

オミクスとインフォマティクスとの融合による迅速、高精度、省動物に適った 毒性予測法の開発に向けて

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 部長

北嶋 聡

Development of a Rapid, Accurate, and Animal-Saving Toxicity Prediction Method using Toxicogenomics

Satoshi Kitajima

Despite advancements in life science technology over recent years, rapid and efficient techniques for toxicity testing have not been developed. Typically, to assess the chronic effects of any drug or compound, it must be administered to animals for at least two years. Comprehensive individual and tissue studies to evaluate toxicity and safety will take approximately one year. In contrast, developing toxicity evaluation systems that integrate new technologies will enhance the efficiency of safety evaluations and markedly reduce costs, contributing to a safer and more secure society. Toxicity tests must be through, highly reliable, and reproducible, with no oversights. Given this premise, we are investigating methods for predicting toxicity based on molecular mechanisms using a limited number of experimental animals, aiming to improve and accelerate the efficiency of toxicity testing, with predictions ideally based on repeated administration over several days.

Specifically, under the framework of “Regulatory Science,” which serves to control the products that are brought about by science and technology to make sure that they truly are helpful to the general public, we are advancing toxicomics research including toxicogenomics to confirm the safety of various chemical substances, such as pesticides, food ingredients, pharmaceuticals, and environmental pollutants, while maintaining comprehensiveness and reliability. Here, we present an overview of this research, including analytical results from applying these methods to assess the toxic effects of several chemical substances, including plant-derived flavors and pesticides.

Keywords: Toxicity prediction, Toxicomics, Percellome, Repeated dose toxicity, Comprehensive gene expression analysis

1. はじめに

ある化学物質のヒトでの毒性・安全性評価は、医薬品以外では通常、齧歯類などを用いる動物実験（毒性試験）を行い、それ以下では有害影響が生じないと考えられる「無毒性量」を求め「安全係数」を適用して行われている。無毒性量を求めるには、閾値の有無を勘案しつつ、用量反応を検討し定量的な判定を行う。生命科学技術の飛躍的進展に対し、大変残念なことに、毒性試験の効率化・迅速化は相対的に遅れている。例えば、慢性影響を検出するために動物への投与期間は最長2年程度、遺漏のない毒性・安全性評価のために全ての個体・組織を対象とした網羅的な検査に1年程度かかる上に、H&E染

色標本による病理組織診断とヒトの健康診断のレベルにとどまる血液検査に終始していると言わざるをえない。

これに対し、新しい技術を導入した毒性・安全性評価系の開発は、安全性評価の効率化やコストの大幅削減につながり、安心・安全な社会の実現への貢献につながる事となる。毒性試験においては、高い信頼性・再現性のもと、見落としのない網羅性の観点が必須であり、できる限り少数の実験動物を用いた分子メカニズムに依拠した毒性予測（理想的には数日間の反復投与による予測）、すなわち、迅速、高精度、省動物に適った毒性予測法の開発を目的として検討している。ここでのヒトへの外挿性は、ヒトの場合も実験動物と同様な分子メカニ

ズム、あるいは、シグナルネットワークを有し、また機能しているのか否か、という観点から検討することになる。具体的には毒性に係るオミクス（生体中に存在する分子全体を網羅的に研究する学問）、すなわち「毒性オミクス」に該当し、「遺伝子から形質発現という流れ」の中で、網羅性、ハイスループット性や信頼性に優れた技術として利用可能なものは、現時点でもmRNAの発現量をみる「トキシコゲノミクス（トキシコトランスクリプトミクス）」しかないため、この手法を中心に検討している。

本手法は、真にヒトと社会に役立つように、もっとも望ましい姿に調整するための科学、すなわちレギュラトリーサイエンスに鑑み、農薬、食品（食品成分）、医薬品、環境汚染物質等の様々な化学物質の安全確認について、従来の試験法による無毒性量の取得に加えて、網羅性・信頼性を担保した上での、生体反応の分子毒性メカニズムの解明や毒性予測を行うトキシコゲノミクスを含む毒性オミクス研究を推進してきたものであり、以下に、いくつかの化学物質（植物由来の天然香料や農薬成分）について適用した解析結果を含めて、この研究の概要について紹介する。

2. 背景

2-1. トキシコゲノミクスを進める背景

DNAマイクロアレイ（DNAチップ）は、細胞内の遺伝子発現量（mRNAの発現量）を測定するために、多数のDNA断片をプラスチックやガラス等の基板上に高密度に配置した分析器具のことであり、1990年代半ばに開発された。全遺伝子スケールの大規模解析を可能とする、このDNAマイクロアレイが実用化されてから30年近くなるが、毒性学研究においてもDNAマイクロアレイが利用されるようになって久しい。加えて近年では次世代シーケンサーが普及し、より一層網羅的になったゲノミクス・エピゲノミクス解析が日常的に実施されるようになってきている。これらの大規模解析技術により、毒性学や薬理学における化学物質の生体影響の分子生物学的な研究は急速に進んでおり、毒性予測や創薬の分野への応用も始まっているが、未だそのポテンシャルが十分に活用されているとはいえず、本格活用はこれからという段階であることは否めない。こうした困難さを抱えつつも、DNAマイクロアレイを用いて、生体中のmRNAの発現量を網羅的にみる「トキシコゲノミクス（トキシコトランスクリプトミクス）」を進めることには、毒性学的なハザード評価上の根本的な動機づけがある。

医薬品開発における非臨床段階あるいは、様々な化学物質の安全性評価においては、通常、実験動物を用いる毒性試験が行われる。この際の前提は「実験動物とヒト

とは基本的には同様な反応を起こす」ということである。従来の化学物質の毒性・安全性評価法は、毒性試験において得られたハザードと量的な情報、すなわち、有害性が認められた最小量を基に、無毒性量（no-observed-adverse-effect level: NOAEL）、あるいは無作用量（No-Observed-effect Level: NOEL）を求め、種差、個体差を含む様々な不確実性を勘案し、100等といった安全係数（不確実係数）で除して、ADIなどのリスク評価指標を得ることにより、ヒトにおける安全量を割り出す、というものである。因みに、ハザード評価に際して安全係数が初めて提案されたのは、1954年に米国FDAにおいて、食品添加物の安全性評価に安全係数100を使ったケースであるとされ、これが安全性に係る定量的評価のはじまりとされる（文献1）。現在に至るまで、安全係数を用いる、こうした安全性評価法が大方うまくいっていることは、周知の事実と考える。しかし、化学物質の影響が、実験動物とヒトの間で極端に違う場合、すなわち大きな種差があった場合には、この前提が崩れることになる。この代表例がサリドマイドの事例であり、ヒトが妊娠初期にサリドマイドを服用することにより生じてしまったアザラシ肢症という奇形は、齧歯類では起きないのである（ウサギではマイルドな奇形が生じる）。考えてみれば、実験動物でもヒトでも、いわばブラックボックスと言っても過言ではないほど、生体内反応が不明な事がまだまだ多く、このことが、化学物質影響の種差あるいは個体差が生じることに通じるものと考えられる。毒性オミクス（生体中に存在する分子全体を網羅的に研究する学問）研究の根本的な動機は、安全係数にも係る、こうした種差・個体差問題を、より近代的に毒性分子メカニズムの解析に基づいて取り扱えるようにすることにある。上述したように、「遺伝子から形質発現という流れ」の中で、毒性評価に欠かせない、網羅性、ハイスループット性や信頼性に優れた技術が利用可能なものは、現時点でもmRNAの発現量をみる「トキシコゲノミクス（トキシコトランスクリプトミクス）」しかないため、この手法を中心に検討している。

毒性オミクス研究を進める上での、もう一つの大きな動機付けは、いわゆる健康食品（法律上の定義は無い）を含む食品の食品成分については、従来型の動物実験に頼るハザード評価法の適用が困難である、という問題が存在するためである。食品の安全性の担保は、端的には「食経験」に基づいている。生しいたけや加熱不完全なしいたけを食べた直後に、湿疹が全身に出現する「しいたけ皮膚炎」や、不完全な処理の綿実油中のゴシポールによるものと考えられている雄性不妊作用の誘発は、食経験が活かされなかった例と言える。食経験には、アク抜きなどを含め適切な調理方法や現実的な摂取の上限量

も寄与している。日本では、いわば毒魚といえるフグでさえも適切な調理を含め、食経験により安全性を担保している。従って、わざわざ食経験が豊富な食品成分について、実験動物を用いてハザード評価を検討することは通常はしない。ところが、いわゆる健康食品、特にサプリメントと称するものの中には、食経験から逸脱し、通常の方法と著しく異なる方法により飲食に供されるものが多くある。調理・加工方法が異なったり、濃縮・抽出・製剤（カプセル）化したりした製品には、食経験が適用できないわけである。ここで、このような食経験が適用できないような食品成分についてのハザード評価をするために、従来の評価法を適用する思考実験を行ってみる。たとえば混餌投与の際の濃度の上限である5%混餌投与の場合、この上限量が無毒性量となった場合、5%混餌投与の場合の摂取量を、例えば3,000 mg/kg体重/日と試算し、安全係数100を適用すると、参照用量は30 mg/kg体重/日となり、体重70 kgとしても、当該の食品成分については、せいぜい一日2 g程度の量までしか、ヒトでの安全性が担保されないことになる。もちろんこうした従来法は、食品添加物や汚染物質などの場合やハザードが強い食品成分の場合には、問題なく機能するはずであるが、食品成分のハザードはそれほど強くな

