

**Table3 Primer sequence**

Gene	Primer	Sequence
Zp3	Forward	5' - TGGTGACAGCAAGGACTATAGCTG -3'
	Reverse	5' - GCAGCCATGGCAACTGTAGTAATTC -3'
$\beta$ -actin	Forward	5' - TTCCAGCCTTCCTTCTTGGGTAT -3'
	Reverse	5' - GTAATCTCCTTCTGCATCCTGTCAc-3'
c-myc	Forward	5' - CGTCTCCACTCACCAGCACCAGCACAACTA-3'
	Reverse	5' - GTTGTGTGTCCGCCTCTTGTGCGTT -3'
Ppar $\alpha$	Forward	5' - CCATACAGGAGAGCAGGGATTTGc-3'
	Reverse	<b>5' - CCATTTCGGTAGCAGGTAGTCTTAG -3'</b>
Cyp2E1	Forward	<b>5' - GCCCGTGTGTGTTGGAGAAG -3'</b>
	Reverse	5' - GATAATGATGGGCAGCAGGTCTCA -3'
Aox	Forward	5' - CCTGCTGGGTGTGGGTGTGTCA -3'
	Reverse	5' - GCTTCTTGGTGGGTGGGTGTTAA -3'
Catlase	Forward	5' - CTGGACAAGTACAACGCTGAGAAG-3'
	Reverse	5' - TTAGCTTTTCCCTTCGCAGCCATGT -3'
Cdc25a	Forward	5' - ACCCTGCCGTTACACTCTTCTG -3'
	Reverse	5' - CTCCCTTGCAGCCTATCTTTGG -3'
Ph	Forward	5' - AACCCCTTATTTTCAGCCCAGTCCTT -3'
	Reverse	5' - GAAGAACCCCATGACTGCAACTAG -3'

Table 5-A

	beta-actin		repeat				
Well	Name	Ct	StdDev Ct	MEAN	ΔCt	relative quantification value	
A1	beta-actin 2	27.62	5.05	27.31	1.38	0.38	
C1	beta-actin 2	27	5.05				
B2	beta-actin 6	23.36	1.6	24.18	-1.75	3.36	
C2	beta-actin 6	25	1.6				
A3	beta-actin 8	31.86	0.94	30.80	4.87	0.03	
B3	beta-actin 8	30.11	0.94				
C3	beta-actin 8	30.43	0.94				
A4	beta-actin 9	28.59	0.61	27.90	1.97	0.26	
B4	beta-actin 9	27.47	0.61				
C4	beta-actin 9	27.63	0.61				
A5	beta-actin 11	21.99	0.21	22.19	-3.73	13.30	
B5	beta-actin 11	22.18	0.21				
C5	beta-actin 11	22.41	0.21				
A6	beta-actin 12	24.15	0.8	24.73	-1.20	2.29	
B6	beta-actin 12	24.4	0.8				
C6	beta-actin 12	25.64	0.8				
A7	beta-actin 13	29.25	0.22	29.27	3.34	0.10	
B7	beta-actin 13	29.06	0.22				
C7	beta-actin 13	29.49	0.22				
A9	beta-actin 16	23.68	1.18	25.03	-0.90	1.86	
B9	beta-actin 16	25.62	1.18				
C9	beta-actin 16	25.79	1.18				
A10	beta-actin 17	25.49	0.38	25.93	0.00	1.00	
B10	beta-actin 17	26.22	0.38				
C10	beta-actin 17	26.07	0.38				

Table 5-B

CYP2E1															
Well	Name	Ct	StdDev	Ct	MEAN	Ct diff.(2E1)	Well	Name	Ct	StdDev	Ct	MEAN	Ct diff.(b-actin)	Ct diff.(2E1)-Ct diff.(b-actin)	relative quantity
C4	CYP2E1 2	14.31	0.07	14.24	-2.79	A1	beta actin-2	22.45	0.06	22.41	0.20	-2.99	7.96		
C5	CYP2E1 2	14.25	0.07			A2	beta actin-2	22.44	0.06						
C6	CYP2E1 2	14.17	0.07			A3	beta actin-2	22.35	0.06						
D4	CYP2E1 6	11.53	0.08	11.58	-5.46	B1	beta-actin 6	18.74	0.04	18.78	-3.43	-2.02	4.07		
D5	CYP2E1 6	11.54	0.08			B2	beta-actin 6	18.81	0.04						
D6	CYP2E1 6	11.67	0.08			B3	beta-actin 6	18.79	0.04						
E4	CYP2E1 8	18.63	0.17	18.73	1.69	C1	beta-actin 8	26.23	0.11	26.15	3.93	-2.24	4.72		
E5	CYP2E1 8	18.64	0.17			C2	beta-actin 8	26.18	0.11						
E6	CYP2E1 8	18.92	0.17			C3	beta-actin 8	26.03	0.11						
F4	CYP2E1 9	20.12	0.05	20.15	3.11	D1	beta-actin 9	26.09	0.30	25.97	3.76	-0.64	1.56		
F5	CYP2E1 9	20.21	0.05			D2	beta-actin 9	26.19	0.30						
F6	CYP2E1 9	20.12	0.05			D3	beta-actin 9	25.63	0.30						
G4	CYP2E1 11	17.06	0.03	17.07	0.04	E1	beta-actin 11	24.14	0.10	24.13	1.92	-1.88	3.68		
G5	CYP2E1 11	17.05	0.03			E2	beta-actin 11	24.22	0.10						
G6	CYP2E1 11	17.11	0.03			E3	beta-actin 11	24.03	0.10						
H4	CYP2E1 12	16.31	0.08	16.23	-0.80	F1	beta-actin 12	23.44	0.01	23.45	1.24	-2.04	4.12		
H5	CYP2E1 12	16.23	0.08			F2	beta-actin 12	23.46	0.01						
H6	CYP2E1 12	16.16	0.08			F3	beta-actin 12	23.46	0.01						
G10	Cyp2e1 13	23.18	0.35	22.95	5.91	G10	b-actin 13			27.68	5.47	0.44	0.74		
G11	Cyp2e1 13	22.55	0.35			G11	b-actin 13								
G12	Cyp2e1 13	23.12	0.35			G12	b-actin 13								
C7	CYP2E1 16	15.59	0.04	15.60	-1.44	A4	beta-actin 16	21.89	0.11	21.87	-0.34	-1.09	2.13		
C8	CYP2E1 16	15.56	0.04			A5	beta-actin 16	21.97	0.11						
C9	CYP2E1 16	15.65	0.04			A6	beta-actin 16	21.75	0.11						
D7	CYP2E1 17	17.05	0.01	17.04	0.00	B4	beta-actin 17	22.24	0.04	22.21	0.00	0.00	1.00		
D8	CYP2E1 17	17.03	0.01			B5	beta-actin 17	22.23	0.04						
D9	CYP2E1 17	17.03	0.01			B6	beta-actin 17	22.17	0.04						

