

遺伝子発現量情報による一般毒性(肝・腎)及び腎発がん性予測法の

ためのプロトコール

**Ver. 2016.03.23**

## 目次

1. 遺伝解析用動物実験における留意事項.....	3
1.1 全般的事項 .....	3
1.2 動物実験計画 .....	3
1.3 用量設定 .....	3
1.4 群構成・動物数 .....	3
1.5 麻酔法 .....	3
1.6 採材方法 .....	3
1.6.1 採材時の留意事項.....	3
1.7 肝臓採材保存法 .....	4
1.8 腎臓採材保存法 .....	4
2. total RNA 抽出.....	4
1.1 使用機器及び試薬.....	4
2.2 抽出法 .....	5
3. バイオアナライザによる RNA 品質(分解度)の確認.....	5
3.1 使用機器及び試薬.....	5
3.2 RNA 品質の確認.....	6
3.3 判定 .....	6
4. マイクロアレイ実験.....	6
4.1 使用機器及び試薬.....	6
4.2 マイクロアレイ解析.....	7
5. データ解析（アレイ間ノーマライズ・発現比算出） .....	8
5.1 ソフトウェア .....	8
5.2 データ解析 .....	8
6. 肝毒性及び腎毒性予測法.....	9
6.1 使用機器及びソフトウェア.....	9
6.2 毒性判別式への適用.....	9
6.3 適用結果の可視化.....	9
6.4 判別方法 .....	10
7. 腎発がん性予測法.....	11
8. 参考文献 .....	12

## 1. 遺伝解析用動物実験における留意事項

### 1.1 全般的事項

動物実験は毒性実験或いは薬理実験等様々な目的のために実施される。従来の動物実験はその目的によって基本的なプロトコールが定められ、検査法、採材臓器等も様々であるが、従来の動物実験に遺伝子発現解析を導入することにより、これまで得ることのできなかった網羅的な生体応答が検出可能である点で極めて貴重な情報を得ることができる。

本章では遺伝子発現量解析を実施する動物実験における基本的留意事項について述べる。

### 1.2 動物実験計画

遺伝子発現量解析はいかなる実験設計の動物実験にも適用可能であるが、目的の結果を得るためには、目的に応じて十分に検討された実験設計を用いる必要がある。本手順書で取り上げる発がん性予測、腎・肝毒性評価に関しては化審法 28 日反復毒性試験<sup>1)</sup>或いは OECD TG407<sup>2)</sup>に従って、実験計画を作成する必要がある。

### 1.3 用量設定

用量設定は前述のガイドラインに準拠し、対照群に加え、最低 2 用量を設定する。

### 1.4 群構成・動物数

群構成は前述のガイドラインに準ずるが、遺伝子発現量変化に関して有意差検定を実施するため、各群最低 3 匹を遺伝子解析に供する必要がある。

### 1.5 麻酔法

遺伝子発現量解析に使用する動物に関しては、実験倫理上麻酔下で屠殺後、採材を行うことになるが、その際遺伝子発現量解析に影響を及ぼさない方法を選択する必要がある。現時点では CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔法及びイソフルラン麻酔法は遺伝子発現解析に際し影響を与えないことが確認されている<sup>3)</sup>。

### 1.6 採材方法

遺伝子発現解析の対象となる RNA は極めて不安定であり、組織中或いは実験者由来の RNA 分解酵素によって容易に分解される。従って、遺伝子解析に用いる試料は採材後速やかに RNA 分解酵素を不活化した条件下で解析時まで保存する必要がある。

#### 1.6.1 採材時の留意事項

RNA は極めて不安定であり、実験者の汗や唾液に含まれる RNA 分解酵素 (RNase) の混入によって容易に分解し、目的とする実験結果に影響を与える可能性がある。したがって、

RNase の混入を防ぐため RNA 実験に用いる試料の採取を行う際、作業中は清潔なマスクおよびディスポーザブルグローブを着用し RNA 調製専用の実験スペースを設けるなど細心の注意を払う必要がある。また、実験器具に関しては可能な限りディスポーザブルのプラスチック製品を使用し、実験スペース及び実験器具などは市販の RNase 除去剤或いは乾熱滅菌 (180℃、2 時間) によって RNase を不活化することが望ましい。

