

TIF ER β vs TIF ER α
 ERE ER β vs ERE ER α

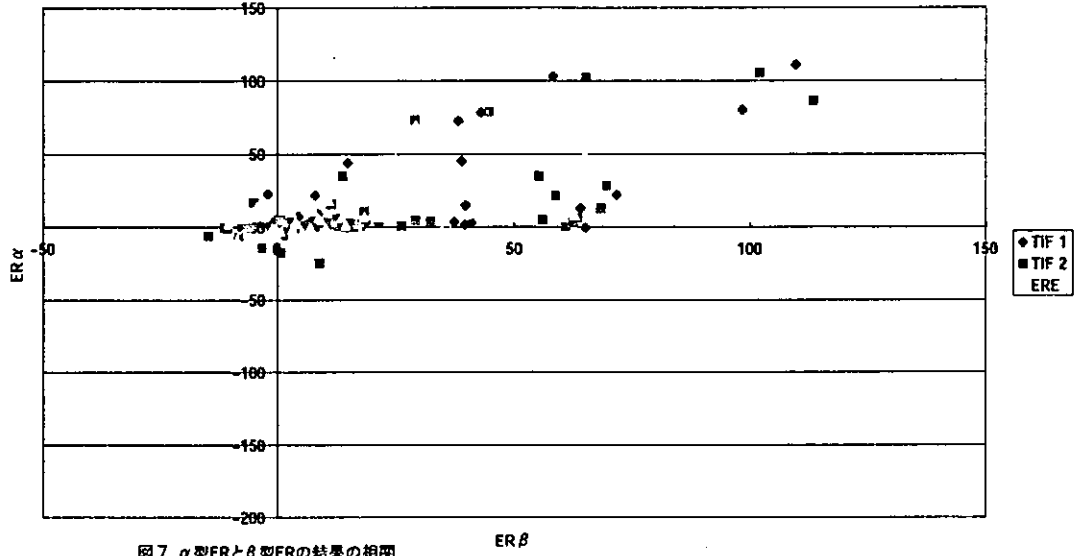
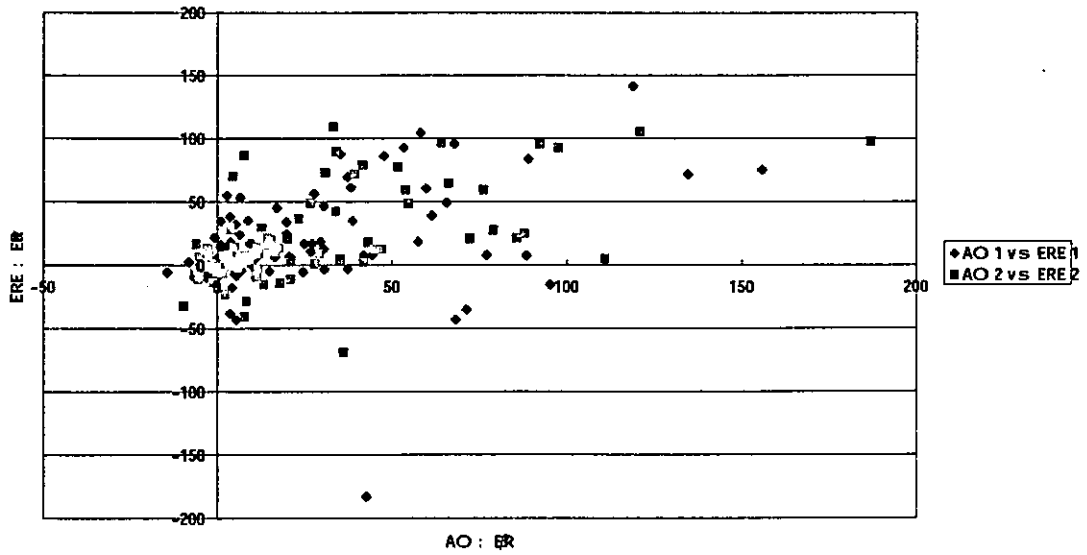


図7 α 型ERと β 型ERの結果の相関

AOER β vs ERE ER α



研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
板井昭子、菅野純	ドッキングモデルを用いた構造活性相関	井口泰泉 監修	環境ホルモンの最新動向と測定・試験機器開発	シー・エム・シー出版	東京	2003	259-263
菅野 純	環境ホルモン		食品の安全性と確認	(株)サイエンスフォーラム	東京	2003	123-127
井上 達	化学物質と健康-低用量問題	井口泰泉 監修	環境ホルモンの最新動向と測定・試験機器開発	Springer-Verlag Tokyo	東京	2003	3-10
Kanno J,	Reverse toxicology as a future predictive toxicology,	T. Inoue and W. D.Pennie (eds.),	Toxicogenomics	Springer-Verlag Tokyo	Tokyo	2003	213-218
Inoue, T.	Introduction: Toxicogenomics -a New Paradigm of Toxicology	T. Inoue and W. D.Pennie (eds.),	Toxicogenomics	Springer-Verlag Tokyo	Tokyo	2003	3-11

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Asano, K., Ono, A, Hashimoto, S, Inoue, T, and Kanno, J	Screening of endocrine disrupting chemicals using a surface plasmon resonance sensor.	Anal Sci.	20	611-616	2004
Yoon BI, Hirabayashi Y, Kawasaki Y, Tsuboi I, Ott T, Kodama Y, Kanno J, Kim DY, Willileeche K, Inoue T.	Exacerbation of benzene pneumotoxicity in connexin 32 knockout mice: enhanced proliferation of CYP2E1-immunoreactive alveolar epithelial cells.	Toxicology.	195 (1)	19-29	2004 Jan 15
Yoon BI, Li GX, Kitada K, Kawasaki Y, Igarashi K, Kodama Y, Inoue T, Kobayashi K, Kanno J, Kim DY, Inoue T, Hirabayashi Y	Mechanisms of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: cDNA microarray analyses using mouse bone marrow tissue.	Environ Health Perspect	111 (11)	1411-20	2003
Tetsuji Nagao, Kazuyoshi Wada, Makiko Kuwagata, Madoka Nakagomi, Chiaki Watanabe, Shinsuke Yoshimura, Yoshiaki Saito, Kenji Usumi, Jun Kanno	Intrauterine position and postnatal growth in Sprague-Dawley rats and ICR mice.	Reproductive Toxicology	18	109-120	2004
Inoue T	Hormonally active agents and plausible relationships to adverse effects on human health	Pure Appl. Chem	75	2555-61	2003

