

トキシコゲノミクスによる食品の安全性評価

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 菅野 純

はじめに

天然食品由来の濃縮・抽出等よりなる新開発食品（サプリメント、健康食品を含む）は、その原料が「食経験」に基づく安全性を担保されたものであるとされるため、化学物質や医薬品等の毒性評価体系の領域外に置かれてきたのが実情である。しかし、特定成分について従来の「食経験」を超えた量を容易に摂取することを可能にするものであることから、新たな健康被害の発生の可能性が想定されるに至り、毒性評価の必要性が出てきた。例えば、タマネギ中の成分による溶血性貧血は動物に対しては有名であるが、人に対しては、起こり得るものの問題視されて来なかった。しかし、仮にタマネギの濃縮製剤が何らかの有効性を謳って市場に出回ったとすると、過剰摂取による溶血性貧血の発症が想定される。この様な、成分濃縮による健康被害の危惧は、大豆イソフラボン製剤をはじめ、種々の、特に謳われる効能の関与成分がはつき

りした物について存在し得る。

「食経験」に基づいた食品の安全性の担保は、「① 現実的に可能な摂取量の上限」、「② 常識的な調理法（水に晒すことや加熱による無毒化など）」、及び「③ 成分の配合バランス」という、少なくとも三つの要因から成り立っていると考えられる（図1）。そして食品由来のサプリメントを含む新開発食品は、たとえ原料が食品であったとしても、この三つが担保されない状況で消費者の口に入ることが可能となる。この様なものを対象とした安全性の評価の全てを、人体を用いた「ボランティア実験」に頼ることは幾つかの限界がある。先ず、有害性が現れないことを示す実験としての過剰摂取試験を行うことが想定されるが、どの程度の負荷で有害性が現れるかが正確には予測できない点、また、疾病予備軍、乳幼児、胎児、妊婦、老人などの高感受性グループを対象とした試験の実施が困難である点が挙げられる。

他方、代替として従来型の動物実験

対象とした場合には適用できない。先のタマネギを例にとると、動物での無作用量の100分の1を人の上限とした場合、人はタマネギを殆ど食べられないことになる。そうかと言って、実験動物に過剰摂取させて得られた所見をそのまま人に当てはめることも難しい。この2つの問題を言い換えると、食品を対象として実験動物を用いた毒性試験を行う場合、種差を正確に勘案した安全性評価法が必要となるのである。

トキシコゲノミクス

医薬品の前臨床段階での、或いは、化学物質の安全性については、人の身代わりとして実験動物による毒性試験が行われる。その際の前提は「実験動物も基本的には人間と同等の反応を起こす」ことである。現在の評価法は、実験動物で得た量的な情報、即ち、有害性が認められた最小量をもとに無毒性量或いは無作用量を算定し、種々の不確実性（個体差や種差を含む）を勘案し、安全係数を用いて人間の安全量を割り出すものである。しかし、この前提が崩れ、動物実験が全く人の安全確保に寄与しない場合が経験されてきた。サリドマイドがその例である。我々が推進するトキシコゲノミクス研究の根本的な動機は、この種差問題、個体差問題をより近代的な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。

上述の如く、食品そのものの安全性確保の為の動物実験（試験）の結果は、安全係数を用いて評価する意味を持たない。むしろ、ヒトと実験動物の感受性差に関する種差の評価を必要とする。よって、この命題は、我々のトキシコゲノミクス研究の目指す究極目標そのもののなのである。

