

Ⅱ． 分担研究報告書

発達神経毒性の迅速化・高精度・省動物に資する新規評価手法開発のための研究

分担研究報告書

分担研究課題：「脳を主対象とする網羅的遺伝子発現解析」

研究分担者 北嶋 聡 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 安全性予測評価部

研究要旨

発達神経毒性(DNT)は、発生期(胎生期)あるいは生後発達期の神経系に対する化学物質による有害作用と説明される。この評価に向けた、より迅速、低コストで省動物に資する新規評価手法の開発が急務となっている。しかしながら、神経系の発生・発達は極めて複雑な現象であり、ヒトの発達神経毒性の定義ですら専門家間で認識が異なるのが現状である。また、有害発現経路(AOP)に立脚したDNTの*in vitro*試験法の開発が精力的になされているが、詳細なAOPの積上げ・組み合わせのみで複雑なDNTに係る試験法の開発や実体の解明が進むとは考えにくい。

本研究では、DNTを発生期と生後発達期とに分け、2つの独自技術による課題の解決を試みる事を目的とする。我々はこれまでに催奇形性陽性物質21種類、陰性物質14種類を0.89の高い正確度かつハイスループットで判別可能なヒトiPS細胞を用いた*in vitro*発生毒性試験法を開発している(iScience 2022, J Biosci Bioeng 2022, STAR Protocols 2022)。この試験法では、胚発生を制御するシグナルネットワークに対する化学物質のかく乱作用を検出することで、1つの試験で発生毒性のAOPを包括的に評価可能である。1)本手法をまずは発生期のDNTの検出に適応拡大しOECDのガイドラインへの採択可能な試験系を開発する。バルプロ酸のようなDNTとの関連が指摘されている物質の評価にも成功しており、実現の可能性は高い。

一方、発達期のDNTに関しては、その複雑さ故に基礎的な背景データの不足が大きな問題である。我々はこれまでに、シックハウス症候群の動物試験モデルの開発に成功し、その中で、発達期においてキシレン等の吸入曝露により、成熟後、DNTの特徴の一つと考えられる情動認知行動異常が誘発されることを見出した。また、脳海馬領域の網羅的発現変動解析により、当該物質の影響をシグナルネットワークとして検出することに成功している。2)これら独自技術を駆使して発達期DNTの発現機序を明らかにし、将来的な*in vitro*試験法への適応拡大に必要なシグナルネットワークを同定する。

令和5年度(初年度)は、この発達期DNTの目的達成に向け、先行研究(22時間/日×7日間反復曝露による吸入曝露試験)における対照群(成熟期マウス海馬)をサンプルとして用いた。そして、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により、中枢神経系に関わる各細胞の分化マーカーとして、Mtap2、Mapt(ニューロン)、Dcx(新生ニューロン)、Gfap(アストロサイト)、Mag、Mbp(オリゴデンドロサイト)、Nes、Sox2(神経幹細胞)の各遺伝子を抽出し、その発現を確認した。

令和6年度(昨年度)は、キシレン(2、20 ppm)を幼若期に反復吸入曝露した際に得られた脳サンプルのうち、海馬について遺伝子発現を網羅的に解析した結果、特に高濃度(20ppm)曝露群において、情動認知行動解析で検出された学習記憶異常に対応すると考えられる神経系のシグナルネットワークを抽出し、グルタミン酸受容体を介すると考えられる神経伝達の抑制が示唆された。またプロモーター解析(*in silico*)を、IPAにおけるUpstream Analysisを用いて検討した結果からは、遺伝子発現調節因子として、中枢神経系における髄鞘形成に関与すると考えられるマイクロRNAであるmir23及びmir27が抽出され、神経伝達や神経回路の維持への関与が示唆された。