いことが多く、かつ、ヒトでの摂取量が比較的多いことから、安全係数に頼る従来法を適用することは困難なのである。実際、食品成分の毒性試験におけるハザード評価においては、安全係数が利用されないケースがある。こうした食経験が適用できないような食品成分についてのハザード評価に際しての方策は、種差を正確に勘案することであり、この場合も、より近代的に毒性分子メカニズムの解析に基づいて取り扱う必要があると考える。

他方で、毒性試験においては、高い信頼性・再現性のもと、見落としのない網羅性の観点が必須であり、こうした毒性学的なハザード評価上の根本的な動機づけに帰すためには、既存のDNAマイクロアレイ技術・解析を間借りする程度の短期的な展望では太刀打ちできず、毒性学的観点に帰すように中・長期的に構え、技術や手法に関して根本から見直し、文字通りのトキシコゲノミクス手法の開発が必要となった。

2-2. 形質非依存的なアプローチの必要性

DNAマイクロアレイ解析を行う際には、化学物質投与により多くの遺伝子発現が変動し、最終的に症状、毒性として観察されるが、トキシコゲノミクスを含む従来の多くのマイクロアレイ解析例では、毒性所見との関連

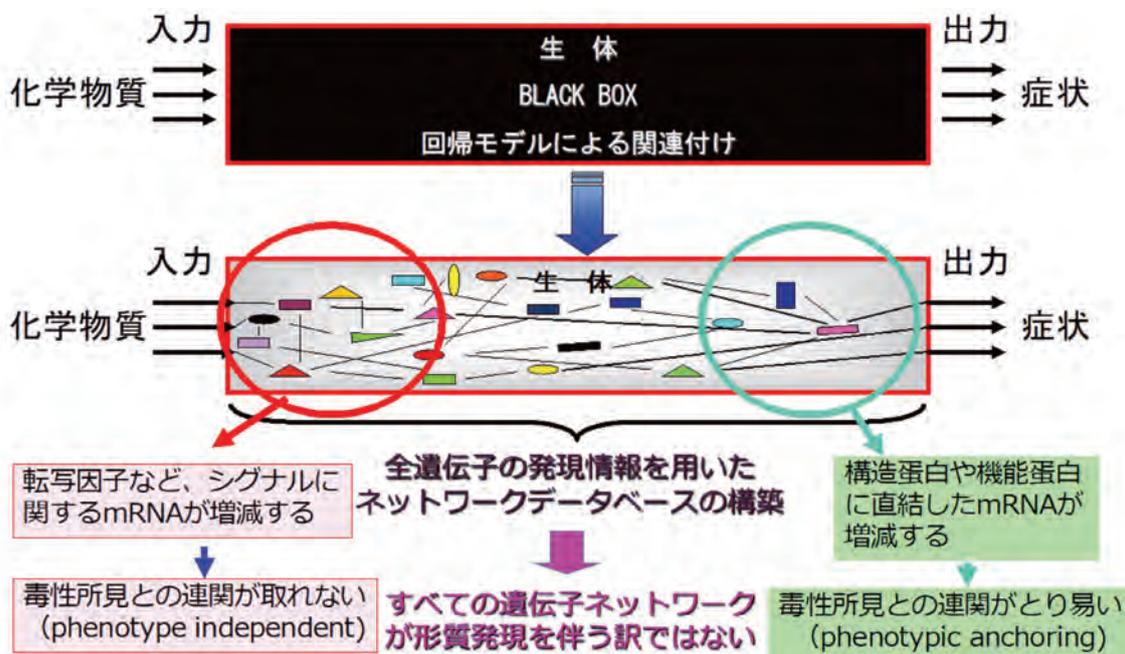


図1：トキシコゲノミクス手法における形質非依存的なアプローチの必要性

毒性分子メカニズムの解明にはシグナルネットワークの全容解明が必要となる。従来の多くのマイクロアレイ解析例では、毒性所見との関連がとりやすい、症状が現れる用量に近いところで観測する事が多いが、この場合は、アポトーシスや炎症等の、化学物質に直接起因しない変化ばかりが目立つ事となり、毒性誘発メカニズムに迫る事は出来ないものとする。そこで、化学物質投与初期の遺伝子発現変動に着目しての、形質非依存的なアプローチをとることとした。

がとりやすい、症状が現れる用量に近いところで観測する事が多い。この場合は、アポトーシスや炎症等の、化学物質に直接起因しない変化ばかりが目立つ事となり、毒性誘発メカニズムに迫る事は出来ないものと考えられる。そもそも、すべての遺伝子ネットワークが形質発現を伴う訳でもない。

毒性分子メカニズムの解析に際して、最も知る必要があることは、生体内での一連の事象であり、遺伝子発現の場合、例え現時点で機能が未知であったとしても、全ての遺伝子の情報を基とした、シグナルネットワークの全容である。すなわちシグナルネットワークの全容解明が解析上の目標となる。全容解明できれば、上述したように、膨大な時間と費用、労力がかかる定型的な長期毒性試験に比べ、迅速で、種差や個体差を勘案した高精度な毒性予測が可能となる事が強く期待される。また小児や老人といった高感受性集団における毒性予測も扱えるようになることも期待される。

そこで我々は、従来の形質依存型のトキシコゲノミクスを根本から見直し、形質にとらわれずに、化学物質投与初期の遺伝子発現変動に着目した、形質非依存的なアプローチをとることとした。また、シグナルネットワークの全容解明のためには、ある特定の遺伝子ではなく、全遺伝子の発現情報を用いたネットワークデータベースの構築をおこなう必要がある。いわば、ビッグデータ級の大規模データベースの構築が必要となる。そのためには、重要とされている、あるいは、興味がある遺伝子といったように、選択した特定の遺伝子群のみの発現変動をみるのではなく、また重みづけをせず、全ての遺伝子を平等に取り扱うこととしている(図1)。毒性学では網羅性という観点が重要であるが、本アプローチはこの観点とも一致している。

さらに、形質非依存的なアプローチをとる、もう一つ別の理由がある。それは簡単な理由であるが、遺伝子の機能が現時点でも未知のものが多数あり、すなわち未認識の「分類」を含んでいるため、既知情報により無理矢理分類してしまい、新分類の予見を見逃し、誤った分類にミスリードしてしまう弊害があるためである。換言すれば、既知の属性(化学物質のラベル、肝毒性、発がん性など)による統計学的な遺伝子リストの抽出法では、原理的に、既知の情報以上の分類を生まないのである。

2.3. 遺伝子発現の絶対量化の必要性：Percellomeプロジェクト

2000年初めにDNAマイクロアレイデータの標準化手法として主流であった統計的な代表値(90%tileなど)による方法、あるいは、ハウスキーピング遺伝子等の内部標準法では、動物投与実験から得た多数の実験データ

を蓄積する際に比較することが困難である。前者では、細胞当たりの総発現量の変化の検出が不可であるためであり、後者では内部標準に用いる遺伝子が発現変動する場合には適用が困難となるためである。またもっと大きな欠点として、同一実験においても多臓器間の比較をすることが困難ということがあった。すなわち、動物投与実験からDNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現データを積み重ねて、ビッグデータ級の大規模データベースを構築するには、対象を特定の化学物質に限ったとしても長時間を要するため、実験担当者あるいは実験施設の差異などによる系統誤差の発生が不可避であり、安全性評価に利用可能な信頼性の高い基盤データベースの構築には不向きであった。加えて、核内受容体を介した生体反応のように、遺伝子発現の変動が多くの遺伝子にわたり、顕著に誘発される場合にも、相対的な変動解析法では対応できないという欠点もあった。こうした点から、主流であった相対的な変動解析法を根本から考え直す必要が生じた。プロジェクトの開始に先立ち、2000年に、この問題を解決するブレイクスルーとして、菅野純 元毒性部長が中心となって開発されたのが、遺伝子発現量の絶対量化計算手法であるPercellome法(Kanno et al. BMC Genomics. (2006), 7, 64, 特許第4415079号)である。Percellome法とは、検体の細胞数を正確に測定値に反映させることにより、細胞1個あたりの転写産物(mRNA等)のコピー数、すなわち、遺伝子発現の絶対量をDNAマイクロアレイデータから生成する手法である。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、枯草菌由来のRNA混合液を添加してから全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、予め5種の枯草菌遺伝子のプローブセットが用意されている)。これにより、マイクロアレイ毎に全ての測定値が、枯草菌由来のRNA混合液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。

