

### 3.3. クラスタリング結果



- 距離マトリクス

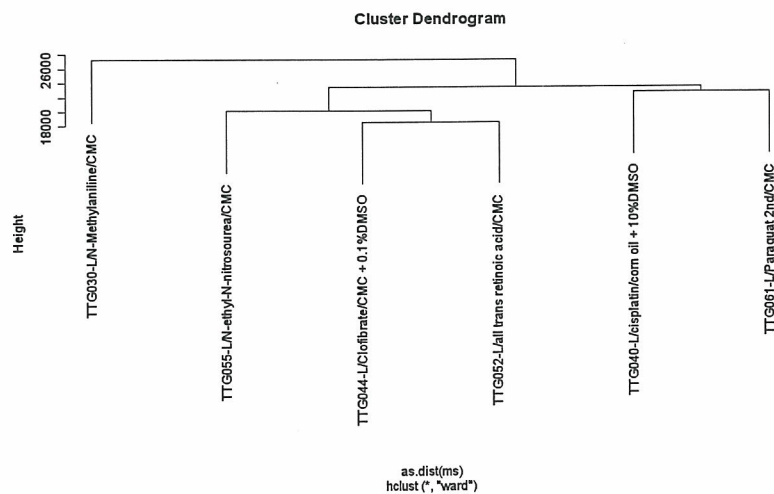
		1	2	3	4	5	6
TTG030-L/N-Methylaniline/CMC	1	0.0	25037.6	24231.9	24014.0	24928.7	25780.9
TTG040-L/cisplatin/corn oil + 10%DMSO	2	25037.6	0.0	20701.1	22379.2	22281.1	22690.0
TTG044-L/Clofibrate/CMC + 0.1%DMSO	3	24231.9	20701.1	0.0	18535.3	19138.9	20669.2
TTG052-L/all trans retinoic acid/CMC	4	24014.0	22379.2	18535.3	0.0	20175.7	22762.7
TTG055-L/N-ethyl-N-nitrosourea/CMC	5	24928.7	22281.1	19138.9	20175.7	0.0	22461.4
TTG061-L/Paraquat 2nd/CMC	6	25780.9	22690.0	20669.2	22762.7	22461.4	0.0

Copyright © NTT COMWARE 2007

### 3.3. クラスタリング結果



- Ward法



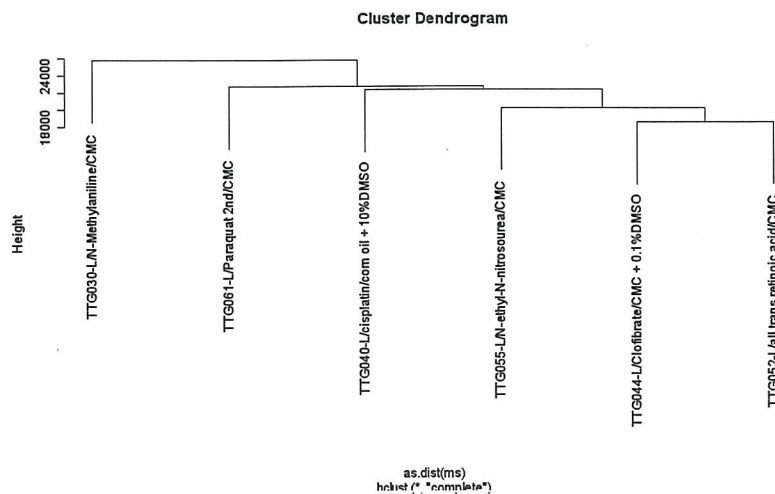
「Clofibrate」と「all trans retinoic acid」が近く、「N-Methylaniline」が遠いという結果になった

Copyright © NTT COMWARE 2007

### 3.3. クラスタリング結果



- Complete法



「Clofibrate」と「all trans retinoic acid」が近く、「N-Methylaniline」が遠いという結果になった

Copyright © NTT COMWARE 2007

### 3.4. まとめ



- 優れた点
  - 山脈構造クラスタリングは、クラスタリング結果を用いるため、プロジェクト(化合物)ごとの偏差を受けにくい
    - 用量を含めたクラスタリング結果を用いるので、単純な化合物の影響を表現してクラスターに分割されるわけではないので結果の判読に留意が必要
- 改良が必要な点
  - 各遺伝子にクラスタリング結果が紐付くので計算量が大い
- その他利点
  - 山脈構造は、重複型のクラスタリング結果を用いる。複数のクラスタリング結果を統合することも可能

Copyright © NTT COMWARE 2007

別添 4

## Ⅱ. 分担研究報告書

発生毒性に関わる遺伝子発現変動解析

分担研究者: 北嶋 聡 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・第五室長

研究要旨

遺伝子発現変動に立脚した迅速・精細な発生毒性評価系を確立することを目的として、分子標的が明らかな催奇形性物質(Shh シグナル阻害剤)であるサイクロパミンを妊娠マウスに投与し、胚における網羅的遺伝子発現解析を検討した。その結果 Shh シグナルではなく、むしろコレステロール合成・代謝系カスケードに影響を与えている可能性が示唆され、化学物質の安全性評価上、意義深いものとなった。

A. 研究目的

遺伝子発現変動に立脚した迅速・精細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、平成 18 年度は、モデル催奇形性物質として Shh シグナル阻害剤であるサイクロパミンを妊娠マウスに投与し、胚における網羅的遺伝子発現解析を検討した。また、分子標的が不明で種差が著しい催奇形性物質: サリドマイドについての予備検討も開始した。

B. 研究方法

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 1 腹分プールした 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、網羅的遺伝子発現変動解析を検討した。マウス胚は、直接、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。「サイクロパミン」(LC laboratories 社)は、ユリ科バイケイソウ属

植物由来 のアルカロイドで、妊娠羊から産まれた仔羊が単眼症を示すことが報告され(Keeler と Binns, 1968)、最近では、Shh シグナリング関連分子の Smo 分子を阻害することが報告された化学物質である(Cooper ら, 1998; Incardona ら, 1998)。留意点として、母動物へのサイクロパミン経口投与による奇形発生は、ウシ、ヤギ、ウサギ、ハムスターで明らかに認められるが、ラット、マウスでは低感受性と報告されている((Keeler, 1975)ことが挙げられる。下記にその構造式ならびに Shh シグナリングを示す。

