

その他遺伝子群

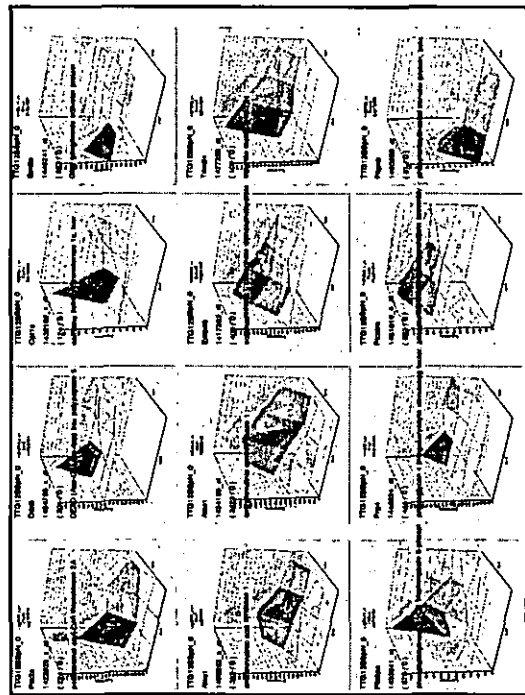
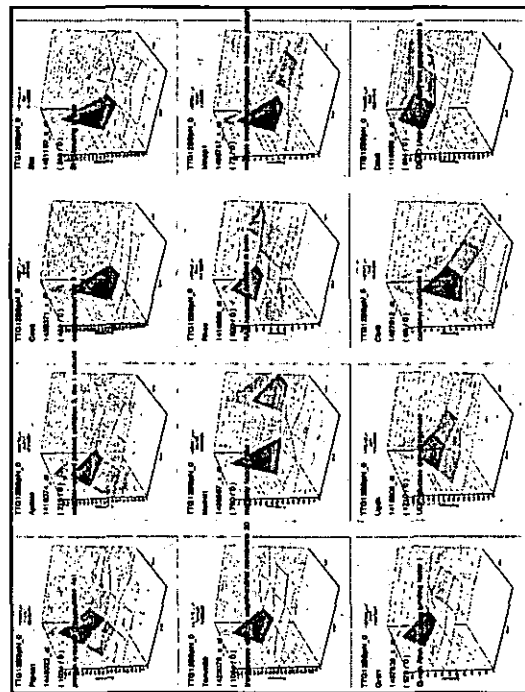
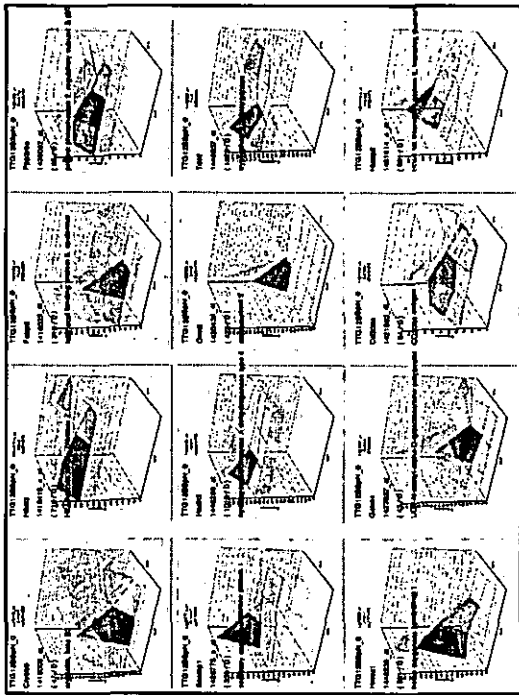
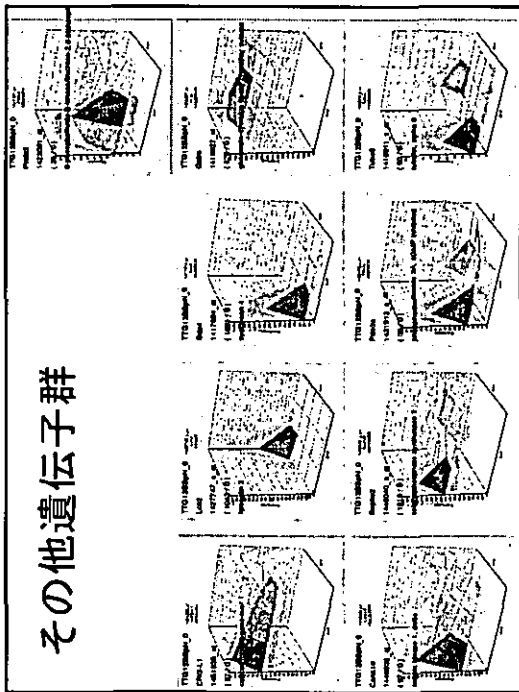


図2 Thalidomideにより発現が変動した遺伝子群

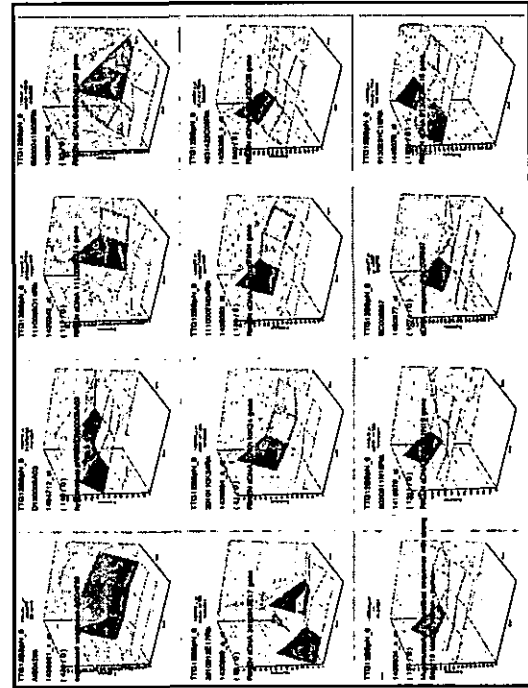
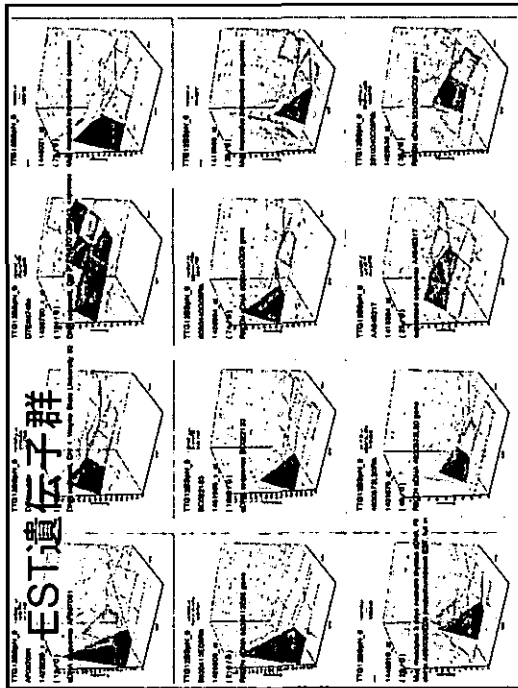
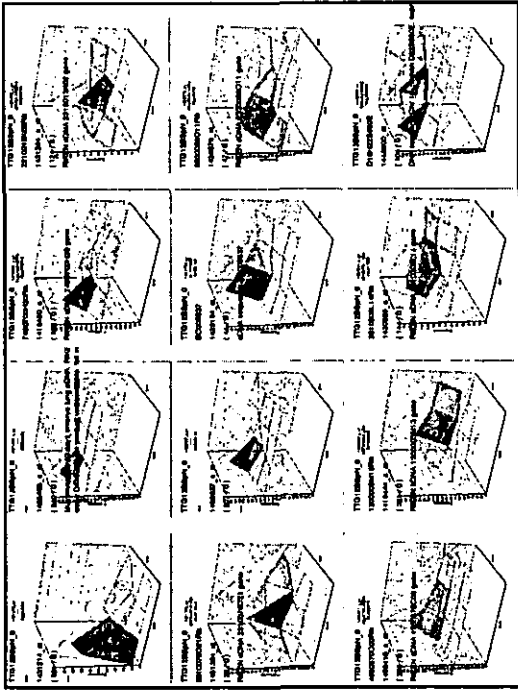


