

メチル水銀曝露による発生期脳内未分化細胞の移動障害メカニズム

(研究課題番号 16500214)

平成16年度～平成17年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))研究成果報告書

平成18年5月

新潟大学附属図書館



2060005603

研究代表者 柿 田 明 美
(新潟大学脳研究所 脳疾患リソース解析部門)

はしがき

メチル水銀中毒症はもはや過去の案件、か。 水俣病の当事国である我が国の科学者、いや国民の殆どが、そのように思われているに違いない。確かに、水俣市や新潟市、あるいはその後のイラクの事例のような地域的高濃度汚染は見られていない。しかしながら、実は地球規模での水銀汚染は近代化と共に年々拡大し続けており、現在でも公衆衛生上の最重要課題の1つに位置付けられる問題なのである。こうした認識を得るに至った基礎研究、中でも1990年代以降の大規模コホート研究も残念ながら欧米主導で展開されており、ごくあたりまえに我々が摂食する魚介類等には驚く程のメチル水銀が含まれていること、胎児とりわけその発生期脳に重大な影響を与える可能性があることが指摘されている。こうした結果を受け、欧米主要国では妊婦の魚類等摂取に関する規制勧告基準を発表している程である。

中毒学から神経病理学への展開。 メチル水銀をめぐる研究動向は過去10年あまりで一転した。そもそも妊娠期間の短い齧歯類には、実験的に胎児脳病変を作ることには出来ない、というのが定説であった。本研究代表者らは、妊娠前から低濃度のメチル水銀に曝露した雌ラットが児を宿し、その後も全妊娠期間に亘り曝露し続けた場合、その児脳には明らかな神経細胞変性が惹起し得ること、そしてその感受性は、脳の発生・発達時期および解剖学的部位ごとに異なっていることを見出した。投与濃度を下げていくことにより、出生した児が一見順調に生育し得るプロトコールも作成したが、こうした胎児期曝露は成長後の高次脳機能障害へと帰結され得ることも明らかにした。これらの知見や方法論は、上記疫学研究結果が出され始めた時期とも相前後したという背景もあり、思いのほか広く認識された。もっとも、本研究者らにとって更に興味深い事実、実は、高濃度のメチル水銀に単回曝露した発生期脳には、上記と全く異なった phenotype を示す脳病変、即ち未分化細胞の移動障害が惹起される、ということであった。即ち、(1)妊娠中期・後期に曝露した胎児では、大脳皮質における神経芽細胞がとる基本的移動パターン(inside-out pattern)が広範に障害されること、(2)神経芽細胞産生初期に曝露した場合には、大脳側頭部のくも膜下腔に神経組織が突出した奇形(LGH: Leptomeningeal glioneuronal heterotopia)とこれと連続した cortical dysplasia が形成されること、(3)新生児脳においてはグリア芽細胞の移動障害が選択的にもたらされることを明らかにした。これらモデルの持つ有用性は何か？ヒトの Migration Disorders は、遺伝子異常に起因するものばかりではない。例えば、難治てんかん原性病巣における cortical dysplasia は弧発性であり発症頻度も高いが、その実、移動障害の具体的病態メカニズムについては殆ど解っていない。つまり、本モデルの多面的な解析は、単にメチル水銀毒性のメカニズムを知るというに留まらない、様々な発生異常脳の基本病態を理解する上でも極めて重要な知見を提供し得るものと思われる。そもそも本モデル以外で、LGH を惹起出来たとの報告、あるいはグリア芽細胞の移動障害を実証した研究はこれまで全く知られていない。

移動障害モデルの分子病態メカニズム。 本研究では、この未分化細胞の移動障害モデルを用い、その分子病理学的背景を明らかにすることを目的とした。変動する遺伝子群の発現プロファイリング(24,000 遺伝子の同時解析)を行い、その後実際の現象に密接に関連する可能性が想定される個々の分子について解析を行った。

研究組織

研究代表者：柿田明美（新潟大学脳研究所脳疾患リソース解析部門・助教授）

研究分担者：坂本峰至（国立水俣病総合研究センター疫学研究部・調査室長）

高橋 均（新潟大学脳研究所病理学分野・教授）

交付額

（単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成16年度	2, 300	0	2, 300
平成17年度	1, 400	0	1, 400
総計	3, 700	0	3, 700

研究発表

（1）学術専門誌等

1. Takao T, Murakami H, Fukuda M, Kawaguchi T, Kakita A, Takahashi H, Kudoh M, Tanaka R, Shibuki K. Transcranial imaging of audiogenic epileptic foci in the cortex of DBA/2J mice. **Neuroreport** 2006; 17 (3): 267-271.
2. Tsuchiya K, Piao Y-S, Oda T, Mochizuki A, Arima K, Hasegawa K, Haga C, Kakita A, Hori K, Tominaga I, Yagishita S, Akiyama H, Takahashi H. Pathological heterogeneity of the precentral gyrus in Pick's disease: a study of 16 autopsy cases. **Acta Neuropathologica**, 2006; in press.
3. Yokomaku D, Jourdi H, Kakita A, Nagano T, Takahashi H, Takei N, Nawa H. ErbB1 receptor ligands attenuate the expression of synaptic scaffolding proteins, GRIP1 and SAP97, in developing neocortex. **Neuroscience** 2005; 136 (4): 1037-1047.
4. Piao Y-S, Tan C-F, Iwanaga K, Kakita A, Takano H, Nishizawa M, Lashley T, Revesz T, Lees A, de Silva R, Tsujihata M, Takahashi H. Sporadic four-repeat tauopathy with frontotemporal degeneration, parkinsonism and motor neuron disease. **Acta Neuropathologica** 2005; 110 (6): 600-609.
5. Kakita A, Kameyama S, Hayashi S, Masuda H, Takahashi H. Pathologic features of dysplasia and accompanying alterations observed in surgical specimens from patients with intractable epilepsy. **Journal of Child Neurology** 2005; 20 (4): 341-350.
6. Piao Y-S, Kakita A, Watanabe H, Kitamoto T, Takahashi H. Sporadic fatal insomnia with spongiform degeneration in the thalamus and widespread PrP^{Sc} deposition in the brain. **Neuropathology** 2005; 25 (2): 144-149.
7. Iwakura Y, Piao Y-S, Mizuno M, Takei N, Kakita A, Takahashi H, Nawa H. Influences of dopaminergic lesion on epidermal growth factor-ErbB signals in Parkinson's disease and its model: neurotrophic implication in nigrostriatal neurons. **Journal of Neurochemistry** 2005; 93 (4): 974-983.
8. Kakita A, Inenaga C, Kameyama S, Masuda H, Ueno T, Honma J, Shimohata M, Takahashi H. Cerebral lipoma and the underlying cortex of the temporal lobe: pathologic

