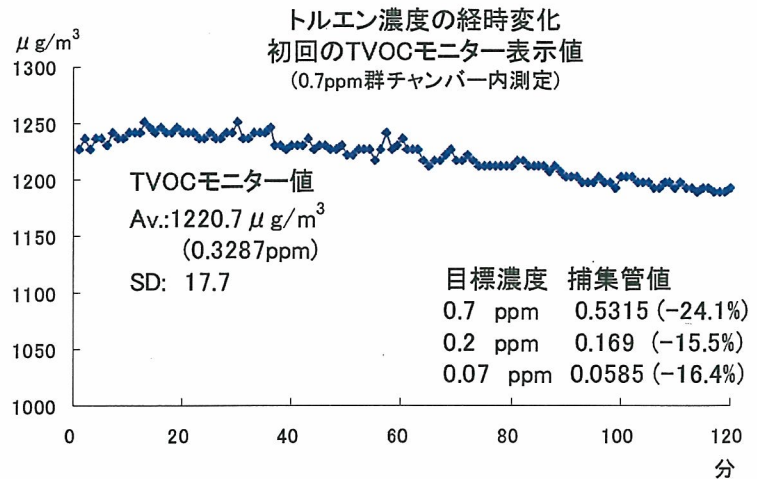
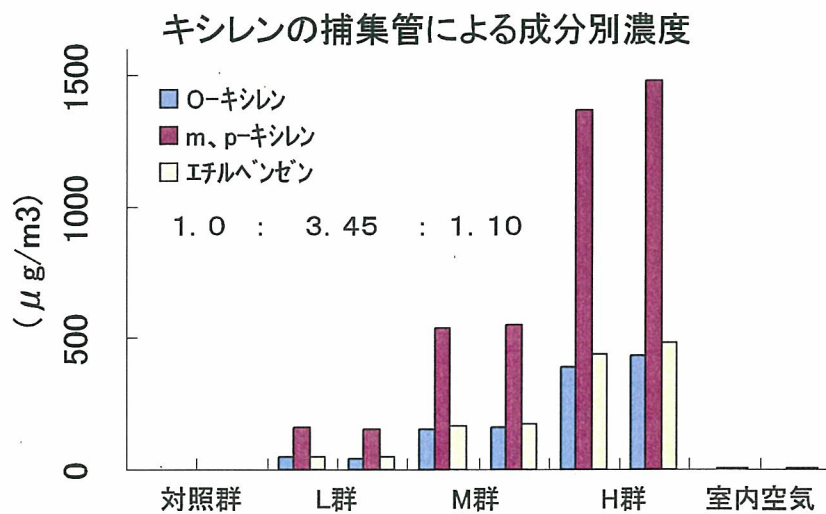
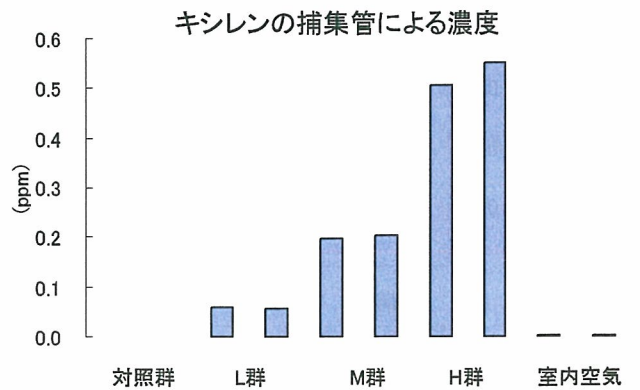
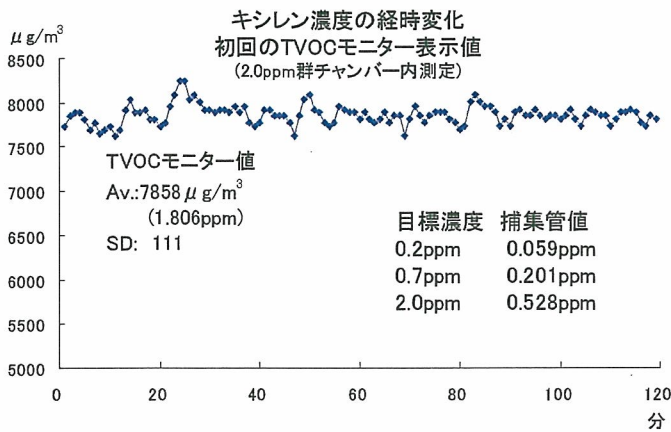
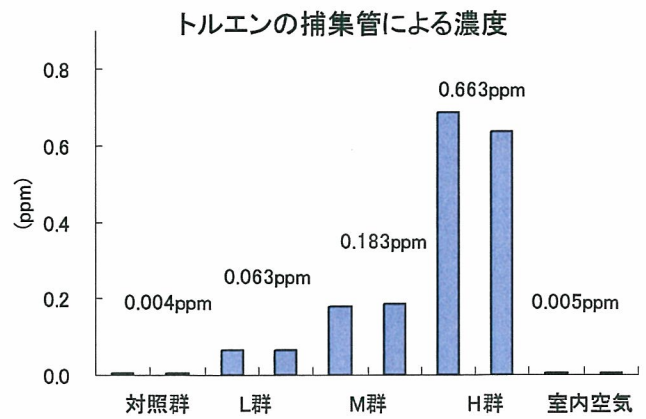
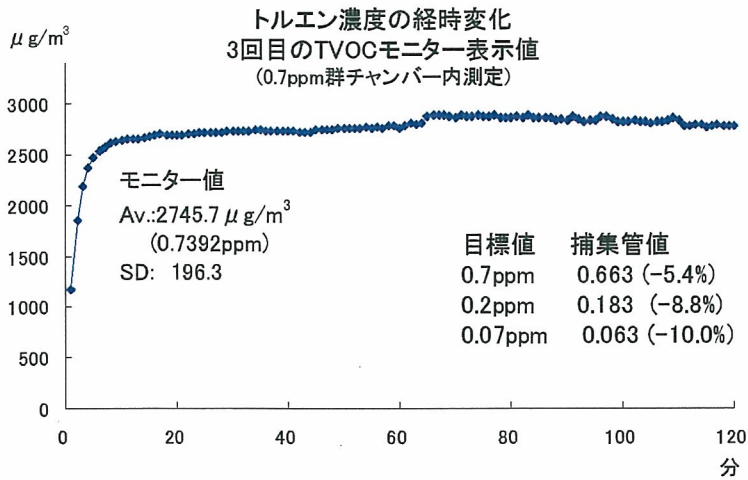


TVOC モニター





厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書

吸入暴露による網羅的遺伝子発現データの解析による
吸入暴露評価と経口暴露の比較研究

分担研究者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部部长

研究要旨

本研究は、化学物質の経気道暴露による肺と肝臓に於ける遺伝子発現変化を経口暴露によるデータと比較しつつ解析し、経気道暴露による毒性評価手法の開発、高度化に寄与する知見を得ることを目的としている。本年度はホルマリン(指針値0.08ppm)の経気道短期暴露(0, 0.175, 0.302, 0.745ppm(0, 13.8, 23.9, 58.9 µg/kg相当)の4用量、2, 4, 8, 24時間後)のマウス肺、肝の網羅的遺伝子発現データを、経口単回暴露(0, 3, 10, 30mg/kgの4用量、時間は同一条件)後の肺、肝のデータと比較解析した。その結果、最も多くの遺伝子の発現が変化した臓器は経気道暴露による肝臓であり、アラキドン酸、リノール酸を代謝するCyp2c55の他、Glutathione S-transferase (GST), mu2, mu3, theta3に加え、DNA障害への対応に関与するRAD9の発現上昇が認められた。更に、マレイン酸をピルビン酸へ代謝するMod1(malate dehydrogenase)や、クエン酸回路におけるオキサロ酢酸からクエン酸への代謝を担うCS (citrate synthase)の発現上昇も認められた。これらの結果は、化学物質の低濃度経気道暴露による生体反応変化を捉えるのに、網羅的遺伝子発現解析手法が有効であることを示すものであると考えられた。

A. 研究目的

本研究は、気化性化学物質の吸入によるリスク評価の基盤整備としてのトキシコゲノミクスとして、網羅的遺伝子発現プロファイリングを基にしたインフォマティクス技術の構築を通して、日常生活に於いて暴露される様々な気化性化学物質の安全性確保の為の、毒性発現メカニズムに基づいた、より迅速且つ正確・精密な吸入毒性評価システムを作成することを目的として実施するものである。

