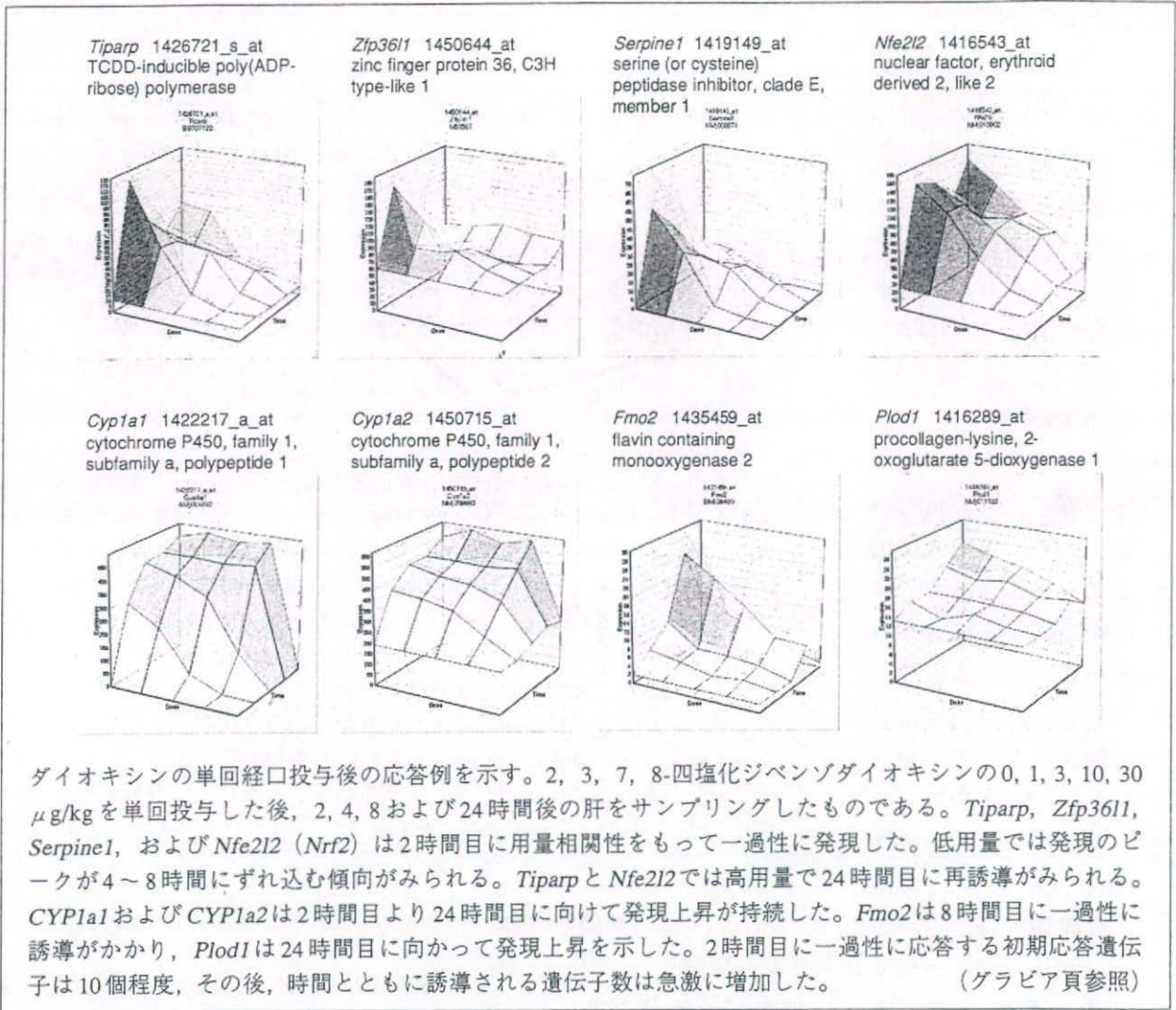


図4 ダイオキシンによる肝遺伝子発現応答

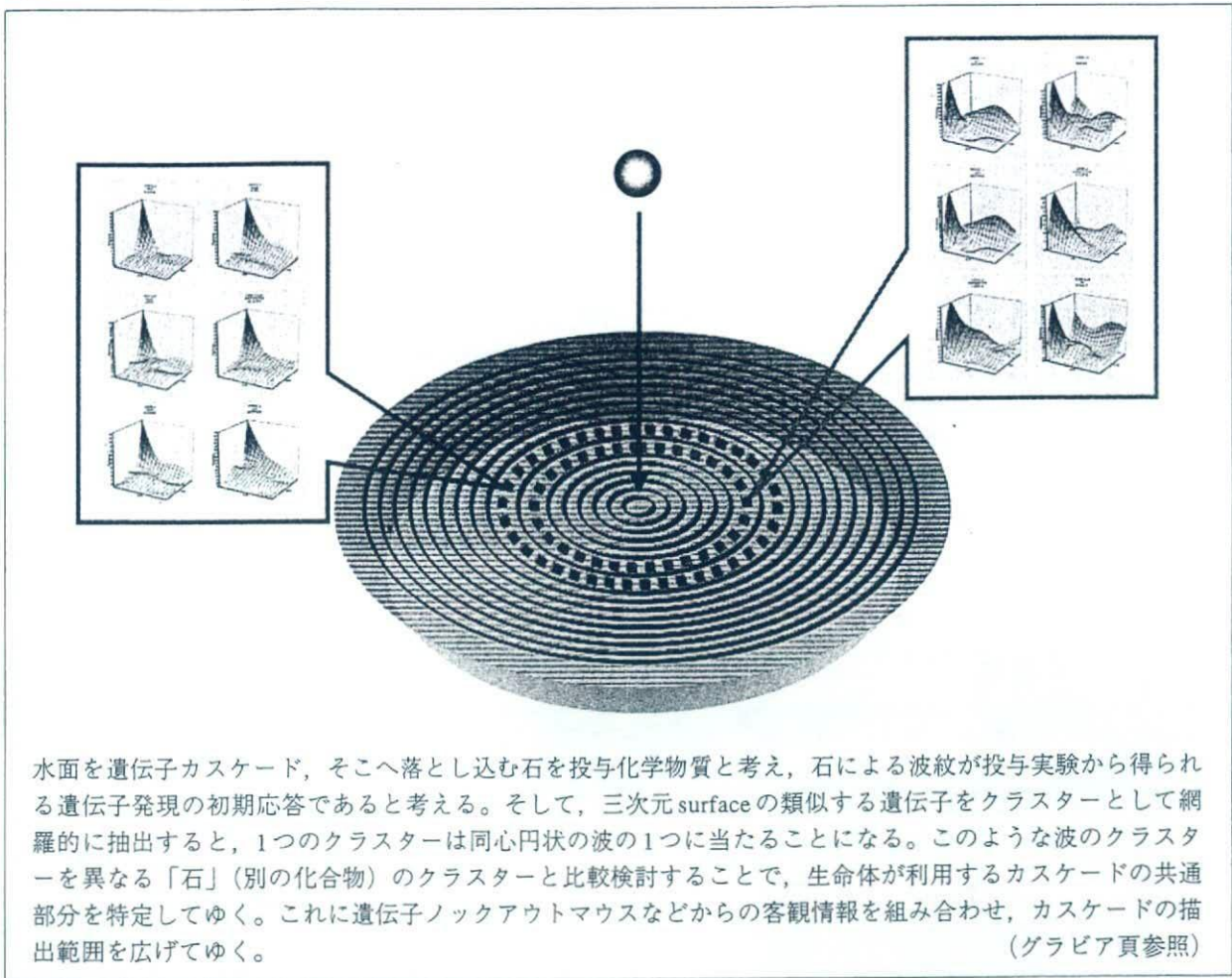


いった。一過性のパターンをとるもの、持続的に増加するもの、二峰性のパターンをとるものなどが観測された⁹⁾。これに引き続くプロジェクトとして、食品・食品添加物関連、シックハウス症候群を考慮した低用量域での吸入毒性トキシコゲノミクス、1匹のマウスから多臓器を採取しそれらの連関を解析する多臓器トキシコゲノミクスを開始したほか、胎児発生、行動神経に関わるプロジェクトへの展開を図っている。

ここで、多臓器連関解析の一部を紹介する。四塩化炭素を0, 0.7, 2および7mg/kgの比較的低用量で強制経口投与し、その2, 4, 8および24時間後に、肝、腎、肺、心、精巣の5臓器を採取、Percellomeデータを得た(図5)。まず、投与とは無関係に変動する概日遺伝子は精巣以外のすべての臓器にお

いて明瞭なパターンを示し、最高値が最低値の数倍を超えるものが多数みられた。この比較的低用量では上記のダイオキシンと比較すると、ごく限られた少数の遺伝子にのみ変動が認められた。2時間目に誘導のかかる遺伝子は肺に最も多く観測された。肺の初期応答はheat shock proteinやcyclooxygenase 2など、ストレス応答反応を示唆するものが主体であった。肺での変動遺伝子数は8時間目にピークを示した後、24時間目には減少傾向を示した。これに対し肝では2~4時間目にはごく少数の代謝酵素が軽度誘導されるのみであったが、8~24時間目に多くの遺伝子発現が観測され、それらにはHIF1a, Thyoredoxin, Gultathione S-transferase, SAA1などが含まれていた。また少数ながら、腎、心に誘発される遺伝子も確認された。四塩化炭素

図④ Percellome Project データ解析の基本概念



三次元多層データ（Millefeuille surface data, MF データあるいは Surface データと呼んでいる）のパターン類似性を元にした候補遺伝子検索ソフトウェア群を中心とした解析システム（MFソフトウェアシリーズ，開発：相崎健一），およびその概念を発展させた教師なしクラスタリング⁹⁾を独自に実用化し，現在も改良・開発を継続中である。