Table 5-C

Ppara $\alpha$		Ct	StdDev Ct	MEAN	Ct. diff.(2E1)	Well	Name	Ct	StdDev Ct	MEAN	Ct diff.(b-actin)	Ct. diff.(2E1)-Ct. diff.(b-actin)	relative quantity
C4	Ppara 2	23.12	0.08	23.20	-0.95	A1	beta-actin-2	22.45	0.06	22.41	0.20	-1.15	2.22
C5	Ppara 2	23.28	0.08			A2	beta-actin-2	22.44	0.06				
C6	Ppara 2	23.21	0.08			A3	beta-actin-2	22.35	0.06				
D4	Ppara 6	19.97	0.04	20.02	-4.14	B1	beta-actin 6	18.74	0.04	18.78	-3.43	-0.71	1.63
D5	Ppara 6	20.04	0.04			B2	beta-actin 6	18.81	0.04				
D6	Ppara 6	20.04	0.04			B3	beta-actin 6	18.79	0.04				
E4	Ppara 8	27.07	0.12	27.19	3.04	C1	beta-actin 8	26.23	0.11	26.15	3.93	-0.90	1.86
E5	Ppara 8	27.20	0.12			C2	beta-actin 8	26.18	0.11				
E6	Ppara 8	27.31	0.12			C3	beta-actin 8	26.03	0.11				
F4	Ppara 9	27.41	0.06	27.47	3.32	D1	beta-actin 9	26.09	0.30	25.97	3.76	-0.44	1.36
F5	Ppara 9	27.48	0.06			D2	beta-actin 9	26.19	0.30				
F6	Ppara 9	27.53	0.06			D3	beta-actin 9	25.63	0.30				
G4	Ppara 11	26.09	0.06	26.02	1.87	E1	beta-actin 11	24.14	0.10	24.13	1.92	-0.05	1.04
G5	Ppara 11	25.98	0.06			E2	beta-actin 11	24.22	0.10				
G6	Ppara 11	26.00	0.06			E3	beta-actin 11	24.03	0.10				
H4	Ppara 12	24.59	0.04	24.64	0.48	F1	beta-actin 12	23.44	0.01	23.45	1.24	-0.76	1.69
H5	Ppara 12	24.66	0.04			F2	beta-actin 12	23.46	0.01				
H6	Ppara 12	24.67	0.04			F3	beta-actin 12	23.46	0.01				
A7	Ppara 13	29.12	0.23	29.37	5.22	G10	b-actin 13			27.68	5.47	-0.25	1.19
A8	Ppara 13	29.58	0.23			G11	b-actin 13						
A9	Ppara 13	29.42	0.23			G12	b-actin 13						
C7	Ppara 16	23.60	0.17	23.46	-0.70	A4	beta-actin 16	21.89	0.11	21.87	-0.34	-0.36	1.28
C8	Ppara 16	23.27	0.17			A5	beta-actin 16	21.97	0.11				
C9	Ppara 16	23.50	0.17			A6	beta-actin 16	21.75	0.11				
D7	Ppara 17	24.24	0.08	24.16	0.00	B4	beta-actin 17	22.24	0.04	22.21	0.00	0.00	1.00
D8	Ppara 17	24.16	0.08			B5	beta-actin 17	22.23	0.04				
D9	Ppara 17	24.07	0.08			B6	beta-actin 17	22.17	0.04				

Table 5-D

Cdc25A															
c	Name	Ct	StdDev	Ct	MEAN	Ct diff.(2E1)	Well	Name	Ct	StdDev	Ct	MEAN	Ct diff.(b-actin)	Ct diff.(2E1)-Ct diff.(b-actin)	relative quantity
E7	CDA25 2	27.82	0.07	27.90	-1.75	A1	beta-actin-2	22.45	0.06	22.41	0.20	-1.95	3.86		
E8	CDA25 2	27.95	0.07			A2	beta-actin-2	22.44	0.06						
E9	CDA25 2	27.93	0.07			A3	beta-actin-2	22.35	0.06						
F7	CDA25 6	25.18	0.05	25.15	-4.50	B1	beta-actin 6	18.74	0.04	18.78	-3.43	-1.07	2.09		
F8	CDA25 6	25.09	0.05			B2	beta-actin 6	18.81	0.04						
F9	CDA25 6	25.18	0.05			B3	beta-actin 6	18.79	0.04						
G7	CDA25 8	31.43	0.09	31.39	1.74	C1	beta-actin 8	26.23	0.11	26.15	3.93	-2.20	4.58		
G8	CDA25 8	31.44	0.09			C2	beta-actin 8	26.18	0.11						
G9	CDA25 8	31.29	0.09			C3	beta-actin 8	26.03	0.11						
H7	CDA25 9	31.99	0.22	32.06	2.41	D1	beta-actin 9	26.09	0.30	25.97	3.76	-1.34	2.54		
H8	CDA25 9	32.31	0.22			D2	beta-actin 9	26.19	0.30						
H9	CDA25 9	31.89	0.22			D3	beta-actin 9	25.63	0.30						
A10	CDA25 11	30.09	0.56	30.36	0.71	E1	beta-actin 11	24.14	0.10	24.13	1.92	-1.20	2.30		
A11	CDA25 11	29.99	0.56			E2	beta-actin 11	24.22	0.10						
A12	CDA25 11	31.01	0.56			E3	beta-actin 11	24.03	0.10						
B10	CDA25 12	29.80	0.09	29.69	0.04	F1	beta-actin 12	23.44	0.01	23.45	1.24	-1.20	2.30		
B11	CDA25 12	29.64	0.09			F2	beta-actin 12	23.46	0.01						
B12	CDA25 12	29.63	0.09			F3	beta-actin 12	23.46	0.01						
C10	CDA25 13	34.77	0.73	35.29	5.63	G10	b-actin 13			27.68	5.47	0.17	0.89		
C12	CDA25 13	35.80	0.73			G11	b-actin 13								
						G12	b-actin 13								
E10	CDA25 16	29.08	0.14	28.99	-0.66	A4	beta-actin 16	21.89	0.11	21.87	-0.34	-0.31	1.24		
E11	CDA25 16	28.83	0.14			A5	beta-actin 16	21.97	0.11						
E12	CDA25 16	29.07	0.14			A6	beta-actin 16	21.75	0.11						
F10	CDA25 17	29.41	0.32	29.65	0.00	B4	beta-actin 17	22.24	0.04	22.21	0.00	0.00	1.00		
F11	CDA25 17	29.53	0.32			B5	beta-actin 17	22.23	0.04						
F12	CDA25 17	30.01	0.32			B6	beta-actin 17	22.17	0.04						

Table 5-E

c-myc		reanalysis																	
Well	Name	Ct	StdDev	Ct	MEAN	Ct diff.(2E1)	Well	Name	Ct	tdDev	MEAN	Ct diff.(b-actin)	Ct diff.(2E1)-Ct diff.(b-actin)	relative quantity					
C4	c-myc 2	28.91	0.39	29.00	-1.60	A1	beta-actin 2	27.62	5.05	27.31	1.38	-2.98	7.91						
C5	c-myc 2	28.66	0.39																
C6	c-myc 2	29.42	0.39																
D4	c-myc 6	25.06	0.03	25.09	-5.50						24.18	-1.75	-3.76	13.52					
D5	c-myc 6	25.12	0.03				B2	beta-actin 6	23.36	1.6									
D6	c-myc 6	25.10	0.03				C2	beta-actin 6	25	1.6									
				#DIV/0!	#DIV/0!		A3	beta-actin 8	31.86	0.94	30.80	4.87	#DIV/0!	#DIV/0!					
							B3	beta-actin 8	30.11	0.94									
							C3	beta-actin 8	30.43	0.94									
				#DIV/0!	#DIV/0!		A4	beta-actin 9	28.59	0.61	27.90	1.97	#DIV/0!	#DIV/0!					
							B4	beta-actin 9	27.47	0.61									
							C4	beta-actin 9	27.63	0.61									
G4	c-myc 11	27.22	0.29	27.54	-3.05		A5	beta-actin 11	21.99	0.21	22.19	-3.73	0.68	0.62					
G5	c-myc 11	27.78	0.29				B5	beta-actin 11	22.18	0.21									
G6	c-myc 11	27.63	0.29				C5	beta-actin 11	22.41	0.21									
H4	c-myc 12	31.00	0.66	30.37	-0.23		A6	beta-actin 12	24.15	0.8	24.73	-1.20	0.97	0.51					
H5	c-myc 12	30.42	0.66				B6	beta-actin 12	24.4	0.8									
H6	c-myc 12	29.69	0.66				C6	beta-actin 12	25.64	0.8									
				#DIV/0!	#DIV/0!		A7	beta-actin 13	29.25	0.22	29.27								
							B7	beta-actin 13	29.06	0.22									
							C7	beta-actin 13	29.49	0.22									
C7	c-myc 16	30.04	0.06	30.11	-0.49		A9	beta-actin 16	23.68	1.18	25.03	-0.90	0.41	0.75					
C8	c-myc 16	30.13	0.06				B9	beta-actin 16	25.62	1.18									
C9	c-myc 16	30.15	0.06				C9	beta-actin 16	25.79	1.18									
D7	c-myc 17	30.65	0.11	30.60	0.00		A10	beta-actin 17	25.49	0.38	25.93	0.00	0.00	1.00					
D8	c-myc 17	30.67	0.11				B10	beta-actin 17	26.22	0.38									
D9	c-myc 17	30.47	0.11				C10	beta-actin 17	26.07	0.38									

