

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業：トキシコゲノミクス

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19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 奥田 晴宏

平成20年(2008)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 を用いたメタボノミクス解析, 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次元的解析手法の確立
- 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 26
- 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 43
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 59
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 72
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 98
鈴木孝昌
7. 細胞レベルでのメタボロミクス技術の開発 120
小原有弘

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 125

IV. 研究成果の刊行物・別刷 129

**厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業：トキシコゲノミクス)
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

現在、トキシコゲノミクスが医薬品の開発ならびに安全性研究において導入され、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。しかし実際には動物実験で種差のあるヒトの毒性を詳細に予測することは難しい。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。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。昨年度までに、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、肝障害軽減薬物の併用試験がバイオマーカーの探索に有効であることが判明した。また、ヒト特異的に肝障害を惹起するflutamideの肝障害動物モデルにおいて障害防御遺伝子群の存在が確認された。さらに、新たな活性酸素毒性軽減薬を開発、プロテオミクス手法の確立と解析ソフトウェアの開発、細胞系を対象とするNMRを用いるメタボロミクスの有用性も示すことが出来た。

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・助教)
堀 弥 (杏林製薬株式会社・創薬研究所・動態安全性研究部・薬物動態研究室・副主任研究員)
矢本 敬 (三共株式会社・安全性研究所・研究第七グループ・第七グループ長)
宮田 直樹 (名古屋市立大学・大学院薬学研究

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・細胞資源研究室・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、安全性予測を行う上で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関連に伴う問題である。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。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。

600MHz 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)および統計解析ソフト(SIMCA-P+)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：

9週齢のC57BL/6N雌性マウスに、0.15 (w/w) % ME3738、0.75% LCA、0.75% LCA+0.05% ME3738または0.75% LCA+0.15% ME3738を含有させた粉末飼料 (CE-2) を6日間自由に摂取させた。ProbucoI併用実験は 8~9週齢の雌性マウスを用い、各群に対し0.5% probucoI、0.5% LCAならびに0.5% LCAと0.5% probucoIを混ぜた粉末飼料 (CE-2) を9日間自由に摂取させた。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:

FLU-1処理、TCPOBOP処理マウス肝臓マイクロゾームによるFLU-1N-水酸化活性とFLU-1 N-OH体の還元活性をHPLCにより解析した。FLU-1 N-OH体等とマイクロゾームタンパクとの間で生成される付加タンパクをflutamideのハプテン抗体を用いたWestern blot法により検出した。BSAをモデルタンパクとしてFLU-1 N-OH体のタンパクとの反応性について解析した。FLU-1 N-OH体の変異原性についてはAmes試験により評価した。

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:

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に核内受容体CARのインバースアゴニストのアンドロスタノール (AND) 並びにチトクロームP450阻害作用が知られているケトコナゾール (KCZ) を併用する実験系により、メタボロミクス解析を行い、バイオマーカーの探索を実施した。

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

エダラボンの基本骨格であるピラゾロン環に種々の置換基を導入したとき、その構造修飾が活性酸素消去能にどのように影響するかを解析する目的で、一連の化合物を合成した。次に、これらの化合物について、酸化電位とヒドロキシルラジカル消去活性 (ESR法) を調べ、種々の置換基が活性酸素消去能に及ぼす影響を調べた。次に、エダラボン誘導体の膜界面での活性酸素消去活性を評価する目的で、ピラゾロン骨格に長鎖アルキル基を導入した化合物を合成した。これらの化合物をリポゾーム膜に取り込ませ、細胞膜上での活性酸素種消去能をESR法により評価した。

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。

株式会社ケー・エー・シーより購入した正常ヒト男性由来尿サンプルを使用した。本サンプルは、BIOPREDIC international 社にて研究目的の使用について同意を得られたドナーより採取後凍結保存されたものである。

本研究に使用した質量分析装置は、ESI-Q/TOF 型 LC-MS/MS QSTAR-XL-PF (Applied Biosystems) であり、ナノ LC (Splitless Nano HPLC System DiNa (KYA テクノロジーズ) オンライン接続し、LC-MS としての測定を行った。通常の測定は、ポジティブモードを使用した。ESI ナノスプレー用チップとして、KYA 社製スプレーチップを使用した。

安定同位体ラベル (ICAT) による定量的解析は、基本的にアプライドバイオシステム社より提供されたcICATラベリングキットとそのプロトコールに従って行った。

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マイクロソーム微量超音波細胞破碎機XL2000を用いて細胞を超音波破碎した。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。ブルカーバイオスピックス社製AVANCE II 800 US2型により¹H-NMRを測定した。

(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によるラット肝障害モデルの尿試料について¹H NMRを測定し、主成分分析法を利用して代謝物総体の変化から毒性評価を実施した。尿の¹H NMRの全スペクトル領域をbinning

したデータシートを主成分分析するとAPAP由来の代謝物（抱合体）が第1主成分軸を特徴づけることがわかった。そこでAPAPおよびその抱合体のスペクトル領域を省いて主成分分析を行い、APAP投与による内因性代謝物総体の変化を解析した。スコアプロットによってAPAPによる影響を反映している主成分軸を明らかにし、さらにローディングプロットによって変化の大きいケミカルシフトを特定し、NMR SUITEによって対応する代謝物の同定を行った。その結果、クエン酸、2-オキソグルタル酸等、エネルギー代謝に関係する代謝物やTMAO、馬尿酸の減少を明らかにできた。これらの代謝物は肝障害のバイオマーカー候補として期待される。また、主成分分析法による網羅的解析を取り入れることによってスペクトルの比較からは見逃してしまう微妙な変化についても読み取ることが可能となり、APAP投与による代謝物の変化とともに、PB前処理の影響についても解析できた。以上、¹H NMRによる尿成分によるメタボロミクスの解析手法を確立し、肝障害のバイオマーカー候補を明らかにすることができた。

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：

LCA誘発肝障害はME3738あるいはprobuco1の併用により軽減された。LCA/ME3738併用実験において血清中ALT活性と肝内胆汁酸レベルは正の相関を示した。ME3738は肝臓のAbcg5/8 mRNAおよびタンパクレベルを増加させ、胆汁中へのコレステロールの排泄を亢進させた。胆汁中へのコレステロールの排泄と胆汁酸の排泄の間に良好な相関性が認められた。LCA/ME3738併用においてもLCA単独投与に比べ胆汁中へのコレステロールと胆汁酸の排泄亢進が認められた。一方probuco1は血清中のコレステロール、リン脂質濃度を減少させるとともに、胆汁中へのリン脂質、胆汁酸の排泄を亢進させた。LCA/probuco1併用投与においてもLCA単独投与群に比べ胆汁中へのリン脂質、胆汁酸の排泄亢進が認められた。

