

表 1 吸入チャンバー内環境の測定結果:温度(22時間暴露)

単位:°C

チャンパー 群	CH-1 対照群	CH-2 0.02 ppb 群	CH-3 0.07 ppb 群	CH-4 0.2 ppb 群
全期間				
平均値	22.4	22.5	22.5	22.5
標準偏差	0.1	0.1	0.1	0.1
日別平均値				
7月13日	22.4	22.5	22.5	22.5
7月14日	22.4	22.4	22.5	22.5
7月15日	22.4	22.5	22.5	22.5
7月16日	22.4	22.5	22.5	22.5
7月17日	22.4	22.5	22.5	22.5
7月18日	22.4	22.5	22.5	22.5
7月19日	22.4	22.5	22.5	22.5
7月20日	22.5	22.5	22.5	22.5
7月21日	22.5	22.5	22.5	22.5

表 2 吸入チャンバー内環境の測定結果:湿度(22時間暴露)

単位:%

チャンパー 群	CH-1 対照群	CH-2 0.02 ppb 群	CH-3 0.07 ppb 群	CH-4 0.2 ppb 群
全期間				
平均値	51.4	52.0	52.3	49.9
標準偏差	1.2	1.5	1.7	1.8
日別平均値				
7月13日	52.3	52.8	53.0	50.2
7月14日	51.9	52.1	52.3	49.4
7月15日	51.5	52.1	52.2	49.6
7月16日	51.4	51.9	52.2	49.8
7月17日	51.2	51.8	52.1	49.7
7月18日	51.1	51.6	51.9	49.5
7月19日	50.9	51.0	51.4	49.0
7月20日	51.0	51.5	52.2	50.2
7月21日	52.8	54.9	56.3	54.1

表 3 吸入チャンバー内環境の測定結果:換気量と換気回数(22時間暴露)

単位:換気量 L/min 換気回数 回/時

チャンバー 群	CH-1		CH-2		CH-3		CH-4	
	対照群		0.02 ppb 群		0.07 ppb 群		0.2 ppb 群	
	換気量	換気回数	換気量	換気回数	換気量	換気回数	換気量	換気回数
全期間								
平均値	213.1	12.1	213.0	12.1	212.9	12.1	213.4	12.1
標準偏差	1.0	0.1	1.3	0.1	3.3	0.2	1.3	0.1
日別平均値								
7月13日	213.2	12.1	212.6	12.0	212.5	12.0	213.3	12.1
7月14日	213.8	12.1	212.7	12.0	212.3	12.0	212.5	12.0
7月15日	214.0	12.1	213.6	12.1	213.7	12.1	213.7	12.1
7月16日	213.9	12.1	212.7	12.0	212.8	12.0	213.3	12.1
7月17日	213.5	12.1	213.0	12.1	213.2	12.1	213.6	12.1
7月18日	213.0	12.1	213.2	12.1	213.9	12.1	213.3	12.1
7月19日	212.4	12.0	213.1	12.1	214.9	12.2	213.4	12.1
7月20日	211.7	12.0	213.0	12.1	213.5	12.1	213.8	12.1
7月21日	212.0	12.0	213.5	12.1	203.3	11.5	214.8	12.2

表 4 吸入チャンバー内の被験物質濃度(22時間暴露)

単位:ppb

	対照群	0.02 ppb群	0.07 ppb群	0.2 ppb群
7月13日午後0時から7月14日午前10時	0	0.020	0.061	0.204
7月14日午後0時から7月15日午前10時	0	0.026	0.083	0.262
7月15日午後0時から7月16日午前10時	0	0.023	0.071	0.232
7月16日午後0時から7月17日午前10時	0	0.019	0.069	0.189
7月17日午後0時から7月18日午前10時	0	0.020	0.074	0.202
7月18日午後0時から7月19日午前10時	0	0.020	0.067	0.206
7月19日午後0時から7月20日午前10時	0	0.020	0.069	0.197
平均濃度	0	0.021	0.070	0.213
標準偏差	0	0.002	0.005	0.011

