja4, Dnajb1, Hspala, Egr1, Ier2, Ier5)し、Genomatix Suiteを用いて、プロモーター解析を行った。相乗発現を呈する候補遺伝子のうちJun, Junb,

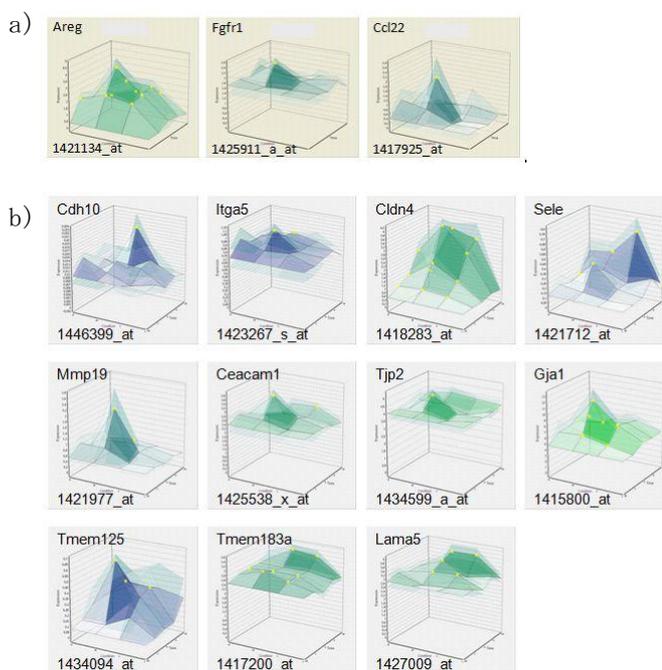
Jund, Fos, Fos11, Egr1は転写因子であり、特にJun, Junb, Jund, Fos, Fos11は複合体を形成し、V\$AP1Fに結合する。Cyr61のプロモーター領域にはV\$AP1Fは存在せず、V\$EGRFがあること、Egr1はV\$EGRFに結合し、またそのプロモーター領域にV\$AP1Fが見出されたこと、およびそれらの経時的発現パターンから、図(1)-6のようなCyr61の発現制御ネットワークが推定された。

また肺の線維化に関連し、PM2.5暴露でも惹起される⁵⁾遺伝子群(Areg、Fgfr1、Ccl22)の相乗発現も検出(図(1)-7)し、細胞接着分子や細胞外マトリクス分子

(Cdh10, Itga5, Cldn4, Sele, mmp19, Ceacam1, Tjp2, Gjal, Tmem125, Tmem183a, Lama5)も同様に相乗的な発現パターンを呈することを明らかにした。これは四塩化炭素とトルエンの複合暴露による



図(1)-6 相乗発現するCyr61の遺伝子発現制御モデル



図(1)-7

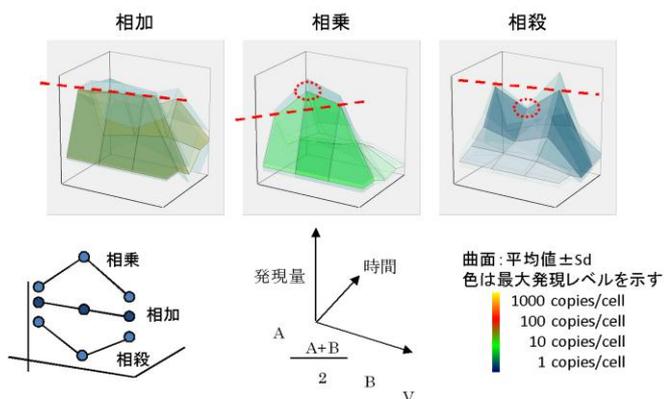
a) PM2.5暴露影響にも関与する⁷⁾遺伝子群の相乗発現、b)相乗発現する細胞接着および細胞外マトリクスの関連分子。

肺障害の相乗的増悪を示唆するものであり、土壌汚染や地下水汚染による複合暴露を評価する際、留意すべき知見である。

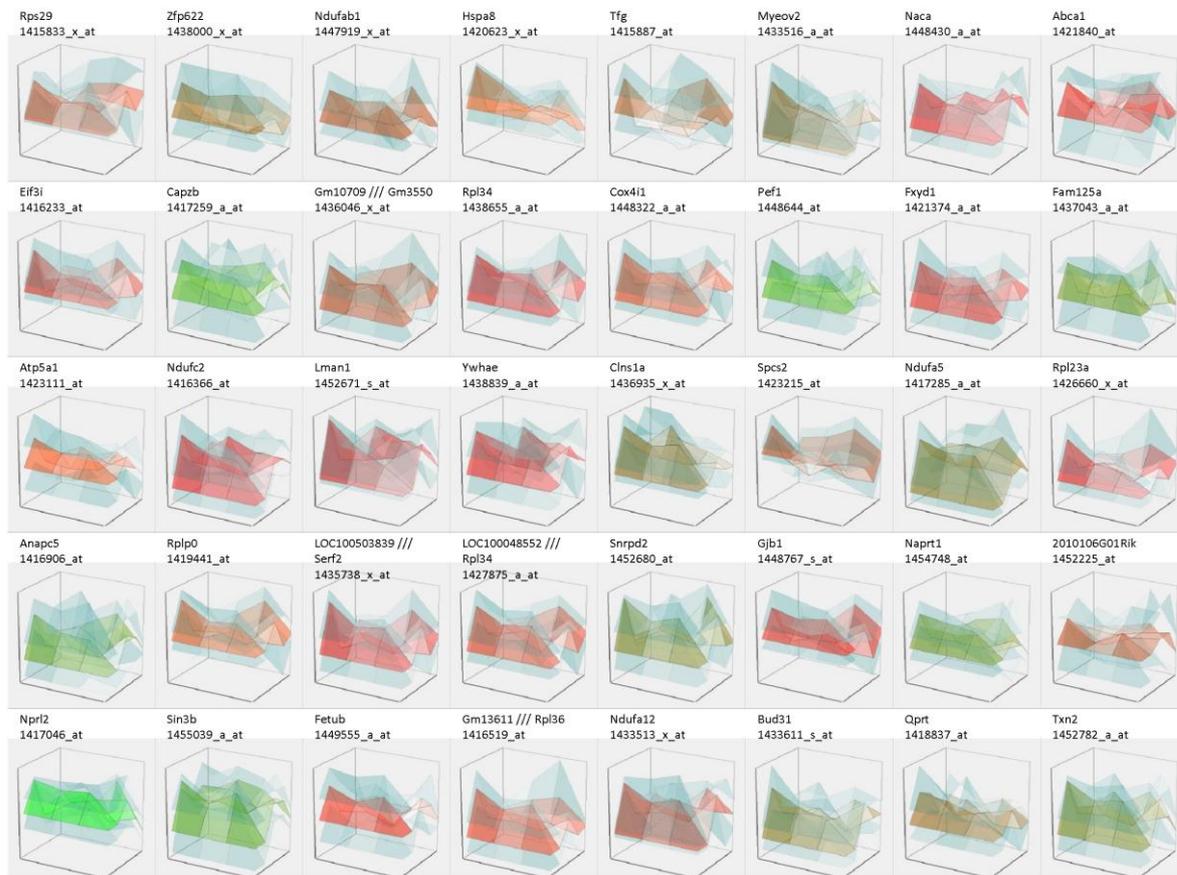
（４）複合暴露実験２：ディート、ペルメトリンの複合暴露による遺伝子発現変動

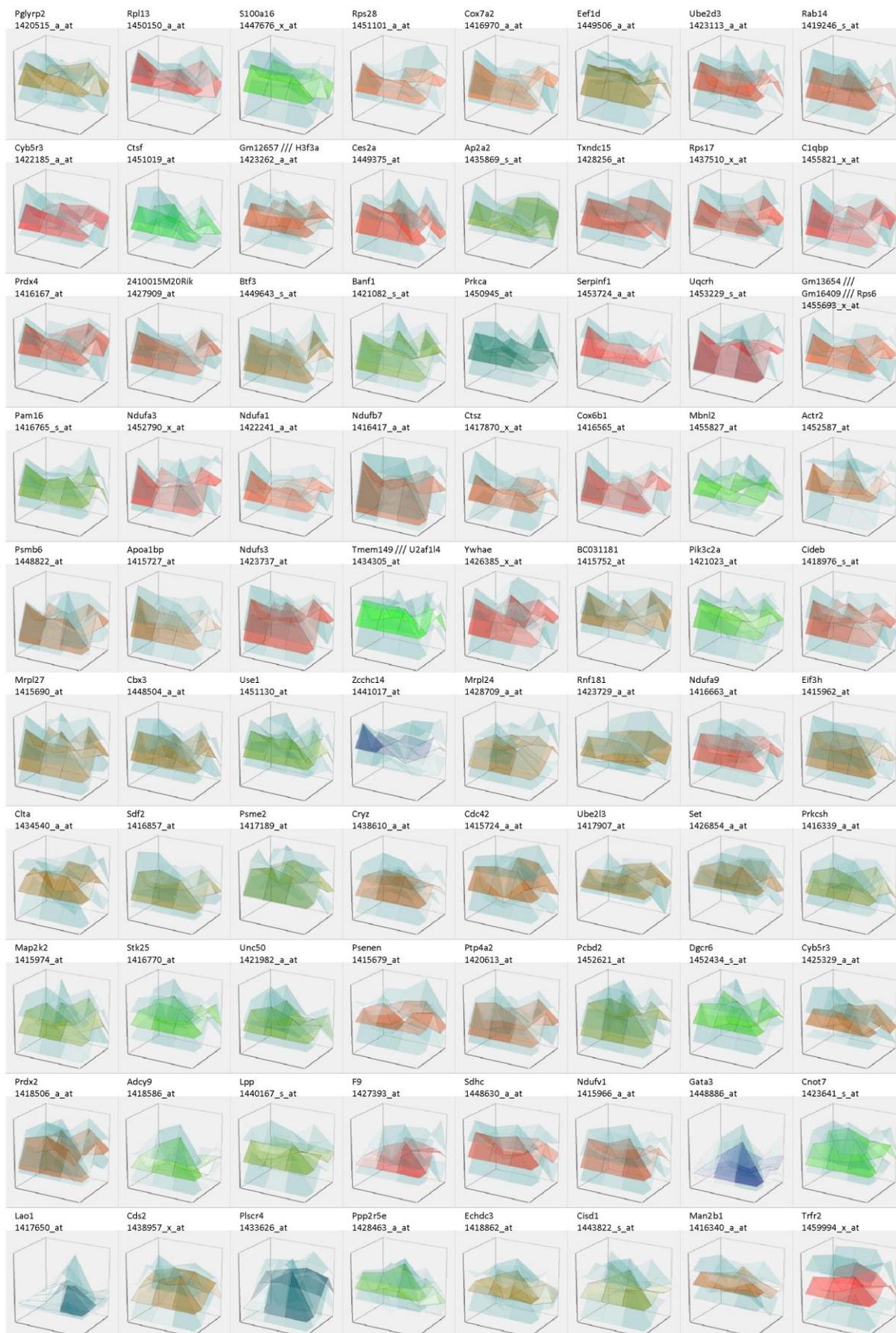
複合暴露実験２の絶対量化発現変動データより、２の方法によって相加（図（１）-８に抜粋）、相乗（図（１）-９）、相殺（図（１）-１０）を示す遺伝子を抽出した。

