

(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2011-137659

(P2011-137659A)

(43) 公開日 平成23年7月14日(2011.7.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	M
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D
	GO 1 N 37/00	1 O 2

審査請求 未請求 請求項の数 60 O L (全 39 頁)

(21) 出願番号 特願2009-296232 (P2009-296232) (22) 出願日 平成21年12月25日 (2009.12.25)	(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
(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	(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 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

(54) 【発明の名称】 遺伝子発現レベルを指標とした化学物質の生体に対する影響の検出・予測方法

(57) 【要約】

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

【解決手段】外部環境の変化による生体内の遺伝子発現変化は鋭敏であるため、生体毒性を判別するための遺伝子セットを同定することは、生体毒性が起こる前に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腎臓組織または腎臓由来の細胞試料に対して、生体応答遺伝子群：(1)ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1、(2)AHNAK nucleoprotein、(3)alpha 1,3-galactosyltransferase 2、(4)alpha-2-macroglobulin、(5)annexin A2、(6)aquaporin 6, kidney specific、(7)calbindin 1、(8)camello-like 1、(9)cathepsin D、(10)CD24 molecule、(11)Cd44 molecule、(12)claudin 3、(13)collagen triple helix repeat containing 1、(14)cysteine sulfinic acid decarboxylase、(15)deiodinase, iodothyronine, type I、(16)deleted in colorectal carcinoma、(17)deoxyribonuclease I、(18)fibrinogen beta chain、(19)flavin containing monooxygenase 3、(20)glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit、(21)glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、(22)glycoprotein (transmembrane) nmb、(23)histamine N-methyltransferase、(24)hypothetical protein LOC56728、(25)kallikrein、(26)kidney androgen regulated protein、(27)lectin, galactoside-binding, soluble, 3、(28)matrix Gla protein、(29)oxidative stress induced growth inhibitor 1、(30)paternally expressed 12、(31)protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A、(32)RAS, dexamethasone-induced 1、(regucalcin (senescence marker protein-30)、(33)regucalcin (senescence marker protein-30)、(34)S100 calcium binding protein A10、(35)S100 calcium binding protein A6、(36)secreted phosphoprotein 2、(37)serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3K、(38)similar to CPE-receptor、(39)similar to tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a、(40)solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 2、(41)solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2、(42)solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1、(43)suppressor of cytokine signaling 3、(44)thymosin, beta 10、(45)tonin、(46)translin、(47)trefoil factor 3, intestinal、(48)ubiquitin D、(49)uromodulin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腎臓組織または腎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】

前記第 1 の遺伝子発現レベル取得ステップにおいて、選択される少なくとも 1 以上の前記生体応答遺伝子は、

(1)ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1、(2)alpha 1,3-galactosyltransferase 2、(3)alpha-2-macroglobulin、(4)annexin A2、(5)aquaporin 6, kidney specific、(6)calbindin 1、(7)cathepsin D、(8)CD24 molecule、(9)Cd44 molecule、(10)claudin 3、(11)cysteine sulfinic acid decarboxylase、(12)deoxyribonuclease I、(13)fibrinogen beta chain、(14)glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、(15)glycoprotein (transmembrane) nmb、(16)lectin, galactoside-binding, soluble, 3、(17)matrix Gla protein、(18)oxidative stress induced growth inhibitor 1、(19)RAS, dexamethasone-induced 1、(20)S100 calcium binding protein A10、(21)secreted phosphoprotein 2、(22)similar to CPE-receptor、(23)similar to tumor necrosis factor receptor superfamily、

member 12a、(2 4) solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2、(2 5) solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1、(2 6) suppressor of cytokine signaling 3、(2 7) thymosin, beta 10、(2 8) translin、のうちの少なくともいずれか 1 つを含むことを特徴とする、請求項 1 記載の化学物質の毒性の検出方法。

【請求項 3】

前記腎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 または請求項 2 のうちのいずれか 1 つに記載の化学物質の毒性の検出方法。

【請求項 4】

10

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 1 または請求項 2 のうちのいずれか 1 つに記載の化学物質の毒性の検出方法。

【請求項 5】

前記ハイブリダイゼーション法は、マイクロアレイ法又はプロット法であることを特徴とする請求項 1 または請求項 2 のうちのいずれか 1 つに記載の化学物質の毒性の検出方法。

【請求項 6】

20

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 5 記載の化学物質の毒性の検出方法。

【請求項 7】

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ることを特徴とする請求項 6 記載の化学物質の毒性の検出方法。

【請求項 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 6 または請求項 7 記載の化学物質の毒性の検出方法。

【請求項 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 または請求項 2 のうちのいずれか 1 つに記載の化学物質の毒性の検出方法。

30

【請求項 10】

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 または請求項 2 のうちのいずれか 1 つに記載の化学物質の毒性の検出方法。

【請求項 11】

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 10 記載の化学物質の毒性の検出方法。

40

【請求項 12】

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 11 記載の化学物質の毒性の検出方法。

【請求項 13】

請求項 1 または請求項 2 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の検出キット。

【請求項 14】

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 13 記載

50

の化学物質の毒性の検出キット。

【請求項 15】

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 14 記載の化学物質の毒性の検出キット。

【請求項 16】

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 mer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の検出キット。

【請求項 17】

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 15 または請求項 16 記載の化学物質の毒性の検出キット。

【請求項 18】

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 14 記載の化学物質の毒性の検出・予測キット。

【請求項 19】

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 13 ないし請求項 18 のうちの1つに記載の化学物質の毒性の検出キット。

【請求項 20】

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 19 記載の化学物質の毒性の検出キット。

【請求項 21】

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、テトラプロモエタン、アジピン酸ジブチル、p-エチルフェノール、o-t-ブチルフェノールおよび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腎臓由来の細胞試料に投与(曝露)するステップと、

(B) 前記生体の腎臓組織または前記腎臓由来の前記細胞試料からmRNAを単離して、生体応答遺伝子群：(1)ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1、(2)AHNAK nucleoprotein、(3)alpha 1,3-galactosyltransferase 2、(4)alpha-2-macroglobulin、(5)annexin A2、(6)aquaporin 6, kidney specific、(7)calbindin 1、(8)camello-like 1、(9)cathepsin D、(10)CD24 molecule、(11)Cd44 molecule、(12)claudin 3、(13)collagen triple helix repeat containing 1、(14)cysteine sulfinic acid decarboxylase、(15)deiodinase, iodothyronine, type I、(16)deleted in colorectal carcinoma、(17)deoxyribonuclease I、(18)fibrinogen beta chain、(19)flavin containing monooxygenase 3、(20)glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit、(21)glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、(22)glycoprotein (transmembrane) nmb、(23)histamine N-methyltransferase、(24)hypothetical protein LOC56728、(25)kallikrein、(26)kidney androgen regulated protein、(27)lectin, galactoside-binding, soluble, 3、(28)matrix Gla protein、(29)

10

20

30

40

50

oxidative stress induced growth inhibitor 1、(30)paternally expressed 12、(31)protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A、(32)RAS, dexamethasone-induced 1、(regucalcin (senescence marker protein-30)、(33)regucalcin (senescence marker protein-30)、(34)S100 calcium binding protein A10、(35)S100 calcium binding protein A6、(36)secreted phosphoprotein 2、(37)serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3K、(38)similar to CPE-receptor、(39)similar to tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a、(40)solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 2、(41)solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2、(42)solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1、(43)suppressor of cytokine signaling 3、(44)thymosin, beta 10、(45)tonin、(46)translin、(47)trefoil factor 3, intestinal、(48)ubiquitin D、(49)uromodulinのうちから選択される少なくとも1以上の生体応答遺伝子に対する遺伝子発現レベルを測定するステップと、

10

(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の作成方法。

【請求項22】

選択される少なくとも1以上の前記生体応答遺伝子は、

(1)ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1、(2)alpha 1,3-galactosyltransferase 2、(3)alpha-2-macroglobulin、(4)annexin A2、(5)aquaporin 6, kidney specific、(6)calbindin 1、(7)cathepsin D、(8)CD24 molecule、(9)Cd44 molecule、(10)claudin 3、(11)cysteine sulfinic acid decarboxylase、(12)deoxyribonuclease 1、(13)fibrinogen beta chain、(14)glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、(15)glycoprotein (transmembrane) nmb、(16)lectin, galactoside-binding, soluble, 3、(17)matrix Gla protein、(18)oxidative stress induced growth inhibitor 1、(19)RAS, dexamethasone-induced 1、(20)S100 calcium binding protein A10、(21)secreted phosphoprotein 2、(22)similar to CPE-receptor、(23)similar to tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a、(24)solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2、(25)solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1、(26)suppressor of cytokine signaling 3、(27)thymosin, beta 10、(28)translin、のうちの少なくともいずれか1つを含むことを特徴とする請求項21記載の照合用遺伝子発現データベースの作成方法。

20

30

【請求項23】

前記腎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21または請求項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】

遺伝子発現レベルの測定は、RT-PCR法、iAFLP(introduced Amplified Fragment Length Polymorphism)法、LAMP(Loop-Mediated Isothermal Amplification)法、nCounter Analysis system、ハイブリダイゼーション法のうちの1つを用いることを特徴とする請求項21または請求項22記載の照合用遺伝子発現データベースの作成方法。

40

【請求項25】

前記ハイブリダイゼーション法は、マイクロアレイ法又はプロット法であることを特徴とする請求項24記載の照合用遺伝子発現データベースの作成方法。

【請求項26】

前記マイクロアレイ法又はプロット法に用いられるプローブは、ヌクレオチド又はタン

50

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 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 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 2 1 または請求項 2 2 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 2 1 または請求項 2 2 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または化学物質の毒性の検出・予測方法。

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】

請求項 2 1 または請求項 2 2 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照合用遺伝子発現データベースの作成キット。

30

【請求項 3 4】

前記プローブは、ヌクレオチド又はタンパク質であることを特徴とする請求項 3 3 記載の照合用遺伝子発現データベースの作成キット。

【請求項 3 5】

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 3 4 記載の照合用遺伝子発現データベースの作成キット。

【請求項 3 6】

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 merであることを特徴とする請求項 3 4 記載の照合用遺伝子発現データベースの作成キット。

40

【請求項 3 7】

前記ヌクレオチドは、標識化ヌクレオチドであることを特徴とする請求項 3 5 または請求項 3 6 記載の照合用遺伝子発現データベースの作成キット。

【請求項 3 8】

前記プローブは、抗体及び/又はアプタマーであるタンパク質であることを特徴とする請求項 3 3 記載の照合用遺伝子発現データベースの作成キット。

【請求項 3 9】

前記プローブは、少なくとも1つ以上を固体支持体に固定したDNAマイクロアレイ、DNAチップ、タンパクチップまたは抗体チップを含むことを特徴とする請求項 3 3 ない

50

し請求項 38 のうちの 1 つに記載の照合用遺伝子発現データベースの作成キット。

【請求項 40】

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 39 記載の照合用遺伝子発現データベースの作成キット。

【請求項 41】

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、o-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腎臓由来の細胞試料に投与(曝露)するステップと、

(B) 前記生体由来の腎臓組織または前記腎臓由来の前記細胞試料から mRNA を単離して、生体応答遺伝子群：(1)ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1、(2)AHNAK nucleoprotein、(3)alpha 1,3-galactosyltransferase 2、(4)alpha-2-macroglobulin、(5)annexin A2、(6)aquaporin 6, kidney specific、(7)calbindin 1、(8)camello-like 1、(9)cathepsin D、(10)CD24 molecule、(11)Cd44 molecule、(12)claudin 3、(13)collagen triple helix repeat containing 1、(14)cysteine sulfinic acid decarboxylase、(15)deiodinase, iodothyronine, type I、(16)deleted in colorectal carcinoma、(17)deoxyribonuclease I、(18)fibrinogen beta chain、(19)flavin containing monooxygenase 3、(20)glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit、(21)glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、(22)glycoprotein (transmembrane) nmb、(23)histamine N-methyltransferase、(24)hypothetical protein LOC56728、(25)kallikrein、(26)kidney androgen regulated protein、(27)lectin, galactoside-binding, soluble, 3、(28)matrix Gla protein、(29)oxidative stress induced growth inhibitor 1、(30)paternally expressed 12、(31)protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A、(32)RAS, dexamethasone-induced 1、(regucalcin (senescence marker protein-30)、(33)regucalcin (senescence marker protein-30)、(34)S100 calcium binding protein A10、(35)S100 calcium binding protein A6、(36)secreted phosphoprotein 2、(37)serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3K、(38)similar to CPE-receptor、(39)similar to tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a、(40)solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 2、(41)solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2、(42)solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1、(43)suppressor of cytokine signaling 3、(44)thymosin, beta 10、(45)tonin、(46)translin、(47)trefoil factor 3, intestinal、(48)ubiquitin D、(49)uromodulin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腎臓由来の細胞試料に曝露させるステップと、

10

20

30

40

50

(E) 前記生体由来の前記腎臓組織または前記腎臓由来の細胞試料から m R N A を単離して、生体応答遺伝子群：(1)ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1、(2)AHNAK nucleoprotein、(3)alpha 1,3-galactosyltransferase 2、(4)alpha-2-macroglobulin、(5)annexin A2、(6)aquaporin 6, kidney specific、(7)calbindin 1、(8)camello-like 1、(9)cathepsin D、(10)CD24 molecule、(11)Cd44 molecule、(12)claudin 3、(13)collagen triple helix repeat containing 1、(14)cysteine sulfinic acid decarboxylase、(15)deiodinase, iodothyronine, type I、(16)deleted in colorectal carcinoma、(17)deoxyribonuclease I、(18)fibrinogen beta chain、(19)flavin containing monooxygenase 3、(20)glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit、(21)glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、(22)glycoprotein (transmembrane) nmb、(23)histamine N-methyltransferase、(24)hypothetical protein LOC56728、(25)kallikrein、(26)kidney androgen regulated protein、(27)lectin, galactoside-binding, soluble, 3、(28)matrix Gla protein、(29)oxidative stress induced growth inhibitor 1、(30)paternally expressed 12、(31)protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A、(32)RAS, dexamethasone-induced 1、(regucalcin (senescence marker protein-30)、(33)regucalcin (senescence marker protein-30)、(34)S100 calcium binding protein A10、(35)S100 calcium binding protein A6、(36)secreted phosphoprotein 2、(37)serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3K、(38)similar to CPE-receptor、(39)similar to tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a、(40)solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 2、(41)solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2、(42)solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1、(43)suppressor of cytokine signaling 3、(44)thymosin, beta 10、(45)tonin、(46)translin、(47)trefoil factor 3, intestinal、(48)ubiquitin D、(49)uromodulin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、

(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 4 2】

請求項 4 1 記載の (B) および (E) において選択される少なくとも 1 以上の前記生体応答遺伝子は、

(1) ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1、(2) alpha 1,3-galactosyltransferase 2、(3) alpha-2-macroglobulin、(4) annexin A2、(5) aquaporin 6, kidney specific、(6) calbindin 1、(7) cathepsin D、(8) CD24 molecule、(9) Cd44 molecule、(10) claudin 3、(11) cysteine sulfinic acid decarboxylase、(12) deoxyribonuclease I、(13) fibrinogen beta chain、(14) glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、(15) glycoprotein (transmembrane) nmb、(16) lectin, galactoside-binding, soluble, 3、(17) matrix Gla protein、(18) oxidative stress induced growth inhibitor 1、(19) RAS, dexamethasone-induced 1、(20) S100 calcium binding protein A10、(21) secreted phosphoprotein 2、(22) similar to CPE-receptor、(23) similar to tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a、(24) solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2、(25) solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1、(26) suppressor of cytokine signaling 3、(27) thymosin, beta 10、(28) translin、のうちの少なくともいずれか 1 つを含むことを特徴とする、請求項 4 1 記載の化学

物質の毒性検出・予測方法。

【請求項 4 3】

前記腎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 4 1 または請求項 4 2 のうちの 1 つに記載の化学物質の毒性の検出・予測方法。

