

のヒトトランスポーターの存在を免疫化学的に組織染色し、視覚化できる試薬も市販され入手が容易になってきている。先の述べた肝細胞の構造において一つ一つの肝細胞は血管側と胆管側とに極性を持つ構造をしており、トランスポーターもそれぞれ局在化している。免疫染色することによりキメラマウスの肝臓中のヒト肝細胞にヒト特異的トランスポーターの発現を観察することが可能である。

薬物輸送でよく研究されその機能が明らかになっている取り込みと排出を担う肝細胞のトランスポーター

を例に上げる。肝特異的有機アニオントランスポーター(liver-specific organic anion transporter) LST-1 (OATP2)は肝実質細胞の血管側に発現し血管からの肝細胞への有機アニオンの取り込みに関与している。一方、MRP2 (cMOAT)は肝実質細胞の胆管側に発現し、肝細胞内から胆汁中への有機カチオンの排出に関与している。

ヒト肝細胞にこれらのトランスポーターの存在および局在について確認することも目的とし病理学的観察を行い、その結果を第II章に記す。

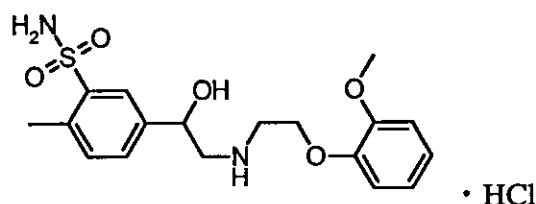


Fig. 1 Structure of amosulalol hydrochloride (Lowgan®)

Table 1 Pharmacokinetic parameters of amosulalol hydrochloride in mice and humans.

Species	Dosing (mg/kg)	N	iv			po				
			$t_{1/2\beta}$ (h)	AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	Cl_{total} (L/h/kg)	T_{max} (h)	C_{pmax} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	$t_{1/2}$ (h)	AUC ₀₋₇ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	Systemic availability (%)
Mice	10	4	1.1	0.93	10.7	0.25	0.31	1.3	0.36	38.7
	100	4	-	-	-	0.25	7.03	0.9	7.94	**
Humans	0.16	7	2.8	1.22	0.1	-	-	-	-	-
	0.23*	2	-	-	-	4	0.2	4.4	1.67	95

*: 12.5 mg/man, **: Not calculated because of no correlation between dosage and AUC

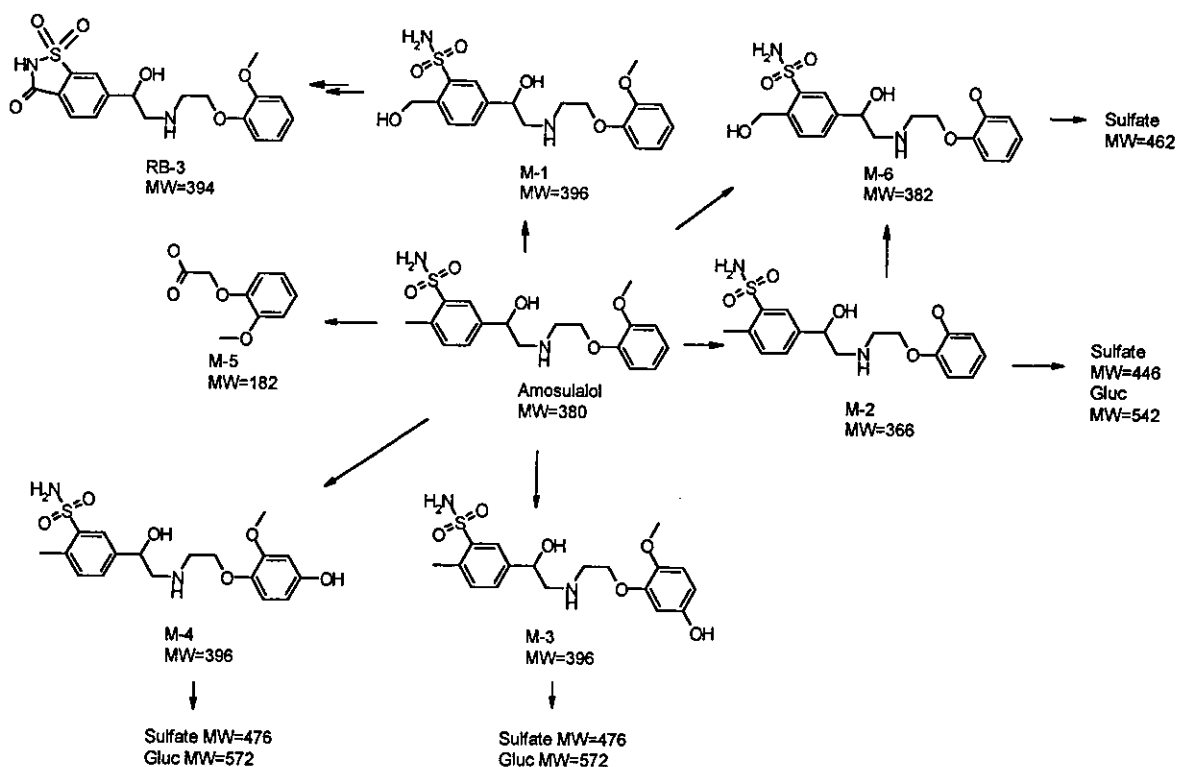


Fig. 2 Metabolic pathways of amosulalol

Table 2 Analysis of Urine of Mice and Humans Administered with Amosulalol Hydrochloride

	Mouse	Human
Amosulalol	7.6 ± 1.6	30.1 ± 5.2
M-1	1.7 ± 0.3	N.D.
M-2	0.9 ± 0.1	N.D.
M-2 glucuronide	22.1 ± 3.5	N.D.
M-2 sulfate	0.2 ± 0.1	N.D.
M-3 glucuronide	5.8 ± 0.6	N.D.
M-3 sulfate	1.4 ± 0.5	12.7 ± 2.5
M-4 glucuronide	4.7 ± 0.8	N.D.
M-6 glucuronide	2.3 ± 0.2	N.D.

IC mice and humans were orally administered with 100 and 50 mg/kg body weight of amosulalol hydrochlorid, respectively.

^a Mean ± S.E.M. (mol/mol % of dose) of 3 experiments.

