

## 【背景】

一方、破骨細胞への影響については2005年にcannabinoidが骨代謝(破骨細胞形成)に影響を及ぼすという論文が報告されている。

Leptinの骨代謝調節機能の発見によって中枢神経系による骨代謝調節機構について関心が高まっているが、全体的な傾向としては未だ限られた情報しか得られておらず、未開拓領域の一つであると言える。

中枢神経系に作用する薬物の内、骨代謝に影響を及ぼすと疑われる薬物はいくつかあげられるが、いずれも骨組織への副作用に関する記載はなく、シンプルな動物実験系での確認とメカニズムの解明が必要であると考えられる。

## 骨代謝に影響を及ぼす可能性がある中枢神経系に作用する主な薬物

### 【Phenitoin, phenobarbital, primidone】

Cytochrome P450 inhibitors

骨密度の減少や大腿骨頸部骨折のリスクの増加等の報告

機序: 肝臓における活性型ビタミンDの不活化亢進による低カルシウム血症による副甲状腺機能亢進

### 【Valproate】

Cytochrome P450 inhibitor, Histone deacetylase inhibitor

骨密度の減少等の報告、骨芽細胞の分化を促進するという報告

機序: 詳細は不明

### 【Benzodiazepine】

GABAの増強作用

大腿骨頸部骨折のリスクの増大

機序: 詳細は不明

### 【Benzamide】

Dopamine receptor antagonist

骨吸収の抑制効果

機序: 詳細は不明 Cathepsin Kの抑制が関与?

### 【方法】

#### [薬物調製]

- 化骨に促進的な作用があると疑われた2種類の薬物、Alprazolam[ベンゾジアゼピン系] (和光純薬) および Sodium valproate [バルプロ酸ナトリウム系] (和光純薬(和光純薬)) の各薬物を0.5%メチルセルロース400水溶液とともにメノウ乳鉢で擦って懸濁液を作成
- 懸濁液を蒸留水で所定の濃度まで希釈(メチルセルロース400の最終濃度は0.005%になるように統一)
- 対照用として薬物を入れないメチルセルロース0.005%水溶液を調製

### 【方法】

#### [ラットへの投与実験]

- 8週齢メスWistar系ラット(1群8匹)にAlprazolam (30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 120  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) または Sodium valproate (20  $\text{mg}/\text{kg}$ , 80  $\text{mg}/\text{kg}$ ) または薬物を含まない投与液を連日1週間連続経口投与
- 脛骨骨折手術の実施(髄内釘による固定)
- 上記各薬物を連日3週間連続経口投与
- X線写真撮影後、標本採取、非脱灰骨組織切片を作成
- マウス骨組織からRNAを抽出し、Northern hybridization解析

### 【方法】

#### [マウスへの投与実験]

- 6週齢メスC57/BL6系マウス(1群8匹)にAlprazolam
- (120  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) または薬物を含まない投与液を連日
- 1週間連続経口投与
  
- 大腿骨骨幹部に直径1.2 mmの骨孔を歯科用ラウンドバーにて形成
  
- Alprazolamをさらに1週間連日経口投与
  
- 骨孔治癒部位を採取し、RNA later液(Ambion)に浸漬、サンプルをハンドミルにて破碎後RNAを抽出
  
- ジーンチップ解析(菅野先生のグループ)

### 【方法】

#### [In vivo骨芽細胞の分化への影響]

- 6週齢メスC57/BL6系マウス(1群8匹)にAlprazolam (120  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 360  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) または薬物を含まない投与液を連日4週間連続経口投与
  
- マウス大腿骨組織を凍結し、ハンドミルにて破碎、Trizol液を用いてRNAを抽出し、Northern hybridization解析

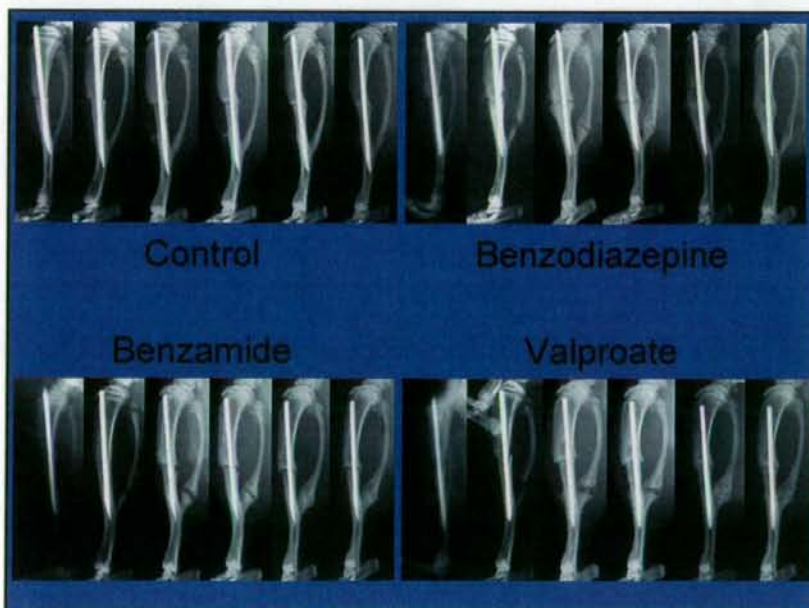
#### 使用プローブ:

