

図3 脂質ラフトを利用した HCV 粒子形成のモデル

VLDL と結合する性質があり、リポ蛋白に含まれる Apolipoprotein E (ApoE), ApoB, ApoC1 などが感染性に重要ということが報告されている。

おわりに

HCV はゲノム配列が多様で、大変変異しやすいウイルスであり、IFN やリバビリンなどの薬剤に対しても耐性を持つウイルスが出現しやすいことが知られている。新たな抗 HCV 薬として、ウイルスプロテアーゼやポリメラーゼなどのウイルス複製に関与する酵素を標的とした薬剤の開発研究が盛んに行われている。HIV と同様にこれらの薬剤についても HCV は耐性変異を獲得することが報告されている。本稿で報告した宿主の脂質産生系¹⁰⁾(図3) などウイルス生活環に関与する宿主因子を標的とし、感染した細胞側の働きを抑えてウイルス増殖を抑制する抗 HCV 薬の開発は耐性ウイルスが出現しにくい薬剤につながる期待がある。

謝辞

本研究は下記の多くの研究者のご協力を得て遂行できたものであり、ここに謝意を表す：松浦善治(大阪大学微生物病研究所・分子ウイルス分野)、深澤征義、花田賢太郎(国立感染症研究所・細胞化学部)、西島正弘(国立医薬品食品衛生研究所)、マイケル・ライ(南加大・微生物学免疫学研究室)、脇田隆宇、鈴木哲朗、宮村達男(国立感染症研究所・ウイルス第二部)。

文献

- 1) Kawada M, Nagamori S, Aizaki H, *et al.*: Massive culture of human liver cancer cells in a newly developed radial flow bioreactor system: ultrafine structure of functionally enhanced hepatocarcinoma cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 34: 109-115, 1998.
- 2) Aizaki H, Nagamori S, Matsuda M, *et al.*: Production and release of infectious hepatitis C virus from human liver cell cultures in the three-dimensional radial-flow bioreactor. *Virology* 314: 16-25, 2003.
- 3) Murakami K, Ishii K, Ishihara Y, *et al.*: Production of infectious hepatitis C virus particles in three-dimensional cultures of the cell line carrying the genome-length dicistronic viral RNA of genotype 1b. *Virology* 351:381-392, 2006.
- 4) Wakita T, Pietschmann T, Kato T, *et al.*: Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med.* 11: 791-796, 2005.
- 5) Lohmann V, *et al.*: Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285: 110-113, 1999.
- 6) Egger D, *et al.*: Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J. Virol.* 76: 5974-5984, 2002.
- 7) Aizaki H, Lee KJ, Sung VM, *et al.*: Characterization of the hepatitis C virus RNA replication complex associated with lipid rafts. *Virology* 324: 450-461, 2004.
- 8) Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, *et al.*: The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol.* 9: 1089-1097, 2007.
- 9) Huang H, *et al.*: Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104: 5848-5853, 2007.
- 10) Aizaki H, Morikawa K, Fukasawa M, *et al.*: A Critical Role of Virion-Associated Cholesterol and Sphingolipid in Hepatitis C Virus Infection. *J Virol.* 82: 5715- 5724, 2008.

モノメリック型およびジェミニ型カチオン界面活性剤の相挙動に及ぼす重合性基の影響

酒井健一^{*,**†}・西山広徳^{*}・小椋孝介^{*}・黒木悠平^{*}・遠藤健司^{*}・
土屋好司^{***}・酒井秀樹^{***}・阿部正彦^{***†}

^{*}東京理科大学工学部工業化学科 千葉県野田市山崎2641 (〒278-8510)

^{**}東京理科大学総合研究機構 千葉県野田市山崎2641 (〒278-8510)

^{***}東京理科大学理学部第一部応用化学科 東京都新宿区神楽坂1-3 (〒162-8601)

† Corresponding Authors, E-mail: k-sakai@rs.noda.tus.ac.jp, abemasa@rs.noda.tus.ac.jp

(2012年3月12日受付；2012年6月14日受理)

要 旨

モノメリック型（一鎖一親水基型）界面活性剤およびジェミニ型（二鎖二親水基型）界面活性剤の水における分子集合体形成に及ぼす重合性基の影響を検討した。その結果、非重合性のモノメリック型（UTAB）、重合性のモノメリック型（PC11）および非重合性のジェミニ型（11-6-11）の相状態は、低濃度側からミセル溶液（ W_m ）相—二相共存領域（II）—ヘキサゴナル液晶（ H_1 ）相—ラメラゲル（ L_β ）相と変化した。一方、重合性のジェミニ型（PC11-6-11）の相状態は、 H_1 相と L_β 相との間にラメラ液晶（ L_a ）相が出現し、低濃度側から W_m -II- H_1 - L_a - L_β 相となった。モノメリック型とジェミニ型界面活性剤のどちらの場合も、それらの疎水基末端に重合性基が存在することにより H_1 相の形成濃度が上昇した。また、ジェミニ型構造を有する界面活性剤は、モノメリック型の界面活性剤の場合よりも H_1 相を形成する濃度（物質量で規格化）が低くなった。

キーワード：ジェミニ型界面活性剤、重合性界面活性剤、相挙動

1. 緒 言

炭化水素系の界面活性剤は、食品や洗剤、各種パーソナルケア商品に至るまで種々さまざまな化成品中、あるいはそれらの製造過程で多用されている。界面活性剤をその化学構造で分類すると、炭化水素系のほかにもフッ化炭素系（撥水性、潤滑浸透性及び防食性に優れており、表面改質剤や金属表面処理剤として用いられている）やシリコン系（消泡性及び離型性に優れており、化粧品や繊維用として利用されている）も挙げられるが、炭化水素系の界面活性剤がこれらの中で最も多用されている。

通常のモノメリック型（一鎖一親水基型）界面活性剤の親水基もしくはその近傍を、スパーサーと呼ばれる連結基で結合した界面活性剤をジェミニ型（二鎖二親水基型）界面活性剤と呼ぶ²⁾。ジェミニ型界面活性剤は対応するモノメリック型の界面活性剤と比較して、ミセル形成能や表面張力低下能がフッ化炭素系の界面活性剤並みに優れているながらも、クラフト温度が格段に低いという特徴を有している。すなわち、モノメリック型の界面活性剤に代わってジェミニ型界面活性剤を使用すれば、化成品中における界面活性剤の総使用量を削減できることになるため、ジェミニ型界面活性剤は環境調和型の有機材料として注目されている。しかし、世界中で市販されているジェミニ型界面活性剤はほんの数種類に過ぎない¹⁾。これはジェミニ型界面活性剤の分子量はモノメリック型界面活性剤の2倍程度であるが、合成と精製の過程が複雑になるために製造コストが格段に高騰するためである。われわれはこの点について、低コスト

でも製造できるジェミニ型界面活性剤を開発してきた³⁻⁶⁾。

ジェミニ型界面活性剤の開発に関する最近の一つの流れは、ジェミニ型の優れた界面化学的特性を活かしつつ、そこにさらなる機能性を付与することにある。この一端としてわれわれは、重合性基を疎水鎖末端に有するジェミニ型界面活性剤を開発してきた⁷⁻⁹⁾。重合性のジェミニ型界面活性剤は一分子内に二つの重合性基を有することから、効率的な分子間重合が可能となる¹⁰⁾。これまでにわれわれは、重合性ジェミニ型界面活性剤を希薄な水溶液中で重合させると、もともと存在していた球状ミセルの構造を維持できること⁷⁻⁹⁾、あるいは固体/水溶液界面に形成された吸着膜を重合させることでその構造を維持できること¹¹⁾などを報告してきた。しかし、重合性ジェミニ型界面活性剤の濃厚水溶液物性、および形成された相構造の重合については包括的な検討を行っていない。界面活性剤はさまざまな形態の分子集合体をその濃度に応じて形成するが、これらの構造を重合により固定化できれば、新たな機能性材料の創製につながる事が期待される。

本研究では、モノメリック型カチオン界面活性剤およびジェミニ型カチオン界面活性剤の分子集合体形成に及ぼす重合性基の影響を、目視および偏光顕微鏡観察、小角X線散乱（SAXS）

¹⁾ 中京油脂(株)：二本鎖ビスカルボン酸塩型の両親媒性化合物（商品名ジェミサーフ）、旭化成ケミカルズ(株)：ジラウロイルグルタミン酸リシンナトリウム塩（商品名ベリセア）、タマ化学工業(株)：ビスビリジニウム四級アンモニウム塩型の両親媒性物質（商品名ハイジェニア）、日油(株)：ホスホリルコリン類似基を有する両性の両親媒性物質（商品名ヴィノベル）。

測定により検討した。

2. 実験方法

2.1 試料

本研究では、以下の界面活性剤を既報^{7,11)}に従って合成し、使用した。各界面活性剤の構造および純度は¹H-NMRとFAB-Massスペクトル、ならびに元素分析により確認した。これら界面活性剤の化学構造をFig. 1に示す。

- (a) モノメリック型カチオン界面活性剤 (非重合性):
undecyltrimethylammonium bromide (UTAB)
- (b) 重合性モノメリック型カチオン界面活性剤:
11-(methacryloyloxy)trimethylundecylammonium bromide (PC11)
- (c) ジェミニ型カチオン界面活性剤 (非重合性):
hexanedyl-1,6-bis(11-dimethylundecylammonium bromide) (11-6-11)
- (d) 重合性ジェミニ型カチオン界面活性剤:
hexanedyl-1,6-bis(11-(methacryloyloxy)dimethylundecylammonium bromide) (PC11-6-11)

また本研究では、Barnstead NANO Pure Diamond UV systemによる精製後、Millipore membrane filter (孔径0.22 μm)でろ過した水を使用した。

2.2 相図の作成および評価法

蓋付き試験管に種々の重量パーセント濃度で界面活性剤、水の順に添加した後、系を密閉した。PC11-6-11とPC11を用いた試料は35℃、11-6-11とUTABを用いた試料は70℃で湯煎することにより加温した。その後、3,000 rpmのボルテックスミキサーを用いて1分間攪拌を行い、3,500 rpmで遠心分離を行った。短時間で系を均一にするために、アニーリング処理(-8℃で12時間静置した後、35℃もしくは70℃に加温して攪拌)を3回繰り返し行った。その後、25℃の恒温槽中で静置した。調製から2週間経過すると、相状態に変化が見られなくなったことから(目視およびクロスニコル下での観察結果より)、この時点で相平衡状態に達したと判断した。

調製した試料の相状態はクロスニコル下での目視観察および倒立型偏光顕微鏡観察(Olympus JEM-100sx)により評価した。その後、SAXS法(Anton Paar PW3830)を用いて液晶試料の同定を行った。SAXS測定はCu-Kα線をX線源として用い、40 kV, 50 mAの条件下で行った。相状態の評価はすべて25℃で行った。

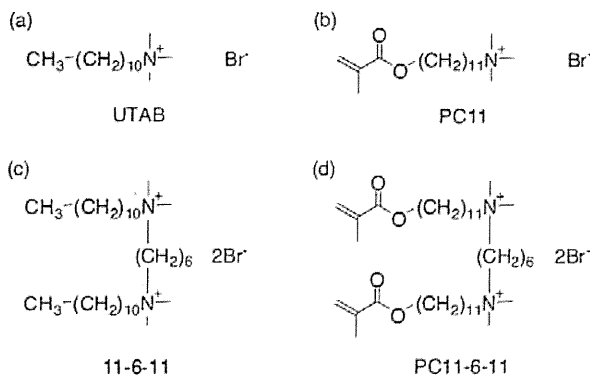


Fig. 1 Chemical structures of the surfactants used in this study.