令和7年度(今年度)は、トルエン(0.7、7 ppm)を幼若期に反復吸入曝露した際に得られた脳サンプルのうち、海馬について遺伝子発現を網羅的に解析した結果、特に高濃度(7ppm)曝露群において、GABA作動性神経伝達の抑制に加え、炎症性応答に関わるシグナルの変化、および神経回路の形成・維持、可塑性に関わるシグナルネットワークが抽出され、行動試験において検出された影響を支持するものであると考えられた。

A. 研究目的

発達神経毒性(DNT)は、発生期(胎生期)あるいは生後発達期の神経系に対する化学物質による有害作用と説明される。この評価に向けた、より迅速、低コストで省動物に資する新規評価手法の開発が急務となっている。しかしながら、神経系の発生・発達は極めて複雑な現象であり、ヒトの発達神経毒性の定義ですら専門家間で認識が異なるのが現状である。また、有害発現経路(AOP)に立脚したDNTのin vitro試験法の開発が精力的になされているが、詳細なAOPの積み上げ・組み合わせのみで複雑なDNTに係る試験法の開発や実体の解明が進むとは考えにくい。本研究では、DNTを発生期と生後発達期とに分け、2つの独自技術による課題の解決を試みる。

発達期のDNTに関しては、その複雑さ故に基礎的な背景データの不足が大きな問題である。我々はこれまでに、シックハウス症候群の動物試験モデルの開発に成功し、その中で、発達期においてキシレン等の吸入曝露により、成熟後、DNTの特徴の一つと考えられる情動認知行動異常が誘発されることを見出した。また、脳海馬領域の網羅的発現変動解析により、当該物質の影響をシグナルネットワークとして検出することに成功している。

本分担研究では、モデル揮発性物質を脳が高感受性期にあたる生後発達期に吸入曝露し、中枢神経系への影響を誘発したマウス脳サンプルの網羅的遺伝子発現解析を行うことにより、将来的なin vitro試験法への適応拡大に必要な神経科学的データを収集する。

B. 研究方法

Total RNA の分離精製

マウス組織(脳)を採取後すみやかにRNA later (Ambion社)に4℃で一晩浸漬し、RNaseを不活化した。脳は摘出後、カミソリ刃にて正中で左右に切断し、左部について、小脳、脳幹、海馬及び大脳皮質の4部位に分離後、各々別チューブに採取した。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。100 ngを電気泳動しRNAの純度及び分解の有無を検討した。

遺伝子発現変動解析

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、300-500 bp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℃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。また、得られた遺伝子リストと既知情報の照合による確認は、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.)を用いて行った。

(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的配慮を十分行い、所属の研究機関が定める「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」を遵守した。

C. 研究結果及び考察

令和5年度(初年度)は、先行研究(22時間/日×7日間反復曝露による吸入曝露試験)の対照群である成熟期雄性マウス(C57BL/6J)の海馬における網羅的遺伝子発現解析の結果、中枢神経系に

関わる遺伝子から、海馬における各細胞の分化マーカーとして、Mtap2とMapt（ニューロン）、Dcx（新生ニューロン）、Gfap（アストロサイト）、MagとMbp（オリゴデンドロサイト）、NesとSox2（神経幹細胞）の各遺伝子を抽出し、その発現を確認し、その発現量の絶対値を求めることができた。

令和6年度(昨年度)は、キシレン（2、20 ppm）を幼若期吸入曝露試験を行ったマウスについて、行動解析終了後に採取した、脳4部位の内、背景データが多く揃っており、また学習記憶の責任部位の1つである海馬の遺伝子発現解析を行った。海馬における上記の各分化マーカーの遺伝子の発現について、曝露群（低濃度および高濃度）と対照群を比較したところ、低濃度（2 ppm）曝露群においてDCX（新生ニューロン）の有意な発現増加が認められた。

次いで、対照群と比較し、2 ppm（低濃度）のキシレン曝露群において、発現が有意(t 検定での P 値<0.05)に変動（増加及び減少）する遺伝子（プローブセット：ps）数を検討したところ、以下のとおりとなった（対照群に対して曝露群の比率が、増加は 1.200 より大きいものを、減少は 0.833 より小さいものを採用）。この際、細胞 1 個あたりの発現コピー数につき海馬において 0.7 コピー以上のものを採用した。