図1 食経験による食品の安全性担保と新開発食品等の関係

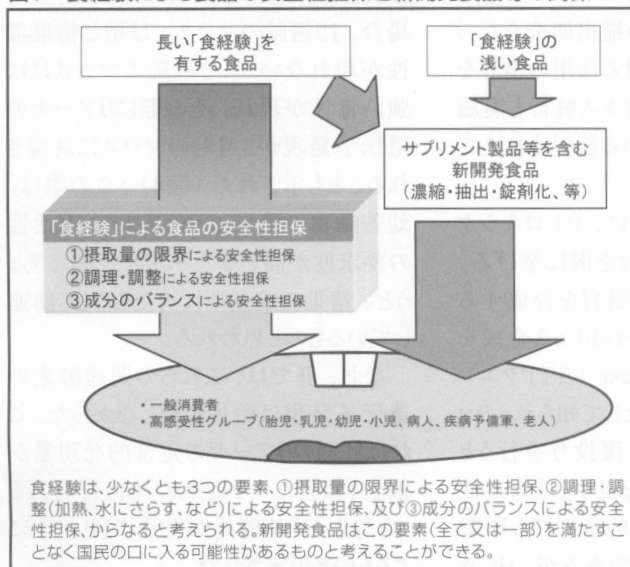
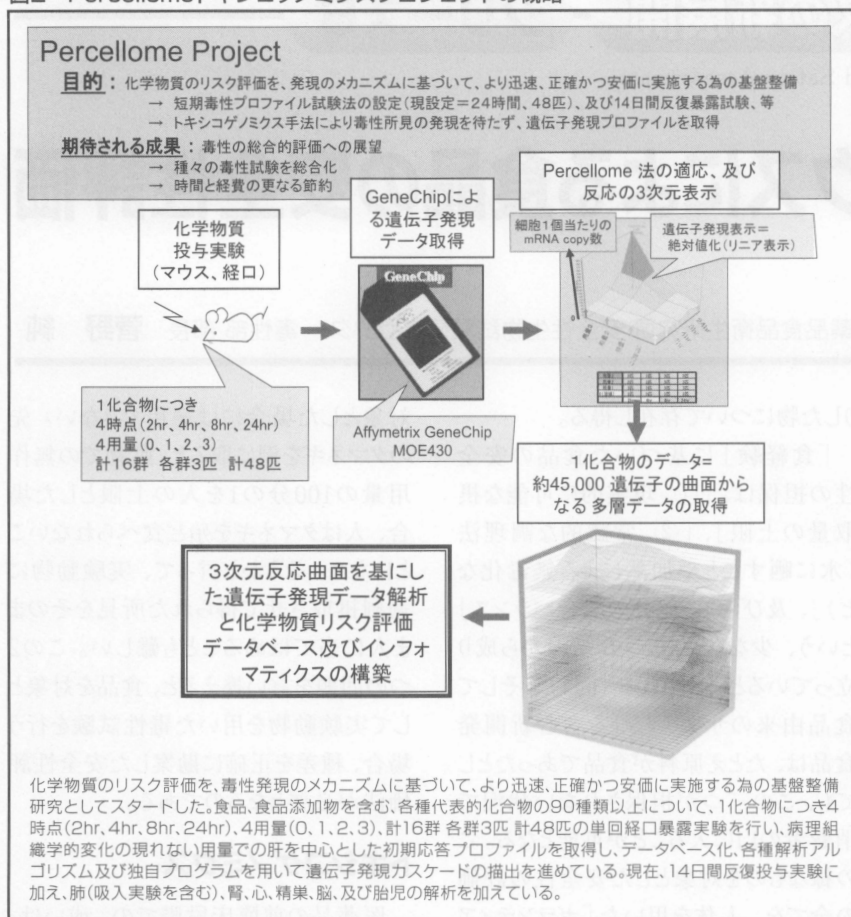


図2 Percellomeトキシコゲノミクスプロジェクトの概略



Percellome Projectと、その食品への応用

Percellome手法は、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個当たりのmRNA絶対量をマイクロアレイデータから生成する手法である。このことにより、サンプル間の比較が飛躍的に容易かつ正確に行えるようになるという利点を有する。これを生かしたPercellomeトキシコゲノミクスプロジェクトにおいては、経口的に摂取した物質が引き起こす肝臓等での初期の反応を遺伝子発現変動としてマイクロアレイ技術を用いて網羅的(約45,000プローブセット、約33,000遺伝子相当)にとらえ、データベース化するとともに、その解析を行っている。データベース中にはガルシニア、フォルスコリン、カフェイン、ゲニスタイン、CoQ10、 α リボ酸などの食品関連化学物質を含む、90種類以上の化学物質の単回投与データが含まれている。この単回投与実験の概要は以下の通りである: 雄12週齢C57BL/6マウスに、3段階の用量にて被検物質を経口単回投与後2、