Inoue T, Igarashi K, Sekizawa J.	Health hazards of endocrine-disrupting chemicals on humans as examined from the standpoint of their mechanism of action	Japan Med Assoc J	46	97-102	2003
Tsuboi I, Morimoto K, Hirabayashi Y, Li GX, Aizawa S, Mori KJ, Kanno J, Inoue T	Senescent B lymphopoiesis is balanced in suppressive homeostasis: decrease in interleukin-7 and transforming growth factor-beta levels in stromal cells of senescence-accelerated mice	Exp Biol Med	29(6)	109-20	2004
<u>Kanno J</u> , Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W.	The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2: coded single-dose studies	Environ Health Perspect.	111 (12)	1550-8	2003 Sep
<u>Kanno J</u> , Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W.	The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2: dose-response studies Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology (Special Session on the Use of Genomics (Toxicogenomics, Proteomics) in Hazard and Risk Assessment) OECD.	Environ Health Perspect	111 (12)	1530-49	2003 Sep
Matsunaga N, <u>Kanno J</u> , Yoshimura I	A statistical method for judging synergism: Application to an endocrine disruptor animal experiment-Synergism in endocrine disruptor studies	Environmetrics	14 (2)	213-222	2003
Tanaka, M., Y. Hirabayashi, T. Sekiguchi, T. Inoue, M. Katsuki and A. Miyajima	Targeted disruption of oncostatin M receptor results in altered hematopoiesis	Blood	102	3154-62	2003
Takahashi, Y., T. Inoue, A. Gossler and Y. Saga	Feedback loops comprising Dll1, Dll3 and Mesp2, and differential involvement of Psen1 are essential for rostrocaudal patterning of somites	Development	130	4259-68	2003
Utsuyama M, <u>Kanno J</u> , Inoue T, Hirokawa K	Age/sex dependent and non-monotonous dose-response effect of diethylstilbestrol on the immune functions in mice.	Toxicol Lett	135 (1-2)	145-53	2002
<u>Kanno J</u> , Kato H, Iwata T, Inoue T	Phytoestrogen-low diet for endocrine disruptor studies.	J Agri Food Chem	50 (13)	3883-5	2002

環境ホルモンの最新動向と測定・試験・機器開発

Recent Aspect of Endocrine Disrupters

— Measurement, Examination and Equipments —

監修：井口泰泉 *Supervisor: Taisen Iguchi*

シーエムシー出版

環境ホルモンの最新動向と測定・試験・機器開発

第Ⅱ編 環境ホルモンの測定・分析・試験・機器開発

第2章 12 ドッキングモデルを用いた構造活性相関

(株)医薬分子設計研究所

板井昭子

国立医薬品食品衛生研究所 安全生物試験研究センター毒性部

菅野 純

12 ドッキングモデルを用いた構造活性相関

菅野 純*¹, 板井昭子*²

12.1 はじめに

ホルモン活性を有する化学物質 (Hormonally Active Chemicals, HACs) が存在することは周知の事実であり, HACsの一義的作用はホルモン受容体に結合し作用を発揮することであると考えられる。これに対して内分泌かく乱化学物質 (Endocrine Disrupting Chemicals, EDCs) は, HACsの中で生体に有害作用を及ぼすもの, すなわち受容体原性毒性を発揮するものということが出来る。ホルモン作用の強弱や有無を検討するスクリーニング試験の設定は可能であるが, 他方, 有害性を検討する試験法 (詳細試験) には受容体原性毒性を見極める性能が要求され, 後述の理由から現在のところ, 最適な方法はその開発を待つ状況にある。

12.2 スクリーニング・テストング・ストラテジー

暫定的に従来の多世代生殖毒性試験に代表される大型試験, 或いはその改良が考慮されるが, その実施には多大な費用と時間がかかるため多数の物質についての逐次実施は困難であると考えられている。そこで厚生労働省では, 内分泌かく乱性を検討する必要がある数万種の化合物について, ホルモン活性に焦点を置いたスクリーニング手法の開発と確立を進め, もって, 詳細試験に資する優先順位リストの作成及び詳細試験の開発を平行して行うこととした。現在までに国内外で行われたホルモン活性測定の結果は, その大半がエストロジェン, 或いは抗アンドロジェン作用物質であることを示してきた。一方, 甲状腺ホルモン受容体に直接的に結合して影響を与える可能性のある物質は殆ど見つかっていない。むしろ, 甲状腺ホルモン系に関しては, 甲状腺ペルオキシダーゼ阻害物質が従来型の毒性試験によって検出されている。よって, 現在, EDCs問題の中心となっているのはエストロジェン様作用を発揮する化合物 (E物質) である。E物質の生体内での作用点の内, そのメカニズムの解析が進んでいるものを利用して, HACsのスクリーニング試験法が考案されている。スクリーニングの対象となる化合物が, 既存化学物質を含めて数万種類以上存在することから, 「受容体分子への結合性」を検討するスクリーニング試験法のひとつに, *in silico*による三次元構造活性相関 (Structure Activity Relationship, SAR) 手法を採用した。また, 「ホルモン受容体依存性蛋白合成誘導」を検討するスクリーニング試験法には, ヒト由来培養細胞を用いたレポーター遺伝子試験法を採用した。これは, HeLa細胞にヒトERおよび応答遺伝子 (ルシフェラーゼ) を導入し, ハイスループットスクリーニングを実施するものである。さらに, 前述

