

表 6 剖検所見(22時間暴露)

## 1回目暴露終了時解剖

群	動物番号	肝臓	肺	脳
対照群	1001	著変なし	著変なし	著変なし
	1002	著変なし	著変なし	著変なし
	1003	著変なし	著変なし	著変なし
0.04 ppm 群	1101	著変なし	著変なし	著変なし
	1102	著変なし	著変なし	著変なし
	1103	著変なし	著変なし	著変なし
0.12 ppm 群	1201	著変なし	著変なし	著変なし
	1202	著変なし	著変なし	著変なし
	1203	著変なし	著変なし	著変なし
0.40 ppm 群	1301	著変なし	著変なし	著変なし
	1302	著変なし	著変なし	著変なし
	1303	著変なし	著変なし	著変なし

## 1日目解剖

群	動物番号	肝臓	肺	脳
対照群	1004	著変なし	著変なし	著変なし
	1005	著変なし	著変なし	著変なし
	1006	著変なし	著変なし	著変なし
0.04 ppm 群	1104	著変なし	著変なし	著変なし
	1105	著変なし	著変なし	著変なし
	1106	著変なし	著変なし	著変なし
0.12 ppm 群	1204	著変なし	著変なし	著変なし
	1205	著変なし	著変なし	著変なし
	1206	著変なし	著変なし	著変なし
0.40 ppm 群	1304	著変なし	著変なし	著変なし
	1305	著変なし	著変なし	著変なし
	1306	著変なし	著変なし	著変なし

## 3日目解剖

群	動物番号	肝臓	肺	脳
対照群	1007	著変なし	著変なし	著変なし
	1008	著変なし	著変なし	著変なし
	1009	著変なし	著変なし	著変なし
0.04 ppm 群	1107	著変なし	著変なし	著変なし
	1108	著変なし	著変なし	著変なし
	1109	著変なし	著変なし	著変なし
0.12 ppm 群	1207	著変なし	著変なし	著変なし
	1208	著変なし	著変なし	著変なし
	1209	著変なし	著変なし	著変なし
0.40 ppm 群	1307	著変なし	著変なし	著変なし
	1308	著変なし	著変なし	著変なし
	1309	著変なし	著変なし	著変なし

## 7日目解剖

群	動物番号	肝臓	肺	脳
対照群	1010	著変なし	著変なし	著変なし
	1011	著変なし	著変なし	著変なし
	1012	著変なし	著変なし	著変なし
0.04 ppm 群	1110	著変なし	著変なし	著変なし
	1111	著変なし	著変なし	著変なし
	1112	著変なし	著変なし	著変なし
0.12 ppm 群	1210	著変なし	著変なし	著変なし
	1211	著変なし	著変なし	著変なし
	1212	著変なし	著変なし	著変なし
0.40 ppm 群	1310	著変なし	著変なし	著変なし
	1311	著変なし	著変なし	著変なし
	1312	著変なし	著変なし	著変なし

表 7 病理組織所見(22時間暴露)

## 1回目暴露終了時解剖

群	動物番号	肝臓	肺	脳
対照群	1001	著変なし	著変なし	著変なし
	1002	著変なし	著変なし	著変なし
	1003	著変なし	著変なし	著変なし
0.04 ppm 群	1101	著変なし	著変なし	著変なし
	1102	著変なし	著変なし	著変なし
	1103	著変なし	著変なし	著変なし
0.12 ppm 群	1201	著変なし	著変なし	著変なし
	1202	著変なし	著変なし	著変なし
	1203	著変なし	著変なし	著変なし
0.40 ppm 群	1301	著変なし	著変なし	著変なし
	1302	著変なし	著変なし	著変なし
	1303	著変なし	著変なし	著変なし