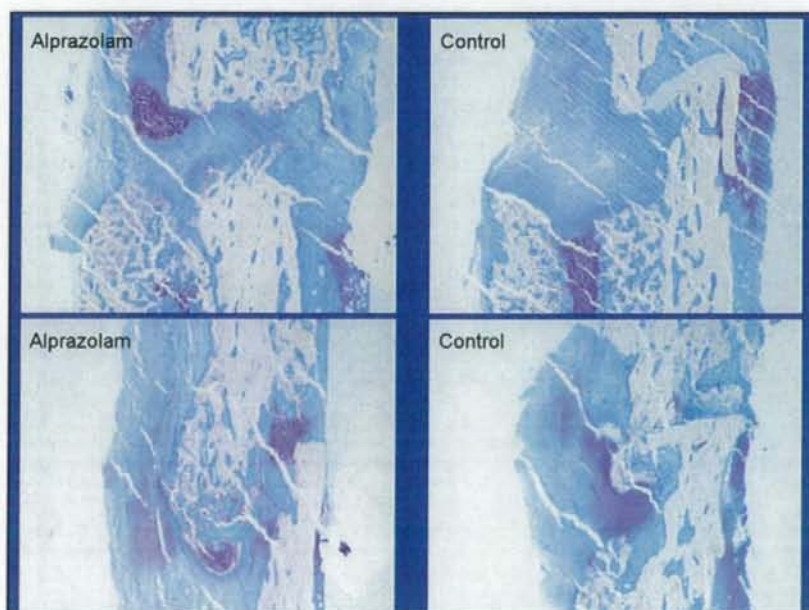
Osteocalcin; Alkaline phosphatase

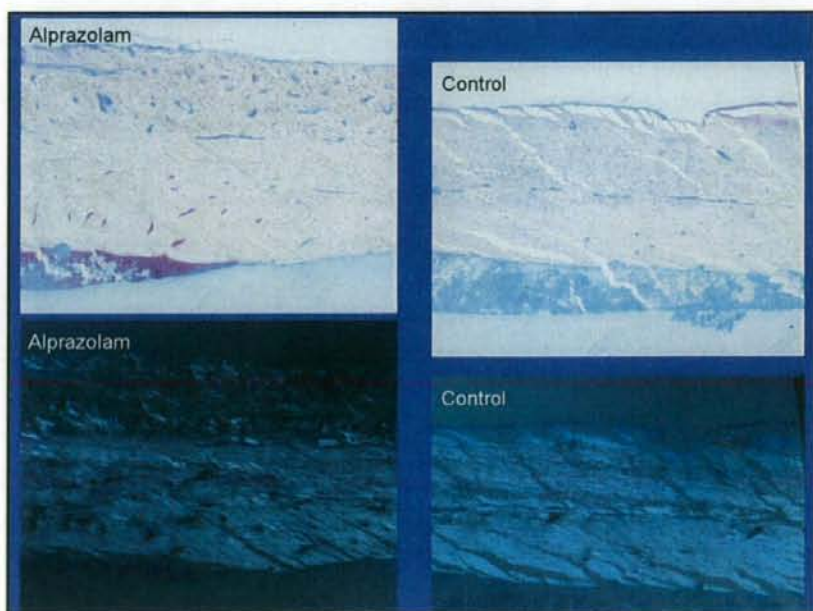
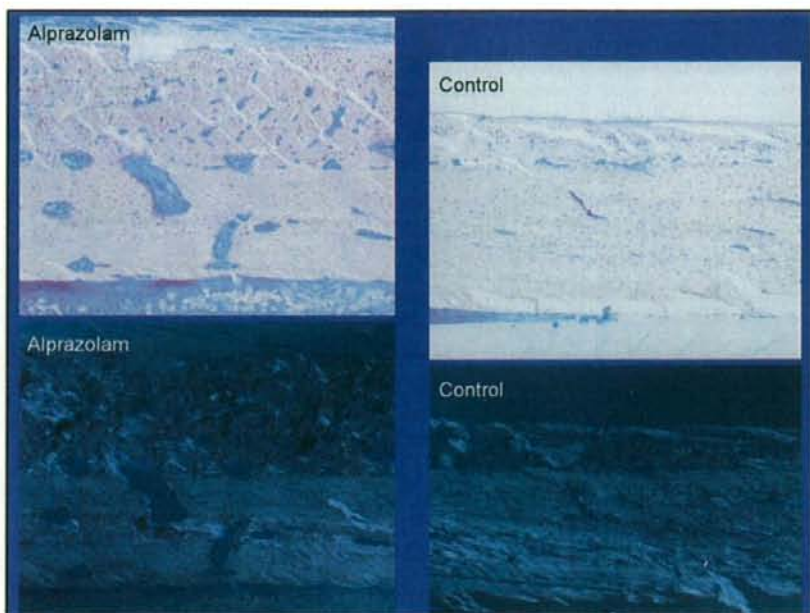
【方法】

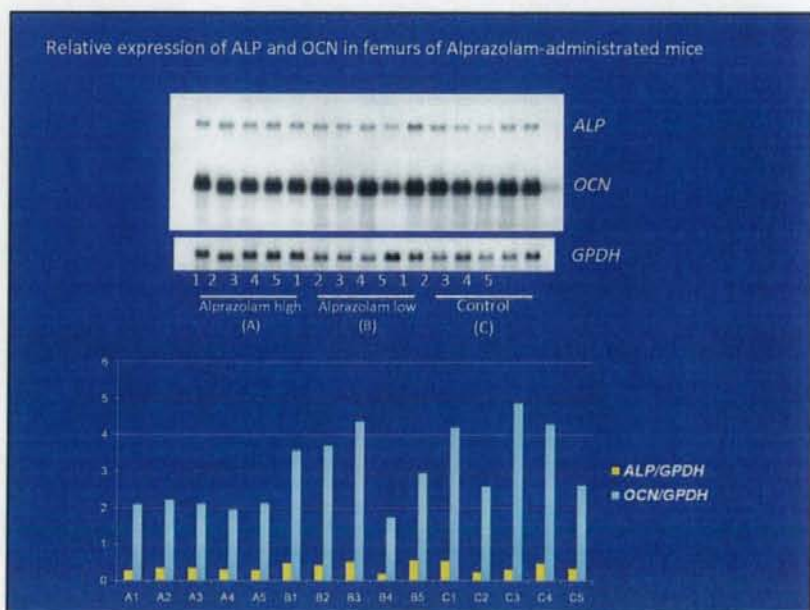
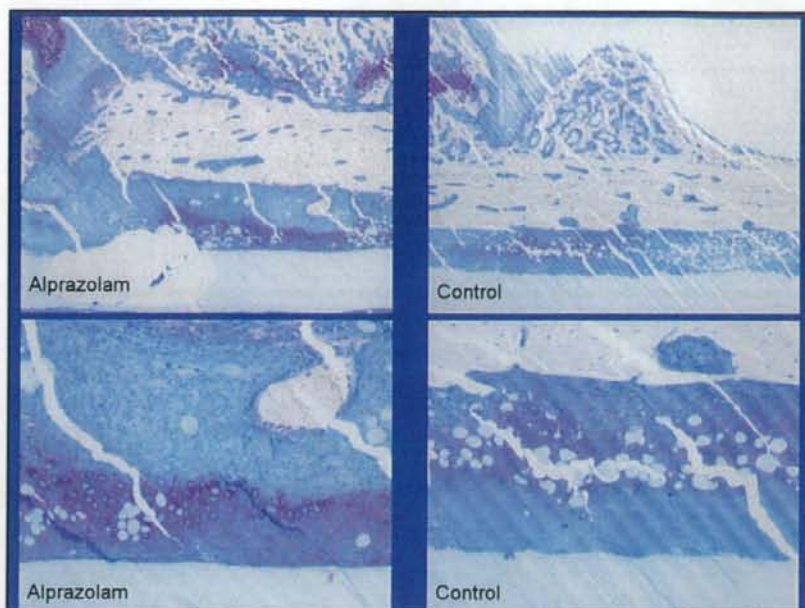
【骨髄間葉系細胞分化実験】

