

厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告書

吸入暴露影響の網羅的遺伝子発現解析、経口暴露との対比による  
評価・優先順位付けの網羅性の向上

研究分担者 菅野 純

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・部長

研究要旨

本研究は、昇華性又は難揮発性の化学物質の極低濃度経気道暴露による肺と肝に於ける遺伝子発現変化を解析し、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、カーバメート系殺虫剤フェノブカルブ（指針値3.8ppb、暴露目標値3.8、12.0及び38.0ppb）及び難揮発性の有機リン系殺虫剤ダイアジノン（指針値0.02 ppb、暴露目標値0.02、0.07及び0.2 ppb）の経気道暴露（4用量、16群構成、各群3匹）をおこない、フェノブカルブでは2時間単回暴露（2、4、8、24時間後）、ダイアジノンでは6時間/日×7日間暴露（6、22、70、166時間後）（＝労働暴露モデル）及び22時間/日×7日間暴露（22、70、166、190時間後）（＝生活暴露モデル）を検討し、マウス肺及び肝の網羅的遺伝子発現データを解析した。その結果、フェノブカルブ2時間単回暴露時、肺では顕著な発現変動を示す遺伝子は認められなかったが、肝では酸化ストレス関連遺伝子の発現増加が認められ、酸化ストレスが誘発されている事が示唆された。ダイアジノン暴露の場合は、6時間暴露時では肺及び肝共に、リンパ球やマクロファージが関与する炎症に関わる遺伝子であるオーファン受容体Nr4a1遺伝子や各CD分子等の発現増加が認められたが、22時間暴露時には、この関連遺伝子の発現増加は顕著に認められなかった。昨年度のクロルピリフォス暴露時の解析の際、代償的に吸入暴露影響を軽減するメカニズムが存在することが示唆され、関与する分子としてCyr61遺伝子が見いだされた。ダイアジノン暴露時でもクロルピリフォス暴露時同様、Cyr61遺伝子の発現増加が、6時間よりも22時間暴露時の方が持続的に、また有意に認められた。Cyr61遺伝子の発現増加が2時間単回暴露及び6時間×7日間暴露と比較し、22時間×7日間暴露時に強く誘導される現象は、先行研究ならびに本研究にて検討した物質の内、トルエン、キシレン、スチレン、テトラデカン、パラジクロロベンゼン、クロルピリフォス及びダイアジノンにて観察されたが、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒドの場合は認められなかった。Cyr61が機能不全を来す状況においては、肺の毒性症状が経時的に増悪する可能

性が考えられ、このことは健康被害の未然防止、治療の観点から意義深いことと考える。

また、発現コピー数の定量化とともに発現遺伝子の組織内局在を明らかにするために、セレスター・レキシコ・サイエンシズ（株）及び（株）ベリタスとの in situ hybridization解析の技術開発に関する共同研究を実施した。

このように、シックハウスレベルの極低濃度暴露に於いても、網羅的遺伝子発現解析手法により昇華性又は難揮発性の化学物質の極低濃度経気道暴露によって生じる生体反応変化を予測することが可能であることが示唆された。

#### A. 研究目的

本研究は、化学物質リスク評価法の基盤整備として、日常生活に於いて使用あるいは受動的に暴露される様々な化学物質の安全性確保の為に毒性発現メカニズムに基づいた、より迅速、定量的、且つ、高精度な吸入毒性評価システムを構築することを目的とする。特に、シックハウス症候群の様に、人における被害報告濃度と実験動物の器質変化濃度の乖離が指摘されてきた極低濃度吸入毒性への理論的及び現実的な対応を包含することを目指すものである。

先行3年間研究（厚労科研・化学物質リスク研究事業「化学物質の経気道暴露による毒性評価手法の開発、高度化に関する研究」（H17-化学一般-003））に於いて、「厚生労働省シックハウス問題に関する検討会」が掲げる13物質の内、ホルマリン、トルエンなど6種の気化性物質について同検討会・室内指針値付近の極低濃度における暴露実験を実施し、肺及び肝の網羅的遺伝子発現変動解析によるデータの蓄積及び、インフォマティクス解析により低濃度吸入毒性の特性を示唆する生物学的に興味深い所見が得られている。本研究では、先行研究の成果を踏まえ、上記13物質の内、昇華性又は難揮発性の化学物質の極低濃度吸入

暴露実験の実施と肺を主体とした遺伝子発現変動解析及びデータベース構築を推進する。今年度は、カーバメート系殺虫剤フェノカルブ及び有機リン系殺虫剤ダイアジノンにつき検討した。

#### 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℃ で一晩浸漬し、RNase を不活化する。肝は 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 RNA later を注入し、RNase の不活化を促した後、採取した。その後、RNA 抽出操作までは -80℃ 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 µL 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 µg 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、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、ビオチン化 UTP, CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA はアフィメトリクス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。

得られた肺、肝サンプルについて、我々が開発した 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 マイクロアレイはアフィメトリクス社の GeneChip (Mouse Genome 430 2.0) を用いた。遺伝子発現変動を、我々が開発した「RSort」を用いて、網羅的に解析した。このソフトは、各遺伝子 (probe set: ps) につき、用量、経時変化及び遺伝子の発現コピー数を各軸とした 3 次元グラフにおいて、発現を表す平面につき凹凸を評価し、全ての ps を生物学的に有意な順に並び替えるものである。また、既知情報との照合によるシグナルネットワークの探索は、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.) を用いて行った。

また、発現遺伝子の組織内局在を、現コピー数情報を保って解析する定量的 in situ hybridization (ISH) 技術の開発に向けて、セレスター・レキシコ・サイエンシズ (株) 及び (株) ベリタスとの共同委託研究を実施した。具体的には前者とは、1,000 mg/kg サリドマイド単回経口投与の際の肺切片 (組織固定条件: 4°C、4 時間) について、陽性対照遺伝子と 2 遺伝子についての ISH を実施し、後者ではラット腎切片を用いて、組織固定条件がより柔軟なプロトコールである ISH を陽性対照遺伝子について実施した。

#### C. 研究結果及び考察

本年度はダイアジノン (Diazinon; 分子量: 304.35、Cas No. : 333-41-5、lot No. 8170X、SZE8170X、純度 98.3%、Sigma-Aldrich) 及び、フェノブカルブ (Fenobucarb: 分子量: 207.3、Cas No. : 3766-81-2、純度 97.4% (ガスクロ用標準品)、Sigma-Aldrich) についてデータ解析を進めた。12 週齢の雄性 C57BL/6J マウス (日本チャールスリバー) に経気道暴露 (4 用量、16 群構成、各群 3 匹) させ、2 時間単回暴露 (2、4、8、24 時間後)、6 時間/日 × 7 日間暴露 (6、22、70、166 時間後) 及び 2 2 時間/日 × 7 日間暴露 (22、70、166、190 時間後) を検討し、得られたマウス肺及び肝を採取して網羅的遺伝子発現解析を行った。ダイアジノンの指針値は 0.02 ppb、暴露目標値は 0.02、0.07 及び 0.2 ppb、他方フェノブカルブの指針値は 3.8 ppb、暴露目標値 3.8、12.0 及び 38.0 ppb である。

