

(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2012-196162

(P2012-196162A)

(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)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 3
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2	4 B O 6 5
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	
G O 1 N 37/00 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	
審査請求 未請求 請求項の数 43 O L (全 33 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2011-61653 (P2011-61653)
 (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】 化学物質曝露による生体への影響の予測方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】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の提供。

【解決手段】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のに対して、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。この、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による、生体毒性の処置方法及び生体毒性の候補薬剤確認方法。

【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 1～29 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)、ヒドラジンー水和物 (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-ジブプロモプロパン (CAS登録番号109-64-8)、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)、1,4-ジブromo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-ブロモ-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-ジブロモベンゼン(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、

10

(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1~29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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

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)、ヒドラジンー水和物 (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)、フタル酸ジヘブチル (CAS登録番号3648-21-3)、テトラブプロモエタン (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1～29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

とする請求項 27 記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

【請求項 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請求項 28 記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

【請求項 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請求項 29 記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

【請求項 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請求項 29 又は 30 に記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

【請求項 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請求項 26 記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

【請求項 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請求項 32 記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

【請求項 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請求項 33 記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

【請求項 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請求項 34 記載の化学物質の毒性判別・予測方法。

【請求項 36】

請求項 3 及び 4 を除く、請求項 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。

【請求項 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請求項 36 記載の化学物質の毒性判別キット。

【請求項 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請求項 37 記載の化学物質の毒性判別キット。

【請求項 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請求項 38 記載の化学物質の毒性判別キット。

【請求項 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請求項 38 または 39 記載の化学物質の毒性判別キット。

【請求項 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請求項 36 記載の化学物質の毒性判別キット。

【請求項 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請求項 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。

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) 10

【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) 20

【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。 30

【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、N-メチルアニリン（CAS登録番号100-61-8）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29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】

40

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1～29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 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-ジブromopropan (CAS登録番号109-64-8)、1-ブrom-3-クロプロpan (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-ジブromobenzen (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 12 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 13 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 14 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-ブロモ-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-ジブロモベンゼン (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1~29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 16 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 17 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 18 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)、テトラブプロモエタン (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1~29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1～29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1～29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」～「F」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と同一の意味を有する。

【0017】

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

【0018】

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

【0019】

被検化学物質（被検群）またはその溶媒（対照群）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1～29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関与するDNA領域をいう。

【0031】

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

10

【0032】

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

【0033】

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

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

ーザンブロット法、ドットブロット法、iAFLP (introduced Amplified Fragment Length Polymorphism) 法、LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法、PCR法、又はmRNA分子を直接測定する方法等を用いることができる。PCR法としては、RT-PCR法、Real Time PCR法、競合PCR法を挙げることができる。

【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:Molecular Probes社) Green Iや、TaqMan (登録商標:アプライドバイオシステムズ社) プローブ等が挙げられる。

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 $[125\text{I}]$ 、 $[131\text{I}]$ 、 $[3\text{H}]$ 、 $[14\text{C}]$ 、 $[32\text{P}]$ 、 $[35\text{S}]$ 、酵素である β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、また、蛍光物質であるシアニン蛍光色素蛍光色素 (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】

30

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。

【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】

40

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。

【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。

【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。

【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。

【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。

【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

10

20

30

40

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、N-メチルアニリン（CAS登録番号100-61-8）を雄のSprague Dawleyラット（6週齢）（日本チャールス・リバー社）に28日間反復投与することにより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Cr1:CD(SD)ラット（雄）を準備し、ポリカーボネイトケージに入れ、エアーコンディショニング・アニマルラック（商品名）内で飼育した。エアーコンディショニング・アニマルラックは、温度22℃、湿度55%に設定し、照明は明期7:00～19:00、暗期19:00～7:00の12時間サイクルに設定した。水は給水ビンを用いて、浄水器を通した水道水を不断給与し、飼料は固形飼料を不断給餌した。実験開始までに1週間の馴化検疫期間を設けた。

【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）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。

【0067】

【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-ブタノンオキシム	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	テトラブプロモエタン	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-ジブプロモプロパン	109-64-8
	nhd	n-ヘキサデカン	544-76-3
第8回	C8	ゴマ油	
	bcp	1-ブプロモ-3-クロロプロパン	109-70-6
	tmb	ブソイドクメン	95-63-6
	dha	ジシクロヘキシルアミン	101-83-7
	14d	1,4-ジブプロモベンゼン	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）を装着したものをを用いたが、これに限定されるものではない。

50

【0069】

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、フタル酸ジヘプチルが1,000mg/kg/day、テトラプロモエタンが200mg/kg/day、アジピン酸ジブチルが1,000mg/kg/day、p-エチルフェノール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-ジブプロモプロパンが250mg/kg/day、n-ヘキサデカンが1,000mg/kg/day、1-ブromo-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-ジブromo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。

【0070】

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。

【0071】

<全RNAの抽出>

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。

【0072】

<核酸検体の調製>

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。

【0073】

<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。

【0074】

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。

【0075】

<マイクロアレイの後処理>

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

【0076】

<標識cDNAの合成>

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

【0077】

<標識プローブの作製>

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

【0078】

<ハイブリダイゼーション>

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

【0079】

<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。

【0080】

<蛍光強度の検出及び数値化>

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

【0081】

<二次比の算出>

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

【0082】

<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、N-メチルアニリン（CAS登録番号100-61-8）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スチューデントのt検定を行ってP値を算出した。それぞれの化学物質投与群と対照群との間で発現レベルの平均値の差が2倍以上、かつ、P値が0.01未満である遺伝子群である29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29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】

10

【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	-0.800	0.118	0.169	-0.494	1.393	0.189	0.054	0.533	0.568
2	-0.523	0.220	0.059	-0.297	1.405	0.186	0.097	0.702	0.674
3	-0.462	0.000	0.010	-0.194	1.750	0.251	-0.092	0.384	0.355
4	-0.216	0.423	0.389	-0.137	1.771	0.434	-0.013	1.151	0.768
5	-0.285	0.449	-0.108	0.002	1.650	0.095	0.665	0.767	0.570
6	0.068	0.268	0.320	0.562	1.201	0.807	0.285	1.329	0.878
7	0.324	0.436	0.459	0.552	0.817	0.514	0.137	0.476	0.616
8	0.014	0.543	-0.047	0.313	0.694	0.321	0.347	0.025	0.424
9	-0.095	-0.198	-0.249	0.091	0.746	0.118	0.020	-0.645	0.003
10	-0.005	0.368	0.037	0.576	1.084	1.757	0.549	0.136	-0.153
11	-0.188	-0.348	-0.221	0.725	0.935	0.698	0.428	0.073	0.247
12	0.445	-0.018	-0.161	0.899	1.078	0.896	0.369	0.314	0.976
13	0.230	0.058	-0.189	0.687	1.376	0.703	0.386	-0.228	0.183
14	0.446	-0.176	-0.626	0.271	0.726	0.159	0.447	-0.025	-0.721
15	0.272	0.443	-0.219	0.053	0.581	0.285	-0.005	0.687	0.849
16	0.000	0.783	0.055	0.073	-0.445	-0.673	0.154	0.000	-0.390
17	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
18	0.061	0.051	0.165	0.431	0.549	0.336	-0.228	-0.449	-0.352
19	-0.187	0.290	0.351	0.079	-0.013	0.521	-0.657	-0.166	-0.308
20	0.471	0.772	-0.004	1.425	0.000	0.819	1.127	0.431	0.113
21	0.428	0.506	0.101	0.554	1.388	0.669	1.354	2.581	2.699
22	-0.207	0.057	-0.004	0.207	1.028	0.230	0.489	1.618	2.126
23	-0.205	0.633	-0.063	2.851	3.193	2.501	0.926	0.574	1.455
24	-0.238	0.189	0.335	2.760	3.382	2.921	1.291	0.596	1.596
25	0.014	0.097	0.075	1.889	1.943	1.712	0.959	0.377	0.785
26	0.689	0.727	0.670	0.810	0.608	0.171	0.545	0.620	1.569
27	0.146	1.041	-0.461	0.392	1.160	0.713	1.073	2.646	2.491
28	-0.219	-0.314	-0.426	0.270	0.546	0.242	2.584	2.914	3.020
29	-0.504	1.063	-0.463	-0.239	-0.550	-0.583	-1.498	-0.864	-0.110

