

12. 神経系形成・発達メカニズムに基づいた高感受性集団に対する 化学物質脳神経系影響の分子毒性学的解析

研究分担者 五十嵐勝秀 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 主任研究官

研究要旨

化学物質暴露影響が固定する背景として注目されている DNA メチル化変化について、神経幹細胞をモデルに DNA メチル化変化が生じやすいゲノム領域の情報を得る。これを、神経系恒常性維持機構が未発達な小児など高感受性集団への化学物質影響解析に役立つ基盤情報として提供する。

マウスでは、胎生 14 日から神経幹細胞がアストロサイト分化能を獲得し始め、これに伴い DNA メチル化変化が生じることが明らかになっている。そこで、メチル化 DNA 断片の濃縮法を活用した ChIP on Chip 法を用いて胎生 11 日と胎生 14 日の DNA メチル化状況を網羅的に比較し、胎生 14 日で脱メチル化されている DNA 候補領域を複数同定した。いくつかの領域について、Bisulfite sequencing による検証を行った結果、1 番染色体の Pou3f3 遺伝子近傍の DNA 領域が、胎生 14 日で脱メチル化されることを確認した。興味深いことに、この DNA 領域の近傍に存在する Pou3f3 遺伝子を含む複数の遺伝子の発現が、胎生 14 日に低下していることが分かった。この DNA 領域の配列特徴を解析したところ、STAT-ETS の promoter module が2ヶ所見出された。転写因子である Stat や Ets タンパク質には、ゲノム上に DNA methyltransferase をリクルートする活性があるという報告があることから、この DNA 領域がこれら転写因子を制御するシグナル伝達の影響を受け、DNA メチル化状態変化を受ける可能性が示唆される。

A. 研究目的

神経系が正常に発達するためには、神経幹細胞の分化が適切に制御される必要がある。神経幹細胞は、発達初期には神経細胞にしか分化できないが、中期以降はグリア細胞にも分化できるようになる特徴を持つことが知られており、この「発達プログラムに応じた神経幹細胞の分化能力変化」、すなわち「成熟」に DNA メチル化が関わっていることが報告されている。DNA メチル化は主に発達期に確立され、その後は細胞の性質を維持する、いわば「細胞記憶」を支える仕組みの一つとして働くと考えられている (Nature 2006:435:p.794-795)。よって、DNA メチル化パターンの確立過程に影響を与える化学物質は、細胞の性質を恒久的に変え、その影響が記憶され長く残る極めて深刻な作用を有すると考えられる。DNA メチル化に影響

を与える物質として、DNA メチル基転移酵素を直接阻害し DNA を脱メチル化させる Azacytidine が有名である。また、メカニズムは不明であり再現性の確認が必要と考えられるが、交配前から離乳までの投与により、Bisphenol A や Genistein が DNA メチル化を変化させるという報告がなされている (PNAS. 2007 :104:p.13056-13061.)。しかし、その数はごく少なく、未だ見出されていない化学物質が多数存在する可能性は否定できない。数が少ないのは、神経系発達における DNA メチル化機構の全容がよく分かっていないためであると考えられ、全容が解明されれば、化学物質が影響を与える仕組みが浮かび上がり、その化学物質の性質を演繹的に予測することが可能になる。研究手法の進展により、今やゲノム DNA のメチル化状況を網羅的に調べる手法が開発

され利用可能になっている。本研究ではこの手法を最大限に活用し、神経幹細胞の成熟における DNA メチル化制御機構解明に焦点を絞った解析を行う。

B. 研究方法

＜マウス胎児神経幹細胞培養(NS cell 培養)＞
C57BL/6 マウス妊娠 11.5 日もしくは 14.5 日の胎児より終脳を分離し、トリプシンもしくはピペットを用いて単細胞化した後、培養系に移す。培養培地 (N2/DMEM/F12 (シグマ社の DMEM/F12 培地にインスリン、プロゲステロン、プトレッシン、アポトランスフェリン、亜セレン酸 Na を添加したもの))に、bFGF (10ng/ml)及び EGF (10 ng/ml)を添加したものをを用い、10cm シャーレ(ヌンク社)に 10^6 個/6ml の密度で生細胞を播種する。翌日 bFGF を半量添加、翌々日培地交換のサイクルを繰り返し、未分化状態での細胞増殖を促す。

＜メチル化 DNA の分離精製＞

培養細胞、組織から抽出精製したゲノム DNA を超音波処理にて破碎し、100~400bp の断片とし、メチル化 DNA 結合蛋白質 MBD2 を用いたメチル化 DNA の分離精製を行う。詳細は本操作をキット化している Methylcollector (Active motif 社)のプロトコールに従った。

＜Promoter array による解析＞

Mouse Promoter 1.0R Array (Affymetrix 社)にてデータを取得した。Affymetrix 社のプロトコールに従い、DNA を増幅し、uracil-DNA-glycosylase を用い短鎖化し、3' 末端をビオチンラベルしたターゲット液をハイブリさせ、ストレプトアビジン-phycoerythrin にて染色し、蛍光シグナルデータを得た。

＜Promoter array data 解析＞

Promoter array から得られたデータは、Affymetrix 社の TAS (Tiling Analysis software) と IGB (Integrated genome browser) を用いた解析

に加え、Genomatix 社の ChipInspector にて解析した。Promoter 配列の *in silico* 解析は、Genomatix Suite (Genomatix 社) にて行った。

Pathway 解析は Ingenuity pathway analysis (Ingenuity Systems Inc.) にて行った。

＜Bisulfite sequencing＞

ゲノム DNA 1ug を MethylEasy Xceed Rapid DNA Bisulphite Modification Kit (タカラバイオ) を用い bisulfite 処理し非メチル化シトシンをウラシルに変換した。変換後の DNA を鋳型に PCR によって解析対象領域を特異的に増幅し、T vector に組み込んだ。得られたクローンを各 12 クローンずつシーケンスし、メチル化状況を QUMA (Quantification tool for Methylation Analysis: 理化学研究所公開ツール) を用いて解析した。

C. 研究結果

本研究ではマウス胎児神経幹細胞を主な材料として用い、神経幹細胞成熟前後(胎生 11 日及び 14 日)の DNA メチル化状況の網羅的解析し、その変化を制御する分子メカニズムを検討する。今年度は、網羅的解析から同定した胎生 14 日に脱メチル化される DNA 領域について bisulfite sequencing 法による検証を行った。

材料としては、胎生 11 日及び 14 日の胎児終脳のゲノム DNA に加え、分化した細胞として、胎生 11 日の神経幹細胞を bFGF を加えない条件で分化させて得たニューロンおよび新生児から分離培養したアストロサイトを用いた。

まず陽性コントロールとして、胎生 14 日で脱メチル化が進む DNA 領域である GFAP 遺伝子のプロモーター、Aldoc 遺伝子のプロモーターの 2 領域を選び、bisulfite sequencing を行った。その結果、両 DNA 領域とも胎生 14 日で脱メチル化が進んでいることが確認された。次に、網羅的解析から同定した 4 領域について検討した。その結果、1 番染色体の領域で胎生 14 日で脱

メチル化が進んでいること、胎生 11 日の神経幹細胞から分化させたニューロンでは胎生 11 日の神経幹細胞同様メチル化されたままであること、アストロサイトではほぼ完全に脱メチル化されていることが分かった。さらに、興味深いことに、この DNA 領域の近傍に存在する Pou3f3 遺伝子を含む複数の遺伝子の発現が、胎生 14 日に低下していることが分かった。さらには、近傍から離れると発現低下は認められず、この DNA 領域を介した特異的な遺伝子発現制御機構の存在が示唆された。一方で、その他の領域については脱メチル化ははっきりしなかった。

