

(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2011-177143

(P2011-177143A)

(43) 公開日 平成23年9月15日(2011.9.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 A	4 B 0 2 4
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 2 9
<b>G O 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 M	4 B 0 6 3
<b>G O 1 N 33/552 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 D	
<b>C 1 2 M 1/00 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/552	
審査請求 未請求 請求項の数 56 O L (全 29 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2010-46953 (P2010-46953)  
 (22) 出願日 平成22年3月3日 (2010.3.3)

(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 BA80 CA04 CA09 HA12  
 4B029 AA07 BB20 CC03 CC08 FA15  
 4B063 QA01 QA18 QQ20 QQ99 QR32  
 QR56 QS03 QS25 QS34 QX02

(54) 【発明の名称】 化学物質が生体を与える影響を検出・予測する方法

## (57) 【要約】

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

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

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

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\_053592、(2) U64030、(3) Y00350、(4) M22642、(5) NM\_001107529、  
(6) NM\_017169、(7) NM\_001007742、(8) NM\_001037095、(9) AW434086、(10) AF035951、  
(11) NM\_053818、(12) NM\_001106847、(13) NM\_133285、(14) AF367448、(15) XM\_222462、  
(16) NM\_012899、(17) NM\_053983、(18) NM\_01135875、(19) NM\_133294、(20) NM\_022539、  
(21) NM\_022540、(22) NM\_053707、(23) NM\_022597、(24) NM\_031008、(25) NM\_012766、(26) J00750、  
(27) NM\_022381、(28) NM\_001029917、(29) NM\_001013236、(30) NM\_012915、  
(31) NM\_017038、(32) AA851352、(33) NM\_001107882、(34) NM\_134395、(35) NM\_024127、  
(36) NM\_001105968、(37) NM\_022588、(38) U10188、(39) X54467、(40) NM\_001105833、  
(41) D14015、(42) NM\_001002016、(43) D50564、(44) NM\_147135、(45) D89731、  
(46) NM\_001126270、(47) NM\_024356、(48) XM\_220618、(49) AF039218、  
(50) NM\_013096、(51) NM\_001106787、(52) NM\_001109537、(53) U97667、  
(54) NM\_001011904、(55) NM\_012568、(56) NM\_001109227、(57) NM\_001105822、  
(58) L06040、(59) NM\_031010、  
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。

**【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。

**【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。

**【請求項 8】**

遺伝子発現レベルの測定は、RT-PCR 法、iAFLP (introduced Amplified Fragmen

10

20

30

40

50

t 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】

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。

10

【請求項 11】

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 10 記載の化学物質の毒性検出方法。

【請求項 12】

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 10 または請求項 11 記載の化学物質の毒性検出方法。

【請求項 13】

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。

20

【請求項 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うことを特徴とする請求項 13 記載の化学物質の毒性検出方法。

【請求項 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ることを特徴とする請求項 14 記載の化学物質の毒性検出方法。

【請求項 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ることを特徴とする請求項 15 記載の化学物質の毒性検出方法。

30

【請求項 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、テトラブプロモエタン、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-(1,1,3,3,4-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、

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：

50

- ( 1 ) NM\_053592、( 2 ) U64030、( 3 ) Y00350、( 4 ) M22642、( 5 ) NM\_001107529、  
( 6 ) NM\_017169、( 7 ) NM\_001007742、( 8 ) NM\_001037095、( 9 ) AW434086、( 1 0 )  
AF035951、( 1 1 ) NM\_053818、( 1 2 ) NM\_001106847、( 1 3 ) NM\_133285、( 1 4 )  
AF367448、( 1 5 ) XM\_222462、( 1 6 ) NM\_012899、( 1 7 ) NM\_053983、( 1 8 ) NM\_00  
1135875、( 1 9 ) NM\_133294、( 2 0 ) NM\_022539、( 2 1 ) NM\_022540、( 2 2 ) NM\_053  
707、( 2 3 ) NM\_022597、( 2 4 ) NM\_031008、( 2 5 ) NM\_012766、( 2 6 ) J00750、( 2  
7 ) NM\_022381、( 2 8 ) NM\_001029917、( 2 9 ) NM\_001013236、( 3 0 ) NM\_012915、  
( 3 1 ) NM\_017038、( 3 2 ) AA851352、( 3 3 ) NM\_001107882、( 3 4 ) NM\_134395、( 3  
5 ) NM\_024127、( 3 6 ) NM\_001105968、( 3 7 ) NM\_022588、( 3 8 ) U10188、( 3 9 )  
X54467、( 4 0 ) NM\_001105833、( 4 1 ) D14015、( 4 2 ) NM\_001002016、( 4 3 ) D5 10  
0564、( 4 4 ) NM\_147135、( 4 5 ) D89731、( 4 6 ) NM\_001126270、( 4 7 ) NM\_024356  
、( 4 8 ) XM\_220618、( 4 9 ) AF039218、( 5 0 ) NM\_013096、( 5 1 ) NM\_001106787、  
( 5 2 ) NM\_001109537、( 5 3 ) U97667、( 5 4 ) NM\_001011904、( 5 5 ) NM\_012568、  
( 5 6 ) NM\_001109227、( 5 7 ) NM\_001105822、( 5 8 ) L06040、( 5 9 ) NM\_031010、  
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。
- 【請求項 18】 20  
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】 30  
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、パラログまたはオーソログであることを特徴とする、請求項 17 ないし請求項 2  
1 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】 40  
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】 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 2 5 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 2 7】

前記ヌクレオチドは、mRNA、cDNA、合成オリゴヌクレオチドであることを特徴とする請求項 2 6 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 2 8】

前記ヌクレオチドは、標識化ヌクレオチドであることを特徴とする請求項 2 6 または請求項 2 7 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 2 9】

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 7 ないし請求項 2 3 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。

10

【請求項 3 0】

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 1 7 ないし請求項 2 3 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 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。

20

【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、ヒドラジノー水和物、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、

30

40

(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\_053592、(2) U64030、(3) Y00350、(4) M22642、(5) NM\_001107529、(6) NM\_017169、(7) NM\_001007742、(8) NM\_001037095、(9) AW434086、(10) AF035951、(11) NM\_053818、(12) NM\_001106847、(13) NM\_133285、(14) AF367448、(15) XM\_222462、(16) NM\_012899、(17) NM\_053983、(18) NM\_001135875、(19) NM\_133294、(20) NM\_022539、(21) NM\_022540、(22) NM\_053707、(23) NM\_022597、(24) NM\_031008、(25) NM\_012766、(26) J00750、(27) NM\_022381、(28) NM\_001029917、(29) NM\_001013236、(30) NM\_012915、(31) NM\_017038、(32) AA851352、(33) NM\_001107882、(34) NM\_134395、(

50

3 5 ) NM\_024127、( 3 6 ) NM\_001105968、( 3 7 ) NM\_022588、( 3 8 ) U10188、( 3 9 ) X54467、( 4 0 ) NM\_001105833、( 4 1 ) D14015、( 4 2 ) NM\_001002016、( 4 3 ) D5 0564、( 4 4 ) NM\_147135、( 4 5 ) D89731、( 4 6 ) NM\_001126270、( 4 7 ) NM\_024356、( 4 8 ) XM\_220618、( 4 9 ) AF039218、( 5 0 ) NM\_013096、( 5 1 ) NM\_001106787、( 5 2 ) NM\_001109537、( 5 3 ) U97667、( 5 4 ) NM\_001011904、( 5 5 ) NM\_012568、( 5 6 ) NM\_001109227、( 5 7 ) NM\_001105822、( 5 8 ) L06040、( 5 9 ) NM\_031010、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】

