

毒性学イノベーション：生体反応機構に則った共通基本概念としての「シグナル毒性」

菅野純

Biomechanism-based innovation of toxicology by the fundamental concept of “Signal Toxicity”

Jun Kanno

When Rachel Carson wrote the “Silent Spring” in 1962, the toxicology society was influenced in an indirect way mainly on environmental effects of massive use of pesticides. However, at that time, for those who were studying DDT and other pesticides, the biological effect of such chemicals were understood as a result of their long-lasting toxicants with slow elimination rates from the body; bio-persistence and in some case bio- and environmentally accumulative. And the chronic effects became overt including complex endpoints not only liver toxicity but, reproductive, immune, and neuronal.

The impact of Silent Spring on toxicology seems to have established the foundations for scientifically accepting the problems widely raised by the Theo Colborn's “Our stolen future”, although its main target was reproductive mechanisms including oestrogen and androgen system.

For basic receptor biologists, non-monotonic dose-response curve was a matter of course, but for toxicologists at that time, all dose-response curves should be monotonic. With further detailed discussion many toxicologists started to understand that there is a good plausibility that such non-monotonic and low dose effect can happen in wild life and may be in humans under certain conditions. Since then, many toxicologists including us have initiated research on the so-called endocrine disrupting chemicals under new paradigm of receptor mediated- or signal-toxicity.

To handle this problem, it became clearer that toxicology has to be innovated towards more biologically mechanistic science. This thinking has linked to the trend of toxicogenomics, where classical pathological findings are used to confirm the results of comprehensive mechanistic analysis data. In contrast, our idea of toxicogenomics, designated as Percellome Toxicogenomics Project, was to develop comprehensive and quantitative gene expression networks out of transcriptomic data alone. Existing biological knowledge is used to help understand the biological or toxicological meaning of the generated networks.

As a whole, the author would like to outline the strategies to cope with the new paradigms and to combine them to construct a more robust toxicological research system under the concept of “signal toxicity”. We believe that this activity should contribute to the development of more comprehensive, faster, cheaper (including less animal to use), and reliable system for the identification, and prediction of toxicity for any kind of agents entering our body and environment.

Keywords: Signal Toxicity, Percellome Toxicogenomics, Receptor, Quantitative, Non-monotonous dose response

To whom correspondence should be addressed;
Jun Kanno; Division of Toxicology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel:+81-3-3700-1141 ext.401; Fax:+81-3-3700-9647; Email: kanno@nihs.go.jp

●アブストラクト

1962年にレーチェル・カーソンが「沈黙の春」を執筆したとき、毒性学界は、殺虫剤の大量使用による環境影響、という観点から間接的に影響を受けるに留まった。しかし、DDTなどの農薬の生体影響を研究していた毒性研究者らには、それらの生物影響は、それらが体内に長期間残留し、消失速度が遅く、時に難分解性のために

体内に蓄積することが一因となっていることと理解された。そして、慢性影響は、単なる肝毒性ではなく、生殖毒性、免疫毒性、神経毒性などの複雑な毒性症状であることが明らかとなっていた。

この様な「沈黙の春」が毒性学界にもたらしたインパクトは、次のテオ・コルボーンらの「失われし未来」で、エストロゲン系とアンドロゲン系を含む生殖影響が中心であったが、取り上げられた問題を、更に広く科学的に受け止める素地となったと考えられる。

基礎生物学者にとって、非単調性の用量作用関係を目撃することが日常茶飯事であったが、当時の毒性学者にとっては、用量作用関係は単調関数でなければならなかった。詳細な論議が交わされた結果、多くの毒性学者は、ある条件下では、野生生物やおそらく人においても、非単調性の用量作用関係が低用量域で認められる蓋然性があるとの認識を示すようになった。それ以来、我々を含め多くの毒性研究者が内分泌かく乱化学物質問題を新しいパラダイムである受容体原生毒性、あるいは、シグナル毒性の問題として取り扱い始めた。

この問題を取り扱うに際して、明らかになったことは、より生体反応機序に基づいた科学として毒性学のイノベーションを行う必要があるという点である。このような考えは、世界的なトキシコゲノミクスの採用につながった。多くの場合、古典的な病理所見をトキシコゲノミクスのデータの検証に用いる方法がとられた。これに対し、我々は、Percellome Projectと称し遺伝子発現ネットワークを遺伝子発現データのみから網羅的、定量的に描出する方法を取った。そして、その後既存情報を用いて個々のネットワークの生物学的及び毒性学的意味づけを行う事とした。

