遺伝子発現量データを用いた AOP に基づく肝毒性評価の可能性

赤堀有美,* 山下京介, 石田和也, 齋藤文代,† 中井 誠

Transcriptomics-driven Evaluation on Liver Toxicity Using Adverse Outcome Pathways (AOP)

Yumi Akahori,* Kyousuke Yamashita, Kazuya Ishida, Fumiyo Saito,† and Makoto Nakai

Chemicals Assessment and Research Center, Chemicals Evaluation and Research
Institute (CERI); 1-4-25 Kouraku, Bunkyo-ku, Tokyo 112-0004, Japan.

(Received August 1, 2019)

Because the liver is the primary target organ for chemicals and pharmaceuticals, evaluation of these substances' liver toxicity is of critical importance. New evaluation methods without animal testing (*i.e.*, *in vitro* and/or *in silico*) are eagerly anticipated, both for animal welfare and for decreasing cost. Also, the importance of mechanistic interpretation of the output derived from non-animal testing has been increasing. Accordingly, we investigated the potential for evaluating liver toxicity by applying the adverse outcome pathway (AOP) concept using gene set enrichment analysis (GSEA) from gene expression (GEx) data. A case study targeting hepatocellular fatty degeneration (HFD) is reported and discussed. We first identified the events detectable in an *in vitro* system by comparing the GEx data from the rat primary hepatocyte (*in vitro*) and rat liver (*in vivo*) treated with a chemical with the ability to induce HFD as one of the phenotypes in a 28-day repeated-dose toxicity test. Then, the scores based on GSEA were calculated after establishing the gene sets for each event leading to HFD. As a result, the mechanistic information leading to HFD was obtained from the score calculated based on the GSEA and the usefulness of the transcriptome-driven evaluation using AOP was demonstrated.

Key words—liver toxicity; gene set enrichment analysis; adverse outcome pathway

1. はじめに

肝臓は、代謝や解毒、胆汁の生成・分泌等を担う主要な臓器であり、肝臓における薬物代謝で生成する活性代謝物の影響等により毒性の標的となる可能性の高い臓器である。実際に、肝臓への影響は、医薬品だけでなく、一般化学物質の28日間反復投与毒性試験においても最も高頻度で認められる毒性影響となっている。¹⁾このように、化学物質等による肝臓への影響評価は非常に重要である。近年は動物愛護の観点、試験期間や費用の削減等のニーズの高まりから、*in vitro* 試験や *in silico* により肝毒性を評価することが望まれている。しかし、実験動物を使用しない評価を行う場合、毒性が引き起こされる可能性について、*in vitro* 試験や *in silico* により提

供される情報と毒性の表現型、すなわち有害性発現 (adverse outcome; AO) との生物学的関係性についての説明が必要になる。近年、この説明のための概念の1つとして、2010年に米国の Ankley ら²⁾が提案した、毒性 (有害影響) に至る生物学的な応答経路を整理する有害性発現経路 (adverse outcome pathway; AOP) がある。AOP は米国や欧州、経済協力開発機構 (Organisation for Economic Co-operation and Development; OECD) 等において受け入れられており、^{3,4)} OECD は米国や欧州の協力を得ながら、2012年から OECD プログラムの一環として AOP 開発を行っている。ここで、遺伝子発現量 (gene expression; GEx) データを扱うトランスクリプトーム解析は、一度に数万種類の mRNA の発現量測定が可能であり、網羅的に生物学的な応答が得られるため、AOP のフレームワークにおける活用も検討されている。⁵⁾しかし、AOP を構成する主要イベント (key event; KE) に関連する遺伝子 (群) やパスウェイを定量的に評価する方法の開発が課題の1つとして指摘されている。⁵⁾そこでわれわれは、

一般財団法人化学物質評価研究機構安全性評価技術研究所 (〒112-0004 東京都文京区後楽 1-4-25)

現所属: *岡山理科大学獣医学部獣医学科 (〒794-8555 愛媛県今治市いこの丘 1-3)

