

厚生労働科学研究研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

化学物質リスク評価の  
基盤整備としてのトキシコゲノミクスに関する研究  
(H15-化学-002)

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 菅野 純

平成16(2004)年4月

# 目 次

I. 総括研究報告書	
網羅的遺伝子発現解析による毒性評価システム開発及び研究の総括 菅野 純	..... 1
II. 分担研究報告書	
1. 生殖毒性に関わる毒性発現メカニズムの解析 江馬 眞	..... 85
2. 発生毒性に関わる遺伝子発現変動解析鳴法による検出系の開発 北嶋 聡	..... 94
3. 造血毒性の発現メカニズム研究 井上 達	..... 101
4. ストレスシグナルに関わる毒性発現メカニズムに関する研究 漆谷 徹郎	..... 106
5. 胸腺毒性に関わる分子メカニズムの研究 山中すみへ	..... 109
6. ヒト培養細胞アレイによる毒性インフォマティクス研究 矢守 隆夫	..... 117
7. マウス培養細胞による毒性メカニズム研究 小野 宏	..... 121
8. 変異原性毒性の生体防御反応として検出の研究 本間 正充	..... 123
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	..... 133
IV. 研究成果の刊行物・別刷	..... 137

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

総括研究報告書

化学物質リスク評価の基盤整備としてのトキシコゲノミクスに関する研究

主任研究者 菅野 純

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

研究要旨

本研究は化学物質リスク評価の基盤整備として、網羅的な遺伝子発現変化解析法を毒性学に適用するものであり、網羅的遺伝子発現プロファイリングを基にした化学物質トキシコゲノミクスデータベースを構築することにより、インフォマティクス技術を活用した化学物質の安全性評価の為の、より迅速、正確且つ安価な評価システムを構築することを目的とする。これにより、従来、人への外挿の際に採用してきたLD<sub>50</sub>や安全係数(不確実係数)の概念が持つ不確実性を補い、毒性発現メカニズムに基づいた、より正確な毒性評価システムの作成を目指す。

今年度の研究成果としてデータベース生成研究では、小型実験動物暴露に於いて、詳細且つ厳密なプロトコールに基づく暴露システム及び、我々の開発した絶対標準化システム(Percellome)を用いた品質管理システムを完成させることに成功した。平行して進めたデータベース生成実験により、本年度データが得られた化合物は25種類に至った。化学物質の選択に於いては、第一候補物質として選んだ100種類以上の化学物質の中から、今年度は、アセトアミノフェン、フェノバルビタール、イソニアジド、ペンタクロロフェノール等を選んだ。評価システムの構築と基盤となるアルゴリズム開発に於いては、多群多層データを解析できるソフトウェアの開発が急務であったため、類似度によるクラスタリング解析に必要なソフトウェア開発を先行させ、スーパーバイズド及び、アンスーパーバイズド(教師なし)クラスタリング解析を実現するインフォマティクスシステムの開発及び導入を行い、その両者に目処をつけた。基盤研究では今年度は、標的臓器別解析として生殖毒性について塩化ジブチル錫(DBTCI)による着床阻害効果のマウス実験系への適用に関して検討し、3.8mg/kgを妊娠4日の単回投与6時間後の子宮とすることに決定し、遺伝子発現プロファイル解析実施準備を完了した。発生毒性に関わる遺伝子発現変動解析として、「サリドマイド」を投与したadultマウス肝臓由来のRNAサンプルを用いて、GeneChip(Affymetrix社製)を用いた網羅的遺伝子発現を検討した。

造血毒性の発現メカニズム研究では、酸化ストレスによって発現の惹起される遺伝子群のプロファイリングを、まず野生型マウスを用いてベンゼン曝露条件下でのそれを

求め、既知の結果と比較し確認した。ストレスシグナルに関わる毒性発現メカニズムに関して、発現解析に用いる予定の ASK1 ノックアウトマウスを SPF 化したのち繁殖を始めた。胸腺毒性に関して、*in vivo* と *in vitro* の両面からサンプルを得、発現解析を行うために必要な実験的検討を行い、雌性マウスにダイオキシン 20  $\mu$ g/kg 投与すると、胸腺 9 日目に対照群の約 1/3 に萎縮することを確認し、*in vitro* では細胞死の見られない 5ppb 程度の低濃度のダイオキシンにより免疫細胞への影響が認められることを明らかにした。< 個体差、種差に関わる解析 >として、ヒト培養細胞アレイによる毒性インフォマティクス研究について、毒性化学物質約 30 種類を 39 系のヒトがん由来細胞株からなるがん細胞パネルで新たに評価し、ジギタリス剤である Digoxin や Ouabain は非常に緊密なクラスタを形成することを明らかにした。マウス培養細胞による毒性メカニズム研究では、マウスの系統による遺伝子発現応答の違いについて検討するために、マウス胎児繊維芽細胞 (MEF) を材料とすることとし、Cd<sup>2+</sup> の IC<sub>50</sub> 値が、C3H/He マウス細胞では 15  $\mu$ M、DBA マウス細胞では 7.5  $\mu$ M となることを明らかにした。遺伝毒性メカニズム解析に於いて、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を、変異原性研究に応用することを目的とし、アルキル化剤など、マウスに突然変異を起こすことが確かめられている化合物を 9 種投与し、臓器の回収をすべて終了した。まず DEN に関して GeneChip を中心に複数のマイクロアレイを用いて解析を行った結果、特徴的な遺伝子変化をリストアップすることができた。

