

# 研究開発項目B-2 「28日間反復投与試験結果と相関する遺伝子発現データセットの開発」

Ⅲ. 研究開発成果(詳細)

Ⅳ. 実用化の見通し(詳細)

# III. 研究開発成果(詳細)

## 3. 研究開発成果について

## ■ 取得データ概要

化学物質数	40種類
供試動物数	238匹 (No.1: 18匹、No.2～8: 28匹、タイムコース: 24匹)
採材臓器数	No.1: 各26臓器、No.2～4: 各25臓器 (No.2はC2, mca, 4emのみ26臓器)、No.5～8: 各24臓器、タイムコース: 各4臓器
RNA取得数	3,611 サンプル
取得プロファイル数	1,028 プロファイル
遺伝子発現データポイント数	11,827,140 ポイント

## ■ 成果物

生体応答遺伝子発現データセット	78セット (肝臓: 49、腎臓: 24、脾臓: 2、皮下脂肪: 2、小脳: 1)
遺伝子発現プロファイル公開 (CIBEX)	97件 (1,025プロファイル) ※3サンプルは化学物質投与とは関係のない病変部位を参考として採取したものであるため、あえて登録していない。
特許出願	10件 (但しH23年度に10件追加)

※ 平成23年8月17日現在

# 研究開発テーマ①

## 既存化学物質の28日間反復投与実験

## 3. 研究開発成果について 研究開発テーマ①既存化学物質の28日間反復投与実験

## ■ 本プロジェクトで扱った40種類の化学物質とその標的臓器

化学物質名称	化学物質名略	Dose(mg/kg)	CAS No.	肝臓	腎臓	脾臓	神経	胃	毒性なし
2-ブタンジオキシム	2bo	100	96-29-7						
m-キシリレンジアミン	mxa	400	1477-55-0						
3-シアネリジン	3cp	180	100-54-9						
2-(2-アミノエチルアミノ)エタノール	2ae	1,000	111-41-1						
テトラヒドロフルフリルアルコール	thf	600	97-99-4						
メタグルアミド	mca	150	79-39-0						
スルホラン	suf	700	126-33-0						
2-イノプロボキシエタノール	2ip	500	109-59-1						
ヒドラジン-水合物	hnh	30	7803-57-8						
4-エチルモルホリン	4em	500	100-74-3						
メタグル酸エチルトリメチルアンモニウムクロリド	mta	1,000	5039-78-1						
塩化ベンジルトリメチルアンモニウム	bac	120	56-93-9						
m-ニコロベンゼンスルホン酸ナトリウム	mns	1,000	127-68-4						
1-ナフチルアミン-4-スルホン酸ナトリウム四水合物	nat	1,000	130-13-2						
3-オキシ-3-メチル-1-ブタノール	mmb	1,000	56539-66-3						
o-ジクロロベンゼン	dcb	500	95-50-1						
3,4-キシリジン	34x	250	95-64-7						
N-メチルアコリン	nma	125	100-61-8						
トリレンジイソシアナート	tdn	300	26471-62-5						
2-(ジブチルアミノ)エタノール	2de	250	102-81-8						
p-ギルフェノール	pcp	700	599-64-4						
m-クレゾール	mcs	1,000	108-39-4						
2,3-ジメチルアコリン	23d	200	87-59-2						
N,N-ジシクロヘキシルカルボジイミド	dhc	300	538-75-0						
フタル酸ジヘチル	dhp	1,000	3648-21-3						
テトラプロモエタン	tbe	200	79-27-6						
アジピン酸ジブチル	dta	1,000	105-99-7						
p-エチルフェノール	pep	1,000	123-07-9						
o-tert-ブチルフェノール	tbp	500	88-18-6						
p-(1,1,3,3,-テトラメチルブチル)フェノール	tmp	300	140-66-9						
2,4-ジ-tert-ブチルフェノール	24b	300	96-76-4						
3,5-キシリジン	35x	200	108-69-0						
N,N-ジメチルベンジルアミン	nda	200	103-83-3						
1,3-ジプロモプロパン	13d	250	109-64-8						
n-ヘキサデカン	nhd	1,000	544-76-3						
1-プロモ-3-クロロプロパン	bcp	300	109-70-6						
ブノイドクセン	tmb	1,000	95-63-6						
ジシクロヘキシルアミン	dha	70	101-83-7						
1,4-ジプロモベンゼン	14d	300	106-37-6						
2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸	ams	1,000	88-44-8						
計				20	18	12	5	1	9

## 主な標的臓器

- 肝臓：20
- 腎臓：18
- 脾臓：12
- 神経：5
- 胃：1
- 毒性なし：9

※「既存化学物質毒性データベース」より

(注)主な標的臓器として判断されていない臓器において、病理変化が生じる場合はある

## 3. 研究開発成果について 研究開発テーマ①既存化学物質の28日間反復投与実験

## ■ 動物実験の概要

## 《供試動物：ラット》

CrI:CD(SD) 雄(入荷時5週齢、試験開始時6週齢)、各群 n=3

## 《投与用量(濃度)》

「既存化学物質毒性データベース」の28日間反復投与実験の最高用量

## 《投与》

強制経口投与(胃ゾンデを使用)

## 《観察項目》

- 一般状態
  - 毎日2回(午前・午後)観察
- 体重測定
  - 1週間に2回、投与前に実施
  - 投与1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25, 28日目および解剖日に測定
- 摂餌量測定
  - 1週間に1回、投与前に実施
  - 投与1, 8, 15, 22日目に給餌量、その約24時間後に残餌量を測定
- 検査項目
  - 血液生化学検査、臓器重量測定

### 3. 研究開発成果について 研究開発テーマ①既存化学物質の28日間反復投与実験

## ■ 試験設計およびそれにともなう臓器採材時間短縮の検討

<実験条件>

- ・ 化学物質は40種類
- ・ 各投与物質群、3匹
- ・ 対照動物数を最少⇒反復投与実験回数を最少
- ・ 最大26臓器採材
- ・ 臓器採材時間は日周リズムを考慮して、3時間以内

1人で26臓器採材した場合、1匹45分以上必要。⇒ 4匹/日

2チームで同時進行 ⇒ 8匹/日

コンタミや臓器の取り違えの可能性あり



1匹を2人で分割して採材

1匹30分で採材可能 ⇒ 6匹/日

最も効率が良い

これに合わせて

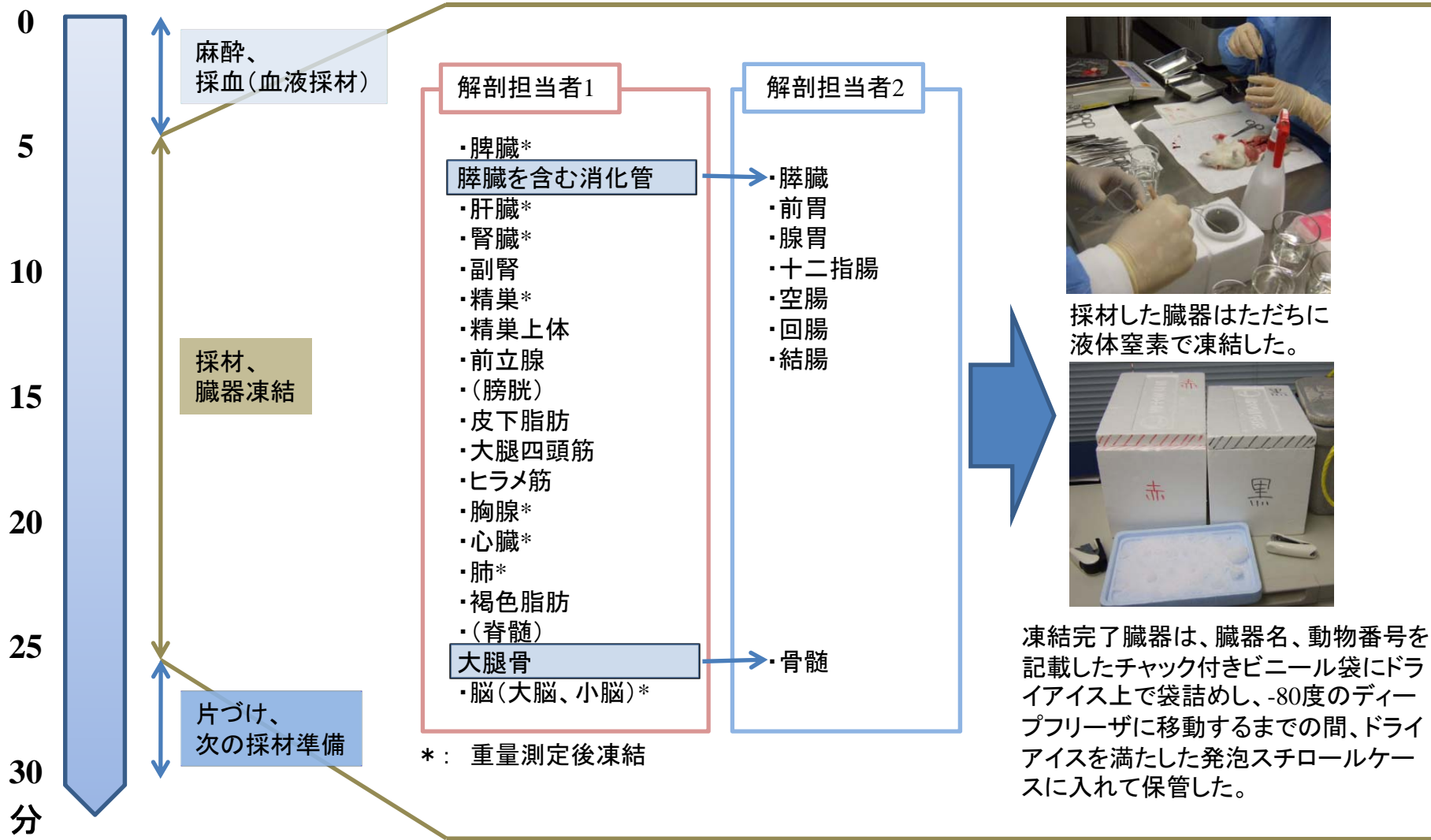
投与は各組ごとに1日ずらして開始した。

×月	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	×月	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
月	火	水	木	金	土	日	月	火	水	木	金	土	日	月	火	水	木	金	土	日	月	火	水	木	金	土	日	月	火	水	木	金	土	日	月	火	水	木	金				
導入		検査																																									
投与回:						1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	6									
投与期間と解剖						→																																					
投与回:						-	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	6								
投与期間と解剖						-																																					
投与回:						-	-	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	6							
投与期間と解剖						-	-																																				

■ □ □ : それぞれ対照+5化学物質の計6匹

3. 研究開発成果について 研究開発テーマ①既存化学物質の28日間反復投与実験

臓器の分割採材



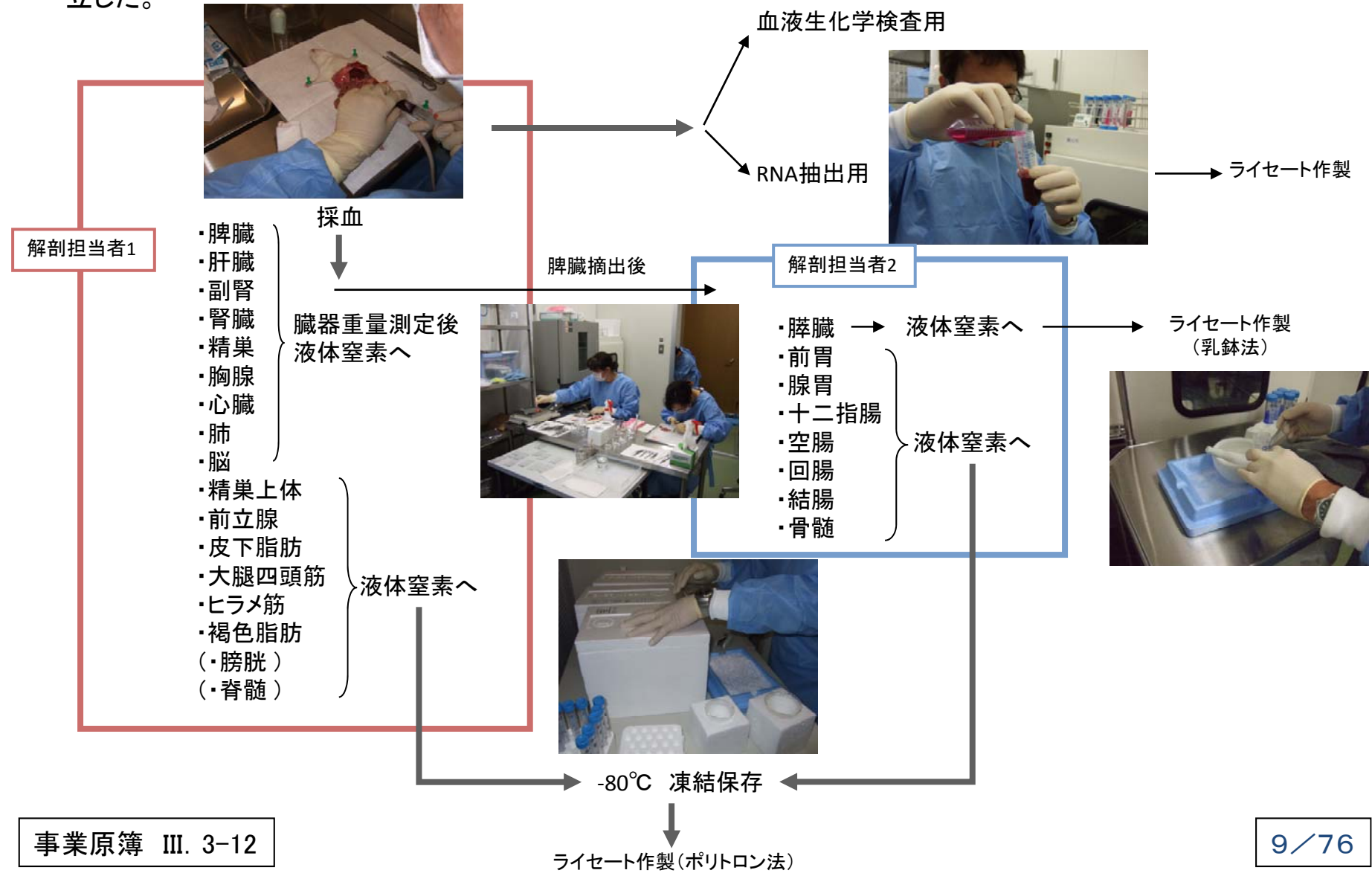
・ 日周リズムの影響を考慮し、中央にあたる3番目に対照を採材することとした。



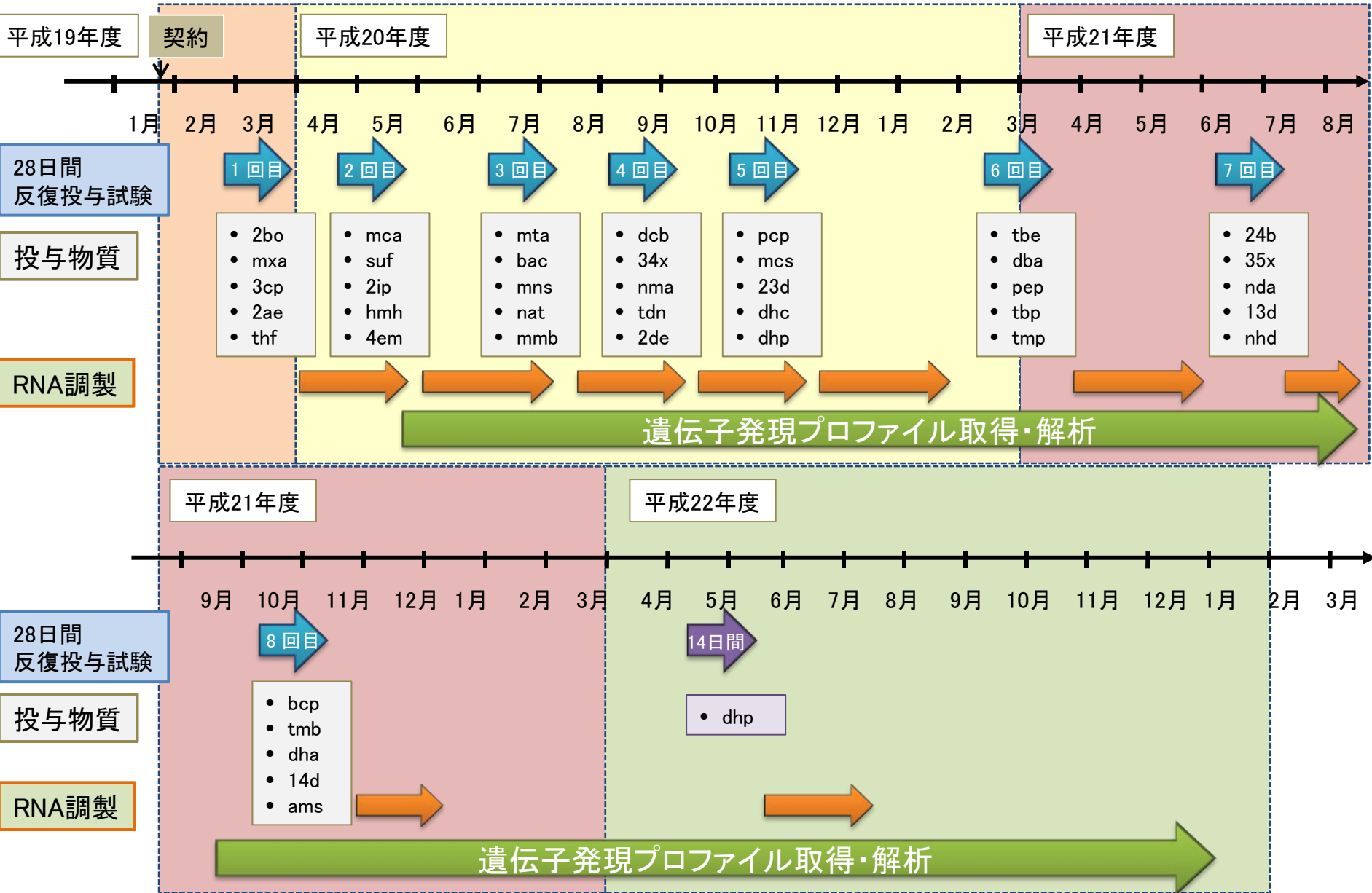
### 3. 研究開発成果について 研究開発テーマ①既存化学物質の28日間反復投与実験

#### ■ 臓器採材の実際

・ 日周リズムを考慮して毎回、ほぼ同時刻に解剖する。また、多臓器・組織を短時間で採材するための手順を確立した。



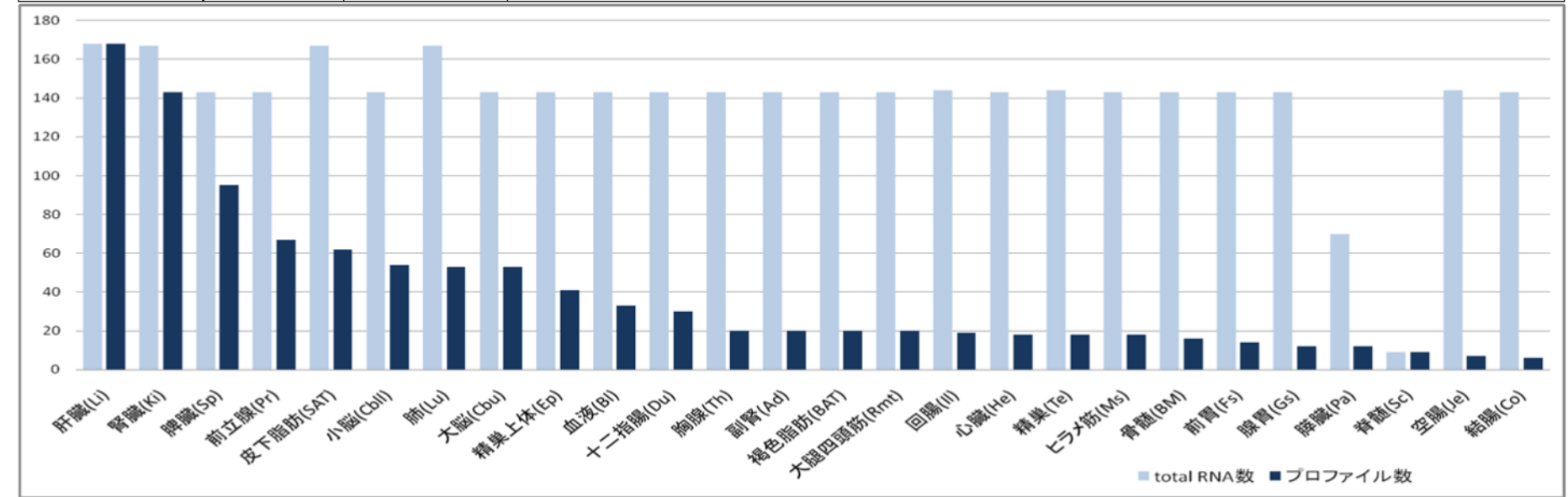
### 3. 研究開発成果について 研究開発テーマ①既存化学物質の28日間反復投与実験



3. 研究開発成果について 研究開発テーマ①既存化学物質の28日間反復投与実験

総計 26臓器 1,028プロファイル (Total RNA: 3,611サンプル)