2002年に産官学のトキシコゲノミクスプロジェクト(TGP、現・国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所)に参加し、その立ち上げ後、翌2003年からPercellome法によるプロジェクトを開始した。TGPではラット及びヒト由来の細胞を用いているのに対して、Percellomeプロジェクトではマウスを選択しているが、この理由は、マウスのゲノム解析が進んでいたことと、遺伝子改変マウスを利用することができるため、毒性シグナルネットワークを、より効率良く解析できると考えたためである。以来、トキシコゲノミクス研究を推進し、データベースの拡充を継続してきた。2024年7月時点で、150化学物質について、経口投与あるいは吸入ば

く露を中心に、マウスを用いた動物実験を行ってマイクロアレイによる網羅的な細胞内の遺伝子の全転写産物（トランスクリプトーム）データセットを得ており、*in vivo*系リソースとしては世界有数の大規模データベースとなっている。

ただし、Percellome法を最大限活かしたとしても、データ精度を担保するためには、サンプリングの厳密な管理が極めて重要である。生体（*in vivo*系）では、恒常性（ホメオスタシス）が機能しているために、トランスクリプトームが安定しており扱いやすいが、一方で、概日リズムという制御が存在するために、飼育環境の明暗周期の管理や、投与・サンプリングの時刻・所要時間の管理を正確に行う必要がある。投与時刻やサンプリング時刻が一定していなければ、マイクロアレイデータの再現性は乏しくなるはずである。換言すれば、概日リズム関連遺伝子の発現量の経時変化を観ることにより、そのデータ全体の信頼性を確認することができる。また高い再現性の確保に向けて、Percellomeプロジェクトの標準プロトコル（後述）では、マウスへの経口投与は計48匹について30分以内（すなわち1匹あたり40秒程度）に終

了し、解剖・各種臓器のサンプリング時間は麻酔時間を含め、計12匹あたり30分以内（すなわち1匹あたり2分30秒以内）に採取している。

他方、培養細胞といった*in vitro*系では、ホメオスタシスが存在しないため、トランスクリプトームが不安定になりやすく、*in vivo*系以上に厳密な管理が必要となってくる。例えば、培養シャーレのインキュベータ内の位置や積み重ね枚数、培養液の交換サイクル、顕微鏡観察の回数や間隔、所要時間、などを一連の研究を通じて、可能な限り一定にする必要がある。*in vivo*系の場合と比較し、*in vitro*系の場合におけるマイクロアレイデータの再現性の確保は、格段に難しいといえる。

2-4. 形質非依存的なトキシコゲノミクスのストラテジーと遺伝子発現の三次元表示（生物系研究者に優しいデータの可視化）

化学物質投与初期の遺伝子発現変動に着目し、シグナルネットワークの全容を明らかにするための、形質非依存的なトキシコゲノミクスのストラテジーは、1時点や1用量のみにおける対照群との比較ではなく、端的に言

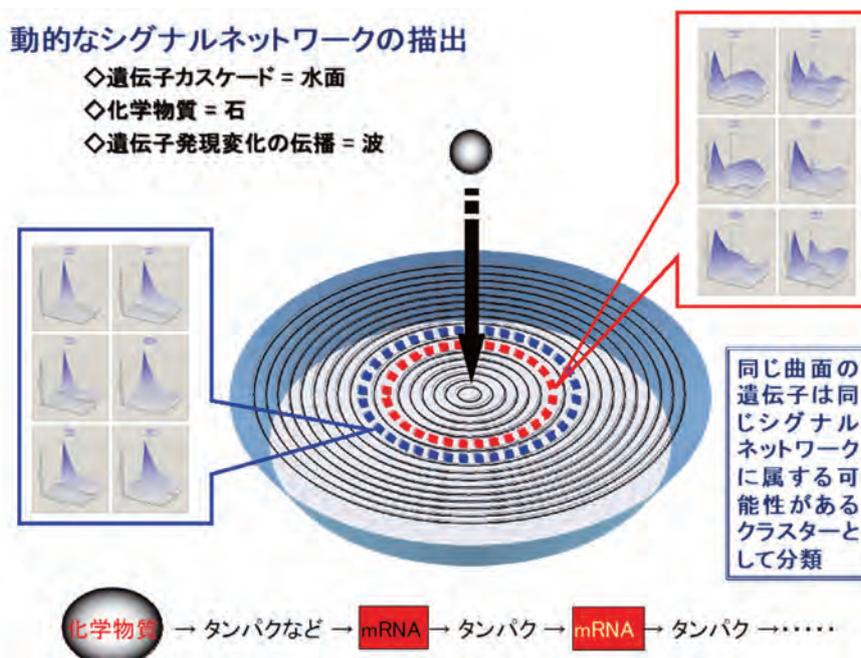


図2：遺伝子発現変動解析のストラテジー

形質非依存的な遺伝子発現変動解析のストラテジーは、1時点や1用量のみにおける対照群との比較ではなく、経時的（動的）なシグナルネットワークの描出である。このストラテジーを、石と水面とその波面を用いて例えると、化学物質を穏やかな水面に投げ込む石に、遺伝子発現変化の伝搬を波に例えられ、同じシグナルネットワークに属する可能性があるクラスターを、その際に生じる波紋と捉えることができる。同一波面上には、同じシグナルネットワークに属する遺伝子が存在する可能性が高いことから、シグナルネットワークへの影響を考える際には、特定の一つの遺伝子の発現変動のみに注目せずに、同一波面上にある多くの関連遺伝子の発現変動が「同様に」起きているか否かについて確認する必要があることとなる。

えば、経時的（動的）なシグナルネットワークの描出である。このストラテジーを、石と水面とその波面を用いて例える。化学物質をあたかも、穏やかな水面に投げ込む石に例えると、遺伝子発現変化の伝搬を波に例えられ、同じシグナルネットワークに属する可能性があるクラスターを、その際に生じる波紋と捉えることができる、というものである（図2）。一般的に、上流の遺伝子発現変動は、多くの、その下流の遺伝子発現変動を伴うが、この点は、この例え話での波紋を想起すれば、波紋が広がるにつれて、関連遺伝子群が増えてくるという観点から、理解しやすくなると考える。別の視座からは、同一波面上には、同じシグナルネットワークに属する遺伝子が存在する可能性が高いことから、シグナルネットワークへの影響を考える際には、特定の一つの遺伝子の発現変動に注目せず、同一波面上にある多くの関連遺伝子の発現変動が「同様に」起きているか否かについて、確認する必要があるものと考えられる。

次に考慮したのは、具体的に、どのような時点のデータを採取し、投与量をどのように決めるか、ということである。前者については、化学物質投与初期の遺伝子発現変動に着目し、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から、投与24時間後まで検討することとし、投与2、4及び8時間後を選択した。後者については、大量に投与すると各臓器に組織障害が誘発される事があり、その際のmRNAデータは細胞障害関連のものが中心となってしまう、被験物質の特徴が抽出困難であった

め、投与量を「投与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」とした。すなわち投与量の決定に際しては、文献値などに頼るのではなく、毎回、用量設定を行うための予備試験を実施しており、基本的には一般状態の変化ならびに投与24時間後の剖検所見をもとに24時間無作用量を求め、これを高用量とし、公比 $\sqrt{10}$ の中用量、低用量の3用量で検討している（投与液は用時調製）。これに基づき、Percellomeプロジェクトの標準プロトコルは、基本的に、4時点〔投与2、4、8及び24時間後〕 \times 4用量〔溶媒対照、低・中・高用量〕の計16群構成（各3例、計48匹）を採用している（溶媒は、コーンオイルまたは0.5%メチルセルロース液を使用し、懸濁液を作成する場合はメノウ鉢を使用）。遺伝子発現変動解析にあたっては、45,000プローブセットからなる〔Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0〕を用いている。

以上述べたPercellomeプロジェクトでのトキシコゲノミクスの主な特徴をまとめると、従来のトキシコゲノミクスを根本から見直し、1) 表現型に依存しないアプローチ、2) 遺伝子発現の絶対値化、3) 網羅的で動的な解析（「遺伝子から形質発現という流れ」の中で全ての遺伝子発現を扱う）、及び、4) 時間及び用量に依存的な遺伝子発現変動解析、ということとなる。

では、解析データを実際に、どのように表し、そして解析するのか、についてであるが、データセットは、基本的に用量4点 \times サンプリング時間4点の計16群構成を採用しているため、これを直感的に評価できるように工