762 ps（増加）、20 ps（減少）

増加分 762 ps ならびに減少分 20 ps について検討した結果、IPA における Canonical pathway による検索、並びに、発現変動が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に IPA における Upstream Analysis を用いて検討したが、いずれの場合においても、現時点では、神経系の有害事象に関わる顕著な影響を示す結果は見いだせなかった。

次に対照群と比較し、20 ppm（高濃度）のキシレン曝露群において、発現が有意(t 検定での P 値<0.05)に変動（増加及び減少）する遺伝子（プローブセット：ps）数を検討したところ、以下のとおりとなった（対照群に対して曝露群の比率が、増加は 1.200 より大きいものを、減少は 0.833 より小さいものを採用）。この際、細胞 1 個あたりの発現コピー数につき海馬において 0.7 コピー以上のものを採

用した。

83 ps（増加）、542 ps（減少）

増加分 83 ps について、IPA における Canonical pathway による検索、並びに、Upstream Analysis を用いて検討したが、神経系の有害事象に関わる顕著な影響を示す結果は現時点では見いだせなかった。

一方、減少分 542 ps について検討した結果、IPA における Canonical pathway による検索において、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、グルタミン酸AMPA 受容体シグナル伝達、カルシウムシグナルが確認され、グルタミン酸受容体を介すると考えられる神経伝達の抑制が示唆された。また、発現減少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 を用いて検討したところ、遺伝子発現調節因子として、中枢神経系における髄鞘形成に関与すると考えられるマイクロRNAである mir23 及び mir27 が抽出され、神経伝達や神経回路の維持への関与が示唆された。

この高濃度曝露群における解析結果については、情動認知行動試験によって検出された学習記憶への影響を支持するものであると考えられた。また、これまでの解析結果により、キシレンの低濃度曝露群と高濃度曝露群では検出される影響に異なる点が多いことから、それぞれ異なるシグナルネットワークを介して、中枢神経系に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

令和7年度(今年度)は、トルエン幼若期吸入曝露試験を行ったマウスについて、行動解析終了後に採取した、学習記憶の責任部位の1つである海馬の遺伝子発現解析を行った。海馬における各分化マーカーの遺伝子の発現について、曝露群（低濃度および高濃度）と対照群を比較したところ、低濃度（0.7 ppm）曝露群、高濃度（7ppm）曝露群において、いずれの分化マーカーも有意差は認められなかった（図1）。

次いで、対照群と比較し、0.7 ppm（低濃度）のトルエン曝露群において、発現が有意(t 検定での P 値<0.05)に変動（増加及び減少）する遺伝子（プローブセット：ps）数を検討したところ、以下のとおりとなった（対照群に対して曝露群の比率が、増

加は 1.200 より大きいものを、減少は 0.833 より小さいものを採用)。この際、細胞 1 個あたりの発現コピー数につき海馬において 0.7 コピー以上のものを採用した。

122 ps (増加)、111 ps (減少)

増加分 122 ps ならびに減少分 111 ps について検討した結果、IPA における Canonical pathway による検索、並びに、発現変動が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に IPA における Upstream Analysis を用いて検討したが、いずれの場合においても、現時点では、神経系の有害事象に関わる顕著な影響を示す結果は見いだせなかった。

次に対照群と比較し、7 ppm (高濃度) のトルエン曝露群において、発現が有意(t 検定での P 値 < 0.05)に変動 (増加及び減少) する遺伝子 (プローブセット: ps) 数を検討したところ、以下のとおりとなった(対照群に対して曝露群の比率が、増加は 1.200 より大きいものを、減少は 0.833 より小さいものを採用)。この際、細胞 1 個あたりの発現コピー数につき海馬において 0.7 コピー以上のものを採用した。

