

細胞での CYPs mRNA 発現量の相関係数が良好な値に推移し、発現レベルが一致してきたと考えられる。

Bowen らは非凍結で供給されたヒト肝細胞を用い、遊離肝細胞に調製した直後と 5 日間培養した状況で CYP1A1 および CYP3A4 mRNA 発現量を定量した結果、培養により CYP1A1 発現量は増加し、CYP3A4 発現が著しく減少したことを報告している(Bowen et al., 2000)。また、我々の研究においても、凍結で供給されたヒト肝細胞でも培養操作により経時的に薬物代謝酵素の mRNA 発現量が低下することを報告した(Nishimura et al., 2003b)。この変動は、細胞が肝臓内での生理的な活動環境から培養液に浸されて生存のみが主な生理的活動になる単層培養に馴化する平衡反応と考えられる。本研究では、CYP1A2 および CYP3A4 mRNA の発現量は培養 24 時間後まで急速に低下しその後はほぼ一定値に経過していた。このような過程において、CYP1A2 mRNA の発現は常にキメラマウスがヒト肝細胞より高値を示したものの、3 例で良好な相関性が見出されたことは特筆すべき結果であった。一方、CYP3A4 mRNA の発現変動は、3 例の中で 2 例はヒトとキメラマウスで同程度に推移し、1 例は CYP1A2 mRNA と同じくキメラマウスが高値に推移した。いずれにしても、培養開始からの変動は相似した推移であった。mRNA 発現量に個体差が見られたが、Rodriguez-Antona ら(2001)は CYP1A2 mRNA の個体差は 582 倍、CYP3A4 mRNA では 128 倍と報告しており、本研究はこの報告の範囲内であった。

ヒト肝細胞では β -NF による CYP1A2 mRNA の誘導と Rif 暴露による CYP3A4 mRNA の誘導が見られ、薬

物代謝活性と酵素タンパク量の変動で示した Roymans ら(2004)の報告と類似した結果であった。キメラマウスの反応性については、CYP1A2 mRNA に関して、若干の相違はあるものの、3 例共にヒト肝細胞と同じ誘導作用が確認できた。しかし、CYP3A4 mRNA 発現の誘導はヒト肝細胞と比べて 3 例中 2 例は微弱であった。キメラマウス肝細胞を用いた CYP3A4 mRNA の誘導評価は、あらかじめ Rif のような陽性対照薬を用いて反応性を確認する必要がある。パイロット研究でドナーとして用いる肝細胞を取捨選択することが肝要であると思われる。

E. 結論

本研究では、ヒト肝細胞と、それをドナーに用いたキメラマウス肝細胞を用い、薬物動態研究等にヒト肝細胞を用いる研究手法で反応性を比較した。その結果、培養 48 時間以降になるとキメラマウス肝細胞の CYPs mRNA の発現量がヒト肝細胞と同程度になることが確認でき、ヒト肝細胞の代替試料として用いることが可能と考えられた。しかし、Rif 暴露による CYP3A4 mRNA 反応性の個体差のように、キメラマウス肝細胞はドナーのヒト肝細胞の生理的反応性を定量的に引き継いでいない場合もあることに注意を要する。キメラマウス肝細胞を用いた研究では、ドナー肝細胞の機能がどの程度引き継がれているかを確認することが必要と考えられた。

F. 健康危険情報：なし

G. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 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

In vitro evaluation of drug induction of human drug-metabolizing enzyme mRNA using hepatocytes isolated from chimeric mice bearing human hepatocytes

第 19 回日本薬物動態学会年会、平成 16 年 11 月 17-19 日、金沢

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

I. 補足 (文中で使用した引用論文を示す)

Bowen, W. P., Carey, J. E., Miah, A., McMurray, H. F., Munday, P. W., James, R. S., Coleman, R. A. and Brown, A. M.: Measurement of cytochrome P450 gene induction in human hepatocytes using quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Drug Metab. Dispos.*, **28**: 781-788 (2000).

Garcia, M., Rager, J., Wang, Q., Strab, R., Hidalgo, I. J., Owen, A., Li, J.: Cryopreserved human hepatocytes as alternative in vitro model for cytochrome p450 induction studies. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, **39**: 283-287 (2003).

Nishimura, M., Yoshitsugu, H., Naito, S. and Hiraoka, I.: Evaluation of gene induction of drug-metabolizing enzymes and transporters in primary culture of human hepatocytes using high-sensitivity real-time reverse transcription PCR. *Yakugaku Zasshi*, **122**: 339-361 (2002).

Nishimura M, Yaguti H, Yoshitsugu H, Naito S and Satoh T (2003a) Tissue distribution of mRNA expression of

human cytochrome P450 isoforms assessed by high-sensitivity real-time reverse transcription PCR. *Yakugaku Zasshi* **123**:369-375.

Nishimura M, Ueda N and Naito S Effects of dimethyl sulfoxide on the gene induction of cytochrome P450 isoforms UGT-dependent glucuronosyltransferase isoforms, and ABCB1 in primary culture of human hepatocytes. *Biol Pharm Bull* **26**:1052-1056 (2003b).

Nishimura, M., Naito, S. Induction of Human CYP1A2 and CYP3A4 in Primary Culture of Hepatocytes from Chimeric Mice with Humanized Liver ; *Drug Metab. Pharmacokinet.*, (in press).

Tateno, C., Yoshizane, Y., Saito, N., Kataoka, M., Utoh, R., Yamasaki, C., Tachibana, A., Soeno, Y., Asahina, K., Hino, H., Asahara, T., Yokoi, T., Furukawa, T., Yoshizato, K.: Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am. J. Pathol.*, **165**: 901-12 (2004).

Seglen, P. O.: Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol.*, **13**: 29-83 (1976).

Li, A. P., Lu, C., Brent, J. A., Pham, C., Fackett, A., Ruegg, CE., Silber, PM.: Cryopreserved human hepatocytes: characterization of drug-metabolizing enzyme activities and applications in higher throughput screening assays for hepatotoxicity, metabolic stability, and drug-drug interaction potential.: *Chem. Biol. Interact.*, **121**: 17-35 (1999).

Lu, C., Li, A. P.: Species comparison in P450 induction: effects of dexamethasone, omeprazole, and rifampin on P450 isoforms 1A and 3A in

primary cultured hepatocytes from man, Sprague-Dawley rat, minipig, and beagle dog. *Chem. Biol. Interact.*, **134**: 271-281 (2001).