表 5 解剖時体重及び肝臓重量(22時間暴露)

## 1日目解剖

群	動物番号	解剖時体重(g)	肝臓重量(g)
対照群	1001	25.2	1.332
	1002	26.3	1.387
	1003	27.2	1.493
0.02 ppb 群	1101	26.3	1.418
	1102	24.7	1.289
	1103	25.2	1.462
0.07 ppb 群	1201	25.6	1.328
	1202	26.8	1.416
	1203	27.0	1.415
0.2 ppb 群	1301	26.3	1.395
	1302	27.5	1.501
	1303	25.0	1.413

## 3日目解剖

群	動物番号	解剖時体重(g)	肝臓重量(g)
対照群	1004	25.5	1.419
	1005	24.7	1.195
	1006	26.0	1.281
0.02 ppb 群	1104	25.6	1.252
	1105	25.7	1.321
	1106	27.1	1.288
0.07 ppb 群	1204	25.0	1.242
	1205	26.9	1.381
	1206	24.5	1.256
0.2 ppb 群	1304	25.7	1.261
	1305	26.0	1.323
	1306	26.4	1.283

## 7日目解剖

群	動物番号	解剖時体重(g)	肝臓重量(g)
対照群	1007	25.1	1.369
	1008	28.1	1.500
	1009	29.9	1.761
0.02 ppb 群	1107	26.3	1.182
	1108	28.2	1.600
	1109	29.3	1.503
0.07 ppb 群	1207	26.7	1.515
	1208	26.0	1.410
	1209	28.0	1.543
0.2 ppb 群	1307	28.5	1.557
	1308	25.2	1.369
	1309	27.7	1.499

## 暴露終了翌日解剖

群	動物番号	解剖時体重(g)	肝臓重量(g)
対照群	1010	26.1	1.406
	1011	24.7	1.239
	1012	27.1	1.463
0.02 ppb 群	1110	26.9	1.380
	1111	25.4	1.384
	1112	27.6	1.485
0.07 ppb 群	1210	28.2	1.595
	1211	26.1	1.010
	1212	27.3	1.580
0.2 ppb 群	1310	27.2	1.475
	1311	25.4	1.473
	1312	27.8	1.573

表 6 剖検所見(22時間暴露)

## 1日目解剖

群	動物番号	肺	肝臓
対照群	1001	著変なし	著変なし
	1002	著変なし	著変なし
	1003	著変なし	著変なし
0.02 ppb 群	1101	著変なし	著変なし
	1102	著変なし	著変なし
	1103	著変なし	著変なし
0.07 ppb 群	1201	著変なし	著変なし
	1202	著変なし	著変なし
	1203	著変なし	著変なし
0.2 ppb 群	1301	著変なし	著変なし
	1302	著変なし	著変なし
	1303	著変なし	著変なし

## 3日目解剖

群	動物番号	肺	肝臓
対照群	1004	著変なし	著変なし
	1005	著変なし	著変なし
	1006	著変なし	著変なし
0.02 ppb 群	1104	著変なし	著変なし
	1105	著変なし	著変なし
	1106	著変なし	著変なし
0.07 ppb 群	1204	著変なし	著変なし
	1205	著変なし	著変なし
	1206	著変なし	著変なし
0.2 ppb 群	1304	著変なし	著変なし
	1305	著変なし	著変なし
	1306	著変なし	著変なし

## 7日目解剖

群	動物番号	肺	肝臓
対照群	1007	著変なし	著変なし
	1008	著変なし	著変なし
	1009	著変なし	著変なし
0.02 ppb 群	1107	著変なし	著変なし
	1108	著変なし	著変なし
	1109	著変なし	著変なし
0.07 ppb 群	1207	著変なし	著変なし
	1208	著変なし	結節 (3mm)
	1209	著変なし	著変なし
0.2 ppb 群	1307	著変なし	著変なし
	1308	著変なし	著変なし
	1309	著変なし	著変なし

