

析法)により行った。

ヒューマン・メタボローム・テクノロジー社によるメタボローム解析は、同社が有する約 900 の代謝物質の精密質量と移動時間が登録された代謝物質ライブラリを使用し、試料中から検出されたピークのうち、ライブラリサーチによりアノテーションがついた代謝物質を解析対象とする。そのため、一度の測定で最大約 900 の代謝物質が存在量とともに同定できる。代謝物質ライブラリは主要代謝経路の代謝物質の大部分を網羅しているため、各代謝物質の存在量だけでなく、代謝マップに基づく解析が可能である。

送付された培養細胞 12 検体について CE-TOFMS のカチオンモード、アニオンモードによる測定が実施された。測定系結果について、ヒューマン・メタボローム・テクノロジー社代謝物質データベースに登録された物質を対象として解析を行った結果、217 (カチオン 99, アニオン 118) のピークが検出された。候補化合物が絞り込まれた代謝物質を Table 2 に示す。

全測定結果を用い、各サンプルを代謝産物の相対的存在量によりクラス分けした。統計解析は階層的クラスタリングと主成分分析によった。解析結果を Fig. 6、7 に示す。

階層的クラスタリング (Fig. 6) は、胎児肝細胞に由来する 3 種のサンプル、胎児肝細胞の単層培養、肝芽細胞の単層培養、肝芽細胞のスフェロイド培養が、それぞれレプリカサンプル (n=3) 間で再現性の良い測定値を与えたことを示していた。成人肝細胞由来のサンプルは階層的クラスタリングで、レプリカ間で近似したパターンを示してはいるが、胎児肝細胞由来サンプルと比較するとばらつきが大きかった。

主成分分析の結果 (Fig. 7) は階層的クラスタリングの結果を反映していた。Fig. 7 では、第 1 主成分と第 2 主成分を用い各サンプルを群分けした。その結果、胎児肝細胞の単層培養、肝芽細胞の単層培養、肝芽細胞のスフェロイド培養は各レプリカサンプルが非常に近傍にプロットされた。また、成人肝細胞由来のサンプルはレプリカ間でばらつきが大きかったが、これはサンプルの由来するドナーの個人差を反映すると考えられる。

Fig. 4 に示す薬物代謝酵素の活性から判断すると、胎児肝細胞を肝芽細胞、さらにそのスフェロイド培養としていくに従い、成人肝

細胞に近い細胞機能を発現する様分化誘導される。

そこで胎児肝細胞、肝芽細胞の単層培養、肝芽細胞の単層培養、肝芽細胞のスフェロイド培養、成人肝細胞の順で存在量に変化する代謝物質を抽出した。具体的には、上記培養の 4 条件を 1 から 4 までランク付けし、各代謝物質の存在量との相関係数を求め、無相関検定を行い有意水準が 0.05 以下の代謝物質を選定した。その結果、72 の代謝物質を選定された。その 72 の代謝物質の測定値をもとに行った主成分分析の結果を Fig. 8 に示す。各サンプルの分離を比較すると第一主成分で胎児肝細胞の単層培養→肝芽細胞の単層培養→肝芽細胞のスフェロイド培養→成人肝細胞の序列を持って分離されていた (Fig. 8 下段)。そこで、72 の代謝産物を第一主成分における因子負荷量をもとに序列化した。その序列において上位 10 位までの代謝物質と下位 10 位までの代謝物質の各サンプルにおける相対的発現量を Fig. 9 に示した。その結果、因子負荷量の絶対値が大きい代謝産物には、cysteine、taurine、glucuronic acid、urea、ornithine などが含まれていた。

次に、測定結果の代謝経路の観点からの解析を試みた。まず、候補化合物が絞り込まれた代謝物質を解糖系/糖新生、ペントースリン酸経路、クエン酸回路、尿素回路、プリン代謝経路、ピリミジン代謝経路、ニコチン酸・ニコチンアミド代謝経路及び各種アミノ酸代謝経路に描画した。結果の全体図を Fig. 10 に示す。

Fig. 8 の主成分分析で因子負荷量の絶対値が大きかった代謝物質について、代謝経路との関係を調べたところ、システインの代謝経路 (Fig. 11) とオルニチン回路 (Fig. 12) に複数の代謝物質が含まれていた。

システインに関しては、代謝物質の 1×10^6 細胞あたりの絶対量を測定した。

胎児肝細胞 (単層培養)	: 9 pmol/ 10^6 cells
肝芽細胞 (単層培養)	: 13 pmol/ 10^6 cells
肝芽細胞 (スフェロイド)	: 18 pmol/ 10^6 cells
成人肝細胞	: 589 pmol/ 10^6 cells

成人肝細胞にはシステインが非常に多量にプールされていた。

D. 考察

ヒト胎児肝細胞の培養、並びに、それを分

化誘導したヒト肝芽細胞の平面培養とスフェロイド培養を行った (Figs. 1,2,3)。各培養条件で培養した細胞の CYP3A4 活性を測定すると、胎児肝細胞 (単層培養) →肝芽細胞 (単層培養) →肝芽細胞の三次元培養と、徐々に活性が増大していた (Fig. 4)。また、それらの比較対照とするためにヒト成人肝細胞について、非凍結の初代培養細胞を3ドナー分入手し培養した (Fig. 5)。一定期間培養後、それぞれからメタボローム解析用サンプルを調製した。ヒト成人肝細胞は、初代培養のため、同一のドナーサンプルから、ゲノミクス解析用と microRNA 解析用の RNA とメチル化解析用のゲノム DNA を合わせて調整した。これらサンプルの解析は、胎児細胞サンプルの調製と合わせて次年度以降行う予定である。

メタボローム解析用サンプル (Table 1) については、ヒューマンメタボローム社にて、同社の有する CE-TOFMS 装置を用いて代謝物質の測定を行った。測定結果について、同社の化合物データ物データベースと比較対照することで、代謝物質の同定と化合物量の半定量を行った。

得られた定量結果をもとに、代謝物質を階層的クラスタリング (Fig. 6) すると、各培養条件におけるレプリカサンプル間で代謝物質の存在量の再現性が高いことが示された。この結果は主成分分析 (Fig. 7) でも示された。いずれの解析でもヒト成人肝細胞サンプルで比較的大きなばらつきが認められるが、これは、ヒト成人肝細胞サンプルが初代培養サンプルであり、各サンプルが異なるドナーに由来することによる個人差を反映した結果と考えられる。

Fig. 7 の主成分分析においては、各サンプル間で関連性が認められなかった。しかしながら、Fig. 4 に示す薬物代謝酵素の活性から判断すると、胎児肝細胞を肝芽細胞、さらにそのスフェロイド培養としていくに従い、成人肝細胞に近い細胞機能を発現する様分化誘導されると推測される。そこで、胎児肝細胞、肝芽細胞の単層培養、肝芽細胞の単層培養、肝芽細胞のスフェロイド培養、成人肝細胞の順で存在量に変化する代謝物質を抽出した。その結果、72 の代謝物質が選定されたので、それらを用いて、再度主成分分析を行った (Fig. 8)。得られた主成分のうち、特に第1主成分で各サンプルをプロットする

と、胎児肝細胞の単層培養→肝芽細胞の単層培養→肝芽細胞のスフェロイド培養→成人肝細胞の序列を持って分離されていた (Fig. 8 下段)。72 の代謝産物を第一主成分における因子負荷量をもとに序列化すると、その序列における上位10位および下位10位までの代謝物質の相対的発現量は分化の進行に伴い増加または減少していた (Fig. 9)。同様の傾向を示す化合物には urea、ornithine、cysteine、taurine、glucuronic acid (data not shown) があつた。

測定により半定量された化合物について既知の代謝経路図に描画した (Fig. 10)。結果を検討すると、Fig. 8 の主成分分析で第1主成分における因子負荷量の序列で上位にあつた cysteine、taurine、glucuronic acid はシステインを中心とする代謝経路 (Fig. 11)、urea、ornithine はオルニチン回路 (Fig. 12) に含まれていた。

システインは成人肝細胞で 10^6 細胞あたり 589 pmol と非常に高く蓄積されていた。システインの細胞内濃度は、アミノ酸の中でも最も低いとされており、ヒト肝癌由来培養細胞 HepG2 における測定値は 10^6 細胞あたり 45 pmol であり、それと比較しても存在量が高いことがわかる。

システインからはタウリンが生合成されることが知られているが、その生合成過程にある cysteinsulfinic acid は同様の傾向を示すにもかかわらず、その下流にある taurine はヒト成人肝細胞で存在量が最も低かつた。この結果は、ヒト成人肝細胞では taurine に至る生合成の活性が下がっているか、taurine の消費が生合成を上回っているか、の二つの解釈が可能である。taurine は肝臓において、cholic acid と結合することで胆汁酸の一つである taurocholic acid となる。今回の測定では taurocholic acid は検出できなかったが、同じく胆汁酸に含まれる glycocholic acid (Fig. 11 中青枠で示す) の生合成はヒト成人肝細胞で最も高かつた。このことより、taurine に関しても、多くが taurocholic acid の生合成に用いられている可能性が高いと考えられる。今回の結果は、胎児肝細胞由来の細胞では、成人肝細胞に比べ胆汁酸の生合成が低いことを示唆している。既に、2才以前の正常乳児の十二指腸液総胆汁酸値は2才以降のそれより低値を示すとの報告 (小田原ら、1976、調剤指針 日本薬剤師会編) もあり、胆汁酸合