LCA誘発肝障害の防御機序、防御因子を同定するために、脂質動態を変動させることが予想されるME3738とprobuco1をLCAと併用して解析した。ME3738あるいはprobuco1併用はともに

LCA誘発肝障害を軽減させ、同時に肝内胆汁酸のレベルを低下させた。ME3738はAbcg5/8の発現を亢進することで、胆汁へのコレステロール排泄を亢進させ、結果的に胆汁酸排泄の低下を防ぐことにより肝内胆汁酸レベルの上昇を防いで、障害を軽減している可能性が示された。一方、probuco1においては、リン脂質の胆汁排泄を亢進することにより、胆道系での疎水性胆汁酸の細胞障害性を軽減する、あるいは胆汁酸排泄を促進することでLCA誘発肝障害を軽減する可能性が示された。これらの結果は胆汁鬱滞時での胆汁生成、胆汁酸排泄促進には、リン脂質やコレステロールの排泄を亢進させることが重要であることを示唆する。PCNとLCA併用の場合においても薬物代謝酵素の誘導だけでなく、肝内脂質（triglyceride、リン脂質）合成を亢進することで胆汁酸排泄を維持し、肝障害を軽減することが前年度の研究からも示唆されている。PCN、ME3738およびprobuco1によりリン脂質やコレステロールの胆汁排泄亢進がLCA誘発肝障害の防御に関与す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

肝障害モデルとin vitroの解析を組み合わせ、細胞障害性の認められるFLU-1N-水酸化体を中心に代謝の面からflutamide誘発肝障害の機序の解析を実施した。TCPOBOPを投与した群では肝ミクロソーム中のFLU-1 N-水酸化活性が対照群と比較して約5倍上昇した。肝内GSHレベルはTCPOBOPおよびFLU-1単独投与群では対照群と比べ有意な差は認められなかったが、FLU-1・TCPOBOP併用群では有意な減少が認められた。絶食2日でマウス肝内GSHは約60%減少したが、FLU-1・TCPOBOP併用群で絶食を行わないと、ALT値は有意に低下した。FLU-1 N-OHをGSH、マウス肝細胞質画分とともに反応させると代謝産物としてFLU-1 N-OHの親化合物であるFLU-1が検出された。またこの反応はglutathione S-transferase (GST)の阻害剤添加により阻害された。FLU-1 N-OHをミクロソームタンパクと反応させると37-75 kDaの間に複数の付加体タンパクが抗flutamideハプテン抗体を用いたイムノプロット法により検出されたが、flutamide, OH-flutamide, FLU-1ではほとんど認められなかった。Flutamideを含むいずれの代謝物もAmes試験においては変異原性

を示さなかった。

肝ミクロソーム中のFLU-1 N-OHの生成はTCPOBOP投与により促進され、FLU-1 N-OHには他の代謝物に比べ強力なタンパク結合性が認められた。また、FLU-1 N-OHは強い細胞毒性を示すことも報告されている。以上の結果はFLU-1 N-OHの肝障害誘発への関与を示唆している。FLU-1 N-OHの細胞内タンパクへの結合は、flutamideによる肝障害誘発の一つの機序として考えられる。

本研究において、肝内GSHが低下する絶食時にはFLU-1による肝障害が強く認められた。肝内GSHは加齢により減少することが報告されている。よって高齢者では肝内GSHが低下しやすく、flutamideによる肝障害を発症しやすいと考えられる。Flutamide誘発肝障害における肝内GSHの役割についてはさらなる研究が必要である。

Flutamideの加水分解により生じたFLU-1は肝にてN-水酸化されタンパク結合能を有するFLU-1 N-OHへ代謝される。FLU-1 N-OHはGSTsによりGSH存在下FLU-1へ還元される。肝内GSH枯渇時には、FLU-1 N-OHはGSHによる解毒代謝を免れ、細胞内タンパクに結合することで肝障害を誘発する可能性が考えられた。

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誘発肝障害に対するアンドロスタンール並びにケトコナゾールの併用により、APAP誘発肝障害はいずれも軽減した。既存の肝障害マーカー（ALT活性の対数値）と質量スペクトル強度との間の相関性に着目してバイオマーカー候補を探索した。APAP単独群と併用群間の統計解析を実施したところ、logALTに対して負あるいは正の相関をする質量数を複数抽出することができた。最後に、これまでのAPAP誘発肝障害研究から得られたバイオマーカー候補20種のケトコナゾール併用試験における変化について検討した。その結果、5種の質量数（313.60, 345.48, 347.56, 347.62, 388.43）においてケトコナゾール併用時のlogALTと同様に有意な減少が認められた。

アセトアミノフェンの投与量を一定にして、

肝障害を軽減させる薬物の併用を行う実験系においても、肝障害マーカー（logALT）と質量スペクトル強度の相関性を解析することによって、バイオマーカー候補の抽出が可能であることが示された。また数種の実験系を組み合わせることにより、より精度の高いバイオマーカーに対する情報が得られる可能性が示された。

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

エダラボンの基本骨格であるピラゾロン環に種々の置換基を導入した化合物について、酸化電位とヒドロキシルラジカル消去活性（ESR法）を調べ、種々の置換基が活性酸素消去能に及ぼす影響を調べた。その結果、1位への置換基導入が酸化電位への影響が少ないことがわかった。また、1位に2-ピリジル基を導入した化合物が、エダラボンに優るすぐれた活性酸素消去能を有することがわかった。次に、ピラゾロン骨格に長鎖アルキル基を導入した化合物を合成し、エダラボン誘導体の膜界面での活性酸素消去活性を評価する目的で、これらの化合物をリポソーム膜に取り込ませ、細胞膜上での活性酸素種消去能をESR法により評価した。その結果、長鎖アルキル基を導入したほぼすべての化合物で、 γ -tocopherolよりもすぐれたヒドロキシルラジカル消去活性を有することが明らかになった。

1位に2-ピリジル基を導入した化合物のすぐれた活性酸素消去能は、分子をエノレート型に固定する効果によるものと考えられ、毒性を軽減した医薬品創製のためのキー化合物になると考えられる。また、長鎖アルキル基を導入したエダラボン誘導体は、細胞内局在性を制御できるすぐれた活性酸素種消去剤として有用である。

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

高感度網羅的測定のため、TOFマス測定でサンプル間のペプチドレベルの発現比較を行い、発現に差があったペプチドピークをターゲットングして同定のためのMS/MS測定を行うという方針で、ノンラベルによる比較及び安定同位体によるラベル法（cleavable-ICAT）の検討を進めた。この解析の過程で、既存の質量分析装置の解析ソフトウェアには機能的限界が