## 暴露終了翌日解剖

群	動物番号	肺	肝臓
対照群	1010	著変なし	著変なし
	1011	著変なし	著変なし
	1012	著変なし	著変なし
0.02 ppb 群	1110	著変なし	著変なし
	1111	著変なし	著変なし
	1112	著変なし	著変なし
0.07 ppb 群	1210	著変なし	著変なし
	1211	著変なし	著変なし
	1212	著変なし	著変なし
0.2 ppb 群	1310	著変なし	著変なし
	1311	著変なし	著変なし
	1312	著変なし	著変なし

表 7 病理組織所見(22時間暴露)

## 1日目解剖

群	動物番号	肺	肝臓
対照群	1001	著変なし	著変なし
	1002	著変なし	著変なし
	1003	著変なし	著変なし
0.02 ppb 群	1101	著変なし	著変なし
	1102	著変なし	著変なし
	1103	著変なし	著変なし
0.07 ppb 群	1201	著変なし	著変なし
	1202	著変なし	著変なし
	1203	著変なし	著変なし
0.2 ppb 群	1301	著変なし	著変なし
	1302	著変なし	著変なし
	1303	著変なし	著変なし

## 3日目解剖

群	動物番号	肺	肝臓
対照群	1004	炎症, 慢性, 巣状 (1+)	著変なし
	1005	著変なし	著変なし
	1006	著変なし	著変なし
0.02 ppb 群	1104	著変なし	著変なし
	1105	著変なし	著変なし
	1106	著変なし	著変なし
0.07 ppb 群	1204	著変なし	著変なし
	1205	著変なし	著変なし
	1206	著変なし	著変なし
0.2 ppb 群	1304	著変なし	著変なし
	1305	著変なし	著変なし
	1306	著変なし	著変なし

## 7日目解剖

群	動物番号	肺	肝臓
対照群	1007	著変なし	著変なし
	1008	著変なし	著変なし
	1009	著変なし	著変なし
0.02 ppb 群	1107	著変なし	著変なし
	1108	著変なし	著変なし
	1109	著変なし	著変なし
0.07 ppb 群	1207	著変なし	著変なし
	1208	著変なし	著変なし*
	1209	著変なし	著変なし
0.2 ppb 群	1307	著変なし	著変なし
	1308	著変なし	著変なし
	1309	著変なし	著変なし

\* 1208 の肝臓に剖検所見で認められた結節は、病理組織学的には正常な肝組織であった。

## 暴露終了翌日解剖

群	動物番号	肺	肝臓
対照群	1010	著変なし	著変なし
	1011	著変なし	著変なし
	1012	著変なし	著変なし
0.02 ppb 群	1110	著変なし	著変なし
	1111	著変なし	著変なし
	1112	著変なし	著変なし
0.07 ppb 群	1210	著変なし	著変なし
	1211	著変なし	著変なし
	1212	著変なし	著変なし
0.2 ppb 群	1310	著変なし	著変なし
	1311	著変なし	著変なし
	1312	著変なし	著変なし



