

20050115/B

厚生労働科学研究費補助金
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)

総合研究報告書

主任研究者 菅野 純

平成18(2006)年3月

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

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～平成 17 年度 総合研究報告書

主任研究者 菅野 純

平成 18(2006)年 3 月

目 次

I. 総合研究報告書

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

菅野 純

..... 1

(資料 1) 実験一覧表

(資料 2) 成果概要

(資料 3) 総括資料

(資料 4) MF Surface 使用法

(資料 5) 遺伝子発現パターン解析結果

(資料 6) Mille Feuille システム運用説明書

(資料 7) 生殖毒性に関わる毒性発現メカニズムの解析・図表

(資料 8) 発生毒性に関わる遺伝子発現変動解析・図表

(資料 9) 造血毒性の発現メカニズム研究・図表

(資料 10) 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・図表

(資料 11) 変異原性毒性の生体防御反応として検出の研究・図表

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

..... 137

III. 研究成果の刊行物・別刷

..... 143

別添 3

I. 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

総合研究報告書

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

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動解析手法を毒性学に適用する事により、より迅速、正確且つ安価な化学物質安全性評価システムを構築することを目的として、網羅的遺伝子発現情報を基にした化学物質トキシコゲノミクスデータベース(DB)を構築し、その有機的活用に必須なインフォマティクス技術(IT)の整備を行った。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生成研究では、マウス肝を主な標的とした単回(急性)暴露トキシコゲノミクス・システムを完成させ、独自開発の絶対標準化システム(Percellome method)の完成と合わせ、3年間で82種類の化学物質を対象にした、延べ約100実験についてのトキシコゲノミクスデータベース(約2億2500万データ)を構築し、解析に必要な視覚化、検索、アンスーパーバズド(教師無し)クラスタリング等の基本解析手法を整備した。平行して分担研究者らによる各種毒性標的、個体差、種差、及び遺伝毒性メカニズムに関わる基盤研究を実施し、そこから得られた知識を既知機能クラスターとしてデータベースへ還元し、その予測性に関するシステム形成に活用した。

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

小野宏 (財)食品薬品安全センター
秦野研究所常務理事、研究顧問

北嶋聡 国立医薬品食品衛生研究所
毒性部主任研究官

本間正充 国立医薬品食品衛生研究所
変異遺伝部室長

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長

A. 研究目的

漆谷徹郎 同志社女子大学薬学部教授
山中すみへ 東京歯科大学衛生学客員教授
北川昌伸 東京医科歯科大学助教授
矢守隆夫 癌研究会癌化学療法センター
分子薬理部部長

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LD₅₀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 90 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遺伝子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

(1) 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)。

(2) 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 90 化学物質を選択する。

(3) 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、本研究で行ったすべて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。

(4) 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、データの処理能力を高め、データを効率よく評価するためにサーバーシステムの二重化を行う。

(5) 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。この条件を満たす技術として、DNA マイクロアレイ技術が最適と判断し、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マイクロアレイデータの評価を行う。

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。

【生殖毒性に関わる毒性発現メカニズムの解析】

ラットでしか検討されていないジブチル錫 DBTCl による早期胚致死作用の検出系にマウスの適用性に関して検討するため、ICR マウスの妊娠初期に DBTCl を投与し、惹起される生殖障害について検討した。さらに、C57BL/6Cr Slc マウスを用いて DBTCl 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検討するため、子宮より RNA を調整し、遺伝子発現解析を行った。

被験物質: Dibutyltin dichloride (DBTCl) (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: 日本エスエルシー)を、雄は 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。また、Crj:CD1(ICR)マウス(日本チャールスリバー)を 8 週齢で購入し、11 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 DBTCl を乳鉢で細粒化した。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)に溶解して、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 DBTCl 溶液を作製した。使用ロットの純度(99.5%)から、実質の DBTCl 量が所定濃度となるように換算した。

投与経路及び投与方法: 強制経口投与した。投与液量は 5 mL/kg とし、個体別に投与日の体重に基づいて算出した。

試験及び観察方法: 雌を雄と 1 対 1 で夕方から同居させ、翌朝陰栓が認められた雌を交尾成立とみなし、その日を妊娠 0 日とした。Crj:CD1(ICR)マウ

スを用いた DBTCl の着床阻害作用の検討では、各群 12 匹の雌マウスの妊娠 0-3 日または妊娠 4-7 日に DBTCl を 7.6, 15.2, 30.4 mg/kg/day あるいは媒体のみを投与し、妊娠 18 日に雌マウスを開腹し、胚/胎児への影響について調べた。妊娠マウスの一般的症状は 1 日に 2 回観察した。妊娠マウスの体重及び摂餌量は妊娠 0, 4, 8, 12 及び 18 日に測定した。妊娠 18 日に妊娠マウスを麻酔下にてと殺した。子宮及び卵巣重量を測定し、黄体数、着床数、生存/死亡胎児数、吸収胚数を記録した。子宮は 10%硫酸アンモニウムに浸して着床痕の有無を確認した。生存胎児については性別、体重及び外表奇形について調べた。また、胎盤重量を記録した。胎児に関する指標については、一腹を単位として統計処理を行った。

子宮における遺伝子解析: C57BL/6Cr Slc マウスの子宮における遺伝子解析では、妊娠あるいは偽妊娠 4 日に DBTCl を 3.8 mg/kg あるいは媒体のみを投与した。対照群のマウスにはオリーブ油のみを強制経口投与した。各群は各々 4 例ずつを確保し、子宮の摘出及び RNA の分離に供した。開腹時に黄体を観察して妊娠、偽妊娠を確認した。

RNA の分離精製: 投与 6 時間後、マウスの右子宮を分離後すみやかに RNAlater (Ambion 社)に浸漬し、RNase を不活化した。4°C、一晩静置した後、RNA 抽出操作まで -80°C にて保存した。RNAlater を除いた後、RNeasy kit (キアゲン社) 添付の RLT buffer を用いて組織破砕液を調製し、DNA 定量用蛍光試薬である Picogreen を用いて、破砕液中の DNA 量を測定した。DNA 量に応じて、Spike RNA cocktail (Bacillus RNA 5 種類の mix) を添加し、TRIzol を用いて粗抽出した液を RNeasy kit を用いて全 RNA 精製した。得た全 RNA の 0.2 µg を電気泳動し品質を確認した。

