

はこれら両タンパクが完成し、それぞれがお互いに結合することが確かめられた。この中でも、放射性 [35 S] methionine-cysteine によってラベルした β -2-microglobulin が得られるようになったことは今後の進展に非常に有利なツールを得たといえる。タンパク質の挙動を見る際に、標識を行うことが多いが、放射性アミノ酸による *in situ* ラベルは、タンパク質本来のコンホメーションを損なうことがなく、より自然に近い動きを見ることができるからである。特に、 β -2-microglobulin のような比較的小さなタンパク分子では、異物標識の影響は大きいので、このように *in situ* 標識が可能な実験系を確立できた意義は大きい。このアフィニティー系の応用としては、機能膜あるいは機能 vesicle の他、再生医療方面にも発展性がある。

以上、平成 16 年度の主な成果を述べたが、以上の他、リポソームの微細構造観察の為の電子顕微鏡による検討では、三枝分担者が昨年度確立した血液内封入法に代わるものとして、肺胞のサーファクタントの観察に用いられてきたタンニン酸固定法の検討を行っている。また、薬物代謝酵素の活性発現における微細環境の検討では、薬物代謝の機能発現にかかる環境について簡便に検討できる系の構築を大政分担者が行った。これは薬物代謝第 I 相反応（酸素添加反応）の条件最適化を簡便に行うために、薬物代謝誘導と薬物代謝の両方を同時に評価できる肝由来細胞株を構築し、様々な薬物による誘導を蛍光を用いて評価し、かつ同時に薬物代謝反応を代謝によって評価可能なシステムである。

E. 結 論

ナノメータースケールの機能性タンパク分子を組み込み、従来の工学的人工透析では成し得ない選択的能動輸送による毒性物質の除去膜の開発を目的とし、本プロジェクトで確立したトランスポーター (MDR1) による ATP 依存性基質輸送に ATP 再生系であるポリリン酸-ポリリン酸キナーゼ系を組み合わせた反応系を検討した。

昨年度まで ATP は系外からの供給を考えていたが、より自律的な機能をデバイスに付与する為、利用され生成した ADP を、ポリリン酸を基質とするポリリン酸キナーゼにより ATP とする系を MDR1 と組み合わせた。ATP 供給系は今までに幾つか確立されているが、それらは非常に高価かつ不安定な高エネルギーリン酸結合の化合物を利用している。一方、ポリリン酸は ATP と同様の高エネルギーリン酸結合によって結合した無機ポリマーで、リン酸を加熱して合成できる単純で非常に安価な化合物である。そこで、この系と昨年度までに確立した MDR1 による ATP 依存性の基質（ベラパミル）取込実験系に組み合わせた。すると ATP を加えた場合と同等の活性がポリリン酸-ポリリン酸キナーゼ ATP 再生系においても同等の取込みが検出でき、この ATP 再生系は MDR1 活性の発現に十分寄与できることがわかった。

これらの成果を含め、機能性膜構築への技術要素の抽出を行い（図 4）、今後の方向性について検討した。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Omasa T, Enosawa S. Construction of liver model with genetically engineered human HepG2 cells. *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*, vol.13, pp.25-29, 2004
- 2) Enosawa S, Takahashi N, Amemiya H, Motomiya Y. Transplantation of nonvascularized kidney tissue fragments into the rat liver with the aim of preserving renal function. *Cell Transplantation* 13:413-419, 2004
- 3) Asada M, Ohmi K, Delia D, Enosawa S, Suzuki S, You A, Suzuki H, Mizutani S. Brap2 functions as a cytoplasmic retention protein for p21 during monocyte differentiation. *Mol Cell Biol* 24:8236-8243, 2004
- 4) Omasa T, Yamanaka M, Tanimura N, Katakura Y, Kishimoto M, Suga K, Enosawa S. Expression and amplification of glutamine synthetase gene endows HepG2 cells with ammonia-metabolizing activity for bioartificial liver support system. *Enzyme Microbial Technology* 35:519-524, 2004

5) Omasa T, Enosawa S. Construction of liver model with genetically engineered human HepG2 cells. *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*, vol.13, pp.25-29, 2004

6) 林 美都子、絵野沢 伸. 体外血液浄化法の現状と人工細胞による非細胞系バイオ人工肝への期待. *Organ Biology* 印刷中

2. 学会発表

- 1) 林 美都子、絵野沢 伸、島内寿徳、久保井 亮一. トランスポータータンパクを組み込んだプロテオリソソームによる非細胞系バイオ人工肝の構築. ワークショップ3. 人工臓器の現状と展望. 第11回日本臓器保存生物医学会総会(広島)平成16年5月21-22日

H. 知的財産権の出願・登録状況

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）
平成16年度分担研究報告書

ナノテクノロジーによる機能的・構造的生体代替デバイスの開発
Ⅲ ナノ生化学系による非細胞性代謝機能代替デバイスの開発研究
機能性プロテオリポソームの開発

分担研究者 久保井 亮一（大阪大学基礎工学研究科 教授）

研究要旨：

MDR1の機能は基質の輸送であり、その輸送方向は脂質膜中の配向性に依存する。モデル細胞膜(リポソーム)に組み込んだプロテオリポソームの配向性について、ATP加水分解活性に基づいて検討した結果、配向性が細胞膜における場合とは逆転することがわかった。したがって、MDR1の薬物排出能を利用して血液中の薬物をリポソーム内水相に除去が可能であることが示唆された。薬物排出能を速度論的に評価した結果、速度定数と排出量の最大値は脂質膜組成、特に膜流動性や脂質マイクロドメインの形成挙動の影響を受けており、適切な脂質組成の選択が重要であることが示唆された。さらに、プロテオリポソームは操作条件(温度、酸化条件)により容易に失活しやすく、MDR1を疎水核として凝集・融合が進行するためであることが分かった。

A. 研究目的

A-1. 背景

肝・腎不全や敗血症、薬物中毒症の治療において透析・濾過と輸液・血漿輸血を組み合わせた血液浄化治療が死亡率低下に効果を発揮している。しかし、長期透析治療による弊害も指摘されており、新鮮血漿の大量消費や血漿性ウイルス感染、ならびに透析アミロイドーシスは克服すべき課題として残っている。一つの模索として、細胞を利用したバイオ人工肝の開発が行なわれているが、装置の煩雑さ、細胞性感染に関する潜在的危険性は否定できない。そこで、細胞の機能から必要なものだけを抽出、再構築した人工細胞膜を構築することにより、現在の血液浄化法の有する限界・問題点を克服できることが期待される。

その一つとして膜タンパク質の利用が上げられる。ヒトの細胞には様々な膜タンパク質があり、多くはATPの加水分解によって得ら

れるエネルギーを利用して、細胞内外の物質やイオンの輸送を行っている。その中でもABC(ATP結合カセット)タンパク質は薬物排出能を有しており¹⁾、生体防御に深く関与しているため、人工肝/腎臓への応用が期待されている。バイオ人工肝が有する潜在的・技術的問題点を克服するための新しい切り口として、必須機能を担う膜タンパク質を組み込んだリポソーム(プロテオリポソーム)の利用方法が本研究の中心課題である。

A-2. これまでの研究成果

前年度までにおいて、我々は、プロテオリポソーム調製の基礎的検討として、天然高分子(タンパク質)や合成高分子(スマートポリマー)を用いたモデル細胞膜の相互作用の解析に取り組んだ。ストレス条件下においてタンパク質やスマートポリマーは構造変化し、疎水核を形成してからリポソーム膜と相互作用することが示唆された(平成14年度)。この

機構に基づき、機能性リガンドや膜タンパク質を適切なストレス条件下において外部から導入し、リポソームの機能化を評価することが可能になる。さらに、誘電分散解析法を用いて、膜タンパク質—界面活性剤混合系に対する活性相関を検討し、適切な界面活性剤の選択の必要性と脂質膜に導入する過程のモニタリングが可能であることを示した(平成 15 年度)。

A-3. 研究目的

そこで、本研究では ABC タンパク質である MDR-1(Multidrug Resistance-1)を配向させたリポソームの機能(薬物排出能)評価を行った。速度論的解析により、MDR1 の排出機能と脂質膜特性との関わりを検討した。次に、人工透析装置への応用を指向し、操作条件として考えられる熱的・酸化的ストレス条件下でのプロテオリポソームの安定性を検討した。最後に、プロテオリポソームの不安定性の原因を検討した。