臓器	total RNA数	プロファイル数	内訳
肝臓(Li)	168	168	第1回(17),第2回(18),第3回(18),第4回(19),第5回(18),第6回(18),第7回(18),第8回(18),第9回(24)
脾臓(Sp)	143	95	第1回(17),第2回(18),第3回(18),第4回(18),第5回(18),第6回(6)
前立腺(Pr)	143	67	第1回(17),第2回(10),第3回(12),第4回(16),第5回(6),第6回(6)
皮下脂肪(SAT)	167	62	第1回(12),第2回(10),第3回(6),第4回(12),第5回(12),第6回(10)
腎臓(Ki)	167	143	第1回(17),第2回(18),第3回(18),第4回(18),第5回(18),第6回(18),第7回(18),第8回(18)
肺(Lu)	167	53	第1回(17),第2回(6),第3回(6),第4回(12),第5回(6),第6回(6)
大脳(Cbu)	143	53	第1回(11),第2回(18),第4回(18),第7回(6)
精巣上体(Ep)	143	41	第1回(17),第4回(12),第5回(12)
小脳(Cbll)	143	54	第1回(11),第2回(18),第4回(10),第7回(6),第8回(9)
血液(Bl)	143	33	第1回(16),第2回(6),第3回(5),第4回(6)
十二指腸(Du)	143	30	第1回(8),第2回(10),第4回(6),第5回(6)
胸腺(Th)	143	20	第1回(8),第2回(6),第4回(6)
副腎(Ad)	143	20	第1回(8),第2回(6),第4回(6)
褐色脂肪(BAT)	143	20	第1回(8),第2回(6),第3回(6)
大腿四頭筋(Rmt)	143	20	第1回(8),第2回(6),第3回(6)
回腸(Ii)	144	19	第1回(7),第3回(6),第4回(6)
心臓(He)	143	18	第1回(6),第2回(6),第6回(6)
精巣(Te)	144	18	第1回(6),第2回(6),第5回(6)
ヒラメ筋(Ms)	143	18	第1回(6),第2回(6),第3回(6)
骨髄(BM)	143	16	第1回(4),第2回(6),第4回(6)
前胃(Fs)	143	14	第1回(8),第6回(6)
腺胃(Gs)	143	12	第1回(6),第2回(6)
膵臓(Pa)	70	12	第1回(6),第2回(6)
空腸(Je)	144	7	第1回(7)
結腸(Co)	143	6	第1回(6)
脊髄(Sc)	9	9	第2回(9)



## 【まとめ】

- 遺伝子発現変動解析用の動物実験標準プロトコルを確立した。
- 最終目標に掲げた取得サンプルを達成した。
  - 最終目標：2,200サンプル
  - 取得サンプル：3,611サンプル

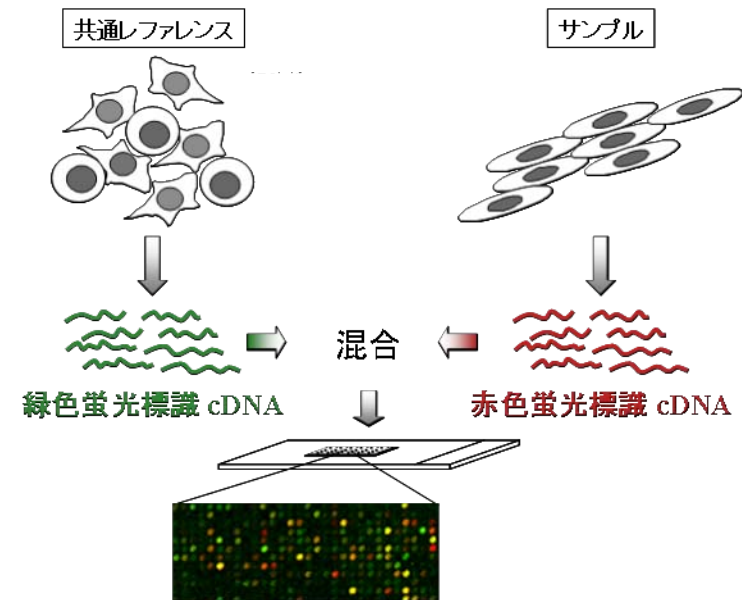
# 研究開発テーマ②

## 既存化学物質投与ラット組織の 遺伝子発現解析

## 3. 研究開発成果について 研究開発テーマ②既存化学物質投与ラット組織の遺伝子発現解析

## ■ 独自開発のDNAマイクロアレイシステム

- NEDO「タンパク質機能解析・活用プロジェクト」(平成12～17年度)で開発・確立
- 80塩基からなる合成DNA(約32,000種類)をスライドガラス上に配列(特許取得済)
  - 特異性の高いプローブ領域選定が可能
  - マイクロアレイ作製の高い「歩留り」を達成
- マイクロアレイ表面に特殊化学処理(特許取得済)
  - マイクロアレイ化後のガラス表面劣化を防止
  - ハイブリダイゼーション条件の安定性を確保
- ランダム・プライミング法による第1鎖cDNA合成で蛍光標識
  - mRNA全長にわたって自由自在にプローブ領域設計が可能
  - プローブ塩基配列の特異性が向上
  - スプライシング・バリエーション解析への応用が可能
- 特殊な器具(特許出願)を使ったハイブリダイゼーション
  - 均一なハイブリダイゼーション条件が成立
- mRNAの増幅を行わない
  - コントロールしにくい酵素反応行程を最低限にとどめて高い再現性を獲得
- 2色法(1枚のマイクロアレイ上で、赤と緑の蛍光色素で標識した2種類のサンプルを混合して競合的にハイブリダイズさせる)を採用
  - マイクロアレイのスポット上のDNA量の変化によって影響を受けないデータ取得が可能
- 共通レファレンスRNAを採用
  - 多数のサンプルのバーチャルな並行解析が可能
- 独自の実験プロトコル(数千回の条件検討実験により決定したもの)を採用
  - 高い再現性を獲得

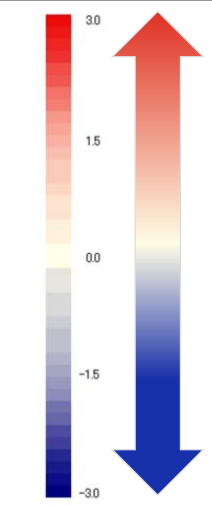




### 3. 研究開発成果について 研究開発テーマ②既存化学物質投与ラット組織の遺伝子発現解析

## ■ 遺伝子発現変動解析データの見方

遺伝子発現レベルが高い



遺伝子発現がレベル低い

化学物質を表すカラーバー

発現パターンが類似したものが集まる

クラスタ

遺伝子数

103

144  
サンプル数

を拡大



この一行が1つの遺伝子



この一列が1つのサンプル

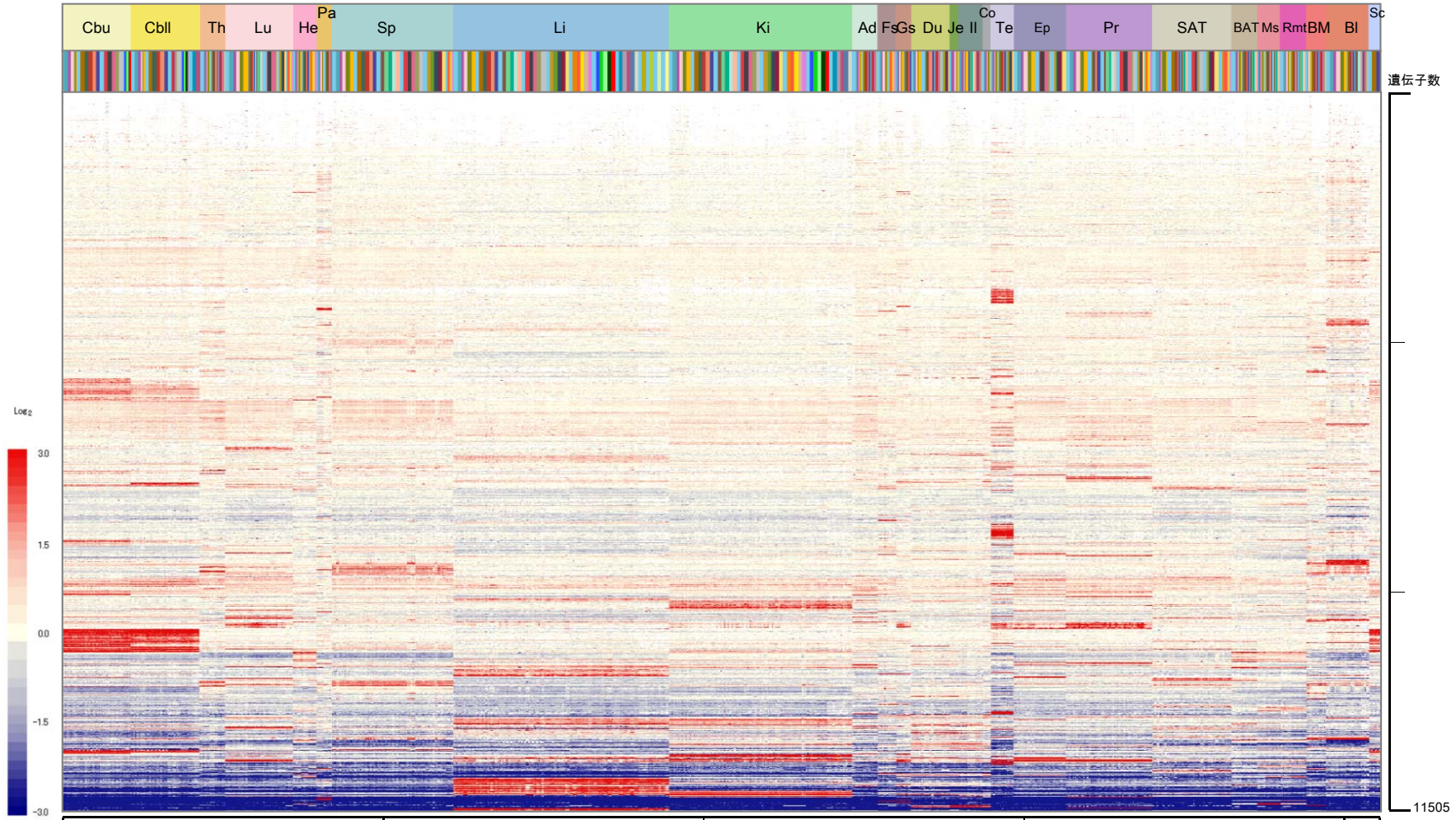
"cytochrome P450, 1a2 (Cyp1a2), mRNA"	NM_012541
"mRNA for kinase, complete cds."	AB020967
aflatoxin B1 aldehyde reductase (AFAR) m	AF045464
aflatoxin B1 aldehyde reductase (Afar),	NM_013215
GSTA5=glutathione S-transferase Yc2 subu	S82820
arginine vasopressin receptor 1A (Avpr1a	NM_053019
"vasopressin V1a receptor gene, complete"	U39450
insulin-like growth factor binding prote	AF006203

よって、上の図は144サンプル、103遺伝子を表していることになる

### 3. 研究開発成果について 研究開発テーマ②既存化学物質投与ラット組織の遺伝子発現解析

#### ■ 全遺伝子発現プロファイル(1,028サンプル)

- 最終目標で定めた遺伝子発現プロファイル数(1,000~1,100)を達成した。



< 28日間反復投与毒性試験 >

溶媒対照	mca	mta	dcb	pcp	tbe	24b	bcp
2bo	suf	bac	34x	mcs	dba	35x	tmb
3cp	2ip	mns	nma	23d	pep	nda	dha
2ae	hnh	nat	tdn	dhc	tbp	13d	14d
thf	4em	mmb	2de	dhp	tmp	nhd	ams

< 14日間反復投与毒性試験 >

溶媒対照	投与後1日
投与後3日	投与後7日
投与後14日	投与後28日

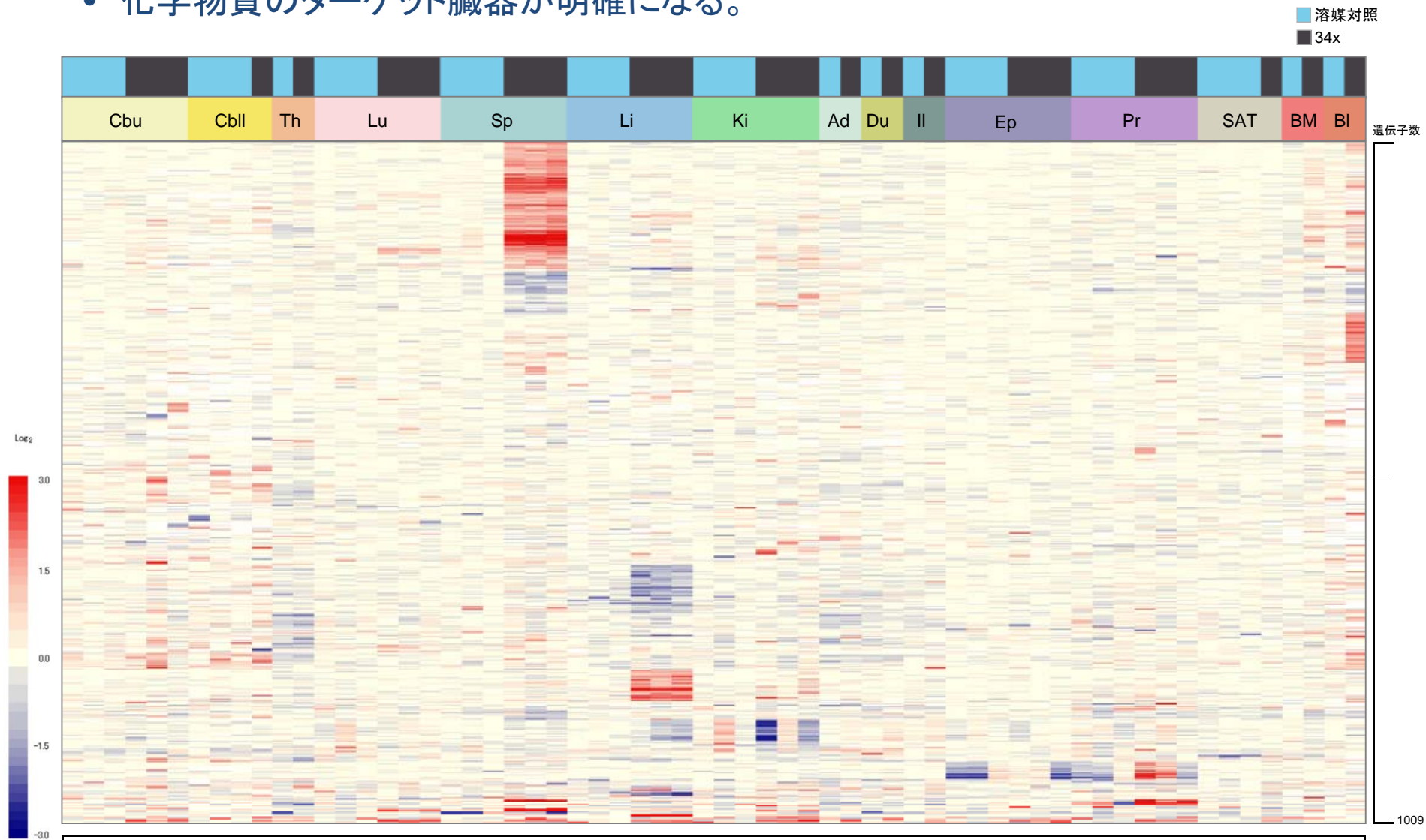
1028 サンプル数



## 3. 研究開発成果について 研究開発テーマ②既存化学物質投与ラット組織の遺伝子発現解析

## ■ 特定の化学物質の曝露による複数臓器の横並び比較(34xを例にして)

- 化学物質のターゲット臓器が明確になる。

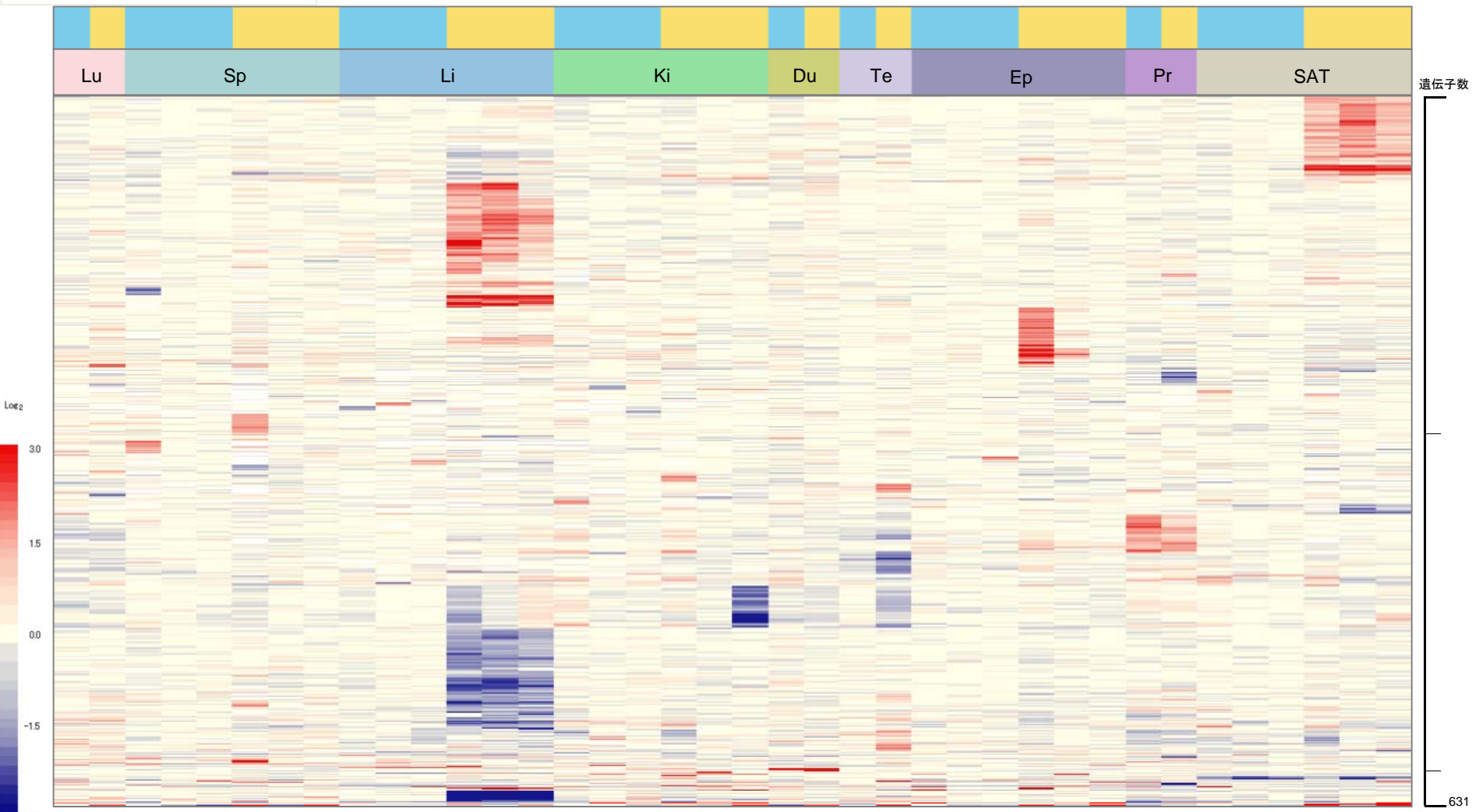


### 3. 研究開発成果について 研究開発テーマ②既存化学物質投与ラット組織の遺伝子発現解析

- 特定の化学物質の曝露による複数臓器の横並び比較 (dhpを例にして)
  - 予期しなかった臓器 (例えば皮下脂肪[SAT]) の影響も検出できる可能性がある。

条件: |filer| ≥ 1.5 (n=1), -zero (n=12)  
 ファイル: Sample-ref. cont.

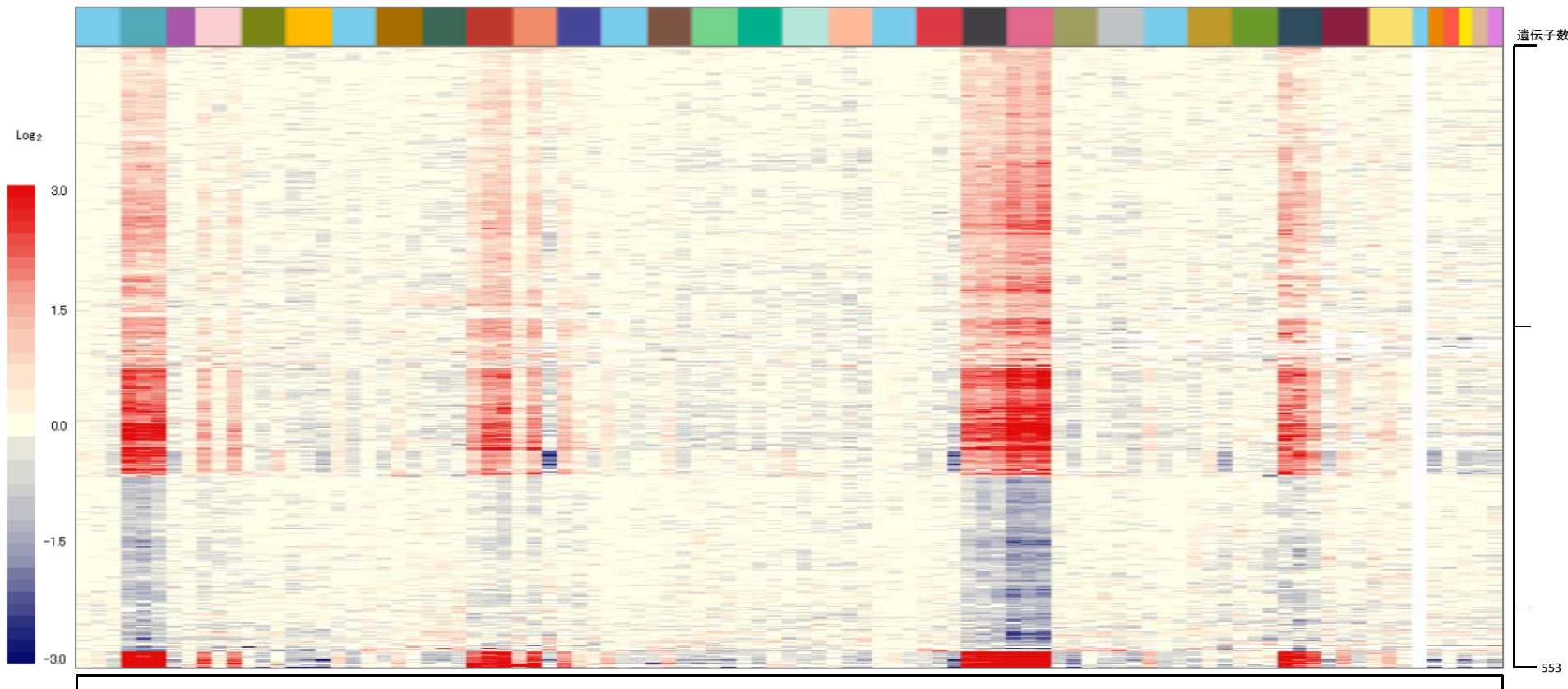
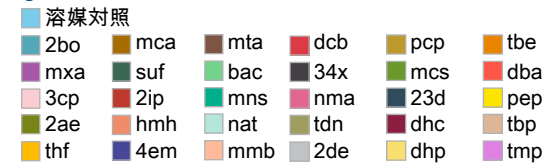
■ 溶媒対照  
 ■ dhp



## 3. 研究開発成果について 研究開発テーマ②既存化学物質投与ラット組織の遺伝子発現解析

## ■ 化学物質の横並び比較(脾臓を例にして)

- 脾臓で生じる遺伝子発現変動パターンは多様性が低い。



抽出条件: t検定(Cvs 2ip, 2bo, 34x, nma, 23d, ttest(0.01), ABS(1.0))  
Sample-control av.

