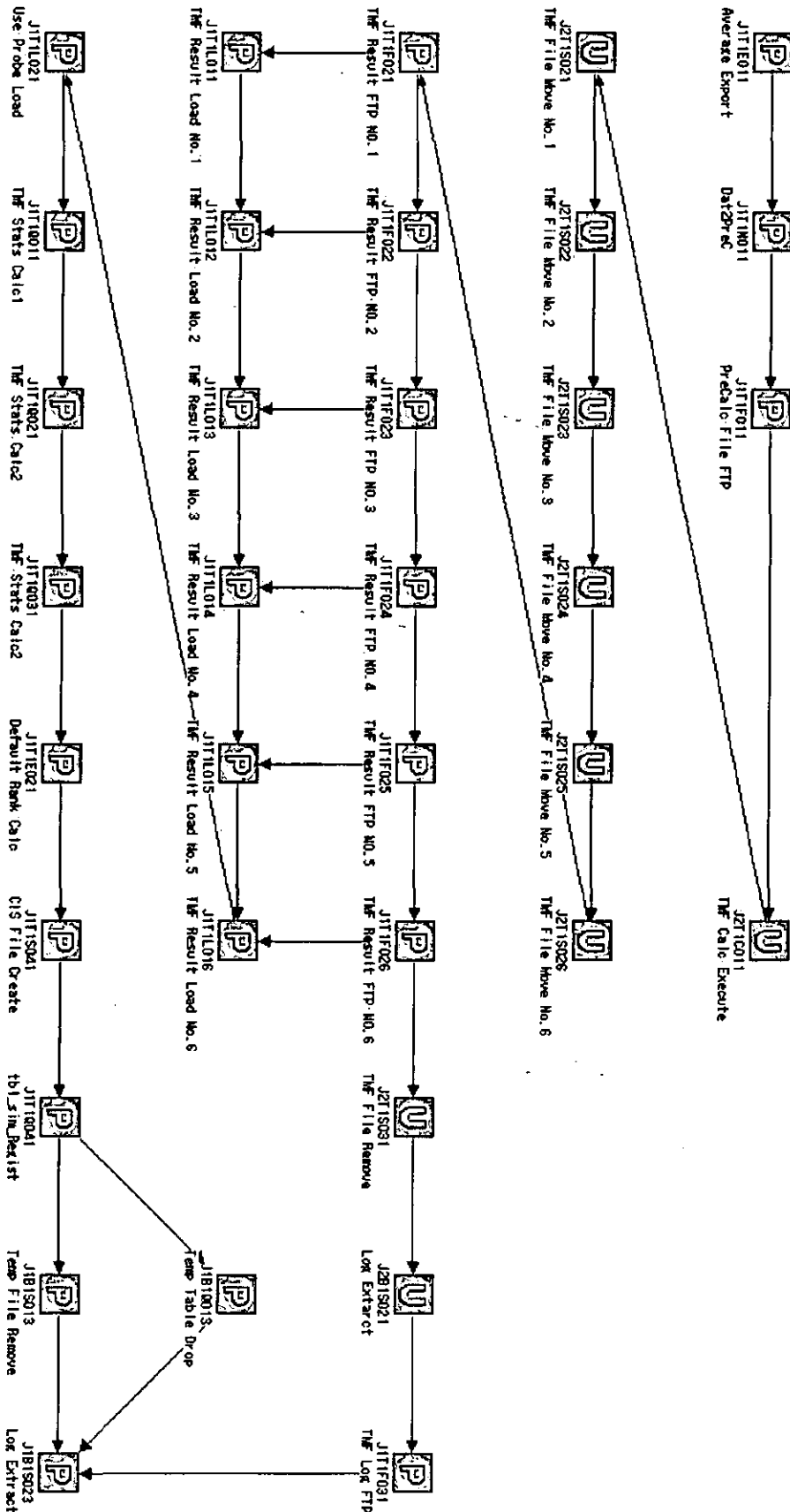
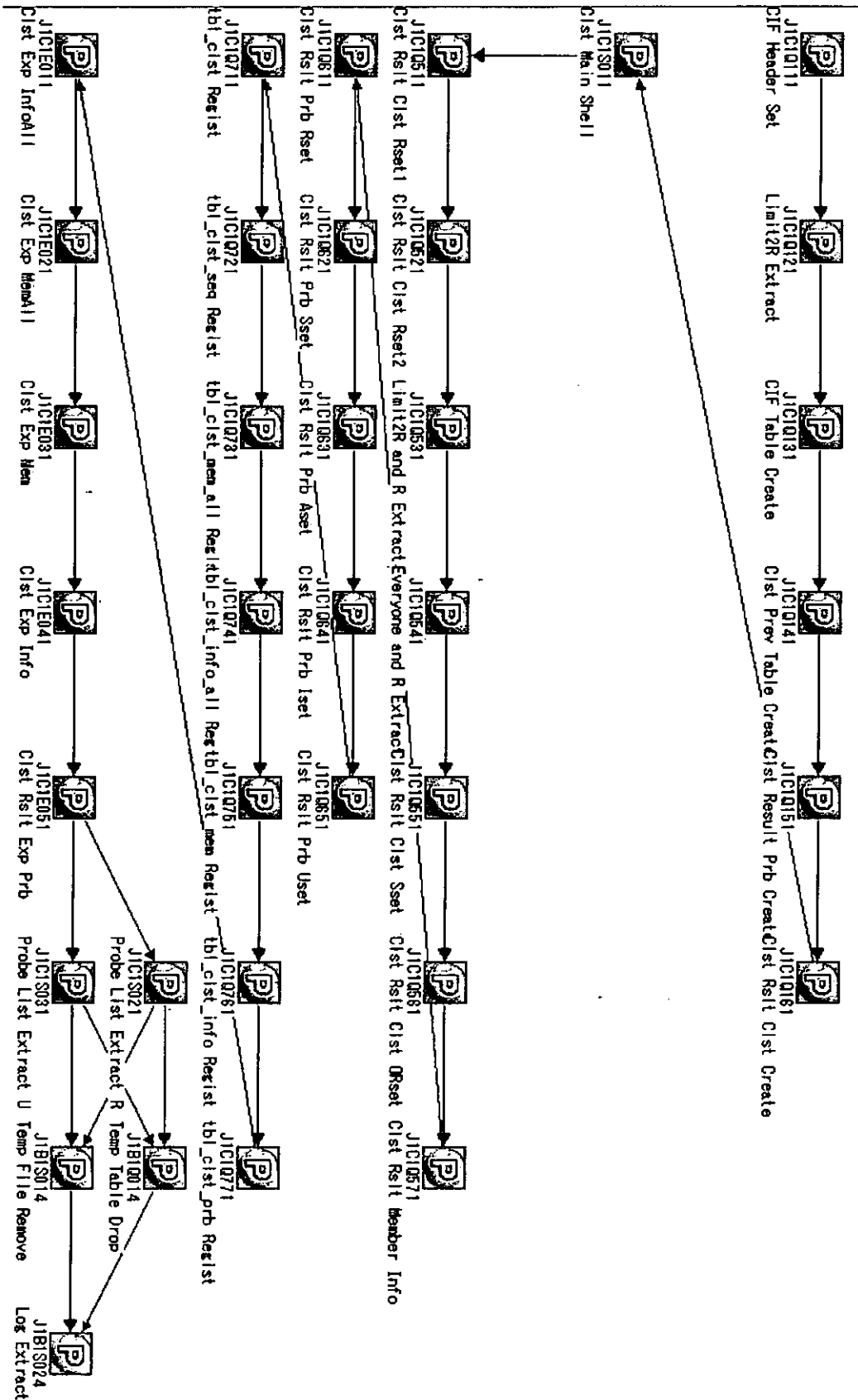
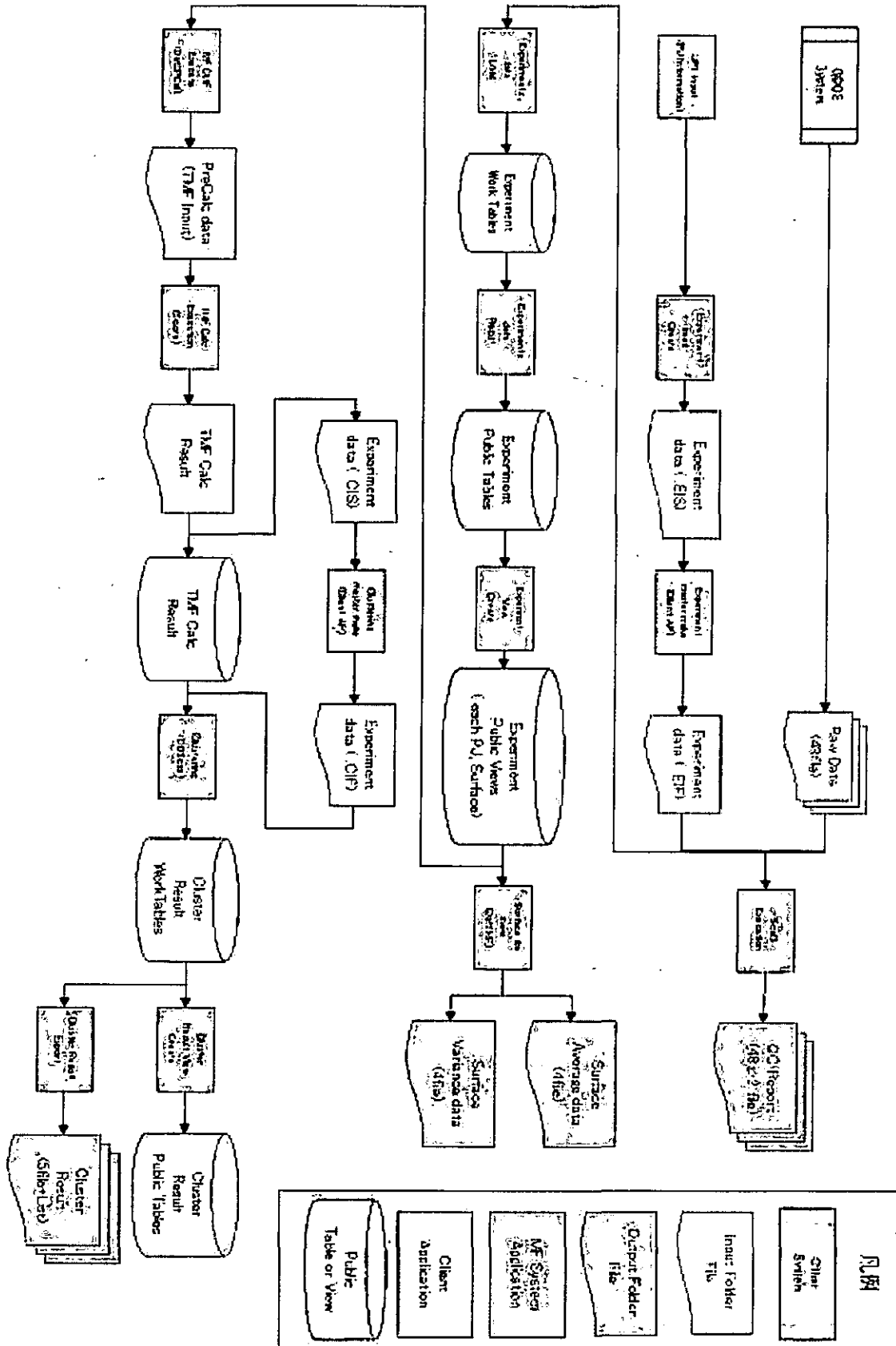


