

(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2012-196160

(P2012-196160A)

(43) 公開日 平成24年10月18日(2012.10.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 ZNAA	4B024
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	4B063
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 102	4B065
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 M	
GO1N 37/00 (2006.01)	GO1N 33/53 D	

審査請求 未請求 請求項の数 43 O L (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-61651 (P2011-61651)  
 (22) 出願日 平成23年3月18日 (2011.3.18)

(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】 化学物質の生体影響の予測方法

(57) 【要約】

【課題】血液学的手法または病理学的手法による肝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判別または予測する方法であって、

(A) 実験動物または肝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の曝露を所定期間だけ与えて検査試料とするとともに、残り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 ~ 37 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少なくとも 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、

(B) 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、

(C) 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肝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判別・予測方法。

**【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判別・予測方法。

**【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】**

前記参照試料について、肝毒性を有することが公知である既知化学物質を含む複数の化学物質又は前記化学物質を溶解させた溶媒の曝露を前記所定期間だけ与えるステップを更に含むことを特徴とする請求項 1 記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

**【請求項 6】**

前記既知化学物質は、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)、スルホラン (CAS登録番号126-33-0)、2-イソプロポキシエタノール (CAS登録番号109-59-1)、ヒドラジーン-水和物 (CAS登録番号7803-57-8)、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)、トリレンジイソシアナート (CAS登録番号26471-62-5)、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)、m-クレゾール (CAS登録番号108-39-4)、2,3-ジメチルアニリン (CAS登録番号87-59-2)、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (CAS登録番号538-75-0)、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)、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)、1,3-ジプロモプロパン (CAS登録番号109-64-8)、1-プロモ-3-クロロプロパン (CAS登録番号109-70-6)、プソイドクメン (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) から選択される少なくとも 1 以上の化学物質であるこ

10

20

30

40

50

とを特徴とする請求項 5 記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

【請求項 7】

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 又は 5 に記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

【請求項 8】

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 7 記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

10

【請求項 9】

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 8 記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

【請求項 10】

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 9 記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

【請求項 11】

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 9 または 10 記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

【請求項 12】

20

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 又は 5 に記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

【請求項 13】

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 12 記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

【請求項 14】

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 13 記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

30

【請求項 15】

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 14 記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

【請求項 16】

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するために用いられる照合データとしての遺伝子発現データベースを作成する方法であって、

(A) 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)、メタクリルアミド (CAS登録番号79-39-0)、スルホラン (CAS登録番号126-33-0)、2-イソプロポキシエタノール (CAS登録番号109-59-1)、ヒドラジーン水和物 (CAS登録番号7803-57-8)、4-エチルモルホリン (CAS登録番号100-74-3)、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)、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)、トリレンジイソシアナート (CAS登録番号26471-62-5)、2-(ジブチルアミノ)エタノール (CAS登録番号10

40

50

2-81-8)、p-クミルフェノール(CAS登録番号599-64-4)、m-クレゾール(CAS登録番号108-39-4)、2,3-ジメチルアニリン(CAS登録番号87-59-2)、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(CAS登録番号538-75-0)、フタル酸ジヘブチル(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)、アジピン酸ジブチル(CAS登録番号105-99-7)、P-エチルフェノール(CAS登録番号123-07-9)、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)、N,N-ジメチルベンジルアミン(CAS登録番号103-83-3)、1,3-ジブプロモプロパン(CAS登録番号109-64-8)、n-ヘキサデカン(CAS登録番号544-76-3)、1-ブromo-3-クロロプロパン(CAS登録番号109-70-6)、ブソイドクメン(CAS登録番号95-63-6)、ジシクロヘキシルアミン(CAS登録番号101-83-7)、1,4-ジブプロモベンゼン(CAS登録番号106-37-6)、及び2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸(CAS登録番号88-44-8)のそれぞれについて所定量を所定期間生体または肝臓由来の細胞試料に投与(曝露)するステップと、

(B)前記生体の肝臓組織または前記肝臓由来の前記細胞試料からmRNAを単離して、配列番号1~37の塩基配列を有する遺伝子群(生体応答遺伝子群)のうちから選択される少なくとも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、(C)前記遺伝子発現レベルを対応する前記化学物質、曝露量及び曝露期間とともに遺伝子発現データとしてデータベース化するステップと、を含むことを特徴とする照合用遺伝子発現データベース作成方法。

#### 【請求項17】

前記測定ステップは、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つを用いることを特徴とする、請求項16記載の照合用遺伝子発現データベース作成方法。

#### 【請求項18】

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17記載の照合用遺伝子発現データベースの作成方法。

#### 【請求項19】

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18記載の照合用遺伝子発現データベースの作成方法。

#### 【請求項20】

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19記載の照合用遺伝子発現データベースの作成方法。

#### 【請求項21】

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19又は20に記載の照合用遺伝子発現データベースの作成方法。

#### 【請求項22】

前記測定ステップは、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、量を測定によることを特徴とする請求項16記載の照合用遺伝子発現データベースの作成方法。

#### 【請求項23】

前記測定は、免疫学的方法によって行うことを特徴とする請求項22記載の照合用遺伝子発現データベースの作成方法。

#### 【請求項24】

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であることを特徴とする請求項23記載の照合用遺伝子発現データベースの作成方法。

#### 【請求項25】

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24記載の照合用遺伝子発現データベ

10

20

30

40

50

ースの作成方法。

【請求項 26】

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) 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)、メタクリルアミド (CAS登録番号79-39-0)、スルホラン (CAS登録番号126-33-0)、2-イソプロポキシエタノール (CAS登録番号109-59-1)、ヒドラジーン水和物 (CAS登録番号7803-57-8)、4-エチルモルホリン (CAS登録番号100-74-3)、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)、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)、トリレンジイソシアナート (CAS登録番号26471-62-5)、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)、m-クレゾール (CAS登録番号108-39-4)、2,3-ジメチルアニリン (CAS登録番号87-59-2)、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (CAS登録番号538-75-0)、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)、アジピン酸ジブチル (CAS登録番号105-99-7)、P-エチルフェノール (CAS登録番号123-07-9)、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)、N,N-ジメチルベンジルアミン (CAS登録番号103-83-3)、1,3-ジプロモプロパン (CAS登録番号109-64-8)、n-ヘキサデカン (CAS登録番号544-76-3)、1-プロモ-3-クロロプロパン (CAS登録番号109-70-6)、ブソイドクメン (CAS登録番号95-63-6)、ジシクロヘキシルアミン (CAS登録番号101-83-7)、1,4-ジプロモベンゼン (CAS登録番号106-37-6)、及び2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸 (CAS登録番号88-44-8)のそれぞれについて所定量を所定期間生体または肝臓由来の細胞試料に投与(曝露)するステップと、

(B) 前記生体の肝臓組織または前記肝臓由来の前記細胞試料からmRNAを単離して、配列番号1~37の塩基配列を有する遺伝子群(生体応答遺伝子群)のうちから選択される少なくとも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、

(C) 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、

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

(E) 前記生体由来の前記肝臓組織または前記肝臓由来の細胞試料からmRNAを単離して、(B)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、

(F) (E)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、

(G) (F)で収集された遺伝子発現データを(C)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判別・予測方法。

【請求項 27】

前記測定ステップは、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つを用いることを特徴とする、請求項26記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

【請求項 28】

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

10

20

30

40

50

とする請求項 2 7 記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

【請求項 2 9】

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 2 8 記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

【請求項 3 0】

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 2 9 記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

【請求項 3 1】

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 9 又は 3 0 に記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

【請求項 3 2】

前記測定ステップは、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、もしくは量を測定によることを特徴とする請求項 2 6 記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

【請求項 3 3】

前記測定は、免疫学的方法によって行うことを特徴とする請求項 3 2 記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

【請求項 3 4】

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であることを特徴とする請求項 3 3 記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

【請求項 3 5】

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 3 4 記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

【請求項 3 6】

請求項 3 及び 4 を除く、請求項 1 乃至 3 5 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判別キット。

【請求項 3 7】

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 3 6 記載の化学物質の毒性判別キット。

【請求項 3 8】

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 3 7 記載の化学物質の毒性判別キット。

【請求項 3 9】

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請求項 3 8 記載の化学物質の毒性判別キット。

【請求項 4 0】

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 3 8 または 3 9 記載の化学物質の毒性判別キット。

【請求項 4 1】

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 3 6 記載の化学物質の毒性判別キット。

【請求項 4 2】

前記プローブは、少なくとも 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 3 6 乃至 4 1 のうちのいずれか 1 つに記載の化学物質の毒性判別キット。

10

20

30

40

50

**【請求項 4 3】**

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 4 2 記載の化学物質の毒性判別キット。

**【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、生体毒性の検出、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、肝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）。

**【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）。

30

**【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。

**【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。

40

**【先行技術文献】****【特許文献】****【0007】**

【特許文献 1】特許第 4 0 2 2 6 1 0 号公報

【特許文献 2】特許第 4 4 7 5 3 7 3 号公報

【特許文献 3】特許第 4 5 7 3 8 7 6 号公報

【特許文献 4】特開 2 0 0 6 - 1 1 5 7 4 8 号公報

50

【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】

【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)

【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る。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たり、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。

【0010】

また、複数の肝毒性を有する化学物質の曝露に対して大規模に遺伝子発現変動解析を行い、それらの化学物質の曝露により生体内で発現変動する遺伝子を特定した例も乏しく、必ずしも異なる複数の化学物質の肝毒性を評価できていなかった。

【0011】

本発明は化学物質の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。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明者は、3-シアノピリジン(CAS登録番号100-54-9)をラットに28日間反復投与したことにより、ラットの肝臓で統計的に有意に発現変動した遺伝子が37遺伝子存在していることを見出し、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判別または予測する方法であって、

(A) 実験動物または肝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の曝露を所定期間だけ与えて検査試料とするとともに、残り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1~37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少なくとも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、

(B) 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

10

20

30

40

50

測定する第 2 の遺伝子発現レベル測定ステップと、

(C) 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肝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判別・予測方法。

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判別・予測方法。

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. 前記参照試料について、肝毒性を有することが公知である既知化学物質を含む複数の化学物質又は前記化学物質を溶解させた溶媒の曝露を前記所定期間だけ与えるステップを更に含むことを特徴とする前記 1 記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

6. 前記既知化学物質は、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)、スルホラン (CAS登録番号126-33-0)、2-イソプロポキシエタノール (CAS登録番号109-59-1)、ヒドラジーン水和物 (CAS登録番号7803-57-8)、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)、トリレンジイソシアナート (CAS登録番号26471-62-5)、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)、m-クレゾール (CAS登録番号108-39-4)、2,3-ジメチルアニリン (CAS登録番号87-59-2)、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (CAS登録番号538-75-0)、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)、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)、1,3-ジプロモプロパン (CAS登録番号109-64-8)、1-プロモ-3-クロロプロパン (CAS登録番号109-70-6)、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) から選択される少なくとも 1 以上の化学物質であることを特徴とする前記 5 記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

7. 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 又は 5 に記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

8. 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 7 記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

9. 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 8 記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

10. 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 9 記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

11. 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 9 または 10 記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

12. 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

10

20

30

40

50

測定によることを特徴とする前記 1 又は 5 に記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

13．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 1 2 記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

14．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 1 3 記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

15．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 1 4 記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

16．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するために用いられる照合データとしての遺伝子発現データベースを作成する方法であって、