- features associated with the malformation. **Acta Neuropathologica** 2005; 109 (3): 339-345.
9. Tan C-F, Piao Y-S, Kakita A, Yamada M, Takano H, Tanaka M, Mano A, Makino K, Nishizawa M, Wakabayashi K, Takahashi H. Frontotemporal dementia with co-occurrence of astrocytic plaques and tufted astrocytes, and severe degeneration of the cerebral white matter: a variant of corticobasal degeneration? **Acta Neuropathologica** 2005; 109 (3): 329-338.
 10. Pan HS, Sakamoto M, Oliveira RB, Liu XJ, Kakita A, Futatsuka M. Changes in methylmercury accumulation in the brain of rat offspring throughout gestation and during suckling. **Toxicological and Environmental Chemistry** 2004; 86 (1/4): 161-168.
 11. Sugai T, Kawamura M, Iritani S, Araki K, Makifuchi T, Imai C, Nakamura R, Kakita A, Takahashi H, Nawa H. Prefrontal abnormality of schizophrenia revealed by DNA microarray; impact on glial and neurotrophic gene expression. **Annals of the New York Academy of Sciences** 2004; 1025: 84-91.
 12. 他田真理、成瀬 聡、新井亜希、佐藤 晶、田中恵子、朴月善、柿田明美、高橋 均、西澤正豊、辻 省次. 重篤な多発性単ニューロパチーを呈し、C型肝炎ウイルス感染に関連した混合型クリオグロブリン血症を認めた全身性血管炎の一部検例. **臨床神経学** 2004; 44 (10): 686-690.
 13. Ohtake H, Limprasert P, Fan L, Onodera O, Kakita A, Takahashi H, Bonner LT, Tsuang DW, Murray IVJ, Lee M-Y, Trojanowski JQ, Ishikawa A, Idezuka J, Murata M, Toda T, Bird TD, Leverenz JB, Tsuji S, La Spada AR. Beta-synuclein gene alterations in dementia with Lewy bodies. **Neurology** 2004; 63 (5): 805-811.
 14. Sakamoto M, Kakita A, Oliveira RB, Pan HS, Takahashi H. Dose-dependent effects of methylmercury administered during neonatal brain spurt in rats. **Developmental Brain Research** 2004; 152 (2): 171-176.
 15. Tohmi M, Tsuda N, Watanabe Y, Kakita A, Nawa H. Perinatal inflammatory cytokine challenge results in distinct neurobehavioral alterations in rats: implication in psychiatric disorders of developmental origin. **Neuroscience Research** 2004; 50 (1): 67-75.
 16. Inenaga C, Kakita A, Iwasaki Y, Yamatani K, Takahashi H. Autopsy findings of a craniopharyngioma with a natural course over 60 years. **Surgical Neurology** 2004; 61 (6): 536-540.
 17. Kakita A, Sakamoto M, Ikuta F, Takahashi H. Effects of methylmercury on developing brain. Neuropathological aspects. **Proceedings of NIMD Forum**, pp. 64-89, 2004.
 18. Watanabe Y, Hashimoto S, Kakita A, Takahashi H, Ko J, Mizuno M, Someya T, Patterson PH, Nawa H. Neonatal impact of leukemia inhibitory factor on neurobehavioral development in rats. **Neuroscience Research** 2004; 48 (3): 345-353.

(2) 教科書・総説等

1. Kakita A, Takahashi H. Hydrocephalus (Chapter 16). In: Golden JA, Harding B (eds), Pathology and Genetics: **Developmental Neuropathology**, ISN Neuropath Press, Basel, Switzerland, pp. 126-130, 2004.
2. 那波宏之、柿田明美. 統合失調症の発達障害仮説とドパミン神経栄養因子. **細胞** 2005; 37 (14): 565-568.

3. 柿田明美. ヒト脳の形成障害：とくに Migration Disorders の病理. 「大脳皮質の形成とその異常」. 脳 21 2005; 8 (3): 268-273.

(3) 講演等

1. 柿田明美. (講師). 脳のかたちとそのできかたの妙をさぐる. 新潟大学脳研究所公開講座『脳と心を科学する』／新潟, 2005 年 10 月 28 日.
2. 柿田明美. (招待講演). てんかんの病理. 国立西新潟中央病院てんかんセンター 夏期セミナー／新潟, 2005 年 8 月 20 日.
3. 柿田明美. (招待講演). Lysosomal and peroxisomal disorder の神経病理. 第 46 回日本神経病理学会, 教育コース『神経病理学の基礎』／宇都宮, 2005 年 5 月 12-14 日.
4. 柿田明美, 稲永親憲, 亀山茂樹, 増田 浩, 上野武彦, 本間順平, 下畑光輝, 高橋 均. 側頭葉脳表部の脂肪腫とこれに連続する大脳皮質：発生異常に関連した組織所見. 第 46 回日本神経病理学会／宇都宮, 2005 年 5 月 12-14 日.
5. 柿田明美. (招待講演). 脳の発達障害の神経病理. 第 94 回日本病理学会, ワークショップ『神経疾患の病理学』／横浜, 2005 年 4 月 14-16 日.
6. 柿田明美. (招待講演). 発生期脳におけるグリア芽細胞の移動経路と動態. グリア研究会特別講演会・グリア講演会／仙台, 2005 年 3 月 12 日.
7. 柿田明美. (招待講演). てんかんの病理. 国立西新潟中央病院てんかんセンター 夏期セミナー／新潟, 2004 年 8 月 21 日.
8. 柿田明美, 亀山茂樹, 高橋 均. 難治てんかん症例の切除脳組織に見られた cortical dysplasia. 第 45 回日本神経病理学会／前橋, 2004 年 5 月 26-28 日.
9. 柿田明美. (招待講演). てんかんの病理. 第 22 回日本脳腫瘍病理学会, 教育セミナー／新潟, 2004 年 5 月 20-21 日.
10. 柿田明美, 亀山茂樹, 高橋 均. Cortical dysplasia / microgyogenesis: 組織所見をどう見ているか. 第 27 回日本てんかん外科学会, ワークショップ『Microdysgenesis の病理』／奈良, 2004 年 4 月 21-22 日.
11. Akiyoshi Kakita. (invited speaker). Neuropathology of NMD and epileptogenic cortical dysplasia. VIIth Annual Meeting of the Infantile Seizure Society. International Symposium on Neuronal Migration Disorders and Childhood Epilepsies. / Tokyo, 2004 年 4 月 16-17 日.

研究成果

以下に本研究成果の概要を記載した。また、本研究期間内に、本研究に関連する研究成果を原著論文として学術専門誌等に発表したもののなかから 11 編を選び、以下に掲載した。

メチル水銀曝露による発生期脳内未分化細胞の移動障害メカニズム

研究代表者： 柿田 明美（新潟大学 脳研究所 脳疾患リソース解析部門 助教授）

研究分担者： 坂本 峰至（国立水俣病総合研究センター 疫学研究部 部長）
高橋 均（新潟大学 脳研究所 病理学分野 教授）

研究協力者： 譚 春鳳（新潟大学 脳研究所 病理学分野 ポスドク）
豊島靖子（新潟大学 脳研究所 病理学分野 助手）
山崎実里（新潟大学 脳研究所 病理学分野 修士大学院生）
龍福雅恵（新潟大学 脳研究所 病理学分野 修士大学院生）

研究要旨

これまで我々は、メチル水銀が脳の発生・発達過程に及ぼす影響を明らかにする目的から、ラット胎児および新生児に高濃度のメチル水銀を投与することを試み、大脳新皮質における、神経芽細胞の移動障害さらにはグリア芽細胞の移動障害が惹起されることを明らかにしてきた。そこで我々は、こうした病理組織学的知見を基盤に、その分子病理学的メカニズムを知る目的から、工学的仕様の異なる二種類の DNA チップを用いた遺伝子発現プロファイリングを行った。得られた膨大なデータをもとに bioinformatics 解析を行った。メチル水銀投与後 48 時間後の組織を用いた解析から、組織病態に密接に関連する可能性が考えられる候補分子として、細胞骨格分子とその関連分子（修飾・架橋・蛋白結合）11 種を選定した。更にメチル水銀投与後のより急性期の遺伝子変動を知る目的から、投与 12 時間後の発現プロファイリングを行った。その結果、上記候補分子類似遺伝子の発現変動が観察され、また現象論的に興味ある分子 (PAF) を同定した。

キーワード：メチル水銀、胎児性水俣病、発生期脳、未分化細胞移動障害、DNA チップ

I 研究目的

ひと胎児が高濃度のメチル水銀に曝露された場合、死産あるいは究めて重篤な脳神経障害をきたすことは、本邦あるいはイラクにおける胎児性メチル水銀中毒症の発症事実からも明らかである。メチル水銀はひとが環境から摂取し得る物質であり、現在でも環境衛生上の最重要問題の一つと位置付けられるものである。特に、メチル水銀に対して脆弱な、胎児脳における影響の解析とそのメカニズムの解明は、緊急かつ重要な課題である。