### ③ Similarityテンプレートのジョブネット

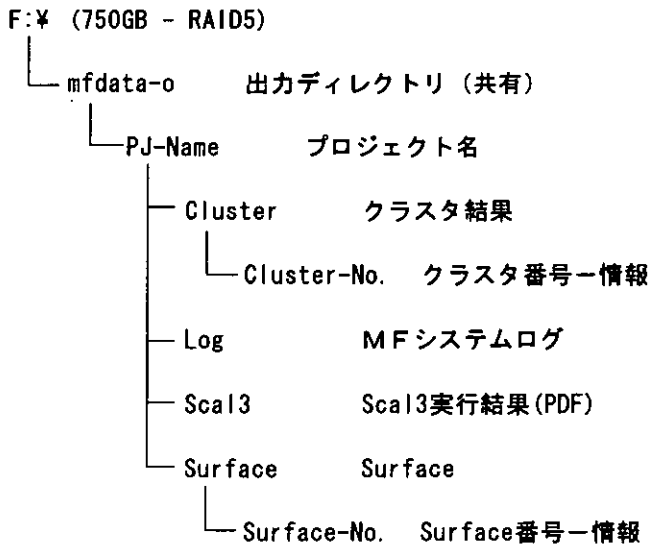
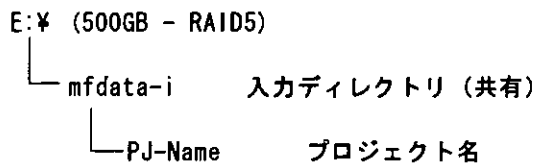
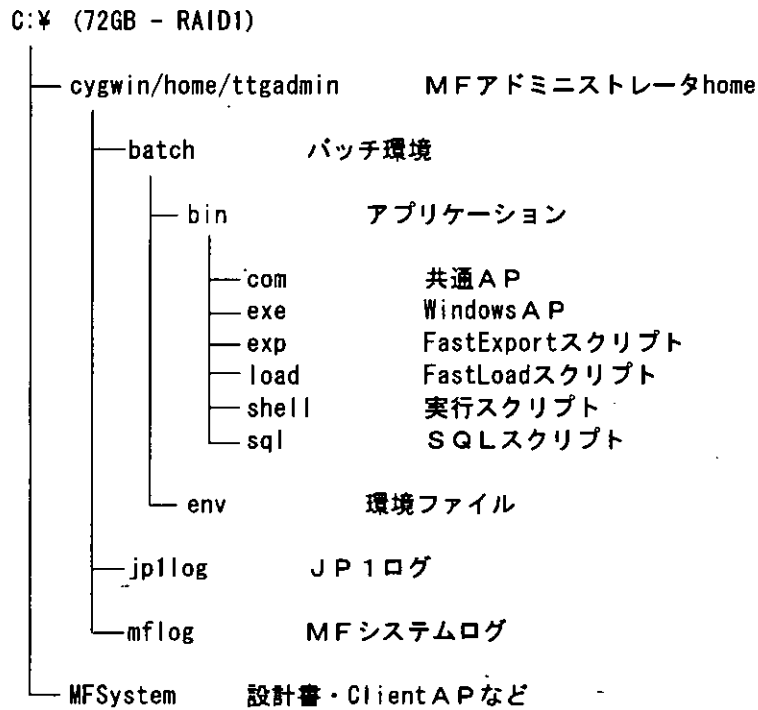


