

トキシコジノミクス

—リバーズ・トキシコロジーの誕生とトキシコロジーにおける新しいパラダイムの展開—

平林 容子[#]・井上 達

Toxicogenomics - a new paradigm of toxicology and birth of reverse toxicology

Yoko Hirabayashi[#] and Tohru Inoue

Toxicogenomics is, similar to other genome science fields, based on DNA microarray and/or DNA chip technologies, which has enabled a large number of gene expressions, thus, have been applied to such functional genomics as pharmacogenomics, oncogenomics, proteomics, metabonomics, etc. Toxicogenomics has advantages such as deducing the number of test animals and the test period, and adopts simpler techniques using new biomarkers. What toxicogenomics can offer to conventional toxicology is given herein.

Keywords: toxicogenomics, reverse toxicology, microarray, DNA chip, proteomics

1. はじめに

マイクロアレイやDNAチップ (Gene Chip[®]) による遺伝子の大量発現技術の試行的普及がすすんでいる。それらの“ゲノム発現情報とリンクして包括的に把握される比較的大容量の分子生物学的情報”は、-omicsの接尾語を付してジノミクス、プロテオミクス、メタボノミクス、などと呼称されるあたらしい生物学領域を形成しつつあり、それらのトキシコロジーへの適用がトキシコジノミクスである。米国の国立衛生研究所 (NIH: National Institutes of Health) の1分野として、国立環境衛生科学研究所 (NIEHS: National Institute of Environmental Health Sciences) に新しく附置された国立トキシコジノミクスセンター (NCT: National Center for Toxicogenomics) は、その設立趣旨の中で、トキシコジノミクスに対して、環境ストレスや環境化学物質の生体影響に関わるゲノムの働きを明らかにするものとし、同センターは、遺伝子の情報、その発現、ならびにそれらの情報のデータベースに関する諸研究を総合することによって「ゲノムと環境」の相互作用の理解を可能とすることを役割としている^{1) 脚注1}、と述べている。

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技術的に可能となった。これらの方法は、ヒトの疾病に対する特異性や感受性などの人類遺伝学領域での応用、薬物とヒトの相互作用に関する創薬面からの応用ならびにそれらの個別治療への応用、さらには腫瘍の病理診断としてのパソジノミクスとしての応用、など幅広い領域で、双方向性の新しい科学の世界を展開しようとしている。

トキシコジノミクスも、これらのゲノム戦略のトキシコロジーへの適用に他ならないので、しばしば分子遺伝学やファーマコジノミクスなどの延長線上で理解されがちである。しかしそこに描き出される科学の世界は、既知の遺伝子の発現を見るにとどまらぬと言う意味にお

¹ Toxicogenomics is a new scientific field that elucidates how the entire genome is involved in biological responses of organisms exposed to environmental toxicants/stressors. Toxicogenomics combines information from studies of genomic-scale mRNA profiling (by microarray analysis), cell-wide or tissue-wide protein profiling (proteomics), genetic susceptibility, and computational models to understand the roles of gene-environment interactions in disease. The National Center for Toxicogenomics (NCT) is a coordinated, multi-disciplinary research program of the National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS), National Institutes of Health (NIH). The goal of this document is to specify the mission, goals and operational scheme of the NCT. <http://www.niehs.nih.gov/nct/concept.htm> 参照.

[#] To whom correspondence should be addressed: Cellular & Molecular Toxicology Division, Center for Biological Safety and Research, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyohga, Setagayaku, Tokyo, 158-8501, Japan; phone 03-3700-9639, facsimile 03-3700-9647, e-mail yokohira@nihs.go.jp

いて、いわば既知から未知を描きだす、「応用」を越えた、文字通りボーダーレスな生命観の中に位置づけられる新しいトキシコロジーの様式である。そしてトキシコジノミクスは、技術の変化が研究の進め方そのものに影響を与えるという意味で、単なる技術論ではなく方法論に他ならない。本総説の筆者の一人、平林は、毒性部機器試験室長を務めるが、ここではその立場から、以上のようなトキシコジノミクスの登場が、「新しい時代の機器試験」としてトキシコロジーにどんな展望を与えるかについての検討をもって本稿の目的としたい。

2. トキシコジノミクスの概観

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。1999年9月、米国のVirginia州Warrenton郊外の瀟洒な別荘でニューヨーク科学アカデミー (New York Academy of Sciences) 主催の「来世紀の毒性学」 (“Toxicology for the Next Millennium”) と称する非公開のワークショップ²⁾ が行われた。Affymetrix社のJing-Shan Huや、Large Scale Proteomics社のSandra Steinerといった若手の技術者が、当時すでに佳境にあったファーマコジノミクスやプロテオミクスに関する目を見張るような成果の一端を紹介し、さらにその将来について活き活きと語ったとき、その発表要旨にトキシコジノミクスの言葉はなかった。Nature Geneticsの特集に、Brown & BotsteinのDNAマイクロアレイの総説³⁾ や、Debouck & Goodfellowの医薬品開発への応用の解説⁴⁾ が掲載されて間もない頃で、この時、データの説明でいわばトキシコジノミクスとも云うべきといったささやかな意味で「トキシコジノミクスへの挑戦」 (“the advent of toxicogenomics”) と云う表現が将来の可能性として使われたのみであった。

1) DNA マイクロアレイ

トキシコジノミクスでは、他のゲノムサイエンスと同様、DNAマイクロアレイやDNAチップを基本技術として用いる⁵⁾⁻⁷⁾。DNAマイクロアレイは、スタンフォード大学のBrownらによる高密度集積アレイ解析法³⁾ 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る⁸⁾⁻⁹⁾。他方、DNAチップは、オリゴヌクレオチドプローブを、光リトグラフィ^{脚注ii)}を用いて合成したもので、これに組織材料由来のmRNAをcRNAに変換してハイブリダイズする¹⁰⁾。もとより、DNAマイクロアレイ法は、大量の遺伝子発現の観察を可能とした点に意義があり、すでに種々の方面に応用されるに至っている。転写因子を検索するトランスクリプトーム⁷⁾、薬物代謝酵素関連の遺伝子の検索や、Single Nucleotide

Polymorphism (SNP) に関わる薬物感受性の検索を対象としたファーマコジノミクス¹¹⁾⁻¹³⁾、病理診断に関わるパソジノミクス (pathogenomics)¹⁴⁾⁻¹⁶⁾、変異原性のサーベイに関わるミュータジノミクス (mutagenomics)¹⁷⁾⁻¹⁸⁾、更に治療の予後診断に関わる予知医学的応用¹⁹⁾⁻²¹⁾、などは、その応用の一部である。殊にDNAチップの方は、ハイブリダイズした遺伝子の塩基配列の解読が可能であるから、先のSNPの選別にも力を発揮し、そうした情報の蓄積は、いわゆる個別創薬 (a tailor-made pharmaceutical)、個別医療への未来を切り開く原動力となっている。

このようなマイクロアレイ技術やDNAチップ技術をと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が、注目すべき点は、その結果従来の帰納的解析 (inductive analysis) にとどまらず、演繹的 (deductive) に未来予測が可能となった点にある。ここで云う演繹的毒性学 (“deductive toxicology”) は、結果的には後述するリバース・トキシコロジー (“reverse toxicology”) を意味する。その予見性に対して、個体の同定を意図するDNAフィンガープリント (finger print) からの演繹で、相当規模のデータベースが形成されないとリバース・トキシコロジーが成立し得ないものと解説がしばしば行われるが、後述の通り、これは事の本質に関わる誤解である。また遺伝子発現に変化を及ぼさないような急性変化や様々のトキシコロジーの表現型が網羅的に把握できるかの如何は、今後の試行に待つところが無いわけではないが、これまで予知できなかった背景が把握される原理が明らかになりつつあるだけに、これに立脚して浮上してくる新たなバイオマーカーの発掘への期待は大きい²²⁾。

