

6-O) sulfotransferase 1) はすべての細胞で、CHST2 は凍結ヘパトサイトと HepG2 細胞で発現が増加していた。NR (nuclear receptor) 関連遺伝子 (Fig. 10B) については、CAR はどの細胞でもほとんど発現が変動していなかった。FXR と PXR はほぼすべての細胞、時間で発現の減少を示した。凍結ヘパトサイトと HepG2 細胞の 24 時間で共通して NR1D2、NR2E3、NR3 などの発現が増加していた。

サイトカイン関連遺伝子 (Fig. 11A) は非凍結ヘパトサイトと凍結ヘパトサイト間で共通して 6 時間で SCYA20 (Small inducible cytokine

subfamily A) が顕著に発現増加しており、TNFSF10 (tumor necrosis factor subfamily) と TNFSF11 は 6 時間と 24 時間で発現減少していた。その他に各細胞間で共通して変動した遺伝子はほとんど認められず、発現変動を示さなかった遺伝子が多かった。アポトーシス関連遺伝子 (Fig. 11B) では CASP (caspase) 遺伝子の動きが目立った。CASP1 と CASP10 はどの細胞でも 24 時間で発現減少を示したが、CASP7 と CASP9 は非凍結ヘパトサイトと凍結ヘパトサイトで発現減少を示した。CASP3、CASP6、CASP8 は大きな発現変動を示さなかった。

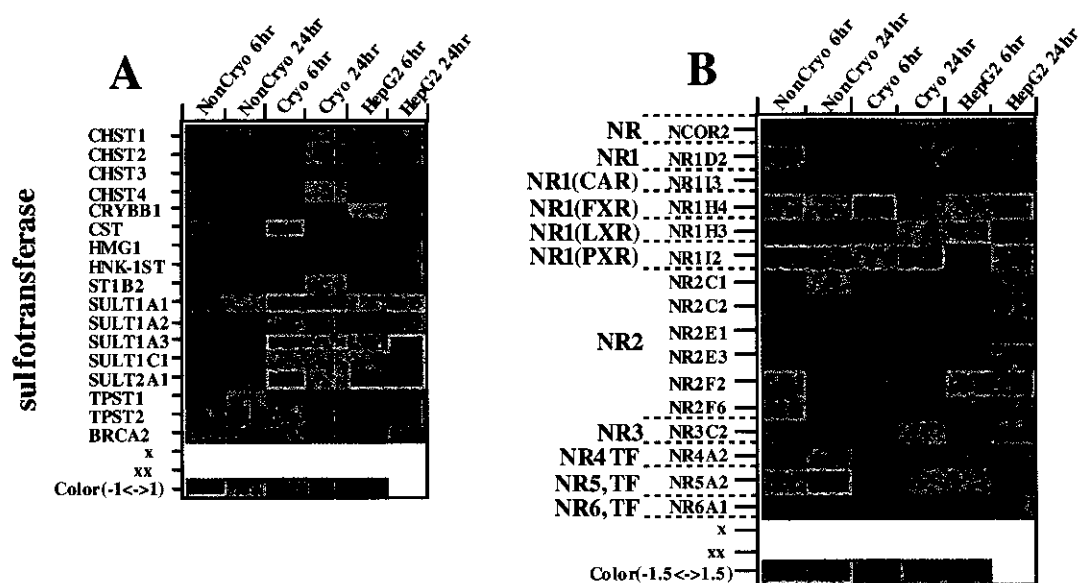


Fig. 10. Changes of expression level of sulfotransferase and nuclear receptor by APAP exposure.

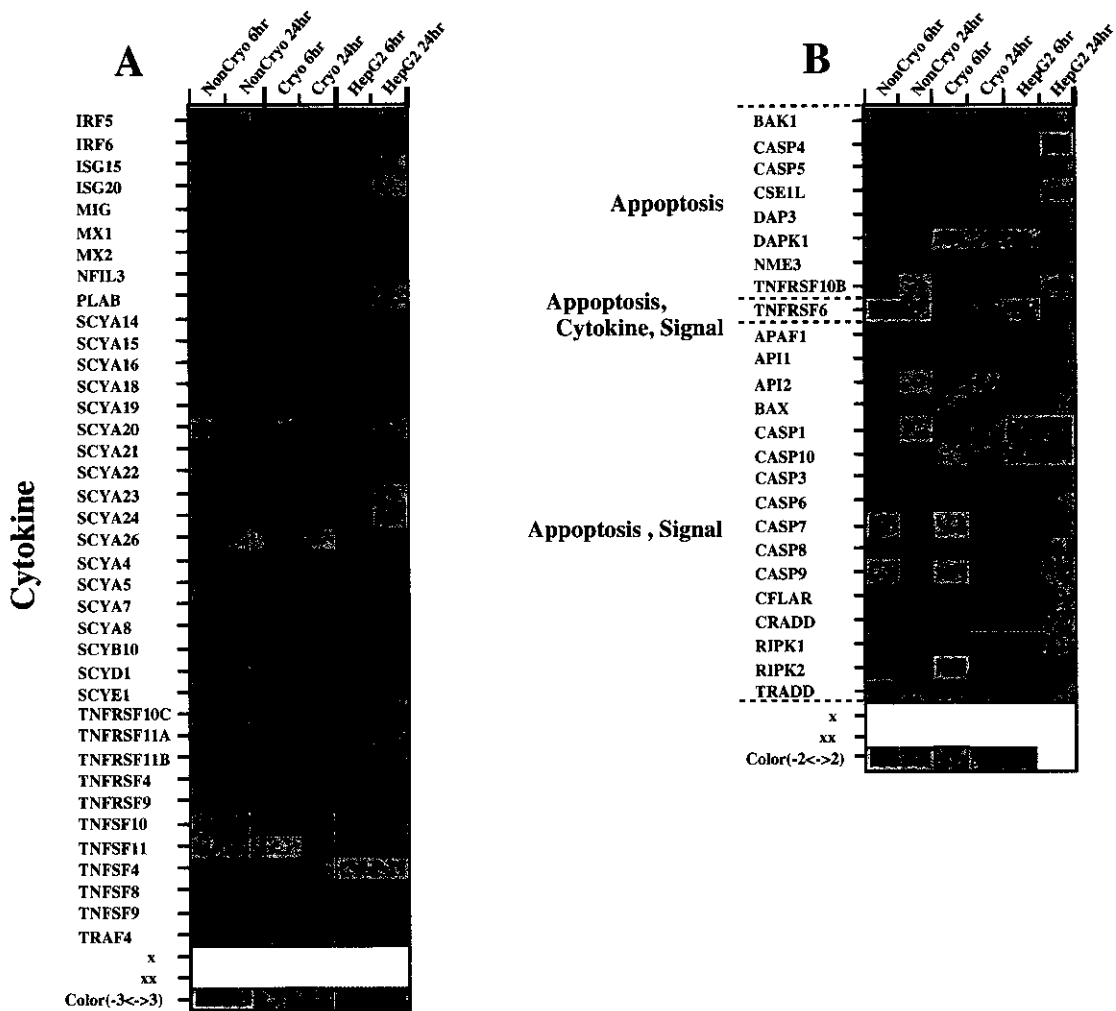


Fig. 11. Changes of expression level of cytokine and apoptosis by APAP exposure.