あることがわかり、独自の手法に合わせた解析を可能とするために、オリジナルなソフトウェアの開発を平行して進めてきた。質量分析生データの加工と、3次元グラフによる可視化、3次元アルゴリズムに基づく自動ピーク検出、Fast Fourier Transform (FFT) 法によるノイズリダクション、ペプチドピーク抽出などの機能を備えたソフトウェア「mzMore」を開発した。

ラットコントロール尿およびアセトアミノフェン処理尿からアセトン沈殿にて得られたタンパク質を ICAT heavy および light reagent にて標識した、マーカー候補ペプチド 5 種類を抽出した。これらのペプチドの MS/MS を測定し、得られた Wiff データファイルより、MASCOT による MS/MS イオンサーチを行うためのピークリストを作成し、トリプシン消化、miss cleavage 許容数 1 にてデータベースサーチ (Swiss Prot) を行った。そのうち 2 個は Major Urinary Protein Precursor, Rat Serum Albumin とほぼ同定され、残る 3 つに対しては Retinoic acid receptor RXR-beta, Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase5, E3-ubiquitin-protein ligase rififylin である可能性が示唆された。

また、ラット尿の分析において、尿中に高濃度で存在する発現量の高い数種のタンパク質が網羅的解析上邪魔になっていることがわかり、これらのタンパクを同定するとともにこれらを前処理により除去するための手法の検討として、抗体結合ビーズを作製し、その効果を検討した。さらに、ヒトでの毒性マーカー検出へ向けた基礎データとして、ヒト尿サンプルに関するプロテオーム解析にも着手した。

C-VII 細胞レベルでのメタボロミクス技術の開発

THP-1細胞は毒性研究に非常によく使用される細胞であり、その点ではこれまでに蓄積されたバックグラウンドデータとの比較が容易である。

薬剤暴露した細胞の遺伝子発現解析データはコントロールと比較して変動した遺伝子群を抽出し、クラスター解析を行った。その結果オメプラゾールとシスプラチン暴露のデータが他の薬剤と異なるグループとなる結果であった。

また、細胞レベルでのメタボノミクス解析に

おいては、NMRが非常に高感度であり、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ている。NMRを用いた薬剤処理細胞のメタボロームデータをPCA解析すると、暴露した薬剤ごとにある程度分離できることがわかった。特にPCA解析を行った時に、遺伝子発現のクラスター解析結果と薬剤の分類が一致していた (図3)。この結果から薬剤暴露した細胞の破碎液によるメタボローム解析が遺伝子発現解析によるトキシコゲノミクスデータを補完するのに有効な方法であるといえる。

D. 結論

D-I NMRを用いたメタボノミクス解析、高感度化技術の開発

APAPのラット肝障害モデルについて¹H-NMRによる尿成分のメタボロミクスを検討した結果、代謝物総体の主成分分析法とNMR SUITEによる代謝物の同定・定量法を併用することによって詳細な解析が可能になることがわかった。本方法を利用してAPAPの影響を解析した結果、エネルギー代謝系に関係するクエン酸、2-オキソグルタル酸やTMAO、馬尿酸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。今後はAPAP以外の肝障害モデルについても本方法を利用したメタボロミクスを実施して、医薬品の安全性評価に有効なバイオマーカーの絞り込みを行う必要が有る。

D-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

D-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:

肝障害の機序あるいは防御の機序の解明、毒性マーカーの検索のため、網羅的遺伝子発現解析等のデータと内在性代謝物の変動を結び付ける解析手法の開発を試みた。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誘発肝障害と胆汁排泄される脂質の代謝異常との関連を考えた。こ

これらの仮説を証明するために脂質動態を変動させることが考えられる、ME3738とprobucoIをLCAと併用して解析を行い、胆汁へ排泄される脂質であるコレステロールやリン脂質の排泄を亢進させる機序が肝障害を軽減させる可能性を示した。網羅的遺伝子発現解析のデータより推測された防御機序を二つの化学物質により検証することに成功した。今後はさらに非侵襲試料を用いたメタボロミクス解析を組み込むことにより毒性マーカー等の検索に発展させていく必要が有る。

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:

本研究はflutamide肝障害誘発の機序を解明するためにin vivo肝障害モデルを構築し、FLU-1 N-OHがタンパク結合を介して肝障害誘発に関与していることを示唆した。また、GSHはGSTsを介してFLU-1 N-OHを還元することでFLU-1 N-OHの解毒代謝に寄与していることを示した。本研究により見出されたFLU-1 N-OHのFLU-1への還元反応はFLU-1 N-OHの重要な解毒代謝機構の一つであると考えられる。本研究はflutamide誘発肝障害において、肝臓でのFLU-1 N-OHの生成増加と肝内GSH枯渇の両方が重要であることを示唆した。

D-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

D-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:

ヒトへの応用が簡便な、尿などの非侵襲試料を用いた新規メタボロミクス高感度安全性予測系の確立を目的として、薬物性肝障害モデルにおける尿および生体成分の質量分析計による解析を実施した。その結果、簡便な前処理後に得た尿の質量スペクトルから、薬物の代謝パターンの変化と共に、肝障害マーカーとの相関性を利用してバイオマーカーを探索する手法を開発した。今後は、得られたバイオマーカー候補の構造を解析し、障害部位における代謝変化と結びつけることで、これらの候補が、肝障害バイオマーカーと成り得るかを検証し、高感度安全性予測系の開発につなげていきたい。

D-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

化学物質の構造修飾が毒性発現に及ぼす影響の解析について、活性酸素消去作用を持ち脳梗塞急性期治療薬として認可されているエダラボンをモデル化合物として選び研究を行った。エダラボンの副作用として知られている腎毒性を軽減する目的で、脂溶性/水溶性を制御する種々の置換基を導入したピラゾロン誘導体を合成し、活性酸素消去能と構造との相関を調べた。その結果、4位にピリジル基を導入したピラゾロン誘導体が、エダラボンに優るすぐれた活性酸素消去能を有していることが明らかになり、構造修飾により毒性が軽減される可能性が示された。

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。cICATを用いた手法により肝毒性物質であるアセトアミノフェン処理したラット尿サンプルを用い、投与により発現減少する数種のペプチドが得られた。これから、肝毒性予測のマーカーとなるかどうかは、普遍性を含め今後検討を加えなければいけないが、LC-MSを用いた高感度な分析によりマーカー候補を検出するまでのストラテジーについてはほぼ確立できたといえ、今後この手法を用いてヒトサンプルを含めた網羅的尿プロテオーム解析へと応用が可能であることが期待できる