*e-mail: akahori-yumi@ceri.jp

本総説は、日本薬学会第139年会シンポジウム S52 で発表した内容を中心に記述したものである。

Table 1. Summary of Molecular Initiating Events (MIEs) and Key Events (KEs) from Existing AOPs for Steatosis/Fatty Liver

MIEs/KE	Items	Liver Steatosis AOP (<i>Homo sapiens</i>) [WikiPathway] ⁶⁾	Knapen <i>et al.</i> , 2018 ⁷⁾	AOPwiki/JRC report, 2012 ⁸⁾
MIEs	PPAR alpha	✓	✓	antagonism
	PPAR delta	✓		
	PPAR gamma	✓	✓	activation
	AhR	activation		agonism
	LXR	activation	✓	activation
	CAR	activation		
	PXR	activation	Cross-talk	activation
	FXR			
	RXR			
	ER			✓
	β -adrenergic receptor		✓	
	PI3K/AKT		✓	
KE	Increase of fatty acid intake		✓	
	Increase of <i>de novo</i> fatty acid synthesis	✓	✓	✓
	Inhibition of fatty acid oxidation	✓	✓	✓
	Fatty acid or lipid influx Activate lipogenesis	Fatty acid	Lipid	Fatty acid
	Fatty acid accumulation		✓	
	Triglyceride accumulation	✓	✓	✓

PI3K: phosphatidylinositol-3-kinase; AKT: protein kinase B; PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor; LXR: liver X receptor; CAR: constitutive androstane receptor; PXR: pregnane X receptor; FXR: farnesoid X receptor; RXR: retinoid X receptor; AhR: aryl hydrocarbon receptor; ER: estrogen receptor.

GEx で評価可能と考えられる肝毒性に係る KE を特定し、その KE に適用可能な遺伝子セットを作成した上で、gene set enrichment analysis (GSEA) を用いた KE の定量化を行い、肝毒性評価の可能性について検討した。また、実験動物を必要としない肝毒性評価系とするために、GSEA を行う際にはラット初代培養肝細胞 (rat primary hepatocyte; rPH) を用いた *in vitro* 試験由来の GEx を用いて検討を行った。本報告では、ケーススタディーとして、肝毒性のうち、脂肪性肝炎や肝硬変など重篤な肝機能障害につながる可能性がある肝細胞脂肪変性の解析例を紹介する。

2. 既存情報の収集

本検討を実施するにあたっては、まず WikiPathways⁶⁾ や文献情報に基づき、肝細胞脂肪変性を 1 つの表現型に持つ脂肪肝 (hepatic steatosis) に関する既存の AOP を収集した (Table 1).^{7,8)}

収集した AOP において複数の報告があった分子開始イベント (molecular initiating event; MIE) には、aryl hydrocarbon receptor (AhR), constitutive androstane receptor (CAR), liver X receptor (LXR), pregnane X receptor (PXR), peroxisome proliferator-activation receptor α (PPAR α) 及び PPAR γ があった。また、KE には、脂肪酸取り込みの増加、*de novo* 脂肪酸合成の亢進、脂肪酸の酸化抑制、脂質輸送の阻害及びトリグリセリドの蓄積があった。

3. 物質間で共通性のあるイベントの特定

AOP に包含される KE は個別物質特有のメカニズムではなく、他の物質の評価に利用できるようにするため、複数の物質において共通である必要がある。そこで、個別物質のラットの肝臓における *in vivo* の GEx データを解析することで、GEx データから評価可能であり、物質間で共通した KE を探索した。

Table 2. Summarized Protocols and Microarray Platform Used in Tox-Omics and Toxicogenomics Projects