#### ④ Clusteringテンプレートのジョブネット



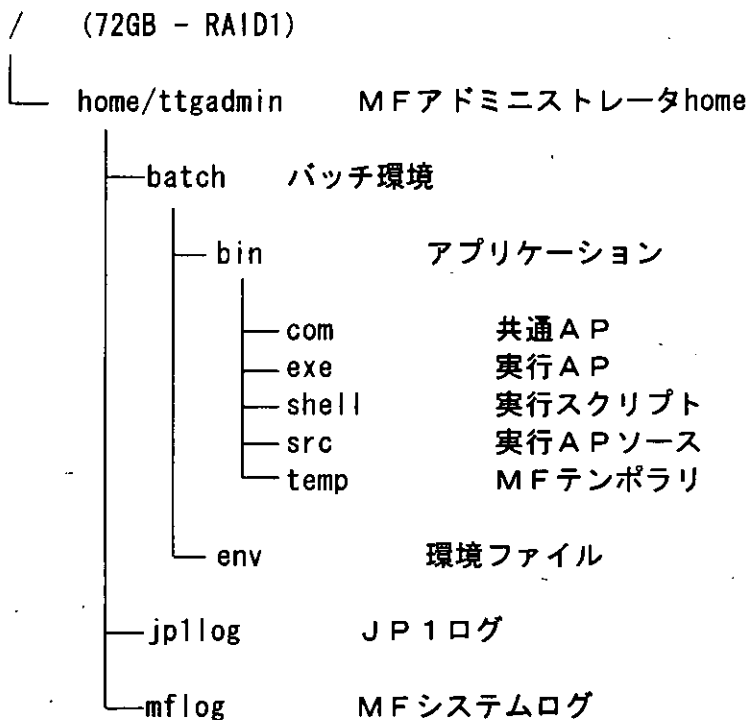


### 参考3 ディレクトリ構成 (Windows)

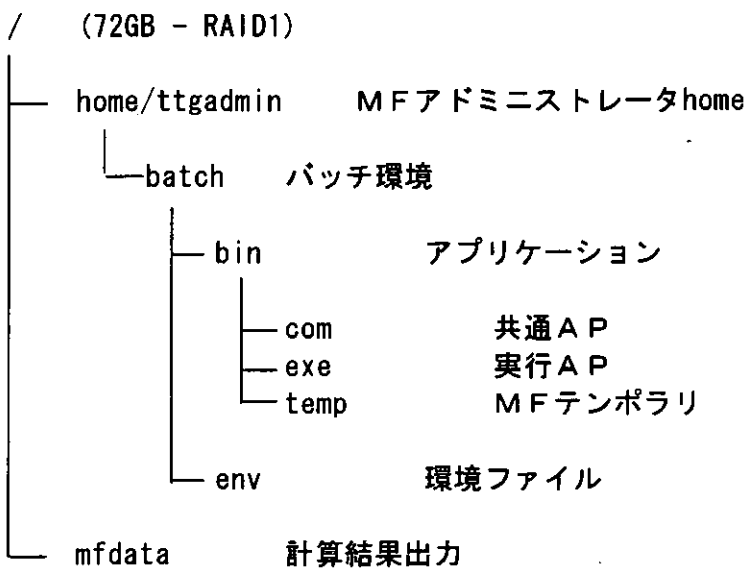


※青字は共有 (公開) ディレクトリ

TGTMFMAN



TGTMFCAL1-3



APが異常終了したときのMFシステムのログは、

**C:¥cygwin¥home¥ttgadmin¥mflog**

に下記の名称規約によって出力されています。

**[JOB-ID]\_[PJ-Name]\_[SurfaceNo]\_[SimNo]\_[ClusterNo].log**

(例) J1D1Q011\_TTG020-L\_001\_01\_01.log

ログのフォーマットは以下のとおりです。

**[JOB-ID] 開始年月日 開始時刻 プログラム名：ログ内容**

(例) [J1C1S011] 2004-03-26 14:51:49 Clst\_Main\_Shell : MainAP Start

異常終了したときは、ログ内容にエラー内容が出力されていますので、内容を確認してエラー対処してください。

また、Teradataでエラーが発生したときは、上記に加えてTeradataのログも出力していますので参考にしてください。

対処したあと、該当ジョブをJP1から「再実行」することにより、処理を進めることができます。

分担研究報告書

研究課題名：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

分担研究課題名：生殖毒性に関わる毒性発現メカニズムの解析

分担研究者 江馬 眞 国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室長

研究協力者 広瀬明彦 国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室

### 研究要旨

本研究は、生殖障害を引き起こす物質のスクリーニングや毒性予測のための因子同定の足がかりとすることを目的としており、平成 15 年は、このような典型的な生殖毒性を示す物質としてジブチルスズ（DBTC1）を選択し、DBTC1 による着床阻害における母体側の要因としての子宮の機能低下の発現機序を明らかにすることを計画した。まず、ラットでしか検討されていない DBTC1 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した。その結果、用いた系統（C57BL/6Cr）では受胎成績が悪く、DBTC1 による着床阻害効果を検出することが困難であった。そこで、DBTC1 による早期の遺伝子発現状況を検討するため、黄体の確認できる妊娠 4 日の DBTC1 単回投与 6 時間後の子宮より RNA を調整することにした。また、DBTC1 による着床阻害効果の子宮側因子の解析のために、偽妊娠動物を作成し、DBTC1 の子宮単独に与える影響についても検討することとした。

#### A. 研究目的

生殖毒性を示す環境化学物質の中でも、有機スズはプラスチック等の可塑剤として大量に生産されており、その中でもジブチルスズ（DBTC1）は有機スズ化合物のなかで最も多く使用されている化合物であり、巻き貝にインボセックスを惹起するトリブチルスズの主要な代謝物としても知られている。ジブチルスズは巻き貝のインボセックスは惹起しないが、ラットに対しては強い生殖発生毒性を示す。我々は、ジブチルスズをラットの妊娠中期に投与したときには胎児奇形を誘発し、また、ラットの妊娠初期に投与したときには着床阻害を起こすことを報告した。また、ラッ

トにおけるジブチルスズによる着床阻害は子宮の機能の低下、すなわち、子宮の脱落膜形成の抑制によって起こることを示唆した。

本研究においては、このような典型的な生殖毒性を示す物質としてジブチルスズを選択し、ジブチルスズによる着床阻害における母体側の要因としての子宮の機能低下の発現機序を明らかにすると共に、生殖障害を引き起こす物質のスクリーニングや毒性予測のための因子同定の足がかりとすることを目的とする。

#### B. 研究方法

ラットでしか検討されていない DBTC1 による着

床障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、着床障害作用についての発現条件及び用量設定試験を行った。

