

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

目 次

第1分野

課題番号

KH11001	バイオフィotonクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 ……	1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 ……	11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 ……	13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 ……	17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 ……	25

第2分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸(S1P)受容体(S1P3)の拮抗薬の開発	望月直樹 ……	31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 ……	35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 ……	47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 ……	58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 ……	66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 ……	70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 ……	77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 ……	86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢野友啓 ……	96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 ……	102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 ……	108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 ……	113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 ……	117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 ……	120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 …… 124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 …… 129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 …… 134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 …… 142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 …… 148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 …… 152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 …… 156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 …… 160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 …… 167
第3分野		
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 …… 175
KH31025	生薬及び漢方処方 of 科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 …… 185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤由起子 …… 194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 …… 200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里 勝利 …… 210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 …… 218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 …… 226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 …… 235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 …… 243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭金 正博 …… 252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭金 正博 …… 257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ …… 261

KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 288
第4分野		
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱脇祥子 …… 307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍児 …… 315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 319
第5分野		
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 …… 327
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 …… 336
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 …… 342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆宇 …… 349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 …… 359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 …… 367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 …… 372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 …… 376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 …… 383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 …… 387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 …… 395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 …… 401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 …… 406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 …… 410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 …… 418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 …… 422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 …… 428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 …… 431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 …… 437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 …… 442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 …… 452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 …… 459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 …… 464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 …… 466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 …… 471
第6分野		
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 …… 479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 …… 500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 …… 511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 …… 516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 …… 524
第7分野		
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法確立に関する研究	乾 賢一 …… 531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 …… 540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 …… 548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究－ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作り－（平成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合研究報告）	森川 馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成17年度報告）	森川 馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640

第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンス
に関する研究

患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及び メタボロミクス的手法の開発に関する研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部
研究者 斎藤 嘉朗

研究要旨 3種の代謝関連遺伝子の5多型につきインビトロ機能解析を行い機能低下を明らかとした。9遺伝子の28多型につきタイピング系の開発・評価を行った。CYP3Aを誘導するPCN処理の有無をラット尿のメタボロミクス解析により識別することができた。

分担研究者

- (1) 東洋紡績(株)敦賀バイオ研究所 宝田 裕
- (2) 第一化学薬品(株)診断薬研究所 森 篤雄
- (3) 三菱ウェルファーマ(株)創薬本部研究部門
薬物動態研究所 丹羽 卓朗
- (4) ファイザー(株)中央研究所 岩崎 一秀

連遺伝子の計28多型につき、タイピング系の開発・評価を行った。またCYP3Aの活性指標と成り得る尿中バイオマーカーを探索する目的で、肝臓におけるCYP3Aの発現レベルを測定できるラットを用いて検討を進めた。

A. 研究目的

薬物に対する生体の反応性(薬物応答性)には、個体差や人種差があることがよく知られている。薬物動態関連分子をコードする遺伝子の多型によりもたらされる機能変化は、薬物血中濃度の過度の低下や上昇を招き、個体差発現の原因となりうる。既に多数の遺伝子多型が薬物動態関連遺伝子において報告されているものの、機能変化が明らかにされているものは非常に少ない。本研究では、遺伝子型タイピングの対象とすべき遺伝子多型を明らかにする目的で、薬物の有効性および副作用発現に影響を及ぼす薬物代謝酵素及びトランスporter等の遺伝子多型を、インビトロ機能解析系を用いて明らかにする。また、同時に、これら遺伝子多型の一斉タイピング系を開発する。さらに、遺伝子多型による予測が困難な場合の薬物応答性の個体差を予測する目的で、メタボロミクス的手法も取り入れて、環境要因により変化する薬物代謝活性の指標となるバイオマーカーを明らかにする。本研究の遂行により、患者毎の薬物代謝酵素及びトランスporterの活性予測が容易となり、個人の体質に見合った適切な医薬品の選択・投与量の決定のための重要な情報を得ることが可能となる。

今年度は3種の遺伝子の多型につきインビトロ機能解析を遂行した。また9種の薬物動態関

B. 研究方法

①遺伝子多型のインビトロ機能解析

1) CYP1A2

昨年度構築した野生型、125C>G (Pro42Arg)、1130G>A (Arg377Gln)、及び1367G>A (Arg456His)の各CYP1A2 cDNAを組み込んだベクターを、ハムスター繊維芽細胞株V79へ昨年度と同様にトランスフェクションし、マイクロソーム画分を調製した。活性測定をCYP1A2の典型的基質であるフェナセチンにつき行った。即ち、400 µgのマイクロソーム画分、5または100 µMのフェナセチンを含む200 µlの50 mM Kpi バッファー(pH7.4)を37°Cで1分間加温した後、1 mM NADPHを加え、さらに40分間インキュベートした。2.5 mlの酢酸エチルを加えて反応を停止し、さらに内部標準物質として500 pmolの3-アセトアミドフェノールを加えて攪拌後、2,000 x gで10分間遠心した。その有機層をN₂ガスで乾固後、100 µlのメタノール/水(50:50, v/v)で溶解し、高速液体クロマトグラフィーによる分析に供した。

また、還元型CO差スペクトルの測定は、各cDNA部分をBaculoDirect Baculovirus Expression Systems (Invitrogen)を用いてバキュロウイルスDNAに組換え、昆虫細胞(Sf21)にトランスフェクションした。2回の感染・上清回収を繰り返し、最終的に8 x 10⁶ pfu/ml以上のウイルス価を得た。これをm.o.i (multiplicity of infection) = 1