95  
サンプル数

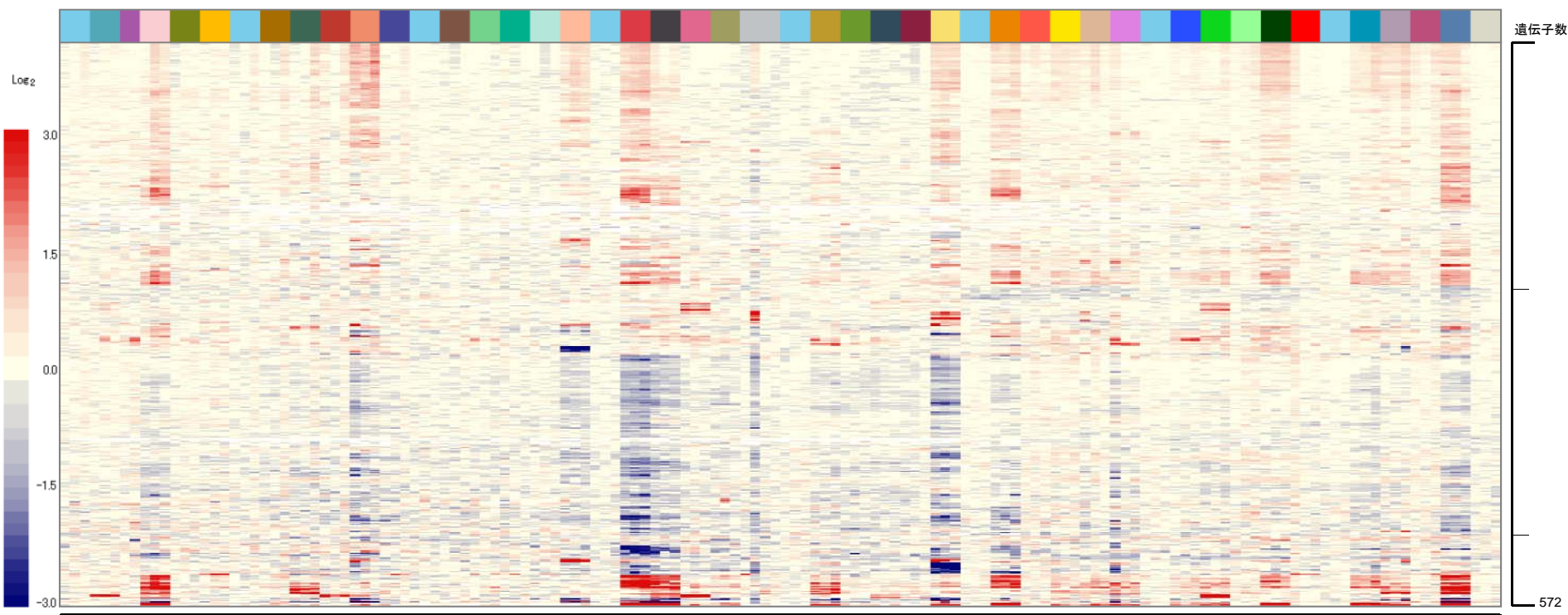


### 3. 研究開発成果について 研究開発テーマ②既存化学物質投与ラット組織の遺伝子発現解析

#### ■ 化学物質の横並び比較(肝臓を例にして)

- 肝臓で生じる遺伝子発現変動パターンは脾臓と比べて多様性が高い。

条件:コントロールで動きのない遺伝子 -zero(n=24), |filter|≤1.7(n=24)  
 抽出条件: t検定(Cvs 全化合物, ttest(0.01), ABS(1.0))  
 ファイル: Sample-Ref.cont



溶媒対照	mca	mta	dcb	pcp	tbe	24b	bcp
2bo	suf	bac	34x	mcs	dba	35x	tmb
mx	2ip	mns	nma	23d	pep	nda	dha
3cp	hnh	nat	tdn	dhc	tbp	13d	14d
2ae	4em	mmb	2de	dhp	tmp	nhd	ams
thf							

## 【まとめ】

- 最終目標に掲げた遺伝子発現プロファイル数を達成した。
  - 最終目標：1,000～1,100プロファイル
  - 取得プロファイル：1,028プロファイル
  - 公開済みプロファイル：1,025プロファイル(※ 3サンプルは化学物質投与とは関係のない病変部位を採取したものであったため、あえて公開しなかった)
- ゲノム学的手法を取り入れた網羅的遺伝子発現解析により、臓器間または化学物質間の横並び比較ができる。

# 生体応答遺伝子セットの探索

## ～肝臓を例にして～

# t検定による遺伝子群の抽出

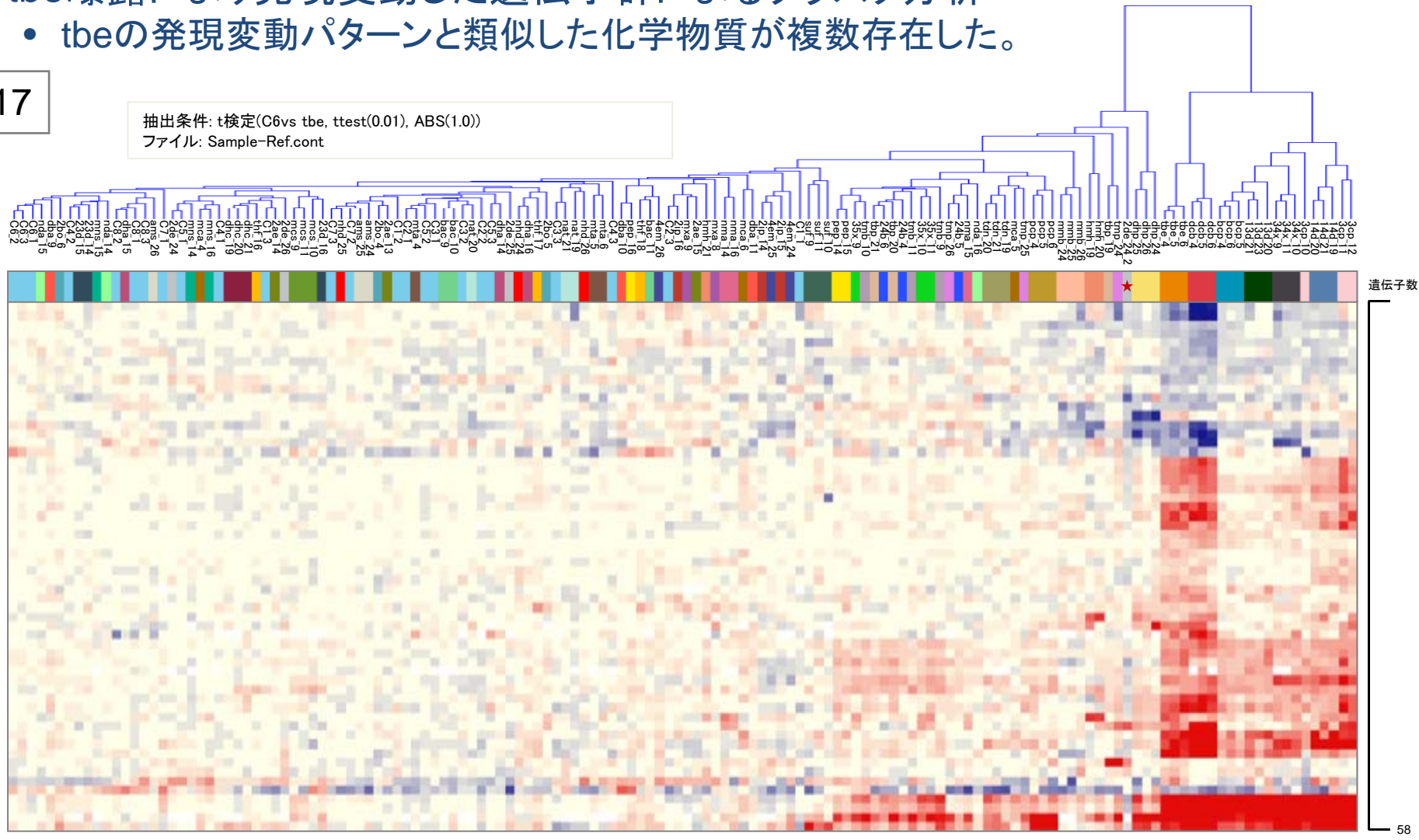
### 3. 研究開発成果について 研究開発テーマ② t検定による遺伝子群の抽出

#### tbe曝露により発現変動した遺伝子群によるクラスタ分析

- tbeの発現変動パターンと類似した化学物質が複数存在した。

Li-17

抽出条件: t検定(C6vs tbe, ttest(0.01), ABS(1.0))  
 ファイル: Sample-Ref.cont



- |      |     |     |     |     |     |     |     |       |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|
| 溶媒対照 | mca | mta | dcb | pcp | tbe | 24b | bcp | ★ 病変部 |
| 2bo  | suf | bac | 34x | mcs | dba | 35x | tmb |       |
| 3cp  | 2ip | mns | nma | 23d | pep | nda | dha |       |
| 2ae  | hnh | nat | tdn | dhc | tbp | 13d | 14d |       |
| thf  | 4em | mmb | 2de | dhp | tmp | nhd | ams |       |



### 3. 研究開発成果について 研究開発テーマ② t検定による遺伝子群の抽出

## 14d曝露により発現変動した遺伝子群によるクラスタ分析

- 14dの発現変動パターンと類似した化学物質が複数存在した。(異なるパターンも存在)



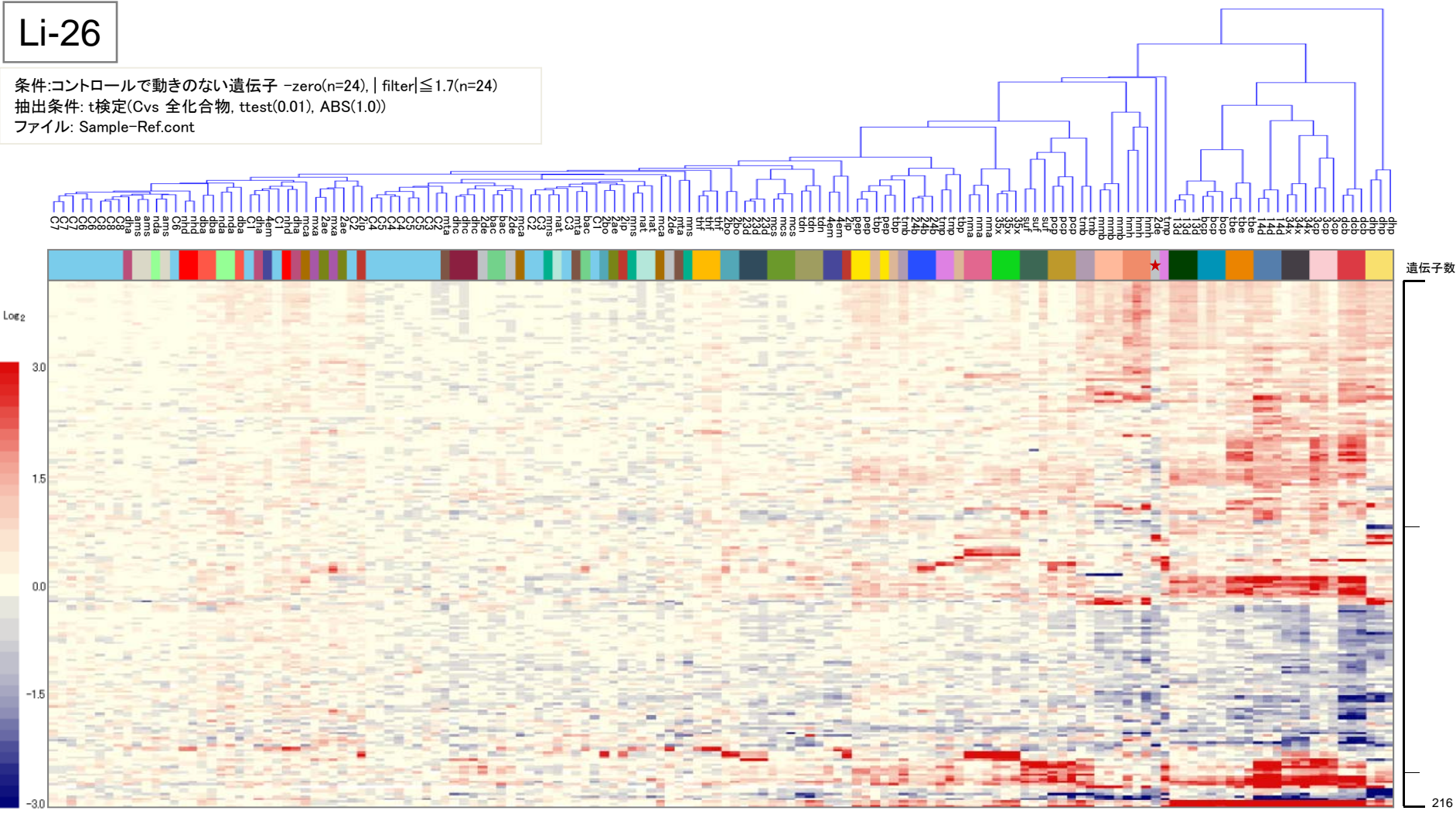
# 複数の化学物質で共通に発現変動する 遺伝子群の抽出

### 3. 研究開発成果について 研究開発テーマ② 複数の化学物質で共通に発現変動する遺伝子群の抽出

## ■ 2種類以上の化学物質で共通して発現変動した遺伝子群によるクラスタ分析

Li-26

条件: コントロールで動きのない遺伝子 -zero(n=24), |filter| ≤ 1.7(n=24)  
抽出条件: t検定(Cvs 全化合物, ttest(0.01), ABS(1.0))  
ファイル: Sample-Ref.cont



- |      |     |     |     |     |     |     |     |       |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|
| 溶媒対照 | mca | mta | dcb | pcp | tbe | 24b | bcp | ★ 病変部 |
| 2bo  | suf | bac | 34x | mcs | dba | 35x | tmb |       |
| mx   | 2ip | mns | nma | 23d | pep | nda | dha |       |
| 3cp  | hnh | nat | tdn | dhc | tbp | 13d | 14d |       |
| 2ae  | 4em | mmb | 2de | dhp | tmp | nhd | ams |       |
| thf  |     |     |     |     |     |     |     |       |

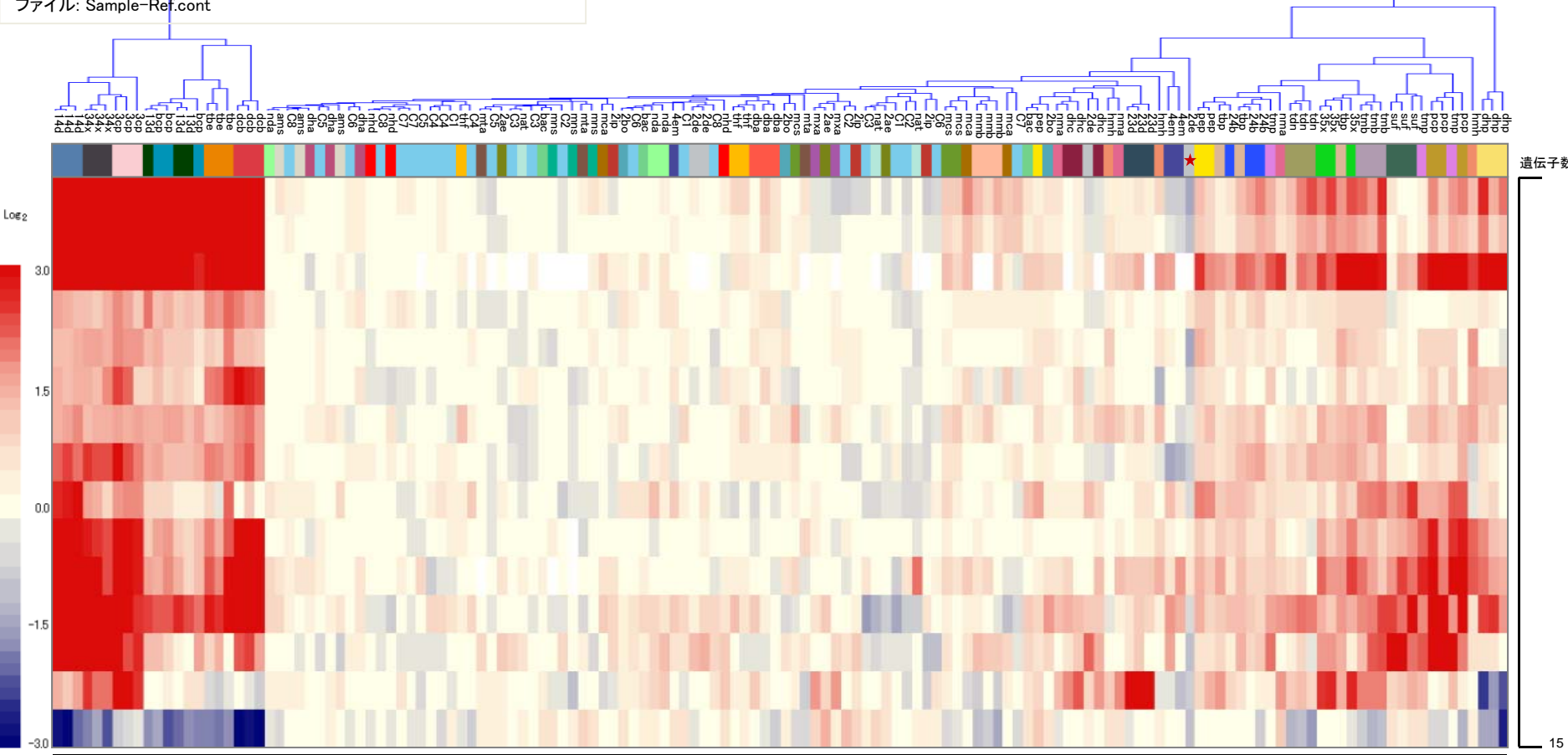
144  
サンプル数

### 3. 研究開発成果について 研究開発テーマ② 複数の化学物質で共通に発現変動する遺伝子群の抽出

## 6種類以上の化学物質で共通して発現変動した遺伝子群によるクラスタ分析

Li-30

条件: コントロールで動かない遺伝子 -zero(n=24), |filter| ≤ 1.7(n=24)  
抽出条件: t検定(Cvs 全化合物, ttest(0.01), ABS(1.0))  
ファイル: Sample-Ref.cont



- |      |     |     |     |     |     |     |     |       |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|
| 溶媒対照 | mca | mta | dcb | pcp | tbe | 24b | bcp | ★ 病変部 |
| 2bo  | suf | bac | 34x | mcs | dba | 35x | tmb |       |
| mx   | 2ip | mns | nma | 23d | pep | nda | dha |       |
| 3cp  | hnh | nat | tdn | dhc | tbp | 13d | 14d |       |
| 2ae  | thf | 4em | mmb | dde | dhp | nhd | ams |       |

144  
サンプル数

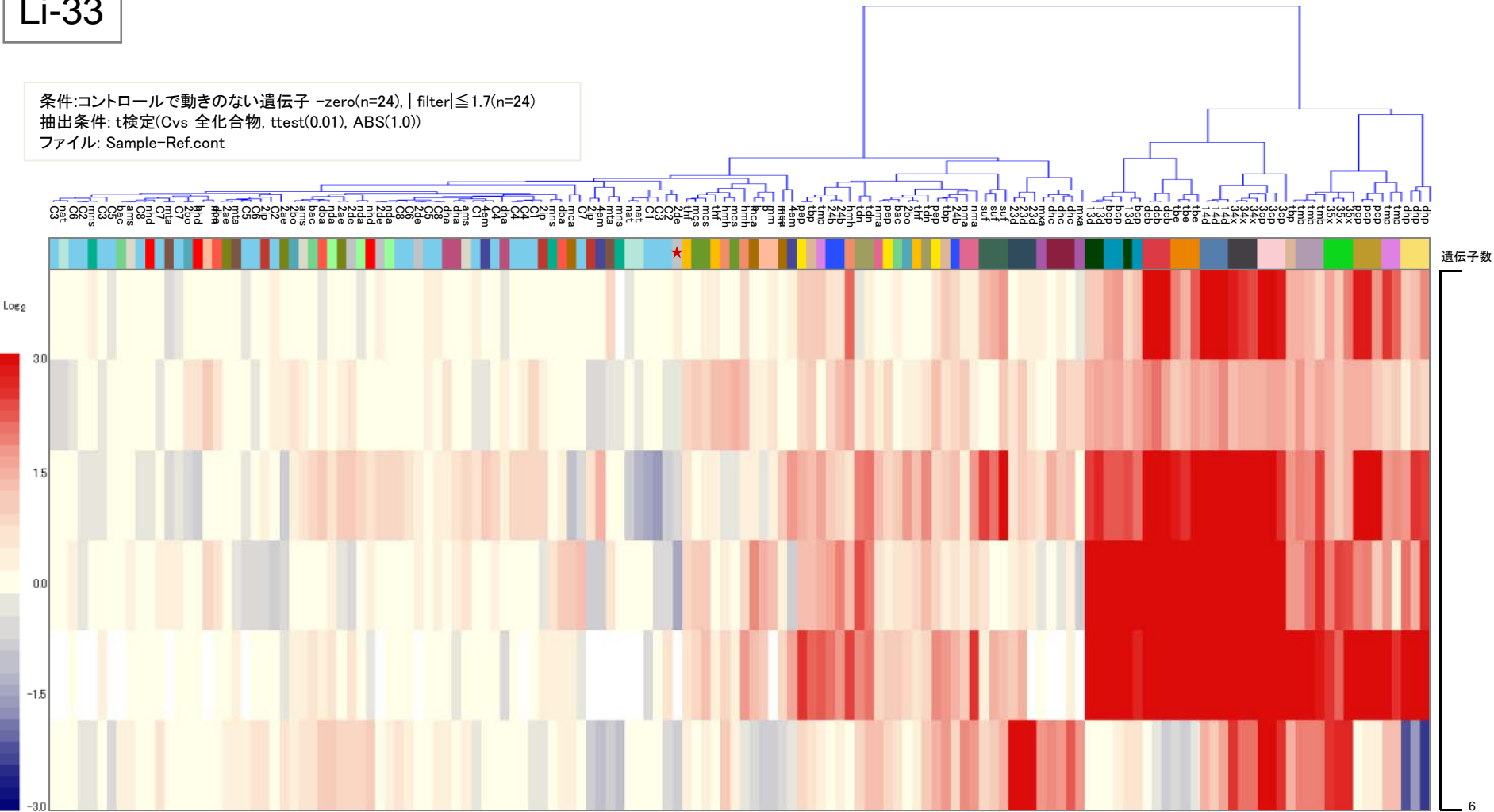


3. 研究開発成果について 研究開発テーマ②  
複数の化学物質で共通に発現変動する遺伝子群の抽出

9種類以上の化学物質で共通して発現変動した遺伝子群によるクラスタ分析

Li-33

条件:コントロールで動きのない遺伝子 -zero(n=24), |filter|≤1.7(n=24)  
抽出条件: t検定(Cvs 全化合物, ttest(0.01), ABS(1.0))  
ファイル: Sample-Ref.cont



