

は現実的には実施不可能となる。そこで、複数のサンプルをハイブリダイゼーションより前に混合し、一つのサンプルとして評価することの妥当性につき検討した。

●方法

マウス TCE 腹腔内投与実験（低曝露群）のデータを使用した。

3 匹のマウスから出発して得られた cRNA サンプルを個別に DNA チップにハイブリダイゼーションし、得られた発現結果 (signal) より 3 匹の算術平均を求めたもの（以下 mean とする）と、cRNA の段階で等量になるようにあらかじめ 3 匹分を混合して一つのサンプルとし、そののちに DNA チップへのハイブリダイゼーション、scanning を行って発現プロファイル（以下 mixed）を得た。

この両者に関して、以下の 3 つの観点から差異を検討した。

- (1) 発現強度の差
- (2) 発現強度の相関
- (3) fold change からみた一致率

●結果および考察

mean 算出に使用された 3 枚のチップおよび mixed チップのすべてにおいて発現が確認された、すなわち Detection が Present もしくは Marginal であったプローブ (3884 個) を解析に供した。発現強度は、比較のために各チップ上の median 値で normalization したものを使用した。

- (1) 発現強度の差

Wilcoxon の符号付順位検定の結果を表 1-3 に示す。Mean と mixed の間の発現強度の差は、marginal significance($p=0.06$)

であった。

- (2) 発現強度の相関

表 4 に示したとおり、mean と mixed 間の相関係数は 0.994 と非常に高かった。

- (3) fold change からみた一致率

表 5 に示したとおり、mean に比して mixed で 2 倍以上の発現強度を示したプローブが 19 個、反対に 0.5 倍以下の発現強度を示したプローブが 75 個、両者の合計は 94 個で、これは全体 (3884 個) の 2.42% であった。同様に 3 倍以上、0.33 倍以下にするとプローブはそれぞれ 3 個、23 個となり、両者の合計 26 個は全体の 0.67% であった。

以上より mean と mixed の発現強度を、その差で評価するとプローブ数が多いため marginal significance となったが、相関係数はきわめて高く、また 2 倍以上ないし 0.5 倍以下に発現強度が変化したものは全体の 2.4% と少なく、全体として mean と mixed に大きな乖離はないと判定できる。すなわち、複数サンプルを DNA チップにハイブリダイゼーションする前に一つのサンプルに混合して評価を行っても、大勢の判断に誤りはないことが確認できた。しかしながら、2.4% の遺伝子に 2 倍以上、もしくは 0.5 倍以下の発現強度の変化が見られたことも事実であり、個別の遺伝子の動態に注目して評価を行う際には、このことを充分考慮にいれ、定量 PCR 法などの他の信頼に足る方法で確認を取る必要性がある。

ODNA チップ解析方法

MicroArray Suite ver.5.0(Affymetrix 社)で

ハイブリダイゼーションで得られたシグナルを読み込み、DNA チップ解析ソフトである Gene Spring Ver.5.0.2(Silicon Genetics 社)にデータを読み込ませ以下の解析を行った。

(1) Normalization

DNA チップ間の比較のためには標準化 (Normalization) が必要となる。ここでは有効な全ての遺伝子発現量の中央値を用いた。すなわち、各 DNA チップ上の Present Call および Marginal Call (これらの分類は Affymetrix 社が独自に採用している) と判定されたプローブの Signal 値の中央値を算出し、その中央値で全てのプローブの Signal 値を除すことにより DNA チップ間の標準化 (Normalization) を行った。すなわち、各 DNA チップ上の Present Call および Marginal Call と判定された遺伝子の Signal 値の中央値を算出し、その中央値で全ての遺伝子の Signal 値を除すことにより DNA チップ間の標準化 (Normalization) を行った。

(2) 有意差のある遺伝子の検出

Cross-gene error model を用いて各曝露時点ごとにコントロール群と曝露群との間に有意差のあるプローブを算出した ($p < 0.1$)。

(3) 相同遺伝子の検索、新たな遺伝子発現ファイルの構築

腹腔内投与実験で詳述した通り、独自に開発した BLAST プログラムをベースとする相同遺伝子検索プログラムを用いて、マウスとラットの DAN チップ上のプローブが対応している新たな遺伝子発現プロファイルを作成して解析を行った。

(4) クラスタリング解析

1) 全てのプローブもしくはどこかの時点

で有意差のあったプローブを用いて、同種内で階層的クラスタリング解析を行った。(Standard Correlation)。図 1A (マウス 全てのプローブ)、図 1B (マウス 有意差のあったプローブ)、図 1C (ラット 全てのプローブ)、図 1D (ラット 有意差のあったプローブ)

2) (3) で得られた新たな遺伝子発現プロファイルを用いて異種間での階層的クラスタリング解析を全ての遺伝子図 2A と有意差があった遺伝子図 2B それぞれに対して行った。

3) 各曝露時点で曝露群のシグナル値をコントロール群のシグナル値で除して Exposed/Control の値を算出した。このデータセットを用いて 2) と同様に異種間での階層的クラスタリング解析を行った。尚、除した結果が ∞ などになったプローブに関しては計算から除外してある。図 3A、図 3B

(5) 機能別遺伝子発現変化の解析

遺伝子の分類には Gene Ontology の概念を用いた。この概念は「遺伝子産物を矛盾なく記述する」というアイデアであり、ウェブ上でその情報は公開されている。<http://www.geneontology.org/> 記述の実体は大きく 3 つ、1) molecular function 2) biological process 3) cellular component に分類されている。また、個々の遺伝子発現変化を β 酸化系遺伝子、酸化ストレスに関与する遺伝子を中心に解析した。

○結果及び考察

●TCE 代謝産物濃度及び生化学的肝機能データ

血中の TCE 代謝産物濃度と肝機能データを表 6A、表 6B に示す。

TCE の代謝には種差があり、ラットとヒトでは二相性の動態を示すが、マウスでは示さない。また、Vmax はマウスはラットヒトに比べて高い。(Elfarra, et al 1998)

ラットでは 18 時間後の血中 TCA 濃度が最も高かった。マウスの TCA 濃度のピークは 1000mg/kg 経口投与実験では 14 時間と 30 時間であり、濃度は 263ug/ml と 288ug/ml である。また、ラットの TCA 濃度のピークは 14 時間であり、濃度は 50ug/ml である。(Prout MS et al., 1985) 今回の我々の経口投与実験では、マウスでは 5 時間後の血中 TCA 濃度が最も高く、一相目のピークに上昇する途中であることが伺える。18 時間後は一相目のピークから速やかに下降した値と思われる。一方ラットでは 18 時間後の値が最も高く、ピークからやや遅れた値として矛盾がない。また、1 週間後と、2 週間後の血中 TCA 濃度はラットがマウスに比べて高い値を示したが、それぞれの種内では大きな差はなく、血中 TCA 濃度がほぼ平衡状態に保たれていると思われる。

