

第1回「石油精製物質等の新たな化学物質規制に必要な
国際先導的有害性試験法の開発
(研究開発項目① 反復投与毒性試験と遺伝子発現変動
による発がん性等発現可能性情報の取得手法の開発)」
終了時評価（事後評価）検討会
参考資料-5

石油製品需給適正化調査等

(石油精製物質等の新たな化学物質規制に必要な国際先導的有害性試験法の開発)

研究開発項目①

反復投与毒性試験と遺伝子発現変動による 発がん性等発現可能性情報の取得手法の開発 事業成果詳細

Version 161006

平成 28 年 10 月 31 日

経済産業省製造産業局化学物質管理課

研究実施機関：一般財団法人化学物質評価研究機構（CERI）

国立大学法人東京農工大学

目次

1. 研究開発目標	3
1.1. 全体の目標設定	3
1.2. 個別要素技術の目標設定	6
2. 成果、目標の達成度	8
2.1. 全体成果	8
2.2. 個別要素技術成果	11
2.2.1. 主要臓器(肝臓・腎臓)に対する一般毒性	11
(1) 研究開発の概要	11
(2) 条件検討	12
(3) 主要臓器に対する一般毒性予測法の開発	20
(4) 評価項目に対する自己評価	59
2.2.2. 発がん性	61
(1) 研究開発の概要	61
(2) 短期発がん性予測手法の開発	62
(3) 評価項目に対する自己評価	95
2.2.3. 神経毒性	97
(1) 研究開発の概要	97
(2) 遺伝子発現量解析のための脳の部位特異的な採材法の構築	97
(3) フィージビリティ研究と神経毒性予測法の開発	99
(4) 評価項目に対する自己評価	111
2.3. 目標の達成度	112
3. 論文発表、特許出願状況等	116
3.1. 論文等の外部発表	116
3.2. 特許出願	116

1. 研究開発目標

1.1. 全体の目標設定

〔背景〕

- 石油の精製工程を経て得られる石油製品や精製の過程で生成される物質（以下「石油精製物質」という）には、消費者の身近で使用される製品となる物質も多いが、有害性情報が明らかになっていない物質が数多く存在している。
- 2020年までに化学物質の影響を最小化するという国際目標（持続可能な開発に関する世界首脳会議（World Summit on Sustainable Development、WSSD）目標）達成のため、欧州では2007年にREACH規則（Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals）を、日本では2011年に化審法（化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律）において、新規化学物質、既存化学物質に関わらず化学物質をリスク評価の対象とするという、世界に先駆けた新たな化学物質規制手法を導入した。現在、類似の規制整備は各国に広まっている。
- 化学物質の危険性や有害性（一般毒性、発がん性、神経毒性等、以下「エンドポイント」という）の分類基準等の統一化にむけ、2003年に国連勧告として採択されたGHS（Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals）の各国における規制への導入も近年急速に進んでいる。
- このように、これまで有害性の評価が行われていなかった物質も評価対象となり、従来以上に多様なエンドポイントに対して有害性を評価するニーズが高まっている。
- 技術的な進展のひとつとして、近年、化学物質に暴露された実験動物における網羅的な遺伝子発現変動を測定・解析することで、従来では取得しえなかった情報を得られるようになっており、従来の試験法では検出が困難と考えられるエンドポイントの発現可能性に関する情報の取得が可能となってきている。

〔目的〕

効果的且つ効率的な有害性評価手法が十分整備されていない毒性エンドポイントとして、特に重要と考えられる「(1) 主要臓器における一般毒性」、「(2) 発がん性」、及び「(3) 神経毒性」について、遺伝子発現変動解析手法等の最新技術を活用し、化学物質の効果的且つ効率的な有害性評価手法を開発することを本プロジェクトの目的とした。

〔解決すべき具体的課題〕

- 現在行われているヒト健康影響に関わる有害性の評価では、動物試験の結果に基づく評価が中心であり、エンドポイントに応じた動物試験をそれぞれ実施しなければならない。ところが、最も長期間の試験となる発がん性では 2 年間の動物試験となる等、多くのリソース（費用、試験期間、実験動物等）が必要となるため、こうした問題を解決できる効果的かつ効率的な有害性情報を取得する手法の開発が課題となる。
- 発がん性のような長期の試験期間を要する毒性を短期間で検出する必要がある。
- 動物試験削減等の効率化のために、行政利用されている既存の試験を活用することが望ましい。



- 化審法や REACH 規則においてスクリーニング試験として行政利用されている 28 日間反復投与毒性試験（OECD テストガイドライン No.407）を活用する。
- 毒性影響に関連した初期的応答を遺伝子発現量の変化等で捉えられれば、長期毒性等の複数の毒性を短期間で検出できる可能性がある。

そこで、本プロジェクトでは、効果的且つ効率的な有害性評価手法が十分整備されていない毒性エンドポイントとして、特に重要と考えられる「(1) 主要臓器における一般毒性」、「(2) 発がん性」、及び「(3) 神経毒性」について、遺伝子発現変動解析手法等の最新技術を活用し、化学物質の効果的且つ効率的な有害性評価手法を開発すると共に、開発した手法の国際標準化をも図ることで、世界規模で化学物質の有害性評価を高度化し、効果的且つ効率的な試験・評価の実施に貢献することを目的とした。具体的には、「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（以下、化審法）」において公定法とされている等、化学物質の毒性スクリーニング試験として汎用されている 28 日間反復投与毒性試験の実施を前提として、この単一の動物試験の臓器等を生体サンプルとして遺伝子発現変動データを取得し、そのデータを解析して、投与された化学物質の前述の (1)～(3) の有害性に関する予兆的情報を得る手法の開発を目標とした。

最終目標	設定理由
<p>28 日間反復投与試験の動物サンプルから取得した遺伝子発現変動データを活用して有害性を予測する手法の開発</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・ ヒト健康影響に対する有害性情報が明らかになっていない物質は多数存在しており、特に重要度の高い(1)主要臓器 (肝臓・腎臓) における一般毒性、(2)発がん性、(3)神経毒性について、それらの有害性情報を効率的に取得する必要が高まっている。一方、現在行われている毒性評価においては、エンドポイントに応じて、それぞれ毒性試験を実施する必要があるが、(1)～(3)等の毒性試験においては、多額の費用、長い試験期間、多くの実験動物を要する。 ・ 化審法や REACH 規則において行政利用されている等、化学物質の毒性スクリーニング試験として汎用されている 28 日間反復投与毒性試験の実施は一般毒性のスクリーニング試験世界各国で義務付けられている。しかし、この試験で評価できる毒性は限定的であり、重要な毒性エンドポイントである発がん性等が評価できていない。また、これらのエンドポイントについては、効果的且つ効率的な有害性評価手法が十分整備されておらず、その手法を整備する必要がある。 ・ 近年、生体内での反応を網羅的に解析する手段としてオミクス技術が進展しており、特に遺伝子発現量変化を測定対象としているゲノミクス技術を活用することで、毒性の作業機序を詳細に解析できる可能性があると共に、生物学的応答を網羅的に解析できることから、28 日間反復投与毒性試験で十分に評価できていなかった毒性エンドポイントについても評価できる可能性を含んでいる。 ・ そこで本プロジェクトでは、毒性エンドポイントとして、特に重要と考えられる(1)～(3)について、遺伝子発現変動解析手法等の最新技術を活用し、化学物質の効果的且つ効率的な有害性評価手法を開発することを目標として設定した。

1.2. 個別要素技術の目標設定

要素技術	目標・指標 (事後評価時点)	設定理由・根拠等
28 日間反復投与試験の動物サンプルから取得した遺伝子発現変動データを活用して有害性を予測する手法の開発	(a) 各毒性に関する関連遺伝子の絞り込み	
	<ul style="list-style-type: none"> ・ 主要臓器（肝臓・腎臓）の毒性、発がん性（肝発がん、腎発がん）及び神経毒性を有する毒性既知物質を効率的に選定して実験動物に投与し、遺伝子の発現変動に関する包括的なデータを取得する。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 有害性を予測する方法を構築する上で、毒性既知の被験物質を選択し、遺伝子発現量データを取得することは不可欠であるため。
	<ul style="list-style-type: none"> ・ 毒性の発現に特異的と考えられる遺伝子を絞り込み、各毒性既知物質の投与による毒性発現のマーカースとして利用しうる遺伝子を選定する。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 各毒性の発現との関係で特徴的な発現変動する遺伝子は、各毒性のマーカージン遺伝子となる可能性が高いため。
	(b) 各毒性の発現可能性を検出し得る方法の確立	
	<ul style="list-style-type: none"> ・ 各毒性既知物質の投与による毒性発現に伴う遺伝子発現変動の特徴分析の結論を得る。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 各毒性により変動する遺伝子の物質間での共通性等の特徴を解析することにより、各毒性のマーカージン遺伝子をより確実なものにできるため。
	<p>【主要臓器（肝臓・腎臓）の一般毒性】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 主要臓器（肝臓・腎臓）の一般毒性の発現可能性を予測する解析手法を確立し、文書化する。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 主要臓器（肝臓・腎臓）の一般毒性については、遺伝子発現量データに基づき各毒性を評価する手法そのものが確立されていないことから、まずはこれを構築する必要があるため。 ・ また、方法を広めるためのツールとして、文書化が必要であるため。
<p>【発がん性（肝発がん・腎発がん）】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 発がん性（肝発がん・腎発がん）の発現可能性を予測する解析手法を確立し、文書化する。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 発がん性（肝発がん・腎発がん）については、遺伝子発現量データに基づき各毒性を評価する手法そのものが確立されていないことから、まずはこれを構築する必要があるため。 ・ また、方法を広めるためのツールとして、文 	

要素技術	目標・指標 (事後評価時点)	設定理由・根拠等
	<p>【神経毒性】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 本事業で取得した新たな科学的知見にもとづき、可能な範囲でその毒性発現可能性を予測する解析手法を確立する。 	<p>書化が必要であるため。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 部位によって役割が異なる脳と言う複雑な組織における遺伝子の発現変動によって神経毒性を捉えることができるかフィージビリティを確認する必要があり、本事業では遺伝子に基づく評価法の実現可能性を検討する研究が中心となることが想定された。そこで、最終成果については、事業終了時点まで得られた、作用既知の5物質分からの知見に基づき可能な範囲で方法論を構築することとした。

2. 成果、目標の達成度

2.1. 全体成果

ヒト健康影響に対する有害性情報が明らかになっていない物質は多数存在しており、特に重要度の高い(1)主要臓器(肝臓・腎臓)における一般毒性、(2)発がん性、(3)神経毒性について、それらの有害性情報を効率的に取得する必要が高まっている。一方、現在行われている毒性評価においては、エンドポイントに応じて、それぞれ毒性試験を実施する必要があるが、(1)主要臓器(肝臓・腎臓)における一般毒性、(2)発がん性、(3)神経毒性等の毒性試験においては、多額の費用、長い試験期間、多くの実験動物を要する。

そこで、本プロジェクトでは、以下を目指して、化審法や欧州の化学品規則(REACH)等でスクリーニング試験として使用されている28日間反復投与毒性試験(OECDテストガイドライン407)に遺伝子発現量解析を取り入れることで、(1)~(3)に関する有害性情報を効率的かつ高精度に取得する新たな評価法を開発した。

具体的には以下を実施した。

(1)~(3)の毒性エンドポイントの検出法開発を行うために必要な目的臓器あるいは組織である肝臓、腎臓及び脳(海馬歯状回、帯状回、脳梁、小脳)における遺伝子発現量データの取得法について標準プロトコルを確立した。特に脳については、脳の部位特異的な採材が行えるメタカーン固定法を開発し、プロトコルを確立した。

(1)主要臓器(肝臓・腎臓)における一般毒性については、35試験(32物質)の28日間反復投与試験を行い、数万種類の遺伝子について包括的な発現量データを取得した。その後、動物実験で得られた毒性所見と遺伝子発現量データとの関係性について、バイオインフォマティクス及び生物学的応答に基づく解析を行い、マーカー遺伝子探索を実施した。これまでに肝臓では単細胞壊死、肝細胞肥大、肝細胞脂肪変性を、腎臓では近位尿細管空胞変性、近位尿細管核濃縮、近位尿細管核大小不同、乳頭壊死について、特徴的に発現変動するマーカー候補遺伝子を選定することができた。さらに、これらのマーカー候補遺伝子群を用いて「主要臓器(肝臓・腎臓)の一般毒性の発現可能性を予測する解析手法」を開発し、プロトコルを作成した。

(2)発がん性については、化学発がんにおいて標的性の高い肝臓及び腎臓に着目し、化審法で行われる28日間反復投与試験で取得した遺伝子発現量データを活用し、長期間投与が必要な発がん性を予測できる“短期発がん性予測手法”の開発を行った。これまでに、35試験(32物質)について28日間反復投与試験を実施し、肝臓及び腎臓の遺伝子発現量データを取得した。肝臓については前身のプロジェクト(NEDOプロジェクト「高精度・簡易有害性(ハザード)評価システム開発」)で新規の短期発がん性予測手法を開発することができたために、本プロジェクトで取得した35試験(32物質)を外部データとして活用し、短期発がん性予測手法の予測精度の確認を行った。また、厚生労働省トキシゲノミクスプロジェクト(2002-2012年度)で取得され、既に一般公開されている遺伝子発現量データを活用し、本システムに適用し、どの程度の予測結果が得られるかを検証した。さらに、より簡易な手法として定量PCR法による定性的な発がん

性予測手法を構築し（一致率；トレーニングデータで 82.8% (24/29), バリレーションデータで 86.4% (19/22)), プロトコルを作成するとともに、OECD へ提案するために Preliminary SPSF¹案を作成した。腎臓については、35 試験 (32 物質) の遺伝子発現量データと腎臓がん性との関連性をバイオインフォマティクス技術により解析し、これまでに腎臓がんに関連したマーカー候補遺伝子を選定することができた。さらに、これらのマーカー候補遺伝子群を用いて腎臓における短期発がん性予測手法を開発し、プロトコルを作成した。

(3)神経毒性については、神経毒性だけでなく発達神経毒性も視野に入れ、発達期だけでなく成熟動物でも新生・分化が継続している、中枢神経系において重要なニューロンやグリアに着目し、作用既知の異なる 5 物質について発達期暴露（妊娠 6 日目から授乳終了時までの母動物投与を介した暴露）及び 28 日間反復投与試験（生後 5 週齢ラットを用いた 28 日間投与）を行い、着目している脳の 4 部位（海馬歯状回、帯状回、脳梁、小脳）の遺伝子発現量データを取得した。また、発達期暴露と 28 日間反復投与試験で発現変動した遺伝子群を比較して、ライフステージが異なる脳サンプルにおいて共通に変動する遺伝子群を選定し、神経毒性のマーカー候補遺伝子を探索するとともに、その免疫組織学的な検出方法等を構築した。さらに、取得したデータで可能な範囲で、神経毒性評価手法を構築し、プロトコル案を作成した。

発がん性及び一般毒性については、ウェブページ²に本事業で取得したデータ、構築したプロトコル及び解析ツールを公開している。また、Preliminary SPSF は 2016 年 6 月に OECD へ提出し、2016 年 10 月現在、各国コメントを受領し、コメント対応を行っているところである。

本プロジェクトで構築した毒性判定もしくは予測手法を行政利用されている 28 日間反復投与試験に組み込みこむことで、これまで毒性エンドポイントごとに個別の異なる動物試験が必要だったが、1 本の毒性試験で複数のエンドポイントを検出できるようになる（図 2.1-1）。これにより大幅なコスト削減と時間短縮、動物数削減が見込まれ、さらに遺伝子発現量をベースにした測定法により定量性が高く、かつメカニズムベースの毒性評価ができることが期待される。

¹ Preliminary SPSF : OECD 加盟国等にテストガイドライン化への関心等の意見を募るための様式

² http://www.cerij.or.jp/research_assistant_project/tox_omics.html

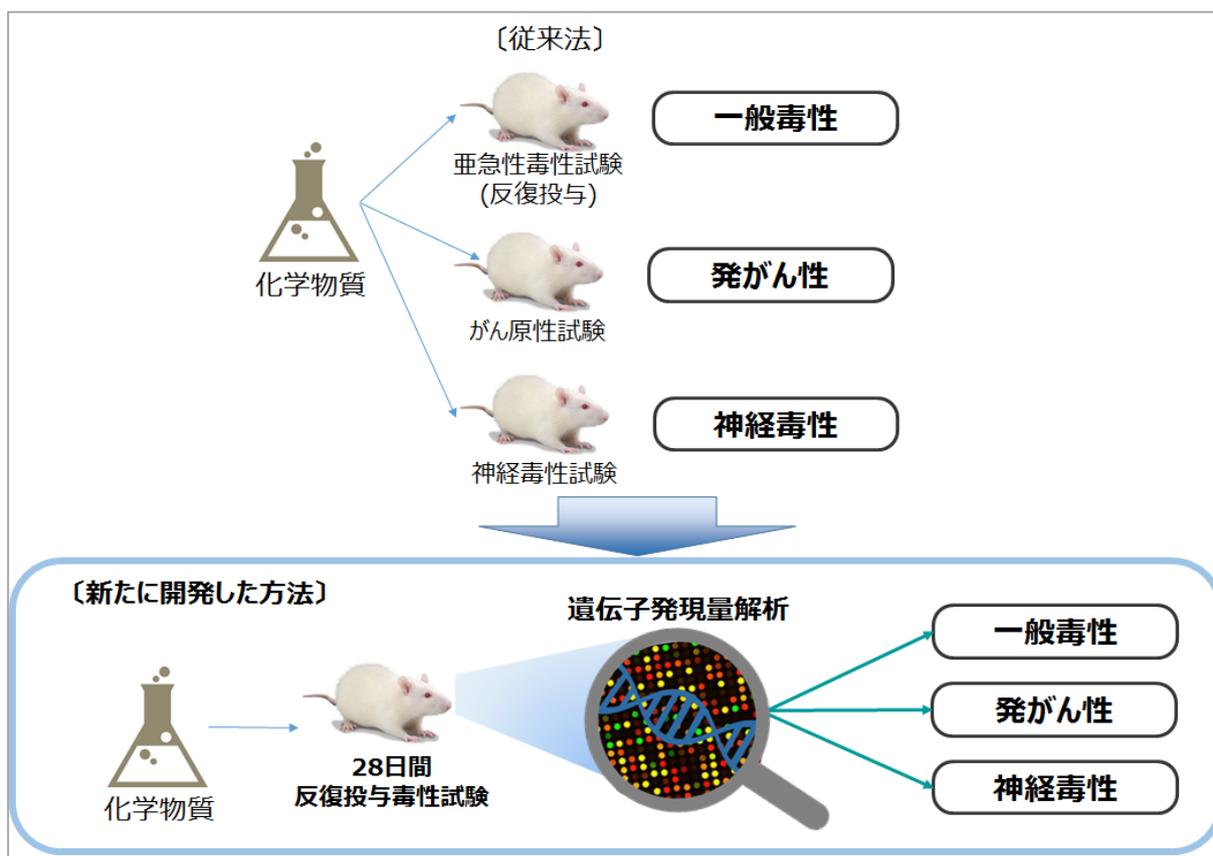


図 2.1-1 開発した新規評価方法のイメージ。

2.2. 個別要素技術成果

2.2.1. 主要臓器(肝臓・腎臓)に対する一般毒性

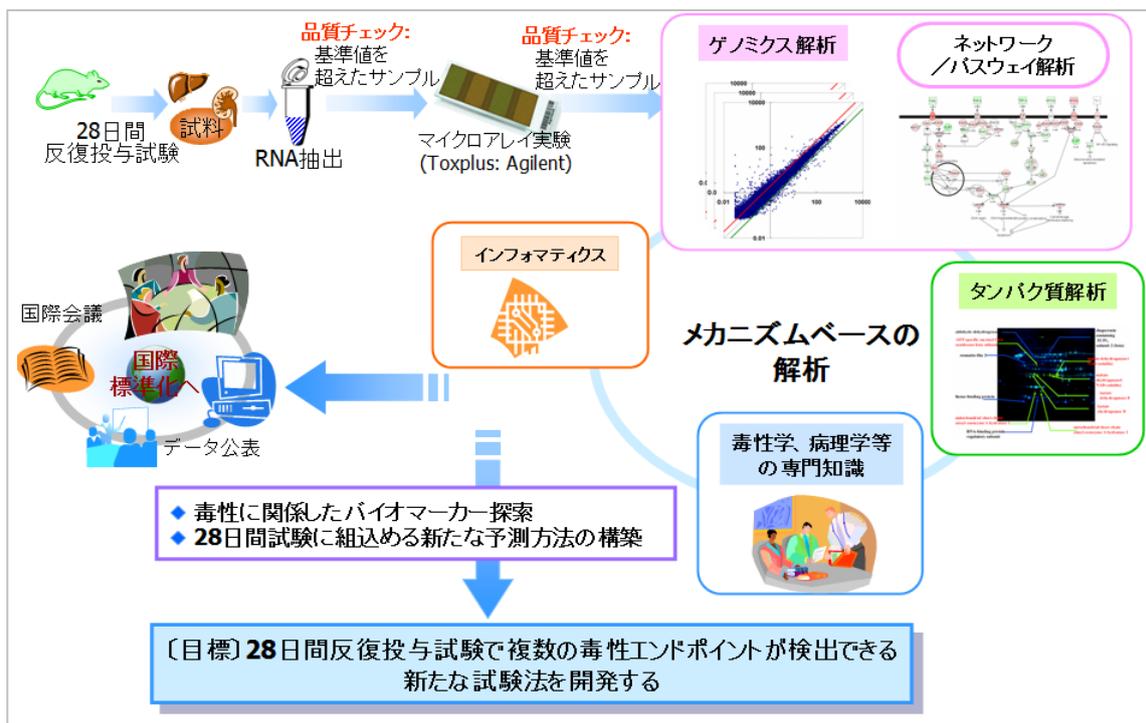
(1) 研究開発の概要

化学物質の一般毒性に関しては、代謝を担う肝臓と排泄を担う腎臓が主要な標的臓器である。加えて、肝毒性及び腎毒性はヒトにおいても重篤な疾患に繋がるため、化学物質のげっ歯類を用いた有害性評価においても特に重要視すべき毒性エンドポイントである。そこで本プロジェクトでは、化学物質の標的性が高く、毒性発現が起こりやすい肝臓と腎臓を開発対象のエンドポイントとする。これまでに肝臓についてはグルタチオン枯渇や PPAR による肝毒性、腎臓については尿細管壊死などいくつかのエンドポイントについて個別のバイオマーカー遺伝子が見出されているものの、それらを一つの試験系でマルチに検出できる評価系は確立されていない。また、血液生化学的検査から肝臓もしくは腎臓の個々の毒性症状を判定しようという試みもなされているが、十分な相関性が得られていない。

そこで、本プロジェクトでは、一般毒性の中でも特に重要性が高いエンドポイントである肝毒性及び腎毒性に着目し、28 日間反復投与試験から得られる肝臓及び腎臓サンプルの遺伝子発現変動データと毒性情報を紐付け、毒性を評価する手法開発を目的とした (図(1)-1)。

5 年間で 35 試験 (32 物質) の 28 日間の反復投与毒性試験を行い、経時的 (1、7、14、28 日間) に肝臓及び腎臓をサンプリングし、それぞれの臓器で遺伝子発現量データの取得を行い、バイオマーカー遺伝子の探索を試みた。バイオマーカー遺伝子の探索においては、統計学的アプローチによる遺伝子選定に加え、生物学的応答に基づく遺伝子の選定を行った。具体的には、本プロジェクトで取得した経時的な遺伝子発現量データと病理組織学的検査を照合することにより、MoA (Mode of Action) /AOP (Adverse Outcome Pathway) として整理して、毒性メカニズムの解明を試み、メカニズムに関連する遺伝子を抽出した。

最終的に、石油精製物質等の幅広い工業化学物質における肝毒性・腎毒性のメカニズムに基づく毒性判定システムを構築した。また、トキシコゲノミクスプロジェクト (TGP) のデータを用いて、肝毒性については肝細胞壊死、腎臓については尿細管壊死に関して、開発した毒性判定システムで判別して、毒性判定システムの判定精度の検証を行った。



図(1)-1 研究計画の概要。

(2) 条件検討

(2)-1 各臓器の採材プロトコルの構築

(2)-1-1 背景及び実施内容

研究を進めるにあたり、対象臓器である肝臓及び腎臓からの遺伝子発現量解析用のサンプル採取方法について、条件の最適化を行い、採材プロトコルを構築した。

肝臓からの採取及び保存方法、RNA 抽出方法については、前身のプロジェクトで検討しており、プロトコルとしては確立しているため、本プロジェクトにおいても同様の手法で実施した。

腎臓については、組織学的に血管系、腎乳頭、尿細管系、糸球体に大きく分けることができ、それらが存在する部位の違いによって解剖学的にも皮質、髄質、乳頭の大きく3部位に分かれている。また化学物質によって引き起こされる腎毒性についても、尿細管壊死のように組織特異的に起こるものが多いために、各組織もしくは部位ごとに通常発現している遺伝子の種類や発現量が大きく異なり、さらには化学物質投与後に影響を受ける遺伝子群も異なることが予想された。そこで事前検討として腎臓の部位別で発現している遺伝子の種類や量に違いがあるのかを調べるために、媒体（コーン油）を3日間投与したSDラットから解剖学的に分離可能と判断された皮質、髄質（外帯）、髄質（内帯）、乳頭の4種を個別に採取し、それぞれからtotal RNAを抽出したのち、個別にマイクロアレイ実験を行い、部位別の遺伝子プロファイルを比較した。また、同時に部位別採取の手技的な再現性と個体間差についても検討した。なお、マイクロアレイ実験の方法については、「3.2.2 遺伝子発現量解析」(後述)に記載の通りである。



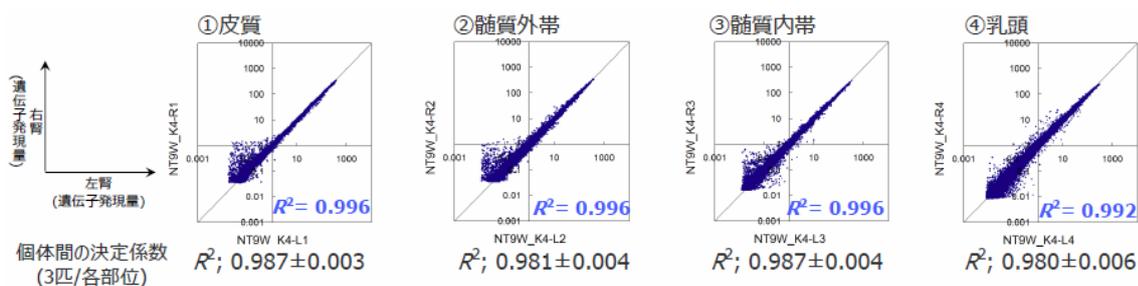
* 腎臓を4部位に分けて採取した後、個別にtotal RNAを抽出し、マイクロアレイ実験を行った(アレイ実験は3匹/群で実施).

図(1)-2 腎臓における各部位の採取方法及び実験の概要.

(2)-1-2 結果

媒体を3日間投与したSDラットの腎臓を皮質、髓質(外帯)、髓質(内帯)、乳頭の4部位に分けて採取し、同一個体の左腎及び右腎の遺伝子発現プロファイルの比較を行った。その結果、4部位とも決定係数(R^2)が0.992~0.996と非常に高い相関性を示したことから、同一個体内の左右の腎臓間では類似した遺伝子発現プロファイルを示していることが分かった(図(1)-3)。

次に個体間のばらつきを調べるために、右腎の各部位について3個体総当たりで相関性解析を行ったところ、何れの部位も決定係数(R^2)が0.980以上を示した(図(1)-3)。このことから、腎臓の各部位における個体間のばらつきは非常に小さいことが分かり、また、動物実験後の部位別採取の手技についても大きなばらつきがないことが確認できた。



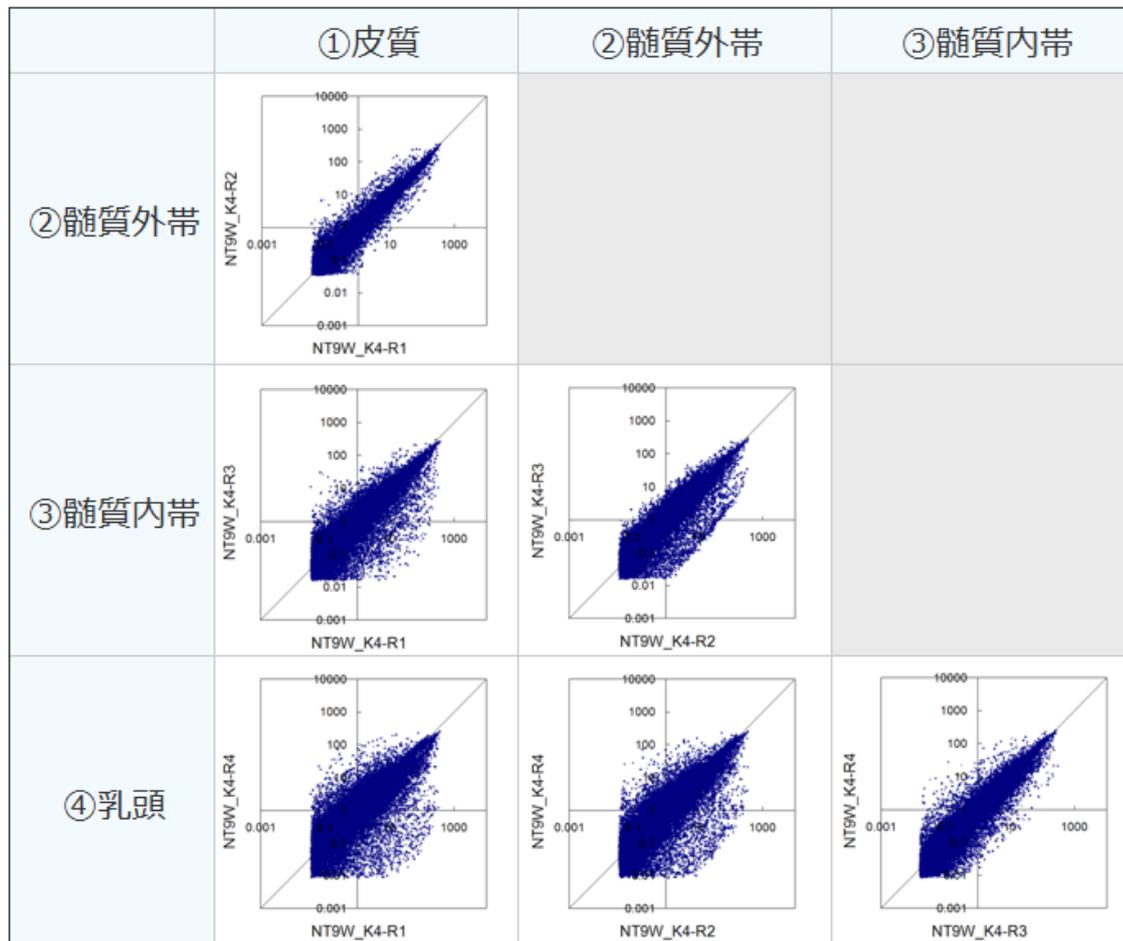
図(1)-3 腎臓各部位の左右及び個体間の遺伝子発現量データのばらつき.

次に、各部位について3個体の遺伝子発現量の平均値を算出した後、発現レベルを腎臓部位間で比較したところ、部位間で大きく遺伝子発現プロファイルが異なることが分かった(図(1)-4A)。隣接する部位間では比較的大きな差異を示す遺伝子数はそれほど多くないものの、離れた部位、特に皮質と乳頭では大きく発現レベルが異なる遺伝子が数多く存在することが分かった。4部位の何れかで発現していることが確認できたものは42,255プローブで、それらを用いて部位間の分散分析(ANOVA)を行ったところ、有意差のないもの($p >$

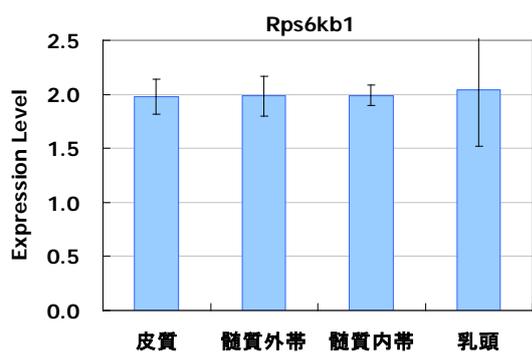
0.05)は6,882プローブと全体の16.3%にしか過ぎなかった。また、これらの遺伝子機能を調べたところ、Gene Expression、RNA Post-Transcriptional Modification、Protein Synthesis、Cell-To-Cell Signaling and Interaction と細胞の恒常性維持に関連したものが多く、最も p 値が大きかったものは *Rps6kb1* 遺伝子 (ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 1) でタンパク質合成に関与したものであった (図(1)-4B)。

部位間で発現レベルに有意差があったものは腎臓で発現している遺伝子の 8 割以上を占め、その中でも最も p 値が小さかったものに *Dhtkd1* 遺伝子 (dehydrogenase E1 and transketolase domain containing 1) があり、皮質と乳頭では 45 倍の発現レベルの差がみられた (図(1)-4C)。また、各部位で特異的な発現レベルを示す遺伝子群の機能を調べたところ、乳頭で発現している遺伝子群の機能は他の 3 部位と全く逆の傾向 (皮質・髄質外帯では分子輸送や脂質代謝、薬物代謝が盛ん) を示すことが分かった (表(1)-1)。

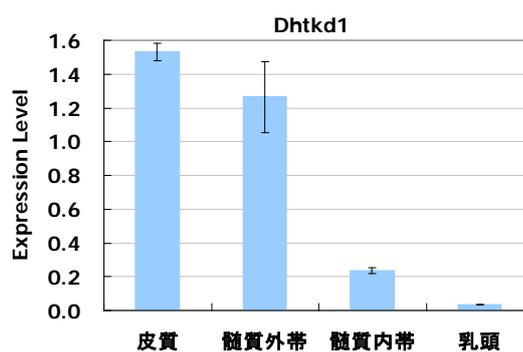
(A) 部位間の遺伝子発現プロファイルの比較



(B) 有意差のない遺伝子($p=0.999$)



(C) 有意差のある遺伝子($p=2.72E-15$)



図(1)-4 腎臓・各部位の遺伝子発現プロファイルの比較.

表(1)-1 部位特異的に発現している遺伝子群の機能分類.

部位	Functional Analysis	
	High expressed	Low expressed
皮質	<ul style="list-style-type: none"> ・Molecular Transport ・Lipid Metabolism 	<ul style="list-style-type: none"> ・Cellular Movement ・Organismal Development
髄質(外帯)	<ul style="list-style-type: none"> ・Molecular Transport ・Lipid Metabolism ・Drug Metabolism 	<ul style="list-style-type: none"> ・Cellular Movement ・Immune Cell Trafficking
髄質(内帯)	<ul style="list-style-type: none"> ・Molecular Transport ・Skeletal and Muscular System ・Development and Function 	<ul style="list-style-type: none"> ・Cellular Movement ・Drug Metabolism
乳頭	<ul style="list-style-type: none"> ・Cellular Movement ・Immune Cell Trafficking 	<ul style="list-style-type: none"> ・Molecular Transport ・Lipid Metabolism

以上の結果から、定常状態の腎臓では部位間で発現している遺伝子の種類も発現量も大きく異なり、それぞれ異なる遺伝子機能に関与していることが分かったため、化学物質投与による影響は部位別で大きく異なる可能性が考えられた。そこで、本プロジェクトでは、化学物質投与後の腎臓における遺伝子発現量解析について、皮質、髄質（外帯）、髄質（内帯）、乳頭の4部位に分けて取得することとした。また、同時に腎臓（全体）の遺伝子発現量データも取得し、各部位で得られたデータと比較することとした。

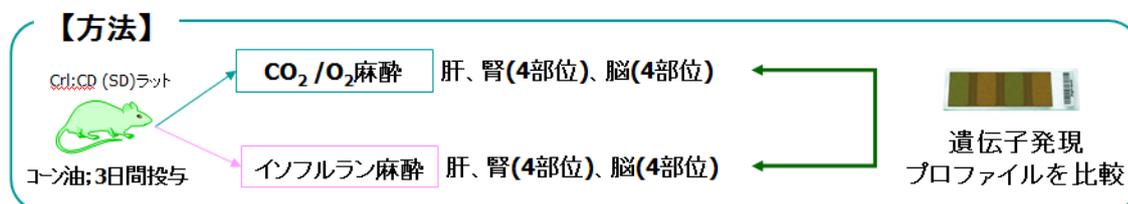
(2)-2 麻酔法の検討

(2)-2-1 背景及び実施内容

前身のプロジェクトにおいて、エーテル麻酔とCO₂/O₂混合麻酔（4:1）を比較したところ、CO₂/O₂混合麻酔の方が肝臓の遺伝子発現プロファイルの個体間のばらつきが小さかったため、これまでのデータについてはCO₂/O₂混合麻酔で取得してきた。他方、麻酔の導入及び覚醒が速いために麻酔深度を容易に迅速に変えることができるという理由から、イソフルラン麻酔が動物実験で多用されるようになった。しかし、イソフルラン麻酔はマウス海馬の遺伝子発現プロファイルに影響するとの報告があるため、麻酔法の違いによって遺伝子発現プロファイルに影響を与える可能性が考えられた。

そこで、麻酔法の違いが遺伝子発現プロファイルにどの程度影響するかを調べるために、媒体（コーン油）を3日間投与したSDラットをCO₂/O₂混合麻酔もしくはイソフルラン麻酔後にと殺し、肝臓、腎臓（皮質、髄質（外帯）、髄質（内帯）、乳頭、脳（海馬歯状回、帯状回、脳梁、小脳））を採取してマイクロアレイによる遺伝

子発現量解析を行った (図(1)-5)。なお、マイクロアレイ実験の方法については、「3.2.2 遺伝子発現量解析」(後述) に記載の通りである。



図(1)-5 麻酔法検討実験の概要。

(2)-2-2 結果

媒体を3日間投与したSDラットCO₂/O₂混合麻酔もしくはイソフルラン麻酔後にと殺し、目的臓器を採取した後、個体間の同一個体の左腎及び右腎の遺伝子発現プロファイルの比較を行った。一例として肝臓及び脳梁で個体間のばらつきをスクアッタープロットで示したところ、CO₂/O₂混合麻酔及びイソフルラン麻酔ともに各プロットの広がり小さく、決定係数 (R^2) も0.976以上と高い相関性を示した (図(1)-6)。その他の部位についても個体間のばらつきを相関性解析により調べたところ、何れの決定係数 (R^2) も0.976以上を示した (表(1)-2)。

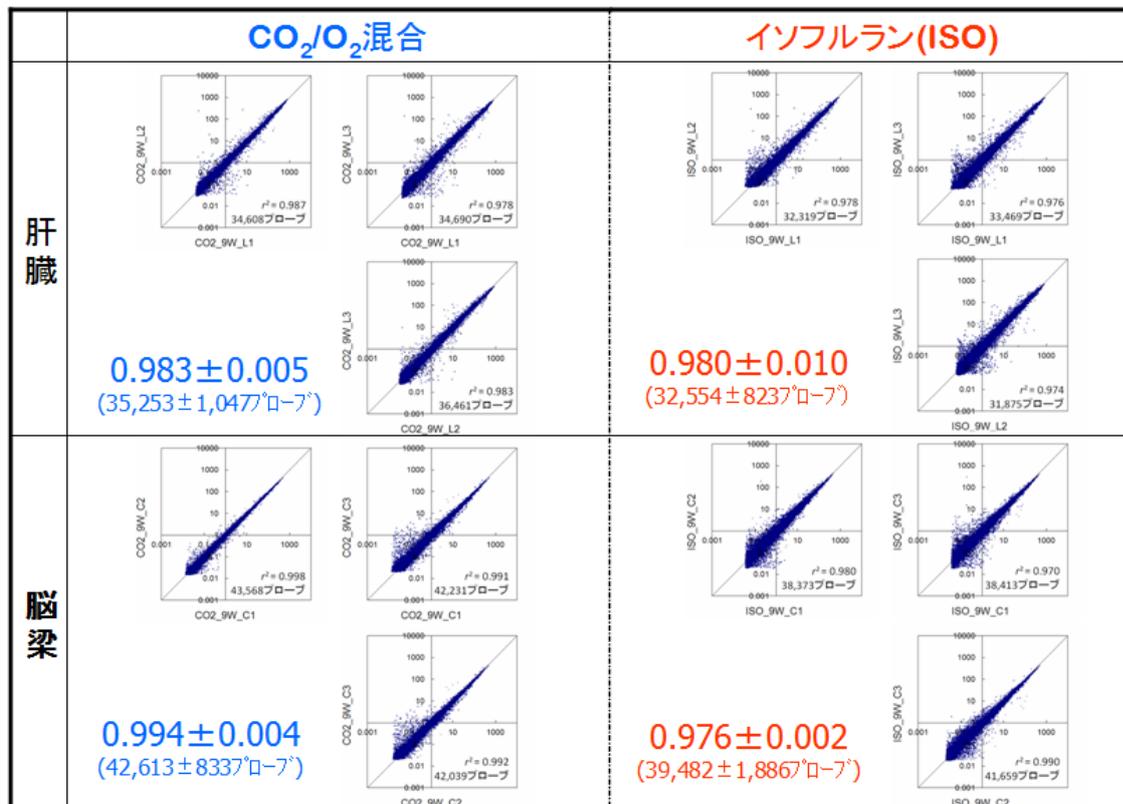
このことから、何れの麻酔法においても、個体間の遺伝子発現プロファイルのばらつきは小さく、麻酔法としては遺伝子発現解析に用いても問題ないことが確認できた。

次に、各臓器もしくは部位について、CO₂/O₂混合麻酔とイソフルラン麻酔との間で発現レベルに有意差のあるものを調べたところ、108~278プローブが選定された。一例として海馬歯状回において麻酔法の違いによって発現レベルに有意差があった遺伝子を調べたところ、イソフルラン麻酔で発現レベルが高かったものに *NAMPT* 遺伝子 (nicotinamide phosphoribosyltransferase)、*NPAS2* 遺伝子 (neuronal PAS domain protein 2)があり、CO₂/O₂混合麻酔で発現レベルが高かったものに、*GCNT1* 遺伝子 (glucosaminyl (N-acetyl) transferase 1, core 2) があつた。

以上の結果から、各組織もしくは部位について麻酔法の違いによって影響を受ける遺伝子が数百プローブ (検出プローブの約0.6%) あることが分かったため、化学物質投与後のバイオマーカー探索の際にはこれらの遺伝子はマーカー候補遺伝子から除外することとした。一方で、麻酔法の違いによって遺伝子発現レベルで受ける影響が1%以下と非常に小さいことが分かったため、何れの麻酔法も本手法に適用できると判断した。そこで、本プロジェクトではこれまで取得してきた遺伝子発現量データとの整合性を図るため、CO₂/O₂混合麻酔を採用することとした。

イソフルラン麻酔については、化学物質投与後の対象サンプルにどのような影響を与えるかについては、現時点でははっきりとしていないため、2物質について同じ条件で動物実験を行った後、CO₂/O₂混合麻酔もしくはイソフルラン麻酔後にと殺し、遺伝子発現プロファイルを比較してバイオマーカー探索に適用可能かについて検討した。この結果については「3. 主要臓器に対する一般毒性のバイオマーカー候補遺伝子の探索」に記載した。

なお、本プロジェクトでは化学物質投与後のデータを取得していないエーテル麻酔については、TGP（トキシコゲノミクスプロジェクト）においてエーテル麻酔後にと殺を行っており、それらのデータが本手法に適用可能なことを確認している（後述）。



図(1)-6 肝臓と脳梁における個体間の遺伝子発現レベルのばらつき (R^2).

表(1)-2 各臓器における個体間遺伝子発現レベルのばらつき (R^2).

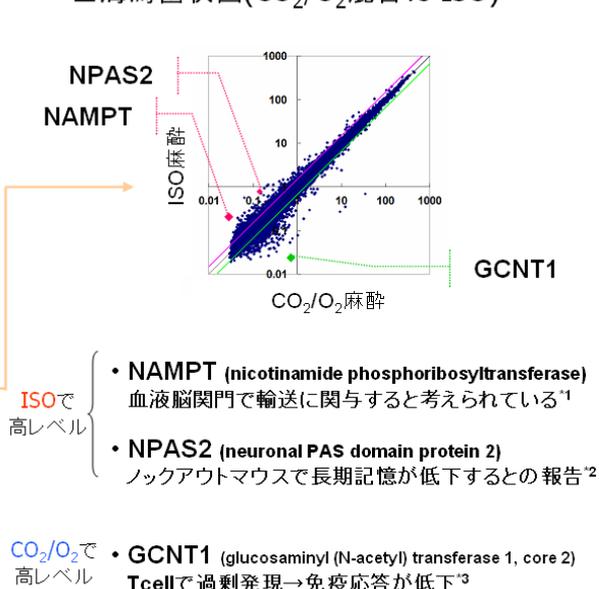
臓器	CO ₂ /O ₂ 混合麻酔	イソフルラン麻酔
肝臓	0.983±0.005	0.980±0.010
腎臓		
皮質	0.983±0.005	0.976±0.002
髄質外帯	0.979±0.010	0.981±0.002
髄質内帯	0.987±0.006	0.988±0.002
乳頭	0.984±0.007	0.986±0.004
脳		
海馬歯状回	0.987±0.004	0.981±0.007
脳梁	0.994±0.004	0.976±0.002
帯状回	0.992±0.005	0.995±0.000
小脳	0.987±0.008	0.995±0.002

■ 発現レベルが高かった遺伝子(プローブ数)*

臓器		CO ₂ /O ₂	ISO
	肝臓	141	68
腎臓	皮質	93	68
	髄質外帯	89	32
	髄質内帯	87	85
	乳頭	81	47
脳	海馬歯状回	75	178
	脳梁	166	112
	帯状回	43	65
	小脳	66	87

* $P < 0.05$ かつ 1.5倍以上 or 1/1.5倍以下

■ 海馬歯状回(CO₂/O₂混合vs ISO)



図(1)-7 麻酔間の遺伝子発現プロファイルの差異.