これまで我々は、メチル水銀が発生・発達期脳に及ぼす影響を明らかにする目的から、ラット胎児・新生児に対するメチル水銀の投与時期と期間、あるいは投与量を変えた一連の研究を行ってきた。その結果、発生期脳に惹起される病変の組織学的表現型は、実は、こうしたメチル水銀への曝露条件によって大きく異なってくることを明らかにしてきた¹⁻⁵⁾。即ち、胎児が、少量のメチル水銀に持続的に曝露した場合には、脳内の特定の部位に選択的神経細胞変性が惹起され¹⁾、こうした個体は成熟後に高次脳機能障害を来すことを明らかにした²⁾。これとは別に、多量のメチル水銀を経胎盤的に胎児に投与した場合には、本来神経細胞が示す厳然たる移動パターン (inside-out pattern) が明らかに障害されること³⁾、更にその障害が神経芽細胞産生初期に惹起された場合には、神経組織がくも膜下腔に突出する脳表の奇形 (leptomeningeal glioneuronal heterotopia) が惹起され得ることを明らかにしてきた⁴⁾。次いで、グリア芽細胞の産生・移動が行われる新生児期にメチル水銀を投与した場合には、これら細胞の移動もメチル水銀によって障害されること、更に、その際の移動障害パターンは神経芽細胞におけるそれとは異なるものであることを明らかにしてきた⁵⁾。

我々は、こうした病理組織学的知見を基盤に、メチル水銀による未分化細胞（神経芽細胞・グリア芽細胞）の移動障害をもたらす分子病態メカニズムを知るために本研究を開始した。はじめに、神経芽細胞の移動期にあるラット胎児、更にはグリア芽細胞の移動期にある同新生児にメチ

ル水銀を投与し、それぞれの終脳外套 rostral 部（組織学的病変の実体³⁾・⁵⁾を既に把握している部位）を対象に、投与48時間後における遺伝子発現プロファイリングを行った。本法は、メチル水銀投与によって変動した mRNA プール全体を網羅的に把握するものであり、実験データの信頼性を高めるために、工学的仕様が大きく異なる2種類の DNA チップ（① Affymetrix Gene Chip：オリゴヌクレオチド搭載、約7,000の既知遺伝子を含め、計約26,200個の遺伝子プローブセット対象。② Filgen Gene Chip：Stanford方式の長い cDNA 搭載 [平均1kb]、約5,000遺伝子対象）を用いた解析を行った。得られた膨大なデータを対象に、Bioinformatics を展開し、病態と密接な関連性を有する遺伝子を絞り込んだ。次に、メチル水銀投与後の急性期における遺伝子変動を確認するため、投与12時間後に同様のサンプリングを行い、変動遺伝子の抽出とこれまでのデータとの整合性について検討した。

II 研究方法

II-1. メチル水銀投与と組織採取

II-1-1：胎児

- (1) ウィスター系ラットを用いた。9週齢の雌を対象に、膈インピーダンスチェッカー（MK-10B, 室町機械）を用いた検定を行い、交配適期と判定した個体と雄を一晚同居させ、翌日を胎生第1日(E1)とした。
- (2) メチル水銀（methylmercury chloride: MMC, ナカライ科学）を同モルのシステイン（関東科学）とともに蒸留水に溶かし、E16の母体に20 mg/kg相当の水銀溶液を一回経口投与した。投与48時間後(E18)に開腹し胎児を採取した。なお、本投与法による終脳外套の病理組織学的解析結果は既に報告した³⁾。そこでは、神経芽細胞の移動障害が広範に惹起されていた。
- (3) 対照として蒸留水のみを投与した母体の胎児を用いた。
- (4) 実体顕微鏡下で開頭し胎児脳を取り出した。終脳外套前方部を切り出し、両側帯状回を含む正中部以外の組織を採取した。つまり、将来の一次運動野および一次体性感覚野に相当する組織を選択的に切り出した。両皮質野は先の組織学的解析³⁾の際の対象部位である。
- (5) 組織採取は、5匹以上の母体から得た数十匹の胎児から行い、それらを混合・分注した。

II-1-2：新生児

- (1) 同系新生児ラットを用いた。出生日をP1とし、P2で20 mg/kg相当の水銀溶液をコンデンスミルクとともに一回経口投与した。投与48時間後(P4)に開頭し、一次運動野および一次体性感覚野を選択的に切り出した。同投与法によって惹起される同部位におけるグリア芽細胞の移動障害の詳細については先に報告した⁵⁾。
- (2) 対照として蒸留水のみを投与した個体を用いた。
- (3) 組織採取は5匹以上の母から出生した数十匹の新生児から行い、それらを混合・分注した。

II-1-3:胎児および新生児に投与後急性期のサンプリング

- (1) メチル水銀投与後の急性期における遺伝子変動を知る目的から、胎児および新生児に同様にメチル水銀を投与し、その12時間後に組織を採取しプロファイリングスタディーを行った。

II-2. サンプル調整

II-2-1：Affymetrix Gene Chip 用

- (1) ISOGEN(Nippon-gene)を用いて、グアニジン/フェノール方により total RNA を抽出した。その精度は、Bioanalyser(Agilent Technology)を用いて検定した。
- (2) mRNA を逆転写酵素と poly-T プライマーを用いて cDNA に変換した。
- (3) biotin-UTP と biotin-CTP の存在下で T7RNA ポリメラーゼを用いて cDNA を増幅した。これにより、各 DNA から 50-100 コピーのビオチン標識した cRNA を合成した。cRNA を 94°C の断片化バッファー内でインキュベートし、35nt から 200nt の cRNA 断片を調整した。
- (4) DNA チップ (Rat U34A, U34B, U34C) にハイブリダイズした。ハイブリダイズしたビオチン標識 cRNA を Streptavidin-Phycoerythrin(SP) で染色し洗浄した。
- (5) goat IgG とビオチン化抗 streptavidin 抗体でチップ上のシグナルを増幅し、再度 SP で染色後洗浄した。
- (6) 共焦点レーザースキャナでチップをスキャンした。画像処理は Affymetrix Microarray Suite

- 5.0を用い、シグナル値の定量は同ソフトウェアによる統計アルゴリズムに従った。
(7) 既知遺伝子が多く乗せられている U34A chip については3回の反復検定を行った。

II-2-2: Filgen Gene Chip 用

- (1) 上記の方法で total RNA を抽出し、精度検定 (O.D. 260/O.D. 280 > 1.7)を行った。
(2) RNA を逆転写反応を行い、Cy3 または Cy5 で標識された cDNA を作製、両 cDNA を混合し、DNA chip にハイブリダイズした。蛍光強度をスキャナーで読みとり、画像を解析ソフトにより数値化した。

II-3. Bioinformatics

- (1) 機能ゲノミクス研究で生じる複雑な遺伝学的情報を解析するためのソフトウェア、GeneSpring 7.2 (Silicon Genetics)を使った。
(2) Affymetrix Data については、3種類の normalization 補正を行った。① Data transformation 補正: 生物学的に意味のない負の値を 0.01 に引き上げた。② Per chip normalization 補正: チップ間のバラツキを揃えるために実施。アレイごとの中央値 (median) で補正した。③ Per gene normalization 補正: 発現パターンから生物学的意味を抽出するのを助ける目的で行った。各遺伝子について全サンプルのノーマライズ値の中央値で補正した。
(3) Filgen Data の normalization については、per spot and chip normalization 補正として raw / control 値から Lowess 補正を行った。

II-4. 未分化細胞の移動動態の観察

これまでの病理組織学的研究からメチル水銀により未分化細胞の移動障害が惹起されることは明らかである。また、これまでのプロファイリング結果から、未分化細胞内の microtubules をその assembly に障害をきたしている可能性が考えられる。即ち、メチル水銀曝露により、移動中の未分化細胞には pathological behavior が観察されうるものと想定される。そこで、その実際の生きた細胞の動きを長時間に亘り観察し、その動態異常を明らかにすることを試みる。方法論としては、我々が独自に開発したレトロウィルスベクター (緑色蛍光蛋白: green fluorescent protein の cDNA を encode したベクター: pNIT-GFP) と微弱な蛍光シグナルを捉えデジタルムービーに変換する Time-lapse microscope system を用いる。予備実験として、新生児ラット (P1)、児の前脳片側 subventricular zone 内に、油圧 Micro-manipulator を用い、GFP-retrovirus 含有液 1 μ l を stereotactic に microinjection した。P3 に達した時点で、Tissue Chopper を用いて 250 μ m 厚の生鮮前脳冠状断スライスを作製し、スライスごと組織培養を行った。倒立型蛍光顕微鏡とこれに装着した CCD カメラを用い、緑色蛍光でラベルされた未分化細胞を長時間 Time-lapse で観察した。画像は、画像取得解析システム (MetaMorph) でデジタル画像として取り込んだ。