Table 5-F

<b>catalase</b>		reanalysis													
Well	Name	Ct	StdDev Ct	MEAN	Ct diff.(2E1)	Well	Name	Ct	StdDev Ct	MEAN	Ct diff.(b-actin)	Ct diff.(2E1)-Ct diff.(b-actin)	relative quantity		
A1	catalase 2	19.94	0.05	19.99	-1.86	A1	beta-actin 2	27.62	5.05	27.31	1.38	-3.24	9.45		
A2	catalase 2	20.02	0.05												
A3	catalase 2	20.01	0.05			C1	beta-actin 2	27	5.05						
B1	catalase 6	16.42	0.03	16.38	-5.46					24.18	-1.75	-3.72	13.15		
B2	catalase 6	16.37	0.03			B2	beta-actin 6	23.36	1.6						
B3	catalase 6	16.36	0.03			C2	beta-actin 6	25	1.6						
C1	catalase 8	24.86	0.23	24.61	2.76	A3	beta-actin 8	31.86	0.94	30.80	4.87	-2.11	4.32		
C2	catalase 8	24.57	0.23			B3	beta-actin 8	30.11	0.94						
C3	catalase 8	24.40	0.23			C3	beta-actin 8	30.43	0.94						
D1	catalase 9	25.18	0.12	25.21	3.36	A4	beta-actin 9	28.59	0.61	27.90	1.97	1.39	0.38		
D2	catalase 9	25.34	0.12			B4	beta-actin 9	27.47	0.61						
D3	catalase 9	25.10	0.12			C4	beta-actin 9	27.63	0.61						
E1	catalase 11	19.34	0.14	19.50	-2.34	A5	beta-actin 11	21.99	0.21	22.19	-3.73	1.39	0.38		
E2	catalase 11	19.59	0.14			B5	beta-actin 11	22.18	0.21						
E3	catalase 11	19.58	0.14			C5	beta-actin 11	22.41	0.21						
F1	catalase 12	21.17	0.15	21.33	-0.52	A6	beta-actin 12	24.15	0.8	24.73	-1.20	0.68	0.62		
F2	catalase 12	21.34	0.15			B6	beta-actin 12	24.4	0.8						
F3	catalase 12	21.48	0.15			C6	beta-actin 12	25.64	0.8						
G1	catalase 13	27.41	0.06	27.43	5.58	A7	beta-actin 13	29.25	0.22	29.27	3.34	2.24	0.21		
G2	catalase 13	27.38	0.06			B7	beta-actin 13	29.06	0.22						
G3	catalase 13	27.50	0.06			C7	beta-actin 13	29.49	0.22						
A4	catalase 16	21.30	0.20	21.14	-0.70	A9	beta-actin 16	23.68	1.18	25.03	-0.90	0.19	0.87		
A5	catalase 16	20.91	0.20			B9	beta-actin 16	25.62	1.18						
A6	catalase 16	21.22	0.20			C9	beta-actin 16	25.79	1.18						
B4	catalase 17	21.78	0.19	21.85	0.00	A10	beta-actin 17	25.49	0.38	25.93	0.00	0.00	1.00		
B5	catalase 17	21.70	0.19			B10	beta-actin 17	26.22	0.38						
B6	catalase 17	22.06	0.19			C10	beta-actin 17	26.07	0.38						

Table 5-G

Aox		reanalysis																	
Well	Name	Ct	StdDev	Ct	MEAN	Ct diff.(2E1)	Well	Name	Ct	StdDev	Ct	MEAN	Ct diff.(b-actin)	Ct diff.(2E1)-Ct diff.(b-actin)	relative quantity				
E7	Aox 2	19.77	0.21	19.68	-2.74	A1	beta-actin 2	27.62	5.05	27.31	1.38	-4.12	17.39						
E8	Aox 2	19.83	0.21																
E9	Aox 2	19.44	0.21			C1	beta-actin 2	27	5.05	24.18	-1.75	-3.34	10.15						
F7	Aox 6	17.34	0.02	17.33	-5.09														
F8	Aox 6	17.30	0.02			B2	beta-actin 6	23.36	1.6										
F9	Aox 6	17.34	0.02			C2	beta-actin 6	25	1.6										
G7	Aox 8	25.33	0.06	25.36	2.94	A3	beta-actin 8	31.86	0.94	30.80	4.87	-1.93	3.82						
G8	Aox 8	25.31	0.06			B3	beta-actin 8	30.11	0.94										
G9	Aox 8	25.43	0.06			C3	beta-actin 8	30.43	0.94										
H7	Aox 9	25.86	0.06	25.87	3.46	A4	beta-actin 9	28.59	0.61	27.90	1.97	1.49	0.36						
H8	Aox 9	25.82	0.06			B4	beta-actin 9	27.47	0.61										
H9	Aox 9	25.94	0.06			C4	beta-actin 9	27.63	0.61										
A10	Aox 11	20.87	0.17	20.69	-1.73	A5	beta-actin 11	21.99	0.21	22.19	-3.73	2.01	0.25						
A11	Aox 11	20.67	0.17			B5	beta-actin 11	22.18	0.21										
A12	Aox 11	20.53	0.17			C5	beta-actin 11	22.41	0.21										
B10	Aox 12	22.38	0.18	22.24	-0.17	A6	beta-actin 12	24.15	0.8	24.73	-1.20	1.02	0.49						
B11	Aox 12	22.31	0.18			B6	beta-actin 12	24.4	0.8										
B12	Aox 12	22.04	0.18			C6	beta-actin 12	25.64	0.8										
C10	Aox 13	27.77	0.12	27.87	5.46	A7	beta-actin 13	29.25	0.22	29.27	3.34	2.12	0.23						
C11	Aox 13	27.84	0.12			B7	beta-actin 13	29.06	0.22										
C12	Aox 13	28.01	0.12			C7	beta-actin 13	29.49	0.22										
E10	Aox 16	21.89	0.08	21.81	-0.61	A9	beta-actin 16	23.68	1.18	25.03	-0.90	0.29	0.82						
E11	Aox 16	21.81	0.08			B9	beta-actin 16	25.62	1.18										
E12	Aox 16	21.73	0.08			C9	beta-actin 16	25.79	1.18										
F10	Aox 17	22.50	0.11	22.42	0.00	A10	beta-actin 17	25.49	0.38	25.93	0.00	0.00	1.00						
F11	Aox 17	22.45	0.11			B10	beta-actin 17	26.22	0.38										
F12	Aox 17	22.30	0.11			C10	beta-actin 17	26.07	0.38										



