

厚生労働科学研究費補助金

トキシコゲノミクス研究事業

非侵襲試料を用いた新規高感度安全性予測系の開発

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 奥田 晴宏

平成19年(2007)年4月

目次

I. 総括研究報告書	
非侵襲試料を用いた新規高感度安全性予測系の開発	1
奥田晴宏	
II. 分担研究報告書	
1. NMR を用いたメタボロミクス解析, 高感度化技術の開発	9
奥田晴宏	
2. メタボロミクスによる安全性予測系の高感度化ならびに組織・血液・尿を試料とした毒性マーカーの3次元解析手法の確立	
2-1 ートキシコゲノミクスとメタボロミクスの融合を指向した肝障害の機序解明ー ...	2 2
2-2 ーヒト特異的に発症する肝障害に対する動物モデルの作製と機序解明ー	3 3
宮田昌明	
3. LC/MS/MS を用いた低分子内因性物質のメタボロミクス技術の開発	
4. メタボロミクスと病理の関連性についての解析	
ー質量分析計を用いたメタボロミクス手法による毒性マーカー検索法の開発ー	5 1
堀 弥、矢本 敬、宮田昌明	
5. メタボロミクス・プロテオミクス解析技術の高度化試薬の開発ならびに毒性軽減構造修飾法の開発	9 1
宮田直樹	
6. LC/MS/MS を用いた網羅的プロテオミクス・ペプチドミクス技術の開発ならびに解析	1 0 3
鈴木孝昌	
7. 細胞レベルでのメタボロミクス技術の開発	1 2 3
小原有弘	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	1 2 8
IV. 研究成果の刊行物・別刷	1 3 1

**厚生労働科学研究費補助金
(トキシコゲノミクス研究事業)
総括研究報告書**

非侵襲試料を用いた新規高感度安全性予測系の開発

主任研究者 奥田晴宏 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部長

研究要旨

医薬品の開発ならびに安全性研究において、現在トキシコゲノミクス手法を導入した研究が進められており、毒性発現時の遺伝子発現情報と既存毒性試験情報の組み合わせにより、毒性発現に関して多くの情報が得られてきた。しかし実際には種差のあるヒトの毒性を詳細に予測することは難しく、その予測にはトキシコゲノミクス研究で得られた遺伝子の発現情報に加えて、毒性によって生じた細胞環境の変化を高感度に検出する手法の組み合わせによる、細胞維持・エネルギー代謝系に関わる内因性物質の代謝変動の経時的な情報が必須である。そこで本研究事業では、ヒトへの応用が簡便な、尿などの非侵襲試料を中心として用いた新規メタボロミクス・プロテオミクス高感度安全性予測系を確立することで、既存手法および実験動物データからでは予測不可能であった毒性マーカーを新たに見出し、毒性の早期予測ならびに詳細なメカニズム予測を実現することを目的とする。昨年度は毒性予測に有用な動物実験モデルの作成と毒性発現機序の解明、メタボロミクス・プロテオミクス研究を遂行するための解析手法に関する基盤的技術、プロテオミクス解析技術の高度化試薬の開発に関して研究を実施した。

本年度は1) NMRを用いたメタボノミクス解析、高感度化技術の開発、2) メタボロミクスによる安全性予測系の高感度化ならびに組織・血液・尿を試料とした毒性マーカーの3次元解析手法の確立、3) LC/MS/MSを用いた低分子内因性物質のメタボロミクス技術の開発、4) メタボロミクスと病理の関連性についての解析、5) メタボロミクス・プロテオミクス解析技術の高感度化試薬の開発ならびに毒性軽減構造修飾法の開発、6) LC/MS/MSを用いた網羅的プロテオミクス・ペプチドミクス技術の開発ならびに解析、7) 細胞レベルでのメタボロミクス技術の開発。なお、研究3) および4)は一連の実験プロトコールのもとで共同研究として実施されたことから、一括として報告する。

これらの研究を通じて、acetoaminophen投与肝障害動物尿より複数のバイオマーカー候補が見出されると共に、flutamide投与肝障害動物モデルにおいて障害防御遺伝子群の存在が示唆された。また、新たなプロテオミクス高感度化の試薬を開発すると共に、解析ソフトウェアの開発に取り組んだ。

分担研究者

奥田 晴宏 (国立医薬品食品衛生研究所・
有機化学部・部長)
宮田 昌明 (東北大学大学院・
薬学研究科・助手)
堀 弥 (杏林製薬株式会社・創薬研究所
薬理研究部動態安全性研究室・
研究員)
矢本 敬 (三共株式会社・安全性研究所
研究第六グループ・主席研究員)
宮田 直樹 (名古屋市立大学・薬学研究科・
教授)
鈴木 孝昌 (国立医薬品食品衛生研究所・

遺伝子細胞医薬部・室長)

小原 有弘 (独立行政法人医薬基盤研究所・
生物資源研究部細胞バンク・
研究員)

A. 研究目的

医薬品の開発ならびに安全性研究において、現在トキシコゲノミクス手法を導入した研究が進められており、毒性発現時の遺伝子発現情報と既存毒性試験情報の組み合わせにより、毒性発現に関して多くの情報が得られてきた。しかし、一方、未解決の課題が複数存在する。一つは、トキシコゲノム情報と病理学的情報との

連関に伴う問題である。即ち、トキシコゲノミクス研究においては機能タンパクmRNAレベルの変動を網羅的に測定し、毒性予測を試みているが、細胞内機能の変化は、必ずしもmRNAレベルに反映されない。しかも機能タンパクレベルが変化しなくても、GSHや補酵素のような機能維持やβ酸化系等のエネルギー産出に関わる分子の変動によって、細胞内オルガネラの障害が起こり、毒性を現すことがある。従って機能タンパクの変動と共に機能性小分子の変化を経時的に捉えることが出来る手法が毒性発現の機序を知るには必要である。もう一つは実験動物で得られたトキシコゲノム情報をヒトの毒性予測に用いる際に、ヒトでは有効に利用できるサンプルが血液、尿等に限定されることから、その予測には限界が存在することである。これらのことから、トキシコゲノム情報のみから種差のあるヒトの毒性を詳細に予測することには大きな困難が存在する。

この困難を克服するためには、トキシコゲノミクス研究で得られた遺伝子の発現情報に加えて、毒性によって生じた細胞環境の変化を高感度に検出する手法の組み合わせによる、細胞維持・エネルギー代謝系が関わる内因性物質の代謝変動の経時的な情報が、必須である。加えて、ヒト毒性予測を目的とするためには、非侵襲的試料からそれら情報を得る必要がある。

そこで本研究事業では、ヒトへの応用が簡便な、尿などの非侵襲試料を中心として用いた新規メタボロミクス・プロテオミクス高感度安全性予測系を確立することで、既存手法および実験動物データからでは予測不可能であった毒性マーカーを新たに見出し、毒性の早期予測ならびに詳細なメカニズム予測を実現することを目的とした。

昨年度はプロテオミクス・メタボロミクスを実施するための技術的課題の解決に取り組むと共に、数種の動物実験モデルを作成した。これらの成果を踏まえ以下の観点から本年度は研究を遂行した。

- 1) NMRを用いたメタボノミクス解析、高感度化技術の開発
- 2) メタボロミクスによる安全性予測系の高感度化ならびに組織・血液・尿を試料とした毒性マーカーの3次元解析手法の確立
- 3) LC/MS/MSを用いた低分子内因性物質のメタボロミクス技術の開発
- 4) メタボロミクスと病理の関連性についての

解析

5) メタボロミクス・プロテオミクス解析技術の高感度化試薬の開発ならびに毒性軽減構造修飾法の開発

6) LC/MS/MSを用いた網羅的プロテオミクス・ペプチドミクス技術の開発ならびに解析

7) 細胞レベルでのメタボロミクス技術の開発

B. 研究方法

B-I NMRを用いたメタボノミクス解析、高感度化技術の開発

共同研究機関の三共(株)より提供されたAcetoaminophen (APAP) 処理ラット尿サンプルを使用した。

500MHz Varian NMR システムに¹H-NMR専用コールドプローブを装備した。ラット尿540μlに内部標準物質として5mMTSP/D₂O溶液を60μl、およびpHインジケータとして1Mイミダゾール/D₂O溶液を6μl添加して¹H-NMR用サンプルとした。測定モードとしてPresat NOESY 1st Increment, 100ms mixing time, 32 transientsを採用した。