#### 分担研究者

江馬眞 国立医薬品食品衛生研究所  
総合評価室長

北嶋聡 国立医薬品食品衛生研究所  
毒性部主任研究官

井上達 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センター長

漆谷徹郎 国立医薬品食品衛生研究所  
大阪支所室長

山中すみへ 東京歯科大学衛生学助教授

矢守隆夫 癌研究会癌化学療法センター  
分子薬理部部长

小野宏 (財)食品薬品安全センター  
秦野研究所所長

本間正充 国立医薬品食品衛生研究所  
変異遺伝部室長

#### A. 研究目的

本トキシコゲノミクス研究は化学物質リスク評価の基盤整備として、網羅的な遺伝子発現変化解析法を毒性学に適用するものであり、網羅的遺伝子発現プロファイリングを基にした化学物質トキシコゲノミクスデータベースを構築することにより、インフォマティクス技術を活用した化学物質の安全性評価の為の、より迅速、正確かつ安価な評価システムを構築することを目的とする。これにより、従来、人への外挿の際に採用してきた LD<sub>50</sub> や安全係数 (不確実係数) の概念が持つ不確実性を補い、毒性発現メカニズムに基づいた、より正確な毒性評価システムの作成を目指す。

#### B. 方法

本研究の目的のために約 100 化学物質を選択し、

3年間の研究期間に於いて小型実験動物(マウスを主体とする)を用いた暴露実験を行い、肝を主標的として発現プロファイルを可能な限り多数の遺伝子について採取する。これらのデータを逐次、電子ファイリングし、遺伝子プロファイルデータベースを構築する(データベース生成研究)。平行して基盤研究を実施し、既存知識と基盤研究により得られる知識を合わせ、インフォマティクスを構築し、既知機能クラスターを基にした予測システムを形成する。また、同時にインフォマティクス情報から未知機能クラスターを抽出し、その機能を検討しデータベースに還元する事で、その機能と精度を継続的に向上させて行く。

#### データベース生成研究:

小型実験動物暴露: 化学物質は原則的に経口投与とし、初期設定値として、単回投与(2、4、8、24時間後検体採取)実験を主体として、必要に応じて反復投与実験を追加しつつ実施する。投与用量は4段階を設定する(16群構成、各群3匹、1実験48匹規模)。mRNAは個体ごとに採取し、原則的に個体別に遺伝子発現プロファイルを得る(群ごとには行わない)。インフォマティクスの検討を進めた段階で、群数及び使用動物数を段階的に絞り込み、遺伝子プロファイルデータベースの構築を効率化する。今年度は30化合物を目標に単回投与のデータベース構築を行った。

化学物質の選択: 化審法対象2万物質の内、製造量、暴露量、暴露形態等を加味して、毒性メカニズムに関する既知情報からカテゴリー化が可能な物質群については、その代表的物質を優先的に選択する。3年間で約100化合物を選択する。

評価システムの構築: 4用量、4時点からの遺伝子発現情報を絶対量表示による標準化手法(Percellome)により数値表示し、測定全遺伝子から成る多層データ(いわゆる“mille-feuille”データ)を得る。ここでは、主任研究者らの開発した絶対量表示による標準化手法により、発現値を線形表示(ゼロ点を含む)することが出来るため、遺伝子欠失マウスのデータが無理なく表示、解析可能となる長所がある。また、絶対量表示と同時に標準化(絶対標準化)が行われるため、複数の実験間での遺伝子発現値の直接比較が可能であるという大きな利点がある。それらについて、アンスーパーバイズド(教師なし)クラスタリング解析を主体に生体反応のクラスター解析を行う。今年度はクラスター解析に必要なソフトウェアの開発を行う。

#### 評価システム開発の基盤となるアルゴリズム開発:

毒性評価システムを開発するにあたり、その基盤となるアルゴリズム開発に必要なハードウェア整備を行う。

#### 遺伝子発現プロファイル生成方法:

ゲノムの全遺伝子発現解析を目標とするが、(1)最も安定して(再現性)、(2)感度よく(SN比)用量相関性をもって、(3)可能な限り多数の遺伝子の発現プロファイルが獲得できる技術を採用する。現段階では、DNAマイクロアレイ技術が最適と考えられ、具体的にはAffymetrix社のGeneChipシステムを用いる。アレイ間のばらつき及び定量性に対する監視機構として、定量的PCR(いわゆるTaqMan PCR)による検討を実施する。定量的PCRに関しては、300種類の遺伝子発現測定を可能とすることを目