2) トキシコロジーの領域とトキシコジノミクス

トキシコジノミクスについて概観する前に、トキシコロジーの領域と構造を理解し、再認識しておくことは意義をなしとしない。それは、トキシコジノミクスであらたに見えてくる世界を分析する際に大きな役割を果たすことになる。トキシコロジーの分野に放射線生物学という領域がある。これは、物理学と生物学の複合領域を形成していて、物理学の一部でもなければ生物学の一部で

ii) 光リトグラフィ (photo-lithograph): 半導体製造技術においては、光を利用して平面基盤にパターンを転写する写真製版技術を意味する。ここでは、一連の型 (フォトリソグラフィックマスク) を用いてチップの露光部位を順次決定し、光照射によるその部位の活性化を利用した特異的な化学合成を行うことで、プローブとなるオリゴヌクレオチドを合成する手段として使われている。

もない。そこでトキシコロジー全般についてその構造を見ると、このものは化学物質や物理現象の基礎としての化学や物理学と、生物学や医学・獣医学との間の学際的境界領域である。獣・医・薬の領域の生化学や薬理学では、トキシコロジーを構成分野として研究対象とすることが少なくないが、実際にトキシコロジーに携わる研究者・技術者の幅は更に広く、理学、農学、工学、薬学、医・獣医学、ひいては、環境科学や「安全科学」と呼ばれる諸領域にも密接に関連している。結果として各国ともトキシコロジーを複合科学として位置づけ、環境科学やライフサイエンスの中に学部組織として取り扱う方向をとりつつある²³⁾。

トキシコロジーの学際性についてももう少し注目してみよう。図1は、生体と物質の相互作用を、横軸を反応の時間軸にとって種々の例を列挙したものである。しかし実際には、横軸は標的物質の質量と考えても良い。化学物質や放射線の生体作用は、物理的・反応過程から、化学的、さらに生物学的に種々の階層の反応がこれに応じた時間軸あるいは質量軸に沿って進行しているものと考えられる。ここでは、たとえば生理学的反応と毒性学的な反応の間に関与する分子群が、共有された関係にあるものと理解される。光や酸素の役割をそれぞれ取り上げてみよう。“光”無くして動物に視覚器は発達しないが、光は斯くの如く生物に必須でありつゝ、同時に、単独でも化学物質との相互作用としてでも、光毒性を惹き起こす。呼吸によって得られる酸素の一部はいわゆる活性酸素種 (ROS: Reactive oxygen species) を生成し酸化ストレスを引き起こすが、同じROSそのものが、細胞内シ

グナル伝達にも役割を果たしている²⁴⁾。生体の発生段階には、神経系をはじめとして多くの組織でアポトーシスが進行していることが知られているが、同時にアポトーシスは、生体が傷害を被った際の細胞処理に利用されている²⁵⁾。同様のことは、時間軸のもっと長いレベルでも生じているものと考えられる。老化に関する遺伝子群は、生体傷害の際、促進加齢とゲノムの不安定化を亢進するという際だった特徴をもつことが想定されており、トキシコジノミクスは、こうした現象の拡がりや背景を明らかにするかも知れない。それらは生理学的に必要な生体刺激である面と、生体に対して様々な傷害を惹起するモメントがあることが理解される。これは、生理学と、トキシコロジーが、生体反応としては本来「連続現象」(the continuum)として理解されるべき本態を意味している。そしてこのことは同時に、トキシコロジーで生体傷害の発現機構を担う発現遺伝子のレパトワ (repertoire) を、生理的現象を担うそれから切り分けることが困難な課題であることを示唆している。

中国語にはトキシコロジー (毒性学) を薬理学と対比して、「毒理学」と呼称する言葉遣いがあるが、この両領域に眼を向けると、薬理学とトキシコロジーの間では、それぞれ薬理効果や毒性機構のメカニズムの理解という方向性で相互に視点が共有されている反面、きわだった方向性の違いがある。薬理学が何らかの「或る効果・効能」を突き止めること、いわばポジティブ・セレクション (positive selection) を焦点にしているものとする、トキシコロジーは、比喩的に云うならば、“何もないこと”、“何もないレベル”を探索するネガティブ・セレクション

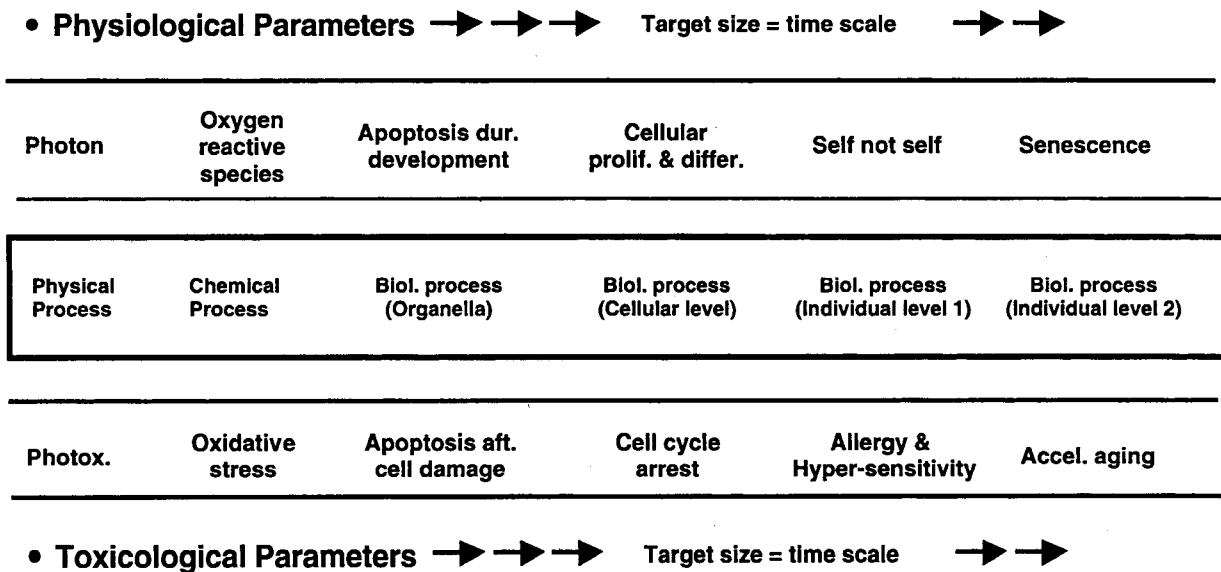


Figure 1: 生体と物質の相互作用

横軸を反応の時間軸にとった場合の種々の例を示す。生理学的指標と毒性学的指標の相対関係を示す。

尚、Biological Process (Individual level 1)とBiological Process (Individual level 2)の違いは、時間レベルの差を便宜的に表現する。

(negative selection) の分野と表現することができる。トキシコロジーでは、その物質の生体影響の認められないレベルの用量（無作用量, NOEL: no observed effect level）や、生体傷害性の影響の認められないレベルの用量（無毒性量, NOAEL: no observed adverse effect level）といった指標を求めることが、なかば目的化している面もないではないからである。いまトキシコジノミクスが「オミクス」サイエンスのトキシコロジーへの適用であるとすれば、その目的は、上記のNOELとか、NOAELといった概念を大量の遺伝子発現法によって一気に解析しようとするに他ならない。ここでも、トキシコジノミクスは、先に見た“連続体”としての生理反応とトキシコロジーにおける反応とを切り分ける遺伝子レベルでの分界点の存在を前提としなくてはならない。

トキシコジノミクスでしばしば論じられる「新しいバイオマーカー」にはそうした期待が込められており、これまでの試行の中でも、それまで認識されなかったようなバイオマーカーの存在が示唆されている。そして“リスク表現バイオマーカー”としての遺伝子群を明らかにする様々の試みがなされている。種々の薬物代謝酵素の動きをモニターする方法、アポトーシスの抑制や、細胞周期の亢進を促す遺伝子群をモニターする方法、エピジェネティック発がん関連化学物質を投与した時に発現が亢進したり低下したりする遺伝子群を取り上げてモニターする方法などは最終のゴールではないまでもその一例ではある（表1：アフィメトリクス社が公開している特定の毒性スクリーニング系の市販チップを示す。）。

振り返ってみると、従来のトキシコロジーは、現象的に‘何もない’という認識を支える、現実の観察手法上の諸要素の上に立脚していた。例えば測定系の側から見ると顕微鏡の分解能がそれであるし、他方、生体の側にも