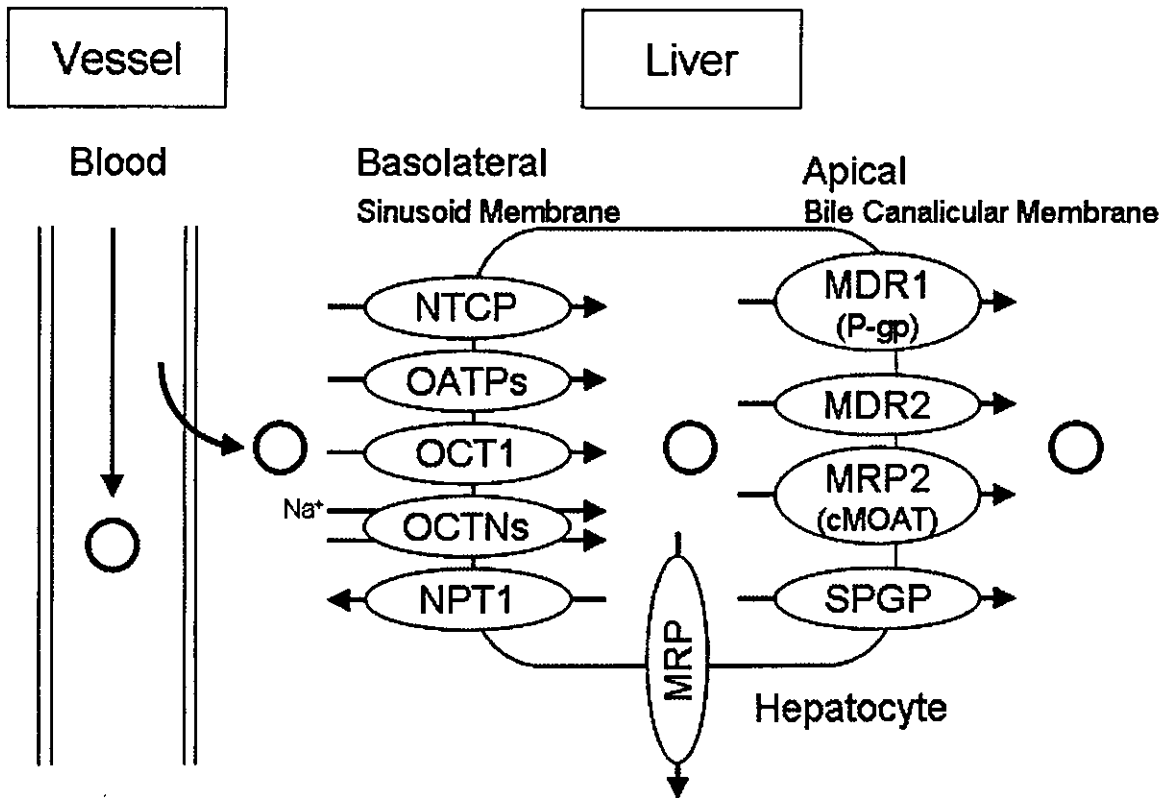


Fig. 3 Illustration of human membrane transporters expressed in liver

第 I 章 ヒト肝細胞キメラマウスにおける塩酸アモスラロールの代謝に関する検討

B. 研究方法

B-1. ヒト肝細胞キメラマウス

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。本研究ではキメラマウスのドナーとして、In Vitro Technologies (Catonsville, MD) より購入した凍結ヒト肝細胞 D2 (白

人、男性、9ヶ月)を用いた。生後11-14週齢の雄性および雌性のキメラマウスを使用した。なお、ヒト肝臓置換率は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) により算出した。使用したキメラマウスの性別およびRIをTable 3にまとめて示した。

Table 3 Chimeric mice used to collect urine and bile samples in this study

Animal No.	Gender	RI [%]	Collected Sample
1-7	M	10	bile
1-9	F	<1	bile
13-1	F	60	bile
13-4	M	50	bile
13-11	F	70	bile
65-2	F	>80	urine
65-4	F	60	urine
65-5	F	40	urine
65-7	M	30	urine
65-8	M	<1	urine
65-10	M	30	urine
65-11	M	50	urine
66-1	F	20	urine
66-5	F	<1	urine
66-6	F	40	urine
66-9	M	20	urine
66-10	M	<1	urine
66-11	M	70	urine
66-12	M	70	urine

F: female, M: male

RI: replacement index

B-2. ICR マウス

ICR マウスは日本クレア (Tokyo, Japan) より 4 週令の雄性を購入し、1 週間以上飼育し馴化させた後に使用した。

B-3. 投与および試料採集方法

B-3-1. キメラマウスからの尿採集

未変化体を 10 mg/kg (salt form) の割合で、前日 17 時より絶食処理したキメラマウスに強制経口投与した。ビークルには精製水を用いた。投与

後、代謝ケージ（メタボリカ MM, Sugiyama Gen Iriki, Tokyo, Japan）に1匹ずつ入れ尿は投与直後からドライアイス冷却下で集められ、24時間後に回収し、代謝ケージは精製水で洗い、洗液も回収した。水は投与直後から自由に摂取させ、餌は投与4時間後に開始した。

B-3-2. キメラマウスからの胆汁採集
飽食のキメラマウスにエーテル麻酔し、胆管カニューレーションを施した。麻酔覚醒後に未変化体を10 mg/kg (salt form)の割合で強制経口投与し、ボールマンケージに固定し胆汁を24時間採集した。

B-3-3. ICRマウスからの尿採取
前日の17時より絶食処理したICRマウスに未変化体を10あるいは100 mg/kg (salt form)の割合で強制経口投与し、代謝ケージにおいて尿を24時間採集した。水は投与直後から自由に摂取させ、餌は投与4時間後に開始した。

B-3-4. ICRマウスからの胆汁採取
前日の17時より絶食処理したICRマウスにエーテル麻酔し、胆管カニューレーションを施した。麻酔覚醒後に未変化体を100 mg/kg (salt form)の割合で強制経口投与し、ボールマ

ンケージに固定し胆汁を24時間採集した。水は投与直後から自由に摂取させ、餌は投与4時間後に開始した。

B-4. 凍結肝実質細胞を用いた *in vitro* 代謝実験

ヒトの凍結肝実質細胞は In Vitro Technologies Inc. (Baltimore, MD, USA)より購入した。ICRマウスの凍結肝実質細胞は XenoTech LLC (KA, USA)より購入した。キメラマウス (Lot No. CTE7-1)の凍結肝実質細胞は広島県産業科学技術研究所より入手した。

B-5. 凍結肝実質細胞を用いた *in vitro* 代謝実験

B-5-1. 細胞の融解

凍結保存肝実質細胞の融解操作は、XenoTech, LLC 発行のプロトコルに従い、Hepatocyte Isolation Kit (XenoTech, LLC) を用いて行った。Hepatocyte Isolation Kit の Tube A および B 内の培地は使用前に恒温槽中（温度設定 37℃）にて予め保温した。

液体窒素を充填した凍結保存容器より凍結保存肝実質細胞のバイアルを取り出し、恒温槽中（温度設定 37℃）で穏やかに攪拌しながらバイアル内の細胞懸濁液を融解した。融

解時間は約 1.5 分間とした。融解した細胞懸濁液は Kit の Tube A に移した。細胞の入っていたバイアル内は Tube B 内の培地 1.5 mL で洗い、その洗液も Tube A に移した。細胞懸濁液を遠心分離 (600 rpm, 20 °C, 5 分) した後、上清を吸引除去した。得られた細胞沈査に Tube B 内の残りの培地全量を加え穏やかに懸濁した後、遠心分離 (500 rpm, 20 °C, 3 分) した。上清を吸引除去して、目的の細胞濃度となるように Krebs-Henseleit 緩衝溶液 (pH 7.4) を加えて穏やかに懸濁した後、CO₂ インキュベータ (温度設定 37 °C, 5% CO₂-95% air) 中にて 30 分間プレインキュベーションした。

B-5-2. 其質溶液の調製

1 mM 塩酸アモスラロール水溶液を Krebs-Henseleit 緩衝溶液 (pH 7.4) にて希釈して 20 μM 塩酸アモスラロール溶液を調製した。この溶液 125 μL を、反応時間ごとに n=1 となるように、24 穴プレートに分注した後、CO₂ インキュベータ (温度設定 37 °C, 5% CO₂-95% air) 中に静置して 10 分間プレインキュベーションした。