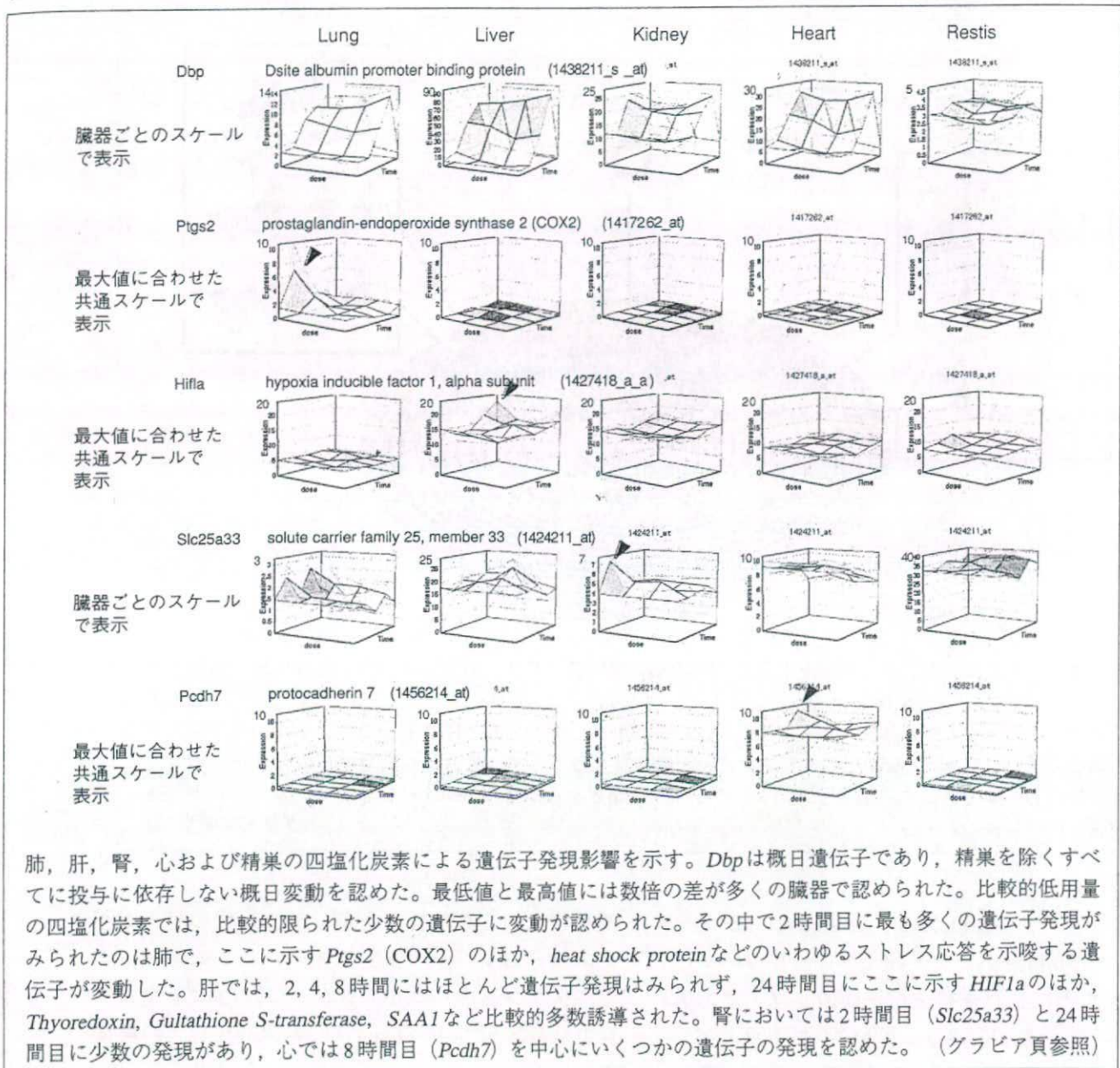
データの三次元可視化は，コンピュータが選り出した遺伝子クラスターの中身を確認する際，ことに mRNA の合成分解のスピードなどの常識から考えて生物学的にありえないパターン（用量軸の方向にも時間軸の方向にもジグザグな変化など）をノイズとして排除する際に威力を発揮している。さらに，いくつかの化合物の全遺伝子リストを比較し，化合物に共通して同期して発現する遺伝子群を自動抽出するシステムも開発済みである。ここで得られた遺伝子群はシグナルカスケードの構

成単位である可能性がある〔5TB 規模のデータベース部分および，大量計算アルゴリズム実装，クラスタリングアルゴリズムなどは NTT コミュニケーションおよび日本 NCR/Teradata（松本伸哉氏）との共同開発による〕。

VI. Percellome Project の概要とデータ例

現在までに，単回強制経口投与による肝の初期反応データを，既知情報のある 90 以上の化学物質（医薬品，一般化学物質，食品関連物質を含む）について採取し終えた。例として，アリル炭化水素受容体（AhR，ダイオキシン受容体）に結合することが知られる 2, 3, 7, 8-四塩化ジベンゾダイオキシン（ダイオキシン）の結果の一部を示す（図④）。比較的少数の AhR 直下の遺伝子が 2 時間目に誘導され，4, 8, 24 と時間が経過するにつれ数が増して

図5 四塩化炭素による多臓器影響



肺、肝、腎、心および精巢の四塩化炭素による遺伝子発現影響を示す。Dbpは概日遺伝子であり、精巢を除くすべてに投与に依存しない概日変動を認めた。最低値と最高値には数倍の差が多くの臓器で認められた。比較的低用量の四塩化炭素では、比較的限られた少数の遺伝子に変動が認められた。その中で2時間目に最も多くの遺伝子発現がみられたのは肺で、ここに示すPtgs2 (COX2)のほか、heat shock proteinなどのいわゆるストレス応答を示唆する遺伝子が発現した。肝では、2, 4, 8時間にはほとんど遺伝子発現はみられず、24時間目にここに示すHIF1aのほか、Thyoredoxin, Gultathione S-transferase, SAA1など比較的多数誘導された。腎においては2時間目(Slc25a33)と24時間目に少数の発現があり、心では8時間目(Pcdh7)を中心にいくつかの遺伝子の発現を認めた。(グラフィア頁参照)

の単回経口投与時の最初の標的は肺であり、いわゆる酸化ストレスが惹起された可能性が指摘される。その背景には肺の好气的環境が考慮され、HIFが肝では誘発されたのに対して、肺で誘導されないこともこれを支持している可能性が考えられた。

まとめ

「マイクロアレイデータには再現性がない」と言われることがあるが、その原因としては、その定量性の良し悪しのほか、実験計画の不十分さ

が挙げられる場合がある。動物には概日リズムがあり、肝では数千の遺伝子に、他のほとんどの臓器でも明らかな概日変動がみられる。サンプリングのタイミングを一定にしないと、この影響を大きく受けてしまいデータが再現しないことが経験される。また、実験前の馴化期間中の動物舎の照明スケジュールが厳密に管理されていないと、タイミングを守っていても実験間誤差が大きくなる。その他、食べさせる餌の組成、飼育時のストレス(断水など)にも反応する。これに似た影響は、in vitroサンプルにも経験される。例えば、培養細胞

の培地交換はもとより、倒立顕微鏡での観察の有無（培地の攪拌などの影響）、インキュベータ内の配置、96穴プレートでの辺縁効果（最外周ウェルの培養条件が中心と異なる）などが、ときに明瞭に遺伝子発現データに反映される。このような点に配慮することで、遺伝子発現データが安定し、再現性が向上することを経験している。

ノーザンブロットのような半定量的な手法において実験サンプルにだけバンドがあり、対照にはないという結果も、Percellome法では10コピーに対して実験サンプルが20コピーである場合がある。最近の医学・生物学には多因子疾患・多因子形質発現制御の概念が導入され、「21世紀初頭までは、患者の遺伝子多型を調べずして治療を行っていた時代」として、「血液型を調べずに輸血していた時代」と並び称されるようになるかもしれない

勢いである。このような多因子概念の世界においては、生体反応の既述は「有（100%）」「無（0%）」の組み合わせではなく、「70%」「50%」「90%」といった半端な数の組み合わせによることになる。その際の網羅的トランスクリプトームデータにとって、定量化と標準化は必須の要件と思える。その確保は、これから実現されるであろう網羅的プロテオミクスなどの基盤としても重要となると考える。

謝辞

本システムの開発とプロジェクトの遂行にあたっては、当毒性部の全メンバー、特に松田菜恵、辻昌貴、安東朋子、安部麻紀、森山紀子、森田紘一、近藤優子、古川佑介、青柳千百合、渡辺忍、相原妃佐子の各氏に深謝する。本研究は厚生労働科学研究費補助金H13-生活-012, H14-トキシコ指定-001, H15-化学-002, H17-化学-003H18-化学一般-001などによる。

Technical Tips

マイクロアレイ実験

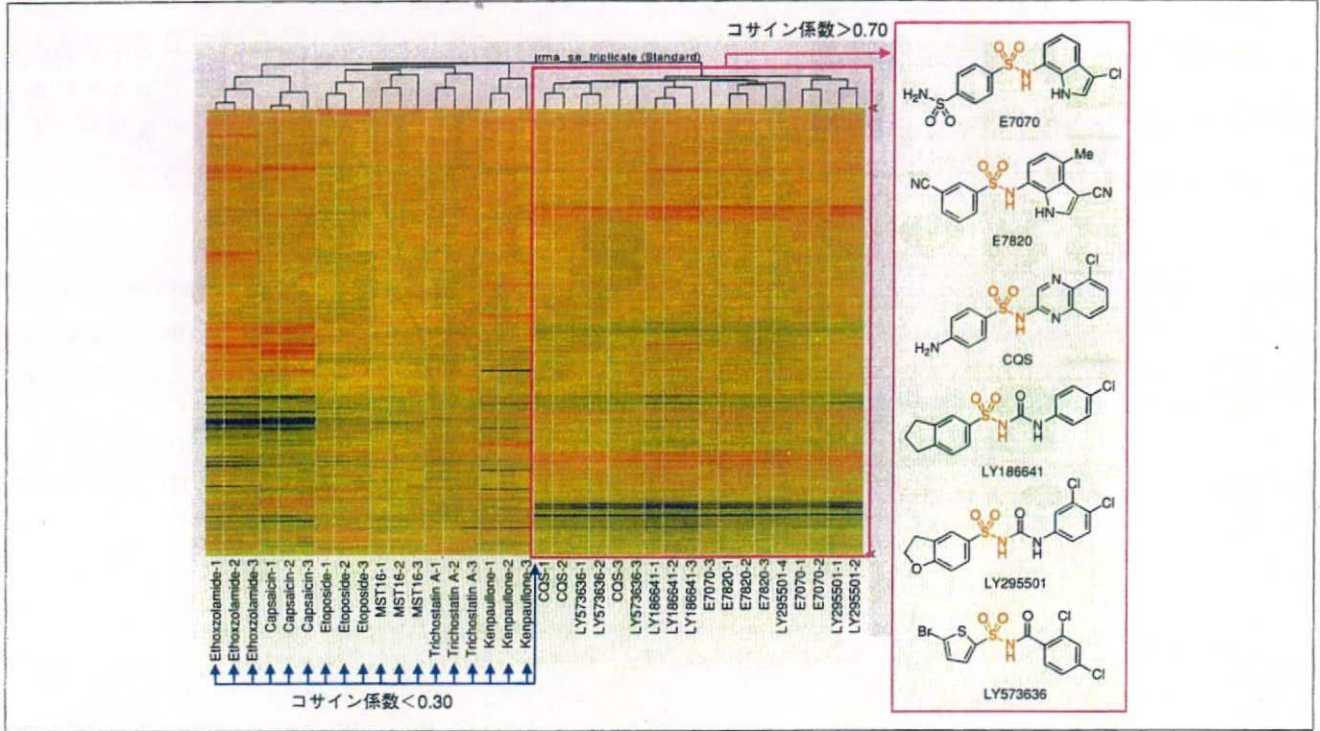
マイクロアレイによる網羅的トランスクリプトーム解析は、電子顕微鏡写真が世に現れた時の状況になぞらえることができる。すなわち、光学顕微鏡では見えない「もの」が新たに見えるようになったわけである。今までに見たことのないものを解析するには、十分な定量性のある方法でなるべく正確なデータを得て、汎用性のある標準化手法を用いて横断的なデータ解析を積み重ねる必要がある。その中で、はっきり見えるようになったものには、実験動物の概日リズムや培養細胞の培地攪拌による影響が含まれる。信頼できる良質のデータを得るには、実験条件設定に今までとは違った次元での細心の注意を払う必要がある所以である。また、動物にしる細胞にしる肉眼的あるいは光学顕微鏡的に確認される器質的变化の多くは、タンパク発現の後のものである。例えて言えば、全焼後の火事場の現場検証であり、出火原因の特定は経験的なものになる。ところが、トランスクリプトーム解析は、実際に出火したところを見るのが目的である。すなわち、タンパクのずっと前のmRNAの発現する段階を見るのである。現場検証の証拠所見を追認するだけの実験にしないように、マイクロアレイ実験のプロトコルはこの点を十分に考慮して設定されたい。