3. 結果および考察

Fig. 2に、各種界面活性剤/水二成分系の25℃における相図を示す。(a)は重合性基をもたないモノメリック型カチオン界面活性剤(UTAB)、(b)は重合性基を有するモノメリック型カチオン界面活性剤(PC11)、(c)は重合性基をもたないジェミニ型カチオン界面活性剤(11-6-11)、(d)は重合性基を有するジェミニ型カチオン界面活性剤(PC11-6-11)の結果である。ここではまず、それぞれの系について相状態の同定結果を示し、その後、各系の相挙動を比較する。

モノメリック型カチオン界面活性剤の場合((a) UTABと(b) PC11)、重合性基の存在の有無にかかわらず、きわめて希薄な濃度領域から等重量濃度付近まで、低粘性かつ光学等方的

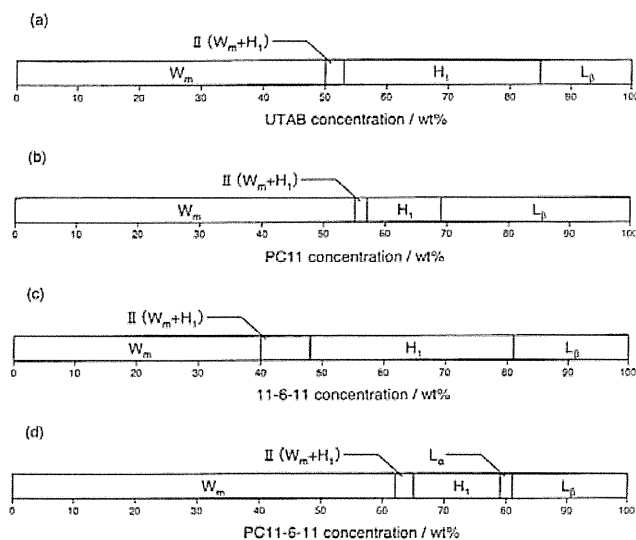


Fig. 2 Binary phase behavior of the surfactants with water at 25 °C : (a) UTAB ; (b) PC11 ; (c) 11-6-11 ; (d) PC11-6-11. Phase abbreviations are as follows : micellar solution (W_m), hexagonal liquid crystal (H₁), lamellar liquid crystal (L_α), and lamellar gel (L_β) phases.

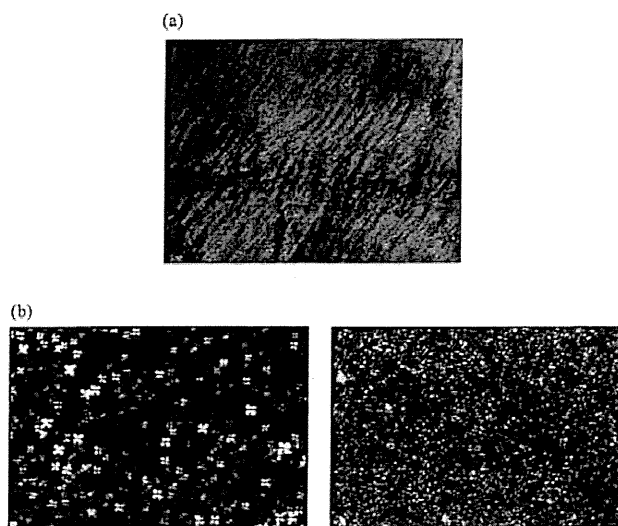


Fig. 3 Polarized optical microscope images of (a) H₁ phase measured for PC11 at 68 wt %, and (b) L_α phase measured for PC11-6-11 at 81 wt %.

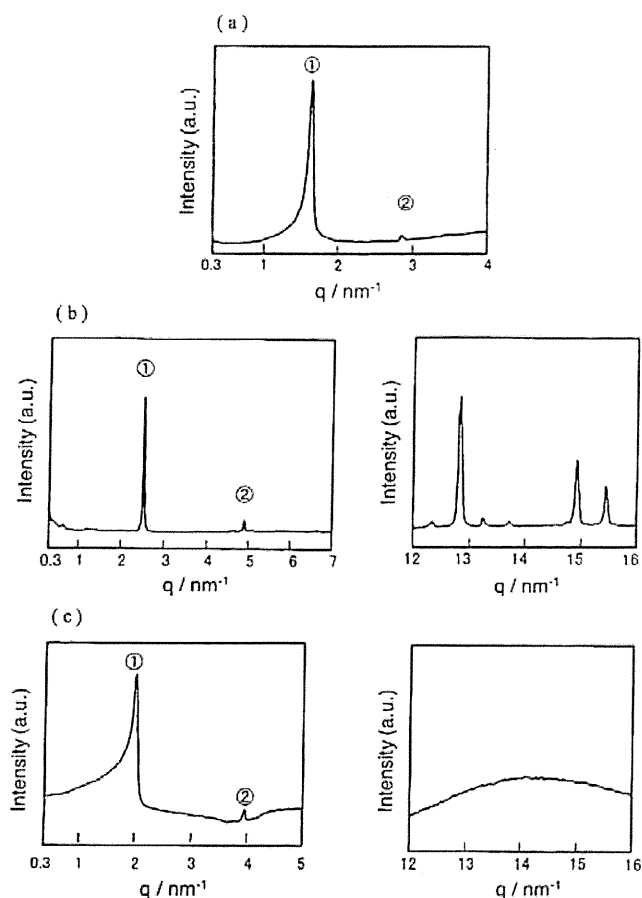


Fig. 4 SAXS spectra measured for (a) H_1 phase of PC11 at 65 wt %, (b) L_β phase of PC11 at 80 wt %, and (c) L_α phase of PC11-6-11 at 81 wt %.

な無色透明の一液相（ミセル水溶液， W_m 相）が得られた。その後ごく狭い領域で、低粘性かつ光学等方的な液体（ W_m 相）と高粘性かつ光学異方的な無色透明液体の二相共存領域があらわれた。さらに界面活性剤の濃度が高くなると、無色透明で高粘性かつ光学異方的な一液相領域が出現した後、白色ゲルとなった。出現した高粘性かつ光学異方的な液体相の偏光顕微鏡観察を行ったところ、ヘキサゴナル液晶特有のファンライクストラクチャーが観察された（一例として、PC11の68 wt %溶液に関する偏光顕微鏡観察結果をFig. 3aに示す）。さらにこの濃度領域においてSAXS測定を行ったところ、ファーストピークとセカンドピークの散乱ベクトル（ q ）値の比が $1:\sqrt{3}$ となった（Fig. 4a：PC11の65 wt %溶液）。この値は六方対称系（(100)面および(110)面）の面間隔比率と一致することから、高粘性かつ光学異方的な液体相はヘキサゴナル液晶相（ H_1 相）であると同定した。また、高濃度領域で出現した白色ゲルは、偏光顕微鏡観察で光学異方性を示した。さらに、低角側のSAXS測定結果（Fig. 4b：PC11の80 wt %溶液）を見ると、 q 値の比が $1:2$ の繰り返しピークがあらわれたこと、および広角領域にはシャープなピークがあらわれたことから、この白色ゲルはラメラゲル相（ L_β 相）であると同定した。

一方、ジェミニ型カチオン界面活性剤の場合（(c) 11-6-11と(d) PC11-6-11）、重合性基の有無によってそれらの相挙動は異なった。重合性基のない11-6-11の場合には、上記のモノメリ

ック型カチオン界面活性剤の場合と同様な相状態（ W_m - H_1 - L_β の各相）を確認できた。一方、重合性基が存在するPC11-6-11の場合には、 W_m - H_1 - L_β の各相に加えて、 H_1 と L_β の二相間にラメラ液晶相（ L_α 相）を見いだした。 L_α 相の同定は、以下の実験結果に基づき行った：①ラメラ液晶相特有の偏光像（マルターゼクロスとモザイクテクスチャー）が光学顕微鏡観察により確認された（Fig. 3b：PC11-6-11の81 wt %溶液）；②SAXS測定結果（Fig. 4c：PC11-6-11の81 wt %溶液）の低角領域に q 値の比が $1:2$ の繰り返しピークが出現した；および③SAXS測定結果の広角領域にシャープなピークがあらわれなかったことによる。

重合性基の有無で相図を比較すると、重合性基を有する界面活性剤は非重合性の界面活性剤よりも、 H_1 相のあらわれる濃度が上昇した。これはモノメリック型（Fig. 2aと2bの比較）とジェミニ型（Fig. 2cと2dの比較）に共通して見られる傾向である。疎水基末端に結合された重合性基は親水的作用を供することが表面張力（空気/水溶液系）の測定結果から示唆されている^{7,9)}。そのため、重合性基が存在することによる H_1 相の高濃度シフトは、疎水鎖間のパッキングが重合性基により乱されたことに起因しているものと考えられる。重合性基導入による疎水鎖のパッキング能の低下は、PC11-6-11系のみで L_α 相が出現したことにも寄与している。すなわち、 L_β 相は疎水鎖がラメラ膜の垂直方向に加えて平行方向にも秩序性をもっているのに対し、 L_α 相の秩序性は垂直方向のみである。PC11-6-11系で失われた平行方向の秩序性は、疎水鎖末端に存在する重合性基の親水的作用に基づいている。