B. 研究方法

B. 研究方法

B-1. 試薬

中性リン脂質として、1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC), 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidyl ethanolamine (DOPE)を用いた。また、Egg phosphatidylcholine(EPC)はAvanti Polar Lipids 製を用いた。Na⁺/K⁺-ATPaseはSIGMAから、その他の特級試薬は和光純薬(Osaka, Japan)から購入した。また、膜タンパク質MDR1は絵野沢らより提供して頂いた。

B-2. リポソームの調製

B-2-1. 一般的なリポソームの調製

リポソームは下記のプロトコールで調製した。リン脂質をクロロホルムで溶解させた溶液をナス型フラスコに入れ、エバポレータにより溶媒を留去すると脂質薄膜が得られる。これを一昼夜、デシケータにて溶媒を蒸発させる。これを適当な水溶液で水和し、一時間振とうさせると多重層リポソーム (MLVs) が生成する。脂質の相転移温度以下の温度(ここでは-80°C, 15分)で急速に冷却するとMLVs溶液はゲル状態で凍結される。その後、相転移温度以上(37°C, 15分)で解凍すると、冷却により崩壊した脂質膜どうしが融合してより大きなMLVsを得ることが出来る。この操作を凍結融解法と呼び、今回は5サイクル行なった。この後、50-200nmの細孔径を有するポリカーボネートフィルターでMLVs溶液を押し出すとフィルターの細孔径に一致する均一な粒径分布を持ったリポソーム溶液を得る事ができる。この手法(extrusion法)により、今回は粒径100nmのリポソームを調製した。詳細は、既報(Yoshimoto *et al.*, 1998)を参照されたい。

B-2-2. プロテオリポソームの調製

調製法の詳細は既報記載の通りである(Sharom *et al.*, 1998)。中性リン脂質1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine(POPC)の脂質薄膜を水和し、凍結融解法、および超音波照射法によってリポソーム(粒径30nm)を調製した。次に、非イオン性界面活性剤(C₁₂E₈)で可溶化したNa⁺/K⁺-ATPase溶液とPOPCリポソーム溶液を混合し、透析により界面活性剤を除去することでプロテオリポソームを得た。また、MDR1の組み込み場合は、β-dodecyl-D-maltosideに可溶化した後、脂質膜と混合し、透析を行な

った。

B-2-3. 膜タンパク質配向の薬物排出機能評価
 上述の MDR-1 配向リポソームによる薬物排出能(Q_{max})を測定した。また、MDR-1 配向リポソームによる ATP の加水分解量を測定した。ATP 加水分解量は、遊離するリン酸由来のモリブデン錯塩形成量から評価した (Chifflet et al., 1988)。MDR-1 の ATP 加水分解活性(ATPase 活性)は、ATP 加水分解量の経時変化から得られる初期勾配を MDR-1 の質量で除した値で定義した。

B-3. 誘電分散解析

詳細は既報 (Morita et al., 2003) を参考されたい。各種添加物質とリポソームとを所定の濃度比で混合した溶液を測定用セルに充填し、インピーダンスアナライザー (Agilent Technologies, 4291B) を用いて各種周波数における比誘電率を測定した。1MHz から 100MHz の範囲のものについて以下に示す Debye の式 (二段緩和)

$$\epsilon' - \epsilon_h = \frac{\Delta\epsilon_1}{1 + (f/f_{c1})^2} + \frac{\Delta\epsilon_2}{1 + (f/f_{c2})^2} \dots (1)$$

$$\epsilon'' - \epsilon_h'' = \frac{(f/f_{c1})\Delta\epsilon_1}{1 + (f/f_{c1})^2} + \frac{(f/f_{c2})\Delta\epsilon_2}{1 + (f/f_{c2})^2} \dots (2)$$

を用いてフィッティング解析を行い、緩和幅 $\Delta\epsilon_1$, $\Delta\epsilon_2$ および緩和周波数 f_{c1} , f_{c2} を求めた。

B-4. リポソームの各種特性の検討

リポソームの脂質濃度の定量は、リン脂質濃度定量キット (商標名: リン脂質テストワコー C) を用いて行なった。リポソーム粒径の確認は動的光散乱法を用いて行なった。膜流動性については、疎水性蛍光プローブ (TMA)-DPH を用い、分極率の逆数 ($1/P$) を膜流動性と定義した。

Table C-1 MDR1 の配向性の評価

	ATPase:lipid [mol/mol]	Protein [nmol]	活性 [mo/mo-pr]	配向性
Proteoliposome	1:19000	0.18	N.D.	N.D.
1.8mM $C_{12}E_8$ 処理後	1:19000	0.18	N.D.	
Proteoliposome	1:4200	0.50	0.208	86%*
1.8mM $C_{12}E_8$ 処理後	1:4200	0.50	0.241	(外向き)
ATPase-TritonX-100		0.63	0.233	
MDR POPC		0.172**	578***	83%
MDR POPC/POPG				89%
MDR DMPC/Chol				86% (外向き)

* 配向性は、 $C_{12}E_8$ 処理後の活性を 100% の配向性と考えたときの相対活性で定義される。

**mg

*** nmol/mg-pr

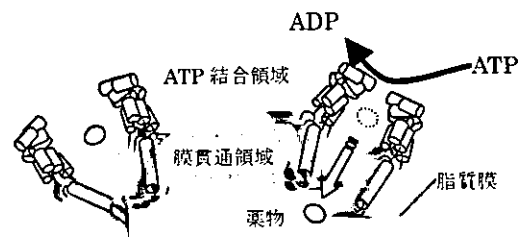


図 C-1 リポソームに組み込まれた MDR-1 の立体構造

B-5. 固定化リポソームクロマトグラフィー

1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-phospho-*o*-choline / egg phosphatidyl ethanolamine (POPC/EPE = 96:4 (モル比)) から成るリポソームは前報 (Yoshimoto et al., 1998) と同様の方法を用いて調製した。得られたリポソームは、ゲル担体 (Sephacryl S-1000 ゲル) に固定化 (Wilcheck and Moron., 1982) し、5.5cm × 0.5cm ガラスカラム (HR5/5, Amersham, Pharmacia Biotech 製) に充填した。これを中圧液体クロマトグラフィーシステム (AKTA Purifier, Amersham Pharmacia Biotech 製) に接続し、所定の条件 (37°C, pH7.5) において溶出実験を行なった。対象物質-リポソーム間相互作用の強さは、刺激の負荷に伴う対象物質本来の溶出体積 (V_r , [ml]) からの遅れ ($V_r - V_0$, [ml]) を固定化脂質量 (M^* [μmol]) で基準化した量 ($(V_r - V_0) / M^*$, すなわち, Capacity factor, k_c) から解析した (Beigi et al.,

1995; Yoshimoto et al., 1998, Yoshimoto and Kuboi, 1999).

C. 研究結果

プロテオリポソーム調製において問題になるのは、組み込んだ膜タンパク質の機能発現である。そこで、最初に MDR-1 の配向性を検討した。

C-1 膜タンパク質の配向性

一般に、リポソームに配向させた膜タンパク質の ATP 結合部位の向きにより薬物の輸送方向が変化する。そこで、MDR-1 の配向性を検討した結果、生体内では ATP 結合部位が内水相に存在するのに対し、リポソームではほとんどが外水相に存在することが確認された (Table 1)。この結果と MDR-1 の立体構造を考慮すると、薬物がリポソーム外水相から内水