D-VII 細胞レベルでのメタボロミクス技術の開発

細胞レベルでのメタボロミクス技術の開発を目的として、THP-1細胞を薬剤処理し遺伝子発現解析データとメタボロミクスデータを比較した。その結果両解析においてオメプラゾールとシスプラチン暴露のデータが他の薬剤と異なるグループとなる結果が得られ、この結果から薬剤暴露した細胞の破碎液によるメタボローム解析が遺伝子発現解析によるトキシコゲノミクスデータを補完するのに有効な方法であると示唆された。

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 (創薬基盤推進研究事業：
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

メタボロミクスを手法とした医薬品の開発・安全性研究における新しい毒性評価法を確立し、毒性学的バイオマーカーを探索することを目的として、APAP によるラット肝障害モデルの尿試料のメタボロミクスを ^1H NMR で実施した。昨年度は主要代謝物の変化を同定・定量用ソフト(NMR SUITE)を用いて解析した結果、APAP 投与によってエネルギー代謝に関係する内因性代謝物の濃度が低下することを明らかにした。今年度は主成分分析法を利用して代謝物総体の変化から毒性評価を実施した。尿の ^1H NMR の全スペクトル領域を Binning したデータシートを主成分分析すると APAP 由来の代謝物 (抱合体) が第 1 主成分軸を特徴づけることがわかった。そこで APAP およびその抱合体のスペクトル領域を省いて主成分分析を行い、APAP 投与による内因性代謝物総体の変化を解析した。スコアプロットによって APAP による影響を反映している主成分軸を明らかにし、さらにローディングプロットによって変化の大きいケミカルシフトを特定し、NMR SUITE によって対応する代謝物の同定を行った。その結果、クエン酸、2-オキシグルタル酸等、エネルギー代謝に関係する代謝物の変動を明らかにできた。これらの代謝物は肝障害のバイオマーカー候補として期待される。また、主成分分析法による網羅的解析を取り入れることによってスペクトルの比較からは見逃してしまう微妙な変化についても読み取ることが可能となり、APAP 投与による代謝物の変化とともに、PB 前処理の影響についても解析できた。以上、 ^1H NMR による尿成分によるメタボロミクスの解析手法を確立し、肝障害のバイオマーカー候補を明らかにすることができた。

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

るいは薬物処置細胞のゲノミクス及びトランスクリプトーム情報の集積が実施されてきた。しかしながら大量のゲノム情報と毒性試験情報からヒト安全性予測を可能にし、ヒトに適用可能な安全性バイオマーカーを開発するには限界があることも明らかになりつつある。今後、安全性マーカーを開発し、非臨床試験におけるヒト安全性予測精度を向上させるため

A. 研究目的

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ることが可能となり、薬物投与実験動物あ

には、トランスクリプトームの下流に存在するオミクス(トキシコメタボロミクス、プロテオミクス)情報に着目し、薬物投与に伴う細胞維持・エネルギー代謝系に関わる内因性物質の代謝変動から毒作用のエンドポイントとして有効な毒性学的バイオマーカーを探索することが必要である。

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。昨年度までに得られた成果として、1) ^1H NMR 専用高感度プローブを装備した NMR を用い、presaturation NOESY のパルスシーケンスを用いて軽水のシグナル消去を行うことにより、ラット尿成分を特別な前処理することなくメタボロミクスに利用可能な ^1H NMR が測定できること、2) 尿の ^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代謝物の同定・定量が可能であること、3) ヒト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および APAP の代謝物の解析を行ったところ、APAP 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 の濃度の低下がみられること、また、PB 前処理によって代謝能を亢進させると、APAP の代謝物の尿中濃度は高くなることが明らかとなった。

今年度は、より精密なメタボロミクス高感度安全性予測系の確立を目的として、APAP 投与ラットの尿中代謝物の解析手法として新たに主成分分析法を導入した。そして、APAP による代謝変動についてさらに詳細な解析を行った。

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%Na₃N₃ 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：600MHz 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 μ l、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 μ l 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, 9615.4Hz spectra width, 5s acquisition time, 96154 number of point, 1s d1, 32 transients

3. NMR の解析

Chemomx 社製 NMR SUITE で尿の NMR スペクトルの 0.5ppm-10.0ppm を 0.04ppm の幅で binning した。binning したテキストファイルは軽水の観測領域 (5.6-6.0ppm) を削除した後、Excel でデータシートに作成し、Umetrix 社製 SIMCA-P+ で主成分分析を行った。なお、APAP 代謝物を含めた主成分分析はデータシートをそのまま使用し、内因性代謝物の主成分分析は APAP およびその代謝物の観測領域をデータシートから削除してから行った。

C. 研究結果

1. 主成分分析法を用いた内因性代謝物の解析

APAP を 500mg/kg および 800mg/kg 投与したラット尿の ¹H NMR を測定して、APAP 投与による内因性代謝物の変動について解析を行った。また、フェノバルビタール(PB)を 100mg/kg 前処理して代謝活性を亢進させたラットについても同様の解析を行い、PB の影響について検討を行った。代表的なスペクトルを図 1 に示す。今回は得られた尿の ¹H NMR スペクトルについて主成分分析による解析を行うため、まず ¹H NMR のスペクトル

を NMR SUITE 上で binning(バケット積分)を行い、0.04ppm 毎の積分値とピークエリアリストを作成した。次にそして多変量解析ソフト(SIMCA-P+)を利用して本データの主成分分析を実施した。なお、主成分分析は APAP 未変化体および APAP 代謝物の影響を除く為、これらのピークエリアは全て削除してから行った。各試料の変化を第 1 主成分と第 2 主成分で表したスコアプロットを図 2 に、また、主成分軸の固有スペクトルに対応するローディングプロットを図 3 に示す。スコアプロットより、APAP と PB の影響は第 1 主成分と第 2 主成分によるクラスタリングで解析が可能となり、PB 非投与群の第 1 主成分は APAP 投与によって変化し、特に 800mg/kg 投与群のクラスターは APAP 非投与群から大きくシフトすることがわかった。また、同様の傾向は PB 投与群でもみられた。一方、第 2 主成分には APAP 投与による変化はみられないことから、APAP による影響は第 1 主成分に特徴づけられることがわかった。次にローディングプロットから第 1 主成分が大きく変化しているスペクトル領域を特定し、NMR SUITE によって対応する内因性代謝物を同定した。その結果、第 1 主成分に大きな変動がみられた 2.70, 2.58ppm はクエン酸、2.42, 2.98, 3.02ppm は 2-オキシグルタル酸、3.94, 3.98, 7.54, 7.62, 7.82ppm は馬尿酸、3.02, 4.06ppm はクレアチニン、3.26ppm は TMAO、5.38, 6.06ppm はアラントインであることがわかった。また、これらの領域について試料毎の積分値変化をトレンドプロットで解析してみた。第一主成分が大きくプラス方向にシフトしているこれらの内因性代謝物濃度は、図 4 に示すように APAP500mg 投与群で低下がみ