次に、最適条件における、受精卵着床時の（経時的あるいは用量依存的な）妊娠子宮の遺伝子発現プロファイルを調べ、着床障害に関係する遺伝子発現変化を同定する。また、胚を有しない偽妊娠マウス子宮の遺伝子発現プロファイルについても検討し、より系を簡単にした生殖障害検出系の開発のために、偽妊娠子宮が使用できるかどうかについても検討する。

発現条件及び用量設定試験は以下のように行った

**被験物質**：Dibutyltin dichloride (DBTCI) (東京化成工業株式会社, D 0223, Di-n-butyltin Dichloride, ロット GG01)を用いた。

**使用動物**：マウス (C57BL/6Cr Slc: 日本ESL) を、雄は 8 あるいは 9 週齢、雌は 7 週齢で入手し、入手日を含め 7 日間の検疫を行った後に使用した。

**投与**：

被験物質の調製：調製は投与当日に行った。溶解を容易にするため、秤量前に乳鉢で細粒化した。秤量可能な適当量を量り取り、媒体(オリーブ油, 和光純薬工業株式会社, 150-00276, ロット WAE5371, PKL4490)に溶解して、いったん高濃度液を作製した後、さらに媒体で希釈して所定濃度の溶液を作製した。使用ロットの純度(99.5%)から、実質の DBTCI 量が所定濃度となるように換算した。

投与経路および投与方法：投与経路は経口投与

とし、1 mL のガラス製注射筒およびマウス用経口ゾンデを用いて強制経口投与した。投与液量は 10 mL/kg とし、個体別に投与日の体重に基づいて算出した。

試験および観察方法：雌を、雄と 1 対 1 で夜間に同居させ、翌朝腔栓あるいは腔垢中に精子が認められた場合に交尾成立とし、その日を妊娠 0 日とした。受胎率向上検討においては、同居前 7 日以上腔垢像を観察し、腔垢像から交配適期と判断された日(発情前期を示す、あるいは周期からみて翌日が発情期と予測される日)に同居させた。予備検討、反復投与試験および単回投与試験においては、妊娠 0 日に群分けを行い、各群に任意に交尾成立動物を振り分けた。

**群構成**

①予備検討

物質名 投与量 (mg/kg/day)	投与期間 (妊娠日)	交尾成立 動物数
媒体	0-7	5
DBTCI (3.8)	0-3	5
DBTCI (15.2)	0-3	5
DBTCI (3.8)	4-7	6
DBTCI (15.2)	4-7	5
無処置	—	10
DBTCI (1.9)	0-3	10
DBTCI (7.6)	0-3	10
DBTCI (1.9)	4-7	10
DBTCI (7.6)	4-7	10

②反復投与試験

物質名 投与量 (mg/kg/day)	投与期間 (妊娠日)	交尾成立 動物数
------------------------	---------------	-------------



媒体	0-3	21
DBTC1 (0.95)	0-3	20
DBTC1 (1.9)	0-3	20
DBTC1 (3.8)	0-3	20
無処置	4-7	7
DBTC1 (0.95)	4-7	7
DBTC1 (1.9)	4-7	7
DBTC1 (3.8)	4-7	7

### ③単回投与試験

物質名 投与量 (mg/kg/day)	投与期間 (妊娠日)	交尾成立 動物数
媒体	1-3	20
DBTC1 (3.8)	1	20
DBTC1 (3.8)	2	20
DBTC1 (3.8)	3	20

### ④受胎率向上検討

交尾成立した無処置動物 23 例

#### 観察方法

各試験の観察項目、時期および測定頻度は、

#### ① 予備検討

体重：妊娠 0 日，投与日，投与終了翌日

帝王切開日：妊娠 18 日

観察項目：剖検，黄体数，妊娠子宮重量，着床数，胎児の生死，生存胎児の性別および体重

#### ② 反復投与試験

体重：妊娠 0 日，投与日，投与終了翌日、帝王切開日

帝王切開日：妊娠 10 日

観察項目：剖検，黄体数，着床数，胚の生死

#### ③ 単回投与試験

体重：妊娠 0 日，投与日，投与終了翌日、帝王

#### 切開日

帝王切開日：妊娠 10 日

観察項目：剖検，黄体数，着床数，胚の生死

#### ④ 受胎率向上検討

体重：妊娠 0 日，投与日，投与終了翌日、帝王切開日

帝王切開日：妊娠 4 日（20 例）、妊娠 7 日（20 例）

観察項目：剖検，黄体数，着床数（妊娠 7 日のみ）

## C. 研究結果

### ① 予備検討

当初，対照および I～IV 群を 5 ないし 6 例/群で検討を開始したところ，15.2 mg/kg の用量における死亡および不妊の多発が認められた。そのため，用量を下げ，かつ例数を増加し V～IX 群（10 例/群）を実施した。その結果，死亡は 7.6 mg/kg の用量においても認められた。また，DBTC1 を投与していない I（対照）および V 群（無処置）における妊娠率が合計 11/15（73%）であったのに対し，投与群における妊娠率は合計 21/61（34%），妊娠初期に死亡した 4 例を除いても 21/57（37%）と低い傾向が認められた。このことから，DBTC1 による着床への影響が予想され，その影響発現には母動物ごとに着床が完全に阻害されるか否かの悉無律的な特性があることが推測された。

### ② 反復投与試験

予備検討の結果から，用量を死亡のみられなかった 3.8 mg/kg 以下に設定し，着床が認められない場合においても黄体数の観察が可能と考えられた妊娠 10 日を帝王切開日として，反復投与試

験を行った。その母動物の帝王切開の成績を Table 2 に示した。

妊娠 10 日までに発情回帰する動物が、IV 群(妊娠 0~3 日に 3.8 mg/kg 投与)に 20 例中 8 例、VIII 群(妊娠 4~7 日に 3.8 mg/kg 投与)に 7 例中 6 例みられた。また、IV 群において黄体の確認された動物の平均着床前死亡率は 39.2%と I (対照)群の 15.3%に比し高い傾向がみられ、被験物質の着床に及ぼす影響のように思われた。しかし、I (対照)群においても発情回帰例が 21 例中 8 例と多く、被験物質の影響か否か明らかではなかった。

### ③ 単回投与試験

上記の反復投与試験において、被験物質による着床阻害作用が疑われた 3.8 mg/kg の用量で、妊娠 1, 2 あるいは 3 日に単回投与し、着床に及ぼす影響を検討した。受胎率の向上を意図し、交配用の雄を生殖発生毒性試験に汎用される Crj:CD-1(ICR)とした。その母動物の体重および帝王切開の成績をまとめて Table 3 に示した。

発情回帰動物の発現頻度および黄体の確認された動物における着床前死亡率ともに I (対照)群と II~IV (被験物質投与)群との間に明らかな差はみられず、着床阻害作用は確認できなかった。

### ④ 受胎率向上検討

受胎率の向上を目的として、雌雄を同居させ自然に交配させるのではなく、事前に膣垢像を観察し、発情前期の確認された日に同居させ、交尾の確認された動物を妊娠 7 日に帝王切開した。交配用の雄には Crj:CD-1(ICR)を用いた。その成績を Table 4 に示した。

黄体が確認された動物は 20 例中 16 例(80%)、着床胚が認められた動物は 10 例(50%)であり、単回投与試験の I (対照)群{黄体が確認された動物 20 例中 15 例(75%)、着床胚が認められた動物 13 例(65%)}と比較して受胎率の向上は認められなかった。