20

30

【0084】

【表 3】

配列番号	2ae_13	2ae_14	2ae_15	thf_16	thf_17	thf_18
1	-0.235	0.581	0.578	-0.707	0.097	0.014
2	-0.057	0.749	0.742	-0.313	0.397	-0.070
3	0.192	0.854	0.773	-0.358	0.423	0.089
4	0.259	1.015	1.272	-0.238	0.855	0.595
5	0.263	1.007	0.963	-0.185	0.395	-0.098
6	0.172	0.045	0.114	-0.222	0.307	-0.002
7	0.355	0.278	0.232	0.081	0.392	0.321
8	-0.259	0.186	0.057	-0.290	0.042	-0.141
9	-0.222	-0.335	-0.217	-0.315	-0.011	-0.589
10	-0.550	-0.123	-0.051	-0.933	0.119	-0.345
11	-0.316	-0.474	-0.491	0.025	-0.080	-0.180
12	0.395	0.127	-0.026	0.052	0.272	0.327
13	-0.042	-0.530	-0.236	0.214	0.010	-0.120
14	0.497	0.472	-0.352	-0.128	0.461	-0.542
15	-0.044	0.235	-0.102	0.060	0.330	0.138
16	0.113	-0.198	-0.531	0.870	-0.354	-0.359
17	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
18	0.107	0.485	-0.228	0.517	0.283	-0.054
19	-0.553	0.039	0.049	-0.010	0.277	0.359
20	0.795	0.527	0.151	0.645	0.354	-0.580
21	-0.190	0.208	-0.051	-0.441	0.417	0.062
22	0.125	0.268	-0.455	-0.179	0.096	0.546
23	0.264	-0.362	0.220	-0.742	-0.439	-1.135
24	0.228	-0.142	0.492	-0.338	-0.736	-0.729
25	0.411	0.336	0.875	0.601	-0.027	0.201
26	0.606	1.448	1.655	0.427	0.958	0.855
27	0.296	-0.507	0.617	0.927	0.053	0.841
28	0.340	1.013	0.616	0.000	0.424	0.447
29	-0.162	-0.806	-1.191	-0.697	-0.159	-0.912

10

20

【 0 0 8 5 】

30

【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	0.490	0.022	0.600	0.051	-0.493	0.805	-0.079	-0.060	0.866
2	0.376	-0.016	0.312	-0.073	-0.139	0.453	0.039	0.172	0.386
3	0.647	-0.233	0.114	0.047	-0.508	-0.492	0.425	0.092	0.092
4	0.693	0.002	0.567	-0.153	-0.111	-0.027	0.356	-0.162	0.436
5	0.878	-0.028	0.181	-0.157	-0.352	-0.149	0.068	-0.227	-0.186
6	-0.262	-0.497	0.583	-0.061	-0.248	0.524	0.203	-0.103	0.687
7	-0.289	-0.578	0.005	-0.348	-0.151	0.093	-0.197	-0.210	0.090
8	-0.131	0.000	0.000	-0.490	-0.615	0.306	-0.093	0.000	0.000
9	-0.156	-0.365	-0.112	-0.444	0.097	0.129	0.385	0.050	-0.137
10	0.426	0.374	0.171	0.538	0.542	-0.141	0.284	0.017	-0.104
11	0.356	0.313	0.128	-0.132	0.359	0.472	0.128	-0.488	0.030
12	0.220	0.796	-0.483	0.598	0.418	-0.267	0.345	0.575	0.325
13	0.334	0.188	-0.263	0.118	0.262	-0.443	0.011	0.331	-0.350
14	-0.410	-0.145	0.184	0.102	0.154	0.491	-0.699	0.034	0.242
15	-0.174	-0.141	-0.334	0.125	-0.011	-0.028	-0.440	0.290	-0.132
16	0.000	0.184	0.537	0.538	0.000	0.000	0.000	0.789	0.136
17	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
18	0.150	-0.224	0.818	-0.913	-0.042	1.293	-0.138	-0.219	0.703
19	-0.146	-0.784	0.493	-0.056	-0.068	-0.084	-0.598	-0.529	-0.381
20	0.272	-0.537	0.668	-0.716	0.324	-0.096	-0.280	-0.206	0.596
21	0.217	-0.027	0.076	-0.103	-0.349	0.413	-0.066	-0.521	-0.227
22	-0.098	0.281	-0.248	0.562	0.496	-0.576	0.196	0.188	-0.271
23	-0.317	0.110	-0.509	-0.327	0.135	-0.321	0.294	-0.199	0.048
24	-0.267	0.050	0.061	-0.207	0.072	0.496	0.056	-0.359	0.844
25	0.101	0.060	0.300	-0.016	0.504	0.748	-0.120	-0.377	0.942
26	0.617	0.219	1.055	0.556	-0.307	0.953	0.994	0.101	0.705
27	0.572	1.171	1.161	1.256	0.500	0.577	2.797	2.656	0.558
28	-0.435	-0.758	0.168	-0.620	-0.790	0.438	1.408	0.935	1.142
29	0.552	-0.509	-0.937	-0.277	-0.029	0.550	-1.477	-0.606	-0.412