シックハウス症候群の原因物質とされるホルムアルデヒド等の13物質に対して室内濃度指

針値が設定されているが、従来の動物試験での症候検出可能濃度とヒトに於いて報告される症候発現濃度には隔たりがある。そこで本研究では、室内空気汚染化学物質等の低濃度吸入暴露解析へのトキシコゲノミクス手法の適用に関する検討を進め、肺及び肝での遺伝子発現変化を解析することで、この隔たりを埋めることを検討する。

B. 研究方法

Total RNA の分離精製

マウス組織を採取後すみやかに RNA later

(Ambion 社)に4°C一晩浸漬し、RNase を不活化する。肝臓は 5mm 径の生検トレパンにより3ヶ所を各々別チューブに採取した。肺は気管から生理食塩水を入れた後 RNA later を注入し、RNase 不活化を促した後、採取した。その後、RNA 抽出操作までは-80°Cにて保存した。抽出に当たっては、RNA later を除いた後、RNeasy キット(キアゲン社)に添付される RLT buffer を添加し、ジルコニアビーズを用いて破砕液を調製した。得られた破砕液の 10 μ L を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定した。DNA 含量に応じ、臓器毎にあらかじめ設定した割合で Spike cocktail(Bacillus 由来 RNA 5 種類の濃度を変えて混合した溶液)を添加し、TRIZOL により水層を得、RNeasy キットを用いて全 RNA を抽出した。100ng を電気泳動し RNA の純度及び分解の有無を検討した。

GeneChip 解析

全 RNA 5 μ g を取り、アフィメトリクス社のプロトコールに従い、T7プロモーターが付加したオリゴ dT プライマーを用いて逆転写し cDNA を合成した。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 社キット)を用い、ピオチン化 UTP, CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA は Affymetrix 社キットにて精製後、300-500bp となるよう断片化し、GeneChip ターゲット液とした。GeneChip には Mouse Genome 430 2.0(マウス)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データを得た。データは当方で開発したソフトウェアとマイクロソフト社エクセルを併用して解析し

た。

C. 研究結果及び考察

本年度はホルマリンについてデータ解析を進めた。C57BL/6CrSlc マウスに経気道短期暴露させた際の肺と肝臓を採取して網羅的遺伝子発現解析を行った。ホルマリンの指針値 0.08ppm に対し、暴露濃度は、実地測定値(捕集管)で 0, 0.175, 0.302, 0.745ppm を 2 時間吸入させた。これは、マウスの呼吸量を 1 分当たり 13.2mL とした場合に、各々 13.8, 23.9, 58.9 μ g/kg/2hr の暴露量に相当する。2 時間の経気道暴露の後にすぐに臓器を採取した群を 2 時間後の群とし、更に 2, 6, 22 時間後採取群を 4, 8, 24 時間後の群とした。得られた肺、肝について、当方が開発した Percellome 手法(遺伝子発現値の絶対化手法)を適用した網羅的遺伝子発現解析を行った。DNA マイクロアレイは Affymetrix 社の GeneChip (Mouse Genome 430 2.0)を用いた。データ解析にあたっては、別途当方で得た経口単回暴露 (0, 3, 10, 30mg/kg の 4 用量、時間は同一条件)後のデータと比較した。

経気道暴露のデータを解析した結果、最も多くの遺伝子の発現が変化した臓器は肝であり、発現変動が示唆された遺伝子数は約 400 であった。一方、経気道暴露による肺では約 60 種類の遺伝子の発現変動が示唆された。また、経口短期暴露では、肝で約 60 種類、肺で約 110 種類の遺伝子の発現変動が示唆された。以下で、発現変動が認められた遺伝子について考察を加えた。

まず、化学物質代謝に関わる遺伝子として、アラキドン酸、リノール酸を代謝する Cyp2c55 の他、Glutathione S-transferase (GST), mu2, mu3, theta3 の発現誘導が認められた。どれも

暴露後 24 時間の時点で暴露量依存的に発現上昇するパターンを示した。これは、吸収されたホルマリンによる代謝酵素誘導に一定の時間を要することを示唆する。

また、DNA 障害への対応に関与する RAD9 の発現上昇がやはり 24 時間目に用量依存的に認められた。これがホルマリンによる DNA 障害を反映するものであるかは検証が必要であるが、注目すべき変化である。

更に、マレイン酸をピルビン酸へ代謝する Mod1(malate dehydrogenase)や、クエン酸回路におけるオキサロ酢酸からクエン酸への代謝を担う CS (citrate synthase)の発現上昇も認められ、糖ヌクレオチド運搬体である Slc35b4 も発現上昇した。また、T 細胞活性化に関わる Ly6a(Sca-1)の発現が 2, 24 時間の時点で発現上昇した。

2 時間時点で発現上昇した遺伝子として、膜タンパクで金属イオン結合領域を持つが機能不明である Zinc finger DHHC domain containing 12 (Zdhhc12)やアポトーシスへの関与が示唆される B-cell leukemia/lymphoma 6(Bcl6)があり、ホルマリンの生物作用といかに関連するか更に解析を加える必要がある。

以上、今年度の解析結果は、ホルマリンの経気道暴露により肝で種々の遺伝子の発現が誘導されたことを示し、化学物質の経気道暴露による生体反応変化を捉えるのに、多臓器にわたる網羅的遺伝子発現解析手法が有効であることを実証するのに十分な結果であると考えられる。また、今回取り上げた遺伝子は経口投与では弱く発現上昇するか変化が認められないものであった。ホルマリンの経気道暴露と経口投与暴露で肝の反応が異なる機序についても今後検討する必要がある。

D. 結論

網羅的遺伝子発現解析手法がシックハウス症候群レベルの低濃度のホルマリンの経気道暴露による生体反応を捉えるのに有効であることが実証された。今後は計画した化学物質について肺、肝の比較を進め、新しい吸入毒性評価手法の開発の基盤とする。

(別添 資料)

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

Shiina H, Matsumoto T, Sato T, Igarashi K, Miyamoto J, Takemasa S, Sakari M, Takada I, Nakamura T, Metzger D, Chambon P, Kanno J, Yoshikawa H, Kato S.(2006) Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 103(1):224-9

Kanno J, Aisaki K, Igarashi K, Nakatsu N, Ono A, Kodama Y, Nagao T.(2006) Per cell" normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays. BMC Genomics 29;7:64.

Grun F, Watanabe H, Zamanian Z, Maeda L, Arima K, Chubacha R, Gardiner DM, Kanno J, Iguchi T, Blumberg B. (2006) Endocrine disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. Mol Endocrinol. 20(9):2141-55

Yasuhiko Y, Haraguchi S, Kitajima S,
Takahashi Y, Kanno J, Saga Y.(2006)
Tbx6-mediated Notch signaling controls
somite-specific Mesp2 expression. Proc
Natl Acad Sci U S A. 103(10):3651-6

菅野 純、北嶋 聡、相崎健一、五十嵐勝
秀、中津則之、高木篤也、小川幸男、児玉
幸夫、Percellome Project による毒性トラン
スクリプトミクスの新しい試み、細胞工学、
2007 年 1 月号、株式会社秀潤社

菅野 純、毒性の高精細解析に向けてのト
キシコゲノミクス、医学のあゆみ Vol.218
No.12 2006.9.16 p1035-6

2. 学会発表

菅野 純、マイクロアレイや定量 PCR から細
胞当たりの mRNA コピー数を得る Percellome
法の概略と生物研究への応用、九州大学医
生研セミナー、2006 年 4 月 17 日、福岡

菅野 純、基礎と応用のリンケージ・ツールと
しての Percellome System、第 95 回日本病理
学会総会、2006 年 4 月 30 日-5 月 2 日、東
京

菅野 純、マイクロアレイや定量 PCR から細
胞当たりの mRNA コピー数を得る Percellome
法*の概略と生物研究への応用、第 104 回
熊本大学発生研・拠点形成 A セミナー、
2006 年 6 月 5 日、熊本

菅野 純、相崎健一、五十嵐勝秀、北嶋聡、
中津則之、創薬とトキシコゲノミクス、第 10 回
がん分子標的治療研究会総会、2006 年 6
月 15 日、東京

菅野 純、Percellome Project の概要と展望、
第 33 回日本トキシコロジー学会、2006 年 7
月 3-5 日、名古屋

菅野 純、Percellom トキシコゲノミクス・プロ
ジェクトの概要と基礎生物学への応用、明治
薬科大学オープンカレッジ、2006 年 8 月 7
日、東京

菅野 純、中津則之、相崎健一、DEN 初期
遺伝子応答から見た好発癌系(C3H)と嫌発
系(B6)マウスの差異、第 65 回日本癌学会総
会、2006 年 9 月 28-30 日、横浜