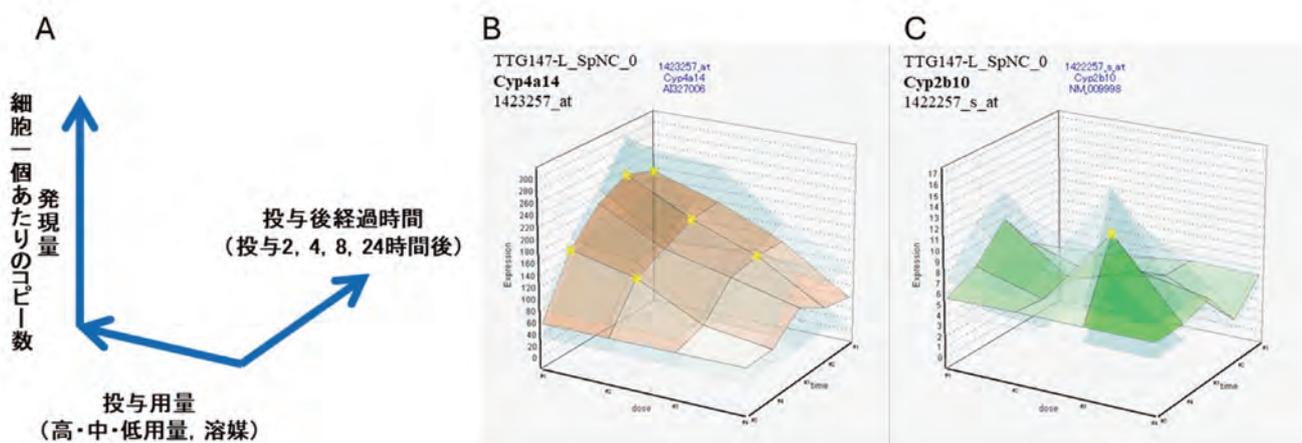


図3：3次元グラフ（Surfaceグラフ）表示

0点からの発現量を垂直軸に示し、用量反応と経時変化を一目で把握できる（A）。各群の平均値、t検定の有意判定（黄色の星印）、加えてこの平均曲面の上下に標準偏差（SD）平面（薄い水色）も表示する。このように3次元グラフとして表示する理由は、各格子点での信頼性の評価、アーチファクトの除去や生物学的な蓋然性を有するか否かの判別に適しているからである。用量相関や経時変化が整っている場合（B）、生物学的に有意な変動と示唆され、整っていない場合（C）は、アーチファクト、いわゆるノイズとして容易に除外できる。

夫した3次元グラフ (Surfaceグラフと呼称) で可視化して、解析処理を行っている (図3)。具体的には、各遺伝子につき濃度依存性、経時変化、遺伝子発現量の変化についての3次元グラフとして示す訳だが、縦軸 (Z軸) に絶対値化したmRNAの発現量 (細胞1個あたりのコピー数) をとり、X, Y軸にはそれぞれ、投与用量とサンプリング時間をとり、各条件のn=3の平均値曲面で、加えてこの平均曲面の上下に標準偏差 (SD) 平面も表示する。GeneChipが45,000プローブセットからなるため、一つの被験物質の実験につき、約45,000枚の3次元グラフが描かれることとなる。このように表示する理由は、各格子点での信頼性の評価、アーチファクトの除去や生物学的な蓋然性を有するか否かの判別に適しているからである。またSurfaceグラフから、各変動遺伝子がどの時点から発現変動を開始し、どの時点で最大の発現変動となったか、を判別して変動遺伝子リストを経時的に分割することで、発現シグナルの上流・下流の解析を効率的に行うことができる。またSurfaceグラフの

形状に基づいてクラスタリングを行えば、同様の発現パターンを示す、即ち同様の発現制御を受けている可能性が高いと解釈できることから、同一もしくは関連性の高い発現シグナルに関与する遺伝子群を得やすく、毒性シグナルネットワークの描出に役立つ。これは先に記したように、同じシグナルネットワークに属する可能性があるクラスターは、その際に生じる波紋上に存在する可能性が高いため、3次元グラフ上で同じ発現パターンを呈することが目視により峻別できるためである。この三次元表示を用いた解析は、一次元や二次元グラフを用いた解析と比較し、格段の検出力があることは容易に想像できる。特に、単一用量で、かつ、時間一点のみによる、統計学的手法を用いた単純な解析では、発現が変動した遺伝子の抽出の際には、生物学的な蓋然性のないシグナルネットワークへとミスリードされる可能性は高くなる。

生物学的な蓋然性を有し、生物学的に有意な変動を示す遺伝子の抽出は、変動比や有意差検定等の統計指標だ

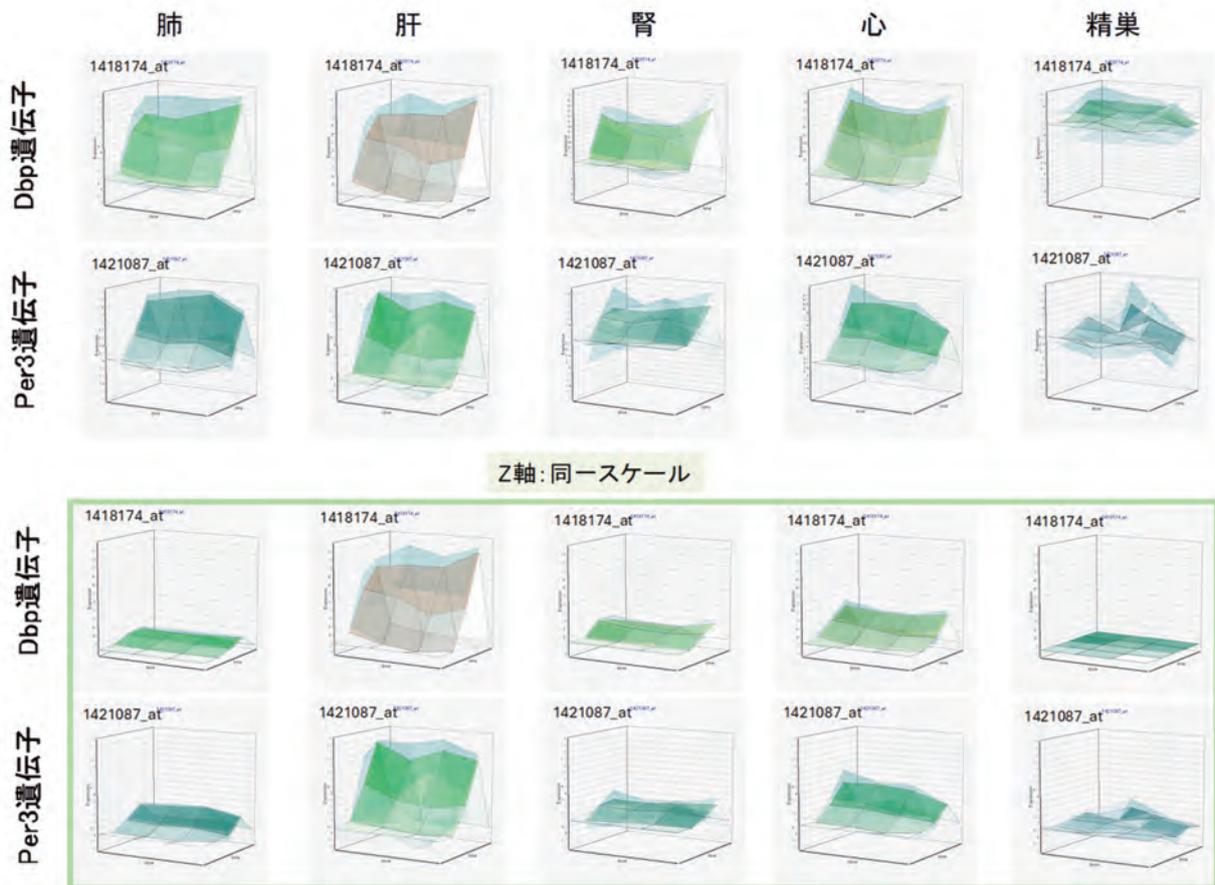


図4：概日リズム関連遺伝子の発現変動の多臓器間比較

化学物質を投与しない状態における、概日リズム遺伝子の一つであるDBP及びPer3遺伝子の発現変動を、肺、肝、腎、心及び精巣の5臓器に亘り示す。これらの遺伝子は、精巣を除く4つの臓器で、自律的に概日変化のパターンを示す。下に示した図は、各臓器のZ軸を同一スケールとしたもの。

けでなく、凹凸やピーク位置などのSurfaceグラフの形状に基づいて行っている。形状を重視するのは、生物学的に有意な変動では用量相関や経時変化が整っており、アーチファクト、いわゆるノイズが容易に除外できるからである。すなわち、三次元表示は、生物系研究者に優しいデータの可視化といえる。この抽出処理をできるだけ自動化するために、Surfaceグラフの形状を基に、生物学的に有意な発現変動を示す遺伝子を抽出するソフトウェアRSortを開発した。これにより、データセット毎に45,000枚のSurfaceグラフから数百～数千程度の候補遺伝子が自動抽出される。解析精度を高める場合は、ここからさらに専門家によるヒューマンキュレーション(HC)を行い、偽陽性の変化等を取り除き、最終的な変動遺伝子リストを作成する。この様な遺伝子リストは、被験物質によるトランスクリプトーム上のハザードの特徴を示しており、被験物質による毒性に係るシグナルネットワークを描出することはもちろんのこと、これらの類似点や相違点を比較解析することで、同様の遺伝子発現を惹起しうる化学物質を抽出したり、トランスクリプトーム間の類似性が高い化学物質の毒性から新規化学物質の毒性を予測したりすることができる。

