

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2013-31377

(P2013-31377A)

(43) 公開日 平成25年2月14日(2013.2.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 2	4 B 0 6 3
C 1 2 N 5/0735 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 0 2 C	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/074 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 0 2 D	
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 0 2 A	
審査請求 未請求 請求項の数 27 O L (全 25 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2011-167768 (P2011-167768)
 (22) 出願日 平成23年7月29日 (2011.7.29)

(出願人による申告) 平成22年度独立行政法人新エネルギー・産業技術開発機構「高機能簡易型有害性評価手法の開発／28日間反復投与試験結果と相関する遺伝子発現データセットの開発」にかかる業務委託研究、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(71) 出願人 509088653
 株式会社メディクローム
 東京都新宿区西新宿三丁目1番5号8F
 (74) 代理人 100134865
 弁理士 田中 泰彦
 (74) 代理人 100151345
 弁理士 今井 順一
 (72) 発明者 渡邊 慎哉
 東京都港区白金台3-18-8-903
 (72) 発明者 今井 順一
 東京都品川区戸越5-2-1-1005
 (72) 発明者 河村 未佳
 神奈川県横浜市鶴見区小野町75番地1号
 株式会社メディクローム横浜研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子発現変動解析による化学物質が生体を与える影響の検出方法

(57) 【要約】

【課題】血液学的手法または病理学的手法による腎臓毒性の検出は指標（マーカー）が限られているため、その評価が困難である。

【解決手段】外部環境の変化による生体内の遺伝子発現変化は鋭敏であるため、生体毒性を判別するための遺伝子セットを同定することは、生体毒性が起こる前に及びそれが病理学的検査により実証される前に生体毒性を迅速かつ正確に検出することが可能である。本発明は、その新たな遺伝子セットを用いた生体毒性の検出・予測方法、そのキット、生体毒性の処置方法及び生体毒性の候補薬剤確認方法を提供する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

被検化学物質を生体または細胞に所定期間曝露させた後の遺伝子発現レベルを測定することにより該被検化学物質の毒性を評価する方法であって、

(A) 実験動物または腎臓由来の細胞試料を複数用意し、その一部について前記被検化学物質を所定期間だけ曝露した後の腎臓または腎臓由来の細胞試料を検査試料とするとともに、残りを未処理または前記化学物質の溶媒を曝露した後の腎臓または腎臓由来の細胞試料を参照試料とするステップと、

(B) 前記検査試料について、配列番号 1 ~ 15 に示される塩基配列を有する遺伝子群としての生体応答遺伝子群のうちから選択される任意の 1 以上の選択生体応答遺伝子群に対する遺伝子の発現レベルを測定する第 1 の遺伝子発現レベル測定ステップと、

(C) 前記参照試料について、前記選択生体応答遺伝子群に対する遺伝子の発現レベルを測定する第 2 の遺伝子発現レベル測定ステップと、

(D) 前記第 1 の遺伝子発現レベル測定ステップ及び前記第 2 の遺伝子発現レベル測定ステップで測定した遺伝子発現レベルを対応する遺伝子ごとに比較し、前記遺伝子の発現レベルの差異に基づいて前記被検化学物質が有する毒性を評価するステップと、
を含むことを特徴とする化学物質の毒性評価方法。

【請求項 2】

前記遺伝子の発現レベルは、前記生体応答遺伝子群のうちのそれぞれの生体応答遺伝子におけるプロモーター配列に連結されたレポータータンパク質をコードする配列を含むレポーター遺伝子における発現レベルを指標として測定されることを特徴とする請求項 1 記載の化学物質の毒性評価方法。

【請求項 3】

請求項 2 記載の方法に使用されるレポーター遺伝子を含む核酸構成物、これを含むベクター、又は、これらを宿主細胞に導入した形質転換細胞であって、前記生体応答遺伝子のプロモーター配列に連結されたレポータータンパク質をコードする配列を含むことを特徴とする核酸構成物、これを含むベクター、又は、これらを宿主細胞に導入した形質転換細胞。

【請求項 4】

前記宿主細胞は、動物細胞、幹細胞、または胚性幹細胞であることを特徴とする請求項 3 記載の形質転換細胞。

【請求項 5】

化学物質が生体に与える影響を遺伝子発現レベルで検出することにより被検化学物質の毒性を判別・予測する方法であって、

(A) 腎毒性を有することが既知の化学物質について所定量を所定期間生体または腎臓由来の細胞試料に投与（曝露）するステップと、

(B) 腎毒性を有さないことが既知の化学物質について所定量を所定期間生体または腎臓由来の細胞試料に投与（曝露）するステップと、

(C) 前記化学物質の溶媒を対照として所定量を所定期間生体または腎臓由来の細胞試料に投与（曝露）するステップと、

(D) 前記生体の腎臓または前記腎臓由来の細胞試料から mRNA を単離して、配列番号 1 ~ 15 の塩基配列を有する遺伝子群としての生体応答遺伝子群のうちから選択される任意の 1 以上の生体応答遺伝子に対する遺伝子発現レベルを測定する測定ステップと、

(E) 前記遺伝子発現レベルを対応する前記化学物質、曝露量、曝露期間とともに遺伝子発現データとして収集するステップと、

(F) 被検化学物質を適当な濃度で一定期間生体または腎臓由来の細胞試料に曝露させるステップと、

(G) 前記生体由来の前記腎臓または前記腎臓由来の細胞試料から mRNA を単離して、(D) のステップで選択した生体応答遺伝子に対する遺伝子発現レベルを測定するステップと

、

10

20

30

40

50

(H)(G)で得られた前記遺伝子発現レベルを前記被検化学物質、曝露量及び曝露期間とともに遺伝子発現データとして収集するステップと、

(I)(H)で収集された遺伝子発現データを(E)で収集された照合用の対応する遺伝子発現データと比較するステップと、

を含むことを特徴とする化学物質の毒性評価方法。

【請求項6】

前記遺伝子発現データの比較が、被検化学物質曝露群と腎毒性を有さないことが既知の化学物質曝露群における遺伝子発現レベルの差異であることを特徴とする、請求項5記載の化学物質の毒性評価方法。

【請求項7】

10

前記遺伝子発現データの比較が、被検化学物質曝露群と腎毒性を有さないことが既知の化学物質曝露群における前記生体応答遺伝子群の発現プロファイルを指標としたクラスタ分析であることを特徴とする、請求項5記載の化学物質の毒性評価方法。

【請求項8】

前記遺伝子発現データの比較が、被検化学物質曝露群と腎毒性を有さないことが既知の化学物質曝露群における前記生体応答遺伝子群の発現プロファイルの相関係数を指標とすることを特徴とする、請求項5記載の化学物質の毒性評価方法。

【請求項9】

腎毒性を有することが既知の化学物質が、2-ブタノンオキシム(CAS登録番号96-29-7)、3-シアノピリジン(CAS登録番号100-54-9)、2-(2-アミノエチルアミノ)エタノール(CAS登録番号111-41-1)、テトラヒドロフルフリルアルコール(CAS登録番号97-99-4)、スルホラン(CAS登録番号126-33-0)、4-エチルモルホリン(CAS登録番号100-74-3)、3-メトキシ-3-メチル-1-ブタノール(CAS登録番号56539-66-3)、o-ジクロロベンゼン(CAS登録番号95-50-1)、3,4-キシリジン(CAS登録番号95-64-7)、N-メチルアニリン(CAS登録番号100-61-8)、2-(ジブチルアミノ)エタノール(CAS登録番号102-81-8)、p-クミルフェノール(CAS登録番号599-64-4)、2,3-ジメチルアニリン(CAS登録番号87-59-2)、フタル酸ジヘプチル(CAS登録番号3648-21-3)、テトラプロモエタン(CAS登録番号79-27-6)、p-エチルフェノール(CAS登録番号123-07-9)、p-(1,1,3,3,-テトラメチルブチル)フェノール(CAS登録番号140-66-9)、2,4-ジ-tert-ブチルフェノール(CAS登録番号96-76-4)、3,5-キシリジン(CAS登録番号108-69-0)、ブソイドクメン(CAS登録番号95-63-6)、1,4-ジプロモベンゼン(CAS登録番号106-37-6)のうちから選択される任意の1以上の化学物質であることを特徴とする、請求項5～8のうちのいずれか1つに記載の化学物質の毒性評価方法。

20

30

【請求項10】

腎毒性を有さないことが既知の化学物質が、m-キシリレンジアミン(CAS登録番号1477-55-0)、メタクリル酸エチルトリメチルアンモニウムクロリド(CAS登録番号5039-78-1)、塩化ベンジルトリメチルアンモニウム(CAS登録番号56-93-9)、m-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム(CAS登録番号127-68-4)、1-ナフチルアミン-4-スルホン酸ナトリウム四水和物(CAS登録番号130-13-2)、トリレンジイソシアナート(CAS登録番号26471-62-5)、m-クレゾール(CAS登録番号108-39-4)、アジピン酸ジブチル(CAS登録番号105-99-7)、o-t-ブチルフェノール(CAS登録番号88-18-6)、N,N-ジメチルベンジルアミン(CAS登録番号103-83-3)、n-ヘキサデカン(CAS登録番号544-76-3)、ジシクロヘキシルアミン(CAS登録番号101-83-7)、及びのうちから選択される任意の1以上の化学物質であることを特徴とする、請求項5～8のうちのいずれか1つに記載の化学物質の毒性評価方法。

40

【請求項11】

前記遺伝子発現レベルの測定は、RT-PCR法、Real Time PCR法、iAFLP(introduced Amplified Fragment Length Polymorphism)法、LAMP(Loop-Mediated Isothermal Amplification)法、nCounter Analysis system、ハイブリダイゼーション法のうちの1つの方法を用いることを特徴とする請求項1乃至10のうちのいずれか1つに記載の化

50

学物質の毒性評価方法。

【請求項 1 2】

前記ハイブリダイゼーション法は、マイクロアレイ法又はプロット法であることを特徴とする請求項 1 1 記載の化学物質の毒性評価方法。

【請求項 1 3】

前記マイクロアレイ法又はプロット法に用いられるプローブは、ヌクレオチド又はタンパク質であることを特徴とする請求項 1 2 記載の化学物質の毒性評価方法。

【請求項 1 4】

前記ヌクレオチドは、mRNA、cDNA、合成オリゴヌクレオチドであることを特徴とする請求項 1 3 記載の化学物質の毒性評価方法。

10

【請求項 1 5】

前記ヌクレオチドは、標識化ヌクレオチドであることを特徴とする請求項 1 3 記載の化学物質の毒性評価方法。

【請求項 1 6】

前記遺伝子発現レベルの測定は、前記生体応答遺伝子に対応する核酸、又は、前記生体応答遺伝子によってコードされるタンパク質について、存在するか、もしくは、量の測定によることを特徴とする請求項 1 乃至 1 0 のうちのいずれか 1 つに記載の化学物質の毒性評価方法。

【請求項 1 7】

前記タンパク質は、免疫学的方法で測定されることを特徴とする請求項 1 6 記載の化学物質の毒性評価方法。

20

【請求項 1 8】

前記免疫学的方法は、前記生体応答遺伝子によってコードされるタンパク質又はその断片に対する特異抗体と標的タンパク質との免疫学的複合体を検出する方法によることを特徴とする請求項 1 7 記載の化学物質の毒性評価方法。

【請求項 1 9】

前記特異抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、及び抗体フラグメントから選択されることを特徴とする請求項 1 8 記載の化学物質の毒性評価方法。

【請求項 2 0】

請求項 1 乃至 1 9 のうちのいずれか 1 つに記載の方法に用いられるプローブを含む化学物質の毒性判別キットであって、前記プローブは、前記生体応答遺伝子またはその転写産物に特異的にハイブリダイズする配列を有する分子を含むことを特徴とする化学物質の毒性評価キット。

30

【請求項 2 1】

前記プローブは、ヌクレオチド又はタンパク質であることを特徴とする請求項 2 0 記載の化学物質の毒性評価キット。

【請求項 2 2】

前記ヌクレオチドは、mRNA、cDNA、又は合成オリゴヌクレオチドであることを特徴とする請求項 2 1 記載の化学物質の毒性評価キット。

【請求項 2 3】

前記ヌクレオチドは、前記生体応答遺伝子のセンス鎖又はアンチセンス鎖とハイブリダイズし、1 0 ~ 1 0 0 塩基であることを特徴とする請求項 2 2 記載の化学物質の毒性評価キット。