菅野 純、相崎健一、小川幸男、関田清司、
北嶋 聡、ヒドロキシクエン酸による精巣毒性
のトキシコゲノミクス解析、第 96 回病理学会
総会、2007 年 3 月 13-15 日、大阪

Kanno Jun, Aisaki Ken-ichi,
Igarashi Katsuhide, Nakatsu Noriyuki,
Kitajima Satoshi, Kodama Yukio,
"PERCELLOME" TOXICOGENOMICS
PROJECT FOR THE MECHANISM-BASED
TOXICOLOGY, the SOT 46th Annual
Meeting March 25-29, 2007

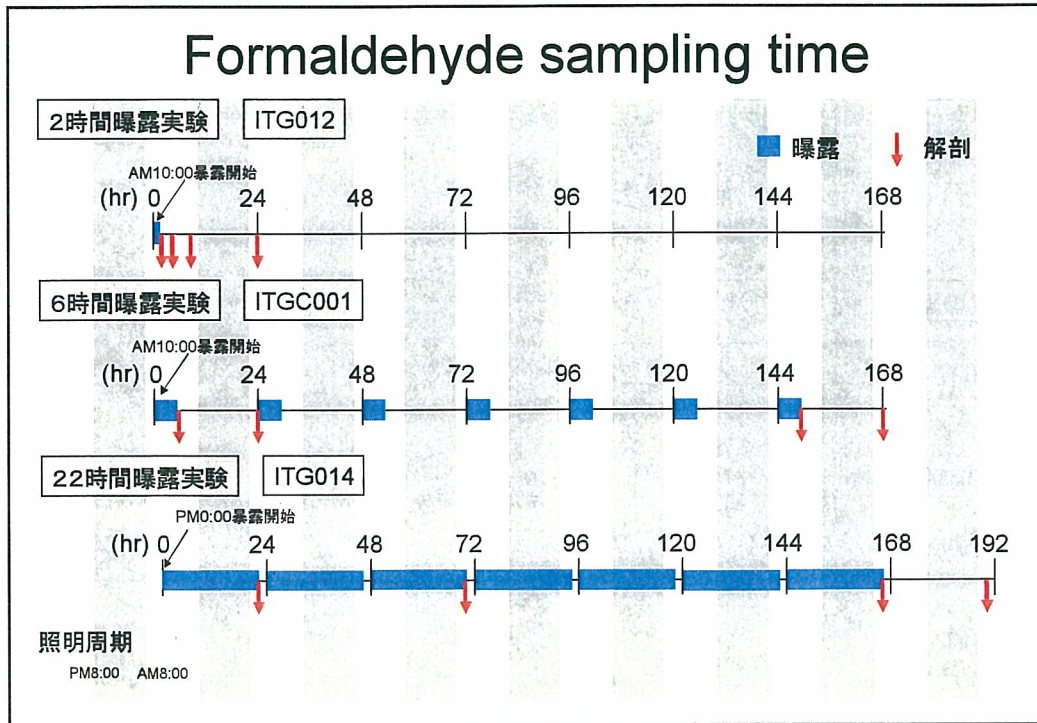
H. 知的財産所有権の出願・登録状況(予定
も含む)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

Formaldehyde sampling time



Formaldehyde吸入量の見積もり

	暴露	2hr単回	6hr x 7日	22hr x 7日	経口単回
コード		ITG012	ITGC001	ITG014	TTG070
wd	C	0.001	0.001	0.001	/
	L	0.107	0.028	0.028	
	M	0.291	0.097	0.093	
	H	1.017	0.450	0.307	
dx	C	0.03	0.10	0.38	0
	L	8.32	6.42	24.30	3
	M	22.64	22.59	79.92	10
	H	79.11	105.01	262.69	30

見積もり条件

- ・マウス体重を25 gとする
- ・100 % が吸収されるとする

43 L/day 0.030 L/min

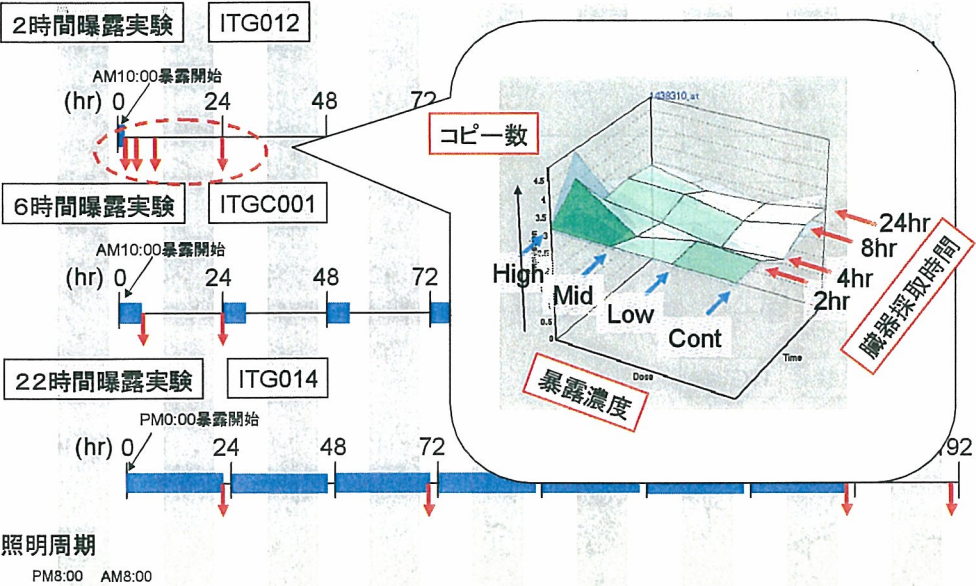
厚生省医薬安全局
医薬品の残留溶媒ガイドラインについて

50 L/day 0.035 L/min

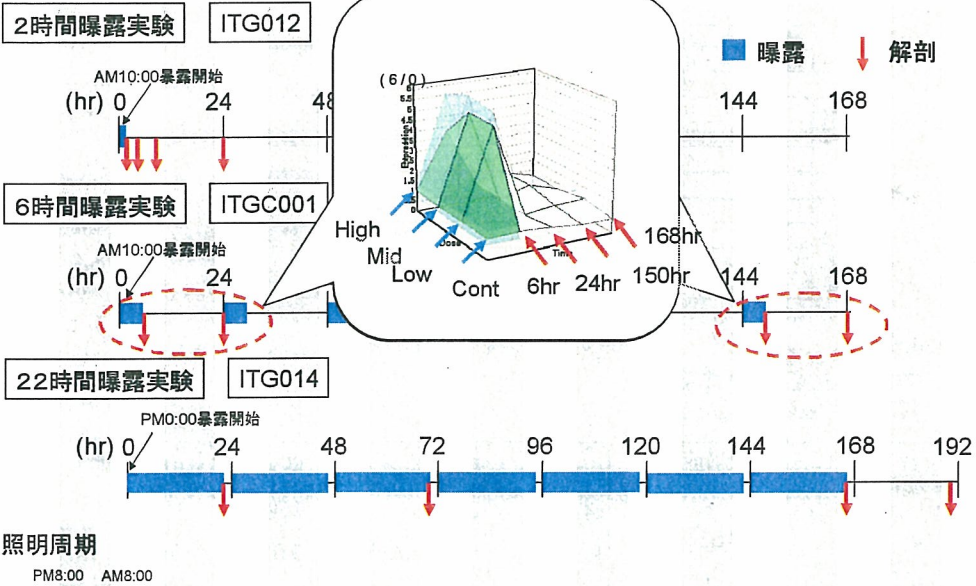
化学物質の初期リスク評価書 Ver. 1.0 No.45
化学物質排出把握管理促進法政令番号:1-28