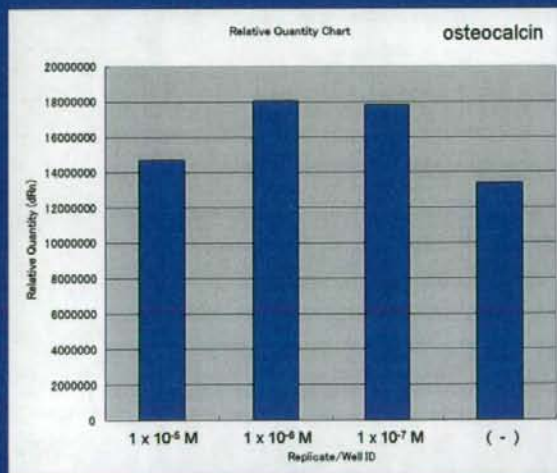
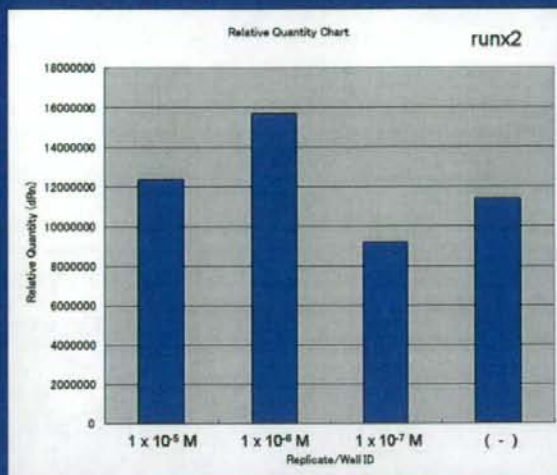
- 5週齢メスddYマウス大腿骨及び脛骨から骨髄細胞を採取
- 10%FCS添加 $\alpha$ -MEMIにて培養
- 生着、増殖した間葉系細胞を6-well typeディッシュに $1.5 \times 10^5$  個ずつplating
- 翌日alprazolamを $1 \times 10^{-6}$ M、 $1 \times 10^{-8}$ M、 $1 \times 10^{-7}$ Mの最終濃度となるよう添加
- 24時間後に細胞をTrizolにて溶解、RNAを抽出
- Mx3005P QPCR System (Stratagene)システムを用いて定量的PCRを行う  
使用プライマー:  
Runx2: Mm00501580\_m1,  
Alkaline phosphatase (ALP): Mm00475834\_m1,  
Osteocalcin: Mm03413826\_mH,  
Gapdh: Mm99999915\_g1 (all from Applied Biosystems, CA)



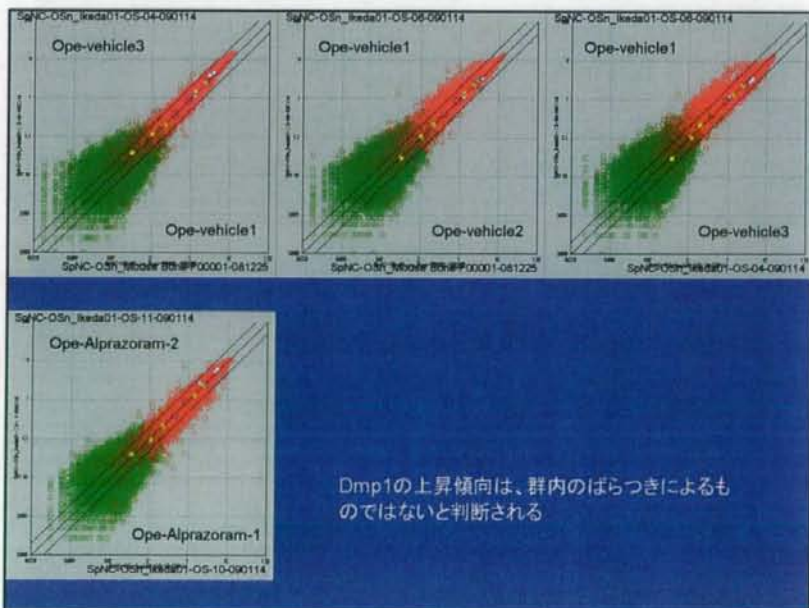
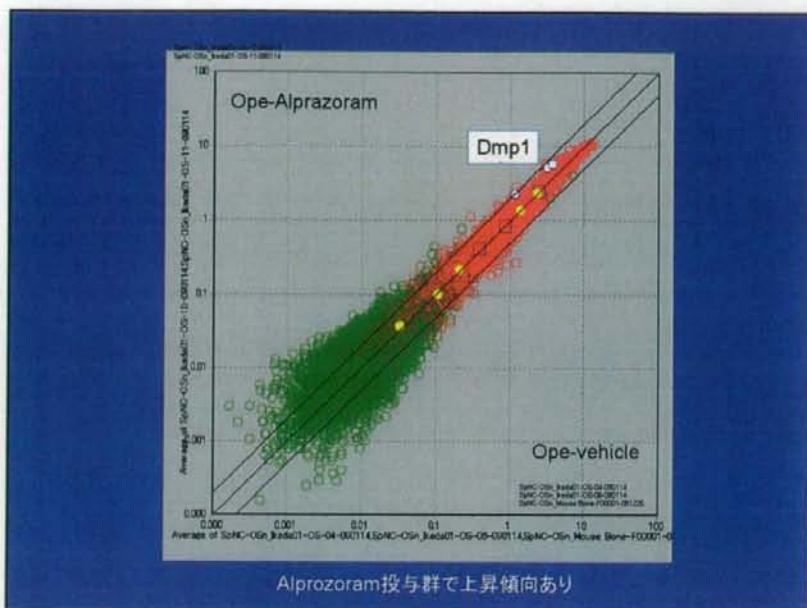






