

バイタルサインの統合的評価をエンドポイントとした新規急性経口投与毒性試験方法の開発  
-統計学による半数致死量から診断学による概略の致死量への転換-(19KD1002)  
分担研究報告書

分担研究課題 急性毒性試験における遺伝子発現変動解析

研究分担者:	北嶋 聡	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部 部長
研究協力者:	栗形麻樹子	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部 室長
研究協力者:	齊藤洋克	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
研究協力者:	森田紘一	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
研究協力者:	辻昌貴	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
研究協力者:	森山紀子	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部

## 研究要旨

本分担研究では、急性毒性発現時の海馬、肺、肝の遺伝子発現データを取得し、その臓器連関解析を実施した。具体的には、被験物質を単回経口投与後、得られたマウスの海馬を含む脳 4 部位、肺及び肝の mRNA サンプルにつき、当方が開発した 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。再現性、感度、用量相関性、全遺伝子発現の網羅性を考慮し Affymetrix 社 GeneChip、Mouse Genome 430 2.0 を使用した。4 用量、4 時点の遺伝子発現情報を既に開発済みの波面解析等を用いた教師無しクラスタリング解析を行い、多臓器連関及びインフォマティクス解析の開発を進める計画である。

H31/R 元年度は、被験物質としてモデル物質として、フグ毒として知られるテトロドトキシン(tetrodotoxin, TTX)を選択し、雄性マウスに単回経口投与した際の「海馬」における網羅的な遺伝子発現変動解析について検討した。金属製胃ゾンデを用いて強制経口投与し、投与後の時間 4 点(投与 2, 4, 8 及び 24 時間後)、投与用量各 300, 100, 30, 0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ (溶媒:0.1%酢酸を含む 0.5%MC, pH3.5)の 4 点からなる計 16 群、各群 3 匹、合計 48 匹のマウスについて解析を行った。なお用量設定に際しては、TTX のマウス経口 LD50 値が 334  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (RTECS 情報)であったことから、最高用量を 700  $\mu\text{g}/\text{kg}$  とし 3 段階の用量(700, 500, 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、及び溶媒対照)を設定し、予備試験を実施した。12 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを用い、各群 3 匹に単回経口投与した。その結果、700  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群では全例、500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群では 2 例に死亡が認められたが、300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  投与群では死亡例はみられなかった。この結果から、24 時間無作用量であった 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$  を最高用量をとし、公比  $\sqrt{10}$  で除して 300, 100, 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$  の投与用量を設定した。

脳のなかで、背景データが多く揃っている「海馬」における網羅的遺伝子発現変動解析をおこなった結果、ストレス関連遺伝子(Sgk1 遺伝子など)の発現増加が目立ち、他方、Na<sup>+</sup>チャンネルなど TTX が直接関与すること

が示唆されるシグナルネットワーク関連遺伝子の発現変動は認められなかった。この事は、海馬に対して TTX が直接作用するわけではなく、ストレス応答に絡むサイトカインや糖質コルチコイドなどのような二次的シグナルが海馬に働き、その結果、TTX の急性参照用量設定のための報告にあるように、**apathy**(無関心)といった中枢影響が誘発されている事が示唆された。

そこで R2 年度は、上述した二次的シグナル候補物質を探索するために、海馬とは別に、「肝」における解析を検討し、多臓器連関解析を実施することとした。現時点での解析の結果、発現変動する遺伝子群の上流には、ストレス応答に絡むデキサメタゾンあるいはグルココルチコイド受容体(NR3C1)やサイトカインである **IL1B** や **TNF** が調節因子として抽出されてきた。グルココルチコイド、**TNF** が存在するのは、海馬での解析と同様であったが、興味深いことに、糖新生に係る多くの遺伝子の発現増加が認められ、毒性予測として、血糖値が上昇するものと考えられた。また二次的シグナル候補物質として、サイトカインである **IL1B** や **TNF** が示唆された。引き続き、多臓器連関につき解析中である。