モノメリック型とジェミニ型で得られた相図を比較すると、 H_1 相と L_β 相のあらわれる濃度が非重合性の場合にはそれぞれいくらか低下し（Fig. 2aと2c比較）、重合性の場合には上昇しているように見える（Fig. 2bと2dの比較）。しかしここで、Fig. 2の横軸（界面活性剤濃度）は重量パーセント表示であることに注意を要する。つまり、系に存在する界面活性剤の物質質量（あるいはモル濃度）でこれらの結果を規格化すると、モノメリック型に比べて分子量が2倍以上あるジェミニ型のほうが、 H_1 相と L_β 相のあらわれる濃度はそれぞれ確実に低くなる。この結果は、モノメリック型からジェミニ型になることで臨界充填パラメーター（CPP）¹²⁾の値が増加し、曲率の小さな分子集合体（今回の場合は、 W_m 相よりも H_1 相、あるいは H_1 相よりも L_β 相）が形成されやすいと考えれば理解できる。また、ジェミニ型になるとスパーサー部の存在により分子全体の疎水性が増加したことも上記の結果に関与している可能性がある。

4. 結 論

水溶液中における炭化水素系のモノメリック型界面活性剤およびジェミニ型界面活性剤の分子集合体形成に及ぼす重合性基の影響を、クロスニコル下による目視および偏光顕微鏡観察、SAXS測定により検討した。その結果、UTAB, PC11, 11-6-11の相図は、低濃度側から W_m -II(W_m+H_1)- H_1 - L_β 相となった。一方、PC11-6-11の相図は H_1 相と L_β 相との間に L_α 相が出現し、低濃度側から W_m -II- H_1 - L_α - L_β 相となった。モノメリック型とジェミニ型に共通して、疎水基末端に重合性基が存在すると、 H_1 相を形成する濃度が上昇することがわかった。また、モノメリ

ック型に比べてジェミニ型界面活性剤のほうが H_1 相を形成する濃度(物質量で規格化)は低下した。本研究で得られた成果は、新規な有機機能性材料を界面活性剤が形成する相状態の固定化により得ようとする際、その基礎的知見となることが期待される。

文 献

- 1) 阿部正彦, 坂本一民, 福井 寛: "トコトンやさしい界面活性剤の本", 日刊工業新聞社(2010).
- 2) K. Holmberg (辻井 薫・高木俊夫・前田 悠 監訳): "応用界面・コロイド化学ハンドブック" 第2編第6章(阿部正彦・大久保貴広・土屋好司訳), エヌ・ティー・エス(2006).
- 3) Y. Takamatsu, N. Iwata, K. Tsubone, K. Torigoe, T. Endo, K. Sakai, H. Sakai, M. Abe: *J. Colloid Interface Sci.*, **338**, 229 (2009).
- 4) K. Sakai, Y. Sangawa, Y. Takamatsu, T. Kawai, M. Matsumoto, H. Sakai, M. Abe: *J. Oleo Sci.*, **59**, 541 (2010).
- 5) K. Sakai, N. Umemoto, W. Matsuda, Y. Takamatsu, M. Matsumoto, H. Sakai, M. Abe: *J. Oleo Sci.*, **60**, 411 (2011).
- 6) K. Sakai, H. Sakai, M. Abe: *J. Oleo Sci.*, **60**, 159 (2011).
- 7) M. Abe, K. Tsubone, T. Koike, K. Tsuchiya, T. Ohkubo, H. Sakai: *Langmuir*, **22**, 8293 (2006).
- 8) K. Sakai, M. Wada, W. Matsuda, K. Tsuchiya, Y. Takamatsu, K. Tsubone, T. Endo, K. Torigoe, H. Sakai, M. Abe: *J. Oleo Sci.*, **58**, 403 (2009).
- 9) M. Abe, T. Koike, H. Nishiyama, S. C. Sharma, K. Tsubone, K. Tsuchiya, K. Sakai, H. Sakai, Y. A. Shchipunov, J. Schmidt, Y. Talmon: *J. Colloid Interface Sci.*, **330**, 250 (2009).
- 10) K. Tajima, T. Aida: *Chem. Commun.*, 2399 (2000).
- 11) K. Sakai, K. Izumi, H. Sakai, M. Abe: *J. Colloid Interface Sci.*, **343**, 491 (2010).
- 12) J. N. イスラエルアチヴィリ(訳: 近藤 保, 大島広行): "分子間力と表面力(第2版)", 朝倉書店(1996).

Effects of Polymerizable Groups on Aqueous Phase Behavior of Monomeric and Gemini Cationic Surfactants

Kenichi SAKAI^{*,**,\dagger}, Hironori NISHIYAMA^{*}, Kosuke OGURA^{*}, Yuhei KUROKI^{*}, Takeshi ENDO^{*},
Koji TSUCHIYA^{**,***}, Hideki SAKAI^{*,**} and Masahiko ABE^{*,**,\dagger}

^{*}Faculty of Science and Technology, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda, Chiba 278-8510, Japan

^{**}Research Institute for Science and Technology, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda, Chiba 278-8510, Japan

^{***}Faculty of Science, Tokyo University of Science, 1-3 Kagurazaka, Shinjuku, Tokyo 162-8601, Japan

^{\dagger} Corresponding Authors, E-mail: k-sakai@rs.noda.tus.ac.jp, abemasa@rs.noda.tus.ac.jp

(Received March 12, 2012; Accepted June 14, 2012)

Abstract

Effects of polymerizable groups on aqueous phase behavior of monomeric and gemini surfactants have been studied on the basis of visual appearance, polarized optical microscopy (POM), and small angle X-ray scattering (SAXS) data. Three phases were observed for non-polymerizable monomeric (UTAB), polymerizable monomeric (PC11), and non-polymerizable gemini (11-6-11) surfactants: micellar solution (W_m), hexagonal (H_1), and lamellar gel (L_β) phases. In the case of a polymerizable gemini surfactant (PC11-6-11), we saw a lamellar liquid crystal (L_α) phase between the H_1 and L_β phases (i.e., W_m - H_1 - L_α - L_β phase transition). Polymerizable groups covalently bound to the terminal hydrocarbon chains resulted in an increased W_m - H_1 phase transition concentration for both the monomeric and gemini surfactants. It seems that this is due to the loosely packed hydrocarbon chains of the polymerizable surfactants in their molecular aggregates. We also found that the gemini surfactants yield a lower W_m - H_1 phase transition concentration (in mol/L) than the monomeric ones, as a result of an increased critical packing parameter and/or an increased hydrophobicity of the gemini surfactants.

Key-words: Gemini surfactant, Polymerizable surfactant, Phase behavior

微小気泡を鑄型としたシリカ中空粒子の調製

酒井秀樹^{*1,2}・鈴木菜津美^{*1}・遠藤健司^{*1}・酒井健一^{*1,2}・土屋好司^{*2,3}・阿部正彦^{*1,2}

微小気泡を鋳型としたシリカ中空粒子の調製

酒井秀樹*^{1,2}・鈴木菜津美*¹・遠藤健司*¹・酒井健一*^{1,2}・土屋好司*^{2,3}・阿部正彦*^{1,2}

Preparation of silica hollow particles using microbubbles as a template

We report here a preparation of silica hollow particles using microbubbles as a template. Microbubbles were prepared in aqueous didodecyldimethylammonium bromide (DDAB) solutions in the presence of 1 % ethanol. Sulfur hexafluoride was used as gas phase. We prepared silica shell on the bubble surface by hydrolysis and condensation reactions of TEOS. Transmission electron microscope observation confirmed that silica hollow particles of about 100 nm in diameter were obtained by the present method.

Key words : silica hollow particle, bubble, cationic surfactant, sol-gel reaction

Received July 23, 2012; Accepted September 17, 2012

1. 緒言

中空粒子とは内部に空隙を有する粒子であり、低密度、高比表面積、物質内包能等の通常の粒子とは異なる種々の性質を持つ。そのため、材料に混入させることにより軽量化や機能の複合化ができるため、軽量材や断熱材¹⁾、複合材料²⁾、色材³⁾など幅広い分野で応用されている^{4), 5)}。その中でも、シリカ(SiO₂)中空粒子は特に注目されており、安価・低屈折率・生体適合性に優れるという

特徴を有することから、ディスプレイ用の反射防止フィルムや、薬剤を内包することによりドラッグデリバリーシステム(DDS)のキャリアーへの応用が期待されている^{6)~8)}。

従来、中空粒子合成法としては、有機ビーズテンプレート法、エマルジョンテンプレート法、噴霧熱分解法、静電噴霧法などが報告されている⁶⁾。しかし、これらの調製法には、環境負荷の高い有機物の使用が不可欠であること、合成に時間がかかり、その方法が容易でないことなどの問題点がある。鋳型の周囲に壁膜を形成させ、その後に鋳型を除去する調製するテンプレート法は、無機中空粒子を調製する上で最も効率的な方法とされているが、中空構造を有するためのコアの作成が必要であり、その作成や除去の作業が困難なことが問題点となっている。

本研究では、界面活性剤により安定化された微小気泡を鋳型とした、シリカ中空粒子の調製について検討を行った。直径 50 μm 以下の微小気泡

*¹ Sakai Hideki, Suzuki Natsumi, Endo Takeshi, Sakai Kenichi and Abe Masahiko
東京理科大学 理工学部 工業化学科
千葉県野田市山崎 2641 (〒278-8510)

*² Sakai Hideaki, Sakai Kenichi, Tsuchiya Koji and Abe Masahiko
東京理科大学 総合研究機構
東京都新宿区神楽坂 1-3 (〒162-8205)

*³ Tsuchiya Koji
東京理科大学 理学部 応用化学科
東京都新宿区神楽坂 1-3 (〒162-8205)

は通常の気泡とは異なり、水中での滞在時間が長いという特徴がある⁹⁾。このことを利用し、微小気泡の界面でシリカの壁膜を形成させて中空粒子を調製する。微小気泡を鋳型とすることができれば、鋳型の除去が不要で作業が簡便になることから、幅広い分野での応用が期待される。