●クラスタリング解析

1) 各時点ごとにコントロール群と曝露群に有意差があったプローブの個数を下記に示す。

曝露時間	マウス(個)	ラット(個)
5hr	68	71
18hr	94	102
1week	37	23
2week	87	62
どこかの時点で有意差有り	215	169

全てのプローブもしくはどこかの時点で

有意差のあったプローブを用いて、同種内で階層的クラスタリング解析を行った結果、マウスでは有意差があったプローブではコントロール群と TCE 曝露群が分かれてクラスタしていた。曝露群では 1 週間曝露と 2 週間曝露が最も近くクラスタする結果であった。この結果は全ての遺伝子を用いた時と多少異なっている。全ての遺伝子を用いた際はコントロール群と TCE 曝露群が分かれず、お互いが混在した結果となった。これは、全ての遺伝子を用いた場合は遺伝子発現の変化があった遺伝子よりも変化が少なかった遺伝子の影響をより強く受けたためであると推測される。また全てのプローブを用いた場合、欠損値(Absent Call)が必然的に多く含まれてしまうため、計算に及ぼす影響がより大きいということも要因の一つにあげられる。

一方ラットでは、全てのプローブを用いても、有意差があったプローブのみを用いてもコントロール群と曝露群が混在する結果となった。

2) マウス、ラットそれぞれでの遺伝子に対する相同遺伝子をそれぞれの種において検索し、マウス、ラットの遺伝子が対応している新たな遺伝子発現プロファイルを作成した。このプロファイルは、相同遺伝子があり、チップ上に相同遺伝子があった遺伝子はマウス、ラットを合わせて 7613 個であり、どちらかの種に有意差があった遺伝子でチップ上に相同遺伝子があった遺伝子は 299 個であった。遺伝子発現プロファイル 2 を用いて異種間でのクラスタリング解析を行った結果、全ての遺伝子と有意差があった遺伝子を用いた場合は共にマウスとラットで大きく 2 つのクラスターに分かれ

ていた。

3) 各曝露時点で曝露群のシグナル値をコントロール群のシグナル値で除した Exposed/Control の値を用いたデータセットでは、2) と同様に全ての遺伝子と有意差があった遺伝子を用いた場合は共にマウスとラットで大きく2つのクラスターに分かれていた。また、有意差のあった遺伝子のクラスタリング解析の結果から判断すると、マウスは1週間曝露と2週間曝露では遺伝子発現の変化は類似しており、ラットでは単回投与後18時間と1週間連続曝露群の変化が類似し、単回投与後5時間と2週間連続曝露群の変化が類似するという結果となった。

●機能別遺伝子発現変化

○Gene Ontlog を用いた解析

我々は上記のクラスタリング解析で示された種差がどのような機能をもつ遺伝子において見出されているのかを知る目的で、有意差があった遺伝子を Gene Ontlogy の概念を用いて機能別に分類してマウスとラットの比較を試みた。その結果の一部を図4に示す。

ラットは Gene Ontlogy に登録されている遺伝子の数がまだ少なく、十分に機能別に分類した結果を示しているとは言い難いが、今後ゲノムの解読が進みそれに伴って Gene Ontlogy に登録される遺伝子数も増加すると思われる。これまでに得られている結果から判断すると、TCE 曝露によって有意な変化を示した遺伝子はマウスとラットで機能的に異なった遺伝子であり、種差があることが伺える。

○個々の遺伝子発現変化の解析

各曝露時点でコントロール群と比較して有意な遺伝子発現変化を示した遺伝子を表7A, B, C, D (マウス)、表8A, B, C, D (ラット) に示す。また、機能別にみた各遺伝子の発現変化について以下で述べる。

CytchromeP450(CYP)

● AB018421:Mus musculus CYP4A10 mRNA for cytochrome P-450, complete cds /cds=(29,1558) /gb=AB018421 /gi=3738262

● M20131cds RATCYP45I Rat cytochrome P450IIE1 gene, complete cds

ペルオキシゾーム増殖薬の脂質代謝系酵素の誘導として、ミクロゾームでは脂肪酸のω酸化に関与する CYP4A10 (マウス) と CYP4A1 (ラット) との mRNA の発現が選択的に増加することが報告されている。

(Lock et al. 1989) マウスでは Cyp4a10 の遺伝子発現が高いレベルで誘導されており、この発現は5時間後より観察された。ラットでは2週間曝露で Cyp4A1 遺伝子の2倍以上の発現増加が観察された。

TCE の主要代謝酵素である CYP2E1 の発現増加はマウスとラットで観察されなかった。

なお、マウスにおいては CYP2E1 遺伝子は DNA チップ上に乗っていないため、個別にリアルタイム PCR で cDNA を半定量を行った。

● K00996mRNA RATCYP45E Rat cytochrome p-450e (phenobarbital-induced) mRNA, 3' end

● K01721mRNA RATCYP45A Rat
P-450(1) variant
(phenobarbital-inducible) cytochrome 3
end, flank

● L00320cds RATCYPB9 Rat cytochrome
P-450b (phenobarbital-inducible) gene,
exon 9

● J00728cds RATCYPE9 Rat cytochrome
P-450e (phenobarbital-inducible) gene,
exon 9

一方ラットでは、上記のチトクロム系酵素
遺伝子の 2 倍以上の発現増加が常に観察さ
れた。これらの遺伝子の機能は不明である。

グルタチオン抱合

● J03952:Mouse, glutathione
transferase GT8.7 mRNA, complete cds
/cds=(12,668) /gb=J03952 /gi=193687

● J04696:Mouse glutathione
S-transferase class mu (GST5-5)
mRNA, complete cds /cds=(4,660)
/gb=J04696 /gi=193549

● U24428:Mus musculus mu-class
glutathione s-transferase (mGSTM5)
mRNA, complete cds /cds=(96,770)
/gb=U24428

● J03958:Glutathione S-transferase,
alpha 2 (Yc2) /cds=(94,762)
/gb=J03958 /gi=193691

● S82820mRNA GSTA5=glutathione
S-transferase Yc2 subunit

● X98055:Glutathione S-transferase,
theta 1 /cds=(0,722) /gb=X98055
/gi=1340075

● X98056:Glutathione S-transferase,
theta 2 /cds=(0,734) /gb=X98056

/gi=1340077

ヒトでは、GSTT1 及び GSTM1 の遺伝子多
型により、腎細胞癌発症率に差が見られる
(GSTT1 と GSTM1 が活性型であった場合、
それぞれのオッズ比は 4.16、 2.74 であっ
た。)という報告がある。(Bruning et al 1997)
実験動物での遺伝子多型による発癌の発症
率の差は現段階では明らかにされていない。
ラットを xenobiotic に曝露すると、GSTA2,
M1 > GSTA1, A3 > GSTA4, M2 の順に
subunits が誘導されると言われている。