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 1 0 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 6】

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 2 0 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 7】

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 0 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 8】

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 3 3 ないし請求項 3 7 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 3 9】

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 3 3 ないし請求項 3 8 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 4 0】

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 つを用いることを特徴とする、請求項 3 3 ないし請求項 3 9 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 4 1】

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。

【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。

【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】

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。

【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 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、

10

20

30

40

50

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。

【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。

10

【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、公的な環境安心イノベーションプログラムが進められている。

【0003】

20

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。

【0004】

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。

【0005】

30

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

【0006】

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）（非特許文献4、非特許文献5）。

【0007】

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、従来の手法では得られない膨大かつ多様な観点による生物学的現象の評価を可能にした。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】特開2004-233105号公報

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Alison H.Harrill et al., Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. November; 4(11): 1379-1389(2008)

【非特許文献2】Elisa Giovannetti et al., Mol. Cancer Ther. 5(6): 1387-

50



1 3 9 4 ( 2 0 0 6 )

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

【非特許文献4】Preeti Chavanet 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 YAKUGAKUASSHI : 1 2 7 ( 1 2 ) : 1 9 6 7 - 1 9 7 4 ( 2 0 0 7 )

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

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

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

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、従来の毒性学的な手法では、獲得される生物学的情報は知見の種類が限られること、並びに、長期毒性試験では費用と効率等の面で問題があった。

【0011】

また、従来の手法では、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。

20

【0012】

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】

【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](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任意に選択した複数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、遺伝子発現レベルを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59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。

30

【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\_053592、（2）U64030、（3）Y00350、（4）M22642、（5）NM\_001107529、（6）NM\_017169、（7）NM\_001007742、（8）NM\_001037095、（9）AW434086、（10）AF035951、（11）NM\_053818、（12）NM\_001106847、（13）NM\_133285、（14）AF367448、（15）XM\_222462、（16）NM\_012899、（17）NM\_053983、（18）NM\_01135875、（19）NM\_133294、（20）NM\_022539、（21）NM\_022540、（22）NM\_053707、（23）NM\_022597、（24）NM\_031008、（25）NM\_012766、（26）J00750、（27）NM\_022381、（28）NM\_001029917、（29）NM\_001013236、（30）NM\_012915、（31）NM\_017038、（32）AA851352、（33）NM\_001107882、（34）NM\_134395、（35）NM\_024127、（36）NM\_001105968、（37）NM\_022588、（38）U10188、（39）X54467、（40）NM\_001105833、（41）D14015、（42）NM\_001002016、（43）D50564、（44）NM\_147135、（45）D89731、（46）NM\_001126270、（47）NM\_024356、（48）XM\_220618、（49）AF039218、（50）NM\_013096、（51）NM\_001106787、

40

50

( 5 2 ) NM\_001109537、( 5 3 ) U97667、( 5 4 ) NM\_001011904、( 5 5 ) NM\_012568、( 5 6 ) NM\_001109227、( 5 7 ) NM\_001105822、( 5 8 ) L06040、( 5 9 ) NM\_031010、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、である。

10

#### 【 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 1 0 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 2 0 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 5 0 個以上であることがさらにより望ましい。

#### 【 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。

20

#### 【 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。

#### 【 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。

30

#### 【 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、合成オリゴヌクレオチドであってもよく、さらに、( 1 2 ) 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 2 1 】

さらに、上記 ( 1 ) ~ ( 7 ) において、( 1 3 ) 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。

40

#### 【 0 0 2 2 】

また、上記 ( 1 3 ) において、( 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ってもよく、( 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ってもよい。また、( 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てもよい。

#### 【 0 0 2 3 】

さらに、本発明は、( 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、

50

( 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、

( 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 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\_053592、 ( 2 ) U64030、 ( 3 ) Y00350、 ( 4 ) M22642、 ( 5 ) NM\_001107529、 ( 6 ) NM\_017169、 ( 7 ) NM\_001007742、 ( 8 ) NM\_001037095、 ( 9 ) AW434086、 ( 10 ) AF035951、 ( 11 ) NM\_053818、 ( 12 ) NM\_001106847、 ( 13 ) NM\_133285、 ( 14 ) AF367448、 ( 15 ) XM\_222462、 ( 16 ) NM\_012899、 ( 17 ) NM\_053983、 ( 18 ) NM\_01135875、 ( 19 ) NM\_133294、 ( 20 ) NM\_022539、 ( 21 ) NM\_022540、 ( 22 ) NM\_053707、 ( 23 ) NM\_022597、 ( 24 ) NM\_031008、 ( 25 ) NM\_012766、 ( 26 ) J00750、 ( 27 ) NM\_022381、 ( 28 ) NM\_001029917、 ( 29 ) NM\_001013236、 ( 30 ) NM\_012915、 ( 31 ) NM\_017038、 ( 32 ) AA851352、 ( 33 ) NM\_001107882、 ( 34 ) NM\_134395、 ( 35 ) NM\_024127、 ( 36 ) NM\_001105968、 ( 37 ) NM\_022588、 ( 38 ) U10188、 ( 39 ) X54467、 ( 40 ) NM\_001105833、 ( 41 ) D14015、 ( 42 ) NM\_001002016、 ( 43 ) D50564、 ( 44 ) NM\_147135、 ( 45 ) D89731、 ( 46 ) NM\_001126270、 ( 47 ) NM\_024356、 ( 48 ) XM\_220618、 ( 49 ) AF039218、 ( 50 ) NM\_013096、 ( 51 ) NM\_001106787、 ( 52 ) NM\_001109537、 ( 53 ) U97667、 ( 54 ) NM\_001011904、 ( 55 ) NM\_012568、 ( 56 ) NM\_001109227、 ( 57 ) NM\_001105822、 ( 58 ) L06040、 ( 59 ) NM\_031010、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 1 0 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 2 0 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 5 0 個以上であることがさらに望ましい。

#### 【 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、パラログまたはオソログであってもよい。

#### 【 0 0 2 6 】

更に、 ( 2 3 ) 上記 ( 1 7 ) ~ ( 2 2 ) 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 2 7 】

更に、 ( 2 4 ) 上記 ( 1 7 ) ~ ( 2 2 ) 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。

## 【 0 0 2 8 】

更に、( 2 5 ) 上記 ( 2 4 ) において、前記ハイブリダイゼーション法が、マイクロレイ法又はプロット法であってもよく、( 2 6 ) 前記マイクロ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 2 9 】

また、( 2 7 ) 上記 ( 1 0 ) 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、( 2 8 ) 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 0 】

さらに、上記 ( 1 7 ) ~ ( 2 3 ) において、( 2 9 ) 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。

10

## 【 0 0 3 1 】

また、上記 ( 1 7 ) ~ ( 2 3 ) において、( 3 0 ) 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、( 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ってもよい。また、( 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てもよい。

## 【 0 0 3 2 】

20

さらに、本発明は、( 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、テトラブプロモエタン、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、