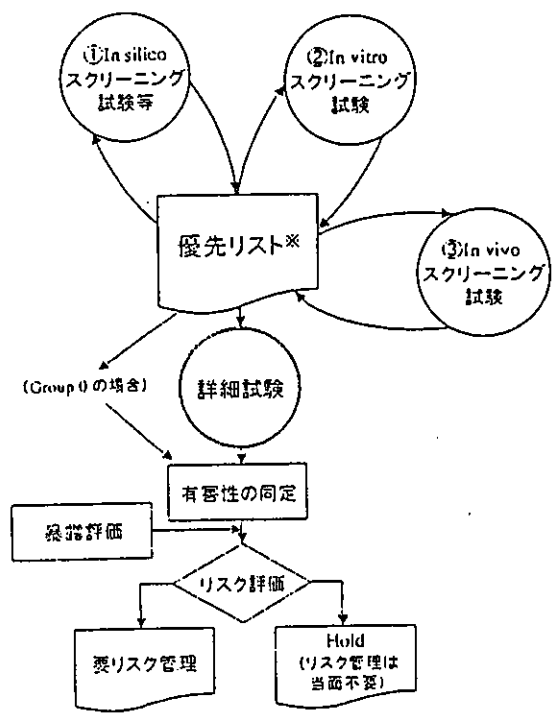
*1 Jun Kanno 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部 部長

*2 Akiko Itai (株)医薬分子設計研究所 代表取締役社長

の *in silico* 及び *in vitro* の系で認定されたホルモン活性が生体内において発揮されるか否かを検討する *in vivo* スクリーニング系には，E物質に関する子宮肥大試験 (Uterotrophic assay)，アンドロジェン様物質に関するハーシュバガー試験を採用した。これらの物質のホルモン活性の評価は，新たな科学的知見や，或いは将来的な手法の増強により，変動することが科学的に十分予想されるとの立場から，スクリーニング段階では化学物質の優先順位リストを提供するのみとし，その順位は逐次再評価の上入れ替えを行い，その上位のものから詳細試験に供するという構想を打ち立てた (図1)。新しい情報や試験結果により，時間とともにリストの内部構造が成熟して行く事となる。

リスト上位の化合物から逐次詳細試験を行い，有害性評価，暴露評価を経てリスク評価を行い，「要リスク管理」物質及び「リスク管理は当面不要」物質にふるい分け，前者については必要な措置を施し，後者については新たな科学的知見により再評価が必要となるまで暫定的にholdする事となる (なお，例外として，農薬等，多世代試験などの大型詳細試験がすでに実施されている物質については，内分泌かく乱性の評価

に十分であると考えられるデータが伴っている場合のみ，直ちに有害性評価，曝露評価，リスク評価へと進むことが出来る。図1中Group 0)。詳細試験に関しては，従来の多世代繁殖毒性試験の限界を認識し，その改良，また従前の肉眼・組織形態所見の他，遺伝子発現情報を駆使する手法も取り入れる試みを含むところの試験法開発を，2005年を目標に進めているが，現在筆者らは「一生涯試験」という概念を提唱し，その「部品」とみなしうる実験系の統合，開発を開始した。



12.3 *In silico* スクリーニングの位置付け

In silico 予測は，エストロゲン受容体のように，受容体構造が既知の場合には，受容体にうまく

- ①~③の試験を行った場合には，その結果を逐次優先リストに記録し，並び替えを行う。
- 優先リストの上位の物質から，詳細試験を実施する。
- 優先リストは，今後新たに知見(作用メカニズム等)が得られた場合や新たな試験法が開発された場合に，それをリスト構造に加え，並び替えを進める。

※優先リスト内部構造

	物質名	<i>in silico</i> 試験等	<i>in vitro</i> 試験	<i>in vivo</i> 試験
Group 0 in vivo F=250	○○○	●●●	●●●	●●●
Group 1 in vivo F=250	○○○	●●●	●●●	●●●
Group 2 in vivo F=250	○○○	●●●	●●●	●●●
Group 3 in vivo F=250	○○○	●●●	●●●	●●●
Group 4 F=250	○○○	●●●	●●●	●●●

図1 試験法スキーム

振り込む分子モデルを探すドッキングシミュレーションに基づくバーチャルスクリーニング法が有効との見地から、我々はこれのドッキングモデル(図2)を採用した一般的にはCoMFAと呼ばれる統計解析ベースの三次元定量的構造活性相関(3D-QSAR)の方法を用いることが多いが、これは、受容体の構造情報がない場合に、活性に必要な構造条件を推定するために有効と考えられる。このドッキングモデルを用いて、市販データベースACD(Available Chemical Directory)の約20万化合物等について、バーチャルスクリーニングを行った。1物質当たりの計算所要時間は、1~2分である。結果については暫時我々が並行して進めている表面プラズモン共鳴法(Surface Plasmon Resonance,

SPR法)による無細胞系及び、Hela細胞を用いた応答反応系におけるデータとの照合・考察を進めているところである。殊に、SPR法によって、ER分子とDNA上のERE配列との結合解離、あるいはCofactor配列(LxxLL)との結合解離がリガンド依存的に変化することが明らかとなってきたが、LBDからDBDあるいはHelix 12を含むCofactor binding特性決定部位への構造影響、あるいはミュータント受容体の構造と結合活性の予測への拡張の可能性にも期待がもたれる。

12.4 エストロジェン受容体ドッキングモデル

現在までに、結晶構造が解析されており受容体の立体構造情報が利用可能なエストロゲン受容体 α と、エストロゲン受容体への結合能が報告されている既知の内分泌かく乱化学物質との相互作用様式とその強さを理論的に解析し、アゴニスト活性の予測・評価法を検討した。アンタゴニスト予測の試みも実施しており、その場合、Protein Data Bank(PDB)に登録されているアンタゴニスト結合型ER α のリガンド結合ドメイン結晶構造のうち、ラロキシフェン(RAL)が結合している1err.pdbを使用した。いずれも、タンパク質座標に水素を付加し、タンパク質分子力場計算プログラムAMBERで付加した水素の構造の最適化・AMBER原子タイプ・原子電荷の割り振りを行った。さらに自動ドッキングプログラムAdam & Eveを実行する際に必要な水素結合情報

