

ら、腎はこれだけに限らず、代謝内分泌機能も有している。そのうち、骨代謝や貧血に対しては、ビタミンD製剤やエリスロポエチンなどの投薬の効果が期待できる。しかしながら、長期透析患者で問題となっている透析アミロイドーシスは、腎の近位尿細管で代謝、再利用されるはずの血中の $\beta 2M$ が関節などに蓄積することによることから、有効な予防・治療法がない。現在、 $\beta 2M$ 吸着療法として、ヘキサデシルアミン分子を有するビーズカラム（商品名リクセル）が使われる。ヘキサデシルアミンは、疎水性物質にアフィニティーを有する合成ポリマー分子で、基本的に、大多数の血清タンパクを吸着してしまう。そこで、分子量約3万以下の分子のみが接触するような多孔構造を持たせることによって、ある程度の選択性を実現している。しかしながら、血清中の中低分子量のタンパクの大部分は吸着するものと考えられ、生体にとって有用なタンパクも吸着除去している可能性がある。そこで、本研究では、 $\beta 2M$ の生理的レセプターである Megalin の主要アフィニティー部位である cluster II を新たな吸着用リガンドとして利用することを目的として検討を行った。

B. 研究方法

1) Megalin cluster II および $\beta 2M$ 発現ベクターの作製と精製

Megalin は膜タンパク質であるため、大腸菌での大量発現は困難である。そこで、バキュロウイルスを用いたタンパク質発現系の構築を試みた。また、実験遂行においてラットを用いることが便利であるため、Megalin と $\beta 2M$ ともにラット遺伝子を用いた。

Megalin 組換え体の作成には Invitrogen 社の Bac-N-Blue Baculovirus Expression System とトランスファーベクター pBlueBacHis2 を用いた。Bac-N-Blue DNA は lacZ の 3'側を含む線状の AcMNPV DNA で lacZ の 5'側を含むベクターと組換えが起こると、X-gal の存在下で青色プラークを生じるため容易にスクリーニングができる。AcMNPV は約 130kb の 2 本鎖 DNA を含み、目的遺伝子を直接このウイルス DNA に組込むことは非常に困難なため、トランスファーベクターに目的遺伝子を組込んだ後、AcMNPV のポリヘドリン遺伝子と目的遺伝子を相同組換えにより置換した。ベクターのクロニング部位の両側にウイルス DNA のポリヘドリン遺伝子あるいは lacZ 遺伝子のフラグメントと同一の塩基配列があり、Bac-N-Blue とトランスファーベクターと同時にトランスフェクションすることにより相同組換えが起こり、目的遺伝子を含んだ組換えウイルスを生じた。得られたウイルスを sf9 細胞に感染させ、Megalin を発現させた。本系で得られるタンパクは N 末端に 6×His タグをもつため Ni-NTA アガロースにより精製を行った。

リコンビナントラット $\beta 2M$ は組換え大腸菌によって作成した。この系のほとんどの部分は昨年度確立しているため、詳細は省く。

2) オートラジオグラフィーによるリコンビナント $\beta 2M$ の検証

[35S]-cystein, methionine mixture の存在下で大腸菌に $\beta 2M$ を作らせ、精製の後、ラットに投与し、腎臓への取り込みを見た。

3) Megalin とリクセルの $\beta 2M$ の特異的吸着および他の血清タンパクの非特異吸着の比較

$\beta 2M$ の濃度を 0.005 ug/ul, 0.01 ug/ul, 0.02

0.04 ug/ul と変えて検討。Megalin と、 $\beta 2M$ の結合は免疫沈降法を用いた。免疫沈降反応に Megalin 1 ug、 $\beta 2M$ 1 ug、ラット血清 100 ul を用いた。4°C、1 時間反応させた後、平衡化した protein A-agarose 25 ul を添加し、1 晩前処理した。前処理した上清に抗 Megalin 抗体 10 ug (対照はウサギ IgG 10 ug) を加え、4°C、1 時間反応させた後、protein A-agarose 25 ul を加え、沈降させた。沈降したタンパク質-抗体-protein A-agarose 複合体を Was buffer で 6 回洗浄した後、15 ul の gel-loading buffer を加えて、SDS-PAGE で解析した。また、リクセルの血清中低分子タンパク質の吸着を調べるため、結合反応液 10 ml 中 1 ml のラット血清を添加した。37°C、4 時間反応させた後、反応したリクセルを生食で 2 回洗い、最後に酢酸を用いて結合タンパクを溶出し、生理食塩水に対して透析を行い、SDS-PAGE で泳動した。

C. 研究結果

1) Megalin Cluster II および $\beta 2M$ 発現ベクターの作製と精製

Megalin cluster II は、ウェスタンブロット法で約 20kD の His-Megalin のバンドを確認した。His タグは精製の便宜の為に組み入れられている。ヒスチジン配列であり、本来のタンパクには存在しないが、低分子であり、また多くの他の組換えタンパク質の機能や分布に影響を与えるおそれが少ないため、His タグを融合タンパク質から切断する操作は行わないこととした。

$\beta 2M$ の精製標品は、ウェスタンブロット法で 18kD と 14kD の 2 本のバンドが見られた。これは pET ベクターのマルチクロニングサ

イトの上流側にトロンビンの認識配列が 2ヶ所あるためと推定された。しかしながら、特に実験上の支障はないと考えられたので、これ以上の精製は行わないことにした。

これらの分子の相互反応性についても調べた。Megalin を発現させた sf9 細胞から粗精製したタンパク画分を電気泳動した後に、 $[^{35}S]$ - $\beta 2M$ と反応させたところ、Megalin cluster II の位置である 20kD に、放射活性がバンドとして検出された。Megalin を発現させていない sf9 細胞のタンパクではこのバンドは見出されなかった。逆に $\beta 2M$ を電気泳動した後、Megalin と反応させ、Megalin に対する抗体でバンドを検出したところ、強いバンドが検出された。

2) オートラジオグラムによるリコンビナント $\beta 2M$ の検証

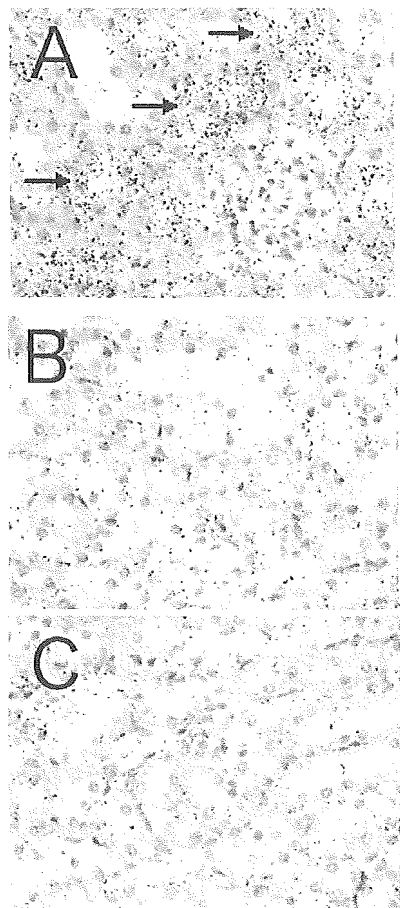
大腸菌によるリコンビナント $\beta 2M$ は、立体性を障害しない in situ 放射性標識が可能であるという利点を有する。特に $\beta 2M$ のように低分子 (分子量約 12,000) の場合は、標識物質を添加することによって、生体内挙動に著しい影響が及ぼすことがある。得られた $\beta 2M$ が生理的に正しい挙動を示すか、確かめるため、ラットに投与し、腎臓への取り込みを見た。