NMRの解析にはChenomx社製NMRスペクトラムからの代謝物の同定と定量解析ソフト(NMR SUITE)を使用した。

B-II メタボロミクスによる安全性予測系の高感度化ならびに組織・血液・尿を試料とした毒性マーカーの3次元解析手法の確立

B-II-1 トキシコゲノミクスとメタボロミクスの融合を指向した肝障害の機序解明:

C57BL/6雌性マウスに、0.6%あるいは0.75% lithocholic acid (LCA)を含有させた飼料(CE-2)を、9日間自由に摂取させた。また併用群として投与開始5日目から4日間、100 mg/kgのpregnenolone-16α-carbonitrile (PCN)をcorn oilに懸濁させ腹腔内に投与した。コントロール群、LCA投与群にも、同量のcorn oilを腹腔内に投与した。これらのマウスの肝臓の遺伝子発現をマイクロアレイ法と21種の脂質関連遺伝子についてRT-PCR法で解析した。肝障害のレベル(ALT, ALP 活性)と肝内脂質レベル(リン脂質、トリグリセリド、遊離脂肪酸、コレステロール)、胆汁排泄脂質速度(胆汁酸、リン脂質、コレステロール)を測定した。

B-II-2 ヒト特異的に発症する肝障害に対

する動物モデルの作製と機序解明:

ヒトのflutamide代謝を明らかにするため組換えヒトCYP (CYP1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4) を発現させたヒトB lymphoblastoid 細胞のマイクロゾーム、10個体のヒト肝マイクロゾームを用いて、flutamide及びその主要代謝物FLU-1を基質として代謝物を解析した。また誘導剤を処理したマウスからのマイクロゾームを用いてFLU-1 N-水酸化活性を測定した。少なくとも12週間flutamideを服用した前立腺癌患者、29人から尿を採取し、尿中flutamide代謝物をLC/MSで解析した。肝障害の認められるグループと認められないグループ間で比較した。

B-III LC/MS/MSを用いた低分子内因性物質のメタボロミクス技術の開発

B-IV メタボロミクスと病理の関連性についての解析

質量分析計を用いたメタボロミクス手法による毒性マーカー検索法の開発:

8週齢の雄性 F344/DuCr1Cr1j ラットに APAP を 100, 500 および 800 mg/kg 強制経口投与した。チューブをドライアイスで冷却した状態で、APAP 投与後 24 時間で排泄される尿を採取した。対照群および APAP 投与群のラット尿各 4 サンプルを融解後、13,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を脱イオン水で 4 倍希釈したものを MS 測定試料とした。Ultra high performance liquid chromatography (UPLC)/ Time of flight mass spectrometry (ToF MS) で取得したピークデータは、MarkerLynx V4.1 (Waters) を用いて、各ピークのイオン強度と全ピークのイオン強度との比を計算することにより標準化した。MarkerLynx V4.1 を用いて主成分分析 (PCA) を実施した。

B-V メタボロミクス・プロテオミクス解析技術の高感度化試薬の開発ならびに毒性軽減構造修飾法の開発

新規 N 末端修飾試薬としてピリジン環をもつ 7 種類の化合物を合成した。ピリジン環の 6 位にメチル基を導入した化合物とその重水素置換体、2 位にメチル基を導入した化合物、2 位と 6 位にメチル基を導入した化合物とその重水素置換体を合成した。また、ピリジンと塩基性が異なり、アルキル化によりカチオン性とし、さらに、同位体標識することを考えたベン

ズイミダゾール誘導体とイミダゾール誘導体も合成した。

これら化合物を用いて、種々のペプチドの N 末端修飾反応を行い、修飾効率を調べるとともに、ソフトイオン化法を用いる質量分析により修飾ペプチドの検出効率を調べた。

次に、MALDI-TOF/MS の PSD (post source decay) モードを用いてアミノ酸配列解析への利用を検討した。

B-VI LC/MS/MSを用いた網羅的プロテオミクス・ペプチドミクス技術の開発ならびに解析

共同研究機関の三共 (株) より提供されたラット尿サンプルを使用した。還元アルキル化、トリプシン消化の後、Monotip C18 カラムを用いて脱塩精製を行い LC-MS 分析に用いた。本研究にはナノ LC として Splitless Nano HPLC System DiNa (KYA テクノロジーズ) を使用した。C-18 逆相カラムを用い、A (2% アセトニトリル、0.1% ギ酸)、B (80% アセトニトリル、0.1% ギ酸) のグラジエントをかけてペプチドを順次カラムより溶出させた。質量分析装置は、ESI-Q/TOF 型 LC-MS/MS QSTAR-XL-PF

(Applied Biosystems) で、ナノ LC とオンライン接続し、LC-MS としての測定を行った。

安定同位体ラベル (ICAT) による定量的解析においては、cICAT ラベリングキットとそのプロトコルに従って行った。DiNa ナノ LC を用い、300 nl/min、50 分間のグラジエントによりペプチドを溶出させ、Qstar-XL にて MS/MS 測定を行い、ProICAT ソフトウェアにより同定と定量を行った。

データ処理に関しては、TOF マス依存解析を可能とするため、Raw データの mzXML への変換ツールとして、mzStar というソフトウェアを利用し、さらに、Pep3D というソフトウェアを利用することで、LC-MS データとしての 3D グラフによる可視化を行った。また、独自の定量解析ソフトとして "mzMore" と名付けたソフトウェアの開発を進めている。

サンプルの前処理による高発現タンパク質の除去の検討のため、LC-MS/MS および二次元電気泳動法と MALD-TOF マス (AB4700) による同定により、ラット尿中の高発現タンパク質を同定した。そして、3 種類のラット尿中高発現タンパク質に対する抗体を作製し、これらを使った抗体ビーズの作製を検討した

B-VII 細胞レベルでのメタボロミクス技術の開発

細胞試料の作成法として超音波による細胞破碎を用い、氷冷酵素安定化バッファー中で細胞を超音波破碎し、酵素活性（G6PD (Glucose-6-phosphate dehydrogenase), LD (Lactate dehydrogenase), NP (Nucleoside phosphorylase))を有した状態で細胞破碎を行った。NMR解析の前処理としてヒトアルブミンを除去するキットAlbumin Segregation Kitを用いた。

(倫理面の配慮)

本研究の実施に際しては、動物愛護の問題はもちろんのこと、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」等に従って行った。その他各研究機関等で定められた倫理規定を遵守して研究を遂行した。あらかじめ当該研究機関の長等の承認等が必要な研究については研究開始前に所定の手続きを行った。

C. 研究結果及び考察

C-I NMRを用いたメタボロミクス解析、高感度化技術の開発

APAP投与による主な代謝物への影響は、PBによる前処理を行わない場合、100mg/kg投与群では殆どみられないのにして、500mg/kg投与群では、クエン酸、2-オキシグルタル酸、コハク酸、フマル酸、馬尿酸、アラントイン、トリメチルアミン N-オキシド(TMAO)の濃度の低下がみられた。特に800mg/kg投与群ではクエン酸、2-オキシグルタル酸、フマル酸、馬尿酸、TMAOの濃度が大きく低下した。一方、PB前処理群ではAPAP投与における内因性代謝物の濃度はPB非処理の場合と同様に、100g/kg投与群では殆どみられず、500mg/kg投与群で低下がみられ、800mg/kg投与群で大きく低下した。

APAP代謝物の構造解析は二次元NMRによって行った。その結果、尿中にはAPAPの硫酸抱合体(APAP sulfate)、グルクロン酸抱合体(APAP glucuronide)、メルカプツール酸抱合体(APAP mercapturate)およびAPAPが含まれていることが明らかとなった。

尿の¹H-NMRスペクトルについてNMR SUITEによって定性・定量を行った結果、解糖系やTCA回路を中心としたエネルギー代謝系からの成分や核酸代謝物、糖、アミノ酸等が確認できた。