他に 3 例を妊娠 4 日に剖検したところ、1 例は妊娠 4 日相当日に発情回帰したが、2 例では黄体が観察可能であり、それぞれ 7 および 11 の黄体が計数された。

## D. 考察

対照群の C57Bl/6Cr マウスの受胎成績が悪く、DBTC1 による着床阻害効果を検出することが難しいので、受胎成績を改善するために雄 ICR マウスを使用や事前の膣垢像観察を行い、雌 C57Bl/6Cr と交配させて DBTC1 の着床阻害作用を検討したが、改善は認められなかった。

そこで、発現解析を行うために、結果②で着床阻害傾向の認められた 3.8 mg/kg を投与量として設定した。早期の遺伝子発現状況を検討するため、着床阻害作用が最も顕著に見られる投与日に DBTC1 を投与したマウスの子宮を採取し、組織学的検査及び遺伝子解析を行うこと、および妊娠確定のための黄体確認動物を選別して使用することを目的として、黄体の確認できる妊娠 4 日の DBTC1 単回投与 6 時間後の子宮より RNA を調整することにした。また、DBTC1 による着床阻害効果の子宮側因子の解析のために、偽妊娠動物を作成し、DBTC1 の子宮単独に与える影響についても検討することとした。本実験は現在進行中であり、RNA サンプルができ次第、Affimetrix のシステムの DNA チップを用いて遺伝子発現を解析する予定

である。

今後の対策としては、C57Bl/6Cr 以外の受胎率の高い系統をマウスの着床阻害効果の検証に使うことを検討すると共に、今回の C57Bl/6Cr との発現状況との比較を行うことにより、系統の違いを含めた DBTCI 着床阻害効果の作用メカニズムの解析を行うとすることが必要であると考えられた。

#### F. 研究発表

Ema, M., Harazono, A., Hirose, A., Kamata, E.  
(2003) Protective effects of progesterone on implantation failure induced by dibutyltin dichloride in rats. *Toxicol. Lett.* 143: 233-238.

Ema, M., Miyawaki, E., Hirose, A., Kamata, E.  
(2003) Decreased anogenital distance and increased incidence of undescended testes in fetuses of rats given monobutyl phthalate, a major metabolite of butyl benzyl phthalate. *Reprod. Toxicol.*, 17, 407-412 (2003).

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

Table1. ①予備検討結果

群	投与量 mg/kg	投与期間 妊娠日	個体 番号	個体 状況	体重(g)			妊娠子宮 重量(g)	黄体数	着床数	着床前 死亡率%	着床後死亡率%			生存胎児			
					妊娠0日	妊娠18日	修正体重					総計	着床後	吸収胎	死亡児	総計	雄	
対照	利-7油	0-7	001	着床認めず	19.9	21.1												
			002		18.2	34.5	22.3	12.24	10	9	10	0	0	0	0	9	7	
			003		17.7	31.9	22.0	9.88	11	9	18	22	0	22	0	7	3	
			004		19.1	33.1	23.4	9.75	11	10	9	30	0	30	0	7	1	
			005		18.6	33.5	23.2	10.33	9	9	0	22	0	22	0	7	5	
			妊娠4/5(80%)	平均値	18.7	30.8	22.7	10.55	10.3	9.3	9.3	18.5	0	18.5	0	7.5	4.0	
			標準偏差	0.8	5.5	0.7	1.15	1.0	0.5	7.4	12.9	0	12.9	0	1.0	2.6		
I	3.8	0-3	101	着床認めず	17.1	21.1												
			102	着床認めず	18.2	20.7												
			103		18.9	34.9	24.5	10.43	10	9	10	11	0	11	0	8	4	
			104		18.2	31.8	21.5	10.30	8	8	0	13	0	13	0	7	3	
			105	着床認めず	20.2	22.4												
			妊娠2/5(40%)	平均値	18.1	26.2	23.0	10.37	9.0	8.5	5.0	12.0	0	12.0	0	7.5	3.5	
			標準偏差	1.6	6.7	2.1	0.09	1.4	0.7	7.1	1.4	0	1.4	0	0.7	0.7		
II	15.2	0-3	201	妊娠4日死亡、着床認めず、皮下腫および腹腔内臓器黄色化	17.8													
			202	妊娠4日死亡、着床認めず、皮下腫および腹腔内臓器黄色化	18.4													
			203	着床認めず	20.5	22.5												
			204	着床認めず	19.0	19.9												
			205	着床認めず	19.4	16.5												
			妊娠0/5(0%)	平均値	19.0	19.6												
			標準偏差	1.0	3.0													
III	3.8	4-7	301	着床認めず	20.3	22.3												
			302	着床認めず	17.1	19.1												
			303		19.3	37.2	24.7	12.52	11	10	9	10	0	10	0	9	6	
			304	着床認めず	18.4	21.6												
			305		19.4	37.7	25.8	11.90	11	10	9	10	0	10	0	9	3	
			306	着床認めず	17.1	18.5												
			妊娠2/6(33%)	平均値	18.6	28.1	25.2	12.2	11.0	10.0	9.0	10.0	0	10.0	0	9.0	4.5	
標準偏差	1.3	8.9	0.8	0.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	2.1				
IV	15.2	4-7	401		18.9	21.2	21.1	0.06	9	9	0	100	100	0	0	0	0	
			402	妊娠8日死亡、着床有り、皮下腫および腹腔内臓器黄色化	19.7													
			403	妊娠8日死亡、着床認めず、皮下腫および腹腔内臓器黄色化	16.5													
			404	妊娠9日死亡、着床認めず、皮下腫および腹腔内臓器黄色化	18.7													
			405	妊娠8日死亡、着床有り、皮下腫および腹腔内臓器黄色化	18.4													
			妊娠3/5(60%)	平均値	18.4	21.2	21.1	0.06	9.0	9.0	0	100	100	0	0	0	0	0
			標準偏差	1.2														
V	無処置	501		19.0	34.9	23.4	11.53	9	9	0	11	0	11	0	8	4		
		502		16.9	29.8	24.3	5.50	10	8	20	63	0	63	0	3	2		
		503		18.6	37.4	24.4	13.01	10	10	0	10	0	10	0	9	4		
		504		21.2	40.4	26.8	13.59	12	10	17	10	0	10	0	9	5		
		505	着床認めず	19.2	21.9													
		506	着床認めず	19.8	23.9													
		507	着床認めず	17.8	22.7													
		508		19.3	38.1	24.9	13.17	10	9	10	0	0	0	0	9	4		
		509		18.7	31.6	23.0	8.83	8	8	0	25	0	25	0	6	2		
		510		19.5	34.0	23.4	10.58	7	7	0	0	0	0	0	7	1		
		妊娠7/10(70%)	平均値	19.0	31.5	24.3	10.86	9.4	8.7	6.7	17.0	0	17.0	0	7.3	3.1		
		標準偏差	1.2	6.7	1.3	2.93	1.6	1.1	8.9	22.0	0	22.0	0	2.2	1.5			
VI	1.9	0-3	601		19.1	37.4	25.4	11.97	9	8	11	0	0	0	8	5		
			602	着床認めず	18.1	18.7	18.5	0.18										
			603	着床認めず	18.6	20.7												
			604		20.5	38.0	26.2	11.78	11	10	9	20	0	20	0	8	5	
			605	妊娠18日午前中帝王切開前に分娩	18.9	24.1												
			606	着床認めず	18.8	21.7												
			607	着床認めず	18.3	20.1												
			608		18.5	35.6	22.1	13.54	10	10	0	0	0	0	0	10	3	
			609	着床認めず	19.6	20.7												
			610		18.1	37.5	24.1	13.43	13	12	8	17	0	17	0	10	6	
			妊娠5/10(50%)	平均値	18.7	27.5	23.3	10.18	10.8	10.0	7.0	9.3	0	9.3	0	9.0	4.8	
			標準偏差	1.1	8.5	3.1	5.65	1.7	1.6	4.8	10.8	0	10.8	0	1.2	1.3		
VII	7.6	0-3	701		18.4	37.7	23.6	14.13	11	10	9	0	0	0	10	7		
			702	妊娠3日死亡、着床認めず、皮下腫および腹腔内臓器黄色化	19.5													
			703	妊娠4日死亡、着床認めず、皮下腫および腹腔内臓器黄色化	17.2													
			704	着床認めず	18.7	20.2												
			705	着床認めず	20.0	22.4												
			706	着床認めず	19.6	22.5												
			707	妊娠17日死亡、着床認めず、皮下腫および腹腔内臓器黄色化	20.5													
			708		18.5	35.4	26.2	9.24	9	8	11	50	0	38	13	4	1	
			709	着床認めず	19.0	23.7												
			710	着床認めず	18.6	20.9												
			妊娠2/10(20%)	平均値	19.0	28.1	24.9	11.69	10.0	9.0	10.0	25.0	0	19.0	8.5	7.0	4.0	