図2 Thalidomideにより発現が変動した遺伝子群

分担研究報告書

研究課題名：化学物質リスク評価の基盤整備としてのトキシコゲノミクスに関する研究

分担研究課題名：造血系における生体異物応答機構に関する研究

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 井上 達

研究要旨

造血系における生体の異物応答に関する普遍性のある指標を得るために、主として酸化ストレス物質を取り上げて、トキシコゲノミクス手法の演繹的利用モデルの確立を目標として、本年は野生型マウスでのベンゼンの初期造血毒性を対象に、小核試験を含む諸々の骨髄における血液の細胞生物学的パラメーターと対比しつつ、遺伝子発現をマイクロアレイ並びに RT-PCR にて比較検討した。これと併行して p53 欠失 (p53-KO) マウスについても酸化ストレス関連遺伝子の発現に注目して同様の視点から検索した。また、酸化ストレス消去系としてのチオレドキシン (Trx) 遺伝子改変動物に対するベンゼンの影響を観察する基礎検討を開始している。

A. 研究目的

本研究は、外来異物と造血系細胞との相互作用を末梢血から骨髄に至る反応の統一的な理解に資するため、関連した細胞生物学的背景実験と比較しつつ、これに対応する発現遺伝子のプロファイルを明らかにすることを目的としている。

B. 研究方法

造血系細胞と外来異物との相互作用のうち、代表的な分子標的として酸化ストレス反応に注目しつつ以下の実験を進めた。モデル実験として、ヒトに対する白血病原性をもち、試験管内試験では酸化ストレス誘導物質としても知られるベンゼンを用い、これまでの細胞生物学

的蓄積データに対応するマイクロアレイデータの採取を Incyte (Mouse GEM 1) 並びに Affymetrix (Murine Genome U74Av2) の系を用いて試行した。検体は主に野生型マウスを用い、経時的な変化を考慮し、曝露期間中や、曝露中止後の回復期における骨髄細胞のプロファイルを解析した。p53-KO 動物や、Trx 遺伝子改変動物についても、予備的検討を行った。また、同様の基礎的検討をアリールヒドロカーボン受容体欠失 (AhR-KO) マウスについても行った。

(倫理面への配慮)

本申請には、①ヒトの遺伝子解析研究、②相手方の同意・協力や社会的コンセンサスを必要とする研究課題又はアンケート調査等を行う研究課題、③生命倫理・安全対策に関して留意するべ

き研究、を含まない。実験動物の飼育・屠殺にあたっては、所内規定に則り適切に取り扱ってきた。

C. 研究結果

【要約】酸化ストレスによって発現の惹起される遺伝子群のプロファイリングを、まず野生型マウスを用いてベンゼン曝露条件下でのそれを求め、既知の結果と比較し、確認した。浮上した遺伝子の普遍性を確認するため、他の方法による検証を進めている。

遺伝子発現の網羅的発現解析を毒性学分野に応用する試みは、既知のエンドポイントに対するハイスループットとしてのそれと、未知のエンドポイントを含む予知技術の開発としてのそれに分かれる。前者については薬効予知などの分野で既に広範に用いられており、後者については、未だ、未知の点の少なくない将来へ向けてのチャレンジである。

本研究では、AhR-KOにおけるベンゼンによる造血毒性の不応性によって、背理的にベンゼン毒性がAhRを仲介することを初めて証明し、その結果、Gonzalezら (Valentine *et al*, *Toxicol Appl Pharmacol*, 141, 205-13, 1996) のCYP2E1の欠失マウスでベンゼンの毒性が見られないとの報告を、異なった角度からサポートした。

以上の結果は、多くの *in vitro* の試験系で示されてきた、ベンゼンの造血毒性メカニズムがベンゼンそれ自体ではなく、ベンゼンモノオキシサイドを始めとする代謝物にあるとされる知見を、*in vivo* で証明したものである。このことについての萌芽的な実験結果は前年度に得、

preliminary data として 2002 年末に学術雑誌に刊行されており、今回更に明らかになった点と総合し、近く学術雑誌への投稿を行う予定である。マイクロアレイによる profile の解析結果も、野生型をもちいた実験と共に、p53-KO 並びにその他各種の遺伝子改変動物での予備試験を終了した。これらの結果と、その酸化ストレスに起因する細胞生物学的主要所見の比較検討は、一部のみ終了し、関係学術雑誌に刊行、もしくは投稿された。

D. 考察

ベンゼンの毒性発現研究の目的は、惹起される病態(生体異物応答)を、主な応答標的組織としての血液系の幹細胞や支持細胞の機能発現によって理解する事にある。百年前のバリの靴職人のベンゼン白血病報告は、実験的追試が不完全で、発症機構や閾値の有無も不明である。本邦の年間生産量は 400 万トンを超え、中国では製靴工の白血病が今も深刻である。本研究の原点は、以上の点に基づいている。ベンゼンの造血毒性メカニズムが、ベンゼンそれ自体ではなく、ベンゼンモノオキシサイドを始めとする代謝物にあることが多くの *in vitro* の試験系で示されてきた。そして、その毒性発現の主因は酸化ストレスに基づくものであることが知られている。本研究では、生体の酸化ストレスを造血組織に標的を絞ってマイクロアレイにて検索し、その生物指標を明らかにするモデル実験を企図して開始した。ここでは、本年対象としたベンゼンの経時的な暴露による細胞生物学的な詳細な蓄積データを基礎として、野生型のみならず、p53-KO マウス、AhR-KO マウス並びに、酸