(A) 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)、メタクリルアミド (CAS登録番号79-39-0)、スルホラン (CAS登録番号126-33-0)、2-イソプロポキシエタノール (CAS登録番号109-59-1)、ヒドラジーン水和物 (CAS登録番号7803-57-8)、4-エチルモルホリン (CAS登録番号100-74-3)、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)、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)、トリレンジイソシアナート (CAS登録番号26471-62-5)、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)、m-クレゾール (CAS登録番号108-39-4)、2,3-ジメチルアニリン (CAS登録番号87-59-2)、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (CAS登録番号538-75-0)、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)、アジピン酸ジブチル (CAS登録番号105-99-7)、p-エチルフェノール (CAS登録番号123-07-9)、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)、N,N'-ジメチルベンジルアミン (CAS登録番号103-83-3)、1,3-ジブロモプロパン (CAS登録番号109-64-8)、n-ヘキサデカン (CAS登録番号544-76-3)、1-プロモ-3-クロロプロパン (CAS登録番号109-70-6)、ブソイドクメン (CAS登録番号95-63-6)、ジシクロヘキシルアミン (CAS登録番号101-83-7)、1,4-ジプロモベンゼン (CAS登録番号106-37-6)、及び2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸 (CAS登録番号88-44-8) のそれぞれについて所定量を所定期間生体または肝臓由来の細胞試料に投与 (曝露) するステップと、

(B) 前記生体の肝臓組織または前記肝臓由来の前記細胞試料からmRNAを単離して、配列番号1~37の塩基配列を有する遺伝子群 (生体応答遺伝子群) のうちから選択される少なくとも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、

(C) 前記遺伝子発現レベルを対応する前記化学物質、曝露量及び曝露期間とともに遺伝子発現データとしてデータベース化するステップと、  
を含むことを特徴とする照合用遺伝子発現データベース作成方法。

17．前記測定ステップは、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つを用いることを特徴とする、前記 1 6 記載の照合用遺伝子発現データベース作成方法。

18．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 1 7 記載の照合用遺伝子発現データベースの作成方法。

19．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 1 8 記載の照合用遺伝子発現データベースの作成

10

20

30

40

50

方法。

20．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19記載の照合用遺伝子発現データベースの作成方法。

21．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19又は20に記載の照合用遺伝子発現データベースの作成方法。

22．前記測定ステップは、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、量を測定によることを特徴とする前記16記載の照合用遺伝子発現データベースの作成方法。

23．前記測定は、免疫学的方法によって行うことを特徴とする前記22記載の照合用遺伝子発現データベースの作成方法。

24．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であることを特徴とする前記23記載の照合用遺伝子発現データベースの作成方法。

25．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24記載の照合用遺伝子発現データベースの作成方法。

26．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) 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)、メタクリルアミド (CAS登録番号79-39-0)、スルホラン (CAS登録番号126-33-0)、2-イソプロポキシエタノール (CAS登録番号109-59-1)、ヒドラジーン水和物 (CAS登録番号7803-57-8)、4-エチルモルホリン (CAS登録番号100-74-3)、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)、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)、トリレンジイソシアナート (CAS登録番号26471-62-5)、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)、m-クレゾール (CAS登録番号108-39-4)、2,3-ジメチルアニリン (CAS登録番号87-59-2)、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (CAS登録番号538-75-0)、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)、アジピン酸ジブチル (CAS登録番号105-99-7)、P-エチルフェノール (CAS登録番号123-07-9)、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)、N,N-ジメチルベンジルアミン (CAS登録番号103-83-3)、1,3-ジプロモプロパン (CAS登録番号109-64-8)、n-ヘキサデカン (CAS登録番号544-76-3)、1-プロモ-3-クロロプロパン (CAS登録番号109-70-6)、ブソイドクメン (CAS登録番号95-63-6)、ジシクロヘキシルアミン (CAS登録番号101-83-7)、1,4-ジプロモベンゼン (CAS登録番号106-37-6)、及び2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸 (CAS登録番号88-44-8)のそれぞれについて所定量を所定期間生体または肝臓由来の細胞試料に投与(曝露)するステップと、

(B) 前記生体の肝臓組織または前記肝臓由来の前記細胞試料からmRNAを単離して、配列番号1~37の塩基配列を有する遺伝子群(生体応答遺伝子群)のうちから選択される少なくとも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、

(C) 前記遺伝子発現レベルに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、

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

(E) 前記生体由来の前記肝臓組織または前記肝臓由来の細胞試料からmRNAを単離して、

10

20

30

40

50

(B)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、

(F)(E)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、

(G)(F)で収集された遺伝子発現データを(C)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判別・予測方法。

27.前記測定ステップは、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つを用いることを特徴とする、前記26記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

10

28.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27記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

29.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28記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

30.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29記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

31.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29又は30に記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

32.前記測定ステップは、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、もしくは量を測定によることを特徴とする前記26記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

20

33.前記測定は、免疫学的方法によって行うことを特徴とする前記32記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

34.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であることを特徴とする前記33記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

35.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34記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

30

36.前記3及び4を除く、前記1乃至35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判別キット。

37.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36記載の化学物質の毒性判別キット。

38.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37記載の化学物質の毒性判別キット。

39.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38記載の化学物質の毒性判別キット。

40

40.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38または39記載の化学物質の毒性判別キット。

41.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36記載の化学物質の毒性判別キット。

42.前記プローブは、少なくとも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36乃至41のうちのいずれか1つに記載の化学物質の毒性判別キット。

43.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42記載の化学物質の毒性判別キット。

50

## 【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肝臓における遺伝子発現様式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1～37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。図中、「C1」は「第1回目の実験に使用した注射用水」を、「2bo」は「2-ブタノンオキシム」を、「3cp」は「3-シアノピリジン」を、「2ae」は「2-(2-アミノエチルアミノ)エタノール」を、「thf」は「テトラヒドロフルフリルアルコール」を、「C2」は「第2回目の実験に使用した注射用水」を、「mca」は「メタクリルアミド」を、「suf」は「スルホラン」を、「2ip」は「2-イソプロポキシエタノール」を、「hnh」は「ヒドラジン-水和物」を、「4em」は「4-エチルモルホリン」を、「C3」は「第3回目の実験に使用した注射用水」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」を、「bac」は「塩化ベンジルトリメチルアンモニウム」を、「mns」は「m-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム」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」を、「mmb」は「3-メトキシ-3-メチル-1-ブタノール」を、「C4」は「第4回目の実験に使用した注射用水」を、「dcb」は「o-ジクロロベンゼン」を、「34x」は「3,4-キシリジン」を、「nma」は「N-メチルアニリン」を、「tdn」は「トリレンジイソシアナート」を、「2de」は「2-(ジブチルアミノ)エタノール」を、「C5」は「第5回目の実験に使用したオリーブ油」を、「pcp」は「p-クミルフェノール」を、「mcs」は「m-クレゾール」を、「23d」は「2,3-ジメチルアニリン」を、「dhc」は「N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド」を、「dhp」は「フタル酸ジヘプチル」を、「C6」は「第6回目の実験に使用したオリーブ油」を、「tbe」は「テトラブromoエタン」を、「dba」は「アジピン酸ジブチル」を、「pep」は「P-エチルフェノール」を、「C7」は「第7回の実験に使用したオリーブ油」を、「24b」は「2,4-ジ-tert-ブチルフェノール」を、「35x」は「3,5-キシリジン」を、「nda」は「N,N-ジメチルベンジルアミン」を、「13d」は「1,3-ジブromoプロパン」を、「nhd」は「n-ヘキサデカン」を、「C8」は「ごま油」を、「bcp」は「1-ブromo-3-クロロプロパン」を、「tmb」は「ブソイドクメン」を、「dha」は「ジシクロヘキシルアミン」を、「14d」は「1,4-ジブromoベンゼン」を、「ams」は「2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸」を表す。また、各化学物質の略号に付随している数字はラットの個体の別を表している。黒と白のバーは肝毒性の有無を表しており、黒が肝毒性を有する化学物質、白が肝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1～37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」～「C」はクラスタを表している。

## 【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様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。

10

20

30

40

50

## 【0019】

被検化学物質（被検群）またはその溶媒（対照群）の対象となる試験動物には、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。

## 【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。

## 【0023】

配列番号1～37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RNA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。

## 【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。

## 【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、人工多能性肝細胞（iPS細胞：induced pluripotent stem cell）で例示できるが、これらに限

10

20

30

40

50

られるものではない。

【0030】

「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、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。

20

【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。

【0035】

「肝毒性」とは、多くの疾病もしくは障害のプロセスにより誘発され得るところの急性もしくは慢性の肝臓の不全もしくは機能障害を意味する。

【0036】

「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。

30

【0037】

「試料」には、好ましくは肝臓の生検材料、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。

【0038】

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。

【0039】

「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。

40

【0040】

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。

【0041】

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

50

ーザンプロット法、ドットプロット法、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。

【0042】

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: Moleclar 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。

10

【0043】

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。

【0044】

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が少なくとも1つ以上固定化されているものを用いる。

20

【0045】

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。

【0046】

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 [ 1 2 5 I ]、[ 1 3 1 I ]、[ 3 H ]、[ 1 4 C ]、[ 3 2 P ]、[ 3 5 S ]、酵素であるガラクトシダーゼ、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蛍光色素 (例えば、Cy 2、Cy 3、Cy 5、Cy5.5、Cy 7、Cyanine 3、Cyanine 5 など) を用いることができる。

【0047】

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。

30

【0048】

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。

【0049】

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。

40

【0050】

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

50

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。

【0051】

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、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。

【0052】

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

【0053】

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。

20

【0054】

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。

【0055】

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。

30

【0056】

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。

【0057】

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。

40

【0058】

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。

【0059】

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。

【0060】

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

50

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】

【0061】

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、3-シアノピリジン（CAS登録番号100-54-9）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肝臓で発現レベルが著しく変化した遺伝子群である。

【0062】

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。

【0063】

< 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。

【0064】

< 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、エアロ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。エアロ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。水は給水ピンを用いて、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。

【0065】

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](http://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/jsp/SearchPage.jsp)）に登録されている37種類の化学物質2-ブタノンオキシム、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、メタクリルアミド、スルホラン、2-イソプロポキシエタノール、ヒドラジン-水和物、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、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド、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、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、1,3-ジプロモプロパン、n-ヘキサデカン、1-プロモ-3-クロロプロパン、ブソイドクメン、ジシクロヘキシルアミン、1,4-ジプロモベンゼン、又は2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸を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。

【0066】

実験のスケジュールとして、37種類の化学物質の反復投与試験を8回に分けて行った

(表1参照)。表中、「第1回」～「第8回」は実験回を表しており、例えば、第1回目の実験では、2-ブタノンオキシム、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、及び、それらの溶媒である注射用水を対照群として同時期に実験をしたことを示している。また、第1回目～第8回目はそれぞれ実験の時期が異なることを示している。さらに、表中の「略号」の欄には、本発明における出願書類中で使用している化学物質の略号を記載しており、「CAS登録番号」の欄には、それぞれの化学物質のCAS登録番号を記載している。

【 0 0 6 7 】

【表 1】

	略号	化学物質名称	CAS登録番号
第1回	C1	注射用水	
	2bo	2-ブタンオキシム	96-29-7
	3cp	3-シアノピリジン	100-54-9
	2ae	2-(2-アミノエチルアミノ)エタノール	111-41-1
	thf	テトラヒドロフルフリルアルコール	97-99-4
第2回	C2	注射用水	
	mca	メタクリルアミド	79-39-0
	suf	スルホラン	126-33-0
	2ip	2-イソプロポキシエタノール	109-59-1
	hnh	ヒドラジン-水和物	7803-57-8
4em	4-エチルモルホリン	100-74-3	
第3回	C3	注射用水	
	mta	メタクリル酸エチルトリメチルアンモニウムクロリド	5039-78-1
	bac	塩化ベンジルトリメチルアンモニウム	56-93-9
	mns	m-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム	127-68-4
	nat	1-ナフチルアミン-4-スルホン酸ナトリウム四水和物	130-13-2
mmb	3-メトキシ-3-メチル-1-ブタノール	56539-66-3	
第4回	C4	オリーブ油	
	dcb	o-ジクロロベンゼン	95-50-1
	34x	3,4-キシリジン	95-64-7
	nma	N-メチルアニリン	100-61-8
	tdn	トリレンジイソシアナート	26471-62-5
	2de	2-(ジブチルアミノ)エタノール	102-81-8
第5回	C5	オリーブ油	
	pcp	p-クミルフェノール	599-64-4
	mcs	m-クレゾール	108-39-4
	23d	2,3-ジメチルアニリン	87-59-2
	dhc	N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド	538-75-0
	dhp	フタル酸ジヘプチル	3648-21-3
第6回	C6	オリーブ油	
	tbe	テトラブromoエタン	79-27-6
	dba	アジピン酸ジブチル	105-99-7
pep	p-エチルフェノール	123-07-9	
第7回	C7	オリーブ油	
	24b	2,4-ジ-tert-ブチルフェノール	96-76-4
	35x	3,5-キシリジン	108-69-0
	nda	N,N-ジメチルベンジルアミン	103-83-3
	13d	1,3-ジブromoプロパン	109-64-8
nhd	n-ヘキサデカン	544-76-3	
第8回	C8	ゴマ油	
	bcp	1-ブromo-3-クロロプロパン	109-70-6
	tmb	プソイドクメン	95-63-6
	dha	ジシクロヘキシルアミン	101-83-7
	14d	1,4-ジブromoベンゼン	106-37-6
ams	2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸	88-44-8	