ダイアジノン及びフェノブカルブの検討を計画するに際し、両化合物とも分析用

の高純度製品を単一ロットで調達すること難しく（商社を通じて世界各国より調達してもバブリングによる発生に最低限度必要な100g程度しか購入できなかった）、従って、一つの化合物を2施設にまたがって実施することが困難となったことから、フェノバルブは2時間曝露、ダイアジノン<sup>®</sup>は6及び22時間の7日間曝露について検討することとした。

#### C-1: ダイアジノン極低濃度経気道曝露時の遺伝子発現変動解析:

以下に、6時間/日×7日間曝露と22時間/日×7日間曝露、それぞれについて、肺及び肝における解析結果を示す。

##### C-1-1: ダイアジノン[6時間/日×7日間曝露]の「肺」における網羅的遺伝子発現変動解析:

発現が有意(t検定でのP値<0.05)に増加するものとして731 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして134 psが見いだされた。リンパ球やマクロファージが関与する炎症に関係すると考えられる、Nr4a1(22、70及び166時間後、中・高用量)、Cxcr4(166時間後、高用量)、CD52(166時間後、低・高用量)、CD37(70時間後、高用量; 166時間後、中・高用量)、Ly6e及びTnfsf10(166時間後、中・高用量)、CD40及びIl2rg(166時間後、高用量)、CD79b、Ly6d及びSell(70時間後、高用量; 166時間後、低・中・高用量)遺伝子の有意な発現増加が認められた。IPAによる検索では特定のシグナルネットワークは抽出されてこなかった。したがって、肺において炎症に関係するシグナルが活性化

されている可能性が示唆された。

細胞増殖に関与する遺伝子として、Kit(166時間後、低・中・高用量)及びMyct1(166時間後、中・高用量)遺伝子の有意な発現増加が認められたが、細胞増殖に関与するその他の遺伝子の顕著な発現変動は認められなかった。トランスポーター遺伝子では、Slc25a30(166時間後、中・高用量)、Slc20a2(166時間後、高用量)遺伝子の有意な発現増加が認められた。また、肺における機能が不明であるが発現増加が顕著に認められた遺伝子として、Sox11(166時間後、中・高用量)、Dtx3l(70及び166時間後、中・高用量)、Stk4(70時間後、高用量; 166時間後、中・高用量)およびHhex(22時間後、低・中・高用量; 70時間後、中・高用量; 166時間後、高用量)遺伝子が認められた。これらの発現上昇の意味付けは困難であるが、発生に関与する遺伝子が多く、この点、興味深い。

発現が有意(t検定でのP値<0.05)に減少するものとして2,675 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして98 psが見いだされた。現時点で有害影響に関係する遺伝子あるいはシグナルネットワークは見いだせなかった。またIPAによる検索では特定のシグナルネットワークは抽出されなかった。

##### C-1-2: ダイアジノン[6時間/日×7日間曝露]の「肝」における網羅的遺伝子発現変動解析:

発現が有意(t検定でのP値<0.05)に増加するものとして1,045 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして109 psが見いだされた。

リンパ球やマクロファージが関与する炎症に関係すると考えられる、Nr4a1(22 時間後、高用量；166 時間後、中・高用量)、Il1b(22 時間後、高用量；70 時間後、中用量)、Cxc112(22 時間後、高用量；166 時間後、低・中・高用量)、Cd276 及び Cd9912(6 時間後、高用量) 遺伝子の有意な発現増加が認められたが、IPA による検索では特定のシグナルネットワークは抽出されてこなかった。したがって、肝において炎症に関係するシグナルが活性化されている可能性が示唆された。また細胞障害時の修復に関与する Fst 遺伝子(22、70 及び 166 時間後、高用量)の発現増加が認められた。トランスポーター遺伝子では Slc6a6(22 及び 166 時間後、高用量) 遺伝子の有意な発現増加が認められた。

発現が有意(t 検定での P 値<0.05)に減少するものとして 2,262 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして 222 ps が見いだされた。現時点で有害影響に関係する遺伝子あるいはシグナルネットワークは見いだせなかった。また IPA による検索では特定のシグナルネットワークは抽出されなかった。

### C-1-3: ダイアジノン[22時間/日×7日間暴露]の「肺」における網羅的遺伝子発現変動解析：

発現が有意(t 検定での P 値<0.05)に増加するものとして 2,641 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして 92 ps が見いだされた。現時点で有害影響に関係する遺伝子あるいはシグナルネットワークは見いだせなかった。

また IPA による検索では特定のシグナルネットワークは抽出されてこなかった。

昨年度のクロルピリフォス暴露時の解析の際、代償的に吸入暴露影響を軽減するメカニズムが存在することが示唆され、関与する分子として Cyr61 遺伝子が見いだされた。このことを踏まえ、ダイアジノン暴露時の Cyr61 遺伝子の発現変動を検討したところ、クロルピリフォス暴露時同様、Cyr61 遺伝子の発現増加が 6 時間よりも 22 時間暴露時の方が持続的に、また有意な増加が認められた(投与 22 時間後、低用量；70 時間後、中・高用量、166 時間後、低・中用量)。

この Cyr61 遺伝子について、その発現変化を、[6時間/日×7日間暴露]及び[22時間/日×7日間暴露]の際とで比較した図を示す(図1)。図は下記のように、各遺伝子につき濃度依存性、経時変化、遺伝子発現量についての3次元グラフとして示した。具体的には、縦軸(Z軸)に絶対値化した(細胞1個あたりのコピー数)mRNAの発現量をと、X、Y軸にはそれぞれ、投与用量と投与後経過時間をと、各条件のn=3の平均値曲面で表示する。加えてこの平均曲面の上下に標準偏差(SD)平面(薄い色)を示す。



