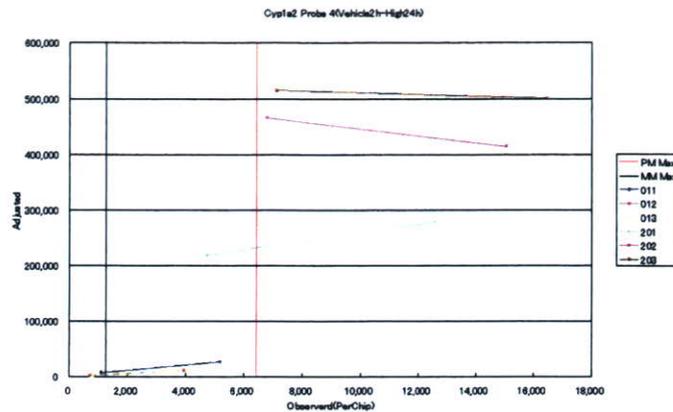


1. 10. 6. 全プローブ計算⑥検証②プローブ単位



- Cyp1a2のプローブ単位でチェック
 - 各線が各チップを表す



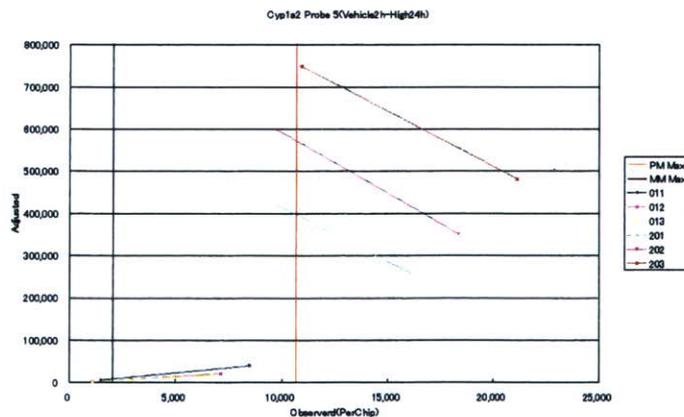
計測値はLangmuir曲線の最大値を大きく上回っている。

Copyright © NTT COMWARE 2008

1. 10. 6. 全プローブ計算⑥検証②プローブ単位



- Cyp1a2のプローブ単位でチェック
 - 各線が各チップを表す



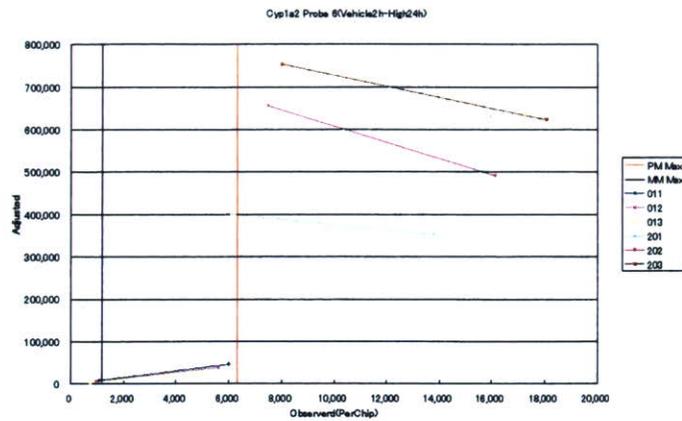
PM-MMで値が逆転しており、結果を不安定にしている

Copyright © NTT COMWARE 2008

1. 10. 6. 全プローブ計算⑥検証②プローブ単位



- Cyp1a2のプローブ単位でチェック
 - 各線が各チップを表す



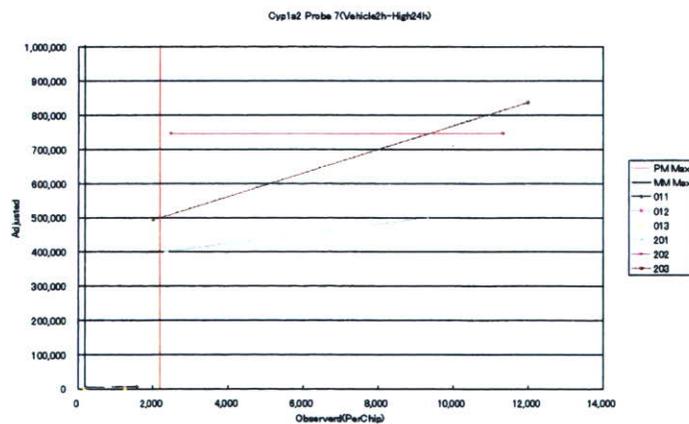
計測値はLangmuir曲線の最大値を大きく上回っている。

Copyright © NTT COMWARE 2008

1. 10. 6. 全プローブ計算⑥検証②プローブ単位



- Cyp1a2のプローブ単位でチェック
 - 各線が各チップを表す



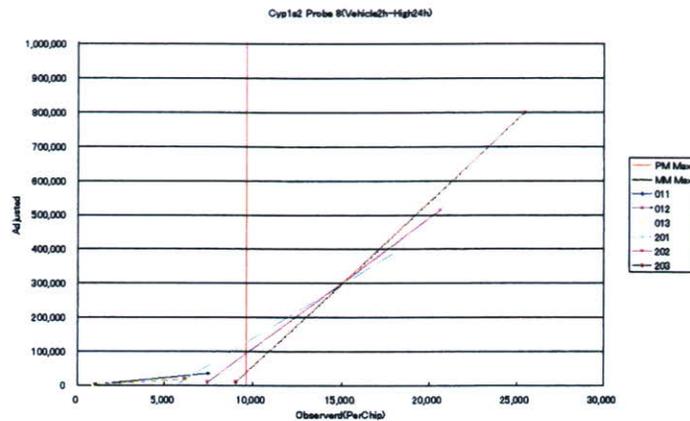
計測値はLangmuir曲線の最大値を大きく上回っている。

Copyright © NTT COMWARE 2008

1. 10. 6. 全プローブ計算⑥検証②プローブ単位



- Cyp1a2のプローブ単位でチェック
 - 各線が各チップを表す



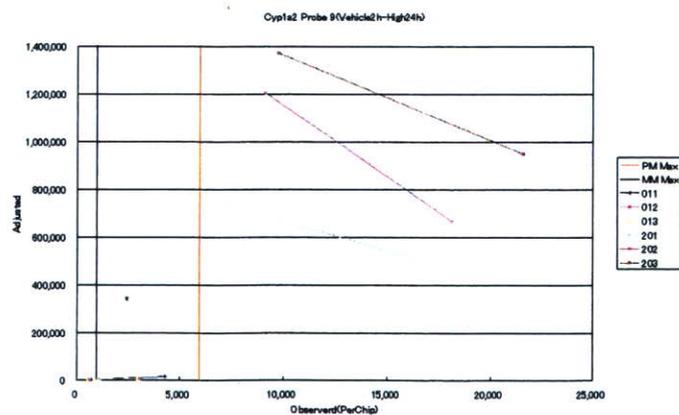
MMはLangmuirが選択されていない

Copyright © NTT COMWARE 2008

1. 10. 6. 全プローブ計算⑥検証②プローブ単位



- Cyp1a2のプローブ単位でチェック
 - 各線が各チップを表す



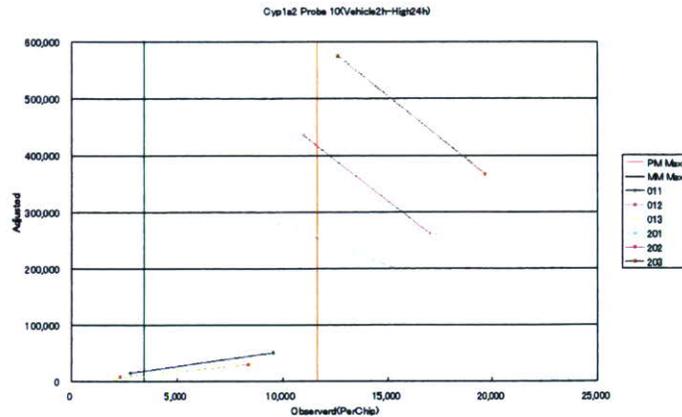