10

20

【0086】

【表 5】

配列番号	2ip 14	2ip 15	2ip 16	hnh 19	hnh 20	hnh 21	4em 24	4em 25	4em 26
1	0.196	-0.214	1.440	-0.031	0.157	1.240	0.080	0.055	0.262
2	0.343	-0.183	1.368	0.115	-0.004	1.104	-0.255	0.003	0.052
3	0.150	-0.241	0.857	-0.834	-0.489	0.398	0.355	0.178	0.052
4	0.223	-0.377	1.497	-0.263	0.611	1.227	0.426	0.412	0.749
5	0.437	0.529	0.585	-0.337	-0.017	0.394	0.805	0.261	-0.056
6	0.350	0.199	1.098	1.075	1.508	1.115	-0.367	-0.208	0.362
7	0.221	-0.056	0.505	1.029	0.594	0.721	-0.386	-0.250	0.121
8	0.863	-0.311	0.000	0.000	0.000	0.201	0.000	-0.187	-0.351
9	0.113	0.192	0.328	-0.218	-0.073	0.513	-0.306	-0.225	-0.215
10	-0.240	0.311	0.984	-0.009	-0.609	-0.097	0.433	0.108	0.067
11	0.946	0.509	0.490	0.451	0.550	0.212	0.497	0.401	0.014
12	1.214	0.844	0.364	0.673	0.887	-0.711	0.312	0.841	-0.307
13	0.768	0.559	0.641	1.034	1.600	-0.373	0.083	-0.281	-0.329
14	-0.017	0.499	0.675	-0.561	0.190	0.895	0.139	-0.059	0.025
15	0.358	0.433	0.493	0.656	0.238	0.822	0.542	0.622	0.584
16	-0.316	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.071	0.000	0.000
17	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.489
18	0.321	-0.134	0.889	-0.749	-0.711	1.207	-1.093	-0.976	-0.003
19	0.392	0.276	1.411	-0.235	0.189	-0.081	0.030	0.473	0.199
20	1.124	0.122	0.916	0.094	-0.262	0.298	-0.631	-0.922	0.269
21	-0.148	0.503	0.299	-0.164	1.300	0.103	0.221	-0.179	0.312
22	0.625	0.819	0.385	2.549	2.504	1.420	0.791	0.708	0.597
23	2.449	2.080	2.206	1.755	1.672	-1.308	-0.013	0.354	-0.410
24	3.278	2.160	3.030	1.893	2.020	-0.654	0.139	0.561	-0.159
25	2.739	1.395	1.839	1.243	1.251	0.524	0.571	0.717	0.350
26	0.547	0.156	1.069	0.702	2.611	1.422	0.473	-0.044	1.431
27	-1.595	1.211	-0.382	-0.894	0.516	0.423	-0.447	-0.698	0.752
28	-0.849	-0.392	0.759	-0.497	0.229	1.044	-0.414	-1.071	0.185
29	-0.648	-0.746	0.061	-0.972	-0.742	-0.596	0.138	-0.333	0.093

30

40

【0087】

【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	-0.247	0.004	-0.279	0.484	-0.023	0.444	1.146	0.287	0.557
2	-0.022	-0.033	-0.373	0.544	-0.256	0.286	1.362	0.185	0.563
3	-0.420	0.113	-0.393	0.729	-0.550	0.209	1.891	0.620	1.397
4	-0.489	0.178	-0.177	0.865	0.146	0.612	1.839	0.691	1.320
5	0.207	0.260	-0.193	0.563	-0.325	0.705	1.530	0.426	0.687
6	0.204	-0.066	-0.100	-0.148	-0.104	-0.031	-0.286	0.125	-0.550
7	-0.027	-0.193	-0.100	-0.222	-0.013	0.077	-0.161	-0.268	-0.115
8	0.251	-0.647	-0.561	0.161	0.162	-1.043	-0.498	0.000	0.182
9	0.219	-0.248	-0.471	-0.646	-0.381	-0.920	0.069	0.002	0.065
10	0.218	-0.207	-0.044	0.333	0.304	0.018	-0.040	-0.258	0.140
11	-0.006	-0.063	-0.479	0.119	-0.021	-0.237	0.080	-0.303	-0.152
12	-0.639	0.953	-0.053	-0.133	0.447	0.484	0.110	0.001	0.691
13	-0.183	-0.058	0.392	0.053	0.090	-0.284	-0.248	0.047	0.153
14	0.267	0.062	-0.069	-0.055	0.300	-0.061	-0.005	0.281	0.228
15	-0.089	0.351	-0.287	-0.096	-0.690	0.039	0.326	-0.596	-0.074
16	0.000	0.083	0.244	-0.047	0.000	0.058	-0.183	-0.042	0.000
17	-0.191	0.000	0.244	0.000	-0.711	-0.904	-0.126	-0.242	0.000
18	-0.205	-0.333	-0.300	-0.534	-0.049	-0.238	-0.658	-0.802	-0.785
19	-0.291	0.352	-0.218	-0.280	-0.402	0.364	-0.657	-0.922	-0.729
20	-0.816	-0.679	-1.025	-0.763	-1.155	-0.153	-1.965	-1.933	-1.682
21	0.135	0.161	-0.045	-0.167	-0.540	0.108	-0.381	-0.457	-0.151
22	-0.318	0.463	0.385	-0.110	-0.009	1.200	0.366	-0.311	0.289
23	-0.173	0.564	0.799	-0.815	-0.273	0.999	0.051	-1.038	-0.485
24	0.020	0.299	0.229	-0.744	0.075	0.822	-0.046	-0.980	-0.798
25	0.152	0.025	0.520	0.410	0.279	0.417	-0.021	0.125	-0.188
26	1.109	0.594	0.014	-0.004	-0.768	-0.394	0.775	0.596	0.862
27	-1.391	1.795	0.927	-0.057	0.000	0.653	0.083	-0.545	0.545
28	-0.247	-0.268	-0.247	0.362	-1.007	0.287	0.306	0.571	0.756
29	0.838	0.417	-0.068	0.169	0.368	0.612	-0.056	-0.610	-0.531

10

20

【0088】

【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	-0.341	-0.155	-0.140	0.090	-0.409	0.030	-0.053	0.279	0.262
2	-0.374	-0.404	-0.019	0.007	-0.400	0.032	0.104	0.378	0.231
3	-0.276	-0.234	0.397	-0.224	-0.073	0.261	0.092	-0.446	-0.183
4	-0.431	-0.029	0.144	-0.548	0.009	0.077	0.410	-0.170	-0.479
5	-0.221	-0.360	0.240	-0.650	-0.167	-0.179	-0.019	-0.138	-0.361
6	-0.522	-0.011	0.179	-0.318	-0.277	0.083	0.570	0.801	0.893
7	-0.380	-0.295	0.106	-0.101	-0.184	0.062	0.312	0.214	0.516
8	0.000	-0.990	-1.164	0.000	0.066	-0.487	0.000	0.160	-0.196
9	0.118	0.026	0.092	-0.034	0.063	-0.240	0.217	0.148	-0.258
10	0.055	0.345	0.163	0.623	-0.621	-0.316	0.241	0.155	0.385
11	0.223	-0.240	-0.272	0.445	-0.252	-0.528	0.324	-0.207	-0.168
12	0.314	0.037	0.190	0.141	0.439	0.510	0.264	0.358	0.251
13	-0.222	-0.057	0.409	-0.286	0.211	0.129	-0.046	0.050	0.020
14	0.340	-0.242	0.491	0.226	-0.286	0.183	0.213	0.132	0.078
15	-0.294	-0.046	0.378	-0.685	-0.365	-0.077	0.129	-0.258	0.303
16	0.348	0.000	-0.256	0.000	-0.445	0.251	0.000	0.000	-0.042
17	0.000	0.000	-0.777	0.000	0.000	0.151	0.000	0.000	-0.459
18	0.163	-0.391	-0.610	0.414	-0.553	-0.176	-0.421	-1.202	-0.044
19	-0.591	-0.581	0.298	-1.019	-0.395	-0.088	0.428	0.242	0.636
20	-1.417	-1.862	-0.514	-0.781	-1.143	-0.894	-1.011	-0.856	-0.939
21	-0.401	-0.443	-0.113	-0.434	-0.247	-0.149	-0.004	0.285	0.691
22	-0.396	0.208	1.118	-0.566	-0.043	0.417	0.166	0.109	0.611
23	-0.653	-0.532	1.565	-0.412	-0.698	1.049	-0.760	-0.452	0.584
24	0.037	-0.674	0.985	-0.378	-0.618	0.505	-0.427	-0.418	0.310
25	0.371	0.539	0.432	-0.389	-0.373	0.066	-0.174	0.287	0.426
26	-0.336	0.223	0.212	0.396	1.006	1.034	0.237	-0.100	-0.050
27	1.660	0.458	0.192	-1.078	-0.745	1.489	-1.243	-0.812	0.747
28	-1.181	-0.514	0.122	0.095	-0.044	0.070	-0.833	0.213	-0.862
29	0.136	0.539	-0.214	-0.139	0.035	0.646	-0.035	0.022	0.678