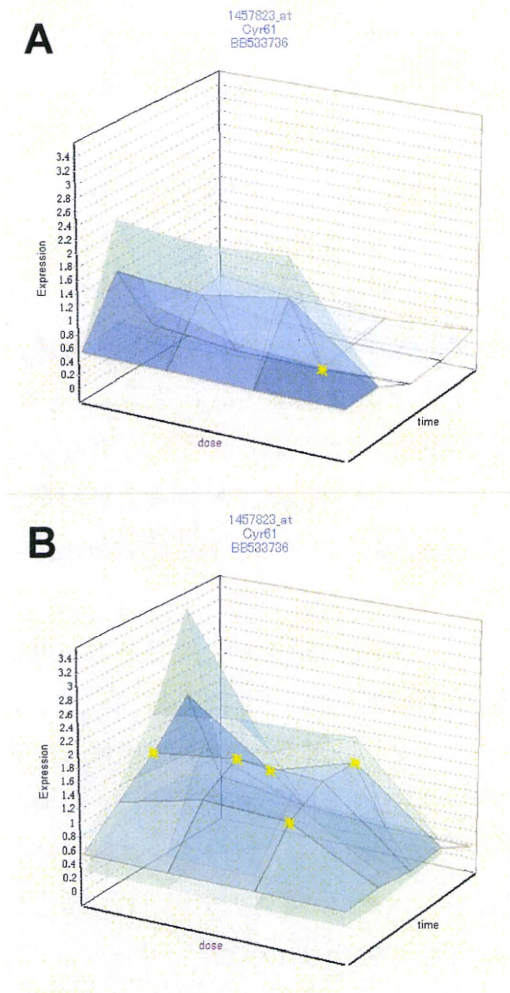


図1 Cyr61 (cysteine rich protein 61)の遺伝子発現変動

A: [6時間/日×7日間暴露]、B: [22時間/日×7日間暴露]。溶媒群と投与群の間の有意差の検定を Student の t 検定によりおこない P 値が 0.05 未満の場合を有意と判定し、図中に★を付した。

発現が有意(t 検定での P 値<0.05)に減少するものとして 1,145 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして 47 ps が見いだされた。IPA

による検索では特定のシグナルネットワークは抽出されなかった。また現時点で有害影響に関する遺伝子あるいはシグナルネットワークは見いだせなかった。

C-1-4: ダイアジノン[22時間/日×7日間暴露]の「肝」における網羅的遺伝子発現変動解析:

発現が、有意(t 検定での P 値<0.05)に増加するものとして 838 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして 144 ps が見いだされた。現時点で有害影響に関する遺伝子あるいはシグナルネットワークは見いだせなかった。また IPA による検索では、特定のシグナルネットワークは抽出されなかった。

発現が有意(t 検定での P 値<0.05)に減少するものとして 2,589 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして 134 ps が見いだされた。現時点で有害影響に関する遺伝子あるいはシグナルネットワークは見いだせなかった。また IPA による検索では特定のシグナルネットワークは抽出されなかった。減少が著しい遺伝子として、Lpin1 遺伝子あるいはアポトーシスに関連する Ddit4(両者共に投与 190 時間後、中・高用量)遺伝子が認められたが、他のアポトーシス関連遺伝子の顕著な発現変動はないことから、アポトーシスと関連する可能性は低いものとする。

C-2: フェノバルブ極低濃度経気道暴露時の遺伝子発現変動解析:

以下に、2時間単回暴露について、肺と肝における解析結果を示す。

C-2-1: フェノブカルブ[2時間単回暴露]の「肺」における網羅的遺伝子発現変動解析:

発現が有意(t検定でのP値<0.05)に増加するものとして929 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして26 psが見いだされた。現時点で有害影響に関係する遺伝子あるいはシグナルネットワークは見いだせなかった。またIPAによる検索では特定のシグナルネットワークは抽出されなかった。

発現が有意(t検定でのP値<0.05)に減少するものとして1,329 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして8 psが見いだされた。現時点で有害影響に関係する遺伝子あるいはシグナルネットワークは見いだせなかった。またIPAによる検索では特定のシグナルネットワークは抽出されなかった。

C-2-2: フェノブカルブ[2時間単回暴露]の「肝」における網羅的遺伝子発現変動解析:

発現が有意(t検定でのP値<0.05)に増加するものとして2,002 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして85 psが見いだされた。酸化ストレスに関係すると考えられる、Sod1(投与24時間後、中・高用量)、Sod2(投与24時間後、高用量)、Prdx1(投与24時間後、高用量)、Prdx6(投与24時間後、高用量)、Txn11(投与24時間後、高用量)、Ephx1(投与24時間後、高用量)、Ephx2(投与24時間後、高用量)、Gpx4(投与24時間後、高用量)及びGsta3(投与24時間後、高用量)等の遺伝子の有意な発現増加(いずれ

も暴露24時間後)が認められ、IPAによる検索でもこのシグナルネットワークが抽出された。したがって、肝において酸化ストレスが誘発されている事が示唆された。

発現が有意(t検定でのP値<0.05)に減少するものとして1,677 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして16 psが見いだされた。現時点で有害影響に関係する遺伝子あるいはシグナルネットワークは見いだせなかった。またIPAによる検索では特定のシグナルネットワークは抽出されなかった。

C-3: 発現遺伝子の組織内局在を発現コピー数の定量化と共に解析するISH技術の開発:

発現遺伝子の組織内局在を発現コピー数の定量化と共に解析するISH技術の開発に向けて、セレスター・レキシコ・サイエンシズ(株)及び(株)ベリタスとの共同研究を実施した。セレスター・レキシコ・サイエンシズ(株)との共同研究により、1,000 mg/kg サリドマイド単回経口投与の際(採取時間:投与2、4、8、24時間後、1群3匹、計24匹)の肺切片(組織固定条件:4℃、4時間)について、陽性対照遺伝子Uteroglobinと2遺伝子(p21(Cdkn1a)及びZbtb16)についてISHを実施した。その結果、全ての遺伝子について、定量性をもつての染色に成功し、マイクロアレイ測定値に比例してUteroglobinでは4時間時に、p21では2、4時間時に誘導が認められ、Zbtb16は誘導が認められなかった。Uteroglobinは終末細気管支上皮のみに発現していた。したがって、本ISH技術は発現コピー数の定量化とともに発現遺伝子の



組織内局在を明らかにすることが可能であることが確認された。この ISH 技法は厳密な組織固定条件（温度・時間等）を要求することから、重要な事例の検出には再実験を実施することで対応することとし、定量的局在確認の方策が確立された。しかし、過去に採取した検体に適応する際には適用が困難であるため、組織固定条件がより柔軟なプロトコルを有する ISH 技術を有する（株）ベリタスとの共同研究を行った。確認試験としてラット腎切片を用いて、陽性対照遺伝子 AQP2 遺伝子について ISH を実施したところ、集合管周囲細胞における特異的な発現を検出することが出来、Percollome 解析により見出された発現変動遺伝子の組織内局在を明らかにするのに適した実用的な技術であることが確認された。吸入暴露した際のマウス肺について本技術を適用する事により、発現コピー数の定量化とともに発現遺伝子の組織内局在を明らかにすることが可能であると考えられる。