計測値はLangmuir曲線の最大値を大きく上回っている。

Copyright © NTT COMWARE 2008

1.10.6. 全プローブ計算⑥検証②プローブ単位



- Cyp1a2のプローブ単位でチェック
 - 各線が各チップを表す



計測値はLangmuir曲線の最大値を大きく上回っている。

Copyright © NTT COMWARE 2008

1.10.7. 全プローブ計算⑥課題:変換範囲



- Cyp1a2において、変換結果として良好な形状を示さなかった。
- 考察
 - Liverサンプルであり、TCDDの影響により通常状態より大きな値を示している
 - 大きな値で、PMとMMで、実測値よりも補正值で大小関係が逆転する場合もみられ、不安定になっている。
- 対策
 - 不安定性を解消するために、高値補正として、計算結果が安定する直線を用いてみる

Copyright © NTT COMWARE 2008

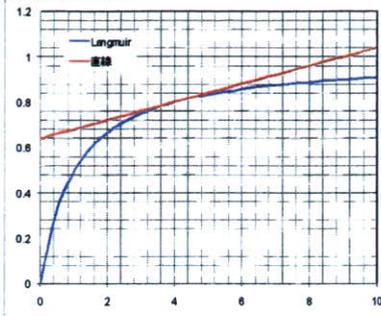
1.11. 全プローブ計算⑦



- アイデア
 - Langmuir方程式と直線を組み合わせる
- 数値計算を行う上で、Langmuirの方程式は上に有界な数式である。次の2点で数値計算上問題がある。
 - 濃度に対する係数に鈍感な関数で、完全飽和に近い状態で適切な収束が得られない
 - 飽和していない場合には、AICにより、排除される
 - 今回は逆関数にするので、逆関数の際に右に有界で定義域が制限される。
- 高濃度において、直線にフィットするものとみなす。
 - この領域に入った場合には詳細な検討が必要である。

$$f(x) = \begin{cases} \frac{x}{x+1} & \text{for } x \leq 4 \\ 0.04x + 0.64 & \text{for } x \geq 4 \end{cases}$$

$$I_n = \begin{cases} I_p \frac{k_p c_i}{k_p c_i + 1} + b_{g_p} & \text{for } k_p c_i \leq 4 \\ 0.04 I_p k_p c_i + b_{g_p} & \text{for } k_p c_i \geq 4 \end{cases}$$



