

## 創薬における毒性回避のための戦略：cDNAマイクロアレイ解析による関連分子の探索と毒作用予見技術の確立

所 属 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  
研究者 井上 達

### 分担研究者

- (1) 日本ロシュ 前臨床科学研究部 堀井郁夫（平成13年4月～平成14年3月）
- (2) 日本ロシュ 前臨床科学研究部（現：中外製薬（株）鎌倉研究所 前臨床研究第二部）  
井上智彰（平成14年4月～平成15年3月）

### 要旨

創薬過程での前臨床試験で予知困難にして特殊なアッセイ系でのみ検出可能であったような障害に対して、造血器、特に造血幹細胞系、及び肝・腎などでの希少毒性に着目して、cDNA マイクロアレイを用いて簡便に予知する方策の開発について検討した。

### 1. 研究目的

本研究の目的は、創薬過程での前臨床試験で予知が困難で、特殊なアッセイ系のみではじめて予知可能であったような、造血器、特に造血幹細胞、或いは肝・腎などでの希少毒性を、cDNA マイクロアレイを用いて簡便に予知する方策を探ることにある。まず、造血細胞は、未分化な造血前駆細胞からさまざまな分化系列の細胞を含む。このため、従来の末梢血のモニターだけでは、潜在的な前駆細胞に限局した障害性を予知することが困難で、しばしば臨床試験に至って初めて認識されることが少なくなかった。また、肝細胞や腎臓の尿管細胞の培養系を用いて毒性を予測する場合、従来の方法では特異酵素の逸脱やミトコンドリア活性を指標とした生存細胞数などをパラメータとしてきたが、この従来の方法では、1つまたは数種類のパラメータしか同時に評価できないので、そのメカニズムや標的に至る正確な細胞障害性の本質が見落とされがちであった。そこで、ここでは cDNA マイクロアレイを用いて、考えられる障害性の可能な限り広範な対象を念頭に置いた網羅的な遺伝子発現を把握することによって、一見すると毒性指標とは思われないような通常の遺伝子発現を若干上回る（下回る）ようなレベルの包括的な遺伝子発現影響を毒性発現スペクトラムとして把握し、これらを通じてメカニズムや標的の評価も視野に入れた、これまで見落とされがちであった多面的な毒性の評価を可能とする予知技術を確認する方策を探る。

造血毒性に関しては、国立衛研が中心となり、明らかな遺伝子毒性物質であるところのベンゼンの、野生型マウスにおけるエピジェネティックな発がん機構と、p53 欠失マウスでの遺伝子毒性発がん機構という、特異な白血病発症機構に着目し、ベンゼンの吸入暴露時の、造血前駆細胞の遺伝子発現変化を野生型マウスと p53 欠失マウスとで経時的に測定し、細胞動態関連分子を中心に関連遺伝子の検索を行う。初年度は、エピジェネティック発がんとしての白血病発症機序の背景にあると考えられる、ベンゼンの吸入暴露時の造血前駆細胞の細胞回転の停止と、暴露の中断による急速な細胞動態の亢進、並びに、野生型マウスにおけるベンゼン曝露中及び回復期の遺伝子発現の経時変化を Incyte<sup>®</sup> のシステムによる cDNA マイクロアレイ解析を用いて行った。本年度は、より遺伝子数が多く、偽陽性に対する精度も高いとされる Affymetrix の Gene chip を用い、ベンゼン曝露直後について、野生型と p53 欠失マウスでの発現遺伝子の変化を比較検討した。

肝・腎などでの希少毒性に関しては、日本ロシュ（現：中外製薬（株）、平成14年10月1日より、合併による社名変更）が中心となって進めている。この研究の第1段階として、ラット実質肝細胞及び腎細胞の培養系において被験化合物に暴露し、遺伝子発現の変化を捉えることによって、肝毒性及び腎毒性の予測を行う場合に、培養による遺伝子発現の変化を把握しておくことは重要である。初年度は、ラット培養肝細胞の既知毒性物質による遺伝子発現変化を観察することを目的に、ラット肝から分離した実質肝細胞の培養条件及び培養期間による遺伝子発現の変化を調べた。すなわち、①最も簡単に広く行われているが肝臓に特異的な機能が低下すると言われている I 型コラーゲンコートプレートでの単層