30

( 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\_053592、( 2 ) U64030、( 3 ) Y00350、( 4 ) M22642、( 5 ) NM\_001107529、( 6 ) NM\_017169、( 7 ) NM\_001007742、( 8 ) NM\_001037095、( 9 ) AW434086、( 1 0 ) AF035951、( 1 1 ) NM\_053818、( 1 2 ) NM\_001106847、( 1 3 ) NM\_133285、( 1 4 ) AF367448、( 1 5 ) XM\_222462、( 1 6 ) NM\_012899、( 1 7 ) NM\_053983、( 1 8 ) NM\_001135875、( 1 9 ) NM\_133294、( 2 0 ) NM\_022539、( 2 1 ) NM\_022540、( 2 2 ) NM\_053707、( 2 3 ) NM\_022597、( 2 4 ) NM\_031008、( 2 5 ) NM\_012766、( 2 6 ) J00750、( 2 7 ) NM\_022381、( 2 8 ) NM\_001029917、( 2 9 ) NM\_001013236、( 3 0 ) NM\_012915、( 3 1 ) NM\_017038、( 3 2 ) AA851352、( 3 3 ) NM\_001107882、( 3 4 ) NM\_134395、( 3 5 ) NM\_024127、( 3 6 ) NM\_001105968、( 3 7 ) NM\_022588、( 3 8 ) U10188、( 3 9 ) X54467、( 4 0 ) NM\_001105833、( 4 1 ) D14015、( 4 2 ) NM\_001002016、( 4 3 ) D50564、( 4 4 ) NM\_147135、( 4 5 ) D89731、( 4 6 ) NM\_001126270、( 4 7 ) NM\_024356、( 4 8 ) XM\_220618、( 4 9 ) AF039218、( 5 0 ) NM\_013096、( 5 1 ) NM\_001106787、( 5 2 ) NM\_001109537、( 5 3 ) U97667、( 5 4 ) NM\_001011904、( 5 5 ) NM\_012568、( 5 6 ) NM\_001109227、( 5 7 ) NM\_001105822、( 5 8 ) L06040、( 5 9 ) NM\_031010、

40

50

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。

#### 【0033】

さらに、(34)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、(35)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、(36)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、(37)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望ましい。

#### 【0034】

さらに、(38)上記(33)～(37)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。

#### 【0035】

更に、(39)上記(33)～(38)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。

#### 【0036】

更に、(40)上記(33)～(39)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。

#### 【0037】

更に、(41)上記(40)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、(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ってもよい。

#### 【0038】

また、(43)上記(42)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、(44)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。

#### 【0039】

さらに、上記(33)～(39)において、(45)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。

#### 【0040】

また、上記(33)～(39)において、(46)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、(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ってもよい。また、(48)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

20

30

40

50

## 【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、化学物質を生体に投与した後の臓器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】各種化学物質を適量28日間反復投与した投与群の脾臓重量を化学物質を溶解する際に用いた溶媒を28日間反復投与した対照群の脾臓重量で除した値(相対重量比)をグラフで表す。棒グラフの縦軸は相対重量比(倍)を表し、棒グラフの下段の記号は、それぞれ「nma」はN-メチルアニリンを、「2bo」は2-ブタノンオキシムを、「34x」は3,4-キシリジンを、「2ip」は2-イソプロポキシエタノールを、「23d」は2,3-ジメチルアニリンを、「hnh」はヒドラジノー水和物を表す。

【図2】各種化学物質を適量28日間反復投与した投与群の脾臓と対照群の脾臓と間で統計的有意差( $P < 0.01$ )のある遺伝子群をスチューデントのt検定により抽出し、その抽出した遺伝子数をグラフで表している。縦軸は遺伝子数を表しており、棒グラフの下段にある記号は、それぞれ「nma」はN-メチルアニリンを、「2bo」は2-ブタノンオキシムを、「34x」は3,4-キシリジンを、「2ip」は2-イソプロポキシエタノールを、「23d」は2,3-ジメチルアニリンを、「hnh」はヒドラジノー水和物を表す。

【図3】N-メチルアニリン、2-ブタノンオキシム、3,4-キシリジン、2-イソプロポキシエタノール、2,3-ジメチルアニリン、ヒドラジノー水和物を適量28日間反復投与した投与群の脾臓と対照群の脾臓と間で統計的有意差( $P < 0.01$ )のある遺伝子群をスチューデントのt検定により抽出した遺伝子の発現レベルを表している。上段のアルファベットおよ

10

20

30

40

50

び数値は、それぞれ「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」はフタル酸ジヘブチルを、「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

【図4】階層的クラスタ分析を表す。本件発明によって特定された59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。デンドログラムの下のカラムに記載されているアルファベットおよび数値は、それぞれ「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」はフタル酸ジヘブチルを、「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。

【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。

40

【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】

「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

50

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またはホモログを用いてもよい。

【0054】

「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。

【0055】

「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。

【0056】

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。

【0057】

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。

【0058】

「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。

【0059】

「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。

【0060】

「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。

【0061】

「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。

【0062】

「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。

【0063】

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。

【0064】

「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。

【0065】

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。

10

20

30

40

50



## 【 0 0 6 6 】

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。

## 【 0 0 6 7 】

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。

## 【 0 0 6 8 】

上記プローブの標識化に用いられる標識試薬は、例えば放射性同位元素である[125I]、[131I]、[3H]、[14C]、[32P]、[35S]、酵素であるーガラクトシダーゼ、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。

## 【 0 0 6 9 】

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。

## 【 0 0 7 0 】

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。

## 【 0 0 7 1 】

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。

## 【 0 0 7 2 】

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

## 【 0 0 7 3 】

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。

## 【 0 0 7 4 】

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

10

20

30

40

50

ノ酸等の分子に特異的に結合する核酸分子である。

【0075】

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。

【0076】

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）よりも高いまたは低いことを用いる。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。

【0077】

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ソ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。

【0078】

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。

【0079】

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。

【0080】

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。

【0081】

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。

【0082】

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】

【0083】

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セットは、N-メチルアニリン、2-ブタノンオキシム、3,4-キシリジン、2-イソプロポキシエタノール、2,3-ジメチルアニリン、または、ヒドラジーン水和物を雄のSprague Dawleyラット（6週齢）（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群である。