30

40

【0089】

【表 8】

配列番号	C4 1	C4 2	C4 3	dc b 4	dc b 5	dc b 6	34x 9	34x 10	34x 11
1	-0.320	-0.325	-0.506	0.246	0.412	0.411	0.256	0.664	0.325
2	-0.296	-0.269	-0.415	0.064	0.370	0.300	0.347	0.557	0.146
3	-0.453	-0.029	-0.339	-0.470	-0.137	-0.378	0.307	1.298	0.664
4	-0.386	-0.468	-0.285	-0.015	-0.366	0.104	0.800	0.722	1.043
5	-0.255	-0.287	0.032	-0.443	-0.214	-0.220	0.215	0.669	0.470
6	-0.625	0.064	-0.275	0.983	1.216	1.176	0.653	0.485	0.444
7	-0.395	-0.037	-0.071	0.524	0.651	0.648	0.526	0.393	0.350
8	0.732	0.303	0.252	0.000	0.336	0.000	0.404	0.230	0.685
9	-0.110	-0.030	0.153	-0.314	-0.451	-0.501	0.212	0.333	0.185
10	0.011	-0.429	-0.038	0.129	-0.007	0.331	0.932	-0.693	0.718
11	-0.239	0.185	0.043	0.516	-0.157	0.115	0.454	0.226	0.382
12	0.406	0.183	-0.219	0.343	1.167	0.929	0.874	1.055	0.553
13	-0.204	-0.057	0.215	0.167	-0.093	-0.062	1.075	0.774	0.637
14	0.144	-0.173	-0.223	0.360	-0.416	0.400	0.664	0.410	-0.609
15	0.113	-0.336	-0.012	0.211	-0.179	-0.025	0.252	0.601	0.438
16	0.000	-1.161	-1.078	0.000	-1.011	0.000	0.000	-1.025	-0.326
17	0.792	0.000	0.749	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.372
18	-0.473	-0.849	-0.284	-0.619	-1.161	-1.364	0.572	-0.215	-0.483
19	-0.107	-0.305	0.163	-0.513	-0.892	-0.640	-0.496	-0.346	-0.707
20	-0.996	-0.187	-1.702	-1.058	-0.651	-1.040	0.082	0.176	-0.434
21	-0.355	-0.127	-0.107	3.742	4.180	3.855	0.233	1.293	0.415
22	-0.056	0.367	-0.253	0.952	1.092	1.568	1.449	1.598	1.150
23	-0.468	0.723	-0.159	-0.230	0.395	-0.668	1.871	1.907	1.899
24	-0.185	0.095	0.017	-0.039	-0.129	-0.644	2.027	1.790	2.118
25	0.226	-0.447	0.078	0.641	-0.584	0.046	1.483	0.681	1.378
26	-0.685	-0.262	-1.005	-1.105	-3.022	-3.328	-2.255	-2.402	-2.248
27	-0.870	-0.699	-0.515	0.448	0.740	2.091	1.239	-0.420	-0.535
28	-0.278	-0.234	0.034	-0.996	0.021	-0.363	2.563	2.110	2.128
29	-0.110	0.611	0.432	-0.932	-0.857	-1.160	-1.324	-0.160	-1.192

10

20

【0 0 9 0】

【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	0.516	1.019	0.785	0.377	0.651	0.164	-0.407	-0.435	-0.241
2	0.614	1.019	0.764	0.307	0.415	-0.038	-0.439	-0.663	0.136
3	0.917	1.536	1.152	0.601	0.983	0.943	0.213	-0.397	0.029
4	1.068	1.389	1.261	0.501	0.821	0.872	0.200	-0.888	0.344
5	0.948	0.774	1.119	0.645	0.850	0.430	-0.049	-0.645	0.183
6	1.877	1.351	1.400	0.024	-0.072	-0.119	-0.731	-0.391	-0.198
7	1.744	1.115	1.483	-0.064	-0.134	-0.183	0.106	-0.010	-0.356
8	1.777	1.468	2.127	-0.063	-0.301	0.474	0.000	-0.397	-0.064
9	1.587	1.246	1.386	0.014	-0.189	0.444	0.477	-0.082	0.185
10	0.794	1.425	1.147	-0.321	0.283	-0.740	0.498	-0.274	-0.141
11	2.552	1.926	2.217	-0.487	-0.234	-0.006	0.233	-0.202	-0.206
12	2.370	1.895	1.899	0.000	0.950	0.161	0.752	0.792	0.407
13	4.263	2.860	3.236	0.067	-0.361	-0.225	0.156	-0.005	0.010
14	1.029	0.968	0.918	0.868	0.436	0.279	0.521	-0.438	0.040
15	1.693	1.051	1.261	0.682	0.663	-0.152	-0.240	-0.194	0.216
16	0.000	-0.035	0.030	0.501	-0.518	0.000	0.000	0.000	0.000
17	-0.239	0.000	-0.251	0.000	0.000	-0.981	0.000	0.000	0.000
18	0.940	0.495	0.956	-1.095	-0.309	0.073	-0.335	-0.817	-0.203
19	0.943	1.042	0.794	-0.147	0.002	-0.509	-0.296	-0.818	-0.317
20	3.012	1.713	2.545	-1.422	-1.399	-1.295	-1.599	-0.994	-0.682
21	1.553	1.547	1.517	0.251	-0.059	-0.433	-0.053	-0.646	-0.447
22	1.969	1.258	1.635	0.211	0.436	-0.251	-0.345	0.120	0.447
23	5.069	4.084	4.549	-0.622	0.683	-0.193	-0.507	0.088	-0.215
24	5.288	4.645	4.466	-0.487	0.219	-0.198	-0.324	-0.248	-0.536
25	4.304	3.703	3.557	-0.254	0.124	0.333	0.254	-0.173	0.098
26	0.906	1.029	0.611	-1.647	-1.298	0.459	-0.288	-0.060	-0.138
27	1.505	0.869	1.353	0.068	-0.491	-1.231	-0.613	2.210	-1.457
28	1.903	1.696	1.307	1.161	0.864	1.375	0.030	0.846	0.125
29	-1.611	-1.540	-1.082	1.064	1.450	-0.324	0.660	-0.611	0.479