化的ストレス消去機構を持つことが当該研究者らによって明らかにされている Trx 発現修飾マウスを検討対象として進めている。我々の研究では、ベンゼンを間歇吸入曝露させると末梢血細胞数や骨髄細胞数の極度の増減変化がみられ、その後、白血病の発症には1年以上かかることがわかっている。ベンゼンによる白血病の誘発には、ベンゼン曝露によって極度の汎血球減少を生ずることなく、且つ白血病の標的細胞となる造血前駆細胞をモニターしつつ曝露計画をデザインすることが要となる。このような複雑な背景をもつベンゼンの血液毒性に対して、詳細な細胞生物学的な分析的データを参照しつつ、マイクロアレイによる、酸化ストレス傷害に焦点をあてた毒性予知システム構築モデル確立実験は、将来的な演繹的トキシコゲノミクス解析研究の重要な基礎となるものである。今回の結果では、AhR-KOにおけるベンゼンによる造血毒性の応答性によって、背理的にベンゼン毒性がAhRを仲介することを初めて証明し、その結果、GonzalezらのCYP2E1の欠失マウスでベンゼンの毒性が見られないとの報告を、異なる角度からサポートした。これをマイクロアレイの結果と比較する検討については、現在進行中である。

E. 結論

野生型並びに AhR-KO マウスを含む各種遺伝子改変動物を用いて、ベンゼン曝露影響のうち、酸化ストレスに起因する細胞生物学的変化と遺伝子発現の profile についての比較検討を行った。この中で、ベンゼンが AhR を介した毒性発現機構を持つという新しい知見を得、既に報

告した preliminary data と総合して、学術雑誌への投稿準備を進めている。

F. 研究発表

1. 論文発表

原著

- Yoon, B.I., G.X. Li, K. Kitada, Y. Kawasaki, K. Igarashi, Y. Kodama, T. Inoue, K. Kobayashi, J. Kanno, D.Y. Kim, T. Inoue and Y. Hirabayashi (2003). Mechanisms of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: cDNA microarray analyses using mouse bone marrow tissue. *Environ Health Perspect* 111: 1411-20.
- Hirabayashi, Y., K. Yoshida, S. Aizawa, Y. Kodama, J. Kanno, Y. Kurokawa, I. Yoshimura and T. Inoue (2003). Evaluation of nonthreshold leukemogenic response to methyl nitrosourea in p53-deficient C3H/He mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 190: 251-61.
- Tanaka, M., Y. Hirabayashi, T. Sekiguchi, T. Inoue, M. Katsuki and A. Miyajima (2003). Targeted disruption of oncostatin M receptor results in altered hematopoiesis. *Blood* 102: 3154-62.
- Takahashi, Y., T. Inoue, A. Gossler and Y. Saga (2003). Feedback loops comprising Dll1, Dll3 and Mesp2, and differential involvement of Psen1 are

essential for rostrocaudal patterning of somites. *Development* 130: 4259-68.

著書・総説など

- Inoue, T. Introduction: Toxicogenomics - a New Paradigm of Toxicology. In: T. Inoue and W. D. Pennie (eds.), *Toxicogenomics*, pp. 3-11. Tokyo: Springer-Verlag Tokyo, 2003.
- Hirabayashi Y, Yoon BI, Kawasaki Y, Li GX, Kanno J, and Inoue T. On the Mechanistic Differences of Benzene-induced Leukemogenesis between Wild type and p53 Knockout Mice. In: K. Tanaka, T. Takabatake, K. Fujikawa, T. Matsumoto, and F. Sato (eds.), *Molecular Mechanisms for Radiation-induced Cellular Response and Cancer Development*, pp. 110-116. Aomori: Institute for Environmental Sciences, 2003.

2. 学会発表

- Hirabayashi Y, Li GX, Yoon BI, Kawasaki Y, Kodama Y, Yodoi J, Kanno J, Inoue T. Leukemia-Prevention *in vivo*-Model: Attenuation of Spontaneous and Benzene-Induced Thymic Lymphoma by Absorption of Reactive Oxygen Species (ROS) using Thioredoxin Over-Expression Mouse. *6th Joint conference of the American*

Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association

Advances in Cancer Research:

Molecular and Cellular Biology, Genomics and Proteomics, Targeted Therapeutics, Novel Clinical Trials, Molecular and Genetic Epidemiology / Prevention (2004.1.28) [Waikoloa, HI, (Conference proceedings, pp158, 2004)]

- Hirabayashi Y, Li GX, Yoon BI, Kawasaki Y, Kodama Y, Kaneko T, Yodoi J, Kanno J, Inoue T: Prevention of benzene-induced leukemogenesis by Trx/ADF requires of p53-expression. The 45th Annual Meeting of the American Society of Hematology (2003.12.8) [San Diego, CA, (*Blood* 102 (11): pp829a, 2003)]
- Inoue T: The Next Step of the TOXICIGENOMICS- From forward to reverse, a predicting genomics -Toxicogenomics International Forum (2003.10.13) [Seoul Korea, (Meeting abstract p6-7, 2003)]
- Yoon BI, Li GX, Kitada K, Kawasaki Y, Igarashi K, Kodama Y, Inoue T, Kobayashi K, Kanno J, Kim DY, Inoue T, Hirabayashi Y: Exploration of the hematotoxic mechanism of benzene based on the cDNA microarray analyses in the mouse bone marrow tissue. *Toxicogenomics International Forum*

- 2003 (2003.10.9) [Tokyo, (Meeting abstract, p89-90, 2003)]
- Inoue T: Mechanisms of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: cDNA microarray analyses using mouse bone marrow tissue. A symposium in Honor of Wagner BM, MD at New York Medical College, "Chemical Safety Assessment: Contributions of Toxicological Pathology and Mechanistic Investigations" , (2003.9.23) [Valhalla, NY]
 - Hirabayashi Y, Li GX, Yoon BI, Fujii-Kuriyama Y, Kaneko T, Kanno J, Inoue T: AhR suppresses hemopoiesis during steady state but accelerates cell cycle as an early response: a study of AhR-knockout mice. DIOXIN 2003 (2003.8.26) [Boston, MA, (Organo-halogen Compounds 64:270-273, 2003)]
 - Hirabayashi Y, Yoon BI, Kitada K, Kawasaki Y, Igarashi K, Kodama Y, Li GX, Kanno J, Kim DY, Inoue T: cDNA microarray analysis addressing the mechanisms of benzene-induced epigenetic and genotoxic changes. Gordon Research Conference on Toxicogenomics (2003.6.25) [Lewiston, ME]

G. 知的財産所有権の取得状況

1. 特許取得：
該当しない
2. 実用新案登録
該当しない
3. その他（データベース等）
該当しない

研究課題名：化学物質リスク評価の基盤整備としてのトキシコゲノミクスに関する研究

分担研究課題名：ストレスシグナルに関わる毒性発現メカニズムに関する研究

国立医薬品食品衛生研究所毒性部 漆谷 徹郎

研究要旨

細胞内ストレス応答経路を解析するため、ワイルドタイプ、及び ASK1 ノックアウトマウスに毒性物質を投与し、各組織について遺伝子発現を網羅的に解析する。初年度は ASK1 ノックアウトマウスを SPF 化したのち繁殖を始め、マウスが使用可能になるまでの間、正常マウスを用いた ASK1 関連遺伝子発現解析の対照実験、MPTP 誘発性 Parkinson 病の条件検討を行った。正常マウスにおいて、酸化ストレスを惹起する化学物質の投与により ASK1 関連遺伝子群における発現変化が定量可能であることが示されたことから、以降のノックアウトマウスを用いた解析に期待もたれる。