(3) 主要臓器に対する一般毒性予測法の開発

(3)-1 被験物質

本プロジェクトの目標として一つの動物実験で様々な毒性エンドポイントをメカニズムベースに検出することがあり、効率的に研究成果を得るためには、1 物質で複数の毒性を示す物質が望ましい。しかしながら、この条件に合致する化合物は非常に少ないために、各毒性エンドポイント（一般毒性/肝毒性、一般毒性/腎毒性、肝発がん性、腎発がん性）で優先順位をつけて化合物を選定することとした。また、先述の条件検討で腎臓の部位別採取が有効であることが分かったため、腎毒性に関する種々の MoA (Mode of Action) / AOP (Adverse outcome pathway) をカバーできるように幅広く陽性物質を選定した方が良いと考え、腎毒性を示す物質を優先的に選定することとし、最終的に 32 物質を選定した (表(1)-3 及び図(1)-8)。

なお、BDCM 及び TBA の 2 物質については、投与後 28 日目のみ、CO₂/O₂ 混合麻酔に加えて、化学物質投与後の生体において麻酔法の違いがどの程度影響するのかを調べるためにイソフルラン麻酔後の遺伝子発現プロファイルを取得した。また、CP は通常は静脈内投与によって毒性が評価されるため、投与経路の違いがどのように遺伝子発現量に影響を与えるかを検証するために、強制経口投与と静脈内投与の両方の条件で動物実験を実施した。そのため、試験数としては合計で 35 試験となった。

表(1)-3 被験物質 (35 試験/32 物質) の既知の一般毒性情報及び本試験での投与量.

物質#	物質名	略称	CAS No.	試験番号*1	一般毒性*2		変異原性 Ames 試験	投与量 (mg/kg/day)
					肝臓	腎臓		
(教師データ)								
1	Bromodichloromethane	BDCM	75-27-4	B10-0092-C B10-0103-I	有	有	P	40, 200
2	Phenolphthalein	PP	77-09-8	B10-0093	有	有	N	200, 1000
3	o-Nitroanisole	o-NA	91-23-6	B10-0094	有	有	P	80, 400
4	2-Amino-4-nitrophenol	2A4Np	99-57-0	B10-0095	有	有	P	150, 750
5	tert-Butyl alcohol	TBA	75-65-0	B10-0096-C B10-0096-I	有	有	N	200, 1000
6	o-Anthranilic acid	2-AA	118-92-3	B10-0097	影響なし	影響なし	N	200, 1000
7	o-Anisidine hydrochloride	o-AH	134-29-2	B10-0098	影響なし	影響なし	P	140, 700
8	tris(2-Chloroethyl) phosphate	TCEP	115-96-8	B10-0099	影響なし	有	P	80, 400
9	2,2-Bis(Bromomethyl)-1,3-propanediol	DBNPG	3296-90-0	B10-0100	影響なし	有	P	200, 1000
10	Nitrilotriacetic acid trisodium monohydrate	Na3-NTA-H2O	18662-53-8	B10-0101	影響なし	有	N	200, 1000
11	1-Amino-2,4-dibromoanthraquinone	ADBAQ	81-49-2	B10-0102	有	有	P	200, 1000
12	Anthraquinone	AQ	84-65-1	B10-0104	有	有	P	200, 1000
13	1,2,3-Trichloropropane	TCP	96-18-4	B10-0105	有	有	P	15, 75
14	N-Nitrosodimethylamine	DMN	62-75-9	B10-0106	有	有	P	0.8, 4

物質#	物質名	略称	CAS No.	試験番号*1	一般毒性*2		変異原性	投与量 (mg/kg/day)
					肝臓	腎臓	Ames 試験	
15	Benzyl Acetate	BA	140-11-4	B10-0107	影響なし	有	N	200, 1000
16	Carbontetrachloride	CCl4	56-23-5	B10-0108	有	有	P	20, 100
17	4,4'-Thiobis(6-tert-butyl-m-cresol)	TBBC	96-69-5	B10-0109	影響なし	有	N	60, 300
18	Dipropylene glycol	DPG	25265-71-8	B10-0110	影響なし	有	N	200, 1000
19	Monuron	CMU	150-68-5	B10-0111	影響なし	有	N	40, 200
20	Tricresyl Phosphate	TOCP	1330-78-5	B10-0113	影響なし	有	N	40, 200
21	cisplatin	CP	15663-27-1	B10-0114(経口) B15-0006(静注)	影響なし	有	P	0.75, 3.75 (経口) 0.15, 0.75 (静注)
22	N,N'-Dinitrosopentamethylenetetramine	DNPT	101-25-7	B10-0115	影響なし	Equivocal	P	40, 200
検証用データ								
23	Potassium bromate	KBrO3	'7758-01-2	B10-0112 B10-0117	影響なし	影響なし	P	20, 100
24	1,2-Dibromoethane	EBD	106-93-4	B10-0118	有	影響なし	P	20, 100
25	Ethylenediamine dihydrochloride	En・2HCl	333-18-6	B10-0119	有	有	N	100, 500
26	Chlorothalonil	CTN	1897-45-6	B10-0120	影響なし	有	N	100, 500
27	Phenylbutazone	PBZ	50-33-9	B10-0121	有	有	N	40, 200

物質#	物質名	略称	CAS No.	試験番号*1	一般毒性*2		変異原性	投与量 (mg/kg/day)
					肝臓	腎臓	Ames 試験	
28	Ochratoxin A	OTA	303-47-9	B10-0122	影響なし	有	P	0.2, 1
29	<i>p</i> -Nitroanisole	pNA	100-17-4	B10-0123	有	有	P	100, 500
30	Sulfone, bis(<i>p</i> -chlorophenyl)	DCDPS	80-07-9	B10-0124	有	有	N	50, 250
31	4-Hydroxy- <i>m</i> -phenylenediammonium dichloride	AMIDOL	137-09-7	B10-0125	影響なし	有	P	20, 100
32	<i>N</i> -Diethylnitrosamine	DEN	55-18-5	B30-0002	有	影響なし	P	0.8, 4

P; 陽性、N; 陰性

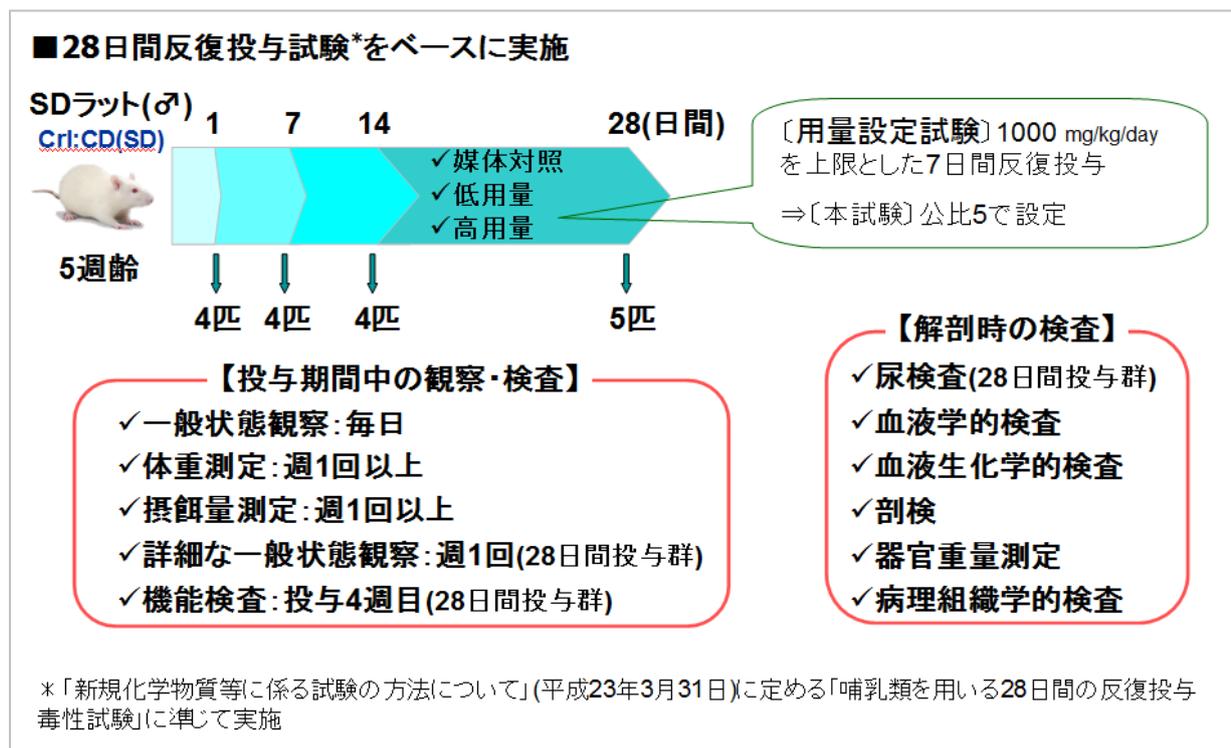
*1 C:CO₂/O₂ 麻酔、I : イソフルラン麻酔

*2 既報の亜急性もしくは慢性毒性試験で毒性が観察された場合は「有」、何も観察されていない場合は「影響なし」。

(3)-2 実験方法

(3)-2-1 動物実験

選定した 14 物質について、「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 23 年 3 月 31 日)に定める「哺乳類を用いる 28 日間の反復投与毒性試験」に準じて、1、7、14、もしくは 28 日間の反復投与毒性試験を行った。なお、BDCM 及び TBA の 2 物質については 28 日間の反復投与後にイソフルラン麻酔を行い、目的臓器を採取した(図(1)-9 及び表(1)-4)。



図(1)-9 動物実験の概要.

表(1)-4 動物実験条件.

動物試験	動物種	ラット
	系統	Cri:CD (SD)
	性	雄
	週齢	投与開始時: 5 週齢
	体重範囲	投与開始時: 平均体重±20%
	動物数	5 匹/群 (サテライト群; 4 匹/群) *ただし、遺伝子発現量解析には 3 匹/群を用いる
	麻酔法	CO ₂ /O ₂ 混合麻酔 (一部、イソフルラン麻酔)
試験物質	投与方法	強制経口投与 (一部、静脈内投与)
	用量	媒体対照 + 2 用量

	投与期間	28 日間 (サテライト群として、1 日、7 日、14 日間投与群を設定する)
	回復試験	なし
検査項目	観察 (一般状態、詳細観察、機能観察、体重、摂餌量)、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、病理学的検査 (剖検、器官重量、病理組織学的検査)	
採材	遺伝子用	肝臓、腎臓、脾臓、胸腺、骨髄、脳 *所定の核酸安定化剤へ浸漬 (4℃、24 時間) し、-80℃保存。脳は所定の方法で固定化
	タンパク用	脳 *氷冷後、速やかに-80℃保存

(3)-2-2 遺伝子発現量解析

RNA 抽出用に保存された各種臓器から total RNA を抽出した後、ND-1000 (NanoDrop) によって RNA 濃度を、バイオアナライザ(Agilent)によって RNA 品質を測定し、RNA 濃度としては 50 ng/μl、純度としては A260/280 > 1.8、A260/230 > 1.5、RIN 値 (RNA Integrity Number) > 7.0 を合格とした。また、マイクロアレイ実験は Agilent 社フォーマットを用いたカスタムアレイ : Whole Rat Genome Toxplus Array を使用し、その後のデータ解析には GeneSpring GX (Agilent)や Ingenuity Pathways Analysis 等を用いた (表(1)-5)。

肝毒性及び腎毒性の判定システムについては、5 年間の研究開発で得られた 35 試験 (32 物質) の遺伝子発現量データを用いて構築した。その解析条件については表(1)-6 に示す。

表(1)-5 遺伝子発現量解析の実験条件.

実施項目		キットもしくは機器
RNA サンプルの調製	RNA 抽出	miRNeasy Mini Kit (QIAGEN)
	濃度測定	ND-1000 (NanoDrop)
	RNA 品質検査	RNA6000 Nano キット、RNA6000 Pico キット
遺伝子発現量解析	マイクロアレイ	Whole Rat Genome Toxplus Array ver. 1 (60K×8) Whole Rat Genome Toxplus Array ver. 2 (60K×8) * 61,537 プローブが搭載
	データ解析	GeneSpring GX ver 12.0 Ingenuity Pathways Analysis (Ingenuity) GeneMaths Ver.2.01 (Applied Maths)
変動遺伝子の選定基準	等量混合 (3~4 個体/群を 1 アレイ)	条件 1) 両群で共通して Detected を示し、かつ発現比が 2 倍以上もしくは 0.5 倍以下を示したもの 条件 2) -SwitchON 型 : 媒体対照群 (分母) Not Detected フラグを示すものの、投与群 (分子) では Detected を示し、かつ発現比が 5 倍以上を示したもの -SwitchOFF 型 : 投与群 (分子) で Not Detected フラグを示すものの、媒体対照群 (分母) では Detected を示し、かつ発現比が

		0.25 倍以下、かつ $p < 0.01$ を示したものの
	個別別 (3~4 個体/群)	条件 1) 両群で共通して Detected を示し、かつ発現比が 1.5 倍以上もしくは 0.67 倍以下、かつ $p < 0.05$ を示したものの 条件 2) 両群で Detected を示し、かつ発現比が 1 より大きく 1.5 倍未満もしくは 1 より小さく 0.67 倍より大きく、かつ $p < 0.01$ を示したものの 条件 3) -SwitchON 型：媒体対照群 (分母) のいずれか 1 検体以上で Not Detected フラグを示すものの、投与群 (分子) では全てで Detected を示し、かつ発現比が 4 倍以上、かつ $p < 0.01$ を示したものの -SwitchOFF 型：投与群 (分子) のいずれか 1 検体以上で Not Detected フラグを示すものの、媒体対照群 (分母) では全てで Detected を示し、かつ発現比が 0.25 倍以下、かつ $p < 0.01$ を示したものの

表(1)-6 判定式構築の条件.

実施項目	実施内容
対象データ	35 試験 (32 物質)
化合物のグループ化	階層的クラスタリング
バイオマーカー候補の選定	Welch's t-test
判別式の構築	SVM (Support Vector Machine)
予測式の最適化	Random calculation

(3)-3 結果

(3)-3-1 肝毒性バイオマーカー候補の探索

(3)-3-1-① 動物試験結果

動物試験結果については、投与 28 日目の高用量群に注目してデータ解析を行った。病理組織学的検査で肝臓に何らかの所見がみられた物質を調べた (表(1)-7)。

表(1)-7 肝重量、剖検及び病理組織学的検査のまとめ (投与 28 日目、高用量).

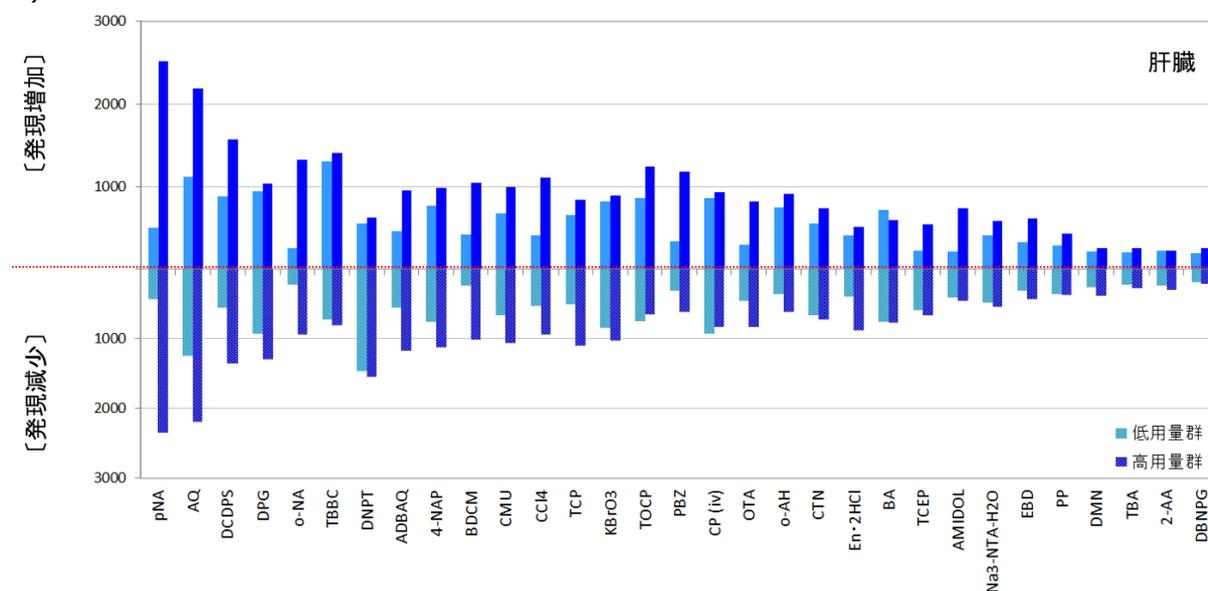
物質名	肝重量 (相対)	剖検 (肝臓)	病理組織学的検査 (肝臓)
BDCM	↑	・肝腫大(5/5)	・小葉中心性肝細胞脂肪変性 (5/5) ・肝細胞単細胞壊死 (5/5) ・小肉芽腫 (5/5)
BDCM_I	↑	・肝腫大(5/5)	・小葉中心性肝細胞脂肪変性 (5/5) ・肝細胞単細胞壊死 (3/5) ・小肉芽腫 (5/5)
o-NA	↑	・肝腫大(5/5)	・小葉中心性肝細胞肥大 (4/5) ・くもり硝子変性 (4/5)
2A4NP	↑	--	・小葉周辺性肝細胞肥大 (5/5) ・くもり硝子変性 (4/5) ・類洞内色素沈着 (1/5)
o-AH	↑	--	・小葉中心性肝細胞肥大 (4/5) ・くもり硝子変性 (4/5)
ADBAQ	↑	・肝腫大(5/5) ・暗褐色化(1/5)	・びまん性肝細胞肥大 (5/5) ・くもり硝子変性 (5/5) ・肝細胞単細胞壊死 (4/5) ・小肉芽腫 (4/5)
AQ	↑	・肝腫大(5/5)	・小葉中心性肝細胞肥大 (5/5) ・くもり硝子変性 (5/5)
TCP	↑	・肝腫大(4/5)	・びまん性肝細胞肥大 (5/5) ・小葉中心性くもり硝子変性 (5/5) ・小葉中心性肝細胞変性 (5/5) ・肝細胞単細胞壊死 (5/5)
DMN	--	・肝腫大(5/5) ・葉の小型化(3/5) ・変色部及び葉間癒着(1/5)	・線維芽細胞増生 (5/5) ・リンパ球浸潤 (5/5) ・類洞内ヘモジデリン沈着 (5/5) ・アポトーシス (4/5) ・有糸分裂像増加 (3/5)

↑ ; 媒体対照群に対して有意な増加を示した ($p < 0.05$). -- ; 所見がみられなかった. カッコ内の数値は所見がみられた動物数.

(3)-3-1-② 遺伝子発現量データの解析（変動遺伝子の抽出）

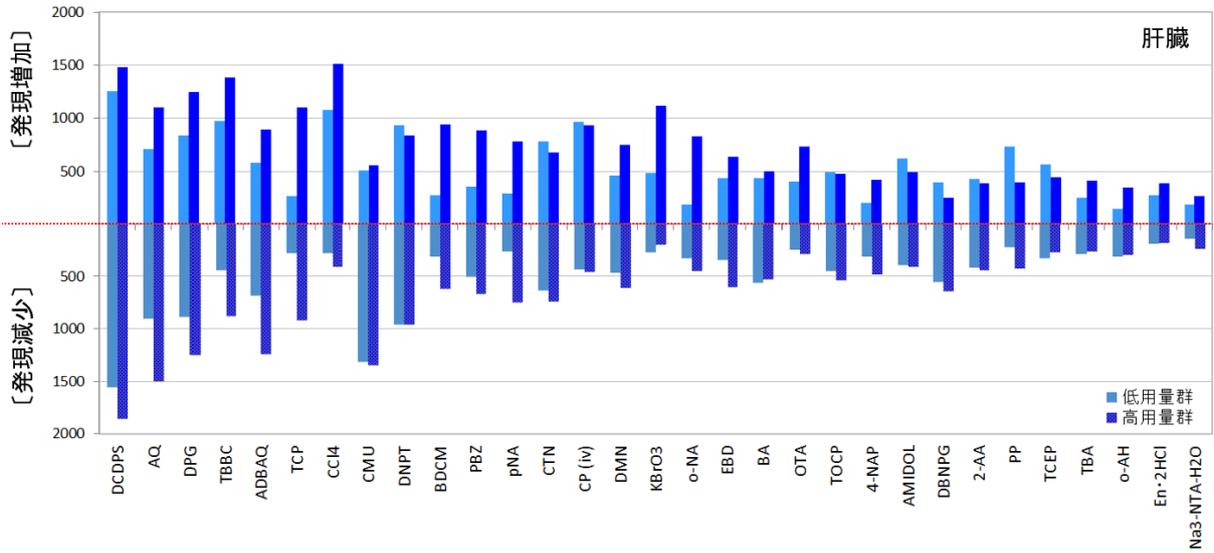
1、7、14、及び28日間反復投与後の肝臓から total RNA を抽出し、RNA 濃度、純度、及び品質が基準を満たしていることを確認した。その後、媒体対照群、低用量群、高用量群の各3匹を用い、1日及び7日目については3匹/群を等量混合して1アレイへ、14日及び28日目については個体別（1匹分を1アレイへ）に供して、マイクロアレイ実験（Agilent Whole Rat Genome Toxplus, 60K×8）を行った。1日及び7日目については、媒体対照群と投与群との間で発現比を算出し、2倍以上もしくは0.5倍以下を示すプローブ数をカウントした。14日及び28日目については、媒体対照群と投与群との間で発現比を算出した後、二群間で有意差検定を行い、有意な発現変動を示す遺伝子を抽出して、そのプローブ数をカウントした。その結果、動物実験において何らかの病理所見を示す物質で変動遺伝子数が多い傾向にあった（図(1)-10）。

1) 投与1日目

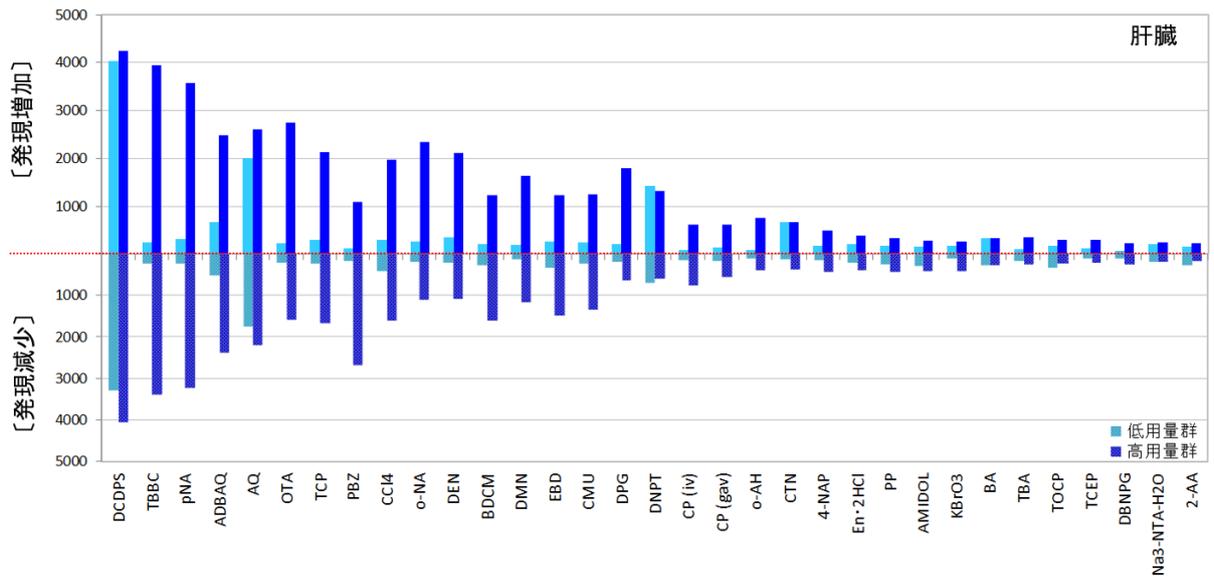


図(1)-10 有意な発現変動を示したプローブ数（肝臓）。

2) 投与7日目

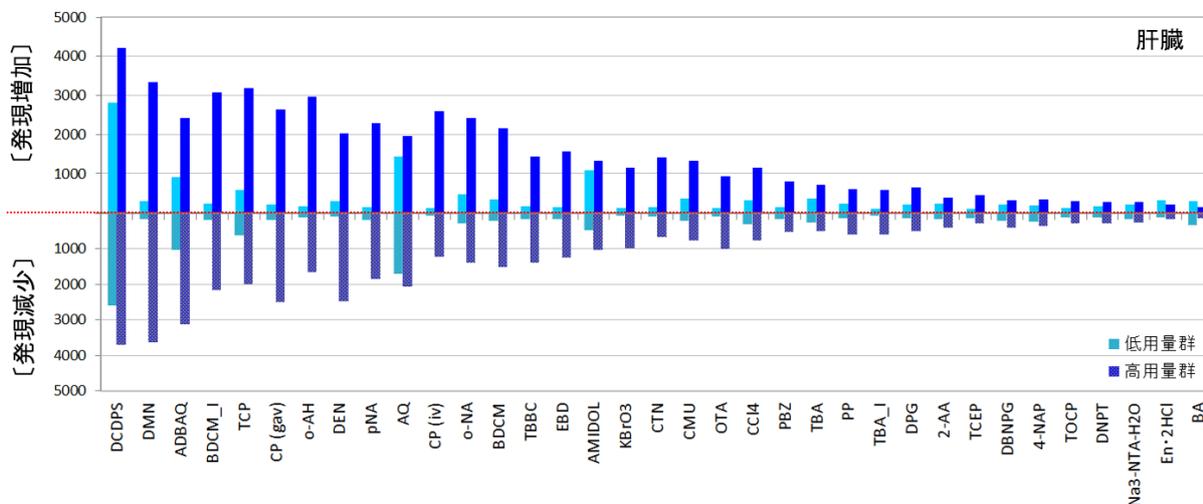


3) 投与14日目



図(1)-10 (続き) 有意な発現変動を示したプローブ数 (肝臓).

4) 投与 28 日目



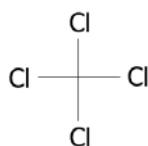
図(1)-10 (続き) 有意な発現変動を示したプローブ数 (肝臓).

(3)-3-1-③ 肝毒性メカニズム : MoA/ AOP 構築 (ケーススタディ : 四塩化炭素)

肝毒性において、遺伝子発現量の変化がどのように毒性と関連しているかを調べるために、ケーススタディとして四塩化炭素 (CCl₄; B10-0108) について、1 日、7 日、14 日、28 日間投与後の肝臓サンプルの遺伝子発現量データと動物試験結果 (特に病理組織学的変化)、並びに論文情報を付加して、MoA (Mode of Action) /AOP (Adverse Outcome Pathway) を構築し、肝毒性メカニズムの考察を行った。

CCl₄ は肝毒性を引き起こす代表的な化合物で、長期間の投与によって肝発がんを引き起こすことが報告されており (Recknagel et al., 1967)、IARC ではグループ 2B (Possibly carcinogenic to humans) に分類されている (図(1)-11)。また、Tox-in vitro チームとの共通被験物質として選定した。

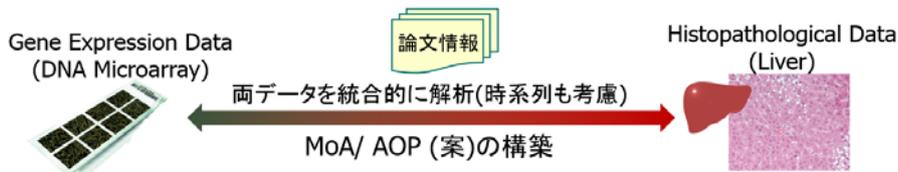
■ Test compound : Carbon tetrachloride (IARC: Group 2B)



● Carbon tetrachloride is one of the well known **hepatotoxins**.

- Fatty liver disease induced by carbon tetrachloride could be understood in terms of **failure in transport of fatty acids as phospholipids**.
- Carbon tetrachloride causes **damages on liver cell mitochondria**
→ It was suggested that lipid accumulation was due to **a failure of normal pathways of lipid oxidation**, and that **death of the liver cells** resulted from interruption in energy-transducing mechanisms.

Pharmacol Rev. 1967 Jun;19(2):145-208



図(1)-11 毒性情報(四塩化炭素).

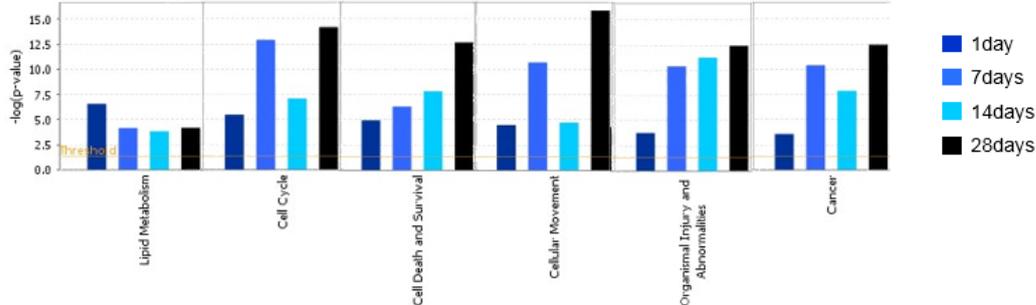
CCl₄ は肝臓内の種々の代謝酵素、特に Cyp2e1、Cyp2b1、Cyp2b12 等の働きによって、Trichloromethyl-free radicals を産生し、DNA の酸化や脂質への結合を引き起こすことが報告されている (Singh et al., 2009)。本研究で取得した遺伝子発現量データでは論文で報告されていた Cyp 類の有意な発現変動はみられなかったものの、Cyp2c12 や Cyp4f5 の発現増加がみられた (図(1)-13) ことから、これらの Cyp が CCl₄ の代謝に関与している可能性が考えられた。また、CCl₄ 投与後の肝臓の病理組織学的検査では、投与 1 日目の低用量群から所見がみられ、投与日数や投与用量が上がるにつれて症状が重篤化したものに、脂肪変性 (Fatty degeneration) があつた (表(1)-8)。Trichloromethyl-free radicals が脂質へ結合することが分かっているため、これが Molecular Initiating Event (MIE) として作用し、肝細胞の脂肪変性につながっていると考えられた。そこで、遺伝子発現量データを確認したところ、1 日目では「Cholesterol biosynthesis」の有意な増加がみられた一方で、「Fatty Acid β -Oxidation」の有意な発現減少が認められた (図(1)-13)。発現増加した「Cholesterol biosynthesis」については、この機能に関連すると思われる病理所見や血液性化学的もしくは血液学的パラメーターに変化がみられなかったため、なぜ発現増加したかについては不明である。次に、経時的な肝臓の病理所見の変化を確認したところ、投与日数が進むにつれて、脂肪変性を示す肝細胞の出現頻度も症状の重篤度も増加した (図(1)-14)。遺伝子発現量データを確認したところ、投与 7 日目では、「Fatty Acid metabolism」、「Transport of lipid」、「Bile Acid Biosynthesis」の有意な発現減少が、投与 14 日目では「Cleavage of lipid」がさらに発現減少し、投与 28 日目ではその現象が維持される結果となった (図(1)-12、図(1)-14)。「Pathway of peroxisomal β -oxidation」に関与する遺伝子群の発現状況を調べたところ、脂肪酸を取り込む Abcd2 の有意な発現減少がみられ、さらに Fatty acyl-CoA から trans- Δ 2-enoyl-CoA へ代謝する acyl-CoA oxidase (Acox1)、trans- Δ 2-enoyl-CoA から 3-L-hydroxyacyl-CoA さらに β -ketoacyl-CoA へ代謝する D-bifunctional protein (DBP) family である Hsd17b6、Hsd3b1、Hsd3b2、Hsd3b4、 β -ketoacyl-CoA から Fatty acyl-CoA (-2C) へ代謝する Acaa1 と β 酸化に関与する一連の酵素群の遺伝子発現量に有意な減少がみられた (図(1)-14)。また、脂肪酸の輸送に関与する ApoA4、ApoA5、ApoE、ApoH、Fabp7、Slc27A5 の発現量減少もみられた (図(1)-14)。これらの結果より、CCl₄ 投与により、脂肪酸の取り込みから細胞内での脂肪代謝、さらに、脂肪酸の輸送までの一連の現象が抑制されている可能性が示唆された。

表(1)-8 病理組織学的検査結果(四塩化炭素) (1~28 日間投与)。

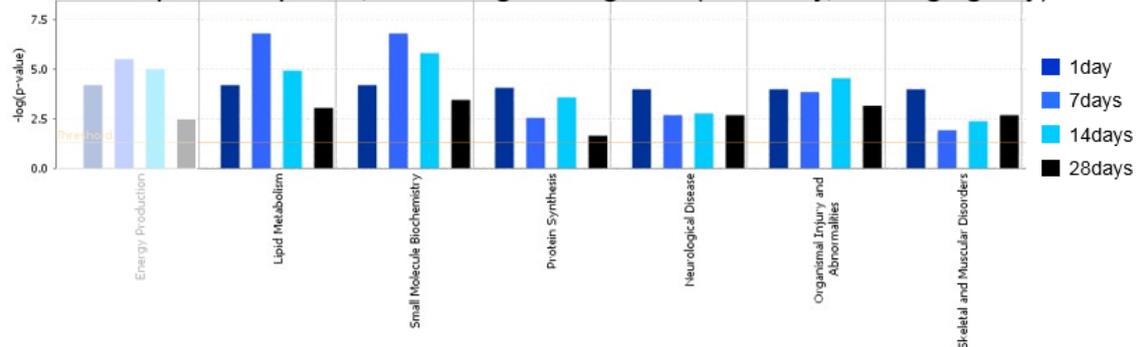
Findings		0 mg/kg/day				20 mg/kg/day				100 mg/kg/day			
		D1	D7	D14	D28	D1	D7	D14	D28	D1	D7	D14	D28
Fatty degeneration, /Hepatocyte/ Centrilobular Severe degree is increasing with dose and administration period	—	4	4	4	5	3	0	0	0	0	0	0	0
	±	0	0	0	0	1	1	0	0	4	0	0	0
	+	0	0	0	0	0	1	4	5	0	1	2	2
	2+	0	0	0	0	0	2	0	0	0	3	2	2
	3+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Hydropic degeneration, Hepatocyte/ Centrilobular	—	4	4	4	5	4	4	4	5	3	1	0	0
	±	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	2+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2
Microgranuloma	—	4	4	4	5	4	0	0	0	4	0	0	1
	+	0	0	0	0	0	1	2	5	0	4	2	0
	2+	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	2	4
Mitosis, increased	—	4	4	4	5	4	4	2	3	4	2	0	1
	+	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	3	1
	2+	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	1	3
Single cell necrosis, Hepatocyte/ Centrilobular	—	4	4	4	5	4	4	4	5	1	4	4	5
	+	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0

-: no remarkable, ±: mild, +: slight, 2+: moderate, 3+: marked

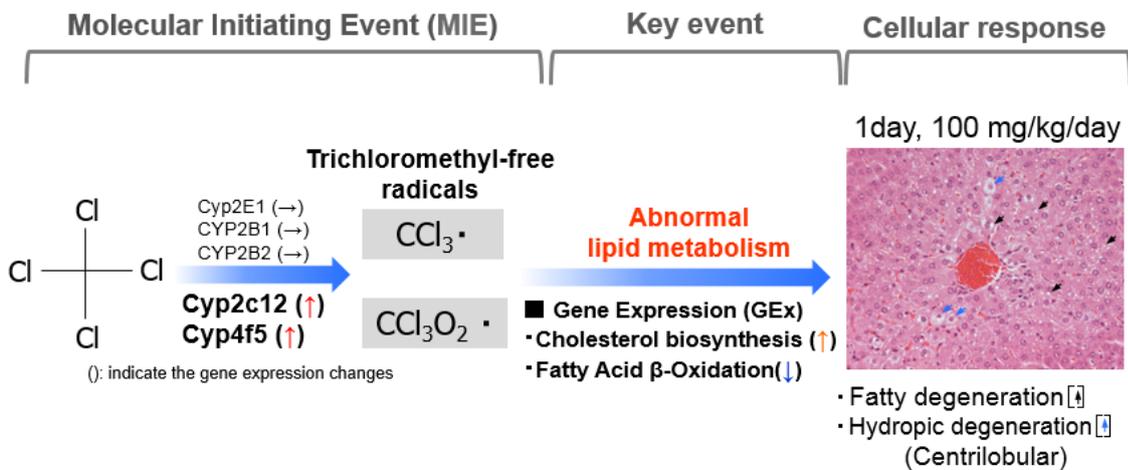
● Gene Expression profile; **Up**-regulated genes (1~28 day, 100 mg/kg/day)



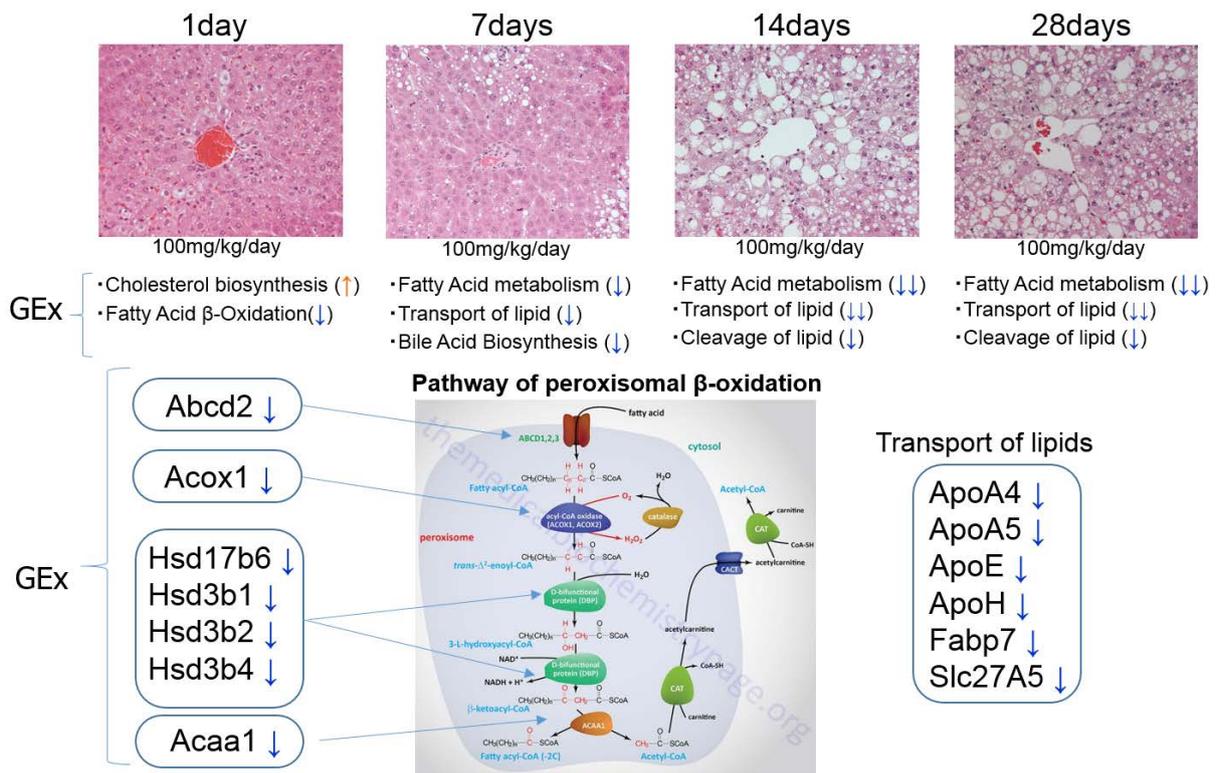
● Gene Expression profile; **Down**-regulated genes (1~28 day, 100 mg/kg/day)



図(1)-12 変動した遺伝子群の機能分類〔四塩化炭素〕(1~28日間投与)。



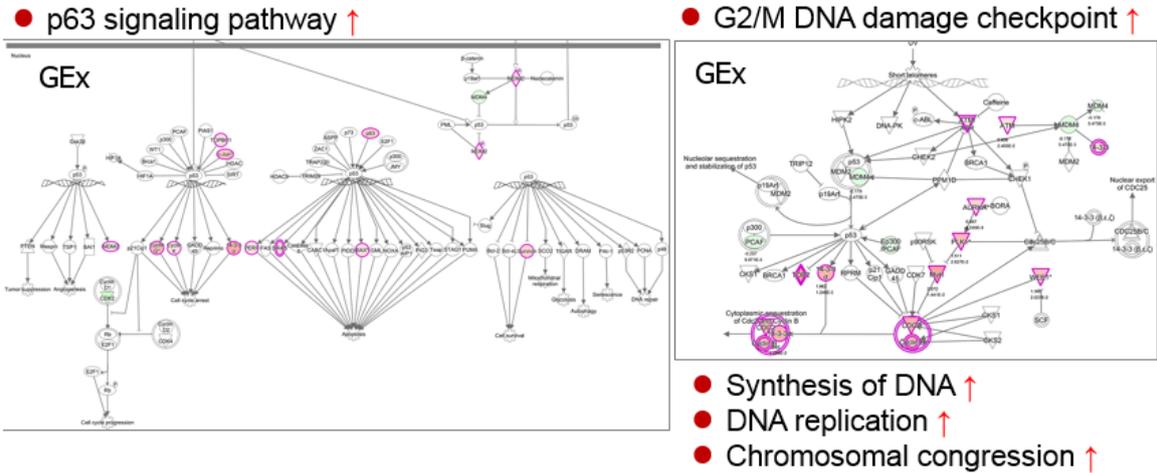
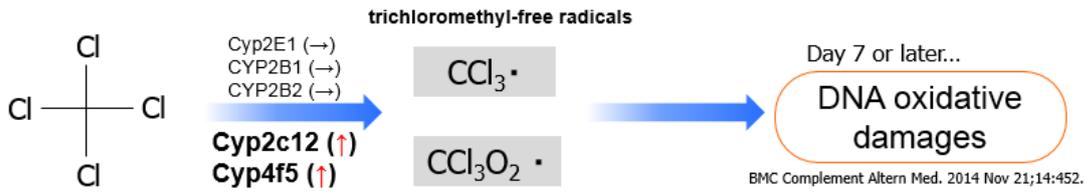
図(1)-13 Molecular Initiating Event (MIE) と脂肪変性との関係〔四塩化炭素〕。
矢印 (オレンジ) は有意な発現増加を示した遺伝子、矢印 (青色) は有意な発現減少を示した遺伝子を示す。



図(1)-14 脂肪変性のメカニズム/経時的変化と遺伝子発現との関係性〔四塩化炭素〕。
矢印 (オレンジ) は有意な発現増加を示した遺伝子、矢印 (青色) は有意な発現減少を示した遺伝子を示す。

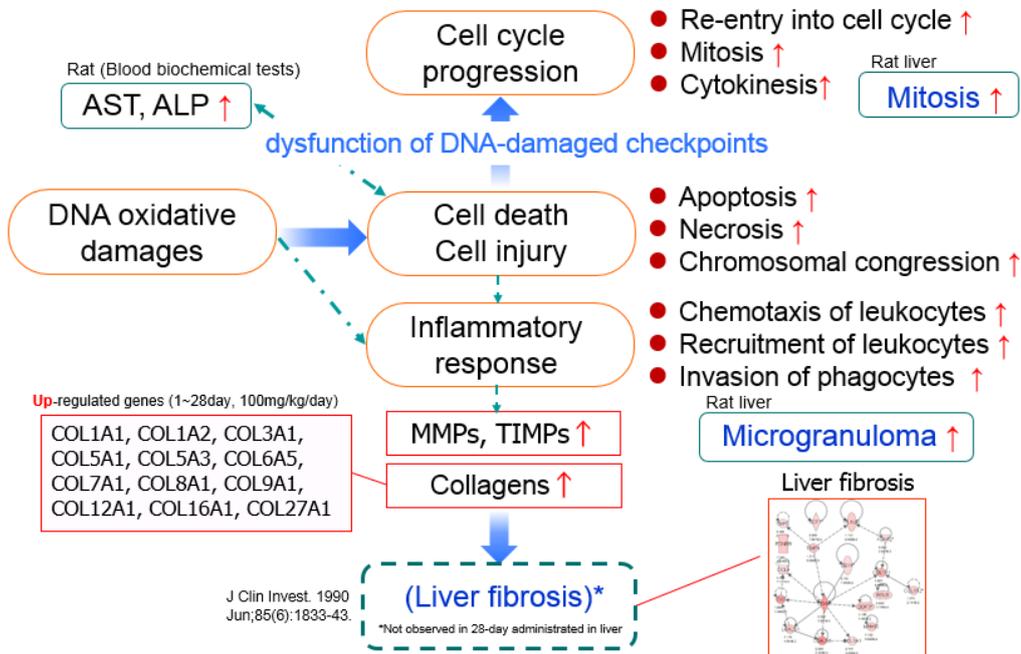
Trichloromethyl-free radicals の肝臓内でのもう一つの MIE として、DNA の酸化があり (Alkreaty et al., 2014; 図(1)-11)、本研究の遺伝子発現量データにおいても、「p63 signaling pathway」や「G2/M DNA damage checkpoint」の遺伝子群に有意な発現増加がみられ、これらのパスウェイが活性化

していることが分かった (図(1)-15)。また、遺伝子機能としても、「Synthesis of DNA」、「DNA replication」の有意な増加がみられた (図(1)-15)。このことから、四塩化炭素投与によって肝臓内で産生された Trichloromethyl-free radicals により、DNA へ酸化ストレスが生じて、DNA 損傷が生じている可能性が考えられた。また、DNA 損傷を補うために DNA 合成系や複製なども活性化された可能性が示唆された。また、遺伝子発現レベルで、「Apoptosis」や「Necrosis」の有意な発現増加、「Chemotaxis of leukocytes」、「Recruitment of leukocytes」、及び「Invasion of phagocytes」の有意な発現増加がみられた (図(1)-16)。病理所見でも「Necrosis」が投与 1 日目に、「Microgranuloma」が投与 7~28 日目に観察されていたことから (表(1)-8)、酸化ストレスによって細胞障害や細胞死が誘導され、それに伴う炎症応答が生じている可能性が考えられた。また、遺伝子発現レベルでは、「Mitosis」や「Cell cycle progression」の有意な増加がみられ、肝臓の線維化での発現増加が認められている種々の MMP (matrix metalloproteinase) や TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase) (Nakatsukasa et al., 1990)、多くの Collagens (Nakatsukasa et al., 1990; COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL5A1, COL5A3, COL6A5, COL7A1, COL8A1, COL9A1, COL12A1, COL16A1, COL27A1) が投与 28 日目で有意に発現増加していた (図(1)-16)。また、遺伝子機能として「Liver fibrosis」に関与する遺伝子群にも有意な発現増加が認められた (図(1)-16)。一般に肝線維化は膠原線維、弾性線維、フィブロネクチンやラミニンなどの細胞外マトリックスの組織内沈着で、持続的あるいは繰り返される肝細胞障害や壊死の結果、修復機構として生じることが知られている (Ito's Toxicologic Pathology, 2013)。これらの結果より、病理所見及び遺伝子発現量変化で壊死や細胞障害が認められ、肝線維化に関与するマーカー遺伝子の発現増加が確認できたことから、28 日間投与群では肝線維化に関する病理所見は観察されていないものの、肝線維化につながるような変化が遺伝子発現レベルでは既に生じていることを確認することができた。



図(1)-15 DNA への酸化的ダメージのメカニズム(四塩化炭素)

矢印 (オレンジ) は有意な発現増加を示した遺伝子、矢印 (青色) は有意な発現減少を示した遺伝子を示す。オレンジ線で囲った遺伝子機能は有意な発現増加を示す。

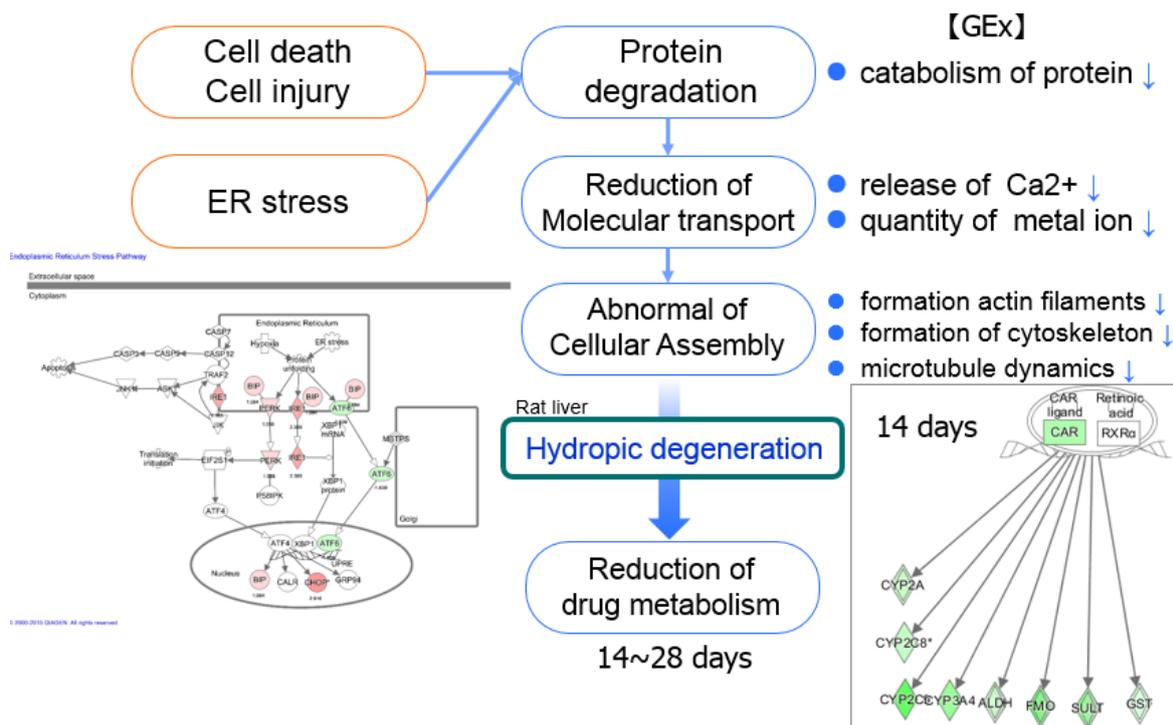


図(1)-16 細胞障害/炎症応答から肝臓の線維化までのメカニズム(四塩化炭素).