30

40

【0 0 9 1】

【表 10】

配列番号	C5 1	C5 2	C5 3	pcp 4	pcp 5	pcp 6	mcs 9	mcs 10	mcs 11
1	-0.058	-0.393	-0.078	1.054	0.602	0.693	0.150	0.624	0.045
2	-0.214	-0.140	-0.078	1.175	0.670	0.853	0.044	0.388	-0.005
3	-0.250	-0.240	-0.135	2.304	0.794	1.383	-0.026	0.577	-0.156
4	0.118	-0.296	-0.805	2.534	1.211	0.986	-0.100	0.278	0.079
5	0.275	-0.053	-0.147	1.516	1.084	1.789	-0.109	-0.186	0.001
6	-0.324	-0.624	-0.485	-0.062	-0.158	-0.186	-0.227	-0.288	-0.010
7	-0.242	-0.303	-0.413	-0.171	-0.161	0.167	-0.421	-0.245	-0.204
8	0.000	0.000	-0.169	-0.011	0.184	0.349	0.000	0.049	0.000
9	0.103	-0.110	0.337	-0.207	-0.228	-0.205	0.200	0.187	-0.365
10	0.372	0.098	-0.381	0.053	0.293	-0.126	0.126	0.294	-0.256
11	0.012	0.705	0.168	0.249	0.523	-0.331	0.201	-0.042	0.218
12	-0.126	-0.379	-0.159	0.384	0.575	0.390	0.185	-0.003	-0.050
13	-0.058	0.119	0.241	0.255	0.009	-0.193	0.101	0.141	0.246
14	0.103	-0.551	0.137	-0.172	-0.048	-0.222	0.032	-0.455	-0.015
15	0.128	-0.335	-0.368	0.173	-0.261	0.131	0.108	-0.097	0.372
16	0.245	-0.278	0.000	0.000	0.487	-0.585	0.423	0.000	0.340
17	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.570	0.000	0.000
18	-0.250	-0.304	-0.300	-0.656	-0.138	0.086	-0.136	0.044	-0.732
19	0.336	-0.193	-0.316	-0.431	-0.459	-0.389	-0.788	-0.864	-0.628
20	0.398	-0.328	-0.175	0.158	0.236	-0.399	0.055	0.518	0.074
21	-0.302	-0.158	-0.094	-0.043	0.255	0.463	-0.835	-0.380	-0.276
22	-0.179	0.054	-0.554	0.677	0.161	0.363	-0.255	-0.750	0.048
23	0.043	-0.208	-0.066	-0.484	0.982	0.429	-0.126	-0.279	0.054
24	0.112	-0.256	0.457	-0.363	1.032	0.287	0.110	0.012	0.016
25	0.213	-0.469	0.297	-0.374	0.663	0.192	0.073	0.194	-0.045
26	0.165	0.744	0.270	1.160	0.316	1.059	-1.280	-0.881	-0.669
27	0.309	0.228	-0.406	0.506	-0.412	0.531	1.014	-0.365	-1.655
28	-0.589	0.424	0.025	0.209	0.356	0.543	0.542	0.371	0.010
29	0.754	-0.247	-0.928	-0.810	-1.273	-1.631	-0.705	-0.947	-1.060

10

20

【0092】

【表 11】

配列番号	23d 14	23d 15	23d 16	dhc 19	dhc 20	dhc 21	dhp 24	dhp 25	dhp 26
1	1.308	0.483	0.224	-0.391	-0.075	-0.294	-0.182	-0.215	-0.387
2	1.230	0.534	0.403	-0.241	-0.088	-0.493	0.017	-0.142	-0.294
3	1.211	0.735	0.454	-0.346	-0.262	-0.586	-0.902	-0.636	-0.720
4	1.266	1.057	0.338	-0.194	-0.036	-0.521	-0.500	-0.455	-0.513
5	1.265	0.909	0.484	0.115	0.058	0.093	-0.287	-0.425	-0.662
6	-0.036	0.095	0.123	-0.685	-0.047	-0.191	0.313	0.423	0.050
7	-0.084	0.045	0.046	-0.188	-0.158	-0.157	0.451	0.211	-0.109
8	-0.181	0.336	0.000	-0.425	-0.317	-0.490	-0.087	0.000	-0.244
9	0.171	0.138	-0.181	-0.007	0.295	-0.203	-0.334	-0.353	-0.517
10	1.547	0.233	0.541	0.455	0.012	0.050	-0.350	-0.141	-0.167
11	0.567	0.654	0.567	-0.098	0.225	-0.025	0.242	0.034	0.133
12	0.703	0.397	0.300	0.067	0.705	-0.224	-0.108	0.389	0.485
13	0.500	0.475	0.256	0.457	0.573	0.327	0.162	0.080	-0.065
14	0.095	-0.032	-0.262	-0.137	-0.039	-0.351	2.733	3.575	2.519
15	0.331	0.540	-0.168	-0.273	0.038	-0.279	2.137	2.845	2.039
16	0.000	0.000	0.000	-0.096	0.000	0.123	0.400	0.000	-0.381
17	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
18	-0.365	-0.352	-0.072	-0.586	-0.572	-0.338	-0.001	-0.806	-0.545
19	-0.207	-0.335	-0.227	0.035	-0.351	-0.486	-0.624	-0.444	-0.651
20	0.565	0.719	0.596	0.000	-0.039	-0.383	0.097	-0.482	-0.497
21	0.017	-0.808	-0.844	-0.126	0.138	-0.198	1.483	1.567	1.259
22	0.429	0.433	0.276	-0.102	0.080	-0.238	0.954	1.026	0.989
23	1.613	1.469	1.436	-0.717	0.166	-0.126	-0.527	-0.026	0.239
24	1.588	1.259	1.329	-0.470	0.049	-0.661	-0.589	-0.262	0.457
25	1.258	0.853	1.211	0.118	0.308	-0.494	-0.034	-0.256	0.164
26	0.551	0.614	0.365	-0.279	0.182	0.351	-1.536	-0.662	0.053
27	1.017	1.536	-0.617	-0.385	-0.856	-1.014	-1.302	-0.886	-0.147
28	3.194	3.704	3.621	1.861	1.761	2.249	-2.263	-2.473	-1.571
29	-1.296	-0.999	-1.317	-0.002	-1.452	-1.248	0.448	-0.056	-0.091