もホメオステシスといった、変動が表に現れない‘invisibleな領域’が閾値のような役割を果たすものと信じられてきた。実際には物質の分析法の進歩はこの分界点を大きく揺るがせ、現実には、測定された結果の毒性的な意義の理解が困難な時代に直面させられているが、ゲノム科学は、これを生体反応の分析法全般としても、そうした無境界領域に近づけようとしようとしている面がある²⁶⁾。

3) トキシコジノミクスの立脚点

前項では、トキシコジノミクスに課せられた生理的領域とトキシコロジーのそれとの境界の切り分けについての課題を明らかにした。それにも関わらずトキシコジノミクスには、実際の作業仮説として種々の立脚点が成り立ち得る。確かにこの課題をどのように考えるかは生物観の問題がありゴールに達してはじめて示し得るものであるが、現在、各国のコンソーシアムあるいは個々の地球規模の巨大な製薬企業群が盛んに模索しているところでもある²⁷⁾⁻²⁹⁾。前述のNCTは、表2のような諸点を作業仮説としてプロジェクトを実施している。このような立脚点は、現象的には存在するものと考えられるが、同時にこの方法に限界があることも示唆される。これらの本質を明らかにしようとするならば、単なる曝露と非曝露のサブトラクション法のみでは解析の難しいことも知られており、遺伝子発現のみで解決することは技術的に困難なことである。理論的には、転写後制御による薬物代謝酵素の関与する毒性反応といえども、これによって惹起させるであろう、あるいは未知の遺伝子群の発現が想定されるので、これらの検出を目指すことが究極の方法となるが、さしあたりの段階ではプロテオミクス、メタボノミクスなどを併行し、タンパクレベルでの発現

Table 1: GeneChip® expression arrays: Rat Toxicology U34 Array

Included on Array	Examples
Metabolism Enzymes	CYP450s, acyltransferases, sulfotransferases, etc.
Growth Factors and Receptors	IGFs, Interleukins, NGFs, TGFs, VEGF, etc.
Kinases and Phosphatases	Lipid kinases, MAPKs, Stress-activated kinases, etc.
Nuclear Receptors	Retinoic acid, Retinoid X, PPARs, etc.
Transcription Factors	Oncogenes, Stats, NF-kappa B, Zinc-finger, etc.
DNA Damage Repair Genes	Polymerases, Topoisomerases, GADDs, RAG, etc.
Apoptosis Genes	Bcl-2 family, Bad, Bax, Caspases, Fas, etc.
Stress Response Genes	Drug transporters, Heat-shock proteins, etc.
Membrane Proteins	Gap-junction proteins, Na ⁺ /K ⁺ -ATPase, Selectins
Cell-cycle Regulators	Cyclins and associated proteins

GeneChip Probe Array Technology®; Copyright 2000 Affymetrix, Inc.; all rights reserved

Table 2: National Center for Toxicogenomics の作業仮説

- ① 特定の化学物質“群”は、遺伝子発現の上でユニークな“expression signature*”を持つ³⁰⁾。
- ② 異なった細胞や異なった組織は、厳密な意味では異なった反応性を示す。
- ③ 各種の動物種は、遺伝子発現の多くで相同的反応プロファイリングを共有している。
- ④ 特定の化学物質“群”のユニークな“expression signature”は、生体の側の条件、例えば胎生期発生過程とか、他の生体条件下で、反応様式が異なっている。
- ⑤ 複合物質反応でのそれらの相同反応性の如何や相違は、より明確に把握される。
- ⑥ 薬剤感受性/反応性を増す遺伝子多型が抽出される。
- ⑦ 環境化学物質の曝露による長期低用量効果の機構解析³¹⁾。

* トキシコジノミクスでは、個体の同定を意図する DNA フィンガープリントのアナロジーとしての、発現遺伝子のパターンからの化学物質の同定ということは、必ずしも目的ではない。即ち毒性の表徴傾向を掴むことに主眼があり、特定の化学物質“群”に共通する毒性発現機構に対応する遺伝子発現パターンが存在することを想定し、このパターンの抽出を目指すものである。

プロファイリングや、SNP解析の結果を情報科学的に照合することによって、実用的な解決の展望を切り開くこともかかせない。

4) リバース・サイエンスの誕生とトキシコロジー

Elizabeth Robertson³²⁾とMario Capecchi³³⁾がそれぞれ独立して遺伝子相同組換え動物、即ちノックアウト(KO)マウスの作製に成功したのは、1989年のことである。これは大腸菌などの下等生物で行われていた組換え体の作出とは、時代の一線を画すインパクトをその後の生物学に与えた。当初のKOマウスは、個々の遺伝子が或る程度よく調べ尽くされた上で作られたので、マウスを作る事によって認められた“予想外”の事柄は多くはなかった^{34)–37)}が、KO動物の作出技術の進展と共に比較的容易に作成が可能となるに従って、逆に遺伝子機能の解析を目的としたKO動物の作成³⁸⁾も逐次なされるようになった。相賀(元・当安全センター毒性部第4室室長)らが手がけていた、機能未知の遺伝子としてクローニングした、転写因子特有の配列のうち、basic helix-loop-helixと呼ばれる配列をもつ遺伝子、Mep1は、このもののKOマウスに奇形が見出され、体節形成の根幹となる機能がはじめて明らかとなるなど、そのよい例と云えよう³⁹⁾。これらは、かつての特徴的な機能を持つ遺伝子をクローニングして後、必要に応じてKO動物を作出する手法に対して逆向きの方法論という意味で、リバース・ジェネティクスと呼ばれることとなった。遺伝子の塩基配列のみが明らかでアノテーション(annotation)のない遺伝子、例えば既知の特異配列を含むことで機能がある程度推測されるものや、そうした既知の特異配列を全く含まず、予測がつかないものなどが含まれるが、こうした遺伝子をノックアウトすることに

より、その遺伝子の持つ機能を明らかにするリバース・ジェネティクスという分子遺伝学あたらしい方法は、科学一般に普及し、帰納法的解析による認識と、それらを背景とした演繹的な推論との双方向性の方法論を導き出し、その結果リバース・サイエンスを創り上げた。分子生物学の歴史が切り開いた双方向性の研究推進戦略は、科学の力をそれまで以上に強め、高める役割を果たしつつある。

かくしてマウスでも全ゲノム解読のプロジェクトが進展するに至り、この双方向性の戦略をとることが分子遺伝学以外の領域でも可能になってきた。トキシコロジーでも例外でなく、ある化学物質の曝露に伴う毒性学的な表現型と、同時に観察される遺伝子発現のプロファイルは、前者の解析が毒性メカニズムの理解を飛躍的に前進させる結果となったのに対して、後者は、遺伝子発現のそのプロファイリングからその物質の惹き起こすであろう表現型を、限られた条件下で推論する可能性を導き出した。これにマイクロアレイ技術やジーンチップ技術が大容量の遺伝子発現解析を実現するに至って、双方向性の解析手段としての‘ジノミクス’が成立する基礎が整っていった。とくに特定の機能指標に限定したチップをデザインすることにより、目的の特性をもつ遺伝子をスクリーニングする手法は、直ちに取り上げられ、薬物代謝や増殖因子、細胞周期などの因子に適用された。そしてファーマコジノミクス、さらにファーマコプロテオミクスなどが成立し、この手法を用いて同様のトキシコロジーチップが作製された。先に見た表1は、その一例である。前述の通り、これはトキシコロジーにおけるいわばポジティブ・スクリーニングであり、対象のはっきりした創薬過程での、毒性によるいわゆる“ドロップアウト”の排除などにすでに大きな威力を発揮してきたものであ

る。しかしながら、前にも述べたとおり、毒性発現のメカニズムの中には、少なくともその反応の初期のレベルでは、転写後制御の修飾が役割を果たすことが少なくない。多くの薬物代謝酵素、膜チャネルに関与するトランスポータ、種々の免疫反応認識の伝達などは、その一例である。従って、これに該当するポジティブ・スクリーニングによるトキシコロジーにはプロテオミクス、メタボノミクスなどの導入が必須となる。そうした課題はあるにせよ、これら一連の方法は、既知の毒性メカニズムによる傷害性を認識するためのポジティブ・スクリーニングとして有効である。他方、トキシコロジーが“何もない”レベルを探索する、つまり、ネガティブ・スクリーニングに対しては、必ずしも目的を達し得ず、別の視点が必要となる。トキシコジノミクスの一般的な可能性を悲観的にとらえる考え方があるが、その多くは、同時にこうしたネガティブ・スクリーニングとしてのトキシコジノミクスに含まれる限界を念頭に置いたものと云えよう。