GeneChip 解析: アフィメトリクス社のプロトコールに

従い、全 RNA 4-5 μ g を T7 プロモーターの付加したオリゴ dT プライマーを用い逆転写し cDNA を調製した。得た cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (ENZO 社) を用い、ビオチン化 CTP, UTP を共存させつつ cRNA を合成した。二本鎖 DNA 及び cRNA 精製にはアフィメトリクス社の GeneChip sample cleanup module キットを用いた。得られた cRNA を 300-500 bp となるよう断片化し、ハイブリダイゼーションコントロールを添加し Genechip ターゲット液とした。GeneChip は MOE430 2.0 を用いた。ハイブリダイゼーションは 45°C にて 18 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンして発現値データを得た。データ解析に際しては、Spike RNA のシグナル値を元に、各遺伝子のシグナル値を DNA 当たりの値に変換した値を用い解析を行った。データ解析に用いたソフトウェアは GeneSpring (Slicon Genetics 社) を主に用いた。

【発生毒性に関わる遺伝子発現変動解析】

発生毒性に関わる胎児遺伝子発現変動解析手法の基本部分の確立を目的として、1) モデル遺伝子改変マウス胚を用いた技術的な妥当性の検証、及び 2) 化学物質非投与野生型胚・全胚を用いた、発生に関わる遺伝子発現の経時変化の解析、さらには 3) モデル発生毒性物質投与による本手法の具体的な適用を試みた。

C57BL/6CrSlc マウス(日本エスエルシー)を実験に用いた(プラグが確認された日の 15 時を胎生 0.5 日とした)。基本的には本プロジェクトの研究方法に則したかたちで、経時的にサンプリングした各ステージのマウス胚(全胚、ただし卵黄嚢膜は除去した)を pool した RNA サンプルを用い、マイクロアレイ[Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430

2.0]を用いて、網羅的遺伝子発現プロファイリングを検討した。マウス胚は、1% の 2-メルカプトエタノール含有 RLT バッファー(QIAGEN 社)に変性・溶解させた。

モデル遺伝子欠損マウス胚の当該遺伝子は、解析の背景データがそろっている、bHLH 型転写因子 MesP1 及び MesP2 遺伝子とした。両遺伝子は、原腸陥入直後の中胚葉に於いて一過性の発現を示す(胎生 6.5-7.5 日)。このホモ型胚(dKO 胚)は、胎生 10.5 日には胎生致死となり胚性中胚葉を欠き、原腸陥入部位には未分化中胚葉が蓄積するという表現型を示す。この遺伝子は、*Cre-loxP* システムを用いた細胞系譜解析やキメラ解析の結果から心臓中胚葉形成に必須な遺伝子であることを明らかにしてきた。経時変化並びに機能面から、この遺伝子カスケードに注目し、胎生 6.5 日及び 7.5 日の野生型並びにホモ型胚の遺伝子発現を解析し比較・検討した。

モデル発生毒性物質としては、Shh シグナル伝達阻害物質であり、哺乳動物に於いて単眼症を誘発することが報告されている「サイクロパミン」(LC laboratories 社)を使用した。本研究で得た野生型マウス胚全胚の遺伝子発現データベースに於ける *Shh* シグナル関連遺伝子の経時変化並びに、予備投与実験の結果を考慮し、50, 30, 10, 3, 0 mg/kg(0.5% CMC にメノウ鉢を使用して懸濁)(1 ml/100gBW)を、妊娠 7.25 日の妊娠動物に単回経口投与し、RNA 用、骨格標本用に、それぞれ妊娠 8.25 日及び 17.25 日にサンプリングを行った。尚、RNA のサンプリングは、50, 0 mg/kg 投与群のみで行った。

Whole mount ISH は、ジゴキシゲニンでラベルした dNTP を用いて作製した RNA プローブを用いて、固定後プロテナーゼ K 処理したマウス胚とハイブリダイゼーションを行い、検出は抗ジゴキシゲニン抗

体、発色は BM purple で行った。

【造血毒性の発現メカニズム研究】

造血系に於ける異物応答の普遍的指標を得るための、酸化ストレス物質の演繹的利用モデル確立を目標として、生体異物応答機構に関する研究を行った。

造血系細胞と外来異物との相互作用のうち、代表的な分子標的として酸化ストレス反応に注目しつつ以下の実験を進めた。モデル実験として、ヒトに対する白血病原性をもち、試験管内試験では酸化ストレス誘導物質としても知られるベンゼンを用い、これまでの細胞生物学的蓄積データに対応するマイクロアレイデータの採取を Incyte (Mouse GEM 1) 並びに Affymetrix (Murine Genome U74Av2/M430.2) の系を用いて試行した。細胞生物学的蓄積データとして、プリンストン大学のレミシュカ博士のグループが近年造血幹細胞の分画から得た cDNA ライブラリーの発現プロファイリングや、最近になって各方面から報告されている胚幹細胞や神経幹細胞特異的とされる遺伝子発現プロファイリングデータベースについても新たな視点に立って比較検討の対象とすることとした。昨年度までの研究に引き続き、野生型(Wt)、p53 ノックアウト(p53-KO)マウスに加えて、酸化ストレス消去系としてのチオレドキシシン(Trx)遺伝子の、ヘミアリル KO マウス及び同遺伝子過剰発現(Tg)マウスとそれぞれの同腹の対照 Wt マウスを解析に用いた。

【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】

酸化ストレス応答の鍵となる分子である ASK1 欠損マウスを利用して、酸化ストレスシグナルを解析する。

動物:ASK1 ノックアウトマウスは、東京大学大学院薬学系研究科細胞情報学教室一條秀憲教授より供与された。15-16 年度までにこのマウスを実験動物中央研究所に於いてSPF化し、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動物施設に導入し、B57BL/6 ヘテロ体として維持繁殖させた。17 年度はこのヘテロ体を同志社女子大学薬学部動物施設に移送し、維持繁殖を再開した。移送が完了したのは 2005 年 8 月末であった。この後、野生型と掛け合わせて誕生したヘテロ体の掛け合わせによって、野生型、及び ASK1 ノックアウトマウスを得た。従って、17 年度はノックアウトマウスを用いた *in vivo* 実験の実施は不可能であった。

細胞による実験:研究協力者である東京大学大学院薬学系研究科細胞情報学研究室に於いて、16 年度、野生型及び ASK1 ノックアウトマウスから、3T3 protocol に従って mouse embryonic fibroblast (MEF)を樹立し、今回の実験に使用した。