現在、解析作業でボトルネックとなっているSurfaceグラフの生物学的有意判定については、RSortによって1/10ほどに候補を絞り込めるが、false negativeを避け

るためにfalse positiveの発生を避けられず、高精度解析の際はこのHC部分の負荷がかなり大きい。このHC部分の作業の効率化・迅速化のために、専門家が選択したSurfaceグラフの画像セットを用いた機械学習により、専門家による生物学的有意判定を予測する人工知能(deep learning)モデルを作製、この利用を、システム・バイオロジー研究機構の北野宏明博士との共同研究により試みており、高精度なものの作製に成功したことを、最近報告したばかりである(文献2)。

3. 適用例

3-1. 概日リズム関連遺伝子の発現変動の多臓器間比較

本解析法は、被験物質による毒性に係るシグナルネットワークを描出することだけでなく、さまざまな生物学的な解析に応用することができる。例えば、化学物質を投与しない状態(溶媒対照群)での、特定の概日リズム関連遺伝子の発現変動を、24時間に亘り、5つの臓器について多臓器間比較することができる。図4にはDbp及びPer3遺伝子という概日リズム遺伝子の発現変動を肺、肝、腎、心、精巣の5臓器に亘り示す。このように、これらの遺伝子は、理由は依然不明だが、精巣を除く4つの臓器で、自律的に概日変化のパターンを示す。遺伝子発現を絶対量化できるPercellome法により、各臓器で発現コピー数が異なることが一目瞭然でわかる。

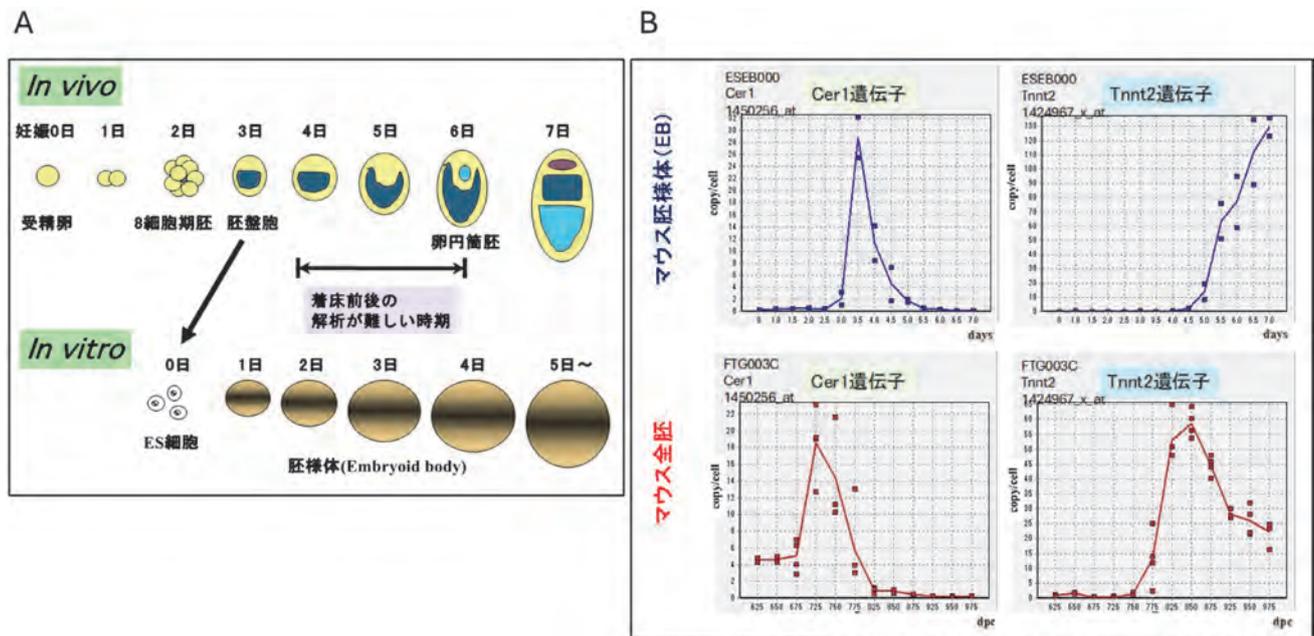


図5：マウス初期胚・全胚，及び，マウスES細胞を用いた胚様体(EB)における遺伝子発現変動の比較

- A：マウス初期胚と胚様体との発生ステージの対応。着床前後のサンプリングや解析が困難な期間の補完として、EBの分化過程が参照できる可能性がある。
- B：マウス初期胚・全胚とマウスEBとの間での、分化マーカーの経時的な遺伝子発現変動の比較。いずれの場合も非常に似たパターンを示した。

3-2. マウス初期胚・全胚、及び、マウスES細胞を用いた胚様体 (EB) における遺伝子発現変動の経時データベースの作成と、両者の比較解析

Percellomeプロジェクトでは、Surfaceグラフ対応のデータセットばかりではなく、それぞれ特徴のある小規模データベースも構築している。例えば、激しく変動する遺伝子発現にも対応できるPercellome法の特性を活かして、マウス (C57BL/6) 個体発生過程の全胚トランスクリプトームを6.25~9.75 dpc (days post-coitum) (プラグが確認された日を0.5 dpcとした) まで6時間間隔 (12時点) で実施してデータベースを構築した (卵黄嚢膜は除去した)。このデータベースは発生毒性のトランスクリプトーム解析におけるリファレンスとなる貴重なものである。同様に、マウス胚性幹 (ES) 細胞 (TT2) を分化させた胚様体 (EB) の遺伝子発現経時データベー

スも作成した (EB形成 1-7日, 14時点)。このEBのデータベースを作成した理由の一つは、マウス初期胚のサンプリングは、事実上6.25 dpc以前のものは難しく、この期間の補完としてEBの分化過程が参照できると考えたからである (図5A)。実際、いくつかの分化マーカーの経時的な遺伝子発現変動を、マウス初期胚・全胚とマウスEBとの間で比較すると、非常に似たパターンを示すことが明らかとなった (図5B)。このことは、想定通り、6.25 dpc以前のマウス胚の遺伝子発現変動をEBのデータベースが補完できることを示唆しているものと考ええる。引き続き、発生毒性に関わる遺伝子発現変動解析手法の確立に向けて、催奇形性モデル物質を、妊娠マウスに投与した際の、マウス胚における本手法の適用と解析を検討中である。