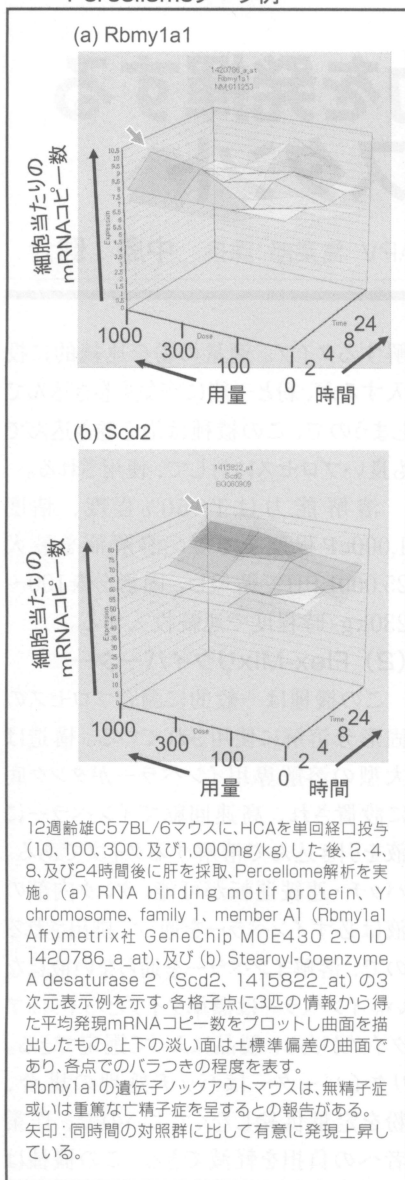
4、8、24時間後に検体採取する16群構成、各群3匹、1実験48匹規模の実験である。mRNAは、個体ごとに採取し、個体別に遺伝子発現プロファイルを得る(図2)。さらに、現在、14日間連続反復投与の影響を観測する実験を加えている。この手法を用いて、食品成分として問題となる化学物質、或いは入手の制限がある場合はその粗生成物について、生体反応のメカニズムに基礎を置いた生体反応のプロファイリングと発現遺伝カスケードの描出研究を行っている。また、人における作用の情報を加味したインフォマティクス解析も実施し、人への外挿に関わる検討を加えている。

ここでは、ごく簡潔に、ヒドロキシクエン酸(HCA)の検討を例に挙げる。HCAは、解糖系から脂質を合成する系の中央に位置しacetyl-CoA合成を司るATP-Citrate lyase(ATPクエン酸リアーゼ)の阻害剤として知られ、ラットやマウスに対して反復投与を行うと精巣に選択的に毒性を現す(精巣毒性を示す化合物は一般的に肝にも影響を与えることが多いのであるが、HCA

は例外である)。5週齢、雄C57BL/6マウスにHCAを3.31%含む飼料を90日間摂取させたと、セルトリ細胞を第一の標的とする精巣毒性が現れた。精巣の遺伝子発現解析を行ったところ、ATP citrate lyaseをはじめとする脂肪酸合成系の酵素(Fatty acid synthase, thiolase, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, Acyl-CoA desaturase等)の遺伝子発現が上昇していた。次いで、HCAの単回暴露実験を12週齢C57BL/6雄ラット(0、100、300、1,000mg/kg、溶媒CMC)を用いて実施したところ、24時間以内には精巣に形態学的変化(毒性)は現れなかったが、遺伝子発現には変動が観察され、RNA binding motif protein、Y chromosome、family 1、member A1(Rbmyl1)が2時間目、Acyl-CoA desaturase(SCD2)等が24時間目で上昇を示した(図3)。これに対しATP citrate lyaseの発現は殆ど変動しなかった。現段階では、リアーゼ阻害と精巣毒性の関連を説明する分子メカニズムは不明であるが、Rbmyl1遺伝子ノックアウトマウスは、無精子症或いは重篤な精子症を呈するとの報告があることから、投与直後から精子形成維持に関わる機構に影響を与えている可能性がある。他方、HCAの影響が顕在化するためには反復暴露が必要であることから、何らかの因子の枯渇或いは蓄積が必要であり、その段階に達するとリアーゼ活性の低下がフィードバック系を介してそのmRNA合成指令として現れるものと考えられる。また、HCA3.31%を含む飼料を28日間与えた場合、12週齢のマウスでは殆ど精巣毒性が現れないが、3週齢のマウスには強い毒性が現れ、その際にリアーゼの遺伝子発現が3週齢のマウスに誘導されることも示された(図4)。この事は、幼若動物の精巣におけるリアーゼ活性の要求度が高い事を示唆しており、ちょうど、精巣の成長期に当たることも関連しているものと思われる。