Rodriguez-Antona, C., Donato, M. T., Pareja, E., Gomez-Lechon, M. J., Castell, J. V.: Cytochrome P-450 mRNA expression in human liver and its relationship with enzyme activity. *Arch. Biochem. Biophys.*, **393**: 308-315 (2001).

Roymans, D., Van Looveren, C., Leone, A., Parker, J. B., McMillian, M., Johnson, M. D., Koganti, A., Gilissen, R., Silber,

P., Mannens, G. and Meuldermans, W.: Determination of cytochrome P450 1A2 and cytochrome P450 3A4 induction in cryopreserved human hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.*, **67**: 427-437 (2004).

Wilkening, S., Stahl, F., Bader, A.: Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab. Dispos.*, **8**: 1035-1042 (2003).

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ペルオキシソーム増殖剤の影響

主任研究者 横井 毅 金沢大学 薬学部

協力研究者 池田 敏彦 三共株式会社 薬剤動態研究所 所長

研究要旨

ヒト肝細胞キメラマウスは、広島大学大学院理学研究科の吉里勝利教授が総括する、広島県地域結集型共同研究事業で開発されたマウスであり、ヒトにおける薬物動態や安全性を予測する上で有用な実験動物になり得ると期待されている。本マウスは、肝障害を発症するアルブミンウロキナーゼプラスミノージェンアクチベータートランスジェニックマウス (uPA マウス) と免疫不全の SCID マウスを交配して生じた免疫不全肝障害マウス (uPA (+/+) /SCID (+/+) マウス) にヒト肝細胞を移植して作製された。

一方、フタル酸エステルのようなペルオキシソーム誘導剤を、マウスやラットに投与すると、肝臓のペルオキシソームが顕著に増殖し、さらに長期投与では癌が発生する。このような現象は、ヒトでは起こらないといわれているが、ヒトにおける安全性を評価する適切な評価系の確立が必要とされている。

ヒト肝細胞キメラマウスは、同一個体がヒト肝細胞とマウス肝細胞を有していることから、ペルオキシソーム増殖剤による影響をヒトとマウスで比較するための最適なモデルと思われる。そこで本研究では、ペルオキシソームを増殖させることで有名なプラスチック可塑剤、ジエチルヘキシルフタレート (DEHP) をヒト肝細胞キメラマウスに 10 日間 1%混餌投与し、肝臓中のヒトの細胞領域およびマウスの細胞領域におけるペルオキシソーム増殖の差を観察した。

電子顕微鏡および免疫組織化学的観察の結果、キメラマウス肝臓のマウス肝細胞の領域では、ペルオキシソームの顕著な増殖が確認された。一方、ヒト肝臓の領域では、ペルオキシソームの増殖は認められなかった。

以上の結果から、ヒト肝細胞キメラマウスは、マウスやラットでペルオキシ

ソームの増殖が確認された新薬の、ヒトにおける安全性を予測する最適な実験系になり得ることが示唆された。

A. 研究目的

広島大学大学院理学研究科の吉里勝利教授を統括とする、広島県地域結集型共同研究事業では、肝障害マウス (uPA マウス:参考文献:Cell, vol. 62, 447-456, 1990) と免疫不全マウス (SCID マウス) とを交配させることによって免疫不全肝障害マウス (uPA/SCID マウス) を作製し、さらにヒト肝細胞を移植することにより、マウス肝臓がヒト肝細胞で置換されたヒト肝細胞キメラマウスを作製することに成功した (参考文献: Am J Pathol. 165, 901-912, 2004)。キメラマウス肝臓中のヒト肝細胞は、ヒト型薬物代謝酵素などのヒト肝細胞機能を保持しているため、キメラマウスは医薬品開発において、ヒトにおける薬物動態あるいは安全性を予測するための重要なモデル動物として利用できることが期待される。

本研究では、ヒト肝細胞キメラマウスにペルオキシソーム増殖剤を投与し、投与後の肝臓を観察することにより、ヒトの肝細胞の領域とマウスの肝細胞の領域でペルオキシソーム増殖剤に対する応答性の差異を比較検討した。

B. 研究方法

ヒト肝細胞キメラマウスは、フェニックスバイオ株式会社にて、インビトロテクノロジーズ (IVT) 社より

購入したヒト肝細胞、IVT-079 を脾臓より注入することにより作製した。移植約 4 週間後に血中ヒトアルブミン濃度を測定し予想置換率を求めた。移植後 2 ヶ月のヒト肝細胞キメラマウス 9 匹に、プラスチック可塑剤として有名なペルオキシソーム増殖剤 DEHP を 10 日間 1% 混餌 (CE-2: 日本クレア株式会社) 投与した。今回、予想置換率 60% のマウスについて肝臓をホルマリンで固定後、パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン/エオジン (HE) および各種抗体を用いた免疫組織染色を行った。また、ヒト肝臓の対照群として、エイチ・エー・ビー研究機構から入手したヒト肝臓組織 (32 歳、ヒスパニック系女性) をホルマリン固定し、同様の処理を行った。

C. 研究結果

C-1. HE 染色

キメラマウス肝臓中にヒト肝臓組織と考えられる結節状の構造が認められた。結節を構成する細胞は細胞質が明るいのが特徴的であった (図 1)。

C-2. ヒトアルブミン抗体染色

HAB 協議会より入手したヒト肝臓組織から抗体の反応がヒト特異的であることを確認した (図 2)。本抗体を用いてヒト肝細胞移植キメラマウス

を観察した結果、結節状の細胞集団が陽性に染まりヒト肝細胞であることを確認した（図3）。

C-3. ヒトカタラーゼ抗体染色

同様に、HAB 協議会より入手したヒト肝組織でペルオキシソームが顆粒状に染色され、本抗体がヒト特異的であることを確認した（図4）。DEHP 投与群のヒト肝細胞キメラマウスでは結節状のヒト肝細胞質中にペルオキシソームが顆粒状に観察されたがペルオキシソームの数は、ヒト正常肝並で、増殖は認められなかった（図5）。

C-4. 電子顕微鏡による観察

DEHP 投与ヒト肝細胞移植キメラマウスでは、マウス肝細胞領域でペルオキシソームの顕著な増殖が観察されたが、ヒト肝細胞領域ではペルオキシソームの増殖は認められなかった（図6）。