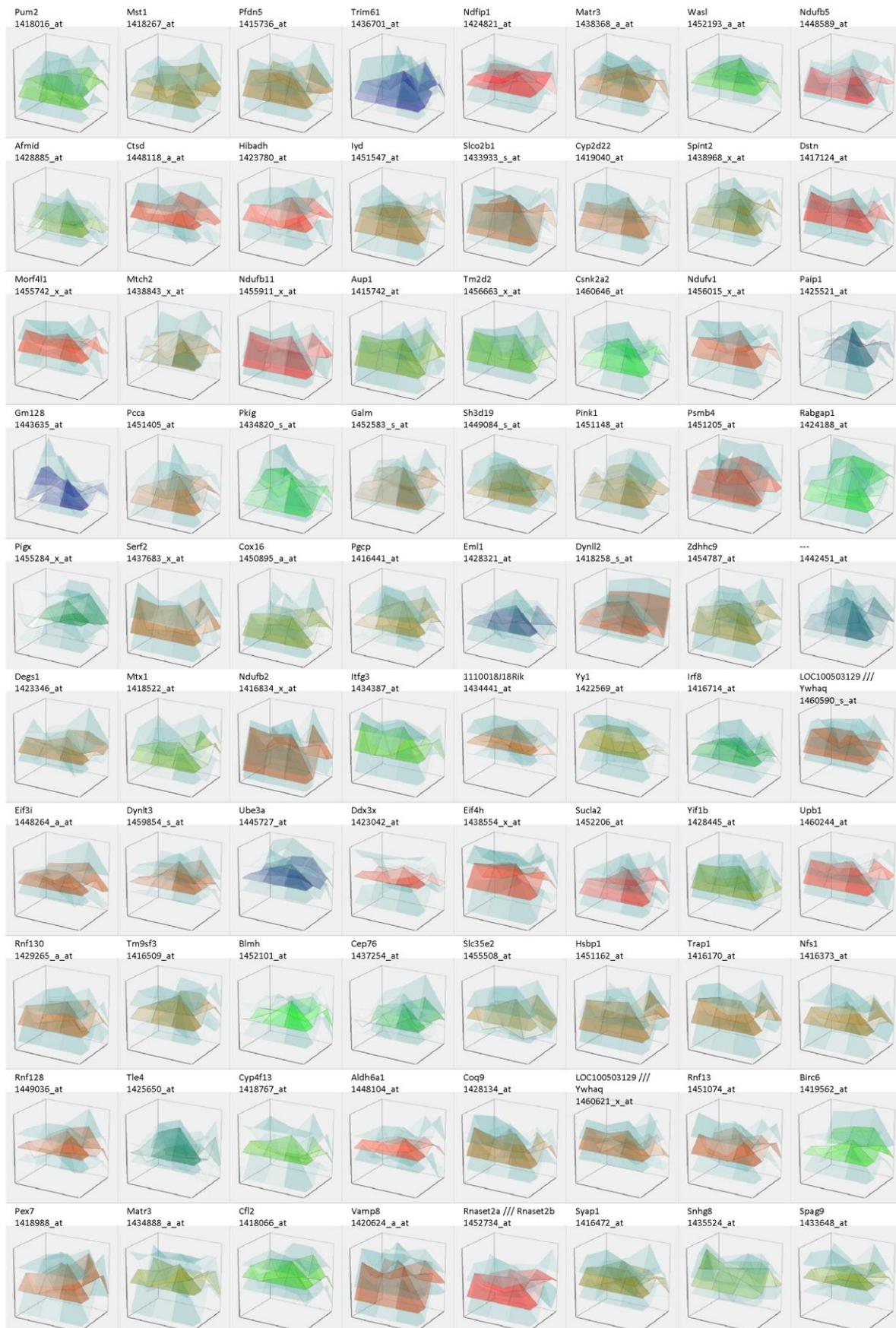
図(1)-8 複合暴露実験2 相加遺伝子リスト

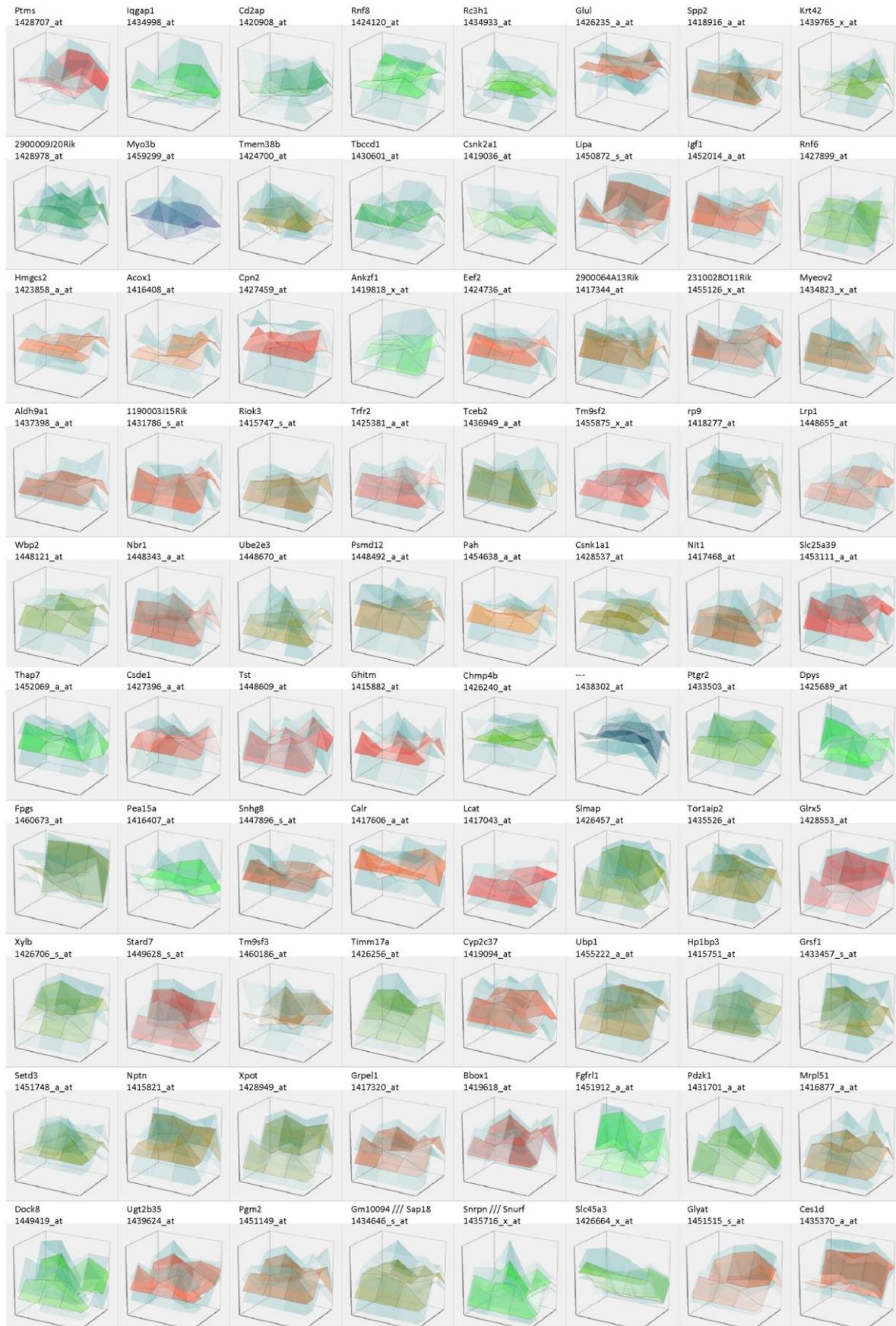


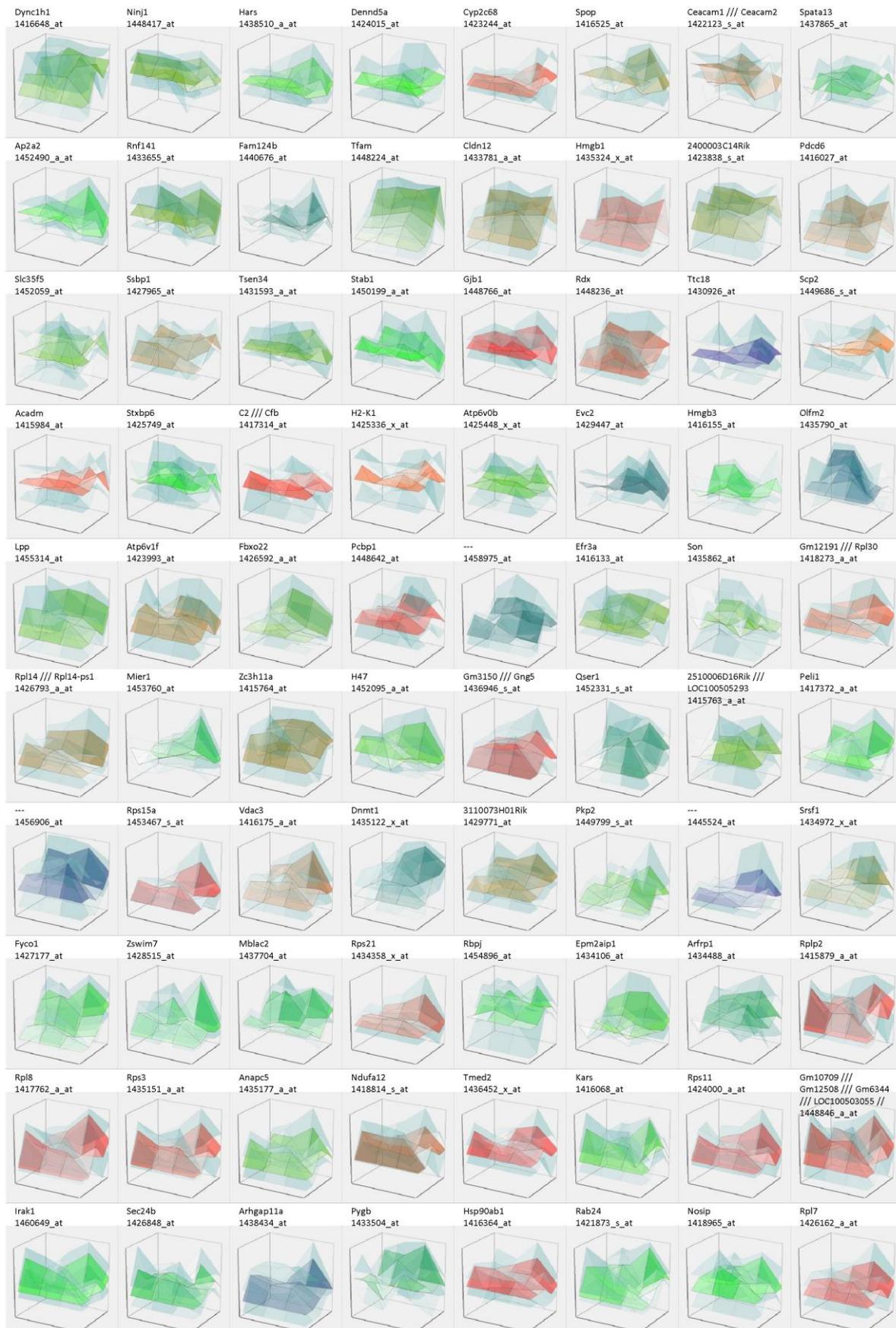
3次元曲面における相加、相乗、相殺パターン

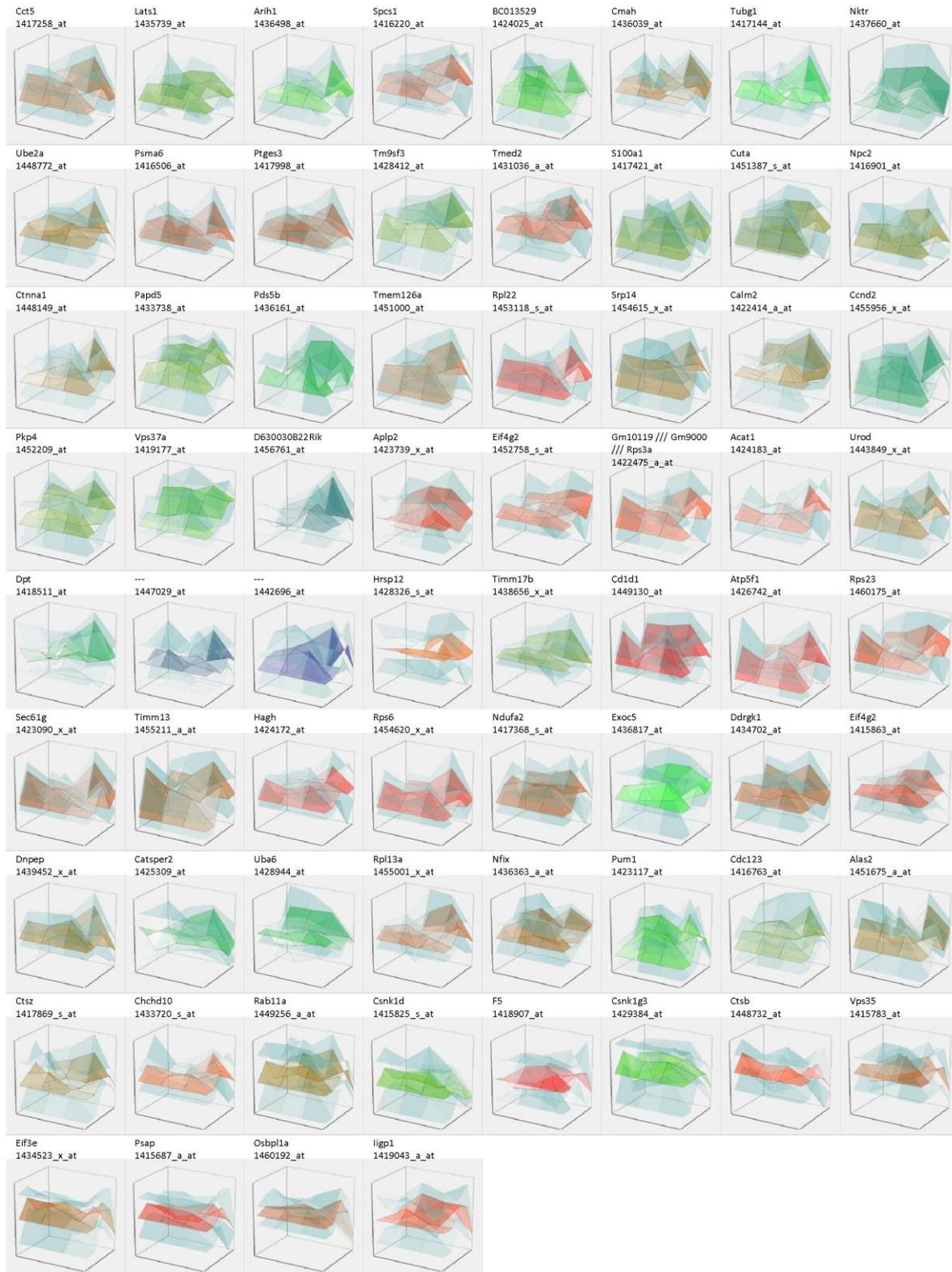




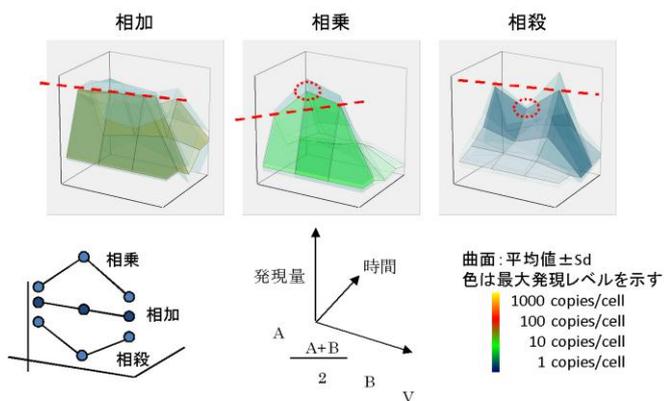




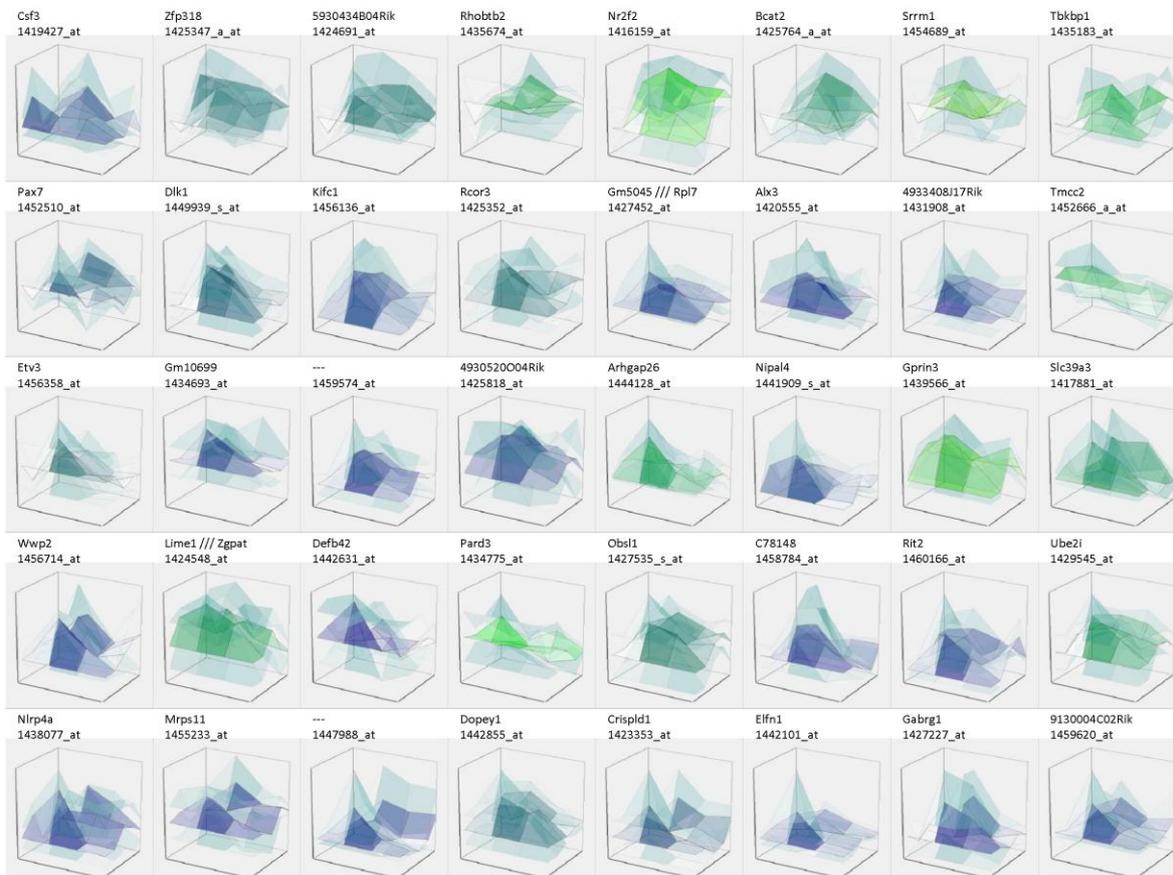


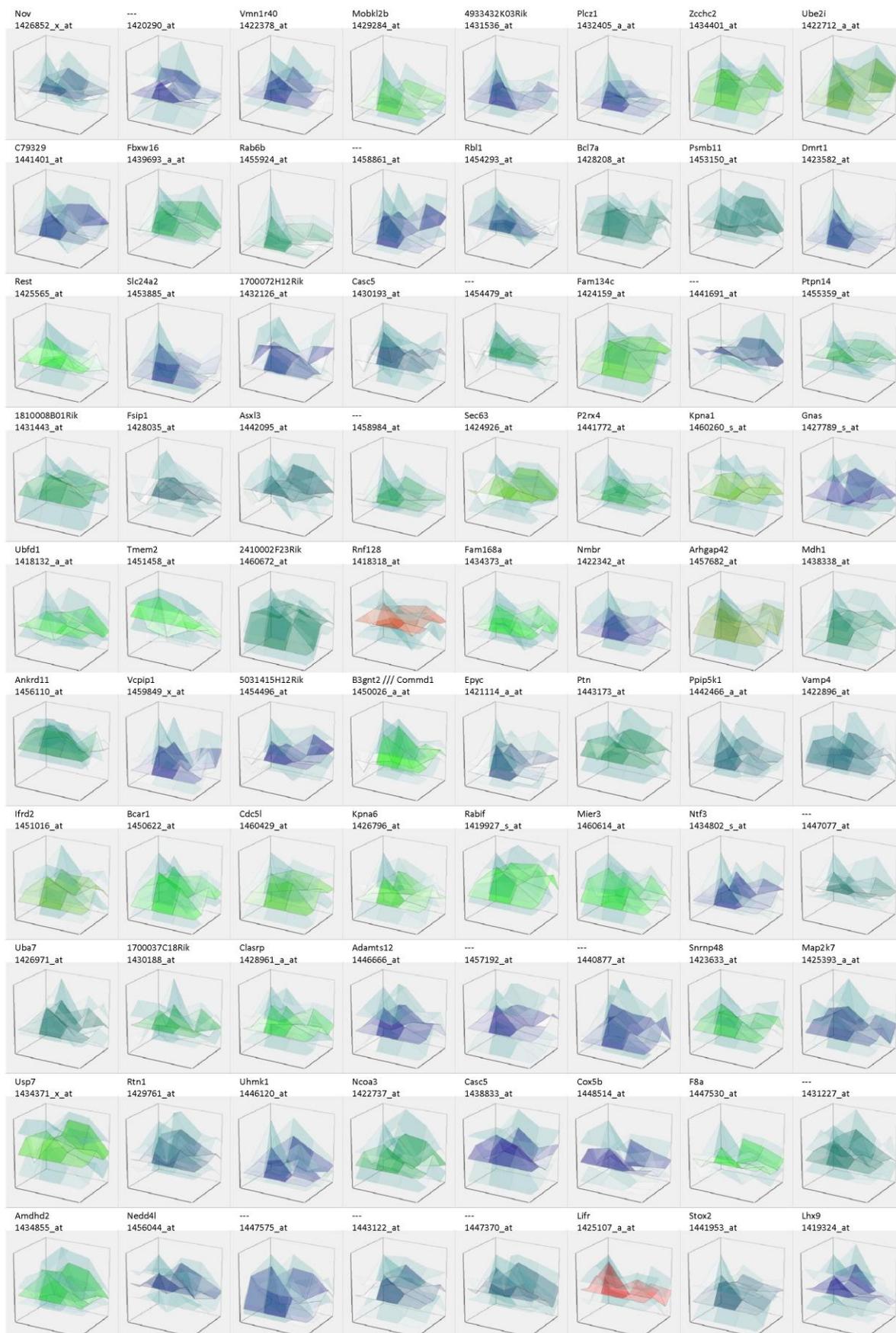


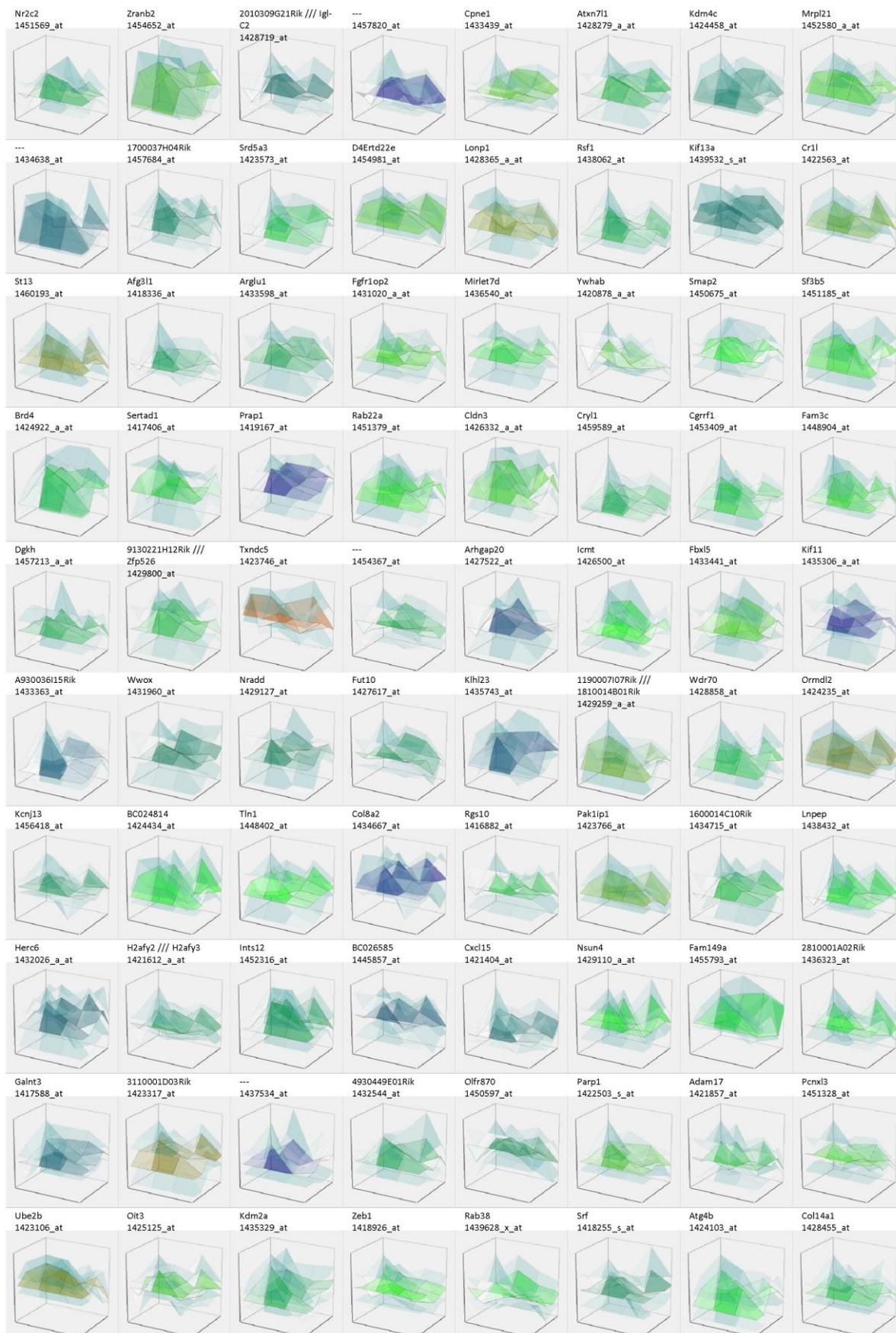
図(1)-9 複合暴露実験2 相乗遺伝子リスト

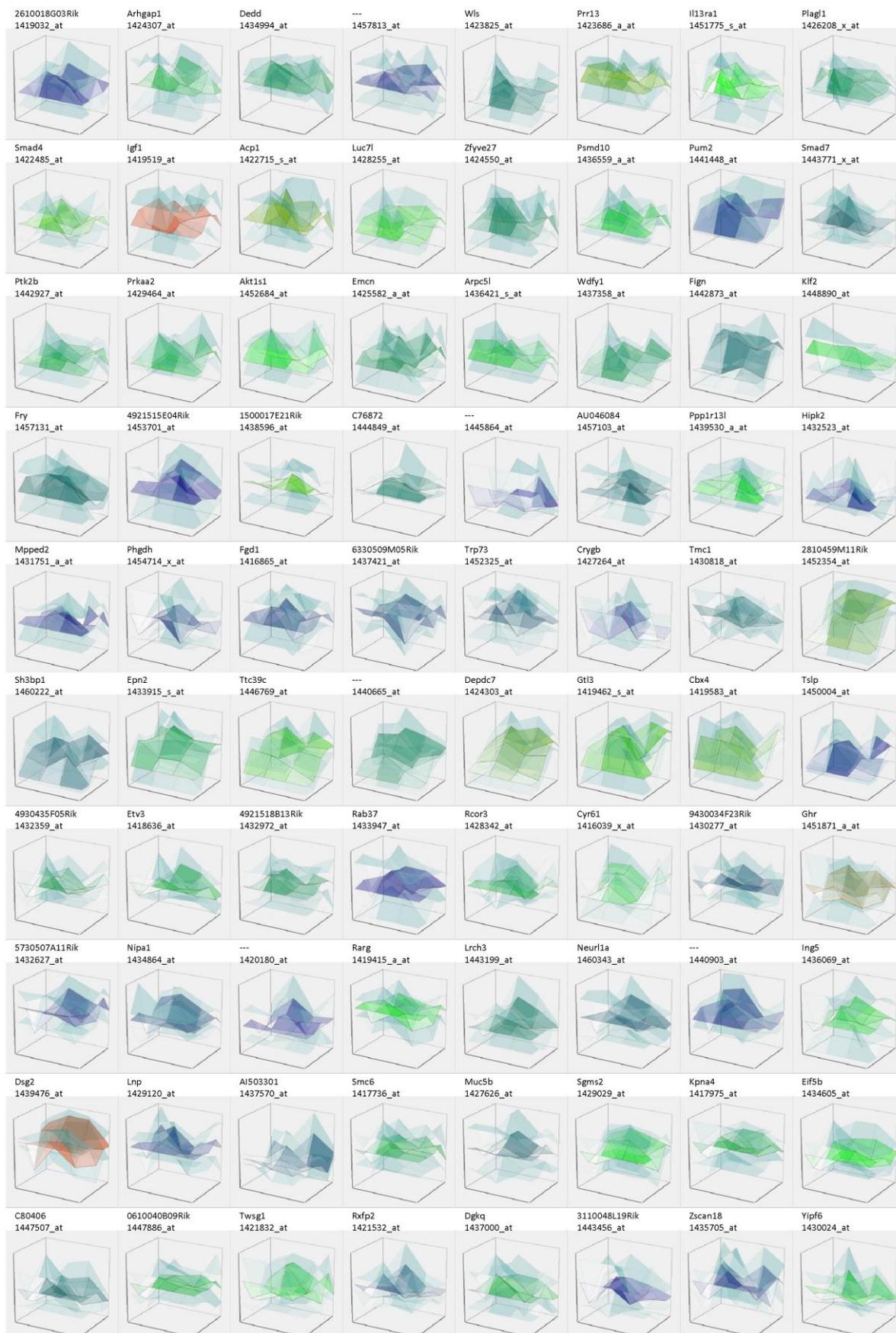


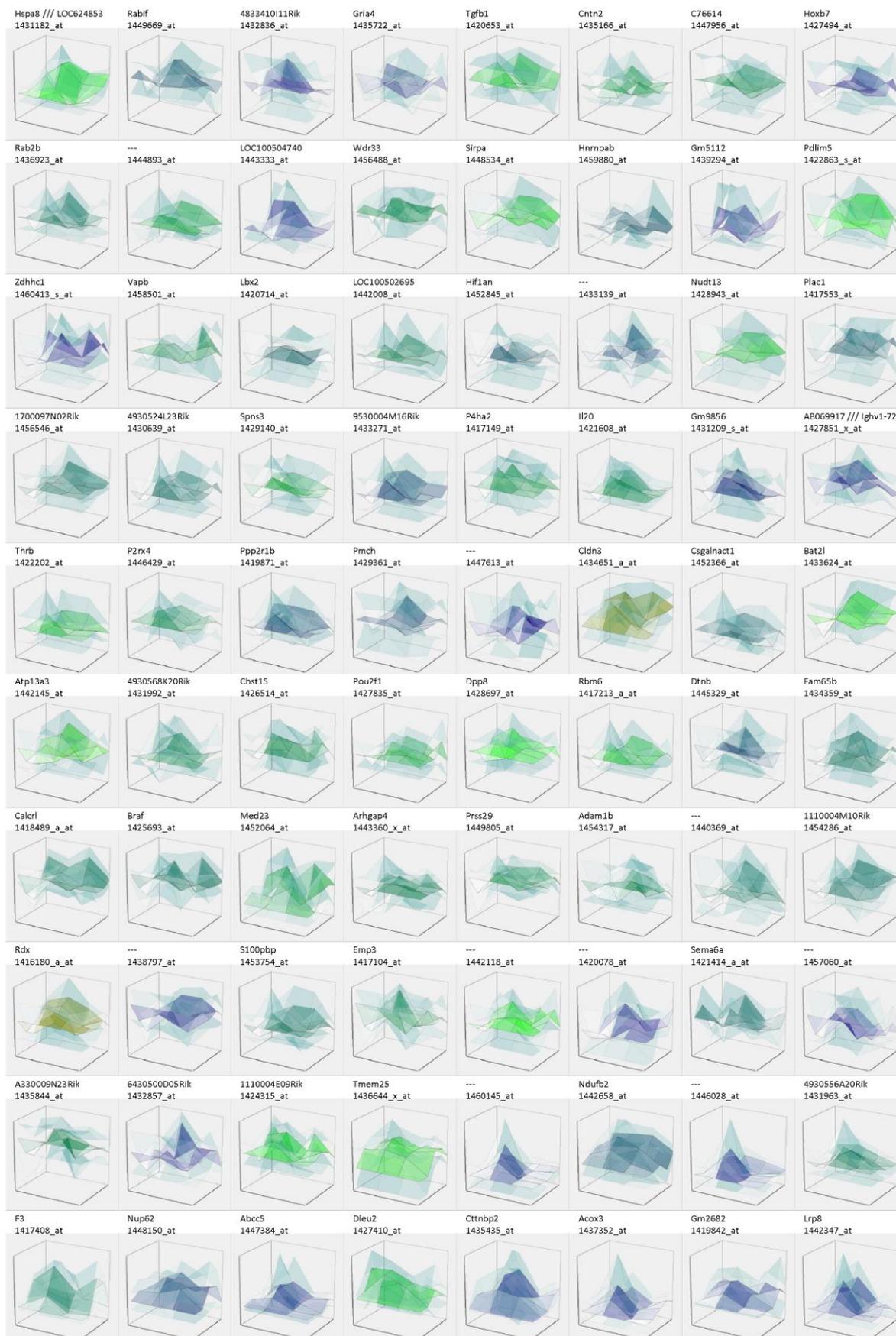