460 ps (増加)、347 ps (減少)

増加分 460 ps について検討した結果、IPA における Canonical pathway による検索において、神経炎症シグナル伝達をはじめとした炎症関連経路が抽出され、炎症性応答に関わるシグナルの亢進方向の変化が示唆された。一方、Upstream Analysis を用いて検討したところ、現時点では、神経系の有害事象に関わる顕著な影響を示す結果は見いだせなかった。

減少分 347 ps について検討した結果、IPA における Canonical pathway による検索において、シナプス形成シグナル伝達、髄鞘形成シグナル伝達、GABA 作動性神経伝達 (合成・放出・再取り込み・分解) に関連する経路等が抽出され、神経回路の形成・維持や可塑性に関わる基盤過程への関与が示唆された。さらに Upstream Analysis を用いて検討したところ、神経保護・シナプス可塑性に関与する beta-estradiol が抽出された。

トルエンの曝露による遺伝子発現変動解析に基

づくパスイ解析の結果からは、特に高濃度 (7 ppm) 曝露群においては、GABA 作動性神経伝達の抑制に加え、炎症性応答に関わるシグナルの変化、および神経回路の形成・維持、可塑性に関わるシグナルネットワークが抽出され、行動試験において検出された影響を支持するものであると考えられた。

以上のキシレンとトルエンの場合の解析結果から生後発達期 DNT 誘発メカニズムとして、グルタミン酸受容体あるいは GABA 受容体を介すると考えられる神経伝達の抑制が示唆された。この点、中枢神経系は興奮性 (主にグルタミン酸作動性) 入力と抑制性 (主に GABA 作動性) 入力の相互作用により成立し、出生後の発達過程で回路機能が成熟し、発達期には、抑制性回路の機能的成熟が相対的に遅れて進行する側面があるため (Le Magueresse & Monyer. Neuron, 2013[doi:10.1016/j.neuron.2013.01.011])、興奮/抑制 (E/I) バランスは出生後発達の過程で次第に調整されることが知られている (Hensch & Fagiolini. Prog Brain Res, 2005 [doi:10.1016/S0079-6123(04)47009-5])。この E/I バランスの成熟は、情動や認知を含む脳高次機能を支える神経回路基盤の形成・維持にも関与するために (Caballero et al. Neurosci Biobehav Rev, 2016[doi:10.1016/j.neubiorev.2016.05.013]、Ferguson & Gao. Front Neural Circuits. 2018[doi:10.3389/fncir.2018.00037])、生後発達期における重要なイベントとして位置づけられるものと考えられる。キシレン曝露の場合では興奮性、トルエン曝露の場合は抑制性に関連するシグナルネットワークへの影響が示唆されており、発達期に進行する E/I バランス成熟過程のいずれかの段階が、当該化学物質曝露によりかく乱される可能性があると考えられた。すなわち、以上の解析結果と考察から、「生後発達期における、将来的に in vitro 試験法への適応拡大に必要なシグナルネットワークの同定の試み」に向け、この E/I バランス成熟過程が、その候補として挙げられ、この評価に際しては、この過程を検討する in vitro 実験系が有用と考える。この例としては、比較的最近になって報告された、iPS 細胞から興奮性及び抑制性ニューロンを個々に分化誘導してから「共培養」することで、E/I バランスの成熟を評価する手法を挙げることができる (Heider

et al. BMC Neuroscience, 2024 [doi: 10.1186/s12868-024-00858-z]]).