参考文献

- 1) Kanno J, Aisaki K, et al : BMC Genomics 7, 64, 2006.
- 2) 菅野 純, 相崎健一, 他 : 細胞工学 23, 685-693, 2004.
- 3) 菅野 純, 北嶋 聡, 他 : 細胞工学 26, 71-77, 2007.
- 4) Matsumoto S, Aisaki K, et al : Genome Informatics 16, 183-194, 2005.
- 5) <http://toxicomics.nihs.go.jp/db/>

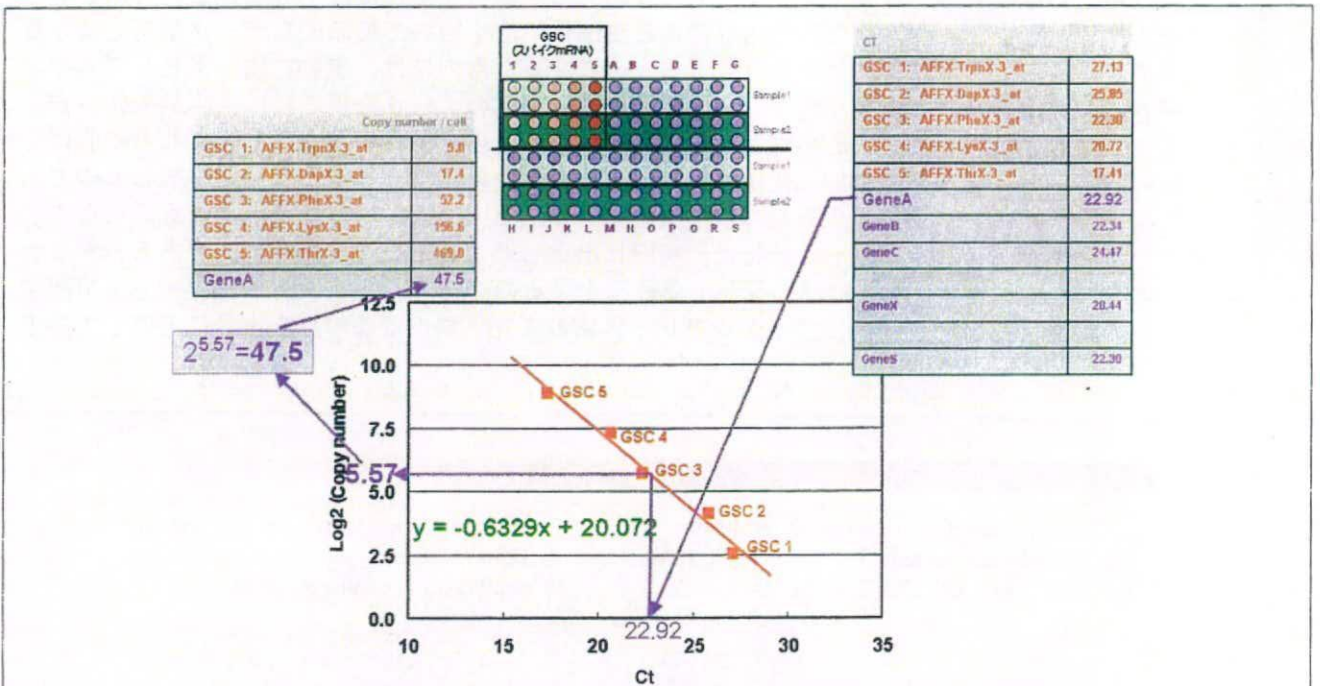
●階層的クラスタリングによる化合物転写プロファイルのフィンガープリンティング

(本文 359 頁参照)



●定量 PCR による Percellome 法の概要

(本文 365 頁参照)

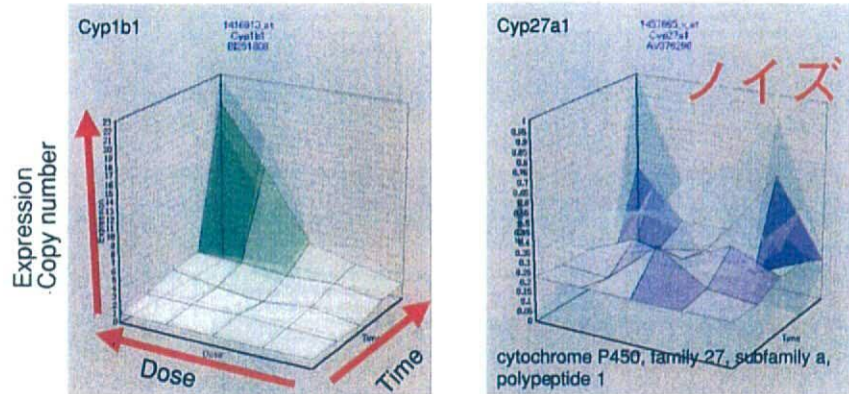


96 ウェルプレートにサンプルを duplicate で分注し, 図中 1~5 のウェルにおいて GSC の 5 種類のスパイク mRNA を増幅する。A~S においてコピー数未知の測定対象を増幅する。プライマーの増幅効率は可能なかぎり揃えておく。CT 値を X 軸に, コピー数の対数を Y 軸に, GSC の 5 点をプロットすると, 各サンプルごとに検量線が得られる。これを用いて GeneA の CT 値が 22.92 であったら, コピー数は 47.5/細胞と求まる。GeneChip[®] においても基本的な同様の方法で約 45,000 プローブセットの Percellome 値を得ている。

● Percellome Project におけるデータの三次元表示 (Millefeuille surface data)

(本文 366 頁参照)

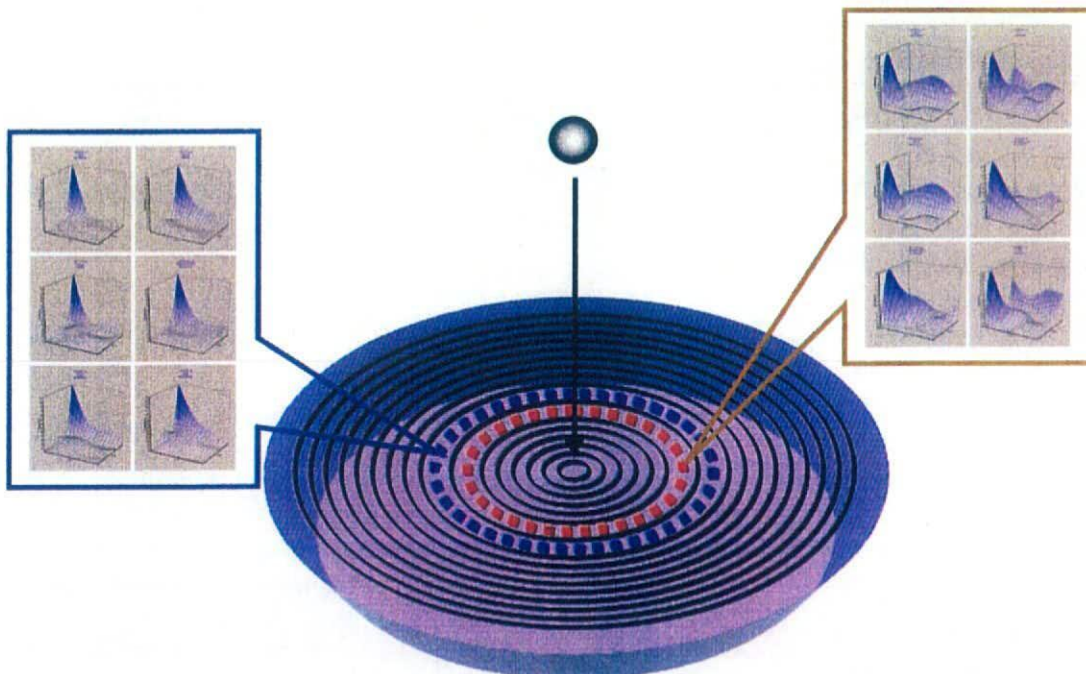
用量, 時間, 発現値を三次元表示し, 1つの遺伝子 (プローブセット) につき1枚の曲面を描く。1つの格子点が1群に対応し, 3匹のデータから計算される平均値からなる平均 surface (濃く色づけ) と $\pm 1SD$ の2つの surface (薄く半透明表示) の合計3層からなる。ここに示すのは図④と同一の2, 3, 7, 8-四塩化ジベンゾダイオキシン (0, 1, 3, 10, 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を単回投与した後, 2, 4, 8 および 24 時間後の肝における



CYP1b1 (左) および *CYP27a1* (右) である。*CYP1b1* は, 24 時間目に用量依存的に誘導がかかっており, SD surface も平均 surface に近接していることから, 生物学的に有意なデータであることが用意に判断される。これに対し, *CYP27a1* は, 時間経過からも用量からも生物学的に考えにくい上下を繰り返しており, また SD surface も分離していることから, 生物学的蓋然性のない, おそらくノイズであると直感される。実際に, その発現絶対値はこの場合の公称下限感度である1コピー/細胞を下回っている。