- |      |     |     |     |     |     |     |     |       |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|
| 溶媒対照 | mca | mta | dcb | pcp | tbe | 24b | bcp | ★ 病変部 |
| 2bo  | suf | bac | 34x | mcs | dba | 35x | tmb |       |
| mx   | 2ip | mns | nma | 23d | pep | nda | dha |       |
| 3cp  | hnh | nat | tdn | dhc | tbp | 13d | 14d |       |
| 2ae  | 4em | mmb | 2de | dhp | tmp | nhd | ams |       |
| thf  |     |     |     |     |     |     |     |       |

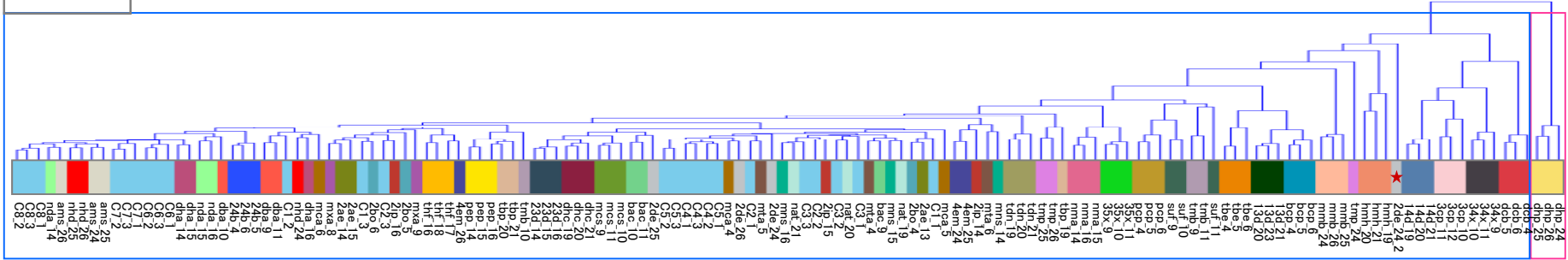
# サンプル方向のクラスタの切り分けによる 遺伝子群の抽出

3. 研究開発成果について

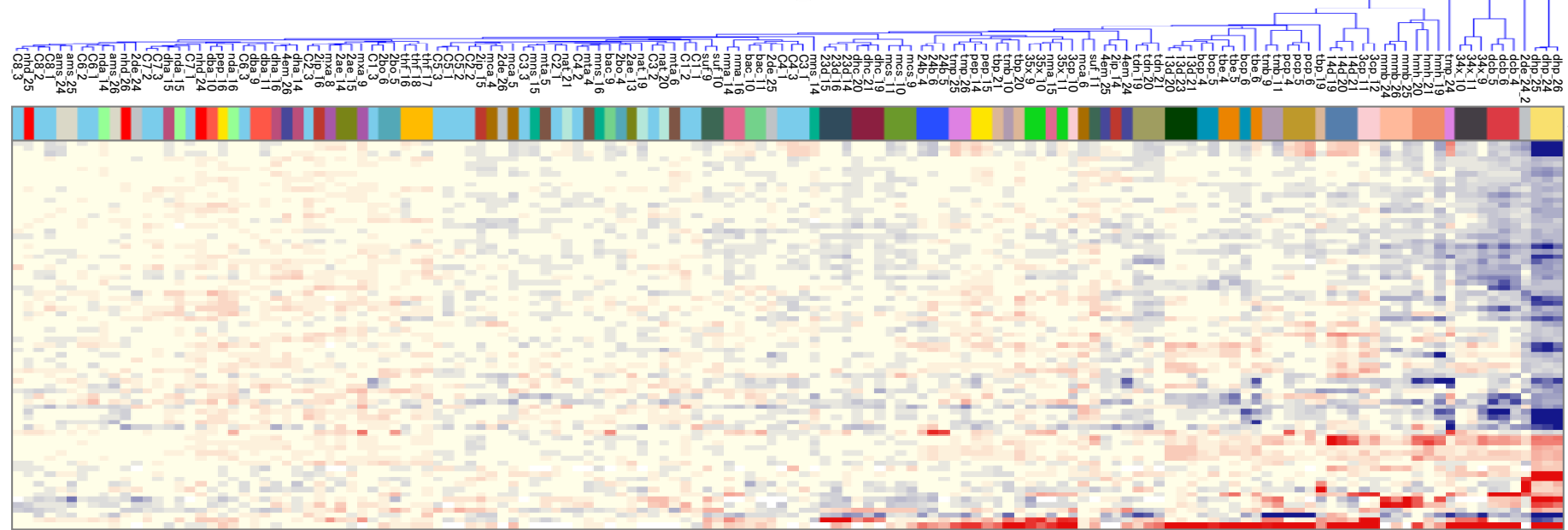
研究開発テーマ②

サンプル方向のクラスタの切り分けによる遺伝子群の抽出

Li-35



抽出条件: t検定(   vs   , ttest(0.01), ABS(1.0))  
 Sample- Ref.cont (コントロールで動きのない遺伝子,1個以上の化合物で発現に差のあった遺伝子群(肝臓)(572遺伝子))



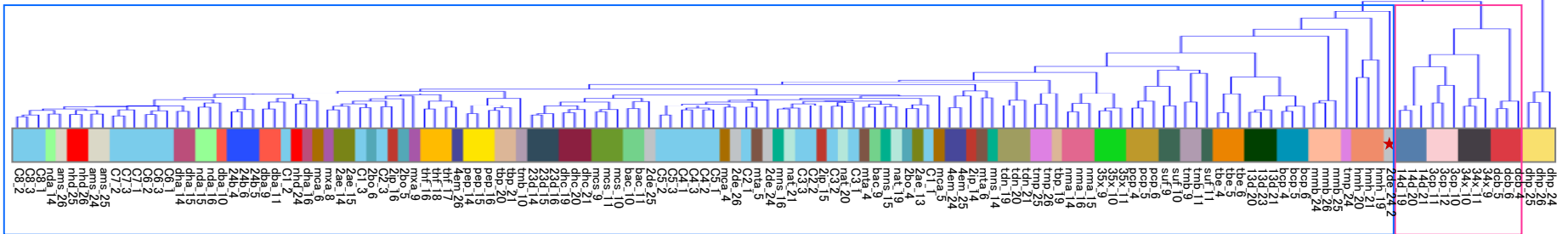
遺伝子数

3. 研究開発成果について

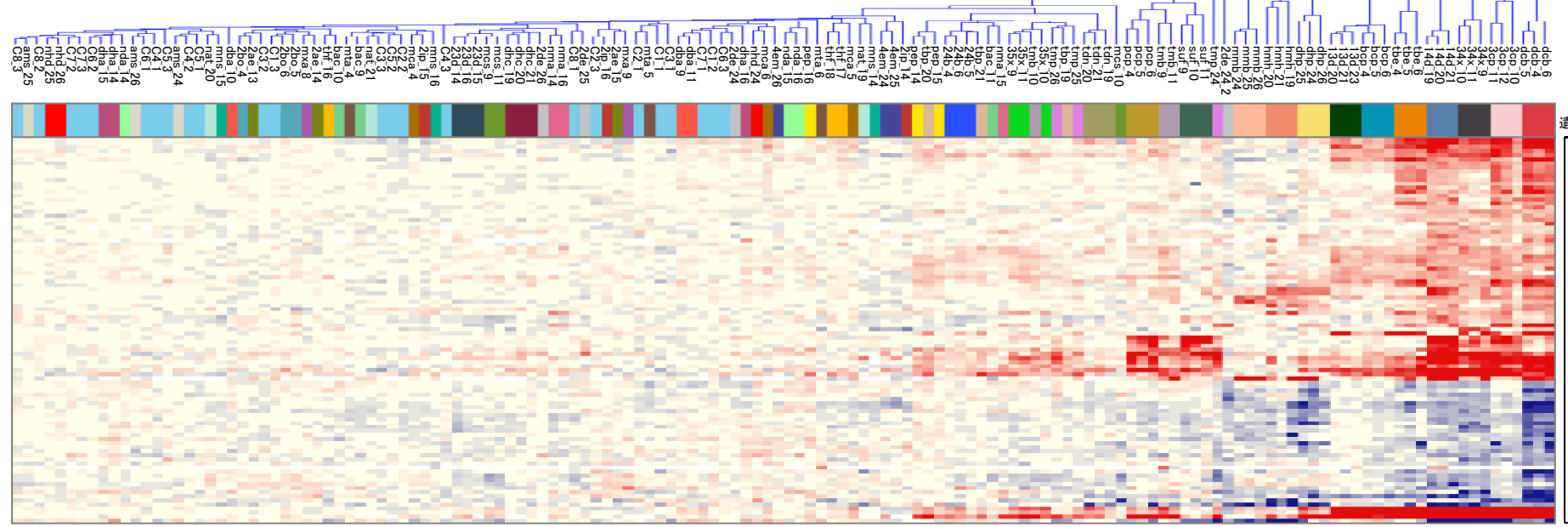
研究開発テーマ②

サンプル方向のクラスターの切り分けによる遺伝子群の抽出

Li-38



抽出条件: t検定 (   vs   , ttest(0.01), ABS(1.0))  
 Sample- Ref.cont (コントロールで動きのない遺伝子, 1個以上の化合物で発現に差のあった遺伝子群(肝臓) (572遺伝子))



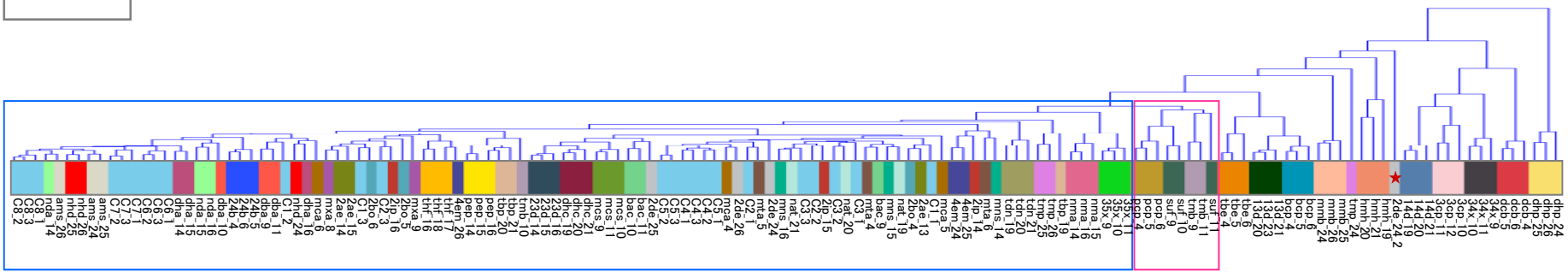


3. 研究開発成果について

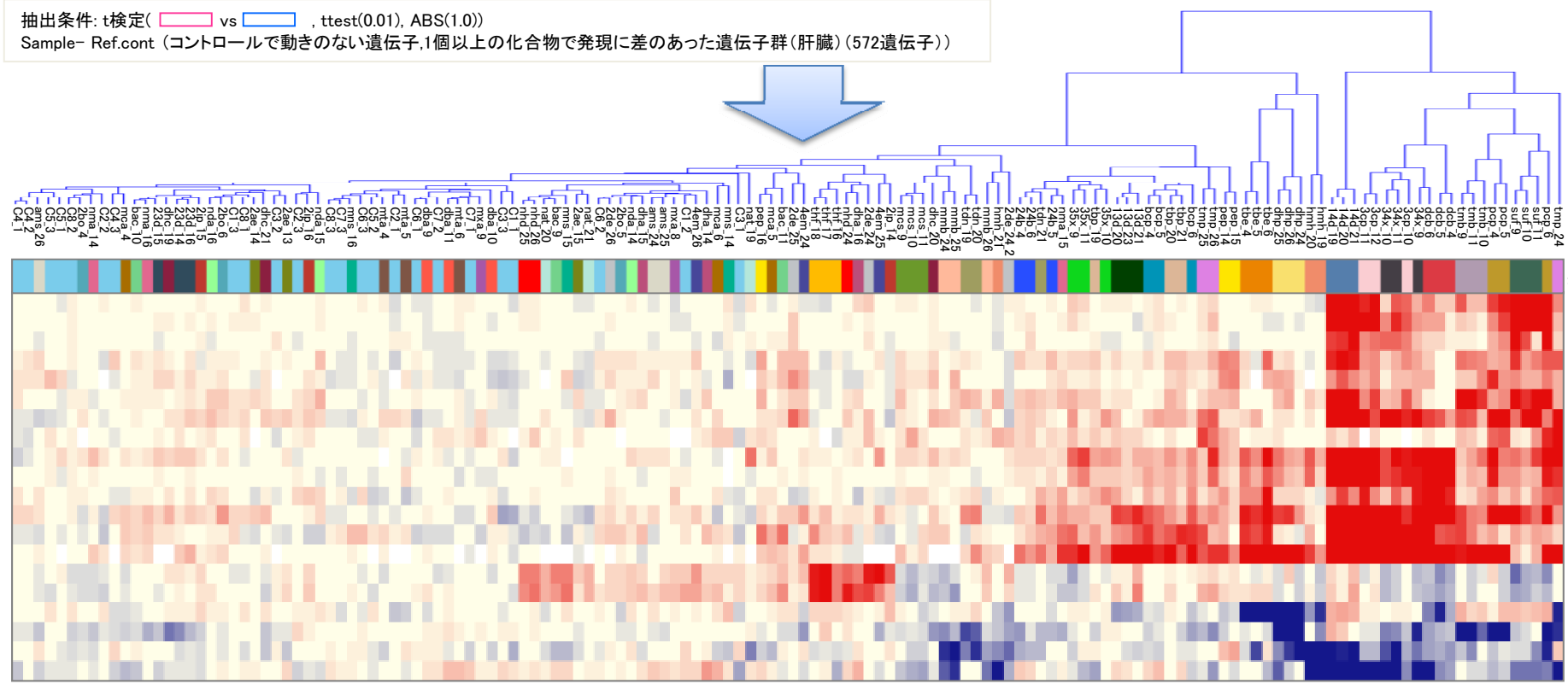
研究開発テーマ②

サンプル方向のクラスタの切り分けによる遺伝子群の抽出

Li-42



抽出条件: t検定(   vs   , ttest(0.01), ABS(1.0))  
 Sample- Ref.cont (コントロールで動きのない遺伝子,1個以上の化合物で発現に差のあった遺伝子群(肝臓)(572遺伝子))



# 遺伝子方向のクラスタの切り分けによる 遺伝子群の抽出

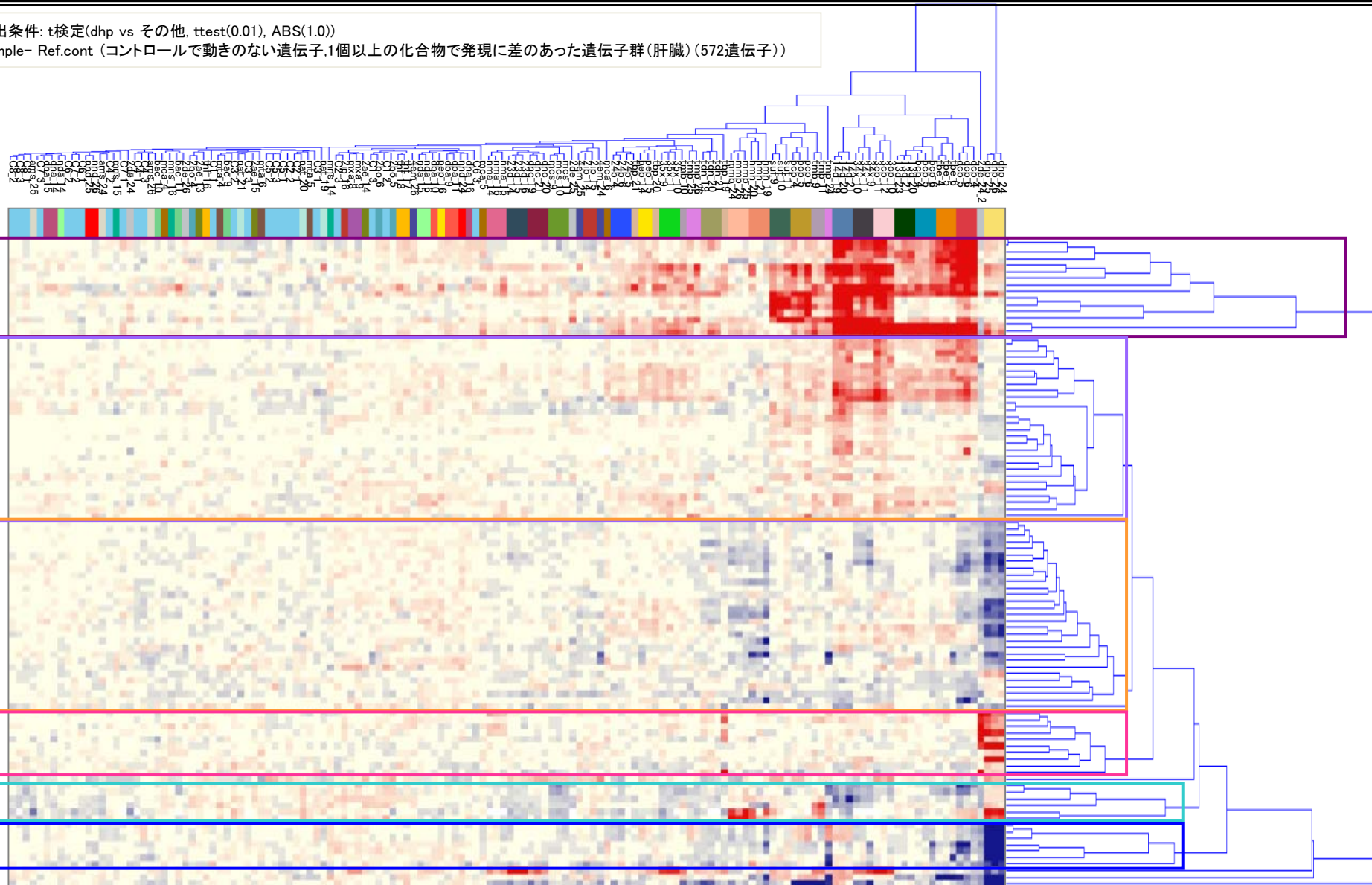
## 3. 研究開発成果について

## 研究開発テーマ②

## 遺伝子方向のクラスタの切り分けによる遺伝子群の抽出

抽出条件: t検定(dhp vs その他, ttest(0.01), ABS(1.0))

Sample- Ref.cont (コントロールで動きのない遺伝子,1個以上の化合物で発現に差のあった遺伝子群(肝臓)(572遺伝子))