B-5-3. 代謝反応の開始および停止
プレインキュベーション終了後、塩

酸アモスラロールの分注された well に細胞懸濁液 125 μL を添加し十分に懸濁した。24 穴プレートを CO₂ インキュベータ (温度設定 37 °C, 5% CO₂-95% air) 内に静置し反応を行った。この時点における塩酸アモスラロール濃度は 10 μM であった。また各ロットの細胞濃度は、Lot No. 104 は 4.8×10⁵ cells/mL、Lot No. CYE は 1.0×10⁶ cells/mL、Lot No. 079 および Lot No. CTE7-1 は 5.0×10⁵ cells/mL に調製した。

反応開始後 4 時点 (0, 3, 6, 24 時間) において、反応液上清を回収し、これにアセトニトリル 125 μL を添加し、反応を停止させた。

B-6. ICR マウス胆汁中代謝物の単離

胆管カニューレーションを施した ICR マウスに 100 mg/kg の割合で未変化体を経口投与し、得られた胆汁を分析したところ、分子量 600 の未同定代謝物が検出された。そこでこの代謝物を単離し構造解析をするために 100 mg/kg の割合で未変化体を強制投与し 24 時間採集した 3.5 mL のマウス胆汁を用いて、以下の精製により単離を行った。

マウス胆汁 3.5 mL に 4 倍量の 100 mM 酢酸アンモニウムを加え希釈した後、予めメタノール 20 mL 次いで精製水で活性化させておいた Oasis

HLB 20 cc/1 g (Waters, MD; USA) を用いて固相抽出を行った。Oasis に胆汁希釈液を通液後、水 20 mL で水洗し、メタノールの比率を 4 段階に変えた 100 mM 酢酸アンモニウム - ギ酸緩衝液でステップワイズ溶出した。その緩衝液の組成は以下の通りであった。100 mM 酢酸アンモニウム - メタノール - 水 - ギ酸 (100:250:650:1)、(100:500:500:1)、(100:750:250:1)、(100:900:0:1)。目的の代謝物を含むメタノールが 50% と 75% の画分を合わせて減圧濃縮し、溶媒を溜去した。得られた乾固物を分取 HPLC に付した。このときの分取条件を Table 4 に示す。このとき代謝物は保持時間 28.5-29 分に溶出した。この画分を Oasis HLB を用いた固相抽出により脱塩・回収し、溶出区から 0.6 mg の代謝物を得た。これを LC/MS および NMR で構造解析を行った。

B-7. LC/MS 分析

LC/MS 分析に供する試料の前処理は凍結肝実質細胞反応液を Fig. 4 に、胆汁を Fig. 5 に示した。尿は遠心ろ過処理後のろ過液を直接注入した。LC/MS の分析条件を Table 5 にまとめて示した。MS の取り込み時間は各

試料のマトリクスが溶出し終わり、代謝物が溶出する前の注入後 10 分からデータの取り込みを開始した。

B-8. 使用機器

LC/MS の分析は LC が HP1100 シリーズ(G1311A ポンプ、G1316A カラムコンパートメント、G1329A オートインジェクター、G1323B システムコントローラー、Hewlett Packard、CA, USA)、UV 検出が Survayer PDA (ThermoQuest, CA, USA)、MS が Finnigan LCQ^{Deca} (ThermoQuest, CA, USA) を用いた。MS の大気圧イオン化法は ESI (ThermoQuest, CA, USA) を用いた。代謝物の精製には島津製作所製 HPLC (LC-10AT ポンプ、SIL-10A オートサンプラー、SPD-10AV UV 検出器、CTO-10A カラムオープン、SCL-10A コントローラー、Chromatopack C-R7A、Kyoto, Japan) を用いた。NMR 測定は JNM-A500 (日本電子、Tokyo, Japan) を用い、内部標準は tetramethylsilane を用いケミカルシフトには ppm を、結合定数には Hz を用いて表記した。測定は methanol-*d*₄ を用いて行った。

Table 4 Conditions of preparative HPLC for unidentified biliary metabolite in ICR mice

LC conditions

Column: Inertsil ODS-3, s-5 μm , 10.0 mm i.d. \times 250 mm (GL Science, Tokyo, Japan))

Column Temp.: 40_C

Flow Rate: 4.6 mL/min

UV detection: 248 nm

Mobile phase: (A) 100 mM AcONH₄-MeOH-H₂O-HCOOH (100:100:800:1)

Mobile phase: (B) 100 mM AcONH₄-MeOH-H₂O-HCOOH (100:800:100:1)

Solvent gradient program

Time	0	5	60	[min]
(A)	95	95	0	[%]
(B)	5	5	100	[%]

Cryopreserved hepatocytes incubations

(humans and mice)

Samples 250 μL

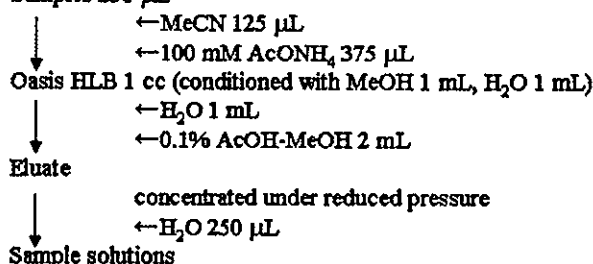


Fig. 4 Sample preparation of cryopreserved hepatocytes incubations for LC/MS analysis

Table 5 Analytical conditions of LC/MS

LC conditions

Column: CAPCELL PAK UG120, s-5 μm , 2.0 mm i.d. \times 250 mm (Shiseido, Tokyo, Japan)

Column Temp.: 40_C

Flow Rate: 0.21 mL/min

UV detection: 271 nm

Mobile phase: (A) 10 mM AcONH₄ (pH9.0)-MeOH (95:5)

Mobile phase: (B) 10 mM AcONH₄ (pH9.0)-MeCN-MeOH (5:47.5:47.5)

Solvent gradient program

Time	0	10	20	30	[min]
(A)	100	70	65	20	[%]
(B)	0	30	35	80	[%]

MS detections

ThermoQuest LCQ^{DECA}, ESI-positive/negative, Heated Capillary Temp.: 300_C

Full scan range: *m/z* 150-1000

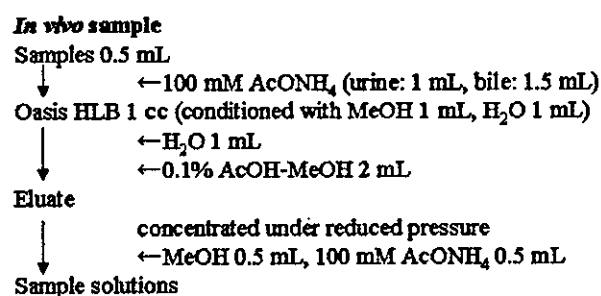


Fig. 5 Sample preparation of mouse bile samples for LC/MS analysis

C. 研究結果

C-1. マウス尿中代謝物プロファイル

ICR マウスおよびキメラマウスの尿を LC/MS で分析したときの結果を Fig. 6 に示した。代謝物の濃度が低いため UV および Total ion chromatogram (TIC) ではピークが確認することが出来なかったため、代謝物と見変化体の分子量を積算したマスキロマトグラムを記載した。ICR マウスのクロマトにおいて代謝物の主要なピーク、M2, M3, M4 の各グルクロン酸抱合体および M-3 の硫酸抱合体は定量値とほぼ一致したピーク強度であった。