【請求項 4 4】

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 4 1 または請求項 4 2 のうちのいずれか 1 つに記載の化学物質の毒性の検出・予測方法。

10

【請求項 4 5】

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 4 4 記載の化学物質の毒性の検出・予測方法。

【請求項 4 6】

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 4 5 記載の化学物質の毒性の検出・予測方法。

【請求項 4 7】

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ることを特徴とする請求項 4 6 記載の化学物質の毒性の検出・予測方法。

20

【請求項 4 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 4 6 または請求項 4 7 記載の化学物質の毒性の検出・予測方法。

【請求項 4 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 4 1 または請求項 4 2 のうちのいずれか 1 つに記載の化学物質の毒性の検出・予測方法。

【請求項 5 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 4 1 または請求項 4 2 のうちのいずれか 1 つに記載の化学物質の毒性の検出・予測方法。

30

【請求項 5 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 5 0 記載の化学物質の毒性の検出・予測方法。

【請求項 5 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 5 1 記載の化学物質の毒性の検出・予測方法。

【請求項 5 3】

請求項 4 1 または請求項 4 2 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の検出・予測キット。

40

【請求項 5 4】

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 5 3 記載の化学物質の毒性の検出・予測キット。

【請求項 5 5】

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ることを特徴とする請求項 5 4 記載の化学物質の毒性の検出・予測キット。

【請求項 5 6】

50

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 merであることを特徴とする請求項54記載の化学物質の毒性の検出・予測キット。

【請求項57】

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54または請求項56記載の化学物質の毒性の検出・予測キット。

【請求項58】

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54記載の化学物質の毒性の検出・予測キット。

【請求項59】

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52ないし請求項58のうちの1つに記載の化学物質の毒性の検出・予測キット。

【請求項60】

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59記載の化学物質の毒性の検出・予測キット。

【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、腎臓毒性の処置の有効性を確認することを助けるための遺伝子発現解析手段およびその結果の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

我が国では、環境と調和した健全な産業活動及び安心・安全な国民生活の実現を目指した化学物質リスク評価・管理システムの構築へ向け、公的な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】

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】

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

10

20

30

40

50

【 0 0 0 7 】

これらのゲノム学的手法は、全遺伝子を個々のパラメータとして活用できるという、従来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。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 8 】

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

【 非特許文献 】

【 0 0 0 9 】

【 非特許文献 1 】 Alison H. Harrill et al., Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. November ; 4 (1 1) : 1 3 7 9 - 1 3 8 9 (2 0 0 8) 10

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

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

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

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

【 非特許文献 6 】 Paolo Fortina et al., Nature Biotech. 2 6 : 2 9 3 - 2 9 4 (2 0 0 8) 20

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

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 0 】

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 】

【 0 0 1 1 】

本発明者は、既存化学物質毒性データベース (http://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/jsp/SearchPage.jsp) に登録されているうちから腎臓毒性を有することが知られている化学物質を投与したラットの腎臓と正常ラットの腎臓における遺伝子発現を網羅的に比較することにより、両者間で発現レベルに差がある遺伝子を見出し、本発明を完成するに至った。 30

【 0 0 1 2 】

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腎臓組織または腎臓由来の細胞試料に対して、生体応答遺伝子群： (1)ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1、(2)AHNAK nucleoprotein、(3)alpha 1,3-galactosyltransferase 2、(4)alpha-2-macroglobulin、(5)annexin A2、(6)aquaporin 6, kidney specific、(7)calbindin 1、(8)camello-like 1、(9)cathepsin D、(10)CD24 molecule、(11)Cd44 molecule、(12)claudin 3、(13)collagen triple helix repeat containing 1、(14)cysteine sulfinic acid decarboxylase、(15)deiodinase, iodothyronine, type I、(16)deleted in colorectal carcinoma、(17)deoxyribonuclease I、(18)fibrinogen beta chain、(19)flavin containing monooxygenase 3、(20)glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit、(21)glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、(22)glycoprotein (transmembrane) nmb、(23)histamine N-methyltransferase、(24)hypothetical protein LOC56728、(25)kallikrein、(26)kidney androgen regulated protein、(27)lectin, galactoside-binding, soluble, 3、(28)matrix Gla protein、(29)oxidative stress induced gr 40 50

rowth inhibitor 1、(30)paternally expressed 12、(31)protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A、(32)RAS, dexamethasone-induced 1、(regucalcin (senescence marker protein-30)、(33)regucalcin (senescence marker protein-30)、(34)S100 calcium binding protein A10、(35)S100 calcium binding protein A6、(36)secreted phosphoprotein 2、(37)serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3K、(38)similar to CPE-receptor、(39)similar to tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a、(40)solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 2、(41)solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2、(42)solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1、(43)suppressor of cytokine signaling 3、(44)thymosin, beta 10、(45)tonin、(46)translin、(47)trefoil factor 3, intestinal、(48)ubiquitin D、(49)uromodulin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腎臓組織または腎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。

【0013】

また、(2) 前記(1)に記載の方法であって、前記第1の遺伝子発現レベル取得ステップにおいて、選択される少なくとも1以上の前記生体応答遺伝子は、

(1) ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1、(2) alpha 1,3-galactosyltransferase 2、(3) alpha-2-macroglobulin、(4) annexin A2、(5) aquaporin 6, kidney specific、(6) calbindin 1、(7) cathepsin D、(8) CD24 molecule、(9) Cd44 molecule、(10) claudin 3、(11) cysteine sulfinic acid decarboxylase、(12) deoxyribonuclease 1、(13) fibrinogen beta chain、(14) glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、(15) glycoprotein (transmembrane) nmb、(16) lectin, galactoside-binding, soluble, 3、(17) matrix Gla protein、(18) oxidative stress induced growth inhibitor 1、(19) RAS, dexamethasone-induced 1、(20) S100 calcium binding protein A10、(21) secreted phosphoprotein 2、(22) similar to CPE-receptor、(23) similar to tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a、(24) solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2、(25) solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1、(26) suppressor of cytokine signaling 3、(27) thymosin, beta 10、(28) translin、のうちの少なくともいずれか1つを含むことが望ましい。

【0014】

また、(3) 前記腎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、(1) または(2) のうちのいずれか1つに記載の化学物質の毒性の検出方法であってもよい。

【0015】

また、(4) 遺伝子発現レベルの測定は、RT-PCR法、iAFLP (introduced Amplified Fragment Length Polymorphism) 法、LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法、nCounter Analysis system、ハイブリダイゼーション法のうちの1つを用いることを特徴とする(1) または(2) のうちのいずれか1つに記載の化学物質の毒性の検出方法であってもよい。

【0016】

また、(5) 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(1)または(2)のうちのいずれか1つに記載の化学物質の毒性の検出方法であってもよい。

【0017】

また、(6)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(5)に記載の化学物質の毒性の検出方法であってもよい。

【0018】

また、(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(6)に記載の化学物質の毒性の検出方法であってもよい。

【0019】

また、(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(6)または(7)に記載の化学物質の毒性の検出方法であってもよい。

【0020】

また、(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(1)または(2)のうちのいずれか1つに記載の化学物質の毒性の検出方法であってもよい。

【0021】

また、(10)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(1)または(2)のうちのいずれか1つに記載の化学物質の毒性の検出方法であってもよい。

【0022】

また、(11)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(10)に記載の化学物質の毒性の検出方法であってもよい。

【0023】

また、(12)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(11)に記載の化学物質の毒性の検出方法。

【0024】

また、本発明は(13)(1)または(2)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の検出キットである。

【0025】

また、(14)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(13)に記載の化学物質の毒性の検出キットであってもよい。

【0026】

また、(15)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(14)に記載の化学物質の毒性の検出キットであってもよい。

【0027】

また、(16)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 merであることを特徴とする(14)に記載の化学物質の毒性の検出キットであってもよい。

【0028】

また、(17)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(15)または(16)に記載の化学物質の毒性の検出キットであってもよい。

【0029】

また、(18)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(14)に記載の化学物質の毒性の検出・予測キットであってもよい。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 0 】

また、(1 9) 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 D N A マイクロアレイ、D N A 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 (1 3) ないし (1 8) のうちの 1 つに記載の化学物質の毒性の検出キットであってもよい。

【 0 0 3 1 】

また、(2 0) 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 (1 9) 記載の化学物質の毒性の検出キットであってもよい。

【 0 0 3 2 】

また、本発明は (2 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ルルアルコール、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、o-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腎臓由来の細胞試料に投与 (曝露) するステップと、

(B) 前記生体の腎臓組織または前記腎臓由来の前記細胞試料から m R N A を単離して、生体応答遺伝子群： (1)ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1、(2)AHNAK nucleoprotein、(3)alpha 1,3-galactosyltransferase 2、(4)alpha-2-macroglobulin、(5)annexin A2、(6)aquaporin 6, kidney specific、(7)calbindin 1、(8)camello-like 1、(9)cathepsin D、(10)CD24 molecule、(11)Cd44 molecule、(12)claudin 3、(13)collagen triple helix repeat containing 1、(14)cysteine sulfinic acid decarboxylase、(15)deiodinase, iodothyronine, type 1、(16)deleted in colorectal carcinoma、(17)deoxyribonuclease 1、(18)fibrinogen beta chain、(19)flavin containing monooxygenase 3、(20)glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit、(21)glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、(22)glycoprotein (transmembrane) nmb、(23)histamine N-methyltransferase、(24)hypothetical protein LOC56728、(25)kallikrein、(26)kidney androgen regulated protein、(27)lectin, galactoside-binding, soluble, 3、(28)matrix Gla protein、(29)oxidative stress induced growth inhibitor 1、(30)paternally expressed 12、(31)protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A、(32)RAS, dexamethasone-induced 1、(regucalcin (senescence marker protein-30)、(33)regucalcin (senescence marker protein-30)、(34)S100 calcium binding protein A10、(35)S100 calcium binding protein A6、(36)secreted phosphoprotein 2、(37)serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3K、(38)similar to CPE-receptor、(39)similar to tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a、(40)solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 2、(41)solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2、(42)solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1、(43)suppressor of cytokine signaling 3、(44)thymosin, beta 10、(45)tonin、(46)translin、(47)trefoil factor 3, intestinal、(48)ubiquitin D、(49)uromodulin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

10

20

30

40

50

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の作成方法である。

【0033】

また、(22)選択される少なくとも1以上の前記生体応答遺伝子は、

(1)ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1、(2)alpha 1,3-galactosyltransferase 2、(3)alpha-2-macroglobulin、(4)annexin A 2、(5)aquaporin 6, kidney specific、(6)calbindin 1、(7)cathepsin D、(8)CD24 molecule、(9)Cd44 molecule、(10)claudin 3、(11)cysteine sulfinic acid decarboxylase、(12)deoxyribonuclease I、(13)fibrinogen beta chain、(14)glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、(15)glycoprotein (transmembrane) nmb、(16)lectin, galactoside-binding, soluble、3、(17)matrix Gla protein、(18)oxidative stress induced growth inhibitor 1、(19)RAS, dexamethasone-induced 1、(20)S100 calcium binding protein A10、(21)secreted phosphoprotein 2、(22)similar to CPE-receptor、(23)similar to tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a、(24)solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2、(25)solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1、(26)suppressor of cytokine signaling 3、(27)thymosin, beta 10、(28)translin、のうちの少なくともいずれか1つを含むことを特徴とする(21)に記載の照合用遺伝子発現データベースの作成方法が望ましい。

10

20

【0034】

また、(23)前記腎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、(21)または(22)に記載の照合用遺伝子発現データベースの作成方法であってもよい。

【0035】

また、(24)遺伝子発現レベルの測定は、RT-PCR法、iAFLP(introduced Amplified Fragment Length Polymorphism)法、LAMP(Loop-Mediated Isothermal Amplification)法、nCounter Analysis system、ハイブリダイゼーション法のうちの1つを用いることを特徴とする(21)または(22)に記載の照合用遺伝子発現データベースの作成方法であってもよい。

30

【0036】

また、(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(24)に記載の照合用遺伝子発現データベースの作成方法であってもよい。

【0037】

また、(26)前記マイクロアレイ法又はプロット法に用いられるプローブは、ヌクレオチド又はタンパク質であることを特徴とする(25)に記載の照合用遺伝子発現データベースの作成方法であってもよい。

40

【0038】

また、(27)前記ヌクレオチドは、mRNA、cDNA、合成オリゴヌクレオチドであることを特徴とする(26)に記載の照合用遺伝子発現データベースの作成方法であってもよい。

【0039】

また、(28)前記ヌクレオチドは、標識化ヌクレオチドであることを特徴とする(26)または(27)に記載の照合用遺伝子発現データベースの作成方法であってもよい。

【0040】

また、(29)前記遺伝子発現レベルの測定を前記生体応答遺伝子に対応する核酸又は前記生体応答遺伝子によってコードされるタンパク質の存在もしくは量を測定することで

50

決定することを特徴とする(21)または(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の作成方法であってもよい。

【0041】

また、(30)前記遺伝子発現レベルの測定を免疫学的方法によって行うことを特徴とする(21)または(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の作成方法であってもよい。

【0042】

また、(31)前記免疫学的方法は、前記生体応答遺伝子によってコードされるタンパク質又はその断片に対する特異抗体と標的タンパク質との免疫学的複合体を検出する方法であることを特徴とする(30)に記載の照合用遺伝子発現データベースの作成方法または化学物質の毒性の検出・予測方法であってもよい。

10

【0043】

また、(32)前記特異抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、および抗体フラグメントから選択されることを特徴とする(31)に記載の照合用遺伝子発現データベースの作成方法であってもよい。

【0044】

また、本発明は(33)(21)または(22)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照合用遺伝子発現データベースの作成キットである。

20

【0045】

また、(34)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(33)に記載の照合用遺伝子発現データベースの作成キットであってもよい。

【0046】

また、(35)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(34)に記載の照合用遺伝子発現データベースの作成キットであってもよい。

【0047】

また、(36)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 merであることを特徴とする(34)に記載の照合用遺伝子発現データベースの作成キットであってもよい。

30

【0048】

また、(37)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(35)または(36)に記載の照合用遺伝子発現データベースの作成キットであってもよい。

【0049】

また、(38)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(33)に記載の照合用遺伝子発現データベースの作成キットであってもよい。

【0050】

また、(39)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(33)ないし(38)のうちの1つに記載の照合用遺伝子発現データベースの作成キットであってもよい。

40

【0051】

また、(40)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(39)に記載の照合用遺伝子発現データベースの作成キットであってもよい。

【0052】

また、本発明は(41)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

50

とにより被検化学物質の毒性を検出・予測する方法であって、

(A) 2-ブタノンオキシム、m-キシリレンジアミン、3-シアノピリジン、2-(2-アミノエチルアミノ)エタノール、テトラヒドロフルフリルアルコール、メタクリルアミド、スルホラン、2-イソプロポキシエタノール、ヒドラジーン水和物、4-エチルモルホリン、メタクリル酸エチルトリメチルアンモニウムクロリド、塩化ベンジルトリメチルアンモニウム、m-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム、1-ナフチルアミン-4-スルホン酸ナトリウム四水和物、3-メトキシ-3-メチル-1-ブタノール、o-ジクロロベンゼン、3,4-キシリジン、N-メチルアニリン、トリレンジイソシアナート、2-(ジブチルアミノ)エタノール、p-クミルフェノール、m-クレゾール、2,3-ジメチルアニリン、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド、フタル酸ジヘブチル、テトラプロモエタン、アジピン酸ジブチル、p-エチルフェノール、o-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腎臓由来の細胞試料に投与(曝露)するステップと、