● Percellome Project データ解析の基本概念

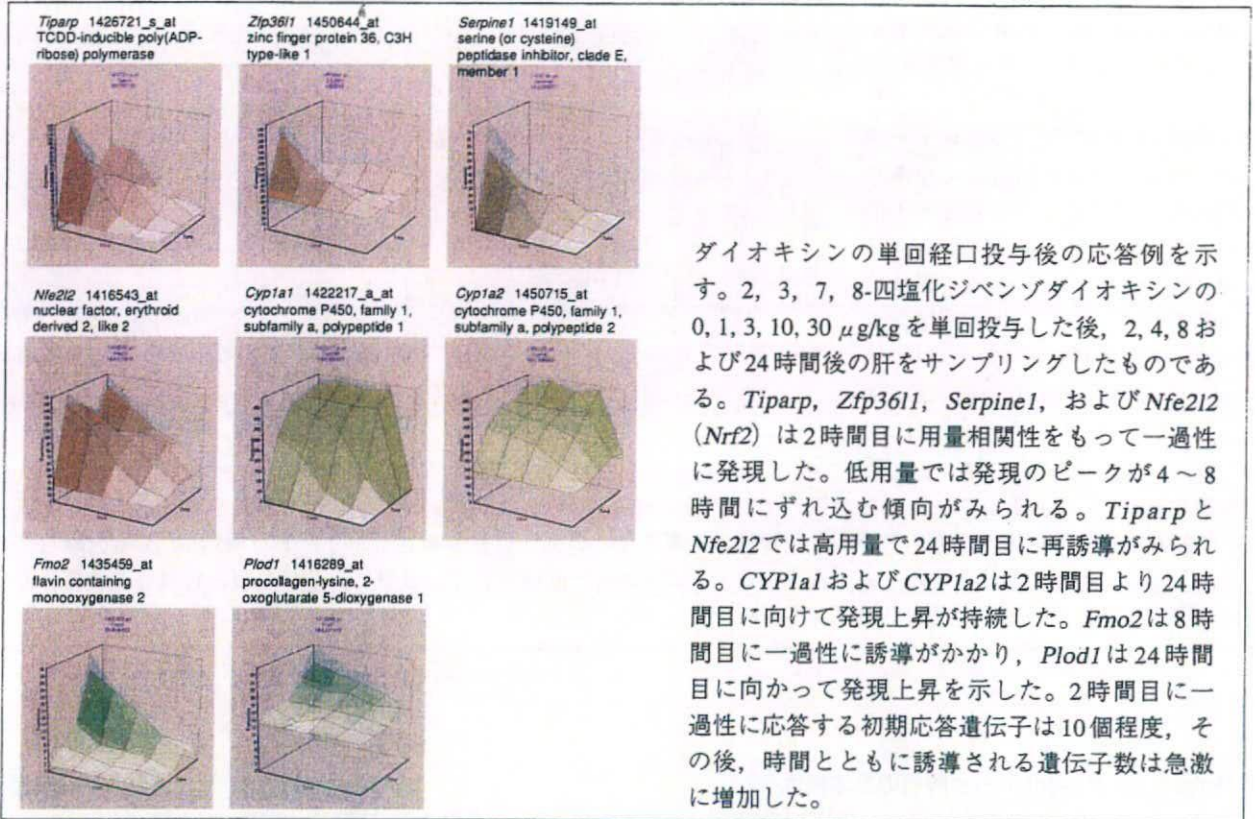
(本文 367 頁参照)



水面を遺伝子カスケード, そこへ落とし込む石を投与化学物質と考え, 石による波紋が投与実験から得られる遺伝子発現の初期応答であると考え。そして, 三次元 surface の類似する遺伝子をクラスターとして網羅的に抽出すると, 1つのクラスターは同心円状の波の1つに当たることになる。このような波のクラスターを異なる「石」(別の化合物) のクラスターと比較検討することで, 生命体が利用するカスケードの共通部分を特定してゆく。これに遺伝子ノックアウトマウスなどからの客観情報を組み合わせ, カスケードの描出範囲を広げてゆく。

●ダイオキシンによる肝遺伝子発現応答

(本文 368 頁参照)

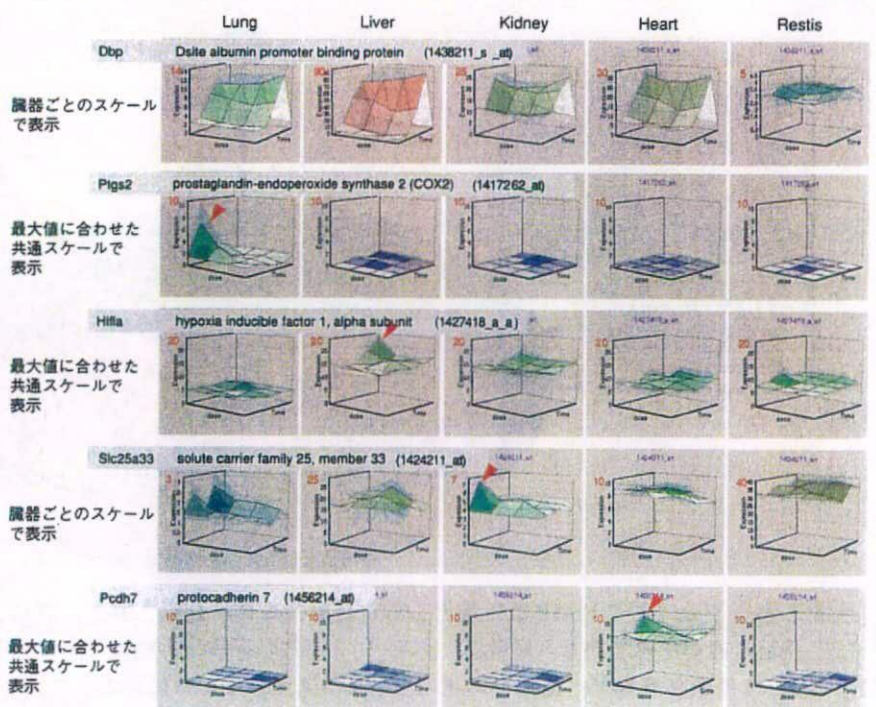


ダイオキシンの単回経口投与後の応答例を示す。2, 3, 7, 8-四塩化ジベンゾダイオキシンの0, 1, 3, 10, 30 μg/kgを単回投与した後、2, 4, 8および24時間後の肝をサンプリングしたものである。*Tiparp*, *Zfp3611*, *Serpine1*, および *Nfe2l2* (*Nrf2*) は2時間目に用量相関性をもって一過性に発現した。低用量では発現のピークが4~8時間にずれ込む傾向がみられる。*Tiparp*と *Nfe2l2*では高用量で24時間目に再誘導がみられる。*CYP1a1* および *CYP1a2*は2時間目より24時間目に向けて発現上昇が持続した。*Fmo2*は8時間目に一過性に誘導がかかり、*Plod1*は24時間目に向かって発現上昇を示した。2時間目に一過性に応答する初期応答遺伝子は10個程度、その後、時間とともに誘導される遺伝子数は急激に増加した。

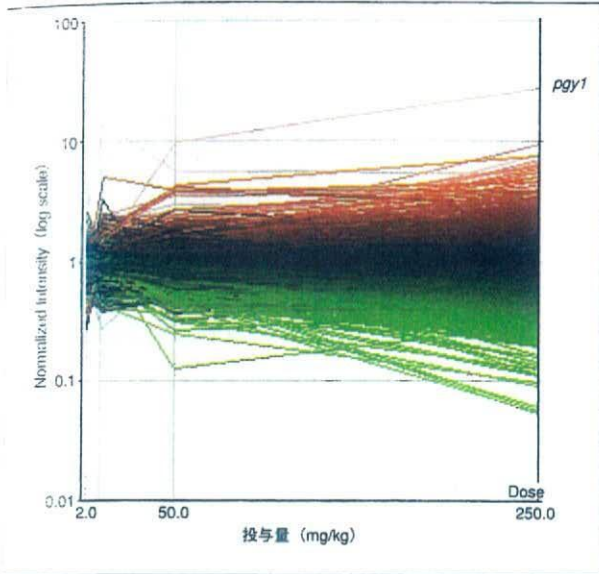
●四塩化炭素による多臓器影響

(本文 369 頁参照)

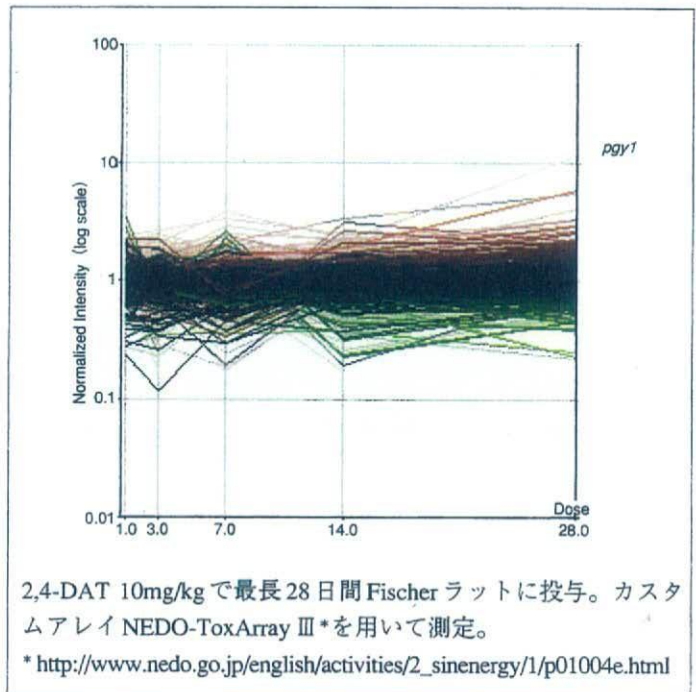
肺, 肝, 腎, 心および精巣の四塩化炭素による遺伝子発現影響を示す。*Dbp*は概日遺伝子であり、精巣を除くすべてに投与に依存しない概日変動を認めた。最低値と最高値には数倍の差が多く臓器で認められた。比較的低用量の四塩化炭素では、比較的限られた少数の遺伝子に変動が認められた。その中で2時間目に最も多くの遺伝子発現がみられたのは肺で、ここに示す *Ptgs2* (COX2) のほか、*heat shock protein* などのいわゆるストレス応答を示唆する遺伝子に変動した。肝では、2, 4, 8時間にはほとんど遺伝子発現はみられず、24時間目にここに示す *HIF1a* のほか、*Thyoredoxin*, *Gultathione S-transferase*, *SAA1* など比較的多数誘導された。腎においては2時間目 (*Slc25a33*) と24時間目に少数の発現があり、心では8時間目 (*Pcdh7*) を中心にいくつかの遺伝子の発現を認めた。