また、マウス一次培養肝細胞の予備検討を行う。ネンブタール麻酔下、門脈より 0.1 mM EGTA を含む 2 価イオン不含ハンクス液を 2 ml/min で 10 分還流後、collagenase (WAKO 034-10533) 0.5 mg/ml, Trypsin Inhibitor (Sigma T-2011) 50 ug/ml で 10 分還流し、肝臓を消化した。50 x g で 3 回洗浄した肝実質細胞を 10% FCS 含 HepatoZYME-SFM (Invitrogen)培地に懸濁し、10⁶/well としてコラーゲンコート 6well プレートに撒き、2~3 時間後、非附着細胞を除き、24 時間後に実験に供した。

薬物投与実験:野生型・ノックアウト各 3 匹のマウスに MPTP 30mg/kg を 4 時間おきに 2 回皮下投与し、m 第 2 回目の投与 24 時間後に肝臓及び黒質を摘出し、GeneChip 解析に供した。また、野生型・ノックアウトマウス各 4 匹に、MPTP 投与 1 週間前から投与 1 週間後まで 1 日 1 回ポールテストを行い、

Parkinsonism の症状の定量化を行った。ポールテストは、マウスを高さ50cmの金属棒の上に上向きに載せ、下を向くまでの時間(T-turn)と下に降りるまでの時間(T-total)を測定し、その時間の延長の程度から Parkinsonism を評価するものである(Fig. 3)。

マウスの黒質の位置は、脳スライスで tyrosine hydroxylase (TH) の免疫染色を行って決定した。黒質のみを切り出すと、1匹のマウスから遺伝子発現解析に十分な RNA が得られないこと、ドーパミンニューロンの含まれる割合がばらつく可能性があることなどから、黒質を含む、中脳全体をサンプルとした(Fig. 4)。

培養細胞については、6穴のプレートに培養したものを遺伝子解析用の1サンプルとした。組織片、または細胞から mRNA を調製し、Affymetrix 社 GeneChip(Mouse Genome 430 2.0)により遺伝子発現を網羅的に解析した。このと、Spike による mRNA 絶対量化システムを用いて定量化を行った。

また、細胞のアポトーシス判定には、Apoptag Fluorescein Direct *In Situ* Apoptosis Detection Kit (Chemicon International) を用いた。

【T細胞機能に関わる胸腺毒性発現メカニズムに関する研究】

T 細胞機能に関わる胸腺毒性発現メカニズムを解析するための手掛かりとして、胸腺細胞に著明なアポトーシスを誘導することが知られているコルチコステロイド投与マウスの胸腺及び脾に於ける遺伝子発現プロファイルの変化を経時的に解析した。

C57BL/6 マウス: 6週齢 ♂を搬入し、8週齢で実験を行った。

リステリア菌: 感染後 7 日程度で約半数死亡する dose の *Listeria monocytogenes* を organism として

7×10^6 腹腔内に接種した。

コルチコステロイド(ヒドロコルチゾン)処理: 2.5 あるいは 10 mg/mouse を腹腔内投与(胸腺は 2 日後くらいでかなり縮小するが、その後正常に復する)した。

経過観察群: ステロイド投与 → 1日あるいは3日後 → リステリア菌感染 → 経過観察

sacrifice 群: ステロイド投与 → 1 hr, 6 hr, あるいは 24 hr 後にマウスを sacrifice し、胸腺及び脾臓を採取

遺伝子発現プロファイルの作製: Percellome 解析手順にのっとり、DNA あるいは RNA を調整し、dose dependency 及び時間経過の上から本班で開発された解析ソフトを用いて遺伝子発現プロファイルを作製した。

【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】

化学物質を肺がん、胃がん、大腸がんなどからなる 39 系のヒトがん培養細胞株 (JFCR39) に 48 時間作用させたのち、細胞株ごとに 50%細胞増殖阻害濃度 (GI50 値) を求める。この GI50 値は細胞株の個性を反映して様々な値をとり、パネル全体で見るとその化学物質固有の GI50 値パターン(フィンガープリント)を示す。作用メカニズムが既知の標準化学物質(抗がん剤、阻害剤など)約 300 種類のフィンガープリントをデータベース化することによって、作用メカニズムが同じ化学物質同士は互いに似たフィンガープリントを示すことを示した。また、フィンガープリントに基づくクラスター解析を行うと、フィンガープリントの類似した化学物質はクラスターし、同一クラスターに属する化学物質は作用メカニズムが共通であることも示した。このデータベースは、被験化学物質の作用メカニズムの予測に使うことが可能である。すなわち、被験化学物質

のフィンガープリントを標準化学物質のフィンガープリントと比較とすることによってその作用メカニズムの予測ができる。このようにフィンガープリントに基づき化学物質の作用メカニズムを予測するシステムを Cancer Cell Informatics と呼んでいる。本研究では、毒性化学物質 155 種類のフィンガープリントを調べ、フィンガープリントの得られたものは Cancer Cell Informatics により評価した。クラスター解析には、Gene Spring (Agilent Technologies) を用いた。

Ziram による活性酸素発生の検出: Ziram をヒト乳癌 MDA-MB-231 細胞株に作用させたのち、活性酸素検出試薬 Aminophenyl fluoresce (APF)、Hydroethidium (HE) を添加し、Flow Cytometer により分析した。ミトコンドリア電子伝達系酵素阻害剤や NOS 阻害剤など数種類の活性酸素関連酵素阻害剤を用い、ziram が関係する活性酸素種の探索を行った。さらに、抗酸化剤 RADICUT (虚血再灌流時の脳保護剤) やスーパーオキシド特異的な抗酸化剤 tiron など添加し、ziram による活性酸素発生に対する阻害効果を FACS により観察した。

【マウス培養細胞による毒性メカニズム研究】

動物の系統の違いが化学物質に対する遺伝子発現応答にどのような違いを与えるかをマイクロアレイ法にて分析するために、Cd²⁺ に対する感受性の異なるマウス 2 系統 (C3H/He: 感受性、DBA: 抵抗性) 由来の全胎児細胞を用いた、硝酸カドミウム及び 3-methylcholanthrene (MCA) による細胞増殖率影響比較、及び、異なる機関で維持された同一細胞株の形質転換能の比較を行い、系統差に伴う化学物質応答の違いを検討した。

妊娠 12~14 日目の C3H/He または DBA/2 マウ

ス全胎児細胞を 96 ウェルプレートに 103 個播種した。翌日、硝酸カドミウムまたは MCA を添加し、3 日間処理した (Cd²⁺: 0.5~30 µM、MCA: 2~20 µg/ml、培地量: 0.2 ml/ウェル)。20 µL のアラマーブルー溶液を各ウェルに添加し、8 時間培養後、相対蛍光強度を測定し、相対細胞増殖率を算出した。