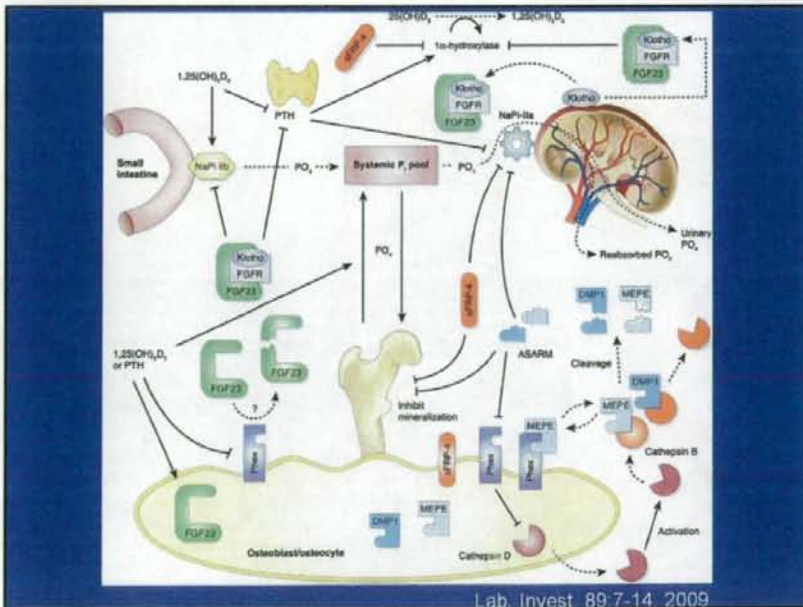


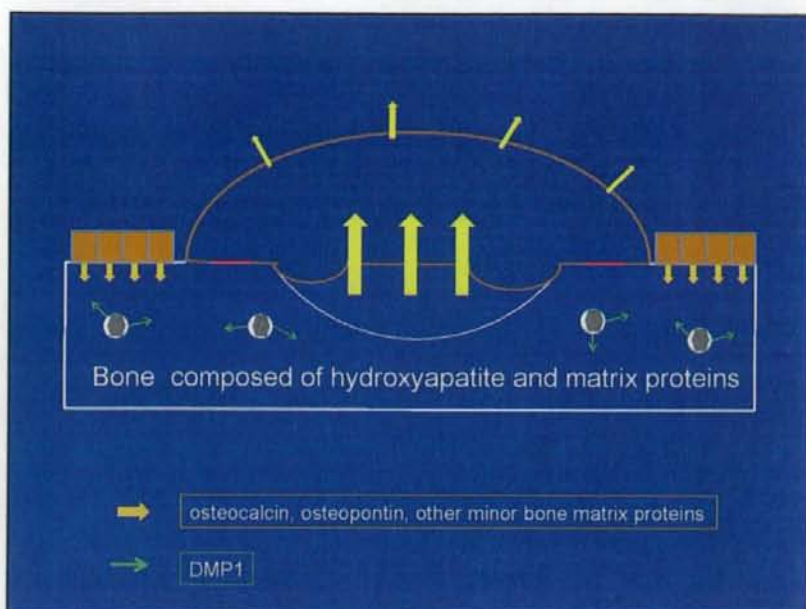




## 結果

1. Alprazolamは骨折治癒時に仮骨形成を促進することがある
2. Alprazolamは骨芽細胞及び骨芽細胞と軟骨細胞への分化機能を有する骨髄間葉系細胞の分化には直接影響を及ぼさない
3. Alprazolam投与により、骨細胞 (osteocyte) で発現する骨基質蛋白の一つ、DMP1の発現上昇が認められる





## 考察

1. Alprazolamによる仮骨形成(軟骨内骨化)促進作用にはDMP1が関与している可能性がある。DMP1は低リン酸血症性くる病の原因遺伝子であり骨組織の正常な石灰化に重要な役割を果たす。また、Alprazolamは骨芽細胞及び骨芽細胞や軟骨細胞への分化機能を有する骨髄間葉系細胞の分化には直接影響を及ぼさなかったが、DMP1も骨芽細胞や軟骨細胞の分化への直接作用は知られていないため、仮骨形成促進作用にDMP1が関与するとしても矛盾はない。

2. Alprazolam投与により、骨細胞(osoteocyte)でのDMP1の発現上昇が起こる可能性がある。この場合、Alprazolam投与により骨質の変化が生じることになり、どのような影響が出るかさらなる検討が必要である。

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

化学物質の遺伝子傷害性予測に関する研究

研究分担者 本間正充

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・変異遺伝部・室長

協力研究者 鈴木孝昌

国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子細胞医薬部・室長

研究要旨

GeneChip を使った網羅的遺伝子発現解析などから、遺伝子傷害性肝発がん物質に特異的に変化する 45 の遺伝子を選択し、これらの遺伝子の発現を、TaqMan Low Density Array (TLDA)を用いる迅速簡便な定量 PCR 法により解析することにより、遺伝子傷害性肝発がん物質をスクリーニング可能であるかを評価した。実験には、新たな評価セットとして、4種類の遺伝子傷害性肝がん原物質(2AAF, IPNA, NNK, Urethane)と 4種類の非遺伝子傷害性物質(DDT, DEHP, Furan, Phenacetin)を用い、マウスへ投与後 4,48 時間後に肝臓より RNA を抽出し、解析を行った。得られたデータより、統計解析および発現変化率によるスコアを求め比較を行ったところ、2 群間に有意差が認められた。さらに、発現変化の方向性も考慮することにより判別力は向上した。また、遺伝子数を応答の良い 25 遺伝子に絞って解析した場合にも、同等以上のパフォーマンスが得られた。以上の結果より、TLDA を用いた手法は、簡便な遺伝子傷害性のスクリーニング法として有用であることが示された。

A. 研究目的

近年のゲノム解析の進展に伴う DNA マイクロアレイ技術の普及をうけ、遺伝子発現解析により、メカニズムを含めた毒性解析を行ういわゆる“トキシコゲノミクス”の手法が注目を浴びることになり、遺伝毒性の研究分野においても新しい試験法の開発に期待がかかっている。こうした流れを受け、我々は GeneChip 等のマイクロアレイを用いた網羅的発現解析により、動物個体における遺伝子傷害性物質に対する遺伝子発現変化を解析することにより、遺伝

子傷害に対する生体防御機構のメカニズムを解析するとともに、新たなスクリーニング系としての開発を目的としてきた。広く一般毒性を対象とした場合、多くのタイプの作用が考えられるため、すべての遺伝子に対して網羅的に調べることは有効であると考えられるが、「遺伝毒性」とその領域を絞った場合には、予測に必要な遺伝子数はある程度絞られ、他の遺伝子のデータはむしろノイズになると考えられる。そこで、ある程度限られた数の遺伝子について、それらの動きをより正確にかつ簡便に測定す

ることが、新規スクリーニング系を開発する上で重要であると考えられる。こうした考えに基づいて、我々はリアルタイム RT-PCRを使った解析として、操作が簡便である TaqMan Low Density Array (TLDA) の系を用いて、より安価、簡便かつ信頼性の高い手法としての新規スクリーニング法を確立することを目的とした。そして、網羅的解析により抽出された指標遺伝子候補のパリデーションを進め、遺伝子傷害性肝発癌物質のスクリーニング系としての評価を行った。