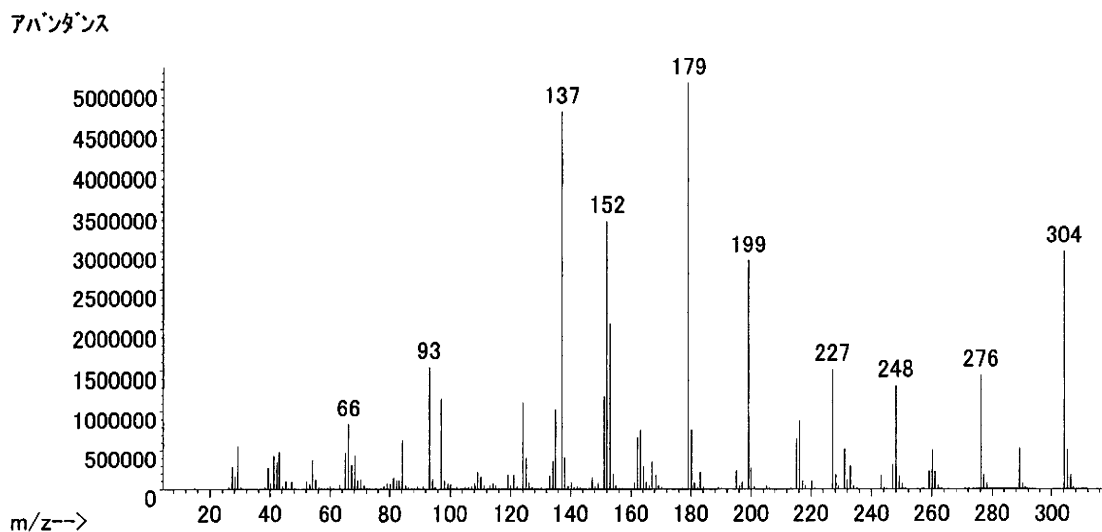


図 1-1 被験物質のマススペクトル

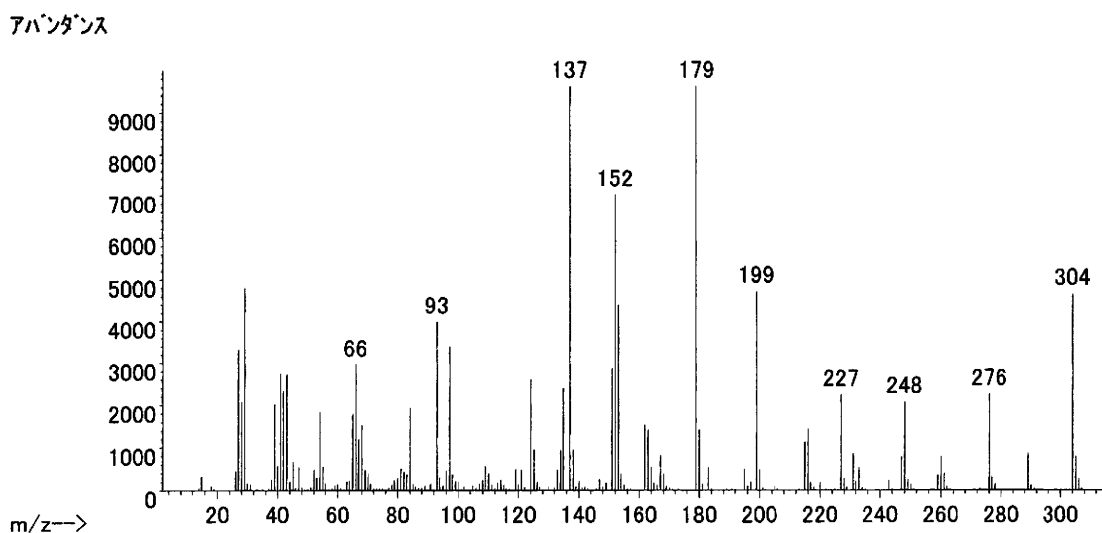


図 1-2 ダイアジノンのマススペクトル(文献1)