培養、②肝臓での機能をより保つと考えられるI型コラーゲンゲル上での培養、③立体的細胞構築が *in vivo* に近いスフェロイド培養、の3条件について、それぞれ比較しつつ遺伝子発現の経時変化を検索した。本年度は、こうした成果に基づき、これらの肝細胞の培養系に既知の肝毒性物質添加による遺伝子発現変化を検討し、それぞれの肝毒性物質の、作用の特徴を反映すると考えられる遺伝子発現変動及び、肝毒性に共通した遺伝発現変動の抽出を試みた。

## 2. 研究方法

### A. 造血毒性

ベンゼン吸入暴露：ベンゼン溶液（和光純薬）を16°Cに加熱して、縦層流式吸入曝露チェンバー内の還流空気に混入させることで、300ppmとし、1日6時間、週5日の吸入曝露を行った。

個体内造血幹細胞動態解析法(BUUV法)：プロムデオシキユリジン（Sigma, MO, USA）の浸透圧ミニポンプ（Alza, CA, USA）によるマウス個体への持続投与後、そのマウスの骨髄細胞を *ex vivo* で近紫外線を照射する事による細胞周期内細胞の淘汰と、その後のコロニーアッセイによる生残コロニーの比率をもって周期内造血幹細胞比率とする。

ウェスタン解析：被検マウスの骨髄細胞から、細胞溶解バッファー（20%SDS, 2mM-phenylmethanesulfonyl fluoride, 5mM-p-aminobenzamide, 2μM-leupeptin, 1.3μM-pepstatin）中で、超音波粉碎して粗蛋白溶液を抽出する。これを SDS-polyacrylamide gel で電気泳動し、Hybond polyvinylidene fluoride 膜に転写し、細胞回転関連分子の特異抗体によって、泳動された蛋白中に含まれる当該蛋白量を測定した。

網羅的発現遺伝子解析：被検マウス骨髄細胞から、セパゾール溶液並びにキアゲンのカラムを用いて、総RNAを抽出・精製した。cDNA マイクロアレイ (Incyte™) による競合ハイブリダイゼーション法：検体は、ベンゼン暴露開始5・12日後、及び5日×2週間の曝露後休曝3日目に、それぞれ各群3匹野生型マウスの大腿骨から採取した骨髄細胞を用いた。曝露群から抽出した総RNAを鋳型としてcDNAを合成するときにCy5、sham群から抽出したRNAを鋳型とした場合にCy3でそれぞれ標識し、両者を混合して、Inciteのマイクロアレイにハイブリダイゼーションさせ、蛍光強度を計測し、曝露群のsham群に対する遺伝子発現の相対変化としての結果を得た。Gene chip (Affymetrix)による発現遺伝子解析：検体は、野生型とp53欠失マウスを用い、sham群とベンゼン暴露（5日×2週間）群、各群3匹の大腿骨から採取した骨髄細胞を用いた。それぞれのマウスから抽出した総RNAを鋳型として2本鎖cDNAを合成し、さらにこれを鋳型にビオチンラベルcRNAを合成、断片化を行い、Gene chipにハイブリダイゼーションさせて解析した。Chipは、Affymetrixのmouse U74 ver.2を用いた。

### B. 肝腎毒性

肝細胞の分離：雄Sprague-Dawleyラット（6～8週齢）から、*in situ perfusion*法により肝細胞を分離した。肝臓を摘出後、細胞をHBSSに浮遊させ、死細胞を除くために35% percollにて比重遠心を行い、沈降した細胞を実質肝細胞として用いた。細胞はWilliams' E培養液（10% FCS,  $10^{-7}$  M insulin,  $10^{-6}$  M dexamethasone 含）に $3 - 30 \times 10^5$  cells/mlの濃度に浮遊させ、培養に用いた。分離した細胞は、均一な実質肝細胞の形態を示し、80%以上のviabilityを得た。