矢印 (オレンジ) は有意な発現増加を示した遺伝子、矢印 (青色) は有意な発現減少を示した遺伝子を示す。オレンジ線で囲った遺伝子機能は有意な発現増加を、青線で囲った遺伝子機能は有意な発現減少を示す。緑色 (太線) で囲ったものは、病理組織学的検査で検出された症状を示す。

また、四塩化炭素投与により病理所見として「Hydropic degeneration」(水腫性変性) が投与 1 日目

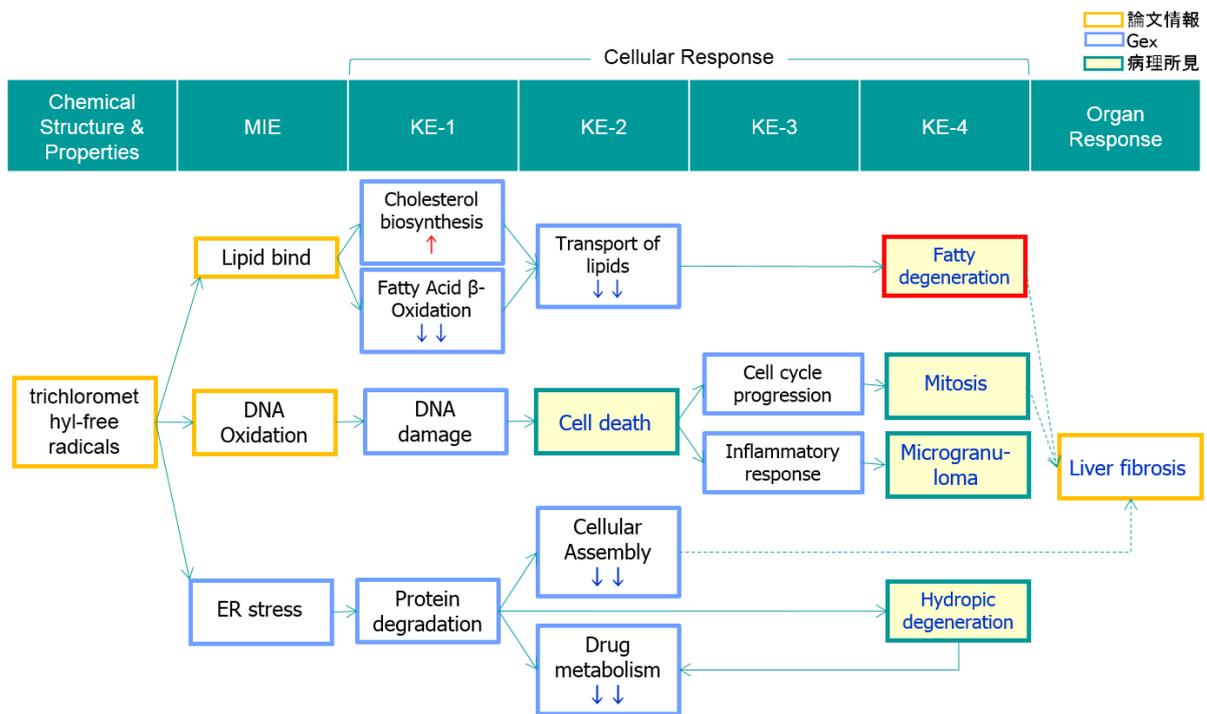
の高用量群から認められた (表(1)-8)。一般に水腫性変性は細胞膜障害による細胞内液の蓄積過剰により発現する膨化性病変で、高度の膜障害では小胞体の嚢状拡張が認められる (Ito's Toxicologic Pathology, 2013)。本研究の遺伝子発現量データでは小胞体ストレスの活性化がみられたことから、水腫性変性に伴う小胞体への影響が生じた可能性が考えられた。また、「Protein degradation」、「Reduction of Molecular transport」、及び「Abnormal of Cellular Assembly」に有意な発現減少がみられ、水腫性変性による細胞膜障害に伴う遺伝子発現量の低下である可能性が考えられた。これらのことから、一連の遺伝子発現量の変化が水腫性変性に関与している可能性が考えられた (図(1)-17)。



図(1)-17 ER ストレスと水腫変性との関係性〔四塩化炭素〕。

矢印 (オレンジ) は有意な発現増加を示した遺伝子、矢印 (青色) は有意な発現減少を示した遺伝子を示す。オレンジ線で囲った遺伝子機能は有意な発現増加を、青線で囲った遺伝子機能は有意な発現減少を示す。緑色 (太線) で囲ったものは、病理組織学的検査で検出された症状を示す。

これら一連の遺伝子発現量変化と病理組織学的検査の結果を MoA (Mode of Action) /AOP (Adverse Outcome Pathway) として、図(1)-18 にまとめた。CCl₄ の代謝産物である Trichloromethyl-free radicals が脂肪へ結合し、また、DNA の酸化ストレスを生じさせ、一連の毒性症状を引き起こすことが分かった。また、本研究の 28 日間反復投与実験では観察されなかったものの、肝線維化につながるような変化を遺伝子発現レベルで見出すことができた。



図(1)-18 肝毒性のメカニズム (MoA/AOP)(四塩化炭素)。

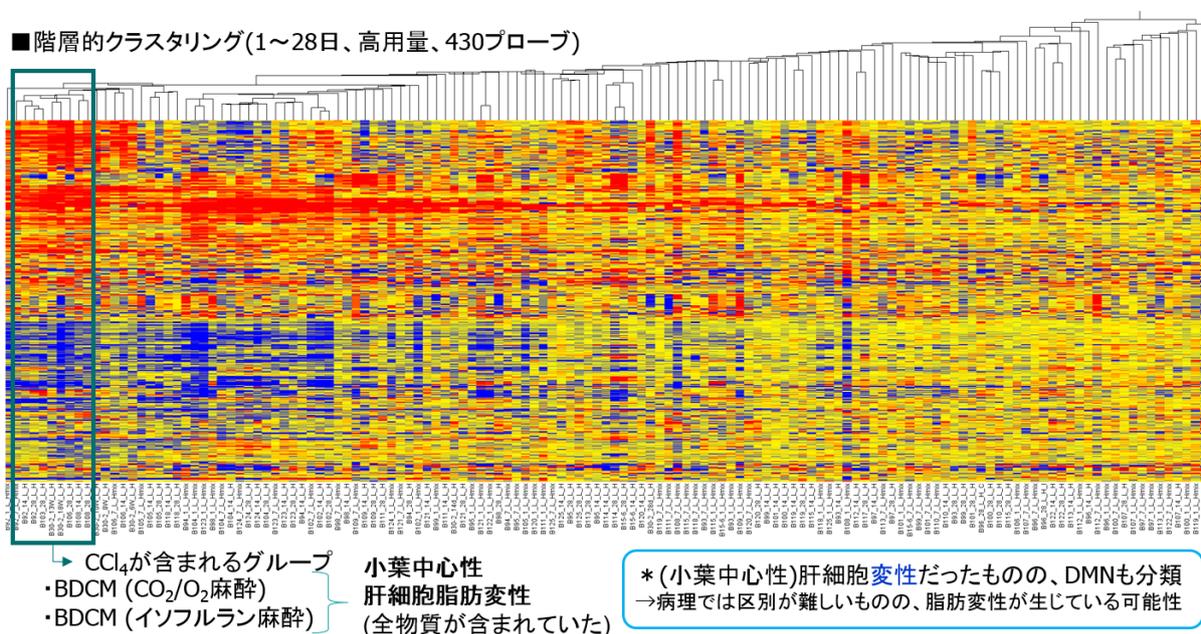
本研究により、遺伝子発現量解析と病理組織学的変化から、 CCl_4 投与によって生じる種々の毒性症状を、MoA (Mode of Action) /AOP (Adverse Outcome Pathway) を作成することで、時系列を整理しながらまとめることができた。このアプローチにより、これまで毒性マーカー遺伝子として個別に明らかになっていたものが、毒性発現の連続的な変化において、どのような役割を果たしているか、どのような生命現象に関与しているかについて明らかにすることができ、毒性メカニズムをより詳細に理解するための非常に重要な知見となった。

(3)-3-1-④ 肝細胞脂肪変性の関連遺伝子による類似化合物の探索

肝毒性に関する MoA/AOP 作成では、四塩化炭素をケーススタディとして構築したが、ここで見出された毒性所見に関連した遺伝子群が、同様の所見を示す他の物質でも同じように変動しているか？という疑問が残った。そこで、四塩化炭素の MoA/AOP で「脂肪変性」との関連性が見出された 430 遺伝子について、31 物質 (34 試験) の 1 日、7 日、14 日、及び 28 日目の全ての肝臓由来のマイクロアレイデータを用いて、階層的クラスタリングを行った。

その結果、四塩化炭素が含まれるグループに、同じ小葉中心性肝細胞脂肪変性がみられた BDCM (Bromodichloromethane) が、 CO_2/O_2 混合麻酔とイソフルラン麻酔の 2 試験が含まれていた (図(1)-19)。なお、31 物質 (34 試験) で小葉中心性肝細胞脂肪変性が観察されたものは、四塩化炭素以外ではこの 2 試験のみであった。さらに、病理所見としては小葉中心性肝細胞変性であったものの、DMN (N-Nitrosodimethylamine) も同じグループ内に含まれており、遺伝子発現プロファイルとしては、脂肪変性のメカニズムに近い変動を示すことが分かった (図(1)-19)。このことから、DMN 投与においても脂肪変性を生じている可能性が高いと考えられ、病理組織学的検査では明確な分類ができない症状でも遺伝子発現プロ

ファイルから判定できる可能性が示唆された。



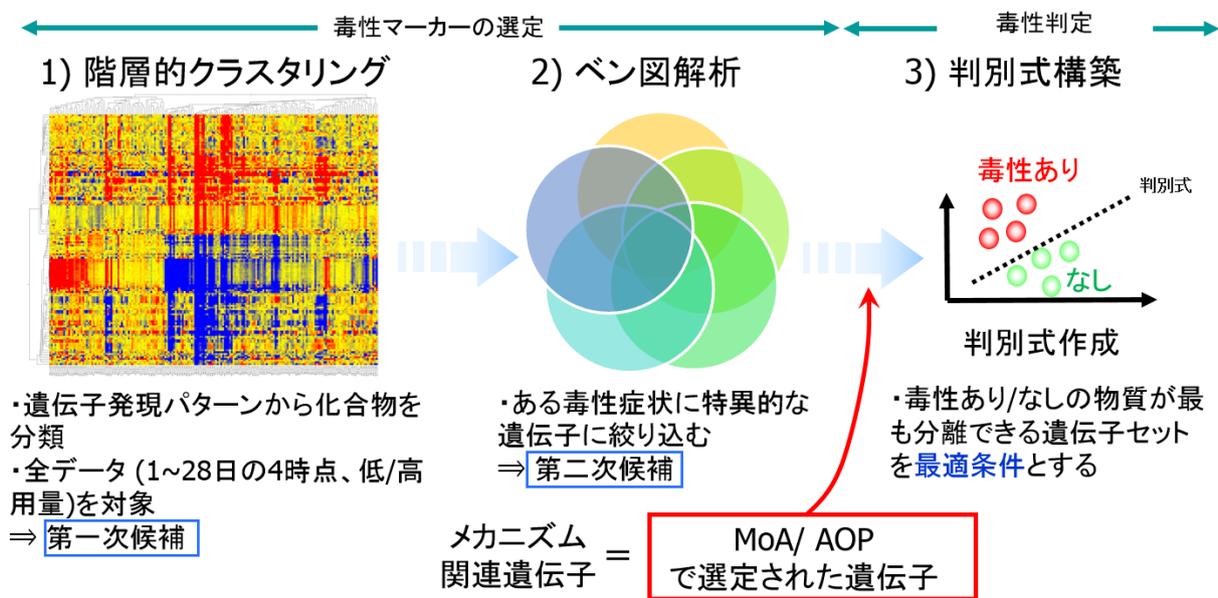
図(1)-19 脂肪変性関連遺伝子 (430 遺伝子) を用いた階層的クラスタリング。

(3)-3-1-⑤ 肝毒性バイオマーカーの探索

肝毒性バイオマーカー探索において、解析対象の毒性所見としてはげっ歯類を用いた一般毒性試験で出現頻度の高もの (肝細胞脂肪変性、(単細胞)壊死、肝細胞肥大) に着目して解析を進めた。なお、肝細胞脂肪変性と肝細胞肥大については、毒性所見がみられた部位別 (小葉中心性、小葉周辺性、びまん性) に分けてバイオマーカー探索を行った。方法としては図(1)-20 に示すとおり、遺伝子発現プロファイルから化合物を分類した後 (第一次候補)、ある毒性症状に特異的な遺伝子群に絞り込んだ (第二候補)。ここで、「(3)-3-1-③ 肝毒性メカニズム: MoA/ AOP 構築 (ケーススタディ: 四塩化炭素)」で選定された毒性メカニズム関連遺伝子を追加して、SVM (support vector machine) による毒性判別式構築において、毒性あり/なしの物質が最も分離できる遺伝子セットを最適条件と、最終的な毒性判定のバイオマーカーとした。

その結果、小葉中心性・肝細胞脂肪変性については、トレーニングデータの 25 試験の中で BDCM, BDCM_I, CCl₄ の 3 試験 (2 物質) で観察された (表(1)-9)。DMN については、病理組織学的検査で肝細胞脂肪変性と判定されなかったものの、「(3)-3-1-④ 肝細胞脂肪変性の関連遺伝子による類似化合物の探索」で上記物質群と同じグループに分類されたことから、陽性物質とした。そこで、これら 4 試験 (3 物質) で有意に発現変動した遺伝子群のベン図解析を行い、物質間の共通性について調べた。その結果、4 試験 (3 物質) で共通して発現変動したものが二次候補として 73 プローブ選定された (表(1)-9)。次に、MoA/ AOP 構築で CCl₄ の肝細胞脂肪変性に関連した遺伝子群と合せて、判別式を最適化したところ、最終的に 8 遺伝子となった (表(1)-9)。その他の毒性症状 (小葉周辺性・肝細胞脂肪変性、(単細胞)壊死、小葉中心性・肝細胞肥大、びまん性・肝細胞肥大) についても同様に毒性バイオマーカーの探索を行ったところ、それぞれ 36 プローブ、14 プローブ、24 プローブ、18 プローブが選定された (表(1)-9)。

なお、肝細胞脂肪変性及び肝細胞肥大については観察された部位の違い、「小葉中心性と小葉周辺性」及び「小葉中心性とびまん性」では遺伝子発現プロファイルが大きく異なり、両者のバイオマーカー遺伝子の共通性は非常に乏しかった（データ示さず）。このことから、同じ毒性症状が生じている場合でも、その部位の違いによって毒性メカニズムが異なる可能性が示唆された。



図(1)-20 毒性判定システムの開発 (構築の流れ).

表(1)-9 バイオマーカー候補遺伝子 (肝毒性).

#	毒性症状		2次候補 (プローブ数)	判別式 (最適条件)	陽性物質名
1	小葉中心性	肝細胞脂肪変性	73	→ 8	BDCM、BDCM_I、DMN、 CCl ₄
2	小葉周辺性		106	→ 36	ADBAQ、TBBC
3	—	単細胞壊死	148	→ 14	BDCM、BDCM_I、DMN、 ADBAQ
4	小葉中心性	肝細胞肥大	50	→ 24	o-NA、o-AH、AQ、 TBBC
5	びまん性		75	→ 18	o-NA、ADBAQ、TCP

(3)-3-2 腎毒性バイオマーカー候補の探索

(3)-3-2-① 動物試験結果

動物試験結果については、投与 28 日目の高用量群に注目してデータ解析を行った。病理組織学的検査で腎臓に何らかの所見がみられた物質を調べた (表(1)-10)。

表(1)-10 腎重量、剖検及び病理組織学的検査 (投与 28 日、高用量).

物質名	腎重量 (相対)	剖検 (腎臓)	病理組織学的検査 (腎臓)
BDCM_I	↑	腎臓腫大 (3/5)	<ul style="list-style-type: none"> ・皮質/近位尿細管の空胞変性 (4/5) ・皮質/近位尿細管の核濃縮 (4/5) ・皮質/近位尿細管の再生 (5/5)
BDCM	--	腎臓腫大 (1/5)	<ul style="list-style-type: none"> ・皮質/近位尿細管の空胞変性 (5/5) ・皮質/近位尿細管の核濃縮 (2/5) ・皮質/近位尿細管の再生 (5/5)
2A4NP	--	<ul style="list-style-type: none"> ・暗褐色化 (4/5) ・腫大 (4/5) 	<ul style="list-style-type: none"> ・髄質外帯/近位尿細管の再生 (1/5) ・髄質外帯/色素沈着 (3/5)
TBA	↑	腎臓の表面点状模様明瞭 (4/5)	<ul style="list-style-type: none"> ・皮質/近位尿細管の硝子滴 (5/5) ・皮質/近位尿細管の核濃縮 (1/5)
TBA_I	↑	腎臓の表面点状模様明瞭 (2/5)	--
o-AH	--	<ul style="list-style-type: none"> ・暗褐色化 (5/5) ・腫大 (1/5) 	<ul style="list-style-type: none"> ・乳頭管好塩基性化 (4/5) ・乳頭壊死 (2/5) ・皮質/近位尿細管ヘモジドリン沈着 (5/5)

物質名	腎重量 (相対)	剖検 (腎臓)	病理組織学的検査 (腎臓)
			<ul style="list-style-type: none"> ・皮質/遠位尿細管拡張 (2/5) ・皮質及び髓質/遠位尿細管拡張 (2/5) ・皮質/近位尿細管硝子滴 (2/5) ・皮質/近位尿細管再生 (2/5)
Na3-NTA-H2O	↑	・腫大 (1/5)	<ul style="list-style-type: none"> ・尿路上皮(移行上皮)過形成 (1/5) ・尿路上皮空胞化 (4/5) ・腎盂炎 (1/5)
ADBAQ	--	・暗褐色化 (5/5)	・皮質/近位尿細管色素沈着 (5/5)
AQ	↑	・腫大 (1/5)	・髓質外帯/近位尿細管空胞変性 (2/5)
DMN	--	--	<ul style="list-style-type: none"> ・皮質/近位尿細管の核大小不同 (2/5) ・腎盂拡張 (1/5)

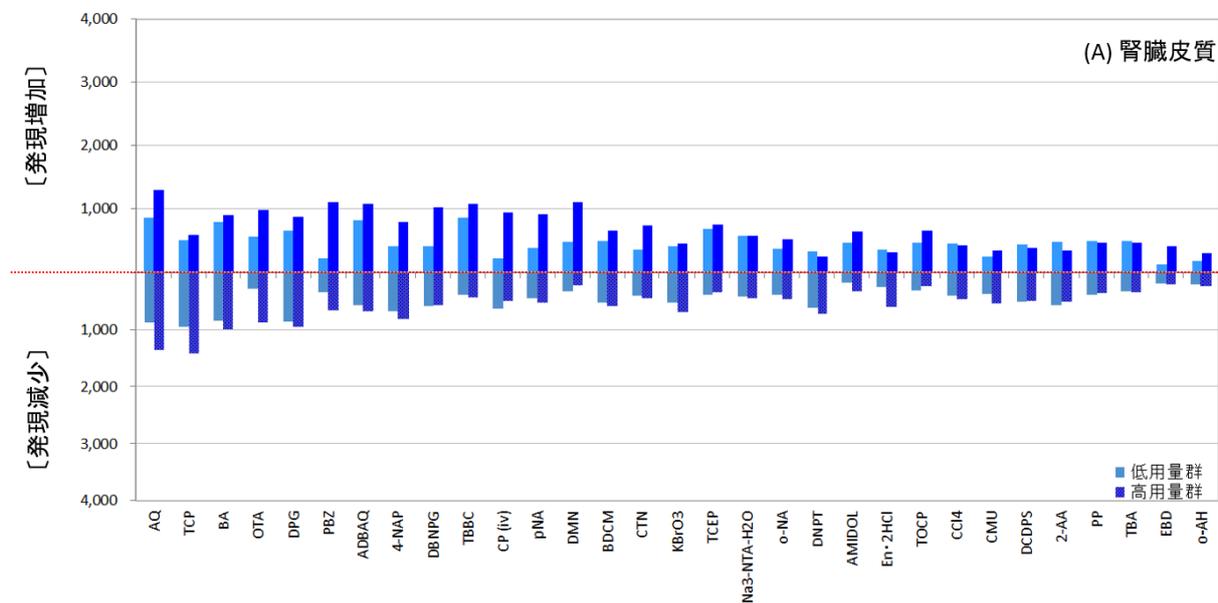
↑ ; 媒体対照群に対して有意な増加を示した ($p < 0.05$). -- ; 有意な変化/所見がみられなかった. カッコ内の数値は所見がみられた動物の例数

(3)-3-2-② 遺伝子発現量データの解析 (変動遺伝子の抽出)

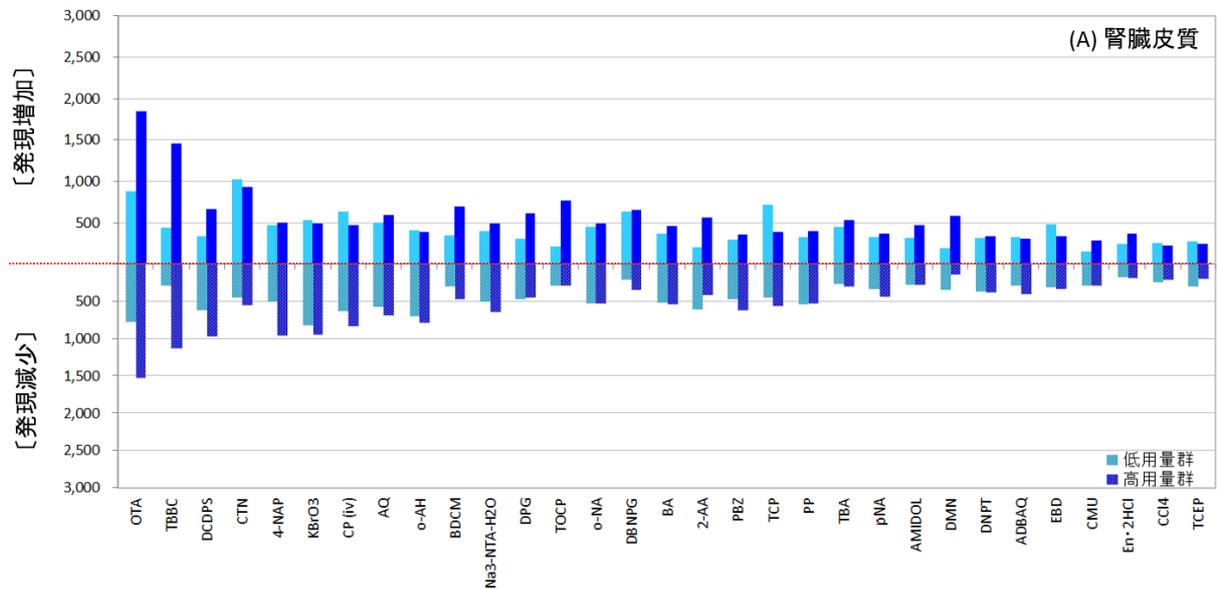
1、7、14、及び 28 日間反復投与後の腎臓を腎臓 (全体) に加えて皮質、髓質 (外帯)、髓質 (内帯)、乳頭の 4 部位に分けて、それぞれから total RNA を抽出し、RNA 濃度、純度、及び品質が基準を満たしていることを確認した。その後、投与後 28 日目の検体について、媒体対照群、低用量群、高用量群の各 3 匹を用い、マイクロアレイ実験 (Agilent Whole Rat Genome Toxplus, 60K×8) を行った。媒体対照群と投与群との間で有意差検定を行い、有意な発現変動を示す遺伝子を抽出し、そのプローブ数をカウントし、その数の多い物質から順に表示した。

(A) 皮質

1) 投与1日目

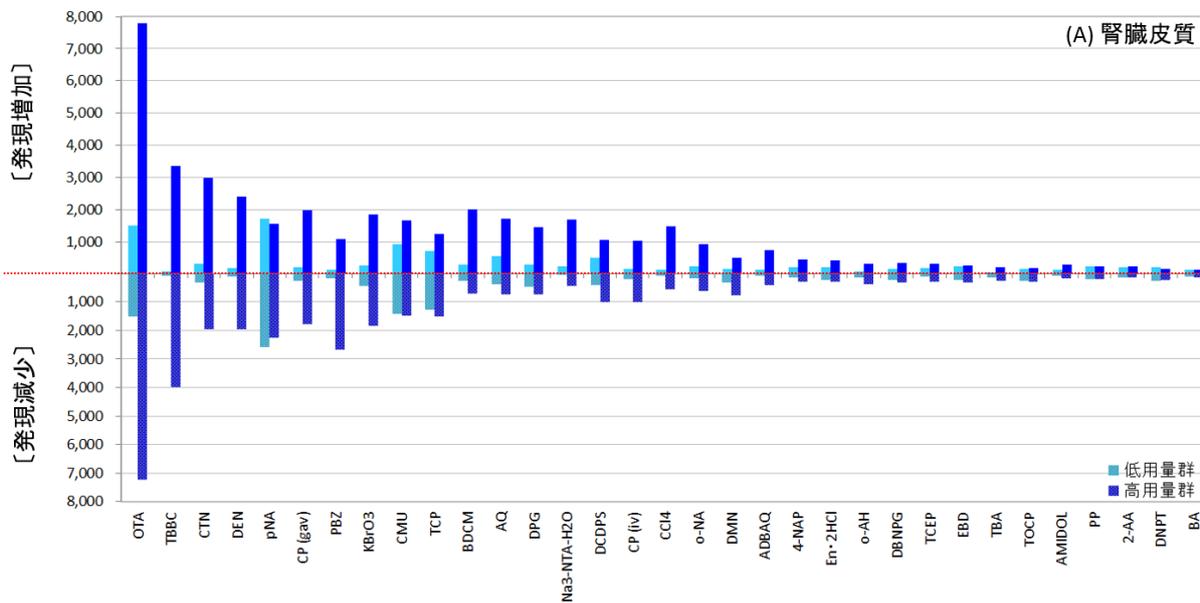


2) 投与7日目

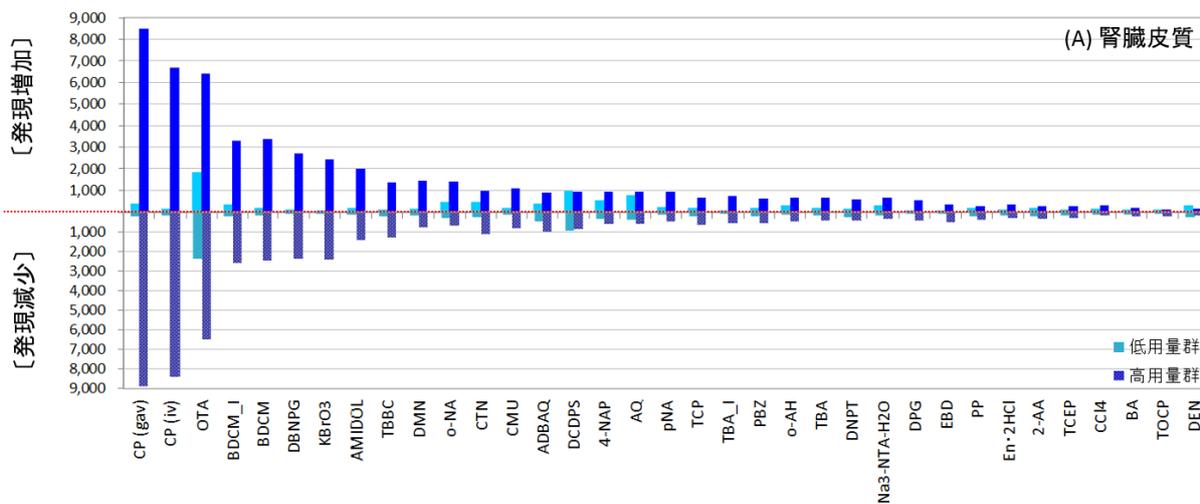


図(1)-21 有意な変動を示したプローブ数 (腎臓).

3) 投与 14 日目



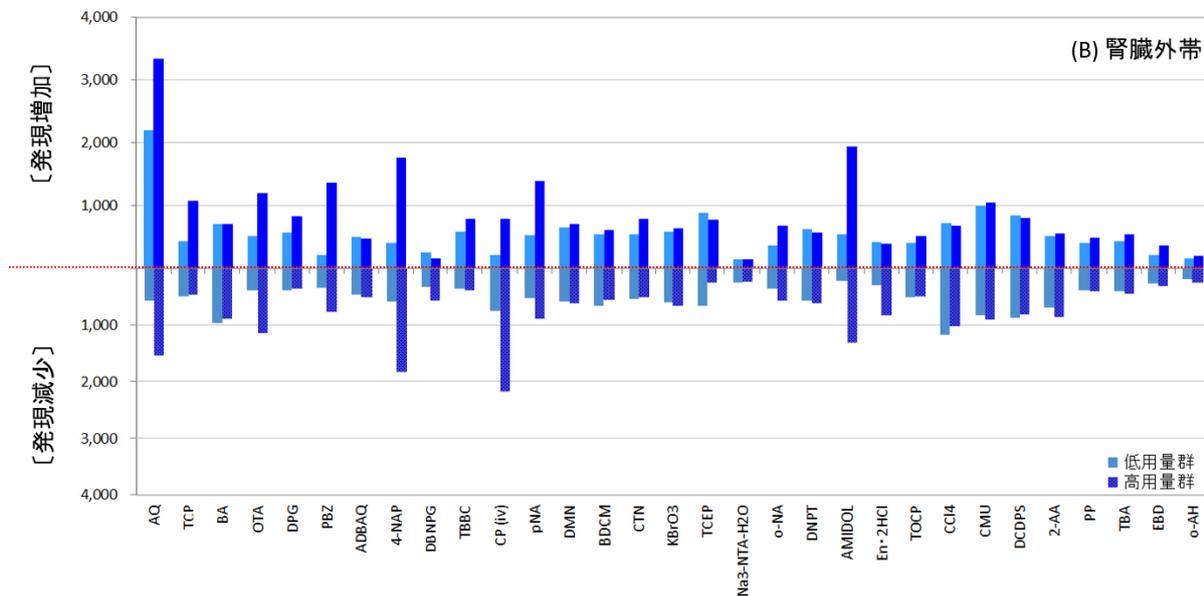
4) 投与 28 日目



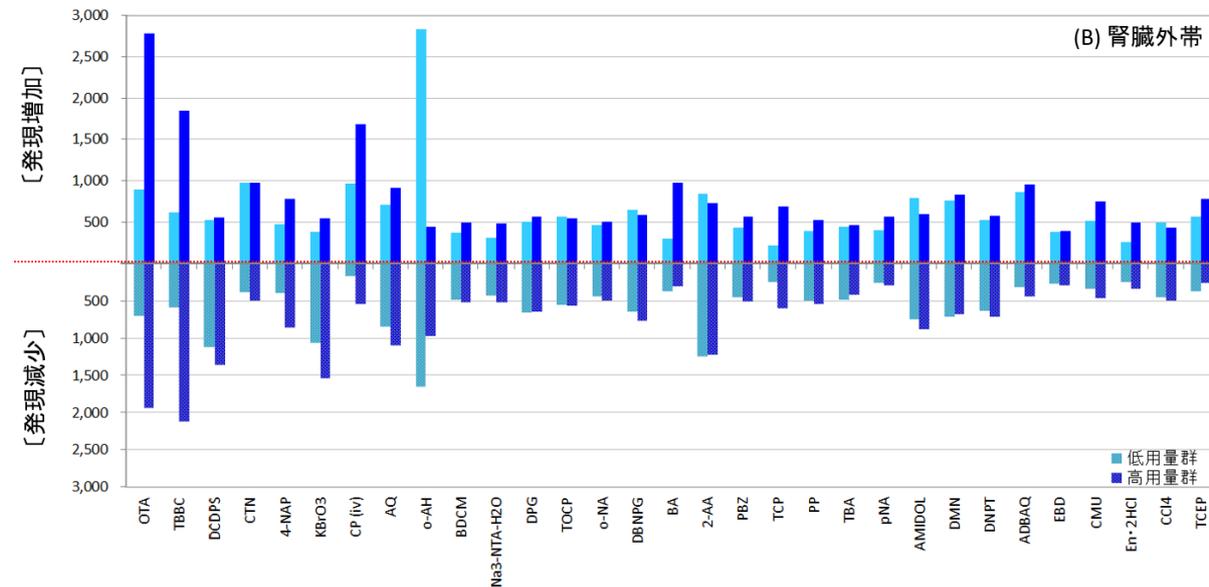
図(1)-21 (続き) 有意な変動を示したプローブ数 (腎臓).

(B) 髄質外帯

1) 投与1日目

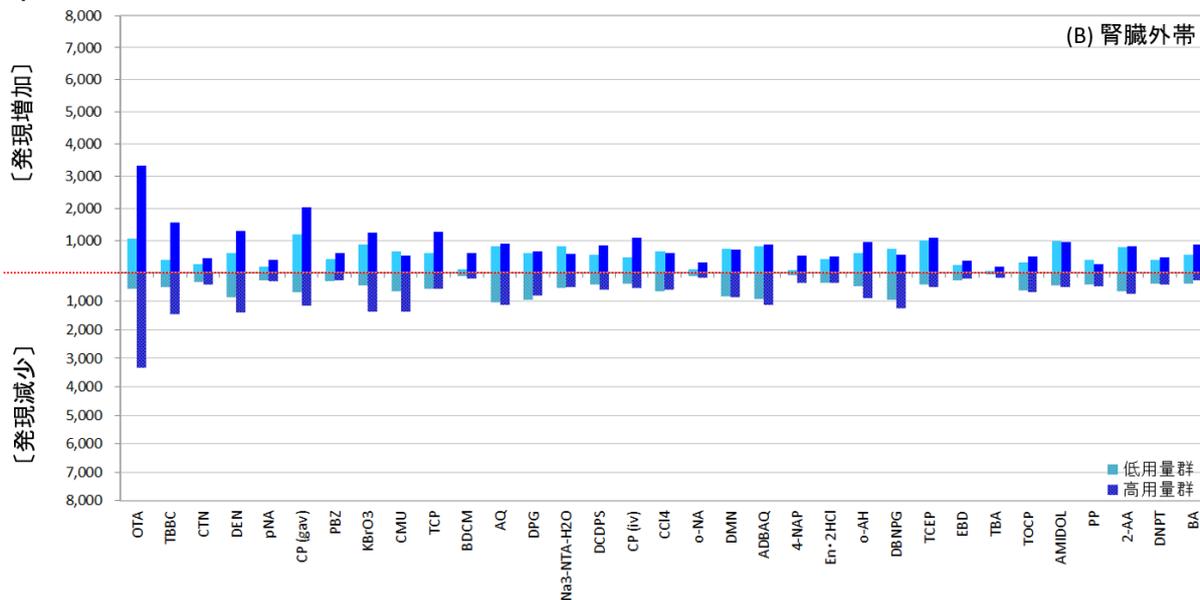


2) 投与7日目

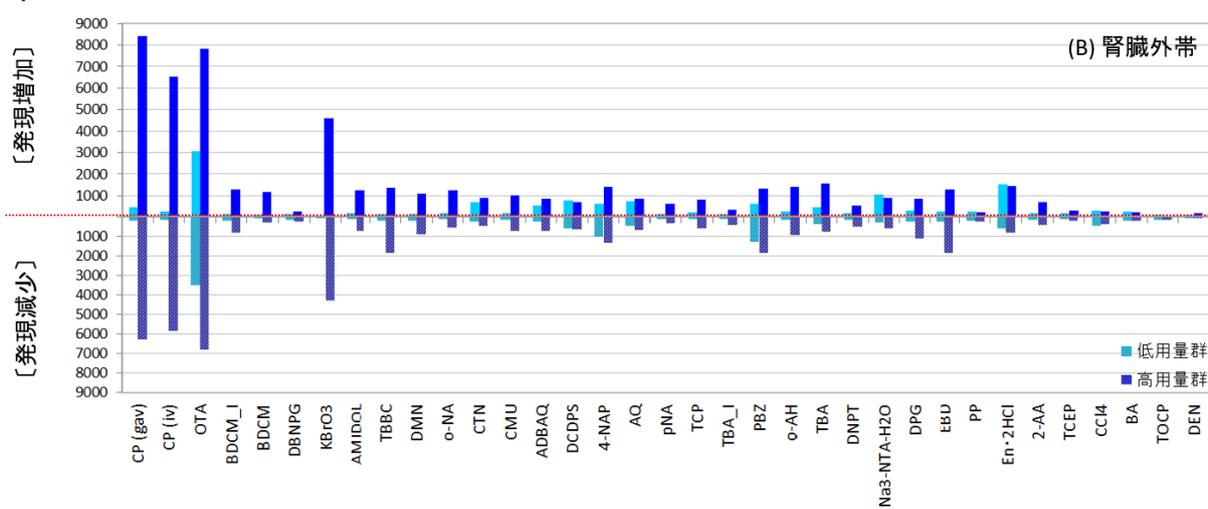


図(1)-21 (続き) 有意な変動を示したプローブ数 (腎臓).

3) 投与 14 日目

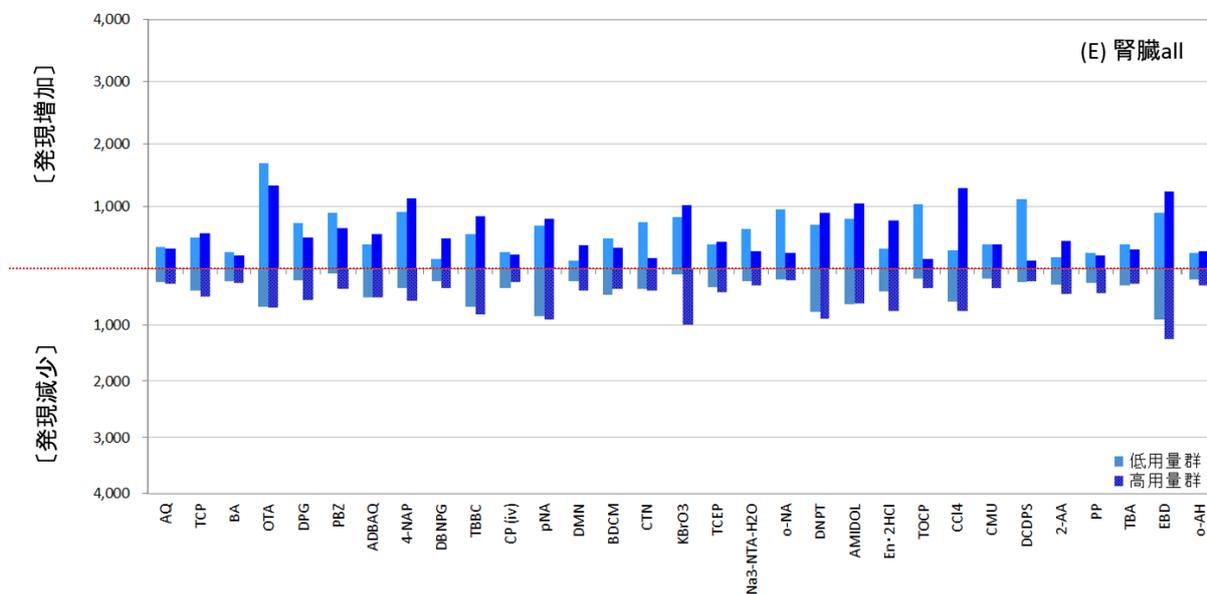


4) 投与 28 日目

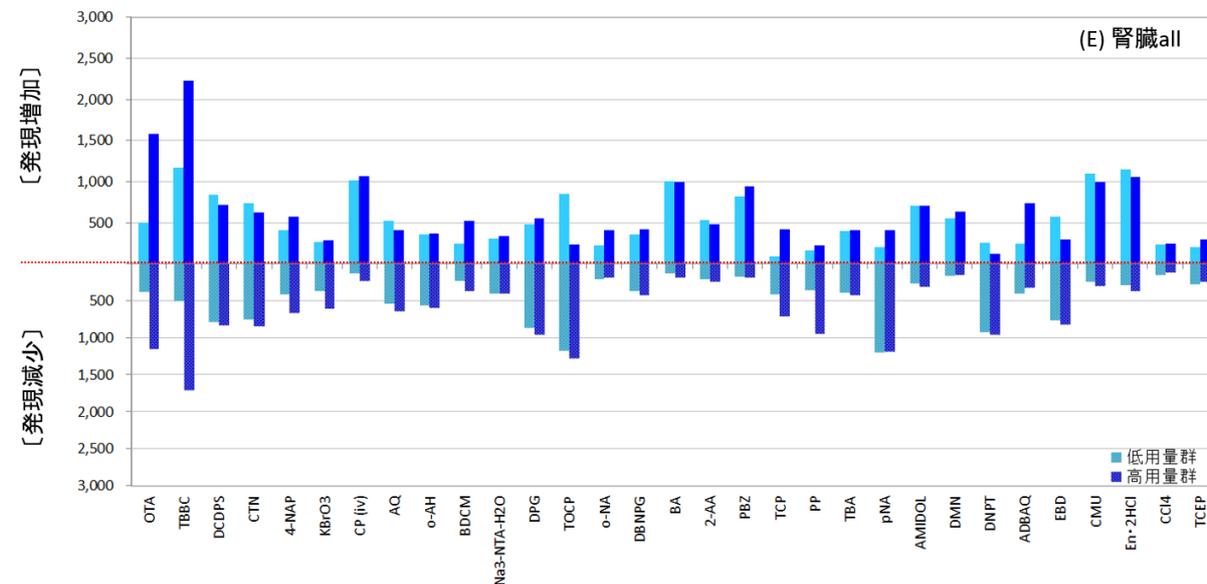


図(1)-21 (続き) 有意な変動を示したプローブ数 (腎臓).