40

【請求項 2 4】

前記ヌクレオチドは、標識化ヌクレオチドであることを特徴とする請求項 2 2 または 2 3 記載の化学物質の毒性評価キット。

【請求項 2 5】

前記プローブは、抗体及び / 又はアプタマーであるタンパク質であることを特徴とする請求項 2 4 記載の化学物質の毒性評価キット。

【請求項 2 6】

50

前記プローブは、任意の１つ以上を固体支持体に固定したDNAマイクロアレイ、DNAチップ、タンパクチップまたは抗体チップを含むことを特徴とする請求項２０乃至２５のうちのいずれか１つに記載の化学物質の毒性評価キット。

【請求項２７】

前記固体支持体は、ガラス、シリコン、プラスチック又は生体膜であることを特徴とする請求項２６に記載の化学物質の毒性評価キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、化学物質が生体に与える影響、毒性の検出、診断、予測及び／もしくは処置のための方法、及び、生体毒性を検出又は予測するためのキットに関する。特に、本発明は、化学物質が生体に与える影響を指標とした化学物質の毒性の検出・予測方法、腎毒性の処置の有効性を確認することを助けるための遺伝子発現解析手段及びその結果の使用に関する。

10

【背景技術】

【０００２】

人類の生活する環境の中で、膨大な数の化学物質が利用されており、現在でも年々新しい化学物質が開発され続けている。しかしながら、これらの化学物質が環境中に放出されることにより、人体を含む生態系に有害な影響を及ぼすことが問題となっており、特に化学物質に起因する環境汚染による人体への影響は社会問題にまでなっている。新規化学物質の人体に及ぼす有害な影響による事故を未然に防ぎ安全性を確保するためには、それらの化学物質の毒性の有無・強さ・ターゲット臓器等の情報を事前に調査し把握しておくことが重要である。そのような観点から、新規化学物質の許認可・承認・登録等を行う各省庁は新規化学物質の届け出の際には一定の毒性試験を行うことを求めており、その試験の基準には法的な規制がなされている。

20

【０００３】

これまでの化学物質のリスク評価は、OECD等で国際標準化された試験方法を踏まえて我が国の「化学物質審査規制法」等に導入された試験法である細菌等を用いた単純で簡便な試験と、ラット等の実験動物を用いた長期毒性試験等によって取得・蓄積されてきた知見とを、その基盤としていた（非特許文献１参照）。

30

【０００４】

近年、急速な発展を見せるゲノム学的なアプローチが、個別化医療に向けてバイオマーカーを用いた薬剤の感受性や副作用との相関を調べるファーマコゲノミクス（非特許文献２及び３参照）、食品成分の摂取に伴って起こるmRNAやタンパク質の発現量の変動を網羅的に解析し、食物が生体に与える影響を調べるニュートリゲノミクス（非特許文献４）等と同様に、化学物質の生物学的活性（特にその有害性）の評価にも応用され始めてきたトキシコゲノミクスと呼ばれる手法が用いられ始めてきた（非特許文献５乃至７参照）。

【０００５】

これらのゲノム学的手法は、全遺伝子を個々のパラメータとして活用することで、従来の手法では得られない膨大かつ多様な観点による生物学的現象の評価を可能にした。

40

【０００６】

遺伝子発現変動解析を用いた化学物質の毒性評価手法としては、酵母を用いた毒性物質の検出方法（特許文献１及び２参照）、細胞を用いた遺伝毒性の判定方法（特許文献３参照）、哺乳動物を用いた発達神経毒性の検出方法（特許文献４乃至６参照）、哺乳動物を用いた発がん物質の予測方法（特許文献７及び８参照）、哺乳動物を用いた発生毒性の予測方法（特許文献９参照）などが公開されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００７】

【特許文献１】特許第４０２２６１０号公報

50

【特許文献2】特許第4475373号公報
【特許文献3】特許第4573876号公報
【特許文献4】特開2006-115748号公報
【特許文献5】特開2009-232842号公報
【特許文献6】特開2009-77701号公報
【特許文献7】特開2009-159852号公報
【特許文献8】特開2007-54022号公報
【特許文献9】特開2010-11843号公報
【非特許文献】

【0008】

10

【非特許文献1】非臨床試験マニュアル(株式会社エル・アイ・シー)(2001)

【非特許文献2】Alison H. Harrill et al., Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. November; 4(11): 1379-1389(2008)

【非特許文献3】Elisa Giovannetti et al., Mol. Cancer Ther. 5(6): 1387-1394(2006)

【非特許文献4】Licia Iacoviello et al., Genes Nutr. 3: 19-24(2008)

【非特許文献5】Preeti Chavan et al., Evid Based Complement Alternat Med. Dec; 3(4): 447-457(2006)

【非特許文献6】渡邊肇 YAKUGAKU ZASSHI: 127(12): 1967-1974(2007)

20

【非特許文献7】Uehara, Takeki et al., Mol. Nutr. Food Res. 54: 218-227(2010)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

従来の化学物質のリスク評価は、細菌等を用いた単純で簡便な試験、及び、ラット等の実験動物を用いた長期毒性試験によって取得・蓄積されてきた知見を、その基盤としていた。しかしながら、これらの従来の毒性学的な手法によって獲得される生物学的情報は知見の種類が限られること、並びに、長期毒性試験では費用と効率等の面で問題があることから、これらの課題を解決できる新規の手法の確立が望まれていた。

30

【0010】

特に、ラット等の実験動物を用いた従来の28日間反復投与毒性試験は、血液学的検査や病理組織学的検査を主体としており、それらの生物学的情報は限られていた。さらに、病理組織学的検査での評価は、判断した者の主観に左右されやすく、同じ病態を見ているにもかかわらず別の表現を用いるなど、異なる化学物質間の毒性を評価するための客観的な指標が乏しかった。

【0011】

本発明は化学物質の腎毒性を簡便かつ確実に検出するための客観的な指標の一つを提供することを課題とする。

40

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明者は、3,5-キシリジン(CAS登録番号108-69-0)をラットに28日間反復投与した後の腎臓で対照群と比較して顕著に発現変動した遺伝子を特定することにより、本発明を完成するに至った。

【0013】

すなわち本発明は以下を提供する。

1. 被検化学物質を生体または細胞に所定期間曝露させた後の遺伝子発現レベルを測定することにより該被検化学物質の毒性を評価する方法であって、

(A) 実験動物または腎臓由来の細胞試料を複数用意し、その一部について前記被検化学

50

物質を所定期間だけ曝露した後の腎臓または腎臓由来の細胞試料を検査試料とするとともに、残りを未処理または前記化学物質の溶媒を曝露した後の腎臓または腎臓由来の細胞試料を参照試料とするステップと、

(B) 前記検査試料について、配列番号 1 ~ 15 に示される塩基配列を有する遺伝子群としての生体応答遺伝子群のうちから選択される任意の 1 以上の選択生体応答遺伝子群に対する遺伝子の発現レベルを測定する第 1 の遺伝子発現レベル測定ステップと、

(C) 前記参照試料について、前記選択生体応答遺伝子群に対する遺伝子の発現レベルを測定する第 2 の遺伝子発現レベル測定ステップと、

(D) 前記第 1 の遺伝子発現レベル測定ステップ及び前記第 2 の遺伝子発現レベル測定ステップで測定した遺伝子発現レベルを対応する遺伝子ごとに比較し、前記遺伝子の発現レベルの差異に基づいて前記被験化学物質が有する毒性を評価するステップと、
を含むことを特徴とする化学物質の毒性評価方法。

2. 前記遺伝子の発現レベルは、前記生体応答遺伝子群のうちのそれぞれの生体応答遺伝子におけるプロモーター配列に連結されたレポータータンパク質をコードする配列を含むレポーター遺伝子における発現レベルを指標として測定されることを特徴とする前記 1 記載の化学物質の毒性評価方法。

3. 前記 2 記載の方法に使用されるレポーター遺伝子を含む核酸構成物、これを含むベクター、又は、これらを宿主細胞に導入した形質転換細胞であって、前記生体応答遺伝子のプロモーター配列に連結されたレポータータンパク質をコードする配列を含むことを特徴とする核酸構成物、これを含むベクター、又は、これらを宿主細胞に導入した形質転換細胞。

4. 前記宿主細胞は、動物細胞、幹細胞、または胚性幹細胞であることを特徴とする前記 3 記載の形質転換細胞。

5. 化学物質が生体に与える影響を遺伝子発現レベルで検出することにより被検化学物質の毒性を判別・予測する方法であって、

(A) 腎毒性を有することが既知の化学物質について所定量を所定期間生体または腎臓由来の細胞試料に投与（曝露）するステップと、

(B) 腎毒性を有さないことが既知の化学物質について所定量を所定期間生体または腎臓由来の細胞試料に投与（曝露）するステップと、

(C) 前記化学物質の溶媒を対照として所定量を所定期間生体または腎臓由来の細胞試料に投与（曝露）するステップと、

(D) 前記生体の腎臓または前記腎臓由来の細胞試料から mRNA を単離して、配列番号 1 ~ 15 の塩基配列を有する遺伝子群としての生体応答遺伝子群のうちから選択される任意の 1 以上の生体応答遺伝子に対する遺伝子発現レベルを測定する測定ステップと、

(E) 前記遺伝子発現レベルを対応する前記化学物質、曝露量、曝露期間とともに遺伝子発現データとして収集するステップと、

(F) 被検化学物質を適当な濃度で一定期間生体または腎臓由来の細胞試料に曝露させるステップと、

(G) 前記生体由来の前記腎臓または前記腎臓由来の細胞試料から mRNA を単離して、(D) のステップで選択した生体応答遺伝子に対する遺伝子発現レベルを測定するステップと、

(H) (G) で得られた前記遺伝子発現レベルを前記被検化学物質、曝露量及び曝露期間とともに遺伝子発現データとして収集するステップと、

(I) (H) で収集された遺伝子発現データを (E) で収集された照合用の対応する遺伝子発現データと比較するステップと、

を含むことを特徴とする化学物質の毒性評価方法。

6. 前記遺伝子発現データの比較が、被検化学物質曝露群と腎毒性を有さないことが既知の化学物質曝露群における遺伝子発現レベルの差異であることを特徴とする、前記 5 記載の化学物質の毒性評価方法。

7. 前記遺伝子発現データの比較が、被検化学物質曝露群と腎毒性を有さないことが既知

10

20

30

40

50

の化学物質曝露群における前記生体応答遺伝子群の発現プロファイルを指標としたクラスタ分析であることを特徴とする、前記 5 記載の化学物質の毒性評価方法。

8．前記遺伝子発現データの比較が、被検化学物質曝露群と腎毒性を有さないことが既知の化学物質曝露群における前記生体応答遺伝子群の発現プロファイルの相関係数を指標とすることを特徴とする、前記 5 記載の化学物質の毒性評価方法。

9．腎毒性を有することが既知の化学物質が、2-ブタノンオキシム (CAS登録番号96-29-7)、3-シアノピリジン (CAS登録番号100-54-9)、2-(2-アミノエチルアミノ)エタノール (CAS登録番号111-41-1)、テトラヒドロフルフリルアルコール (CAS登録番号97-99-4)、スルホラン (CAS登録番号126-33-0)、4-エチルモルホリン (CAS登録番号100-74-3)、3-メトキシ-3-メチル-1-ブタノール (CAS登録番号56539-66-3)、o-ジクロロベンゼン (CAS登録番号95-50-1)、3,4-キシリジン (CAS登録番号95-64-7)、N-メチルアニリン (CAS登録番号100-61-8)、2-(ジブチルアミノ)エタノール (CAS登録番号102-81-8)、p-クミルフェノール (CAS登録番号599-64-4)、2,3-ジメチルアニリン (CAS登録番号87-59-2)、フタル酸ジエチル (CAS登録番号3648-21-3)、テトラプロモエタン (CAS登録番号79-27-6)、p-エチルフェノール (CAS登録番号123-07-9)、p-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノール (CAS登録番号140-66-9)、2,4-ジ-tert-ブチルフェノール (CAS登録番号96-76-4)、3,5-キシリジン (CAS登録番号108-69-0)、ブソイドクメン (CAS登録番号95-63-6)、1,4-ジプロモベンゼン (CAS登録番号106-37-6)のうちから選択される任意の1以上の化学物質であることを特徴とする、前記 5～8のうちのいずれか1つに記載の化学物質の毒性評価方法。

10．腎毒性を有さないことが既知の化学物質が、m-キシリレンジアミン (CAS登録番号1477-55-0)、メタクリル酸エチルトリメチルアンモニウムクロリド (CAS登録番号5039-78-1)、塩化ベンジルトリメチルアンモニウム (CAS登録番号56-93-9)、m-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム (CAS登録番号127-68-4)、1-ナフチルアミン-4-スルホン酸ナトリウム四水和物 (CAS登録番号130-13-2)、トリレンジイソシアナート (CAS登録番号26471-62-5)、m-クレゾール (CAS登録番号108-39-4)、アジピン酸ジブチル (CAS登録番号105-99-7)、o-t-ブチルフェノール (CAS登録番号88-18-6)、N,N-ジメチルベンジルアミン (CAS登録番号103-83-3)、n-ヘキサデカン (CAS登録番号544-76-3)、ジシクロヘキシルアミン (CAS登録番号101-83-7)、及びのうちから選択される任意の1以上の化学物質であることを特徴とする、前記 5～8のうちのいずれか1つに記載の化学物質の毒性評価方法。