30

40

【0093】

【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	pep 15	pep 16
1	0.154	-0.024	0.117	0.029	-0.060	0.491	0.324	0.403	0.690	0.892	0.862	0.091
2	0.235	-0.214	0.127	0.072	-0.204	0.295	0.342	0.466	0.727	1.048	0.711	-0.027
3	0.348	-0.130	0.071	-0.462	-0.431	-0.416	0.224	0.391	0.201	0.975	0.644	-0.241
4	0.256	0.178	-0.112	-0.219	0.195	-0.468	0.504	0.458	0.867	1.430	1.205	0.208
5	0.069	-0.395	0.011	-0.459	-0.325	-0.407	0.839	0.143	0.632	0.273	0.596	-0.102
6	0.296	0.266	0.366	0.942	0.959	0.915	0.697	0.518	0.526	0.477	0.508	0.297
7	0.180	0.189	0.157	0.234	0.335	0.499	0.137	0.164	0.365	0.031	0.037	-0.025
8	0.252	-0.232	-0.029	0.000	0.000	0.000	0.676	0.722	0.850	0.847	-0.191	0.790
9	-0.183	-0.212	0.317	-0.398	-0.157	0.232	0.236	-0.282	0.321	-0.103	0.119	0.479
10	0.470	0.005	-0.407	-0.266	-0.016	-0.038	-0.323	-0.402	-0.217	-0.351	-0.320	-0.133
11	0.291	0.090	0.030	0.213	-0.394	0.201	0.348	-0.174	0.392	-0.357	0.185	-0.183
12	-0.146	-0.094	-0.032	0.133	0.249	-0.213	-0.074	-0.077	-0.077	0.094	0.067	-0.239
13	-0.553	-0.263	-0.891	-0.517	-1.007	-0.296	-0.121	-0.485	-0.168	-0.260	-0.445	-0.533
14	0.747	0.459	-0.999	0.035	0.080	-0.536	0.133	-0.102	0.105	0.072	-0.590	-0.346
15	0.301	0.358	-0.097	0.607	1.055	0.485	0.255	0.248	0.220	0.289	0.045	0.309
16	1.120	0.000	0.000	-0.268	0.000	0.356	0.000	0.000	1.023	-0.073	0.510	0.000
17	0.050	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
18	0.430	0.524	0.639	0.538	0.632	0.196	1.069	0.826	0.525	0.531	0.395	0.346
19	0.316	0.106	-0.061	-0.009	0.411	-0.180	0.629	0.325	0.154	0.322	0.743	-0.194
20	1.489	1.314	0.485	0.295	1.359	0.000	0.000	1.380	0.881	0.661	0.962	1.119
21	-0.263	0.145	0.372	1.694	2.094	1.612	0.080	0.141	0.282	-0.189	0.445	-0.324
22	-0.255	0.143	-0.061	2.363	2.234	1.540	-0.398	-0.591	-0.025	1.179	0.272	-0.010
23	0.152	-0.017	-0.063	0.170	-0.143	-0.924	0.624	-0.501	-0.136	0.002	0.334	-0.756
24	0.138	-0.098	-0.172	-0.064	-0.473	-0.756	0.834	-0.643	0.416	0.556	0.511	-0.627
25	0.421	-0.309	-0.464	0.076	-0.006	0.005	0.394	-0.204	0.165	0.529	0.110	-0.221
26	-0.307	0.245	-0.870	-1.220	-0.987	-1.582	-0.026	-1.105	-0.950	-0.275	0.054	0.247
27	0.113	-1.057	0.017	-0.467	-0.525	0.843	-1.047	-1.052	-1.010	-0.480	1.719	-0.640
28	0.755	0.438	-0.114	-0.702	-0.816	-0.535	0.445	1.135	0.252	0.820	1.450	0.991
29	0.466	-0.040	-0.438	-0.226	0.026	-0.651	0.408	-0.588	0.288	-0.919	-0.767	-1.624

【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	-0.007	0.359	0.009	1.050	1.541	2.034	0.646	1.139	0.424
2	0.203	0.357	0.072	0.977	1.806	2.009	0.645	1.094	0.186
3	-0.142	0.360	-0.029	1.263	2.453	2.625	1.107	1.272	0.283
4	-0.137	0.182	-0.302	0.914	2.434	2.586	1.204	0.963	-0.219
5	-0.417	0.086	-0.353	0.875	1.241	1.902	0.330	0.870	-0.385
6	0.122	0.063	0.119	0.337	0.434	0.318	1.431	1.673	1.527
7	0.049	0.060	0.104	0.077	0.076	-0.125	0.821	0.980	0.999
8	0.000	-0.228	-0.224	0.167	-0.105	0.255	0.598	0.852	1.406
9	0.179	0.748	0.202	-0.031	0.140	0.209	0.869	1.086	0.804
10	0.046	-0.656	-0.187	-0.079	-0.411	-0.701	1.362	1.466	1.015
11	-0.262	-0.101	-0.309	0.139	-0.086	-0.151	1.649	1.770	1.794
12	-0.258	-0.242	0.173	0.029	0.222	0.181	1.485	1.758	1.921
13	0.068	0.029	0.202	-0.005	0.147	-0.135	2.342	2.478	2.662
14	0.529	0.096	-0.181	-0.150	0.387	-0.449	0.449	0.525	0.901
15	0.002	0.345	-0.181	-0.207	-0.111	-0.301	1.029	0.918	0.981
16	-0.625	0.000	0.000	-0.557	-0.579	-0.704	0.245	0.759	-0.450
17	0.000	-0.403	0.358	-0.144	-0.789	-0.618	-0.691	-0.523	-0.679
18	-0.482	0.277	0.594	0.153	0.131	-0.164	0.951	0.770	0.973
19	0.029	0.201	0.129	-0.391	-0.481	-0.646	0.506	0.894	0.614
20	0.564	0.552	-0.110	-0.001	0.022	0.441	1.719	2.134	2.272
21	-0.004	-0.061	0.229	-0.682	-0.196	-1.018	1.020	1.690	1.236
22	-0.510	-0.275	-0.148	0.733	0.422	0.194	1.673	1.594	1.776
23	-0.068	-0.114	-0.241	-0.060	-0.514	-0.190	3.917	4.036	4.176
24	-0.056	-0.101	-0.133	-0.069	-0.302	-0.371	3.887	4.267	4.386
25	-0.296	-0.052	-0.050	-0.131	0.077	-0.008	3.017	3.250	3.480
26	-0.906	-1.036	-1.412	-0.095	0.613	0.375	0.577	-0.148	-0.587
27	-1.192	-0.513	-0.360	-1.431	1.264	-0.346	-0.439	-0.377	-0.986
28	0.044	0.617	0.265	0.141	0.873	0.349	2.597	2.703	2.693
29	0.415	0.178	-0.207	-1.448	-1.482	-1.184	-1.430	-1.579	-1.652

【0 0 9 5】

10

20

30

40

【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	0.176	0.039	1.193	1.437	0.051	1.018	0.752	0.369	0.392
2	0.233	-0.083	1.099	1.250	0.366	0.905	0.612	0.220	0.215
3	-0.032	-0.234	1.530	1.341	0.271	0.342	0.422	0.768	0.159
4	-0.380	-0.071	1.349	1.377	0.632	0.457	0.983	0.335	-0.130
5	-0.168	-0.438	0.464	0.385	-0.716	-0.159	0.827	0.256	-0.078
6	0.117	0.437	0.294	0.900	0.624	0.767	0.463	0.255	0.227
7	0.250	0.137	-0.006	0.381	0.024	0.348	0.274	0.042	0.031
8	0.175	0.420	0.360	0.131	0.145	0.371	0.268	0.448	0.051
9	0.050	0.067	-0.020	0.085	-0.206	-0.420	-0.036	0.267	-0.040
10	-0.330	-0.621	-0.255	0.144	0.029	-0.345	-0.296	0.123	-0.052
11	-0.080	-0.458	0.034	-0.298	-0.122	-0.357	-0.013	0.020	-0.049
12	0.166	-0.273	-0.088	-0.862	-0.525	-0.097	0.211	-0.419	0.169
13	-0.049	-0.617	-0.470	-0.908	-0.422	-0.679	-0.046	-0.183	-0.042
14	0.194	0.202	0.024	0.118	0.612	0.723	0.516	0.136	-0.131
15	-0.339	-0.013	0.305	0.127	0.641	0.332	-0.030	-0.281	-0.040
16	-0.326	2.074	0.562	-0.724	0.171	0.213	0.591	0.153	0.085
17	-0.552	0.000	0.000	0.000	0.000	-1.182	0.000	0.219	0.000
18	0.230	0.545	1.146	0.569	0.378	0.570	0.871	0.578	0.693
19	-0.331	0.192	0.265	-0.434	0.037	0.410	0.637	-0.155	-0.414
20	0.866	-0.228	-0.154	-0.088	0.120	0.460	0.190	0.119	-0.194
21	-0.486	0.240	-0.105	-0.088	0.899	0.425	0.635	-0.086	-0.662
22	-0.029	-0.757	-0.241	0.653	0.531	0.358	-0.018	0.258	0.791
23	0.153	0.113	0.334	-0.005	-0.206	0.296	0.592	0.126	0.054
24	0.355	0.255	0.434	-0.046	-0.114	0.293	0.743	0.226	-0.015
25	0.402	0.094	0.121	-0.108	-0.175	0.011	0.233	-0.077	-0.162
26	0.577	0.195	0.116	-0.344	-0.458	-0.791	0.367	-0.348	-0.591
27	-0.845	1.130	1.408	0.215	-1.438	0.178	1.392	-1.565	-1.421
28	0.379	0.918	1.195	0.056	-0.076	0.566	1.064	-0.085	-0.050
29	-0.248	-0.168	-1.082	-0.672	-1.446	-0.810	-0.051	0.292	-0.267