Table 6

sample No	Relative Quantity									
	exposure	$\beta$ -actin	Cyp2E1	Ppar $\alpha$	Cdc25A	c-myc	catalase	Aox		
17	control	1	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00		
16	control	1.27	2.13	1.28	1.24	0.75	0.87	0.82		
13	control	0.02	0.74	1.19	0.89	.	0.21	0.23		
12	low	0.42	4.12	1.69	2.30	0.51	0.62	0.49		
11	low	0.26	3.68	1.04	2.30	0.62	0.38	0.25		
9	low	0.07	1.56	1.36	2.54	.	0.38	0.36		
8	low	0.07	4.72	1.86	4.58	.	4.32	3.82		
6	high	10.8	4.07	1.63	2.09	13.52	13.15	10.15		
2	high	0.87	7.96	2.22	3.86	7.91	9.45	17.39		

## Reference

Ahn SJ, Costa J, Emanuel JR. (1996) PicoGreen quantitation of DNA: effective evaluation of samples pre- or post-PCR. *Nucleic Acids Res.* 1;24(13):2623-5.

Ashby,J., Brady,A., Elcombe,C.R., Elliott,B.M., Ishmael,J., Odum,J., Tugwood,J.D., Kettle,S. and Purchase,I.F. (1994) Mechanically-based human hazard assessment of peroxisome proliferator-induced hepatocarcinogenesis. *Hum. Exp. Toxicol.*, 13, 1–117

Borak J, Russi M, Puglisi JP. (2000) Meta-analyses of TCE carcinogenicity. *Environ Health Perspect.* 108(12):A542-4.

Bull RJ. (2000) Mode of action of liver tumor induction by trichloroethylene and its metabolites, trichloroacetate and dichloroacetate. *Environ Health Perspect.* May;108 Suppl 2:241-59.

Chen CW. (2000) Biologically based dose-response model for liver tumors induced by trichloroethylene. *Environ Health Perspect.* 108 Suppl 2:335-42.

Clewell HJ 3rd, Gentry PR, Covington TR, Gearhart JM. (2000) Development of a physiologically based pharmacokinetic model of trichloroethylene and its metabolites for use in risk assessment. *Environ Health Perspect.* 108 Suppl 2:283-305.

ECETOC (1994) *Trichloroethylene: Assessment of Human Carcinogenic Hazard*, Technical Report no. 60. ECETOC, Brussels, Belgium.

Enger O. (1996) Use of the fluorescent dye PicoGreen for quantification of PCR products after agarose gel electrophoresis. *Biotechniques.* 21(3):372-4.

Fisher JW. (2000) Physiologically based pharmacokinetic models for trichloroethylene and its oxidative metabolites. *Environ Health Perspect.* 108 Suppl 2:265-73.

Green,T. (1997) Trichloroethylene induced cancer in animals and its relevance to humans. *J. Occup. Health*, 39, 261–273.

Hanioka N, Omae E, Yoda R, Jinno H, Nishimura T, Ando M (1997) Effect of trichloroethylene on cytochrome P450 enzymes in the rat liver. *Bull Environ Contam*

*Toxicol.* 58(4):628-35.

Krey,G., Braissant,O., L'Horset,F., Kalkhoven,E., Perroud,M., Parker,M.G. and Wahli,W. (1997) Fatty acids, eicosanoids and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol. Endocrinol.*, 11, 779–791

Lash LH, Fisher JW, Lipscomb JC, Parker JC. (2000) Metabolism of trichloroethylene. *Environ Health Perspect.* 108 Suppl 2:177-200.

Lee,S.S., Pineau,T., Drago,J., Lee,E.J., Owens,J.W., Kroetz,D.L., Fernandez-Salguero,P.M., Westphal,H. and Gonzalez,F.J. (1995) Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol. Cell. Biol.*, 15, 3012–3022

Maotoni,C., Lefemine,G., Cotti,G. and Perino,G. (1988) Long-term carcinogenicity bioassays on trichloroethylene administration by inhalation to Sprague-Dawley rats and Swiss and B6C3F1 mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 534, 316–342

Moore MM, Harrington-Brock K. (2000) Mutagenicity of trichloroethylene and its metabolites: implications for the risk assessment of trichloroethylene. *Environ Health Perspect.* 108 Suppl 2:215-23.

Muralidhara S and Bruckner JV (1999) Simple method for rapid measurement of TCEchloroethylene and its major metabolites in biological samples. *J Chromatogr B* 732: 145-153

Nakajima T, Kamijo Y, Usuda N, Liang Y, Fukushima Y, Kametani K, Gonzalez FJ, Aoyama T (2000) Sex-dependent regulation of hepatic peroxisome proliferation in mice by trichloroethylene via peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). *Carcinogenesis.* 21(4):677-82.

Nakajima T, Wang RS, Elovaara E, Park SS, Gelboin HV, Vainio H. (1992) A comparative study on the contribution of cytochrome P450 isozymes to metabolism of benzene, toluene and trichloroethylene in rat liver. *Biochem Pharmacol.* 22;43(2):251-7.

Nakamoto T, Hase I, Imaoka S, Hiroi T, Oda Y, Asada A, Funae Y. (2000) Quantitative RT-PCR for CYP3A4 mRNA in human peripheral lymphocytes: induction of CYP3A4 in lymphocytes and in liver by rifampicin. *Pharmacogenetics*. 10(6):571-5.

NCI (1996) *Carcinogenesis Bioassay of Trichloroethylene*, Technical Report Series no. 2. DHEW publication no. (NIH) 76-802 (1976). US Department of Health, Education and Welfare, Washington, DC.

NTP (1983) *Carcinogenesis Bioassays of Trichloroethylene in F344 Rats and B6C3F1 Mice*, NIH Publication no. 82-1799. US Department of Health and Human Service, Research Triangle Park, NC.

Palmer,C.N., Hsu,M.H., Griffin,K.J., Raucy,J.L. and Johnson,E.F. (1998) Peroxisome proliferator activated receptor-alpha expression in human liver. *Mol. Pharmacol.*, 53, 14-22

Reddy,J.K. and Chu,R. (1996) Peroxisome proliferator-induced pleiotropic responses: pursuit of a phenomenon. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 804, 176-201

Rhomberg LR. (2000) Dose-response analyses of the carcinogenic effects of trichloroethylene in experimental animals. *Environ Health Perspect*. 108 Suppl 2:343-58.

Rodriguez-Antona C, Jover R, Gomez-Lechon MJ, Castell JV. Related Articles (2000) Quantitative RT-PCR measurement of human cytochrome P-450s: application to drug induction studies. *Arch Biochem Biophys*. 1;376(1):109-16

Scott CS, Coglianò VJ. (2000) Trichloroethylene and cancer: epidemiologic evidence *Environ Health Perspect*. 108 Suppl 2:159-60

Singer VL, Jones LJ, Yue ST, Haugland RP. Related Articles (1997) Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation. *Anal Biochem*. 1;249(2):228-38.

Soni MG, Ramaiah SK, Mumtaz MM, Clewell H, Mehendale HM (1999) Toxicant-inflicted injury and stimulated tissue repair are opposing toxicodynamic forces in predictive toxicology. *Regul Toxicol Pharmacol.*;29(2 Pt 1):165-74.