そして、これらの内因性代謝物についてAPAPによる影響を解析してみた結果、内因性代謝物濃度の変動は100mg/kg投与群では殆ど見られなかったが、500mg/kg投与群で代謝物濃度クエン酸、2-オキシグルタル酸、フマル酸などのエネルギー代謝に関連する化合物および馬尿酸、TMAOの濃度が大きく低下することがわかった。共同研究者の矢本、堀、宮田らによって同時に行われた生化学試験では、肝障害マーカーのアラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)活性が100mg/kg投与群では非投与群と同程度の値を示しているのに対して500mg/kgおよび800mg/kg投与群では顕著な上昇を示していることから、今回の内因性代謝物濃度の低下は肝障害の発症と関連していると考えられた。

C-II メタボロミクスによる安全性予測系の高感度化ならびに組織・血液・尿を試料とした毒性マーカーの3次元解析手法の確立

C-II-1 トキシコゲノミクスとメタボロミクスの融合を指向した肝障害の機序解明：

マウスにLCA0.6%あるいは0.75%を9日摂取させると血清ALT活性、ALP活性の上昇が認められた。PCNをLCA(0.6%)と併用すると、ALT、ALP活性はほとんど無処置レベルまで低下した。肝内トリグリセリド、遊離脂肪酸、リン脂質においてはいずれも、LCA群ではコントロール群に比べて有意な減少が認められた。一方、LCA/PCN群、PCN群では逆にコントロール群と比較して上記脂質濃度の有意な増加が認められた。LCA群の胆汁酸、リン脂質、コレステロールの胆汁排泄速度はすべてコントロール群に比べて有意に減少し、LCA/PCN群ではLCA群と比較して、有意な増加が認められた。マイクロアレイ解析で大きく発現変動をしている遺伝子はRT-PCR法においても同様な結果が得られた。一方マイクロアレイ解析で有意な変動が認められなかった遺伝子においてもRT-PCR法により変動は解析されたが、その変動レベルは2倍以下であった。遺伝子変動としてLCAによる肝障害発現時の変動(LCA群 vs control群)とともにPCN併用により障害が軽減される過程での遺伝子変動(LCA/PCN群 vs LCA群)の2つのパラメータを組み合わせることで、遺伝子発現変動パターンを4つに分類した。障害のレベルに対して正あるいは負の関係で変動するグループとそれ以外の2つのグループに分類された。LCA誘発肝障害の防御因子と考えられる

Cyp3a11とSult2a1はLCA障害時に増加し、PCN併用による障害の軽減時にも増加した。これと同様な発現変動を示したのが、Mrp3, CD36, PPAR γ , stearyl-CoA desaturase (Scd), fatty acid elongase (Fae)だった。

これらの遺伝子は肝内の脂肪酸レベルの亢進あるいは胆汁酸レベルの低下に関与すると考えられることより、肝障害の防御因子となる可能性を有していると考えられる。本実験でのRT-PCRによる個別の発現変動解析により一連の機能に関与する遺伝子群でも発現変動パターンが異なり、それらを区別することにより生体応答に対応した有益な遺伝子発現情報を抽出出来る可能性が示された。

C-II-2 ヒト特異的に発症する肝障害に対する動物モデルの作製と機序解明

C. 研究結果

FLU-1から新たな代謝物であるFLU-1-N-OHが生成することがMSスペクトルより確認され、10個体中7個体のミクロゾームでFLU-1-N-OH生成が確認された。FlutamideからFLU-1の代謝はcarboxylesterase 阻害剤のbis-(p-nitrophenyl)phosphoric acid(500 μ M)により完全に阻害された。FLU-1からFLU-1-N-OHへの代謝はCYP3A阻害剤のmiconazole (10 μ M)で53%阻害された。ヒト組み換え酵素を用いた解析によりFLU-1からFLU-1-N-OHへの代謝は基質濃度1 μ MではCYP3A4とCYP1A2のみで認められ、CYP3A4がCYP1A2に比べて約10倍高かった。基質濃度100 μ Mではその他にCYP2C9, CYP2A6でも活性が認められ、CYP3A4とCYP2C9が同程度寄与することが明らかとなった。Flutamide服用患者の尿中flutamide代謝物の解析によりFLU-1-N-OHが検出された。FLU-1-N-OHはほとんどが抱合型で存在することを明らかになった。肝障害の認められた群と認められない群間でFLU-1-N-OH体さらにその他のflutamide代謝物の間に有意な量的差異は認められなかった。Cyp1aを誘導する β -naphthoflavone処理したマウスの肝ミクロゾームでFLU-1-N-OH体の生成が5倍増加した。一方Cyp3aを誘導するPCN処理したマウスの肝ミクロゾームではFLU-1-N-OH体の生成の有意な増加は認められなかった。

ヒト肝臓ミクロゾーム、ヒト組み換え酵素の解析により、ヒト肝臓でFLU-1-N-OH体が生成することが示唆された。さらにヒト組み換えCYP

発現系を用いた解析によりCYP3A4がFLU-1からFLU-1-N-OH体を生成する主要なCYP分子種であることが示唆された。この結果はCYP3A4阻害剤であるmiconazoleを用いた実験によっても支持された。一方マウスにおいては主にCyp1aでFLU-1からFLU-1-N-OHへの代謝が行われることが示され、ヒトとマウスで代謝活性化体生成のための分子種に差異があることが明らかとなった。Flutamide服用患者の尿中flutamide代謝物の解析によりFLU-1-N-OHが抱合体として検出された。肝障害の有無によるFLU-1-N-OH体量の差異は認められず、FLU-1-N-OHが究極の活性化体ではなく更なる代謝やその他の何らかの因子が毒性発現に必要な可能性が示された。

C-III LC/MS/MSを用いた低分子内因性物質のメタボロミクス技術の開発

C-IV メタボロミクスと病理の関連性についての解析

質量分析計を用いたメタボロミクス手法による毒性マーカー検索法の開発：

APAP 投与群 (100, 500 および 800 mg/kg) および対照群の尿サンプルにおけるポジティブイオンモードによる UPLC/ToF MS 解析では 3255 ピークを含む MS スペクトルが検出された。このうち、1372 ピークが対照群の 4 例中 2 例以上で検出されたことから、これらのピークを内因性の代謝物として解析の対象とした。APAP 投与群では、対照群に対して 108 ピークが増加 ($P < 0.05$, Fold change > 1.5), 233 ピークが減少 ($P < 0.05$, Fold change < 0.67) を示した。有意な増減を示した 341 ピークに関して PCA 解析を実施し、クラスター分離への影響が強い複数個のピークを取得した。一方肝障害マーカーである血清 ALT 活性に相関性の高いピークの抽出を実施し 175 ピークに有意な相関性 (Spearman 順位相関, $P < 0.05$) が認められた。同様に PCA 解析を実施し、絞り込みを行い複数個のピークを取得した。二つの方法により 2 種類の共通に抽出される代謝物ピークを取得した。

内因性代謝物に絞った解析の一手法として、薬物を投与しないラットの尿において検出される代謝物ピークに関して、薬物投与により変動する尿代謝物プロファイルの取得を行うことで投与薬物による影響を取り除いて解析することが可能となった。また対照群において検

出される内因性代謝物のピークへの絞り込みや、既存の肝障害マーカーとの相関性に基づく絞り込みを行い、PCA解析によりクラスターの形成と分離に強く寄与するピークを抽出することから、バイオマーカー候補を探索することが可能であった。

C-V メタボロミクス・プロテオミクス解析技術の高感度化試薬の開発ならびに毒性軽減構造修飾法の開発

新規に合成した誘導体化剤は、すでにMSによるタンパク質の同定や定量に用いられている誘導体化剤と比べて同程度の反応性を示し、同位体分布を利用したアミノ酸配列解析では2倍以上反応性が良いことが分かった。N末端のアミノ酸がArg, His, Thr, Tyrにおいて定量的に反応すること、また、Lysの側鎖のアミノ基とも反応することが示された。リン酸化ペプチドの検出も容易にでき、新規誘導体化剤は、N末端修飾試薬として有効であると考えられる。

Bradykininを用いてMALDI-TOF/MSのピーク強度を比較することでペプチドの相対的定量ができるかどうか検討し、ピーク強度比が、ペプチド濃度により変化することを確認した。ピークの変化から相対的に定量することが可能と考えられる。N末端修飾試薬を用いてタンパク質の変動解析を行った場合、タンパク質の発現量が20%以上あれば定量が可能であるという知見を得た。

