

induced ultrastructural alterations in the cytoplasmic components of liver cells characterized by prominent decrease of glycogen granules and RERs, proliferation of SERs, decrease and degradation of mitochondria, and increase of lipid droplets. These subcellular alterations were mostly consistent with those noted in the guinea pig liver following TCDD treatment²⁸, but concentric membrane arrays in the liver cells were not evident in the present study, presumably due to the different experimental protocol or the different species used in the studies. In the cerebral neuronal cells in the present study, alterations in subcellular components by TCDD were also evident, despite the changes being less profound than those in the liver cells. These subcellular changes in the liver and neuronal cells may represent the cytotoxic outcome of TCDD due to oxidative cellular damage and also cellular adaptation including detoxification.

Effective prevention of TCDD-induced toxicity by administration of antioxidants such as oltipraz[5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiol-3-thione] or butylated hydroxyanisole, or by pretreatment with vitamins A and E further supports the hypothesis that oxidative processes are involved in TCDD-induced toxicity^{29,30}. Attenuation of subcellular changes in the liver and neuronal cells by transgene of TRX/ADF in the present study indicates the critical role of oxidative stress in the toxic events induced by TCDD, and also the protective function of ADF/TRX in these organs, as in our previous study of TCDD-induced bone marrow toxicity²⁶. The protective effect of TRX/ADF against oxidative cellular damage is believed to be achieved by free radical scavengers³¹, activation of DNA repair enzymes, such as activator protein endonuclease (Ref-1; redox factor-1)³², and activation of nuclear factor-kappa B (NF-kB)³³.

Taken together, the results of our present study strongly suggest that the acute toxic effect induced in the liver and brain by a single large dose of TCDD is due to oxidative cellular damage, and that TRX/ADF plays a role in protection against TCDD-induced acute toxicity. Considering the routes and concentrations of TCDD exposed to humans, research on the effect of extremely low doses of TCDD by oral ingestion on the oxidative cellular damage of target organs is clearly warranted.

References

1. Kociba RJ, Keeler PA, Park CN, and Gehring PJ. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD): results of a 13-week oral toxicity study in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* **35**: 553–574. 1976.
2. Chahoud I, Krowke R, Schimmel A, Merker HJ, and Neupert D. Reproductive toxicity and pharmacokinetics of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 1. Effects of high doses on the fertility of male rats. *Arch Toxicol.* **63**: 432–439. 1989.
3. Funseth E and Ilbäck N-G. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on blood and spleen natural killer (NK) cell activity in the mouse. *Toxicol Lett.* **60**: 247–256. 1992.
4. Ivens IA, Loser E, Rinke M, Schmidt U, and Neupert M. Toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in rats after single oral administration. *Toxicology.* **73**: 53–69. 1992.
5. Ivens IA, Loser E, Rinke M, Schmidt U, and Mohr U. Subchronic toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in rats. *Toxicology.* **83**: 181–201. 1993.
6. Erin Staples E, Murante FG, Fiore NC, Gasiewicz TA, and Silverstone AE. Thymic alteration induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin are strictly dependent on aryl hydrocarbon receptor activation in hemopoietic cells. *J Immunol.* **160**: 3844–3854. 1998.
7. Poland A and Knutson JC. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **22**: 517–554. 1982.
8. Cook JC, Gaido KW, and Greenlee WF. Ah receptor: relevance of mechanistic studies to human risk assessment. *Environ Health Perspect.* **76**: 71–77. 1987.
9. Alsarif NZ, Lawson T, and Stohs SJ. Oxidative stress induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin is mediated by the aryl hydrocarbon (Ah) receptor complex. *Toxicology.* **92**: 39–51. 1994a.
10. Stohs SJ, Hassan MQ, and Murray WJ. Lipid peroxidation as a possible cause of TCDD toxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* **111**: 854–859. 1983.
11. Mohammadpour H, Murray WJ, and Stohs SJ. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin -induced lipid peroxidation in genetically responsive and non-responsive mice. *Arch Environ Contam Toxicol.* **17**: 645–650. 1988.
12. Wahba ZZ, Lawson TA, Murray WJ, and Stohs SJ. Factors influencing the induction of DNA single strand breaks in rats by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Toxicology.* **58**: 57–69. 1989.
13. Al-Bayati ZAF, Murray WJ, and Stohs SJ. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced lipid peroxidation in hepatic and extrahepatic tissues of male and female rats. *Arch Environ Contam Toxicol.* **16**: 159–166. 1987.
14. Alsharif NZ, Schlueter WJ, and Stohs SJ. Stimulation of NADPH-dependent reactive oxygen species formation and DNA damage by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in rat peritoneal lavage cells. *Arch Environ Contam Toxicol.* **26**: 392–397. 1994b.
15. Stohs SJ. Oxidative stress induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Free Radic Biol Med.* **9**: 79–90. 1990.
16. Bondy SC and Naderi S. Contribution of hepatic cytochrome P450 systems to the generation of reactive oxygen species. *Biochem Pharmacol.* **48**: 155–159. 1994.
17. Floyd RA. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc Soc Exp Biol Med.* **222**: 236–245. 1999.
18. Hassoun EA, Li F, Abushaban A, and Stohs SJ. Production of superoxide anion, lipid oxidation and DNA damage in the hepatic and brain tissues of rats after subchronic exposure to mixtures of TCDD and its congeners. *J Appl Toxicol.* **21**: 211–219. 2001.
19. Tritscher AM, Seacat AM, Yager JD, Groopman JD, Miller BD, Bell D, Sutter TR, and Lucier GW. Increased oxidative DNA damage in livers of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin treated intact but not ovariectomized rats. *Cancer Lett.*

- 98: 219–225. 1996.
20. Hassoun EA, Wilt SC, Devito MJ, Van Birgelen A, Alsharif NZ, Birnbaum LS, and Stohs SJ. Induction of oxidative stress in brain tissues of mice after subchronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Toxicol Sci.* **42**: 23–27. 1998.
 21. Slezak BP, Hatch GE, DeVito MJ, Diliberto JJ, Slade R, Crisman K, Hassoun E, and Birnbaum LS. Oxidative stress in female B6C3F1 mice following acute and subchronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Toxicol Sci.* **54**: 390–398. 2000.
 22. Senft AP, Dalton TP, Nebert DW, Genter MB, Hutchinson RJ, and Shertzer HG. Dioxin increases reactive oxygen production in mouse liver mitochondria. *Toxicol Appl Pharmacol.* **178**: 15–21. 2002.
 23. Nakamura H, Nakamura K, and Yodoi J. Redox regulation of cellular activation. *Annu Rev Immunol.* **15**: 351–369. 1997.
 24. Nakamura H, Matsuda M, Furuke K, Kitaoka Y, Iwata S, Toda K, Inamoto T, Yamaoka Y, Ozawa K, and Yodoi J. Adult T cell leukemia-derived factor/human thioredoxin protects endothelial F-2 cell injury caused by activated neutrophils or hydrogen peroxide. *Immunol Lett.* **42**: 75–80. 1994.
 25. Yokomise H, Fukuse T, Hirata T, Ohkubo K, Go T, Muro K, Yagi K, Inui K, Hitomi S, and Mitsui A. Effect of recombinant human adult T cell leukemia-derived factor on rat lung reperfusion injury. *Respiration.* **61**: 99–104. 1994.
 26. Yoon BI, Hirabayashi Y, Kaneko T, Kodama Y, Kanno J, Yodoi J, Kim DY, and Inoue T. Transgene expression of thioredoxin (Trx/ADF) protects against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)-induced hematotoxicity. *Arch Environ Contam Toxicol.* **41**: 232–236. 2001.
 27. Takagi Y, Mitsui A, Nishiyama A, Nozaki K, Sono H, Gon Y, Hashimoto N, and Yodoi J. Overexpression of thioredoxin in transgenic mice attenuates focal ischemic brain damage. *Proc Natl Acad Sci USA.* **96**: 4131–4136. 1999.
 28. Turner JN and Collins DN. Liver morphology in guinea pigs administered either pyrolysis products of a polychlorinated biphenyl transformer fluid or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Toxicol Appl Pharmacol.* **67**: 417–429. 1983.
 29. Hassan MQ, Stohs SJ, and Murray WJ. Inhibition of TCDD-induced lipid peroxidation, glutathione peroxidase activity and toxicity by BHA and glutathione. *Bull Environ Contam Toxicol.* **34**: 787–796. 1985.
 30. Hassan MQ, Stohs SJ, and Murray WJ. Effects of vitamin E and A on TCDD-induced lipid peroxidation and other biochemical changes. *Arch Environ Contam Toxicol.* **14**: 437–442. 1985.
 31. Tanaka T, Nishiyama Y, Okada K, Hirota K, Matsui M, Yodoi J, Hiai H, and Toyokuni S. Induction and nuclear translocation of thioredoxin by oxidative damage in the mouse kidney: independence of tubular necrosis and sulfhydryl depletion. *Lab Invest.* **77**: 145–155. 1997.
 32. Walker LJ, Robson CN, Black E, Gillespie D, and Hickson ID. Identification of residues in the human DNA repair enzyme HAP1 (Ref-1) that are essential for redox regulation of Jun DNA binding. *Mol Cell Biol.* **13**: 5370–5376. 1993.
 33. Schenk H, Klein M, Erdbrügger W, Dröge W, and Schulze-Osthoff K. Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factor NF- κ B and AP-1. *Proc Natl Acad Sci USA.* **91**: 1672–1676. 1994.

BENZENE-INDUCED HEMATOPOIETIC TOXICITY TRANSMITTED BY AHR IN THE WILD-TYPE MOUSE WAS NEGATED BY REPOPULATION OF AHR DEFICIENT BONE MARROW CELLS.

Yoko Hirabayashi¹, Byung-Il Yoon¹, Guang-Xun Li¹, Yoshiaki-Fujii-Kuriyama², Toyozo Kaneko¹, Jun Kanno¹, Tohru Inoue³

¹Cellular and Molecular Toxicology Division, National Institute of Health Sciences

²Tsukuba Advanced Research Alliance (TARA), University of Tsukuba

³Center for Biological Safety & Research, National Institute of Health Sciences

Introduction

Recent studies have shown that the aryl hydrocarbon receptor (AhR) in primitive cells transmits negative signals for the proliferation of such cells^{1, 2}. As we previously reported, primitive hemopoietic progenitor cells increases in number in AhR-knockout (KO) mice; on the other hand, relatively mature progenitor cells on the other hand, decreases in number in a homeostatic manner¹.