実質肝細胞の培養：以下の3条件で培養した。①市販のI型コラーゲンコートプレートを用いた単層培養（mono-layer）、②I型コラーゲンゲル上での単層培養（collagen gel）、③回転培養によるスフェロイド培養（spheroid）。

実質肝細胞培養系における既知の肝毒性物質への暴露：以下にあげる既知の肝毒性物質を肝細胞培養系に添加した。即ち、acetaminophen (IC50: 14014 μM), amiodarone (IC50: 14014 μM), chlorpromazine (IC50: 14014 μM), cisplatin (IC50: 14014 μM), clofibric acid (IC50: 38.3 μM), cyclophosphamide (IC50: 3657 μM), diclofenac sodium (IC50: 263 μM), disulfiram (IC50: 35.4 μM), lithocholic acid (IC50: 94.8 μM)である。濃度は上記カッコ内に示した細胞毒性評価結果 (IC50) の1/3及び1/10の濃度で行った。暴露6時間目及び24時間目に細胞を回収しRNAの分離を行った。

RNAの分離及びGene chipによる発現遺伝子解析：方法は造血毒性の項に同じなので省略する。尚、用いたchipはAffymetrixのRat Toxicology U34 Arrayである。

## 3. 研究成果

### A. 造血毒性

ベンゼン曝露による造血幹細胞の細胞動態の修飾 (BUUV法による解析)：まず、野生型マウスの造血幹細胞では、細胞動態を反映して、BrdUrdの標識率が経時的に増加し、培養性コロニーの場合は6日

前後でプラトーに達した。これに対してベンゼンを曝露すると、標識率の増加は全く認められず細胞回転は停止に至ったものと考えられた。更に、ベンゼンの曝露を中止すると、急速に細胞回転は回復した。一方、p53 遺伝子欠失(KO)マウスでは、ベンゼン曝露による細胞回転の抑制は、殆どみられなかった。

ベンゼン曝露による細胞動態関連分子量の変化 (ウエスタン解析): 細胞回転関連分子のうち p15、p16、p18、p19、p21、p27、CDK2、CDK4、CDK6 について、曝露開始 1 日から 12 日まで、それぞれの蛋白質量を検討した結果、p21 の発現については、ベンゼン曝露をはじめると、次第にその濃度が上昇し、12 日目には定常状態の約 15~20 倍に増加するが、曝露を休止すると急速に定常状態まで回復した。また、p53KO では、この p21 の増加現象は観察されない。

ベンゼン曝露による発現遺伝子量の野生型における経時変化 (cDNA マイクロアレイ解析): ベンゼン曝露 5・12 日後、及び、12 日曝露終了 3 日目の回復期において、それぞれ sham 群に対する発現遺伝子変化を検討した。その結果、ベンゼン曝露中に発現が上がり、曝露終了後速やかに発現が低下するもの、逆に、曝露中は低下して曝露終了後速やかに上昇するもの、曝露期間中から上昇し曝露終了後も上がり続けるもの、などの種々のパターンとして認識される遺伝子の存在が観察された。例えば、ベンゼン代謝物の骨髄での代謝を司る事が知られている myeloperoxidase は、曝露中は高く、曝露終了後速やかに低下した。他方、cdk 関連分子のホモログで、曝露中は低下して、曝露終了後速やかに上昇するものがみられた。