BALB/3T3 A31-1-1 細胞 (食薬センターで使用: JCRB 細胞バンクから入手、ECVAM で使用: ECVAM から入手) は、ウシ胎児血清を 10% 含む MEM または DMEM 培地を用いて培養した。

形質転換試験: 10⁴ 個の細胞を 60 mm ディッシュに播種した。24 時間後、MCA を添加し (3 µg/ml) 72 時間処理した。培地交換は、細胞播種後の最初の 4 週間は 1 週間に 2 回、後の 2 週間は 1 週間に 1 回行った。細胞を播種してから 6 週目にメタノールで固定後、ギムザ液で染色し、ディッシュあたりの形質転換巣を数えた。

軟寒天コロニー形成試験: 100~1000 個の細胞を 0.33% 軟寒天培地に播種し、3 週間培養しコロニー数を数えた。

【変異原性毒性の生体防御反応として検出の研究】

遺伝子傷害性スクリーニングに有用な遺伝子セットの定量的 RT-PCR 法を用いた検討を行った。本研究は日本環境変異原学会の MMS 研究会に於いて、マイクロアレイの変異原研究への応用をテーマとして、表 1 に示す 13 機関が参加した共同研究の一環として行われた。

薬物投与: 遺伝子傷害性物質として、アルキル化剤である diethylnitrosamine (DEN), dimethylnitrosamine, ethyl nitrosourea, dipropylnitrosamine, 芳香族化合物として dimethylbenzo- anthracene, o-aminoazotoluene,

dibenzo[*a,h*]pyrene, 非遺伝子傷害性物質として、ethanol, phenobarbital、四塩化炭素 (CCl₄), Diethylhexyl phthalate (DEHP), trichloro ethylene (C₂HCl₃)の計 12 化合物を用い、遺伝子傷害性物質を TG マウスにおいて変異原性が確認されている用量で、非遺伝子傷害性物質を 1/2LD₅₀ 用量で B6C3F1 マウスに単回腹腔内投与した。使用した投与量を表 2 に示す。

マイクロアレイによる遺伝子発現解析: 4時間後、20時間後、14日後及び28日後に肝臓などの臓器を回収した。一群5匹分をまとめて TRIzol 法により RNA を抽出し、Affymetrix 社製 GeneChip (MOE430A)、toxicogenomics array (青学) など表 3 に示した種々のマイクロアレイを用いて発現解析を行った。

GeneChip データの解析法: GeneChip より得られた蛍光イメージより Microarray Suite (Affymetrix) ソフトウェアにて数値化を行い、各遺伝子プローブごとの発現強度である Average Difference 値 (Raw intensity) 及び Affymetrix 社の標準判定法による遺伝子の存在に関する判定 (P: presence, M: marginal A: absence) を行った。この際、チップごとの染色度合いの差を補正するため、各チップにおける Raw intensity の中間値を "100" に設定し、チップごとの蛍光強度補正を行った。こうして得られた発現強度のデータを発現解析ソフトである GeneSpring (Silicon Genetics) にインポートし、各種解析を行った。発現変化を示した遺伝子の選択においては、各データポイントあたり 1 チップのみを使用したため統計的手法が使用できず、その代わりに図 1 に示すような遺伝子発現強度に応じて有意水準を変化させる独自の Step-wise 選択法を以前より開発してきたが、その最終形として回帰曲線を用いた intensity-dependent selection 法を完成させ、解析に用いた。

RT-PCR 法による検討: 遺伝子傷害性物質に特徴的に変化する遺伝子群に対して、RT-PCR を行うための primer の設計を行った。Primer は特異性や自己会合性などを考慮に入れ設計し、遺伝子あたり 2 セットを準備した。定量的 RT-PCR 法には、リアルタイム PCR 装置 ABI prism7000 を用い、蛍光色素として Syber Green-I を使った 2-step 法にて行った。すなわち、マウス肝臓より抽出したトータル RNA サンプル 10 µg を DNase (Wako RT grade) で処理した後、1 µg 分を用いて High-Capacity cDNA Archive kit (ABI) により、逆転写反応を行い cDNA を合成した。その 40ng 分を SYBR Green PCR Master Mix にて各遺伝子特異的プライマーを用いて増幅し、ABI7000 により増幅 DNA 量を 2 本鎖 DNA 特異的にインターカレートする蛍光色素 SYBR Green 1 にてリアルタイムにモニタする。別途求めた希釈サンプルの増幅速度から得られたキャリブレーション値を元に、各サンプルの増幅速度から cDNA 量を定量する。そして、ハウスキーピング遺伝子として用いた GAPDH の量を基準に補正を行い、各サンプル間での目的遺伝子の発現量を相対定量した。

用量反応性の検討: GeneChip 解析に於いては、単一の投与量のみを用いたが、遺伝子発現変化の用量反応性を調べる目的で、DEN 及び ENU に関して、以下の複数の用量を設定し、新たに 1 群 5 匹のマウスに対して単回腹腔内投与を行った。

DEN: 3, 9, 27, 80 mg/kg

ENU: 6, 17, 50, 150 mg/kg

投与後、4時間及び28日後にマウス肝臓を回収し、5匹分をまとめて TRIzol 溶液にてホモジネートとした。そして、抽出したトータル RNA を用いて、RT-PCR による解析を行った。

(倫理面への配慮) 動物実験の計画及び実施に際

しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、所属の研究機関が定める動物実験に関する指針のある場合は、その指針を遵守している。

C. 結果

データベース生成研究

(1) 小型実験動物実験システム整備

安定したデータの採取が可能な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、維持して研究を進めた。

暴露システムとしては、既に完成した、実験マウスの搬入、飼育から化学物質投与溶液調製、採取臓器中のサンプリング位置に至るまで詳細かつ厳密なプロトコルを維持した。その結果は、サーカディアンリズムに則って発現変動する遺伝子が実験間で相違の少ない極めて質の高いデータを得ることで確認された。

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標準化システム (Percellome method) を用いた品質管理システムを維持し、それにより、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高確度で判定し、質に問題があるデータの再測定を的確に実施することで全体として高品質のデータを維持した。さらに、DNA マイクロアレイにより得られたデータを検証する定量的 RT-PCR 法にも Percellome method を適用した独自システムを完成させた。