We have reported that benzene-induced hemopoietic toxicity is transmitted by AhR³. We also found that cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) related to benzene metabolism is also up regulated in the bone marrow by benzene exposure in the bone marrow⁴. Therefore, it is of interest to hypothesize a greater role of bone marrow cells in hemopoietic toxicities rather than the hepatic metabolism. Accordingly, in the present study, benzene-induced hemopoietic toxicity was evaluated in wild type (Wt) mice after a lethal dose of whole-body irradiation followed by repopulation of bone marrow cells that lack AhR or, *vice versa*, in AhR KO mice after repopulation of Wt bone marrow cells.

As results, benzene-induced hemopoietic toxicity seems to have been transmitted through AhR, and benzene was transformed by *de novo* metabolism with CYP2E1 in the bone marrow.

Materials and Methods

Animals. The establishment of homozygous AhR KO (AhR^{-/-}) mice, the 129/SvJ strain, is described elsewhere^{3, 5}. The breeding of heterozygous AhR KO (AhR^{+/-}) males with AhR^{+/-} females generated wild-type (AhR^{+/+}), AhR^{+/-}, and AhR^{-/-} mice. The neonates were genotyped by PCR screening of DNA from the tail. Female mice (12 weeks old) were used in the study. Eight-week-old C57BL/6 male mice from Japan SLC (Shizuoka, Japan) were used as recipients for the repopulation assay and the assay of CFU in the spleen. All the mice were housed under specific pathogen-free conditions at 24 ± 1°C and 55 ± 10%, using a 12-hr light-dark cycle. Autoclaved tap water and food pellets were provided *ad libitum*.

Blood and bone marrow (BM) parameters. Peripheral blood was collected from the orbital sinus. Peripheral blood leukocyte (WBC), red blood cell (RBC) and platelet (PLT) counts were determined using a blood cell counter (Sysmex M-2000, Sysmex Co., Kobe, Japan). Bone marrow (BM) cellularity was evaluated by harvesting BM cells from the femurs of each mouse⁶. The animals were sacrificed. Then a 27-gauge needle was inserted into the femoral bone cavity through the proximal and distal edges of the bone shafts, and BM cells were flushed out under pressure by injecting 2 ml of a-MEM. A single-cell suspension was obtained by gently triturating the BM cells through the 27-gauge needle, and cells were counted using Sysmex M-2000.

Irradiation. Recipient mice were exposed to a lethal radiation of 800.1 cGy, at a dose rate of 124 cGy/min, using a ¹³⁷Cs-gamma irradiator (Gamma Cell 40, CSR, Toronto, Canada) with a 0.5-mm aluminum-copper filter.

CFU-S Assay. The Till and McCulloch method⁷ was used to determine the number of colony-forming units in the

spleen (CFU-S). Aliquots of BM cell suspensions were used to evaluate the number of CFU-S. The number of BM cells was adjusted to that appropriate for producing nonconfluent spleen colonies, and the cells were then transplanted into lethally irradiated mice by injection through the tail vein. Spleens were harvested 9 and 13 days after the injection, and fixed in Bouin's solution. Macroscopic spleen colonies were counted under an inversion microscope at a magnification of $\times 5.6$.

CFU-GM and CFU-E Assay. *in vitro* colony formation was assayed in semisolid methylcellulose culture^{6,8}. Briefly, 8×10^4 BM cells suspended in 100 ml of medium were added to 3.9 ml of a culture medium containing 0.8% methyl cellulose, 30% fetal calf serum, 1% bovine serum albumin, 10^{-4} M 2-mercaptoethanol, with 10 ng/ml murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) for CFU-GM or 1 ng/ml murine Interleukin-3 and 2 U/ml erythro-poietin for erythroid CFU (CFU-E). One-ml aliquots containing 2×10^4 BM cells were plated in triplicate in a 35-mm tissue-culture plate, and incubated for six days in a completely humidified incubator at 37 °C with 5% CO₂ in air. Colonies were counted under an inverted microscope at magnifications of $\times 40$ for CFU-GM after 6-day culture and $\times 100$ for CFU-E after 3-day culture.

BM repopulation assay⁹. The BM repopulation assay was performed similarly to the assay of CFU-S, except that 10^6 BM cells were injected into lethally irradiated mice. One month after the transfusion of BM cells, the repopulated mice were used in the experiment.

Results and Discussion

As previously reported, AhR-KO mouse showed a significant increase in WBC counts (Figure 1 A). This was also consistent with the high number of myeloid progenitor cells, *i.e.*, CFU-S-9 and CFU-S-13, observed in the AhR-KO mice (Figure 1, B). Thus, steady-state hemopoiesis is presumed to be suppressed by AhR signaling due to the possible presence of a physiological ligand, which is not readily observed in AhR-KO mice. In response to such an AhR-null effect, the AhR-KO mouse reversely shows extensive hemopoiesis in the spleen, although this hemopoietic enhancement is also reflected in another negative hemopoietic regulation in the BM. Accordingly, in the present study, benzene-induced hematotoxicity was evaluated in the Wt mice after a lethal dose of whole-body irradiation followed by the repopulation of BM cells that lack AhR.

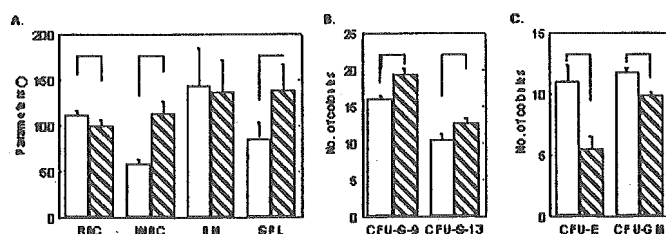


Figure 1: Comparison of various blood parameters between Wt mice (open columns) and AhR-KO mice (shaded columns)¹; A. Peripheral blood, bone marrow and spleen weight. * Parameters indicate the counts of peripheral red blood cells (RBCs, $\times 10^6$ /ml) and white blood cells (WBCs, $\times 10^6$ /ml), bone marrow cellularity (BM, $\times 10^5$ /femur), and weight of spleen (SPL, mg). B. Number of colony-forming units in spleen (CFU-S/1 $\times 10^5$ BM cells) observed on days 9 (CFU-S-9) and 13 (CFU-S-13). C. Numbers of *in vitro* granulocyte-macrophage CFUs (CFU-GM/5 $\times 10^3$ BM cells) and erythroid CFU (CFU-E/1 $\times 10^4$ BM cells). †: Significant difference between Wt and AhR-KO mice determined by *t*-test at $p < 0.05$.

Figures 2, A-C, show the RBC (A), WBC (B), and platelet (PLT: C) counts (per mL) in the peripheral blood after repopulation of the BM. In each figure, in the Wt mice repopulated with Wt BM cells (two columns on the left), the groups subjected to intraperitoneal benzene exposure (second from the left) show significant decreases in RBC and PLT counts (92% and 69%; $p=0.010$ and 0.016 , respectively) compared with the sham exposure groups (farthest left in each figure), except 2B, *i.e.*, WBC counts (96%). When the mice repopulated with AhR-KO BM cells (two columns on the right) are exposed to benzene, there are no significant differences between the sham exposure groups (second from the right) and the benzene exposed groups (farthest right) in A through C. Significant decreases

observed in the Wt mice repopulated with Wt BM cells were negated when the Wt mice were repopulated with AhR-KO BM cells; thus, the reduction in the number of peripheral blood cells observed in the Wt mice after benzene exposure is assumed to be responsible for the AhR expression in BM cells. Although the two sham exposures (i.e., Wt mice, open column; and AhR-KO mice, solid column) are essentially identical in A and C, there seems to be insufficient recovery of the BM in transplantation in Figure 2B, and the solid column is significantly reduced (see, Figure 3 on CFU-GM).

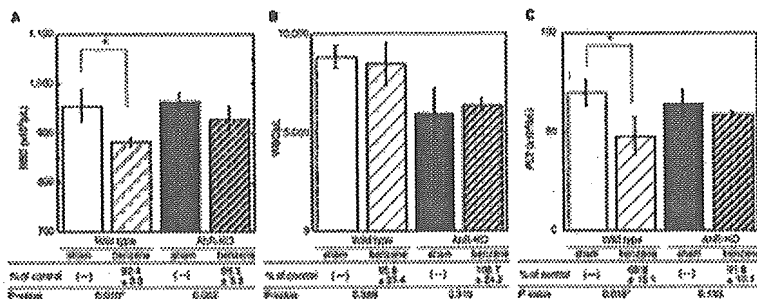


Figure 2: Comparison of various blood parameters in peripheral blood; A, RBC, B, WBC, and C, platelets (open bars vs lightly shaded bars in Wt mice repopulated with Wt BM cells; solid bars vs heavily shaded bars in Wt mice repopulated with AhR BM cells).

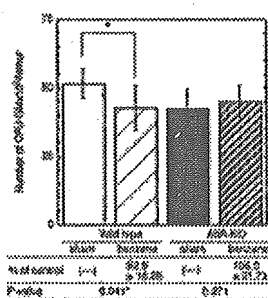
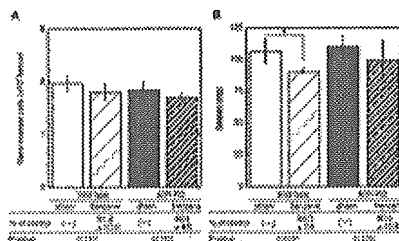


Figure 3: *: Significant difference between sham and exposed determined by t-test at $p < 0.05$.

In Figure 3, again, the significant decrease in the number of granulocyte-macrophage colony-forming units *in vitro* (CFU-GM/ 5×10^3 BM cells) in the BM cells from the Wt mice repopulated with Wt BM cells (82.9% in benzene exposure, lightly shaded column to the right of the sham exposure, open leftmost column; $p=0.041$) is negated in the BM cells from mice repopulated with AhR-KO BM cells (sham exposure, solid column; and benzene exposure, heavily shaded column, respectively). In this figure, the efficiency of repopulation with AhR-KO BM cells (solid column) seems to be insufficient, since the solid column is smaller than the open column ($p=0.025$). The mechanism underlying the incomplete recovery of AhR-KO BM cells, is still unknown; however, the sublethal irradiation of the recipient mice may be the case, where suppressive intrinsic factors may have been released from tissues given the lethal dose of irradiation received by the host animals.

Despite the insufficient recovery of the number of GM-CFU in mice repopulated with AhR-KO BM cells, number of BM cells, regardless of repopulated cell type (either Wt or AhR-KO BM cells) and type of exposure (either benzene or sham exposure), there were no significant differences in number of BM cells among the groups in a homeostatic manner (Figure 4, A; 91.4% and 92.4%, respectively, $p > 0.1$). However, after benzene exposure, a significant decrease in splenic weight was observed in the Wt→Wt group (85.0%, $p=0.022$), but not in the AhR-KO-BM→Wt group (90.0%, $p=0.173$). This supports the notion that AhR-KO negates the suppressive effect on splenic weight after benzene exposure.