D. 考察 DEHP 投与により、キメラマウス肝臓中のマウス肝細胞選択的にペルオキシソームの増殖が確認された。

E. 結論

ペルオキシソーム増殖剤のヒトにおける安全性の予測にヒト肝細胞キメラマウスが非常に有用であることが示唆された。

F. 健康危険情報：なし

G. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

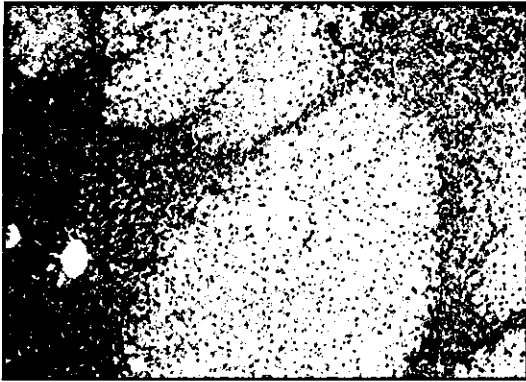


図1 ヒト肝細胞キメラマウス肝臓の
HE染色 (x10)

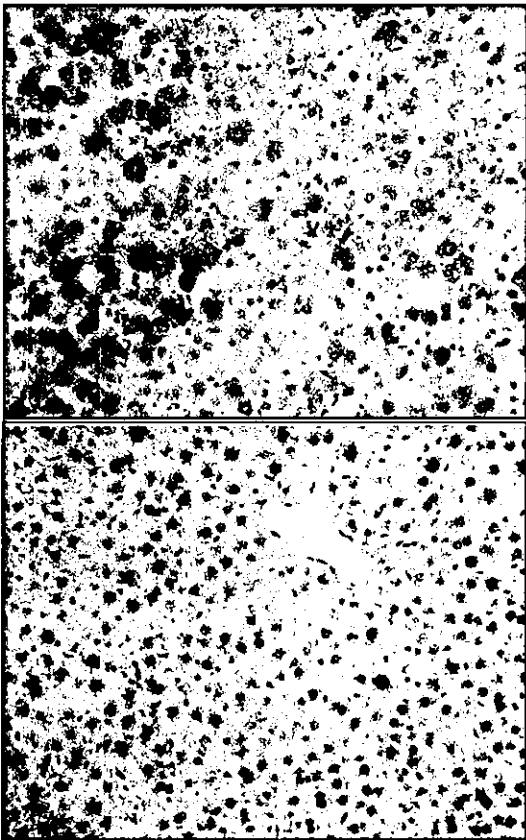


図2 ヒトアルブミン抗体染色 (x20)
上：ヒト肝組織
下：uPA/SCID マウス肝組織

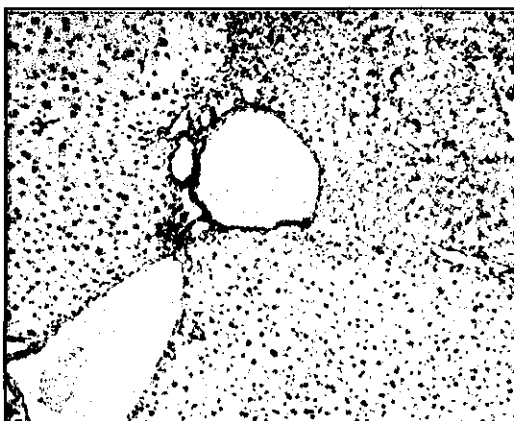


図3：ヒト肝細胞キメラマウス肝臓の抗
ヒトアルブミン抗体染色 (x10)

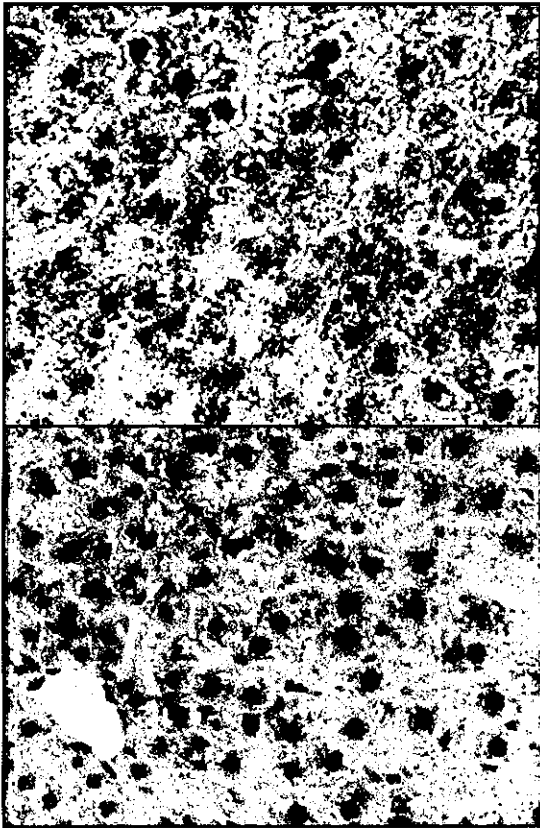


図4 ヒトアルブミンカタラーゼ抗体染色 (x40)

上：ヒト肝組織

下：uPA/SCID マウス肝組織

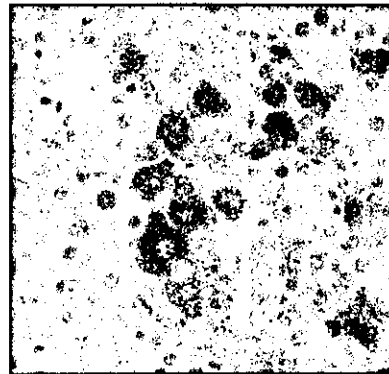
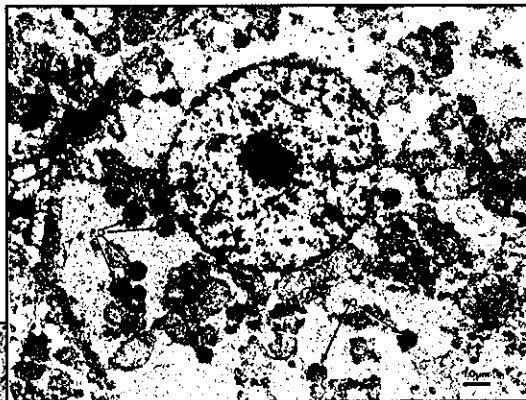
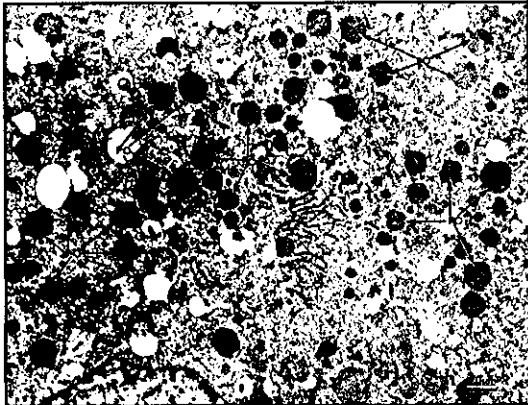