図 1 に示すように、リコンビナント $\beta 2M$ はラット腎の皮質部分、特に近位尿細管上皮細胞に取り込まれた。一方、その他の部位である、髄質、腎胚ではバックグラウンドレベルの取込みしかみなかった。我々のリコンビナント $\beta 2M$ は生体内状態と同じ挙動を示したことから、正しいコンフォメーションを有することが推定された。

昨年度の研究で、リコンビナント $\beta 2M$ と Megalin は in vitro で結合することがわかった。

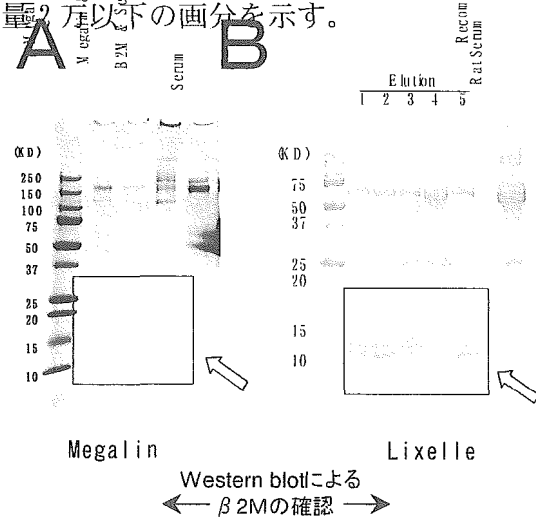
いることから、おそらく、in vivoにおいても Megalin を通じて近位尿細管細胞に取り込まれているものと考えられた。

図1 放射性 [35S]-cysteine, methionine で in situ 標識したリコンビナント β 2M が、ラット腎近位尿細管上皮細胞に取り込まれていることを示すオートラジオグラフィ像 (A、矢印部分。Gは糸球体)。腎髄質 (B) や乳頭部 (C) では特に取り込みが見られていない。



して、ラット血液と接触させたところ、非常に多くのタンパクが吸着されることがわかった (図2 B 枠内)。一方、リコンビナント Megalin cluster II 部位を反応させたところ、このような非特異的吸着は起きなかった (図2 A 枠内)。さらに、ウェスタンブロッティング法によれば、リクセルと同様に明らかに β 2M が吸着されていた (図2 下段)。

図2 血清の中低分子画タンパクに対する Megalin (A) とリクセル (B) の非特異吸着程度の違い。それぞれ枠で囲った部分は分子量 20 kDa 以下の画分を示す。



3) Megalin とリクセルの β 2M の特異的吸着および他の血清タンパクの非特異吸着の比較

正常血中の β 2M 濃度は 0.005ug/ul 以下である。透析患者においても 0.02ug/ul 以下では組織への沈着はないとされる。臨床症状がある患者の血中 β 2-M 濃度は $28 \pm 6.1 \sim 33.9 \pm 8.6$ ug/ml であることから、今回の実験では β 2M の濃度を 0.005ug/ul, 0.01ug/ul, 0.02ug/ul, 0.04 ug/ul と変えて検討した。

リクセルに充填されているビーズを取り出

以上の結果より、リクセルは血清中の中低分子タンパク質を著しく吸着することがわかった。この中には、サイトカインなど、生体のホメオスタシスに必須のペプチドが含まれている可能性もある。一方、Megalin cluster II は β 2M との結合はあるが、非特異的吸着が極めて少ないことがわかった。図2 Aにおいて、アルブミンとの結合は見られるが、この点は、リクセル同様に、担体を工夫して接触するタンパク分子をサイズによってふるい分けるこ

とによって防止可能と考えられる。医療機器化への問題点としては Megalin cluster II の分子量がまだ 2 万余と大きいことである。そこで、現在、さらにその内部での $\beta 2M$ 結合領域を限定化するための解析を行っている。

D. 考 察

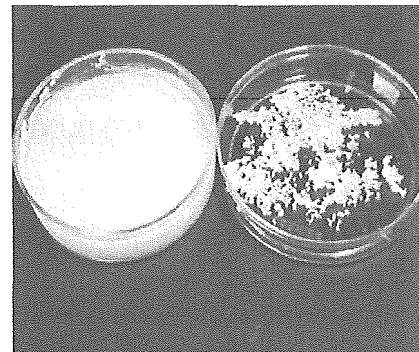
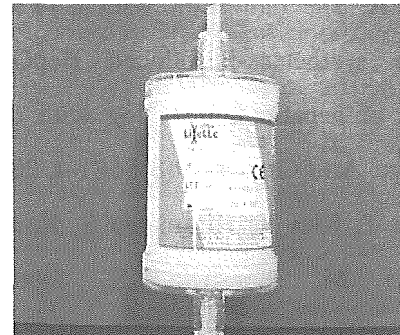
リクセルは $\beta 2-M$ を吸着除去する治療手段として開発された吸着カラムである(図3)。リクセルの本体は、高い疎水性を有するヘキサデシル基であり、形状を直径約 $460\mu m$ の多孔質セルロースとすることにより、主として分子量 $4,000-20,000$ のペプチドやタンパク質を吸着する。臨床検討において有効な $\beta 2-M$ 除去能をもつことが確認されている。ただし、リクセルは $\beta 2-M$ 特異的ではなく、ヘキサデシル基に接触する分子をサイズの絞込み設計であるため、 $\beta 2-M$ と同程度の分子量の疎水性タンパクに対しては同様の吸着性を示すものと考えられる。そこで、リクセルが持つこの非特異吸着性を確認し、一方で、生理的リガンドである Megalin のリガンド特異性を検討した。

リクセルは工学的にはよく設計された吸着カラムであるが、今回の研究で明らかになったように、やはり生理的リガンドは、生体機能の本態である特異性に優れることがわかった。Megalin そのものは、巨大分子であるが、今回用いたのは $\beta 2M$ にアフィニティーがあるとされる Cluster II 部分(分子量 2 万余)である。現在、さらにそのアフィニティー決定部位を調べ、工業的応用が容易になるような中小ペプチド鎖にまで、限定化することを試みている。

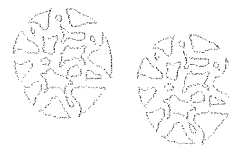
Megalin の生理的リガンドは $\beta 2M$ の他にも

存在し、代表的なものとしてアルブミン(分子量 68,000)がある。実際、今回の検討でもアルブミンとの結合が見られている。この点に関しては、リクセルと同様に、接触分子の分子サイズ分画を行うことによって、交差吸着の回避が可能と考えられる。

図3 リクセルの外観と内部粒子の様子。疎水性分子全般にアフィニティを有するセチルアミン(ヘキサデシルアミン)を固定した多孔性セルロースビーズを用い、分子サイズを限って吸着する。



ビーズの
模式図



E. 結 論

透析アミロイドーシスの原因物質である $\beta 2M$ を特異的に吸着する生理的タンパク質を医療材料に利用することを目的に、このタンパクの機能部位とされる Cluster II を遺伝子工学的に作成したところ、同タンパクは、 $\beta 2M$ と良好な結合を示す一方で、同タンパクと同じ分画範囲の他の中低分子とは結合しないこ

とがわかった。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Wang N, Tsuruoka S, Yamamoto H, Enosawa S, Omasa T, Sata N, Matsumura T, Nagai H, Fujimura A. The bioreactor with CYP3A4- and glutamine synthetase-introduced HepG2 cells: treatment of hepatic failure dog with diazepam overdose. *Artif Organs* 29(8); 681-4, 2005

2) Omasa T, Kim K, Hiramatsu S, Katakura Y, Kishimoto M, Enosawa S, Ohtake H. Construction and evaluation of drug-metabolizing cell line for bioartificial liver support system. *Biotechnology Progress* 21; 161-167, 2005

3) 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* 12(2); 137-145, 2005

2. 学会発表

1) 絵野沢 伸. バイオの力を利用する体外型血液浄化法組立の方法論. シンポジウム. 細胞組織再生の現状と未来. 日本生物工学会第57回大会、筑波 平成17年11月15-17日

2) 絵野沢 伸. トランスポーターの医工学的利用. ワークショップ4. 薬物体内動態、代謝酵素とトランスポーター. 第12回日本臓器保存生物医学会総会、筑波 平成17年11月25-26日

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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）

島内 寿徳（大阪大学基礎工学研究科 助手）

研究要旨：

MDR1の機能は細胞内からの毒性物質の汲み出しであり、人工臓器のナノバイオデバイスの候補として注目されている。モデル細胞膜(リポソーム)に組み込んだ結果、配向性が細胞膜における場合とは逆転し、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。プロテオリポソームをゲル担体に固定化することで、MDR1を疎水核とする凝集・融合による機能低下を抑制することに成功した。さらに、ローダミンをモデル薬物として、連続的に透析除去操作を行った結果、最低1週間、連続運転が可能であり、3回以上の再使用が可能であった。したがって、プロテオリポソーム固定化カラムが人工臓器のデバイスとして利用可能であることが示された。

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、生体防御に深く関与している。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(リポソームとの相

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。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和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)。さらに、再構築したプロテオリポソームの基礎的機能評価を行った。まず、薬物除去機能が脂質組成に依存する点や調製後の自然劣化による機能低下がMDR1自身の強い疎水性による事を示した(平成 16 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)を配向させたりポソームの機能(薬物排出能)評価と共に、凝集による機能低下を抑制するため、プロテオリポソームのゲル担体への固定化を試みた。次に、人工透析装置への応用を指向し、連続操作を行い、モデル薬物の除去特性を検討した。

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) , 1,2dimirystoyl-*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。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 は植田(京大)、および絵野沢ら(国立成育)より提供して頂いた。

B-2. リポソームの調製

B-2-1. 一般的なりポソームの調製

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℃, 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℃, 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、MDR1 を 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. 膜タンパク質配向リポソーム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. 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:リン脂質テストワーク-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。ドメイン形成指標として、ピレンのエキシマー/モノマー蛍光強度比 (E/M 値)を用いた。

B-4. 固定化リポソームクロマトグラフィー

1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-phosphocholine / egg phosphatidylethanolamine (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)に固定化し、5.5cm×0.5cm ガラスカラム(HR5/5, Amersham, Pharmacia Biotech 製)に充填した。実験によってはカラム充填高さを適宜変えた。これをポンプ、ならびに透析ユニットに接続し、所定の条件(37℃, pH7.5)において透析操作を行なった。

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、粒径が小さくなるほど配向性が外向きに移行し、脂質組成の影響は小さいことがわかった(**Table 1**)。したがって、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。この結果と MDR-1 の ATP 結合部位と輸送機構との関係を考慮すると、薬物がリポソーム外水相から内水相に輸送されることが期待され、**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。

Table C-1 MDR1 の配向性の評価

Lipid	Mean diameter [nm]*	Orientation [%]**
	78	93***
POPC	153	86
	381	68
POPC/POPG	139	84
DMPC/Chol	160	85

*Mean diameter was measured with dynamic light scattering method.

**The direction of ATP binding site facing to outer aqueous phase was defined as 100 %.

*** This proteoliposome was prepared with extrusion method by using the polycarbonate filter with 100 nm in pore size. The intrinsic activity of ATPase was quite low compared with those with the larger diameters

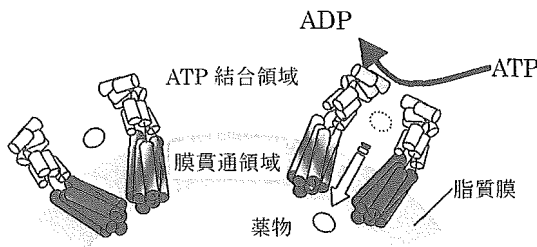


図 C-1 リポソームに組み込まれた MDR-1 の立体構造

C-2 MDR1 の薬物排出機能の評価

まず、MDR1 と各種薬物分子との結合特性について検討するため、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結合特性ならびに多剤耐性を評価した。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 MDR1 の薬物排出量(Q)と考え、Q を時間に対してプロットした結果、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。

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

C-2-1 MDR1 の多剤耐性

ローダミンの結合に関するみかけの速度係数 k_{app} をローダミン濃度に対して片対数プロットすると、図 C-3 を得る。 k_{app} 値変動量の 50% 値に対応する薬物濃度を EC_{50} と定義できるので、各種薬物分子の EC_{50} を Table C-2 に

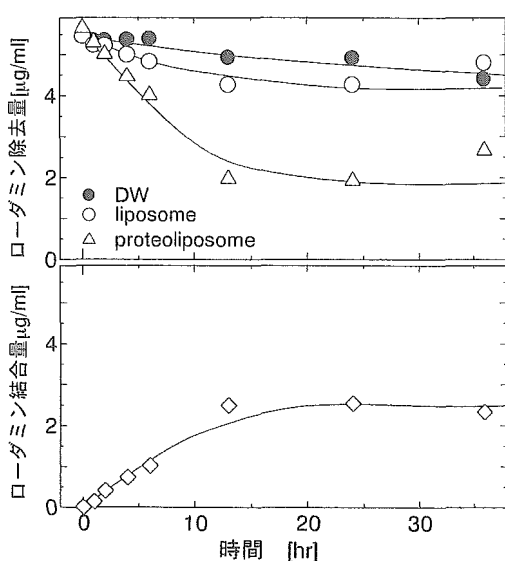


図 C-2 ローダミン B 濃度の経時変化.

DW: 蒸留水

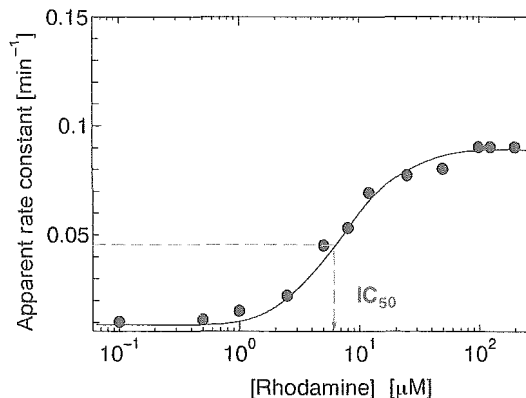


図 C-3 ローダミン B の薬物結合特性

まとめた。従来報告されている薬物解離定数 (K_d) との対応関係が良好であることから、図 C-2 に基づく結合特性の解析方法は、MDR1 の多剤耐性を評価できる妥当な手法であると判断できる。

C-2-2 薬物排出量

式(1)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-4 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ため、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。

Table C-2 MDR1 に対する各種薬物分子の EC_{50} 値

Drug or ligand	EC_{50} [μM]
Colchicine	143 (13*)
Daunorubicin	— (10.*)
Calcein	13.5 —
Trifluoperazine	— (7.7)
Doxorubicin	8.7 (4.4*,
Rhodamine	5.3 (3.2*)
Verapamil	4.4 (2.4*)
Digoxine	0.88 (0.39)
Triton X-100	0.52 (0.37*)

Pepstatin	— (35.8**)
Valinomycin	0.81 (0.78 **)
Cyclosporin A	— (0.20**)

*Quenching of fluorescence probe: Liu and Sharome, *Biochemistry*, 35, 11865-11873 (1996)
 ** Quenching of fluorescence probe: Sharome *et al.*, *J.Biol.chem.*, 270, 10334-10341 (1995)

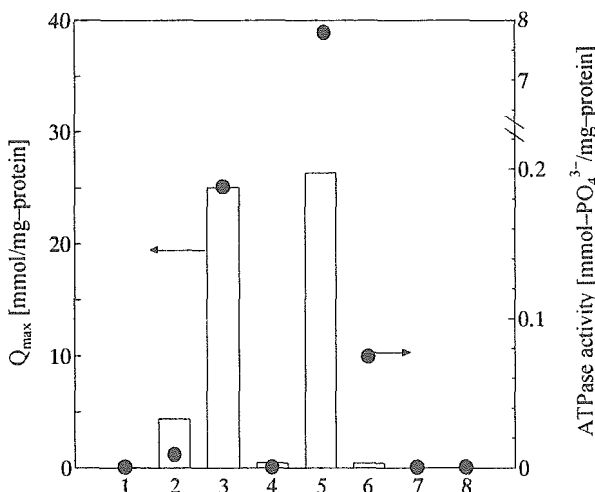


図 C-4 脂質組成を変化させたときの薬物除去能および ATPase 活性. 1:EPC, 2:POPC, 3:POPC/Chol, 4:DOPC, 5:DOPC/DOPE, 6:DOPC/DPPC/Chol, 7:DMPC, 8:DMPC/SA
 略号: ATP(adenosine triphosphate), POPG(1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidyl-glycerol), EPC(Egg-Yolk-Phosphatidylcholine), POPC(1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine),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

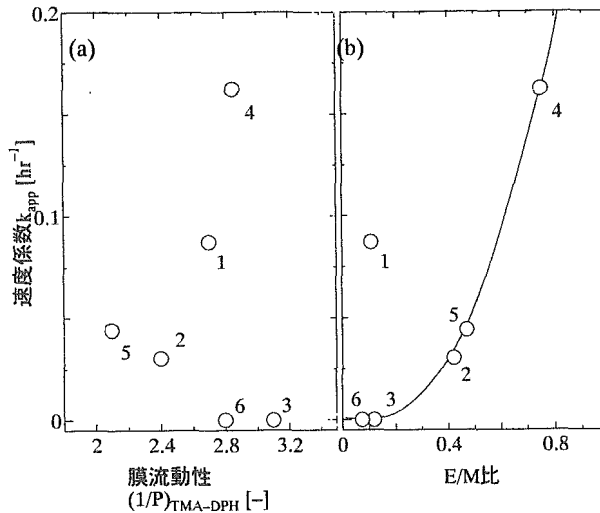


図 C-5 (a)膜流動性, (b)E/M 比と見かけの速度係数の関係(1mol%ピレン脂肪酸)
 1:PC, 2:POPC/Chol, 3:DOPC, 4:DOPC/DOPE, 5:1OPC/DPPC/Chol, 6:DMPC

C-2-3 薬物排出の速度過程

式(1)より得られる速度論的パラメータ k_{app} は、結合逆速度定数の意味を持つ。そこで、 k_{app} を、各種リソソームの膜流動性、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-5 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 を含むリソソーム系では高い E/M 比を示している(図 C-5(b))。これは PE が相分離していることを反映しているもので、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与することが示唆される。

C-3 プロテオリポソームの固定化

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。従来のバイオ人工肝などの透析システムでは、肝臓由来細胞をシートに固定化する手法が技術開発の鍵になっている。そこで、プロテオリポソームをゲル担体に固定化するための最適条件を探索した。

C-3-1 固定化に及ぼす脂質組成の影響

まず、ゲル担体として Sephacryl S-1000 を選択し、プロテオリポソームの固定化量を検討した。プロテオリポソームは、DOPC/DOPE 組成を使用した。その結果を Table C-3 に示す。一般に、脂質のみの場合のゲル担体への固定化の方が優れており、プロテオリポソームの場合、全体的に $2 \mu\text{mol-lipid/mg-gel}$ 程度であった。今回用いた固定化法は共有結合法であり、脂質(PE)のアミノ基とゲル担体由来の活性化ヒドロキシル基との結合形成において、膜タンパク質が立体障害になっていることが、脂質組成によらない固定化量の低さの原因になっていると推測される。

Table C-3 固定化に及ぼす脂質組成の影響

Lipid	Immobilized lipid amounts [$\mu\text{mol-lipid/mg-gel}$]	
	liposome	proteoliposome
POPC	26	0.2
POPC/ch	12	2.2
DOPC	8	n.d.
DOPC/DOPE	9.5	2.1
DOPC/DPPC/ch	0.1	n.d.

n.d.:not detected. Proteoliposome was made of DOPC/DOPE and immobilized onto Sephacryl S1000. Column length was 5 cm.

C-3-2 固定化に及ぼすゲル担体の影響

次に、固定化に及ぼすゲル担体の影響を検討した。プロテオリポソームの脂質組成は前述の DOPC/DOPE を用いた。図 C-6 に各種ゲル担体に対するプロテオリポソームの固定化量を示した。最も高い固定化量を与えるのは Sephacryl S-1000 であった。次いで Sephadex や TSK 6000PW の固定化量が高かった。これらは疎水性が高く、ゲル担体としても固めであるが、Sephacryl S-1000 のように柔らかいゲル

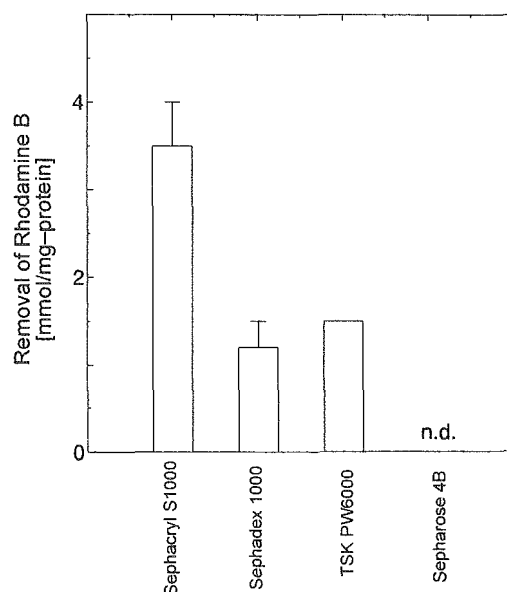


図 C-6 固定化に及ぼすゲル担体の影響

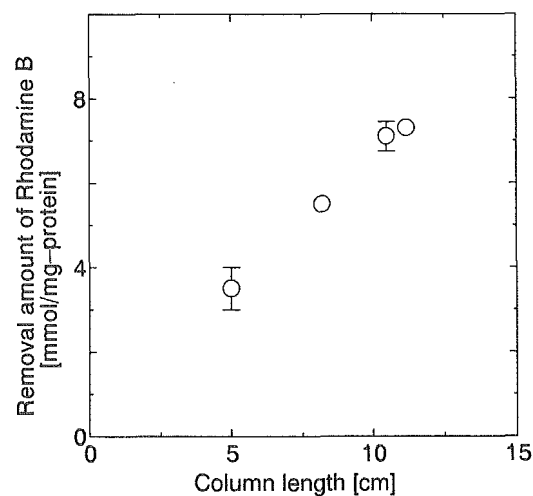


図 C-7 カラム長さと除去能の関係

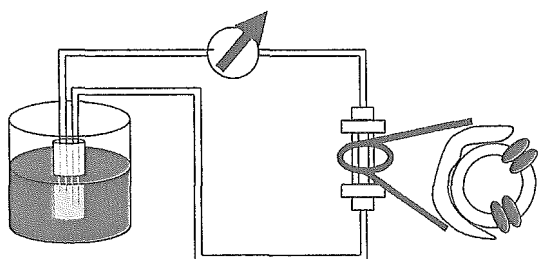


図 C-8 透析装置の概要

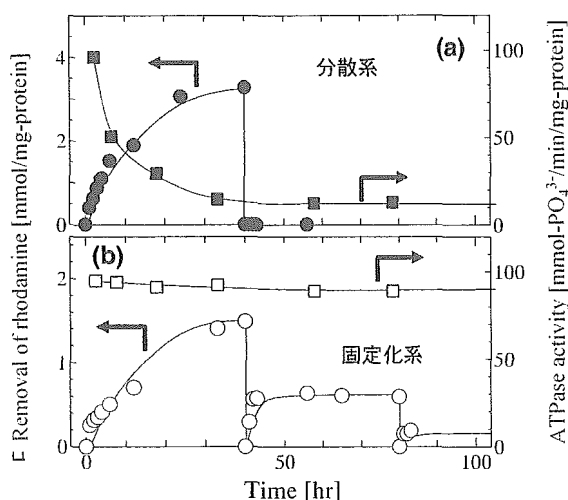


図 C-9 透析の連続操作 (a)分散系, (b)固定化系.
脂質組成:DOPC/DOPE

担体への固定化は非常に効率が低かった。カラムへの充填などの実用面を考えると、Sephadex S-1000 のような硬いゲル担体を用いるのが有効であることが示唆された。

C-3-3. カラム長さの影響

固定化プロテオリポソームカラムによる薬物や老廃物の除去プロセスの効率は、カラム長さ(充填高さ)に直接影響を受ける。そこで、カラム長さの効果を検討した。

図 C-7 にカラム長さとのロードミン除去量の関係を示した。両者は良好な相関性を示しており、期待通り、薬物除去能が、カラム長さに比例する固定化量に依存することが示された。

C-4. プロテオリポソーム固定化カラムによる透析操作

プロテオリポソーム固定化カラムによる透析操作を行うため、図 C-8 のような操作系を構築した。対照系として、まずプロテオリポソームを固定化していない(分散系)について、ATPase 活性とロードミン除去量の経時変化を測定した(図 C-9(a))。50hr 経過後、ATPase 活性はほとんど失われ、ロードミン除去能も消失していた。これは、MDR1 を疎水核とする凝集機構によるものと考えられる。蛍光共鳴エネルギー移動実験や凝集速度に関する ATP 濃度依存性の実験は、上記の推論を強く支持している。

そこで、固定化系における透析操作を検討した結果を図 C-9(b)に示す。ATPase 活性は 1 週間以上ほぼ 100% に保たれ、ロードミン除去操作も最低 3 回の繰り返し操作が可能であった。ゲル担体へのプロテオリポソームの固定化による凝集抑制が効を奏したと考えられる。

【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)
- Sharom, F.J., et al., *J. Biol. Chem.*, **270**, 10334-10341(1995)
- Sharom, F.J., et al., *Biochemistry*, **35**, 11865-11873 (1996)

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 を分解するとき生じるコンフォ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をゲル担体 (Sephadex S-1000 など) に固定化することで凝集を抑制でき、最低 3 回以上の連続透析操作が可能であった。

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1. 論文

1. Proteoliposome as a functional material for the artificial organs, T. Shimanouchi, R. Kuboi *et al.*, *Artificial organs*, submitted
2. 馬越 大, 森田誠一, 久保井亮一, リポソームの固定化(8 章 5 節), リポソーム応用の新展開 (エヌ・ティー・エス)

G-2. 学会発表

1. 薬物排出タンパク質の多剤耐性に及ぼす不均一脂質膜構造の影響, (阪大院・基礎工) 島内 寿徳, 馬越 大, 久保井亮一, 化学工学年会, 岡山大, 2005 年 9 月
2. Study on Stress Responsive Dynamics of Liposome Membranes and its Application, M.Sasaki, T.Shimanouchi, R.Kuboi, S.Morita, International conference on COEIEC IIV, Osaka (2005.12.20)
3. Study on Stress Responsive Dynamics of Liposome Membranes and its Application ~Artificial organs using proteoliposomes~, T. Shimanouchi and R.Kuboi, Membrane 3rd Stress biotechnology Symposium 2005, Osaka (2005.11.3)

G-3. 新聞報道

なし

H. 知的所有権の取得状況

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 生命先端工学専攻 助教授

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として、生体血管内反応系を模すことの可能なマイクロリアクタによる評価系を構築した。容量 100 μ L のマイクロリアクタ内に肝臓由来の薬物代謝強化細胞を播種し、これに連続的に薬物を供給することにより、生体外にて生体内反応を模した形での薬物代謝評価系を構築することができた。

A. 研究目的

薬物代謝とは、生体内において行われる酵素反応による化合物(蛋白質も含む)の化学構造の変化に他ならない。すなわち、「生体内反応」そのものである。これらの反応を担っているのは細胞内に存在する酵素であるが、酵素反応の反応場としては、マイクロレベルでの構造体:細胞、組織等が用いられている。すなわち、生体内では生きたマイクロバイオリアクターが生体反応を担っていると言っても過言では無い。

生体内における薬物代謝反応場として、最もよく知られているのが、肝臓である。肝臓は人体の化学工場と呼ばれる様に、数百以上の非常に多数の化学反応に関わっている臓器である。

肝臓は、生体内最大の臓器(成人で約 1.5kg)であり、約 50 万の肝小葉と呼ばれる構造体からなっている。一つの肝小葉には 50 万個の肝細胞があり、これらの細胞が放射状に配置され、効率よく血液と接することにより、その機能を発揮できる様になっている。肝臓の最小単位である肝小葉の構造を図に示す。

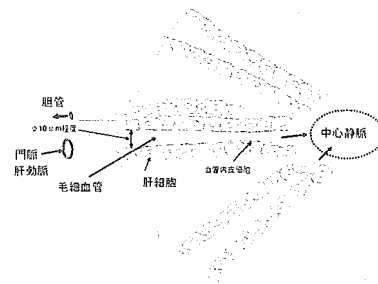


図 肝小葉構造の模式図

肝小葉は、実際の代謝を担う肝実質細胞と間質細胞、クッパー細胞等からなる。生体内に吸収された薬物は、肝動脈を通過して毛細血管を通じて肝実質細胞に供給され、代謝される。内径 10 μ m 程度の毛細血管だと、血流量は 10⁻⁷ ml/min 程度となり、まさにマイクロチャンネルと同様に、層流条件下での反応が実現されている。さて、非常に多種類にわたる肝臓の機能のうち、近年最も注目されているのは解毒代謝、特に薬物代謝である。

実際の薬物代謝は肝実質細胞中で第 I 相反応(Phase I)と第 II 相反応(Phase II)の主として2つのステップを経て代謝される。第 I 相反応は、体内に吸収された薬物が酸化、還元、加水分解をうける。このステップでは主として極性化反応が起こり、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

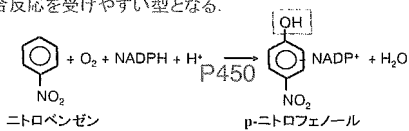
基が生成、導入され、薬物に極性官能基が付与される。第 II 相反応は抱合反応である。この反応によって、第 I 相にて極性官能基が付与された薬物にグルクロン酸、硫酸、グルタチオンなど第一相反応よりも大きな置換基が導入される。この結果、尿中などを経てより生体外に排出されやすくなる。I, II 相反応の模式図を下記に示す。

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。

反応例



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

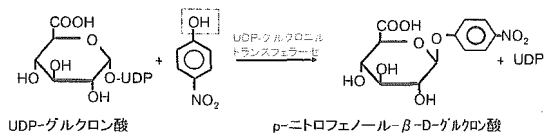


図 肝臓における薬物代謝反応

ヒト生体内薬物代謝の機能発現にかかる環境を解明する事柄は、医薬品の開発においては、避けては通れない必須の検討項目であり、化合物自身の構造に基づく予測、解析、酵素、肝ミクロソーム、細胞株、初代細胞から動物実験までありとあらゆる手段によって *in vitro* の実験からヒトにおける *in vivo* での代謝を予測する手法が開発されている。これらのアプローチは、構成要素を要素分解して、ミクロレベルでの反応から予測する手法と、ミニスケールでの動物で得られたデータをヒトに外挿して推定する手法がある。

マクロからのアプローチ：動物実験系、バイオ人工臓器

薬物のヒト体内における薬物代謝環境を予測するためには、アロメトリーと呼ばれる個

体の大きさ(体重や表面積など)と臓器の構造及び機能との相関性を用いた経験則を利用して、予測をする手法が主として用いられている。本手法は実際の医薬品開発の現場においては常套手段として利用され、近年では、ヒト初代肝臓細胞を移植可能なマウスを構築し、これを用いて薬物代謝を予測しようとする試みがある。一方、動物実験自体について、できるだけ回避しようとする方向性もあり、近未来的には、細胞を用いて再構築したバイオ人工肝やバイオ人工腎によって薬物代謝を予測する手段についても検討されている。

バイオ人工臓器は従来の機械的装置のみからなる人工臓器ではなくて、より実際の生体に近い生体由来の材料(細胞、酵素等)を用いて、これと人工物を組み合わせることにより構築した臓器である。人工肝臓の場合は、生体由来の初代肝実質細胞や、細胞株を用いて、これを高密度可能なりアクターと組み合わせる事により、薬物やアンモニアの代謝を行わせる事が可能となる。一方、バイオ人工腎臓は、従来の濾過機能のみをシミュレートしている血液透析とはことなり、腎由来細胞と透析装置を組み合わせることにより、腎機能を再現しようとする試みである。さらには、肝臓と腎臓の細胞を組み合わせることにより、これらの臓器による薬物代謝を再現する試みもある。

ミクロからのアプローチ：肝ミクロソーム、初代肝細胞、肝由来細胞株の利用

一方、これに対してヒトでの代謝予測を、薬物代謝を担っている酵素、細胞に要素分解することにより行う手法も様々に用いられている。具体的にはP450を多量に含むヒト肝ミ

クローズド画分やヒト初代肝細胞、肝由来細胞株を用いることにより、生成される代謝物の構造決定、代謝経路の解明、さらには代謝経路に参与する酵素系の解明、細胞における酵素誘導、薬物相互作用、基質阻害活性、等の検討である。現在、これらの評価系を用いた新薬候補化合物の絞り込みのためのハイスループットアッセイ系は、できるだけ多数のサンプルの評価を同時にこなすために、回分反応を用いて行われている。ところが、しばしば、これらの評価を行う際には、回分反応であるがゆえに、代謝反応の直線性が保たれていない範囲での測定や、広い基質濃度範囲での代謝活性検証が行われていない場合がある。また、反応に伴って基質濃度が減少し、反応速度も低下する。

そこで、基質濃度を一定に保て、かつそのレベルを自由自在に制御可能で、かつ、ステップ応答的に基質を切り替えられるため、多種の薬物に対する切り替え応答についても評価可能なシステムとしてマイクロチャンネルを用いたマイクロリアクターが注目されている。

マイクロリアクターとは、マイクロ・ナノレベルでの加工技術を用いて作成される反応場を利用して、様々な化学・生物反応を実現するマイクロスケールでのリアクターと定義される。マイクロリアクターと呼ばれる場合には、マイクロスケールの回分反応ではなく、通常マイクロチャンネルを利用して連続的に反応する系を指す場合が多い。

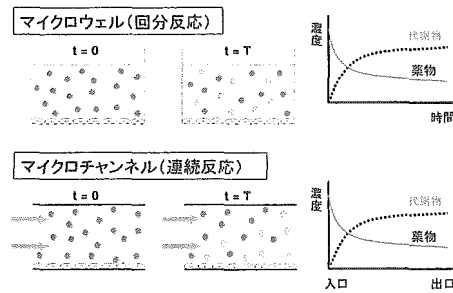
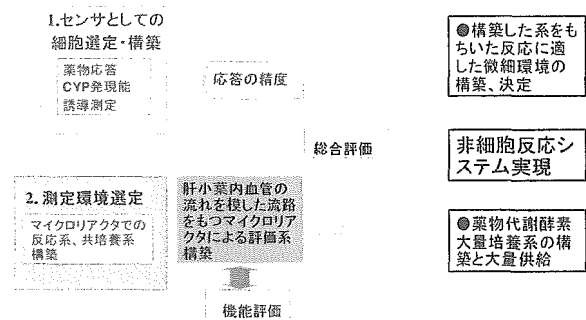


図 マイクロウェルとマイクロチャンネルの比較

本年度は、薬物代謝評価細胞を用いて下記のような Cell-based screening system の開発を行い、これを用いた薬物代謝環境整備を行うことを目標とし、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た。

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



B. 研究方法

実験材料としてグルタミン合成酵素遺伝子と薬物代謝酵素遺伝子ヒトCYP3A4遺伝子を含むベクターを構築し、これを用いて、肝由来のHepG2細胞株を形質転換して構築したGS-3A4-HepG2細胞を用いた。本細胞株は、ヒト初代肝細胞と比較して遜色ないP450 3A4活性を持つ。

センサとしての細胞をもちいて測定系を構

築するためには、細胞の測定環境の整備が欠かせない。そこで、マイクロリアクターとして、下記の図に示す深さ 400 μm 、幅 4000 μm 、流路長 50mm のマイクロチャンネル型リアクター(容積 100 μL , μ -SlideI)を用いて薬物代謝実験を行った。

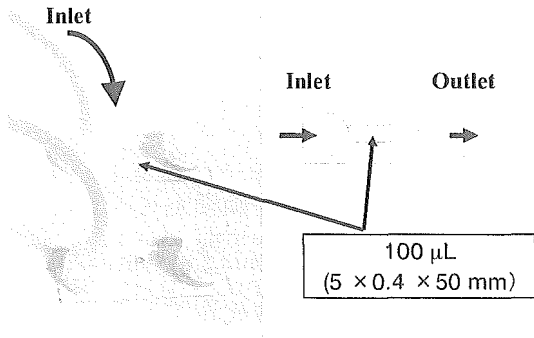


図 用いたマイクロリアクター(μ -SlideI)

(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

マイクロリアクターの操作因子として、もっとも重要なパラメータにリアクタへの薬物を導入する流速がある。生体内の血管においては、血管のサイズによって流速が変化する。下図に生体内における血流速度について示す。ここでは肝小葉における流速として、毛細血管における血流を用い、実際に血管内の流れに近い流速値として、0.04cm/sec を目安として、流速の設定を行った。この流速で溶液を流すと、層流が実現可能である。

流速について

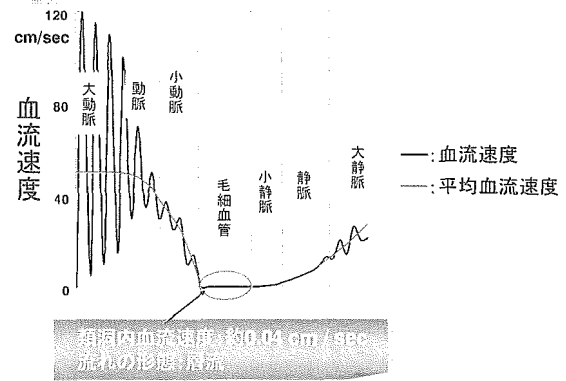
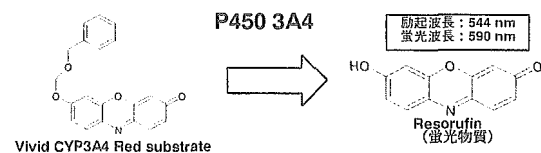


図 生体内における血流速度

以上より、回分培養とマイクロリアクタでの実験条件として流速 3mL/h(0.04cm/sec)を設定し、面積あたりの細胞量を $2.5 \times 10^3 \text{ cells/mm}^2$ で一定とした条件下にて薬物代謝反応を行った。

連続反応系での測定を行うため、細胞培養容器として μ -Slide I (ibidi) を使用した。 μ -Slide I はガス透過性の生体適合性樹脂で作成されており、深さ 400 μm 、幅 4000 μm 、流路長 50mm (総容量 100 μL) の流路を持っている。流路底面部は細胞外マトリックスによって表面修飾が成されており、ここに細胞を播種して接着させ、代謝反応の場とする。基質は P450 3A4 によって特異的に代謝されて蛍光物質 resorufin となる Vivid CYP3A4 Red Substrate を 1 μM 、5 μM 、25 μM で用いた。本基質は励起波長 544nm、蛍光波長 590nm にて CYP3A4 特異的の反応を検出可能である(下図)。



上記のマイクロリアクターおよび細胞を用いて、基質濃度 $1\mu\text{M}$ 、流入速度 3mL/h にて連続培養を行い、同じ基質濃度の回分反応と比較した。

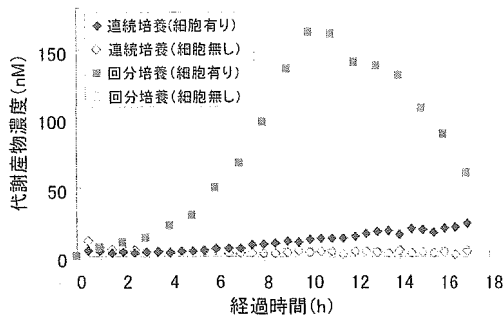


図 代謝産物濃度の経時変化

連続反応系においては、回分培養に比較して基質の自然酸化から生じるバックグラウンドの上昇がみられる。そこで、自然酸化を差し引いた値を実際の細胞によってなされた反応と仮定して、細胞あたりの代謝活性の経時変化を求めた。

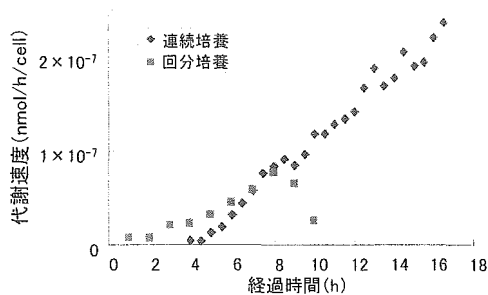


図 細胞あたりの代謝速度の経時変化

連続反応系においては、代謝活性が時間と共に上昇していくが、回分培養では 8 時間まで経過した後には活性が低下し、連続反応系での活性上昇がみられた。さらに、同じ基質濃度 $1\mu\text{M}$ で流速を変化させた結果を以下に示す。

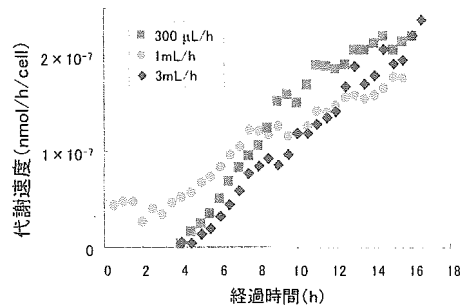


図 連続反応系における流速の影響
(基質濃度 $1\mu\text{M}$)