Figure 4: Comparison of number of BM cells (A) or weight of spleen (B) with or without benzene exposure, in mice repopulated with Wt BM cells or in mice repopulated with AhR-KO BM cells. (Wt mice repopulated with Wt BM cells, lightly shaded columns, second from left; or without benzene exposure, open columns, farthest left, benzene exposure vs Wt mice repopulated with AhR-KO BM cells, each of the two right columns).

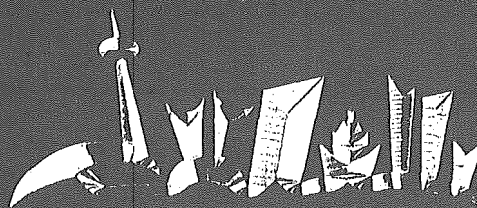


Conclusions

The up-regulation of CYP2E1 after benzene exposure was specifically observed in our previous microarray study of the bone marrow tissue⁴. The analysis of the gene expression specifically derived from the hematopoietic stem cell compartment¹⁰, and the evaluation of the toxicological alteration of such an expression as a measure of stem cell specific toxicological biomarkers are hot issues in the current hematotoxicology¹¹. Mice that have been lethally irradiated and repopulated with BM cells from AhR-KO mice essentially did not show any benzene-induced hematotoxicity, implying that such toxicity is derived from *de novo* metabolisms with CYP2E1 in the BM other than hepatic metabolism. The present study raises two questions on AhR-mediated TCDD-induced hematotoxicity: Do Wt mice repopulated with AhR-KO BM cells show hematotoxicity by TCDD unlike in the case of benzene exposure? If such is the case, what would be the transmitter from the site of xenobiotic metabolic activation to the bone marrow?

References

- 1 Hirabayashi, Y., Li, G., Yoon, B.I., Fujii-Kuriyama, Y., Kaneko, T., Kanno, J., and Inoue, T. (2003) *Organohalogen Compounds*, 64, 270
- 2 Garrett, R.W., and Gasiewicz, T.A. (2005) Meeting abstract [Molecular Regulation of Stem Cell, Keystone symposia], 61
- 3 Yoon, B.I., Hirabayashi, Y., Kawasaki, Y., Kodama, Y., Kaneko, T., Kanno, J., Kim, D.Y., Fujii-Kuriyama, Y., and Inoue, T. (2002) *Toxicol Sci*, 70, 150
- 4 Yoon, B.I., Li, G.X., Kitada, K., Kawasaki, Y., Igarashi, K., Kodama, Y., Inoue, T., Kobayashi, K., Kanno, J., Kim, D.Y., Inoue, T., and Hirabayashi, Y. (2003) *Environ Health Perspect*, 111, 1411
- 5 Mimura, J., Yamashita, K., Nakamura, K., Morita, M., Takagi, T.N., Nakao, K., Ema, M., Sogawa, K., Yasuda, M., Katsuki, M., and Fujii-Kuriyama, Y. (1997) *Genes Cells*, 2, 645
- 6 Yoon, B.I., Hirabayashi, Y., Kawasaki, Y., Kodama, Y., Kaneko, T., Kim, D.Y., and Inoue, T. (2001) *Exp Hematol*, 29, 278
- 7 Till, J.E., and McCulloch, E.A. (1961) *Radiat Res*, 14, 213
- 8 Hirabayashi, Y., Matsuda, M., Aizawa, S., Kodama, Y., Kanno, J., and Inoue, T. (2002) *Exp Biol Med (Maywood)*, 227, 474
- 9 Hirabayashi, Y., Inoue, T., Suda, Y., Aizawa, S., Ikawa, Y., and Kanisawa, M. (1992) *Exp Hematol*, 20, 167
- 10 Ivanova, N.B., Dimos, J.T., Schaniel, C., Hackney, J.A., Moore, K.A., and Lemischka, I.R. (2002) *Science*, 298, 601
- 11 Hirabayashi, Y., Inoue, T. (2005) in: *Handbook of Toxicogenomics* (Borlak J., Ed.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. Weinheim, 583.



25TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM
ON HALOGENATED ENVIRONMENTAL
ORGANIC POLLUTANTS AND POPO

DIOXIN 2005

ISPAC 20

20TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON
POLYCYCLIC AROMATIC COMPOUNDS

ORGANOHALOGEN COMPOUNDS VOLUME 67

**CD-ROM OF PROCEEDINGS OF
DIOXIN 2005 AND ISPAC-20**

Edited by E. Reiner and M. Alaee

CD production sponsored by:



CHEM

ISBN 0-470-6972-0-1

環境ストレス応答と生体ホメオスターシス

— 総論 —

井上 達

◎生体は、内外の環境中に漂ううたかたのようなものである。生体の外部環境が外気や水環境によることはもちろんのことであるが、内部環境についてもその主たる部分は、それら外部環境中の物質を食物もしくはその混入物として消化管内に取り込んだ状態にほかならないから、消化管壁には種々の防御機構が備わっているといえ、対外環境の延長線上で理解されるものである(図1)。環境と食品を同列で取り扱う所以もこの点にある。ちなみに外気を取り込む呼吸器も消化器を発生原基としているので、消化器の機能を考える際に、そうした生体内腔を貫通する外部環境としての共通性を呼吸器を含めて念頭におくことは無駄にはならない。本章における生体と内外環境物質についての生体の異物ストレス応答の各論に入る前に、環境・食品などによるレドックス制御の逸脱と、環境・食品中の成分によるそうした酸化ストレスの消去の例の概略を紹介する。



環境ストレス応答, チオレドキシシン, 放射線, 臭素酸カリウム, 食品化学発癌

各環境ストレス応答と生命系

内外の環境と生体の相互作用の中で、レドックス平衡機能に働くチオレドキシシン(TRX)などの分子種は、①原核生物から真核生物まで普遍的に備わっている酸素種による傷害の防御機構としての役割から、②有酸素下でのミトコンドリアを利用した好気的生命活動レベルで発揮される諸機能、さらに、③そうしたレドックスを生体の調節機構として利用する機能系にいたるまで、それぞれ異なったレベルでの環境応答機構に役割を果たしていることが明らかになっている¹⁾。放射線や紫外線に対する物理・化学的で直接的に作用する強い活性酸素やラジカル生成に対する還元蛋白としての役割を①とすれば、水溶性分子として排出する代謝過程での水解酵素チトクローム P450 の転写活性化など異物代謝の制御に働く機構は②に該当し、また NF- κ B のような転写因子の遺伝子発現制御を通じた免疫系のレドックス調節などは③の一例として理解される。本書では、それらレドッ

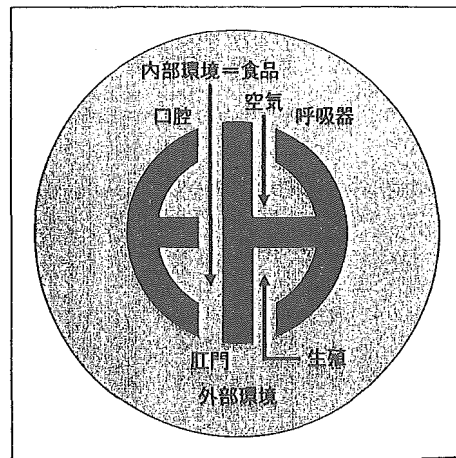


図1 生体内外環境の概念図

消化管は、外部環境の陥入組織である。食品を環境成分としてとらえる意義はこの点にある。ちなみに呼吸器は、消化器を原基として発達する組織であり同様に理解すべきものと考えられる。

クス機構の基礎については第1章、関連する病態については第2章に紹介されており、その破綻・修復と予防のためのメカニズムを研究して健康医学への方策を考えることを、本章の目的としてい

Redox regulation in xenobiotic response

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

る。

たとえば、先の TRX 遺伝子をノックアウトしてさまざまなレベルで働いている TRX を消去すると、ホモ欠失では胚細胞は胎生致死をきたし²⁾、また、その過剰発現系を作製すると、種々のレベルでのレドックスの平衡状態の破綻に対して顕著な抵抗性をみることが浮かび上がってくる(本書、平林「ダイオキシンの生体影響と防御機構」の項参照)^{3,4)}。ここでトランスジェニックマウスの作製に導入された TRX 遺伝子は、ヒトのそれなので、この分子種の機能の普遍性が窺われよう。酸化ストレスに対する還元蛋白の誘導が原核生物からヒトまでよく保存されていることから想定されるように、抗酸化ストレス機構については、種間の相溶性がよく保存されており、本章で取り扱われる種々の環境・食品などの物質の作用も、それらの種を超えて理解することが可能と考えられる。

第4章では、まず内外環境物質として生体に異物ストレス応答を迫ってくる物質が取り上げられ、生体におけるレドックス制御の逸脱の機構が紹介されており、ついでレドックス制御の積極的な維持が健康医学の中心課題にあるものとの考え方から予防的見地にたった諸研究が紹介されている。それら個別の各論に入る前に、環境・食品などによるレドックス制御の逸脱の例と、反対に環境・食品中の成分によるそうした酸化ストレスの消去を企図する例を取り上げて、総論としてのつとめを果たしたい。

① 環境要因によるレドックス制御からの逸脱

放射線や紫外線あるいは、種々の食品や食品添加物は、環境要因として、レドックス平衡を酸化傾向に傾け、酸化ストレス状態を引き起こすことがある。酸化ストレスが生体に対して引き起こす傷害は、第1章で解説されているようなさまざまな細胞機能の不全状態を引き起こす。それらには細胞のプログラム死、蛋白のミス・フォールディング、ミトコンドリアの機能不全、プロテアソームの機能障害などがあげられている⁵⁾が、とりわけその直接的な DNA 傷害に基づく修復エラーは発癌を引き起こす要因となる⁶⁾。レドックス制御が抗酸化種傷害防御機構のみならず、レドックスを生

体の調節機構として利用する機能系に広くかかわっていることからするならば、その平衡状態の逸脱の影響も、さらに広範な生物機能の障害として理解されるはずである。しかしそれらの背景は、TRX 遺伝子のノックアウトのような系で観察するときその子細が初めて明らかになるものの、通常の動物実験などによる観察ではその認識は困難であることが少なくない。裏返すならば、そうした背景にこそ、環境医学・健康医学の新しい領域としてのおもしろさが潜んでいることが理解されよう。

ここでは、電離放射線、臭素酸カリウム (KBrO₃)、ヘテロサイクリックアミンの3つの例をとりあげて、それぞれの発癌性に介在する酸化ストレスの関与の機構を簡単に紹介する。

