

厚生労働行政推進調査事業費（化学物質リスク研究事業）  
トキシコゲノミクスとシステムバイオロジーとの融合による  
新型化学物質有害性評価系の実装研究  
（21KD2001）

令和4年度 分担研究報告書

短期間「新型」反復曝露実験と単回曝露実験データベースの対比による  
反復曝露毒性予測技術の開発

研究分担者 菅野 純

国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター  
毒性部 客員研究員

研究要旨

本研究は、毒性の分子機序に基づいて、現行の不確実係数（安全係数）を利用する有害性評価手法を補強し、より迅速で、高精度且つ省動物を具現化した新たな有害性評価系の開発を目標として、マイクロアレイ（GeneChip）と次世代シーケンサを用いて基盤となる遺伝子発現及びエピゲノムの網羅的データを得つつ、独自開発のソフトウェア群による化学物質の生体影響の網羅的分析法の体系化を行い、これに、毒性学・分子生物学に精通したデータサイエンス専門家を擁して、システムバイオロジー及び人工知能（AI）技術を融合した新たな有害性評価系の開発を進める。

特に先行研究において、Percellome 法\*を基盤とする「新型」反復曝露実験\*\*の蓄積によりプロトタイプを構築した化学物質の反復曝露による生体影響のデータベースについては、溶媒の反復曝露影響や、反復曝露影響の可逆性・非可逆性を遺伝子単位で取得、反映することにより、解析精度を向上させる。単回曝露のデータベースと共にこれを利用することで、現在は長い時間と多額の費用を要している長期反復曝露の毒性評価の期間短縮・効率化を検討する。

令和4年度は、エストラゴールの4日間の新型反復曝露、及び、フタル酸ビス(2-エチルヘキシル)の4日間の新型反復曝露の2実験（以下、Estragole[4+1]及びDEHP[4+1]と表記）を実施し、遺伝子発現解析を進めて単回曝露、反復曝露に共通の要素と異なる要素を抽出した。Estragole [0+1]、及び Estragole[4+1]の遺伝子発現誘導は、ともにPPAR 下流の脂質代謝に関わる遺伝子が主体であったが、[4+1]により、発現遺伝子の総数は数倍に増加し、基線反応、及び、過渡反応が増強し発現のタイミングが早まる遺伝子を多く認めた。4日間の反復曝露により小胞体ストレスなどを介しての細胞増殖シグナルの増強が示唆され、少なくともマウス肝に対する発癌性が Gene Ontology から強く示唆された。年度内に、先行研究にて解析した PPAR リガンド化学物質との比較を行う。DEHP[4+1]についても GeneChip 解析を実施し網羅的な遺伝子発現データを得て先行研究による DEHP[0+1]（単

回曝露)と比較するなどして解析を進めた。

尚、動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、国立医薬品食品衛生研究所の「動物実験の適正な実施に関する規程」(動物実験承認番号 365)に従い実施した。

-----  
(\*) mRNA発現値を細胞1個当たりのコピー数として絶対定量する方法。

(\*\*) 全動物に同量の検体を反復曝露し、遺伝子発現測定直前の曝露時に、溶媒群、低用量群、中用量群、高用量群に分けて最終曝露を一回行う。実験の反復曝露と単回曝露の回数をもとに[14+1]、[4+1]、[0+1]等と表記することとした。

## A. 研究目的

本研究は、独自構築したトキシコゲノミクス・データベース(DB)にインフォマティクス、及び、人工知能(AI)を拡大適用し、化学物質が実験動物に惹起する遺伝子発現変動等の分子毒性学情報から、科学的根拠に基づく有害性予測評価手法を確立する。これにより「安全係数」を用いる従来の有害性評価手法を補強するとともに、迅速、高精度、省動物を具現化する新たな評価システムを構築することを目的とする。