## 1日目解剖

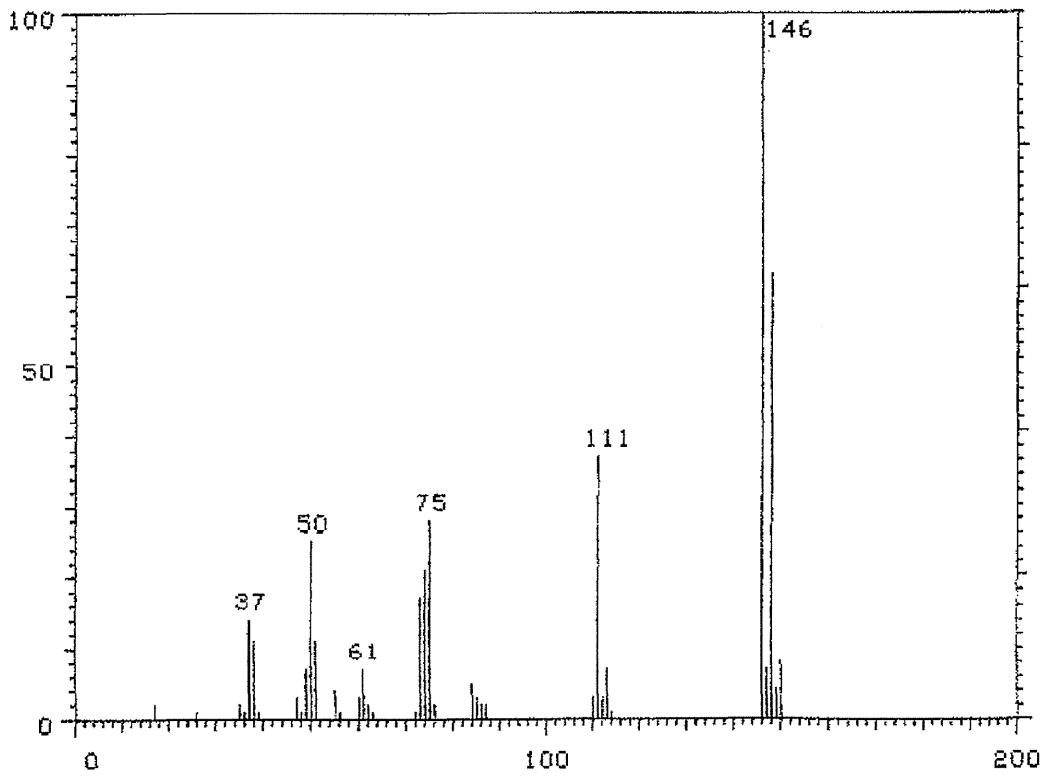
群	動物番号	肝臓	肺	脳
対照群	1004	著変なし	著変なし	著変なし
	1005	著変なし	著変なし	著変なし
	1006	著変なし	著変なし	著変なし
0.04 ppm 群	1104	著変なし	著変なし	著変なし
	1105	著変なし	著変なし	著変なし
	1106	著変なし	著変なし	著変なし
0.12 ppm 群	1204	著変なし	著変なし	著変なし
	1205	著変なし	著変なし	著変なし
	1206	著変なし	著変なし	著変なし
0.40 ppm 群	1304	著変なし	著変なし	著変なし
	1305	著変なし	著変なし	著変なし
	1306	著変なし	著変なし	著変なし

## 3日目解剖

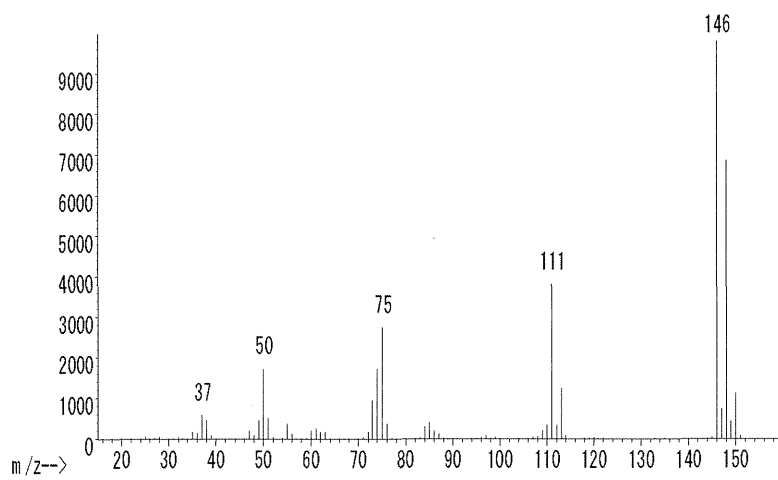
群	動物番号	肝臓	肺	脳
対照群	1007	著変なし	著変なし	著変なし
	1008	著変なし	著変なし	著変なし
	1009	著変なし	著変なし	著変なし
0.04 ppm 群	1107	著変なし	著変なし	著変なし
	1108	著変なし	著変なし	著変なし
	1109	著変なし	著変なし	著変なし
0.12 ppm 群	1207	著変なし	著変なし	著変なし
	1208	著変なし	著変なし	著変なし
	1209	著変なし	著変なし	著変なし
0.40 ppm 群	1307	著変なし	著変なし	著変なし
	1308	著変なし	著変なし	著変なし
	1309	著変なし	著変なし	著変なし