ここでは、毒性学的に新規な種々のパラダイムに対応する種々の戦略とともに、それらを「シグナル毒性」の概念の下に包括的に統合してより堅固な毒性研究システムを構築する戦略を概説する。我々の身体及び、環境に入り込むありとあらゆる物質の毒性の同定と予測を、これらの戦略が、より包括的、迅速かつ安価（使用動物数削減を含む）、信頼性の高いものとする考える。

●毒性学の範囲

広義の医学には二つの面がある。不幸にして発病してしまった患者の救済のための「個別治療」と、健康なヒトの集団からの発病数・発病率を上げない、あるいは下げるための「集団治療」である。後者を「集団治療」と呼ぶのは一般的でも論理的でもないが、疫学+公衆衛生学+労働衛生学+予防医学+…の複合分野の総体を表す言葉が他には俄かに思いつかなかったので、お許しいただきたい。

毒性学はこれら「個別」と「集団」の治療の全てに深くかかわる複合領域であることは確かであり、近年の分子生物学の進歩が*in vivo*に於けるGenomics研究を飛躍的に促進したことにより、益々、毒性学の関与が深化してきたと実感される。

これらの基盤となる毒性評価（有害性評価）には、多くの場合、人の身代わりとして実験動物が用いられ、その毒性所見を人に外挿することが行われる。これは、実験動物も人も基本的に同等の生体反応を示すという前提に基づいてきた。現在の毒性学は、先端的分子生物学的手法を取り入れ、生体反応メカニズムに踏み込むことにより、種差や個体差（SNPsなどを勘案した）の問題に対しても科学的な検討が進もうとしている。また、遺伝子改変動物やトキシコゲノミクスなどの新技術の導入により、評価の高精度化と迅速化が進んでいる。

●毒性学とは

「毒」という漢字は、英語のPoisonの訳語としてもToxinの訳語としても用いられ、その為、一般の日本人には毒性学が「恐ろしい学問」として捕らえられるようである。Poison（ポイズン：毒物）は、意図的に「毒」として人が使うものごとを表し、動詞として用いるときの意味は、「～に毒を盛る、食中毒にかからせる、～を毒殺する、汚染する」などであり、poison a person with strychnine などと使う。これに対して、Toxin（トキシン）は毒素と訳されるが、身を守るために動植物が作って持っているもの、この場合は、自分自身には毒ではない、を指すことが多い。例えば、テトロドトキシン（フグ毒）がそれに当たる。それが転じて、人が利用するために作り出した物質が意図しない悪さをする場合に、その作用を表すようになったと考えられる。「この薬には、腎臓に対するToxicityがあることがわかった」、という具合である。形容詞がToxic、その名詞形がToxicity（毒性）、そしてその学問がToxicology（毒性学）となる。

古来より、毒物（ポイズン）、及びその原料となる毒素（トキシン）は、薄めて使用した際の薬効や、解毒の研究から、薬（くすり）の元として研究の対象となってきた。薬学の毒物学、或いは副作用学として毒性学では、15世紀の錬金術師かつ医師であったParacelsus（パラケルスス）の有名な言葉が毒性学の基礎としてしばしば引用される。通常引用される英語訳は、“All things are poison and not without poison； only the dose makes a thing not a poison”これは、「すべてのものは毒であり、毒でないものは無い。量だけがものを毒でなくする。」、あるいは、「有害でない物質はなく、用量によって毒であるか薬であるかが決まる。」と日本語訳されたり解釈

されたりしている。これは、非常に良い言葉であり、毒性学の本質を突いている。しかし、実際の起源は、水銀の様な毒物でも薄めて使うと薬になる（癲癇に効いたという話らしい）という「ホルミシス」現象を指していた様である。注意すべきことは、ここでの「毒作用」と「薬作用」の間の用量作用関係や、「薬」用量とゼロの間の用量域は考慮されていないことである（図1）。

この流れを汲んで、現代の薬学も、薬効が期待される薬用量での作用が考察の対象であり、副作用としての毒性は、無意識のうちに薬効量より高い用量を想定して語られることが多い。そして「用量ゼロ」は「服用しない」ことであり、その用量ゼロのところと薬用量との間の半端な投与量の領域は考慮外である。これが、薬学（薬効）の毒性学の特徴であるが、我々は、薬だけに暴露されているわけではない。より一般化された毒性学には、この「パラケルスス」の毒の概念だけでは少し足りないのである。

広義の毒性学は、生体とあらゆる外来性物質 (xenobiotics) との相互作用を研究する分野であり、主目的は「人（ヒト）の安全」であり、少なくとも以下の、相互に絡み合った要因を考慮する必要がある。