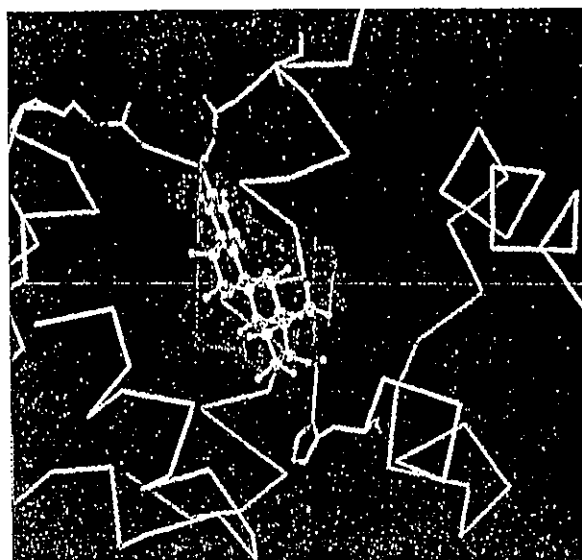


図2 ER α の結晶解析構造データを元にした17 β -estradiolがER α のLBDに収まったところの、アミノ酸骨格とリガンド結合ポケットの形状表示例

ドッキングシミュレーションでは、このような低分子化合物の結合様式と蛋白質との分子間相互作用を計算することで、結合性の予測を行う。

を割り振った。リガンド候補化合物は三次元化した後、自動ドッキングに必要な情報（水素結合情報とコンフォメーション探索時の結合回転情報）を付加した。なお、三次元化には単純なディスタンスジオメトリ法による構造立ち上げの後MMFF力場を用いた構造最適化とMOPAC-MNDO法による原子電荷計算を行なうプログラムOliveを使用し、自動ドッキングに必要な情報付加には、医薬分子設計研究所で開発したプログラム「Adam & Eve」の付属プログラムであるEve-makeを使用した。スクリーニングの結果、結合活性値と受容体-リガンド間の相互作用の強さとの間に良好な相関を得た。また、これらの化学物質のうち入手可能なものについてはCOS-1細胞を用いて転写活性値の測定も行なった。得られた情報を利用して、エストロゲン作用を有する物質が既に多く知られているフラボン類の市販化合物を対象としてバーチャルスクリーニングを実行し、21化合物を選び出した。これらの化合物の転写活性を測定したところ、11化合物に活性がみられた。

12.5 バーチャルスクリーニング

またバーチャルスクリーニングは、前述のAdam & Eveを用いてアンタゴニスト結合型ER α のリガンド結合ドメインとデータベース中の化合物の安定な複合体構造を推定することにより行なった。このプログラムは、対象データベース中のすべての化合物についてそのコンフォメーションを系統的に変えながら結合キャビティへのドッキングを試行する。その結果、タンパク質-低分子化合物間の原子同士のぶつかりや静電的な反発のない安定な結合様式とコンフォメーションを得ることができる。今回は、条件を満たす結合様式が複数得られた場合には一化合物につき最大5つの複合体構造を出力した。また、Adam & Eveのドッキング過程では低分子化合物側だけが構造最適化され受容体側はリジッドなまま扱われるため、得られたすべての複合体構造について、低分子化合物と受容体のリガンド結合キャビティを構成しているアミノ酸残基全体の構造最適化を行った後、医薬分子設計研究所で開発したタンパク質-リガンド間の結合自由エネルギーを見積もるプログラムGenBを利用して結合自由エネルギーを算出した。

12.6 考察

内分泌かく乱化学物質のスクリーニングストラテジーにおいて、ドッキングシミュレーションによる方法は、その対象化合物の数が多いため非常に有用な手段となる。本手法によれば、従来のQSAR法に比較して、非常に高速に高精度の結果を得られ、さらに既知リガンドと構造が全く異なる化合物をも選別できるという有用性が示された。今後は、細胞系や無細胞系におけるER作用データからのフィードバック、分子内ドメイン間相互作用の解析、ポイントミューテーションの影響予測の可能性を含めたスクリーニング性能改善、及び受容体科学に向けた応用の可能性という両面への展開が期待される。

序章 化学物質と健康—低用量問題

井上 達*

1 生体と外界との相互作用

1.1 生体反応の限度幅

生体に対する化学物質の作用は、その生物がその対象物質と“遭遇”するにあたって、どれだけそれに応じた生理機能を備えているかにかかっている。自らの腸内細菌の産生するテトロドトキシンから毒性影響を受けることのない“ふぐ”自身のナトリウムチャンネルの特異な適応はこのことをよく示している。おそらく生物は悠久の昔から蓄積した体験をもとにして、外界・周囲に適応した機能を発揮しているのであるが、他方そこに備わった機能を越えた負荷に堪えることはできない。

こうした対応力の限度幅に対して許容量と呼ぶことがあるが、この呼び方はいつも正しいとは限らない。本節では一見そうした限度の範囲内に見える“possible-risk”を取り上げようとしているが、トキシコロジーはいまこうした“possible-risk”を生体が許容しているか否かの判断の難しさに直面している。ここではこの限度幅をさしあたり恕限度と呼ぶことにしよう。一般論としては生物には確かに極限の負荷に対して適応する“可塑性”も備わっており、先にみた機能的適応もその賜物に他ならない。しかしそれは長い時間軸を以って認識される次元の大きく隔たった問題であり、現時点での化学物質と生体の調和のとれた健康的な相互関係を探求する次元の問題とはいえない。

1.2 “適応反応”と傷害性

けだしトキシコロジーでは、生体影響のどこまでが適応的生体反応で、どこからが障害性変化（ここでは傷害性も同義）であるかの分界点を見定めることが課題となる。そしてその中で恕限度の占める位置も課題である。しかし截然としたその切り分けはしばしば困難なほか、それらは相互に重なり合っている面もあるので、驚くほどに適切な方法論のないことに気づく。つまりこれは新しい課題なのである。