ベンゼン曝露による発現遺伝子量の変化 (Gene Chip): ベンゼン曝露 12 日後において、sham 群に対する発現遺伝子変化を野生型と p53 欠失マウスで比較検討した。まず野生型で、先の解析でも見られた myeloperoxidase の発現上昇などを確認した。これをふまえて、野生型と p53 欠失マウスとを比較したところ、野生型では細胞動態の停止を反映する D1 cyclin の低下、Rb 関連遺伝子群 (p130、p48) の上昇などこれまでの観察結果や報告に矛盾しない遺伝子発現変化がみられた。他方、p53 欠失マウスでは、アポトーシス抑制因子としての Bcl-2 の発現がベンゼン曝露によって上昇していたが、同時にアポトーシス促進因子としての Caspase9 の発現も上昇していた。

#### B. 肝腎毒性

肝細胞培養による遺伝子発現変化: ラット肝細胞の培養により種々の遺伝子発現の変化が認められたが、培養条件 (monolayer, collagen gel, spheroid) によらず同様に变化した遺伝子が多く、特定の培養条件に特異的に発現が変化したことが明らかになった遺伝子は、24 遺伝子であった。培養条件に寄らず発現が増加した遺伝子は、beta-actin, heme 分解酵素, polyamine 合成酵素, 脂質代謝・生合成, coresterol 生合成, glutathione 合成, UDPGT, 細胞内情報伝達物質, ストレスに対する HSP 等の因子, 癌遺伝子等であった。また、培養液には insulin 及び dexamethasone を添加しているが、この作用であると考えられる PHAS-, mdm2 が増加している。培養条件によらず発現が減少した遺伝子は、Cytochrome P450 関連を中心とした種々の薬物代謝・ステロイド代謝に関わる酵素, 脂肪酸β酸化に関連する酵素, UDPGT family の 1 つ (UDPGTr-21) グルタチオン抱合酵素等であった。

Collagen gel 培養での acetaminophen 曝露による遺伝子発現変化: Collagen gel の培養条件でラット肝細胞を既知の肝毒性物質に曝露したが現時点で結果が得られ予備解析中である acetaminophen についての結果を示す。Acetaminophen (IC50 の 1/3 濃度) に 6 時間曝露した後の遺伝子発現の変化を予備解析の結果認められた遺伝子発現の変化は以下の通りであった。即ち Acetaminophen により発現が増加した遺伝子は、7 遺伝子あり、HSP 関連の heat shock protein 70 (HSP 70)及び 70 kD heat shock-like protein, ストレス関連の growth arrest and DNA-damage-inducible protein GADD153, P450 関連の cytochrome P450IIC13 及び CYP2A2 などであった。また逆に Acetaminophen により発現が減少した遺伝子は、P450 関連の cytochrome P450, liver cytochrome P450 M, 及び cytochrome P450 2F4, HSP 活性調節に関与する DNA J homolog 2 など 14 遺伝子であった。

### 4. 考察・まとめ

#### A. 造血毒性

野生型マウスに見られたベンゼンによる骨髄造血幹細胞の細胞動態の抑制は、p53KO マウスで抑制が認められなかったこととあわせて、p53 による発現制御が知られている p21 の蛋白質量が野生型で増加していたことから、p53 を介する p21 の増加によって引き起こされていたものと考えられる。但し、in vitro でのベンゼン曝露試験や、ここで観察された細胞回転の抑制に対して、p21 の増加の peak はむしろ遅い。これは、幹細胞動態停止に対して、p21 は全骨髄細胞で見ているため、個々の細胞、特に幹細胞でのそれを必ずしも反映していないことが考えられる。他方、何らかの別の機構によって、細胞回転が速やかに抑

制される機構についても念頭に置いて、更に解析を進める。

併せてこのことは、Benzene もしくは、その代謝物が、p53 の checkpoint を発動する程度には、DNA damage を引き起こすことを示唆している。従来、分化型の細胞では細胞回転が抑制されても、幹細胞ではむしろ亢進していることが想定され、その結果白血病が誘発されることが仮説とされてきたが、ここで得られた結果はこれを否定するものであった。野生型におけるベンゼン白血病は、以上のようなベンゼンによる細胞周期の停止とアポトーティックな細胞死による細胞数と細胞キネティックスのオシレーションと関連していることがわかってきた。尚、文献上は、ベンゼン曝露により細胞周期は、亢進するとする見解と、今回見たような停止を重視する見解とが見られる。この背景を検討したところ、細胞周期の亢進を示す報告は、基本的には、曝露後の時間経過が比較的長期に及ぶものが目立ったので、制御後のオーバーシュートを反映しているものとする。