(C) 腎臓/全体
1) 投与1日目

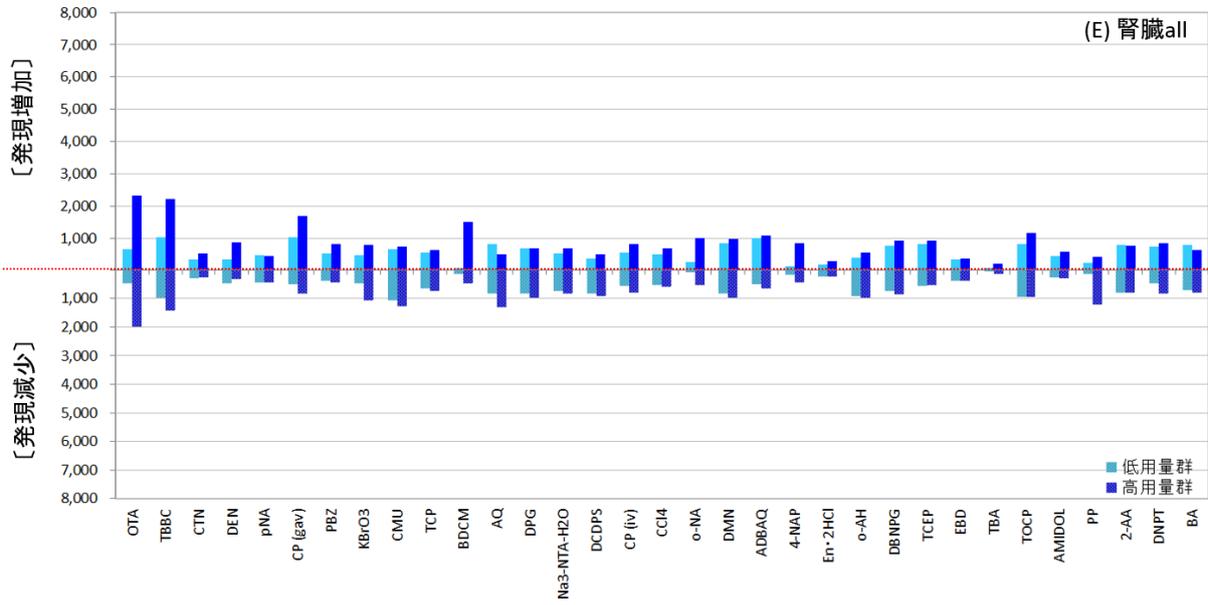


2) 投与7日目

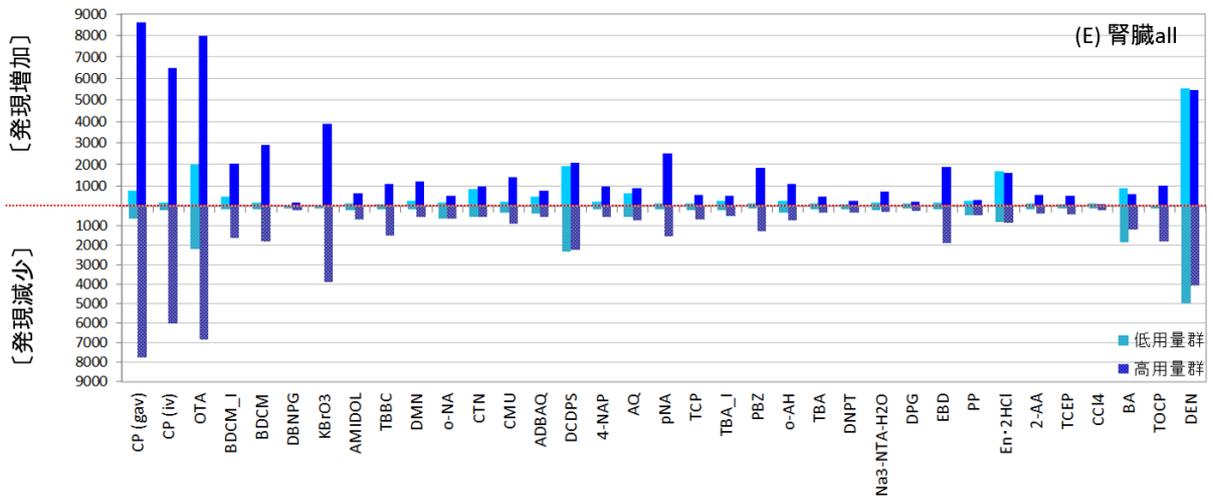


図(1)-21 (続き) 有意な変動を示したプローブ数 (腎臓).

3) 投与 14 日目



4) 投与 28 日目



図(1)-21 (続き) 有意な変動を示したプローブ数 (腎臓).

(3)-3-2-③ 腎毒性メカニズム : MoA/ AOP 構築 (ケーススタディ : シスプラチン)

腎毒性において、遺伝子発現量の変化がどのように毒性と関連しているかを調べるために、ケーススタディとしてシスプラチン (CP; B10-0114) について、1 日、7 日、14 日、28 日間投与後の腎臓サンプル、特に病理所見がみられた皮質と髄質外帯の遺伝子発現量データと動物試験結果、並びに論文情報を付加して、MoA (Mode of Action) /AOP (Adverse Outcome Pathway) を構築し、腎毒性メカニズムの考察を行った。

CP はミトコンドリアを介してアポトーシスを誘導することで細胞死を引き起こすことから、抗がん剤 (DNA 架橋剤) として用いられているが、一方で腎臓に対して強い毒性を示すことが報告されている (Pabla et al., 2008; 図(1)-22)。腎毒性に関しては、炎症や尿細管への障害が引き金になって、重篤な腎毒性につながるなどの報告があるものの (Pabla et al., 2008; 図(1)-22)、詳細なメカニズムについてはあまり分かっていない。

そこで、本研究では経時的に取得した遺伝子発現量データと病理組織学的検査の両方を照合し、さらに、論文情報を調査することで、CP によって引き起こされる腎毒性についてメカニズムを解明するために、MoA/AOP 構築を行った。さらに、本プロジェクトでは、腎臓を皮質、髄質外帯、髄質内帯、乳頭の 4 部位に分けて個別にマイクロアレイ実験を行っているため、腎尿細管が多く存在する、皮質と髄質外帯の遺伝子発現量データを主に解析した。なお、CP は Tox-in vitro チームとの共通被物質としても選定した。

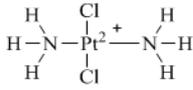
CP 投与によって生体内では、reactive oxygen species (ROS) が生じ、それが DNA、タンパク質、脂質、及びコファクターの酸化を引き起こすことが知られている (Brooker, 2011)。本研究で取得した CP 投与 (静脈内投与) 後の遺伝子発現量データについて、1 日、7 日、14 日、28 日目の 4 時点について、尿細管が多く存在する腎臓 (髄質外帯) で有意に発現変動した遺伝子の機能を調べた。発現増加した遺伝子群では、「Cell Death and Survival」や「Inflammatory Response」の有意性が経時的に増加することが分かった (図(1)-23)。病理所見では、Renal tube (Single cell) necrosis が投与 7 日目から 28 日目にかけてみられており (表(1)-11)、主に「Cell Death and Survival」に関する遺伝子発現変化と関与していることが考えられた。一般に腎臓における尿細管壊死には上皮細胞の単細胞壊死と限局性あるいは巣状壊死があり、単細胞壊死では、細胞の収縮、好酸性化、核濃縮、核の断片化がみられ、炎症性変化は伴わない (Ito's Toxicologic Pathology, 2013)。限局性あるいは巣状壊死では細胞の腫大や核の融解・濃縮がみられ、炎症応答を伴う (Ito's Toxicologic Pathology, 2013)。遺伝子発現量データでは、「Apoptosis」に関する変化は 14 日目以降から有意になり、28 日目には増強したことから、投与初期にみられた Renal tube (Single cell) necrosis では、限局性あるいは巣状壊死が主に生じており、それに伴って炎症応答も誘導された可能性が考えられた (図(1)-23)。また、投与後期には Apoptosis (単細胞壊死) が誘導され、Renal tube (Single cell) necrosis も広範囲にかつ重篤化した可能性が考えられた。

また、発現増加した遺伝子群で経時的に有意性が高まった機能としては、「Cellular growth and proliferation」があり、Mitosis に関係したサイクリン系、成長因子として、FGF7、GDFs、TGFs の有意な発現増加がみられた (図(1)-24)。特に投与 14 日目以降に「Cellular growth and proliferation」の有意性が高くなったことから、病理所見で投与 14 日目以降にみられた「Regeneration」に関与した変化である可能性が考えられた。

「Organismal Injury and Abnormalities」の発現増加の有意性も投与 1 日目から高く、その機能に含

まれる詳細な情報としては、「abnormal renal clearance」、「abnormal transport of kidney」、「abnormality of urinary system」があり、これらの機能異常が投与初期から生じていることが分かった (図(1)-24)。発現減少している遺伝子群では、「Amino acid Metabolism」、「Lipid Metabolism」、「Vitamin and Mineral Metabolism」について、投与 1 日目で有意性が高く、7 日目から 14 日目で一旦減少して 28 日目で再び有意性が高くなった (図(1)-25)。また、「Metabolism」、「Molecular Transport」、「Organismal Injury and Abnormalities」も同様の傾向を示した (図(1)-25)。これは CP 投与後すぐに、尿細管で細胞障害や細胞異常が生じ、通常の腎臓では正常に働いている脂質代謝、アミノ酸代謝、ビタミン/ミネラル代謝等に機能低下が見られたものの、投与 7 日目から 14 日目にかけては、尿細管の再生/修復が生じ、これらの機能が一旦回復したものと考えられた (図(1)-25)。さらに、CP が連続して投与されることで、異常細胞が蓄積し、投与 28 日目では再び脂質代謝、アミノ酸代謝、ビタミン/ミネラル代謝等が機能低下し、さらに重篤化したものと考えられた (図(1)-25)。また、CP 投与によって、トランスポーターの変性が生じるとの報告があり (Holzer et al., 2006)、本データにおいても、「Molecular transport」の遺伝子発現量に有意な減少が認められた (図(1)-25)。パスウェイ解析においても、腎臓 (皮質) で「Mitochondrial Dysfunction」に関与する遺伝子群に有意な低下がみられ、特に電子伝達系 (酸化リン酸化) が抑制されていることが分かった (図(1)-26)。これらの一連の現象が尿細管の機能不全につながり (Yang et al., 2014)、さらに、本プロジェクトの病理所見として観察された「Cast formation」、「Luminal obstruction」、「Dilatation」につながったものと考えられた。CP は長期間投与により、不可逆的な腎臓の機能不全を経て、慢性的な腎毒性につながることを報告されているため (Rubera et al., 2013)、本研究で得られた 28 日間までの病理組織学的な変化や遺伝子発現量変化は、それらに至るまでの変化を詳細に捉えているものと考えられた。

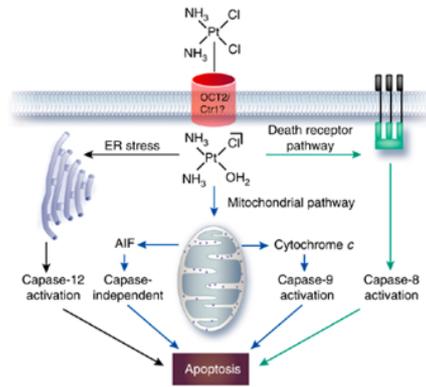
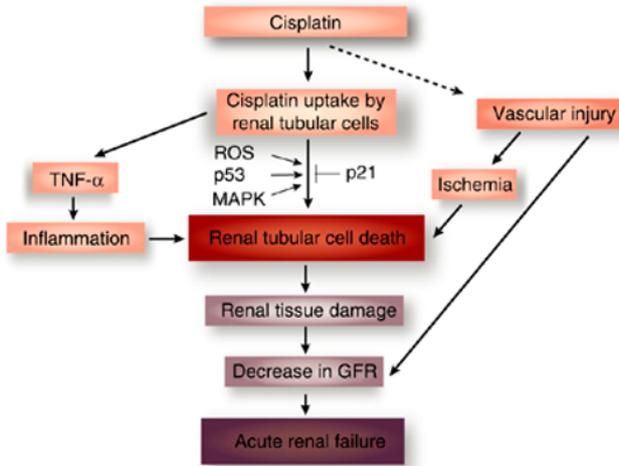
これら一連の遺伝子発現量変化と病理組織学的検査の結果を MoA (Mode of Action) /AOP (Adverse Outcome Pathway) として、図(1)-27 にまとめた。CP 投与によって生体内で生じる ROS の働きにより、DNA、タンパク質、脂質、及びコファクターの酸化反応が生じ、それが Molecular Initiating Event (MIE) となって、主に尿細管への障害とそれに伴う機能不全を引き起こしていることが分かった (図(1)-27)。また、本研究では、腎臓を皮質、髄質外帯、髄質内帯、乳頭と 4 部位に分けて採取し、個別にマイクロアレイデータを取得したことで、尿細管が多く存在する皮質と髄質外帯に着目して、より詳細なメカニズム考察を行うことができた。これにより、CP の腎毒性メカニズムについて、従来の報告よりも精緻な分子メカニズムを解明することができ、さらに慢性的な腎毒性につながる遺伝子発現量変化を捉えることができた。



【シスプラチン(CP)】CAS No. 15663-27-1

腎毒性物質；Tox-in vitro (細胞P)との共通暴露物質選定

・抗がん剤の一種 * DNA架橋剤(グアニン及びアデニンのN-7位に結合)



Kidney Int. 2008 May;73(9):994-1007.

Kidney Int. 2008 May;73(9):994-1007.

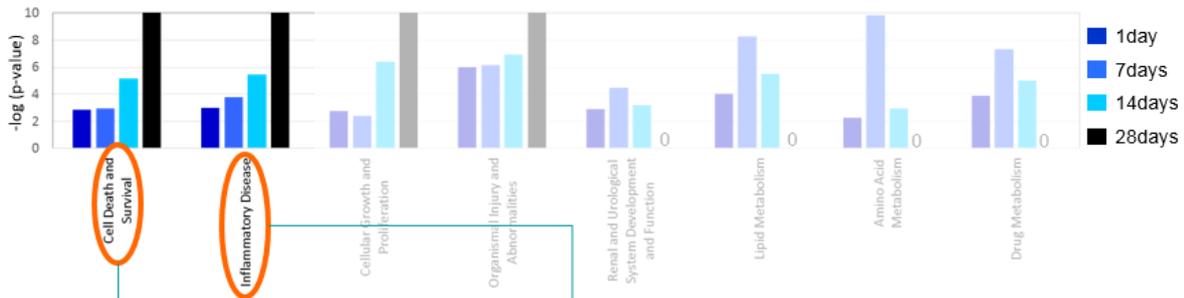
図(1)-22 毒性情報〔シスプラチン〕

表(1)-11 病理組織学的検査結果〔シスプラチン〕

Findings		0 mg/kg/day				0.15 mg/kg/day				0.75 mg/kg/day			
		D1	D7	D14	D28	D1	D7	D14	D28	D1	D7	D14	D28
(Single cell) necrosis / Renal tube/ Cortico-medullary junction	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	2
	2+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
(Single cell) necrosis / Renal tube/ Inner medullar	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
	2+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Degeneration / Renal tube/ Cortex, Cortico-medullary junction	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0
	2+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Karyomegaly / Renal tube/ Cortico-medullary junction	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
Karyomegaly / Renal tube/ Inner medullar	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
	2+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dilation / Renal pelvis	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	2+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Dilation / Renal tube/ Cortico-medullary junction	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	2+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
	3+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Regeneration / Renal tube/ Cortico-medullary junction	±	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
	2+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
Regeneration / Renal tube/Inner medullar	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
	2+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2

±: mild, +: slight, 2+: moderate

● Gene Expression profile; **Up**-regulated genes (1~28 day, 0.75 mg/kg/day)



- p63 (p53 family, 転写因子) ↑
- p21 (細胞周期停止) ↑
- MGMT (DNA修復酵素) ↑
- RAD51 (DNA修復酵素) ↑
- CASP3 (アポトーシス誘導) ↑
- CASP1, 4, 8, 12も ↑

- TNF superfamily (3種) ↑
- Interleukin (8種) ↑
- Chemokine (9種) ↑

アポトーシス誘導→単細胞細胞死(それ以外に直接的な細胞障害もあり)、炎症応答が生じている

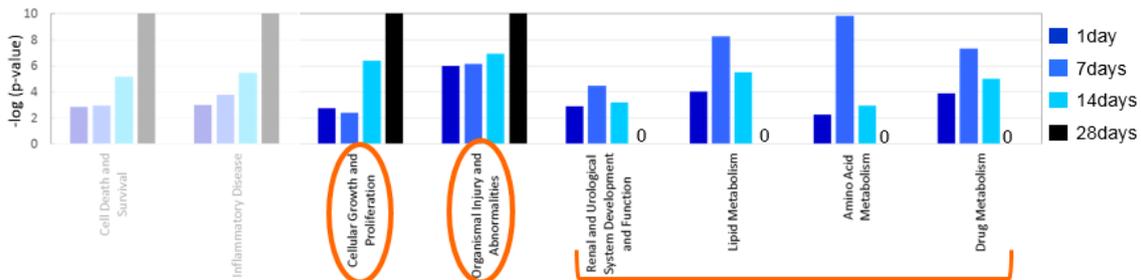
NRF2-mediated Oxidative Stress Response ↑

→ 細胞内でROSによりOxidative Stressが生じている可能性を支持する

図(1)-23 発現増加した遺伝子群の機能分類-1(シスプラチン)

矢印 (オレンジ) は有意な発現増加を示した遺伝子、矢印 (青色) は有意な発現減少を示した遺伝子を示す。

● Gene Expression profile; **Up**-regulated genes (1~28 day, 0.75 mg/kg/day)



- cyclin (細胞周期亢進): 13種 ↑
- FGF7 (成長因子) ↑
- GDF (成長因子): 3種 ↑
- TGF (成長因子): 3種 ↑

- 『腎/泌尿器システムの発達』については、投与14日から有意性が低下→28日目ではゼロ
- 『脂質代謝』、『アミノ酸代謝』、『薬物代謝』も同様

→投与後期には、正常な腎機能が失われている可能性

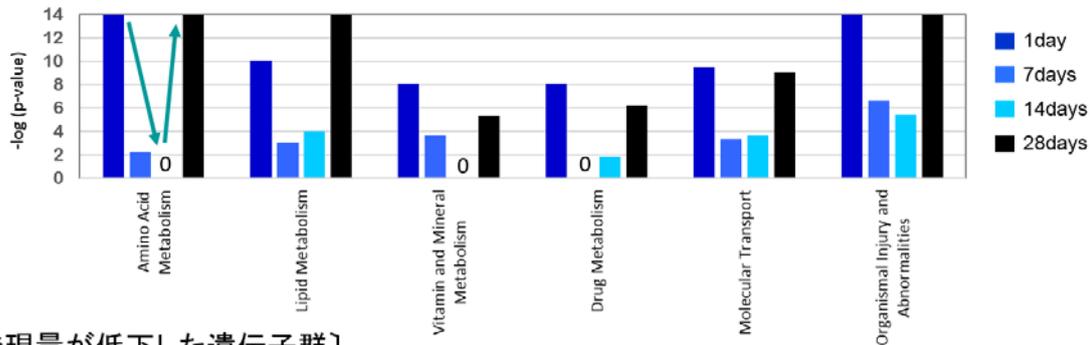
(投与14日目以降に尿細管再生がみられているが、正常な細胞ではない(=機能不全)の可能性)

- abnormal renal clearance
- abnormal transport of kidney
- abnormality of urinary system

図(1)-24 発現増加した遺伝子群の機能分類-2(シスプラチン)

矢印 (オレンジ) は有意な発現増加を示した遺伝子、矢印 (青色) は有意な発現減少を示した遺伝子を示す。

● Gene Expression profile; **Down**-regulated genes (1~28 day, 0.75 mg/kg/day)



〔発現量が低下した遺伝子群〕

- ・『脂質代謝』、『アミノ酸代謝』、『薬物代謝』は、投与1日目で有意性が高く、その後減少、28日目で再び有意性が高くなる(Upとは逆パターン)
- ・『ビタミン/ミネラル代謝』、『分子輸送』、『組織損傷/異常』も同様の傾向

→Cisplatin投与すぐに細胞が障害を受け、代謝、輸送などの機能低下が生じる

→投与7~14日目に再生/修復が生じる(遺伝子数が減少→緩和)

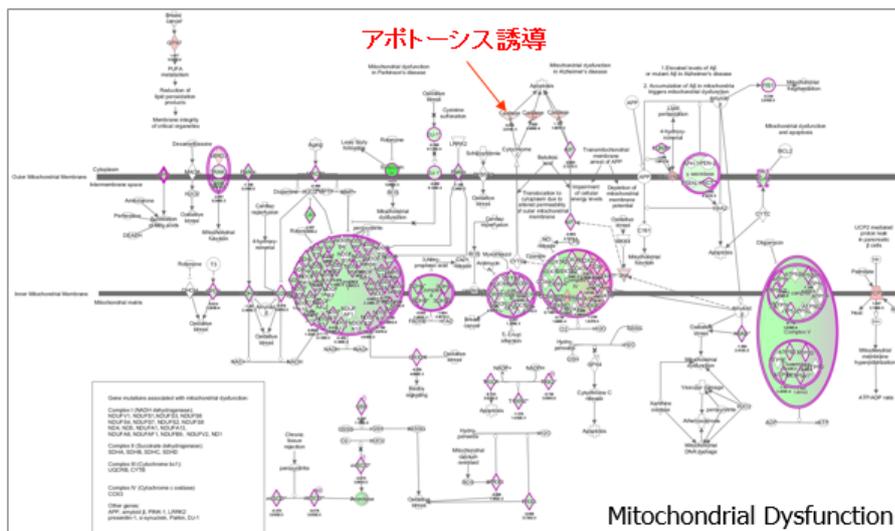
→投与28日目に再び機能低下が生じる

(重篤化し、不可逆的な状態になっている可能性→がん化へ移行)

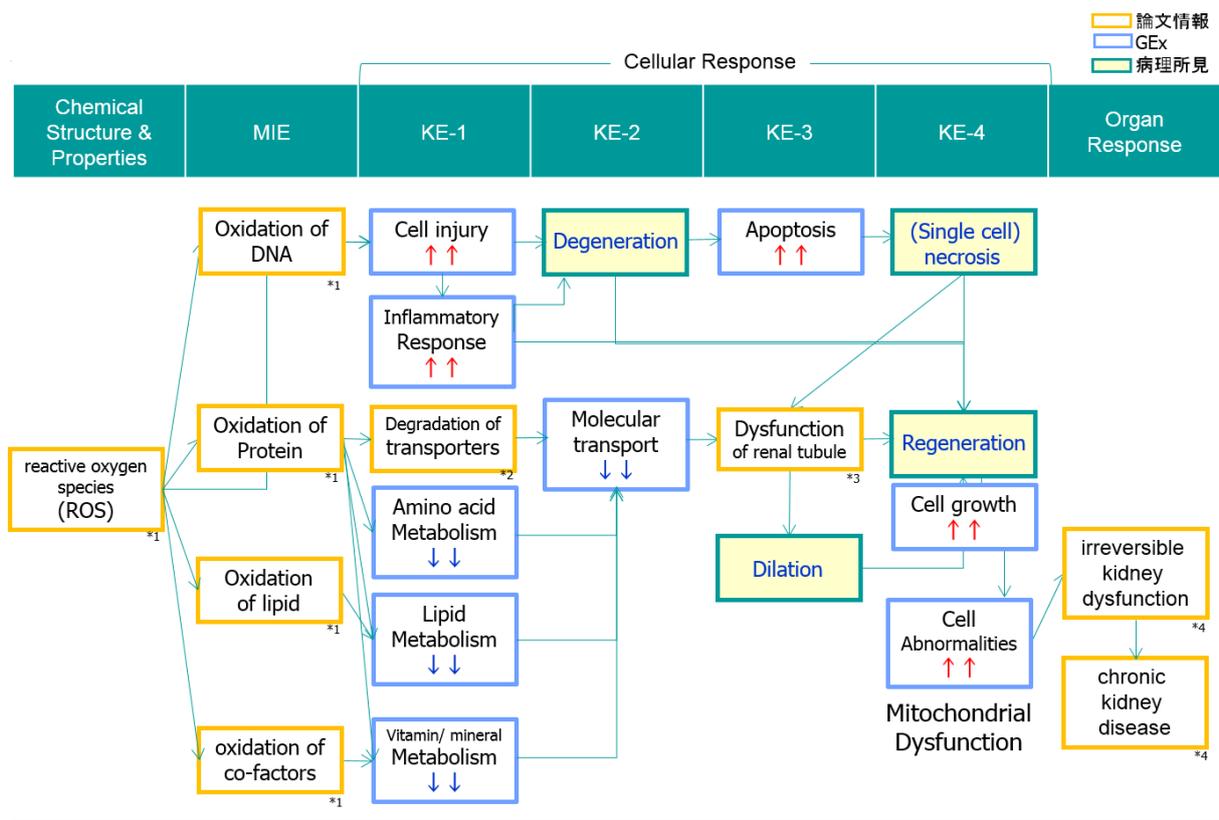
図(1)-25 発現減少した遺伝子群の機能分類〔シスプラチン〕



電子伝達系
(酸化リン酸化)



図(1)-26 腎毒性のメカニズム：ミトコンドリアの機能不全〔シスプラチン〕



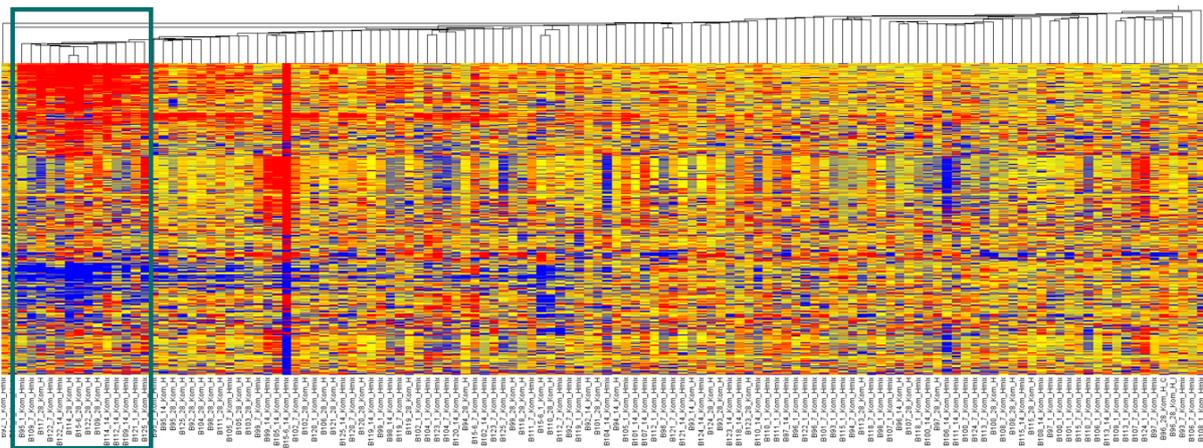
*1; Brooker. (2011) Genetics: analysis and principles (4th ed.) *2; Holzer., et al (2006) Cancer Res.
 *3; Yang., et al (2014) Arch Toxicol. *4; Rubera., et al (2013) Cell Death Dis

図(1)-27 腎毒性のメカニズム (MoA/AOP)(シスプラチン)

(3)-3-2-④ (単細胞)壊死の関連遺伝子による類似化合物の探索

腎毒性に関する MoA/AOP 作成では、をケーススタディとして構築したが、ここで見出された毒性所見に関連した遺伝子群が、同様の所見を示す他の物質でも同じように変動しているかという点について、肝毒性と同様の戦略で確認を行った。まず、シスプラチンの MoA/AOP で「尿細管壊死」との関連性が見出された 1,814 遺伝子について、31 物質 (34 試験) の 1 日、7 日、14 日、及び 28 日目の全ての腎臓 (髄質外帯) 由来のマイクロアレイデータを用いて、階層的クラスタリングを行った。

その結果、CP (静脈内投与) が含まれるグループに 28 日間投与で尿細管壊死がみられた全ての物質 (TBBC、KBrO₃、OTA、CP/経口投与) が分類された (図(1)-28)。さらに、投与 1 日目のみで尿細管壊死を示した AMIDOL 及び 2A4Np も同じグループに分類されたことから、投与日数にはよらず、尿細管壊死を示すものは類似のプロファイルを示すことが分かった。このことから、遺伝子発現プロファイルからメカニズム解析をすることで、より腎臓の尿細管壊死との関連性の高い遺伝子群を見出すことができることが分かり、毒性マーカー探索にもメカニズム解析が有効であることが示された。



↳ Cisplatin (静脈内注射) が含まれるグループ

- ・TBBC
- ・OTA
- ・KBrO₃
- ・Cisplatin(経口)
- ・AMIDOL
- ・2A4Np

尿細管(単細胞)壊死
【髄質外帯】

*カッコの物質は投与1日目のみ所見あり

投与日数が異なっても、(単細胞)壊死が
みられた全ての物質が、同じグループ内
に分類された

図(1)-28 尿細管壊死関連遺伝子 (1,814 遺伝子) を用いた階層的クラスタリング

(3)-3-2-⑤ 腎毒性バイオマーカーの探索

腎毒性バイオマーカー探索において、解析対象の毒性所見としては、げっ歯類を用いた一般毒性試験で出現頻度の高もの(単細胞壊死、空胞変性、核大小不同、核濃縮、壊死/鉍質沈着)に着目して解析を進めた。方法としては図(1)-20 に示すとおり、遺伝子発現プロファイルから化合物を分類した後(第一次候補)、ある毒性症状に特異的な遺伝子群に絞り込んだ(第二候補)。ここで、「(3)-3-2-③ 腎毒性メカニズム: MoA/ AOP 構築(ケーススタディ: シスプラチン)」で選定された毒性メカニズム関連遺伝子を追加して、SVM (support vector machine) による毒性判別式構築において、毒性あり/なしの物質が最も分離できる遺伝子セットを最適条件と、最終的な毒性判定のバイオマーカーとした。

その結果、尿細管の単細胞壊死については、トレーニングデータの 25 試験の中で TBBC、CP (静脈内投与)、CP (強制経口投与) の 3 試験 (2 物質) で観察された (表(1)-12)。そこで、これら 3 試験 (2 物質) で有意に発現変動した遺伝子群のベン図解析を行い、物質間の共通性について調べた。その結果、3 試験 (2 物質) で共通して発現変動したものが第二次候補として 20 プローブ選定された (表(1)-12)。次に、MoA/ AOP 構築で CP の単細胞壊死に関連した遺伝子群と合せて、判別式を最適化したところ、最終的に 10 遺伝子となった (表(1)-12)。

その他の毒性症状 (空胞変性、核大小不同、核濃縮、壊死/鉍質沈着) についても同様に毒性バイオマーカーの探索を行ったところ、それぞれ 3 プローブ、4 プローブ、4 プローブ、9 プローブが選定された (表(1)-12)。

表(1)-12 バイオマーカー候補遺伝子 (腎毒性).

#	毒性症状		2次候補 プローブ数	判別式 (最適条件)	陽性物質名
1	皮質・尿細管	空胞変性	67	→ 3	BDCM、BDCM_I
2	皮質・尿細管	核大小不同	87	→ 4	DMN*
3	皮質・尿細管	核濃縮	8	→ 4	BDCM、BDCM_I、TBA
4	髄質外帯・ 尿細管	単細胞壊死	20	→ 10	TBBC、CP(gav)、 CP(iv)
5	乳頭	壊死/鉍質沈着	37	→ 9	o-AH、Na3-NTA-H2O

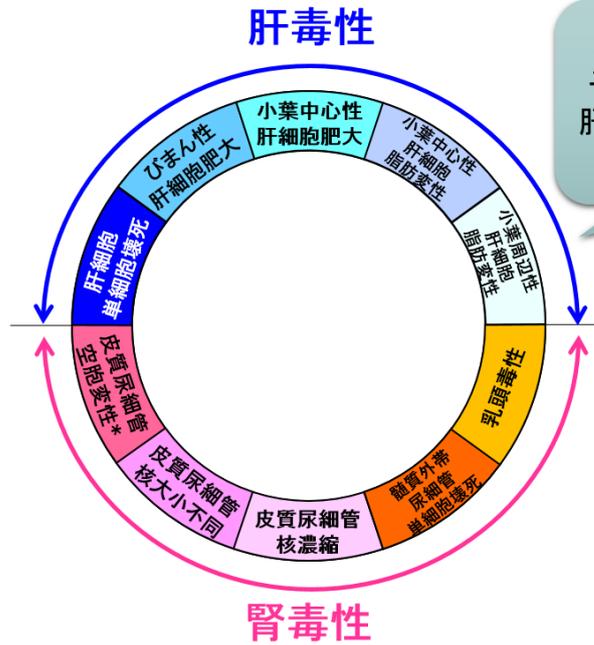
* 対象の陽性物質数が少ないため、個体別データで解析した。

(3)-3-3 毒性判定システムの構築

これまでに同定した肝毒性 (5 種) に関する各毒性バイオマーカー (表(1)-9) と、腎毒性 (5 種) に関する各毒性バイオマーカー (表(1)-12) を用いて、SVM (Support Vector Machine) によって構築した各毒性の判別式については、各化合物に対する判定結果を一度に分かりやすく可視化するために、個別の判定結果をレーダーチャート形式で全てプロットすることで、化合物ごとに一つの結果として表示した (図(1)-28)。まず、トレーニングデータとして 25 試験 (22 物質) の投与 28 日目の高用量群の遺伝子発現量データを用いて、肝毒性 (5 種) と腎毒性 (5 種) を判定した。

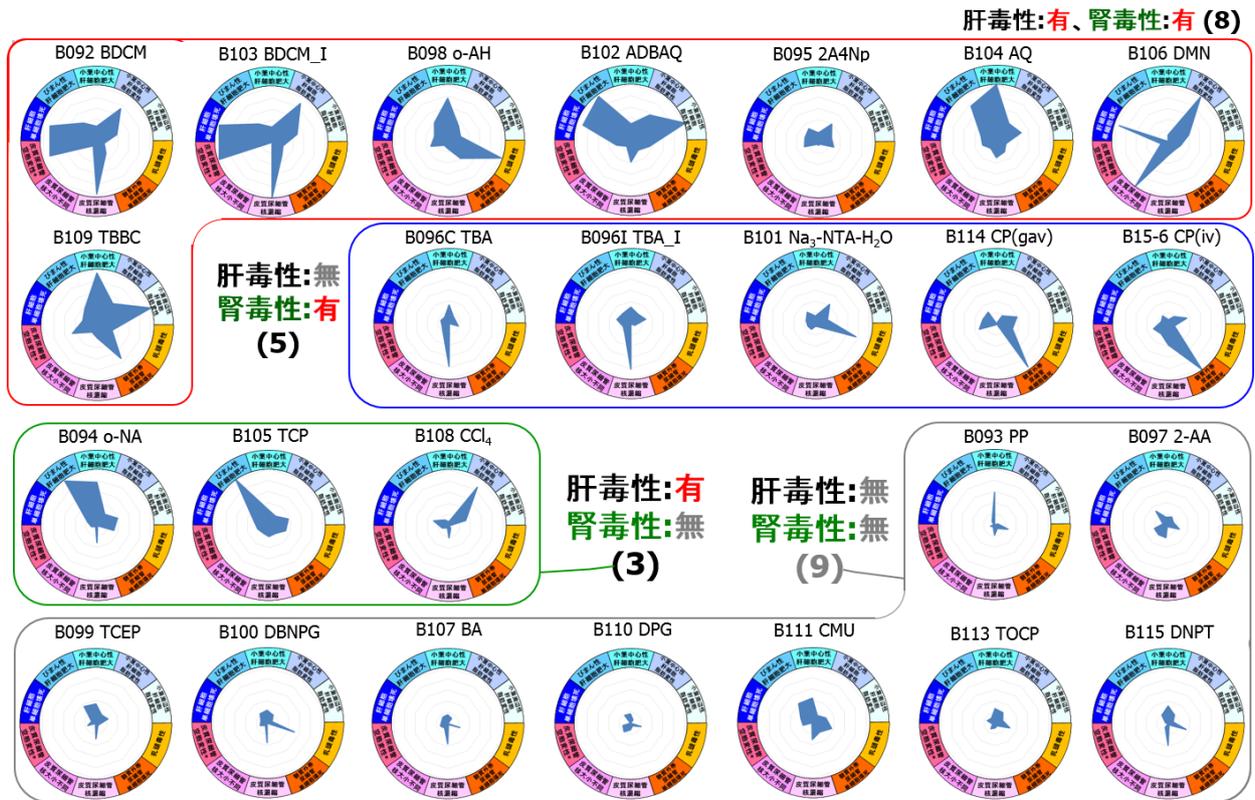
その結果、全体的に投与 28 日目の高用量群で観察された毒性症状に沿った判定結果が得られ、全体の一致率 (10 所見の平均値) は 99.2%と高い値を示した (図(1)-29)。また、CO₂/O₂ 混合麻酔とイソフルラン麻酔に分けて動物実験を行った 2 物質 (BDCM 及び TBA) では、麻酔法が異なった場合でもそれぞれの化合物で非常に類似した予測結果が得られた (図(1)-29)。また、ADBAQ と AQ は基本骨格にアントラキノン系を有する構造類縁体で、両方とも肝毒性を有するものの、発がん性については ADBAQ のみが陽性を示すことが分かっている。本判定結果においても、両者のレーダーチャートの形状は大きく異なることから、28 日間投与でみられる肝毒性についても、遺伝子発現レベルで両化合物の毒性影響に明らかな差異が生じていることが分かった。また、肝毒性も腎毒性も示さなかった 6 物質については、全体的にレーダーチャートの形状が小さかったことから、実際の毒性影響を反映しているものと思われる。

次に、10 試験 (10 物質) をテストデータ (外部データ) として、構築した毒性判定システムの検証を行った。その結果、全体の一致率 (10 所見の平均値) は 96.7%と高い値を示した (図(1)-30)。これらのことから、本研究で構築した毒性判定システムは、判定精度が高いうえに、視覚的に毒性影響を俯瞰して捉えることができるため、非常に有用な方法であると考えられる。また、今後さらに毒性エンドポイントが増加していく場合でもシステムとして対応できるため、拡充性も兼ね備えたシステムを考案することができた。

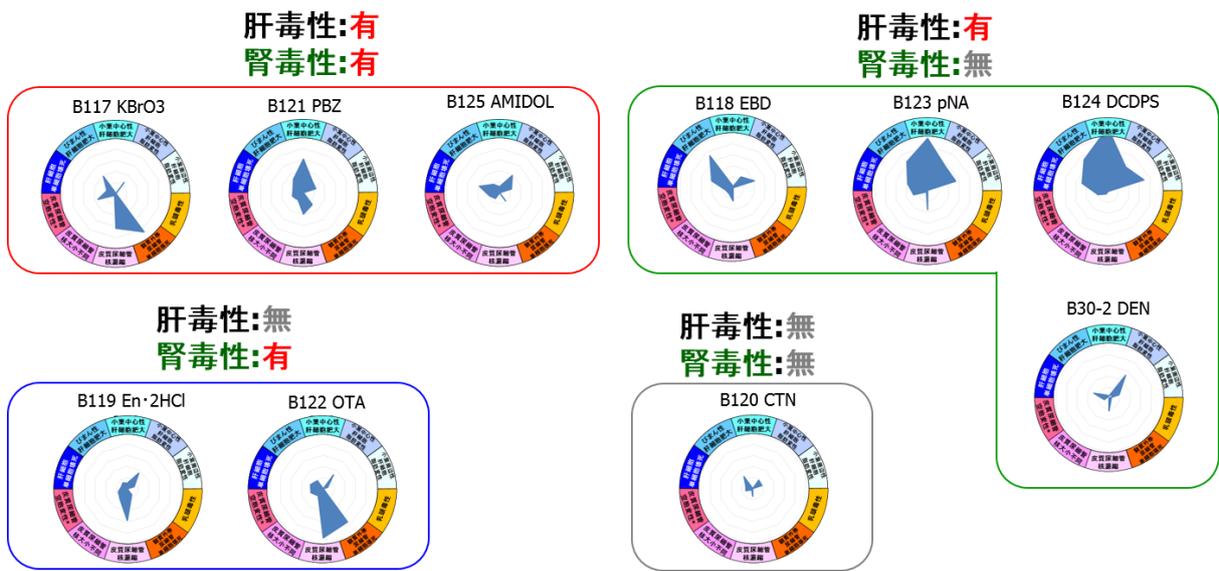


バイオマーカー候補遺伝子→判別式が構築できた肝毒性(5所見)及び腎毒性(5所見)を配置した。

図(1)-28 レーダーチャート形式での判別結果の表示.



図(1)-29 肝毒性及び腎毒性の判定結果 (トレーニングデータ、25 試験).



図(1)-30 肝毒性及び腎毒性の判定結果 (テストデータ、10 試験).

(4) 評価項目に対する自己評価

(4)-1 得られた成果

- ・ 腎臓の部位別採取方法（皮質、髄質外帯、髄質内帯、乳頭）及び部位別の遺伝子発現量データを取得することができ、腎臓からの採取方法についてプロトコルを確立できた。
- ・ 主要臓器（肝臓・腎臓）に対する一般毒性の高精度化及び精緻化に向けて、肝毒性に関しては肝細胞単細胞壊死、肝細胞脂肪変性、肝細胞肥大、肝細胞肥大(小葉周辺性)の4種の毒性症状について、45～165プローブのバイオマーカー候補を選定することができた。腎毒性に関しては単細胞壊死、空胞変性、核大小不同、核濃縮、壊死/鉍質沈着の4種の毒性症状について、10～2,019プローブのバイオマーカー候補を選定することができた。
- ・ 肝毒性及び腎毒性については、それぞれの毒性症状に応じたバイオマーカーを選定し、レーダーチャート形式で視覚的にも分かりやすい毒性判定システムを開発できた。具体的には、肝毒性に関しては5所見（小葉中心性肝細胞脂肪変性、小葉周辺性肝細胞脂肪変性、(単細胞)壊死、小葉中心性肝細胞肥大、びまん性小葉中心性)、腎毒性については5所見（空胞変性、核大小不同、核濃縮、尿管(単細胞)壊死、乳頭壊死)の毒性バイオマーカーを選定し、毒性判定システムを構築できた。肝臓及び腎臓の遺伝子発現量データから毒性判定した一致率は、トレーニングデータ（25試験/22物質）で99.2%（96～100%）、テストデータ（10試験/10物質）で96.7%（80～100%）と高い値を示した。

(4)-2 設定された目標以外に得られた成果

- ・ 麻酔法の検討によりこれまで採用してきたCO₂/O₂混合麻酔に加え、イソフルラン麻酔法も適用できることを示した。また、TGPデータの本法への適用を検討し、適用可能であることが分かったため、TGPで実施していたエーテル麻酔も適用できることが確認でき、実験条件の拡充を図ることができた。
- ・ 試験条件の検討によって、腎臓を部位別に採取して個別に遺伝子発現量解析を行うことが有効と判断されたため、化学物質投与後の腎臓についても全て部位別採取を行うことに決定して研究を進めた。これにより、腎臓の組織特異的な毒性についてより詳細な遺伝子発現量データを取得できるようになり、動物実験で得られた表現型に近い結果を得ることができるようになった。一例として、2-Amino-4-nitrophenolの腎臓・髄質外帯特異的に生じた毒性について、動物試験結果と遺伝子発現量データを部位別に照合して考察し、毒性メカニズムの推定を行うことができ、外部発表を行った。
- ・ 肝毒性については四塩化炭素、腎毒性についてはシスプラチンをケーススタディとして、毒性メカニズムをMoA (Mode of Action) /AOP (Adverse Outcome Pathway) として整理することができた。さらに、このMoA/ AOPに用いた毒性メカニズム関連遺伝子は、物質間で共通した発現変動を示すものがあつたため、毒性判定システムのマーカー遺伝子としても活用できた。
- ・ 最終評価に掲げている「各毒性の発現可能性を検出し得る方法の確立」について、どのような形のものを開発するかは、本プロジェクトにおいて重要なポイントとなるが、この点について、これまでに得られた35

試験（32物質）のバイオマーカー候補遺伝子を利用して、毒性判定システムのプロトタイプ構築を試みた。その結果、複数の毒性症状を一つの結果としてみる事ができるレーダーチャート式に判定結果を表示し、視覚的に毒性影響を俯瞰して捉えることができるシステムを考案した。

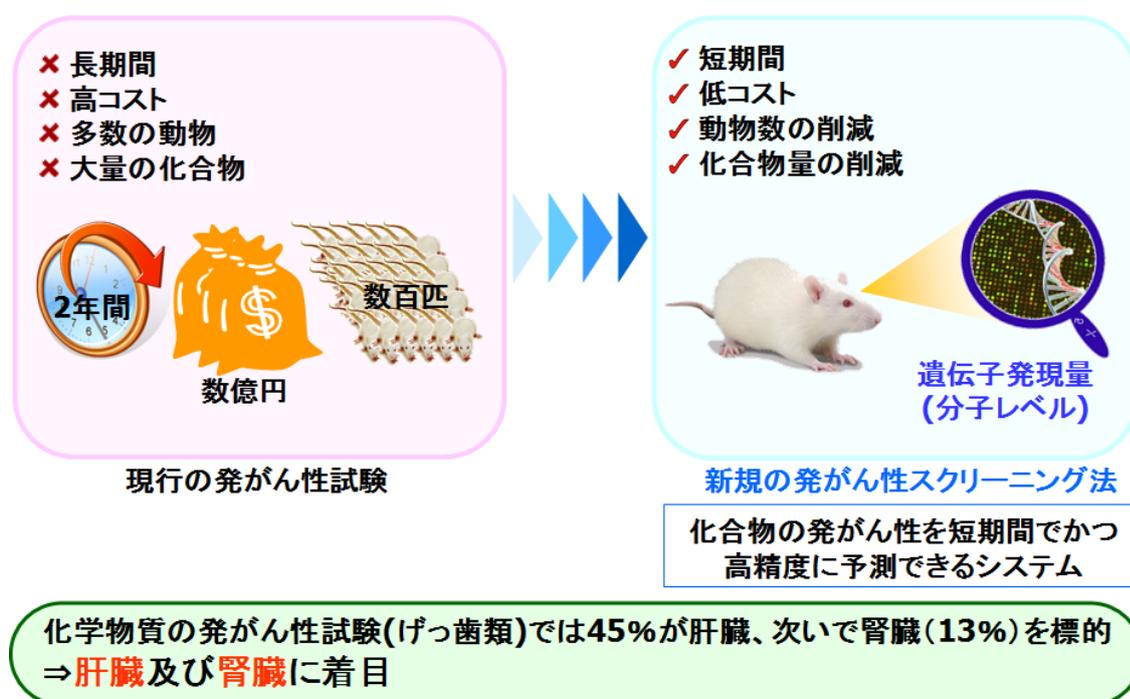
(4)-3 共通指標である、論文の発表、特許の出願、国際標準の形成（OECD での活動）、プロトタイプ の作製等（2.2 論文発表、特許出願状況等を参照）

本プロジェクトの概要及び成果については、2012 年に OECD 会議での発表を行った。また、腎臓の部位別採取方法や腎臓の組織特異的に生じる毒性と遺伝子発現量変化との関係性については、現在論文投稿中である。

2.2.2. 発がん性

(1) 研究開発の概要

化学物質による発がん性は非常に重要な毒性エンドポイントであるにもかかわらず、現行の発がん性試験では長期間の投与実験（2年間）を行うため、多数の実験動物及び大量の化合物が必要となり、非常に高コストで負担の大きいものになっている（図(2)-1）。そのため、ガイドラインに沿った方法で実施された発がん性試験は1,000物質にも満たないのが現状である（NTP; National Toxicology Program）。そこで本プロジェクトでは、化学物質による発がん性で標的性の高い肝臓及び腎臓に着目し、短期間かつ低コストの新規発がん性スクリーニング手法の開発を試みた。具体的には肝臓及び腎臓の遺伝子発現量をマイクロアレイで網羅的に調べることで、早期の発がんマーカー遺伝子を探索し、その変動から長期間投与によって将来的に起こる発がん性を予測することを目標にした。

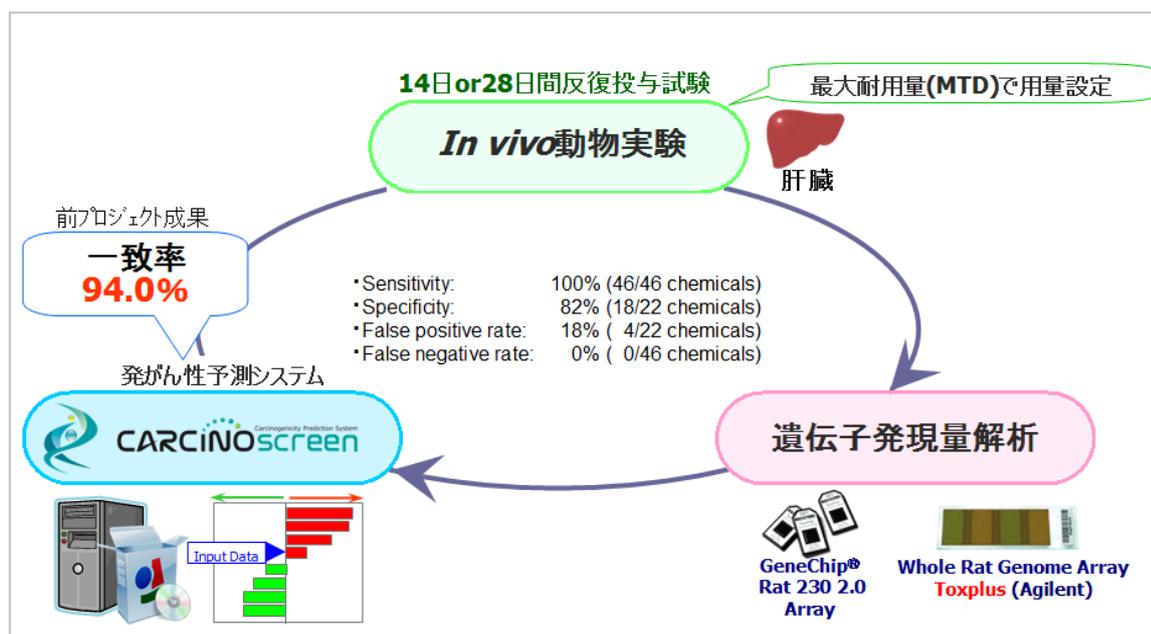


図(2)-1 研究開発の戦略(発がん性).