Table 2. ②反復投与試験結果

群		黄体数	着床胚数	生存胚数	着床前 死亡率	着床後 死亡率
I 媒体 G0-3	Mean	9.4	8.2	7.8	15.3	12.2
	S.D.	1.8	2.9	2.4	28.9	20.6
	n	13	13	12	13	12
II DBTCI 0.95 mg/kg G0-3	Mean	9.5	6.8	8.6	26.4	1.3
	S.D.	1.8	3.9	1.2	41.3	4.9
	n	18	18	14	18	14
III DBTCI 1.9 mg/kg G0-3	Mean	9.1	8.1	8.0	11.1	6.9
	S.D.	1.1	2.7	2.0	25.3	12.8
	n	18	18	17	18	17
IV DBTCI 3.8 mg/kg G0-3	Mean	9.3	6.1	8.1	39.2	5.7
	S.D.	1.8	4.6	2.0	44.5	7.9
	n	10	10	7	10	7
V 媒体 G4-7	Mean	8.8	6.3	7.2	31.3	4.4
	S.D.	1.0	3.9	2.5	41.9	9.9
	n	6	6	5	6	5
VI DBTCI 0.95 mg/kg G4-7	Mean	10.9	9.1	7.4	13.2	18.9
	S.D.	2.6	1.2	2.1	15.1	21.2
	n	7	7	7	7	7
VII DBTCI 1.9 mg/kg G4-7	Mean	10.0	8.2	8.8	20.0	10.8
	S.D.	1.3	4.2	2.2	39.5	16.6
	n	6	6	5	6	5
VIII DBTCI 3.8 mg/kg G4-7	Mean	9.0	9.0	9.0	0.0	0.0
	S.D.					
	n	1	1	1	1	1

G: Gestation day

群	個体番号	黄体数	着床胚数	生存胚数	着床前 死亡率	着床後 死亡率	
I 媒体 G0-3	1F01	9	8	8	11.1	0.0	
	1F02	10	10	10	0	0	
	1F03	9	9	9	0	0	
	*1F04	G8に発情					
	1F05	9	9	8	0	11.1	
	1F06	10	10	10	0	0	
	*1F07	G5に発情					
	1F08	5	0	—	100	—	
	1F09	11	11	11	0	0	
	*1F10	G9に発情					
	1F11	10	10	8	0	20.0	
	*1F12	G6に発情					
	1F13	8	8	8	0	0	
	*1F14	G8に発情					
	*1F15	G9に発情					
	*1F16	G5に発情					
	1F17	13	10	3	23.1	70.0	
	*1F18	G9に発情					
	1F19	9	5	4	44.4	20.0	
	1F20	9	9	9	0	0	
	1F21	10	8	6	20.0	25.0	
II DBTCI 0.95 mg/kg G0-3	2F01	8	8	8	0	0	
	2F02	10	9	9	10.0	0	
	2F03	10	9	9	10.0	0	
	2F04	11	11	11	0	0	
	2F05	10	0	—	100	—	
	2F06	11	11	9	0	18.2	
	2F07	15	0	—	100	—	
	2F08	7	0	—	100	—	
	2F09	9	6	6	33.3	0	
	*2F10	剖検時卵胎のみ、黄体を認めず					
	*2F11	G7に発情					
	2F12	10	9	9	10.0	0	
	2F13	8	8	8	0	0	
	2F14	8	8	8	0	0	
	2F15	9	9	9	0	0	
	2F16	10	10	10	0	0	
2F17	9	8	8	11.1	0		
2F18	8	8	8	0	0		
2F19	9	9	9	0	0		
2F20	9	0	—	100	—		
III DBTCI 1.9 mg/kg	3F01	9	8	8	11.1	0	
	3F02	9	9	9	0	0	
	3F03	9	9	9	0	0	



Table 4. ④受胎率向上検討結果

識別番号	体重(g)		黄体数	着床数	着床前 死亡率	性周期															
	G0	G7				-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	G0	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	
2	21.5	22.2	9	5	44	D	D	E	E	M	D	P	+	E	M	D	D	D	D	D	D
3	17.1	19.8	8	8	0	D	E	M	D	M	D	P	+	M	D	D	D	D	D	D	D
4	18.1	20.5	5	0	100	D	D	E	E	E	D	P	+	M	D	D	D	D	D	D	D
5	17.8	19.6	13	11	15	D	E	E	E	M	D	P	+	E	D	D	D	D	D	D	D
6	19.4	20.4	8	6	25	E	E	E	E	E	D	P	+	E	M	D	D	D	D	D	D
10	19.5	19.3	G3, 4, 7に発情				D	D	D	D	D	D	P	+	M	D	E	E	M	D	E
11	19.9	21.2	8	0	100	E	E	E	E	M	D	P	+	M	D	D	D	D	D	D	D
12	19.2	21.7	11	11	0	E	E	E	M	D	D	P	+	E	M	D	D	D	D	D	D
13	19.3	18.9	G6, 7に発情				D	E	E	M	D	D	P	+	M	E	M	D	D	E	E
14	19.0	21.8	12	10	17	E	E	E	E	M	D	P	+	D	D	D	D	D	D	D	D
15	20.0	22.3	11	11	0	E	E	E	M	D	D	P	+	E	M	D	D	D	D	D	D
16	20.2	20.4	6	0	100	D	P	E	E	M	D	P	+	M	D	D	D	D	D	D	D
17	19.3	22.1	16	12	25	E	E	E	M	D	D	P	+	M	D	D	D	D	D	D	D
18	18.6	20.9	6	0	100	E	E	E	E	M	D	P	+	E	M	D	D	D	D	D	D
19	19.3	20.2	G6, 7に発情				P	E	E	E	M	D	P	+	M	D	D	D	D	E	E
20	18.4	18.6	G5, 6に発情				D	D	D	D	D	D	P	+	E	M	O	P	E	E	M
22	19.8	20.7	9	9	0	E	E	E	E	M	D	P	+	E	M	D	D	P	D	D	D
23	20.1	21.5	5	0	100	P	E	E	E	D	D	P	+	M	D	D	D	D	D	D	D
24	21.2	23.3	13	12	8	E	E	E	M	D	D	P	+	M	D	D	D	D	D	D	D
25	18.6	19.5	5	0	100	E	E	E	E	M	D	P	+	E	M	D	D	D	D	D	D
Mean	19.3	20.7	9.1	5.9	45.9																
S.D.	1.1	1.3	3.3	5.1	44.8																
n	20	20	16	16	16																

