

(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2010-246527

(P2010-246527A)

(43) 公開日 平成22年11月4日(2010.11.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	4B024
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B063
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53 M	
G01N 37/00 (2006.01)	G01N 33/53 D	

審査請求 未請求 請求項の数 56 O L (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-46952 (P2010-46952)
 (22) 出願日 平成22年3月3日 (2010.3.3)
 (31) 優先権主張番号 特願2009-80651 (P2009-80651)
 (32) 優先日 平成21年3月27日 (2009.3.27)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(出願人による申告) 平成21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 渡辺 慎哉
 東京都港区白金台3-18-8-903
 (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
 Fターム(参考) 4B024 AA11 AA20 CA02 CA12 DA02
 HA14 HA15

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 化学物質が生体に与える影響の予測方法、これに用いるプローブセット及び検出又は定量用キット

(57) 【要約】

【課題】 臓器・組織に依存することなく、またマイナーな臓器への影響についても、簡便かつ確実に検査できる化学物質が生体に与える影響を検出または予測する方法の提供。

【解決手段】 生体応答遺伝子セットのうち1又は2以上の遺伝子の発現レベルを測定することによって検出され、前記遺伝子セットが特定のGenBank登録番号を有する遺伝子、又はその変異体であることを特徴とする。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

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検出する方法であって、

(A) 前記化学物質の曝露を受けた脾臓組織または脾臓由来の細胞試料に対して、下記の GenBank 登録番号で塩基配列が特定される生体応答遺伝子群：

(1) NM_012887、(2) NM_080581、(3) S78284、(4) NM_001029917、(5) U72350、(6) NM_134411、(7) NM_031776、(8) NM_001037095、(9) NM_133560、(10) NM_012713、(11) NM_001105833、(12) J02934、(13) NM_017301、(14) NM_012734、(15) NM_001106134、(16) NM_198743、(17) NM_019227、(18) NM_017226、(19) NM_022597、(20) NM_134395、(21) NM_001107958、(22) NM_053582、(23) NM_001106847、(24) NM_012899、(25) AF367448、(26) BF544079、(27) AF039218、(28) NM_033651、(29) XM_577816、(30) NM_031008、(31) NM_001109159、(32) NM_001012166、(33) AW434086、(34) XM_222462、(35) NM_001004203、(36) NM_021262、(37) X73371、(38) U95113、(39) NM_001009645、(40) NM_012955、(41) NM_022637、(42) BC168943、(43) NM_023022、(44) NM_139186、(45) AJ003004、(46) NM_133294、(47) NM_012716、(48) NM_001105822、(49) BF411776、(50) NM_012624、(51) XM_226431、(52) NM_133285、(53) NM_001014843、(54) NM_031695、(55) M88595、(56) J05181、(57) NM_012915、(58) D50564、(59) NM_024127、(60) AF184893、(61) NM_080582、(62) U10188、(63) NM_080889、(64) NM_053707、(65) NM_001130497、(66) NM_053358、(67) NM_022539、(68) NM_031740、(69) NM_022798、(70) NM_001106825、(71) XM_233453、(72) NM_152790、(73) NM_030851、(74) NM_001000856、(75) NM_022245、(76) NM_001106856、(77) NM_022540、(78) NM_017312、(79) NM_053983、(80) Y00350、(81) NM_001013236、(82) NM_021590、(83) NM_001013996、(84) AB021980、(85) NM_022588、(86) NM_001011904、(87) L06040、(88) XM_227612、(89) XM_228464、(90) M58040、(91) M22642、(92) NM_001105968、(93) NM_001109227、(94) X76452、(95) NM_017168、(96) NM_019263、(97) NM_031010、(98) NM_022381、(99) D14015、(100) NM_030826、(101) NM_012568、(102) NM_022505、(103) NM_053959、(104) NM_022533、(105) S75437、(106) NM_019354、(107) NM_001107529、(108) NM_001110487、(109) NM_012520、(110) L41686、(111) L26268、(112) NM_017169、(113) NM_019186、(114) NM_133296、(115) AF026472、(116) M75146、(117) Y00047、(118) NM_138853、(119) NM_022647、(120) XM_220618、(121) NM_175577、(122) NM_001002016、(123) NM_020091、(124) NM_012964、(125) NM_012491、(126) D25233、(127) AJ251299、(128) AF035951、(129) NM_001105796、(130) NM_023021、(131) U10455、(132) X99257、(133) NM_012507、(134) NM_019296、(135) AF095576、(136) NM_053688、(137) NM_001011955、(138) NM_053749、(139) NM_017038、(140) NM_001107823、(141) AF036548、(142) NM_053439、(143) NM_001106787、(144) NM_001034133、(145) NM_001106601、(146) NM_022676、(147) NM_147135、(148) NM_017166、(149) NM_053818、(150) NM_022274、(151) X57018、(152) NM_017258、(153) NM_172009、(154) Y13380、(155) NM_134472、(156) NM_001100992、(157) NM_001100986、(158) NM_013096、(159) NM_012511、(160) M21782、(161) NM_053592、(162) NM_001007742、(163) NM_001106547、(164) NM_019346、(165) NM_133567、(166) D89731、(167) NM_012925、(168) X76697、(169) NM_024356、(170) NM_022706、(171) X54467、(172) NM_017187、(173) NM_001008882、(174) NM_052805、(175) X07365、(176) NM_001100723、(177) NM_138873、

10

20

30

40

50

(1 7 8) AF090348、(1 7 9) NM_012690、(1 8 0) NM_053730、(1 8 1) NM_001012028、(1 8 2) NM_001025691、(1 8 3) NM_001025411、(1 8 4) NM_001126270、(1 8 5) NM_012764、(1 8 6) NM_001135875、(1 8 7) M21210、(1 8 8) D87212、(1 8 9) NM_001013120、(1 9 0) NM_001001286、(1 9 1) NM_001024242、(1 9 2) NM_001013859、(1 9 3) NM_053820、(1 9 4) U22893、(1 9 5) NM_134353、(1 9 6) U97667、(1 9 7) NM_022615、(1 9 8) NM_019179、(1 9 9) NM_001109537、(2 0 0) NM_001108304、(2 0 1) NM_001017491、(2 0 2) NM_001106192、(2 0 3) AF410926、(2 0 4) NM_013069、(2 0 5) NM_019283、(2 0 6) NM_053598、(2 0 7) NM_001012460、(2 0 8) NM_001009600、(2 0 9) NM_012778、(2 1 0) NM_022391、(2 1 1) NM_001107882、(2 1 2) NM_001008510、(2 1 3) NM_001106460、(2 1 4) NM_001127523、(2 1 5) NM_017305、(2 1 6) V01226、(2 1 7) J00750、(2 1 8) NM_012766、(2 1 9) NM_019205

10

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第1の遺伝子発現レベル測定ステップと、

(B) 前記化学物質の曝露を受けていない脾臓組織または脾臓由来の細胞試料に対して、前記第1の遺伝子発現レベル取得ステップにおいて選択された前記生体応答遺伝子のそれぞれに対する遺伝子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の遺伝子発現データレベル測定ステップ及び前記第2の遺伝子発現データレベル測定ステップにおける前記遺伝子発現レベルを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の検出方法。

20

【請求項2】

少なくとも5個以上の前記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を包含する請求項1記載の化学物質の毒性の検出方法。

【請求項3】

少なくとも10個以上の前記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を包含する請求項1記載の化学物質の毒性の検出方法。

【請求項4】

少なくとも20個以上の前記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を包含する請求項1記載の化学物質の毒性の検出方法。

【請求項5】

少なくとも50個以上の前記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を包含する請求項1記載の化学物質の毒性の検出方法。

30

【請求項6】

前記生体応答遺伝子は、マウス、ラット、イヌ、サルまたはヒトにそれぞれ対応するホモログ、パラログまたはオーソログであることを特徴とする、請求項1ないし請求項5のうちのいずれか1つに記載の化学物質の毒性検出方法。

【請求項7】

前記脾臓組織または前記細胞試料は、マウス、ラット、イヌ、サルまたはヒト由来であることを特徴とする、請求項1ないし請求項5のうちのいずれか1つに記載の化学物質の毒性検出方法。

40

【請求項8】

遺伝子発現レベルの測定は、RT-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1ないし請求項7のうちのいずれか1つに記載の化学物質の毒性検出方法。

【請求項9】

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8記載の化学物質の毒性検出方法。

【請求項10】

50

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 9 記載の化学物質の毒性検出方法。

【請求項 1 1】

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 0 記載の化学物質の毒性検出方法。

【請求項 1 2】

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 0 または請求項 1 1 記載の化学物質の毒性検出方法。

【請求項 1 3】

前記遺伝子発現レベルの測定を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の存在もしくは量を測定することで決定することを特徴とする請求項 1 ないし請求項 3 のうちのいずれか 1 つに記載の化学物質の毒性検出方法。

10

【請求項 1 4】

前記タンパク質の存在もしくは量の測定を免疫学的方法によって行うことを特徴とする請求項 1 3 記載の化学物質の毒性検出方法。

【請求項 1 5】

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 1 4 記載の化学物質の毒性検出方法。

20

【請求項 1 6】

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、およ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 5 記載の化学物質の毒性検出方法。

【請求項 1 7】

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検出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、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、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、ヒドラジーン水和物、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、-t-ブチルフェノールおよびp-(1,1,3,3,-テトラメチルブチル)フェノールのそれぞれについて所定量を所定期間生体または脾臓由来の細胞試料に投与(曝露)するステップと、

30

40

(B) 前記生体の脾臓組織または前記脾臓由来の前記細胞試料から mRNA を単離して、下記のGenBank登録番号で塩基配列が特定される生体応答遺伝子群：

(1) NM_012887、(2) NM_080581、(3) S78284、(4) NM_001029917、(5) U72350、(6) NM_134411、(7) NM_031776、(8) NM_001037095、(9) NM_133560、(10) NM_012713、(11) NM_001105833、(12) J02934、(13) NM_017301、(14) NM_012734、(15) NM_001106134、(16) NM_198743、(17) NM_019227、(18) NM_017226、(19) NM_022597、(20) NM_134395、(21) NM_001107958、(22) NM_053582、(23) NM_001106847、(24) NM_012899、(25) AF367448、(26) BF544079、(27) AF039218、(28) NM_033651、(29) XM_577816、(30) NM_031008、(31) NM_001109159、(32) NM_001012166、(33) AW434086、(34) XM_222462

50

(3 5) NM_001004203、 (3 6) NM_021262、 (3 7) X73371、 (3 8) U95113、 (3 9) NM_001009645、 (4 0) NM_012955、 (4 1) NM_022637、 (4 2) BC168943、 (4 3) NM_023022、 (4 4) NM_139186、 (4 5) AJ003004、 (4 6) NM_133294、 (4 7) NM_012716、 (4 8) NM_001105822、 (4 9) BF411776、 (5 0) NM_012624、 (5 1) XM_226431、 (5 2) NM_133285、 (5 3) NM_001014843、 (5 4) NM_031695、 (5 5) M88595、 (5 6) J05181、 (5 7) NM_012915、 (5 8) D50564、 (5 9) NM_024127、 (6 0) AF184893、 (6 1) NM_080582、 (6 2) U10188、 (6 3) NM_080889、 (6 4) NM_053707、 (6 5) NM_001130497、 (6 6) NM_053358、 (6 7) NM_022539、 (6 8) NM_031740、 (6 9) NM_022798、 (7 0) NM_001106825、 (7 1) XM_233453、 (7 2) NM_152790、 (7 3) NM_030851、 (7 4) NM_001000856、 (7 5) NM_022245、 (7 6) NM_001106856、 (7 7) NM_022540、 (7 8) NM_017312、 (7 9) NM_053983、 (8 0) Y00350、 (8 1) NM_001013236、 (8 2) NM_021590、 (8 3) NM_001013996、 (8 4) AB021980、 (8 5) NM_022588、 (8 6) NM_001011904、 (8 7) L06040、 (8 8) XM_227612、 (8 9) XM_228464、 (9 0) M58040、 (9 1) M22642、 (9 2) NM_001105968、 (9 3) NM_001109227、 (9 4) X76452、 (9 5) NM_017168、 (9 6) NM_019263、 (9 7) NM_031010、 (9 8) NM_022381、 (9 9) D14015、 (1 0 0) NM_030826、 (1 0 1) NM_012568、 (1 0 2) NM_022505、 (1 0 3) NM_053959、 (1 0 4) NM_022533、 (1 0 5) S75437、 (1 0 6) NM_019354、 (1 0 7) NM_001107529、 (1 0 8) NM_001110487、 (1 0 9) NM_012520、 (1 1 0) L41686、 (1 1 1) L26268、 (1 1 2) NM_017169、 (1 1 3) NM_019186、 (1 1 4) NM_133296、 (1 1 5) AF026472、 (1 1 6) M75146、 (1 1 7) Y00047、 (1 1 8) NM_138853、 (1 1 9) NM_022647、 (1 2 0) XM_220618、 (1 2 1) NM_175577、 (1 2 2) NM_001002016、 (1 2 3) NM_020091、 (1 2 4) NM_012964、 (1 2 5) NM_012491、 (1 2 6) D25233、 (1 2 7) AJ251299、 (1 2 8) AF035951、 (1 2 9) NM_001105796、 (1 3 0) NM_023021、 (1 3 1) U10455、 (1 3 2) X99257、 (1 3 3) NM_012507、 (1 3 4) NM_019296、 (1 3 5) AF095576、 (1 3 6) NM_053688、 (1 3 7) NM_001011955、 (1 3 8) NM_053749、 (1 3 9) NM_017038、 (1 4 0) NM_001107823、 (1 4 1) AF036548、 (1 4 2) NM_053439、 (1 4 3) NM_001106787、 (1 4 4) NM_001034133、 (1 4 5) NM_001106601、 (1 4 6) NM_022676、 (1 4 7) NM_147135、 (1 4 8) NM_017166、 (1 4 9) NM_053818、 (1 5 0) NM_022274、 (1 5 1) X57018、 (1 5 2) NM_017258、 (1 5 3) NM_172009、 (1 5 4) Y13380、 (1 5 5) NM_134472、 (1 5 6) NM_001100992、 (1 5 7) NM_001100986、 (1 5 8) NM_013096、 (1 5 9) NM_012511、 (1 6 0) M21782、 (1 6 1) NM_053592、 (1 6 2) NM_001007742、 (1 6 3) NM_001106547、 (1 6 4) NM_019346、 (1 6 5) NM_133567、 (1 6 6) D89731、 (1 6 7) NM_012925、 (1 6 8) X76697、 (1 6 9) NM_024356、 (1 7 0) NM_022706、 (1 7 1) X54467、 (1 7 2) NM_017187、 (1 7 3) NM_001008882、 (1 7 4) NM_052805、 (1 7 5) X07365、 (1 7 6) NM_001100723、 (1 7 7) NM_138873、 (1 7 8) AF090348、 (1 7 9) NM_012690、 (1 8 0) NM_053730、 (1 8 1) NM_001012028、 (1 8 2) NM_001025691、 (1 8 3) NM_001025411、 (1 8 4) NM_001126270、 (1 8 5) NM_012764、 (1 8 6) NM_001135875、 (1 8 7) M21210、 (1 8 8) D87212、 (1 8 9) NM_001013120、 (1 9 0) NM_001001286、 (1 9 1) NM_001024242、 (1 9 2) NM_001013859、 (1 9 3) NM_053820、 (1 9 4) U22893、 (1 9 5) NM_134353、 (1 9 6) U97667、 (1 9 7) NM_022615、 (1 9 8) NM_019179、 (1 9 9) NM_001109537、 (2 0 0) NM_001108304、 (2 0 1) NM_001017491、 (2 0 2) NM_001106192、 (2 0 3) AF410926、 (2 0 4) NM_013069、 (2 0 5) NM_019283、 (2 0 6) NM_053598、 (2 0 7) NM_001012460、 (2 0 8) NM_001009600、 (2 0 9) NM_012778、 (2 1 0) NM_022391、 (2 1 1) NM_001107882、 (2 1 2) NM_001008510、 (2 1 3) NM_001106460、 (2 1 4) NM_001127523、 (2 1 5) NM_017305、 (2 1 6) V01226、 (2 1 7) J00750、 (2 1 8) NM_012766、 (2 1 9) NM_019205