【0084】

本発明で用いられる生体応答遺伝子セット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。

【0085】

[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、

- (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、

10

20

30

40

50

- (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。

【0086】

#### [動物試験]

国立医薬品食品衛生研究所の既存化学物質毒性データベース ([http://dra4.nihs.go.jp/mhlw\\_data/jsp/SearchPage.jsp](http://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/jsp/SearchPage.jsp)) に登録されている 30 種類の化学物質脾臓毒性が報告されている化学物質 2-ブタノンオキシム (和光純薬株式会社) (100mg/kg)、m-キシリレンジアミン (東京化成工業株式会社) (400mg/kg)、3-シアノピリジン (和光純薬株式会社) (180mg/kg)、2-(2-アミノエチルアミノ)エタノール (和光純薬株式会社) (1000mg/kg)、テトラヒドロフルフリルアルコール (和光純薬株式会社) (600mg/kg)、メタクリルアミド (和光純薬株式会社) (150mg/kg)、スルホラン (和光純薬株式会社) (700mg/kg)、2-イソプロポキシエタノール (和光純薬株式会社) (500mg/kg)、ヒドラジン-水和物 (和光純薬株式会社) (30mg/kg)、4-エチルモルホリン (和光純薬株式会社) (500mg/kg)、メタクリル酸エチルトリメチルアンモニウムクロリド (和光純薬株式会社) (1000mg/kg)、塩化ベンジルトリメチルアンモニウム (和光純薬株式会社) (120mg/kg)、m-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム (和光純薬株式会社) (1000mg/kg)、1-ナフチルアミン-4-スルホン酸ナトリウム四水和物 (和光純薬株式会社) (1000mg/kg)、3-メトキシ-3-メチル-1-ブタノール (和光純薬株式会社) (1000mg/kg)、o-ジクロロベンゼン (和光純薬株式会社) (500mg/kg)、3,4-キシリジン (和光純薬株式会社) (250mg/kg)、N-メチルアニリン (和光純薬株式会社) (125mg/kg)、トリレンジイソシアナート (和光純薬株式会社) (300mg/kg)、2-(ジブチルアミノ)エタノール (和光純薬株式会社) (250mg/kg)、p-クミルフェノール (和光純薬株式会社) (700mg/kg)、m-クレゾール (和光純薬株式会社) (1000mg/kg)、2,3-ジメチルアニリン (東京化成工業株式会社) (200mg/kg)、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (和光純薬株式会社) (300mg/kg)、フタル酸ジヘプチル (和光純薬株式会社) (1000mg/kg)、テトラプロモエタン (和光純薬株式会社) (200mg/kg)、アジピン酸ジブチル (和光純薬株式会社) (1000mg/kg)、p-エチルフェノール (和光純薬株式会社) (1000mg/kg)、-t-ブチルフェノール (和光純薬株式会社) (500mg/kg) および p-(1,1,3,3,-テトラメチルブチル)フェノール (和光純薬株式会社) (300mg/kg) を 28 日間反復して Sprague Dawley ラット (7 週齢、雄) に経口投与した。正常対照群として、オリブ油 (小堺製薬株式会社製) または注射用水 (日本薬局方 注射用水、大塚蒸留水) 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、例えば数日間でもよい。

【0087】

#### [全 RNA の抽出]

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。

【0088】

#### [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。

【0089】

#### [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 (Scheda, 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。

#### 【0090】

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。

#### 【0091】

##### [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、公開特許公報 (特開2004-233105) 記載の方法により行った。

#### 【0092】

##### [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 (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。

#### 【0093】

##### [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、MicropureEZ (ミリポア社製) およびMicroconYM30 (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 µlに調製した。

#### 【0094】

##### [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。

#### 【0095】

##### [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。

#### 【0096】

##### [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

10

20

30

40

50

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。

【0097】

[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、2-ブタノンオキシム、3,4-キシリジン、2-イソプロポキシエタノール、2,3-ジメチルアニリン、または、ヒドラジーン-水和物を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とを比較して、それぞれ、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において、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553遺伝子を抽出した(図2)。さらに、それぞれの化学物質において特定された遺伝子群の中から、4つ以上の化学物質で重複して抽出された遺伝子群(59遺伝子)を特定した(表1~6)。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、「C1」、「C2」、「C3」、「C4」、「C5」および「C6」はそれぞれ対照群のラットであることを表しており、「C1」、「C2」および「C3」が生理食塩水を、「C4」、「C5」および「C6」がオリーブオイルを投与した群を示している。また、「2bo」は2-ブタノンオキシムを、「mxa」はm-キシリレンジアミンを、「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、「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」はヒドラジーン-水和物を、「4em」は4-エチルモルホリンを、「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、「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、「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、「dnc」はN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミドを、「dhp」はフタル酸ジヘブチルを、「tbe」はテトラブプロモエタンを、「dba」はアジピン酸ジブチルを、「pep」はp-エチルフェノールを、「tbp」は-t-ブチルフェノールを、「tmp」はp-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノールをそれぞれ28日間反復投与したラットであることを示している。また、同一の記号が記されているものは、それぞれの化学物質に対して複数個体で試験を行ったことを示しており、それぞれ個体が異なることを示している。また、数値は、それぞれの化学物質を28日間ラットに反復して投与した後の脾臓の遺伝子発現レベルを対照群の平均値の相対比に換算した値であり、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。