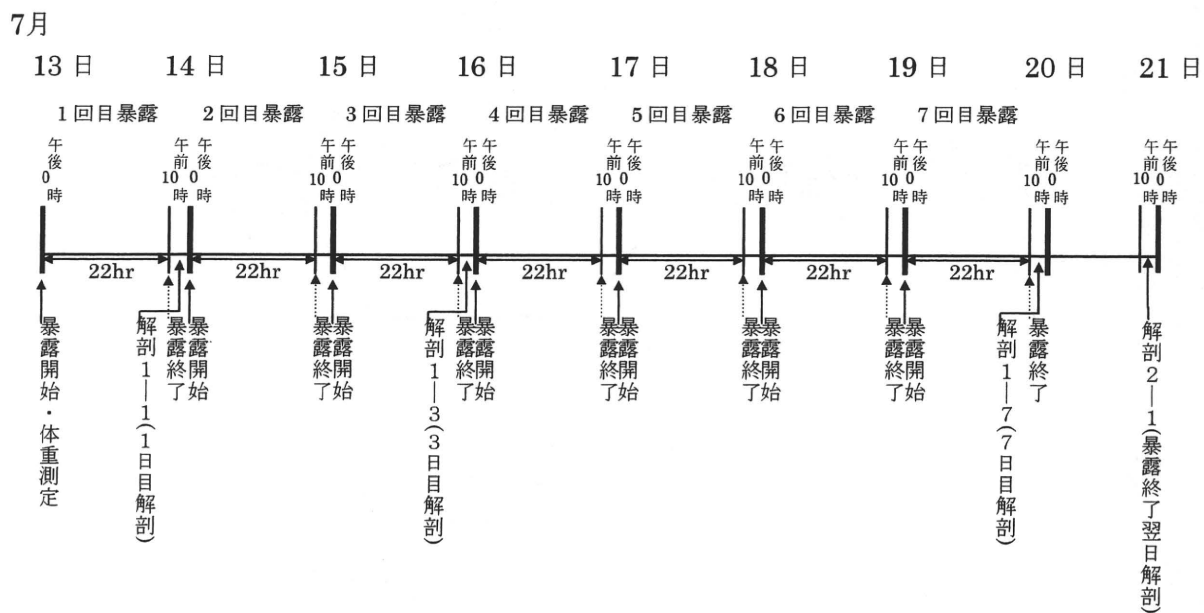


図 2 試験スケジュール (22 時間暴露)