G: Gestation day, P: Proestrus, E: Estrus, M: Metestrus, D: Diestrus, +: 腔内に腔栓を確認

研究課題名：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  
分担研究課題名：発生毒性に関わる遺伝子発現変動解析

国立医薬品食品衛生研究所毒性部 北嶋 聡

## 研究要旨

本分担研究では、毒性発現メカニズムに支えられた新たな発生毒性評価系を確立することを目的とする。このために、催奇形性物質を adult あるいは妊娠マウスに投与し、肝臓組織あるいは胎児組織由来の RNA サンプルにつき、GeneChip(Affymetrix)を用いた網羅的遺伝子発現プロファイリングを検討中である。今年度は adult マウスの肝臓を中心に解析した。

### A. 研究目的

本分担研究では、毒性発現メカニズムに支えられた新たな発生毒性評価系を確立することを目的とする。このために、催奇形性物質を adult あるいは妊娠マウスに投与し、肝臓組織あるいは胎児組織における網羅的遺伝子発現プロファイリングを検討する。今年度は adult マウスの肝臓を中心に解析した。

### B. 研究方法

「サリドマイド」を 4 用量 (0, 80, 240, 900 mg/kg) (1 群 3 匹) につき、12 週齢の雄性マウス (C57BL/6CrSlc) に単回経口投与し、経時的に肝臓由来の RNA をサンプリングした (投与 2, 4, 8, 24 時間後)。

#### (倫理面への配慮)

使用する動物の屠殺にあたっては、麻酔薬の使用しないしは頸椎脱臼法など苦痛の少ない方法を用いるといった、本研究所の実験動物取り扱い倫理規定

に準拠した対応を行っており、当研究施設はそのモデル施設となっている。

### C. 研究結果

「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解析を検討した。その結果、発現が増加しているものの中に、ストレス応答遺伝子群 (Sod1, Txn1, Abcd4, Abcc2)、p53 により発現が制御されることが報告されている遺伝子群 (Trp53inp1, Cdkn1a, Igfbp1 など)、Cyp 遺伝子群 (Cyp7a1, Cyp26a1, Cyp2b20, Cyp2c55) などの興味深い遺伝子群が見いだされた。

### D. 考察

今年度は、実験系がすでに確立された adult マウス肝臓を利用した解析をおこなった。この検討から、催奇形性化学物質の遺伝子発現変化の特徴が明らかになるものと期待される。来年度以降は、胎児組織



サンプルを利用した解析に移る。これまでに、胎児由来 RNA の収率や質のチェックなど予備的検討を済ませた。

また、標的分子が明らかな催奇形性化学物質を実際に妊娠マウスに投与し、胎児組織サンプルを利用した解析も予定しており、最終的には新たな発生毒性評価系の確立を目指す。

#### E. 結論

「サリドマイド」を投与した adult マウス肝臓由来の RNA サンプルにつき、GeneChip(Affymetrix)を用いた網羅的遺伝子発現解析を検討中である。発現が増加しているものの中には、ストレス応答遺伝子群を始め、興味深い遺伝子群が見いだされた。来年度以降は、胎児サンプルを用いた解析に移る。なお、胎児サンプル由来の RNA の収率、質の check についての予備検討は、終了した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

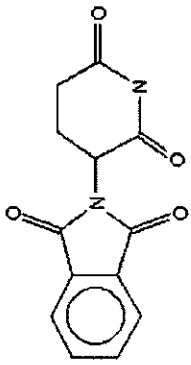
なし

##### 2. 実用新案登録

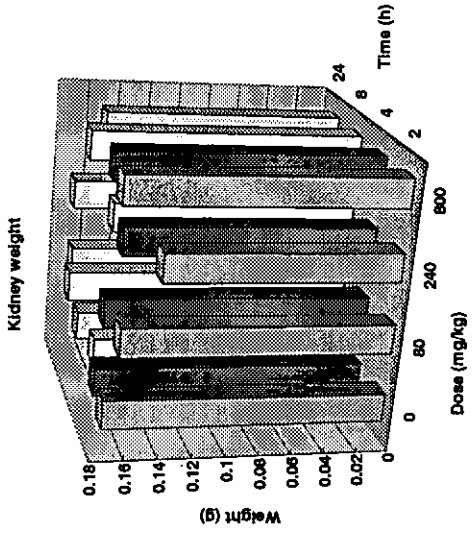
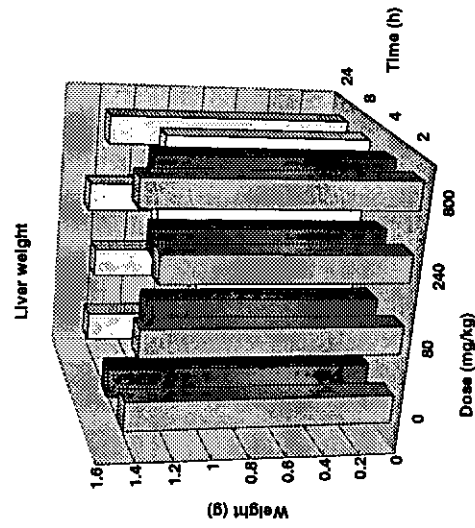
なし