- ① 用量作用関係：少なくとも幾つかのパターンが想定される。特に、遺伝子に不可逆的な「傷」を入れる発がん物質の場合のように、閾値が想定できない場合（あるいは設定しないことが合理的な場合）がある。その場合、高用量を暴露されればその人が被害者となるが、低用量の場合、個々の被害者の顔が見えない（1万人中、何人かが発症する確率的な事象）。対象は多数のヒト、例えば国民、消費者、労働者。例えば、アフラトキシンを1ng/kg体重/日毎日摂取すると肝臓癌で死ぬ人の数が100万人につき0.1～3人増える。全国で10人～300人。この人たちの顔は見えないし、「私、汚染されたお米を食べ

ちゃったんですけど、肝臓癌になるのでしょうか?」と聞かれても答えに窮するタイプの毒性である。

- ② 閾値の設定（閾値の有無）の問題：受容体を介したシグナルが毒性の主要因である場合、DNAにアダクトを形成するなどして直接的に「傷」を残す場合（DNA修復機構も完全ではなくある確率で見逃しがあると考え）など、原理的に閾値が無いことが想定される場合のほか、一端身体に入ったら出て行かないアスベストの様に影響が不可逆的に蓄積すると考えられる場合は、閾値を設定しない方が合理的である。
- ③ 不可逆的か可逆的かの問題：DNA障害のほか、エピジェネティックに不可逆的な影響が残る場合が想定される。また、発生、発達期の個体では、暴露された瞬間の影響自体が可逆的であっても、成長中の体の構築に影響が残ることで結果として不可逆となる場合がある。特に、発達中の中枢神経系では一時的な神経活動のかく乱が、形成途上の神経回路の微細構造に不可逆的な乱れを残すことが示されている。
- ④ 毒性発現の時間軸：「急性毒性」、「慢性毒性」、「遅発性毒性」等として表現される。急性毒性は「単回暴露」の影響を指すことが、慢性毒性は「反復暴露」の影響を指すことが多い。遅発影響は、単回または短い期間の反復暴露の後、潜伏期を置いて影響が現れることを指し、毒性学の分野での深刻な問題として「周産期、新生児期、あるいは小児期暴露による成熟後の有害影響」がある。
- ⑤ ADME：体に入る物質の立場からは、ADME（吸収Absorption, 分配Distribution, 代謝Metabolism, 排泄Excretion）が考察される。SNPsが大きく影響すると考えられ、その研究が進んでいるのが代謝、特にP450などの代謝酵素についてである。ADME