(A:alpha、M:mu、T:Theta、P:Pi に対応)
ラットでは、GST α 2 遺伝子は 5 時間で 2
倍以上の発現増加が、マウスでは 18 時間
後からの発現増加が観察された。GST μ 1
遺伝子はラットでは 5 時間後に大きな発現
増加が見られたが、マウスでは変化は見ら
れなかった。また、GST μ 2 遺伝子はラッ
トは 5 時間後より、マウスは 18 時間後に
2 倍以上の発現増加が観察された。

これらの遺伝子発現の変化は TCE 曝露によ
る特異的な GST 遺伝子の変化でない可能
性はあるが、ラットの遺伝子発現変化はマ
ウスに比べて早いことが分かる。このこと
は、ラットはマウスに比べて TCE の CY
P によるメジャーな代謝経路が低濃度で飽
和し、グルタチオン抱合による代謝に移行
しやすいことと矛盾していない結果である。

β 酸化系酵素

long chain fatty acyl CoA synthetase

● U15977:Mus musculus long chain fatty
acyl CoA synthetase mRNA, complete cds
/cds=(0,2099) /gb=U15977 /gi=563830

● Rat mRNA for long-chain acyl-CoA

synthetase (EC 6.2.1.3) /cds=(13,2112)
/gb=D90109 /gi=220717

AOX

● AF006688:Mus musculus peroxisomal
acyl-CoA oxidase (muspaox) mRNA,
complete cds /cds=(80,2065)
/gb=AF006688 /gi=2253379

● J02752 Rat acyl-coA oxidase mRNA,
complete cds /cds=(73,2058)
/gb=J02752 /gi=202677

peroxisomal enoyl-CoA-
hydrotase-3-hydroxyacyl-CoA
bifunctional enzyme

● AJ011864:Mus musculus mRNA for
L-specific multifunctional
beta-oxidation protein, partial CDS
/cds=(0,854) /gb=AJ011864
/gi=5830359

● Rat peroxisomal enoyl-CoA-
hydrotase-3-hydroxyacyl-CoA
bifunctional enzyme
mRNA, complete cds /cds=(21,2189)
/gb=K03249 /gi=206068

3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase

● D29639:Mouse embryonal carcinoma
cell mRNA for 3-hydroxyacyl CoA
dehydrogenase,

● EST195165 Rattus norvegicus cDNA, 3
end /clone=RHEAT10 /clone_end=3
/gb=AA891362 /gi=3018241complete cds
/cds=(53,964) /gb=D29639 /gi=1125025

3-ketoacyl-CoA thiolase

● Y14004:Mus musculus mRNA for acyl-CoA
thioesterase /cds=(8,1267) /gb=Y14004
/gi=2765361
catalase

● M29394:Mouse catalase mRNA, 3
end /cds=(0,77) /gb=M29394
/gi=192377 /ug=Mm.4215

● M11670 Rat liver catalase mRNA,
complete cds /cds=(83,1666)
/gb=M11670 /gi=203344 /ug=Rn.3001
/len=2495

脂肪酸のペルオキシゾームにおいて脂肪
酸は図 5 に示したカスケードに従ってアセ
チル CoA とアシル CoA に代謝される。ア
シル CoA は再び再利用され、アセチル CoA
はクエン酸回路に入る。またアシル CoA の
AOX による最初の代謝段階において、 H_2O_2
が産生され、酸化ストレスを引き起こすと
言われているがこの H_2O_2 は catalase によ
って処理される。

β 酸化系酵素の遺伝子発現変化を図 6A,
B に示した。

long-chain fatty acyl-CoA synthetase 遺
伝子は、マウスもラットも 2 倍以上の発現
変化は観察されなかった。

AOX はマウスでは曝露 1 週間群と 2 週間
群は 2 倍以上の変化が観察されたが、単回
投与の 5 時間後は 2 倍以下の増加、18 時間
後では遺伝子の発現変化は観察されなかつ
た。AOX の遺伝子発現はペルオキシゾーム
増殖薬 2 時間後から誘導されることが知ら
れており、5 時間では遺伝子発現のピーク
を捉えることが出来なかった可能性が高い。
一方ラットでは AOX 遺伝子の明らかな遺
伝子発現の変化は観察することは出来なかつ
た。

Bifunctional enzyme と高い類似性を持
つ L-specific multifunctional beta-oxidation
protein はマウスでは 5 時間後から 4 倍以上

の発現が観察された。この遺伝子は AOX に遅れて、発現が誘導されると推測される。ラットでは単回投与の 18 時間後から増加しており、2 週間投与では 2 倍以上の発現増加が観察されたが、その遺伝子発現量はマウスに比べて低い。

Long-chain acyl-CoA thioesterase の酵素活性はペルオキシゾーム増殖薬により、ラットの肝細胞で誘導されることが報告されている。(Engberg et al. 1997) マウスでは 5 時間後よりその発現増加が観察された。その遺伝子発現パターンは bifunctional enzyme 遺伝子に類似している。一方ラットの遺伝子発現は DNA チップの検出感度以下であった。

β 酸化系の酵素の遺伝子発現を時間軸で追跡していくと、その代謝カスケードに沿った変化を観察することが出来た。腹腔内へ TCE を単回投与し、24 時間後に遺伝子発現の変化を観察した際には十分に捉えることが出来なかったペルオキシゾーム β 酸化系酵素の変化をこの実験デザインでは捉えることが出来た。また体重当りの TCE 投与量が同じであるにも関わらず、 β 酸化に関わる遺伝子発現の変化はマウスとラット間で大きく異なるという種差が観察された。

酸化ストレスに関する遺伝子

酸化ストレスは従来、特異的な遺伝子変異を誘発する酸化性 DNA 傷害など、活性酸素による細胞構成成分の傷害の誘発に基づいて発癌に関与すると考えられてきた。しかし最近では、酸化ストレスは一酸化窒素 (NO) をはじめとする活性窒素、炎症性サイトカイン、アポトーシスや細胞増殖など

を制御する種々のシグナル因子と共に複雑なネットワークを形成して発癌に関与していると言われるようになった。例えば活性酸素は NF- κ B, AP-1 などの転写因子を活性化し、それによる COX-2 などの誘導に関与する。(Gius D et al., 2000 Newton R et al., 1997) また、アポトーシスや細胞増殖制御に関連するシグナル伝達系においてセカンドメッセンジャーとして働くことが知られている。(Nose K et al. 2000)

ペルオキシゾーム増殖薬 (PPs) を含む化学物質による肝発癌性は動物実験が多数行われており、肝発癌性の過程で酸化ストレスが関与していることが報告されている。PPs の投与により、ペルオキシゾーム酵素レベルは増加し、活性酸素類 (ROS) を増加させ、種々の細胞器官に損傷を与える。この ROS の増加に起因する DNA の酸化的損傷は PPs による発癌に関与していると言われている。(Yeldandi et al., 2000) しかし PPs は細胞増殖を増加させ、アポトーシスを減じる作用もあり、この作用が発癌のメカニズムであるとも言われている。