##### 3. その他 (データベース等)

なし



# Thalidomide



## 臓器重量変化

図1 Thalidomide化学構造と臓器重量変化

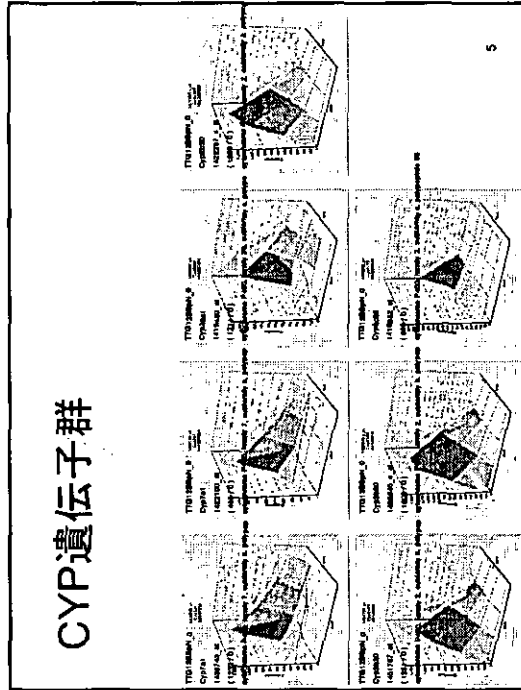
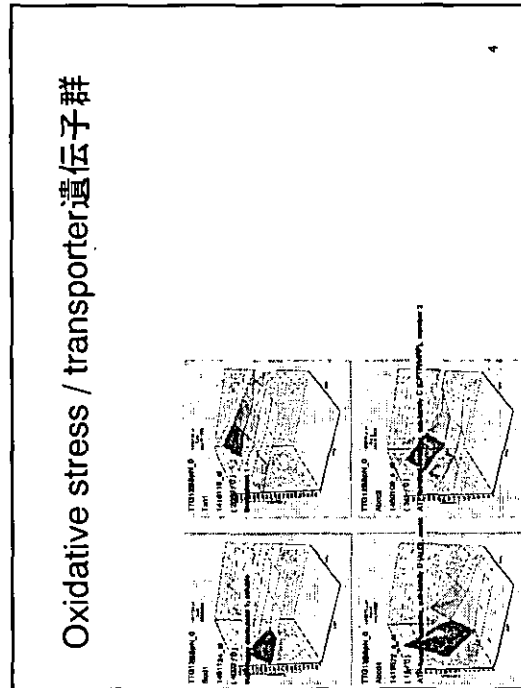
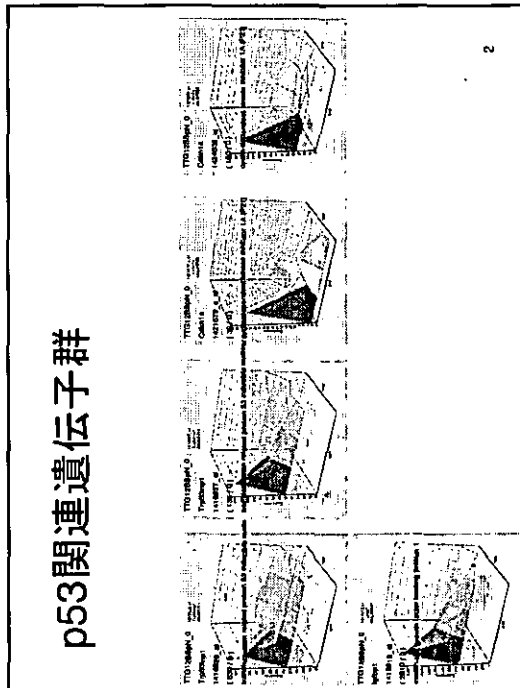


図2 Thalidomideにより発現が変動した遺伝子群

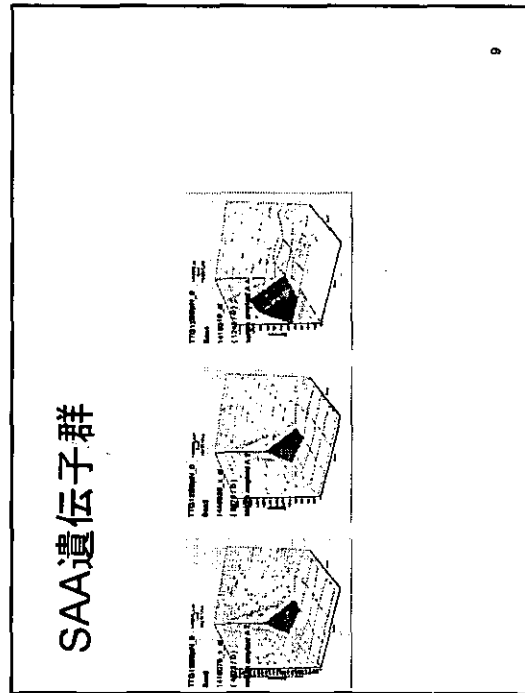
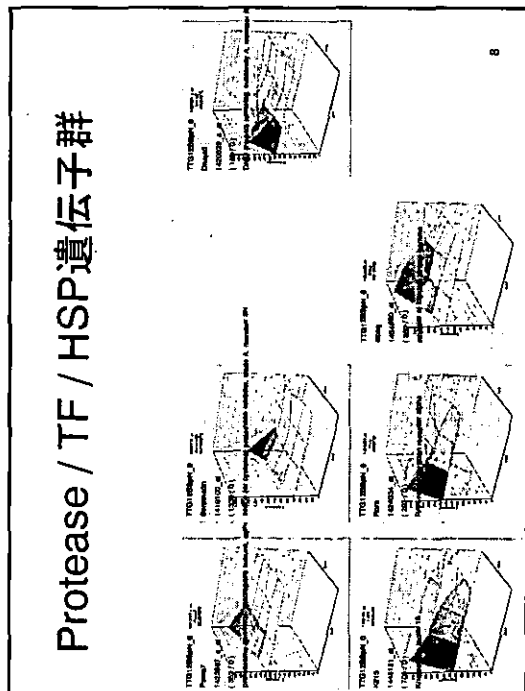
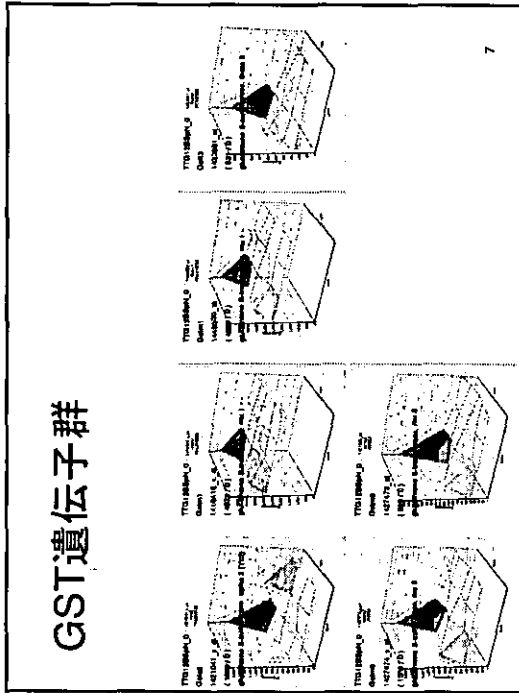
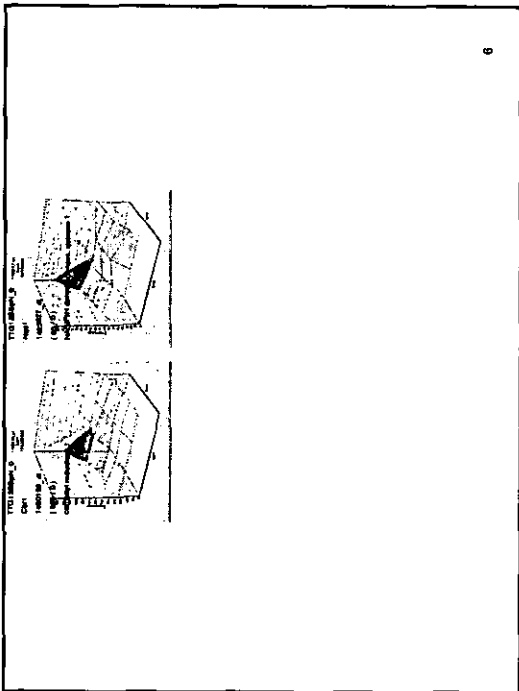


図2 Thalidomideにより発現が変動した遺伝子群