10

20

30

40

## 【0068】

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）を装着したのものを用いたが、これに限定されるものではない。

50

## 【 0 0 6 9 】

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、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、メタクリルアミドが150mg/kg/day、スルホランが700mg/kg/day、2-イソプロポキシエタノールが500mg/kg/day、ヒドラジーン水和物が30mg/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、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミドが300mg/kg/day、フタル酸ジブチルが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1,000mg/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、1,3-ジプロモプロパンが250mg/kg/day、n-ヘキサデカンが1,000mg/kg/day、1-プロモ-3-クロロプロパンが300mg/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、2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸が1,000mg/kg/dayとし、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。

10

20

## 【 0 0 7 0 】

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、肝臓を採取し、速やかに液体窒素で凍結させた。凍結させた肝臓組織は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。

## 【 0 0 7 1 】

## &lt; 全RNAの抽出 &gt;

肝臓組織からの全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。

30

## 【 0 0 7 2 】

## &lt; 核酸検体の調製 &gt;

検体用mRNAの調製は、肝臓組織から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。

## 【 0 0 7 3 】

## &lt; マイクロアレイの作製 &gt;

マイクロアレイ用合成DNAを用いてマイクロアレイを作製した。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。

40

## 【 0 0 7 4 】

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)を超微量分注装置(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。

## 【 0 0 7 5 】

## &lt; マイクロアレイの後処理 &gt;

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。

50

## 【0076】

## &lt; 標識cDNAの合成 &gt;

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）（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。

10

## 【0077】

## &lt; 標識プローブの作製 &gt;

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。

## 【0078】

## &lt; ハイブリダイゼーション &gt;

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。

20

## 【0079】

## &lt; 洗浄 &gt;

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。

30

## 【0080】

## &lt; 蛍光強度の検出及び数値化 &gt;

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（log<sub>2</sub>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。

40

## 【0081】

## &lt; 二次比の算出 &gt;

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。

## 【0082】

## &lt; 統計学的処理 &gt;

50

化学物質が生体に与える影響を判別するために有用な遺伝子を選択するために、3-シアノピリジン（CAS登録番号100-54-9）を28日間反復投与したラットの肝臓と注射用水を投与した対照群ラットの肝臓とを比較して、各遺伝子の対数変換相対的発現比に対する学生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が2倍以上、かつ、P値が0.01未満である遺伝子群である37遺伝子を特定した。次に、残りの36種類の化学物質およびそれぞれの対照を投与したラットの肝臓から取得した遺伝子発現プロファイルから、該37遺伝子を抽出した（表2～16）。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た。また、表中の略号は表1に記載のものを使用し、略号に付随の数字は個体の別を表している。

【0083】

【表2】

配列番号	C1_1	C1_2	C1_3	2bo_4	2bo_5	2bo_6	3cp_10	3cp_11	3cp_12
1	-0.041	0.397	0.056	-0.158	-0.244	-0.284	-1.309	-0.721	-1.197
2	0.172	0.593	0.202	0.022	-0.150	0.024	-1.364	-1.068	-0.996
3	0.538	0.335	0.136	-0.067	-0.225	-0.124	-1.000	-0.729	-1.139
4	0.102	0.192	0.357	-0.108	0.050	0.126	-0.846	-1.029	-0.657
5	0.352	0.402	0.172	-0.047	0.324	0.170	-0.606	-1.041	-0.957
6	0.150	0.278	0.143	-0.254	0.229	-0.021	-1.080	-0.989	-0.726
7	0.474	0.326	0.120	-0.317	-0.383	-0.478	-0.881	-0.450	-0.792
8	0.456	0.334	-0.083	0.189	0.337	-0.006	-0.778	-1.114	-0.723
9	0.261	0.706	0.620	-0.308	0.377	0.188	-0.732	-0.535	-0.374
10	-0.163	0.411	0.208	-0.317	-0.069	-0.032	-1.105	-1.308	-1.298
11	0.631	0.434	0.203	-0.385	0.288	-0.129	-1.028	-1.897	-1.475
12	0.301	-0.339	0.006	0.218	-0.419	-0.324	-1.696	-1.185	-1.215
13	0.973	0.548	0.950	0.646	1.186	0.387	-0.634	-0.325	-0.561
14	-1.143	-0.658	-0.511	-0.140	-0.169	0.639	0.685	0.198	0.537
15	0.236	0.445	0.696	0.318	0.783	0.680	-0.417	-0.923	-0.736
16	-0.094	0.040	0.172	-0.063	0.501	-0.122	1.174	1.671	1.657
17	-0.544	0.148	0.245	-0.312	0.570	0.359	1.085	1.833	1.606
18	0.194	0.285	0.300	0.564	0.509	0.598	1.716	1.880	1.816
19	-0.385	0.047	0.162	-0.140	0.611	0.031	1.273	1.628	1.670
20	0.280	0.298	0.574	0.057	0.469	0.276	1.601	1.864	1.546
21	0.474	0.478	-0.093	0.405	0.144	0.347	2.036	2.934	2.399
22	-0.261	-0.128	0.254	-0.171	0.049	0.011	0.923	1.583	1.454
23	-0.326	-0.224	0.179	0.294	0.527	0.152	0.805	1.215	1.104
24	-0.512	-0.261	-0.132	0.113	0.014	0.275	1.205	1.644	1.181
25	-0.539	0.073	-0.355	0.141	0.354	0.034	0.864	1.046	1.379
26	0.169	-0.227	0.206	0.608	0.631	0.985	1.073	1.582	1.312
27	-0.391	-0.020	-0.520	0.716	0.371	-0.080	0.803	1.517	1.449
28	0.118	-0.390	-0.525	0.581	-0.559	-0.584	0.899	1.323	1.628
29	-0.216	-0.349	0.460	0.268	0.155	0.271	2.328	3.151	3.217
30	-0.707	-0.103	0.209	-0.262	-0.134	-0.071	2.176	2.728	3.046
31	-0.160	-0.176	-0.069	-0.013	-0.141	0.083	1.987	1.928	2.108
32	-0.421	-0.029	0.734	0.720	0.515	0.951	2.687	3.190	2.390
33	0.174	0.294	-0.264	0.089	-0.111	-0.079	2.759	3.508	3.193
34	-0.841	-0.303	0.003	0.594	0.148	0.592	2.777	3.895	3.806
35	-0.419	0.732	1.005	-0.528	1.146	0.390	2.981	4.320	3.801
36	-0.219	-0.314	-0.426	0.270	0.546	0.242	2.584	2.914	3.020
37	-0.606	-0.036	-0.059	0.066	0.510	0.972	3.619	4.920	4.624

【0084】

10

20

30

40

【表 3】

配列番号	2ae_13	2ae_14	2ae_15	thf_16	thf_17	thf_18
1	0.043	0.185	0.331	-0.444	0.078	-0.384
2	0.206	0.255	0.323	-0.121	0.174	-0.433
3	0.042	-0.073	-0.362	0.183	0.878	-0.185
4	-0.044	0.281	0.271	0.196	0.387	0.289
5	0.374	0.367	0.458	0.125	0.572	0.222
6	-0.022	0.428	0.248	0.111	0.370	0.392
7	0.326	-0.111	0.197	0.011	0.197	-0.415
8	-0.005	-0.383	-0.337	-0.245	-0.094	0.151
9	-0.068	0.309	0.240	-0.580	0.364	0.036
10	0.216	0.536	0.265	0.222	1.050	0.097
11	0.271	0.213	0.105	-0.187	0.697	0.609
12	0.389	0.124	-0.057	0.427	0.959	0.534
13	0.768	0.624	1.025	-0.247	0.665	-0.074
14	-0.333	-0.405	0.476	-0.358	-0.728	0.286
15	0.335	1.418	0.568	-0.451	-0.167	0.424
16	0.094	0.141	0.232	0.037	0.245	0.359
17	-0.357	0.147	-0.227	-0.432	0.281	0.233
18	-0.106	0.155	-0.065	0.188	-0.209	-0.036
19	-0.603	0.347	0.440	-0.012	-0.248	0.191
20	0.462	0.479	0.343	-0.426	-0.040	0.058
21	0.062	-0.021	-0.341	0.102	0.388	0.288
22	-0.316	-0.112	0.114	0.093	0.210	0.165
23	0.198	0.589	0.458	0.097	0.148	0.372
24	0.275	0.376	0.311	0.620	0.147	0.485
25	-0.581	-0.166	-0.522	-0.109	-0.158	-0.148
26	0.060	0.464	0.155	0.431	0.853	0.982
27	0.737	0.541	-0.232	0.399	-0.043	0.853
28	-0.201	-0.552	-0.746	-0.047	0.091	-0.032
29	0.272	0.291	-0.236	0.070	-0.116	-0.035
30	-0.216	-0.135	-0.532	-0.276	-0.604	-0.385
31	-0.051	-0.264	-0.037	0.168	-0.270	0.111
32	1.082	0.212	-0.523	0.188	-0.065	-0.319
33	-0.049	0.121	-0.230	0.329	-0.003	-0.039
34	0.597	0.046	-0.170	0.206	0.317	0.293
35	-0.580	-0.571	0.333	0.963	1.018	1.860
36	0.340	1.013	0.616	0.000	0.424	0.447
37	-0.040	0.176	-0.438	0.467	0.722	0.677