2-C-4. 凍結ヘパトサイトの同一ロット間での発現変動のバラツキ

凍結ヘパトサイトの同一ロットサンプルを用いて、DNA チップの測定バラツキについてn数を3として検討を行った。バラツキの度合いを示す平均 CV 値は APAP 曝露 6 時間で 25%、24 時間で 28%であった

(Fig. 12)。

2-C-5. Real-time PCR による遺伝子発現解析

DNA チップによる解析結果を裏付けるため、非凍結ヘパトサイトと凍結ヘパトサイトについて、DNA チップにより発現に変動が認められ

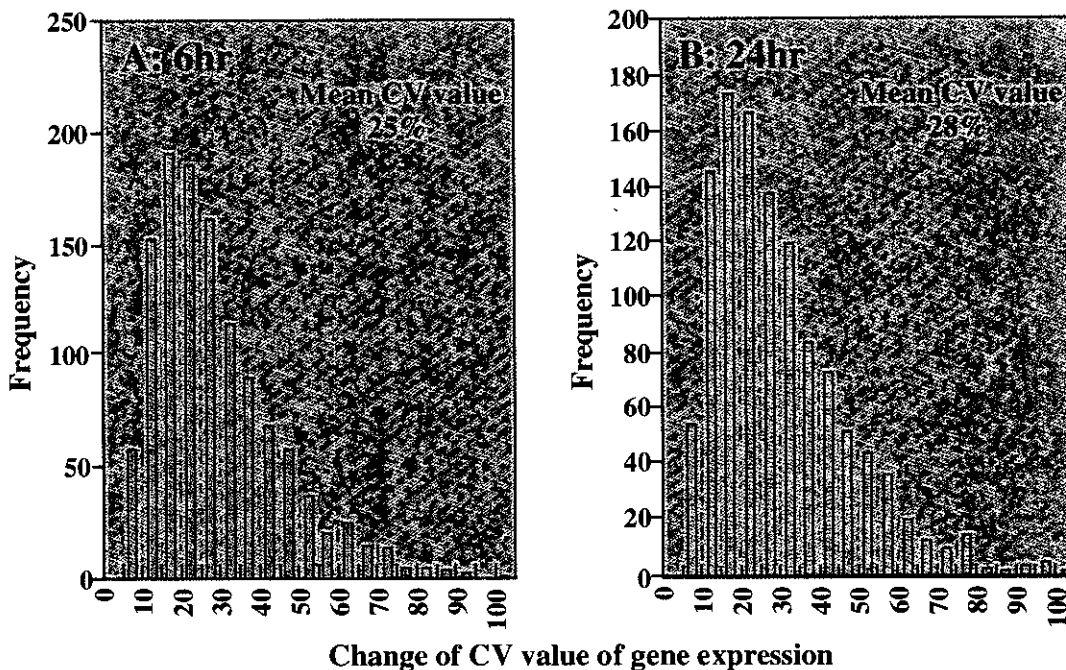


Fig. 12. Distribution of change of CV value of gene expression between three-time experiments using the same lot of cryopreserved hepatocytes.

The cryopreserved hepatocytes were exposed to 5 mM APAP for 6 hours (A) and 24 hours (B).

た遺伝子のうち薬物動態遺伝子 14 種類 (CYP1B1、CYP26A1、EPHX2、PIG3、CES、ALDH5、ALDH10、HNMT、GSTZ1、CHST2、SULT2A1、PTGS2、GSTA3、ABCF1) について real-time PCR により発現の変動を確認した (Fig. 13)。このうち、11 種類が DNA チップと再現性のある結果を示した。GSTA3 は検出できなかった。PTGS2 は DNA チップと real-time PCR で正反対の発現変動を示した (data not shown)。ABCF1 は real-time PCR でほとんど発現に変動が認められな

った (data not shown)。凍結ヘパトサイトの CYP1B1、非凍結ヘパトサイトの SULT2A1 の 24 時間では real-time PCR と DNA チップで共に顕著な発現増加を示したが増加レベルは real-time PCR の方が大きく、CYP1B1 では約 6 倍、SULT2A1 では約 9 倍の発現比を示した。EPHX2、PIG3、CES、ALDH5、CHST2 は各測定方法、時間で発現比が 2 倍以内を示した。

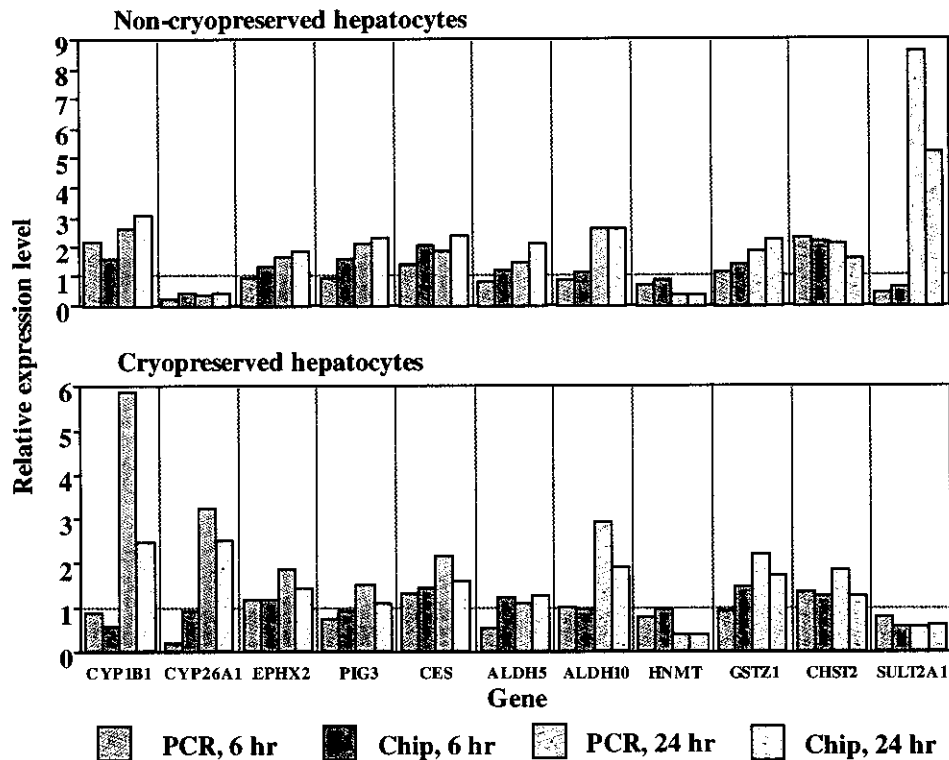


Fig. 13. Comparison of quantitation method for mRNA expression levels by real-time PCR and DNA chip.