これまで、高濃度域で、放物線を使用してきた。直線を使用することで、安定性が増すことが考えられる

Copyright © NTT COMWARE 2008

1.11.1. 全プローブ計算⑦ 結果



非線形最適化の結果

- 現在までの非線形モデルよりも非線形計算の安定性がよくない。非線形最適化計算中も数値計算上のエラーで多く停止した

終了状態	Brain側飽和	Liver側飽和
勾配ベクトル判定収束	74,275	66,007
移動量判定収束	40,917	26,076
局所的最小値	34,491	27,883
繰り返し回数が上限を超えた	86	90
総計	149,769	120,056

収束した

局所的収束

収束失敗

今までの補正式と比較して収束の安定性が悪い

Copyright © NTT COMWARE 2008

1.11.2. 全プローブ計算⑦ 結果



Langmuir Model採用個数

- ProbeSet中で何個のProbeがLangmuirモデルを採用しているか

- Brain側飽和

PM

合計 / Count(*)	列ラベル																
行ラベル	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	総計			
0		3908	1956	1021	421	189	71	9	3					7578			
1	4837	3827	2346	1321	703	284	89	32	7	1				13447			
2	2453	2258	1591	969	519	248	108	31	11	1				8189			
3	1308	1152	888	547	311	144	53	15	6	2			1	4407			
4	686	593	409	235	98	53	21	9	4					2108			
5	348	270	153	77	32	13	2	2					1	898			
6	109	73	45	19	11	5	1							263			
7	23	18	16	3	6	1	1							68			
8	7	5	1	1	1									15			
9	1	2			1									4			
総計	9772	12106	7385	4193	2103	937	346	98	31	4	1	1		36977			

PM側で11プローブが対象となるものがなく、適切な補正は難しい

Copyright © NTT COMWARE 2008

1.11.2. 全プローブ計算⑦ 結果



Langmuir Model採用個数

- Liver側飽和

PM

合計 / Count(*)	列ラベル																
行ラベル	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	総計			
0		4486	1161	321	181	103	55	46	18	5	7	1		6364			
1	6341	2872	937	360	194	117	83	49	39	12	4	2		11010			
2	1226	861	493	222	156	113	117	71	37	25	6	1		3238			
3	162	163	127	100	106	108	91	68	40	24	13	1		1003			
4	30	58	58	69	60	122	91	77	56	27	9	3		660			
5	19	36	46	66	83	78	76	73	36	23	7			543			
6	21	39	59	61	88	63	62	44	29	18	7	4		495			
7	13	35	35	47	47	38	50	29	20	17	4			335			
8	4	19	37	32	46	47	35	20	17	9				266			
9	2	6	21	16	17	23	21	17	8	4	1			136			
10	3	3	5	10	3	7	8	9	4					52			
11	1	2			2	2	2		1	2				12			
総計	7822	8580	2889	1304	963	821	691	503	305	166	58	12		24114			

PM側で11プローブが対象となるものが少なく、適切な補正は難しい

Copyright © NTT COMWARE 2008

1.11.3. 全プローブ計算⑦検証①



- LBMでの線形性チェック
 - 50:50を1に正規化したグラフを作成し、線形性のチェック
 - Langmuir変換を含むプローブセットを全プロットし、目視で線形性の確認する。値の低いもの以外で変な値を示すものがないことを確認する

Copyright © NTT COMWARE 2008

1.11.3. 全プローブ計算⑦検証①蝶の羽 (1)



- 対象プローブセット: 50%:50%において、1000程度の値を持つ

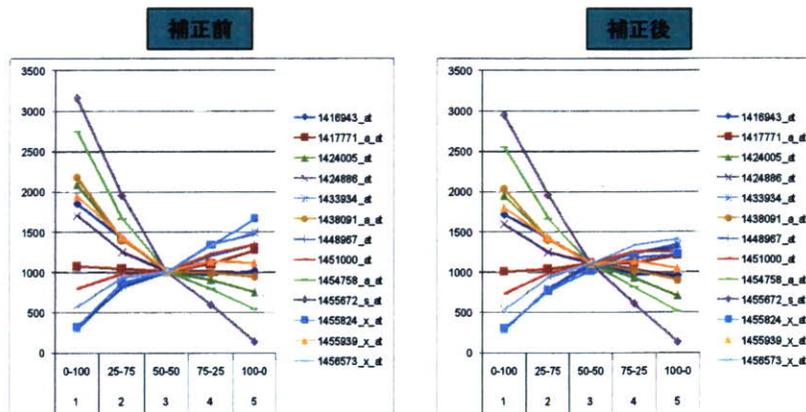
affy_id	Intensity
1424886_at	1008.53
1433934_at	1004.20
1424005_at	1002.17
1417771_a_at	1005.90
1451000_at	1000.37
1456573_x_at	1005.87
1455824_x_at	1006.07
1416943_at	1007.17
1454758_a_at	1007.60
1438091_a_at	1008.33
1448967_at	1003.97
1455939_x_at	1006.53
1455672_s_at	1004.00