で Sf21 細胞に感染させ、24 時間後に 0.1 mM δ -アミノレブリン酸および 0.1 mM クエン酸鉄を加え、さらに 48 時間インキュベートさせることにより野生型及び異型酵素を発現させた。その細胞の総ライセート画分につき、還元型 CO 差スペクトルの測定を Omura と Sato の方法 (J. Biol. Chem., 239, 2370-2378 (1964)) に従って行い、得られた 450 及び 490 nm の吸光度差より吸光度係数 $91 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いて CYP 含量を算出した。

2) Glucocorticoid 受容体 (GR)

我々の解析で見いだしていた遺伝子多型 420G>T (Lys140Asn) につき機能解析を行った。野生型 GR cDNA プラスミドを鋳型として、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) にて塩基置換を導入した。調製した野生型及び変異型発現プラスミドを、COS-7 細胞へトランスフェクションし、通常 48 時間後、細胞を回収した。

mRNA レベルの定量は、調製した Total RNA を oligo dT プライマーを用いて逆転写後、TaqMan Gene Expression Assay (Hs00230818_ml, Applied Biosystems) により測定し、別個に定量した β -actin の mRNA レベルで補正した。

蛋白質レベルの定量はウサギ抗ヒト GR 抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc.) 及び HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を用いたイムノプロット法により行った。

転写活性は GR 結合配列を有するルシフェラーゼレポーターベクターを用いて、リガンドであるデキサメサゾン (細胞回収 24 時間前に添加) により誘導される発光強度を測定した。細胞内分布は上記抗 GR 抗体及び蛍光標識二次抗体を用いて蛍光顕微鏡下、観察した。

3) CYP3A4

a) 酵母発現系

pCR3.1 ベクターに挿入されている野生型 CYP3A4 及び CYP3A4*16 cDNA につき、アミノ酸置換を引き起こさぬよう cDNA 内部の *Hind* III サイトへ塩基置換を導入し、同酵素により切断されないよう改変した。これを鋳型として、両端に *Hind* III サイトを有するプライマーで増幅した cDNA 断片を精製後、発現ベクター (酵母 NADPH-P450 還元酵素 cDNA を組み込み済み) へ *Hind* III サイトを用いて挿入した。酵母細胞の形質転換はリチウム法により行い、培養液体より酵母を回収後、マイクロソーム画分を調製した。得られたマイクロソーム画分は使用するまで -80°C で保存した。

P450 含量の測定は、還元型 CO 差スペクトルの

測定 (1) の CYP1A2 の項に記載) 結果より算出した。また CYP3A4 の発現レベルは抗ラット CYP3A2 抗血清 (第一化学薬品) を用いたイムノプロット法により、NADPH-P450 還元酵素の活性はシトクロム C の還元活性により、定法に従って解析した。

b) 昆虫細胞発現系

pCR3.1 ベクターに挿入されている野生型 CYP3A4 及び CYP3A4*16 cDNA を pFastBacDual ベクター (ヒト NADPH-P450 還元酵素 cDNA を p10 プロモーター下にクローニング済み) の polyhedrin プロモーター下に組換えた。本ベクターにより大腸菌 DH10Bac をトランスフォーメーションし、組換え Bacmid DNA を得た。シーケンシングにて塩基配列を確認後、Sf21 細胞へトランスフェクションし、ウィルスストックを得た。Sf21 細胞への感染を数回繰り返し、ウィルス価 5×10^7 pfu/ml 以上の最終ストックを得た。これを HighFive 細胞へ m. o. i = 4.0 でインフェクションし、24 時間後に 0.1 mM クエン酸鉄と 0.1 mM δ -アミノレブリン酸を加え、さらに 48 時間培養し、マイクロソーム画分の調製を行った。

P450 含量の測定は、還元型 CO 差スペクトルの測定 (1) の CYP1A2 の項に記載) 結果より算出した。NADPH-P450 還元酵素の活性はシトクロム C の還元活性により、定法に従って解析した。

c) 活性測定

酵母系で発現させた野生型 CYP3A4 及び CYP3A4*16 の活性測定は、ミダゾラムの 1' 位及び 4 位の水酸化反応、テルフェナジンの α -ブチル位水酸化反応、テストステロンの 6β -水酸化反応、及びニフェジピンの酸化反応につき行った。本検討における反応溶液は、原則として基質 (後述)、CYP (final conc.: 3.7, 11, 33, 100, 300, 900 pmol/ml)、NADPH (1.3 mM)、 MgCl_2 (3.3 mM)、およびリン酸緩衝液 (pH = 7.4, 100 mM) から構成され、最終容量は 200 μl に調整された。各々の基質の最終濃度は、ミダゾラム (300 μM)、テルフェナジン (1 μM)、テストステロン (200 μM)、そしてニフェジピン (30 μM) とした。NADPH を除いた反応液を 5 分間 37°C でプレインキュベーション後、NADPH を添加して反応を開始した。反応 0、5、10、および 15 分後にメタノールを同量加えて反応を停止し、混合液を 2000 rpm、30 分間遠心して得られた上清を LC/MS/MS で分析した。代謝産物は逆相系 LC で生体成分と分離後に MS で定量した。