そこで、1 番染色体の領域について配列上の特徴が無いか調べた。その結果、STAT-ETS の promoter module が 2ヶ所見出された。転写因子である Stat や Ets タンパク質には、ゲノム上に DNA methyltransferase をリクルートする活性があるという報告があることから、この DNA 領域がこれら転写因子を制御するシグナル伝達の影響を受け、DNA メチル化状態変化を受ける可能性が示唆された。

D. 考察

本年度は、本研究で主要技術として用いた ChIP on Chip 法による網羅的 DNA メチル化解析法の bisulfite sequencing による検証を行った。ChIP on Chip 法による網羅的 DNA メチル化解析法においては、網羅的解析を可能とするために多量の DNA を必要とするため、ChIP によって回収された微量の DNA を増幅するステップを必要とする。ChIP により回収される DNA 量は数 100pg にとどまるため、random primer を用いた PCR を行い、DNA 断片を増幅する (RP-PCR) 必要がある。そのため、得られたデータは増幅に伴う誤差を含んでいる危険性があることに注意が必要である。実際、bisulfite sequencing による検証で確認が取れたのは 4 領域中 1 領域にとどまった。

一方で、bisulfite sequencing により脱メチル化が確認された 1 番染色体の領域の近傍には、神経発生において必須な役割を果たすことが報告されている Pou3f3 (Dev Cell, 2006;11(6):831-44.) 遺伝子が存在し、その発現は胎生 11 日で高く、胎生 14 日で低いことが確認された。この DNA 領域は胎生 14 日時点で脱メチル化が進むことから、DNA メチル化について通常想定されている発現抑制とは逆の現象が認められていることとなる。しかし、DNA メチル化が必ずしも遺伝子発現を抑制するとは限らず、実際、メチル化シトシンに結合する MeCP2 が DNA メチル化依存的に遺伝子発現を促進する例も報告されており (Science, 2008;320(5880):1224-9.)、この領域の脱メチル化と、Pou3f3 を含む近傍の複数の遺伝子の発現低下が強く結びついている可能性も否定できないと考えられる。

この DNA 領域には、ETS や STAT といった、DNA methyltransferase と結合する転写因子の結合配列が module 状に存在している。すなわち、この DNA 領域のメチル化状態がこれら転写因子を制御するシグナル伝達系の影響を受ける可能性が考えられる。ETS や STAT はタンパク質リン酸化を介するシグナル伝達系の制御を受けており、キナーゼ活性に影響を与える化学物質の暴露により、最終的に DNA メチル化変化が生じ、暴露影響が固定する可能性が想定されうると考えられる。

E. 結論

今年度の研究により、神経幹細胞の成熟において DNA メチル化変化を受ける DNA 領域が確定された。今後、その配列の特徴を詳細に解析し、転写因子やシグナル伝達系の観点から DNA メチル化制御機構を明らかにすることが肝要である。化学物質のそれら転写因子やシグナル伝達系に対する影響を検討することで、

DNA メチル化に影響し、神経系恒常性維持機構が未発達な小児など高感受性集団に強く作用しうる一群の化学物質を同定できる可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

NANOS2 interacts with the CCR4-NOT deadenylation complex and leads to suppression of specific RNAs. Suzuki A, Igarashi K, Aisaki KI, Kanno J, Saga Y. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Feb 2. [Epub ahead of print]

Hypersensitivity of AhR-deficient mice to LPS-induced septic shock. Sekine H, Mimura J, Oshima M, Okawa H, Kanno J, Igarashi K, Gonzalez FJ, Ikuta T, Kawajiri K, Fujii-Kuriyama Y. Mol Cell Biol. 2009 Dec;29(24):6391-400.

Gene Expression Profiling and Cellular Distribution of Molecules with Altered Expression in the Hippocampal CA1 Region after Developmental Exposure to Anti-Thyroid Agents in Rats. Saegusa Y, Woo GH, Fujimoto H, Inoue K, Takahashi M, Hirose M, Igarashi K, Kanno J, Mitsumori K, Nishikawa A, Shibutani M. J Vet Med Sci. 2009 Nov 27. [Epub ahead of print]

Intrauterine environment-genome interaction and children's development (2): Brain structure impairment and behavioral disturbance induced in male mice offspring by a single intraperitoneal administration of domoic acid (DA) to their

dams. Tanemura K, Igarashi K, Matsugami TR, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J. J Toxicol Sci. 2009;34 Suppl 2:SP279-86.

2. 学会発表

発性中枢影響解析 -幼若期雄マウスへのトリアゾラム投与による学習記憶障害について-

種村 健太郎, 松上 稔子, 五十嵐 勝秀, 相崎 健一, 北嶋 聡, 菅野 純

日本トキシコロジー学会学術年会, Vol.36 pp.1303-, 2009年, 岩手

ビスフェノールA経胎盤曝露によりマウス泌尿生殖洞で発現変動する性分化関連遺伝子群の同定

荒瀬栄樹、石井健一郎、五十嵐勝秀、相崎健一、小倉友二、今村哲也、吉尾裕子、有馬公伸、菅野純、杉村芳樹

第 97 回日本泌尿器科学会総会, 巻:100 号:2 頁:160, 2009年, 岡山

H. 知的財産所有権の出願、登録状況

特になし

13. AhR の生理機能と炎症応答・小児期個体における役割

研究分担者 藤井 義明 東京大学 分子細胞生物学研究所 核内情報研究分野 非常勤講師

研究要旨

ダイオキシンに代表される多環性芳香族化合物は催奇型性、発癌のプロモーション作用、クローラクネ、内分泌攪乱作用など、多岐に亘る生体毒作用を示すが、この作用の殆どが生体内因子 AhR によって仲介されることが AhR 欠失マウスを用いた実験から明らかにされている。この生体毒性の発現は AhR の正常な生理機能の裏面の作用と考えられる。従って、AhR による毒性作用を理解するには AhR による生理機能の発現のメカニズムを理解することが重要である。そのような観点から新たに発見された AhR の癌抑制因子としての働きと免疫現象における役割及び他の受容体型転写因子との相互作用について研究している。今回は AhR リガンドによる AhR の活性化による β -カテニンのユビキチン化・分解による癌抑制作用及び AhR の働きをフィードバック的に抑制する AhRR(AhR repressor)の作用メカニズムについて報告する。

A. 研究目的

APC^{min/+}マウスにおける腸がんの発症を AhR のリガンドが抑制するかを検証する。また、活性化された AhR によって発現が促進される AhRR がどのようにして co-repressor をリクルートして AhR の転写活性を阻害するかについてその作用メカニズムを明らかにする。

B. 研究方法

APC^{min/+}, APC^{min/+}AhR^{-/+}, APC^{min/+}AhR^{-/-}マウスを用いて腸に癌を発症させる。この実験系で AhR のリガンドである indole 3-carbinol (I3C)、dimethylindolyl methane(DIM)を食餌に混入して離乳期より与え、腸における癌の発症が AhR のリガンドの投与によって抑制されるかを検討する。また、 β -カテニンの発現を免疫組織学的方法で調べて、AhR のリガンドによって β -カテニンの発現の減少が起こるかを検証し、 β -カテニンの AhR によるユビキチン化、分解系が働くかを明らかにし、AhR のリガンドによって癌の発症が抑制されるかを検証する。また、AhR によって発現が促進され、AhR の転写活性を阻害する AhRR の作用メカニズムについて COS 細胞や HeLa 細胞を用いて、DNA トランスフェク