## A. 研究目的

本研究の目的は、ヒトの安全性確保に主眼を置いた上で、Reduction と Refinement により動物福祉の課題を解決する新規急性経口投与毒性試験方法の開発である。現在、急性毒性において使用されているエンドポイントを「死亡」からより精緻な「複数のバイタルサイン」に置き換え、化学物質の毒性強度の指標を「統計学」を背景とした「半数致死量(LD50)」から「診断学」を基盤にした「概略の致死量」へ転換を図る。一般状態、心電、心拍、血圧、体温、呼吸、脳波などの「バイタルサイン」を指標とした更なる動物数の削減とヒトの安全性確保の向上を可能とする「新規急性経口投与毒性試験方法」が、近年の IT デバイスの小型化と新素材センサーの出現により開発可能となった。具体的には1匹の実験動物から多項目に亘るバイタルサイン(VS)を取得することにより毒性徴候を精緻に解析・定量化し、計算科学によって化学物質の急性毒性の強度と毒性標的の合理的判定基準を作成し、ヒトが急性曝露された際の危険度をより正確に予測する事を可能とする。これにより、毒物及び劇物取締法の指定に関して、中毒事象を含むより現実に想定される事故等に即した規制が可能となる。言い換えると、ヒトの急性中毒患者が救急外来で受ける諸検査に該当する所見を1匹の実験動物から取得する試験法の開発である。本研究は二つの大きな柱からなる。第一の柱は、「今までの情報や経験から選択した VS の諸項目の、急性毒性指標としての妥当性、再現性、信頼性、を確認する研究」である。これには、①急性毒性発現における遺伝子発現変動解析、②急性毒性試験における行動解析の二つを分担研究課題として設定した。第二の柱は、「選択した VS の諸項目を正確に、実験動物から測定するためのデバイスの改良」である。これには、③新素材を用いたバイタルサインセンサーの開発、④バイタルサインの統合的解析方法(ソフトウェア)の開発を分担研究課題として設定した。

本分担研究では、第一の柱の①急性毒性発現における遺伝子発現変動解析を扱う。

## B. 研究方法

計画通りに、H31/R 元年度(初年度)は、モデル物質として、フグ毒として知られるテトロドトキシン

(tetrodotoxin, TTX)を選択し、雄性マウスに単回経口投与した際の、「海馬」における網羅的な遺伝子発現変動解析について検討した。また R2 年度(今年度)は、海馬とは別に、「肝」における解析を検討し、多臓器連関解析を実施することにより、昨年度の解析により想定された二次的シグナル候補物質を探索することとした。

以下に実験方法の概要を示す。遺伝子発現変動解析は、独自の遺伝子発現値の絶対化手法である Percellome 法(Kanno J et al, BMC Genomics 7 64 2006)を用いた。

### B-1 トキシコゲノミクス

雄性マウス(成熟期[12 週齢])を対象とし、被験物質を、金属製胃ゾンデ(KN-348、夏目製作所)を用いて強制経口投与し、投与後の時間 4 点(投与 2, 4, 8 及び 24 時間後)、投与用量各 300, 100, 30, 0 µg/kg(溶媒:0.1%酢酸を含む 0.5%MC, pH3.5)の 4 点からなる計 16 群、各群 3 匹、合計 48 匹のマウス各臓器について解析を行った。採取臓器は、海馬を含む脳 4 部位(海馬、皮質、脳幹、小脳)、肺及び肝とする。マウス各組織を採取後すみやかに RNA later (Ambion 社)の入った RNA 用サンプルチューブ(キアゲン社)に採取し、4°Cで一晩浸漬し、RNase を不活化した。

得られたマウスの海馬を含む脳 4 部位、肺及び肝の mRNA サンプルにつき、当方が開発した 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。再現性、感度、用量相関性、全遺伝子発現の網羅性を考慮し Affymetrix 社 GeneChip、Mouse Genome 430 2.0 を使用する。4 用量、4 時点の遺伝子発現情報を既に開発済みの波面解析等を用いた教師無しクラスタリング解析を行い、多臓器連関及びインフォマテイクス解析を行った。

### B-2 被検物質

H31/R 元年度(初年度)は、モデル物質として、フグ毒として知られるテトロドトキシン(tetrodotoxin, TTX) (生化学用); 分子量 319.27, CAS No. 4368-28-9、富士フイルム和光純薬(株))を使用した。TTX の化学構造式を図1に示す(別添)。