10

20

30

【 0 0 8 5 】

【表 4】

配列番号	C2_1	C2_2	C2_3	mca_4	mca_5	mca_6	suf_9	suf_10	suf_11
1	0.151	-0.562	0.385	-0.416	-0.715	0.513	-1.105	-0.813	-0.062
2	0.343	-0.744	-0.004	-0.350	-0.531	-0.172	-1.333	-0.824	-0.593
3	0.143	-0.705	-0.353	-0.409	-0.366	0.540	-0.942	-0.758	-0.556
4	-0.181	-0.454	-0.189	-0.373	-0.479	-0.068	-0.677	-0.337	-0.239
5	-0.057	0.033	0.280	-0.142	-0.179	0.852	-0.420	-0.460	0.434
6	-0.026	-1.012	0.122	-0.882	-0.475	0.415	-1.204	-1.218	-0.231
7	0.145	-0.680	-0.733	-0.266	-0.660	-0.245	-0.986	-0.209	-0.755
8	0.479	-0.020	0.000	-0.089	-0.401	0.652	-0.297	-0.320	-0.390
9	-0.042	-0.522	0.146	-0.136	-0.184	0.401	-0.129	-0.569	0.076
10	0.800	0.098	-0.213	0.669	-0.305	0.438	0.323	-0.555	0.227
11	0.965	0.277	0.324	0.108	0.919	1.160	-0.334	0.285	0.373
12	0.534	0.399	0.492	-0.694	0.295	1.436	-0.911	-0.376	0.069
13	1.049	-0.095	0.122	0.101	0.461	0.693	-0.261	-0.805	-0.425
14	-0.433	-0.336	-0.161	0.148	-0.233	-0.608	-0.111	0.468	-0.125
15	-0.216	-0.282	1.337	0.272	-0.140	0.213	0.725	0.642	0.341
16	-0.478	-0.122	0.303	0.240	0.307	0.754	0.761	0.380	0.935
17	0.013	-0.572	-0.060	0.158	0.436	0.463	-0.100	-0.306	0.427
18	-0.203	-0.242	0.514	0.053	0.014	0.277	0.158	0.232	0.359
19	-0.072	-0.107	0.525	-0.235	-0.532	1.059	-0.578	-0.432	0.242
20	-0.474	-0.470	0.086	0.064	-0.199	0.305	0.939	0.820	1.247
21	-0.213	-0.791	-0.706	-0.243	0.286	0.314	-0.094	0.344	0.387
22	-0.209	-0.314	0.483	0.517	0.275	0.655	0.212	0.543	0.954
23	-0.214	-0.109	0.245	-0.065	0.017	0.072	0.732	0.192	0.994
24	-0.499	0.063	-0.181	0.056	0.006	0.013	1.075	1.065	1.232
25	0.551	0.138	-0.587	-0.434	0.187	-0.495	0.000	0.000	0.065
26	-0.312	-0.284	-0.292	-0.091	0.256	0.371	0.575	0.624	0.671
27	-0.401	-0.384	-0.197	-0.367	0.477	-0.576	1.659	0.543	0.967
28	0.244	-0.270	-0.951	-0.049	-0.095	1.264	-1.926	-1.207	0.313
29	-0.309	0.000	0.198	-0.028	-0.129	-0.005	3.028	3.523	3.257
30	-0.673	0.296	0.115	-0.286	-0.420	0.019	3.895	3.669	4.315
31	0.381	0.210	-0.346	-0.255	0.446	-0.726	3.324	2.352	0.697
32	0.830	-0.315	0.758	0.002	0.601	0.844	2.110	3.280	3.538
33	0.280	-0.216	0.452	-0.008	0.182	0.027	1.789	1.239	1.400
34	0.238	0.686	-0.548	0.753	1.016	-0.373	2.124	1.698	2.473
35	0.444	-1.096	-0.188	1.024	1.401	0.910	1.554	1.136	1.639
36	-0.435	-0.758	0.168	-0.620	-0.790	0.438	1.408	0.935	1.142
37	0.000	0.570	0.252	0.894	1.274	0.507	1.280	0.315	1.523

10

20

【 0 0 8 6 】

30

【表 5】

配列番号	2ip_14	2ip_15	2ip_16	hmh_19	hmh_20	hmh_21	4em_24	4em_25	4em_26
1	-0.137	-0.327	0.696	-1.302	-0.949	-0.009	0.229	0.131	0.374
2	-0.925	-0.182	0.174	-2.028	-0.681	-0.451	0.112	-0.227	0.069
3	-0.446	-0.134	-0.075	-1.874	-1.517	-0.958	0.520	0.288	0.878
4	0.272	-0.574	-0.003	0.025	-0.121	0.213	-0.430	-0.194	-0.100
5	-0.199	-0.466	0.542	-2.016	-1.211	-0.035	-0.376	-0.565	0.585
6	-1.429	-0.691	0.353	-1.840	-0.550	0.825	-1.569	-1.406	0.525
7	0.069	-0.390	-0.281	-0.499	-0.761	-1.068	-0.358	-0.544	-0.101
8	0.595	0.000	0.371	-1.297	-0.458	-0.216	-0.324	0.216	0.406
9	-0.066	-0.599	0.271	-0.191	0.028	1.030	-0.267	-0.018	0.413
10	1.435	-0.147	-0.071	-0.535	-0.556	-1.182	0.361	0.920	0.769
11	0.812	0.246	0.809	0.081	0.797	0.493	0.522	0.108	0.714
12	-0.316	0.268	0.350	0.000	-1.154	-1.746	0.000	-0.443	0.659
13	-0.842	0.247	0.802	-1.144	-1.009	-0.077	-0.038	-0.278	0.714
14	-0.118	0.359	-0.342	0.338	-0.229	-0.358	0.629	0.838	-0.521
15	0.518	-0.261	0.910	0.339	0.551	0.673	0.101	0.037	0.789
16	0.770	0.195	0.117	0.368	0.210	0.806	0.103	0.340	0.334
17	-0.182	-0.328	0.209	0.503	0.403	0.486	0.223	-0.038	0.759
18	0.086	-0.167	0.409	0.689	1.770	1.126	0.489	0.186	0.443
19	-0.312	-0.737	0.759	0.264	0.554	1.173	-0.681	-0.917	0.283
20	-0.558	-0.138	0.075	-1.052	-0.949	0.585	0.213	0.183	0.377
21	-0.756	-0.500	-0.592	-0.292	-0.618	-0.585	-1.477	-1.267	-0.551
22	0.272	0.119	0.190	0.181	0.432	0.230	0.391	0.189	0.716
23	0.924	0.125	0.389	0.529	0.411	0.824	-0.437	-0.334	0.449
24	0.089	-0.282	0.235	-0.514	-0.156	0.003	0.069	0.132	0.172
25	-0.132	-0.251	-0.700	-0.185	0.082	-0.886	0.000	-0.197	-0.388
26	-0.270	-0.081	-0.215	-0.348	-0.913	-0.601	-0.948	-0.687	0.098
27	-0.270	-0.710	-0.130	-0.128	-0.481	0.261	-0.219	-0.319	0.216
28	-0.307	-0.612	0.366	-1.784	-2.170	-0.885	-0.785	-1.067	-0.684
29	-0.036	0.226	-0.032	-0.106	-0.132	-0.447	-0.082	0.248	0.116
30	-0.286	0.414	0.131	-0.646	-0.420	-0.397	-0.401	-0.003	0.247
31	-0.336	0.355	-0.197	-0.120	0.198	-0.766	0.150	-0.103	-0.392
32	-1.209	0.917	1.069	-0.142	0.620	-0.156	1.671	-0.196	0.670
33	0.137	-0.023	-0.136	0.905	2.229	-0.079	0.353	-0.093	0.210
34	-0.046	0.570	-0.093	1.481	2.314	0.284	0.657	1.726	-0.054
35	-0.947	-0.085	-0.875	-0.081	1.507	-0.105	0.397	-0.698	0.078
36	-0.849	-0.392	0.759	-0.497	0.229	1.044	-0.414	-1.071	0.185
37	0.000	0.507	-0.195	1.697	2.471	0.979	1.633	0.000	0.054

10

20

【 0 0 8 7 】

30

【表 6】

配列番号	C3_1	C3_2	C3_3	mta_4	mta_5	mta_6	bac_9	bac_10	bac_11
1	0.398	-0.190	-0.367	-0.604	-0.012	-0.300	-0.718	-0.628	-0.965
2	0.280	0.079	-0.290	-0.821	0.164	-0.484	-0.731	-0.369	-0.707
3	0.179	-0.106	0.149	-0.080	0.261	0.137	-0.170	-0.486	-0.225
4	-0.194	-0.128	-0.008	-0.398	-0.753	0.111	-0.121	-0.344	-0.532
5	-0.247	-0.008	-0.051	-0.399	-0.102	0.376	-0.193	-0.588	-0.574
6	-0.054	0.014	0.027	-0.427	-0.319	-0.841	-0.582	-0.402	-0.642
7	-0.169	0.168	-0.515	-0.880	-0.174	-0.150	-0.245	-0.619	-0.744
8	0.933	0.746	0.021	-0.965	0.428	0.916	-0.060	0.134	-0.179
9	-0.264	0.013	-0.376	-0.023	0.016	0.175	0.071	-0.457	-0.653
10	0.155	0.762	-0.547	-0.407	-0.143	-0.457	-0.197	0.178	-0.370
11	0.620	0.943	-0.046	0.058	0.308	0.593	0.517	-0.481	-0.055
12	-0.351	0.379	-0.069	-0.217	0.252	-0.125	-0.181	-0.297	0.245
13	-0.395	0.330	-0.353	0.842	0.721	0.534	1.222	-0.077	0.194
14	0.356	-0.180	0.269	-0.435	-1.276	0.041	0.541	0.063	0.298
15	-0.174	0.237	0.409	0.472	-0.722	0.804	0.720	0.391	0.727
16	-0.237	-0.317	-0.229	-0.266	-0.249	0.153	0.308	0.162	0.609
17	-0.229	-0.049	-0.158	-0.366	0.146	0.307	0.001	-0.098	0.313
18	-0.254	-0.482	-0.183	-0.196	0.233	0.081	-0.299	0.162	0.544
19	0.000	0.068	-0.524	0.000	0.000	-0.275	0.000	0.000	-0.366
20	-0.431	-0.101	-0.046	-0.080	-0.099	-0.086	0.228	0.250	0.474
21	-0.462	-0.290	-0.263	-0.111	0.058	0.122	-0.198	-0.414	-0.168
22	-0.174	-0.222	-0.161	-0.405	-0.301	0.070	0.003	0.235	0.755
23	-0.011	0.520	0.174	-0.387	-0.157	-0.047	0.334	0.246	0.686
24	-0.650	0.611	0.212	0.474	-0.286	0.175	0.537	0.643	0.218
25	-0.325	0.285	0.022	-0.079	0.455	-0.424	0.545	0.000	0.375
26	-0.128	0.178	0.220	0.340	-0.048	0.416	0.346	0.079	0.039
27	-0.059	0.141	-0.018	-0.502	-0.018	-0.526	-0.121	0.039	0.065
28	-1.293	-0.529	-0.578	-0.911	0.043	-0.133	-0.079	-0.735	-0.072
29	-0.320	0.272	-0.055	0.198	-0.040	0.403	0.160	0.132	0.030
30	-0.627	0.120	-0.070	0.532	-0.043	0.496	0.191	0.304	-0.105
31	0.056	0.666	-0.137	-0.070	0.366	-0.528	0.109	0.270	0.343
32	-0.027	0.993	-0.405	0.830	0.621	0.483	0.208	0.302	0.998
33	0.274	0.014	-0.250	-0.217	0.923	-0.591	0.013	0.052	0.427
34	-0.219	-0.074	0.588	0.000	-0.525	-0.016	0.364	0.371	0.243
35	-1.072	-0.377	0.305	0.973	0.660	-0.211	0.004	0.957	2.132
36	-0.247	-0.268	-0.247	0.362	-1.007	0.287	0.306	0.571	0.756
37	0.355	0.000	-0.061	0.426	0.000	0.000	0.000	0.653	1.200