Items	Tox-Omics Project	Toxicogenomics Project (TGP)
Experimental animals	CrI:CD (SD) rat (male) 5 week-old	CrI:CD (SD) rat (male) 6 week-old
Duration	Single dose (1 d) 7 d, 14 d and 28 d repeated dose	Single dose (1 d) 3 d, 7 d, 14 d and 28 d repeated dose
Route of administration	Gavage	Gavage
Treatment groups	Vehicle control, Low, High Dose. 4 animals/group for 1 d, 7 d and 14 d. 5 animals/group for 28 d.	Vehicle control, Low, Middle, High Dose. 5 animals/group.
Dose setting	Maximum tolerated dose was set at the high dose after a 7-day preliminary test. 1/5th of that dose was set as the low dose, in principle.	Maximum tolerated dose was set at the high dose after a 7-day preliminary test. The low, middle and high dose levels were set at the ratios of 1 : 3 : 10, in principle.
Anesthesia	CO ₂ /O ₂ gas anesthesia (CO ₂ : O ₂ =4 : 1)	Ether anesthesia
Observation items	<ul style="list-style-type: none"> • Clinical observations • Functional observations • Body weight • Food consumption • Urinalysis • Hematology • Blood chemistry • Organ weights • Macroscopic observation • Histopathology 	<ul style="list-style-type: none"> • Clinical observations — • Body weight • Food consumption • Urinalysis (occasionally) • Hematology • Blood chemistry • Organ weights (Liver and kidney) • Macroscopic observation (Liver and kidney) • Histopathology (Liver and kidney)
Sampling point	Single dose: 24 h after treatment Repeated dose: 24 h after final treatment	Single dose: 3, 9 and 24 h after treatment Repeated dose: 24 h after final treatment
Sampling organs	Liver, kidney	Liver, kidney
Microarray platform	Whole Rat Genome Microarray 8×60 K Toxplus ver. 2 (Agilent)	Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix)
Note	Microarray experiment; Three samples/group for 28 d were analyzed by microarray experiment. Three samples/group for 1 d, 7 d and 14 d were pooled for the microarray experiment.	Three samples/group for 1 d, 3 d, 7 d, 14 d and 28 d were analyzed by microarray experiment, in principle.

3-1. GEx 解析に使用したデータ *In vivo* GEx データとして、2011 年から 5 ヶ年で実施された経済産業省における「研究開発項目①遺伝子発現変動データから各種毒性の発現可能性を取得する手法の開発」事業 (Tox-Omics プロジェクト)⁹⁾ 及び独立行政法人医薬基盤研究所、国立医薬品食品衛生研究所及び製薬企業が参画したトキシコゲノミクスプロジェクト (Toxicogenomics Project; TGP)¹⁰⁾ において取得されたラットを用いた動物試験データ及び肝臓における GEx データを使用した。各プロジェクトの動物試験条件、マイクロアレイプラット

フォーム等を Table 2 に示す。

3-2. GEx 解析に基づく物質共通性のある KE の探索 解析に供した物質は、Tox-Omics 及び TGP で実施された 28 日までの反復投与毒性試験で肝細胞脂肪変性が認められた carbon tetrachloride (CCl₄), bromodichloromethane (BDCM), tetracycline (TC), coumarin (CMA) 及び ethinyl estradiol (EE) とした (Table 3)。さらに、TGP の 28 日までの反復投与毒性試験では肝細胞への脂肪蓄積は認められていないが、肝細胞への脂肪蓄積が既知の Ethionine¹¹⁾ を加えた 6 物質の肝臓における