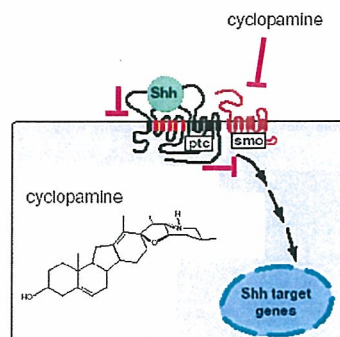


図1 サイクロパミンの構造式と Shh シグナリングとの関係。サイクロパミンは、Smo 分子と結合しシグナルを阻害すると考えられている。

サイクロパミン投与実験に関しては、投与経路は経口投与、投与容量は 10 (ml /kgBW)、溶媒はコーンオイル(シグマ社製)とし、懸濁にメノウ鉢を使用し、用事調整にて作製した。投与時期、用量設定の根拠に関しては、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おける Shh シグナル関連遺伝子の経時変化ならびに、予備投与実験の結果(70mg/kgBW 投与で妊娠マウス 10 匹中 2 匹死亡)を考慮し、0、3、10、30 mg/kgBW を、1 群 5 匹として、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 日および 17.25 日にサンプリングをおこなった。なお、RNA のサンプリングは、0、30 mg/kg 投与群のみでおこなった。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おこない、検出は抗ジゴキシゲニン抗体、発色は BM purple でおこなった。

なお、Shh の胎生 7.5-9.5 日胚における発現 (whole mount ISH) ならびに野生型マウス胚全胚の遺伝子発現データベースにおける Shh シグナル関連遺伝子の経時変化をそれぞれ図 2、3 として下記に示す。

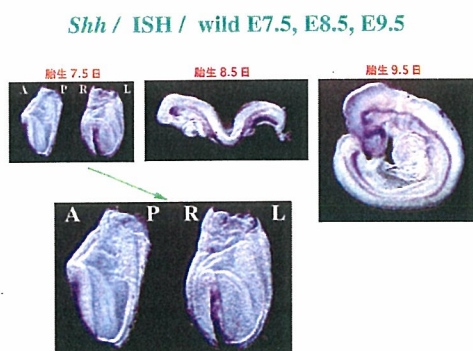


図 2 Shh の胎生 7.5-9.5 日胚における発現

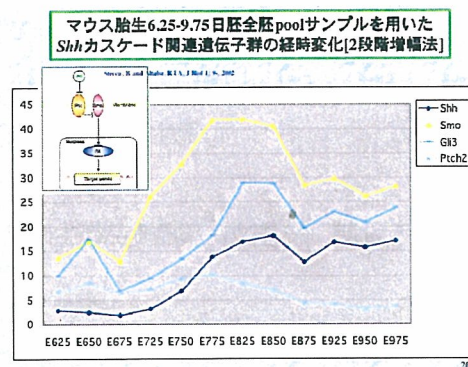


図 3 野生型マウス胚全胚の遺伝子発現データベースにおける Shh シグナル関連遺伝子の経時変化

(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、下記、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守する。「国立医薬品食品衛生研究所・動物実験倫理委員会の制定による国立医薬品食品衛生研究所・動物実験に関する指針(平成 9 年 7 月版)」。

### C. 研究結果

妊娠 7.25 日の妊娠動物に、各種濃度のサイクロパミンを単回強制経口投与し、妊娠 17.25 日に帝王切開して得られた胎児の外表面検査、胎児重量、胎児数を検討したところ、30 mg/kgBW 投与群で a) 平均胎児数の有意な減少、b) 平均胎児重量の有意な減少、c) 平均胎盤遺残数の有意な増加、d) 浸軟胎児が胎児計 28 匹中 1 匹に認められ、10 mg/kgBW 投与群で a) 平均胎盤遺残数の有意な増加が認められた。なお、顕著な外表異常は認められなかった。

この用量設定実験結果を参考とし、妊娠 7.25 日の妊娠動物にサイクロパミン(0, 30 mg/kg)を単回経口投与し、投与 2、8、24 時間後の胎児 RNA

サンプルにつき、遺伝子発現変動解析を検討した。まず、サイクロパミンの標的分子である Smo ならびに Shh シグナル関連遺伝子(Shh, Ptch1, Gli1, Gli2, Gli3)につき検討したところ、対照群と投与群とで有意な変化が認められなかった(図4)。

QuickTime<sup>®</sup>  
TIFF (LZW) ALIENWARE  
C:\Program Files\Apple Computer\QuickTime<sup>®</sup> Components\QTData\QTData.qd

図4 妊娠マウスへのサイクロパミン(30 mg/kg)単回経口投与は胎児での Shh シグナル関連遺伝子の発現を顕著に変化させない。

次いで、網羅的に遺伝子発現変動解析を検討した。対照群と投与群とで比較し、以下の3条件を満たす遺伝子群(プローブセット: p.s.)を選別した。すなわち、1) どちらかの発現コピー数が2より大、2) t-test でのP値が0.05未満、3) 双方の平均値の比(投与/溶媒)が1.6より大。その結果、投与2時間後で17、投与8時間後で23、投与24時間後で213のp.s.が見いだされた。シグナルカスケード面からさらに検討したところ、コレステロール生合成に関わる遺伝子群の発現変動が見いだされた(図5)。

QuickTime<sup>®</sup>  
TIFF (LZW) ALIENWARE  
C:\Program Files\Apple Computer\QuickTime<sup>®</sup> Components\QTData\QTData.qd

図5 妊娠マウスへのサイクロパミン(30 mg/kg)単回経口投与は胎児でのコレステロール生合成関連遺伝子の発現を変動させる

#### D. 考察

以上の結果から、Shh シグナリング阻害剤サイクロパミン(30 mg/kgBW)の経胎盤暴露により、マウス胚では、Shhシグナルカスケードというよりも、コレステロール生合成シグナルカスケードに影響を与えている可能性が示唆された。現時点では、このカスケードに対して促進的に作用するのか、抑制的に作用するのか、不明である。サイクロパミンによる催奇形性は、ラット、マウスでは低感受性であることを上述したが、この理由として、少なくともマウスでは、このコレステロール生合成シグナルカスケードにおいてサイクロパミンが結合あるいは代謝されている可能性が考えられた。したがって今後、コレステロール生合成阻害剤との併用により、マウスにおいてもサイクロパミン投与による催奇形性が顕著となる可能性が推測された。

また、コレステロール生合成を阻害するHMG-CoA reductase 阻害剤 atorvastatin の妊娠ラットへの経口投与で胚吸収が報告されている(Dostal ら、1994)。したがって、サイクロパミンがコレステロール生合成阻害作用を有している場合、このことにより胚吸収が引き起こされる可能性が示唆され、サイクロパミン(30 mg/kgBW)で認められた、平均胎児数の有意な減少、平均胎児重量の有意な減少、平均胎盤遺残数の有意な増加、ならびに浸軟胎児の出現は、この阻害機序に起因している可能性も考えられた。本解析結果は、阻害剤・活性化剤などの分子標的物質が、生体においては、当該分子とは異なる分子に作用