標とし、今年度は最適な primer の設計に目処をつけることとした。

基盤研究(探索的研究):以下の各個別研究を実施し、基盤研究とする。

- ・ ジブチル錫生殖毒性に関わる毒性発現メカニズムの解析(江馬)
- ・ サリドマイドによる血管新生、TNF- $\alpha$ 産生修飾を指標とした発生毒性に関わる遺伝子発現変動解析(北嶋)
- ・ フリーラジカルなどの活性酸素種(ROS)の中から数種の化学物質を選択する。これらの暴露に基づく、細胞内カルシウム上昇、過酸化水素の発生及び細胞増殖反応などに関与する関連標的遺伝子の発現を中心に観察を行う。ADF(チオレドキシン)の過剰発現動物での遺伝子発現変異をリファレンスアレーとして発現データプロファイリングの特殊化を行う(井上)
- ・ ASK1 ノックアウトマウスに於けるストレス応答シグナル系の解析研究(漆谷)
- ・ アリル炭化水素受容体及びグルココルチコイド受容体を介する胸腺毒性に関わる分子メカニズム研究(山中)
- ・ ヒト培養細胞アレイによる毒性インフォマテイクス研究(矢守)
- ・ 系統差に主眼を置いたマウス培養細胞による毒性メカニズム研究(小野)
- ・ 典型的な遺伝毒性物質(ジエチルニトロサミン、ジプロピルニトロサミン、エチルニトロソウレアを含む数化合物)に関する、多臓器での遺伝子発現データを蓄積しつつ実験手技を含めた標準的プロトコールの検討を行う(本間)

## C. 結果

### データベース生成研究

#### 小型実験動物暴露

本年度は初年度であり、データを蓄積することに加え、安定したデータの出る暴露システム及び遺伝子発現プロファイル生成システムを構築することを念頭に置いて研究を進めた。暴露システムとしては、実験マウスの搬入、飼育から化学物質投与溶液調製、サンプリング位置に至るまで詳細且つ厳密なプロトコールを完成するに至り、例えばサーカディアンリズムに則って発現変動する遺伝子について実験間での相違の無い極めて質の高いデータを得ることが出来るようになってきている。遺伝子発現プロファイル生成システムとしては、我々の開発した絶対量化システムを用いた品質管理システムを完成するに至り、発現値のばらつきが個体差を反映するものか、データの質の低さによるものかを判定することが可能となった結果、質に問題があるデータは発現データ測定をやり直すことで全体として高品質のデータを得ることが可能となっている。本年度実施し、データが得られた化合物は、25種類である。

#### 化学物質の選択

本研究で目標としている予測システムの構築に当たり、我々はマウス肝臓を標的臓器に定めている。そこで、肝臓に対する作用を有する物質を中心に化学物質の選択を行った。第一候補物質として100種類以上の化学物質を選び、実際にデータを得るものを絞り込んでいる。今年度は、アセトアミノフェン、フェノバルビタール、イソニアジド、ペンタクロロフェノール等を選んだ。

## 評価システムの構築と基盤となるアルゴリズム開発

本研究で構築するデータベースでは、化合物毎に濃度(4用量)、処理後時間(4時点)を振った16群からなるデータが登録される。また、同時に測定する遺伝子の種類は約4万であり、生成されるデータが多群且つ多層データ(いわゆる“mille-feuille”データ)となる。ここでは、申請者らの開発した絶対量表示により、発現値を線形表示(ゼロ点を含む)することが出来るため、遺伝子欠失マウスのデータが無理なく表示、解析可能となる長所がある。また、絶対量表示と同時に標準化(絶対標準化)が行われるため、複数の実験間での遺伝子発現値の直接比較が可能であるという大きな利点がある。しかし、このような多群多層データを解析できるソフトウェアは市販されておらず、データ解析を行うためにソフトウェアの開発が急務であった。今年度は、変動パターンの類似度によるクラスタリング解析に必要なソフトウェア解析を先行させ、同時にアンスーパーバイズド(教師なし)クラスタリング解析を実現するインフォマテイクシステムの開発及び導入を行った。その結果、“MF surface”を始めとするデータ解析ソフトウェア群の開発に成功し、類似度ベースのクラスタリング解析を効率的に行う環境を整備することに成功した。

また、NTT comware 社への委託研究を中心に、アンスーパーバイズドクラスタリング解析を実現する環境の整備にも目処がついた。すなわち、GeneSpring等の既存の市販解析ソフトウェアに実装されているKM法などを用いたクラスタリング手法では望むような分類ができない(処理速度とクラスターアルゴリズムそのものの両方の制約)状況に対し、この課題を解決すべく既存のパッケージに捕らわれない様々な分類手法を試み、最適な遺伝子の分類手法の開発を目指し、以下の検討を加えた(別紙 NTT

comware 社報告書参照)。

既存の解析ソフトウェアが持ち合わせていないクラスタリング手法のうち、まずEM法を用いて分類を試みた。この手法は、クラスター数を複数指定して、もっとも分離が良い方法を客観的に選択できるというメリットがある。しかしながらこの手法では、クラスター数=2(発現する/しない)が最適であるという現実的でない結果となった。これらのことから、クラスター数を指定せず、最適な分類を自動的に選択するクラスタリング手法を新規に開発することにした。そこで、以下の条件