3次元曲面における相加、相乗、相殺パターン

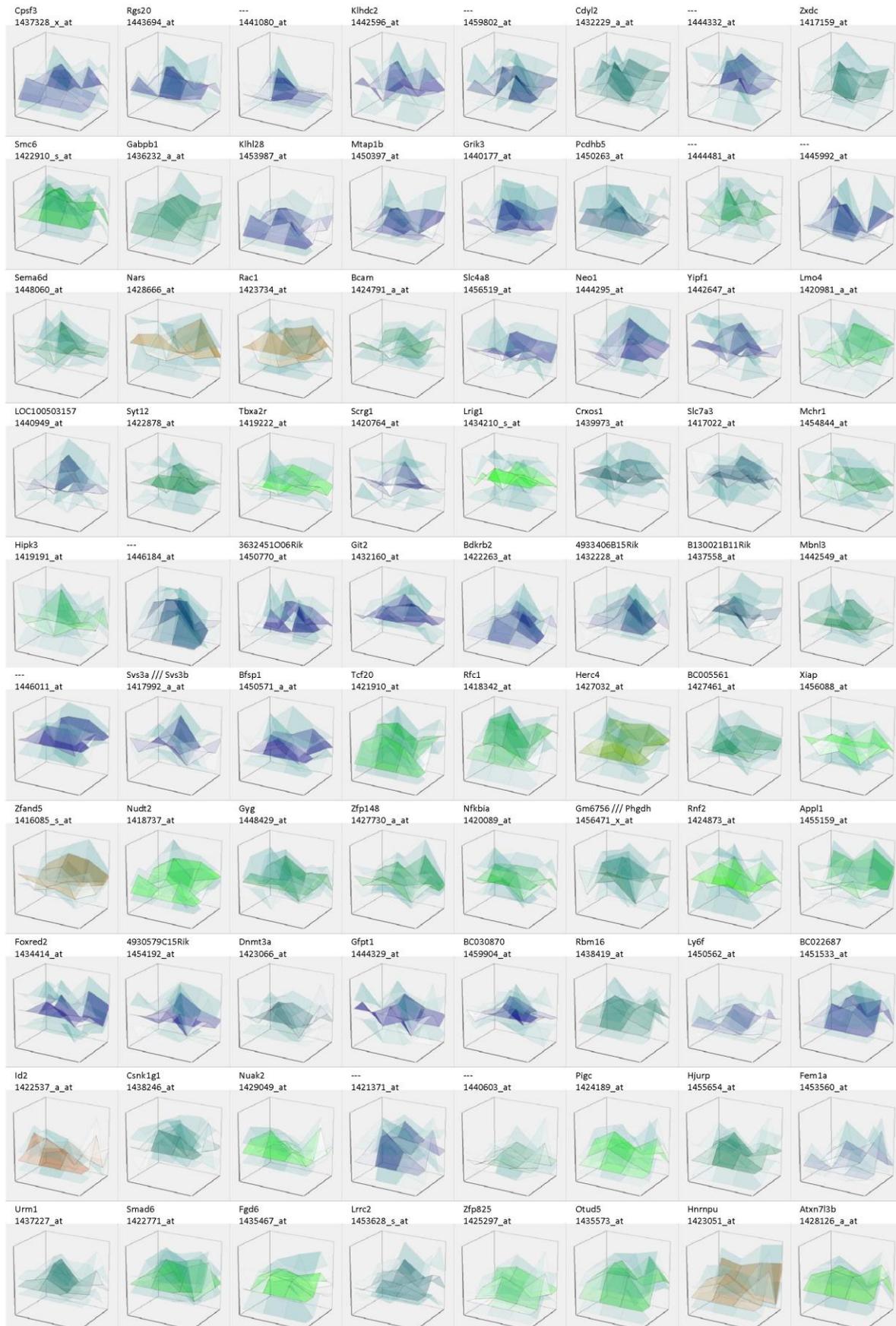


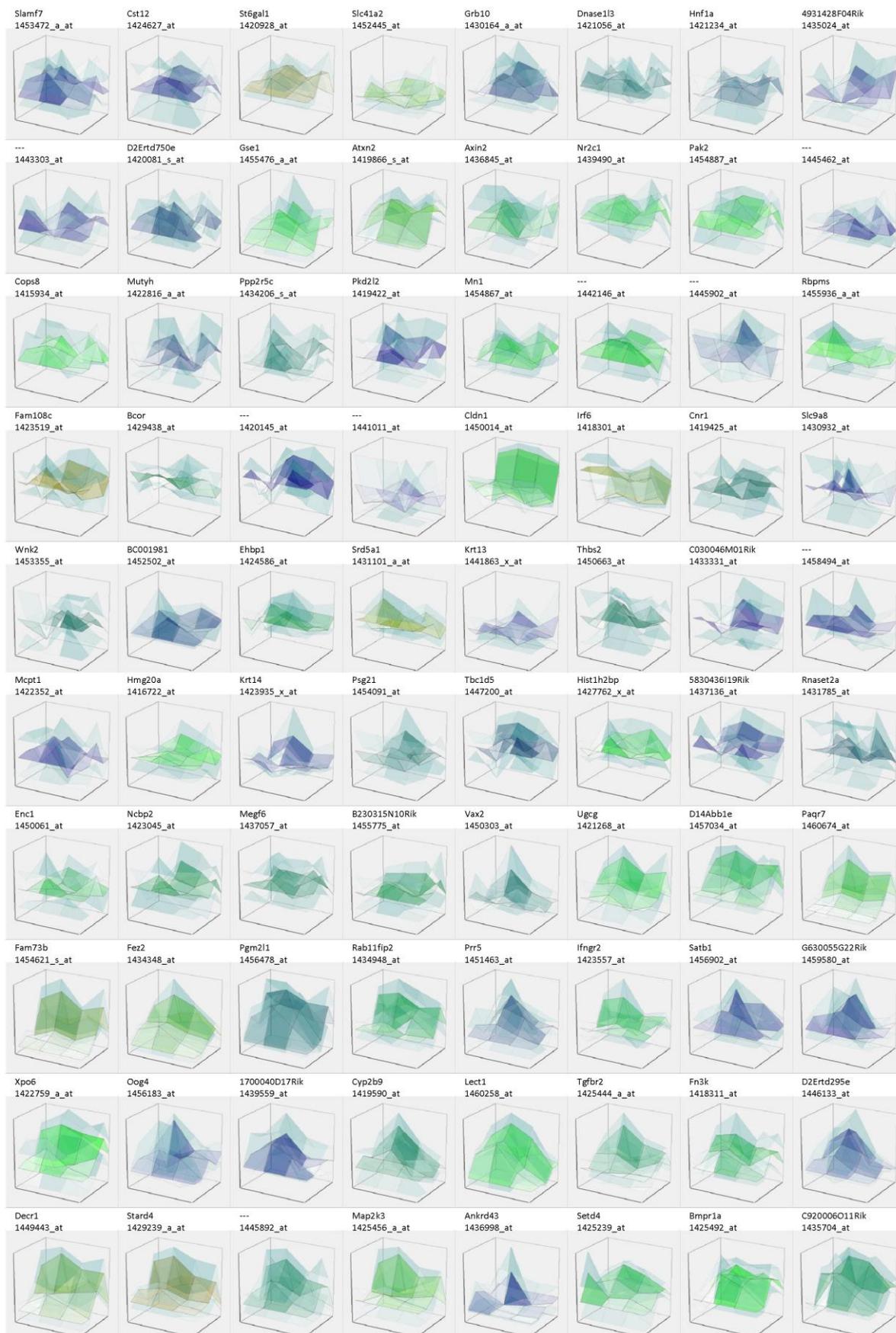


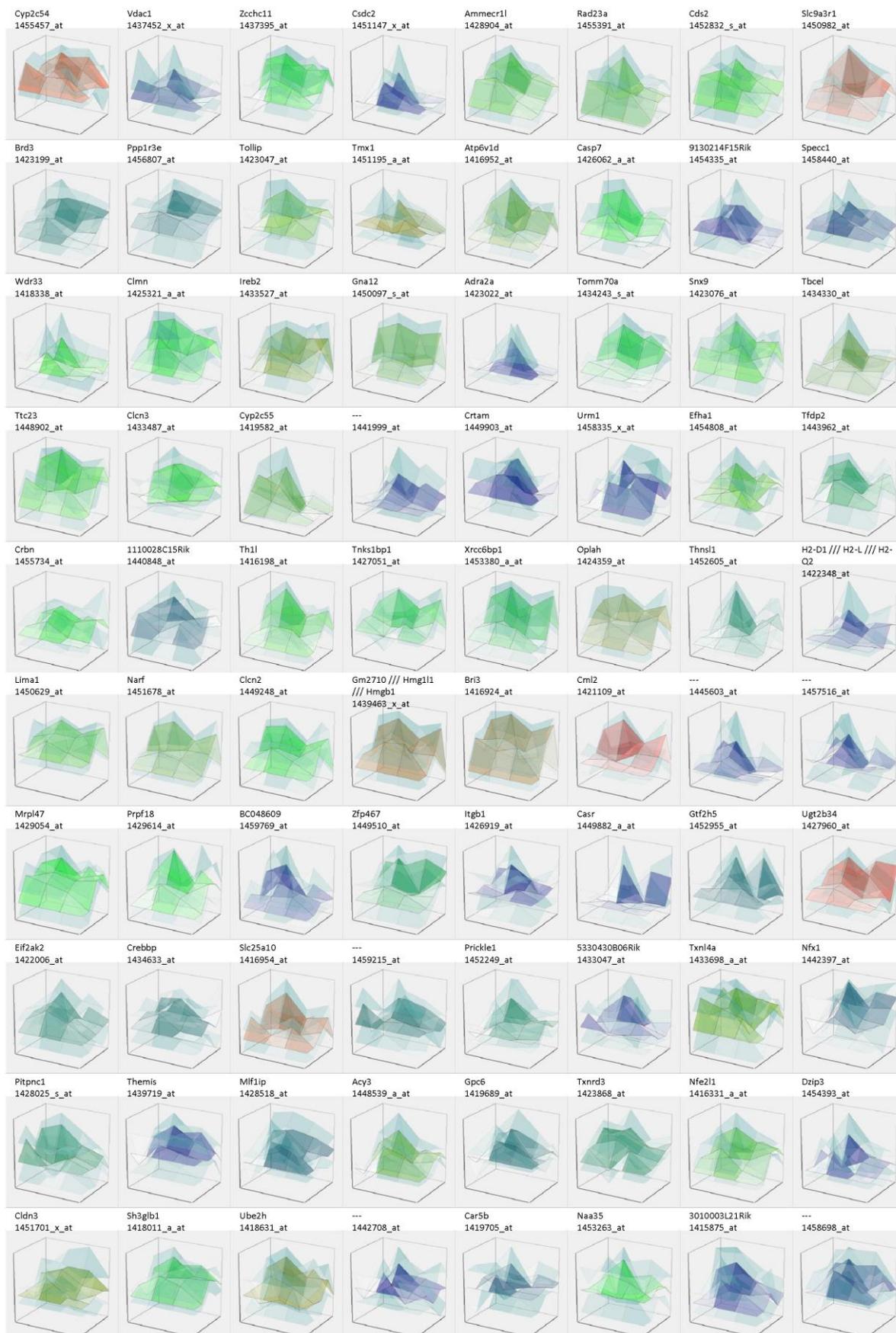


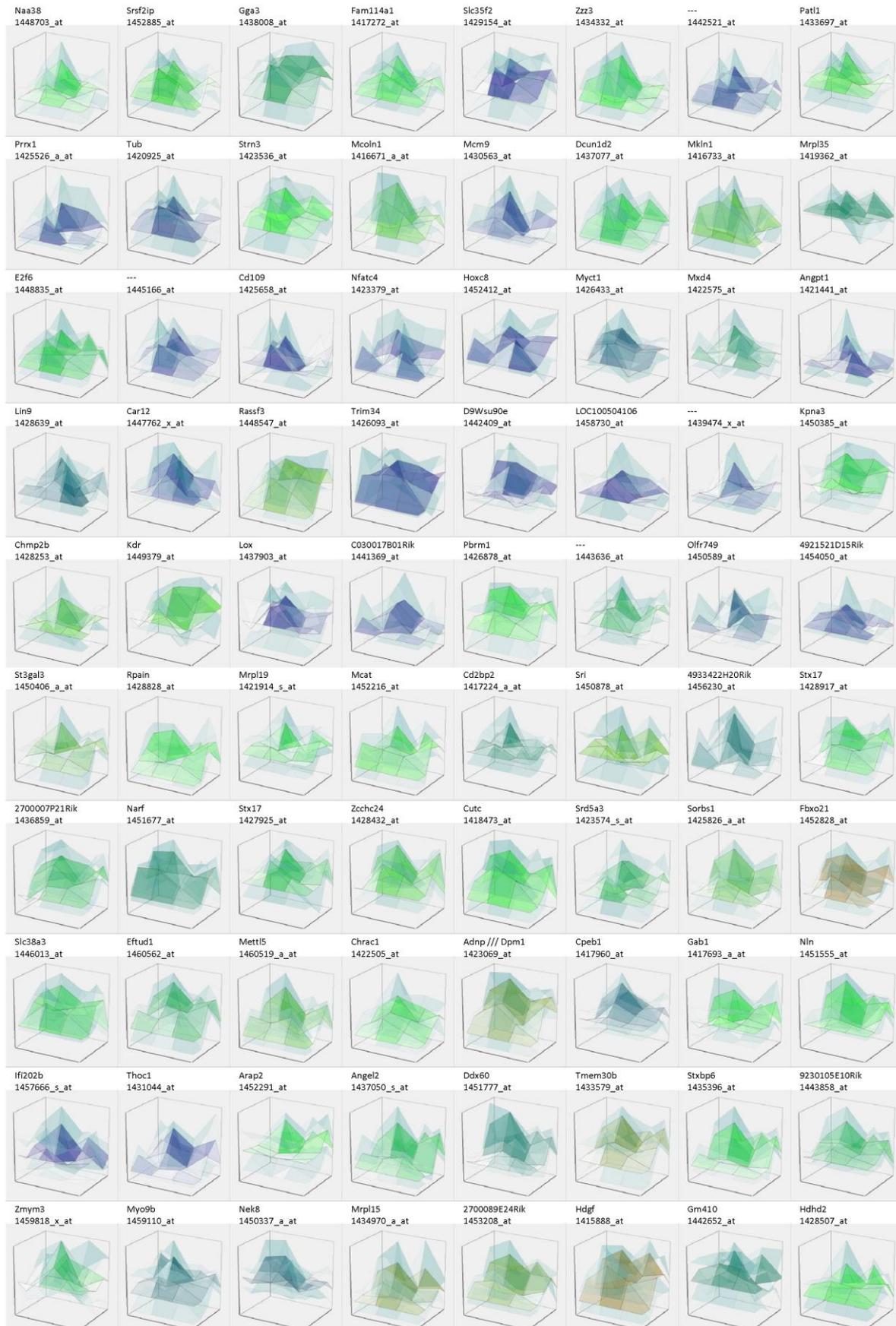


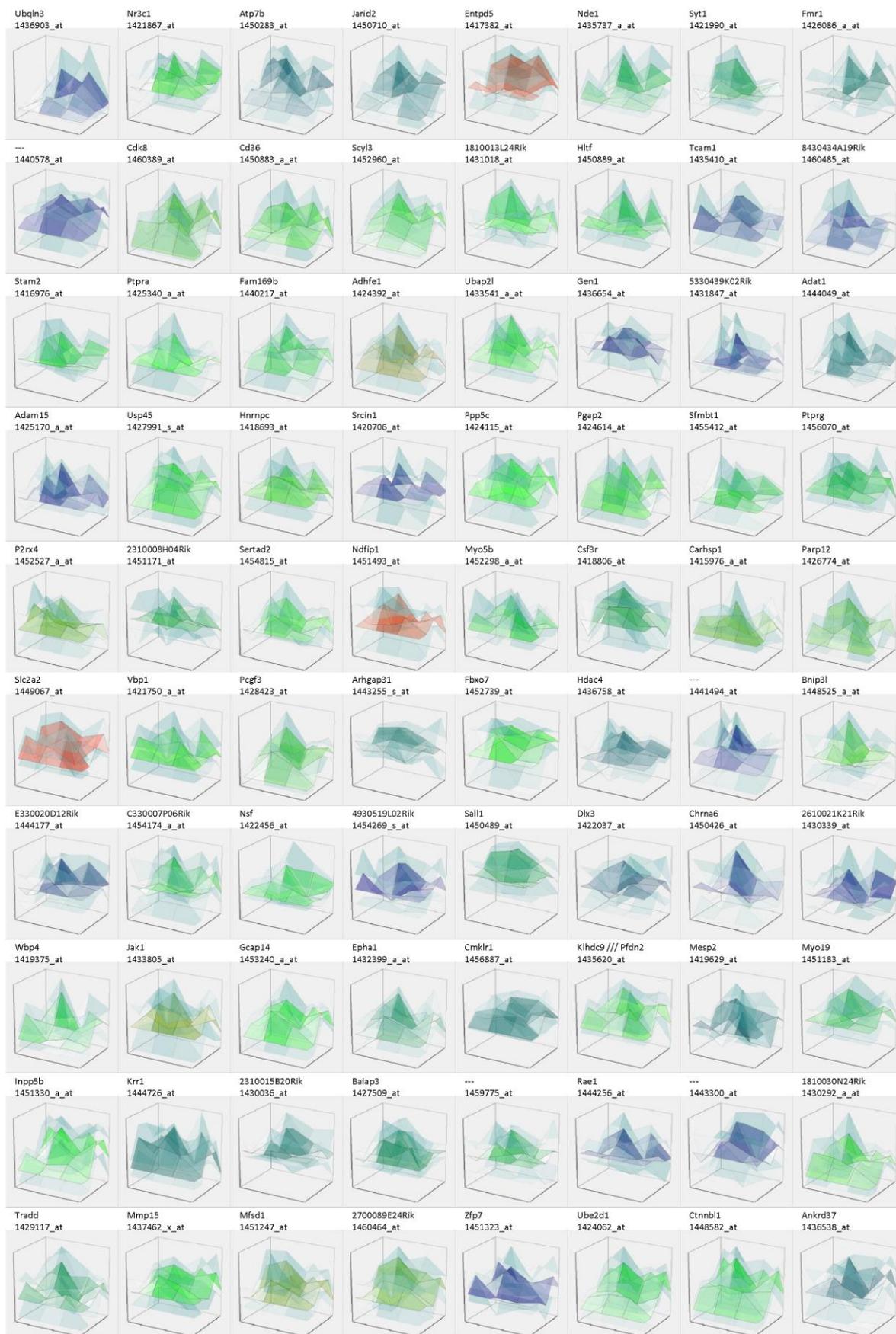


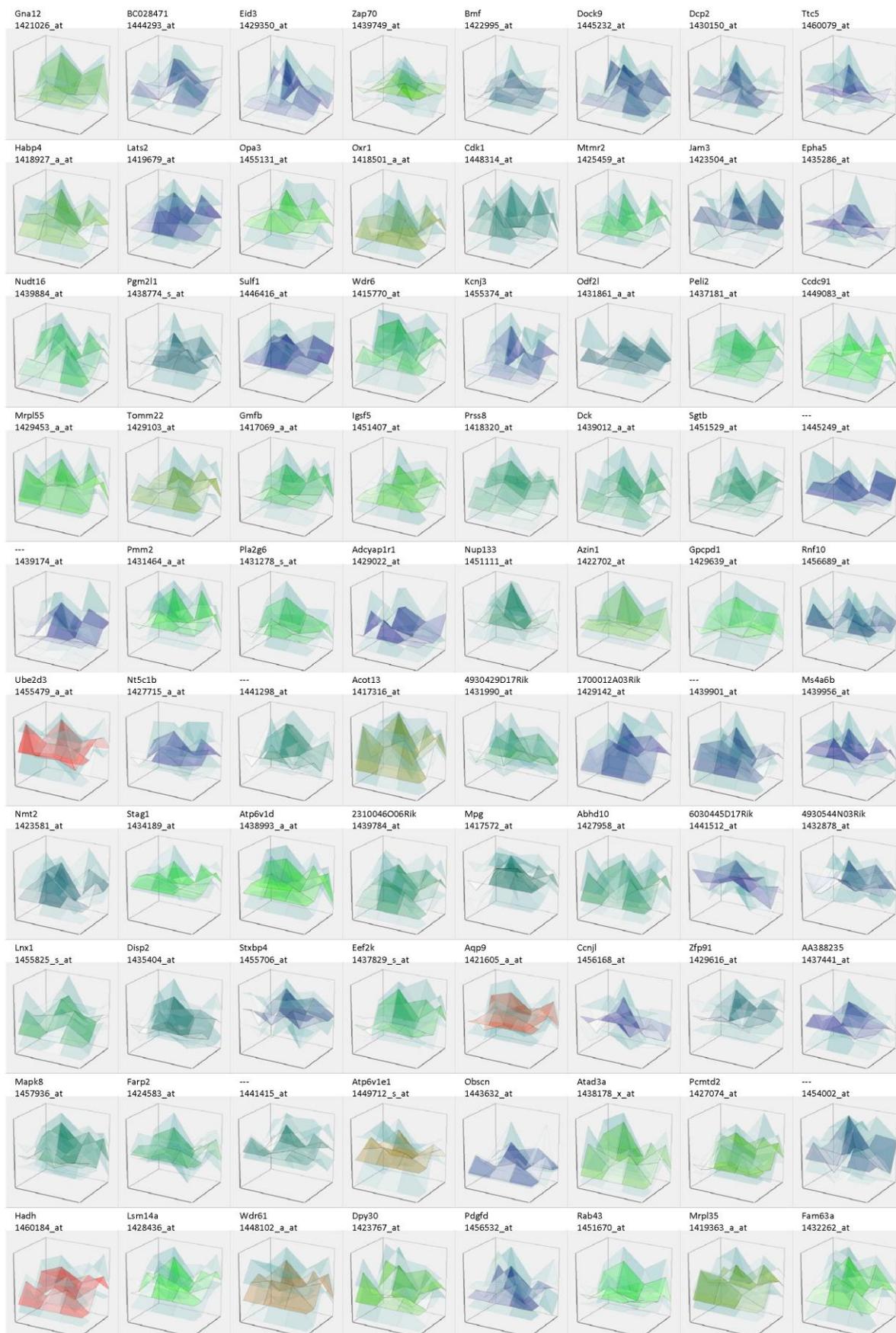


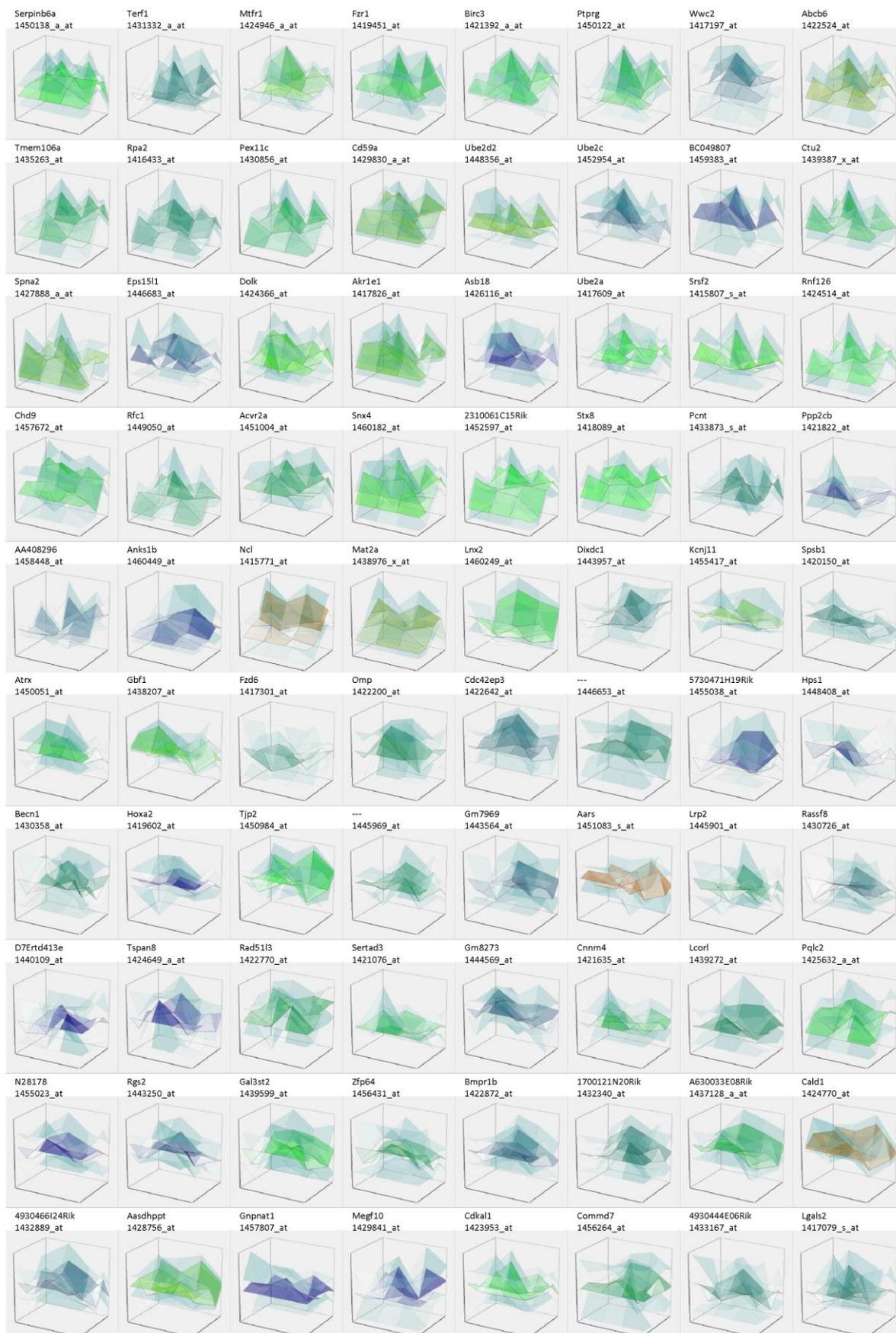


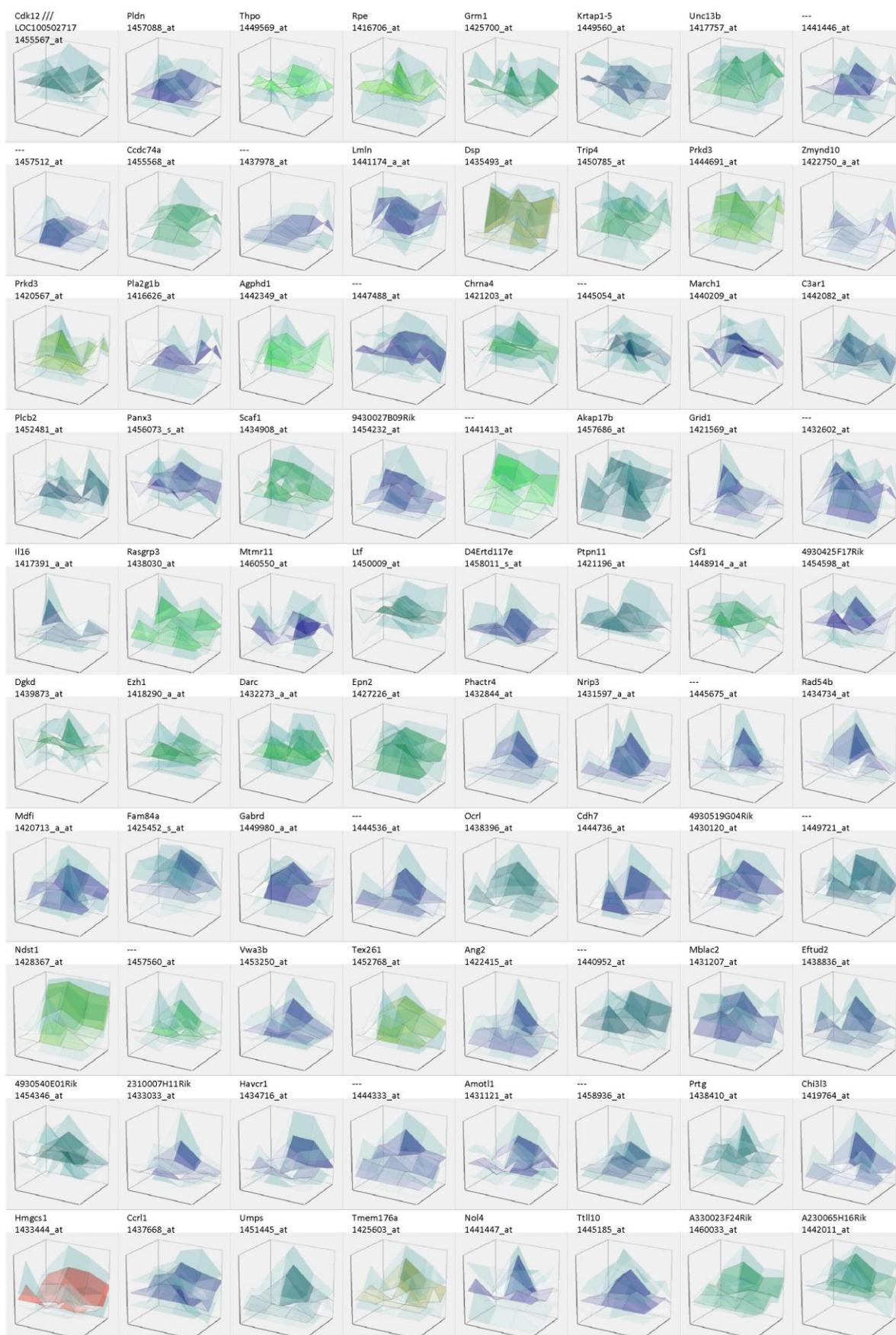


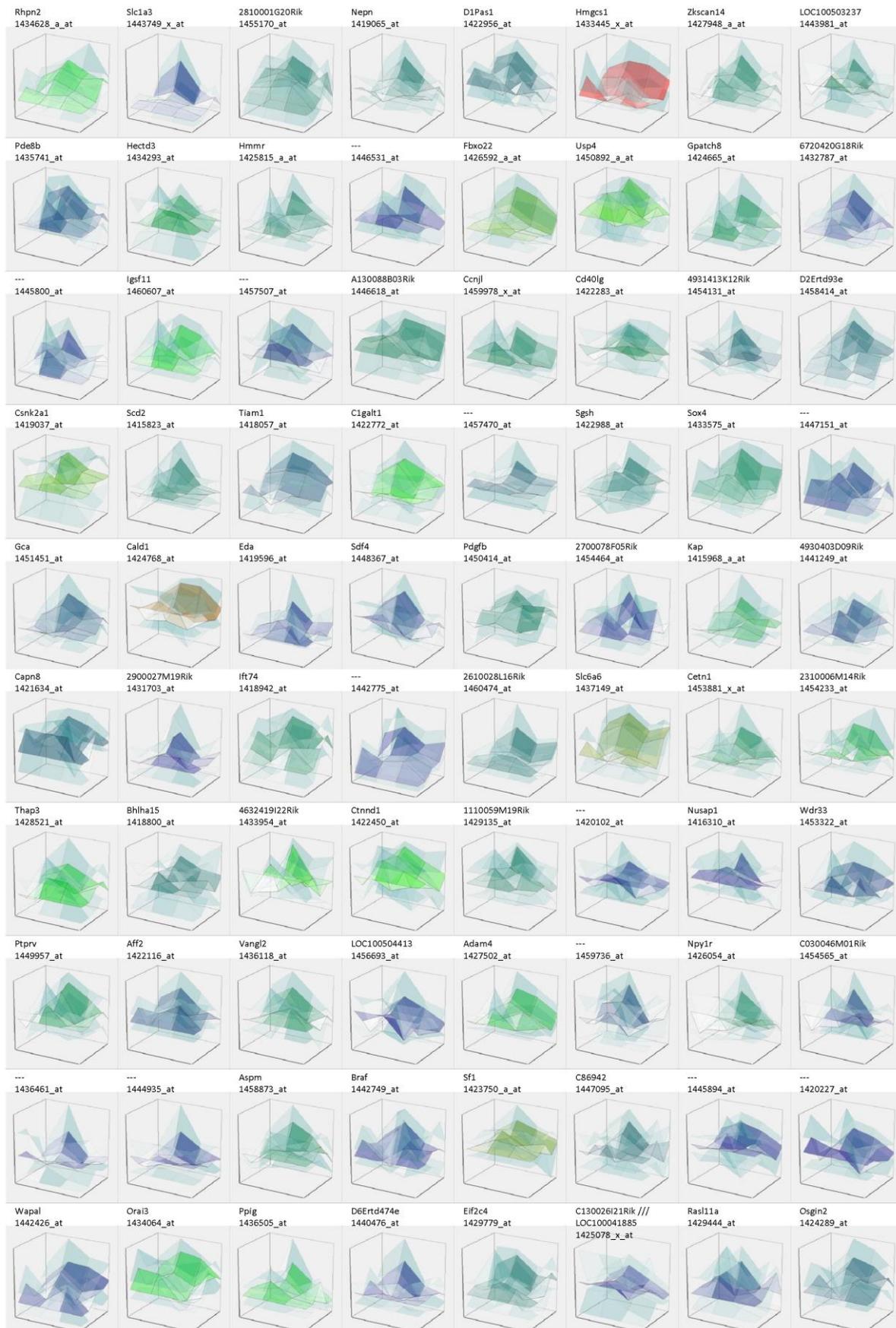


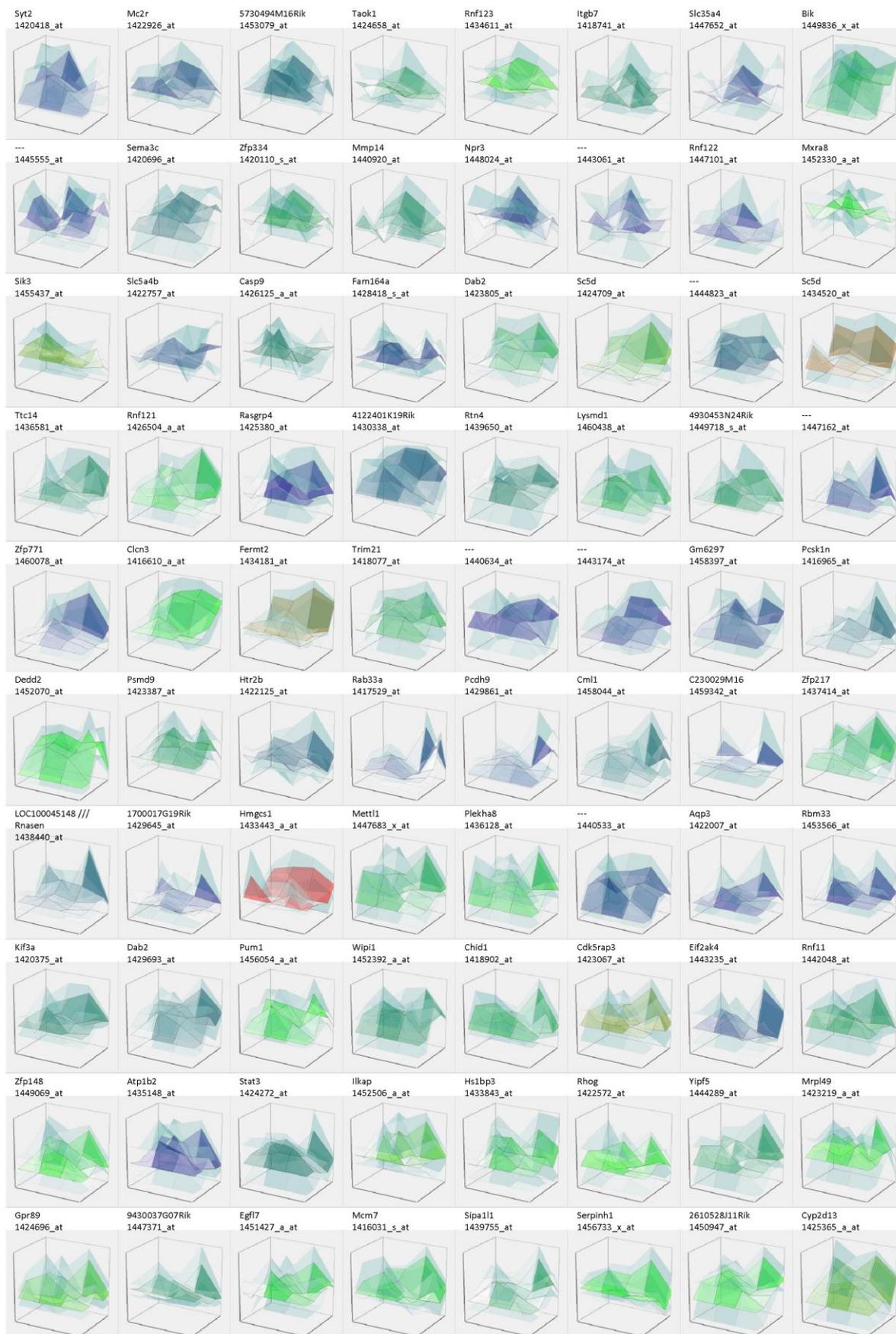


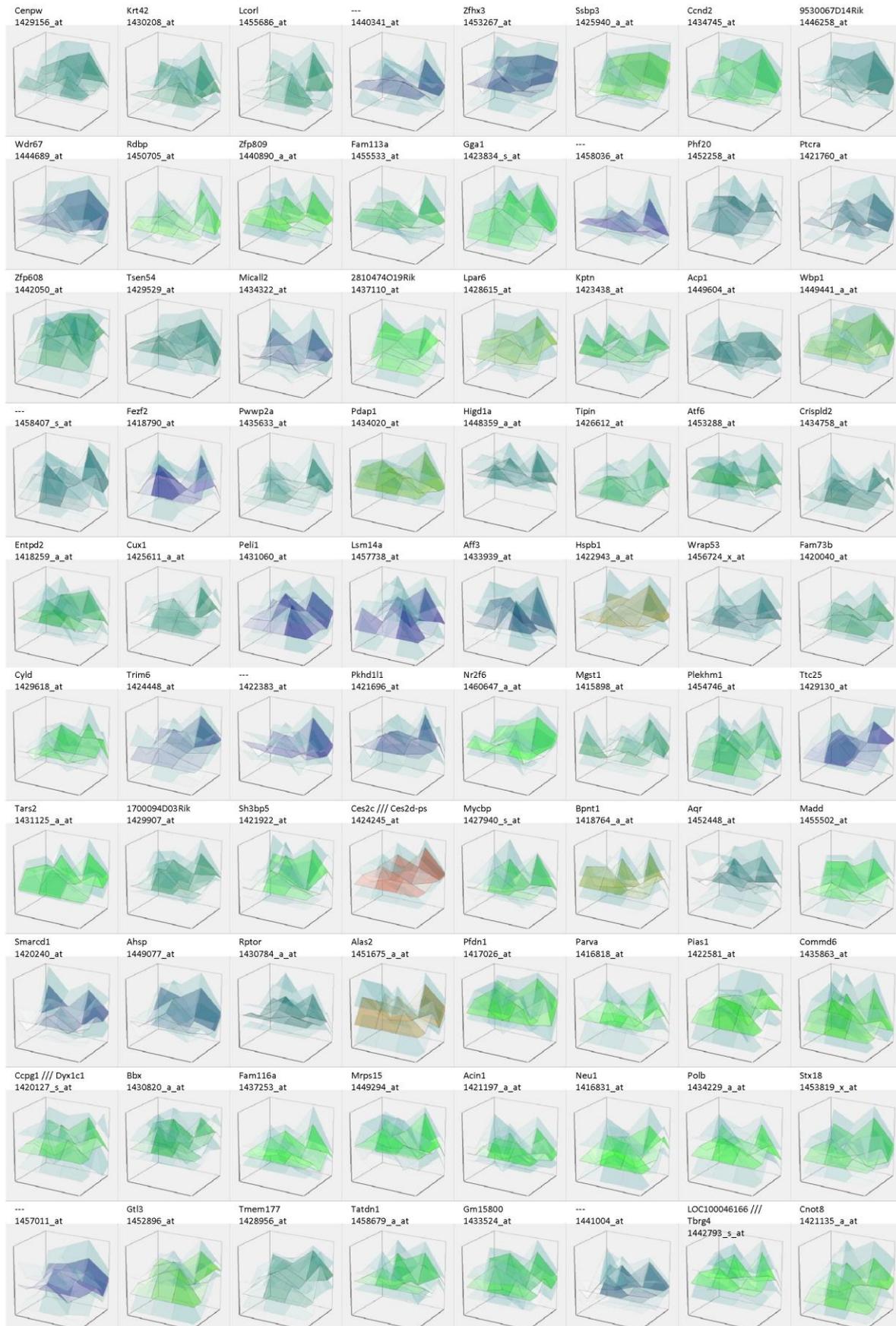