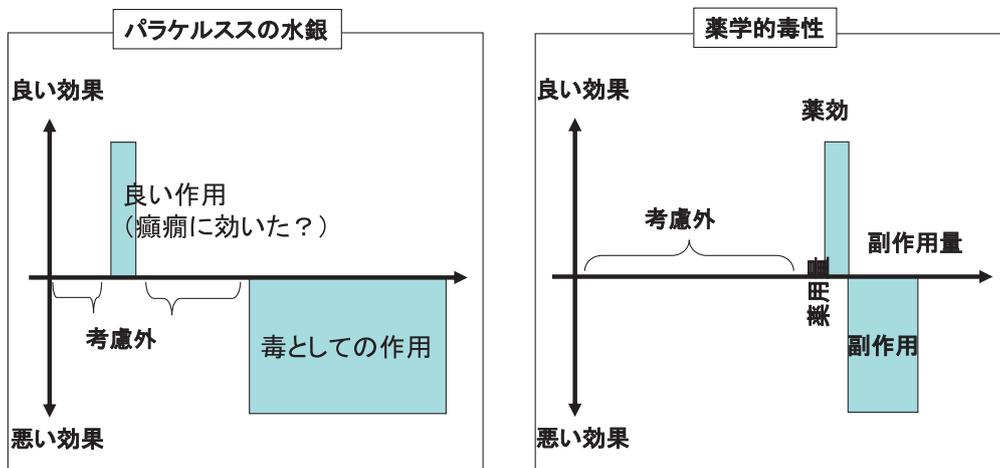


図 1

が胎児・新生児・小児と大人で異なることが知られている。グレープフルーツの問題もこのレベルで語られる。

- ⑥ 複合影響：重要であるが毒性学で最も立ち遅れている研究分野の一つ。薬剤は複合処方が常識であるが、それに加えて、患者の食事、腸内細菌産生物、疾病そのものによる体の異常状態、などとの相互作用は、おそらく、事故や事象が明らかになってから後追いで解析している状況であろう。
- ⑦ ホルミシス現象と、何通りかの閾値：もともとの謂れは、「ホルミシスとは、ある物質が高濃度あるいは大量に用いられた場合には有害であるのに、低濃度あるいは微量に用いられれば逆に有益な作用をもたらす現象」であるとされる。放射線ホルミシスは「高線量は有害だが、低線量は健康によい」という話になる。よく、ホルミシス現象として報告される実験のパターンとして、発癌物質Aで肝臓に低頻度ながら肝腫瘍を誘発しておいて、物質Bを与えると、低用量では発がん率が下がり、途中の用量で発がん率がAのみの時と同じになり、その量を超えると発がん率が上昇を始める、というものがある。一旦、発癌率が下がった用量域において、ホルミシス現象が認められたと判定する。興味深いのは、同じ実験で、発がん率の減少は無視し、増加のみをもって物質Bの発癌促進影響を定義すると、Bは途中の用量から影響を発揮しだしたとの判定になり、Bの発癌促進作用には「閾値」があるとの判定がなされる。ところが、「閾値」には、別の定義も可能である。用量をゼロから増加させた場合、その物質の影響が観察されない用量の最大値を閾値とする、即ち、上

記で「発がん率の減少」を無視しない立場である。この場合、Bには閾値が無いことになる。この、チグハグは、シグナル毒性の立場から「複合影響」の範疇において論議することで解決される。ある特定の原因により誘発されている背景病態がある場合、それと同じ原因が追加されると、その原因の用量作用関係に基づいて病態は悪化する。ところが、背景病態に、別の要因が加わった場合、病態は、悪化する場合、変化しない場合、及び軽快する場合の3つの可能性がある。実際、放射線の場合、ラットに400日間外部照射したのち、全例が死亡するまで生涯観察(1,400日間)した低線量外部照射実験では、寿命短縮や発がん率には、ホルミシス現象は認められない、との結論が出ている(Tanaka et al, Radiation Res. 160:376-379, 2003)。これは、背景病変に対して処置が加算的であること、即ち、背景の放射線等の影響に対して外部照射の影響のメカニズムが同等であることを示唆する。異種の化学物質同士や、化学物質と放射線との組み合わせの場合には、両者間の毒性発現メカニズムが異なる事が多く、モニターする毒性影響(例えば腫瘍発生率)とそのモニター時期を適切に選択すると、容易に「ホルミシス現象」を示す実験を組むことが出来る。異時的に暴露すると更に容易になる。この実態は、シグナル毒性の観点から網羅的にA及びBの影響を解明するに越したことはないが、この場合、実験プロトコルを精査すれば通常は明瞭に予測あるいは解釈がつくことが多い。ここでの結論は「無条件でのホルミシス」は存在しないということである。算数の因数分解の話ではないが、「殴ってさする」たぐいの現象なので

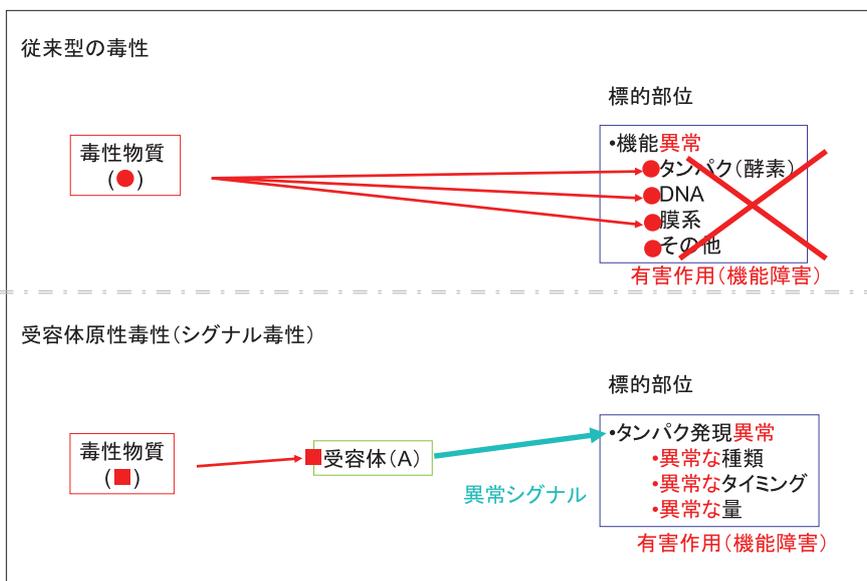


図 2

ある。「殴る」に相当する要因は、実験者自らが用意する場合は明瞭であるが、それが「天然」由来のものを使用する実験では一見「無条件」にホルミシス現象が得られるように錯覚されるので、注意が必要である。そういう意味では、このParacerasusの有名な言葉には落とし穴があるのである（図1）。