(B) 前記生体由来の腎臓組織または前記腎臓由来の前記細胞試料からmRNAを単離して、生体応答遺伝子群： (1)ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1、(2)AHNAK nucleoprotein、(3)alpha 1,3-galactosyltransferase 2、(4)alpha-2-macroglobulin、(5)annexin A2、(6)aquaporin 6, kidney specific、(7)calbindin 1、(8)camello-like 1、(9)cathepsin D、(10)CD24 molecule、(11)Cd44 molecule、(12)claudin 3、(13)collagen triple helix repeat containing 1、(14)cysteine sulfinic acid decarboxylase、(15)deiodinase, iodothyronine, type I、(16)deleted in colorectal carcinoma、(17)deoxyribonuclease I、(18)fibrinogen beta chain、(19)flavin containing monooxygenase 3、(20)glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit、(21)glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、(22)glycoprotein (transmembrane) nmb、(23)histamine N-methyltransferase、(24)hypothetical protein LOC56728、(25)kallikrein、(26)kidney androgen regulated protein、(27)lectin, galactoside-binding, soluble, 3、(28)matrix Gla protein、(29)oxidative stress induced growth inhibitor 1、(30)paternally expressed 12、(31)protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A、(32)RAS, dexamethasone-induced 1、(regucalcin (senescence marker protein-30)、(33)regucalcin (senescence marker protein-30)、(34)S100 calcium binding protein A10、(35)S100 calcium binding protein A6、(36)secreted phosphoprotein 2、(37)serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3K、(38)similar to CPE-receptor、(39)similar to tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a、(40)solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 2、(41)solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2、(42)solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1、(43)suppressor of cytokine signaling 3、(44)thymosin, beta 10、(45)tonin、(46)translin、(47)trefoil factor 3, intestinal、(48)ubiquitin D、(49)uromodulin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腎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腎臓組織または前記腎臓由来の細胞試料からmRNAを単離して、生体応答遺伝子群： (1)ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1、(2)AHNAK nucleoprotein、(3)alpha 1,3-galactosyltransferase 2、(4)alpha-2-macroglobulin、(5)annexin A2、(6)aquaporin 6, kidney specific、(7)calbindin 1、(8)camello-like 1、(9)cathepsin D、(10)CD24 molecule、(11)Cd44 molecule、(12)claudin 3、(13)collagen triple helix repeat containing 1、(14)

10

20

30

40

50

cysteine sulfinic acid decarboxylase、(15)deiodinase, iodothyronine, type I、(16)deleted in colorectal carcinoma、(17)deoxyribonuclease I、(18)fibrinogen beta chain、(19)flavin containing monooxygenase 3、(20)glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit、(21)glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、(22)glycoprotein (transmembrane) nmb、(23)histamine N-methyltransferase、(24)hypothetical protein LOC56728、(25)kallikrein、(26)kidney androgen regulated protein、(27)lectin, galactoside-binding, soluble, 3、(28)matrix Gla protein、(29)oxidative stress induced growth inhibitor 1、(30)paternally expressed 12、(31)protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A、(32)RAS, dexamethasone-induced 1、(regucalcin (senescence marker protein-30)、(33)regucalcin (senescence marker protein-30)、(34)S100 calcium binding protein A10、(35)S100 calcium binding protein A6、(36)secreted phosphoprotein 2、(37)serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3K、(38)similar to CPE-receptor、(39)similar to tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a、(40)solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 2、(41)solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2、(42)solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1、(43)suppressor of cytokine signaling 3、(44)thymosin, beta 10、(45)tonin、(46)translin、(47)trefoil factor 3, intestinal、(48)ubiquitin D、(49)uromodulin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、

(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。

【0053】

また、(42)(41)に記載の(B)および(E)において選択される少なくとも1以上の前記生体応答遺伝子は、

(1)ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 1、(2)alpha 1,3-galactosyltransferase 2、(3)alpha-2-macroglobulin、(4)annexin A2、(5)aquaporin 6, kidney specific、(6)calbindin 1、(7)cathepsin D、(8)CD24 molecule、(9)Cd44 molecule、(10)claudin 3、(11)cysteine sulfinic acid decarboxylase、(12)deoxyribonuclease I、(13)fibrinogen beta chain、(14)glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、(15)glycoprotein (transmembrane) nmb、(16)lectin, galactoside-binding, soluble, 3、(17)matrix Gla protein、(18)oxidative stress induced growth inhibitor 1、(19)RAS, dexamethasone-induced 1、(20)S100 calcium binding protein A10、(21)secreted phosphoprotein 2、(22)similar to CPE-receptor、(23)similar to tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a、(24)solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2、(25)solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1、(26)suppressor of cytokine signaling 3、(27)thymosin, beta 10、(28)translin、のうちの少なくともいずれか1つを含むことを特徴とする、(41)に記載の化学物質の毒性検出・予測方法であってもよい。

【0054】

また、(43)前記腎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、(41)または(42)のうちの1つに記載の化学物質の毒性の検出・予測方法であってもよい。

【0055】

また、(44) 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(41) または(42) のうちのいずれか1つに記載の化学物質の毒性の検出・予測方法であってもよい。

【0056】

また、(45) 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(44) に記載の化学物質の毒性の検出・予測方法であってもよい。

10

【0057】

また、(46) 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(45) に記載の化学物質の毒性の検出・予測方法であってもよい。

【0058】

また、(47) 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(46) に記載の化学物質の毒性の検出・予測方法であってもよい。

【0059】

また、(48) 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(45) または(47) に記載の化学物質の毒性の検出・予測方法であってもよい。

20

【0060】

また、(49) 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(41) または(42) のうちのいずれか1つに記載の化学物質の毒性の検出・予測方法であってもよい。

【0061】

また、(50) 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(41) または(42) のうちのいずれか1つに記載の化学物質の毒性の検出・予測方法であってもよい。

30

【0062】

また、(51) 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(50) に記載の化学物質の毒性の検出・予測方法であってもよい。

【0063】

また、(52) 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(51) に記載の化学物質の毒性の検出・予測方法であってもよい。

【0064】

また、本発明は(53) (41) または(42) 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の検出・予測キットである。

40

【0065】

また、(54) 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(53) 記載の化学物質の毒性の検出・予測キットであってもよい。

【0066】

また、(55) 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(54) に記載の化学物質の毒性の検出・予測キットであってもよい。

50

い。

【0067】

また、(56)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 merであることを特徴とする(54)に記載の化学物質の毒性の検出・予測キットであってもよい。

【0068】

また、(57)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(55)または(56)に記載の化学物質の毒性の検出・予測キットであってもよい。

【0069】

また、(58)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(54)に記載の化学物質の毒性の検出・予測キットであってもよい。

10

【0070】

また、(59)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(53)ないし(58)のうちの1つに記載の化学物質の毒性の検出・予測キットであってもよい。

【0071】

また、(60)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(59)に記載の化学物質の毒性の検出・予測キットであってもよい。

【発明の効果】

20

【0072】

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】

【0073】

【図1】クラスタ分析を表す。デンドログラムの下のカラムに記載されているtmp-1、tmp-2、tmp-3はp-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノールを28日間反復投与したラットの腎臓サンプルを表す。また、対照-1、対照-2、対照-3はそれぞれオリブ油を28日間反復投与したラットの腎臓サンプルを表す。なお、記号の後の数字は個体番号を表している。さらに、図中右側のカラムは遺伝子数を表示している。また、図中左側のバーは $\log_2$ 比値を表している。

30

【図2】CRE(血中クレアチニン)の値をグラフ化したものを表す。デンドログラムの下のカラムに記載されている対照-1、対照-2、対照-3はそれぞれオリブ油を28日間反復投与したラットの腎臓サンプルを表す。また、tmp-1、tmp-2、tmp-3はそれぞれ化学物質p-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノールを28日間反復投与したラットの腎臓サンプルを表す。なお、記号の後の数字は個体番号を表している。

【図3】CRE(血中クレアチニン)の値をグラフ化したものを表す。デンドログラムの下のカラムに記載されている対照A-1、対照A-2、対照A-3、対照B-1、対照B-2、対照B-3、はそれぞれオリブ油を28日間反復投与したラットの腎臓サンプルを表している。また、tmp-1、tmp-2、tmp-3はそれぞれ化学物質p-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノールを28日間反復投与したラットの腎臓サンプルを表す。さらに、pcp-1、pcp-2、pcp-3はそれぞれ化学物質p-クミルフェノールを28日間反復投与したラットの腎臓サンプルを表す。なお、記号の後の数字は個体番号を表している。

40

【図4】クラスタ分析を表す。デンドログラムの下のカラムに記載されているtmp-1、tmp-2、tmp-3はp-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノールを28日間反復投与したラットの腎臓サンプルを表し、pcp-1、pcp-2、pcp-3はそれぞれ化学物質p-クミルフェノールを28日間反復投与したラットの腎臓サンプルを表す。なお、記号の後の数字は個体番号を表している。また、対照はオリブ油を28日間反復投与したラットの腎臓サンプルを表し、contは対照以外の正常ラットの腎臓サンプルを表す。さらに、図中右側のカラムは遺伝子数を

50

表示している。また、図中左側のバーは $\log_2$ 比値を表している。

【図5】クラスタ分析を表す。デンドログラムの下のカラムに記載されているtmp-1、tmp-2、tmp-3はp-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノールを28日間反復投与したラットの腎臓サンプルを表す。また、対照-1、対照-2、対照-3はそれぞれオリブ油を28日間反復投与したラットの腎臓サンプルを表す。なお、記号の後の数字は個体番号を表している。さらに、図中右側のカラムは遺伝子数を表示している。また、図中左側のバーは $\log_2$ 比値を表している。

【図6】49個の生体応答遺伝子の遺伝子発現データセットによるクラスタ分析を表す。デンドログラムの下のカラムはそれぞれラットに投与した化学物質の区別を表しており、図中左上には各カラムに対する化学物質の対応一覧を記している。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-水和水物を、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合物を、mm b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、23 d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o-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)フェノールを表している。さらに、図中右側のカラムは遺伝子数を表示している。また、図中左側のバーは $\log_2$ 比値を表している。

【図7】28個の生体応答遺伝子の遺伝子発現データセットによるクラスタ分析を表す。デンドログラムの下のカラムはそれぞれラットに投与した化学物質の区別を表しており、図中左上には各カラムに対する化学物質の対応一覧を記している。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-水和水物を、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合物を、mm b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、23 d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o-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)フェノールを表している。さらに、図中右側のカラムは遺伝子数を表示している。また、図中左側のバーは $\log_2$ 比値を表している。

【発明を実施するための形態】

【0074】

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。

【0075】

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。

【0076】

「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またはホモログを用いてもよい。

【0077】

「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。

10

【0078】

「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。

【0079】

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。

【0080】

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。

20

【0081】

「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。

【0082】

「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。

【0083】

「腎臓毒性」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腎臓の不全もしくは機能障害を意味する。

30

【0084】

「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。

【0085】

「試料」には、好ましくは腎臓の生検材料、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。

【0086】

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。

40

【0087】

「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。

【0088】

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

50

P C R 法、コンペティティブ P C R 法を挙げることができる。

【 0 0 8 9 】

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、D N A マイクロアレイ、D N A チップ、または抗体アレイ等が挙げられる。D N A マイクロアレイ又は D N A チップには該遺伝子のヌクレオチド又は c D N A 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 9 0 】

なお、ヌクレオチド又は c D N A は、該遺伝子の一部に相当する部分でもよい。

【 0 0 9 1 】

上記プローブの標識化に用いられる標識試薬は、例えば放射性同位元素である [¹²⁵I]、[¹³¹I]、[³H]、[¹⁴C]、[³²P]、[³⁵S]、酵素である β - ガラクトシダーゼ、β - グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、また、蛍光物質であるシアニン蛍光色素蛍光色素（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 9 2 】

また、上記リアルタイム P C R 法としては、例えば、組織内又は細胞内の全 R N A や m R N A から逆転写酵素により合成した c D N A を鋳型にして、P C R 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 P C R 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 9 3 】

通常、D N A マイクロアレイや D N A 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、D N A マイクロアレイ又は D N A 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 9 4 】

なお、D N A 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 c D N A 断片若しくはオリゴ D N A 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 D N A は一般的には 2 5 ~ 1 0 0 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 9 5 】

D N A マイクロアレイや D N A 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 m R N A を精製し、該 m R N A 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 c D N A を得ることができる。この標識化 c D N A と D N A マイクロアレイや D N A 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 9 6 】

上記標識化 c D N A の作製に用いられる標識物質としては、放射性同位元素、蛍光物質等を用いることができる。例えば、蛍光物質としては、Cy 2、Cy 3、Cy 5、Cy5.5、Cy 7、Cyanine 3、Cyanine 5、FITC（イソチオシアン酸フルオレセイン）、テキサスレッド、ローダミン等が挙げられる。

【 0 0 9 7 】

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 9 8 】

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

10

20

30

40

50

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。

【0099】

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。

10

【0100】

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。

【0101】

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。

20

【0102】

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。

【0103】

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。

【0104】

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。

30

【0105】

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SD、Wistarラットなどでもよく、雄でも雌でも構わない。

【0106】

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】

40

【0107】

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、p-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノール（和光純薬株式会社製）を雄のSDラット（6週齢）に28日間反復投与（300 mg/kg）することにより腎臓で発現レベルが著しく変化した遺伝子群である。

【0108】

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。

【0109】

[遺伝子発現データベース]

50

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、
- (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。

【0110】

10

[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) に登録されている 30 種類の化学物質腎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)、フタル酸ジヘブチル (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)、o-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 SD 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 SD ラット (6 週齢、雄) に経口投与した。28 日間の反復投与後、ラットから腎臓を採取し、速やかに液体窒素で凍結させた。凍結させた腎臓組織は 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なく、例えば数日間でもよい。

20

30

40

【0111】

[全 RNA の抽出]

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

【0112】

[核酸検体の調製]

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

50

【 0 1 1 3 】

[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 (Schna, 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。

【 0 1 1 4 】

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

10

【 0 1 1 5 】

[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。

【 0 1 1 6 】

[標識cDNAの合成]

該mRNA 1.5μg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。

20

【 0 1 1 7 】

[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15μlに調製した。

30

【 0 1 1 8 】

[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。

40

【 0 1 1 9 】

[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。

【 0 1 2 0 】

[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

50

し、蛍光強度を数値化した。すなわち、DNAマイクロアレイ上に固定されたオリゴDNAのスポットの蛍光強度をそれぞれ別々に測定し、スポット以外の場所の蛍光強度からバックグラウンドを算出してノイズとしてそれぞれのスポットの蛍光強度から差し引く。そして、サンプルにおける蛍光強度/共通レファレンスの蛍光強度を算出するという解析を行う。すなわち、各サンプルの遺伝子発現レベルはすべて共通レファレンスに対する相対比として検出されるため、単純に複数サンプルを横並び比較できる状態となっている。このようにして取得された数値を集積してデータベース化する。表1から5がデータ例である。