ション法あるいはトランスフォーマントを作成する事によって行い、AhRR の SUMO 化が AhR の転写活性にどのような影響を及ぼすかについて検討する。

C. 研究結果

我々は先に腸には少なくとも APC と AhR の 2 つ β -カテニンのユビキチン化・分解系があり、各々が癌抑制因子として働いている事を報告したが、APC 系の変異によって腸癌が発症し易くなっているマウスに AhR のリガンドを与えて、癌の発症がどのような影響を受けるか検討をした。ヒトでは FAP (Familial adenomatous polyposis、家族性腺腫症)として APC に変異のある大腸癌多発家系がよく知られているのでそのモデルとして APC^{min/+}, APC^{min/+}AhR^{+/-}, APC^{min/+}AhR^{-/-}マウスを用いて AhR のリガンドの癌抑制効果を検討した。APC^{min/+}マウスと比較して APC^{min/+}AhR^{+/-}あるいは APC^{min/+}AhR^{-/-}の複合変異マウスは腸回盲部や小腸における癌の発症時期が早まり、悪性度も増していたが、APC^{min/+}を含むこれらのマウスの離乳期に I3C や DIM の AhR のリガンドを食餌に混ぜて与えるとポリープを含む癌の発症が AhR の発現に依存して著しく抑制される事が分かった。しか

し、AhRの発現のないAPC^{min}/+AhR^{-/-}マウスではリガンドの発癌抑制効果が認められなかった。β-カテニンの発現を免疫組織染色法で検討するとAhRの発現している腸管ではリガンドの投与に依存してβ-カテニンの発現が顕著に低下している事が分かった。このことはAhRのリガンドがAhRの活性化により腸発癌抑制効果を示す事が明らかになり、腸組織ではAhRが癌抑制因子として働く事が確認された。

AhR活性はその標的遺伝子産物であるAhRRによってフィードバック的に阻害される。AhRRはArntとヘテロ2量体を形成してAhR/Arntヘテロ2量体の結合するXREに結合してAhR/Arntの転写活性を競争的に阻害するが、その時にANKRA2, HDAC4, HDAC5をCo-repressorsとしてリクルートする事をtwo hybrid法によるスクリーニングとCHIP法によって先に示した。Co-repressorsはAhRRのC-末端の転写阻害領域でAhRRと結合する。この時にAhRRはSUMO化される必要がある事が分かった。AhRRのC末端には種々の動物種間で保存されたSUMO化サイトのコンセンサス配列が3ヶ所存在する。In vitroのSUMO化の実験で3つのSUMO化サイトにある保存されたリジン残基がSUMO化される事が分かった。そのリジン残基をアルギニンに置換すると3つの変異は同じ程度にAhRRの転写抑制活性を低下させ、3つすべてのリジン残基を置換すると転写抑制活性は最も低下する事が示された。またAhRRのSUMO化は、2量体形成のパートナー分子であるArntが存在すると顕著に促進される。一方ArntにもSUMO化のサイトが1ヶ所存在するがこのSUMO化もAhRRの存在によって促進され、逆に転写活性化のパートナー分子であるAhRの存在はArntのSUMO化を阻害する事が明らかになった。このSUMO化によってANKRA2, HDAC4, HDAC5とAhRRの結合性が顕著に増強される事が分かった。さらにHDAC5はAhRRと直接的に結合するが、HDAC4とAhRRとの結合はANKRA2を介することもわかった。この事はSUMO化がAhRR/Arntによる

AhR/Arntの転写活性の抑制に必要な修飾であることを示している。AhRR/Arntによる阻害はトリコスタチンAによって解除される事から、AhRRによる阻害はHDAC活性による事が確認された。

D. 考察及びE. 結論

AhRの新しい機能として我々によって発見されたE3ユビキチンリガーゼとしての働きは腸において、β-カテニンを分解して癌抑制因子として働いている事が分かり、腸では既に知られているAPCによるβ-カテニンの分解系と少なくとも2つのβ-カテニン分解による癌抑制因子系が働いている事が明らかになった。2つの癌抑制因子系は協調的に働いており、1つの系が欠失すると癌が発症するし、両方が欠失するとさらに癌になり易さが増強される。しかし、APCの変異によって腸癌が発症し易くなったAPC^{min}/+マウスにAhRのリガンドを食餌に混ぜて与えると癌の発症は顕著に抑制される事が分かった。AhRリガンドの作用はAPC^{min}/+AhR^{-/-}マウスでは見られなくなる事から、AhRの発現に依存している事が分かった。AhRリガンドを与えられたAPC^{min}/+マウスではβ-カテニンの発現が著しく阻害されている事からAhRの活性化によるユビキチン分解系が機能している事が示された。この事はAhRのリガンドとして働くI3CやDIM等のトリプトフェンの誘導体が癌予防薬として働く事を示している。AhRの転写活性のフィードバック的抑制因子として発見されたAhRRの阻害作用がSUMO化によって調節される事が明らかになった。AhRRとパートナー分子であるArntのSUMO化はお互いの存在下に、各々のSUMO化が促進される。興味深い事に転写活性化に働くArntのパートナー分子であるAhRの存在ではArntのSUMO化は起こらないことからAhRRとArntのSUMO化は抑制因子複合体形成に特異的である事が分かった。またSUMO化によってAhRRのCo-repressorであるANKRA2, HDAC4, HDAC5との結合性が増強される事も明らかになった。マクロファージ等ではLPS処理によって、直ち

に AhR が誘導されるが、数時間遅れて AhRR の誘導が認められる。自然免疫では AhR による転写活性化がフィードバック阻害機構によって精緻な調節を受けている事が考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

P450の分子生物学 第2版 講談社、
大村恒雄、石村巽、藤井義明 編

2) 雑誌

Iida K, Mimura J, Itoh K, Ohyama C, Fujii-Kuriyama Y, Shimazui T, Akazawa H, Yamamoto M. Suppression of AhR signaling pathway is associated with the downregulation of UDP-glucuronosyltransferases during BBN-induced urinary bladder carcinogenesis in mice. *J Biochem.* Oct 29 (2009)

Skine H, Mimura J, Oshima M, Kanno J, Igarashi K, Gonzalez FJ, Ikuta T, Kawajiri K, Fujii-Kuriyama Y. Hypersensitivity of aryl hydrocarbon receptor-deficient mice to lipopolysaccharide-induced septic shock. *Mol Cell Biol* 29 6391-6400 (2009)

Kimura A, Naka T, Nakahama T, Chinen I, Masuda K, Nohara K, Fujii-Kuriyama Y, Kishimoto T. Aryl hydrocarbon receptor in combination with Stat 1 regulates LPS-induced inflammatory responses. *J Exp Med* 206 2027-2035 (2009)

Kawajiri K, Kobayashi Y, Ohtaka F, Ikuta T, Matsushima Y, Mimura J, Pettersson S, Pollenz RS, Sakaki T, Hirokawa T, Akiyama T, Kurosumi M, Poellinger L, Kato S, Fujii-Kuriyama Y. Aryl hydrocarbon receptor suppresses intestinal

carcinogenesis in Apc min/+ mice with natural ligands. *Proc Natl Acad Sci USA* 106 13481-13486 (2009)

Funatake CJ, Ao K, Suzuki T, Murai H, Yamamoto M, Fujii-Kuriyama Y, Kerkvliet NI, Nohara K. Expression of constitutively-active aryl hydrocarbon receptor in T-cell enhances the down-regulation of CD62L, but does not alter expression of CD25 or suppress the allogeneic CTL response. *J Immunotoxicology.* (6) 194-203 (2009)

Nohara K, Suzuki T, Ao K, Murai H, Miyamoto Y, Inoue K, Pan X, Motohashi H, Fujii-Kuriyama Y, Yamamoto M, Tohyama C. Constitutively active aryl hydrocarbon receptor expressed in T cells increases immunization-induced IFN-gamma production in mice but does not suppress T(h)2-cytokine production or antibody production. *Int Immunol.* 21 769-777 (2009)

Nakata A, Urano D, Fujii-Kuriyama Y, Mizuno H, Tago K, Itoh. G-protein signaling negatively regulates the stability of aryl hydrocarbon receptor. *EMBO Rep* 10 622-628 (2009)