## 1.7 肝臓採材保存法

動物を麻酔下で腹部大動脈から放血して安楽死させ、重量を測定後、外側左葉の中央部から (門脈側とその反対側を結ぶ対角線に沿って) 2~3 mm 幅の組織片を採取し、遺伝子発現量解析用に供する。1 組織片の重量が 0.75 g 以下であることを確認した後、それぞれ重量の 5 倍量以上の保存液 (RNAlater、Thermo Fisher Scientific) に浸漬する。

## 1.8 腎臓採材保存法

部位別の分割を行わない場合：

動物を麻酔下で腹部大動脈から放血して安楽死させ、腎臓を左右個別に重量を測定後、片側の腎臓の中央部から乳頭を含むように水平に 4~5 mm 幅の組織片を採取する。組織片から被膜を取り除いた後、正中で二分し、半分を幅 3 mm 以内に細切し、組織重量の 5 倍量以上の RNAlater に浸漬する。

部位別に分割する場合：

動物を麻酔下で腹部大動脈から放血して安楽死させ、左右個別に重量を測定後、片側の腎臓の中央部から乳頭を含むように水平に 4~5 mm 幅の組織片を採取する。組織片から被膜を取り除いた後、正中で二分した後に、乳頭、髓質内帯、髓質外帯及び皮質を分けてサンプリングし、それぞれ組織重量の 5 倍量以上の RNAlater に浸漬する。

## 2. total RNA 抽出

### 1.1 使用機器及び試薬

- ・精密電子天秤 (メトラートレド、AB104-S 等)
- ・TissueLyser (QIAGEN)
- ・NanoDrop1000 (Thermo Fisher Scientific)
- ・miRNeasy Mini Kit (QIAGEN、Cat.No. 217004)
- ・クロロホルム (和光純薬工業、038-02606)
- ・エタノール (和光純薬工業、057-00456)
- ・Nuclease-Free Water (Invitrogen、10977-015 等)

## 2.2 抽出法

RNAlater 保存した臓器からは、miRNeasy Mini Kit を用いて total RNA の抽出を行う。

- 1) -80℃保存した RNAlater 浸漬臓器サンプルを室温へ移動させ、RNAlater 液を溶解(15～30 分程度)
- 2) 臓器サンプル 5～30 mg を秤量後に分取し、2 mL チューブに入れ、ジルコニアビーズ (1 個)を添加
- 3) 750  $\mu$ L の QIAzol を添加し、TissueLyser で、25 Hz で 5 分間破砕  
ブロック内部を 180 度回転させて TissueLyser に装着し、25 Hz で 5 分間破砕
- 4) 室温に 5 分間放置後、クロロフォルム 150  $\mu$ L を添加
- 5) 15 秒以上ボルテックスし、2 分間放置
- 6) 4℃、13,000 rpm で 15 分間遠心
- 7) 沈殿を取らないよう上清 (400  $\mu$ L)を新しい 1.5 mL チューブに移す
- 8) 70%エタノールを 400  $\mu$ L 添加し、よくピペッティング
- 9) コレクションチューブをつけたままの miRNeasy Mini Spin Columns に 700  $\mu$ L を移し、フタをして、13,000 rpm で 15 秒間遠心し、廃液を除去
- 10) 同じカラムに残りの液を移し、13,000 rpm で 15 秒間遠心後、廃液を除去
- 11) Buffer RW1 を 700  $\mu$ L 添加し、13,000 rpm で 15 秒間遠心後、廃液を除去
- 12) Buffer RPE を 500  $\mu$ L 添加し、13,000 rpm で 15 秒間遠心後、廃液を除去
- 13) Buffer RPE を 500  $\mu$ L 添加し、13,000 rpm で 15 秒間遠心後、廃液を除去
- 14) 70%エタノールを 500  $\mu$ L 添加し、13,000 rpm で 15 秒間遠心後、廃液を除去
- 15) 13,000 rpm で 2 分間遠心後、1.5 mL 溶出用チューブへカラムを移動
- 16) RNase free water を 30 もしくは 50  $\mu$ L 添加し、1 分間静置
- 17) 8,000 rpm で 2 分間遠心し、total RNA を溶出

溶出した total RNA の一部については微量吸光光度計 (NanoDrop 1000 等) で吸光度を測定し、RNA 濃度、A260/280 比、及び A260/230 比を算出する。RNA 濃度としては 100 ng/ $\mu$ L 以上、A260/280 比は 1.8 以上、A260/230 比は 1.5 以上の場合を合格とし、溶出した total RNA 液は分注して一部を 100 もしくは 200 ng/ $\mu$ L に調製した後、原液とともに-80℃で保存する。