図5：ヒト肝細胞キメラマウス肝臓の抗ヒトカタラーゼ抗体染色 (x40)

図6：ヒト肝細胞キメラマウス肝臓の電子顕微鏡観察像

上：ヒト肝細胞領域

下：マウス肝細胞領域



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 Phase II 酵素に関する検討

分担研究者 中島 美紀 金沢大学薬学部 助教授
協力研究者 加藤 美紀 金沢大学薬学部

研究要旨

マウス肝の 80%以上をヒト肝細胞に置換可能なヒト肝細胞キメラマウスは、ヒトにおける薬物動態を予測するのに有用な動物モデルになり得ることが期待される。昨年度までに、キメラマウスの肝にヒト CYP が発現しており、ドナーと同様の酵素活性を持つことを明らかにした。そこで、本年度は Phase II 反応を担う薬物代謝酵素である硫酸転移酵素 (SULT)、N-アセチル転移酵素 (NAT)、グルタチオン S-転移酵素 (GST)、グルクロン酸転移酵素 (UGT) に注目し、キメラマウスにおける発現とその機能を明らかにすることを目的に、mRNA、タンパク、酵素活性レベルでの検討を行った。

キメラマウスの肝におけるヒト UGT、SULT、NAT および GST の発現および薬物抱合能を明らかにするため、様々なヒトアルブミン (hAlb) 濃度を示したキメラマウスを用いて、mRNA 発現量、タンパク発現量、酵素活性を測定した。その結果、mRNA 発現量、タンパク発現量、酵素活性ともに hAlb 濃度依存的な増加が認められた。また、ヒトに特異的なモルフィン 6-グルクロン酸抱合活性、トログリタゾン硫酸抱合活性、エストロン硫酸抱合活性およびスルファミタジン N-アセチル抱合活性でドナーと同程度の活性を有することが認められた。これより、ヒト肝細胞キメラマウスの肝には、ヒト UGT、SULT、NAT および GST が発現しており、かつヒトの薬物抱合能を有することを明らかにした。

医薬品開発において候補化合物の体内動態を明らかにすることは、有効性および安全性評価において重要である。特に薬物代謝についての詳細な検討は必須項目である。本章における Phase II 酵素に関する基礎的な検討結果を含め、ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト薬物代謝酵素の発現を明らかにすることにより、ヒト肝における薬物の代謝を総括的に実験動物モデルで予測すること

が可能と考えられる。本研究は、ヒト肝細胞キメラマウスの薬物代謝試験への応用を示した研究であり、今後の薬物動態研究をはじめとし医薬品開発に大きく貢献するものと期待できる。

A. 研究目的

近年、医薬品開発において候補化合物の体内動態を明らかにすることは、有効性および安全性評価の要となるため重要であることが広く認識されている。最近 10 年間で、候補化合物が臨床試験開始後に開発中止にいたった理由の約 40%が体内動態に関連するものである。薬効および副作用発現に関連する薬物の体内動態には人種差、個体差が認められており、その原因は薬物の吸収・分布・代謝・排泄過程の差によると考えられる。特に、体内動態に大きな影響を与えるものは代謝過程である。

現在、新規医薬品候補化合物のヒトにおける代謝反応の予測は、ヒト肝ミクロソーム (HLM)、ヒトチトクロム P450 (CYP) 発現系、初代ヒト肝培養細胞 (ヒト肝細胞) あるいはヒト肝スライスなどを用いた *in vitro* 実験系で検討される。頻用されている HLM は、CYP 酵素活性を減少させることなく数年間凍結保存することが可能である。しかし、化合物による CYP の誘導を評価することはできない。ヒト肝細胞は、すべての薬

物代謝酵素が発現しているが、培養を続けるにつれて酵素活性が減少する。加えて、ヒト肝由来の試料は、社会的、倫理的問題を伴い、安定供給に様々な問題がある。これに対し、ラットやマウスなどの実験動物を用いた *in vivo* 実験系は、化合物の全身体内動態を明らかにすることが可能であるという点で有用である。しかし、ヒトとげっ歯類の間には薬物代謝能において大きな種差が存在する。

これらの問題を解決するために様々な研究がなされてきている。Watanabe ら (2003b) は不死化ヒト肝星細胞を用いた人工肝臓を作製した。この細胞モデルでは、CYP3A4 および CYP2C9 のタンパク発現は認められているが、酵素活性については明らかにされていない。また、ヒト肝細胞を増殖させることが可能なヒト肝細胞キメラマウスの開発も行われている。Dandri ら (2001) は免疫不全肝障害マウスにヒト肝細胞を移植し、マウス肝の約 15%をヒト肝細胞に置換することに成功した。同様に、Mercer ら (2001) は 50%以上置換することに成功した。しかし、両者ともヒト肝ウイルス感染に關す

る報告であったため、ヒト薬物代謝酵素の発現に関する情報はない。

最近、分担研究者である吉里勝利教授により、マウス肝の80%以上がヒト肝細胞に置換されたヒト肝細胞キメラマウスが樹立された (Tateno et al., 2004)。これは、肝障害を呈するウロキナーゼプラスミノーゲンアクチベーター (uPA) (+/+) トランスジェニックマウスと免疫不全マウスである SCID マウスを交配することにより得られる、両形質を有する uPA^{+/+}/SCID マウスにヒト肝細胞を移植して作製する。これまで、マウス肝の80%以上をヒト肝細胞に置換できた例はなく、極めて画期的なキメラマウスと考えられる。このキメラマウスの技術は、少量のヒト肝細胞から同一の肝組織を無限に増殖させることが可能であり、キメラマウスの肝をヒト肝試料として医薬品開発時の薬物動態試験に応用できるか検討することには大きな意義があると考えられる。