【0121】

【表1】

遺伝子名	ID	溶媒対照										2bo	nra	3cp
(clone K-32) kallikrein mRNA, 3' end.	L33839	-0.04	0.12	-0.08	-0.52	0.45	0.07	-0.04	0.22	-0.19	-0.29	-0.03	0.96	
Tonin (Ton), mRNA.	NM_012677	-0.20	0.04	0.16	-0.36	0.39	-0.03	-0.10	0.13	-0.03	-0.12	0.09	0.89	
protein phosphatase 1, regulatory (inhib)	NM_022676	-0.04	0.00	0.04	-0.27	0.37	-0.10	-0.21	0.01	0.21	0.07	-0.06	0.24	
gamma-glutamylcysteine synthetase mRNA.	J05181	-0.03	-0.08	0.11	0.13	0.29	-0.42	0.15	-0.09	-0.06	0.16	-0.29	-0.14	
pregnancy-induced growth inhibitor (Okd3)	NM_138504	-0.25	0.15	0.09	0.07	0.15	-0.22	0.12	-0.15	0.03	0.10	0.13	0.26	
mRNA for organic cation transporter OCT2	D83044	-0.03	0.10	-0.07	0.04	0.49	-0.52	0.00	0.03	-0.03	0.08	0.06	-0.12	
flavin-containing monooxygenase 3 (Fmo3)	NM_053433	-0.01	0.05	-0.05	-0.24	0.36	-0.12	-0.05	-0.11	0.16	0.04	-0.26	-0.18	
Uromodulin (Tamm-Horsfall protein) (Umod)	NM_017082	-0.30	0.18	0.12	-0.30	0.43	-0.13	0.14	-0.21	0.07	-0.15	-0.16	-0.54	
Kidney androgen-regulated protein (Kap).	NM_052802	-0.10	0.00	0.10	-0.36	0.51	-0.15	-0.03	-0.32	0.35	0.32	-0.18	0.09	
Glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NM_017008	-0.11	-0.18	0.30	-0.24	0.43	-0.19	0.03	-0.05	0.02	-0.28	0.24	-0.02	
hypothetical protein LOC56728 (LOC56728)	NM_019908	0.07	0.05	-0.13	-0.04	0.15	-0.11	-0.14	0.03	0.12	-0.45	-0.45	-0.63	
Deleted in colorectal cancer (rat homolog)	NM_012841	0.01	0.14	-0.14	-0.17	0.38	-0.21	-0.10	-0.21	0.31	-0.22	0.14	-0.07	
cysteine-sulfinate decarboxylase (Csad).	NM_021750	-0.16	-0.22	0.37	-0.14	0.07	0.06	-0.05	0.20	-0.15	0.39	0.02	0.33	
translin (Tsn), mRNA.	NM_021762	0.09	-0.17	0.08	-0.34	0.16	0.18	0.16	0.08	-0.24	0.25	-0.07	0.17	
deiodinase, iodothyronine, type 1 (Dio1)	NM_021653	-0.19	0.11	0.08	0.23	-0.16	-0.07	0.07	0.01	-0.08	0.17	0.32	0.36	
Deoxyribonuclease I (Dnase1), mRNA.	NM_013097	0.17	-0.39	0.21	-0.73	0.40	0.33	-0.20	0.03	0.17	-0.13	0.11	1.05	
Regucalcin (Rgn), mRNA.	NM_031546	-0.32	0.21	0.11	-0.23	0.34	-0.11	-0.19	-0.21	0.40	0.07	-0.17	-0.82	
Solute carrier family 4, member 1, anion	NM_012651	0.15	-0.02	-0.13	-0.57	0.66	-0.09	0.13	0.14	-0.27	0.36	-0.13	-0.03	
aquaporin 6 (Aqp6), mRNA.	NM_022181	0.03	0.19	-0.22	-0.46	0.43	0.04	-0.05	0.14	-0.09	0.05	0.21	0.14	
putative N-acetyltransferase Camello 2 (	NM_021668	-0.10	0.08	0.02	0.18	-0.04	-0.14	-0.17	-0.35	0.52	0.50	0.40	-0.34	
histamine N-methyltransferase (Hmt), mR	NM_031044	-0.69	0.55	0.14	-0.16	0.05	0.12	-0.11	0.02	0.09	0.23	-0.50	-0.94	
Trefoil factor (intestinal) (Tff3), mRNA	NM_013042	-0.18	0.02	0.15	-0.38	0.43	-0.05	0.27	-0.54	0.26	0.43	0.08	-0.67	
spp-24 precursor mRNA, partial cds.	U19485	-0.45	0.58	-0.13	-0.60	0.28	0.32	-0.11	0.46	-0.35	0.69	0.69	0.50	
calbindin 1 (Calb1), mRNA.	NM_031984	-0.62	0.07	0.55	-0.22	0.16	0.07	-0.19	-0.19	0.37	-0.12	-0.75	-1.09	
calpactin I heavy chain (Anxa2), mRNA.	NM_019905	-0.23	0.06	0.17	-0.11	-0.11	0.22	-0.05	-0.03	0.09	-0.08	-0.22	-0.03	
thymosin, beta 10 (Tmsb10), mRNA.	NM_021261	0.02	-0.07	0.05	-0.10	0.16	-0.06	-0.02	0.03	-0.01	0.18	-0.07	-0.12	
matrix Gla protein (Mgp), mRNA.	NM_012862	-0.41	0.14	0.27	-0.31	0.17	0.14	0.03	-0.24	0.20	0.18	0.46	0.36	
mRNA for preprocathepsin D (EC 3.4.23.5)	X54467	0.06	-0.11	0.04	-0.19	0.01	0.18	0.15	-0.07	-0.08	0.27	0.40	0.48	
lectin, galactose binding, soluble 3 (Lg	NM_031832	0.12	-0.42	0.30	-0.29	-0.10	0.40	-0.03	-0.12	0.15	-0.03	-0.27	0.28	
S-100 related protein mRNA, complete cds	J03627	-0.03	0.07	-0.04	0.26	-0.22	-0.04	-0.05	0.01	0.04	-0.01	-0.11	0.05	
CD24 antigen (Cd24), mRNA.	NM_012752	-0.02	-0.08	0.10	-0.05	0.11	-0.06	-0.05	-0.01	0.06	-0.08	-0.20	-0.33	
calcium binding protein A6 (calyculin) (	NM_053485	0.05	-0.09	0.04	-0.54	0.36	0.18	-0.15	0.04	0.11	0.73	-0.03	0.28	
similar to tumor necrosis factor recepto	XM_220201	-0.15	0.08	0.07	0.04	0.08	-0.13	0.17	-0.05	-0.12	-0.24	-0.14	0.40	
similar to claudin 4 [Mus musculus] (LOC	XM_222090	0.04	-0.06	0.02	-0.22	0.03	0.20	0.02	0.04	-0.05	0.01	0.03	0.08	
cytokine inducible SH2-containing protei	NM_053565	-0.27	0.03	0.24	0.02	-0.22	0.21	0.04	-0.01	-0.03	0.32	0.11	0.16	
solute carrier family 34 (sodium phospho	NM_053380	-0.32	0.44	-0.12	0.43	-0.12	-0.31	0.00	0.01	-0.02	-0.01	-0.03	-0.30	
DEXRAS1 (Dexas1) mRNA, complete cds.	AF239157	0.11	-0.16	0.05	-0.17	-0.15	0.32	-0.17	-0.13	0.30	-0.45	-0.64	-0.47	
AHNAK-related protein mRNA, partial cds.	AF454371	-0.10	0.10	0.00	0.23	-0.52	0.29	0.06	0.08	-0.14	-0.20	-0.12	-0.20	
CD44 antigen (Cd44), mRNA.	NM_012924	-0.14	0.55	-0.41	0.51	0.04	-0.54	-0.23	0.21	0.02	-0.36	-0.26	-0.41	
a disintegrin and metalloproteinase with	AF149118	0.37	-0.30	-0.07	0.00	0.30	-0.30	-0.21	-0.01	0.22	0.44	0.30	-0.72	
osteonectin mRNA, complete cds.	AF184983	-0.11	-0.07	0.19	-0.51	0.21	0.30	-0.18	-0.07	0.25	-0.37	0.25	-0.35	
iC3 synthase (LOC171553), mRNA.	NM_138524	-0.34	-0.15	0.49	0.65	-0.22	-0.42	0.05	-0.11	0.07	-0.43	-0.21	-0.73	
alpha-2-macroglobulin (A2m), mRNA.	NM_012488	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-0.21	-0.26	0.47	-0.30	-0.10	0.03	
Serine protease inhibitor (Spm2b), mRNA	NM_012657	0.18	-0.46	0.28	-0.15	0.21	-0.05	0.12	-0.33	0.21	-0.06	0.18	-0.24	
ckln3 gene.	AJ011656	-0.15	-0.12	0.27	-0.13	-0.25	0.38	0.18	-0.05	-0.13	0.04	0.37	-0.48	
Sprague-Dawley fibrinogen B beta chain m	U05675	-0.13	-0.04	0.17	0.07	-0.74	0.67	0.03	-0.03	0.00	-0.51	-1.22	-0.43	
collagen triple helix repeat containing	NM_172333	0.10	0.29	-0.39	0.54	-0.02	-0.51	0.04	-0.21	0.17	-0.24	-0.54	-0.78	
similar to paternally expressed 12; freq	XM_218737	0.04	-0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	-0.06	0.06	0.00	-0.21	0.15	0.13	
ubiquitin D (Ubd), mRNA.	NM_053299	0.25	-0.12	-0.13	0.09	-0.07	-0.02	-0.04	0.07	-0.03	-0.74	-0.60	0.20	

【0122】

10

20

30

【表 2】

遺伝子名	ID	2ae	thf	mca	suf	2ip	hnh	4em	nfa	bac	nns	nat	nmb
(clone K-32) kallikrein mRNA, 3' end.	L33839	0.35	-0.14	-0.02	-0.06	0.32	-0.59	-0.49	0.22	0.79	-0.15	0.49	-0.07
Tonin (Ton), mRNA.	NM_012677	0.61	0.09	-0.15	-0.09	-0.14	-0.62	-0.84	0.10	0.53	-0.40	0.31	-0.15
protein phosphatase 1, regulatory (inhib	NM_022676	0.16	0.25	-0.13	-0.71	-0.82	-0.88	-0.38	0.21	0.52	0.47	0.08	-0.07
gamma-glutamylcysteine synthetase mRNA,	J05181	-0.38	-0.48	-0.14	-0.45	0.03	-0.68	-1.16	-0.22	-0.06	-0.22	-0.20	-0.39
pregnancy-induced growth inhibitor (Ok3	NM_138504	-0.15	-0.62	-0.15	-0.50	-0.12	-0.81	-1.30	-0.14	-0.05	-0.11	-0.19	0.00
mRNA for organic cation transporter OCT2	D83044	0.09	-0.44	0.17	0.19	0.36	-0.50	-0.70	-0.20	-0.55	-0.56	-0.05	-0.83
flavin-containing monooxygenase 3 (Fmo3)	NM_053433	-0.09	-0.21	0.34	-0.43	-0.30	-0.23	-0.75	-0.01	-0.46	-0.68	-0.33	-0.44
Uromodulin (Tamm-Horsfall protein) (Umod)	NM_017082	-0.46	-0.27	-0.27	-0.33	-0.36	-1.22	-0.11	-0.12	-0.23	-0.22	-0.25	-0.05
Kidney androgen-regulated protein (Kap).	NM_052802	-0.51	-0.58	0.39	0.20	-0.12	-0.62	-0.23	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NM_017008	-0.95	-0.55	-0.16	-0.61	-0.22	0.15	-1.00	-0.08	0.08	-0.05	-0.43	0.35
hypothetical protein LOC56728 (LOC56728)	NM_019908	-1.48	-0.12	-0.05	0.11	-0.11	-0.20	-0.05	-0.16	0.12	-0.09	0.11	0.51
Deleted in colorectal cancer (rat homo1	NM_012841	-1.00	-0.24	-0.01	-0.42	-0.47	-0.66	-0.19	0.31	-0.38	-0.67	-0.39	-0.98
cysteine-sulfinate decarboxylase (Csd).	NM_021750	-1.48	-0.75	-0.53	0.04	-0.87	-0.15	-1.51	0.04	0.31	0.67	0.11	-0.60
translin (Tsn), mRNA.	NM_021762	-1.59	-0.66	-0.13	0.08	-0.51	0.35	-0.98	-0.12	0.08	0.47	0.17	0.03
deiodinase, iodothyronine, type 1 (Dio1)	NM_021653	-0.40	-0.01	-0.13	-0.24	-0.21	-0.56	-0.89	0.33	-0.03	-0.10	0.04	0.05
Deoxyribonuclease I (Dnase1), mRNA.	NM_013097	0.05	0.54	-0.76	-0.26	-0.10	0.57	-0.46	0.35	-0.29	-0.32	-0.20	-0.47
Regucalcin (Rgn), mRNA.	NM_031546	-1.86	-1.54	0.41	-0.30	0.24	-0.38	-1.26	0.44	-0.01	0.55	0.14	-0.65
Solute carrier family 4, member 1, anion	NM_012651	0.10	-0.03	-0.22	-0.03	0.04	0.46	0.15	0.35	0.22	-0.07	-0.10	0.02
aquaporin 6 (Aqp6), mRNA.	NM_022181	0.43	0.55	0.48	0.14	-0.03	-0.04	-0.22	0.79	0.93	1.12	0.39	1.21
putative N-acetyltransferase Camello 2 (	NM_021668	0.40	-0.35	0.54	-0.23	-0.60	-1.11	-2.18	-0.33	0.47	0.56	0.08	0.20
histamine N-methyltransferase (Hmt), mR	NM_031044	0.31	-0.72	0.35	-0.74	0.29	-1.13	-2.52	0.57	1.08	0.66	0.07	0.19
Trefoil factor (intestinal) (Tf3), mRNA	NM_013042	-0.89	-2.03	-0.30	-0.69	-0.31	-1.42	-1.98	-0.14	-0.27	-0.07	0.03	-1.13
spp-24 precursor mRNA, partial cds.	U19485	0.71	0.49	0.64	0.39	-0.23	0.74	-0.02	0.94	1.27	0.63	0.50	0.69
calbindin 1 (Calb1), mRNA.	NM_031984	-1.40	-0.59	0.18	0.09	-0.86	0.59	-0.83	1.36	1.28	1.17	0.49	0.37
calpactin I heavy chain (Anxa2), mRNA.	NM_019905	0.19	-0.27	-0.17	-0.44	-0.52	0.11	-0.50	0.06	0.04	0.00	0.16	-0.32
thymosin, beta 10 (Tnusb10), mRNA.	NM_021261	0.15	0.13	0.33	-0.37	-0.31	-0.28	0.14	-0.22	-0.12	-0.05	0.17	-0.09
matrix Gla protein (Mgp), mRNA.	NM_012862	0.11	0.22	0.23	0.02	-0.48	-0.09	-0.40	0.35	0.38	0.38	-0.07	0.43
mRNA for preprocathepsin D (EC 3.4.23.5)	X54467	0.11	0.19	0.13	-0.11	-0.12	0.37	-0.13	0.46	0.29	0.35	-0.07	0.01
lectin, galactose binding, soluble 3 (Lg	NM_031832	-0.23	0.18	-0.13	0.03	-0.47	-0.06	-0.16	-0.32	-0.53	-0.25	-0.47	-0.24
S-100 related protein mRNA, complete cds	J03627	0.15	-0.21	0.59	0.51	0.25	0.22	0.12	0.12	-0.04	0.30	-0.09	0.22
CD24 antigen (Cd24), mRNA.	NM_012752	-0.13	-0.27	0.46	0.27	0.28	0.26	0.32	-0.23	-0.50	-0.50	-0.08	-0.52
calcium binding protein A6 (calcyclin) (	NM_053485	0.29	0.30	0.40	-0.09	0.06	0.44	-0.32	-0.15	-0.01	0.08	0.50	-0.39
similar to tumor necrosis factor recepto	XM_220201	0.34	0.10	0.32	0.55	0.41	1.16	1.25	0.05	-0.11	0.04	-0.08	-0.01
similar to claudin 4 [Mus musculus] (LOC	XM_222090	0.32	0.09	0.36	0.40	0.33	0.66	0.42	-0.27	-0.07	-0.15	0.09	0.07
cytokine inducible SH2-containing protei	NM_053565	0.36	0.48	0.53	0.35	-0.16	-0.13	0.76	-0.20	0.12	0.03	-0.63	-0.09
solute carrier family 34 (sodium phospho	NM_053380	-0.25	-0.15	0.24	0.65	0.71	0.31	0.41	0.02	0.48	0.29	0.53	0.45
DEXRAS1 (Dexas1) mRNA, complete cds.	AF239157	-0.34	-0.49	-0.27	0.13	-0.44	-0.38	0.00	0.02	-0.23	-0.15	0.27	-0.11
AHNAK-related protein mRNA, partial cds.	AF454371	-0.42	-0.38	0.25	-0.18	-0.11	-0.42	0.06	-0.03	0.11	0.39	-0.34	0.67
CD44 antigen (Cd44), mRNA.	NM_012924	-0.37	-0.84	0.69	0.32	-0.15	0.03	0.03	-0.35	-0.51	-0.05	0.46	0.13
a disintegrin and metalloproteinase with	AF149118	0.20	-0.40	0.76	0.71	0.57	0.68	0.00	-0.41	0.27	0.09	-0.13	-0.25
osteocalcin mRNA, complete cds.	AF184983	0.18	-0.52	1.00	0.41	-0.05	0.41	0.09	-0.62	-0.33	-0.06	-0.33	-0.92
iGb3 synthase (LOC171553), mRNA.	NM_138524	-0.64	-0.52	-0.34	0.12	0.11	0.61	0.08	-0.38	-0.64	-0.55	-0.05	-0.74
alpha-2-macroglobulin (A2m), mRNA.	NM_012488	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.53	1.21	0.00	0.00	0.24
Serine protease inhibitor (Spin2b), mRNA	NM_012657	-0.49	0.02	-0.43	0.45	-0.03	0.11	-0.14	-0.01	0.17	-0.18	0.01	0.38
ckln3 gene.	AJ011656	0.32	-0.33	-0.40	-0.73	-1.24	-1.03	-0.70	-0.28	0.15	0.26	-0.44	-0.38
Sprague-Dawley fibrinogen B beta chain m	U05675	-0.63	-1.14	0.30	0.07	0.09	-0.09	0.09	0.08	0.50	1.01	0.50	0.48
collagen triple helix repeat containing	NM_172333	-0.92	-1.12	-0.27	0.24	-0.63	0.26	-0.01	-0.75	0.09	-0.06	0.48	-0.06
similar to paternally expressed 12; freq	XM_218737	-0.52	0.06	0.23	0.21	0.00	0.00	-0.37	-0.52	-0.15	-0.42	0.25	-0.33
ubiquitin D (Ubd), mRNA.	NM_053299	0.15	-0.49	0.42	-0.91	0.24	1.36	2.02	-1.29	-0.76	-0.20	-0.01	0.71