ところで、 H_2O_2 などの ROS は NF- κ B を活性化させる。NF- κ B は核内に入り、標的遺伝子の転写を活性化させ、細胞の増殖やアポトーシスを調節する。(Meyer et al., 1993)

NF- κ B 活性化の程度と PPs の発癌性との密接な関係は PPs による発癌性が報告されていないハムスターで NF- κ B 活性が低下していることなどから明らかであるとされている。(Lake et al., 1993)

強力な PPs である Wy-14,643 を投与すると、マウスとラットでは H_2O_2 を産生する AOX は活性化され、 H_2O_2 代謝酵素であ

る Catalase の活性化は変化せず、GPX(glutathione peroxidase)は不活性化される。一方 GST、glutathione reductase selenium-dependent GPX の肝臓中の基本的レベルがラットよりも多く存在するハムスターでは、GPX の活性化が観察される。(O'Brein et al., 2001) この PP s による酸化/抗酸化のアンバランスは NF- κ B 活性によって支配されている可能性が示唆されている。(Li et al., 1996) PP s の処理後 NF- κ B 活性が低いため、ハムスターでは余分な H₂O₂ の処理能力が高くなるのではないかとされている。(Tharappel et al., 2001)

NF- κ B は誘導型転写活性化因子であり、NF- κ B 結合配列は免疫・炎症応答に関わる多くの遺伝子のプロモーター領域に存在し、これらの発現制御を行っている。NF- κ B の制御を受ける遺伝子として、IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, TNF などのサイトカインやセクレチンなどの細胞間接着分子、誘導型 NO 合成酵素(iNOS)、IL-2 受容体 α 鎖などが知られている。(Baeuerle PA et al., 1996)

化学物質の刺激は細胞内の酸化還元(レドックス)状態を変化させ、転写因子である Activator protein 1(AP-1)は活性化される。AP-1 は Fos/Jun タンパク質の複合体であり、レドックス変化は c-fos, c-jun 遺伝子の発現を誘導し、それらの遺伝子産物の発現を誘導する。

ペルオキシゾームにおける酸化とミトコンドリアに存在する CYP 系酵素は H₂O₂ を産生する重要な酵素であり、H₂O₂ の 80% がこれらによって産生されている。(Boveris A, et al., 1972) PP s は H₂O₂

generating enzyme である AOX や Cyp4A subfamily 遺伝子を肝臓で誘導する。一方、先述した通りマウスとラットでは H₂O₂ degrading enzyme である Catalase, GPX は変化しないか、不活性化されている。この PP s による酸化/抗酸化のアンバランスは酸化ストレスの増加を引き起こす。更に、AOX (-/-) マウスでは PP s の投与によりペルオキシゾーム増殖と PPAR α に反応する Cyp4A1, Cyp4A3 といった遺伝子の誘導が見られたことより、AOX の基質が PPAR α のリガンドであり、AOX を調節していることが明らかとなった。(Fan et al., 1998) PPAR α は NF- κ B 活性化の重要な抑制タンパクである I κ B α の発現誘導することが示されている。また、PPAR α が c-Jun アミノ末端と生理的に結合し、AP-1 の DNA 配列への結合を抑制することが明らかとなっている。(Delerive et al., 1999) このように PPAR α は NF- κ B だけでなく AP-1 にも影響を与え、細胞内レドックス制御に関わっている。

メタロチオネイン (MT) は酸化ストレスによって誘導合成される。MT 遺伝子発現は転写レベルで制御されており、MT の 5' 領域には MLTF/ARE(major late transcription factor/ antioxidant responsive element)などが存在し、MT の発現が誘導される。また、AP-1 の転写調節因子結合部位も存在する(Viarengo A et al., 2000 Andrews GK 2000)

以上の知見より酸化ストレスに関与する遺伝子を選択し、DNA チップ上での遺伝子発現変化を観察した。その結果を図 7 に示す。

○ 結果

- AB018421:Mus musculus CYP4A10 mRNA for cytochrome P-450, complete cds /cds=(29,1558) /gb=AB018421 /gi=3738262 /ug=Mm.10742 /len=2077
 - Y11638:Cytochrome P450, 4a14 /cds=(26,1549) /gb=Y11638 /gi=2342636 /ug=Mm.7459 /len=2547
 - AF006688:Mus musculus peroxisomal acyl-CoA oxidase (muspaox) mRNA, complete cds /cds=(80,2065) /gb=AF006688 /gi=2253379
 - M29394:Mouse catalase mRNA, 3 end /cds=(0,77) /gb=M29394 /gi=192377 /ug=Mm.4215
 - M35725:Mouse Cu-Zn superoxide dismutase mRNA, complete cds /cds=(4,468) /gb=M35725 /gi=192929 /ug=Mm.5274 /len=469
 - L35528:Mus musculus manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene /cds=(70,738) /gb=L35528 /gi=2182263 /ug=Mm.2597 /len=906
 - M57718mRNA RATCYP4A1 Rat cytochrome P-450 IV A1 (CYP4A1) gene, complete cds
 - M33936 Rat Cyp4a locus, encoding cytochrome P450 (IVA3) mRNA, complete cds /cds=(12,1535) /gb=M33936 /gi=204989 /ug=Rn.11319 /len=2140
 - J02752 Rat acyl-coA oxidase mRNA, complete cds /cds=(73,2058) /gb=J02752 /gi=202677 /ug=Rn.6193 /len=3741
 - M11670 Rat liver catalase mRNA, complete cds /cds=(83,1666) /gb=M11670 /gi=203344 /ug=Rn.3001 /len=2495
 - X07365 Rat mRNA for glutathione peroxidase /cds=UNKNOWN /gb=X07365 /gi=56328 /ug=Rn.2581 /len=1161
 - Y00404 Rat mRNA for copper-zinc-containing superoxide dismutase /cds=(93,557) /gb=Y00404 /gi=57274 /ug=Rn.6059 /len=650
 - Y00497 Rat mRNA for manganese-containing superoxide dismutase (MnSoD) /cds=(11,679) /gb=Y00497 /gi=56690 /ug=Rn.10488 /len=1438
- マウスでは H_2O_2 generating enzyme である Cyp4A10, Cyp4A14 の遺伝子発現が観察された。中でも Cyp4A10 は 5 時間後で 8 倍の発現増加が見られた。一方、ラットでもマウス Cyp4A10 の相同遺伝子である Cyp4A1 の遺伝子発現増加が観察されたが、増加の大きさはマウスと比較して小さく、2 週間曝露で 2 倍以上の変化が見られたに過ぎない。マウス Cyp4A14 の相同遺伝子である Cyp4A3 には遺伝子次発現の変化は見られなかった。
- 同じく H_2O_2 generating enzyme である AOX はマウスで 1 週間、2 週間曝露で 2 倍以上の変化を示したのに対し、ラットでは遺伝子次発現の変化は見られなかった。
- M57999:Nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells 1,