Copyright © NTT COMWARE 2008

1.11.3. 全プローブ計算⑦検証①蝶の羽(2)



- 対象プローブセット:50%:50%において、1000程度の値を持つ



一部のプローブで飽和に近い曲線になっている

Copyright © NTT COMWARE 2008

1.11.3. 全プローブ計算⑦検証①蝶の羽(1)



- 対象プローブセット:50%:50%において、10000程度の値を持つ

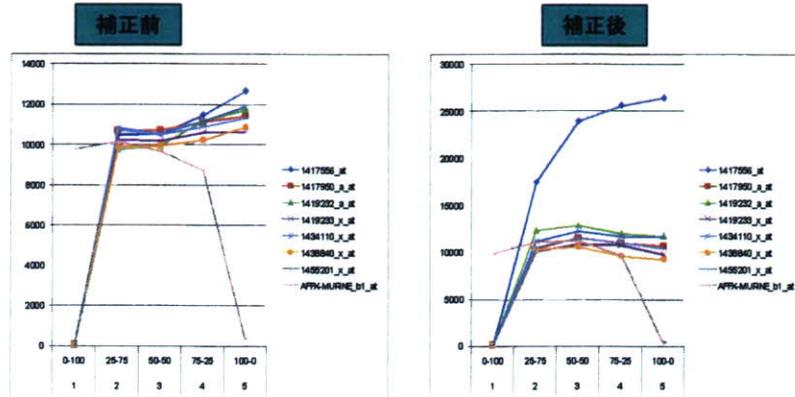
affy id	Intensity
1417556 at	10550.2
1417950 a at	10735.1
1419232 a at	9940.1
1419233 x at	10193.0
1434110 x at	10519.8
1438840 x at	9940.5
1455201 x at	10504.2
AFFX-MURINE b1 at	9686.6

Copyright © NTT COMWARE 2008

1.11.3. 全プローブ計算⑦検証①蝶の羽(5)



- 対象プローブセット: 50%:50%において、10000以上の値を持つ



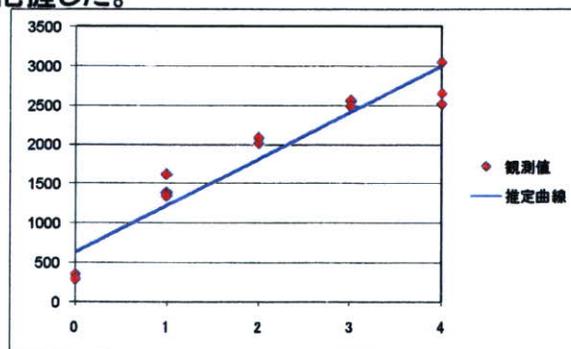
1417556_atは、補正により、引き延ばすことができたと考え

Copyright © NTT COMWARE 2008

1.11.3. 全プローブ計算⑦状況確認&課題



- あるプローブにおいて、収束結果後のLangmuir曲線の状況を図化し把握した。



課題: 高値の補正用直線部分しか現われていない。

補正係数を求めるときと、補正計算を実施する際に高値補正の扱いを変更すべきと考えられる

Copyright © NTT COMWARE 2008

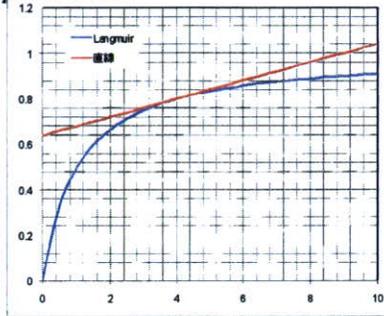
1. 12. 全プローブ計算⑧ 数値計算上の技巧 Langmuir方程式と直線を組合せる



- 数値計算を行う上で、Langmuirの方程式は上に有界な数式である。次の2点で数値計算上問題がある。
 - 濃度に対する係数に鈍感な関数で、完全飽和に近い状態で適切な収束が得られない
 - 飽和していない場合には、AICにより、排除される
 - 今回は逆関数にするので、逆関数の際に右に有界で定義域が制限される。
- 高濃度において、直線にフィットするものとみなす。
 - この領域に入った場合には詳細な検討が必要で無ス

$$f(x) = \begin{cases} \frac{x}{x+1} & \text{for } x \leq 4 \\ \frac{0.04x+0.64}{0.04x+0.64} & \text{for } x \geq 4 \end{cases}$$

$$I_M = \begin{cases} I_p \frac{k_p c_j}{k_p c_j + 1} + b g_p & \text{for } k_p c_j \leq 4 \\ I_p (0.04 k_p c_j + 0.64) + b g_p & \text{for } k_p c_j \geq 4 \end{cases}$$