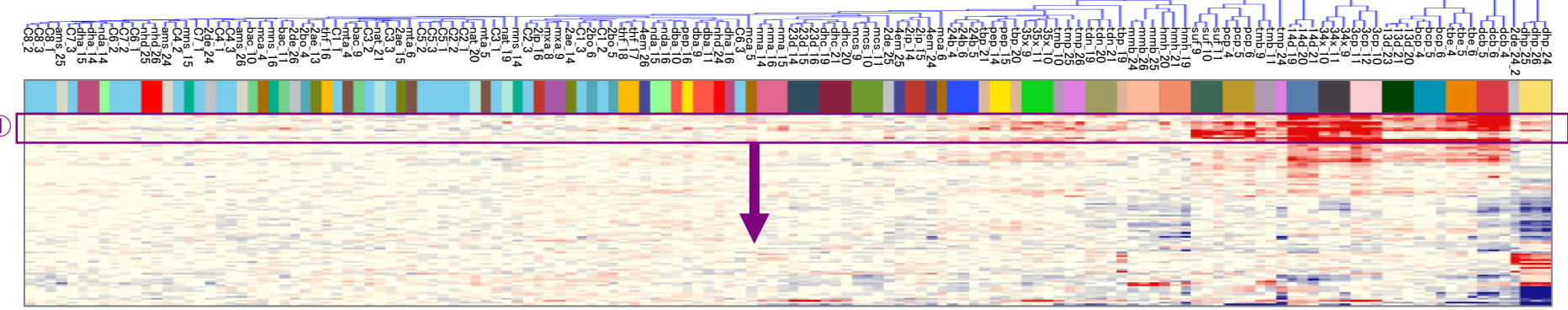


### 3. 研究開発成果について

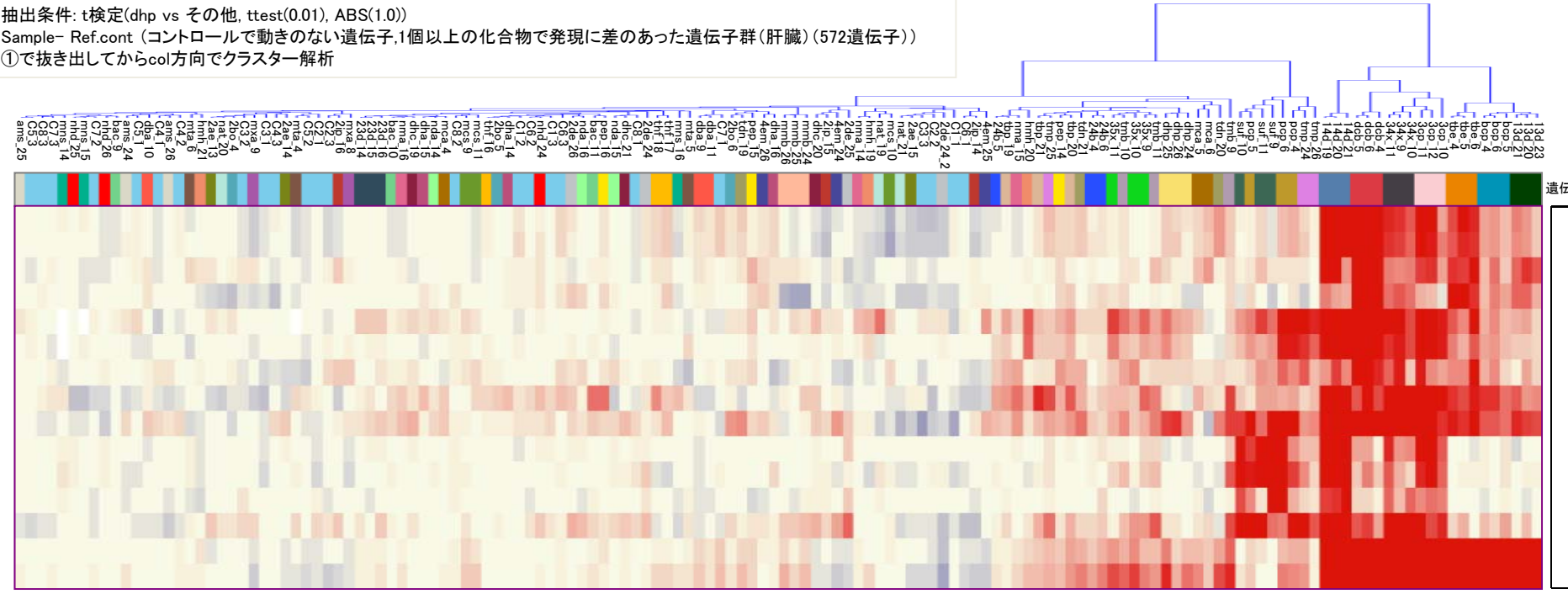
### 研究開発テーマ②

### 遺伝子方向のクラスタの切り分けによる遺伝子群の抽出

Li-44



抽出条件: t検定(dhp vs その他, ttest(0.01), ABS(1.0))  
 Sample- Ref.cont (コントロールで動きのない遺伝子, 1個以上の化合物で発現に差のあった遺伝子群(肝臓)(572遺伝子))  
 ①で抜き出してからcol方向でクラスター解析

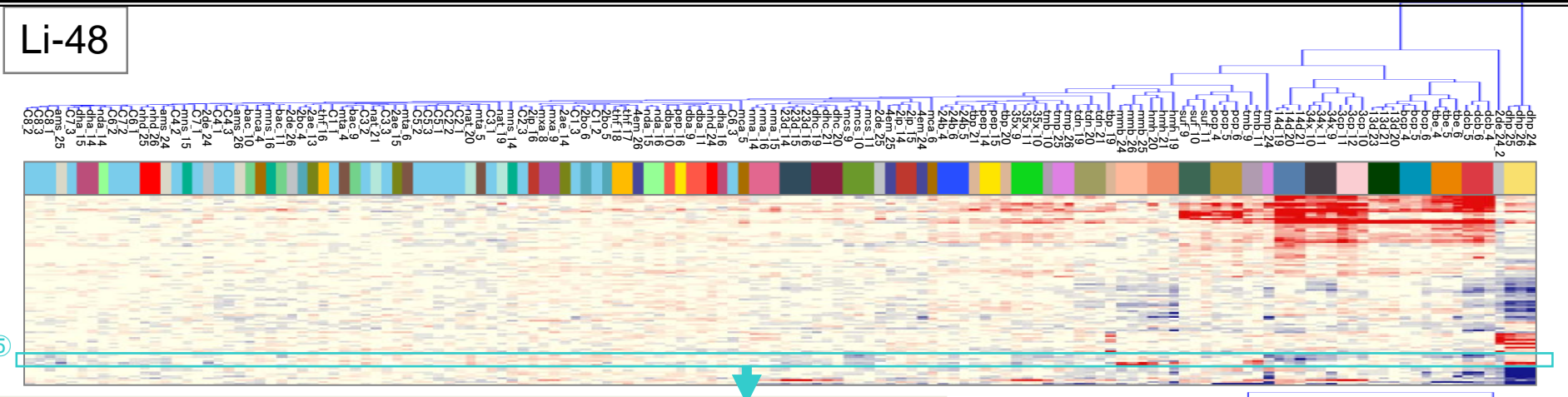


3. 研究開発成果について

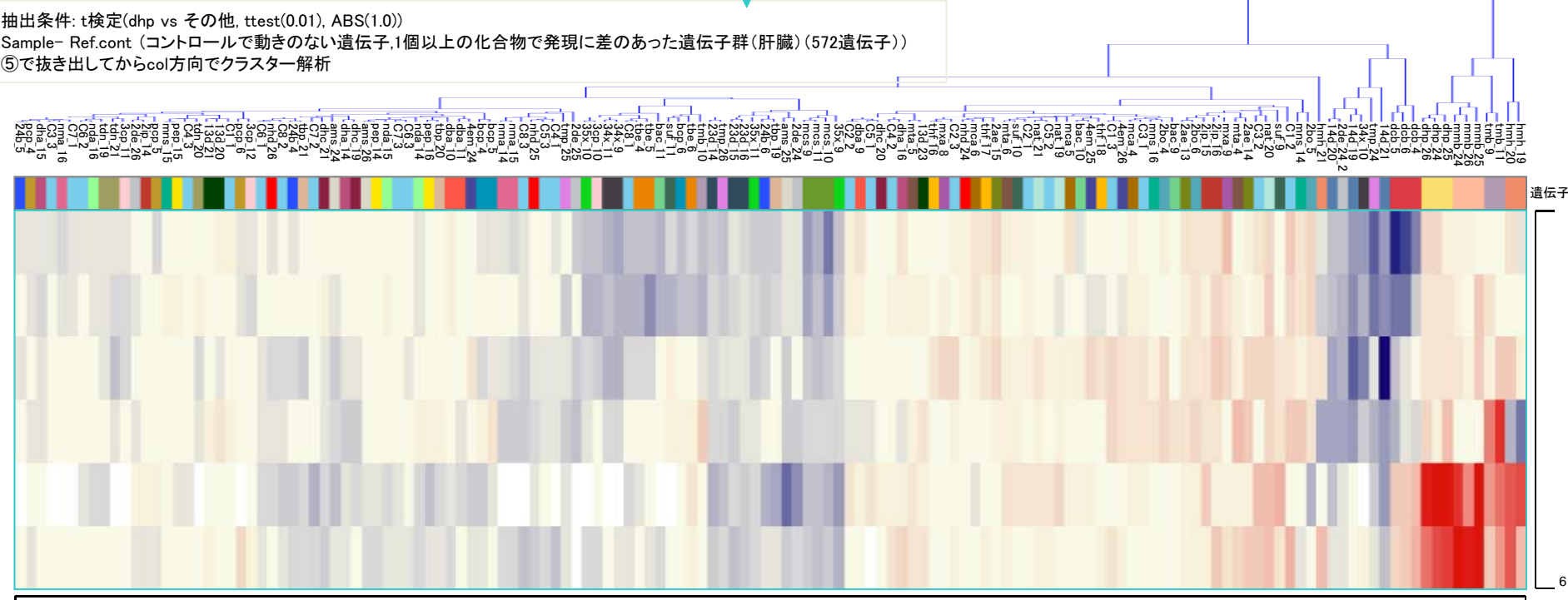
研究開発テーマ②

遺伝子方向のクラスタの切り分けによる遺伝子群の抽出

Li-48



抽出条件: t検定(dhp vs その他, ttest(0.01), ABS(1.0))  
 Sample- Ref.cont (コントロールで動きのない遺伝子, 1個以上の化合物で発現に差のあった遺伝子群(肝臓)(572遺伝子))  
 ⑤で抜き出してからcol方向でクラスター解析



# 従来の毒性試験結果と 遺伝子発現変動解析結果との比較



### 3. 研究開発成果について 研究開発テーマ② 遺伝子方向のクラスターの切り分けによる遺伝子群の抽出

#### ■ 従来の毒性試験結果と遺伝子発現変動解析結果との比較(脾臓)

- 毒性所見が報告されている9物質のうち8物質は対照群と分けることができる遺伝子セットが存在した。
- 毒性所見が報告されていない21物質はすべて対照群と分けることができる遺伝子セットが存在しなかった。

		2bo	mua	3cp	2se	thf	mca	sf	2ip	hnh	4em	mta	boc	huc	rot	mmb	tkb	34c	rma	tch	2de	pcp	mcc	23d	dac	dip	lba	da	pep	thp	tmp	合計		
病理データベース	ラット血																																	
	脾臓(浸血(浸血亢進))																																	
	ヘモシテリン(浸血)																																	
データベース	遺伝子発現変動																																	
	遺伝子																																	
遺伝子セット	3a-1	50																																7
	3a-2	46																																4
	合計																																	

毒性所見が報告されている  
化学物質



9/30物質



8/9物質

対照群と分ける生体応答  
遺伝子セットが存在したもの

		2bo	mua	3cp	2se	thf	mca	sf	2ip	hnh	4em	mta	boc	huc	rot	mmb	tkb	34c	rma	tch	2de	pcp	mcc	23d	dac	dip	lba	da	pep	thp	tmp	合計		
病理データベース	ラット血																																	
	脾臓(浸血(浸血亢進))																																	
	ヘモシテリン(浸血)																																	
データベース	遺伝子発現変動																																	
	遺伝子																																	
遺伝子セット	3a-1	50																																7
	3a-2	46																																4
	合計																																	

毒性所見が報告されてい  
ない化学物質



21/30物質



21/21物質

対照群と分ける生体応答  
遺伝子セットが存在しないもの

<病理データベース>

- 赤: 毒性あり
- 白: 毒性なし
- 青: 所見なし

<血液生化学的検査>

- 赤: 毒性あり
- 白: 所見なし
- 青: 未測定

<遺伝子セット>

- 赤: 対照から最も近いクラスターに属する (n=3: 3/3)
- 黄: 対照から最も近いクラスターに属する (n=3: 3/2)
- 緑: 対照から2番目に近いクラスターに属する (n=3: 3/3)
- 紫: 対照から2番目に近いクラスターに属する (n=3: 3/2)
- 白: 変化なし
- 青: 変化あり
- 黒: 未測定

3. 研究開発成果について 研究開発テーマ②

遺伝子方向のクラスタの切り分けによる遺伝子群の抽出

従来の毒性試験結果と遺伝子発現変動解析結果との比較(腎臓)

- 「既存化学物質毒性データベース」で毒性所見の記載があった21物質のうち20物質は対照群と分けることができる遺伝子セットが存在した。

	2ho	mxs	3p	2h	2d	mxs	af	2p	1mh	4m	mts	bc	mxs	nt	mmb	kb	34c	mxs	tdh	2d	pcp	mc	23d	dic	dp	lbe	dks	pep	tp	tmp	24b	33a	mxs	13d	2d	bcp	tmb	4h	14d	ums
病理データベース	[Heatmap showing toxicity data for various substances]																																							
データベース	[Heatmap showing toxicity data for various substances]																																							
血液生化学的検査(データベース)	[Heatmap showing blood chemistry data for various substances]																																							
血液生化学的検査	[Heatmap showing blood chemistry data for various substances]																																							
遺伝子	[Heatmap showing gene expression data for various substances]																																							
遺伝子セット	[Heatmap showing gene set expression data for various substances]																																							
合計	3	0	5	1	3	1	1	3	7	5	0	0	0	0	3	5	7	7	0	1	10	4	2	1	5	0	1	0	17	9	6	0	5	0	6	0	0	1	1	

データベースで毒性所見が見られたもの

21/40物質

データベースで毒性所見が見られたもので、遺伝子で区別できたもの

20/21物質

病理・血液

遺伝子発現

: 毒性あり  
 : 毒性なし  
 : 所見なし  
 : 毒性あり  
 : 毒性なし  
 : 所見なし  
 : 未測定  
 : 未測定  
 : 対照から最も遠いクラスタに属する (n=3: 3/3)  
 : 対照から最も遠いクラスタに属する (n=3: 3/2)  
 : 対照から2番目に遠いクラスタに属する (n=3: 3/3)  
 : 対照から2番目に遠いクラスタに属する (n=3: 3/2)  
 : 対照から3番目に遠いクラスタに属する (n=3: 3/3)  
 : 対照から3番目に遠いクラスタに属する (n=3: 3/2)



### 3. 研究開発成果について 研究開発テーマ②

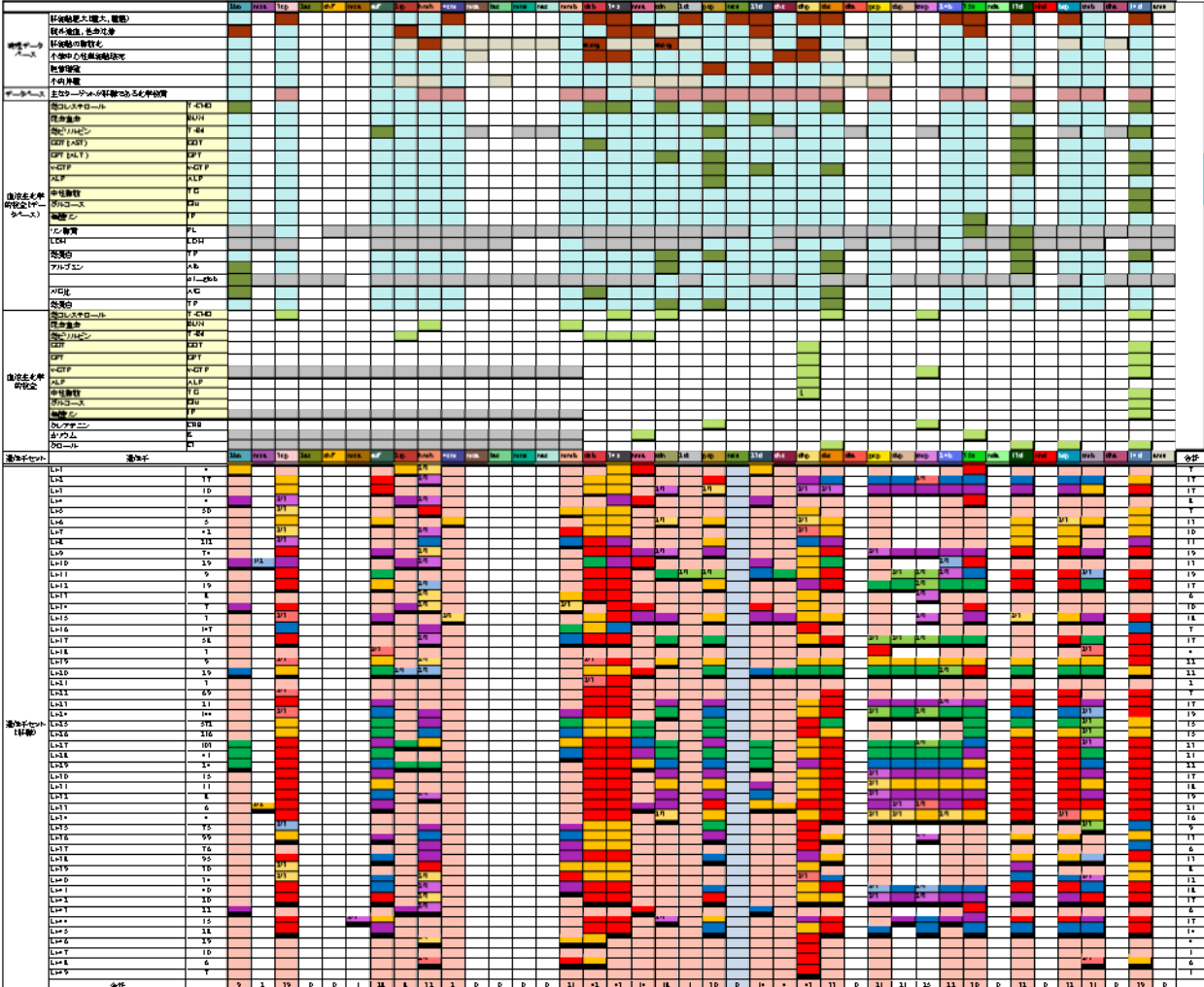
## 従来の毒性試験結果と遺伝子発現変動解析結果との比較

# 従来の毒性試験結果と遺伝子発現変動解析結果との比較(肝臓)

- 毒性所見が報告されている25物質のうち24物質は対照群と分けることができる遺伝子セットが存在した。

病理・血液

遺伝子発現



毒性所見が報告されている化学物質

25/40物質

対照群と分ける生体応答遺伝子が存在したもの

24/25物質

- <遺伝子セット>
- 対照から最も遠いクラスに属する (n=3: 3/3)
  - 対照から最も近いクラスに属する (n=3: 3/2)
  - 対照から2番目に近いクラスに属する (n=3: 3/3)
  - 対照から3番目に近いクラスに属する (n=3: 3/2)
  - 対照から4番目に近いクラスに属する (n=3: 3/3)
  - 対照から5番目に近いクラスに属する (n=3: 3/3)
  - 対照から6番目に近いクラスに属する (n=3: 3/2)
  - 対照から7番目に近いクラスに属する (n=3: 3/3)
  - 対照から8番目に近いクラスに属する (n=3: 3/2)
  - 対照から9番目に近いクラスに属する (n=3: 3/3)
  - 対照から10番目に近いクラスに属する (n=3: 3/2)

<病理データベース> <血液生化学的検査>

<span style="background-color: #800000; color: white; padding: 2px;"> </span> : 毒性あり	<span style="background-color: #008000; color: white; padding: 2px;"> </span> : 毒性あり	<span style="background-color: #90EE90; color: black; padding: 2px;"> </span> : 変化なし
<span style="background-color: #FFFFFF; color: black; padding: 2px;"> </span> : 毒性なし	<span style="background-color: #FFFFFF; color: black; padding: 2px;"> </span> : 所見なし	<span style="background-color: #90EE90; color: black; padding: 2px;"> </span> : 変化あり
<span style="background-color: #FFFFFF; color: black; padding: 2px;"> </span> : 所見なし	<span style="background-color: #FFFFFF; color: black; padding: 2px;"> </span> : 未測定	<span style="background-color: #90EE90; color: black; padding: 2px;"> </span> : 未測定

## 【まとめ】

## ■ 生体応答遺伝子発現データセットを取得した。

- 肝臓： 49セット
- 腎臓： 24セット
- 脾臓： 2セット
- 皮下脂肪： 2セット
- 小脳： 1セット
  
- 合計： 78セット

■ 従来の毒性試験で得られている知見は、遺伝子発現変動解析でほぼ検出できる可能性がある。さらに、従来の毒性試験では**検出できていない(見逃されていた)変化**も遺伝子発現レベルでは**検出できる**可能性がある。

腎臓：40物質		生体応答遺伝子セット	
毒性所見		ある	なし
報告されている化学物質	21	20	1
報告されていない化学物質	19	7	12

肝臓：40物質		生体応答遺伝子セット	
毒性所見		ある	なし
報告されている化学物質	25	24	1
報告されていない化学物質	15	3	12

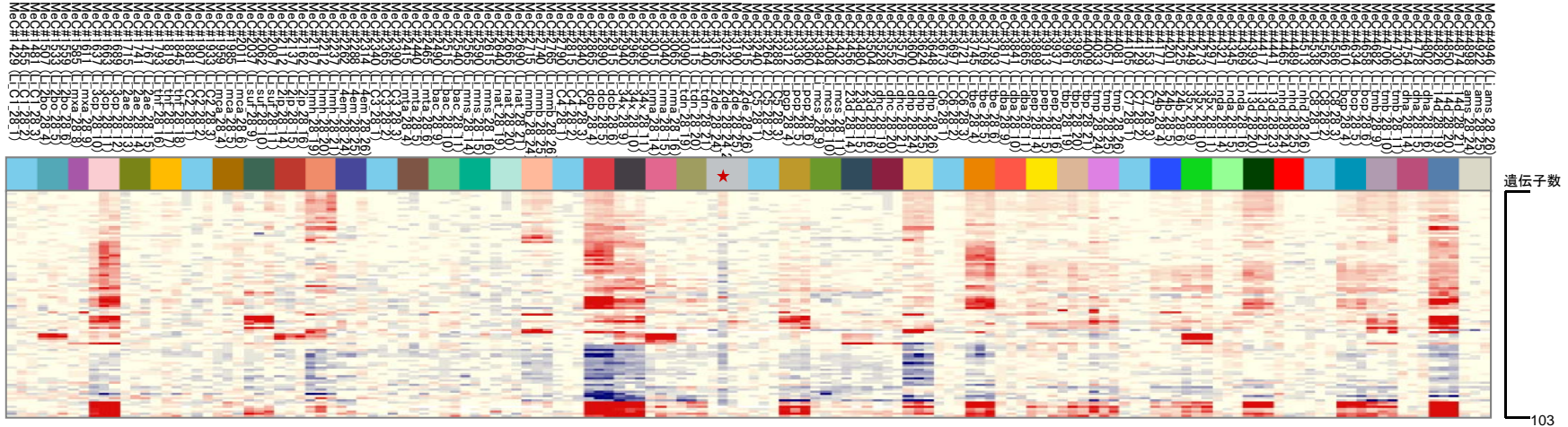
脾臓：30物質		生体応答遺伝子セット	
毒性所見		ある	なし
報告されている化学物質	9	8	1
報告されていない化学物質	21	0	21