	Rat	Mouse (Ratから換算)
体重	250 g	25g
呼吸量	0.132 L/min	0.0132 L/min

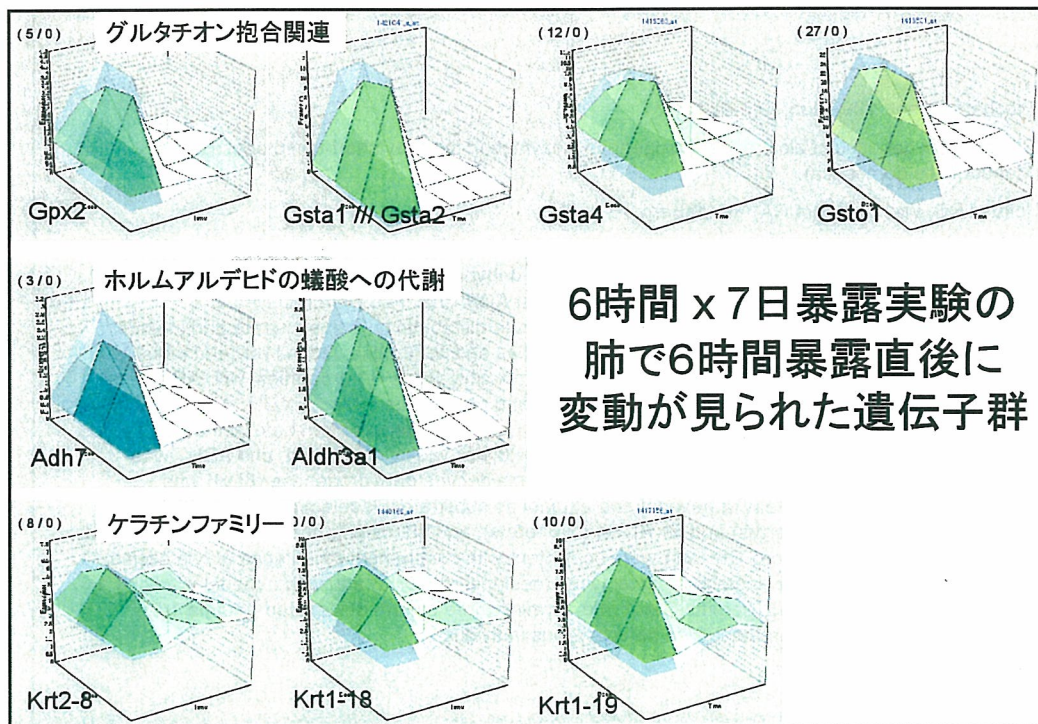
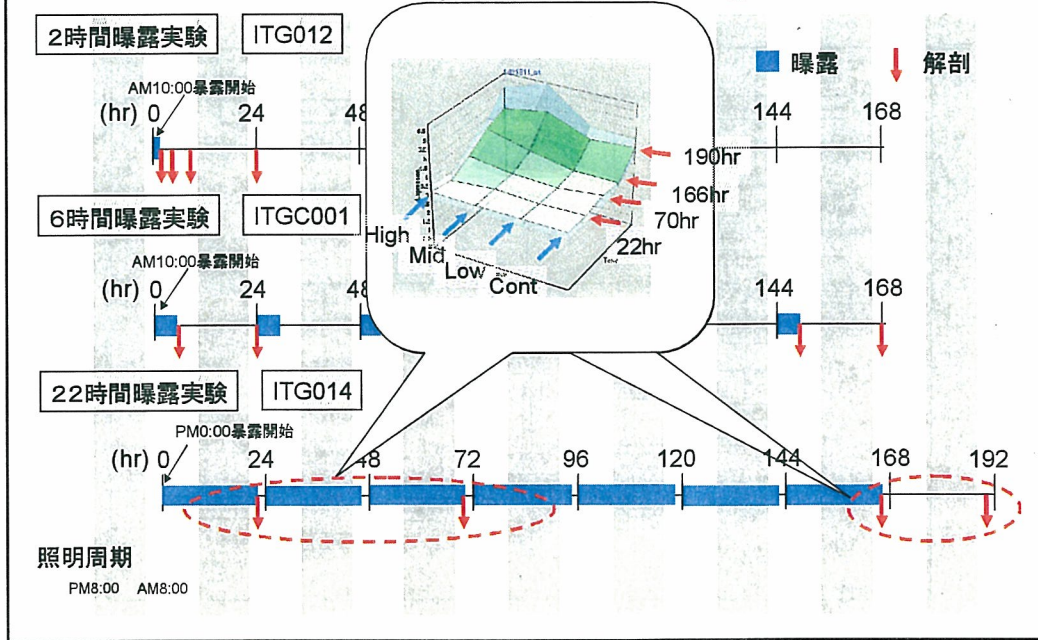
Formaldehyde sampling time



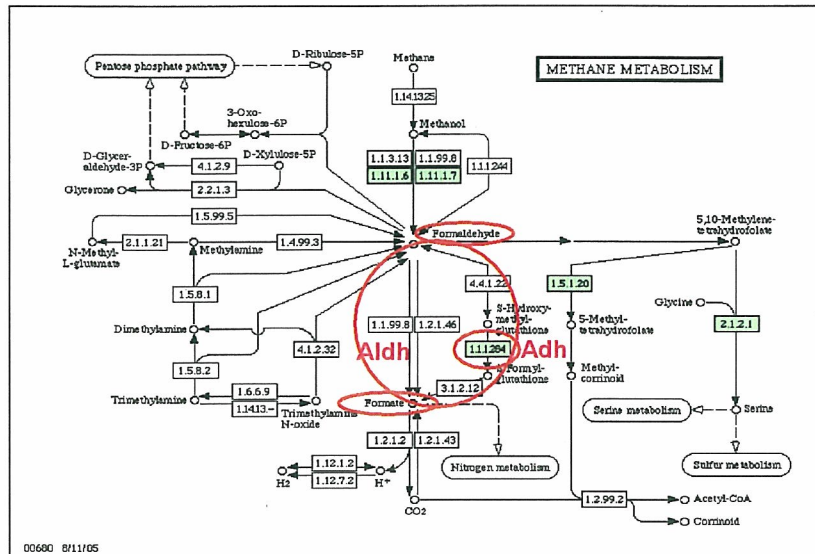
Formaldehyde sampling time



Formaldehyde sampling time



Formaldehyde代謝経路



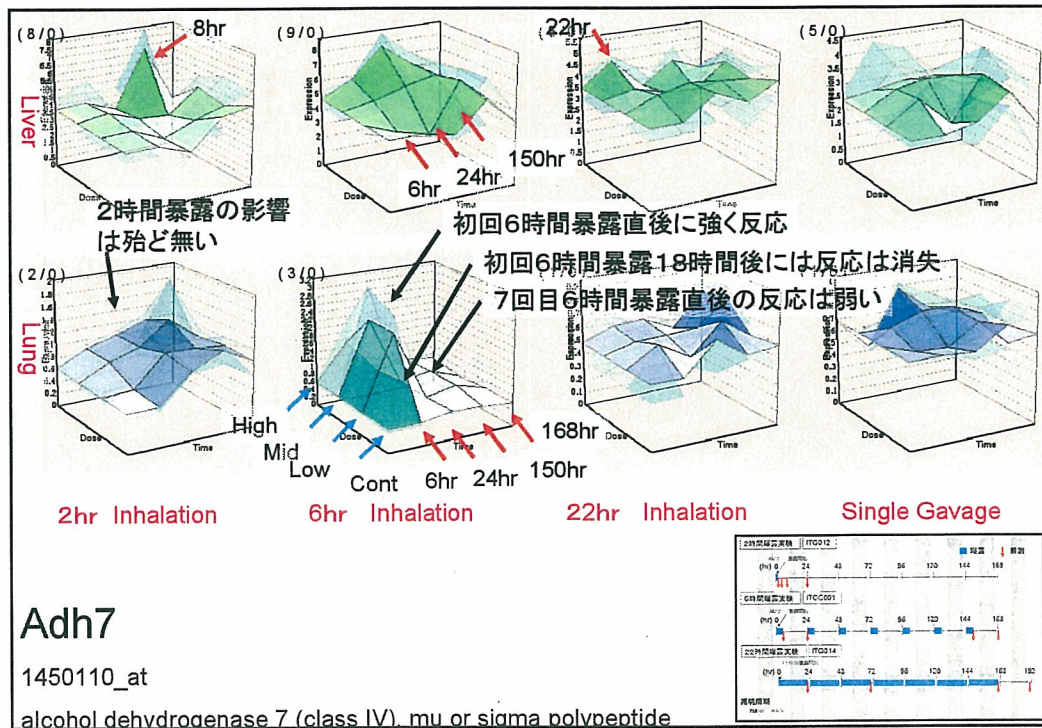
KEGGより抜粋

Biochem Genet. 1992 Jun;30(5-6):215-31.