これまで、高濃度域で、放物線を使用してきた。直線を使用することで、安定性が増すことが考えられる。

非線形最適化の収束計算の安定性のため、本式のパラメータ推定では、直線部分がないものとして計算を行う。

1. 12. 1. 全プローブ計算⑧ Langmuir等温式による補正値を求める式



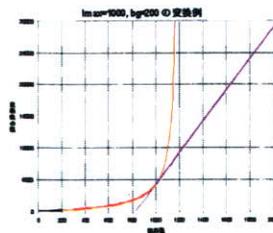
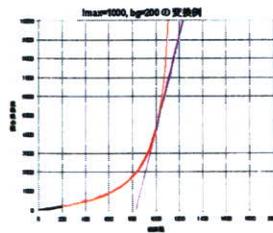
- LBMなどで、プローブ毎に、各係数を求めておき、各実験で、補正値を計算する

$$I = I_p \frac{k_p c_j}{1 + k_p c_j} + b g_p$$

I : Observed Intensity
 I_p : Saturation Intensity
 k : equilibrium constant
 c : concentration
 $b g$: background component

$$k_p c_j = \frac{I - b g_p}{I_p - I}$$

と求め、
 $I = I_p k_p c_j + b g_p$
 を補正値とする



高濃度における補正 ($k a > 4$ の場合)

$$I = I_p (0.04 k_p c_j + 0.64) + b g_p$$

$$k_p c_j = \frac{\left(\frac{I - b g_p}{I_p} \right) - 0.64}{0.04}$$

と求め、
 $I = I_p k_p c_j + b g_p$
 を補正値とする

1.12.2. 全プローブ計算⑧非線形最適化の結果



- 現在までの非線形モデルよりも非線形計算の安定性がよくない。非線形最適化計算中も数値計算上のエラーで多く停止した

終了状態	Brain側飽和	Liver側飽和	
勾配ベクトル判定収束	63,035	63,856	} 収束した
移動量判定収束	48,817	33,274	
局所的最小値	37,917	22,926	} 局所的収束
総計	149,769	120,056	

Copyright © NTT COMWARE 2008

1.12.3. 全プローブ計算⑧ Langmuir Model採用個数



- ProbeSet中で何個のProbeがLangmuirモデルを採用しているか

Brain側飽和

PM

合計 / Count(*)	列ラベル	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	20	総計
0	行ラベル															
1		4829	3833	2341	1335	700	291	95	29	8	1					13462
2		2455	2294	1609	1002	541	245	111	34	10	1					8302
3		1303	1163	868	563	314	156	58	14	8	1			1		4449
4		676	591	416	247	108	55	18	11	6	1					2129
5		352	287	159	85	30	16	4	3	1		1	1			939
6		111	72	47	20	14	4	1								269
7		22	18	16	5	3	2	1								67
8		7	5	1	1	1										15
9		1	2													3
17															1	1
総計		9756	12127	7400	4267	2132	959	361	100	36	4	1	1	1	1	37146

PM側で11プローブが対象となるものがなく、適切な補正は難しい

Copyright © NTT COMWARE 2008

1.12.3. 全プローブ計算⑧ Langmuir Model採用個数

- Liver側飽和

PM

合計 / Count(*)	列ラベル	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	17	総計
0			4421	1203	350	163	102	49	47	23	5	7	2			6372
1		6462	3344	1216	432	225	136	73	57	44	19	8	5			12021
2		1385	1117	575	267	140	123	121	71	60	34	22	5			3920
3		179	214	166	105	91	92	87	77	55	46	25	12			1149
4		30	38	39	42	44	62	73	85	65	75	45	14			612
5		3	9	12	17	27	38	57	78	76	68	56	28			469
6		2	3	8	5	16	18	35	55	50	64	58	37			351
7			1	3	3	8	10	21	35	65	51	64	44			305
8				2	3	7	18	23	31	51	74	88				297
9			1			1	1	5	12	20	29	48	127			245
10							2	2	5	6	15	61	205			296
11									1	2	7	23	225	1		259
13															1	1
総計		8061	9148	3224	1225	715	591	541	546	497	464	491	782	1	1	26297

PM/PM双方で11プローブが補正対象となるものが見つかり、プローブセットとして、飽和現象が観測されたと考えられる。

Copyright © NTT COMWARE 2008

1.12.4. 全プローブ計算⑧ 検証①

- LBMでの線形性チェック
 - 50:50を1に正規化したグラフを作成し、線形性のチェック
 - Langmuir変換を含むプローブセットを全プロットし、目視で線形性の確認する。値の低いもの以外で変な値を示すものがないことを確認する