11．前記遺伝子発現レベルの測定は、RT-PCR法、Real Time PCR法、iAFLP (introduced Amplified Fragment Length Polymorphism) 法、LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法、nCounter Analysis system、ハイブリダイゼーション法のうちの1つの方法を用いることを特徴とする前記 1乃至10のうちのいずれか1つに記載の化学物質の毒性評価方法。

12．前記ハイブリダイゼーション法は、マイクロアレイ法又はプロット法であることを特徴とする前記 11記載の化学物質の毒性評価方法。

13．前記マイクロアレイ法又はプロット法に用いられるプローブは、ヌクレオチド又はタンパク質であることを特徴とする前記 12記載の化学物質の毒性評価方法。

14．前記ヌクレオチドは、mRNA、cDNA、合成オリゴヌクレオチドであることを特徴とする前記 13記載の化学物質の毒性評価方法。

15．前記ヌクレオチドは、標識化ヌクレオチドであることを特徴とする前記 13記載の化学物質の毒性評価方法。

16．前記遺伝子発現レベルの測定は、前記生体応答遺伝子に対応する核酸、又は、前記生体応答遺伝子によってコードされるタンパク質について、存在するか、もしくは、量の測定によることを特徴とする前記 1乃至10のうちのいずれか1つに記載の化学物質の毒性評価方法。

17．前記タンパク質は、免疫学的方法で測定されることを特徴とする前記 16記載の化学物質の毒性評価方法。

10

20

30

40

50

18．前記免疫学的方法は、前記生体応答遺伝子によってコードされるタンパク質又はその断片に対する特異抗体と標的タンパク質との免疫学的複合体を検出する方法によることを特徴とする前記17記載の化学物質の毒性評価方法。

19．前記特異抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、及び抗体フラグメントから選択されることを特徴とする前記18記載の化学物質の毒性評価方法。

20．前記1乃至19のうちのいずれか1つに記載の方法に用いられるプローブを含む化学物質の毒性判別キットであって、前記プローブは、前記生体応答遺伝子またはその転写産物に特異的にハイブリダイズする配列を有する分子を含むことを特徴とする化学物質の毒性評価キット。

21．前記プローブは、ヌクレオチド又はタンパク質であることを特徴とする前記20記載の化学物質の毒性評価キット。

22．前記ヌクレオチドは、mRNA、cDNA、又は合成オリゴヌクレオチドであることを特徴とする前記21記載の化学物質の毒性評価キット。

23．前記ヌクレオチドは、前記生体応答遺伝子のセンス鎖又はアンチセンス鎖とハイブリダイズし、10～100塩基であることを特徴とする前記22記載の化学物質の毒性評価キット。

24．前記ヌクレオチドは、標識化ヌクレオチドであることを特徴とする前記22または23記載の化学物質の毒性評価キット。

25．前記プローブは、抗体及び/又はアプタマーであるタンパク質であることを特徴とする前記24記載の化学物質の毒性評価キット。

26．前記プローブは、任意の1つ以上を固体支持体に固定したDNAマイクロアレイ、DNAチップ、タンパクチップまたは抗体チップを含むことを特徴とする前記20乃至25のうちのいずれか1つに記載の化学物質の毒性評価キット。

27．前記固体支持体は、ガラス、シリコン、プラスチック又は生体膜であることを特徴とする前記26記載の化学物質の毒性評価キット。

【発明の効果】

【0014】

本発明によれば、化学物質を生体に投与した後の腎臓又は化学物質を曝露した後の腎臓由来の細胞試料における遺伝子発現パターンを比較することにより、化学物質が生体に対して毒性を有するか否かを簡便に判定あるいは予測できる。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】配列番号1～15に示される塩基配列を有する遺伝子の発現変動パターンに基づいて階層的クラスタ分析結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0016】

他に特に規定されない限り、明細書及び特許請求の範囲を含む本出願に使用される用語は、本発明が属する分野における通常の知識を有する者（当業者）によって、一般的に理解されるものと同一の意味を有する。

【0017】

当業者は、本明細書中に記載されるものと同等又は類似の多くの方法及び物質を認識する。ただし、本発明は本明細書に記載される方法及び物質に限定されない。

【0018】

被検化学物質の投与量は、被検化学物質を曝露された試験動物または細胞内の遺伝子発現レベルが適度に増加または減少する量であることが望ましい。例えば、試験動物又は細胞の致死量未満の最大用量が望ましく、被検化学物質の試験動物に対するLD50値を基準にして決定することも可能である。

【0019】

被検化学物質（被検群）またはその溶媒（対照群）を投与する対象となる試験動物には

10

20

30

40

50

、ラット、マウス、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ、サルなどの哺乳動物を使用することもできる。また、その対象となる細胞には、ラット、マウス、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ、サル、ヒトなどの哺乳動物由来の細胞を使用することができる。

【0020】

被検化学物質の投与期間は1～90日が望ましく、より好ましくは1～60日であり、さらに好ましくは1～28日であるが、より迅速に試験を行う観点から1～14日でも構わない。投与は1日数回が望ましく、より好ましくは1日1回が望ましい。

【0021】

被検化学物質の投与方法は特に制限されない。例えば、経口投与、腹腔内投与、静脈注射等の一般的な方法を使用できる。

10

【0022】

「遺伝子発現レベルを測定する」とは、該遺伝子の発現レベルを検出又は定量する限り特に制限されず、例えば、該遺伝子のmRNAやcDNAを検出又は定量してもよい。さらには、該遺伝子がコードするタンパク質を検出又は定量してもよい。これらの検出又は定量には、該遺伝子又はその遺伝子産物であるペプチド若しくはタンパク質に特異的に結合する分子を用いることが望ましい。遺伝子又はその遺伝子産物であるペプチド若しくはタンパク質に特異的に結合する分子とは、特に制限されないが、該遺伝子に特異的に結合するヌクレオチド、DNA、cDNA、RNA、ペプチド若しくはタンパク質に特異的に結合する抗体等を例示することができる。また、該遺伝子の発現レベルの検出又は定量には、該遺伝子のmRNAもしくはタンパク質の断片又はホモログを用いてもよい。

20

【0023】

配列番号1～15に示される塩基配列は、例えば、National Center for Biotechnology InformationのBLAST (URL; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) を利用したホモロジー検索により遺伝子を特定することが可能である。

【0024】

「DNAマイクロアレイ」とは、オリゴヌクレオチドや一本鎖または二本鎖のDNAをガラス基板上などに高密度に配置したものをいい、「DNAマイクロアレイ法」とは、そのDNAマイクロアレイ上で蛍光標識したcDNA分子などとハイブリッド形成を行わせて定性的且つ定量的にDNAと結合した核酸の種類や量を測定する手法をいう。

30

【0025】

「オリゴヌクレオチド」とは、ヌクレオチドが数個重合した分子の総称のことをいう。

【0026】

mRNAの「ホモログ」とは、該mRNAに実質的に類似したヌクレオチドに関連する。「実質的に類似した」とは、当業者によって十分理解され、具体的にはそれぞれの配列類似性が少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%を有することを意味する。

【0027】

また、タンパク質の「ホモログ」とは、該mRNAに実質的に類似したペプチドに関連する。「実質的に類似した」とは、当業者によって十分理解され、具体的にはそれぞれの配列類似性が少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%を有することを意味する。

40

【0028】

「化学物質に曝露された臓器組織または細胞試料」とは、組織もしくは細胞試料、または試料が由来した動物が、化学物質により処理されたことを意味する。

【0029】

「幹細胞」とは、自己複製能と分化した細胞をつくる能力を併せ持った未分化細胞のことを言い、胚性幹細胞 (ES細胞: Embryonic stem cell)、組織幹細胞、人工多能性幹細胞 (iPS細胞: induced pluripotent stem cell) で例示できるが、これらに限られるものではない。

【0030】

50

「プロモーター」とは、転写開始反応の効率に關与するDNA領域をいう。

【0031】

「レポーター遺伝子」とは、目的の因子の機能を測定するために代用される遺伝子のことであり、産物の活性が簡単に定量化できるものが好まれる。本発明のレポーター遺伝子には、生体応答遺伝子のプロモーター配列と当該プロモーター配列に作動可能に接続されたレポータータンパク質をコードする配列とを含み、レポータータンパク質としては、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、ホタルルシフェラーゼ、ウミシイタケルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、緑色蛍光タンパク質（GFP）、青色蛍光タンパク質（CFP）、黄色蛍光タンパク質（YFP）または赤色蛍光タンパク質（dsRed）等が挙げられるが、これらに限られるものではない。

10

【0032】

本発明において「生体応答遺伝子のプロモーター配列に連結される」とは、対象の遺伝子の発現が該プロモーター配列の制御下に配置されることをいい、通常、対象となる遺伝子のすぐ上流にプロモーター配列が配置されるが、必ずしも隣接している必要はない。

【0033】

「ベクター」とは、組換えDNA技術において、外来性DNAを組み込み、宿主細胞中で増えることのできるDNAのことをいい、プラスミド、ファージ、ウイルス、酵母人工染色体などが挙げられるが、これらに限られるものではない。

【0034】

「形質転換細胞」とは、形質転換体、トランスフォーマントとも呼ばれ、ある形質を示す細胞（供与細胞）のDNAを、それを示さない細胞（受容細胞）へ導入して生じた供与細胞の形質を示す細胞をいう。供与細胞又は受容細胞としては、原核細胞、酵母、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞等が例示される。

20

【0035】

「毒性作用」とは、化学物質の存在に起因する、生体、臓器系、各臓器、組織、細胞、又は細胞内単位に対する有害作用を指す。毒性作用は、生理的もしくは物理的な症状、又は細胞もしくは臓器の壊死のような攪乱であり得る。

【0036】

「試料」には、好ましくは腎臓組織由来の材料、並びに、例えば血液、血漿、血清、リンパ液、腹水、尿、便のような任意の体液が含まれるものとする。なお、これに限られるものではない。

30

【0037】

明細書及び特許請求の範囲を含む本出願で使用される際には、「個体」とは、ヒトの個体、動物又は個体の集団もしくはプールを意味するものとする。

【0038】

「CAS登録番号」とは米国化学会の一部門であるCAS（Chemical Abstracts Service）が運営・管理する化学物質登録システムから付与される化学物質に固有の数値識別番号のことを意味する。

【0039】

本出願に係る特許請求の範囲及び明細書で使用する「生体応答遺伝子」とは、化学物質の曝露等の外的な刺激により生体内において発現レベルが変動する遺伝子を意味し、「生体応答遺伝子群」とは複数の生体応答遺伝子の組合せのことを意味する。

40

【0040】

遺伝子の発現レベルを検出、測定又は定量する具体的な方法としては、該遺伝子に特異的に結合するプローブ用の標識化ヌクレオチド、標識化cDNAまたは標識化RNAを用いたノーザンブロット法、ドットブロット法、iAFLP（introduced Amplified Fragment Length Polymorphism）法、LAMP（Loop-Mediated Isothermal Amplification）法、PCR法、又はmRNA分子を直接測定する方法等を用いることができる。PCR法としては、RT-PCR法、Real Time PCR法、競合PCR法を挙げることができる。

【0041】

50

前記Real Time PCR法としては、例えば、試料内の全RNAやmRNAから逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、該cDNAを鋳型にして目的領域をPCR法により増幅し、該増幅産物の生産過程をリアルタイムにモニタリングする方法が挙げられる。リアルタイムにモニタリングする試薬としては、例えば、SYBR（登録商標：Molecular Probes社）Green Iや、TaqMan（登録商標：アプライドバイオシステムズ社）プローブ等が挙げられる。

【0042】

前記競合PCR法としては、例えば、試料内の全RNAやmRNAから逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、該cDNAと内部標準DNAを同一の反応チューブ内で反応させる方法や、さらに前記逆転写反応時にmRNAとともにRNA内部標準を加えて反応させる方法等が挙げられる。また、内部標準遺伝子の配列は、例えば、増幅目的遺伝子の配列と相同配列でもよく、非相同な配列でもよい。

10

【0043】

さらに、遺伝子の発現レベルを検出又は定量する具体的な方法としては、DNAマイクロアレイ、DNAチップ、又は抗体アレイ等を用いる方法が挙げられる。DNAマイクロアレイ又はDNAチップには該遺伝子のヌクレオチド又はcDNAが1つ以上固定化されているものを用いる。