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ステップと、

10

20

30

40

50

(C)(B)で得られた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18】

少なくとも5個以上の前記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を包含する請求項17記載の照合用遺伝子発現データベース作成方法。

【請求項19】

少なくとも10個以上の前記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を包含する請求項17記載の照合用遺伝子発現データベース作成方法。

【請求項20】

少なくとも20個以上の前記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を包含する請求項17記載の照合用遺伝子発現データベース作成方法。

【請求項21】

少なくとも50個以上の前記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を包含する請求項17記載の照合用遺伝子発現データベース作成方法。

【請求項22】

前記生体応答遺伝子は、マウス、ラット、イヌ、サルまたはヒトにそれぞれ対応するホモログ、パラログまたはオソログであることを特徴とする、請求項17ないし請求項21のいずれか1つに記載の照合用遺伝子発現データベース作成方法。

【請求項23】

前記脾臓組織または前記細胞試料は、マウス、ラット、イヌ、サルまたはヒト由来であることを特徴とする、請求項17ないし請求項22のうちのいずれか1つに記載の照合用遺伝子発現データベース作成方法。

【請求項24】

遺伝子発現レベルの測定は、RT-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17ないし請求項22のうちのいずれか1つに記載の照合用遺伝子発現データベース作成方法。

【請求項25】

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24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26】

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25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27】

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26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28】

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26または請求項27のいずれか1つ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29】

前記遺伝子発現レベルの測定を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の存在もしくは量を測定することで決定することを特徴とする、請求項17ないし請求項23のうちのいずれか1つ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30】

前記遺伝子発現レベルの測定を免疫学的方法によって行うことを特徴とする請求項17ないし請求項23のうちのいずれか1つに記載の照合用遺伝子発現データベースの作成方

10

20

30

40

50

法。

【請求項 3 1】

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 0 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 3 2】

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、およ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 1 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 3 3】

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検出・予測する方法であって、

(A) 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、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、ヒドラジーン水和物、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、-t-ブチルフェノールおよび p - (1,1,3,3,-テトラメチルブチル) フェノールのそれぞれについて所定量を一定期間生体または脾臓由来の細胞試料に投与 (曝露) するステップと、

(B) 前記生体由来の脾臓組織または前記脾臓由来の前記細胞試料から m R N A を単離して、下記のGenBank登録番号で塩基配列が特定される生体応答遺伝子群：

(1) NM_012887、(2) NM_080581、(3) S78284、(4) NM_001029917、(5) U72350、(6) NM_134411、(7) NM_031776、(8) NM_001037095、(9) NM_133560、(1 0) NM_012713、(1 1) NM_001105833、(1 2) J02934、(1 3) NM_017301、(1 4) NM_012734、(1 5) NM_001106134、(1 6) NM_198743、(1 7) NM_019227、(1 8) NM_017226、(1 9) NM_022597、(2 0) NM_134395、(2 1) NM_001107958、(2 2) NM_053582、(2 3) NM_001106847、(2 4) NM_012899、(2 5) AF367448、(2 6) BF544079、(2 7) AF039218、(2 8) NM_033651、(2 9) XM_577816、(3 0) NM_031008、(3 1) NM_001109159、(3 2) NM_001012166、(3 3) AW434086、(3 4) XM_222462、(3 5) NM_001004203、(3 6) NM_021262、(3 7) X73371、(3 8) U95113、(3 9) NM_001009645、(4 0) NM_012955、(4 1) NM_022637、(4 2) BC168943、(4 3) NM_023022、(4 4) NM_139186、(4 5) AJ003004、(4 6) NM_133294、(4 7) NM_012716、(4 8) NM_001105822、(4 9) BF411776、(5 0) NM_012624、(5 1) XM_226431、(5 2) NM_133285、(5 3) NM_001014843、(5 4) NM_031695、(5 5) M88595、(5 6) J05181、(5 7) NM_012915、(5 8) D50564、(5 9) NM_024127、(6 0) AF184893、(6 1) NM_080582、(6 2) U10188、(6 3) NM_080889、(6 4) NM_053707、(6 5) NM_001130497、(6 6) NM_053358、(6 7) NM_022539、(6 8) NM_031740、(6 9) NM_022798、(7 0) NM_001106825、(7 1) XM_233453、(7 2) NM_152790、(7 3) NM_030851、(7 4) NM_001000856、(7 5) NM_022245、(7 6) NM_001106856、(7 7) NM_022540、(7 8) NM_017312、(7 9) NM_053983、(8 0) Y00350、(8 1) NM_001013236、(8 2) NM_021590、(8 3) NM_001013996、(8 4) AB021980、(8 5) NM_022588、(8 6) NM_001011904、(8 7) L06040、(8 8) XM_227612、(8 9) XM_228464、(9 0) M58040、(9 1) M22642、(9 2) NM_001105968、(9 3) NM_001109227、(9 4) X76452、(9 5) NM_017168、(9 6) NM_019263、(9 7) NM_031010、(9 8) NM_022381、(9 9) D14015、(1 0 0) NM_030826、(1 0 1) NM_012568

10

20

30

40

50

、 (1 0 2) NM_022505、 (1 0 3) NM_053959、 (1 0 4) NM_022533、 (1 0 5) S7543
 7、 (1 0 6) NM_019354、 (1 0 7) NM_001107529、 (1 0 8) NM_001110487、 (1 0 9
) NM_012520、 (1 1 0) L41686、 (1 1 1) L26268、 (1 1 2) NM_017169、 (1 1 3)
 NM_019186、 (1 1 4) NM_133296、 (1 1 5) AF026472、 (1 1 6) M75146、 (1 1 7)
 Y00047、 (1 1 8) NM_138853、 (1 1 9) NM_022647、 (1 2 0) XM_220618、 (1 2 1
) NM_175577、 (1 2 2) NM_001002016、 (1 2 3) NM_020091、 (1 2 4) NM_012964、
 (1 2 5) NM_012491、 (1 2 6) D25233、 (1 2 7) AJ251299、 (1 2 8) AF035951、
 (1 2 9) NM_001105796、 (1 3 0) NM_023021、 (1 3 1) U10455、 (1 3 2) X99257
 、 (1 3 3) NM_012507、 (1 3 4) NM_019296、 (1 3 5) AF095576、 (1 3 6) NM_053
 688、 (1 3 7) NM_001011955、 (1 3 8) NM_053749、 (1 3 9) NM_017038、 (1 4 0
) NM_001107823、 (1 4 1) AF036548、 (1 4 2) NM_053439、 (1 4 3) NM_001106787
 、 (1 4 4) NM_001034133、 (1 4 5) NM_001106601、 (1 4 6) NM_022676、 (1 4 7
) NM_147135、 (1 4 8) NM_017166、 (1 4 9) NM_053818、 (1 5 0) NM_022274、 (1
 5 1) X57018、 (1 5 2) NM_017258、 (1 5 3) NM_172009、 (1 5 4) Y13380、 (1 5
 5) NM_134472、 (1 5 6) NM_001100992、 (1 5 7) NM_001100986、 (1 5 8) NM_0130
 96、 (1 5 9) NM_012511、 (1 6 0) M21782、 (1 6 1) NM_053592、 (1 6 2) NM_001
 007742、 (1 6 3) NM_001106547、 (1 6 4) NM_019346、 (1 6 5) NM_133567、 (1 6
 6) D89731、 (1 6 7) NM_012925、 (1 6 8) X76697、 (1 6 9) NM_024356、 (1 7 0
) NM_022706、 (1 7 1) X54467、 (1 7 2) NM_017187、 (1 7 3) NM_001008882、 (1
 7 4) NM_052805、 (1 7 5) X07365、 (1 7 6) NM_001100723、 (1 7 7) NM_138873、
 (1 7 8) AF090348、 (1 7 9) NM_012690、 (1 8 0) NM_053730、 (1 8 1) NM_00101
 2028、 (1 8 2) NM_001025691、 (1 8 3) NM_001025411、 (1 8 4) NM_001126270、 (1
 8 5) NM_012764、 (1 8 6) NM_001135875、 (1 8 7) M21210、 (1 8 8) D87212、
 (1 8 9) NM_001013120、 (1 9 0) NM_001001286、 (1 9 1) NM_001024242、 (1 9 2
) NM_001013859、 (1 9 3) NM_053820、 (1 9 4) U22893、 (1 9 5) NM_134353、 (1
 9 6) U97667、 (1 9 7) NM_022615、 (1 9 8) NM_019179、 (1 9 9) NM_001109537、
 (2 0 0) NM_001108304、 (2 0 1) NM_001017491、 (2 0 2) NM_001106192、 (2 0 3
) AF410926、 (2 0 4) NM_013069、 (2 0 5) NM_019283、 (2 0 6) NM_053598、 (2
 0 7) NM_001012460、 (2 0 8) NM_001009600、 (2 0 9) NM_012778、 (2 1 0) NM_02
 2391、 (2 1 1) NM_001107882、 (2 1 2) NM_001008510、 (2 1 3) NM_001106460、 (2
 1 4) NM_001127523、 (2 1 5) NM_017305、 (2 1 6) V01226、 (2 1 7) J00750、
 (2 1 8) NM_012766、 (2 1 9) NM_019205

のうちから少なくとも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ステ
 ップと、

(C) (B) で得られた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脾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脾臓組織または前記脾臓由来の細胞試料から m R N A 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検出・予測方法。

【請求項 3 4】

請求項 3 3 記載の (B) および (E) において選択される生体応答遺伝子は、少なくと
 も 5 個以上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検出・予測方法。

【請求項 3 5】

10

20

30

40

50

請求項 33 記載の (B) および (E) において選択される生体応答遺伝子は、少なくとも 10 個以上であることを特徴とする、請求項 33 記載の化学物質の毒性検出・予測方法。

【請求項 36】

請求項 33 記載の (B) および (E) において選択される生体応答遺伝子は、少なくとも 20 個以上であることを特徴とする、請求項 33 記載の化学物質の毒性検出・予測方法。

【請求項 37】

請求項 33 記載の (B) および (E) において選択される生体応答遺伝子は、少なくとも 50 個以上であることを特徴とする、請求項 33 記載の化学物質の毒性検出・予測方法。

10

【請求項 38】

前記生体応答遺伝子は、マウス、ラット、イヌ、サルまたはヒトにそれぞれ対応するホモログ、パラログまたはオソログであることを特徴とする、請求項 33 ないし請求項 37 のいずれか 1 つに記載の照合用遺伝子発現データベース作成方法

【請求項 39】

前記脾臓組織または前記細胞試料は、マウス、ラット、イヌ、サルまたはヒト由来であることを特徴とする、請求項 33 ないし請求項 38 のうちの 1 つに記載の化学物質の毒性検出・予測方法。

【請求項 40】

遺伝子発現レベルの測定は、RT-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 33 ないし請求項 39 のうちのいずれか 1 つに記載の化学物質の毒性検出・予測方法。

20

【請求項 41】

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 40 記載の化学物質の毒性検出・予測方法。

【請求項 42】

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 41 記載の化学物質の毒性検出・予測方法。

30

【請求項 43】

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 42 記載の化学物質の毒性検出・予測方法。

【請求項 44】

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 42 または請求項 43 記載の化学物質の毒性検出・予測方法。