A. 研究目的

本研究の目的は、細胞のストレス応答に関する細胞内情報伝達系を解析することにある。このため、ストレス応答の鍵となる遺伝子を欠損したマウスの遺伝子発現応答を正常マウスのそれと比較することによって、当該遺伝子の下流のシグナルを一気に解明しようとするものである。

B. 研究方法

実験は、ワイルドタイプ、及び ASK1 ノックアウトマウスに被験物質を投与し、各組織について mRNA を調製し、Affymetrix 社 GeneChip により遺伝子発現を網羅的に解析する。このとき、Spike による mRNA 絶対量化システムを用いて定量化を行う。組織としては、主要な毒性発現の場である肝臓、酸化ストレスに特徴的な肺、そして独自の

ストレス応答反応が予想される脳神経細胞を対象とする。初年度はパラコートとその構造類似体 MPTP を検討した。MPTP は脳黒質ドパミンニューロンを選択的に破壊する Parkinson 病モデル作成ツールとして興味深い物質である。MPTP については、遺伝子発現解析と並行して、Parkinson 病発症における ASK-1 の系の関与の有無についても、病態生理学的な検討を行う。

（倫理面への配慮）

使用する動物の屠殺にあたっては、麻酔薬の使用ないしは頸椎脱臼法など苦痛の少ない方法を用いるといった、本研究の実験動物取り扱い倫理規定に準拠した対応を行っており、当研究施設はそのモデル施設となっている。

C. 研究結果

【要約】初年度は ASK1 ノックアウトマウスを SPF 化したのち繁殖を始めた。マウスが使用可能になるまでの間、正常マウスを用いた ASK1 関連遺伝子発現解析の対照実験、MPTP 誘発性 Parkinson 病の条件検討を行った。

初年度は ASK1 ノックアウトマウスを恒常的に維持するため、実験動物中央研究所において人工授精・帝王切開によりマウスを SPF 化し、国立衛研安全性生物試験研究センター動物施設に導入した。ジェノタイピング法を確立し、現在、ノックアウトマウス、および対照としてのワイルドタイプマウスを繁殖中である。マウスが成長し、実験が可能となるまでの間、正常マウスを用いた対照実験を行った。まず、正常マウスにおける既知の ASK1 関連遺伝子の日内変動、および毒物を投与したときの肝臓における ASK1 関連遺伝子の変化を検討したところ、酸化ストレスを惹起することが知られている化学物質により、ASK1 関連遺伝子が共通して発現変化を示すことが認められた。また、MPTP 誘起 Parkinsonism の評価のためのポールテスト、黒質部分の切り出し・遺伝子発現解析法等の基礎検討を行った。

D. 考察

初年度は開始が遅かったため、目的の実験を行うには至らなかった。すなわち、ASK1 ノックアウトマウスを SPF 化し、繁殖させる必要があったため、年度末においても、漸く 2-3 週令のマウスが利用できるのみである（12 週令マウスを使用する予定）。従って、本年は正常マウスを用いた解析のみが可能であった。数種の酸化ストレス関

連化学物質を用いた解析から、ASK1 と関連が報告されている遺伝子の発現変化が認められた。これは、mRNA 絶対量化システムが有効に働いていることを示すが、これらの因果関係の解析や、未知の経路の発見につなげるには困難もある。その意味で、ノックアウトマウスを用いた次年度の解析に期待がもてる結果であった。

E. 結論

DNA マイクロアレイ法により、酸化ストレスを受けた組織において、ASK1 関連遺伝子の定量的変化をとらえることが可能であることが示された。今後 ASK1 ノックアウトマウスを利用することによって、この経路の解析を行っていく。

F. 研究発表

1. 論文発表

J. Matuskawa, K. Nakayama, T. Nagao, H. Ichijo, and T. Urushidani. Role of ADP-ribosylation factor 6 in gastric acid secretion. *J. Biol. Chem.* 278(38):36470-36475, 2003.

K. Tashiro, T. Nagao, H. Kurose, H. Ichijo, and T. Urushidani. Role of Rho in rabbit parietal cell. *J. Cell. Physiol.* 197:409-417, 2003.

2. 学会発表

TOXICOGENOMICS PROJECT IN JAPAN - OBJECTIVE AND PROPOSAL. T. Urushidani, J. Kanno, T. Miyagishima, and T. Nagao. Society of Toxicology, 43rd Annual Meeting (Mar. 21-25, 2004, Baltimore, USA)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他（データベース等）

なし

分担研究報告書

研究課題名：化学物質リスク評価の基盤整備としてのトキシコゲノミクスに関する研究

分担研究課題名：とくに胸腺毒性（免疫毒性）に関わる分子メカニズムの研究

分担研究者 山中すみへ 東京歯科大学・助教授

研究協力者 吉江紀夫 中村康則（日本歯科大学・新潟学部）

太田 薫（東京歯科大学・衛生学講座）

研究要旨

化学物質の生体影響の1つとして免疫毒性があり、その標的臓器として胸腺が大きく関わっている。そこで微量で免疫毒性を有するといわれているダイオキシンを中心として、*in vivo* 投与による胸腺細胞への影響と併せて、*in vitro* におけるリンパ球T細胞への影響を調べた。マウスへのダイオキシン 5 μ g/kg および 20 μ g/kg の1回腹腔内投与で胸腺の萎縮がみられ、とくに 20 μ g/kg 投与では9日目に顕著な萎縮を認めるとともに、CD-4 および CD-8 alpha の免疫組織化学的变化もみられたが詳細は現在検討中である。

一方、正常リンパT細胞やヒト急性リンパ芽球性白血病T細胞の MOLT-3 を用いた *in vitro* の検索では、細胞死のほとんどみられないダイオキシンの 5 100ppb 濃度で細胞表面抗原の CD-4 陽性細胞および インターロイキン-2 レセプター (IL-2 \cdot R) 陽性細胞の減少の傾向がみられ、免疫機能への影響を示唆する結果を得た。

A. 研究目的

化学物質の生体毒性の1つとして、アレルギーの発現など免疫毒性がある。とくに近年、花粉症や食物アレルギー、薬物アレルギー、金属アレルギーなど多様なアレルギーの発症が増加傾向にあり、化学物質の免疫毒性の評価が求められている。

また環境汚染物質として問題となっているダイオキシンは、動物実験では、他の臓器にはほとんど影響のみられない低濃度でも胸腺の萎縮や、T細胞の減少という免疫毒性があることがわかって

いる。ヒトの免疫系に対する影響については、疫学調査でリンパ球分布の変化や細胞膜抗原レベルの変動を示す報告もみられる。

このような化学物質の潜在的な免疫毒性が、花粉症などのアレルギー発現のような免疫機能や宿主の感受性にいかに影響しているかを検討することが必要である。

そこで今回、免疫毒性（胸腺毒性）に関わる分子メカニズムから毒性指標を見いだすことを目的として、*in vivo* では免疫毒性の標的臓器としての胸腺に対する毒性影響を免疫組織化学的手法で