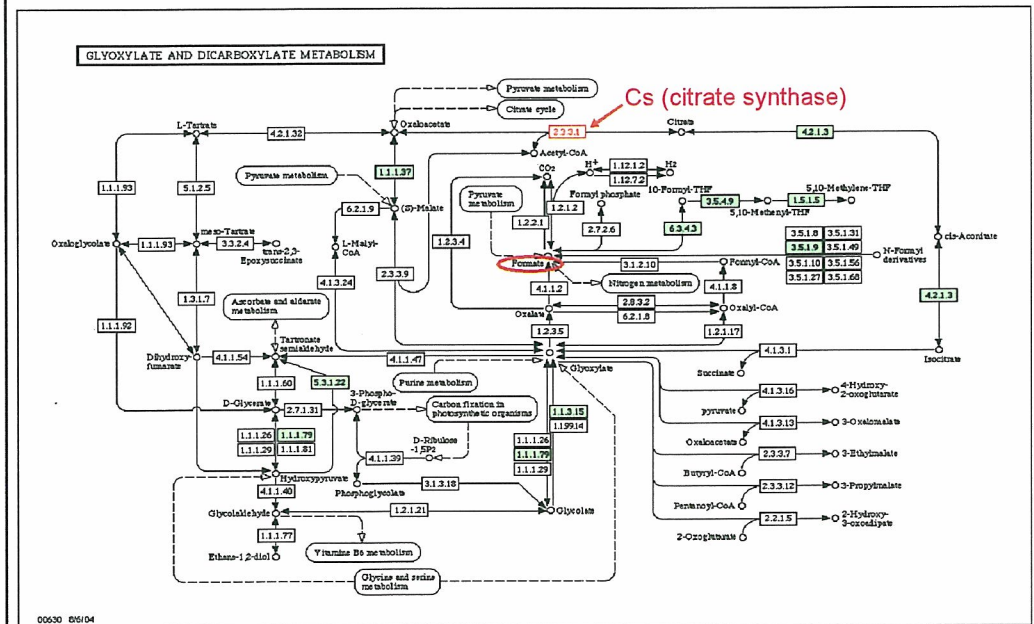
Biochemical genetics of alcohol dehydrogenase isozymes in the gray short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*).

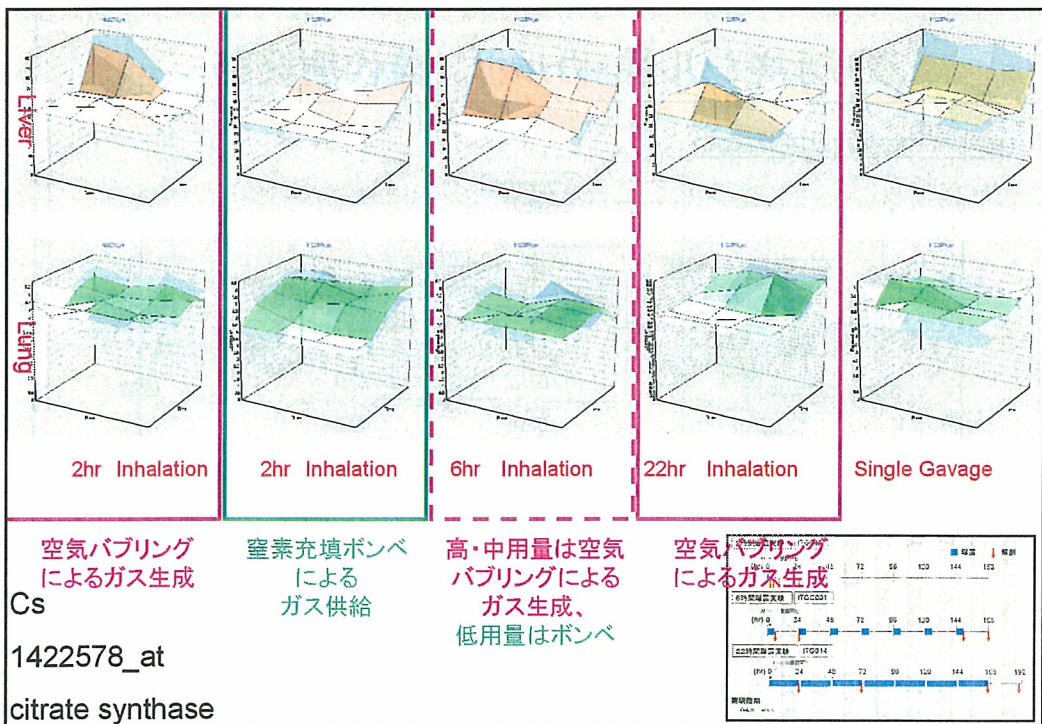
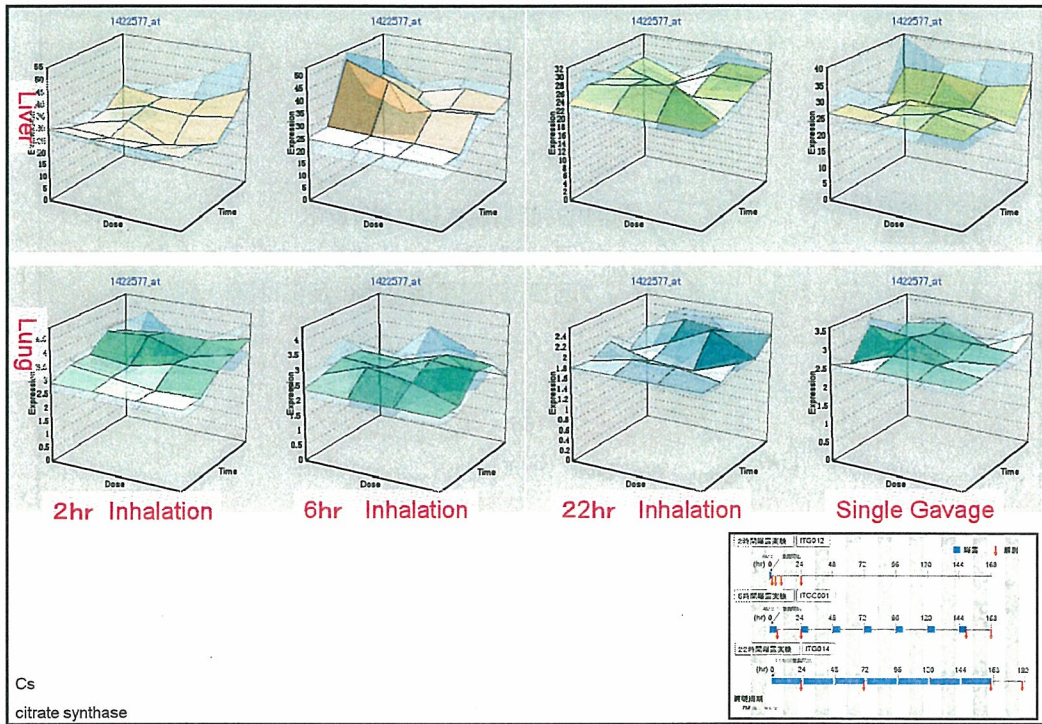
Holmes RS, van Oorschot RA, VandeBerg JL.

Polyacrylamide gel-isoelectric focusing (PAGE-IEF) methods were used to examine the multiplicity, tissue distribution, and biochemical genetics of alcohol dehydrogenase (ADH) isozymes among gray short-tailed opossums (*Monodelphis domestica*). Seven ADH isozymes were resolved and distinguished on the basis of their isoelectric points, tissue distributions, and substrate and inhibitor specificities. ADH1 and ADH2 exhibited Class I properties and were observed in liver (and intestine) extracts. ADH3, ADH4, and ADH5 showed "high-Km" (possibly Class IV) properties, with ADH3 and ADH4 exhibiting high activity in cornea, ear, stomach, and esophagus extracts. **ADH6 and ADH7 exhibited Class III properties, including activities as formaldehyde dehydrogenases**, with each showing different tissue distribution characteristics; ADH6 was widely distributed, and ADH7 was restricted to prostate extracts. An additional form of formaldehyde dehydrogenase (FDH) was observed, which was inactive with hexenol and ethanol as substrates. Isoelectric point variants were observed for ADH3 (three forms) and for ADH4 (two forms), and the inheritance of ADH3 was studied in 15 families of *M. domestica*. The data were consistent with codominant inheritance of two alleles (ADH3*A and ADH3*B) at a single autosomal locus (designated ADH3) and with a model involving a dimeric ADH isozyme: ADH3 (gamma 2 isozyme, forming three dimers designated gamma 1(2), gamma 1 gamma 2, and gamma 2(2) in heterozygous individuals).