Soni MG, Mangipudy RS, Mumtaz MM, Mehendale HM (1998) Tissue repair response as a function of dose during trichloroethylene hepatotoxicity. *Toxicol Sci.* 42(2):158-65

Sumida A, Fukuen S, Yamamoto I, Matsuda H, Naohara M, Azuma J. (2000) Quantitative analysis of constitutive and inducible CYPs mRNA expression in the HepG2 cell line using reverse transcription-competitive PCR. *Biochem Biophys Res Commun.* 27;267(3):756-60 21(3):372-4.

Tao L, Ge R, Xie M, Kramer PM, Pereira MA (2000) Effect of trichloroethylene on DNA methylation and expression of early-intermediate protooncogenes in the liver of B6C3F1 mice. *J Biochem Mol Toxicol.* 13(5):231-7

Tao L, Yang S, Xie M, Kramer PM, Pereira MA (2000) Effect of trichloroethylene and its metabolites, dichloroacetic acid and trichloroacetic acid, on the methylation and expression of c-Jun and c-Myc protooncogenes in mouse liver: prevention by methionine. *Toxicol Sci.* 54(2):399-407

Umezumi T, Yonemoto J, Soma Y, Miura T (1997) Behavioral effects of trichloroethylene and tetrachloroethylene in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 58(3):665-71.

Wartenberg D, Reyner D, Scott CS. (2000) Trichloroethylene and cancer: epidemiologic evidence. *Environ Health Perspect.* 108 Suppl 2:161-76.

### I - 3. 「変異原」

#### I - 3 - 1. 「ブレオマイシンによる遺伝子発現の研究」

**要旨** DNA鎖の断列は付加体の形成とともに重要なゲノムへのダメージである。ブレオマイシン（以下、BLM）は”Radio-mimetic”drugと呼ばれ、電離放射線に似たDNA鎖の切断を引き起こす。DNAチップによる発現の比較では、BLM7.5  $\mu$ g/ml処理群と30  $\mu$ g/ml処理群で、それぞれ102と16のプローブ（遺伝子）に生物学的にも意味があると考えられる変化がみられた。これら全てについて解釈することは難しいが、共通にup regulateされたものには、インターフェロンの細胞増殖抑制作用を媒介するinterferon-inducible RNA-dependent protein kinase (Pkr)、アポトーシス関連のWSL-LR、WSL-S1、WSL-S2、抗がん剤の投与で誘導され、細胞の異物への反応と考えられた90-kDa heat-shock proteinがあり、とくにPkrは200~300倍のup regulationであった。7.5  $\mu$ g/ml処理群でup regulateされたものには2本鎖DNA断裂を修復する因子の一つであるKu80、酸化ストレスによって水酸化されたグアニン残基をDNAから切り離すOGG1などがある。なお、BLMも酸化ストレスを与えることが報告されている。30  $\mu$ g/ml処理群ではアポトーシスを誘導するTRAILの受容体であるTRAIL receptor 2がup regulateされたほか、PHAなどでT-cellを刺激した時にCDKファミリーのなかで最も初期に誘導されるcdk6がdown regulateされた。ゲノムへの損傷があった場合には、細胞周期が止まり、この間に損傷の修復が行われる。もし、損傷が大きく修復不能である場合にはアポトーシスが誘導され、間違った遺伝情報が伝わらないようになっていると言われている。BLMは10  $\mu$ g/ml以上の濃度ではcytotoxicであるとされおり、今回の実験でも7.5  $\mu$ g/ml処理群と30  $\mu$ g/ml処理群の2濃度を設定した。BLM投与によりcell-cycleが抑えられ、低濃度では主として修復関連遺伝子のup regulationがみられ、高濃度ではapoptosis関連遺伝子のup regulationがみられるという仮説を立てた。一部に矛盾する点も残るものの、DNAチップによる結果は、細胞増殖を抑制する遺伝子のup regulationがみられるなど、仮説に近いものと考えられた。なお、PCRを利用して遺伝子のcDNA中のコピー数を推定する方法ではDNAチップと同様の結果が得られなかったが、理由の一つに補正法の違いが考えられた。

DNA鎖の断列は付加体の形成とともに重要なゲノムへのダメージである。2本鎖DNAの切断は組換え修復かnon-homologous end joiningによって修復される。ブレオマイシン（以下、BLM）は、Streptomyces verticillusから得られる抗がん剤であり、悪性リンパ腫などに適応があり、抗がん剤抗生物質に分類される。BLMは、約200種類の化合物の混合物であり、それらは、アミンの部分異なっている。BLMは、低い濃度では脱塩基を起こし、とくにチミン残基のところでこの性質が著しい<sup>1)</sup>。脱塩基を起こした部位ではDNA鎖の切断がみられる。一旦、DNA鎖の切断が起こった部位はその反対側もBLMの作用を受けやすいと言われ、結果としてdouble-strand breakがみられ

る。double-strand breakが電離放射線に特徴的な現象であることから、BLMは“radio-mimetic”drugと呼ばれている。近年ではがん患者の変異原への修復能の違いを検出するため、患者のリンパ球をBLMに曝露させて、その影響をコントロール群と比較検討している論文もある。DNA鎖切断後の修復因子関連遺伝子やその他の遺伝子の発現の変動を知る目的でBLMをリンパ球に曝露し、得られたRNAをDNAチップにハイブリダイゼーションした。

##### I - 3 - 1 - 1.

ブレオマイシン中毒量における cell viability

BLMは10  $\mu$ g/ml以上の濃度では

cytotoxic であるとされている。製造メーカーの付属書類では細胞の選択を行うのに 10~100  $\mu\text{g/ml}$  の濃度の BLM を使用するよう勧めている。DNA チップによる実験では、10  $\mu\text{g/ml}$  を挟んだ 7.5  $\mu\text{g/ml}$  と 30  $\mu\text{g/ml}$  の濃度でリンパ球を処理する予定であったので、30  $\mu\text{g/ml}$  の濃度における time-course study を行った。

#### 材料と方法

**リンパ球の分離** ヘパリン入り採血管を用いて手背静脈より採血を行い、Phicoll-Paque Plus (Amasham-Pharmacia) のマニュアルに従ってリンパ球の分離を行った。リンパ球は、最終的に 1 群あたり 2 ml の無血清 RPMI1640 培地 (Gibco BRL) に浮遊させた。

なお、本研究で使用している血液はすべて研究者自身のものである。

**ブレオマイシン処理** リンパ球は、分離後直ちに 37°C の water bath に写し、5 分間インキュベートした後、ブレオマイシン (Sigma) を 30  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で添加、混和し、37°C で 1 時間インキュベートした。インキュベーション終了後、無血清 RPMI1640 培地で 2 回洗ったのち、10% FBS (Gibco BRL) 添加 RPMI1640 培地 (ペニシリン、ストレプトマイシン) 2 ml に浮遊させ、底面積 25  $\text{cm}^2$  のカルチャーボトル (Falcon) に撒いて 37°C、5%  $\text{CO}_2$  の条件で培養した。コントロール群では、ブレオマイシンの投与以外の処置をまったく同様に行った。