## 7日目解剖

群	動物番号	肝臓	肺	脳
対照群	1010	著変なし	著変なし	著変なし
	1011	著変なし	著変なし	著変なし
	1012	著変なし	著変なし	著変なし
0.04 ppm 群	1110	著変なし	著変なし	著変なし
	1111	著変なし	著変なし	著変なし
	1112	著変なし	著変なし	著変なし
0.12 ppm 群	1210	著変なし	著変なし	著変なし
	1211	著変なし	著変なし	著変なし
	1212	著変なし	著変なし	著変なし
0.40 ppm 群	1310	著変なし	著変なし	著変なし
	1311	著変なし	著変なし	著変なし
	1312	著変なし	著変なし	著変なし



被験物質のマススペクトル



パラジクロロベンゼンのマススペクトル

McLafferty FW, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data.  
6th ed. New York, NY: John Wiley and Sons.

図1 マススペクトル



22時間 x 7日間反復暴露 (投与22、70、166、190時間後に観測) [時刻：10時、10時、10時、10時]

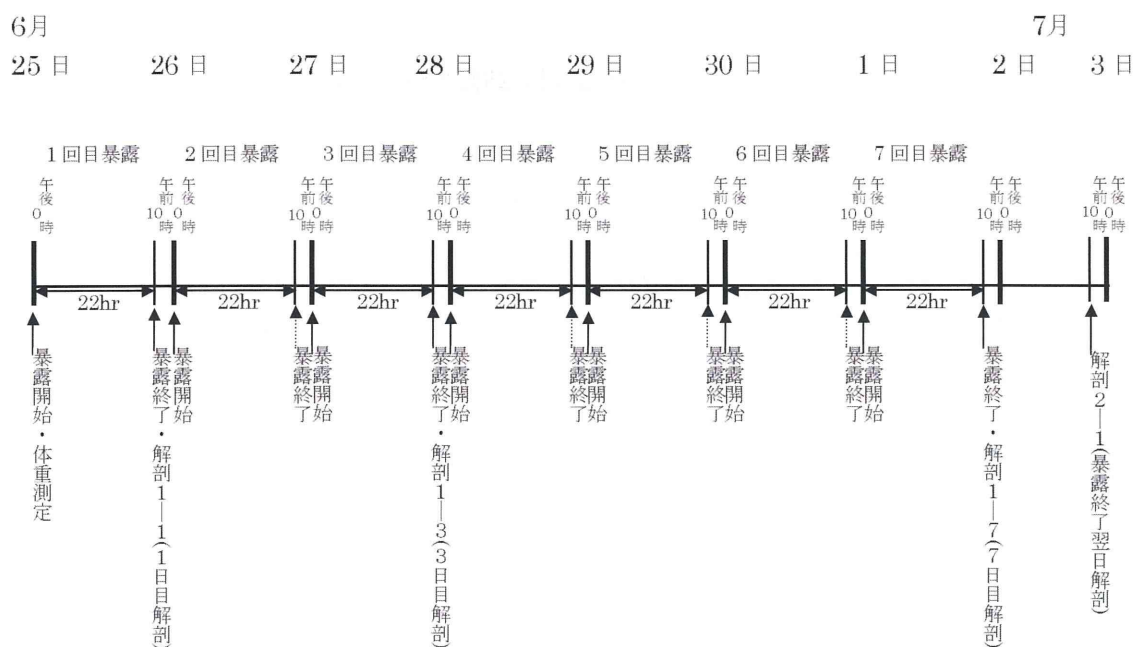


図 2 試験スケジュール(22時間暴露)