Oshima M, Mimura J, Sekine H, Okawa H, Fujii-Kuriyama Y. SUMO modification regulates the transcriptional repressor function of aryl hydrocarbon receptor repressor. *J Biol Chem.* 284 11017-11027 (2009)

Shimada T, Hiramatsu N, Hayakawa K, Takahashi S, Kasai A, Tagawa Y, Mukai M, Yao J, Fujii-Kuriyama Y, Kitamura M. Dual suppression of adipogenesis by cigarette smoke through activation of the aryl hydrocarbon receptor and induction of endoplasmic reticulum stress. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 296, E724-730 (2009)

Ikuta T, Namiki T, Fujii-Kuriyama Y, Kawajiri K. AhR protein trafficking and function in the skin. *Biochem Pharmacol.* 77 588-96 (2009)

Ohtake F, Fujii-Kuriyama Y, Kato S. AhR acts as an

- E3 ubiquitin ligase to modulate steroid receptor functions. *Biochem Pharmacol.* 77 474–84 (2009)
- Kimura A, Naka T, Nohara K, Fujii-Kuriyama Y, Kishimoto T. Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 9721–9726 (2008)
- Hirabayashi Y, Yoon BI, Li GX, Fujii-Kuriyama Y, Kaneko T, Kanno J, Inoue T. Benzene-induced hematopoietic toxicity transmitted by AhR in wild-type mouse and nullified by repopulation with AhR-deficient bone marrow cells: time after benzene treatment and recovery. *Chemosphere.* 73, S290–294 (2008)
- Baba T, Shima Y, Owaki A, Mimura J, Oshima M, Fujii-Kuriyama Y, Morohashi KI. Disruption of aryl hydrocarbon receptor (AhR) induces regression of the seminal vesicle in aged male mice. *Sex Dev.* 2, 1–11 (2008)
- Ohtake F, Baba A, Fujii-Kuriyama Y, Kato S. Intrinsic AhR function underlies cross-talk of dioxins with sex hormone signalings. *Biochem Biophys Res Commun.* 370, 541–546 (2008)
- Hosoya T, Harada N, Mimura J, Motohashi H, Takahashi S, Nakajima O, Morita M, Kawauchi S, Yamamoto M, Fujii-Kuriyama Y. Inducibility of cytochrome P450 1A1 and chemical carcinogenesis by benzo[a]pyrene in AhR repressor-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 365, 562–567 (2008)
- Oshima M, Mimura J, Yamamoto M, Fujii-Kuriyama Y. Molecular mechanism of transcriptional repression of AhR repressor involving ANKRA2, HDAC4, and HDAC5. *Biochem Biophys Res Commun.* 364, 276–282 (2007)
- Matsumoto Y, Ide F, Kishi R, Akutagawa T, Sakai S, Nakamura M, Ishikawa T, Fujii-Kuriyama Y, Nakatsuru Y. Aryl hydrocarbon receptor plays a significant role in mediating airborne particulate-induced carcinogenesis in mice. *Environ Sci Technol.* 41, 3775–3780 (2007)
- Kawajiri K and Fujii-Kuriyama Y, Cytochrome P450 Gene Regulation and Physiological Functions mediated by the Aryl Hydrocarbon Receptor, *Arch. Biochem. Biophys.* 464, 207–212 (2007)
- Ohtake F, Baba A, Takada I, Okada M, Iwasaki K, Miki H, Takahashi S, Kouzmenko A, Nohara K, Chiba T, Fujii-Kuriyama Y and Kato S, Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase, *Nature* 446, 562–566 (2007)
- Goryo K, Suzuki A, Carpio CA, Sizaki K, Kuriyama E, Mikami Y, Kinoshita K, Yasumoto K, Rannug A, Miyamoto A, Fujii-Kuriyama Y, Sogawa K. Identification of amino acid residues in the Ah receptor involved in ligand binding. *Biochem Biophys Res Commun.* 354, 396–402 (2007)
- Sagredo C, Ovrebo S, Haugen A, Fujii-Kuriyama Y, Baera R, Botnen IV, Mollerup S. Quantitative analysis of benzo[a]pyrene biotransformation and adduct formation in Ahr knockout mice. *Toxicol Lett.*, 167, 173–182 (2006)
- Sekine H, Mimura J, Yamamoto M, Fujii-Kuriyama Y. Unique and overlapping transcriptional roles of Arnt (Arylhydrocarbon receptor nuclear translocator) and Arnt2 in xenobiotic and hypoxic responses. *J Biol*

Chem., 281, 37507-37516 (2006)

2. 学会発表

藤井義明, ダイオキシン受容体の本来の機能: 多機能因子の作用メカニズムと内分泌攪乱作用との関わり、第12回日本内分泌攪乱化学物質学会、特別講演、2009年12月7、8日 東京大学、山上会館

藤井義明、アрилハイドロカーボン受容体の本来の生理機能: 異物代謝から自然免疫まで生体防御機構を制御する多機能因子の作用メカニズム、第2回博多シンポジウム10月9、10日、九大医学部地区コラボレーション

Yoshiaki Fujii-Kuriyama, "Physiological function of dioxin receptor (aryl hydrocarbon) receptor, multifunctional regulator that senses and responds to environmental stimuli" horiba International Conference, 21st Century Advance in the Molecular Toxicology of Environmental Chemicals and Pathogenesis. Tetsumon Memorial Auditorium, Tokyo Dec. 9-10 2009

Yoshiaki Fujii-Kuriyama, "Physiological function of dioxin receptor , a multifunctional regulator that senses and responds to environmental stimuli" The Humphrey Oei Distinguished Lecture Series, National Cancer Center Singapore, Singapore General Hospital Auditorium, Dec. 3rd 2009

Yoshiaki Fujii-Kuriyama, "Physiological function of dioxin receptor, a multifunctional regulator in the field spanning from xenobiotic metabolism to innate immunity" Seminar, Cancer Science Institute, National University of Singapore. Dec. 2nd 2009

大竹史明, 藤井義明, 加藤茂明、ダイオキシン受容

体はリガンド依存的ユビキチンリガーゼである。第82回日本生化学会大会 シンポジウム 2009年10月21~24日 神戸ポートアイランド

鳥居 暁、小林健太郎、高橋正之、片平香澄美、松下夏樹、安元健一、藤井義明、十川和博、マグネシウム欠乏はパラガングリオン細胞での間欠的低酸素応答の欠如を引き起こす。第82回 日本生化学会大会 2009年10月21~24日 ポートアイランド

Yoshiaki Fujii-Kuriyama, "Molecular mechanisms of AhR function in physiological and toxicological processes" 11th SAC Seminar New Trends in Chemical Toxicology, Danilovskaya Hotel, Moscow 22-25 September 2008

大竹史明、岡田麻衣子、西川亜美、藤井義明、加藤茂明、リガンド依存性転写因子はユビキチンリガーゼ複合体として機能する。第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月9日~12日、神戸ポートアイランド

大島基彦、三村純正、関根弘樹、山本雅之、藤井義明、SUMO化によるAhRを介した転写抑制機構の制御、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月9日~12日、神戸ポートアイランド

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

14. CYP 遺伝子発現を制御する SXR、CAR、AhR 等の薬物受容体と 免疫系制御因子 NF- κ B の相互作用の分子解明

分担研究者 西川 淳一 武庫川女子大学 薬学部 衛生化学研究室 教授

研究要旨

感染症や炎症による免疫系の賦活化が肝薬物代謝能を変化させ、薬物相互作用や副作用の発生を引き起す可能性が考えられる。本研究では、まず、細菌感染モデルとしてリポ多糖(LPS)を投与したマウスを用い、肝臓におけるシトクロム P-450(CYP) 遺伝子発現変動を明らかにし、次に、実際の肝代謝能への影響を定量的に検討した。また、一般的な免疫系疾患として I 型アレルギーに着目し、卵白アルブミンによる感作、惹起を施したモデルマウスを作製し、同様に肝臓における CYP 遺伝子の発現解析を行った。その結果、免疫系の活性化が CYP 遺伝子発現を変動させることが明らかになり、感染症罹患患者やアレルギー患者では、肝薬物代謝能が変動している可能性が示唆された。