Copyright © NTT COMWARE 2008

1.12.4. 全プローブ計算⑧検証①



- 対象プローブセット:50%:50%において、1000程度の値を持つ

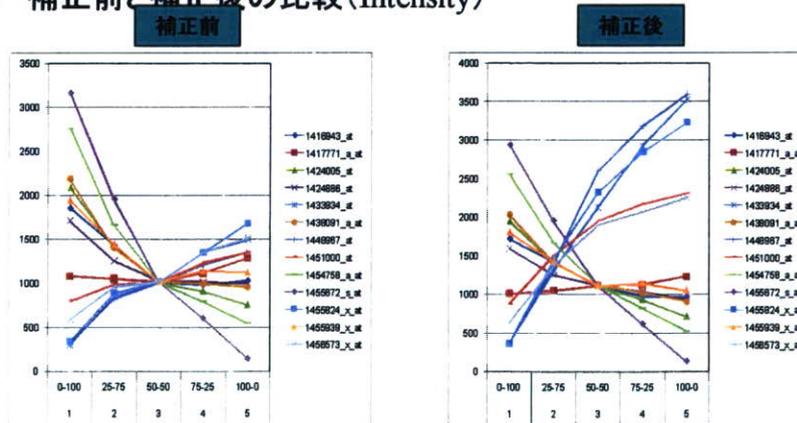
affy_id	Intensity
1424886_at	1008.53
1433934_at	1004.20
1424005_at	1002.17
1417771_a_at	1005.90
1451000_at	1000.37
1456573_x_at	1005.87
1455824_x_at	1006.07
1416943_at	1007.17
1454758_a_at	1007.60
1438091_a_at	1008.33
1448967_at	1003.97
1455939_x_at	1006.53
1455672_s_at	1004.00

Copyright © NTT COMWARE 2008

1.12.4. 全プローブ計算⑧検証①



- 対象プローブセット:50%:50%において、1000程度の値を持つ
- 補正前と補正後の比較(Intensity)



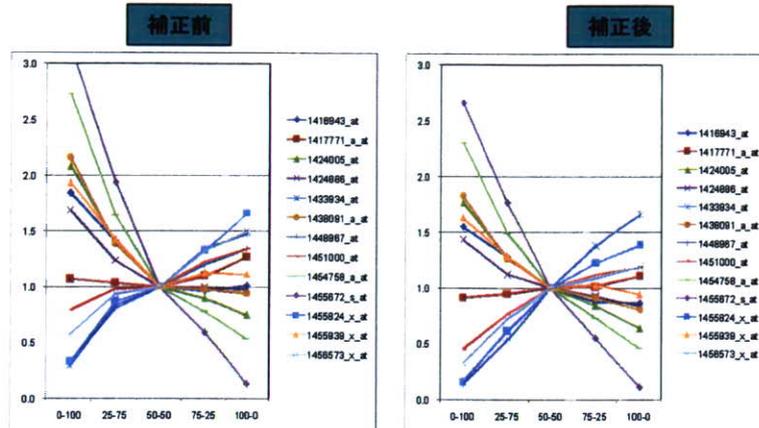
直線性の示す補正結果となった。

Copyright © NTT COMWARE 2008

1.12.4. 全プローブ計算⑧検証①



- 対象プローブセット: 50%:50%において、1000程度の値を持つ
- 補正前と補正後の比較(50%:50%で正規化)



直線性を示す補正結果となった。

Copyright © NTT COMWARE 2008

1.12.4. 全プローブ計算⑧検証①



- 対象プローブセット: 50%:50%において、10000程度の値を持つ

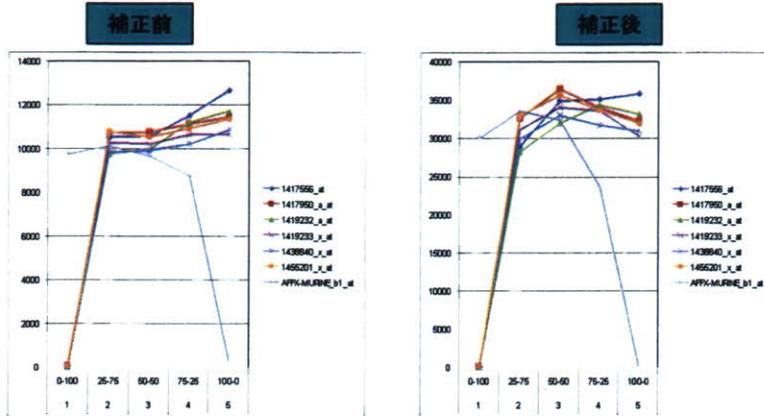
affy_id	Intensity
1417556 at	10550.2
1417950 a at	10735.1
1419232 a at	9940.1
1419233 x at	10193.0
1434110 x at	10519.8
1438840 x at	9940.5
1455201 x at	10504.2
AFFX-MURINE b1 at	9686.6