●シグナル毒性（受容体原生毒性）

古典的な毒性の場合、毒性物質は、細胞やその中の蛋白質やDNAなどに直接作用し機能障害を起こす。一方、シグナル毒性の場合は、毒性物質は細胞にある受容体に結合してシグナルを伝えるだけで十分に作用が現れる（図2）。受容体と結合して誤ったシグナルを出すことによって障害を起こすが、受容体の無い細胞には何の悪さもしない。

また、内分泌系だけではなく、神経系、免疫系も同じ仕組みであり、これらの系に対するシグナル毒性もある。受容体に結合して反応を引き起こす物質と受容体については、よく「鍵と鍵穴」のような関係と説明され、内分泌系のものなどは多少ルーズに作られているので、ドンピシャの「鍵」となる物質でなくても、構造が似たような物質が鍵穴に作用することもある。受容体に本来の「鍵」となる物質ではなく別の物質がくっついて、間違っただ種類のタンパクを、間違っただタイミングで、間違っただ量を作るという間違っただ指令（シグナル）を出してしまうために有害な作用が生じるのがシグナル毒性の基本である。またシグナル伝達は、通常小さな刺激でより大きな影響として働く増幅系なので、ごく微量のばく露で影響がでて、閾値が設定しにくい。またシグナルのかく乱であるために、遺伝子の損傷などの影響は起こさない。遺伝子の発現を調整する仕組みであるエピジェネティックな仕組みの変化を介して、長く影響を残すと言うことになる。

異常なシグナルが身体に及んだ時期によって個体が受ける影響は違う。特に胎生期～新生児期は、各種のシグナルを体内でやり取りして身体を完成させていくので、そういう時期に異常なシグナルが外部からの化学物質等によりもたらされると、身体の構造や機能に大きな影響が及ぶことがある。シグナル毒性の極端な例として、1981年のノーベル生理学賞を受賞した視覚野の形成に関する研究がある。子猿の片目の瞼を縫い合わせてしまうと、その眼の網膜には、明暗刺激は届くものの、物の輪郭、即ち輪郭刺激が届かないために、縫い合わせた方の目の視覚野の神経領域が発達することなく、その子猿が大人になってから瞼を開いても、そちらの目は失明する。眼球に異常はなくても視覚を喪失する皮質盲であった。人間でも、2歳以下の子どもに2日以上眼帯をさせると、

眼帯をかけた目が弱視になることが知られている。治療は6歳ごろまでなら可能で、見える方の目を隠すことでバランスを取り戻し、きちんと立体視ができるようになるが、それ以降に治療を開始しても症状は修正されなくなってしまう。このノーベル賞の受賞講演の要旨の冒頭に、「この実験のデザインは、先天性の白内障の子供が、白濁したレンズを除去し適切に視力を矯正してもなお重篤かつ恒久的な視覚欠損を示すという知見に、間違いなく影響されたものである」との下りがある。大人になってからの白内障では、レンズを交換するだけで、視力が劇的に回復すが、子供の場合は、猿の実験と同じことが起こってしまっていたのである。

言語の発音、絶対音感など、俗に「頭の固くならない内」でないと身につかないことは他にもたくさん知られている。脳の中には、適切な時期に適切な刺激、即ち、シグナルが適切どころに届かないと正常に機能が完成しなくなるという部位が、今まで、我々がはっきりと認識されていない部位や機能を含めて、沢山あるということなのである。

この様な、異常なシグナルの影響は、極端な例では、組織、臓器の形態形成に直接影響するが、よりマイルドな状況では、特定の影響がしばしば確率的事象としてあらわれるようになる。例えば、胎内で経胎盤的にエストロゲン活性のある化学物質に暴露された雌マウスの性周期を生後6か月以上追跡すると、高用量群は、早期から全動物が一斉に性周期異常を示すのに対し、低用量群は、その内の何匹かが時間差を持って性周期異常を示すことが知られている。この様な状況は、丁度、低線量放射線の影響の説明と同じく、確率的事象として、性周期を制御する中枢神経系に対するエピジェネティックな機構により、引きおこされていると考えられる。

●内分泌かく乱化学物質問題

ホルモン様活性化学物質の、従来の毒性評価試験に於ける無毒性量よりも低用量域（実際の環境からの暴露濃度に近い用量域）での暴露に於いて有害性が現れる懸念が指摘され、内分泌かく乱化学物質（EDCs）問題として、毒性学分野で大きく取り上げられて来た。EDCs問題は、本質的には上記の「シグナル毒性」の問題と捕らえることが出来る。化学物質が特定の受容体に結合し、そこから発せられる異常シグナルが毒性症状を誘発する、と考えられるものである。EDCsの主たる標的は受容体であり、内在性のリガンドと類似した濃度域で作用を発揮することが問題となる。その際、恒常性維持機構が完成している成人（成獣）では、その作用は相殺される可能性が高い。これに対して、永続的・不可逆的な影響が危惧されるのが、恒常性維持機構が完成していない発達途上の胎