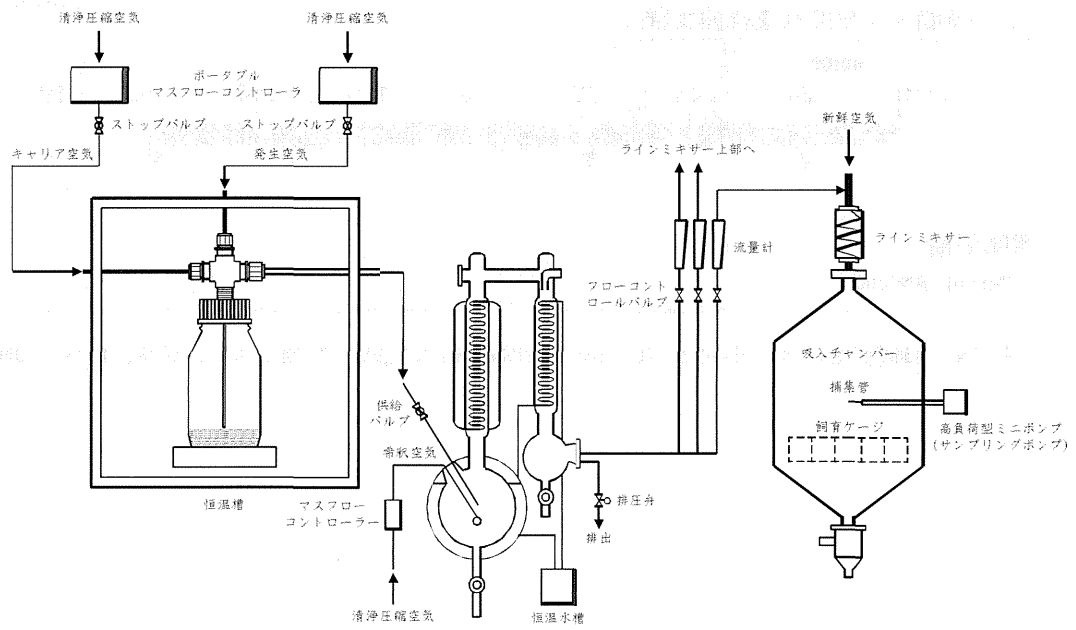


図 3 吸入装置のシステム

別紙-1

### 検査成績書

日本バイオアッセイ研究センター 御中

2013年4月11日  
和光純薬工業株式会社

Code No.047-01315  
p-ジクロロベンゼン



規格ノ等級	和光特級	
Lot No.	WEP0371	
数量	500g	
検査項目	検査成績	規格値
外観	白色の結晶	白色の結晶
エタノール溶状	透明	試験適合(透明)
水分	0.0%	0.1%以下
含量(毛管カラムGC)	99.9%	98.0%以上
検査年月日	2012/03/02	

判定	合格	検査責任者	上田恵美
----	----	-------	------

(1/1)

成績書発行番号 9999197



国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 御中

遺伝子発現誘導に基づく化学物質分類技術及び同期発現  
遺伝子抽出技術の高精度化に関する業務コンサルティング  
御報告書

平成24年2月24日  
株式会社NTTデータ

# テーマ

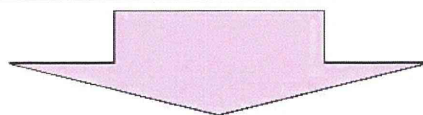
---

平成21年までに独自に開発した、遺伝子発現誘導に基づく化学物質分類技術、及び同期発現遺伝子抽出技術による解析をより一層高精度化させるために、これらのアルゴリズムを、昨年度までに開発・実用化したマイクロアレイデータ高精度化技術(MLANGなど)に適用させる。

# 1.化合物分類

以前に低発現と考えられていた1コピー以下の遺伝子が、差が小さいが大量に存在するため、化合物分類において、化合物間の距離の主な原因となっていた。

平成22年度の研究において、マイクロアレイ高精度化技術(MLANG)を改良し、上で問題となっていた遺伝子を0発現遺伝子として特定することができた。



低発現の原因が取り除かれたので、高発現の遺伝子が、化合物分類において、化合物間の距離の主要な要因となった。

Apoa2, Apoe, Albなど 発現値が大きすぎて変動が検知できないような遺伝子

想定される誤差の原因

1. 飽和補正における、飽和最大値の推定精度
2. 高濃度の計測誤差

これらの誤差の影響を低減化する手法を含めた化合物分類を作成する

## 1.1.化合物分類手法の改良項目

- 化合物分類のための想定される誤差
- MLANGの特性と結果の精度
  - MLANGは、双曲線により飽和を補正しているため、高濃度の発現に関して、比較的誤差が大きい。QPCRとの対比より、MAS5を使用した計算での限界は600コピー程度であった。MLANGでは、5000コピーであっても、プローブセット内の各プローブの飽和のばらつきなどをモデルに組み込んであり、状況によっては、推定可能である。しかしながら、含まれる誤差も大きなものになる。この差異が、主要な差異を生み出すことのないようにシグモイドを模した誤差軽減の係数を用いる
- 個体間の変動
  - Percellome実験では、同一の実験条件で、3匹のマウスを用いている。2条件で、3匹同士を比較した際に、絶対コピー数の差異を比較すると、個体差により2条件で差異があるように判定されることがある。個体間で変動が大きな遺伝子が主要な差異を生み出すことがないように、個体間の差異の大きな遺伝子の差異を軽減する係数を用いる。