(倫理面への配慮)

- (1) 実験動物の飼育は、新潟大学脳研究所特殊動物実験室で行い、24 時間の温度・湿度管理をもって行った。
(2) 成獣へのメチル水銀投与に際しては、専用の胃ゾンデ先端にキシロカインゼリーを塗布し、粘膜刺激を軽減した。新生児への投与に際しては、コンデンスミルクとともに経口投与し、自発的嚥下運動を誘発することで行った。
(3) 組織採取に当たっては、成獣に対するネンブタール筋中麻酔およびエーテル吸入麻酔を併用し、深麻酔に達した後、開腹手術を行った。新生児からの組織採取は、個体が低温麻酔下に達した後、開頭術を行った。
(4) 本実験計画については、既に新潟大学動物委員会に実験承認申請を行い、同委員会における倫理面等についての審議を経て、承認を得ている (平成 14 年 2 月 28 日、新潟大学長、新大研 9 号)。

III 研究結果

III-1. メチル水銀投与 48 時間後の遺伝子変動

III-1-1. Affymetrix Data (図 1-3)

神経芽細胞の移動期である胎児のサンプルにおいて、対照群と比較しメチル水銀投与群で優位な変動を示した遺伝子は、1.5 倍以上 up-regulated: 1,388 genes / total 26,261 (5.3%) (図 1A)、1.5 倍以上 down-regulated: 895 (3.4%) (図 1B) であった。今回の実験系を基にした解析の目的は、胎児期および新生児期にメチル水銀を投与した場合に共通して up-あるいは down-regulate している遺伝子を絞り込むことにある。しかしながら、遺伝子の発現変動に対する胎児と新生児のサンプル間の影響は大きく (図 1C)、水銀投与群と対照群との間で発現に差のある遺伝子を正確に抽出するためには、この点も考慮する必要があると考えた。

そこで、因子 1 (胎児 vs 新生児)、因子 2 (水銀投与群 vs 対照群)、およびこれら二つの因子の組み合わせにより生まれる効果 (交互作用) を同時に考慮に入れた二元配置の分散解析 (2way-ANOVA) を実施した。それぞれの因子に起因する統計学的優位な ($P < 0.05$) 発現変動遺伝子を抽出し、クラスター解析を行った (図 2)。因子 1 による優位な変動遺伝子は 1,927 個 (7.3%) (図 2A)、因子 2 による優位な変動遺伝子は 214 個 (0.8%) (図 2B)、両因子の交互作用により優位に変動した発現遺伝子は 164 (0.6%) (図 2C) であった。

胎児・新生児ごとに、水銀投与群と対照群との間で発現に優位差のある遺伝子群を抽出すると (図 3)、胎児で up-regulated: 127 個, down-regulated: 99、新生児で up-regulated: 111, down-regulated: 112 であった。胎児および新生児で共通して、1.5 倍以上 up-regulated していた遺伝子は 40 個 (図 3A)、1.5 倍以上 down-regulated していた遺伝子は 44 個 (図 3B) であった。

III-1-2. Filgen Data (図 4、5)

胎児サンプルにおいて、水銀投与群のノーマライズ値が 1.5 以上を示した遺伝子は 309 個 (6.1%) (図 4A)、0.667 以下の遺伝子は 326 個 (6.5%) (図 4B)、であった。新生児サンプルでは、1.5 以上が 561 個 (11.2%) (図 4C)、0.667 以下が 621 個 (12.3%) (図 4D) であった。胎児・新生児で共通して 1.5 以上を示した遺伝子は 160 個 (3.2%) (図 5A)、0.667 以下が 231 個 (4.6%) (図 5B) であった。

III-1-3. プラットフォームの異なるアレイ間のデータ比較 (表 1)

Affymetrix および Filgen 両 microarray に搭載されている遺伝子について、GenBank ACCN から Locus Link ID, UniGeneID を検索し、同等の遺伝子と認められるものをリスト化した。その上で、メチル水銀に曝露した胎児または新生児において変動の認められた遺伝子リストを作成した (表 1)。両アレイで共通して変動している遺伝子は極めて少なく、down-regulate しているものについては、胎児期で 15 genes (collagen type 1 alpha 1, similar to testis-specific gene, UI-R-A0-bf-f-07-0-Ui.sl, PCTAIRE-1 protein kinase, similar to beta-galactosidase alpha peptide, similar to beta lactamase IRT-4, similar to kinesin family protein KIF1a, selenoprotein W, LOC362673, similar to interferon regulatory factor 3, similar to lactose operone repressor, similar to glycyl-tRNA synthetase, lymphocyte antigen 68, similar to RIKEN cDNA 5830446M03, similar to TRH3)、新生児期で 3 genes (myosin IE, albumin, alpha-fetoprotein) であった。

III-1-4. 遺伝子の機能による分類 (図 6)

LocusLink ID, GO categories などからキーワード検索を行い、遺伝子の既知の機能 (計 21 種類) について発現変動を解析した (図 6)。メチル水銀曝露により、細胞骨格蛋白・細胞周期・転写因子・代謝関連蛋白・細胞外基質など、胎児脳・新生児脳では、実にさまざまな分子種が変動しているおり、その増減の傾向も両プラットフォーム間で異なっていた。

III-1-5. 神経芽細胞の移動に関連する既知分子の変動 (data not shown)

主にマウスやラットあるいは Drosophila を用いた研究から、これまで神経芽細胞の移動に関与するとされる様々な分子が知られてきた。また、いわゆるヒトの neuronal migration disorders^{6, 7)} のうち、遺伝性の病態の幾つかについてはその原因遺伝子が同定されている。それらのラット homolog について解析したところ、以下の分子種については有意な発現変動は認められなかった。(1) reelin cascade: *reelin*, *ApoE*, *VLDLR*, *LDLR*, (2) tangential migration: *Nkx2.1*, *Mash1*, (3) cell signaling: *Hgf*, *BDNF*, *TrkB*, *PI3K*, *Shh*, (4) cell guidance: *Sema3*, *Nrp1/2*, *SDF-1*, *CXCR4*, (5) transcription: *Ngn1/2*, (6) human causative genes: *doublecortin*, *filamin-1*。

III-1-6. 重要分子の選定 (表2)

メチル水銀曝露による神経芽細胞およびグリア芽細胞の移動障害に密接に関連した分子を想定した際、up-regulate している分子は全て除外し、更に、down-regulate している分子の中から apoptosis 関連分子や oncogene, heat shock 分子などを除き、分子を絞り込んだ。その結果、cytoskeletal associated molecules なかでも microtubules とその修飾分子群で down-regulate しているものが含まれていることに気付いた。統計上、必ずしも優位な down-regulate とは判定されなかったものも含め、表2にあげた11分子を、現象関連重要分子の候補として選定した。

III-2. メチル水銀投与12時間後の遺伝子変動

III-2-1. Affymetrix Data (図7)

ESTが多数配されたU34B, U34Cのchipを用いた解析は現実的ではないとの判断から、U34A chipを用いた反復解析を行った。メチル水銀を投与した胎児サンプルにおいて2倍以上のup-regulationを示したものは155遺伝子であり、down-regulationを示したものは132遺伝子であった。

III-2-2. Filgen Data (図8, 9)

メチル水銀を投与した胎児サンプルにおいて2倍以上のup-regulationを示したものは491遺伝子、down-regulationを示したものは395遺伝子であった。一方、メチル水銀を投与した新生児サンプルにおいて2倍以上のup-regulationを示したものは245遺伝子、down-regulationを示したものは339遺伝子であった(図8)。胎児および新生児で共通してup-regulationを示したものは50、down-regulationは166遺伝子であった(図9)。

III-3. メチル水銀投与12時間後および48時間後の変動遺伝子の比較 (表3)