評価するとともに、in vitro ではリンパT細胞に対する細胞毒性、細胞表面抗原の CD-4 や CD-8、インターロイキン-2・レセプター (IL-2・R) などの免疫指標に対する影響について検討した。

B. 研究方法

◆ in vivo での検索方法

9 週齢の BALB/c 雌性マウスを用いて、Wellington 社より入手したダイオキシン (2,3,7,8-TCDD; tetra chlorodibenzo -p-dioxin) (50 μ g/ml in octane) をコーン油で希釈して腹腔内注射 (投与容量; 0.04 /10 g) により単回投与した。対照群のコーン油のみ、5 および 20 μ g/kg の 3 群とし、投与後の肉眼的変化を観察するとともに、3 日目、9 日目にエーテル麻酔下にて安楽死させたのち胸腺を摘出した。胸腺の臓器重量を測定後、直ちに凍結し、スライドグラス上でアセトン固定した。そして CD-4 および CD-8 alpha のモノクロナール抗体 (RD System 社・USA より入手) を用いて CD-4 および CD-8 alpha の胸腺細胞の表面抗原を蛍光抗体間接法により免疫染色を行った。

◆ in vitro での検索方法

被験物質としては、水銀 (塩化第二水銀) とダイオキシン (2,3,7,8-TCDD)、PHA (フィトヘマグルチニン) を用いた。また用いた細胞は健常な成人から採血した後 Lymphoprep を用いて分離した末梢リンパ球 T 細胞と、大日本製薬 (株) より入手したヒト急性リンパ芽球性白血病 T 細胞の MOLT-3 である。被験物質の各濃度 (ダイオキシン; 2 300ppb, 水銀; 1 5ppm, PHA; 1, 2 ppm) を含む培養液中で 2 日 7 日間培養した後、モノクロナ

◆ in vitro での結果

正常リンパ球 T 細胞と白血病 T 細胞における CD-4 陽性および CD-8 陽性、IL-2・R 陽性の抗原発現

ール抗体 (BD Bioscience 社より入手) を用いて蛍光発色させた細胞表面の CD-4, CD-8, CD-25 (インターロイキン-2 レセプター; IL-2・R) 抗原発現を、フローサイトメトリーにより検索した。

C. 研究結果

◆ in vivo での結果

雌性マウスにダイオキシンの 5 μ g/kg および 20 μ g/kg を投与した群は、初期に体重減少の傾向がみられたが、5 日目以降は回復して対照群との差は全く認められなかった。また行動や外観、糞尿にも異常所見は認められず、投与後 3 日目の剖検でも各臓器に異常はみられなかった。しかし 9 日目の剖検では、20 μ g/kg 投与群のマウスでは、肉眼的にも明らかな胸腺の萎縮が観察された。表 1 には胸腺重量を群別に比較して示したように、投与 3 日目では大差なかったが、9 日目には 20 μ g/kg 投与群は対照群の約 1/3 と明らかな萎縮が認められた。また胸腺の細胞表面の抗原発現への影響を検索するために、まず正常マウスにおける免疫組織化学染色の所見を図 1 に示した。正常マウスでは、胸腺皮質にはリンパ球が密に分布していることから、CD-4 陽性細胞および CD-8 alpha 陽性細胞ともに胸腺髄質よりも胸腺皮質に多く存在し、また細胞膜にとくに強い活性が認められる。胸腺髄質においては、CD-4 および CD-8 alpha の両抗体の陽性反応は一部の細胞 (細胞型は不明) にのみみられる。ダイオキシンの投与で明らかな胸腺の萎縮がみられたマウスでの CD-4 および CD-8 alpha の免疫細胞の変化についても現在検索中である。

をフローサイトメトリーで検索し、そのパターンを図 2 と図 3 に示した。いずれもヒトのリンパ球 T 細胞ではあるが、鏡頭でも白血病 T 細胞

(Molt-3) は、正常細胞に比べて細胞サイズが大きく、またフローサイトメトリー・パターンも異なるものであった。正常T細胞(図2)ではCD-4およびCD-8、IL-2・Rともに陽性細胞と陰性細胞が分離された。しかしMolt-3細胞(図3)では明らかな分離が不可能であったので、negative染色も同時に施すことによって、陽性・陰性を判別し、それらの結果を表2にまとめて示した。非特異的マイトーゲン作用の強いPHAとの接触では、両細胞ともにCD-4およびCD-8、IL-2・Rのいずれも陽性細胞が明らかに増加したが、水銀やダイオキシンとの接触では細胞の差がみられた。すなわち正常T細胞では、水銀およびダイオキシンとの接触で、CD-4陽性細胞、CD-8陽性細胞およびIL-2・R陽性細胞のいずれについても減少の傾向がみられた。しかしMolt-3細胞では、水銀とダイオキシンによりCD-4陽性細胞の減少とCD-8陽性細胞の増加を示したが、IL-2・R陽性細胞では水銀では増加、ダイオキシンでは減少の傾向であった。水銀では細胞死のみられる5ppm濃度での変化であったが、ダイオキシンとの接触では、細胞死のみられない5ppb程度の低濃度から免疫細胞への影響が認められた。

D. 考察

ダイオキシンの毒性は、免疫毒性とともに、生殖・発生毒性、肝毒性、内分泌系への影響など広範囲であるが、ダイオキシンに最も感受性が高い標的臓器は胸腺とリンパ組織であるといわれている。そこで今回はダイオキシンの免疫毒性(胸腺毒性)に関わる分子メカニズムを検討することから、免疫毒性の指標を見いだすこととした。

ダイオキシンのin vivo暴露による胸腺の萎縮は顕著であり、今回の9週齢マウスの結果でも

20 μ g/kgの投与で肉眼的にもまた臓器重量でも明らかであった。T細胞の分化にも影響するといわれていることから、胸腺細胞のT細胞表面抗原のCD-4およびCD-8 alphaの発現を免疫蛍光染色により検討したが、胸腺の萎縮の影響が認められている。これらの胸腺の萎縮やT細胞表面抗原の変化は、T細胞の成熟に関係し、末梢T細胞の機能に影響するものと考えられる。また胎仔や幼若マウスの方がダイオキシンに対してさらに感受性が高いことが考えられるので、現在4週齢マウスでも検討中である。また萎縮のみられる胸腺について、DNAマイクロアレイを用いたGene Chip解析を依頼し、今後遺伝子発現の変化まで解析を行う予定である。