【0098】

10

20

30

40

【表 1】

Name	ID	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C21	C22	C23	C24	C25	C26	C27	C28	C29	C30	C31	C32	C33	C34	C35	C36	C37	C38	C39	C40	C41	C42	C43	C44	C45	C46	C47	C48	C49	C50	C51	C52	C53	C54	C55	C56	C57	C58	C59	C60	C61	C62	C63	C64	C65	C66	C67	C68	C69	C70	C71	C72	C73	C74	C75	C76	C77	C78	C79	C80	C81	C82	C83	C84	C85	C86	C87	C88	C89	C90	C91	C92	C93	C94	C95	C96	C97	C98	C99	C100	C101	C102	C103	C104	C105	C106	C107	C108	C109	C110	C111	C112	C113	C114	C115	C116	C117	C118	C119	C120	C121	C122	C123	C124	C125	C126	C127	C128	C129	C130	C131	C132	C133	C134	C135	C136	C137	C138	C139	C140	C141	C142	C143	C144	C145	C146	C147	C148	C149	C150	C151	C152	C153	C154	C155	C156	C157	C158	C159	C160	C161	C162	C163	C164	C165	C166	C167	C168	C169	C170	C171	C172	C173	C174	C175	C176	C177	C178	C179	C180	C181	C182	C183	C184	C185	C186	C187	C188	C189	C190	C191	C192	C193	C194	C195	C196	C197	C198	C199	C200	C201	C202	C203	C204	C205	C206	C207	C208	C209	C210	C211	C212	C213	C214	C215	C216	C217	C218	C219	C220	C221	C222	C223	C224	C225	C226	C227	C228	C229	C230	C231	C232	C233	C234	C235	C236	C237	C238	C239	C240	C241	C242	C243	C244	C245	C246	C247	C248	C249	C250	C251	C252	C253	C254	C255	C256	C257	C258	C259	C260	C261	C262	C263	C264	C265	C266	C267	C268	C269	C270	C271	C272	C273	C274	C275	C276	C277	C278	C279	C280	C281	C282	C283	C284	C285	C286	C287	C288	C289	C290	C291	C292	C293	C294	C295	C296	C297	C298	C299	C300	C301	C302	C303	C304	C305	C306	C307	C308	C309	C310	C311	C312	C313	C314	C315	C316	C317	C318	C319	C320	C321	C322	C323	C324	C325	C326	C327	C328	C329	C330	C331	C332	C333	C334	C335	C336	C337	C338	C339	C340	C341	C342	C343	C344	C345	C346	C347	C348	C349	C350	C351	C352	C353	C354	C355	C356	C357	C358	C359	C360	C361	C362	C363	C364	C365	C366	C367	C368	C369	C370	C371	C372	C373	C374	C375	C376	C377	C378	C379	C380	C381	C382	C383	C384	C385	C386	C387	C388	C389	C390	C391	C392	C393	C394	C395	C396	C397	C398	C399	C400	C401	C402	C403	C404	C405	C406	C407	C408	C409	C410	C411	C412	C413	C414	C415	C416	C417	C418	C419	C420	C421	C422	C423	C424	C425	C426	C427	C428	C429	C430	C431	C432	C433	C434	C435	C436	C437	C438	C439	C440	C441	C442	C443	C444	C445	C446	C447	C448	C449	C450	C451	C452	C453	C454	C455	C456	C457	C458	C459	C460	C461	C462	C463	C464	C465	C466	C467	C468	C469	C470	C471	C472	C473	C474	C475	C476	C477	C478	C479	C480	C481	C482	C483	C484	C485	C486	C487	C488	C489	C490	C491	C492	C493	C494	C495	C496	C497	C498	C499	C500	C501	C502	C503	C504	C505	C506	C507	C508	C509	C510	C511	C512	C513	C514	C515	C516	C517	C518	C519	C520	C521	C522	C523	C524	C525	C526	C527	C528	C529	C530	C531	C532	C533	C534	C535	C536	C537	C538	C539	C540	C541	C542	C543	C544	C545	C546	C547	C548	C549	C550	C551	C552	C553	C554	C555	C556	C557	C558	C559	C560	C561	C562	C563	C564	C565	C566	C567	C568	C569	C570	C571	C572	C573	C574	C575	C576	C577	C578	C579	C580	C581	C582	C583	C584	C585	C586	C587	C588	C589	C590	C591	C592	C593	C594	C595	C596	C597	C598	C599	C600	C601	C602	C603	C604	C605	C606	C607	C608	C609	C610	C611	C612	C613	C614	C615	C616	C617	C618	C619	C620	C621	C622	C623	C624	C625	C626	C627	C628	C629	C630	C631	C632	C633	C634	C635	C636	C637	C638	C639	C640	C641	C642	C643	C644	C645	C646	C647	C648	C649	C650	C651	C652	C653	C654	C655	C656	C657	C658	C659	C660	C661	C662	C663	C664	C665	C666	C667	C668	C669	C670	C671	C672	C673	C674	C675	C676	C677	C678	C679	C680	C681	C682	C683	C684	C685	C686	C687	C688	C689	C690	C691	C692	C693	C694	C695	C696	C697	C698	C699	C700	C701	C702	C703	C704	C705	C706	C707	C708	C709	C710	C711	C712	C713	C714	C715	C716	C717	C718	C719	C720	C721	C722	C723	C724	C725	C726	C727	C728	C729	C730	C731	C732	C733	C734	C735	C736	C737	C738	C739	C740	C741	C742	C743	C744	C745	C746	C747	C748	C749	C750	C751	C752	C753	C754	C755	C756	C757	C758	C759	C760	C761	C762	C763	C764	C765	C766	C767	C768	C769	C770	C771	C772	C773	C774	C775	C776	C777	C778	C779	C780	C781	C782	C783	C784	C785	C786	C787	C788	C789	C790	C791	C792	C793	C794	C795	C796	C797	C798	C799	C800	C801	C802	C803	C804	