Affymetrix, Filgen 両 DNA chip とも、12時間後における変動遺伝子数は48時間後のそれと比較し明らかに少なく、また両者で共通した挙動を示した分子の数もかなり少ないことが解った。また、両プラットフォーム間で変動分子数を比較すると、ここでも共通遺伝子数は極端に少ないことが解った。しかしながら、詳細にこれらのリストを検索すると、48時間後でdown-regulate していた幾つかの分子(collagen type 1 alpha 1, myosin IE, albumin, alpha-fetoprotein など)は12時間後の解析でもdown-regulate しており、両者で共通した分子の動きが確認されると共に、方法論的妥当性を示唆するデータと考えられた。48時間後のサンプルから抽出した候補分子のうち、12時間後のサンプルでもdynein-similar moleculeのdown-regulationが観察されるなど一部は共通した挙動を示す可能性が示された。一方、48時間後のサンプルからは抽出されなかったものの、12時間後のサンプルで有意なdown-regulationを示す分子のうち、platelet-activating factor, 1-alpha(PAF)など、現象論的に極めて興味深い分子種の変動が認められた。

IV 考察

本研究で行ったメチル水銀投与法は、神経芽細胞およびグリア芽細胞の移動障害を惹起するものである^{3, 4)}。その病態は、イラクで発生した胎児性メチル水銀中毒症の剖検例が示すそれ⁸⁾とも明らかな共通性があり、発生期脳におけるメチル水銀毒性の病態機序を知る上でも重要な実験モデルと考えられる。

こうした背景から、本研究では、メチル水銀投与後の胎児・新生児脳における遺伝子発現プロファイリングを行い、現象に密接に関連した(二次的変動ではない)重要分子種の選定を行った。これまでの同方法による実験結果から、DNA chipの工学的構造特性に依存したデータが抽出されるものであることを踏まえ、仕様の異なる2種類のDNA chipを複数回行うことにより、データの再現性・信頼性を高めようと試みた。そのため、得られた実験粗データは膨大であり、特定の統計解析アルゴリズムでは解析できず、複数の機能ゲノミクス解析ソフトによるbioinformaticsを行った。また、メチル水銀投与12時間後の急性期における遺伝子発現プロファイリングを行い解析を進めた。どの分子が重要かを見極める作業が、本研究計画全体を通じて、極めて重要な要素となると判断したためである。

両DNA chipのデータからも、多数の分子種の変動が計測された。本研究では、既に捉えている組織病理学的知見を基盤にしており、胎児および新生児で共通した分子病態メカニズムが存

在する、との作業仮説のもとに解析を進めた。即ち、神経芽細胞の移動障害とグリア芽細胞の移動障害をもたらす分子病態メカニズムには共通の側面があると見なした訳である。そこで、メチル水銀投与後に up-regulate した分子は二次的変動（反応性）を示すものと判断し、今回の目的からは標的分子とはならないと判断した。Down-regulate した分子のうち、apoptosis 関連分子や oncogene、あるいは stress response molecule や hormone peptide などの分子も除外視した。

両 DAN chip から得られたデータの検定条件を、1.5 倍以上あるいは normalize 値が 0.667 以下とする条件では、胎児・新生児で共通して down-regulate している候補分子は特定できなかった。しかしながら、有意とみなす条件を緩和し遺伝子リストを詳細に再検討すると、細胞骨格分子とその関連分子（修飾・架橋・蛋白結合）の down-regulation が見られることに気付いた。

未分化細胞が移動する際には、先端突起を移動方向に伸長し核がその方向に引き上げられる現象が必須であり⁹⁾、その際、microtubules は高度の極性アセンブリーを構築し positive end を伸長方向に向けたダイナミクスを示すことが知られている。本研究で選定した 11 分子はこうした移動細胞の細胞内プロセスにも関連する可能性も考えられることから、重要候補分子として抽出した。また、メチル水銀投与 12 時間後のサンプルで有意に down-regulate する分子として PAF などが抽出された。PAF は、ヒト migration disorders の代表的疾患である lissencephaly の原因遺伝子 *LIS1* の翻訳蛋白との相同性が極めて高く、細胞移動に必須な分子であることが知られている。また PAF は、*aspergillus nidulans* の核移動に関与する蛋白 nudF との相同性も高く、発生期脳における未分化細胞の移動に際して、核の移動を制御している可能性が指摘されている。メチル水銀曝露により、こうした重要分子が時間依存性に障害を受ける可能性も考えられ、そのメッセージおよび蛋白発現の検定は、病態を理解する上で極めて重要と考えられる。

V 結論

メチル水銀投与による未分化細胞の移動障害メカニズムを知る目的から、2 種類の DNA チップを用いた遺伝子発現プロファイリングを行い、その膨大なデータをもとに bioinformatics 解析を行った。その結果、組織病理学的知見に密接に関連する可能性が想定される重要分子として、細胞骨格分子とその関連分子（修飾・架橋・蛋白結合）を選定した。

本研究を遂行する上での研究基盤・業績

これまで我々は、微量のメチル水銀を慢性的にラット胎児および新生児に投与することにより、脳病変を惹起し得る方法を確立した。その結果、メチル水銀に対する神経細胞の脆弱性は脳の発達時期や部位により大きく異なること（文献 1～5）、更には胎児期に曝露した児は、成長後には高次脳機能障害をきたすこと（6）を明らかにした。一方、高濃度のメチル水銀を胎児脳に投与した場合には神経芽細胞の移動障害が（7）、新生児期に投与した場合にはグリア芽細胞の移動障害が惹起されることを明らかにした（8）。神経芽細胞産生初期の投与によって、脳の特定部位に脳表の奇形とこれと連続した皮質異形成が出来ることを明らかにした（9）。このように本研究は、これまで確立した一連の病理組織学的知見を基盤とし、これを更に発展させたものである。方法的には、これまで研究者自身のラボで確立した Gene Chip や Real-time PCR などの分子生物学的手法（10）、レトロウィルスや Time-lapse digital monitoring system, slice culture を用いた細胞生物学的手法（11, 12）を組み合わせで行ったものである。

1. Kakita A, Wakabayashi K, Su M, et al. Distinct pattern of neuronal degeneration in the fetal rat brain induced by consecutive transplacental administration of methylmercury. *Brain Res* 2000;859:233-239.
2. Sakamoto M, Wakabayashi K, Kakita A, et al. Widespread neuronal degeneration in rats following oral administration of methylmercury during the postnatal developing phase: a model of fetal-type minamata disease. *Brain Res* 1998;784:351-354.
3. Wakabayashi K, Kakita A, Sakamoto M, et al. Variability of brain lesions in rats administered methylmercury at various postnatal development phases. *Brain Res* 1995;705:267-272.
4. Sakamoto M, Kakita A, Wakabayashi K, et al. Evaluation of methylmercury intoxication on the developing brain: a study with consecutive and low-dose exposure throughout gestation and lactation periods. *Brain Res* 2002;949:51-59.
5. Sakamoto M, Kakita A, Oliveira RB, et al. Dose-dependent effects of methylmercury administered during neonatal brain spurt in rats. *Dev Brain Res* 2004;152:171-176.
6. Kakita A, Wakabayashi K, Su M, et al. Intrauterine methylmercury intoxication; consequence of the inherent brain lesions and cognitive dysfunction in maturity. *Brain Res* 2000;877:322-330.

7. Kakita A, Inenaga C, Sakamoto M, et al. Neuronal migration disturbance and consequent cytoarchitecture in the cerebral cortex following transplacental administration of methylmercury. *Acta Neuropathol* 2002;104:409-471.
8. Kakita A, Inenaga C, Sakamoto M, et al. Disruption of postnatal progenitor migration and consequent abnormal pattern of glial distribution in the cerebrum following administration of methylmercury. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003;62:835-847.
9. Kakita A, Wakabayashi K, Su M, et al. Experimentally induced leptomeningeal glioneuronal heterotopia and underlying cortical dysplasia of the lateral limbic area in rats treated transplacentally with methylmercury. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;60:768-777.
10. Futamura T, Kakita A, Tohmi M, et al. Neonatal perturbation of neurotrophic signaling results in abnormal sensorimotor gating and social interaction in adults: implication for epidermal growth factor in cognitive development. *Molecular Psychiatry* 2003;8:19-29.
11. Kakita A, Goldman JE. Patterns and dynamics of SVZ cell migration in the postnatal forebrain: monitoring living progenitors in slice preparations. *Neuron* 1999;23:461-472.
12. Kakita A, Zerlin M, Takahashi H, et al. Some glial progenitors in the neonatal subventricular zone migrate through the corpus callosum to the contralateral cerebral hemisphere. *J Comp Neurol* 2003;458:381-388.