## 1.1.化合物分類の改良項目

- 化合物を実験動物に投与する実験では、実験間の差異も無視できない。特に、溶媒が肝臓で代謝されている可能性があり、肝臓と溶媒の間では強い関係があると思われる。
  - ダイオキシン類は脂溶性のため、Corn Oilを溶媒として用いるが、Corn Oilを使用すると、脂肪を輸送、代謝関連の遺伝子が活発に動くことが想定される
- プロジェクト間差異を生み出すと考えられる要因
  - 溶媒
  - 餌種類
  - 季節
    - 餌時間、昼夜の時間は管理されているので大きな変化はないはず
  - マイクロアレイ出荷ロット
  - 機器洗浄
  - 実験者
    - 個人、習熟度

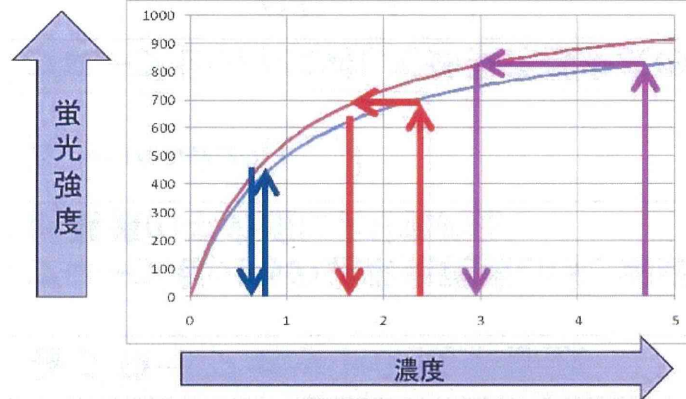
化合物影響とプロジェクト影響を個別に取り出せる工夫を考える

# 1.2.化合物間距離の定義 誤差による重み付け

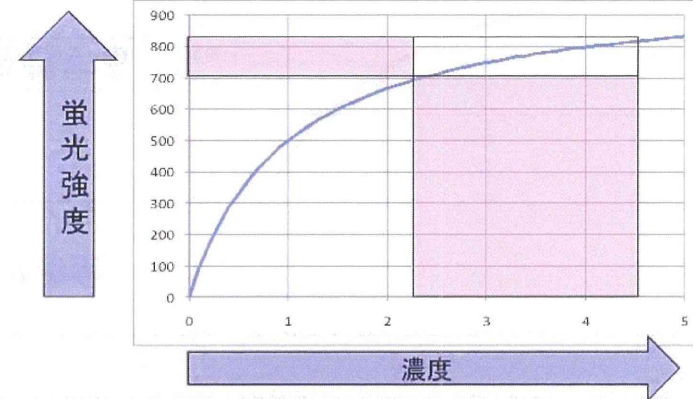
## 高濃度の誤差の原因

1. 飽和補正における、飽和最大値の推定精度
2. 高濃度の計測誤差

飽和最大値の誤差は、高濃度ほど大きく影響を受ける



蛍光強度の誤差は、高濃度ほど大きく影響を受ける



高濃度のものを双曲線で誤差を戻して、評価する。評価の比重は、化合物分類を実施すると、1遺伝子1個の係数を作成する。

## 1.2.化合物間距離の定義

### 各プローブセットの効果係数

プローブセットpの通常発現値 $L_p$ を、溶媒群における全計測値の中央値により求める

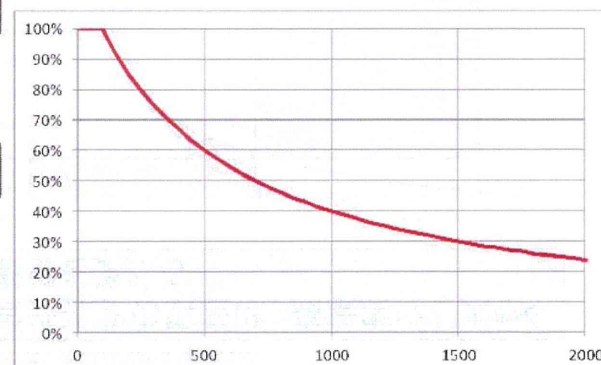
$$L_p = \underset{a,i,j}{\text{median}}(x_{paij})$$

プローブセットpに対して効果係数を次のように定義する

$$\text{effect}_p = 1 + \frac{f(L_p - L_{\text{base}})}{I_{\text{max}}}$$

ここで関数fは、負のときに0となる関数

$$f(x) = \begin{cases} x & \text{if } x > 0 \\ 0 & \text{if } x \leq 0 \end{cases}$$



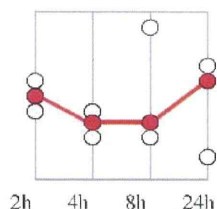
$L_{\text{base}}$ 以下の場合には効果係数は100%で、 $I_{\text{max}} + L_{\text{base}}$ の時に50%となるように設定する。