即ち、先行研究にて構築済みの延べ8億5千万遺伝子発現情報からなる高精度トキシコゲノミクスデータベースと単回曝露及び反復曝露の毒性ネットワーク解析技術を基盤に、これらを維持・拡充しつつ、さらに臓器別のゲノムDNAメチル化及び代表的物質の反復曝露によるヒストン修飾情報を加えて、毒性ネットワーク解析による、短期間試験での反復曝露毒性の予測評価技術を開発する。この際、インフォマティクス専門家によりシステムトキシコロジーや人工知能の技術を融合し、反復曝露にも対応する新型化学物質有害性評価系の実装を進める。

## B. 研究方法

### ●試薬及び動物：

エストラゴール(分子量：148.20、Cas No.: 140-67-

0、純度98%、Sigma-Aldrich)について、4日間「新型」反復曝露(4日間反復曝露後に単回曝露、以降、[4+1]と表記)のプロトコルにて実施した。エストラゴールの4回反復曝露の用量は70.0mg/kg、最終の単回曝露の用量は先行実験で実施した[0+1]実験と同様に0、10、30、100 mg/kgとした。

またフタル酸ビス(2-エチルヘキシル)(Bis(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP)、分子量：390.56、Cas No.: 117-81-7、純度98%以上、東京化成工業(株))について、4日間「新型」反復曝露(4日間反復曝露後に単回曝露、以降、[4+1]と表記)のプロトコルにて実施予定。

各曝露実験には12週齢の雄性C57BL/6Jマウス(日本チャールスリバー)を用い溶媒はコーンオイル(C8267、Sigma-Aldrich)とし、金属製胃ゾンデ(KN-348、夏目製作所)と、ガラス製シリンジを用いて強制経口曝露を行い、最終曝露の2、4、8及び24時間後に肝を採取した。

### ●Total RNAの分離精製：

マウス肝組織は5mm径の生検トレパンにより3ヶ所を各々別チューブに採取した。採取後すみやかにRNA later(Ambion社)に4℃で一晩浸漬し、RNaseを不活化した。その後、RNA抽出操作までは-80℃にて保存した。抽出に当たっては、RNA laterを除いた後、RNeasyキット(キアゲン社)に添付されるRLT

buffer を添加し、ジルコニアビーズを用いて破砕液を調製した。得られた破砕液の 10  $\mu$ L を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定した。DNA 含量に応じ、臓器毎にあらかじめ設定した割合で Spike cocktail (Bacillus 由来 RNA 5 種類の濃度を変えて混合した溶液) を添加し、TRIZOL により水層を得、RN easy キットを用いて全 RNA を抽出した。100ng を電気泳動し RNA の純度及び分解の有無を検討した。

#### ●GeneChip 解析：

全 RNA 5  $\mu$ g を取り、アフィメトリクス社のプロトコルに従い、T7 プロモーターが付加したオリゴ dT プライマーを用いて逆転写し cDNA を合成し、得た cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (ENZO 社キット) を用い、ビオチン化 UTP, CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA はアフィメトリクス社キットにて精製後、300-500bp となるよう断片化し、GeneChip ターゲット液とした。GeneChip には Mouse Genome 430 2.0 (マウス) を用いた。ハイブリダイゼーションは 45°C にて 18 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンしてデータを得た。肝サンプルからこの様にして得られたデータについて、我々が開発した Percellome 手法 (遺伝子発現値の絶対量化手法) を適用して絶対量化した後に網羅的遺伝子発現解析を行った。先ず我々が開発した「RSort」ソフトウェアを用いて、各遺伝子 (probe set: ps) につき、用量、経時変化及び遺伝子の発現コピー数を各軸とした 3 次元グラフにおいて、発現を表す平面の凹凸を評価し、全ての ps を数理的に有意な変動を示す順に自動的に並び替えた。このリストの上位のものから専門家による Visual Selection を行い、生物学的に有意と判定される変化を示した ps を網羅性を維持しつつ厳選して解析に使用した。シグ