また昆虫細胞発現系と酵母細胞発現系を比較した実験では、各々の野生型 CYP3A4 発現マイクロソーム

ムを用い、代表的基質として知られるミダゾラムおよびカルバマゼピンの代謝を評価した。ミダゾラムの濃度は5、50 μM 、カルバマゼピンの濃度は50、250 μM 、ミクロソーム添加量はそれぞれ酵母細胞で発現した野生型 CYP3A4 が 1.787 mg protein/mL (100 pmol P450/mL)、酵母細胞のコントロールミクロソームが 1.787 mg protein/mL、昆虫細胞で発現した野生型 CYP3A4 が 0.2275 mg protein/mL (10 pmol/mL)、昆虫細胞のコントロールミクロソームが 0.2275 mg protein/mL とし、37°C で5分間 (ミダゾラム) または20-30分間 (カルバマゼピン) 反応後、反応液中の代謝物を LC/MS(/MS) にて定量した。なお、昆虫細胞発現系ミクロソームはチトクローム b5 精製蛋白 (80 nM) を添加し 5分間プレインキュベートした後、反応液に添加した。

②タイピング系開発・評価

1) UGT1As 多型のタイピング系開発

UGT1A 分子は基質特異性を決定する N 末ドメインと UDP-グルクロン酸の結合に重要な C 末ドメインに分類できる。UGT1A 分子種には9種類知られているが、遺伝子構造的には N 末ドメインが各分子種に固有のエクソン1によりコードされ、C 末ドメインが各分子種に共通の4エクソン (エクソン2-5) によりコードされる。本年度は UGT1A3, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9, 1A10 の N 末ドメインをコードする各エクソン1領域で見いだされたアミノ酸置換を伴う遺伝子多型につき、パイロシーケンシング法によるタイピング系を作成した。対象とした多型は、UGT1A3 では 17A>G (Gln6Arg), 31T>C (Trp11Arg), 133C>T (Arg45Trp), 140T>C (Val47Ala)、UGT1A6 では 19T>G (Ser7Ala), 269G>A (Arg90His), 308C>A (Ser103Stop), 541A>G (Thr181Ala), 552A>C (Arg184Ser)、UGT1A7 では 387T>G (Asn129Lys), 391C>A+392G>A (Arg131Lys), 622T>C (Trp208Arg)、UGT1A8 では 518C>G (Ala173Gly)、UGT1A9 では 422C>G (Ser141Cys), 726T>G (Tyr242Stop), 766G>A (Asp256Asn)、UGT1A10 では 4G>A (Ala2Thr), 177G>A (Met59Ile), 200A>G (Glu67Gly), 605C>T (Thr202Ile) の計 21 多型である。

まず各多型部位を含む断片をゲノム DNA (10-15 ng、日本人樹立細胞株由来) より特異的に PCR 増幅した。この際、それぞれのプライマーのいずれか一方は、ビオチンラベルしたものをを用いた。PCR 産物をストレプトアビジンビーズと10分間インキュベートして結合させ、フィルタープレートに移した。0.2 M NaOH を添加して1分間処理することにより1本鎖化し、さらに洗浄後、2 mM Mg acetate

を含む 20 mM Tris acetate (pH 7.6) 中でビーズを懸濁し、96穴専用プレートに移した。シーケンシングプライマー (10 pmol) を加え、95°C で2分間処理した後、室温まで冷却し、シーケンシングプライマーと PCR 産物をハイブリダイズさせた。これを PSQ™96MA (Biotage AB) にてミニシーケンシング反応を行い、多型を解析した。

2) ABCG2 多型のタイピング系開発

報告されている ABCG2 の遺伝子多型より、何らかの機能変化が現在までに報告されている4種の多型 34G>A (Val112Met)、376C>T (Gln126Stop)、421C>A (Gln141Lys) 及び 1322G>A (Ser441Asn) を対象とした。まず各多型部位を含む断片をゲノム DNA (15 ng、日本人樹立細胞株由来) より特異的に PCR 増幅した。パイロシーケンシングは前項の通り行った。

3) CYP2C9 及び CYP2C19 多型の新規タイピング系の評価

CYP2C9 および CYP2C19 をモデル遺伝子として、アレル特異的 PCR 法の改良型である SELMAP (Self Selective Multi Amplification Primers)-PCR 法によるタイピング系の正確性をシーケンシング結果と比較することにより検討した。対象とした多型は、酵素活性の低下・消失を伴う CYP2C9*3 (1075A>C, Ile359Leu), CYP2C19*2 (681G>A, splicing defect), CYP2C19*3 (636G>A, Trp212Stop) の3種類である。SELMAP-PCR 法の最初の検討には、ボランティア由来の検体から抽出したゲノム DNA を用いた。また、シーケンシング結果との比較に用いたゲノム DNA は、日本人由来培養細胞株より抽出したものである。タイピング方法は、多型部位に特異的な配列を3'末端から2番目の塩基に持つアレル特異的プライマーを順鎖と逆鎖に設定し、各々の特異的プライマーに対となるプライマーを組み合わせて用い、1本のチューブで PCR による増幅を行った後、各プライマーにより増幅された特異的な増幅産物の長さを、アガロース電気泳動で測定し、アレルタイプを判定した。

③バイオマーカー探索

PCN による誘導実験: Sprague-Dawley ラットに、PXR リガンドで CYP3A1 などの誘導剤である PCN (pregnenolone-16 α -carbonitrile) を3日間 75 mg/kg で腹腔内投与した (n=6)。対照群 (n=6) にはコーンオイルのみを投与した。3日目の投与直後から、絶食下で24時間採尿した。尿は遠心後、

測定まで-30℃で保存した。4日目に、ラットの肝臓を採取し、定法に従いそれぞれ mRNA 及び肝ミクロソーム画分を調製し、測定まで-80℃で保存した。

リアルタイム RT-PCR 法：1 µg の RNA から逆転写して cDNA を調製後、Multiplex PCR で、CYP3A1 の mRNA の発現量を ABI Prism 7000 (Applied Biosystems) で測定した。発現量の比較は Comparative Ct method に従い、補正には rRNA を用いた。