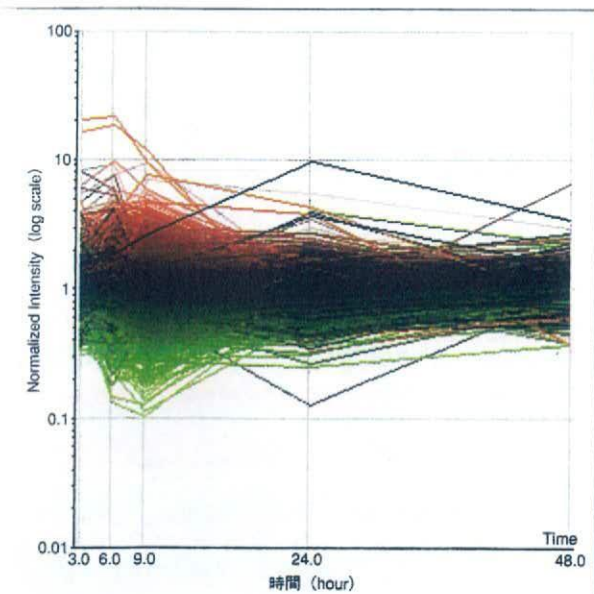
● 2,4-DAT 投与 24 時間後の遺伝子発現変動
(本文 375 頁参照)



● 2,4-DAT 反復投与による遺伝子発現変動 (本文 375 頁参照)



● 2,4-DAT 50mg/kg 投与による遺伝子発現変動
(本文 376 頁参照)



Sprague-Dawley ラットに単回投与。GeneChip[®] Rat Expression 230A アレイを用いて測定。

非臨床試験

—ガイドラインへの対応と
新しい試み—

編集委員 野村 護 / 堀井郁夫 / 吉田武美

LIFE-SCIENCE INFORMATION CENTER

第3節 トキシコゲノミクスの大規模高精度データベースの構築と解析

1. はじめに

毒性学(トキシコロジー)はヒトの健康・安全を確保することを目的とし、外来性の物質(化学物質など)が生体に進入した際の生体反応を記述し理解することにより、身の回りの物質の毒性(有害性)を予測し、それらの曝露による被害を未然に防ぐとともに、曝露された場合の治療法を開発する研究分野である。

この毒性予測の精度向上を目指した分子生物学レベルの毒性研究は、遺伝子、遺伝子発現、タンパク合成、タンパク修飾などから最終的な毒性症状までのあらゆる段階を対象とする。その際、探索的な科学研究と異なる点として、毒性学には、予期せぬ事態を見逃がさない「網羅性」の確保が要求されることが挙げられる。我々はその現実的対応として、遺伝子発現をほぼ全遺伝子についてカバーする高密度 cDNA マイクロアレイによる毒性学的トランスクリプトーム研究、すなわちトキシコゲノミクス研究を開始した。

創薬過程における非臨床段階での毒性学、特にラットを用いた一連の毒性試験は、薬の安全性確保に大きく貢献するとともに、審査資料の構成成分としての重要な役割を果たしてきている。これに対するトキシコゲノミクスの位置づけには、その発達段階にも応じて、何通りかあるように思われる。ここでは、薬学の中の副作用学としての毒性学に加えて、医学(病理学)、環境生物学、あるいは生物界に対する化学界の関わりとしての毒性学を念頭に、我々が進める Percellome Project を中心としたトキシコゲノミクスの大規模高精度

データベースの構築と、そのデータ解析についての現状と展望を概説する。

2. トキシコゲノミクス研究の目的と最終目標

従来の毒性学は、生物個体が「ブラックボックス」であっても、それに対する「入力」としての化学物質が引き起こす毒性症状をそれからの「出力」として記述し、入出力の関連を体系化することで安全性確保に貢献してきた。我々のトキシコゲノミクス研究は、ブラックボックスの中身を遺伝子発現カスケードの面から解明することにより生体反応メカニズムに基いた分子毒性学を構築することを目的としている。そして、究極の目標としてコンピュータ内のバーチャルマウスやバーチャル人間の完成を掲げ、そこへ向う過程で実験動物からヒトへの外挿の精度向上を実現しようとするものである。前述のごとく毒性学は網羅性を重んじるため、得たデータを既知情報により分類・解析するアプローチ(いわゆる、phenotypic anchoring や、既知の応答に関わるバイオマーカー探索など)は後に回し、トランスクリプトーム情報そのものの中から、生物学的に有意な反応カスケードを描出するアプローチを取ることとした。これは丁度、電子顕微鏡写真が世に現れた時の状況に準えることができる。すなわち、光学顕微鏡では見えない「もの」が新たに見えるようになったわけであるが、それが何であるかは、光学顕微鏡像を参照しても簡単には分からない。電子顕微鏡像を解釈しコンセンサスとしての教科書

(図譜など)ができ上がって初めて日常的に利用されるようになったわけであり、教科書を完成する作業自体が1つの研究分野を形成したという歴史がある。繰り返しになるが、我々の目指すトキシコゲノミクスと従来の毒性学との関係は電子顕微鏡と光学顕微鏡の関係にあり、実用化に向けての教科書作成にあたる基礎研究が必要である。

話は前後するが、毒性学研究は、人体実験が可能な一部の状況(成人を対象とした医薬品の臨床試験など)を除いて、ヒトの身代わりとしての実験動物を用いて行われる。上記の目標を達成するために、我々は動物種としてマウスを選択したが、その理由は、遺伝子情報がヒトに次いで豊富であること、および、遺伝子改変マウスが利用可能であり、それから得られる情報(下流カスケードの情報、ノックアウトマウスが示す欠落症状等)が遺伝子発現カスケードの客観的な描出と毒性学的意義付けに大きく貢献することが予見されたことによる。それでも、複数の実験から得られる大量の実験データを蓄積した上での横断的な解析が必須となる。そのためには、データの標準化と互換性確保が重要となってくる。そこで、我々は、発現データの標準化手法として、マイクロアレイや定量PCRから細胞1個あたりのmRNAコピー数を得るPercellome法を開発した。

3. Percellome Project

3.1 Percellome法：細胞1個あたりのmRNAコピー数として発現値を得る方法

原理は、サンプルの細胞数に対してmRNAの発現値を標準化するという単純なものである。具体的には、サンプル破砕液のDNA量から細胞数を求め、外部標準mRNA(スパイクRNA)を細胞1個あたり決まった分子数だけその破砕液に添加し、そしてRNA抽出、測定に移る。スパイクRNAの

発現値が細胞1個あたり何コピーに由来するかが既知であることを利用し、サンプル中の全てのRNA測定値を、細胞1個あたりのコピー数に換算する。スパイクRNAは、枯草菌の5種類の遺伝子のmRNAを濃度を公比3で振って混合したカクテル(dose-graded spike cocktail; GSC)として用意した。これにより、各サンプルに細胞1個あたりのコピー数が既知である標準点5点が導入され、これらを繋げば標準直線が得られる。この直線を用いて実際に測定したmRNAの発現値(マイクロアレイの場合数万種)をコピー数に換算する¹⁾⁻³⁾。

このような測定に用いるマイクロアレイには十分な定量性・直線性が備わっている必要がある。その検証にはLBM標準サンプル(肝[L]と脳[B]を100:0, 75:25, 50:50, 25:75および0:100に混合した5サンプルからなるセット)を用いた。現在までに、Affymetrix社GeneChip(マウス, ラット, ヒト, ゼノパス), Agilent社の単色44kアレイ(マウス, ラット, ヒト), およびCodelink(マウス, ラット, ヒト)マイクロアレイについて、定量性・直線性を確認し、Percellome測定が可能な状態となっている。ただし、真のコピー数は、原則的にマイクロアレイからは求まらず、プローブあるいはプローブセットごとの用量反応特性の影響を受ける(現行のExpression Arrayのプローブの塩基配列設計にはある程度の同一定量性が得られる配慮がなされている)。この問題に対するPercellome法の利点は、定量PCR等で真の値が測定されたサンプルを、一度、マイクロアレイで測定すれば、そこから換算式が導かれ、真の値への一括変換が原理的に可能であることにある。現段階では、AffymetrixのGeneChipのプローブセットごとの特性に依存したデファクト絶対値である。LBMのようなサンプルをPercellome法を実行可能なプラットフォーム間で共通に測定すれば、プローブあるいはプローブセットごとの換算式が用意される。これは、マイクロアレイ間のみならず、定量的PCRとの間、および、同一プラットフォーム

ホーム内での1回増幅プロトコールと2回増幅プロトコールとの間でも可能である。

GSCの添加を正確に行うために高精度を要求されるDNA定量については、手作業プロトコールおよび自動ロボット(PerkinElmer JANUS)のプロトコールを準備した。GSCのストックも含め共同研究ベースで供給可能である(連絡先:kanno@nihs.go.jp)。

3.2 Percellome Projectの実験プロトコール

体内に侵入してきた化学物質等を第一に感知するのは、多くの場合タンパク質であり、それからの次の影響が遺伝子発現に波及した場合にmRNAの変動として現れ、それが次のタンパク質を誘導し、次のmRNA変動を招く、と模式的には考えられる。このような初期応答を観測する目的から、まず、成獣の肝を対象とした単回経口投与実験プロジェクトを開始した。mRNA合成のスピードと動物実験の手技上の現実的限界を考慮し、単回強制経口投与の2, 4, 8, および24時間後にサンプリングを行うプロトコールを設定した。また、用量依存性を考慮し、投与量を溶媒対象(0), $\times 1$, $\times \sqrt{10}$, および $\times 10$ とした4群を設定した。すなわち、1つの化合物について、4(時点) \times 4(用量)の16群、各群3匹、合計48匹とした。マウスはノックアウトマウスを併用する前提からC57BL/6(SLC)を、週齢は肝の酵素が安定する12週齢、性別は性周期のない雄、とした。また、後述するが、肝、腎、肺、心、脳など、ほとんどの臓器に明瞭な日内変動が認められるため、マウスを10週齢時点で搬入し、明暗12時間サイクルを厳守した環境で2週間馴化した後、明サイクル2時間目に投与、以後、各予定時刻の前後20分~30分以内にサンプリングを完了することとした。1匹につき、麻酔(エーテル)、脱血(腋窩動脈より)の後の2分~3分以内としている(実施要領を執筆中)。マイクロアレイはAffymetrix社GeneChip