これまでに気泡を鋳型としたシリカ中空粒子の調製法として、ゾル-ゲル法により調製したシリカゾルに気体を注入する方法¹⁰⁾と気泡の表面にシリカ粒子を吸着させる方法¹¹⁾が報告されている。しかし、前者はサイズが大きく、後者は表面の緻密さに欠けるという問題点があるため、実際に実用化には及んでいない。そこで、本研究では微小気泡を調製後に、気泡界面にゾル-ゲル法によりシリカの壁膜を直接形成させ、微小かつ緻密なシリカ中空粒子を調製することを目的とした。また、シリカ中空粒子の調製に及ぼす主な要因と考えられる界面活性剤の種類、エタノール添加濃度、pH、シリカ前駆体濃度、内包ガスの調製条件を変化させることにより、最も効率良く中空粒子を調製することができる最適条件を探索した。

2. 実験

2.1 試料

本研究では、微小気泡を安定化させるための界面活性剤として、以下の界面活性剤を使用した。カチオン界面活性剤として、一鎖型であるセチルトリメチルアンモニウムブロミド ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Br}$; CTAB, シグマアルドリッチ製)、及び二鎖型であるジドデシルジメチルアンモニウムブロミド ($[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}]_2(\text{CH}_3)_2\text{NBr}$; DDAB, 東京化成工業(株)製)、ジヘキサデシルジメチルアンモニウムブロミド ($(\text{CH}_3)_2\text{N}[(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3]_2\text{Br}$; DHDAB, 東京化成工業(株)製)を、アニオン界面活性剤として、ドデシル硫酸ナトリウム ($[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3]\text{Na}$; SDS, 日光ケミカルズ(株)製)を、ノニオン界面活性剤として、オクタエチレングリコールモノドデシルエーテル ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_8\text{OH}$; C_{12}E_8 , コスモステクニカルセンター製)、及びオクタエチレングリコールドデシルエーテル ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_8\text{OH}$; C_{16}E_8 , コスモステクニカルセンター製)を使用した。また、内包ガスとして、水難溶性・高密度の六フッ化硫黄 (SF_6 ,

純度 99.999 % 以上, 鈴木商館(株)製)及び窒素 (N_2 , 純度 99.99 % 以上, 鈴木商館(株)製)を使用した。シリカ前駆体には、テトラエチルオルトシリケート ($\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$; TEOS, (株)高純度化学製, 純度 99.9999 %) を使用し、pH 調整剤として水酸化ナトリウム (NaOH , 関東化学(株)製)を使用した。溶媒として、超純水 ($>18.2 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$), 及びエタノール ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$; EtOH, 和光純薬工業(株)製)を使用した。

2.2 シリカ中空粒子の調製

界面活性剤水溶液 20 g に対して、内包ガスで 20 分間バブリングを行った。その後、ガスを送りながら超音波分散機ホモジナイザー ((株)日本精機製作所製 US-300T, 20 kHz) のチップ先端を気液界面付近に固定し、1 分間超音波照射をすることで微小気泡を調製した。その後、大きな気泡を浮上させるために 10 分間静置させた。この溶液に、水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH 調整後、TEOS を加えて 30 分間攪拌し、25 °C で 24 時間静置させた。調製したシリカ中空粒子の構造は、透過型電子顕微鏡 (TEM) (HITACHI 製, H7650) を用いて評価した。

本稿では、シリカ中空粒子の形成に及ぼす要因として、界面活性剤の種類、エタノール添加濃度、pH、シリカ前駆体量、内包ガスを変化させて調製し、シリカ中空粒子を形成させる最適条件を検討した。

2.3 シリカ中空粒子の焼成

調製したシリカ中空粒子から界面活性剤を除去するため焼成を行った。最適条件で調製したシリカ中空粒子(未焼成)分散溶液を吸引ろ過・洗浄を行い、120 °C で 10 時間乾燥処理を行った。その後、乳鉢を用いてサンプルを細かくすりつぶし、500 °C で 6 時間焼成を行い、シリカ中空粒子を得た。

3. 結果及び考察

3.1 界面活性剤の分子構造の最適化

まず、様々な界面活性剤を用いて、気泡を鋳型としたシリカ中空粒子の調製に最適な界面活性剤の検討を行った。界面活性剤には、カチ

オン界面活性剤である一鎖型の CTAB, 二鎖型の DDAB, DHDAB, アニオン界面活性剤である SDS, ノニオン界面活性剤である $C_{12}E_8$, $C_{16}E_8$ を用いた。界面活性剤濃度はすべて 2 mM となるよう統一し, pH=12.0, TEOS 量 0.20 g (最終溶液に対して 24 mM), 内包ガス SF_6 の条件でシリカ粒子を調製した。調製したシリカ粒子の TEM 観察結果を図 1 に示す。

図 1 より, CTAB, DDAB, DHDAB, $C_{16}E_8$ において, 部分的ではあるが中空粒子を確認することができた。その中でも, DDAB を用いた場合に最も数多くの中空粒子が観察された。また, SDS, $C_{12}E_8$ においては, 粒子は確認されず, バルク体で反応したシリカ凝集体のみ観察された。アニオン, ノニオン界面活性剤に比べ, カチオン界面活性剤を用いた時中空粒子を形成しやすかった。この原因として, シリカ前駆体の加水分解により生成する中間体が負の電荷を有するため, カチオン界面活性剤との静電相互作用により気泡界面で選

択的に吸着するためと考えられる。また, カチオン界面活性剤の中でも特に DDAB を用いた時最も数多くの中空粒子を得ることができた。これは, 界面活性剤の吸脱着速度とゲル—液晶相転移温度に起因すると考えられる。DDAB は吸脱着速度が遅いため, NaOH や TEOS を加えた際, 界面活性剤が気泡界面から脱離しにくい。また, DDAB は 25 °C で液晶の相状態をとるため, 流動性が高く曲率エネルギー (界面膜に曲率を付与するのに必要なエネルギー) が小さい。このような理由から, 気泡の安定性が比較的高かったものと考えられる。

以上より, 界面活性剤に DDAB を用いたとき最も数多くのシリカ中空粒子を調製できることが分かり, 以後界面活性剤に DDAB を用いてさらなる調製条件の最適化を行うことにした。なお, DDAB 水溶液 2 mM を用いて調製した微小気泡の気泡径は, 動的散乱測定より気泡調製 10 分後の時点で直径 100~200 nm であった。

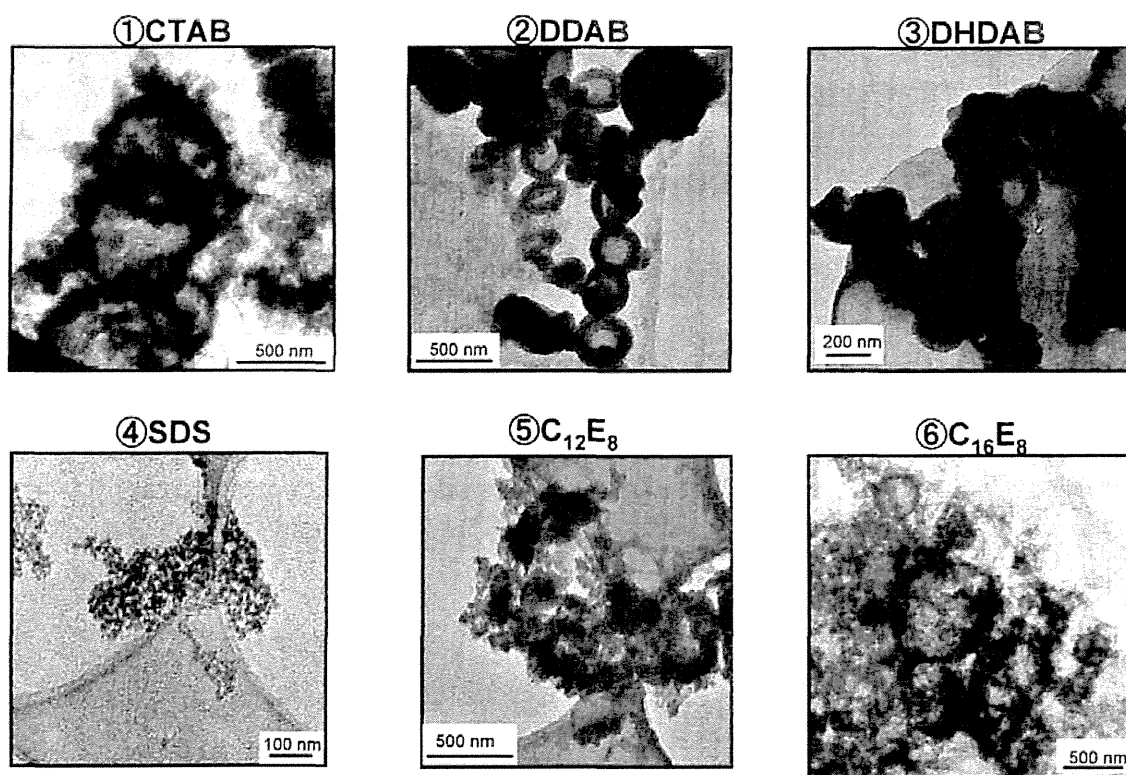


図 1 種々の界面活性剤を用いて調製したバブルを鋳型として作成したシリカ中空粒子の TEM 観察結果

3.2 エタノール添加濃度の影響

前項では、界面活性剤に DDAB を用いた時、部分的に中空構造を確認することができたが、得られる中空粒子量は少なかった。そこで、気泡発生量を増加させるために界面活性剤水溶液に少量のエタノールを添加した。エタノールを 0 (無添加)、1、3、5、10 wt% と変化させ界面活性剤水溶液を調製し、シリカ中空粒子の調製を試みた。界面活性剤には DDAB を用い (2 mM)、pH=12.0、TEOS 量 0.20 g (24 mM)、内包ガス SF₆ の条件で行った。

その結果、エタノール添加濃度 1、3 wt% において、無添加系よりも高収率でシリカ中空粒子が確認することができた (図 2)。これは、エタノールの添加により、キャビテーション効果の促進や溶媒の表面張力値の低下により気泡発生量が増加したためと考えられる。しかし、5 wt% 以上では添加濃度の増加に伴い、中空粒子の数が減少した。過剰量添加すると、表面張力値の低下から気泡の安定性が低下し、気泡が崩壊しやすくなったものと考えられる。以上より、エタノール添加濃