カタログ番号:206-11071  
ロット番号 :LKG5746  
純度 :95.7 %[HPLC]

### B-3 用量設定実験

TTX のマウス経口 LD<sub>50</sub> 値が 334 µg/kg (RTECS 情報)であったことから、最高用量を 700 µg/kg とし 3 段階の用量(700, 500, 300 µg/kg、及び溶媒対照)を設定し、予備試験を実施した。12 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを用い、各群 3 匹に単回経口投与した。その結果、700 µg/kg 群では全例、500 µg/kg 群では 2 例に死亡が認められたが、300 µg/kg 投与群では死亡例はみられなかった。この結果から、24 時間無作用量であった 300 µg/kg を最高用量をとし、公比√10 で除して 300, 100, 30µg/kg の投与用量を設定した

### B-4 統計処理

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た。実験データは、平均値±標準偏差(SD)にて示した。

### B-5 各遺伝子の発現変動の表示方法

実験結果における各遺伝子の発現変動を、下記図 2(別添)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す。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、投与用量とサンプリング時間をとり、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。

(倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護の配慮を十分行い、下記、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。「国立医薬品食品衛生研究所・動物実験等の適正な実施に関する規程(平成 27 年 4 月版)」。

## C. 研究結果及び考察

### C-1 TTX をマウスに単回強制経口投与した際の海馬における網羅的遺伝子発現変動解析:

解析ソフト RSort を利用し、遺伝子の発現変動が有意(t 検定での時点毎に溶媒対照との間で P 値< 0.05)で、発現変動の最高値のコピー数が 2 以上という条件で遺伝子を粗抽出した。その結果、発現が増加する遺伝子 286 プローブセット(ps) が粗抽出され、このうち目視による確認により生物学的な変化が示唆されたものとして 121 ps が抽出された。また発現が減少する遺伝子としては 508 ps が粗抽出され、目視による確認により生物学的な変化が示唆されたものは抽出されなかった。

増加分 121 ps について検討した結果、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークとして、ストレス応答遺伝子が見出せた。

次いで、発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析 (in silico) を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討した結果、ストレス応答に絡むデキサメタゾンあるいは TNF が調節因子として抽出されてきた。したがって、海馬における細胞に対してストレス応答が誘発されていることが明らかとなった。神経機能への影響などについてさらに詳細な解析を進めている。

他方、興味深いことに Na<sup>+</sup>チャネルなど TTX が直接関与することが示唆されるシグナルネットワーク関連遺伝子の発現変動は認められないことが明らかとなった。この事は、TTX が血液脳関門を通過できないことを示しているものと考えられる。

近年、二枚貝から TTX が検出され、EU において貝類の TTX のリスク評価が行われ、TTX のリスクは国際的に注目されるようになってきている。欧州食品安全機関 (EFSA) が取りまとめた報告書では、既往知見であるヒトに対する最低致死用量が 2 mg であることに疑問が示された。その一方で、マウス腹腔内投与毒性における半数致死量 (LD<sub>50</sub>) を 9~12.5 µg/kg、経口投与における LD<sub>50</sub> を 232~532 µg/kg と推定し、また「単回経口投与の際の無気力状態 (apathy) という一般状態変化を指標」とした急性参照用量 (ARfD) を 0.25 µg/kgBW と導出し、貝類を 400 グラム喫食した場合のヒトに対し有害な影響をもたらさない貝肉中の含有量を 44 µgTTX 等量/kg 貝肉と推定

している。ARfD とは、ヒトが、ある物質を 24 時間以内に経口摂取した場合に、健康に悪影響を示さないと推定される一日当たりの摂取量である。

したがって、げっ歯類において単回経口投与した TTX が無気力状態 (apathy) を誘発することから、中枢にはたらくことが明らかとなってきたが、TTX が血液脳関門を通過できないことから、この分子機序は不明である。

我々の海馬における網羅的遺伝子発現変動解析の結果からは、海馬に対して TTX が直接作用するわけではなく、ストレス応答に絡むサイトカインや糖質コルチコイドなどのような二次的シグナルが海馬に働き、その結果、TTX の急性参照用量設定のための報告にあるように、apathy (無関心) といった中枢影響が誘発されている事が示唆された。そこで今後、二次的シグナル候補物質を探索するために、海馬とは別に、肝における解析を検討し、多臓器連関解析を実施することとした。