- ・約4万以上の遺伝子を同時に対象に出来る
- ・クラスター数入力を必要としない
- ・有限時間で終了する

を満足する新規クラスタリング手法を独自に開発するため、密度をベースとしたクラスタリング手法を開発することとした。

このクラスタリングの特徴について、以下の点があげられる。

- ・類似度テーブルが用意できればRDBの操作文で簡易に実行できる
- ・クラスター数はある閾値と密度に依存するが、初期入力に与える必要がない
- ・類似度テーブルから、それぞれのクラスターの大きさが推測できる
- ・どの遺伝子からも離れている固有な遺伝子が抽出できる
- ・類似度テーブルについて、遺伝子数の組み合わせ程度であれば通常のPCサーバにより有限の時間で計算が完了する

まず特徴のある5129遺伝子で、ある閾値を適当に変化させていきながらこのクラスタリング手法を適用してみた。その結果、概ね50~100のクラスター

に分割することができた。MOE430v2 の 45101 プロブセットについて実施したところ、1000~1500 のクラスターに分割することに成功した。閾値の設定値によりクラスター数をおおよそコントロールできることが示された。

このクラスタリング手法は、既存の解析パッケージでは実行不能な大量計算を行い、有用性の高い多量の 2 次データを生成する。そこで、この手法を大型 DB 上に組み込み、全体としてシステム化する作業を、Teradata を基本に実施した。その結果、既製品を一切使用せずに我々の絶対量化データ(ミルフィーユデータ)の基本取扱が可能となった。

#### 遺伝子発現プロファイル生成方法

ゲノムの全遺伝子発現解析を目標とし、(1)最も安定して(再現性)、(2)感度よく(SN 比)用量相関性をもって、(3)可能な限り多数の遺伝子の発現プロファイルが獲得できる技術を開発した。現段階では、DNA マイクロアレー技術が最適と考えられ、具体的には Affymetrix 社の GeneChip システムを用いる。今年度は本システムの安定化及びデータ品質検討システムの開発を行い、スパイク RNA データに基づく品質検定法、データばらつきが GeneChip データ不良によるのか、動物個体差によるのかを判定する方法を確立することに成功した。アレイ間のばらつきに対する監視機構として実施予定とした定量的 PCR (いわゆる TaqMan PCR) については、従来法とは異なった原理による絶対量化 PCR プロトコルを考案し、測定対象とする遺伝子を約 300 種類選び、測定用の primer の最適化及び合成を開始した。

#### 基盤研究

生殖毒性に関わる毒性発現メカニズムの解析(江馬):ラットでしか検討されていない塩化ジブチル錫(DBTCI)による着床阻害効果のマウスの実験系への適用性に関して検討するため、C57BL/6Cr マウスの妊娠初期に DBTCI を投与し、着床阻害作用についての発現条件及び用量設定試験を行った。その結果を基に、遺伝子発現プロファイル解析に用いる投与、サンプリング条件を設定し、ジブチルスズ 3.8mg/kg を妊娠 4 日の単回投与 6 時間後の子宮とすることに決定した。

発生毒性に関わる遺伝子発現変動解析(北嶋):「サリドマイド」を投与した adult マウス肝臓由来の RNA サンプルを用いて、GeneChip(Affymetrix)を用いた網羅的遺伝子発現を検討した。発現が増加しているものの中には、少なくともストレス応答遺伝子群が見い出されたが、これ以外にも、興味深い遺伝子群が見い出された。

造血毒性の発現メカニズム研究(井上):酸化的ストレスによって発現の惹起される遺伝子群のプロファイリングを、まず野生型マウスを用いてベンゼン曝露条件下でのそれを求め、既知の結果と比較し、確認した。浮上した遺伝子の普遍性を確認するため、他の方法による検証を進めることとした。

ストレスシグナルに関わる毒性発現メカニズムに関する研究(漆谷):発現解析に用いる予定の ASK1 ノックアウトマウスを SPF 化したのち繁殖を始めた。マウスが使用可能になるまでの間、正常マウスを用いた ASK1 関連遺伝子発現解析の対照実験、MPTP 誘発性 Parkinson 病の条件検討を行った結