【0044】

なお、ヌクレオチド又はcDNAは、該遺伝子の一部に相当する部分でもよい。

【0045】

上記プローブの標識化に用いられる標識試薬は、例えば放射性同位元素である[¹²⁵I]、[¹³¹I]、[³H]、[¹⁴C]、[³²P]、[³⁵S]、酵素であるβ-ガラクトシダーゼ、β-グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、また、蛍光物質であるシアニン蛍光色素（例えば、Cy2、Cy3、Cy5、Cy5.5、Cy7、Cyanine 3、Cyanine 5など）を用いることができる。

20

【0046】

また、上記Real Time PCR法としては、例えば、組織内又は細胞内の全RNAやmRNAから逆転写酵素により合成したcDNAを鋳型にして、PCRの増幅産物をリアルタイムでモニタリングする方法が挙げられる。リアルタイムPCR用モニタリング試薬としては、例えばSYBR Green IやTaqManプローブ等が用いられる。

【0047】

通常、DNAマイクロアレイやDNAチップは、プローブが支持体の上に固定されているアレイ又はチップであり、DNAマイクロアレイ又はDNAチップの支持体としては、ハイブリダイゼーションに使用可能なものであればよく、例えばガラス、シリコン、プラスチックなどの基板や、ニトロセルロース膜、ナイロン膜等を用いることができる。

30

【0048】

なお、DNAマイクロアレイとは、生体応答遺伝子群に含まれる遺伝子全長、またはその部分配列と相補的なcDNA断片若しくはオリゴDNAを固定支持体に1つ以上固定したものをいう。ここでいう相補的なオリゴDNAは一般的には25～100塩基の長さのものが用いられるが、必ずしもこれに限定されない。

【0049】

DNAマイクロアレイやDNAチップの使用方法については特に制限されない。例えば、生体試料からmRNAを精製し、該mRNAを鋳型とした逆転写反応を行う際に、適切な標識を付したプライマーや標識ヌクレオチドを使用することにより、標識されたcDNAを得ることができる。この標識化cDNAとDNAマイクロアレイやDNAチップ表面上に固定された本発明におけるプローブとの間でハイブリダイゼーションを行わせ、被検試料とのハイブリダイゼーション及び対照試料とのハイブリダイゼーションのそれぞれの結果を比較し、該遺伝子の有無を検出したり、発現レベルを測定したりすることにより、臓器毒性の検出または予測を行うことができる。

40

【0050】

遺伝子に対応するポリペプチド又はタンパク質は上記生体応答遺伝子の発現産物であり

50

、該ポリペプチド又はタンパク質のアミノ酸配列の配列情報は、NCBIの遺伝子データベースにおいて、それぞれのアクセッションナンバーによりアプローチすることもできる。

【0051】

上記ポリペプチド又はタンパク質を検出又は定量する方法としては、所定のポリペプチド又はタンパク質を検出又は定量する方法であれば特に制限されない。例えば、該ポリペプチド又はタンパク質に特異的に結合する抗体やアプタマー等を用いることができ、抗体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、2つのエピトープを同時に認識することができる二機能性抗体等を例示できる。これらの抗体は、慣用のプロトコルを用いて該ポリペプチド又はタンパク質又はそれらの断片を抗原として用いて作製することができる。また、アプタマーとは、タンパク質、アミノ酸等の分子に特異的に結合する核酸分子である。

10

【0052】

上記ポリペプチド又はタンパク質に特異的に結合する抗体を用いて、被検試料中に存在する該ポリペプチド又はタンパク質を検出又は定量する場合、免疫沈降法、電気化学発光法、RIA (Radioimmunoassay) 法、ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 法、蛍光抗体法等の公知の免疫学的方法を用いることができる。

【0053】

上記判定の基準としては、被検試料中に存在する該遺伝子の発現レベル (又は該遺伝子に対応するポリペプチド若しくはタンパク質の発現レベル) が正常対照試料中に存在する、該遺伝子の発現レベル (又は該遺伝子に対応するポリペプチド若しくはタンパク質の発現レベル) よりも高い又は低いことを利用する。例えば、1群3検体以上の試料の発現レベルを測定した結果について、t検定を行った場合に、 $P < 0.05$ 、より好ましくは $P < 0.01$ 、さらに好ましくは $P < 0.001$ 、さらにより好ましくは $P < 0.0001$ である場合が挙げられる。

20

【0054】

検定方法はt検定に限定されるものではなく、U検定、F検定、マン・ホイットニ検定やウィルコクサン符号付順位検定でもよい。また検定に限定されるものではなく、例えば各群の発現レベルの平均値の差を用いてもよい。

【0055】

基準値は、被検試料における発現レベルを測定する度に毎回測定する必要はなく、例えば、様々な種の生体試料における正常対照試料中に存在する遺伝子の発現レベルをあらかじめ測定しておき、その測定値を用いて比較することができる。

30

【0056】

遺伝子発現レベルの変化には特定の化学物質と生体組織との直接の反応のみならず、臓器に障害が生じた結果としての二次的反応も含まれる。

【0057】

生体応答遺伝子群に含まれる遺伝子は、ヒト、ラット、マウス、ウサギ、又はサルのような任意の哺乳動物において、マーカーとして用いられ得る。好ましくは、生体応答遺伝子群に含まれる遺伝子は、ラット又はマウスにおいてマーカーとして用いられる。

【0058】

動物の種類は特に限定されるものではなく、例えば、ラットの場合にはSprague Dawleyラット、Wistarラットなどでもよく、雄でも雌でも構わない。

40

【0059】

以下、実施例により本発明による化学物質の毒性判別・予測方法、核酸構成物、ベクター、形質転換細胞、照合用遺伝子発現データベースの作成方法、及び、化学物質の毒性判別キットをより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

【実施例1】

【0060】

本発明の毒性作用を検出または予測するための方法に用いられる生体応答遺伝子群は、

50

N-メチルアニリン（CAS登録番号100-61-8）を雄のSprague Dawleyラット（6週齢）（日本チャールス・リバー社）に28日間反復投与することにより腎臓で発現レベルが著しく変動した遺伝子群である。

【0061】

本発明で用いられる生体応答遺伝子群は以下の方法により得られる。なお、ここで、「発現レベル」とは絶対量である必要はなく相対量でよい。

【0062】

< 遺伝子発現データベース >

本発明による遺伝子発現データベースの作成は、

- (1) 種々の化学物質について、ラットなどが死亡しない適当な投与量を決定し、
- (2) 適当な濃度の化学物質を一定期間、ラットなどに繰り返し曝露し、
- (3) 曝露した生体から各臓器を摘出し、
- (4) 摘出した臓器からmRNAを単離し、
- (5) DNAマイクロアレイ法などにより特定遺伝子の発現レベルを測定し、
- (6) 得られた遺伝子発現レベルを化学物質、その濃度、曝露時間とともに遺伝子発現データベースとしてまとめる、と以上6つの工程によりなされる。

10

【0063】

< 動物試験 >

5週齢のCrI:CD(SD)ラット（雄）を準備し、ポリカーボネイトケージに入れ、エアーコンディショニング・アニマルラック（商品名）内で飼育した。エアーコンディショニング・アニマルラックは、温度22℃、湿度55%に設定し、照明は明期7:00～19:00、暗期19:00～7:00の12時間サイクルに設定した。水は給水ビンを用いて、浄水器を通した水道水を不断給与し、飼料は固形飼料を不断給餌した。実験開始までに1週間の馴化検疫期間を設けた。

20

【0064】

国立医薬品食品衛生研究所の「既存化学物質毒性データベース」（http://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/jsp/SearchPage.jsp）に登録されている33種類の化学物質、2-ブタノンオキシム、m-キシリレンジアミン、3-シアノピリジン、2-（2-アミノエチルアミノ）エタノール、テトラヒドロフルフリルアルコール、スルホラン、4-エチルモルホリン、メタクリル酸エチルトリメチルアンモニウムクロリド、塩化ベンジルトリメチルアンモニウム、m-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム、1-ナフチルアミン-4-スルホン酸ナトリウム四水和物、3-メトキシ-3-メチル-1-ブタノール、o-ジクロロベンゼン、3,4-キシリジン、N-メチルアニリン、トリレンジイソシアナート、2-（ジブチルアミノ）エタノール、p-クミルフェノール、m-クレゾール、2,3-ジメチルアニリン、フタル酸ジヘブチル、テトラプロモエタン、アジピン酸ジブチル、p-エチルフェノール、o-t-ブチルフェノール、p-（1,1,3,3,4-テトラメチルブチル）フェノール、2,4-ジ-tert-ブチルフェノール、3,5-キシリジン、N,N-ジメチルベンジルアミン、n-ヘキサデカン、ブソイドクメン、ジシクロヘキシルアミン、1,4-ジブプロモベンゼン、又はを28日間反復してSprague Dawleyラット（6週齢、雄）に経口投与した。正常対照群として、オリーブ油、注射用水又はゴマ油を28日間反復してSprague Dawleyラット（6週齢、雄）に経口投与した。また、1群あたり3個体のラットを使用した。なお、動物試験は28日間に制限されることはなく、例えば数日間でもよい。

30

40

【0065】

化学物質の投与液は、化学物質を必要量秤量し、適当な溶媒（注射用水、オリーブ油、ゴマ油など）を用いて溶液又は均一な懸濁液を作製した。経口投与は2.5mL用または5.0mL用注射用シリンジにフレキシブル経口ゾンデ（商品名）を装着したものをを用いたが、これに限定されるものではない。なお、溶媒は、2-ブタノンオキシム、m-キシリレンジアミン、3-シアノピリジン、2-（2-アミノエチルアミノ）エタノール、テトラヒドロフルフリルアルコール、スルホラン、4-エチルモルホリン、メタクリル酸エチルトリメチルアンモニウムクロリド、塩化ベンジルトリメチルアンモニウム、m-ニトロベンゼンスルホン酸ナト

50

リウム、1-ナフチルアミン-4-スルホン酸ナトリウム四水和物、および3-メトキシ-3-メチル-1-ブタノールは注射用水（大塚製薬株式会社製）を使用し、o-ジクロロベンゼン、3,4-キシリジン、N-メチルアニリン、トリレンジイソシアナート、2-（ジブチルアミノ）エタノール、p-クミルフェノール、m-クレゾール、2,3-ジメチルアニリン、フタル酸ジヘプチル、テトラプロモエタン、アジピン酸ジブチル、p-エチルフェノール、o-t-ブチルフェノール、p-（1,1,3,3,-テトラメチルブチル）フェノール、2,4-ジ-tert-ブチルフェノール、3,5-キシリジン、N,N-ジメチルベンジルアミン、およびn-ヘキサデカン（小堀製薬株式会社製）を使用し、ブソイドクメン、ジシクロヘキシルアミン、および1,4-ジプロモベンゼンはゴマ油（小堀製薬株式会社製）を使用した。なお、投与液に使用する溶媒はこれらに限定されることはない。

10

【0066】

各化学物質の投与量はそれぞれ、2-ブタノンオキシムが100mg/kg/day、m-キシリレンジアミンが400mg/kg/day、3-シアノピリジンが180mg/kg/day、2-（2-アミノエチルアミノ）エタノールが1,000mg/kg/day、テトラヒドロフルフリルアルコールが600mg/kg/day、スルホランが700mg/kg/day、4-エチルモルホリンが500mg/kg/day、メタクリル酸エチルトリメチルアンモニウムクロリドが1,000mg/kg/day、塩化ベンジルトリメチルアンモニウムが120mg/kg/day、m-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムが1,000mg/kg/day、1-ナフチルアミン-4-スルホン酸ナトリウム四水和物が1,000mg/kg/day、3-メトキシ-3-メチル-1-ブタノールが1,000mg/kg/day、o-ジクロロベンゼンが500mg/kg/day、3,4-キシリジンが250mg/kg/day、N-メチルアニリンが125mg/kg/day、トリレンジイソシアナートが300mg/kg/day、2-（ジブチルアミノ）エタノールが250mg/kg/day、p-クミルフェノールが700mg/kg/day、m-クレゾールが1,000mg/kg/day、2,3-ジメチルアニリンが200mg/kg/day、フタル酸ジヘプチルが1,000mg/kg/day、テトラプロモエタンが200mg/kg/day、アジピン酸ジブチルが1,000mg/kg/day、p-エチルフェノールが1,000mg/kg/day、o-t-ブチルフェノールが500mg/kg/day、p-（1,1,3,3,-テトラメチルブチル）フェノールが300mg/kg/day、2,4-ジ-tert-ブチルフェノールが300mg/kg/day、3,5-キシリジンが200mg/kg/day、N,N-ジメチルベンジルアミンが200mg/kg/day、n-ヘキサデカンが1,000mg/kg/day、ブソイドクメンが1,000mg/kg/day、ジシクロヘキシルアミンが70mg/kg/day、1,4-ジプロモベンゼンが300mg/kg/day、投与対象となるラットの体重の測定値から投与液量を計算して、ラットに投与した。