例えば生体反応の限度内、ホメオステシスの範囲内の変化であれば、それは生理的な変動で

* Tohru Inoue 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 センター長

あり生体への障害性はないものとする見方はしばしば見受けられる。しかしながら本書で取り上げられようとしている内分泌攪乱現象などでは特に、そしておそらくもっと一般的にも、そうしたホメオステシスの捉え方には多分に疑念が生まれつつある。この点には生物学とトキシコロジーの認識のズレもあるように見え、内分泌攪乱問題の本質もここに焦点がある。ある試験法である現象が見え¹⁾、他の異なった試験法でそれが見えなかった²⁾、といった議論があった。果ては「科学的に」どちらが正しい、正しくないといった議論もなされた。この問題は新しい課題に該当しているので、これを混乱ないしは矛盾ととらえる人々も見られたが、本質は、多分に双方とも正しかったということに収束してゆくのではないかと考えている。

1.3 薬理と“毒理”のcontinuum³⁾

化学物質と生体の相互作用、健康の保持を考えると、生体は、外界物質（の濃度）との調和のとれたバランス上に健康を維持していることが伺われる。様々の自然界の物質はもとより、紫外線や可視光のような物理的要素からはじまって、量的調節そのものは“必ずしも”自由にならないながら時間などの要素も同様の生体作用因子としてとらえられる。生体と物質の相互作用を、横軸を反応の時間軸に取った場合の種々の例を薬理学的指標と毒理学的指標を相対的に示すと図1のようになる。そこでは外界物質は、過小に過ぎれば生体の発達維持に支障を来し、過大に過ぎれば逆の面から生体障害（傷害）を引き起こす。いま生体に対する負荷からの回復という視点で考えると、“休養”のもたらず生体作用はある一面での時間軸に対する負の方向への制御ととらえることもできる。ここで人類が作り出す無機・有機の化学物質に対して生体がどのような位置関係を形成しているかについての認識も、同様の視点から理解されるわけであるが、これら

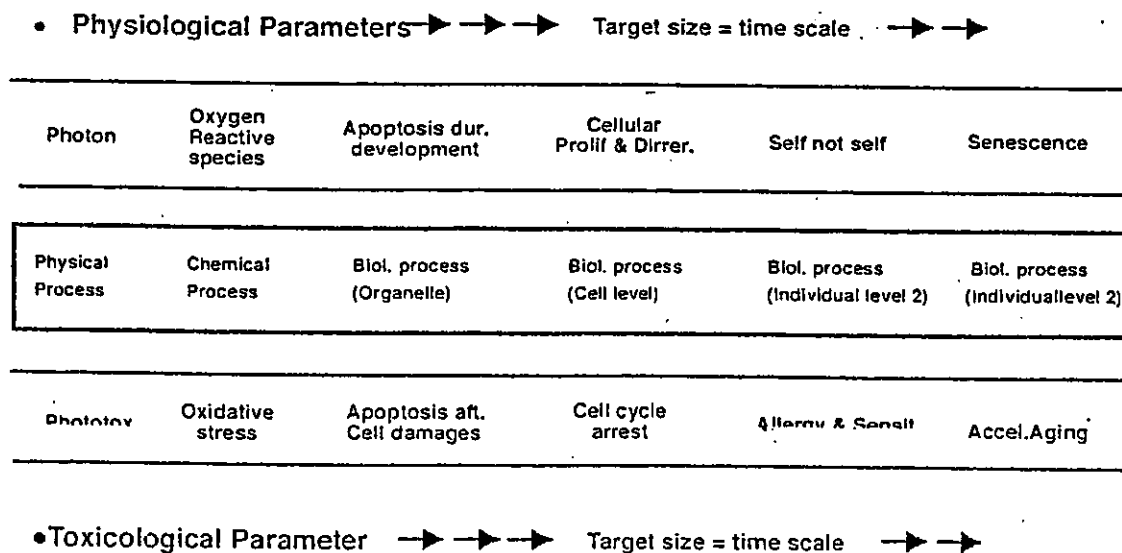


図1 生体と物質の相互作用

については同時に、生物の進化の長い歴史から見ればあまりにも経験の浅い領域に属しており、“未知”の事柄も少なくない。

1.4 恒常性の範囲内のリスク

生体には、獲得された平衡状態の維持機構が備わっていると考えられ、これはホメオステシス（恒常性）と呼ばれるが、その背景では多次元的でネットワーク状の相互作用・拮抗関係にある様々のモメントのたえざる平衡調節が働いている。こうした関係の中では微量の物質作用は緩衝効果によってうち消されるので、これへの反応は通常の観察方法では検出されないことも知られている。観察されない認識下での事柄が生体への影響の有無や、通常観察されない事柄が生体の特殊な状態下で影響を及ぼす可能性の如何ということになると、これまで無視し得るものと判断されてきたので、当然未知の事柄が少なくない。そこでにわかには注目されているのがここに取り上げる「低用量問題⁹⁾」である。農薬、工業用化学物質などの中に折に触れて見いだされる、ホルモン様の生体作用をもついわゆる内分泌攪乱性化学物質（環境ホルモンは俗称）は、まさにこの低用量問題を焦点としている。ここでは、野生生物の雌化現象や群集単位の縮小、ヒトでの生殖腺の異常あるいは腫瘍発生の増加などが危惧の対象として取り上げられた。結果として、それら環境中のホルモン様生体作用物質（例えば農薬、工業用化学物質）と生体（例えばホルモン受容体）との低用量レベルでの相互関係が問題の本質となっているものとの理解に至っている。これらの諸点についての参考には、米国National Research Councilの“Hormonally Active Agents in the Environment.”（1999）¹⁰⁾や、WHO/IPCSがまとめたGlobal Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors.（2002）¹¹⁾などがあるほか、小著¹²⁾も参照されたい。（<http://www.ehp.niehs.nih.gov/who/>）

2 低用量作用への認識

2.1 はじめに

毒性試験とは、障害性（ここでは傷害性も同様）限度試験であり、障害性の観察される限度を見極めることによって、その限度以下の用量における安全性を担保しようとするものである。もしこの前提が崩れるならば毒性試験による安全性の担保は、別の方法によらざるを得ないが、低用量問題は、そうした一環として登場した。このものは、①閾値の有無 ②相乗性・相加性の有無、そして、③高用量からの外挿性の可否、反応の線形—非線形用量相関問題、などの諸点に分けて問題提起された。しかし実際にはこれらは相互に関連したひとつの問題である。反応性が線形用量相関を示すことが確かであれば、高用量から直線外挿性に低用量反応が想定可能であり、