ナルネットワークの探索は、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.) を用いて検討した。

#### 倫理面への配慮

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、所属の研究機関が定める動物実験に関する指針のある場合は、その指針を遵守している。(国立医薬品食品衛生研究所は国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の制定になる国立医薬品食品衛生研究所・動物実験等の適正な実施に関する規程 (平成 27 年 4 月版))

### C. 研究結果

当初計画に沿って研究を行い、下記の成果を得た。  
 令和4年度は、エストラゴール(estragole)の新型反復曝露実験 (TTG245 : 70mg/kg を4日間曝露後、5日目に0, 10, 30, 100mg/kg) (Estragole[4+1]と表記)、及びフタル酸ビス(2-エチルヘキシル) (DEHP)の新型反復曝露実験 (TTG251 予定) (DEHP[4+1]と表記)を実施し、GeneChipによる肝の網羅的遺伝子発現解析を実施した。

#### ① Estragole[0+1] (実験コード TTG147-L)

先行研究で実施した単回曝露実験 (以後Estragole[0+1]と表記) の、2、4、8、24時間目に増加を開始した遺伝子の数は、それぞれ39、20、65、12であった。

EstragoleはPPAR $\alpha$ のリガンドであることが知られており、2時間目の39遺伝子には、それに合致する所見として、PPAR $\alpha$ 及びPPAR $\delta$ を上流に持つ遺伝子が誘導開始していた (Acot1、Acot2、Cyp4a31、Pdk4、等)。

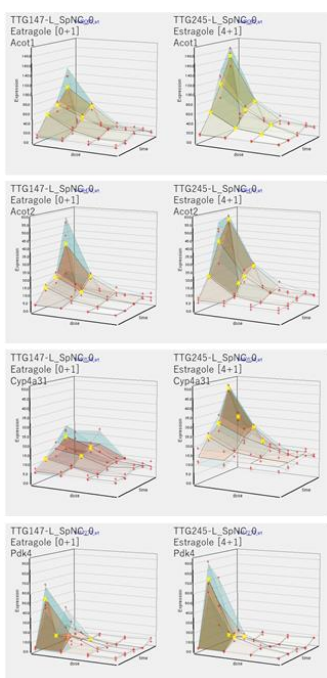


図1 左[0+1] 右[4+1]にてAcot1、Acot2、Cyp4a31、Pdk4を示す。

4時間目に誘導開始され4時間目にピークとなる遺伝子は少なかった。4時間目に誘導開始し8時間目にピークとなる遺伝子、及び8時間目に誘導開始された遺伝子は、PPAR $\alpha$ やPPAR $\delta$ の下流の脂質代謝、脂質合成に関わる遺伝子が含まれていることが示された (Abhd6、Gyk等)。

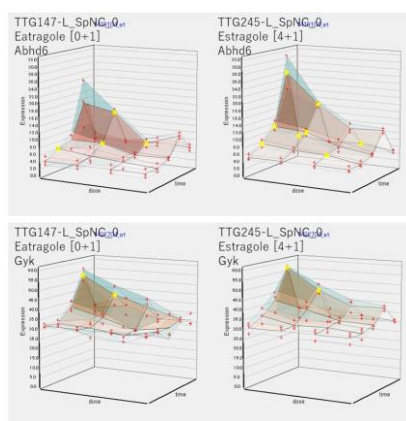


図2 左[0+1] 右[4+1]にてAbhd6、Gykを示す。

8時間目に誘導開始された65遺伝子はPPAR $\alpha$ あるいはPPAR $\delta$ の下流の遺伝子が多く含まれていた (Acaa1、Por、Paqr7等)。