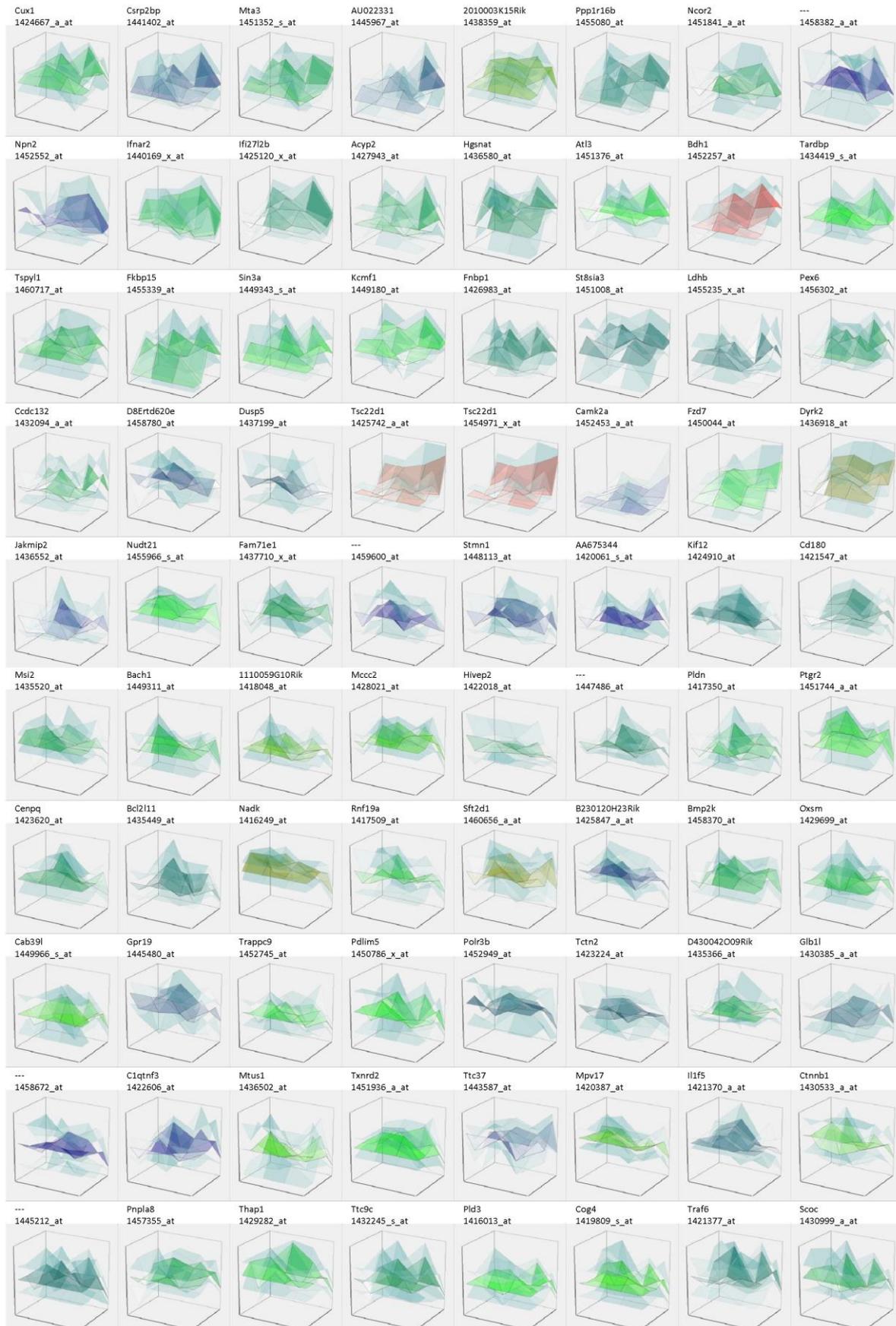


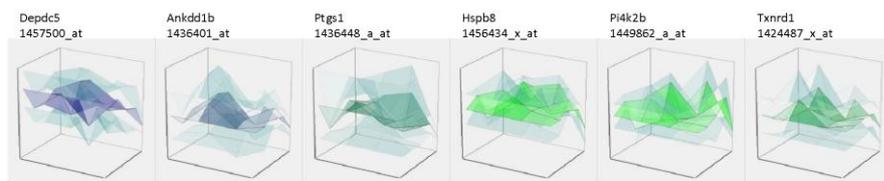




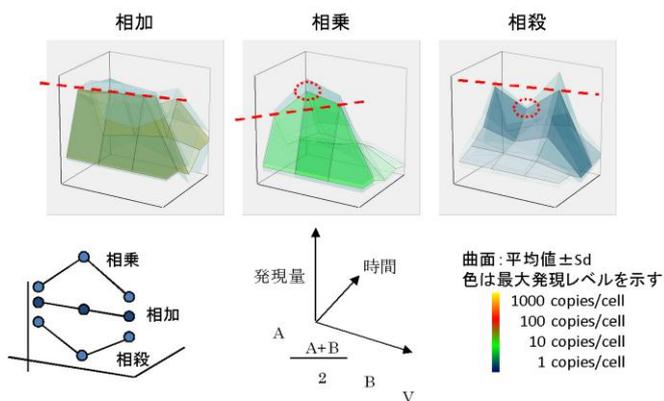




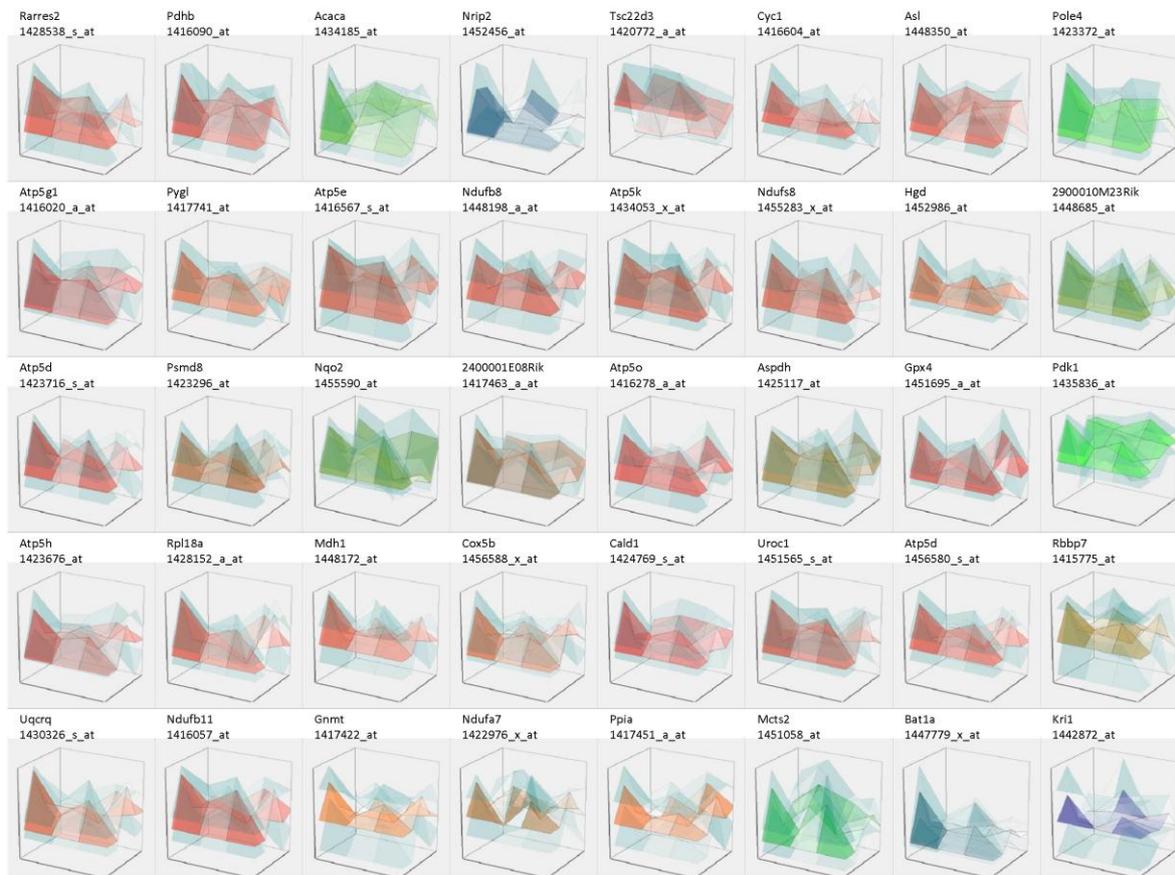


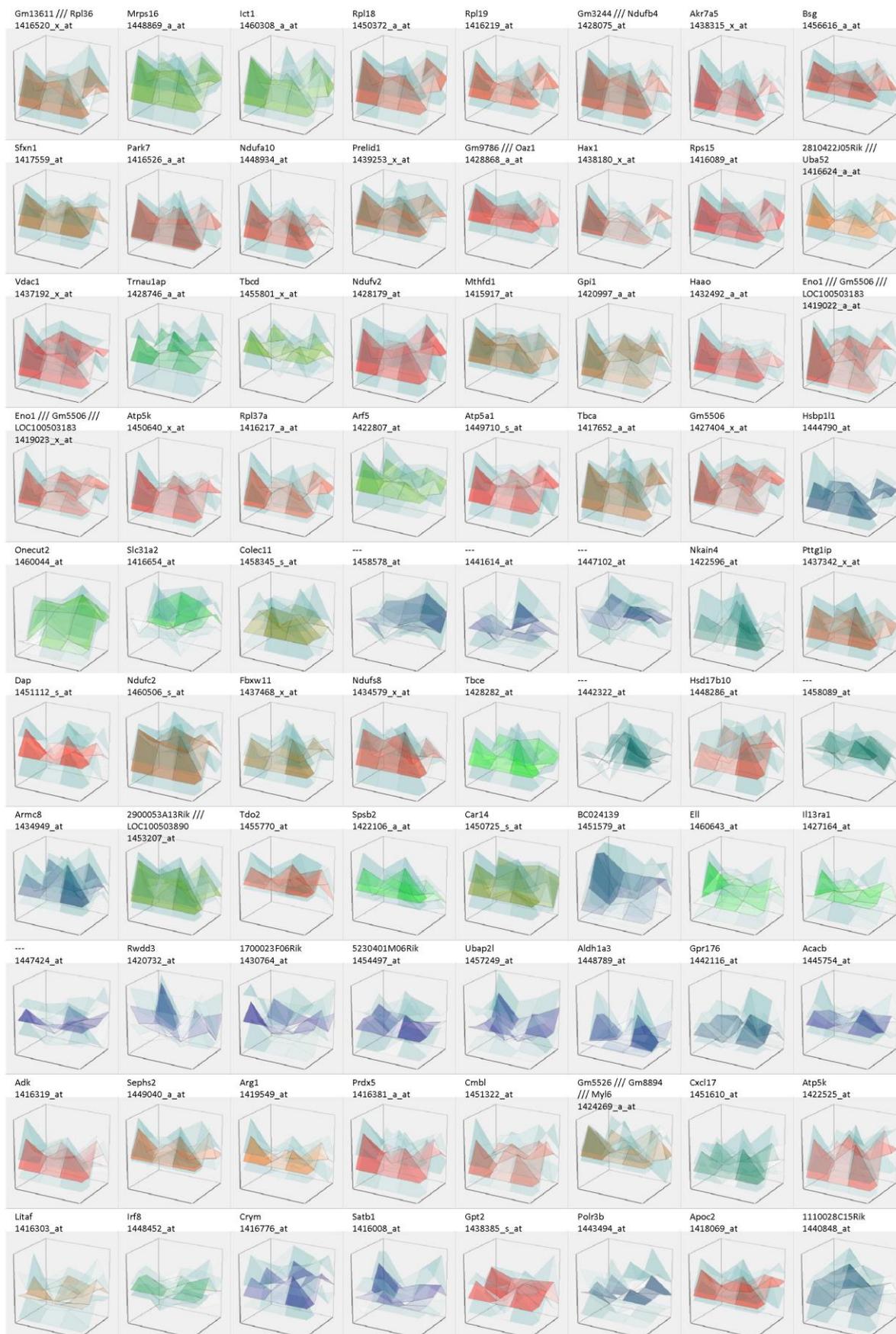


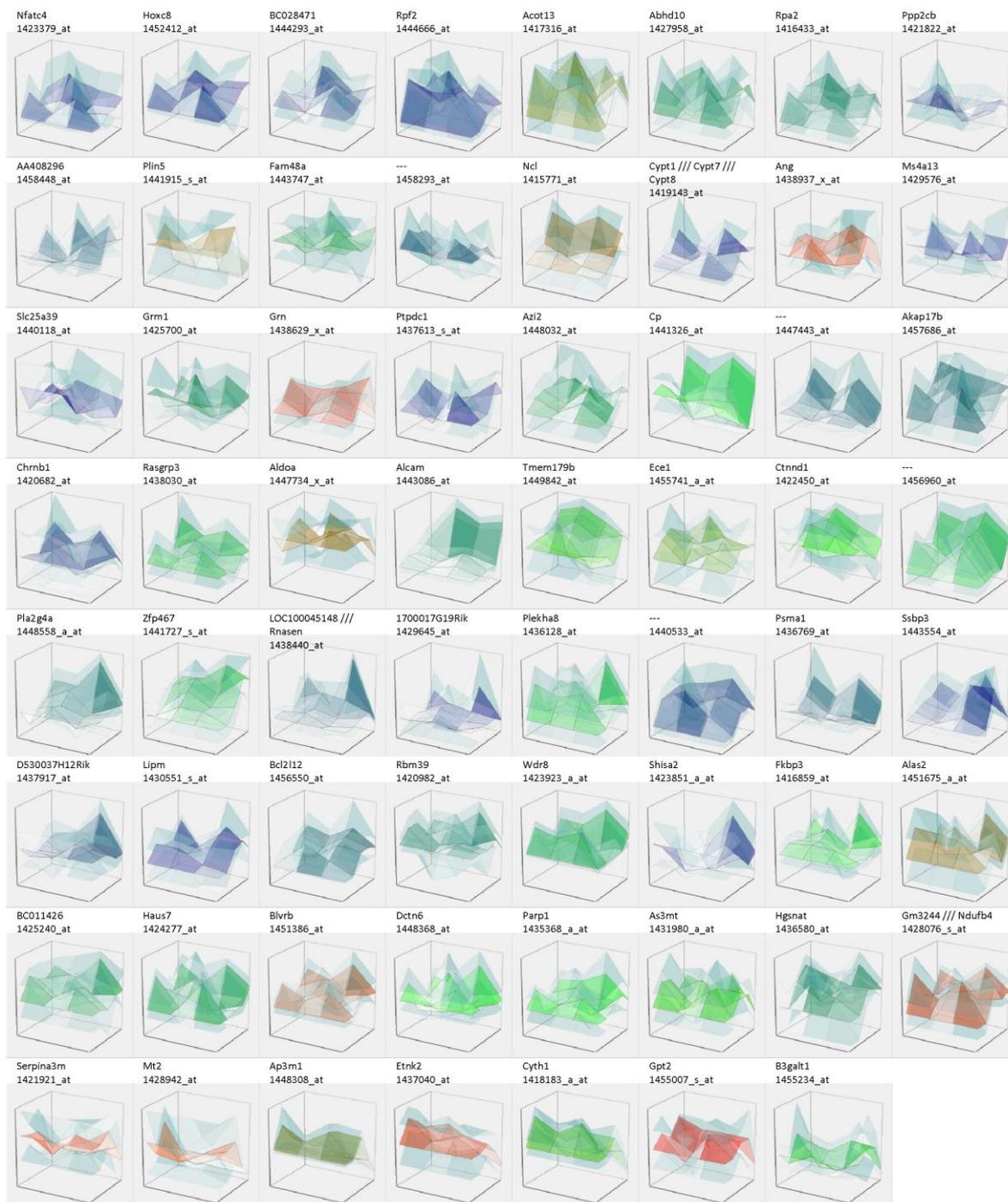
図(1)-10 複合暴露実験2 相殺遺伝子リスト



3次元曲面における相加、相乗、相殺パターン

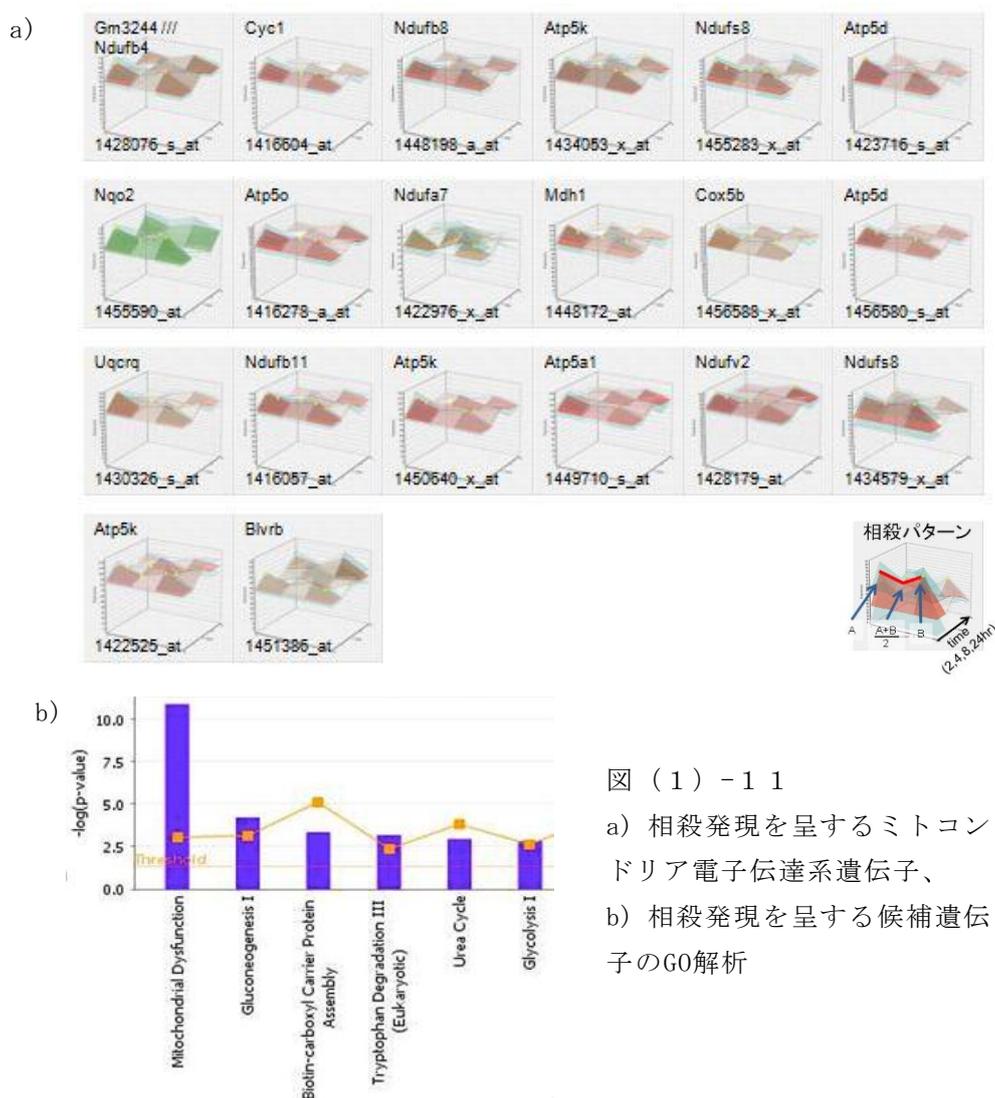






これらの遺伝子の機能解析を実施したところ、相殺影響を受ける遺伝子の多くがミトコンドリア電子伝達系の関連遺伝子（Atp5a1, Atp5d, Atp5k, Atp5o, Bivrb, Cox5b, Cyc1, Mdh1, Ndufa7, Ndufb11, Ndufb4, Ndufb8, Ndufs8, Ndufv2, Nqo2, Uqcrqなど）であることが判明した（図（1）-11）。