引用文献

- 1) Kakita A, Wakabayashi K, Su M, et al. Distinct pattern of neuronal degeneration in the fetal rat brain induced by consecutive transplacental administration of methylmercury. *Brain Res* 2000; 859: 233-239.
- 2) Kakita A, Wakabayashi K, Su M, et al. Intrauterine methylmercury intoxication. Consequence of the inherent brain lesions and cognitive dysfunction in maturity. *Brain Res* 2000; 877: 322-330.
- 3) Kakita A, Inenaga C, Sakamoto M, et al. Neuronal migration disturbance and consequent cytoarchitecture in the cerebral cortex following transplacental administration of methylmercury. *Acta Neuropathol* 2002; 104: 409-417.
- 4) Kakita A, Wakabayashi K, Su M, et al. Experimentally induced leptomeningeal glioneuronal heterotopia and underlying cortical dysplasia of the lateral limbic area in rats treated transplacentally with methylmercury. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; 60: 768-777.
- 5) Kakita A, Inenaga C, Sakamoto M, et al. Disruption of progenitor migration and consequent abnormal pattern of glial distribution in the cerebrum following administration of methylmercury. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; 62: 835-847.
- 6) Mizuguchi M, Takashima S, Kakita A, et al. Lissencephaly gene product. Localization in the central nervous system and loss of immunoreactivity in Miller-Dieker syndrome. *Am J Pathol* 1995; 147: 1142-1151.
- 7) Kakita A, Hayashi S, Moro F, et al. Bilateral periventricular nodular heterotopia due to filamin 1 gene mutation: widespread glomeruloid microvascular anomaly and dysplastic cytoarchitecture in the cerebral cortex. *Acta Neuropathol* 2002; 104: 649-657.
- 8) Choi BH, Lapham LW, Amin-Zaki L, et al. Abnormal neuronal migration, deranged cerebral cortical organization, and diffuse white matter astrogliosis of human fetal brain.: a major effect of methylmercury poisoning in utero. *J Neuropathol Exp Neurol* 1978; 37: 719-733.
- 9) Kakita A, Goldman JE. Pattern and dynamics of SVZ cell migration in the postnatal forebrain: monitoring living progenitors in slice preparations. *Neuron* 1999; 23: 461-472.
- 10) Kakita A, Zerlin M, Takahashi H, et al. Some glial progenitors in the neonatal subventricular zone migrate through the corpus callosum to the contralateral cerebral hemisphere. *J Comp Neurol* 2003; 458: 381-388.

Molecular expression profiles of the developing cerebral mantle following fetal or neonatal administration of methylmercury: an approach for understanding mechanisms underlying progenitor migration disturbance

Chun-Feng Tan^a, Yasuko Toyoshima^a, Misato Yamazaki^a, Masae Ryufuku^a,
Mineshi Sakamoto^c, Hitoshi Takahashi^a, Akiyoshi Kakita^{a,b}

^a*Departments of Pathology and ^bPathology Neuroscience, Brain Research Institute, University of
Niigata, 1 Asahimachi, Niigata 951-8585, Japan*

^c*Department of Epidemiology, National Institute for Minamata Disease, Minamata 867-0008, Japan*

Keywords: Methylmercury; Fetal-type Minamata disease; Brain development; Migration abnormality; DNP tip

Abstract

To understand the effects of methylmercury (MeHg) on neuronal and glial progenitor migration in the developing cerebral cortex, we examined profile alterations in gene expression in the telencephalic mantle following fetal or neonatal administration of MeHg, where an apparent disruption of the progenitor migration had been elucidated histopathologically. We applied extracted mRNA samples to two kinds of DNA microarrays, which had been made under different biotechnological concepts. Then, we performed analysis of the plenty of data according to the bioinformatics methodologies. We selected 11 molecules, which could be regarded as candidates of specific molecular cues closely associated with the migration disturbance underlying MeHg neurotoxicity.

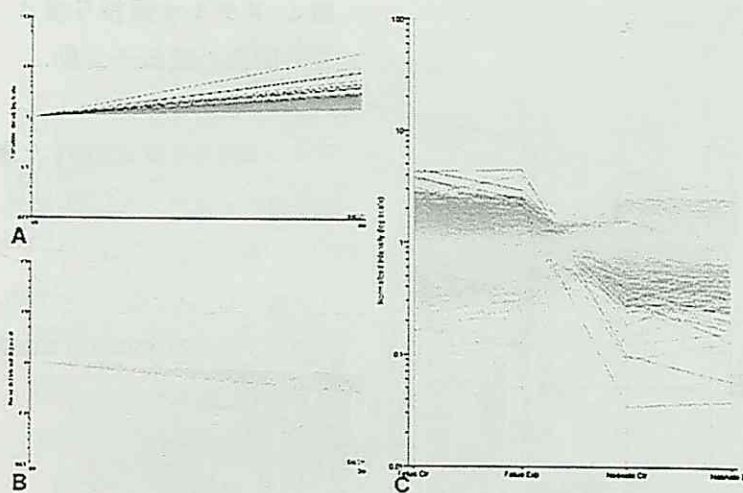


図1 メチル水銀投与後48時間後の遺伝子変動. Affymetrix Gene Chip Data 1. 全26,261遺伝子セットのうち、メチル水銀投与後の胎児脳で1.5倍以上 up-regulate した遺伝子 (A:1388個)および down-regulate した遺伝子 (B:895個)のイメージ。(C)胎児・新生児間における遺伝子の発現変動。

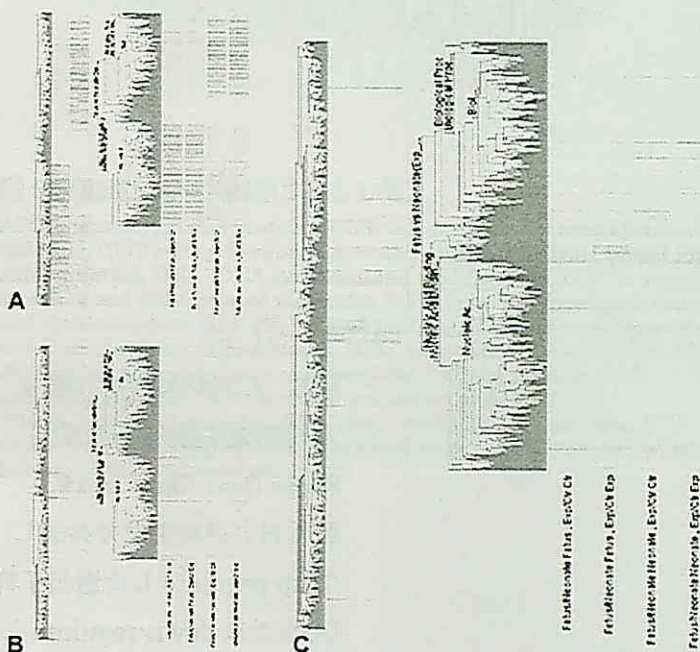


図2 メチル水銀投与後48時間後の遺伝子変動. Affymetrix Gene Chip Data 2. (A) 因子1 (胎児 vs 新生児) におけるクラスター解析。(B) 因子2 (メチル水銀投与群 vs 対照群) におけるクラスター解析。(C) 因子1および2の交互作用により有意に変動する発現遺伝子のクラスター解析。