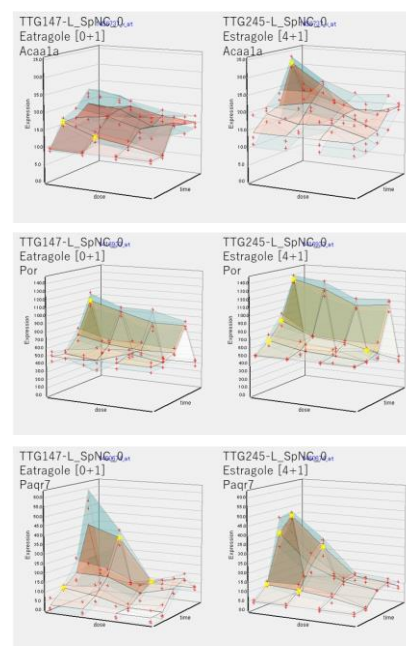


図3 左[0+1] 右[4+1]にてAcaa1、Por、Paqr7を示す。

24 時間目に誘導開始された 12 遺伝子は、反応が弱いものも多く PPAR $\alpha$ あるいは ESRR $\alpha$  の下流の遺伝子が含まれていた (Acat1、Ech1、Fabp2 等)。

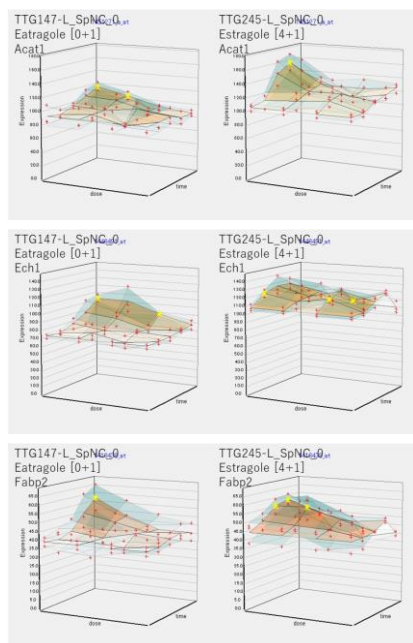


図4 左[0+1] 右[4+1]にてAcat1、Ech1、Fabp2を示す。

今までに検討した PPAR リガンド化学物質と比較すると、誘導遺伝子数は少なく、単回曝露の影響は 8 時間目をピークに収束する傾向が認められた。

## ② Estragole[4+1] (実験コード TtG245-L)

最終曝露終了後、2、4、8、24 時間目に発現増加を開始した遺伝子の数は、183、146、176、0 であった。

2 時間目に誘導開始された遺伝子の数は、Estragole[0+1]の 5 倍近くに増加した、[0+1]と同様に PPAR の下流の遺伝子が誘導される(上記 図1右側) ことに加え、[4+1]のみにおいて、小胞体ストレスシグナルが流れることが示唆された (Dnajc3、Hsp90b1、Mbtps1 等)

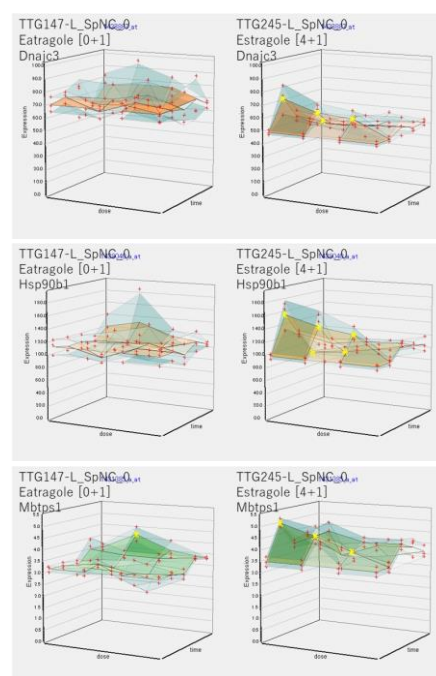


図5 左[0+1] 右[4+1]にてDnajc3、Hsp90b1、Mbtps1を示す。

これらの上流には、Xbp1、E1f2、Eif2ak3 等が位置することが示唆された。

4 時間目に誘導開始された遺伝子の数も、Estragole[0+1]の 7 倍近くに増加した。多くは脂質代謝に関わる PPAR $\alpha$ 、PPAR $\gamma$ の下流の遺伝子であった (Abhd6、Ddhd2、Mgll 等)。