A. 研究目的

2009 年に発生した新型の豚インフルエンザは世界的に大流行し、糖尿病、心臓病、ぜんそくなどの持病を抱えた人の重症化が問題となった。この例に限らず、複数の病気に罹患している場合の薬剤投与には注意が必要である。感染症などによる免疫系の活性化が薬剤の薬物動態を変化させることは十分予想されるが、その詳細は明らかにされていない。そこで本研究課題では、マウスを用いた感染症やアレルギーのモデル実験で、免疫系と薬物代謝系の相互作用に関する解析を行った。

薬物代謝酵素 cytochrome P450 (CYP) 遺伝子の発現誘導は、SXR (steroid and xenobiotic receptor)、CAR (constitutive androstane receptor)、AhR (arylhydrocarbon receptor) などの薬物受容体によっておこなわれる。一方、感染やアレルギー刺激による免疫系の賦活化には IL-1 や TNF などの炎症性サイトカインによる NF- κ B の活性化が重要な役割を果たしている。前年度までの研究で、SXR、CAR、AhR などの薬物受容体と NF- κ B は相互にその活性を抑制しあう関係にあり、外来異物による CYP 遺伝子の発現誘導

も LPS 投与により低下することがわかった。しかし、薬物代謝酵素は外来異物で誘導をかけない状態でもある程度発現しており、ステロイドなど内分泌系生理活性物質の代謝に関与している。そこで、今年度はそのような定常状態の CYP 遺伝子の発現レベルに免疫系の賦活化がどう影響するかを調べた。また、肝ミクロゾームを用いて、実際の肝代謝能も調べた。

B. 研究方法

細菌感染モデルマウスでの CYP の発現

8 週齢の BALB/c 系雄マウス(n=5)に LPS(1 mg/kg)を腹腔内投与して免疫系を活性化した後、27 時間後に肝臓を摘出し、CYP3A11、CYP2B10、CYP2C29、CYP2C55、CYP1A2 の mRNA 量をリアルタイム PCR で調べた。

I 型アレルギーモデルマウスでの CYP の発現

8 週齢の BALB/c 系雄マウス(n=5)に ovalbumin (OVA) 2 mg/mL と Freund's incomplete adjuvant (FIA) を等量混ぜたエマルジョンを 50 μ L 投与し感作させた後、2 週間後に 0.1mg/mL の OVA を 100 μ L 投与してアナフィラキシーを惹起させた。OVA 投与 3 時間後に肝臓を摘出し、

CYP3A11、CYP2B10、CYP2C29、CYP2C55、CYP1A2 の mRNA 量をリアルタイム PCR で調べた。

炎症性サイトカインの発現変動

感染症と I 型アレルギーの動物実験系において、免疫系の活性化が正常に起きていることを確認するために、炎症性サイトカインの TNF α と IL-1 β について mRNA 量をリアルタイム PCR で調べた。

RNA の抽出と cDNA の合成

肝臓をセパゾール RNA I super (ナカライテスク) 中でホモジナイズして、total RNA を抽出した。得られた total RNA を鋳型として、PrimeScript RT reagent Kit (タカラバイオ) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を作製した。

Real-time PCR

SYBER Primer Ex Taq II (タカラバイオ) を用い、初期変性後(95 $^{\circ}$ C、10sec)、各々のプライマーに応じたアニーリング温度で PCR を行った。定量は ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems) を用いて行った。

肝代謝能の測定

感染症モデルマウス及より摘出した肝臓よりミクロゾーム分画を調整した。ここにテストステロン及びニフェジピンを加え、NADPH 存在下でインキュベートし、有機溶媒で抽出後、HPLC による分析を行った。

C. 研究結果

LPS 投与による CYP 遺伝子の発現変動

LPS 投与による CYP 遺伝子の発現変動を調べたところ、無処理群を 1 とした時、CYP3A11 は 0.07 ± 0.02 、CYP2C29 は 0.08 ± 0.02 、CYP2C55 は 0.06 ± 0.04 、CYP1A2 は 0.05 ± 0.03 で定常状態に比べ 1/10 以下に発現量が減少していた(図 1)。しかし、CYP2B10 については逆に 5 倍以上に発現量が増加した(表 1)。また、同じ実験系において PXR リガンドの PCN が CYP3A11 を、CAR

リガンドの TCPOBOP が CYP2B10、CYP2C29、CYP2C55 を、AhR リガンドの B(a)P が CYP1A2 を誘導することを確認した。

同様に、I 型アレルギーの CYP 遺伝子発現に及ぼす影響を調べたところ、CYP3A11、CYP2C29、CYP2C55、CYP1A2 について若干の変動が認められたが、有意差は得られなかった。しかし、CYP2C10 については、LPS と同様に 5 倍以上の発現増加が認められた(表 2)。

肝抽出液中の薬物代謝能

mRNA の発現変動が、実際の代謝能を反映しているかどうかを調べるために、LPS 投与したマウスの肝臓からミクロゾーム分画を調整し、テストステロンとニフェジピンの酵素的な変換を調べた。その結果、LPS 投与による両化合物の代謝クリアランスの減少が認められ、CYP3A の遺伝子発現に 관련된肝抽出液中の薬物代謝酵素の活性変動が認められた(表 3)。

炎症性サイトカインの発現変動

感染症モデルマウスと I 型アレルギーモデルマウスについて、TNF α と IL-1 β の発現量を調べたところ、いずれのモデルにおいても炎症性サイトカインの上昇が認められ、NF- κ B が活性化していることを確認した。

D. 考察

感染症やアレルギーにより薬物代謝能が低下することは古くから経験的に知られているが、そのメカニズムに関してはよくわかっていない。そこで、前年度までに、化学物質による CYP 遺伝子発現誘導に及ぼす感染や炎症の影響を調べた。その結果、免疫系制御因子の NF- κ B が SXR、CAR、AhR の転写活性化能を抑制し、CYP 遺伝子の発現誘導を弱めることが推察された。しかし、薬物代謝酵素は化学物質による誘導がかからない状態でもある程度発現しており、本年度は定常状態における CYP 遺伝子発現に及ぼす感染や炎症の影響を調べた。

その結果、CYP3A11、CYP2C29、CYP2C55、CYP1A2 については、LPS 投与によって顕著な発現低下が認められた。しかし、CYP2C10 については、逆に 5 倍以上の発現増加が認められ、I 型アレルギーモデルマウスにおいても同様の結果であった。感染症モデルマウスと I 型アレルギーモデルマウスのいずれにおいても、IL-1 β や TNF α は発現上昇しており、NF- κ B は活性化されていると考えられる。もし CYP2C10 の定常状態における遺伝子発現が CAR によって主に行われているのならば、NF- κ B の活性化により発現は減少すると考えられるが、実験結果はこの予想に反している。これらの結果は、感染による免疫系の活性化がほとんどの場合は薬剤の代謝速度を減少の方向に向かわせるが、特定の CYP 分子種については発現が増加し、そのような CYP によって代謝される薬剤については代謝速度が亢進することを示唆している。