【 0 1 2 3 】

10

20

30

【表 3】

遺伝子名	ID	dcb	34x	nna	tdn	2de	pcp	mcs	23d				
(clone K-32) kallikrein mRNA, 3' end.	L33839	0.03	0.01	0.29	-0.09	0.17	0.04	0.24	-0.77	-0.77	-0.44	0.71	-0.54
Tonin (Ton), mRNA.	NM_012677	-0.14	-0.09	0.27	0.04	0.41	0.16	0.28	-0.69	-0.52	-0.27	0.59	-0.69
protein phosphatase 1, regulatory (inhib	NM_022676	0.00	-0.61	0.34	0.25	0.02	-0.19	-0.19	-0.74	-0.38	-0.88	-0.06	-0.32
gamma-glutamylcysteine synthetase mRNA.	J05181	0.28	0.37	-0.22	-0.01	0.09	-0.12	-0.24	-0.52	-0.83	-0.74	0.22	-0.04
pregnancy-induced growth inhibitor (Oki3	NM_138504	0.67	0.17	-0.06	-0.20	-0.03	-0.10	0.18	-0.45	-0.15	-0.20	0.34	0.19
mRNA for organic cation transporter OCT2	D83044	0.37	0.28	0.34	-0.65	0.21	-0.08	-0.06	-0.96	-0.81	-1.11	0.32	-0.26
flavin-containing monooxygenase 3 (Fmo3)	NM_053433	0.02	0.14	-0.08	0.22	0.13	-0.01	-0.31	-0.72	-0.59	-0.72	-0.16	-0.14
Uromodulin (Tamm-Horsfall protein) (Umod)	NM_017082	-0.02	-0.29	0.02	0.17	0.40	-0.25	-0.23	-0.69	-1.03	-0.87	-0.40	-0.29
Kidney androgen-regulated protein (Kap).	NM_052802	0.00	0.00	0.00	-0.08	0.00	0.56	0.00	-0.55	-0.79	-0.72	-0.08	-0.46
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NM_017008	0.22	-0.03	-0.26	0.17	-0.08	-0.17	0.12	-0.58	-0.45	0.38	0.56	0.12
hypothetical protein LOC56728 (LOC56728)	NM_019908	-0.33	-0.13	-0.37	0.10	-0.02	-0.18	-0.23	-0.50	-0.13	-0.13	-0.14	-0.15
Deleted in colorectal cancer (rat homolog)	NM_012841	0.20	-0.29	-0.46	-0.39	-0.05	-0.35	-0.82	-1.19	0.10	-1.43	0.17	-0.45
cysteine-sulfinate decarboxylase (Csad).	NM_021750	0.71	0.37	0.73	0.94	0.37	0.72	0.36	-0.21	0.04	-0.37	0.26	-0.07
translin (Tsn), mRNA.	NM_021762	0.10	-0.43	0.08	0.55	0.13	0.28	-0.18	-0.53	0.24	-0.35	0.10	-0.13
deiodinase, iodothyronine, type 1 (Dio1)	NM_021653	0.34	-0.38	0.61	-0.13	-0.03	0.06	0.23	-1.27	-0.99	-1.68	0.18	-0.22
Deoxyribonuclease I (Dnase1), mRNA.	NM_013097	-0.28	-0.01	0.44	-0.02	-0.12	0.64	0.21	-0.56	0.31	0.01	0.49	-0.47
Regucalcin (Rgn), mRNA.	NM_031546	-0.22	-0.05	0.17	-0.58	-0.11	-0.20	-0.17	-0.34	0.07	-0.29	0.23	0.11
Solute carrier family 4, member 1, anion	NM_012651	0.30	-0.69	0.42	-0.16	-0.38	-0.06	-0.13	-1.45	-1.19	-1.47	0.62	-0.14
aquaporin 6 (Aqp6), mRNA.	NM_022181	0.30	-0.22	-0.11	-0.63	0.19	-0.56	-0.15	-0.48	-0.37	-0.85	1.04	0.42
putative N-acetyltransferase Camello 2 (	NM_021668	0.35	0.44	0.76	0.03	0.29	-0.02	-0.26	0.17	-0.25	-0.46	0.29	0.08
histamine N-methyltransferase (Hmt), mR	NM_031044	0.06	0.92	-0.06	-0.16	0.52	-0.28	-0.22	0.59	0.35	-0.13	0.71	0.09
Trefoil factor (intestinal) (Tff3), mRNA	NM_013042	-0.07	0.34	0.50	0.06	0.61	0.62	0.12	0.44	0.43	0.39	0.67	0.28
spp-24 precursor mRNA, partial cds.	U19485	0.37	0.37	-0.23	0.81	-0.30	1.09	-0.15	0.02	-0.13	0.33	0.78	-0.24
calbindin 1 (Calb1), mRNA.	NM_031984	-1.30	-0.69	-0.48	-1.00	-0.37	-0.86	-1.39	-2.64	-0.49	-0.22	-0.61	-0.48
calpastin I heavy chain (Anxa2), mRNA.	NM_019905	-0.12	0.49	-0.01	0.17	-0.07	0.38	-0.25	0.88	0.64	1.13	-0.25	0.07
thymosin, beta 10 (Tmsb10), mRNA.	NM_021261	-0.69	0.28	-0.46	0.20	0.02	0.10	-0.22	1.16	1.09	1.49	-0.25	0.47
matrix Gla protein (Mgp), mRNA.	NM_012862	0.22	0.16	-0.28	0.40	0.08	0.06	-0.01	1.43	0.95	1.51	-0.15	0.45
mRNA for preprocathepsin D (EC 3.4.23.5)	X54467	-0.02	0.39	-0.05	-0.17	-0.20	0.14	0.21	0.74	0.62	1.05	-0.06	0.62
lectin, galactose binding, soluble 3 (Lg	NM_031832	-0.09	-0.14	-0.14	0.26	-0.02	0.30	0.11	0.98	1.39	1.83	0.07	0.57
S-100 related protein mRNA, complete cds	J03627	0.00	0.05	0.03	-0.17	-0.20	0.05	0.11	0.84	1.18	1.56	0.20	0.35
CD24 antigen (Cd24), mRNA.	NM_012752	-0.36	0.57	-0.28	-0.25	0.09	0.16	-0.30	0.94	0.71	1.37	-0.03	0.65
calcium binding protein A6 (calyculin) (	NM_053485	-0.05	0.68	0.34	0.12	0.42	0.40	0.07	0.94	1.52	2.08	-0.31	0.77
similar to tumor necrosis factor recepto	XM_220201	0.19	0.27	-0.05	-0.04	-0.23	-0.46	-0.10	0.20	0.65	0.45	0.08	0.20
similar to claudin 4 [Mus musculus] (LOC	XM_222090	-0.21	-0.11	-0.06	0.20	-0.14	-0.04	-0.27	1.11	1.13	1.33	-0.01	0.42
cytokine inducible SH2-containing protei	NM_053565	-0.09	-0.10	-0.18	0.16	0.23	0.00	0.07	0.74	0.32	0.77	0.00	0.45
solute carrier family 34 (sodium phospho	NM_053380	0.02	0.48	0.12	0.09	-0.11	-0.15	0.20	0.79	0.39	0.24	-0.11	0.56
DEXRAS1 (Dexas1) mRNA, complete cds.	AF239157	0.23	0.03	-0.39	0.18	-0.59	0.27	0.36	0.55	0.93	0.54	0.18	0.34
AHNAK-related protein mRNA, partial cds.	AF454371	0.01	0.01	0.02	-0.63	-0.24	-0.26	-0.20	0.99	0.90	0.82	0.24	0.74
CD44 antigen (Cd44), mRNA.	NM_012924	-0.20	-0.47	-0.44	0.04	-0.31	-0.28	-0.41	1.21	0.79	1.01	-0.25	0.29
a disintegrin and metalloproteinase with	AF149118	-0.41	-0.09	-0.49	-0.29	-0.10	-0.30	-0.13	0.78	0.56	0.51	-0.88	-0.20
osteocalcin mRNA, complete cds.	AF184983	0.04	0.13	-0.04	-0.19	0.01	0.17	0.09	0.51	0.25	1.17	-0.11	0.00
iGb3 synthase (LOC171553), mRNA.	NM_138524	-0.12	0.13	-0.13	0.33	0.20	0.54	0.07	1.22	0.39	0.91	0.43	0.91
alpha-2-macroglobulin (A2m), mRNA.	NM_012488	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Serine protease inhibitor (Spin2b), mRNA	NM_012657	-0.75	0.00	0.28	-0.36	0.18	0.21	0.25	0.55	-0.06	0.70	0.35	0.07
ckln3 gene.	AJ011656	-0.08	0.26	-0.16	0.60	0.51	0.54	-0.03	0.54	0.48	0.84	0.21	0.49
Sprague-Dawley fibrinogen B beta chain m	U05675	-0.34	0.12	-0.36	0.03	0.51	0.15	0.14	1.54	0.98	1.53	-0.43	0.18
collagen triple helix repeat containing	NM_172333	-1.30	-0.48	-0.73	-0.29	-0.62	0.06	-0.89	0.90	0.01	0.33	-0.58	0.44
similar to paternally expressed 12; freq	XM_218737	0.17	1.02	0.00	-0.30	0.00	-0.17	-0.48	0.00	0.15	0.11	0.00	-0.07
ubiquitin D (Ubd), mRNA.	NM_053299	-0.37	-0.03	-1.77	0.04	-0.11	-0.26	-0.67	2.30	2.44	3.05	-1.12	-1.19