C805	C806	C807	C808	C809	C810	C811	C812	C813	C814	C815	C816	C817	C818	C819	C820	C821	C822	C823	C824	C825	C826	C827	C828	C829	C830	C831	C832	C833	C834	C835	C836	C837	C838	C839	C840	C841	C842	C843	C844	C845	C846	C847	C848	C849	C850	C851	C852	C853	C854	C855	C856	C857	C858	C859	C860	C861	C862	C863	C864	C865	C866	C867	C868	C869	C870	C871	C872	C873	C874	C875	C876	C877	C878	C879	C880	C881	C882	C883	C884	C885	C886	C887	C888	C889	C890	C891	C892	C893	C894	C895	C896	C897	C898	C899	C900	C901	C902	C903	C904	C905	C906	C907	C908	C909	C910	C911	C912	C913	C914	C915	C916	C917	C918	C919	C920	C921	C922	C923	C924	C925	C926	C927	C928	C929	C930	C931	C932	C933	C934	C935	C936	C937	C938	C939	C940	C941	C942	C943	C944	C945	C946	C947	C948	C949	C950	C951	C952	C953	C954	C955	C956	C957	C958	C959	C960	C961	C962	C963	C964	C965	C966	C967	C968	C969	C970	C971	C972	C973	C974	C975	C976	C977	C978	C979	C980	C981	C982	C983	C984	C985	C986	C987	C988	C989	C990	C991	C992	C993	C994	C995	C996	C997	C998	C999	C1000	C1001	C1002	C1003	C1004	C1005	C1006	C1007	C1008	C1009	C1010	C1011	C1012	C1013	C1014	C1015	C1016	C1017	C1018	C1019	C1020	C1021	C1022	C1023	C1024	C1025	C1026	C1027	C1028	C1029	C1030	C1031	C1032	C1033	C1034	C1035	C1036	C1037	C1038	C1039	C1040	C1041	C1042	C1043	C1044	C1045	C1046	C1047	C1048	C1049	C1050	C1051	C1052	C1053	C1054	C1055	C1056	C1057	C1058	C1059	C1060	C1061	C1062	C1063	C1064	C1065	C1066	C1067	C1068	C1069	C1070	C1071	C1072	C1073	C1074	C1075	C1076	C1077	C1078	C1079	C1080	C1081	C1082	C1083	C1084	C1085	C1086	C1087	C1088	C1089	C1090	C1091	C1092	C1093	C1094	C1095	C1096	C1097	C1098	C1099	C1100	C1101	C1102	C1103	C1104	C1105	C1106	C1107	C1108	C1109	C1110	C1111	C1112	C1113	C1114	C1115	C1116	C1117	C1118	C1119	C1120	C1121	C1122	C1123	C1124	C1125	C1126	C1127	C1128	C1129	C1130	C1131	C1132	C1133	C1134	C1135	C1136	C1137	C1138	C1139	C1140	C1141	C1142	C1143	C1144	C1145	C1146	C1147	C1148	C1149	C1150	C1151	C1152	C1153	C1154	C1155	C1156	C1157	C1158	C1159	C1160	C1161	C1162	C1163	C1164	C1165	C1166	C1167	C1168	C1169	C1170	C1171	C1172	C1173	C1174	C1175	C1176	C1177	C1178	C1179	C1180	C1181	C1182	C1183	C1184	C1185	C1186	C1187	C1188	C1189	C1190	C1191	C1192	C1193	C1194	C1195	C1196	C1197	C1198	C1199	C1200	C1201	C1202	C1203	C1204	C1205	C1206	C1207	C1208	C1209	C1210	C1211	C1212	C1213	C1214	C1215	C1216	C1217	C1218	C1219	C1220	C1221	C1222	C1223	C1224	C1225	C1226	C1227	C1228	C1229	C1230	C1231	C1232	C1233	C1234	C1235	C1236	C1237	C1238	C1239	C1240	C1241	C1242	C1243	C1244	C1245	C1246	C1247	C1248	C1249	C1250	C1251	C1252	C1253	C1254	C1255	C1256	C1257	C1258	C1259	C1260	C1261	C1262	C1263	C1264	C1265	C1266	C1267	C1268	C1269	C1270	C1271	C1272	C1273	C1274	C1275	C1276	C1277	C1278	C1279	C1280	C1281	C1282	C1283	C1284	C1285	C1286	C1287	C1288	C1289	C1290	C1291	C1292	C1293	C1294	C1295	C1296	C1297	C1298	C1299	C1300	C1301	C1302	C1303	C1304	C1305	C1306	C1307	C1308	C1309	C1310	C1311	C1312	C1313	C1314	C1315	C1316	C1317	C1318	C1319	C1320	C1321	C1322	C1323	C1324	C1325	C1326	C1327	C1328	C1329	C1330	C1331	C1332	C1333	C1334	C1335	C1336	C1337	C1338	C1339	C1340	C1341	C1342	C1343	C1344	C1345	C1346	C1347	C1348	C1349	C1350	C1351	C1352	C1353	C1354	C1355	C1356	C1357	C1358	C1359	C1360	C1361	C1362	C1363	C1364	C1365	C1366	C1367	C1368	C1369	C1370	C1371	C1372	C1373	C1374	C1375	C1376	C1377	C1378	C1379	C1380	C1381	C1382	C1383	C1384	C1385	C1386	C1387	C1388	C1389	C1390	C1391	C1392	C1393	C1394	C1395	C1396	C1397	C1398	C1399	C1400	C1401	C1402	C1403	C1404	C1405	C1406	C1407	C1408	C1409	C1410	C1411	C1412	C1413	C1414	C1415	C1416	C1417	C1418	C1419	C1420	C1421	C1422	C1423	C1424	C1425	C1426	C1427	C1428	C1429	C1430	C1431	C1432	C1433	C1434	C1435	C1436	C1437	C1438	C1439	C1440	C1441	C1442	C1443	C1444	C1445	C1446	C1447	C1448	C1449	C1450	C1451	C1452	C1453	C1454	C1455	C1456	C1457	C1458	C1459	C1460	C1461	C1462	C1463	C1464	C1465	C1466	C1467	C1468	C1469	C1470	C1471	C1472	C1473	C1474	C1475	C1476	C1477	C1478	C1479	C1480	C1481	C
------	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	---