10

20

【 0 0 8 8 】

30

【表 7】

配列番号	mns_14	mns_15	mns_16	nat_19	nat_20	nat_21	mmb_24	mmb_25	mmb_26
1	-0.792	-0.331	-0.357	-0.214	0.217	-0.397	-0.284	-0.679	-0.323
2	-0.799	-0.156	-0.207	-0.206	0.511	0.181	-0.202	-0.406	-0.563
3	-0.832	0.098	-0.252	0.217	-0.027	0.161	-0.562	-1.256	-0.472
4	-0.155	-0.137	-0.021	-0.284	-0.353	0.087	-0.317	-0.484	-0.265
5	0.082	-0.117	-0.177	0.201	-0.082	-0.146	-0.720	-0.629	-0.496
6	-2.012	0.001	-0.184	-0.104	-0.331	-0.196	-0.776	-0.472	-0.570
7	0.072	-0.386	-0.271	-0.550	-0.625	-0.355	-0.302	-0.784	-0.840
8	0.312	-0.076	0.329	-0.396	0.707	0.499	-0.129	-0.089	-0.079
9	-0.642	-0.260	0.058	-0.037	-0.061	-0.115	0.131	-0.139	0.232
10	0.487	0.029	-0.236	-0.457	0.182	0.134	-0.202	-0.815	-0.361
11	0.341	0.220	-0.039	0.832	0.511	0.190	-0.169	0.286	-0.341
12	0.758	0.279	-0.476	0.522	-0.247	0.244	-0.735	-1.152	-0.941
13	-0.206	0.091	-0.500	-0.292	0.520	-0.231	-0.972	-0.598	-0.937
14	0.573	0.307	0.029	-0.473	-0.105	1.135	0.303	0.382	0.028
15	0.381	0.554	0.574	0.323	0.381	0.830	-1.186	-0.951	-1.398
16	0.432	-0.374	-0.120	-0.064	-0.179	0.445	-0.255	-0.648	-0.696
17	-0.277	-0.047	0.037	-0.538	-0.326	-0.091	0.383	0.345	0.414
18	0.096	-0.635	0.349	-0.788	-0.399	-0.072	-0.138	-0.004	-0.021
19	0.000	0.000	0.151	0.000	-0.128	-0.034	0.000	0.327	-0.057
20	0.855	-0.776	-0.307	-0.238	-0.635	-0.302	-0.517	-0.331	0.039
21	-0.450	-0.106	0.032	-0.397	-0.567	-0.234	-0.157	-0.179	-0.062
22	0.172	-0.489	0.132	-0.075	0.143	0.055	-0.595	-0.326	-0.583
23	0.171	-0.450	0.299	-0.057	0.031	0.023	-0.125	-0.182	-0.016
24	0.609	0.289	-0.016	-0.300	0.314	-0.309	-0.073	0.428	-0.239
25	0.000	-0.550	-0.225	-0.059	-0.488	-0.690	0.000	0.495	-0.360
26	0.232	0.332	0.335	-0.229	-0.532	0.267	-0.048	-0.308	-0.071
27	-0.352	-0.998	0.131	-0.670	-0.650	-0.276	-0.523	-0.226	0.093
28	-0.934	-0.748	-0.412	-0.595	-0.315	-0.828	-0.483	-0.469	-0.606
29	0.430	0.090	0.013	0.029	0.009	-0.035	0.127	0.115	0.138
30	0.769	-0.027	0.221	0.656	-0.138	-0.292	0.056	0.259	0.241
31	0.357	0.025	-0.300	0.320	0.205	0.170	0.471	-0.315	-0.170
32	0.120	0.264	-0.580	-0.157	0.684	-0.639	1.218	1.102	1.113
33	0.000	0.307	-0.266	-0.346	-0.029	0.064	0.383	0.015	-0.204
34	0.000	0.000	-0.089	2.110	0.335	-0.148	0.675	1.003	0.104
35	0.650	-1.087	1.322	-0.144	-0.900	-0.452	1.151	-0.023	0.407
36	-1.181	-0.514	0.122	0.095	-0.044	0.070	-0.833	0.213	-0.862
37	0.000	0.000	0.496	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.136

10

20

30

【 0 0 8 9 】

【表 8】

配列番号	C4_1	C4_2	C4_3	dcb_4	dcb_5	dcb_6	34x_9	34x_10	34x_11
1	-0.515	0.059	-0.068	-1.826	-2.242	-1.806	-1.202	-1.397	-1.523
2	-0.863	0.007	0.480	-1.584	-2.266	-1.568	-1.114	-1.075	-1.076
3	-0.820	0.090	-0.208	-1.190	-1.123	-1.295	-0.880	-0.609	-0.516
4	-0.432	0.064	-0.260	-0.870	-0.370	-1.301	-1.137	-0.875	-1.226
5	-0.234	-0.322	-0.458	-1.322	-1.318	-1.791	-1.459	-0.910	-1.171
6	-0.543	-0.006	-0.258	-1.705	-1.787	-2.005	-0.399	-0.776	-0.721
7	-0.452	0.305	0.172	-1.064	-1.257	-0.911	-0.297	0.198	-0.389
8	-0.450	0.197	-0.511	-0.831	-0.891	-0.465	0.000	-0.130	-0.016
9	-0.399	0.042	-0.560	-0.343	-0.448	-0.738	-0.032	-0.541	-0.586
10	-0.533	-0.008	-0.690	-1.257	-1.845	-2.790	-0.974	-1.232	-1.000
11	-0.772	-0.459	-0.875	-0.932	-1.656	-2.419	-1.422	-1.176	-1.202
12	-0.904	-0.069	-0.811	-1.355	-1.981	-1.663	-1.306	-0.056	-0.736
13	-0.463	0.141	-0.583	-1.527	-2.046	-1.898	-1.407	-0.301	-0.633
14	0.361	0.299	0.404	0.694	0.145	-0.359	-0.312	-0.502	-0.850
15	-0.262	-0.706	-0.912	-2.991	-3.567	-2.819	-1.891	-2.245	-1.471
16	0.149	0.173	-0.422	1.913	2.275	2.097	1.523	1.482	1.605
17	-0.416	-0.101	-0.210	1.741	1.942	1.593	1.284	1.430	1.134
18	0.157	0.057	0.305	1.099	1.240	1.378	1.559	1.538	1.688
19	0.000	0.147	0.000	0.000	1.656	0.000	0.000	1.322	0.000
20	0.480	0.014	0.519	1.291	1.179	1.262	1.790	1.250	1.847
21	0.081	0.376	-0.225	1.605	2.027	2.267	2.535	2.332	2.331
22	-0.079	-0.199	-0.141	0.997	1.116	0.763	0.643	0.800	0.443
23	-0.376	0.027	-0.139	0.359	0.428	0.029	0.251	0.022	-0.020
24	0.105	-0.741	-0.435	0.669	0.670	0.266	-0.002	0.040	0.557
25	0.478	0.637	0.000	0.910	0.813	0.630	0.786	1.833	1.359
26	-0.257	0.223	-0.262	-0.012	-0.296	0.451	0.776	0.932	1.199
27	-0.036	-0.205	-0.480	0.564	0.842	1.222	0.740	1.117	0.692
28	-0.386	0.394	-0.186	0.860	0.435	-0.381	0.283	1.251	0.084
29	0.064	-0.155	-0.266	0.491	1.683	1.596	1.773	1.853	2.699
30	-0.003	-0.236	-0.159	1.119	1.122	2.030	1.470	0.833	2.267
31	0.069	0.077	0.188	0.500	1.007	0.908	1.325	2.227	2.182
32	-0.386	-0.316	0.221	1.569	2.296	2.476	3.172	3.421	3.435
33	-0.197	0.011	-0.231	3.170	3.357	3.205	2.768	2.413	2.548
34	-0.886	-0.480	0.140	3.478	3.750	3.672	3.334	2.384	3.023
35	-0.399	-0.551	0.281	2.335	2.310	3.384	3.155	2.985	3.383
36	-0.278	-0.234	0.034	-0.996	0.021	-0.363	2.563	2.110	2.128
37	0.012	0.058	0.000	4.936	4.936	5.227	5.058	4.463	5.016

10

20

【 0 0 9 0 】

30

【表 9】

配列番号	nma_14	nma_15	nma_16	tdn_19	tdn_20	tdn_21	2de_24	2de_25	2de_26
1	-1.196	-0.555	-0.787	-0.494	-0.338	-0.233	0.407	-0.431	0.098
2	-1.081	-0.735	-0.705	-0.304	-0.473	0.026	0.499	0.022	0.238
3	-0.867	-0.490	-1.136	-0.082	0.364	-0.112	0.452	-0.381	0.434
4	-0.670	-0.031	-0.167	0.236	0.373	-0.492	0.122	0.099	0.173
5	-0.524	-0.253	-0.459	-0.314	0.026	-0.278	0.262	-0.265	-0.216
6	-0.285	-0.280	-0.413	0.069	0.090	-0.135	0.528	-0.397	-0.022
7	-0.617	-0.181	-0.168	-0.034	0.154	0.041	-0.385	-0.463	-0.009
8	-0.310	-0.968	-0.201	0.121	0.475	-0.911	0.013	-0.838	0.242
9	-0.302	-0.090	-0.224	-0.104	-0.274	-0.688	0.585	-0.375	0.006
10	-0.440	-0.207	-0.033	-0.444	-0.152	-0.323	0.171	0.545	0.763
11	-0.718	-0.808	-0.844	-0.729	-0.559	-0.615	-0.044	-0.673	-0.055
12	-0.399	-0.159	0.064	-0.819	-0.452	-0.215	-0.041	-0.013	-0.202
13	0.162	0.424	0.519	0.142	0.407	0.162	-0.286	-1.193	-0.229
14	0.393	1.208	0.203	-0.151	-0.533	0.321	-0.293	0.670	-0.649
15	0.764	1.154	-0.384	-1.344	-1.620	-1.029	-0.491	0.502	-0.045
16	0.568	0.568	0.451	0.037	0.188	-0.099	0.008	0.650	0.656
17	0.287	0.364	0.025	0.586	0.689	0.425	-0.099	-0.445	0.249
18	0.247	0.666	0.328	0.154	0.015	0.123	-0.037	-0.249	-0.060
19	0.000	0.355	0.000	0.000	-0.031	0.000	0.000	-0.155	-0.165
20	-0.188	0.925	0.046	0.093	0.127	0.220	-0.517	0.075	-0.002
21	0.122	0.717	0.147	1.082	1.399	1.002	0.100	-0.379	-0.265
22	-0.093	0.431	0.071	-0.590	-0.853	-0.247	-0.657	0.139	0.034
23	0.557	0.029	0.368	-0.228	0.001	-0.241	-0.258	0.201	0.292
24	1.038	0.760	0.597	-0.573	1.355	0.252	0.339	1.176	0.219
25	0.382	0.231	0.452	0.289	0.146	0.971	0.025	-0.253	0.528
26	0.250	0.863	0.444	0.794	0.821	0.165	0.043	0.097	-0.023
27	-0.253	-0.064	-0.394	0.425	-0.272	-0.678	-0.331	-0.399	-0.573
28	0.628	0.385	0.243	0.807	0.862	0.254	0.044	-1.559	-0.053
29	-0.053	0.382	0.181	0.142	-0.085	-0.175	0.474	1.144	0.330
30	-0.127	0.187	0.068	0.211	-0.367	0.054	1.161	0.351	0.216
31	0.078	-0.103	0.187	0.090	-0.001	0.205	0.765	1.073	0.140
32	-0.238	0.113	0.202	0.305	-0.369	0.874	1.379	2.222	1.410
33	0.479	0.433	0.122	0.069	-0.354	0.356	-0.050	0.079	0.314
34	1.380	0.975	0.739	0.682	0.031	0.884	-0.064	0.137	0.071
35	-0.036	2.135	1.017	-0.557	0.723	1.491	0.795	-0.440	1.109
36	1.903	1.696	1.307	1.161	0.864	1.375	0.030	0.846	0.125
37	1.159	2.598	0.999	0.848	1.870	2.088	0.000	0.624	0.000