$L_{\text{base}}$ は100コピー、 $I_{\text{max}}$ は600コピーと設定した。

効果係数を全組み合わせで共通とすることにより、化合物間の距離を、数学的な距離(三角不等式を満たす)として取り扱えるようにし、化合物間の距離をユークリッド座標系に割り付ける際に不整合を起こさないようにした

## 1.2.化合物間距離の定義

次のように化合物間距離を定義する



時刻

プローブセットp、化合物a、時刻iにおける代表値

$$x_{pai} = \text{median}_{j=1}^3(x_{paj})$$

プローブセットp、化合物a、化合物bの間の距離

$$r_{pab}^2 = \sum_{i=1}^4 (x_{pai} - x_{pbi})^2$$

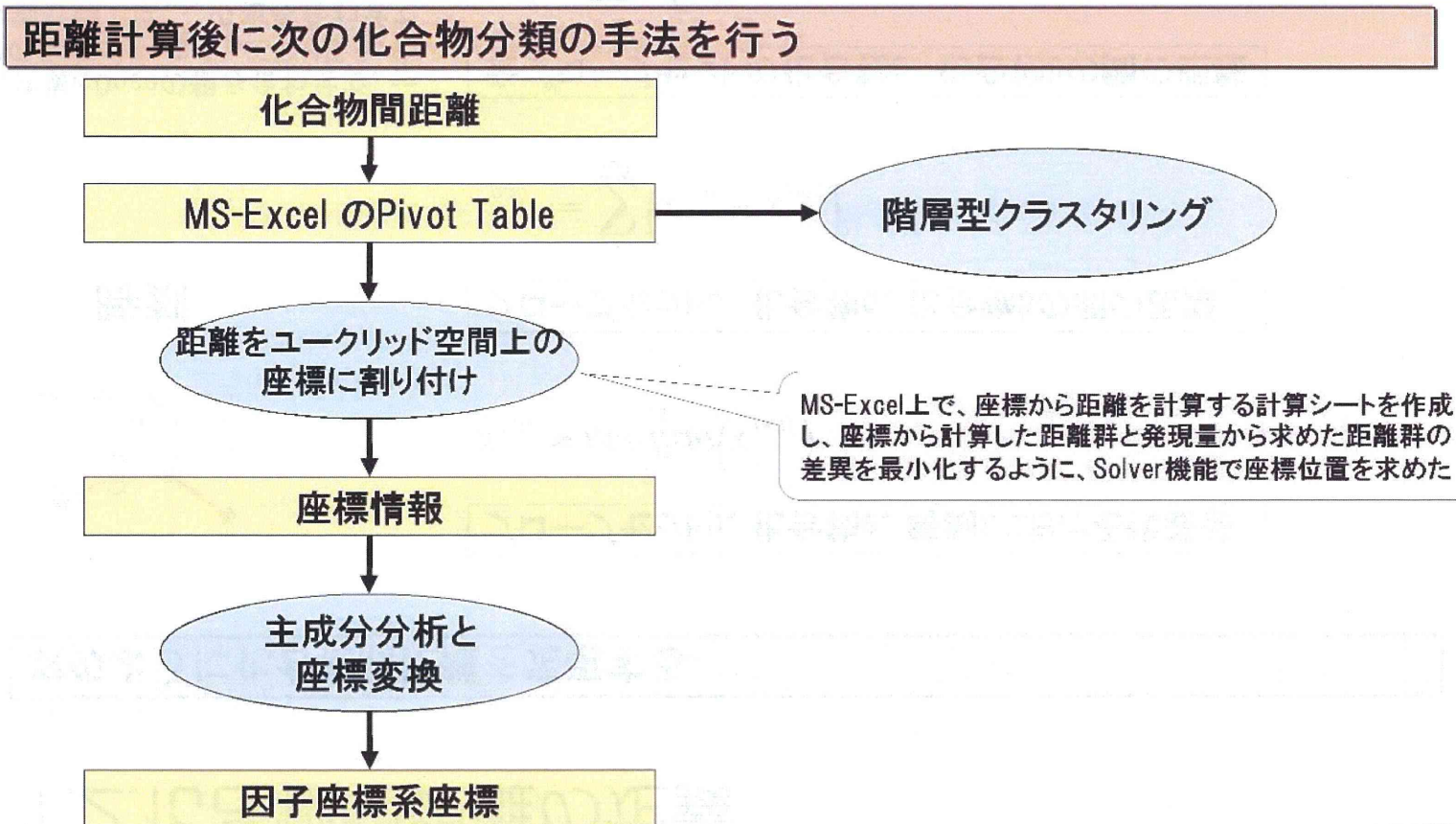
全プローブセットの化合物a、化合物bの間の距離

$$r_{ab}^2 = \sum_{p=1}^2 \frac{r_{pab}^2}{\text{effect}_p^2}$$

化合物とDoseの組み合わせで、一つの反応パターンとして取り扱う。化合物分類では、この組み合わせで、「化合物」と呼ぶこともある



# 1.3.距離計算後の手順



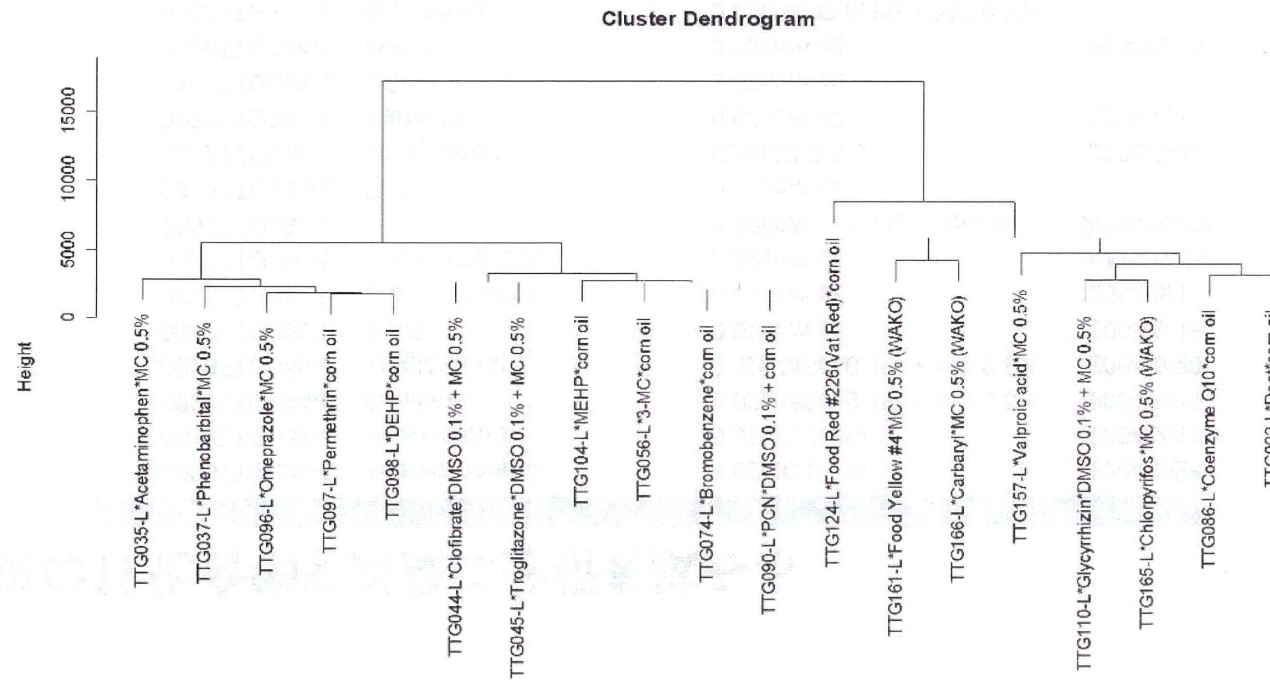
## 1.4.対象化合物

- 次の19化合物を対象に分析を試みる

Project No.	Project Name	Chemical	SpF	Vehicle	date
0086TTG035-L		Acetaminophen	0.02	MC 0.5%	2004/2/26
0014TTG037-L		Phenobarbital	0.02	MC 0.5%	2004/2/19
0033TTG044-L		Clofibrate	0.02	DMSO 0.1% + MC 0.5%	2004/5/13