果、酸化ストレスを惹起することが知られている化学物質により、ASK1 関連遺伝子が共通して発現変化を示すことが認められた。

胸腺毒性に関わる分子メカニズムの研究(山中): *in vivo* と *in vitro* の両面からサンプルを得、発現解析を行うために、必要な実験的検討を行った。<*in vivo* 検討結果> 雌性マウスにダイオキシンの  $5 \mu\text{g/kg}$  及び  $20 \mu\text{g/kg}$  を投与した群は、初期に体重減少の傾向がみられたが、5 日目以降は回復して対照群との差は全く認められなかった。また行動や外観、糞尿にも異常所見は認められず、投与後3 日目の剖検でも各臓器に異常はみられなかった。しかし 9 日目の剖検では、 $20 \mu\text{g/kg}$  投与群のマウスでは、肉眼的にも明らかな胸腺の萎縮が観察された。胸腺重量を比較した結果、投与 3 日目では大差なかったが、9 日目には  $20 \mu\text{g/kg}$  投与群は対照群の約  $1/3$  と明らかな萎縮が認められた。<*in vitro* 検討結果> 正常リンパ球T細胞と白血病T細胞(Molt-3 細胞)に於ける CD-4 陽性及び CD-8 陽性、IL-2-R陽性の抗原発現をフローサイトメトリーで検索し、非特異的マイトゲン作用の強い PHA との接触では、両細胞ともに CD-4 及び CD-8、IL-2-Rのいずれも陽性細胞が明らかに増加したが、水銀やダイオキシンの接触では細胞の差がみられた。すなわち正常T細胞では、水銀及びダイオキシンの接触で、CD-4 陽性細胞、CD-8 陽性細胞及び IL-2-R陽性細胞のいずれについても減少の傾向がみられた。しかし Molt-3 細胞では、水銀とダイオキシンの接触により CD-4 陽性細胞の減少と CD-8 陽性細胞の増加を示したが、IL-2-R陽性細胞では水銀では増加、ダイオキシンの接触では減少の傾向であった。水銀では細胞死のみられる  $5\text{ppm}$  濃度での変化であったが、ダイオキシンの接触では、細

胞死のみられない  $5\text{ppb}$  程度の低濃度から免疫細胞への影響が認められた。

ヒト培養細胞アレイによる毒性インフォマティクス研究(矢守): 本年度は、GeneChip を用いた解析等、毒性分子機構の解析を行う毒性化学物質の選択を目的とし、毒性化学物質約 30 種類を 39 系のヒトがん由来細胞株からなるがん細胞パネルで評価した。調べた毒性化学物質のうちがん細胞増殖を直接は阻害しないものが見られた。これらについてはがん細胞パネルでは評価不能である。一方、約 6 割の毒化学物質ではがん細胞増殖阻害が見られ Finger Print が得られた。COMPARE 解析の結果、多くの場合毒性化学物質は既存の抗がん剤とは異なる Finger Print を示した。これは、毒性化学物質の多くが薬物である抗がん剤とは作用機作や分子標的を異にすることを示唆している。さらに、クラスター解析によって毒性化学物質の Finger Print 類似性に基づくグループ分けが可能であった。たとえば、ジギタリス剤である Digoxin や Ouabain は非常に緊密なクラスターを形成した。その他にも、CPIP、IPBC、Triazine、IBTA の 4 者、DTBHQ、Imparamine、2,4-Dinitrichlorobenzene の 3 者などもそれぞれのクラスターを形成した。

マウス培養細胞による毒性メカニズム研究(小野): マウスの系統による遺伝子発現応答の違いについて検討するために、マウス胎児繊維芽細胞(MEF)を材料とすることとし、*in vivo* に於ける  $\text{Cd}^{2+}$  による毒性作用の違いが、*in vitro* である MEF に於いても再現されるかどうかを、細胞毒性作用を見ることが検討した。その結果、 $\text{IC}_{50}$  値は、C3H/He マウス細胞では  $15 \mu\text{M}$ 、DBA マウス細胞では  $7.5 \mu\text{M}$  で

あった。

変異原性毒性の生体防御反応として検出の研究  
(本間):マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を、  
変異原性研究に応用することを目的とし、日本環境  
変異原学会MMS研究会における共同研究を行っ  
ている。アルキル化剤など、マウスに突然変異を起  
こすことが確かめられている化合物を投与し、得ら  
れた肝臓に於ける遺伝子発現変化を、市販ガラス  
マイクロアレイ、カスタムメイドマイクロアレイ、  
GeneChip などを用いて解析を行った。すでに、非  
遺伝子傷害性物質を含めた9化合物に関して投与  
が終了し、Affymetrix 社製 GeneChip を用いた解析  
をこれらの化合物に関して順次行っており、他機関  
において平行してガラスマイクロアレイを用いた解  
析が進行中である。

#### D. 考 察

##### データベース生成研究

本年度は、本研究で目標としている100化合物の  
うち、25 化合物についてデータ取得を終了した。こ  
れに加え、データ品質管理システムの構築、データ  
解析を可能とするソフトウェア、ハードウェアの整備  
にも成功した。これらの成果によって、蓄積されるデ  
ータを効率的且つ詳細に解析する必要最低限の環  
境が整備されたので、今後、本年度得られたデータ  
を更に詳細に解析し、既測定物質間の反応類似性  
を検討することにより、毒性メカニズム解析のインフォ  
マティクスの基盤を作ることが可能となる。次年度以  
降蓄積するデータを合わせ、毒性予測精度を向上さ  
せていく予定である。