C-VI LC/MS/MSを用いた網羅的プロテオミクス・ペプチドミクス技術の開発ならびに解析

安定同位体標識を使わずに、別々のLC-MS分析のデータを、サンプル間で比較する手法について検討を行った。これまでに確立したPep3Dを用いたLC-MSデータの可視化により、異なるランの間のLC-MSデータを、3次元グラフとして比較する事が可能となった。しかし、同一サンプルを2回分析しLC-MSの再現性を検討したところ、LCによるリテンションタイムのずれ、質量分析装置によるペプチドピーク強度の再現性に問題があることがわかった。

ノンラベル化法での利用を念頭に置いて、LC-MSデータに基づいた発現差解析のためのオリジナルソフトウェア“mzMore”の開発を、インドRushmore社の協力を得て進めてきた。ピーク同定と定量、ノイズの除去、データの標

準化、可視化、データのアウトプットという課題に対し、ICAT法については、データの標準化の問題は解決されているため、ピーク認識と定量の部分のみが重要な課題となっている。各スキャンにおいて、荷数の異なるペプチドピークの存在も考慮して、一つのペプチドの定量をより正確に行うことをめざしている。

ICATラベル法に関しては、実際のラット尿サンプルを用いてそのパフォーマンスのチェックと解析系の確立を行った。ICAT解析を行うためのソフトウェアであるProICATは、MS/MSデータによる同定操作を前提として要求するが、MS/MSへの親イオンの選択に問題があり、タンパクの同定がうまくいかないことがわかった。そこで、ICATについても、TOFマス依存的数据解析を可能とするため、オリジナルのソフトウェア開発を進めている。

ラット尿中の高発現量のタンパク質を前処理にて除去するため、これらの同定を試み、alpha-2u-globulin、urinary protein 2 precursor、serum albumin、Alpha-amylase、などが同定された。そして、同定されたMUPおよびUP1-3を効率的に取り除くために、これらに対する特異的抗体を作製した。現在、この抗体を用いて、除去用の抗体ビーズの作製を行っている。

C-VII 細胞レベルでのメタボロミクス技術の開発

細胞超音波破碎試料を用いたNMR解析を実施した。今回の解析に用いた細胞は、LI90(肝臓)、HUV-EC-C(血管内皮)、NCR-G1(精巣)、HeLaS3(子宮頸部)、HL60(急性前骨髄球性白血病由来細胞)、HepG2(肝臓)、KMRC-3であり、いずれも研究によく利用されている細胞を使用した。特にHepG2は肝癌由来細胞であり、肝臓を標的とする毒性試験に汎用されている。また、もう一つの毒性標的臓器としてよく取り上げられるのが腎臓であり、今回KMRC-3を用いてそのモデルとして可能性を検討した。用いた細胞の内、KMRC-3は非常に増殖が遅く、倍加時間が14日であったことから考えると、スクリーニングのような大量に細胞を使用する研究には適していないことがわかった。

また、細胞レベルでのメタボノミクス解析においては、煩雑な前処理を必要としないことから、細胞を薬剤処理し、一定時間後超音波破碎した細胞試料をアルブミン除去後解析する方

法を検討しており、実際にNMR解析したところ、ノイズ等を気にすることなく解析が可能であるという結果を得た。

D. 結論

D-I NMRを用いたメタボミクス解析，高感度化技術の開発

¹H-NMRによる尿成分のメタボミクスについて、APAPのラット肝障害モデルについて検討した結果、エネルギー代謝系からの代謝産物、核酸代謝物、糖などの内因性代謝産物のうち、クエン酸、2-オキソグルタル酸、フマル酸、馬尿酸、TMAOの尿中濃度の顕著な低下がみられた。この変化はALTをマーカーとした肝障害と相関したことから、メタボミクスにおける肝障害のバイオマーカー候補としてこれらの内因性代謝物が有効であることがわかった。

D-II メタボミクスによる安全性予測系の高感度化ならびに組織・血液・尿を試料とした毒性マーカーの3次元解析手法の確立

D-II-1 トキシコゲノミクスとメタボミクスの融合を指向した肝障害の機序解明：

網羅的遺伝子発現解析に加え、肝臓の内在性代謝物（脂質）レベルの変動データよりLCA誘発肝障害と脂質代謝異常との関連が考察された。さらにRT-PCR法による個別の遺伝子発現変動データをマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析データと比較し、マイクロアレイデータの有用性についても明らかにした。遺伝子発現変動を2つ以上の変動パラメーターの組み合わせにより場合分けすることで、障害と関連する意味のある発現変動をしている遺伝子の抽出が出来る可能性が示された。

D-II-2 ヒト特異的に発症する肝障害に対する動物モデルの作製と機序解明：

ヒトにおけるflutamideの肝障害に関連すると考えられるFLU-1-N-OH体がヒト肝のミクロゾーム画分により生成されることが示され、その経路に主にcarboxylesteraseとCYP3A4が関与することが示された。一方マウスにおいてはCYP3AではなくCYP1Aの関与が示唆されヒトとマウスで主要な代謝活性化酵素に種差が存在することが示唆された。また前立腺癌患者の尿中代謝物としてFLU-1-N-OH体が検出されたが、その濃度に肝障害の認められる群と認められ

ない群間に差異は認められなかった。このことよりflutamideの肝障害発現にはFLU-1-N-OH体の更なる代謝や何らかのその他の因子が必要であると考えられた。

D-III LC/MS/MSを用いた低分子内因性物質のメタボミクス技術の開発

D-IV メタボミクスと病理の関連性についての解析

質量分析計を用いたメタボミクス手法による毒性マーカー検索法の開発：

ヒトで肝障害の発生が報告されている APAPのラット肝障害モデルを用い、質量分析計を用いた尿サンプルのメタボミクスメタボミクス手法の開発を行った。薬物を投与しない群（対照群）で検出されるピークのみをまず抽出した後、それらについて解析を実施することで投与薬物の代謝物の影響を取り除くことに成功した。さらに毒性指標との相関性等による絞り込みと PCA 解析の絞り込みを組み合わせることでバイオマーカー候補を精度よく抽出出来ることが示された。以上のことよりバイオマーカー検索のための質量分析計を用いたメタボミクスメタボミクス手法の基礎的な解析法が確立されたと考えられた。

D-V メタボミクス・プロテオミクス解析技術の高感度化試薬の開発ならびに毒性軽減構造修飾法の開発

メタボミクス・プロテオミクス解析に利用可能な高感度誘導体化試薬の開発研究を行い、

1. 新規 N 末端修飾試薬を合成した。
2. 合成した新規 N 末端修飾試薬はペプチドとの反応性が良く、リン酸化ペプチドの検出や PSD モードによるアミノ酸配列解析を容易にすることを明らかにした。
3. 化合物の安定同位体による質量差を利用して、MS による相対的定量が行えることを実証した。

これらの結果より、新規合成化合物はN末端修飾試薬としてタンパク質の同定や相対的定量、リン酸化部位の同定に有効であることが明らかになり、これらの誘導体化試薬は、メタボミクス・プロテオミクス解析に有効利用できると考える。

D-VI LC/MS/MSを用いた網羅的プロテオミクス・ペプチドミクス技術の開発ならびに解析

オンライン nanoLC-MS/MS を用い、定量と同定を分離した 2-step のアプローチにより、尿中のペプチドおよびタンパクを網羅的に解析する手法の確立を行なった。ノンラベル化法による比較では、特にシグナル強度の補正が課題となった。安定同位体を用いたラベル化法 (cICAT 法) についても、TOF-MS のみを利用した ICAT 解析を可能とするために、独自の解析ソフトウェアの開発を進めた。

また、より高感度化をはかるための手段として、尿中の高発現量タンパク質を同定し、それらに対する抗体を作製し、前処理用の抗体ビーズの開発を進めた。

D-VII 細胞レベルでのメタボロミクス技術の開発

細胞レベルでの薬剤による毒性の予測を行うため、細胞試料を用いた NMR によるメタボロミクス技術の開発を目的とした。本年度は細胞 (各種臓器由来) のメタボローム解析に必要なサンプル調製法 (特にアルブミン除去などの前処理法) の検討を行い、超音波破碎試料を用いた NMR によるメタボローム解析を実施した。