D. 結論

生後発達期DNTの分子機序解明に向け、キシレン(0、2及び20 ppm)を幼若期に反復吸入曝露した際に得られた脳サンプルのうち、海馬について遺伝子発現を網羅的に解析した結果、特に高濃度(20ppm)曝露群において、情動認知行動解析で検出された学習記憶異常に対応すると考えられる神経系のシグナルネットワークを抽出し、グルタミン酸受容体を介すると考えられる神経伝達の抑制が示唆され、またプロモーター解析(in silico)を、IPAにおけるUpstream Analysisを用いて検討した結果からは、遺伝子発現調節因子として、中枢神経系における髄鞘形成に関与すると考えられるマイクロRNAであるmir23及びmir27が抽出され、神経伝達や神経回路の維持への関与が示唆された。

トルエンについてもキシレンでの行動影響と同様に、生後発達期における曝露により、DNTの特徴の一つと考えられる行動異常が確認され、その類似点として、特に記憶に対する影響が顕著に観察される結果となった。トルエンの曝露による遺伝子発現変動解析に基づくパスウェイ解析の結果からは、特に高濃度(7 ppm)曝露群においては、GABA作動性神経伝達の抑制に加え、炎症性応答に関わるシグナルの変化、および神経回路の形成・維持、可塑性に関わるシグナルネットワークが抽出され、行動試験において検出された影響を支持するものであると考えられた。

このように、生後発達期DNT誘発メカニズムに関与する複数のシグナルネットワークを見出し、以って、生後発達期のin vitro試験法への適応拡大に必要な候補シグナルネットワークを明らかにするという当初の目的は達成できたものと考ええる。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表(抜粋)

○Hirokatsu Saito, Kousuke Suga, Koji Fujihara, Motoh Mutsuga, Satoshi Yokota, Takuya Nishimura, Satoshi Kitajima: Exposure to xylene early in life induces memory abnormalities of adult male mice. Exp. Anim. 2025, 75 (2): 222-233.
[doi.org/10.1538/expanim.25-0064]

Yumiko Imai, Shunsuke Kimura, Satoshi Kitajima, Norihiro Sadato, Ryosuke Chiba, Hiroshi Hibino, Satomi Adachi-Akahane: Toward the promotion of “One Health” – part I: How do humans work to live together with humans, other organisms, and xenobiotics on Earth? J Physiol Sci. 2025; 76(1):100050
[10.1016/j.jphys.2025.100050]

Toshime Igarashi, Satoshi Yokota, Asako Aida, Takuya Nishimura, Satoshi Kitajima: In vivo screening evaluation of 12 chemicals as candidate endocrine disruptors using ovariectomized mouse uterotrophic bioassay. Regul. Toxicol. Pharmacol. 2025; 162: 105900
[doi.org/10.1016/j.yrtph.2025.105900]

Satoshi Yokota, Kiyoshi Hashimoto, Takuya Sato, Koichi Uemura, Kazuhide Makiyama, Takuya Nishimura, Satoshi Kitajima, Takehiko Ogawa: A long-term mouse testis organ culture system to identify germ cell damage induced by chemotherapy. Curr. Res. Toxicol. 2025; 8: 100228.
[doi.org/10.1016/j.crttox.2025.100228]

Satoshi Yokota, Tsuyoshi Kawakami, Hiroki Yoshioka, Nozomu Moriya, Nao Sekine, Nobuhiko Miura, Satoshi Kitajima, Takamichi Ichinose, Shigeru Oshio: In utero impacts of intratracheal administration of silver nanoparticles on spermatogenesis in two generations of mice. Environ Sci Pollut Res Int. 2025; 32(25):15304-15320.
[doi: 10.1007/s11356-025-36607-w]

Yu Takahashi, Takeshi Igawa, Chiyo Nanba, Hajime Ogino, Hideho Uchiyama, Satoshi Kitajima: Perichordal Vertebral Column Formation in Rana kobai. J Morphol. 2025;

286(4): e70044.
[10.1002/jmor.70044]

Kenji Ohya, Shouhei Hirose, Kohei Nishikaku, Taka-hiro Ohnishi, Kenichi Lee, Sunao Iyoda, Akiko Ku-bomura, Yukihiro Akeda, Katsumi Mizukami, Tomi-katsu Suzuki, Kenji Takinami, Yuhji Taquahashi, Makiko Kuwagata, Satoshi Kitajima, Takashi Inoue, Yukiko Hara-Kudo. Genomic features and patho-genicity of atypical diarrheagenic Escherichia coli from a large foodborne outbreak. International Journal of Food Microbiology 434 (2025) 111134-
[doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2025]