5) リバース・トキシコロジー

リバース・ジェネティクスの歴史と同様、リバース・

トキシコロジーは、マイクロアレイ技術と全ゲノムの解読の終了という2本の柱に支えられて、“遺伝子発現のみから、より短期でより少数の動物試験、さらには試験管内培養細胞のみで、毒性予測が可能になるもの”と期待されている。前項でみたような問題点にも関わらず、トキシコロジーにおけるポジティブ・セレクションとしての既知遺伝子の現実的な発現情報を提供してゆく傍らで、全ゲノムの発現情報が着実に蓄積されてゆくならば意外に早い時期の実用化も考えられよう。特に、リバース・トキシコロジーにおける予知能には、実用的に考えるならば、無限の情報量が求められているのではなく、また更には、人工頭脳的な要素の導入も想定されている。しかもここで想定される新規のバイオマーカーとなり得る遺伝子群のプロファイリング、即ち、発現遺伝子の構成と発現強度による特徴付けをとっても、前述のとおりホメオステシスによって表現型の明らかでなかった一連の遺伝子群が浮かび上がってくるものと想定されている。一度それらが明らかになれば、それら新しいバイオマーカーに基づく基準は、熟練を要しない簡明な方法として普及してゆくことになるものと思われる。

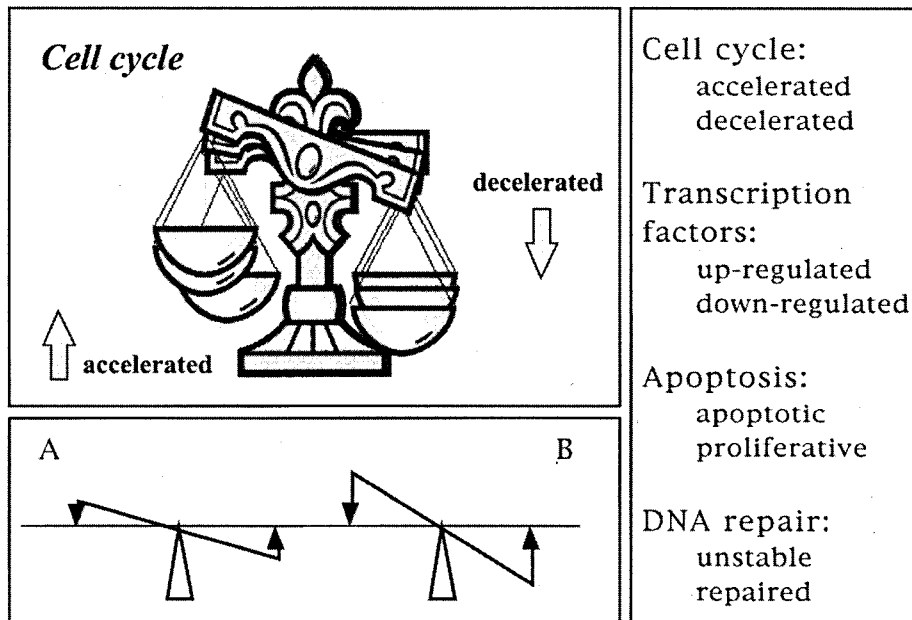


Figure 2: 細胞周期に関する遺伝子群の拮抗関係

細胞回転のアクセルとして働く遺伝子群、例えばE2Fやサイクリン及びサイクリン依存性キナーゼなどと、ブレーキとして働く遺伝子群、例えばp53やサイクリン依存性キナーゼ抑制因子などがそうであるし、単純に二つの要素に分解できるとは思わないが、ある転写因子の発現上昇を促す遺伝子群と逆に発現抑制に働く遺伝子群のネットワーク構造も同様に考えることができる。アポトーシス、DNA修復、などといったその他の様々な生命現象も、何らかの意味でそうした関係の上に成り立っているものと理解される。こうした背景をもつ生命現象に対して、トキシコジノミクスが、どのようにして生体障害(傷害)性の影響を設定しエンドポイントの線を引くかは検討課題であるが、トキシコジノミクスでは、それらの拮抗関係にある双方の遺伝子群の動きや一連のシグナルの流れが把握されることになる。さしずめこれは、機械的に過ぎるかも知れないが、拮抗する筋肉群のバランスによって四肢の運動が静止状態にあることを筋電計はその双方を検知することのアナロジーと考えればよい。ところで図のA、Bのようにこうした拮抗関係では同じバランスがとれていてもその相互の拮抗関係が小さい場合と大きい場合がある。エピジェネティック発がんにおける調節因子の過剰発現などは、リスクの高い状態と考えられる。トキシコジノミクスでは、この相違が認識され得るものと考えられる。

一方、リバース・トキシコロジーは、前々項で見たような立脚点に沿って初歩的なデータが報告されている³⁰⁾ものの、フォワード・ジノミクスの手法による種々の蓄積と異なり、ある程度のプロファイリングデータの蓄積なしでは成立し得ない。そういう意味では現状でのリバース・トキシコロジーは、未だ仮説の域を出ない。その予測力は、遺伝子発現プロファイルのデータ量やそれらと表現型とをリンクさせた情報量、そして更にそれらをインフォマティクス、即ち、遺伝子発現情報から得られる機能情報データベースとして確立させる作業のテンポに掛かっている。更に正確な予測戦略としては、特化した遺伝子発現に基づいて作製されるプロテオームチップのようなリバース・プロテオミクスとのデータリンク、即ち、相互的なデータの統合作業も求められている。

さてリバース・トキシコロジーには、NOELやNOAELに相当するあらたな概念の提供が求められていることは前述の通りである。図2はこの点を概念的にまとめている。種々の遺伝子群は、様々な機能の遺伝子の、網の目のような拮抗関係の中に位置づけられるものと考えられる。図2の細胞周期を顕すバランスは、細胞が細胞周期のアクセルに関わる遺伝子群とブレーキに関わる遺伝子群の拮抗関係の中で、平衡状態を維持しているとの想定を戯画化している。図の右に示すいくつかの例のごとく、細胞周期のみならず転写因子の発現の亢進と抑制、アポトーシスの亢進と抑制、DNA修復の亢進と抑制など、いずれも同様と考えられ、ある拮抗関係の、バランスシート上の“結果”を見ているものと理解される。

さてこのとき、例えば図2左下の平衡状態AとBを想定すると、こうしたAとBのようなバランスの振幅の差は、従来のトキシコロジーの指標では一般に観察することの出来なかったものである。こうしたあらたに可視化されてくる概念を前にして、ではつぎに、AとBでは、いずれのリスクが高いと考えるべきであろうか。リバース・トキシコジノミクスでは、こうした拮抗関係を破綻する種々のKO動物のようなモデルを駆使し、そこで動く遺伝子群を截然と切り分けて、個々のインフォマティクスと密接に関連したプロファイリング・データベースを形成してゆく過程が重要である。

3. リバース・トキシコジノミクスの実用的なアプローチ

トキシコジノミクスのデータ・プロファイリングは化学物質と遺伝子発現の1対1対応を求めるものではなく、その意味で、DNAフィンガープリントによって個体識別をする作業とは本質的に異なる。即ち、一連の包括的に分類される化学物質群と特定の遺伝子発現プロファイリングの対応関係で整理されてゆくものであり、そのために必要な基本データは実用的には有限であると考えて差し支えない。但し同時に、リバース・トキシコジノミ

クスの構築は、漫然と毒性指標のポジティブ・セレクションの傍らで、データ・プロファイリングの蓄積を積み重ねてゆくだけでは、その確立はおぼつかない。すでに試みられているかもしくは計画されているリバース・トキシコジノミクスの実用的なアプローチの中から、いくつかの例に絞って解決すべき課題を検討してみたい。