Non-cryopreserved hepatocytes and cryopreserved hepatocytes were exposed to 5 mM APAP for 6 and 24 hours. relative quantitation is expressed as the ratio of the each gene/ $\beta$ -actin to that in control.

#### 2-C-6. APAP 曝露による遺伝子の発現変動に与える BSO の影響

非凍結ヘパトサイトにおいてグルタチオンの生成を減少させたときの影響について検討した。縦軸は各遺伝子名を示していないが、1258 個の遺伝子中の一部を、横軸はサンプルの種類と APAP の曝露時間を示す。BSO を前処置した対照群 24 時間の

サンプルは APAP を曝露していない。BSO 処置群のサンプルはすべて n = 1 での結果を示してある。図の赤い部分は APAP 曝露によって遺伝子の発現の増加を、緑の部分は発現の減少を、黒の部分は発現に変化がなかったことを示している。非凍結ヘパトサイトの BSO 未処置サンプルで発現減少を示した遺伝子が BSO 処

置した細胞では発現が変動しないか、あるいは発現が増加していた。(Fig. 14) BSO 処置の APAP 曝露 24 時間では BSO 未処置ヘパトサイトで認められたような遺伝子の発現減少がほとんど認められず、一部の遺伝子では BSO 処置したヘパトサイトでのみ発現増加を示していた。また、BSO 未処置サンプルにおいて有意な変動を示さなかった遺伝子は、BSO 処置サンプルにおいても大きな変動は認められなかった (data not shown)。

#### 2-C-7. 核内受容体遺伝子の発現変動に与える APAP 曝露の影響

薬物動態関係遺伝子の転写調節に関わる核内受容体遺伝子の発現変動に注目した (Fig. 19)。AHR は非凍結ヘパトサイトと凍結ヘパトサイトの APAP 曝露 6 時間で発現減少を示した。CAR はどの細胞、どの時間でも発現にほとんど変動が認められなかった。FXR はすべての細胞で発現の減少を示し、非凍結ヘパトサイトと凍結ヘパトサイトの 6 時間では特に強く減少した。LXR は非凍結ヘパトサイトではほとんど変動せず、凍結ヘパトサイトの 24 時間、HepG2 細胞の 6 時間で発現が減少した。PXR は非凍結ヘパトサイトと凍結ヘパトサイトで強い減少を示し

た。RXRs はどの細胞でも大きな変動が認められなかった。PPARs は PPAR  $\delta$  が非凍結ヘパトサイトと凍結ヘパトサイトのそれぞれ 24 時間でわずかに発現が増加した。PPAR  $\gamma$ s は 6 時間で発現が減少し、HepG2 細胞の 24 時間で強い発現減少を示した。PPAR  $\alpha$  は RXRs と同様にほとんど変動を示さなかった。

#### 2-D. 考察

ヒト肝細胞キメラマウスは、薬物動態試験のみならず、医薬品の安全性試験に新たな手法をもたらすと期待されている。本年度の研究では、キメラマウスの供給が充分ではなく、さらに、キメラマウスの基本的な評価研究を行ったために、安全性試験をキメラマウスで行うことが出来なかった。本年度は、キメラマウスのヘパトサイトを使用した場合を想定して、ヒトヘパトサイトを用いて網羅的な遺伝子発現解析の準備実験を行った。なお、ヒト DNA チップは、表 1 に示すように、薬物動態関連遺伝子を主体に搭載した「薬物反応性ヒト DNA チップ」を日立製作所で作成・使用した。

肝毒性を示す薬物として APAP を用いて、非凍結および凍結ヘパトサイトに暴露し、遺伝子の発現変動を検討した。ヒトにおける APAP の肝

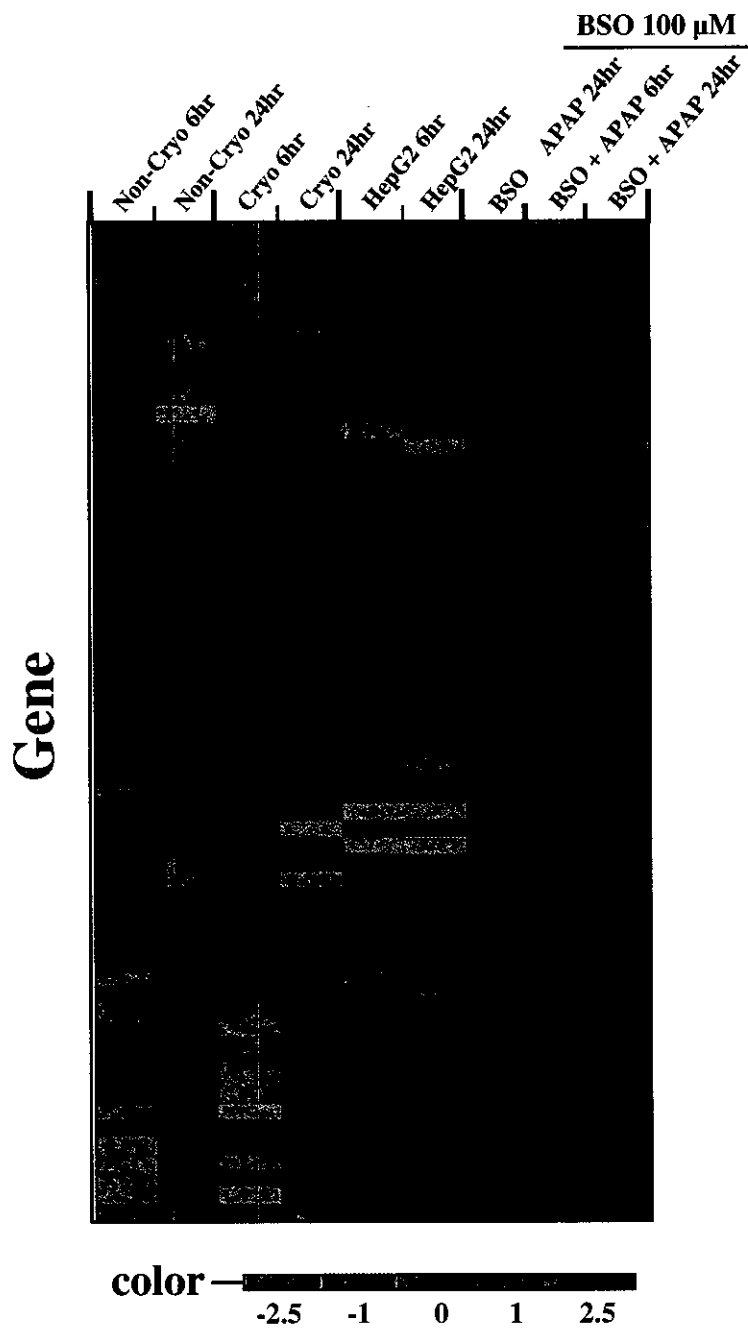


Fig. 14. Changes of gene expression profile by BSO-pretreatment in non-cryopreserved and cryopreserved hepatocytes and HepG2 cells.