成においては、胎児肝細胞は胎児・新生児期の肝機能を反映していると考えられた。

また、出生時における化学物質代謝の第二相反応については、出生時には硫酸抱合及びグリシン抱合は成人とほぼ同等の活性が認められるがグルクロン酸抱合能は低いことが知られている（調剤指針 日本薬剤師会編）。今回の測定結果でも、gulcoronic acid は成人肝細胞のみで検出されており（data not shown）、胎児肝細胞においてはグルクロン酸抱合能が低いことが予測され、この点においても胎児肝細胞は胎児・新生児期の肝機能を反映していると考えられた。

一方、オルニチン回路の中間体がヒト成人肝細胞で増加傾向にあった（Fig. 12）。オルニチン回路はアミノ酸の代謝の過程で遊離してきたアンモニアを尿素に変えて無毒化する代謝経路である。この回路が活性化されているということは、成人肝細胞ではアンモニア代謝が盛んに行われていることを示していると考えられる。このことは、オルニチン回路の反応の律速段階であるアンモニアと炭酸からカルバモイルリン酸を生成する反応を触媒する酵素であるカルバモイルリン酸シンターゼIをアロステリックに活性化する N-acetyl glucuronic acid が成人肝細胞で存在量が高い（Fig. 12 中青枠で示す）ことから支持されると考える。本経路の活性化についての意義は現時点では不明であるが、胎児・新生児期の肝機能を成人と区別する特徴なのかもしれない。

以上の知見は、これらの代謝回路により解毒化される化学物質に対して、胎児肝細胞に由来する系では成人肝細胞に比べ解毒活性が低いことが予測され、より低濃度の暴露で細胞毒性が発現することが予想される。今後は、胎児において肝細胞毒性が高い化学物質を用い、この予測が本系で再現されるかの検討が必要と考える。

E. 結論

本年度はヒト胎児肝細胞の単層培養とそれを分化誘導した肝芽細胞の単層培養、肝芽細胞のスフェロイド培養、および、ヒト成人肝細胞の4種の *in vitro* 培養系より、メタボローム用サンプル、ゲノミクス用サンプル、エピゲノム解析用サンプルを調製した。

そのうち、メタボローム用サンプルを用いて、メタボローム解析を行った。

本年度の解析から、今回用いた4種の *in vitro* 培養系において、胎児肝細胞由来の細胞では、成人肝細胞に比べ胆汁酸の生合成が低いこと、グルクロン酸抱合能が低いことを示唆する結果を得た。この結果は、過去の知見と一致していた。

また、成人肝細胞においてオルニチン回路の活性化が認められた。

これらは、今回用いた4種の *in vitro* 培養系を特徴づけるものと考えられる。今後は、これらの解析結果に関して、*in vivo* での報告と一致するか、また、化学物質の胎児・新生児期における毒性発現の知見と一致するかの検討を行い、本系が *in vitro* 毒性評価系として有用性の検討を行う必要があると考える。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) Tamaki Hori¹, Takashi Kubo¹, Atsuko Miyajima¹, Momoko Sunouchi¹, Ken Nakazawa¹, Yuko Sekino¹, Shogo Ozawa, Fabrice Morel, Anne Corlu and Seiichi Ishida¹
EFFECTS OF A NEWLY DEVELOPED 3D-CELL CULTURE VESSEL ON DRUG METABOLISM-RELATED GENE EXPRESSIONS IN HepaRG CELLS, 第25回日本薬物動態学会年会 (2010,10)

2) 石田誠一
医薬品の安全性・毒性研究への幹細胞の応用 — ガイドライン案作成への取り組み、日本動物実験代替法学会、第23回大会 (2010,12)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

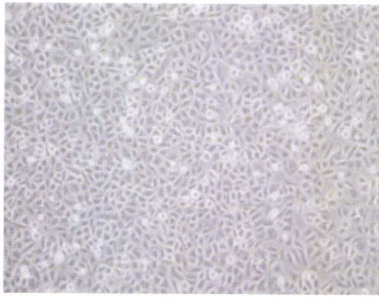


Fig. 1 胎児肝細胞

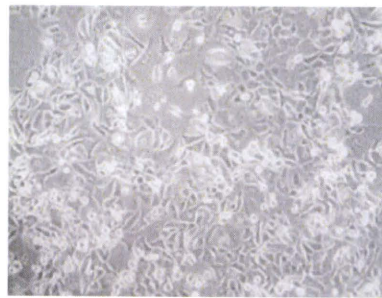


Fig. 2 肝芽細胞
(単層培養)

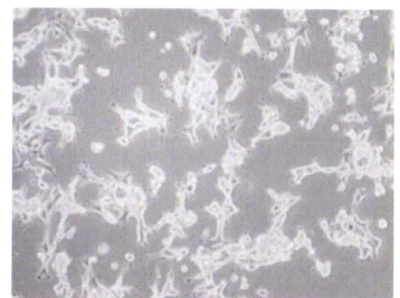


Fig. 3 肝芽細胞
(スフェロイド)

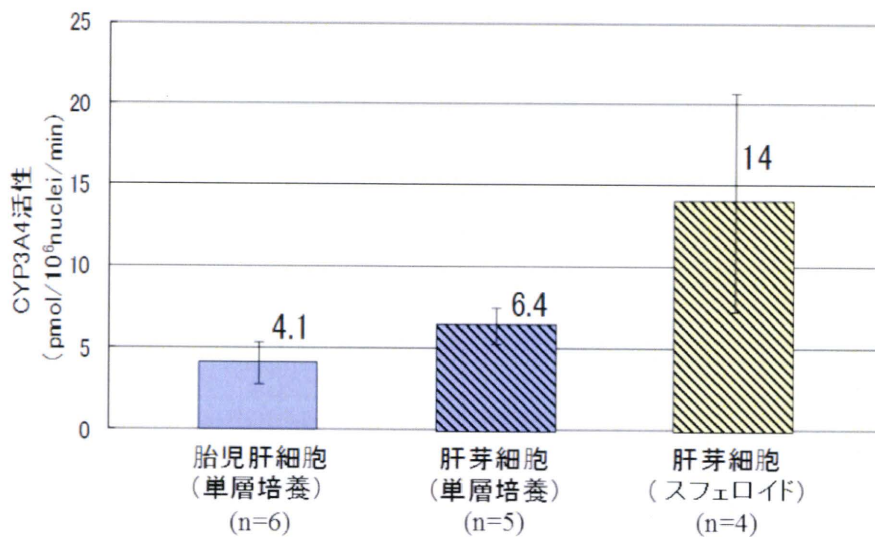


Fig. 4 各々の細胞のCYP3A4活性の比較



HEP220523

Age: 81
Sex: Male
Ethnicity: Unknown
Liver pathology:
Hepatocellular carcinoma



HEP220524

Age: 66
Sex: Male
Ethnicity: Unknown
Liver pathology:
Hepatic metastases



HEP220527

Age: 62
Sex: Female
Ethnicity: Caucasian
Liver pathology:
Hepatocellular carcinoma