【請求項 45】

前記遺伝子発現レベルの測定を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の存在もしくは量を測定することで決定することを特徴とする請求項 33 ないし請求項 39 のうちのいずれか 1 つに記載の化学物質の毒性検出・予測方法。

40

【請求項 46】

前記遺伝子発現レベルの測定を免疫学的方法によって行うことを特徴とする請求項 33 ないし請求項 39 のうちのいずれか 1 つに記載の化学物質の毒性検出・予測方法。

【請求項 47】

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 46 記載の化学物質の毒性の検出・予測方法。

【請求項 48】

50

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、およ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 47 記載の化学物質の毒性の検出・予測方法。

【請求項 49】

請求項 1 ないし請求項 48 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キットであって、該プローブが、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検出キット。

【請求項 50】

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 49 記載の化学物質の毒性検出キット。 10

【請求項 51】

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 50 記載の化学物質の毒性検出キット。

【請求項 52】

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、10~100merであることを特徴とする請求項 50 または請求項 51 記載の化学物質の毒性検出キット。

【請求項 53】

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 50 ないし請求項 52 のうちのいずれか 1 つに記載の化学物質の毒性検出キット。 20

【請求項 54】

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 49 または請求項 50 記載の化学物質の毒性検出キット。

【請求項 55】

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 49 ないし請求項 54 のうちのいずれか 1 つに記載の化学物質の毒性検出キット。

【請求項 56】

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 55 記載の化学物質の毒性検出キット。 30

【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、予測および/もしくは処置のための方法、および、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、脾臓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およびその結果の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

我が国では、環境と調和した健全な産業活動及び安心・安全な国民生活の実現を目指した化学物質リスク評価・管理システムの構築へ向け、公的な化学物質総合評価管理プログラムが進められている。

【0003】

人類が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、特に化学物質によ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。したがって、化学物質のリスク（特に人体に与える影響）を評価することは社会的な要請が強い。 40

10

20

30

40

50

【 0 0 0 4 】

これまで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。

【 0 0 0 5 】

しかし、これらの従来毒性学的手法によって獲得される生物学的情報は知見の種類に限られること、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必要であった。

【 0 0 0 6 】

近年、急速な発展を見せるゲノム学的なアプローチが、薬剤の有効性評価（ファーマコゲノミクス）（非特許文献1、非特許文献2）、食物の生体への影響評価（ニュートリゲノミクス）（非特許文献3）等と同様に、化学物質の生物学活性（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）（非特許文献4、非特許文献5）。

10

【 0 0 0 7 】

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できるという、従来手法では得られない膨大かつ多様な観点による生物学現象の評価を可能にした。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 8 】

【 特許文献 1 】 特開 2 0 0 4 - 2 3 3 1 0 5 号 公 報

20

【 非特許文献 】

【 0 0 0 9 】

【 非特許文献 1 】 Alison H. Harrill et al., Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. November; 4 (1 1) : 1 3 7 9 - 1 3 8 9 (2 0 0 8)

【 非特許文献 2 】 Elisa Giovannetti et al., Mol. Cancer Ther. 5 (6) : 1 3 8 7 - 1 3 9 4 (2 0 0 6)

【 非特許文献 3 】 Licia Iacoviello et al., Genes Nutr. 3 : 1 9 - 2 4 (2 0 0 8)

【 非特許文献 4 】 Preeti Chavan et al., Evid Based Complement Alternat Med. Dec; 3 (4) : 4 4 7 - 4 5 7 (2 0 0 6)

【 非特許文献 5 】 渡邊肇 YAKUGAKU ZASSHI : 1 2 7 (1 2) : 1 9 6 7 - 1 9 7 4 (2 0 0 7)

30

【 非特許文献 6 】 Paolo Fortina et al., Nature Biotech. 2 6 : 2 9 3 - 2 9 4 (2 0 0 8)

【 非特許文献 7 】 Gary K Geiss et al., Nature Biotech. 2 6 : 3 1 7 - 3 2 5 (2 0 0 8)

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 0 】

これまでの毒性が未知の化学物質が生体にどのような影響（毒性）があるのかを調べるためには、従来毒性学的手法では、獲得される生物学的情報は知見の種類に限られること、並びに、長期毒性試験では費用と効率等の面で問題があった。

40

【 0 0 1 1 】

また、従来手法では、化学物質の有害性評価の対象となるのは肝臓または脾臓が主であった。しかし、対象となる臓器・組織が変われば、それぞれの臓器・組織に特異的な評価方法が必要となり、かつ、評価手法も異なることが多かった。さらに、化学物質が及ぼすマイナーな臓器へ影響を検査するためには、病理組織学的検査以外には検査方法が存在しないものもあった。

【 0 0 1 2 】

本発明は、これらの課題を解決できる簡便かつ確実な新規の手法を提供することにある。

50

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明者は、既存化学物質毒性データベース (http://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/jsp/SearchPage.jsp) に登録されている化学物質の中から髄外造血を引き起こすことが知られている2-ブタノンオキシムを28日間反復して経口投与したラットの脾臓とそれらの化学物質を溶解した溶媒を投与した対照群のラットの脾臓における遺伝子発現プロファイルを取得し、比較することにより、両者間で発現レベルに統計的に有意な差がある遺伝子が219個存在していることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0014】

すなわち、本発明は、(1)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検出する方法であって、

(A)前記化学物質の曝露を受けた脾臓組織または脾臓由来の細胞試料に対して、下記のGenBank登録番号で塩基配列が特定される生体応答遺伝子群：

(1)NM_012887、(2)NM_080581、(3)S78284、(4)NM_001029917、(5)U72350、(6)NM_134411、(7)NM_031776、(8)NM_001037095、(9)NM_133560、(10)NM_012713、(11)NM_001105833、(12)J02934、(13)NM_017301、(14)NM_012734、(15)NM_001106134、(16)NM_198743、(17)NM_019227、(18)NM_017226、(19)NM_022597、(20)NM_134395、(21)NM_001107958、(22)NM_053582、(23)NM_001106847、(24)NM_012899、(25)AF367448、(26)BF544079、(27)AF039218、(28)NM_033651、(29)XM_577816、(30)NM_031008、(31)NM_001109159、(32)NM_001012166、(33)AW434086、(34)XM_222462、(35)NM_001004203、(36)NM_021262、(37)X73371、(38)U95113、(39)NM_001009645、(40)NM_012955、(41)NM_022637、(42)BC168943、(43)NM_023022、(44)NM_139186、(45)AJ003004、(46)NM_133294、(47)NM_012716、(48)NM_001105822、(49)BF411776、(50)NM_012624、(51)XM_226431、(52)NM_133285、(53)NM_001014843、(54)NM_031695、(55)M88595、(56)J05181、(57)NM_012915、(58)D50564、(59)NM_024127、(60)AF184893、(61)NM_080582、(62)U10188、(63)NM_080889、(64)NM_053707、(65)NM_001130497、(66)NM_053358、(67)NM_022539、(68)NM_031740、(69)NM_022798、(70)NM_001106825、(71)XM_233453、(72)NM_152790、(73)NM_030851、(74)NM_001000856、(75)NM_022245、(76)NM_001106856、(77)NM_022540、(78)NM_017312、(79)NM_053983、(80)Y00350、(81)NM_001013236、(82)NM_021590、(83)NM_001013996、(84)AB021980、(85)NM_022588、(86)NM_001011904、(87)L06040、(88)XM_227612、(89)XM_228464、(90)M58040、(91)M22642、(92)NM_001105968、(93)NM_001109227、(94)X76452、(95)NM_017168、(96)NM_019263、(97)NM_031010、(98)NM_022381、(99)D14015、(100)NM_030826、(101)NM_012568、(102)NM_022505、(103)NM_053959、(104)NM_022533、(105)S75437、(106)NM_019354、(107)NM_001107529、(108)NM_001110487、(109)NM_012520、(110)L41686、(111)L26268、(112)NM_017169、(113)NM_019186、(114)NM_133296、(115)AF026472、(116)M75146、(117)Y00047、(118)NM_138853、(119)NM_022647、(120)XM_220618、(121)NM_175577、(122)NM_001002016、(123)NM_020091、(124)NM_012964、(125)NM_012491、(126)D25233、(127)AJ251299、(128)AF035951、(129)NM_001105796、(130)NM_023021、(131)U10455、(132)X99257、(133)NM_012507、(134)NM_019296、(135)AF095576、(136)NM_053688、(137)NM_001011955、(138)NM_053749、(139)NM_017038、(140)NM_001107823、(141)AF036548、(142)NM_053439、(143)NM_001106787、(144)NM_001034133、(145)NM_001106601、(146)NM_022676、(147)NM_147135、(148)NM_017166、(149)NM_053818、(150)NM_022274、(1

10

20

30

40

50

5 1) X57018、 (1 5 2) NM_017258、 (1 5 3) NM_172009、 (1 5 4) Y13380、 (1 5 5) NM_134472、 (1 5 6) NM_001100992、 (1 5 7) NM_001100986、 (1 5 8) NM_013096、 (1 5 9) NM_012511、 (1 6 0) M21782、 (1 6 1) NM_053592、 (1 6 2) NM_001007742、 (1 6 3) NM_001106547、 (1 6 4) NM_019346、 (1 6 5) NM_133567、 (1 6 6) D89731、 (1 6 7) NM_012925、 (1 6 8) X76697、 (1 6 9) NM_024356、 (1 7 0) NM_022706、 (1 7 1) X54467、 (1 7 2) NM_017187、 (1 7 3) NM_001008882、 (1 7 4) NM_052805、 (1 7 5) X07365、 (1 7 6) NM_001100723、 (1 7 7) NM_138873、 (1 7 8) AF090348、 (1 7 9) NM_012690、 (1 8 0) NM_053730、 (1 8 1) NM_001012028、 (1 8 2) NM_001025691、 (1 8 3) NM_001025411、 (1 8 4) NM_001126270、 (1 8 5) NM_012764、 (1 8 6) NM_001135875、 (1 8 7) M21210、 (1 8 8) D87212、 (1 8 9) NM_001013120、 (1 9 0) NM_001001286、 (1 9 1) NM_001024242、 (1 9 2) NM_001013859、 (1 9 3) NM_053820、 (1 9 4) U22893、 (1 9 5) NM_134353、 (1 9 6) U97667、 (1 9 7) NM_022615、 (1 9 8) NM_019179、 (1 9 9) NM_001109537、 (2 0 0) NM_001108304、 (2 0 1) NM_001017491、 (2 0 2) NM_001106192、 (2 0 3) AF410926、 (2 0 4) NM_013069、 (2 0 5) NM_019283、 (2 0 6) NM_053598、 (2 0 7) NM_001012460、 (2 0 8) NM_001009600、 (2 0 9) NM_012778、 (2 1 0) NM_022391、 (2 1 1) NM_001107882、 (2 1 2) NM_001008510、 (2 1 3) NM_001106460、 (2 1 4) NM_001127523、 (2 1 5) NM_017305、 (2 1 6) V01226、 (2 1 7) J00750、 (2 1 8) NM_012766、 (2 1 9) NM_019205

10

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第1の遺伝子発現レベル測定ステップと、

20

(B) 前記化学物質の曝露を受けていない脾臓組織または脾臓由来の細胞試料に対して、前記第1の遺伝子発現レベル取得ステップにおいて選択された前記生体応答遺伝子のそれぞれに対する遺伝子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の遺伝子発現データレベル測定ステップ及び前記第2の遺伝子発現データレベル測定ステップにおける前記遺伝子発現レベルを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の検出方法、である。

【 0 0 1 5 】

特に、(2) 前記生体応答遺伝子が少なくとも5個以上であることが望ましく、(3) 前記生体応答遺伝子が少なくとも10個以上であることがより望ましい。また、(4) 前記生体応答遺伝子が少なくとも20個以上であることがさらに望ましく、(5) 前記生体応答遺伝子が少なくとも50個以上であることがさらにより望ましい。

30

【 0 0 1 6 】

更に、(6) 上記(1) ~ (5) において、前記生体応答遺伝子は、マウス、ラット、イヌ、サルまたはヒトにそれぞれ対応するホモログ、パラログまたはオーソログであってもよい。

【 0 0 1 7 】

更に、(7) 上記(1) ~ (5) において、前記脾臓組織または前記細胞試料は、マウス、ラット、イヌ、サルまたはヒト由来であってもよい。

【 0 0 1 8 】

更に、(8) 上記(1) ~ (7) において、前記遺伝子発現レベルの測定は、R T - P C R 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つを用いることで決定されてもよい。

40

【 0 0 1 9 】

更に、(9) 上記(1) ~ (8) において、前記遺伝子の発現レベルが、ハイブリダイゼーション法によって測定されてもよく、(1 0) 前記ハイブリダイゼーション法が、マイクロアレイ法又はプロット法であってもよい。

【 0 0 2 0 】

また、(1 1) 上記(1 0) において、前記ヌクレオチドは、m R N A、c D N A、合

50

成オリゴヌクレオチドであってもよく、さらに、(12)前記ヌクレオチドは、標識化ヌクレオチドであってもよい。

【0021】

さらに、上記(1)~(7)において、(13)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の存在もしくは量を測定することで決定されてもよい。

【0022】

また、上記(13)において、(14)前記タンパク質の存在もしくは量の測定を免疫学的方法によって行ってもよく、(15)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ってもよい。また、(16)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、および抗体フラグメントから選択されてもよい。

10

【0023】

さらに、本発明は、(17)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検出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、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、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、t-ブチルフェノールおよびp-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノールのそれぞれについて所定量を所定期間生体または脾臓由来の細胞試料に投与(曝露)するステップと、