E. 結論

免疫系の活性化が CYP 遺伝子発現に影響を及ぼすことが認められ、感染症罹患者やアレルギー患者では、肝薬物代謝能が変動している可能性が高い。また、その変動は代謝速度を低下の方向に向かわせる場合が多いと考えられるが、薬剤によっては亢進する可能性もある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Structure-dependent activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α by organotin compounds. Hiromori, Y., Nishikawa, J., Yoshida I, Nagase H, Nakanishi T. Chem. Biol. Interact., 180, 238-244 (2009)

Identification of retinoic acid receptor agonists in sewage treatment plants. Zhen, H., Hu, J., Xiao, Y., Yang, M., Hirotsuji, J., Nishikawa, J., Nakanishi, T. and Ike, M. Environ. Sci. Technol., 43, 6611-6616 (2009)

2. 学会発表

薬物代謝酵素遺伝子発現を抑制する核内受容体と NF- κ B の相互作用の分子解明 森家望、片岡裕美、藤野秀樹、西川淳一、九川文彦 日本薬学会第 129 年会(2009)

アレルギー既往マウスはオルトフタルアルデヒドに対する感受性を高める 片岡裕美、山下邦彦、西川淳一、扇間昌規、市川厚 日本薬学会第 129 年会(2009)

感染症と I 型アレルギーモデルマウスにおける肝代謝機能の解析 森家望、片岡裕美、藤野秀樹、西川淳一、九川文彦 第 8 回次世代を担う若手フアーマ・バイオフィオーラム(2009)

CYP 遺伝子発現減少を制御する核内受容体と NF- κ B の相互作用の分子解明 森家望、片岡裕美、藤野秀樹、西川淳一、九川文彦 第 24 回日本薬物動態学会(2009)

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

なし

表1 LPS投与がCYP遺伝子発現に及ぼす影響

gene	LPS	PCN	TCPOBOP	B(a)P
CYP3A11	0.07 ± 0.02 ^{***}	8.08 ± 0.77 ^{**}		
CYP2B10	5.45 ± 1.12 [*]		503 ± 107 [*]	
CYP2C29	0.08 ± 0.02 ^{**}		9.32 ± 1.09 ^{**}	
CYP2C55	0.06 ± 0.04 [*]		2880 ± 708 [*]	
CYP1A2	0.05 ± 0.03 ^{**}			12.3 ± 1.60 ^{**}

Data (mean ± SE, n=3-5) are expressed as the fold value compared with control group after normalization to GAPDH. Statistics : Student's *t* test, **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001 vs control.

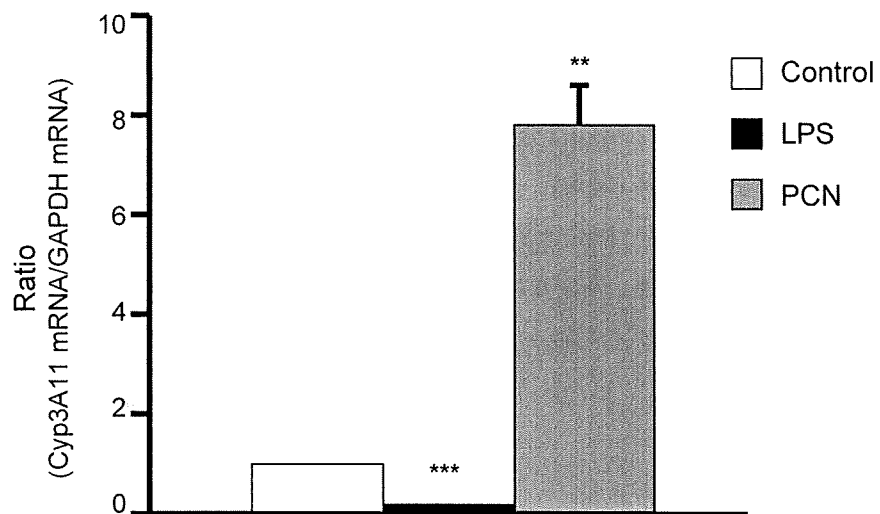


図1 LPS投与がCYP3A11発現量に及ぼす影響

Each column (mean ± SE, n=5) are expressed as fold value compared with control group.

Statistics : Student's *t* test, ***p*<0.01, ****p*<0.001 vs control.

表2 アナフィラキシーがCYP遺伝子発現に及ぼす影響

gene	Anaphylaxis(day14) ^{a)}	LPS ^{b)}
CYP3A11	0.07 ± 0.13	0.07 ± 0.02 ^{***}
CYP2B10	5.47 ± 1.10 [#]	5.45 ± 1.12 [*]
CYP2C29	0.81 ± 0.09	0.08 ± 0.02 ^{**}
CYP2C55	2.30 ± 0.61	0.06 ± 0.04 [*]
CYP1A2	0.80 ± 0.13	0.05 ± 0.03 ^{**}

a) Data (mean ± SE, n=5) of "Anaphylaxis" are expressed as fold value compared with "(normal) → OVA group" after normalization to GAPDH. Statistics : Student's t test, #p<0.05 vs with "(normal) → OVA group".

b) Data (mean ± SE, n=3-5) of "LPS" are expressed as fold value compared with control group after normalization to GAPDH. Statistics : Student's t test, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs control.

表3 LPS投与が薬物代謝能に及ぼす影響

	Testosterone		Nifedipine
	CL _{int.}	6β-hydroxylation	CL _{int.}
	μ L/min/mg protein	nmol/min/mg protein	μ L/min/mg protein
Control	73.2	2.70	124.1
LPS	33.1	0.67	35.5
PCN	254.2	5.57	681.1

Data (mean, n=2) are expressed testosterone 6β-hydroxylation activity and the intrinsic clearance (CL_{int.}) of testosterone and nifedipine in the microsomes.

【小児など高感受性集団の評価に関する国際動向調査研究】

15. 形態形成期への影響を中心とした研究動向に関する OECD/WHO 関連等ハーモナイゼーション総括

研究分担者 井上達 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

研究要旨

本研究は、「内分泌かく乱化学物質」関連の物質の形態形成期を中心とした生体影響研究を目的として一昨年度に新たに発足し、本年度、3年目をもって研究を終了する。当担当者は「OECD/WHO 関連等ハーモナイゼーション総括」と題して、主たる課題としては、経済協力開発機構 OECD と世界保健機構 WHO で進められている試験法の開発や基礎研究の推進と、本邦における内分泌かく乱化学物質(EDC)問題に関する調査・研究とが、スムーズな国際相互協調の下で推進せられるよう、当研究班を通じて必要な情報収集を行い、また、副次課題として、本邦としての独自の研究情報の発信や提案を行うこととしてきた。関連情報の収集等の調査報告は一昨年報告にまとめたが、本年度については、主課題の方では、哺乳瓶に由来するビスフェノール A や玩具を巡るフタル酸エステル類の扱いが取り上げられた程度で、内分泌かく乱問題の国際協調に関わる理論上の課題は生じなかった。そこでここでは、本研究課題の発足以来、副次課題として継続してきた低用量問題について、独自の情報の発信・提案の立場から、これまでの認識を整理しこの問題の本質を取りまとめることとする。

A. 研究目的

本分担研究の主課題の目的は、諸国際組織における現段階での研究・調査活動の到達点を整理し、今後の課題を明らかにすることであり、まとめるならば、[諸国際組織の研究・調査の到達点の整理、そこでの試験法の開発等と、本邦のそれとの整合性のために必要な情報の収集と発信]である。

すなわち、経済協力開発機構 OECD と世界保健機構 WHO で進められている試験法の開発や基礎研究の推進の課題と、本邦における内分泌かく乱化学物質(EDC)問題に関する調査・研究とが、スムーズな国際相互協調の下で推進せられるよう、当研究班を通じて必要な情報収集を行い、併せて、副次課題として、本邦としての独自の情報の発信や提案を行うことにある。