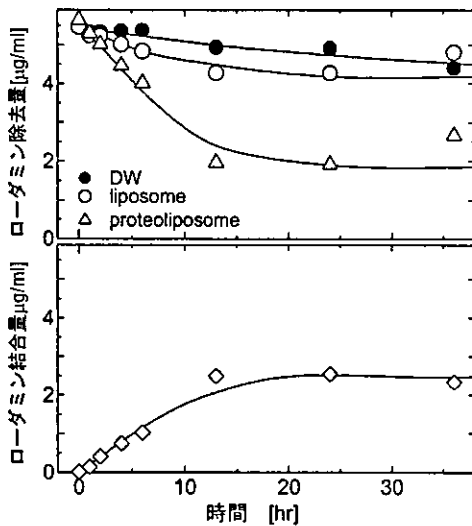


図 C-2 ローダミン B 濃度の経時変化

相に輸送されるものと予想され、図 C-1 に示すように MDR-1 配向リポソームを薬物除去に利用できる可能性が示唆された。

C-2 MDR1 の薬物排出機能の評価

ローダミン B をモデル薬物として MDR-1 配向リポソームの薬物除去能を評価した。対照系 (MDR-1 を配向していないリポソーム) と比較して外水相のローダミン B 濃度の顕著な減少が見られた (図 C-2)。このことから、MDR-1 による薬物除去が可能であることが確認された。そこで、プロテオリポソームとリポソームが示すローダミン B 除去量の差分を MDR-1 の薬物排出量 (Q) と考え、Q を時間に対してプロ

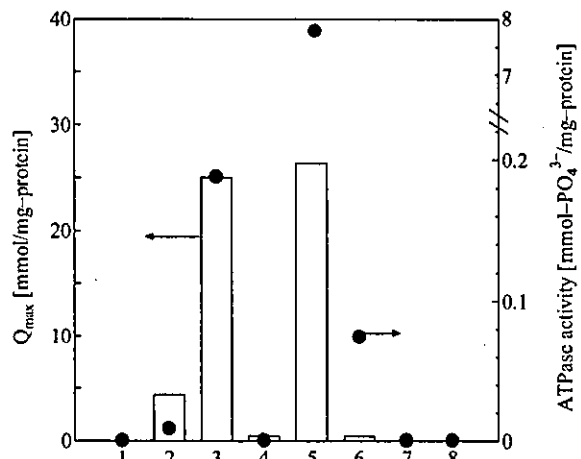


図 C-3 脂質組成を変化させたときの薬物除去能および ATPase 活性. 1: EPC, 2: POPC, 3: POPC/Chol, 4: DOPC, 5: DOPC/DOPE, 6: DOPC/DPPC/Chol, 7: DMPC, 8: DMPC/SA
略号: ATP (adenosine triphosphate), POPG (1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidyl-glycerol), EPC (Egg-Yolk-Phosphatidylcholine), POPC (1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine), Chol (Cholesterol), DOPC (1, 2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine), DOPE (1, 2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine), DPPC (1, 2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine), DMPC (1, 2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine), SA (Stearic acid), Q_{max}: Uptake of drug [nmol/mg-protein]

ットした結果、一次速度論的評価が可能なプロファイルであることがわかった。そこで次式を用いて速度論的評価を行なった。

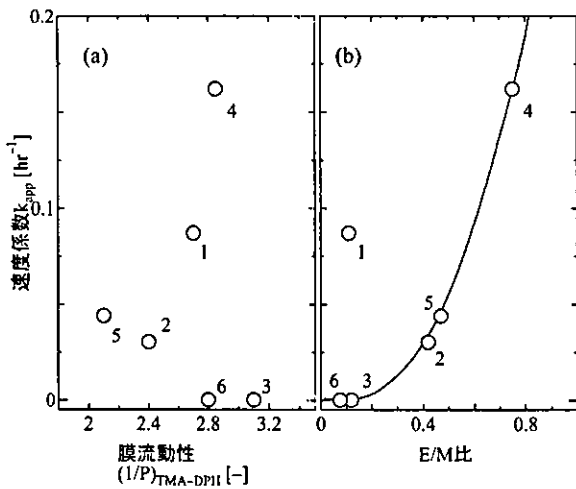
$$Q = Q_{\max} (1 - e^{-k_{app}t}) \dots \dots (3)$$

C-2-1 薬物排出量

式(3)を用いて得られるMDR-1による薬物除去量の最大値(Q_{max})を様々な脂質組成で検討した結果、図C-3で示すように、単純脂質組成より混合脂質組成の方が優れた除去能を持つことがわかる。特に、POPC/Chol, DOPC/DOPE系での排出量と活性が高いことが分かった。さらにATP加水分解活性もローダミン除去能と同様の傾向を示した。一方、DMPC/SAはタンパク質との相互作用が強いので、膜タンパク質の組み込み・機能発現の候補として期待されたが、ATP加水分解活性と除去量の実測値は低かった。MDR1の組み込み量自体は他の脂質組成と変わらなかったことを考慮すると、MDR1周辺の脂質環境が重要であることが予想される。

C-2-2 薬物排出の速度過程

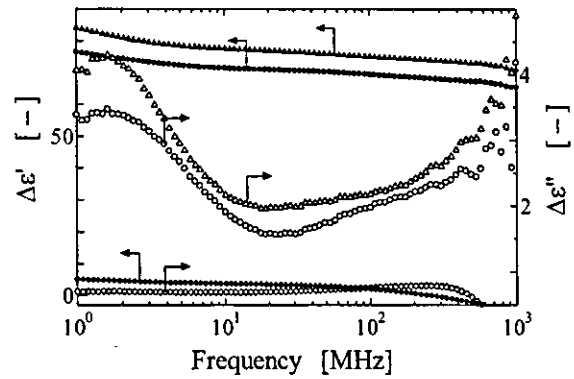
式(3)より得られる速度論的パラメータ k_{app} は、結合速度定数の意味を持つ。そこで、 k_{app} を、各種リポソームの膜流動性、クラスター形成挙動の指標であるE/M比と比較した。図C-4に示すように、例外はあるものの、流動性の増大とともに薬物排出量も増大し、ドメイ



図C-4 (a)膜流動性、(b)E/M比と見かけの速度係数の関係(1mol%ピレン脂肪酸)

1:EPC, 2:POPC/Chol, 3:DOPC, 4:DOPC/DOPE, 5:DOPC/DPPC/Chol, 6:DMPC

ン形成の必要性も関係していることもわかった。特に、DOPEを含むリポソーム系では高いE/M比を示している(図C-4(b))。これはPEが相分離していることを反映しているので、MDR1の高活性発現にはドメイン形成が必要であることを示している。実際、膜タンパク質は生体膜上では、ラフトあるいはカベオラと



図C-5(a) 各種物質の誘電率, 誘電損の周波数依存性



図C-5(b) 特性周波数(f_{c2})の温度依存性

呼ばれるマイクロドメインに存在していると考えられている。つまり、MDR1が機能を十分に発揮するためには、生体膜様の構造が必要であることを示唆している。以上の結果から、脂質膜の構造が膜タンパク質の機能向上に深く関わることを示唆される。

C-3 プロテオリポソームのストレス安定性

前節までの検討より、プロテオリポソームの透析システムへの応用が可能であることが示された。しかし、透析の操作条件下でのプロテオリポソームの劣化条件を検討する必要がある。そこで、本節では、熱・酸化的ストレス条件下でのプロテオリポソームの安定性を検討した。

C-3-1 膜タンパク質導入による脂質膜の熱安定性

モデルとして Na⁺/K⁺-ATPase を組み込んだプロテオリポソームによる熱安定性を検討した。まず、DMPC リポソーム、プロテオリポソーム(脂質は DMPC)の誘電分散スペクトルを測定した(図 C-5(a))。プロテオリポソームのスペクトルがリポソーム単独系と類似しているため、プロテオリポソームの誘電特性は脂質膜に起因していると考えられる。実際、膜タンパク質可溶化ミセルのスペクトルは平坦であり、上記の二つのスペクトルとは異なることから上記の結論は支持される。そこで、デバイの式(1)と(2))を用いてスペクトルを解析し、脂質膜の流動性に対応する特性周波数(f_{c2})を求めた。 f_{c2} の温度依存性を図 C-5(b)に示す。25°C以上の温度条件では f_{c2} (リポソーム単独系) > f_{c2} (プロテオリポソーム)であり、膜タンパク質の組み込みによる膜流動性の低下を反映している。熱安定性を検討するため、次式に示すアレニウスの式に基づく解析を行なった。

$$k = 2\pi f_{c2} = \exp\left(-\frac{\Delta E}{RT}\right) \dots \dots (4)$$

解析の結果、活性化エネルギー(ΔE)はリポソーム単独系では 42.2kJ/mol、プロテオリポソームの場合は 19.9kJ/mol であった。本実験系の場合、活性化エネルギーは熱安定性の意味を持つ。したがって、膜タンパク質の組み込み