#### C-2: TTX をマウスに単回強制経口投与した際の「肝」における網羅的遺伝子発現変動解析:

解析ソフト RSort を利用し、遺伝子の発現変動が有意 (t 検定での時点毎に溶媒対照との間で P 値 < 0.05) で、発現変動の最高値のコピー数が 2 以上という条件で遺伝子を粗抽出した。その結果、発現が増加する遺伝子 1,893 プロブセット(ps) が粗抽出され、このうち目視による確認により生物学的な変化が示唆されたものとして 750 ps が抽出された。また発現が減少する遺伝子としては 352 ps が粗抽出され、目視による確認により生物学的な変化が示唆されたものは抽出されたものとして 27ps が抽出された。

増加分 750ps について検討した結果、有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークとして、ストレス応答遺伝子やサイトカイン関連遺伝子が見出せた。ストレス応答遺伝子は海馬の際でも認められた。

この内、顕著な発現変動が認められた、Nfkbia (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor, alpha)、Sgk1 (serum/glucocorticoid regulated kinase 1)、Mt1 (metallothionein 1) 及び、Gadd45g (growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma) の 4 種の遺伝子の発現変動を図 3 (別添) に示す。

次いで、発現増加が認められる遺伝子の発現調

節因子の探索の為に、プロモーター解析 (in silico) を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討した結果、ストレス応答に絡むデキサメタゾンあるいはグルココルチコイド受容体(NR3C1)やサイトカインである IL1B や TNF が調節因子として抽出されてきた。抽出された上位 20 位のを図 4 (別添) として示す (< E-9)。したがって、肝における細胞に対してストレス応答が誘発されていることが明らかとなった。

この点、IL1B は、別の研究班での先行研究により、海馬に対して神経伝達抑制作用を有する可能性を示唆するデータを得ており、このことから、IL1B や TNF といった肝由来のサイトカインが海馬に働く二次的シグナル候補物質であることが示唆された。

肝機能への影響などについてさらに詳細な解析を進めたところ、糖新生に係るシグナルネットワークが見出された。すなわち「PGC-1→Foxo1→HNF4→G6pc→Pck1」というシグナルネットワークである。これに係る遺伝子発現変動を図 5 (別添) として示す。したがって毒性予測として、TTX の単回経口投与により、血糖値が上昇するものと考えられ、今後、実測する予定である。

加えて今後、当毒性部が有する遺伝子発現データベース(100 種類以上の化学物質の単回投与データが含まれている)との参照解析を行い、より詳細な遺伝子発現変動解析をおこない、解析精度を上げる予定である。

#### D. 結論

H31/R 元年度は、被験物質としてモデル物質として、フグ毒としてしられる TTX を選択し、雄性マウスに単回経口投与した際の「海馬」における網羅的な遺伝子発現変動解析について検討した。この理由は、脳の内、背景データが多く揃っている部位が海馬であるためである。解析の結果、ストレス関連遺伝子 (Sgk1 遺伝子など) の発現増加が目立ち、他方、Na<sup>+</sup>チャネルなど TTX が直接関与することが示唆されるシグナルネットワーク関連遺伝子の発現変動は認められなかった。この事は、海馬に対して TTX が直接作用するわけではなく、ストレス応答に絡むサイトカインや糖質コルチコイドなどのような二次的シグナルが海馬に働き、その結果、TTX の急性参照用量設定のための報告にあるように、apathy (無関心) と

いった中枢影響が誘発されている事が示唆された。

そこで R2 年度は、この二次的シグナル候補物質を探索するために、海馬とは別に、「肝」における解析を検討し、また多臓器連関解析を実施することとした。解析の結果、発現変動する遺伝子群の上流には、ストレス応答に絡むデキサメタゾンあるいはグルココルチコイド受容体(NR3C1)やサイトカインである IL1B や TNF が調節因子として抽出されてきた。

興味深いことに、ストレス応答関連遺伝子やサイトカイン遺伝子に加えて、糖新生に係る多くの遺伝子の発現増加が認められた。したがって毒性予測として、TTX の単回経口投与により、血糖値が上昇するものと考えられ、今後、実測する予定である。