1. 電離放射線

放射線は、その物理化学的過程で活性酸素をつくりだし、生体に酸化ストレス状態を惹起する。その詳細は、すぐれた総説^{7,8)}にゆずるが、放射線の発癌機構としては、DNA や染色体に直接傷害を引き起こす一次発癌機構と、細胞増殖の亢進やアポトーシスの抑制などのエピジェネティックな機構に基づく二次発癌機構との双方が考えられる。放射線が引き起こす DNA 傷害の発見は古く⁹⁾、前者の主要因と考えられ、酸化ストレスによるものと理解される。しかしながら放射線の引き起こす DNA 傷害は、放射線発癌や放射線白血病の成因を、それらの頻度などとの相関性においてかならずしもよく説明しない。放射線照射後の造血幹細胞の機能変化などが詳細に探求されたが、この問題は解決していない。実験的に放射線照射を行った後に骨髄移植を行うと、骨髄は波をうって幾度かのオーバーシュートを繰り返しつつ回復に向かうが最終的には完全な回復をみることはなく、たとえば造血前駆細胞のコロニー形成能を指標にみる限り 80~85%程度の回復にとどまる¹⁰⁾。これは骨髄の造血支持細胞の放射線障害の修復不全によるものと考えられ、骨髄は、たとえば *myc* の過剰発現状態をもって幹細胞の S 期分画を高目に維持し、末梢血が無処置の状態に匹敵するまでの回復を下支えしている¹¹⁾。こうした骨髄の造血支持細胞の造血にあたる持続的なストレス¹⁰⁾や、放射

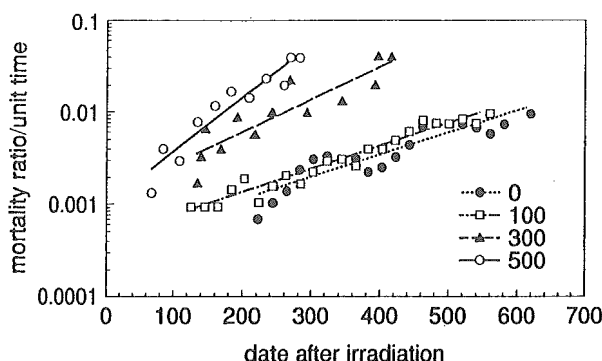


図2 ゴンベルツ表現による照射線量に応じたマウスの死亡曲線の変化

横軸に年齢をとり、縦軸に累積死亡率を対数でとると、マウスは、指数関数的に直線的に死亡する(非照射対照群参照)。照射線量を増すごとに、死亡率は傾きが急峻化し、促進老化の形をとって早期に白血病死する(照射線量, cGy)。

線によって引き起こされる遺伝子の不安定性につながる要因が、エピジェネティックな白血病の発症機構の一翼となっているものと考えられる(図2)。図に見られるように放射線量を増すに従って死亡直線は傾きが急峻化する。反対に TRX トランスジェニックマウスによる放射線白血病の頻度低下と死亡の遅延の観察はまだできていないが、造血幹細胞などの放射線感受性や紫外線感受性が TRX トランスジェニックマウスで寛恕になることが観察されている。

2. 臭素酸カリウム(KBrO₃)

臭素酸カリウム(KBrO₃)は、製パンの過程でソフターとしてドー(dough)に混入させるものである。かつて黒川ら¹²⁾は、ラットでこのものに腎腫瘍誘発性があることを見出した。実験は数次にわたって行われているが、F344系雌雄のラットを用いた104週の飲水投与実験では、500, 250, 125, 60, 30, 15, および0ppmの投与に対して、シグモイド状の発生頻度の腎細胞癌が観察され、閾値の設定が困難な結果であった¹³⁾。実際に製パン業に使用されていたことと相まって、KBrO₃はサルモネラ菌に対する復帰突然変異を引き起こさないの、その発癌機構が関心を集めた。その後の研究で、これは、KBrO₃が放出する活性酸素がDNA付加体、8-hydroxydeoxyguanosineを形成することによる一次発癌と、遺伝子傷害性化学物質*N*-ethyl-*N*-hydroxyethylnitrosoureaの前処置後の投与に

よって発癌性の亢進を示す二次発癌との双方の性質を有する、弱いながらも完全発癌物質であることが明らかになった¹⁴⁾(脚注*1)。昨今は、食品もしくは食品添加物の生体影響、発癌性のいかにに対する関心が高まっているが、この臭素酸カリのそれはひと昔前のことでもあり、歴史的に特筆される事件として記憶されることとなった。

3. ヘテロサイクリックアミン(MelQX)による発癌

MelQXは、魚の焼けこげから抽出された物質のひとつであり、その後高熱で焼いた肉類でも形成されることの知られている癌原物質である¹⁵⁾。このMelQXによる発癌は、抗酸化物質によって抑制されることが知られている(後述)ので、酸化的DNA傷害に起因するものと想定されていたがその直接的証明はなかった。これに対して、あらかじめ遺伝子傷害性化学物質のdiethyl nitrosamine(DEN)を投与しておいて、これにMelQXと種々の合成抗酸化剤を併用投与し、前腫瘍性病変と考えられている胎盤型グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST-P)陽性巣を指標に抗酸化剤の効果をみた実験がある¹⁶⁾。それによれば、1-*O*-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone(HTHQ)などの合成抗酸化剤は、GST-P陽性巣の抑制が顕著であったに

*1: アメリカをはじめとする各国は、このものの発癌性が軽微であったので、KBrO₃を製パン過程で十分加熱することによって残留量を低く抑えるなどの注意喚起をもって移行措置とし、後に使用中止とした。

もかわらず、また同時に行った茶カテキンでは顕著な GST-P 巢形成の抑制が認められたにもかかわらず、DNA 付加体 8-OHdG の形成の抑制は認められなかった。そして HTHQ の抑制効果は、MelQX の代謝活性化の抑制によるものであったものと結論している。MelQX の発癌性には、同時にレドックスを介した nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) の関与を経て酸化 DNA 傷害が介在するものと報告¹⁷⁾もみられるので、双方の過程が存在するものと想定され、酸化ストレスによるレドックス制御の破綻がむしろ双方の過程にかかわっているものとも考えられる。

● 環境制御によるレドックス制御逸脱の修復

酸化ストレスを低く抑制することによって、レドックス平衡が逸脱するのを予防する試みが健康医学の立場から活発に進められている。筆者のこれまでににかかわってきた関連する研究の中から、カロリー制限による放射線白血病の抑制、茶カテキン類や TRX 過剰発現マウスを用いた実験癌の予防などについて紹介し、最後に、アリーヒドロカーボン受容体結合食品に関する松井らの研究について簡単に解説して、本章の総論としての務めを果たしたい。

1. カロリー制限

カロリー制限の歴史は古く、1935 年の McCay の実験的試みにまでさかのぼる¹⁸⁾。Yu らは、ラットを用いたカロリー制限実験で、寿命の延長にリンクした腫瘍死の遅延を観察した。興味深いことに彼らはこの実験でサテライト群をもうけて経時的に屠殺し、先の腫瘍死の遅延が腫瘍発生の遅延ではなく腫瘍の成長の緩徐化にあることを明らかにした¹⁹⁾。このようにカロリー制限による腫瘍死の遅延・抑制のメカニズムが、腫瘍の発生そのもの、すなわち一次発癌に影響するのか、腫瘍の増生、すなわち二次発癌としてのプロモーションに影響するのかを明らかにするため、放医研の吉田らは、興味深いデザインの実験を行った²⁰⁻²²⁾。放射線白血病誘発のための放射線 1 回照射(生後 8 週に施行)の前と後に分けて、カロリー制限を 5 週齢で開始し、照射後、通常食にもどす照射前カロリー制限群(①)、反対に照射までは通常食で飼育

し、照射直後から制限する照射後カロリー制限群(②)、そして、照射前後を通して生涯カロリー制限を行う群(③)の各群を設けた。①はカロリー制限により、白血病の潜在的標的細胞である造血幹細胞の数量が減ることが知られているので、いわばカロリー制限のイニシエータに対する修飾因子としての役割に注目した群と考えられるのに対して、②は、照射後にカロリー制限を行うもので、いわばカロリーというプロモータ作用を抑制した状態に注目した群と考えることができる。結果としてカロリー制限は、③の生涯カロリー制限群でもっとも白血病の発症が抑制されたことはともかくとして、②でも発症が抑制されることがわかり、イニシエータ作用の方も、プロモータ作用の方にも、抑制効果があるものと考えられた(脚注*2)。意外にも①群は、照射後、通常食に戻すことにより急速に体重は増加し、カロリー制限を行わなかった通常食群における放射線白血病頻度と有意差はみられず、抑制効果はなかったので、ここで想定したカロリーの“プロモーション効果”の方が大きいことが示される結果となった。ここでカロリー制限は、エネルギー消費の抑制として酸化の防止に役割を果たしているわけであるが、そのことを実験的に明快に示した例として、Merry の行ったマイクロアレイによる解析²³⁾がある。その結果によれば、組織におけるレドックス状態は、蛋白や脂質、そして DNA の酸化産物の蓄積が顕著であることはもちろんであるが、カロリー制限などと比較して明らかになる点は、むしろ、レドックス制御による転写活性化による細胞機能により大きな差が見出されることとして、これが、加齢過程のメカニズムを解き明かすことにつながる、としている。

2. 緑茶成分

緑茶成分の抗酸化作用は、今日では知らない人がないほどであるが、緑茶のどの成分が活性酸素の吸収にどのように作用するのかの詳細や、その有効量と実際の飲茶量との関係などの細かい点にはつ

*2: ところで、この③の生涯カロリー制限群の白血病頻度は抑制されたものの、この群の寿命は、最長ではなかった。発育早期の過度なカロリー制限は、健全な老年期の維持に対して負の影響を及ぼすものようである。

きない興味がある。ちなみに緑茶は、2-nitropropane(2-NP)のような一次発癌剤²⁴⁾に対しても、pentachlorophenol(PCP)のような二次発癌剤²⁵⁻²⁷⁾に対しても発癌の抑制効果が観察されている(脚注*3)。発癌用量の2-NP投与群に緑茶成分として通常の飲茶の要領で熱湯抽出した茶を飲水として飲ませた群では、顕著なトリグリセリドの低下、8-OHdG付加体の無処置群レベルまでの低下、肝臓のBrdUrd標識率の同じく無処置対照群レベルまでの低下をみている。このときの飲茶に含まれていた緑茶成分は、epigallocatechin gallate(EGCG)で822 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、総カテキン量として1,606 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であったが、その総飲水量は、1日当りEGCG換算で118 ml、カテキン換算で106 mlのお茶に相当し、通常のヒトの日常摂取量に近い値であった。発癌機構のどの部分にEGCGが関与するのかを考えてみると、これらの抗酸化成分がプレイオトロピックに発癌のさまざまな部分に関与していることがわかる²⁷⁾。