することを示唆しており、化学物質の安全性評価上、意義深いものと考えられた。

今後の検討課題として、催奇形性物質を含む多様な化学物質の投与実験などを考慮し、より一般化した実験系を検討する必要性、およびバイオインフォマティクスの進捗を適宜取り入れることによる、より精度の高い解析法の必要性が考えられた。現在、サリドマイドの用量設定実験を検討中である。本研究を通して、ヒトにおける発生毒性評価を、正確に詳細に、また迅速・安価に予測できることが期待される。

#### E. 結論

遺伝子発現変動に立脚した迅速・精細な発生毒性評価系を確立することを目的として、分子標的が明らかな催奇形性物質(Shh シグナル阻害剤)であるサイクロパミンを妊娠マウスに投与し、胚における網羅的遺伝子発現解析を検討した。その結果 Shh シグナルではなく、むしろコレステロール合成・代謝系カスケードに影響を与えている可能性が示唆され、化学物質の安全性評価上、意義深いものとなった。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### 1) 雑誌

菅野 純、北嶋 聡、相崎 健一、五十嵐 勝秀、中津 則之、高木篤也、小川幸夫、児玉幸夫「細胞工学 特集 精神疾患研究の新たな戦略 vol. 26 No.1, 2007」監 修 澤 明 Special Review:「Percellome Project による毒性トランスクリプトミクスの新しい試み」

秀潤社、東京、2007年、71-77 ページ

2) Kitaïma S, Miyagawa-Tomita S, Inoue T, Kanno J and Saga Y, Mesp1-nonexpressing cells contribute to the ventricular cardiac conduction system. Dev Dyn 235: 395-402, 2006.

3) Yasuhiko Y, Haraguchi S, Kitaïma S, Takahashi Y, Kanno J and Saga Y, Tbx6-mediated Notch signaling controls somite-specific Mesp2 expression. Proc Natl Acad Sci USA 103: 3651-3656, 2006.

4) Kii I, Amizuka N, Minqi L, Kitaïma S, Saga Y and Kudo A, Periostin is an extracellular matrix protein required for eruption of incisors in mice. Biochem Biophys Res Commun 342: 766-772, 2006.

5) Takahashi Y, Kitaïma S, Inoue T, Kanno J and Saga Y, Differential contributions of Mesp1 and Mesp2 to the epithelialization and rostro-caudal patterning of somites. Development 132: 787-796, 2005.

##### 2. 学会発表

1) 発生毒性の Percellome トキシコゲノミクス解析 [第 1 回毒性オミクスフォーラム(第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会との共催) 2006 年 7 月

北嶋 聡

2) Percellome 手法を用いた遺伝子発現変動解析の発生毒性実験への適用[第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会] 2006 年 7 月

(北嶋 聡、相崎 健一、五十嵐 勝秀、中津 則之、相賀 裕美子、菅野 純)

3) Percellome 手法を用いたマウス ES 細胞分化系における分化マーカー遺伝子の発現パターンの解析 [第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会] 2006 年 7 月

(高木篤也、北嶋 聡、中津則之、五十嵐勝秀、相崎健一、菅野純)

4) 核内受容体作動性物質による遺伝子発現変動の Percellome 解析  
2006 年 7 月 [第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会] 2006 年 7 月

(五十嵐 勝秀、中津 則之、相崎 健一、北嶋 聡、児玉 幸夫、菅野 純)

5) Percellome データ解析システム (Millefeuille システム) の開発 [第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会] 2006 年 7 月

(相崎 健一、中津 則之、北嶋 聡、五十嵐 勝秀、菅野 純)

6) Percellome 手法を用いた Diethylnitrosamine によるマウス肝遺伝子発現変動解析 [第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会] 2006 年 7 月  
(中津 則之、北嶋 聡、相崎 健一、五十嵐 勝秀、児玉 幸夫、菅野 純)

7) Global gene expression profiling in mouse embryonic stem cells and embryoid bodies.

[第 20 回国際生化学・分子生物学会議 / 第 29 回日本分子生物学会年会] 2006 年 6 月

(Takagi A, Kitajima S, Nakatsu N, Igarashi K, Aisaki K and Kanno J)

8) Lunatic fringe expression in the anterior PSM is insufficient for somite boundary formation in the mouse embryo. [第 39 回日本発生生物学会] 2006 年 5 月

(高橋 雄、北嶋 聡、菅野 純、相賀 裕美子)

9) 体節形成に関わる転写因子 Mesp2 の発現制御における転写因子 Tbx6 の役割 [第 39 回日本発生生物学会] 2006 年 5 月

(安彦行人、原口清輝、北嶋 聡、高橋 雄、菅野 純、相賀裕美子)

H. 知的財産所有権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。



# 目 的

高精度の発生毒性評価系を確立すること



催奇形性物質投与時のマウス胚における  
マイクロアレイを用いた遺伝子発現変動解析の試み

1

## 背景1

### 高精度の発生毒性評価系の必要性

#### 1) 種差の問題

例) サリドマイド

#### 2) 検出感度の問題

例1) 対照群での奇形発生

例2) 同一母体内での胎児間の差

例3) 見過ごされやすい異常

[機能障害, 免疫障害, 腫瘍, 発生頻度の変化, 短命等]

→ 実験動物で催奇形性という所見が認められなくても  
ヒトでの催奇形性を正確に予見しなければならない

## 遺伝子発現からみた胎児の特徴

adultとは異なり胎児では  
発生に関与する遺伝子群が  
激しく経時的に変化する

→ 特定のシグナルカスケードを描出できる可能性

3

## 高精度な発生毒性評価系を構築するには

化学物質投与 → 遺伝子発現変化 → 毒性発現

網羅的遺伝子  
発現解析



毒性



毒性発現の有無に関わらず  
遺伝子発現変化に着目した  
解析技術へ

# これまでのストラテジー

1. 本計画の実用性の検討  
—モデル遺伝子改変マウス胚を用いて—
2. 基礎データとしての無処置野生型マウス・全胚  
における遺伝子発現の、経時変化の網羅的解析  
[マウス胎生6.25-9.75日](TIME POINT:12点)
3. 発生毒性モデル物質を妊娠マウスに投与した際の  
胎児に対する本手法の適用と解析