(2) 化学物質の選択

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。初年度は、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取り上げ、平成 16 年度はエストラジオール、テストステロン、クロフィブレート等の核内受容体作用物質、カフェイン、ヒドロキシクエン酸等の食

品由来物質、Diethylnitrosamine (DEN)、3-methylcholanthrene (3-MC) 等の発がん物質等を主とし、最終年度はアセフェート、カルバリル等の農薬、ホルマリン、アセトアルデヒド、トルエンなどシックハウス症候群との関連が指摘されている物質等を選んだ。

(3) 化学物質数

合計で 90 種類の化学物質のデータを得ることを目標にデータベース構築を行った。初年度は 25 種類、平成 16 年度は 30 種類の化学物質についてデータを得た。最終年度は 27 種類の化学物質についてデータが得られ、合計 82 種類の化学物質について、延べ 100 実験超のデータベースが構築された。化学物質数は 90 に届かなかったが、投与用量の範囲を拡大した化学物質 (2 実験分)、異なるマウス系統間での反応の違いを検討した化学物質など、同一化学物質について複数回の実験を行った化学物質が 5 種類の他、反復投与を加えた化学物質、複数臓器のデータを採取した実験など、延べでは実験数は 100 を超え、それに伴い、データ総量も予定を超える 2 億レコードを超える規模のデータベースが構築された。

(4) 評価システムの構築

構築したデータベースには基本プロトコルにより生成された、化学物質毎に濃度 4 点、処理後時間 4 点を組み合わせた 16 群からなるデータが主体に登録されている。市販のソフトウェアはこのような多群のデータ解析には能力不足であることが当初から判明しており、ソフトウェアの開発が急務であった。

初年度は化学物質毎のデータを解析する基本ソフトウェア開発に注力し、16 群の遺伝子発現値を 3 次元表示し、定型パターンに似た発現パターンを

示す遺伝子群を抽出するソフトウェア(MF Surface)を開発した。平成 16 年度は、類似した発現パターンを示す遺伝子群を自動的にクラスター分類する教師無しクラスタリングシステム(評価システム開発の基盤となるアルゴリズム開発)を開発した(委託・共同研究:NTTcomware/NCR)。平成 17 年度は得られたクラスター間の共通要素を分析するソフトウェアを開発した。これにより、遺伝子カスケードの交点の候補を求める方法が得られた。また、データベースを有効活用するためのサーバーシステムの導入を完了した。

基盤研究

初年度に各班員の実験系と網羅的遺伝子発現解析とを対応させるための条件設定を主に行い、平成 16 年度及び平成 17 年度にデータ蓄積を進めた。

【生殖毒性に関わる毒性発現メカニズムの解析】

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、3.8mg/kg を妊娠 4 日目に単回投与し 6 時間後の子宮を対象に、遺伝子発現解析を行った。その結果、着床時にその遺伝子発現が著しく誘導される遺伝子のうち、免疫寛容や細胞外マトリックスタンパク、胎児発生に関連するキナーゼなどの遺伝子発現を DBTCI が阻害している可能性が示唆された。平成 17 年度は、DBTCI の胚致死作用について ICR マウスを用いて調べた。マウスの妊娠 0-3 日または妊娠 4-7 日に 7.6-30.4 mg/kg/day の DBTCI を強制経口投与した。妊娠 0-3 日の 30.4 mg/kg/day 投与で妊娠率の低下、着床前胚死亡率の上昇がみられ、妊娠 0-3 日の 15.2

mg/kg/day 以上の投与、妊娠 4-7 日の 7.6 mg/kg/day 以上の投与で着床後胚死亡率の上昇が認められた。これらの結果から、DBTCI はラットにおけると同様、マウスにおいても生殖障害を惹起することを明らかとした。

【発生毒性に関わる遺伝子発現変動解析】

初年度は、催奇形性化学物質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。平成 16 年度は、マウス胎生 7.5-9.5 日のステージに焦点を絞り、1)各ステージの胚 1 匹当たりの DNA 量、total RNA 量の算出、2) 遺伝子発現量の絶対値化に必要な spike factor の決定、3) モデル遺伝子改変マウス胚を用いた、そのマイクロアレイ解析の妥当性の検討、4)各ステージの各遺伝子の網羅的な経時変化のデータを得ること、を目的に検討し、催奇形性物質の投与によるマウス胚を用いたマイクロアレイ解析実験に向けた技術基盤を整備した。平成 17 年度は、1)モデル遺伝子改変マウス胚を用いた技術的な妥当性の検証、及び 2)化学物質非投与野生型胚・全胚を用いた、発生に関わる遺伝子発現の経時変化の解析、さらには 3)モデル発生毒性物質投与による本手法の具体的な適用を試み、発生毒性に関わる遺伝子発現変動解析手法の基本部分を確立した。

【造血毒性の発現メカニズム研究】

初年度は、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野生型マウスを用いてベンゼン曝露条件下で求め、既知の結果と比較し確認した。平成 16 年度は、造血系における生体の異物応答に関する普遍性のある指標を得るために、主として酸化ストレス物質を取

り上げて、トキシコゲノミクス手法の演繹的利用モデルの確立を目標として研究を行った。ベンゼン暴露マウスの造血器系で発現する造血前駆細胞特異的プロファイリングに注目し、これらの中からバイオマーカーとしての robustness のある候補遺伝子の組合せの試行的な抽出を行った。また、それらの遺伝子の p53 欠失 (p53-KO) マウスにおける発現態様についても比較検討した。酸化的ストレス消去系としてのチオレドキシシン (Trx) 遺伝子の遺伝子改変動物における遺伝子発現背景について基礎的検討を終了した。平成 17 年度は、造血系における生体の異物応答に関する普遍性のある指標を得るために、主として酸化的ストレス物質を取り上げて、トキシコゲノミクス手法の演繹的利用モデルの確立を目標として研究を行った。外来異物として、引き続きベンゼン暴露の造血器系への影響をみることを念頭におきつつ、標的としてチオレドキシシン (Trx) 遺伝子改変動物を用いた酸化的ストレス消去系に注目して遺伝子発現解析を行った。Trx のヘミアリルノックアウトマウスでは、野生型マウスに比べて特異的な遺伝子の高い発現が見出され、それらの遺伝子の一部は Trx 過剰発現マウスでその発現強度が大きく低下しており、Trx 依存性の酸化的ストレス関連遺伝子と考えられた。これに基づいて関連したいくつかの要因解析を試みた。