尿の主成分分析：尿を水で 5 倍に希釈し、LC/TOF-MS のポジティブ・モードで測定した。クロマトグラムの保持時間 3.497 分、M+1/z=387.1558 のピークを基準にして、各ラット尿を測定して得たクロマトグラムの保持時間を相対保持時間で表した。保持時間 0~6.5 分のクロマトグラム・データより、単位保持時間当たり強度の強いもの 20 個をマーカー（保持時間と質量数のセット）として選択し、主成分分析の対象とした。変数を平均 0、標準偏差 1 に正規化し、Spotfire DecisionSite for Statistics (Spotfire Japan) を用いて主成分分析を行った。

④倫理面への配慮

「①遺伝子多型のインビトロ機能解析」の 3 研究は、既知の遺伝子多型に関するインビトロ機能解析のため、倫理面での問題は生じないと考えられる。

「②タイピング系開発・評価」のうち、SELMAP-PCR 法の最初の検討に用いたゲノム DNA は、ヒト由来であり、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、所属機関の倫理審査委員会による承認を受け、連結可能匿名化の後、研究に使用した。その他の研究は、公的バンクより購入した日本人由来樹立細胞株のゲノム DNA を用いたものであり、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」の対象にはならないと考えられる。

「③バイオマーカー探索」はラットを用いた研究であるため、「動物の愛護及び管理に関する法律」および総理府告示「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」を遵守し、最小匹数を用い、かっできる限り苦痛を与えないよう配慮して行った。

C. 研究結果

①遺伝子多型のインビトロ機能解析

1) CYP1A2

昨年度に引き続き、野生型及び 3 種類のアミノ酸置換を伴う変異型につき解析を行った。まず、

フェナセチンの O-脱エチル化活性を測定したところ、3 種類の変異型ともに、基質濃度が 5 µM 及び 100 µM のいずれの場合でも、大幅な活性低下が認められた（表 1）。

昨年度のイムプロットティングの結果では、アポ蛋白質発現量の低下率は、Pro42Arg で 34%、Arg377Gln 及び Arg456His で 70%であったが、上記フェナセチンの O-脱エチル化活性及び昨年度の 7-エトキシレゾルフィンの O-脱エチル化活性の低下率は共に 96%以上であった。従って、酵素活性を有するヘム蛋白質の生成が大幅に低下している可能性が考えられたため、次に、昆虫細胞で大量発現させた酵素蛋白質につき還元型 CO 差スペクトルの測定を行った（図 1）。ヘム蛋白質による 450 nm の吸収は、野生型に比して、3 種類の変異型のいずれも大幅な低下を示したことから、これらの変異型では活性型であるヘム含有蛋白質レベルが大幅に低下していることが明らかとなった。

2) Glucocorticoid 受容体 (GR)

まず mRNA 発現レベルを検討したところ、野生型及び Lys140Asn 変異型間で有意な差は認められなかった。これはリガンドであるデキサメサゾンを加えた場合でも同様の結果であった。一方、イムプロットティングの結果、蛋白質発現レベルは、変異型で約 86%の大幅な低下が認められ、この低下はプロテアソーム阻害剤 MG-132 処理で抑制された。従って、Lys140Asn 置換による蛋白安定性の低下・分解促進が考えられた。さらに転写活性を測定したところ、レポーター酵素であるルシフェラーゼ活性の約 33%の低下が変異型で見られた。一方、蛋白質の細胞内局在に対する Lys140Asn アミノ酸置換の影響は認められなかった。

3) CYP3A4

a) CYP3A4 蛋白質（野生型及び*16）の酵母細胞及び昆虫細胞での発現

酵母細胞のミクロソーム画分（3-4 ロット）では、野生型 CYP3A4 の場合、P450 含量は 32-73 pmol/mg protein、シトクロム C の還元活性は 0.8-1.2 µmol/min/mg protein であった。一方、CYP3A4*16 の場合、P450 含量は 42-62 pmol/mg protein、シトクロム C の還元活性は 1.0-1.3 µmol/min/mg protein であった。NADPH-P450 還元酵素単独発現のミクロソーム画分におけるシトクロム C 還元活性は 3.0 µmol/min/mg protein であった。

一方、昆虫細胞のミクロソーム画分（1 ロット）では、野生型 CYP3A4 の場合、P450 含量は 44 pmol/mg

protein、シトクロムC還元活性は361 nmol/min/mg proteinであった。CYP3A4*16の場合の含量等は検討中である。バキュロウィルス非感染細胞のミクロソーム画分におけるシトクロムCの還元活性は16 nmol/min/mg proteinであった。

b) 酵母細胞で発現したCYP3A4を用いた解析

酵母細胞で発現した野生型CYP3A4及びCYP3A4*16の活性及び酵素学的性質を解析した。検討した基質中、ミダゾラム以外の基質では代謝物が検出できなかった。代謝物が検出できたミダゾラムの1'位及び4位の水酸化反応において、代謝物生成に直線性が見られたインキュベーション時間は5分、CYP濃度は300 pmol/mlまでであったことから、その後の実験では、インキュベーション時間およびCYP濃度をそれぞれ5分および100 pmol/mlとした。