1) 未知化学物質の毒性予測

図3は、未知化学物質の毒性指標を明らかにするプログラムの例を図示している。ここで掲げている毒性陽性あるいは、陰性の化学物質としては、極端な例を挙げるならば、化審法^{脚注iii)}で取り上げる指定化学物質と非指定化学物質を対象に考えるのも良い。既知の種々の毒性表現型に関する代表例を取り上げて、それらの投与マウスと非投与マウスから、図の右側の要領でそれぞれmRNAを抽出し、ここでは、これを逆転写させてcDNA化しつつ、赤と緑の色素標識をした後、競争的ハイブリダイゼーションを行っている。データベースの取り方は、種々考えられるが、これらの結果を左下のような魔法陣の中にデータベース化してゆく。これに対して未知物質の遺伝子発現プロファイリングが、先のデータベースのいずれに位置づけられるか等を繰り返しデータ照合してゆく中で、その発現パターンの特徴をインフォマティクスとしてデータベース化してゆくものである。

2) モデル動物の有効性

内分泌攪乱性の化学物質のスクリーニングにはエストロゲン受容体やアンドロゲン受容体との親和性を見る方法が用いられている。それらにはそれらの役割があるとしても、核内受容体がDNAの応答配列に結合する際のコファクターの影響など、未知の要素を予測することはできない。

これを短期目標として解決する方法は、例えば標的の受容体遺伝子KOマウスを用いる事などによって確実に当該受容体原性変化であることを確認しつつ捨象してゆくことである。即ち、モデル動物を用いることによる網羅的ないし包括的な遺伝子群の中から関連遺伝子を“あぶり出す”ことである。アリアル hidrocarbon 受容体のKOマウス (AhR・KO) では、ダイオキシンによる影響が観察されない。野生型の動物にダイオキシンを投与して発現する遺伝子は様々であるが、その中でAhR・KOで、発現が見られない遺伝子は決して多くはない。これらの遺伝子群の中には、AhRを介する特異的な影響のバイオマーカーとなる遺伝子が含まれているか

ⁱⁱⁱ 化審法：化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律。昭和48年制定。

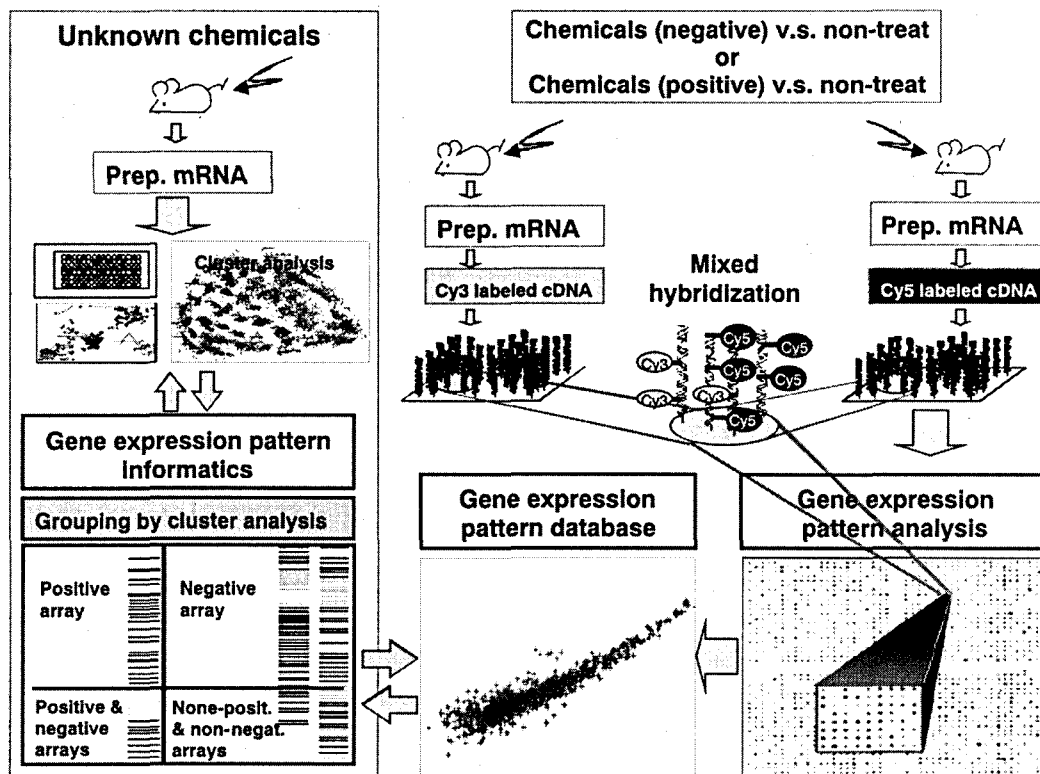


Figure 3: 未知化学物質の毒性指標を明らかにするプログラム

本文参照

ら、何らかの折りにこれらの発現をセットで修飾する物質があれば、それらの発現機構はともかくとして、ダイオキシン様の毒性を示すリスク対象となるものと考えることができる。われわれの研究室で用いられるチオレドキシシンKOマウスでの情報は、それ自体有効要素であるが、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) のKOマウスやカタラーゼ欠乏マウスなどでの結果と複合させると酸化ストレスに対するより包括的な簡易バイオマーカーの“あぶり出し”が成功することになる。

ベンゼンは、明らかな遺伝毒性化学物質であるが、同時に強いp53依存性の細胞周期抑制を引き起こし、野生型のマウスでは、よほど特徴的な条件でなければ白血病を作らない^{40)–42)}。1887年のLe Noireのバリの靴職人での報告⁴³⁾以来、われわれがマウスで報告するまで100年の年月が掛かったのは、理由のないことではなかったと云えよう^{40), 44)}。このベンゼン曝露時の野生型とp53KOマウスでのマイクロアレイにおける発現遺伝子パターンを見ると、野生型マウスでの発現遺伝子は、遺伝子障害性のモニター遺伝子が中心である⁴⁵⁾。ベンゼン白血病は、p53KOマウスと野生型の双方で観察されるが、両者の発生メカニズムには相当の違いがあることが判る。

以上モデル動物の利用の意義をまとめた。但し、このものの利用が、リバーズ・トキシコジノミクスの樹立に、本質的に必要と言うことではない。ここで探索しようと

する新しいバイオマーカーとなり得る発現遺伝子プロファイリングは、いずれは適切な曝露実験系の中で、同定検出されるはずのものとして期待されるからである。

3) 試験管内試験の有効性

前項で個体レベルのin vivo試験法による試料の収集を取り上げたが、ここでは、試験管内試験の材料を用いた場合に得られる情報について、その可能性を考えてみたい。

表3には、in vitroとin vivoの組織採取によって得られる種々の表徴型、即ち毒性学で言うところのエンドポイントに沿った毒性の諸標的を掲げている。表の左端に表示してある“yes”は、試験管内試験で充分意味のある情報が得られるものと考えられるエンドポイントを示しており、“no”は、個体試験でなければ意味のある結果が得られないと考えられるパラメータを表示している。イオンチャンネルやイオンポンプに関わる生体膜の役割を明らかにすることには、培養細胞で充分代替可能と考えられるし、他方、胎児形成期の諸情報のように、現段階で試験管内試験による良い対象マーカーは見いだせず、個体試験でのみ把握可能なものを示している。

同じ試験管内試験でも、取り扱う培養細胞系によって、得られる情報が格段に高度になりつつあるのが近年のこの領域の科学の発展である。図4に示すように、これま

Table 3: トキシコジノミクスのための試料とエンドポイント—試験管内試験試料は有効か？

試験管内試験の有効性	毒性指標
No [yes]*	<i>Morphogenesis, developmental anomaly</i>
No	<i>Identifying tissue-specific toxicity</i>
No/ yes	<i>Epigenetic carcinogenesis (as modification of gene expression)</i>
	<i>Metabolic activation</i>
No	Hepatic activation leading to multi-tissue damage
Yes	Tissue-specific activation
	<i>Receptor-mediated events</i>
Yes/ no	Neuronal tissue
Yes/ no	Steroid hormonal tissue
Yes/ no	Ah-receptors
Yes	<i>Cytotoxicity</i>
	<i>Membrane activities</i>
Yes	ion channels, ion pumps
	<i>Inhibition of biochemical process</i>
Yes	Uncoupling oxidative phosphorylation, inhibition of ATP production by redox cycling initiation to produce ROS
Yes	Oxidative phosphorylation to inhibit ATP production
Yes/ no	Alteration of calcium homeostasis