なお別添に表 1 として、遺伝子の発現変動が有意 (t 検定での P 値<0.05)で、発現変動の最高値の発現コピー数が 200 以上という条件下で自動抽出した全遺伝子のリストを示す。抽出された遺伝子数は 25 ps であった。

R3 年度も引き続き、急性毒性誘発モデル物質を単回経口投与した際の、海馬や肝などの組織における網羅的遺伝子発現変動解析を実施する。

## E. 健康危機情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Ryuichi Ono, Yusuke Yoshioka, Yusuke Furukawa, Mie Naruse, Makiko Kuwagata, Takahiro Ochiya, Satoshi Kitajima, Yoko Hirabayashi: Novel hepatotoxicity biomarkers of extracellular vesicle (EV)-associated miRNAs induced by CCl4. *Toxicol Rep.* 2020; 7: 685-692. [doi 10.1016/j.toxrep.2020.05.002].

Richard Nock, Natalia Polouliakh, Frank Nielsen, Keigo Oka, Carlin R Connell, Cedric Heimhofer, Kazuhiro Shibani, Samik Ghosh, Ken-Ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Taketo Akama, Hiroaki Kitano: A Geometric Clustering Tool (AGCT) to robustly unravel the inner cluster structures of time-series gene expressions. *PLoS One* 2020; 15(7):

e0233755.

[doi 10.1371/journal.pone.0233755]

Hirokatsu Saito, Kenshiro Hara, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura: Effect of Vitamin E deficiency on spermatogenesis in mice and its similarity to aging. *Reproductive Toxicology* 2020; 98: 225-232. [doi: 10.1016/j.reprotox.2020.10.003].

登田美桜、北嶋 聡、シリーズ: 日本毒性学会との連携 マリンバイオトキシン; フグ毒のリスク評価について、*中毒研究(Jpn. J. Clin. Toxicol.)* 2021; 34: 58-62. [ISSN: 0914-3777]

### 2. 学会発表

北嶋 聡、種村 健太郎、菅野 純、室内揮発性有機化学物質の極低濃度下における吸入曝露の際のマウス中枢神経系への影響、第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020.6.30.) オンライン

高橋 祐次、種村 健太郎、相崎 健一、北嶋 聡、急性毒性試験の近代化によるテトロドキシンの中枢影響評価、第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020.6.29.) オンライン

種村 健太郎、佐々木 貴熙、齊藤 洋克、高橋 祐次、北嶋 聡、菅野 純、発達期マウスへのドーモイ酸投与による成熟後の神経行動毒性発現～海産毒による異常誘発モデルとしての検討 2 ～、第 47 回日本毒性学会学術年会(2020.6.29.) オンライン

齊藤 洋克、原 健士朗、富永 貴志、中島 欽一、北嶋 聡、菅野 純、種村 健太郎、低用量ペルメトリンの早期慢性ばく露による成熟後の雄マウス行動影響、第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020.6.29.) オンライン

種村 健太郎、齊藤 洋克、古川 佑介、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、低用量/低濃度化学物質の発生-発達期ばく露による情動認知行動毒性～情動認知行動毒性評価系の国際標準化に向けた対応～、第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020.6.30.) オンライン

菅野 純、北嶋 聡、相崎 健一、小野 竜一、Percellome Project における精度管理とその解析への影響、第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020.6.30.) オンライン

小野 竜一、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、化学物質の反復投与によるゲノムワイドなヒストン修飾の変化、第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020.6.30.) オンライン

大久保 佑亮、嘉本 海大、高橋 祐次、北嶋 聡、太田 裕貴、覚醒下非拘束ラットから血中酸素飽和

度・心拍数・呼吸数を計測可能なウェアラブルパルスオキシメータの開発、第 47 回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) オンライン

相崎 健一、長谷 武志、北嶋 聡、小野 竜一、北野 宏明、菅野 純、Current and future application of PERCELLOME database as a part of big data to toxicological research、第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020.7.1.) オンライン

Toshime Igarashi, Yukuto Yasuhiko, Ryuichi Ono, Erika Tachihara, Yu Takahashi, Makiko Kuwagata, Satoshi Kitajima、CRISPR/Cas9 システムを用いたマウス受精卵のゲノム編集におけるオンターゲットの多様な非意図的変異、第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020.6.29.) オンライン