## 3. バイオアナライザによる RNA 品質(分解度)の確認

### 3.1 使用機器及び試薬

- BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies )
- RNA-6000 Nano reagent kit (Agilent Technologies、PN:5067-1511)
- RNA 6000 Nano LabChip Kit (Agilent Technologies、PN:5067-1511)
- Nuclease-Free Water (Invitrogen、10977-015 等)

### 3.2 RNA 品質の確認

RNA 品質(分解度)の確認のためのサンプル調製には、RNA 6000 Nano LabChip Kit を用い、測定には BioAnalyzer 2100 を用いる。

- 1) 100 もしくは 200 ng/μL に調製した total RNA 溶液を 1 μL 分取し、1 μL の Nuclease-Free Water を加えて 2 倍希釈する
- 2) 550 μL の Nano gel matrix をスピンフィルターに移し、1,500g で 10 分間、室温で遠心
- 3) 65 μL の Nano gel matrix に 1μL の Nano dye を加え、十分に攪拌(Gel-Dye Mix の調製)
- 4) RNA ラダー及び供試検体(2 μL)を 70°C で 2 分間熱変性させ、氷中で 5 分間放置
- 5) 9 μL の Gel-Dye Mix をラボチップの◎マーク(1ヶ所)にアプライし、Chip ステーション (Agilent)のプランジャーを 1 mL の目盛りまで下げ、30 秒間静置
- 6) プランジャーを外して 5 秒間待った後、ラボチップを取り出し、9 μL の Gel-Dye Mix を◎マーク(2ヶ所)にアプライ
- 7) 5 μL の Sample buffer を 12ヶ所と▲マーク (1ヶ所)にアプライ
- 8) 1 μL の RNA Ladder(熱変性済み)を▲マーク (1ヶ所)にアプライ
- 9) 1 μL の RNA サンプル(熱変性済み)を 12ヶ所にアプライ
- 10) 専用のボルテックスミキサー(IKE)でラボチップを 2,400 rpm で 1 分間で攪拌後、BioAnalyzer 2100 にラボチップを装着し、解析を開始(約 30 分間)

### 3.3 判定

測定結果から、マイクロアレイ実験に供することができる基準である RIN (RNA Integrity Number)値 >7であることを確認する。

## 4. マイクロアレイ実験

### 4.1 使用機器及び試薬

- Low Input Quick Amp Labeling Kit, One-color (Agilent Technologies、PN: 5190-2305)
- RNA Spike-In Kit, One-Color (Agilent Technologies、PN: 5188-5282)
- Gene Expression Hybridization Kit (Agilent Technologies、PN: 5188-5242)
- Gene Expression Wash Buffer Kit (Agilent Technologies、PN: 5188-5327)
- DNase/RNase-free distilled water (Invitrogen、10977-015)
- RNeasy Mini Kit (Qiagen、74104)
- Hybridization gasket slides (Agilent Technologies、PN: G2534-60014)
- Rat Whole Genome ToxPlus 60K×8 (Custom) (Agilent Technologies、Design ID: 045522)
- RNA 6000 Nano Assay Kit (Agilent Technologies、PN: 5067-1511)
- NanoDrop ND-1000 (Thermo scientific)

- Agilent Microarray Scanner (Agilent Technologies、PN: G4900DA, G2565CA or G2565BA)
- Hybridization oven (Agilent Technologies、PN: G2545A)
- Microarray Hybridization Chambers (Agilent Technologies、PN: G2530-60029)

## 4.2 マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析は Agilent が推奨する一色法のプロトコール(ファイル名 ; One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis (Quick Amp Labeling))に準じて実施する。

### 1) Spike-in Mix の調製

一連のアレイ実験の実施精度を確認するために、内部標準 (Spike-in Mix)を添加する。

### 2) total RNA サンプルからの cDNA 合成

100 ng の total RNA を出発として、サンプル中に含まれる mRNA から逆転写反応によって cDNA 合成を行う。

### 3) Cy-3 ラベル化 cRNA の増幅反応

合成した cDNA を鋳型に Cy-3-CTP を加えて、T7 RNA polymerase で反応させることで、cRNA を合成・増幅させながら、Cy-3-CTP を直接取り込ませる。