上記に示されるように、連続反応系においては、流速を $1/10$ に低下させても同様に細胞活性の持続的な上昇が観察された。また、代謝測定の前後に於いて細胞の接着状態を観察した結果を以下に示す。流れによって剪断力がかかっているにも関わらず、細胞の接着は変化しなかった。

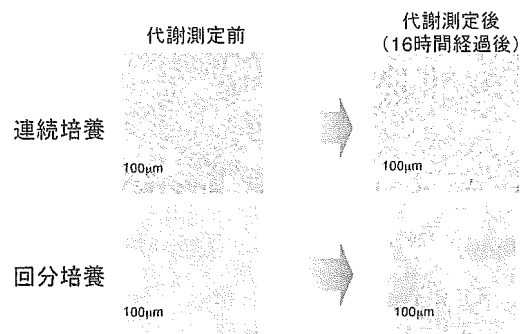


図 反応前後における細胞の形態変化

E. 結論

以上をまとめると、薬物代謝の機能発現にかかる環境について、生体内薬物代謝環境を忠実に再現する手段の候補の一つとして、薬物代謝細胞をもちいたマイクロリアクターによる代謝活性測定システムを構築した。マイク

ロリアクタを用いた連続反応系と通常のディッシュを用いた回分反応系を比較したところ、連続反応系においては代謝活性が持続的に維持され、上昇することが示された。実際の非細胞性代謝機能代替デバイスにおいては、連続反応系を用いることになり、本研究で得られたシステムが薬物代謝環境整備に不可欠なる貢献が期待できる。

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, Kazumi Kim, Shinya Hiramatsu, Yoshio Katakura, Michimasa Kishimoto, Shin Enosawa and Hisao Ohtake "Construction and evaluation of drug-metabolizing cell line for bioartificial liver support system" Biotechnology Progress Vol. 21, pp.161-167 (2005)
- 2)Ning Wang, Shuichi Tsuruoka, Hisashi Yamamoto, Shin Enosawa, Takeshi Omasa, Naohiro Sata, Toshiharu Matsumura, Hideo Nagai and Akiko Fujimura, "The bioreactor with CYP3A4- and glutamine synthetase-introduced HepG2 cells:Treatment of Hepatic failure dog with diazepam overdose", Artificial Organs vol.29, No.8, pp.681-684 (2005)
- 3)Takeshi Omasa, Tetsuji Hayashi, Shinsuke Onishi, Tadaaki Hashimoto, Michimasa Kishimoto, Tomohiro Yoshikawa, Masato Miyake,

Hisao Oitake "Development of cell-based simulator system for drug evaluation" In; 7th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference 2005, ANI-O3 (APBIOChEC'05), May 15-19, Jeju Island, Korea, Abstract p.86 (proceeding CD-ROM 全4頁)

4)大政健史 "バイオ人工肝臓の評価は如何にあるべきか?" 医工学治療 vol.17, No.4 pp.195-201 (2005)

5)大政健史 "セル&ティッシュエンジニアリング —細胞から臓器までのネットワーク—" 日本生物工学会誌 vol.83 No.7 p.331-333 (2005)

6)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" 日本生物工学会誌 vol.83 No.3 p.117-122 (2005)

2.著書

1)大政健史 「マイクロリアクタを用いた薬物代謝系の構築」 「マイクロリアクタテクノロジー —限りない可能性と課題—」 343-353 頁 エヌ・ティー・エス (2005)

2)大政健史 「182 細胞大量培養」(分担執筆) 松島綱治、酒井敏行、石川昌、稲寺秀邦編 「予防医学事典」 413-415 頁 朝倉書店 (2005)

3)大政健史 「I編 1.4 動物資源」 39-45 頁、「4編 4-2-6 フローサイトメトリーとその利用」 242-244 頁 (分担執筆) 「生物工学ハンドブック」 日本生物工学会編、コロナ社 (2005)

3.学会発表

(国際学会)

1) Takeshi Omasa “Chromosome targeting for biopharmaceutical production” In; 7th Northeastern Asia Symposium on Biotechnology, Proceeding book p.41-42, November 7-9, 2005, Gyeongju, Korea (Invited lecture, Korea Science and Engineering Foundation, & JSPS)

2) Takeshi Omasa, Tetsuji Hayashi, Shinsuke Onishi, Tadaaki Hashimoto, Michimasa Kishimoto, Tomohiro Yoshikawa, Masato Miyake, Hisao Ohtake “Construction of suitable cell line and system for cell based simulator for drug evaluation” In; 11th Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC) 2005, Beijing China, PP-33, Oct. 24-26, Abstract p.71 (2005)

3) Takeshi Omasa, Tetsuji Hayashi, Shinsuke Onishi, Tadaaki Hashimoto, Michimasa Kishimoto, Tomohiro Yoshikawa, Masato Miyake, Hisao Ohtake “Development of cell-based simulator system for drug evaluation” In; 7th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference 2005, ANI-O3 (APBIOChEC'05), May 15-19, Jeju Island, Korea

(国内学会)

1) 大政健史(招待講演)

“「工業動物細胞(CHO等)での物質生産ー現状と将来」” 第4回「バイオロジカルズ(タンパク医薬)製造技術研究会(産総研・生物機能工学研究部門&バイオインダストリー協会)」 2005年7/1 バイオインダストリー協会、中央区、東京

2) 大政健史 “遺伝子増幅系を利用したバイオ医薬品プラットフォームの開発” 大阪大学生命科学・生命工学シンポジウム -21世紀を拓くフロンティア産業バイオ- 要旨集 p.18 2005年、12/14 千里ライフサイエンスセンター、大阪

3) 大政健史 “バイオロジックス生産における現状と課題” 化学工学会第37回秋季大会, F101, CD-ROM、全1ページ, 2005年9/15-17, 岡山大学、岡山

4) 大西真亮、林 哲司、橋本忠明、本田孝祐、大政健史、岸本通雅、吉川智啓、三宅正人、大竹久夫 “微小流路を用いた薬物代謝評価システムの構築” 化学工学会第37回秋季大会, W096, CD-ROM、全1ページ, 2005年9/15-17, 岡山大学、岡山 (化学工学会バイオ部学生会最優秀ポスター賞受賞)

5) 林 哲司、大西真亮、吉川智啓、三宅正人、大政健史、大竹久夫 “マイクロチャネルを用いた薬物代謝測定システムの構築” 2005年度日本動物細胞工学会大会(JAACT2005)、P-応-5 要旨集 p.70、2005年7/6-7、東京大学山上会館、文京区、東京

6) 矢野秀法、梶田美穂子、吉川智啓、大政健史、大竹久夫 “CHO細胞の染色体構造に基づく宿主細胞株の構築” 2005年度日本動物細胞工学会大会(JAACT2005)、P-応-6 要旨集 p.71、2005年7/6-7、東京大学山上会館、文京区、東京