# 有害性評価マーカーの探索

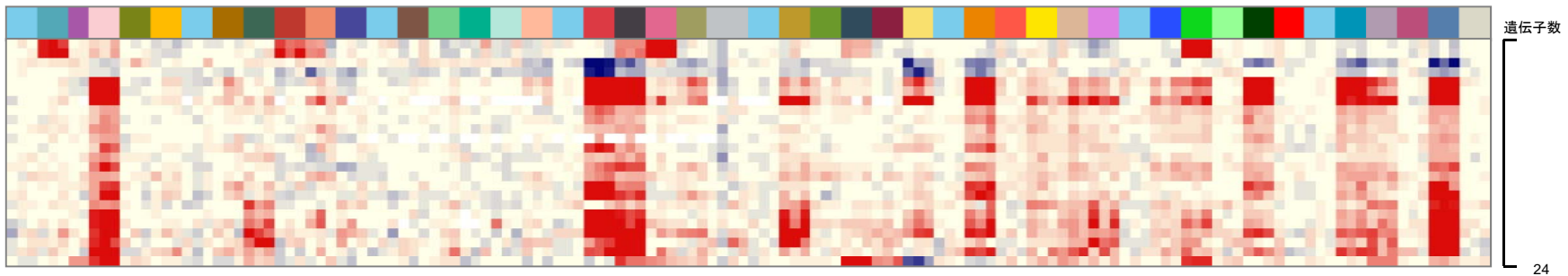
## 3. 研究開発成果について 研究開発テーマ②有害性評価マーカーの探索

## ■ 複数の化学物質で発現変動する遺伝子は有害性評価マーカーになり得る(肝臓)

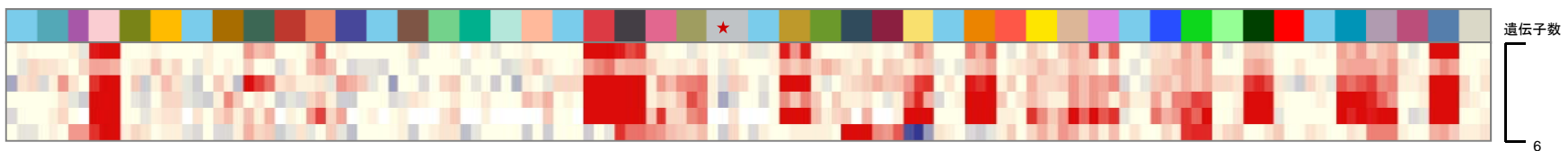
## ◆ 3種類以上の化学物質で発現変動した遺伝子群(103プローブ)



## ◆ 5種類以上の化学物質で発現変動した遺伝子群(24プローブ)



## ◆ 9種類以上の化学物質で発現変動した遺伝子群(6プローブ)



# 神経毒性

## 3. 研究開発成果について 研究開発テーマ②神経毒性

## ■ 神経毒性を有すると報告されていた化学物質

- 本プロジェクトの被験化学物質(40種類)には、「既存化学物質毒性データベース」で神経毒性を有すると記載のあった化学物質が5つ含まれていた。

化学物質名	メタクリルアミド	4-エチルモルホリン	2-(ジブチルアミノ)エタノール	1-ブロモ-3-クロロプロパン	ジシクロヘキシルアミン
英語表記	Methacrylamide	4-Ethylmorpholine	2-(dibutylamino)ethanol	1-Bromo-3-chloropropane	Dicyclohexylamine
略	mca	4em	2de	bcp	dha
CAS No.	79-39-0	100-74-3	102-81-8	109-70-6	101-83-7
用量(DB)	300 mg/kg	800 mg/kg	400 mg/kg	500 mg/kg	200 mg/kg
用量(Tx)	150 mg/kg	500 mg/kg	250 mg/kg	300 mg/kg	70 mg/kg
病理標本	固定: 10%中性緩衝ホルマリン液 染色: ヘマトキシリン・エオジン  その他: 特殊染色(ボディアン染色, K・B染色, ニューロフィラメント免疫染色)	固定: 0.1 mol/Lリン酸緩衝10%ホルマリン溶液 染色: ヘマトキシリン・エオジン	固定: 0.1 mol/Lリン酸緩衝10%ホルマリン溶液 染色: ヘマトキシリン・エオジン	固定: 0.1 mol/Lリン酸緩衝10%ホルマリン溶液 染色: ヘマトキシリン・エオジン	固定: 0.1 mol/Lリン酸緩衝10%ホルマリン溶液 染色: ヘマトキシリン・エオジン (10個体)  その他: 灌流固定、電子顕微鏡用樹脂包埋 (3個体)
病理所見	小脳脚の軸索膨化(7中1個体のみ) 坐骨神経の神経線維の変性	なし	なし	視床下部、視床の軽微～軽度な空胞変性	なし
主な一般状態	よろめき歩行(後肢の反転を伴う例もあり)	振戦	痙攣、振戦、異常発声、蒼白、呼吸数減少 10中3個体、死亡。	痙攣、呼吸深大、過敏 10中9個体、死亡または切迫殺。	痙攣、姿勢の異常、流涎、呼吸異常 10中6個体、死亡。 灌流固定用 3中2個体、死亡。
FOB	実施	実施	実施	未実施	未実施

FOB: Functional Observation Battery (神経症状観察および神経機能検査)

5種類中1種類

**mcaのみ**で発現レベルに変動がある  
遺伝子群(41プローブ)が存在した。

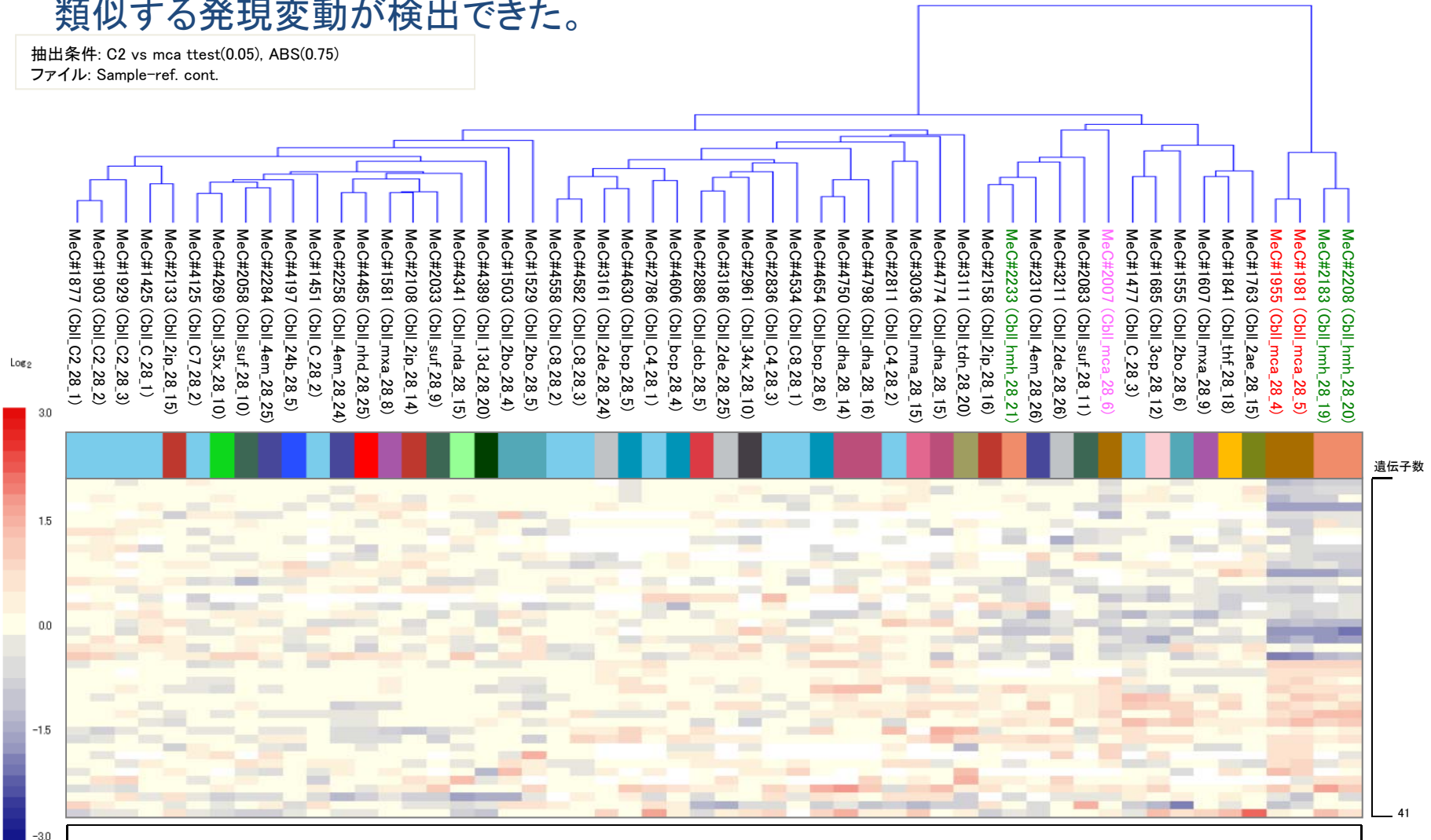


## 3. 研究開発成果について 研究開発テーマ②神経毒性

## ■ メタクリルアミド(mca)で発現変動する遺伝子群(41プローブ)(小脳)

- 3個体中2個体で発現レベルが変動していた遺伝子群が存在した。また、hmhでmcaと類似する発現変動が検出できた。

抽出条件: C2 vs mca ttest(0.05), ABS(0.75)  
ファイル: Sample-ref. cont.

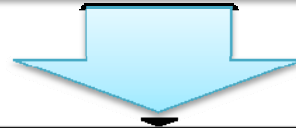


## 3. 研究開発成果について 研究開発テーマ②神経毒性

## ■ ヒドラジンー水和物(hmh)の毒性

国立医薬品食品衛生研究所の「既存化学物質毒性データベース」では神経毒性については何の記載もない⇒ラットでは神経毒性に係る所見が出ていない。

ところがヒトでは・・・



特定標的臓器・全身毒性(単回ばく露):

ヒトについては、「急性暴露によって**中枢神経系**、肝臓、腎臓に影響を及ぼすことが知られている。」(環境省リスク評価第1巻(2002)の記述があることから、中枢神経系、肝臓、腎臓が標的器官と考えられた。

以上より、分類は区分1(**中枢神経系**、肝臓、腎臓)とした。

中枢神経系、肝臓、腎臓の障害

特定標的臓器・全身毒性(反復ばく露):

ヒトについては、「肝毒性、**神経症状**、心臓症状」、「黄疸、死後の剖検で重度腎炎、尿細管壊死、糸球体腎炎、限局性肝細胞壊死がみられた。」(CERI・NITE有害性評価書 No.78 (2004))、「胃炎、**振戦**、**嗜眠**、**言動の一貫性喪失**、黄疸、肝臓の肥大で易触診、血中ビリルビン量の上昇、血中クレアチニン量の上昇、蛋白尿、剖検所見:重度の尿細管壊死」(IARC (1987))等の記述があることから、肝臓、**神経系**、消化管、腎臓が標的臓器と考えられた。なお、消化管への影響については、経皮暴露試験での影響のため、標的臓器として採用した。以上より、分類は区分1(肝臓、**神経系**、消化管、腎臓)とした。

長期又は反復ばく露による肝臓、**神経系**、消化管、腎臓の障害(区分1)

「化学物質等安全データシート」より引用

ヒトでは神経毒性が報告されていた

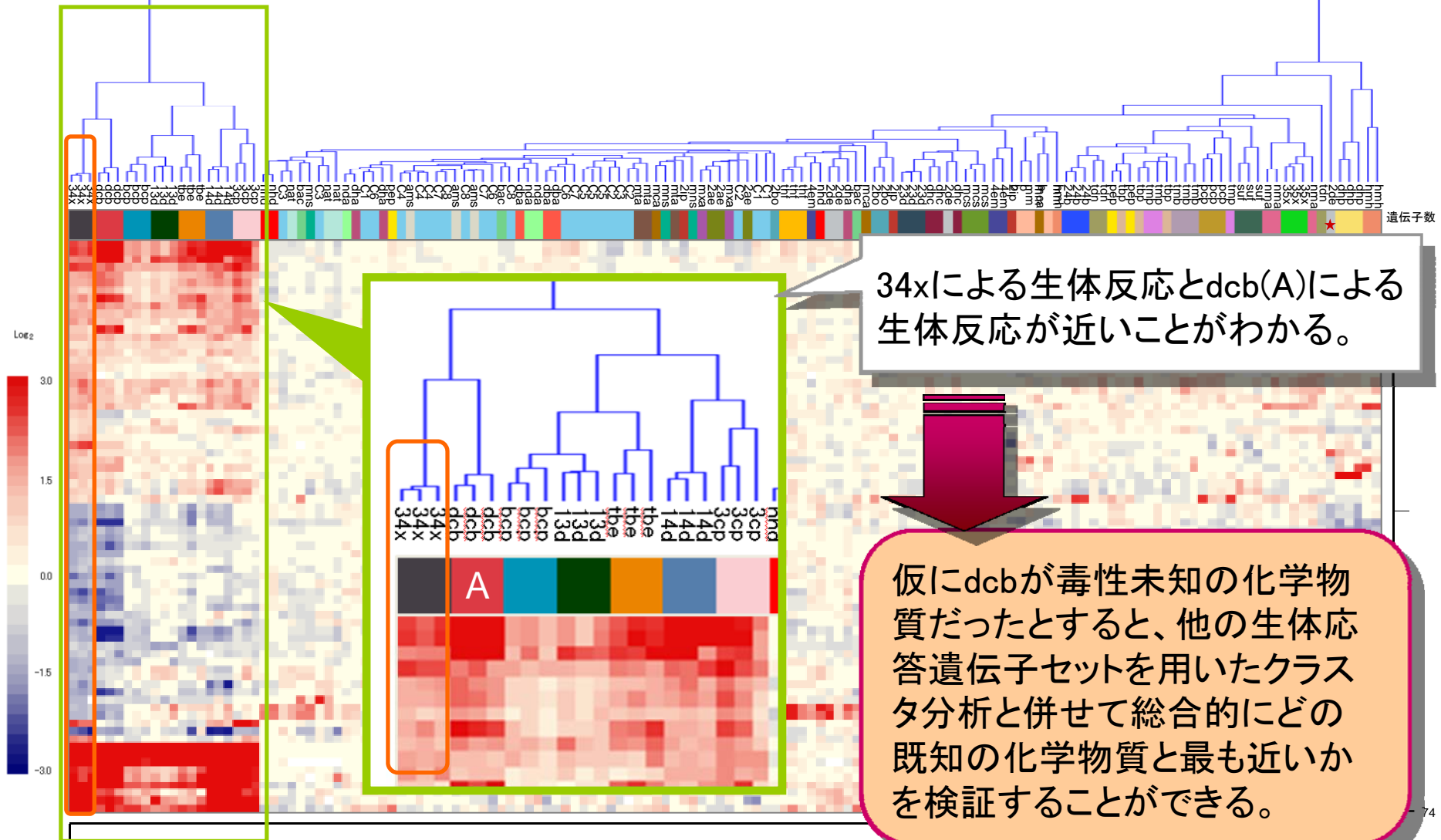
## 【まとめ】

- 遺伝子発現変動解析で、神経毒性を有する化学物質の有害性を評価できる可能性がある。

# 化学物質の有害性予測

## 3. 研究開発成果について 研究開発テーマ②化学物質の有害性予測

■ 34xと対照群のt検定により特定した生体応答遺伝子発現データセットによりクラスタ分析⇒34x以外の化学物質が同じ房に入る⇒他の化学物質の有害性を評価



# 反復投与毒性試験期間の 短縮化の可能性



### 3. 研究開発成果について 研究開発テーマ②反復投与毒性試験期間の短縮化の可能性

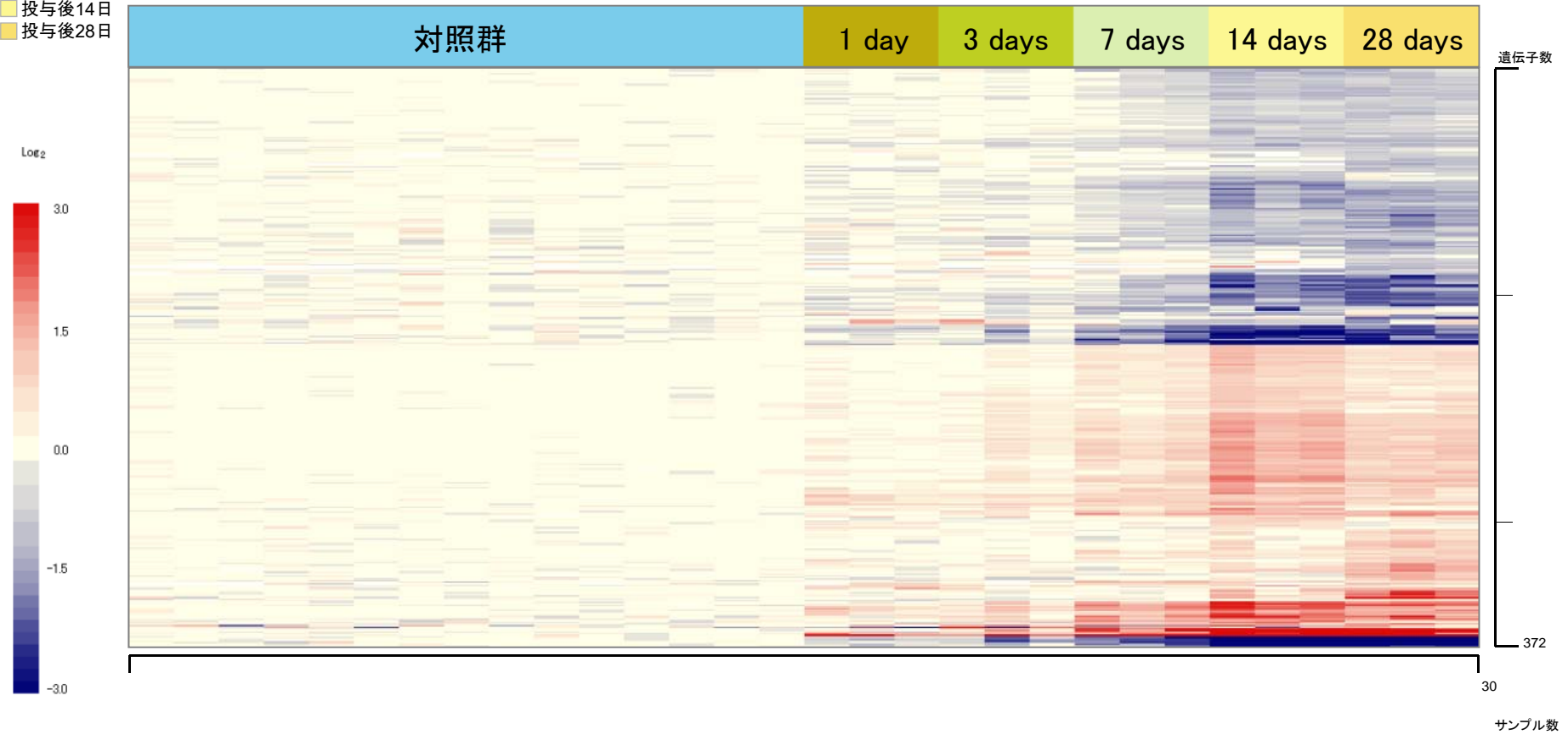
#### ■ タイムコース実験(フタル酸ジヘプチルを例にして)

- 28日より前の段階で多くの遺伝子の発現変動を検出し得る。

抽出条件: t検定(各コントロールvs投与後 1,3,14,28日, ttest(0.01), ABS(0.75))  
Sample-contav

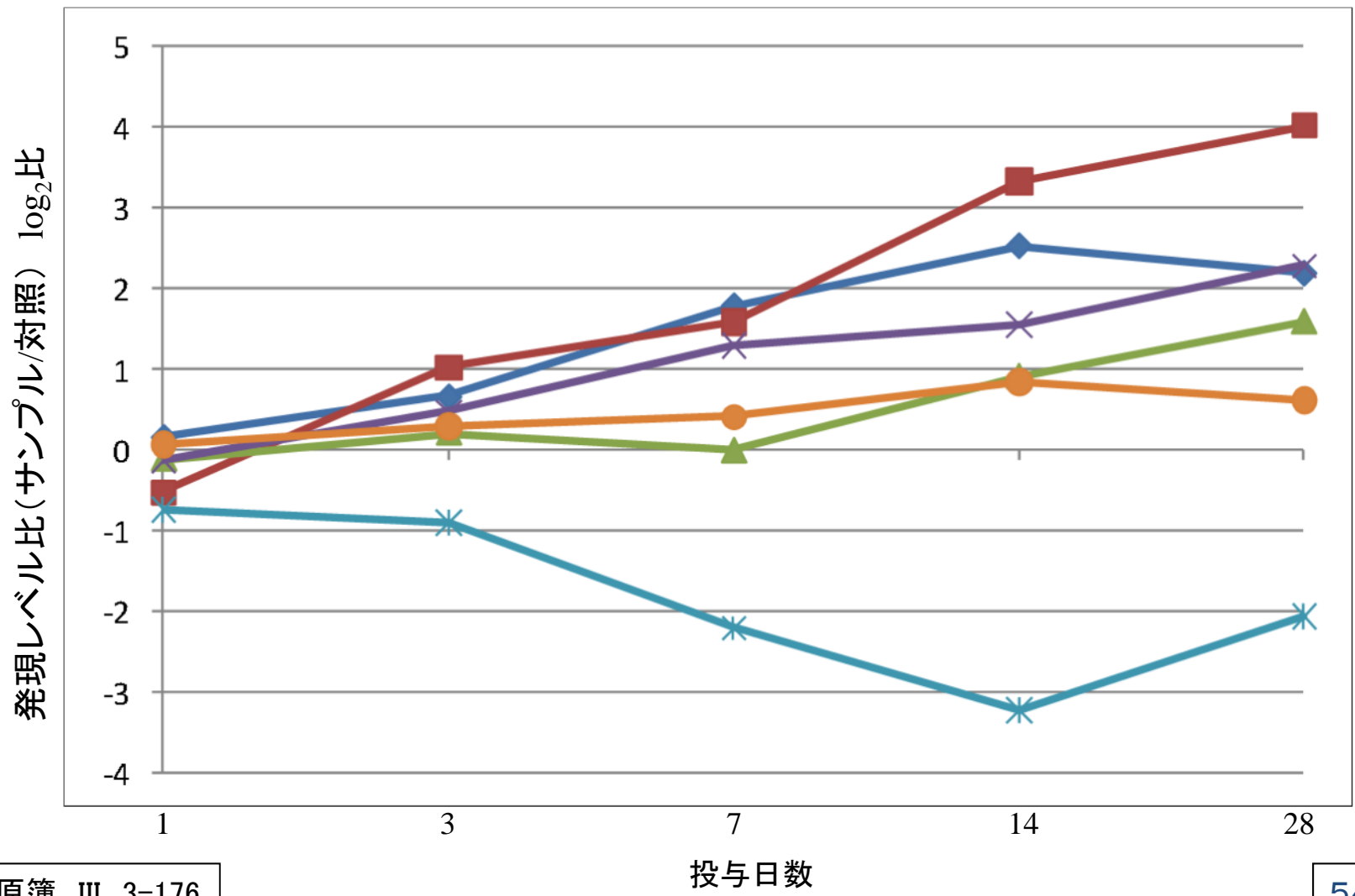
- 溶媒対照
- 投与後1日
- 投与後3日
- 投与後7日
- 投与後14日
- 投与後28日