20

【0067】

臓器の採取は、化学物質の最終投与の約24時間後に行った。具体的には、ラットを麻酔下で腹部大動脈より放血（全採血）して安楽死させた後、腎臓を採取し、速やかに液体窒素で凍結させた。凍結させた腎臓はISOGEN（ニッポンジーン社製）溶液中でホモジナイズすることにより粉碎した。

30

【0068】

<全RNAの抽出>

腎臓組織からの全RNAの抽出はISOGEN試薬（ニッポンジーン社製）を用いて推奨のプロトコルに従って行った。

【0069】

<核酸検体の調製>

検体用mRNAの調製は、腎臓組織からISOGEN試薬（ニッポンジーン社製）を用いて抽出した全RNAから、Poly(A) Pureキット（Ambion社製）を用い、各社推奨のプロトコルに従って行った。

40

【0070】

<マイクロアレイの作製>

ラット遺伝子断片ライブラリー（マイクロダイアグノスティック社製）を用いてマイクロアレイを作製した。該ラット遺伝子断片ライブラリーには、配列番号1～212で示される塩基配列を有する合成オリゴヌクレオチドを含んでいた。また、マイクロアレイの作製方法・条件に限定はないが、例えば（Schena, M. et al., Science, 270, 467-470. (1995)）に記載の作製方法を用いることができる。

50

【0071】

ラット遺伝子断片ライブラリーを微量分注装置（マイクロダイアグノスティック社製）によりスライドガラス（松波硝子工業社製、HAコートスライドガラス）にプリントしてマイクロアレイを作製した。該マイクロアレイを気相恒温器内にて80℃で1時間静置し、さらにUVクロスリンカー（Hoefer社製、UVC500）を用いて120mJの紫外線を照射した。

【0072】

< マイクロアレイの後処理 >

マイクロアレイの後処理については、特許公報（特許第4190899号）記載の方法により行った。

【0073】

< 標識cDNAの合成 >

該mRNA 1.5 µgを核酸標識・ハイブリダイゼーション試薬（マイクロダイアグノスティック社製）、逆転写酵素SuperScriptII（登録商標：ライフテクノロジーズ）（インビトロジェン社製）、Cyanine5-deoxyuridinetriphosphate(Cyanine5-dUTP)（Perkin Elmer社製）を用い、標識cDNAを作製した。一方、対照としてラット共通レファレンス（マイクロダイアグノスティック社製）を使用した。共通レファレンスに対しては核酸標識・ハイブリダイゼーション試薬（マイクロダイアグノスティック社製）、逆転写酵素SuperScriptII（インビトロジェン社製）、Cyanine3-deoxyuridinetriphosphate(Cyanine3-dUTP)（Perkin Elmer社製）を用い、標識cDNAを作製した。作製方法は、各社推奨のプロトコルに従った。

【0074】

< 標識プローブの作製 >

これらの標識cDNA、すなわち、Cyanine5-dUTPで標識した検体及びCyanine3-dUTPで標識した対照レファレンスを同一試験管内で混合した後、MicropureEZ（ミリポア社製）及びMicroconYM30（登録商標：ミリポア）（ミリポア社製）により精製した。最終的には核酸標識・ハイブリダイゼーション試薬に付属のハイブリダイゼーションバッファー及び純水を用いて15 µlに調製した。

【0075】

< ハイブリダイゼーション >

該溶液を99℃で5分間加熱して熱変性させた後に、DNAマイクロアレイ上に滴下し、ハイブリダイゼーションカセット（マイクロダイアグノスティック社製）に格納した。該ハイブリダイゼーションカセットを気相恒温器（三洋電機バイオメディカ社製）に入れ、42℃で約20時間、静置した状態で保温した。この操作によって、サンプル中に含まれる標識cDNAがDNAマイクロアレイ上の相補的なオリゴDNAと特異的に結合する。

【0076】

< 洗浄 >

ハイブリダイゼーションカセットからスライドガラスを取り出し、核酸標識・ハイブリダイゼーション試薬（マイクロダイアグノスティック社製）付属のハイブリダイゼーション洗浄溶液を用い、同社推奨のプロトコルに従ってスライドガラスを洗浄した。

【0077】

< 蛍光強度の検出及び数値化 >

各遺伝子の発現レベルはDNAマイクロアレイ上に固定されたオリゴDNAと結合した標識cDNAの蛍光強度を測定することにより見積もることができる。洗浄したスライドガラスをスキャナGenePix4000B（Axon Instrument社製）を用いて蛍光を測定し、スキャナに付属の解析ソフトウェアGenePixPro（Axon Instrument社製）を用いて光学的に評価し、蛍光強度の相対値（Cyanine5/Cyanine3）数値化した。すなわち、DNAマイクロアレイ上に固定されたオリゴDNAのスポットの蛍光強度をそれぞれ別々に測定し、蛍光強度をヒト共通レファレンスとの相対比（log₂比）で表した。また、スポット以外の場所の蛍光強度からバックグラウンドを算出してノイズとしてそれぞれのスポットの蛍光強度から差し引いた。さらに、サンプルにおける蛍光強度/共通レファレンスの蛍光強度を算出するという解析を

10

20

30

40

50

行った。すなわち、各サンプルの遺伝子発現レベルはすべて共通レファレンスに対する相対比として検出されるため、単純に複数サンプルを横並び比較できる状態となっている。このようにして取得された数値を集積してデータベース化した。

【0078】

< 二次比の算出 >

次に、すべての対照群の平均値を算出し、それぞれのサンプルについてその平均値との相対値（「二次比」と呼ぶ。）を算出した。以下の計算はすべて二次比を用いて行った。

【0079】

< 腎臓に影響を与える化学物質の選択 >

「既存化学物質毒性データベース」（国立医薬品食品衛生研究所）に登録されている化学物質から33種類の化学物質、すなわち、2-ブタノンオキシム、m-キシリレンジアミン、3-シアノピリジン、2-（2-アミノエチルアミノ）エタノール、テトラヒドロフルフリルアルコール、スルホラン、4-エチルモルホリン、メタクリル酸エチルトリメチルアンモニウムクロリド、塩化ベンジルトリメチルアンモニウム、m-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム、1-ナフチルアミン-4-スルホン酸ナトリウム四水和物、3-メトキシ-3-メチル-1-ブタノール、o-ジクロロベンゼン、3,4-キシリジン、N-メチルアニリン、トリレンジイソシアナート、2-（ジブチルアミノ）エタノール、p-クミルフェノール、m-クレゾール、2,3-ジメチルアニリン、フタル酸ジヘブチル、テトラプロモエタン、アジピン酸ジブチル、p-エチルフェノール、o-t-ブチルフェノール、p-（1,1,3,3,-テトラメチルブチル）フェノール、2,4-ジ-tert-ブチルフェノール、3,5-キシリジン、N,N-ジメチルベンジルアミン、n-ヘキサデカン、プソイドクメン、ジシクロヘキシルアミン、1,4-ジプロモベンゼン、を選択した。

【0080】

< 遺伝子群の抽出 >

3,5-キシリジンを28日間反復投与したラットの腎臓とその溶媒を投与した対照群ラットの腎臓とを比較して、各遺伝子の対数変換相対的発現比に対するスチューデントのt検定を行ってP値を算出した。それぞれの化学物質投与群と対照群との間で発現レベルの平均値の差の絶対値が1.0以上、かつ、P値が0.01未満である遺伝子群を抽出したところ15プローブ（配列番号1～15に示される塩基配列を有する遺伝子群）であった。表1～12には配列番号1～15に示される塩基配列を有する遺伝子群の発現情報を記しており、数値は二次比で表している。また表中、「配列番号」の欄には特定した遺伝子の配列番号を記している。また、表中の略号は「C1」は「第1回目の実験に使用した注射用水投与群」を、「2bo」は「2-ブタノンオキシム投与群」を、「mxa」は「m-キシリレンジアミン投与群」「3cp」は「3-シアノピリジン投与群」を、「2ae」は「2-（2-アミノエチルアミノ）エタノール投与群」を、「thf」は「テトラヒドロフルフリルアルコール投与群」を、「C2」は「第2回目の実験に使用した注射用水投与群」を、「suf」は「スルホラン投与群」を、「4em」は「4-エチルモルホリン投与群」を、「C3」は「第3回目の実験に使用した注射用水投与群」を、「mta」は「メタクリル酸エチルトリメチルアンモニウムクロリド投与群」を、「bac」は「塩化ベンジルトリメチルアンモニウム投与群」を、「mns」は「m-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム投与群」を、「nat」は「1-ナフチルアミン-4-スルホン酸ナトリウム四水和物投与群」を、「mmb」は「3-メトキシ-3-メチル-1-ブタノール投与群」を、「C4」は「第4回目の実験に使用した注射用水投与群」を、「dcb」は「o-ジクロロベンゼン投与群」を、「34x」は「3,4-キシリジン投与群」を、「nma」は「N-メチルアニリン投与群」を、「tdn」は「トリレンジイソシアナート投与群」を、「2de」は「2-（ジブチルアミノ）エタノール投与群」を、「C5」は「第5回目の実験に使用したオリーブ油投与群」を、「pcp」は「p-クミルフェノール投与群」を、「mcs」は「m-クレゾール投与群」を、「23d」は「2,3-ジメチルアニリン投与群」を、「dhp」は「フタル酸ジヘブチル投与群」を、「C6」は「第6回目の実験に使用したオリーブ油投与群」を、「tbe」は「テトラプロモエタン投与群」を、「dba」は「アジピン酸ジブチル投与群」を、「pep」は「p-エチルフェノール投与群」を、「tbp」は「o-t-ブチルフェノール投与

10

20

30

40

50

群」を、「tmp」は「p-(1,1,3,3,-テトラメチルブチル)フェノール投与群」を、「C7」は「第7回の実験に使用したオリブ油投与群」を、「24b」は「2,4-ジ-tert-ブチルフェノール投与群」を、「35x」は「3,5-キシリジン投与群」を、「nda」は「N,N-ジメチルベンジルアミン投与群」を、「nhd」は「n-ヘキサデカン投与群」を、「C8」は「ゴマ油投与群」を、「tmb」は「ブソイドクメン投与群」を、「dha」は「ジシクロヘキシルアミン投与群」を、「14d」は「1,4-ジブromoベンゼン投与群」を、を表す。また、略号に付随の数字は個体の別を表している。

【0081】

実験は8回に分けて行い、第1回目の実験では2-ブタノンオキシム、m-キシリレンジアミン、3-シアノピリジン、2-(2-アミノエチルアミノ)エタノール、テトラヒドロフルフリルアルコールの5種類の化学物質をそれぞれ注射用水に溶解して投与し、第2回目の実験ではスルホラン、4-エチルモルホリンの2種類の化学物質をそれぞれ注射用水に溶解して投与し、第3回目の実験ではメタクリル酸エチルトリメチルアンモニウムクロリド、塩化ベンジルトリメチルアンモニウム、m-ニトロベンゼンスルホンナトリウム、1-ナフチルアミン-4-スルホン酸ナトリウム四水和物、3-メトキシ-3-メチル-1-ブタノールの5種類の化学物質をそれぞれ注射用水に溶解して投与し、第4回目の実験ではo-ジクロロベンゼン、3,4-キシリジン、N-メチルアニリン、トリレンジイソシアナート、2-(ジブチルアミノ)エタノールの5種類の化学物質をそれぞれ注射用水に溶解して投与し、第5回目の実験ではp-クミルフェノール、m-クレゾール、2,3-ジメチルアニリン、フタル酸ジヘプチルの5種類の化学物質をそれぞれオリブ油に溶解して投与し、第6回目の実験ではテトラブromoエタン、アジピン酸ジブチル、p-エチルフェノール、o-t-ブチルフェノール、p-(1,1,3,3,-テトラメチルブチル)フェノールの5種類の化学物質をそれぞれオリブ油に溶解して投与し、第7回目の実験では2,4-ジ-tert-ブチルフェノール、3,5-キシリジン、N,N-ジメチルベンジルアミン、n-ヘキサデカンの4種類の化学物質をそれぞれオリブ油に溶解して投与し、第8回目の実験ではブソイドクメン、ジシクロヘキシルアミン、1,4-ジブromoベンゼン、の3種類の化学物質をそれぞれゴマ油に溶解して投与した。