3. 実験発癌予防

魚の焼けこげから抽出された変異原物質ヘテロサイクリックアミン類と酸化ストレスの関連については先に述べた。これは、チトクロームP450の1A2による*N*-hydroxylationと一次酵素による、*N*-acetyl transferaseによってDNA傷害物質が生成され、これがDNA-付加体の形成に関与しているものと考えられている。そこで、抗酸化物質との併用による癌予防を念頭においた精力的な実験が行われている¹⁷⁾。さまざまな合成抗酸化剤のうち、この報告では、HTHQにもっとも強い癌抑制が観察されているが、興味深いことに、これらの抗酸化物質がその抗酸化作用よりも、MeIQXの代謝活性化を傷害することによって発癌抑制に作用していることがわかったという。この解釈の正否は、代謝活性化による癌原性物質の生成機構をよく研究しないとわからない点があるが、前項の茶カテキンの作用機序のところでも述べたように、抗酸化物質の癌抑制機構は、多分にプレイオトロピックに働いていることが知られており、単一の

メカニズムによるとは限らない点で、研究では注意して吟味する必要がある。実験癌予防としては、TRXの過剰発現マウスによる、酸化ストレス消去モデルがある。このものは、急性の酸化ストレス障害のみならず、ベンゼンによる白血病発症を抑制し、さらに寿命の延長をももたらした(本書、平林「ダイオキシンの生体影響と防御機構」の稿参照)。

4. アリールヒドロカーボン受容体(AhR)と結合する食品

シトクロームP450の分子種1A1の発現を引き起こす転写因子としてHoffmannらおよび藤井らのグループによってそれぞれクローニングされたAhRはダイオキシン受容体とも呼ばれ、このものはダイオキシン類(TCDD)と結合するとArntとヘテロ二量体をつくり、DNAの特定領域に結合して、CYP1A1の転写の活性化を惹起する。この応答領域はXenobiotic Response Element(XRE)といい、TRXの発現調節領域にもこのXRE配列が見出されている²⁸⁾。松田らは、このAhRが、結合する生体内天然リガンドの未知なオーファン受容体であることに注目し、これを探索していく過程で、天然の生体物質としては尿中に排泄されるインディルピンがリガンドとなることを見出し²⁹⁾、さらに食品中にも多数のAhRリガンドがあることを見出した³⁰⁾。それらの中には、緑茶、ウーロン茶、コーヒー、リンゴジュース、などの飲料中に含まれているものもある。AhRの異物代謝機能は、TRXの制御を受けることが知られており³¹⁾、これらの食品は、なんらかの形で異物代謝に関与するものと考えられるが、それが生体にとって吉の役割を持つのか、潜在的な凶の役割を持つのか、わかっていない。

● おわりに

以上、レドックス制御にかかわる生体の反応機構について通覧した。各論では、いくつかの代表的なテーマに沿って、より詳細なメカニズムについて解説される。

文献

- 1) Packer, L. and Yodoi, J. (eds.): Redox Regulation of

*3: 一次発癌、二次発癌については、本稿の「環境要因によるレドックス制御からの逸脱、1. 電離放射線」の項参照。

- Cell Signaling and its Clinical Application. Marcel Dekker, New York, 1999, p.328.
- 2) Matsui, M. et al. : *Dev. Biol.*, **178** : 179-185, 1996.
 - 3) Takagi, Y. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96** : 4131-4136, 1999.
 - 4) Mitsui, A. et al. : *Antioxid Redox Signal*, **4** : 693-696, 2002.
 - 5) Andersen, J. K. : *Nat. Med.*, **10**(Suppl.) : S18-25, 2004.
 - 6) Klaunig, J. E. and Kamendulis, L. M. : *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **44** : 239-267, 2004.
 - 7) Riley, P. A. : *Int. J. Radiat. Biol.*, **65** : 27-33, 1994.
 - 8) Trosko, J. E. and Inoue, T. : *Stem Cells*, **15**(Suppl. 2) : 59-67, 1997.
 - 9) Muller, H. J. : *Science*, **66** : 84-87, 1927.
 - 10) Cronkite, E. P. and Carsten, A. L. : Proc. The Sixth Int. Congr. of Radiat. Res. (ed. by Misono, K. et al.), Jpn. Assoc. Radiat. Res. Toppan Printing, Tokyo, 1979, pp. 648-656.
 - 11) Shuin, T. et al. : *Cancer Res*, **46** : 5302-5311, 1986.
 - 12) Kurokawa, Y. et al. : *Gann*, **73** : 335-338, 1982.
 - 13) Kurokawa, Y. et al. : *J. Natl. Cancer Inst.*, **77** : 977-982, 1986.
 - 14) Kurokawa, Y. et al. : *Environ. Health Perspect.*, **87** : 309-335, 1990.
 - 15) Ohgaki, H. et al. : *Princess Takamatsu Symp*, **16** : 97-105, 1985.
 - 16) Hirose, M. et al. : *Food. Chem. Toxicol.*, **37** : 985-992, 1999.
 - 17) Murata, M. et al. : *Jpn. J. Cancer Res.*, **90** : 268-275, 1999.
 - 18) MacCay, C. M. et al. : *J. Nutr.*, **10** : 63-79, 1935.
 - 19) Yu, B. P. et al. : *J. Gerontol.*, **37** : 130-141, 1982.
 - 20) Yoshida, K. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94** : 2615-2619, 1997.
 - 21) Yoshida, K. et al. : *IARC. Sci. Publ.*, **156** : 553-555, 2002.
 - 22) Yoshida, K. et al. : Radiation and homeostasis. In : Proceedings of the International Symposium of Radiation and Homeostasis (ed. by Sugahara, T. et al.). Elsevier, Oxford, 2002 pp.455-458.
 - 23) Merry, B. J. : *Aging Cell*, **3** : 7-12, 2004.
 - 24) Sai, K. et al. : *Food Chem. Toxicol.*, **36** : 1043-1051, 1998.
 - 25) Sai, K. et al. : *Cancer Lett.*, **173** : 163-174, 2001.
 - 26) Sai, K. et al. : *Carcinogenesis*, **21** : 1671-1676, 2000.
 - 27) Sai, K. : *放射線科学*, **42**(6) : 113-119, 1999.
 - 28) Masutani, H. et al. : *J. Toxicol. Sci.*, **26** : 199, 2001.
 - 29) Adachi, J. et al. : *J. Biol. Chem.*, **276** : 31475-31478, 2001.
 - 30) Matsui, S. : 未発表データ.
 - 31) Yoon, B. I. et al. : *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **41** : 232-236, 2001.

* * *

はじめに

Introduction



井上 達

Tohru INOUE

国立医薬品食品衛生研究所

解読された全ゲノムの塩基配列を利用して明らかにしうることは、ゲノム構造に拘束された決定論的な生命の枠組みと、遺伝子発現の可塑性によって展開する確率論的な生命の多様性である。前者ではミレニウム計画などで傾注された薬物代謝における SNPs の発見やテーラーメイド創薬戦略の研究が進んだ一方、後者でいまゲノムと環境の相互作用によって展開される生物の多様なエピジェネティクスとしての環境生体応答学がおもしろくなっている¹⁾。トキシコゲノミクス²⁾はどちらかといえば後者に属し、それはトランスクリプトミクスやプロテオミクス、インフォマティクスなどの総体によって描きだされるトキシコパノミクス(toxicopanomics)とでもよぶべき新領域である。

トキシコパノミクスは物質と生体の応答学であるが、生体側からみる手法をトランスクリプトミクスと考えれば、生体内生成物の側からみる解析手法は主としてプロテオミクスによる。前者では DNA チップなどの高密度集積アレイ解析を用い、後者では GC マスなどの蛋白定量解析手法を適用する。ちなみに代謝に注目すると、前者は、メタボミクスの手法、後者では代謝物に焦点をあてたメタボロミクスを中心に探査することになる。

この世界ではゲノム科学が取り組んできた帰納的解析にとどまらず、遺伝子発現や蛋白発現をフェノタイプとして用いることによって演繹的に後生的な予測が可能となる。オミクス領域を積極的にそうした予測のツールに発展させようとする点に、ここで取り上げるトキシコパノミクスの、決定論的な応用としての“マイクロアレイ診断”と異なった特徴がある。遺伝子発現情報は塩基配列情報にとどまり転写の経路や蛋白がフェノタイプとして持つ情報の多様性(complexity)をカバーしないから予測は限定的になる。エピジェネティクスに対する予測能は未知である。そうした限界にもかかわらずこのものの生命の安全性や環境科学へ果たす役割には大きな期待が寄せられている。

文献

- 1) 井上 達：毒性学の現状と展望—あたらしいバイオサイエンスとしての生体異物応答科学。科学, 74(1) : 18-23, 2004.
- 2) Inoue, T. and Pennie, W. D. (ed.) : Toxicogenomics. Springer-Verlag, Tokyo, 2003, pp.1-11.