により、熱安定性が低下したことが示唆された。これは、膜タンパク質が脂質膜に導入されたことにより、脂質膜の秩序構造が変化し、熱ストレス条件の負荷により容易に秩序が乱されてしまうことを意味している。

さらに、熱ストレス条件下での活性についても検討した。37、45°Cでの ATP 加水分解活性の経時変化を測定した結果を図 C-6 に示す。いずれの温度でも約 50%の活性が維持されていることが分かる。通常の水溶性タンパク質

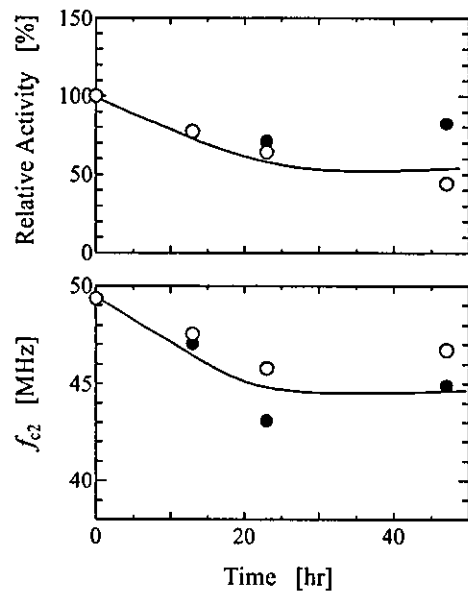


図 C-6 熱ストレス条件下におけるプロテオリポソームの ATP 加水分解活性の時間変化: (●) 37°C, (○) 45°C

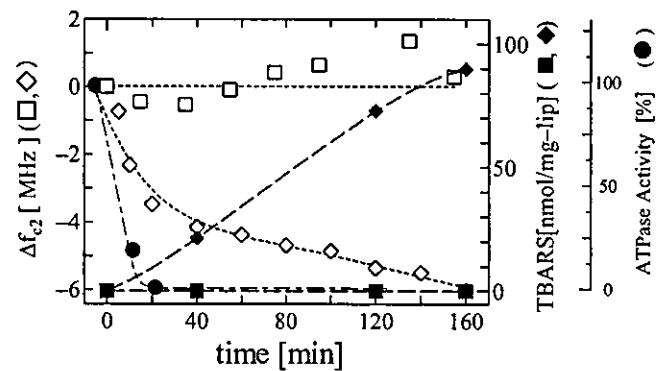


図 C-7 過酸化水素共存下におけるプロテオリポソームの特性周波数、脂質酸化量、ATP 加水分解活性の時間変化

(例えばウシ炭酸脱水酵素 CAB)の場合、本条件での相対活性はほぼ 90%を維持している。したがって、膜タンパク質はかなり不安定であることが推察される。

C-3-2 酸化ストレス応答特性

次に、ATPase 活性に及ぼす酸化ストレスの影響を検討した。酸化ストレスとしては過酸化水素を用いた。また、酸化の効果を見るために、不飽和度の高い SIPC(酸化されやすい)を混合した DMPC/SIPC リポソームを用いた。図 C-7 に f_{c2} 値, TBARS 量, ATP 活性の経時変化を示した。脂質の酸化に伴って、SIPC は酸化され、次第に膜流動性 (f_{c2}) が減少する。これは、酸化脂質量の指標である TBARS 量も増加により確認できた。同時に、ATP 加水分解活性も急激に低下した。したがって、酸化ストレスの存在は、プロテオリポソームの機能低下を招く事がわかった。

C-3-3. プロテオリポソームの安定性因子

プロテオリポソームを人工臓器における薬物除去要素として応用する場合、上記のような熱・酸化ストレスに対する不安定性は克服すべき課題となる。そこで本節では、プロテオリポソームの失活挙動の原因を探った。

図 C-8 にプロテオリポソームの ATP 加水分解活性と濁度の経時変化を示した。濁度はリポソームの凝集・融合の指標であるが、1日で濁度は増加し飽和に達した。それと共に、活性も低下し、二日後にはほぼ活性が消失した。

濁度増加がプロテオリポソームの融合に起因すると考え、蛍光エネルギー移動型プローブ (NBD-PE→Rh-PE)を用いた膜融合の検討を行った。リポソームの場合、ほとんどエネルギー移動は見られないが(図 C-9(a)), プロテオリポソームの場合は経時的に Rh-PE 側の蛍光ピークが増加し、エネルギー移動が起こっていることを示している(図 C-9(b))。そこでエネルギー移動効率の時間変化を調べたところ、膜タンパク質の組込み量に依存してエネルギー移動効率が增大していることがわかった(図 C-10)。これは、膜タンパク質が融合の誘起因子であることを示唆している。

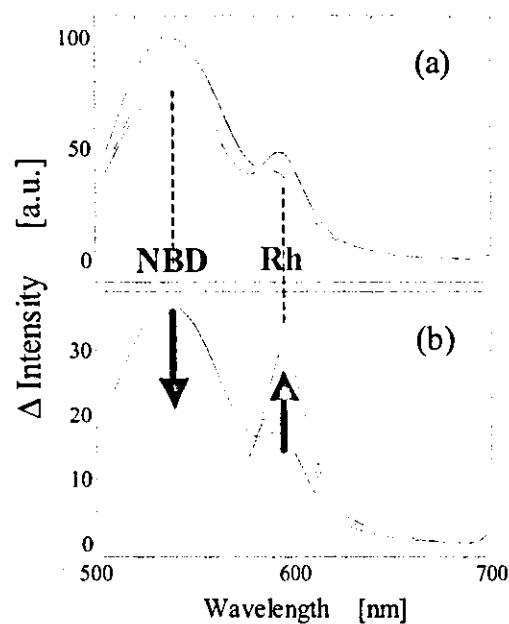


図 C-9. (a)リポソームと(b)プロテオリポソームの蛍光エネルギー移動

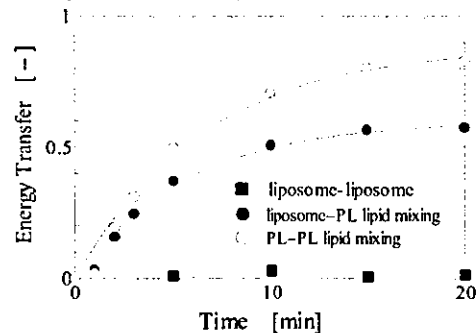
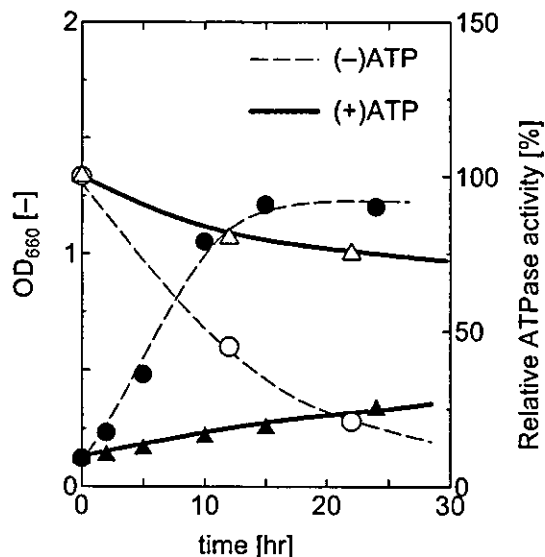