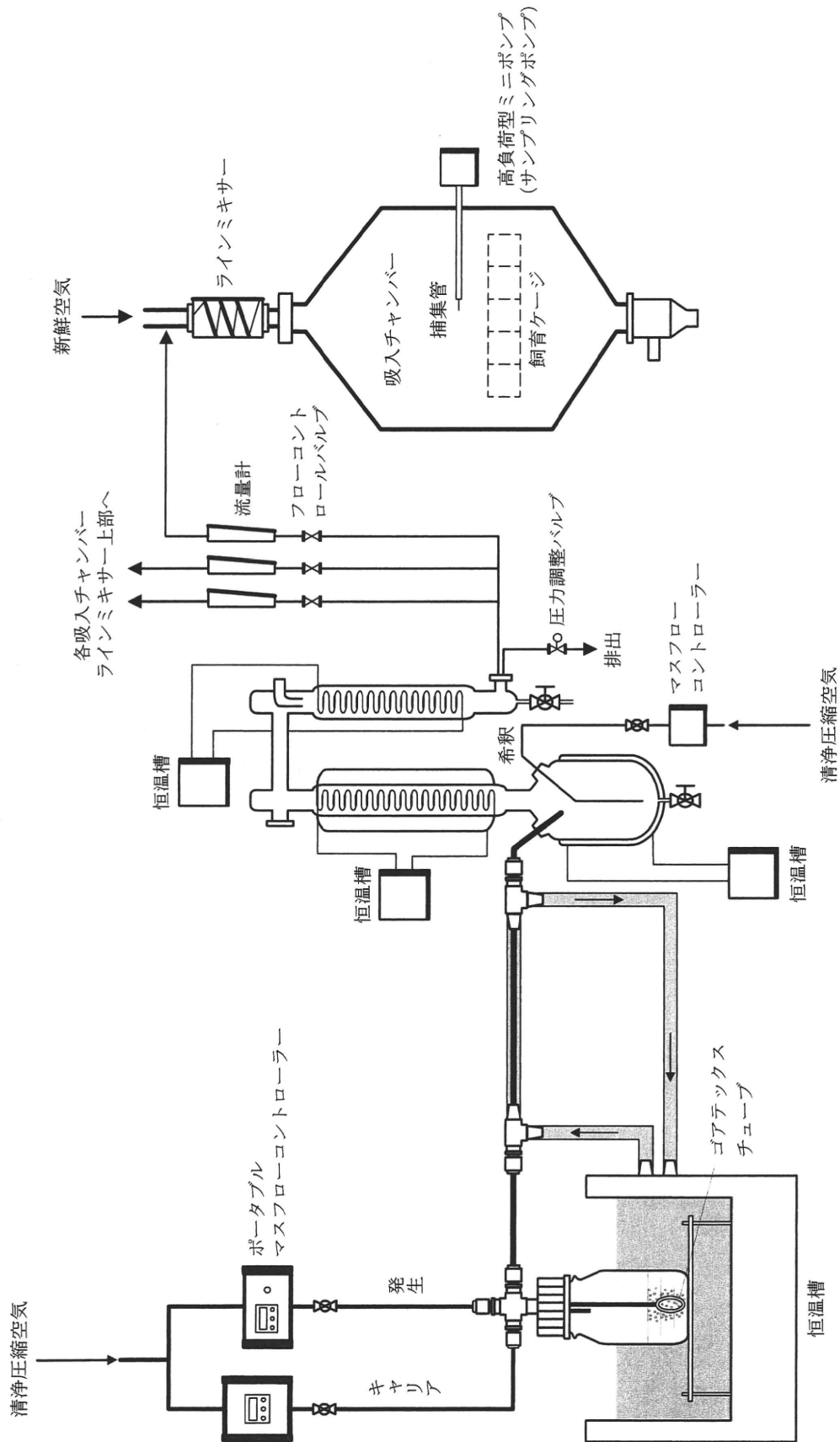


図 3 吸入装置のシステム

国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 御中

# 委託研究報告書 (STEP9)

発現データ補正のための係数最適化研究

# 1. テーマ



発現データ補正のために、実験データを使用した学習により係数を求めている。様々な種類の  
の実験データを用いて学習することにより係数の精度が向上するため、ここでは出来るだけ  
多くのプロローブについて適切な係数を得られるように学習用の実験データを選別、もしくは必  
要に応じて調整したサンプルを新たに測定し、学習処理と係数の最適化を進めた。