医薬品の毒性評価、その未来 —実験動物と動物試験の展望—

井上 達 国立医薬品食品衛生研究所

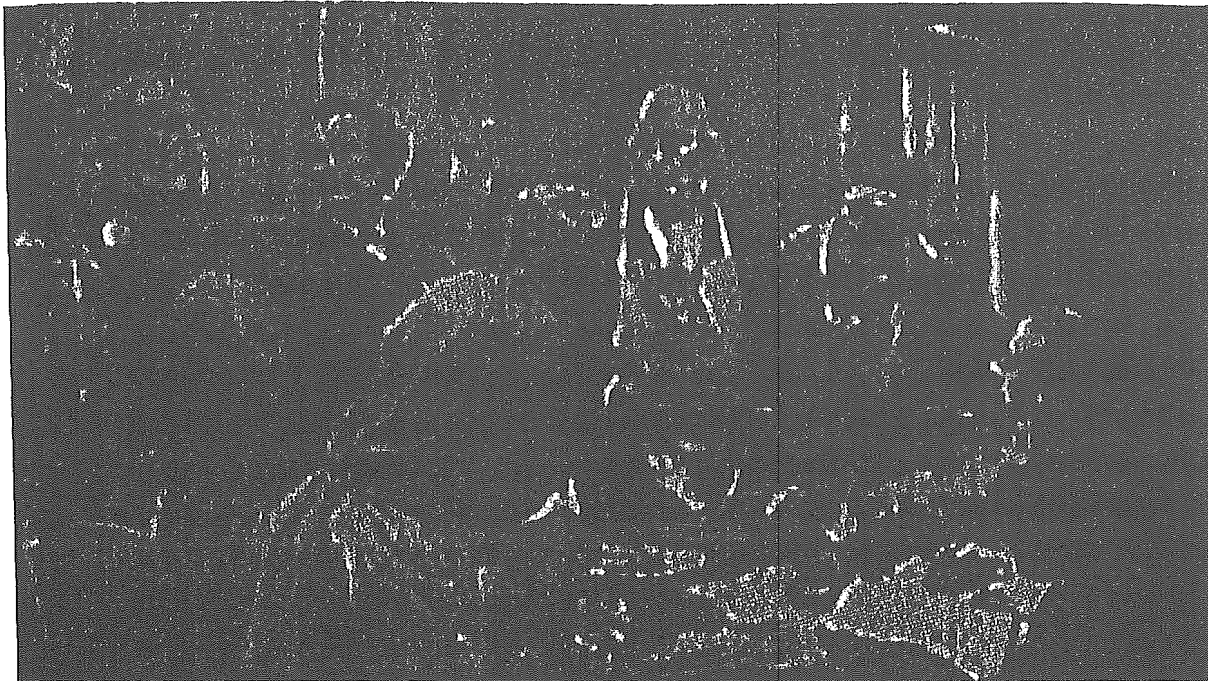


図1 実験示観を行う
クロード・ベル
ナル(中央、
正面を向いて
いる人物)と、弟
子たち(平田実
「図説科学・技術の
歴史 下」、朝倉書
店、1985年より)

はじめに

前臨床試験、あるいは非臨床試験とよばれる医薬品の毒性評価試験は、単回投与、反復投与、遺伝毒性、がん原性、および生殖発生といったコア試験、ならびにトキシコキネティクス、皮膚感作性、皮膚光感作性、といった特殊毒性試験など多くの試験バッテリーから構成され、多数の実験動物が用いられる^{1, 2)}。

国会で「動物の愛護および管理に関する法律」³⁾が見直されようとしている折りでもあり、一般の人々は必ずしも事柄を筋道を立てて考えてくれる訳ではないから、これは人々の眼に好感をもっては迎えられない。しかしそれら動物実験の内、遺伝毒性試験やがん原性試験のように、その名称そのものが目的を顕す試験はそれとして、いわゆる毒性試験が前臨床試験のスタートライ

ンで求められる肝心な情報は、当該の薬物を治療に際してどの程度の用量まで投与し得るかという点にある。これ以上投与すると死を招くというような危険性の限度を知ることなしにヒトへの治療に用いることは道義的に無理だからである。

そう考えると、動物実験はなくせるはずがないという結論がアツという間に出てきて、議論はすぐさま、せめて少しでも使用動物を減らすワケにはゆかないかという展開になってくる。事実今、動物愛護団体が動物実験に求めている努力目標は、動物実験の縮少(reduction)、改良(refinement)、そして代替(replacement)、すなわち“3R”である。

今日、本邦で用いられている研究用の動物などすべてを含んだ実験動物の年間使用数量は、ラットが124万匹、マウスが280万匹であり⁴⁾、この数量は膨

本稿は、2004年11月25日日本学術会議第27回トキシコロジー研究連絡委員会シンポジウムにおいて「動物実験と科学」と題して行った講演の骨子を元に趣旨をまとめたものである。

大というべきかもしれない。しかしラットの場合、1995年は209万匹、1998年は153万匹と発表されているので、これは1995年に比べれば、60%という激減であることも事実である。マウスに至っては、1995年の668万匹の何と42%である。

実はこれは驚くにはあたらないのであって、この背景には、科学史上まれにみる激動的な研究の質の変化が進行している。ここ10~15年の実験動物の利用法は大きな変化を遂げている。それがそのまま現段階では使用動物の単純な縮小につながっているとは思われないが、闇雲に動物に何かの処置を施して観察をするといった研究で得られるものの成果の質が今見直されつつある。つまり、ここでは、実験動物の使用数は科学の発展段階に応じて増減するということが見事に示唆されているのである。

先の動物数の内、毒性試験に用いられた動物数を推定してみると、2001年は、ラットが66万匹、マウスが112万匹である。毒性試験に用いられた動物数については変遷の詳細が手許にないが、こちらの方では、いわゆる医薬品の各国間相互承認の国際協調会議(ICH)⁹⁾の進行に伴って不必要になっている試験がかなりある。それがどの程度この間の動物数の減少に貢献しているかは興味がある。ともかくこのように減少しつつある動物実験であるが、さらに将来を見据えたとき、未来の動物実験はどうなってゆくのであろうか。これについては、創薬のための最低限の動物実験はなくすことは不可能であり、未来永劫続けざるを得ない、という考え方が意外に多い。

こういう質問がある。「動物実験は、たとえば西暦3000年、つまり今から千年後にも依然として続けられているとあなたは思いますか?」。このような質問に対して、yesと考えるヒトからは、

「千年後とはいえ、あらかじめ前臨床動物実験が行われていないようなriskyなおくすりをあなたはご自分のお子さんに飲ませますか?」と反問が返ってくる。千年たっても今日のように次々と新薬の開発を続けなければならぬほど、所詮、究極のよく効くくすりなどというものは創れるはずがないという科学の未来観は、そのまま生命の神秘に対する畏敬の念に発した敬虔な考え方とも考えられるが、もう1つ、病気の治療という応用科学の終局を、科学の発展に終点がないという命題を語るときの「科学一般」と混同している向きもある。たしかに、先天性の疾患やがんなどに対して限られた努力あるのみで、本源的な解決には至り得ないものとも考えるのはやむを得ないことかもしれない。しかも、病気の中には時代と環境に即して新たに生まれてくるものも少なくないし、現状をみる限りでは、解決したものより残されている難題と難治の病の方が多い。しかし、今アニリンの合成に起源を求めるとなれば、これまでの目覚ましい発展は近代のわずか170年足らずの間の成果にすぎない。それは究極のゴールからみるならばささやかなものに過ぎないかも知れないが、この間にはもはや治療方針の根幹の確立した病気もあれば、事実上消滅してしまったものさえたくさんある。現状の動きがいかにか萌芽的にもせよ、将来、科学の発展とともに、実験動物がその必要性を失ってゆく運命にあることは確かなことなのだと思う。あえて動物福祉とか、動物愛護とかといった社会運動の助けを借りることなく、科学の発展そのものの結果として…。問題はそれがどのような道筋を歩んでゆくのかにある。

本稿では、動物実験が歴史に登場してから今日に至るまでの流れを通覧し、これからの医薬品の毒性評価などにかかわる動物利用の行方を、クロード・

ベルナル、ブルース・エームズ、および、パトリック・ブラウンの3人を取り上げて考えてみたい。

クロード・ベルナル： 実験医学の生みの親

動 物実験を研究に導入することの意義を最初に学説として主張したのは、クロード・ベルナル(Claude Bernard, 1813-1878年)であると伝えられている。ベルナルは、「実験医学序説」を著し、動物実験の生みの親として知られる⁶⁾。岩波文庫版実験医学序説によれば、ベルナルは1813年に東部フランスのサン・ジュリアンに生まれ、21歳の時、劇作家を志してパリに出て後、文芸批評家の忠告に従って医学の道に進んだ。生理学者マジャンディの弟子となった後、胃液に関する研究で学位を得て、膵液の消化作用の研究によりマジャンディの後任として、ゴレージュ・ド・フランスの教授になっている。

実験動物を用いることによる予知力と再現性のある生物学の発展はベルナルによって始まった。これは自然や病態に対して、静的な観察結果の記載や解釈をもって主体としたそれまでの博物学や記載科学に対して、生物に直接働きかけ、その反応から生体の仕組みや病態を証明しようとする“近代科学思想”の幕開けであり、今日的な眼で見ると、それはトキシコロジーの萌芽そのものをも意味していた(図1)⁷⁾。だから彼は「観察家」という名称を、自らは変化させることなく、したがって自然が示すままに蒐集した現象の研究に単純または複雑な探究方法を応用する人に与えたとし、「実験家」という名称を、自然現象を変化させたり、何らかの目的をもってそれらを変化させ、自然が彼に提供しなかったような環境や条件において自然現象を出現させるために単純または複雑な探究方法を応用する

人に与える⁸⁾として、両者を截然と区別している。

ベルナルは肝臓がグリコーゲンを貯蔵する機能を持ち、これによって糖代謝の調節に重要な役割を果たしていることを発見した(1843-1857年)。これは「器官の内部分泌」という概念の基礎となり、今日の糖尿病の概念が形成されるにあたってきわめて重要なものとなった。続いて膵液についての彼の研究(1849-1856年)では、消化の生理学と病理学にも新発見をもたらした。

ベルナルによる第3の発見として知られる研究は、血管運動神経機構についてである。これは正常生理学にとって重要であるだけでなく、病理学においても適用される面が多い。たとえば、能動性充血やたぶん狭心症の理解にも重要であるし、病理学と生理学の境界領域に存在する多くの問題が関係している⁹⁾。これら3つの分野のどの1つをとっても歴史に残る偉業であるが、彼は自らのうち立てた実験医学の理念に基づいて、そのすべてをものしたのであり、かくしてフランスに実験医学の伝統の根を降下さしめることとなった。

年月を経てベルナルの医学方法論は、実験動物を用いた研究に利用されるだけでなく、生物を用いた試験にも広く用いられるようになり、やがてその量は肥大し、実験動物の“大量消費”

時代を到来させることになっていった。だから、ベルナルは、同時に、人類の歴史で最初の実験動物の「敵」でもあったといえることができる。ヒトへの毒性の判断に実験動物を用いて毒性予測をする方法は、これをシステム化した結果、安全性予測の方法に限りない進展をもたらしたが、同時に動物実験のニーズも限りなく増大した。とりわけ、“発がんのメカニズムは不明でも、発がん性の予測は可能”とする命題によって基礎づけられた「発がん性バイオアッセイ試験」は、実験動物で得られる情報を“蓋然性”から“可能性”に大胆に引き上げて解釈することにより、発がん性に対する驚異的な予測能力をもったトキシコロジーの方法を人類に提供するところとなった。結果として、他をもって替えることのできない実験動物の“消費”につながっていったことは皮肉であるが、これも科学史の過渡期における事柄と考えられなくもない。

ブルース・エームズ： 復帰突然変異試験の歴史的意義

ブルース・エームズ (Bruce N. Ames) に彼がサルモネラ菌による復帰突然変異の検出によるスクリーニング系の開発を手がけた意図を聞いたことはないが、1973年にAmesらによって開発された復帰突然変異試験は、