5

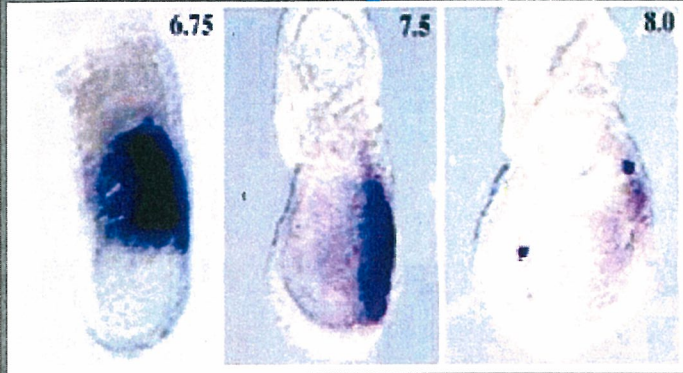
# これまでのストラテジー

1. 本計画の実用性の検討  
—モデル遺伝子改変マウス胚を用いて—
2. 基礎データとしての無処置野生型マウス・全胚  
における遺伝子発現の、経時変化の網羅的解析  
[マウス胎生6.25-9.75日](TIME POINT:12点)
3. 発生毒性モデル物質を妊娠マウスに投与した際の  
胎児に対する本手法の適用と解析