cDNA マイクロアレイについては、Incite 社のマイクロアレイと Affymetrix 社の chip を用いた。双方の解析を行った野生型では、Incite の結果の一部は Affymetrix の DNA chip でも confirm する事ができ、さらに、western などの結果とも整合性のある細胞回転の抑制をよく説明する結果を得ることが出来た。今後これを元に、予想外の遺伝子発現変化についても解析を進める。また、p53 欠失マウスでは、DNA 修復酵素群の発現が抑制され、アポトーシスについては抑制因子としての Bcl-2 も、促進因子としての Caspase9 も上昇することによる、双方の拮抗したシグナルのバランスによって DNA 障害が充分修復されない状態にもかかわらずアポトーシスによる除去が効率よく行われなかった状態が想定された。

ベンゼン曝露後の造血幹細胞の細胞周期を検討して、ベンゼンの細胞周期に与える影響が、その急速な停止とおそらくは apoptosis の惹起にあることを初めて明らかにした。さらに、その細胞周期の変化が、曝露休止期における細胞周期の亢進を引き起こし、エピジェネティック発がんとしての白血病誘発を引き起こす母地となることを明らかにした。これらの経過中の遺伝子発現を網羅的に観察し、細胞周期制御関連の遺伝子群や増殖分化に関連する遺伝子群の発現の消長を見だし、ベンゼン白血病における野生型マウスの白血病誘発の背景となる遺伝子変化として矛盾のないものであることを明らかにした。

## B. 肝腎毒性

肝細胞培養による遺伝子発現変化: Cytochrome P450 の多くは低下していることが明らかとなり、培養という操作により、ストレス反応を引き起こしているものと考えられた。これらの変化は、今回検討した培養の条件の選択により完全に克服することは難しいものと考えられた。しかしながら、いくつかの遺伝子で、培養条件に特異的な変化が認められ、それぞれの培養条件の特徴が明らかとなった。生化学的に肝細胞の培養条件の選択により保たれる機能について調べた報告では、通常の単層培養に比べて胆汁合成、尿酸分泌、P450 誘導、GST 活性、UDPGT 活性、peroxisome proliferation 等が長期間維持されることが示されているが、本実験における遺伝子発現の解析の結果では、一部の P450 発現を始め、糖新生、 $\beta$ 酸化に関わる酵素の遺伝子発現が保たれていること、peroxisome proliferator-inducible gene の発現が保たれていること等がこれらを示唆するが、それぞれの機能は、単一の遺伝子に支配されているものではなく、多くの遺伝子発現が複雑に関与しているので、一部の遺伝子発現だけで単純に判断できないものと考えられる。種々の化合物の肝毒性を肝細胞の培養系で評価する場合に、今回の実験で得られた培養操作のみによる遺伝子発現の変化を考えに入れながら、それぞれの化合物による遺伝子変化を解釈する必要があるものと考えられる。また、今回の実験では行っていないが 1 週間以上に及ぶ長期の培養を必要とする試験系では、monolayer 培養では肝細胞が死滅してしまうので、細胞分裂がみられる他の細胞が主になってしまい、肝細胞の培養系として成立しなくなるが、spheroid, collagen gel 等では、1 週間以上の長期培養においても肝実質細胞が生存しており、多少の遺伝子発現変化は認められるが、維持されている機能を有効に利用することによりある特定の目的の肝細胞培養系としては成立しているものと考えられる。