児・新生児・小児である。EDCs問題の理解は、「本質の対象は胎児・新生児・小児であり、その分子標的は受容体シグナル系を共有する神経・内分泌・免疫系であり、その有害影響は不可逆的な遅発影響として現れる」ということである。

話は、若干それるが、ダイオキシンはとても不思議な物質と言える。通常ダイオキシンを大量に投与すると、マウスは死んでしまい、人間の場合は体がボロボロになるが、ダイオキシン受容体を取り除いたノックアウトマウスに大量にダイオキシンを与えても、ほとんど症状が出ないという結果になる。つまり、ダイオキシンは受容体が無いと毒性を示さない、即ち、受容体以外のタンパク、酵素、膜成分、などと、ほとんど相互作用しない、というシグナル毒性の典型例ということである。

●化学物質の毒性評価—Percellome (パーセロム) 法—

数万種に及ぶと言われる身の回りの化学物質の毒性評価は、実験動物の所見を人に外挿する事によって実施され、種差や個体差は「安全係数 (不確実係数)」により、量的な安全マージンをとる事で勘案されてきた。しかし、サリドマイドに代表されるが如く、これには科学的な限界があり、人の安全性確保をより確実にするためには「毒性学の近代化」が必要である。それには従来法に加え、ブラックボックスであった毒性発現機序の分子レベルでの把握が重要であり、そのための研究手法としては網羅的に遺伝子発現変動をプロファイリングすることによるトキシコゲノミクス研究法が特に有効である。

トキシコゲノミクスを毒性評価に応用するために、一般的には従来法により得られた毒性所見にトキシコゲノミクス情報を照合して、毒性所見との対応を検討する方法が行われた。しかし、この方法では、従来法で得られた所見よりも詳細な変化がトキシコゲノミクス情報に含まれていても、それを掘り起こすことが難しいという欠点があった。そこで、我々は、トキシコゲノミクス情報の中から毒性を予見し得る変化を漏れなく抽出する方針を取った。これは、丁度、電子顕微鏡が発明されたときに、そこに映し出された、今までに見たことが無い様な映像が、何なのであるかを明らかにしてきた過程に類似している。この為には、既存の毒性情報に頼らずに、幾通りもの毒性に対応する可能性のある遺伝子発現変化のデータを集積した大規模な網羅的遺伝子発現データベースが必要となる。その構築に際して問題となったのが、多数のマイクロアレイ実験に由来するトキシコゲノミクスデータを一括参照するための基盤技術の開発であった。当時一般的にマイクロアレイで測定した「発現量」は相対比 (fold change) で示され、マイクロアレイ間比較、及び実験間比較に際しては逐一、データを相対

的に比較する計算が必要で、統一的な比較は困難な状況だったからである。

そこで我々はmRNA発現量を細胞1個あたりのコピー数として絶対量化する方法 (Percellome法, 特許第4415079号, Kanno et al., BMC Genomics. 29:7:64, 2006) を独自に開発して、全データの直接比較を可能とした。具体的には、生体材料の破碎液に、そのDNA含量 (=サンプル中の細胞数を反映) に比例した量の、枯草菌由来RNA混合液 (GSC=Grade-dosed Spike Cocktail) を添加してからtotal RNAを抽出し、そのままマイクロアレイ測定を行う (Affymetrix GeneChipには枯草菌遺伝子のプローブセットが5種、予め用意されている)。これにより、マイクロアレイ毎に全ての測定値が、GSCの測定値から生成した換算式によって、細胞1個あたりのコピー数単位に変換 (絶対量化) される。

次に問題となったのは、どの様な時点のデータを採取するか、及び投与量である。前者については、化学物質が生体に次々と変化を誘発して行く様子をmRNAの発現変化として、網羅的に追跡することとした。後者については、大量に投与すると肝に光学顕微鏡的に明瞭なアポトーシスを誘発される事があるが、その際のmRNAデータはアポトーシスのものが中心となってしまい、投与物質の特徴が抽出困難であった。そこで、投与量を「24時間以内に従来法で明らかな毒性が検知されない最大量」、即ち、狙うところを、シグナル毒性量、とした。