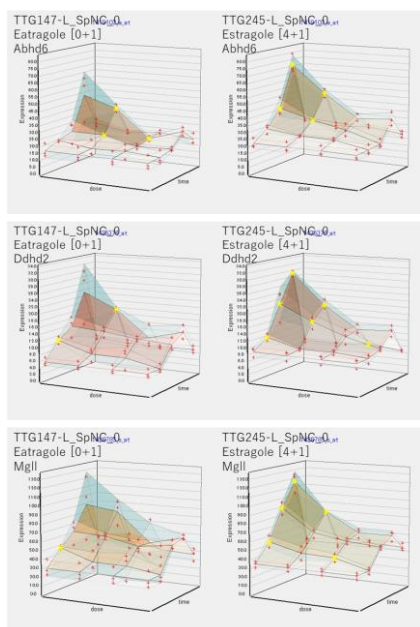


図6 左[0+1] 右[4+1]にてAbhd6、Ddhd2、Mgllを示す。

8 時間目に誘導開始された遺伝子の数も、Estragole[0+1]の 3 倍近くに増加した。多くは脂質代謝に関わる PPAR $\alpha$ 、PPAR $\gamma$  の下流の遺伝子であった (Slc27a1、Acat1 等)。これに加えて、Estrogen-mediated S-phase Entry (IPA analysis) に属する Ccnd1、Cdk2、Tfdp1 などが誘導された。

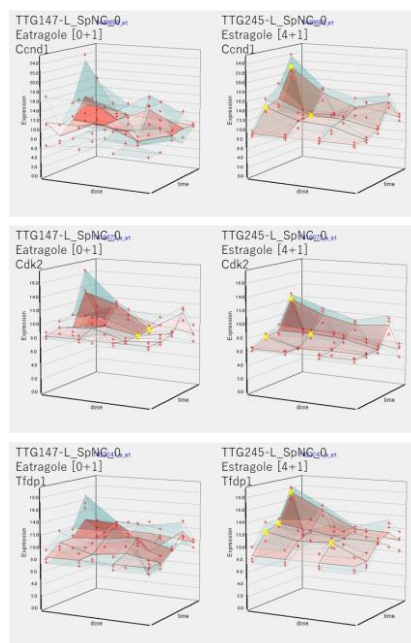


図7 左[0+1] 右[4+1]にてCcnd1、Cdk2、Tfdp1を示す。

24 時間目に誘導開始された遺伝子は Estragole[4+1]では認められなかった。後述する基線反応の解析の結果と関係するが、[0+1]と[4+1]とにおいて共に発現する遺伝子の多くについて、4 日間の反復曝露の結果、発現のタイミングが早まる現象が認められた。24 時間目に誘発される遺伝子がなくなった理由として、この現象が関与していることが示唆された。

③最終曝露後 2、4、8、24 時間に生じる早い変動を過渡反応 (Transient Response) とし、反復曝露で引き起こされるベースラインの上昇、或いは、低下の変動を基線反応 (Baseline Response) と定義して、その解析を実施した。

4 日間反復曝露により誘発された基線反応の解析を行った。測定 4 時点の内、3 時点乃至 4 時点で、反復により発現が有意に低下 (1.5 倍、t 検定で  $p < 0.05$ 、3 コピー/細胞以上) した基線反応遺伝子 (ソフトウェア“Baseline Comparison”による計算結果)は 82、上昇した基線反応遺伝子は 197 であった。