一方、正常T細胞や白血病T細胞のような免疫細胞を用いてin vitroでダイオキシンと接触し、CD-4およびCD-8、IL-2・Rの陽性細胞の割合をフローサイトメトリーで検討した結果でも10ppbの低濃度から影響がみられた。同時に試験したPHAは、非常に強い非特異的なマイトーゲン作用を有することから、T細胞の幼若化や増殖作用は鏡眼的に観察されたとともに、フローサイトメトリーでも明らかにCD-4およびCD-8、IL-2・R陽性細胞のいずれも増加がみられた。また水銀でもin vitro接触で免疫細胞に対する影響がみられたが、水銀の5ppm濃度は細胞死をもたらすIC₅₀値(細胞毒性試験で求めた正常T細胞でのIC₅₀値; 6.0ppm)に近く、細胞死による細胞膜の変化が原因と考えられた。しかしダイオキシンの5ppbでは、ほとんど細胞死がみられない濃度であることから、今回認められた変化は、ダイオキシンによる免疫細胞の細胞膜抗原レベルに対する影響と考えられる。CD-8陽性細胞の変化については細胞種

による差がみられたが、両細胞ともに CD-4 陽性細胞や IL-2・R 陽性細胞の減少が観察された。CD-4 陽性細胞や IL-2・R 陽性細胞の減少は、CD-4 / CD-8 の比率にもつながり、免疫機能の低下をもたらすことになると考えられる。ヒトにおける疫学調査で、ダイオキシンの暴露によりリンパ球分布や細胞膜抗原レベルの変動を示唆する報告もあることから、今回の *in vitro* の結果との関係を検討し、免疫機能や宿主感受性との関係なども今後明らかにしていきたい。

E. 結論

環境汚染物質として生体影響が問題となっているダイオキシンを中心として、今回免疫毒性影響を *in vivo* と *in vitro* の両面から検討した。5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ および 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ のダイオキシン 1 回の服腔内投与で胸腺の明らかな萎縮が認められ、それとともに T 細胞表面抗原の CD-4 および CD-8 alpha など免疫細胞への影響も観察された。また正常 T 細胞や急性リンパ芽球性白血病 T 細胞・MOLT-3 を用いた *in vitro* におけるダイオキシンの接触では、CD-4 陽性細胞や IL-2・R 陽性細胞の減少がみられ、免疫機能の低下の影響が考えられたので、今後 *in vivo* の結果との関係から検討していく。

F. 研究発表

1. 論文発表

① Sumie Yamanaka ; Metal allergy and its screening methods associated with dental practice, *Dentistry in Japan* 38, 187-194, 2002

2. 学会発表

① 野村登志夫、山中すみへ、太田 薫 ; 金属アレルギー

ギーのスクリーニングのためのリンパ球機能検査、第 72 回日本衛生学会、日衛誌 57、2002

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他 (データベース等)

なし

表1. ダイオキシン投与による胸腺重量とその対体重比の変化

群	投与3日後		投与9日後	
	重量(mg)	対体重比 (%)	重量(mg)	対体重比 (%)
対照群	48	0.25	51	1.28
5 μ g/kg群	35	0.19	40	0.22
20 μ g/kg群	32	0.18	18	0.1

表2. in vitroでの化学物質の接触による免疫細胞の変化

細胞種	化学物質	濃度	CD-4陽性細胞	CD-8陽性細胞	IL-2・陽性細胞
正常T細胞	水銀	1ppm	変化なし	変化なし	変化なし
		5ppm	↓	↓	↓
	ダイオキシン	2ppb	変化なし	変化なし	変化なし
		5ppb	↓	↓	↓
		10ppb	↓	↓	↓
		30ppb	↓	↓	↓
		100ppb	↓	↓	↓
PHA	2ppm	↑↑	↑↑	↑↑	
Molt-3細胞	水銀	1ppm	変化なし	変化なし	変化なし
		5ppm	↓	↑	↑
	ダイオキシン	2ppb	変化なし	変化なし	変化なし
		5ppb	↓	↑	↓
		10ppb	↓	↑	↓
		30ppb	↓	↑	↓
		100ppb	↓	↑	↓
PHA	2ppm	↑↑	↑↑	↑↑	