【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】

初年度は、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。

平成 16 年度は、酸化ストレス応答の鍵となる分

子である ASK1 欠損マウスを用いて、酸化ストレスシグナルを解析し、GeneChip を用いた網羅的遺伝子発現解析を行い、肝臓及び脳において ASK1 欠損マウスと野生型マウスの間に発現の差のある遺伝子群が抽出した。また、MPTP 投与による実験的 Parkinson 病の感受性が ASK1 欠損マウスと野生型マウス間で異なる可能性が見いだされ、この現象と関連する遺伝子候補を抽出した。

平成 17 年度は GeneChip を用いた網羅的遺伝子発現解析により、Mouse embryonic fibroblast において ASK1 欠損マウスと野生型マウスの間に発現の差のある遺伝子群を抽出した。また、MPTP による実験的 Parkinson 病モデルの機序解明の系として、培養細胞が使用可能である可能性を見出した。

【T 細胞機能に関わる胸腺毒性発現メカニズムに関する研究】

T 細胞機能に関わる胸腺毒性発現メカニズムを解析するための手掛かりとして、胸腺細胞に著明なアポトーシスを誘導することが知られているコルチコステロイドの影響を検討した。薬剤はマウスに *in vivo* 腹腔内投与し、投与マウスの胸腺細胞及び脾細胞における遺伝子発現プロファイルの投与後早期における変化を経時的に解析した。投与によって有意な発現変化を示す T 細胞機能に関わる遺伝子、細菌感染に関わる遺伝子リストを作製し、胸腺におけるコルチコステロイドの作用について網羅的に検討した。

【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】

初年度は、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。約6割の毒性化学物質でがん細胞増殖阻害を指標としたFinger Printが得られ、物質選択に役立てた。

平成16年度は、約20種類の毒性化学物質を加えた合計約140のFingerprintをデータベース化し、Cancer Cell Informaticsによるクラスター分析を行った。機能が殆ど知られていないziramが酸化ストレス関連毒性化学物質を含むクラスターに属しており、生化学的な解析の結果、ziramが活性酸素発生に関与する可能性が示された。このことからCancer Cell Informaticsが毒性化学物質の作用機作予測に有効である可能性が認められた。Tributyltin (TBT)の分子メカニズム解析にはがん細胞パネルの中の前立腺癌PC-3細胞株をモデル系として用いた。Gene Chip解析によりTBTにより発現変化する遺伝子が多数抽出された。

【マウス培養細胞による毒性メカニズム研究】

初年度は、マウスの系統による遺伝子発現応答の違いを*in vitro*で検討するために、マウス胎児繊維芽細胞(MEF)を材料とすることとした。Cd²⁺をモデルに細胞毒性作用を検討した。その結果、IC₅₀値は、C3H/Heマウス細胞では15 uM、DBAマウス細胞では7.5 uMであった。

平成16年度は、マウス培養細胞において、動物の系統による遺伝子発現の違いがあるかどうか、マイクロアレイ法で分析する前に、C3H/Heマウス(Cd²⁺感受性、AHH誘導性)とDBA/2マウス(Cd²⁺抵抗性、AHH非誘導性)の全胎児細胞を用いて、*in vitro*でも感受性の差が観察されるかどうか細胞毒性試験を用いて検討した。細胞を硝酸カドミウムまたは3-methylcholanthrene (MCA)で3日間処理し、相対細胞増殖率を算出した。Cd²⁺処理におけるIC₅₀値は、C3H/He細胞では

4.1 uM、DBA/2細胞では5.7 uMであった。一方、MCA処理では、両細胞において細胞増殖の阻害は観察されず、逆に約20%の細胞数の増加が5~20 ug/mlにおいて認められた。

平成17年度は、同じ細胞株でもその性質は、管理・維持されている研究室間で異なることが知られていることを踏まえ、食品薬品安全センター(食薬センター)とEuropean Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)において維持されているBALB/3T3細胞(マウス全胎児由来)を用い、形質転換試験を行うことで両細胞を比較した。細胞を3-methylcholanthrene (MCA)3 ug/mlで処理し、6週間培養した結果、食薬センターの細胞では形質転換巣が誘発されたが、ECVAMの細胞では全く誘発されなかった。このことから、培養細胞を用いて化学物質をマイクロアレイ法で分析する時は、標準となるべき細胞株、及びデータが必要であることが示唆された。

【変異原性毒性の生体防御反応として検出の研究】

初年度は、変異原性物質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でき、相互の比較を行った。

平成16年度は、アルキル化剤及び多環芳香族化学物質などの遺伝子傷害性物質7化学物質、非遺伝子傷害性物質としてフェノールとエタノールをマウスに投与し、肝臓における遺伝子発現変化を経時的にGeneChipを用いて解析した。遺伝子傷害性物質にのみ共通して発現変化する遺伝子群を絞り込み、約30種類の遺伝子を抽出した。これらは、遺伝子傷害性をスクリーニングするための候補遺伝子としての有用性が期待される。

平成17年度は、GeneChip 解析の結果得られた、遺伝子傷害特異的な反応を示す遺伝子群に対しプライマーを設計し、定量的 RT-PCR 法による検討を行った。その結果、GeneChip データとの再現性は高く、より感度良く遺伝子発現変化が検出された。さらに、用量相関性を詳細に検討した結果、多くの遺伝子に関して良い用量反応性が得られ、選択した遺伝子が遺伝子傷害性スクリーニングのために有用であることがわかった。

D. 考察

データベース生成研究

3年間で82種類の化学物質を対象にした、延べ約100実験超についてのトキシコゲノミクスデータベース(約2億2500万データ)を構築した。これに加え、有意な変動を示した全遺伝子を一括して解析するアンスーパーバイズド(教師無し)クラスタリングソフトウェアの安定動作バージョンを開発し、データベースに納められている全実験データの処理を進めた。ここで得られたクラスタ情報を元に平成17年度に開発した同期発現遺伝子群評価アルゴリズムを用いた解析を行うことが可能となった。これらの情報はいずれも毒性予測精度を向上させるために不可欠なものであり、データベース化(解析に必要な視覚化、検索)すると共に、分子生物学的にも解析をさらに進め活用していく基盤となるものである。

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したものである。その結果、トリブチル錫、サリドマイド、フリーラジカルなどの活性酸素種(ROS)、ASK1 ノックアウトマウス、胸腺毒性、ヒト培養細胞アレイによる毒性インフォマティクス、マウス系統差に主眼をおいた毒性メカニズム比較、典型的な遺伝毒性物質