##### 基盤研究

基盤研究は上記データベース生成研究により得ら

れる未知の遺伝子発現プロファイルの検証に寄与す  
べく実施しているものであるが、従来網羅的遺伝子発  
現解析が適用されてこなかった研究材料がほとんどで  
ある。そこで本年度は、実験条件の最適化に重点を置  
いて研究を進めた。その結果、分担研究のほとんどに  
於いて条件の最適化を終えることができた。これらの  
条件を用い、次年度以降網羅的遺伝子発現解析デー  
タを蓄積することができ、データベース生成研究による  
毒性予測精度向上に寄与することが期待できる。

#### E. 結 論

本研究の目的である化学物質リスク評価の基盤  
整備としてのトキシコゲノミクスデータベース構築に  
向けて、今年度はデータベース生成研究に於いて、  
小型実験動物暴露システムの確立、絶対標準化シ  
ステムを適用した網羅的遺伝子発現プロファイル品  
質管理システムの確立、25 種類の化学物質につい  
てのデータ取得、データ解析に必要な基本ソフトウ  
ェアの開発、アンスーパーバーズドクラスタリング環  
境整備など、データベース整備に必須な環境を整え  
ることに成功した。また、平行して進めた基盤研究に  
於いては、各分担研究に於ける網羅的遺伝子発現  
解析に最適な実験条件の設定に努め、次年度以降  
に本格的に検討を進めるための条件設定に成功し  
た。これらの成果に基づき、3 年間の研究期間に於  
いて約 100 種類の化合物からなる網羅的遺伝子発  
現データベースを整備する目処がついたとともに、  
得られたデータを存分に活用した毒性評価システム  
開発に向けて十分な成果が得られたものと判断して  
いる。

#### F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 原著

Tetsuji Nagao, Kazuyoshi Wada, Makiko Kuwagata, Madoka Nakagomi, Chiaki Watanabe, Shinsuke Yoshimura, Yoshiaki Saito, Kenji Usumi, Jun Kanno, Intrauterine position and postnatal growth in Sprague-Dawley rats and ICR mice. *Reproductive Toxicology*, 18, 109-120, 2004

Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2: coded single-dose studies. *Environ Health Perspect*. 2003 Sep;111(12):1550-8.

Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2: dose-response studies. *Environ Health Perspect*. 2003 Sep;111(12):1530-49.

Yoon BL, Li GX, Kitada K, Kawasaki Y, Igarashi K, Kodama Y, Inoue T, Kobayashi K, Kanno J, Kim DY, Inoue T, Hirabayashi Y. Mechanisms of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: cDNA microarray analyses using mouse bone marrow tissue. *Environ Health Perspect*. 2003 Aug;111(11):1411-20.

Hirabayashi Y, Yoshida K, Aizawa S, Kodama Y, Kanno J, Kurokawa Y, Yoshimura I, Inoue T. Evaluation of nonthreshold leukemogenic response to methyl nitrosourea in p53-deficient

C3H/He mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2003 Aug 1;190(3):251-61.

Fujiwara M, Kaneko T, Iwana H, Takemoto N, Tsunoo H, Kanno J, Ohkusa T, Okayasu I. Inhibitory effects of Bifidobacterium longum on experimental ulcerative colitis induced in mice by synthetic dextran sulfate sodium. *Digestion*. 2003;67(1-2):90-5.

Matsunaga N, Kanno J, Yoshimura I. A statistical method for judging synergism: Application to an endocrine disruptor animal experiment-Synergism in endocrine disruptor studies, *Environmetrics* 2003, Volume 14, Issue 2, 213-222

#### 総説 単行本等

菅野 純: IV 創薬への利用 “トキシコゲノミクス”、生体の科学、金原一郎記念医学医療振興財団/医学書院、54(5):477-481, 2003

菅野 純: 新たな創薬へ向けて “トキシコゲノミクス”、現代医療、現代医療社、35(7):239-244, 2003

菅野 純: 食品の安全性と確認 第5章汚染化学物質の安全確認の実用的評価法 第4節 環境ホルモン、(株)サイエンスフォーラム、2003年6月25日 123-127

Kanno, J: Reverse Toxicology as a future predictive toxicology :In: W.D. Pennie & T. Inoue (Eds.). *Toxicogenomics (proceedings of the Toxicogenomics International Forum 2001)*, Springer-Verlag Tokyo. 2002 pp213-218

学会発表

菅野 純、「分子標的」と「全遺伝子トキシコゲノミクス」、がん分子標的治療研究会 2003年6月2日 東京

菅野 純、「トキシコゲノミクスの現状」、第30回トキシコロジー学会学術年会ワークショップ「プロテオミクスとトキシコゲノミクスの現状と問題点」2003年7月20日 相模原

Jun Kanno, Toxicogenomics -A phenotype independent approach-, Annual Meeting of Korean Society of Toxicology, Oct 30, 2003, Seoul, Korea

菅野 純、「トキシコゲノミクスの新展開」、第26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 2003年12月3日 東京