- p105 /cds=(291,3206) /gb=M57999
/gi=201931 /ug=Mm.3420 /len=3892
- M15131:Interleukin 1 beta
/cds=(77,886) /gb=M15131 /gi=198293
/ug=Mm.22150 /len=1339
 - X62646:M.musculus mRNA for IL-6
signal transducer (gp130)
/cds=(88,2841) /gb=X62646
/gi=840816 /ug=Mm.4364 /len=2995
 - D84196:Mouse strain NOD tumor
necrosis factor alpha (TNFA) gene
/cds=(0,707) /gb=D84196 /gi=1944347
/ug=Mm.1293 /len=708
 - X73580:M.musculus mRNA for
secretin /cds=(8,409) /gb=X73580
/gi=313710 /ug=Mm.4723 /len=490
 - L26267 Rattus norvegicus nuclear
factor kappa B p105 subunit mRNA,
3 end /cds=(0,1568) /gb=L26267
/gi=425471 /ug=Rn.2411 /len=2245
 - M98820 Rat interleukin 1-beta
mRNA, complete cds /cds=(76,882)
/gb=M98820 /gi=204905 /ug=Rn.9869
/len=1329
 - M26744 Rattus norvegicus
interleukin 6 (IL6) mRNA, complete
cds /cds=(64,699) /gb=M26744
/gi=204915 /ug=Rn.9873 /len=1046
 - L00981mRNA#1 Rattus norvegicus
lymphotoxin (TNF-beta) gene,
complete cds, tumor necrosis factor
(TNF-alpha) gene, complete cds
/cds=(151,759) /gb=L00981
/gi=205253 /ug=Rn.9820 /len=1341
 - M64033 Rat secretin gene, complete
cds /cds=(34,438) /gb=M64033
/gi=206891 /ug=Rn.9919 /len=524
- NF-kB は H₂O₂ で活性が増加すること
より、遺伝子発現の増加が期待されたが、
マウスではクロスハイブリダイゼーション
等の理由により正確なシグナルが得られな
かった (Absent Call)。ラットでは遺伝子
発現変化は捉えられなかった。
- NF-kB によって転写調節を受けている
遺伝子(IL-1b, IL-2, IL-6, GM-CSF, TNF
 α , secretin, iNOS, IL2r α)の発現変化は、
マウスで IL-6 が曝露後 5 時間で 0.5 倍以下
に down regulate した以外は変化は観察さ
れなかった。
- Y07919:Adaptor-related protein
complex AP-1, beta 1 subunit
/cds=(109,2940) /gb=Y07919
/gi=2398719 /ug=Mm.29699
/len=3885
 - U20735:Mus musculus transcription
factor junB (junB) gene, 5 region
and complete cds /cds=(294,1328)
/gb=U20735 /gi=965003 /ug=Mm.1167
/len=1786
 - J04509:Jun proto-oncogene related
gene d1 /cds=(121,1146) /gb=J04509
/gi=198486 /ug=Mm.1175 /len=1147
 - M77245 R.norvegicus beta chain
clathrin associated protein complex
AP-1 mRNA, complete cds
/cds=(39,2888) /gb=M77245
/gi=203112 /ug=Rn.9466 /len=3663
 - X54686cds RNPJUNB R.norvegicus
pJunB gene
 - D26307cds RATJUND Rat jun-D

gene, complete cds

AP-1 は酸化ストレスにより活性化するので、遺伝子発現の増加が期待されたが、マウスとラットの両方で遺伝子発現の変化は見られなかった。

AP-1 を構成する Fos/Jun タンパク質の遺伝子はラットの 2 週間曝露で JunB 遺伝子が 0.5 倍以下に down regulate した以外は変化は観察されなかった。JunB は転写因子である AP-1 の構成成分であり、JUN の antagonist として働く、JunB は Jun と比較して転写は少ないが、Jun に代わって働く可能性が示唆されている。(Passegue E et al.,2002) JunB の遺伝子発現が低下した意義は不明である。

- K02236:Metallothionein 2
/cds=(0,185) /gb=K02236 /gi=199131
/ug=Mm.89170 /len=186
- M11794cds#2 RATMT12C Rat
metallothionein-2 and
metallothionein-1 genes, complete
cds

メタロチオネインは MT1 遺伝子はマウスで遺伝子発現変化は観察されなかったが、MT2 遺伝子はマウスでは曝露 18 時間後に 4 倍以上の発現増加が観察されたのに対し、ラットでは 5 時間後に 1/8 以下、18 時間後に 1/2 以下の発現低下が見られた。メタロチオネインは酸化ストレスによって誘導されることより、マウスで曝露後 18 時間では酸化ストレス反応が生じていることを推測させる。ラットの down regulation と対照的であり、種差として興味深い結果である。

○まとめ

1. クラスター解析ではマウスとラットのデータは明確に区別され、遺伝子発現変化の種差を視覚的に捉えることが出来た。

2. Gene Ontology を用いて遺伝子を分類して表示すると、機能別に遺伝子発現の変化を捉えることが出来た。

3. 個々の遺伝子で観察すると、代謝カスケードに応じた変化を見ることが出来た。

以上より、DNA チップは一時に多数の遺伝子変化を観察出来るので、幾つかのタイムポイントで発現プロファイルを得ておくと、時間軸に沿った遺伝子の発現変化をダイナミックに捉えることが可能であり、DNA チップは化学物質のリスクアセスメントを行う上で有用なツールであることが十分に示された。

健康危害情報

なし

研究発表

1.

Sano Y, et. al. DNA microarray-based gene expression profiling by exposure of trichloroethylene.

(第 13 回日中韓産業保健学術集談会、2001 年 5 月、北京)

2.

佐野有理、西脇祐司、出来尾史子、松本幸男、中島 宏、野見山哲生、武林 亨、大前和幸. DNA チップを用いたトリクロロエ

チレン曝露による遺伝子発現プロファイル
の変化.

(第72回日本衛生学会総会、平成14年
3月、津)

3.

佐野有理、出来尾史子、中島 宏、松本幸
男、武林 亨、西脇祐司、大前和幸. DNA
チップを用いたトリクロロエチレン曝露に
よる遺伝子発現プロファイルの種差.