Table 3. Summary of the Histopathological Findings of the Liver

Chemical name/Name of project		Low dose					Middle dose					High dose				
Findings	Grade	1 d	3 d	7 d	14 d	28 d	1 d	3 d	7 d	14 d	28 d	1 d	3 d	7 d	14 d	28 d
Carbon tetrachloride (CCl ₄) ^{a,b} /Tox-Omics		20 mg/kg/d										100 mg/kg/d				
	±	1/4		1/4			NA					4/4				
Degeneration, fatty/ Hepatocyte/Centrilobular	+		NA	3/4	4/4	5/5							NA	1/4	2/4	2/5
	++													3/4	2/4	2/5
	+++															1/5
Bromodichloromethane (BDCM) ^c /Tox-Omic		40 mg/kg/d										200 mg/kg/d				
	±						NA							2/4	4/4	
Degeneration, fatty/ Hepatocyte/Centrilobular	+		NA										NA	2/4		3/5
	++															2/5
Coumarin (CMA) ^d /TGP		15 mg/kg/d					50 mg/kg/d					150 mg/kg/d				
	±											2/5				
Degeneration, vacuolar/ Hepatocyte/Centrilobular	+											1/5 5/5				
Tetracycline (TC)/TGP		25 mg/kg/d					80 mg/kg/d					250 mg/kg/d				
	±											2/5 2/5				
Degeneration, vacuolar/ Hepatocyte/Midlobular																
Ethinyl estradiol (EE) ^e /TGP		1 mg/kg/d					3 mg/kg/d					10 mg/kg/d				
	±						1/5 2/5 3/5					3/5 2/5				
Degeneration, fatty/ Hepatocyte/Midlobular	+											2/5 2/5				
	++											1/5				

NA: Not applicable. ^a Necrosis/Hepatocyte/Focal was observed in one animal from the vehicle control group (1-day treatment). ^b Other findings in the CCl₄ treatment group: Degeneration, hydropic/Hepatocyte/Centrilobular; Mitosis increased; Single cell necrosis/Hepatocyte/Centrilobular; Necrosis/Hepatocyte/Focal; Microgranuloma. ^c Other findings in the BDCM group: Hypertrophy/Hepatocyte/Periportal; Hypertrophy/Hepatocyte/Centrilobular; Necrosis, single cell/Hepatocyte; Necrosis/Hepatocyte/Multifocal; Necrosis/Hepatocyte/Focal; Microgranuloma. ^d Other findings in the CMA treatment group: Hypertrophy/Hepatocyte/Centrilobular; Change, eosinophilic/Hepatocyte/Centrilobular; Necrosis, single cell/Hepatocyte/Centrilobular, Inclusion body/Hepatocyte/Diffuse. ^e Other findings in the EE treatment group: Hypertrophy/Hepatocyte/Centrilobular; Change, eosinophilic/Hepatocyte/Periportal; Single cell, necrosis/Hepatocyte; Proliferation/Kupffer cell/Diffuse; Dilatation/Sinusoid/Diffuse.

GEx データについて、Ingenuity® Pathways Analysis (IPA®) ソフトウェアによるパスウェイ解析及び機能解析を実施した。その結果、GEx 解析による物質共通性のある KE としてコレステロール生合成の亢進、ステロイド代謝亢進、アミノ酸代謝亢進及び炎症応答があった (Table 4)。また、ハロゲン化アルキルの CCl₄ 及び BDCM においては、脂肪蓄積からさらに重篤な脂肪性肝炎や線維化の一因となる炎症応答¹²⁾も確認できた。

なお、本検討では肝細胞における空胞変性 (Degeneration, vacuolar) 及び脂肪変性 (Degeneration, fatty) はいずれも肝細胞への脂肪蓄積として扱った。¹³⁾

4. ラット初代培養肝細胞 (rPH) の GEx を用いた GSEA

4-1. GSEA について GSEA は、個々の遺伝子ではなく、あらかじめ定義した遺伝子セット (例えば、AhR パスウェイに関連する遺伝子セットや炎症応答という機能に関連する遺伝子セット等) と実験で得られた遺伝子の間に統計学的に有意な差異があるかを検定することで、実験で得られた遺伝子の変化における生物学的意味等を解釈する方法である。^{14,15)} GSEA を行うためには、解析したい機能等に関する遺伝子セットが必要となるが、遺伝子セットを大規模に収載している Molecular Signature Database (MSigDB)¹⁶⁾ には、捉えたい現象を示す