原唯香、平舘裕希、原健士朗、北嶋聡、菅野純、種村健太郎、エストロゲン受容体  $\alpha$  非翻訳領域遺伝子改変マウスの学習記憶不全と遺伝子発現プロファイル解析、第 113 回日本繁殖生物学会大会(2020.9.25.)、オンライン

五十嵐智女、安彦行人、小野竜一、高橋雄、栗形麻樹子、北嶋聡、CRISPR/Cas9 のゲノム編集によるノックインマウス作製時に認められたオンターゲットの多様な非意図的変異、日本食品衛生学会創立 60 周年記念第 116 回学術講演会 (2020.11.24.)、オンライン

北嶋 聡、食品トキシコゲノミクスと毒性予測、第 18 回食品安全フォーラム (2020.11.27.)

北嶋 聡、シックハウス(室内空気汚染)対策に関する研究—極低濃度吸入曝露の際のマウス海馬 Percellome トキシコゲノミクスによる中枢影響予測—、令和 2 年度化学物質の安全管理に関するシンポジウム (2021.2.4.) オンライン

Ono R, Yasuhiko Y, Aisaki KI, Kitajima S, Kanno J, Hirabayashi Y: Horizontal gene transfer mediated by exosomes: a possible new risk for genome editing、Keystone Symposia Conference: Engineering the Genome(2020.2.10) on-line

Kanno J, Aisaki KI, Ono R, Kitajima S : Comprehensive Histone, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeated Exposure to Chemicals: Percellome Project Update、59th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2020.3.15) on-line

Ono R, Yoshioka Y, Furukawa Y, Ochiya T, Kitajima S, Hirabayashi Y: Evaluation of extracellular vesicles ( EVs ) as toxic biomarkers in mouse、59th Annual Meeting of Society of Toxicology (2020.3.15) on-line

## 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

別添

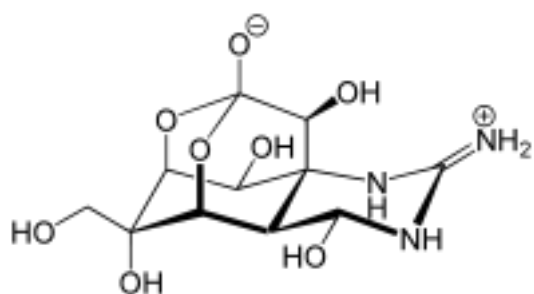


図 1 TTX の化学構造式

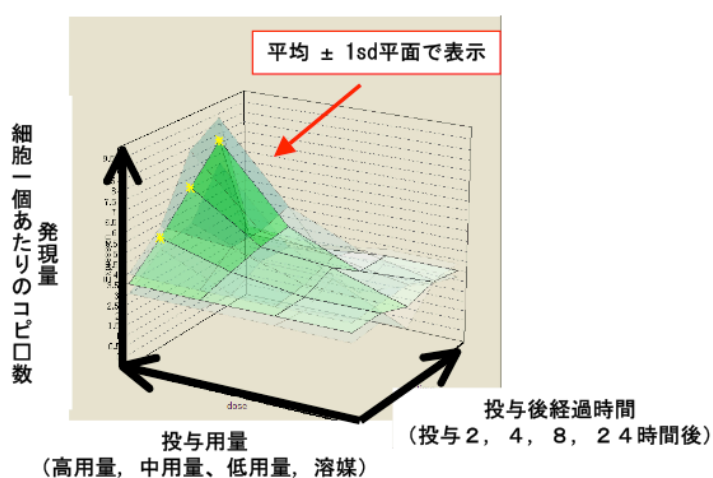


図 2 遺伝子発現変動を示す図

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 次元の曲面グラフとして示し、各条件の 3 サンプルの平均値を示す曲面と、その上下に標準偏差(SD)平面(薄い色)をあわせて示した。一つの化学物質につき、約 45,000 枚の平面が描かれる。