図 C-10 エネルギー移動効率の経時変化

そこで、プロテオリポソームの表面特性を評価した。まずANS蛍光強度を測定した結果、プロテオリポソームにおける蛍光強度はリポソーム（対照系）の場合の約1.4倍(局所的疎水性 $LH_{lip}=1.0 < LH_{proteolip}=1.4$)であった。したがって、リポソームに比べ、プロテオリポソームは疎水的であることが示唆される。また、固定化リポソームクロマトグラフィー (ILC)におけるプロテオリポソーム、ならびにリポソームの溶出挙動を検討した結果、プロテオリポソームの溶出速度が遅かった (data not shown)。溶出速度の遅れは検査物質の疎水性の大きさを示すことから、本実験結果はANS蛍光測定の結果を支持する。図C-5(b)の結果より、膜タンパク質の組込みにより膜流動性は低下する。膜流動性は脂質膜の疎水性と対応するので、 f_2 の低下は脂質膜の疎水性の低下を予想させる。これはANS蛍光実験とILC実験の結果と一見矛盾するように思われるが、これらの実験事実に基づけば、膜タンパク質の組込みにより膜全体が疎水化されたと考えるより、膜タンパク質自体が疎水的であると考えるほうが妥当である。実際、膜タンパク質の存在により局所的疎水性(LH)は、 $LH=1.0 \rightarrow 1.4$ に増大している。現時点では、膜タンパク質自身のLH値は求められないが、高い値であることが推測される。疎水性相互作用に基づく脂質膜-タンパク質間相互作用 ($LH_{pr} \times LH_{lip}$)を、カルセイン封入リポソームからのカルセイン漏出率(RF/ ϕ)で評価した結果を図C-11に示した。MDR1を組込んだプロテオリポソームの場合、 $LH_{lip} \times LH_{proteolip}=1.4$ であるので、MDR1を疎水核として、脂質膜と強く疎水的に相互作用することが分かる。つまり、MDR1が凝集・融合を誘起するという可能性が高い。

以上の考察より、MDR1を疎水核とするシナリオに基づき、プロテオリポソームの不安定



図C-12 プロテオリポソームの凝集に及ぼすATP共存効果

性を説明可能であると我々は考えている。

C-3.4. プロテオリポソームの安定性の改善

MDR1組込みリポソームにATPを大過剰で共存させると、10mM以上の濃度範囲で凝集や活性低下の抑制が認められた(図C-12)。しかし、ATPはMDR1の基質でもあり、大過剰のATPの存在はMDR1の活性阻害になることも指摘されている。これについては、ATPと化学的に類似な構造を有する候補物質などを含めた凝集阻害剤の探索、ならびに、賦活剤の探索が必要であると考えている。

【参考文献】

- Beigi, F., Q. Yang and P. Lundahl; *J. Chromatogr. A*, 704, 315-321(1995)
- Chifflet, S. et al., *Anal. Biochem.*, 168, 1-4(1988)
- Yoshimoto, M., R. Kuboi, Q. Yang and J. Miyake; *J. Chromatogr. B*, 712, 59-71(1998)
- Yoshimoto, M. and R. Kuboi, *Biotechnol. Progr.*, 15, 480-487(1999)
- Morita S., *J. Biosci. Bioeng.*, 95, 252-256 (2003)
- Shikata et al., *Langmuir*, 14, 6804-6808 (1998)
- Sharom, F.J., et al., *Biochem. Cell Biol.*, 76, 695-708(1998)

D. 考察

DOPC/DOPE 組成の場合、MDR1 の ATP 加水分解活性や除去量が高いことが本実験で示された(図 C-3). 従来, 膜タンパク質の機能発現には, 脂質膜中でのコンフォーメーションを維持するための境界脂質の存在が指摘されている. DOPE は単独ではヘキサゴナル相を構成し, 脂質二分子膜を形成しないが, PC 系との混合により, マイクロドメインを形成する. さらに, 一部の膜タンパク質は, 生体膜から分離精製したとき, PE を完全に除去することが不可能であり, 膜タンパク質の境界脂質であると考えられている. それ故, 本実験において MDR1 の機能が強く発現したのも, DOPE が境界脂質として作用したからだと推察される.

一方, コレステロール含有リポソームの場合, 除去量ならびに活性が非常に高いが, この理由として, コレステロールが MDR1 の輸送基質になり得る可能性が指摘されている. 図 C-1 に示す従来の輸送機構 (vacuum cleaner 仮説) では, 脂質膜中に存在するコレステ

ロールの輸送は説明できない. 他方, MDR1 が ATP を分解するときを生じるコンフォーメーションの変化と周辺脂質の秩序の変化が密接に関連しているとする仮説 (flippase 仮説) がある. 詳細な検討が必要であるが, コレステロールの輸送の場合, この機構が有力であると推測される.

E. 結論

MDR1 をモデル細胞膜(リポソーム)に組み込んだプロテオリポソームの配向性について検討した結果, ATP 加水分解活性評価より, 配向性が細胞膜における場合とは逆転することがわかった. したがって, MDR1 の薬物排出能を利用して血液中の薬物をリポソーム内水相に除去が可能であることが示唆された. 薬物排出能を速度論的に評価した結果, 結合定数と排出量の最大値は脂質膜組成, 特に膜流動性や脂質マイクロドメインの形成挙動の影響を受けており, 適切な脂質組成の選択が重要であることが示唆された. さらに, プロテオリポソームは操作条件(温度, 酸化条件)により容易に失活しやすいことが, MDR1 を凝集核とするシナリオに基づいて説明が可能であった.

以上より, MDR1 組込みリポソームを透析システムに応用することが可能であることが示唆された.

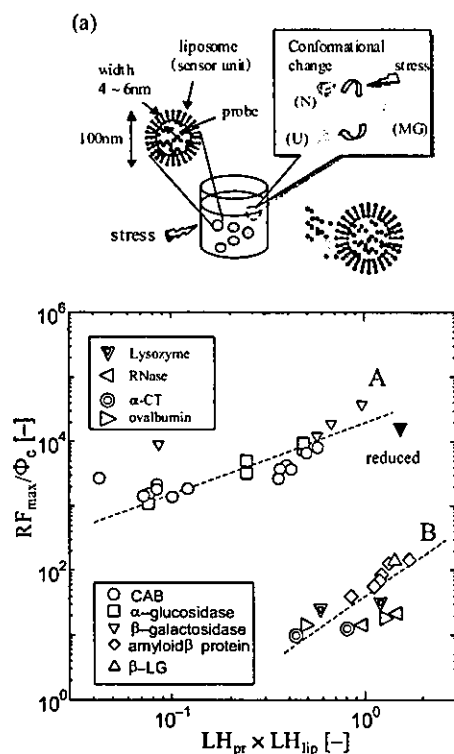


図 C-11 タンパク質による脂質膜の不安定化

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1. 論文

1. Detection of protein conformation under stress conditions using liposomes as sensor materials, R. Kuboi, T. Shimanouchi, M. Yoshimoto,

H. Umakoshi, Sensors and Materials, 16(5), 241-254 (2004)

2. Monitoring of Protein Dynamics on Membrane Under Stress Condition Using Dielectric Dispersion Analysis, M. Sasaki, K. Miyagawa, T. Shimanouchi, and R. Kuboi, Proc. APCCHE 2004

H. 知的所有権の取得状況
なし

G-2. 学会発表

1. プロテオリポソーム調製プロセスのモニタリングとストレス応答機能の評価, (阪大院・基礎工) 佐々木 勝司, 島内 寿徳, 久保井 亮一, 化学工学会, 大阪府大, 2004年4月
2. Monitoring of protein dynamics on membrane under stress condition using dielectric dispersion analysis: The use of proteoliposome. Sasaki M., Shimanouchi T., Kuboi R., Seiichi Morita, COEIEC IV. Osaka (2004. 8. 30-31)
3. Nano-Artificial-Cell Membrane Based Sensor for Stress-Mediated Bioseparation_T. Shimanouchi, M. Sasaki, B.-K. Lee, R. Kuboi, Bioseparation 2004, Fukuoka (2004. 10. 15-17)
4. リポソームによる新規なバイオセンサーの開発 ～水中ストレス成分のモニタリングへの応用～, (阪大院・基礎工) 佐々木 勝司, 李 奉局, 島内 寿徳, (和歌山高専) 森田 誠一, 久保井 亮一, 生物工学会, 名工大, 2004年9月

G-3. 新聞報道

なし

III. ナノ生化学系による非細胞性代謝機能代替デバイスの開発研究
薬物代謝機能発現環境の最適化

分担研究者 大政健史 大阪大学大学院工学研究科 応用生物工学専攻 助手(学内講師)

研究要旨：本研究では、ナノ生化学系による非細胞性代謝機能代替デバイスの開発研究を目指し、薬物代謝の機能発現にかかる環境について簡便に検討できる系の構築を行った。ヒトにおける薬物代謝は、一連の第Ⅰ相反応と第Ⅱ相反応から成り、代謝される。本年度は、第Ⅰ相反応の最適化を簡便に行うために、薬物代謝誘導と薬物代謝の両方を同時に評価できる肝由来細胞株を構築し、様々な薬物による誘導を蛍光を用いて評価し、かつ同時に薬物代謝反応を代謝によって評価可能なシステムを確立した。