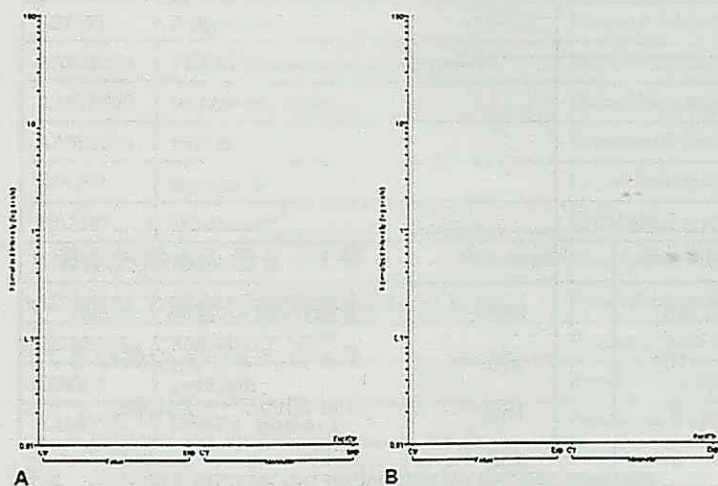


図3 メチル水銀投与後48時間後の遺伝子変動. Affymetrix Gene Chip Data 3. 胎児および新生児の双方で、メチル水銀投与群で1.5倍以上 up-regulate (A) または down-regulate (B) している遺伝子群のイメージ。

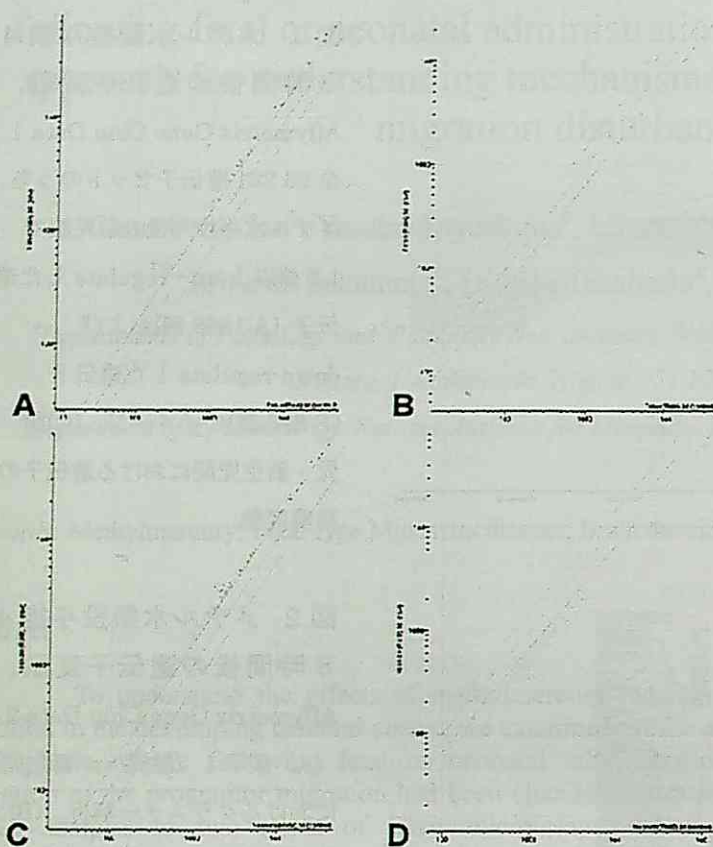


図4 メチル水銀投与後48時間後の遺伝子変動.

Filgen Gene Chip Data 1.

メチル水銀投与群で変動した遺伝子群のイメージ。(A, B) 胎児、(C, D) 新生児。(A, C) ノーマライズ値が1.5以上を示したものの。(B, D) ノーマライズ値が0.667以下を示したものの。

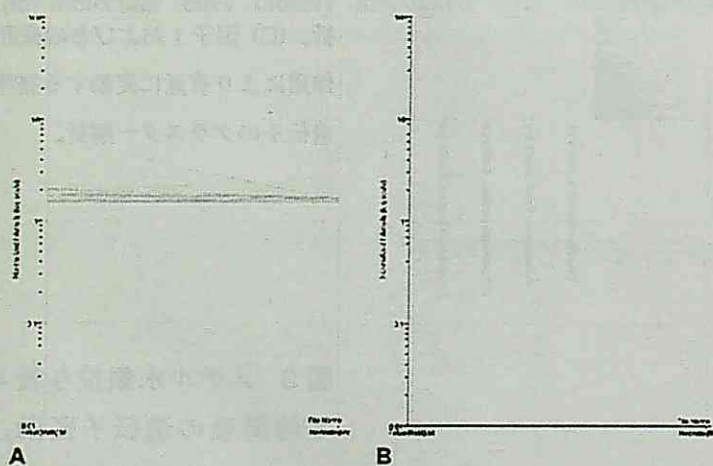


図5 メチル水銀投与後48時間後の遺伝子変動.

Filgen Gene Chip Data 2.

胎児および新生児で共通して up-regulate した遺伝子群 (A) または down-regulate した遺伝子群 (B) のイメージ。

	Affymetrix のみ	両者共通	Filgen のみ
胎児 up-regulated	1345	43	384
胎児 down-regulated	880	15	476
新生児 up-regulated	108	3	160
新生児 down-regulated	109	3	458

表1 メチル水銀投与後48時間後の遺伝子変動. プラットフォームの異なるアレイ間のデータ比較。

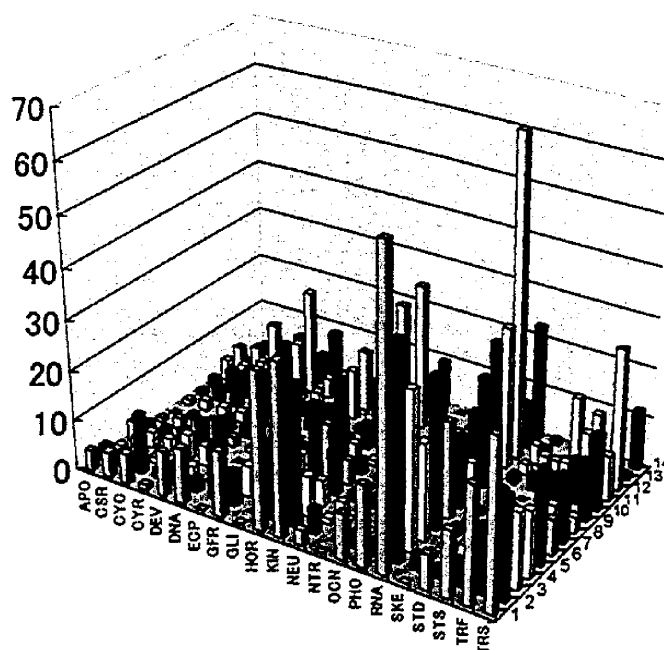


図6 変動遺伝子の機能による分類。

APO: apoptosis-related proteins, CSR: cell surface receptors/cell adhesion molecule, CYC: cell-cycle-related proteins, DEV: organ development and differentiation, DNA: DNA synthesis and modifications, ECP: intercellular signaling and ECM-related molecules, GFR: growth/neurotrophic factors and their receptors, GLI: glia-related proteins, HOR: hormones/peptides and their receptors, KIN: kinases, NEU: neuron-specific molecules, NTR: neurotransmitter synthesis and receptors, OCN: oncogenes, PHO: phosphatases, RNA: RNA binding/translation proteins, SKE: cytoskeletal/motor proteins, STD: signal transducers/G proteins, STS: stress response/ubiquitination/heat shock proteins, TRF: transcription factors, TRS: transporters/channels

GenBank	Molecule Description	Putative Role Description
L27421	frequenin	Neuronal calcium sensor, radial glial cells
AA892299	FERM-domain-containing protein	Structural protein, a member of the ERM protein
AA875659	internexin, alpha	Cytoskeleton organization
AA892303	dynein	Cytoskeletal functional protein
X68199	myosin Ib	Neural development
M81687	syndecan 2	Cytoskeletal protein binding
AI070512	neurexin 2	Neuronal cell recognition molecule
AI227608	microtubule-associated protein tau	Cytoskeletal molecule
AI145444	neurabin 1	Binding to actin filaments, cytoskeleton
X66366	gephyrin	Protein-cytoskeletal interaction
AA963234	tubulin, epsilon 1	Cytoskeleton, spliced