6

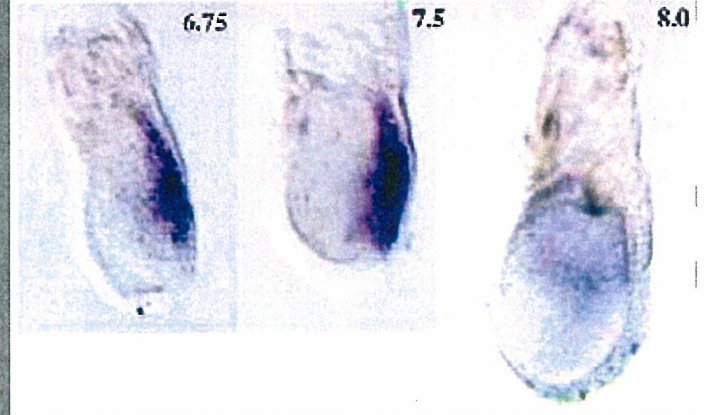
# Mesp1とMesp2の発現の比較

*Mesp1*



発色室温3hr

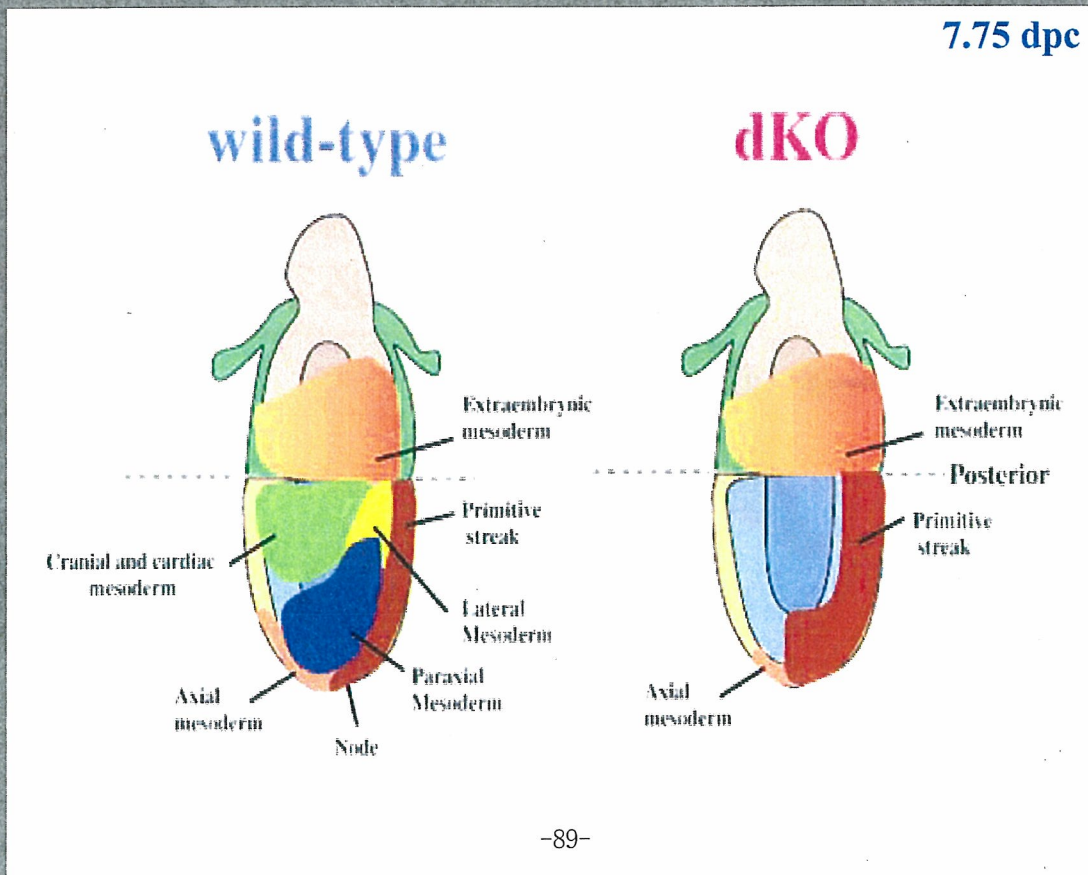
*Mesp2*



発色4°C O/N

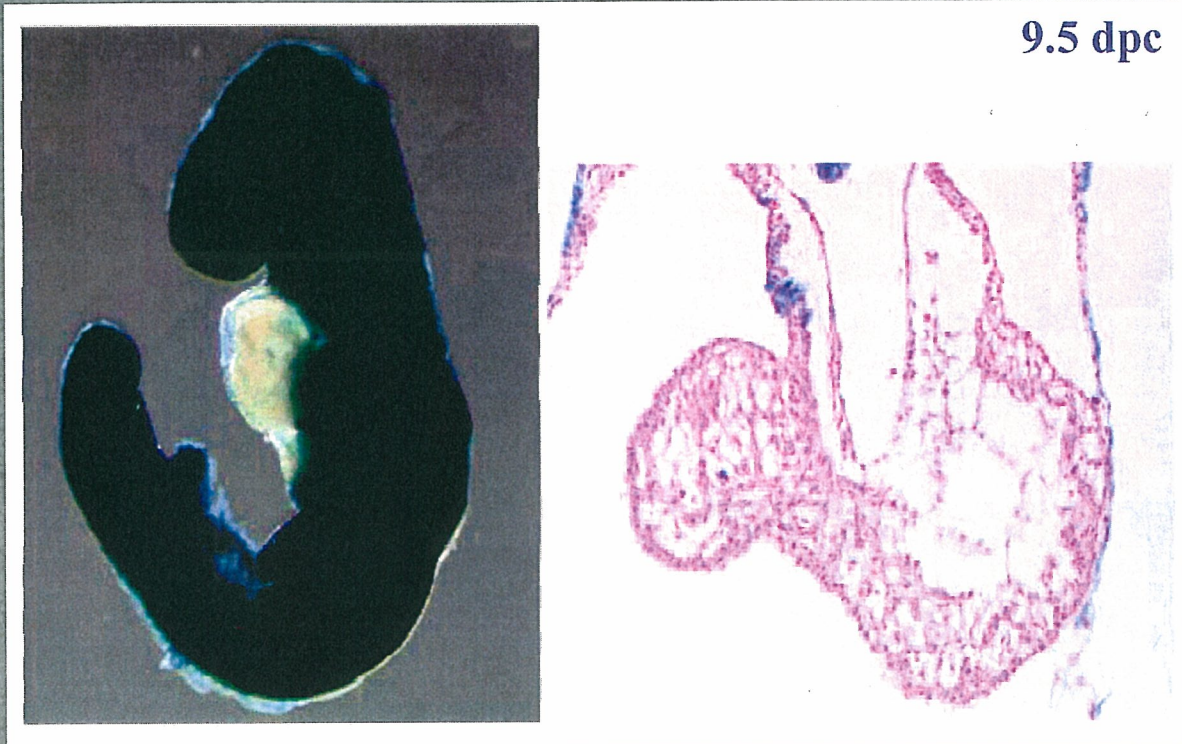
7

# dKO 胚は胚性中胚葉形成不全を示す



8

# dKO 細胞は心臓形成に寄与できない —Mesp1, Mesp2は心臓中胚葉形成に必須な転写因子—

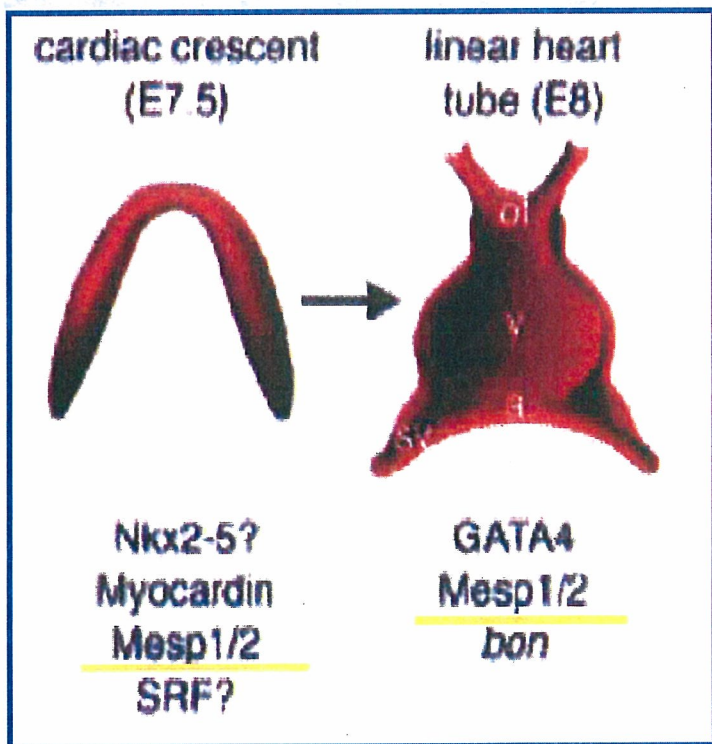


9.5 dpc

Kitajima et al., *Development* 127: 3215-3226, 2000

9

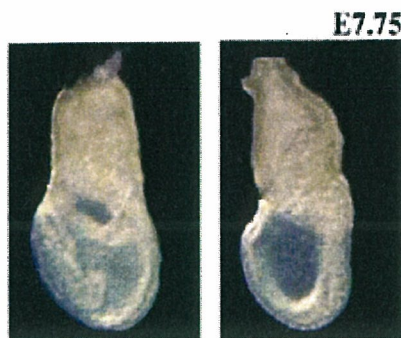
このMesp1, Mesp2遺伝子欠損胚を発生毒性モデル胚として使用する



Mesp1, Mesp2は心臓中胚葉形成に必須な転写因子

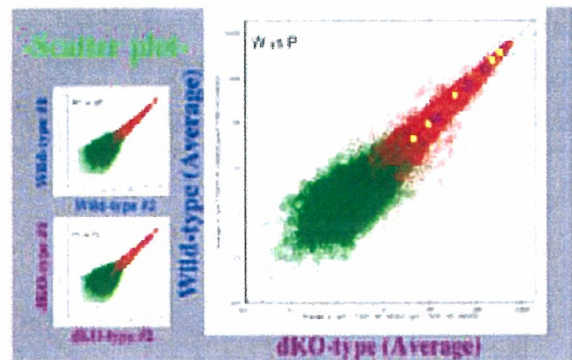
Bruneau BG, *Cir Res* 90: 509-519, 2002

# モデル遺伝子改変マウス胚を用いた GeneChip解析技術の実用性の検討



野生型

dKO ホモ型



wild/hetero: 39 embryo;  
dKO: 25 embryo (n=2)

「Percellome手法の適用」

マイクロアレイ解析

[Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0]

11

## dKO胚で発現が減少している遺伝子群

胎生7.75日

*-top ten-*

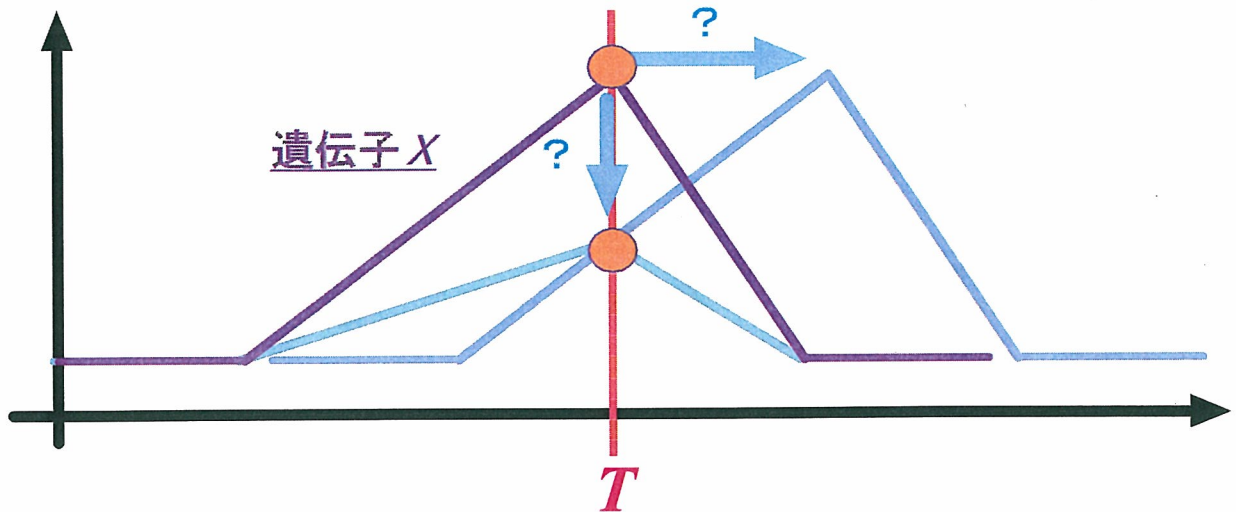
Gene Title	Gene Symbol	Ratio	W average
aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A2	Aldh1a2	0.002	403.816
caudal type homeo box 1	Cdx1	0.003	279.153
troponin T2, cardiac	Tnnt2	0.027	76.5958
gastrulation brain homeobox 2	Gbx2	0.03	164.481
EST	---	0.037	18.6573
SRY-box containing gene 11	Sox11	0.038	45.5636
homeo box A1	Hoxa1	0.039	615.395
ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)	Ankrd1	0.045	22.1695
EST	C030002E08Rik	0.047	10.8268
pleiotrophin	Ptn	0.055	85.043