Table 4. Summary of the Identified Key Events from Rat Liver Transcriptomics

Chemical Name/Project Name	Identified Key Events						
	Fatty acid metabolism (incl. β -oxidation)	Fatty acid transport	Cholesterol biosynthesis	Lipid transport	Steroid metabolism	Amino acid metabolism	Inflammation response
Carbon tetrachloride (CCl ₄)/Tox-Omics	▼	▼	△	▼		▼	△
Bromodichloromethane (BDCM)/Tox-Omics	▼	▼		▼	▼	▼	△
D,L-Ethionine (ET)/TGP	▼	▼	△	▼	▼	▼	
Coumarin (CMA)/TGP	▼			▼	▼	▼	
Tetracycline (TC)/TGP		▼	△				
Ethinyl estradiol (EE)/TGP	▼	▼		▼	▼	▼	

△: activated, ▼: repressed/inhibited.

遺伝子セットがない、あるいは個々の遺伝子セットが大き過ぎる等により、肝細胞脂肪変性に至る KE として適切な遺伝子セットがなく、新たに遺伝子セットを作成する必要が生じた。

4-2. GSEA のための遺伝子セットの作成

AOP に含まれる KE は、*in silico* 又は *in vitro* 試験で評価できることが望ましく、また、*in vitro* 試験を実施する場合には、コストの観点からはその数が少ないことが望ましい。そこで、Table 4 に示した *in vivo* (ラットの肝臓) の GEx から特定できた KE のうち、直接的な肝細胞における脂肪蓄積及び重篤化に関与している Fatty acid metabolism, Fatty acid/Lipid transport, Cholesterol biosynthesis, Inflammation response に加え、Table 1 において 3 つの既存 AOP に共通しており、GEx で捉えられる可能性があると考えられた *de novo* fatty acid synthesis の 5 つの KE について、GSEA のための遺伝子セットを以下の手順で作成した。なお、rPH における GEx は TGP においてのみ取得されていることから、遺伝子セットは TGP のデータを用いて作成した。

1) TGP でラット肝臓及び rPH における GEx データがある物質から 28 日間の反復投与で肝細胞脂肪変性が認められた物質あるいは脂肪肝を引き起こすことが知られている物質を選定した (6 物質; ET, CMA, EE, Ethionamide, Clomipra-

mine, 2-Bromoethylamine)。

2) 選定した物質の最高用量における *in vivo* 及び *in vitro* 試験の GEx データから変動遺伝子を抽出し、各系で共通して変動する遺伝子リストを作成した。

3) 遺伝子セットを作成する KE 毎に、論文情報の調査に加え、IPA[®]ソフトウェアを用いて関連遺伝子群を抽出した。

4) 2) で作成した遺伝子リストと及び 3) で抽出した関連遺伝子群を照合し、発現変動の大きさを考慮しつつ、被験物質の暴露により生じた応答と関連性の高い遺伝子に絞り込んだ。

5) 肝毒性の報告がない 4 物質 (Glibenclamide, Moxisylyte, Famotidine, Triazolam) において *in vivo* 及び *in vitro* 試験で共通で変動した遺伝子リスト (陰性物質遺伝子リスト) を作成し、陰性 2 物質以上で変動した遺伝子については、4) で作成したリストから除外して、最終的な遺伝子セットとした。

作成した遺伝子セットに含まれる遺伝子数を Table 5 に示す。

4-3. ラット初代培養肝細胞 (rPH) の GEx を用いた GSEA Broad Institute から提供されている GSEA のプログラム¹⁷⁾を用いて、normalized enrichment score (NES) 及び、遺伝子セットに含まれる遺伝子数に対して該当した遺伝子数の割合を示

Table 5. Gene Set Names and Number of Genes in Each Gene Set

Gene set name	No. of genes in each gene set
Inhibition of FA metabolism	121
Inhibition of Lipid Transport	36
Cholesterol Biosynthesis	36
<i>de novo</i> FA Synthesis	56
Inflammatory Response	19

FA: Fatty acid.