## B. 研究方法

### 1. TaqMan® Low Density Array (TLDA) の作製

これまで、日本環境変異原学会 MMS 研究会の共同研究として、GeneChip 等の解析により、遺伝子傷害性に特異的に反応する遺伝子群を選択した。これらの遺伝子 45 種類の発現を、定量的 RT-PCR 法にて解析するための 48x8 フォーマットの TLDA を設計し、アプライドバイオシステムズ社に作製を依頼した。

この設計に際して、昨年度の検討で反応性の悪かった Elov16, Psma3, Glu1, Dscr1, Gatad2a, Slc4a4, Eva1 の 7 種の遺伝子を除き、代わりに共同研究者である青山学院大学におけるオリジナルマイクロアレイの検討において有効性の高かった遺伝子を新たに加え、表 1 に示した遺伝子セットを確定した。

この際、内在性コントロールとして TLDA にあらかじめ組み込まれて提供される 18s リボソームタンパクに加えて、これまで用いた Psma3 (proteasome (prosome macropain) subunit, type3) に変えて、青学グループにおける RT-PCR 解析のコントロール遺伝子として使用されている glyceraldehyde-3-phosphate

dehydrogenase (Gapdh)、および我々の GeneChip データより選択した発現レベルの最も安定した遺伝子として、mitochondrial ribosomal protein S24 (Mrps24) を用いた。

### 2. 遺伝子傷害性スクリーニング系としての TLDA カードのパリデーション試験のための新たな化合物群の投与

スクリーニング系としての TLDA カードに選んだ遺伝子の有効性を評価するための新たな化合物として以下のセットを選んだ。

この TLDA を用いた遺伝子傷害性のスクリーニング系を再評価するために、表 2 に示した 4 化合物ごとの新規の化合物セットを設定した。遺伝子傷害性肝発癌物質として、トランスジェニックマウスを用いた変異原性試験データがあり、投与量の設定が可能な

4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), urethane, 2-acethylaminofluorene (2AAF), diisopropylnitrosamine (IPNA) の 4 化合物を選択し、表 2 に示した投与量と溶媒にてマウスに単回腹腔内投与した。

また対照となる非遺伝子傷害性物質として、非遺伝子傷害性肝発癌物質として知られる di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), dichloro-diphenyl-trichloroethane (DDT), furan の 3 化合物と、非発癌性の肝毒性物質として Phenacetin を選び、それぞれ LD<sub>50</sub> の 1/4-1/2 量で単回投与した。

薬物投与 4 時間後および 48 時間後に肝臓を回収した。そして、抽出した total RNA より cDNA を調整し、新規 48 遺伝子を搭載した TLDA を用いて、遺伝子発現の解析を行った。同時に、青山学院大学を始めとする共同研究参加機関においては、独自に設計したリアルタイム PCR 用のプライマーセットを配布し、

SYBR Green によるリアルタイム RT-PCR (2step)法により、指標遺伝子の発現変化を解析した。

#### (倫理面への配慮)

使用する動物の屠殺にあたっては、本研究所の実験動物取り扱い倫理規定に準拠し、麻酔薬の使用ないしは頸椎脱臼法など苦痛の少ない方法を用いた。

### C. 研究結果

#### 1. TLDAによる新たな化合物セットのスクリーニング

遺伝子傷害特異的の反応遺伝子 45 種類を搭載した TLDA カードを用いて、4 種の遺伝子傷害性肝発癌物質および 4 種の非遺伝子傷害性物質処理によるマウス肝臓での遺伝子発現変化を検討した。

一群 5 匹のマウスに対し RNA 抽出し、random hexamer を用いて cDNA の合成を行った (青山学院大学 (青学) では、primer として oligo-dT を用いた)。そして、TLDA を用いた TaqMan 定量 PCR 法にてマーカー候補遺伝子の発現を比較した。データの解析にあたっては、3 種の内在性コントロール遺伝子の発現量の平均値を  $\Delta Ct$  を算出する際の基準として用いた。各遺伝子に対して対照となるコントロール群の  $\Delta Ct$  値の平均値をもとに  $\Delta \Delta Ct$  値を計算し、次式よりコントロールに対する発現量の比 (RQ) を算出した。

$$RQ(\text{ratio}) = 2^{-\Delta \Delta Ct}$$

( $\Delta \Delta Ct$  法では、1 サイクルの差による増幅量の差を 2 倍として比を算出する)

こうして算出した各サンプルの RQ 値を表 3 と 4 にまとめた。表 3 においては、4 時間後のデータを表 4 においては 48 時間後のデータを遺伝子傷害物質と非遺伝子傷害性物質に分けてマウス個体ごとにリストした。そして、発現量が 2 倍以上になったものを赤印で、1/2 以下になったものを青印でそれぞれ変化量に応じて 3 段階に色分けし示した。表には比の値のみを示した。

昨年度の傾向と同じく、非遺伝子傷害物質処理によっても多くの遺伝子が変化を示し、一見しての判別は難しそうであったが、48 時間後では、遺伝子傷害性物質処理により、より多くの遺伝子が動く傾向が見られた。特に、Bax、CyclinG1、Isg2011、Mbl2 などの遺伝子は、遺伝子傷害性物質特異的に変化した。それ以外の遺伝子に関しても、変化の方向性や変化率を考慮すると、判別に有効であると考えられた。そこで、それらを考慮した点数付けにより各遺伝子のスコアリングを行った結果、表 5 に示すようなランク付けができた。9 点以上のスコアを示した 25 遺伝子を以下の解析において、選択遺伝子として使用した。

#### 2. 統計解析と遺伝子傷害性の有無に関する判定法の検討

まず、遺伝子傷害性物質と非遺伝子傷害性物質が単純な判別分析によって分離できるかどうかを、主成分分析法を用いて検討した結果を図 1 に示す。すべてのデータを使って解析した結果、上記 25 遺伝子のみを使った場合にもかなりオーバーラップが見られた。比較的差のあった 48 時間のみのデータを使った場合には、25 遺伝子を選択した際には、かなり分離は良くなった。さらに、遺伝子傷害性物質から AAF を、非遺伝子傷害性物質から