(第76回日本産業衛生学会総会、平成1
5年4月、山口)

知的財産権の出願・登録状況

未

表 1

記述統計量

	N	平均値	標準偏差	最小値	最大値
MIXED	3884	3.8761	6.2425	.00	47.99
MEAN	3884	3.8073	5.9372	.05	46.01

表 2

順位

	N	平均ランク	順位和
MEAN - MIXED 負の順位	1776 ^a	2046.74	3635005.50
正の順位	2105 ^b	1851.79	3898015.50
同順位	3 ^c		
合計	3884		

a. MEAN < MIXED

b. MEAN > MIXED

c. MIXED = MEAN

表 3

検定統計量^b

	MEAN - MIXED
Z	-1.884 ^a
漸近有意確率(両側)	.060

a. 負の順位に基づく

b. Wilcoxon の符号付き順位検定

表 4

対応サンプルの相関係数

	N	相関係数	有意確率
ヘア 1 MIXED & MEAN	3884	.994	.000

表 5 fold change からみた mean と mixed の差異

F change>2	F change<0.5	合計	%	母集団
19	75	94	2.42%	3884
F change>3	F change<0.33	合計	%	
3	23	26	0.67%	3884

表6A 経口投与 マウス 血中TCE代謝産物濃度

Sample	TCA ug/ml	TCA mean (ug/ml)	TCA M(mol/l)	BW (g)	TCA (M/Kg)
12 5時間後	122.93	104.78	0.75	22.4	33.59
13 5時間後	103.35		0.63	22.86	27.67
14 5時間後	131.31		0.80	23.39	34.36
15 5時間後	81.73		0.50	24.82	20.15
16 5時間後	86.55		0.53	23.26	22.77
17 5時間後	106.29		0.65	27.02	24.07
24 18時間後	22.69	31.60	0.14	21.7	6.40
25 18時間後	32.83		0.20	21.1	9.52
26 18時間後	58.96		0.36	21.8	16.55
27 18時間後	38.25		0.23	25.5	9.18
28 18時間後	32.63		0.20	23.6	8.46
29 18時間後	21.59		0.13	24.5	5.39
36 1週間後	17.77	16.89	0.11	27.06	4.02
37 1週間後	16.62		0.10	27.8	3.66
38 1週間後	18.96		0.12	26.08	4.45
39 1週間後	11.84		0.07	26.83	2.70
40 1週間後	17.17		0.11	24.38	4.31
41 1週間後	15.99		0.10	24.68	3.96
52 2週間後	23.72	19.03	0.15	27.69	5.24
53 2週間後	15.44		0.09	25.96	3.64
54 2週間後	13.32		0.08	25.04	3.26
55 2週間後	23.45		0.14	25.99	5.52
56 2週間後	42.08		0.26	23.43	10.99
57 2週間後	16.85		0.10	26.48	3.90
58 2週間後	21.02		0.13	27.04	4.76
59 2週間後	21.88		0.13	28.13	4.76
60 2週間後	16.35		0.10	27.16	3.68
61 2週間後	10.97		0.07	27.73	2.42

表6B 経口投与 ラット 血中TCE代謝産物濃度

Sample	TCA ug/ml	TCA mean (ug/ml)	TCA M(mol/l)	BW (g)	TCA (M/Kg)	GOT (IU/L)	GPT (IU/L)	LDH (IU/L)
12 5時間後	14.02	16.73	0.09	339.80	0.25	79	31	220
13 5時間後	15.18		0.09	316.90	0.29	74	36	213
14 5時間後	13.86		0.08	325.00	0.26	89	48	174
15 5時間後	17.73		0.11	332.30	0.33	78	38	219
16 5時間後	19.98		0.12	342.90	0.36	90	40	452
17 5時間後	23.38		0.14	314.00	0.46	75	38	224
24 18時間後	83.61	54.18	0.51	339.00	1.51	158	36	2865
25 18時間後	38.64		0.24	353.00	0.67	119	46	890
26 18時間後	42.29		0.26	298.90	0.87	125	37	1470
27 18時間後	79.71		0.49	342.00	1.43	172	47	1240
28 18時間後	45.05		0.28	316.10	0.87	159	45	1855
29 18時間後	49.69		0.30	319.80	0.95	113	36	1485
36 1週間後	36.62	37.53	0.22	346.90	0.65	82	35	656
37 1週間後	64.05		0.39	323.56	1.21	110	51	419
38 1週間後	34.32		0.21	315.61	0.67	94	48	843
39 1週間後	48.02		0.29	335.44	0.88	90	48	386
40 1週間後	31.14		0.19	353.88	0.54	114	37	677
41 1週間後	26.47		0.16	301.56	0.54	112	44	896
48 2週間後	27.43	23.76	0.17	384.21	0.44	61	36	328
49 2週間後	19.77		0.12	369.22	0.33	85	50	304
50 2週間後	22.70		0.14	380.12	0.37	111	43	930
51 2週間後	21.97		0.13	366.24	0.37	110	39	306
52 2週間後	51.77		0.32	359.47	0.88	80	40	176
53 2週間後	22.96		0.14	341.24	0.41	74	37	228