ICR マウス、ヒト肝臓低置換 (RI<1%未満) および高置換 (RI>80%) キメラマウスを比較すると低置換マウスのクロマトは ICR マウスのク

ロマトと比較的類似していた。しかし、M2 グルクロン酸抱合体 (M2G) のピークが小さくなり M2 硫酸抱合体 (M2S) が増加した。また、M3 硫酸抱合体 (M3S) が ICR マウスではほとんど検出されていない一方、低置換率マウスでは ICR マウスより代謝能が亢進していることが示唆された。高置換と低置換マウスを比較すると低置換キメラマウスに見られた代謝物は置換率に関係なく同様なパターンおよび含量を示した。ヒト肝細胞により代謝されると予想される M3S は置換率に応じて増加していることが判明した。しかし、高置換マウスの M3S の未変化体に対する排泄率はヒトと比して低いものであった。また、ヒトでは M1 および M2 に代謝されないがヒト肝臓置換率に応じて排泄率が増加していた。

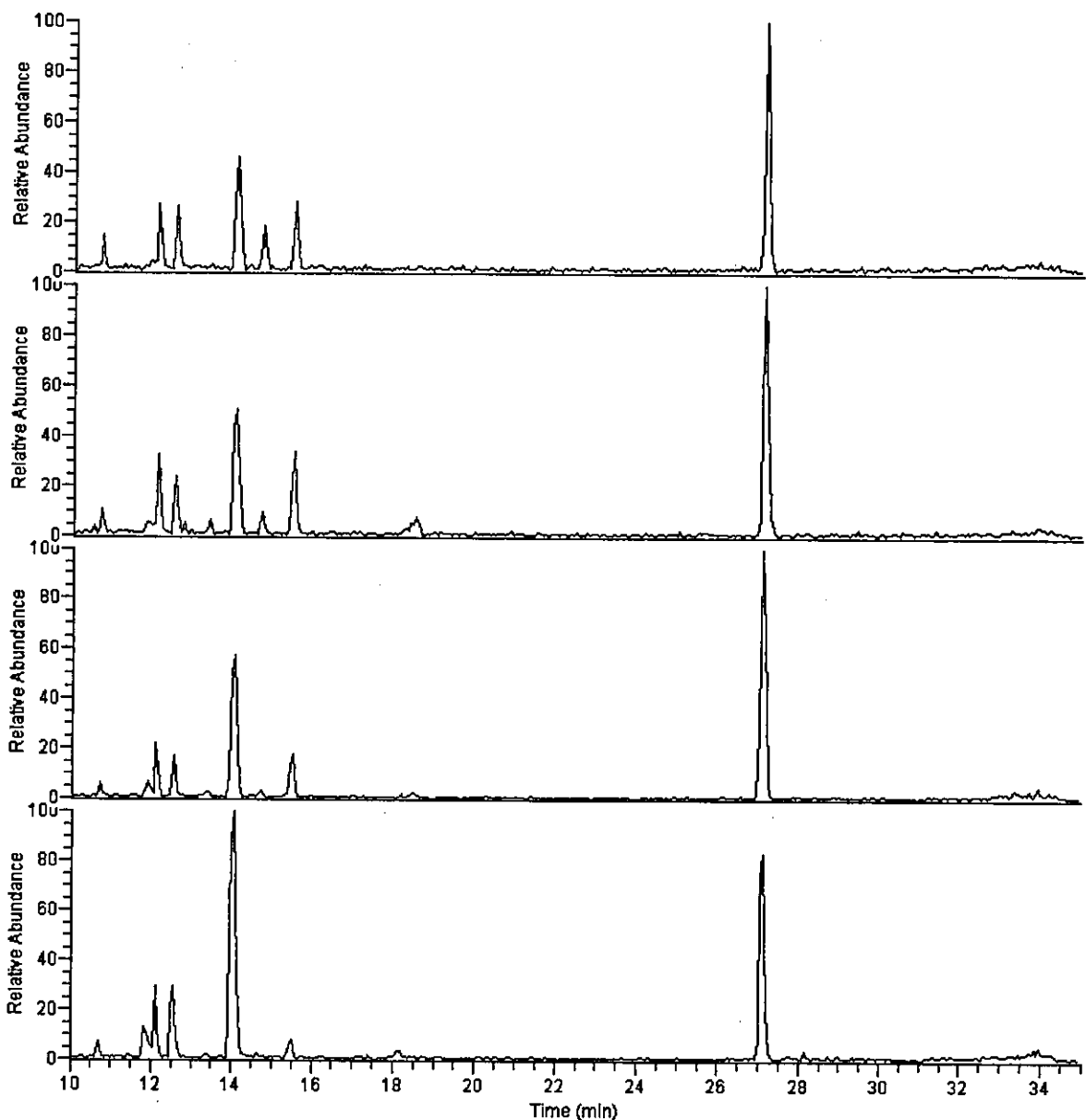


Fig. 6 Representative mass chromatograms of chimeric mice (RI>80%, A), (RI=40%, B), (RI<1%, C) and ICR mice (D) urine samples collected for 0 to 24 h after single oral administration at a dose of 10 mg/kg (A-C) and 100 mg/kg (D)

C-2. マウス胆汁中代謝物プロファイル

キメラマウスに常法に従って胆管カニューレーションを施したが、体重が少なく胆管が細いこと。ICR マウスと比較して肝臓が肥大している

こと、ICR マウスと比較してエーテル麻酔に対して感受性が高く麻酔中に死亡し易いこと等から、胆管カニューレーションが非常に困難であった。ICR マウスおよびキメラマウスの胆汁を LC/MS で分析した結果

を Fig. 7 に示した。尿同様、代謝物と見変化体の分子量を積算したマスキロマトグラムを記載した。

ICR マウスの 10 mg/kg 投与では尿同様、M2G が主代謝物であることが判明した。しかし、100 mg/kg 投与では保持時間約 21 分にこれま構造が明らかにされていない代謝物が主代謝物として排泄されていることが判明した。この未同定代謝物の構造解析については C-4 で記述する。このほかに M2G の相対的ピーク強度が低下し M1, M2S, M3S および ラットの胆汁中代謝物 RB-3 が検出された。

ICR マウスとヒト肝臓低置換キメラマウスのクロマトを比較すると低置換マウスのクロマトは 100 mg/kg の ICR マウスのクロマトと類似していた。キメラマウス間で比較すると高置換マウスでは M3S の排泄率が他の代謝物と相対的に増加している傾向が認められた。しかし、それ以外の代謝物のプロファイルと比較すると代謝物プロファイルと置換率に何らかの相関を見出すことは出来なかった。