表2 Selected interesting molecules for further analysis

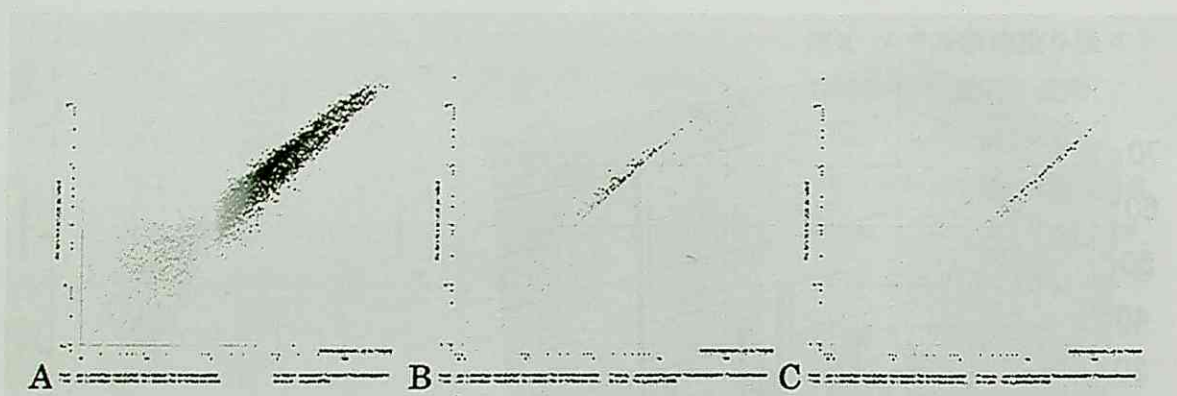


図7 メチル水銀投与後12時間後の遺伝子変動. Affymetrix Gene Chip Data 4. A: 全遺伝子のノーマライゼーション化後の解析図. B: 胎児サンプルでメチル水銀投与群で2倍以上の up-regulation を示した 155 遺伝子のイメージ. C: 同様に down-regulation を示した 132 遺伝子のイメージ.

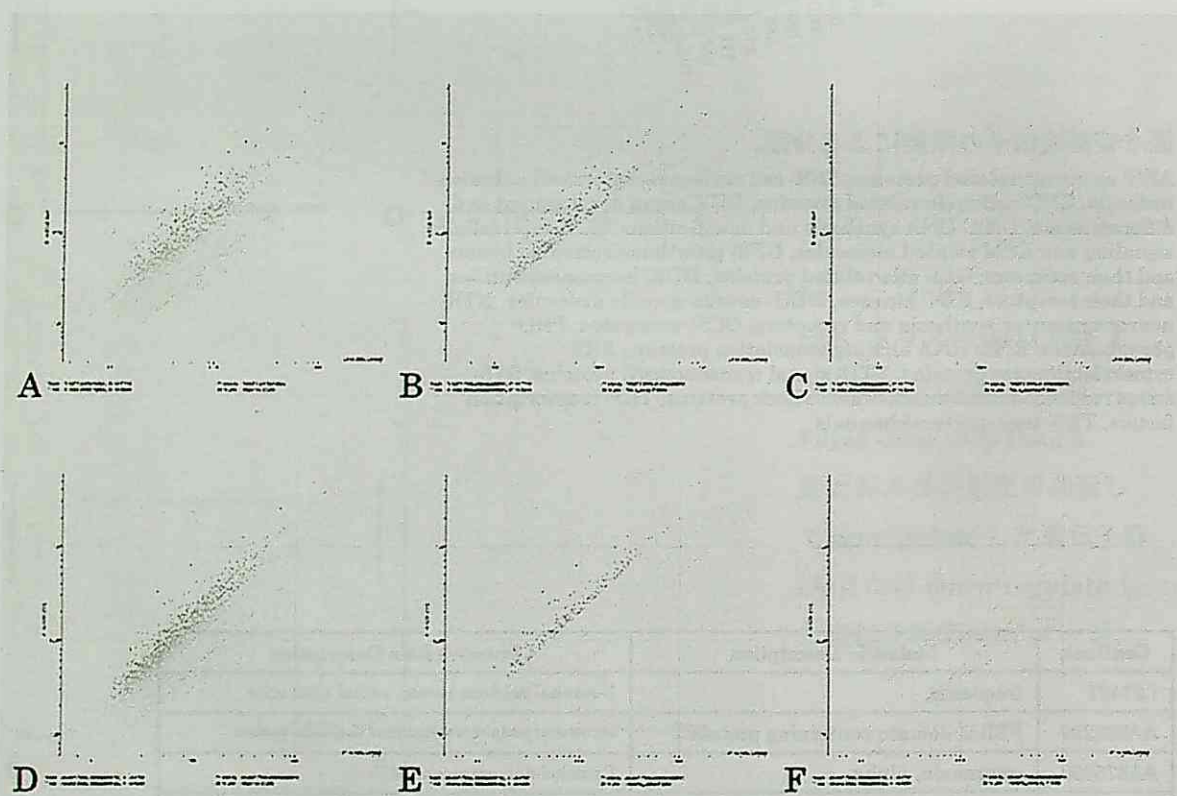


図8 メチル水銀投与後12時間後の遺伝子変動. Filgen Gene Chip Data 3.
A-C: 胎児サンプルの発現解析図. A: ノーマライゼーション化後の解析図. B: メチル水銀投与群で2倍以上の up-regulation を示した 491 遺伝子のイメージ. C: 同様に down-regulation を示した 395 遺伝子のイメージ. D-F: 新生児サンプルの発現解析図. D: ノーマライゼーション化後の解析図. E: メチル水銀投与群で2倍以上の up-regulation を示した 245 遺伝子のイメージ. F: 同様に down-regulation を示した 339 遺伝子のイメージ.

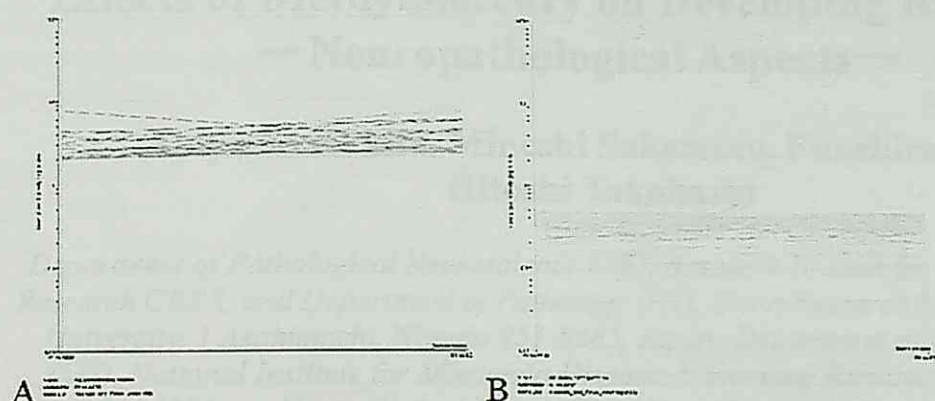


図9 メチル水銀投与後12時間後の遺伝子変動. Filgen Gene Chip Data 4.

メチル水銀投与後の胎児および新生児で共に2倍以上の up-regulation (A)を示した50遺伝子、あるいは down-regulation (B)を示した166遺伝子の解析図。

	Hg 投与 12 時間後の変動遺伝子数	Hg 投与 48 時間後の変動遺伝子数	共通遺伝子数
<Affymetrix Gene Chip>			
胎児 up-regulated	155	1388	2
胎児 down-regulated	132	895	1
<Filgen Gene Chip>			
胎児 up-regulated	491	309	48
胎児 down-regulated	395	326	11
新生児 up-regulated	245	561	41
新生児 down-regulated	339	621	11
胎児&新生児 up-regulated	50	160	0
胎児&新生児 down-regulated	166	231	1
<胎児データのプラットフォーム間比較>			
Affymetrix および Filgen 両者で up-regulated	6	43	0
Affymetrix のみ up-regulated	149	1345	2
Filgen のみ up-regulated	318	384	17
Affymetrix および Filgen 両者で down-regulated	6	15	0
Affymetrix のみ down-regulated	126	880	1
Filgen のみ down-regulated	306	476	14

表3 メチル水銀投与12時間後および48時間後における変動遺伝子数の比較。