※28日目は第5回28日間  
反復投与試験のデータを使用



3. 研究開発成果について 研究開発テーマ②反復投与毒性試験期間の短縮化の可能性

- 有害性バイオマーカー遺伝子(6遺伝子)の経時的発現変動
  - 40種類の化学物質全データから絞り込んだバイオマーカー候補遺伝子群は比較的早い段階から発現変動し始めている。



## 【まとめ】

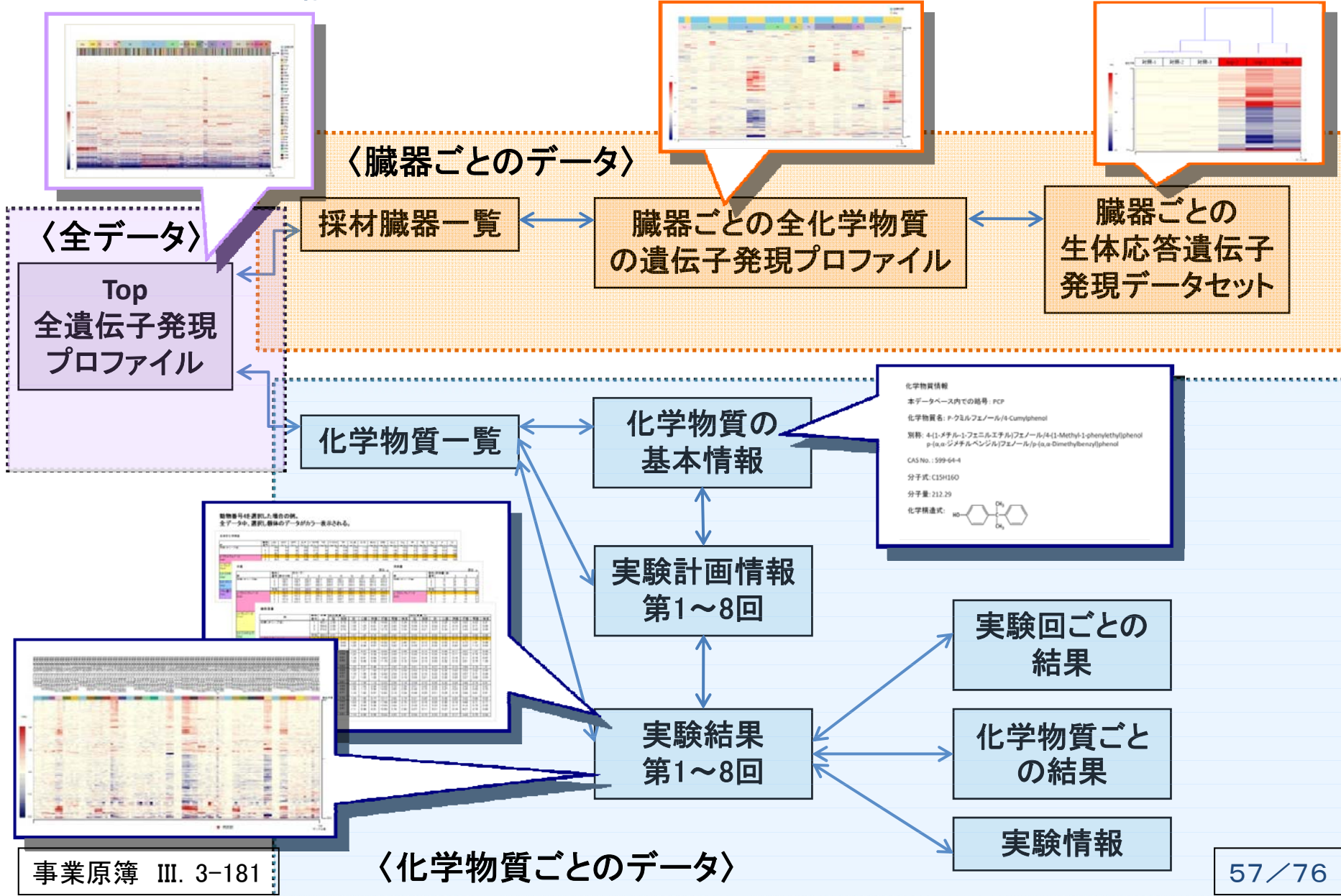
- 従来の反復投与試験よりも短期間で生体内の遺伝子発現レベルの変化を検出できる可能性がある。  
⇒コスト削減の可能性

# 研究開発テーマ③

## 遺伝子発現情報の登録・開示と データベース化

### 3. 研究開発成果について 研究開発テーマ③遺伝子発現情報の登録・開示とデータベース化

#### ■ データベースの構築・公開⇒広く一般に利用可能

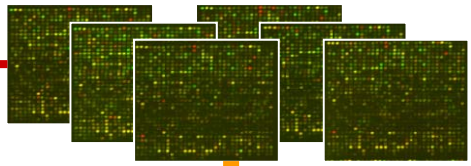


### 3. 研究開発成果について 研究開発テーマ③遺伝子発現情報の登録・開示とデータベース化

## 外部データベースとのリンク

遺伝子発現プロファイル

データ登録



集積



※H-Inv DBホームページより引用

【遺伝子の情報】  
(日本語・英語)

**CIBEX** Center for Information Biology Gene Expression Database

Top Search Experiment List Array List Submission Contact

CIBEX is a public database for microarray data, which is aimed at storing MIAME-compliant data in accordance with MGED Society recommendations.

Search Experiment Browse  
Accession Title Authors advanced search GO  
Experiment List Array List  
Statistics Experiments: 81 Arrays: 126 Hybridizations: 2287  
Model Name Provider last updated 2009/09/10  
DDBJ DNA Data Bank of Japan

Link MGED society MGED home MIAME MAGE Microarray Databases ArrayExpress GEO Other Databases

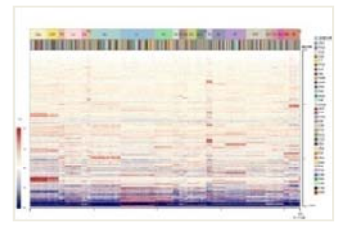
Submission Grant Support

※CIBEXホームページより引用

【全データの公開】  
(英語)

クラスター解析

◆ 全臓器解析



◆ 個別解析



- ◆ 血液生化学データ
- ◆ 体重・臓器重量データ
- ◆ 基本情報

遺伝子発現情報統合データベース

(日本語) ⇒ 将来的に英語表記も予定

既存化学物質毒性データベース  
Japan Existing Chemical Data Base (JECDDB)

検索項目: @CAS番号 @物質名称

キーワード

試験種別

※国立医薬品食品衛生研究所 既存化学物質毒性DBより引用

【化学物質の毒性情報】  
(日本語)



## 【まとめ】

- 化学物質の有害性評価に有用な毒性マーカーまたは遺伝子セットについて知的財産権の確保を行った後(特許出願10件:但しH23年度に10件追加)、すべてのデータ(1,025プロファイル)を国立遺伝学研究所のデータベースで登録し、既に公開済みである。
  - 一般の研究者などが利用しやすい形に編纂したデータベースの構築を進めており、平成23年8月に公開する予定である。
- ⇒本事業で開発された遺伝子発現データセット(成果)が、広く社会において(特に、有害性評価やその手法開発に従事している専門家及び規制行政担当者に)利用され得る環境を提供した。

## IV. 実用化の見通し(詳細)

# 有害性評価書情報の統合・ 新規データベースの構築



# IV. 実用化の見通しについて 有害性評価書情報の統合・新規データベースの構築

## ■ データベースの活用

<遺伝子発現情報統合データベース>



アクセス

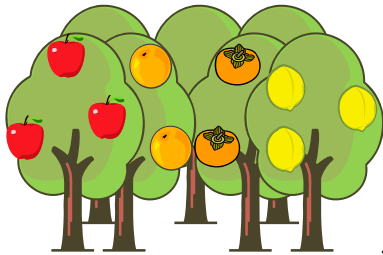
情報をフィードバック

閲覧はフリー

アクセス制限(無料)

化学物質ごと

生体応答遺伝子セット



遺伝子発現情報のダウンロード(パスワード制)

研究・開発等に自由に用いることが可能

株式会社メディクローム

- ・ バイオマーカーの開発
- ・ 化学物質有害性評価手法の開発
- ・ キット化

- ・ in vitro試験法の開発
- ・ 毒性メカニズムの研究

受託解析  
各社で開発した化学物質・薬剤などの毒性評価(同一手法により遺伝子発現変動解析し、データベースと直接比較)

商品化

論文発表等

# キット化・受託ビジネス展開



## ■ キット化(製品化)の展開

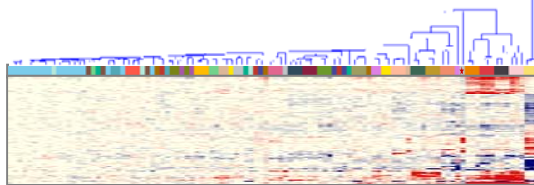
## プロジェクト

成果物(生体応答遺伝子セット、毒性マーカー)

## キット化(製品化)

- ・ 生体応答遺伝子セット
- ・ 毒性マーカー

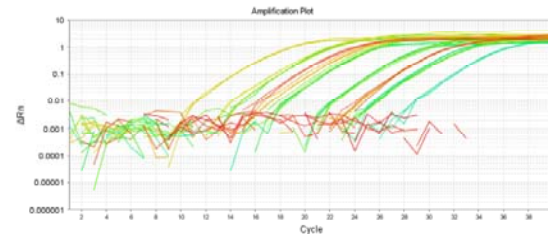
特許権取得



定量系へ移行



Real-Time PCR 等



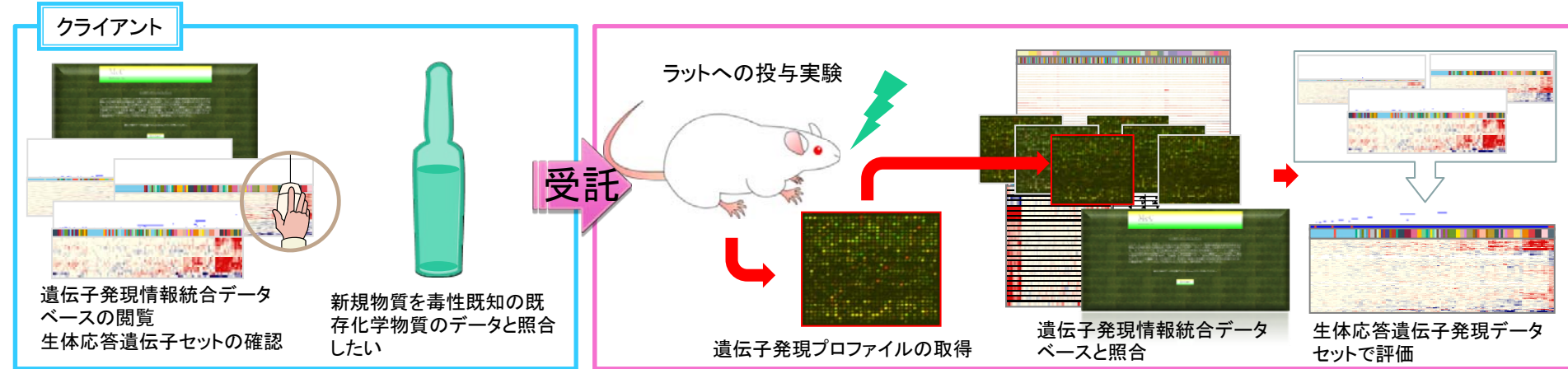
複数の試薬メーカー・検査メーカーに共同開発を打診中

- キット化する遺伝子の選定
- 定量系への移行の検討
- 標準物質(標準RNAなど)の開発
- 市場調査

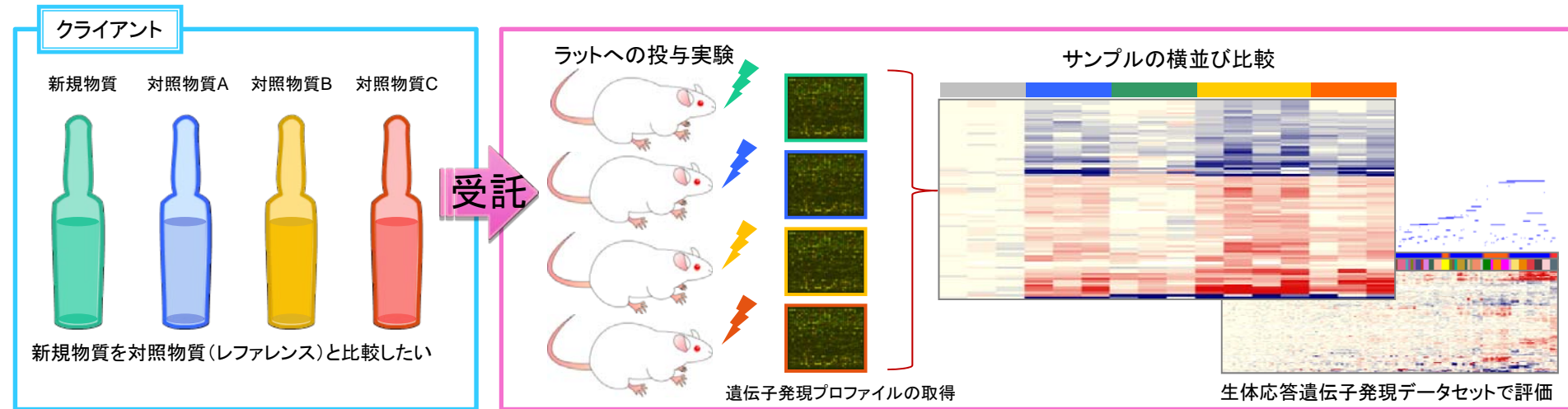
IV. 実用化の見通しについて キット化・受託ビジネス展開

■ 受託ビジネスの展開

〈ビジネスモデルA〉



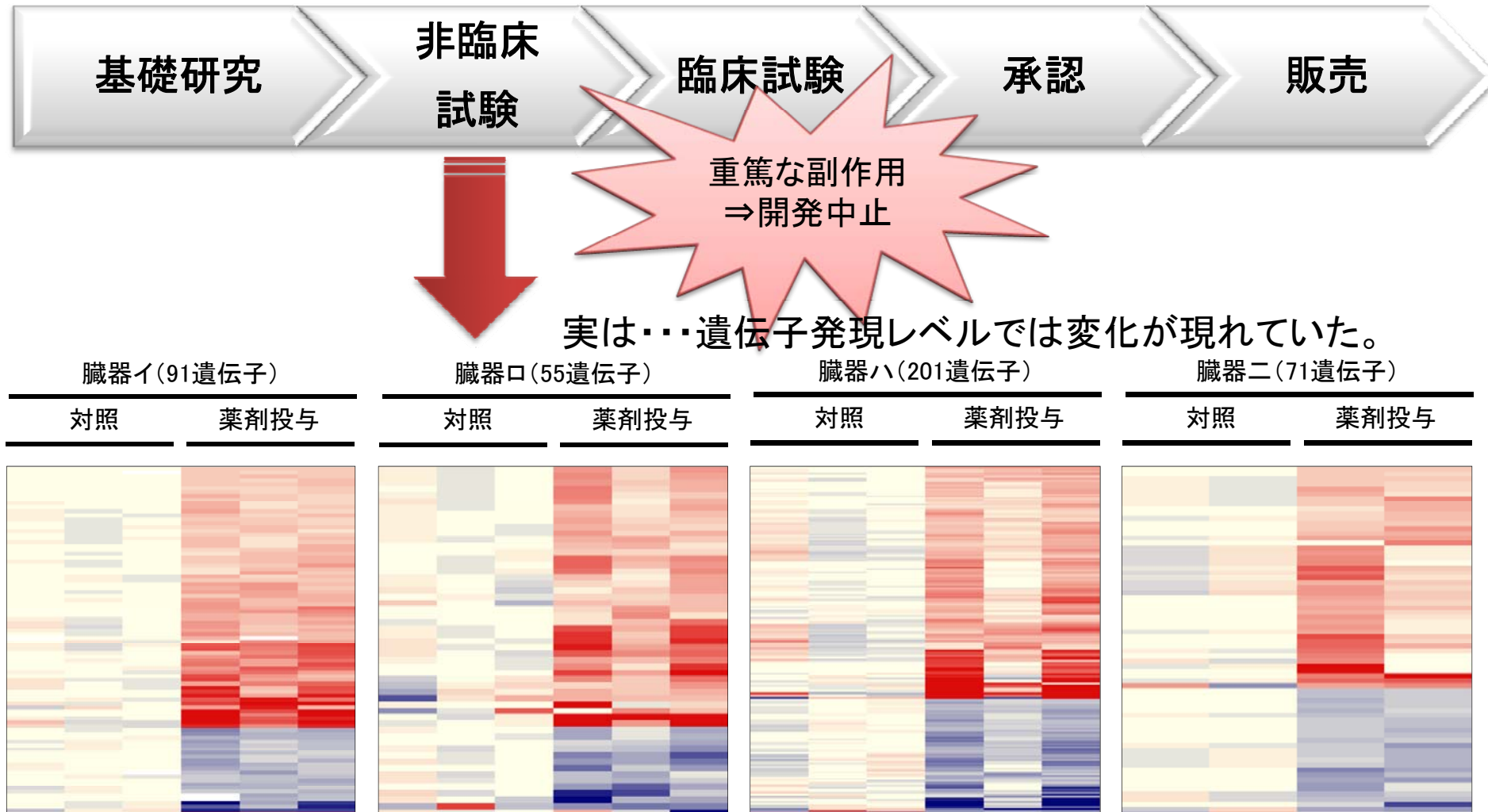
〈ビジネスモデルB〉



# キット化・受託ビジネス展開の具体例

## ■ 事例1: X社の場合(ビジネスモデルA)

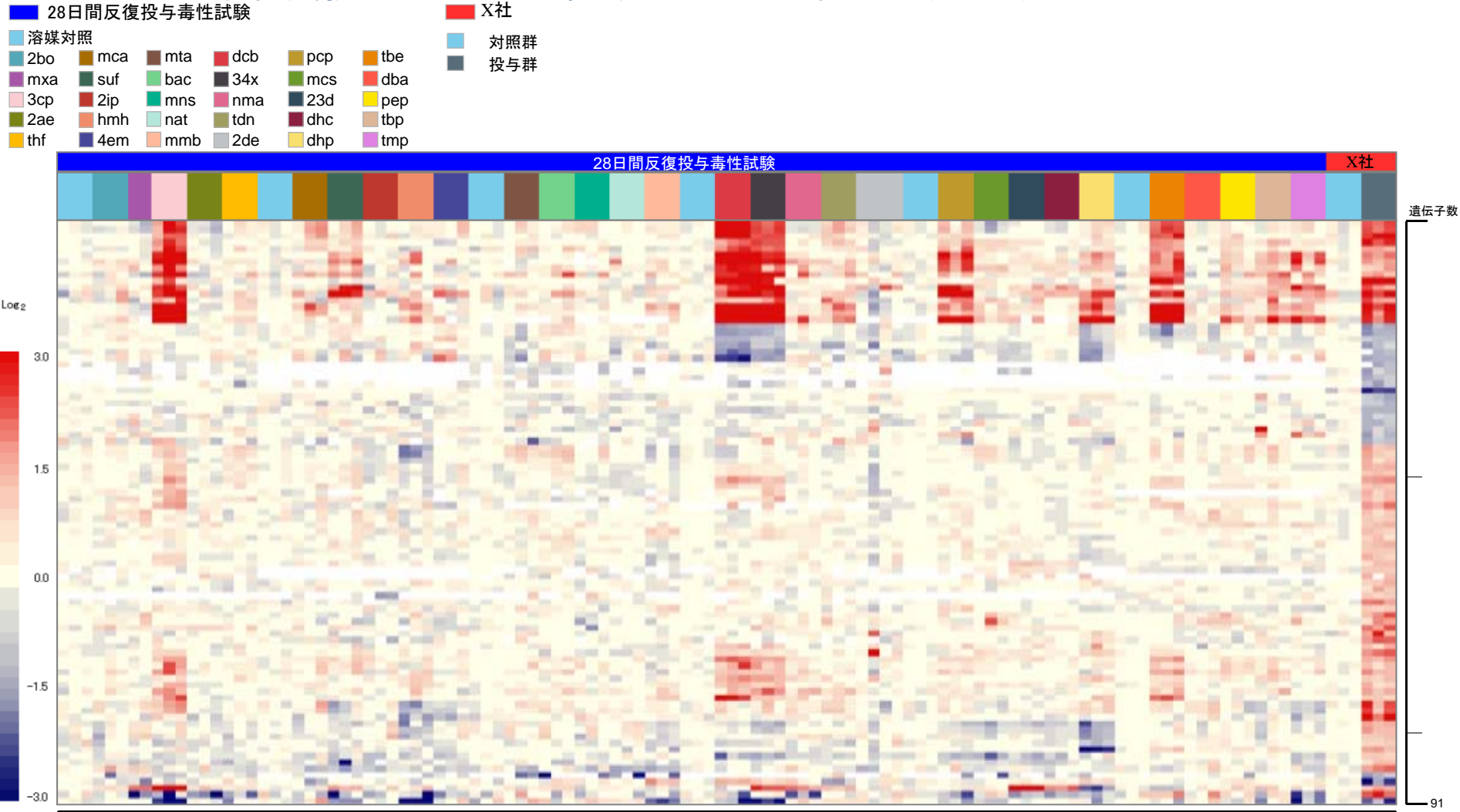
- 臨床試験で重篤な副作用が出たために開発中止となった抗がん剤は、28日間反復投与試験で複数の臓器で遺伝子発現レベルに変化が現れていた。