E. 健康危機管理情報

なし

F. 研究発表

各分担研究報告書に記載した。

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金(トキシコゲノミクス研究事業)
分担研究報告書

分担研究課題：NMR を用いたメタボロミクス解析，高感度化技術の開発

分担研究者：奥田晴宏 国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部長

研究要旨

尿などの非侵襲試料によるメタボロミクスを手法とした医薬品の高感度安全性予測系の開発を目的として、ヒトへの肝障害の発生が報告されている APAP のラット肝障害モデルについて尿中代謝成分のメタボロミクス解析を $^1\text{H-NMR}$ を用いて行った。尿の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定し、NMR SUITE を利用して代謝産物の定性・定量を行った結果、APAP500mg/kg および 800mg 投与群で内因性代謝物の濃度が低下し、特にクエン酸、2-オキシグルタル酸、フマル酸、馬尿酸、TMAO の濃度が大きく低下した。この結果は肝障害マーカーの ALT 活性と相関した。また、PB 前処理によって代謝能を更新させると、APAP500mg/kg 投与群においてこれらの内因性代謝物濃度は PB 非処理群と比べて高い値を示した。以上の結果より、APAP 投与によって濃度の低下がみられる内因性代謝物はメタボロミクスにおける肝障害のバイオマーカー候補となることが明らかとなった。なお、尿の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルからは APAP 代謝産物の解析も可能であり、抱合体の構造解析および定量を行った。これらの化合物濃度は APAP 投与量と PB 前処理の有無によって変動がみられ、薬物代謝と毒性との解析に有力な情報となることが明らかとなった。以上、非侵襲試料を用いた医薬品の安全性予測系の開発に資する手法として、 $^1\text{H-NMR}$ による尿成分のメタボロミクスに関する基礎的な解析法が確立された。

研究協力者

福原 潔 国立医薬品食品衛生研究所
有機化学部 室長
宮田直樹 名古屋市立大学大学院
薬学研究科 教授

での毒作用検知能力には難があった。また、臨床試験に入る時の外挿性にも乏しいものであった。しかし、近年、トキシコゲノミクス研究の急速な進展は、医薬品の開発・安全性研究において毒性発現を遺伝子レベルで捉えたより多くの情報が得られるようになってきた。そして、毒性学的に意味のある遺伝子発現から毒作用発現にまでに続発するカスケード的な発現因子 (mRNA、タンパク、代謝物) のプロファイリングから、化合物のスクリーニングにおける毒作用のエンドポイ

A. 研究目的

医薬品の開発・安全性研究において毒性試験ガイドラインなどで示されているバイオマーカー的な指標は、従来はヒトでの臨床検査で実施されていた検査項目を適用したものが殆どで、実際の実験動物

ントとして有効な毒性学的バイオマーカーの探索が積極的に行われるようになった。

本研究事業では、ヒトへの応用が簡便な尿などの非侵襲試料を利用した新規メタボロミクス・プロテオミクス高感度安全性予測系を確立することを目的としている。主任研究者の奥田は血液および尿サンプルを用いた NMR によるメタボロミクス高感度安全予測系を確立し、薬剤暴露時の毒性および薬効に基づく内因性物質の代謝変動情報との相関に関する知見を得る。昨年度は ^1H -NMR によるラット尿成分の解析手法について検討し、 ^1H -NMR 専用高感度プローブを装備した 500MHzNMR を使い、presaturation NOESY で軽水のシグナルを消去することによってメタボロミクスに利用可能な ^1H -NMR スペクトルを測定できることがわかった。また、 ^1H -NMR スペクトルは定量解析用ソフト(NMR SUITE)を利用することによって内因性尿中代謝物の定性・定量が可能であることを明らかにした。さらに、尿のスペクトルパターンは採取条件による影響は少ないことから、尿採取から測定までの一連の操作に技術的な問題はないことがわかった。そこで今年度は、ヒトで肝障害が報告されているアセトアミノフェン(APAP)のラット肝障害モデルから得られた尿を用いて ^1H -NMR による内因性代謝物質および APAP 代謝物の解析を行い毒性への影響について検討を行った。また、フェノバルビタール(PB)前処理の影響についても検討した。

B.研究方法 (倫理面への配慮)

本研究は動物の尿を扱うため、「国立医薬品食品衛生研究所動物実験に関する指針」に従って行った。

1. ^1H -NMR 測定に供する尿サンプル

動物の尿は、三共製薬安全性研究所より供与していただいたラットの尿を用いた。実験動物、被験物質・投与方法、尿サンプル採取は以下の通りである。

実験動物：8 週齢の雄性 F344/DuCriCrlj ラットを 1 週間環境に馴化させた後、9 週齢で試験に使用。APAP 投与後はラット用ステンレス製メタボリックケージに移して個別飼育。

被験物質・投与方法：PB は 0 および 100mg/kg、APAP は 0, 500 および 800mg/kg を強制経口投与。投与スケジュールは、前処置として PB を 4 日間投与し、PB 投与 4 日目に APAP を単独投与。尿サンプル採取：1%NaN₃ で処理したコニカルチューブに、APAP 投与後 24 時間で排泄される尿を採取。遠心分離(3000rpm, 5min)して上清を尿サンプルとした。

2. ^1H -NMR 測定

装置：500MHz Varian NMR システムに ^1H -NMR 専用コールドプローブを装備
サンプル調整：ラット尿 540 μl に内部標準物質として 5mMTSP/D₂O 溶液を 60 μl 、および pH インジケータとして 1M イミダゾール/D₂O 溶液を 6 μl 添加して ^1H -NMR 用サンプルとした。

測定モード：Presat NOESY 1st Increment, 100ms mixing time, 32 transients

3. NMR の解析

Chemomx 社製 NMR スペクトラムからの

代謝物の同定と定量解析ソフト(NMR SUITE)により解析を行った。

C. 研究結果

1. APAP 投与による内因性代謝物の変動と PB の影響

APAP・PB 併用試験で得られた尿について $^1\text{H-NMR}$ を測定した。そして NMR SUITE を用いて 23 種類の内因性代謝物について解析を行った。代表的な尿の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを図 1 に、また、主な代謝物の定性・定量結果を表 1 に示す。APAP 投与による主な代謝物への影響は、PB による前処理を行わない場合、100mg/kg 投与群では殆どみられないのにして、500mg/kg 投与群では、クエン酸、2-オキソグルタル酸、コハク酸、フマル酸、馬尿酸、アラントイン、トリメチルアミン N-オキシド(TMAO)の濃度の低下がみられた。特に 800mg/kg 投与群ではクエン酸、2-オキソグルタル酸、フマル酸、馬尿酸、TMAO の濃度が大きく低下した。一方、PB 前処理群では APAP 投与における内因性代謝物の濃度は PB 非処理の場合と同様に、100g/kg 投与群では殆どみられず、500mg/kg 投与群で低下がみられ、800mg/kg 投与群で大きく低下した。しかし、500mg/kg 投与群での内因性代謝物濃度は、PB 非処理の場合と比べて高かった。なお、PB 前処理による内因性代謝物への影響は、APAP 非投与時には殆どみられなかった。

2. APAP 代謝物の変動と PB の影響

APAP 代謝物の構造解析は二次元 NMR によって行った。APAP500mg/kg 投与の尿の二次元 NMR スペクトルを図 2 に示す。その結果、尿中には APAP の

硫酸抱合体(APAP sulfate)、グルクロン酸抱合体(APAP glucronide)、メルカプツール酸抱合体(APAP mercapturate)および APAP が含まれていることが明らかとなった。図 3 に示すように、これらの代謝物の芳香環領域のシグナルの分離はかなり良好であった。そこで、馬尿酸の芳香族プロトンのシグナルの定量値(濃度/ピーク面積)をリファレンスとして、NMR SUITE によって各代謝物の濃度を求めた。その結果を表 2 に示す。PB で前処理を行わない場合、硫酸抱合体が APAP100mg/kg 投与群で認められ、500mg/kg 投与群ではさらにグルクロン酸抱合体とメルカプツール酸抱合体および未変化体の APAP が認められた。APAP800mg/kg 投与群ではこれらの代謝物と APAP 未変化体の濃度は増加した。一方、PB 前処理群では APAP100mg/kg 投与群で硫酸抱合体と共にグルクロン酸抱合体およびメルカプツール酸抱合体が認められ、これらの代謝物濃度は APAP 投与量の増加とともに増えた。なお、PB 前処理群での APAP 代謝物は PB 非処理群と比べて高濃度に存在することが確認された。一方、APAP 未変化体については PB 非処理群と同様に APAP500mg/kg および 800mg/kg 投与で確認されたが、尿中濃度は PB 非処理群と比べて低濃度であることが確認された。