A. 研究目的

日本において、ウイルス性肝炎を始めとする急性肝不全患者は数多い。急性肝不全は、急激な肝細胞壊死あるいは肝細胞機能不全により、肝性脳症・黄疸・腹水・出血傾向・腎不全などを呈す。これらに対して、血液濾過透析（持続的血液濾過透析 continuous hemodiafiltration：CHDF）や血漿交換（plasma exchange：PE）を組み合わせた肝機能補助療法が、現在最も臨床に応用されている。これは、肝臓により解毒・代謝されるべき物質を血液から濾過するか、または血漿と共に除去して不足分をヒト正常血漿により補充する方法である。しかし、多種にわたる肝機能の全てを代替できないため、十分な治療成績をおさめるには至っていない。

劇症肝炎等の末期肝不全の根治療法として肝移植が一般的に行われているが、ドナー不足など様々な問題点が残されている。そこで、脳死肝移植以外の治療法として、またドナー肝が移植されるまでの緊急対応（bridge-use）として、肝不全に陥った生体の肝機能を補助できる肝機能補助装置の開発が重要な課題である。現在では、肝機能補助装置として、バイオリアクター（物理的材料）に動物細胞（生物的材料）を充填し

た血液浄化システム（バイオ人工肝）が多数開発されてきている。

肝細胞は、非常に旺盛な再生能力を有することから、急性肝不全に陥った肝臓が再生し機能を回復するまでの期間、このような肝機能補助装置を用いて肝機能を補助することの重要性は高い。バイオ人工肝に代表される血液浄化システムにおいて肝機能を担う細胞は、大きく二つに分類される。1つはブタなどの異種動物由来の初代肝細胞を用いるものである。これらの細胞は高い肝機能を有しているものの、急速に肝機能が低下するため、その機能を長期間維持することは難しく、必要となるたびに調達しなければならない。また異種動物であるため、免疫拒絶反応・未知のウイルス感染等の危険性が指摘されている。

これらに対峙する形で用いられているものが、HepG2などのヒト由来細胞株である。これらの細胞は無限増殖能を有するため長期にわたって維持できるという特性があるものの、肝機能が失われているという問題点がある。これまで、研究者らは、この細胞を用いた生体内代謝臓器代替システム、すなわちバイオ人工臓器を構築してきた。ところが、生体由来物質、すなわち細胞を用いる場合には、

生体由来であるための様々な規制や取り扱いの難しさ、調製の難しさ、ウイルスなどの感染など、色々な問題点が指摘されるようになってきた。一方、これらの細胞株を用いた代謝反応代替システムは、反応場としての細胞、すなわち、数々のナノサイズの細胞構成部品(細胞内小器官：すなわち小胞体やゴルジ体、ミトコンドリア、核など)からなるマイクロサイズの反応代謝機能代替デバイス：細胞ともとらえる事ができる。この細胞は、自分でエネルギーを得て自己複製を行い、かつ代謝が可能であり、しかも常温常圧にて反応を行う事ができ、生物の長年にわたる進化の結果としての非常に効率的な代謝反応システムとなっている。すなわち、反応の効率からみると、極めて素晴らしい究極のシステムとなっている。

従って、この効率的なシステムを完全に人工触媒：化合物による反応にて置き換える事は不可能もしくは非常に非効率的と言って良い。そこで、非細胞性代謝機能代替デバイスの開発研究を行うに当たり、効率的な反応環境の検証に関してはナノサイズの部品からなるマイクロリアクター：細胞を利用し、これをもちいて薬物代謝機能発揮環境を解析することにより、非細胞系における薬物代謝機能発現環境の最適化を行うことを考えた。

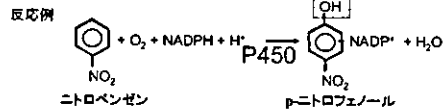
実際の肝臓における薬物代謝反応は第 I 相反応と第 II 相反応から成る。第一相反応は、酸化・還元・加水分解などによって、水酸基・カルボキシル基・アミノ基などの比較的小さな極性基が生成、導入される反応である。第二相反応は、グルクロン酸・硫酸・グルタチオンなど第一相反応よりも大きな置換基が導入される抱合反応である。

多くの薬物は第一相反応で水酸基などの小さな極性基が導入された後、第 II 相反応でより大きな極性基が付加され、排泄しやすい形へと変化し、尿中などに排泄される。I, II 相反応の模式図を下記に示す。

他の主たる肝機能・・・肝臓における薬物代謝

第一相反応(酸化・還元・加水分解等の反応)

OH基・NH₂基・COOH基などが生成され、極性を生じると共に抱合反応を受けやすい型となる。



第二相反応(抱合反応)

抱合反応により極性がさらに増大し、より排泄されやすい型となる。

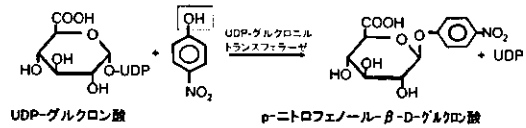
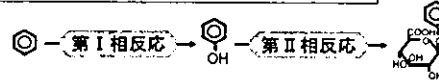


図 肝臓における薬物代謝反応

ヒトにおいては、薬物代謝の約 80%を第 I 相反応を担う薬物代謝酵素 cytochrome P450 が担っている。劇症肝炎患者においては、特にこの第 I 相反応の代謝能力が低下していると言われている。また P450 は基質特異性が低いという特徴があり、P450 の分子種である P450 3A の場合、臨床で使用されている医薬品のおよそ半分を代謝することが出来る。さらに、P450 3A4 は P450 全体の約 30%の発現量を占めていることが知られている(下記図)

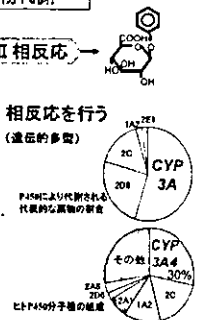
他の主たる肝機能・・・肝臓における薬物代謝



・ヒトにおける薬物代謝の約 80%は第 I 相反応を行う Cytochrome P450 が担っている。(遺伝的多型)

・P450 3Aは臨床で使用されている医薬品の約半分を代謝する。

・P450 3A4 はP450全体の約 30%の発現量を占める。



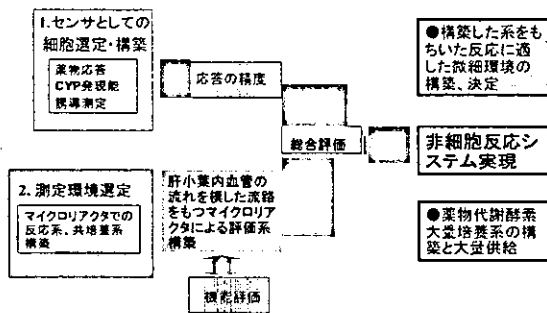
P450 3A4導入薬物代謝細胞の構築

図 P450 分子種と発現様式

そこで、広範囲の薬物を代謝させるために、この P450 3A4 の遺伝子 (CYP3A4) を肝由来 HepG2 細胞に導入し、薬物代謝評価可能な薬物代謝動物細胞の構築を試みた。

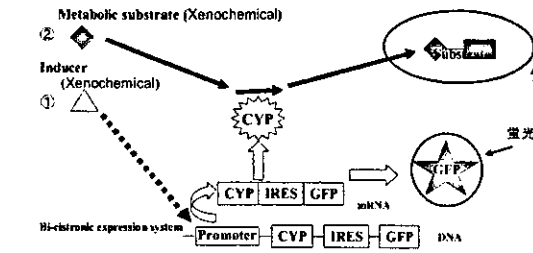
薬物代謝を評価するにあたり、より簡便なシステムとして下記のような Cell-based screening system の開発を行い、これを用いることにより簡便に細胞環境評価を試みた。本システムの開発項目としてセンサとしての細胞の選定・構築、そしてそれを用いた応答、精度の検証、さらにはマイクロリアクターを用いて血管での流れを模倣した評価システムを構築し、これを用いた薬物代謝に適した環境の整備を行う。