C-3. マウス胆汁中代謝物の構造解析

今回初めて採取され分析されたマウス胆汁中に未同定の代謝物がある

ことが判明した。この代謝物は LC/MS 分析において m/z 618, 623 を与え、これらはそれぞれ代謝物のアンモニウムおよびナトリウムのアダクトイオンと考えられ、分子量を 600 と推定した。 m/z 618 での MS/MS より未変化体と推定されるアグリコンのフラグメントイオン m/z 381 が得られたことから、その差分から未変化体にグルクロン酸残基と 28 u が付加した代謝物と推定した。1H-NMR においてアノメリックプロトンのシグナルが δ 5.43, 5.45 [0.5H ($J=7.8$ Hz) each] に分裂したダブルットピークとして観測された。この低磁場シフトしたアノメリックプロトンのケミカルシフトと、2 つのコンフォーマーによりシグナルが分裂したことから、グルクロン酸がカルボニル基に結合していると推定された。アグリコン部分のケミカルシフトは 2 級アミンに結合している部分を除いて、ほとんど未変化体と同じであった事からこのカルボニル基は 2 級アミンに結合し、未変化体のカルバモイルグルクロン酸 (carbamoyl glucuronide) と推定した。アノメリックプロトンの大きな結合定数からグルクロン酸は β 結合していると推定した。推定された代謝物と未変化体の構造と NMR の帰属を Fig. 8 に示した。

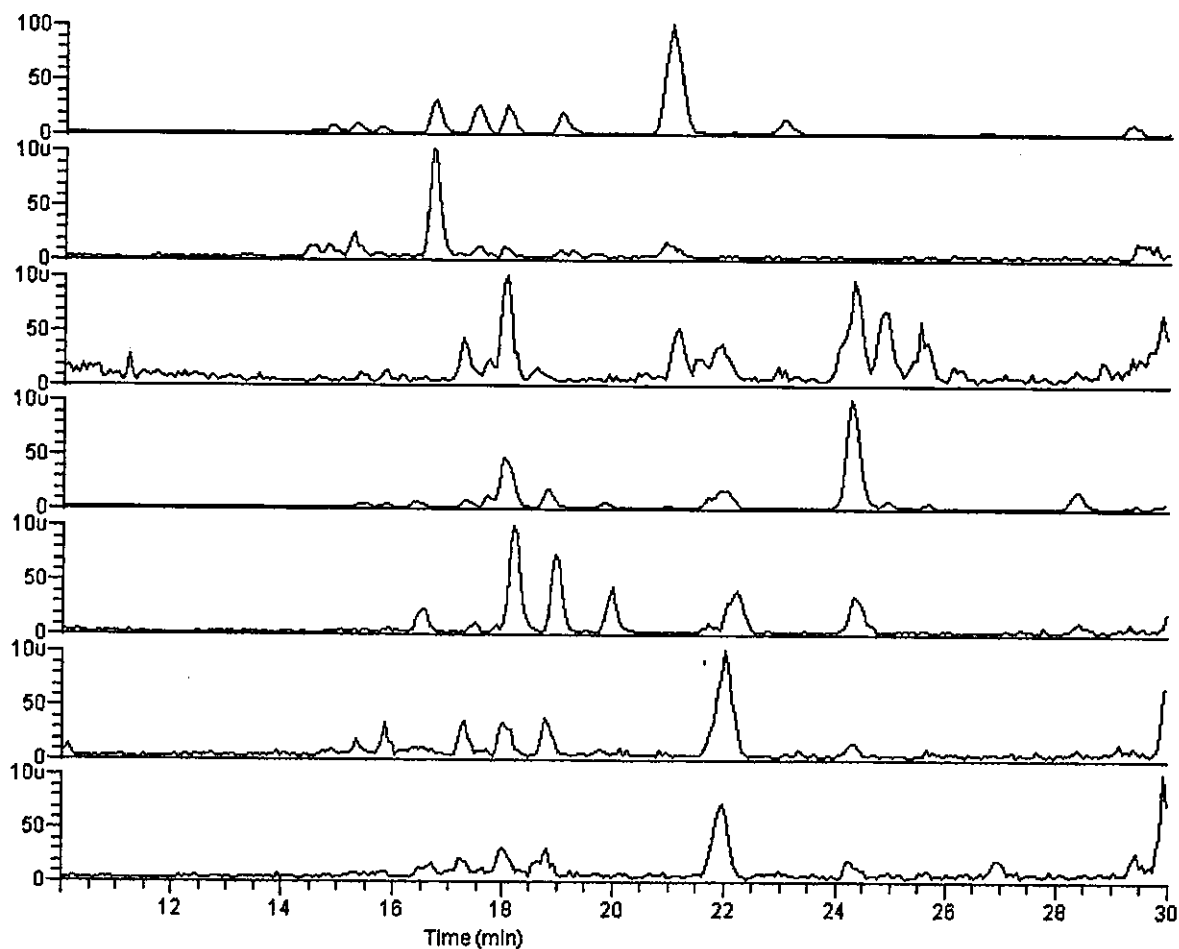


Fig. 7 Mass chromatograms of ICR mice (100 mg/kg, A) and (10 mg/kg, B), and chimeric mice (RI=70%, C), (RI=70%, D), (RI=60%, E), (RI=10%, F) and (RI<1%, G) bile samples collected for 0 to 24 h after single oral administration to bile duct-cannulated animals.

Amosulalol hydrochloride was administrated at a dose of 10 mg/kg to all chimeric mice.

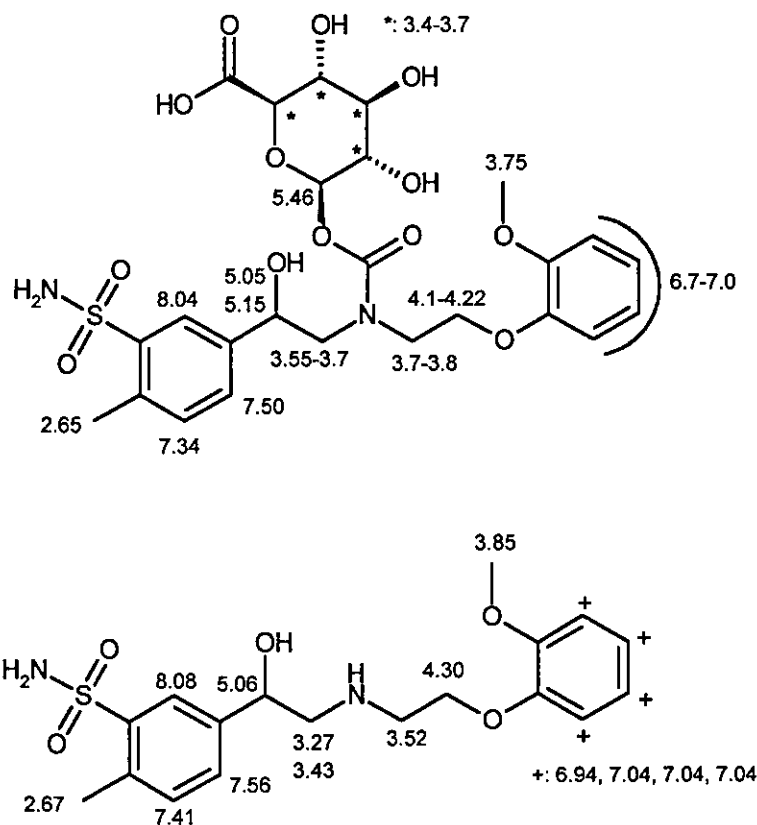


Fig. 8 Structures and ¹H-NMR assignment of amosulalol carbamoyl glucuronide (above) and amosulalol (below) in methanol-*d*₄

- 1) Chemical shift values were noted in ppm.
- 2) Marked signals were not isolated between signals and not assigned to individual hydrogen atom.