[発現部位]

- Myocardium
- (Myocardium)
- Myocardium
- Brain
- ?
- Heart (OFT)
- Brain
- Myocardium
- ? (IP3R)
- Brain

# 遺伝子発現比による遺伝子リストアップを 時間1点でおこなうことの問題点

遺伝子Xの発現に関し、ある影響下での比較を考える時、  
時間T1点における観察だけでは、発現ピークの変化か、  
位相のシフトなのか、あるいは両者複合なのか不明である

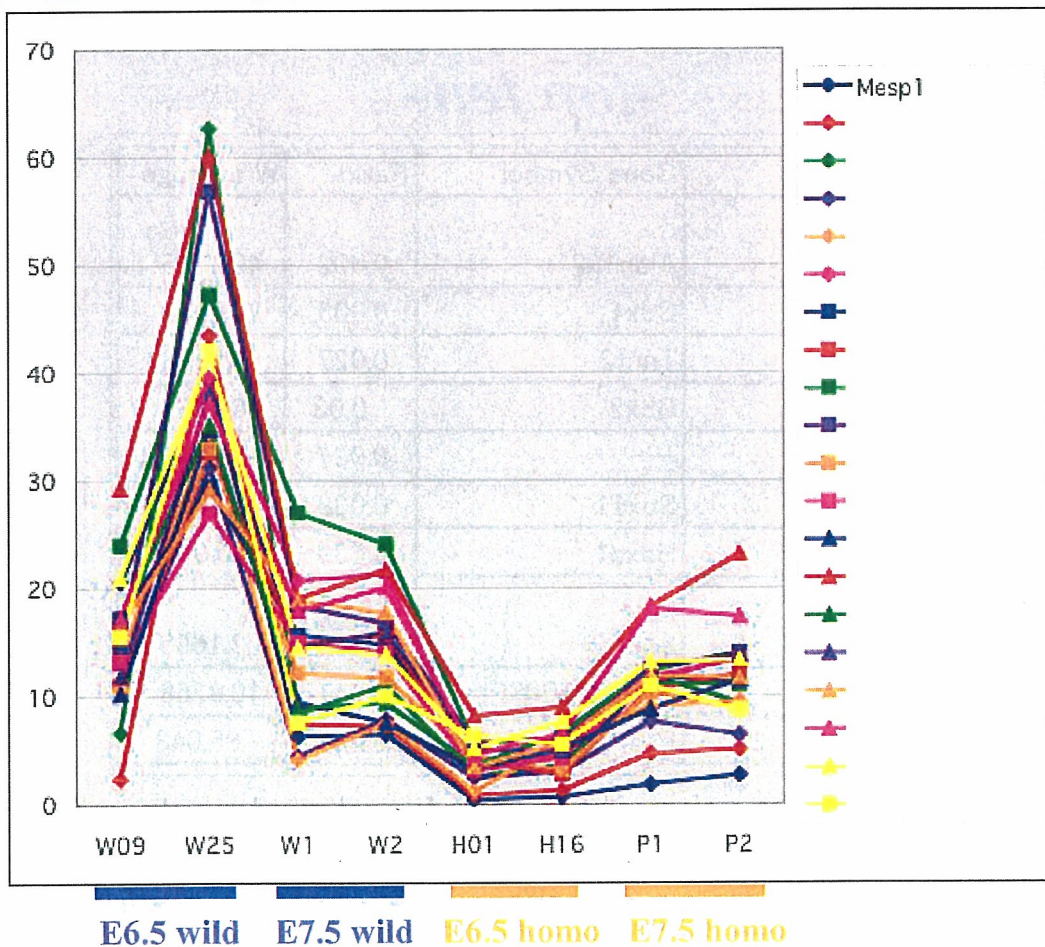


13

## —Mesp1の標的遺伝子の探索—

top20

野生型/dKO型の機能面の情報と時間的な情報を横に並べて評価



14

## X遺伝子は*Mesp1*と似た発現パターンを示し、 dKO胚では発現が消失する

ISH/ *Gene X* T7 probe

[wild]

6.5 dpc



7.5 dpc



[dKO]

7.5 dpc



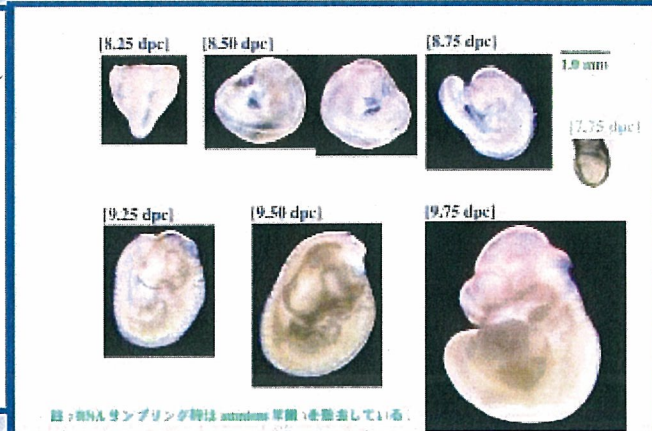
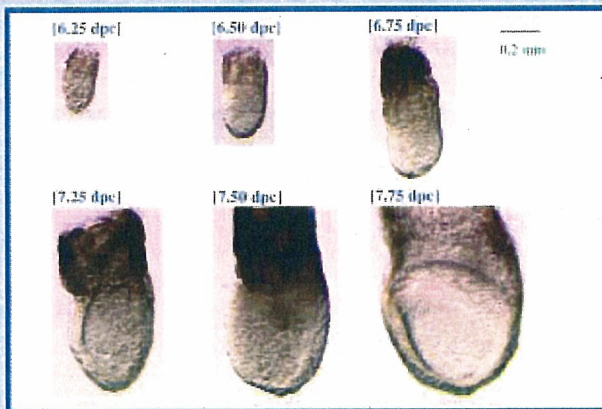
31