基線反応 (Baseline Response) が低下した遺伝子群は、上流に PPAR を持たず、Chemokine Signaling や



Xenobiotic Metabolism Signaling に属する遺伝子が含まれていた (Arnt、Mapk1 等)。

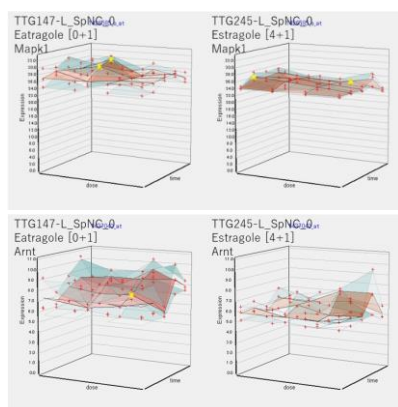


図8 左[0+1] 右[4+1]にてArnt、Mapk1を示す。

基線反応 (Baseline Response) が上昇した遺伝子群は、上流に PPAR $\alpha$ 、POR、ESR1 等を持ち、脂質代謝 (Cyp4a14、Retsat 等) の他、Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling (Csnk1d、Nr5a2 等) などの分裂促進等のシグナルが活性化していることが示唆された。

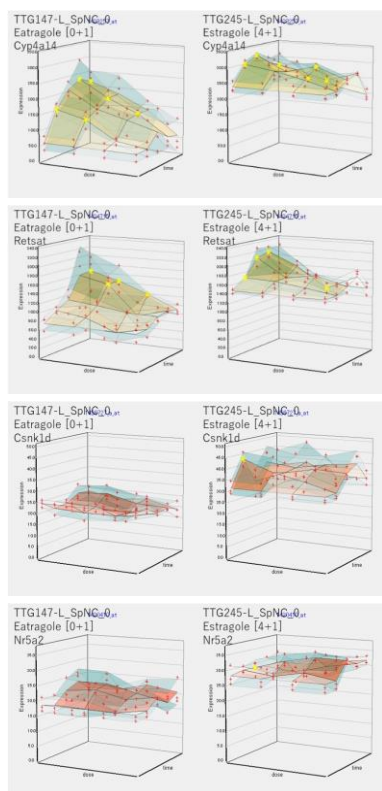


図9 左[0+1] 右[4+1]にてCyp4a14、Retsat、Csnk1d、Nr5a2を示す。

以上より、Estragole の4日間反復曝露は、PPAR 下流遺伝子の基線反応を上昇させ、一部の脂質代謝関連遺伝子の過渡反応も増強させ、発現のタイミングを早めた。また、反復曝露により小胞体ストレスなどを介した細胞増殖シグナルの増強も示唆された。Gene Ontology 解析の結果、4日間反復により、少なくともげっ歯類に於いて発癌性が強く示唆され、先行研究において解析した PPAR リガンド化学物質との詳細な比較解析を行った。

DEHP の新型反復曝露実験 (実験コード TTG251-L) については、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を終え、有意な変動を示す遺伝子の抽出と解析、および DEHP の単回曝露実験 (実験コード TTG098-L) との比較検討を進めた。

#### D. 考察

令和4年度は、エストラゴールの4日間の新型反復曝露、及び、フタル酸ビス(2-エチルヘキシル)の4日間の新型反復曝露の2実験 (以下、Estragole[4+1] 及び DEHP[4+1]と表記) を実施し、遺伝子発現解析を進めて単回曝露、反復曝露に共通の要素と異なる要素を抽出した。

Estragole[4+1]の結果から、明らかな毒性所見を發揮しない用量において、4日間という短期の反復曝露によって、単回曝露とは大きく異なる変化を明らかにすることが出来た。特に、PPAR 下流の遺伝子の基線反応と過渡反応が増強され、遺伝子発現のタイミングが早くなる傾向が明らかとなった。これに加えて小胞体ストレス等のシグナルが反復投与により活性化し細胞増殖等の発癌性等の毒性を示唆したことから、慢性毒性への外挿の可能性が示唆されたと考える。