#### D. 結論

本年度は、カーバメート系殺虫剤フェノブカルブ（指針値 3.8ppb、暴露目標値 3.8、12.0 及び 38.0ppb）及び難揮発性の有機リン系殺虫剤ダイアジノン（指針値 0.02 ppb、暴露目標値 0.02、0.07 および 0.2 ppb）の経気道暴露（4 用量、16 群構成、各群 3 匹）をおこない、フェノブカルブでは 2 時間単回暴露（2、4、8、24 時間後）、ダイアジノンでは 6 時間/日×7 日間暴露（6、22、70、166 時間後）（＝労働暴露モデル）と及び 2 2 時間/日×7 日間暴露（22、70、166、190 時間後）（＝生活暴露モデル）を検討し、マウス肺、肝の網羅的遺伝子発現デー

タを解析した。

解析の結果、フェノブカルブのシックハウスレベルの極低用量暴露に於いて、2 時間単回暴露時、肺では顕著な発現変動を示す遺伝子は認められなかったが、肝では多くの酸化ストレス関連遺伝子の発現増加が観察され、肝において酸化ストレスが誘発されている事が示唆され、反復暴露により酸化ストレスによる細胞障害が顕在化する可能性が示唆された。上記した通り、分析用の高純度製品を単一ロットで調達すること難しかったため、7 日間暴露実験は検討できなかったが、今後、長期暴露による実験が必要と考える。

ダイアジノンの 0.02 ppb 以上という極低濃度暴露に於いて、肺及び肝、双方に於いてシグナル伝達に関わる多くの遺伝子発現変動が認められ、有害性を示唆するシグナルとして、ダイアジノン[6 時間/日×7 日間暴露]の肺及び肝共に、リンパ球やマクロファージが関与する炎症に関わる遺伝子であるオーファン受容体 Nr4a1 遺伝子や様々な CD 分子等の発現増加が認められた。22 時間暴露時では、この関連遺伝子の発現増加は顕著に認められなかった。

昨年度のクロルピリフォス暴露時の解析の際、代償的に吸入暴露影響を軽減するメカニズムが存在することが示唆され、関与する分子として Cyr61 遺伝子が見いだされた。今年度検討したダイアジノン暴露時でもクロルピリフォス暴露時同様、Cyr61 遺伝子の発現増加が、6 時間よりも 22 時間暴露時の方が持続的に、また有意に認められた。文献検索により、Cyr61 分子が酸素過剰症(高酸素症)モデルマウスでの肺上皮細胞の細胞死を防御する、という報告を見



いだした(Jin Y et al., Am J Respir Cell Mol Biol 33: 297-302, 2005)。この報告は上述した示唆を支持するものと考えられる。

そこで、Cyr61 遺伝子の発現増加が2時間単回暴露及び6時間×7日間暴露と比較し、22時間×7日間暴露時に持続的に強く誘導される現象が、先行研究にて検討した物質暴露の際に認められるか否かを検証した。その結果、トルエン、キシレン、スチレン、テトラデカン、パラジクロロベンゼン、クロルピリフォス及びダイアジノンの暴露の際はこの現象が観察された。他方、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒドの場合は認められなかった。このことはCyr61が機能不全を来す状況においては、肺の毒性症状が経時的に増悪する可能性が考えられ、このことはシックハウス症候群等の健康被害の未然防止、治療の観点から意義深いことと考える。

また、発現コピー数の定量化とともに発現遺伝子の組織内局在を明らかにするために、セレストター・レキシコ・サイエンシズ(株)及び(株)ベリタスとのISH解析の技術開発に関する共同研究を実施した結果、Percellome解析により見出された発現変動遺伝子の組織内局在を明らかにするのに適した実用的な技術基盤が整備できた。さらに、遺伝子発現変動の組織内局在が明らかに存在することを確認したことから、ISHから得る情報によって解析内容の格段の高精度化が期待される。

このように、シックハウスレベルの極低用量暴露に於いても、網羅的遺伝子発現解析手法により極低濃度経気道暴露によって生じる生体反応変化を予測することが可能であることが示唆された。すなわち、網羅

的遺伝子発現解析手法は、ヒトに於ける症候発現濃度を動物に暴露した場合にも有効な生理反応検出手法として活用できることが示された。これにより、これまで指摘されてきた、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隔たりがあるという課題を遺伝子発現解析手法が克服しうることが示された。

今後さらなる研究により、13物質の中から、特に、生体防御系の発動が弱く、反復暴露により生体反応が増強する物質については、実際にシックハウスレベルの低濃度での長期暴露により、電子顕微鏡的あるいは蛋白マーカー的に病巣を観測できるものがあると考えられる。また、肝の反応が明瞭に観測されていることは、肺から血行性と考えられる機構により遠隔臓器へ影響が波及することを示しており、シックハウス症候群等で問題となる全身症状、特に中枢神経系を介するものについても、確実に病態を追究できるものと期待される。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

Yoshida T, Sekine T, Aisaki K, Mikami T, Kanno J, Okayasu I., CITED2 is activated in ulcerative colitis and induces p53-dependent apoptosis in response to butyric acid., J Gastroenterol 2011 46(3): 339-49.

Arase S, Ishii K, Igarashi K, Aisaki K, Yoshio Y, Matsushima A, Shimohigashi Y, Arima K, Kanno J, Sugimura Y., Endocrine Disrupter Bisphenol A Increases In Situ Estrogen Production in the Mouse Urogenital Sinus., Biol Reprod. 2011 84(4):734-42.

Atsushi Baba, Fumiaki Ohtake, Yosuke Okuno, Kenichi Yokota, Maiko Okada, Yuuki Imai, Min Ni, Clifford A Meyer, Katsuhide Igarashi, Jun Kanno, Myles Brown, and Shigeaki Kato, Signal-sensing activation of a histone lysine demethylase complex, *Nature Cell Biology*, accepted 2011.3

菅野 純、Percellome トキシコゲノミクスの進捗、医学のあゆみ 医歯薬出版株式会社 Vol.236 no.12, p1125-1126, 2011

## 2. 学会発表

Jun Kanno, Katsuhide Igarashi, Kentaro Tanemura, Hirotugu Asano, Kinichi Nakashima, Glucocorticoid induces expression of astrocyte marker GFAP mRNA in mouse neural stem cells. 14th International Congress of Endocrinology, 2010.3.29, Kyoto, poster

菅野 純、インフォマティクス局面にある Percellome トキシコゲノミクスの食品・食品添加物への適用、第37回日本トキシコロジー学会 学術年会(2010.6.16) (沖縄)、口演