**細胞数の計測** 24、48、72 時間後に培養液をよく混和したのち、少量を取り、トリパンブルー染色液 (Gibco BRL) を 25 対 1 の割合で加え、ヘモサイトメーターを用いて検鏡、計測し、平均と 95% 信頼区間を計算した。

**結果と考察** 細胞数の推移を Table 1 に示す。なお、表中の値は、ヘモサイトメーターの値である。30  $\mu\text{g/ml}$  群の細胞数の低下は 72 時間後になって有意となった。なお、一群あたりの初期リンパ球数は  $6 \times 10^5$  個であった。BLM はアポトーシスを引き起こすとされている。アポトーシスには細胞膜の酸化による「はやい」のものと「おそ

い」ものがあるとされているが、BLM は後者に属する。3 日目に細胞数の減少が見られたことは BLM が「おそい」アポトーシスを引き起こすことと矛盾しない結果であった。

#### I - 3 - 1 - 2.

#### DNA チップによる expression profile の解析

DNA 鎖の断裂による遺伝子の発現の変化を見るためリンパ球を BLM に曝露し、24 時間後に細胞を回収、total RNA を抽出してハイブリダイゼーションを行った。

BLM は 10  $\mu\text{g/ml}$  以上の濃度で cytotoxic であるといわれている。ゲノムへの損傷があった場合には、細胞周期が止まり、この間に損傷の修復が行われる。もし、損傷が大きく修復不能である場合にはアポトーシスが誘導され、間違った遺伝情報が伝わらないようになっていっているとされている。そこで、今回の実験でも 10  $\mu\text{g/ml}$  前後の 2 濃度を設定した。低濃度では主として修復関連遺伝子の up regulation がみられ、高濃度では apoptosis 関連遺伝子の up regulation がみられるのではないかという仮説を立てた。また、曝露から回収までの時間は、電離放射線によるリンパ球の遺伝子の発現の変化が、曝露後 24 時間でもっとも顕著であったこと、がんの cell line を紫外線に曝露させた実験では、曝露 6 時間で修復関連因子として p21 の発現のみが up regulate されたことを参考に 24 時間とした。

#### 材料と方法

**リンパ球の分離** ヘパリン入り採血管を用いて手背静脈より採血を行い、Phicoll-Paque Plus (Amasham-Pharmacia) のマニュアルに従ってリンパ球の分離を行った。リンパ球は、最終的に 1 群あたり 10 ml の無血清 RPMI1640 培地 (Gibco BRL) に浮遊させた。

**ブレオマイシン処理** 分離後直ちに直径 10 cm のペトリディッシュ 2 枚に 5 ml ずつリンパ球を播き、ブレオマイシン (Sigma)

を 7.5  $\mu$ g/ml および 30  $\mu$ g/ml の濃度で添加、混和し、37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件で1時間インキュベートした。インキュベーション終了後、無血清 RPMI1640 培地で2回洗ったのち、10%FBS(Gibco BRL)添加 RPMI1640 培地 (ペニシリン 100  $\mu$ g/ml、ストレプトマイシン 100  $\mu$ g/ml) 2ml に浮遊させ、再び 37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件で 24 時間培養した。コントロール群では、ブレオマイシンの投与以外の処置をまったく同様に行った。

**total RNA の抽出** total RNA の抽出は、RNA easy mini kit (Qiagen) によった。24 時間後に静かに培養液を取り除き、1 ディッシュあたり 600  $\mu$ l の Buffer RLT を加え、万遍無くディッシュ全体に行き渡らせた後、静置した。取り除いた培養液は 300g で 5 分間遠心し、上清を取り除いたのち、ディッシュの TLR 溶液でペレットを溶解し、-80°C で保存した。total RNA の抽出はキットに添付のマニュアルに従った。

## 2 本鎖 cDNA の調製

2 本鎖 DNA の合成には、SuperScript Choice System (Gibco BRL) を用いた。詳細は添付のマニュアルに従った。また、Affimetrix 社の Expression Analysis Technical Manual も参照した。

**cRNA の調製** in vitro transcription には市販のキット (ENZO BioArray Terminal Labeling Kit) を用いた。詳細は使用説明書に従い、Affimetrix 社の Expression Analysis Technical Manual も参照した。

**ハイブリダイゼーション** ハイブリダイゼーションには、DNA チップとして HumanGenomeU95A を用いて 45°C で毎分 60 回転させながら、16 時間インキュベートした。詳細は Affimetrix 社の Expression Analysis Technical Manual に従った。

**Wash と Staining** wash と staining には fluidics station を用いた。詳細は Affimetrix 社の Expression Analysis Technical Manual に従った。

**Scanning と解析** Wash と Staining 終了後、専用の scanner で各プローブのシグナルを読み取った。解析は Microarray suite 4.0 (Affimetrix) と GeneSpring (Silicon

Genetics) によった。標準化は Microarray suite の use all probe set モードを選択した。コントロール群と 7.5  $\mu$ g/ml 処理群、コントロール群と 30  $\mu$ g/ml 処理群の比較を行い、両者の間で発現に 4 倍以上差のあるプローブ (遺伝子) を抽出した。

## 結果と考察

リンパ球より total RNA を抽出、コントロール群、7.5  $\mu$ g/ml 処理群、30  $\mu$ g/ml 処理群で、それぞれの RNA から最終的に cRNA が合成され、その半量が精製された。一部はアガロースゲルで観察するため、そのままにし、残りは fragmentation を行った。Figure 1 に fragmentation 前後の cRNA の電気泳動像を示す。

GeneChip をスキャナーで読み取らせた結果が Figure 2、3、4 である。これをもとにコントロール群と 7.5  $\mu$ g/ml 処理群、コントロール群と 30  $\mu$ g/ml 処理群の散布図を作製した (Figure 5、6)。コントロール群と 7.5  $\mu$ g/ml 処理群を比較して、4 倍以上の変動の見られたプローブを Table 2 に示す。このうち、生物学的に意味のあると考えられる (A) 遺伝子の発現が up regulate (I) しているもので少なくとも BLM 処理群で発現 (P) しているもの、または、(B) 遺伝子の発現が down regulate (D) しているもので、少なくともコントロール群で発現 (P) しているものを境界域 (M) も含めて Table 3 に示す。up regulate された 102 のプローブすべてについて説明することは困難であるが、これらを幾つかのグループに分類することは可能である。まず、特記すべき点として修復関連遺伝子である Ku80 が境界域ながら up regulate されていたことが挙げられる。2 本鎖 DNA 断裂は non-homologous end joining または組換え修復によって修復される。Ku80 は Ku70 とともに heterodimer を形成し、heterodimer は、DNA-PKcs とともに non-homologous end joining を行う。哺乳類では non-homologous end joining と組換え修復のうち non-homologous end joining が優位であるといわれている。このほか、



修復関連遺伝子で up regulate されたものに OGG1 がある。OGG1 は酸化ストレスなどによって水酸化された DNA 中のグアニン残基を DNA から切り離す働きがある。数は多くないが BLM が 2 価の鉄イオンとともに酸化ストレスの指標である 8-hydroxy-2'-deoxyguansine を増加させたという報告があるので<sup>2-3)</sup>、OGG1 の up regulation も矛盾しない結果と考えられる。2 年目には紫外線暴露の際の 8-hydroxy-2'-deoxyguansine の形成について調べる予定であるので、BLM を投与したリンパ球における 8-hydroxy-2'-deoxyguansine についても検討し、OGG1 との関連を検討したい。oxidative stress への抵抗性を高めるものとして知られている 60S Ribosomal Protein RPL10A が up regulate されていたことも酸化ストレスが実際に加わっていたことを示唆している可能性がある。90-kDa heat-shock protein も up regulate されていた。heat-shock protein は低酸素状態のほか、xenobiotics への暴露の際に働くとして知られているが、90-kDa heat-shock protein は抗がん剤の投与により発現が亢進することが報告されており BLM 投与に対するリンパ球の反応と考えられた。