CYP は薬物を含む生体異物や内因性化合物などの代謝において重要な役割を担っている。これまで、我々はキメラマウスの肝にはヒト CYP が発現しており、ドナーと同程度の酵素活性を有することを明らかにした (Katoh et al., 2004)。さらに CYP の代表的な誘導薬であるリファンピ

シンおよび 3-MC を用いた実験で、キメラマウスの肝に発現しているヒト CYP は誘導能を有することが明らかになった (Katoh et al., 2005)。

しかし、薬物の代謝には CYP だけではなく、硫酸転移酵素 (SULT)、N-アセチル転移酵素 (NAT)、グルタチオン S-転移酵素 (GST)、グルクロン酸転移酵素 (UGT) などの Phase II 反応に関与する薬物代謝酵素 (Phase II 酵素) も関与している。親化合物が直接抱合を受ける場合もあるが、Phase I 代謝物が抱合され排泄されることも多い。特に近年では、医薬品の非臨床試験において、代謝過程で CYP の関与が小さく、CYP を介した相互作用が少ないと予想される化合物が選択される傾向にある。すなわち、薬物の代謝に関して相対的に Phase II 酵素の寄与が大きくなると考えられる。実際に、多くの薬物が抱合反応を受けることから、キメラマウスの薬物動態学試験への応用に際して、キメラマウスの肝に Phase II 酵素が発現しているかを検討することは極めて重要である。

そこで、本研究では分担者である中島は、昨年度の CYP の発現に関する検討に引き続き、本年度はヒト肝細胞キメラマウス由来の肝ミクロソームを中心に、Phase II 酵素である UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT)、

硫酸転移酵素 (SULT)、N-アセチル転移酵素 (NAT) およびグルタチオンS-転移酵素 (GST) について、RT-PCRを用いてmRNAの発現レベルを、ウエスタンブロット分析によりタンパクの発現レベルを、HPLC分析により各種酵素活性レベルを検討し、ヒト肝細胞キメラマウスの有用性の確立を目指して実験を行った報告を記す。

B. 研究方法

B-1. 実験動物

本章ではヒト肝細胞キメラマウス作製にあたり、ドナーA (白人, 男性, 9ヶ月) とドナーB (日本人, 男性, 12歳) の肝細胞を用いた。雄性 uPA^{+/+}/SCID マウスおよび uPA^{-/-}/SCID マウスは、日本チャールズリバー (Yokohama, Japan) より入手した。

キメラマウスの作製方法を簡単に以下に示す。生後 20 から 30 日齢の uPA^{+/+}/SCID マウスの脾臓からヒト肝細胞を移植した。必要に応じて、補体抑制作用のあるメシル酸ナファモスタットを腹腔内投与した。本章で使用したキメラマウスを Table 1 に示す。なお、ELISA 法により測定したキメラマウスの血中ヒトアルブミン濃度 (human albumin concn., hAlb) と、ヒト特異的サイトケラチン 8/18 抗体による免疫染色から算出

した置換率 (replacement index, RI) は相関が認められているため (Tateno et al., 2004)、Table 1 に併記した。

Table 1. Chimeric mice used in the present study.

Mouse No.	Donor	hAlb	RI
		mg/ml	%
1	A	0.0	0
2	A	0.6	20
3	A	1.2	30
4	A	3.1	50
5	A	6.5	60
6	A	9.3	70
7	A	10.8	80
8	A	13.7	90
9	A	13.7	90

11 ^a	B	0.0	0
12 ^a	B	1.6	30
13 ^a	B	2.1	50
14 ^a	B	3.5	60
15 ^a	B	7.7	90

A: Caucasian, male, 9 months.

B: Japanese, male, 12 years.

^aTotal hepatic RNA in No. 11 - 15 could not be obtained in this study.

B-2. ヒト肝細胞

ドナーA の凍結ヒト肝細胞は、In Vitro Technologies (Catonsville, Japan) より購入した。ドナーB の肝細胞は、両親からのインフォームドコンセントのもと入手した。

B-3. 試薬

ISOGENは日本ジーン (Tokyo, Japan) より購入した。MMLV-逆転写酵素 (reverse transcriptase, RT)、制限酵素*Kpn I*および*Bam H I*は東洋紡 (Osaka, Japan) から購入した。ランダムヘキサマー、Takara Ex Taq™ R-PCR Version、SYBR® GREEN Iおよび制限酵素*Taq I*は宝酒造 (Osaka, Japan) より購入した。オリゴヌクレオチドは、北海道システムサイエンス (Sapporo, Japan) に合成を依頼した。プールドヒト肝ミクロソーム、プールドヒト肝サイトゾル (HLC)、ヒトUGT1A1およびヒトUGT2B7を発現させたバキュロウイルス発現系ミクロソーム、ウサギ抗ヒトUGT1A1抗体、ウサギ抗ヒトUGT2B7抗体はBD Gentest (Worburn, MA) より購入した。ヒトSULT1Eを発現させたバキュロウイルス発現系サイトゾル、ヒトSULT2A1を発現させたバキュロウイルス発現系サイトゾル、ウサギ抗ヒトSULT1E抗体、ウサギ抗ヒトSULT2A1抗体、ヒトGSTA1-1を発現させた発現系サイトゾルおよびウサギ抗ヒトGSTA1-1抗体はOxford Biomedical Research (Oxford, MI) より購入した。ビオチン化抗ウサギIgG抗体、ペルオキシダーゼ標識アビジンビオチン複合体はVector

(Burlingame, CA) より購入した。発色用3,3'-ジアミノベンチジンは同仁化学 (Kumamoto, Japan) より購入した。アセチルカルニチン、カルニチンおよびスルファメタジンはSigma-Aldrich (St. Louis, MO) より購入した。その他の試薬は、特級、生化学用および高速液体クロマトグラフィ用のもを用いた。また、以下に本章で使用した溶液等の組成を示した。表示のないものは1 L当たりの濃度または量で示した。