野生型および*16変異型のミクロソームを各3ロットずつ用いて、ミダゾラム代謝能を比較したところ、1'位の水酸化反応では、ロット間差が比較的大きく、 K_m 値および V_{max} 値共に統計的な有意差は見られないものの、 V_{max} 値では変異型で低下傾向が認められた。一方、4位の水酸化反応では、 K_m 値の差は見られないものの、 V_{max} 値は野生型に比べ変異型で有意に低下していた($p = 0.011$, Student t -test)。

次に、酵母NADPH-P450還元酵素発現ミクロソームの添加による酵素活性の変動を野生型CYP3A4およびCYP3A4*16を発現したミクロソームの一部を用いて検討した。酵母NADPH-P450還元酵素発現ミクロソームとしては、今回のCYP3A4発現に用いた酵母細胞に発現させたもの(MOCK)、およびSPI-bio社より入手したもの(M40002)を用いた。M40002ミクロソームの添加により、野生型CYP3A4においてミダゾラム1'位および4位の水酸化活性は1/4および1/2に低下した。別ロットのミクロソームを用いた結果ではあるが、*16変異型においては、MOCKミクロソームの添加によりミダゾラムの4位の水酸化活性は1.5倍上昇した。

最後に、遺伝子多型の基質間相互作用への影響を野生型CYP3A4および*16変異型ミクロソームの一部を用いて検討した。ミダゾラムの1'位の水酸化反応において、10 μM の α -ナフトフラボン野生型および変異型CYP3A4の酵素活性をそれぞれ1.8および1.5倍増加させた。またミダゾラムの4位の水酸化反応において、100 μM のテストステロンは野生型CYP3A4の酵素活性を1.6倍増加させたが、変異型では影響が見られなかった。

c) 酵母細胞発現系と昆虫細胞発現系の酵素活性比較

野生型CYP3A4を発現した酵母細胞と昆虫細胞のミクロソーム画分を用いて、両者の活性をミダゾラムおよびカルバマゼピンを基質として比較した。P450当たりの活性値(pmol/min/pmol P450)で比較した場合、ミダゾラム濃度5 μM では1'位及び4位の水酸化反応は共に30-40倍、50 μM では共に約15倍、昆虫細胞発現系の方が高い活性を示した。またカルバマゼピンのエポキシ化反応では、基質濃度が50 μM では酵母細胞発現系において代謝物は検出できず、250 μM では昆虫細胞発現系の方が酵母細胞発現系に比して2,000倍を超える高い活性を示した。

②タイピング系開発・評価

1) UGT1As多型のタイピング系開発

対象とした21種の遺伝子多型につき、パイロシーケンシング法によるタイピング系を開発した。UGT1A3の17A>G(Gln6Arg)及び31T>C(Trp11Arg)、UGT1A6の541A>G(Thr181Ala)及び552A>C(Arg184Ser)の解析例を図2に示した。本パイロシーケンシング法によるタイピング結果(24検体)は直接シーケンス法による結果と完全に一致し、今回確立したタイピング系が有用であることが示された。

2) ABCG2多型のタイピング系開発

開発したパイロシーケンシング法による4遺伝子多型のタイピングを試みたところ、全ての多型につき明瞭なタイピング結果が得られた。また、本パイロシーケンシング法による解析結果(12検体)は直接シーケンス法による結果と完全に一致し、今回確立したタイピング系が有用であることが示された。

3) CYP2C9及びCYP2C19多型の新規タイピング系の評価

確立したSELMAP-PCR法を用いて、CYP2C9*3、CYP2C19*2、CYP2C19*3につき、各々85、68、62種の細胞株由来ゲノムDNA検体のタイピングを行った結果、全ての検体及び多型で理論値通りの長さの増幅バンドが得られ、その結果はシーケンシングによる結果と100%一致した。従って、本SELMAP-PCR法の有用性が示された。

③バイオマーカー探索

PCN処理を行ったラットと対照ラットの肝臓中のCYP3A1 mRNAをRT-PCR法で測定した結果、PCN

処理により、CYP3A1 mRNA のコピー数は、平均約 110 倍増加し、本 PXR リガンドによって CYP3A1 が誘導されていることを確認した。

PCN 処理ラット及び対照ラットの尿のクロマトグラムを基に、約 4000 のピークをマーカーとして選択し主成分分析を行った。3 個の主成分につき分析して得られたスコア・プロットを図 3 に示した。(a) は第 3 主成分を第 1 主成分に対してプロットしたもの、(b) は第 3 主成分を第 2 主成分に対してプロットしたものであるが、いずれの場合でも、対照群と PCN 処理群が明確に分離されることが示された。

D. 考察

①遺伝子多型のインビトロ機能解析

1) CYP1A2

CYP1A2 は気管支拡張剤テオフィリンや抗不整脈薬メキシレチン等の代謝に関与するチトクロム P450 分子種である。今回解析した 3 種の変異型はいずれもアポ蛋白質発現レベルの低下率以上の活性低下をもたらしたため、その原因を探るべく還元型 CO 差スペクトルを測定したところ、活性型であるヘム蛋白質のレベルが大幅に低下していることを明らかにした。即ち、3 種の変異型におけるヘム蛋白質レベルは、これらの活性レベルとほぼ関連していた。3 種の多型は以下のように CYP1A2 蛋白質で重要な領域内に位置すると考えられる。

Pro42Arg : Pro42 は N 末のプロリンが豊富なモチーフの最初の残基に該当する。本モチーフは酵素蛋白質の他のポリペプチド部分との相互作用を通じて蛋白質の正常な折りたたみに関与することが示唆されており、アミノ酸置換によりヘムが結合可能となる正常な立体構造の蛋白質が生成しなかった可能性が考えられる。