Fig. 5 BIOPREDIC社 非凍結肝細胞の顕微鏡像

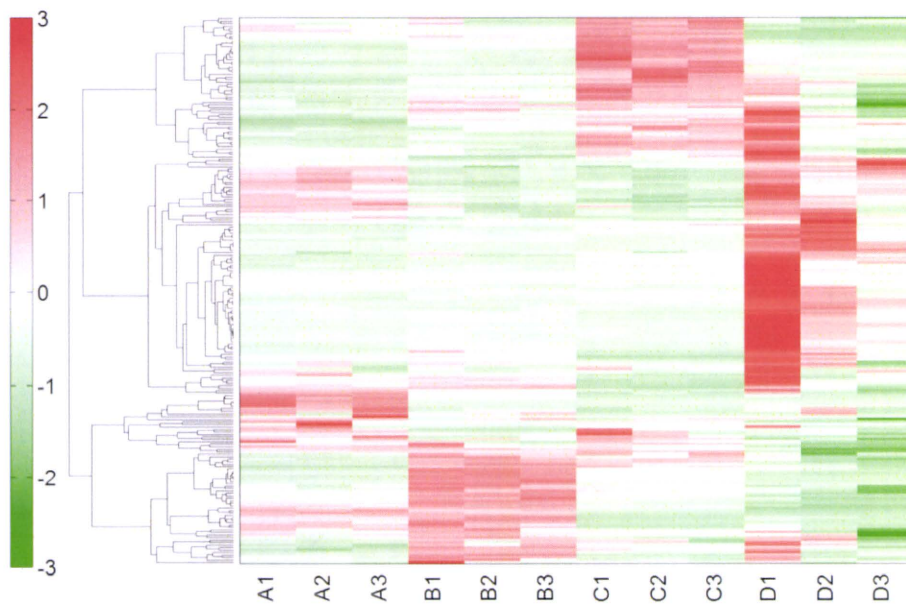


Fig. 6 全測定結果を用いた階層的クラスタリング

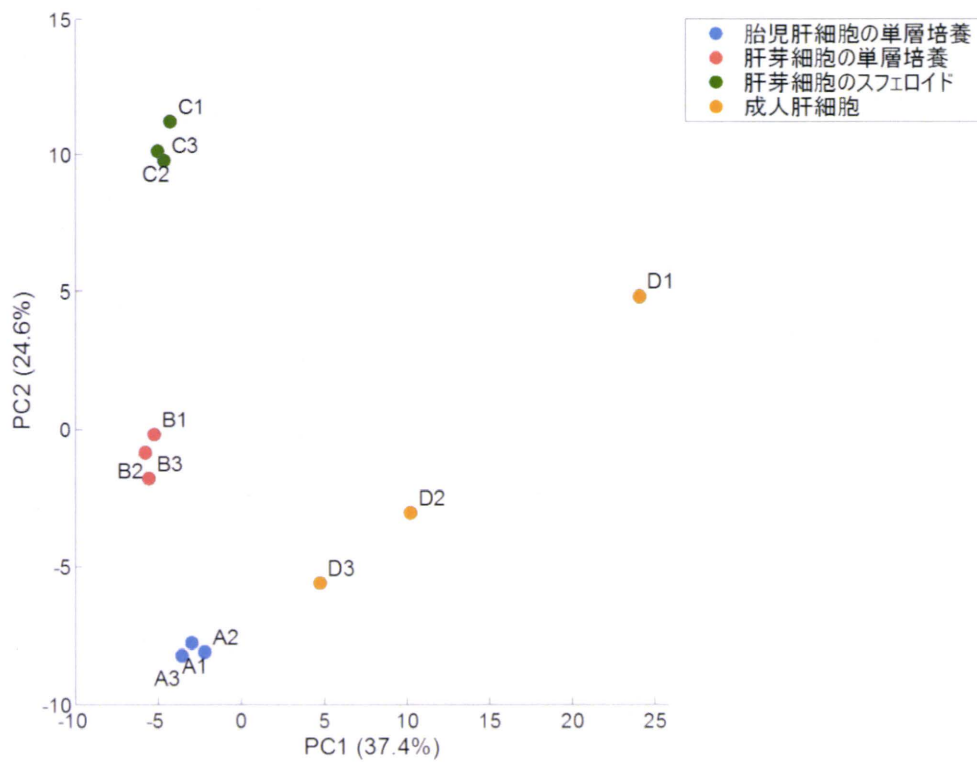
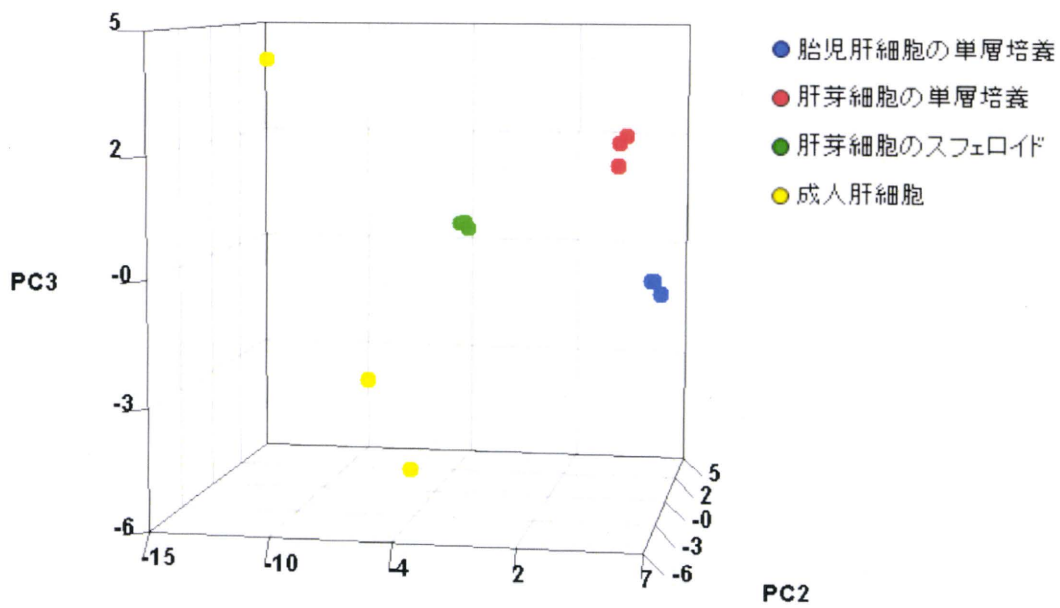