Phenacetinを除いて解析した場合には、すべての遺伝子を用いた場合でも、よい分離が得られた。

次に、統計解析により2群間の有意差を検定した。コントロール群との $\Delta Ct$ 値の比較により、t検定における有意水準を各種設定した際に、有意差のつく遺伝子の数を示したのが、表6である。まず、変化の方向性を考慮せず有意差のついた遺伝子から、2群間の比較検定をt-testにて行ったところ、48時間のデータでは遺伝子ごとの有意水準を1%とした場合のみ $p < 0.05$ となったが、4時間のデータに関してはいずれの場合においても有意差はみられず、両者を総合した場合にも有意差はつかなかった。そこで、非遺伝子傷害性物質では逆方向の変化をするケースが多い点に着目し、逆方向に動いた場合を除いた時(片側検定)には、2群間の差がより顕著になり、4時間では依然差はつかなかったものの、48時間のデータでは、部分的に $P < 0.05$ となった。4時間と48時間をあわせたデータに関しては、有意差はつかなかった。そこでさらに、逆に動いた遺伝子数を減点したところ、2群間の有意差はより顕著となり、遺伝子ごとの有意水準を2.5%とした場合には、いずれの比較においても $p < 0.05$ となった。個々の化合物での有意遺伝子数を比較した場合にも、非遺伝子傷害性物質で最も数の多かったPhenacetinが、遺伝子傷害性物質で最も数の少ない2AAFの数を下回り、なんとか2群を分離できた。

さらに、遺伝子傷害性物質の場合にはより変化の度合いが大きい点を考慮し、変化率による重み付けをすることにした。個別のマウスデータにおいて、2倍、5倍、10倍以上の変化をそれぞれ1, 2, 3点とスコアリングし、個別マウスの得点を合計した。この場合にも、方向性を

考慮しなかった場合には2群間の有意差はつかなかったが、方向性を考慮し、さらに逆に動いた場合を減点した場合には、良い分離が得られた。

以上の結果から、最適なスコアリング法として、遺伝子間比較有意水準2.5%での方向性を考慮して減点した有意遺伝子数に10を乗じた値に、変化率での得点を加えた値を化合物ごとのスコア値として算出したところ、4時間、48時間個々では2群間を完全には分離できなかったが、両者を合わせたスコアは、非遺伝子傷害性物質 DEHP (102), DDT (-35), Phe(146), Furan (120)に対し、遺伝子傷害性物質 IPNA(642), Urethane (286), 2AAF (188), NNK (630)となり、両者の間にカットオフラインを設定可能となることがわかった。

同様のスコアリングを、反応性の良かった25遺伝子に限定して行ったところ、表7に示したように全体にパフォーマンスは向上し、25遺伝子のみからも、全遺伝子を用いた場合と同等以上の判別結果が得られることがわかった。最終的なスコアリングとして、遺伝子間比較有意水準5%での方向性を考慮して減点した有意遺伝子数に10を乗じた値に、変化率での得点を加えた値を化合物ごとのスコア値として算出したところ、4時間、48時間を合わせたスコアは、非遺伝子傷害性物質 DEHP (66), DDT (-88), Phe(91), Furan (100)に対し、遺伝子傷害性物質 IPNA(613), Urethane (290), 2AAF (192), NNK (675)となった。この結果から最終的な判別法としては、選択した25遺伝子を用いて算出したスコアより、非遺伝子傷害性物質の最高値100と遺伝子傷害性物質の最低値192の間にカットオフライン(便宜的に150)を設定することにより、遺伝子傷害性物質を判別可能となることがわかった。

最後に、同じ動物由来のサンプルを用いて並行して行われた共同研究のデータとして、SyBr Green I を用いた一般的な RT-PCR 法によるデータを今回得られた TLDA データと比較した結果を表 8 に示した。共通して用いられた 20 遺伝子に関して 4 時間後のデータでは、全体に非常に一致した傾向を示し、両者のデータの信頼性が確認できた。なお、一部の遺伝子に関しては異なる傾向が得られたが、これはプライマーの配列や位置による影響が考えられ、今後の検討課題となった。

#### D. 考察

GeneChip を用いた網羅的解析より選択した 45 遺伝子(一部入れ換え)を用いて作製した TLDA を用いて、定量 RT-PCR 法による新規化合物セットのスクリーニングを行ったわけであるが、前回と比較してより良いデータが得られた。本来は、昨年度のデータより判別のアルゴリズムを作成し、今年度の化合物セットにおいてその検証を試みる予定であったが、昨年度のデータに関してはサンプル調整上のばらつき等から、満足のいく評価アルゴリズムを設定することが難しかった。そこで、今年度は、RNA 抽出および cDNA 合成を同じ研究室にて一貫して行った結果、データの質は向上し、評価アルゴリズムの作成に耐えるデータが得られた。得られた発現データは、昨年の検討と同様に、非遺伝子傷害性物質での動きも多く見られたことより、一見しては遺伝子傷害性の有無による判別は難しそうであったが、統計解析などの判別法を検討することにより、最終的に両者を判別可能なアルゴリズムを設定することができた。また、この判別には、用いた遺伝子のうち約半数の 25 遺伝子のデータで十分であることがわかった。また、スコアリングを行う

ことにより、遺伝子傷害性に関してある程度定量的な評価を行うことも可能であると期待できる。

今後は、選択した 25 遺伝子を使った定量的 RT-PCR 法により、遺伝子傷害性の判別が可能であることを実証してゆきたい。

#### E. 結論

遺伝子発現解析においては、標的遺伝子が絞りこまれた場合には、簡便、迅速かつ信頼性の高い手法として TLDA を用いた解析法が有効であることが再確認できた。

選択された遺伝子セットを用いて、新規の化合物セットを解析した結果、遺伝子傷害性肝発癌物質とそれ以外の化合物間に明確な判別を行うためのアルゴリズムを設定でき、今回の化合物セットでは 100% の予測率を得ることができた。また、最終的には、反応性の良い 25 遺伝子を用いることで、パフォーマンスを向上できることがわかった。今後、本試験法は新たな遺伝子傷害性スクリーニング法として有用であると期待できる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Watanabe T, Tanaka G, Hamada S, Namiki C, Suzuki T, Nakajima M, Furihata C.

Dose-dependent alterations in gene expression in mouse liver induced by diethylnitrosamine and ethylnitrosourea and determined by quantitative real-time PCR.

Mutat Res. 673: 9-20, 2009.

本間正充; 遺伝毒性物質に閾値はあるのか?

ファルマシア 45, 143-148 (2009)



Tanabe S, Sato Y, Suzuki T, Suzuki K, Nagao T, Yamaguchi T.

Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells for identification of novel markers in early- and late-stage cell culture.

J Biochem. 144: 399-408, 2008.