ディート（昆虫忌避剤）とペルメトリン（殺虫剤）の複合暴露時にはこれらの遺伝子が相殺影響を受けることから、これらの化学物質を併用することによりミトコンドリアの機能不全が誘発される危険性があることが判明した（検証が必要であるが、この分子挙動は倦怠感などの不定愁訴の原因になる可能性がある）。



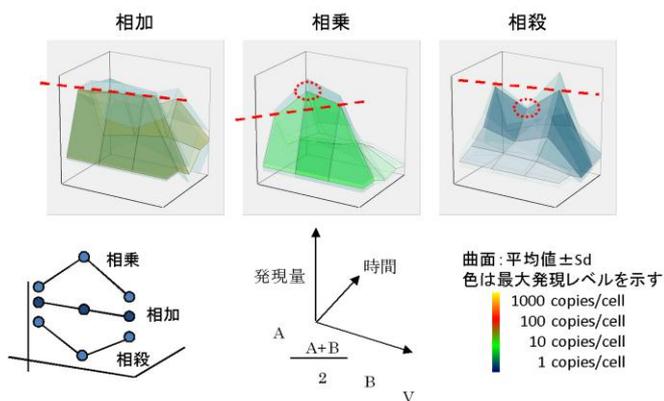
図（1）-11

a) 相殺発現を呈するミトコンドリア電子伝達系遺伝子、
 b) 相殺発現を呈する候補遺伝子のGO解析

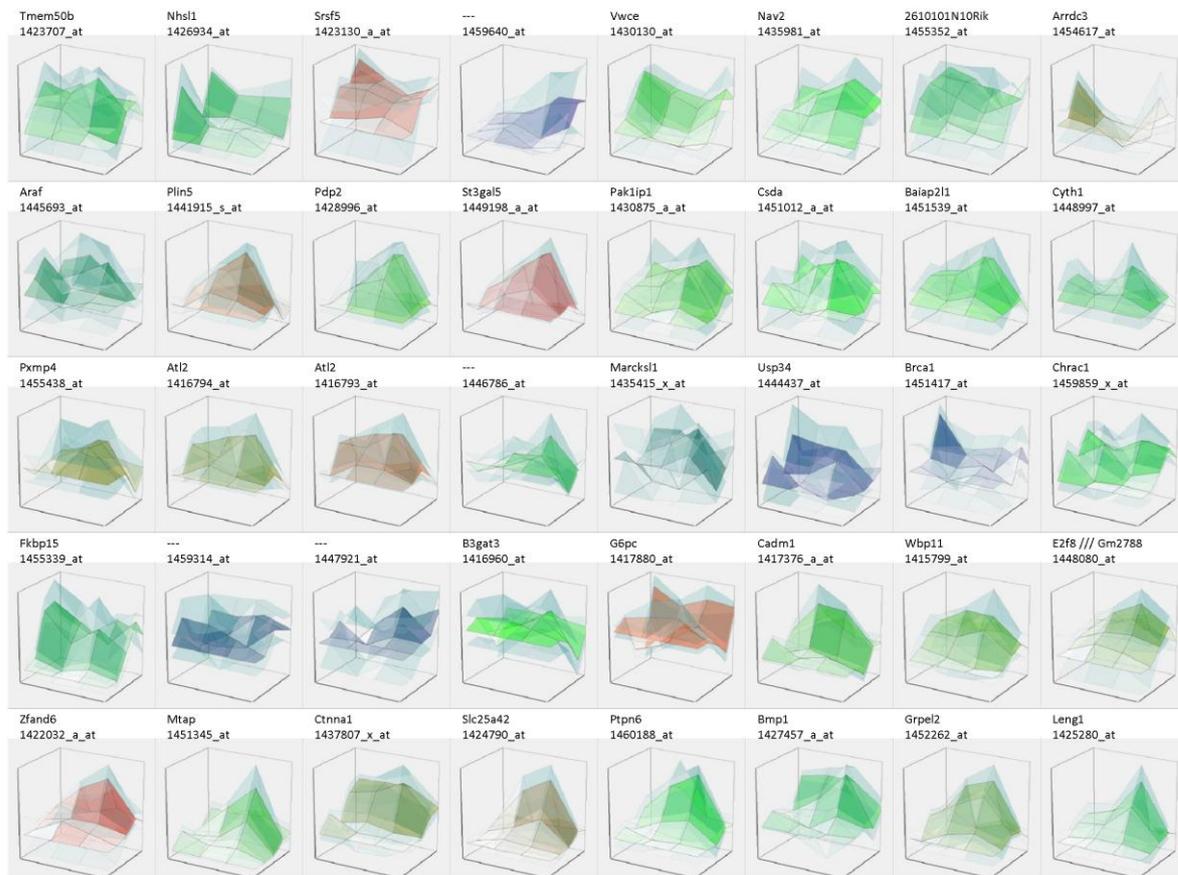
（5）複合暴露実験3：フタル酸ビス（2-エチルヘキシル）、ビスフェノールAの複合暴露による遺伝子発現変動

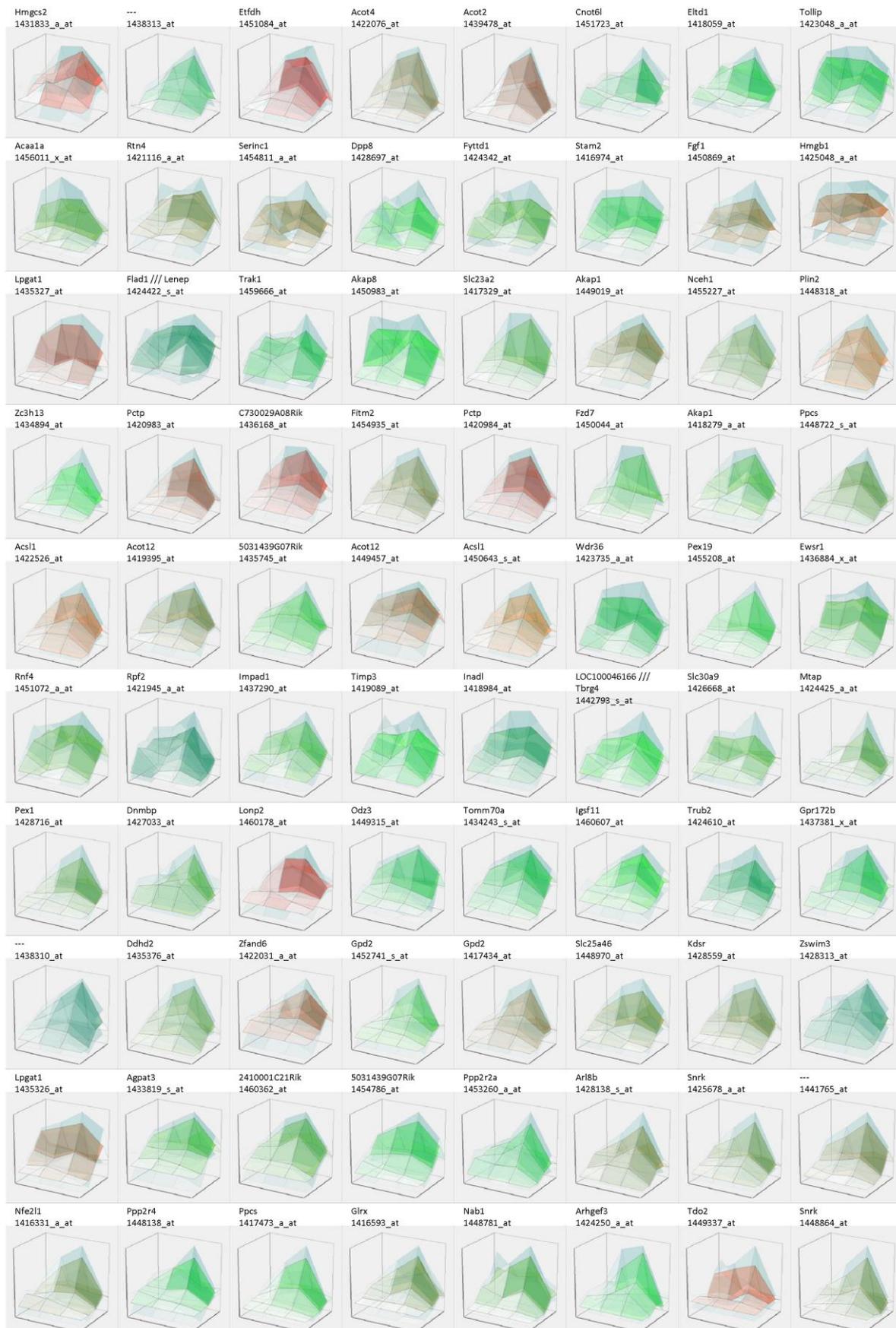
複合暴露実験3の絶対量化発現変動データより、2の方法によって相加（図（1）-12に抜粋）、相乗（図（1）-13）、相殺（図（1）-14）を示す遺伝子を抽出した。