す Hit Ratio を算出した。遺伝子セット作成に用いた物質の結果を Fig. 1 に示す。NES では当該遺伝子セットに含まれる遺伝子群が全体として up-regulate 又は down-regulate されたかを正負の符号で表現されている。例えば、Fig. 1 に示す脂肪酸代謝の遺伝子セットはいずれの物質においても負の値を示しており、脂肪酸代謝が抑制されている可能性があることが示唆され、*in vivo* 系で検出された応答を

反映した結果が得られた。ここで、EE については、28 日間投与したラットの肝臓において肝細胞脂肪変性が認められているが、rPH の GEx を用いた GSEA の Hit Ratio が小さかったことから、今回使用した EE の *in vitro* 系の GEx データでは KE の応答が十分に捉えられていないことが分かった。そのため、エストロゲン受容体が介在すると考えられる肝細胞への脂肪蓄積については、今回選定した遺伝子セットでは評価できない可能性が考えられた。一方、陰性物質の 4 物質については、NES 及び Hit Ratio が算出されない又は、Hit Ratio が低く変動した遺伝子の数が少ない傾向があった。このことから、変動遺伝子数を指標とした Hit Ratio の値から KE の影響の強さが推定できる可能性があると考えられた。

さらに、遺伝子セット作成に使用していない、肝細胞脂肪変性の病理組織学的所見が認められた 9 物質 [Adapin, Amitriptyline, Azathioprine, CCl₄, Dil-

Fig. 1. Results of Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) for KEs to Evaluate Fatty Degeneration of Hepatocytes

^a“Category”: P: Positive for fatty degeneration of hepatocytes; N: Negative for fatty degeneration of hepatocytes; E: External chemicals. ^b“Dose”: Minimum dose at which fatty degeneration of the hepatocytes was observed in 28-day treatment. ^c“Concentration”: Highest concentration tested in rat primary hepatocytes. \$: Fatty degeneration of the hepatocytes in 28-day treatment was not observed. #: Minimum dose observed in TGP experiment. (Color figure can be accessed in the online version.)

tiazem, Hexachlorobenzene (HCB), Hydroxyzine, Imipramine, Theophylline] では, 7 物質において肝細胞における蓄積に関連すると考えられる KEs を, rPH の GEx に基づき NES 及び Hit Ratio としてスコア化できた. なお, CCl₄ については, *in vivo* では CYP2E1, CYP2B1 又は CYP2B2 により活性代謝物である CCl₃ ラジカルが生成すると考えられている.¹⁸⁾ しかし, rPH における 24 時間暴露の CYP2E1 及び CYP2B1/CYP2B2 の GEx を確認したところ, CYP2E1 及び CYP2B1/CYP2B2 はそれぞれ *in vivo* の約 1/15 及び約 1/12 程度であり, 活性代謝物が生成していない可能性が考えられた. また, HCB については, Fig. 1 に示すどの物質よりも対水溶解度が低く (0.0062 mg/L¹⁹⁾), 十分な濃度で試験が実施できていない可能性が考えられた.

5. まとめ

ラット肝臓における GEx の解析結果に基づき, GEx で評価可能と考えられる肝細胞脂肪変性に至るイベントを特定した. また, 特定したイベントについて rPH の GEx に基づく GSEA による評価ができる遺伝子セットを作成した. その結果, rPH の GEx に基づき算出されるスコアが *in vivo* 系で検出された亢進/抑制を反映した結果であったことから, これらの指標を肝毒性評価に利用できる可能性があると考えられた. 今後, GSEA スコア及び Tox21 等で取得されている *in vitro* 試験データ等を用いた肝毒性予測モデル構築の検討を行う. また, 科学的知見等の蓄積に応じて, 遺伝子セットの見直しを行うことで, より汎用性が広く, 高精度な肝毒性予測モデルへ高めていきたい.

謝辞 本研究の実施の共同研究者である, 一般財団法人化学物質評価研究機構の作永真由美氏及び大野文子氏に深く感謝する. 本研究の一部は, 経済産業省「材料の社会実装を支える高速・高効率な安全性評価技術の開発—毒性関連ビッグデータを用いた人工知能による次世代型安全性予測手法の開発—(AI-SHIPS プロジェクト)」の一環で実施したものである.