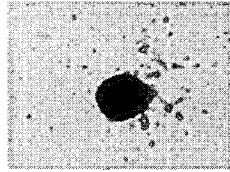
*[yes]: 全胚培養のような、現状での問題点は多くとも、個体レベルの試験を限定的に模倣する実験系が将来期待されるもの。

で分化が先行して培養の困難だった胚性幹細胞や、神経、造血といった組織の幹細胞など、幹細胞システムでも Leukemia inhibitory factor, Thrombopoietin, kit ligand, Interleukin-6, basic fibroblast growth factor などを用いることにより自己複製能を保持したままそれらを培養することが可能になった^{32), 46)–48)}。また、初期培養細胞系や樹立培養細胞系では、ヒト細胞なども充分駆使できる体制が整っている。それらの細胞系の機能に即して、遺伝子発現を効果的に観察できる場合が多々あることは疑いない。とりわけ、胚性幹細胞系については、その由来が実験動物由来とヒト由来とに関わらず、1個の細胞の増殖分化の観察から予見される情報は、実験動物1個体の情報に相当するという点は、発生毒性学の将来を考える上で画期的且つ、極めて重要な視点である^{49), 50)}。

4) 標準化のための戦略

多くの試験・研究施設で取り組まれているマイクロア

レイやDNAチップ関連のデータは、現段階では、その施設間にあっても、また個々の研究・技術者間にあっても、互換性に乏しく、比較が困難なことが知られている。トキシコジノミクスでは、この実態を革命的に改変して種々の採取試料から種々の条件で得られる結果を標準化 (standardization) することが求められている。こうした標準化は、トキシコジノミクスにおける応用以外の領域では、大きな問題点であることには変わりはなくも、その深刻さは比較にならず、黙過し得た面が少なくない。トキシコジノミクスの取り組みによってはじめてその必要性が焦眉の課題になったといつてよい。mRNAの不安定性はこのプログラムの大きな課題であり、組織採取からRNA抽出までの効率の安定化を考えるだけでも制御すべき条件が多段階に及ぶ。更に、これに先にもふれた逆転写、色素標識、ハイブリダイゼーションなどの諸過程を経て、スキャン操作と続く。しかも比較にならない膨大な数量の遺伝子が対象となる。従って試料の発現デー

Stem cells:

Neurosphere Culture

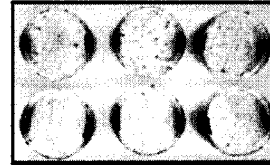
Embryonic stem cells
neuron, hemopoietic system, vascular
system, cartilage-osteocyte system

Hemopoietic stem
a variety of hemopoietic lineages

Neuronal stem cells,
neuron, retinal stem cells, glia, and other
tissue lineages

Tissue cells:

Primary hepatic cells
Primary renal cells
Variety of cell lines



metabolism
cell cycle modulators
proliferators and a variety of inhibitors
terminal differentiation

Figure 4: 試験管内試験で取り扱われる細胞系

幹細胞系は、自己複製能を保持したままそれらを培養することが可能になり、これらの細胞の分化能に基づく遺伝子発現を観察する材料として利用され得る。

初期培養細胞系や樹立培養細胞系では、ヒト細胞なども充分駆使できる体制が整い、各々の細胞系の機能に即した遺伝子発現を観察する材料として利用され得る。

タにバラツキを生ずる要因は、単に数的にステップが多
いだけではなく、チップの均質性を含め、多次元に及ぶ
ことを指摘しておかなければならない。さまざまな角度
から発現データの標準化の取り組みがなされている。

その方法としては、①トキシコジノミクスの標準化を
必要とする研究・技術者のコンソーシアム形成がなにより
も重要となる。ついで諸問題があがるが、②標準試料
を用いた試料採取条件の均一化、③同様条件下での
RNA操作の均一化はもっとも基本的な課題となる。一
般に多くの試みではリファレンス遺伝子群を設定して、
逆転写、色素標識、ハイブリダイゼーションなどの各ス
テップの効率をモニターしているようであるが、組織の
採取やRNAの質がネックになっては意味がないので、
これらは総合的に至適条件にむけての検討を求められる
ことになる。④かくして、②や③をサポートする条件を、
ソフトとハードの両面から確立する作業をすすめ、相互

にフィードバックを重ねつつ、最終的には自動化、即ち
ロボテックシステムへと創り上げてゆく作業が必要である。

さらに、⑤これらの原則的な作業の側からの標準化の
他に、データの互換性をサポートするためのリファレン
スとなる塩基配列を導入して、最終的に得られるデータ
の補正を行う試みは、格段に重要な意味をもつ。スパイク
^{iv}情報と呼ばれるデータの標準化補正配列などを導
入しつつ、解析的方法と演繹的方法の双方からデータを
収集する試みは、当研究所におけるトキシコジノミクス
のプロジェクト^vでも主要な課題のひとつとして取り
組まれている。

尚、米国医薬品庁 (FDA: Food and Drug Agency) の
外郭団体の国際生命科学研究機構 (ILSI: International
Life Sciences Institute) ^{vi}でも、異なる実験間で得ら
れるアレイデータの比較のためのプロトコル探求に向け

^{iv} スパイク：外部標準として加える細菌などに由来する遺伝子配列。

^v 国立衛研プロジェクト：平成14年度の厚生労働科学研究において実施されることとなった「萌芽的先端医療技術推進（トキシコゲノミクス分野）研究事業」。当研究所と民間企業との共同研究により、「トキシコゲノミクス手法を用いた医薬品安全性予測システムの構築」を行う計画となっている。このプロジェクトでは、トキシコゲノミクスを、集中的かつ大規模に、網羅的遺伝子発現プロファイリングを基にしたインフォマティクス技術を利用して、創薬過程における安全性の予測システムを作成するものとしており、平成14年度から平成18年度までの5カ年計画で約150化学物質を対象に、ラットなどの小型実験動物および培養細胞を用いた曝露実験を行い、肝・腎を主標的として、発現プロファイルを可能な限り多数の遺伝子について採取し、データベースの構築を行うこととしている。産官学の提携によって実施する。http://www.nihs.go.jp/toxico/toxico.html 参照。

^{vi} http://www.ilsilife.org/参照

た取り組みが進行している。

4. トキシコロジーにおけるパラダイムシフト

1) 生理から毒性への生体反応の連続性

トキシコロジーの領域について概観した際にも触れたとおり、生体の生理的变化と毒性徴候の境界は、通常の毒性試験で見たものが、分子の動きで見た場合には、相互に連続体であるものと考えられる。こうした認識は、従来生体反応を見るときに、全く存在しなかったわけではないが、トキシコジノミクスが動き出したことにより、少しずつ明らかになってきた。この認識のパラダイムシフトは、生理的変動と、トキシコロジー領域での変化の、截然とした切り分けをむしろ困難にする面があるが、同時に研究のゴールとして個々の毒性の本質的なメカニズムとリンクした、要となる遺伝子、即ち新しい毒性分子マーカーの同定へとつながる事が期待されている。

2) ホメオステシスの背景の可視化

トキシコロジーにおける低用量問題は、長年のエンigma (enigma) である。分子生物学的認識の進展とともに、たとえばDNA障害を伴った発がん物質の低用量域での閾値現象が、p53欠失動物では、無閾値性に観察され、通常動物でのそれは、修復に関与することが明らかになりつつある。このような通常観察されない、静止変化や閾値現象は、トキシコジノミクスによって、“見えてくる”，即ち、可視化される。

この点については、リバース・トキシコロジーの項でも触れたが、実際にはホメオステシスの裏に隠れた二つの平衡関係といった、単純な関係ではなく、三つ巴から網の目の制御関係を呈していることが少なくないであろうから、これが更にリスク評価の基礎となってゆくとすれば、これも大きなパラダイムシフトといわなければならない。