低用量域に閾値があれば実質的には相乗・相加問題は発生しないからである。これらについてトキシコロジー領域に個々の具体的なデータは必ずしもなかったかも知れないが、種々の生物学的事象からくる生物学的蓋然性からみると、これらの命題の否定はもとより単純な事柄ではなかった。2000年10月、米国EPAは、ノースカロライナ州で、従来求められてきた無作用量 (NOEL) や無毒性量 (NOAEL) よりも低い用量域⁴⁾で、いま内分泌攪乱問題で対象となっているようなパラメータに該当する新たな影響が観察され得るものかを問う「低用量問題に関するワークショップ」を開催した。その記録は、EPAのwebsite⁴⁾に紹介されているのでここではふれないが、この会議以後、少しずつ低用量作用に関連する報文がでてきた。それらの諸説に収斂の気配は見えないが、双方にある方向性が認められるので、いずれそれらを整理する機会も近いものと考えられる⁷⁻²¹⁾。

2.2 閾値の有無

閾値の有無に関する証明は実質的には生物統計学的に用量相関のモデル型から導き出すことになる。現象面からのそれには、例えば子宮肥大試験でのリガンドの用量に応じた子宮の肥大変化がロジスティックないしはシグモイド・カーブを取ることを以て知られる。因みにロジスティック・カーブの無閾値性はそれ自体では決定論とはならないが、低用量域で限りなくX軸に漸近するという意味で無閾値性を示唆している。EPAのEarl Grayは、抗アンドロジェン作用を持つ物質の種々の雌化指標が同様のロジスティック・カーブもしくはS字状曲線をとっていて、調べた限りでベースラインレベルまで接近したと述べている^{22, 23)}。内分泌攪乱化学物質の疑義のある物質の多くがリン脂質からなる細胞膜をたやすく透過すること、従って、受容体1分子と化学物質1分子が反応するものと考え、反応性は十分に低用量域に達することにならざるを得ないことなどがこの無閾値仮説の原点であった。事実、ホメオステシスの環境を切り離れた実験系では、*in vivo*試験でさえも極めて低い用量で様々の反応が生ずることがすでに知られている²⁴⁾。十分に低用量の領域でのリガンドの受容体との会合は当然確率的に低くはなるので、近年発がん性領域でも用いられる“practicalな”閾値はあるものと考えられる。

2.3 相乗性・相加性の有無

この問題に該当するデータとしては、かつてSoto²⁵⁾が複合アッセイ系確立の可能性を論じた報告が原点になると思われるが、この課題に真正面から取り組んだという意味で、最近注目されるのは、ロンドン大学のKortenkampのグループによる相加性に関する報告である²⁶⁻²⁸⁾。彼らの一連の報告は、報告者らの文中にあるような相乗性 (synergy) を意味しないが、明らかな相加性 (additives) を確認したという意味でその結論は重い。先のE.Grayも vinclozolinと

procymidoneの相互作用が相加的であったとしている²⁹⁾。

2.4 反応の線形－非線形用量相関問題

この問題に関するデータは、従来のNOELやNOAELなどよりも低用量で何らかの変動パラメータが観察された、という形で間接的に示される。先のE.Grayは、vinclozolinで、このものの抗アンドロゲン作用が従来の無作用量レベル（数千mg/kg）より低いレベル（100～200mg/kg）で肛門・生殖突起間距離の短縮など様々のパラメータに雌化傾向を生ずることを報告した^{22, 23)}。Bisphenol Aに関連したデータもこのところ数多く認められる。九州大学の粟生（Aou）らによれば、Wistar系の妊娠ラットへのBisphenol A 1.5mg/kg（NOAELは50mg/kg）を投与し、仔の成育後のオープン・フィールドテストにおける行動と、脳の青斑核（locus ceruleus）の小型化など、雌化傾向が見られたと報告している³⁰⁾。なお、こうした行動観察については、Grayらも、anti-androgenic chemicalでの結果を追加している³¹⁾。わが国の環境省では、この低用量影響を検出する試験法の開発研究の一環として、改良一世代試験の検討を進めている³²⁾。その中で、di-cyclohexyl phthalateによるF1世代における8, 40 μ g/kg/dayでのER α mRNAやARのmRNA発現の亢進（従来のNOEL/NOAELは500mg/kg/day [肝重量増加]）やdi-2-ethylhexyl phthalateによるF1世代における50 μ g/kg/dayでの血清FSHの上昇（従来のNOEL/NOAELは100mg/kg/dayでの肝重量増加）などを観察し、従来のNOEL/NOAEL以下のレベルで、種々のパラメータの変動の見られることを明らかにしている。環境省プロジェクトの低用量における変動パラメータの中にホルモン受容体の遺伝子発現が散見されることは、前節での考察と符合して意味がある。

3 今後の方向性

3.1 低用量問題とChildren's program

低用量問題を通覧すると、これが無視できない生物学的蓋然性を持つことが分かるが、具体的なデータの多くは胎生期間中の形態形成期や、新生児の急激な発育期に関連したものであることに気づく。このことから見ても、内分泌攪乱物質問題そのものが胎児・新生児を含む小児の問題（Children's program³³⁾）の重要な柱となってゆくことは疑いない。ヒトでの現存疫学データが十分な役割を果たしていない現状にあっても、今日までの結果が示す内分泌攪乱問題の本質に関わるchildren's programの生物学的蓋然性は、明らかに高いと考えられるからである。