20

(B) 前記生体の脾臓組織または前記脾臓由来の前記細胞試料からmRNAを単離して、下記のGenBank登録番号で塩基配列が特定される生体応答遺伝子群：

30

(1) NM_012887、(2) NM_080581、(3) S78284、(4) NM_001029917、(5) U72350、(6) NM_134411、(7) NM_031776、(8) NM_001037095、(9) NM_133560、(10) NM_012713、(11) NM_001105833、(12) J02934、(13) NM_017301、(14) NM_012734、(15) NM_001106134、(16) NM_198743、(17) NM_019227、(18) NM_017226、(19) NM_022597、(20) NM_134395、(21) NM_001107958、(22) NM_053582、(23) NM_001106847、(24) NM_012899、(25) AF367448、(26) BF544079、(27) AF039218、(28) NM_033651、(29) XM_577816、(30) NM_031008、(31) NM_001109159、(32) NM_001012166、(33) AW434086、(34) XM_222462、(35) NM_001004203、(36) NM_021262、(37) X73371、(38) U95113、(39) NM_001009645、(40) NM_012955、(41) NM_022637、(42) BC168943、(43) NM_023022、(44) NM_139186、(45) AJ003004、(46) NM_133294、(47) NM_012716、(48) NM_001105822、(49) BF411776、(50) NM_012624、(51) XM_226431、(52) NM_133285、(53) NM_001014843、(54) NM_031695、(55) M88595、(56) J05181、(57) NM_012915、(58) D50564、(59) NM_024127、(60) AF184893、(61) NM_080582、(62) U10188、(63) NM_080889、(64) NM_053707、(65) NM_001130497、(66) NM_053358、(67) NM_022539、(68) NM_031740、(69) NM_022798、(70) NM_001106825、(71) XM_233453、(72) NM_152790、(73) NM_030851、(74) NM_001000856、(75) NM_022245、(76) NM_001106856、(77) NM_022540、(78) NM_017312、(79) NM_053983、(80) Y00350、(

40

50

8 1) NM_001013236、 (8 2) NM_021590、 (8 3) NM_001013996、 (8 4) AB021980、
 (8 5) NM_022588、 (8 6) NM_001011904、 (8 7) L06040、 (8 8) XM_227612、 (8
 9) XM_228464、 (9 0) M58040、 (9 1) M22642、 (9 2) NM_001105968、 (9 3) NM_
 001109227、 (9 4) X76452、 (9 5) NM_017168、 (9 6) NM_019263、 (9 7) NM_0310
 10、 (9 8) NM_022381、 (9 9) D14015、 (1 0 0) NM_030826、 (1 0 1) NM_012568
 、 (1 0 2) NM_022505、 (1 0 3) NM_053959、 (1 0 4) NM_022533、 (1 0 5) S7543
 7、 (1 0 6) NM_019354、 (1 0 7) NM_001107529、 (1 0 8) NM_001110487、 (1 0 9
) NM_012520、 (1 1 0) L41686、 (1 1 1) L26268、 (1 1 2) NM_017169、 (1 1 3)
 NM_019186、 (1 1 4) NM_133296、 (1 1 5) AF026472、 (1 1 6) M75146、 (1 1 7)
 Y00047、 (1 1 8) NM_138853、 (1 1 9) NM_022647、 (1 2 0) XM_220618、 (1 2 1
) NM_175577、 (1 2 2) NM_001002016、 (1 2 3) NM_020091、 (1 2 4) NM_012964、
 (1 2 5) NM_012491、 (1 2 6) D25233、 (1 2 7) AJ251299、 (1 2 8) AF035951、
 (1 2 9) NM_001105796、 (1 3 0) NM_023021、 (1 3 1) U10455、 (1 3 2) X99257
 、 (1 3 3) NM_012507、 (1 3 4) NM_019296、 (1 3 5) AF095576、 (1 3 6) NM_053
 688、 (1 3 7) NM_001011955、 (1 3 8) NM_053749、 (1 3 9) NM_017038、 (1 4 0
) NM_001107823、 (1 4 1) AF036548、 (1 4 2) NM_053439、 (1 4 3) NM_001106787
 、 (1 4 4) NM_001034133、 (1 4 5) NM_001106601、 (1 4 6) NM_022676、 (1 4 7
) NM_147135、 (1 4 8) NM_017166、 (1 4 9) NM_053818、 (1 5 0) NM_022274、 (1
 5 1) X57018、 (1 5 2) NM_017258、 (1 5 3) NM_172009、 (1 5 4) Y13380、 (1 5
 5) NM_134472、 (1 5 6) NM_001100992、 (1 5 7) NM_001100986、 (1 5 8) NM_0130
 96、 (1 5 9) NM_012511、 (1 6 0) M21782、 (1 6 1) NM_053592、 (1 6 2) NM_001
 007742、 (1 6 3) NM_001106547、 (1 6 4) NM_019346、 (1 6 5) NM_133567、 (1 6
 6) D89731、 (1 6 7) NM_012925、 (1 6 8) X76697、 (1 6 9) NM_024356、 (1 7 0
) NM_022706、 (1 7 1) X54467、 (1 7 2) NM_017187、 (1 7 3) NM_001008882、 (1
 7 4) NM_052805、 (1 7 5) X07365、 (1 7 6) NM_001100723、 (1 7 7) NM_138873、
 (1 7 8) AF090348、 (1 7 9) NM_012690、 (1 8 0) NM_053730、 (1 8 1) NM_00101
 2028、 (1 8 2) NM_001025691、 (1 8 3) NM_001025411、 (1 8 4) NM_001126270、 (1
 8 5) NM_012764、 (1 8 6) NM_001135875、 (1 8 7) M21210、 (1 8 8) D87212、
 (1 8 9) NM_001013120、 (1 9 0) NM_001001286、 (1 9 1) NM_001024242、 (1 9 2
) NM_001013859、 (1 9 3) NM_053820、 (1 9 4) U22893、 (1 9 5) NM_134353、 (1
 9 6) U97667、 (1 9 7) NM_022615、 (1 9 8) NM_019179、 (1 9 9) NM_001109537、
 (2 0 0) NM_001108304、 (2 0 1) NM_001017491、 (2 0 2) NM_001106192、 (2 0 3
) AF410926、 (2 0 4) NM_013069、 (2 0 5) NM_019283、 (2 0 6) NM_053598、 (2
 0 7) NM_001012460、 (2 0 8) NM_001009600、 (2 0 9) NM_012778、 (2 1 0) NM_02
 2391、 (2 1 1) NM_001107882、 (2 1 2) NM_001008510、 (2 1 3) NM_001106460、 (2
 1 4) NM_001127523、 (2 1 5) NM_017305、 (2 1 6) V01226、 (2 1 7) J00750、
 (2 1 8) NM_012766、 (2 1 9) NM_019205

10

20

30

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ステップと、

(C) (B) で得られた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である。

【 0 0 2 4 】

さらに、 (1 8) 前記生体応答遺伝子が少なくとも5個以上であることが望ましく、 (1 9) 前記生体応答遺伝子が少なくとも10個以上であることがより望ましい。また、 (2 0) 前記生体応答遺伝子が少なくとも20個以上であることがさらに望ましく、 (2 1) 前記生体応答遺伝子が少なくとも50個以上であることがさらにより望ましい。

【 0 0 2 5 】

さらに、 (2 2) 上記 (1 7) ~ (2 1) において、前記生体応答遺伝子は、マウス、ラット、イヌ、サルまたはヒトにそれぞれ対応するホモログ、パラログまたはオーソログ

40

50

であってもよい。

【0026】

更に、(23) 上記(17)～(22)において、前記脾臓組織または前記細胞試料は、マウス、ラット、イヌ、サルまたはヒト由来であってもよい。

【0027】

更に、(24) 上記(17)～(22)において、前記遺伝子発現レベルの測定は、RT-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つを用いることで決定されてもよい。

【0028】

更に、(25) 上記(24)において、前記ハイブリダイゼーション法が、マイクロアレイ法又はプロット法であってもよく、(26) 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ってもよい。

【0029】

また、(27) 上記(10)において、前記ヌクレオチドは、mRNA、cDNA、合成オリゴヌクレオチドであってもよく、さらに、(28) 前記ヌクレオチドは、標識化ヌクレオチドであってもよい。

【0030】

さらに、上記(17)～(23)において、(29) 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の存在もしくは量を測定することで決定されてもよい。

【0031】

また、上記(17)～(23)において、(30) 前記タンパク質の存在もしくは量の測定を免疫学的方法によって行ってもよく、(31) 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ってもよい。また、(32) 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、および抗体フラグメントから選択されてもよい。

【0032】

さらに、本発明は、(33) 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検出・予測する方法であって、

(A) 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、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、ヒドラジーン水和物、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、-t-ブチルフェノールおよびp-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノールのそれぞれについて所定量を一定期間生体または脾臓由来の細胞試料に投与(曝露)するステップと、

(B) 前記生体由来の脾臓組織または前記脾臓由来の前記細胞試料からmRNAを単離して、下記のGenBank登録番号で塩基配列が特定される生体応答遺伝子群：

(1) NM_012887、(2) NM_080581、(3) S78284、(4) NM_001029917、(5) U72350、(6) NM_134411、(7) NM_031776、(8) NM_001037095、(9) NM_133560、(10) NM_012713、(11) NM_001105833、(12) J02934、(13) NM_017301、(14) NM_012734、(15) NM_001106134、(16) NM_198743、(17) NM_019227、(18) NM_017226、(19) NM_022597、(20) NM_134395、(21) NM_001107958、(22) NM_0

10

20

30

40

50

53582、 (2 3) NM_001106847、 (2 4) NM_012899、 (2 5) AF367448、 (2 6) BF5440
79、 (2 7) AF039218、 (2 8) NM_033651、 (2 9) XM_577816、 (3 0) NM_031008、
(3 1) NM_001109159、 (3 2) NM_001012166、 (3 3) AW434086、 (3 4) XM_222462
、 (3 5) NM_001004203、 (3 6) NM_021262、 (3 7) X73371、 (3 8) U95113、 (3
9) NM_001009645、 (4 0) NM_012955、 (4 1) NM_022637、 (4 2) BC168943、 (4 3
) NM_023022、 (4 4) NM_139186、 (4 5) AJ003004、 (4 6) NM_133294、 (4 7) NM_
012716、 (4 8) NM_001105822、 (4 9) BF411776、 (5 0) NM_012624、 (5 1) XM_22
6431、 (5 2) NM_133285、 (5 3) NM_001014843、 (5 4) NM_031695、 (5 5) M88595
、 (5 6) J05181、 (5 7) NM_012915、 (5 8) D50564、 (5 9) NM_024127、 (6 0)
AF184893、 (6 1) NM_080582、 (6 2) U10188、 (6 3) NM_080889、 (6 4) NM_05370 10
7、 (6 5) NM_001130497、 (6 6) NM_053358、 (6 7) NM_022539、 (6 8) NM_031740
、 (6 9) NM_022798、 (7 0) NM_001106825、 (7 1) XM_233453、 (7 2) NM_152790
、 (7 3) NM_030851、 (7 4) NM_001000856、 (7 5) NM_022245、 (7 6) NM_0011068
56、 (7 7) NM_022540、 (7 8) NM_017312、 (7 9) NM_053983、 (8 0) Y00350、 (8
1) NM_001013236、 (8 2) NM_021590、 (8 3) NM_001013996、 (8 4) AB021980、
(8 5) NM_022588、 (8 6) NM_001011904、 (8 7) L06040、 (8 8) XM_227612、 (8
9) XM_228464、 (9 0) M58040、 (9 1) M22642、 (9 2) NM_001105968、 (9 3) NM_
001109227、 (9 4) X76452、 (9 5) NM_017168、 (9 6) NM_019263、 (9 7) NM_0310
10、 (9 8) NM_022381、 (9 9) D14015、 (1 0 0) NM_030826、 (1 0 1) NM_012568
、 (1 0 2) NM_022505、 (1 0 3) NM_053959、 (1 0 4) NM_022533、 (1 0 5) S7543 20
7、 (1 0 6) NM_019354、 (1 0 7) NM_001107529、 (1 0 8) NM_001110487、 (1 0 9
) NM_012520、 (1 1 0) L41686、 (1 1 1) L26268、 (1 1 2) NM_017169、 (1 1 3)
NM_019186、 (1 1 4) NM_133296、 (1 1 5) AF026472、 (1 1 6) M75146、 (1 1 7)
Y00047、 (1 1 8) NM_138853、 (1 1 9) NM_022647、 (1 2 0) XM_220618、 (1 2 1
) NM_175577、 (1 2 2) NM_001002016、 (1 2 3) NM_020091、 (1 2 4) NM_012964、
(1 2 5) NM_012491、 (1 2 6) D25233、 (1 2 7) AJ251299、 (1 2 8) AF035951、
(1 2 9) NM_001105796、 (1 3 0) NM_023021、 (1 3 1) U10455、 (1 3 2) X99257
、 (1 3 3) NM_012507、 (1 3 4) NM_019296、 (1 3 5) AF095576、 (1 3 6) NM_053
688、 (1 3 7) NM_001011955、 (1 3 8) NM_053749、 (1 3 9) NM_017038、 (1 4 0
) NM_001107823、 (1 4 1) AF036548、 (1 4 2) NM_053439、 (1 4 3) NM_001106787 30
、 (1 4 4) NM_001034133、 (1 4 5) NM_001106601、 (1 4 6) NM_022676、 (1 4 7
) NM_147135、 (1 4 8) NM_017166、 (1 4 9) NM_053818、 (1 5 0) NM_022274、 (1
5 1) X57018、 (1 5 2) NM_017258、 (1 5 3) NM_172009、 (1 5 4) Y13380、 (1 5
5) NM_134472、 (1 5 6) NM_001100992、 (1 5 7) NM_001100986、 (1 5 8) NM_0130
96、 (1 5 9) NM_012511、 (1 6 0) M21782、 (1 6 1) NM_053592、 (1 6 2) NM_001
007742、 (1 6 3) NM_001106547、 (1 6 4) NM_019346、 (1 6 5) NM_133567、 (1 6
6) D89731、 (1 6 7) NM_012925、 (1 6 8) X76697、 (1 6 9) NM_024356、 (1 7 0
) NM_022706、 (1 7 1) X54467、 (1 7 2) NM_017187、 (1 7 3) NM_001008882、 (1
7 4) NM_052805、 (1 7 5) X07365、 (1 7 6) NM_001100723、 (1 7 7) NM_138873、
(1 7 8) AF090348、 (1 7 9) NM_012690、 (1 8 0) NM_053730、 (1 8 1) NM_00101 40
2028、 (1 8 2) NM_001025691、 (1 8 3) NM_001025411、 (1 8 4) NM_001126270、 (1
8 5) NM_012764、 (1 8 6) NM_001135875、 (1 8 7) M21210、 (1 8 8) D87212、
(1 8 9) NM_001013120、 (1 9 0) NM_001001286、 (1 9 1) NM_001024242、 (1 9 2
) NM_001013859、 (1 9 3) NM_053820、 (1 9 4) U22893、 (1 9 5) NM_134353、 (1
9 6) U97667、 (1 9 7) NM_022615、 (1 9 8) NM_019179、 (1 9 9) NM_001109537、
(2 0 0) NM_001108304、 (2 0 1) NM_001017491、 (2 0 2) NM_001106192、 (2 0 3
) AF410926、 (2 0 4) NM_013069、 (2 0 5) NM_019283、 (2 0 6) NM_053598、 (2
0 7) NM_001012460、 (2 0 8) NM_001009600、 (2 0 9) NM_012778、 (2 1 0) NM_02
2391、 (2 1 1) NM_001107882、 (2 1 2) NM_001008510、 (2 1 3) NM_001106460、 (2
1 4) NM_001127523、 (2 1 5) NM_017305、 (2 1 6) V01226、 (2 1 7) J00750、 50