図 1. BALB/c 雌性正常マウス胸腺における CD-4 および CD-8 alpha の免疫組織染色像

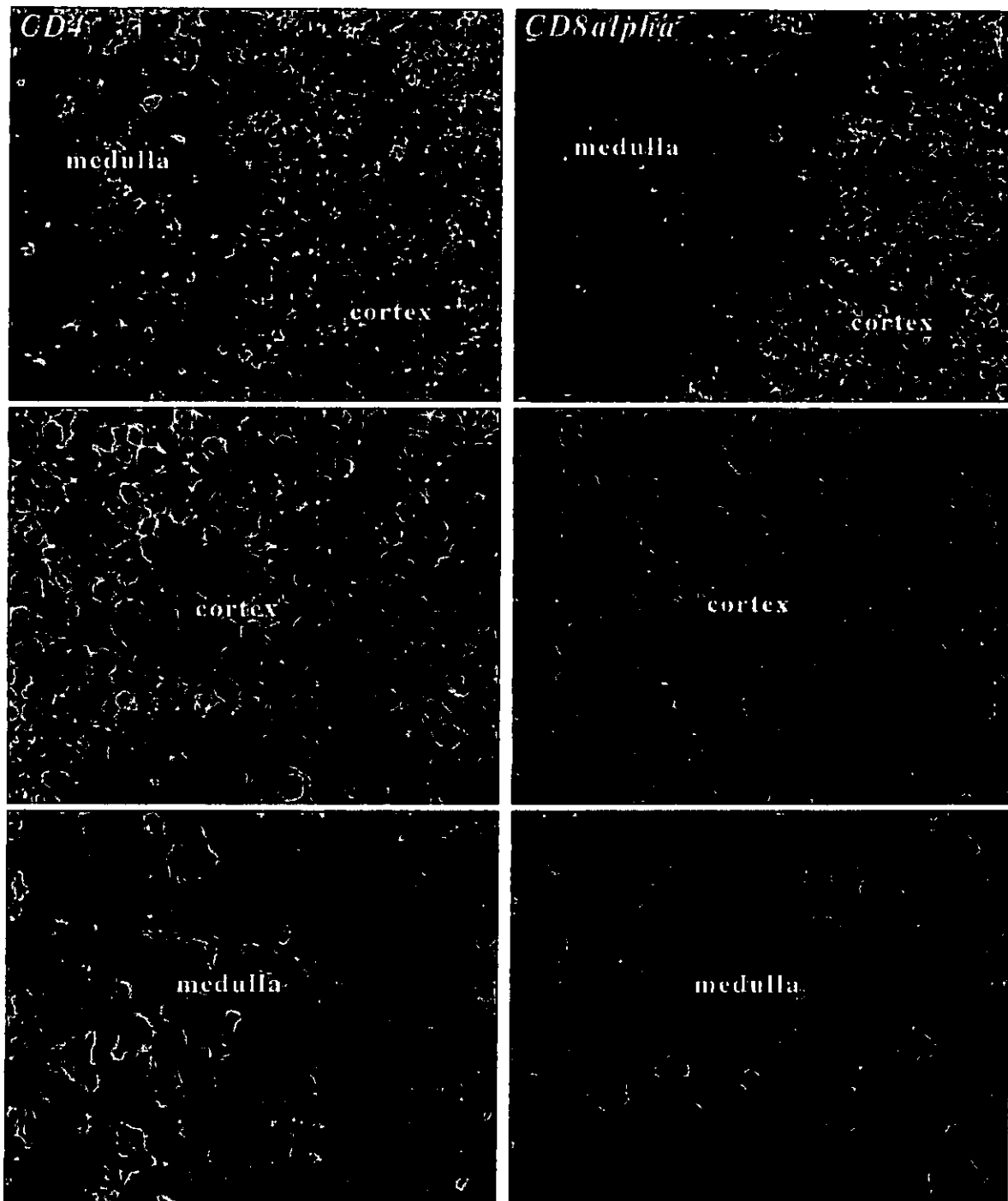


図2. in vitro における化学物質接触時の正常リンパ球T細胞の
フローサイトメトリー・パターン

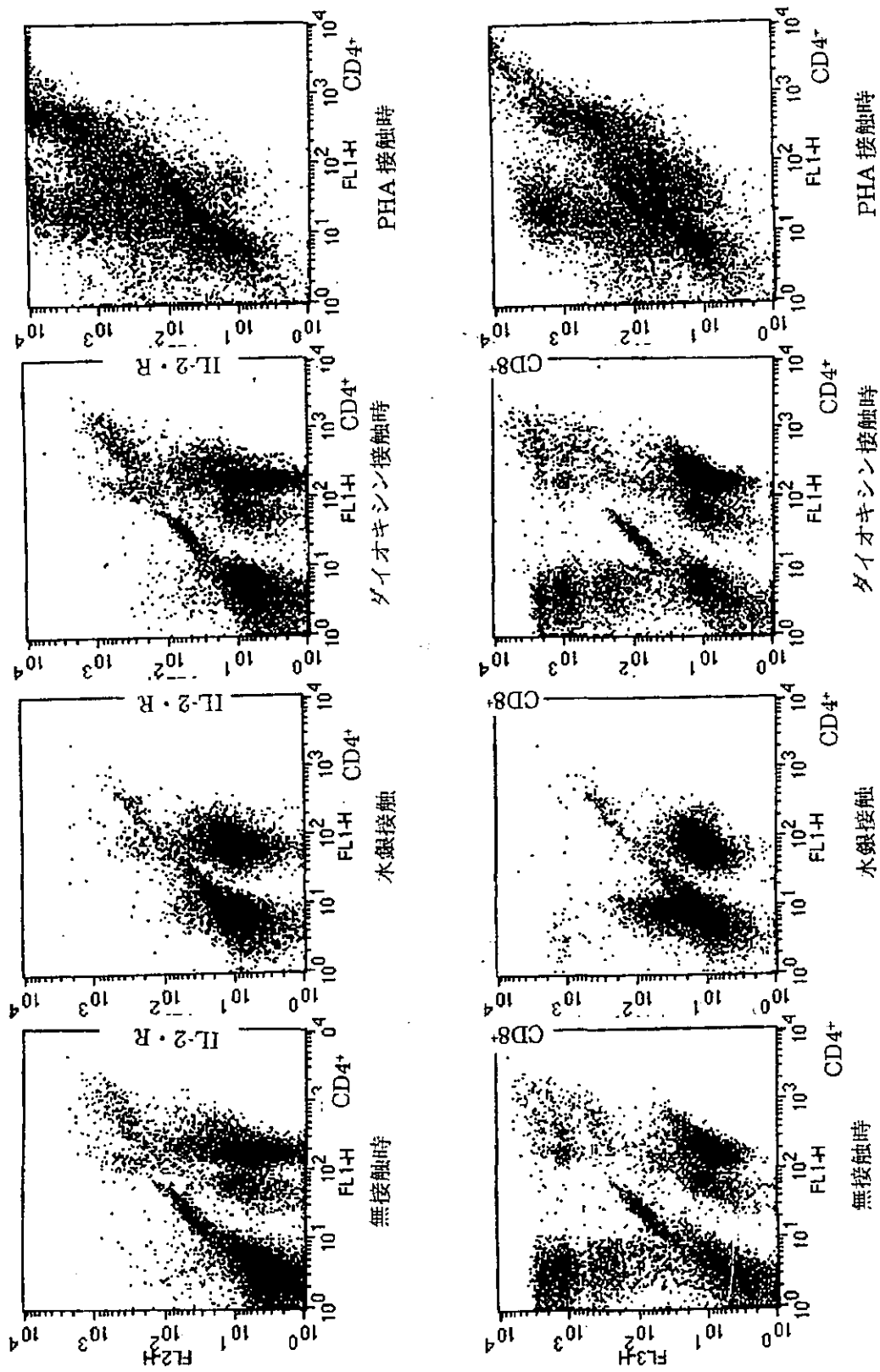
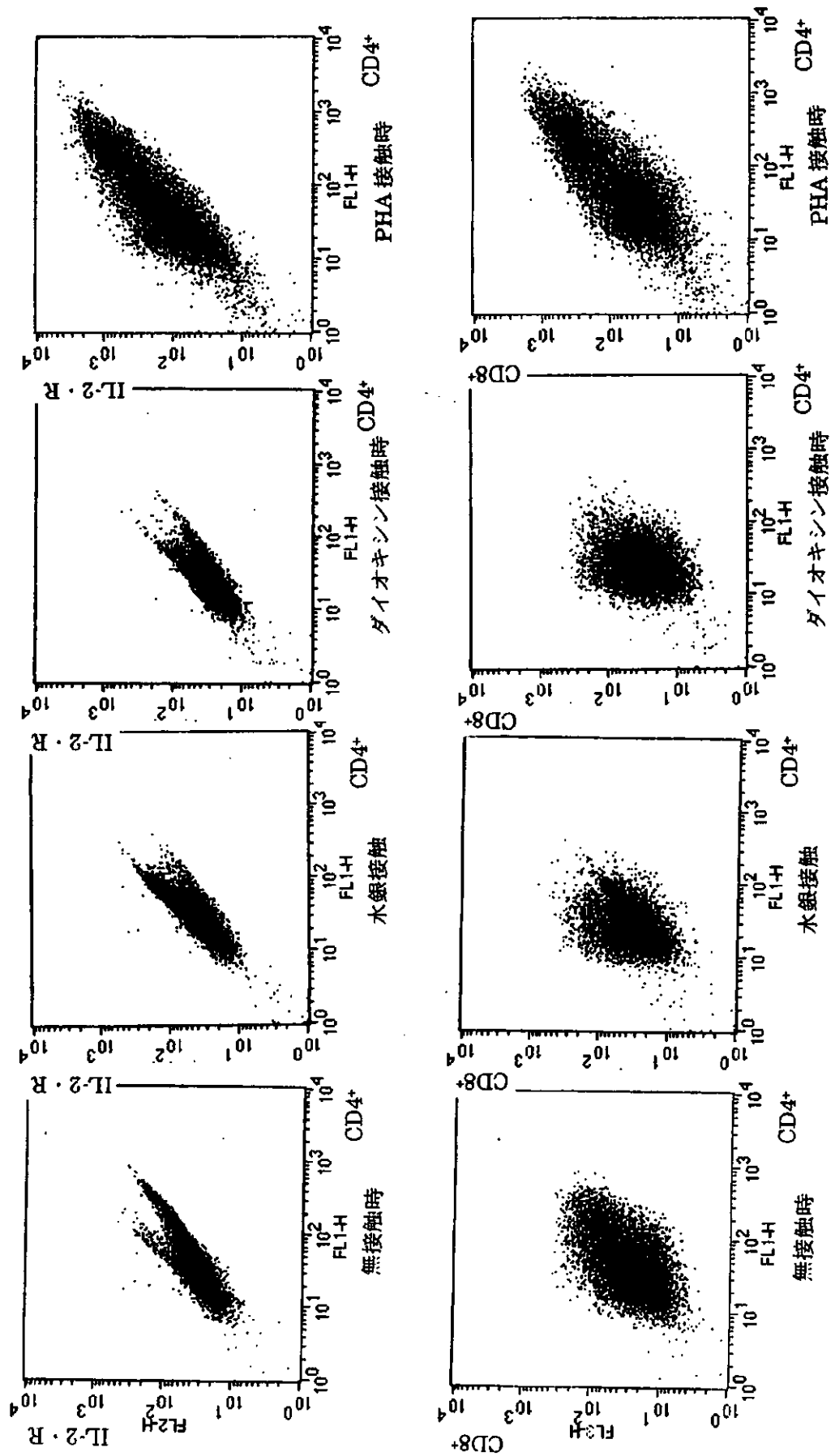