DEPC処理精製水

DEPCの最終濃度が0.1%になるように精製水に加え、37°Cで2時間加温した。その後、121°C、40分間オートクレーブした。

5x逆転写反应用緩衝液

250 mM Tris-HCl (pH8.3)、375 mM KCl、15 mM MgCl₂、50 mM DTT

5x SGI緩衝液

Ex Taq R-PCR version 10x Buffer (Mg²⁺ free) 250 μL、250 mM Mg²⁺ Solution 30 μL、100x SYBR® GREEN Iを8.4 μL、10 mM dNTPs 75 μL、5 U/μL Ex Taq R-PCR version 25 μLに滅菌精製水を加えて全量を500 μLとした。

TE
10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、1 mM
EDTA

0.5x TBE
オートクレーブにより滅菌した 5x
TBE (Tris 54.0 g、ホウ酸 27.5 g、
EDTA 4.7 g) を精製水で 10 倍希釈

ホモジナイズ緩衝液
0.1 M Tris-HCl、0.1 M KCl、1 mM
EDTA (pH 7.4)

TGE緩衝液
10 mM Tris-HCl、20% Glycerol、1
mM EDTA (pH 7.4)

サンプル処理液
SDS 6.0 g、2 M Tris-HCl緩衝液 (pH
6.8) 20 mL、ピロニンY 6.0 mg、グ
リセロール 60 mLに超純水を加え、
全量を192 mLとした。

SE
5 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0)、50
mM EDTA、0.5% N-ラウロイルサル
コシンナトリウム

フェノール溶液
フェノールを1 M Tris-HCl緩衝液
(pH 7.4) で平衡化後、8-ヒドロキ
シキノリンを0.1%、2-メルカプトエ

タノールを0.2%になるよう加えた。

フェノール/クロロホルム溶液
フェノールにクロロホルムを等量加
え、1 M Tris-HCl緩衝液 (pH 7.4)
で平衡化後、8-ヒドロキシキノリン
を0.1%、2-メルカプトエタノールを
0.2%になるよう加えた。

クロロホルム溶液
クロロホルムとイソアミルアルコー
ルを24:1 (v/v) の比で混合

B-4. 肝からのtotal RNAの調製

ISOGENのマニュアルに修正を加
え、以下の方法で肝臓からtotal RNA
を調製した。肝切片に、ISOGENを
加えてホモジナイズ後、サンプルチ
ューブに分注し、クロロホルムを加
えて激しく15秒間攪拌した。室温で3
分間放置した後、4°C、14,000 gで15
分間遠心分離した。上清を別のチュ
ープに採取し、イソプロパノールを
加えて室温にて8分間放置した後、4°C、
13,000 gで10分間遠心分離した。沈
殿を75%エタノールで洗浄した。この
沈殿を乾燥させた後、DEPC処理精製
水に溶解させ、260 nmにおける吸光
度を測定することにより定量した。
同時に300 nmの吸収を基準として
280 nmと260 nmの吸光度を測定し、
その比をタンパク質混入の有無の指

標とした。なお、ドナーAの肝を入手することができなかつたため、total RNAを調製できなかつた。

B-5. RT-PCR法によるヒトmRNA発現量の定量

UGT1A1、UGT1A9、UGT2B7、SULT1A1、SULT1B1、SULT2A1、NAT1、NAT2、GSTA1、GSTA2およびGSTT1 mRNAの定量は大塚製薬工場株式会社（東京）に依頼し、Taq-Man™プローブ法にて行った（Nishimura et al., 2002）。本章で使用したプライマーはマウスと交差反応を示さないことを確認した。

UGT1A1

(GenBank accession number NM_000463)

Sense primer (187-207):
5'-GACGCCTCGTTGTACATCAGA-3'
Anti-sense primer (269-249):
5'-TCTTTACATCCTCCCTTTGG-3'
TaqMan probe (209-238): 5'-ACGGAG
CATTTTACACCTTGAAGACGTACC-3'

UGT2B7

(GenBank accession number NM_001074)

Sense primer (14-42): 5'-GGACTTC
AGTAATTTTGCTAATACAACCTG-3'
Anti-sense primer (98-80):
5'-TATTCTGCTGCCACACCA-3'
TaqMan probe (76-47): 5'-CCTTTCC
ACAATTCCCAGAGCTAAAGCAAA-3'

SULT1A1

(GenBank accession number NM_001055)

Sense primer (391-408):
5'-AACGCAAAGGATGTGGCA-3'
Anti-sense primer (510-491):
5'-TCCGTAGGACACTTCTCCGA-3'
TaqMan probe (431-452):
5'-ACATGGCCAAGGTGCACCCTGA-3'

SULT1B1

(GenBank accession number NM_014465)

Sense primer (386-404):
5'-TGGCTCGTAATGCCAAGGA-3'
Anti-sense primer (518-498):
5'-CAGGAACCATAGGCCACTTTT-3'
TaqMan probe (448-479): 5'-CAGCCTTT
TCCTGGTACCTGGGAAGAATATCT-3'

GSTA1

(GenBank accession number S49975)

Sense primer (151-170):
5'-ATGTTCCAGCAAGTGCCAAT-3'
Anti-sense primer (519-501):
5'-ACTGGAGTCAAGCTCCTCG-3'
TaqMan probe (331-361): 5'-
GTATGTCC
ACCTGAGGAAAAAGATGCCAAGC-3'

また、ヒトSULT1E1 mRNA発現量の定量は、total RNAからcDNAを合成し、得られたcDNA溶液を用いて以下のようにPCRを行った。cDNA溶液 1 μ L、10 μ M センスプライマー 1 μ L、10 μ M アンチセンスプライマー 1 μ L、5x SGI緩衝液 5 μ Lに滅菌精製水を加え、全量を25 μ Lとした。Smart Cycler[®] System (Cepheid, Sunnyvale, CA) を用いてPCR反応を行い、蛍光をreal timeで検出することにより定量を行った。本章で使用したヒトSULT1E1プライマーを下記に示す。本章で使用したヒトSULT1E1プライマーはマウスSULTと交差反応を示さないことを確認した。

SULT2E1

(GenBank accession number NM_005420)

Sense primer (277-297):

5'-AAACAATTAGATGAGATGAAT-3'

Anti-sense primer (450-433):

5'-ATTTGGATGACCAGCCAC-3'