(2 1 8) NM_012766、(2 1 9) NM_019205

のうちから少なくとも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ステップと、

(C) (B) で得られた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脾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脾臓組織または前記脾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検出・予測方法である。

【 0 0 3 3 】

さらに、(3 4) 前記生体応答遺伝子が少なくとも5個以上であることが望ましく、(3 5) 前記生体応答遺伝子が少なくとも10個以上であることがより望ましい。また、(3 6) 前記生体応答遺伝子が少なくとも20個以上であることがさらに望ましく、(3 7) 前記生体応答遺伝子が少なくとも50個以上であることがさらにより望ましい。

【 0 0 3 4 】

さらに、(3 8) 上記 (3 3) ~ (3 7) において、前記生体応答遺伝子は、マウス、ラット、イヌ、サルまたはヒトにそれぞれ対応するホモログ、パラログまたはオーソログであってもよい。

【 0 0 3 5 】

更に、(3 9) 上記 (3 3) ~ (3 8) において、前記脾臓組織または前記細胞試料は、マウス、ラット、イヌ、サルまたはヒト由来であってもよい。

【 0 0 3 6 】

更に、(4 0) 上記 (3 3) ~ (3 9) において、前記遺伝子発現レベルの測定は、RT-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つを用いることで決定されてもよい。

【 0 0 3 7 】

更に、(4 1) 上記 (4 0) において、前記ハイブリダイゼーション法が、マイクロアレイ法又はプロット法であってもよく、(4 2) 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ってもよい。

【 0 0 3 8 】

また、(4 3) 上記 (4 2) において、前記ヌクレオチドは、mRNA、cDNA、合成オリゴヌクレオチドであってもよく、さらに、(4 4) 前記ヌクレオチドは、標識化ヌクレオチドであってもよい。

【 0 0 3 9 】

さらに、上記 (3 3) ~ (3 9) において、(4 5) 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の存在もしくは量を測定することで決定されてもよい。

【 0 0 4 0 】

また、上記 (3 3) ~ (3 9) において、(4 6) 前記タンパク質の存在もしくは量の測定を免疫学的方法によって行ってもよく、(4 7) 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ってもよい。また、(4 8) 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、および抗体フラグメントから選択

10

20

30

40

50

されてもよい。

【0041】

また、本発明は(49)上記(1)～(48)において用いられるプローブを含むキットであって、該プローブが、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化学物質の毒性検出・予測キットである。

【0042】

さらに、(50)上記(49)において、前記プローブは、ヌクレオチド又はタンパク質であってもよい。

【0043】

また、(51)上記(50)において、前記ヌクレオチドはmRNA、cDNA、合成オリゴヌクレオチドであってもよい。

【0044】

さらに、(52)上記(50)または(51)において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、10～100merであってもよい。

【0045】

また、(53)上記(50)～(52)において、前記ヌクレオチドは、標識化ヌクレオチドであってもよい。

【0046】

さらに、(54)上記(49)または(50)において、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ってもよい。

【0047】

また、(55)上記(49)～(54)において、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んでいてもよい。

【0048】

さらに、(56)上記(55)において、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ってもよい。

【発明の効果】

【0049】

本発明によれば、化学物質をラットに28日間反復投与した後の脾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】

【0050】

【図1】対照群および2-ブタノンオキシム投与群のラットの各個体における脾臓の相対重量(脾臓重量/体重×100)(%)をグラフに表している。縦軸は脾臓相対重量(%)を、横軸はラットの各個体を表している。対照1、対照2、および対照3は蒸留水を投与した対照群のラットを、投与群1、投与群2、および投与群3は2-ブタノンオキシムを投与したラットを表している。また、棒グラフの上の数値は、ラットの各個体における脾臓相対重量の値を示している。

【図2】階層的クラスタ分析の結果を表す。本件発明によって特定された219遺伝子の発現レベルを対照群(3個体)および2-ブタノンオキシム投与群(3個体)のラットの脾臓の遺伝子発現プロファイルから抽出し、それらの発現レベルのデータにより2次元の階層的クラスタ分析を行った。左の3つのカラムが対照群を、右の3つのカラムが2-ブタノンオキシム投与群である。さらに、図中右側のカラムは遺伝子数を表示している。

【図3】階層的クラスタ分析の結果を表す。本件発明によって特定された219遺伝子の発現レベルを対照群(16個体)および30種類の化学物質をそれぞれ28日間反復投与したラットの脾臓の遺伝子発現プロファイルから抽出し、それらの発現レベルのデータにより2次元の階層的クラスタ分析を行った。上段のアルファベットおよび数値は、それぞれ

10

20

30

40

50

「C」は対照群を、「1」は2-ブタノンオキシムを、「2」はm-キシリレンジアミンを、「3」は3-シアノピリジンを、「4」は2-(2-アミノエチルアミノ)エタノールを、「5」はテトラヒドロフルフリルアルコールを、「6」はメタクリルアミドを、「7」はスルホランを、「8」は2-イソプロポキシエタノールを、「9」はヒドラジーン-水和水物を、「10」は4-エチルモルホリンを、「11」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、「12」は塩化ベンジルトリメチルアンモニウムを、「13」はm-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムを、「14」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、「15」は3-メトキシ-3-メチル-1-ブタノールを、「16」はo-ジクロロベンゼンを、「17」は3,4-キシリジンを、「18」はN-メチルアニリンを、「19」はトリレンジイソシアナートを、「20」は2-(ジブチルアミノ)エタノールを、「21」はp-クミルフェノールを、「22」はm-クレゾールを、「23」は2,3-ジメチルアニリンを、「24」はN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミドを、「25」はフタル酸ジヘプチルを、「26」はテトラプロモエタンを、「27」はアジピン酸ジブチルを、「28」はP-エチルフェノールを、「29」は-t-ブチルフェノールを、「30」はp-(1,1,3,3,-テトラメチルブチル)フェノールを投与したラットの脾臓サンプルであることを表している。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0051】

他に特に規定されない限り、本明細書中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。

【0052】

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

【0053】

本発明の化学物質が生体に与える影響を判別する方法としては、化学物質を28日間反復投与した後の脾臓に存在する本件生体応答遺伝子群から選ばれる遺伝子の発現を検出する方法や、該遺伝子に対応するポリペプチドまたはタンパク質を検出する方法であれば特に制限されない。

【0054】

本明細書中における「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。これらの検出又は定量には、生体応答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。生体応答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、生体応答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またはホモログを用いてもよい。

【0055】

生体応答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、生体応答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、またはPCR法を用いることができる。PCR法として、RT-PCR法、リアルタイムPCR法、コンペティティブPCR法を挙げることができる。

【0056】

「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。

【0057】

「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。

【0058】

本明細書中、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。

【0059】

また、本明細書中、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。

10

【0060】

「候補化合物」とは、その毒性について試験される任意の化合物を指す。

【0061】

「化合物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、化合物により処理されたことを意味する。

【0062】

「脾臓毒性」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脾臓の不全もしくは機能障害を意味する。

【0063】

「毒性作用」とは、化合物の存在に起因する、生体、臓器系、各臓器、組織、細胞、また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、または細胞もしくは臓器の壊死のような攪乱であり得る。

20

【0064】

「試料」には、好ましくは脾臓の生検材料、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。

【0065】

本明細書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。

30

【0066】

「候補薬剤」には、タンパク質もしくはそのフラグメント、抗体、小分子の阻害剤もしくはアゴニスト、核酸分子、たとえば、アンチセンスヌクレオチド、リボザイム、二重鎖RNA、有機および無機化合物等のような天然のまたは合成の分子を含む。

【0067】

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、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法、LAMP法、nCounter Analysis systemまたはPCR法を用いることができる。PCR法として、RT-PCR法、リアルタイムPCR法、コンペティティブPCR法を挙げることができる。

40

【0068】

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、または抗体アレイ等が挙げられる。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。

【0069】

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。

【0070】

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 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^3\text{P}]$ 、 $[^3\text{S}]$ 、酵素である β -ガラクトシダ

50

ーゼ、ーグルコシダーゼ、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、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。

【0071】

また、上記リアルタイムPCR法としては、例えば、組織内又は細胞内のトータル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TapManプローブが用いられる。

【0072】

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。

10

【0073】

なお、DNAマイクロアレイとは、生体応答遺伝子セット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。

【0074】

DNAマイクロアレイやDNAチップの使用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。

20

【0075】

DNAマイクロアレイやDNAチップに用いるプローブはcDNAでも合成オリゴDNAでも構わない。

30

【0076】

DNAマイクロアレイやDNAチップの使用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、本件生体応答遺伝子の有無を検出したり、発現レベルを測定することにより、化学物質が生体に与える影響の判別または予測を行うことができる。

【0077】

本件生体応答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転写産物であり、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。

40

【0078】

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

50

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。

【0079】

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、PIA法、ELISA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。

【0080】

上記判定の基準としては、被検試料中に存在する本件生体応答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）よりも高いことを用いる。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。

【0081】

検定方法はt検定に限定されるものではなく、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。

【0082】

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本件生体応答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。

【0083】

ラットの種類は特に限定されるものではなく、例えば、Sprague Dawley、Wistarラットなどでもよく、雄でも雌でも構わない。さらには、ラットでなくてもよく、例えば、マウスを用いることもできる。

【0084】

遺伝子発現レベルの変化には特定の化合物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。

【0085】

生体応答遺伝子セットに含まれる遺伝子は、ヒト、ラット、マウス、また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、生体応答遺伝子セットに含まれる遺伝子は、ラットまたはマウスにおいてマーカーとして用いられる。

【0086】

以下、実施例により本発明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】

【0087】

本発明の毒性判定方法に用いられる本件遺伝子セットに含まれる遺伝子は、化学物質2-ブタノンオキシム（100mg/kg）（和光純薬株式会社製）をSprague Dawleyラット（日本チャールス・リバー社製）に28日間反復投与することにより脾臓で発現レベルが著しく変化した遺伝子である。

【0088】

化学物質2-ブタノンオキシムをラットに28日間反復投与することにより、脾臓重量は有意（ $P < 0.01$ ）に増加した（図1）。

【0089】

本発明で用いられる219種の遺伝子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。

【0090】

[遺伝子発現データベース]

本発明の遺伝子発現データベースを作成するには、

10

20

30

40

50

- (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。

という工程によりなされる。

【0091】

[動物試験]

10

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において脾臓腫大および髄外造血を引き起こすことが報告されている化学物質2-ブタノンオキシム(100mg/kg)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、化学物質2-ブタノンオキシムを溶解した蒸留水(大塚製薬社製)を28日間反復してSprague Dawleyラット(6週齢、雄)に経口投与した。28日間の反復投与後、ラットから脾臓を採取し、速やかに液体窒素で凍結させた。凍結させた脾臓組織はISOGEN(ニッポンジーン社製)を用いて粉碎した。なお、動物試験は28日間に制限されることはなく、数日間でもよい。

【0092】

[全RNAの抽出]

20

脾臓組織からの全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。

【0093】

[核酸検体の調製]

検体用mRNAの調製は、脾臓組織から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。

【0094】

[マイクロアレイの作製]

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する。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。

30

【0095】

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、更にUVクロスリンカー(Hoefer社製、UVC500)を用いて120 mJの紫外線を照射した。

【0096】

[マイクロアレイの後処理]

40

マイクロアレイの後処理については、公開特許公報(特開2004-233105)記載の方法により行った。

【0097】

[核酸検体の調製]

検体用mRNAは、脾臓組織から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。

【0098】

[標識cDNAの合成]

該mRNA1.5 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

50

ク社製)、逆転写酵素SuperScriptII(インビトロジェン社製)、Cyanine 5-deoxyuridin etriphosphate(Cyanine 5-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-deoxyuridin etriphosphate(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。

【0099】

[標識プローブの作製]

これらの標識cDNA、すなわち、Cyanine5-dUTPで標識した検体および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、Micropure EZ(ミリポア社製)およびMicrocon YM30(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および純水を用いて15 μ lに調製した。