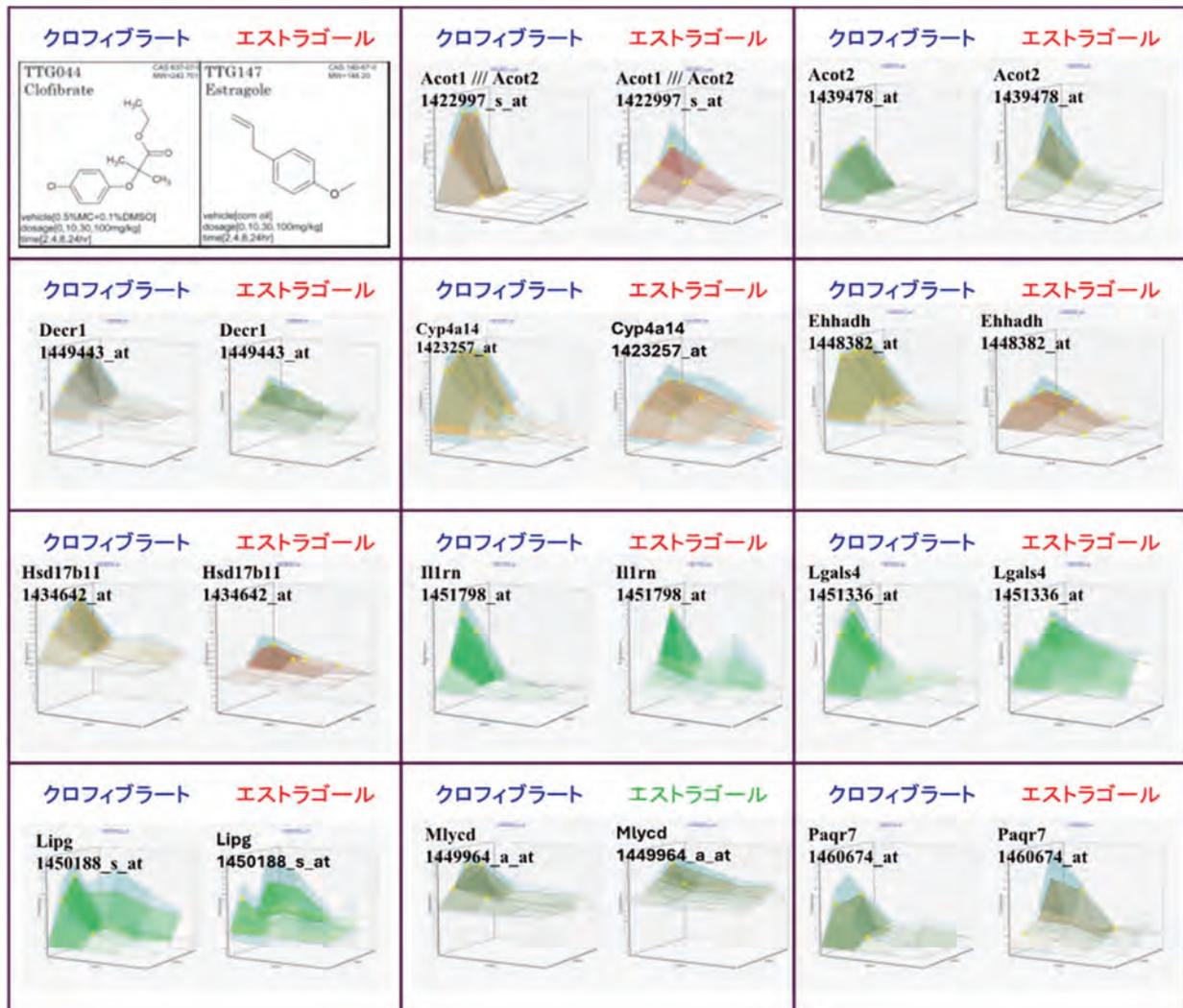


図6：クロフィブラート (左) あるいはエストラゴール (右) による、複数のPPAR α 関連遺伝子の発現変動の比較両者の間で、同様な変化パターンで遺伝子発現変動が観察された。用量設定は、両物質共に同じであったため、同様なpotencyにて比較できる。両者で、遺伝子発現量の絶対値である縦軸のスケールを一致させてある。

3.3. 化学物質をマウスに単回経口投与した際の毒性に係るシグナルネットワークの描出

化学物質の単回経口投与の場合について、本手法を適用した例について、いくつか記載する。エストラゴールは、キク科ヨモギ属の植物タラゴンの香り成分の主成分であり香料として使用されている。またタラゴンは各種料理にハーブとして利用されている。エストラゴールは、げっ歯類において肝発がんを誘発するという報告があるが、その詳しい誘発機序は不明であった。そこでその分子機序を明らかにする目的で、本手法を適用した。予備実験の結果から、溶媒をコーンオイルとし、100 mg/kgを高用量とし、公比 $\sqrt{10}$ で3用量にて(0, 10, 30, 100 mg/kg)、雄性マウスに単回強制経口投与をおこない、投与2, 4, 8及び24時間後と、経時的にサンプリングをおこない、解析した。Surfaceグラフの形状を基に、生物学的に有意な発現変動を示す遺伝子を抽出するソフトウェアRSortを用い、また市販の解析ソフトIngenuity Pathways Analysis (IPA) を利用しつつ検討したところ、*in silico*でのプロモーター解析 (Upstream Regulator Analysis (IPA)) において核内受容体PPAR α が抽出される等、PPAR α シグナルネットワークが活性化することが示唆された。この点、我々が所有するPercellomeデータベースには、PPAR α 活性化薬クロフィブラート (高脂血症治療剤) が含まれていたため、クロフィブラートとエストラゴールの場合とを比較検討することとした。

偶然にも、エストラゴールとクロフィブラートの用量設定は一致していた(0, 10, 30, 100 mg/kg)。図6に、PPAR α 関連遺伝子について、左がクロフィブラートの場合、右がエストラゴールの場合を示す(両者で、遺伝子発現量の絶対値である縦軸のスケールを一致させてある)。すると、驚くほど両者の間で、同様な変化パターンで遺伝子発現変動が観察され、かつ、用量設定はたまたま偶然、両物質の場合で同じであったため、同様なpotencyにて影響をあたえていることが確認された。すなわち、エストラゴールは未報告の性質、即ち、高脂血症治療剤であるクロフィブラートと比しても劣らないほどの強いPPAR α シグナル活性化作用 (ペルオキシゾーム増殖作用) を有していることが示唆された。げっ歯類においては、PPAR α シグナルの活性化により肝発がんが誘発されることが知られているため、エストラゴール投与による肝発がんの誘発機序として、PPAR α シグナル活性化作用が示唆された。またこの解析結果は、先に示した波紋の例えのように、当該遺伝子のSurfaceグラフが経時的、濃度依存的に似ているということは、これらの当該遺伝子が同じシグナルネットワーク上に存在する可能性が高いという示唆を、強く支持する結果と考え

る(文献3)。

別の適用例として、除草剤ペンタクロロフェノール(PCP) (現在は農薬登録は失効) の場合を挙げることができる。エストラゴールの場合と同様な検討を行い解析した結果(0, 10, 30, 100 mg/kg)、PCPでの解析でも未報告の性質、即ち、インターフェロンシグナルネットワークが著しく活性化していることが明らかとなった。PCPによる機能変化(急性中毒)としては、発熱、発汗などが認められ、従来、この分子機序として酸化的ストレス、ミトコンドリア脱共役作用が考えられていたが、今回の解析の結果、これらに関する遺伝子の発現変動は顕著に認められず、PCPによる機能変化は、むしろインターフェロンシグナルを介したインフルエンザ様作用であることを示唆し報告した(文献4)。この際、各時点(投与2, 4, 8及び24時間後)における遺伝子発現プロファイルを解析し、経時的・動的なシグナルネットワークの描出についても検討をおこなった。したがって、以上の解析事例から、実際に分子メカニズムに基づいたかたちで迅速に、被験物質の毒性予測に関する情報を得ることができたものと考えられる。

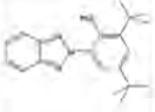
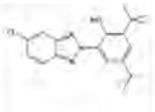
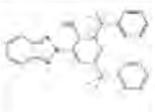
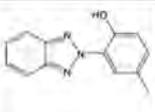
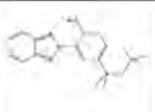
一方、Percellomeデータベースは*in vivo*系のトキシコゲノミクスデータベースとしては世界有数の規模となっており、2024年7月現在では延べ遺伝子数にして7億件(=9億4千万プローブセット)が登録されている。被験物質としては、その影響を与える遺伝子発現ネットワークのバリエーションが豊富になるように選択しており、150種とはいえ、非常に多くの毒性シグナルネットワークをカバーしていると考えられるため、ビッグデータ級と称して差し支えないと思われる。ところが、この比較作業で扱うデータ量は膨大であり、人手ではかなり困難であるために、このような大規模比較解析を容易に実行できるように、専用ソフトウェアPercellomeExplorerを開発し、毒性分子機序の解析や化学物質の毒性予測等に活用している。ここでは、各化学物質により変動する遺伝子リスト間で、多対多の類似計算を行い、それを基に化学物質のクラスタリングを行えば、化学物質が影響を与える毒性シグナルと、化学物質が惹起する毒性の関連性がたまかながら示唆される。実際に、エストラゴールの場合に適用したところ、やはり、上述したクロフィブラートが、類似度が高い化学物質として挙がってきたことから、この解析手法は有用と考える。

3.4. 化学構造が類似している複数の化学物質のハザード影響についての、トランスクリプトームプロファイルによるカテゴリー化

分子構造、物理化学的性状及び有害性等が類似または規則的なパターンを示す化学物質をグループ化し、未試

験物質を評価する手法として、カテゴリーアプローチが知られており、国際的にも検討が進められている。フェノール性ベンゾトリアゾールは、様々なポリマー製品に添加される紫外線吸収剤であり、海外の化学物質毒性評価プログラムで以前評価されたことがあるが、その構造と毒性の関係については限定的であった。そこで、山田隆志氏（安全性予測評価部室長）との共同研究で、本手法を、化学構造が類似している複数のフェノール性ベンゾトリアゾールについてのトランスクリプトームプロファイルによるカテゴリー化に適用した（OECDにおけ

るIATA事例研究）。フェノール性ベンゾトリアゾールの経口反復投与毒性試験では、肝毒性が主要な毒性であり、毒性のレベルは置換基の種類と程度によって異なることが示されている。構造の多様性や置換の程度が、物理化学的性質、バイオアベイラビリティ、作用機序、毒性学的性質に影響を及ぼすことが予想される。解析の結果、フェノール性ベンゾトリアゾールの肝でのトランスクリプトームプロファイルは、核内受容体経路の活性化および／または酸化ストレスの誘導を強く示唆しており、これらは観察された肝への影響と関連している可能

番号	物質 (CAS 番号)	増加した プローブ セット数*	第1相反応**				第2相反応**	
			AhR- Cyp1	CAR- Cyp2	PXR- Cyp3	PPAR- Cyp4	Nrf2- phase II enzymes	Nrf2+ Keap1
1	 3846-71-7	5480	0	100	100	100	100	100
3	 3864-99-1	3230	0	50	80	100	50	80
5	 70321-86-7	370	0	0	0	30	5	0
6	 2440-22-4	150	0	0	0	0	10	0
7	 3147-75-9	250	0	40	0	40	0	0