Fig. 7 全測定結果を用いた主成分分析

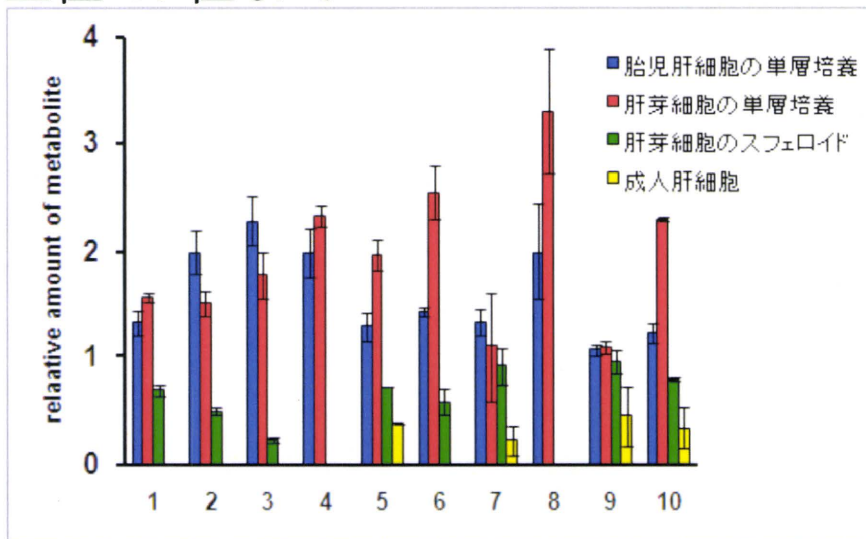


PC1
 PC1 に投影した結果



Fig. 8 72 の代謝物質の測定値を用いた主成分分析

上位 10 位まで



下位 10 位まで

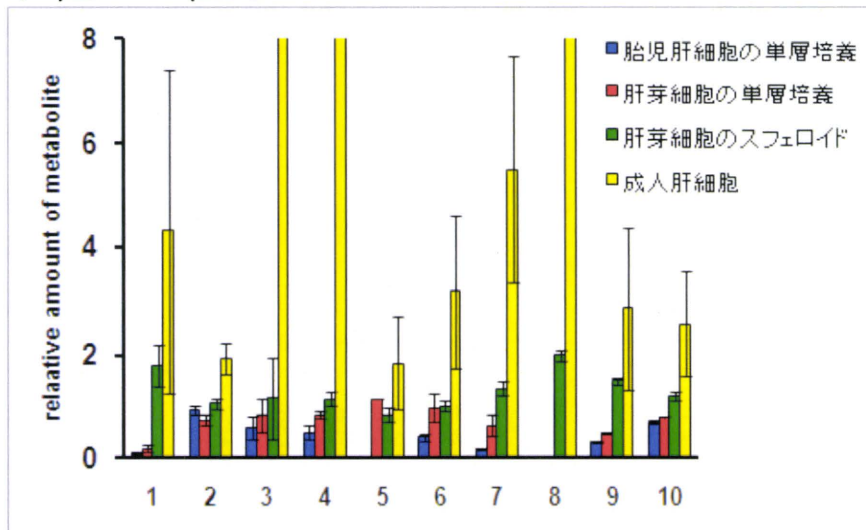


Fig. 9 主成分分析の第一主成分において因子負荷量の絶対値が大きかった代謝物質の相対的存在量

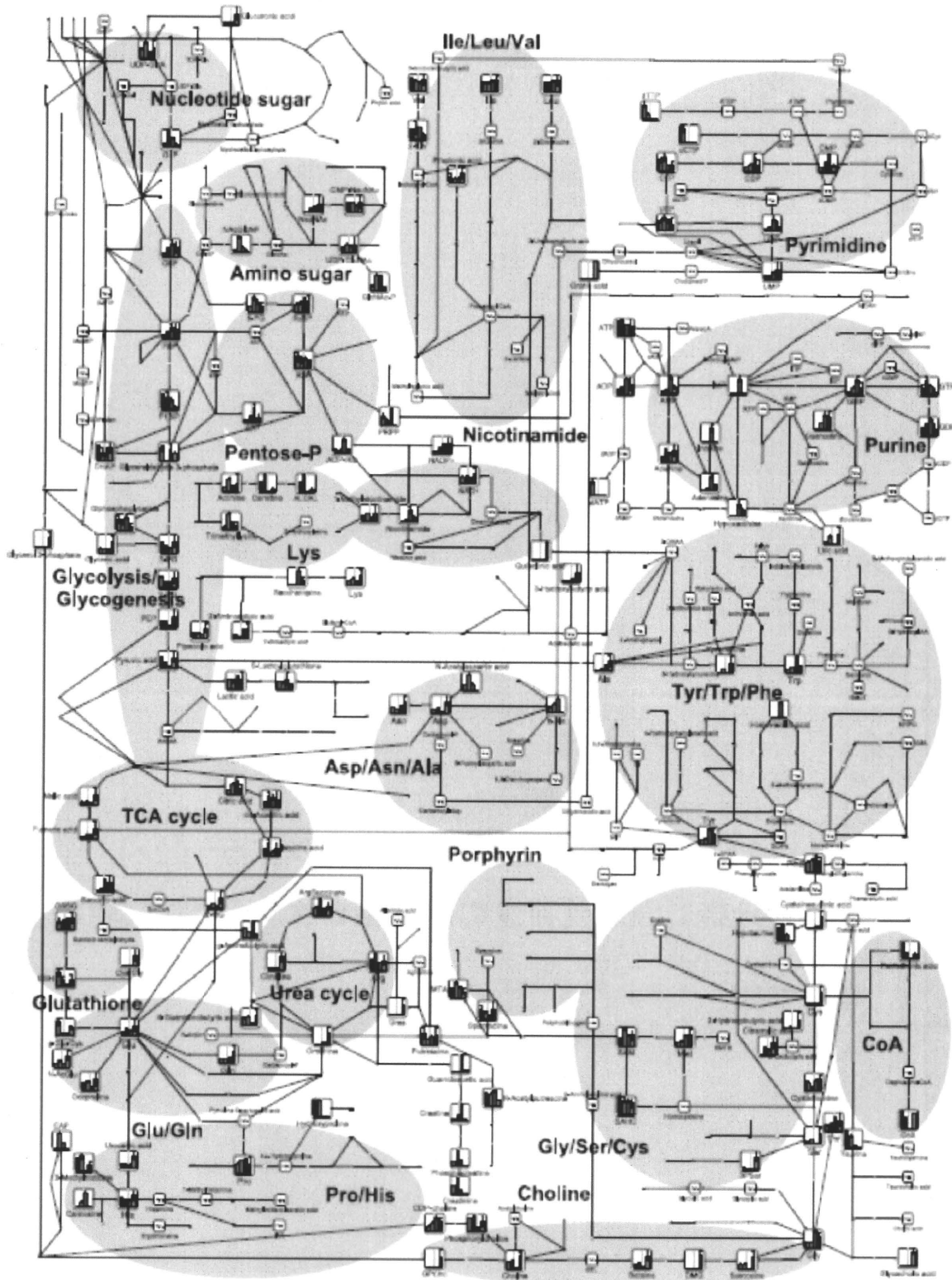


Fig. 10 代謝物質の経路図

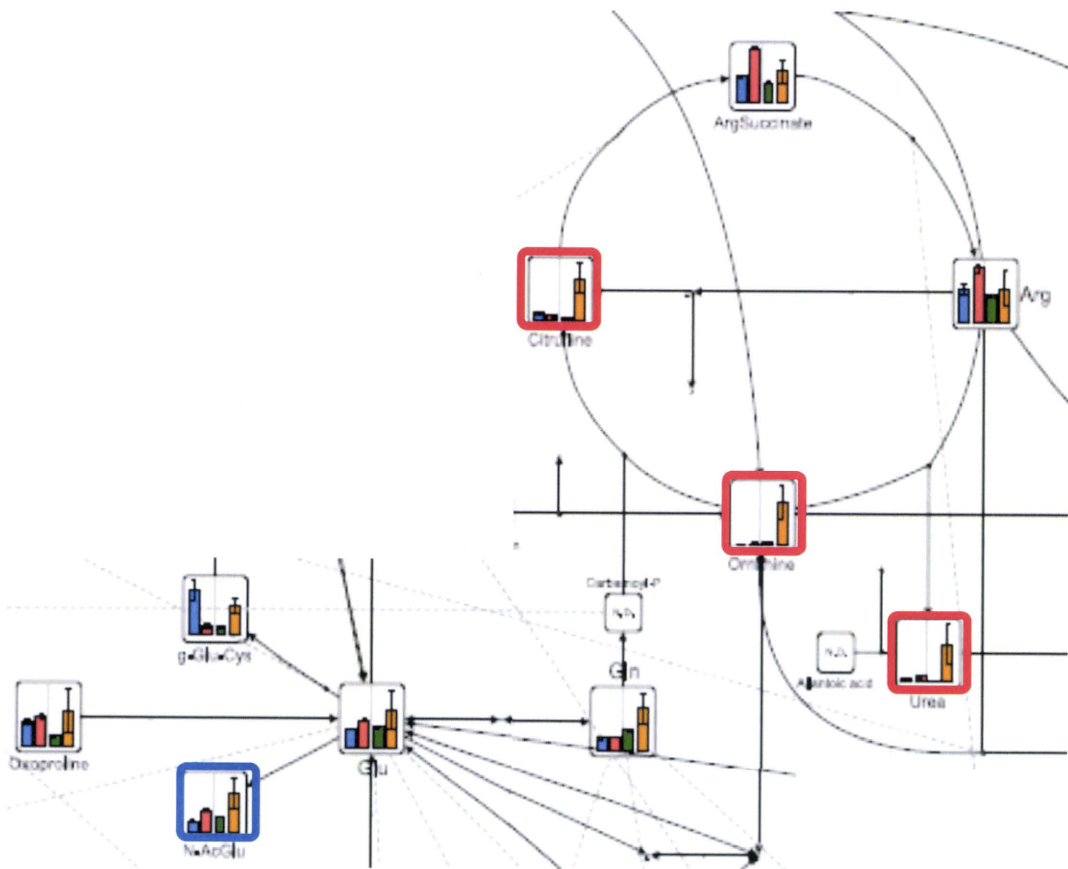


Fig. 12 代謝物質の経路図（オルニチン回路）

- : 主成分分析で因子負荷量の絶対値が大きかった代謝物質
- : 考察参照

Table 1 試料情報

送付試料名	測定に供した試料名	試料量 ($\times 10^6$ cells)	群名	希釈倍率 (Cation) [§]	希釈倍率 (Anion) [§]
A1 (胎児肝細胞の単層培養)	A1	2.2		1	1
A2 (胎児肝細胞の単層培養)	A2	2.2	胎児肝細胞の単層培養	1	1
A3 (胎児肝細胞の単層培養)	A3	2.2		1	1
B1 (胎芽細胞の単層培養)	B1	4.6		1	2.5
B2 (胎芽細胞の単層培養)	B2	4.6	胎芽細胞の単層培養	1	2.5
B3 (胎芽細胞の単層培養)	B3	4.6		1	2.5
C1 (胎芽細胞のスフェロイド)	C1	5.0		1.5	1.5
C2 (胎芽細胞のスフェロイド)	C2	5.0	胎芽細胞のスフェロイド	1.5	1.5
C3 (胎芽細胞のスフェロイド)	C3	5.0		1.5	1.5
D1 (成人肝細胞 HEP220523)	D1	2.165		1	1
D2 (成人肝細胞 HEP220524)	D2	3.13	成人肝細胞	1	1
D3 (成人肝細胞 HEP220527)	D3	2.0		1	1

[§]測定時の希釈倍率

Table 2 候補化合物が絞り込まれた代謝物質 (その1)

NIHSF-HMT-003

13. 添付資料

表 2 候補化合物が絞り込まれた代謝物質 (その1)