10

20

30

40

【 0 1 0 2 】



0

20

**【 0 1 0 3 】**

20



【表 6】

	Name	ID	C6	C6	C6	pef	tpb	tmp
1	Cyclin D3 (Cnd3)	NM_012766	0.2374	0.2134	0.3936	-0.0983	0.1564	-0.0325
2	similar to RIKEN cDNA 0610016J10	NM_001029917	-0.0387	-0.2978	-0.0965	-0.2112	0.0884	-0.1633
3	protoporphyrinogen oxidase	NM_001105968	0.0039	-0.1477	-0.0538	0.0658	0.0871	0.0259
4	similar to ring finger protein 10	NM_001011904	0.0648	-0.6483	0.081	-0.4417	-0.312	-0.3196
5	cathepsin B (Ctsb)	NM_022597	-0.1025	-0.0204	-0.2516	-0.2417	-0.3387	-0.124
6	UI-R-E0-ct-b-06-0-UIs1 UI-R-E0 cDNA	NM_022588	0.4115	0.2134	0.4078	0.2193	-0.2145	0.2719
7	kinetochore associated 2	NM_001126270	-0.9684	-0.1666	0.2304	-0.1265	0	-0.5944
8	thymidine kinase	M22642	0.1232	-0.1746	0.2451	-0.152	0.0532	-0.4283
9	deoxyuridine triphosphatase (Dut), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 2	NM_053592	-0.2265	-0.4211	0.0051	-0.4029	-0.2839	-0.4651
10	protein regulator of cytokinesis 1	NM_001107529	0.0331	-0.154	0.1161	-0.3838	-0.1405	-0.2537
11	kinesin-related protein KRP1 (KRP1)	AF035951	-0.3149	-0.4023	0.0051	-0.4897	0.0043	-0.0209
12	Methionyl aminopeptidase 2 (Metap2)	NM_022539	-0.2193	-0.3673	0.081	-0.1895	-0.2245	-0.4651
13	Adaptor-related protein complex 2, alpha 2 subunit (Ap2a2)	NM_031008	0.0117	-0.3455	-0.4332	-0.3337	-0.1932	-0.5901
14	ribonucleotide reductase M1	AA851352	-0.592	-0.408	-0.0628	-0.5206	-0.1706	-0.4849
15	ATPase inhibitory factor 1 (Atpif1)	NM_012915	-0.6276	-0.4345	-0.2058	-0.4163	-0.4394	-0.5794
16	Clone RKIEJ47	NM_001013236	-0.7351	-0.2601	-0.0735	-0.399	-0.5623	-0.3464
17	AIM-1	D89731	-0.585	-0.1368	-0.2311	-0.4144	-0.1981	-0.8729
18	proliferating cell nuclear antigen (Pcna)	NM_022381	-0.4921	-0.5029	0.0166	-0.2887	-0.5456	-0.6715
19	transmembrane protein 14C (Tmem14c), transcript variant 1	NM_134395	-0.2861	-0.2669	-0.29	-0.3688	-0.424	-0.2759
20	cyclin E	D14015	-0.1009	-0.3618	-0.1373	-0.2162	0.0128	-0.5334
21	citron (Cit)	AF039218	-0.599	-0.2217	0.1699	0.1294	-0.1932	-0.6491
22	Polo-like kinase 1 (Drosophila) (Plk1)	U10188	-0.1816	-0.446	-0.3043	-0.1862	-0.1883	-0.2301
23	deoxyuridine triphosphatase	U64030	-0.6422	-1.1556	-0.5136	-0.9315	-0.6028	-1.056
24	Uroporphyrinogen decarboxylase (Urod)	Y00350	-0.2302	-0.8629	-0.2777	-0.6397	-0.6898	-0.4283
25	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, glycine), member 9 (Slc6a9)	NM_053818	-1.0149	-1.4325	-0.5012	-0.3209	-0.4433	-0.2301
26	Peroxiredoxin 3 (Prdx3)	NM_022540	-0.8739	-0.8501	-0.6615	-1.0052	-0.8628	-0.9671
27	Hepatoma-derived growth factor (Hdgf)	NM_053707	-0.7171	-0.8099	-0.5428	-0.9426	-0.8864	-0.9923
28	preprocathepsin D (EC 3.4.23.5)	X54467	-0.7772	-0.1462	-0.7488	-0.6285	-0.8245	-0.4553
29	Clone REMDB16	NM_001107882	-0.8429	-0.9752	-0.6753	-1.1202	-1.0685	-1.1381
30	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha (Gadd45a)	NM_024127	-0.5779	-1.1275	-1.0628	-0.9735	-0.9318	-0.9179
31	round spermatid protein RSP29 gene	U97667	-0.8912	-1.6285	-0.7056	-1.5843	-1.5086	-1.4321
32	GTP cyclohydrolase 1 (Gch)	NM_024356	-0.9837	-1.728	-1.1695	-1.0983	-0.5539	-0.8992
33	aminolevulinic acid, delta-, dehydratase (Alad)	NM_012899	-1.7456	-2.1556	-1.5555	-2.5757	-1.9076	-1.9152
34	similar to RIKEN cDNA 1110033G07	NM_001007742	-1.4704	-2.029	-1.4371	-2.011	-1.6534	-1.7821
35	Moloney leukemia virus 10-like 1	NM_001106787	1.208	-0.3636	1.2855	0.4372	0.4036	0.8126
36	similar to hypothetical protein MGC30714	NM_001109227	1.3177	0.7048	1.6962	0.9233	0.5402	0.6671
37	similar to C184L ORF1 protein	NM_001109537	0.993	-0.1	0.9189	-0.136	0.3022	0.3851
38	chemokine (C-C motif) ligand 12	NM_001105822	1.5172	0	0.2777	0	0	0
39	hemoglobin alpha, adult chain 2 (Hba-a2)	NM_013096	2.2973	0.6917	2.323	1.2366	1.3432	1.3802
40	peroxiredoxin 2 (Prdx2)	NM_017169	0.469	-0.2332	0.5018	-0.2417	-0.0143	-0.0979
41	CD52 antigen (Cd52)	NM_053983	0.0132	-0.5961	0.5262	-0.3137	-0.1642	-0.3464
42	Clone UI-R-BJ0p-afd-b-02-0-UI	AW434086	0.8006	-0.2266	0.454	-0.1202	-0.0316	0.0034
43	coproporphyrinogen oxidase (predicted)	NM_001037095	-0.1658	-0.6154	-0.0568	-0.7523	-1.1017	0.0343
44	Clone UI-R-C2p-m-b-10-0-UI	NM_001106847	-0.0403	-0.7951	0	-0.5735	0	0
45	hemogen (Hemgn)	NM_133294	-0.0694	-0.5602	0	0	0	-0.2486
46	Histone cluster 1, H1d (Hist1h1d)	NM_133285	0.4991	0.3661	0.4593	0.2305	0.6395	0.2068
47	similar to M2 ribonucleotide reductase	XM_222462	0.1246	0.128	0.912	0.0878	0.2239	-0.0427
48	cyclin A2	AF367448	0.7514	0.1241	0.2524	0.0336	0.3409	-1.1601
49	glycine receptor, alpha 2 (Gira2)	NM_012568	0.8541	0.234	0.7214	-0.3209	-0.2718	0.158
50	similar to RIKEN cDNA 4432417N03	NM_001135875	0.8966	0.4167	0.9043	0.7871	0.5254	0.3818
51	SH3-binding domain kinase 1 (Sbk1)	NM_147135	0.895	0.5588	0.5221	0.496	0.5155	0.603
52	lamin A (Lmna)	NM_001002016	-1.9115	-2.2134	-2.1278	-2.4436	-2.3333	-1.926
53	phosphatase, orphan 1	NM_001105833	-1.6495	-2.2805	-1.708	-2.7794	-1.9731	-1.9643
54	protein phosphatase 1A, magnesium dependent, alpha isoform (Ppm1a)	NM_017038	-1.4111	-1.2266	-1.2742	-1.3819	-1.3226	-1.5029
55	Mercaptopyruvate sulfurtransferase (Mpst)	D50564	-1.3542	-1.503	-1.4061	-1.136	-1.4569	-1.2218
56	metallothionein-i (mt-1)	J00750	-2.9837	-3.2266	-2.5513	-3.0052	-2.962	-2.9755
57	Y box protein 2 (predicted)	XM_220618	-2.6349	-2.7002	-2.811	-2.4837	-2.1452	-2.2588
58	12-lipoxygenase	L06040	0.5816	0	0	0.376	0.2941	1.4121
59	arachidonate 15-lipoxygenase (Alox15)	NM_031010	1.7816	0.5873	1.5496	0.989	1.6818	1.0632