C-4. 凍結肝実質細胞を用いた *in vitro* 代謝実験

塩酸アモスラロールを凍結肝実質細胞で代謝させたときの LC/MS 分析の結果を Fig. 9 にまとめて示した。分析した結果、未変化体がほとんどで代謝物の生成はわずかであったことから、クロマトでは未変化体の分子量を加算せずに表示した。ICR マウスにおいては M2G が尿と

同じく主代謝物であることが判明し、尿代謝をよく反映していた。ヒト肝細胞 (IVT079, IVT CYE) においては主代謝物は M3S でヒトの尿中代謝物と一致していた。しかし数種のその他の代謝物 (M4S, M6S, M3, M1) も検出された。IVT079 を移植したキメラマウスから調製した凍結肝実質細胞では、ヒトと同じ代謝プロファイルを示した。

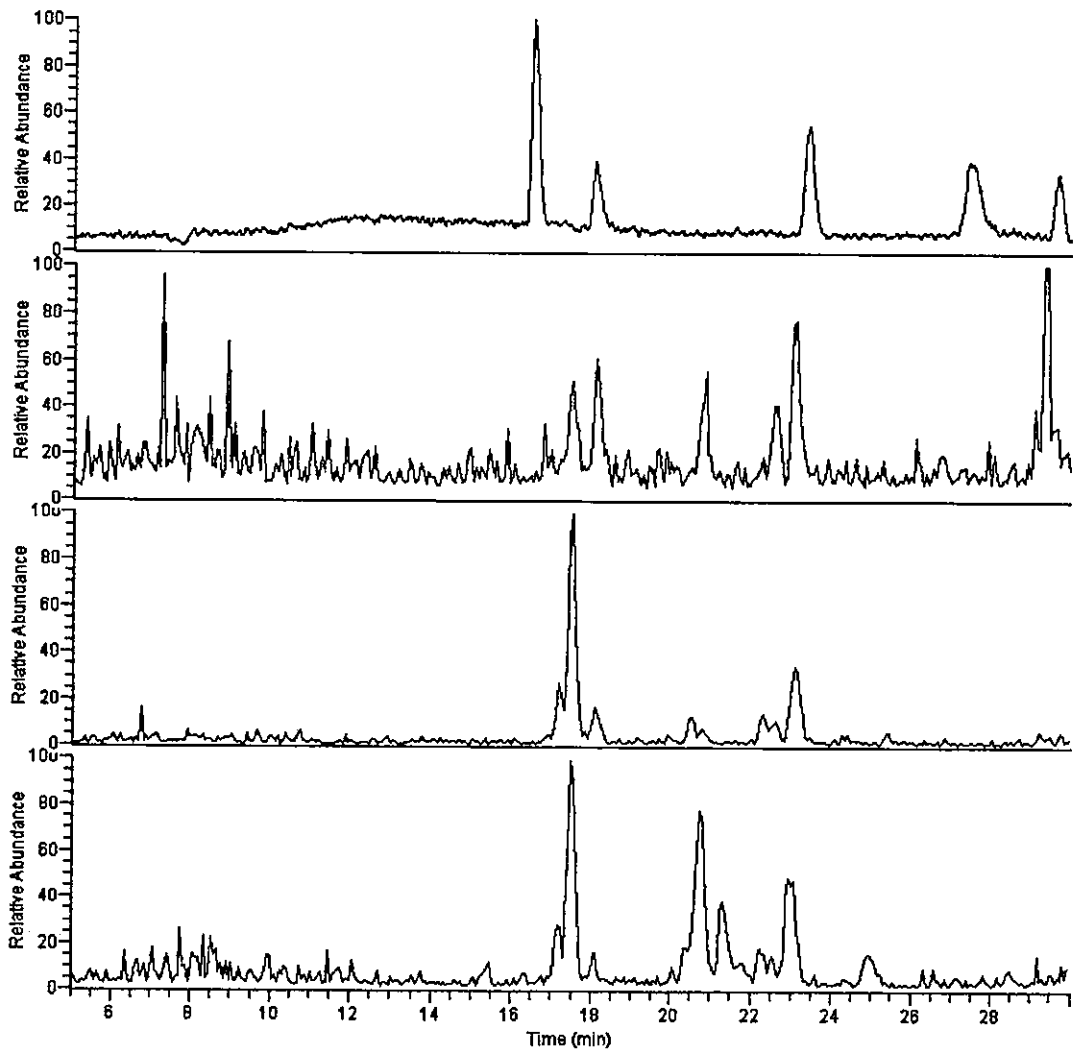


Fig. 9 Mass chromatograms of amosulalol hydrochloride incubations with cryopreserved hepatocytes prepared from ICR mice (A), chimeric mouse (Lot No. IVT079, B), humans (Lot No. IVT079, C) and (Lot No. CYE, D) Substrate was subtracted when drawing mass chromatograms.

第Ⅱ章 ヒト肝細胞キメラマウスにおける肝細胞の組織学的考察

B-1. 組織学的検査

安楽死直後のキメラマウスの新鮮

な肝臓を4%パラホルムアルデヒド (PFA)で室温24時間で固定した後、脱水してパラフィン包埋した。パラフィン切片(3-5 μm)は、常法に従ってHematoxylin/Eosin (H&E)染色および過ヨウ素酸シッフ(PAS)染色を

実施し、光学顕微鏡下で鏡検した。

B-2. 免疫組織化学的検査

安楽死直後のキメラマウスの新鮮な肝臓の一部を液体窒素で凍結させた後、使用時まで -80°C で保存し、その凍結切片(5-8 μm)を免疫染色に用いた。肝組織内の類洞内皮と毛細胆管を検出するため、抗ヒトCD31マウスモノクローナル抗体(Biomedica, CA, USA)、抗ヒトZO-1ウサギ抗血清(Zymed Laboratories Inc; CA, USA)を用いて免疫染色を実施した。ヒト肝細胞に発現しているヒトトランスポーターを検出するため、抗ヒトMRP2マウスモノクローナル抗体(Alexis, Nottingham, UK)、抗ヒトMRP3マウスモノクローナル抗体(Kamiya Biomedical Co; WA, USA)、抗ヒトMDR1マウスモノクローナル抗体(P-gp, Kamiya Biomedical, WA, USA)、抗ヒトOAT2ウサギ抗血清(Transgenic, Kumamoto, Japan)、抗ヒトLST-1ウサギ抗血清(Alpha Diagnostic International Inc; TX, USA)を用いて免疫染色を実施した。上記のCD31, LST-1, MRP3, OAT2, MRP2, MDR1を用いた免疫染色は酵素標識ポリマー法(間接法)を用いて実施した。凍結切片は風乾後、アセトンで10分間固定した。内因性ペ

ルオキシダーゼ活性を阻害するため、0.3%過酸化水素水で30分間処理し、その後、1%ウシ血清アルブミン(BSA)で15分間室温で処理し、非特異的結合をブロックした。1次抗体処理は 4°C overnightで行った。内因性ピオチンの影響を避けるため、西洋わさびペルオキシダーゼを抱合させたデキストランポリマー法を採用したDAKO Envision+ システム(Dakocytomation, Denmark)により可視化した。Envisionポリマー試薬と切片を室温で30分間反応させた後、DABを10-15分間反応させた。ヘマトキシリンで対比染色を行い、光学顕微鏡下で鏡検した。