度 1~3 wt% の時に、無添加よの場合よりも効率よくシリカ中空粒子を調製できることが分かり、その中でも収率が最も高かった 1 wt% を最適エタノール添加濃度とした。

3.3 pH の影響

次に pH による影響を検討するため、pH を 10.5、11.0、11.5、12.0、12.5 と変化させ、調製を試みた。エタノール添加濃度 1 wt%、TEOS 量 0.20 g (24 mM)、内包ガス SF₆ の条件で行った。

その結果、pH 11.0、11.5、12.0 の時中空粒子を形成できることが分かった (図 3)。pH 10.5 ではシリカの凝集体しか確認することができなかった。これは、pH が低すぎるために加水分解反応が遅くシリカの壁膜が形成する前に気泡が崩壊したためと考えられる。一方、pH が高い pH 12.5 では、針状粒子が形成された。pH が高いため加水分解反応が一気に進み、直線的で粗雑な構造のシリカが形成されたためと考えられる。よって、pH 11.0~12.0 の中で最も高収率で中空粒子を調製することができた pH 11.5 を最適 pH とした。

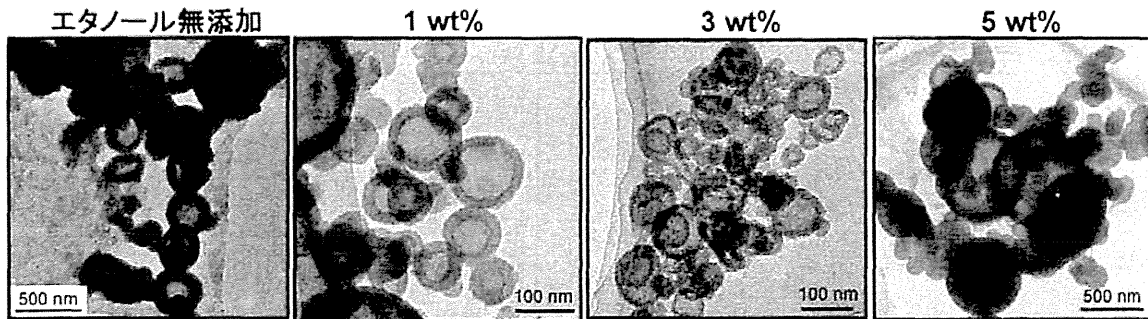


図 2 エタノール添加濃度を変化させて調製したシリカ中空粒子の TEM 観察結果 (界面活性剤: DDAB, pH=12)

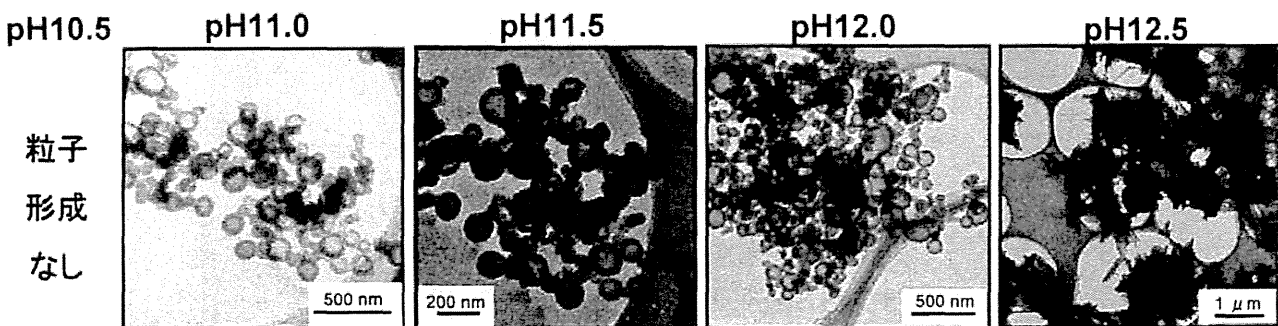


図 3 種々の pH で調製したシリカ中空粒子の TEM 観察結果 (界面活性剤: DDAB, EtOH濃度: 1 wt%)

3.4 シリカ前駆体濃度の影響

続いて、TEOS 量がシリカ中空粒子に及ぼす影響を検討した。TEOS 量を 0.050, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40 g (各3.0, 6.0, 12, 24, 36 mM) と変化させ、調製を行った。他の条件は、エタノール添加濃度 1 wt%, pH=11.5, 内包ガス SF₆ に固定した。

その結果、0.20 g (24 mM) の時、最も収率良くシリカ中空粒子を得ることができた (図 4)。0.050 g (6.0 mM) では粒子の形成は確認できず、0.10 g (12 mM) では中空粒子がわずかに確認できたもののその表面は粗かった。TEOS 量の不足のため形成できる中空粒子の数も少なく、また気泡界面に TEOS が吸着しても充分強固なシリカ壁膜を形成しにくいためと考えられる。一方、0.20 g 以上では、TEOS 量の増加に伴い中空粒子の膜厚が厚くなり、バルク中の凝集物や粒子間の凝集が増加した。0.20 g の時、中空粒子の膜厚は 10~20 nm であったのに対し、0.30 g (36 mM) では約 30 nm となり、さらに 0.40 g (48 mM) では電子線が

透過できないほど膜厚が増大した。以上より、壁膜の厚さが最も適当であった 0.20 g (24 mM) を最適 TEOS 量に決定した。

3.5 内包ガスの影響

続いて、内包ガスによる影響について検討を行った。これまでの検討では、我々のこれまでの検討結果³⁾をもとに、オストワルド熟成を抑制し気泡を安定化させるために、内包ガスとして比重が大きく難溶性である SF₆ を用いていたが、本項では、SF₆ と比較するため空気や窒素 (N₂) での調製を試みた。内包ガスとしてそれぞれ空気、N₂、SF₆ を用いて、エタノール添加濃度 1 wt%, pH 11.5, TEOS 量 0.20 g の条件下で中空粒子の調製を試みた。

その結果、空気及び N₂ を用いた場合には SF₆ を用いた場合と比べ、中空粒子の粒子径が小さくなった。また、生成粒子数は減少し、凝集が多く見られた (図 5)。気泡の大きさに分布があると、

TEOS

0.05 g

0.1 g

0.2 g

0.3 g

0.4 g

粒子
形成
なし

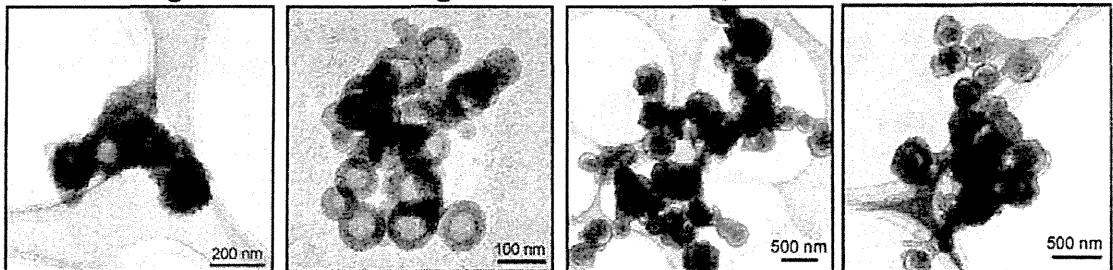


図 4 シリカ前駆体量を変化させて調製したシリカ中空粒子の TEM 観察結果 (界面活性剤: DDAB, EtOH 濃度: 1 wt%, pH=11.5)

Air

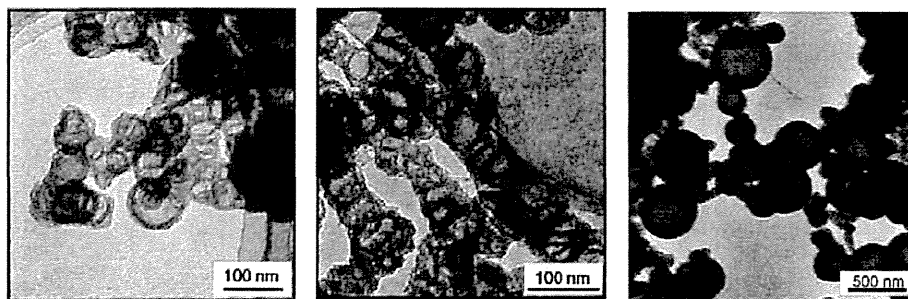
N₂SF₆

図 5 内包ガスを変化させて調製したシリカ中空粒子の TEM 観察結果

時間の経過に伴い、小さい気泡を構成していたガスが水中に溶解し、拡散して大きな気泡に取り込まれ、小さな気泡はより小さくなり、一方大きい気泡はさらに大きくなるという現象(オストワルド熟成)が観測される。空気と N_2 を用いた場合では気泡中のガスが水中を拡散し、壁膜形成中に気泡のサイズ変化が生じやすい。そのため、生成した中空粒子の粒子径は小さくなるが、崩壊する中空粒子も多いため生成数は減少したと考えられる(図 6)。一方、 SF_6 場合、水への溶解が無視できるほど小さいため、オストワルド熟成による気泡サイズの成長が抑制され、安定性が向上するために、結果として数多くのシリカ中空粒子を調製できると考えられる。

3.6 シリカ中空粒子の焼成

これまでに検討した最適条件で調製したシリカ中空粒子を、界面活性剤を除去するため焼成を試みた。焼成は、 $500\text{ }^\circ\text{C}$ で 6 時間行った。焼成前のシリカ中空粒子の TEM 像を図 7 (a) に、焼成後の

TEM 像を図 7 (b) に示す。

図 7 (b) より、焼成後も中空構造を維持できることが分かった。焼成後もほぼ同一の粒子径であり、平均粒子径 110 nm 、膜厚 $10\sim 20\text{ nm}$ であった。