### 4) Cy3 ラベル化 cRNA の精製

未反応の Cy-Dyes を除去するために、蛍光色素でラベル化された cRNA の精製を行う。ここでは、RNeasy Mini kit を用いる。

### 5) ラベル化 cRNA サンプルの断片化

ハイブリダイゼーション効率を一定にするため、合成したラベル化 cRNA 産物を一定の長さにする断片化処理を行なう。

### 6) マイクロアレイとのハイブリダイゼーション

マイクロアレイとラベル化 cRNA 産物との反応(ハイブリダイゼーション)では、カスタマイズされた Rat Whole Genome ToxPlus 60K×8 パックアレイ、ガセットスライド、ハイブリダイゼーションチャンバー及びハイブリオーブンを使用する。

### 7) マイクロアレイの洗浄

未反応のラベル化 cRNA サンプルを除去するために、マイクロアレイの洗浄を行なう。

### 8) マイクロアレイのスキャン

マイクロアレイ上で反応した蛍光色素の強度を読み取るために、MicroArray Scanner を用いてスキャンを行なう。

### 9) スキャン画像の数値化

スキャンされた画像データから各スポットの蛍光強度を数値化するために、Feature Extraction ソフトウェア(Agilent Technologies )を用いて、Raw Data ファイルを作成すると同時に、アレイ実験の実施精度を確認するための QC レポートも得る。

## 5. データ解析 (アレイ間ノーマライズ・発現比算出)

### 5.1 ソフトウェア

本データ解析では表5-1に示すソフトウェアを用いる。アレイ間ノーマライズ法としては、Agilent Technologies社推奨のグローバルノーマライゼーションを選択した。ノーマライズの際のソフトウェアにはGeneSpring GX (Agilent Technologies)を用い、以下の条件で実施する。

- Data Transformation: Set measurements less than 0.01 to 0.01
- Per Chip: Normalize to 75 percentile

表 5-1 ソフトウェア一覧

名称	メーカー
GeneSpring GX	Agilent Technologies
Microsoft Excel	Microsoft

### 5.2 データ解析

ノーマライズを行うと同時に、Raw data内にある5項目のフラグ情報をもとに、3種類のGeneSpring flags (“P (Present)”, “M (Marginal)”, “A (Absent)”)に変換した。これは、2項目中のいずれか一つでも“Absent”と判定された場合は、最終的に“A”のGeneSpring flagが付く。“A”の判定はないが、その他の3項目のいずれかで“M”判定があった場合は、最終的に“M”が付く(表1)。“A”及び“M”の判定が全く付かなかった場合、“P”(最も信頼性の高い判定)となる (表5-2)。

表5-2 数値化データ(Raw Data)とGeneSpringにおけるフラグ情報。

Flag description in Agilent FE output	Column headers in Agilent FE output		GeneSpring flags
Feature is saturated	gIsSaturated	1	Marginal
Feature is not uniform	gIsFeatNonUnifOL	1	Marginal
Feature is not positive and significant	gIsPosAndSignif	0	Absent
Feature is not above background	gIsWellAboveBG	0	Absent
Feature is a population outlier	gIsFeatPopnOL	1	Marginal



## 6. 肝毒性及び腎毒性予測法

肝臓並びに腎臓の一般毒性を判別するため、28 日間反復投与試験結果から選定した肝臓および腎臓サンプルから取得したマイクロアレイデータを既に構築した判別式に適用することで、肝臓並びに腎臓の一般毒性所見（表 6-1）を検出し、さらにレーダーチャート形式でグラフ化することで、肝臓及び腎臓における該当所見の程度を視覚的に表現することが可能となる。

表 6-1 解析対象の肝臓及び腎臓の一般毒性

#	肝臓	腎臓
1	肝細胞単細胞壊死	皮質尿細管空胞変性
2	びまん性肝細胞肥大	皮質尿細管核大小不同
3	小葉中心性肝細胞肥大	皮質尿細管核濃縮
4	小葉中心性肝細胞変性	髄質外帯尿細管単細胞壊死
5	小葉周辺性肝細胞脂肪変性	乳頭毒性（壊死/変性）

### 6.1 使用機器及びソフトウェア

肝毒性及び腎毒性予測では表 6-2 に示すソフトウェアを用いる。

表 6-2 ソフトウェア一覧

名称	メーカー
Microsoft Excel	Microsoft
Tox-screen (毒性判別用ソフトウェア)	CERI

### 6.2 毒性判別式への適用

CERI ホームページ ([www.cerij.or.jp/](http://www.cerij.or.jp/)) より [Tox-screen ソフトウェアをダウンロードする](#) を起動させ、Data シートにノーマライズ後の全プローブのシグナル値およびフラグ情報を添付する。その後、計算ボタンを押すことで自動的にノーマライズ後のマイクロアレイデータが毒性判別式へ適用される。各毒性の判別値は Result シートに出力されており、値が大きいくほど、遺伝子レベルではその毒性影響が現れていることを示す（判別値の最小値は 0）。