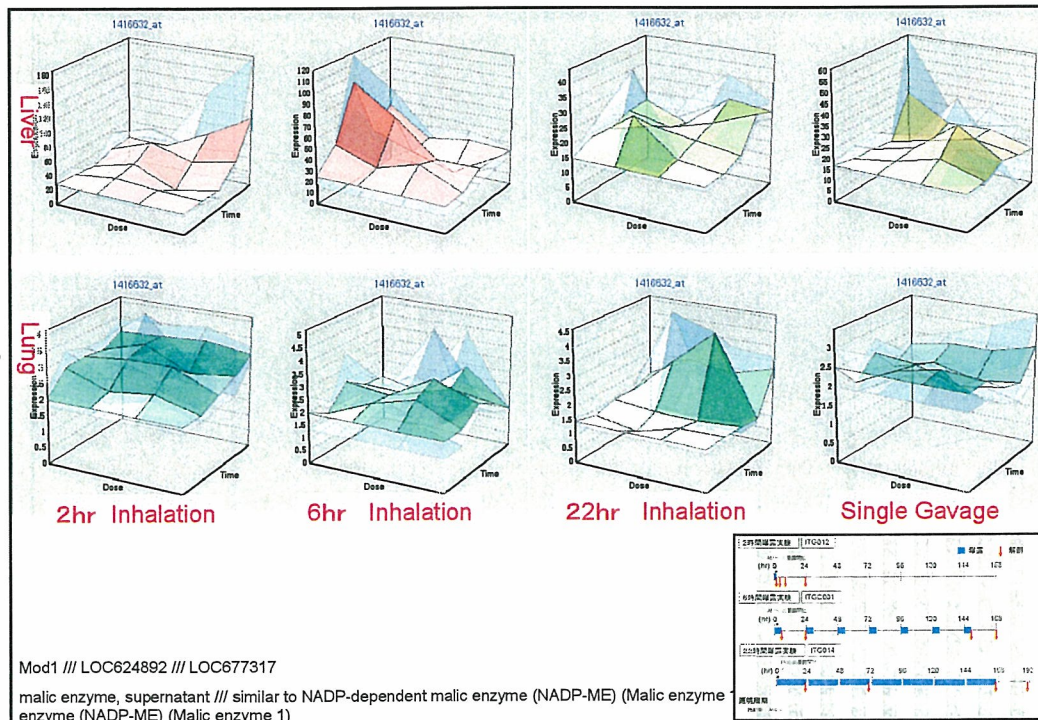
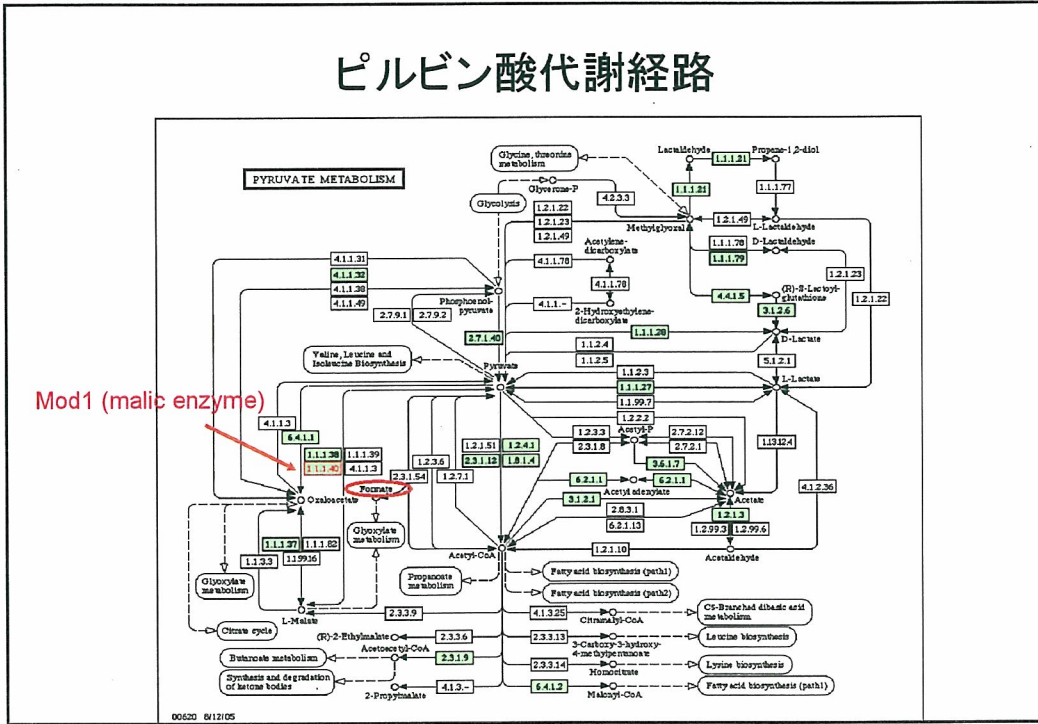


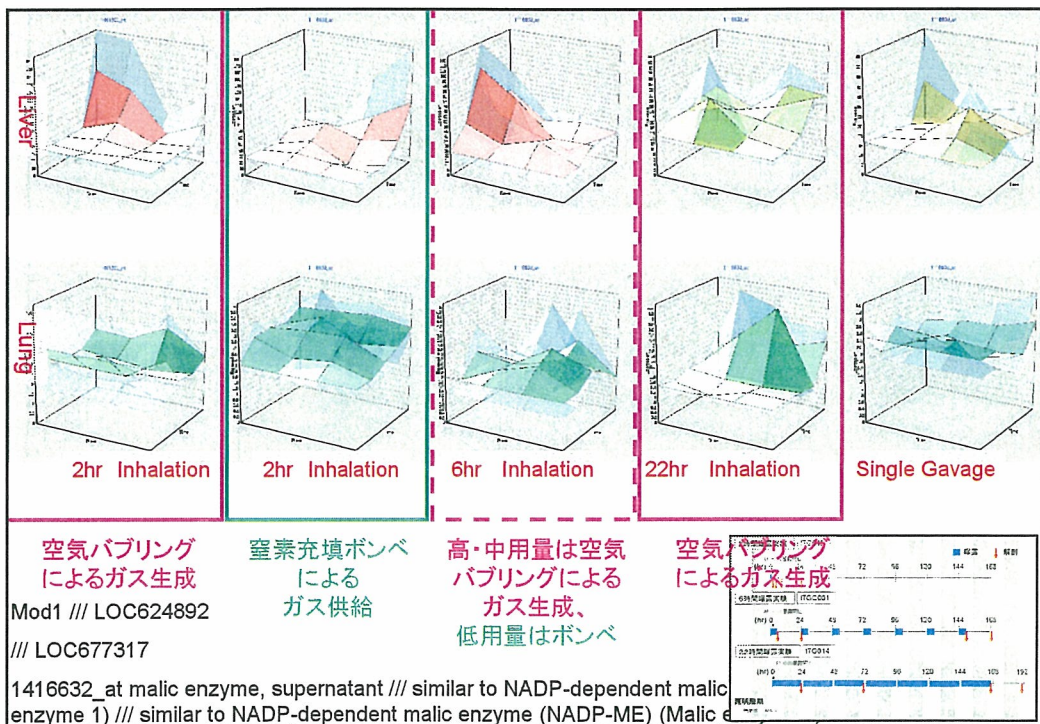
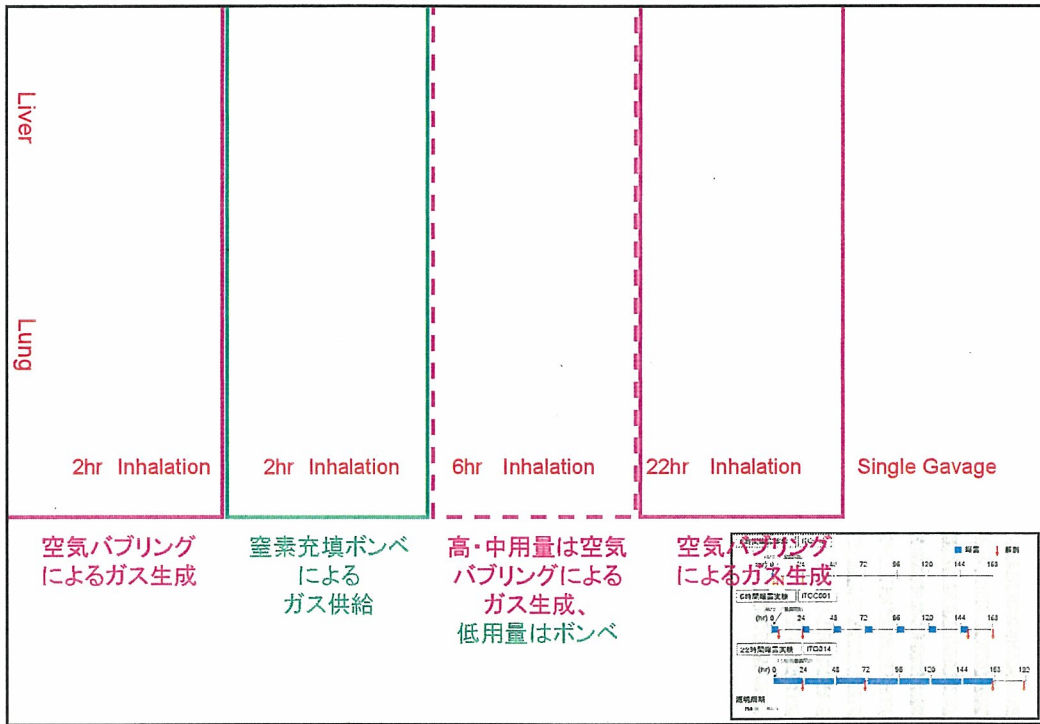
グリオキシル酸・カルボン酸代謝経路