【0100】

[ハイブリダイゼーション]

該溶液を99 $^{\circ}$ Cで5分間加熱して熱変性させた後に、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 $^{\circ}$ Cで20時間、静置した状態で保温した。

【0101】

[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。

【0102】

[蛍光強度の検出および数値化]

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、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く。そして、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う。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する。

【0103】

[統計学的処理]

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、2-ブタノンオキシムを28日間反復投与したラットの脾臓と対照群のラットの脾臓において、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。その結果、両群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219種類の遺伝子を同定した(表1~4)。表中の「Name」の欄には対象となる遺伝子の遺伝子名を、「ID」の欄には対象となる遺伝子のGenBankの登録番号(アクセッション番号)を示している。また、「対照1」、「対照2」および「対照3」は対照群のラットであることを表しており、それぞれ個体が異なることを示している。さらに、「投与群1」、「投与群2」および「投与群3」は2-ブタノンオキシムを28日間反復投与したラ

10

20

30

40

50

ットであることを表しており、それぞれ個体が異なることを示している。また、数値は各個体における各遺伝子の発現レベル比（底を2とする対数比）を表している。

【0104】

【表1】

Name	ID	対照1	対照2	対照3	投与群1	投与群2	投与群3
thymopoietin	NM 012887	0.8249	0.7947	0.7494	2.4997	2.5274	2.5639
ATP-binding cassette, sub-family C, member 3	NM 080581	-0.179	-0.2295	-0.265	1.2543	1.3285	1.3333
bcl-xshort:apoptosis inducer	S78284	-0.1332	-0.1086	-0.2363	1.644	1.7493	1.6257
mediator of cell motility 1	NM 001029917	0.2484	0.3305	0.1938	1.8208	1.9344	1.8692
Bcl-xalpha	U72350	-0.2472	-0.2123	-0.3623	1.5369	1.6022	1.4311
RAB3A interactor protein-like 1	NM 134411	0.355	0.3079	0.3301	1.8641	1.9247	1.8269
guanine deaminase	NM 031776	-0.1347	-0.0462	-0.2599	1.713	1.8138	1.6587
coproporphyrinogen oxidase	NM 001037095	0.0941	0.1472	-0.1313	2.9498	2.6348	2.9617
trafficking protein, kinesin binding 2	NM 133560	0.3635	0.497	0.1496	3.3983	3.5671	3.1407
protein kinase C, beta, transcript variant 1	NM 012713	2.685	2.7309	2.8358	1.7472	1.6609	1.7972
phosphatase, orphan 1	NM 001105833	-1.808	-1.824	-2.0914	0.2668	0.2419	-0.003
cAMP-dependent protein kinase type II regulatory subunit	J02934	-0.9383	-1.0927	-1.0584	0.295	0.3869	0.3413
sphingosine-1-phosphate receptor 1	NM 017301	2.3896	2.3887	2.5157	1.3633	1.3094	1.476
hexokinase 1	NM 012734	-0.7493	-0.8922	-0.9909	0.7342	0.5599	0.8281
similar to RBKEN cDNA 2810433K01	NM 001108134	-1.2279	-1.0448	-1.1281	0.0344	-0.0345	-0.1022
Bax1 leukemia-related gene	NM 198749	0.2893	0.4035	0.2081	1.4418	1.2626	1.4001
intersectin 1, transcript variant 2	NM 019227	-0.2343	-0.2438	-0.4744	1.1007	0.9441	0.879
postbityl arginine deiminase, type II	NM 017226	-0.5122	-0.3324	-0.7054	1.3691	1.3082	1.0657
cathepsin B	NM 022597	0.1991	-0.0146	-0.1035	1.5099	1.435	1.6605
transmembrane protein 14C, transcript variant 1	NM 134395	0.3126	0.0864	-0.1096	2.2443	1.8625	2.0938
T-cell acute lymphocytic leukemia 1	NM 001107958	0.2252	0.4076	-0.048	2.7089	3.2982	2.9418
tubulointerstitial nephritis antigen-like 1	NM 053582	-0.2603	-0.3444	-0.2396	0.9263	1.0888	0.8932
transcription factor Dc-2	NM 001106847	0.122	0.1665	-0.4087	3.1509	2.5484	2.916
aminolevulinatase, delta-, dehydratase	NM 012899	-1.2935	-0.7407	-1.3495	1.9294	1.3869	1.9512
cyclin A2	AF367448	0.4849	0.9683	0.5246	3.2779	2.7403	3.1589
UI-R-E0-dd-d-05-0-UIr1 UI-R-E0	BF544079	0.4829	0.2871	0.5007	2.6043	2.2076	2.483
postsynaptic density protein (citron)	AF039218	-0.489	-0.1573	-0.422	1.8653	2.0953	1.5877
minichromosome maintenance complex component 4	NM 033651	0.0258	0.2194	0.185	1.2086	1.1082	1.3708
PREDICTED: similar to STAR-related protein 1-4E	XM 577816	-0.0773	0.0056	-0.2892	1.1573	1.3371	1.1736
adaptor-related protein complex 2, alpha 2 subunit	NM 031008	-0.524	-0.3023	-0.2263	1.0979	0.9035	1.0349
HCCA2 protein	NM 001109159	0.0825	-0.1086	-0.136	1.2246	0.9409	1.0677
ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 10	NM 001012166	-0.0304	-0.1999	-0.1804	3.1805	2.7447	2.8206
Clone UI-R-BjOp-afd-b-02-0-UI	AH434086	0.3603	0.357	-0.1282	2.8501	2.7062	3.0273
PREDICTED: similar to M2 ribonucleotide reductase	XM 222462	0.7801	0.5512	0.994	2.8777	2.9051	2.8982
minichromosome maintenance deficient 7	NM 001004203	0.2576	0.2705	0.2818	1.4904	1.4224	1.5442
acid phosphatase 1, soluble (Acp1), transcript variant 1	NM 021262	-0.0193	-0.1693	-0.2908	1.7534	1.685	2.1036
Fc gamma receptor	X73371	2.0767	1.9094	2.1331	0.8803	0.6313	0.9316
histone H2a gene	U95113	-0.2801	0.2794	-0.2081	2.6189	2.079	2.2066
kinesin family member 22	NM 001009645	-0.3395	-0.1144	-0.4823	1.1969	0.9481	1.1959
centromere protein 1	NM 012955	0.1482	0.3974	0.5646	2.0729	1.8204	2.0921
ventral anterior homeobox 2	NM 022637	-0.6365	-0.4469	-0.7217	0.5487	0.654	0.364
biliverdin reductase B	BC168943	0.4839	0.1325	-0.3005	2.4149	1.9063	2.2632
Rh-associated glycoprotein	NM 023022	0.372	0.9517	-0.1454	4.7908	3.8981	4.8801
Mki67 (FHA domain) interacting nucleolar phosphoprotein	NM 139186	1.2134	1.5826	1.0096	3.4972	3.2591	3.872
ABC transporter	AJ003004	-1.2505	-1.5164	-1.3974	-0.2444	0.0996	0.0511
hemogen	NM 133294	0.1258	0.2959	-0.3825	3.4556	2.9104	2.6151
solute carrier family 16, member 1	NM 012716	-0.4909	-0.0517	-0.653	2.1255	1.5812	1.6878
chemokine (C-C motif) ligand 12	NM 001105822	1.4946	1.3685	0.8324	3.979	3.4291	3.6558
Clone UI-R-BT1-bmw-a-04-0-UI	BF411776	-2.842	-2.5436	-3.0792	0.4396	0.2741	0.4268
pyruvate kinase, liver and RBC	NM 012624	-2.6666	-2.5834	-2.71	0.0417	0.0528	-0.3073
similar to beta-1,3-galactosyltransferase-related protein (predicted)	XM 226431	-0.1213	-0.4036	-0.2736	1.2785	1.1766	1.2651
histone cluster 1, H1d	NM 133285	0.0312	0.8047	0.305	3.4795	2.8852	2.8492
Fas apoptotic inhibitory molecule 3 (Faim3)	NM 001014843	3.1556	3.2764	3.5184	1.8633	1.9477	2.216
ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 2	NM 031695	-0.4123	-0.6986	-0.2599	1.2794	1.4525	1.4867
glycine transporter	M86595	-1.0193	-0.486	-1.1407	1.6382	1.5905	1.1187

10

20

【0105】

【表 2】

Name	ID	対照1	対照2	対照3	投与群1	投与群2	投与群3
gamma-glutamylcysteine synthetase	JO5181	-0.5181	-0.7273	-0.8137	1.1188	0.6716	0.8578
ATPase inhibitory factor 1	NM 012915	-0.1775	-0.3123	-0.5186	1.3651	1.2354	1.359
mercaptopyruvate sulfurtransferase	D50564	-1.1682	-1.4305	-1.6198	1.0057	0.4045	0.5944
growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	NM 024127	-0.4417	-0.4378	-0.8724	1.6835	1.3106	1.0955
ribosomal protein S271	AF184893	1.1056	1.2263	1.0293	0.1152	-0.025	0.2699
ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 6	NM 080582	-1.5946	-1.2598	-1.2927	-0.0115	-0.0632	-0.3528
polo like kinase	U10188	0.2063	-0.0173	-0.2515	1.6686	1.3595	1.5191
interleukin 2 receptor, gamma	NM 080889	3.0904	2.8796	3.1955	1.9141	1.8368	2.1562
hepatoma-derived growth factor	NM 053707	-0.4214	-0.6878	-0.5789	0.5126	0.5776	0.8648
patatin-like phospholipase domain containing 5	NM 001130497	0.1617	-0.1115	-0.2599	1.7061	1.6633	1.2456
single stranded DNA binding protein 3	NM 053358	-0.011	0.0839	-0.1066	1.3983	1.7401	1.4122
methionyl aminopeptidase 2	NM 022539	-0.1852	0.075	-0.3084	0.9818	1.2517	1.0525
UDP-GalbetaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 6	NM 031740	-1.2407	-1.0365	-1.3862	0.0604	-0.1426	-0.2667
tripartite motif-containing 17	NM 022798	-0.1438	0.1879	-0.7077	2.9688	2.253	2.4753
hypothetical LOC300751	NM 001106825	0.1106	-0.3173	-0.1724	2.5271	1.9251	1.9366
PREDICTED: erythroblast membrane-associated protein (predicted)	XM 233453	0.5648	1.1528	0.0514	4.8215	4.3844	3.6345
calcium regulated heat stable protein 1	NM 152790	0.0682	-0.2679	-0.2032	1.456	0.9991	1.3142
bradykinin receptor B1	NM 030851	0.384	0.4045	-0.0628	2.1868	1.7611	1.7083
olfactory receptor 386	NM 001000856	2.0058	2.5255	2.4822	0.7449	0.7697	0.3797
cytochrome b5 type A (microsomal)	NM 022245	-2.3069	-2.4161	-2.6024	-1.5245	-1.2632	-1.1496
ubiquitin-like modifier activating enzyme 7	NM 001106856	-3.077	3.245	3.182	1.712	1.7841	2.0507
peroxiredoxin 3	NM 022540	-0.5558	-0.9098	-0.5536	0.8579	0.6452	0.7255
BCL2-related ovarian killer	NM 017312	-3.3834	-3.1968	-3.9201	0.3835	0.2116	0.1781
CD52 antigen	NM 053983	0.6914	0.2882	0.0082	3.144	3.1466	3.3776
uroporphyrinogen decarboxylase	Y00350	-0.1529	0.1103	-0.5896	2.0986	1.5781	1.8476
ribonucleotide reductase M1	NM 001013236	-0.5458	-0.1261	-0.2634	1.2348	1.3432	1.1385
aryl hydrocarbon receptor-interacting protein-like 1	NM 021590	0.5206	0.1867	0.1521	1.8267	1.6378	1.7762
solute carrier family 25, member 37	NM 001013996	0.9191	1.3106	0.2522	4.6793	4.179	4.1653
delta-6 fatty acid desaturase	AB021980	-2.7843	-2.5049	-2.7288	-1.3357	-1.7259	-1.5808
metastasis associated 1	NM 022588	0.2904	0.4739	0.4946	2.4962	2.0239	2.4173
ring finger protein 10	NM 001011904	0.4817	0.209	-0.2279	2.5872	1.9429	2.1562
12-lipoxygenase	U06040	1.6846	1.3737	0.5491	4.6783	4.2618	5.4992
PREDICTED: solute carrier family 30 (zinc transporter), member 7	NM 227812	2.345	2.4756	2.5987	0.8751	0.3786	0.4556
PREDICTED: similar to Fus1 protein	XM 228464	-0.3069	-0.0643	-0.3169	1.3599	0.9395	1.3522
transferrin receptor	M58040	0.0096	-0.2195	-0.9918	3.3315	3.0129	2.8064
thymidine kinase	M22642	0.3399	0.3327	-0.2064	2.6096	2.3851	2.5942
protoporphyrinogen oxidase	NM 001105968	-0.0889	0.0583	-0.3751	1.7275	1.1463	1.4766
tetraspanin 33	NM 001109227	1.3241	1.2037	0.7553	3.9058	3.0808	3.3182
Rnorvegicus mRNA for calcium-pumping ATPase isoform 4	X76452	0.3192	0.5649	0.5988	1.931	2.0502	1.5901
phospholipase C, gamma 2	NM 017168	2.452	2.152	2.4855	1.2253	1.3673	1.4931
multiple inositol polyphosphate histidine phosphatase 1	NM 019263	-0.4068	-1.0587	-0.9666	0.8913	1.4253	0.94
arachidonate 15-lipoxygenase	NM 031010	1.7964	1.5355	0.6405	4.808	4.9289	5.4282
proliferating cell nuclear antigen	NM 022381	0.2181	-0.0615	-0.2097	1.8443	1.735	1.7074
cyclin E	D14015	-0.4548	-0.3615	-0.6286	1.7494	1.1691	1.43
glutathione peroxidase 1	NM 030826	0.3507	0.146	-0.016	1.9341	2.0029	1.932
glycine receptor, alpha 2	NM 012568	0.6466	0.7713	0.0799	3.0759	2.9092	2.7228
Rh blood group, D antigen	NM 022505	1.0792	1.5258	0.9961	3.2487	3.2679	3.0481
bridging integrator 1	NM 053959	1.9671	1.9725	2.1585	0.7467	0.836	1.116
plasma membrane proteolipid	NM 022533	-0.7107	-0.5377	-1.3532	1.3616	1.8617	1.0781
T-cell receptor gamma chain	S75437	3.0621	2.6309	2.6327	1.2405	0.6802	1.2511
uncoupling protein 2 (mitochondrial proton carrier)	NM 019354	1.1201	0.5187	0.8672	2.3388	2.2219	2.7329
protein regulator of cytokinesis 1	NM 001107529	0.5358	0.3799	-0.1251	2.3801	3.2153	2.0009
testis-specific serine kinase 4	NM 001110487	-0.1153	-0.4215	-0.0334	1.005	1.1895	1.0171
catalase	NM 012520	-1.4642	-1.6201	-1.4431	0.2531	0.213	-0.1674
(clone REM4) ORF mRNA	L41686	0.5433	0.066	0.7247	2.5013	2.1064	2.0056