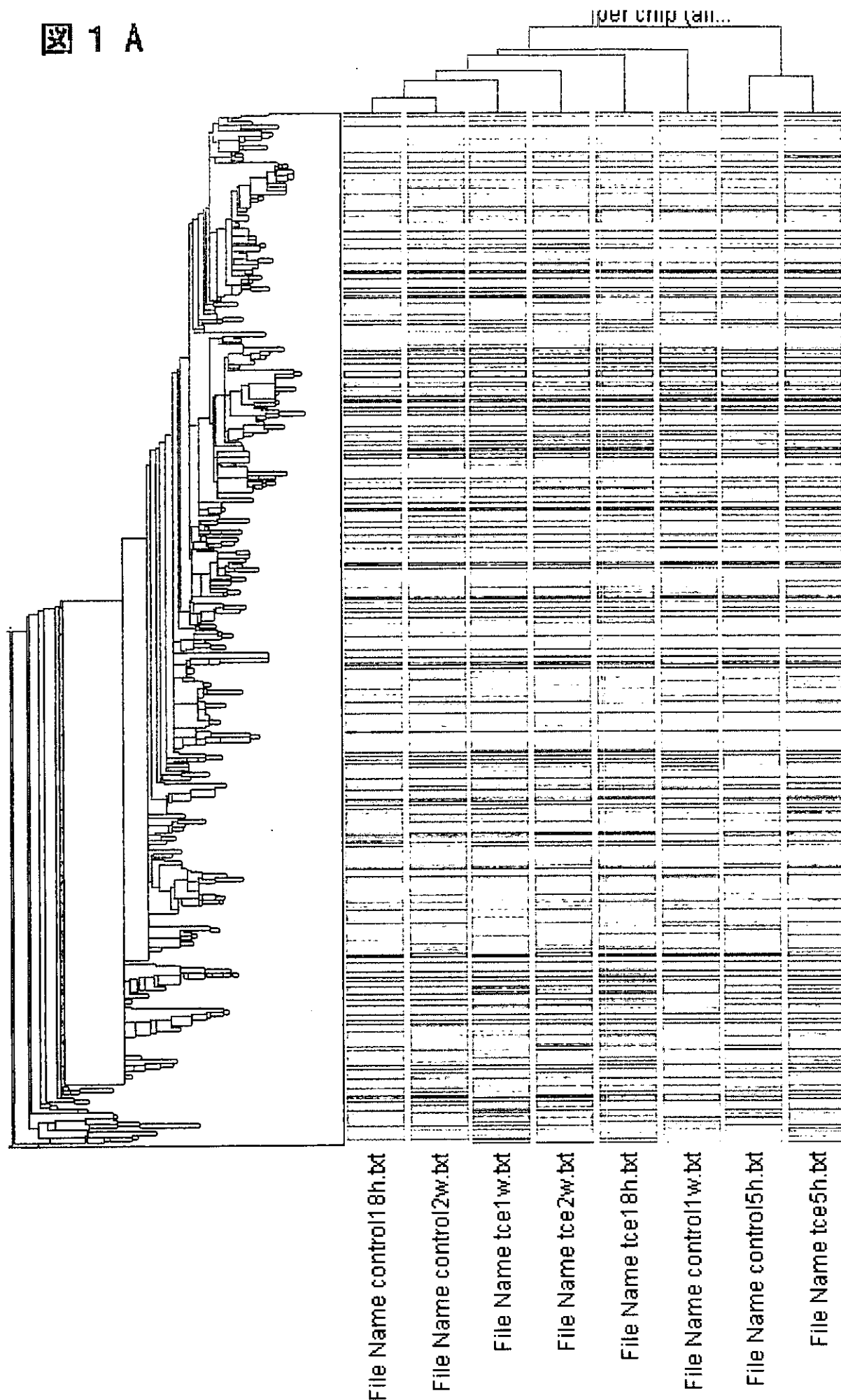
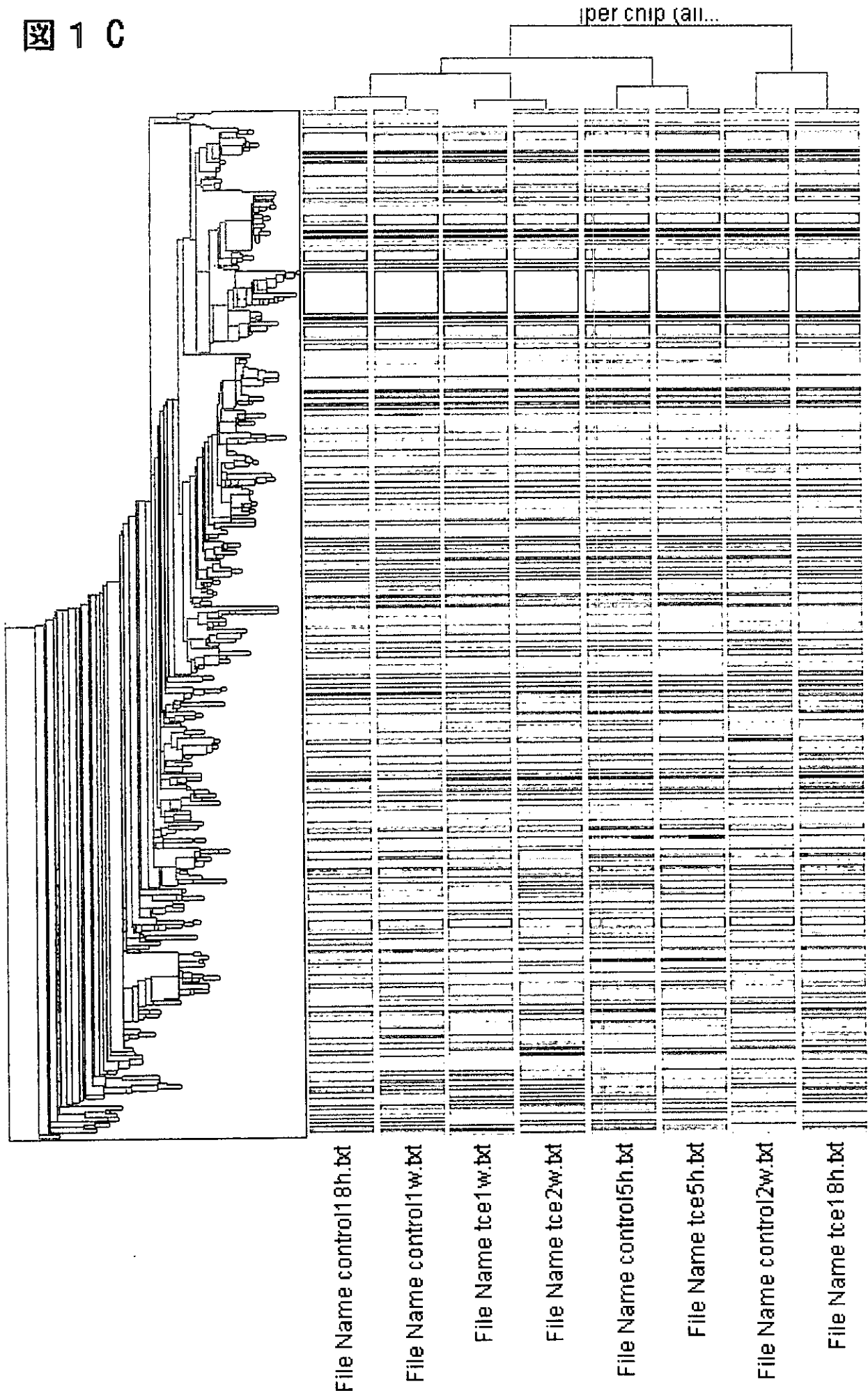




图 1 C



Selected Gene Tree:

Selected Experiment Tree:

per chip (all gene-s...

per chip (all gene-s...

Colored by: N/A

Gene List: all genes (8800)