B-6. 肝ミクロソームおよび肝サイトゾルの調製

採取したキメラマウス、uPA^{+/-}/SCIDマウスおよびuPA^{-/-}/SCIDマウス肝を用いた。採取したマウス肝に、肝重量の3倍容のホモジナイズ緩衝液を加え、ポリトロンにより細切後、テフロンホモジナイザーにてホ

モジナイズした。ホモジネートを9,000 g、4°Cで20分間遠心分離後、上清をさらに105,000 g、4°Cで90分間遠心分離した。得られた上清をサイトゾルとした。また沈殿物にホモジナイズ緩衝液を加えてホモジナイズ後、105,000 g、4°Cで60分間遠心分離した。得られた沈殿物を肝重量の1倍容のTGE緩衝液に懸濁しミクロソームとした。また、Bradford法 (Bradford, 1976) に従い Protein Assay kit を用いてサイトゾルタンパクの定量を行った。なお、ドナーAについては肝を入手することができなかったため、肝ミクロソームおよび肝サイトゾルを調製できなかった。

B-7. SDS-PAGEとウエスタンブロット分析によるヒトPhase II酵素タンパクの定量

Laemmli (1970) およびTowbinら (1979) の方法に修正を加え、以下の方法により測定を行った。

肝ミクロソームおよび肝サイトゾルにサンプル処理液と2-メルカプトエタノールを加えた後、100°Cで3分間煮沸し、ポリアクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEを行った。SDS-PAGE後、Immobilon膜 (Millipore, Billerica, MA) に電氣的に転写した。1次抗体、2次抗体、3次抗体反応後の発色は0.06%の3,3'-ジ

アミノベンチジン四塩酸塩を用い、GS-700 デンシトメーター (Bio-Rad) にて定量した。予備検討の結果より、各ヒトUGT、SULT、GST抗体は本章の実験条件ではマウスUGT、SULT、GSTと交差反応を示さないことを確認した。

B-8. Phase II 酵素活性測定

B-8-1. モルフィン 6-グルクロン酸抱合活性測定

モルフィン6-グルクロン酸抱合活性はWatanabeら (2002) の方法に修正を加えて以下のように測定した。反応溶液は1 mM モルヒネ、100 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.4)、5 mM MgCl₂、25 µg of alamethicin/mg microsomal protein、0.5 mg/mLミクロソームタンパク、30 mM UDP-グルクロン酸とした。反応停止後、13,000 gで10分間遠心分離し、上清80 µLをHPLCに注入した。HPLCによる分析にはL7100ポンプ (日立製作所, Tokyo, Japan)、L7200オートサンプラー (日立製作所)、L7405 UV検出器 (日立製作所)、Uni-3ノイズベースクリーン (ユニオン, Gunma, Japan)、CTO-6Aカラムオープン (島津製作所, Kyoto, Japan) を用いた。カラムはDevelosil C30-UG (野村化学, Aichi, Japan) を用い、移動相は50 mMリン酸二水素ナトリウム溶液

とした。カラム温度は35°C、流速は1.5 mL/minとし、溶離液をUV 285 nmでモニターし、D-2000インテグレーター (日立製作所) に出力した。

B-8-2. トログリタゾン硫酸抱合活性の測定

トログリタゾン硫酸抱合活性はHonmaら (2001) の方法に修正を加えて以下のように測定した。反応溶液は最終濃度が1 µMトログリタゾン、50 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.4)、1 mM DTT、0.5 mg/mLサイトゾルタンパク、100 µM PAPSとした。反応停止後、13,000 gで10分間遠心分離し、上清80 µLをHPLCに注入した。HPLCによる分析にはL7100ポンプ、L7200オートサンプラー、L7405 UV検出器、Uni-3ノイズベースクリーン、CTO-6Aカラムオープンを用いた。カラムはYMC-PACK ODS-A 302 (YMC, Kyoto, Japan) を用い、移動相は42%アセトニトリル/0.05%リン酸 (v/v) とした。カラム温度は35°C、流速は1.5 mL/minとし、溶離液をUV 230 nmでモニターし、D-2000インテグレーターに出力した。

B-8-3. エストロン硫酸抱合活性の測定

エストロン硫酸抱合活性はSuzukiら (2003) の方法に修正を加え以下

のように測定した。反応溶液は50 μ M エストロン、50 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.4)、1 mM DTT、7 mM MgCl₂、0.8 mg/mL サイトゾルタンパク、100 μ M PAPS とした。反応停止後、13,000 gで10分間遠心分離し、上清80 μ LをHPLCに注入した。HPLCによる分析にはL7100ポンプ、L7200オートサンプラー、L7405 UV検出器、Uni-3ノイズベースクリーン、CTO-6Aカラムオープンを用いた。カラムはCapcell Pak UG120 (SHISEIDO, Tokyo, Japan) を用い、移動相は25% アセトニトリル/50 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 8.0) とした。カラム温度は35°C、流速は1.0 mL/minとし、溶離液をUV 275 nmでモニターし、D-2000インテグレータに出力した。

B-8-4. スルファメタジン N-アセチル抱合活性の測定

スルファメタジンN-アセチル抱合活性はEstrada-Rodgersら (1998) の方法に修正を加え以下のように行った。反応溶液は500 μ Mスルファメタジン、50 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.4)、1 mM DTT、5 mMアセチルカルニチン、0.02 Unitカルニチンアセチルトランスフェラーゼ、0.5 mg/mLサイトゾルタンパク、アセチルコエンザイムAとした。反応停止後、8,000 gで10分間遠心分離し、上清50

μ LをHPLCに注入した。HPLCによる分析にはLC-6Aポンプ (島津製作所)、SIL-6Bオートサンプラー (島津製作所)、SPD-6AV UV検出器 (島津製作所)、SLC-6Bシステムコントローラー (島津製作所)、WIG-7000Aクーリングシステム (Isido, Tokyo, Japan)、Uni-3ノイズベースクリーン、CO-965カラムオープン (日本分光, Tokyo, Japan) を用いた。カラムはMightysil RP-18 (関東化学, Tokyo, Japan) を用い、移動相は5% アセトニトリル/20 mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) とした。カラム温度は35°C、流速は1.0 mL/minとし、溶離液をUV 254 nmでモニターし、C-R7A plusインテグレーター (島津製作所) に出力した。