# IV. 実用化の見通しについて キット化・受託ビジネス展開の具体例

## ■ 事例1 : X社の場合 (ビジネスモデルA)

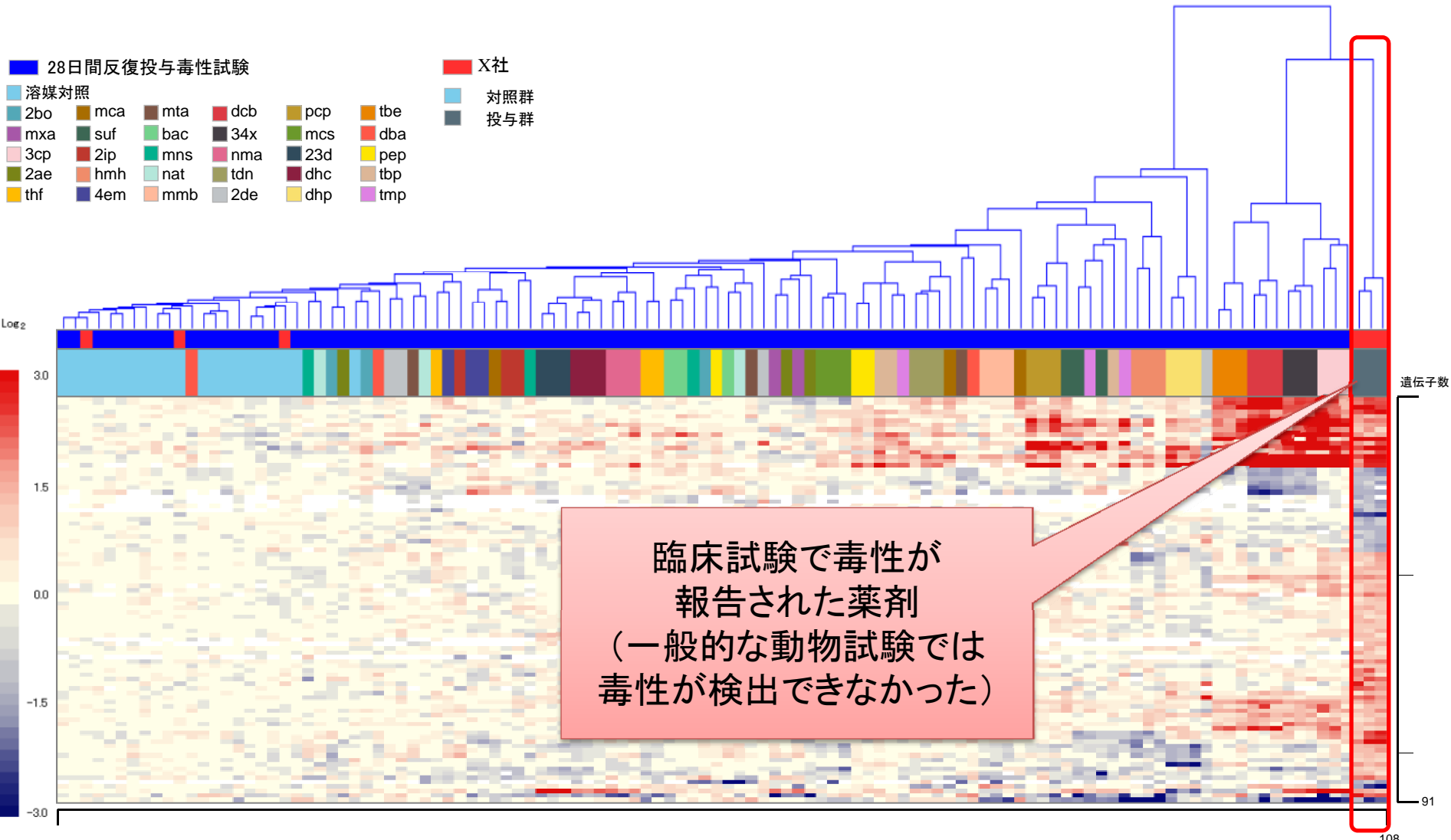
- X社の薬剤候補物質投与により発現変動した遺伝子群の一部は本プロジェクトで使用した化学物質投与により発現変動した遺伝子群と一致した。



# IV. 実用化の見通しについて キット化・受託ビジネス展開の具体例

## ■ 事例1: X社の場合(ビジネスモデルA)

- X社の薬剤の毒性は、非臨床試験(動物試験)で予測できた可能性がある。

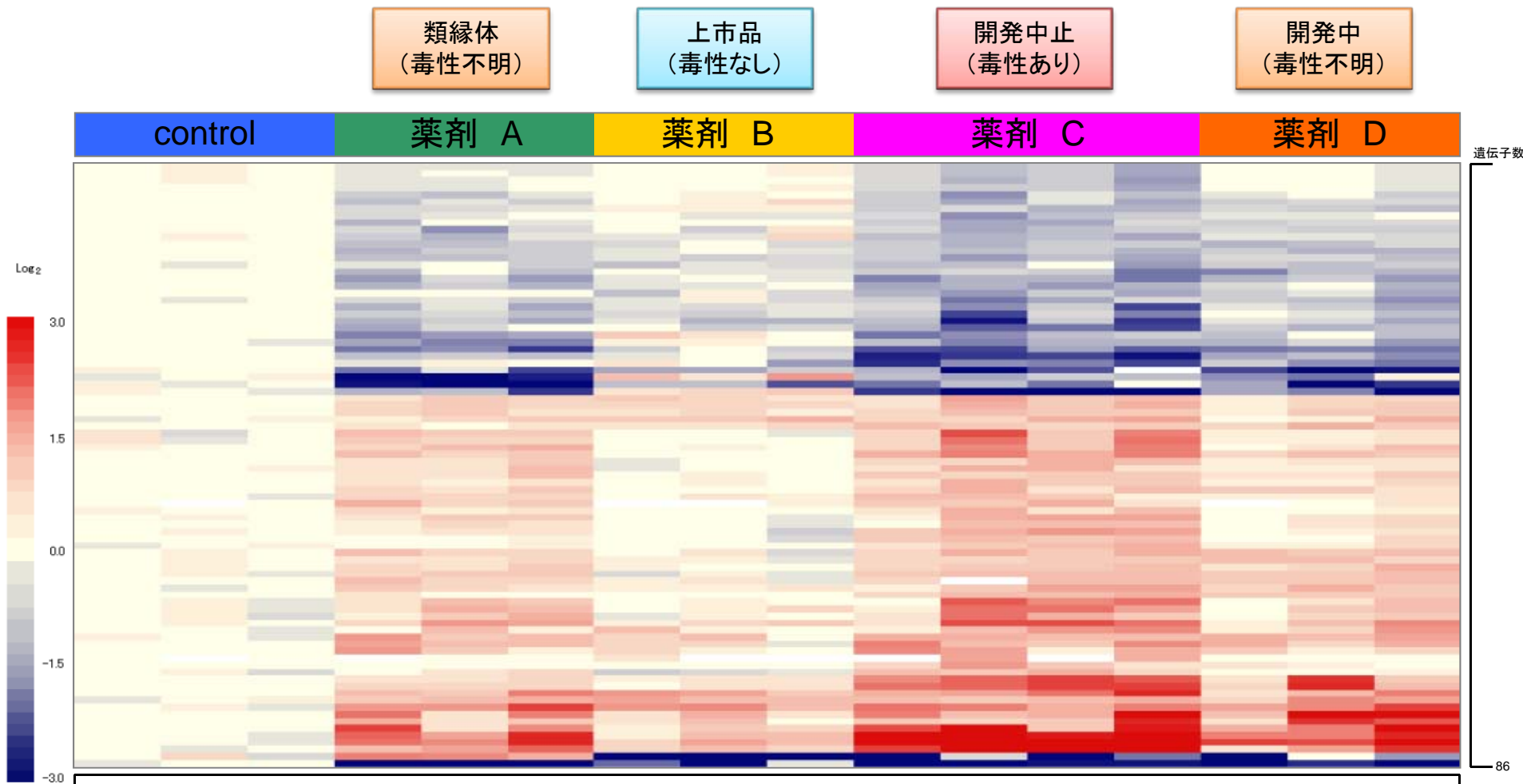




## IV. 実用化の見通しについて キット化・受託ビジネス展開の具体例

## ■ 事例2: Y社の場合(ビジネスモデルB)

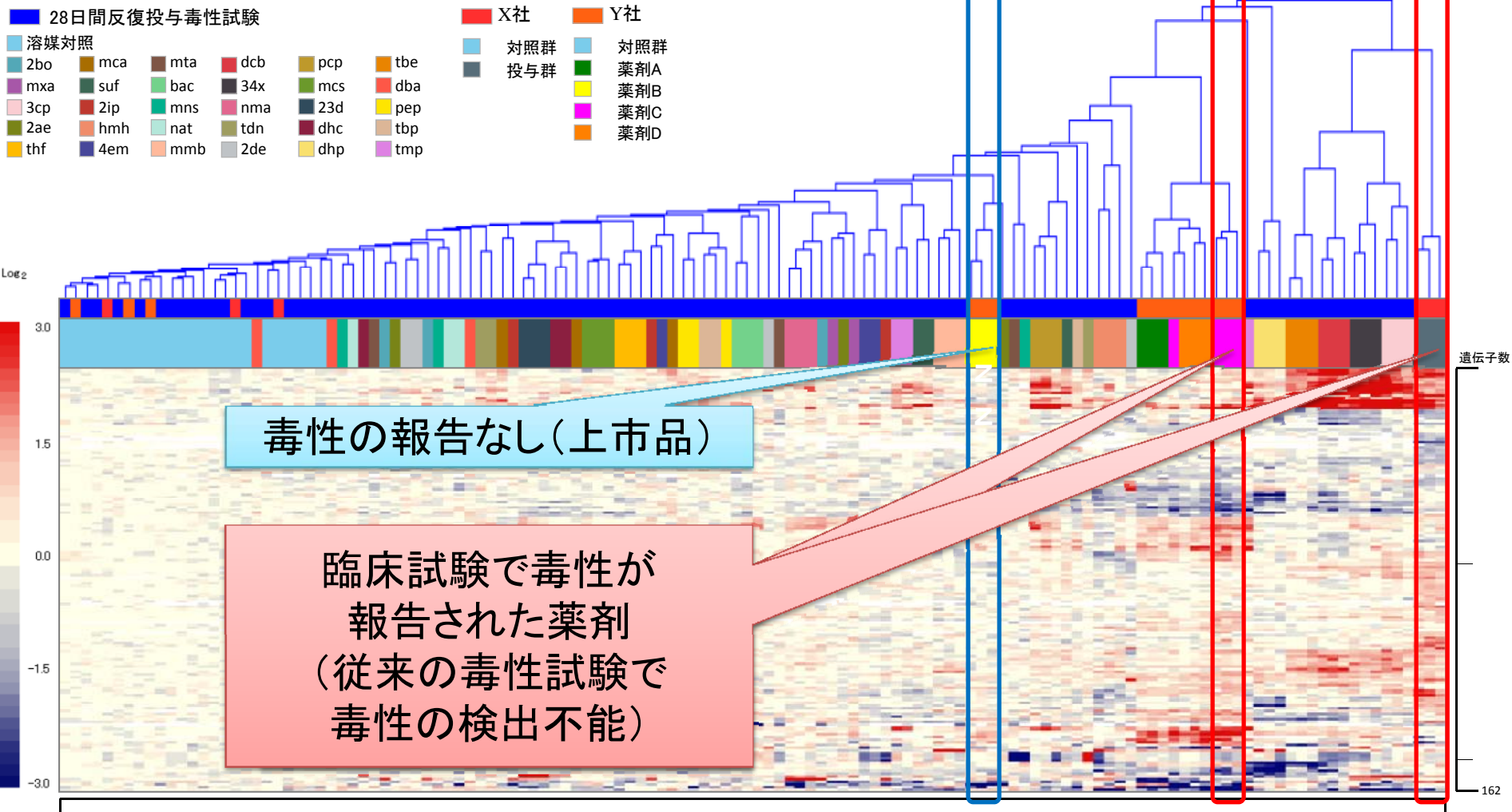
- 上市品(薬剤B)が最も変化が少なく、臨床試験で副作用のために開発中止となった薬剤(薬剤C)が最も変化が大きかった。



# IV. 実用化の見通しについて キット化・受託ビジネス展開の具体例

## ■ 本プロジェクトの成果を用いたX社とY社の薬剤の毒性評価

- 本プロジェクトの手法を用いることにより、非(前)臨床段階で薬剤の毒性(副作用)予測ができる可能性がある。

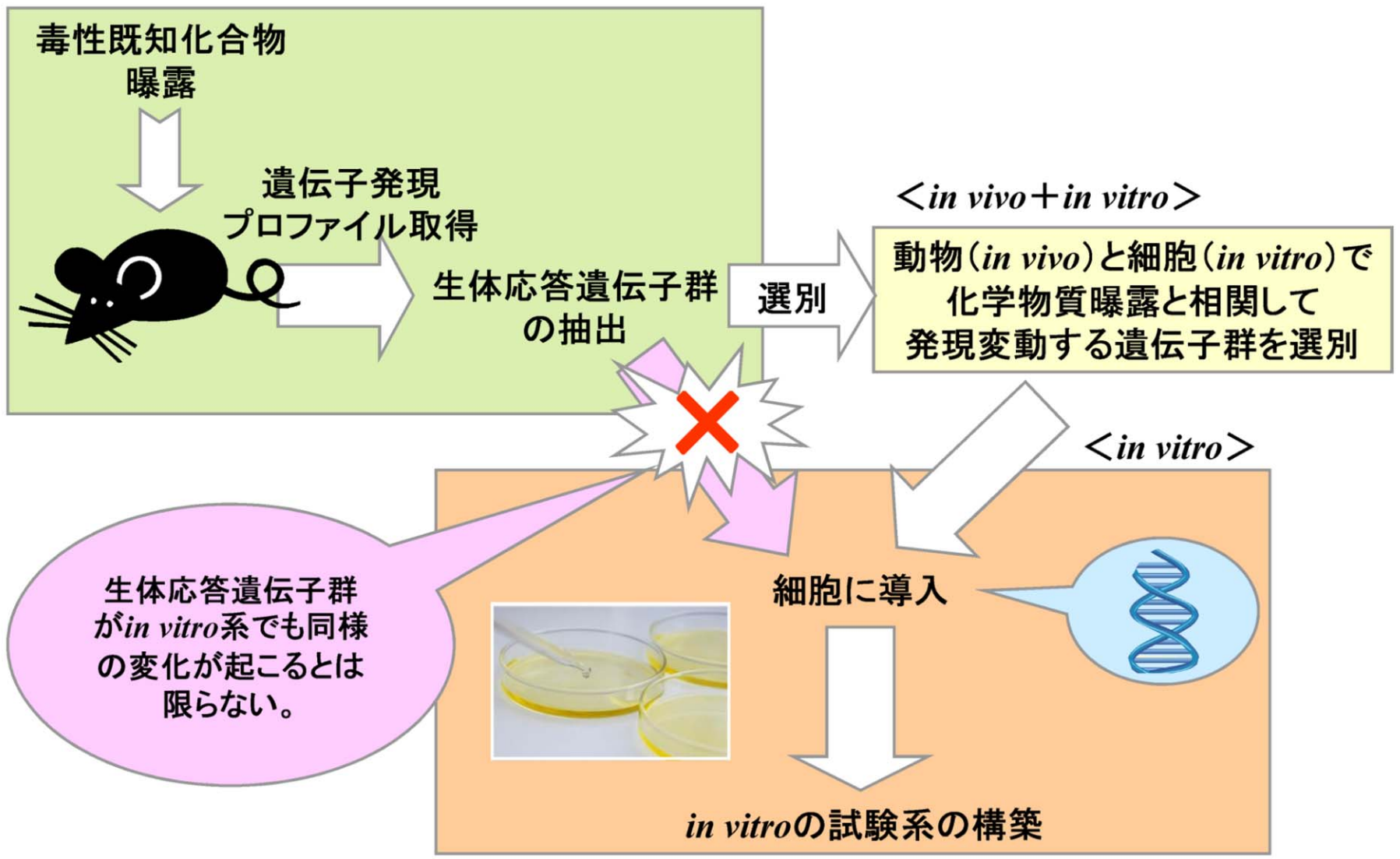


毒性の報告なし(上市品)

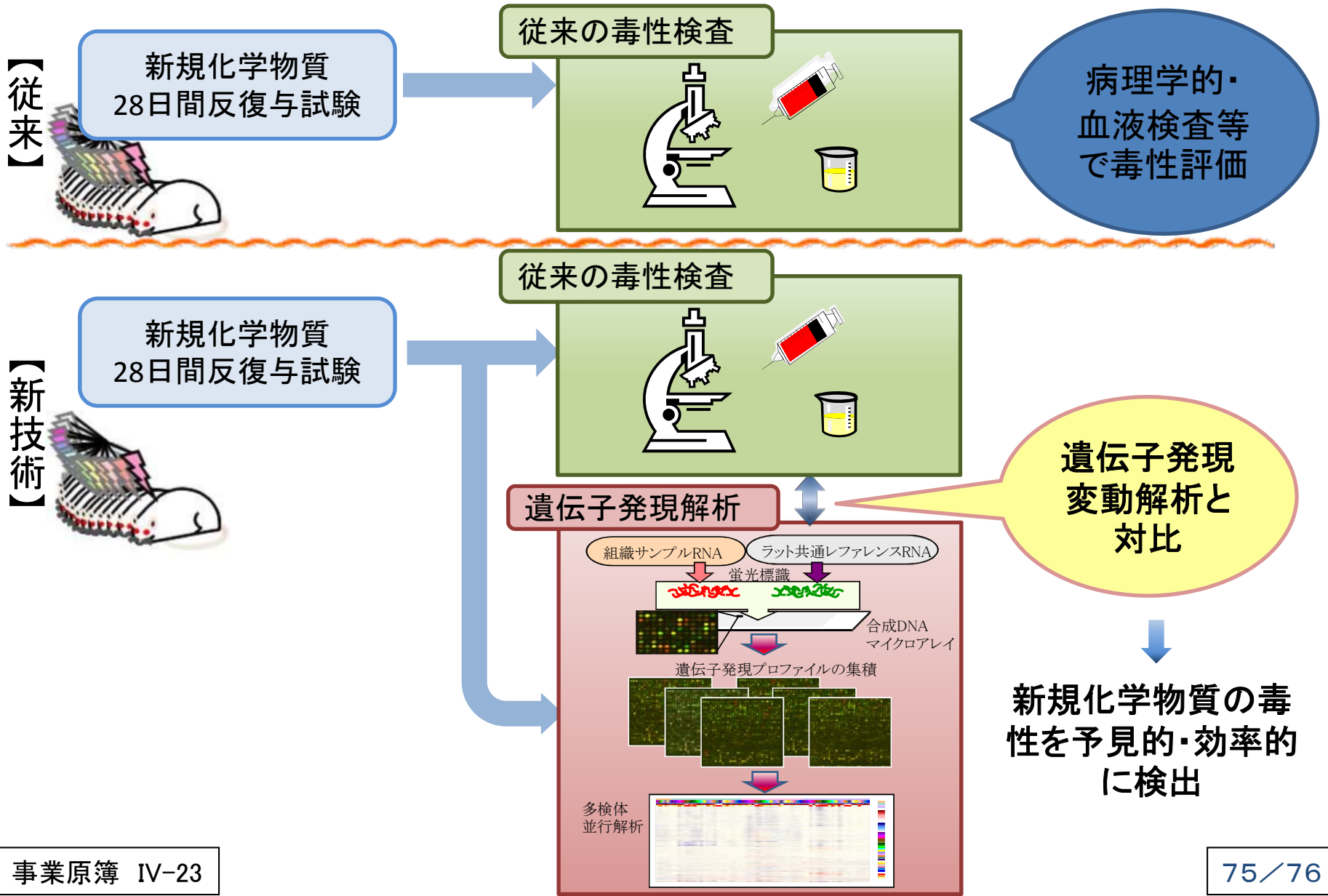
臨床試験で毒性が報告された薬剤  
(従来の毒性試験で毒性の検出不能)

# 研究開発促進・公的な有害性評価試験法認定

### ■ 研究開発促進



### ■ 公的な有害性評価試験法認定



## IV. 実用化の見通しについて

## 【実用化された際の効果】

## ■ 有害性評価書情報の統合・新規データベースの構築

- 既存化学物質の毒性評価と遺伝子発現情報を統合することにより、化学物質の生物学的活性を相互に比較可能となり、**既存情報の再活用化**という新たな展開が期待できる。

## ■ キット化・受託ビジネス展開

- 多彩な臓器・組織間での比較解析から新規有害性バイオマーカーを同定することにより、**新たな有害性評価法の開発**が期待できる。
- 新規有害性バイオマーカーや生体応答遺伝子セットの検出**キットを開発**することにより、本事業で開発した手法の普及が期待できる。
- (株)メディクロームによる**受託ビジネス**の再開が期待できる。
- 本事業で確立した手法を抗がん剤などの各種薬剤に応用することにより、**前臨床試験段階で毒性(副作用)の予測**ができ、**莫大なコスト削減**が期待できる。

## ■ 研究開発促進・公的な有害性評価試験法認定

- 各種化学物質投与により発現変動した遺伝子群による**毒性発現のメカニズムを解明**することが期待でき、さらに、**in vitro試験法**への応用も期待できる。
- 本事業で確立した手法を実用化することで、従来の反復毒性試験のサンプルの一部を遺伝子発現変動解析に供し、これまでよりも**精度の高い化学物質の毒性評価法の確立**が期待できる。