Collagen gel 培養での acetaminophen 曝露による遺伝子発現変化: Acetaminophen に曝露後の遺伝子変化は種々のストレス反応に加えて、コレステロール合成・代謝、尿酸代謝、グルコース代謝の低下であった。どの変化が Acetaminophen に特異的なものか、また多くの毒性物質に共通する変化であるか、他の既知肝毒性物質での結果の解析を待たなければならないが、細胞毒性の結果としての遺伝子発現変化を概ね捉えているものと考えられる。Acetaminophen による肝毒性のメカニズムは P450 による代謝活性化とその後に発生する protein adducts によることが示唆されているが、詳細な遺伝子発現の経時変化及びそのメカニズムについては完全には解明されていない。また、in vivo においては、本培養系にはほとんど含まれていない Kupffer 細胞による反応の修飾も関与することが示唆されており、それに伴うサイトカイン等の炎症性遺伝子変化は、本培養系での遺伝子発現の解析では主な変化として捕らえられていない。このことは、in vitro 培養系を用いて毒性を評価する時には常に考えに入れておく必要があり、in vitro の系は in vivo

の反応全体を再現しているのではなく、部分的に系を取り出して標的を明確にすることによって検出したい反応を特異的に捕らえることが特徴であると考えられる。この点も含めて、acetaminophen 以外の既知の肝毒性物質での結果の解析が終了後に考察したい。

## 5. 研究発表

(誌上発表)

Inoue T: Introduction: Toxicogenomics-A new paradigm of Toxicology In: Toxicogenomics, Eds: Inoue T and Pennie WD. Springer, Tokyo, pp3-11, 2003.

Yoon BI, Hirabayashi Y, Kitada K, Igarashi K, Li GX, Kawasaki Y, Kanno J, and Inoue T: cDNA microarray analyses using mouse bone marrow tissue: investigation of the mechanisms of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity, *EHP* (投稿準備中)

Inoue T and Horii I: Development of an antigenicity study consisting of *in vitro* priming in mouse peritoneal exudate cells and *in vitro* anaphylaxis test in rat mast cells. *Alternative to Animal Testing and Experimentation* (投稿中)

Yoshida K, Aizawa S, Watanabe K, Hirabayashi Y and Inoue T: Stem-cell leukemia: p53 deficiency mediated suppression of leukemic differentiation in C3H/He myeloid leukemia, *Leuk Res*, **26**(12), 1085-92, 2002.

Yoon BI, Hirabayashi Y, Kawasaki Y, Kodama Y, Kaneko T, Kanno J, Kim DY, Fujii-Kuriyama Y and Inoue T: Aryl hydrocarbon receptor mediates benzene-induced hematotoxicity, *Toxicol Sci*, **70**(1), 150-6, 2002.

Tanaka K, Watanabe K, Mori M, Kamisaku H, Tsuji H, Hirabayashi Y, Inoue T, Yoshida K and Aizawa S: Cytogenetic and cellular events during radiation-induced thymic lymphomagenesis in the p53 heterozygous (+/-) B10 mouse, *Int J Radiat Biol*, **78**(3), 165-72, 2002.

Hirabayashi Y, Matsuda M, Aizawa S, Kodama Y, Kanno J and Inoue T: Serial transplantation of p53-deficient hemopoietic progenitor cells to assess their infinite growth potential, *Exp Biol Med (Maywood)*, **227**(7), 474-9, 2002.

Wang K, Shindoh H, and Inoue T, Horii I: Advantages of *in vitro* cytotoxicity testing by using primary rat hepatocytes in comparison with established cell lines. *J. Toxicol. Sci.* **27** (3), 229-237, 2002.

Inoue T and Horii I: Effects on fetal thymocyte populations and postnatal T cell dependent immune functions after maternal exposure to 5-fluorouracil during pregnancy in mice. *J. Toxicol. Sci.* vol. 27, (2), 79-86, 2002.

Yoon BI, Hirabayashi Y, Kawasaki Y, Kodama Y, Kaneko T, Kim DY, Inoue T: Mechanism of action of benzene toxicity: Cell cycle suppression in hemopoietic progenitor cells (CFU-GM) *Experimental Hematology*, **29**, 278-285, 2001.