北嶋 聡、菅野 純、Percellome 発生トキシコゲノミクスの進捗、第37回日本トキシコロジー学会 学術年会(2010.6.16) (沖縄)、口演

種村 健太郎、五十嵐 勝秀、松上 稔子、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、脳発生-発達期の神経シグナルかく乱による遅発性中枢影響解析-幼若期雄マウスへのイボテン酸投与による脳高次機能障害について-、第37回日本トキシコロジー学会 学術年会(2010.6.18) (沖縄)、口演

菅野 純、相崎健一、北嶋 聡、Percellome トキシコゲノミクスの抗がん剤研究への応用、第69回日本癌学会学術総会(2010.9.24) (大阪)口演

Natalia Polouliakh, Jun Kanno, Yukiko Matsuoka, Ken-Ichi Aisaki, Richard Nock, Frank Nielsen, Keigo Oka, Satoshi Kitajima and Hiroaki Kitano, Discovery of Gene Network Regulated by the Toxicity Equivalent Factor of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD) and 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzofuran (TCDF) chemicals. the 11th International Conference on System Biology(2010.10.11) (Edinburgh, UK), Poster

F. 知的財産所有権の出願・登録状況(予定も含む)

### 1. 特許取得

(1) 特許出願 2010年12月、「競合的ハイブリダイゼーションにおける遺伝子データの補正方法及び補正装置」

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 定量性ISH評価研究結果報告書

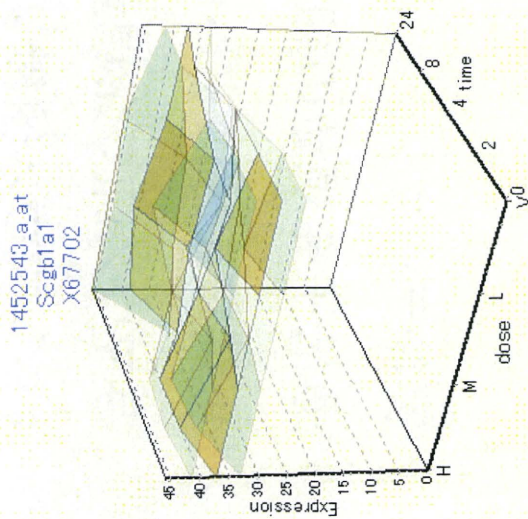
### 実施テーマ

遺伝子発現量の組織化学的な測定法として定量性ISH(Q-ISH)法の可能性を評価すべく、Percollome解析によって化学物質サリドマイド投与マウス肺で発現量とその変動が確認されている複数の遺伝子について、マウス組織切片上の遺伝子発現を定量性ISH法による蛍光画像から測定し、Percollome解析データとの相関性を確認する。特に発現変動領域について確認する。

# 肺定量 ISH候補遺伝子

サリドマイド経口単回投与(1000mg/kg)後の肺Percellome解析の結果から、下記の3遺伝子を候補遺伝子として選択した。

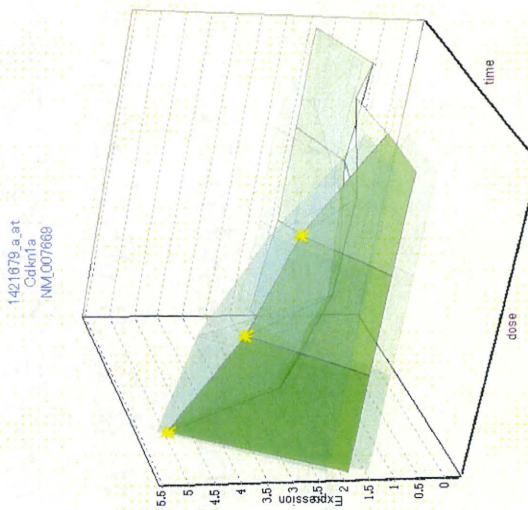
## Uteroglobin



secretoglobin, family 1A, member 1

陽性対象遺伝子

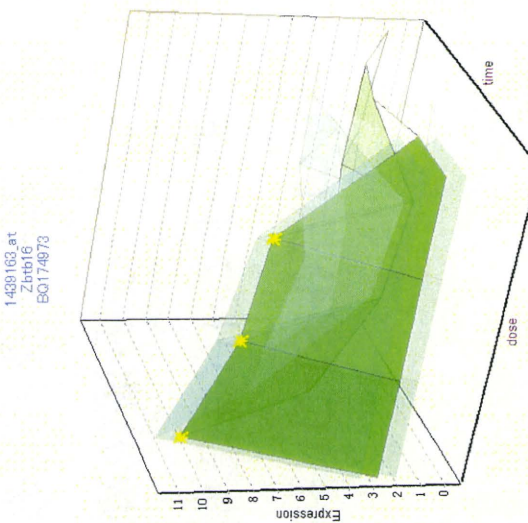
## Cdkn1a



cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)