られ、800mg 投与群ではさらに低下することがわかった。

APAP の影響は第 1 主成分に特徴的に現れるのに対して、PB 前処理の影響は、APAP 非投与群の場合、第 1 主成分と第 2 主成分共に現れ、PB 投与群と非投与群では異なるクラスターを形成した。一方、APAP 投与群での PB の影響は、第 1 主成分には現れず、第 2 主成分のみ変化が見られた。そこで、まず第 1 主成分が大きく変化している代謝物のトレンドプロットから、PB 前処理の影響を APAP 非投与群と比較してみた。その結果、クエン酸、2-オキソグルタル酸および 3.5-4.0ppm のグルコン酸・グルコース領域が PB 処理によって増加することがわかった。一方、第 2 主成分が大きく変化しているスペクトル領域は、ローディングプロットから 3.42ppm であることがわかった。NMR SUITE より 3.42ppm の内因性代謝物はタウリンであることがわかり、さらに、トレンドプロットにより、タウリンは PB 投与群にのみ増加していることがわかった。

2. 主成分分析法を用いた APAP 代謝物の解析

APAP 投与したラット尿のスペクトルには、内因性代謝物と共に APAP の硫酸抱合体、グルクロン酸抱合体、メルカプツール酸抱合体および APAP 未変化体が確認される。そこで、これらのスペクトルのピークを含む 0.5ppm-10.0ppm を 0.4ppm の範囲で Binning したデータについて主成分分析を実施した。その結果、図 5 に示すように、全試料は第 1 主成分と第 2 主成分によってクラスタリングできることがわかった。このうち第 1 主成分は APAP 投与によって大きく変化し、

APAP500mg よりも 800mg 投与の方が大きくシフトした。一方、第 2 主成分は、APAP 非投与群では PB 前処理と非処理では明らかに異なって別のクラスターを形成しているが、APAP 投与群では第 2 主成分に大きなばらつきがみられ、PB の影響を第 2 主成分で特徴づけることはできなかった。次にローディングプロットにより第 1 主成分の変化に対応するスペクトル領域について調べた。その結果、図 6 に示すように、3.62, 3.9, 7.1, 7.14, 7.34 ppm はグルクロン酸抱合体、7.30, 7.42ppm は硫酸抱合体、6.94, 7.22 はメルカプツール酸抱合体、6.86, 6.9ppm は APAP 未変化体、2.14, 2.18ppm は抱合体および APAP 未変化体の N-アセチル基であることがわかった。そこで、これらのピークについて試料毎の変化をトレンドプロットで調べた。その結果、図 7 に示すように、第 2 主成分に大きな変化がみられたグルクロン酸抱合体のピーク強度は APAP 投与量の増加とともに大きくなり、APAP800mg 投与では尿中にグルクロン酸抱合体が大量に含まれていることがわかった。また、硫酸抱合体は、APAP500mg 投与と 800mg 投与では殆ど尿中排泄量が変わらないことがわかった。一方、APAP 未変化体は、APAP の投与量と共に増加しているが、未変化体の濃度は PB 前処理によって薬物代謝活性を増加させると低下することがわかった。

D. 考察

メタボロミクスの分析手法として代表的な質量分析法は代謝物総体に基づくパターンの高感度解析が可能であり、得られたデータを主成分分析することによって薬物刺激に対する応答の詳細な解析が

可能である。しかしながら質量情報からは低分子化合物を主体とする内因性代謝物の同定は困難な場合が多く、主成分軸によるスコアプロットから毒性を特徴付ける軸が明らかになっても、そこから質量数に由来する代謝物の同定は殆ど行われていない。¹H NMR の場合は、個々の代謝物を同定できるプロトンのケミカルシフトが化合物情報として得られるが、代謝物総体としての尿のスペクトルから個々の代謝物を特定するのは難しく、質量分析法と同様、スペクトルパターンによる主成分分析が主流として行われている。しかしながら近年、Chenomx 社が開発した NMR SUITE は、200 種類以上の内因性代謝物の NMR データベースを利用した生体成分からの代謝物解析用のソフトウェアであり、これを利用することによって尿中の代謝物の同定・定量が可能となった。そこでメタボロミクスによる毒性評価手法の開発とバイオマーカーの特定に本ソフトウェアの利用を試み、昨年度は APAP のラット肝障害モデルの尿の ¹H NMR スペクトルについて主要なピークの同定・定量を行い、APAP 投与によってクエン酸、2-オキシグルタル酸、フマル酸、馬尿酸、TMAO が顕著に減少することを明らかにした。この結果は Nicholson らによって報告された、肝障害物質ヒドラジン投与で減少する尿中代謝物と一致することから、本方法がメタボロミクスの分析手法として有効であることがわかった。しかしながら NMR SUITE を利用したメタボロミクスでは主要代謝物の同定・定量に限定されてしまう為、複雑な ¹H NMR スペクトルから微量代謝物を解析することは難しく、代謝物総体の変化を評価することはできない。実際、NMR SUITE での解析では PB

による前処理の影響を明らかにすることはできなかった。そこで、今年度はデータ解析に主成分分析法を取り入れることによって、¹H NMR で測定可能な全ての代謝物についてクラスタリングを行い、APAP および PB による影響を特徴づける軸を明らかにした。さらに、ローディングプロットによって変化がみられるピーク領域については NMR SUITE を利用して代謝物構造を明らかにした。なお、APAP 投与尿の ¹H NMR スペクトルには APAP 由来の代謝物のピークも観測される為、内因性代謝物を主成分分析する場合は APAP およびその抱合体のピークを省いたデータシートを作成して行った。その結果、APAP 投与の影響は第 1 主成分軸に現れ、大きく変化しているピーク領域は昨年度明らかにした代謝物と同様であることが確認された。この結果より、APAP 投与ラットではクエン酸や 2-オキシグルタル酸などが関係しているエネルギー代謝系が抑制されていることが明らかとなった。

今回、主成分分析を行うことにより、新たに PB の影響を明らかにすることができた。特に APAP 非投与群では、PB の影響は第 1 および第 2 主成分に明らかに現れ、PB 非処理群とは異なるクラスターを形成した。また、ローディングプロットにより第 1 主成分軸はクエン酸、2-オキシグルタル酸、およびグルコース領域の増加、第 2 主成分軸はタウリンの増加に特徴づけられることが明らかとなった。一方、APAP 投与群では、PB の影響は第 2 主成分に現れたが、第 1 主成分には明確な差はみられなかった。