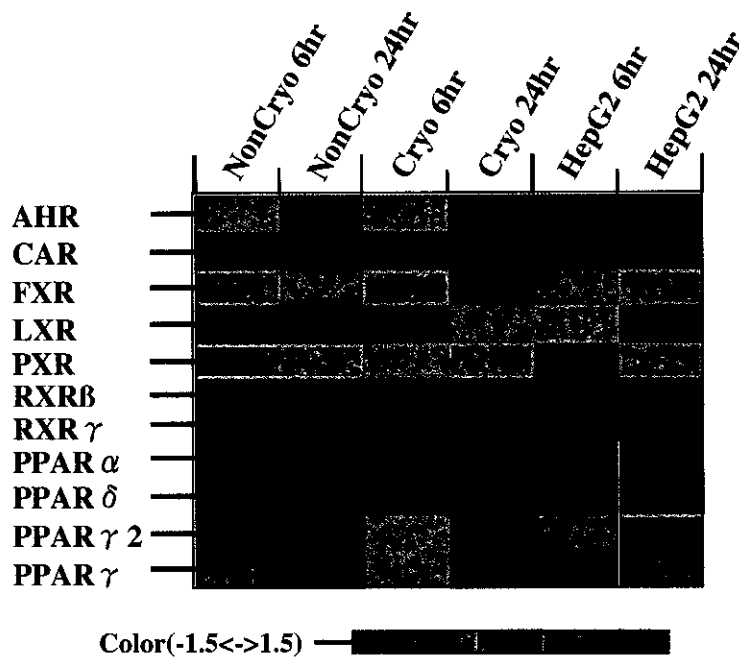


Fig. 15. Changes of expression level of transcription factors by APAP exposure in rat *in vivo* and *in vitro*.

障害についてはこれまで多数の報告がなされてきたが、毒性発生メカニズムの詳細な検討は未だなされていない。そこで、ヒトヘパトサイトを用いて、ヒト *in vitro* における APAP 毒性の遺伝子発現変化を解析した。DNA チップを用いることにより、遺伝子の顕著な発現変化が認められた。今回の実験では、少ない発現変化は非特異的である可能性を考慮し、他の論文で報告されているように、有意な発現変化を 2 倍以上の増減とした (Coller et al., 2000; Kaminski et al., 2000; Puga et al., 2000)。これま

で、マウス *in vivo* で 11,000 個以上の遺伝子を搭載した DNA チップを用いた APAP の研究で、APAP 曝露 6 時間で 226 個の遺伝子が有意に発現が増加したと 106 個の遺伝子が有意に発現が減少したことが報告されている (Reilly et al., 2001)。多くのストレス性のタンパクや c-fos、c-jun などの早期反応性の因子が変動しており、これらの遺伝子と APAP の毒性との関連について研究がなされている (Liu et al., 1999; Salminen et al., 1997; Blazka et al., 1996; Kitteringham et al., 2000)。本研究で

APAP 曝露により有意に発現が変動した遺伝子数の割合は、これまでの報告での割合とほぼ同じであった。発現の変動の大きさは過去の報告と比較すると小さかったが、*in vivo* と *in vitro* の差が関係していると考えられる。しかし、細胞周期、サイトカイン、アポトーシス、P450、成長因子、シグナル伝達など、いろいろなカテゴリーに属する遺伝子が発現変動しており、これらの中に APAP の肝障害発症に関与する遺伝子の存在が示唆された。

ヒト非凍結ヘパトサイトと凍結ヘパトサイトにおける発現変動を示す遺伝子は大部分が共通しており、両細胞に対する APAP 曝露の影響は類似していると考えられる。さらに非凍結ヘパトサイトと凍結ヘパトサイト間で、発現変動に有意な差が認められた遺伝子は、APAP 曝露 6 時間または 24 時間でそれぞれ 6 個と 4 個であった。6 時間ではサイトカイン関連遺伝子である IRF4 と TNFRSF11B が凍結ヘパトサイトで発現が減少していた。IRF4 は IL-12 の産生を調節することによって間接的に T ヘルパー細胞の分化に影響を与えることが報告されている (Lohoff et al., 2002)。しかし、他の IRFs (IRF1, IRF3, IRF5, IRF6) は非凍結ヘパトサイトと凍結ヘパトサ

イト間では差が見られなかった。凍結ヘパトサイトではサイトカインの発現が変動すると考えられる。IGFBP1 と RAB33A はそれぞれ成長因子とオンコジーンのカテゴリーに含まれる遺伝子であり、非凍結ヘパトサイトにおいて発現が減少していた。これらの遺伝子の発現変化も非凍結ヘパトサイトにおける APAP の毒性発現に対して何らかの影響を与えていることが示唆される。

HepG2 細胞を用いた APAP の毒性の検討について、APAP 20 mM を 24 時間まで曝露した時の遺伝子の発現変動について Gore ら (2000) により報告されている。1 時間から 24 時間までの 9 点のうち 3 点以上で 20 mM の APAP 曝露により発現が有意に増加した遺伝子の数は 5,000 個中 258 個であった。本章で検討した 5 mM の APAP 曝露の結果と比較すると非常に高い割合で遺伝子が発現している。これは、20 mM と 5 mM という濃度の差によると考えられる。また、大きく変動した個々の遺伝子についてみてみると、核内でアポトーシスのクロマチン凝縮の誘導体をコードする Acinus が発現増加したことを述べている。この遺伝子はアポトーシスを起こす caspase により活性化される蛋白をコードしている (Sahara et al., 1999)。また、ハムス



ターの細胞でアポトーシスを引き起こすと報告されている DAD1 (defender against cell death 1) は発現が減少した。トランスポーターに関係する遺伝子では SEC13 と SEC23 という遺伝子の発現が減少したことを示している。本章の実験では HepG2 細胞においてアポトーシス関連遺伝子では CSE1L (Chromosome segregation 1 (yeast homolog)-like) が、トランスポーター関連遺伝子は APAP 曝露 24 時間で ABCC5 が有意な発現の増加を示した。これまでヒト *in vitro* において DNA チップを用いた研究がほとんどなされていない。ゆえに、本章の結果と Gore らの結果を参考にして今後の検討に役立てていくことが期待される。