この約10数年間に、140種類超 (医薬品、一般化学物質、食品関連物質を含む) の化学物質の単回経口暴露によるマウス肝の初期応答データを含む、延べ5.8億遺伝子情報からなるPercellomeデータベースを得た。これは、基本的に投与後の時間、暴露用量、遺伝子発現量の3軸からなる3次元曲面データにより構成される。解析にはこの3次元曲面の特徴抽出という独創的な方法を採用し、解析ソフトウェア群 (相崎健一) は独自開発である (図3)。また、動物実験レベルからの厳重な実験管理により、高精細且つ高再現性を実現している。このシステムによりシグナル毒性が類似した物質は瞬時に検出可能となり、未知の作用の同定も迅速に行えるようになった (Kanno et al., J Toxicol Sci. 38(4): 643-54, 2013)。シックハウス症候群の指針値程度のごく低濃度域での吸入毒性トキシコゲノミクスも実施しており、ごく低濃度のホルマリンで肺の複数の遺伝子発現が明確に誘導されること、海馬に影響が及ぶこと、キシレン (2ppm) については情動認知行動に影響が現れること、などを見出している。中枢影響が疑われる物質群については、胎生期~幼若期の発達中の脳に対する神経シグナルかく乱が脳構造や神経回路の形成に影響を及ぼし、成熟後に行動異常等の脳高次機能の障害として顕在化することを、妊娠マウスへ神経伝達

物質類似物質を投与する経胎盤暴露実験や、離乳前暴露実験から見いだしており、仔マウスに成長後に誘発される遅発性中枢毒性と海馬の遺伝子発現異常の関連解析から標的ネットワークが示唆されつつある。

反復暴露時の毒性に関する実験も進めている。全動物に同量の検体を反復投与し、遺伝子発現測定直前の投与時に、溶解群、低用量群、中用量群、高用量群に分けて最終投与を一回行う、というプロトコルを開発し、「新型反復暴露」と名付けた。この新型反復暴露は、遺伝子改変マウスに対する単回投与実験からヒントを得ている。「化学物質による遺伝子改変状態 (chemically-induced transgenic state)」を反復暴露により作成し、そこに単回投与を行うという考えである。この新型反復暴露により、反復暴露が2種類の反応を遺伝子発現に及ぼすことが判明した。それは、過渡反応：暴露の都度に概ね24時間以内に収まる速い変化、及び、基線反応：暴露を重ねるに連れ、日を追って発現値の基線が徐々に移動する緩徐な反応である。四塩化炭素、バルプロ酸ナトリウムなどについて、単回暴露と新型反復暴露を比較解析し、過渡反応の振幅の増減と、基線反応の増減傾向が関連することを見出した。ただし四塩化炭素では過渡反応が急速に消失する遺伝子が多いのに対し、バルプロ酸ナトリウムではそのような傾向は弱いという差異も認められた。

また、興味深いことに、基線反応の上流に、化学物質に依存しない共通した分子機構が働いている強い可能性が示された。

以上の、単回暴露プロトコル及び、新型反復暴露プロトコルから得られたPercellome解析結果から、ごく短期（単回暴露及び小数回反復暴露）の、ごく少数のマウスによる実験から、毒性メカニズム予測が可能となる段階に到達したと考えられる。

●まとめ

筆者は、発がんプロモーション作用（今で言うエピジェネティック作用）を研究の主対象に皮膚メラノサイトや甲状腺の発がん実験を手掛け、そこから内分泌かく乱化学物質問題に関わり、受容体原生毒性（シグナル毒性）、Percellome トキシコゲノミクスProjectによる網羅的遺伝子発現ネットワーク解析による毒性予測へと対象を広げてきた。その過程で、特に内分泌かく乱化学物質問題の際に、物議をかましたのが「生物学的蓋然性 (biological plausibility)」の概念である。生命科学一般には馴染むこの概念は、規制決定に関わる毒性評価システムにはそうではなかった様である。現在OECDなどで取り上げられているAOP (Adverse Outcome Pathway) は内分泌かく乱化学物質問題のアプローチを手本に、それを一般