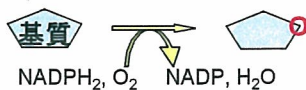
ピルビン酸代謝経路





Cyp2c55 (1419582_at)

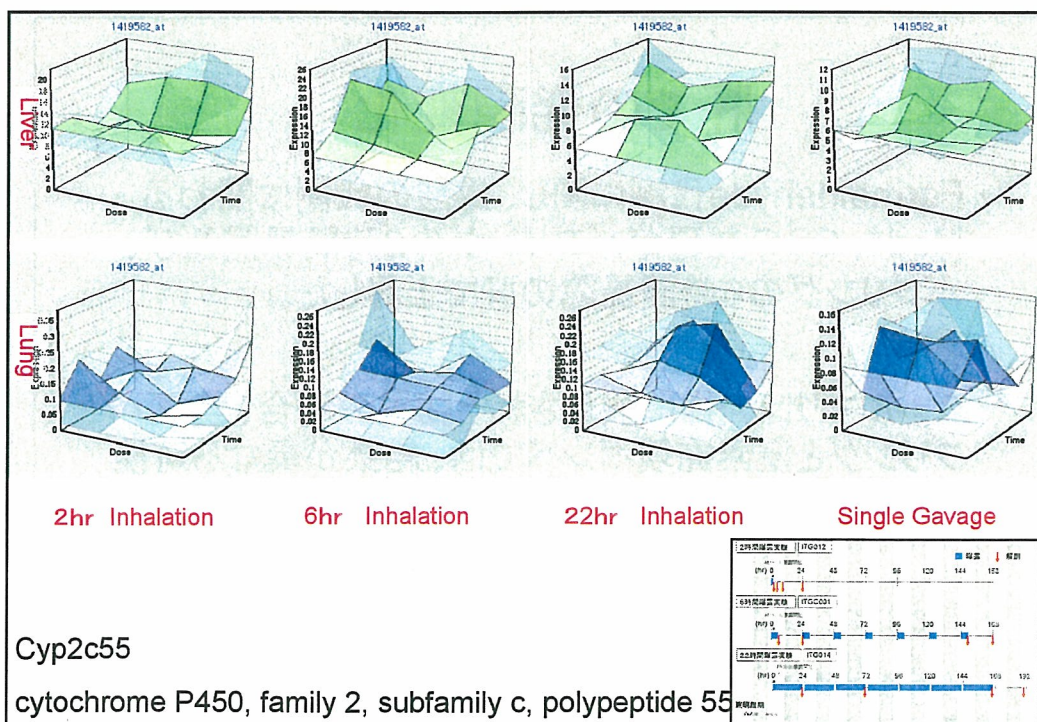
cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 55