3.2 毒性学のパラダイムシフト

低用量問題に取り組む中で、たくさんの事柄が明らかになってきた。ここで課題となった「性の可塑性」なども、多分に生命存続のための生物に備わった知恵であった。それが裏目に出た形でこの問題は発生している。その中には、様々の生命におしなべて影響の及んでいる事象が見いだされたが、他方、十分な生物学的蓋然性を持ちながらも齧歯類-霊長目-ヒトへの外挿性の明らかに否定されている事象もある。本稿で取り上げた齧歯類の性的二型核の変化などもこれに属し、霊長目での方法論は、また異なったものとなることを意味している。けだし蓋然性の蓋然性たる所以である。そうした中にあってもホメオステシスの範囲内でのリスク、薬理と“毒理”のcontinuumに重なった生体障害の可能性は、毒性学の方法論の新たな段階を期するパラダイムシフトといえよう。低用量問題に関するノースカロライナ会議が従来の試験法そのものに疑問を投げかけることになったのは、こうした背景があつたのことと考えている。

3.3 トキシコジノミクス³⁾

先にホメオステシスの陰に隠れていて表面的には“見えない”現象を見いだすことが新しい課題となることにふれた。これに役割を果たすものと期待される手法として、マイクロアレイやDNAチップによる遺伝子の大量発現技術の試行的普及が進んでいる。それらの“ゲノム発現情報とリンクして包括的に把握される”比較的大容量の分子生物学的情報は、-omicsの接尾語を付してジノミクス、プロテオミクス、メタボノミクスなどと呼称される新しい生物学領域を形成しつつある。これらのトキシコロジーへの適用がトキシコジノミクスである³⁴⁾。例えばDNA障害を伴った発がん物質の低用量域での閾値現象が、p53欠失動物では、無閾値性に観察され、通常動物でのそれは、修復に関与することが明らかになりつつある。このような通常観察されない静止変化や閾値現象は、トキシコジノミクスによって、“見えてくる”、可視化される。多次元的でネットワーク状の相互作用・拮抗関係にある様々のモメントの堪えざる平衡調節も可視化される。そういったことが期待される。これを通じていま明らかにされようとしている低用量問題は、今少し論理的な構成をもった現象として理解されるようになるものと思われる。

低用量問題は、内分泌攪乱物質問題を契機として、ヒトと外界との相互関係を探る本質的な生物学の課題の一つになろうとしている。

文 献

- 1) Nagel SC *et al.*, Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA)

- assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol, *Environ Health Perspect*, 105, 70-76 (1997).
- 2) Cagen SZ *et al.*, *Toxicol Sci.*, 50, 36-44 (1999).
 - 3) Inoue T., Toxicogenomics—a new paradigm of toxicology. In, T. Inoue, W.D. Pennie (eds.), *Toxicogenomics*. Springer, Tokyo, Berlin 2003, pp.3-11.
 - 4) 米国NTPでは、「一般的に毒性試験で用いる用量よりも低い用量」として問題提起を行った (<http://nipserver.niehs.nih.gov/htdocs/liason/FinalRptLowDoseFR.html>).
 - 5) WHO/International Programme on Chemical Safety; Eds, D. Damstra, S. Barlow, A. Bergman, R. Kavlock, G. van der Kraak., *Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors*. World Health Organization, 2002, pp.180. (<http://www.ehp.niehs.nih.gov/who/>).
 - 6) National Research Council, *Hormonally Active Agents in the Environment*. National Academy Press, Washinton, D.D., 1999, pp.430.
 - 7) 井上達, 五十嵐勝秀, 関澤純, 内分泌かく乱物質の作用機序からみたヒトへの健康障害, *日医会誌*, 127, 197-201 (2002).
 - 8) Honma S *et al.*, Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction, *Reprod Toxicol*, 16, 117-122 (2002).
 - 9) Palanza P *et al.*, Exposure to a low dose of bisphenol A during fetal life or in adulthood alters maternal behavior in mice, *Environ Health Perspect*, 110, Suppl.3, 415-422 (2002).
 - 10) Schonfelder G *et al.*, In utero exposure to low doses of bisphenol A lead to long-term deleterious effects in the vagina, *Neoplasia*, 4, 98-102 (2002).
 - 11) Schonfelder G *et al.*, Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit, *Environ Health Perspect*, 110, A703-707 (2002).
 - 12) Tinwell H *et al.*, Normal sexual development of two strains of rat exposed in utero to low doses of bisphenol A., *Toxicol Sci.*, 68, 339-348 (2002).
 - 13) Wetherill YB *et al.*, The xenoestrogen bisphenol A induces inappropriate androgen receptor activation and mitogenesis in prostatic adenocarcinoma cells, *Mol Cancer Ther*, 1, 515-524 (2002).
 - 14) Ashby J., Testing for endocrine disruption post-EDSTAC: extrapolation of low dose rodent effects to humans, *Toxicol Lett*, 120, 233-242 (2001).
 - 15) Markey CM *et al.*, In utero exposure to bisphenol A alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland, *Bio Reprod*, 65, 1215-1223 (2001).
 - 16) Markey CM *et al.*, The mouse uterotrophic assay: a reevaluation of its validity in assessing the estrogenicity of bisphenol A, *Environ Health Perspect*, 109, 55-60 (2001).
 - 17) Gupta C., Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals, *Proc Soc Exptl Biol Med.*, 224, 61-68 (2000).
 - 18) Elswick BA *et al.*, Effect of different sampling designs on outcome of endocrine

Reprint from

T. Inoue, W.D. Pennie (Eds.)

Toxicogenomics

© Springer-Verlag Tokyo 2003

Printed in Hong Kong. Not for Sale.