以上のことから、微小気泡を鋳型として、微小かつ緻密なシリカ中空粒子を調製する手法を確立することができた。

4. 結論

カチオン界面活性剤、特に二鎖型構造を有する DDAB を用いて微小気泡を形成させ、これを鋳型にしてシリカ前駆体である TEOS の加水分解・重縮合反応を行うことにより、シリカ中空粒子を調製することができた。また、気泡の安定化剤として用いるエタノールの添加濃度、pH、TEOS 量、内包ガスの条件を変化させて最適条件の検討を行ったところ、エタノール添加濃度 $1\text{ wt}\%$ 、pH 11.5 、TEOS 量 0.20 g (24 mM)、内包ガス SF_6 の時最も効率よく中空粒子が得られることが分かつ

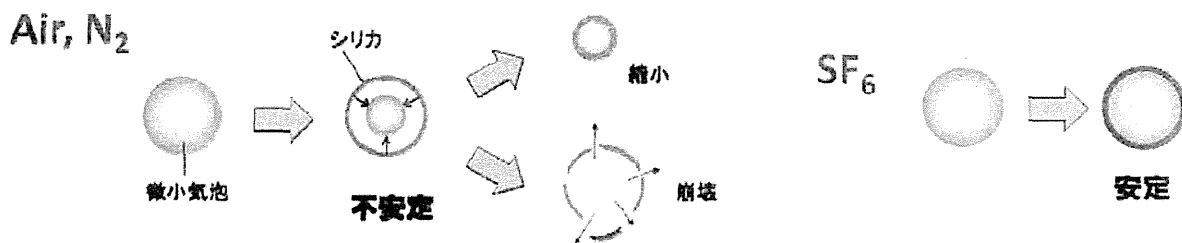


図 6 シリカ中空粒子の形態に及ぼす内包ガスの影響

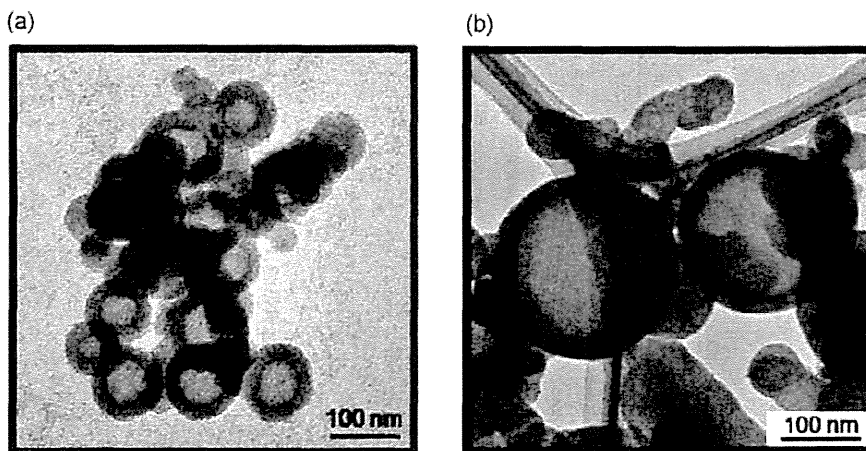


図 7 最適条件で調製したシリカ中空粒子の TEM 像 (a) 焼成前, (b) 焼成後

た。この最適条件で得られたシリカ中空粒子は、平均粒子径 110 nm, 膜厚 10~20 nm であり、焼成 (500℃, 6 h) 後も中空構造を保持することができた。

参考文献

- 1) T. Tani, *R&D Review of Toyota CRDI*, **34**, 3 (1999).
- 2) 戸田裕之, 加賀城央, 細井一良, 小林俊郎, 伊藤洋輔, 東原隆, 合田孝志, *材料*, **50**, 474-481 (2001).
- 3) J. Park, *J. Colloid Interface Sci.*, **266**, 107-114 (2003).
- 4) D. Walsh, B. Lebeau, S. Mann, *Advanced Materials*, **11**, 324-328 (1999).
- 5) F. Caruso, R. A Caruso, H. Mohwald, *Science*, **282**, 1111-1114 (1998).
- 6) 小石真純, “マイクロ/ナノ系カプセル・微粒子の開発と応用”, シーエムシー出版 (2003).
- 7) C. Oh, J. H. Park, S. Shin, S. G. Oh, *Studies in Surface Science and Catalysis*, **146**, 189-192 (2003).
- 8) J. H. Park, S. Y. Bae, S. G. Oh, *Chemistry Letters*, **32**, 598-599 (2003).
- 9) 石井淑夫ら編, “泡のエンジニアリング”, テクノシステム, (2005).
- 10) Y. S. Han, Y. Tarutani, M. Fuji, M. Takahashi, *Advanced Materials Research*, **11-12**, 673-676 (2006).
- 11) D. Grigoriev, R. Miller, D. Shchukin, H. Möhwald, *Small*, **3**, 665-671 (2007).

Original Article

Development of humanized steroid and xenobiotic receptor mouse by homologous knock-in of the human steroid and xenobiotic receptor ligand binding domain sequence

Katsuhide Igarashi¹, Satoshi Kitajima¹, Ken-ichi Aisaki¹, Kentaro Tanemura¹,
Yuhji Taquahashi¹, Noriko Moriyama¹, Eriko Ikeno¹, Nae Matsuda¹, Yumiko Saga^{2,3},
Bruce Blumberg⁴ and Jun Kanno¹

¹Division of Cellular and Molecular Toxicology, Biological Safety Research Center,
National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo, 158-8501, Japan

²Division of Mammalian Development, National Institute of Genetics, Yata 1111, Mishima 411-8540, Japan

³The Graduate University for Advanced Studies (Sokendai), Yata 1111, Mishima 411-8540, Japan

⁴Department of Developmental and Cell Biology, 2011 Biological Sciences 3, University of California,
Irvine, CA 92697-2300, USA

(Received December 7, 2011; Accepted January 12, 2012)

ABSTRACT — The human steroid and xenobiotic receptor (SXR), (also known as pregnane X receptor PXR, and NR1I2) is a low affinity sensor that responds to a variety of endobiotic, nutritional and xenobiotic ligands. SXR activates transcription of Cytochrome P450, family 3, subfamily A (CYP3A) and other important metabolic enzymes to up-regulate catabolic pathways mediating xenobiotic elimination. One key feature that demarcates SXR from other nuclear receptors is that the human and rodent orthologues exhibit different ligand preference for a subset of toxicologically important chemicals. This difference leads to a profound problem for rodent studies to predict toxicity in humans. The objective of this study is to generate a new humanized mouse line, which responds systemically to human-specific ligands in order to better predict systemic toxicity in humans. For this purpose, the ligand binding domain (LBD) of the human SXR was homologously knocked-in to the murine gene replacing the endogenous LBD. The LBD-humanized chimeric gene was expressed in all ten organs examined, including liver, small intestine, stomach, kidney and lung in a pattern similar to the endogenous gene expressed in the wild-type (WT) mouse. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis showed that the human-selective ligand, rifampicin induced Cyp3a11 and Carboxylesterase 6 (Ces6) mRNA expression in liver and intestine, whereas the murine-selective ligand, pregnenolone-16-carbonitrile did not. This new humanized mouse line should provide a useful tool for assessing whole body toxicity, whether acute, chronic or developmental, induced by human selective ligands themselves and subsequently generated metabolites that can trigger further toxic responses mediated secondarily by other receptors distributed body-wide.

Key words: Steroid and xenobiotic receptor, Pregnane X receptor, Humanized mouse,
Ligand binding domain, Knock-in mouse

INTRODUCTION

Most orally administered xenobiotics are metabolized first by the intestine and then by the liver after portal transport. The expression levels of enzymes involved in xenobiotic metabolism are regulated at the transcriptional level by key xenobiotic sensors including the ster-

oid and xenobiotic receptor (SXR), also known as the pregnane X receptor (PXR), pregnane activated receptor (PAR) and NR1I2 (Bertilsson *et al.*, 1998; Lehmann *et al.*, 1998; Blumberg *et al.*, 1998). SXR is important in the field of toxicology for at least two reasons. Firstly, this receptor system induces the expression of CYP3A and CYP2B enzymes, the major metabolizers of pharmaceu-

Correspondence: Jun Kanno (E-mail: kanno@nihs.go.jp)

tics and xenobiotics. Therefore, SXR is a key mediator of drug- and chemical-induced toxicity as well as drug-drug and drug-nutrient interactions (Zhou *et al.*, 2004). Secondly, the orthologous rodent and human receptors exhibit differential sensitivity for a subset of chemical ligands important in the field of toxicology. For example, rifampicin (RIF) is a specific and selective activator of human SXR, whereas pregnenolone 16 α -carbonitrile (PCN) is selective for the rodent orthologue.

Rodent-human differences in CYP3A and CYP2B-mediated responses to xenobiotics can be a profound problem in toxicologic studies where rodents are used to predict the toxicity of a compound in humans (Ma *et al.*, 2007). Therefore, development of a murine model that reconstructs the SXR-mediated systemic response of humans is of a great significance in toxicology.

Human and rodent SXRs share ~95% amino acid sequence identity in the DNA-binding domain (DBD) but only about 77% identity in the LBD. Tirona *et al.* (2004) analyzed the ligand selectivity of a human-rat chimeric protein and showed that the species differences are primarily defined by sequence differences in the LBD. Watkins and colleagues showed that the key residues responsible for the majority of the ligand selectivity were Leu 308 (human) and Phe305 (rat and mouse). Crystallographic analysis located these amino acids within or neighboring the flexible loop that forms a part of the pore to the ligand-binding cavity. Swapping the rodent and human-specific residues was shown to modulate the activation by the human-selective activator RIF *in vitro* (Watkins *et al.*, 2001). According to those findings, a simple replacement of the mouse LBD with the human sequence should be sufficient to "humanize" the ligand binding properties as well as activation of the downstream target genes.

Three kinds of humanized mice have already been generated. One is the SXR-null/Alb-SXR mouse (Alb-SXR mouse) made by crossing the SXR knockout mice with a transgenic mouse line that expresses human SXR in liver under the control of the albumin promoter (Xie *et al.*, 2000). Gonzalez and colleagues generated a transgenic mouse expressing a human BAC containing the entire hSXR gene in a SXR null background, thus controlled under human SXR promoter (SXR BAC mouse) (Ma *et al.*, 2007). Another mouse is the human SXR genome knock-in mice (hSXR genome mouse) (Scheer *et al.*, 2008). The human SXR genomic region from exon 2 to exon 9 was knocked-in to mouse SXR exon 2. This mouse expresses the human full length SXR mRNA under the control of mouse SXR promoter regulation. Although useful for toxicology studies, these mice

have disadvantages in that the human SXR is expressed only in the liver (Alb-SXR mouse), hSXR mRNA is not expressed in all of the tissues where SXR is known to be expressed (SXR BAC mouse), and there might be potential differences in the binding affinities of hSXR DNA-binding domain (DBD) to *cis*-acting elements in mouse SXR target genes (hSXR genome mouse).