菅野純、「IGS ラットを用いたトキシコゲノミクス」CD(SD)IGS 研究会/研究集会 2003年12月19日 東京

Jun Kanno “Focusing on Toxicogenomics Research” The 3<sup>rd</sup> International Congress of Asian Society of Toxicology : ASIATOX III February 1-6, 2004, Bangkok / Chiang Mai, Thailand

Jun Kanno, Aisaki Ken-ichi, Atsushi Ono, Katsuhide Igarashi “Toxicogenomics using “percellome” and “mille-feuille” data system” The Joint International Meeting of The Japanese Society of Toxicologic Pathology (JSTP) and The International Federation of Societies of Toxicologic Pathology (IFSTP) including The International Academy of Toxicologic Pathology (IATP)

February 15-18, 2004, Kobe, Japan

菅野 純「Toxicogenomics の進捗」第240回CBI学会研究講演会, 2004年3月19日、東京

G. 知的財産所有権の取得状況

1. 特許取得:

遺伝子の絶対発現量測定方法(出願中)

発明者:菅野純、相崎健一、五十嵐勝秀、小野敦、井上達、長尾拓

出願日:2003年9月9日

出願番号:特願2003-317031

出願人:菅野純、国立医薬品食品衛生研究所

2. 実用新案登録

該当しない

3. その他(データベース等)

該当しない

TTG 実験一覽表

実験番号	TTG	Title(投与物質)	M.W.	白黒	投与物質略語	Sex	マウスn数	Dose(mg/kg)	肝臓	腎臓	肺	精巣	胸腺	骨髄	大腸上皮	子宮	海馬	視床下部	動物実験実施日
1	Hepatotomy					♂	38		○										2002.9.17-27
2	Hepatotomy					♂	36		○										2002.10.21-31
3	Hepatotomy					♂	45		○										2002.12.2-12
4	Acetaminophen				Acetamino	♂	20		○										2003.1.23-1.30
5	Acetaminophen				Acetamino	♂	33		○										2003.1.27-2.3
6	Hepatotomy					♂	6		○										2003.2.17-27
7	Hepatotomy					♂			○										2003.3.4-5
8	Phenobarbital				PB	♂	48	0.17,50,150	○										2003.3.5-6
9	Valproic Acid				VPA	♂	48	0.89,267,800	○										2003.3.3-4
10	Acetaminophen				Acetamino	♂	48	0.60,180,600	○										2003.4.2-3
11	Isoniazid				Isoniazid	♂	48	0.15,50,150	○										2003.4.1-2
12	Thalidomide				Thalidomi	♂	48	0.80,240,800	○										2003.4.3-4
13	Paraquat				Paraquat	♂	48	0.10,30,100	○					○					2003.4.24-25
14	2,4-dinitrophenol			黒	2,4-DNP	♂	48	0.3,10,30	○										2003.4.22-23
15	4-amino-2,6-dichlorophenol			白	4A2,6DCP	♂	48	0.20,70,200	○										2003.4.23-24
16	Pentachlorophenol			黒	PCP	♂	48	0.10,30,100	○										2003.6.5
17	Hydroxytric Acid			黒	HCA	♂	48	0.3,31%	○										2003.6.19
18	2-Aminomethylpyridine			白	2-AMP	♂	48	0.20,70,200	○										2003.10.30-31
19	2-Vinylpyridine			黒	2-VP	♂	51	0.20,70,200	○										2003.10.23-24
20	TCDD				TCDD	♂	60	0.1,3,10,30μg/kg	○					○					2003.10.16-17
21	TCDF				TCDF	♂	60	0.1,3,10,30μg/kg	○					○					2003.9.30-10.1
22	Cisplatin				cis-pt	♂	83	0.5,15,50	○						○				2003.9.25-26
23	Transplatin				trans-pt	♂	83	0.5,15,50	○							○			2003.10.2-3
24	E2,BPA,GEN (子宮肥大試験)				E2, BPA, GEN	♀	56	0.3μg/kg, 70mg/kg, 25mg/kg, 35+12.5mg/kg	○										2003.9.2-5
25	Citric acid-calcium salt				CAC	♂	50	CAC:3.61% HCA:3.31%	○										2003.10.28
26	TCDF				TCDF	♂	60	0.1,3,10,30μg/kg	○					○					2003.11.13-14
27	1,2,3-Triazole			黒	1,2,3-TAZ	♂	48	0.40,140,400	○										2003.11.27-28
28	1,2,4-Triazole			白	1,2,4-TAZ	♂	48	0.40,140,400	○										2003.12.4-5
29	2-Aminomethylpyridine			白	2-AMP	♂	48	0.20,70,200	○										2003.11.20-21
30	N-Methylaniline			黒	NMA	♂	48	0.15,50,150	○										2003.12.18-19
31	2-Chloro-4,6-dimethylaniline			白	2C4,6DMA	♂	48	0.3,10,30	○										2003.12.11-12
32	3-Amino-1H-1,2,4-triazole			黒	3A1H1,2,4T	♂	48	0.40,140,400	○										2004.1.8-9
33	1,2-Dichloro-3-nitrobenzene				1,2-DC3NB	♂	48	0.3,10,30	○										2004.1.22-23
34	4-Ethynitrobenzene				4-ENB	♂	48	0.50,150,500	○										2004.1.29-30
35	Acetaminophen				Acetamino	♂	48	0.18,60,180	○										2004.2.26-27
36	Valproic Acid				VPA	♂	48	0.60,180,600	○										2004.2.5-6
37	Phenobarbital				PB	♂	48	0.15,50,150	○										2004.2.19-20
38	Hydroxytric Acid				HCA	♂	48	0.100,300,1000	○										2004.3.4-5
39	Citric acid-calcium salt				CAC	♂	48	0.100,300,1000	○										2004.3.11-12
40	Cisplatin				cis-pt	♂	80	0.5,15,50	○							○			2004.3.18-19