2. 学会発表 (抜粋)

北嶋 聡: 細胞培養食品を取り巻く最近の情勢についてーその開発状況と安全性に係る諸外国の規制動向ー、第23回食品安全フォーラム、東京、2025年12月12日、口頭

北嶋 聡: 細胞培養食品を取り巻く最近の情勢について、培養細胞の食品利用に係る国際会議、東京、2025年11月13日、口頭

五十嵐智女, 西村拓也, 北嶋 聡: 細胞培養食品(いわゆる培養肉)の開発と安全性確保に関する最新動向Ⅱー潜在的なハザード因子の検討ー、日本動物学会第96回名古屋大会、名古屋、2025年9月5~6日、ポスター

菅野 純, 小林美穂, 渡部徹郎, 辻 昌貴, 森田絃一, 菅 康佑, 横田 理, 高橋祐次, 北嶋 聡: カーボンナノチューブ吸入曝露マウスの肺病変におけるリンパ管を中心とした病理形態について、第52回日本毒性学会学術年会、沖縄、2025年7月4日、口頭 (シンポジウム)

北嶋 聡: 遺伝子改変、細胞分析、遺伝子発現及びエピジェネティクス解析を包括した網羅的 in vivo 毒性研究、第52回日本毒性学会学術年会、沖縄、2025年7月3日、口頭 (学会賞受賞者講演)

松田直晃, 大久保佑亮, 小原息吹, 小石川 蒼, 馬 敏, 高野珠実, 西村拓也, 高橋祐次, 北嶋 聡, 平林容子, 関澤信一, 桑原正貴, 太田裕貴, 柄内亮太: 長時間連続の自動行動診断を実現するラット用ウェアラブルデバイスシステムの開発、第52回日本毒性学会学術年会、沖縄、2025年7月2日

五十嵐智女, 西村拓也, 北嶋 聡: 細胞培養食品における食品衛生上の潜在的なハザード因子の検討、第52回日本毒性学会学術年会、沖縄、2025年7月2日、ポスター

五十嵐 智女, 相田 麻子, 横田 理, 西村 拓也, 高橋 祐次, 桑形 麻樹子, 北嶋 聡: 多層卵巣摘出マウスを用いた子宮肥大試験による内分泌かく乱化学物質のスクリーニング評価、第72回日本実験動物学会総会、名古屋、2024年5月22日、ポスター

五十嵐智女, 西村拓也, 北嶋 聡: 細胞培養食品(いわゆる培養肉)の開発と安全性確保に関する最新動向Ⅱー潜在的なハザード因子の検討ー、日本動物学会第96回名古屋大会(2025.9.4-6), P479B, 名古屋.

五十嵐智女, 西村拓也, 北嶋 聡: 細胞培養食品(いわゆる培養肉)の安全性確保における潜在的なハザード因子の検討、第121回日本食品衛生学会学術講演会(2025.10.16-17), P-86, 東京

五十嵐 智女, 西村 拓也, 北嶋 聡: フードテックを活用した様々な新規食品の開発と安全性に係る規制動向ー細胞培養食品の潜在的ハザード因子の検討ー、令和7年度日本動物学会中部支部大会(2025.12.6-7), P-19, 静岡.