As noted above, it is known that the critical differences between human and rodent ligand-selectivity reside in the LBD. Therefore, when our project to generate a humanized SXR mouse was initiated, we reasoned that altering the LBD would be sufficient to generate a humanized ligand selectivity. We decided to retain the mouse DBD to avoid any potential differences between the binding affinities of the chimeric receptor for *cis*-acting elements in the mouse genome. To maintain the tissue-specific expression pattern of the endogenous gene, we inserted the human cDNA encoding the region carboxyl-terminal to the DBD into the mouse gene. This retains all of the 5' and 3' regulatory elements in the mouse gene, as well as introns 1 and 2, which contain important elements for regulating SXR expression (Jung *et al.*, 2006).

Here we report a new line of mouse (hSXRki mouse) in which a cDNA encoding the human LBD is homologously recombined into the mouse gene after exon 3. The tissue distribution of the resulting chimeric mouse DBD-human LBD mRNA is comparable to that of the WT mouse. The hSXRki mouse showed a fully humanized response to the human-selective activator RIF in that the *Cyp3a11* mRNA was induced in liver and mucosa of small intestine in response to RIF, but not the rodent-selective compound PCN. This new mouse line should provide a useful tool for assessing the whole body toxicity induced by a human selective SXR ligand itself and its subsequently generated metabolite(s) that can trigger further toxic responses through other pathways body-wide.

MATERIALS AND METHODS

Generation of hSXRki knock-in mice

A DNA fragment of mouse SXR intron 2 to exon 3 was PCR amplified using mouse BAC DNA (BAC clone No. RP23-351P21) as a template. Primers used were BAC39486FW and mSXR462RV (for sequences of the primers see Table1). This fragment was connected to the LBD of human SXR cDNA from amino acid 105 through the carboxyl terminus amplified by the PCR primers: hSXR904FW and hSXR1887RVEcoRI (template; human SXR cDNA). The 3'UTR of bovine growth hormone (BGH) was added to 3' to the terminal codon. This concatenated fragment was introduced to a vector, which

Humanized SXR Mouse by knock-in of human SXR LBD

Table 1. List of primer pairs

Purpose	Primer name	Sequence (5' to 3')
Targeting vector construction	BAC39486FW	CCATGGGTACCACGAATAACAA
	mSXR462RV	CATGCCACTCTCCAGGCA
	hSXR904FW	AAGAAGGAGATGATCATGTCCG
	hSXR1887RVEcoRI	CCGAATTCTCATCATCAGCTACCTGTGATACCGAACA
Genotyping	NeoAL2	GGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTT
	SXR RC RV5	TGAGAGTGCACAAGTTCAAGCT
	WTInt5	AGTGATGGGAACCACTCCTG
	WTE6RV	TGGTCTCAATAGGCAGGTC
	mhSXRE4	GTGAACGGACAGGGACTCAG
	mhSXRSARV	CTCTCTGGCTCATCTCAC
Percellome quantitative RT-PCR	Cyp3a11 FW	CAGCTTGGTGCTCCTCTACC
	Cyp3a11 RV	TCAAACAACCCCATGTTTT
	Ces6 FW	GGAGCCTGAGTTCAGGACAGAC
	Ces6 RV	ACCTCACTGTTGGGGTTC
	mouse SXR FW	AATCATGAAAGACAGGGTTC
	mouse SXR RV	AAGAGCACAGATCTTTCCG
	human SXR FW	ATCACCCGGAAGACACGAC
	human SXR RV	AAGAGCACAGATCTTTCCG
	mouse-human SXR FW	CCCATCAACGTAGAGGAGGA

has the neomycin resistance gene with loxP sequence at both ends, removable with Cre recombinase (Saga *et al.*, 1999). A 7kb KpnI fragment containing intron 2 was used as a long arm and 1.3kb PstI-EcoRI fragment containing from exon 8 to intron 8 was used as a short arm for homologous recombination (Fig. 1). The resulting targeting vector was linearized with SacII and introduced by electroporation to TT2 ES cell line (Yagi *et al.*, 1993) and neomycin resistant clones were selected, PCR genotyped, and confirmed by the Southern blotting. For generation of chimeric mice, these ES clones were aggregated with ICR 8-cell embryos and transferred to pseudopregnant female recipients. The chimeric mice born were bred with ICR females. Germ line transmission of the targeted allele was confirmed by PCR. A mouse was crossed with a CAG-Cre transgenic mouse (Sakai and Miyazaki, 1997) to evict the neomycin resistance gene, and back crossed to C57BL/6 CrSlc (SLC, Inc., Shizuoka, Japan) at least 6 generations and used for the analysis.

PCR Genotyping

(See Table 1 for primer sequences)

Primers for identification of homologously recombined ES clones were NeoAL2 and SXR RC RV5. DNA purified from the tail of each mouse was used for PCR genotyping. Primers for WT detection were WTInt5 and WTE6RV amplifying a product of 755 bp. Primers for

confirmation of removal of the neomycin resistance gene were mhSXRE4 and mhSXRSARV amplifying a product of 1,223 bp.

Southern blot analysis

To confirm homologous recombination, DNA from ES cell cultures was purified and digested with BamHI and XhoI, then electrophoresed and analyzed by Southern hybridization (Saga *et al.*, 1997). Mouse SXR exon 9 region which remains after homologous recombination was used for the probe. The restriction fragments from the WT allele and targeted allele are 2,305 bp and 1,925 bp, respectively.

Chemicals

RIF (molecular weight 822.95) and PCN (molecular weight 341.49) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Corn oil was purchased from Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan).

Quantitative RT-PCR (Percellome PCR)

(See Table 1 for primer sequences)

The method for Percellome quantitative RT-PCR was described previously (Kanno *et al.*, 2006). Briefly, tissue pieces stored in RNAlater (Ambion, Austin, TX, USA) were homogenized and lysed in RLT buffer (Qiagen GmbH., Germany) and 10 µl aliquots were used

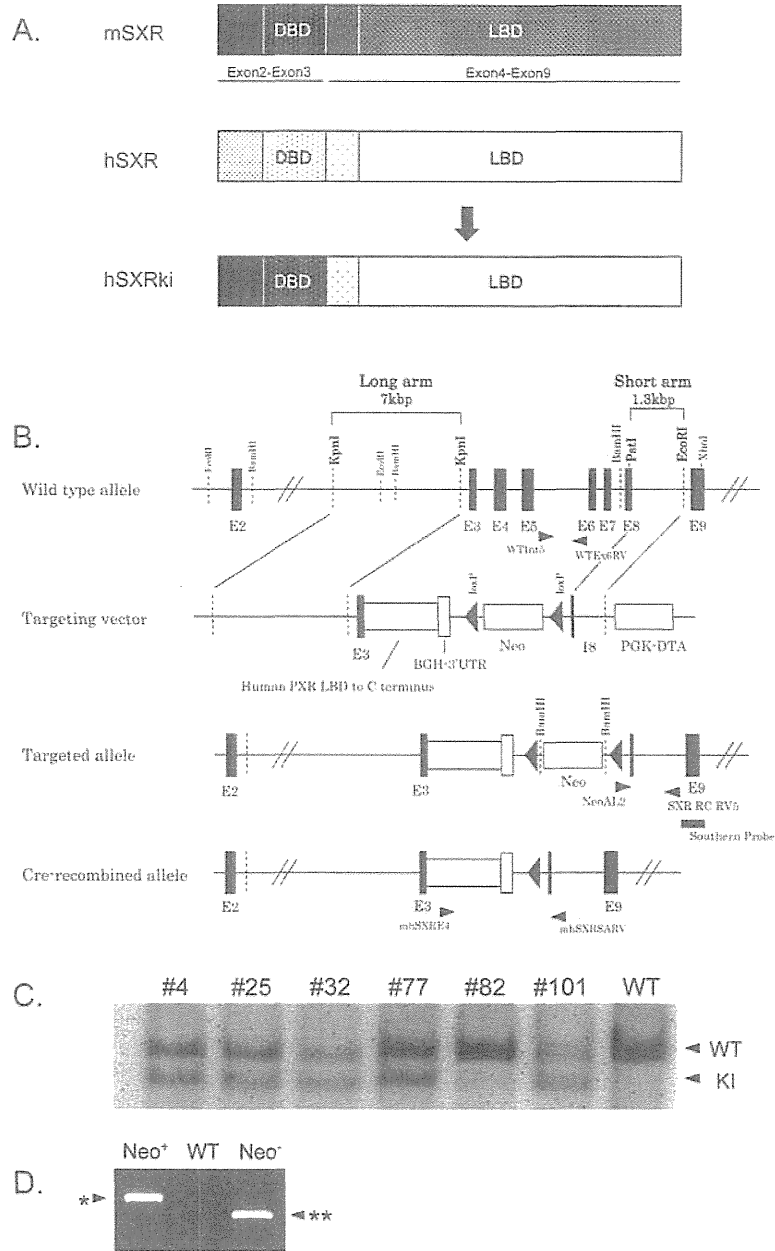


Fig. 1. Targeting strategy used to generate the hSXRki mouse. **A)** Diagram of hSXRki chimeric protein. Hinge region and ligand binding domain (LBD) of human SXR are knocked-in to mouse SXR, resulting in chimeric protein having murine N-terminal domain and DNA binding domain (DBD). **B)** Targeting strategy used to generate the hSXRki mouse. The chimeric mouse DBD and human LBD fragment, followed by the BGH 3' UTR were knocked-in to the mouse SXR gene. The genomic region spanning from exon 3 to exon 8 was substituted by the inserted fragment with the remainder of the gene remaining intact. **C)** Confirmation of homologous recombination by southern blot analysis. Six ES clones positive for recombination by PCR genotyping were further analyzed by southern blot (clones #4 ~ #101). Lower bands (1925 bp) indicate successful homologous recombination; upper bands (2305 bp) correspond to WT allele. Clones #4, #25, #32, #77 and #101 were confirmed as homologous recombinants; clones #4 and #25 were used for the generation of chimeric mice. **D)** Confirmation of Cre-mediated removal of the neomycin resistance gene. Mouse tail genome DNA was PCR amplified with the primer set, mhSXRE4 and mhSXR SARV. *, 2,858 bp (for the mice having the neomycin resistance gene), **, 1,223 bp (for the mice without the neomycin resistance gene).