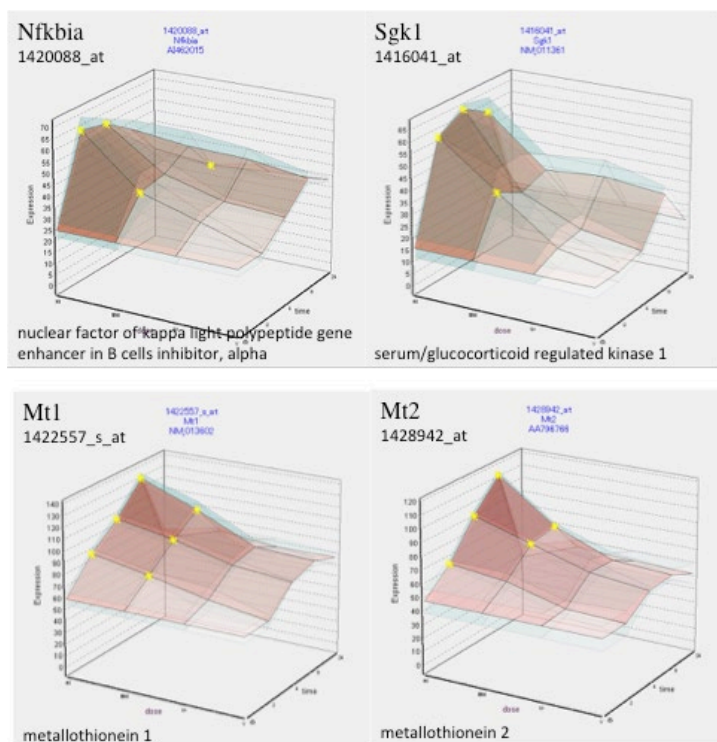


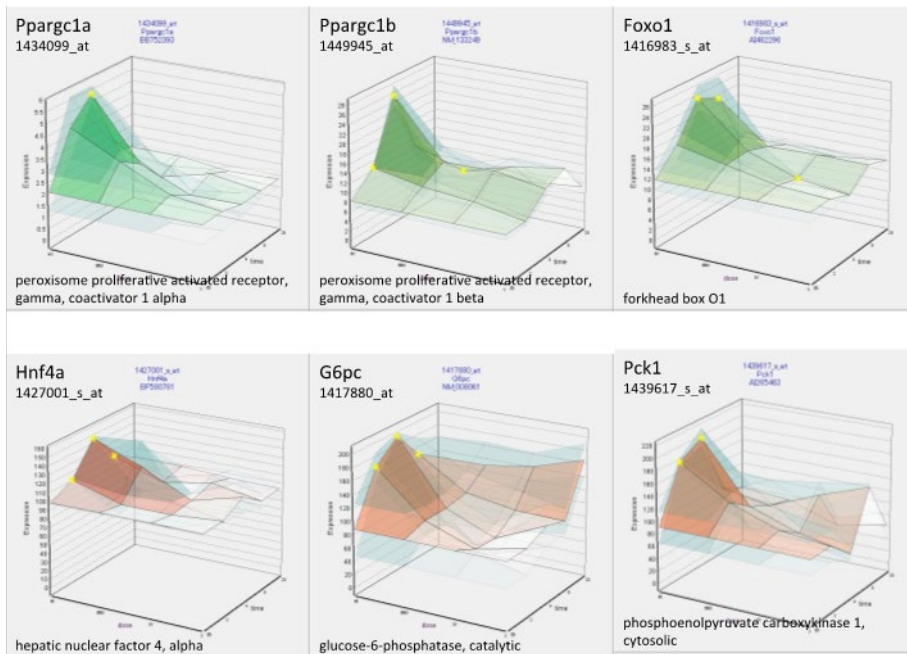
図 3 TTX 単回経口投与時のマウス肝におけるストレス応答関連遺伝子 Nfkbia、Sgk1、Mt1 及び Gadd45g 遺伝子の発現変動

TTX 単回投与時にマウス海馬で発現増加が認められたストレス応答関連遺伝子の一部について発現変動の状態を示す(\*は、同時点の溶媒対象群に対して、 $p < 0.05$  で有意な変動であることを示す)。