APAP 投与群の ¹H NMR スペクトルからは APAP の未変化体および抱合体が観測される。その為、binning したデータシ

ートからこれらのピークを省かずに主成分分析を行うと、APAP の未変化体および抱合体の変化が第 1 主成分軸を特徴付けることがわかった。一方、第 2 主成分軸は APAP 非投与群ではスコアプロットに大きな差がみられ PB 前処理と非処理では異なるクラスターを形成した。一方、APAP 投与群では第 2 主成分に大きなばらつきがみられた。この結果より第 2 主成分は APAP の代謝物には関係なく、PB の影響を反映していることが示された。実際、ローディングプロットではタウリンの変化が第 2 主成分軸に特徴づけられることがわかった。

以上、主成分分析法は NMR のシグナル変化をパターン認識で解析する大変有効な手法であり、APAP による内因性代謝物総体の変化をスコアプロットによってクラスタリングすることが可能となった。また、APAP による影響を反映している主成分軸については、ローディングプロットによって変化の大きいケミカルシフトを特定した後、NMR SUITE によって対応する代謝物を明らかにすることができた。主成分分析法による網羅的解析法を取り入れることによってスペクトルの比較からは見逃してしまう微妙な変化についても読み取ることが可能となり、APAP 投与による代謝物の変化のみならず、PB 前処理の影響についても解析できることがわかった。今後は APAP 以外の肝障害モデルについてもバイオマーカー候補の探索を行い、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。また、尿以外の非侵襲試料についてもメタボロミクスを実施することによって、毒性評価におけるメタボロミクスの可能性と有用性について検討を行う予定である。

E. 結論

トキシコゲノミクス、トキシコプロテオミクスの下流に位置するメタボロミクスは生体反応の変化として代謝物の全体像を捉え、代謝物のプロファイルの統計解析から毒性予測や毒性バイオマーカーの同定などが可能となることから医薬品の開発・安全性研究の初期段階における有力な毒性評価手法と考えられる。メタボロミクスによる解析を ^1H NMR で行う場合、得られたスペクトルから代謝物総体の変化および個々の代謝物の同定・定量に関する情報を効率よく得ることが要求される。本研究では presaturation NOESY のパルスシーケンスを用いて軽水のシグナルを消去した尿の ^1H NMR スペクトルについてメタボロミクスの解析法の検討を行った。その結果、主成分分析法によるクラスタリングがシグナル変化をパターン認識として解析し、代謝物総体の変化を明らかにする有効な手法であることがわかった。さらに主成分分析法によって明らかになった毒性を特徴づける主成分軸については、ローディングプロットで大きな変化がみられるシグナルを NMR SUITE で解析することによって代謝物の同定・定量が可能となることがわかった。本手法を利用して、APAP のラット肝障害モデルの尿のメタボロミクスを行ったところ、エネルギー代謝系からの内因性代謝産物が肝障害のバイオマーカー候補として有効であ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 による尿成分によるメタボロミクスの解析手法を確立し、肝障害のバイオマーカー候補を明らかにすることができた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) R. Shimazawa, N. Nagai, S. Toyoshima, H. Okuda, Present sate of new chiral drug development and review in Japan, *J. Health Sciences*, **54**, 23-29 (2008).

2) K. Fukuhara, I. Nakanishi, A. Matsuoka, T. Matsumura, S. Honda, M. Hayashi, T. Ozawa, N. Miyata, S. Saito, N. Ikota, H. Okuda, Effect of methyl substitution on antioxidative property and genotoxicity of resveratrol, *Chem. Res. Toxicol.*, **21**, 282-287 (2008).

3) S. Manda, I. Nakanishi, K. Ohkubo, Y. Uto, T. Kawashima, K. Fukuhara, H. Okuda, H. Hori, T. Ozawa, N. Ikota, S. Fukuzumi, and K. Anzai, Enhanced radical-scavenging activity of naturally-oriented Artepillin C Derivatives, *Chem. Commun.*, 626-628 (2008).

4) I. Nakanishi, T. Shimada, K. Ohkubo, T. Shimizu, S. Urano, H. Okuda, N. Miyata, T. Ozawa, K. Anzai, S. Fukuzumi, N. Ikota, K. Fukuhara, Involvement of electron transfer in the radical-scavenging reaction of resveratrol, *Chem. Lett.*, **36**, 1276-1277 (2007).

5) 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.* **15**, 3869-3873 (2007).

2. 学会発表

1) 中西郁夫, 島田知一, 大久保 敬, Sushma Manda, 清水健彦, 浦野四郎, 奥田晴宏, 宮田直樹, 小澤俊彦, 安西和紀, 福住俊一,

伊古田暢夫, 福原 潔, プロトン共役電子移動を経由するレスベラトロールのラジカル消去反応, 日本薬学会第 128 年会, 横浜 (2008, 3).

2) 福原 潔, 中西郁夫, 大久保 敬, 深井直樹, 小澤俊彦, 宮田直樹, 浦野四郎, 福住俊一, 安西和紀, 奥田晴宏, リジン側鎖を有する平面型カテキン誘導体の合成とラジカル消去活性, 日本薬学会第 128 年会, 横浜 (2008, 3).

3) I. Nakanishi, K. Ohkubo, K. Miyazaki, S. Urano, H. Okuda, N. Ikota, K. Anzai, S. Fukuzumi, T. Ozawa, and K. Fukuhara, Structure-Activity Relationships in the Radical-Scavenging Reaction of Polyphenolic Flavones, Oxygen Club of California 2008 World Congress, California, USA (2008,3).

4) 福原 潔, 及川伸二, 今井耕平, 正田卓司, 中村朝夫, 川西正祐, 奥田晴宏, 新しい光線力学療法剤の開発研究, 日本酸化ストレス学会関東支部会, 東京 (2007, 12).

5) K. Fukuhara, I. Nakanishi, A. Matsuoka, T. Ozawa, N. Miyata, N. Ikota, and H. Okuda, Effect of Methyl Substitution of Antioxidative Properties and Genotoxicity of Resveratrol, International Conference on Food Factors for Health Promotion (ICoFF2007), Kyoto, (2007,12).

6) T. Kawashima, I. Nakanishi, K. Ohkubo, S. Manda, K. Fukuhara, H. Okuda, T. Ozawa, N. Ikota, K. Anzai, and S. Fukuzumi, Effects of Interaction between Curcumin and Metal Ions on the Radical-Scavenging Reaction, The 4th Joint Meeting of the Society for Free Radical Research Australasia and Japan 2007 (SFRR A+J 2007), Kyoto, (2007,12).