【0082】

【表1】

配列表	C1_1	C1_2	C1_3	2bo_4	2bo_5	2bo_6	mxg_8	mxg_9
No.1	-0.049	0.166	-0.117	2.262	2.143	2.084	0.106	0.745
No.2	-0.149	0.089	0.060	2.661	2.562	2.681	0.183	0.321
No.3	-0.099	0.701	-0.602	1.501	1.104	1.300	-0.057	-0.602
No.4	0.176	0.362	-0.538	1.007	0.853	1.094	0.344	0.074
No.5	0.254	0.068	-0.322	1.064	1.301	1.334	0.334	-0.355
No.6	0.013	0.237	-0.249	0.825	1.222	1.266	0.459	0.048
No.7	-0.257	-0.065	0.322	2.416	2.366	2.856	-0.128	0.162
No.8	-0.028	0.043	-0.015	0.645	1.067	1.002	0.080	0.459
No.9	-0.151	-0.134	0.285	2.144	1.846	2.190	0.001	0.160
No.10	-0.152	0.126	0.026	0.774	0.643	1.050	-0.179	0.079
No.11	-0.207	0.015	0.193	0.759	0.673	0.707	0.042	-0.150
No.12	0.043	-0.016	-0.027	0.416	0.369	0.582	-0.029	0.132
No.13	0.056	-0.037	-0.019	0.560	0.104	-0.114	0.022	-0.961
No.14	-0.138	-0.083	0.221	1.360	1.404	1.500	0.226	0.029
No.15	-0.116	0.058	0.058	1.279	1.192	1.207	0.215	0.381

【0083】

【表 2】

配列表	3cp10	3cp11	3cp12	2ae13	2ae14	2ae15	thf16	thf17	thf18
No.1	1.206	0.578	0.963	0.282	-0.210	-0.433	-0.061	-0.862	-1.464
No.2	1.427	0.839	1.438	0.691	-0.487	0.304	0.025	-0.865	-1.214
No.3	0.386	0.082	0.000	0.934	0.543	-0.493	0.552	0.510	-1.093
No.4	0.060	-0.233	0.616	0.197	0.012	-0.346	-0.248	-0.519	-0.227
No.5	0.477	0.271	0.587	0.185	0.102	-0.341	-0.004	0.068	-0.522
No.6	0.376	0.015	0.407	0.216	0.240	-0.336	0.350	0.022	-0.324
No.7	0.917	0.242	1.477	0.303	-0.576	0.527	-0.447	-1.178	-1.331
No.8	0.343	0.529	0.004	0.084	-0.424	-0.331	0.017	-0.431	-0.161
No.9	0.793	0.327	1.059	0.253	-0.112	0.488	0.250	-0.129	-0.317
No.10	0.231	-0.150	0.629	0.064	0.068	0.140	-0.052	-0.325	-0.127
No.11	-0.106	-0.090	-0.514	-0.041	-0.302	-0.968	-0.500	0.273	-0.894
No.12	-0.127	0.112	0.247	0.031	0.077	0.278	-0.017	-0.012	0.209
No.13	0.044	0.237	-0.477	0.245	0.362	-1.357	-0.284	-0.833	-1.253
No.14	0.567	0.171	0.000	0.228	-0.013	0.271	0.246	0.539	-0.039
No.15	0.582	0.122	0.753	0.197	-0.245	0.191	-0.151	0.180	-0.281

10

【0084】

【表 3】

配列表	C2_1	C2_2	C2_3	suf9	suf10	suf11	4em24	4em25	4em26
No.1	0.391	-0.101	-0.291	0.068	-0.263	0.562	0.447	0.455	0.019
No.2	0.426	-0.102	-0.323	-0.027	-0.410	0.744	0.323	0.415	-0.130
No.3	-0.008	-0.090	0.098	0.330	0.249	0.000	0.481	0.506	-0.011
No.4	0.166	0.114	-0.280	0.072	0.242	-0.441	-0.030	0.632	-0.074
No.5	0.339	-0.319	-0.020	0.269	0.197	-0.212	0.115	0.165	-0.621
No.6	0.054	0.067	-0.121	0.158	0.131	0.282	0.258	0.495	-0.274
No.7	0.241	-0.259	0.018	-0.648	-0.718	0.698	0.672	0.359	-0.156
No.8	0.258	-0.225	-0.033	0.120	0.034	0.633	0.237	0.495	-0.240
No.9	-0.186	-0.305	0.491	-0.658	-0.677	-0.360	-0.186	-0.420	-0.265
No.10	-0.009	-0.158	0.168	-0.113	-0.446	0.008	0.317	0.238	-0.179
No.11	0.974	-0.423	-0.551	0.721	0.365	-0.058	0.237	0.050	-0.209
No.12	0.184	-0.118	-0.066	0.102	-0.191	0.025	0.070	0.424	0.004
No.13	0.000	0.040	-0.040	-0.016	-0.235	0.818	0.268	-0.036	0.317
No.14	0.088	-0.005	-0.083	-0.053	-0.308	-0.261	-0.381	-0.453	-0.515
No.15	0.062	-0.096	0.034	-0.014	-0.173	0.137	-0.160	0.188	0.174

20

30

【0085】

【表 4】

配列表	C3_1	C3_2	C3_3	mta_4	mta_5	mta_6	bac_9	bac_10	bac_11
No.1	-0.063	-0.090	0.152	-0.517	-0.397	-0.415	-0.964	-0.902	-0.167
No.2	-0.199	-0.179	0.378	-0.522	-0.415	-0.265	-1.071	-1.344	0.233
No.3	0.779	0.097	-0.876	0.541	-0.110	-1.090	0.960	0.000	-1.108
No.4	-0.479	-0.014	0.493	-0.196	0.044	0.299	-1.345	-1.025	0.714
No.5	0.059	-0.059	0.000	0.196	0.407	0.000	-0.186	-0.145	0.000
No.6	-0.315	-0.002	0.317	-0.077	0.352	0.240	-0.031	-0.109	0.138
No.7	0.084	0.390	-0.474	-0.353	-0.142	-0.633	-0.906	-1.041	-0.578
No.8	-0.113	-0.704	0.817	-0.131	0.560	1.016	0.335	0.050	0.502
No.9	0.069	0.341	-0.411	0.155	-0.119	-0.461	-0.052	-0.289	-0.226
No.10	0.168	0.124	-0.293	0.252	-0.145	-0.614	-0.288	-0.276	-0.573
No.11	-0.405	-0.288	0.693	0.122	-0.016	0.362	-0.756	-0.441	-0.326
No.12	0.176	0.181	-0.357	0.232	0.185	-0.190	0.104	0.160	-0.345
No.13	-0.275	-0.496	0.771	-0.649	-0.303	0.188	-1.282	-0.206	0.910
No.14	0.068	0.116	-0.183	-0.452	0.028	-0.288	-0.081	-0.056	-0.599
No.15	0.155	0.352	-0.507	0.268	0.144	-0.462	0.108	0.213	-0.162

40

【0086】

【表 5】

配列表	mns_14	mns_15	mns_16	nat_19	nat_20	nat_21	mmb_24	mmb_25	mmb_26
No.1	-0.581	-0.353	0.674	-0.343	0.000	0.643	-0.122	-0.494	0.177
No.2	-0.949	-0.853	0.991	-0.573	-0.655	0.646	-0.595	-0.739	0.393
No.3	-0.219	-0.183	-0.766	-0.684	0.127	-0.179	0.462	0.000	-1.245
No.4	-0.628	-0.949	0.616	-0.598	-0.562	0.533	-0.042	-0.694	0.250
No.5	-0.405	-0.023	0.000	0.186	0.064	0.000	-0.404	0.214	0.000
No.6	-0.424	0.067	0.559	-0.295	0.291	0.169	-0.465	0.081	0.193
No.7	-0.611	-0.573	0.554	-0.304	-0.151	-0.075	-0.272	-0.638	-0.095
No.8	-0.041	-0.441	0.874	0.217	-0.006	0.678	-0.596	0.289	0.412
No.9	-0.265	0.034	0.313	0.105	0.076	0.099	-0.023	0.293	-0.425
No.10	-0.366	-0.159	-0.477	-0.455	-0.232	-0.106	-0.386	-0.292	-0.360
No.11	-0.470	-0.960	0.174	0.160	-0.246	0.360	-0.513	-0.959	-0.179
No.12	0.186	0.284	-0.161	0.014	-0.019	-0.243	0.174	-0.120	-0.095
No.13	-0.567	-0.025	1.163	-0.744	-0.323	1.451	-0.535	-0.643	0.996
No.14	-0.097	0.290	-0.146	0.215	0.131	-0.051	-0.258	0.162	-0.645
No.15	0.027	0.158	0.020	0.296	0.021	-0.344	-0.047	0.177	-0.637

10

【0087】

【表 6】

配列表	C4_1	C4_2	C4_3	dcb_4	dcb_5	dcb_6	34x_9	34x_10	34x_11
No.1	-0.221	0.529	-0.308	-0.051	0.317	-0.654	1.924	1.919	2.994
No.2	-0.648	0.894	-0.245	0.062	0.546	-0.599	2.278	2.165	3.321
No.3	-0.291	0.291	0.000	0.854	0.592	1.000	2.368	1.345	2.699
No.4	-0.327	0.587	-0.260	-0.672	0.822	-0.519	0.538	1.016	0.902
No.5	-0.072	0.000	0.072	0.285	0.000	0.353	1.061	0.000	1.571
No.6	0.135	-0.124	-0.012	-0.330	-0.172	-0.515	2.256	1.010	2.146
No.7	-0.537	0.407	0.130	0.346	0.288	-0.061	2.641	2.436	4.265
No.8	0.206	0.054	-0.260	-0.051	-0.068	0.283	0.405	0.233	0.512
No.9	0.006	0.035	-0.040	0.610	0.232	0.311	1.769	1.892	3.556
No.10	-0.078	-0.066	0.143	0.207	-0.044	0.441	1.655	0.791	1.621
No.11	0.381	-0.931	0.551	0.413	-0.680	0.584	0.886	-0.005	0.975
No.12	0.085	-0.211	0.125	0.218	-0.020	0.436	1.051	0.563	1.302
No.13	0.300	0.097	-0.398	-0.687	-0.464	-0.967	0.073	0.213	0.119
No.14	-0.219	-0.097	0.316	0.069	-0.202	0.172	0.769	0.845	1.312
No.15	-0.105	0.298	-0.193	0.460	0.148	0.740	0.944	0.763	1.245

20

30

【0088】

【表 7】

配列表	nma_14	nma_15	nma_16	tdn_19	tdn_20	tdn_21	2de_24	2de_25	2de_26
No.1	3.997	3.813	4.085	-0.335	0.232	-0.469	0.076	0.332	-0.154
No.2	4.625	3.659	4.550	-0.404	0.560	-0.615	0.103	0.367	-0.131
No.3	3.945	3.251	0.000	0.000	0.559	1.629	0.697	0.270	1.050
No.4	2.160	1.703	2.111	-0.024	0.069	-0.040	-0.506	0.683	-0.555
No.5	3.126	0.000	3.068	0.395	0.000	0.502	0.377	0.000	0.148
No.6	4.856	3.536	4.231	-0.384	-0.303	-0.167	-0.411	-0.040	-0.403
No.7	5.225	4.320	5.042	-0.163	0.372	-0.586	0.424	0.052	0.026
No.8	2.521	1.801	2.458	-0.302	-0.496	0.124	-0.250	0.337	-0.462
No.9	4.332	3.441	4.090	-0.208	0.160	-0.328	0.386	-0.137	-0.017
No.10	2.636	1.872	2.683	0.145	-0.035	-0.051	0.368	0.037	0.227
No.11	2.837	1.464	1.849	-0.617	-0.625	0.111	0.101	0.176	-0.975
No.12	2.101	1.541	2.362	0.293	0.206	0.060	0.367	-0.090	0.368
No.13	1.167	1.253	1.546	0.324	-0.508	0.266	-0.556	0.459	-0.244
No.14	2.611	1.828	2.763	0.069	-0.157	0.449	0.305	-0.332	0.227
No.15	2.472	2.197	2.631	0.034	-0.319	-0.200	0.286	0.109	0.162