Percellomeトキシコゲノミクス研究

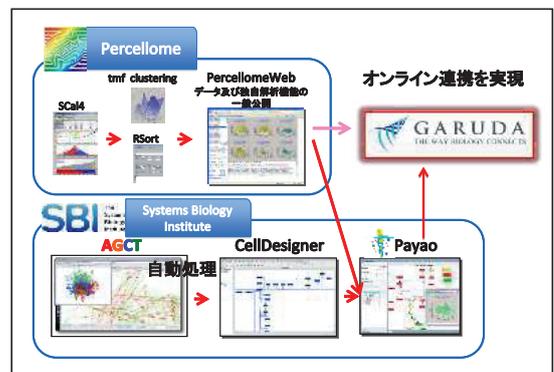
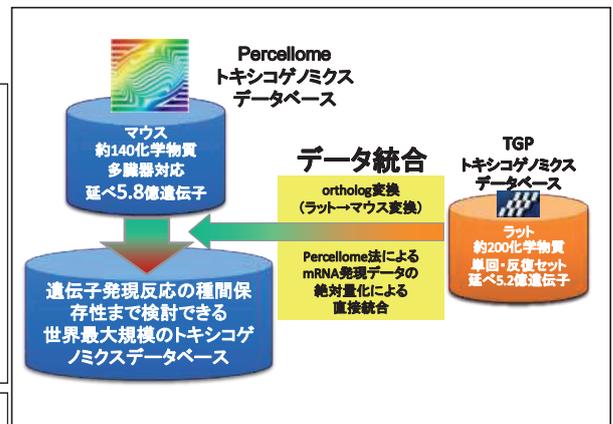
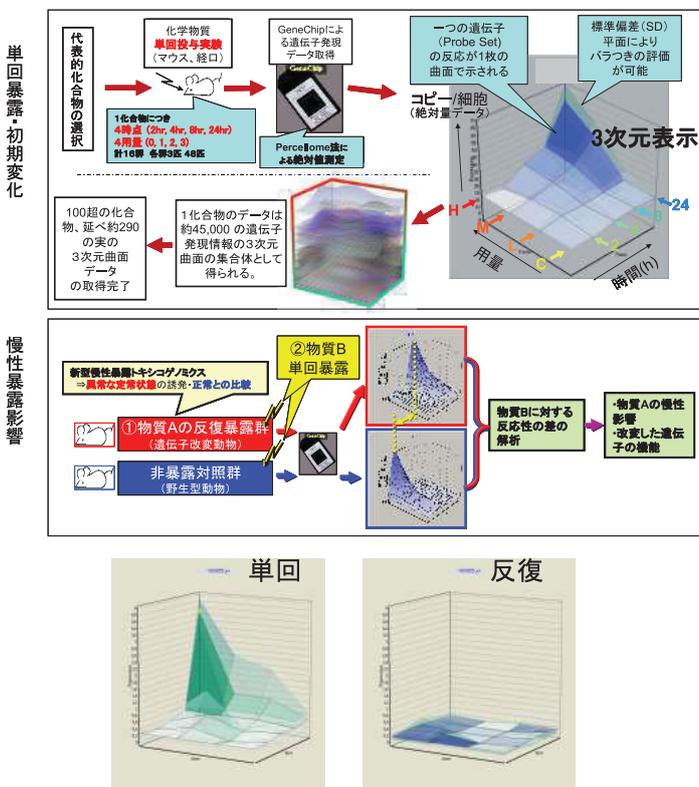


図 3

化しようという試みと理解できよう。蓋然性は、不安や危惧に根ざした当てずっぽうではなく、科学的知見からの演繹に基づく明白な妥当性があることを指す。これを毒性学的に裏返せば、毒性試験が正しく行われたことを判断出来てデータが読めることのみならず、使用した試験プロトコールの限界が把握できること、に該当すると思われる。ナノマテリアル毒性研究は、既存の異物・粉体毒性の限界に対処するための実施可能な工夫を模索する過程であり、特にアスベストの中皮腫発癌メカニズムとの共通性が指摘されるMWCNTの検討は蓋然性の延長に位置するものと考えられよう (Takagi et al., *Cancer Sci.* 103(8):1440-4, 2012, Taquahashi et al., *J Toxicol Sci.* 38(4):619-28, 2013)。毒性評価 (有害性評価) には、多くの場合、人の身代わりとして実験動物が用いられ、その毒性所見を人に外挿することが行われる。今後、当分の間、シグナル毒性解析の手法として少規模の動物実験が必須であり続けると考える。その成果が、バリデーション可能な代替法の開発の基礎となってゆくと考える。

現在の毒性学は、先端的分子生物学的手法を取り入れ、生体反応メカニズムに踏み込むことにより、種差や個体差 (SNPsなどを勘案した) の問題に対しても科学的な検討が進もうとしている。また、遺伝子改変動物やトキシコゲノミクスなどの新技術の導入により、評価の高精度化と迅速化が進んでいる。ちょうど、*in vivo*で分子生物学研究を実施することが可能となった現在、毒性発生機構をシグナル毒性のレベルで、システムバイオロジーの助けを借りモデル系の解析などを通して、毒性評価の更なる最適化とリスク評価の精度の向上が達成されると考える。これらが、患者のみならず健康なすべての人々 (消費者、労働者、製造者を含む) の安全安心と健全な活動の維持に大きく貢献すると考える。