BSO はグルタチオン生合成の阻害剤であり、HepG2 細胞に 100  $\mu$ M で 3 日間前処置することで APAP 曝露 (10 mM) により LDH 漏出率が増加し、MTT 測定による細胞の生存率が減少する (Yoshitomi et al., 2001)。BSO 処置により細胞内の GSH が減少し、APAP の Hecp 細胞に対する細胞毒性が有意に増加したことが報告されている。また、HepG2 細胞に BSO を処置することで細胞内の GSH が約 90%減少することも報告されている (Dai and Cederbaum, 1995)。本章の実験では、BSO を非

凍結ヘパトサイトに前処置した場合の対照群 (APAP 未曝露) における遺伝子の発現変動はほとんど認められなかった。APAP を 6 時間または 24 時間曝露しても遺伝子の発現変動は対照群と類似していた。しかし、BSO 未処置のヘパトサイトとは発現が大きく異なっており、BSO を処置して細胞内の GSH 含量を減少させることを通じてヘパトサイトに対する APAP の影響が大きく変化したことが示唆される。

核内受容体である CAR に注目すると、ラットにおける APAP 曝露による CAR の発現変動は、ラット *in vivo* ではほとんど認められず、*in vitro* では顕著に発現増加した。ヒト *in vitro* においてはラット *in vivo* と同様に発現変動はほとんど認められなかった。このことから、ヒトとラットでは APAP を曝露した際に CAR の発現変動が大きく異なることが示された。しかしこれは、ヒトヘパトサイトとラットの *in vivo*、スライスの違いによる差が現れている可能性がある。CAR の mRNA 発現は変化しないが、CAR 蛋白の発現や局在性に影響を与えている可能性もある。別の核内受容体である PXR は非凍結ヘパトサイトと凍結ヘパトサイトにおいて顕著に発現が減少した。PXR は CYP3A4 の発現を調節して

いることで知られている重要な因子であり、APAP 曝露により PXR の発現が減少したことによって CYP3A4 の発現も減少し、NAPQI の代謝生成を減少させて毒性を減らすメカニズムとして働くことが考えられる。APAP の肝障害発症時に CAR が毒性発現のマーカーとして適用出来るか否かはヒトにおいてはまだ不明であり、今後の更なる検討が必要である。

#### E. 結論

ヒト肝細胞キメラマウスのヘパトサイトについて薬物動態関連遺伝子を中心に肝 mRNA の発現解析を行い、ドナーの肝 mRNA と比較した。その結果キメラマウス肝は、ドナー肝よりも全体的に mRNA の発現が少し低いものの、ヒト肝として充分い機能している可能性が示された。さらに、ヒト肝の代表的な薬物代謝酵素である CYP1A1、CYP1A2 および CYP3A4 の誘導を認めたことより、キメラのヘパトサイトは、ヒトヘパトサイトとして十分に使用できる可能性が示された。今後さらに様々な誘導剤について検討し、キメラマウスにおけるヒト特異的酵素の機能の評価について更なる検討が必要である。

ヒト肝細胞キメラマウスは医薬品 6.

の安全性試験への利用も期待されている。本年度は十分なマウスを確保できなかったために、その予備検討として、凍結および非凍結のヒトヘパトサイトを用いて、薬物動態関連遺伝子を主体とした網羅的な遺伝子発現解析を行った。肝毒性薬として APAP を用いた。この研究の結果、核内受容体とその関連遺伝子の動きが毒性に影響している可能性が示されたと共に、キメラマウスのヘパトサイトを用いた研究の準備も完了した。

F. 健康危険情報：なし

#### G. 研究発表

論文発表：なし

学会発表： ヒト肝細胞を有するキメラマウス由来の初代肝細胞培養系を用いた酵素誘導実験；日本薬学会第 123 年会、平成 15 年 3 月 27-29 日、長崎

DNA チップを用いたヒトヘパトサイトにおけるアセトアミノフェンの影響の解析；第 17 回日本薬物動態学会年会、平成 14 年 11 月 20～22 日、東京

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

その他：なし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進事業）  
分担研究報告書

ヒト肝細胞キメラマウスにおける薬物動態関連項目の  
タンパク質、酵素活性レベルの測定に関する研究

分担研究者 中島 美紀 金沢大学薬学部 助教授

研究要旨

医薬品の開発において、ヒト初代肝細胞を用いた薬物動態および安全性試験が行われてきたが、現在、我が国ではヒト初代肝細胞は全て輸入に頼っている。広島県地域結集型共同研究事業（研究統括：広島大学大学院理学研究科 吉里勝利教授）で開発されたヒト肝細胞キメラマウスは、マウスの肝の 80%以上がヒト肝細胞と置き換わり、ヒトと同一の肝細胞を多量に得ることができるため、ヒトにおける薬物動態および安全性を予測できる医薬品開発に有用なシステムになり得ると予想される。そこで、ヒト肝細胞キメラマウスの有用性について、薬物代謝酵素 CYP に関してタンパク発現レベル、酵素活性レベルにおける評価試験を行った。タンパク発現レベルでは、ウエスタンブロット分析を用いて、CYP の主要な分子種である CYP1A2、CYP2C8、CYP2C9、CYP2D6、CYP3A4 についてマウスには交差反応を示さず、ヒト特異的に検出する方法を確立した。また、酵素活性レベルでは CYP2C9 が触媒するジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性と CYP2A6 が触媒するクマリン 7-水酸化酵素活性の測定が評価試験として有用であることを明らかにした。現在、さらに多くの分子種についての評価試験を検討している。また、酵素誘導の予備検討として、CYP3A4 の誘導剤であるリファンピシンを投与したヒト肝細胞キメラマウスでヒト CYP3A4 の誘導がタンパク発現レベルで認められた。従って、このヒト肝細胞キメラマウスは、ヒトの誘導能を有する可能性が示唆された。今後、さらに様々な誘導剤について検討し、キメラマウスの有用性について評価する予定である。

## A. 研究目的

医薬品開発における薬物動態および安全性の予測試験には、ヒト由来組織とりわけヒト肝試料が必要である。我が国では現在、多量のヒト肝を欧米からの輸入に頼っている。本研究では、独自に吉里勝利教授（分担研究者）によって開発された『ヒト肝細胞キメラマウス』を用いて、ヒトにおける薬物動態および安全性を予測するシステムを樹立することを目的とする。『ヒト肝細胞キメラマウス』は、特殊な免疫不全マウスにヒト肝細胞を注入し、ヒト肝細胞を特異的に増殖させる画期的なシステムであり、マウス肝の約80%以上がヒト肝に置き替わり、ドナーの肝細胞と全く同じ肝細胞を多量に作製することが可能である。

このヒト肝細胞キメラマウスの適用により、(1) 同一のドナー由来のヒト肝細胞を無制限に増やして得ることが出来るため、肝細胞の極めて有効な利用が可能になる。(2) 多種類の肝細胞のパネル化が容易になり、複数の研究機関におけるデータの比較検討が容易になる。(3) パネル化された肝細胞により、遺伝子多型と表現多型（特