図3. in vitro における化学物質接触時の急性リンパ芽球性白血病T細胞の
フローサイトメトリー・パターン



分担研究報告書

研究課題名：化学物質リスク評価の基盤整備としてのトキシコゲノミクスに関する研究

分担研究課題名：ヒト培養細胞アレイによる毒性インフォマティクス研究

分担研究者：矢守 隆夫 （財）癌研究会 癌化学療法センター 分子薬理部

研究要旨

ヒトがん細胞パネル法は、被験化学物質の細胞増殖阻害データを標準薬剤感受性データベースと参照し、インフォマティクス的手法によりその作用機作や分子標的を推定する抗がん物質評価系である。このがん細胞パネルをヒト培養細胞アレイとして応用し、毒性化学物質の評価、特にその細胞増殖への影響を調べるためのツールとして活用する。本年度はがん細胞パネル法により新たに約 30 毒性化学物質の増殖阻害活性を検討した。これを、すでにデータを取得した約 90 種類毒性化合物とあわせ合計約 120 種類の中から GeneChip 解析による毒性分子機構の解明をすすめるべき毒性化学物質の候補を選択した。

A. 目的

ヒトがん細胞パネル法は、被験化学物質の細胞増殖阻害データを標準薬剤感受性データベースと参照し、インフォマティクス的手法によりその作用機作や分子標的を推定する抗がん物質評価系である。このがん細胞パネルをヒト培養細胞アレイとして応用し、毒性化学物質の評価、特にその細胞増殖への影響を調べるためのツールとして活用する。本年度は、GeneChip を用いた解析等、毒性分子機構の解析を行う毒性化学物質の選択を目的とし、すでにデータを取得した約 90 種類の化学物質に加えて新たに約 30 種類の毒性化学物質のデータを取得し、データベースの拡充を行った。

B. 方法

薬物を肺がん、胃がん、大腸がんなどからなる 39 系のヒトがん由来培養細胞株（がん細胞パネル）に 48 時間暴露させたのち、細胞株ごとに 50% 細胞増殖阻害濃度（GI50 値）を求める。この GI50 値は細胞株の個性を反映して様々な値をとり、パネル全体で見るとその薬物固有の GI50 値パターン（Finger Print）を示すことがすでにわかっている。薬物間で Finger Print の相関性を検定するプログラム COMPARE により薬物間での作用機作の類似性を推定できる。本研究では、毒性化学物質約 30 種類をがん細胞パネルで評価した。それぞれの Finger Print を求め、その化学物質間の類似性および標準薬剤との類似性を COMPARE ならびにクラスター解析(Gene Spring ソフトウェア)で比較した。その結果から、毒性分子機構の解析を行う毒性化学物質・細胞株の選

扱を行った。

C. 研究結果

調べた毒性化学物質のうちがん細胞増殖を直接は阻害しないものが見られた。これらについてはがん細胞パネルでは評価不能である。一方、約 6 割の毒化学物質ではがん細胞増殖阻害が見られ Finger Print が得られた。COMPARE 解析の結果、多くの場合毒性化学物質は既存の抗がん剤とは異なる Finger Print を示した。これは、毒性化学物質の多くが薬物である抗がん剤とは作用機作や分子標的を異にすることを示唆している。さらに、クラスター解析によって毒性化学物質の Finger Print 類似性に基づくグループ分けが可能であった。たとえば、ジギタリス剤である Digoxin や Ouabain は非常に緊密なクラスターを形成した。その他にも、CPIP、IPBC、Triazine、IBTA の 4 者、DTBHQ、Imparamine、2,4-Dinitrichlorobenzen の 3 者などもそれぞれのクラスターを形成した。

D. 考察

がん細胞パネルは少なくとも毒性化学物質の特定のポピュレーションを Finger Print により特徴付けし分類しうることを示された。以前から示唆されてきていたように、作用機作や分子標的が明らかな毒性化学物質の Finger Print を数多くデータベース化することにより毒性評価の新手法となる可能性が考えられる。Paraquat, Ziram は HBC-5, MKN1, NCI-H522 等の細胞で高い増殖阻害活性を示した。また、Digoxin, Ouabain は感受性が高い細胞株と低い細胞株が明確である。これらの化学物質及び細胞株をモ

デルとして、Gene Chip による網羅的な遺伝子発現解析をすることで、毒性分子機構の解明の糸口となることが期待される。

E. 結論

本研究により、GeneChip 解析のモデルとなる毒性化学物質および細胞株の組み合わせの候補を選択することができた。来年度以降はこれら候補について Gene Chip 解析と細胞生物学的解析を併用し、毒性分子機構の解明をすすめる。

F. 研究発表

1. 論文発表 (2003-4)

1. Bai, J., Kitabatake, M., Toyozumi, K., Fu, L., Zhang, S., Dai, J., Sakai, J., Hirose, K., Yamori, T., Tomida, A., Tsuruo, T., and Ando, M. Production of Biologically Active Taxoids by a Callus Culture of *Taxus cuspidata*, *J Nat Prod.* 67:58-63, 2004.
2. Hama, K., Aoki, J., Fukaya, M., Kishi, Y., Sakai, T., Suzuki, R., Ohta, H., Yamori, T., Watanabe, M., Chun, J., and Arai, H. Lysophosphatidic acid and autotaxin stimulate cell motility of neoplastic and non-neoplastic cells through LPA1, *J Biol Chem*, 2004.
3. Rengifo-Cam, W., Konishi, A., Morishita, N., Matsuoka, H., Yamori, T., Nada, S., and Okada, M. Csk defines the ability of integrin-mediated cell adhesion and migration in human colon cancer cells: implication for a potential role in cancer metastasis, *Oncogene.* 23:289-97, 2004.
4. Mashino, T., Nishikawa, D., Takahashi,