安全性試験のために“工業的”に“消費”されはじめていた実験動物による発がん性試験に対して、哺乳綱動物を用いる必要のない試験法の展望を示した点で画期的な発明となった¹⁰⁾。今日Ames試験とよばれているこのサルモネラ菌の突然変異でヒトの発がん性の予測を試みる方法の予知能には、初期には当然のことながらさまざまな技術的問題が含まれていた。これに対して当初の His⁻→His⁺の復帰突然変異を起こしやすい相補株を幾種類か選ぶ工夫に始まり、rfa⁻遺伝子の導入によって膜透過性の亢進を促したこと、uvrB⁻やpkM101による修復能の欠失を導入したことなど種々の改良が加えられた。わけても、ラット肝のマイクロソーム分画(S9mix)を用いて代謝を促すことにより、サルモネラ菌に対して直接の変異原性のない薬物についても変異原性のある物質への活性化を予知する方法を開発した成果は¹¹⁾、今日に至る実用的スクリーニング系の完成に大きく寄与した(図2)。

結局、発がん性というメカニズム特性故にということはあるにせよ、この試験管内試験で遺伝子突然変異活性が陽性となった物質に対しては、もはや利用の難しい物質として発がん性バイオアッセイ試験は行われず、利用が放棄されることが稀でなくなった。このためこれに該当する実験動物のニーズが一挙に消滅した。Amesが“すべての発がん物質が変異原物質だ!”¹²⁾と発表したとき、そのことは必ずしもAmesの意図するところではなかったと思われるが、この科学の発展は膨大な動物実験を一部にせよ初めて不必要なものにした点で歴史的に不朽の一步となった。それはH. J. Mullerが放射線でショウジョウバエの表現型に変異原性を発見してから約半世紀¹³⁾、Charlotte Auerbachらがnitrogen mustardsに化学物質としてはじめての変異原性を証明し

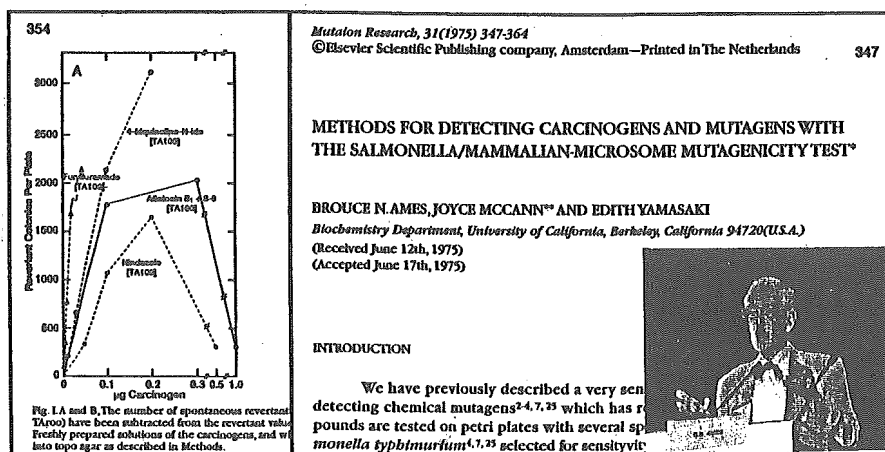


図2 ブルース・エームズとマイクロソーム分画を用いた試験管内代謝試験を発表した論文(1975年)写真は、2001年の第9回国際トキシコロジー学会(パリ)にて講演をするエームズ博士。

てから約30年のちのことである¹⁴⁾。

エームズの功績により、科学の発展が実験動物の運命を本質的に決定することが示唆されたが、今日的にみたとときに将来の実験動物の運命を握るキートとその道筋とは如何なるものなのだろう。筆者は、それはマイクロアレイ技術を基礎としたトキシコジノミクスに負うところが甚大であろうと想定している。

**パトリック・ブラウン：
トランスクリプトームの描き出す未来像**

図3は、左手のマウスやラットなどいわゆるげっ歯目の動物の死亡カーブからヒトのそれに至るまでの変化を、縦軸を指数関数的に、横軸を通常尺でプロットしたものである。この図に明らかなおおりに、げっ歯目の動物から霊長目の動物まで、哺乳綱動物の寿命は連続的に次第に緩やかな寿命曲線をとるように発達して今日に至っており、それら相互の間には、基本的には遺伝子発現などの指標上の相互外挿性があるものと想定される。遺伝子発現を指標とした情報がその橋渡しになるものとの想定もこうした背景となる生物の進化を基礎にしている。

分子生物学の発展は、生物学の課題に対して、帰納的に背景機構を解析理解する方法と、演繹的に蓋然的な推論をする方法との双方向的戦略の可能性を切り開いた。トキシコジノミクスの技術的基礎はゲノムの大容量の発現情報処理にあり、後で述べるようなマイクロアレイ法やDNAチップ法の開発によって可能となった。トキシコジノミクスは、始まったばかりの新しい方法論である。「Nature Genetics」の特集に、Brown & BotsteinのDNAマイクロアレイの総説¹⁵⁾や、Debouck & Goodfellowの医薬品開発への応用の解説¹⁶⁾が掲載されたのは、わずか5年前のことに過ぎない。トキシコジノミクス

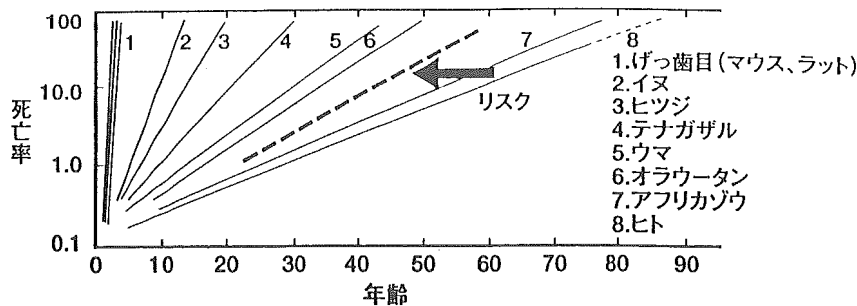


図3 ゴンベルツ関数で示したおもな哺乳綱動物の死亡曲線
生体への毒性作用は、図の矢印(→)の方向に直線の傾きを急峻化する効果をもつ。

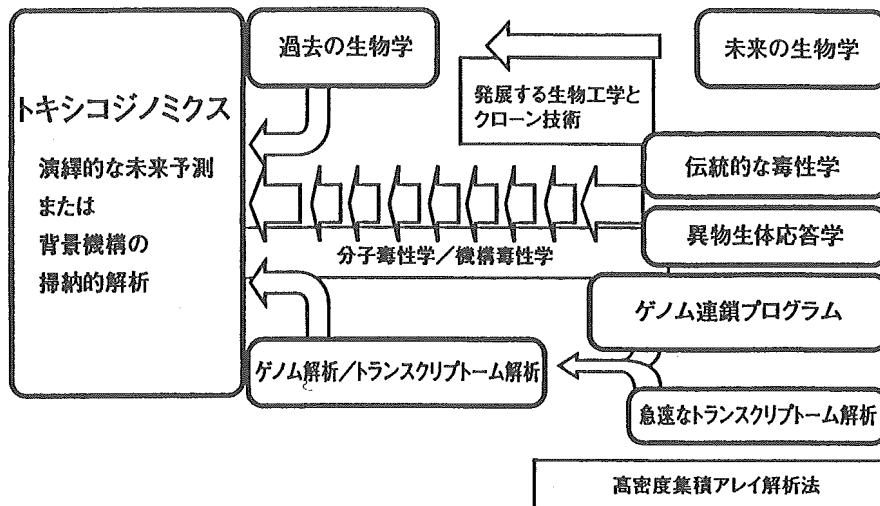


図4 トキシコジノミクスの成立に至る系譜
トキシコジノミクスは、①解析のならばに演繹的手法に基づく生物学全般、②伝統的な毒性学と異物生体応答学、および、③ゲノム配列と高密度集積アレイ解析法の3つの流れが合流してできた新しい予測科学である。

では、他のゲノムサイエンスと同様、DNAマイクロアレイやジーンチップを基本技術として用いる^{17, 18, 19)}。DNAマイクロアレイは、スタンフォード大学のPatrick O. Brownらによる高密度集積アレイ解析法¹⁵⁾を基礎としており、cDNAを、スポットターを用いてガラス基盤上に固定し、これに組織から抽出したmRNAをcDNAに転写させると同時に蛍光標識してハイブリダイズさせている^{20, 21, 22)}。

このようなマイクロアレイ技術等をトキシコロジーに適用するのがトキシコジノミクスである²³⁾が、その結果、ゲノム科学が従来の帰納的解析(inductive analysis)にとどまらず、演繹的(deductive)に未来予測を可能とするツール(演繹的毒性学²⁴⁾“deductive toxicology”)になったことは大いに注目し値する。図4は、トキシコジノミクスが

伝統的な従来よりのトキシコロジーと新しい生物学、ならびに高密度集積アレイ解析法の開発が合流して形成されたものであることを戯画化している。DNA発現情報は表徴型に比べて情報量は相対的に小さく、フェノタイプの持つcomplexityをカバーしきれないから、ここでの予測はある程度のカテゴリー分類を標的対象とすることが前提となる。今後の試行に待つところがないわけではないが、このカテゴリーに対応して浮上してくる新たなバイオマーカー発掘への期待は大きい²⁵⁾。

ここでトキシコジノミクスで整理しておきたい点は、このものを用いたりリスク評価の展望である。この点での道筋が明らかにならないと、いかに最もらしい展望が語られても実用化はおぼつかない。

まず、用量相関性についてみてみよ

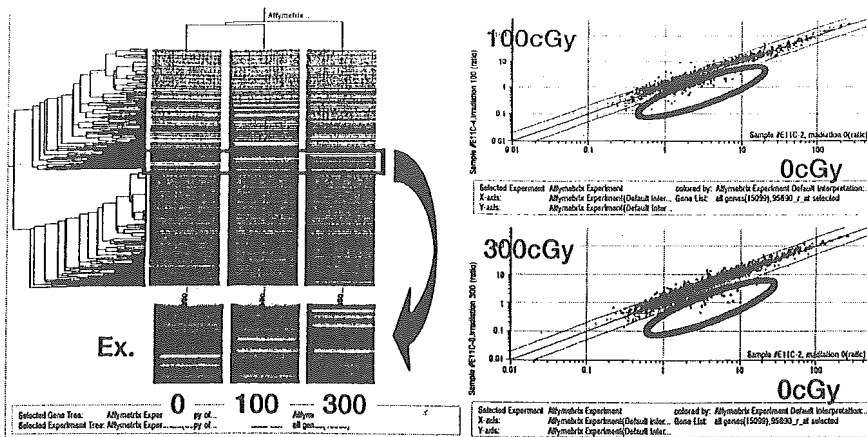


図5 異なる照射線量(γ線)の放射線暴露によって観察された遺伝子発現プロファイル線量によって発現が上昇する遺伝子群(黒枠で表現)と、それぞれの用量に特異的なプロファイリング(下部に抽出)とに注目。