## E. 結論

本研究は、ほぼ計画通りに進捗した。

先行研究の成果と同様に、僅か4日間の反復曝露により長期の反復毒性を推測する基礎データを取得できること、即ち新型反復曝露実験プロトコルと Percellome 法に基づく網羅的解析技術による、短期間試験での反復曝露毒性の予測の実現可能性が高いことが示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) Takaaki Tsunematsu, Rieko Arakaki, Mami Sato, Masako Saito, Kunihiko Otsuka, Yusuke Furukawa, Yuhji Taquahashi, Jun Kanno, Naozumi Ishimaru: Exposure to Multiwall Carbon Nanotubes Promotes Fibrous Proliferation by Production of Matrix Metalloproteinase-12 via NF- $\kappa$ B Activation in Chronic Peritonitis. *Am J Pathol.* 2022; 192(11): 1559-1572. [doi.org/10.1016/j.ajpath.2022.07.009].

(2) Aisaki KI, Ono R, Kanno J, Kitajima S. [Percellome Project: research on molecular mechanisms of toxicological responses based on transcriptomics and epigenetics]. *Nihon Yakurigaku Zasshi.* 2022;157(3):200-206. [doi.org/10.1254/fpj.21122] (Japanese).

(3) Dina Mourad Saleh, Shengyong Luo, Omnia Hosny Mohamed Ahmed, David B. Alexander, William T. Alexander, Sivagami Gunasekaran, Ahmed M. El-Gazzar, Mohamed Abdelgied, Takamasa Numano, Hiroshi Takase, Makoto Ohnishi, Susumu Tomono, Randa Hussein Abd el Hady, Katsumi Fukamachi, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Jiegou Xu, Shugo Suzuki, Aya Naiki-Ito, Satoru Takahashi and

Hiroyuki Tsuda: Assessment of the toxicity and carcinogenicity of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation: a two-year study. *Part Fibre Toxicol.* 2022; 19(1): 30. [doi.org/10.1186/s12989-022-00469-8].

(4) Motoki Hojo, Ai Maeno, Yoshimitsu Sakamoto, Aya Ohnuki, Yukie Tada, Yukio Yamamoto, Kiyomi Ikushima, Ryota Inaba, Jin Suzuki, Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Norihiko Kobayashi, Makoto Ohnishi, Yuko Goto, Takamasa Numano, Hiroyuki Tsuda, David B. Alexander, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Akiko Inomata and Dai Nakae: Two-year intermittent exposure of a multiwalled carbon nanotube by intratracheal instillation induces lung tumors and pleural mesotheliomas in F344 rats. *Part Fibre Toxicol.* 2022; 19(1):38. [doi.org/10.1186/s12989-022-00478-7].

### 2. 学会発表

(1) 相崎健一、小野竜一、菅野純、北嶋 聡: Percellome プロジェクト ～トランスクリプトミクスとエピジェネティクス、インフォマティクスによる毒性分子機序の探求～、第 96 回日本薬理学会年会、(2022.12.2)、横浜

(2) 菅野純: 粉体吸入実験装置の考察. 第 13 回 粉末吸入剤研究会シンポジウム、(2022.11.24)、ANA クラウンプラザホテル富山、シンポジウム、口演.

(3) J. Kanno, K.-I. Aisaki, R. Ono, S. Kitajima: Histone Modification, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposure to a Chemical. The XVI<sup>TH</sup> International Congress of Toxicology (ICT2022), (2022.9.19),



Maastricht, The Netherlands Oral.

(4) D. M. Saleh, W. T. Alexander, D. B. Alexander, M. Abdelgaied, A. M. EL-Gazzar, O. H. Mohamed, S. Gunasekaran, T. Hirose, A. N. Ito, S. Suzuki, M. Gi, Y. Taquahashi, A. Hirose, J. Kanno, S. Tsuruoka, H. Tsuda: The toxic and carcinogenic potential of three different sizes of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation. The XVI<sup>TH</sup> International Congress of Toxicology (ICT2022), (2022.9.20), Maastricht, The Netherlands Oral.