発現変化検討遺伝子

## Zbtb16

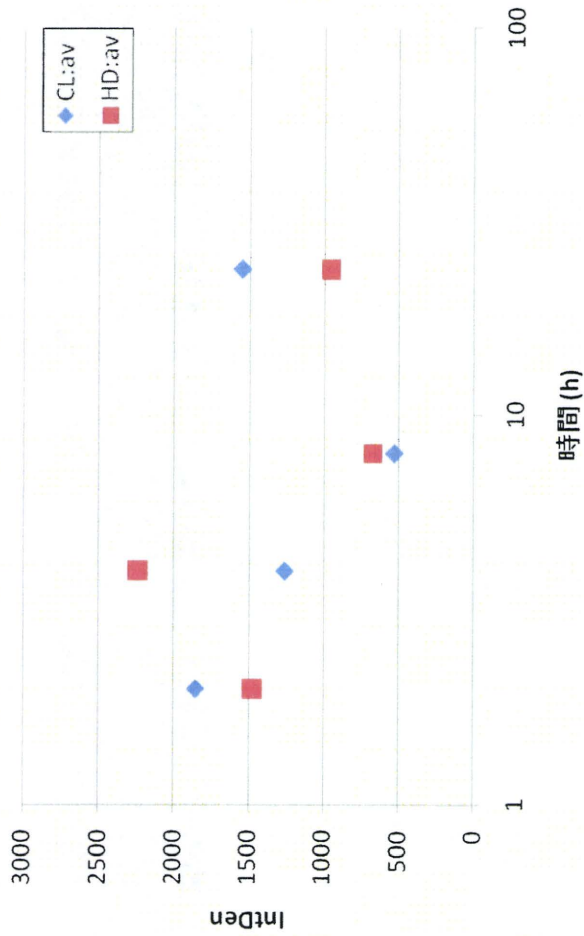


zinc finger and BTB domain containing 16

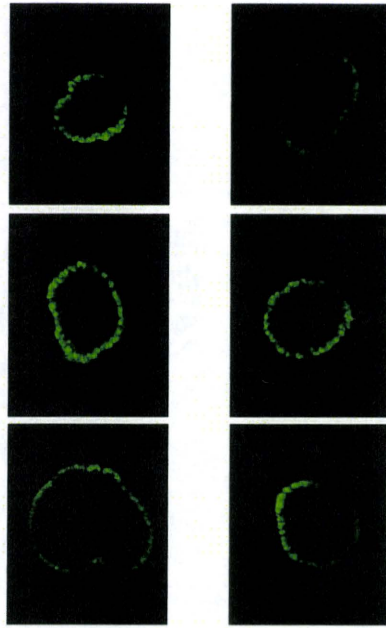
発現変化検討遺伝子

# Uteroglobin

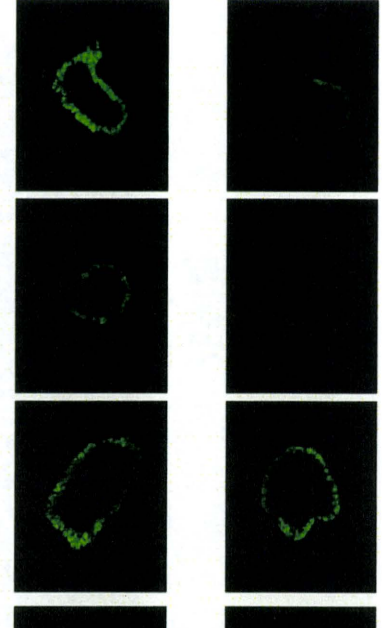
Uteroglobin: Region A



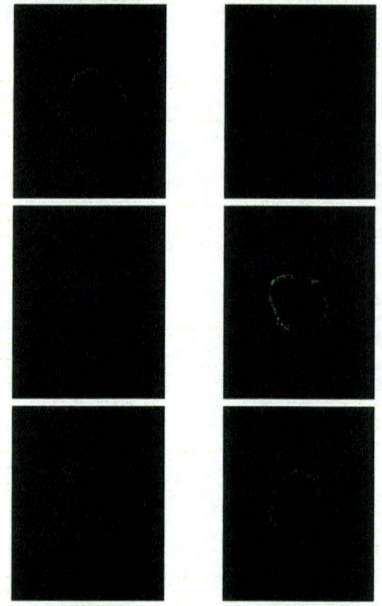
2時間



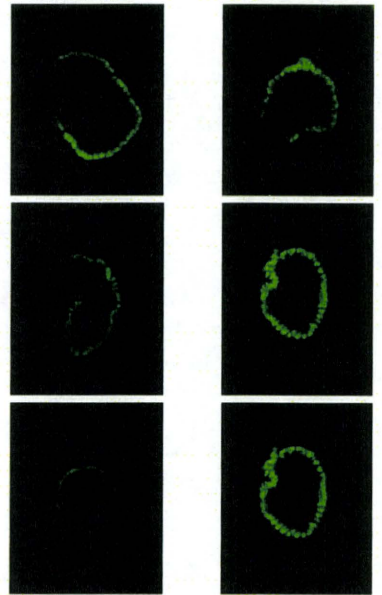
24時間



8時間



4時間

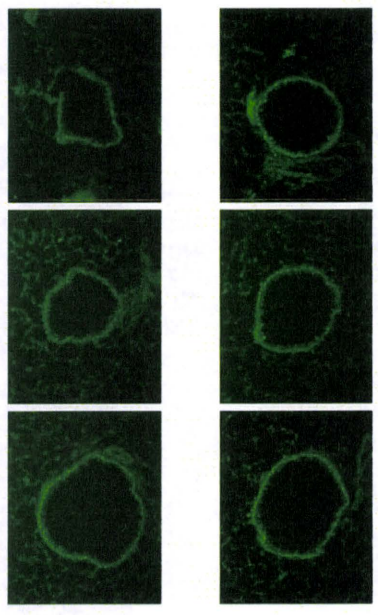




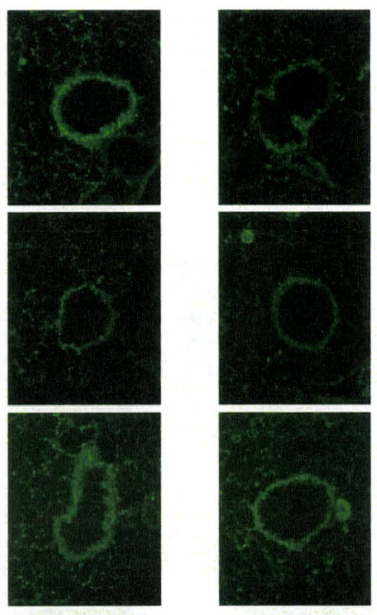
# Cdkn1a



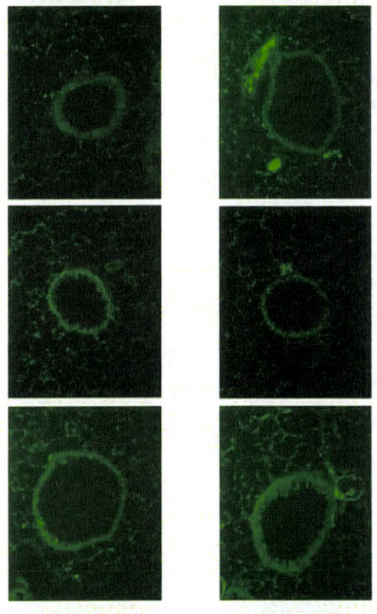
2時間



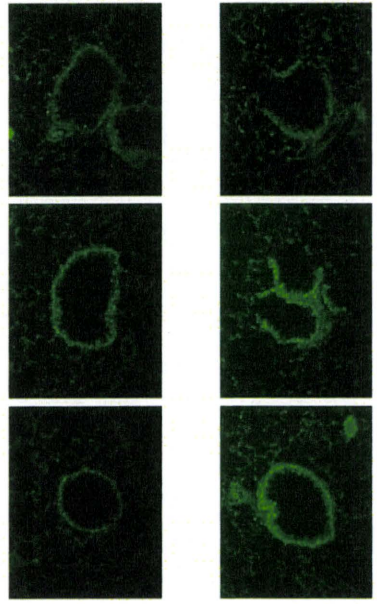
24時間



8時間

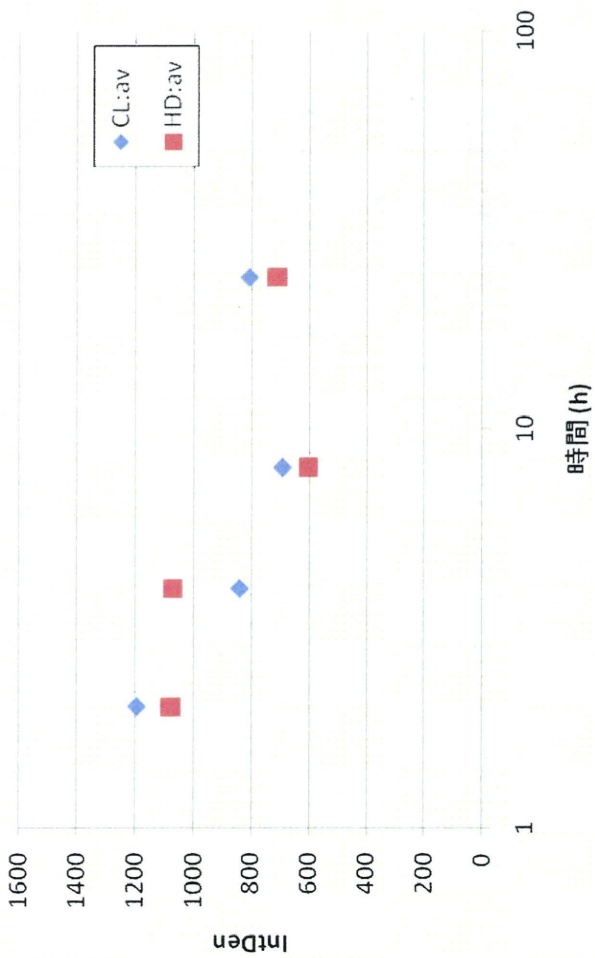


4時間

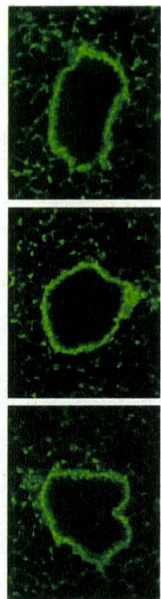
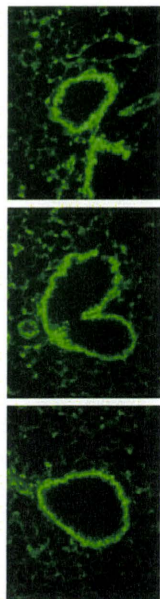


# Zbtb16

Zbtb16: Region A



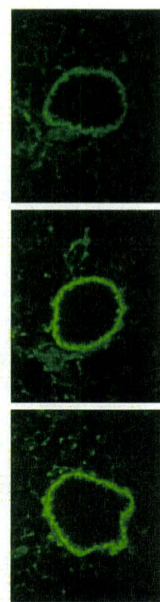
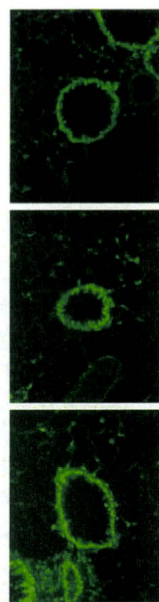
2時間



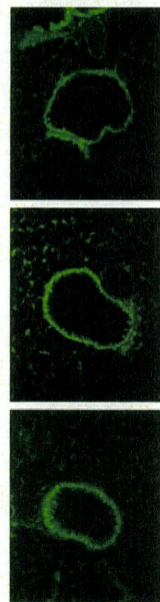
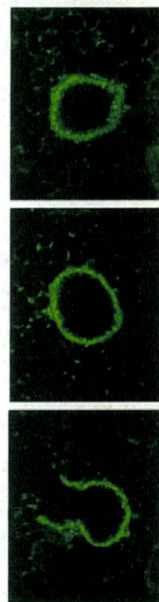
Vehicle