これまでに前身のプロジェクトを通じて肝臓を標的とした発がん性については、14日間もしくは28日間の反復投与試験後の肝臓サンプルの遺伝子発現量データから、94%の一致率で発がん性を予測できるシステムを既に構築し、CARCINOscreen[®]と名付けた（図(2)-2）。そこで、肝臓については、このCARCINOscreen[®]の精度を確認するため、外部データの取得を行い、発がん性の予測を行うこととした。具体的には、本プロジェクトで得られた35試験（32物質）の肝臓に遺伝子発現量データのCARCINOscreen[®]への適用を行った。次に外部機関で動物実験及びマイクロアレイ実験を実施して取得された遺伝子発現量データ；TGPデータを本システムに供して、どの程度の一致率を示すかを調べた。さらに、

本システムの適用範囲を明確化するため、既存の発がん性スクリーニング手法である中期発がん性試験及び Bhas-42 試験 (*in vitro* 系) との比較を行った。

腎臓については、本プロジェクトで短期発がん性予測手法の開発を開始するため、化学物質投与後の遺伝子発現量データの取得から始めることとした。この際、「(1) 主要臓器(肝臓・腎臓)に対する一般毒性」での検討で、腎臓組織の部位別採取が有効であることが示されたため、腎発がん性予測のためのマーカー遺伝子探索についても部位別に取得された遺伝子発現量データを活用することにした。



図(2)-2 これまでに開発した短期の肝発がん性予測システムの概要。

(2) 短期発がん性予測手法の開発

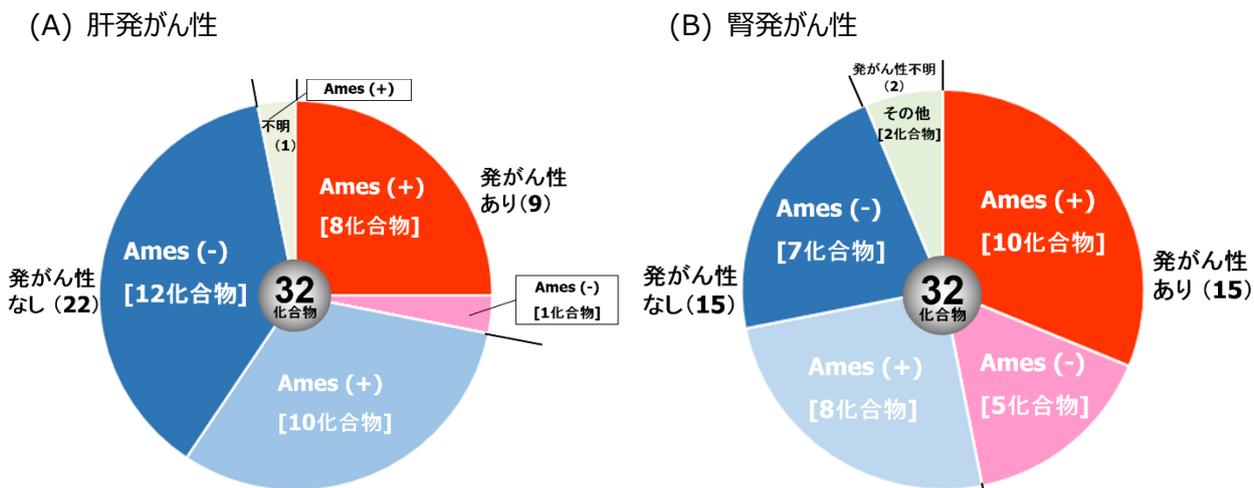
(2)-1 被験物質 (肝発がん及び腎発がん)

肝臓及び腎臓の遺伝子発現量データについては、「(1) 主要臓器(肝臓・腎臓)に対する一般毒性」で取得した 35 試験 (32 物質) のデータを活用した。それらの化学物質の既知の発がん性情報については、表 (2)-1 及び図(2)-3 に示す。なお、腎臓については早期の発がん性バイオマーカー探索から始めるため、腎発がん性を示す物質を優先的に選択した。

表(2)-1 被験物質の発がん性及び変異原性の既知情報.

物質 #	略称	CAS	試験番号	発がん性		変異原性
				肝臓	腎臓	Ames 試験
1	BDCM	75-27-4	B10-0092 B10-0103	(P)	P	N
2	PP	77-09-8	B10-0093	N	P	N
3	o-NA	91-23-6	B10-0094	N	P	P
4	2A4Np	99-57-0	B10-0095	N	P	P
5	TBA	75-65-0	B10-0096(C) B10-0096(I)	N	P	N
6	2-AA	118-92-3	B10-0097	N	N	N
7	o-AH	134-29-2	B10-0098	N	P	P
8	TCEP	115-96-8	B10-0099	E	P	N
9	DBNPG	3296-90-0	B10-0100	N	P(膀胱)	P
10	Na3-NTA-H2O	18662-53-8	B10-0101	N	P(膀胱)	N
11	ADBAQ	81-49-2	B10-0102	P	P	P
12	AQ	84-65-1	B10-0104	N	P	P
13	TCP	96-18-4	B10-0105	N	P	P
14	DMN	62-75-9	B10-0106	P	P	P
15	BA	140-11-4	B10-0107	N	N	N
16	CCl4	56-23-5	B10-0108	P	N	N
17	TBBC	96-69-5	B10-0109	N	N	N
18	DPG	25265-71-8	B10-0110	N	N	N
19	CMU	150-68-5	B10-0111	P	P	N
20	KBrO3	7758-01-2	B10-0112 B30-0002	N	P	P
21	TOCP	1330-78-5	B10-0113	N	N	N
22	CP	15663-27-1	B10-0114 B15-0006	P	P	P
23	DNPT	101-25-7	B10-0115	N	NT	P
24	EBD	106-93-4	B30-0002	N.C.	N	P
25	En·2HCl	333-18-6	B10-0119	N	N	N
26	CTN	1897-45-6	B10-0120	N	P	N
27	PBZ	50-33-9	B10-0121	N	N.C.	N
28	OTA	303-47-9	B10-0122	N	P	N
29	pNA	100-17-4	B10-0123	N.C.	N	P
30	DCDPS	80-07-9	B10-0124	N	N	N
31	AMIDOL	137-09-7	B10-0125	N	N	P
32	DEN	55-18-5	B30-0002	P	N	P

P; 陽性、N; 陰性、(P); 雌ラット肝臓で陽性、N.C.; 不明 (not clear)



図(2)-3 被験物質の毒性分類 (発がん性).

(2)-2 実験方法

(2)-2-1 動物実験

「(1)3.2.1 動物実験」に記載した内容と同じ方法で実施した。

(2)-2-2 遺伝子発現量解析

「(1)3.2.2 遺伝子発現量解析」に記載した内容と同じ方法で実施した。

(2)-2-3 肝発がん性の短期予測手法の開発

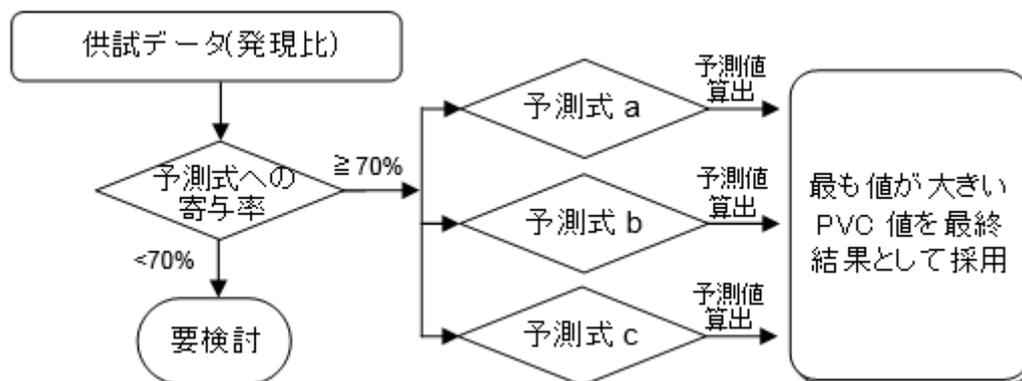
(2)-2-3-① 肝発がん (予測システムの検証)

本研究で取得した肝臓の遺伝子発現量データが CARCINOscreen[®]に供することができるかを確認するために、解析可能と判断された予測遺伝子の寄与率を集計した。CARCINOscreen[®]予測システムは、発がん性のメカニズム別に構築した3種類の異なる発がん性予測式から成り立っているため (Matsumoto et al., 2009; Matsumoto et al., 2011)、各発がん性予測式について寄与率が70%以上を示した場合を合格とした (図(2)-4)。次に、CARCINOscreen[®]予測システムに含まれる全ての発がん性予測式にアレイデータを供し、最も値が大きな予測値 (PVC 値; the Prediction Value of CARCINOscreen[®]) を最終結果として採用した。

また、外部データを用いた予測システムの検証では厚生労働省 TGP (トキシコゲノミクスプロジェクト) データを活用した。TGP データについては、発がん性の有無が明確になっている40物質について14日間反復投与試験を行った遺伝子発現量データ (GeneChip[®]を使用) を用いて (表(2)-2 及び表(2)-3)、CARCINOscreen[®]によって肝発がん性を予測した。

さらに、類似のスクリーニング手法として、中期発がん性試験 (11物質、表(2)-4) 及び *in vitro* Bhas42

試験 (22 物質、表(2)-5) における予測精度の比較を行った。



図(2)-4 CARCINOscreen[®] 予測システムの概要.

表(2)-2 実験条件(TGP データ).

項目	内容
生物種/系統/性別	Crj:CD(SD)IGS ラット、雄
投与開始時の週齢	6 週齢
動物	用量設定
	公比√10
実験	群構成
	媒体対照、低用量、中用量、高用量(3 匹/群)
	投与期間
	14 日間反復投与
	麻酔方法
	エーテル麻酔
GE	マイクロアレイ
	GeneChip [®] Rat Genome 230 2.0 Array

表(2)-3 TGP データの化合物一覧.

#	化合物	略称	投与量(mg/kg/day) ^{*1}			TD ₅₀ ^{*2}	C ^{*3}	M ^{*4}
			L	M	H			
1	2-Acetamidofluorene	2AAF	30	100	300	1.22	+	+
2	Carbon tetrachloride	CCL4	30	100	300	529	+	-
3	Clofibrate	CFB	30	100	300	169	+	-
4	Ethanol	ETN	400	1,200	4,000	9,110	+	-
5	Ethionine	ET	25	80	250	5.24	+	-
6	Fenofibrate	FFB	10	100	1000	--	+	?
7	Gemfibrozil	GFZ	30	100	300	247	+	?
8	Hexachlorobenzene	HCB	30	100	300	3.86	+	-
9	Methapyrilene	MP	10	30	100	9.13	+	-
10	Monocrotaline	MCT	3	10	30	0.94	+	-

#	化合物	略称	投与量(mg/kg/day) ^{*1}			TD ₅₀ ^{*2}	C ^{*3}	M ^{*4}
			L	M	H			
11	N-Nitrosodiethylamine	DEN	3	10	30	0.052	+	+
12	Phenobarbital	PB	10	30	100	--	+	+
13	Tamoxifen	TMX	6	20	60	--	+	?
14	Thioacetamide	TAA	4.5	15	45	11.5	+	-
15	WY-14643	WY	10	30	100	--	+	?
16	Allopurinol	APL	15	50	150	--	-	?
17	Allyl alcohol	AA	3	10	30	--	-	-
18	Aspirin	ASA	45	150	450	--	-	-
19	Chlorpheniramine	CHL	3	10	30	--	-	?
20	Cimetidine	CIM	100	300	1,000	--	-	?
21	Coumarin	CMA	15	50	150	--	-	+
22	Cyclosporine A	CSA	10	30	100	--	-	-
23	Disulfiram	DSF	60	200	600	--	-	-
24	Etoposide	ETP	3	10	30	--	-	?
25	Furosemide	FUR	30	100	300	--	-	-
26	Glibenclamide	GBC	100	300	1,000	--	-	?
27	Ibuprofen	IBU	20	60	200	--	-	?
28	Isoniazid	INAH	50	100	200	--	-	+
29	Labetalol	LBT	45	150	450	--	-	?
30	Metformin	MFM	100	300	1,000	--	-	?
31	Methyldopa	MDP	60	200	600	--	-	?
32	Pemoline	PML	7.5	25	75	--	-	?
33	Penicillamine	PEN	100	300	1,000	--	-	?
34	Perhexiline	PH	15	50	150	--	-	?
35	Promethazine	PMZ	20	60	200	--	-	?
36	Ranitidine	RAN	100	300	1,000	--	-	?
37	Tannic acid	TAN	100	300	1,000	--	-	+
38	Tetracycline	TC	100	300	1,000	--	-	?
39	Theophylline	TEO	20	60	200	--	-	-
40	Tolbutamide	TLB	100	300	1,000	--	-	-

*1 L; 低用量, M; 中用量, H; 高用量.

*2 TD₅₀; ラット肝臓における TD₅₀ 値(mg/kg/day; carcinogenic potency database)で,--はラット肝臓の TD₅₀ 値が得られなかったものを示す.

*3 C; ラット肝臓がん性 (2年間の投与試験)の結果で+が陽性、-が陰性を示す.

*4 M; 変異原性 (Ames)の結果で+が陽性、-が陰性、?が情報がなかったものを示す.

表(2)-4 中期発がん性試験^{*1}の化合物一覧.

#	化合物	C ^{*2}	M ^{*3}
1	Quinoline	+	+

#	化合物	C*2	M*3
2	Safrole	+	+
3	MeIQx	+	+
4	Phenobarbital	+	-
5	Hexachlorobenzene	+	-
6	α -Hexachlorocyclohexane	+	-
7	Thioacetamide	+	-
8	Urethane	+	-
9	Chlorendic acid	+	-
10	DDT	+	-
11	Caprolactam	-	-

*1 中期発がん性試験は Hasegawa R. *et al.*, 1992 より引用.

*2 C; ラット肝発がん性 (2年間の投与試験) の結果で + が陽性、- が陰性を示す.

*3 M; 変異原性 (Ames) の結果で + が陽性、- が陰性を示す.

表(2)-5 *n vitro* Bhas42 試験*1の化合物一覧.

#	化合物	C*2	M*3
1	2,4-Diaminotoluene	+	+
2	2-Acetylaminofluorene	+	+
3	1,4-Dioxane	+	-
4	Methyl carbamate	+	-
5	Urethane	+	-
6	Benz[a]anthracene	+	+
7	3-Methylcholanthrene	+	+
8	Benzo[a]pyrene	+	+
9	Quercetin	+	+
10	MNNG	+	+
11	d-Limonene	+	-
12	Diethylstilbestrol	+	-
13	2,6-Diaminotoluene	-	+
14	8-Hydroxyquinoline	-	+
15	2-Chloroethanol	-	+
16	p-Phenylenediamine 2HCl	-	+
17	4-Acetylaminofluorene	-	+
18	D-Mannitol	-	-
19	Caprolactam	-	-

#	化合物	C*2	M*3
20	Tetracycline hydrochloride	-	-
21	Benzoin	-	-
22	Tetracycline hydrochloride	-	-

*1 Bhas42 assay は Sakai A. et al., 2010 より引用.

*2 C; ラット肝発がん性 (2年間の投与試験) の結果で+が陽性、-が陰性を示す.

*3 M; 変異原性 (Ames) の結果で+が陽性、-が陰性を示す.

(2)-2-3-② 定量 PCR 法による簡易発がん性評価法の構築

マイクロアレイ測定に基づいた短期発がん性予測システム CARCINOscreen®について、より簡便な方法で発がん性を予測できるかを検討するために、遺伝子発現量の測定法として、より簡便な手法である定量 PCR (polymerase chain reaction) とし、発がん性予測の判定方法も、標準法 (マイクロアレイ測定法) の 15 遺伝子を用いた専用数式を用いるのではなく、最適化した 4 遺伝子を発がん性予測の測定対象遺伝子として、判定を簡便化した。

1) 被験物質

測定対象の化合物は、トレーニングデータとして 29 物質 (表(2)-6)、バリデーションデータとして 22 物質 (表(2)-7) を選定した。

表(2)-6 定量 PCR 測定に用いた化合物 (トレーニングデータ: 29 物質, F344 ラット)

Chemical	CAS	Vender ¹	Dose ₂	V ³	Expected results ⁴	Standard Decision
Diethylnitrosamine	55-18-5	B	20	DW	+	True
N-Nitrosomorpholine	59-89-2	B	10	DW	+	True
2-Acetylaminofluorene	53-96-3	A	6	CO	+	True
2-Nitropropane	79-46-9	A	40	CO	+	True
2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4-5-f]quinoxaline	77500-04-0	D	20	CMC	+	True
3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene	55-80-1	B	50	CO	+	True
Benz[a]anthracene	56-55-3	B	50	CO	+	True
4-Dimethylaminoazobenzene	60-11-7	C	50	CO	+	True
1,4-Dioxane	123-91-1	C	1,000	DW	+	True
Thioacetamide	62-55-5	C	20	DW	+	True
Clofibrate	637-07-0	A	250	CO	+	True
Di(2-ethylhexyl)phthalate	117-81-7	A	300	CO	+	True

Chemical	CAS	Vender ¹	Dose ₂	V ³	Expected results ⁴	Standard Decision
α-Hexachlorocyclohexane	319-84-6	C	20	CO	+	True
Butylated hydroxyanisole	25013-16-5	C	750	CO	+	True
Phenobarbital	50-06-6	C	100	DW	+	True
Chloroform	67-66-3	A	90	CO	+	True
Diethylstilbestrol	56-53-1	B	10	CO	+	True
Hexachlorobenzene	118-74-1	A	5	CO	+	True
Trichloroethylene	79-01-6	A	700	CO	+	True
Benzo[a]pyrene	50-32-8	C	15	CO	+	True
2,6-Diaminotoluene	823-40-5	A	10	DW	-	True
4-Nitroanthranilic acid	619-17-0	B	1,000	CO	-	True
γ-Hexachlorocyclohexane	58-89-9	A	10	CO	-	True
L-Ascorbic acid	50-81-7	C	1,000	DW	-	True
2-Chloroethanol	107-07-3	A	40	DW	-	True
2-Chloromethylpyridine HCl	6959-47-3	B	150	DW	-	True
Sodium benzoate	532-32-1	C	1,000	DW	-	True
Indomethacin	53-86-1	C	5	CO	-	True
Aspirin	50-78-2	A	27	CO	-	True

¹: A; Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA), B; Tokyo chemical Co., Ltd (Tokyo, Japan), C; Wako pure chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan), D; Nard institute Ltd. (Hyogo, Japan).

²: mg/kg/day.

³: V; Vehicle (投与に用いた媒体), CO; Corn oil, DW; Distilled water, CMC; 1% Carboxymethylcellulose sodium solution.

⁴: Expected results;げつ歯類に対する発がん性, +; 陽性, -; 陰性.

表(2)-7 定量 PCR 測定に用いた化合物 (バリデーションデータ: 22 物質)

Chemical	CAS	Vender ¹	Dose ₂	V ³	Strain	Expected results ⁴	Standard Decision
4-Aminoazobenzene	60-09-3	C	50	CO	F344	+	True
1-Amino-2-methylantraquinone	82-28-0	A	150	CO	F344	+	True
o-Nitrotoluene	88-72-2	B	300	CO	F344	+	True
3-(4-Chlorophenyl)-1,1-dimethylurea	150-68-5	A	250	CO	F344	+	True

Chemical	CAS	Ven- der ¹	Dose ²	V ³	Strain	Expected results ⁴	Standard Decision
Tetracycline hydrochloride	64-75-5	A	1,000	DW	F344	-	True
2,4-Diaminotoluene	95-80-7	C	15	DW	SD	+	True
1,2,3-Trichloropropane	96-18-4	B	75	CO	SD	+	True
Cisplatin	15663-27-1	C	3.75	DW	SD	+	True
1,2-Dibromoethane	106-93-4	B	75	CO	SD	+	True
Clofibrate	637-07-0	B	250	CO	SD	+	True
Di(2-ethylhexyl)phthalate	117-81-7	A	300	CO	SD	+	True
Thioacetamide	62-55-5	C	20	DW	SD	+	True
Benzyl Acetate	140-11-4	B	1,000	CO	SD	+	True
Carbon tetrachloride	56-23-5	C	100	CO	SD	+	True
3-(4-Chlorophenyl)-1,1-dimethylurea	150-68-5	A	200	CO	SD	+	True
2,6-Diaminotoluene	823-40-5	A	15	DW	SD	-	False
2-Chloromethylpyridine HCl	6959-47-3	B	150	DW	SD	-	True
Tricresyl Phosphate	101-25-7	C	200	CO	SD	-	False
Sodium benzoate	532-32-1	C	1,000	DW	SD	-	True
4,4'-Thiobis(6-tert-butyl-m-cresol)	96-69-5	B	300	CO	SD	-	True
Dipropylene glycol	25265-71-8	C	1,000	DW	SD	-	True
Sulfone, bis(p-chlorophenyl)	80-07-9	B	250	CO	SD	-	True

¹: A; Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA), B; Tokyo chemical Co., Ltd (Tokyo, Japan), C; Wako pure chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan).

²: mg/kg/day.

³: V; Vehicle (投与に用いた媒体), CO; Corn oil, DW; Distilled water.

⁴: Expected results;げっ歯類に対する発がん性, +; 陽性, -; 陰性.

2) 保存 RNA の品質検査及び逆転写反応 (cDNA 合成)

既に RNA 抽出を実施し、-80℃保存した肝臓由来の total RNA サンプル (3 匹/群、媒体対照群及び高用量群) について、「(1)3.2.2 遺伝子発現量解析」に記載されたバイオアナライザによる RNA 品質 (分解度) の確認と同様の方法で RNA の品質検査を行った。RNA Integrity Number (RIN) 値が 7.0 以上のものを合格として、本研究に用いた。

Total RNA の出発量としては、500 ng~5 µg として、ThermoScript™ RT-PCR System (Invitrogen) を用いた逆転写反応を行った。なお、反応系に用いた試薬は表(2)-8 及び表(2)-9 に示す。

表(2)-8 プライマー-Mix の組成

試薬名	1 反応
Total RNA	X µL
Oligo (dT) ₂₀ Primer	0.5 µL
Random-hexamer Primer	0.5 µL
dNTP mix (10 mM)	2.0 µL
DEPC-treated water	9.0-X µL
	12.0 µL

Total RNA (9 µL) に、3.0 µL のプライマー-Mix を添加し、65℃で 5 分間反応後、氷上で 3 分間冷却した。その後、RT マスター-Mix を調製し、8.0 µL ずつ添加して、25℃, 10 分→55℃, 60 分→85℃, 5 分で反応させた後、氷上で 5 分間以上冷却して、-20℃以下で保存した。

表(2)-9 RT マスター-Mix の組成

RT マスター-Mix	1 反応
5×First-Strand Buffer	4.0 µL
0.1M DTT	1.0 µL
RNaseOUT (40 unit/µL)*	1.0 µL
DEPC-treated water	1.0 µL
ThermoScript™ RT (15 units/µL)*	1.0 µL
*氷冷保存	8.0 µL

3) 定量 PCR 測定及び発がん性の判定方法

発がん性予測遺伝子の最小セット (4 遺伝子) と内部標準遺伝子 Gapdh の合計 5 遺伝子 (表(2)-10) について、表(2)-11 に示したキット/試薬を用いて定量 PCR 測定を行った。なお、出発量は 50 pg ~5 ng/µLとし、同一サンプル内では測定対象遺伝子と内部標準遺伝子との間で同一濃度を用いた。得られたサイクル数については、内部標準遺伝子 Gapdh に対する比率を算出した後、媒体対照群に対する高用量群の発現比を算出した。発がん性予測の判定としては、発がん性予測遺伝子の最小セット (4 遺伝子) のうち、3 遺伝子 (Abcb1b, Igh-6, Eprs) の何れかが媒体対照群に対して 2 倍以上の発現増加、もしくは 1 遺伝子 (Map3k8) が媒体対照群に対して 0.5 倍以下に発現減少した場合を陽性と判定した。

表(2)-10 定量 PCR 測定に用いた遺伝子名及びプライマー配列

Gene symbol	GeneName	Gene ID	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Ampl icon size (bp)
Abcb1b	ATP-binding cassette, subfamily B (MDR/TAP), member 1B	24646	TCATGAGCTGGGAGTA TTTGAGG	GTCTCTGAAGGCTTCT CGTCTTG	130
Igh-6	immunoglobulin heavy chain 6	299357	GAATGGAACTCCGGAG AGAC	GTGTGGGTTTACCAGT GGAC	103
Eprs	glutamyl-prolyl-tRNA synthetase	289352	CCGATTGCCATCCGTC CTA	GCACCGATGGTTGAGC CTGA	102
Map3k8	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	116596	GCCCAGTCTGATGACC ATGTG	GCAGCGACTCTGAATG TTCCTT	62
Gapdh	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	24383	GGCACAGTCAAGGCTG AGAATG	ATGGTGGTGAAGACGC CAGTA	143

表(2)-11 用いた試薬及び機器

項目	試薬/機器名、反応条件	メーカー
定量 PCR (反応)	SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)	TAKARA
反応温度	95°C 00:30 × 1 回 95°C 00:05, (50-60) °C* 00:34 × 35 回 95°C 00:15, 60°C 1:00, 95°C 00:15 × 1 回	—
定量 PCR (測定)	ABI PRIZM7000	Applied Biosystems
内部標準遺伝子	GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)	TAKARA

(2)-2-3-③ 肝発がん性評価に用いた遺伝子のメカニズム等の解析・考察

発がんに至るまでのプロセスの中で、肝発がん性評価に用いた遺伝子の遺伝子発現量がどのように変化するかを調べるために、Diethylnitrosamine (DEN) の 90 日間反復投与毒性試験で得られた肝臓サンプルの遺伝子発現量データと動物試験結果 (特に病理組織学的変化) から MoA (Mode of Action) /AOP (Adverse Outcome Pathway) を構築し、肝発がんメカニズムの考察を行った。さらに、CARCINOscreen® 予測システムで用いている遺伝子がどのように関与しているかを調べた。

(2)-2-4 腎発がん性の短期予測手法の開発

(2)-2-4-① 腎発がん性の短期予測手法の構築

腎臓については、組織構造が肝臓に比べて複雑なため、発がんの標的臓器部位が異なる可能性が考えられた。そこで、本プロジェクトでは、腎臓を皮質、髄質外帯、髄質内帯、乳頭に分けて、個別に遺伝子発現量データを取得した。腎臓における既知の発がん性情報では、尿細管を標的としたものが最も多かったことから、尿細

管を主に含む皮質 と髄質外帯のデータを用いて発がん性予測式作成に着手した。早期の腎発がん性予測に関連するマーカー遺伝子の探索は表(2)-12 に、判別式構築については、表(2)-13 に記載の方法で実施した。

さらに、構築した判別式については、外部データに対する予測精度を確認するため、10 試験 (10 物質) の高用量群のマイクロアレイデータを用いて腎発がん性の予測を行った (表(2)-14)。

表(2)-12 腎発がんマーカー候補遺伝子の選定条件 (トレーニングデータ)。

実施項目	方法	補足情報
対象データ	25 試験 (22 物質)	皮質、髄質外帯
化合物のグループ化	階層的クラスタリング	1,7,14,28 日、高用量群のデータを使用
バイオマーカー候補の選定	Welch's t-test	<ul style="list-style-type: none"> ・全ての物質で A フラグを示す遺伝子を除外 ・発がん性物質と非発がん性物質群との間で有意差検定を実施して遺伝子候補(1 次)を選定 ・1 次選定リストで発がん性物質グループの 70%以上の物質で変動*し、かつ非発がん性物質群の 40%以下の物質でのみ変動する遺伝子(1.5 倍以上もしくは 1/1.5 倍以下)を候補遺伝子として選定

表(2)-13 腎発がん性予測式構築の条件 (トレーニングデータ).

実施項目	実施内容
対象データ	35 試験 (32 物質)
判別式の構築	SVM (Support Vector Machine)
予測式の最適化	Random calculation

表(2)-14 腎発がん性予測式構築の条件 (検証データ).

実施項目	実施内容
対象データ	10 試験 (10 物質)

(2)-2-4-② 腎発がん性評価に用いた遺伝子のメカニズム等の解析・考察

腎発がんに至るまでのプロセスの中で、遺伝子発現量がどのように変化するかを調べるために、腎発がん性物質であるシスプラチン (Cisplatin; B15-0006/ B10-0114) の 28 日間反復投与毒性試験で得られた 1 日、7 日、14 日、28 日間投与後の腎臓サンプル (特に髄質外帯) の遺伝子発現量データと動物試験結果 (特に病理組織学的変化) から MoA (Mode of Action) /AOP (Adverse Outcome Pathway) を構築し、腎発がんメカニズムの考察を行った。

(2)-3 結果

(2)-3-1 肝発がん性の短期予測手法の開発

(2)-3-1-① 本プロジェクトで取得した遺伝子発現量データ

本プロジェクトで取得した 35 試験 (32 物質) の 28 日間反復投与後の肝臓における遺伝子発現量データを CARCINOscreen[®]へ供して PVC 値を算出した。その結果、既知の肝発がん性物質の 9 物質 (11 試験) については、pNA を除いてすべて正しく発がん性ありと予測された (図(2)-5)。非発がん性物質については、Marginal と判定された 1 試験 (2-AA) を除くと、6 物質で偽陽性と判定された (図(2)-5)。その結果、全体の正答率 (Concordance) としては 78.8%を示し、陽性一致率 (Sensitivity) は 90.9%と非常に高い値を示した (表(2)-15)。一方で陰性一致率 (Specificity) は 72.7%と若干低かった (表 IV-3-3-2-3)。

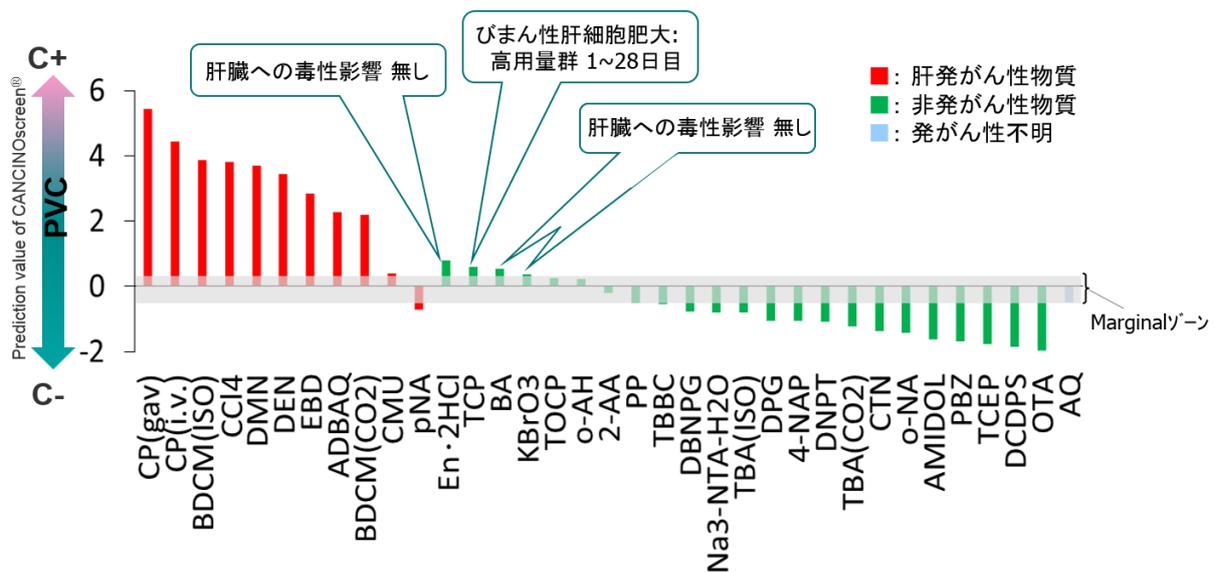
非発がん性物質で偽陽性と判定された 6 物質のうち、2 物質 (TOCP 及び o-AH) は PVC 値が低く、Marginal に近い値を示したものの、4 物質については若干高い PVC 値を示した。本研究で実施した 28 日間反復投与試験では、TCP を除いて肝臓への毒性影響は認められなかったものの、既知の発がん性試験では、TCP では、雄ラットでは対照群と各投与群との間に有意差はなかったものの、傾向検定で肝臓腫瘍の増加傾向との報告があり、マウスでは雌雄ともに肝発がん性陽性の物質であった (NTP TR 384)。En・2HCl は、ラットの 90 日、2 年間混餌投与試験で肝細胞異型性が認められていることから (Khandelwal et al., 1980)、この肝臓における増殖性変化が影響している可能性が考えられた。BA では、ラットで発がん性を示す報告はなかったものの、マウスでは強制経口投与で 1,000 mg/kg/day で肝臓腫瘍の増加を示したとの報告があった (NTP TR 431)。KBrO3 では、ラット 2 年間飲水投与試験で、雄に肝臓腫瘍を認められていた (Kurokawa et al., 1986)。これらの報告から仮にこの 4 物質を一致率の算出から除外した場合、89.7% (26/29 試験) と高い数値を示した。このことから、CARCINOscreen[®]はバリデーションデータに対しても一定の精度で発がん性を予測できることが確認できた。

これらの結果より CARCINOscreen[®]は陰性物質を含めて高い予測精度を示すことが確認できた。

表(2)-15 ラット肝臓での発がん性予測結果(CARCINOscreen[®]) ; 一致率

	高用量群 (28 日間投与)
Concordance	78.8% (26 / 33)
Sensitivity	90.9% (10 / 11)
Specificity	72.7% (16 / 22)
False Positive	27.3% (6 / 22)
False Negative	9.1% (1 / 10)

* 肝発がん性が不明だった 1 試験 (AQ) 及び Marginal と判定された 1 試験 (2AA) を除いた 33 試験 (30 物質) で集計した。



図(2)-5 CARCINOscreen®による予測結果(肝臓、28日目、高用量)。

CARCINOscreen®の判定結果で+が陽性(カッコ付きは雌ラット肝臓で陽性)、±がMarginal、-が陰性を示す。

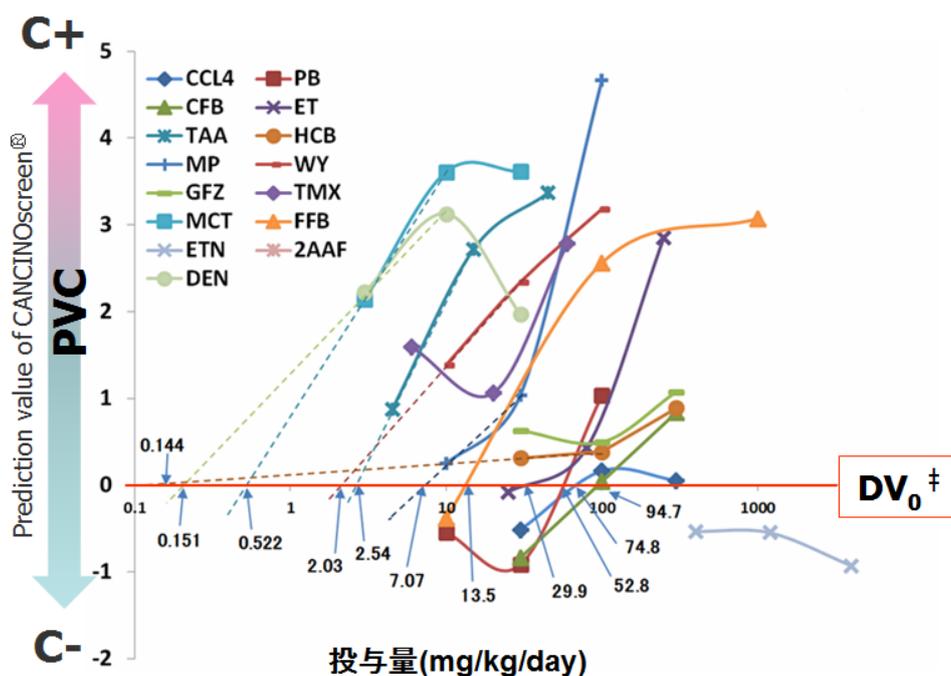
(2)-3-1-② TGPで取得された遺伝子発現量データ

外部機関で取得された遺伝子発現量データに対する CARCINOscreen®の適用性を調べるために、TGPデータベースであるTG-GATEから、40物質(発がん性; 15物質、非発がん性; 25物質)の14日間反復投与と試験後の肝臓の遺伝子発現量データ(GeneChip®を使用)をダウンロードし、データチェックを行った後、媒体対照群に対する投与群(低用量、中用量、高用量)の発現比を算出した。それらのデータをCARCINOscreen®に供して一致率を調べたところ、低用量群で85%、中用量群で95%、高用量群で92.5%と高い予測結果を得ることができた(表(2)-16)。次に、発がん性を示す15物質について、CARCINOscreen®で得られたPVC値と用量との関係性を調べた。その結果、低用量群では発がん性なし(陰性)と判定される物質がいくつかみられ、全体的に用量相関的にPVC値が増加する傾向を示すことが分かった(図(2)-6)。このことが、表(2)-16で得られた予測結果において、低用量群では陽性一致率(Sensitivity)が60%と低かった原因となり、全体の一致率が3用量群の中で最も低いことに繋がっていた。一方で、高用量群では陽性一致率が93.3%と3用量群の中で最も高かったものの、陰性一致率は中用量では100%だったのに対し、高用量群では92.0%と低下した(表(2)-16)。このことから、全体の一致率では中用量群で95%だったのに対して高用量群では92.5%と若干値が下がったことが分かった。これらの検討より、投与量とCARCINOscreen®による予測結果(PVC値)にはある一定の関係性があることが示唆された。

そこで、3用量の用量反応曲線からPVC値が0(ゼロ)になる投与量、すなわちDV₀値を算出し、既存の発がん性試験で得られているTD₅₀値との相関性を調べた。その結果、両者の相関係数は0.8を示し、比較的高い値を示すことが分かった(図(2)-7)。以上の結果より、CARCINOscreen®による予測結果(PVC値)で定量的評価ができる可能性が示唆された。

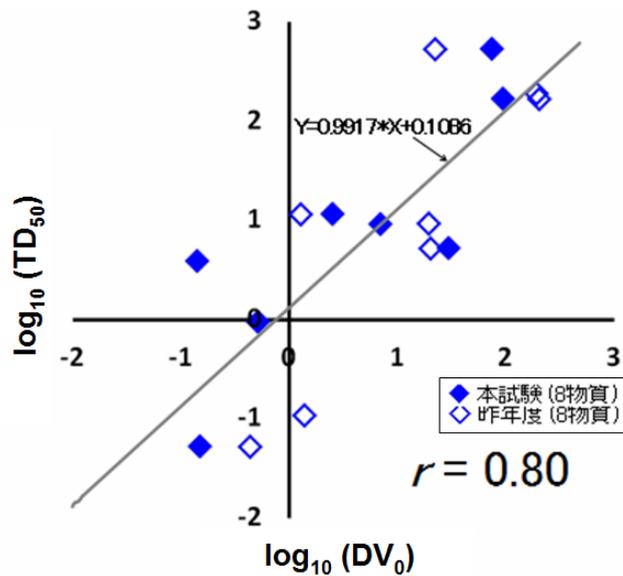
表(2)-16 TGPデータの予測結果(40物質)。

CARCINOscreen [®] による予測結果			
	低用量	中用量	高用量
Concordance	85.0% (34/40)	95.0% (38/40)	92.5% (37/40)
Sensitivity	60.0% (9/15)	86.7% (13/15)	93.3% (14/15)
Specificity	100% (25/25)	100% (25/25)	92.0% (23/25)
False Positive	0% (0/25)	0% (0/25)	8.0% (2/25)
False Negative	40.0% (6/15)	13.3% (2/15)	6.7% (1/15)



図(2)-6 PVC 値と用量との関係性(15 物質、肝臓、14 日目).

‡ DV₀ ; Doses at which the predictive Value curves crossed zero.



図(2)-7 DV_0 値と TD_{50} 値との相関性.

(2)-3-1-③ 他の発がん性スクリーニング手法との比較

次に、新たに開発した CARCINOscreen[®]の適用範囲を確認するため、既存の発がん性のスクリーニング手法として用いられている中期発がん性試験及び Bhas42 試験 (*in vitro*) との結果の比較を行った。なお、予測結果の比較については、両試験で予測結果が得られているものを解析対象とし、中期発がん性試験では 11 物質、Bhas42 試験では 22 物質について比較を行った。その結果、中期発がん性試験との比較では、両試験ともラット肝臓を標的とした発がん性物質で、変異発がん性物質 (3 物質) 及び非変異発がん性物質 (7 物質) を全て正しく予測することができた。また、非発がん性物質 (1 物質) についても両試験で陰性と正しく判定できた。全体の一致率としては両試験とも 100%を示し、11 物質と少なかったものの、CARCINOscreen[®]は中期発がん性試験とほぼ同等の検出力を有していることが確認できた (表(2)-17)。

次に *in vitro* 系の発がん性スクリーニング手法である Bhas42 試験との比較を行った。その結果、Bhas42 試験では非変異発がん性物質の 3 物質、ラット肝臓以外の発がん性物質の 1 物質、陰性物質の 3 物質の合計 7 物質が正答しなかった。CARCINOscreen[®]ではラット肝臓以外の発がん性物質の 2 物質、陰性物質の 1 物質の合計 3 物質が正答しなかった。正答率としては、Bhas42 試験で 68.2%、CARCINOscreen[®]で 86.4%となり、CARCINOscreen[®]の方が高い予測精度を有することが分かった (表(2)-17)。

このことから、28 日間の投与期間にも関わらず、肝臓の遺伝子発現プロファイルから長期毒性としての発がん性を予測できる CARCINOscreen[®]は、他のスクリーニング手法に比べても一定の予測精度を有していることが確認できた。

表(2)-17 中期発がん性試験 (11 物質) 及び Bhas42 試験との比較 (22 物質).