【 0 1 2 4 】

10

20

30

【表 4】

遺伝子名	ID	dhc			dlp		tbe			dba			pep		
(clone K-32) kallikrein mRNA, 3' end.	L33839	0.04	-0.40	-0.48	-0.53	0.22	-0.35	0.18	0.19	0.15	0.00	0.62	0.24	0.71	
Tonin (Ton), mRNA.	NM_012677	0.34	-0.02	-0.16	-0.39	0.16	-0.35	0.26	0.20	0.12	-0.03	0.39	0.14	0.36	
protein phosphatase 1, regulatory (inhib	NM_022676	0.54	0.17	-0.07	-0.64	-0.12	-0.54	-0.02	-0.05	0.12	-0.35	0.49	0.10	-0.26	
gamma-glutamylcysteine synthetase mRNA.	J05181	0.10	0.01	0.03	0.16	0.35	0.22	0.08	0.24	-0.35	0.02	-0.01	0.21	0.11	
pregnancy-induced growth inhibitor (Okl3	NM_138504	0.33	0.26	0.23	-0.10	0.25	0.22	0.50	-0.03	-0.21	0.06	-0.25	-0.02	-0.40	
mRNA for organic cation transporter OCT2	D83044	0.40	0.33	-0.04	0.19	0.17	0.05	-0.11	0.08	0.18	0.20	-0.22	-0.23	0.00	
flavin-containing monooxygenase 3 (Fmo3)	NM_053433	0.97	-0.11	-0.24	-0.13	0.09	-0.12	0.11	-0.07	-0.15	-0.27	-0.13	-0.19	-0.62	
Uromodulin (Tamm-Horsfall protein) (Umod)	NM_017082	0.20	-0.11	-0.14	-0.09	0.21	0.39	0.25	0.17	0.08	0.21	0.27	0.09	0.16	
Kidney androgen-regulated protein (Kap).	NM_052802	0.30	0.32	-0.79	-0.23	0.54	0.50	0.63	0.19	-0.27	-0.34	0.22	-0.07	-0.27	
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NM_017008	0.45	0.13	0.40	0.02	0.39	0.51	-0.25	0.07	-0.13	-0.21	0.30	0.17	0.07	
hypothetical protein LOC56728 (LOC56728)	NM_019908	0.34	0.10	-0.19	-0.06	-0.22	-0.30	-0.31	0.03	-0.58	-0.40	-0.56	-0.55	-0.22	
Deleted in colorectal cancer (rat homolog	NM_012841	0.44	0.35	-0.04	0.28	0.17	-0.38	-0.14	-0.17	0.15	-0.68	-0.26	-0.02	0.13	
cysteine-sulfinate decarboxylase (Csad).	NM_021750	0.60	0.35	0.23	0.14	0.72	0.14	-0.02	0.05	0.20	-0.09	0.09	0.22	-0.12	
translin (Tsn), mRNA.	NM_021762	0.34	0.42	-0.07	-0.30	0.52	0.22	-0.01	-0.16	0.16	0.12	-0.13	0.37	-0.36	
deiodinase, iodothyronine, type 1 (Dio1)	NM_021653	0.43	-0.37	-0.82	-0.57	0.45	0.79	0.47	-0.38	0.08	-0.63	-0.78	-0.41	-0.29	
Deoxyribonuclease I (Dnase1), mRNA.	NM_013097	1.19	1.00	0.68	0.56	0.27	0.58	0.66	-0.26	0.01	-0.12	0.18	0.02	-0.31	
Regucalcin (Rgn), mRNA.	NM_031546	1.07	0.83	0.32	-0.45	-0.11	-0.03	0.05	0.50	-0.16	-0.13	-0.70	-0.26	-0.31	
Solute carrier family 4, member 1, anion	NM_012651	-0.01	0.22	0.37	0.20	0.24	0.09	0.38	0.08	0.33	-0.16	0.56	0.34	0.08	
aquaporin 6 (Aqp6), mRNA.	NM_022181	0.61	0.04	-0.01	0.12	-0.30	-0.40	-0.09	-0.70	-0.50	-0.46	0.22	-0.02	-0.15	
putative N-acetyltransferase Camello 2 (	NM_021668	0.30	0.45	-0.15	-0.29	-0.15	-0.19	-0.09	-0.42	-0.96	-0.62	-0.42	-0.25	-0.30	
histamine N-methyltransferase (Hnmt), mR	NM_031044	0.29	0.83	-0.23	-0.45	0.11	0.09	0.70	0.14	-0.83	-0.47	-0.12	-0.63	-0.53	
Trefoil factor (intestinal) (TIF), mRNA	NM_013042	0.39	0.26	-0.04	-0.42	0.35	0.01	0.63	0.11	-0.39	-0.34	-0.26	-0.22	-0.82	
spp-24 precursor mRNA, partial cds.	U19485	0.10	-0.12	0.71	-0.28	-0.59	-0.93	-1.30	-1.19	0.17	-1.11	-1.35	-0.69	-0.15	
calbindin 1 (Calb1), mRNA.	NM_031984	0.67	0.08	0.86	0.78	-0.60	0.30	-0.64	0.39	-0.15	0.27	0.99	0.02	-0.45	
calpactin I heavy chain (Anx2), mRNA.	NM_019905	0.00	-0.14	0.01	-0.55	0.19	0.00	0.15	-0.04	-0.14	0.07	0.08	-0.34	0.12	
thymosin, beta 10 (Tnmb10), mRNA.	NM_021261	0.06	-0.22	-0.37	-0.23	0.16	0.13	-0.11	0.10	-0.26	-0.24	-0.32	-0.38	-0.20	
matrix Gla protein (Mgp), mRNA.	NM_012862	0.26	-0.03	0.06	-0.14	0.27	-0.01	-0.05	-0.06	0.36	-0.03	-0.19	0.03	0.09	
mRNA for preprocathepsin D (EC 3.4.23.5)	X54467	0.82	0.27	0.19	0.02	0.33	0.28	0.49	0.26	0.32	0.14	0.07	0.35	0.22	
lectin, galactose binding, soluble 3 (Lg	NM_031832	0.18	0.56	0.29	0.31	0.08	0.20	-0.07	0.06	0.28	-0.12	0.21	-0.10	0.05	
S-100 related protein mRNA, complete cds	J03627	0.75	0.54	0.26	-0.10	0.21	-0.03	0.02	0.03	-0.28	0.04	-0.84	-0.16	0.04	
CD24 antigen (Cd24), mRNA.	NM_012752	-0.01	0.09	-0.23	0.12	-0.05	-0.13	-0.37	0.05	-0.43	-0.04	-0.43	-0.26	-0.13	
calcium binding protein A6 (calyculin) (	NM_053485	-0.29	0.45	0.13	-0.14	0.04	0.24	0.12	0.18	-0.15	-0.10	0.47	0.01	0.20	
similar to tumor necrosis factor recepto	XM_220201	-0.13	-0.34	0.13	-0.10	0.12	0.24	0.30	0.13	0.04	-0.04	0.15	0.32	-0.06	
similar to claudin 4 [Mus musculus] (LOC	XM_222090	0.10	0.18	0.30	0.10	0.15	-0.01	0.17	0.33	0.01	-0.02	0.12	0.19	0.15	
cytokine inducible SH2-containing protei	NM_053565	-0.69	-0.05	0.41	0.01	0.38	0.35	0.44	0.14	0.09	-0.06	0.45	0.45	0.25	
solute carrier family 34 (sodium phospho	NM_053380	-0.29	-0.22	0.02	0.20	0.22	0.15	-0.04	0.09	-0.06	-0.08	-0.18	-0.11	-0.30	
DEXRAS1 (Dexas1) mRNA, complete cds.	AF239157	-0.44	0.24	0.27	-0.21	-0.03	-0.37	0.14	0.25	0.30	0.22	0.00	0.21	0.05	
AHNAK-related protein mRNA, partial cds.	AF454371	0.55	0.00	-0.07	0.00	0.17	0.13	0.43	0.00	0.48	0.17	-0.18	0.47	0.33	
CD44 antigen (Cd44), mRNA.	NM_012924	-0.14	-0.13	0.45	0.54	0.50	-0.10	0.10	0.33	-0.37	0.25	0.14	0.07	0.01	
a disintegrin and metalloproteinase with	AF149118	-0.48	-0.36	-0.30	0.00	0.26	-0.49	0.89	0.21	-0.24	-0.07	0.16	-0.02	0.18	
osteonectin mRNA, complete cds.	AF184983	-0.34	0.18	0.44	-0.75	0.68	0.06	0.53	0.50	0.47	-0.24	0.30	-0.32	0.08	
iGob3 synthase (LOC171553), mRNA.	NM_138524	0.64	0.07	-0.07	0.29	-0.01	-0.21	-0.17	-0.30	0.06	-0.17	-0.48	-0.03	0.10	
alpha-2-macroglobulin (A2m), mRNA.	NM_012488	0.00	0.00	0.00	0.00	-0.33	-0.63	0.86	0.22	0.00	-0.15	0.29	-0.24	0.18	
Serine protease inhibitor (Spin2b), mRNA	NM_012657	0.32	-0.26	0.13	0.07	-0.05	0.00	1.23	-0.16	0.33	-0.29	0.27	-0.07	0.11	
cldn3 gene.	AJ011656	0.20	0.07	0.24	0.41	0.02	-0.03	0.50	0.61	0.12	0.49	0.36	0.39	0.22	
Spangue-Dawley fibrinogen B beta chain m	U05675	0.11	0.26	-0.06	0.39	0.04	0.23	0.16	0.24	0.11	0.88	0.33	0.46	0.54	
collagen triple helix repeat containing	NM_172333	0.95	-0.54	-0.23	-0.22	0.40	-0.42	0.09	0.41	-0.88	-0.23	-0.08	-0.52	0.13	
similar to paternally expressed 12; freq	XM_218737	0.00	0.06	0.17	0.09	0.00	0.62	0.00	0.16	0.62	0.87	0.00	-0.39	0.00	
ubiquitin D (Ubd), mRNA.	NM_053299	-0.23	0.53	-0.17	-0.01	0.59	0.30	0.50	-0.09	0.04	0.97	-0.17	0.01	0.11	

【 0 1 2 5 】

10

20

【表 5】

遺伝子名	ID	tbp			tmp		
(clone K-32) kallikrein mRNA, 3' end.	L33839	-0.01	-0.24	-0.12	-3.01	-0.23	-1.86
Tonin (Ton), mRNA.	NM 012677	-0.16	-0.49	-0.21	-2.92	-0.51	-1.70
protein phosphatase 1, regulatory (inhib	NM 022676	-0.29	-0.31	-0.20	-2.80	-0.38	-1.57
gamma-glutamylcysteine synthetase mRNA.	J05181	-0.03	-0.25	0.32	-2.18	-0.08	-1.94
pregnancy-induced growth inhibitor (Ok3	NM 138504	-0.15	0.06	-0.55	-2.51	-0.83	-2.12
mRNA for organic cation transporter OCT2	D83044	0.17	-0.03	-0.18	-2.21	-0.69	-1.65
flavin-containing monooxygenase 3 (Fmo3)	NM 053433	0.06	0.15	0.21	-2.78	-0.51	-1.54
Umodulin (Tamm-Horsfall protein) (Umod)	NM 017082	0.16	0.18	0.07	-2.14	-0.40	-1.69
Kidney androgen-regulated protein (Kap).	NM 052802	0.38	-0.05	0.20	-2.38	-0.44	-2.16
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NM 017008	-0.06	-0.14	-0.20	-3.27	-0.98	-1.59
hypothetical protein LOC56728 (LOC56728)	NM 019908	-0.25	-0.16	-0.45	-2.59	-0.71	-1.55
Deleted in colorectal cancer (rat homol	NM 012841	-0.14	0.02	0.07	-3.36	-0.58	-2.21
cysteine-sulfinate decarboxylase (Csad).	NM 021750	-0.61	-0.37	-0.28	-2.36	-1.06	-1.70
translin (Tsn), mRNA.	NM 021762	-0.25	-0.43	-0.28	-1.75	-0.97	-1.60
deiodinase, iodothyronine, type 1 (Dio1)	NM 021653	-0.81	-0.57	-0.83	-3.53	-0.74	-1.99
Deoxyribonuclease I (Dnase1), mRNA.	NM 013097	0.35	-0.03	0.26	-2.39	-0.90	-2.23
Regucalcin (Rgn), mRNA.	NM 031546	0.29	0.15	0.14	-3.59	-0.45	-2.23
Solute carrier family 4, member 1, anion	NM 012651	0.04	0.22	0.17	-3.60	-1.56	-2.77
aquaporin 6 (Aqp6), mRNA.	NM 022181	-0.19	-0.17	-0.23	-2.95	-1.65	-2.47
putative N-acetyltransferase Camello 2 (	NM 021668	-0.35	-0.26	-0.10	-3.10	-0.14	-1.68
histamine N-methyltransferase (Hnmt), mR	NM 031044	-0.10	-0.23	0.53	-1.93	-0.34	-1.58
Trefoil factor (intestinal) (Tff3), mRNA	NM 013042	0.20	-0.55	-0.53	-1.72	-0.40	-1.62
spp-24 precursor mRNA, partial cds.	U19485	-1.23	-0.97	-0.65	-3.86	-1.78	-1.57
calbindin 1 (Calb1), mRNA.	NM 031984	0.28	0.09	0.29	-1.95	-1.66	-0.69
calpactin I heavy chain (Anxa2), mRNA.	NM 019905	0.28	-0.11	-0.05	2.74	1.21	1.69
thymosin, beta 10 (Tmsb10), mRNA.	NM 021261	0.21	-0.51	-0.19	2.75	0.93	1.95
matrix Gla protein (Mgp), mRNA.	NM 012862	-0.33	0.08	-0.08	2.73	1.04	2.25
mRNA for preprocathepsin D (EC 3.4.23.5)	X54467	0.21	0.15	0.05	2.00	1.05	1.85
lectin, galactose binding, soluble 3 (Lg	NM 031832	-0.05	0.23	0.08	2.39	1.21	1.99
S-100 related protein mRNA, complete cds	J03627	-0.16	0.11	-0.30	1.99	0.86	1.71
CD24 antigen (Cd24), mRNA.	NM 012752	-0.11	-0.27	-0.09	2.05	0.78	1.84
calcium binding protein A6 (calcyclin) (	NM 053485	-0.08	-0.40	-0.06	3.30	0.68	1.82
similar to tumor necrosis factor recepto	XM 220201	0.35	0.31	0.31	3.03	1.24	2.37
similar to claudin 4 [Mus musculus] (LOC	XM 222090	0.08	-0.10	-0.07	2.78	1.47	2.75
cytokine inducible SH2-containing protei	NM 053565	0.24	-0.24	0.25	3.12	0.85	1.87
solute carrier family 34 (sodium phospho	NM 053380	0.08	0.28	0.16	2.61	1.02	1.83
DEXRAS1 (Dexas1) mRNA, complete cds.	AF239157	0.28	-0.14	0.00	1.84	1.09	1.71
AHNAK-related protein mRNA, partial cds.	AF454371	0.20	0.63	0.55	2.10	0.61	1.56
CD44 antigen (Cd44), mRNA.	NM 012924	0.43	-0.24	0.06	2.65	1.34	1.87
a disintegrin and metalloproteinase with	AF149118	0.39	0.09	0.15	2.37	1.54	2.54
osteactivin mRNA, complete cds.	AF184983	0.70	0.09	0.06	2.71	1.29	1.81
iGb3 synthase (LOC171553), mRNA.	NM 138524	-0.35	-0.14	-0.44	2.12	0.86	1.81
alpha-2-macroglobulin (A2m), mRNA.	NM 012488	0.00	-1.17	0.17	2.59	0.85	1.54
Serine protease inhibitor (Spin2b), mRNA	NM 012657	0.02	-0.01	-0.53	1.61	0.15	1.93
cldn3 gene.	AJ011656	-0.21	0.03	0.11	1.91	0.88	1.80
Sprague-Dawley fibrinogen B beta chain m	U05675	0.65	0.01	0.47	3.33	1.90	2.81
collagen triple helix repeat containing	NM 172333	-0.76	-0.16	-0.67	2.50	0.13	1.52
similar to paternally expressed 12; freq	XM 218737	0.00	1.10	0.68	0.00	1.66	2.16
ubiquitin D (Ubd), mRNA.	NM 053299	-0.40	0.52	0.16	3.50	-0.63	4.36

【0126】

40

[血液サンプル処理]

採血は、投与最終日翌日に実施する剖検と同時にいった。ラットは採血前日の午後5時から除餌し、水のみを給与した。エーテル麻酔下でラットを開腹し、腹部大静脈より血液を採取した。採取した血液は、ガラス製試験管に入れ、室温で10分間静置し、さらに氷中で15分静置した後、遠心分離を行い、上清を採って、これを血液生化学検査用血清とした。なお、血液生化学検査は財団法人畜産生物科学安全研究所にて行った。

【0127】

[生体応答遺伝子群の抽出]

腎臓毒性を判別するための有用な遺伝子を選択するために以下の計算を行った。最初に対照群のラットの腎臓における遺伝子発現データの平均値を算出した。次に化学物質 p - (

50

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腎臓における遺伝子発現レベルと前記対照群の平均値との比を算出した。さらに、前記化学物質を投与したラットのうち少なくとも2個体以上で前記対照群の平均値との比が2.83倍以上または0.35倍以下の遺伝子を抽出した。さらに、対照群の標準偏差が0.5未満の遺伝子を選択した(49遺伝子)。

【0128】

[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。

【0129】

上記同定された遺伝子について階層的クラスタ分析を行った。階層的クラスタ分析は解析用ソフトウェア「Expression View Pro」(マイクロダイアグノスティック社製)を用いて行った。また、階層的クラスタ分析は「cluster」や「treeview」などのソフトウェアを用いても行うことができる。その結果、化学物質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うち2個体(個体識別番号:tmp-1およびtmp-3)と対照群とが大きく2群に分類され、さらに、残りの1個体(個体識別番号:tmp-2)がその中間に位置した(図1)。中間に位置した個体(個体識別番号:tmp-2)は、血液生化学検査の結果、他の2個体(個体識別番号:tmp-1およびtmp-3)よりもクレアチニン(CRE)の異常値の程度が低く(図2)、該クラスタ分析の結果は上記クレアチニンの異常値と関連していた。なお、血液生化学検査におけるクレアチニン(CRE)の値は、腎臓に障害が起こると異常値を示すマーカーであることが知られている。

【実施例2】

【0130】

[p-クミルフェノールの腎臓毒性]

p-クミルフェノールは、国立医薬品食品衛生研究所の既存化学物質毒性データベースにおいて腎臓毒性が報告されている化学物質である。本発明における生体応答遺伝子セットで上記化学物質による腎臓毒性を検出できるかを検証した。

【0131】

[p-クミルフェノール投与試験]

実施例1の場合と同様の方法により、p-クミルフェノール(和光純薬株式会社製)(500mg/kg)を28日間反復してSDラット(6週齢、雄)に経口投与した。正常対照群として、化学物質p-クミルフェノールを溶解したオリブ油(小堺製薬株式会社製)を28日間反復してSDラット(6週齢、雄)に経口投与した。さらに、上記と同様の方法によりラットから腎臓を採取し、血液生化学検査および遺伝子発現プロファイルを取得した。

【0132】

[血液生化学検査]

クレアチニン(CRE)の値が対照群と比較して上記化学物質投与群が有意に高かった($P < 0.004$)(図3)。

【0133】

[クラスタ分析]

上記同定された遺伝子セットのデータを用いて、同様にクラスタ分析を行った。その結果、p-クミルフェノールを投与したラットはすべて上記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うちの1個体(個体識別番号:tmp-2)と同じクラスタを形成した。一方、化学物質を投与していないラット(Cont)は6個体とも対照群と同じクラスタを形成した(図4)。

【実施例3】

【0134】

10

20

30

40

50

[生体応答遺伝子セットの絞り込み]

上記生体応答遺伝子セットから、個体識別番号tmp-2と対照群とのlog₂比の差の絶対値が0.75以上の遺伝子を抽出した(28遺伝子)。

【0135】

[クラスタ分析]

上記同定された生体応答遺伝子セットのデータを用いて、同様にクラスタ分析を行った。その結果、p-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノール投与群と対照群が2群に分類された(図5)。

【0136】

[p-クミルフェノールの毒性評価]

上記同定された生体応答遺伝子セットのデータを用いて、同様にクラスタ分析を行った。その結果、p-クミルフェノールを投与したラットはすべて上記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うちの1個体(個体識別番号:tmp-2)と同じクラスタを形成した。一方、化学物質を投与していないラット(Cont)は6個体とも対照群と同じクラスタを形成した(図5)。