ID	Compound name	Comparative Analysis					
		肝臓組織の基準値 vs 胎児肝臓組織の基準値		肝臓組織のスクレロイド vs 胎児肝臓組織の基準値		成人肝臓組織 vs 胎児肝臓組織の基準値	
		Ratio †	p-value ‡	Ratio †	p-value ‡	Ratio †	p-value ‡
A_0006	Citramalic acid	1x	N.A.	1x	N.A.	1x	N.A.
C_0074	Gly-Leu	1x	N.A.	1x	N.A.	1x	N.A.
C_0004	Adenosine	1x	N.A.	1x	N.A.	1x	N.A.
C_0007	Serthroprins	1x	N.A.	1x	N.A.	1x	N.A.
C_0008	Guanosine	1x	N.A.	1x	N.A.	1x	N.A.
C_0077	N-Acetylhistidine	1x	N.A.	1x	N.A.	N.A.	N.A.
C_0005	Carnosine	1x	N.A.	1x	N.A.	N.A.	N.A.
C_0003	Kynurenic acid	1x	N.A.	N.A.	N.A.	1x	N.A.
C_0009	Ophthalmic acid	1x	N.A.	N.A.	N.A.	1x	N.A.
C_0002	Carboxymethyllysine	1x	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
A_0002	Ethanolamine phosphate	36	9.0E-04 ***	13	3.1E-05 ***	0.6	0.184
C_0007	Ser-Glu	11	0.004 **	2.3	0.025 *	<1	N.A.
A_0004	N-Acetylglucosamine 6-phosphate	6.6	0.003 **	2.1	0.003 **	0.4	0.087
C_0075	N ⁶ ,N ⁶ ,N ⁶ -Trimethyllysine	6.5	0.001 **	2.6	0.002 **	1.7	0.374
A_0045	Uric acid	5.3	0.003 **	<1	N.A.	7.2	0.201
A_0009	Phosphoserine	4.9	0.001 **	1.8	0.001 **	0.2	0.014
A_0003	Sedoheptulose 7-phosphate	4.5	0.044 *	14	0.044 *	4.7	0.229
C_0042	Thioproline	4.0	0.080 *	8.6	0.006 **	36	0.050
C_0073	N ⁶ -Acetylsermidine	3.9	5.8E-04 ***	6.7	2.4E-04 ***	7.1	0.051
A_0079	Glucose 1-phosphate	3.6	0.004 **	2.4	0.020 *	0.7	0.278
A_0005	N-Acetylglucosamine 1-phosphate	3.6	1.5E-04 ***	3.0	0.002 **	0.5	0.199
A_0076	myo-Inositol 1-phosphate myo-Inositol 3-phosphate	3.5	8.3E-05 ***	3.7	0.015 *	3.4	0.195
A_0006	GMP	3.3	0.004 **	7.5	0.007 **	3.5	0.181
C_0002	γ-Butyrobetaine	3.3	2.3E-05 ***	1.5	0.014 *	2.3	0.423
C_0078	ADMA	3.0	0.002 **	2.2	0.015 *	2.1	0.217
A_0005	Butyric acid	3.0	0.354 *	1.4	0.146	1.5	0.442
A_0001	N-Acetylaspartic acid	2.9	6.7E-04 ***	1.2	0.074	<1	N.A.
A_0002	5-Phosphogluconic acid	2.9	0.026 *	1.9	0.009 **	1.0	0.939
A_0006	N-Acetylneuraminic acid	2.7	0.078 *	4.9	0.002 **	8.0	0.235
A_0003	Citric acid	2.5	0.009 **	3.6	0.003 **	1.2	0.737
C_0006	Creatine	2.5	3.7E-05 ***	6.6	0.001 **	0.6	0.138
C_0003	Thiamine	2.4	0.060 *	2.5	0.002 **	7.8	0.078
A_0078	Glucose 6-phosphate	2.4	0.137	9.0	0.008 **	3.5	0.197
C_0108	5-Adenylmethionine	2.3	4.2E-04 ***	1.6	0.010 *	1.5	0.314
C_0044	Adenosine	2.3	0.018 *	1.6	0.031 *	2.3	0.185
C_0023	Betaine	2.3	5.5E-05 ***	0.3	2.0E-04 ***	4.6	0.002
A_0127	NADP ⁺	2.2	0.086 *	4.0	0.018 *	5.2	0.181
A_0007	NADPH ₂ divalent	2.1	0.006 **	1.4	0.502	1.7	0.489
C_0100	Argininosuccinic acid	2.1	3.2E-05 ***	0.8	0.011 *	1.2	0.489
A_0126	NADH	2.0	0.147	1.6	0.412	1.9	0.387
A_0117	GTP	2.0	0.023 *	1.3	0.265	0.5	0.158
C_0109	Cysteine glutathione disulphide	2.0	0.171	1.9	0.018 *	46	0.139
A_0008	CMP	2.0	0.045 *	4.1	0.010 *	1.8	0.130
A_0002	lactic acid	2.0	0.195	0.7	0.047 *	1.1	0.634
A_0000	N-Acetylglycolic acid	2.0	0.005 **	1.3	0.003 **	3.6	0.100
A_0050	cis-Aconitic acid	2.0	0.161	1.9	0.067	1.5	0.589
A_0004	Glucuronic acid	1.9	0.082 *	1.3	0.096	9.1	0.138
C_0000	O-Acetylserine	1.9	7.3E-05 ***	<1	N.A.	0.2	0.015
A_0000	myo-Inositol 2-phosphate	1.9	8.5E-04 ***	1.7	8.9E-04 ***	0.8	0.584
C_0006	Glu-Glu	1.9	0.029 *	0.7	0.030 *	0.6	N.A.
A_0119	UDP-glucose UDP-galactose	1.9	0.017 *	1.3	0.181	3.9	0.354
C_0076	Gly-Asp	1.9	0.002 **	0.6	0.010 *	0.3	0.006 **
C_0000	Phytocyanine 5-phosphate	1.9	0.006 **	2.1	0.015 *	7.1	0.094
A_0025	N-Acetyl-β-alanine	1.8	4.0E-04 ***	1.1	0.178	0.5	0.232
A_0114	CDP-choline	1.8	0.010 **	3.1	0.007 **	2.2	0.097
C_0101	5-Deoxy-5-methylthiadenoine	1.8	0.012 *	1.3	0.044 *	0.7	0.311
A_0026	Glutaric acid	1.8	0.031 *	1.1	0.742	0.7	0.418
C_0019	Creatinine	1.8	0.013 *	0.4	0.004 **	<1	N.A.
A_0002	N-Formylmethionine	1.8	0.025 *	2.7	0.019 *	<1	N.A.
A_0108	GDP	1.8	0.004 **	2.7	8.0E-04 ***	1.0	0.976

① 比較対象はFの標準値とIの標準値からDN、Cの標準値とEの標準値からDNを算出する。
 † 胎児肝臓組織の基準値と成人肝臓組織の基準値との比。
 ‡ p-valueを基として算出している。N.A.: Not Available
 * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001
 † 肝臓組織の基準値と胎児肝臓組織の基準値との比を基として算出している。

Table 2 候補化合物が絞り込まれた代謝物質 (その2)

NIHSF-HMT-003

表 2 候補化合物が絞り込まれた代謝物質 (その2)