D. 考察

尿などの非侵襲試料を利用したメタボロミクス・プロテオミクス手法を医薬品の安全性評価に利用する為には、毒性予測に有効なバイオマーカーを探索することが必要である。この場合、バイオマーカーは簡便な手法で解析可能であること、

また、ある特定の薬物固有の生体反応で出現するものではなく、薬物による生体反応の結果として生ずる毒性に直接関係しているものでなくてはならない。すなわち、薬物が異なっても生体反応として現れる毒性に共通したバイオマーカーを探索することが必要である。今年度は昨年度確立した¹H-NMRと代謝物の解析ソフトを利用した尿中の内因性代謝物質の解析手法を利用して、APAPによる薬物誘発肝障害モデルにおける毒性発現バイオマーカーについて検討を行った。尿の¹H-NMRスペクトルについてNMR SUITEによって定性・定量を行った結果、図1に示すように、乳酸、クエン酸、コハク酸など、解糖系やTCA回路を中心としたエネルギー代謝系からの成分や核酸代謝物、糖、アミノ酸等が確認できた。そして、これらの内因性代謝物についてAPAPによる影響を解析してみた結果、内因性代謝物濃度の変動は100mg/kg投与群では殆ど見られなかったが、500mg/kg投与群で代謝物濃度クエン酸、2-オキソグルタル酸、フマル酸などのエネルギー代謝に関連する化合物および馬尿酸、TMAOの濃度が大きく低下することがわかった。共同研究者の矢本、堀、宮田らによって同時に行われた生化学試験では、肝障害マーカーのアラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)活性が100mg/kg投与群では非投与群と同程度の値を示しているのに対して500mg/kgおよび800mg/kg投与群では顕著な上昇を示していることから、今回の内因性代謝物濃度の低下は肝障害の発症と関連していると考えられた。また、Nicholsonらは、肝障害物質ヒドラジン投与のラット尿では、クエン酸、2-オキソグルタル酸、馬尿酸、TMAOの濃度が低下するこ

とを報告しており(*Chem. Res. Toxicol.* 2001, 14, 975-987)、今回の結果と一致することがわかった。以上、APAPによって誘発される肝障害によって尿中の内因性代謝物濃度の低下がみられ、特に大きな変動がみられる代謝物は肝障害のマーカーとして有効であることが予測された。

そこで次に、内因性代謝物を肝障害のマーカーとして、APAPによる肝障害に対するPBの影響について検討してみたところ、PB前処理により代謝能の更新したラットでも内因性代謝物濃度の低下がみられ、APAP800mg/kg投与群ではPB非投与群と同様に低い値を示すことから肝障害が進行していることが予測された。しかしAPAP500mg/kg投与群では、PB非投与群にみられるような大きな低下が認められないことから、APAPによる肝障害はPB前処理によって抑制されていることが予測された。

今回、APAPの代謝物については二次元NMRを解析することによって代表的な代謝物である硫酸抱合体、グルクロン酸抱合体、メルカプツール酸抱合体およびAPAPの未変化体が同定できた。各尿中濃度についてはNMR SUITEを利用して決定した。その結果、APAP100mg/kg投与群では、PBによる前処理を行わないと硫酸抱合体のみが認められるのに対して、PB前処理によって代謝能を更新させるとグルクロン酸抱合体、メルカプツール酸抱合体およびAPAP未変化体も確認できた。また、各APAP代謝物濃度はAPAP投与量に相関して増加がみられたが、PBによって代謝能を更新させたラットではPB非投与群のラットと比べてAPAP代謝物濃度が高くなることがわかった。

今回、明らかとなった肝毒性の予測に

有効な内因性代謝物は尿の¹H-NMRによって容易に測定でき、定量も NMR SUITE を利用することによって十分可能であることから、薬物の安全性評価に有効なバイオマーカー候補にあげられる。今後は、¹H-NMR スペクトルについて主成分分析等の統計処理による網羅的な解析を実施し、必要であれば二次元 NMR や質量分析等を駆使することによって、さらに有効なバイオマーカーの探索を行う。また、他の肝障害モデルについてもバイオマーカー探索を行って肝障害に対して高選択的で鋭敏なバイオマーカーの絞り込みを行う。同様の探索は他の毒性モデルについても行い、薬物暴露において起こりうる様々な毒性とバイオマーカーに関するデータベースを作成し、メタボロミクスによる高感度安全性予測系を確立する。

E. 結論

¹H-NMR による尿成分のメタボロミクスについて、APAP のラット肝障害モデルについて検討した結果、エネルギー代謝系からの代謝産物、核酸代謝物、糖などの内因性代謝産物のうち、クエン酸、2-オキシグルタル酸、フマル酸、馬尿酸、TMAO の尿中濃度の顕著な低下がみられた。この変化は ALT をマーカーとした肝障害と相関したことから、メタボロミクスにおける肝障害のバイオマーカー候補としてこれらの内因性代謝物が有効であることがわかった。また、¹H-NMR スペクトルからは APAP 代謝物の解析も可能であり、硫酸抱合体、グルクロン酸抱合体、メルカプツール酸抱合体の同定と定量を行った。その結果、これらの化合物濃度は APAP 投与量と PB 前処理の有無

によって変動がみられ、薬物代謝と毒性との解析に有力な情報となることが明らかとなった。以上、非侵襲試料を用いた医薬品の安全性予測系に資する手法として、¹H-NMR による尿成分のメタボロミクス解析の基礎的な手法が確立された。今後は主成分分析等の統計処理の実施および多くの毒性モデル系におけるバイオマーカー候補の検討を行う予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K. Fukuhara, S. Oikawa, N. Hakota, Y. Sakai, Y. Hiraku, T. Shoda, S. Saito, N. Miyata, S. Kawanishi, H. Okuda, 9-Nitroanthracene derivative as a precursor of anthraquinone for photodynamic therapy, *Bioorg. Med. Chem.* in press.
- 2) W. Hakamata, E. Yamamoto, M. Muroi, M. Mochizuki, M. Kurihara, H. Okuda, K. Fukuhara, Design and synthesis of α -glucosidase inhibitor having DNA cleaving activity, *J. Appl. Glycosci*, **53**, 255-260 (2006).
- 3) W. Hakamata, I. Nakanishi, Y. Masuda, T. Shimizu, H. Higuchi, Y. Nakamura, T. Oku, S. Saito, S. Urano, T. Ozawa, N. Ikota, N. Miyata, H. Okuda, K. Fukuhara, Planar catechin analogues with alkyl side chains, as a potent antioxidant and an α -glucosidase inhibitor, *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 6524-6525 (2006).
- 4) W. Hakamata, M. Muroi, T. Nishio, T. Oku, A. Takatsuki, H. Osada, K. Fukuhara, H. Okuda, M. Kurihara, N-linked oligosaccharide processing enzymes as molecular targets for drug discovery, *J. Appl. Glycosci*, **53**, 149-154 (2006).
- 5) K. Fukuhara, M. Nagakawa, I. Nakanishi, K.

Ohkubo, K. Imai, S. Urano, S. Fukuzumi, T. Ozawa, N. Ikota, M. Mochizuki, N. Miyata, H. Okuda, Structural Basis for DNA Cleaving-Activity of Resveratrol on the Presence of Cu(II), *Bioorg. Med. Chem.* **14**, 1437 – 1443 (2006).