*: 投与量: 1,000 mg/kg BW (単回、経口)

** : 1,000 mg/kg BW の場合における半定量的相対誘導度

図7：フェノール性ベンゾトリアゾール類を単回経口投与した際の、マウス肝トランスクリプトームプロファイルの比較

いずれの場合も、核内受容体経路の活性化および／または酸化ストレスの誘導を強く示唆していると同時に、わずかな化学構造の違いでもトランスクリプトームプロファイルに大きく影響を与えることも明らかになった。

性が高いこと、同時に、わずかな化学構造の違いでもトランスクリプトームプロファイルに大きく影響を与えることも明らかになった。このことから、トランスクリプトームプロファイルは、化学構造が類似している複数のフェノール性ベンゾトリアゾールのハザード影響の詳細なカテゴリー化に寄与することが示唆された(図7)(文献5)。この事は、本手法が、化学構造が類似している複数の化学物質のハザード影響についてのカテゴリー化に適用可能であることを示唆するものとする。

以上、記載したこれらの成果は毒性研究分野のみではなく、医薬品開発や他の医学・生物学分野への波及効果が期待されるため、Percellomeデータベースのトランスクリプトームデータについては、Surfaceグラフ対応データの大半をRESTful WebAPIを介してオンラインで提供している(<https://www.nihs.go.jp/tox/percellome.html>)。データだけでなく解析ソフトウェア

の普及・維持については、北野宏明氏(システム・バイオロジー研究機構)が主催しているGARUDAアライアンス(<http://www.garuda-alliance.org/>)がリリースしているGARUDAプラットフォーム上で連携動作する様々なソフトウェア(ガジェットと称する)の1つとして、GUI操作でPercellomeデータベースを利用できる“Percellomeガジェット”を提供している。

4. 反復投与毒性への適用

以上までに記載した単回投与の際のトキシコゲノミクスの適用に加え、反復投与毒性への適用、すなわち、反復投与毒性の場合の毒性予測の迅速化に向け、数日間程度の反復投与の場合も検討中である。反復毒性の毒性分子機序を解明することで、安全性評価の精度の向上だけでなく、反復投与期間の短縮による安全性評価の迅速化が期待される。また反復投与による生体の定常反応の変化、つまり反復毒性成立の分子機序の解明が進めば、被

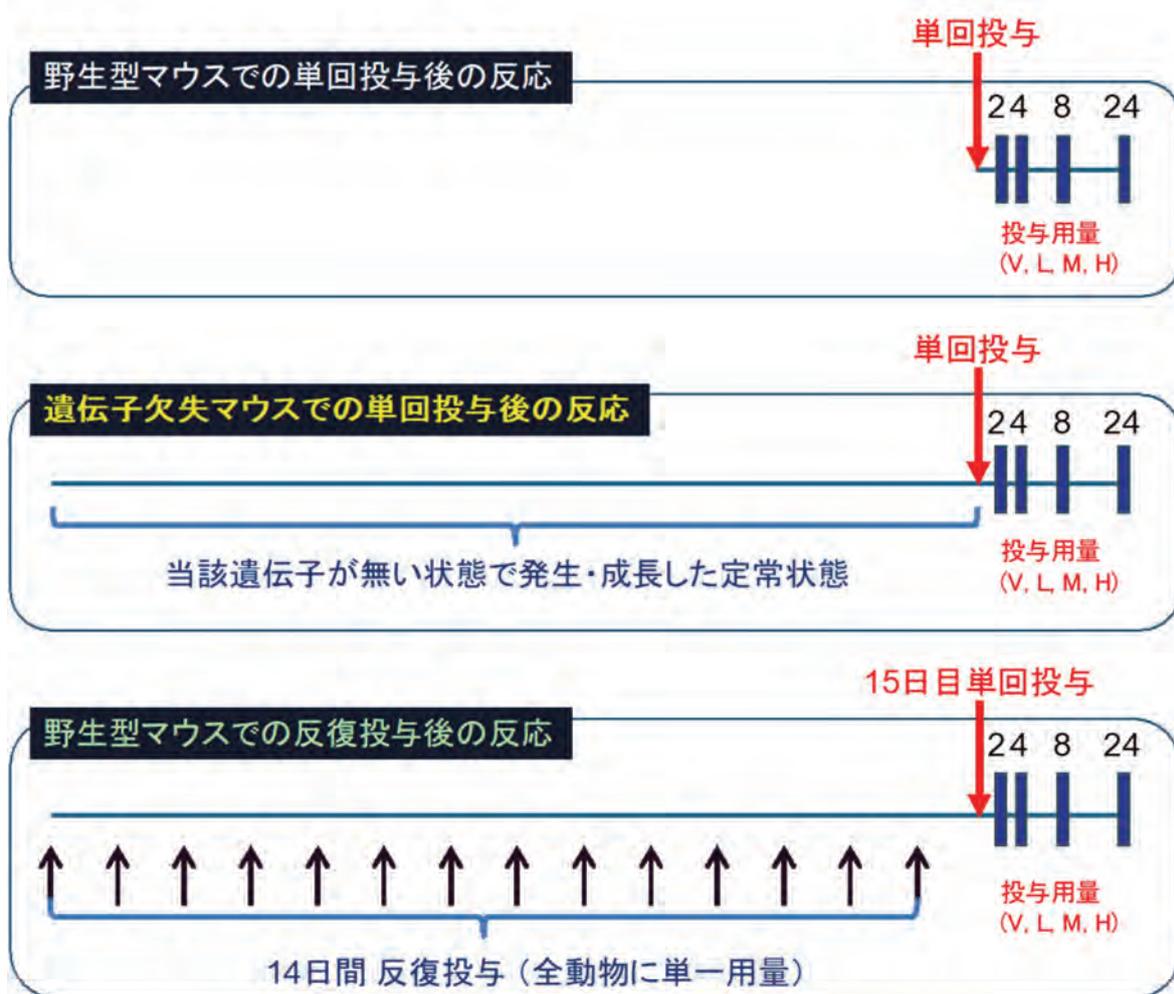


図8：新型反復投与実験

単回投与プロトコル(上段)、および新型反復曝露試験プロトコルの着想となった遺伝欠失マウスでの単回投与(中段)、及び、14日間反復投与+単回投与プロトコル(下段)。

験物質がどのような反復毒性を引き起こすのか、予測することが可能となる。より具体的には、反復投与毒性については成立機序に関わるシグナルネットワークの解析に取り組んでおり（後述）、特にトランスクリプトームとエピゲノムの解析を同時に行って、ヒストン修飾やゲノム DNA のメチル化といったエピジェネティック機構が反復毒性機序へ与える影響の解明を進めている。また解析プロセスへの人工知能（AI）導入による解析規模の拡大や効率向上も試みている。反復毒性試験の短期間化やビッグデータに基づく *in silico* 予測、及び、省動物化した *in vivo* 試験の組み合わせによる毒性予測など本手法の本格活用を目指して検討している。

生物個体 (*in vivo*) の系においては、*in vitro* 系とは異なり、ホメオスタシス（恒常性維持）が存在するため、化学物質による影響を、投与前の状態に戻そうとする力が働くはずであり、この点、反復投与の場合と比較し、単回投与の場合は回復が早いものと予想できる。一方、反復投与の場合には、生体が回復しようとしても、被験物質の投与影響が持続するために、体内のシグナルネットワークは投与前とは異なる、ある定常状態に落ち着く可能性が強く示唆され（反復投与による定常状態の変化）、したがって、反復投与毒性の予測を考える場合は、上述した単回投与の場合とは違った戦略が必要となってくるはずである。そこで、反復毒性の分子機序解析に向けて、この反復投与による定常状態の変化と、その状態下で単回投与を行った際の急性反応とを分離することのできる「新型反復毒性試験プロトコル」を開発、実施している。このプロトコルは、遺伝子改変マウスに

おける単回投与実験にヒントを得たものである。遺伝子改変マウスの場合、溶媒投与群を含めた全てのマウスで等しく、遺伝子改変による影響を日々繰り返し受けていると解釈できる。よって化学物質の反復投与でも同様の状態を作り出すために、新型反復毒性試験では反復投与期間に「一定量」の化学物質を全数に対して反復投与する。さらに反復投与により変化した定常状態下での急性反応を見るために、最終反復投与の翌日に単回投与実験を行う（図8）。この新型プロトコルで得たマイクロアレイデータをSurfaceグラフにすると、反復毒性シグナルを、反復投与により変容した定常状態を示す「基線反応（baseline response）」と、その定常状態下での生体反応を示す「過渡反応（transient response）」とに分離できる。2024年7月現在、延べ20化学物質について新型反復毒性試験を実施して、関与する毒性シグナルの解析を進めている。多くの化学物質に於いては反復投与によって過渡反応が減弱ないし消失するのに対して、バルプロ酸ナトリウムなど医薬品として用いられる化学物質については反復投与による過渡反応の減弱がほとんど見られなかった。これは繰り返し飲み続けても効果を失わないという医薬品に必要な性質を反映したものである可能性がある。また、化学物質それぞれに特異的な反応が見られる一方で、共通する傾向としては、反復投与により基線反応が低下した際には、過渡反応のピークが低下する傾向が見られた。