Copyright © NTT COMWARE 2008

1.12.4. 全プローブ計算⑧検証①



- 対象プローブセット: 50%:50%において、10000以上の値を持つ



補正により、0%-25%-50%は、若干直線に引き延ばすことができ、50%-75%-100%において、大きな変化がなく良好な結果となった

Copyright © NTT COMWARE 2008

1.13. まとめ



Langmuir吸着等温式を用いてある程度飽和に現象に関する補正が可能であった。

- 課題
 - LBMにおいて飽和現象を示したことのあるプローブだけが補正対象となる
 - 当該LBM以外での適用に関して不安定である
 - チップごと補正が不安定である
 - バックグラウンドノイズ、最大輝度
- 計算上必要な項目
 - 補正計算において、飽和値以上を示した場合の対処方法
 - ある一定値以上は線形に補正されるとみなす
 - 非線形収束において、高値補正の項目は考慮に入れない
 - 線形の項目をいれると収束の安定性に欠ける

Copyright © NTT COMWARE 2008

2.1. テーマ2



- テーマ
 - MADICパラメータ検討
- 背景
 - MADIC(Mass Distributed Clustering : A New Clustering Algorithm for Repeated Measurements in Gene Expression Data, Genome Informatics 16(2): 183-194 (2005), PMID: 16901101、特許番号3995099 (平19.8.10))は論文作成時に、Moe430Aを対象としており、現在チップMoe430 2.0とプローブセットが増えている。
- 目的
 - プローブセットの数に対してパラメータが適切な検討を導き出す。

Copyright © NTT COMWARE 2008

2.2. MADICクラスタ分類



密度が高い領域

- RIGOROUS
 - クラスタの中心
- SHELL
 - RIGOROUSから一定の距離以内に存在する
- ADHESIVE
 - RIGOROUSから少し離れている

密度が低い領域

- UNIQUE
 - 単一で密度が高いとみなせる(SDが小さい)
- ISOLATE
 - 単一で密度が高いとみなせる
- UNSTABLE
 - 単一で密度が高いとは考えられない

Copyright © NTT COMWARE 2008

2.3. 検討パターン



- 第1パターン
 - 論文時と同様のパラメータを用いる
 - $\rho = 1.4$
- 第2パターン
 - 密度閾値を若干厳しくし、クラスタとして現れるのを少し遅らせる
 - $\rho = 1.7$

- クラスタの最後の閾値は同じものを使用する

Copyright © NTT COMWARE 2008

2.4. 結果



2パターンの結果分類の対比

		パターン2						
パターン1	標準	RIGOROUS	SHELL	ADHESIVE	UNIQUE	ISOLATE	UNSTABLE	総計
	RIGOROUS	480	30	8				518
	SHELL	13	13,513	3,045				16,571
	ADHESIVE	1	1,174	22,020				23,195
	UNIQUE				4,322			4,322
	ISOLATE					8		8
	UNSTABLE						487	487
	総計	494	14,717	25,073	4,322	8	487	45,101

厳しい基準にすることにより、RIGOROUSがSHELLやADHESIVEへ移っていった。しかし、大きな違いは存在しない

Copyright © NTT COMWARE 2008

2.4. 結果



2パターンのうち片方だけでRIGOROUSとなったプローブ

ID	パターン1 (標準)					パターン2				
	Pin no.	Impedance	Label	Pin no.	Impedance	Pin no.	Impedance	Label	Pin no.	Impedance
1401000 #	35304	0	35304	458	0	07948	20	35304	458	0
1405000 #	35304	20	35304	747	2	07948	20	35304	747	2
1410000 #	307	0	307	747	0	13548	21	307	747	0
1410040 #	1171	141	1171	1171	1	1171	1490	141	1490	1
1411000 #	1490	241	1490	250	2	1490	1537	241	1537	2
1411080 #	1714	40	1714	1714	2	1714	1808	40	1808	2
1411257 #	1788	30	1788	1788	2	1788	2071	30	2071	2
1411300 #	1788	31	1788	1788	2	1788	2069	31	2069	2
1420010 #	10525	30	10525	2813	3	10525	223	30	223	3
1410007 #	228	0	228	2813	0	12645	30	228	2813	0
1430000 #	4410	41	4410	4410	1	4410	223	41	223	1
1430067 #	5273	36	5273	5273	1	5273	889	36	889	1
1410180 #	8146	46	8146	8146	2	8146	810	46	810	2
1420024 #	6530	20	6530	6530	1	6530	855	20	855	1
1420030 #	6536	28	6536	6536	2	6536	852	28	852	2
1420010 #	7875	271	7875	7875	1	7875	728	271	728	1
1420006 #	7875	36	7875	7875	1	7875	1143	36	1143	1
1430009 #	8136	41	8136	8136	2	8136	3433	41	3433	2
1401000 #	8581	41	8581	8581	3	8581	3433	41	3433	3
1420008 #	8134	41	8134	8134	3	8134	3433	41	3433	3
1420000 #	8385	271	8385	8385	1	8385	450	271	450	1
1420040 #	8728	30	8728	8728	1	8728	855	30	855	1
1411000 #	15510	0	15510	8728	0	15510	281	0	281	0
1411000 #	15510	0	15510	8728	0	15510	281	0	281	0
1420000 #	8921	40	8921	8921	2	8921	3433	40	3433	2
1420007 #	10560	36	10560	10560	2	10560	489	36	489	2
1410007 #	21078	36	21078	10901	2	21078	1143	36	1143	2
1420000 #	10901	0	10901	10901	2	10901	1143	0	1143	2
1420010 #	3681	36	3681	1143	2	3681	1143	36	1143	2
1420010 #	43074	271	43074	11785	2	43074	11785	271	11785	2
1420007 #	14262	22	14262	14262	3	14262	810	22	810	3
1420000 #	8100	0	8100	10901	0	10188	271	8100	271	0
1420000 #	38548	0	38548	10901	0	10284	271	38548	271	0
1420000 #	38550	0	38550	10901	0	10284	271	38550	271	0
1420000 #	12288	46	12288	12288	1	12288	4038	46	4038	1
1420000 #	15117	21	15117	15117	1	15117	223	21	223	1
1420000 #	15969	42	15969	15969	1	15969	5078	42	5078	1
1430010 #	17882	34	17882	17882	1	17882	8136	34	8136	1
1430010 #	18145	43	18145	18145	2	18145	3173	43	3173	2
1430007 #	18145	43	18145	18145	2	18145	3173	43	3173	2
1430000 #	18737	42	18737	18737	2	18737	2200	42	2200	2
1430010 #	18871	30	18871	18871	2	18871	11078	30	11078	2
1430015 #	20521	46	20521	20521	2	20521	2173	46	2173	2
1430000 #	43074	0	43074	271	0	52478	48	43074	271	0
1440010 #	3037	31	3037	3037	1	3037	3037	31	3037	1
1410010 #	3804	0	3804	3037	0	3037	3037	0	3037	0
1400000 #	4500	0	4500	3037	0	3037	3037	0	3037	0
1430010 #	18728	0	18728	3037	0	27101	32	18728	3037	0
1420007 #	8100	0	8100	3037	0	28699	271	8100	3037	0
1420010 #	40336	30	40336	40336	1	40336	8134	30	8134	1
1420010 #	40341	30	40341	40341	1	40341	8134	30	8134	1
1420010 #	40341	30	40341	40341	1	40341	8134	30	8134	1