変異原に暴露された際には cell-cycle が止まって時間を稼ぎ、その間に修復が行われるという。BLM の毒性と関連して注目されるのが、細胞の分裂、増殖を抑える働きのある遺伝子である。interferon-inducible RNA-dependent protein kinase (以下、Pkr) がこれにあたり 200 倍以上の up regulation がみられた。Pkr は、インターフェロンの増殖抑制作用を仲介しているとされている蛋白である。Pkr との関連で gamma-interferon-inducible protein (IP-30) も関連している可能性が考えられた。その他、内皮細胞が分化誘導されるときに down-regulated される EDF-1、細胞増殖を妨げる contact inhibition に関与するとされる calgizzarin も up regulate されていた。

acid ceramidase は overexpression により TNF が誘導する細胞死から細胞を保護

するといわれており、BLM 投与の際にも cell-cycle が止まっている間、細胞死にブレーキをかけている可能性が考えられた。

ユビキチンには p53 その他の cell-cycle controlling 蛋白を分解する働きがある。7.5  $\mu$ g/ml 処理群では ubiquitin 自身のほか、ユビキチンのリガンドである ribosomal protein L28、ユビキチンと相互作用のある lysosomal-associated multitransmembrane protein (LAPtm5) が up regulate されていた。ユビキチン-26S proteasome 系は p53 を分解するが proteasome のアクチベーターである hPA28 の beta サブユニットも up regulate されていた。ユビキチンとその関連遺伝子の up regulate は cell cycle が回転する方向への動きであり、一見奇妙にも見えるが、これによって cell-cycle のバランスが保たれている可能性が考えられた。

アポトーシス関連蛋白として up regulate されていたものに WSL-LR, WSL-S1 および WSL-S2 がある。tau protein kinase CDK5/P20 はヒートショックによるアポトーシスに関連するほか細胞内骨格や細胞接着をコントロールしている。7.5  $\mu$ g/ml 処理群は、BLM による損傷ののち修復へ向かう群として濃度を設定した。しかし、暴露後 24 時間という時点では、BLM の作用によりリンパ球は「修復」と「自爆」の間でゆれている状態とも考えられ、このように考えるとアポトーシス関連蛋白の up regulate も不自然ではないように考えられた。

RNA を得る素材としてリンパ球（血液中の単核球）を用いているので、これに由来するものが多くみられる。T-cell specific antigen、lymphocyte-specific protein 1 (LSP1)、cDNA clone similar to CAMPATH-1、lymphocyte antigen (HLA-G1)、IgM heavy chain constant region などがこれにあたる。生物学的意義は不明であるが、actin などの線維、細胞内骨格に関連するものも up regulate されていた。elongation factor EF-1-alpha、profilin、rho GDP-dissociation Inhibitor 2 である。アポ

トーススの項で取り上げた CDK5/P20 と何らかの関連がある可能性も考えられた。そのほか、Wilms tumor 関連蛋白であり、tumor suppressor として知られる QM、がん遺伝子 longation factor 1-alpha 1 (PTI-1) も up regulate された。PTI-1 は、がんの cell line にビンクリスチンなどを投与した際に、抗がん剤耐性株で 90-kDa heat-shock protein とともに up regulate されたことが報告されている<sup>4)</sup>。

なお、down regulate された3つの遺伝子の意義は不明であった。

コントロール群と 30  $\mu$ g/ml 処理群を比較して DNA チップ上の反応強度すなわち遺伝子の発現量に有意 (4 倍以上) な変化が見られたものは Table 4 のとおりであった。

これらのうち、Abs Call (Absolute Call) 欄がコントロールで既に A (Absent) であってそれが曝露により減少して A (Absent) となっているものは信頼性が低いものとして除外すると、有意な発現量の変化を示す遺伝子は Table 5 のとおりであった。

これらの 16 のプローブの中で、高濃度曝露後 5 倍に増加した TRAIL receptor 2 の発現量変化は、高濃度のブレオマイシンにより細胞のアポトーシスが誘導された可能性を示唆するので以下に考察を加える。

TNF family のサイトカインとそれに対応する受容体はアポトーシスを強力に誘導する物質として知られており、そのうちの一つである Fas はリガンドが結合することで 3 量体化し、アダプター蛋白である FADD を呼び寄せて procaspase-8 を活性化させる<sup>5)</sup>。TRAIL は最も新しく発見された TNF family の一員であり、さまざまな種類の癌細胞にアポトーシスを誘導しうるが、正常細胞には誘導しないことが知られている<sup>6)</sup>。TRAIL は TRAIL receptor 1 と TRAIL receptor 2 を介してアポトーシスを誘導し、その過程で Fas と同様に FADD と procaspase-8 が関与していることが明らかにされた<sup>7)</sup>。本実験で使用した細胞は正常細胞であり、また procaspase-8 の発現量は変化していないことから、アポトーシスが誘導されたと結論付けることはでき

ないが、ブレオマイシンと同様に DNA 障害を引き起こすアドリアマイシンやエトポシドの投与により TRAIL receptor 2 の発現量は増加することが報告されており<sup>8)</sup>、本実験の結果もブレオマイシンによる DNA 障害に対する反応を見ているものと考えられる。

また、同じアポトーシス関連遺伝子として WSL-LR, WSL-S1 および WSL-S2 も 7.5  $\mu$ g/ml 処理群と同様に up regulate されていた。

down regulate された遺伝子のなかでは PLSTIRE 蛋白 (cdk6) が注目される<sup>9)</sup>。cdk 6 は、cdk4 とホモロジーがあり、PHA などで T リンパ球を刺激した際に、cdk ファミリーのなかで最も初期に誘導される蛋白である。7.5  $\mu$ g/ml 処理群でも up regulate された Pkr は、30  $\mu$ g/ml 処理群でも 300 倍の up regulation がみられたが、これと併せて細胞増殖に抑制がかかっているものと考えられた。

### I - 3 - 1 - 3.

#### RT-PCR 法による遺伝子発現の解析

PCR では cell-cycle のコントロール機構のなかで p53 の下流に位置する p21、2 本鎖 DNA 断裂の 2 つ修復機構 non-homologous end joining と組換え修復関連因子としてそれぞれ、Ku80 と Ku70、RAD51 と RAD52 を選んだ。標準化には house keeping gene としてこの種の実験によく使われる beta-actin を用いた。酸化ストレスなどによって水酸化された DNA 中のグアニン残基を DNA から切り離す OGG1 は DNA チップによる発現実験で 4 倍以上の亢進がみられたので PCR においても検討した。

#### 材料と方法

リンパ球の分離 ヘパリン入り採血管を用いて手背静脈より採血を行い、Phicoll-Paque Plus (Amasham-Pharmacia) のマニュアルに従ってリンパ球の分離を行った。リンパ球は、最終的に 1 群あたり 2ml の無血清 RPMI1640 培地 (Gibco BRL) に浮遊させた。培地は予め 37°C に温めた。

**ブレオマイシン処理** 直径 6cm のペトリディッシュ分離後直ちに 37°C の water bath に写し、5 分間インキュベートした後、ブレオマイシン (Sigma) を 7.5  $\mu$ g/ml および 30  $\mu$ g/ml の濃度で添加、混和し、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件で 1 時間インキュベートした。インキュベーション終了後、無血清 RPMI1640 培地で 2 回洗ったのち、10% FBS (Gibco BRL) 添加 RPMI1640 培地 (ペニシリン、ストレプトマイシン) 2 ml に浮遊させ、再び 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件で 24 時間培養した。コントロール群では、ブレオマイシンの投与以外の処置をまったく同様に行った。