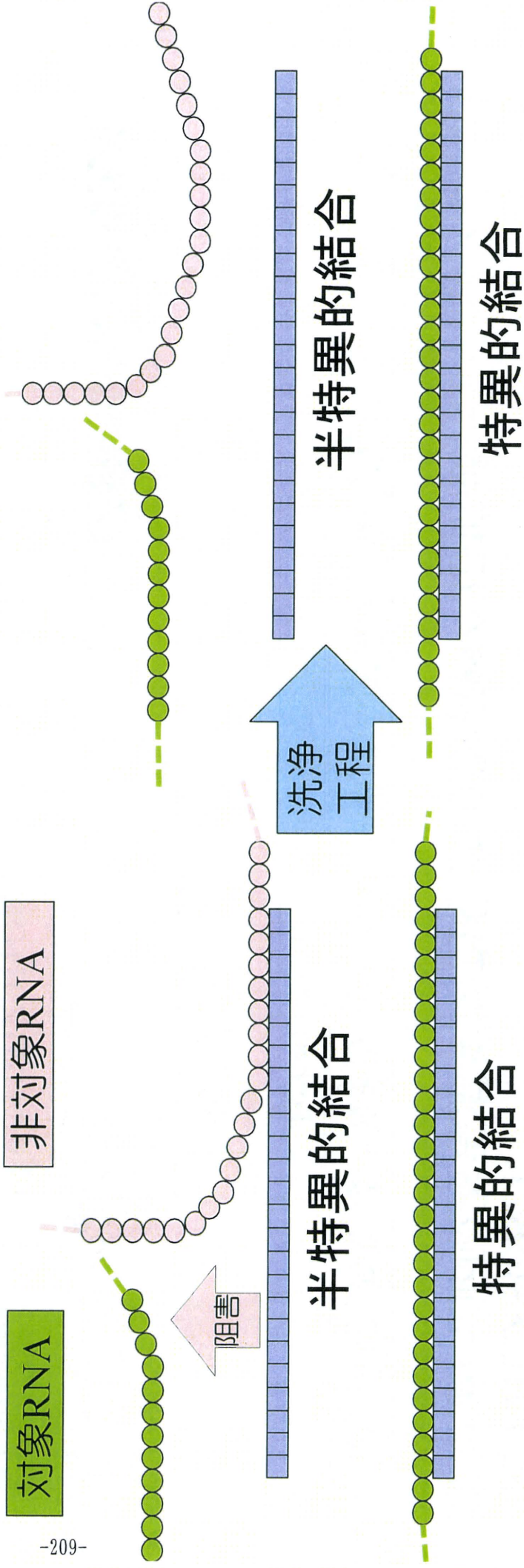
# 2.MLANG Langmuir吸着等温平衡方程式の多溶質への拡張

MLANGの基本概念およびアルゴリズムは、平成20年度の研究において確立した。

半特異的結合(Semi-specific Hybridization)という概念により多溶質吸着等温平衡方程式を構築

半特異的結合は、プローブと非対象RNAとの間に弱い結合力が働くことに基づく。  
この結合力のため、非対象RNAもある程度の時間の時間とどまり、平衡状態に於いても特異的結合の割合は一定以上にならない。

半特異的結合は、洗浄工程で剥離される





# 2.MLANG Langmuir吸着等温平衡方程式の多溶質への拡張

各RNAの真の濃度が既知の場合の蛍光強度を導き出すモデル

HybridizationとWashingの2ステップ

非対象RNA

結合阻害

Hybridization  
多溶質による  
熱平衡方程式

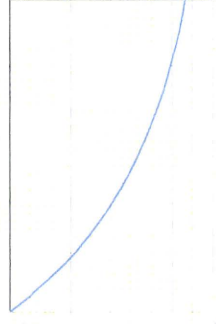
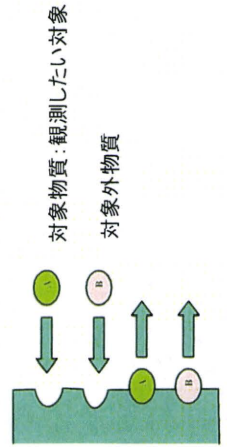
対象RNA

対象RNAのみとなる

Washing  
減衰現象

酸 温度 時間

酸 温度 時間





# 2.MLANG

## Langmuir吸着等温平衡方程式の多溶質への拡張

### 多溶質による吸着のモデル化、Langmuir吸着等温式と同じ仮定

吸着速度は、吸着体の残り個数と溶質の濃度に比例すると仮定する

$$V' = K \cdot \left( N - \sum_{i=1}^n N_i \right) \left( \sum_{i=1}^n C_i \right)$$

個々の溶質の吸着速度は、溶質の濃度の比に比例する(多溶質用に新規導入)

$$V'_i = \frac{C_i}{\sum_{j=1}^n C_j} V'$$

個々の溶質の離脱速度は、吸着した個数に比例する

$$V_i = \alpha_i \cdot N_i$$

式変形

プローブ*i*に吸着したターゲット*j*の個数

$$N_{ij} = \frac{C_j}{\alpha_{ij}} \cdot K \cdot \left( N - \sum_{j=1}^m N_{ij} \right) + \varepsilon_{ij}$$

プローブ*i*に吸着したターゲット*j*の離脱速度係数  
吸着速度係数は1とし、 $\alpha$ で調整する

$$\alpha_{ij} \geq 0$$



# 2.MLANG

## Langmuir吸着等温平衡方程式の多溶質への拡張

各RNAの真の濃度がわかっている場合の計測値を導き出すモデル(数式表現)