Yatagai, F., Umebayashi, Y., Honma, M., Sugawara, K., Takayama, Y., and Hanaoka, F. Mutagenic radioadaptation in a human lymphoblastoid cell line. *Mutat. Res.*, 638, 48-55 (2008)

Yasui, M., Suenaga, E., Koyama, N., Masutani, C., Hanaoka, F., Gruz, P., Shibutani, S., Nohmi T., Hayashi, M., and Honma, M. Miscoding properties of 2'-deoxyinosine, a nitric oxide-derived DNA Adduct, during translesion synthesis catalyzed by human DNA polymerases. *J Mol Biol*, 377, 1015-1023 (2008)

Yatagai, F., Suzuki, M., Ishioka, N., Ohmori, H., Honma, M. Repair of I-SceI Induced DSB at a specific site of chromosome in human cells: influence of low-dose, low-dose-rate gamma-rays. *Radiat Environ Biophys* 47, 439-44 (2008)

Nohmi, T., Toyoda-Hokaiwado, N., Yamada, M., Masumura, K., Honma, M., and Fukushima, S. International Symposium on Genotoxic and Carcinogenic Thresholds. *Genes and Environment*, 30, 101-107 (2008)

## 2. 学会発表

本間正充: 医薬品に不純物として含まれる遺伝毒性物質の分類と許容量

第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2008.6)

本間正充: ICH における新しい遺伝毒性試験ガイドライン(S2R1)と試験実施タイミング

第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2008.6)

Honma, M. Ultimate Threshold and Genetic Consequence of A Single Double Strand Break in Human Cells.

International Symposium on Genotoxic and Carcinogenic Thresholds (2008.7)

Honma, M. Genome Mapping of Damaged Chromosome Regions Induced by Ionizing Irradiation Using DNA Microarray Analysis. 38<sup>th</sup> European Environmental Mutagen Society (2008.9)

T. Suzuki, T. Suresh, T. Oshizawa, K. Ramesh, K. Suzuki Proteomics approach to find new biomarkers for genotoxicity in mouse urine.

欧州環境変異原学会 2008 (2008年9月)

T. Suzuki, M. Kogi, M. Honma, S. Tanabe, T. Yamaguchi SNP and CGH array analysis on amplification profile of the c-myc gene

第 67 回日本癌学会学術総会(2008年10月)

谷田貝文夫、菅澤薫、榎本秀一、本間正充: DSB 修復効率からの適応応答の追求 日本放射線影響学会第 51 回大会(2008.11)

本間正充:DNA 二本鎖切断修復と遺伝的不安定性

日本環境変異原学会第 37 回大会(2008.12)

安井 学、本間正充:ヒトリンパ球細胞のゲノム内に導入させた 8-オキシグアニン1分子の突然変異誘発能

日本環境変異原学会第 37 回大会(2008.12)

小山直己、木村葵、安井学、高見成昭、高橋美和、今井俊夫、山本歩、汲田和歌子、増村健一、増田修一、木苗直秀、松田知成、能美健彦、本間正充:ライフステージを考慮したアクリルアミドの多臓器遺伝毒性評価

日本環境変異原学会第 37 回大会(2008.12)

斉藤美香、松藤寛、千野誠、林真、本間正充、山形一雄:過酸化水素によって誘導されたヒトリンパ球細胞 TK6 の細胞増殖と遺伝毒性に対する天然抗酸化物質の保護効果

日本環境変異原学会第 37 回大会(2008.12)

木村葵、坂本浩子、西郷和彦、洲加本孝幸、本間正充:*In vitro* コメットアッセイプロトコールの検証

日本環境変異原学会第 37 回大会(2008.12)

Wang, J., Sawyer, J., Honma, M., Chen, T., and Moore, M. The Mouse Lymphoma Assay detects recombination, deletion, and aneuploidy.

日本環境変異原学会第 37 回大会(2008.12)

谷田貝文夫、高橋昭久、本間正充、鈴木ひろみ、大森克徳、関真也、橋爪藤子、島津徹、榎本秀一、大西武雄、石岡憲昭:宇宙実験:

放射線影響の LOH 検出系による解析

日本環境変異原学会第 37 回大会(2008.12)

本間正充、櫻庭真弓、汲田和歌子、林 真:DNA マイクロアレイによる放射線損傷領域のゲノムマッピング

日本環境変異原学会第 37 回大会(2008.12)

中嶋圓、鈴木雅也、田中仁、本間正充、林真:*In vitro* コメットアッセイ国際バリデーショナルデータ解析に関する一考察

日本環境変異原学会第 37 回大会(2008.12)

安井学、Suzuki, N.、本間正充、Shibutani, S.:一酸化窒素によって形成する DNA 付加体の誤塩基対形成メカニズム

第 31 回分子生物学会(2008.12)

押澤正、豊田淑江、内田恵理子、鈴木孝昌、鈴木和博、山口照英 カルシウム結合タンパク質 S100A8 は HL-60 細胞の好中球様分化において増殖・分化に重要な働きをする(その 2)

BMB2008(2008 年 12 月)

田邊思帆里、佐藤陽治、鈴木孝昌、鈴木和博、山口照英 ヒト間葉系幹細胞における培養分化マーカー同定に関する遺伝子発現プロファイリング

BMB2008(2008 年 12 月)

多田隈英未、櫻井幹也、渡辺貴志、鈴木孝昌、成見香瑞範、浜田修一、平山満朝、真田尚和、小枝暁子、中嶋圓、大信田系裕、佐久間智宏、降旗千恵 遺伝子傷害性肝発がん物質および非遺伝子傷害性肝発がん物質

投与マウス肝臓における遺伝子発現の比較解析

BMB2008(2008年12月)

櫻井幹也, 多田隈英未, 花原泉, 渡辺貴志, 鈴木孝昌, 降旗千恵 マウス肝臓における遺伝子傷害性肝発がん物質 Chrysene 投与後短時間での遺伝子発現解析

BMB2008(2008年12月)

新井祐子, 多田隈英未, 渡辺貴志, 浜田修一, 鈴木孝昌, 中嶋圓, 降旗千恵 ジエチルニトロソアミン投与マウス肝臓における、遺伝子発現の経時変化および用量依存性変化の解析

BMB2008(2008年12月)

スレッシュ ティルパッティ, ラメッシュ ドス, 押澤 正, 鈴木和博, 鈴木孝昌 プロテオミクス手法を用いた遺伝子傷害性の新しいバイオマーカー探索

日本環境変異原学会第 37 回大会(2008年12月)

鈴木孝昌, 降旗千恵 Collaborative study on the toxicogenomics in JEMS/MMS

日本環境変異原学会第 37 回大会(2008年12月)

鈴木孝昌, 小泉朋子, 本間正充, 中嶋圓, 濱田修一, 渡辺貴志, 降旗千恵 トキシコゲノクスに関するJEMS/MMS共同研究II: 遺伝子障害性発癌物質の迅速スクリーニング系としての TaqMan Low Density Array の評価

日本環境変異原学会第 37 回大会(2008年12月)