化学物質の反復投与により生じた定常状態の変化（基線反応）にはエピジェネティック機構が関与している可能性が高いため、これを確認すべく新型反復毒性試験の肝サンプルを用いてゲノムDNAメチル化解析（全ゲノ

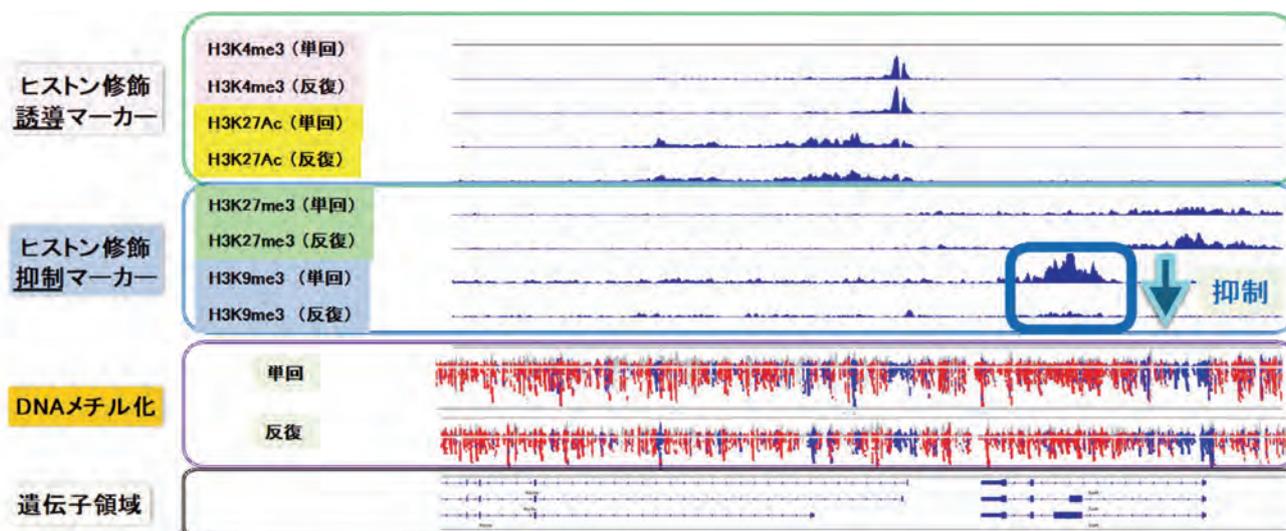


図9：エピゲノム解析図

Integrative Genomics Viewer (IGV) の表示例。上半がヒストン修飾 (ChIP-Seq)、下半がゲノムDNAメチル化 (WGBS) の解析図。WGBSデータではメチル化されている領域を赤、メチル化されていない領域を青として表示。

ムバイサルファイトシーケンス：WGBS）とヒストン修飾解析（ChIP-Seq）も行っている。新型反復毒性試験において基線反応若しくは過渡反応を示した遺伝子を中心に、それらの転写開始点付近のメチル化状態を Integrative Genomics Viewer (IGV, Broad Institute) を用いて検討した。WGBSデータではメチル化されている領域を赤、メチル化されていない領域を青として表示している。検討の結果、少なくとも14日以内の反復投与ではゲノムDNAのメチル化パターンはほとんど変化しないことが確認された。一方、「ヒストン修飾」については、誘導マーカーであるH3K4me3とH3K27Ac、抑制マーカーであるH3K27me3とH3K9me3のそれぞれに対応する抗体を用いてクロマチン免疫沈降シーケンス（ChIP-Seq）を実施、それぞれの頻度をヒストグラム表示して解析している（図9）（文献6）。DNAのメチル化状態の場合と異なり、化学物質の反復投与によって、ヒストン修飾の変化は観察された。それぞれの増減の変化を総合して誘導・抑制状態を予測したところ、マイクロアレイによる発現変動パターンと照合したところ、予測と一致する場合が多数確認できた。以上の通り、反復毒性については、エピジェネティック機構、特にヒストン修飾の関与が強くと示唆される結果となっている。引き続き、被験物質の数を増やし、ケーススタディーを重ね、分子機序解析を進め、反復毒性予測技術の開発を目指す所存である。

おわりに

Percellome手法を用いるトキシコゲノミクスによる研究成果は着々と積み重ねられており、またその技術基盤はほぼ整ったものといえる。実際、この手法の実用化の例として、2024年度から有機フッ素化合物（PFAS）の規制に関わる優先付け及び合算評価に資する研究へと適用し、PFASの有害性に関わる分子シグナルを明らかにし、用量作用関係を含む毒性予測を行う研究を開始した（主任研究者：相崎健一氏（毒性部室長）、環境省・PFASに関する総合研究）。ここでは、このPFASの分子毒性メカニズムの解明により、PFAS分類法の構築、リスク評価の優先順位付け及び複合影響評価が進むことが期待される。

一方で、化学物質のハザード評価手法としての本格活用はこれからという段階であることは否めない。この状況の打破するためには、トキシコゲノミクス・インフォマティクス研究をもう一段上へ飛躍させると共に、データやソフトウェアの普及、及び、人手や時間が掛かる遺伝子発現解析上の大量に生じるデータ処理の効率化が必須と考える。この点、インフォマティクスやAIの加速度的な技術進歩によって処理能力が大幅に向上している

ため、近い将来、情報密度が高いビッグデータであっても効率よく処理できるようになると見込まれる。これにより、本手法の化学物質のハザード評価手法としての本格活用が始まり、できる限り少数の実験動物を用いた分子メカニズムに依拠した毒性予測（数日間の反復投与による予測）が可能となり、化学物質のハザード評価の高精度化、ヒトへの外挿性向上、及び、省動物につながる事が期待される。あわせて、シグナルネットワークの全容把握の視座からは、新たな毒性シグナルネットワークや想定外のシグナルネットワークに係る新知見の発見が見込まれることから、毒性領域だけではなく、医学・生物学全般への還元も期待される。

謝辞

本稿で紹介した内容の多くは、菅野純氏（国立医薬品食品衛生研究所 名誉所員、元毒性部長）、相崎健一氏（毒性部室長）及び小野竜一氏（毒性部室長）の研究成果をもとにさせていただいた。また本研究は、厚生労働行政推進調査事業費（H27-化学-指定-001, H30-化学-指定-001, 21KD2001）、及び厚生労働科学研究費（H29-化学-一般-005, 20KD1001）のサポートにより実施した。またAIやシステムバイオロジー分野については特定非営利活動法人システム・バイオロジー研究機構の北野宏明先生、長谷武志先生、株式会社ソニーコンピュータサイエンス研究所のNatalia Polouliakh先生の御協力を、GARUDAプラットフォームを用いた解析手法開発については国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所バイオインフォマティクスプロジェクトの夏目やよい先生の御協力を頂いた。また毒性部現職員・元職員をはじめ、本稿を含むこれまでの研究遂行に協力していただいた方々に感謝いたします。

引用文献

- 文献1: Lehman AJ and Fitzhugh OG: "100-Fold Margin of Safety" Assoc. Food Drug Off. U.S.Q. Bull. 18, 1954; 33-35.
- 文献2: Hase T, Ghosh S, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J, Kitano H, Yachie A: DTox: A deep neural network-based in visio lens for large scale toxicogenomics data. J Toxicol Sci. 2024; 49(3): 105-115. [doi.org/10.2131/jts.49.105]
- 文献3: Kanno J, Aisaki K, Igarashi K, Nakatsu N, Kodama Y, Sekita K, Takagi A, Kitajima S: Application of percellome toxicogenomics to food safety. In: Hormone-Disruptive Chemical Contaminants in Food. Edited by Pongratz I and Bergander L. Royal Society of Chemistry,

London, 184, 2011.

文献4 : Kanno J, Aisaki K, Igarashi K, Kitajima S, Matsuda N, Morita K, Tsuji M, Moriyama N, Furukawa Y, Otsuka M, Tachihara E, Nakatsu N, Kodama Y: Oral administration of pentachlorophenol induces interferon signaling mRNAs in C57BL/6 male mouse liver. *J Toxicol Sci.* 2013; 38(4):643-654. [doi 10.2131/jts.38.643]

文献5 : Case study on the use of an integrated approach to testing and assessment for the repeated-dose toxicity of phenolic benzotriazoles,

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Series on Testing & Assessment. 2017; 271: 1-44.

[https://one.oecd.org/document/env/jm/mono\(2017\)23/en/pdf](https://one.oecd.org/document/env/jm/mono(2017)23/en/pdf)

文献6 : 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による毒性分子機序の探求～, *日本薬理学雑誌*, 2022; 157: 200-206.

[doi.org/10.1254/fpj.21122]