	中期発がん性試験 (ラット肝発がん物質のみ)		Bhas42 assay	
	中期発がん性試験*	CARCINOscreen®	Bhas42 assay [†]	CARCINOscreen®
Concordance	100% (11/11)	100% (11/11)	68.2% (15/22)	86.4% (19/22)
Sensitivity	100% (10/10)	100% (10/10)	66.7% (8/12)	83.3% (10/12)
Specificity	100% (1/1)	100% (1/1)	70.0% (7/10)	90.0% (9/10)
False Positive	0% (0/1)	0% (0/1)	30.0% (3/10)	10.0% (1/10)
False Negative	0% (0/10)	0% (0/10)	33.3% (4/12)	16.7% (2/12)

* 中期発がん性試験 (Hasegawa R. *et al.*, 1992), CARCINOscreen® ToxIII, 投与28日目

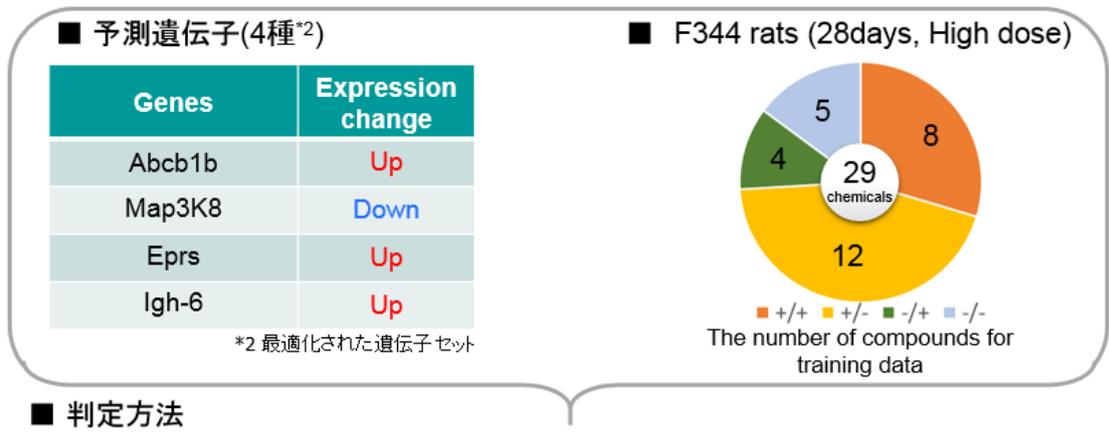
† Bhas42 assay (Sakai A. *et al.*, 2010)のInitiation assay若しくはPromotion assayの何れかでPositiveであれば発がん性あり、両assayでNegativeであれば発がん性なし。

(2)-3-1-④ 定量 PCR 法による簡易発がん性評価法の構築

環境中の化学物質の発がん性は、人間にとって最も重要な毒性エンドポイント一つであり、これまでに我々は、マイクロアレイ測定に基づく短期発がん性予測システム：CARCINOscreen®を開発してきた。本システムはラット肝発がん性を90%以上の精度で予測できる有望なツールであるが (Matsumoto *et al.*, 2014)、遺伝子発現量の測定には特殊な装置を必要とし、熟練したバイオインフォマティクス技術がデータ解析に必要とされている。

そこで、我々は、マイクロアレイ解析ベースの CARCINOscreen®に代わるプラットフォームとして、定量 PCR 測定ベースのシステムの開発を試みた。まず、予測遺伝子セットの最小化を行い、候補遺伝子セットの 3,150 の組合せの中から最終的に4つの予測遺伝子 (Abcb1b, Eprs, Map3K8、および Igh-6) を選択した。また、定性的な簡易発がん性判定法を開発し、トレーニングデータとして 29 物質を予測したところ (図(2)-8)、82.8%の一致率を示した (表(2)-18)。開発した本簡易法の検証として、22 物質を予測したところ、86.4%の精度でラットにおける化学物質の肝臓癌誘発を予測することができることを示した (表(2)-19)。定量 PCR 法による簡易発がん性予測法は、予測性能だけでなく、その使いやすさとコスト効率の良さから、有害性評価への応用が期待される。このように、開発した定量 PCR 法による簡易発がん性予測法は、レギュラトリーサイエンスにおいて、化学物質の発がん性を予測するための有望なツールになると考えられる (Saito *et al.*, 2016)。

なお、本成果は、OECD でのテストガイドライン化を目指して、OECD の Preliminary SPSF 案を作成し、2016 年 6 月に OECD へ提出した。2016 年 10 月現在、各国からのコメントに対応しているところである。



■ 判定方法

4種の予測遺伝子のうち、いずれか1遺伝子でも2倍以上(3遺伝子)もしくは1/2倍以下(1遺伝子)を示せば、“発がん性あり”と判定

図(2)-8 定量 PCR による簡易発がん性予測手法の概要

表(2)-18 ラット肝臓での簡易発がん性予測結果 (トレーニングデータ) ; 一致率

	高用量群 (28 日間投与)
Concordance	82.8% (24 / 29)
Sensitivity	80.0% (16 / 20)
Specificity	88.9% (8 / 9)
False Positive	11.1% (1 / 9)
False Negative	20.0% (4 / 20)

表(2)-19 ラット肝臓での簡易発がん性予測結果 (バリデーションデータ) ; 一致率

	高用量群 (28 日間投与)
Concordance	86.4% (19 / 22)
Sensitivity	78.6% (11 / 14)
Specificity	100.0% (8 / 8)
False Positive	0.0% (0 / 8)
False Negative	21.4% (3 / 14)

(2)-3-1-⑤ 肝発がん性評価に用いた遺伝子のメカニズム等の解析・考察

肝発がん性評価に用いた遺伝子のメカニズム等の解析・考察として、90日間(13週間)反復投与試験を実施した Diethylnitrosamine (DEN) をケーススタディとした。DEN は肝臓内の cytochrome P450 2E1 (Cyp2E1) の働きによって代謝され (Yamazaki *et al.*, 1991; IARC Monographs)、N-nitrosoethyl-n-(2-hydroxyethyl)amineやN-nitrosoethyl-n-(carboxymethyl)amine等の代謝産物を生成することが知られている。また、代謝産物の一つであるN-nitrosoethyl-n-(2-hydroxyethyl)amineはDNAとの付加体を形成し、変異原性を有することが報告

されている (Scherer *et al.*, 1991)。本解析データでは、Cyp2E1 の有意な発現増加はみられなかったものの、多くの cytochrome P450 (Cyp26A1, Cyp26B1, Cyp2B6, Cyp2C12, Cyp2C18, Cyp2C70, Cyp2C79, Cyp2C80) の有意な発現増加が認められたことから、これらの Cyp が DEN 代謝に関与している可能性が考えられた (図(2)-9)。また、投与初期の 14 日投与群から、がん抑制遺伝子である p53 signaling パスウェイが活性化しており、DNA ダメージによって活性化する p53 自体の有意な発現増加がみられ、その働きを抑制する Mdm2 の有意な発現増加もみられたことから (図(2)-10)、p53 の働きが活性化している可能性が示唆された。そのターゲット遺伝子で細胞周期を停止させる p21 やアポトーシスを誘導する Bax, Perp, Puma, Fas の発現増加もみられたことから (図(2)-10)、アポトーシスが誘導されている可能性が考えられた。また、p53 signaling パスウェイには含まれていないものの、アポトーシス誘導因子として、Caspase 類 (Casp1, Casp2, Casp3, Casp4, Casp7, Casp12) の発現増加もみられた (図(2)-11)。病理組織学的検査において、14 日投与群の高用量群で軽微なアポトーシスが観察されていたことから (表(2)-20)、これらの遺伝子群の発現増加を支持する結果である。また、発現増加した遺伝子群で有意性が高かった機能としては、「Cell Death and Survival」、「Organismal Injury and Abnormalities」があり、細胞障害 (Cell injury) が生じている可能性が考えられた (図(2)-11)。また、「Cellular Growth and Proliferation」の有意性も投与 28 日投与群から 6 週投与群で高くなっており、細胞周期の亢進から細胞増殖につながっている可能性が考えられた (図(2)-11)。「Cellular Movement」の有意性が 14 日、28 日、6 週投与群にかけて経時的に増加しており、これらの遺伝子は炎症応答に伴う血液系細胞の走化性に関与する遺伝子群であった (図(2)-11)。DEN 投与により、アポトーシスだけではなくネクローシスも生じている可能性が考えられ、その細胞死に伴う炎症応答である可能性が示唆された。

一方、有意に発現減少した遺伝子群に関する機能分類では、投与期間に依存して、有意性が高まるものが数多くみられ、それらの機能は肝機能として重要な「Lipid Metabolism」、「Amino Acid Metabolism」、「Vitamin and Mineral Metabolism」、「Energy Production」であった (図(2)-12)。特に投与 10 週目以降にその有意性が高くなる傾向にあったため、これらの機能が DEN 投与によって抑制されている可能性が考えられた。また、「Molecular Transport」についても、投与 10 週目以降にその有意性が高くなる傾向にあり、DEN 投与が進むにつれて、分子輸送能が低下している可能性が考えられた (図(2)-12)。DEN 投与による経時的な遺伝子発現量変化で、有意に変動した遺伝子数をカウントしたところ、14 日から 28 日投与群にかけて増加するものの、6 週から 8 週投与群でいったんその数が減少し、10 週以降に再び増加傾向を示すことが分かっている (図IV-3-2-01-3-0)。この結果より、DEN 投与初期と後期では肝臓の状態に変化が生じており、その転換点が投与 6~8 週にあるのではないかと推察した。そこで、有意に発現増加した遺伝子群の中で、投与初期で有意性が増加し、投与 8 週前後で有意性がいったん下がり、その後、再び増加するパターンを示す遺伝子機能を調べた。その結果、上記のような有意性のパターンを示すものに「Cellular Development」があり、この機能に分類された遺伝子群について、投与処理の 14 日投与群 (280 遺伝子) と投与後期の 10 週投与群 (328 遺伝子) を比較したところ、83 遺伝子は両投与日数で共通していたものの、7 割以上の遺伝子が投与日数特異的な発現増加を示していた (図(2)-13)。「Cellular Development」について投与日数特異的に発現増加した遺伝子を調べたところ、14 日投与群では転写因子の割合が高く、細胞増殖に関連した機能が活性化していることが分かった (図(2)-13)。また、成長因子としては、3 種 (MDK, NGF, TGFA) の有意な増加がみられ、これらは肝細胞の発達に関係している遺伝子であることが報告されており、MDK

(Midkine) は HepG2 で発現が認められており (Huang *et al.*, 2015)、Hepatocellular carcinoma での発現増加も報告されていた (Zhong *et al.*, 2015)。NGF (nerve growth factor) は肝臓の線維化に関与しているとの報告が (Amoras *et al.*, 2015)、TGFA (transforming growth factor alpha) は肝硬変や肝臓における腫瘍性病変との報告があり (Jaskiewicz *et al.*, 1995)、何れの遺伝子も肝臓の増殖性変化や腫瘍性変化と関係している遺伝子であった。一方、10 週間投与群では、転写因子の割合は 14 日間投与に比べて少なくなり、成長因子の数が増えていた。また、10 週間投与で特異的に発現していた成長因子 (BMP5、FGF1、KITLG、NRG2、PDGFA、PTN) は、通常では肝臓以外での発現が認められているものが多く、骨や神経、大腸など発現量が多いものが含まれていた。このことから、DEN 投与で有意に発現した「Cellular Development」関連の遺伝子は、投与初期では、肝細胞の増殖性変化や腫瘍性病変に関与するものが特異的に発現しているものの、投与が進むにつれて、肝臓以外で発現する遺伝子群が有意に増加することが分かった。これにより、病理所見として増殖性変化/腫瘍性病変がみられる段階になると、肝臓以外で特異的に発現する成長因子が有意に発現増加してくることから、肝細胞の発達・成長に異常が生じている可能性が考えられた。

また、これらの異常細胞の増加により、本来、肝機能として重要な「Lipid Metabolism」、「Amino Acid Metabolism」、「Vitamin and Mineral Metabolism」、「Energy Production」に異常をきたし、投与日数が進むにつれて、これらの遺伝子群の発現量低下が著しくなった可能性が考えられた。また、「Molecular Transport」についても投与後期の 10 週投与群から有意な発現量低下がみられたことから、肝細胞の異物代謝能についても低下している可能性が示唆された。

その他にも、病理所見として Oval cell (卵円形細胞) の過形成がみられ、DEN 投与によって、ネクローシスやアポトーシス、細胞障害で失われた肝細胞を補おうとして、Oval cell が出現したものと考えられた。また、この段階で、異常な細胞分化・発達も生じていると推察された。また、投与後期の 10 週投与群で特異的に発現増加した成長因子に FGF1 (fibroblast growth factor 1) があり、FGF1 と FGF2 をノックアウトしたマウスでは肝臓の線維化が減少したことから、これらの遺伝子は肝臓の線維化に重要な役割を果たすことが報告されており (Yu *et al.*, 2003)、本研究でも有意な増加がみられ、さらに、軽微であるものの、10 週間投与及び 13 週間投与で肝臓の線維化がみられたことから、遺伝子発現レベルでのその変化が検出されていることが確認できた。また、13 週間投与後の肝臓組織を GST-P で免疫染色したところ、低用量群でも高用量群でも GST-P 陽性肝細胞巣が確認でき、さらに用量依存的に面積が増加していることが分かった (図(2)-14)。

これら一連の遺伝子発現量変化と病理組織学的検査の結果を MoA (Mode of Action) /AOP (Adverse Outcome Pathway) として、図(2)-15 にまとめた。この中で、発がん性予測遺伝子がどのように関与しているかを調べたところ、予測遺伝子の一つである Abcb1b は遺伝子機能としては、transport に関与しており (Probert *et al.*, 2014)、本研究では投与 14 日から 18 週まで有意な発現増加を維持することが確認できた (図(2)-15)。もう一つの予測遺伝子である Ccng1 は細胞周期に関係しており (Smith *et al.*, 1997)、この遺伝子についても投与 14 日投与群から 18 週投与群まで有意な発現増加を維持することが確認できた (図(2)-15)。このことから、腫瘍性病変が見られない 14 日間もしくは 28 日間投与後の肝臓の遺伝子発現量データから構築した CARCINOscreen® に用いた発がん性予測遺伝子は、発がんメカニズムの初期に関与しており、さらに、投与日数が進み、腫瘍性病変が認められる状態になっても、有意な発現増加が維持されることが分かった。

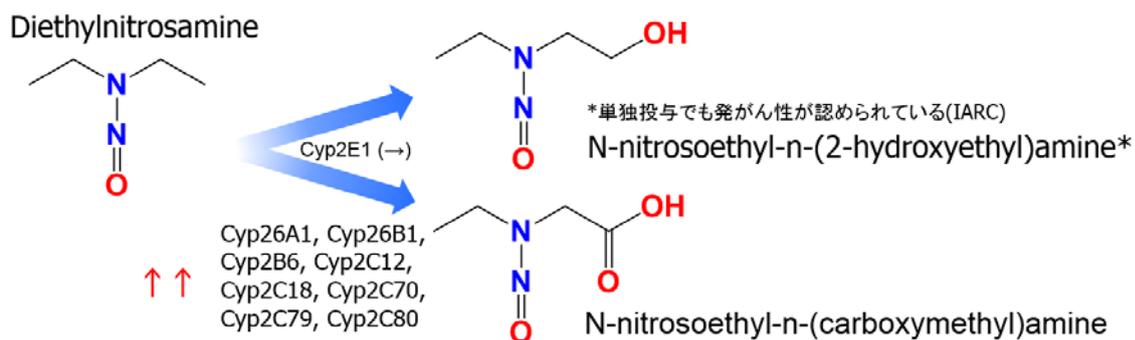
本研究により、遺伝子発現量解析と病理組織学的変化から、投与初期から発がんに至るまでのメカニズムについて、MoA (Mode of Action) /AOP (Adverse Outcome Pathway) を作成することができた。また、発がん性予測遺伝子については、投与初期から増殖性病変/腫瘍性病変が生じるまで変化が継続していたことから、発がん性を予測できる妥当性を確認することができた。

表(2)-20 DEN 投与による影響 (動物実験)

	2週間投与後	4週間(28日間)投与後	6週間投与後	8週間投与後	10週間投与後	13週間(90日間)投与後
剖検	影響なし	影響なし	影響なし	影響なし	高用量: 白色部 1/5	高用量: 白色部 10/10
器官重量	影響なし	影響なし	高用量: 絶対・相対重量↓	高用量: 絶対・相対重量↓	高用量: 絶対・相対重量↓	高用量: 絶対・相対重量↓
病理組織学的検査	高用量: Apoptosis-c (±) 4/5	高用量: Apoptosis-c (+) 5/5	高用量: Apoptosis-c (+) 5/5	高用量: Fibrosis-c (±) 1/5	高用量: Fibrosis-c (±) 2/5 Pigment-c (+) 4/5	高用量: Fibrosis-c (±) 2/10 Pigment-c (±) 3/10
			高用量: E-foci (±) 1/5	高用量: B-foci (±) 3/5 E-foci (±/+) 3/5	高用量: B-foci (±/+/++) 3/5 E-foci (+/+/+/++) 5/5 OCH (++) 1/5 低用量: B-foci (±) 1/5	高用量: Adenoma 1/10 B-foci (+) 10/10 C-foci (+) 1/10 E-Foci (+/+/+/+) 10/10 M-foci (+) 1/10 OCH (+) 6/10 低用量: B-foci (+) 3/10 E-foci (±/+) 9/10

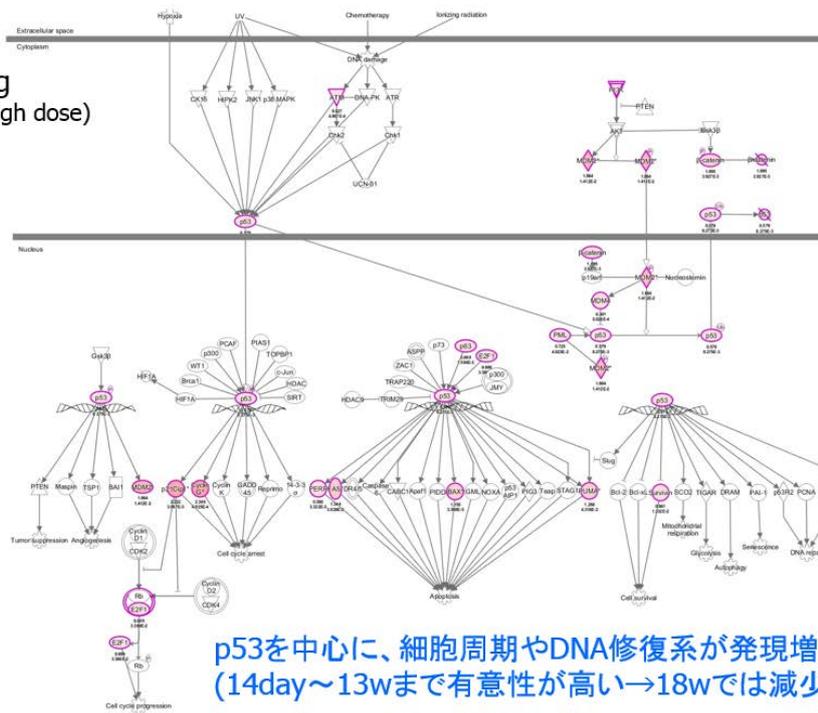
Apoptosis-c:小葉中心性アポトーシス、Fibrosis-c:小葉中心性線維化、Pigment-c:小葉中心性色素沈着

E-foci:好酸性変異肝細胞巢、B-foci:好塩基性変異肝細胞巢、C-foci:明細胞性変異肝細胞巢、M-Foci:混合型変異肝細胞巢、OCH:卵円形細胞過形成



図(2)-9 生体内でのDENの代謝

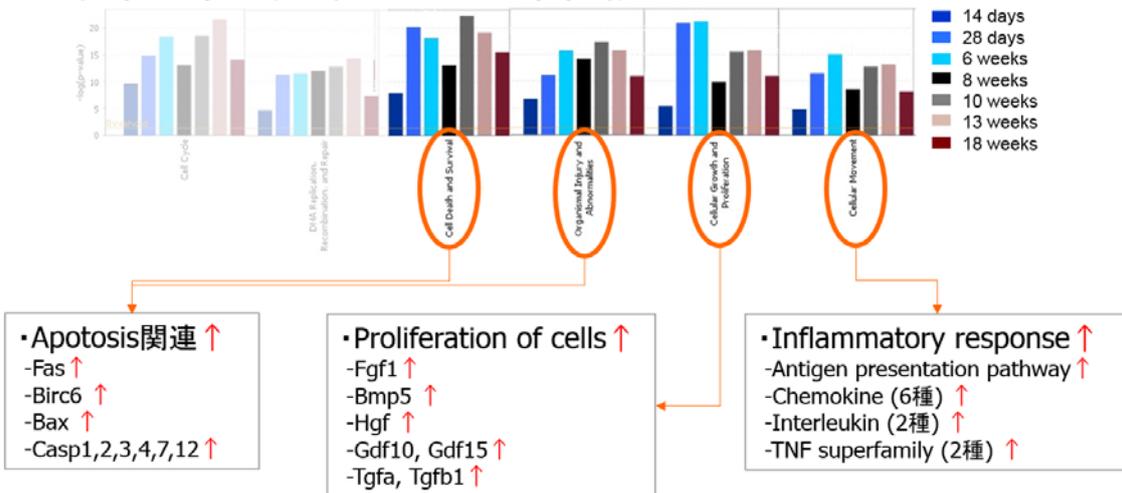
p53 signaling
(14day, Liver, High dose)



p53を中心に、細胞周期やDNA修復系が発現増加している
(14day~13wまで有意性が高い→18wでは減少)

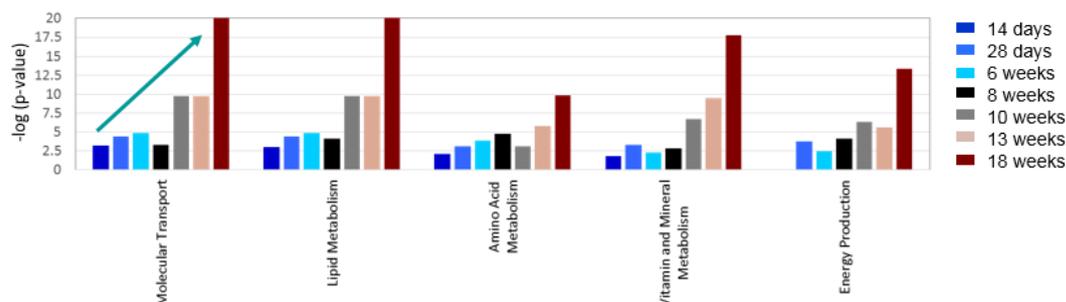
図(2)-10 DEN 投与後の p53 signaling パスウェイの変化

● Up-regulated genes (14 day~18 weeks, 4.0 mg/kg/day)



図(2)-11 DEN 投与後に発現増加した遺伝子の機能 (14日~18週間投与)

● **down-regulated genes** (14 day~18w, 4.0 mg/kg/day)



〔発現量が低下した遺伝子群〕

・『分子輸送』、『脂質代謝』、『アミノ酸代謝』、『ビタミン/ミネラル代謝』、『エネルギー産生』は、投与1日目で有意性が低いものの、投与後期にかけて有意性が経時的に増加する傾向がみられた

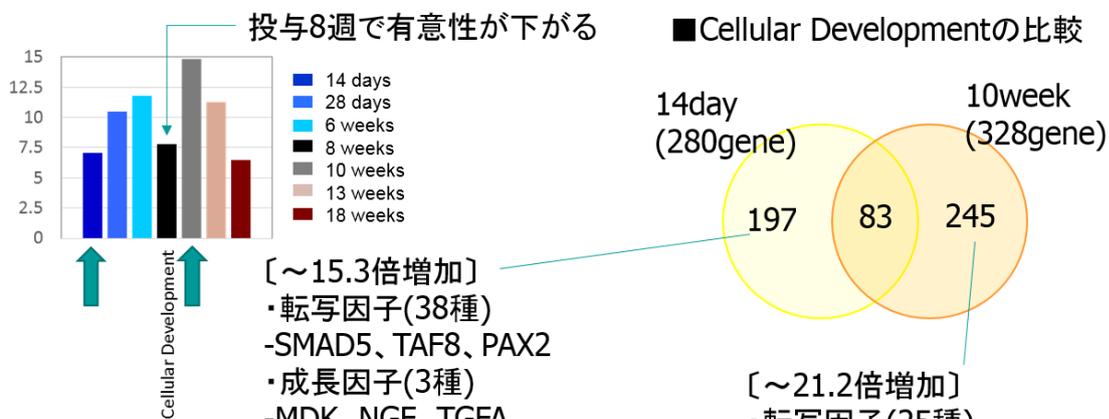
→DEN投与が進むにつれて、代謝、輸送などの機能低下が徐々に生じる

→投与後期(10~18W)では特に機能低下が著しい

→**肝細胞腺腫、肝細胞がんでは肝細胞がもつ本来の機能が失われている可能性が高い**

図(2)-12 DEN 投与後に発現減少した遺伝子の機能 (14 日~18 週間投与)

● **Up-regulated genes** (14 day~18w, 4.0 mg/kg/day)



〔~15.3倍増加〕

・転写因子(38種)
-SMAD5、TAF8、PAX2

・成長因子(3種)

-MDK、NGF、TGFA

→細胞増殖に関与するものが多く、成長因子も肝細胞に関与している

〔~21.2倍増加〕

・転写因子(25種)

-FOXM1、FOXN4

・成長因子(6種)

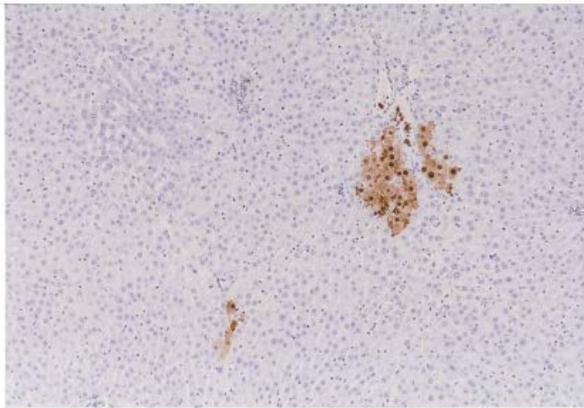
-BMP5、FGF1、KITLG、NRG2、

PDGFA、PTN

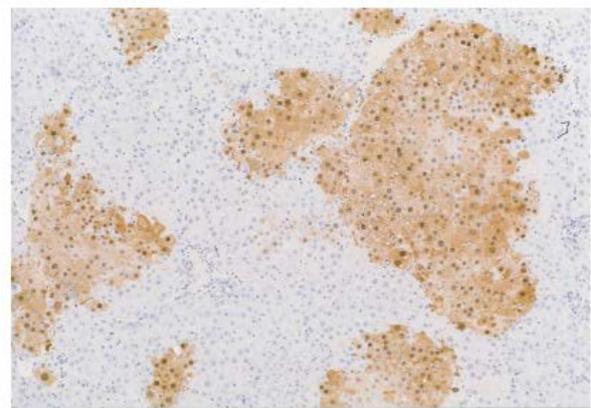
→肝細胞以外の成長に関与するものが多い

投与初期と後期では、細胞の発達に関する遺伝子の種類に違いがある

図(2)-13 「Cellular Development」に関連した遺伝子群の比較 (14 日と 10 週間投与)

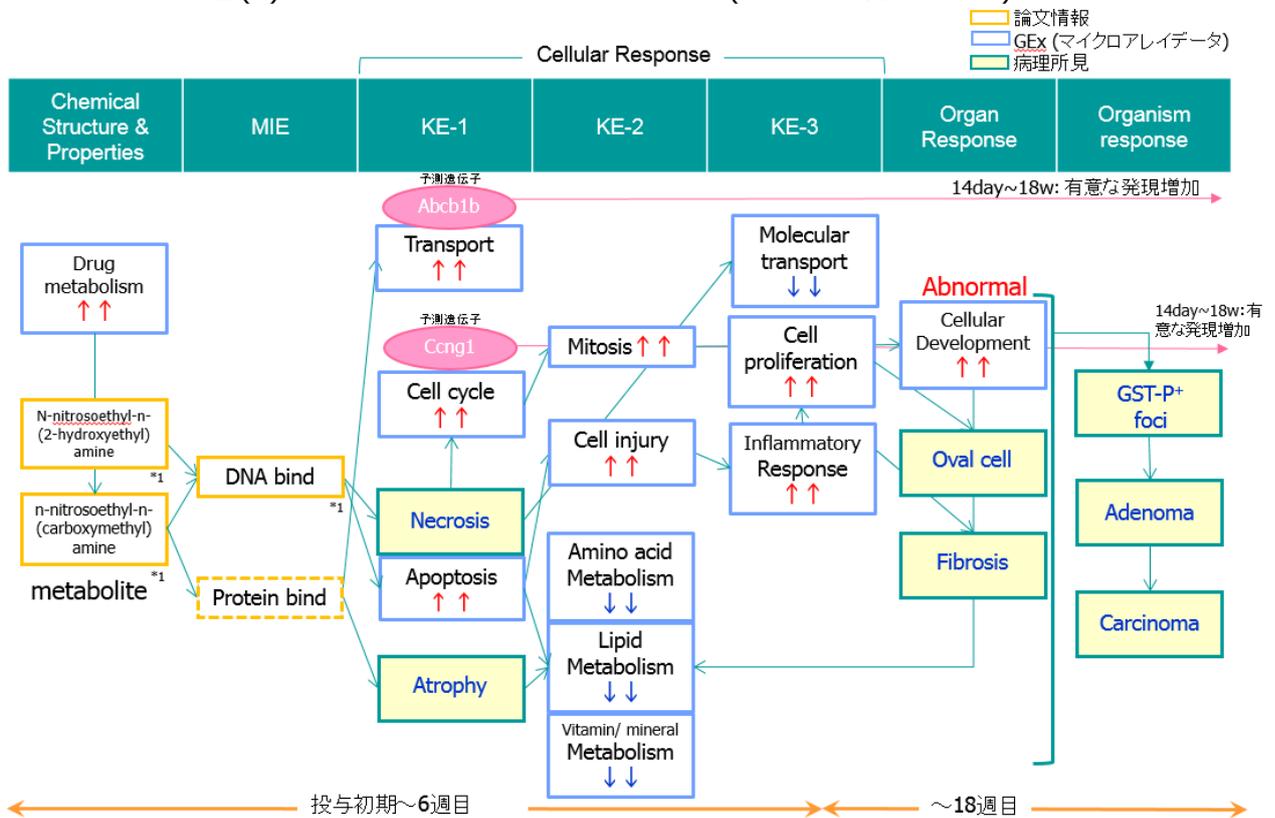


0.8 mg/kg/day (13週間投与)
GST-P⁺肝細胞巢



4 mg/kg/day (13週間投与)
GST-P⁺肝細胞巢

図(2)-14 病理組織学的検査結果：肝臓 (GST-P 免疫組織化学)



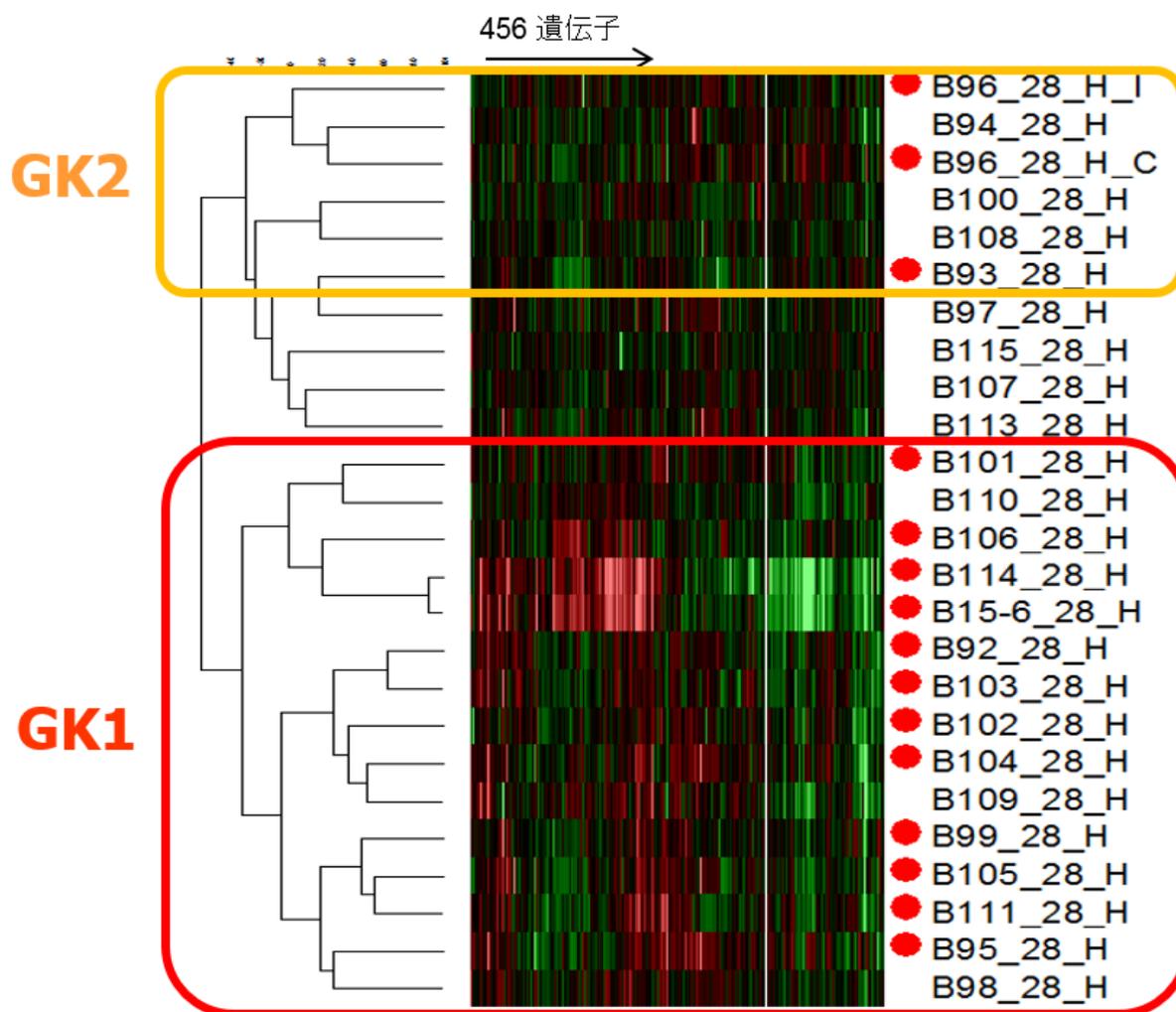
図(2)-15 DENによる肝毒性/肝発がん性メカニズム：MoA/AOP (案)

(2)-3-2 腎発がん性の短期予測手法の開発

(2)-3-2-① 腎発がん性の短期予測手法の構築

腎臓の発がん性については、その所見を調べたところ、尿細管がんを示す物質が腎発がん性物質の多数を占めることが分かった。そこで、皮質及び髄質外帯の遺伝子発現量データを中心に解析し、尿細管がんに関連したバイオマーカー候補遺伝子の探索を行うこととした。まず、25 試験 (22 物質) をトレーニングデータセット

トとし、腎発がん性陽性物質：3 物質以上で発現増加もしくは減少を示す遺伝子群（456 プローブ）を選定し、階層的クラスタリングによって化合物の分類を行った。その結果、腎発がん性グループとして大きく 2 種があることを見出し、グループ 1 (GK1) では腎発がん性陽性物質が 12 物質、グループ 2 (GK2) では 3 物質含まれていた (図(2)-16)。



図(2)-16 遺伝子発現量データの階層的クラスタリング (腎臓・皮質、投与 28 日目)。

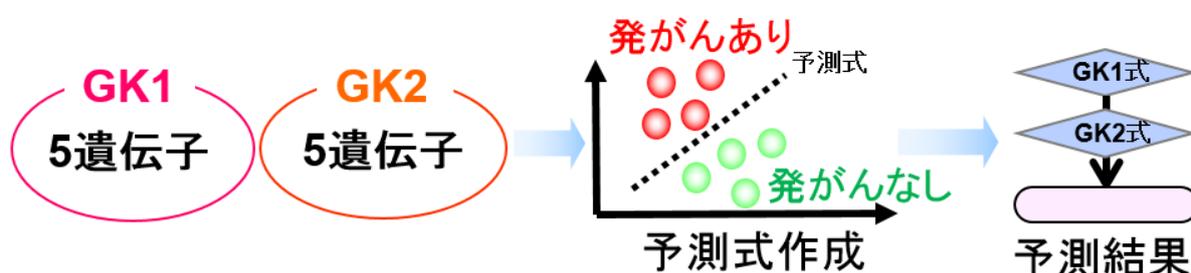
3 物質以上で有意な変動を示した 456 プローブを用いた (distance metric ; Peason, linkage rule ; Ward's). 赤丸: 腎尿細管がんを示す物質 (発がん性試験)。

(2)-3-2-①-1) 腎発がん性予測システムの開発

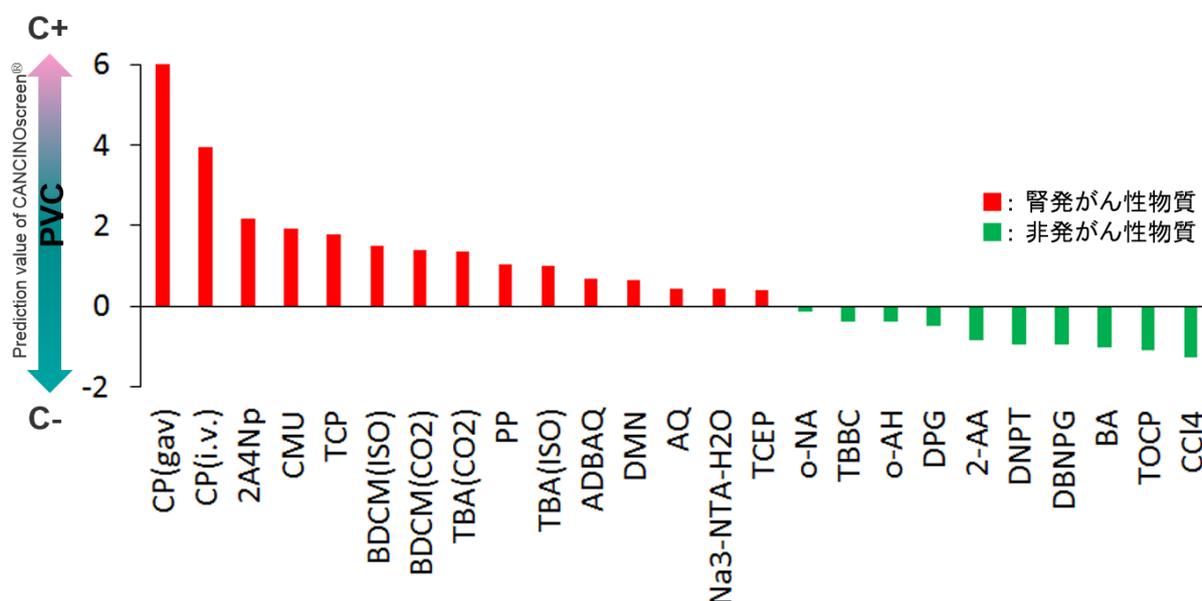
階層的クラスタリングによって分類された GK1 及び GK2 において、非腎発がん性物質との間で発現量に差異のある遺伝子を皮質もしくは髄質外帯のマイクロアレイデータを用いて選定したところ、それぞれ 5 遺伝子が抽出された (図(2)-17)。それらの遺伝子群を用いて、SVM (support vector machine) にて予測式を構築した後、全ての対象化合物に対して、皮質と髄質外帯の両部位のマイクロアレイデータを GK1 と GK2 の 2 種の

予測式に適用し、両式から得られたPVC値から値が大きい方を最終的な予測結果とした。その結果、25試験(20物質)全てが正答し、一致率としては100%となった(図(2)-18)。

次に、トレーニングデータには含まれない10試験(10物質)を外部データとして、開発した腎発がん性予測システムに供した。その結果、腎発がん性が陽性の3物質については、全て正しく「腎発がん性あり」と予測され、陽性一致率(Sensitivity)が高いことが分かった(図(2)-19)。しかしながら、陰性物質では、5物質中の2物質(AMIDOL及びEBD)で誤って陽性と判定され、EBDについてはPVC値が低かったものの、AMIDOLでは比較的高いPVC値を示した(図(2)-19)。AMIDOLでは雄マウスで腎発がんを示すことが報告されていたことから、本システムの予測結果からもラット肝臓でも発がん性を示す可能性が示唆された。



図(2)-17 腎発がん性の短期予測システムの戦略。



図(2)-18 腎発がん予測システムによる予測結果(トレーニングデータ; 25試験/20物質)。



図(2)-19 腎発がん予測システムによる予測結果 (テストデータ ; 10 試験/10 物質).

(2)-3-2-② 腎発がん性評価に用いた遺伝子のメカニズム等の解析・考察

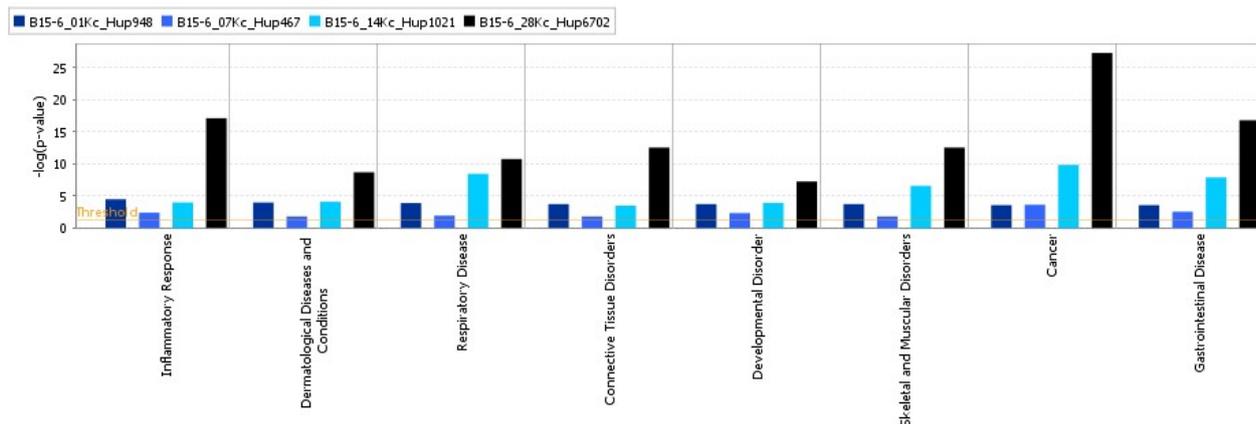
腎尿細管がんを引き起こす代表的な腎発がん性物質としてシスプラチン (静脈内投与、高用量群) に注目し、尿細管が多く存在する腎臓の皮質と髄質外帯のマイクロアレイデータを用い、1 日、7 日、14 日、28 日間と経時的な遺伝子発現量の変化を解析した。発現増加した遺伝子群について、IPA ソフトウェアによる機能分類 (Functional Analysis) を行ったところ、腎臓の皮質においては、「Cancer」の有意性が 1~7 日投与群まではそれほど高くなかったものの、14 日間投与から若干増加し、28 日投与群では最も高い有意性を示し、1,817 遺伝子がこの機能に分類されていた (図(2)-20)。腎臓の髄質外帯においても、「Cancer」の有意性は 1~14 日投与群まではそれほど高くなかったものの、28 日投与群では非常に高い有意性を示し、2,435 遺伝子がこの機能に分類されていた (図(2)-20)。「Cancer」に分類された遺伝子群について、ベン図解析によって皮質と髄質外帯の重なりを調べたところ、996 遺伝子については、両部位に共通していることが分かった (図(2)-21)。なお、「3.4.1 腎発がん性物質のマーカー遺伝子候補探索」で選定された腎発がん性予測遺伝子の一部がこの 996 遺伝子に含まれていることを確認した (データ示さず)。

また、腎臓 (髄質外帯) において発がんに関連したパスウェイ「Molecular Mechanisms of Cancer」との重なりを経時的に調べた。その結果、1~14 日投与群までは、このパスウェイ上で有意な発現増加を示した遺伝子は 10 種程度もしくはそれ以下だったものの、28 日投与群ではパスウェイ全体の数多くの遺伝子で発現増加がみられた (図(2)-22)。また、投与日数ごとに有意な発現増加を示した遺伝子を比べたところ、その種類は必ずしも同じではなく、特に、1 日、7 日、14 日投与群の重なりは乏しかった (図(2)-22)。しかし、28 日投与群において、1~14 日投与群まで変化に加えて、さらに多くの発がん関連遺伝子の発現増加がみられた。特に Oncogene (発がん遺伝子) である c-Jun、c-Fos、MYC 遺伝子が有意に発現増加しており、細胞増殖に関与している GLI、E2F、及び SMAD1/5/8 や、細胞の生存に関与する NF- κ B も有意な発現増加を示していたことから、腎臓 (髄質外帯) では発がんで見られる増殖性変化が生じている可能性が考えられた。また、このパスウェイには含まれていないものの、種々の発がん関連遺伝子の発現量が増加していたことから、シスプラ

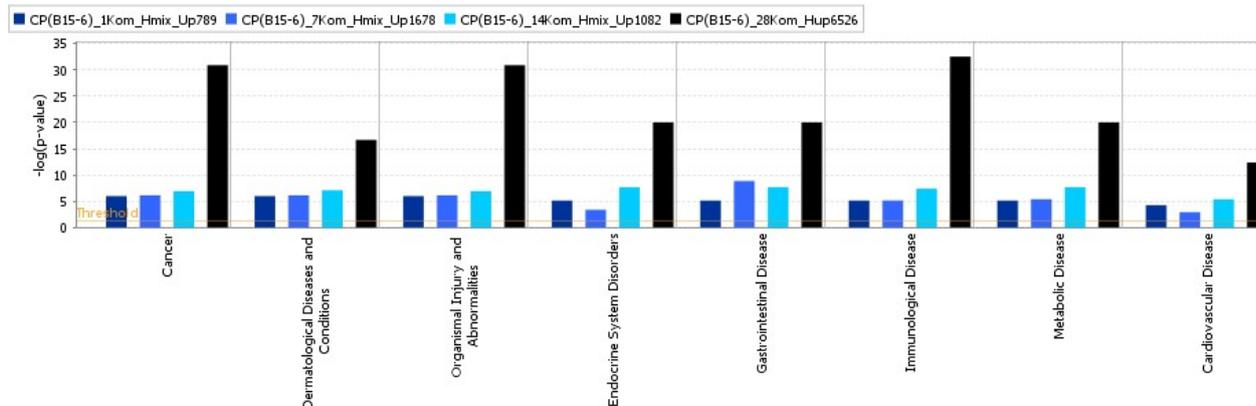
チン投与によって、発がん性との関連性が報告されている遺伝子群については、投与 28 日投与群で大きく影響を受けていることが分かった。これは、腎臓（皮質）でも同様の傾向を示していた（データ示さず）。なお、シスプラチン投与後 28 日投与群では、腫瘍性病変に関連した組織学的変化は観察されていない。

このことから、シスプラチンを 28 日間投与した腎臓組織では腫瘍性病変が認められていないものの、すでに発がんとの関連性が報告されている遺伝子群に大きな変化が認められていることが確認できた。

1) 皮質



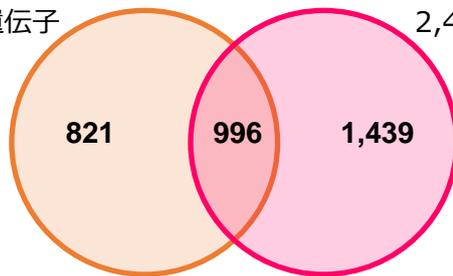
2) 髄質外帯



図(2)-20 シスプラチン投与後の腎臓（皮質及び髄質外帯）で増加した遺伝子の機能分類.