ステップ1 Hybridization  
プローブ*i*に吸着したターゲット*j*の個数

$$N_{ij} = \frac{N - \sum_{k=1, k \neq i}^m N_{ik}}{\alpha_{ij} + C_j} C_j$$

ステップ2 Washing  
プローブ*i*に吸着したターゲット*j*の個数

$$n_{ij} = N_{ij} \cdot e^{-\gamma \cdot \alpha_{ij}}$$

ステップ3 Observation  
プローブ*i*で観測される値

$$n_i = \sum_{j=1}^m n_{ij} + \bar{\varepsilon}_i$$

$N$ : 吸着体個数 (全プローブ同一)

$C_j$ : ターゲット*j*の濃度

$N_{ij}$ : プローブ*i*に結合したターゲット*j*のRNA数

$\alpha_{ij}$ : プローブ*i*からターゲット*j*が離脱する速度

$\gamma$ : 洗浄係数変換定数

$n_{ij}$ : 洗浄後にプローブ*i*に結合しているターゲット*j*のRNA数

$\varepsilon_i$ : 観測誤差(正規分布と仮定)

### 3. 係数学習方針

- ・ プローブとターゲットの全組み合わせに対して、物理化学的に塩基配列に基づいた結合力(離脱速度係数)を求めることは、いくつかの課題があり、困難である。
  - ターゲット範囲外での結合
  - 複数個所における結合
  - 完全平衡状態へ未到達
  - 断片化
  - 増幅効率
  - RNA同士の結合
  - RNA2次構造
- ・ MLANGでは、観測値から離脱速度係数を求めている。
- ・ 半特異的結合に対する離脱速度係数は、対象以外のRNAとの結合力である。種々のRNAが色々な割合で混合されたサンプルの計測データを用いて学習を行うことにより、離脱速度係数を求め、精度を高める。



### 3.係数学習方針

#### 次の実験条件で実験を用いて学習を行う

検体なし

Affymetrix社の標準実験プロトコルにおいてコントロールとして、添加するRNAが存在する。添加RNAのみのデータを用いることで添加RNAの影響を係数に反映させる

臓器およびGSCの直交表による混合計測 & LBM

Percellome用の外部スパイクとして、6種のRNAを添加している(GSC)。これらのRNAによる影響および複数の臓器サンプルの混合により、相互作用に対する係数を学習する

臓器基本発現TTG関連Vehicle (GSC-dilution, TTG122-Y, TTG160-G, TTG160-H, TTG040-C)

各臓器で発現するRNAが関与する係数を学習する。特に、臓器特異な遺伝子および共通する遺伝子間の係数を学習する

TTG020-L(TCDD処置)

化合物を投与した際に特異に変動する遺伝子の係数を学習する



# 3. 係数学習方針 直交表による混合計測

品質検査などで使用される、複数事象の組み合わせ試験のための手法として、直交表が用いられる。この直交表を応用して、各臓器およびスパイクを混合し、実験することにより、これらの間の関係を示す係数を求める

- L32直交表を用いて、
- ・ 臓器濃度2水準(無/有)
  - ・ GSC濃度4水準(無/飽和無/飽和小/飽和大)
- として、実験を実施する

## L32直交表

31因子2水準に対して、32回の実験を行う。  
GSCに関して2因子をまとめて、4水準とする方法を採用した

## 臓器(19)

腎臓  
精巣  
脾臓  
小腸上皮  
全脳  
膵臓  
心臓  
骨格筋  
肝臓  
卵巣  
骨髓  
肺  
子宮  
胸腺  
胚 (E8.5)  
胚 (E9.5)  
脂肪  
腸間膜  
ES細胞

## GSC(6)

THR  
Lys  
Phe  
Dap  
Trp  
Lambda

臓器は、臓器間で発現パターンが異なるように、NIHS毒性部様に選定いただいた。