ZO-1を用いた免疫組織化学染色は、蛍光抗体を用いた間接法で実施した。凍結切片は風乾後、アセトンで5分間固定した後、1% BSAで30分間室温で処理し、非特異的結合をブロックした。ZO-1に対する1次抗体処理は30分間室温で実施し、その後、抗ウサギ Alexa 488 抗体(Molecular Probes Inc; OR, USA)で30分間室温で反応させた。切片はヨウ化プロピジウムで1分間室温で対比染色させた。蛍光切片は共焦点型レーザー走査型顕微鏡 TCS SP2 (Leica Microsystems, Tokyo, Japan)を用いて鏡検した。

B-3. ヒトLST-1およびヒトMRP2の二重染色

LST-1 および MRP2 に対する二重染色は、最初に MRP2 に対しての染色を前述のペルオキシダーゼを用いた酵素標識ポリマー法（間接法）にて実施し、続いて LST-1 に対しての染色をアルカリフォスファターゼを用いた酵素標識ポリマー法（間接法）にて実施した。LST-1 の染色方法は、切片を 1% BSA で 30 分間室温で処理した後、1 次抗体を 3 時間室温で反応させた。アルカリフォスファターゼと抱合させたデキストランポリマー(DAKO Envision/AP system, Dakocytomation, Tokyo, Japan)を 30 分間室温で反応させた。この切片をファストブルーを用いて 8°C、over night で反応させた。最後にヘマトキシリンで対比染色し、光学顕微鏡下で鏡検した。

C. 研究結果

ヒト肝細胞は既存のマウス肝組織内で結節状に生着していた。ヒト肝細胞は肝小葉および肝細胞索を構築せず、敷石状に配列していた(Fig. 10 A)。ほとんどのヒト肝細胞は軽度の腫大を示し、細胞質は均一で淡明であった。また、びまん性に細胞内グリコーゲン顆粒の蓄積が認められた (PAS 染色陽性)。ときにヒト

肝細胞の細胞質内に大小の空胞が認められた。一方、既存のマウス肝細胞は uPA 遺伝子の発現により傷害を受け、びまん性萎縮、空胞化および壊死が認められた。さらに、マウス肝細胞では、大小の再生性結節が認められ、しばしば肝葉全域が置換されていた。

内皮のマーカーである CD31 と毛細胆管に局在するタイトジャンクションである ZO-1 の組織化学的検査により、ヒト肝細胞がキメラ肝組織内へ組み込まれていることが確認された。ヒト CD31 免疫染色により、一層の内皮に裏打ちされた既存の類洞がヒト肝細胞間に僅かながら検出された(Fig. 10 B)。また、ヒト肝細胞領域で ZO-1 陽性の毛細胆管がネットワークを形成しており、個々のヒト肝細胞から出た毛細胆管はヒト肝細胞の集塊の中で広範囲に分岐していた。さらに、ヒト毛細胆管が近傍のマウス小葉間胆管に結合していると考えられる部位が認められた(Fig. 10 C)。キメラマウス肝組織内のヒトトランスポーターの発現を確認するため、基底膜（血管、basolateral）側に発現しているトランスポーターとして LST-1, OAT2, MRP3, 毛細胆管(apical)側に発現しているトランスポーターとして MRP2, MDR1 に対する抗体を用いて、

免疫染色を行った。その結果、LST-1 と MRP3 は主にヒト肝細胞の基底膜側に発現していた (Fig. 10 D)。OAT2 はヒト肝細胞の細胞質膜全体に発現していたが、基底膜側でより顕著であった。MRP2 と MDR1 を含む毛細胆管のトランスポーターは、免疫染色でヒト肝細胞の apical 側の細胞質膜に強く発現しており、その染色パターンは ZO-1 の染色性と同

様であった。LST-1 および MRP2 の二重染色の結果、両方のトランスポーター共にヒト肝細胞で予想された側、すなわち LST-1 は血管側、MRP2 は胆管側に発現していることが証明され、キメラマウスの肝臓中のヒト肝細胞でも apical-basolateral の極性が保持されていることが今回の研究ではじめて明らかとなった。

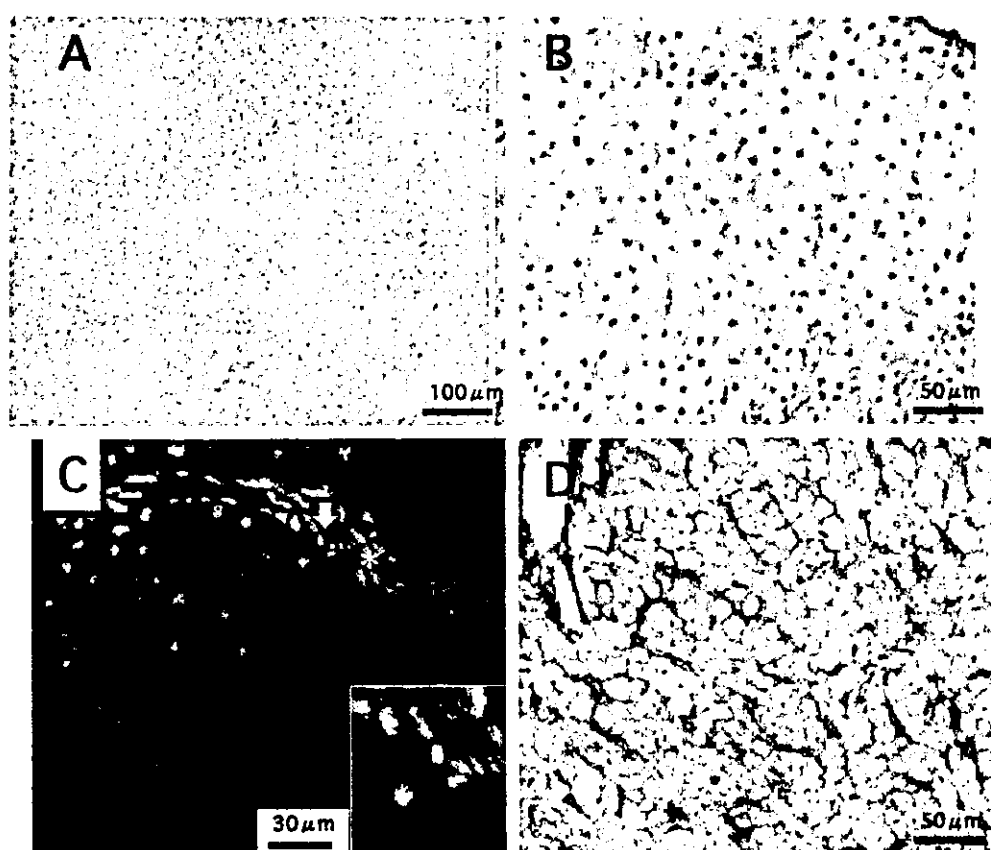


FIG 10. Histology of chimeric mouse liver transplanted with human hepatocytes. (A) Human hepatocytes stained by hematoxylin/eosin staining (100X). (B) Immunohistochemical detection of CD31 (200X). (C) Immunohistochemical detection of ZO-1 using fluorescent antibody (300X). A region that considered as connecting human bile canaliculi to mouse interlobular bile duct (*) was observed (arrow). Inset of figure shows the higher magnification (600X). (D) Immunohistochemical detection of LST-1 (violet) and MRP2 (brown) in human hepatocytes by a double stain method (200X).