ID	Compound name	Comparative Analysis					
		成人群中の発見率 (%) 自発的発現の発見率		成人群中のスプレッド (%) 自発的発現の発見率		成人群中の発見率 (%) 代謝物の発見率	
		Ratio †	p-value †	Ratio †	p-value †	Ratio †	p-value †
A_0100	FAD oxidase	1.8	0.002	2.2	5.0E-04	2.0	0.310
A_0034	2-Oxoglutaric acid	1.7	0.008	1.0	0.973	4.8	0.180
A_0074	2-Oxoglucose 6-phosphate	1.7	N.A.	2.3	0.006	+1	N.A.
C_0006	Lys	1.7	0.002	1.0	0.883	2.8	0.198
A_0102	CDP	1.7	0.004	3.7	0.000	1.8	0.533
C_0005	β-Ala	1.7	3.9E-04	2.8	0.003	0.06	6.0E-02
A_0046	Glycose 3-phosphate	1.7	0.142	1.5	0.184	18	0.088
C_0041	Oxalate	1.7	0.025	2.3	0.003	60	0.007
A_0006	Gluconic acid	1.7	0.003	1.7	0.009	5.2	0.300
A_0130	UDP-glucuronic acid	1.7	0.016	0.8	0.048	1.1	0.914
C_0008	Arg	1.7	0.004	0.9	0.128	1.0	0.828
C_0002	Carnitine	1.7	0.028	+1	N.A.	0.3	0.019
A_0019	Aspartic acid	1.7	0.041	+1	N.A.	+1	N.A.
A_0003	AMP	1.6	0.004	7.0	0.001	2.7	0.081
A_0016	Succinic acid	1.6	0.084	4.1	0.021	3.5	0.308
A_0108	Adenosine 5'-phosphosulfate	1.6	0.003	1.8	0.004	1.7	0.111
C_0009	Asp	1.6	4.0E-05	5.0	0.001	9.4	0.102
C_0008	Gly-Gly	1.5	0.004	0.6	0.018	0.3	N.A.
C_0014	Ser	1.5	2.0E-04	0.7	0.001	3.5	0.218
A_0103	UDP	1.5	0.002	5.0	0.000	2.0	0.484
C_0000	Pyridoxal	1.5	0.016	1.5	0.074	0.8	0.518
C_0006	Glu	1.5	7.0E-04	1.1	0.142	2.1	0.228
A_0009	2-Hydroxybutyric acid	1.5	0.441	0.6	0.198	8.4	0.184
C_0007	1-Methyl-2-pyrrolidone	1.4	0.216	1.3	0.325	2.7	0.004
A_0107	ADP	1.4	0.003	3.1	7.6E-04	1.9	0.370
C_0000	Nicotinamide	1.4	0.203	1.2	0.048	3.9	0.198
C_0001	Urea	1.4	0.230	0.4	0.010	11	0.111
C_0003	Cys	1.4	0.380	2.0	0.306	88	0.080
C_0048	1-Methylpiperazine	1.4	0.003	0.8	8.1E-04	1.4	0.688
A_0123	UDP-N-acetylglucosamine	1.4	0.087	1.1	0.140	1.4	0.670
A_0012	Fumaric acid	1.4	0.011	1.1	0.380	5.8	0.168
A_0122	GDP-mannose GDP-galactose	1.4	0.169	1.7	0.008	1.7	0.371
A_0121	ADP-glucose GDP-fucose	1.4	0.288	1.7	0.016	1.1	0.788
A_0113	UTP	1.4	0.116	1.0	0.870	0.7	0.518
C_0043	Asp	1.3	0.008	0.6	0.022	3.8	0.115
C_0028	Thr	1.3	0.003	2.3	0.001	2.0	0.280
C_0020	Phe	1.3	0.003	1.5	0.003	1.0	0.808
A_0010	3-Hydroxybutyric acid	1.3	0.037	2.4	1.6E-04	8.3	0.188
A_0077	Fructose 6-phosphate	1.3	0.482	2.8	0.006	2.3	0.300
A_0073	Ribulose 5-phosphate	1.2	0.320	1.9	0.002	1.5	0.407
A_0000	5-Oxoprolidine	1.2	0.087	0.4	0.000	1.0	0.488
A_0075	Basin	1.2	0.082	0.5	0.016	1.0	0.837
A_0116	ATP	1.2	0.203	0.8	0.488	0.7	0.488
C_0016	Hypoxanthine	1.2	0.003	0.5	0.006	+1	N.A.
C_0007	Mel	1.2	0.087	2.8	0.003	2.8	0.232
C_0067	3-Methylazoxane	1.2	0.228	+1	N.A.	0.4	0.288
A_0008	UMP	1.2	0.550	2.4	0.010	3.3	0.284
C_0005	Hydroxyproline	1.2	0.115	+1	N.A.	+1	N.A.
C_0004	Phe	1.2	0.071	1.8	0.004	1.1	0.875
C_0001	Trp	1.2	0.041	4.0	0.008	1.4	0.317
A_0112	GTP	1.2	0.980	0.6	0.087	0.4	0.127
A_0006	Glucuronic acid	1.1	0.542	1.0	0.782	1.4	0.528
C_0072	Phosphorylcholine	1.1	0.013	0.3	2.7E-05	0.7	0.388
C_0001	4-Chlorobutylbutyric acid	1.1	0.288	0.4	0.011	1.3	0.888
A_0124	UMP-N-acetylglucosamine	1.1	0.301	0.9	0.388	1.2	0.644
C_0008	Pyridoxine	1.1	0.888	+1	N.A.	0.3	0.081
C_0004	Glu	1.1	0.031	1.7	0.004	3.7	0.078
C_0071	Trp	1.1	0.188	3.2	0.004	2.1	0.287
A_0009	Malic acid	1.1	0.501	0.8	0.541	4.2	0.207
A_0008	6-Hydroxyhexanoic acid	1.1	0.528	2.3	0.004	+1	N.A.

† 成人群中の発見率 (%)
 ‡ 成人群中のスプレッド (%)
 § 成人群中の発見率 (%)
 ¶ 成人群中の発見率 (%)

Table 2 候補化合物が絞り込まれた代謝物質 (その3)

NIHSF-HMT-003

表 2 候補化合物が絞り込まれた代謝物質 (その3)

ID	Compound name	Comparative Analysis					
		HMT DB*		Comparative Analysis			
		Ratio†	p-value‡	Ratio†	p-value‡		
C_0013	Choline	1.1	0.504	0.2	0.001	1.6	0.219
C_0003	Pyruvic acid	1.0	0.709	0.9	0.474	2.1	0.168
C_0002	Isobutyric acid	1.0	0.600	0.9	0.762	4.0	0.168
A_0118	ADP-glucose	1.0	0.667	4.8	0.017	1.2	0.468
A_0022	4-Methyl-3-oxovaleric acid 3-Methyl-3-oxovaleric acid	1.0	0.800	2.0	4.0E-04	0.6	0.308
A_0030	Threonic acid	1.0	0.689	0.9	0.187	0.4	0.057
A_0009	Isopropionic acid	1.0	0.900	1.3	0.347	1.5	0.287
A_0014	2-Oxovaleric acid	1.0	0.977	1.2	0.046	0.3	0.040
C_0034	N-Acetylmethionine	1.0	0.625	1.2	0.012	0.9	N.A.
C_0103	Glutathione [GS(GS)]_dimer†	1.0	0.913	1.1	0.484	1.4	0.413
A_0126	NaCl†	1.0	0.731	0.9	0.187	1.6	0.317
C_0004	serosamine	1.0	0.757	+1	N.A.	2.5	0.227
C_0037	Leu	1.0	0.504	1.1	0.116	1.1	0.796
C_0038	Ile	1.0	0.467	1.2	0.039	1.2	0.591
C_0002	Gly	0.9	0.133	3.4	2.3E-04	2.2	0.163
A_0011	Glycic acid	0.9	0.595	0.7	0.130	3.2	0.129
C_0040	Asp	0.9	0.030	1.9	0.006	2.4	0.249
C_0107	5-Amino-3-hydroxypentanoic acid	0.9	0.366	0.9	0.203	0.7	0.174
C_0021	Oxaloacetic acid	0.8	0.123	91	0.003	8.1	0.039
A_0081	Fucose 1,6-diphosphate	0.8	0.521	0.7	0.003	0.2	0.039
C_0080	His	0.8	0.040	0.8	0.007	1.3	0.426
C_0022	Val	0.8	0.017	0.7	0.002	0.8	0.529
A_0041	3-Hydroxy-3-methylglutamic acid	0.8	0.189	2.8	3.1E-04	1.8	0.189
C_0108	Glutamic acid	0.8	0.065	1.1	0.189	2.1	0.020
C_0109	5-Lactoylglutamine	0.8	0.159	1.3	0.382	0.7	0.043
C_0031	Threonine	0.8	0.080	0.10	0.003	+1	N.A.
C_0049	Uracinic acid	0.8	0.366	0.8	0.389	3.2	0.087
A_0017	2-Hydroxyvaleric acid	0.8	0.434	2.0	0.012	0.8	0.287
A_0044	Phosphoenolpyruvic acid	0.8	0.521	0.9	0.004	2.1	0.339
C_0053	Spermidine	0.8	0.404	0.3	0.089	1.0	0.882
C_0034	3-Aminovaleric acid	0.8	0.024	+2	0.005	+1	N.A.
C_0012	2-Aminobutyric acid	0.7	0.012	0.7	0.004	2.2	0.238
A_0081	2,3-Diphosphoglyceric acid	0.7	0.289	1.1	0.700	0.4	0.074
C_0081	2-Aminoacetic acid	0.7	0.170	2.1	0.004	2.4	0.247
A_0089	Aspartic acid	0.7	0.075	0.4	0.012	1.4	0.424
A_0008	Lactic acid	0.7	0.109	1.3	0.009	0.9	0.912
A_0002	Propionic acid	0.7	0.389	0.8	0.499	1.5	0.432
A_0015	Hexanoic acid	0.7	0.039	+5	0.005	1.2	0.417
A_0033	Oxaloacetic acid	0.7	0.074	0.4	8.7E-05	1.0	0.918
C_0102	Streptovycin sulfate_4H2O_dimer†	0.7	0.407	+1	N.A.	7.6	0.283
A_0081	N-Acetylmethionine	0.6	0.002	+4	0.002	0.5	0.139
A_0004	Heptanoic acid	0.6	0.005	+5	0.009	1.2	0.416
A_0027	2-Hydroxy-4-methylvaleric acid	0.6	0.004	+4	0.010	+1	N.A.
C_0011	GABA	0.6	0.004	+5	0.007	0.2	0.004
A_0072	Ribose 5-phosphate	0.6	0.289	0.9	0.899	0.9	0.191
A_0071	Nicotinic acid	0.6	0.025	0.7	0.147	1.2	0.003
A_0089	PIP†	0.6	0.139	1.9	0.009	0.2	N.A.
C_0089	Citulline	0.6	0.003	+2	0.003	6.1	0.003
A_0046	Dihydroxyacetone phosphate	0.5	0.139	0.9	0.154	0.8	0.497
A_0089	CoA_dimer†	0.5	0.029	+1	N.A.	0.9	N.A.
A_0087	3-Phosphoglyceric acid	0.5	0.080	0.9	0.010	1.1	0.749
A_0007	Tylic acid	0.5	0.080	+6	0.084	1.2	0.882
A_0004	Pyruvic acid	0.5	0.006	+12	0.002	1.0	0.989
A_0040	Pteroylglutamic acid	0.5	7.1E-04	+3	2.3E-04	1.1	0.478
A_0089	Linoleic acid	0.5	0.001	+4	6.8E-04	1.3	0.013
A_0087	Lauroic acid	0.5	0.001	+4	0.003	1.2	0.371
C_0104	Glutathione [GS(GS)]	0.5	0.082	0.11	0.004	0.5	0.161
C_0003	Pantoic acid	0.4	0.309	0.7	0.447	0.8	0.717
A_0049	Diacetic acid	0.4	0.014	+3	0.016	1.1	0.679
A_0089	Prostaglandin E2	0.4	0.002	+3	0.004	1.3	0.504