図(1)-12 複合暴露実験3 相加遺伝子リスト

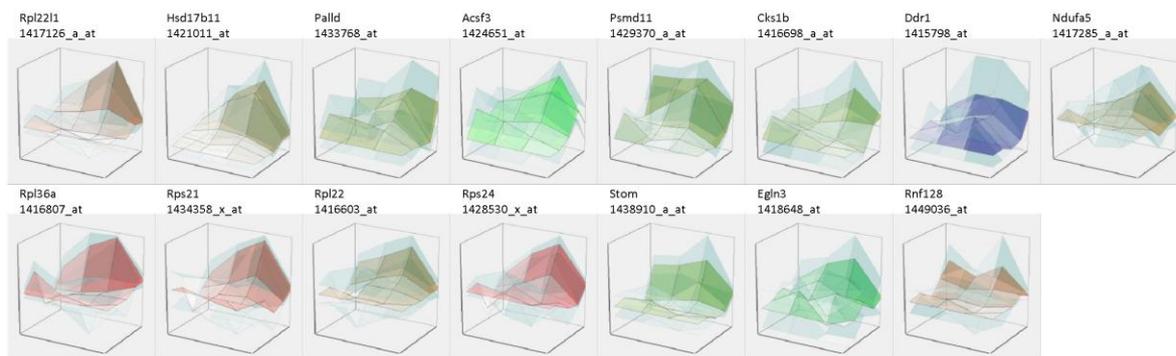


3次元曲面における相加、相乗、相殺パターン

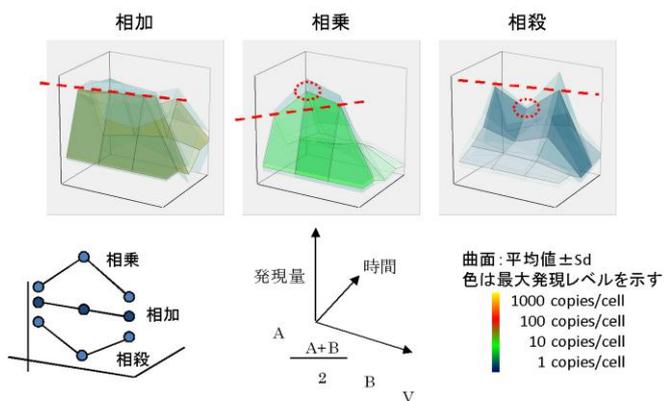




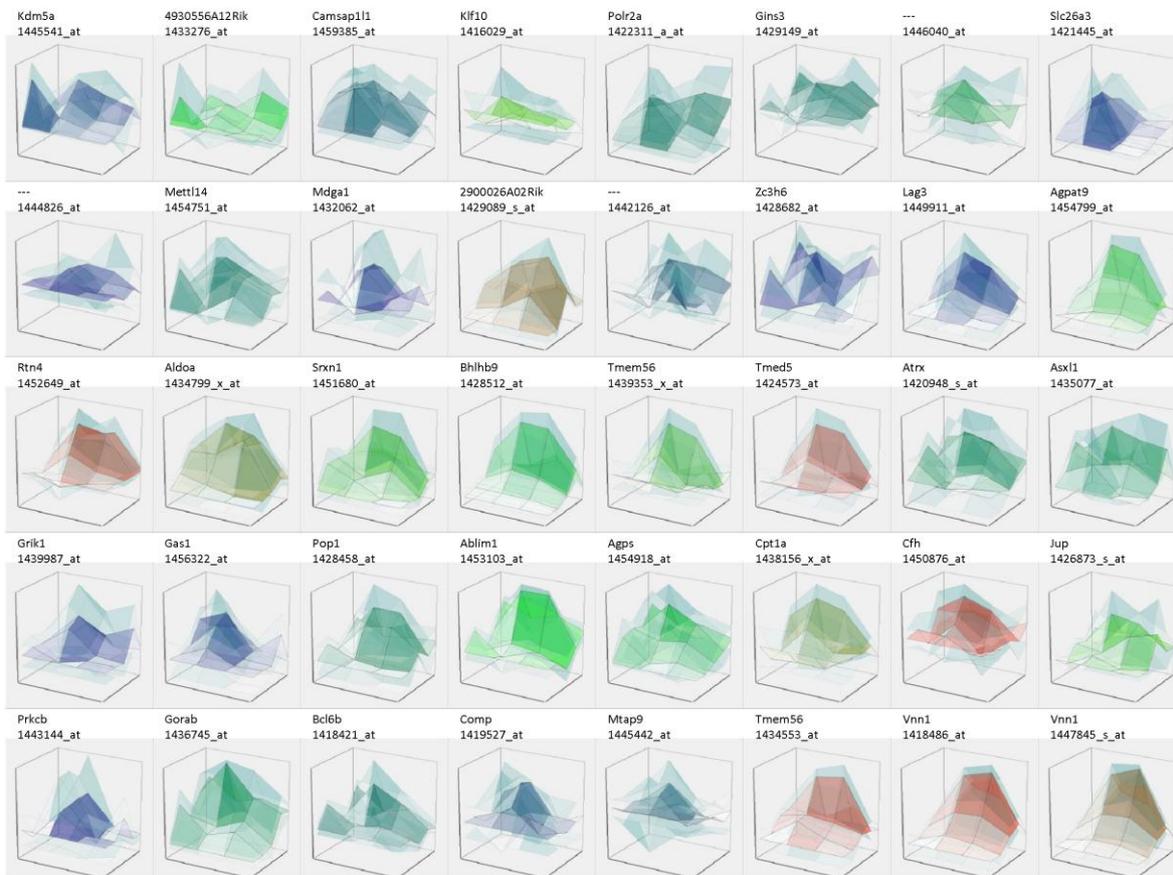


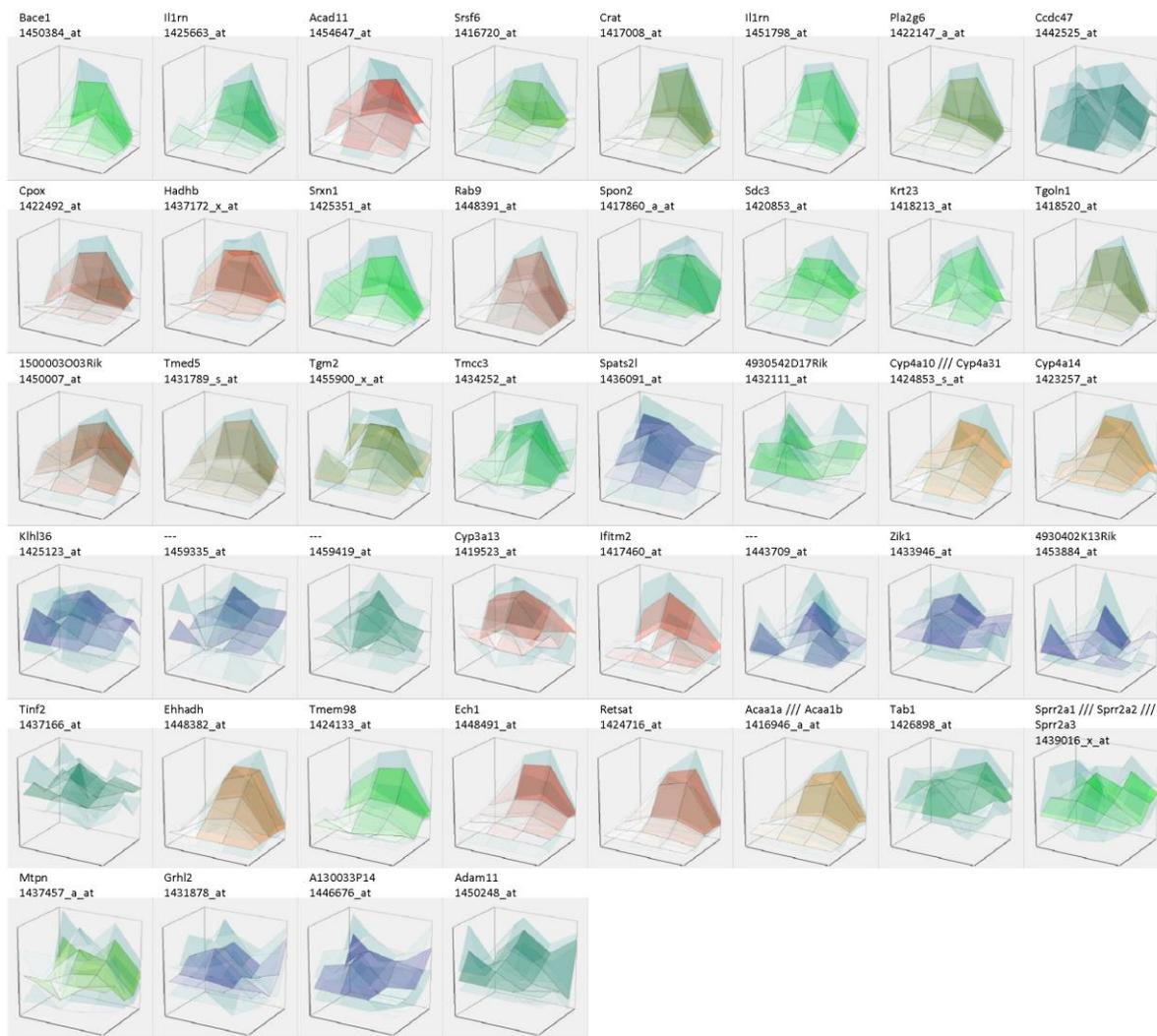


図(1)-13 複合暴露実験3 相乗遺伝子リスト

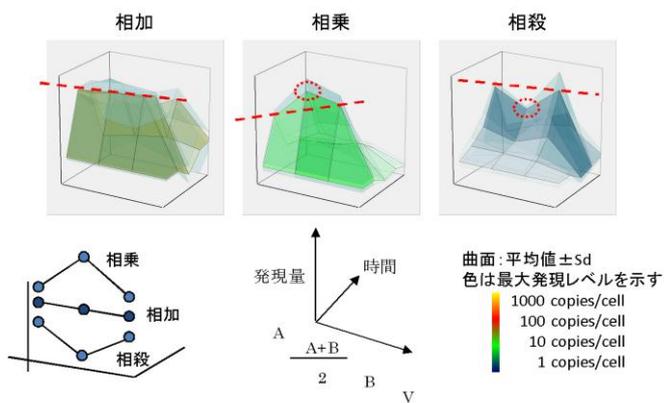


3次元曲面における相加、相乗、相殺パターン

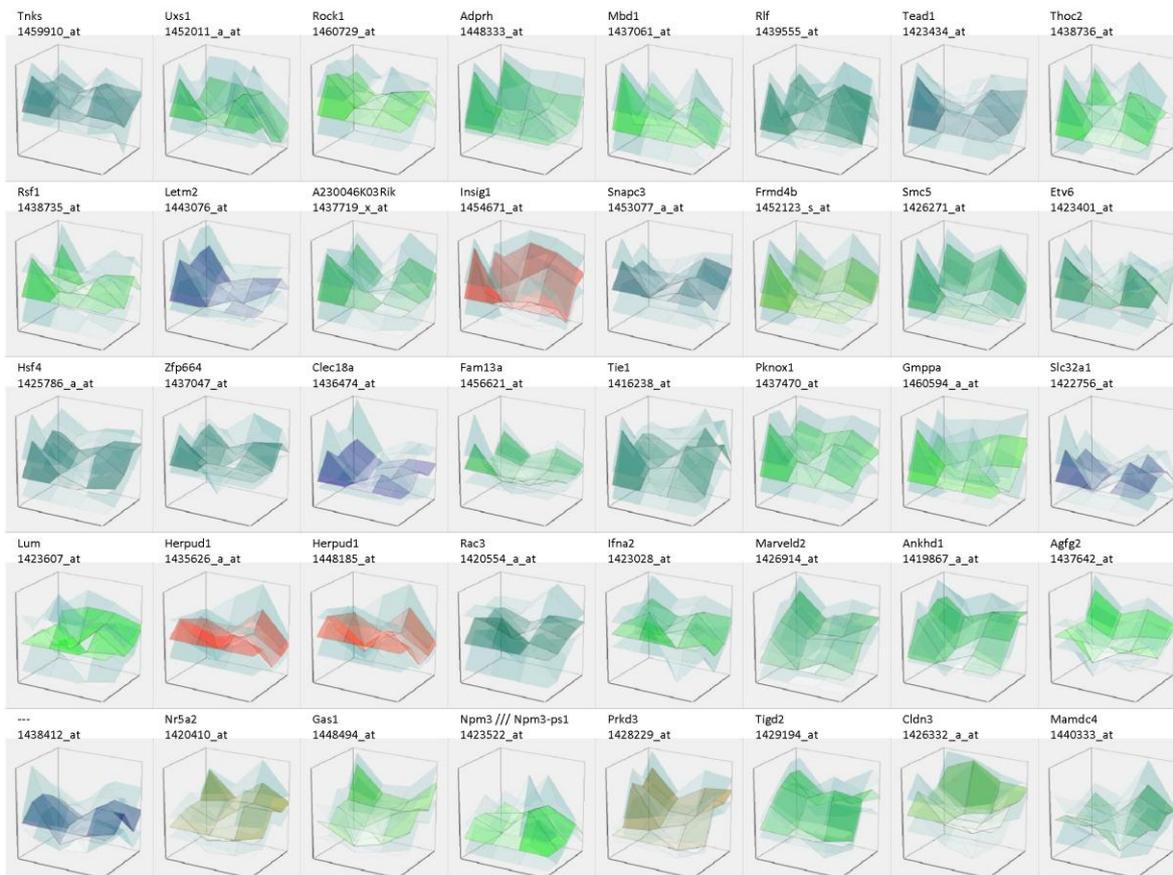


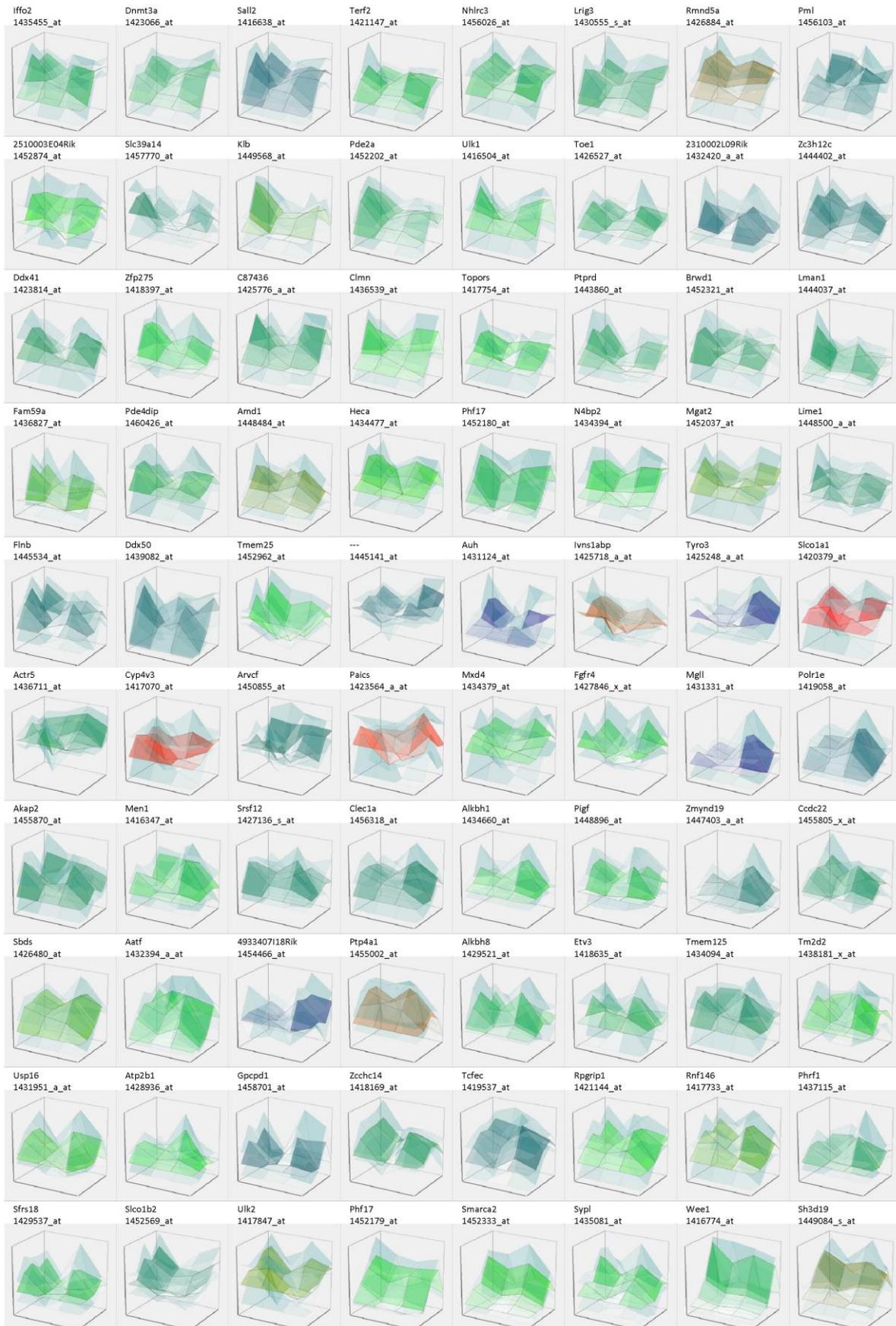


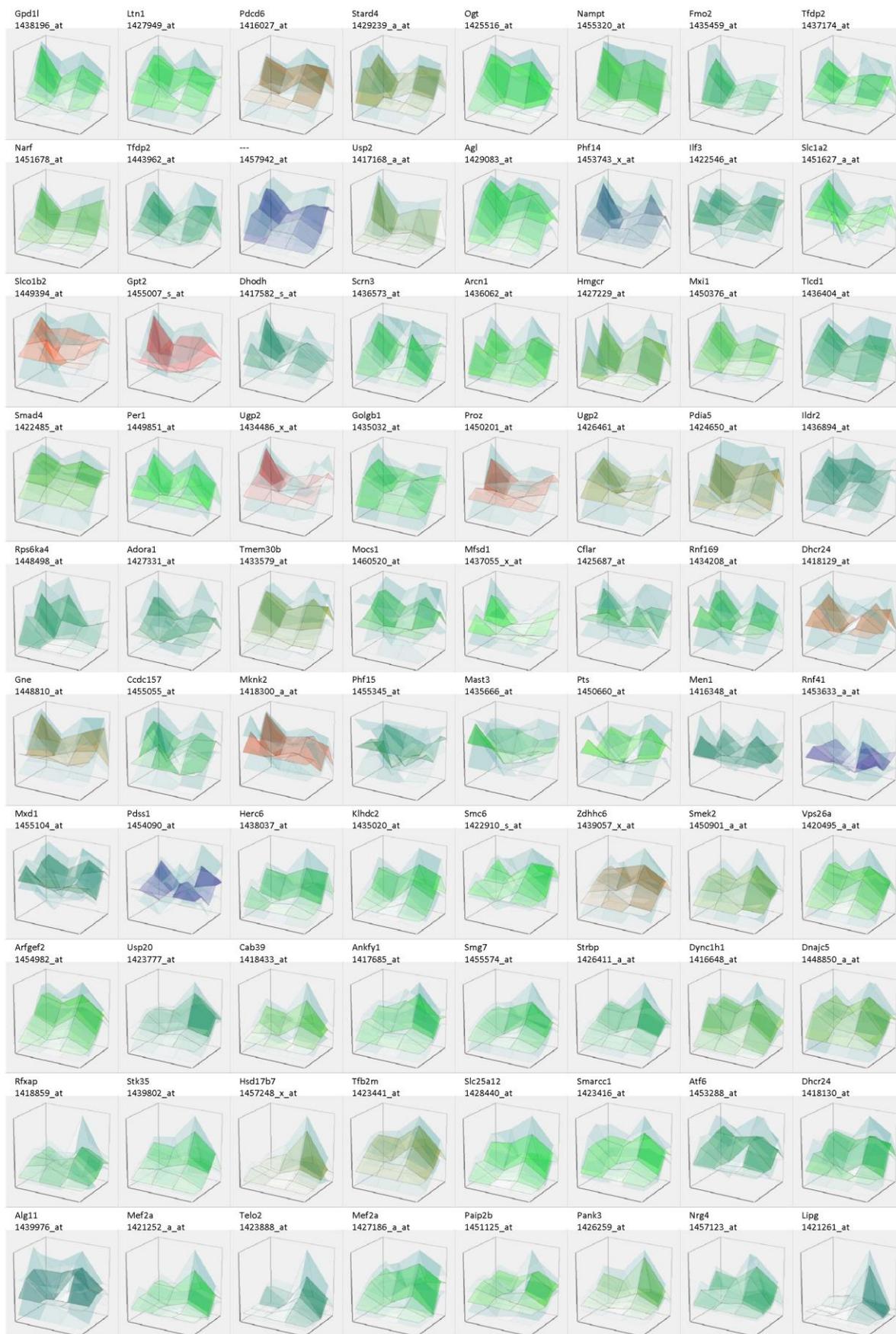
図(1)-14 複合暴露実験3 相殺遺伝子リスト

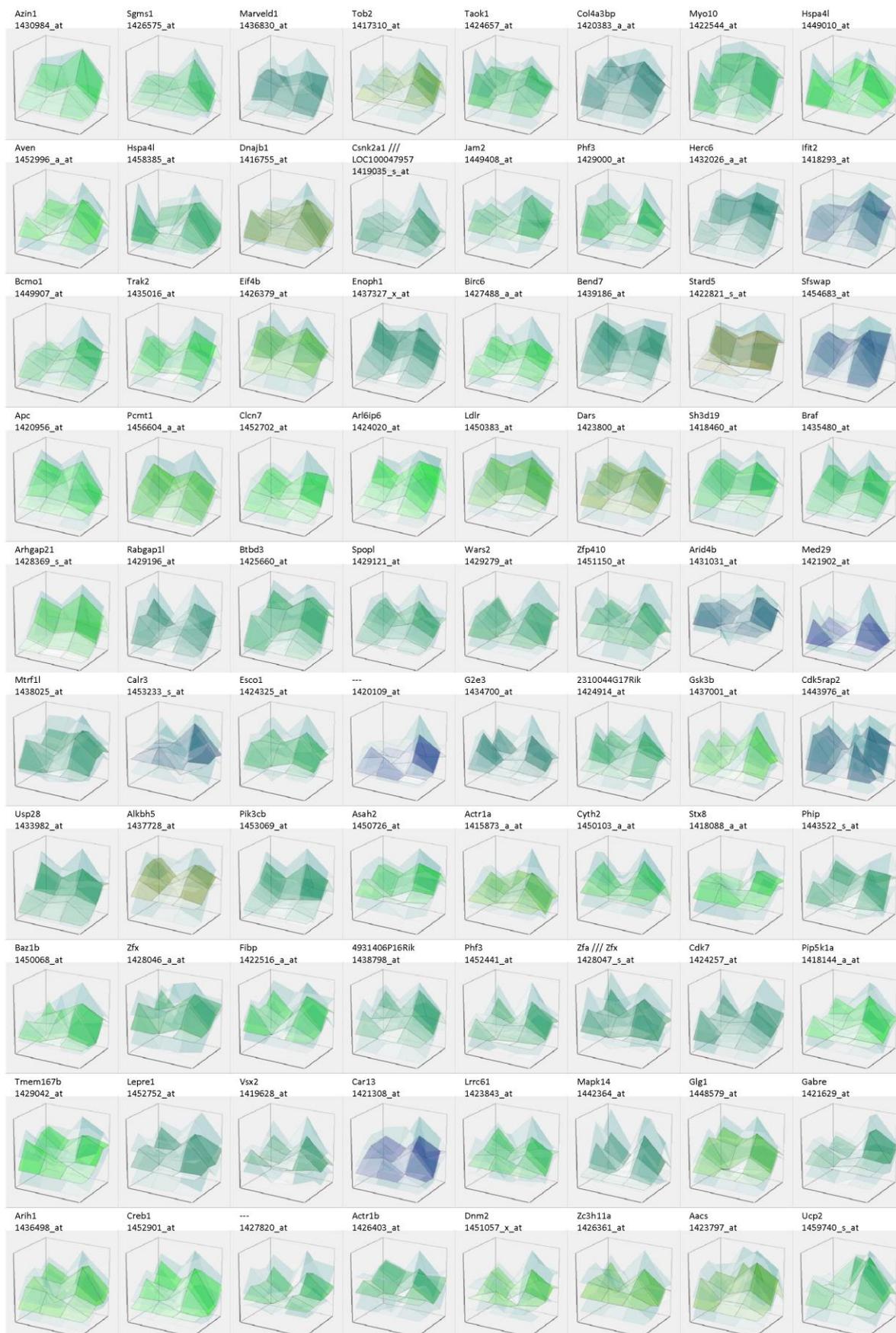


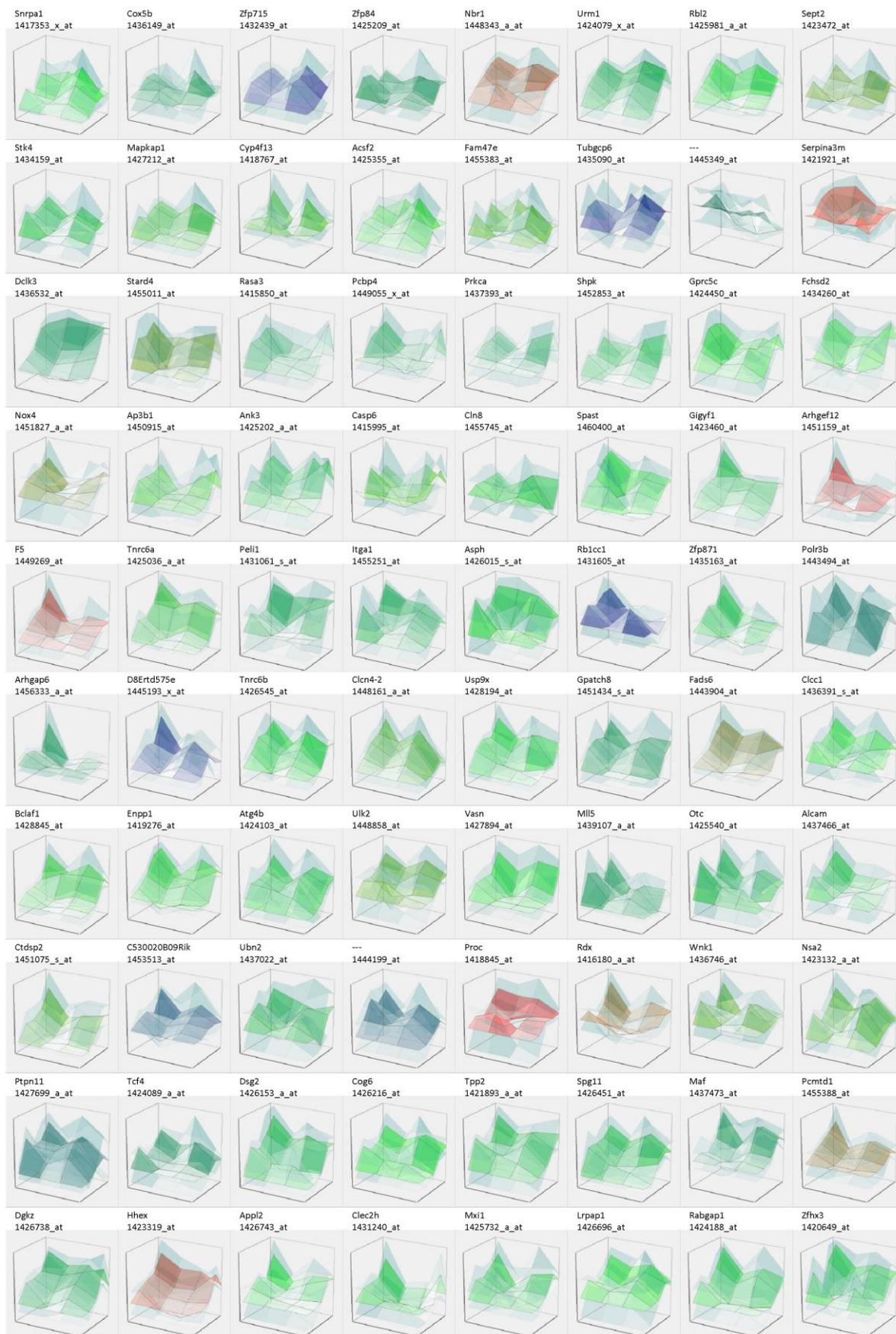
3次元曲面における相加、相乗、相殺パターン

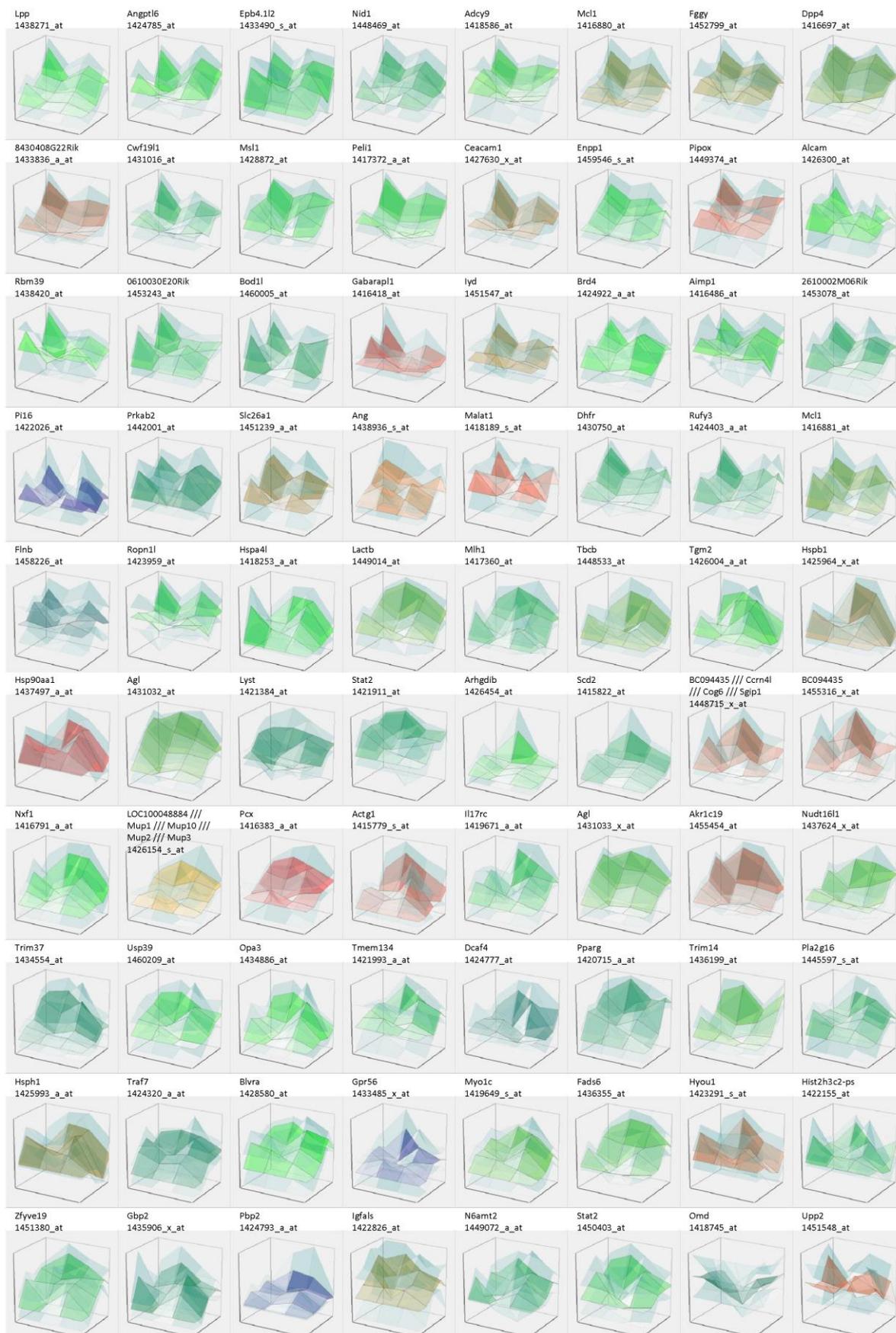






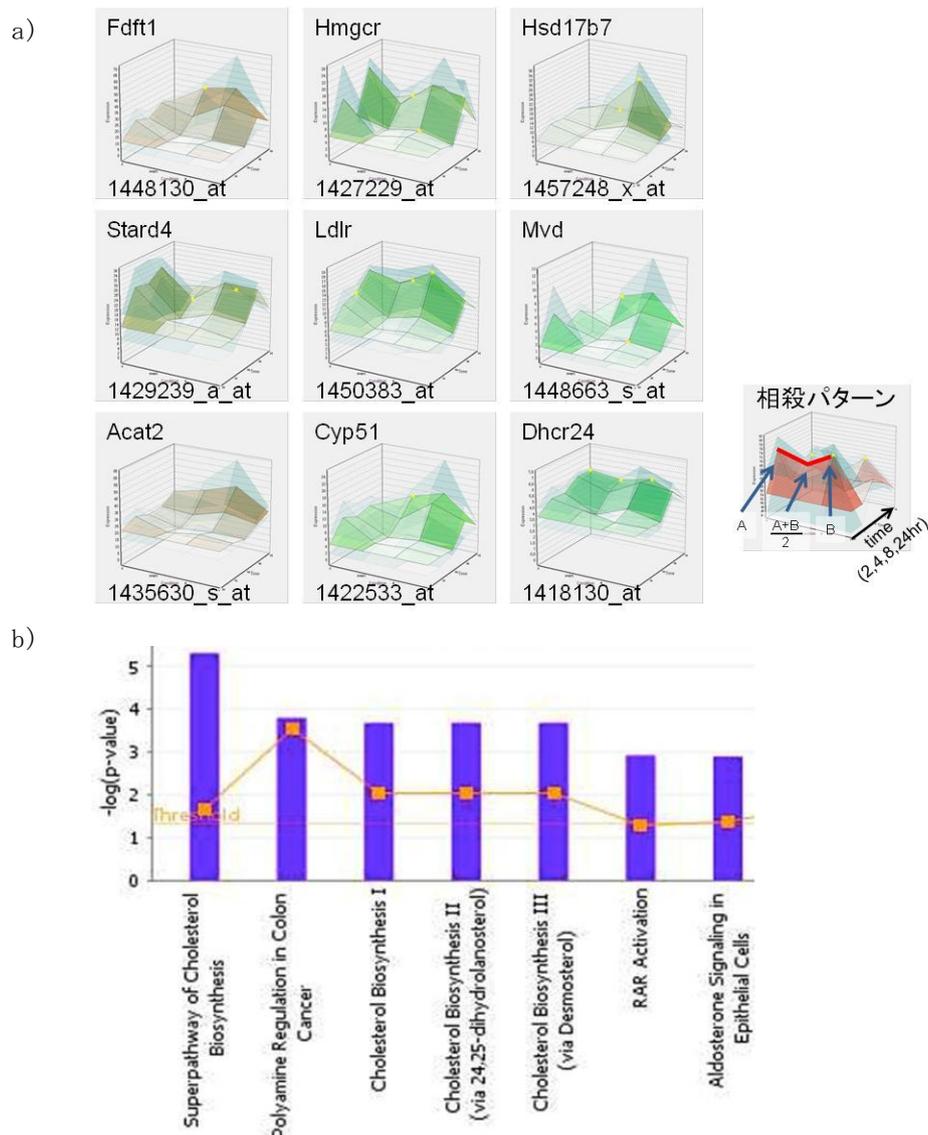








これらの遺伝子の機能解析を実施したところ、相殺影響を受ける遺伝子の多くがコレステロール生合成の関連遺伝子（Acat2, Cyp51, Dhcr24, Fdft1, Hmgcr, Hsd17b7, Ldlr, Mvd, Stard4）であることが判明した（図（1）-15）。これらの分子はコレステロール生合成回路の全体に分布しており、強固な抑制効果が予想される。この生合成回路への影響は単独暴露の際には観察さ



図（1）-15

a) 相殺発現を呈するコレステロール生合成遺伝子、b) 相殺発現を呈する候補遺伝子のGO解析

れず、このような相殺効果は従来知られていなかったものであり、環境化学物質の規制設定の参考になると共に、ドラッグシードとしての応用も考えられる。

(6) 複合効果を呈する遺伝子のプロモーター解析

複合暴露実験1, 2, 3の肝において相乗変化もしくは相殺変化を示した遺伝子を対象に、その転写制御において複合暴露に関連する特徴を調査すべく、TRANSFACおよびgeneExplainを用いてプロモーター解析を行った。その結果、特有のもの（該当条件でのみ存在）、共通のもの（該当条件の全候補遺伝子に共通）、および特徴的な転写因子コンビネーション（高頻度で共役するもの）の情報を得た（図（1）-16）。

| | | 特有 | 共通 | 転写因子コンビネーション |
|-----------------|----|--|---|--|
| CCI4 x トルエン | 相乗 | V\$P300_01 | V\$GATA4_Q3, V\$NKX25_02, V\$PPARG_02, V\$HOXA4_Q2, V\$DBP_Q6, V\$HAND1E47_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 | V\$DBP_Q6, V\$HMGY_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_Q1 |
| ディート x ベルメリン | 相乗 | V\$CEBP_Q2_01 | V\$NKX25_02, V\$DBP_Q6, V\$PPARG_02, V\$HMGY_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_Q2, 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_Q2, V\$NF1_Q6_01, V\$TBP_Q6, V\$POU3F2_Q2 | V\$NKX25_02, V\$GATA4_Q3, V\$PAX8_01, V\$PAX6_01, V\$HOXA4_Q2, V\$GEN_INI3_B, V\$DBP_Q6, V\$HMGY_Q6, V\$CDPCR3_01, V\$GRE_C | V\$AP2ALPHA_01, V\$COUP_DR1_Q6, V\$DR4_Q2, V\$HMGY_Q6, V\$HNF4ALPHA_Q6, V\$MTF1_Q4, V\$OCT1_Q2, 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_Q2, V\$PAX6_Q2, V\$VDR_Q3 |

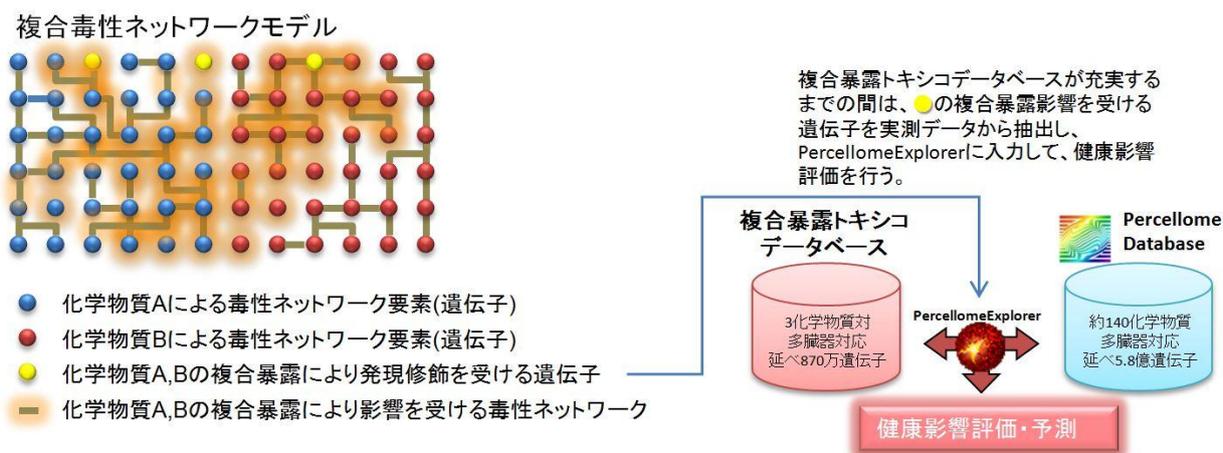
図（1）-16

現時点では3対の複合暴露実験のみを対象としているため、これらの情報を複合暴露の評価・予測に直接参照するには精度不足であるが、同様の複合暴露実験データを追加して標準データベース化してゆくことで信頼性が向上し、評価・予測判定の基盤情報の1つとなると期待される。

(7) 複合暴露評価・予測システムのプロトタイプ

Percellomeプロジェクトでは、既に単回暴露毒性についての評価・予測サポートシステムを実用化している。このシステムでは、約100化学物質を対象とした単回暴露実験のトランスクリプトーム解析データを基盤データベースとして利用し、検体による特徴的な遺伝子発現誘導情報を入力して、その毒性を評価・予測する。

本研究の成果を反映して構築されるべき「複合暴露評価・予測システム」は、既存の単回暴露用システムに、複合暴露特有の現象に対応する標準データベースと解析エンジンを結合させた構造になる（図（1）-17）。この複合暴露解析用の追加部分も、単回暴露用システムと原理的に同様のものとなる（参照する標準データベースの内容と、解析エンジンの設定が異なるだけ）ため、基本設計はほぼ終了している。



図(1)-17 複合作用評価・予測システムの構成図

複合暴露評価・予測システム用の標準データベース(複合暴露トキシコデータベース)も、収録すべきデータが複合暴露解析に特化しているだけで、データベース構造に特殊な部分は無く、基本構築も終了している。既に測定済みの複合暴露実験データを収録しており、研究的な用途に利用しつつ、システム稼働に必要な追加データに備えて待機している。

(8) 考察

本研究では、適切な実験設計を採用した3対の複合暴露実験における、網羅的で高精度のトランスクリプトームデータを得た。延べ870万遺伝子のデータであり、複合暴露評価、予測システムを稼働させるには不十分だが、その基本技術を開発し、システムのプロトタイプを構築し始めるには最小限ながら有用な情報となった。

これら3対の複合暴露実験結果を解析した結果、相加的な遺伝子発現挙動を示す遺伝子群が多数存在することが確認された。このことは、微量であっても多数の化学物質に複合暴露した場合、分子レベルではそれらの影響が加算され、ついには顕在化するリスクを示唆するものであり、今後の政策決定において環境中化学物質の量的規制を取り扱う際、留意点となる結果であると考えられた。

単独投与に比べ、複合投与において有意に遺伝子発現が増強(相乗効果)、あるいは減弱(相殺効果)する遺伝子も多数同定されたが、その大半は残念ながら機能未知であり、その意義については今後の研究の進展を待たざるを得ない。しかし上述したとおり、抽出された遺伝子リストの中には疾病や健康障害に関わると報告されている遺伝子(群)が複数含まれていた。

本研究で得られた最も重要な知見は、3対の複合暴露実験結果において、共通して相乗・相殺効果を示す遺伝子は稀であったことである。これは複合効果に関与する分子が固定したものでは無く、化学物質の組合せによって責任遺伝子群が変化することを示唆している。よって、複合暴露影響の有害性情報を迅速に政策決定へ反映させるには、本研究で基本技術を生成した複合効果の分子機序に基づく評価・予測システムの完成が必須である。

なお現時点で、複合暴露評価・予測システムは上述の通り、基本設計を終え構築を開始しているが、その基盤となる標準データベースの情報量が不足している。30対程度の複合暴露実験を追

加すれば必要最低限の情報規模が確保され、システム稼働が可能と推定している。具体的には、使用した6化学物質の組合せを変えた複合暴露実験を実施しつつ、これらとは独立した作用を有する化学物質の新規組合せ（Percellomeデータベースの単回暴露時データを参考にリストアップ済み）による実験を実施し、情報追加することで、可能になる見込みである。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