## これまでのストラテジー

1. 本計画の実用性の検討  
—モデル遺伝子改変マウス胚を用いて—
2. 基礎データとしての無処置野生型マウス・全胚  
における遺伝子発現の、経時変化の網羅的解析  
[マウス胎生6.25-9.75日](TIME POINT:12点)
3. 発生毒性モデル物質を妊娠マウスに投与した際の  
胎児に対する本手法の適用と解析



# GeneChip一枚あたりに必要なマウス胎生6.25-9.75日胚(全胚)の匹数の算出



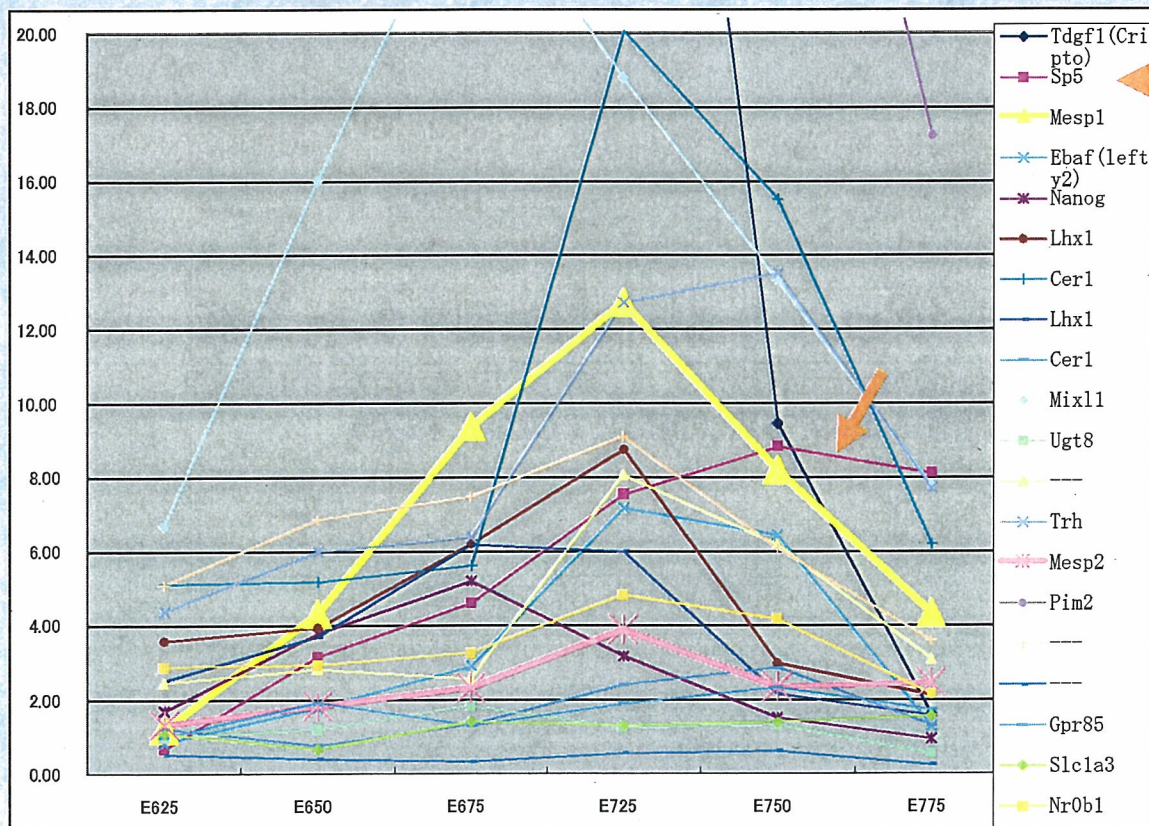
dpc	平均genomic DNA量 (ng)/ embryo [平均±S.D.; n=4 pools; total 20-27 embryo] *6.25 dpc: n=3 pools; total 33 embryo	平均total RNA量(ng)/ embryo [平均±S.D.; n=4 pools; total 20-27 embryo] *6.25 dpc: n=3 pools; total 33 embryo	GeneChip1枚あたりに必要なembryo数 [total RNA 5 ug換算]
6.25	20.0±4.0	19.1±6.7	262
6.50	33.4±4.2	44.8±22.2	112
6.75	44.3±5.5	30.0±15.0	167
7.25	109.4±39.6	119.8±51.7	42
7.50	201.0±18.4	212.5±68.0	24
7.75	358.6±286.0	551.0±335.0	9
8.25	769.5±18.9	823.9±206.6	6
8.50	1,482.0±722.9	2,039.5±599.4	3
8.75	2,472.8±664.5	1,915.6±325.5	3
9.25	9,875.3±1,500.5	9,738.9±2,186.8	1 (0.5)
9.50	15,952.1±3,087.0	12,676.0±3,229.1	1 (0.4)
9.75	20,315.1±1,845.2	14,954.2±3,523.3	1 (0.3)

17

Top20

## Mesp1発現と似た経時変化を示す遺伝子群

— ピアソン相関係数r(6.25-7.75) > 0.4, E6.25発現量>1, 最大値÷最小値 降順 —



18

# *Sp5*は*Mesp1*と似た発現パターンを示し dKO胚の原腸陥入部位で強く発現する

ISH/ *SP5* T7 probe

QuickTime<sup>®</sup> C<sup>2</sup>  
TIFFÄILZWÄj äLiÆEvÈçÉOÉaÉÄ  
Ç™Ç±ÇÄEsÉNE`ÉÉÇ¼â@ÇÈÇZÇ½Ç...ÇÖiKóvÇ-ÇIÄB

QuickTime<sup>®</sup> C<sup>2</sup>  
TIFFÄILZWÄj äLiÆEvÈçÉOÉaÉÄ  
Ç™Ç±ÇÄEsÉNE`ÉÉÇ¼â@ÇÈÇZÇ½Ç...ÇÖiKóvÇ-ÇIÄB

19

## これまでのストラテジー

1. 本計画の実用性の検討  
—モデル遺伝子改変マウス胚を用いて—
2. 基礎データとしての無処置野生型マウス・全胚  
における遺伝子発現の、経時変化の網羅的解析  
[マウス胎生6.25-9.75日 (T0-10 POINTS): 2歳]
3. 発生毒性モデル物質を妊娠マウスに投与した際の  
胎児に対する本手法の適用と解析