Mouse430 2.0(初期は430 A)を用いた。サンプルはプールせず、個体ごとに測定した。

3.3 Percellome Projectデータの構造(Millefeuille surface data)と解析

化学物質単回投与による遺伝子発現変動は、時間および用量に依存するという考えから、x軸=時間、y軸=用量、z軸=mRNAコピー数とする3次元グラフ上に曲面(surface)として投与が誘発する遺伝子発現変動を可視化した。1つの遺伝子(GeneChipでのprobe set)につき、3匹の平均surfaceと ± 1 標準偏差(SD) surfaceを表示することで、視覚的に反応を捉えると同時に、ノイズあるいはartifactであるか否かの感触を容易に得られるようにした。Percellome Projectではこの3次元surfaceのパターンを基礎に遺伝子発現カスケードの描出に関わる方法論の開発を進めている。現在、1つの実験から得られるGeneChip 48枚のデータを一括処理する能力を持ったPercellome自動換算・データ品質管理(QC)ソフトウェア、3次元多層データ(Millefeuille data; MFデータあるいはSurfaceデータと呼んでいる)のパターン類似性を元にした候補遺伝子検索ソフトウェア群を中心とした解析システム(MFソフトウェアシリーズ、開発:相崎健一)、およびその概念を発展させた教師なし(クラスター数の指定なし)クラスタリング⁴⁾を独自に実用化し、現在も改良・開発を継続中である。データの3次元可視化は、コンピュータが選び出した遺伝子クラスターの中身を確認する際、殊にmRNAの合成分解のスピード等の常識から考えて生物学的にあり得ないパターン(用量軸の方向にも時間軸の方向にもジグザグな変化など)をノイズとして排除する際に威力を発揮している(図1)。

いくつかの化合物の全遺伝子リストを比較し、化合物に共通して同期して発現する遺伝子群を自動抽出するシステムも開発済みである。ここで得

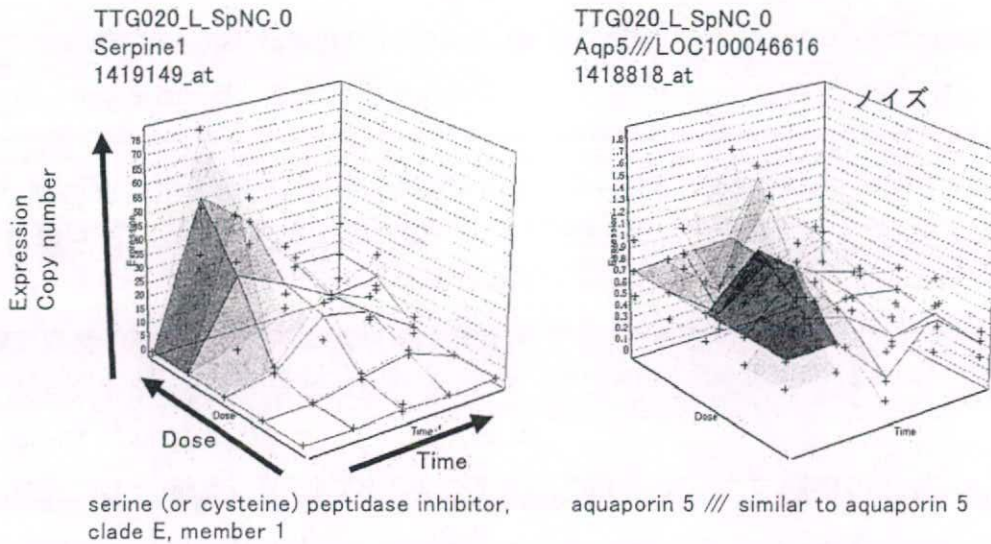


図1 Percellome Projectにおけるデータの3次元表示(Millefeuille surface データ)

用量, 時間, 発現値を3次元表示し, 1つの遺伝子(probe set)につき1枚の曲面を描く。1つの格子点が1群に対応し, 3匹のデータから計算される平均値からなる平均 surface(濃く色づけ)と±1SDの2つの surface(薄く半透明表示)の合計3層からなる。2,3,7,8-四塩化ジベンソダイオキシン(0, 1, 3, 10, 30 μg/kg)を単回投与した後, 2, 4, 8, および 24 時間後の肝における serpine 1(左)および aquaporin 5(右)である。serpine 1は, 2時間目をピークとする用量依存的な誘導がかかっており, SD surfaceも平均 surfaceに近接していることから, 生物学的に有意なデータであることが容易に判断される。これに対し, aquaporin 5は, 時間経過からも用量からも生物学的に考え難い上下を繰り返しており, また, SD surfaceも分離していることから, 生物学的蓋然性のない, おそらくノイズであると直感される。実際に, その発現絶対値はこの場合の公称下限感度である1コピー/細胞を下回っている。(図中の(+))は個別のデータを示す)

られた遺伝子群はシグナルカスケードの構成単位である可能性がある。(5TB規模のデータベース部分および, 大量計算アルゴリズム実装, クラスタリングアルゴリズム等は(株)NTTコムウェア・NTTデータおよび(株)日本NCR/Teradata(松本伸哉氏)との共同開発による)。

3.4 Percellome Projectの概要とデータ例

現在までに, 単回強制経口投与による肝の初期反応データを, 既知情報のある約100以上の化学物質(医薬品, 一般化学物質, 食品関連物質を含む)について採取し終えた。これに引き続くプロジェクトとして, 食品・食品添加物関連, シックハウス症候群を考慮した低用量域での吸入毒性トキシコゲノミクス, 1匹のマウスから多臓器を採

取しそれらの連関を解析する多臓器トキシコゲノミクスを開始したほか, 胎児発生, 行動神経に関わるプロジェクトへの展開を図っている。ここで, 多臓器連関解析の一部を紹介する。サリドマイドを0, 100, 300, および1,000 mg/kgの用量で強制経口投与し, その2, 4, 8, および24時間後に, 肝, 腎, 肺, 心, 脳の5臓器を採取, Percellome dataを得た。まず, 投与とは無関係に変動する概日遺伝子は全ての臓器において明瞭なパターンを示し, 最高値が最低値の数倍を超えるものが多数見られた(図2)。ここでは肺に注目した解析の一部を紹介する。2時間目に用量相関性を持って発現誘導のピークを示す遺伝子に, Cdkn1a(P21)が認められた(図3)。類似のパターンを示す初期応答遺伝子には, Fas, Foxo3a, Gata2, など50あまりがあり, 酸化的ストレスが誘発されているこ

Circadian Gene
(Dbp : D site albumin promoter binding protein 1438211_s_at)

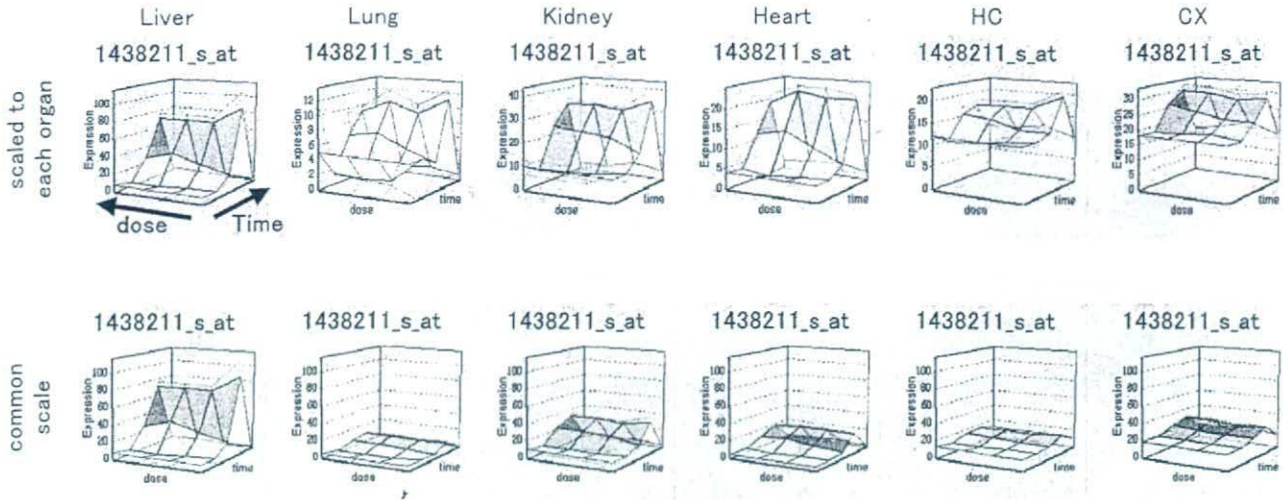


図2 サリドマイドによる多臓器影響(1)

肝, 肺, 腎, 心, 海馬(HC)および大脳(CX)のサリドマイドによる遺伝子発現影響を示す。Dbpは、概日遺伝子であり、全ての組織に投与に依存しない概日変動を認めた。最低値と最高値には数倍の差が多く臓器で認められた。

Cdkn1a (P21) ; cyclin-dependent kinase inhibitor 1A 1424638_at

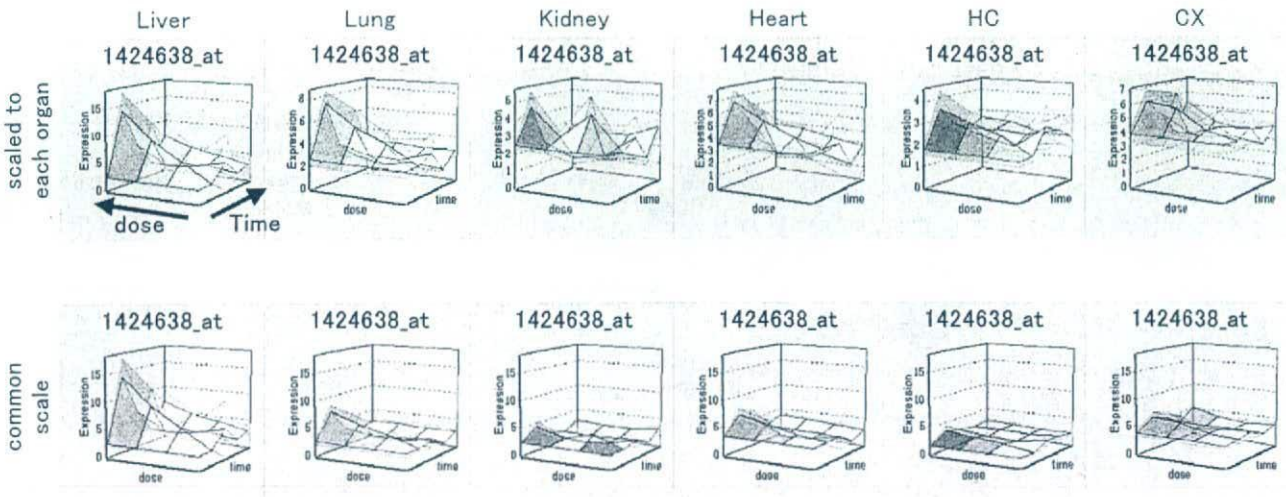


図3 サリドマイドによる多臓器影響(2)

肝, 肺, 腎, 心, 海馬(HC)および大脳(CX)のサリドマイドによる遺伝子発現影響を示す。いずれの臓器・組織においても、2時間目に用量相関性をもって、Cdkn1a(P21)の誘導が認められた。