40

【0089】

【表 8】

配列表	C5.1	C5.2	C5.3	pcp.4	pcp.5	pcp.6	mcs.9	mcs.10	mcs.11	23d.14	23d.15	23d.16	dhp.24	dhp.25	dhp.26
No.1	0.285	0.042	-0.326	-0.281	0.204	0.166	0.192	-0.116	-0.594	1.663	0.932	0.984	0.003	-0.022	-0.323
No.2	-0.065	0.134	-0.070	-1.112	0.155	0.065	-0.023	-0.135	-0.406	1.403	1.087	1.108	-0.400	-0.125	-0.790
No.3	-0.755	0.000	0.755	-0.360	-0.257	0.560	-0.504	-1.090	-0.657	-0.287	0.060	0.058	-0.441	-0.814	-0.660
No.4	0.476	-0.586	0.108	-0.042	-0.166	-0.052	0.160	-0.646	-0.155	0.202	-0.434	0.057	0.181	-0.442	-0.213
No.5	-0.067	0.184	-0.117	-0.204	-0.344	-0.340	-0.169	0.035	-0.491	0.659	-0.095	0.455	-0.261	-0.248	-0.415
No.6	-0.016	-0.155	0.171	-0.006	0.136	0.317	-0.228	0.025	-0.152	0.847	0.221	0.283	0.325	0.605	0.372
No.7	-0.138	0.016	0.122	-0.723	-0.438	-0.080	-0.112	-0.072	-0.252	1.802	1.227	1.111	-0.326	-0.016	-0.820
No.8	-0.295	-0.193	0.488	0.879	0.125	0.367	0.312	0.760	0.420	0.856	0.464	0.286	0.935	0.154	0.029
No.9	-0.077	-0.119	0.195	-0.495	-0.418	-0.428	-0.323	-0.265	-0.339	1.068	0.605	0.572	-0.497	-0.356	-0.880
No.10	-0.235	0.113	0.122	0.255	0.671	0.897	-0.145	0.143	0.244	0.369	0.503	0.481	-0.069	0.370	0.153
No.11	-0.462	-0.207	0.669	-0.221	0.180	0.014	-0.291	0.186	-0.261	-0.260	0.050	-0.143	1.064	-0.403	-0.082
No.12	-0.300	0.199	0.100	-0.368	-0.053	-0.084	-0.322	0.249	0.229	0.192	0.256	0.345	-0.394	0.243	0.100
No.13	0.889	-0.330	-0.558	0.688	0.570	1.036	0.421	-0.990	-0.155	0.386	-0.275	-0.193	0.843	-0.483	-0.326
No.14	-0.056	0.088	-0.033	-0.135	0.250	-0.479	-0.275	-0.215	-0.074	0.389	-0.121	0.363	-0.062	-0.345	-0.485
No.15	-0.083	0.056	0.028	-0.551	-0.368	-0.553	0.169	0.315	0.336	0.464	0.280	0.411	-0.711	0.006	-0.181

10

【0 0 9 0】

【表 9】

配列表	C6.1	C6.2	C6.3	tbe.4	tbe.5	tbe.6	dbe.9	dbe.10	dbe.11
No.1	-0.023	0.013	0.010	0.271	-0.275	-0.521	1.030	-0.010	0.292
No.2	0.172	-0.060	-0.112	0.239	-0.428	-0.862	0.747	-0.114	0.022
No.3	0.038	0.169	-0.206	-0.284	-0.110	0.420	0.553	-0.418	0.730
No.4	-0.194	0.035	0.159	0.002	-0.270	-0.184	0.007	-0.306	0.433
No.5	-0.223	0.049	0.174	0.407	-0.234	0.120	0.322	-0.132	0.199
No.6	-0.444	0.348	0.096	0.170	0.297	0.194	0.292	-0.310	0.144
No.7	0.259	-0.114	-0.145	0.114	-0.523	-0.749	0.687	-0.278	-0.195
No.8	0.138	-0.343	0.205	0.317	0.112	0.382	0.460	-0.175	-0.070
No.9	-0.086	0.185	-0.099	0.332	0.131	0.089	0.616	0.256	0.113
No.10	-0.005	0.055	-0.050	-0.015	-0.033	-0.440	0.195	-0.049	-0.172
No.11	0.127	-0.426	0.299	0.725	0.528	0.241	0.796	-0.289	-0.270
No.12	-0.163	0.144	0.020	0.089	0.155	-0.204	0.093	-0.072	0.229
No.13	-0.526	0.106	0.420	0.136	-0.625	0.252	0.388	0.821	0.766
No.14	0.197	-0.483	0.286	-0.012	-0.180	-0.237	0.384	-0.312	-0.461
No.15	0.066	-0.083	0.018	0.169	0.075	0.112	0.160	0.455	0.023

20

【0 0 9 1】

【表 10】

配列表	pep.14	pep.15	pep.16	tbp.19	tbp.20	tbp.21	tmp.24	tmp.25	tmp.26
No.1	0.839	0.823	0.197	0.617	-0.320	-0.073	-0.150	0.002	-0.012
No.2	0.773	0.413	-0.097	0.491	-0.669	-0.523	-2.100	-0.673	-1.080
No.3	0.442	-0.185	0.020	0.293	0.659	0.396	-0.127	0.119	0.734
No.4	0.104	0.217	-0.037	0.397	-0.027	0.029	0.153	-0.167	0.197
No.5	0.679	0.359	0.169	0.151	0.112	0.044	-0.436	0.068	-0.174
No.6	-0.289	0.206	-0.067	0.068	0.143	-0.365	-0.349	-0.043	-0.234
No.7	0.722	0.413	-0.086	0.319	-0.440	-0.533	-2.275	-0.860	-1.071
No.8	-0.687	-0.115	-0.118	-0.036	0.252	-0.342	-0.168	0.159	-0.698
No.9	0.890	0.513	-0.250	0.763	0.006	0.018	-0.401	0.082	-0.432
No.10	0.054	-0.106	-0.341	-0.075	-0.284	-0.224	1.068	0.116	0.828
No.11	-0.730	-0.088	-0.010	-0.396	0.199	-0.790	-0.292	0.341	-0.943
No.12	0.274	0.430	0.092	0.125	0.150	0.199	-0.008	0.208	0.200
No.13	0.773	0.965	0.429	0.459	0.131	0.877	0.586	1.069	0.819
No.14	0.201	-0.016	-0.020	0.082	-0.109	-0.398	-0.364	-0.233	-0.662
No.15	0.460	0.082	0.185	0.348	0.352	-0.055	-0.912	0.045	-0.701

30

40

【0 0 9 2】

【表 1 1】

配列表	C7.1	C7.2	C7.3	24b.4	24b.5	24b.6	35x.9	35x.10	35x.11	nda.14	nda.15	nda.16	nhd.24	nhd.25	nhd.26
No.1	-0.166	0.260	-0.094	-0.220	0.151	0.019	3.520	3.528	3.862	-0.337	-0.237	-0.477	-0.518	-0.265	-0.347
No.2	-0.199	0.367	-0.168	-0.330	-0.163	-0.124	3.774	3.921	4.203	0.001	0.138	-0.287	-0.068	-0.194	0.361
No.3	0.178	0.130	-0.308	-0.180	-0.448	0.208	2.176	2.440	2.482	-1.116	-0.550	-0.643	-0.185	-0.501	0.545
No.4	0.107	0.212	-0.319	0.076	0.493	0.057	1.923	2.221	2.316	-0.122	-0.505	-0.562	-0.730	-0.154	-0.154
No.5	-0.130	0.190	-0.060	-0.049	-0.358	-0.012	2.006	2.212	2.293	-0.307	-0.318	-0.210	-0.375	-0.168	1.254
No.6	0.333	-0.533	0.201	-0.452	0.076	-0.266	3.317	3.315	3.669	-0.612	-0.606	-0.553	-0.349	-0.490	0.160
No.7	-0.056	0.323	-0.267	-0.583	-0.239	-0.131	3.584	3.778	4.137	0.174	0.180	-0.020	0.430	0.069	0.021
No.8	-0.084	0.487	-0.403	0.249	-0.063	0.138	1.952	2.312	2.087	-0.553	-0.204	-0.212	0.110	-0.072	1.000
No.9	-0.074	0.033	0.041	-0.372	-0.080	-0.169	2.764	3.045	3.413	0.687	0.264	0.261	-0.117	0.261	1.769
No.10	-0.298	0.141	0.156	0.527	0.661	0.300	1.635	2.060	1.833	0.188	0.344	0.460	0.515	0.487	-0.195
No.11	-0.146	0.389	-0.254	0.091	0.310	0.158	2.135	2.465	2.465	0.441	-0.044	0.566	0.336	-0.081	1.206
No.12	0.158	-0.079	-0.078	0.088	0.055	-0.145	1.043	1.505	1.367	0.145	0.008	0.007	0.261	-0.005	0.019
No.13	-0.060	-0.156	0.217	0.324	-0.042	-0.024	1.164	1.284	1.683	-0.544	-0.540	0.948	-1.052	-0.034	-0.030
No.14	-0.227	0.211	0.016	-0.611	0.100	-0.627	1.883	2.127	2.266	-0.404	-0.368	-0.281	0.051	-0.391	-0.964
No.15	-0.189	0.102	0.087	0.204	-0.225	0.101	1.768	1.781	2.222	0.520	0.221	0.404	0.527	0.080	0.408

10

【0 0 9 3】

【表 1 2】

配列表	C8.1	C8.2	C8.3	tmb.9	tmb.10	tmb.11	dha.14	dha.15	dha.16	14d.19	14d.20	14d.21
No.1	-0.240	0.168	0.072	0.788	-0.277	-0.430	0.104	-0.036	-0.051	-0.526	-0.924	-0.740
No.2	-0.331	0.352	-0.021	0.454	-0.338	-0.339	-0.084	-0.005	-0.379	-0.898	-1.077	-0.763
No.3	-0.558	0.558	0.000	0.570	-0.282	0.833	0.541	0.249	0.416	1.242	-0.036	-0.184
No.4	-0.191	-0.131	0.322	0.309	0.147	0.190	0.424	0.258	0.108	0.302	0.427	-0.957
No.5	0.081	0.067	-0.148	-0.060	-0.173	0.110	-0.091	0.355	-0.061	0.156	0.223	0.151
No.6	-0.244	0.273	-0.029	-0.111	-0.340	0.119	-0.004	-0.013	-0.120	0.481	0.074	-0.065
No.7	-0.470	0.229	0.242	-0.153	-0.354	-0.624	-0.110	-0.532	-0.588	-0.317	-1.044	-1.141
No.8	0.658	-0.313	-0.345	0.665	-0.059	0.817	0.257	0.301	1.060	0.844	0.000	0.106
No.9	-0.551	0.523	0.029	0.328	-0.003	0.063	0.083	-0.305	-0.018	-0.411	-0.233	0.010
No.10	0.026	-0.108	0.082	-0.128	-0.188	-0.471	-0.411	-0.425	-0.209	0.041	-0.379	0.071
No.11	0.452	0.348	-0.800	0.361	0.059	0.855	0.369	0.028	0.663	0.194	0.609	0.688
No.12	0.187	0.069	-0.256	0.006	-0.020	-0.381	-0.193	-0.123	0.256	0.048	-0.084	-0.270
No.13	0.544	-0.537	-0.007	1.084	0.468	0.270	-0.106	0.242	-0.081	0.126	0.274	-0.165
No.14	0.291	-0.633	0.342	-0.643	0.228	-0.856	-0.874	-0.521	0.332	0.212	0.284	-0.519
No.15	-0.190	0.086	0.103	-0.157	0.159	-0.391	-0.511	-0.424	-0.019	-0.055	-0.151	-0.002

20

【0 0 9 4】

なお、前記 3 3 種類の化学物質の中で 1 6 種類の化学物質をラットに 2 8 日間反復投与した場合に、腎臓の病理所見の異常が報告されていた。「2-ブタノンオキシム投与群」は尿細管上皮へのリポフスチン様物質の沈着が、「3-シアノピリジン投与群」、「3,4-キシリジン投与群」、「プソイドクメン投与群」は硝子滴変性が、「o-ジクロロベンゼン投与群」は尿細管の好酸性細胞内封入体増加が、「p-(1,1,3,3,-テトラメチルブチル)フェノール投与群」は尿細管上皮の再生像が、「4-エチルモルホリン投与群」、「2-(ジブチルアミノ)エタノール投与群」は壊死および空胞化が、「N-メチルアニリン投与群」は尿細管への色素沈着、硝子滴変性および壊死が、「3,5-キシリジン投与群」は尿細管への色素沈着および硝子滴変性が、「スルホラン投与群」は硝子滴変性、好酸球および好塩基球の出現が、「1,4-ジプロモベンゼン投与群」は尿細管上皮の再生像が、「2-(2-アミノエチルアミノ)エタノール投与群」は尿細管拡張および両染色小体沈着が、「2,3-ジメチルアニリン投与群」は尿細管拡張、鉍質沈着、尿細管上皮の変性、細胞浸潤および腎乳頭壊死が、「2,4-ジ-tert-ブチルフェノール投与群」は尿細管拡張、尿細管上皮の変性、細胞浸潤が、「p-クミルフェノール投与群」は尿細管拡張、尿細管や集合管上皮の再生像が報告されていた。なお、病理所見では顕著な変化はなかったが、他の検査で腎臓に毒性があると報告された化学物質は、「テトラヒドロフルフリルアルコール投与群」「3-メトキシ-3-メチル-1-ブタノール投与群」、「フタル酸ジヘブチル投与群」、「テトラプロモエタ投与群」、「p-エチルフェノール投与群」であった。