Arg377Gln : Arg377 は K ヘリックス中の Glu-X-X-Arg モチーフのアルギニン残基に該当する。本モチーフと meander 領域のアルギニン残基は立体的に相互作用し、ヘムの結合に重要であることが示唆されている。従って、アミノ酸置換により立体構造が変化し、ヘムが結合できなくなった可能性が考えられる。

Arg456His : Arg456 はヘムの結合に重要と考えられる L ヘリックス直前の領域内に存在するため、アミノ酸置換によりヘムが結合できなくなった可能性が考えられる。

今回機能解析を行った 3 種の多型は、その頻度は 0.5% 以下と低いものの、活性をほぼ消失することから、CYP1A2 が関与する医薬品の代謝予測・副

作用発現等を考える上で、重要な多型と考えられた。

2) Glucocorticoid 受容体 (GR)

GR は抗炎症作用を有するステロイド剤の標的分子であると共に、CYP2C8 や CYP3A4 等の発現を制御する転写因子であることが知られている。解析の結果、Lys140Asn 変異体では、蛋白発現量が約 86% 低下したが、転写活性は約 33% しか低下しなかった。このことから、受容体当たりの転写活性は上昇するものの、蛋白発現量を考慮すると活性は低下すると考えられた。従って、本多型を有するヒトでは薬剤応答性や代謝酵素誘導能が変化する可能性が考えられた。

2) CYP3A4

CYP3A4 は、現在使われている約半数の薬物の代謝に関与する最も重要なチトクロム P450 分子種である。日本人では数種のアミノ酸置換を伴う遺伝子多型が報告されている。その中で、*CYP3A4*16* (Thr185Ser) は日本人でアリル頻度 0.014 で見いだされ、テストステロン水酸化活性につき約 50% の低下を引き起こすことが報告されている。一方、遺伝子多型による代謝能変化に基質特異性があることが、*CYP2C9*3* 等において報告されている。*CYP3A4*16* は日本人において機能低下を伴う最も頻度の高い *CYP3A4* の遺伝子多型であることから、その基質特異性を明らかにすることは、重要と思われる。本研究班では、主任研究者がマイクロソーム画分の調製を、分担研究者が活性測定を行った。

酵母系で発現した *CYP3A4*16* につき、ミダゾラムの 4 位の水酸化反応における K_{max} 値の低下が確認され、昨年の哺乳動物発現系での結果と同じ傾向が得られた。しかしながら、1' 位の水酸化反応ではロット差が大きく、今後の追加検討が必要である。また exogenous に添加された NADPH-P450 還元酵素により、野生型および変異型の *CYP3A4* 酵素活性は変動する場合があった。従って、野生型および変異型の酵素活性を比較する反応において、exogenous に還元酵素発現マイクロソームを添加する場合は、その発現分子種及び P450 に対する NADPH-P450 還元酵素の添加量のモル比等に十分注意しなければならないことが示唆された。また近年、*CYP3A* サブファミリーのユニークな性質として協同性が報告されている。そこで、野生型および変異型 *CYP3A4* の発現マイクロソームを用いて、*CYP3A4* の基質間相互作用について検討したところ、2 種の添加基質でミダゾラム代謝活性の変化が認められたことから、同じ *CYP3A4* で代謝される併用

薬を投与する場合は、本相互作用も重視すべきであると考えられた。

野生型 CYP3A4 を酵母細胞および昆虫細胞で発現したマイクロソーム画分を用いて、ミダゾラムおよびカルバマゼピンの代謝活性を比較した結果、両発現系では代謝活性に大きな差を認めた。今後は、活性の高い昆虫細胞発現系にて、CYP3A4*16 の活性・基質特異性への影響を解析する予定である。

② タイピング系開発・評価

本年度はパイロシーケンシング法により、*UGT1A3*, *UGT1A6*, *UGT1A7*, *UGT1A8*, *UGT1A9*, *UGT1A10* 及び *ABCG2* で見いだされたアミノ酸置換を伴う多型 25 種につきタイピング法を開発した。使用ゲノム量も少なく (10-15 ng)、また図 2 に示した通り、近接した複数の多型を同時に解析可能である。各 *UGT1A* 分子種は基質特異性が異なるものの、複数の分子種が同一化合物の代謝に関与する場合も多々あることから、開発したタイピング法による複数分子種の多型解析は、生体における総グルクロン酸抱合能の推定に有用である可能性が考えられた。

また、本研究で評価した SELMAP-PCR 法は、アレル特異的プライマー (ASP) -PCR 法の改良型であり、同様にアレル特異的プライマーを用いる方法である。しかし SELMAP-PCR 法で用いる各アレル特異的プライマーは、伸長する向きが逆であることが特徴である。各々のアレル特異的プライマーに対となるプライマーを組み合わせて増幅させることで、各アレルの増幅産物長が変わるため、電気泳動にて増幅産物長を測定するだけでタイピングできる。このため、PCR 後の酵素処理等は不要であり、簡便、迅速であるという ASP-PCR 法の長所を保持する一方、2 本の PCR 反応を 1 本で行えること、検体入れ忘れによる擬陰性がないことなど ASP-PCR 法の短所を克服した方法である。使用するゲノム DNA 量も約 20 ng と比較的少ないため、今後の薬物動態関連分子の遺伝子多型の、迅速な一斉タイピングにも有用と考えられた。

③ バイオマーカー探索

PCN 処理の有無を、尿中の生体内代謝物を用いたメタボロミクス解析により識別することができた。PCN 処理により、ラットでは CYP3A1、CYP3A2 のみならず *oatp* や *UGT* なども誘導されるので、今回のメタボロミクスの手法によって識別されたのは、CYP3A の活性差に起因する生体内代謝物の変化ばかりではないが、ヒトにおける CYP3A4 の活性を

メタボロミクスの手法で識別できる可能性を示唆する結果が得られた。

今後はラットのデータを用いて、クラスター分析、蛋白・mRNA レベルを応答変数にした PLS 解析を試み、今回の解析も含めた種々のモデルから識別性のよいモデルを選択すると共に、追加実験を行いモデルの予測性能をバリデーションする予定である。

E. 結論

3 種の遺伝子 (*CYP1A2*, *GR*, *CYP3A4*) の 5 多型につきインビトロ機能解析を遂行し、全ての多型で活性低下を明らかとした。また CYP3A4 では昆虫細胞発現系が有用であることが示された。有用多型のタイピングでは、6 種の *UGT1As* 及び *ABCG2* 遺伝子の計 25 多型につき、プライマー伸長法によるタイピング系の開発を行うと共に、*CYP2C9* 及び *CYP2C19* の計 3 多型につき、SELMAP-PCR 法によるタイピング系の評価を行い、これらのタイピング系が有用であることが示された。また CYP3A の活性指標と成り得る尿中バイオマーカーを探索する目的で、肝臓における CYP3A の発現レベルを測定できるラットを用いて検討し、CYP3A1 を誘導する PCN 処理の有無を、尿中の生体内代謝物を対象としたメタボロミクス解析により識別することができた。

謝辞

研究にご協力頂いた下記の方に深謝致します。

国立医薬品食品衛生研究所

機能生化学部・部長	澤田 純一
同・主任研究官	前川 京子
医薬安全科学部・室長	鹿庭 なほ子
同・室長	頭金 正博
同・主任研究官	黒瀬 光一
同	杉山永見子
環境衛生化学部・室長	神野 透人
岡山大学医歯薬学総合研究科助教授	
	埴岡 伸光

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Y. Saito, N. Hanioka, K. Maekawa, T. Isobe, Y. Tsuneto, R. Nakamura, A. Soyama, S. Ozawa, T. Tanaka-Kagawa, H. Jinno, S. Narimatsu and J. Sawada: Functional analysis of three CYP1A2 variants found in a Japanese population. *Drug Metab.*

Dispos., 33, 1905-1910, 2005.

- 2) S. Koyano, Y. Saito, S. Ozawa, A. Miyajima and J. Sawada: Functional characterization of a K140N human glucocorticoid receptor variant. *Int. J. Pharmacol.*, 1, 316-323, 2005.
- 3) M. Saeki, Y. Saito, H. Jinno, K. Sai, S. Ozawa, K. Kurose, N. Kaniwa, K. Komamura, T. Kotake, H. Morishita, S. Kamakura, M. Kitakaze, H. Tomoike, K. Shirao, T. Tamura, N. Yamamoto, H. Kunitoh, T. Hamaguchi, T. Yoshida, K. Kubota, A. Ohtsu, M. Muto, H. Minami, N. Saijo, N. Kamatani and J. Sawada: Haplotype structures of the *UGT1A* gene complex in a Japanese population. *Pharmacogenomics J.*, 6, 63-75, 2006.

2. 学会発表

- 1) 斎藤嘉朗、祖山晃子、前川京子、小澤正吾、他: 日本人における薬物代謝酵素 CYP1A2 の遺伝子多型探索とハプロタイプ解析。日本人類遺伝学会第 50 回大会 (平成 17 年 9 月 21 日、倉敷)

- 2) 斎藤嘉朗、埴岡伸光、前川京子、磯部隆史、他: 日本人で見いだされた薬物代謝酵素 CYP1A2 遺伝子多型の機能解析。第 78 回日本生化学会大会 (平成 17 年 10 月 20 日、神戸)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

「薬物代謝酵素 CYP1A2 遺伝子の多型を検出するプライマーセット、プライマー及びプローブ、並びに該酵素の代謝活性の検査薬及びその検査方法」特願 2005-187979 (平成 17 年 6 月 28 日)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1 野生型及び 3 変異型 CYP1A2 のフェナセチン *O*-脱エチル化活性
Each value represents the mean \pm S.D. of three separate experiments.

	Activity	
	5 μ M	100 μ M
	<i>pmol/min/mg microsomal protein</i>	
Wild type	2.575 \pm 0.205	11.78 \pm 1.289
Pro42Arg	N.D.***	0.466 \pm 0.057***
Arg377Gln	N.D.***	N.D.***
Arg456His	N.D.***	0.377 \pm 0.083***

N.D., not detectable. Detection limit, 0.16 pmol/min/mg microsomal protein.
*** $P < 0.001$ compared with the wild type.

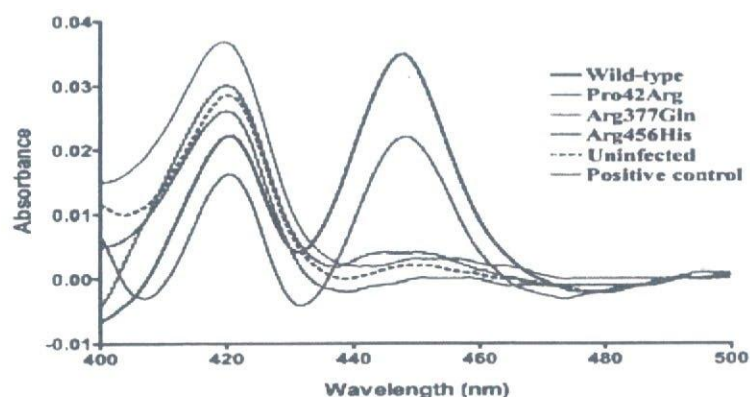


図 1 野生型及び 3 変異型 CYP1A2 の還元型 CO 差スペクトル

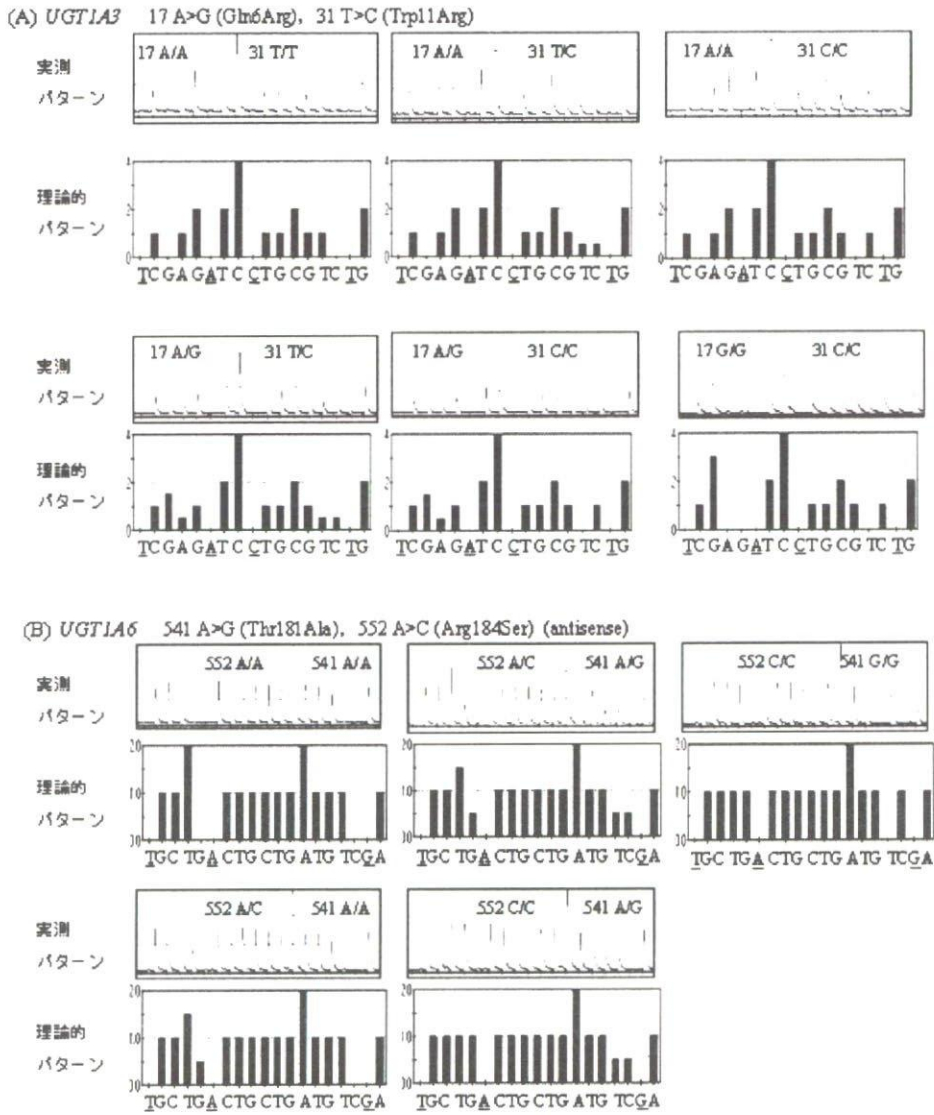


図2 確立したタイピング系のパイログラム例 (A) *UGT1A3* 17A>G (Gln6Arg)及び31T>C (Trp11Arg)、(B) *UGT1A6* 541A>G (Thr181Ala)及び552A>C (Arg184Ser)。下線はバックグラウンドレベルの測定のために加えた配列に存在しない塩基を示す。

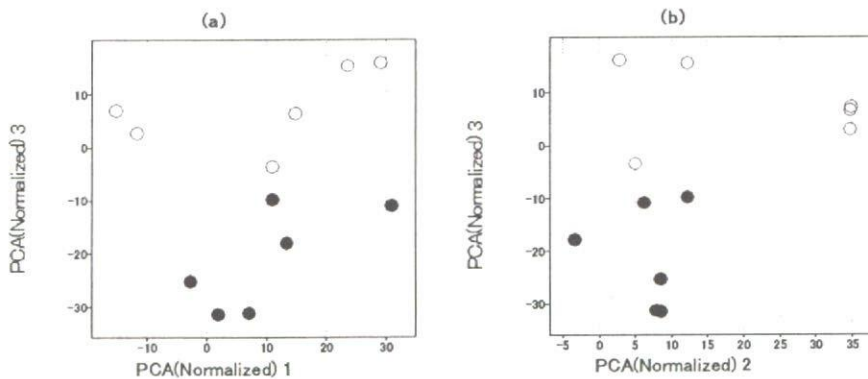


図3 ラット尿データの主成分分析のスコアプロット
 (a) 第3主成分 (t_3) 対 第1主成分 (t_1)
 (b) 第3主成分 (t_3) 対 第2主成分 (t_2)
 ● 対照ラット、○ PCN 処理ラット

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

平成18年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団
〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社