0029TTG045-L		Troglitazone	0.02	DMSO 0.1% + MC 0.5%	2004/5/20
0052TTG056-L		3-MC	0.02	corn oil	2004/9/16
0090TTG074-L		Bromobenzene	0.02	corn oil	2005/5/12
0271TTG086-L		Coenzyme Q10	0.02	corn oil	2005/11/15
0237TTG090-L		PCN	0.02	DMSO 0.1% + corn oil	2005/10/20
0219TTG092-L		Deet	0.02	corn oil	
0272TTG096-L		Omeprazole	0.02	MC 0.5%	2006/3/30
0273TTG097-L		Permethrin	0.02	corn oil	2006/4/13
0107TTG098-L		DEHP	0.02	corn oil	
0108TTG104-L		MEHP	0.02	corn oil	2006/5/16
0183TTG110-L		Glycyrrhizin	0.02	DMSO 0.1% + MC 0.5%	
0147TTG124-L		Food Red #226(Vat Red)	0.005	corn oil	2007/1/25
0245TTG157-L		Valproic acid	0.005	MC 0.5%	2008/12/18
0274TTG161-L		Food Yellow #4	0.005	MC 0.5% (WAKO)	2009/4/23
0275TTG165-L		Chlorpyrifos	0.005	MC 0.5% (WAKO)	2009/7/16
0276TTG166-L		Carbaryl	0.005	MC 0.5% (WAKO)	2009/12/17