に誘導能）の対応付けが可能になる。(4) 実験動物の使用を減らすことができる。(5) 医薬品開発のコストを削減できる。(6) 入手が困難な日本人由来の肝細胞を多量に得ることが可能になる。(7) 人種差の検討が極めて容易になる。(8) 我が国発信の技術である。

(9) 毒性発現の予測研究が飛躍的に進展するなど、この画期的なキメラマウスの使用により、我が国の医薬品開発に大きな利益をもたらすものと期待される。

そこで本研究において、ヒト肝細胞キメラマウス由来肝細胞の評価試験を行う。また、薬物代謝酵素の誘導剤をキメラマウスに投与し、酵素誘導能について精査する。ヒト肝細胞キメラマウスは100%ヒト肝細胞を有する訳ではないため、マウス由来の酵素も誘導される可能性がある。よって、どの程度ヒト特異的な酵素が誘導を受けるか代表的な誘導剤を投与し定量を行う。本年度は薬物代謝酵素 CYP について mRNA レベル、タンパクレベル、酵素活性レベルで検討し、評価試験の確立を目指して実験を行った。また、誘導剤を投与することにより、タンパクレベルおよび酵素活性レベルでの定量に

ついて予備的な実験を行った。

## B. 研究方法

### 1. 評価試験の検討

#### 【タンパクレベル】

マウスに交差反応することなくヒト CYP を特異的に検出できる評価系について、ウエスタンブロット分析を用いて検討を行なった。

ヒト肝ミクロソームとして Gentest 社から市販されているプールドヒト肝ミクロソーム (lot.8 もしくは 21) を、マウス肝ミクロソームとしては系統差も考慮するために、AhR(+/-) マウスおよび Cyp1a2/1b1(+/-)マウスのそれぞれのプールド肝ミクロソームを用いた。

タンパク濃度が 1 mg/mL もしくは 2 mg/mL となるようにミクロソームを滅菌精製水で希釈したものを 10  $\mu$ L に対して、サンプル処理液 (SDS 6 g、2 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 6.8) 20 mL、ピロニン Y 6 mg、グリセロール 60 mL に超純水を加え、全量を 192 mL とした溶液) と 2-メルカプトエタノールを 32 : 5 の割合で混合した溶液を 10  $\mu$ L 加えた後、100°C で 3 分間煮沸し、SDS-PAGE を行った。濃縮ゲルではゲル 1 枚あたり 15 mA で約 20 分間、分離ゲルでは 1 枚当たり 30 mM で約 60 分泳動を行った。終了後、Immobilon 膜に電氣的に 10 V、30 分間転写した。

その際、濾紙、アクリルアミドゲル、Immobilon 膜は転写バッファー (Tris 3.03 g、グリシン 14.4 g、メタノール 200 mL に超純水を加え 1000 mL にメスアップした溶液) を浸して使用した。転写後、Immobilon 膜を 3% スキムミルク-0.1% Tween 20-PBS 溶液に浸して約 18 時間ブロッキングを行った。なお、標品として市販のバキュロウイルス発現系 CYP を用いた。1 次抗体としてヒト CYP1A2 に対するマウスモノクローナル抗体 (PBS で 500 倍希釈)、ウサギ抗ヒト CYP1A2 抗体 (PBS で 5,000 倍希釈)、ヒト CYP2A6 に対するマウスモノクローナル抗体 (PBS で 500 倍希釈)、ウサギ抗ヒト CYP2C8 (PBS で 5,000 倍希釈)、ウサギ抗ヒト CYP2C9 (PBS で 500 倍希釈)、ウサギ抗ヒト CYP2C19 (PBS で 300 倍希釈)、ヒト CYP2D6 に対するマウスモノクローナル抗体 (PBS で 500 倍希釈)、ヒト CYP2E1 に対するマウスモノクローナル抗体 (PBS で 500 倍希釈) およびウサギ抗ヒト CYP3A4 (PBS で 500 倍希釈) を検討した。2 次抗体としてビオチン化抗ウサギ IgG 抗体 (PBS で 2,000 倍希釈)、3 次抗体としてペルオキシダーゼ標識アビジンビオチン複合体 (PBS で 2,000 倍希釈) を用いた。1 次、2 次、3 次抗体はともに室温

で 60 分間反応させた。ブロッキング後および 1 次、2 次抗体反応後は PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄し、3 次抗体反応後は PBS で 10 分間ずつ 3 回洗浄し、非特異的に結合した抗体を除いた。発色は 0.06% ジアミノベンチジン溶液で行った。

#### 【酵素活性レベル】

主要なヒト CYP 分子種が触媒する反応について、マウスに交差反応することなくヒト CYP で特異的に触媒されるかを確認するために HPLC や蛍光光度計を用いて検討を行なった。ヒト肝ミクロソームとして Gentest 社から市販されているプールドヒト肝ミクロソーム (lot.20 もしくは 21) を、マウス肝ミクロソームとして系統差も考慮するために、雄性 AhR(+)+マウスおよび雄性 Cyp1a2/1b1(+)+マウスのそれぞれプールド肝ミクロソームを用いた。

#### ・ 7-エトキシレゾルフィン *O*-脱エチル化酵素活性 (CYP1A2)

最終濃度が 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4)、0.2 mg/mL ミクロソームタンパク、0.2  $\mu$ M 7-エトキシレゾルフィンとなるように精製水を加えて全量を 180  $\mu$ L とした。37°C で 2 分間プレインキュベーションした後、NADPH 生成系 (0.5 mM NADP<sup>+</sup>、5 mM glucose-6-phosphate、5 mM MgCl<sub>2</sub>、1 U/mL glucose-6-

phosphate dehydrogenase) を 20  $\mu$ L 添加することにより反応を開始した。37°C で 5 分間インキュベーションした後、氷冷したメタノールを 100  $\mu$ L 添加することにより反応を停止した。次いで、6,000 g で 5 分間遠心分離を行い、上清 20  $\mu$ L を HPLC に注入して分析した。HPLC による分析には PU-980 ポンプ (Jusco)、AS-950-10 オートサンプラー (Jusco)、C-R4X インテグレーター (島津)、CO-965 カラムオープン (Jusco)、FP920II 蛍光検出器 (Jusco) を用いて溶離液の蛍光強度を Ex: 574 nm、Ex: 596 nm で測定した。カラムは Mightysil RP-18 (関東化学、4.6 mm x 150 mm) を用い、移動相は 35%メタノール、20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) とした。流速は 1 mL/min、カラム温度は 35°C とした。