# 遺伝子発現パターン 解析結果報告書

---

2004年3月31日(水)

NTTコムウェア株式会社  
ビジネス創出部

1. 期待値最大化法を利用したクラスタリング
2. 次元リダクション
3. TMF計算
4. 密度ベースと階層的クラスタリングの融合
5. 関数近似手法

# 1. 期待値最大化法を利用したクラスタリング



## (1) Uteroデータに対するクラスタリング分析

入力データ

実験条件 (時間/dose) 毎にn匹 (2-4匹) のマウスによる発現量を単純平均した値

・ Gene数 : 12,488個

・ 変数 : 4 (時間毎) X 4 (dose毎) + 1 (0値) = 17変数

クラスタリング手法

期待値最大化法 (EM法) ※EM=Expectation Maximization

マハラノビス距離を使用し、統計的手法によりノイズの影響を受けにくい結果から求められる統計量 (AIC: 赤池情報量規準) により、最適なクラスタ数を求められる

データ加工手法

- (1) 加工なしによるクラスタリング
- (2) 発現量の対数変換によるクラスタリング



# 1. 期待値最大化法を利用したクラスタリング

## (1) Uteroデータに対するクラスタリング分析

分析結果 . . . (1) 加工なしによるクラスタリング

クラスタ数	収束ステップ数	最大対数尤度	AIC
2	24	-101.6577	881.32
3	37	-91.8425	1199.69
4	43	-86.8586	1527.72
5	50	-83.5964	1859.19

AIC (Akaike Information Criteria)

与えられたデータの範囲でより近い数式モデルを作るための統計指標。小さいほどよい

収束ステップ数より、クラスタの数を増やしていくと収束しにくい結果が得られた。これは、発現量が一様に分散しており、カテゴリ分けしにくい傾向があると推測される。

また、AICの値からクラスタ数=2が最適 という、

発現する / 発現しない

という2つのクラスタに分かれたと思われる 現実的な解ではない結果 になった

# 1. 期待値最大化法を利用したクラスタリング



(1) Uteroデータに対するクラスタリング分析

分析結果 . . . (2) 発現量の対数変換によるクラスタリング

クラスタ数	収束ステップ数	最大対数尤度	AIC
2	12	-4.1891	686.38
3	5	0.0884	1015.82
4	3	1.0533	1351.89

AIC (Akaike Information Criteria)

与えられたデータの範囲でより近い数式モデルを作るための統計指標。小さいほどよい

(1) の結果を踏まえて、データを対数変換することにより、発現量を圧縮したあとにクラスタリングを実施した。収束ステップ数をみるに、その効果はあったと思われる。

しかしながら、AICの値から クラスタ数=2が最適 という、

発現する / 発現しない

という2つのクラスタに分かれたと思われる 現実的な解ではない結果 になった

# 1. 期待値最大化法を利用したクラスタリング



## (1) Uteroデータに対するクラスタリング分析

### 結果の考察

2種類の方法により、クラスタリングを実施してきたが、両方とも現実的な解でないという結果に終わった。

これらの原因として、

- ・変数が多すぎることによる影響
- ・ノイズによる影響

などが考えられる。

これらのことから、これらの影響を除去するために、次のような方法が有効ではないのかと考えた

- (1) 変数が多すぎることによる影響を避けるために、何らかの方法で変数を減らす
- (2) ノイズによる影響を避けるために、Presenceが多くみられるGeneに絞ってクラスタリングを実施する

今回は(1)について、その方法についてのアプローチを検討した

# 1. 期待値最大化法を利用したクラスターリング



## (2) TTG8データに対するクラスターリング分析

分析結果 . . . (1) 加工なしによるクラスターリング

クラスター数	収束ステップ数	最大対数尤度	AIC
2	17	-90.4904	786.98
3	39	-82.1528	1072.31
4	50	-77.3473	1364.69

AIC (Akaike Information Criteria)

与えられたデータの範囲でより近い数式モデルを作るための統計指標。小さいほどよい

収束ステップ数より、クラスターの数を増やしていくと収束しにくい結果が得られた。これは、発現量が一樣に分散しており、カテゴリ分けしにくい傾向があると推測される。

また、AICの値から クラスター数=2が最適 という、

発現する / 発現しない

という2つのクラスターに分かれたと思われる 現実的な解ではない結果 になった