10

20

【0 0 9 6】

【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	0.389	0.404	0.201	0.321	0.592	0.674	0.252	0.264	0.805
2	-0.011	0.435	0.206	0.271	0.518	0.571	0.023	0.171	0.808
3	0.547	0.684	0.362	0.414	1.057	0.502	-0.246	0.017	0.047
4	0.406	0.309	-0.028	0.192	0.815	0.532	-0.337	-0.292	0.204
5	-0.365	0.388	0.050	0.206	-0.041	-0.068	-0.267	0.043	0.059
6	0.117	0.166	0.237	0.356	0.273	0.601	0.391	0.331	0.748
7	0.242	0.157	0.286	-0.044	-0.015	0.151	0.291	0.101	0.498
8	0.016	0.149	-0.244	-0.364	-0.105	-0.061	-0.101	0.231	0.274
9	0.250	-0.245	0.275	-0.005	0.174	-0.137	0.396	0.344	-0.116
10	0.159	-0.119	-0.283	-0.060	-0.013	-0.084	-0.381	-0.085	-0.123
11	0.147	-0.138	-0.114	-0.119	-0.428	-0.128	-0.316	0.310	-0.079
12	-0.217	-0.062	0.112	0.322	0.453	0.700	-0.212	0.020	0.288
13	0.142	0.081	0.422	0.173	0.318	0.030	-0.125	-0.125	-0.385
14	0.051	0.071	0.258	0.398	0.140	0.203	-0.417	0.194	0.125
15	0.188	-0.192	0.265	0.253	-0.301	0.293	0.295	0.180	0.148
16	0.000	-0.426	0.315	0.209	-0.526	0.070	0.003	0.319	-0.486
17	-0.785	-0.439	-0.375	-0.134	0.000	0.105	-0.493	0.198	-0.205
18	0.302	-0.288	0.284	-0.261	-0.087	-0.456	0.706	0.476	0.353
19	-0.091	-0.138	0.072	-0.156	-0.642	-0.305	-0.082	-0.073	-0.101
20	-0.238	-0.214	0.028	0.367	0.258	0.232	0.362	0.564	-0.135
21	-0.425	-0.352	-0.051	-0.213	0.107	0.451	0.332	-0.222	0.137
22	0.677	-0.036	0.775	0.899	0.468	1.046	0.071	0.573	0.021
23	-0.538	-0.066	0.249	-0.519	-0.379	-0.706	-0.190	-0.190	-0.356
24	-0.494	-0.053	0.052	-0.638	-0.159	-0.707	0.189	0.189	-0.093
25	-0.297	-0.262	0.067	-0.187	-0.214	-0.398	0.264	-0.008	0.000
26	-0.384	-0.113	-0.135	-0.245	-0.172	-0.381	0.872	0.276	0.661
27	0.413	-1.026	0.596	1.207	0.295	0.383	2.371	-0.577	1.076
28	0.627	0.467	0.265	-0.182	0.732	0.500	2.043	1.952	2.009
29	-0.414	-0.217	-0.645	-0.683	-1.133	-1.108	-1.205	-1.478	-1.453

30

40

【0 0 9 7】

【表 16】

配列番号	dha 14	dha 15	dha 16	14d 19	14d 20	14d 21	ams 24	ams 25	ams 26
1	0.452	0.323	0.565	0.531	0.248	0.721	-0.070	0.569	0.076
2	0.436	0.122	0.604	0.701	0.379	0.582	-0.051	0.559	-0.078
3	0.068	0.002	-0.015	0.227	-0.309	0.721	-0.082	0.405	-0.102
4	0.226	0.488	0.322	0.435	0.379	0.502	0.216	0.341	-0.040
5	0.345	0.273	0.421	0.537	0.065	0.513	-0.129	0.519	-0.059
6	0.432	0.152	0.556	0.718	0.984	0.356	0.036	0.016	0.214
7	0.027	0.091	0.559	0.422	0.518	0.190	0.146	0.046	0.196
8	-0.115	0.058	-0.097	-0.473	0.878	0.726	-0.133	-0.213	-0.080
9	-0.310	0.023	0.280	0.009	-0.227	-0.181	-0.805	-0.035	0.070
10	-0.522	-0.173	-0.384	-0.620	-0.414	0.179	0.076	0.118	0.050
11	-0.003	-0.026	-0.340	-0.779	-0.494	0.298	0.117	-0.052	-0.003
12	-0.080	-0.066	0.261	0.806	0.877	0.293	0.181	0.148	-0.083
13	-0.066	-0.221	-0.532	-0.542	0.082	-0.111	-0.024	0.121	0.091
14	-0.375	-0.042	-0.036	0.130	0.291	0.822	-0.151	0.069	0.266
15	-0.107	-0.035	-0.043	0.474	0.402	0.666	-0.137	-0.185	0.157
16	0.362	-0.339	0.027	0.215	0.781	0.454	-0.255	0.052	0.043
17	-0.392	0.000	-0.662	0.000	-0.448	0.000	-1.421	-0.692	0.000
18	0.172	0.205	0.782	0.379	0.154	0.305	0.414	0.157	0.282
19	-0.372	0.215	0.109	-0.639	-0.220	-0.553	-0.063	-0.072	-0.245
20	-0.079	0.000	0.499	0.156	-0.107	-0.261	0.082	0.635	0.424
21	-0.014	-0.035	0.011	1.016	0.972	2.262	-0.230	0.299	-0.111
22	0.147	0.077	0.084	1.755	1.135	1.609	0.148	0.103	0.247
23	-0.260	-0.390	0.569	-0.568	-0.190	-1.082	-0.110	-0.021	-0.164
24	-0.058	-0.644	0.338	-0.758	-0.063	-0.916	0.079	0.134	0.080
25	-0.115	-0.257	0.054	-0.228	-0.309	-0.413	0.036	0.111	0.290
26	0.655	0.034	0.499	0.013	-0.048	-0.007	0.104	0.353	0.540
27	0.439	0.157	0.430	0.977	0.990	0.783	-1.006	0.714	-0.788
28	0.371	0.112	0.175	1.468	1.584	1.140	0.405	0.340	0.687
29	0.062	-0.169	0.458	-0.768	-0.502	-1.312	-0.730	-0.990	-0.611

10

20

【実施例 2】

【0098】

<クラスタ分析>

DNAマイクロアレイで取得した遺伝子発現データの分析手法として、例えばクラスタ分析が挙げられる。クラスタ分析とは、遺伝子発現変化パターンの類似した遺伝子同士をグルー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。