† 比値が1.0未満の値を示すものは、HMT DBに存在しない化合物を示す。
 ‡ p-valueが0.05未満の値を示すものは、HMT DBに存在しない化合物を示す。
 † 比値が1.0未満の値を示すものは、HMT DBに存在しない化合物を示す。
 ‡ p-valueが0.05未満の値を示すものは、HMT DBに存在しない化合物を示す。

Table 2 候補化合物が絞り込まれた代謝物質 (その 4)

NIHSF-HMT-003

表 2 候補化合物が絞り込まれた代謝物質 (その 4)

ID	HMT ID ¹ Compound name	Comparative Analysis					
		HMT ID ¹ の候補化合物との相対比		HMT ID ¹ の候補化合物との相対比		HMT ID ¹ の候補化合物との相対比	
		Ratio ²	p-value ³	Ratio ²	p-value ³	Ratio ²	p-value ³
A_0018	Benzoic acid	0.4	0.005	0.4	0.002	0.9	0.003
A_0023	5-Oxopentanoic acid	0.4	0.002	0.9	0.009	1.0	0.844
C_0019	Dibenzofuran	0.4	0.085	0.9	0.796	0.2	0.053
C_0008	Cocaine	0.4	0.151	0.7	0.324	+1	N.A.
A_0031	p-Toluic acid	0.4	0.012	0.9	0.014	0.9	0.479
C_0034	Cytosine	0.4	0.004	1.2	0.081	1.3	0.388
A_0035	2-Phosphoglyceric acid	0.4	0.010	0.4	9.3E-04	1.0	0.803
A_0013	4-Oxovaleric acid	0.4	4.5E-04	0.4	8.3E-04	0.8	0.262
A_0070	Parathionic acid	0.3	0.002	0.08	0.002	0.2	0.017
C_0026	Tetrahydrofuran	0.3	0.013	0.4	0.014	1.3	0.315
A_0111	ATP	0.3	0.016	+1	N.A.	+1	N.A.
A_0037	3-Phenylpropanoic acid	0.3	0.014	0.2	0.012	1.2	0.694
C_0031	1-Oh-Cyn	0.2	0.021	0.2	0.020	0.7	0.177
C_0032	Glycaminohydroxyproline	0.12	0.013	0.07	0.012	21	0.203
C_0028	Cytosine	0.09	0.002	0.07	0.021	0.2	0.028
C_0029	3-Amino-2-hydroxypropanoic acid	0.09	0.002	1.0	0.866	0.3	0.026
A_0047	Glycaminohydroxy 3-phosphoate	+1	N.A.	0.8	0.027	0.6	0.110
A_0036	O-Phosphoserine	+1	N.A.	+1	N.A.	1.9	0.026
A_0042	Phthalic acid	+1	N.A.	+1	N.A.	+1	N.A.
A_0110	CTP	+1	N.A.	+1	N.A.	+1	N.A.
A_0115	GATP	+1	N.A.	+1	N.A.	+1	N.A.
C_0033	Melanine	+1	N.A.	+1	N.A.	+1	N.A.
A_0030	Adipic acid	N.A.	N.A.	1+	N.A.	1+	N.A.
A_0029	Cytosaminohydroxy acid	N.A.	N.A.	1+	N.A.	1+	N.A.
C_0040	Hydroxyproline	N.A.	N.A.	1+	N.A.	1+	N.A.
A_0025	Homovanillic acid	N.A.	N.A.	1+	N.A.	N.A.	N.A.
A_0034	ASP	N.A.	N.A.	1+	N.A.	N.A.	N.A.
C_0030	Insulin	N.A.	N.A.	1+	N.A.	N.A.	N.A.
A_0021	Chloroacetic acid	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	1+	N.A.
A_0038	Oxalic acid	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	1+	N.A.
A_0043	Quarternic acid	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	1+	N.A.
A_0034	4-Pyridoxic acid	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	1+	N.A.
A_0108	Glyoxylic acid	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	1+	N.A.
C_0010	N-A-Carboxyglycine	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	1+	N.A.
C_0030	4-Hydroxyproline	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	1+	N.A.
C_0070	Cys-Gly	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	1+	N.A.
C_0035	1-Oh-2-aminobutyric acid	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	1+	N.A.

1. HMT IDは、HMTデータベースに登録されている化合物のID番号を示す。
 2. Ratioは、HMTデータベースに登録されている化合物の相対比を示す。
 3. p-valueは、HMTデータベースに登録されている化合物の相対比の有意性を示す。
 4. N.A.は、Not Availableを示す。
 5. +1は、HMTデータベースに登録されている化合物の相対比が1であることを示す。

7. 要約

NIHSより送付された培養細胞 12 検体について、CE-TOFMS[†]のカチオンモード、アニオンモードによる測定を実施した。本試験では、HMT代謝物質データベースに登録された物質を対象として解析を行った。この結果、217 (カチオン 99, アニオン 118) のピークが検出され、これらの物質を解糖系/糖新生、ペントースリン酸経路、クエン酸回路、尿素回路、プリン代謝経路、ピリミジン代謝経路、ニコチン酸・ニコチンアミド代謝経路及び各種アミノ酸代謝経路に描画した。

[†] キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計

8. 材料及び方法

8-1 試料

国立衛研にて、培養細胞を採取した。採取した試料は表 1 に示す 12 検体が冷凍状態で HMT に送付された。

表 1 試料の情報

送付試料名	測定に供した試料名	試料量 (x10 ⁶ cells)	群名	母液標準 (Cation) ^a	母液標準 (Anion) ^b
A1: 胎児肝細胞の単層培養	A1	2.2	胎児肝細胞の単層培養	1	1
A2: 胎児肝細胞の単層培養	A2	2.2		1	1
A3: 胎児肝細胞の単層培養	A3	2.2		1	1
B1: 胎児細胞の単層培養	B1	4.6	肝細胞の単層培養	1	2.5
B2: 胎児細胞の単層培養	B2	4.6		1	2.5
B3: 胎児細胞の単層培養	B3	4.6		1	2.5
C1: 胎児細胞のスフェロイド	C1	5.0	肝細胞のスフェロイド	1.5	1.5
C2: 胎児細胞のスフェロイド	C2	5.0		1.5	1.5
C3: 胎児細胞のスフェロイド	C3	5.0		1.5	1.5
D1: 成人肝細胞 (HEP220523)	D1	2.165	成人肝細胞	1	1
D2: 成人肝細胞 (HEP220524)	D2	3.13		1	1
D3: 成人肝細胞 (HEP220527)	D3	2.0		1	1

^a 測定時の標準液

8-2 前処理

NIHSにて培養細胞の培養を行った。試料は、プロトコール (外部書類番号: [E-100650]) に従って洗浄及び回収を行い、凍結後、HMT に送付した。

HMTにて試料を受領後、減圧濃縮またはメタノールを加えて溶媒量を2,000 µLに調整し、2,000 µLのクロロホルム及び800 µLのMilli-Q水を加え攪拌し、遠心分離 (2,300 × g, 4°C, 5分)を行った。遠心分離後、水相を限外ろ過チューブ (MILLIPORE, ウルトラフリー-MC UFC3 LCC 遠心式フィルターユニット 5 kDa) に400 µL×4本移し取った。これを遠心 (9,100 × g, 4°C, 120分)し、限外ろ過処理を行った。ろ液を乾固させ、再び50 µLのMilli-Q水に溶解して測定に供した。

9. 測定

本試験ではカチオンモード、アニオンモードの測定を以下に示す条件¹⁾で行った。

陽イオン性代謝物質（カチオンモード）

装置

Agilent CE-TOFMS system (Agilent Technologies 社) 1号機
Capillary: Fused silica capillary i.d. 50 μm \times 80 cm

測定条件

Run buffer: Cation Buffer Solution (p/n: H3301-1001)
Rinse buffer: Cation Buffer Solution (p/n: H3301-1001)
Sample injection: Pressure injection 50 mbar, 10 sec
CE voltage: Positive, 27 kV
MS ionization: ESI Positive
MS capillary voltage: 4,000 V
MS scan range: m/z 50-1,000
Sheath liquid: HMT Sheath Liquid (p/n: H3301-1020)

陰イオン性代謝物質（アニオンモード）

装置

Agilent CE-TOFMS system (Agilent Technologies 社) 3号機
Capillary: Fused silica capillary i.d. 50 μm \times 80 cm