D. 考察

肝臓は内臓で最大の臓器であり、薬物や生体成分の解毒・代謝において重要な役割を担っている器官である。臓器内においては第一相および第二相反応が統合し薬物を代謝している。肝臓へ取り込まれた薬物が代謝物あるいは未変化体のまま肝細胞から血液や胆汁中へ受動拡散あるいはトランスポーターによって能動輸送され全身を循環している。ヒト肝細胞キメラマウスの肝臓はドナーのヒト肝臓の種々の cytochrome P450 (CYPs) をエンコードしている mRNA を発現していることが確かめられている (Tateno *et al.*, 2004)。ヒト UDP-glucuronosyltransferase と sulfotransferase の mRNA がキメラマウスで発現していることが確認されている (Dr. Naito of Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd., personal communication)。以上のことからヒト肝臓キメラマウスのヒト肝細胞においても第一相反応および第二相代謝能をほとんど維持していると推察された。今回の研究の中で我々は、キメラマウス中のヒト肝細胞の病理学的な検査によりその構造と主要なトランスポーターの局在化を検証した。組織検査の結果、ヒトの肝細胞組織像では肝小葉と肝細胞索の構造が完全に欠除しているこ

とが明らかとなった。しかし、ヒト肝細胞間で類洞の存在し、これはヒト肝細胞に新鮮な血液が供給されることを示している。ZO-1 タンパクの免疫組織化学的検査によりヒト肝細胞から分泌された胆汁がマウスの胆管網に接続し、総胆管への排泄されることが強く示唆された。また、入手可能なヒト肝細胞トランスポーターの免疫染色によりその存在が確認され、さらにトランスポーターの apical-basolatera の極性が存在が明らかになったことは、本来の構造体を欠いてはいるが、移植された肝細胞がマウス肝細胞の間で、定着し分裂する過程で細胞の極性を認識し分化・誘導されることを示唆した。

キメラマウスの代謝実験に先立ち、塩酸アモスラロールのマウス尿中代謝物は神村らにより HPLC-UV 法により定量された (Kamimura *et al.* 1985)。その結果をもとに、今回 LC/MS を用いて分析したところ、定性試験ではあったが、第一相反応代謝物と第二相代謝物ともにこれらの代謝物ピークは半定量的に分析することが判明し、定量値と定性分析の相対的ピーク面積強度のパターンでよく一致した。

キメラマウスの胆汁中代謝物を検索するに当たり、これまで ICR マウスの胆汁中代謝物が検索実施されてい

かったので、今回初めて実施した。尿中代謝物検索と同様に100 mg/kgの投与のほかにキメラマウスで投与の10 mg/kg投与を実施した。100 mg/kgにおいてはこれまでに見出されていなかった代謝物を検出し、マウス胆汁中より単離した。各種機器分析によりその構造を未変化体の carbamoyl glucuronide と構造決定した。その一方で、10 mg/kg投与群では100 mg/kgの投与群より代謝パターンは大きく異なり尿中の代謝パターンに酷似していた。100 mg/kg投与群で代謝パターンが変わったのは、代謝経路が飽和したため代謝能が比較的大きいグルクロン酸抱合へ代謝経路が変わったためと推察された。

被検薬の投与量はキメラマウスでは10 mg/kgとした。これはICRマウスで 100 mg/kg、ヒトで約0.85 mg/kgの薬効用量で2桁の差があることから決定した。RIが1%未満の低置換率マウスの尿および胆汁の代謝物パターンはおおよそICRマウスのものと一致した。Alba-uPAにより障害を受けたマウス肝細胞は著しい代謝活性を有し、代謝物を尿および胆汁へ排泄することが分かった。ICRマウスと低置換マウスを比較して異なる点はM2Gがキメラマウスでは減少し、M2Sが増加している点であった。キ

メラマウスの尿の代謝物プロファイルと比較するとヒト肝臓置換RIの割合に関係なくM3Sを除く各代謝物ピークに量的な差異は観察されなかった。その一方、ヒト肝臓置換RIの割合が増加するにつれて、M3Sの増加が認められた。塩酸アモスラロールのキメラマウスにおける肝クリアランスは残存のマウス肝細胞あるいはAlb-uPA遺伝子により障害を受けたマウス肝細胞に予想以上に代謝されることが明らかとなった。胆汁中代謝物プロファイルにおいては、10 mg/kg投与でありながら低置換マウスの代謝物パターンは100 mg/kgのパターンに類似していた。これは肝障害により代謝が飽和していることを示唆していると思われた。置換率が上昇するにつれ、ヒト代謝物であるM3Sが増加している傾向が認められた。しかしながら他の代謝物のパターンは置換率に関係が見られず個体差があると考えられた。キメラマウスの尿においては胆汁のように飽和による代謝パターンの変化が観察されなかったのは腎排泄が飽和しているためと考えられた。

山之内製薬(株)代謝研究所で実施された16人の異なったドナーから調製された肝ミクロソームを用いた*in vitro*相関試験の結果、塩酸アモスラロールは主にCYP3A4により代謝さ

れることが明らかになった。これよりキメラマウスの肝臓中のヒト肝細胞中のCYP3A4により被検薬がM3に代謝されたと推察された。しかし、残念なことにM3Sがヒト胆汁中に排泄されたという臨床実験がされていない。そして、M3Sのトランスポーターは同定されていないが、今回の試験結果によりヒトにおいても尿同様M3Sは胆汁中へも排泄されていることが強く示唆された。

塩酸アモスラロールのPK解析の結果、総クリアランスがICRマウスでは $10.7 \text{ lh}^{-1}\text{kg}^{-1}$ ヒトでは $0.1 \text{ lh}^{-1}\text{kg}^{-1}$ であった(Nakashima *et al.*, 1986)。これはこの薬物がマウスにおいてヒトよりもより代謝され易いことを示している。今回のヒト肝細胞キメラマウスを使った実験から、ヒトよりもマウスの代謝速度の速い薬物ではヒトの代謝を予測するには不向きであると思われた。寄主であるマウス肝細胞の干渉対策として、例えば90%以上の高置換率キメラマウスを作成するか、ホスト動物の代謝能のみを選択的に抑制する方法が挙げられる。一例として、1つか2つの生体異物代謝CYPの遺伝子のノックアウトマウスが開発されつつある(Gonzalez and Kimura, 2003)。ヒト化マウスへのこれらの遺伝子の導入は今回のアモスラロール代謝で見出された問題の

解決の一つの手段となり得ると推察される。

E. 結論

ヒト肝臓キメラマウスの組織化学的検査により移植されたヒト肝細胞が寄主のマウス肝細胞の中で類洞と肝小管基底膜に複合構造を形成し、さらにヒトトランスポーターが極性を持ちそれぞれの細胞に発現し、分裂・増殖していることが明らかとなった。キメラマウスが塩酸アモスラロールを代謝し、ヒト特異的代謝物M3の硫酸抱合体を尿および胆汁中に排泄していた。

寄主肝細胞の競合的代謝活性の抑制の測定は必要ではあるが、キメラマウスはヒトの薬物代謝と消失を予測することが可能なツールになり得ると思われた。

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

- 特許取得：なし
- 実用新案登録：なし
- その他：なし