10

20

30

40

【 0 1 0 6 】

【表 3】

Name	ID	対照1	対照2	対照3	投与群1	投与群2	投与群3
anti-proliferative factor	L26268	2.0207	1.8032	1.9749	0.4819	0.3916	0.8187
peroxiredoxin 2	NM 017169	0.6973	0.574	0.0362	3.4552	3.2913	3.258
ADP-ribosylation factor-like 4A	NM 019186	-1.3343	-1.0476	-1.5474	0.9113	1.0198	0.9324
solute carrier family 6	NM 133296	-0.0262	-0.1739	-0.3659	1.315	1.2288	0.8416
guanine aminohydrolase	AF026472	0.1482	0.2849	-0.407	1.7529	2.3066	1.78
kinesin light chain A	M75146	-0.5142	-0.2327	-0.7335	1.2284	1.3786	1.2054
cyclin (PCNA, proliferating cell nuclear antigen)	Y00047	0.1556	-0.1663	-0.3297	1.8526	1.2063	1.7038
UBX domain protein 11	NM 138853	-0.8893	-0.9508	-1.2685	0.2804	-0.0017	-0.132
histone cluster 1, H2bl	NM 022647	-0.8642	-0.2858	-1.5226	3.0191	2.5602	2.4124
PREDICTED: Y box protein 2 (predicted)	XM 220618	-2.0193	-2.2154	-2.6733	-0.2658	-0.8288	-0.7753
Cd6 molecule	NM 175577	1.2374	1.3268	0.8324	2.9386	2.7292	2.7716
lamin A (Lma), transcript variant 2	NM 001002016	-1.6797	-1.6325	-2.0614	0.2631	0.3007	0.3516
prochymosin	NM 020091	-1.9918	-2.4973	-1.9418	-0.6108	-0.3807	-0.7827
hyaluronan mediated motility receptor	NM 012964	-0.1258	0.0518	0	1.3881	1.0974	1.3107
adducin 2 (beta)	NM 012491	0.6466	0.622	0.2012	3.5386	2.6002	3.1263
retinoblastoma protein, partial sequence	D25235	0.6846	1.1707	0.9416	2.4272	1.9449	2.3881
mRNA for napsin (nap gene)	AJ251299	0.7381	0.8994	0.8538	-0.3565	-0.314	-0.0278
kinesin-related protein KRP1	AF035951	-0.2751	0.2904	-0.4431	2.3809	2.4149	2.125
ArtGAP with coiled-coil, amylin repeat and PH domains 1	NM 001105796	2.4093	2.0769	2.5323	1.0986	0.7773	1.4105
potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 4	NM 023021	0.7544	0.5576	0.5057	2.2082	2.065	1.718
Sprague-Dawley polydnavirus-binding protein-related protein mRNA, 5' end	U10455	-0.6731	-1.2825	-0.8415	0.9551	0.4045	0.4983
Rnorvegicus mRNA for lamin C2	X99257	-1.2215	-0.8456	-1.4744	0.2865	0.6253	0.2602
ATPase, Na+/K+ transporting, beta 2 polypeptide	NM 012507	-1.2215	-1.1483	-0.9445	-0.2251	0.1435	-0.2069
cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	NM 019296	-0.6688	-0.5894	-0.5453	1.8271	1.6138	1.2872
APS protein	AF095576	1.3071	1.1344	1.5413	-0.0698	0.3523	0.3276
phosphodiesterase 6H, cGMP-specific, cone, gamma	NM 053688	2.1881	2.5216	2.8074	1.0782	0.7652	1.2854
carbohydrate (keratan sulfate Gal-6) sulfotransferase 1	NM 001011955	1.7593	1.3507	1.6902	0.5282	0.2881	0.7263
aurora kinase B	NM 053749	0.1956	0.2182	0.1393	1.5624	1.3131	1.2693
protein phosphatase 1A, magnesium dependent, alpha isoform	NM 017038	-1.3002	-1.0672	-1.581	-0.1636	0.3193	-0.148
growth factor independent 1B transcription repressor	NM 001107823	0.1333	0.6114	-0.3623	2.781	2.3762	2.0479
RGC-32	AF036548	-1.0933	-0.6856	-1.5641	1.7978	1.7652	1.5054
RAN, member RAS oncogene family (Ran)	NM 053439	0.2587	0.1532	-0.1297	1.131	1.121	1.2966
Mov10l1, Moloney leukemia virus 10-like 1, homolog (mouse)	NM 001106787	1.2536	0.9683	0.2992	3.7484	3.2784	3.5149
kelch domain containing 2	NM 001034133	-0.572	-0.5068	-1.0466	0.568	0.896	0.4849
bolA homolog 3 (E. coli)	NM 001106601	-0.6973	-0.943	-1.0117	0.4396	0.1224	0.6546
protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A	NM 022676	-4.0875	-4.2343	-4.1281	-2.577	-3.0001	-2.8206
SH3-binding domain kinase 1	NM 147135	1.0157	0.4836	0.357	2.8426	1.8756	2.4004
stathmin 1	NM 017166	-0.5142	-0.8577	-0.3993	0.5711	0.3218	0.6286
solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, glycine), member 9	NM 053818	-0.3763	0.0647	-0.8288	2.8861	2.4033	2.5191
baculoviral IAP repeat-containing 5	NM 022274	0.5877	0.7378	0.257	1.7525	1.4749	1.7562
FGR	X57018	2.9081	3.2263	2.7352	1.5553	1.932	1.9639
B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	NM 017258	2.0143	1.7873	1.6253	0.5949	0.4969	0.9743
acetylcholinesterase	NM 172009	-1.0304	-0.8773	-1.0291	0.4957	0.1295	0.114
mRNA for amphiphysin, amph2	Y13380	-0.2734	-0.2598	-0.1836	-1.4948	-1.4029	-1.169
kinesin family member 2C (KIF2c), transcript variant 2, mRNA	NM 134472	0.158	-0.3089	-0.284	1.2449	0.8919	0.8727
ets, variant 3-like	NM 001100992	0.127	0.3612	-0.2015	1.4291	1.0757	1.4786
homeodomain interacting protein kinase 1	NM 001100986	0.6743	0.146	0.1888	2.022	1.8041	1.7855
hemoglobin alpha, adult chain 2	NM 013096	1.8596	1.7333	0.9483	3.9293	4.0349	4.3424
ATPase, Cu++ transporting, beta polypeptide	NM 012511	-0.4871	-0.2582	-0.2229	0.9915	0.8885	0.5227
Rat Ig active lambda2-like chain mRNA, 3' end	M21782	3.9915	3.817	3.5013	2.133	2.1425	2.2572
deoxyuridine triphosphatase (Dut), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1	NM 053592	0.2701	0.4217	-0.2447	2.5289	2.3529	2.42
UBA domain containing 1 (Uba1), mRNA	NM 001007742	-1.0903	-0.6965	-1.7335	2.0179	1.6778	1.7407
similar to RIKEN cDNA 2010011120 (RGD1311378)	NM 001106547	0.8163	1.3295	1.263	2.1838	2.5333	2.2937
solute carrier family 14 (urea transporter), member 1	NM 019346	0.7315	1.2177	1.0039	2.2057	2.3134	1.8142
ArtGAP with dual PH domains 1	NM 133567	0.734	0.6548	-0.3937	3.6145	2.9904	3.1804
mRNA for AIM-1	D89731	-0.5338	0.0634	-0.3881	1.4118	1.1969	1.1503

【 0 1 0 7 】

50

【表 4】

Name	ID	対照1	対照2	対照3	投与群1	投与群2	投与群3
CD59 molecule, complement regulatory protein	NM 012925	0.2926	-0.1815	0.1547	1.3329	1.4991	1.4614
Rnorvegicus (Wistar) B7 mRNA for B7 antigen	X76697	0.5573	0.5037	-0.4803	2.6985	3.2347	3.082
GTP cyclohydrolase 1	NM 024356	-1.193	-0.977	-1.5683	0.5639	0.0705	0.9133
GABA(A) receptor-associated protein like 2	NM 022706	0.1445	-0.2107	-0.5044	1.4385	1.0974	1.1147
Rat mRNA for preprocathepsin D (EC 3.4.23.5)	X54467	-0.6536	-0.7318	-0.767	0.7922	0.8386	1.2699
high mobility group box 2	NM 017187	0.9527	1.6228	0.7729	3.2443	2.64	2.998
ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1	NM 001008882	0.1182	0.5065	0.2172	1.4467	1.4418	1.3299
cholinergic receptor, nicotinic, alpha 3	NM 052805	0.8372	1.1914	0.2981	3.0076	2.5853	2.5467
Rat mRNA for glutathione peroxidase	X07365	-0.1651	-0.4251	-0.9666	1.3311	1.6368	1.3119
ADP-dependent glucokinase	NM 001100723	1.0947	1.2898	0.7587	2.1313	2.3682	2.0876
nibrin	NM 138873	-0.0759	-0.3274	-0.6463	1.3084	1.1358	1.2596
putative G-protein coupled receptor GPCR14	AF090348	-0.086	-0.0324	0.42	-1.6642	-1.0376	-1.1053
ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4	NM 012690	0.356	0.2827	0.2759	1.9859	1.9018	1.5412
stromal antigen 3	NM 053730	-0.9462	-0.6514	-0.7478	0.008	0.5099	0.3425
NUF2, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)	NM 001012028	-0.3377	-0.3833	-0.3387	1.2687	1.0895	0.8528
similar to RIKEN cDNA 170003JH04 (RGD1311739)	NM 001025691	0.2063	1.0117	0.703	2.447	2.4129	1.8719
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 4	NM 001025411	-1.8767	-2.0393	-2.5599	0.005	0.0866	0.1352
NDC80 homolog, kinetochore complex component (S. cerevisiae)	NM 001126270	-0.2359	0.4317	-0.1804	1.5919	1.3892	1.7828
GATA binding protein 1	NM 012764	0.5471	0.5686	0.3703	3.3638	3.246	2.5464
RAN binding protein 10	NM 001135875	0.7936	1.0023	0.8742	3.161	2.6927	2.4766
glutathione peroxidase	M21210	1.0985	1.1071	1.0251	3.2021	2.6742	2.7463
mRNA for NB-2	D87212	-0.0615	0.3294	0.0823	1.17	0	1.0863
immunoglobulin superfamily, member 11	NM 001013120	0.4157	0.338	-0.2634	1.6568	1.8463	1.2907
olfactory receptor 378	NM 001001286	0.4592	0.3974	-0.0204	1.281	1.9921	1.729
cathepsin W	NM 001024242	2.3046	1.8491	1.8988	1.1179	0.7247	1.1691
inositol polyphosphate-5-phosphatase K	NM 001013859	0.7991	0.9215	1.0054	2.159	1.8634	1.7162
early B-cell factor 1	NM 053820	1.0478	1.209	1.6105	0.1275	-0.0203	0.355
muscle Y-box protein YB2	U22893	0.0177	-0.1999	-1.0853	2.4636	2.1089	1.9403
poly(A) binding protein, cytoplasmic 1	NM 134353	0.5263	0.4836	0.4886	1.7661	1.4241	1.5536
round spermatid protein RSP29	U97667	-0.704	-0.6578	-1.3825	1.5629	1.4361	1.41
topoisomerase (DNA) I	NM 022615	1.1144	0.5857	0.9207	2.2281	1.8893	1.952
thymidylate synthetase	NM 019179	0.2003	0.1374	-0.105	1.4096	1.4523	0.924
Siagen's syndrome/scleroderma autoantigen homolog (human)	NM 001109537	1.4622	1.4671	0.4083	3.849	3.8298	3.3215
IGFBP associated, gamma subunit, ear containing, ARF binding protein 3	NM 001108304	2.282	2.6292	2.8139	1.321	1.1705	1.7594
lymphocyte transmembrane adaptor 1	NM 001017491	3.1328	2.7045	2.7892	2.037	1.5646	2.0139
chromatin licensing and DNA replication factor 1	NM 001106192	0.428	0.109	-0.0204	1.476	1.0349	1.6756
cytokine receptor gamma chain	AF410926	2.8933	2.4853	2.9949	1.8886	1.4699	2.0056
Cd74 molecule, major histocompatibility complex class II invariant chain	NM 013069	3.5728	3.2926	3.8427	1.9129	1.7345	2.5103
solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), member 2	NM 019283	-0.9542	-1.1305	-0.7939	0.5426	-0.0471	0.1523
nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 4	NM 053598	-0.7843	-0.865	-1.006	0.9113	0.3583	0.3985
sepsin 1	NM 001012460	2.1881	1.6642	2.1598	1.0301	0.657	1.0622
Rho, GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	NM 001009600	2.6246	2.6055	2.797	1.4517	1.2843	1.7964
aquaporin 1 (Aqp1)	NM 012778	-1.0137	-0.6878	-1.6374	1.6849	1.5368	1.6229
pituitary tumor-transforming 1	NM 022391	0.0271	0.2581	-0.6869	2.3168	2.014	2.0184
membrane-associated ring finger (C3HC4) 8	NM 001107882	-0.5781	-0.5693	-1.1628	0.9666	0.8566	0.7601
interferon stimulated exonuclease gene 20	NM 001008510	0.0204	0.075	0.0181	1.2001	0.8463	1.1227
protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 (lymphoid)	NM 001106460	2.98	2.4289	3.0305	1.6868	1.3541	1.7333
similar to Putative protein C21orf45 (RGD1310778)	NM 001127523	0.1258	-0.4378	-0.0733	1.6425	0.865	1.2842
glutamate cysteine ligase, modifier subunit	NM 017305	-0.6601	-0.8098	-0.4963	1.2686	1.0296	1.9036
Rat mRNA for alpha-tubulin	V01226	0.4137	0.5159	0.6991	1.337	1.4848	1.4439
rat metallothionein-I	J00750	-2.9542	-2.7453	-2.8881	-1.421	-1.2016	-1.8104
cyclin D3	NM 012766	0.5583	0.5337	0.0459	1.9164	1.8731	1.791
chemokine (C-C motif) ligand 11	NM 019205	1.3752	1.2832	0.4609	3.5084	3.1829	3.3302