なお、肝では、これらの関連酵素の遺伝子発現は殆ど変動しなかった。これは肝でのリアーゼの定常的発現量が細胞1個当たりで精巣の10倍程度あること等から、予備能が十分に高いことによるものと想定された。

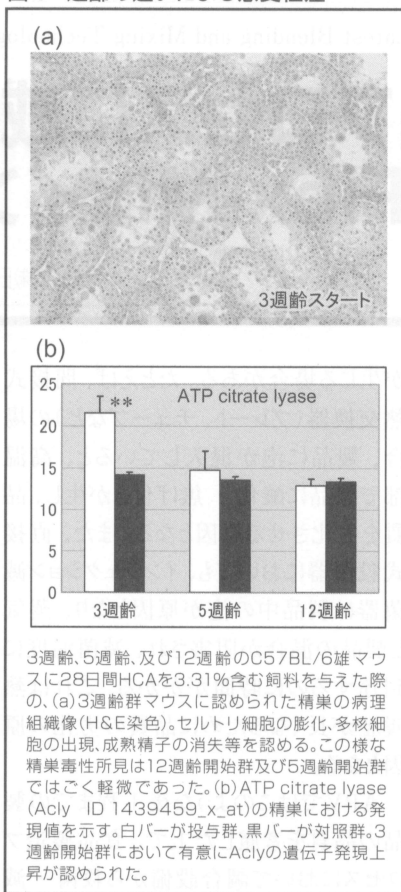
図3 HCAの単回経口暴露時の
Percellomeデータ例



まとめ

原料に「食経験」があるために安全であると言われるものは、従来の化学物質や医薬品等の毒性評価体系の対象から漏れているのが実情である。食品を対象とした当該トキシコゲノミクス研究は、その領域をカバーするものであり、緊急性をもって対処する際の科学

図4 週齢の違いによる感受性差



的な基盤となることが期待される。

また、健康被害が疑われた場合、従来の手順では、先ず成分分析を行い、責任成分の目星をつけ、その物質の合成、或いは抽出、精製を行い、そして、動物実験(毒性試験)による毒性検証へと進む。この時、責任成分の特定に時間を要する場合がある。そのような場合、疑われた食品が惹起する生体反応を遺伝子発現の立場からトキシコゲノミクスにより網羅的に解析し、データベースとの照合などを経て、毒性成分や毒性機構の推定を行うことで、責任成分特定を支援することが期待される。

効能を謳うものについては、製造者責任(PL)を問う形での規制が可能と

考えられる。しかし、現実的には効能をはっきりとは謳わない形での販売が主体である。よって、長期的には原材料食品そのものの成分情報(毒性情報を含む)を消費者へ周知することが、食の安全の確保に重要となると思われる。Percellome法を用いた食品トキシコゲノミクスが個別な毒性評価のみならず、そのような面においても貢献できればなお幸いである。

謝辞

本Percellome Projectの遂行に当たっては、当毒性部の全メンバー、特に松田菜恵、辻昌貴、森田紘一、今井あや子、安東朋子、安部麻紀、森山紀子、近藤優子、青柳千百合、相原妃佐子、渡辺忍の各氏の卓越した働きに感謝する。三次元Surface可視化及びそれを用いた解析ツール群のアルゴリズム開発は共著者の相崎健一主任研究官による。データベース関連、MADIC実装等のIT開発はNTTコムウェア、日本NCR(日本テラデータ)との共同研究による。本研究は厚生労働科学研究費補助金H13-生活-012、H13-生活-013、H14-トキシコ-001、H15-化学-002、H18-化学-一般-001、等による。

〈参考文献〉

- Kanno J, et al: "Per cell" normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays. BMC Genomics. 2006 Mar 29;7:64.
- 菅野 純ら、ゲノム毒性学: 形質非依存型トキシコゲノミクスの導入. 細胞工学2004年Vol. 23, No.6, pp. 685-693.
- 菅野 純ら、Percellome Projectによる毒性トランスクリプトミクスの新しい試み. 細胞工学2007年Vol. 26, No.1, pp.71-77.
- Matsumoto S, et al. Mass Distiributed Clustering: A New Clustering Algorithm for Repeated Measurements in Gene Expression Data. Genome Informatics 16 (2): 2005, 183~194.
- 相崎健一ら、Percellomeシステム. 月刊「細胞」、ニュー・サイエンス社 in press