Upstream Regulator	Molecule Type	p-value of over Target Molecules in Dataset
1 NR3C1	ligand-dependent nuclear receptor	1.41E-14
2 HNF4A	transcription regulator	1.83E-12
3 IL1B	cytokine	2.34E-12
4 dexamethasone	chemical drug	3.67E-12
5 Gcg	other	4.98E-12
6 lipopolysaccharide	chemical drug	5.23E-11
7 RORA	ligand-dependent nuclear receptor	5.66E-11
8 methylprednisolone	chemical drug	7.55E-11
9 palmitic acid	chemical - endogenous mammalian	7.58E-11
10 beta-estradiol	chemical - endogenous mammalian	1.48E-10
11 RORC	ligand-dependent nuclear receptor	2.66E-10
12 ACOX1	enzyme	3.23E-10
13 ZMPSTE24	peptidase	4.67E-10
14 PRKAG3	other	5.97E-10
15 forskolin	chemical toxicant	8.36E-10
16 TP53	transcription regulator	8.65E-10
17 TNF	cytokine	9.86E-10
18 FOXO3	transcription regulator	1.16E-09
19 cycloheximide	chemical reagent	3.35E-09
20 pirinixic acid	chemical toxicant	3.77E-09

図 4 プロモーター解析 (in silico) を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討した結果

ストレス応答に絡むデキサメタゾンあるいは TNF が調節因子として抽出されてきた。抽出された上位 20 位のもの示す。NR3C1 は、グルココルチコイド受容体の別名である。



**図5 TTX 単回経口投与時のマウス肝における糖新生関連遺伝子 Ppargc1a、Foxo1、Hnf4a、G6pc 及び Pck1 遺伝子の発現変動**

TTX 単回投与時にマウス海馬で発現増加が認められた糖新生関連遺伝子について発現変動の状態を示す (\*は、同時点の溶媒対象群に対して、 $p < 0.05$  で有意な変動であることを示す。)

**表1**

解析ソフト RSort を利用し、TTX 単回経口投与時のマウス海馬において遺伝子の発現変動が有意(t 検定での P 値<0.05)で、発現変動の最高値の発現コピー数が 200 以上という条件下で自動抽出した発現変動遺伝子のリスト [抽出された遺伝子数 25 ps] (抽出条件: Expand-H\_G2\_AP\_lmt\_Std-Av.RSSETA)

	AffyID	Gene Name	Yp1	Max	P1t-test
1	1418918_at	Igfbp1	02hr	318.1235667	0.003899734
2	1448185_at	Herpud1	02hr	214.0015	0.006725889
3	1450332_s_at	Fmo5	04hr	225.1868667	0.006593222
4	1422557_s_at	Mt1	04hr	307.9568667	8.72E-05
5	1424744_at	Sds	04hr	228.2198	1.12E-05
6	1426516_a_at	Lpin1	04hr	200.4312	1.61E-06
7	1428942_at	Mt2	04hr	300.4293	1.36E-05
8	1424853_s_at	Cyp4a10 /// C	08hr	246.6151667	0.029148386
9	1438657_x_at	Gm13363 ///	08hr	204.1972333	0.008159991
10	1450970_at	Got1	08hr	200.9056667	0.002013223
11	1435137_s_at	1200015M12Ri	08hr	201.3215333	0.021730182
12	1455770_at	Tdo2	08hr	249.9540333	0.002306547
13	1449337_at	Tdo2	08hr	212.0763333	0.003851623
14	1455892_x_at	---	08hr	230.5795	0.001144295
15	1431213_a_at	Gm3579	08hr	234.6139333	0.000630987
16	1455869_at	---	08hr	218.3590333	0.001007548
17	1424126_at	Alas1	08hr	250.9812333	0.023476841
18	1428909_at	A130040M12Ri	08hr	264.3732	0.024018119
19	1422230_s_at	Cyp2a4 /// Cy	08hr	241.2177	0.013657129
20	1417610_at	Apoa5	08hr	292.0906333	0.016281626
21	1423147_at	Mat1a	08hr	245.8919	0.039107447
22	1453238_s_at	A130040M12Ri	08hr	227.5710333	0.022209107
23	1418706_at	Slc38a3	08hr	237.4986	0.015401815
24	1454925_x_at	Mdh1	24hr	252.9401333	0.020635606
25	1435371_x_at	Ces1d	24hr	200.4195	0.009338377