3) インフォマティクスによる多元次元認識

内分質かく乱性化学物質と想定される諸物質を投与後6時間の子宮における遺伝子発現の変動を見たcDNA マイクロアレイの結果によれば、エストラジオールにより発現の誘導される遺伝子のごく一部をビスフェノールA (BPA) とノニルフェノールが共有し、その他の物質によって誘導される遺伝子についても多様であった⁵¹⁾。また、エチニルエストラジオール、BPA、ゲニスタインの母体投与後の胎児の子宮や卵巣での遺伝子発現解析でも、3物質に共通する遺伝子群は存在するが、同時に全く共通性を持たない遺伝子発現も観察されている⁵²⁾。これらの結果は、内分泌攪乱化学物質として、エストロゲン受容体に対する反応性で見ると単一の切り口からみたエンドポイントでこれらの物質の生体影響を特徴づける

ことが困難であり、将来のトキシコロジーがこれらの発現遺伝子群の集まり (clusterと呼んでいる) のインフォマティクスによって共通性のものと非共通性の多くの遺伝子群の特徴を多元次的に把握して、理解することを求められていることを意味する。もとより、こうした認識論がなかった訳ではないが、明確な認識方法に遭遇したという点で、これもトキシコロジーの新しいパラダイムの展開と考えられている。

4) アナログ認識からデジタル認識へ

最後は、データのアナログ認識とデジタル認識の問題である。薬理学では、薬効学的用量相関を越えたところでトキシコロジー・レベルの遺伝子発現が顕れるものと考え、これを把握しようという戦略がある。事実、マイクロアレイの世界では、しばしば単純に増加する関数の任意のA点とB点でもそれぞれに発現する遺伝子群のレパトワには違いがあり、発現の強さにのみ差があると考えはしない。しかし従来の技術で見たときの用量相関は連続性と認識されることが少なくないので、両者の認識のギャップの分子背景がさらに明らかにされる必要がある。蓋し、発達成長などの生物変化は、概して単純片対数増殖を示すことが少なくないので、そこからの認識に支配されているものと思われるが、薬物投与の際の遺伝子変化は、そうしたアナログ的な遺伝子発現よりも諸用量に対して様々に異なったグループの遺伝子のデジタルな変化として観察されるものと想定される。放射線でも照射量に応じて発現する遺伝子のレパトアに相違が見られるとの報告がある⁵³⁾。

おわりに

Toxicogenomics International Forum 2001と称する国際フォーラムが昨秋東京で開催された。このフォーラムは、網羅的な遺伝子発現手法を用いた様々の応用について、各国の研究の現状を相互交流し、今後の発展方向を探ることを目的としたものであった。このフォーラムでの発表内容を中心にしてSpringer Verlagからその名もToxicogenomicsと銘打っての出版が既に決まっている。

本所においては、脚注vにも触れたとおり、創薬のためのトキシコジノミクスの大きなプロジェクトがスタートしつつある。NCTの設立趣旨を述べた米国のクリントン前大統領の教書によれば、トキシコジノミクスによる化学物質からのリスクの回避は、国家の責務であるとしている。当研究所のこの課題に対する使命はますます大きくなっていくものと考えられる。

以上、トキシコジノミクスの登場によって新しい変革を求められる毒性学を、筆者の一人が担当する機器試験の展望の面から考察した。トキシコジノミクスによって与えられるであろう個々の試験結果は、これまでの膨大

な動物による、時に解釈の困難な大量の数値から、明らかに毒性学的な意味をもった機能的表現型となるものと思われる。そのことが、危害同定 (Hazard Identification) をたやすくしてくれるものとの期待は大きいですが、果たしてリスクアセスメントとの関係ではどのような展望となるのか、今少し実績を重ねながら、見つめてゆきたい。校正時注：上記の“Toxicogenomics”は10月末日現在、既に出版されている。(ISBN 4-431-70344-6 Springer-Verlag Tokyo)

REFERENCES

- 1) Tennant, R. W.: The National Center for Toxicogenomics: using new technologies to inform mechanistic toxicology. *Environ Health Perspect*, **110**: A8-10. (2002)
- 2) "Toxicology for the Next Millennium." Proceedings of a conference. September 20-23, 1999, Warrenton, Virginia, USA. eds. by, Isfort, R.J. and Lederberg, J., *Annals of the New York Acad Sci*, **919**, New York, pp. 1-324. (2000)
- 3) Brown, P. O. and Botstein, D.: Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet*, **21**: 33-7. (1999)
- 4) Debouck, C. and Goodfellow, P. N.: DNA microarrays in drug discovery and development. *Nat Genet*, **21**: 48-50. (1999)
- 5) Lovett, R. A.: Toxicogenomics. Toxicologists brace for genomics revolution. *Science*, **289**: 536-7. (2000)
- 6) Hamadeh, H. K., Bushel, P., Paules, R. and Afshari, C. A.: Discovery in toxicology: mediation by gene expression array technology. *J Biochem Mol Toxicol*, **15**: 231-42. (2001)
- 7) Storck, T., von Brevern, M. C., Behrens, C. K., Scheel, J. and Bach, A.: Transcriptomics in predictive toxicology. *Curr Opin Drug Discov Devel*, **5**: 90-7. (2002)
- 8) Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. and Brown, P. O.: Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, **270**: 467-70. (1995)
- 9) Schena, M., Shalon, D., Heller, R., Chai, A., Brown, P. O. and Davis, R. W.: Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**: 10614-9. (1996)
- 10) Fodor, S. P., Rava, R. P., Huang, X. C., Pease, A. C., Holmes, C. P. and Adams, C. L.: Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature*, **364**: 555-6. (1993)
- 11) Adam, G. I.: The development of pharmacogenomic models to predict drug response. *Curr Opin Drug Discov Devel*, **4**: 296-300. (2001)
- 12) Lloyd, A.: Pharmacogenomics: Qualitative gene profiling using differential analysis of transcripts with alternative splicing. *Drug Discov Today*, **5**: 429-430. (2000)
- 13) McCarthy, J. J. and Hilfiker, R.: The use of single-nucleotide polymorphism maps in pharmacogenomics. *Nat Biotechnol*, **18**: 505-8. (2000)
- 14) Liefers, G. J., Tollenaar, R. A., Nakamura, Y. and van de Velde, C. J.: Genetic cancer syndromes and large-scale gene expression analysis: applications in surgical oncology. *Eur J Surg Oncol*, **27**: 343-8. (2001)
- 15) Gabrielson, E., Berg, K. and Anbazhagan, R.: Functional genomics, gene arrays, and the future of pathology. *Mod Pathol*, **14**: 1294-9. (2001)
- 16) Kallioniemi, O. P., Wagner, U., Kononen, J. and Sauter, G.: Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet*, **10**: 657-62. (2001)
- 17) Aardema, M. J. and MacGregor, J. T.: Toxicology and genetic toxicology in the new era of "toxicogenomics": impact of "-omics" technologies. *Mutat Res*, **499**: 13-25. (2002)
- 18) Gollapudi, B. B. and Krishna, G.: Practical aspects of mutagenicity testing strategy: an industrial perspective. *Mutat Res*, **455**: 21-8. (2000)
- 19) Herrmann, J. L., Rastelli, L., Burgess, C. E., Fernandez, E. E., Rothberg, B. E., Rothberg, J. M. and Shimkets, R. A.: Implications of oncogenomics for cancer research and clinical oncology. *Cancer J*, **7**: 40-51. (2001)
- 20) Nakamura, Y.: Isolation of disease-associated genes through genome analysis and their clinical application. *Keio J Med*, **50**: 134-40. (2001)
- 21) Torhorst, J., Bucher, C., Kononen, J., Haas, P., Zuber, M., Kochli, O. R., Mross, F., Dieterich, H., Moch, H., Mihatsch, M., Kallioniemi, O. P. and Sauter, G.: Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol*, **159**: 2249-56. (2001)
- 22) Reynolds, L. J. and Richards, R. J.: Can toxicogenomics provide information on the bioreactivity of diesel exhaust particles? *Toxicology*, **165**: 145-52. (2001)
- 23) "Information Resources in Toxicology," 3rd ed., eds. by, Wexler, P., Hakkinen, P.J., Kennedy, G., Stoss, F.W., Academic Press, San Diego, pp.921 (1999)
- 24) Inoue, M., Sakaguchi, N., Isuzugawa, K., Tani, H. and Ogiwara, Y.: Role of reactive oxygen species in gallic acid-induced apoptosis. *Biol Pharm Bull*, **23**: 1153-7. (2000)
- 25) Hetts, S. W.: To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *Jama*, **279**: 300-7.