10

20

【 0 0 9 1 】

30

【表 1 0】

配列番号	C5_1	C5_2	C5_3	pcp_4	pcp_5	pcp_6	mcs_9	mcs_10	mcs_11
1	0.290	-0.328	0.194	-0.230	-0.825	-1.000	-0.439	-1.213	-0.601
2	-0.147	-0.163	0.170	-0.038	-0.681	-1.267	-0.834	-1.207	-0.315
3	0.121	-0.325	-0.555	-0.235	-0.049	-1.069	-0.473	-0.755	-0.144
4	-0.074	-0.017	-0.338	-0.880	-0.752	-1.527	-0.363	-0.285	-0.514
5	-0.298	-0.279	-0.113	-0.677	-0.643	-0.863	-0.645	-0.362	-0.787
6	-0.294	-0.093	-0.376	-0.654	-1.327	-0.173	-0.667	-0.535	-0.049
7	0.307	-0.154	0.198	0.364	0.039	0.611	-0.212	-0.095	-0.479
8	0.123	-0.272	0.000	-0.201	-0.177	0.000	-0.186	-0.122	-0.685
9	-0.234	-0.278	-0.340	0.078	-0.150	0.573	-0.903	-0.887	-1.009
10	0.232	-0.048	0.630	0.664	0.631	0.078	-0.465	-1.350	0.007
11	0.219	-0.116	-0.247	-0.598	-0.168	-0.646	-0.770	-0.621	0.299
12	-0.315	0.119	-0.069	-0.651	0.081	-0.674	0.290	-0.051	0.605
13	0.243	-0.717	-0.583	1.407	0.268	-0.066	-0.321	-0.710	-0.573
14	-0.200	0.801	0.598	0.009	-0.401	-0.584	0.898	0.340	0.038
15	-0.341	0.511	-0.191	-0.578	-0.696	-1.388	-0.663	-0.773	-0.499
16	-0.182	0.060	-0.237	0.759	0.729	0.838	0.471	0.232	0.461
17	-0.013	-0.378	-0.295	0.104	0.164	0.391	-0.004	0.055	0.299
18	-0.160	-0.256	0.310	0.986	0.952	0.189	0.418	-0.002	0.163
19	-0.463	0.162	0.183	0.500	0.550	0.327	-0.101	-0.444	-0.217
20	-0.380	-0.409	-0.136	0.720	0.584	0.839	0.362	0.416	0.103
21	-0.082	-0.496	-0.079	0.992	0.600	1.523	0.760	0.599	0.701
22	-0.008	0.026	0.268	0.673	0.574	0.325	0.136	0.292	0.159
23	-0.455	0.165	-0.039	0.104	0.741	0.159	-0.153	-0.013	-0.234
24	0.053	0.024	-0.574	0.370	0.451	1.575	0.014	0.825	-0.147
25	-0.081	0.060	-0.454	0.668	0.220	0.248	-0.343	0.239	0.312
26	-0.712	-0.485	-0.526	-0.550	-0.138	0.221	-0.198	0.376	0.342
27	-0.520	-0.721	-0.385	-0.548	0.304	0.440	-0.845	-0.183	-1.064
28	0.570	-0.622	-0.098	0.561	-0.188	0.467	-0.530	-0.509	-0.931
29	-0.206	-0.017	-0.280	1.865	2.498	3.954	-0.037	-0.033	-0.141
30	-0.372	-0.023	0.057	2.464	2.747	4.396	0.373	0.525	-0.191
31	-0.198	-0.095	0.277	1.496	1.876	2.876	0.073	0.156	0.148
32	-0.517	0.245	-0.782	3.445	3.482	2.041	0.583	0.397	-0.123
33	-0.452	-0.304	0.313	2.784	1.783	2.758	0.425	0.267	0.068
34	0.869	0.124	0.350	2.920	2.035	3.047	0.863	0.999	0.584
35	-0.500	0.562	0.099	1.609	0.686	1.502	-0.069	-0.426	0.809
36	-0.589	0.424	0.025	0.209	0.356	0.543	0.542	0.371	0.010
37	0.000	0.000	-0.122	3.594	3.053	2.944	1.369	0.550	0.922

10

20

【 0 0 9 2 】

30

【表 1 1】

配列番号	23d 14	23d 15	23d 16	dhc 19	dhc 20	dhc 21	dhp 24	dhp 25	dhp 26
1	-0.922	-0.303	-0.465	-1.003	-0.480	-0.560	-1.585	-1.905	-1.050
2	-0.951	-0.119	-0.431	-0.623	-0.002	0.055	-0.976	-2.003	-1.019
3	-0.410	-0.432	-0.535	-0.456	-0.239	-0.512	-1.228	-2.083	-1.138
4	-0.349	-0.012	-0.276	-0.004	-0.123	0.091	-0.499	-0.668	-0.805
5	-0.683	-0.688	-0.667	-0.530	-0.359	-0.302	-0.731	-0.650	-0.216
6	-0.128	-0.233	-0.157	-0.676	-0.482	-0.394	-0.713	-0.934	-1.014
7	0.009	0.268	-0.325	-0.305	0.024	-0.109	-0.887	-0.967	-1.307
8	0.075	-0.333	-0.060	-0.019	-0.600	-0.473	-0.796	0.000	-0.704
9	-0.574	-0.550	-0.312	-0.272	-0.354	-0.242	0.865	0.223	0.007
10	0.219	-0.407	-0.224	0.612	0.004	0.536	-1.133	-1.846	0.000
11	-0.011	-0.657	-0.544	-0.594	-0.509	-0.063	-1.199	-1.798	-0.686
12	-0.155	-0.323	-0.407	-0.396	-1.034	-0.158	-1.134	0.000	-1.362
13	0.546	-0.032	-0.341	-0.950	-0.759	-0.600	-0.877	-1.217	-0.090
14	0.461	0.207	0.589	0.331	-0.104	0.202	-1.203	-0.540	-0.362
15	-0.387	-0.215	0.104	0.252	0.211	-0.203	-2.662	-1.531	-1.421
16	0.346	0.480	0.766	0.282	0.108	0.617	0.109	0.212	0.322
17	0.349	0.186	0.166	0.011	-0.317	0.114	-0.050	0.572	0.342
18	-0.045	0.257	0.004	0.198	0.089	0.468	-0.413	0.225	0.252
19	0.277	0.197	0.120	0.183	-0.381	-0.099	0.385	0.945	0.705
20	0.067	-0.229	0.278	0.118	0.069	0.304	-0.162	0.016	-0.174
21	0.381	0.336	0.472	-0.031	-0.306	0.265	-0.024	0.658	0.413
22	0.207	0.289	-0.003	0.152	0.191	0.283	-0.311	0.032	0.614
23	0.280	-0.099	0.346	0.374	0.064	0.270	0.226	0.502	-0.075
24	0.260	-0.263	0.029	0.356	0.510	0.454	-0.297	-0.372	0.109
25	-0.017	-0.288	-0.152	-0.410	-0.172	-0.210	0.232	0.498	-0.369
26	0.214	0.050	0.855	-0.291	-0.235	0.165	-0.910	-0.572	-0.762
27	-0.429	-0.728	-0.673	-0.532	0.068	-0.458	-0.515	-0.111	-0.269
28	0.019	-0.127	-0.455	-0.184	-0.122	0.462	0.807	0.397	1.099
29	0.145	0.304	0.301	0.304	0.353	0.084	-0.505	-0.296	-0.134
30	0.036	-0.137	0.092	-0.068	0.402	0.323	-0.178	-0.037	-0.253
31	-0.218	-0.446	0.030	0.112	0.445	0.144	0.048	-0.092	0.033
32	0.640	0.276	1.203	0.639	1.482	1.103	-0.020	0.671	0.769
33	0.237	0.493	0.332	-0.224	0.485	0.036	1.067	1.890	1.381
34	1.099	1.021	1.038	0.946	1.308	-0.037	1.423	2.136	1.622
35	0.493	0.554	-0.121	0.616	1.018	-0.229	-0.365	0.585	0.409
36	3.194	3.704	3.621	1.861	1.761	2.249	-2.263	-2.473	-1.571
37	1.107	0.000	1.452	0.000	0.000	0.399	3.320	4.502	3.859

10

20

【 0 0 9 3 】

30

【表 1 2】

配列番号	C6 1	C6 2	C6 3	tbe 4	tbe 5	tbe 6	dba 9	dba 10	dba 11	pep 14	peo 15	peo 16
1	0.180	0.157	0.241	-0.579	-0.541	-0.255	0.453	-0.432	0.159	-0.048	0.265	0.059
2	0.250	0.265	0.516	-0.616	-0.810	-0.202	0.563	-0.400	0.027	-0.125	0.336	0.021
3	0.058	0.035	0.706	-0.257	-0.690	-1.064	0.819	-0.511	0.614	-0.091	-0.333	0.199
4	0.238	0.080	0.132	-0.177	-0.327	-0.463	0.483	0.448	0.190	0.193	0.226	0.059
5	-0.191	-0.017	0.036	-0.325	-0.371	-0.641	0.400	-0.077	0.387	0.162	0.251	0.142
6	0.174	0.066	0.395	-0.327	-0.507	-0.568	0.494	0.306	0.537	0.204	0.495	0.535
7	0.198	0.408	-0.077	-0.983	-0.691	-1.224	0.440	0.067	0.507	-0.202	-0.412	-0.366
8	-0.471	-0.523	-0.040	0.092	-0.312	0.015	0.156	-0.368	0.255	-0.074	0.222	-0.227
9	-0.068	0.144	0.306	0.209	0.095	0.088	0.455	0.252	0.424	0.374	0.287	0.442
10	-0.480	0.124	0.496	-0.651	-0.576	-2.177	0.076	-0.228	-0.178	0.142	0.093	0.987
11	-0.268	-0.249	-0.285	-0.456	-0.062	-1.097	0.463	-1.049	0.852	-0.472	-0.440	0.285
12	0.000	0.384	0.387	-0.302	0.450	0.000	0.450	-0.683	0.473	-1.369	-0.356	1.291
13	-0.324	-0.029	-0.261	-1.235	-0.589	-1.983	0.714	0.136	1.354	-0.013	0.210	-0.078
14	-0.057	-0.140	-0.470	-0.125	-0.299	0.076	-0.406	-0.164	-1.016	0.120	-0.005	0.673
15	0.541	0.086	-0.404	-1.926	-2.026	-1.698	-0.529	0.109	-0.964	0.282	0.117	1.131
16	0.066	0.107	0.077	1.596	1.505	1.923	0.092	-0.101	0.428	1.030	0.409	0.816
17	0.208	0.300	0.458	1.908	1.747	2.178	0.680	0.505	0.715	1.074	1.022	0.429
18	0.013	0.213	0.247	1.041	0.987	1.974	0.367	0.562	0.514	1.422	1.085	0.775
19	0.377	0.068	0.180	1.090	1.229	1.567	0.449	0.069	0.422	0.943	0.567	0.716
20	-0.433	0.098	-0.395	0.433	0.650	0.891	0.290	0.710	0.202	0.696	1.452	0.474
21	-0.177	0.115	0.380	2.003	1.860	1.553	0.331	0.334	0.481	0.936	0.934	0.500
22	-0.063	0.332	0.242	1.152	1.233	1.181	0.200	0.304	0.141	0.736	0.581	0.542
23	-0.334	-0.043	-0.299	0.365	0.582	-0.220	0.039	0.579	0.194	0.576	0.063	0.891
24	0.114	0.613	-0.279	0.288	0.647	-0.350	-0.215	0.425	-0.303	0.507	0.416	0.613
25	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
26	-0.253	0.130	0.068	0.199	0.095	0.396	-0.059	0.111	-0.260	0.096	-0.047	0.591
27	0.254	-0.033	0.907	0.900	0.918	0.772	-0.001	0.366	-0.009	-0.266	-0.138	-0.337
28	0.262	-0.006	0.216	0.799	1.109	0.042	0.950	0.727	1.287	0.289	0.825	-0.879
29	-0.029	-0.118	-0.100	0.077	-0.249	-0.354	-0.460	-0.302	-0.194	-0.042	-0.232	0.009
30	-0.402	0.193	0.413	0.092	0.384	0.397	-0.351	-0.214	-0.064	0.252	0.168	-0.002
31	-0.168	-0.409	0.029	0.279	-0.003	-0.097	-0.333	-0.124	-0.363	-0.117	-0.574	-0.056
32	-1.183	0.739	0.530	0.904	1.523	0.247	-0.414	-0.523	0.190	0.636	0.612	0.624
33	0.046	-0.225	-0.104	1.995	1.404	2.305	0.183	-0.356	-0.201	1.089	0.783	0.055
34	0.298	0.144	0.156	2.313	1.854	2.973	0.277	0.246	-0.366	1.403	1.129	0.491
35	-0.920	1.008	1.232	2.556	2.412	2.755	-0.704	0.331	-0.607	1.477	-0.280	2.123
36	0.755	0.438	-0.114	-0.702	-0.816	-0.535	0.445	1.135	0.252	0.820	1.450	0.991
37	0.180	0.039	0.050	4.442	4.165	5.045	0.391	0.492	0.011	2.533	1.898	1.100