#### ・ フェナセチン *O*-脱エチル化酵素活性 (CYP1A2)

最終濃度が 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4)、0.1 mM EDTA、0.2 mg/mL ミクロソームタンパク、20  $\mu$ M フェナセチンとなるように精製水を加えて全量を 180  $\mu$ L とした。37°C で 1 分間プレインキュベーションした後、NADPH 生成系を 20  $\mu$ L 添加することにより反応を開始した。37°C で 30 分間インキュベーションした後、氷冷したアセトニトリルを 100

μL 添加することにより反応を停止し、次いで、内部標準物質として 10 ng/μL カフェインを 10 μL 添加して攪拌した。6,000 g で 5 分間遠心分離を行い、上清 50 μL を HPLC に注入した。

HPLC 装置は、L-6200 ポンプ（日立）、851-AS オートサンプラー（Jusco）、CTO-6A カラムオーブン（島津）、L-4000 UV 検出器（日立）、D-2000 インテグレーター（日立）を用いた。カラムは Mightysil RP-18 (4.6 mm x 150 mm) を用い、移動相は 10%アセトニトリル、50 mM リン酸二水素カリウムとした。流速は 1.0 mL/min、カラム温度は 35°C とし、溶離液を 245 nm でモニターした。

・クマリン7-水酸化酵素活性 (CYP2A6)

最終濃度が 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4)、0.05 mg/mL ミクロソームタンパク、10 μM クマリンとなるように精製水を加えて全量を 180 μL とした。37°C で 1 分間プレインキュベートした後、NADPH 生成系を 20 μL 添加することにより反応を開始した。37°C で 10 分間インキュベートした後、氷冷した 60% 過塩素酸を 20 μL 添加することにより反応を停止した。次いで 6,000 g で 5 分間遠心分離し、上清 50 μL を

HPLC に注入した。

HPLC 装置は L-6000 ポンプ（日立）、AS-8010 オートサンプラー（東ソー）、807-IT (Jusco)、865-CO カラムオーブン (Jusco)、F-1080 蛍光検出器（日立）を用いて溶離液の蛍光強度を Ex : 338 nm、Ex : 458 nm で測定した。カラムは Shiseido Capcellpak C18 (資生堂、4.6 mm x 150 mm) を用い、移動相は 30%アセトニトリル、20 mM 過塩素酸ナトリウムとした。流速は 1 mL/min、カラム温度は 35°C とした。

・ベンジルオキシレゾルフィン O-脱アルキル化酵素活性 (CYP2B6)

最終濃度が 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4)、0.2 mg/mL ミクロソームタンパク、0.2 μM ベンジルオキシレゾルフィンとなるように精製水を加えて全量を 180 μL とした。37°C で 2 分間プレインキュベートした後、NADPH 生成系を 20 μL 添加することにより反応を開始した。37°C で 15 分間インキュベートした後、氷冷したメタノールを 100 μL 添加することにより反応を停止した。次いで、6,000 g で 5 分間遠心分離を行い、上清 20 μL を HPLC に注入して分析した。HPLC による分析には PU-980 ポンプ、AS-950-10 オートサンプラー、C-R4X インテグレーター、CO-965 カラム



オープン、FP920II 蛍光検出器を用いて溶離液の蛍光強度を Ex:574 nm、Ex:596 nm で測定した。カラムは Mightysil RP-18 (4.6 mm x 150 mm) を用い、移動相は 35%メタノール、20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) とした。流速は 1 mL/min、カラム温度は 35°C とした。

・ジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性 (CYP2C9)

最終濃度が 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4)、0.2 mg/mL ミクロソームタンパク、30  $\mu$ M ジクロフェナクとなるように精製水を加えて全量を 180  $\mu$ L とした。37°C で 2 分間プレインキュベートした後、NADPH 生成系を添加することにより反応を開始した。37°C で 30 分間インキュベートした後、氷冷したアセトニトリルを 200  $\mu$ L 添加することにより反応を停止した。次いで、内部標準物質として 0.5 M のクロルゾキサゾン を 5  $\mu$ L 添加し攪拌後、6,000 g で 5 分間遠心分離した。上清 50  $\mu$ L を HPLC に注入して分析した。

HPLC 装置は L-7100 ポンプ (日立)、L-7200 オートサンプラー (日立)、D-2000 インテグレーター (日立)、CTO 6A カラムオープン (島津)、L-7405 UV 検出器 (日立) を用いて溶離液を 278 nm でモニター

した。カラムは Mightysil RP-18 (4.6 mm x 150 mm) を用い、移動相はアセトニトリル:50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) = 25:75 (v/v) とした。流速は 1 mL/min、カラム温度は 35°C とした。

・S-メフェニトイン 4-水酸化酵素活性 (CYP2C19)

最終濃度が 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4)、0.2 mg/mL ミクロソームタンパク、50  $\mu$ M S-メフェニトインとなるように精製水を加えて全量を 180  $\mu$ L とした。37°C で 2 分間プレインキュベートした後、NADPH 生成系を 20  $\mu$ L 添加することにより反応を開始した。37°C で 30 分間インキュベートした後、氷冷したアセトニトリルを 100  $\mu$ L 添加することにより反応を停止した。次いで、内部標準物質として 5 ng/ $\mu$ L フェノバルビタールを 10  $\mu$ L 添加して攪拌した。6,000 g で 5 分間遠心分離を行い、上清 50  $\mu$ L を HPLC に注入した。

HPLC 装置は、L-6200 ポンプ、851-AS オートサンプラー、CTO-6A カラムオープン、L-4000 UV 検出器、D-2000 インテグレーターを用いた。カラムは Mightysil RP-18 (4.6 mm x 150 mm) を用い、移動相は 20%アセトニトリル、50 mM リン酸二水素カリウムとした。流速は 1.0

mL/min、カラム温度は 35°C とし、溶離液を 220 nm でモニターした。

・デブリソキン 4-水酸化酵素活性 (CYP2D6)

最終濃度が 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4)、0.2 mg/mL ミクロソームタンパク、100 μM デブリソキンとなるように精製水を加えて全量を 180 μL とした。37°C で 2 分間プレインキュベートした後、NADPH 生成系を 20 μL 添加することにより反応を開始した。37°C で 10 分間インキュベートした後、氷冷した 60%過塩素酸を 20 μL 添加することにより反応を停止した。次いで 6,000 g で 5 分間遠心分離し、上清 100 μL を HPLC に注入した。

HPLC 装置は L-6000 ポンプ、AS-8010 オートサンプラー、807-IT、865-CO カラムオープン、F-1080 蛍光検出器を用いて溶離液の蛍光強度を Ex : 219 nm、Ex : 286 nm で測定した。カラムは Shiseido Capcellpak C18 (4.6 mm x 150 mm) を用い、移動相は 12%アセトニトリル、20 mM 過塩素酸ナトリウム (pH 3.0) とした。流速は 1 mL/min、カラム温度は 35°C とした。

・クロルゾキサゾン 7-水酸化酵素活性 (CYP2E1)