7) 福原 潔, 中西郁夫, 松岡厚子, 小澤俊彦, 伊古田暢夫, 宮田直樹, 奥田晴宏, 抗酸化成分レスベラトロールのラジカル消去活性の増強と遺伝毒性の軽減, 第 40 回酸化反応

討論会, 奈良(2007, 11).

- 8) K. Fukuhara, I. Nakanishi, M. Obara, K. Ohkubo, T. Kawashima, T. Ozawa, N. Ikota, K. Anzai, S. Fukuzumi, N. Miyata, S. Saito, and H. Okuda, Intramolecular Base-Accelerated Radical-Scavenging Reaction of a Planar Catechin Derivative Having a Lysine Moiety, 14th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine (SFRBM), Washington, D.C., USA, (2007,11).
- 9) I. Nakanishi, T. Shimada, K. Ohkubo, S. Manda, S. Urano, H. Okuda, N. Miyata, T. Ozawa, K. Anzai, S. Fukuzumi, N. Ikota, and K. Fukuhara, Electron-Transfer Mechanism in the Radical-Scavenging Reaction of Resveratrol, 14th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine (SFRBM), Washington, D.C., USA, (2007,11).
- 10) 福原 潔、中西郁夫、小原美紀、大久保敬、川島知憲、小澤俊彦、伊古田暢夫、安西和紀、福住俊一、宮田直樹、斎藤慎一、奥田晴宏、分子内にリジン部位を有する平面型カテキン誘導体のラジカル消去反応, 第22回生体機能関連化学シンポジウム、東北、(2007, 9).
- 11) 福原 潔、及川伸二、箱田奈南、平工雄介、正田卓司、宮田直樹、川西正祐、奥田晴宏、光線力学療法剤の開発: 9-ニトロアントラセン誘導体からのアントラキノンの生成と DNA 切断反応, 第29回日本光医学・光生物学会、富山(2007, 7).
- 12) 川島知憲、中西郁夫、大久保 敬、Sushma Manda、福原 潔、奥田晴宏、小澤俊彦、伊古田暢夫、安西和紀。福住俊一、クルクミンによるラジカル消去反応における生体関連金属イオンの効果, 第17回金属の関与する生体関連反応シンポジウム(SRM2007), 京都(2007, 6).
- 13) 中西郁夫、大久保 敬、宇都義浩、川島知憲、Sushma Manda、福原 潔、奥田晴宏、堀 均、伊古田暢夫、福住俊一、安西和紀、小澤俊彦、天然フェノール性抗酸化物質を基本骨格にした新規抗酸化物質の開発, 第7回 AOB(Antioxidant Biofactor)研究会、台大醫院国際會議中心(2007, 6).
- 14) 福原 潔、及川伸二、箱田奈南、平工雄介、正田卓司、宮田直樹、川西正祐、奥田晴宏、新しい光線力学療法剤の開発: 光照射下における 9-ニトロアントラセン誘導体の DNA 切断反応, 第29回日本フリーラジカル学会学術集会、日本過酸化脂質・フリーラジカル学会第31回大会合同学会、名古屋(2007, 6).
- 15) 福原 潔、中西郁夫、松岡厚子、小澤俊彦、伊古田暢夫、宮田直樹、奥田晴宏、レスベラトロールをテンプレートとした新規抗酸化剤の開発, 第29回日本フリーラジカル学会学術集会、日本過酸化脂質・フリーラジカル学会第31回大会合同学会、名古屋(2007, 6).