Copyright © NTT COMWARE 2008

2.5. 結論



- RIGOROUSになるかどうかで、一部違いはみられたものの、両パターン間で有意な差異はなかった。
- MOE430Aで使用したパラメータをMOE430 2.0でもそのまま使用可能と考えられる。

Copyright © NTT COMWARE 2008

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・室長

研究要旨

遺伝子発現変動に立脚した高精度な発生毒性評価系の確立を目的として今年度は、催奇形性の種差が著しい化学物質サリドマイドを妊娠マウスに単回経口投与した際の、胚における網羅的遺伝子発現変動解析を検討した結果、遺伝子欠失マウス胚の肢部で形成異常の報告がある遺伝子の発現減少が認められた。この遺伝子産物がサリドマイドの未知の標的分子である可能性が示唆され、安全性評価上、意義深いものと考えられた。

A. 研究目的

遺伝子発現変動に立脚した高精度な発生毒性評価系を確立すること。このために、平成 19 年度は、催奇形性モデル物質として、ヒトで催奇形を示すがげっ歯類では示さないという種差が著しい催奇形性物質(サリドマイド)を、妊娠マウスに単回経口投与した際の胚(1 腹分のプールサンプル)に対する網羅的遺伝子発現変動解析を検討した。

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。

サリドマイド(BIOMOL)の投与経路は経口投与、投与容量は 10 (mg/kgBW)、溶媒は 0.5%メチルセルロース(信越化学)とし、懸濁にはメノウ鉢を使用し用事調整にて作製した。投与時期に関しては、昨年度のサイクロパミン投与実験での検討を考慮し、同じく妊娠 7.5 日とした。用量設定に際しては、用量設定実験として強制経口投与の最大

耐量と考えられる 1,000 mg/kgBW を含む用量で検討した結果、いずれの用量でも毒性学的変化が認められなかったことから、本実験での用量を 1,000mg/kgBW とした。したがって、本実験の群構成を 0 および 1,000 mg/kg 投与群とし、胚 RNA のサンプリングは投与後 2, 8, 24 時間後におこなった。whole mount ISH は、ジゴキシンゲンin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おこない、検出は抗ジゴキシンゲン抗体、発色は BM purple でおこなった。

(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、下記、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。「国立医薬品食品衛生研究所・動物実験の適正な実施に関する規程(平成 19 年 4 月版)」。

C. 研究結果

先ず用量設定実験として、妊娠 7.25 日の妊娠マウスに、各種濃度(0, 100, 300, 1,000 mg/kgBW)のサリドマイドを単回経口投与し、妊娠 17.25 日に帝王切開して得られた胎児の外表検査、胎児重量、胎児数を検討したところ、いずれの群でも有意差は認められなかった。

この結果を考慮し、妊娠 7.25 日の妊娠動物にサリドマイド(0, 1,000 mg/kg)を単回経口投与し、投与 2, 8, 24 時間後の胚 RNA サンプルにつき網羅的遺伝子発現変動解析を