とが示唆された。既知情報との照合によっても、Free Radical Scavengingなるキーワードが含まれる反応であった(図4)。これらのことから、サリドマイドは肺に対して酸化的ストレスを介した毒

性を示すことが示唆され、文献的に多発性骨髄腫患者にサリドマイドが間質性肺炎を誘発するなどの報告があり、それが確認された。肝ではサリドマイドにより発現が減少する遺伝子はほとんど認

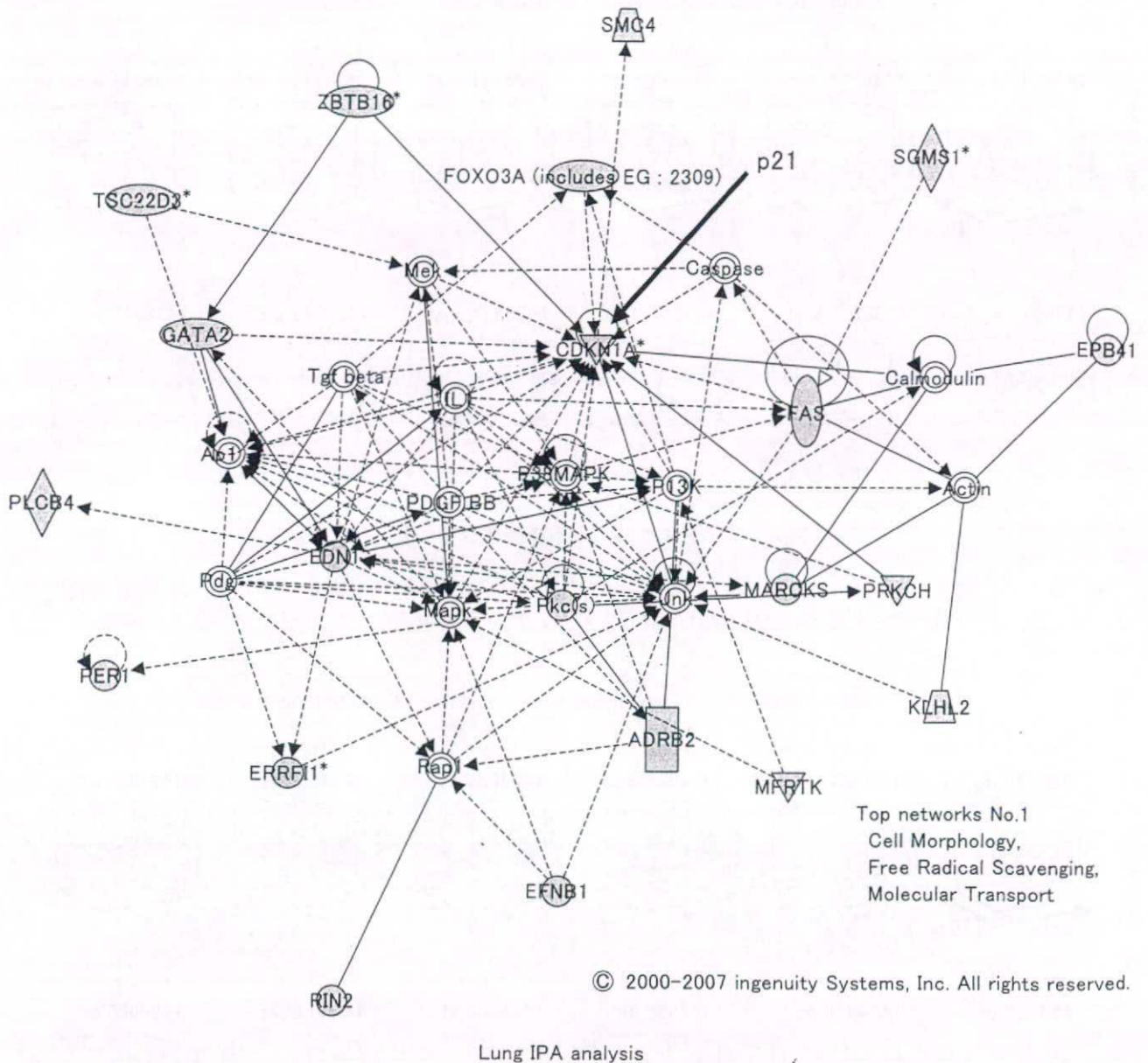


図4 肺におけるサリドマイド誘導(発現上昇)遺伝子の既知情報との照合

Ingenuity Pathway Analysis のデータベースとの照合から、フリーラジカルに関するカスケードの関与が示され、文献的に肺に対する障害を示す事例が確認された(灰色:実際に変動している遺伝子)。

められなかったが、肺では数十の発現減少遺伝子が抽出された。既知情報と照合すると、Connective Tissue Development and Function, Skeletal and Muscular System Development and Tissue Development というキーワードにくくられる遺伝子群が含まれており、その中には、肢芽形成に関わる Lbh

(limb-bud and heart)なるものが含まれていた。肺は、肝に比べて間葉系成分が多く、より多彩な反応が観測される可能性が指摘される。どの細胞集団が該当遺伝子を発現しているかの同定には、必要に応じて、*in situ* hybridization を実施することとしており、現在の感度は50コピー/細胞程度

であるが、さらなる高感度化を図っている。

4. まとめ

「マイクロアレイデータには再現性がない」と言われることがあるが、その原因としては、その定量性の善し悪しのほかに、実験計画の不充分さが挙げられる場合がある。動物には概日リズムがあり、前述のごとく肝では数千の遺伝子に、また、他のほとんどの臓器でも明らかな概日変動が見られる。サンプリングのタイミングを一定にしないとこの影響を大きく受けてしまい、データが再現しないことが経験される。また、実験前の馴化期間中の動物舎の照明スケジュールが厳密に管理されていないと、タイミングを守っていても実験間誤差が大きくなる。その他、餌の組成、飼育時のストレスにも注意が必要である。これに似た影響は、*in vitro* サンプルにも経験される。例えば、培養細胞の培地交換はもとより、倒立顕微鏡での観察の有無(培地の攪拌等の影響)、インキュベータ内の配置、96穴プレートでの辺縁効果(最外周wellの培養条件が中心と異なる)などが、時に明瞭に遺伝子発現データに反映される。このような点に配慮することで、遺伝子発現データが安定し、再現性が向上することを経験している。

データ解析のアプローチとして、しばしばバイオマーカー検索が行われるが、最終的フェノタイプとの関連性による抽出の限界が気になるところである。我々の目指すカスケード描出については、教師なしクラスタリングと網羅的特徴抽出アルゴリズムの組み合わせによる解析が始まったところである。教師なしクラスタリングは、Percellomeデータの3次元曲面の形状の類似性を指標に、45,000枚の曲面について総あたり計算を行い、45,000プローブセットの類似性密度を求め、高密度の中心をそのクラスターの代表反応としてクラスターを抽出する。他方、密度の低いところに

は、他の45,000とは似ていないものが点在する。これらは、1つのプローブセットが1つのクラスターを形成していると考え、single gene clusterとして抽出する。同様に2遺伝子クラスター、3遺伝子クラスター、といった具合に、小さいクラスターから大きいクラスターまで、教師なしクラスタリング解析を行っている。網羅的特徴抽出アルゴリズムは、Percellome曲面の16格子点情報から凸ピークおよび凹ピークを検出し、その複雑さなどの特徴から、mRNAの反応特性に照らして生物学的意味を持つ可能性の高い曲面を網羅的に抽出するものである。この2つのアプローチを組み合わせることにより、網羅性を確保しつつ、生物学的意味を持つ曲面の抽出を行っている。これらにより、カスケードの要員遺伝子の抽出が可能となり、このアプローチによるカスケード描出の糸口が次々に得られている。今後、これらの要員遺伝子の連結作業を加速する手段としてのInformatics研究を外部との共同研究を含めて推進することにより、近い将来には網羅性を確保した状態でのカスケード同定が可能となることを見込まれるに至っている。特に、遺伝子改変マウス情報との対比が有効であることが示されており、国内外のノックアウトマウスプロジェクト(KOMP)や、国立遺伝学研究所の城石俊彦博士らによるMSM/MsマウスとC57BL/6Jマウスのコンソミックマウスライブラリ研究⁵⁾などとの連携も考慮したデータ解析をも展望するものである。

謝 辞

本システムの開発とプロジェクトの遂行にあたっては、当毒性部の全メンバー、特に松田菜恵、辻 昌貴、安東朋子、安部麻紀、森山紀子、森田絃一、近藤優子、古川佑介、青柳千百合、相原妃佐子の各氏に深謝する。本研究は厚生労働科学研究費補助金H13-生活-012、H14-トキシコ指定-001、H15-化学-002、H17-化学-一般-003、H18-化学-一般-001等による。

参考文献

- 1) Kanno J., Aisaki K., Igarashi K., Nakatsu N., Ono A., Kodama Y. and Nagao T. : "Per cell" normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays. *BMC Genomics*, 7 : 64, 2006.
- 2) 菅野 純, 相崎健一, 五十嵐勝秀, 小野 敦, 中津則之 : ゲノム毒性学形質非依存型トキシコゲノミクスの導入. *細胞工学*, 23(6) : 685-693, 2004.
- 3) 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*, 26(1) : 71-77, 2007.
- 4) Matsumoto S., Aisaki K. and Kanno J. : Mass Distributed Clustering : A New Algorithm for Repeated Measurements in Gene Expression Data. *Genome Informatics*, 16 : 183-194, 2005.
- 5) Takada T., Mita A., Maeno A., Sakai T., Shitara H., Kikkawa Y., Moriwaki K., Yonekawa H. and Shiroishi T. : Mouse inter-subspecific consomic strains for genetic dissection of quantitative complex traits. *Genome Res.*, 18 : 500-508, 2008.
(菅野 純 / 北嶋 聡 / 相崎健一 / 五十嵐勝秀 /
小川幸男 / 関田清司)

Letter

Design and performance of a system for blood collection of rats under whole-body inhalation exposure

Makoto Take, Makoto Ohnishi, Kasuke Nagano, Seigo Yamamoto and Shoji Fukushima

Japan Bioassay Research Center, Japan Industrial Safety and Health Association, 2445 Hirasawa, Hadano,
Kanagawa 257-0015, Japan

(Received October 17, 2008; Accepted December 9, 2008)

ABSTRACT — In order to obtain basic risk assessment data on human health exposure to volatile organic compound (VOC) vapor by inhalation, a whole-body inhalation exposure system which allows blood collection during the exposure period was designed. The system was tested using chloroform as a model VOC. Chloroform vapor, sampled from the supply-header, animal-chambers and exhaust-header, remained constant in this system with variations in its concentration being less than 2%; flow rate of the vapor through the system was also constant. Rats were exposed to chloroform vapor and blood collected from the tail during exposure to the chloroform vapor. The chloroform concentration in the blood increased during the initial 60 min of exposure, and afterwards its concentration remained at about 2 µg/ml from 60 to 360 min. In conclusion, our design allows blood to be collected from individual rats during exposure by inhalation to test VOCs and changes in the blood concentration of the VOC during exposure to be assessed.