Thalidomide

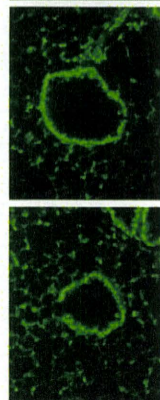
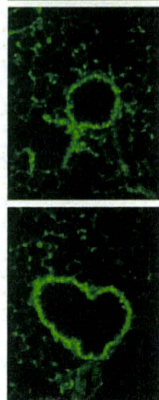
24時間



8時間



4時間





## 結果概要

- 全遺伝子について、定量性をもって染色に成功した
- Percellome測定値に対応し、Uteroglobinでは4時間時に、p21では2, 4時間時に高誘導が認められ、Zbtb16は一定した発現が認められた。
- Uteroglobinは終末細気管支上皮のみに発現していた。
- 本ISH技術により、発現コピー数の定量化とともに発現遺伝子の組織内局在を明らかにすることが可能であることが確認された。

## QuantiGene ViewRNA: 手法検討

### 検討目的

セレスター・レキシコサイエンシズのISHプロトコルは厳密な組織固定条件を必要とする。そのため、過去に採取した検体に対応可能な、組織固定条件がより柔軟なプロトコルを有する、QuantiGene ViewRNAが適用可能か、陽性対象遺伝子を用いて検討する。

# QuantiGene ViewRNAの原理

ターゲットプローブ上にbranched DNAを構築し、ラベル検出する

## mRNAの補足(ターゲットプローブ)



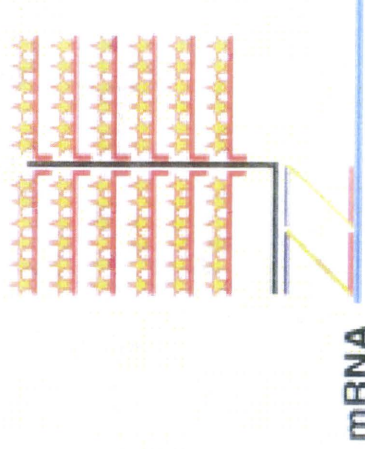
赤: mRNAにハイブリする配列 (20bp)

黄: リンカー (10-20bp)

青: 検出用プローブにハイブリする配列 (20bp)

2ヶのターゲットプローブのペアで特異性を担保

## mRNAの検出

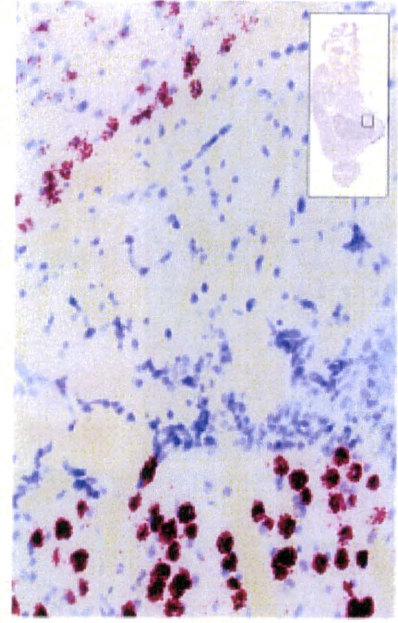


mRNA上に構築されたbranched DNA複合体

- 2ヶペアでハイブリしたターゲットプローブにpre-Ampがハイブリし、Ampをハイブリさせ、labelにて検出する。
- Labelは蛍光(4色)、アルカリフォスファターゼが利用可能