腎臓 (皮質)
1,817 遺伝子

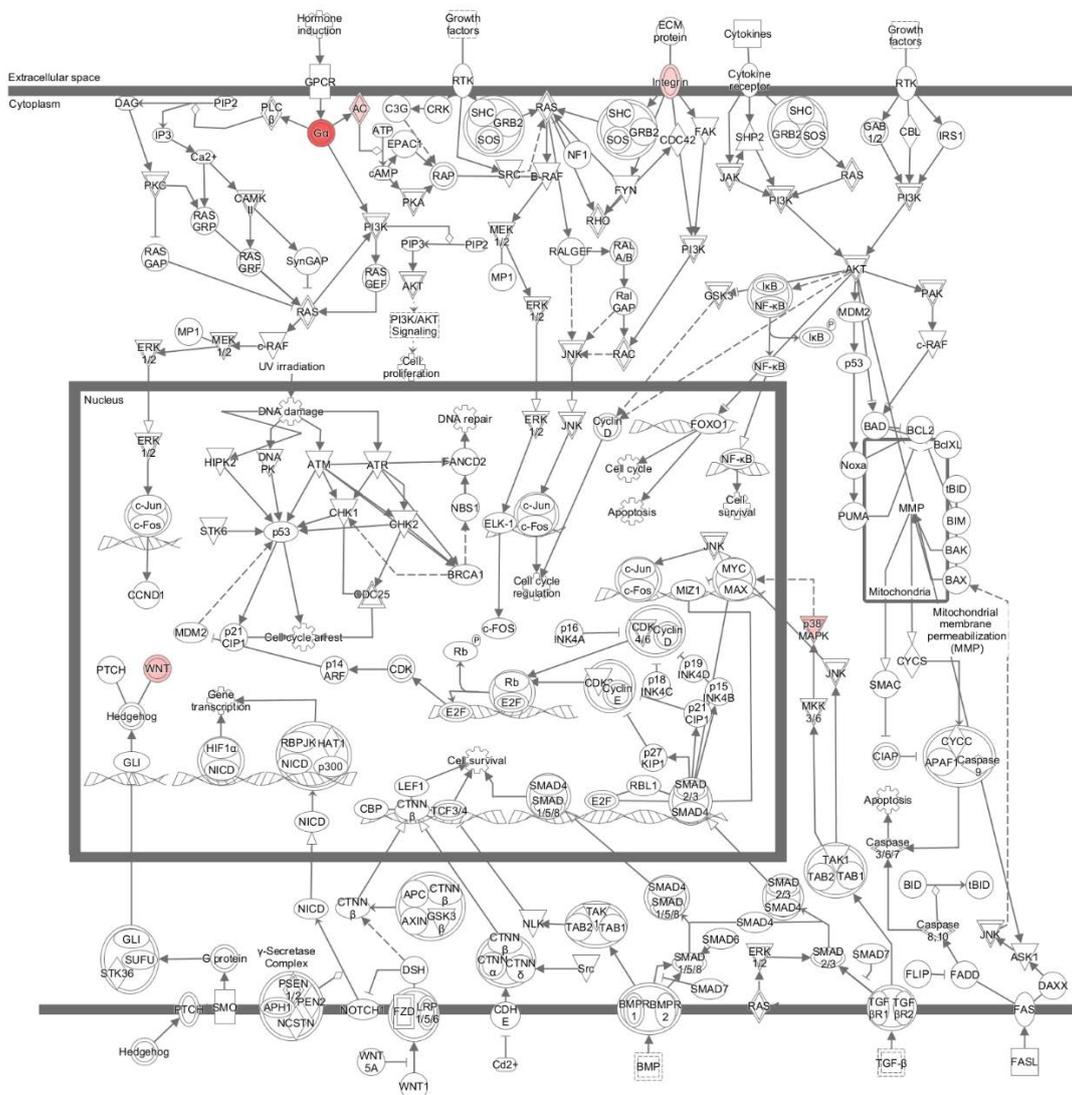
腎臓 (髄質外帯)
2,435 遺伝子



図(2)-21 「Cancer」に分類された遺伝子群のベン図解析.
28 日間投与、高用量群、IPA 解析から「Cancer」に分類された遺伝子

1) 投与 1 日 (腎臓・髄質外帯)

Molecular Mechanisms of Cancer



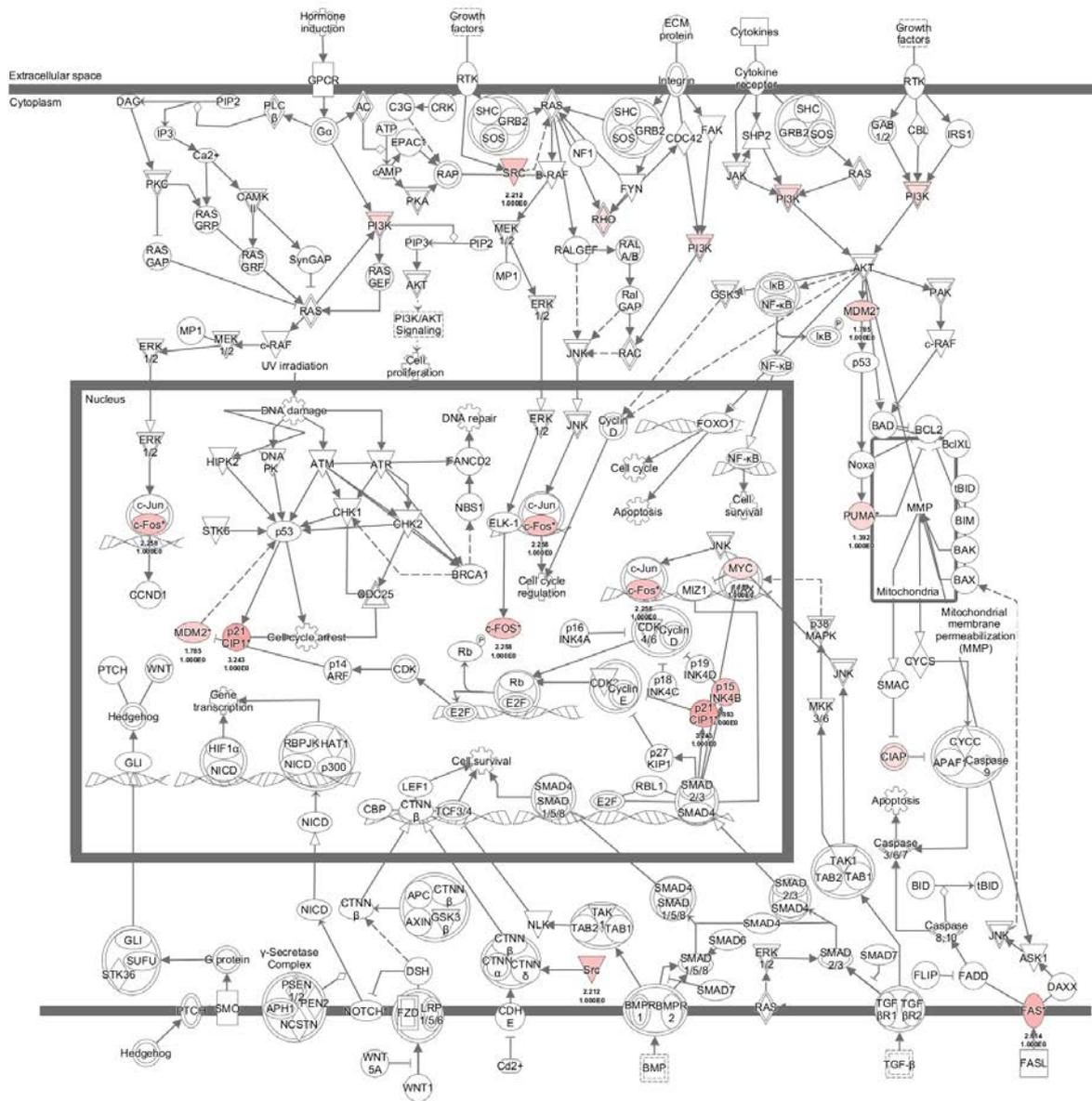
© 2000-2015 CIGAGEN. All rights reserved.

図(2)-22 「Molecular Mechanisms of Cancer」で有意に発現増加した遺伝子.

2) 投与 7 日 (腎臓・髄質外帯)

3) 投与14日 (腎臓・髄質外帯)

Molecular Mechanisms of Cancer

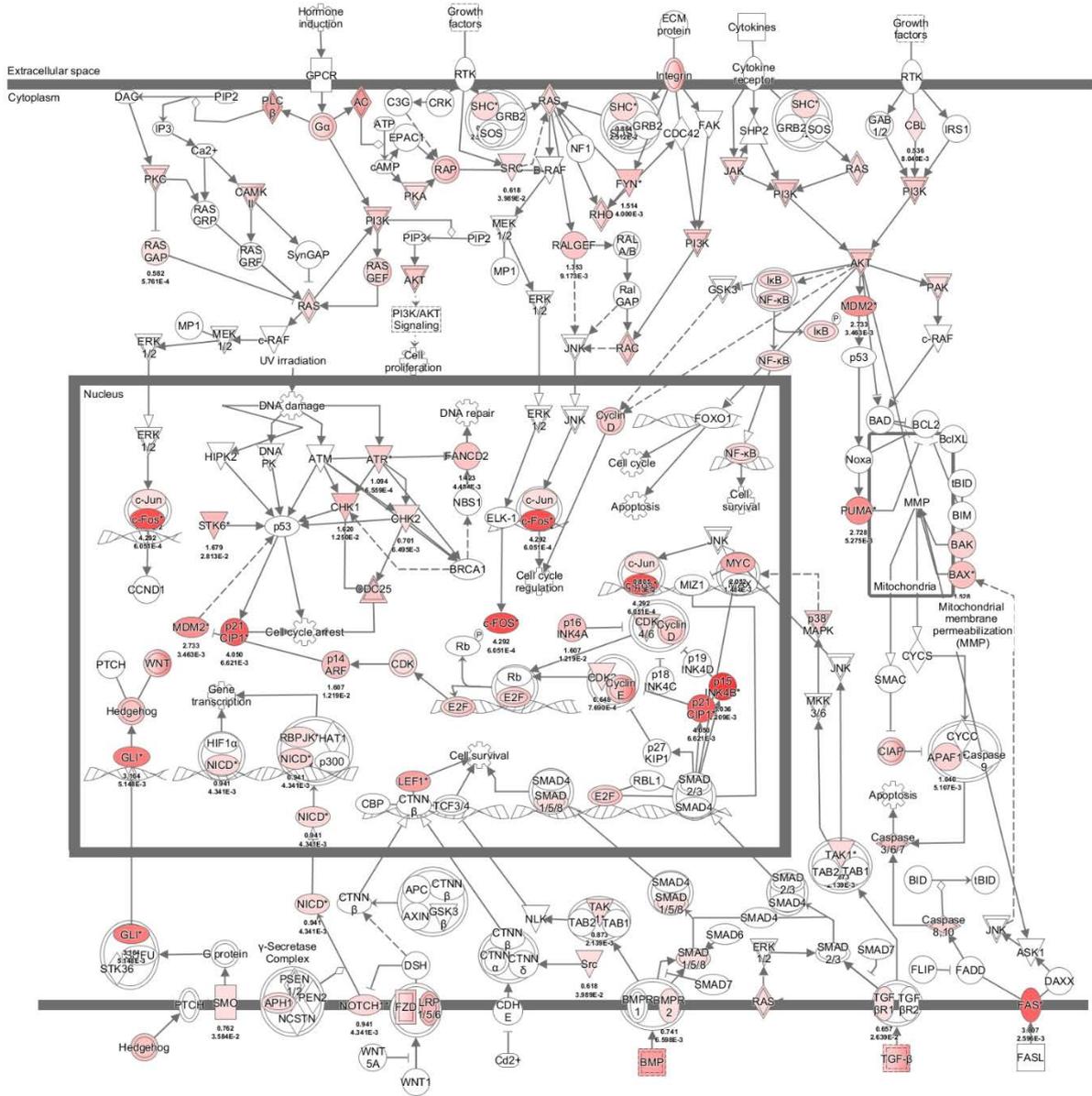


© 2000-2016 QIAGEN. All rights reserved.

図(2)-22 (続き) 「Molecular Mechanisms of Cancer」で有意に発現増加した遺伝子.

4) 投与 28 日 (腎臓・髄質外帯)

Molecular Mechanisms of Cancer



© 2009-2016 QIAGEN. All rights reserved.

図(2)-22 (続き) 「Molecular Mechanisms of Cancer」で有意に発現増加した遺伝子.

(3) 評価項目に対する自己評価

(3)-1 得られた成果

【肝発がん】

- ・ 外部データに対する予測精度の確認及び適用範囲の明確化を達成できた。具体的には、これまで確立してきた短期発がん性予測システム (CARCINOscreen[®]) に、本プロジェクトで得られた35試験/32物質 (Marginal判定及び分類不明を除く33試験/30物質) の肝臓の遺伝子発現量データを適用したところ、陽性一致率 (Sensitivity) が90.9%と高い正答率を示すことが分かった。
- ・ システムの検証のために外部データとして厚生労働省プロジェクトであるTGPデータを活用し、発がん性情報が明らかな40物質のデータをCARCINOscreen[®]に供したところ、中用量以上で90%以上の一致率を示した。このことから、外部データの発がん性予測に対して堅牢性を示すことが分かった。
- ・ 発がん性スクリーニング手法として既に使用されている中期発がん性試験とBhas42試験 (*in vitro*) との比較を行い、CARCINOscreen[®]の適用範囲について検討したところ、Bhas42試験 (*in vitro*) 試験に比べて高い正答率を示し、中期発がん性試験とほぼ同等の発がん性予測精度を示すことを確認した。

【腎発がん】

- ・ 腎発がん性に関しては、皮質と髄質外帯のマイクロアレイデータを用いて発がん性予測遺伝子として10種類を選定し、トレーニングデータと外部データを合わせた35試験/32物質 (分類不明を除く33試験/30物質) を予測したところ、正答率は94.0%と高い予測結果を示した。

(3)-2 設定された目標以外に得られた成果

- ・ 肝発がん性予測手法の一般化 (ガイドライン化) を目的とした簡易法の開発まで達成できた。具体的には、専門技術/設備が必要なCARCINOscreen[®]に対し、一般的な実験施設でも実施可能な定量PCR法による遺伝子発現量測定と、発現比のみで判定する簡易発がん判定法を開発した。開発した簡易法で肝発がん性を予測したところ、トレーニングデータ (29物質) で82.8%、テストデータ (22物質) で86.4%と比較的高い正答率を示すことが分かった。
- ・ 肝発がん性については、Diethylnitrosamine (DEN)、腎発がん性についてはシスプラチンをケーススタディとして、毒性メカニズムをMoA (Mode of Action) /AOP (Adverse Outcome Pathway) として整理することができた。

(3)-3 共通指標である、論文の発表、特許の出願、国際標準の形成 (OECD での活動)、プロトタイプ の作製等 (2.2 論文発表、特許出願状況等を参照)

本プロジェクトの概要及び成果については、2012年及び2015年にOECD会議での発表を行った。また、CARCINOscreen[®]による肝発がん性予測手法、ラット系統間差 (SD, F344, Wistar-Han ラット)、定

量 PCR 法による簡易発がん性予測手法の開発、麻酔法の違いによる遺伝子発現プロファイルの差異については、論文化した。

さらに、腎発がん性予測手法の開発、腎臓部位別の遺伝子発現量の差異、肝毒性関するバイオマーカー探索については、論文投稿中である。

本事業で開発した量 PCR 法による簡易発がん性予測法については、OECD でのテストガイドライン化を目指して、OECD の Preliminary SPSF 案を作成し、2016 年 6 月に OECD へ提出した。2016 年 10 月現在、各国からのコメントに対応しているところである。

2.2.3. 神経毒性

(1) 研究開発の概要

成熟動物に現れる神経毒性の多くは神経病理学的に検出が可能であるのに対し、発達神経毒性は未知な点が多く、特にニューロンやグリアの分化に与える影響は、不可逆的影響も懸念されるため、毒性予測評価上のエンドポイントとして重要性を増してきている。また、神経突起形成、シナプス形成や髄鞘形成などの神経の発達過程と成熟神経の生存・維持は同等の機序を利用する 경우가多く、成熟期の神経毒性物質が発達期に影響を示す可能性が高い。特に、ラットにおいて、海馬歯状回や嗅球は成熟後にもニューロン新生を続けるユニークな部位であることが知られているため、成熟後の暴露によっても神経発達に影響を及ぼす物質の標的となる可能性が想定される。これらの脳部位に着目して、遺伝子や分子の変化を網羅的に評価することで、成熟期神経毒性の今まで見逃されていた高感受性の作用点や、成熟動物での発達神経毒性の検出性の有無を明らかにできる可能性がある。

本プロジェクトでは5カ年を通して、発達期だけでなく、成熟後でも生じる中枢神経系において重要なニューロンやグリアの新生・分化に着目して、28日間反復投与試験での発達神経毒性の検出性を視野に入れた、網羅的遺伝子発現解析技術等を利用した新たな神経毒性評価手法の開発を目的とした。ただし、脳の遺伝子発現量解析に基づき神経毒性を評価している課確認するフィージビリティ研究を行う必要があったことから、先行する主要臓器（肝臓・腎臓）における一般毒性や発がん性とは異なる開発となる。

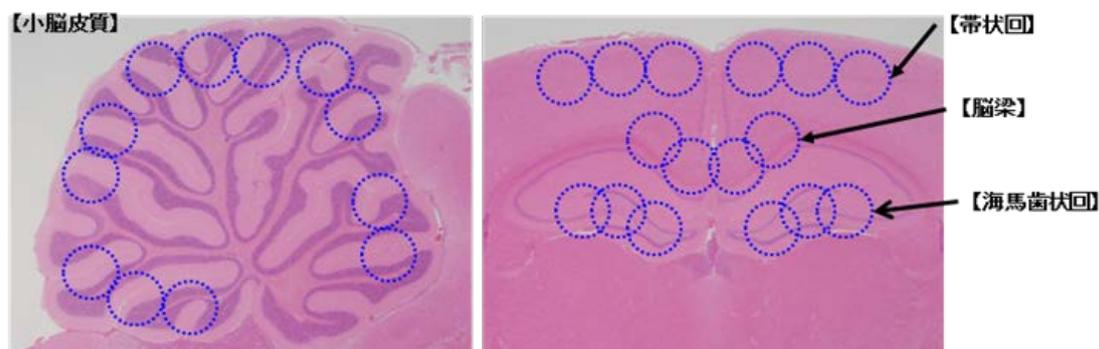
まず、マイクロアレイによる遺伝子発現量解析及びプロテオーム解析に適うよう、各脳組織部位特異的な組織採材手法を確立した。次に、作用既知物質を用い、28日間反復投与(生後5週齢ラットを用いた28日間投与)による神経毒性及び発達期暴露(妊娠6日目から授乳終了時までの母動物投与を介した暴露)による発達期神経毒性の遺伝子発現プロファイルを獲得するとともに、着目している脳の4部位(海馬歯状回、帯状回、脳梁、小脳)の遺伝子発現量データを取得した。また、発達期暴露と28日間反復投与試験で発現変動した遺伝子群を比較して、ライフステージが異なる脳サンプルにおいて共通に変動する遺伝子群を選定し、神経毒性のマーカー候補遺伝子を探索するとともに、免疫組織化学的検索による発現分布解析等から、神経毒性の評価に利用できる分子セットを探索し、成熟期及び発達期神経毒性評価の可能性の有無を検討した。さらに、作用既知の5物質が有する作用機序に基づく神経毒性評価手法を構築し、プロトコル案を作成した。

(2) 遺伝子発現量解析のための脳の部位特異的な採材法の構築

(2)-1 背景及び実施内容

中枢神経系は解剖学的な構造が精緻で部位特異性が高く、遺伝子やタンパク質の発現解析の際は解析部位別に組織を採取する必要がある。しかし、通常の動物解剖の作業時間内で軟組織である脳の特定領域を正確かつ適切に採材することは極めて困難である。そのため、適切な作業を実施するには、DNA、RNA及びタンパク質等の生体高分子のクオリティーを保持したまま組織を固定する必要がある。本プロジェクトでは、各脳組織部位特異的なマイクロアレイ及びプロテオーム解析に適う組織採材手法の確立を目指し、全脳のメタカーン固定組織から各脳部位を採取し、抽出したRNA及びタンパク質のクオリティー及び網羅的発現データのバラツキを未固定組織と比較する等して、遺伝子発現量解析のための脳の部位特異的な採材法を構築した。

無処置の Cri:CD (SD)ラットを用い、発達期暴露及び 28 日間反復投与試験のそれぞれの剖検週齢である 3 週齢及び 9 週齢について、全脳を採取した。メタカーン液(メタノール：クロロホルム：酢酸=6：3：1)あるいはアセトンに浸漬し、4℃で 5 時間振盪して固定した。その後 100%エタノールに浸漬し、4℃で一晩振盪した。固定・脱水後、脳鋳型(ブレインマトリックス)を用いて厚さ 2 mm のスライスを作成し、生検トレパンにより、帯状回、小脳皮質、海馬歯状回及び脳梁の 4 部位を採材した(図(3)-1)。サンプルは、100%エタノールに浸漬し、-80℃下で保存した。未固定組織は脳採取後、直ちに生検トレパンを用いて、帯状回及び小脳皮質の 2 部位を採材した。RNA 解析用サンプルは RNAlater[®]に浸漬し、4℃で 24 時間保存後、-80℃下で保存した。タンパク質解析用サンプルは液体窒素で凍結し、直ちに-80℃下で保存した。



図(3)-1 各脳部位の採材箇所.

(2)-2 結果

Total RNA のクオリティー解析の結果、3 週齢及び 9 週齢ともに、未固定、メタカーン固定、アセトン固定の順に分解が進んでいたが、マイクロアレイ等の解析に必要なクオリティー (RIN 値 7.0 以上) を保持していた。また、9 週齢の帯状回及び小脳皮質におけるタンパク質の発現を SDS-PAGE により解析した結果、未固定、メタカーン固定及びアセトン固定の間に、ポリペプチドのバンド強度に明らかな差はなく、抽出ポリペプチドのクオリティーに差は認められなかった。以上の結果から、メタカーン固定脳における生体高分子のクオリティーは、total RNA 及びタンパク質ともにアセトン固定脳より優れており、網羅的解析に適う品質を保持していることが明らかとなった。

マイクロアレイデータによる mRNA の網羅的遺伝子発現解析において、ラットの週齢を問わず、全解析部位の個体間のばらつきは、メタカーン固定でアセトン固定と比べて小さかったことから、メタカーン固定の方が固定法としてより優れていることが明らかとなった。また、2D-DIGE(2 Dimensional Fluorescence Difference Gel Electrophoresis)によるタンパク質発現量解析の結果、両固定とも未固定と比較して total ポリペプチドに対するスポット容積比に差のある分子が散見されたが、メタカーン固定でアセトン固定と比べて数が少なく、差が小さかったことから、メタカーン固定組織からのポリペプチド抽出量は、アセトン固定に比して固定による影響が小さいことが明らかとなった。

以上より、網羅的な遺伝子及びタンパク質解析において、9 週齢及び 3 週齢ともに、本実験条件におけるメタカーン全脳固定法は有用であると判断され、組織採取法として確立することができた。

(3) フィージビリティ研究と神経毒性予測法の開発

(3)-1 被験物質

神経毒性モデル物質として、表 (3)-1 に示す 5 物質を用いた。

表 (3)-1 被験物質名等

物質名	既知メカニズム	用量	
		発達期 暴露試験 [ppm]	28 日間反復経口 投与試験 [mg/kg/day]
6-プロピル-2-チオウラシル (PTU)	ニューロン新生障害性 神経幹細胞障害性	1, 3, 10 ^{*1}	0.1, 10
グリシドール (GLY)	軸索遠位端傷害性	100, 300, 1000 ^{*1}	30, 200
クプリゾン (CPZ)	髄鞘形成障害性	100, 400 ^{*2}	(300), 600
バルプロ酸 (VA)	ニューロン移動障害性	667, 2000 ^{*1}	200, 900
メチルニトロソウレア (MNU)	細胞増殖阻害性 DNA 障害性	3, 10, 30 ^{*1}	5, 15

*1 飲水投与、*2 混餌投与

(3)-2 実験方法

(3)-2-1 発達期暴露試験及び 28 日間反復経口投与試験

実験動物には Crl:CD (SD)ラットを用いた。

発達期暴露試験については、妊娠ラットを用いて、妊娠 6 日目から生後 21 日目まで母動物を介して飲水投与し、生後 21 日齢の児動物の脳を採材した (ただし、クプリゾンについては混餌投与とした)。成熟動物を対象とした 28 日間暴露試験は、雄性ラットを用い、生後 5 週齢から 28 日間被験物質を強制経口投与し、脳を採取した。なお、投与量は、表 (3)-1 に示した。

(3)-2-2 遺伝子発現量解析

「2.2.1.(3)-2-2 遺伝子発現量解析」に記載した内容と同じ方法で実施した。

なお、解析対象部位は、各試験から採取した脳から海馬歯状回、脳梁、帯状回及び小脳皮質である。採材箇所の詳細については、図(3)-1 を参照されたい。

(3)-3 結果及び考察

(3)-3-1 作用既知物質を用いた動物試験の実施と包括的なデータ取得

表(3)-1 に示した 5 物質について、①妊娠ラットに妊娠 6 日目から生後 21 日目まで母動物を介して被験物質を暴露した発達期暴露試験（脳採材は生後 21 日齢の児動物）及び②生後 5 週齢から 28 日間被験物質を強制経口投与した試験を実施し、得られた脳サンプルの部位別（海馬歯状回、帯状回、脳梁、小脳）のマイクロアレイによる遺伝子発現量データを取得した（3 個体/群×3 群×4 部位×2 試験/物質×5 物質=360 データ）。

(3)-3-2 神経毒性評価のためのバイオマーカー候補の探索

表(3)-1 に示した 5 物質による投与依存的に有意に変動している遺伝子を抽出するため、各試験の媒体対照群に対する有意差検定を実施し、以下のいずれか条件に合致する遺伝子を抽出した（表(3)-2）。

- ① $p < 0.05$ かつ 1.5 倍以上 or 0.67 倍以下に変動(all PM フラグ)、
- ② $p < 0.01$ かつ 1 倍以上 1.5 倍より小さい or 0.67 倍より大きい 1 倍以下(all PM フラグ)、あるいは
- ③ [ON 型] $p < 0.01$ かつ 4 倍以上(分母 ; 何れか A フラグ、分子 ; all PM フラグ)
[OFF 型] $p < 0.01$ かつ 0.25 倍以下(分母 ; all PM フラグ、分子 ; 何れか A フラグ)

表(3)-2 有意差検定によって抽出された遺伝子数.

被験物質	発達期暴露 (21日齢)					28日間反復投与(9週齢)						
	投与群	変動遺伝子数				投与群	変動遺伝子数					
			海馬歯状回	脳梁	帯状回		小脳皮質		海馬歯状回	脳梁	帯状回	小脳皮質
PTU	低用量群	増加	996	725	2,100	2,786	低用量群	増加	140	104	109	259
		減少	897	1,009	1,780	2,415	低用量群	減少	241	68	106	171
	高用量群	増加	1,614	2,375	4,723	4,805	高用量群	増加	774	175	611	465
		減少	1,603	3,243	4,413	5,386	高用量群	減少	1625	217	892	469
グリシドール GLY	低用量群	増加	266	100	103	360	低用量群	増加	103	401	232	116
		減少	710	214	196	430	低用量群	減少	109	501	279	116
	高用量群	増加	417	294	143	328	高用量群	増加	573	391	567	332
		減少	775	233	218	279	高用量群	減少	471	815	435	527
クプリゾン	低用量群	増加	345	3,401	302	245	低用量群	増加	97	143	222	261
		減少	535	2,790	513	570	低用量群	減少	148	103	312	184
	高用量群	増加	757	2,736	273	247	高用量群	増加	381	1,322	2,460	1,042
		減少	1,259	2,806	537	396	高用量群	減少	633	490	1,767	2,051
バルプロ酸	低用量群	増加	150	988	150	363	低用量群	増加	427	165	577	3,081
		減少	271	1,299	143	241	低用量群	減少	345	221	541	1,499
	高用量群	増加	265	1,105	2,210	960	高用量群	増加	2,389	962	1,449	2,970
		減少	442	482	788	872	高用量群	減少	1,971	213	2,779	1,282
メチルニトロソウレア MNU	低用量群	増加	156	125	87	95	低用量群	増加	224	132	67	108
		減少	130	145	145	168	低用量群	減少	235	83	64	271
	高用量群	増加	129	112	200	305	高用量群	増加	418	1,673	396	2,274
		減少	133	179	140	251	高用量群	減少	543	1,397	391	1,487

以下のいずれかの条件に合致した遺伝子数 ; ① $p < 0.05$ かつ 1.5 倍以上 or 0.67 倍以下に変動(all PM フラグ)、② $p < 0.01$ かつ 1 倍以上 1.5 倍より小さい or 0.67 倍より大きい 1 倍以下(all PM フラグ)、あるいは③ [ON 型] $p < 0.01$ かつ 4 倍以上(分母 ; 何れか A フラグ、分子 ; all PM フラグ)。
[OFF 型] $p < 0.01$ かつ 0.25 倍以下(分母 ; all PM フラグ、分子 ; 何れか A フラグ)

(3)-3-3 毒性発現に伴う遺伝子発現変動の特徴分析

本検討における特徴分析として以下を実施した；

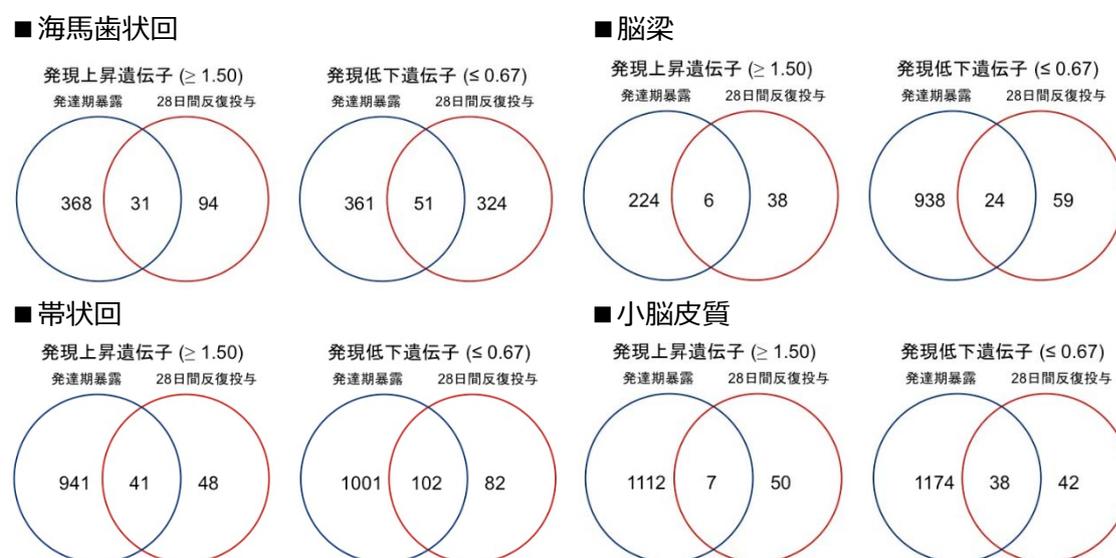
- ① 28 日間反復投与試験の枠組みにおける発達神経毒性の検出可能性に関する検討
- ② (発達)神経毒性評価に利用可能な有効指標の探索
- ③ 有効指標等を用いた作用既知物質の毒性プロファイル

(3)-3-3-① 28 日間反復投与試験の枠組みにおける発達神経毒性の検出可能性に関する検討

発達期暴露により観察された神経毒性、すなわち発達神経毒性と類似の毒性プロファイルかつ遺伝子発現変動が認められることにより、28 日間反復投与試験の枠組みで発達神経毒性を検出できる可能性ができると考え、本プロジェクト開始から 3 年目までに取得された PTU、GLY 及び CPZ のデータに基づき、各物質において発達期暴露及び 28 日間反復投与試験で共通して有意に発現変動する遺伝子の探索を行った。

a. PTU の発達期暴露及び 28 日間反復投与試験データの重複遺伝子解析

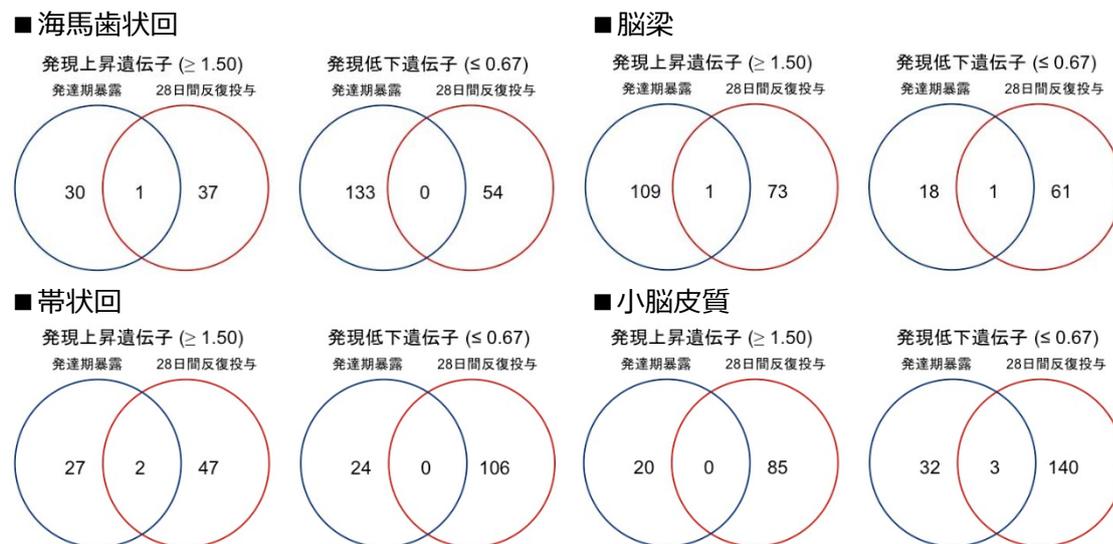
PTU の発達期暴露及び 28 日間反復投与試験データの各脳部位における重複遺伝子数を図(3)-1 に示した。海馬歯状回及び帯状回において、比較的多くの発現低下遺伝子が見出された。また、ニューロン新生及びシナプス可塑性の障害指標候補として *Chrdl1*、*Hes5*、Eph family gene、*Slit1* 及び *Robo3*、ミエリン形成障害指標候補として *Plp1* 及び *Mbp* が獲得された。



図(3)-1 : PTU を暴露したの脳の部位別における共通変動遺伝子数.

b. グリシドールの発達期暴露及び 28 日間反復投与試験データの重複遺伝子解析

グリシドールの発達期暴露及び 28 日間反復投与試験データの各脳部位における重複遺伝子数を図(3)-2 に示した。いずれの脳部位においても重複はほとんど認められず、神経発達関連遺伝子は獲得されなかったため、軸索障害物質に関しては、遺伝子発現プロファイルによる毒性予測は困難である可能性が示された。

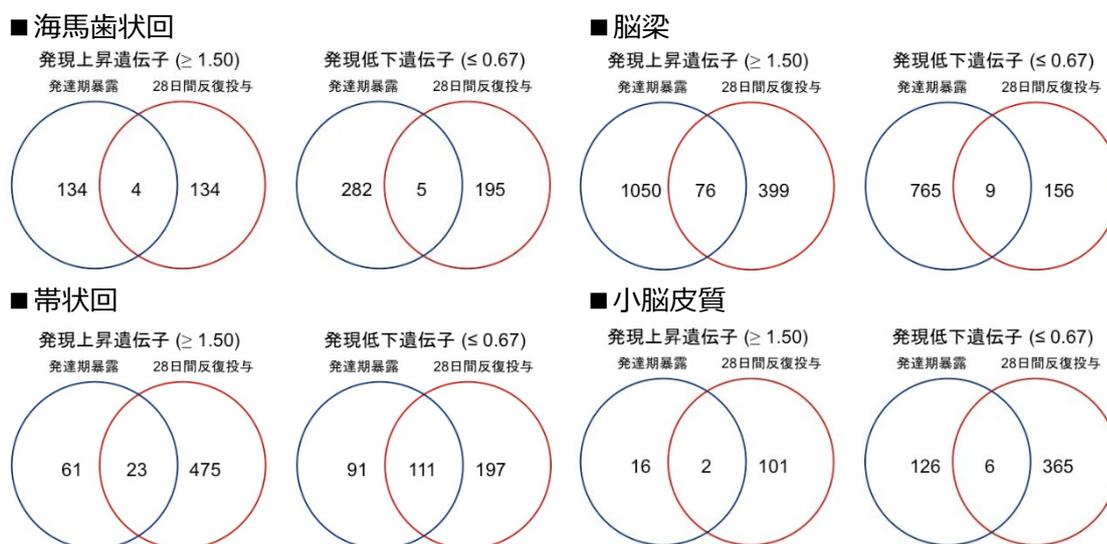


図(3)-2 : グリシドールを暴露したの脳の部位別における共通変動遺伝子数

c. クプリゾンの発達期暴露及び 28 日間反復投与試験データの重複遺伝子解析

クプリゾンの発達期暴露及び 28 日間反復投与試験データの各脳部位における重複遺伝子数を図(3)-3 に示した。脳梁における発現上昇遺伝子及び帯状回における発現低下遺伝子として、比較的多くの遺伝子が得られ、脳梁においては炎症及び免疫反応関連遺伝子の発現上昇が認められ、帯状回においては、ミエリン形成及び傷の修復に関わる遺伝子の発現低下が認められた。これらの遺伝子変動は、クプリゾンによる髄鞘傷害と、それに対する反応性の変化を反映したものと考えられ、28 日間反復投与試験で評価可能な髄鞘傷害物質の毒性予測指標候補として、ミエリン形成及び炎症関連遺伝子が獲得され、評価部位としてはミエリンの豊富な脳梁及び帯状回が高感受性である可能性が示された。

以上、a~c の結果から、発達期暴露におけるグリシドールによる軸索障害性は 28 日間反復投与試験では検出が困難ではあるものの、発達期暴露で認められる PTU によるニューロン新生、シナプス可塑性やミエリン形成障害、クプリゾンによる髄鞘障害性は 28 日間反復投与試験で検出可能であることが示され、28 日間反復投与試験の枠組みで発達神経毒性を検出できると判断した。



図(3)-3 : クプリゾンを暴露したの脳の部位別における共通変動遺伝子数.