2. 学会発表

- 1) 福原 潔、石川亜希、袴田 航、斎藤慎一、奥田晴弘、N-ニトロソフェンフルラミンの毒性反応機構の解析 - 活性酸素毒性の可能性 -, 日本薬学会第 127 年会、富山(2007,3).
- 2) 中西郁夫、宇都義浩、大久保 敬、川島知憲、Sushma Manda、金澤秀子、永澤秀子、堀均、奥田晴宏、福原 潔、小澤俊彦、福住俊一、伊古田暢夫、安西和紀、抗酸化作用の増強を目的としたアルテピリンC誘導体の開発、日本薬学会第127年会、富山(2007,3).
- 3) 福原 潔、中西郁夫、松岡厚子、松村友博、本田幸子、林美貴子、小澤俊彦、宮田直樹、伊古田暢夫、斎藤慎一、奥田晴宏、新規抗酸化剤の開発 - レスベラトロールのメチル誘導体 -, 日本薬学会第127年会、富山(2007,3).
- 4) 川島知憲、中西郁夫、大久保 敬、Sushma Manda、金澤秀子、奥田晴宏、福原 潔、小澤俊彦、伊古田暢夫、福住俊一、安西和紀、クルクミンのラジカル消去活性における金属イオンの効果、日本薬学会第 127 年会、富山(2007,3)
- 5) 川島知憲、中西郁夫、薬丸晴子、乳井美奈子、Sushma Manda、大久保 敬、金澤秀子、福原 潔、奥田晴宏、福住俊一、小澤俊彦、伊古田暢夫、安西和紀、分子内に塩基性部位を有する新規ビタミンE誘導体の合成とラジカル消去活性評価、第 18 回ビタミンE研究会、長崎(2007,1)
- 6) 福原 潔、中西郁夫、松岡厚子、松村友博、本田幸子、林美貴子、小澤俊彦、宮田直樹、伊古田暢夫、斎藤慎一、奥田晴宏、抗酸化作用の増強と遺伝毒性の軽減を目的としたレスベラトロール誘導体の開発、日本環境変異原学会第 35 回大会、大阪(2006,11)
- 7) 中西郁夫、宇都義浩、大久保 敬、川島知憲、Sushma Manda、金澤秀子、永澤秀子、堀均、奥田晴宏、福原 潔、小澤俊彦、伊古田暢夫、福住俊一、安西和紀、ESRによる新規アルテピリンC誘導体のラジカル消去活性評価、第45回電子スピンサイエンス学会年会、京都(2006,11)
- 8) T.Kawashima, I.Nakanishi, K.Ohkubo, Y.Uto, S.Manda, K.Suzuki, H.Kanazawa, K.Fukuhara, H.Okuda, H.Nagasawa, H.Hori, K.Anzai, T.Ozawa, N.Ikota and S.Fukuzumi, Radical-Scavenging Reactions of 4-Propenylphenol Derivatives, 13th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine(SFRBM), USA(2006,11).
- 9) I.Nakanishi, K.Ohkubo, T.Kawashima, K.Kawaguchi, M.Nyui, M.Takusagawa, S.Manda, T.Suenobu, K.Fukuhara, H.Okuda, H.Kanazawa, N.Miyata, T.Ozawa, K.Anzai, S.Fukuzumi and N.Ikota, DNA Cleaving-Activity of Water-Soluble C₇₀ under Visible-Light Irradiation, 13th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine(SFRBM), USA(2006,11).
- 10) 中西郁夫、宇都義浩、大久保 敬、川島知憲、Sushma Manda、金澤秀子、永澤秀子、堀均、奥田晴宏、福原 潔、小澤俊彦、伊古田暢夫、福住俊一、安西和紀 アルテピリンCおよびその誘導体のクルミルペルオキシラジカル消去活性、日本過酸化脂質・フリーラジカル学会第 30 回大会、東京(2006,9).
- 11) 川島知憲、中西郁夫、宇都義浩、大久保敬、鈴木桂子、Sushma Manda、金澤秀子、福原 潔、奥田晴宏、永澤秀子、堀均、福住俊一、安西和紀、小澤俊彦、伊古田暢夫、4-プロペニルフェノール化合物によるフリーラジカル消去反応における構造活性相関、第 2 回分子情報ダイナミクス研究会、大阪(2006,9).
- 12) 川島知憲、中西郁夫、大久保 敬、Sushma Manda、金澤秀子、奥田晴宏、福原 潔、小澤俊彦、福住俊一、伊古田暢夫、安西和紀、クルクミンのラジカル消去活性に対する金属イオンの効果、バイオ関連化学合同シンポジウム(第 21 回生体機能関連化学部会・第 9 回バイオテクノロジー部会・第 9 回生命化学研究会)、京都(2006,9).

13) 中西郁夫, 宇都義浩, 大久保 敬, 川島知憲, Sushma Manda, 金澤秀子, 永澤秀子, 堀 均, 奥田晴宏, 福原 潔, 小澤俊彦, 伊古田暢夫, 福住俊一, 安西和紀, アルテピリンCおよびその誘導体のラジカル消去活性, バイオ関連化学合同シンポジウム (第21回生体機能関連化学部会・第9回バイオテクノロジー部会・第9回生命化学研究会), 京都(2006,9).

14) K.Fukuhara, I.Nakanishi, T.Kawashima, A.Tada, H.Yakumaru, K.Ohkubo, H.Kanazawa, S.Urano, H.Okuda, N.Miyata, K.Anzai, T.Ozawa, S.Fukuzumi and N.Ikota, Synthesis, Radical-Scavenging Activity, and Redox Behavior of Planar Catechin Derivatives, XIII Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International, Switzerland(2006,8).

15) T.Kawashima, I.Nakanishi, K.Ohkubo, Y.Uto, S.Manda, H.Kanazawa, K.Fukuhara, H.Okuda, K.Suzuki, H.Nagasawa, H.Hori, K.Anzai, T.Ozawa, S.Fukuzumi and N.Ikota, Kinetic Study on the Radical-Scavenging Activity of Natural Antioxidants Having 4-Propenylphenol Structures, XIII Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International, Switzerland(2006,8).

16) 川島知憲, 中西郁夫, 宇都義浩, 大久保敬, 鈴木桂子, Sushma Manda, 金澤秀子, 福原 潔, 奥田晴宏, 永澤秀子, 堀 均, 福住俊一, 安西和紀, 小澤俊彦, 伊古田暢夫, プロペニルフェノール化合物によるフリーラジカル消去反応, 第6会 AOB 研究会, 札幌(2006,6).

17) 福原 潔, 中西郁夫, 松村友博, 斎藤慎一, 宮田直樹, 小澤俊彦, 伊古田暢夫, 奥田晴宏, レスベラトロールをシーズとした新規抗酸化剤の開発, 第28回日本フリーラジカル学会学術集会, 三重(2006,5).

18) 中西郁夫, 大久保 敬, 川島知憲, 川口久美子, 乳井美奈子, 田草川光子, 末延知義, 福原 潔, 奥田晴宏, 金澤秀子, 宮田直樹, 小澤俊彦, 安西和紀, 福住俊一, 伊古田暢夫, 水溶性 C₇₀ フラーレンの光反応による活性酸素生成と DNA 切断, 第28回日

本フリーラジカル学会学術集会, 三重(2006,5).

19) 川島知憲, 中西郁夫, 宇都義浩, 大久保敬, Sushma Manda, 金澤秀子, 福原 潔, 奥田晴宏, 永澤秀子, 堀 均, 福住俊一, 安西和紀, 小澤俊彦, 伊古田暢夫, 天然および合成4-プロペニルフェノール誘導体のラジカル消去活性, 第28回日本フリーラジカル学会学術集会, 三重(2006,5).