(5) 菅野純、相崎健一、小野竜一、北嶋 聡 Percellome project からみた毒性 AI の展望. 第 49 回日本毒性学会学術年会、(2022.7.2)、札幌コンベンションセンター、シンポジウム、口演.

(6) 齊藤洋克, 種村健太郎, 菅野純, 北嶋聡: アセフェート単回経口投与による雄マウスの情動認知行動解析—化学物質曝露影響から考える神経発達障害—第 49 回日本毒性学会学術年会、(2022.7.1)、札幌コンベンションセンター、シンポジウム、口演.

(7) 菅野純:「子供の毒性学:脳高次機能の形成異常の諸要因」—イントロダクション—. 第 49 回日本毒性学会学術年会、(2022.7.1)、札幌コンベンションセンター、シンポジウム、口演.

(8) 前野愛, 北條幹, 坂本義光, 湯澤勝廣, 長澤明道, 生嶋清美, 山本行男, 平松恭子, 矢野範男, 大貫文, 稲葉涼太, 鈴木仁, 横田理, 高橋祐次, 小林憲弘, 菅野純, 広瀬明彦, 猪又明子, 中江大:多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の2年間間欠気管内投与によるラット発がん性試験. 第 49 回日本毒性学会学術年会、(2022.6.30)、札幌コンベンションセンター、ポスター.

(9) 高橋祐次, 横田理, 広瀬明彦, 菅野純: ナノマテリアルの慢性吸入ばく露試験法の効率化. 第 49 回日本毒性学会学術年会、(2022.6.30)、札幌コンベンションセンター、シンポジウム、口演.

(10) 菅野純、相崎健一、小野竜一、北嶋 聡 新型反復曝露トランスクリプトミクスから見た発癌エピジェネティクスの考察. 第 49 回日本毒性学会学術年会、(2022.6.30)、札幌コンベンションセンター、シンポジウム、口演.

(11) Jun Kanno: Comprehensive analysis of the gene expression networks in toxicology: single-versus repeated-dosing and organ-organ interaction. the first seminar of ASIATOX webinar series, (2022.6.25), Virtual, Oral.

(12) J. Kanno, K. Aisaki, R. Ono, and S. Kitajima: Comprehensive Histone, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposed to Chemicals: Percellome Project 2022 Update. Society of Toxicology (SOT) 61st Annual Meeting (SOT2022), (2022.3.30), San Diego, USA, Poster.

(13) Y. Taquahashi, S. Yokota, K. Morita, M. Tsuji, K. Suga, M. Kuwagata, M. Hojyo, A. Hirose, and J. Kanno: Preliminary Report of the Two-Year, Every Four-Week-Interval Intermittent Whole Body Inhalation Study of the Multiwalled Carbon Nanotube in Male Mice. Society of Toxicology (SOT) 61st Annual Meeting (SOT2022), (2022.3.29), San Diego, USA, Poster.

(14) D. M. Saleh, O. H. Ahmed, D. B. Alexander, W. T. Alexander, H. Takase, M. Ohnishi, S. Tomono, J. Kanno, A. Hirose, S. Takahashi, and H. Tsuda: Two-Year Study for the Assessment of the

Carcinogenic and Toxic Effect of Double Walled Carbon Nanotubes in the Rat Lung after Intratracheal Instillation. Society of Toxicology (SOT) 61st Annual Meeting (SOT2022), (2022.3.29), San Diego, USA, Poster.

⑮ Natsume-Kitatani Y, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J「Comparative study of dynamic changes in gene expression profiles induced by PPARα ligands」  
ECCB2022 2022/9/18 スペイン

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし