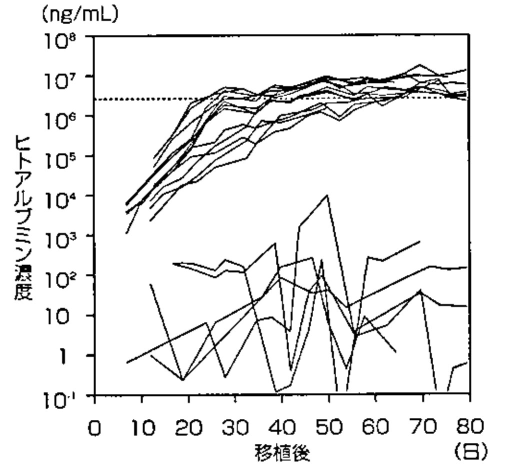
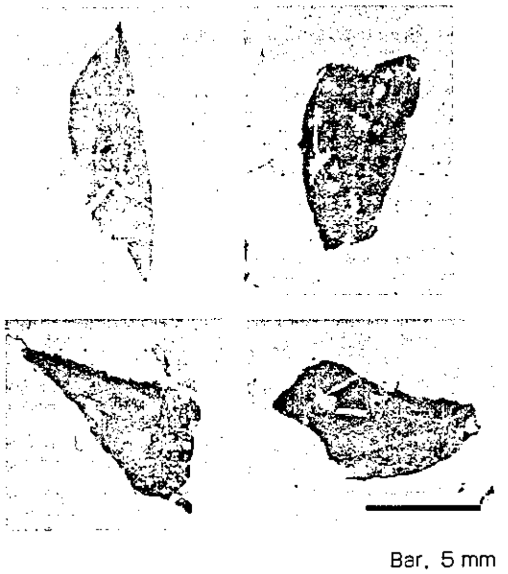


ヒト肝細胞を移植したuPA/SCIDマウスの尾から血液を2μL経時的に採取し，ヒトアルブミン濃度をELISAで測定した。ヒトアルブミン濃度が2mg/mL以上に達したマウスに補体抑制剤を投与した。その結果，19匹中12匹のマウスにヒト肝細胞が生着し，ヒトアルブミン濃度は3mg/mL（点線）を超えて上昇し，最高で13mg/mLに達した。

図2　ヒト肝細胞を移植したマウス血中のヒトアルブミン濃度



移植後77日目のヒト肝細胞キメラマウスの肝臓の6葉の凍結切片を作製し，ヒト特異的サイトケラチン8/18の抗体で染色した。そのうちの4葉の染色像を示す。染色された部位がヒト肝細胞に置換された領域である。これらの染色切片から，切片あたりの陽性面積の割合を算出し置換率とした。このマウスの置換率は84%であった。

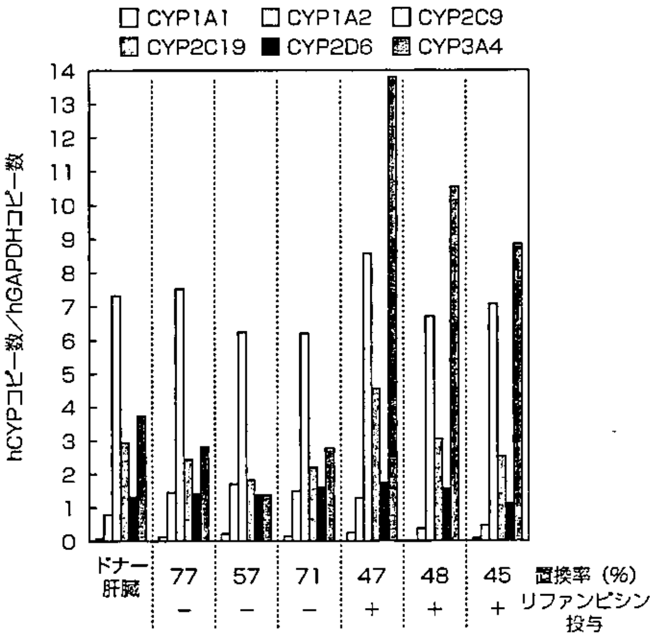
図3　サイトケラチン8/18抗体を用いた組織染色

与することにより，3mg/mL以上のヒトアルブミン値を示すマウスの体重減少と死亡を防ぐことが可能となることを見出した。この方法により，ヒトアルブミン濃度は最高で13mg/mLに達した(図2)[6)]。

キメラマウスのヒト肝細胞による置換率を求めるために，肝臓の凍結切片を作製し，ヒト特異的サイトケラチン8/18抗体による免疫染色，またはヒトcDNAプローブを用いた*in situ* hybridizationを実施し，染色した切片の面積あたりの陽性領域の割合を置換率とした（図3）。その結果，マウス血中ヒトアルブミン濃度と置換率には相関があり，5mg/mLのヒトアルブミン値を示すマウスのヒト肝細胞による置換率は約70%であった。キメラマウスにフサンを投与することにより，最高で置換率96%のキメラマウスが得られた[6)]。

キメラマウス肝臓におけるヒトチトクローム P450発現

キメラマウス肝臓よりTotal RNAを抽出し，ヒトチトクロームP450（hCYP）の分子種hCYP1A1，1A2，2C9，2C19，2D6，3A4のmRNAについて，ABI 7700を用いてリアルタイム定量性RT-PCR法により発現量（コピー数）を測定した。その結果，置換率が高くなるほどhCYPの高い発現量がみられた。hCYPのそれぞれのコピー数をヒトglyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (hGAPDH) のコピー数で割ると，ドナーの値と非常に近い値を示した（図4）[6)]。リファンピシンはhCYP3A4の発現量を誘導することが知られている。キメラマウスにリファンピシンを50mg／体重kgの投与量で4日間腹腔内投



ドナー肝臓と６匹のキメラマウス肝臓からTotal RNAを抽出し，リアルタイム定量性RT-PCRにより，６種類のhCYPとhGAPDHのコピー数を測定した。６匹中３匹にはリファンピシンを４日間投与した。リファンピシンを投与していない３匹のCYPの発現量はドナー肝臓と似ていた。リファンピシンを投与した３匹では，CYP3A4のみ高い発現が認められた。

図４　キメラマウスにおけるhCYP mRNAの発現量

与し，５日目に肝臓を採取した。hCYP mRNAの発現量を同様に測定したところ，hCYP3A4のみが高い値を示した（図４）。

また，CYP2C9の薬物代謝活性をジクロフェナクを基質として測定したところ，キメラマウス肝臓にも活性がみられた。ヒト肝細胞による置換率が高くなるほど，CYP2C9の高い活性がみられた[6]。

おわりに

われわれは，マウス肝臓の90%以上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した。このマウスの肝臓には，ヒト肝臓と同程度のヒト型CYPのmRNAが発現しており，薬物代謝活性も認められた。また，薬物によるCYPの選択的誘導も認められた。このキメラマウスはヒト肝炎ウイルスに対する抗ウイルス薬の開発だけでなく，新薬開発のための非臨床試験における薬物動態試験や肝毒性試験などに利用可能と考えられた。

【参考文献】

1) Sandgren EP, Palmiter RD, Heckel JL, et al：Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene. Cell, 66：245-256, 1991
2) Rhim JA, Sandgren EP, Degen JL, et al：Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. Science, 263：1149-1152, 1994
3) Rhim JA, Sandgren EP, Palmiter RD, Brinster RL：

Complete reconstitution of mouse liver with xenogeneic hepatocytes. Proc Natl Acad Sci USA, 92 : 4942-4946, 1995

4) Dandri M, Burda MR, Török E, et al : Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and *in vivo* infection with hepatitis B virus. Hepatology, 33 : 981-988, 2001

5) Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, et al : Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. Nat Med, 7 : 927-933, 2001

6) Tateno C, Yoshizane Y, Saito N, et al : Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. Am J Pathol (in press)

製剤技術と品質管理の専門情報誌 PHARM TECH JAPAN 9月号 Vol.20 No.10 株式会社じほう

特集：医薬品製造におけるクリーンテクノロジー

■注射剤製造の概要とクリーン化
—第14改正日本薬局方およびその解説書から— …… 三宅康夫（千代田化工建設）
■アイソレーターシステムの現状と展望 …… 川﨑康司（エアレックス）
■レポート：トーアエイヨー 製剤技術センターのクリーン化設備

ARTICLES

■植物由来カプセル開発検討報告 …… 柴田一郎（富士カプセル）
■医薬品における脱酸素剤使用の現状と今後の展開 …… 榊原好久（三菱ガス化学）
■FDA査察 "よい結果を出すためのポイント"（4） …… 山岡尚志（タックオフィス）

Study of GMP

■製剤GMPガイドライン（2） 製薬協GMP専門委員会の提案 …… 重光 真（明治製菓）

Chimeric Mice With Human Hepatocytes
- A New Tool for Pre-Clinical Evaluation of New Chemical Entities -

Chise Tateno[1], Toru Horie[2], and Katsutoshi Yoshizato[1,3]

From [1]Yoshizato Project, CLUSTER, Prefectural Institute of Industrial Science, [2]PhoenixBio Co., Ltd, [3]Department of Biological Science, Developmental Biology Laboratory, Hiroshima University, Higashihiroshima, Hiroshima, Japan.

2004年36巻7月臨時増刊号（通巻471号）
細胞 The Cell（p.30～p.34）
ニューサイエンス社
New Science Co.LTD.

Chimeric Mice With Human Hepatocytes
- A New Tool for Pre-Clinical Evaluation of New Chemical Entities -

Chise Tateno[1], Toru Horie[2], and Katsutoshi Yoshizato[1,3]

From [1]Yoshizato Project, CLUSTER, Prefectural Institute of Industrial Science [2]PhoenixBio Co., Ltd, [3]Department of Biological Science, Developmental Biology Laboratory, Hiroshima University, Higashihiroshima, Hiroshima, Japan.

Key words
human hepatocytes, chimeric mice, cytochrome P450

Abstract

Human hepatocytes were transplanted into urokinase-type plasminogen activator-transgenic SCID mice (uPA/SCID mice), which are immunodeficient and undergo liver failure. The transplanted cells were characterized in terms of their *in vivo* growth potential and functions. The human hepatocytes progressively repopulated the murine host liver when treated with a drug that has anti-human complement factor activity, and these mice developed livers with replacement index values as high as 96%. The human hepatocytes in the murine host liver expressed mRNAs for a variety of human cytochrome P450 (hCYP) subtypes, in a manner that was similar to the donor liver. The mRNAs for hCYPs were induced in the liver in a CYP type-specific manner when the mice were treated with drugs. From these results, we conclude that the chimeric mouse developed in the present study is a useful model for assessing the functions and pharmacological responses of human hepatocytes.

Introduction

Researchers have developed humanized (chimeric) mice by partially repopulating the mouse liver with human hepatocytes. Dandri and colleagues transplanted fresh human hepatocytes into mice that were generated by crossing mice transgenic for urokinase-type plasminogen activator (uPA) with mice that carried a deletion of the recombinant activation gene-2 (RAG-2)[1]. The replacement index (RI) of the resulting chimeric liver was 15% at most. Human hepatitis B viruses were able to infect and replicate in the humanized uPA/ RAG-2 mice[1]. Humanized mice were also produced by transplanting human hepatocytes into uPA/SCID mice, and these mice have been utilized for infection studies with human hepatitis C viruses[2].

Recently we succeeded in generating uPA/SCID mice with livers that were almost completely repopulated with human hepatocytes. The livers of the chimeric mice were tested for normal expression of the various forms of human cytochrome P450 (hCYP), which play central roles in metabolizing medicines in the human liver[3]. We also examined whether the chimeric liver showed induction of the appropriate hCYP subtype when the mouse was administered a drug with known specificity for a certain CYP subtype in the human liver[3].

1-3-1 Kagamiyama, Higashihiroshima, Hiroshima 739-8526, Japan.
Fax: (+81) 82-424-1492 E-mail: kyoshiz@hiroshima-u.ac.jp

1. Repopulation of mouse livers with human hepatocytes in the presence of complement inhibitor

The present study was performed with the approval of the ethics board of the Hiroshima Prefectural Institute of Industrial Science and Technology. The uPA$^{+/+}$/SCID$^{+/+}$ mice were generated by crossing uPA mice {B6SJL-TgN(Alb1Plau)144Bri} with SCID mice (Fox Chase SCID C.B-17/Icr-*scid* Jcl). Liver tissues were isolated from a 12-year-old Japanese donor. Hepatocytes were isolated and stored in liquid nitrogen. We also used commercially available frozen human hepatocytes, which represent hepatocytes from a 9-month-old-Caucasian boy (IVT079; *In Vitro* Technologies Inc.)[3]. These hepatocytes were thawed and transplanted with 5.0-7.5 $\times$ 10^5 viable hepatocytes via spleen into the uPA$^{+/+}$/SCID$^{+/+}$ mice at 20 to 30 days after birth.

Blood samples were collected periodically from the tail vein, and the levels of human albumin (hAb) was determined by ELISA. In this instance, the chimeric mice could not survive when the level of hAb in the host blood exceeded 3 mg/ml, which corresponded to RI > 50%. Atrophy and necrosis of the kidney and pancreas were observed in these mice. However, there was neither severe necrosis nor inflammation in the human hepatocyte-repopulated livers. Depositions of human complement 3 (hC3) and human membrane attacking complexes (hMAC) were observed in the kidneys[3]. The currently available data strongly suggest that chimeric mice die due to human complement-induced disorders in organs other than the liver, particularly the kidneys. The administration of Futhan (nafamostat mesilate, 6-amidino-2-naphthyl p-guanidinobenzoate dimethane-sulfonate; gifted by Torii Pharmaceutical Co., Ltd.), which is an anti-complement drug that inhibits the C5/C3 convertase[4]. The host animals were injected intra-peritoneally with 200 µl of 1.5 mg/ml Futhan "once every 2 days", "once per day", and "twice per day", when the hAb concentrations are between 2 and 4 mg/ml, 4 and 6 mg/ml, and > 6 mg/ml, respectively. The administration of Futhan had a remarkable effect on the chimeric mice, in that these mice survived for long periods of time (> 6 months) and showed steady gains in body-weight within the two months post-transplantation, and sustained high levels of hAb, ranging from 3 to 13 mg/ml (Fig. 1). The animals appeared normal and showed high RI values (~96% maximally). Thus, it seems likely that Futhan functions as an anti-complement factor(CF) agent, as one would expect. We believe that activated hCFs produced by propagated human hepatocytes attack the cells of the host mouse. Futhan has been shown to be effective in the therapy of acute pancreatitis[5] and pulmonary vascular injury[6], and in the prolongation of xenograft survival[7]. Thus, it appears that Futhan not only suppresses CFs, but also functions as a serine protease inhibitor to prevent secondary injuries caused by proteases that leak from injured tissues.

The chimeric livers were characterized morphologically and histologically with respect to the extent of chimerism, as estimated by the concentrations of hAb in the host blood. The red nodules that were distributed sporadically in the livers of mice whose hAb levels were below the level of detection may represent colonies of transgene-deleted host hepatocytes, as reported previously[8]. The livers of mice that had 1-5 mg/ml hAb in the blood were chimeric, in that they contained both white and red areas. The livers of mice with hAb blood levels of > 5 mg/ml were all red-colored.

To identify human hepatocytes in the chimeric livers, liver sections of mice were subjected to human specific cytokeratin 8/18 (hCK8/18) immunostaining (Fig. 2). We confirmed that the regions that were positive for the immunostaining coincided almost exactly with those that showed positive *in situ* hybridization staining with human DNA probes in the corresponding serial section[3]. We calculated the RI as the ratio of area occupied by hCK8/18-positive hepatocytes to the entire area examined in immunohisto-chemical sections of seven lobes. RI values correlated well with the hAb concentrations in the blood of chimeric mice (Fig. 3). The correlation graph suggests that mice with > 5 mg/ml hAb in the blood should have RI > 70%. Thus, approximately 30% of transplanted mice with human hepatocytes were considered to have RI > 70%.

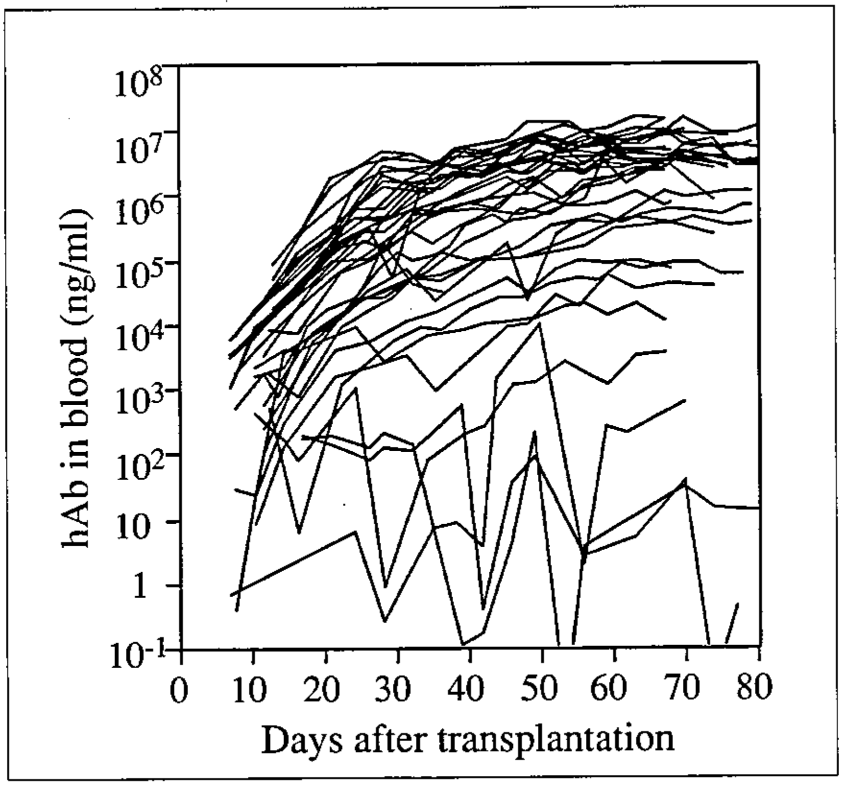


Fig. 1 Humanized mice with human hepatocytes.
The uPA$^{+/+}$SCID$^{+/+}$ mice were transplanted with human hepatocytes. The mice were treated with Futhan according to the regimen described in the text.

2. Expression of hCYP proteins and mRNAs in the livers of chimeric mice

CYP isoforms play central roles in the metabolism of chemicals and medicines. The livers of the chimeric mice were tested for normal expression of the various forms of human hCYP.

hCYP2C9 protein was detected in the microsome fraction of chimeric liver by Western blotting[3]. CYP2C9 preferentially catalyzes diclofenac via its diclofenac 4'-hydroxylation activity[9]. Diclofenac is an appropriate substrate for measuring the activity of human-specific CYP in chimeric mouse livers, because the microsome fractions of the control uPA$^{-/-}$/SCID$^{+/+}$ mice showed very low levels of activity for this enzyme. Liver microsomes were prepared from chimeric mice and treated with diclofenac, to test their ability to metabolize the drug. The level of diclofenac 4'-hydroxylase of the mouse with RI = 0% was similar to those of the control mice, while the levels of this enzyme in the remaining chimeric mice increased with increasing RI values[3]. From this, we conclude that human hepatocytes in chimeric livers retain pharmacological activity against diclofenac *via* the production of hCYP2C9.

Total RNA samples were isolated from the liver tissues of the donor and chimeric mice. The mRNAs for six hCYPs, hCYP1A1, 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, and 3A4, were quantified by quantitative RT-PCR using the total RNA samples. The hCYP sequences were not amplified in the control uPA$^{-/-}$/SCID$^{+/+}$ mouse livers, which indicates that the primers used are specific for human genes. The mRNA level for each hCYP in each individual chimeric mouse correlated well with the RI value for that mouse. The relative copy numbers of the hCYPs were obtained by normalizing the observed copy numbers against the copy number of human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. The hCYP expression profile of each chimeric mouse was similar to that of the donor. This suggests that the human hepatocytes in the chimeric mice express the six hCYP genes in a semi-normal fashion, as is the case in the human body.

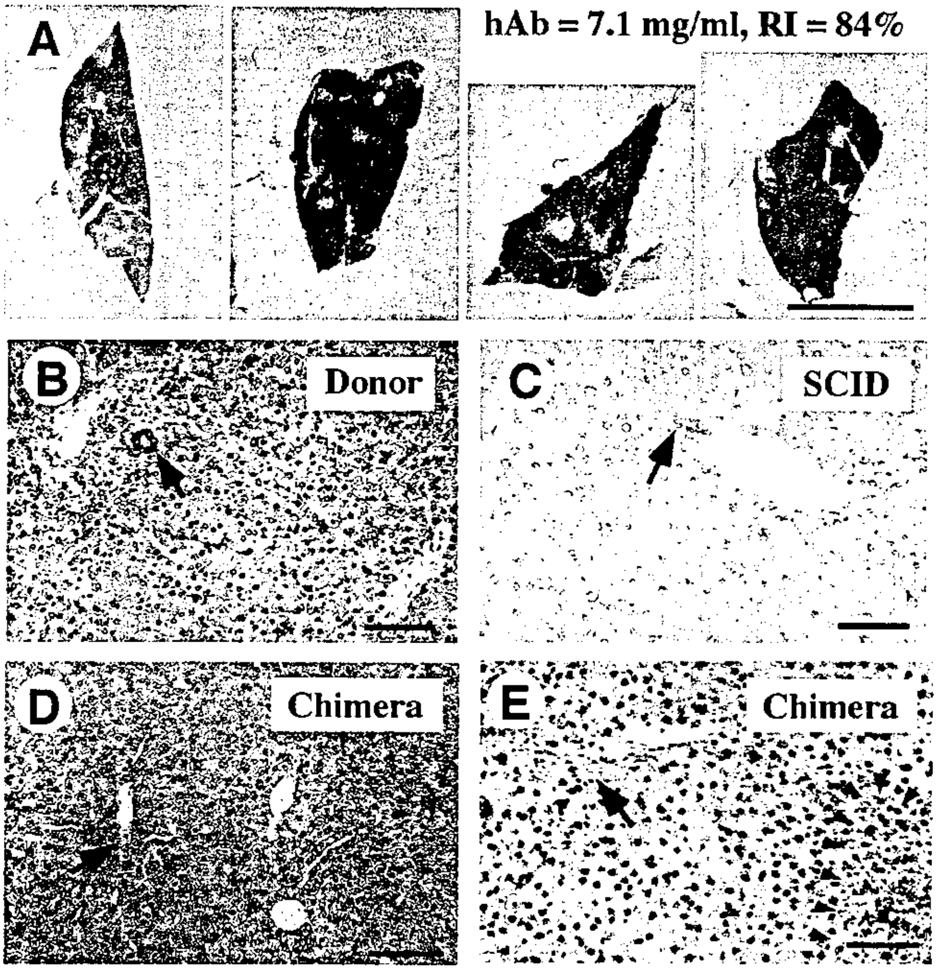


Fig. 2 Demonstration of mouse liver chimerism.
Histological serial sections were prepared from six liver lobes of a chimeric mice, and stained with anti-hCK8/18 antibodies. (A) Photos are tissues of one of the median and the left lateral lobe, one of the right lateral lobes, and one of the caudate lobe from left to right. RI was determined from the stain as 84%. Bar, 5 mm. (B) Donor liver stained with anti-hCK8/18 antibodies. (C) uPA$^{-/-}$/SCID$^{+/+}$ mouse liver stained with anti-hCK8/18 antibodies. (D) Chimeric liver stained with anti-hCK8/18 antibodies. (E) Chimeric liver stained with *in situ* hybridization using human DNA probes. Bars from (B) to (E), 100 μm.

We also examined whether the chimeric liver was capable of responding to CYP-inducing chemicals. Rifampicin and 3-methylcoranthrene (3-MC) were used as specific inducers of CYP3A, and CYP1A1 and 1A2, respectively[10, 11]. Chimeric mice were injected intraperitoneally with rifampicin or 3-MC. The mRNA levels of six hCYPs in the liver tissues were measured 24 hours later. Rifampicin treatment enhanced the expression 5.8-fold. This level of induction was specific for hCYP3A4 among the six hCYPs tested. The administration of 3-MC enhanced the expression levels of the CYP1A1 and CYP1A2 mRNAs to 10.0-fold and 6.4-fold, respectively.

Conclusion

The prediction of human responses to test drugs based upon data obtained from experiments with laboratory animals such as rodents is not practical because there are considerable differences in the metabolism of drugs between animals and humans. Recently, we developed the method to yield "chimeric mice"/"humanized mice" whose hepatocytes are near-completely replaced with human hepatocytes[3]. These

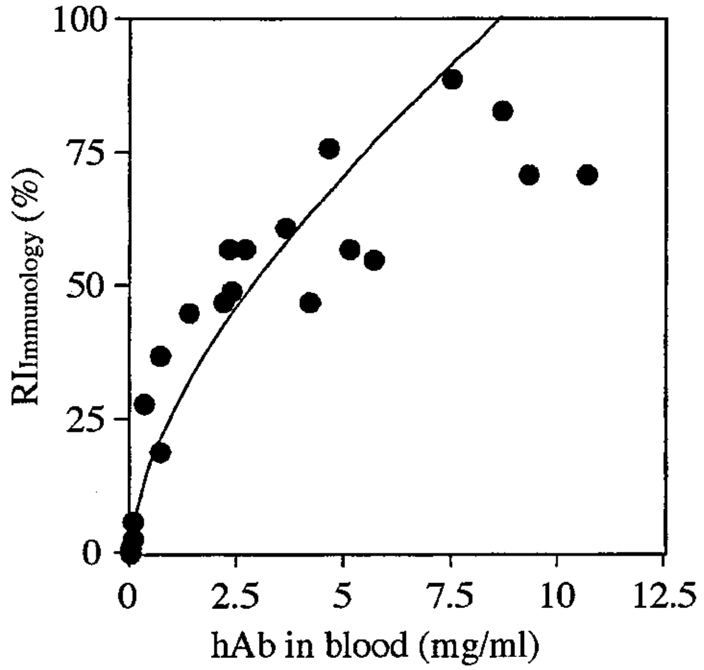


Fig. 3 Correlation between RI and the hAb concentration in mouse blood.
The hAb concentration is plotted against the corresponding $RI_{Immunology}$. The $RI_{Immunology}$ values were obtained by immunostaining with anti-CK8/18.

mice show the humanized metabolism toward test drugs. The utilization of chimeric mice into pre-clinical evaluation for the metabolism and toxicity of test drugs will much shorten the period of discovery and development of new chemical entities, and will much reduce the cost for such activity.

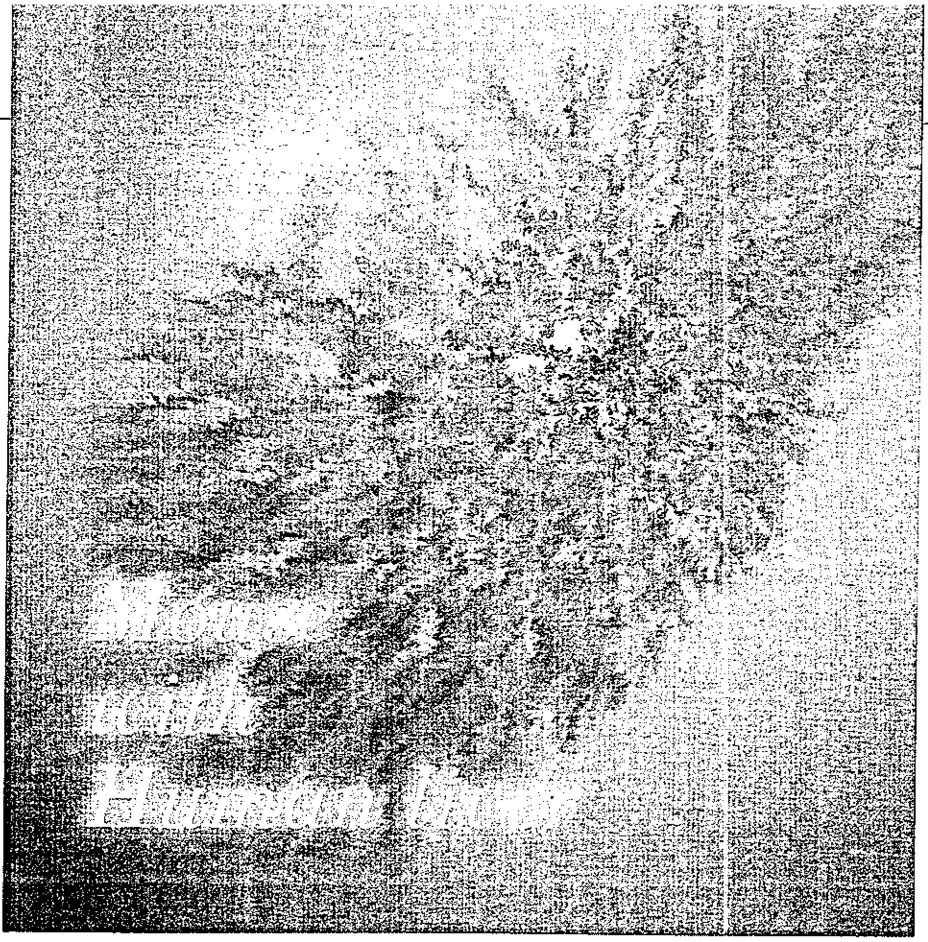
References

1) Dandri M, Burda MR, Török E, *et al.*: Hepatology. 33: 981-988, 2001.
2) Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, *et al.*: Nat Med. 7: 927-933, 2001.
3) Tateno C, Yoshizane Y, Saito N, *et al.*; Am J Pathol. (in press)
4) Inagi R, Miyata T, Maeda K, *et al.*: Immunol Lett. 27: 49-52, 1991.
5) Iwaki M, Ino Y, Motoyoshi A, *et al.*: Jpn J Pharmacol. 41: 155-162, 1986.
6) Uchiba M, Okajima K, Murakami K, Okabe H, Takatsuki K. Am J Respir Crit Care Med. 155: 711-718, 1997.
7) Miyagawa S, Shirakura R, Matsumiya G, *et al.*: Transplantation. 55: 709-713, 1993.
8) Sandgren EP, Palmiter RD, Heckel JL, *et al.*: Cell. 66: 245-256, 1991.
9) Leemann T, Transon C, Dayer P, *et al.*: Life Sci. 52: 29-34, 1993.
10) Bowen WP, Carey JE, Miah A, *et al.*: Drug Metab Dispos. 28: 781-788, 2000.
11) Kato R, Pharmacol Ther. 6: 41-98, 1979.

☆ ☆ ☆

特集

「ヒトの肝細胞を持つマウス」



立野 知世
広島県産業科学技術研究所　知的クラスター創成事業　吉里プロジェクト
吉里 勝利
広島大学大学院理学研究科生物科学専攻発生生物学研究室　教授

はじめに

医薬品開発には10年以上の年月と約300億円の費用がかかるといわれている。多くの化学物質から医薬品候補を選択するために、マウス、ラット、イヌ、サルなど用いて、薬効試験、安全性試験が行われる。これらの動物で有効性と安全性が確認された候補医薬品について、臨床試験が行われる。しかし、動物とヒトでは、肝臓における薬物の代謝能力が大きく異なることが知られている。肝臓の主要薬物代謝酵素であるシトクロームP450（CYP）は1A, 2C, 2D, 3Aなどの多くの分子種から成るが、それぞれの分子種の発現の割合は動物種によって大きく異なる。したがって、動物種によって薬物動態が大きく異なることが原因となり、臨床試験において薬効がみられなかったり、毒性が現れたりすることから、約半分の医薬候補品が開発中止となる。このことは、莫大な労力と費用の無駄となっている。これらの無駄を最小限に留めるために、米国Food and Drug Administrationは前臨床試験において、ヒトの肝細胞を用いたin

vitro試験を推称している。しかし、in vitroの試験では限界がある。そこで、ヒト肝細胞を持つマウスが存在すれば、ヒトの薬物動態や肝毒性などをin vivoで予測するための強力なツールとなるのではないかと考えられる。

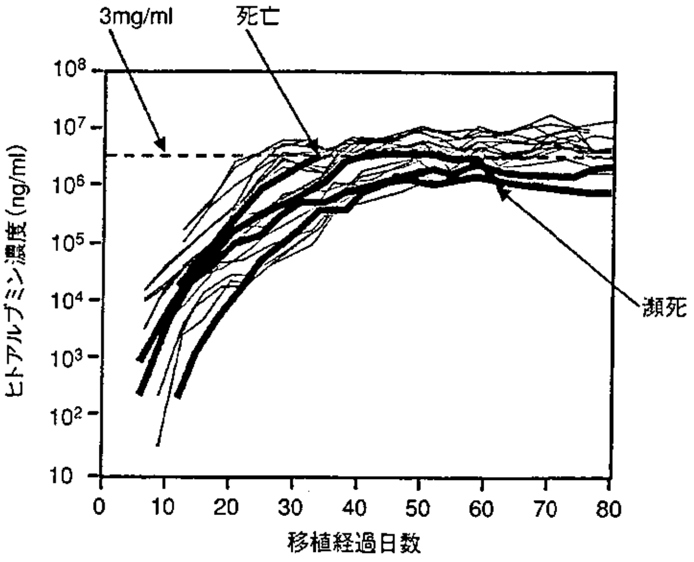
また、ヒト肝炎ウィルスであるHBVやHCVはヒトあるいはチンパンジーの体内の肝細胞にしか感染しない。このため、これらのウィルスの感染メカニズムの解明や抗ウィルス剤の開発の進展は遅い。HBVやHCVに感染するヒト肝細胞を持つキメラマウスは、抗ウィルス剤のスクリーニングにも有効であると考えられる。

ヒト肝細胞を持つキメラマウスの作製

これまで、いくつかの研究施設により異種動物の肝細胞を持つキメラマウスの開発が試みられてきた。ヒト肝細胞を移植した場合、ホスト動物の免疫反応により排除されず、移植した肝細胞がホストの肝臓の中で増殖できる環境が必要である。このため、免疫不全の性質を持つnudeマウス、SCIDマウスあるいはRag2ノックアウトマウスが利用されている。また、肝細胞に増殖刺激を与える必要性から、肝障害の性質を持つuPAトランスジェニックマウス[1]が利用されている。uPAトランスジェニックマウスは、アルブミンエンハンサープロモーターにウロキナーゼプラスミノーゲンアクチベーターを接続した遺伝子が導入されたもので、肝臓特異的にuPAが作られ分泌される[1]。uPAが肝細胞に大量に発現しているため、このマウスの肝細胞には小さな脂肪滴が多数存在し、肉眼的には白い肝臓が観察される。Rhimらはこのu PAトランスジェニックマウスとnudeマウスを掛け合わせ、uPA/nudeマウスを作製し、ラット肝細胞を移植した。その結果、ラット肝細胞で100%置換されたキメラマウスを作出することができた[2]。DandriらがuPA/Rag2ノックアウトマウスにウッドチャックの肝細胞を移植したところ、30～60%置換された[3]。さらに、DandriらやMercelらが、ヒト肝細胞をそれぞれuPA/Rag2ノックアウトマウスおよびuPA/SCIDマウスに移植したところ、その置換率は最高で約15%および約50%であった[4,5]。

私達は、マウス肝臓のほとんどがヒト肝細胞で置換されたマウスを作製するために、広島大学・自然科学研究支援開発センター・動物実験施設と共同で、uPAトランスジェニックマウスとSCIDマウスを掛け合わせ、uPA/SCIDマウスを作製した。これら二種類の遺伝子をホモ接合体として持つマウスは、免疫不全と肝障害を同時に持つため体重増加の抑制が見られるが、多くのマウスは生存することができる。生後約20日で体重約5 gのuPA/SCIDマウスに麻酔をかけ、左脇腹を約5 mm切開し、脾臓から50万個から100万個のヒト肝細胞を注射器を用いて移植した。脾臓に移植した多くの肝細胞は脾静脈を介して肝臓に流れる。移植に用いた肝細胞は、大腸癌の肝臓転移などで肝臓を部分切除した患者の切除肝から、あるいは米国から輸入した凍結保存ヒト肝細胞を融解して用いた。患者から正常肝細胞を分離する際は、倫理委員会で承認を受け患者からインフォームドコンセントを得た上で実施した[6]。

私たちは、12歳男児の肝細胞を4匹のuPA/SCIDマウスに移植した。ヒト肝細胞のマウスへの生着・増殖の程度を知るために、マウスの尾から2 μmlの血液を継時的に採取し、マウス血中のヒトアルブミン濃度をモニタリングした。4匹とも、マウス血中のヒトアルブミン濃度は対数的に増加し、移植後約50日以降はプラトーに達した（図1）。4匹中2匹の



uPA/SCIDマウスにヒト肝細胞を移植し、マウス血中のヒトアルブミン濃度を測定した。フサンを投与していないマウス(▬)のうち、ヒトアルブミン濃度が3 mg/ml(---)を越えたマウスは、死亡または瀕死状態となった。フサンを投与したマウス(—)はヒトアルブミン濃度が3 mg/mlを越えても生存することができ、ヒトアルブミン濃度が10 mg/mlを越えるマウスも見られた。

図1　マウス血中ヒトアルブミン濃度

マウス血中ヒトアルブミン濃度は、2 mg/ml以下でありマウスは80日以降屠殺するまで生存した。一方、残りの2匹はヒトアルブミン濃度が3 mg/ml以上を超えると、体重が減少し、死亡または瀕死状態となり屠殺・解剖した。

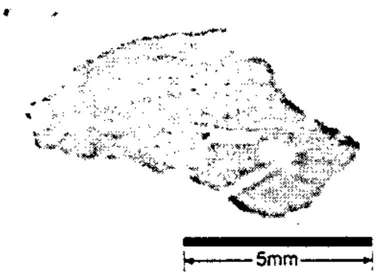
動物は、リンパ球や抗体、NK細胞などの異物に対する反応以外に、補体系により異物を排除する能力を持っている。補体系は本人や同種の細胞には働かないしくみを持っている。主な補体因子は肝臓で作られるため、uPA/SCIDマウスの血中においても、ヒトアルブミンの増加とともに、ヒト補体因子の濃度の上昇が観察された。実際にヒトアルブミン濃度が3 mg/ml以上で瀕死状態となったマウスの腎臓を調べると、糸球体や尿細管にヒト補体因子や、細胞障害性のある補体系の最終産物であるヒト膜攻撃複合体（MAC）の沈着が観察された。したがって、移植したヒト肝細胞が産生した補体因子が、マウスの腎臓で活性化され、腎障害などによりマウスが死にいたったのではないかと考えた[6]。

通常補体抑制剤として使用されるフサン（nafamostat mesilate, 鳥居製薬から供与）をキメラマウスに投与した。その結果、フサンの投与により、ヒトアルブミン濃度が3 mg/ml以上のマウスの体重減少は抑えられ、また、長期間生存させることが可能となった。この薬剤の投与により、マウス血中ヒトアルブミン濃度は増加し、高いもので10 mg/mlを超えるものも観察された（図1）。移植後約70～80日のマウスを解剖し、肝臓を肉眼的に観察すると、マウス血中のヒトアルブミンがほとんど検出されなかったマウスの肝臓は白い色を呈していた（図2a)。マウス血中のヒトアルブミン濃度が高いマウスの肝臓ほど赤い領域が増加し、ヒトアルブミン濃度が5 mg/ml以上のマウスでは、肝臓の大部分が赤い色を呈していた（図2b)。

キメラマウスの肝臓の凍結切片を作製し、ヒト肝細胞特異的な抗体、ヒトサイトケラチン8/18抗体により免疫染色を行うと、マウスの肝臓の中に存在するヒト肝細胞のみを染め分けることができる（図2c)。マウスの肝臓切片面積あたりのヒトサイトケラチン8/18抗体陽性面積の割合を、ヒト肝細胞による置換率として表した。その結果、ヒトアルブミン濃度と置換率には正の相関が認められ、1 mg/mlのマウスで約20%、2 mg/mlで約30%、3 mg/mlで約

(a) マウス血中ヒトアルブミン濃度が0 mg/ml.置換率0%のマウスの肝臓。肝臓のほとんどが障害肝で白い色をしている。

(b) マウス血中ヒトアルブミン濃度が7.7 mg/ml、置換率89%のマウスの肝臓。障害を持つマウスの肝臓はヒトの肝細胞でほとんど置換されており、肝臓は赤い。



(c) マウス血中ヒトアルブミン濃度が6.6 mg/ml、置換率84%のマウスの肝臓の凍結切片をヒト特異的サイトケラチン8/18抗体で染色したときの顕微鏡像。農染された領域がヒト肝細胞により置換された部分である。バーは5mm。

図2 ヒト肝細胞キメラマウスの肝臓およびヒト肝細胞特異抗体を用いた免疫染色

50%、4 mg/mlで約60%、5 mg/ml以上で約70%以上の置換率であった。また、別のドナー肝細胞を用いた場合も同様な結果が得られた[6]。

もともとuPA/SCIDマウスは肝障害を持っているため、血清中のGPTが高く、総アルブミン量が低い。ヒト肝細胞の置換率が高くなるにつれて、GPTは低下し、総アルブミン量は増加する傾向にあった。したがって、ヒト肝細胞に置換されることにより、肝障害が改善されたと考えられる[6]。

このようにして作製されたヒト肝細胞キメラマウスが、最初に述べたように医薬品開発に利用できるかどうか調べるために、キメラマウス肝臓におけるヒト薬物代謝酵素の発現量を調べた。ドナー肝臓とキメラマウス肝臓よりtotal RNAを抽出し、ヒトCYP分子種のみに反応し、マウスCYP分子種には反応しないプライマーを用いて、real-time定量性RT-PCRを行った。total RNA 1 ng当たりのヒトCYP分子種のCYP1A1, 1A2, 2C9, 2C19, 2D6および3A4のmRNAのコピー数を求めた。その結果、キメラマウス肝臓におけるそれぞれのCYP分子種のコピー数は置換率と正の相関が認められた。置換率90%以上のキメラマウス肝臓では、ほぼドナーと同程度のコピー数が観察された。また、ハウスキーピング遺伝子の一つであるヒトGAPDHに特異的なプライマーを用いて同様にヒトGAPDH mRNAのコピー数を求め、それぞれの分子種のコピー数を割ることにより、キメラマウス肝臓の中のヒト肝細胞あたりのそれぞれの分子種の発現コピー数を求めることができる。このようにして求めたコピー数は、置換率の異なるキメラマウス間でもほぼ同程度であり、ドナー肝ともほぼ一致していた。したがって、キメラマウスの肝臓におけるヒト肝細胞は、ドナー肝臓におけるヒト薬物代謝酵素のmRNA発現量を維持していることがわかった。さらに、これらCYP分子種の蛋白発現および酵素活性も維持していることも確認した[6]。

今後の展望

これらのヒト肝細胞キメラマウスに薬物を投与し、キメラマウスにおける薬物動態を調べたところ、ヒトでの動態に近いデータも得られている。また、キメラマウスのヒト肝細胞にはHBVやHCV

が感染し増幅できることも確認しており、このキメラマウスは、抗ウィルス剤を含む医薬品開発に貢献できる新しいツールとして期待できる。

キメラマウス肝臓の中で、ヒト肝細胞は肝特異機能を失うことなく50日で100～200倍に増殖することができる。このようにして増殖させたヒト肝細胞の安全性と有効性が確かめられれば、将来、これらの肝細胞を肝細胞移植やハイブリッド型人工肝臓などの再生医療にも利用可能ではないかと考えている。

参考文献

1) Sandgren EP, Palmiter RD, Heckel JL, Daugherty CC, Brinster RL, Degen JL: Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene. Cell 1991, 66:245-256
2) Rhim JA, Sandgren EP, Palmiter RD, Brinster RL: Complete reconstitution of mouse liver with xenogeneic hepatocytes. Proc Natl Acad Sci USA 1995, 92: 4942-4946
3) Dandri M, Burda MR, Gocht A, Török E, Pollok JM, Rogler CE, Will H, Petersen J: Woodchuck hepatocytes remain permissive for hepadnavirus infection and mouse liver repopulation after cryopreservation. Hepatology 2001, 34:824-833
4) Dandri M, Burda MR, Török E, Pollok JM, Iwanska A, Sommer G, Rogiers X, Rogler CE, Gupta S, Will H, Greten H, Petersen J: Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus. Hepatology 2001, 33:981-988
5) Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, Douglas DN, Hao C, Rinfret A, Addison WR, Fischer KP, Churchill TA, Lakey JRT, Tyrrell DLJ, Kneteman NM: Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. Nat Med 2001, 7:927-933
6) 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 2004, 165:901-912

Experimental Animals

Covance R. P. Inc 代理店　Japan Laboratory Animals, Inc.

株式会社 日本医科学動物資材研究所

〒179-0074　東京都練馬区春日町6丁目10番40号
TEL（03）3990-3303　FAX（03）3998-2243

第6章　ヒト組織代替法
第2説　個体レベルでのヒト化動物
第1項　ヒト肝細胞を導入したスキッドマウス

立野知世　広島県産業科学技術研究所　知的クラスター創成事業　吉里プロジェクト
吉里勝利　広島大学大学院　理学研究科　生物科学専攻　動物科学講座　発生生物学教室

1. はじめに

製薬や創薬の開発研究では、長い年月と巨額な費用をかけてラット、マウス、イヌ、及びサルなどの実験動物で薬効と安全性が検証されている。ところが、選択された医薬候補品の約半数が、ヒトと動物での薬物動態の種差が原因となり臨床試験の段階で開発中止となっている。もし、ヒト型の薬物動態を忠実に反映することができる動物モデルがあれば、このような問題は回避されるであろう。ヒトシトクローム P450 (CYP) 分子種を発現するトランスジェニックマウスも作製されている。しかし、マウスが本来持つシトクローム P450 の発現を抑えることができないため *in vivo* における実験結果の解釈は難しい。もし、マウス肝臓をヒト肝細胞ですべて置換することができれば、このマウスを用いて、医薬候補品のヒトにおける薬物動態や肝毒性を予測することができると考えられる。これまで、いくつかの研究グループが、マウス肝臓をヒト肝細胞で置換させる試みを行い、15-50%置換できることを示した。私たちは最近、マウス肝臓の 70%以上をヒト肝細胞で置換させることに成功した。この項では、他の研究グループの取り組みを紹介するとともに、私達の開発した高置換キメラマウスの作製方法及びヒト肝細胞キメラマウスの医薬品開発への利用の可能性について述べる。

2. キメラマウスを作製するための肝障害を持つ実験動物

ホストとなるマウス肝臓を移植したドナー肝細胞で置換させるためには、条件の整った肝障害モデルマウスが必要となる。まず、その肝障害がホストマウスにとって致死的ではないことが必要である。２つ目は、肝障害となる原因が移植したドナー肝細胞に障害を与えないこと、３つ目は、ホスト肝臓が移植した肝細胞にとって生着・増殖できる環境であることが挙げられる。理想的には、ホストの肝細胞の増殖が阻止され、ドナー肝細胞の増殖と同じようなスピードでホスト肝細胞が死んでいくことが望ましい。このような肝障害を持つマウスとしては、アルブミンエンハンサープロモーターウロキナーゼプラスミノーゲンアクチベータートランスジェニックマウス (uPA マウス)及びチロシン血漿マウスが知られている。

uPA マウスは、Sandgren らにより uPA の生体内での機能を知ることを目的として、uPA を肝細胞で大量に産生し分泌するマウスとして作出された（表 1）[1]。uPA マウスは肝臓が白いマウスとして生まれる。白い肝臓をヘマトキシリン・エオシン (H&E) で染色すると、好塩基性に染色され、小型で萎縮した細胞が認められる。電子顕微鏡で観察すると、肝細胞の中に小さな脂肪滴が多数観察される。このことは、uPA に細胞毒性があることを示している。このマウスの uPA 導入遺伝子は約 5 つ連続でつながっている[1]。細胞分裂の際に導入遺伝子の欠失が生じ、肝細胞が正常な増殖能を回復することによりコロニーが形成され（図１）、ヘミ接合体では生後約 8 週で遺伝子が欠失したマウス肝細胞で完全に置

換される。したがって、ヘミ接合体では生後約8週目以降では正常な血液生化学値を示し、繁殖も可能となる。ホモ接合体の肝細胞では、2つの導入遺伝子を持つため遺伝子の欠失の頻度がヘミ接合体に比べて明らかに低い（図1）。ホモ接合体マウスでは1.4 x 10^4回に1回の細胞分裂の頻度で、uPA遺伝子の欠失が生じることが知られている[1]。

Rhimらはメタロチオネイン (MT) のプロモーターにβ-ガラクトシダーゼ遺伝子が接続された遺伝子が導入されたトランスジェニックマウスの肝細胞を分離し、7.5-17.0 x10^5個の肝細胞をuPAヘミマウスに脾臓から移植し、4-5週でカドミウムを投与後解剖した（表1）[2]。肝臓をX-gal染色することにより、ドナー細胞を青い細胞として識別することができる。移植した細胞の3-17%の細胞がマウス肝臓に生着した。移植された正常マウス肝細胞は脾静脈を介してマウス肝臓に生着しコロニーを形成し、最高でマウス肝臓の80%がドナー肝細胞で置換された。1つのコロニーを1個の細胞から形成されたと仮定すると、4-5週の間に最低で12回分裂したと計算された[2]。

Overturfらは、チロシン血症モデルマウスであるfumarylacetoacetate hydrolase (FAH)欠損マウスを用いた（表1）[3]。このマウスはFAHを産生できないため、2(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3 cyclohexane dione (NTBC)を飲水で投与し続けることにより肝障害は抑えられ生存することができる。生後6週目のFAH欠損マウスへのNTBCの投与を中止し、β-ガラクトシダーゼ遺伝子が導入されたトランスジェニックマウス (ROSA-26) から肝細胞を分離し脾臓経由で移植した。移植した肝細胞はホスト肝臓に生着し増殖した。このマウスの肝臓から肝細胞を分離し、NTBCの投与を中止した別のチロシン血症マウスに移植した。この操作を繰り返すことにより、ROSA-26のマウス肝細胞をチロシン血症マウスの肝臓から肝臓へ継代を行った。その結果、マウス肝細胞の増殖は衰えることなく、最低で69回分裂したと計算された[3]。

3. 異種動物肝細胞を持つキメラマウスの作製

Rhimらは、uPAマウスとnudeマウスを掛け合わせ、uPA/nudeマウスを作製した（表1）[4]。nudeマウスは胸腺がないためT細胞を持たない。uPA (+/+) /nudeマウスにラット肝細胞を移植したところ、ラット肝細胞はuPA (+/+) /nudeマウス肝臓に生着し、移植後8週目には、マウス肝臓のすべてがラット肝細胞で置換されるマウスも見られた。このキメラマウスの肝臓の構造はきわめて正常で、部域性を示していた。すなわち、正常な肝臓組織は小葉構造の中心静脈周辺の肝細胞がα2u-globuminを発現している。抗α2u-globumin抗体でキメラマウス肝臓切片を免疫染色すると、正常な肝臓と同じく中心静脈周辺の肝細胞のみが染色された[4]。このキメラマウスはラット肝細胞とマウス非実質細胞で構成されているが、血流、マウス非実質細胞及び細胞外マトリックスとラット肝細胞の相互作用によりマウスの小葉における部域性を獲得したものと思われた。

Petersenらは、uPAマウスとrecombination activation gene-2 (RAG-2)ノックアウトマウスを掛け合わせ、uPA/RAG-2マウスを作製した（表1）[5]。RAG-2ノックアウトマウスはV (D) J recombinase活性を欠損しているため機能的なT細胞とB細胞を持たない。uPA (+/-) /RAG-2マウスにウッドチャックの肝細胞を移植した。ウッドチャックのWHVは、HBVと非常に近いことが知られている。5-10 x 10^5個のウッドチャックの肝細胞をuPA (+/-) /RAG-2マウスに移植し、3か月後に血清および肝臓を解析した。マウス血清のSDS/PAGE

のゲルをCoomassie blueにより染色することにより、マウスアルブミンとウッドチャックアルブミンを泳動の移動度の違いにより検出し、ウッドチャック肝細胞がマウスに生着しているのを確認した。ウッドチャック肝細胞を移植したuPA (+/-) /RAG-2マウス肝臓からゲノムDNAを抽出し、ウッドチャックのゲノムDNAを用いてSouthern blottingにより置換率を求めたところ、30-95%であった。WHVに感染しているウッドチャック肝細胞を移植したuPA (+/-) /RAG-2マウス血清および肝臓には、WHVウィルスゲノムおよびWhc蛋白が検出された。また、WHVに感染していないウッドチャック肝細胞をuPA (+/-) /RAG-2マウスに移植し、1×10^7コピーのWHVを含む血清を筋注したところ、4ヶ月後にはWHV DNAが肝臓に検出され、10ヶ月にわたり血清中にWHV DNAが検出された。さらに、彼らは、WHVに感染しているキメラマウスにインターフェロンαを投与することにより、マウス血清中のWHVコピー数を減少させ、dexamethasoneを投与することにより増加させることを示した[5]。

Petersenらは、さらに、uPA (+/-) /RAG-2マウスにヒト肝細胞を移植した（表1）[6]。肝臓移植に使われなかった脳死患者の肝臓から分離したヒト肝細胞と、肝腫瘍切除組織の腫瘍周辺組織から採取した肝細胞を分離後速やかにuPA (+/-) /RAG-2マウスにそれぞれ移植し、マウス肝臓への生着をマウス血清中のヒトアルブミン濃度で調べた。その結果、脳死患者ドナーからの肝細胞は10例中7例のマウスに検出された。一方、切除肝から分離した肝細胞は26例中1例も検出されなかった。このことは、切除肝臓は灌流までに90分から4時間の温阻血時間が存在し、肝細胞の生存率も40-80%と低かったことが原因と考えられた。マウス血清中のヒトアルブミン濃度を、マウスモノクローナル抗体によるWestern blottingの結果から求めた。スタンダードとして、マウス血清とヒト血清をさまざまな割合で混合した血清を用いた。その結果、最高でマウス血清に15%ヒト血清を混合した時に相当するヒトアルブミンが検出された。また、肝臓サンプルからゲノムDNAを抽出し、ヒトゲノムDNAをヒト特異的なAlu配列に対するPCRとdot blot hybridizationにより検出した。彼らは、このマウスに5×10^6コピーのHBVを含むヒト血清を投与した。その結果、HBVはマウスに感染し、マウス血清DNA中にHBVが検出された。また、ヒト血清を2種類のHBs抗原に対する抗体によりWestern blottingを行った結果、それぞれの抗原のグリコシル化しているバンドとしていないバンドが検出された。したがって、キメラマウス血中には、高ウィルス血症のヒト血清中に見られるのと同様に、ウィルス粒子とその中間体が存在するものと思われる。キメラマウス肝臓を、HBc抗原に対する抗血清を用いて免疫染色を行った。HBc抗原は核に存在しているが知られている。HBVに感染したキメラマウスの肝細胞のうち、最高で15%の肝細胞がHBc抗原陽性であった。以上の結果は、彼らの作製したキメラマウスは最高でマウス肝細胞の15%がヒト肝細胞で置換され、このヒト肝細胞はHBVに感染しうることを示している[6]。

MercerらはuPAマウスとSCID-bgマウスを掛け合わし、uPA/SCIDマウスを作製した（表1）[7]。SCIDマウスはDNA-dependent protein kinase geneに点突然変異があり、immunoglobulinとT細胞レセプターのrecombinationが正常にできない。切除肝から分離したヒト肝細胞を凍結保存したものを融解して、uPA (+/-) /SCIDマウスまたはuPA (+/+) /SCIDマウスに10^6個のヒト肝細胞を脾臓から移植した。マウス血清中のヒトアルブミン濃度を抗ヒトアルブミン抗体でのdot blottingにより求めたところ、uPA (+/+) /SCIDマウスでは移植後7週ま

でマウス血清中のヒトアルブミン濃度は増加し、最高で約2 μg/ml に達しその後一定の値を示した。一方、uPA (+/-) /SCID マウスでは、マウス血清中ヒトアルブミン濃度は uPA (+/+) /SCID マウスよりも低く、5-6週目頃より低下しはじめた。このことは、この時期より uPA 遺伝子の欠失により生じたマウス肝細胞コロニーが増殖してくるためと考えられた。抗ヒト肝細胞に対する抗体により、キメラマウス肝臓切片を染色したところ、マウス肝臓の50%以上が陽性であるものも観察された。彼らは、ヒト肝細胞を持つ uPA (+/+) /SCID マウスに約 7.4×10^5 コピーの HCV を腹腔内に投与した。その結果、投与後3週目には 10^3-10^6 コピーの HCV が検出された。キメラマウス肝臓中に negative-strand viral RNA を血清投与後2-5週目に検出されたことから、肝臓における HCV の複製が証明された。HCV が感染したマウス血清を別のキメラマウスへ接種し、さらにこれを繰り返した。その結果、いずれのマウス血清にも HCV が検出され、マウスからマウスの HCV の継代は成功した[7]。

4. ヒト肝細胞の分離

私たちは、主に大腸癌などの転移性肝癌の部分肝切除を行う患者から、切除肝に含まれる正常部位の研究利用に対するインフォームドコンセントをいただき、広島県産業科学技術研究所倫理委員会の承認のもと研究を実施している。切除肝から正常部位を切り出し、UW 液で灌流し脱血した。4℃の UW 液に浸してヒト細胞専用のクリーンルームまで運搬した。クローンベンチ内で EGTA を含む Hanks 液で約20分間灌流し、0.05%コラゲナーゼで組織がやわらくなるまで灌流した。その後、肝組織の被膜をとり細胞をほぐした。細胞分散液を 50g、2分で遠心分離し、その沈澱を肝実質細胞とした。これらの細胞を保存する場合は、プログラムフリーザーを用いて凍結し、液体窒素に保存した（図2）[8]。

5. 高置換ヒト肝細胞を持つキメラマウスの作製

これまでに述べてきたヒト肝細胞キメラマウスの報告では、ヒト肝細胞置換率は最高で50%であった。私たちは、ドナーがヒト肝細胞であっても工夫すれば完全にマウス肝細胞を置換できるのでないかと考えた。uPA マウスと SCID マウスを掛け合わせ、uPA/SCID マウスを作製した（表1）[8]。生後20-30日目の uPA (+/-) /SCID マウスまたは uPA (+/+) /SCID マウスに3才から72才のドナー由来の分離直後または凍結融解した 5-10 x 10^5 個のヒト肝細胞を脾臓経由で移植した。移植3週目にマウスの肝臓の切片を作製し、ヒト特異的サイトケラチン (hCK) 8/18 抗体で免疫染色を行った。その結果、ドナーによって、コロニーの数や大は異なるものの、分離直後または凍結融解したヒト肝細胞共、hCK8/18 陽性コロニーが観察された[8]。

ヒト肝細胞の uPA/SCID マウス肝臓への生着と増殖を継時的に推定するために、尾から 2 μl 採血し、マウス血中のヒトアルブミン濃度をヒト特異的なアルブミン抗体を用いて ELISA により定量した。この ELISA はマウス血中に存在するヒトアルブミン濃度を約1 μg/ml 以上から測定可能であった。uPA (+/+) /SCID マウスまたは uPA (+/-) /SCID マウスに年齢の異なるドナー肝細胞を移植した。通常、移植後約2 週目よりマウス血中にヒトアルブミンが検出された。その後、uPA (+/+) /SCID マウスでは移植後7週目頃までヒトアルブミン濃度は対数的に増加し、その後一定の値を示した。一方、uPA (+/-) /SCID マウスに移植した場合は、4週目頃からヒトアルブミン濃度が低下した。ドナーの年齢が低い方が、

マウス血中のヒトアルブミン濃度の上昇スピードが早く、1 mg/ml 以上の高いヒトアルブミン濃度まで達する傾向にあった。ドナー年齢が高いと、ヒトアルブミン濃度の上昇スピードが遅く、最高で 1 mg/ml 程度でプラトーに達した[8]。

そこで、私たちは年齢が低い 12 才のドナーを選択し、uPA (+/+) /SCID マウス 4 匹に 5×10^5 個のヒト肝細胞を移植した。その結果、ヒト肝細胞は 4 匹のマウス肝臓いずれにも生着し、マウス血中のヒトアルブミン濃度が上昇した。2 匹のヒトアルブミン濃度は 3 mg/ml には達せず、移植後 80 日以降解剖するまで生存した。残りの 2 匹のうち 1 匹はヒトアルブミン濃度が 3 mg/ml を超えたが体重が急激に減少し死亡した。残りの 1 匹も同じくヒトアルブミン濃度が 3 mg/ml を超え、その後、体重減少が続き、移植後 63 日目に瀕死状態になったので解剖した。このマウスのヒト肝細胞による置換率は約 50%で肝臓には病変が認められず、腎臓と膵臓に壊死が見られた[8]。これらの観察結果から、私達は、マウス肝臓の中で増殖したヒト肝細胞が産生する物質がホストマウスを攻撃しているのではないかと考えた。

補体は細菌や移植された異種細胞などを認識し、活性化され最終的に膜攻撃性複合体 (MAC) となって細菌や細胞に穴を開ける。この作用には抗体を介したものと介さないものがあるが、私たちが用いているのは SCID マウスであるため、抗体を介した反応は考えにくい。しかし、SCID マウスは Leaky 現象といって、加齢と共に抗体がわずかであるが産生することが知られているため、抗体を介した反応の可能性も考える必要があると思われる。私たちは、肝細胞は主な補体因子を産生するため、ヒト肝細胞がヒト補体を産生し、マウス本体に悪影響を及ぼしたのではないかと考えた。そこで、マウス血中のヒト活性型 C3a を測定したところ、ヒトアルブミン濃度の上昇と共に増加した。瀕死マウスの腎臓をヒト C3 とヒト MAC 抗体で免疫染色したところ、糸球体と尿細管に陽性反応が見られた[8]。

そこで、ヒトアルブミン濃度が 3 mg/ml 以上のキメラマウスを作製するためには、ヒト補体の活性化を抑制する必要があると考えた。一般に補体抑制物質としては、コブラ毒が知られているが、最近ではワシントン条約のため入手ができない。私たちは、補体抑制効果が高い医薬品としてしられている nafamostat mesilate (フサン、鳥居薬品より供与)を投与することにした。まず、uPA (-/-) /SCID マウスの腹腔内に体重 1 g 当たりヒト血清 30 μl を投与し、9 時間後の血清を採取すると、著しく溶血しており、GPT も上昇していた。また、この時の血清中のヒト C3a 濃度は、キメラマウスの血清中の濃度と近かった。ヒト血清投与 2 時間前にフサンを投与すると、溶血の程度および GPT の上昇は抑えられた[8]。これらの結果から、フサンはキメラマウスに期待通りの効果を示すことができるものと考えられる。

uPA (+/+) /SCID マウスにヒト肝細胞を移植し、マウス血中のヒトアルブミン濃度とマウス体重の変化を調べた。マウス血中のヒトアルブミン濃度が 2 mg/ml を超えるとマウスの体重が減少し始めた。150 μg/ml のフサンを 200 μl キメラマウスに 2 日に 1 回投与した。その結果、マウスの体重は増え始め、ヒトアルブミンも上昇した。ヒトアルブミン濃度がさらに増加するとマウス体重は再び減少し始めた。そこで、フサン投与を 1 日 1 回に増やした。その結果、マウスの体重は再び増え始め、ヒトアルブミン濃度も増加した。ヒトアルブミン濃度がさらに増加するとマウス体重が再び減少し始めたため、フサン投与を 1 日

２回とした。その結果、マウスの体重は回復し屠殺するまで生存した（図3)。これらの結果から、マウス血中のヒトアルブミン濃度が 2-4 mg/ml のマウスにはフサン投与を１回／２日、4-6 mg/ml のマウスには１回／１日、6 mg/ml 以上のマウスには２回／１日とした。このようなスケジュールでフサンをキメラマウスに投与することにより、マウス血中のヒトアルブミン濃度が 3 mg/ml を超えてもマウスは生存し、ヒトアルブミン濃度は最高で 13 mg/ml 以上になった（図4）[8]。

マウス肝臓の各葉の凍結切片を作製し、CK8/18 抗体で免疫染色またはヒト cDNA プローブを用いて *in situ* hybridization を実施し、マウス肝臓の占める面積あたりの陽性面積の割合を求め、ヒト肝細胞による置換率とした（図5)。屠殺時のヒトアルブミン濃度と置換率は正の相関が認められたことから、マウス血中のヒトアルブミン濃度からおおよその置換率を予想することが可能である[8]。

上記方法によって、これまで、日本人の 12 才のドナー及び米国から購入した 9 ヶ月と 13 才のドナーの凍結肝細胞を用いて、置換率 70%以上のキメラマウスの作出に成功している。最高で置換率 96%のキメラマウスの作製も可能となった[8]。

6. ヒト肝細胞キメラマウスの性質

マウス血中にヒトアルブミンが検出されず、0%の置換率であったマウスの肝臓はほとんどが白色であるが、uPA 遺伝子の欠失によるコロニーが少し観察された。マウス血中のヒトアルブミンが検出されたマウスでは、ヒト肝細胞によるコロニーが観察された。uPA 遺伝子の欠失によるコロニーは鮮やかな赤色をしているが、ヒト肝細胞由来のコロニーはそれに比べるとやや薄い赤色をしているため肉眼的にも識別できる。置換率 70%以上のキメラマウスの肝臓はほぼ肝臓全体が置換されておりやや薄い赤色を呈している（図6）[8]。

高置換ヒト肝細胞キメラマウスは、ホストマウスの肝細胞が少ないため、ヒト肝細胞が本来持っているヒト型の薬物代謝酵素を発現していれば、医薬品開発のための薬物動態試験などに利用可能と考えられる。そこで、キメラマウスの肝臓における CYP の mRAN の発現を調べた。キメラマウス肝臓から総 RNA を抽出し、1 ng 総 RNA から cDNA に逆転写し、この cDNA をテンプレートとしてヒト CYP1A1, 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4 に特異的なプライマーを用いて定量性 real-time PCR を行った。その結果、それぞれの発現コピー数は、置換率が高いほど高い値を示した。それぞれのキメラマウス肝臓におけるハウスキーピング遺伝子であるヒト GAPDH のコピー数も求め、ヒト CYP1A1, 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4 のコピー数を割ることにより、キメラマウス肝臓のヒト肝細胞における相対的なコピー数を求めた。その結果、相対的なコピー数はドナー肝臓におけるコピー数とほぼ一致していた（図7)。このことから、キメラマウス肝臓におけるヒト肝細胞は、ドナー肝臓とほぼ同じレベルで CYP 分子種の遺伝子を発現しているものと考えられる[8]。

rifampicin は CYP3A4 を、3-methylcolanthrene（3-MC）は CYP1A1 および 1A2 の発現を誘導することが知られている。そこで、ヒト肝細胞キメラマウスに rifampicin または 3-MC を 4 日間腹腔内投与した。その肝臓における CYP の mRNA の発現量を調べたところ、rifampicin を投与したマウスでは CYP3A4 が約 6 倍（図 7)、3-MC を投与したマウスでは CYP1A1 が約 10 倍に、また、CYP1A2 は約 6 倍に誘導されていた[8]。これらのことから、このヒト肝細胞キメラマウスは、医薬品開発における薬物動態試験などに利用できると考え