に関する網羅的遺伝子発現解析への適用性、に関し、データベース生成研究による毒性予測精度向上に役立つ成果が上がった。

【生殖毒性に関わる毒性発現メカニズムの解析】

ラットにおいて生殖障害を惹起するDBTCIをマウスの妊娠初期に投与したときの生殖障害作用を検討し、DBTCIはマウスにおいても生殖障害を引き起こすことを示した。最も著しい影響は妊娠率の低下、全胚吸収等の生殖障害であった。

毒性症状は妊娠0-3日、4-7日投与の15.2 mg/kg/day以上の投与で認められた。また、母体体重への影響は、妊娠0-3日投与の30.4 mg/kg/day、妊娠4-7日投与の7.6 mg/kg/day以上の投与で観察された。妊娠4-7日の投与後には母体体重の妊娠末期までの回復も認められなかった。補正母体体重増加についても妊娠4-7日投与の15.2 mg/kg/day以上の投与で有意に低下していた。妊娠4-7日のDBTCI投与後に観察された母体体重に対する強い影響は、妊娠4-7日の投与により胚/胎児生存に対する悪影響がより強く発現し、腹当たりの胎児数が減少したことがその一因と考えられる。

妊娠0-3日はマウスの着床前の時期、妊娠4-7日は着床中及び着床直後の時期に相当する。妊娠0-3日の投与では着床阻害(着床前胚死亡着)が、妊娠4-7日の投与では着床後胚死亡がDBTCI投与により惹起されることが想定された。妊娠0-3日のDBTCI投与では着床前胚死亡、着床後胚死亡、低胎児体重が認められ、着床前に投与したDBTCIは着床前及びその後の胚の生存に悪影響を及ぼし、その後の胚の成長にも悪影響を及ぼすことが示唆された。妊娠4-7日のDBTCI投与では着床後胚死亡、低胎児体重が認められ、着床中及び直後に投与したDBTCIは着床後の胚の生存及び成長に悪影響を及ぼすことが示唆さ

れた。これらの所見は、DBTCIの生殖発生に及ぼす影響は投与時期によって異なることを示している。

化学物質による胚死亡は種々のメカニズムによって引き起こされる。すなわち、胚に対する直接作用または母体の恒常性に異常を引き起こして間接的に胚に悪影響を及ぼす可能性が考えられる。正常な雌の生殖機能は、正常な中枢神経系、卵巣・子宮の活動によって維持されており、これらの各部位における毒性影響が胚の生存に悪影響を及ぼす。子宮内膜は胚の生存にとって重要な役割を果たしており、DBTCIの子宮内膜に対する影響を検討することは毒性学的に重要である。

DBTCIのマウス子宮内膜に対する影響を検討するために、マウスの着床時期の子宮よりRNAを調整し、子宮の遺伝子発現状況の検討を行った。受精卵の有無にかかわらず、DBTCIによる着床阻害作用を示す子宮側の因子の解析を目的に、妊娠及び偽妊娠ラットにおけるDBTによる子宮の遺伝子発現への影響の解析を行ったが、両者で共通して有意に誘導された遺伝子はなく、抑制された遺伝子もUnknownを含めて2つしかなかった。しかし、妊娠4日の子宮採取時の遺伝子発現は偽妊娠と妊娠で大きく異なっており、すでに着床に向けた準備が始まっていることが判明した。そこで、この着床準備に対して変動している遺伝子のうち、着床阻害に対する影響因子の抽出のためには、DBTCI投与により逆方向に変動する遺伝子の解析を行うこととした。その結果、tryptophan 2,3-dioxygenase、insulin-like growth factor binding protein 2、tenascin-C、Kinesin family member 20A、maternal embryonic leucine zipper kinase等の遺伝子が、DBTCI投与により着床準備を阻害する遺伝子の候補として抽出された。tryptophan 2,3-dioxygenaseは、別名Indoleamine

2,3 dioxygenase (IDO)でもあり、胎盤組織中に強発現しており、トリプトファン(Trp)からキヌレニンへの代謝により、CD4⁺、CD8⁺ T cell及びナチュラルキラー(NK)細胞の増殖を抑制し免疫寛容状態を作り出すと考えられている他、このIDO阻害剤が1-メチル・トリプトファンを異系間の妊娠マウスに投与し、胎盤周辺の炎症及び流産を誘導することが知られている。また、インスリン様増殖因子(IGF)は、性ステロイドと協調して子宮内膜の細胞増殖に作用している。その他、tenascin-Cは、tenascin-R等とともに細胞外マトリックス蛋白の一つである他、Kinesin family member 20AはRas associated proteinであるRAB6Aと相互作用して細胞増殖や維持にかかわるとされ、maternal embryonic leucine zipper kinaseは着床前の胚の発達に重要な役割をしていることが指摘されている。これらのことは、着床時に、DBTCIは着床準備のための免疫寛容や内膜細胞の増殖作用、着床前胚発生にかかわる遺伝子を抑制することにより、着床阻害を引き起こしている可能性を示唆したものと考えられた。しかし、依然この作用が、DBTCIにより直接引き起こされたものか、あるいは偽妊娠ラットでの脱落膜形成阻害と共に示された血清プロゲステロン量の抑制による2次的なものであるかを検討することは今後の課題である。

【発生毒性に関わる遺伝子発現変動解析】

[平成15年度]

- 1) 胚ではなくadultマウス肝臓とはいえ、サリドマイドを代表例とする催奇形性化学物質投与により、遺伝子発現の変動が観察されたが、サリドマイドに関するマウス胚での遺伝子発現変動解析には至らず、両者共通のシグナルカスケードが存在するか否かは不明なままであり、今後の課題となった。
- 2) マウス胚を用いた遺伝子発現変動解析法では、

adult 肝臓をサンプルとする場合を多少変更させたが、この変法によりはじめて、マウス胚でも遺伝子発現変動解析が出来る見通しがたったものと考えられた。

[平成 16 年度]