複合暴露は、生活環境、自然環境における生物（人や動植物）に対する化学物質暴露の一般的な形態であるが、従来の毒性評価手法では対応が困難なため、新たな有害性評価技術の開発が求められてきた。

本研究により、単一化学物質の分子毒性所見から、複数の化学物質暴露による複合影響の評価・解析、及び複合暴露影響を論理的に予測するインフォマティクス開発のための基盤を確立した。本研究で取得した複合暴露実験データは3対であるが、複合暴露解析に特化した高精度の網羅的トランスクリプトームデータは世界的にも稀であり、国際的なソフトウェアプラットフォームGARUDAを介したデータ公開（平成25年度中に開始予定）により、同種の研究活動の推進のみならず、今後の生命科学研究の進歩に伴う基礎医学研究の推進、新規化学物質の設計開発等に対する貢献が期待される。

(2) 環境政策への貢献

複数の併存する環境化学物質による複合暴露が日常化している状況下、複合暴露影響の評価、予測システムの構築は政策貢献上においても急務であるが、複合暴露問題が現行の毒性学では対応できていない上、本研究で明らかになったように、複合暴露影響に関与する分子が固定していない以上、現実的時間内に技術的に実現可能なアプローチは、トキシコゲノミクスを利用した本研究しかないと考えられる（現行の毒性評価方法では無限の組合せを試験せざるを得ず、現実的な時間内に解を求めることが出来ない）。

本研究で実施した複合暴露実験は3対のみではあるが、複合効果評価基準となる専用標準データベースの構築を開始し、基本的な解析・評価技術を開発した本研究の意義は大きい。

評価システム稼働のための必須条件となる標準データの追加取得は最短3年で実施可能（期間は研究予算に依存する）であり、その結果を加えることにより、複合暴露評価体制が確立し、立案した対応策が適切な提案か否か吟味することが可能になると見込まれる。これにより、人及び環境の安全・保全の質の向上とともに、被害の未然防止の結果としての除染、補償等の経費負担の回避が期待できる。

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない

<行政が活用することが見込まれる成果>

3対の環境化学物質の複合暴露実験により、相乗・相殺挙動をとる遺伝子以外の遺伝子の多く

は相加的な挙動を示すことが判明した。この所見は複合暴露に普遍的なものである可能性が高い。注目すべきは低濃度（無症候用量）において有意な遺伝子発現変動が観察された点、すなわち個々の化学物質が微量であっても多数の化学物質が併存した場合には、相加的な遺伝子発現レベルの上昇により生体影響が顕在化する可能性を示唆していた。このような複数の化学物質に跨がる量的監視は現在、分子標的が唯一であることを前提としたダイオキシン類に限って実施されているが、今後、より多くの環境化学物質について複数の分子標的を考慮しての、同様の管理体制の導入を検討する必要がある。

本研究は、単一化学物質の分子毒性所見から、複数の化学物質の複合暴露影響を論理的に予測するインフォマティクス開発の端緒となるものであり、既に基本技術の開発の大半を終え、残るは稼働に必要な標準データベースの拡充（研究予算規模に依存するが、過去実績では最短3年で実施可能な作業量）のみとした。実用化の暁には、リスク評価・管理業務として、生活環境や自然環境の複合暴露評価体制が確立し、これによる対応策の適正化が見込まれる。これにより、人及び環境の安全・保全の質の向上とともに、被害の未然防止の結果としての除染、補償等の経費負担の回避が期待できる。

6. 国際共同研究等の状況

Percellomeプロジェクトでは、北野 宏明博士（特定非営利活動法人システム・バイオロジー研究機構（SBI） 会長）が主催し、平成25年度中に一般公開が開始される国際的なライフサイエンス研究用ソフトウェアプラットフォーム研究開発計画、Garuda Alliance (www.garuda-alliance.org)に参加し、世界有数規模を誇るPercellomeトキシコゲノミクスデータベースの提供を行うが、その一環として、本研究成果である複合暴露におけるトランスクリプトームデータの提供を予定している。

Garuda Allianceは”Garuda Platform”という共通インターフェイスや一連のソフトウェア提供・管理システムの構築を通じ、ライフサイエンス研究の解析技術・ソフトウェアの集約と、それによる相乗的な研究推進を目的とした、独創的な国際共同研究計画である。計画にはUniversity of Southern California（米）、University of Luxembourg（独）、University of Manchester（英）、University of Monash（豪）、Gwangju Institute of Science and Technology（韓）、東京大学（日）、理化学研究所（日）、慶応大学（日）、沖縄科学技術大学院大学（日）など、世界のアカデミア、バイオ企業が参加しているが、特にインフォマティクス領域に強いメンバーが多く、複合暴露影響の解析のように複雑な解析が必要な問題の解決における共同研究成果が期待できる。

7. 研究成果の発表状況

（1）誌上発表

<論文（査読あり）>

特に記載すべき事項はない

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない

(2) 口頭発表 (学会等)

特に記載すべき事項はない

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

(4) シンポジウム、セミナー等の開催 (主催のもの)

- 1) 第37回日本トキシコロジー学会 毒性オミクスシンポジウム(平成22年6月16日、沖縄コンベンションセンター、観客150名)
- 2) 第38回日本トキシコロジー学会 毒性オミクスシンポジウム(平成23年7月12日、パシフィコ横浜 会議センター、観客170名)
- 3) 第39回日本毒性学会 毒性オミクスシンポジウム(平成24年7月17日、仙台国際センター、観客150名)
- 4) 第39回日本毒性学会 子どもの毒性学シンポジウム(平成24年7月17日、仙台国際センター、観客120名)

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

(6) その他

特に記載すべき事項はない

8. 引用文献

- 1) N. Matsunaga, J. Kanno, C. Hamada and I. Yoshimura: Environmetrics, 20, 1-13 (2009)
“An experimental design for judging synergism on consideration to endocrine disruptor animal experiments.”
- 2) J Kanno, K. Aisaki, K. Igarashi, N. Nakatsu, A. Ono, Y. Kodama and T. Nagao: BMC Genomics, 7, 64(2006), ““Per cell” normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays.”
- 3) D.R. Laurence & P.N. Bennett: Churchill Livingstone, (1980), “Clinical Pharmacology”
- 4) Y. Jinm, HP. Kim, E. Ifedigbo, LF. Lau, AM. Choi: Am J Respir Cell Mol Biol, 33, 297-302(2005), “Cyr61 protects against hyperoxia-induced cell death via Akt pathway in pulmonary epithelial cells.”
- 5) M. Rumelhard, K. Ramgolam, F. Auger, AC. Dazy, S. Blanchet, F. Marano and A. Baeza-Sguiban: Toxicology Letters, 168, 155-164(2007), “Effects of PM2.5 components in the release of amphiregulin by human airway epithelial cells.”