測定条件

Run buffer: Anion Buffer Solution (p/n: H3302-1021)
Rinse buffer: Anion Buffer Solution (p/n: H3302-1022)
Sample injection: Pressure injection 50 mbar, 25 sec
CE voltage: Positive, 30 kV
MS ionization: ESI Negative
MS capillary voltage: 3,500 V
MS scan range: m/z 50-1,000
Sheath liquid: HMT Sheath Liquid (p/n: H3301-1020)

10. データ処理及び解析

10-1 データ処理

CE-TOFMSで検出されたピークは、自動積分ソフトウェアのMasterHands ver.2.9.0.9（慶應義塾大学開発）を用いて自動抽出し、ピーク情報として質量電荷比 (m/z)、移動時間 (Migration time: MT)とピーク面積値を得た。得られたピーク面積値は下記の式²⁾を用いて相対面積値に変換した。また、これらのデータには Na^+ や K^+ などのアダクトイオン及び、脱水、脱アンモニウムなどのフラグメントイオンが含まれているので、これらの分子量関連イオンを削除し

た。しかし、物質特異的なアダクトやフラグメントも存在するため、すべてを精査することはできなかった。精査したピークについて、 m/z とMTの値をもとに、各試料間のピークの照合・並列化を行った。

$$^{12)} \text{相対面積値} = \frac{\text{目的ピークの面積値} \times \text{実際の初期メタノール添加量 (mL)}}{\text{内部標準物質の面積値} \times \text{細胞数} \times \text{プロトコールの初期メタノール添加量 1.3 (mL)}}$$

10-2 候補代謝物質検索

検出されたピークに対して m/z とMTの値をもとにHMT代謝物質データベースに登録された全物質との照合、検索を行った。検索のための許容誤差はMTで $\pm 0.5 \text{ min}$ 、 m/z では $\pm 10 \text{ ppm}^{13)}$ とした。

$$^{13)} \text{質量誤差 (ppm)} = \frac{\text{実測値} - \text{理論値}}{\text{実測値}} \times 10^4$$

10-3 統計解析 (PCA, HCA)

主成分分析 (PCA)はSampleStat ver.3.13 (HMT開発)を用いて行った。また、階層的クラスタリング解析 (HCA)及びHeatmap表記はPeakStat ver.3.17 (HMT開発)を用いて行った。クラスタリングの結果は、別途添付するエクセルファイルを参照することによりすべての候補化合物を確認することができる。両解析とも、データの前処理としてピーク単位での標準化 ($\mu=0, \sigma=1$)を行っている。

10-4 代謝経路の描画

代謝物質定量データの代謝経路マップへの描画を実施した。代謝経路の描画には、VANTED (Visualization and Analysis of Networks containing Experimental Data)¹⁴⁾を用いた。描画に用いた代謝物質の名称には、一部HMT化合物データベースとは異なる略称を用いている。尚、代謝経路はヒトで確認された酵素を基に作成している。

10-5 主要代謝物質の定量

HMTで通常、主要な代謝物質として選択し、定量を行っているアミノ酸、有機酸、糖リン酸及び核酸を含む108物質について解析を行った。検量線は内部標準物質により補正したピーク面積を用い、各物質について100 μM の一点検量 (内部標準物質 200 μM)として濃度を算出した。

11. 結果

11-1 候補代謝物質検索

培養細胞12検体についてCE-TOFMSによるメタボローム解析を行った。HMT代謝物質データベースに登録された物質の m/z 及びMTの値から217 (カチオン99, アニオン118) ピー

クに候補化合物が付与された(表2)。これらについては、別途添付するエクセルファイルを参照することにより確認することができる。

11-2 統計解析 (PCA, HCA)

検出されたピークを用いて主成分分析を行った結果を図1に示す。また、階層的クラスタリングを行い、HeatMap表示させた結果を図2に示す。データの预处理として、N.D.には eps (≥ 0)を代用し、標準化 ($\mu=0, \sigma=1$)を行っている。

11-3 群間比較

候補化合物が絞り込まれた217ピークについて、各群間の相対面積値比の算出 Welch の t-検定を実施した(表2)。

11-4 代謝経路の描画

これらの候補化合物を解糖系/糖新生、ペントースリン酸経路、クエン酸回路、尿素回路、プリン代謝経路、ピリミジン代謝経路、ニコチン酸・ニコチンアミド代謝経路及び各種アミノ酸代謝経路に描画した(図3~13)。略称を用いた物質に関しては、HMT代謝物質データベースでの名称との対応をAppendix資料に示す。

11-5 主要代謝物質の定量

HMTの定める主要代謝物質108(カチオン52、アニオン56)種のうち、89(カチオン42、アニオン47)物質のピークが検出され、定量値を算出した(表3)。

12. 参考文献、資料

- 1) T. Soga, D. N. Heiger: Amino acid analysis by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* 72: 1236-1241, 2000.
- 2) T. Soga, Y. Ueno, H. Naraoka, Y. Ohashi, M. Tomita et al.: Simultaneous determination of anionic intermediates for *Bacillus subtilis* metabolic pathways by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* 74: 2233-2239, 2002.
- 3) T. Soga, Y. Ohashi, Y. Ueno, H. Naraoka, M. Tomita et al.: Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 2: 488-494, 2003.
- 4) <http://vanted.pk-gatersleben.de/>

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

周産期における薬物動態関連因子の発現解析

研究分担者 簾内 桃子 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部主任研究官
研究協力者 中澤 憲一 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部主任研究官

研究要旨

胎児期・新生児期において化学物質の暴露は、その後の成長期に障害をもたらす恐れがあることが指摘されている。化学物質の毒性発現あるいは解毒に果たす薬物代謝酵素系の役割は大きい。しかし周産期における薬物代謝酵素系の特性は、成熟期と異なることが知られているものの不明な点が多く残されている。そこで周産期期における化学物質代謝解析の一環として、ヒト成長期における薬物代謝酵素系および関連する動態因子の発現解析を目的とした。初年度は、新生児期、乳児期、幼児期および学童期の成長期における凍結ヒト肝細胞の収集を行った。初年度のみの細胞収集では統計解析に十分なロット数を得られなかったことから、次年度も引き続き細胞を収集し遺伝子解析を行うこととした。一部のヒト肝細胞を用いRT-PCR法によりCYP遺伝子の発現を測定した。ヒト胎児期に特有なCYP分子種であるCYP3A7は、新生児期および乳児期のヒト肝細胞において確認され、その発現はCYP3A4比べ高い傾向を示した。新生児期および乳児期に調製された肝細胞にも胎児期・新生児期の特徴が保存されていることを示す知見で、新生児期、乳児期のヒト肝細胞は、成長期の毒性発現評価に利用可能なツールとなりうることが示唆された。肝細胞に添付の代謝データを解析したところ、実験内容に沿うヒト肝細胞の選択には、CYP代謝活性レベルのみならず今後はmRNAレベルの情報も考慮することが望ましいことが示唆された。

A. 研究目的

母体あるいは成長期に曝露された化学物質は、母乳を介しあるいは直接、新生児や乳児等の成長期において障害を引き起こすことがある。特に成長期での影響が危惧されているのは、化学物質に対する胎児期および新生児期を含む成長期における感受性が成人に比べ強いと考えられているからである。また、化学物質は体内の脂肪組織に蓄積される場合や、その障害が不可逆である可能性もあることから、成長期における化学物質の影響を評価することは極めて重要である。

肝臓における薬物代謝酵素および薬物動態関連因子は、標的臓器における化学物質の影響を評価するにあたり体内動態を考慮するうえで重要な因子であるのみならず、化学物質の代謝活性化などの毒性発現および解毒と密接に関連しており、その変動は胎児期および成長期の健康に影響を及ぼすことが知られている。

今までに当研究室では、ラット周産期において a) benzo(a)pyrene、aminopyrine および hexobarbital の代謝活性は極めて低いものの

基質によっては胎齢 16 日目から活性が認められること、b)PCB の妊娠期曝露は、胎児期の benzo(a)pyrene 代謝酵素活性を強く誘導し、胎齢 21 日目の benzo(a)pyrene 代謝酵素活性は無処置胎児の 169 倍、無処置成熟ラットの約 5 倍高い活性レベルを示すことを報告してきた (Sunouchi, M., *et. Al.*, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 59;540-7, 1981) (Sunouchi, M., *et. Al.*, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 73;457-63, 1984)。このように、ラット周産期においては、肝薬物代謝活性のレベルは極めて低いものの、化学物質による薬物代謝酵素誘導能を十分に有していることが示された。

一方、実験動物とヒトの間には、発現している CYP 酵素の種類、量そして酵素学的性質などの点で種差が認められていることから、化学物質の曝露がヒト成長期に及ぼす影響を評価するためにはヒト肝細胞を用いた *in vitro* 曝露評価系が有用である。日本国内におけるヒト組織の入手は極めて困難であるが、成長期および成人ドナー由来の市販ヒト肝細胞を海外から入手し、各成長時期における薬物代謝酵素と薬物動態関連因子の