### 6.3 適用結果の可視化

ノーマライズ後のマイクロアレイデータを毒性判別式へ適用した後、Graph シートにレーダーチャート式のグラフが自動的に作成される。

## 6.4 判別方法

Tox-screen ソフトウェアより出力されたレーダーチャートは、上側に肝毒性の 5 所見、下側に腎毒性の 5 所見の判別値をグラフ化したもので、合計 10 所見について試験に用いた化合物の毒性を可視化することができる。レーダーチャートが円の中心付近に位置すると肝臓並びに腎臓への影響が小さいことを示し、レーダーチャートが円の外側に近づくに従い、肝臓もしくは腎臓への影響が大きいことを示すものである (図 6-1)。

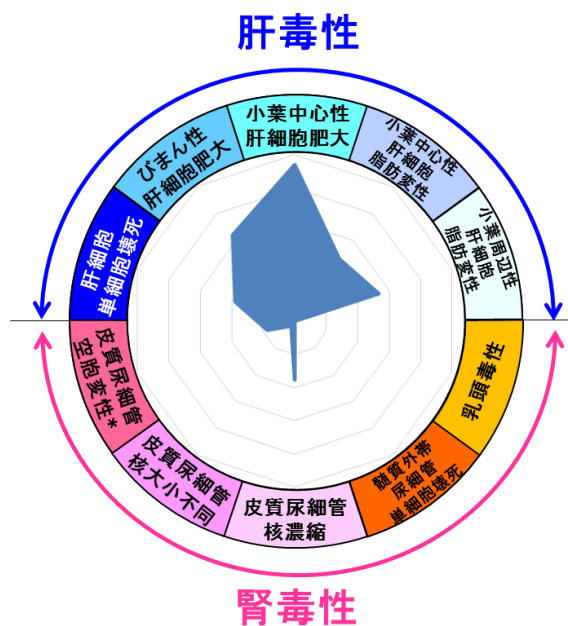


図 6-1 毒性判別結果のレーダーチャート

## 7. 腎発がん性予測法

CERI ホームページ ([www.cerij.or.jp/](http://www.cerij.or.jp/))から Tox-screen ソフトウェアをダウンロードし、起動する。データシートの「log2ratio」タブに 28 日間反復投与後の腎臓(皮質)のノーマライズ後のシグナル値及びフラグ情報を貼り付けることで自動的に SVM (Support Vector Machine)法で作成した 2 つの予測式に適用される。結果は「発がん性予測」タブに出力されており、両式から得られた予測値から、値が大きい方を最終的な予測結果とする (図 7-1)。得られた予測値が正の値であれば腎発がん陽性、負の値であれば陰性と判定される。

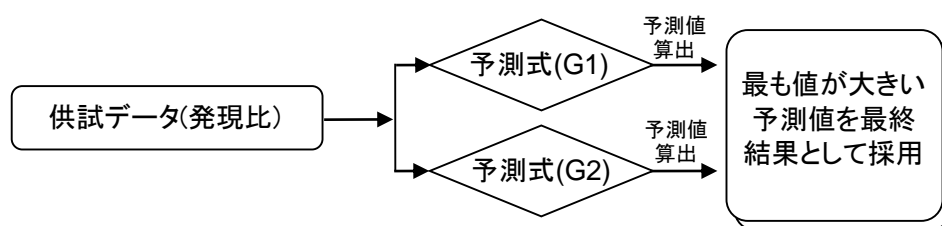


図 7-1 腎発がん性予測システムの判定方法.

## 8. 参考文献

- 1) Ministry of Economy, Trade and Industry. Act on the Evaluation of Chemical Substances and Regulation of Their Manufacture, etc, Chemical Substances Control Law. 2009.
- 2) OECD. OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS (TG 407) Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents. 2008.
- 3) Yamashita K, Matsumoto H, Saito F, Takeyoshi M. Differences in gene expression profiles in liver caused by different types of anesthesia: cases of CO<sub>2</sub>-O<sub>2</sub> and isoflurane. J Toxicol Sci. 2015; 40(6):829-36.