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

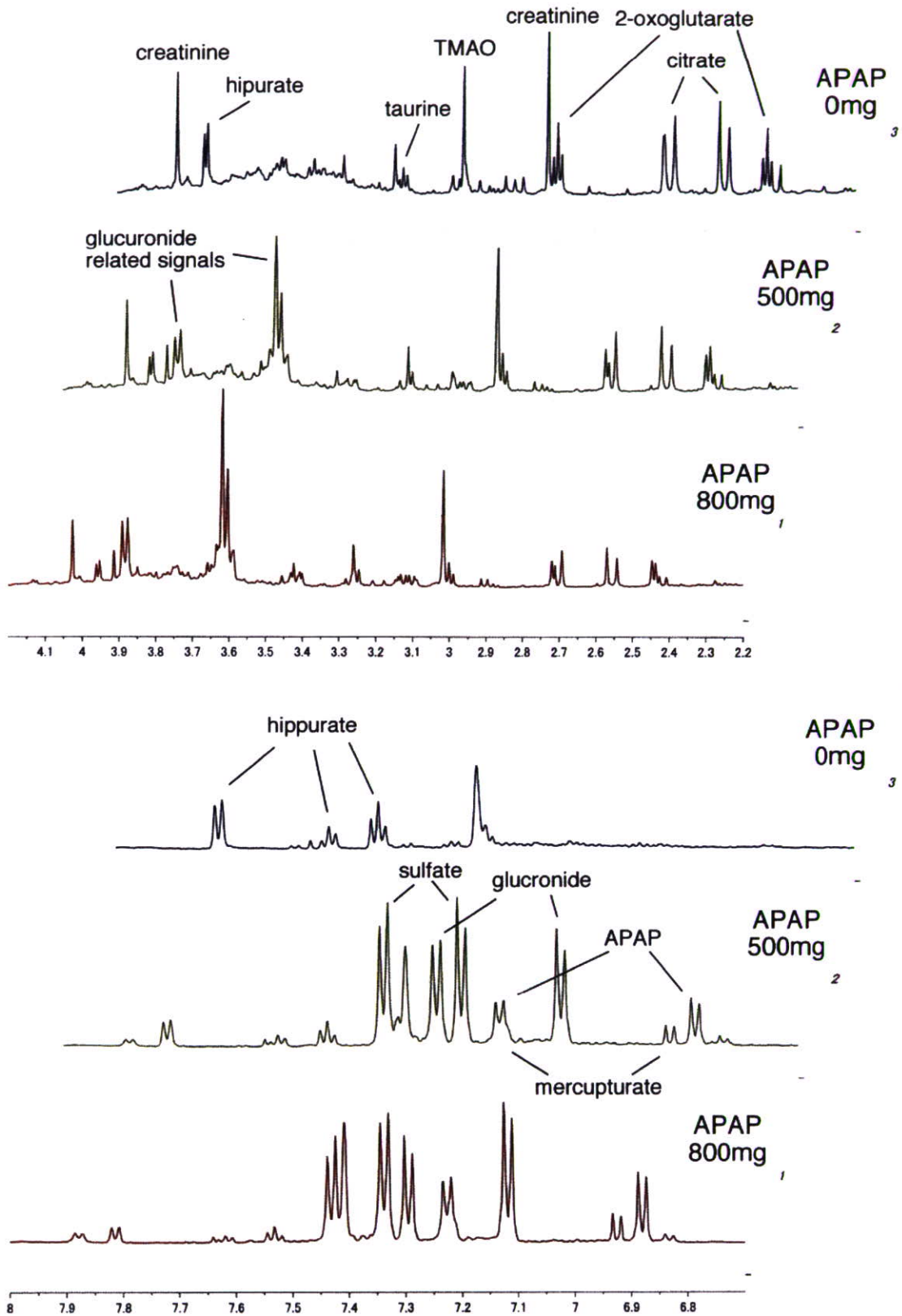


図 1-1. PB 非処理、APAP 投与ラット尿の ¹H NMR スペクトル

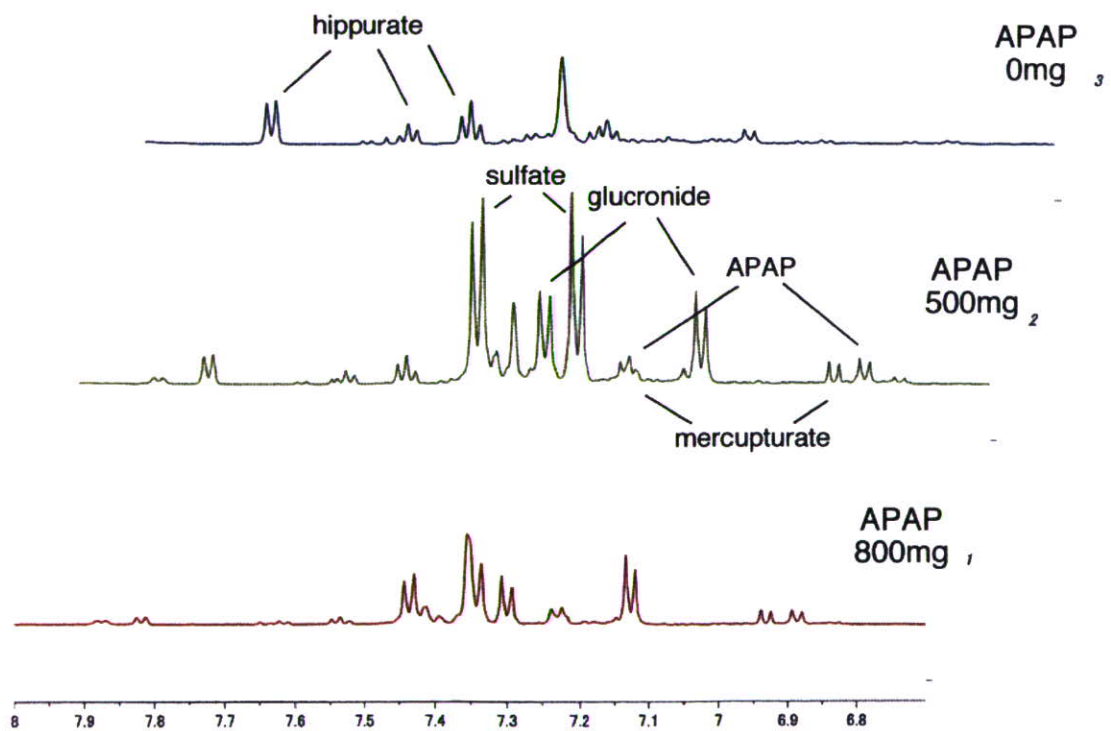
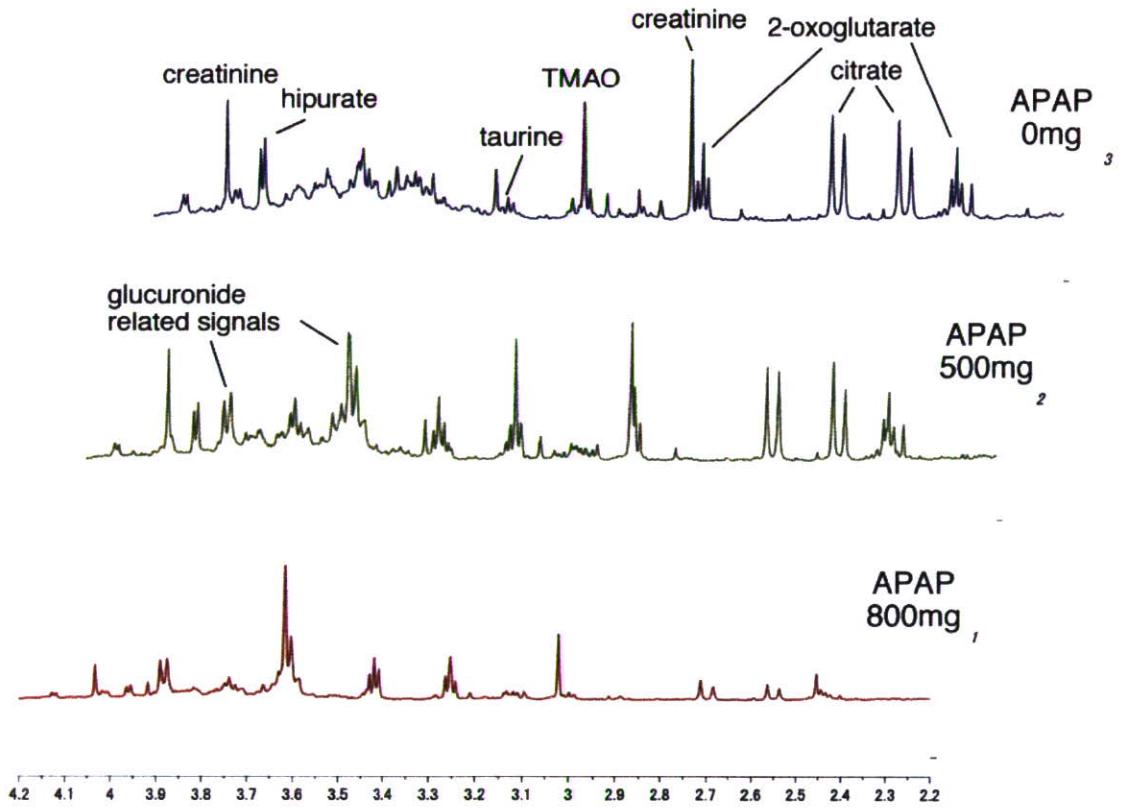


図 1-2. 100mg/kgPB 前処理、APAP 投与ラット尿の ^1H NMR スペクトル