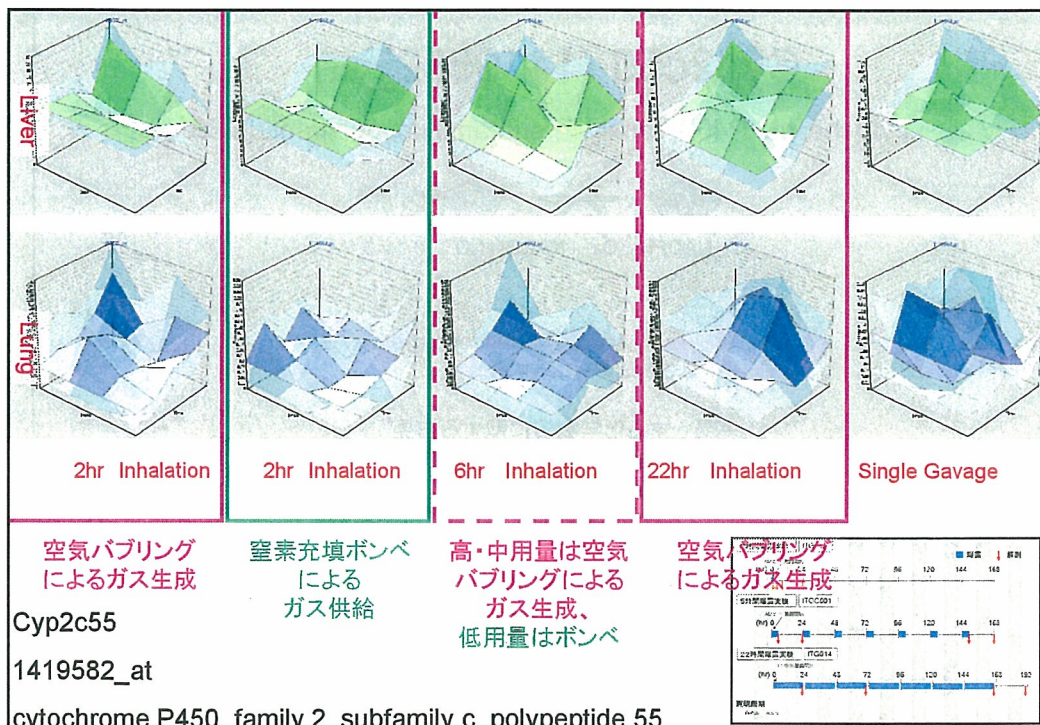


第一相薬物代謝酵素 Cytochrome P450 ファミリーに属する。

基質とする化学物質に関する知見はほとんどないが、アラキドン酸を基質とする報告¹⁾がある。

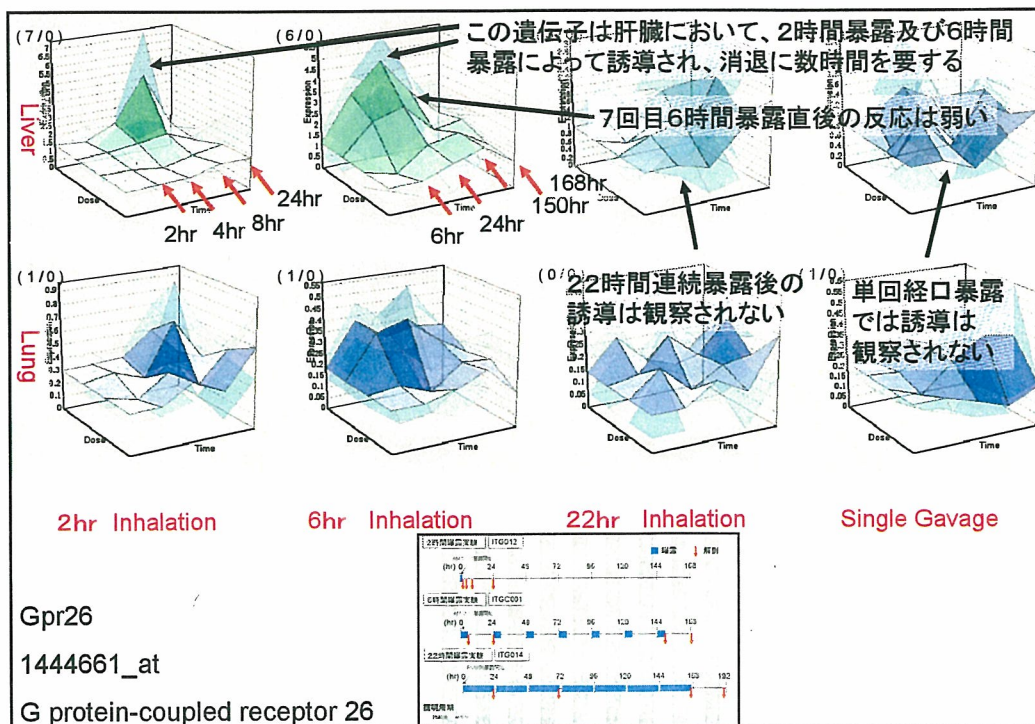
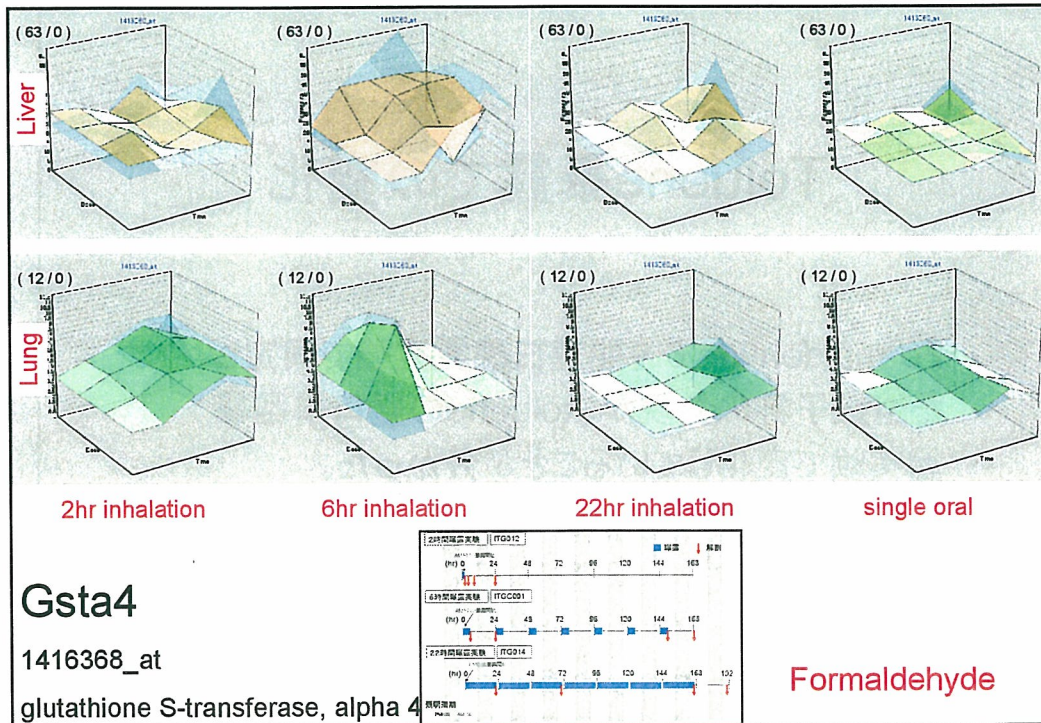
¹⁾Mol Pharmacol. 2004 May;65(5):1148-58.
Wang H, Zhao Y, Bradbury JA, Graves JP, Foley J, Blaisdell JA, Goldstein JA, Zeldin DC.





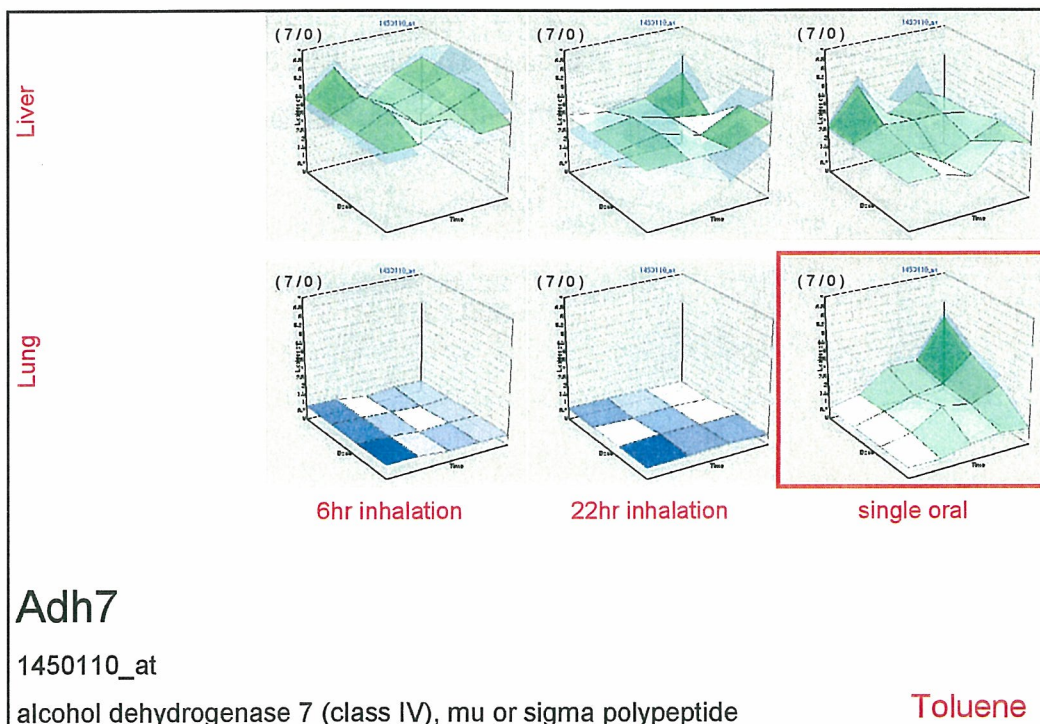
肝での発現変化

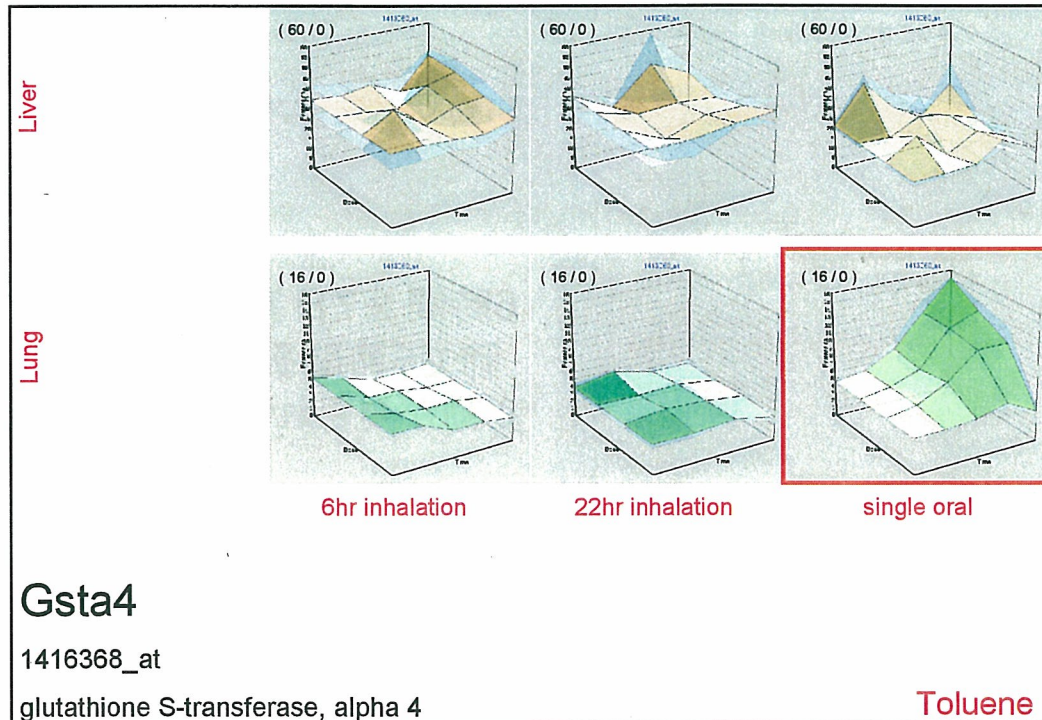
- Formaldehyde代謝に関し、蟻酸の代謝に関わる Mod1, CSの発現がバブリングの2時間暴露及び、バブリングの6時間暴露の肝で上昇した。
- フォルマリンの様に酸化される物質の場合、空気バブリングと窒素充填ポンベでは、結果が異なる可能性が示された。
- Mod1は、22時間暴露肺でも弱い発現上昇が見られた(但し、ポンベガスによる低用量群)。



Toluene暴露での変化

Formaldehyde 6時間連日暴露実験で同定した遺伝子群の発現が、tolueneの経口単回暴露実験で変化していることが分かった。





Promoter解析

- グルタチオン抱合関連遺伝子
Gpx2, Gsta2, Gsta4, Gsto1
- ホルムアルデヒドの蟻酸への代謝
Adh7, Aldh3a1

のpromoterに共通する転写因子結合モチーフを
検索した