Yoon BI, Hirabayashi Y, Kaneko T, Kodama Y, Kanno J, Yodoi J, Kim DY, Inoue T: Transgene expression of thioredoxin (Trx/ADF) protects against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced hematotoxicity. *Arch Environ Contam Toxicol.*, **41**, 232-236, 2001.

Yoon BI, Hirabayashi Y, Ogawa Y, Kanno J, Inoue T, Kaneko T. Hemopoietic cell kinetics after intraperitoneal single injection of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice. *Chemosphere*, **43**, 819-822, 2001.

Haraguchi S, Kitajima S, Takagi A, Takeda H, Inoue T, Saga Y. Transcriptional regulation of *Mespl* and *Mesp2* genes: differential usage of enhancers during development. *Mech Dev*, **108**, 59-69, 2001.

Sai K, Kang KS, Hirose A, Hasegawa R, Trosko JE, Inoue T. Inhibition of apoptosis by pentachlorophenol in v-myc-transfected rat liver epithelial cells: relation to down-regulation of gap junctional intercellular communication. *Cancer Lett*, **173**, 163-74, 2001.

五十嵐 勝秀、井上 達: -Report- 「トキシコゲノミクス国際フォーラム 2001」の開催と将来展望、MEDICHEM NEWS, p18-20, No. 2, May, 2002.

平林容子、井上 達: トキシコジノミクスーリバーストキシコロジーの誕生とトキシコロジーにおける新しいパラダイムの展開、国立医薬品食品衛生研究所報告 **120**, 39-52, 2002.

堀井郁夫, 創薬段階での非臨床評価, ハイスループレット・トキシコロジー, 野村, 堀井, 吉田編, 非臨床マニュアル (エル・アイ・シー, 東京), p335-334, 2001.

堀井郁夫, 創薬段階での非臨床評価, トキシコゲノミクス・トキシコプロテオミクス, 野村, 堀井, 吉田編, 非臨床マニュアル (エル・アイ・シー, 東京), p348-357, 2001.

(口頭発表)

平林容子、尹 秉一、川崎 靖、李 光勲、菅野 純、井上 達: ベンゼン白血病の誘発機序: p53 欠失マウスと野生型における異なった反応性、低線量放射線の生物影響に関する国際シンポジウム -放射線による細胞応答とがん発生の分子機構-(2002, 10), Meeting Proceedings, 2003, in press.

井上 達: Toxicogenomics がトキシコロジー研究に果たす役割、ミニシンポジウム 1 Toxicogenomics-

環境化学物質の生体影響強化におけるゲノム情報の活用、日本薬学会第122年会(2002.03.26)

Inoue T: Applied Genomics: A Tool in Toxicology, 33<sup>rd</sup> Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology (2002.02), Meeting abstract pp18-30, 2002.

井上 達: 「血液毒性」化学物質の造血組織に対する影響とリバーストキシコロジー、第24回日本学術会議トキシコロジー研究連絡委員会シンポジウム「毒作用解明のための分子毒性学的アプローチ」(2001.12.06)

Inoue T: Introductory Keynote Reverse Toxicology – a new paradigm of toxicology, Toxicogenomics International Forum 2001 (2001.10)

Inoue T: Life Science-based Future Toxicology, Lecture at the Seoul National University (2001.09.07)

堀井郁夫, 創薬安全性評価におけるスフェロイド細胞培養系について、第8回HAB協議会 学術年会(2001, 05)

堀井郁夫, 医薬品の創薬: 開発研究における薬物安全性評価の新しい動向と展開, 日本実験動物科学技術大会 2001 発表 (2001, 05)

井上 達: トキシコゲノミックスの展望、講演会「ヒト肝細胞・遺伝子発現解析からの副作用の予測」(2002.01.24)

## 6. 知的所有権の取得状況

- 1) 取得特許  
無し。
- 2) 実用新案登録  
無し。
- 3) その他  
無し。