10

20

【 0 0 9 4 】

【表 1 3】

配列番号	C7_1	C7_2	C7_3	24b_4	24b_5	24b_6	35x_9	35x_10	35x_11
1	0.192	0.245	0.157	-0.311	-0.104	-0.303	-0.892	-0.223	-0.453
2	-0.020	0.261	0.280	-0.205	-0.019	-0.442	-0.879	-0.245	-0.862
3	0.269	0.574	0.072	0.331	-0.093	0.104	-0.853	-0.291	-0.999
4	0.196	0.203	0.469	-0.112	-0.284	-0.260	-0.276	-0.378	-0.157
5	0.244	0.181	0.181	0.138	0.099	0.079	-0.271	0.066	-0.149
6	0.231	0.371	0.146	-0.063	0.100	0.000	-0.045	0.132	-0.120
7	0.118	-0.153	-0.078	0.275	0.469	0.215	-0.728	-0.524	-0.323
8	-0.531	-0.213	0.094	-0.197	-0.377	-0.273	-0.217	-0.417	-0.533
9	0.373	0.399	0.310	0.553	0.730	0.367	0.301	0.229	0.492
10	-0.042	0.100	-0.147	0.360	0.069	0.357	-0.584	0.154	-0.564
11	-0.208	0.218	-0.180	-0.084	-0.408	-0.291	-0.288	-0.483	-0.850
12	0.034	0.590	-0.083	0.087	-0.266	0.829	0.175	-0.159	-1.044
13	0.501	-0.113	-0.034	0.537	1.348	1.882	-0.281	0.042	-1.506
14	-0.190	-0.282	-0.348	-0.232	-0.840	-0.350	-0.474	-0.192	0.085
15	-0.752	-0.285	-0.477	0.053	0.098	-0.859	0.268	-0.270	-0.330
16	-0.091	0.113	0.562	0.819	0.691	1.039	0.830	1.118	1.230
17	0.344	0.562	0.300	0.945	0.805	1.132	0.588	0.651	0.911
18	-0.048	0.246	0.038	0.467	0.787	0.694	0.578	0.640	1.028
19	-0.032	-0.524	0.002	0.672	0.711	0.809	0.922	0.839	1.145
20	0.582	0.492	-0.612	0.630	0.032	0.816	0.956	0.443	0.477
21	0.754	0.234	0.398	1.427	0.943	1.636	1.339	1.280	1.667
22	0.048	-0.124	-0.017	-0.073	0.273	0.228	0.358	0.024	0.524
23	-0.280	0.216	0.096	-0.350	-0.084	0.312	0.347	0.250	0.559
24	0.365	0.652	-0.098	-0.949	0.139	0.462	0.817	-0.232	0.985
25	0.408	-0.016	0.161	0.428	0.206	0.380	0.501	0.253	0.845
26	0.575	0.010	0.608	0.634	0.448	0.465	1.160	0.708	1.172
27	-0.170	0.763	0.757	-0.381	-0.643	-0.805	0.258	-0.555	-0.006
28	1.159	0.796	0.953	0.215	0.720	0.619	1.220	0.909	0.628
29	0.018	0.094	0.112	0.432	-0.022	0.685	0.813	0.264	0.390
30	0.480	0.012	0.116	0.339	0.340	0.065	1.100	0.503	0.804
31	-0.189	-0.425	0.067	0.228	-0.049	0.946	0.277	-0.353	0.174
32	-0.459	-0.490	-0.503	0.906	0.485	1.182	1.769	1.722	0.413
33	-0.194	0.174	-0.326	0.651	0.895	0.736	1.651	1.052	2.040
34	-0.497	0.307	-0.100	0.850	0.767	0.828	2.178	1.707	2.463
35	-0.236	-0.782	0.784	0.627	1.554	1.165	2.203	1.139	1.382
36	0.044	0.617	0.265	0.141	0.873	0.349	2.597	2.703	2.693
37	-0.530	-0.043	0.079	2.062	1.434	1.770	2.540	2.222	3.558

10

20

【 0 0 9 5 】

30

【表 1 4】

配列番号	nda_14	nda_15	nda_16	13d_20	13d_21	13d_23	nhd_24	nhd_25	nhd_26
1	0.338	-0.137	-0.232	0.054	0.219	0.445	0.299	0.431	0.507
2	0.072	-0.111	-0.525	-0.001	0.188	0.023	0.209	0.109	-0.018
3	-0.486	-0.392	-0.559	-0.805	-0.333	-0.417	0.541	0.618	-0.403
4	0.236	0.077	0.309	-0.150	0.083	0.011	0.346	0.100	0.145
5	0.210	0.183	0.606	0.151	0.034	0.379	0.742	0.156	0.511
6	-0.008	0.326	0.151	0.058	0.073	0.084	0.343	0.264	0.264
7	-0.069	0.362	-0.437	-1.346	-1.050	-0.706	-0.567	0.018	-0.551
8	-0.458	-0.238	0.219	0.244	-0.151	-0.002	0.101	0.391	-0.149
9	0.399	0.385	0.624	0.720	0.632	0.734	0.926	0.473	0.625
10	0.134	0.561	0.103	0.002	0.297	0.859	0.503	-0.030	0.132
11	0.008	-0.206	0.013	-0.029	0.173	0.106	1.002	0.280	0.219
12	0.138	0.826	0.561	-0.168	0.705	-0.980	0.907	0.370	-0.093
13	-0.389	-0.777	0.305	0.275	-0.452	-0.118	1.090	0.040	-0.474
14	0.602	0.479	-0.598	-0.525	0.174	-0.157	-0.422	0.062	0.779
15	-0.441	0.408	-0.025	-1.706	-2.096	-1.757	0.560	-0.518	-0.388
16	0.454	0.416	0.462	1.746	1.521	1.181	0.505	0.387	0.113
17	0.313	0.237	0.718	2.076	1.181	1.325	0.448	0.258	0.344
18	0.117	0.170	0.234	1.365	1.213	1.144	-0.248	-0.306	-0.193
19	-0.167	0.130	0.437	1.543	1.735	1.395	0.223	-0.366	-0.100
20	0.278	0.632	0.097	1.128	0.868	0.536	-0.441	-0.275	-0.140
21	0.202	0.307	0.614	1.525	1.260	1.345	0.257	0.362	0.365
22	0.300	0.378	0.654	0.786	0.623	0.309	0.160	-0.447	-0.249
23	-0.383	0.438	0.456	-0.525	-0.402	0.110	0.490	-0.284	-0.369
24	0.333	0.187	1.052	0.313	0.101	0.337	-0.007	0.384	0.420
25	-0.021	-0.067	-0.193	0.698	0.114	0.371	-0.372	-0.207	-0.611
26	0.422	0.514	0.763	0.893	1.129	1.026	0.114	0.637	0.709
27	-0.140	0.446	0.954	-0.314	-0.604	-0.005	-0.248	0.198	0.265
28	0.882	-0.079	1.746	1.260	0.035	1.157	0.214	0.655	0.619
29	0.126	0.552	0.488	-0.218	-0.556	-0.244	0.358	0.377	0.348
30	0.441	0.354	0.262	0.292	-0.097	0.305	0.222	0.535	0.528
31	-0.005	-0.009	-0.331	-0.308	-0.265	-0.053	-0.272	0.075	-0.056
32	-0.167	0.929	1.219	1.376	0.435	0.148	1.124	-0.023	0.037
33	0.153	-0.453	0.151	1.115	1.114	0.963	-0.188	-0.057	0.047
34	0.823	-0.139	-0.153	1.562	1.504	0.895	0.349	0.274	0.246
35	0.673	-0.839	0.523	1.758	2.327	1.880	1.247	-1.019	-0.593
36	0.379	0.918	1.195	0.056	-0.076	0.566	1.064	-0.085	-0.050
37	-0.051	-0.030	0.584	3.992	3.811	3.350	-0.531	0.064	-0.118

10

20

【 0 0 9 6 】

30

【表 1 5】

配列番号	C8_1	C8_2	C8_3	bcp_4	bcp_5	bcp_6	tmb_9	tmb_10	tmb_11
1	-0.859	-0.273	0.099	-0.207	-0.343	-0.460	-0.415	-0.224	-0.449
2	-1.137	-0.262	-0.268	-0.425	-0.434	-0.491	-0.570	-0.447	-0.529
3	-0.276	-0.157	0.097	-0.253	0.027	-0.503	-0.177	-0.334	-0.589
4	-0.101	0.032	0.309	-0.295	-0.126	-0.101	-0.215	-0.394	-0.345
5	-0.045	0.239	0.203	-0.359	-0.283	-0.799	0.300	-0.153	-0.325
6	0.036	0.026	0.483	-0.562	-0.736	-0.510	-0.269	-0.099	0.112
7	0.152	-0.095	0.017	0.461	-1.053	-1.076	-0.571	-0.498	-0.463
8	-0.154	-0.553	0.438	-0.202	-0.441	-0.339	-0.029	-0.717	-0.394
9	-0.216	-0.135	0.110	-0.152	-0.481	-0.304	0.427	0.019	0.587
10	-0.585	-0.247	-0.313	-0.481	-0.310	-0.844	-0.008	-0.927	-0.194
11	-0.429	-0.391	-0.309	-0.756	-0.624	-1.155	-0.129	-0.939	-0.548
12	0.128	-0.546	-0.197	-0.815	-0.517	-1.168	1.069	-0.016	0.073
13	-0.223	-0.057	-0.627	-0.426	0.186	-0.550	-0.312	-0.884	0.251
14	0.761	0.520	0.739	0.107	-0.309	0.396	0.095	0.139	0.444
15	0.189	-0.136	-0.113	-1.519	-1.839	-2.314	-1.141	-0.932	-1.351
16	0.467	0.204	-0.083	1.554	1.316	1.480	1.346	1.292	0.748
17	0.143	0.028	0.274	1.340	1.158	1.468	0.942	0.907	0.829
18	-0.638	-0.137	-0.275	1.462	0.739	1.083	0.672	1.014	0.818
19	-0.330	0.215	0.300	1.287	1.153	1.154	0.937	0.477	0.401
20	0.162	0.320	-0.016	0.538	0.613	0.654	0.734	0.763	0.409
21	-0.022	0.449	0.161	1.663	1.462	1.255	1.484	1.322	0.999
22	0.307	0.187	-0.044	1.106	0.536	0.555	0.638	0.590	0.193
23	0.539	0.207	0.481	-0.429	-0.025	-0.317	0.144	0.691	0.269
24	0.891	0.354	0.303	0.238	0.236	0.516	0.564	0.578	0.653
25	0.045	-0.115	-0.384	0.686	0.469	0.116	0.511	0.668	-0.363
26	0.487	0.335	0.530	0.972	0.549	0.722	1.130	0.667	0.790
27	0.150	0.776	0.792	-0.564	0.426	-0.182	-0.450	-0.067	-0.259
28	-0.225	0.337	1.012	0.551	1.344	0.762	1.048	1.079	1.643
29	0.512	0.431	0.259	0.429	0.623	0.195	1.192	0.502	0.869
30	0.662	0.437	0.266	0.332	0.784	0.284	2.314	1.320	1.290
31	-0.015	0.289	0.082	-0.368	0.413	-0.136	0.314	-0.250	0.384
32	0.892	0.222	-0.328	1.260	1.676	0.814	2.387	1.233	2.291
33	0.163	0.333	0.239	1.638	1.231	1.781	0.801	1.385	1.397
34	-0.546	0.464	0.125	1.509	1.214	1.867	1.210	2.104	1.644
35	-0.302	-0.149	0.539	2.569	2.056	2.616	2.491	1.304	1.982
36	0.627	0.467	0.265	-0.182	0.732	0.500	2.043	1.952	2.009
37	0.202	-0.202	-0.140	4.079	2.622	3.928	2.845	3.205	3.153