10

20

30

40

50

【 0 1 0 8 】

【 クラスタ解析 】

上記同定された遺伝子につ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、これらの遺伝子の発現レベルにより明確に2群が区別されることが確認された（図2）。

【 実施例 2 】

【 0 1 0 9 】

実施例 1 と同様の方法を用いて、下記の化学物質を 28 日間反復投与したラットの脾臓における遺伝子発現レベルを測定した。使用した化学物質は、m-キシリレンジアミン（C₈H₁₂N₂）（400mg/kg）（東京化成工業株式会社製）、3-シアノピリジン（C₆H₄N₂）（180mg/kg）（和光純薬株式会社製）、2-(2-アミノエチルアミノ)エタノール（C₄H₁₂N₂O）（1000mg/kg）（和光純薬株式会社製）、テトラヒドロフルフリルアルコール（C₅H₁₀O₂）（600mg/kg）（和光純薬株式会社製）、メタクリルアミド（C₄H₇NO）（150mg/kg）（和光純薬株式会社製）、スルホラン（C₄H₈O₂S）（700mg/kg）（和光純薬株式会社製）、2-イソプロポキシエタノール（C₅H₁₂O₂）（500mg/kg）（和光純薬株式会社製）、ヒドラジン-水和物（H₆N₂O）（30mg/kg）（和光純薬株式会社製）、4-エチルモルホリン（C₆H₁₃NO）（500mg/kg）（和光純薬株式会社製）、メタクリル酸エチルトリメチルアンモニウムクロリド（C₉H₁₈ClNO₂）（1000mg/kg）（和光純薬株式会社製）、塩化ベンジルトリメチルアンモニウム（C₁₀H₁₆ClN）（120mg/kg）（和光純薬株式会社製）、m-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム（C₆H₄NNaO₅S）（1000mg/kg）（和光純薬株式会社製）、1-ナフチルアミン-4-スルホン酸ナトリウム四水和物（C₁₀H₈NNaO₃S）（1000mg/kg）（和光純薬株式会社製）、3-メトキシ-3-メチル-1-ブタノール（C₆H₁₄O₂）（1000mg/kg）（和光純薬株式会社製）、ジクロロベンゼン（C₆H₄Cl₂）（500mg/kg）（和光純薬株式会社製）、3,4-キシリジン（C₈H₁₁N）（250mg/kg）（和光純薬株式会社製）、N-メチルアニリン（C₇H₉N）（125mg/kg）（和光純薬株式会社製）、ジイソシアン酸トリレン（C₉H₆N₂O₂）（300

mg/kg) (和光純薬株式会社製)、2-(ジブチルアミノ)エタノール($C_{10}H_{23}NO$) (250mg/kg) (和光純薬株式会社製)、p-クミルフェノール($C_{15}H_{16}O$) (500mg/kg) (和光純薬株式会社製)、m-クレゾール(1000mg/kg) (C_7H_8O) (和光純薬株式会社製)、2,3-ジメチルアニリン(200mg/kg) ($C_8H_{11}N$) (東京化成工業株式会社製)、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド($C_{12}H_{22}N_2$) (300mg/kg) (和光純薬株式会社製)、フタル酸ジヘブチル($C_{22}H_{34}O_4$) (1000mg/kg) (和光純薬株式会社製)である。

【0110】

本発明である219個の生体応答遺伝子群を、前記各種化学物質を投与したラットの脾臓サンプルから取得した遺伝子発現プロファイルから抽出し、2次元のクラスタ解析を行った。

10

【0111】

その結果、国立医薬品食品衛生研究所の既存化学物質毒性データベースでは脾臓の髄外造血を引き起こすと報告されており、かつ、剖検所見において脾臓肥大が確認された化学物質である3,4-キシリジン、2,3-ジメチルアニリン、N-メチルアニリン、および2-イソプロポキシエタノールは、2-ブタノンオキシムと同じクラスタに属し、その他の化学物質は対照群と同じクラスタに属した(図2)。この結果は、本件生体応答遺伝子データセットが、生体に対して2-ブタノンオキシムと同じような影響(例えば、髄外造血を引き起こすような作用)を有する化学物質を遺伝子発現レベルで予測し得ることを意味する。

20

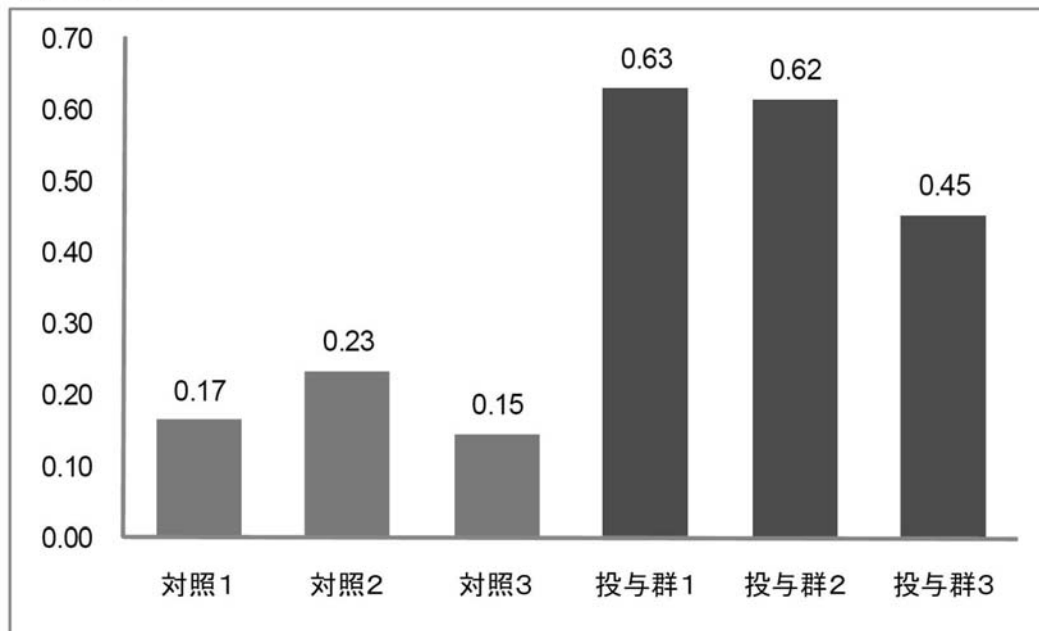
【産業上の利用可能性】

【0112】

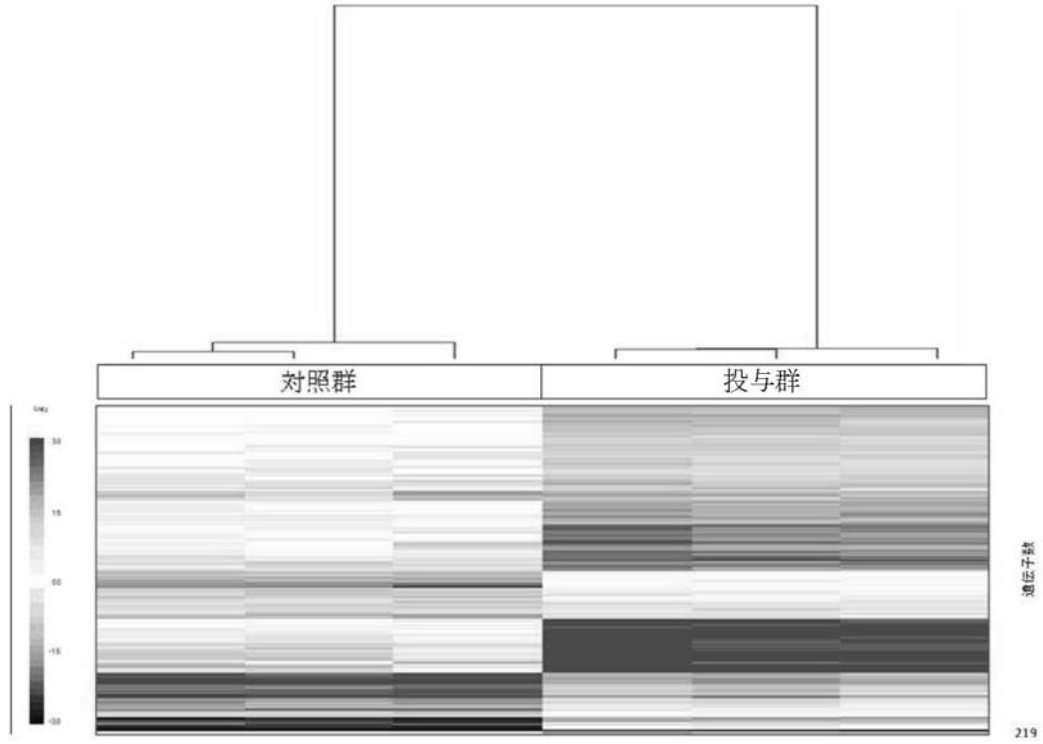
本発明の、化学物質が生体に与える影響の検出方法および予測方法によって、既存化学物質の有害性評価だけでなく、新規化学物質が世に出る場合に簡便にその生体に対する有害性を評価することができる可能性がある。

【図1】

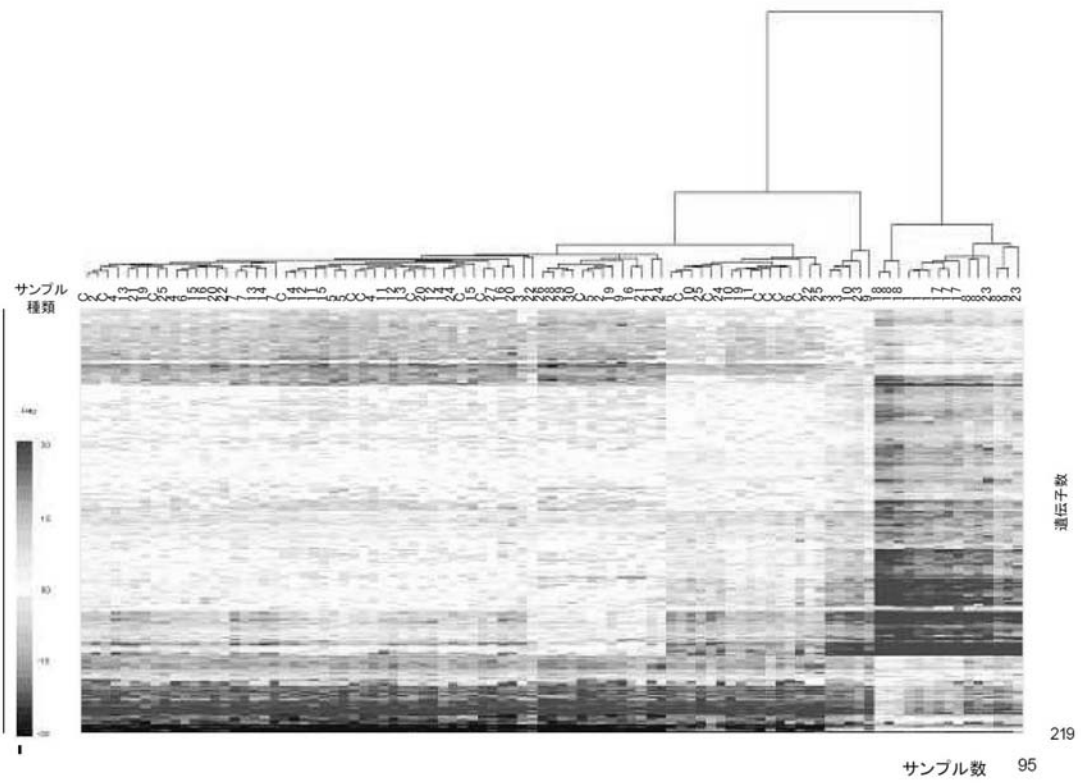
脾臓相対重量(%)



【 図 2 】



【 図 3 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

G 0 1 N 37/00 1 0 2

Fターム(参考) 4B063 QA20 QQ02 QQ08 QQ42 QQ52 QQ61 QR32 QR35 QR41 QR48
QR55 QR72 QR77 QS25 QS33 QS34 QS39 QX01