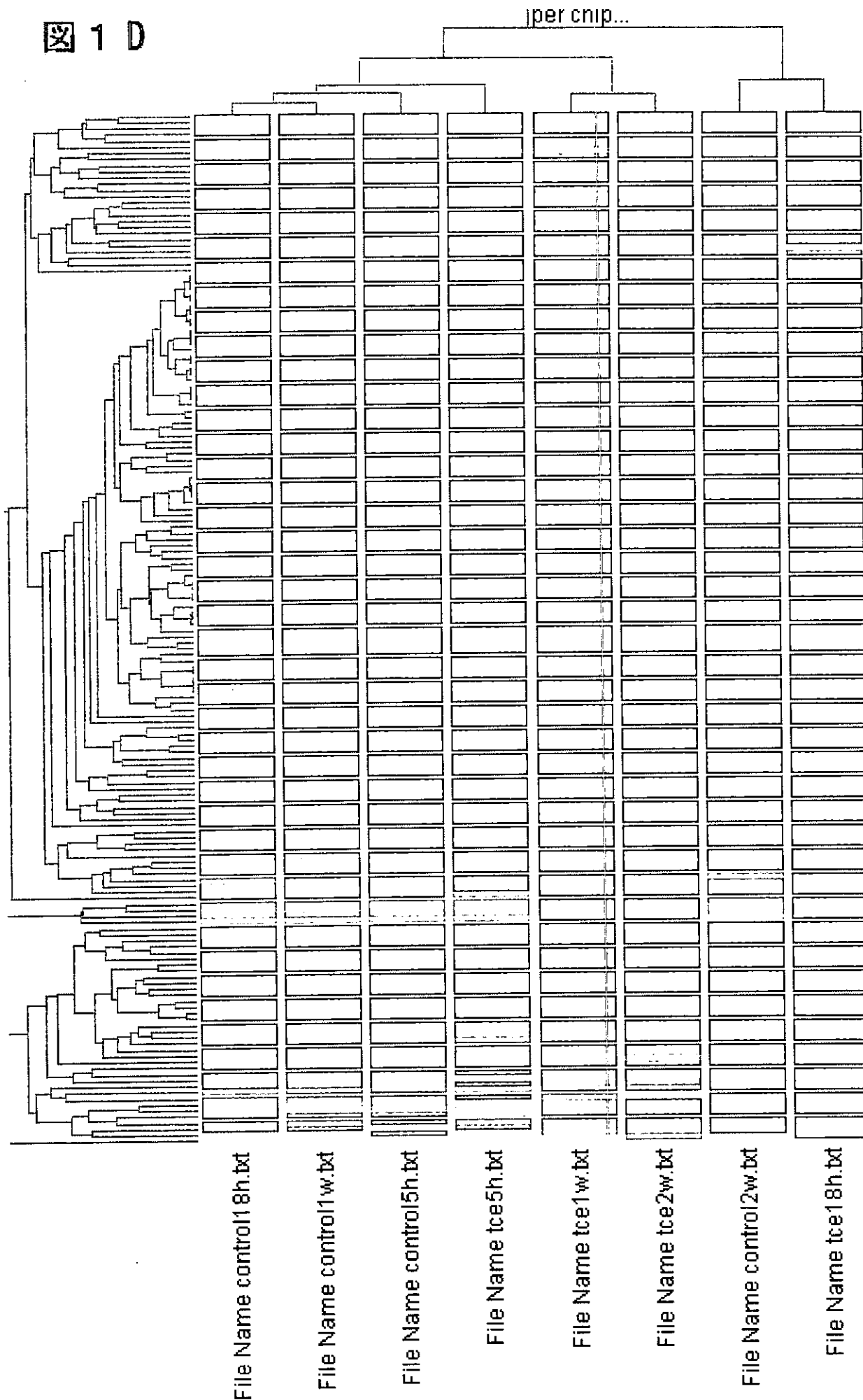
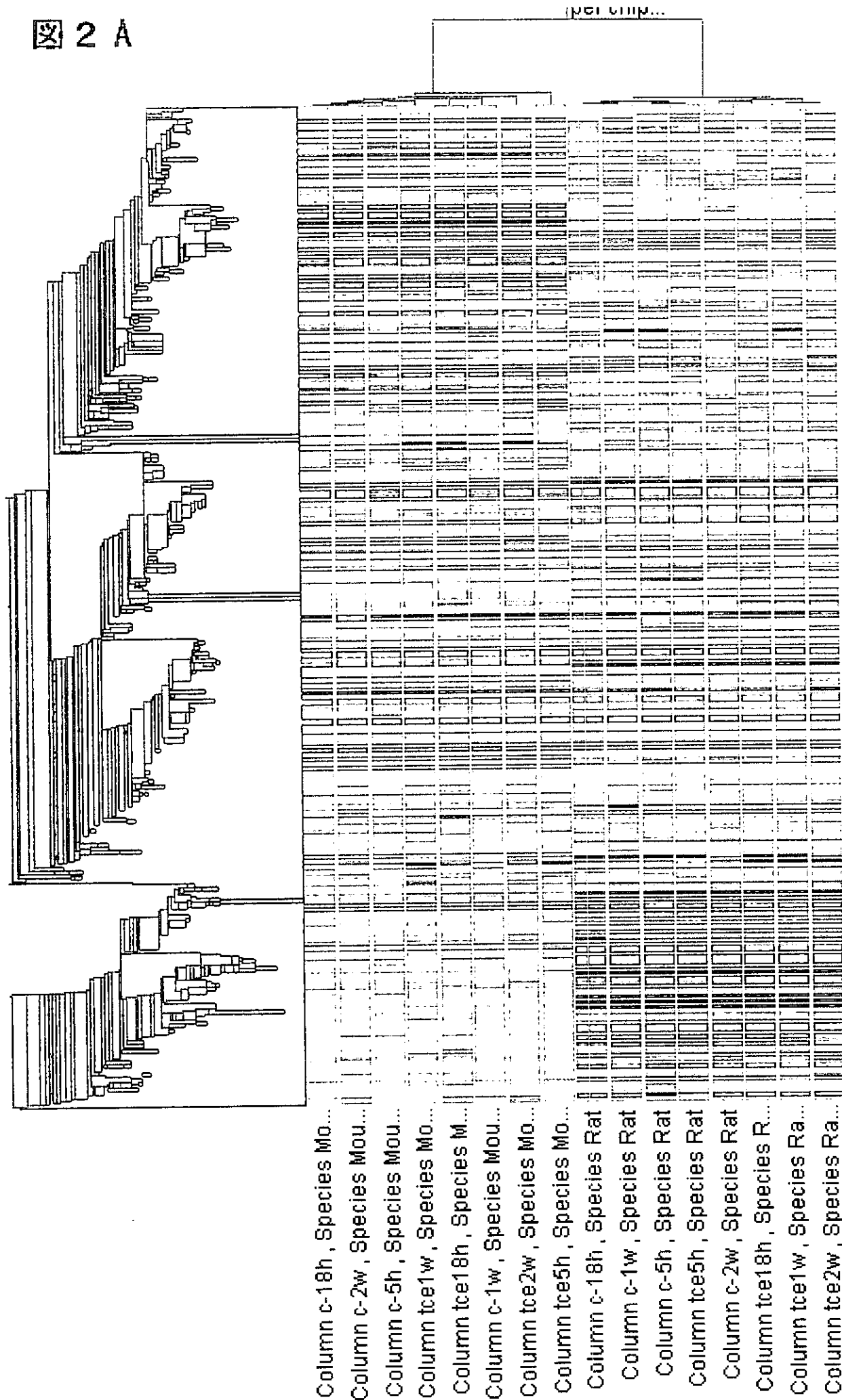


図 2 A



Selected Gene Tree:

per chip normalize...

Colored by: N/A

Selected Experiment Tree:

per chip normalize...

Gene List: all genes less ∞あり (7613), 187...