B. 研究方法

諸国際組織における現段階での研究動向を主として文献的に整理すると同時に、そこから内分泌かく乱化学物質問題の諸課題の到達点と今後の課題を抽出、分析することとした。

C, D. 結果と考察

低用量問題の経過とその解析のまとめ
[結論] 低用量問題は、独立した3つの要素から成る複合問題であった。すなわち、第1は、毒性学が危害徴候を高用量作用から推定する方法で成り立ってきたことに由来し、第2は、これが生体の調節機構の障害という毒性学で未開拓の問題であったこと、そして第3に、それがストカスティック(確率論的)な生体反応を対象とした、文字通りの低用量科学としての毒性学の問題であったこと、の3点に基づいている。いずれも毒性学に

とって未経験の新しい事柄であったため解明に時間を要したが、いまその本態が明らかになるうとしている。

内分泌かく乱化学物質における低用量問題は、1996年12月にロンドン郊外のWeybridgeでこの問題に関する最初の国際会議ⁱが開かれた時以来の焦点であった。その時の論理は、低用量問題に限って云えば、R.カーソンの“沈黙の春(Silent Spring)ⁱⁱ”に啓発されて以後、化学物質の安全性には殊のほか注意を払っていただけに、「安全性生物試験の行われる或る程度の高用量域での障害性を見過ごしていたとは考えにくいこと、従ってもしホルモン様作用による障害があるとするならば、低用量域にEDC物質に特有の作用があるのではないか」というもので、いわば化学物質に対する安全性試験へ責任を持つOECDのプライドも緋い交ぜになったものであったと思われる。もとより受容体との相互作用に由来する内分泌ホルモン様物質の生体作用では、安全性生物試験が行われるような高用量では、受容体はしばしば発現降下を起こして無応答状態に陥る。他方、この作用は受容体とリガンド分子の反応にもとづくから、極めて低用量でも応答反応を起こすことが実験的にも知られている。かくして、すべての生体障害を受容体作用で説明できるとする考え方と、何らの生体分子の構造異常も見いだされないことからして、これらの物質の低用量作用そのものに疑念をいだく考え方との間で、果てしなく擦れ違いの議論が行われた。実験が積み重ねられて、時も経過していった。けだし、2000年10月にノースカロライナ州で米国EPAが低用量

問題に関するワークショップを開催しⁱⁱⁱ、低用量作用が“ない”とする論文も、“ある”とする論文も、いずれもcredibleであった、という至極賢明な結論を出したにも拘わらず、その意義は今日まで生かされていない。

爾来10余年が過ぎたが多くの内分泌かく乱化学物質で、安全性生物試験では決定的な所見が観察されない。Rochelle Tylらは一昨年2008年になっても、ねばり強く、2世代、3世代などの一連の生殖毒性試験で低用量が何も引き起こさなかったことを報じている^{iv,v}。低用量問題とは何だったのかを取りあげるとき、この事実を正しく教訓として取りあげる必要がある。

結論として考えられることは、低用量問題は、独立した3つの要素から成る複合問題であったということである。すなわち、第1は、毒性学が高用量作用から危害徴候を推定する方法で成り立ってきたことに由来し、第2は、これが生体の調節機構の障害という毒性学で未開拓の問題であったこと、そして第3に、これがストカスティック(確率論的)な生体反応を対象とした、文字通りの低用量科学としての毒性学の問題であったこと、の3点にもとづいている。注目されるのは第1の課題を含めていずれも、これまで毒性学が従来扱って来なかった対象だったということである。殊に第2、第3の課題は、科学一般の中でここ数年の間に明らかになってきた命題である。低用量問題は、こうした未開拓で未経験の要素にもとづいていたため、なかなか問題の本質に辿り着くことができなかつたと考えられる。

1. 高用量から作用を見る毒性学の間

題点

用量を増せば“当然”生体影響は強くなる筈である。その高用量域で確認される生体影響(危害影響 adverse effect =エンドポイント)が、用量を下げて、もはや見られなくなる用量を、無作用量(no adverse effect level)として安全域とする安全性生物試験(=毒性試験)の論理は、これまで何の不思議もなく多くの化学物質に適用されてきた^{vi}。ところがホルモン物質では、高用量では受容体の発現降下が起こるし、低用量では生体のホメオステシスに打ち消される性質があるから、現象的には、高用量でさえ取るに足らない影響にとどまり、低用量では殆ど“検出”されないことになる。そうした物質に対する生体障害作用が見落とされる結果になっても不思議はない。つまり第1の課題については、後ほど見いだされるようになった持続効果と併せて、ホルモン様作動性の化学物質の反応様式(mode of action)は、まったくの想定外のことであった。だから嘗て女性ホルモン影響の検出のために開発された子宮肥大試験(uterotrophic assay)^{vii}をスクリーニング系として OECD が取り上げ、本邦がリード・カントリーとしてこれに取り組むことになった際も、これら物質群の作用が検出されたとき、それがどんな生体障害を反映することになるのか否かが大まじめに議論されることとなった。

このことは、毒性学にあたらしい教訓を与えた。もとより毒性学では前述の通り、比較的高用量域に於ける実験的生体反応の用量相関直線を実験データ以下の低用量域へ外挿して無反応域を求め、それら無反応域よりも低い用量での生体影響を無影響と推定してきた。無

反応域以下では、障害性は無いと考えるわけである。平易な論理であるが、或る事柄を“無い”と推論し、保証するということは、科学の方法論としては大いに稀少な“推定力”を意味する。用量相関の直線性の如何の問題などが前提として介在するとは云え、この“力”こそが近代毒性学の果たした重大な役割の源泉となる中心命題であった。

内分泌かく乱化学物質で観察された“想定外”の出来事は、まず、化学物質の中に従来型の毒性試験の論理を適用できないものがあること、そしてさらに、ガイドラインで定式化された毒性試験が、(当然の事ながら)決定論的な事象を捉える試験系として確立していて、確率論的な事象への“予測力”については疑念があるというものである。言い換えれば後者の命題の意味するところは、毒性試験は、近年、様々に取り上げられているエピジェネティクスに対する“検出力”が限定的だということを示唆している。低用量問題の解明に時間がかかった背景には、こうした毒性試験のスキームに関わる根本問題があったことが作用していた。

2. 生体調節機構の障害という新しい毒性学の課題

毒性試験が決定論的な事象を捉える試験系として作られていて、非決定論的で確率論的な事象への“予測力”については疑念があるということも前述した。内分泌かく乱現象が従来の試験法で観察されなかった背景は何だったのか。これについては、従来の試験法が専ら生体内分子の改変や変質などといった物質構造異常に対応するものであった点が指摘される。それは、低用量の曝露影響下

で、通常の生体の生理的調節水準内にあって、眼に見えない形で微視的かつエピジェネティックに機能不全へと進行し、遂には不可逆的調節異常に陥る“生体の調節異常”を検出することの不得意な、これまで想定されてこなかったものである。生体内には、大小様々な規模のこうした調節不全状態がいろいろな形で発生している。実験的な例としては、ラットの胎生期における低用量のビスフェノールAの投与が引き起こす母性機能変化^{viii}が知られ、また思春期の早発傾向につながると考えられる膣開口の早期化なども観察されている^{ix}。比較的高用量のビスフェノールAの出生直後のラットへの投与は、時を経て成熟後の雌のラットに持続性の無排卵も引き起こしている。これらは遅延性無排卵機構として注目される、調節機構における障害のわかりやすい例であるが、このようなエストロゲン系とプロゲステロン系の2相制御下にある調節機構の異常現象は、その振れはホメオステシスの背景に隠れてしまい、さらに大きな振幅に達するか、対応した方法や機器を用いない限りなかなか異常として把握されない。例えばいま水平に持ち上げて静止させた腕の筋肉が、上方に持ち上げる筋肉群と下方に押し下げる筋肉群の平行バランスによってはじめて水平に維持されると云うことは、それら各々の筋群が活発な拮抗関係を維持していることを筋電図で確かめることによってはじめて把握されることとのアナロジーである。これがパーキンソン症候群に至ると、事態は絶えず振幅を持続し静止位を保てなくなる。しかしこの状態と云えども、この腕が静止位の維持に堪えきれずに落下しない限り、“情報値の平均”をと