- 1) 結果に示した各ステージにおける遺伝子発現変動解析に要する胚数は、あくまでも最小値であり、採取した RNA の質のチェック、RT-PCR による再現性のチェックなど、他の用途を考慮すると実際には、おおよそこれらの 2 倍量は必要なものと考えられた。
- 2) Spike factor の決定により、マイクロアレイ解析上、発現 RNA 量の絶対値化が可能となった。このことにより、増殖・分化が旺盛な発生初期のステージ間における、各遺伝子発現の比較が正確におこなえるものと考えられた。
- 3) モデル遺伝子改変マウス胚を用い、胚を用いたマイクロアレイ解析の妥当性を検証することができたが、興味深いことに、発現量の比からリストアップされてくる遺伝子群の上位には、従来用いられてきている分子マーカー遺伝子は存外少なく、この点、留意する必要があるものと考えられた。この原因として、time point1 点の解析では、経時的に激しく変化する遺伝子発現変化を考慮していないことが考えられた。したがって、解析方法の妥当性ではなく、むしろデータ取得上の戦略の妥当性が疑われた
- 4) 各ステージ特異的な遺伝子群のリストアップは、各種シグナルカスケードを考える際に有用となるだけでなく、催奇形性物質投与を考慮した場合、標的分子の遺伝子発現変化を考慮した投与のタイミングの設定、あるいは逆に、当該物質の標的分子の推定にも役立つものと考えられた。なお本実験では、全胚を用いて検討しており、少なくとも本実験でのステージ(胎生 7.5-9.5 日)を用いる限

り、標的性が不明な催奇形性物質投与の場合でも、全胚にわたる解析が可能なものと考えられた。ただし、time point3 点であったため、発生に関わる遺伝子発現の激しい経時的な変化に、取得データが追いついていないことが強く示唆された。

[平成 17 年度]

- 1) モデル遺伝子改変マウス胚を用い、胚を用いたマイクロアレイ解析の妥当性を検証することができた。留意点としては、経時的に発現が変化する遺伝子を対象とした場合、各時点での発現量の比からのリストアップだけでは不正確な解析となり、あくまでも、経時変化全体の動きを考慮する必要性が強く示唆された。また、下記 2) に示すように、出来るだけ細かい Time point での遺伝子発現データベースに還元することにより、より解析精度が高まるものと考えられた。
- 2) 本マウス初期野生型胚・全胚を用いた遺伝子発現データベースの利用は、各ステージ特異的な遺伝子群のリストアップなど、各種シグナルカスケードの探索上、有用となるだけでなく、催奇形性物質投与を考慮した場合、標的分子の遺伝子発現変化を考慮した投与のタイミングの設定、あるいは逆に、当該物質の標的分子の推定にも役立つものと考えられた。平成 16 年度は、time point3 点であったため、発生に関わる遺伝子発現の激しい経時的な変化に、取得データが追いついていないことが強く示唆された。そこで、平成 17 年度は、より細かく time point をとり(0.25 日毎、計 12 点)、検討することとした。実際、より正確なデータベースを取得することができた。また、代表的な遺伝子発現を指標として、経時的に同様な遺伝子発現変化パターンを示す遺伝子のリストアップもできた。今後の検討課題としては、遺伝子発現データベースからのシグナルカスケードの正確・詳細な予測の可否が挙げられるが、今後のバイオインフォマティクス

の進捗を適宜取り入れ、より精度の高い解析法の樹立に努めていく予定である。

3 50 mg/kgのサイクロパミンの単回経口投与(妊娠7.5日)により、妊娠17.5日における胎児数は明らかには減少したが、今回の検討結果では、胎盤遺残は認められたが浸軟胎児はみとめられず、サイクロパミン投与後かなり早期に一部の胎児が死亡した可能性が示唆された。したがって、50 mg/kgのサイクロパミン投与により、催奇形ではなく胎児毒性が認められたこととなるが、この濃度のもとで、投与翌日(24時間後)の胎児サンプルにつき遺伝子発現変動解析を検討したところ、現時点では、標的遺伝子が関係する遺伝子群(Shh, Smo, Ptch, Gliなど)の発現に変化が認められなかった。この検出に至らなかった理由として以下の2つ、すなわち、1) 結果で記載したように、本胎児RNAサンプルは、妊娠動物1腹分の胎児をプールしており、その結果遺伝子発現変化の検出感度が低下している可能性、2) 投与後24時間という1点のTime point のみの検討結果であり、投与後より早期に遺伝子発現が変化している可能性、が示唆された。今後は、投与後の経時変化をより細かく検討していく予定である。

他方、50 mg/kgのサイクロパミン投与により認められたのは胎児毒性という変化であり、催奇形あるいは変化が認められない濃度のサイクロパミン投与実験の必要性が強く示唆された。今後は、より細かく投与用量を設定し、遺伝子発現変動を解析する予定である。なお、マウスにおけるサイクロパミンを用いた催奇形性実験の報告は、妊娠動物が、かなり死亡する投与用量(180 mg/kgBW)を用いたもののみであり(Keeler RF, *Proc Soc Exp Biol Med* 149: 302-306, 1975)妊娠動物の死亡が認められない用量を用いた催奇形性実験は、今回が初めてのものである。

【造血毒性の発現メカニズム研究】

ベンゼンの毒性発現研究の目的は、惹起される病態(生体異物応答)を、主な応答標的組織としての血液系の幹細胞や支持細胞の機能発現によって理解する事にある。百年前のパリの靴職人のベンゼン白血病報告は、実験的追試が不完全で、発症機構や閾値の有無も不明である。本邦の年間生産量は400万トンを超え、中国では製靴工の白血病が今も深刻である。本研究の原点は、以上の点に基づいていた。

初年度と次年度は、ベンゼン曝露を中心に生体の異物応答作用を検討した。マウスにおける白血病誘発は多年の苦心の未成功した。しかし、ベンゼンもその代謝物も Ames 試験陰性が知られ、それはこれらの疎水性に基づくとされる。そこで注目される点が、ベンゼンの代謝過程での活性酸素種(ROS)生成であり、ベンゼンやhydroquinone(HQ)、catechol、trans-trans muconic acidなどの代謝物に認められる顕著な染色体破砕性(clastogenesis)もこれによるものと信じられ、ベンゼンのgenotoxicityの根拠と考えられている。ところがベンゼンの白血病は低用量では観察されず、先のベンゼン以外のclastogenではベンゼンと異なり少なくともマウスでの白血病原性は認められない(但し、HQのみラットで自然発生単核白血病的頻度が上昇する)。従って、ベンゼンの白血病のユニークな酸化ストレス説も不明にとどまり、その白血病原性がgenotoxicityとepigenetic carcinogenicityのいずれによるかさえ明らかとはいえない。このような複雑な背景をもつベンゼンの血液毒性に対して、詳細な細胞生物学的な分析的データを参照しつつ、マイクロアレイによる、酸化ストレス傷害に焦点をあてた毒性予知システム構築モデル確立実験は、将来的な演繹的トキシコゲノミクス解析研究の重要な基礎となるものである。結果の項でも明ら