【0 1 0 4】

[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の類似した、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どうしがグループ化される。

【0 1 0 5】

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（図4）。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、2-ブタノンオキシム、2-イソプロポキシエタノール、3,4-キシリジン、およびN-メチルアニリンを投与したラットは3個体中3個体が、また、2,3-ジメチルアニリンを投与したラットは3個体中2個体が、ヒドラ

10

20

30

40

50

ジナー水和物を投与したラットは3個体中1個体が他の個体と明確に区別することが可能であった。これらの物質は、脾臓に対して毒性あるいは影響を与えることが知られており ([http://dra4.nihs.go.jp/mhlw\\_data/jsp/SearchPage.jsp](http://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/jsp/SearchPage.jsp))、これらのことは、これらの化学物質が生体の脾臓に与える影響を遺伝子発現レベルで明確に区別(判別)することができることを意味する。

【0106】

また、これらのことは、被検化学物質について同様の動物実験を行い、この生体応答遺伝子セットについての遺伝子発現レベルを測定した後、前記遺伝子発現データセットを用いてクラスタ分析により比較することにより、被検化学物質について、少なくとも前記の化学物質に類似した毒性の有無を判定できることを意味する。

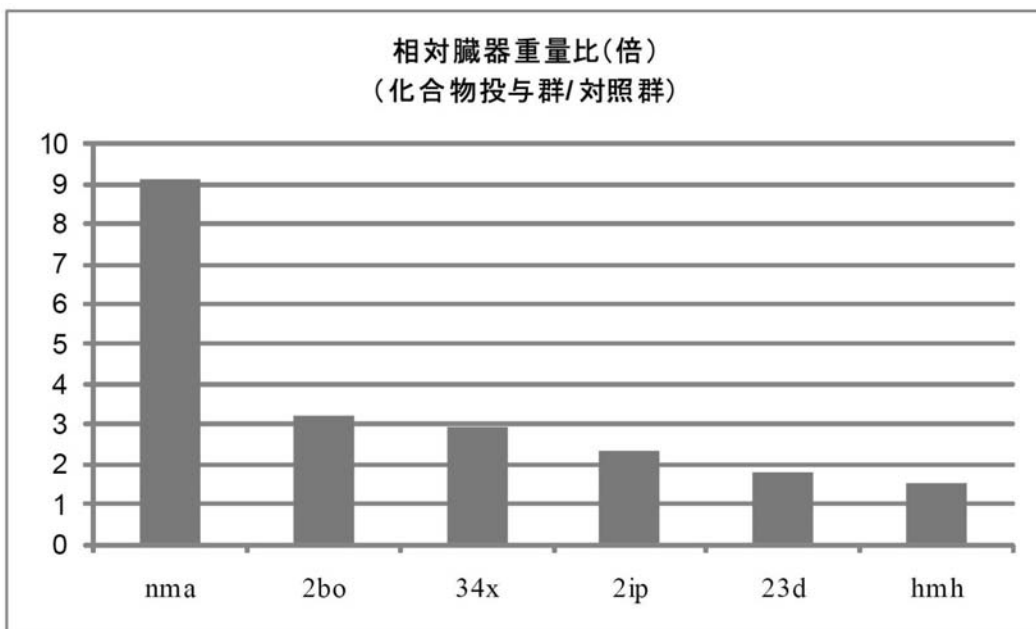
10

【産業上の利用可能性】

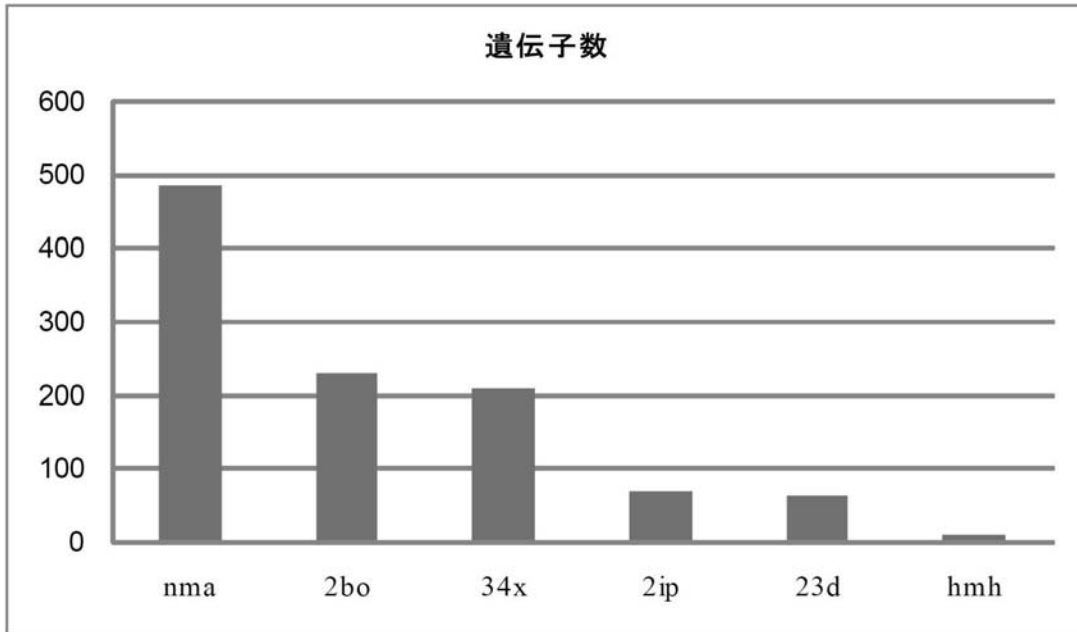
【0107】

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

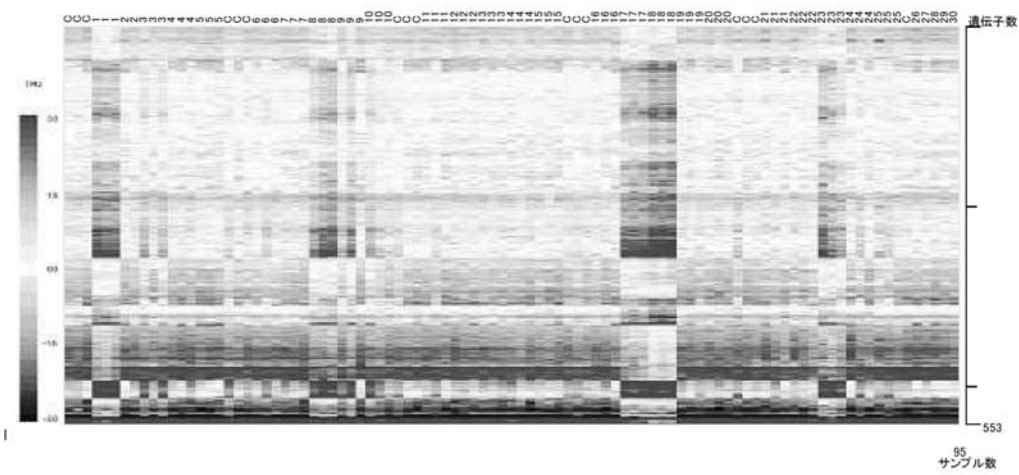
【図1】



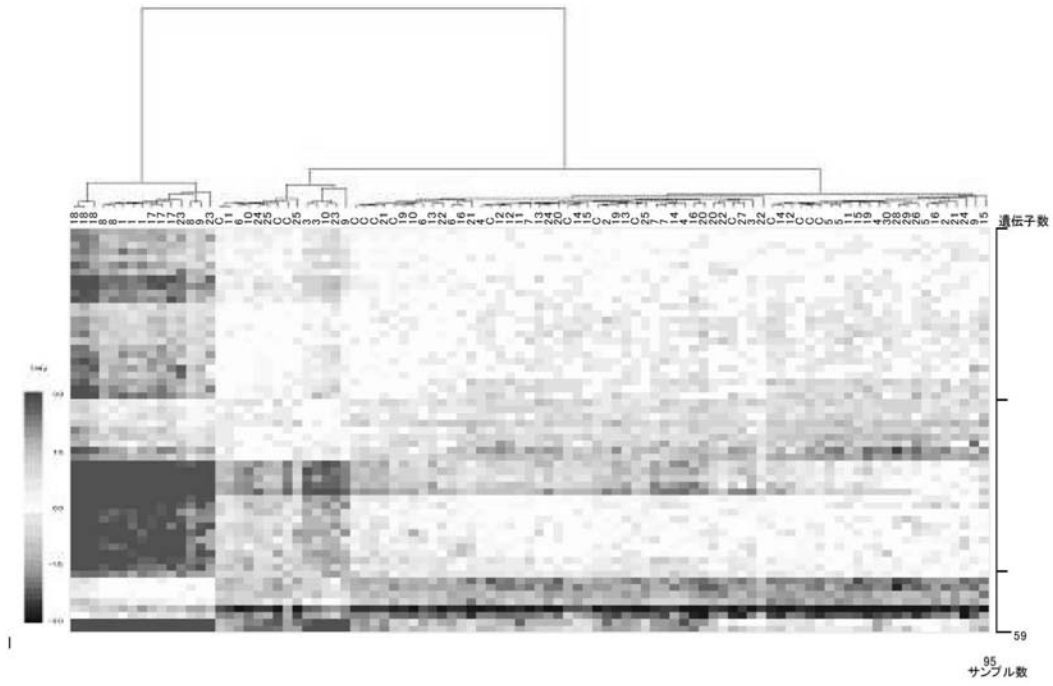
【図 2】



【図 3】



【 図 4 】



---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 4 0 B 50/06	(2006.01)	C 1 2 M 1/00	A	
		C 4 0 B 50/06		

专利名称(译)	检测和预测化学物质对生物体的影响的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2011177143A</a>	公开(公告)日	2011-09-15
申请号	JP2010046953	申请日	2010-03-03
申请(专利权)人(译)	公司的Medi格		
[标]发明人	渡辺 慎哉 河村 未佳		
发明人	渡辺 慎哉 河村 未佳		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 G01N33/53 G01N33/552 C12M1/00 C40B50/06		
FI分类号	C12Q1/68.A C12N15/00.A G01N33/53.M G01N33/53.D G01N33/552 C12M1/00.A C40B50/06 C12N15/09.200 C12Q1/6837.Z C12Q1/686.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/HA12 4B029/AA07 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/CC08 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ20 4B063/QQ99 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QS03 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02		
代理人(译)	田中彦 今井淳一		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

要解决的问题：为了解决由于血液学途径或病理性获取而难以检测脾脏毒性的评价的问题，因为指标（标记物）是有限的。ŽSOLUTION：由于外部环境变化引起的生物体内基因表达的变化是敏感的，因此确定生物毒性的基因组的鉴定能够在生物毒性之前快速准确地检测生物毒性。通过病理检查证实生物毒性之前和之前。本发明提供了一种用新基因组检测预测生物毒性的方法，其试剂盒，治疗生物毒性的方法，以及确认候选药物的生物毒性的方法。Ž