利益相反 開示すべき利益相反はない.

REFERENCES

- 1) Abe T., Kobayashi K., Nishikawa S., Yamada T., Hasegawa R., Sakuratani Y., Yamada H., Hirose A., Kamata E., Yoshida M., Sunouchi M., Honma M., Yamashita T., Sakai K., Yamazoe Y., Hayashi M., *PHARM STAGE*, **12**, 39–47 (2012).
- 2) Ankley G., Bennett R., Erickson R., Hoff D., Hornung M., Johnson R., Mount D., Nichols J., Russom C., Schmieder P., Serrano J., Tietge J., Villeneuve D., *Environ. Toxicol. Chem.*, **29**, 730–741 (2010).
- 3) Organisation for Economic Co-operation and Development. “Adverse Outcome Pathways, Molecular Screening and Toxicogenomics.”: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/adverse-outcome-pathways-molecular-screening-and-toxicogenomics.htm>, cited 17 July, 2019.
- 4) European Chemicals Agency, “Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment Chapter R.7a: Endpoint specific guidance,” Version 6.0, 2017.
- 5) Brockmeier E., Hodges G., Hutchinson T., *et al.*, *Toxicol. Sci.*, **158**, 252–262 (2017).
- 6) WikiPathways. “Liver Steatosis AOP (*Homo sapiens*)”: <https://www.wikipathways.org/index.php/Pathway:WP4010>, cited 17 July, 2019.
- 7) Knapen D., Angrish M., Fortin M., Katsiadaki I., Leonard M., Margiotto-Casaluci L., Munn S., O’Brien J., Pollesch N., Smith L., Zhang X., Villeneuve D., *Environ. Toxicol. Chem.*, **37**, 1723–1733 (2018).
- 8) Landesmann B., Goumenou M., Munn S., Whelan M., JRC Scientific and Policy Reports, JRC75689, 2012.
- 9) Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan. “Activities in Tox-Omics.”: http://www.cerij.or.jp/research_assistant_project/tox_omics.html, cited 17 July, 2019.
- 10) Uehara T., Ono A., Maruyama T., Kato I., Yamada H., Ohno Y., Urushidani T., *Mol. Nutr. Food Res.*, **54**, 218–227 (2010).
- 11) Puddu P., Calderera C., Marchetti M., *Biochem. J.*, **102**, 163–167 (1967).
- 12) Farrell G., van Rooyen D., Gan L., Chitturi

- S., *Gut Liver*, **6**, 149–171 (2012).
- 13) Thoolen B., Maronpot R., Harada T., Nyska A., Rousseaux C., Nolte T., Malarkey D., Kaufmann W., Küttler K., Deschl U., Nakae D., Gregson R., Vinlove M., Brix A., Singh B., Belpoggi F., Ward J., *Toxicol. Pathol.*, **38**, 5S–81S (2010).
- 14) Mootha V., Lindgren C., Eriksson K., *et al.*, *Nat. Genet.*, **34**, 267–273 (2003).
- 15) Subramanian A., Tamayo P., Mootha V., Mukherjee S., Ebert B., Gillette M., Paulovich A., Pomeroy S., Golub T., Lander E., Mesirov J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 15545–15550 (2005).
- 16) Broad Institute, Inc. “Molecular Signatures Database v6.2”: <http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/index.jsp>, cited 17 July, 2019.
- 17) Broad Institute, Inc. “Gene Set Enrichment Analysis”: <http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>, cited 17 July, 2019.
- 18) Weber L., Boll M., Stampfl A., *Crit. Rev. Toxicol.*, **33**, 105–136 (2003).
- 19) Farmer W., Yang M., Latery J., “Residual Management by Land Disposal: Proceedings of the Hazardous Waste Research Symposium,” 1976, pp. 177–185.