最終濃度が 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4)、0.2 mg/mL ミク

ロソームタンパク、50 μM クロルゾキサゾンとなるように精製水を加えて全量を 180 μL とした。37°C で 2 分間プレインキュベートした後、NADPH 生成系を 20 μL 添加することにより反応を開始した。37°C で 30 分間インキュベートした後、氷冷したアセトニトリルを 100 μL 添加することにより反応を停止し、次いで、内部標準物質として 10 ng/μL 7-水酸化クマリンを 5 μL 添加して攪拌した。6,000 g で 5 分間遠心分離を行い、上清 50 μL を HPLC に注入した。

HPLC 装置は、L-6200 ポンプ、851-AS オートサンプラー、CTO-6A カラムオープン、L-4000 UV 検出器、D-2000 インテグレーターを用いた。カラムは Mightysil RP-18 (4.6 mm x 150 mm) を用い、移動相は 20%アセトニトリル、50 mM リン酸二水素カリウムとした。流速は 1.0 mL/min、カラム温度は 35°C とし、溶離液を 295 nm でモニターした。

・テストステロン 6β-水酸化酵素活性 (CYP3A4)

最終濃度が 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4)、0.2 mg/mL ミクロソームタンパク、50 μM テストステロンとなるように精製水を加えて全量を 180 μL とした。37°C で 2 分間プレインキュベートした後、

NADPH 生成系を 20  $\mu$ L 添加することにより反応を開始した。37°C で 5 分間インキュベートした後、氷冷したメタノールを 100  $\mu$ L 添加することにより反応を停止し、次いで、内部標準物質として 10 ng/ $\mu$ L 11 $\beta$ -水酸化テストステロンを 5  $\mu$ L、3 M NaCl を 25  $\mu$ L、ジクロロメタンを 1.5 mL 添加し、1 分間激しく攪拌した。700 g で 10 分間遠心分離し、ジクロロメタン層 1.5 mL を別の試験管に移し、窒素気流下乾固させた。残渣を 200  $\mu$ L の移動相に溶解させ、そのうち 100  $\mu$ L を HPLC に注入した。

HPLC 装置は、L-6200 ポンプ、851-AS オートサンプラー、CTO-6A カラムオープン、L-4000 UV 検出器、D-2000 インテグレーターを用いた。カラムは Mightysil RP-18 (4.6 mm x 150 mm) を用い、移動相は 45%メタノールとした。流速は 1.0 mL/min、カラム温度は 35°C とし、溶離液を 240 nm でモニターした。

## 2. 誘導剤投与によるタンパクおよび酵素活性の変動-予備検討-

### 【薬物投与】

ヒト肝細胞キメラマウス、uPA(+/-)SCID マウス、uPA(-/-)SCID マウスにコーン油に溶解したリファンピシンを 50 mg/kg で連続して 4 日間腹腔内投与した。全て雄性のマ

ウスを用いた。リファンピシン投与マウスにはフサンも投与した。コントロールとしてヒト肝細胞キメラマウス、uPA(+/-)SCID マウス、uPA(-/-)SCID マウスに 4 日間フサンのみを腹腔内投与した群、また、uPA(+/-)SCID マウスと uPA(-/-)SCID マウスは薬物未処置群も検討した。本研究で用いたヒト肝細胞キメラマウス作製に際し、移植に使用したヒトヘパトサイトは同一ドナー由来のものを用いた。uPA(+/-)SCID マウスおよび uPA(-/-)SCID マウスは各群 3 例以上とした。

### 【ミクロソーム調製】

最終投与から約 24 時間後に肝臓を摘出した。1.15%塩化カリウム溶液で肝臓を洗浄後、肝重量を測定し、約 0.5 g を採取した。採取した肝臓に 3 倍量のホモジナイズ用緩衝液 (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M KCl, 1mM EDTA; pH 7.4) を加え、テフロン potter 型ホモジナイザーで 3 ストローク処理し、9,000 g、4°C で 15 分間遠心分離した。得られた上清を 105,000 g、4°C で 90 分間遠心分離した。得られた沈殿に肝重量の 3 倍量のホモジナイズ用緩衝液を加え、テフロン potter 型ホモジナホモジナイザホモジナイザーで 1 ストローク処理し、105,000 g、4°C で 60 分間遠心分離した。沈殿に 1 倍

量の TGE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, 20% Glycerol, 1 mM EDTA; pH 7.4) を加えて、テフロン potter 型ホモジナイザーで 1 ストローク処理した。タンパク定量は Bio-Rad Protein assay kit を用いて測定した。

#### 【ウエスタンブロット分析による CYP3A4 タンパク量の定量】

方法は項目 1. 評価試験の検討に準じた。ただし、タンパクは 5 µg アプライとし、1 次抗体のウサギ抗ヒト CYP3A4 は PBS で 1,000 倍希釈した。バキュロウイルス発現系 CYP3A4 を標準品として用いた。代表的なヒト肝ミクロソームにおける CYP3A4 含有量として、Gentest 社製のプールドヒト肝ミクロソーム (lot.21) を用いた。また、ヒト肝細胞キメラマウス作製時に使用したヒト肝ヘパトサイトのドナーの肝ミクロソームについてもあわせて検討した。発色後の膜を流水で十分に洗浄し、Bio-Rad GS-700 デンシトメーターにて定量した。

#### 【ジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性】

方法は項目 1. 評価試験の検討に準じた。代表的なヒト肝ミクロソームにおけるジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性値として、Gentest 社製のプールドヒト肝ミクロソーム (lot.20) を用いた。また、ドナー

の肝ミクロソームについてもあわせて検討した。なお、uPA(+/-)SCID マウスおよび uPA(-/-)SCID マウスについては、各群 3 例以上としているため、解析時には各群における平均値を用いた。

#### 【クマリン 7-水酸化酵素活性】

方法は項目 1. 評価試験の検討に準じた。ただし、タンパク濃度は 0.01 mg/mL とした。代表的なヒト肝ミクロソームにおけるクマリン 7-水酸化酵素活性値として、Gentest 社製のプールドヒト肝ミクロソーム (lot.21) を用いた。また、ドナーの肝ミクロソームについてもあわせて検討した。なお、uPA(+/-)SCID マウスおよび uPA(-/-)SCID マウスについては、各群 3 例以上としているため、ジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性同様、解析時には各群における平均値を用いた。

#### 【倫理】

キメラマウス作成に用いたヒト肝細胞の使用については、広島大学倫理委員会の承諾「課題名；手術等で摘出されたヒト組織から分離したヒト肝細胞を用いた薬物代謝研究（遺伝子解析を含む）」（平成 14 年 6 月 10 日承認）にもとづいている。さらに、金沢大学の医学部等医の倫理委員会において（課題名；ヒト肝細胞キメラマウスを用いた医薬品の動