- (1998)
- 26) Smith, L. L.: Key challenges for toxicologists in the 21st century. *Trends Pharmacol Sci*, **22**: 281-5. (2001)
- 27) Fielden, M. R. and Zacharewski, T. R.: Challenges and limitations of gene expression profiling in mechanistic and predictive toxicology. *Toxicol Sci*, **60**: 6-10. (2001)
- 28) Pennie, W. D., Woodyatt, N. J., Aldridge, T. C. and Orphanides, G.: Application of genomics to the definition of the molecular basis for toxicity. *Toxicol Lett*, **120**: 353-8. (2001)
- 29) Nuwaysir, E. F., Bittner, M., Trent, J., Barrett, J. C. and Afshari, C. A.: Microarrays and toxicology: the advent of toxicogenomics. *Mol Carcinog*, **24**: 153-9. (1999)
- 30) Hamadeh, H. K., Bushel, P. R., Jayadev, S., Martin, K., DiSorbo, O., Sieber, S., Bennett, L., Tennant, R., Stoll, R., Barrett, J. C., Blanchard, K., Paules, R. S. and Afshari, C. A.: Gene expression analysis reveals chemical-specific profiles. *Toxicol Sci*, **67**: 219-31. (2002)
- Hamadeh, H. K., Bushel, P. R., Jayadev, S., DiSorbo, O., Bennett, L., Li, L., Tennant, R., Stoll, R., Barrett, J. C., Paules, R. S., Blanchard, K. and Afshari, C. A.: Prediction of compound signature using high density gene expression profiling. *Toxicol Sci*, **67**: 232-40. (2002)
- 31) Olden, K., Guthrie, J. and Newton, S.: A bold new direction for environmental health research. *Am J Public Health*, **91**: 1964-7. (2001)
- 32) Schwartzberg, P. L., Goff, S. P. and Robertson, E. J.: Germ-line transmission of a c-abl mutation produced by targeted gene disruption in ES cells. *Science*, **246**: 799-803. (1989)
- 33) Capecchi, M. R.: Altering the genome by homologous recombination. *Science*, **244**: 1288-92. (1989)
- 34) Stanton, B. R., Reid, S. W. and Parada, L. F.: Germ line transmission of an inactive N-myc allele generated by homologous recombination in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, **10**: 6755-8. (1990)
- 35) te Riele, H., Maandag, E. R., Clarke, A., Hooper, M. and Berns, A.: Consecutive inactivation of both alleles of the pim-1 proto-oncogene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature*, **348**: 649-51. (1990)
- 36) Yagi, T., Ikawa, Y., Yoshida, K., Shigetani, Y., Takeda, N., Mabuchi, I., Yamamoto, T. and Aizawa, S.: Homologous recombination at c-fyn locus of mouse embryonic stem cells with use of diphtheria toxin A-fragment gene in negative selection. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**: 9918-22. (1990)
- 37) Zijlstra, M., Li, E., Sajjadi, F., Subramani, S. and Jaenisch, R.: Germ-line transmission of a disrupted beta-2-microglobulin gene produced by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature*, **342**: 435-8. (1989)
- 38) Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Court, D. L.: Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics. *Nat Rev Genet*, **2**: 769-79. (2001)
- 39) Saga, Y., Hata, N., Kobayashi, S., Magnuson, T., Seldin, M. F. and Taketo, M. M.: MesP1: a novel basic helix-loop-helix protein expressed in the nascent mesodermal cells during mouse gastrulation. *Development*, **122**: 2769-78. (1996)
- 40) Yoon, B. I., Hirabayashi, Y., Kawasaki, Y., Kodama, Y., Kaneko, T., Kim, D. Y. and Inoue, T.: Mechanism of action of benzene toxicity: cell cycle suppression in hemopoietic progenitor cells (CFU-GM). *Exp Hematol*, **29**: 278-85. (2001)
- 41) Snyder, C. A., Goldstein, B. D., Sellakumar, A. R., Bromberg, I., Laskin, S. and Albert, R. E.: The inhalation toxicology of benzene: incidence of hematopoietic neoplasms and hematotoxicity in ARK/J and C57BL/6J mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, **54**: 323-31. (1980)
- 42) Cronkite, E. P., Bullis, J., Inoue, T. and Drew, R. T.: Benzene inhalation produces leukemia in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, **75**: 358-61. (1984)
- 43) Le Noir, and Claude: Sur un cas de purpura attribué a l'intoxication par la benzine, *Séance du*, **29**, 1251-60. (1887)
- 44) Kawasaki, Y., Hirabayashi, Y., Yoon, B.I., Huo, Y., Kaneko, T., Kyrokawa, Y., Inoue, T.: Benzene inhalation induced an early onset and a high incidence of leukemias in the p53 deficient C57BL/6 mice. *Japanese Journal of Cancer Research*, **92** suppl.: 71. (2001)
- 45) Yoon, B.I., Hirabayashi, Y., Kawasaki, Y., Kodama, Y., Igarashi, K., Kanno, J., Kaneko, T., Inoue, T.: cDNA microarray in mouse bone marrow cells: Profiles reflecting the epigenetic responses to benzene. *Meeting abstract of the 23rd Annual meeting of the Molecular Biology Society of Japan*, **669**. (2000)
- 46) Berger, M., Fagioli, F., Piacibello, W., Sanavio, F., Mareschi, K., Biasin, E., Bruno, S., Gammaitoni, L., Gunetti, M., Nesi, F., Madon, E. and Aglietta, M.: Role of different medium and growth factors on placental blood stem cell expansion: an in vitro and in vivo study. *Bone Marrow Transplant*, **29**: 443-8. (2002)
- 47) Batard, P., Monier, M. N., Fortunel, N., Ducos, K., Sansilvestri-Morel, P., Phan, T., Hatzfeld, A. and Hatzfeld, J. A.: TGF-(beta)1 maintains hematopoietic immaturity by a reversible negative control of cell cycle

- and induces CD34 antigen up-modulation. *J Cell Sci*, **113**: 383-90. (2000)
- 48) Pincus, D. W., Keyoung, H. M., Harrison-Restelli, C., Goodman, R. R., Fraser, R. A., Edgar, M., Sakakibara, S., Okano, H., Nedergaard, M. and Goldman, S. A.: Fibroblast growth factor-2/brain-derived neurotrophic factor-associated maturation of new neurons generated from adult human subependymal cells. *Ann Neurol*, **43**: 576-85. (1998)
- 49) 胚幹細胞 (ES細胞) に対するダイオキシンの影響—マイクロアレイによる解析 (高木篤也:平成13年度厚生科研費金子班報告)
- 50) 高木篤也:胚幹細胞を用いた検討, In:内分泌攪乱化学物質の生物試験研究法, 監修:井上 達, シュプリンガーフェアラーク東京, pp143-149. (2000)
- 51) マウス生殖腺の分化及び精子, 卵形性への内分泌攪乱化学物質の影響及び低用量影響に関する研究 (井口泰泉:平成13年度厚生科研費井上班報告)
- 52) Naciff, J. M., Jump, M. L., Torontali, S. M., Garr, G. J., Tiesman, J. P., Overmann, G. J. and Daston, G. P.: Gene expression profile induced by 17alpha-ethynyl estradiol, bisphenol a, and genistein in the developing female reproductive system of the rat. *Toxicol Sci*, **68**: 184-99. (2002)
- 53) Schreyer, S. K., Karkanitsa, L. V., Albanese, J., Ostapenko, V. A., Shevchuk, V. Y., and Dainiak, N.: Analysis of radiation-associated changes in gene expression using microarray technology. In: Proceedings of the Advanced Research Workshop on Protracted Intermittent or Chronic Irradiation: Biological Effect and Mechanisms of Tolerance, 14-17 May 2002, Schloss Reisenburg, Germany (in press).