降旗千恵, 渡辺貴志, 夏目匡克, 中嶋圓, 濱田修一, 多田隈英未, 櫻井幹也, 花原泉, 小枝暁子, 佐久間智宏, 大信田系裕, 前田晃央, 成見香瑞範, 真田尚和, 平山満朝, 大山ワカ子, 岡田恵美子, 本田大士, 須藤鎮世, 鈴木孝昌 トキシコゲノクスに関するJEMS/MMS 共同研究(2008年): 遺伝子傷害性および非遺伝子傷害性肝がん原物質についての精選した 27 遺伝子に関する qPCR 法による遺伝子発現解析

日本環境変異原学会第 37 回大会(2008年12月)

浅野哲秀, 西川貴史, 笠松俊夫, 青儀巧, 岡宏明, 小島肇, 伊東悟, 鈴木孝昌, 原巧, D. Gibson, 林 真、皮膚細胞を用いる小核試験—開発と検証—

日本環境変異原学会第 37 回大会(2008年12月)

鈴木孝昌, 田邊思帆里, 小木美恵子, 押澤正, 佐藤陽治, 山口照英, 鈴木和博 ヒト間葉系幹細胞継代培養時の染色体安定性の解析

第 8 回日本再生医療学会総会

#### G. 知的財産所有権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

表1 TLDA カード用に新たに選択した指標遺伝子

Gene Symbol	Gene Name	Ref Seq	Gene Symbol	Gene Name	Ref Seq
<b>Aacs</b>	acetoacetyl-CoA synthetase	Mn00513427.m1	<b>Igf1bp1</b>	insulin-like growth factor binding protein 1	Mn00515154.m1
<b>Bax</b>	Bcl2-associated X protein Gene	Mn00402050.m1	<b>Igf2</b>	insulin-like growth factor 2	Mn00833447.m1
<b>Bhlhb2</b>	basic helix-loop-helix domain containing class B2	Mn00478593.m1	<b>Isg2011</b>	interferon stimulated exonuclease gene 20-like 1	Mn00471554.m1
<b>Btg2</b>	B-cell translocation gene 2, anti-proliferative	Mn00476162.m1	<b>Jun</b>	Jun oncogene	Mn00495082.s1
<b>Camk1d</b>	calcium/calmodulin-dependent protein kinase ID	Mn00616508.m1	<b>Lpp</b>	LIM domain containing preferred translocation partner in lipon	Mn00724478.m1
<b>Car3</b>	carbonic anhydrase 3	Mn00480016.m1	<b>Lrp1</b>	low density lipoprotein receptor-related protein 1	Mn00464608.m1
<b>Ccnd1</b>	cyclin D1	Mn00432385.m1	<b>Ly6s</b>	lymphocyte antigen 6 complex, locus A	Mn00726565.s1
<b>Ccng1</b>	cyclin G1	Mn00438084.m1	<b>Mbd1</b>	methyl-CpG binding domain protein 1	Mn005221100.m1
<b>Cdkn1a</b>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21)	Mn00432448.m1	<b>Mbi2</b>	mammose binding lectin (C)	Mn00481623.m1
<b>Cyp2b10</b>	cytochrome P450 family 2 subfamily b polypeptide 10	Mn00456591.m1	<b>Mdm2</b>	transformed mouse 3T3 cell double minute 2	Mn00481658.m1
<b>Cyp4a14</b>	cytochrome P450 family 4 subfamily a polypeptide 14	Mn00484102.m1	<b>Mgs2</b>	myelin protein zero-like 2	Mn00468397.m1
<b>Cyrf1</b>	cytosine rich protein 61	Mn00487498.m1	<b>Mrops24</b>	mitochondrial ribosomal protein S24	Mn00468026.m1
<b>Ddit4</b>	DNA-damage-inducible transcript 4	Mn00512503.g1	<b>Mts1</b>	metastasis suppressor 1	Mn00465014.m1
<b>Ddit4l</b>	DNA-damage-inducible transcript 4-like	Mn00513313.m1	<b>Nono</b>	non-POU-domain-containing octamer binding protein	Mn00934875.g1
<b>Egfr</b>	epidermal growth factor receptor	Mn00433023.m1	<b>Phla1</b>	pleckstrin homology-like domain family A, member 1	Mn00450345.g1
<b>Ephx1</b>	epoxide hydrolase 1, microsomal	Mn00488752.m1	<b>Phla3</b>	pleckstrin homology-like domain family A, member 3	Mn00449648.m1
<b>Fabp5</b>	fatty acid binding protein 5, epidermal	Mn00783731.s1	<b>Rcan1</b>	regulator of calcineurin 1	Mn00527762.m1
<b>Gadd45g</b>	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma	Mn00442225.m1	<b>Rcan1</b>	regulator of calcineurin 1	Mn00517094.m1
<b>Gapdh</b>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Mn00999915.g1	<b>Sde</b>	serine dehydratase	Mn00455126.m1
<b>Gsta2</b>	glutathione S-transferase alpha 2 (Yc2)	Mn00933353.sH	<b>St3gal5</b>	ST3 beta-galactoside alpha-2, 3-sialyltransferase 5	Mn00488232.m1
<b>Gstm3</b>	glutathione S-transferase mu 3	Mn00933923.m1	<b>Sult1d1</b>	sulfotransferase family 1D, member 1	Mn00502030.m1
<b>Hamp2</b>	hepcidin antimicrobial peptide 2	Mn00842044.g1	<b>Trp53inp1</b>	transformation related protein 53 inducible nuclear protein 1	Mn00458141.m1
<b>Hhex</b>	hematopoietically expressed homeobox	Mn00433954.m1	<b>Tubb2c</b>	tubulin beta 2c	Mn00947804.g1
<b>Htr1b</b>	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B Gene	Mn00439377.s1	<b>Hs09999901.s1</b>	Eukaryotic 18S rRNA	

赤字;新しく選択したマーカー候補遺伝子 青字;内在性コントロール遺伝子

表2 新規バリデーションのための化合物セットと投与量

### Genotoxic carcinogens (4)

1. 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) 、 250mg/kg bw, olive oil
2. urethane, 1000 mg/kg bw, saline
3. 2-acetylaminofluorene, 300 mg/kg bw, olive oil
4. diisopropanolnitrosamine, 500mg/kg bw , saline

### Non-genotoxic carcinogens (3)

5. di(2-ethylhexyl)phtalate (peroxisome proliferator), 2000 mg/kg bw, olive oil
6. dichloro-diphenyl-trichloroethane (DDT) (not peroxisome proliferator) 、 50 mg/kg bw, olive oil
7. furan (not peroxisome proliferator), 30 mg/kg bw, olive oil

### Hepatotoxin

8. phenacetin, 400 mg/kg bw, olive oil