(3)-3-3-② (発達)神経毒性評価に利用可能な有効指標の探索

遺伝子発現プロファイルによる神経毒性及び発達神経毒性の検出性を明らかにする目的で、毒性機序の異なる5物質の遺伝子発現解析データの共通性もしくは特異性を検索した。また、各物質の毒性プロファイルから、毒性発現機序に基づく毒性指標プロファイルの及び、毒性指標遺伝子セットの獲得を目指した。さらに、免疫組織化学的に評価可能な分子についても探索を行った。

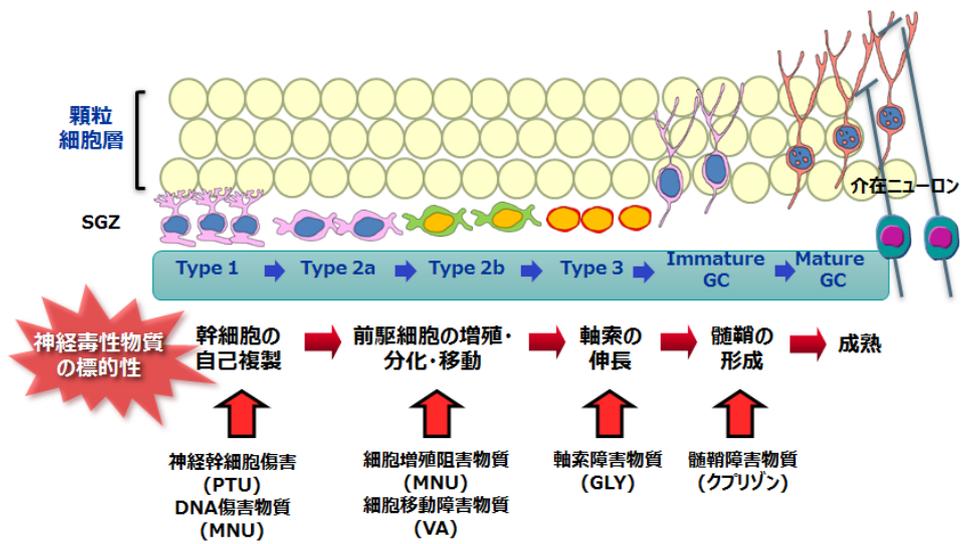
- 発達期暴露試験あるいは28日間反復投与試験における部位別の遺伝子変動の共通性探索
- 毒性発現機序に基づく有意に変動した遺伝子及び高感受性部位の探索
- bの探索結果に基づく、免疫組織化学的に検出可能な分子指標の探索

a. 発達期暴露試験あるいは28日間反復投与試験における部位別の遺伝子変動の共通性探索

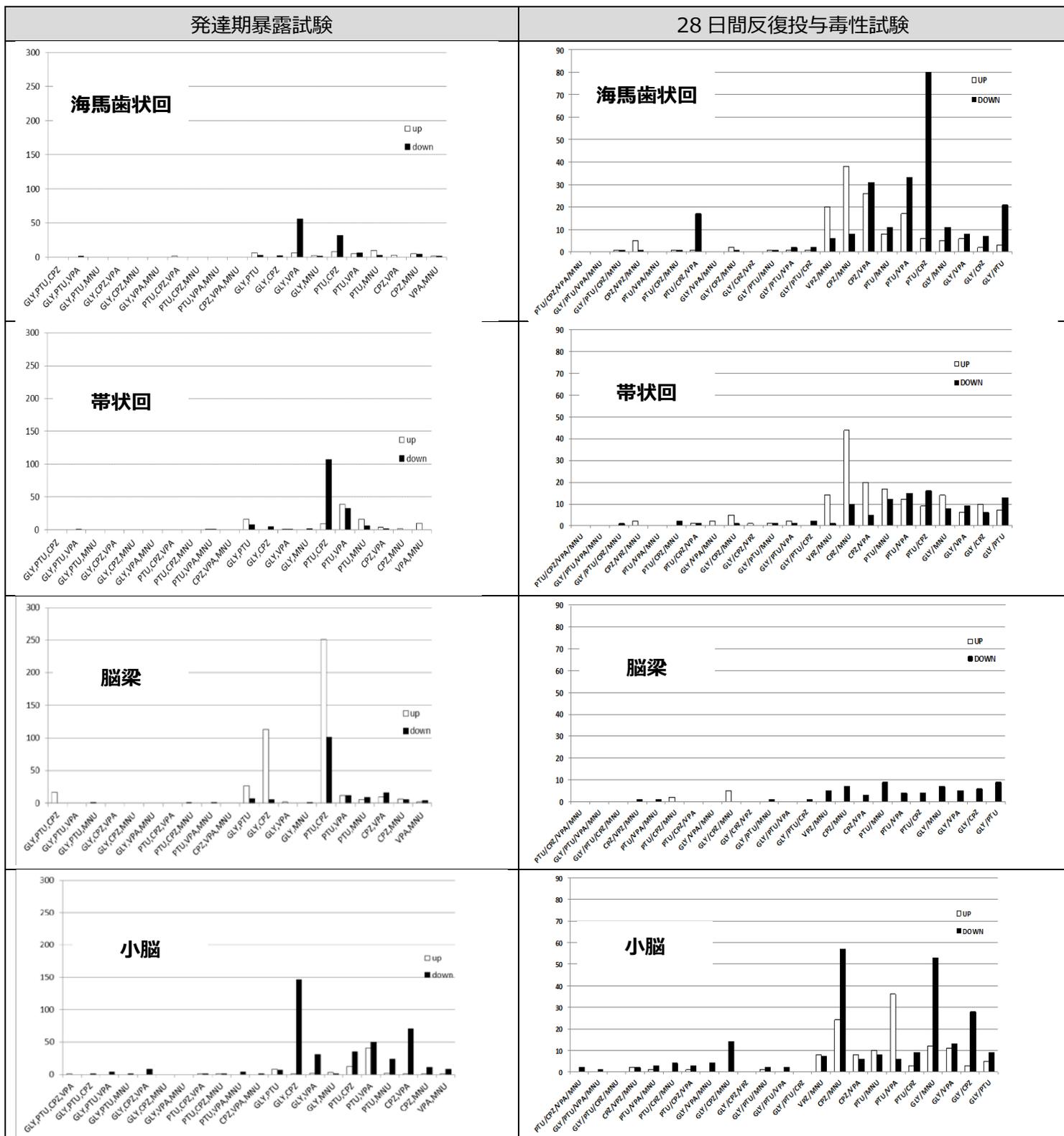
発達期暴露試験及び28日間反復投与試験のそれぞれにおいて、5物質の対照群に比して1.50倍以上の発現上昇及び0.67倍以下の発現低下を示した遺伝子リストを用い、海馬歯状回、帯状回、脳梁及び小脳で、5物質間での変動遺伝子の共通性を探索した。

図(3)-4に示す顆粒細胞系譜のニューロン新生と被験物質の作用機序との関係から推定されたとおり、作用機序が異なるから5物質間で共通に変動する神経毒性関連遺伝子は、いずれの脳部位でも見出されなかった。また、4物質ないし3物質間で重複して変動した遺伝子も、いずれの脳部位でも少数であった(図(3)-5)。

これらのことから、複数の毒性機序に共通する指標となる遺伝子は獲得されず、遺伝子発現は毒性機序に特異的に変動するものが多いと考えられた。



図(3)-4：顆粒細胞系譜のニューロン新生と被験物質の作用機序との関係。



図(3)-5：物質間共通変動遺伝子数

b. 毒性発現機序に基づく有意に変動した遺伝子及び高感受性部位の探索

28 日間反復投与試験の脳の部位別サンプルから取得した遺伝子発現量データに基づき、有意に発現変動している遺伝子の機能及び高感受性の標的部位を表(3)-3 に示した。

PTU 及び CPZ において有意に発現変動した遺伝子としては、髄鞘傷害性を反映する共通の遺伝子が多数認められ、特に海馬歯状回及び帯状回が髄鞘形成及びオリゴデンドロサイト分化に関連する遺伝子群の変動を高感度に検出できる部位であることが示された。また、PTU において有意に発現変動した遺伝子として、ニューロン新生障害性を反映する遺伝子を獲得し、海馬歯状回がニューロン新生及びシナプス伝達関連遺伝子の変動を高感度に検出できる部位であることが示された。グリンドールにおいて有意に発現変動した遺伝子として、軸索傷害性を反映する遺伝子を獲得し、海馬歯状回がニューロン新生及び軸索形成関連遺伝子の変動を高感度に検出できる部位であることが示された。また、バルプロ酸及び PTU の暴露試験結果より、細胞移動障害性を反映する変動遺伝子を獲得し、海馬歯状回及び帯状回がニューロン新生及び細胞移動関連遺伝子の変動を高感度に検出できる部位であることが示された。さらに、メチルニトロソウレアの暴露試験結果より、DNA 傷害性を反映する遺伝子発現プロファイルとして、広範な脳領域においてニューロン新生及びアポトーシス関連遺伝子の変動が検出できることが示された。

表(3)-3 : 毒性発現機序毎に有意に変動した遺伝子機能及び高感受性標的部位。

被験物質	神経毒性機序	有意に変動した遺伝子機能	高感受性標的部位
PTU・CPZ	髄鞘傷害	髄鞘形成、オリゴデンドロサイト分化	海馬歯状回・帯状回
PTU	ニューロン新生障害	ニューロン新生、シナプス伝達	海馬歯状回
GLY	軸索傷害	ニューロン新生、軸索形成	海馬歯状回
PTU・VA	ニューロン(細胞)移動障害	ニューロン新生、細胞移動	海馬歯状回・帯状回
MNU	DNA 傷害	ニューロン新生、アポトーシス	広範な領域

これらの毒性作用機序毎に有意に変動した神経毒性に係る遺伝子機能を有する遺伝子から、28 日間反復投与試験で神経毒性を評価するための毒性指標遺伝子セットを選定した (表(3)-4)。髄鞘形成障害性に関しては、海馬及び帯状回における *Cnp*, *Mag*, *Mal*, *Mbp*, *Plp1*、ニューロン新生障害性に関しては海馬における *Eph* ファミリー遺伝子、シナプス可塑性への影響に関しては海馬における *Arc*, *Fos*, *Jun*, *Ptgs2* 及び *Eph* ファミリー遺伝子、細胞移動障害性に関しては海馬及び帯状回における *Reln*, *Ret*, *Robo3*, *Gfra3*, *Tbx1* の発現変動が、それぞれの毒性機序による影響を反映する指標として選定された。また、表 VI-2.3-3-2 において太字で示した遺伝子に関しては、発達期暴露試験でも該当部位で発現変動が認められており、発達神経毒性指標となると考えている。

表(3)-4 : 毒性発現機序に基づく毒性指標遺伝子セット及び高感受性標的部位

神経毒性発現機序	高感受性標的部位	毒性指標遺伝子セット

髄鞘形成障害	海馬・帯状回	<i>Cnp, Mag, Mal, Mbp, Plp1</i>
ニューロン新生障害	海馬	<i>Eph family genes</i>
シナプス可塑性変動	海馬	<i>Arc, Fos, Jun, Ptgs2, Eph family genes</i>
細胞移動障害	海馬・帯状回	<i>Reln, Ret, Robo3, Gfra3, Tbx1</i>

太字下線：発達期暴露試験でも有意に変動した遺伝子

c. bの探索結果に基づく、免疫組織化学的に検出可能な分子指標の探索

「b. 毒性発現機序に基づく有意に変動した遺伝子及び高感受性部位の探索」で選定した毒性指標遺伝子セットに加え（表 2.2.3.(3)-4）、発達期暴露試験における網羅的遺伝子発現解析により獲得した毒性指標遺伝子及び既知のニューロン新生障害指標を用いた免疫組織化学的解析結果を元に、各神経毒性発現機序に基づく、免疫組織化学的に検出可能な毒性指標分子セット及びその高感受性部位を選定した（表 (3)-5）。

ニューロン新生障害性の指標として、海馬歯状回顆粒細胞層における PAX6、TBR2、DCX 及び TUC4、ニューロン新生、シナプス伝達及び細胞移動障害性の指標として、海馬歯状回門における RELN、PVALB、CALB2 及び SST、シナプス可塑性に対する影響の指標として、海馬歯状回顆粒細胞層及び帯状回における ARC、海馬歯状回顆粒細胞層における FOS、JUN、COX2 及び EPHA4、髄鞘形成障害性の指標として、海馬及び帯状回における MBP 及び CNPase、グリア新生障害性の指標として、脳梁における KLOTHO の分布解析が有用であることが示された。

表(3)-5：毒性発現機序に基づく発達神経毒性指標分子セット及び高感受性標的的部位

神経毒性発現機序	高感受性標的的部位	毒性指標分子セット
ニューロン新生障害	海馬 顆粒細胞層	PAX6, TBR2, DCX, TUC4
GABA 性介在ニューロン (ニューロン新生、シナプス伝達、細胞移動)	海馬 歯状回門	RELN, PVALB, CALB2, SST
シナプス可塑性	海馬 顆粒細胞層	ARC, FOS, JUN, COX2, EPHA4
	帯状回	ARC
髄鞘形成障害	海馬・帯状回	MBP, CNPase
グリア新生障害	脳梁	KLOTHO

(3)-3-4 可能な範囲での毒性発現可能性を予測する解析手法の確立

これまでに実施した機序の異なる 5 物質の発達期暴露試験及び 28 日間反復投与試験の結果から、神経毒性機序ごとの高感受性標的的部位と、毒性機序に基づく毒性指標遺伝子セット及び免疫組織化学的に評価可能な分子セットを獲得した。これらの成果を基に、未知の化学物質の神経毒性発現可能性を予測するための解析手法として、現時点で実施可能な範囲における、神経毒性/発達神経毒性予測のための解析手法として、プロトコルを考案した。

以下に概要を示す。

1. 被験物質の雄性ラットに対する 28 日間反復投与試験を行う。
2. 投与終了後に脳を摘出し、全脳をメタカーン固定 (n=6/群) 及びブアン固定 (又は PFA 灌流固定 ; n=10/群) する。
3. メタカーン固定脳を脳鋳型 (ブレインマトリックス) を用いて厚さ 2 mm 冠状断面を作製し、海馬歯状回、脳梁及び帯状回を 1 mm 径の生検トレパンを用いて採材する。これらのサンプルから RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR により、髄鞘形成障害指標遺伝子セット (*Cnp*, *Mag*, *Mal*, *Mbp* 及び *Plp1*) 及び細胞移動障害指標遺伝子セット (*Reln*, *Ret*, *Robo3*, *Gfra3* 及び *Tbx1*) の海馬歯状回及び帯状回における発現変動の有無を確認する。また、ニューロン新生障害指標遺伝子セット (*Eph* ファミリー遺伝子)、及びシナプス可塑性影響指標遺伝子セット (*Arc*, *Fos*, *Jun*, *Ptgs2* 及び *Eph* ファミリー遺伝子) の海馬歯状回における発現変動の有無を確認する。
4. ブアン固定 (又は PFA 灌流固定) 大脳の冠状断面を作製してパラフィン包埋し、切片を用いて免疫組織化学的解析を行う。ニューロン新生障害指標分子 (PAX6, TBR2, DCX 及び TUC4) の海馬歯状回顆粒細胞層下帯における分布を解析する。ニューロン新生、シナプス伝達及び細胞移動障害指標分子 (GABA 性介在ニューロン : RELN, PVALB, CALB2 及び SST) の海馬歯状回門における分布を解析する。シナプス可塑性影響指標分子 (ARC, FOS, JUN, COX2 及び EPHA4) 及び髄鞘形成障害指標分子 (MBP 及び CNPase) の海馬歯状回顆粒細胞層及び帯状回における分布を解析する。グリア新生障害指標分子 (KLOTHO) の脳梁における分布を解析する。
5. 3 及び 4 の結果を総合して、被験物質の神経毒性及びその障害機序を予測する。

(3)-4 まとめ

本プロジェクトで選定した神経毒性物質は、PTUはニューロン新生障害、細胞移動障害、髄鞘形成障害等、広範な機序による神経発達障害物質、グリシドールは軸索傷害物質、クプリゾン髄鞘傷害物質、バルプロ酸は細胞移動障害物質、メチルニトロソウレアは DNA 傷害物質の代表として選択した。いずれも異なる神経毒性機序を持つことから、5 物質間に共通する変動遺伝子は見出されなかった。一方で、PTU・クプリゾン間では髄鞘形成関連遺伝子が共通して変動しており、PTU・クプリゾンに共通する神経毒性に関しては遺伝子発現量変化を捉えることで検出できる可能性が示された。

5 物質それぞれの 28 日間反復投与試験の網羅的遺伝子発現解析結果の比較により、髄鞘傷害性、ニューロン新生障害性、軸索傷害性、ニューロン移動障害性及び DNA 傷害性に対するそれぞれの高感受性標的的部位及び、有意に発現変動する遺伝子群を獲得した。これに基づき、海馬歯状回及び帯状回におけるミエリン形成障害性指標遺伝子セット及び細胞移動障害性指標遺伝子セット、及び海馬におけるニューロン新生障害性指標遺伝子セット及びシナプス可塑性影響指標遺伝子セットを獲得した。これらの多くは発達期暴露試験でも変動を示したことから、発達神経毒性指標としても有用であると考えられた。

毒性指標遺伝子セットに加え、既知の発達神経毒性指標について免疫組織化学的評価を検討した結果、海馬歯状回におけるニューロン新生、シナプス伝達及び細胞移動障害指標分子セット、海馬歯状回及び帯状回におけるシナプス可塑性影響指標分子セット及び髄鞘傷害指標分子セット、帯状回におけるグリア新生障害指標分子セットを獲得した。

これらの毒性指標遺伝子／分子セットに基づき、28 日間反復投与試験の枠組みにおいて未知の化学物質の神経毒性発現可能性を予測するための解析手法として、簡易プロトコルを作成した。即ち、被験物質のラットに対する 28 日間反復投与試験を行い、投与終了後に脳を摘出し、メタカーン固定及びブアン固定（又は PFA 灌流固定）を行う。メタカーン固定脳を用い、リアルタイム RT-PCR 法により高感受性部位における毒性指標遺伝子の発現変動を検索する。また、ブアン固定（又は PFA 灌流固定）脳を用い、免疫組織化学的手法により高感受性部位における毒性指標分子の分布解析を行う。これらの結果を総合し、被験物質の神経毒性及びその障害機序を予測する。

今回提案する簡易プロトコルの有用性に関しては、毒性機序が既知の他の（発達）神経毒性物質の暴露試験を重ねて行い、データを蓄積することでその汎用性を検証する必要があると考えられる。

(4) 評価項目に対する自己評価

(4)-1 得られた成果

- ・ 毒性機序の異なる5つの既知の神経毒性物質について発達期暴露試験及び28日間反復経口投与試験を実施し毒性プロファイルを得た。
- ・ 各試験で取得した脳の部位別の遺伝子発現変動プロファイルを獲得し、遺伝子発現解析による神経毒性検出の可能性を見出した。
- ・ 神経毒性の作用機序が異なる物質で特異的に変動する遺伝子セット（のべ15遺伝子）及び免疫組織化学的な検査を行う分子セット（16分子）を選定した。
- ・ 高感受性の脳部位における遺伝子発現量変化及び免疫組織化学的手法を組み合わせることにより、(発達)神経毒性の発現可能性を評価するプロトコル(案)を構築した。

(4)-2 設定された目標以外に得られた成果

- ・ 脳部位特異的なマイクロアレイ及びプロテオーム解析に適う組織採材手法を確立した。
- ・ 発達期暴露試験と28日間反復投与試験間で共通の変動遺伝子群を抽出できたことから、28日間反復経口投与試験から得られる遺伝子発現情報の発達神経毒性発症予測への応用の可能性が示唆された。特に海馬歯状回では、発達期暴露及び28日間反復投与試験ともに、ニューロン新生傷害を反映する遺伝子群に発現変動が認められたことから、本部位を標的とした遺伝子発現解析による成熟期及び発達期神経毒性予測への有用性が示唆された。
- ・ 遺伝子発現量変化だけでなく、免疫組織化学的なマーカー分子を特定した。
- ・ 免疫組織化学的な解析手法を取入れることにより、より広範な作用機序による(発達)神経毒性を評価できるようになった。

(4)-3 共通指標である、論文の発表、特許の出願、国際標準の形成（OECDでの活動）、プロトタイプ の作製等（2.2 論文発表、特許出願状況等を参照）

- ・ メタカーン固定法を利用した各脳組織部位特異的なマイクロアレイ及びプロテオーム解析に適う組織採材手法の確立に関する論文が1報、その他代表化合物の暴露試験及び遺伝子発現プロファイル等にかかわる論文10報が受理されており、現在2本の論文を投稿中である。
- ・ 神経毒性については、本プロジェクトにおいては遺伝子発現量で評価するというフィージビリティを中心とした検討を行っていたが、5物質と限られた物質の中からも、それら5物質が有する作用機序に基づく神経毒性評価プロトコル案を構築することができた。

2.3. 目標の達成度

表 3 最終目標に対する成果・達成度の一覧表

最終目標	成果	達成度
28 日間反復投与試験の動物サンプルから取得した遺伝子発現変動データを活用して有害性を予測する手法の開発		
(a)各毒性に関する関連遺伝子の絞り込み		
<p>・主要臓器（肝臓・腎臓）の毒性、発がん性（肝発がん、腎発がん）及び神経毒性を有する毒性既知物質を効率的に選定して実験動物に投与し、遺伝子の発現変動に関する包括的なデータを取得する。</p>	<p>・ 6万プローブ（約3万遺伝子）が搭載されたマイクロアレイを用いて、全サンプルについて包括的な遺伝子発現量データを取得した。</p>	達成
	<p>一般毒性：</p> <p>・ 被験物質として35試験/32物質について、28日間反復投与毒性試験（サテライト群：1、7、14日間投与群）を行い、肝臓及び腎臓の5部位（皮質、髄質外帯、髄質内帯、乳頭、全体）の遺伝子の発現変動に関する品質が確保された包括的なデータを取得した（合計：3,369サンプル）</p>	達成
	<p>発がん性：</p> <p>・ 遺伝子発現量データについては、一般毒性と共有した。さらに、肝発がんが生じるまでの遺伝子発現量データを取得するために、Diethylnitrosamine (DEN) を14日、28日、6週、8週、10週、13週、18週間反復投与した肝臓サンプルについてマイクロアレイ実験を行った（肝臓：3個体/群×3群×7時点=63サンプル）</p>	達成
	<p>神経毒性：</p> <p>・ 神経毒性作用既知の5物質を選定し（軸索傷害物質、髄鞘傷害物質、細胞移動障害物質等）、28日間反復投与毒性試験及び妊娠期・授乳期ばく露試験を行い、脳の4部位（海馬歯状回、帯状回、脳梁、小脳）のマイクロアレイによる遺伝子</p>	達成

	<p>の発現変動に関する品質が確保された包括的なデータを取得した (3個体/群×3群×4部位×2試験/物質×5物質=360サンプル)。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 神経毒性作用既知の5物質の詳細な毒性所見や免役染色が可能な分子等のデータを取得した。 	
<p>・ 毒性の発現に特異的と考えられる遺伝子を絞り込み、各毒性既知物質の投与による毒性発現のマーカとして利用しうる遺伝子を選定する。</p>	<p>一般毒性：</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 肝毒性は5所見 (小葉中心性肝細胞脂肪変性、小葉周辺性肝細胞脂肪変性、(単細胞)壊死、小葉中心性肝細胞肥大、びまん性小葉中心性) について、8～36種類の毒性発現マーカ遺伝子を選定した。 ・ 腎毒性は5所見 (空胞変性、核大小不同、核濃縮、尿細管(単細胞)壊死、乳頭壊死) について、3～10種類の毒性発現マーカ遺伝子を選定した。 	達成
	<p>発がん性：</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 肝発がん性はこれまでに15遺伝子の予測遺伝子を選定した。 ・ 肝発がん性の簡易法 (定量PCR法による簡易予測法) では最小予測遺伝子セットとして4遺伝子を選定した。 ・ 腎発がん性は、新たに皮質と髄質外帯の遺伝子発現量データから10遺伝子を選定した。 	達成
	<p>神経毒性：</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 神経毒性の作用機序が異なる物質で特異的に変動する遺伝子セット (のべ15遺伝子) 及び免役組織化学的な検査を行う分子セット (16分子) を選定した。 	達成
<p>(b) 各毒性の発現可能性を検出し得る方法の確立</p>		
<p>各毒性既知物質の投与による毒性発現に伴う遺伝子発現変動の特徴分析の結論を得る。</p>	<p>一般毒性：</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 肝毒性及び腎毒性の合計10所見の毒性判定結果については、1化合物あたり1つ 	達成

	<p>のレーダーチャート形式で可視化し、その一致率はトレーニングデータ（25試験/22物質）で99.2%、テストデータ（10試験/10物質）で96.7%と高い値を示した。</p> <ul style="list-style-type: none"> 肝毒性については、四塩化炭素、腎毒性についてはシスプラチンをケーススタディとして、毒性メカニズムをMoA (Mode of Action) /AOP (Adverse Outcome Pathway) として整理した。 	
	<p>発がん性：</p> <ul style="list-style-type: none"> 肝発がん性は、各種外部データに対して、平均85%以上の高い一致率で発がん性を予測できた。 腎発がん性はトレーニングデータと外部データを合わせた35試験/32物質（分類不明を除く33試験/30物質）を予測したところ、正答率は94.0%と高い予測結果を示した。 肝発がん性についてはDiethylnitrosamine (DEN)、腎毒性についてはシスプラチンをケーススタディとして、毒性メカニズムをMoA (Mode of Action) /AOP (Adverse Outcome Pathway) として整理した。 	達成
	<p>神経毒性：</p> <ul style="list-style-type: none"> 28日間反復投与毒性試験の枠組みで得られる脳の部位別の遺伝子発現量データを用いることで神経毒性が評価できる可能性を示した。 また、28日間反復投与毒性試験の枠組みで発達神経毒性を評価できる可能性を示した。 本事業で試験を実施した5物質のデータに基づき神経毒性の作用機序に応じて高感受性の脳部位を特定することができた。 	達成
【主要臓器（肝臓・腎臓）の一般毒性】	<ul style="list-style-type: none"> 肝毒性及び腎毒性の毒性判定システムについて、動物実験、サンプル調製、マイクロ 	達成

<p>・主要臓器（肝臓・腎臓）の一般毒性の発現可能性を予測する解析手法を確立し、文書化する。</p>	<p>アレイ実験について標準プロトコルを作成し、ウェブページ³で公表した。</p>	
<p>【発がん性（肝発がん・腎発がん）】</p> <p>・発がん性（肝発がん・腎発がん）の発現可能性を予測する解析手法を確立し、文書化する。</p>	<p>・肝発がん性及び腎発がん性の予測システムについて、動物実験、サンプル調製、マイクロアレイ実験について標準プロトコルを作成し、ウェブページ³で公表した。</p> <p>・肝発がん性の簡易法（定量PCR法による簡易予測法）については、Preliminary SPSF案を作成した。Preliminary SPSFについては2016年6月にOECDへ提出し、2016年10月現在、各国からのコメントに対応しているところである。</p>	<p>達成</p>
<p>【神経毒性】</p> <p>・本事業で取得した新たな科学的知見にもとづき、可能な範囲でその毒性発現可能性を予測する解析手法を確立する。</p>	<p>・限られた物質ではあるが、獲得した神経毒性機序ごとの測定対象部位と、毒性機序に基づく毒性指標遺伝子セット及び免疫組織化学的に評価可能な分子セットに基づき、神経毒性の発現可能性を予測する解析プロトコルを考案した。プロトコルには以下の内容を含む；</p> <ul style="list-style-type: none"> - 脳の標的部位を遺伝子発現量解析等に採材するために開発したメタカーン固定法及びメタカーン固定脳からの採材方法。 - 髄鞘形成障害指標遺伝子セット等の遺伝子セット（のべ15遺伝子）、各遺伝子セットの測定対象部位、及びそれらの測定方法。 - 免疫組織化学的な解析を行う毒性指標分子セット（16分子）、各分子セットの測定対象部位、及びそれらの測定方法。 - 判定方法の案。 	<p>達成</p>

³ http://www.cerij.or.jp/research_assistant_project/tox_omics.html

3. 論文発表、特許出願状況等

3.1. 論文等の外部発表

本プロジェクト成果の論文、外部発表等の実績は以下のとおりである。

また、論文投稿詳細及び口頭発表・講演等詳細をそれぞれ表 3-1 及び表 3-2 に示す。

論文投稿(件数、H28 年 10 月現在) 合計 26 件

掲載あるいは受理	投稿中
23	3

学会発表(件数、H28 年 10 月現在) 合計 53 件

国際学会 (口頭発表)	国内学会 (口頭発表)	講演等
5*	7	7
国際学会 (ポスター発表)	国内学会 (ポスター発表)	
10	24	

* : OECD 会議での発表 2 回を含む

3.2. 特許出願

・特許出願実績なし。(H28 年 10 月末現在)

* 本プロジェクトにより開発した試験手法は OECD ガイドライン化等による国際標準化により幅広く普及させることを前提としているため、積極的な特許出願は行っていない。

表 3-1 論文投稿詳細

No.	Author	Title	ジャーナル名、巻、ページ、年号 [年号順]
1.	Matsumoto H, Yakabe Y, Saito F, Saito K, Sumida K, Sekijima M, Nakayama K, Miyaura H, Otsuka M, Shirai T	New Short Term Prediction Method for Chemical Carcinogenicity by Hepatic Transcript Profiling Following 28-Day Toxicity Tests in Rats.	Cancer Informatics, 10:259-271, 2011
2.	Shiraki A, Akane H, Ohishi T, Wang L, Morita R, Suzuki K, Mitsumori K, Shibutani M	Similar distribution changes of GABAergic interneuron subpopulations in contrast to the different impact on neurogenesis between developmental and adult-stage hypothyroidism in the hippocampal dentate gyrus in rats.	Arch. Toxicol., 86(10):1559-1569, 2012
3.	松本博士	学会報告「遺伝子発現変動を用いた短期発がん性システム;CARCINOscreen®	安研協会報、第 24 号 : pp.84-85, 2012
4.	赤堀有美、今田中伸哉	新規試験法開発を目指す Tox-Omics について	JSAAE News Letter(日本動物実験代替法学会), 2012
5.	赤堀有美	オミクス技術を用いた新規試験法開発プロジェクト Tox-Omics について	安研協会報, 第 24 号 : 79-81, 2012
6.	Akane H, Shiraki, A, Imatanaka, N, Akahori Y, Itahashi, M, Ohishi T, Mitsumori K, Shibutani M	Glycidol induces axonopathy by adult stage-exposure and aberration of hippocampal neurogenesis affecting late-stage differentiation by developmental exposure in rats.	Toxicol. Sci., 134(1):140-154, 2013
7.	Akane H, Saito F, Yamanaka H, Shiraki A, Imatanaka N, Akahori Y, Morita R, Mitsumori K, Shibutani M.	Methacarn as a whole brain fixative for gene and protein expression analyses of specific brain regions in rats.	J. Toxicol. Sci., 38(3):431-443, 2013

No.	Author	Title	ジャーナル名、巻、ページ、年号 [年号順]
8.	Matsumoto H, Saito F, Takeyoshi M	CARCINOscreen®: New short-term prediction method for hepatocarcinogenicity of chemicals based on hepatic transcript profiling in rats.	J. Toxicol. Sci., 39(5):725-734, 2014
9.	Akane H, Saito F, Shiraki A, Takeyoshi M, Imatanaka N, Itahashi M, Murakami T, Shibutani M	Downregulation of immediate-early genes linking to suppression of neuronal plasticity in rats after 28-day exposure to glycidol.	Toxicol. Appl. Pharmacol., 279(2):150-162, 2014
10.	Shiraki A, Saito F, Akane H, Takeyoshi M, Imatanaka N, Itahashi M, Yoshida T, Shibutani M	Expression alterations of genes on both neuronal and glial development in rats after developmental exposure to 6-propyl-2-thiouracil.	Toxicol. Lett. , 228(3):225-234, 2014
11.	Akane H, Shiraki A, Imatanaka N, Akahori Y, Itahashi M, Abe H, Shibutani M	Glycidol induces axonopathy and aberrations of hippocampal neurogenesis affecting late-stage differentiation by exposure to rats in a framework of 28-day toxicity study.	Toxicol. Lett., 224(3):424-432, 2014
12.	Akane H, Saito F, Shiraki A, Imatanaka N, Akahori Y, Itahashi M, Wang L, Shibutani M	Gene expression profile of brain regions reflecting aberrations in nervous system development targeting the process of neurite extension of rat offspring exposed developmentally to glycidol.	J. Appl. Toxicol., 34(12):1389-1399, 2014
13.	Abe H, Tanaka T, Kimura M, Mizukami S, Imatanaka N, Akahori Y, Yoshida T, Shibutani M	Developmental exposure to cuprizone reduces intermediate-stage progenitor cells and cholinergic signals in the hippocampal neurogenesis in rat offspring.	Toxicol. Lett., 234(3):180-93, 2015

No.	Author	Title	ジャーナル名、巻、ページ、年号 [年号順]
14.	Yamashita K, Matsumoto H, Saito F, Takeyoshi M	Differences in gene expression profiles in liver caused by different type of anesthesia; cases of CO ₂ -O ₂ and isoflurane.	J. Toxicol. Sci., 40(6):829-836, 2015
15.	Matsumoto H, Saito F, Takeyoshi M	Applicability of a gene expression based prediction method to SD and Wistar rats: An example of CARCINOscreen®.	J. Toxicol. Sci., 40(6):805-807, 2015
16.	Abe H, Tanaka T, Kimura M, Mizukami S, Saito F, Imatanaka N, Akahori Y, Yoshida T, Shibutani M	Cuprizone decreases intermediate and late-stage progenitor cells in hippocampal neurogenesis of rats in a framework of 28-day oral dose toxicity study.	Toxicol. Appl. Pharmacol., 287(3):210-221, 2015
17.	Shibutani M	Hippocampal neurogenesis as a critical target of neurotoxicants contained in foods.	Food Safety, 3(1):1-15, 2015
18.	Yamanaka H and Takeyoshi M	Identification of sheep red blood cell (SRBC) surface immune-responsive peptides detected by antisera from SRBC immunized rat.	J. Toxicol. Sci., 41(1):13-16, 2016
19.	Saito F, Matsumoto H, Akahori Y, Takeyoshi M	Simpler alternative to CARCINOscreen® based on quantitative PCR (qPCR)	J. Toxicol. Sci., 41(3):383-390, 2016
20.	Abe H, Saito F, Tanaka T, Mizukami S, Hasegawa-Baba Y, Imatanaka N, Akahori Y, Yoshida T, Shibutani M	Developmental cuprizone exposure impairs oligodendrocyte lineages differentially in cortical and white matter tissues and suppresses hippocampal interneuronal glutamatergic signals and synaptic plasticity in rats	Toxicol. Appl. Pharmacol., 290:10-20, 2016

No.	Author	Title	ジャーナル名、巻、ページ、年号 [年号順]
21.	Shiraki A, Saito F, Akane H, Akahori Y, Imatanaka N, Itahashi M, Yoshida T, Shibutani M	Gene expression profiling of the hippocampal dentate gyrus in an adult toxicity study captures a variety of neurodevelopmental dysfunctions in rat models of hypothyroidism.	J. Appl. Toxicol., 36(1): 24-34, 2016
22.	Shiraki A, Tanaka T, Watanabe Y, Saito F, Akahori Y, Imatanak N, Yoshida T, Shibutani M	Immunohistochemistry of aberrant neuronal development induced by 6-propyl-2-thiouracil in rats	Toxicol. Appl. Pharmacol., in press.
23.	Abe H, Saito F, Tanaka T, Mizukami S, Watanabe Y, Imatanaka N, Akahori Y, Yoshida T, Shibutani M	Global gene expression profiles in brain regions reflecting abnormal neuronal and glial functions targeting myelin sheaths after 28-day exposure to cuprizone in rats.	Toxicol. Appl. Pharmacol., in press.
24.	Saito F, Hoshuyama S., Kobayashi T., Matsumoto H., Takeyoshi M.	Time course analysis of outer medulla-specific gene expression profiles in the kidneys of Sprague-Dawley rats in a repeated dose study of 2-amino-4-nitrophenol	J. Toxicol. Sci.,投稿中
25.	Matsumoto H, Saito F, Takeyoshi M	Investigation of the early-response genes of chemical-induced renal carcinogenicity for the prediction of chemical carcinogenicity in rats.	J. Toxicol. Sci.,投稿中
26.	Yamashita K, Saito F, Matsumoto H, Takeyoshi M	Chemical-induced fatty degeneration and specific gene expression changes in rat liver	J. Toxicol. Sci.,投稿中

表 3-2 口頭発表・講演等詳細 (○：発表者)

No.	発表者	演題	発表学会等 [年号順]
1.	○武吉正博	新規経済産業省プロジェクト「遺伝子プロジェクト」	第 24 回日本動物実験代替法学会学術大会. 市民公開講座「日本における代替法研究の新しい胎動」, 仙台, 2011
2.	○白木彩子、Wang Liyun、大石 巧、赤根弘敏、土屋卓磨、北条友理、鈴木和彦、三森国敏、渋谷 淳	発達期ないし成熟後での甲状腺機能低下によるラット海馬歯状回におけるニューロン新生への影響の比較	第 152 回日本獣医学会学術集会, 大阪, 2011
3.	○赤根弘敏、齋藤文代、山中秀徳、白木彩子、大石 巧、Wang Liyun、林 仁美、鈴木和彦、三森国敏、渋谷 淳	ラットの脳部位特異的な網羅的解析を可能とするメタカーン全脳固定法の検討	第 28 回日本毒性病理学会学術集会, 東京, 2012
4.	○松本博士、矢可部芳州、齋藤文代、武吉正博、白井智之	CARCINOscreen: a new short term screening method for chemical carcinogenicity 特徴的な遺伝子発現パターンを用いた短期発がん性予測法 CARCINOscreen	日本環境変異原学会 第 40 回大会, 東京, 2012
5.	○齋藤文代、松本博士、武吉正博、矢可部芳州	短期発がん性システムの Wister Hannover ラットへの適用性及び系統間差の検討 Applicability evaluation of the short-term prediction system for carcinogenicity of Wister Hannover rats and interstrain difference.	第 39 回日本毒性学会学術集会, 仙台, 2012
6.	○松本博士、齋藤文代、武吉正博	化学物質の短期発がん性スクリーニングの用量設定方法の検討 Improvement of a dose setting method for the short-term chemical carcinogenicity screening method	第 39 回日本毒性学会学術集会, 仙台, 2012

No.	発表者	演題	発表学会等 [年号順]
7.	○Saito, F.	Japanese New Project :Assay Developments by Omics Technologies (日本の新プロジェクトについて;オミクス技術によるアッセイ系の開発)	OECD 5th Meeting of The Extended Advisory Group on Molecular Screening and Toxicogenomics, Paris, 2012
8.	○Saito, F.	Japanese New Project :Assay Developments by Omics Technologies (日本の新プロジェクトについて;オミクス技術によるアッセイ系の開発)	AXLR8-3 Workshop Berlin, 2012
9.	○Saito F, Matsumoto H, Takeyoshi M	CARCINOscreen®: New short-term prediction method for carcinogenicity by hepatic transcript profiling in a 28-day repeat-dose toxicity study	生命医薬情報学連合大会(日本バイオインフォマティクス学会年会), 東京, 2012
10.	○松本博士	遺伝子発現変動を用いた化学物質の毒性予測	CERI 寄附講座 (九州大学) 先端材料化学 ~設計, 構造・物性から機能化まで~, 福岡, 2012
11.	○齋藤文代	遺伝子発現量データを用いた新たな毒性評価方法の開発	第 17 回化学物質評価研究機構研究発表会, 東京, 2012
12.	○白木彩子、赤根弘敏、齋藤文代、山中秀徳、Liyun Wang、大石 巧、鈴木和彦、三森国敏、渋谷 淳	6-propyl-2-thiouracil (PTU)の発達期暴露によるラット海馬歯状回における甲状腺機能低下を介したニューロン新生の持続的な影響検出とその遺伝子発現プロファイルの同定	第 39 回日本毒性学会学術集会, 仙台, 2012
13.	○赤根弘敏、齋藤文代、山中秀徳、白木彩子、盛田怜子、八舟宏典、谷合枝里子、鈴木和彦、三森国敏、渋谷 淳	グリシドールのラット母動物暴露による母動物と児動物の神経系に対する影響	第 39 回日本毒性学会学術集会 仙台, 2012
14.	○HIRONO Y, NOSE M, KAWAZOE A,	Immunotoxic effects by oral gavage of	第 41 回日本免疫学会学術集会, 千葉, 2012

No.	発表者	演題	発表学会等 [年号順]
	SHIGEYOSHI E, SASAKI K, TANAHASHI Y, SAKURA M, TAKEYOSHI M, SAITO F, AKAHORI Y, IMATANAKA N, TAKEUCHI M	cyclophosphamide or cyclosporine A as immunosuppressive drug in Rats	
15.	○Hirono Y, Nose M, Kawazoe A, Shigeyoshi E, Sasaki K, Tanahashi Y, Sakura M, Takeyoshi M, Saito F, Akahori Y, Imatanaka N, Takeuchi M	Effects of cyclophosphamide as immunosuppressive drug on Alveolar Macrophages by oral administration in rats	The 17th Congress of the APSR (第17回アジア太平洋呼吸器学会議), 香港, 2012
16.	○Kojima H, Tanaka N, Oshimura M, Saito K, Saito F, Imatanaka N	New Research Projects in Japan for Alternative to Repeated Dose Oral Toxicity Studies	EUROTOX, Stockholm, 2012
17.	○Kojima H, Tanaka N, Oshimura M, Saito K, Saito F, Imatanaka N	Japanese New Project "ARCH-Tox" for the Future Chemicals Management Policy: Research and Development of In Vitro and In Vivo Assays for Internationally eading Hazard Assessment and Test Methods	1st Annual Meeting of the American Society for Cellular & Computational Toxicology, ベセスダ、米国, 2012
18.	○齋藤文代	遺伝子の発現量測定による発がん性スクリーニング手法について	化学物質のリスク評価検討会 第4回有害性評価小委員会(厚生労働省), 東京, 2012
19.	○Akane H, Saito F, Shiraki A, Mitsumori K, Shibutani M	Effect of maternal exposure to glycidol on nervous system of dams and offspring in rats.	30th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology, Annual Meeting of the European College of Veterinary Pathologist 24th Annual Meeting of the Spanish Society of Veterinary Pathology. León, 2012
20.	○齋藤文代	非臨床スクリーニングにおける CARICNOscreen®の有用性と今後の	医薬品産業情報研究会 (PIフォーラム). 第32回セイフティー分科会, 2013

No.	発表者	演題	発表学会等 [年号順]
		展開(短期発がん性予測システム：CARCINOscreen®)	
21.	○齋藤文代	2-Amino-4-nitrophenol の SD ラットを用いた 28 日間反復投与試験における腎臓部位別の経時的な遺伝子発現プロファイル解析 Time course analysis of zone specific gene expression profiles of kidney in 28-day repeated dose study in SD rats of 2-Amino-4-nitrophenol.	第 40 回日本毒性学会学術集会, 幕張, 2013
22.	○松本博士	TGP データを用いた化学物質の短期発がん性スクリーニング法: CARCINOscreen®の検証 Validation of a short-term prediction system for carcinogenicity (CARCINOscreen®) using dataset of Toxicogenomics Project.	第 40 回日本毒性学会学術集会, 幕張, 2013
23.	○赤根弘敏、齋藤文代、白木彩子、板橋恵、Wang Liyun、赤堀有美、今田中伸哉、鈴木和彦、三森国敏、渋谷淳	グリシドールのラット 28 日間反復投与による海馬ニューロン新生への影響	第 40 回日本毒性学会学術集会, 千葉, 2013
24.	○松本博士	遺伝子発現変動を用いた化学物質の毒性予測	CERI 寄附講座 九州大学大学院工学研究院応用化学部門「先端材料化学 ～設計、構造・物性から機能化まで～」, 福岡, 2012
25.	○Saito, F.	(招待講演) CARCINOscreen®: Novel short-term prediction system for carcinogenicity of chemicals by hepatic transcriptome analysis in a 28-day repeated dose toxicity study	Genetic Engineering-2013 the International Conference on Genetic Engineering & Genetically Modified Organisms, NC, 2013

No.	発表者	演題	発表学会等 [年号順]
26.	○赤根弘敏、齋藤文代、白木彩子、板橋恵、Wang Liyun、鈴木和彦、三森国敏、渋谷淳	グリンドールのラットへの 28 日間反復投与による海馬歯状回におけるニューロン新生に対する影響	第 29 回日本毒性病理学会学術集会, つくば, 2013
27.	○白木彩子、赤根弘敏、齋藤文代、赤堀有美、今田中伸哉、板橋恵、Wang Liyun、大石巧、鈴木和彦、三森国敏、渋谷淳	6-propyl-2-thiouracil (PTU)のラット発達期暴露による甲状腺機能低下を介したニューロン・グリア発達障害に関連する遺伝子発現プロファイルの異なる脳部位での同定	第 29 回日本毒性病理学会学術集会, つくば, 2013
28.	○渋谷淳	ニューロン新生：発達神経毒性の新たな標的性	公益社団法人日本獣医学会、日本小動物獣医学会—シンポジウム「毒性病理学とヒトの健康」—モデル動物を通じたメカニズム解明—平成 24 年度日本獣医師会 獣医学術学会年次大会、大阪市, 2013
29.	○渋谷淳	化学物質と神経発達	第 5 回応用トキシコロジー リカレント講座, 東京, 2013
30.	○Kojima H	Japanese Project “ARCH-Tox” for the Future Chemicals Management Policy: Research and Development of in vitro and in vivo Assays for Internationally Leading Hazard Assessment and Test Methods	15th Annual Congress of European Society for Alternatives to Animal Testing (EUSAAT), Linz, Austria, 2013
31.	○白木彩子、赤根弘敏、齋藤文代、赤堀有美、今田中伸哉、板橋恵、Wang Liyun、村上智亮、鈴木和彦、吉田敏則、渋谷淳	6-Propyl-2-thiouracil (PTU)のラット 28 日間反復投与による甲状腺機能低下を介したニューロン・グリア発達障害の検出	第 30 回日本毒性病理学会学術集会, 徳島, 2014
32.	○齋藤文代	遺伝子の発現量測定による発がん性スクリーニング手法について (短期発がん性予測システム: CARCINOscreen®)	化学物質のリスク評価検討会 第 4 回遺伝毒性評価ワーキンググループ (厚生労働省),

No.	発表者	演題	発表学会等 [年号順]
			2014
33.	○阿部一、板橋恵、田中猛、村上智亮、齋藤文代、武吉正博、今田中伸哉、吉田智則、渋谷淳	脱髄誘発物質クプリゾンのラットへの発達期暴露による離乳時の海馬ニューロン新生に対する影響	第 41 回日本毒性学会学術年会, 神戸, 2014
34.	○白木彩子、赤根弘敏、齋藤文代、赤堀有美、今田中伸哉、板橋恵、村上智亮、吉田敏則、渋谷淳	6-propyl-2-thiouracil (PTU)のラット発達期暴露及び28日間反復投与による甲状腺機能低下を介したニューロン・グリア発達障害に関連する障害指標分子の検索	第 157 回日本獣医学会学術集会講演要旨集, 神戸, 2014
35.	○齋藤文代	Tox-Omics Project: Development of methods to detect multi-toxic effects using gene expression analysis	9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Science, プラハ, 2014
36.	○Abe H, Itahashi M, Tanaka T, Kimura M, Mizukami S, Akahori Y, Imatanaka N, Yoshida T, Shibutani M	Impact of cuprizone as a demyelinating agent on rat hippocampal neurogenesis	国際神経病理学会, リオデジャネイロ, 2014
37.	○阿部一、田中猛、白木彩子、齋藤文代、赤堀有美、今田中伸哉、吉田智則、渋谷淳	ラット28日間反復投与試験の枠組みでの海馬ニューロン新生に対する脱髄誘発物質 Cuprizone の障害性の検出	第 31 回日本毒性病理学会学術集会, 東京, 2015
38.	○阿部一、田中猛、齋藤文代、赤堀有美、武吉正博、今田中伸哉、吉田智則、渋谷淳	髄鞘傷害物質クプリゾンのラットへの発達期暴露による脳部位での網羅的遺伝子発現解析を用いたニューロン・グリア発達障害指標の検出 Search for disruption markers of neuronal and glial development by global gene expression analysis in brain regions of rats after developmental exposure to cuprizone, a myelin toxicant.	第 42 回日本毒性学会学術年会, 石川, 2015

No.	発表者	演題	発表学会等 [年号順]
39.	○渡邊洋祐、村上智亮、阿部一、田中猛、白木彩子、木村真之、水上さやか、寒川祐見、吉田敏則、渋谷淳	バルプロ酸の発達期暴露によるラットの海馬歯状回の生後ニューロン新生に与える影響	第 42 回日本毒性学会学術年会, 石川, 2015
40.	○Saito F	Tox-Omics Project: Development of mechanism based detection system for chemical-induced hepatotoxicity using gene expression analysis.	OECD -Meeting of the Extended Advisory Group on Molecular Screening and Toxicogenomics, Paris, 2015
41.	○Hasegawa-Baba Y, Watanabe Y, Tanaka T, Shiraki A, Kimura M, Mizukami S, Abe H, Murakami T, Saito F, Akahori Y, Imatanaka N, Yoshida T, Shibutani M	Different Toxicity Targets in the Hippocampal Neurogenesis by Developmental and Postpubertal-stage Exposure to Valproic Acid in Rats	13th European Congress of Toxicologic Pathology (ESTP), ギルフォード (英国), 2015
42.	○Abe H, Tanaka T, Shirak A, Kimura M, Mizukami S, Saito F, Akahori Y, Imatanaka N, Yoshida T, Shibutani M	Evaluation of developmental neurotoxicity of cuprizone as a demyelinating agent in a framework of 28-day repeated oral toxicity study	13th European Congress of Toxicologic Pathology (ESTP), ギルフォード (英国), 2015
43.	○Shiraki A, Akane H, Itahashi M, Saito F, Akahori Y, Imatanaka N, Yoshida T, Shibutani M	Immunohistochemical Detection of Aberrant Neuronal Development Induced by 6-Propyl-2-thiouracil (PTU) in the Framework of Developmental Neurotoxicity study and 28-day Toxicity Studies Using Rats.	13th European Congress of Toxicologic Pathology (ESTP), ギルフォード (英国), 2015
44.	○Kojima H, Oshimura M, Imatanaka N	Update for Japanese Project "ARCH-Tox" for the Future Chemicals Management Policy: Research and Development of in vitro and in vivo Assays for Internationally Leading Hazard Assessment and Test	The American Society for Cellular and Computational Toxicology (ASCCT), ノースカロライナ, 2015

No.	発表者	演題	発表学会等 [年号順]
		Methods	
45.	○渋谷淳	ニューロン・グリア新生を標的とした網羅的神経毒性評価手法の高度化 (Establishment of comprehensive evaluation method on neurotoxicity targeting neurogenesis and gliogenesis)	日本動物実験代替法学会 第 28 回大会, 横浜, 2015
46.	○齋藤文代	遺伝子発現解析によるメカニズムベースの毒性評価	日本動物実験代替法学会 第 28 回大会, 横浜, 2015
47.	○松本博士	遺伝子発現解析による発がん性予測への挑戦 (Challenge to short-term prediction for chemical carcinogenicity by gene expression analysis)	日本動物実験代替法学会 第 28 回大会, 横浜, 2015
48.	○小島肇	シンポジウム 7 : 経済産業省プロジェクト「石油精製物質等の新たな化学物質規制に必要な国際先導的有害性試験法の開発 : ARCH-Tox」の計画概要,	日本動物実験代替法学会 第 28 回大会, 横浜, 2015
49.	○齋藤文代	遺伝子発現量解析によるメカニズムベースの肝/腎毒性評価	日本毒性学会学術年会, 名古屋, 2016
50.	○松本博士	遺伝子発現量解析による発がん性予測への挑戦	日本毒性学会学術年会, 名古屋, 2016
51.	○渡邊洋祐、水上さやか、長谷川也須子、赤堀有美、今田中伸哉、吉田敏則、渋谷淳	メチルニトロソ尿素 28 日間反復経口投与によるラット海馬ニューロン新生顆粒細胞系譜の神経幹細胞からの広範な障害性について	日本毒性学会学術年会, 名古屋, 2016
52.	○林多恵、松本博士、赤堀有美、山下京介、宮浦	短期発がん性スクリーニング法 CARCINOscreen®を用いた遺伝	日本毒性学会学術年会, 名古屋, 2016

No.	発表者	演題	発表学会等 [年号順]
	英樹、小林俊夫、菊野秩、石井聡子、中井誠、齋藤文代	子発現量データに基づく（定量的）リスク評価法の検討	
53.	○Watanabe Y, Nakajima K, Hasegawa-Baba Y, Mizukami S, Akahori Y, Imatanaka N, Yoshida T, Shibutani M	Comparison in the effect on rat hippocampal neurogenesis between developmental exposure and postpubertal-stage exposure of N-methyl-N-nitrosourea.	14th European Congress of Toxicologic Pathology (ESTP), バルセロナ, 2016