○齊藤洋克, 菅康佑, 藤原恒司, 六鹿元雄, 横田理, 西村拓也, 北嶋 聡: 生後発達期のキシレン曝露による成熟後雄マウスの行動影響解析 第52回日本毒性学会学術年会、沖縄、2025年7月3日、ポスター

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

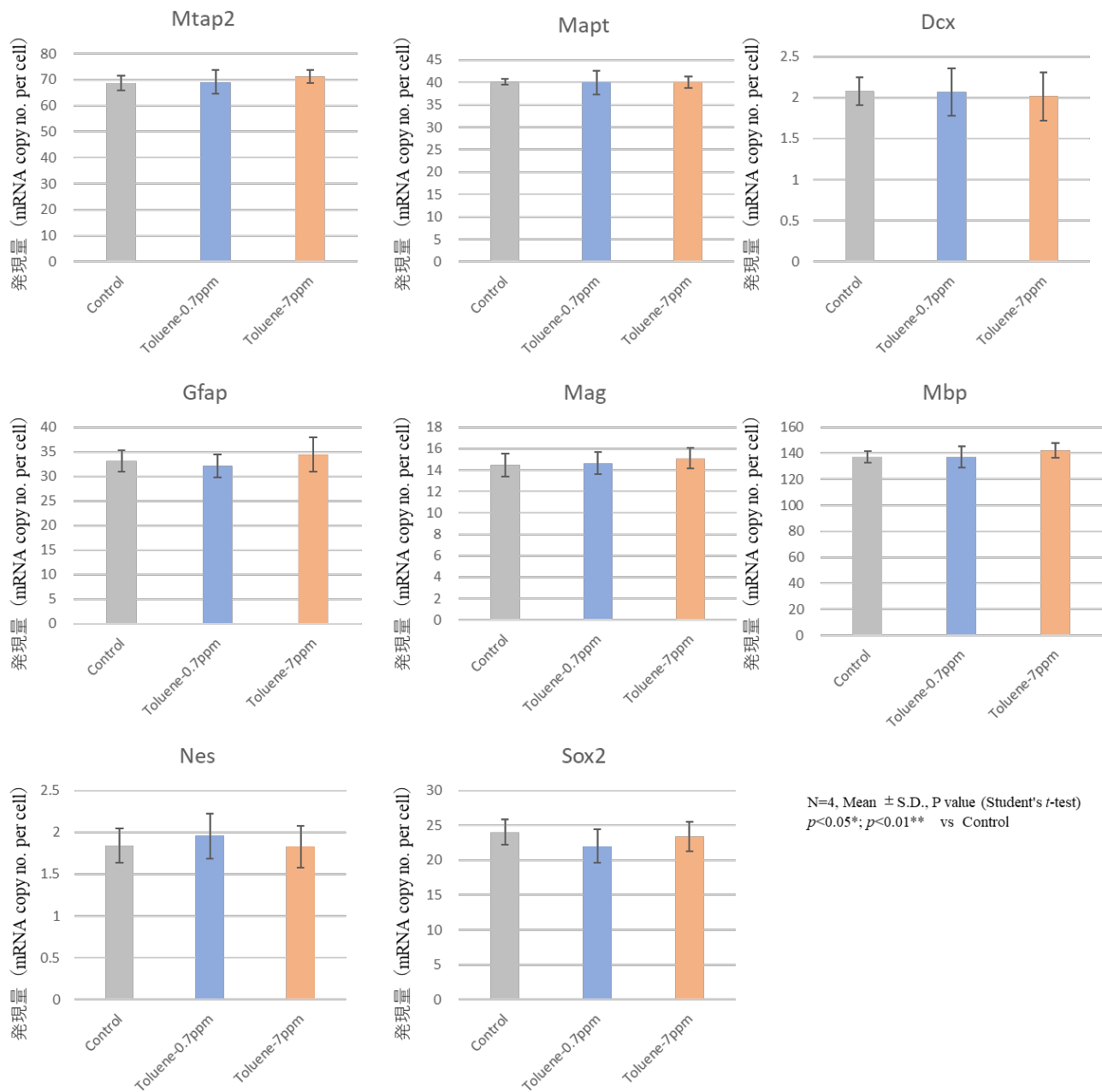


図 1. 海馬における各細胞の分化マーカーの遺伝子発現