【実施例4】

【0137】

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、o-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)フェノールをそれぞれ適当な濃度で28日間反復してラットに曝露させたのち、腎臓組織からmRNAを単離し、遺伝子発現プロファイルを取得した。それらの遺伝子発現プロファイルから生体応答遺伝子群:(1)ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1、(2)AHNAK nucleoprotein、(3)alpha 1,3-galactosyltransferase 2、(4)alpha-2-macroglobulin、(5)annexin A2、(6)aquaporin 6, kidney specific、(7)calbindin 1、(8)camello-like 1、(9)cathepsin D、(10)CD24 molecule、(11)Cd44 molecule、(12)claudin 3、(13)collagen triple helix repeat containing 1、(14)cysteine sulfinic acid decarboxylase、(15)deiodinase, iodothyronine, type I、(16)deleted in colorectal carcinoma、(17)deoxyribonuclease I、(18)fibrinogen beta chain、(19)flavin containing monooxygenase 3、(20)glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit、(21)glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、(22)glycoprotein (transmembrane) nmb、(23)histamine N-methyltransferase、(24)hypothetical protein LOC56728、(25)kallikrein、(26)kidney androgen regulated protein、(27)lectin, galactoside-binding, soluble, 3、(28)matrix Gla protein、(29)oxidative stress induced growth inhibitor 1、(30)paternally expressed 12、(31)protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A、(32)RAS, dexamethasone-induced 1、(regucalcin (senescence marker protein-30)、(33)regucalcin (senescence marker protein-30)、(34)S100 calcium binding protein A10、(35)S100 calcium binding protein A6、(36)secreted phosphoprotein 2、(37)serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3K、(38)similar to CPE-receptor、(39)similar to tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a、(40)solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 2、(41)solute carrier family 34 (sodium phosphate), m

10

20

30

40

50

ember 2、(42)solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1、(43)suppressor of cytokine signaling 3、(44)thymosin, beta 10、(45)tonin、(46)translin、(47)trefoil factor 3, intestinal、(48)ubiquitin D、(49)uromodulinの遺伝子発現データを抽出して遺伝子発現データセットとした。

【0138】

これらの遺伝子発現データをもとにしてクラスタ分析を行ったところ、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うち2個体が一つのクラスタを形成し、p-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノールの1個体とp-クミルフェノールを投与したラットの3個体すべてが一つのクラスタを形成した(図7)。また、その他の化学物質は対照群と同じクラスタの中で混在していた(図7)。

10

【0139】

なお、p-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノールおよびp-クミルフェノールはラットに28日間反復投与することにより腎臓に毒性を有することが知られている(http://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/jsp/SearchPage.jsp)。

【0140】

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比較することにより、被検化学物質について、少なくともp-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノールおよびp-クミルフェノールに類似した毒性の有無を判定できることを意味する。

20

【0141】

なお、表1から5は、DNAマイクロアレイ法により取得した遺伝子発現データセットの例を示す。左端の列は生体応答遺伝子の遺伝子名であり、その次の列にはGenBank IDを記載してある。また一番上の行には、化学物質の略号を記しており、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、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o-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)フェノールである。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腎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る。

30

【実施例5】

【0142】

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、o-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)フェノールをそれぞれ適当な濃度で28日間反復してラットに曝露させたのち、腎臓組織からmRNAを単離し、遺伝子発現プロファイルを取得した。それらの遺伝子発現プロファイル

40

50

から生体応答遺伝子群：(1) ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1、(2) alpha 1,3-galactosyltransferase 2、(3) alpha-2-macroglobulin、(4) annexin A2、(5) aquaporin 6, kidney specific、(6) calbindin 1、(7) cathepsin D、(8) CD24 molecule、(9) Cd44 molecule、(10) claudin 3、(11) cysteine sulfinic acid decarboxylase、(12) deoxyribonuclease I、(13) fibrinogen beta chain、(14) glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、(15) glycoprotein (transmembrane) nmb、(16) lectin, galactose-binding, soluble, 3、(17) matrix Gla protein、(18) oxidative stress induced growth inhibitor 1、(19) RAS, dexamethasone-induced 1、(20) S100 calcium binding protein A10、(21) secreted phosphoprotein 2、(22) similar to CPE-receptor、(23) similar to tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a、(24) solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2、(25) solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1、(26) suppressor of cytokine signaling 3、(27) thymosin, beta 10、(28) translin、の遺伝子発現データを抽出して遺伝子発現データセットとした。

10

【 0 1 4 3 】

これらの遺伝子発現データをもとにしてクラスタ分析を行ったところ、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うち2個体が一つのクラスタを形成し、p-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノールの1個体とp-クミルフェノールを投与したラットの3個体すべてが一つのクラスタを形成した(図7)。また、その他の化学物質は対照群と同じクラスタの中で混在していた(図7)。

20

【 0 1 4 4 】

なお、p-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノールおよびp-クミルフェノールはラットに28日間反復投与することにより腎臓に毒性を有することが知られている(http://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/jsp/SearchPage.jsp)。

【 0 1 4 5 】

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、この遺伝子発現データセットを用いて比較することにより、被検化学物質について、少なくともp-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノールおよびp-クミルフェノールに類似した毒性の有無を判定できることを意味する。

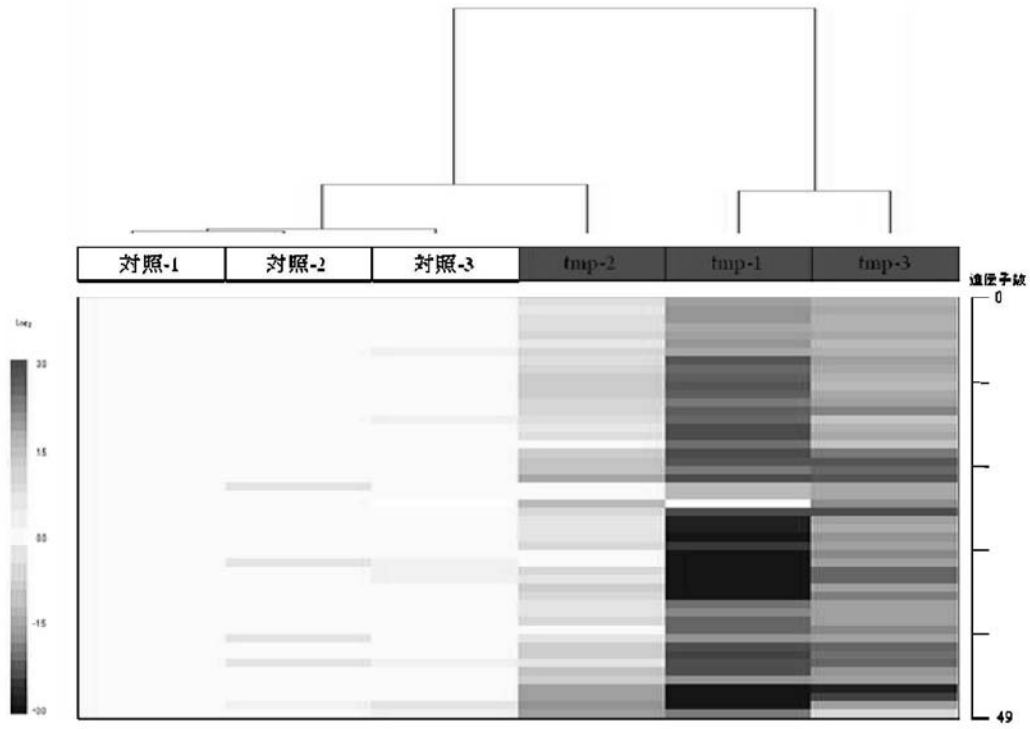
30

【産業上の利用可能性】

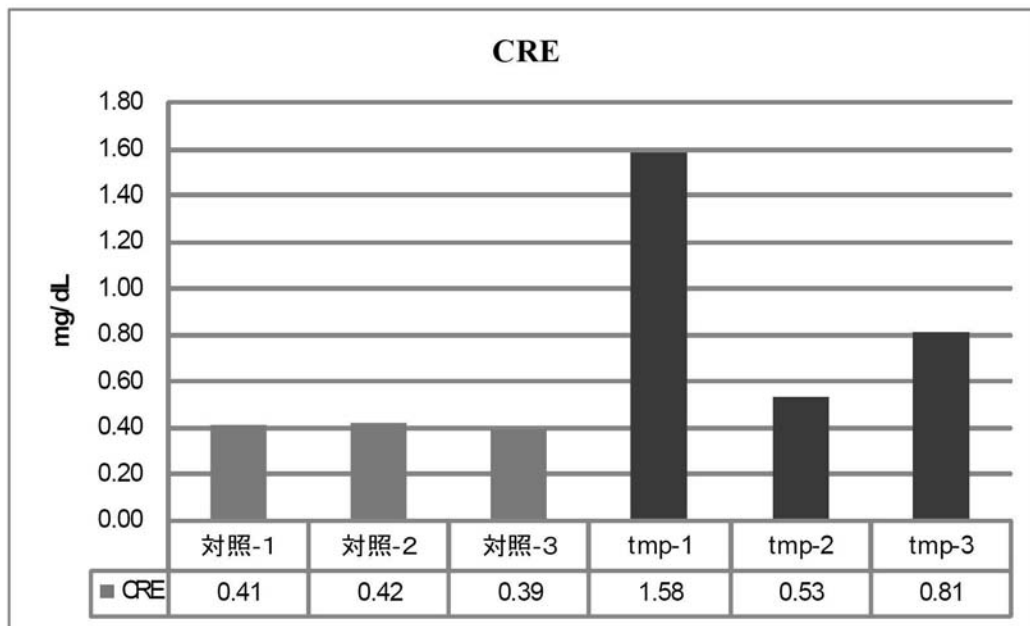
【 0 1 4 6 】

本発明の腎臓毒性判定遺伝子セットは、腎障害、すなわち、腎臓疾患、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。