Cell-based screening system 開発による微細環境迅速評価系



本年度は、薬物代謝を簡便に測定するために、下記のような薬物代謝応答系を備えた細胞を構築し、蛍光を用いる事により簡便かつ迅速に評価可能な細胞構築を試みた。本細胞のコンセプトは、CYP プロモーター配列を用いることにより、代謝物が細胞に取り込まれて薬物代謝酵素の誘導が起こる。そして反応自体は発現した P450 の構造遺伝子によって代謝物が測定され、誘導自体はレポーター遺伝子によって経時的に測定可能な系である。

薬物代謝評価細胞



利点
 CYP3A4の誘導発現を蛍光で追跡可能
 CYP3A4とGFPを個々に発現 → 定量的解析が可能
 薬物代謝環境の簡便な検証が可能
 : 異物に反応して、光って代謝する細胞の構築

B. 研究方法

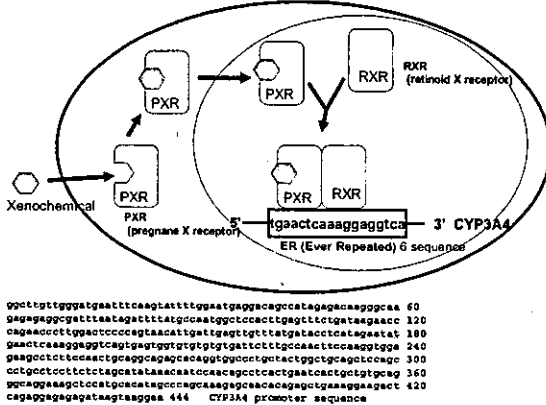
宿主動物細胞 として、理化学研究所細胞バンク RCB0459 株であるヒト由来 HepG2 株を用いた。本細胞は human hepatocellular carcinoma 由来であり、増殖形態は epithelial-like である。

培地として、RDF(HO)培地(日本製薬 010406)にグルタミンを添加した培地(RDF (Gln+))もしくは、代わりにアンモニアを添加した培地(RDF (Gln-))に、牛胎児血清 (fetal bovine serum (FBS))を 10%となるように添加したものを用いた。細胞培養容器としては、T-フラスコ (MS-20050 (底面積 25 cm², 容量 50 mL), MS-21250 (75 cm², 250 mL), MS-20800 (225 cm², 800 mL); 住友ベークライト), 100 mm dish (25020; Corning), または 96-well プレート (FALCON; 353072) を用いた。

現在、P450 を誘導する配列は、いくつか知られている。ここでは具体例として、最もよく知られている ER6 配列を用いた。本配列は、pregnane X receptor に外来誘導物質が結合したのちに、レセプター-誘導物質複合体が核内に移動し、これと retinoid X receptor とが結合してプロモーター領域に結合することにより、P4503A4 の発現誘導が開始される。本プロモーター配列の下流に CYP 構造遺伝子と、レポ

一ター遺伝子として GFP 遺伝子を導入することにより、薬物代謝に利用できるプラスミドを構築した。

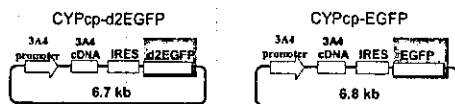
CYP3A4の誘導機構と利用したプロモーター配列



細胞株に組み込む P450 発現プラスミドは下記の様に 2 種類構築した。本プラスミドは P450 プロモーターの下流に CYP3A4 構造遺伝子と GFP を IRES 配列を介在させて結合することにより、一つの 3A4 プロモーターにて 2 つの構造遺伝子をドライブすることが可能である。

Materials

Cell line: human hepatocyte HepG2
(cell number: 6×10^4)



・EGFP半減期 2時間
・誘導のオンオフ確認および
定量的解析に応用可能?

・d2EGFPより半減期が長い
・誘導発現開始および
微弱な誘導も検出可能?

Inducer

Clotrimazole Dexamethasone Rifampicin Phenytoin
(sol. in DMSO, 10 μ M)

また、3A4 誘導薬剤として、Clotrimazole, Dexamethasone, Rifampicin, Phenytoin を用いた。また、構築した細胞へのトランスフェクションおよび細胞の評価は Transfection array システムを用いて行った。本システムは、産業技術総合研究所ティッシュエンジニアリング研究センターにて開発されたシステムであり、スライド

ガラス上にスポッティングしたベクターの上に細胞をふりかけることによって行う固相系トランスフェクションの手法により、細胞により効率的かつ簡便にトランスフェクションを行う事ができる。また、得られた細胞の接着したスライドガラスを蛍光顕微鏡で観察することにより、細胞の応答を簡便に検出することが可能である。

(倫理面への配慮)

ここで用いた研究手法は、すでに既知(公表済)の細胞株および遺伝子を用いており、特に倫理面への配慮は必要としない。

C.研究結果

薬物代謝を評価できるベクターとしてレポーター遺伝子に EGFP と d2EGFP を用いたベクター、CYPcp-EGFP および CYPcp-d2EGFP の 2 種類の発現ベクターを構築した。本ベクターを用いて、トランスフェクションアレイにより、肝由来の HepG2 細胞株を形質転換した。誘導薬剤による蛍光誘導に関しては、得られたトランスフェクション後の細胞を誘導処理することにより行った。具体的には、誘導薬剤である clotrimazole, dexamethasone, phenytoin, rifampicin, そして各誘導薬剤の溶媒である DMSO のみをそれぞれ 10 μ M 添加して培養を行った。添加後から形態観察を行ったところ、添加後 1 日目で p3A4cp-d2EGFP は誘導薬剤を添加したものが、p3A4cp-EGFP は DMSO のみを含めた全種類の細胞で誘導を示す蛍光が確認された。

添加後3日目頃から p3A4cp-d2EGFP に蛍光強度の差が見られ始め、dexamethasone を添加した細胞が最も強い蛍光を示した。(図)。またその頃から、DMSO のみを添加された p3A4cp-d2EGFP 導入細胞でも若干蛍光が確認され始めた。(data not shown)。

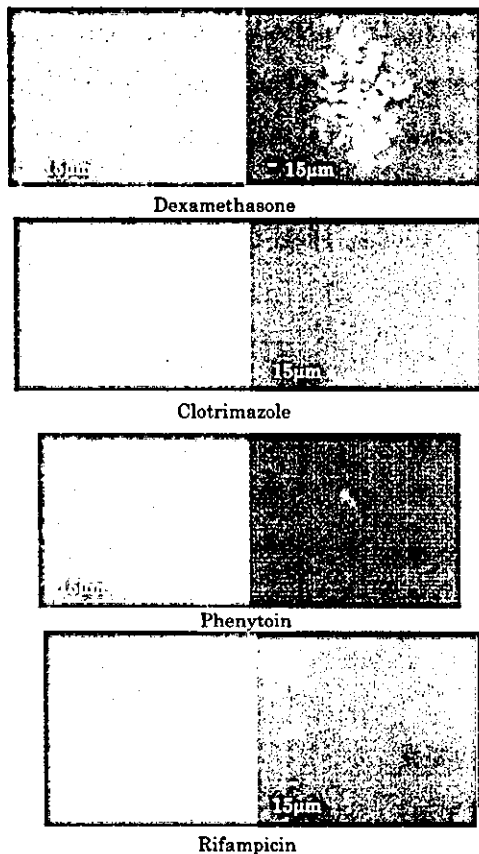


図 p3A4cp-d2EGFP の誘導実験結果 (day 3)
(左図:位相差顕微鏡、右図:蛍光画像)

P 3A4cp-EGFP は全種類の添加に関して蛍光が観察されたが、応答の優劣は確認できなかった。(図)