# 1.5.階層クラスタリング

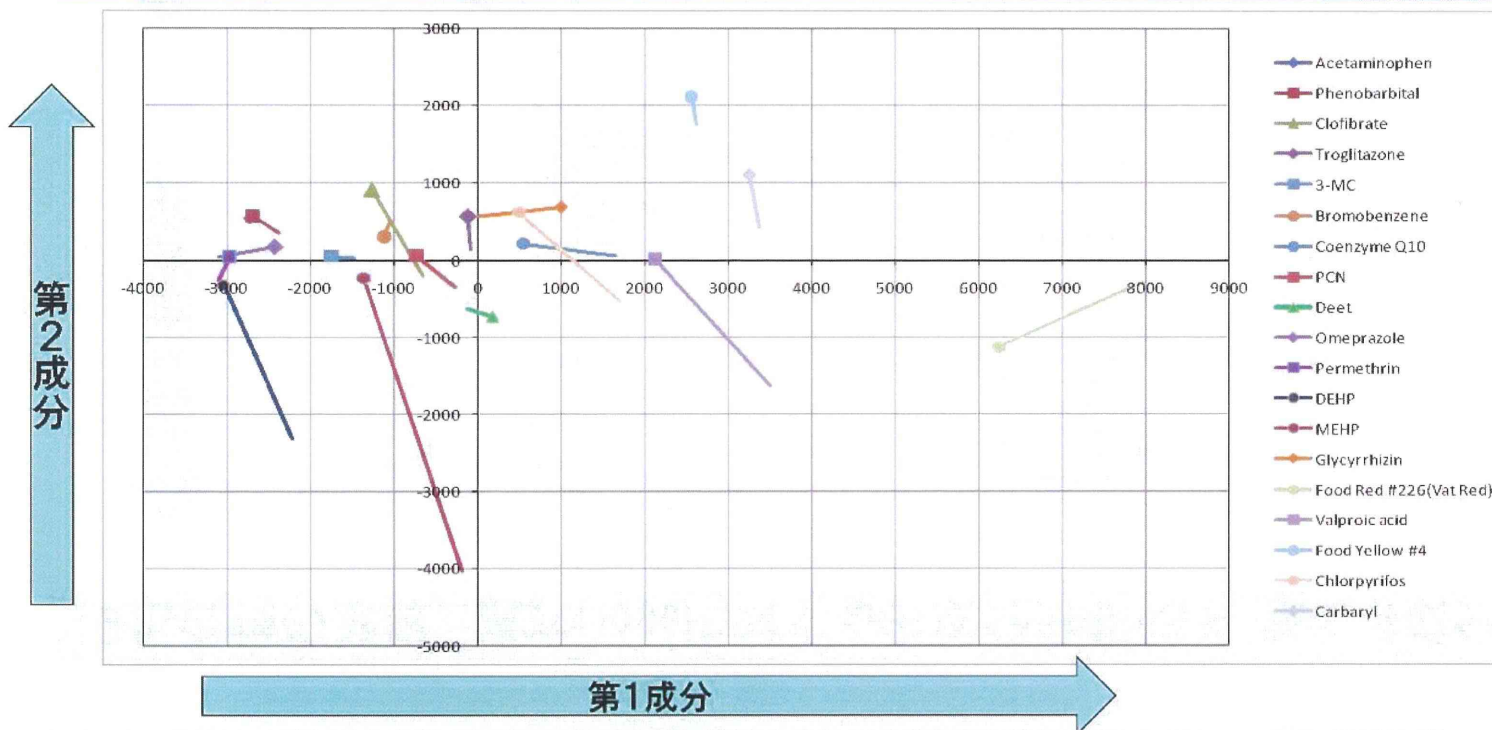
- ・ 溶媒群のプロジェクト間のクラスタリングを実施



実験時期(TTG番号)による影響が強いように見える

# 1.6.主成分分析による座標変換

19化合物の溶媒と最大Doseに対する主成分分析結果 第1,2成分



第1成分として、溶媒の差異、特にGSC添加濃度変化による影響が強く表れている