**total RNA の抽出** total RNA の抽出は、RNA easy mini kit (Qiagen) によった。24 時間後に静かに培養液を取り除き、1 ディッシュあたり 600  $\mu$ l の Buffer RLT を加え、万遍無くディッシュ全体に行き渡らせた後、静置した。取り除いた培養液は 300g で 5 分間遠心し、上清を取り除いて、PBS(-) で一度洗い、ディッシュの TLR buffer でペレットを溶かして、RNA の抽出まで -80°C に保存した。抽出の詳細は、キットに添付のマニュアルによった。

**1 本鎖 cDNA の調製** 得られた total RNA はゲノム DNA のコンタミネーションを除くため Dnase I (Gibco BRL) 処理を行ったのち、cDNA の first strand synthesis を行った。合成には市販のキット (Gibco BRL) を用い、詳細は添付のマニュアルに従った。

**PCR** PCR を応用して初期コピー数を推定するのに先立ち、紫外線実験用のものも含めて修復関連遺伝子用のプライマーをデザインし、条件検討を行った。Table 6 に示した。遺伝子は表中のアニーリング温度で単一のバンドが得られた。DNA-PKCs、hMTH1 についても同様の検討を行ったが、残念ながら単一のバンドが得られなかった。標準物質としては、PCR の条件検討でも用いた白血球 cDNA を用いた。こちらは EDTA で処理した血液から RNA easy blood kit (Qiagen) を使って total RNA を抽出し、Dnase I (Gibco BRL) でゲノム DNA を除去

した後、市販のキット (Gibco BRL) を使って cDNA の first strand を合成した。PCR の反応液の組成は以下のとおりである。

10×Buffer	2.0 $\mu$ l
2.5mM MgCl <sub>2</sub>	2.4 $\mu$ l
dNTP mixture	1.6 $\mu$ l
AmpErase UNG (1U/ $\mu$ l)	0.2 $\mu$ l
Primer Forward (20 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l
Primer Reverse (20 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l
template	1.0 $\mu$ l
AmpliTaQ Gold (5U/ $\mu$ l)	0.1 $\mu$ l
DW	up to 20 $\mu$ l
<hr/>	
total	20 $\mu$ l

また、サーマルサイクラーにおける温度変化は以下の通りである。

前熱変性：95°C、3 分

熱変性：95°C、30 秒

アニーリング：58°C、30 秒

伸長反応：72°C、30 秒

} ×40 サイクル

## 結果と考察

各サンプルで 10 倍希釈と 100 倍希釈を用意したが、検量線内におさまる希釈率の結果を採用した。Table 7 は各遺伝子の標準白血球 cDNA 中の当該遺伝子のコピー数を 1 としたときのコピー数の比である。Table 8 はさきの結果をもとに beta-actin を使って他の遺伝子を標準化したものである。Table 9 はコントロール群を 1 としたときの 7.5  $\mu$ g/ml 処理群、30  $\mu$ g/ml 処理群の値である。PCR では p21 が投与量に比例して up regulate されており、他の遺伝子は顕著な傾向が見られず DNA チップの結果とは矛盾するものであった。そこで、total RNA のコントロール群、7.5  $\mu$ g/ml 処理群、30  $\mu$ g/ml 処理群の各初期投入量である 0.5  $\mu$ g、0.6  $\mu$ g、0.25  $\mu$ g をもとに各遺伝子の標準化を試みた (Table 10)。Table 11 は、コントロールを 1 としたときの 7.5  $\mu$ g/ml 処理群、30  $\mu$ g/ml 処理群

の値である。補正方法を変えても p21 が投与量に比例して up regulate されており beta-actin による補正と傾向に大きな変化はなかった。DNA チップと PCR を利用した初期 cDNA 中のコピー数の結果は一致しなかったが、このかい離には標準化が一因に挙げられる。2つのサンプルの遺伝子の発現状態を比較するには補正が必要である。DNA チップでは補正をするのに 12,000 の全てのプローブを使用して標準化した。これにたいし PCR では beta-actin のみを使用した。最近の研究では幾つかの house keeping gene の平均を使って補正する方法もよく取られているので、PCR 実験での補正にはさらに検討が必要と考えられた。

## 結論

ゲノムへの損傷があった場合には、細胞周期が止まり、この間に損傷の修復が行われる。もし、損傷が大きく修復不能である場合にはアポトーシスが誘導され、間違った遺伝情報が伝わらないようになっていと言われている。BLM は 10  $\mu$ g/ml 以上の濃度では cytotoxic であるとされている。今回の実験でも 7.5  $\mu$ g/ml 処理群と 30  $\mu$ g/ml 処理群の 10  $\mu$ g/ml 前後の 2 濃度を設定した。低濃度では主として修復関連遺伝子の up regulation がみられ、高濃度では apoptosis 関連遺伝子の up regulation がみられるのではないかという仮説を立てた。DNA チップによる発現の比較では、BLM 7.5  $\mu$ g/ml 処理群と 30  $\mu$ g/ml 処理群で、それぞれ 102 と 16 のプローブ (遺伝子) に生物学的にも意味があると考えられる変化がみられた。これら全てについて解釈することは難しいが、7.5  $\mu$ g/ml 処理群と 30  $\mu$ g/ml 処理群で共通に up regulate されたものインターフェロンの細胞増殖抑制作用を媒介する interferon-inducible RNA-dependent protein kinase (Pkr)、アポトーシス関連の WSL-LR、WSL-S1、WSL-S2、抗がん剤の投与で誘導され、細胞の異物への反応と考えられた 90-kDa heat-shock protein があり、とくに Pkr は 200~300 倍の up regulation であった。7.5  $\mu$ g/ml

処理群で up regulate されたものには 2 本鎖 DNA 断裂を修復する因子の一つである Ku80、酸化ストレスによって水酸化されたグアニン残基を DNA から切り離す OGG1 などがある。30  $\mu$ g/ml 処理群ではアポトーシスを誘導する TRAIL の受容体である TRAIL receptor 2 が up regulate されたほか、PHA などで T-cell を刺激した時に CDK ファミリーのなかで最も初期に誘導される cdk6 が down regulate された。ゲノムへの損傷があった場合には、細胞周期が止まり、この間に損傷の修復が行われる。もし、損傷が大きく修復不能である場合にはアポトーシスが誘導され、間違った遺伝情報が伝わらないようになっていと言われている。BLM は 10  $\mu$ g/ml 以上の濃度では cytotoxic であるとされおり、今回の実験でも 7.5  $\mu$ g/ml 処理群と 30  $\mu$ g/ml 処理群の 2 濃度を設定した。BLM 投与により cell-cycle が抑えられ、低濃度では主として修復関連遺伝子の up regulation がみられ、高濃度では apoptosis 関連遺伝子の up regulation がみられるという仮説を立てた。一部に矛盾する点も残るものの、DNA チップによる結果は、細胞増殖を抑制する遺伝子の up regulation がみられるなど、仮説に近いものと考えられた。なお、PCR を利用して遺伝子の cDNA 中のコピー数を推定する方法では DNA チップと同様の結果が得られなかったが、理由の一つに補正法の違いが考えられた。

DNA チップは一度に数多くの遺伝子の変動を観察できる点で非常に優れており、有用なツールと考えられた。

## 健康危害情報

なし

## 研究発表

未

## 知的財産権の出願・登録状況

未

## 参考文献