H. 知的財産権の出願・登録状況

登録および登録予定共になし

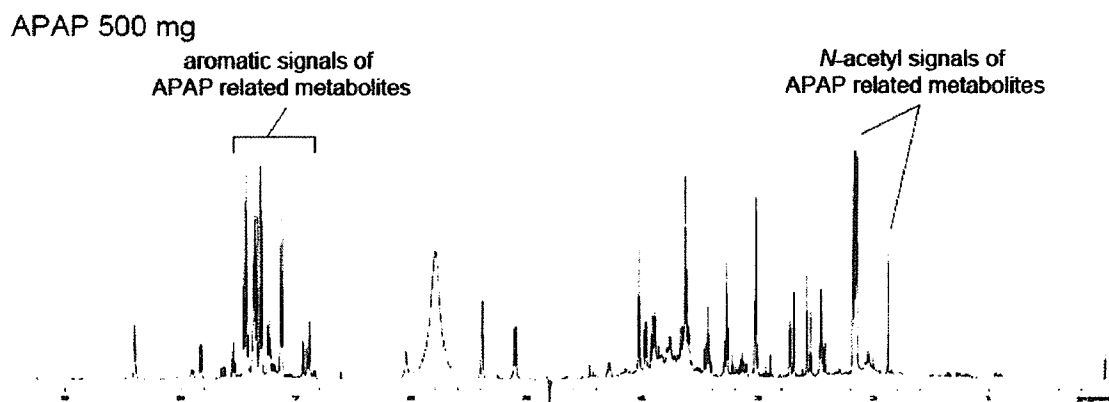
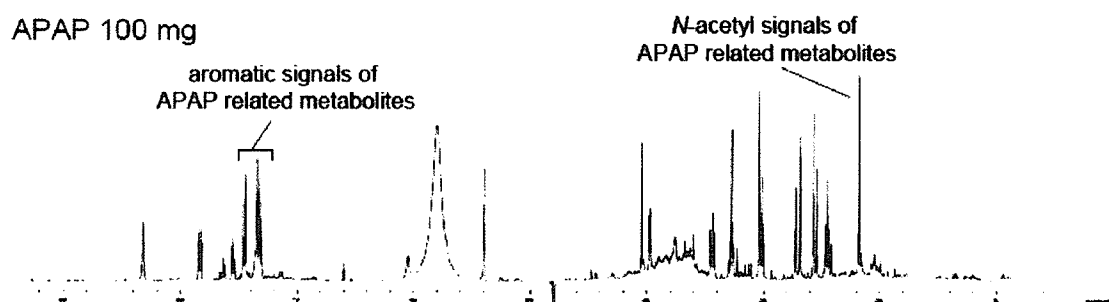
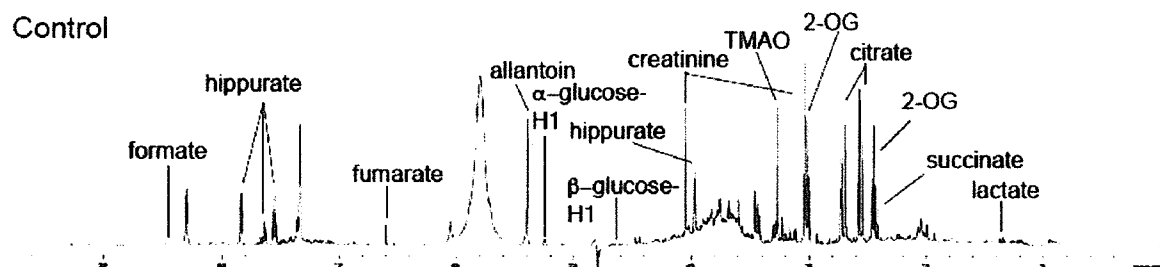


図1. APAP 投与ラット尿の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

File : home/vnml/vmrcsya/data/urine_2D/03M002_gcosy.fid
Sample ID : tmpstudy

Pulse Sequence: gCOSY
Solvent: d2o
Temp. 30.0 C / 303.1 K
Operator: vnml
File: 03M002_gcosy
VMSR-400 "varian"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.189 sec
Width 5411.3 Hz
2D Width 5411.3 Hz
8 repetitions
512 increments
OBSERVE H1, 499.8214573 MHz
DATA PROCESSING
Sg. sine bell 0.095 sec
F1 DATA PROCESSING
Sg. sine bell 0.048 sec
PT size 2048 x 2048
Total time 2 hr. 1 min. 16 sec

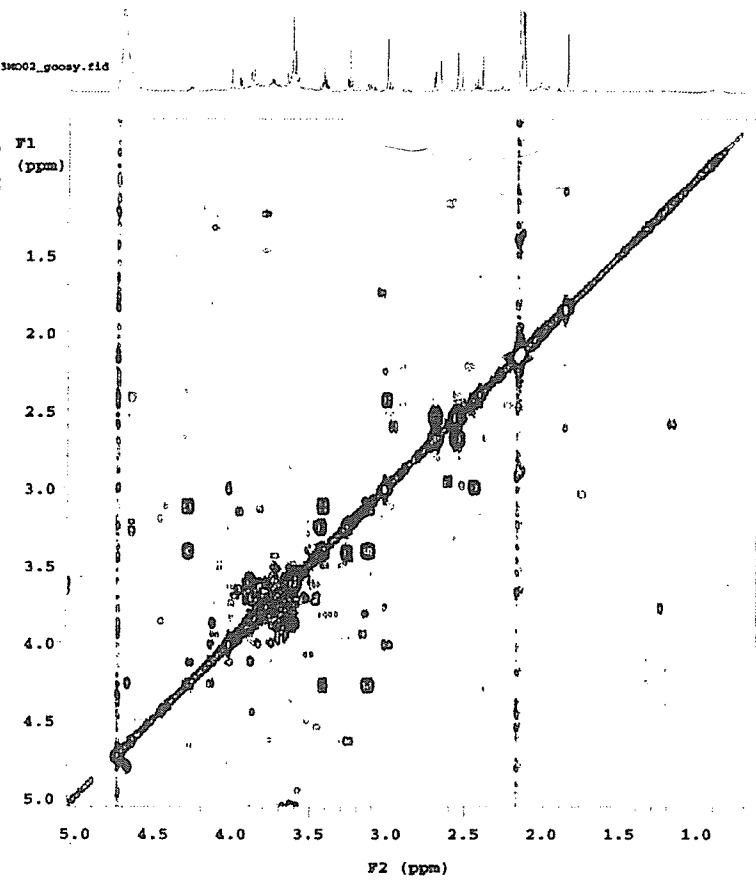


図 2-1. APAP 投与ラット尿の二次元 NMR(H-H COSY)スペクトル (1.0~5.0 ppm)

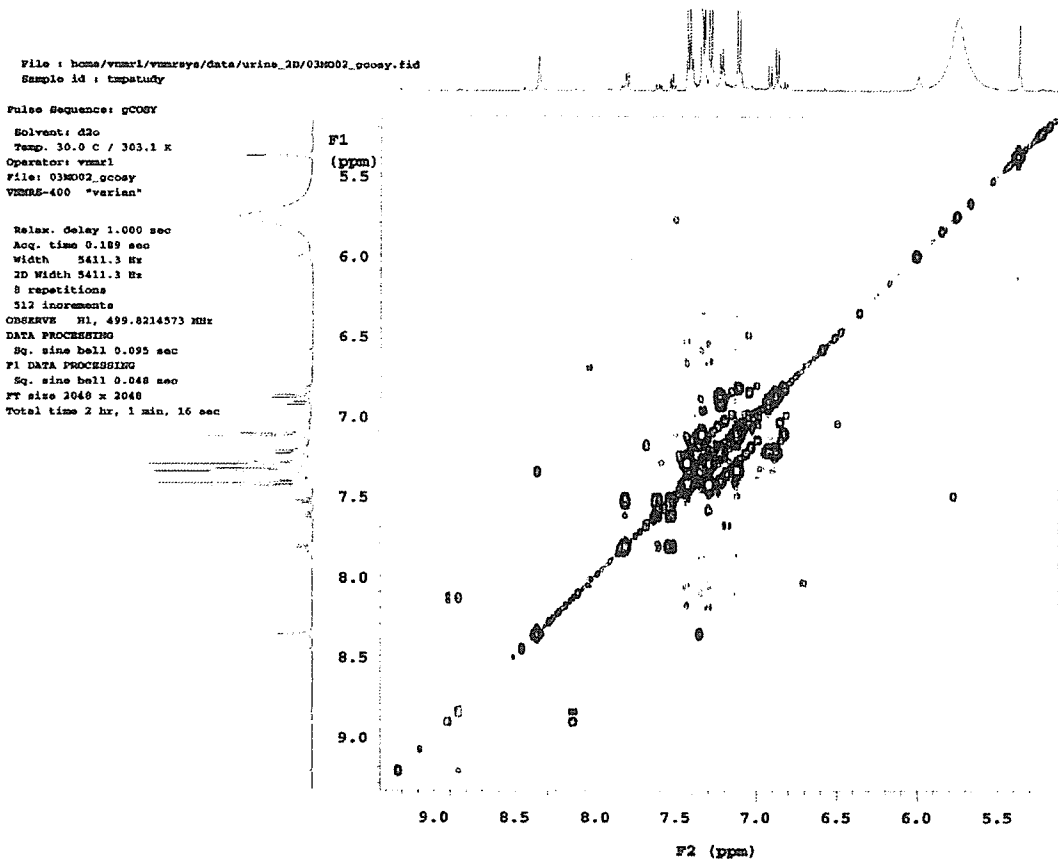


図 2 - 2 . APAP 投与ラット尿の二次元 NMR(H-H COSY)スペクトル (5.5ー9.0 ppm)