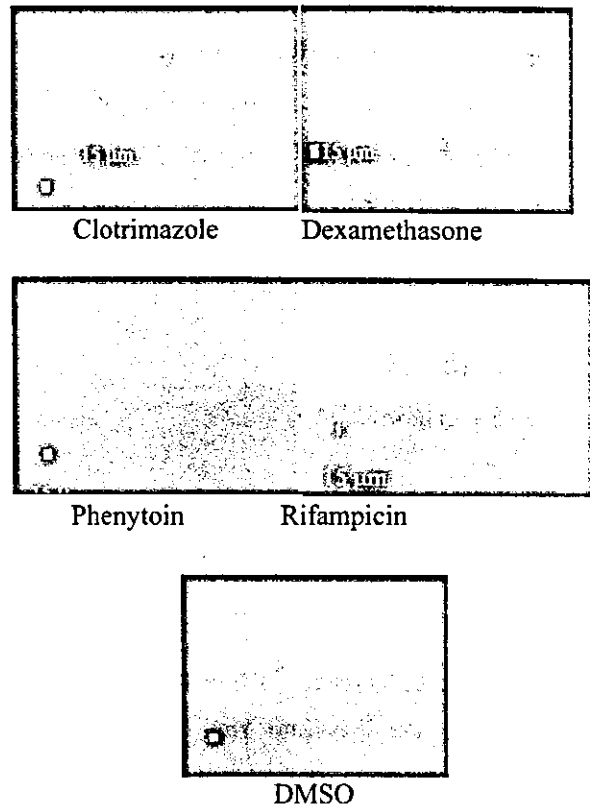


図 p3A4cp-EGFP の誘導実験結果 (day 1)

d2EGFP は半減期が約2時間と短く、応答の on-off を検出するのに適している。一方、EGFP は蛋白質が安定であるため、細胞内にて分解されにくく、検出感度としては高いものの、応答をみるには適していないと考えられる。

E. 結論

以上をまとめると、薬物代謝を簡便に測定するために、薬物代謝応答系を備えた細胞を構築し、蛍光を用いる事により簡便かつ迅速に評価可能な細胞構築を試みた。本細胞のコンセプトは、CYP プロモーター配列を用いることにより、代謝物が細胞に取り込まれて薬物代謝酵素の誘導が起こる。そして反応自体は発現した P450 の構造遺伝子によって代謝物が測定され、誘導自体はレポーター遺伝子

によって経時的に測定可能な系である。構築した p3A4cp-d2EGFP および p3A4cp-EGFP ベクターをヒト肝由来 HepG2 細胞にトランスフェクションすることにより、薬物代謝誘導が起こり、かつその誘導を蛍光にて検出可能な細胞が構築できた。

F.健康危険情報

該当する情報は無い。

G.研究発表

1.論文発表

1) **Takeshi Omasa**, Michimasa Kishimoto, Masaya Kawase, Kiyohito Yagi "An attempt at decision making in tissue engineering: reactor evaluation using the analytic hierarchy process (AHP)" Biochemical Eng. J. Vol. 20, pp.173-179 (2004)

2) **Takeshi Omasa**, Shin Enosawa "Construction of liver model with genetically engineered human HepG2 cells", Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects, Vol. 13, pp.25-29 (2004)

3) Masaaki Kobayashi, Nobuhiro Sugihara, Hirohiko Ise, **Takeshi Omasa**, Naoki Negishi "Real time monitoring of drug metabolic enzyme response inside human hepatoma GS-3A4-HepG2 cells by means of electrochemical impedance measurement" Polymers for Advanced Technologies Vol. 15, pp.232-243.(2004)

4) **Takeshi Omasa**, Mitsugu Yamanaka, Naoko Tanimura, Yoshio Katakura, Michimasa

Kishimoto, Ken-ichi Suga, and Shin Enosawa "Expression and amplification of glutamine synthetase gene endows HepG2 cells with ammonia-metabolizing activity for bioartificial liver support system" Enzyme and Microbial Technology Vol. 35, pp.519-524 (2004)

5) **Takeshi Omasa**, Mihoko Kajita, Tomohiro Yoshikawa, Yoshio Katakura, Michimasa Kishimoto, Hisao Ohtake "Rapid construction of gene-amplified CHO cell line by gene targeting" Proceedings for the 10th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering (APChE2004), 1P-01-019, (2004) (CD-ROM 出版) (全7ページ)

2.著書

1)井嶋博之、**大政健史**ら「バイオミメティック組織デバイス -開発の現状と将来展望-」(分担執筆) 日本生物工学会セル&ティッシュエンジニアリング研究部会編 編集代表(酒井康行、**大政健史**) 三恵社 (2004)

3.学会発表

(国際学会)

1) **Takeshi Omasa**, Masaya Kawase, Shin Ennosawa and Hisao Ohtake "Bioartificial liver support system -construction and evaluation-" In:, international symposium and annual meeting of Korean Society for Biotechnology and Bioengineering, Proceeding book p.102 ,A205, October 13-15, 2004, Cheongju, Korea (Invited lecture, Supported by organizer)

2) **Takeshi Omasa**, "Tissue engineering and it's

application in Japan” In; Engineering Conference International: Cell Culture Engineering VIII, Workshop II D. Non-pharmaceutical applications of animal cell culture, March 7-12, Cancun, Mexico (2004)

3)Takeshi Omasa, Masaya Kawase, Kiyohito Yagi, Michimasa Kishimoto, Hisao Ohtake “AHP evaluation for bioartificial liver support system” In; Young Asian Biochemical Engineers’ Community (YABEC) 2004, Advancing together for another 10 Years!, Osaka, Japan, PP-112, Sep. 23-25, Abstract p.151 (2004)

4)Takeshi Omasa, Mihoko Kajita, Tomohiro Yoshikawa, Yoshio Katakura, Michimasa Kishimoto, Hisao Ohtake “Rapid construction of gene-amplified CHO cell line by gene targeting” In;10th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering (APPChE2004), 1P-01-019, October 17-21, Kitakyushu Japan (2004)

5)Takeshi Omasa, Hidenori Yano, Mihoko Kajita, Yuki Ogura, Tomohiro Yoshikawa, Yoshio Katakura, Michimasa Kishimoto, Hisao Ohtake “Suitable chromosome location for CHO-dhfr gene amplification system” In;17th annual and international meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT '04) O-5, abstract p.46 November 15-18, Nagoya, Japan (2004)

(国内学会)

1)大政健史(招待講演)

“セル&ティッシュエンジニアリングー細胞

から臓器までのネットワークー”

日本生物工学会 平成16年度日本生物工学会技術セミナー「バイオテクニクス (Biotechnics and -mix)」2005年2月 要旨集 9-15頁 九州大学 箱崎キャンパス 国際ホール、福岡

2)大政健史(招待講演)

“薬物代謝細胞の構築とその評価系への応用” 第12回 近畿バイオインダストリー振興会議技術シーズ公開会 2004年9月 要旨集 p.1 大阪科学技術センター、大阪
主催：近畿バイオインダストリー振興会議

3)大政健史 “動物細胞培養による物質生産系構築とティッシュエンジニアリングへの応用” 照井賞受賞講演 日本生物工学会、平成16年度大会 2F13-4,5, 要旨集 p.185 2004年、9/21-23、名城大学、名古屋

4)大政 健史, 橋本 忠明, 大西 真亮, 岸本 通雅, 吉川 智啓, 三宅 正人, 大竹 久夫 “Cell-based screening system 開発に向けた薬物応答細胞と薬物代謝測定系開発” 日本生物工学会、平成16年度大会 2F11-5, 要旨集 p.184 2004年、9/21-23、名城大学、名古屋

5)大政健史、大西真亮、橋本忠明、岸本通雅、絵野沢伸、大竹久夫 “マイクロリアクターを用いた薬物代謝評価システム構築の試み” 第11回 HAB 研究機構学術年会、O-2、2004年5/18-19 昭和大学、東京 要旨集 p.46

6)大政健史 “動物細胞の産業応用；蛋白質生産からバイオ人工臓器迄”第2回最先端バイオテクノロジー公開セミナー 化学工学会関

西支部 P20, 2004 年 5/13、神戸女学院大、西宮

7)大西真亮、橋本忠明、金和美、門脇洋平、岸本通雅、大政健史、絵野沢伸、大竹久夫 “肝由来細胞株を用いた薬物代謝バイオ血液浄化システム構築” 化学工学会第 69 年会, Q205, CD-ROM、全 1 ページ 要旨集 p.719, 2004 年 4/2-4、大阪府立大学、堺

4.その他

受賞: 社団法人 日本生物工学会 第 27 回 照井賞 「動物細胞培養による物質生産系構築とそのティッシュエンジニアリングへの応用」 平成 16 年度

H.知的財産権の出願・登録状況

1)大政健史、大竹久夫

” 組換えヒト細胞、ならびにその組換えヒト細胞を用いてヒト薬物代謝酵素 の誘導および薬物代謝の少なくとも一方を評価する方法” 特願 2004-046675 号