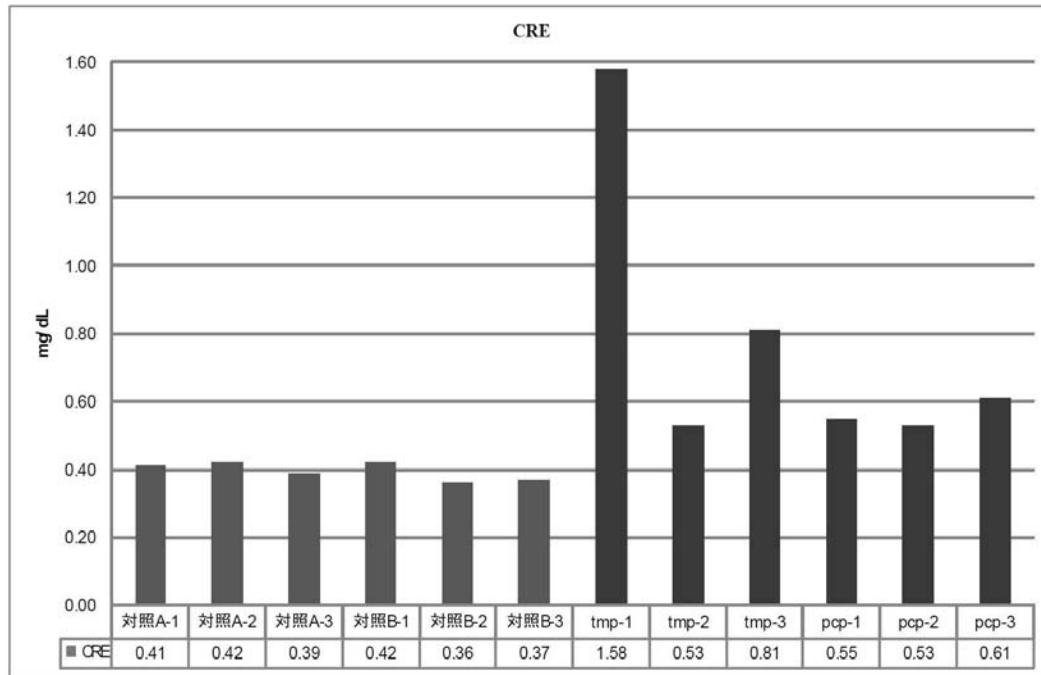
【 図 1 】



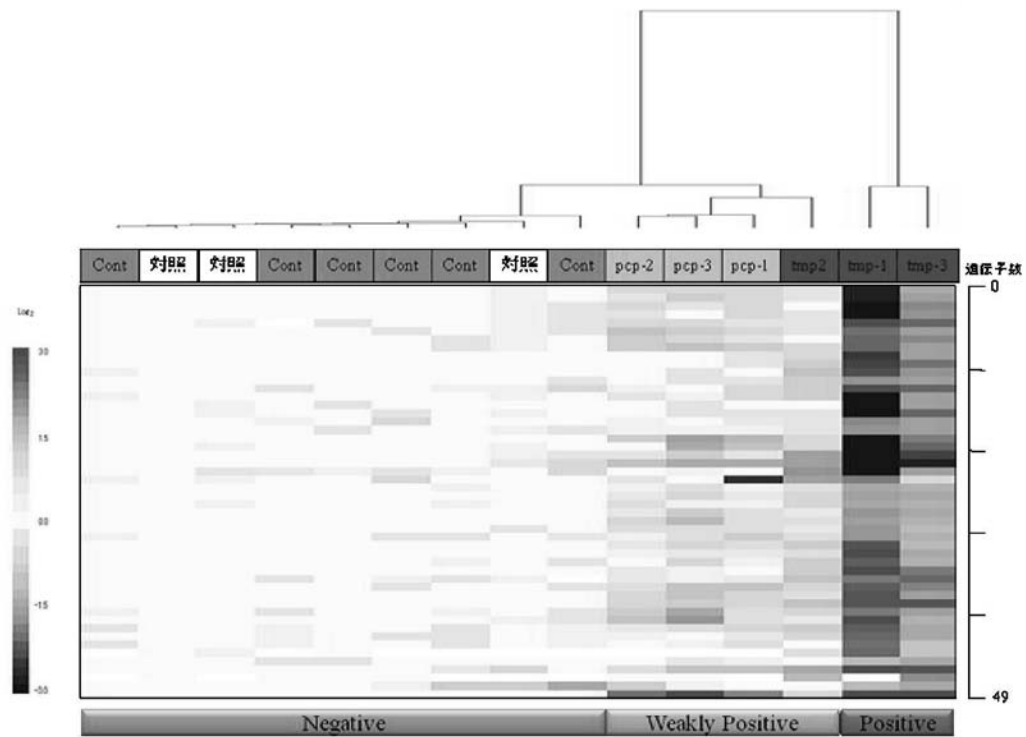
【 図 2 】



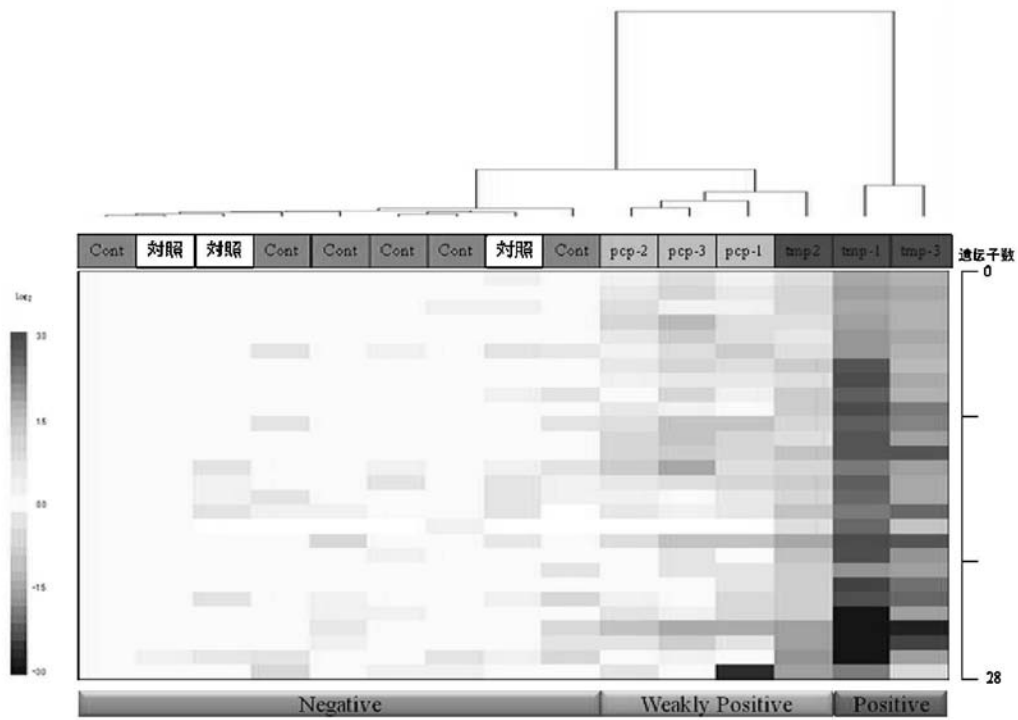
【 図 3 】



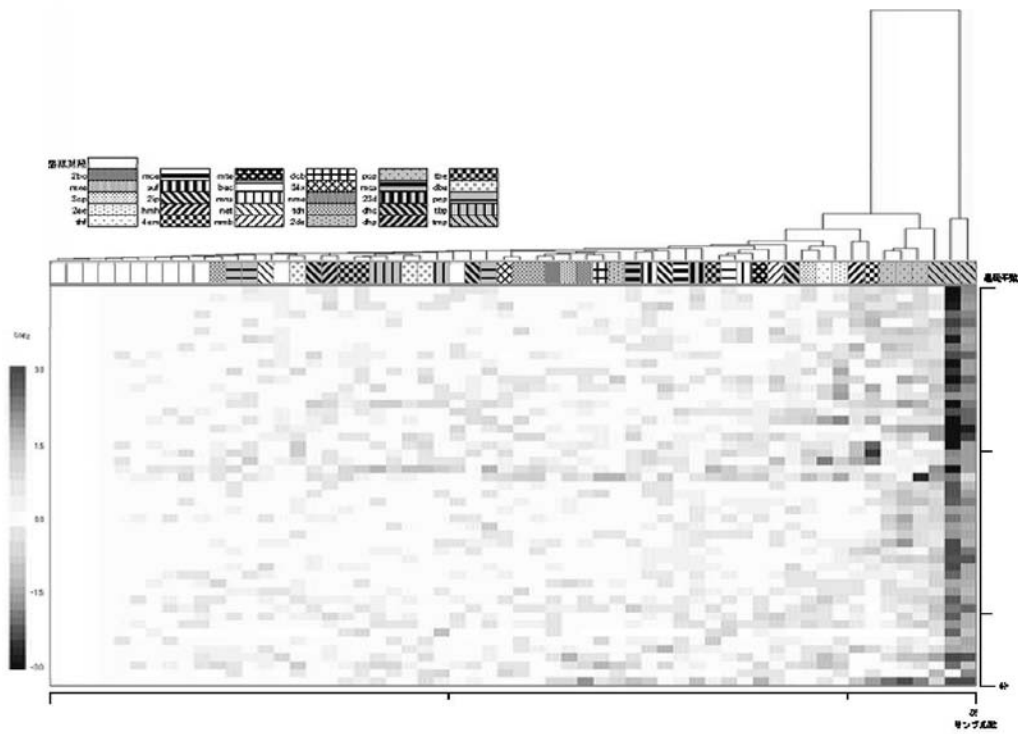
【 図 4 】



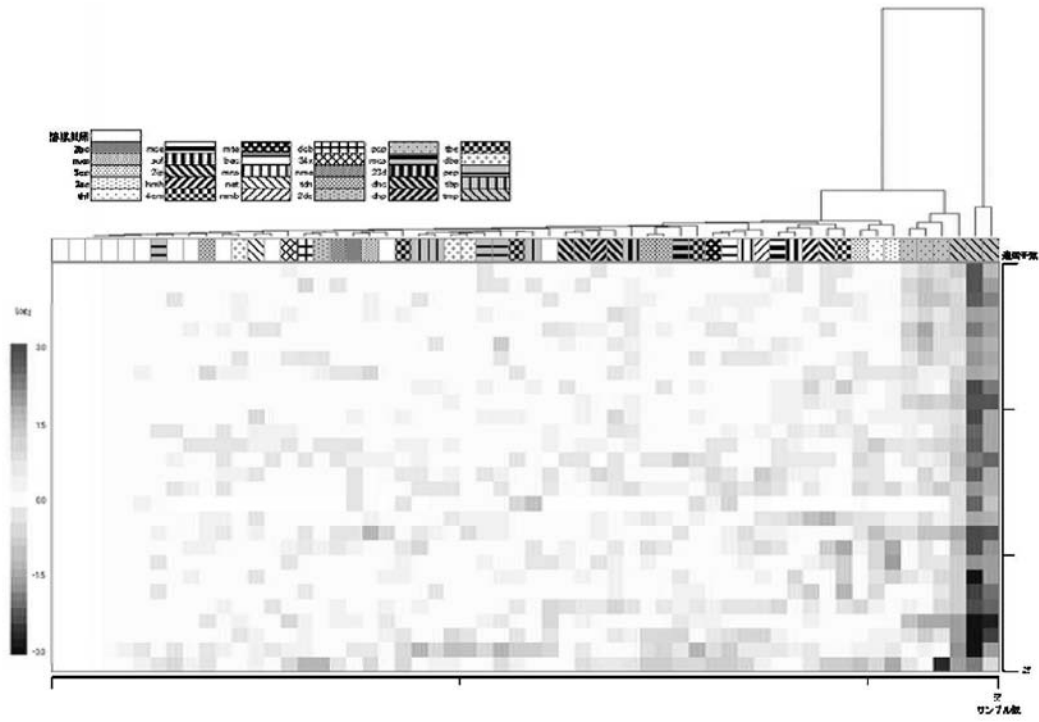
【図 5】



【図 6】



【 図 7 】



专利名称(译)	使用基因表达水平作为指标来检测/预测化学物质对活体的影响的方法		
公开(公告)号	JP2011137659A	公开(公告)日	2011-07-14
申请号	JP2009296232	申请日	2009-12-25
申请(专利权)人(译)	公司的Medi格		
[标]发明人	河村未佳		
发明人	河村 未佳		
IPC分类号	G01N33/53 G01N37/00		
FI分类号	G01N33/53.M G01N33/53.D G01N37/00.102		
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：解决由于标记物有限而难以通过血液学方法或病理学方法评估肾毒性检测的问题。ŽSOLUTION：由于外部环境变化引起的生物体内基因表达变化很明显，因此识别用于区分生物体毒性的基因组可以在生物体毒性发生之前快速准确地检测到生物体的毒性，并通过病理学验证检查。提供了使用新基因组检测和预测生物体毒性的方法，试剂盒，处理生物体毒性的方法，以及确认生物体毒性的候选药物的方法。

Ž

通称子表	HD	0.12	-0.08	-0.52	0.41	0.07	-0.04	0.22	-0.19	-0.29	-0.03	0.96
Utricle Kc-20 kallikrein mRNA, 3' end.	U13839	-0.04	0.12	-0.08	-0.52	0.41	0.07	-0.04	0.22	-0.19	-0.29	-0.03
Tonin (Ton), mRNA	NM_012677	-0.20	0.04	0.16	-0.36	0.30	-0.03	-0.10	0.13	-0.03	-0.12	0.09
parietal phosphatase 1, regulatory subdo	NM_022676	-0.04	0.00	0.04	-0.27	0.37	-0.10	-0.21	0.03	0.21	0.07	-0.06
immune-globulin heavy chain, cytochrome mRNA	U01481	-0.01	-0.08	0.11	0.13	0.29	-0.42	0.15	-0.09	-0.06	0.16	-0.29
pregnancy-induced growth inhibitor (PGI)	NM_138504	-0.25	0.15	0.09	0.07	0.15	-0.22	0.12	-0.15	0.03	0.10	0.13
mRNA for organic cation transporter OC 12	U08044	-0.03	0.10	-0.07	0.04	0.49	-0.52	0.00	-0.03	-0.03	0.08	-0.12
the neurexin-1 neuromodulin 3 (Nm3)	NM_053433	-0.01	0.05	-0.05	-0.24	0.36	-0.12	-0.05	-0.11	0.16	0.04	-0.26
Uromodulin (Tamm-Horsfall protein) (Umod)	NM_017082	-0.30	0.18	0.12	-0.30	0.47	-0.13	0.14	-0.21	0.07	-0.15	-0.16
Kelch-like endoplasmic reticulum protein (Klep)	NM_022682	-0.19	0.00	0.10	-0.36	0.51	-0.15	-0.03	-0.32	0.35	0.32	-0.18
Glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NM_017008	-0.11	-0.18	0.30	-0.24	0.43	-0.19	0.03	-0.05	0.02	-0.28	0.24
hypothetical protein LOC 50728 (LOC 50728)	NM_019908	0.07	0.05	-0.13	-0.04	0.15	-0.11	-0.14	0.03	0.12	-0.45	-0.45
Osteoblastic osteonectin (Ost) (Ostn)	NM_012641	0.01	0.14	-0.14	-0.17	0.38	-0.21	-0.10	-0.21	0.31	-0.22	0.14
cysteine-sulfinate decarboxylase (Csd)	NM_021750	-0.16	-0.22	0.37	-0.14	0.07	0.06	-0.05	0.20	-0.15	0.39	0.02
transin (Tn), mRNA	NM_021782	0.09	-0.17	0.06	-0.14	0.16	0.10	0.16	0.08	-0.24	0.25	-0.07
deiodinase, iodothyronine, type 1 (Dio1)	NM_021655	-0.19	0.11	0.08	0.25	-0.16	-0.07	0.07	0.00	-0.08	0.17	0.32
Decylcholine kinase 1 (Dck1), mRNA	NM_013907	0.17	-0.39	0.21	-0.75	0.40	0.33	-0.20	0.03	0.17	-0.13	0.11
Receptor-like kinase (Rlk), mRNA	NM_013466	-0.32	0.21	0.13	-0.23	0.34	-0.11	-0.19	-0.21	0.40	0.07	-0.17
Solute carrier family 4, member 1, isoform	NM_012651	0.15	-0.02	-0.13	-0.57	0.66	-0.09	0.13	0.14	-0.27	0.36	-0.13
Interleukin 6 (Acp6), mRNA	NM_021203	0.03	0.19	-0.22	-0.46	0.43	-0.04	-0.05	0.14	-0.09	0.05	0.21
neuronal Nucleoside transferase, C-terminal	NM_013668	-0.10	0.08	0.02	0.18	-0.01	-0.14	-0.17	-0.35	0.52	0.50	0.40
histamine N-methyltransferase (Hmt), mR	NM_031044	-0.69	0.55	0.14	-0.16	0.05	0.12	-0.11	0.02	0.09	0.23	-0.50
Tissue factor (tissue factor) (TF), mRNA	NM_033042	-0.18	0.02	0.15	-0.38	0.43	-0.05	0.27	-0.54	0.26	0.43	0.08
type-24 proteinase mRNA, partial cds	U119485	-0.45	0.58	-0.13	-0.60	0.28	0.52	-0.11	0.46	-0.35	0.69	0.69
calmodulin 1 (Calb1), mRNA	NM_011984	-0.62	0.07	0.55	-0.22	0.16	0.07	-0.19	-0.10	0.37	-0.12	-0.75
caldesmon heavy chain (Acta2), mRNA	NM_019960	-0.23	0.06	0.17	-0.11	-0.13	0.22	-0.05	-0.03	0.09	-0.08	-0.22
thyrocyte, beta 10 (Tnfr10), mRNA	NM_021261	0.02	-0.07	0.05	-0.10	0.16	-0.06	-0.02	0.03	-0.01	0.18	-0.07
neuronal protein, alpha, mRNA	NM_012682	-0.11	0.14	0.27	-0.31	0.17	0.14	0.03	-0.24	0.20	0.18	0.46
mRNA for peroxisomal protein D (PC 3.4.23.5)	U34467	0.06	-0.11	0.04	-0.19	0.01	0.18	0.15	-0.07	-0.08	0.27	0.40
lectin, galactose binding, soluble 3 (Lg)	NM_031832	0.12	-0.42	0.30	-0.29	-0.10	0.80	-0.03	-0.12	0.15	-0.03	-0.27
Cs 100-related protein, mRNA, complete cds	U01627	-0.01	0.07	-0.04	0.26	-0.22	-0.04	-0.05	0.01	0.04	-0.11	0.05
CTD4 antigen (Ctd4), mRNA	NM_012752	-0.02	-0.08	0.10	-0.05	0.11	-0.06	-0.05	-0.01	0.06	-0.08	-0.20
caldesmon-binding protein A6 (caldesmon1)	NM_053465	-0.05	-0.09	0.04	-0.54	0.36	0.18	-0.15	0.04	-0.11	0.72	-0.03
similar to tumor necrosis factor receptor	NM_020201	-0.15	0.08	0.07	0.04	0.08	-0.13	0.14	-0.05	-0.12	-0.24	-0.14
similar to chordin 4 (Mus musculus) [LOC	NM_225960	0.04	-0.06	0.02	-0.22	0.03	0.20	0.02	0.04	-0.05	0.01	0.03
cyclokinin-inducible 512-containing protein	NM_053567	-0.27	0.03	0.24	0.02	-0.22	0.21	0.04	-0.03	-0.03	0.32	0.11
solute carrier family 34 (solute phosphat	NM_053380	-0.32	0.44	-0.12	0.43	-0.12	-0.31	0.00	0.40	-0.02	-0.01	-0.03
DENK1 (Denk1) mRNA, complete cds	AF 209157	0.11	-0.16	0.05	-0.17	-0.15	0.32	-0.17	0.13	0.30	-0.45	-0.64
ADPNA5-related protein mRNA, partial cds	AF 454771	-0.10	0.10	0.00	0.31	-0.52	0.29	0.06	-0.14	-0.20	-0.12	-0.20
CD44 antigen (C44), mRNA	NM_012924	-0.11	0.55	-0.41	0.51	0.01	-0.54	-0.23	0.21	0.02	-0.36	-0.26
in vitro and in vivo proteinase with	AF 144119	0.25	-0.30	-0.07	0.09	0.39	-0.30	-0.72	-0.03	0.22	0.44	0.30
neurokinin mRNA, complete cds	AF 144083	-0.11	-0.07	0.19	-0.51	0.21	0.30	-0.18	-0.07	0.35	-0.27	-0.35
PKC3 synthase (LOC 17155), mRNA	NM_138524	-0.34	-0.15	0.49	0.05	-0.22	-0.42	0.05	-0.11	0.07	-0.43	-0.21
alpha-2-macroglobulin (A2m), mRNA	NM_012408	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-0.21	-0.26	0.47	-0.30	0.03
Serine protease inhibitor (Spir2b), mRNA	NM_012657	0.18	-0.46	0.28	-0.15	0.21	0.05	0.12	-0.33	0.21	-0.06	0.18
Uln 5 gene	U001656	-0.15	-0.12	0.27	-0.13	-0.28	0.36	0.16	-0.05	-0.13	0.04	0.37
Serpinase-3 (Serpinase 3) beta chain m	U00575	-0.11	-0.04	0.17	0.07	-0.74	0.07	0.03	-0.00	-0.51	-1.22	-0.43
collagen triple helix repeat containing	NM_172333	0.10	0.29	-0.39	0.54	-0.02	-0.51	0.04	-0.31	0.17	-0.24	-0.54
capable to potentially expressed 12, 6eq	NM_218737	0.04	-0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	-0.06	0.06	0.00	-0.21	0.15
intraquim D (Ud), mRNA	NM_052509	0.25	-0.12	-0.13	0.09	-0.07	-0.02	-0.04	0.07	-0.03	-0.74	-0.60