Springer

References

1. Lovett RA: Toxicogenomics. Toxicologists brace for genomics revolution. *Science* 289: 536-537, 2000.
2. Hamadeh HK, Bushel P, Paules RS, Afshari CA.: Discovery in toxicology: mediation by gene expression microarray. *Biochem Mol Toxicol* 15: 231-242, 2001.
3. Storck T, von Brevern MC, Behrens CK, Scheel J, Bach A.: Transcriptomics in predictive toxicology. *Curr Opin Drug Discov Devel* 5: 90-97, 2002.
4. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO: Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467-470, 1995 / Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown PO, Davis RW: Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 10614-10619, 1996.
5. Fodor SP, Rava RP, Huang XC, Pease AC, Homes CP, Adams CL: Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature* 364: 555-556, 1993.
6. Lloyd A: Pharmacogenomics-Qualitative gene profiling using differential analysis of transcripts with alternative splicing profiles. *Drug Discovery Today* 5: 429-430, 2000.
7. Aardema MJ, MacGregor JT: Toxicology and genetic toxicology in the new era of "toxicogenomics": impact of "-omics" technologies. *Mutat Res* 499: 13-25, 2002.
8. Herrmann JL, Rastelli L, Burgess CE, Fernandez EE, Rothberg BE, Rothberg JM, Shimkets RA: Implications of oncogenomics for cancer research and clinical oncology. *Cancer J* 7: 40-51, 2001
9. Liefers GJ, Tollenaar RAEM, Nakamura Y, van de Velde CJH: Genetic cancer syndromes and large-scale gene expression analysis: applications in surgical oncology. *Europ. J Surg Oncol* 27: 343-348, 2001.
10. Nakamura Y: Isolation of disease-associated genes through genome analysis and their clinical application. *Keio J Med* 50: 134-140, 2001.
11. Kamataki T, Nunoya K, Sakai Y, Kushida H, Fujita K: Genetic polymorphism of CYP2A6 in relation to cancer. *Mutat Res* 428: 125-130, 1999.
12. Heller RA, Schena M, Chai A, Shalon D, Bedilion T, Gilmore J, Wooley DE, Davis RW: Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2150-2155, 1997.
13. Capecchi MR: Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244: 1288-1292, 1989.
14. Schwartzberg PL, Goff SP, Robertson EJU: Germ-line transmission of a c-abl mutation produced by targeted gene disruption in ES cells. *Science* 246: 799-803, 1989.
15. Zhu H, Bilgin M, Bangham R, Hall D, Casamayor A, Bertone P, Lan N, Jansen R, Bidlingmaier S, Houfek T, Mitchell T, Miller P, Dean RA, Gerstein M, Snyder M.: Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science* 293: 2101-2105, 2001
16. Zhu H, Snyder M: Protein arrays and microarrays. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5: 40-45, 2001.

Introduction:

Toxicogenomics - a new paradigm of toxicology

Tohru Inoue

Center for Biological Safety & Research, National Institute of Health Sciences
1-18-1 Kamiyohga, Setagayaku, Tokyo 158-8501, Japan

Summary. Molecular biology has enabled the elucidation of biological subjects with bilateral strategies, namely, an inductive approach and a deductive approach. Along with the development of the mouse whole-genome sequencing project, it has enabled elucidation of the science bilateral interrelationships between the toxicological phenotypes related to particular toxicants and expression profiles of pertinent genes induced by exposure to toxicants. While a conventional inductive approach permits exploration of the toxicological mechanism by cloning genes and analyzing gene and protein expression during the course of chemical exposure, the newly developed deductive approach potentially permits the elucidation of the toxicological phenotype(s) through gene expression.

Microarray technology has dramatically changed the time course of drug discovery in new drug development. Potential therapeutics can be screened for thousands of endpoints indicative of efficacy and adverse toxicity at one time using the microarray technology. Simultaneously, the same technology can be used to explore unique genomic "expression fingerprints", which can be used to group the biological effects of chemical actions at a various doses, time intervals, or target tissues, in a variety of animal species, into profiles as the bases of gene expression. Accumulation of the expression profiles (here and elsewhere) of whole genomes for reference chemicals for a variety of treatment conditions permits the establishment of an informatics profile (here and elsewhere) for reverse toxicology, which is conversely supposed to predict the toxicological phenotypes solely by analyzing gene expression. This translational introductory oversees the future prospects of how microarrays can be used in applied toxicology.

Key words. Toxicogenomics, DNA microarray, reverse science, reverse genetics, reverse toxicogenomics

DNA microarrays

As an introductory keynote to "Toxicogenomics", a discussion on what toxicogenomics can offer to conventional toxicology is given here in this

Toxicology and toxicogenomics

Before describing an overview of toxicogenomics, what toxicology is, namely, its definition, entity, and scientific bases, should be reviewed first. Toxicology is an interdisciplinary area between biology/medicine and chemistry/physics. Key molecules participating in physiological responses and toxicological responses are presumably comparable (Figure 1), implying that physiological responses and toxicological responses may be a continuum. Pharmacology involves the identification of something available; on the other hand, toxicology involves the identification of not only the mechanism of toxicity but also clarifying a border of "nothing", i.e., NOEL, "no observed effect level", and/or NOAEL, "no observed adverse effect level". The goals of toxicology are to predict the effect of potential hazards on human health effects, and to identify the mechanism of toxicity, NOEL and/or NOAEL. In this regard, toxicogenomics is supposed to clarify comprehensively the border of "nothing". Although a prototype of "toxicogenomics" was developed in 1997 (Heller et al., 1997) to identify specific toxicological phenotypes, such as oxidative stress inducers, drug-metabolizing chemicals, and cell-cycle-specific modulators, comprehensive toxicogenomics became possible after the whole-genome sequencing project was accomplished in 2001. Because of the completion of the whole genome sequence, finally, the toxicology to predict "nothing" became possible.

Birth of reverse science & toxicology

In 1988, a new era of mouse genetics, reverse genetics, was started by generating the first knockout gene for mammalian species, murine *int-2*, by the group of Mario Capecchi's (Capecchi et al., 1988) and then Elizabeth Robertson's (Schwartzberg, et al., 1989). Thereafter, molecular biology has enabled the elucidation of biological subjects by bi-directional strategies, forward and reverse ones, i.e., the inductive and the deductive approach, respectively, where not only genes that possess a particular expression phenotype have been cloned by forward genetics, but also a number of genes of which functions were not known have been uncovered their function by reverse genetics, i.e., knockout technologies. The history of genetics teaches such bilaterally alternating strategies to strengthen scientific power. Thus, it is speculated that the inductive toxicology and deductive toxicology may complement each other.

Along with the development of the mouse whole-genome sequencing project, such bi-directional strategies for analysis became possible also in toxicology; the toxicologic phenotypes of particular toxicants and the expression profiles of pertinent genes reacting with the toxicants. While the inductive approach permits exploration of the toxicological mechanism by analyzing gene and protein expression during the course of toxicological testing, the deductive approach