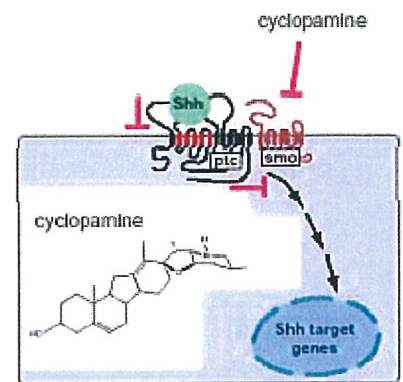
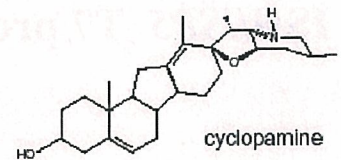
# サイクロパミンの特徴

☆ユリ科バイケイソウ属植物由来 催奇形性 ベラトルムアルカロイド

神経管発生における細胞間相互作用などに関与する *Shh* シグナリングに対する阻害作用を有する

## 歴史

- ・ユリ科植物を食べた妊娠羊から産まれた仔羊が単眼症を示した(Binns ら, 1963).
- ・サイクロパミンを経口投与した妊娠羊から産まれた仔羊が単眼症を示した(KeelerとBinns, 1968).
- ・サイクロパミン経口投与による奇形発生は、ウシ、ヤギ、ウサギ、ハムスター、ラット、マウスで認められた。ただし、ラット、マウスでは低感受性(Keeler, 1975)
- ・サイクロパミンは、*Shh* シグナリング関連分子の *Smo* の阻害作用を有する (Cooperら, 1998; Incardonaら, 1998).
- ・*Smo* のKOマウスが単眼症を示す(Zhangら, 2001).



標的分子が一応明らかなモデル催奇形性物質

注)母動物への経口投与時、サイクロパミンが胎児の *Smo* 分子を阻害する、と直接証明した報告はない。

21

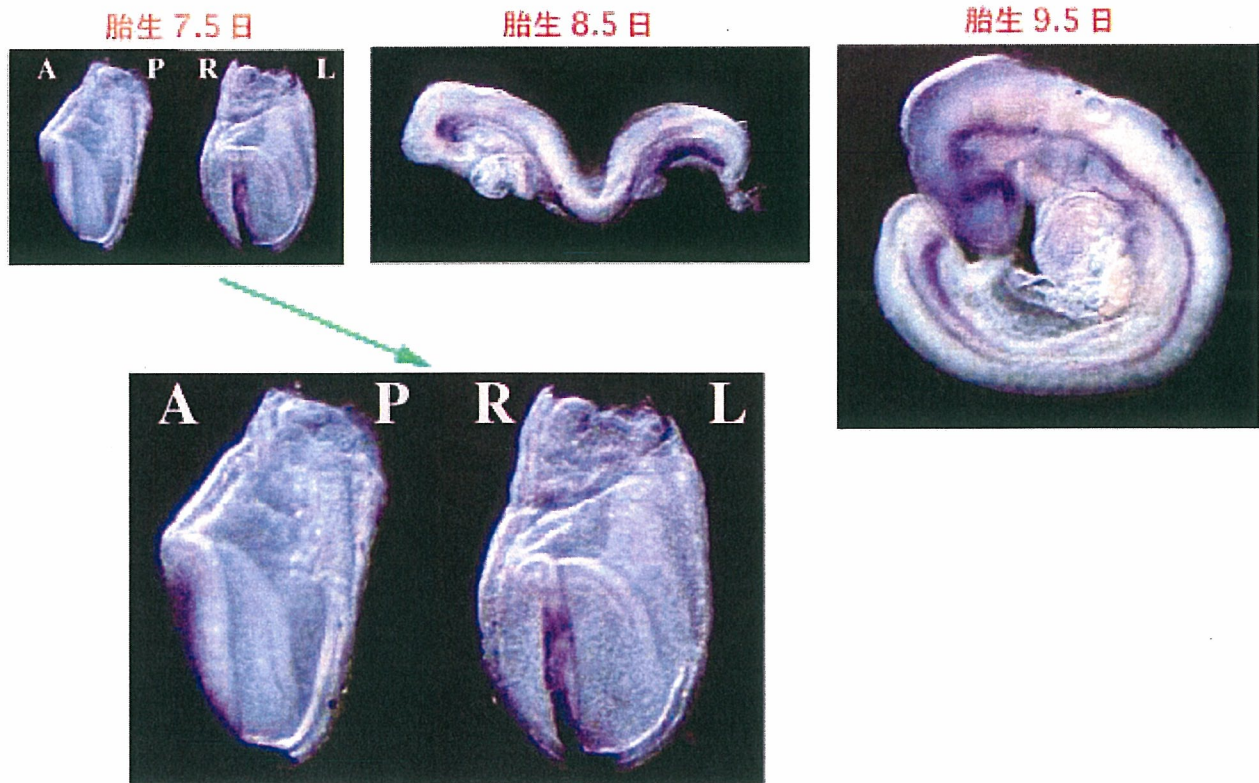
マウスにおけるサイクロパミンを用いた催奇形性実験の報告は妊娠動物が、かなり死亡する投与用量[180 mg/kgBW]を用いたもののみ

TABLE II. EFFECT OF JERVINE AND CYCLOPAMINE ON MICE.

Group and gestation period	Individual daily dose (mg)	Dose (mg/kg)	No. of dams	Ratio of affected to normal litters	No. of normal offspring	No. of affected offspring	No. of resorptions in litters w/offspring	No. of totally re-sorbed litters	No. of over-dose deaths in dams	Malignancies*
<b>Cyclopamine:</b>										
7	5 <sup>b</sup>	180	3	0/1	10	0	0	0	2	—
6-7	10 <sup>b</sup>	360	3	0	0	0	0	0	3	—
6-8	10 <sup>b</sup>	360	4	0/2	26	0	0	0	2	—
7-9	10	360	7	0/1	12	0	0	0	6	—
7	5	180	6	0/2	23	0	0	0	4	—
7	10 <sup>b</sup>	360	4	1/2	25	1	0	0	2	1-E
8	5	180	6	1/1	11	1	0	1	4	1-E
9	5	180	11	2/7	73	2	0	0	4	2-E
<b>Controls:</b>										
	nongavaged		14	0/14	148	1	2	0	0	1-E
	H <sub>2</sub> O-gavaged		13	0/13	127	0	2	0	0	—

\* E = exencephalic.  
<sup>b</sup> Sample and buffer.

# 胎生7.5-9.5日マウス胚における*Shh*の発現



# マウス胎生6.25-9.75日胚全胚poolサンプルを用いた *Shh*カスケード関連遺伝子群の経時変化[2段階増幅法]

Stecca, B and Altaba, R I A, J Biol 1: 9-, 2002