30

【0099】

配列番号1～29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6つのクラスタ（A～F）を形成した。クラスタAには、N-メチルアニリン（「nma」で表す。）および3,5-キシリジン（「35x」で表す。）が含まれており、クラスタBには、フタル酸ジヘプチル（「dhp」で表す。）が含まれており、クラスタCには、3-シアノピリジン（「3cp」で表す。）、3,4-キシリジン（「34x」で表す。）、2,3-ジメチルアニリン（「23d」で表す。）、ヒドラジンー水和物（「hnh」で表す。）、2-イソプロポキシエタノール（「2ip」で表す。）および2-ブタノンオキシム（「2bo」で表す。）が含まれており、クラスタDには、o-ジクロロベンゼン（「dcb」で表す。）およびテトラプロモエタン（「tbe」で表す。）が含まれており、クラスタEには、2,4-ジ-tert-ブチルフェノール（「24b」で表す。）の3個体中2個体およびp-クミルフェノール（「pcp」で表す。）の3個体中1個体が含まれており、クラスタF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～Fには該遺伝子（29遺伝子）を特定する際に用いた化学物質であるN-メチルアニリン以外にも肝毒性を有することが知られている12種類の化学物質が含まれていた。

40

【0100】

50

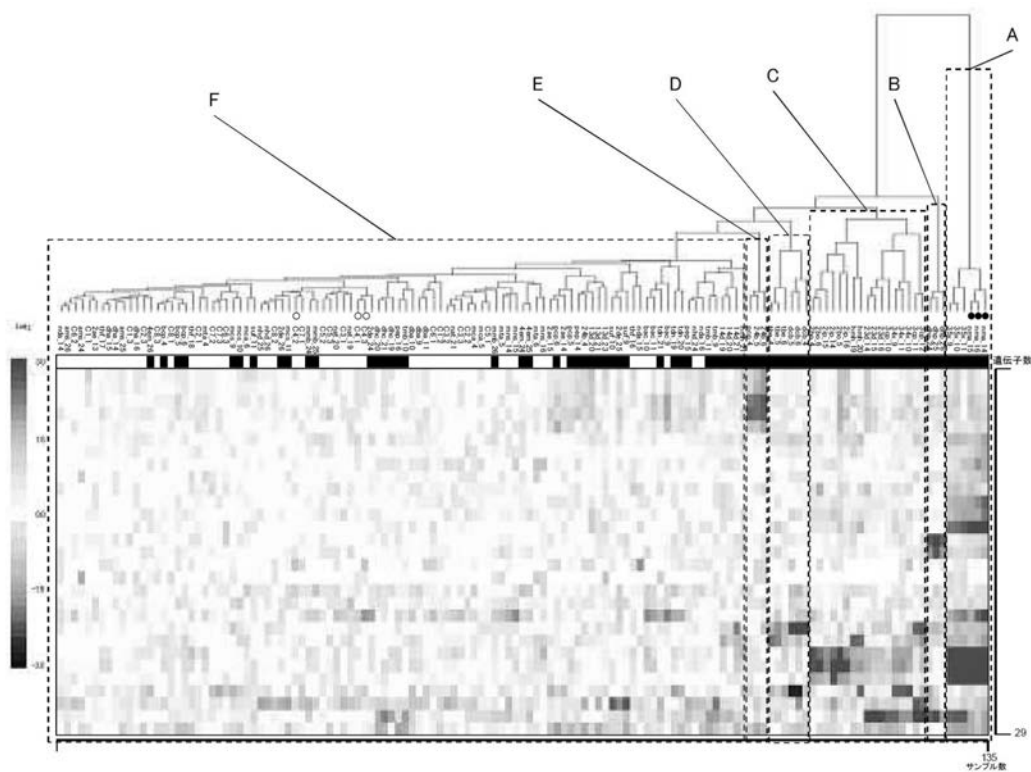
これらの結果は、配列番号 1～29 に示される塩基配列を有する遺伝子セットの遺伝子発現変動パターンを比較することにより、高い確率で対照群とある特定の肝毒性または肝臓に何らかの影響を与える化学物質を判別することが可能であることを示唆している。

【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】

2012196162000001.app

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) 4B024 AA11 CA01 CA04 CA09 CA11 CA20 HA12 HA14
4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR55
QR62 QS25 QS34 QS39 QX01
4B065 AA90X BD21 CA46

专利名称(译)	化学暴露对生物体影响的预测方法		
公开(公告)号	JP2012196162A	公开(公告)日	2012-10-18
申请号	JP2011061653	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 C12N15/09 C12N5/10 G01N33/53 G01N37/00		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A C12N5/00.102 G01N33/53.M G01N33/53.D G01N37/00.102 C12N15/63.Z 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/CA01 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/HA12 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS39 4B063/QX01 4B065/AA90X 4B065/BD21 4B065/CA46		
代理人(译)	田中彦 今井淳一		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种使用新基因组的生物毒性检测/预测方法，其试剂盒，生物毒性治疗方法和生物毒性候选药物确认方法。 解决方案：由于指标（标记）有限，因此很难通过血液学或病理学方法检测肝毒性。 表情变化很大。 通过鉴定用于区分生物毒性的基因组来治疗生物毒性的方法和确定候选生物毒性的方法。 [选择图]无

略号	化学物質名称	CAS登録番号
第1図	C1 注射用水	
	2bo 2-ブタノンオキシム	96-29-7
	3op 3-シアノピリジン	100-54-9
	2ae 2-(2-ニブチルアミノ)エタノール	111-41-1
	urf テトラヒドロフルフリルアルコール	97-99-4
第2図	C2 注射用水	
	mod メタクリルアミド	79-39-0
	suf スルホラン	128-33-0
	2ip 2-イソプロポキシエタノール	109-59-1
	hmb 4-ヒドロキシ-4-水和物	7803-57-8
第3図	4am 4-モチルモルホリン	100-74-3
	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
	mts m-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム	127-68-4
第4図	not 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
	mod 3-メトキシ-3-メチル-1-ブタノール	55539-86-3
	C4 オリーブ油	
	dcb 2-ジクロロベンゼン	95-50-1
	34x 3,4-キシリジン	95-64-7
第5図	rma N-メチルアニリン	100-61-8
	tdn トリレンジアミンナート	26471-82-5
	2de 2-(ジブチルアミノ)エタノール	102-81-8
	C5 オリーブ油	
	pop p-タールフェノール	599-94-4
第6図	mos m-クレゾール	108-39-4
	23d 2,3-ジメチルアニリン	87-59-2
	dnc n-ニトロベンゼンカルボキシミド	538-75-0
	dhp フタル酸ジヘフタル	3648-21-3
	C6 オリーブ油	
第7図	the テトラプロモエタン	79-27-6
	dha アジピン酸ジブチル	105-99-7
	pep p-メチルフェノール	123-07-9
	C7 オリーブ油	
	24b 2,4-ジ-tert-ブチルフェノール	96-76-4
第8図	35x 3,5-キシリジン	108-69-0
	nda n-ニトロベンゼンアミン	103-83-3
	13d 1,3-ジブチロモロバシ	109-64-8
	ndd n-ヘキサデカン	544-76-3
	C8 オリーブ油	
第9図	bcp 1-ブチル-3-クロロプロパン	109-70-6
	tmb ブゾイダメン	95-63-6
	dna ジンクDヘキシルアミン	101-83-7
	14d 1,4-ジブチロベンゼン	108-37-6
	ams 2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸	88-44-8