Key words: Whole-body inhalation exposure system, Blood collection, Rats, Chloroform

INTRODUCTION

Inhalation exposure studies on animals using volatile organic compounds (VOCs) have delineated dose-response relationships to determine effective endpoints for the risk assessment of people exposed to VOC vapor by inhalation. The vapor concentrations in most of these studies is used as the endpoint dose when determining the dose-response effects. However, it is the internal dose, i.e., the concentration of the VOC in the blood, and factors such as time-course changes in the blood concentration of the VOC which is usually more directly related to many of the adverse health effects of a particular VOC.

Blood collection from animals during the inhalation exposure period has been reported, but only when using a nose-only inhalation exposure system (CERI News, 2005). Blood concentrations of inhaled chemicals using whole-body inhalation systems have been described in some reports (Kaneko *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1995; Hori *et al.*, 1999), but the blood concentration data was obtained only after termination of inhalation exposure period. For whole-body inhalation exposure studies, the animals are individually housed in an inhalation exposure chamber and are exposed to the chemical substance;

under these whole-body exposure conditions, it is impossible to collect the blood from the animal during the inhalation exposure period. Therefore, it is difficult to obtain blood concentration data that accurately corresponds to the exposure concentration.

We have designed a whole-body inhalation exposure system that allows blood to be collected from the tails of exposed rats during the inhalation exposure period. The system was verified using chloroform as a model VOC: chloroform is found in both outdoor and indoor air (International Programme on Chemical Safety, 1994; International Agency for Research on Cancer, 1999), and is a carcinogen (Yamamoto *et al.*, 2002; Nagano *et al.*, 2006).

MATERIALS AND METHODS

Whole-body inhalation exposure system

The system is composed of two parts: a whole-body inhalation apparatus in which the rats are exposed to chemical vapors and a blood-collection module in which the rats are housed during exposure and allows blood to be collected from the tail.

The whole-body inhalation apparatus is shown in

Correspondence: Makoto Take (E-mail: m-take@jisha.or.jp)

Fig. 1. A chemical vapor-air mixture is generated by bubbling clean air through the test VOC. The vapor is supplied to the animal chambers via the supply-header and vented via the exhaust-header. A flow-meter and flow-control-valve are attached to each animal-chamber to control the flow rate of the chemical vapor-air mixture through the animal-chamber. The blood-collection module is inserted into the animal-chamber and is held in place by a holder-nut. The inhalation apparatus has 9 vapor sampling ports: one at each end of the supply-header (S-1 and S-2), one in each animal-chamber (A-1-6), and one in the exhaust-header (E-1). The supply-header and animal-chamber are made of acrylic acid resin, and the holder-nut and exhaust-header are made of poly vinyl chloride resin.

The blood-collection module is shown in Fig. 2. This module is composed of an animal-housing assembly and a tail-holder assembly. The animal-housing assembly consists of an animal-holder made of acrylic acid resin equipped with a dome type head-cover. The animal-holder has protruding circular fins to keep it from moving after it is placed within the whole-body inhalation apparatus. The tail-holder assembly is composed of a silicon-septum made of silicon rubber and a backup-plate made of stainless steel. The silicon-septum forms an airtight gasket between the backup-plate and the animal-holder to

prevent chemical vapor leakage. A hole in the silicon-septum (position X in Figs. 2 and 3) allows for protrusion of the tail for blood collection and is smaller than the tail root of the rat to prevent vapor leakage. The animal-housing and tail-holder assembly are held firmly together by the holder-nut which also holds the blood-collection module in place in the whole-body inhalation apparatus.

The test animal is housed and blood collected as follows. The rat is placed in the animal-holder and the head-cover moved down the slide line to fit its body size. The head-cover is fixed in place with the head-cover screw and the animal-housing assembly is placed into the whole-body inhalation apparatus. Finally, the rat's tail is passed through the hole of the tail-holder assembly, and the tail-holder, the animal-housing assembly and the whole-body inhalation apparatus are clamped firmly together with the holder-nut. The rat is exposed to vapor and blood is collected from the tail vein as shown in Fig. 3.

Temperature relative humidity of the system is measured by thermo-hygro meter at 6 min intervals, and maintained in a range of $22 \pm 3^\circ\text{C}$ and $51 \pm 8\%$, respectively. The flow rate of air through the animal-chamber is monitored by flow-meter during the inhalation exposure time, and controlled by a flow-control-valve within a range of 250 to 260 ml/min.

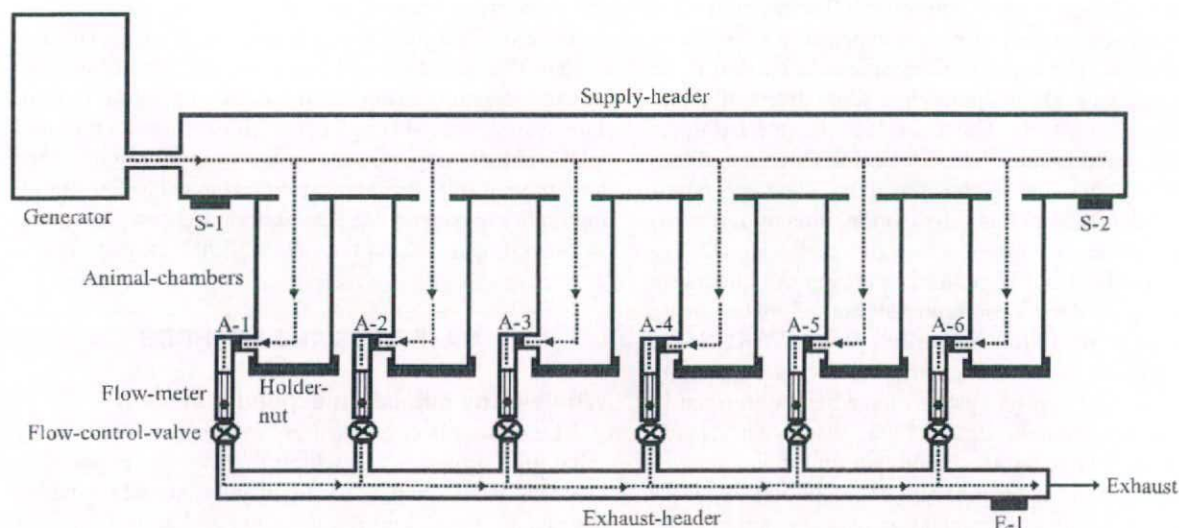


Fig. 1. Schematic diagram of whole-body inhalation apparatus. S-1 and 2: sampling ports of supply-header, A-1-6: sampling ports of animal-chambers, E-1: sampling port of exhaust-header.

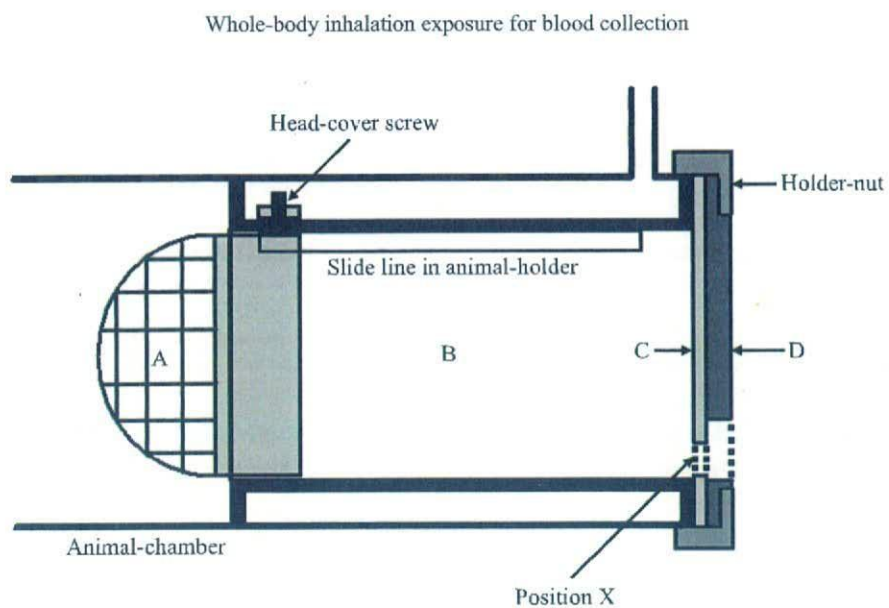


Fig. 2. Blood-collection module of whole-body inhalation exposure system. Animal-housing assembly (A: Head-cover, B: Animal-holder) and tail-holder assembly (C: Silicon-septum, D: Backup-plate).

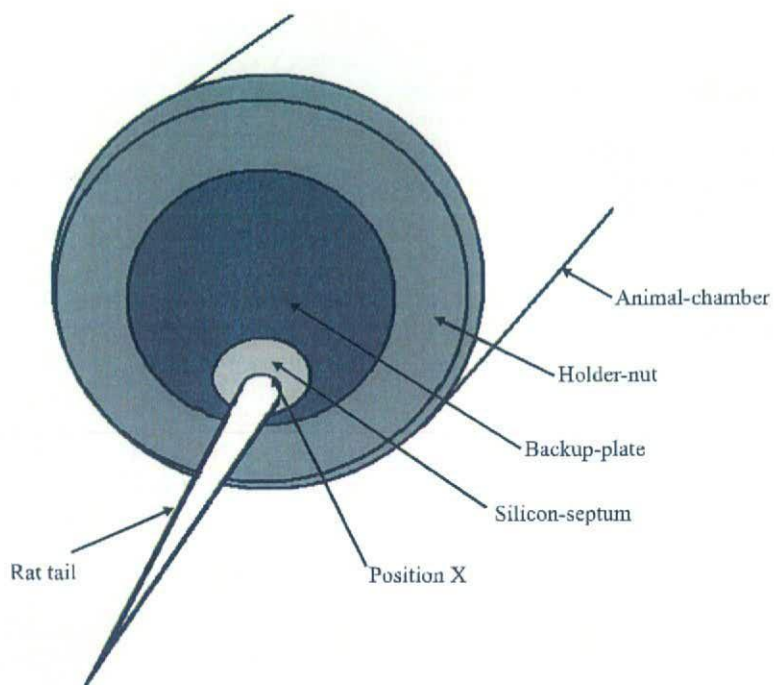


Fig. 3. Rat tail protruding through tail-holder assembly when blood-collection module is in place in whole-body inhalation exposure system.