(2) 複合暴露実験

中央労働災害防止協会
試験管理部

日本バイオアッセイ研究センター
加納 浩和

平成22～24年度累計予算額：12,003千円（うち、平成24年度予算額：4,001千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

C57BL/6J系雄マウスに環境化学物質2種を同時に単回強制経口投与し、その毒性を単一での投与と比較することにより、複合暴露影響の質的及び量的な修飾を検証した。具体的には複合暴露実験1で四塩化炭素とトルエン、複合暴露実験2でディートとペルメトリン、複合暴露実験3でフタル酸ビス（2-エチルヘキシル）（=DEHP）とビスフェノールAの3対を選定し、各単一暴露群、複合暴露群を設け、さらに、各群内に、投与終了後2時間目、4時間目、8時間目及び24時間目の解剖時点を設けた。

観察、検査として、一般状態の観察、体重測定、剖検、臓器重量測定、病理組織学的検査を実施した。いずれの複合暴露実験においても、一般状態の観察を投与直前、投与直後及び各解剖期の解剖直前に実施したが、異常所見はみられなかった。また、体重測定を各解剖時点の解剖直前に実施したが、被験物質投与に関連すると考えられる体重の変動はみられなかった。

剖検、病理組織学的検査及び臓器重量測定でも被験物質投与の影響と考えられるものは認められなかった。

以上のことから、実施した3対の複合暴露実験では、一般状態、体重、剖検、臓器重量及び病理組織学的検査で、単一投与、複合投与とも影響が検出されなかった。これは、本研究の遺伝子発現ネットワークの描出という目的のために設定した、明確な毒性所見が発現しない用量（無症候用量）での検体採取実験が計画通り厳密に遂行されたことを示し、サブテーマ遺伝子発現情報解析で生成したデータの品質を裏付けるものである。

[キーワード]

複合暴露、環境化学物質、マウス、無症候用量

1. はじめに

複合暴露は、生活環境、自然環境における生物（人や動植物）に対する化学物質暴露の一般的形態であるにもかかわらず、従来の毒性評価手法では対応が困難なため、新たな有害性評価技術の開発が求められている。

従来の毒性評価のための動物実験プロトコルの基本部分を用いて、群構成と投与法を改変すれば、複合暴露実験を行うことは可能である。ただし、これにより得られた検体の評価法に複合影響判定の困難さがある。即ち、従来の病理学的・生化学的・生理学的検査では、複数の要因が作用した結果の総体としての解剖時の最終的な所見が得られることから、その成り立ちを複数の化学物質の影響に分解・合成することが困難である。複合影響の詳細を従来法で行う為には、2つの

物質の比率を変化させるなどの手段が考えられるが、比率ごとに実験を繰り返す必要があり、非現実的であった。

これに対処するためには、毒性の分子機序に基づく評価方法が必要であり、化学物質の単独暴露実験の結果を、合成可能な形式で測定・記録する方法の開発が待たれている。現時点で実用化に最も近い測定・評価技術は、マイクロアレイなど網羅的な遺伝子発現解析技術を用いたトキシコゲノミクスである。その中でも、細胞1個あたりのmRNA発現量を測定し、網羅的な遺伝子発現解析を可能としたPercellome法¹⁾は、測定精度が高い、データ比較が飛躍的に効率化されるという優位性のほかに、延べ270余の実験結果を統合したトキシコゲノミクスデータベースを有していることから、効率的かつ迅速な複合暴露評価技術開発が期待できる。

2. 研究開発目的

化学物質の複合暴露評価技術を開発するために、モデルとなる化学物質対を単独もしくは複合暴露し、その毒性を比較することにより、複合暴露影響の質的及び量的な修飾を検証する。またトキシコゲノミクス解析で用いる高品質のRNA用サンプルを高再現性が実証されている厳格な手順により採取し、サブテーマ遺伝子発現情報解析に提供して、複合暴露評価技術の開発のための基礎データ取得を支援する。

3. 研究開発方法

モデルとなる対の化学物質について実験動物に複合暴露を行い、動物を解剖して mRNA 測定用等の臓器を採取すると共に、剖検等の検査を行った。

(1) 動物

動物は、日本チャールス・リバー(株)の C57BL/6J マウス (SPF) の雄を使用した。雄 70 匹を 10 週齢で導入し、2 週間の馴化を実施した。発育順調で一般状態に異常を認めなかった動物から、体重値の中央値に近い 48 匹を選別し、試験に用いた。

(2) 飼育条件

動物は、全飼育期間を通して以下の環境で飼育した。

温度 : 23±2℃

湿度 : 55±15%

明暗サイクル : 12 時間点灯 (8:00~20:00) / 12 時間消灯 (20:00~8:00)

換気回数 : 15~17 回/時

ケージへの動物の収容方法 : 単飼

ケージの材質・形状・寸法等 :

ステンレス製 2 連網ケージ (112(W)×212(D)×120(H) mm/匹)

飼料は、全飼育期間を通して、オリエンタル酵母工業(株)の CRF-1 固形飼料 (30kGy- γ 線照射滅菌飼料) を使用し、固形飼料給餌器により自由摂取させた。

試験に使用した飼料の栄養成分と夾雑物については、オリエンタル酵母工業(株)から分析データを使用ロットごとに入手し、保管した。また、飼料中の夾雑物は本試験計画書に規定した許容

基準と照合して異常のないことを確認し、保管した。

飲水は、全飼育期間を通して、市水（神奈川県秦野市水道局供給）をフィルターろ過した後、紫外線照射して用い、自動給水装置（給水ノズル）により自由摂取させた。

また、試験施設として実施している定期サンプリングにより、飲水サンプルの検査を(財)食品薬品安全センター秦野研究所に依頼して、水道法を参考にして規定した項目について分析し、結果を試験計画書に規定した許容基準と照合して異常のないことを確認し、保管した。

(3) 試験群の構成及び動物数

試験群は下表の計 4 群とした。動物数は 1 群当たり 3 匹、経時的サンプリングを投与終了後 4 時点（2 時間後、4 時間後、8 時間後、及び 24 時間後）に実施し、計 48 匹とした。

| | 化学物質 (A) | 化学物質 (B) |
|-----------|----------|----------|
| 溶媒対照群 | — | — |
| 複合暴露群 | 0.5 倍量 | 0.5 倍量 |
| 単独暴露群 (A) | 1 倍量 | — |
| 単独暴露群 (B) | — | 1 倍量 |

群分けは、投与前日に行った。供試動物の各群への割り当ては、一般状態及び体重の推移に異常を認めない動物を体重の重い順より各群に 1 匹ずつ割り当て、二巡目からは各群の動物の体重の合計を比較して、小さい群より順に体重の重い動物を割り当てることにより、群間の体重の偏りを小さくする群分け方法（適正層別方式）²⁾により実施した。

動物の個体識別は、検疫、馴化期間及び観察期間を通してケージに個体識別番号を記したラベルを付すことにより行なった。

(4) 被験物質の特性・同一性、安定性

被験物質の同一性は、赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計（(株)島津製作所 FTIR-8200PC）により測定し、文献値^{3,4)}と比較し確認した。

また被験物質の安定性は、使用開始前及び使用終了後に赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計（(株)島津製作所 FTIR-8200PC）を用いて測定し、それぞれのデータを比較することにより確認した。

(5) 被験物質の用量

各被験物質の投与用量は、国立医薬品食品衛生研究所・毒性部における、網羅的遺伝子発現変動解析に向けた用量設定実験（単回投与）の際に、一般状態の変化ならびに、投与 24 時間後の剖検時に顕著な所見が認められないという条件の下で設定した。

複合暴露実験 1 : (A) 四塩化炭素、(B) トルエン
溶媒 コーンオイル

| | |
|-----------|------------------------|
| 溶媒対照群 | A=0mg/kg, B=0mg/kg |
| 複合暴露群 | A=3.5mg/kg, B=500mg/kg |
| 単独暴露群 (A) | A=7.0mg/kg, B=0mg/kg |
| 単独暴露群 (B) | A:=0mg/kg, B=1000mg/kg |

複合暴露実験 2 : (A) デイート、(B) ペルメトリン

| | |
|-----------|-----------------------|
| 溶媒 | コーンオイル |
| 溶媒対照群 | A=0mg/kg, B=0mg/kg |
| 複合暴露群 | A=50mg/kg, B=0mg/kg |
| 単独暴露群 (A) | A=100mg/kg, B=0mg/kg |
| 単独暴露群 (B) | A:=0mg/kg, B=100mg/kg |

複合暴露実験 3 : (A) フタル酸ビス (2-エチルヘキシル)、(B) ビスフェノールA

| | |
|-----------|------------------------|
| 溶媒 | 0.1%DMSO添加コーンオイル |
| 溶媒対照群 | A=0mg/kg, B=0mg/kg |
| 複合暴露群 | A=350mg/kg, B=150mg/kg |
| 単独暴露群 (A) | A=700mg/kg, B=0mg/kg |
| 単独暴露群 (B) | A:=0mg/kg, B=300mg/kg |

(6) 被験物質の調製

用時調整した。なお液中の被験物質の濃度は、ガスクロマトグラフを用いて確認し、設定濃度に対して正確に調製されたことを確認した。

(7) 投与方法

0.5 mL ガラス製注射筒 (株)トップ) 及びマウス用金属ゾンデ (KN-348/マウス経口ゾンデ 針 夏目製作所) を用いて、投与液 10 mL/kg を強制経口投与した。なお個体ごとの投与液量は、投与前日の体重を基準に算出した。投与回数は、1回とし、定められた時刻 (10時15分) に対して前後15分以内 (10時00分~10時30分) に投与を終了し、投与開始・終了時刻を記録した。

(8) 動物の検査及び臓器の保存

投与後2、4、8、及び24時間目に深麻酔下に脱血後、臓器採取を行った。1匹当たり2分半から3分以内に脱血及び、肝、腎、肺の計3臓器採取を行った。臓器採取に際しては、特にmRNA分解を最小限に抑えるため、RNA保護試薬 (RNAlater®, Applied Biosystems社) の肺内注入や肝・腎のRNAlater浸透処理を行った。

(9) 病理組織学的検査

病理組織学検査用に採取した腎 (通常は右腎を用いるが、剖検で異常が見つかった場合は左腎を対象とする)、肝及び肺について、切り出し、パラフィン包埋を行った。その後、薄切、ヘマ

トキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡で病理組織学的に検査した。

(10) 倫理面への配慮

本動物実験は、平成18年4月28日付、環境省告示第88号「実験動物の飼育及び保管ならびに苦痛の軽減に関する基準」、平成18年6月1日付け、厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本方針」及び平成18年11月27日付け、日本バイオアッセイ研究センター制定「動物実験に関する指針」を遵守した。また本試験は日本バイオアッセイ研究センターの動物実験委員会で承認された。

4. 結果及び考察

(1) 被験物質の特性・同一性、安定性

被験物質の同一性は、赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計（(株)島津製作所 FTIR-8200PC）により測定し、文献値^{3,4)}と比較し確認した。

また被験物質の安定性は、使用開始前及び使用終了後に赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計（(株)島津製作所 FTIR-8200PC）により測定し、それぞれのデータを比較することにより確認した。

(2) 複合暴露実験1（四塩化炭素、トルエン）の一般検査及び病理学的検査

いずれの群にも動物の死亡はなく、投与直前、投与直後及び解剖直前とも、一般状態にも異常所見はみられなかった。

各解剖時点の動物について、解剖直前に実施した体重測定では、被験物質投与に関連すると考えられる体重変動はみられなかった。

剖検では、投与2時間後解剖のトルエン単一ばく露群の1匹と投与8時間後解剖の複合ばく露群の1匹の左腎に水腎症が認められた。また、投与8時間後解剖の四塩化炭素単一ばく露群の1匹の左腎に結節が認められた。その他の動物には、特記すべき剖検所見は認められなかった。

臓器重量では、投与2時間後解剖のトルエン単一ばく露群の1匹に、右腎臓の実重量と体重比の高値が認められた。投与8時間後解剖の複合ばく露群の1匹に、左腎臓の実重量と体重比の高値が認められた。その他の動物の肝臓と腎臓の実重量と体重比には、顕著な低値や高値は認められなかった。

病理組織学検査では、投与2時間後解剖のトルエン単一ばく露群の1匹と投与8時間後解剖の複合ばく露群の1匹の左腎に水腎症が認められた。また、投与8時間後解剖の四塩化炭素単一ばく露群の1匹の左腎に瘢痕が認められた。その他の動物には、肝を含め特記すべき病理組織学的所見を認めなかった。

腎重量の高値については、検出されたいずれの場合も、水腎症を有していたことから、被験物質投与による影響ではなく、個体差によるものと判断した。

1匹のマウスにおいて、水腎症が観察されたが、水腎症はこの系統のマウスに自然発生として通常みられる所見であること、当該動物以外には腎に病理組織学的な異常を認めなかったことから、投与による影響ではないと判断した。同様に1匹のマウスにおいて、結節（病理学検査では

癒痕と認められた)が観察されたが、これもこの系統のマウスに自然発生として通常みられる所見であることから、投与による影響ではないと判断した。

(3) 複合暴露実験2 (ディート、ペルメトリン) の一般検査及び病理学的検査

いずれの群にも動物の死亡はなく、投与直前、投与直後及び解剖直前とも、一般状態にも異常所見はみられなかった。

各解剖時点の動物について、解剖直前に実施した体重測定では、被験物質投与に関連すると考えられる体重変動はみられなかった。

剖検では、投与24時間後解剖の複合ばく露群の1匹の左腎に水腎症と長径3mmの結節が認められた。その他の動物には、特記すべき剖検所見は認められなかった。

臓器重量では、投与4時間後解剖のディート単一ばく露群の1匹に、肝の実重量と体重比の低値、左右腎の実重量と体重比の高値が認められた。その他の動物の肝と腎の実重量と体重比には、顕著な低値や高値は認められなかった。

病理組織学検査において、肝では特記すべき所見は認められなかった。腎では、投与24時間後解剖の複合ばく露群の1匹の左腎に水腎症と限局性尿細管萎縮(剖検で認められた結節の部分)が認められた。その他の動物には特記すべき所見は認められなかった。

肺では、投与2時間後解剖動物のペルメトリン単一ばく露群の1匹に、肺の細気管支上皮に過形成と杯細胞過形成、肺泡領域に肺胞上皮の過形成と扁平上皮化生、及び炎症性細胞浸潤が認められた。その他の動物には、特記すべき所見は認められなかった。

臓器重量の低値もしくは高値については、検出されたいずれの場合も、特定の群のみにみられた変化ではなく、病理組織学的に異常を認めなかったことから、被験物質投与による影響ではなく、個体差によるものと判断した。

1匹のマウスにおいて、結節を伴う水腎症が観察されたが、水腎症はこの系統のマウスに自然発生として通常みられる所見であること、当該動物以外には腎に病理組織学的な異常を認めなかったことから、投与による影響ではないと判断した。結節(限局性尿細管萎縮)は、水腎症によって萎縮した腎乳頭部に認められたことから、水腎症に伴って発生した偶発病変と考えられた。また1匹のマウスにおいて肺の細気管支に上皮の過形成と杯細胞過形成、肺泡領域に肺胞上皮の過形成と扁平上皮化生、及び炎症性細胞浸潤が認められたが、これらの変化は一本の細気管支とそれに繋がる肺泡領域だけに限局した変化として認められ、組織奇形と考えられた。

(4) 複合暴露実験3 (DEHP、ビスフェノールA) の一般検査及び病理学的検査

いずれの群にも動物の死亡はなく、投与直前、投与直後及び解剖直前とも、一般状態にも異常所見はみられなかった。

各解剖時点の動物について、解剖直前に実施した体重測定では、被験物質投与に関連すると考えられる体重変動はみられなかった。

剖検では、投与24時間後解剖のビスフェノールA単一曝露群にて、左腎にのう胞のある個体1匹が認められた。その他の動物には、特記すべき剖検所見は認められなかった。

肝、腎の臓器重量については、投与2時間後解剖の複合ばく露群1匹、DEHP単一ばく露群1匹、

投与 4 時間後解剖の複合ばく露群 1 匹、DEHP 単一ばく露群 1 匹、投与 8 時間後解剖の複合ばく露群 1 匹、投与 24 時間後解剖の DEHP 単一ばく露群 1 匹) に、肝の実重量と体重比の低値が認められた。また、これらの動物は、腎の実重量と体重比もやや高値であった。その他、投与 24 時間後解剖のビスフェノール A 単一ばく露群 2 匹の腎実重量と体重比もやや高値であった。その他の動物の肝と腎の実重量と体重比には、顕著な低値や高値は認められなかった。

病理組織学検査において、肝と肺では、特記すべき所見は認められなかった。

腎では、投与 8 時間後解剖の DEHP 単一ばく露群の 1 匹の右腎と投与 24 時間後解剖のビスフェノール A 単一ばく露群の 1 匹の左腎に水腎症が認められた。その他の動物には特記すべき所見は認められなかった。

臓器重量の低値もしくは高値については、検出されたいずれの場合も、特定の群のみにみられた変化ではなく、病理組織学的に異常を認めなかったことから、被験物質投与による影響ではなく、個体差によるものと判断した。

また何匹かのマウスにおいて、水腎症が観察されたが、この系統のマウスに自然発生として通常みられる所見であること、当該動物以外には腎に病理組織学的な異常を認めなかったことから、投与による影響ではないと判断した。

(5) 判定

以上のことから、本実験で実施した、複合暴露実験においては、いずれの場合も一般状態、体重、剖検、臓器重量及び病理組織学的検査で、計画どおり、単一投与による影響は認められず、また、複合ばく露による影響も検出されなかった。

またサブテーマ遺伝子発現情報解析で測定した遺伝子発現データにおいても、概日リズムの乱れを示す異常は検出されず、Percellome 遺伝子発現解析に適した高品質の mRNA 測定用サンプル採取が成されたことを確認した。

(6) 考察

本サブテーマの結果は、実施した検査項目上、単一投与、複合投与とも完全な陰性データであり、溶媒対照群との有意差は一切無いが、サブテーマ遺伝子発現情報解析の結果の通り、遺伝子発現レベルでは有意な遺伝子発現変動が観察されている。

もし通常の動物試験のように、本サブテーマで実施した検査項目で検知されるほどの化学物質を投与してしまった場合、そのサンプルを用いた遺伝子発現情報解析では、毒性症状に直接関連する、毒性ネットワークの最下流の遺伝子変動に隠れ、本来、研究すべき上流ネットワークの検出、解析が困難になる。これは今後、遺伝子発現変動測定を含む試験計画を立案する際に留意すべきポイントである。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

複合暴露は、生活環境、自然環境における生物（人や動植物）に対する化学物質暴露の一般的な形態であるが、従来の毒性評価手法では対応が困難なため、新たな有害性評価技術の開発が

求められてきた。

本研究により、単一化学物質の分子毒性所見から、複数の化学物質暴露による複合影響の評価・解析を可能とする、複合暴露影響を論理的に予測するインフォマティクス開発への道が開かれる。本研究のようなインフォマティクス開発においては、基盤となる生体データの品質は極めて重要である。測定が高感度であるほど、些細な誤差が解析の障害となり、しかも解析の初期のうちにはそれが誤差であるとの認識が難しく、最終的な開発段階に至って初めて障害として気付かれることも多い。本研究に於いては、厳密な飼育環境維持(特に照明制御による概日リズムの同調化)の下、mRNA用サンプル採取に最適化された高度な動物実験を実施し、単独投与群(各1)、複合投与群(1)、溶媒対照群(1)の4群(n=3)につき、投与後2、4、8、24時間に採取した肝、肺、腎の計144サンプルを得た。

これらのサンプルから得られる高精度かつ網羅的なトランスクリプトーム情報は、本研究目的である複合暴露影響の評価・予測技術開発だけでなく、さらに、生命活動の重要な分子機序であるシグナルネットワークの解明等に欠かせないものであり、生命科学研究の進歩に伴う基礎医学研究の推進、新規化学物質の設計開発など、に対する長期的な波及効果は極めて大きい。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない

<行政が活用することが見込まれる成果>

特に記載すべき事項はない

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

特に記載すべき事項はない

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない

<その他誌上発表(査読なし)>

特に記載すべき事項はない

(2) 口頭発表(学会等)

特に記載すべき事項はない

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

(6) その他

特に記載すべき事項はない

8. 引用文献

- 1) J Kanno, K. Aisaki, K. Igarashi, N. Nakatsu, A. Ono, Y. Kodama and T. Nagao: BMC Genomics, 7, 64(2006)
“Per cell” normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays.”
- 2) 阿部正信: 薬理と治療、14、7285-730 (1986)
“長期毒性試験に用いるラット、マウスの体重変化の解析による群分けの適正層別方式の確立.”
- 3) Bio-Rad Laboratories. 2009.
“4366 Pesticides & Agricultural Chemicals. Bio-Rad’s IR Spectral Database.”
- 4) FW. McLafferty, ed.: Jone Wiley and Sons. (1994)
“Wiley Registry of Mass Spectral Data. 6th ed.”

Molecular Toxicology Study for Risk Assessment of Combined Exposure to Environmental Chemicals

Principal Investigator: Jun KANNO

Institution: National Institute of Health Sciences (NIHS)

Address: 1-18-1 Kamiyoga, Setagawa-ku, Tokyo 158-8501, Japan

TEL: +81-3-3700-9619, FAX: +81-3-3700-9647

E-mail address: kanno@nihs.go.jp

Cooperated by: Japan Bioassay Research Center

[Abstract]

Key Words: Combined effect, Combined exposure, Percellome Toxicogenomics, Mouse, Synergistic effect

The goal of this research is to develop a molecular-mechanism-based prediction informatics system for prediction of combined effect of more than one chemical simultaneously administered. Percellome Toxicogenomics system is applied to the combined exposure model using mice. Four groups of 12 male C57BL/6 mice each were administered, by single oral gavage, either Chemical A alone, Chemical B alone, half amounts of Chemical A and Chemical B as combined exposure, and vehicle common to both chemicals. Liver, lung and kidney for mRNA analysis by Affymetrix GeneChip Mouse 430 2.0 were sampled at 2, 4, 8, and 24 hours after gavage (n=3 each). GeneChip data was obtained by a Percellome method, i.e. absolute mRNA copy number per one cell (average) for the liver and in one study the liver and lung. The mRNA expression data were plotted onto the 3-dimension surface graph for further analysis. Original software designed to handle the 3-D surface including "RSort" was utilized to automatically extract genes that show significant response out of 45,000 probe sets data generated by the GeneChip, and then, they were assorted by Student's t-test and Welch-test into "additive", "synergistic", and "antagonistic" responses. Three chemical pairs, i.e. carbon tetrachloride (CCl₄) and toluene (Tol), Deet and Permethrin (Perm), Bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) and Bisphenol A (BPA) were selected, due to several reasons including preexisting rich data for single oral gavage study data in the Percellome database.

There were several notable combined effects in the gene responses. The synergistic expression of Cyr61, one of the molecular targets in various models of lung injury and human lung diseases, suggests a potential toxicity of CCl₄ and Tol combined

exposure in lung. In this study, another synergistic response among pulmonary fibrosis related genes were observed. Deet and Perm pair induced antagonistic response of mitochondrial electron transport system genes in liver which might relate to wasting syndrome, and DEHP and BPA pair cause hitherto unreported antagonistic suppression of genes related to cholesterol biosynthesis in liver.

Through the promoter analysis it was suggest that there were some specific and/or common transcriptional factor binding sites were identified, suggesting that combined effects are depend at least in part on transcriptional regulation mechanism.

As a whole, the Percellome approach show here was considered as a promising direction for the development of predictive system of combined effect further research, adding a few more chemical pairs should contribute for the maturation of the prediction system.

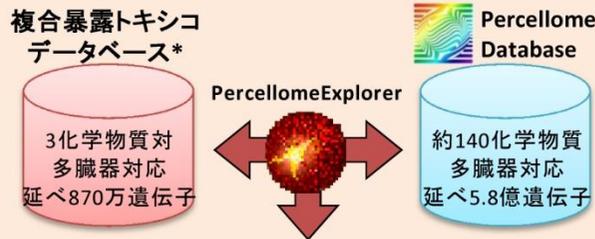
C-1007

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

厚生労働省 国立医薬品食品衛生研究所

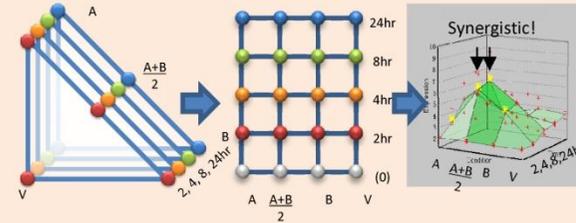
複合暴露による遺伝子発現変動データベース*の構築開始

*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。



健康影響評価・予測

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

健康影響に關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

CCI4 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