う。用量と発現遺伝子の相関を考えると、ときに陥りやすい認識の隘路は、発現遺伝子を遺伝子発現の強さとの相関でみようとしがちになる点である。そうではなく個々の用量に特異的な発現遺伝子の組み合わせ(プロファイリング)を抽出することに焦点がある。つまり、遺伝子発現に対してアナログ的に変化する用量変化に注目するのではなく、デジタル的に浮かび上がってくる特異マーカーを探索することが焦点となる。図5をみると黒枠で表現された発現亢進プロファイリングに気づくと同時に、樹状アンドログラムの集中点に群間相互でまったく異なる発現プロファイルを示すグループが見出される。それらの当該処置特異性は別にタグをもうけるなりといった方法で特定する必要があるが、基本的にはこうしたプロファイリングの特性が、生物学的なマーカーになってゆく。そしてこの作業の延長線上に同様の考え方によって、無作用量(NOEL)や無毒性量(NOEL)に特異的なプロファイリングも浮上してくる。興味深いことに、ここで求められる特異的なプロファイリングは、それらの機能特性を考慮に入れて考察すると、必ずしも従来の試験結果に基づく値とは一致するとは限らないのであって、ある場合にはより高くなり、ある場合

にはより低くなる。そうした認識は、トキシコジノミクスのリスク評価を、発現量や発現の強さの標準化に依存しがちな旧来のパラダイムによる呪縛から新しい発想へと解き放つ役割をもち、毒性学的に重要な意義がある。試験管内試験から個体レベル試験への外挿性について考えてみよう。図3を紹介した際に、種間外挿性への期待を述べた。たとえば、チオレドキシシン分子が大腸菌からヒトに至るまでよく保存されている通り、生体にエッセンシャルな分子の種間保存性は一般にきわめて高い。そうした要となる遺伝子群を中心に、未知の遺伝子を含む発現遺伝子のクロスチェックを進めてゆくことによって、ある程度のスクリーニング系が成立することにさしたる疑問はないであろう。近似したプロファイリングが見出せるならば、さらなる詳細な確認は必要としても、一義的にその時の両者の用量はそのまま機能的相同用量と認定されることになる。これに対して試験管内試験から個体レベル試験への外挿性の方は、机上で省察すると実際以上に困難が想定されることになる。一般論としては、心臓のない単細胞に対する試験管内影響が心臓毒性を予測するシステムとなり得るとはなかなか考えにくいからである。しかし

心毒性は、究極的には心筋や心血管系や、さらには心の刺激伝導系の特殊心筋細胞の細胞毒性にほかならず、そうした見地に立った試験管内データの個体レベルでの予測力(predictability)を視野にいたした試みも始まっている^{26, 27)}。生殖毒性における展望には今後の試行錯誤が予想されるが、発生毒性については胚幹細胞系の導入によって、従来型の検出力以上の形態形成期の網羅的遺伝子解析の展望が浮かび上がっている。とくにヒトの胚幹細胞のマイクロアレイ発現データのプロファイリングが確立されている²⁸⁾ので、これとの比較といったやり方で毒性学的な検討が進んでいる^{29, 30)}。したがって、分化の多能性を保持した胚幹細胞の培養・維持技術(図6)は標的細胞としてことのほか重要であり、ヒト胚幹細胞の培養にこのところの熱意が傾けられている背景には、移植や再生医学への利用にとどまらない広い応用への期待感がある³¹⁾。初期発生の形態形成プログラミンの研究によって明らかにされるシークエンシャルな遺伝子発現の成果は、近い将来、現在行われている動物実験におけるそれと比較にならない精度の発生毒性評価系を導き出すものと期待されるし、またその試験管内試験系が樹立される日も夢ではない。

論じるべき点は、生理学的遺伝子発現と毒性学の側のそれとの分界点の問題をはじめ、標的遺伝子群を抽出するための処理時間(日数)の選定法など、

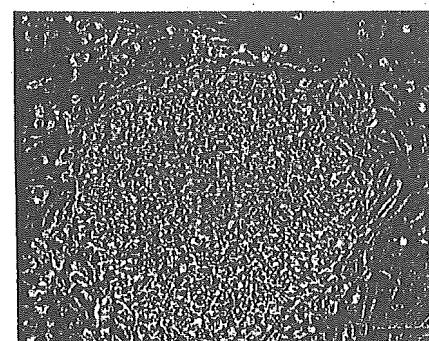


図6 培養性ヒト幹細胞
Science., 303, 2004³¹⁾表紙写真より

さまざまなトキシコロジー・タームに対する戦略が明らかになってきている。問題点も同時に多々あるが、誌面の制約もあるので最後に国際生命科学研究機構 (ILSI) が行った遺伝毒性に関する共同研究結果を紹介して、この項を終了しよう。

図7は、遺伝子傷害性が直接性の医薬品(シスプラチン: CIS、メチルメタン sulfoneイト: MMS、マイトマイシンC: MMC)と非直接性の医薬品(タキソール: TXL、ヒドロキシユレア: HU、エトポシド: ETP)における個体レベル投与実験後の発現遺伝子と比較したものである。結果は、投与4時間後(a)でも、投与24時間後(b)でも、両者の遺伝子発現に際だった違いを示すことがわかるであろう。こうした峻別が未知の物質で可能かの如何についてはまだ問題がある。とくに遺伝子傷害性が直接性の化学品と非直接性の化学品との峻別に問題がなくとも、課題は遺伝子傷害性が非直接性の化学物質と非発がん性の物質との峻別がつくかどうかという点になると、必ずしも明瞭な分別点が得られるとは限らない。これらの展望については、今少し試験データを蓄積することが必要である。

おわりに

グロード・ベルナルが実験医学をうち立てた時、イギリスでは時を同じくして動物愛護協会が設立されている(1854年)³³⁾。彼の生体への飽くなき追求に対する嫌悪と罪悪感ゆえに、彼の死後、その妻と娘は、動物愛護の運動に身をおいたと伝えられている。そしてイギリスでは、1876年には動物虐待法が制定されている。ベルナルが歴史に果たした役割は本稿の冒頭で述べたが、伝えられている彼の考え方は、“生物の神秘的な内部を曝露し、その機能をみるためには、まず、屍体について解剖した後に、今度はさ

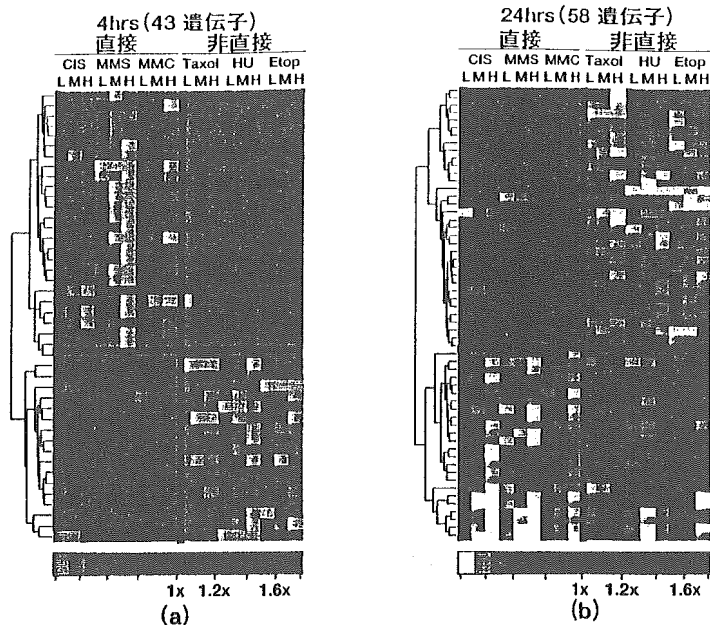


図7 発がん性のメカニズムの差異による発現遺伝子プロファイルの差異
直接性遺伝子傷害性の発がん性を示す医薬品(シスプラチン: CIS、メチルメタン sulfoneイト: MMS、マイトマイシンC: MMC)と非直接性遺伝子傷害性の発がん性を示す医薬品(タキソール: TXL、ヒドロキシユレア: HU、エトポシド: ETP)をラットに投与後の、両者における発現遺伝子の比較。結果は、投与4時間後(a)でも、投与24時間後(b)でも、両者の遺伝子発現に反対方向の際だった違いが観察される(図下のバーコードの白黒パターンにみえるように黒色調は発現の亢進、白色調は抑制を示す)。

らに必ず生体に対しても解剖を行わなければならない」と云う徹底したものであった。ベルナルが強調したかったのは、当時医学の先端であった、ともすれば「生体解剖」とも見紛うような新しい外科学におけるヒトへの“解剖学的”外科処置(vivisection)の風潮に対して、もっと事前にヒトに対する適用の前に実験医学研究をするよう促すことであった。それはヒトと実験動物の生物学的な共通性を認識の基礎とする近代生物学に立脚したものであったが、かくもその重要性の強調された動物実験は無麻酔下での生体解剖を重視するなどによって、その当初から激しい反対運動とその第一歩をともにして踏み出すことになったのであった。

動物実験がもっていた歴史的意義、実験動物の果たす役割はもとより限定的なものであるに違いない。“Animal Welfare”のドライビング・フォースには、すべての生物を同胞とする博愛主義とこれに根ざした種々の施策があり、その一環としては、ただちに実施可能で施策に移されるべき、必要な多くの

対応事項があり、本邦でも今これへの姿勢が問われている。そしてそれはそれで大いに積極的に対応を計る必要のあることは否定さるべきもない。

しかしすでにみてきたように科学の発展によって動物実験の必要性はその時代時代で格段に変遷してきたし、これからはさらに変化してゆくものと判断される。今トランスクリプトミクスによるデータの蓄積を始めたばかりの状況にあって、科学史の中に内在するものにはその変化を正確に認識することは容易ではないのだが、やがて蓄積される膨大な生物学の情報はこれまでの想像を絶するような規模の電算技術によってデジタル化され、蓄積され、アニマル・フリーで利用される時代を迎えようとしている。近頃、コンピューショナル・バイオロジーとよばれる分野³⁴⁾が各研究所に新設されつつある。これをアレイデータの電算処理部門と理解している向きもあるようであり、また事実そういうケースもあるようであるが、注目すべき本流の目指しているところは異なっている。それは、