ると対照群との間に有意差が認められないということも起こってくる。通常の試験系では、こうした揺れ動くデータ(調節不全)を把握することが想定されていない。これが生体の調節異常を一般試験系がしばしば検出しないという現象の比喩的な背景である。実際には生体内には、レドックス制御、血圧調節、あるいは薬物代謝における拮抗調節関係などこうした調節機構に該当する生理機構が無数にある^x。内分泌かく乱化学物質の安全性生物試験にも、こうした“調節異常の毒性”を解読するシステムズトキシコロジー(systems toxicology)の開発が必要だったのだということに気付かされる¹¹。低用量問題が“検出”できなかった背景は、こうした事柄も関連していたと考えられる。

3. ストカスティックな生体反応を対象とした毒性学の問題

毒性試験による予測が決定論的予測に限定され、エピジェネティクスの“検出”に対して限定的ないし想定外であったことを前述した。これはストカスティック(確率論的)な生体反応を背景としており、それ自体は低用量で観察されやすいが、実は必ずしも低用量に限定された問題ではない。例えばいま100匹のマウスがいて、ある発がん物質で、20匹に軟部組織腫瘍、20匹に造血器腫瘍、さらに20匹に肺腫瘍、20匹に腎硬化症と関連する加齢病変が発生するものとしよう。こうした実験は近交系の動物を用いることにより、極めて再現性良く追試することができるが、どのマウスに何が発症し、あるいは造血器腫瘍を発症するのはどのネズミとどのネズミかを1~2ヶ月程度で予測す

ることは通常の試験では容易でない。こうした確率論的事象はマクロ的には決定論的であって、決して不確実性なのではなく、まして理論問題として不可知ではなかった筈のものである。つまり、理論上はある事象の不可逆点 (point of no return)の前に予測可能な筈だったものであるが、これまで科学がその方法を持たなかったことに疑問を持つことはなく、看過されてきた。しかし、いまやマイクロアレイなどの遺伝子発現解析手法の適切な応用によって、様々な事象に対する生物反応の予測遺伝子発現クラスターの形成が観察される見通しは、将来の毒性予測の焦点となっているホットなトピックである^{xi}。

つぎに実験群の母数を減らしてゆくと、イベントはさらに確率論的になってくるから、通常の試験では、結果の予測はいよいよつかなくなる。こうした確率論的なデータに対してこれまでの毒性学が、意味のあるデータと考える確たる根拠を見いだし得ず、しばしばそれらを棄却してきたことは、科学の発展段階の制約としてやむを得ないものがあったと考えるべきであるが、結果的には、低用量問題の進展を阻む結果となった。これが、低用量問題が把握できなかった3つ目の要因であった。

4. 低用量問題を解決するあたらしい毒性学の確立

低用量影響が認識されなかった背景は、上述のような3つの要素に起因していたと考えられるが、これに対して向後どのような研究的措置を講ずれば、実態を把握することができるであろうか。そのためには3つの要因に即した対応が求めら

れる。いま第1の要因について考えるならば、対応するひとつの方策はといえば、ホメオステシスの陰に隠れて見えなくなる低用量変化を顕在化することが求められるわけであるから、例えばそれはまさに子宮肥大試験はその1つの有効な方法であることがわかる。反対にそうしたあたらしい試験系の構築無しに見ることは恐らくできないのであって、既存のデータを一寸見直すことによって、これまで無視してきたものが見えてくるといった性質のものではない。

問題点としては、子宮肥大試験で検出されることをもって危害リスクを想定しようとした場合、エンドポイントが不明確であることである。第1の要因への対応に限局して何等かのエンドポイントを設定するためには、頻度は低くとも、先に挙げた“早期膣開口”などの表徴表現型や、惹いてはそれに対応する種々の発がん徴候を観察可能なだけの規模の実験群動物数で観察することが求められることになる。こうした表現型はこれまで想定されていなかったから、観察期間の点からも用いた動物匹数の面からも検出することができなかったわけだが、頻度は低くとも、一定の確率で危害リスクが出現することは確かのようなのである。因みにビスフェノールAには、内分泌かく乱性とは目的の異なった一群 100 匹を超える実験規模の発がん性試験の報告がある^{xii}。この報告のデータを用いて生涯観察期間の発がん性を再計算すると、統計的に有意な寿命の短縮は明らかであった^{xiii}。多くの化学物質でこうした実験を行うことは現実的でないので、实际的に推奨されるわけではないが、理論問題としては、そうした背景に繋がっているということに他な

らない。

第2の生体調節機構の障害の面から見た場合には、どんな対応が考えられるであろうか。化学物質はいま8万種類とも10万種類ともいう多くの種類が用いられている。これらすべての化学物質の毒性プロファイルを明らかにすることは容易ではなく、限りなく不可能に近いと思われる。他方、代表的な毒性物質で動物試験を行って、実験動物の側の遺伝子発現を網羅的に把握し、毒性プロファイルを抽出し、データベースを構築することは、不可能ではない。毒性プロファイルは何万もあるのではなく、数千のオーダーのものと考えられ、これとの照合によって、毒性シグナルを発する化学物質スクリーニングし、毒性シグナル発現の蓋然性のあるものに限って安全性生物試験を施行しようとする試みもある^{xiv}。米国ではいまそうした毒性シグナルの抽出のための昼夜を分かたぬ大規模なロボティックなアレイ試験が進行中である^{xv}。これらが抽出されるまでには20~30年の年月が掛かると思われる。しかしそこで内分泌かく乱化学物質のシグナルがどのような扱いになるかを待つまでもなく、前述の第1のエンドポイントに対応する毒性プロファイルの抽出を終了するまでにはそれほど時間を要することはないであろう。

第3のストカスティックな生体反応について考えよう。第2の毒性シグナルの抽出の際に問題となるのは、第3の要因、頻度の低い確率論的シグナルの捕捉の問題である。これまで毒性学は、エピジェネティクスを背景とする生体障害や、生物自身や生体反応の多様性に立脚した確率論的現象に対して、正面から対応してこなかったといつてよい。当然のこ

とながら、科学も、その応用学としての毒性学も、決定論的な対象を中心に、機械的な再現性の確かめられる範囲の実験科学にもとづいて構築されてきたのである。再現性が確認できる、ということは、科学的であるか否かの試金石となる代名詞でさえある。ところが、科学の世界には、再現性は、確率論的にしか確認できないストカスティックな現象があることが次第に解ってきた。これに対応した“シグナルの固定化”は、概念的には、ストカスティックシグナルの決定論化(deterministification)とでも云うべきコンピューショナル(computational)な情報加工作業である。一般に大容量のデータを蓄積することにより、十分に大きな確率論的なデータでは亜群集塊化(clusterization)をさせることができるものと信じられている。この亜群集塊化によって確率論的で非決定論的な膨大なデータの決定論化が可能になると、これまで蓋然性としてしか捉えることのできなかった、多くの事象が確率論的な予測の範囲に入ってくる。これは、医療や保健分野で現実的に期待されていることであるが、毒性分野での利用も夢でなくなるものと予想される。

E. 結語

低用量問題は、未知で、予想外に深い科学の基礎を背景にしていたので、簡単に実相が解けなかったが、いま次第にその本態が明らかになろうとしている。安全性生物試験に関わってきた多くの人々には予想外の展開であったかもしれない。ここで提案した考え方の検証に向けて、今後の研究が進展することが期待される。