## 実施例

(カタログ記載図)



# 実験手順と特徴

## 染色用スライド調製まで

1. 組織採取 & 固定 (10%ホルマリ  
ン中、4°C一晩を基本。それ以  
上の固定でも賦活化条件を検  
討することで対応可能)
2. パラフィンブロック作製 (DEPC  
水を用いる必要は無い)
3. 薄切
4. **10%ホルムアルデヒド固定** (過  
固定させ、固定状態を一定化  
する)
5. 脱パラ

## ハイブリ & 染色

ハイブリ温度は全て40°C

1. **賦活化** (煮沸処理とprotease処理:  
処理時間の組合せ10種類を検討す  
れば大抵は染まるとのこと)
2. ターゲットプローブハイブリ
3. Branched DNA構築用ハイブリ
  - i. Pre-Amp
  - ii. Amp
  - iii. Label (蛍光 or AP)
4. FastRed発色 (蛍光法では不要)
5. Hematoxylin染色

## 特徴:

- **あえて過固定の状態にした後に賦活化処理**するプロトコルを採用することで、一定条件でのハイブリ & 染色を狙っている。
- ターゲットプローブごとに条件検討する必要が無い
- 従来法に比べ、ハイブリ & 染色の操作が簡便である



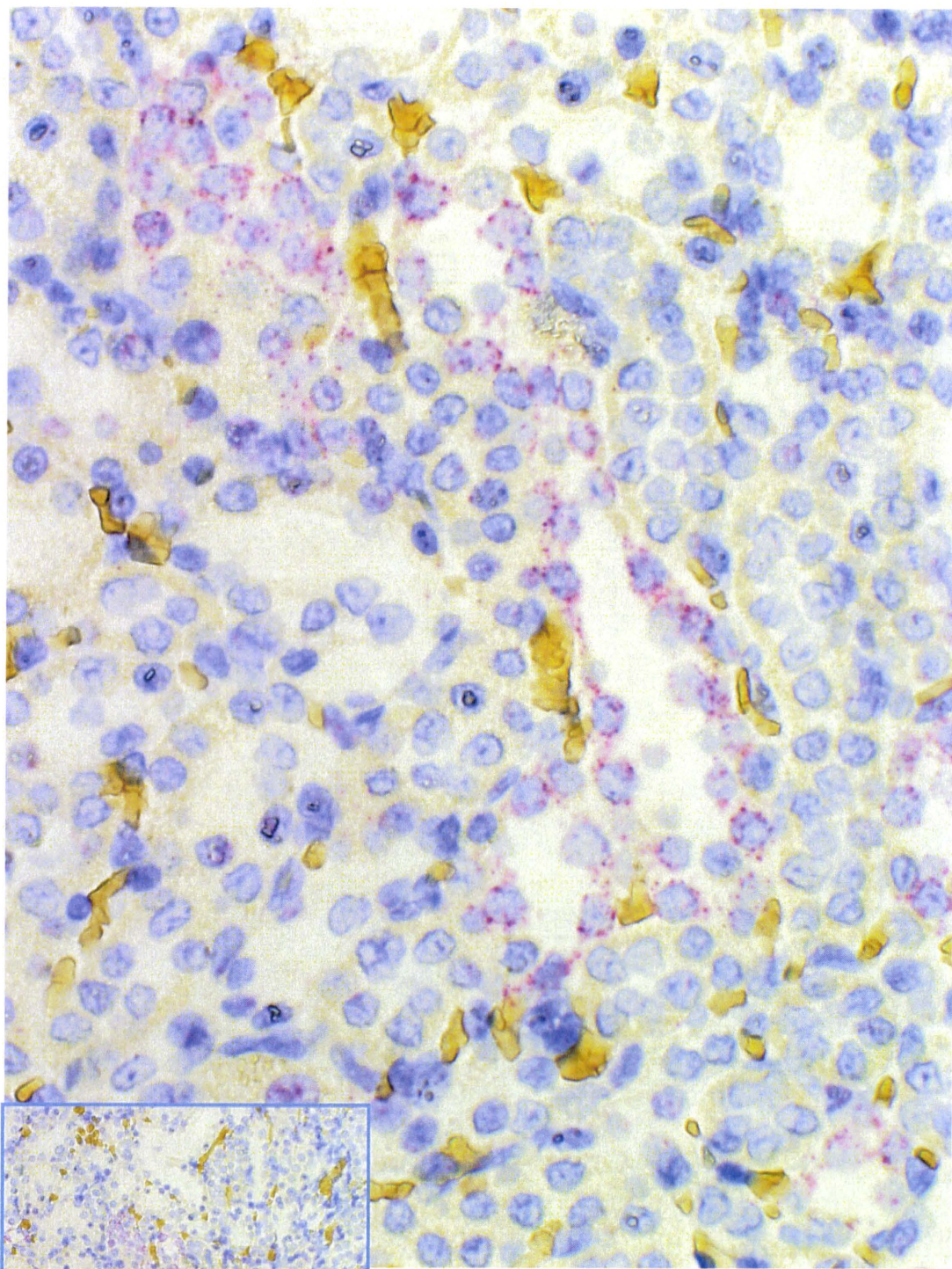
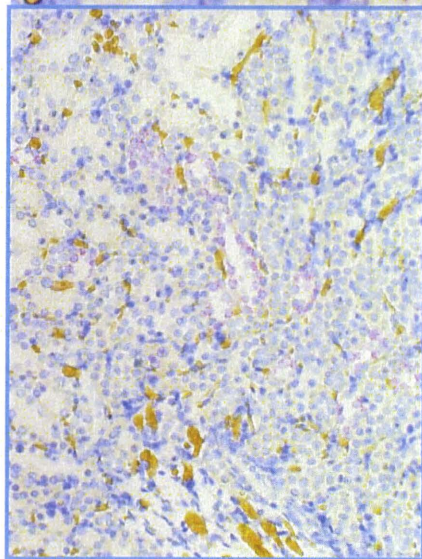
# 検討結果

## Rat kidney: Aquaporin 2 (AQP2)

Paraffin section

Substrate: FastRed

Counterstain: Haematoxylin



各ドットがmRNA  
1コピーに相当