30

40

【実施例 2】

【0 0 9 5】

< クラスタ分析 >

DNA マイクロアレイで取得した遺伝子発現データの分析手法として、例えばクラスタ分析が挙げられる。クラスタ分析とは、遺伝子発現変化パターンの類似した遺伝子同士をグループ化する統計的手法である。データ間の類似度（例えばユークリッド距離など）を定義し、その類似度を用いることにより遺伝子発現パターンが類似した、すなわち、遺伝子発現に対して類似した影響を持つ化学物質同士がグループ化される。

50

【0096】

配列番号1～15に示される塩基配列を有する遺伝子の発現変動パターンに基づいて階層的クラスタ分析を行った。階層的クラスタ分析は解析用ソフトウェア「Expression View Pro」(マイクロダイアグノスティック社製)を用いて行った。また、階層的クラスタ分析は「cluster」や「treeview」などのソフトウェアを用いても行うことができる。その結果、化学物質を大きく2つのクラスタに分類することができた。図1にクラスタ分析の結果を示す。なお、図中、「C1」は「第1回目の実験に使用した注射用水投与群」を、「2bo」は「2-ブタノンオキシム投与群」を、「mx」は「m-キシリレンジアミン投与群」を、「3cp」は「3-シアノピリジン投与群」を、「2ae」は「2-(2-アミノエチルアミノ)エタノール投与群」を、「thf」は「テトラヒドロフルフリルアルコール投与群」を、「C2」は「第2回目の実験に使用した注射用水投与群」を、「suf」は「スルホラン投与群」を、「4em」は「4-エチルモルホリン投与群」を、「C3」は「第3回目の実験に使用した注射用水投与群」を、「mta」は「メタクリル酸エチルトリメチルアンモニウムクロリド投与群」を、「bac」は「塩化ベンジルトリメチルアンモニウム投与群」を、「mns」は「m-ニトロベンゼンスルホンナトリウム投与群」を、「nat」は「1-ナフチルアミン-4-スルホン酸ナトリウム四水和物投与群」を、「mmb」は「3-メトキシ-3-メチル-1-ブタノール投与群」を、「C4」は「第4回目の実験に使用した注射用水投与群」を、「dcb」は「o-ジクロロベンゼン投与群」を、「34x」は「3,4-キシリジン投与群」を、「nma」は「N-メチルアニリン投与群」を、「tdn」は「トリレンジイソシアナート投与群」を、「2de」は「2-(ジブチルアミノ)エタノール投与群」を、「C5」は「第5回目の実験に使用したオリブ油投与群」を、「pcp」は「p-クミルフェノール投与群」を、「mcs」は「m-クレゾール投与群」を、「23d」は「2,3-ジメチルアニリン投与群」を、「dhp」は「フタル酸ジヘプチル投与群」を、「C6」は「第6回目の実験に使用したオリブ油投与群」を、「tbe」は「テトラブプロモエタン投与群」を、「dba」は「アジピン酸ジブチル投与群」を、「pep」は「p-エチルフェノール投与群」を、「tbp」は「o-t-ブチルフェノール投与群」を、「tmp」は「p-(1,1,3,3,-テトラメチルブチル)フェノール投与群」を、「C7」は「第7回の実験に使用したオリブ油投与群」を、「24b」は「2,4-ジ-tert-ブチルフェノール投与群」を、「35x」は「3,5-キシリジン投与群」を、「nda」は「N,N-ジメチルベンジルアミン投与群」を、「nhd」は「n-ヘキサデカン投与群」を、「C8」は「ゴマ油投与群」を、「tmb」は「プソイドクメン投与群」を、「dha」は「ジシクロヘキシルアミン投与群」を、「14d」は「1,4-ジブプロモベンゼン投与群」を表す。サンプル名を表す略号の下にある黒と白のバーは腎毒性の有無を表しており、黒が腎毒性を有する化学物質、白が腎毒性を有さない化学物質を表している。さらに、黒丸と白丸は、配列番号1～15に示される塩基配列を有する遺伝子を特定する際に比較対象としたサンプルを表しており、黒丸が化学物質投与サンプルを、白丸が対照サンプルを表している。また、「A」および「B」は主要なクラスタを表している。

10

20

30

40

【0097】

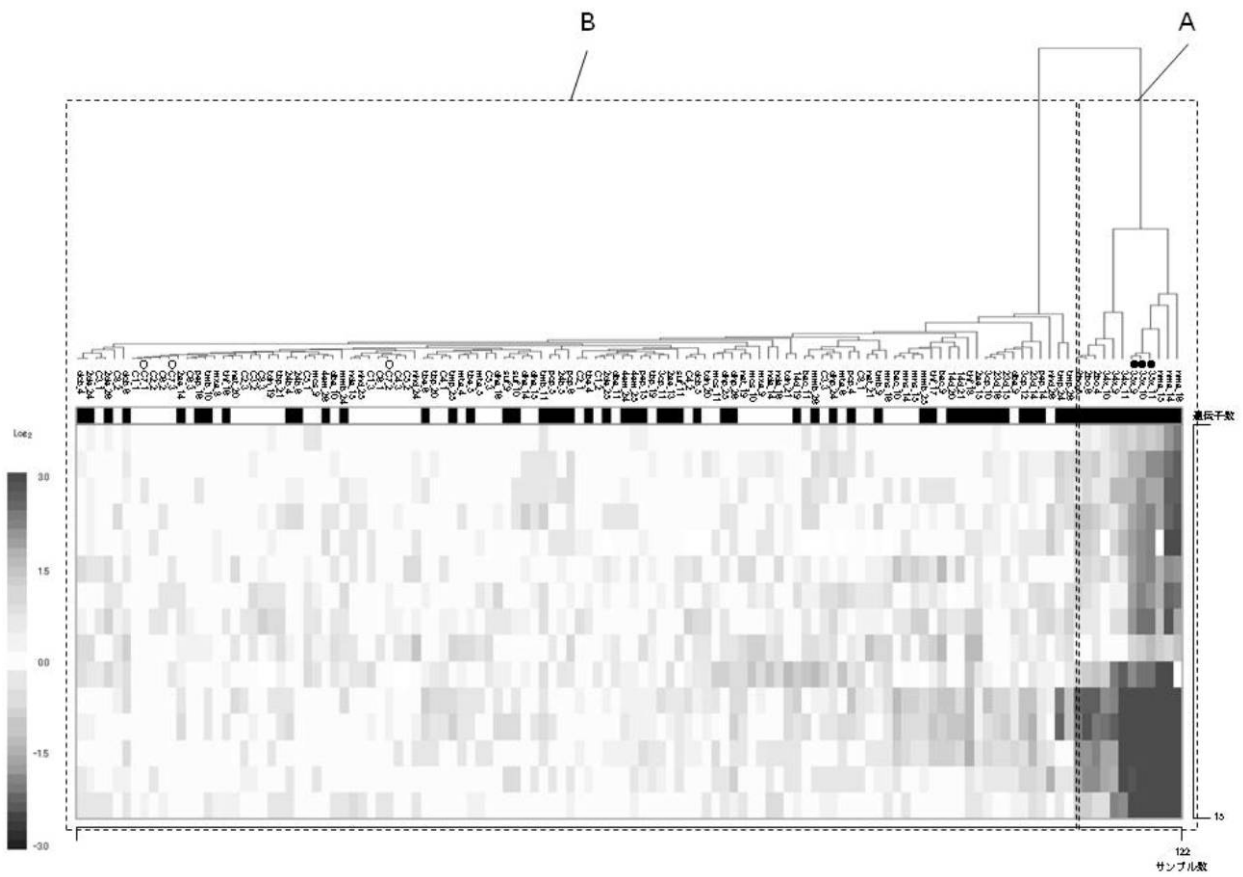
「A」のクラスタには、N-メチルアニリン投与群(nma)が3個体中3個体、3,5-キシリジン投与群(35x)が3個体中3個体、3,4-キシリジン投与群(34x)が3個体中3個体、2-ブタノンオキシム投与群(2bo)が3個体中3個体含まれていた。「B」のクラスタには、対照群を含むその他のサンプルが含まれていた。なお、「A」のクラスタには腎毒性を有することが知られている化学物質のみが含まれていた。この結果は、配列番号1～15に示される塩基配列を有する遺伝子の発現変動パターンによって、これらの化学物質を対照群と区別することができ、また、化学物質を分類できることを意味する。

【産業上の利用可能性】

【0098】

本発明の毒性判定遺伝子セットは、腎毒性のモニタリング、それらの診断および/またはそれらに対する種々の措置もしくは薬剤の有効性を判定することを助けることができる可能性がある。

【図 1】



【配列表】

2013031377000001.app

 フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I			テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/06 (2006.01)	C 1 2 Q 1/06			
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53		M	
G 0 1 N 37/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/53		D	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	G 0 1 N 37/00	1 0 2		
	C 1 2 N 15/00		A	
	C 1 2 N 15/00		F	

(72)発明者 加藤 史子

神奈川県横浜市鶴見区小野町 7 5 番地 1 号 株式会社メディクローム横浜研究所内

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA04 CA12 DA02 EA02 EA03 EA04 GA11 HA14
 4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ08 QQ53 QR36 QR40 QR48 QR62 QR72
 QR77
 4B065 AA90X AA90Y AB01 BA02 BD25 CA24 CA46

专利名称(译)	通过基因表达波动分析检测化学物质对生物体的影响的方法		
公开(公告)号	JP2013031377A	公开(公告)日	2013-02-14
申请号	JP2011167768	申请日	2011-07-29
申请(专利权)人(译)	公司的Medi格		
[标]发明人	渡邊慎哉 今井順一 河村未佳 加藤史子		
发明人	渡邊 慎哉 今井 順一 河村 未佳 加藤 史子		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N5/10 C12N5/0735 C12N5/074 C12N5/071 C12Q1/06 G01N33/53 G01N37/00 C12N15/09		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12N5/00.102 C12N5/00.202.C C12N5/00.202.D C12N5/00.202.A C12Q1/06 G01N33/53.M G01N33/53.D G01N37/00.102 C12N15/00.A C12N15/00.F C12N15/09.200 C12N5/071 C12N5/0735 C12N5/074 C12N5/10 C12Q1/68.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA12 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QR36 4B063/QR40 4B063/QR48 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/BD25 4B065/CA24 4B065/CA46		
代理人(译)	田中彦 今井淳一		

摘要(译)

要解决的问题：解决用血液学或病理学方法检测肾脏毒性难以评估的问题。解决方案：外部环境的变化导致体内基因表达的急剧改变，以及基因组的鉴定用于确定活体毒性的方法导致在发生毒性之前或在通过病理检查证实毒性的正面之前快速且精确地检测毒性。因此，提供了使用新基因组检测或预测毒性的方法，该方法试剂盒，治疗毒性的方法，以及确认毒性候选药物的方法。

配列表	C1.1	C1.2	C1.3	2bo.4	2bo.5	2bo.6	mxg.8	mxg.9
No.1	-0.049	0.166	-0.117	2.262	2.143	2.084	0.106	0.745
No.2	-0.149	0.089	0.060	2.661	2.562	2.681	0.183	0.321
No.3	-0.099	0.701	-0.602	1.501	1.104	1.300	-0.057	-0.602
No.4	0.176	0.362	-0.538	1.007	0.853	1.094	0.344	0.074
No.5	0.254	0.068	-0.322	1.064	1.301	1.334	0.334	-0.355
No.6	0.013	0.237	-0.249	0.825	1.222	1.266	0.459	0.048
No.7	-0.257	-0.065	0.322	2.416	2.366	2.856	-0.128	0.162
No.8	-0.028	0.043	-0.015	0.645	1.067	1.002	0.080	0.459
No.9	-0.151	-0.134	0.285	2.144	1.846	2.190	0.001	0.160
No.10	-0.152	0.126	0.026	0.774	0.643	1.050	-0.179	0.079
No.11	-0.207	0.015	0.193	0.759	0.673	0.707	0.042	-0.150
No.12	0.043	-0.016	-0.027	0.416	0.369	0.582	-0.029	0.132
No.13	0.056	-0.037	-0.019	0.560	0.104	-0.114	0.022	-0.961
No.14	-0.138	-0.083	0.221	1.360	1.404	1.500	0.226	0.029
No.15	-0.116	0.058	0.058	1.279	1.182	1.207	0.215	0.381