B-9. 肝ゲノムDNAの調製

Brilliant ら (1991) の方法に従い、ドナーA由来のキメラマウスの肝について以下の操作を行い、ゲノムDNAを調製した。肝切片にTE (pH 7.4) を加えガラスホモジナイザーにてホモジナイズした。その後、別のチューブに移し、SEを加え、さらに1/10量の10 mg/mLアクチナーゼEと10 mg/mL RNaseを10 μ L加え転倒攪拌した後、37°Cで2時間インキュベートした。等量のフェノール溶液を加え、室温で10分間振盪後、20°C、600 g

で10分間遠心分離を行い、上清を回収した。次に等量のフェノール/クロロホルム溶液を加え、室温で10分間振盪後、20°C、600 gで10分間遠心分離を行い、上清を回収し、再度同様の操作を行った。さらに2倍量のクロロホルム溶液を加え、室温で10分間振盪し、20°C、600 gで10分間遠心分離を行い、上清を回収した。0.5% リニア-ポリアクリルアミドを10 μ L 加えた後、冷エタノールを2.5倍容加え、穏やかに転倒攪拌した。-80°Cで30分間冷却した後、4°C、9,000 gにて10分間遠心分離を行った。沈殿を冷70%エタノールで洗浄し、得られたゲノムDNAをTEに溶解した。4°Cで一晩放置後、260 nmにおける吸光度を測定することにより定量した。同時に300 nmの吸収を基準として280 nmと260 nmの吸光度を測定し、その比をタンパク質混入の有無の指標とした。

B-10. ヒトNAT2 遺伝子多型の判定

B-10-1. AS-PCRによる遺伝子判定

NAT2*5の遺伝子判定を2種のAS-PCR法 (A) および (B) を用いて行った。遺伝子判定に用いたプライマーはTable 2に示した。

(A) ゲノムDNAに10x PCR緩衝液 2.5 μ L、10 μ Mのセンスプライマー (341-SW1もしくは341-SM1) と10

μ Mのアンチセンスプライマー (341-AS) をそれぞれ1 μ L、2.5 mM dNTPs 2.5 μ L、25 mM MgCl₂ 1.5 μ L、Taq DNAポリメラーゼ 0.2 μ L (1.0 U) を加え、滅菌精製水にて全量を25 μ Lとし、PCR反応を行った。反応後、アガロースゲルを用いて電気泳動を行い遺伝子断片の長さを確認した。Fig. 1Aに泳動模式図を示した。なお、使用したプライマーはuPA^{+/+}/SCIDマウス、uPA^{-/-}/SCIDマウスの肝から調製したゲノムDNAには交差反応しないことを確認した。

(B) Cascorbiら (1995) の方法に修正を加え、以下のように行った。ゲノムDNAに10x PCR緩衝液2.5 μ L、10 μ Mのセンスプライマー (NAT2-S2) と10 μ Mのアンチセンスプライマー (NAT2-AS2) をそれぞれ0.5 μ L、2.5 mM dNTPs 2 μ L、25 mM MgCl₂ 2.4 μ L、Taq DNAポリメラーゼ 0.2 μ L (1.0 U) を加え、滅菌精製水にて全量を25 μ LとしPCR反応を行った。反応後、アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、886 base pair (bp) の長さの遺伝子断片をゲルごと切り出した。切り出したゲルをシームレスセルロースチューブ (和光純薬工業, Osaka, Japan) に入れ、0.5x TBEを加えた後、電気泳動し、886 bpのPCR産物を含む溶液を回収した。その後、等量のフェノール/クロロホルム溶

液を加え、室温で5分間振盪後、20°C、3,000 gで5分間遠心分離を行い、上清を回収した。さらに等量のクロロホルム溶液を加え、室温で5分間振盪し、20°C、3,000 gで5分間遠心分離を行い、上清を回収した。2.5倍量の冷エタノールと1/10量の3 M酢酸ナトリウム (pH 5.2) 加え、穏やかに転倒攪拌した。-80°Cで30分間冷却した後、4°C、13,000 gにて10分間遠心分離を行った。沈殿を冷70%エタノールで洗浄し、TEに溶解した。切り出した886 bpのPCR産物溶液1 µLに10x PCR緩衝液2.5 µL、10 µMのセンスプライマー (341-SW2もしくはは

341-SM2) と10 µMのアンチセンスプライマー (NAT2-AS2) をそれぞれ0.5 µL、2.5 mM dNTPs 2 µL、25 mM MgCl₂ 1.8 µL、Taq DNAポリメラーゼ 0.2 µL (1.0 U) を加え、滅菌精製水にて全量を25 µLとしPCR反応を行った。反応後、アガロースゲルを用いて電気泳動を行い遺伝子断片の長さを確認した。Fig. 1Bに泳動模式図を示した。なお、使用したプライマーはuPA^{+/-}/SCIDマウス、uPA^{-/-}/SCIDマウスの肝から調製したゲノムDNAには交差反応しないことを確認した。

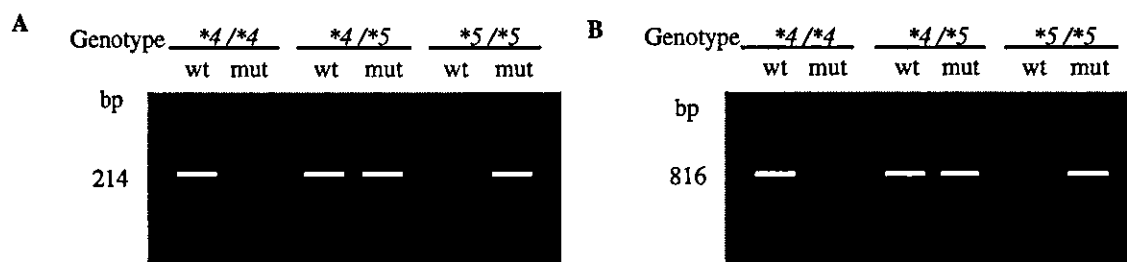


Fig. 1. Genotyping of NAT2*5 allele in genomic DNA by AS-PCR. Schematic AS-PCR patterns for detection of the NAT2*5 allele using different primers. A, The 341-Swt1, 341-Smut1 and 341-AS primers were used. B, NAT2-S2, NAT2-AS2, 341-Swt2 and 341-Smut2 primers from Cascorbi et al. (1995) were used. wt: PCR product obtained by wild-specific primer; mut: PCR product obtained by mutant-specific primer.