10

20

【 0 0 9 7 】

30

【表 16】

配列番号	dha_14	dha_15	dha_16	ams_24	ams_25	ams_26	14d_19	14d_20	14d_21
1	0.239	-0.334	0.960	0.129	0.184	0.248	-1.054	-1.436	-1.353
2	0.249	-0.490	0.513	0.242	-0.064	0.005	-1.557	-1.797	-1.376
3	0.785	-0.822	0.873	0.107	0.148	-0.145	-1.448	-1.210	-1.170
4	0.351	0.170	0.322	0.173	0.108	0.018	-0.758	-1.124	-1.362
5	0.434	0.034	0.918	0.122	-0.020	-0.185	-0.211	-0.190	-0.785
6	0.534	0.181	0.800	0.484	0.159	-0.134	-0.731	-0.984	-1.017
7	0.099	0.178	0.021	0.508	0.037	0.025	-1.121	-0.885	-0.621
8	-0.180	-0.262	0.529	-0.149	-0.140	-0.369	0.146	-0.892	-0.181
9	0.680	0.318	1.203	0.348	0.163	0.127	0.711	0.553	0.358
10	0.366	-0.003	0.428	-0.155	-0.338	-0.678	-0.136	-0.510	-0.574
11	0.549	-0.314	0.797	-0.045	-0.022	-1.229	-0.588	-1.426	-0.700
12	0.543	0.491	0.168	0.156	0.096	-0.727	0.563	-0.502	-0.070
13	0.408	0.488	0.392	0.134	-0.280	-0.788	-1.568	-1.567	-1.361
14	0.095	0.349	-0.478	0.244	-0.038	0.361	0.078	-0.290	0.069
15	0.381	0.093	-0.097	-0.561	0.150	0.177	-2.814	-2.061	-3.224
16	0.158	0.224	0.543	0.013	0.176	0.551	1.691	1.637	1.651
17	0.234	0.078	0.567	0.202	0.119	-0.092	1.628	1.248	1.547
18	0.235	-0.116	0.185	-0.027	-0.066	0.147	1.234	1.436	1.303
19	0.689	0.255	0.865	0.179	0.373	0.251	1.524	1.783	1.574
20	-0.066	0.213	-0.352	0.137	-0.793	-0.143	1.509	1.513	1.498
21	0.132	0.259	0.390	0.130	0.186	-0.007	2.210	2.118	2.473
22	0.095	0.260	-0.121	-0.439	-0.058	0.179	0.728	0.964	1.214
23	-0.553	0.704	-0.763	-0.640	0.083	-0.295	0.820	1.052	0.937
24	0.373	0.812	0.507	0.037	0.093	0.634	1.493	1.652	1.635
25	-0.024	0.057	-0.409	0.332	-0.089	0.346	1.174	1.220	1.151
26	0.549	0.539	0.279	0.349	0.426	0.035	0.520	0.914	0.779
27	-0.300	0.438	-0.143	-0.464	0.194	0.489	1.573	2.149	1.711
28	0.651	0.808	1.391	0.537	0.632	0.447	1.411	0.446	1.064
29	-0.111	0.185	-0.075	-0.111	-0.175	-0.024	5.013	4.372	3.854
30	-0.057	0.208	0.979	-0.333	-0.074	0.268	5.640	5.632	5.281
31	-0.219	0.005	-0.046	-0.337	0.018	-0.480	2.486	2.546	3.550
32	-0.117	0.063	0.433	-0.082	-0.442	-0.806	3.776	3.776	3.776
33	0.162	-0.418	-0.261	0.053	0.113	0.084	3.249	3.568	3.458
34	-0.191	0.749	0.771	0.657	0.773	0.163	4.010	4.325	4.064
35	1.225	1.340	-0.383	-0.582	0.169	-0.663	3.555	3.772	3.550
36	0.371	0.112	0.175	0.405	0.340	0.687	1.468	1.584	1.140
37	-0.104	-0.555	-0.466	-0.079	-0.157	0.524	4.479	4.915	4.359

10

20

## 【実施例 2】

30

## 【0098】

## &lt; クラスタ分析 &gt;

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ピング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。

## 【0099】

配列番号 1 ~ 37 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、大きく 3 つのクラスタ（A ~ C）を形成した。クラスタ A には、スルホラン（「suf」で表す。）、p-クミルフェノール（「pcp」で表す。）、o-ジクロロベンゼン（「dcb」で表す。）、1,4-ジプロモベンゼン（「14d」で表す。）、3,4-キシリジン（「34x」で表す。）および 3-シアノピリジン（「3cp」で表す。）が含まれており、クラスタ B には、ヒドラジーン水和物（「hnh」で表す。）の 3 個体中 2 個体、フタル酸ジヘブチル（「dhp」で表す。）、テトラプロモエタン（「tbe」で表す。）、ブソイドクメン（「tmb」で表す。）、3,5-キシリジン（「35x」で表す。）、1,3-ジプロモプロパン（「13d」で表す。）および 1-プロモ-3-クロロプロパン（「bcp」で表す。）が含まれており、クラ

40

50

スタCには対照群を含む残りの化学物質が含まれていた(図1)。クラスタAには該遺伝子(37遺伝子)を特定する際に用いた化学物質である3-シアノピリジン以外にも肝毒性を有することが知られている5種類の化学物質が含まれており、該37遺伝子の発現パターンで比較する限りにおいて、これらの化学物質が3-シアノピリジンと類似していることを示している。また、クラスタBには、肝毒性を有することが知られている7種類の化学物質が含まれており、対照群と区別できた。

【0100】

これらの結果は、配列番号1~37に示される塩基配列を有する遺伝子セットの遺伝子発現変動パターンを比較することにより、高い確率で対照群とある特定の肝毒性または肝臓に何らかの影響を与える化学物質を判別することが可能であることを示唆している。

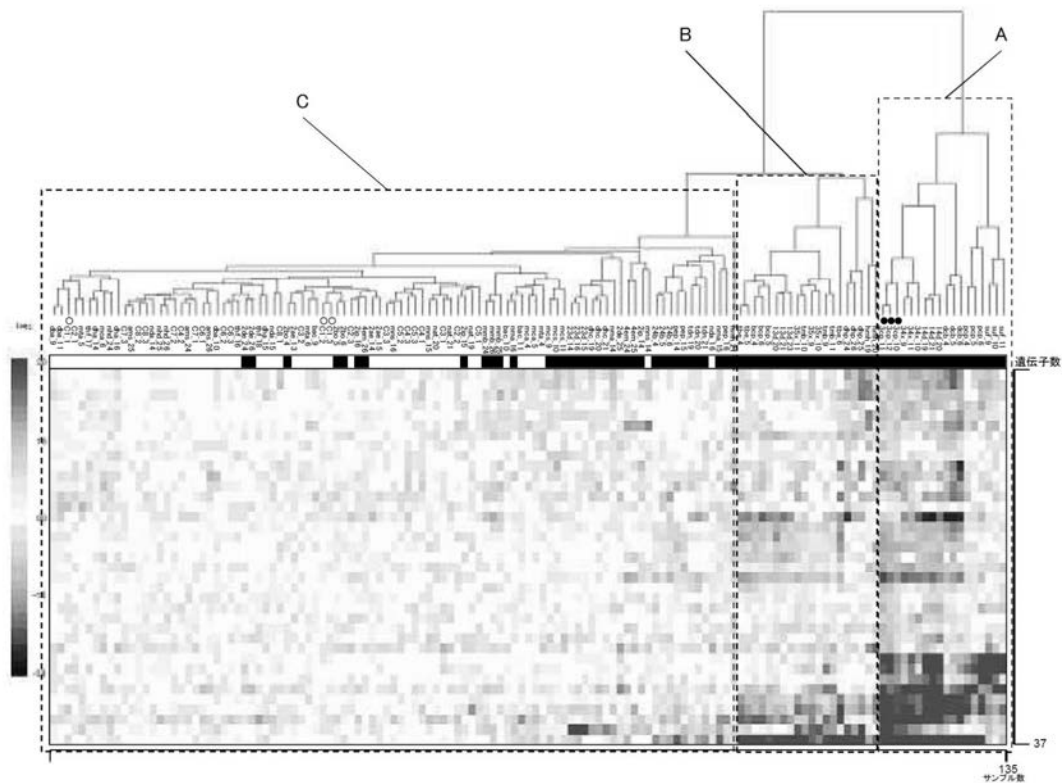
10

【産業上の利用可能性】

【0101】

本発明の肝臓毒性判定遺伝子セットは、肝障害、すなわち、肝臓疾患、損傷又は毒性のモニタリング、それらの診断及び/又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】

201219616000001.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 N 15/09 (2006.01) G 0 1 N 37/00 1 0 2  
C 1 2 N 15/00 A

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA04 CA09 CA12 DA02 HA14  
4B063 QA01 QA05 QA18 QQ53 QQ79 QQ91 QR32 QR56 QR77 QR80  
QR82 QS34 QS36 QS38 QX02  
4B065 AA90X AB01 AC20 BA02 CA46

专利名称(译)	预测化学物质的生物效应的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2012196160A</a>	公开(公告)日	2012-10-18
申请号	JP2011061651	申请日	2011-03-18
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		
发明人	渡邊 慎哉 今井 順一 河村 未佳		
IPC分类号	C12Q1/68 C12Q1/02 C12N5/10 G01N33/53 G01N37/00 C12N15/09		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12Q1/02 C12N5/00.102 G01N33/53.M G01N33/53.D G01N37/00.102 C12N15/00.A C12N5/10 C12Q1/68.AZN.A C12Q1/6813.Z C12Q1/6837.Z C12Q1/6844.Z C12Q1/6851.Z C12Q1/686.Z C12Q1/6897.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/DA02 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QQ91 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QR82 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS38 4B063/QX02 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/AC20 4B065/BA02 4B065/CA46		
代理人(译)	田中彦 今井淳一		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

要解决的问题：使用血液学或病理学技术检测肝毒性的问题，因为标记物有限，很难评估检测方法。解决方案：由于外部环境变化引起的体内基因表达变化很严重，鉴定用于确定生物毒性的基因组使得可以在生物毒性发生之前和通过病理检查验证之前快速且精确地检测生物毒性。提供了使用新基因组检测和预测生物毒性的方法，其试剂盒，治疗生物毒性的方法，以及确认候选药物的生物毒性的方法。

略号	化学物質名称	CAS登録番号
第1位	C1 注射用水	
	2bo 2-ブタンジオキシム	96-29-7
	3op 3-シアノピリジン	100-64-9
	2ap 2-(2-シアノエチル)アミノエタノール	111-64-1
第2位	thf テトラヒドロフルフリルアルコール	97-99-4
	C2 注射用水	
	msa メタクリルアミド	79-39-0
	2ip 2-インプロピルキシンタノール	126-33-0
第3位	2ap 2-インプロピルキシンタノール	100-59-1
	trnh トラネキサム酸	7803-97-8
	4om 4-エチルモルホリン	100-74-3
	C3 注射用水	
第4位	msa メタクリル酸エチルトリメチルアンモニウムクワリド	5039-76-1
	bac 塩化ベンジルトリメチルアンモニウム	56-93-9
	msb m-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム	127-08-4
	nat 1-ナフチルアミンスルホン酸ナトリウム四水和物	139-13-2
第5位	mmh 3-メトキシ-N-メチル-1-ピラゾール	56539-86-3
	C4 芥りー油	
	dcb 2,2-ジクロロベンゼン	95-50-1
	34x 3,4-キシリジン	95-64-7
第6位	nmh N-メチルアニリン	100-61-8
	tdn トリレンジアミンナート	26371-92-5
	2de 2-(2-ジチルアミノ)エタノール	102-81-8
	C5 芥りー油	
第7位	msc m-クレゾール	590-64-4
	23d 2,3-ジメチルアニリン	108-39-4
	dnc NN-ジメチル-N-キシルカルボジイミド	87-59-2
	dhp フタル酸ジヘフチル	538-75-0
第8位	C6 芥りー油	3648-21-3
	msc m-クレゾール	590-64-4
	23d 2,3-ジメチルアニリン	108-39-4
	dnc NN-ジメチル-N-キシルカルボジイミド	87-59-2
第9位	24b 2,4-ジメチルアニリン	100-61-8
	35x 3,5-キシリジン	108-69-0
	msd m-メチルベンゼン	100-62-3
	13d 1,3-ジプロピルアミン	109-64-8
第10位	nmh N-メチルアニリン	544-76-3
	C8 芥りー油	
	24b 2,4-ジメチルアニリン	100-61-8
	nmh N-メチルアニリン	100-62-3
第11位	14d 1,4-ジプロピルアミン	100-37-6
	ams 2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸	88-44-8
	24b 2,4-ジメチルアニリン	100-61-8
	nmh N-メチルアニリン	100-62-3