Humanized SXR Mouse by knock-in of human SXR LBD

for genomic DNA quantification with PicoGreen fluorescent dye (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A prepared spike mRNA cocktail solution containing known quantity of five mRNAs of bacillus subtilis was added to the tissue lysate in proportion to the DNA quantity. Total RNA was purified from the lysate using the RNeasy kit (Qiagen). One microgram of total RNA was reverse-transcribed with SuperScript II (Invitrogen). Quantitative real time PCR was performed with an ABI PRISM 7900 HT sequence detection system (Applied Biosystems) using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), with initial denaturation at 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 30 sec at 95°C and 30 sec at 60°C and 30 sec at 72°C, and Ct values were obtained. Primers for Cyp3a11 were Cyp3a11 FW and Cyp3a11 RV. Primers for Ces6 were Ces6 FW and Ces6 RV. Primers for mouse SXR selective quantification were mouse SXR FW and mouse SXR RV. Primers for hSXRki selective quantification were human SXR FW and human SXR RV. Primers for both mouse SXR and hSXRki quantification were mouse-human SXR FW and mouse-human SXR RV that amplify the DBD region of the chimera.

In Situ Hybridization analysis

Digoxigenin-labeled cRNA probe for Cyp3a11 was synthesized according to Suzuki *et al.* (2005) by RT-PCR using mouse liver cDNA as a template. The primers used were as follows: forward 5'-GATTGGTTTTGATGCCTGGT-3' and reverse 5'-CAAGAGCTCACATTTTTTCATCA-3'. The amplified product was sequence confirmed

and ligated with Block-iT T7-TOPO (Invitrogen) Linker, which contains the T7 promoter site. A secondary PCR was performed to generate the sense and antisense DNA templates. For antisense template, Block-iT T7 Primer and Cyp3a11 forward primer (or reverse primer for generation of sense DNA template), the same primer as for the first PCR amplification, were used. With these DNA templates, both sense and antisense digoxigenin-labeled riboprobes were synthesized using a DIG RNA labeling kit (Roche Diagnostics, Germany) according to the manufacturer's protocol.

ISH on paraffin sections was carried out according to Suzuki *et al.* with a modification; permeabilization condition 98°C for 15 min in HistoVT One (Nacalai tesque, Japan).

Animals experiments

Male hSXRki and WT mice were maintained under a 12 hr light/12 hr dark cycle with water and chow (CRF-1, Oriental Yeast Co. Ltd., Tokyo, Japan) provided *ad libitum*. The animal studies were conducted in accordance with the Guidance for Animal Studies of the National Institute of Health Sciences under Institutional approval. The expression level of the hSXRki and WT SXR mRNA of ten organs (brain, thymus, heart, lung, liver, stomach, spleen, kidney, small intestine and testis) were analyzed on 15 weeks old male mice (n = 2) by the Percollome quantitative RT-PCR.

For the demonstration of selective gene induction by RIF and PCN in hSXRki and WT male mice on 13 weeks

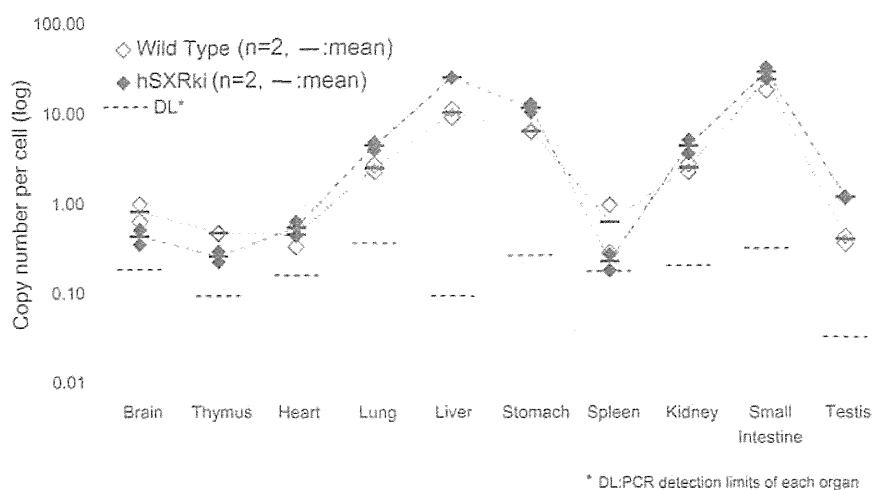


Fig. 2. Conservation of tissue expression patterns of hSXRki mRNA in the knock-in mouse. Percollome quantitative RT-PCR analysis was performed to measure the absolute expression levels of WT SXR mRNA and hSXRki mRNA in ten organs of WT and hSXRki mice. The expression levels of hSXRki mRNA among organs were comparable to WT.

old, three mice per group were singly dosed orally with vehicle (corn oil+0.1% DMSO), 10, 30, or 100 mg/kg of RIF, or 20, 70, or 200 mg/kg PCN (approximately equivalent in molar dose). Eight hours later, mice were sacrificed by exsanguination under ether anesthesia and the liver and the small intestine mucosa were sampled. Liver samples in small pieces were stored in RNA later (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) for further analysis. The small intestine under ice-cooled condition was longitudinally opened, gently rinsed with RNase-free saline and the epithelium was scraped with a glass slide and immersed in RNAlater. For *in situ* hybridization (ISH) of Cyp3a11 in the liver, 15 weeks old male hSXRki and WT mice were dosed orally with vehicle (corn oil), RIF (10 mg/kg), or PCN (40 mg/kg) daily for 3 days and liver sampled 24 hr later. All mice were sacrificed by exsanguination under ether anesthesia.

Statistical analysis

All values are expressed as the means \pm S.D. and group differences analyzed by unpaired Student's *t* test or one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc comparison. Level of significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Generation of hSXRki knock-in mice

Among 144 neomycin resistant TT2 ES clones, six PCR positive clones were further submitted to Southern blotting for the confirmation of homologous recombination. As shown in Fig. 1C, five clones were confirmed, and two (#4 and #25) were used to generate chimeric mice. The resulting mice were backcrossed to ICR strain to confirm germline transmission. One clone (#4) was crossed to a mouse constitutively expressing Cre recombinase to remove the neomycin resistance gene (Fig. 1D) and backcrossed to C57BL/6 CrSlc for at least 6 generations before further analysis.

Tissue distribution of hSXRki mRNA

Ten tissues, i.e., brain, thymus, heart, lung, liver, stomach, spleen, kidney, small intestine and testis from both hSXRki and WT mice were measured for hSXRki or WT SXR mRNA expression by the Percellome quantitative RT-PCR. As shown in Fig. 2, the levels of hSXRki mRNA are comparable to that of SXR in WT mouse and expressed in all tissues analyzed.

Humanized responses in hSXRki mouse

Humanized response of hSXRki was demonstrated by administration of the mouse-specific ligand PCN and the

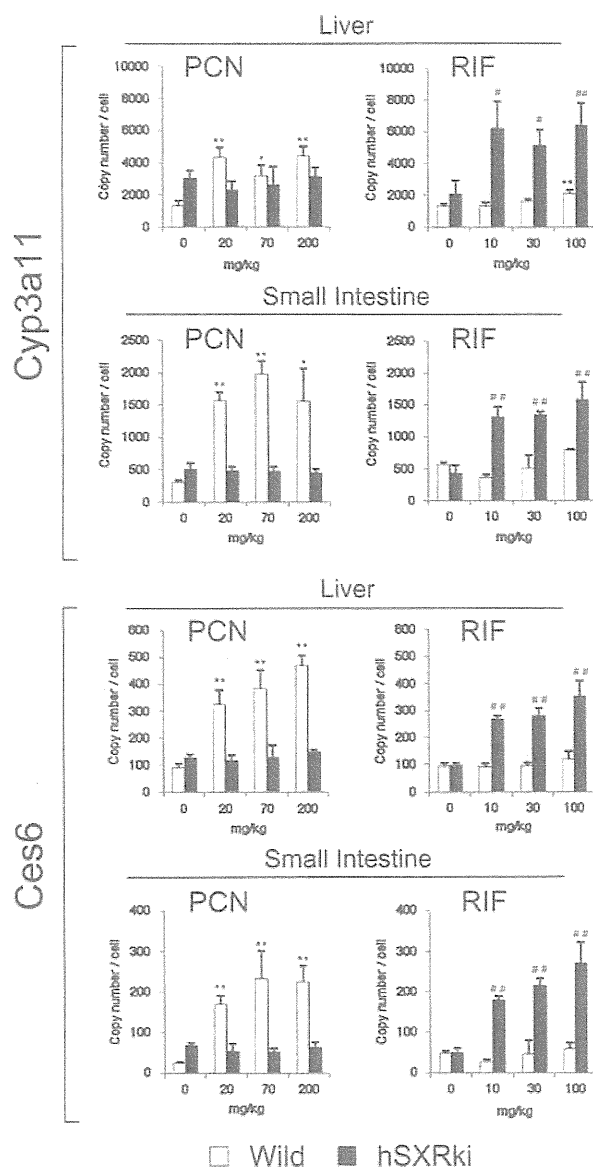


Fig. 3. Humanized response of hSXRki mice to RIF and PCN; Percellome quantitative RT-PCR. WT mice and hSXRki mice ($n = 3$ each) were singly dosed orally with vehicle (corn oil+0.1% DMSO), 20, 70, or 200 mg/kg PCN, or 10, 30, or 100 mg/kg of RIF (approximately equivalent in molar dose each other). Percellome quantitative RT-PCR data of Cyp3a11 and Ces6, both known as SXR target genes, in liver and small intestinal mucosa showed humanized responses in hSXRki. Bars = S.D., *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ compared with vehicle group of WT, #, $p < 0.05$, ##, $p < 0.01$ compared with vehicle group of hSXRki. Analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc comparison. Level of significance was set at $p < 0.05$.

ISH of Cyp3a11

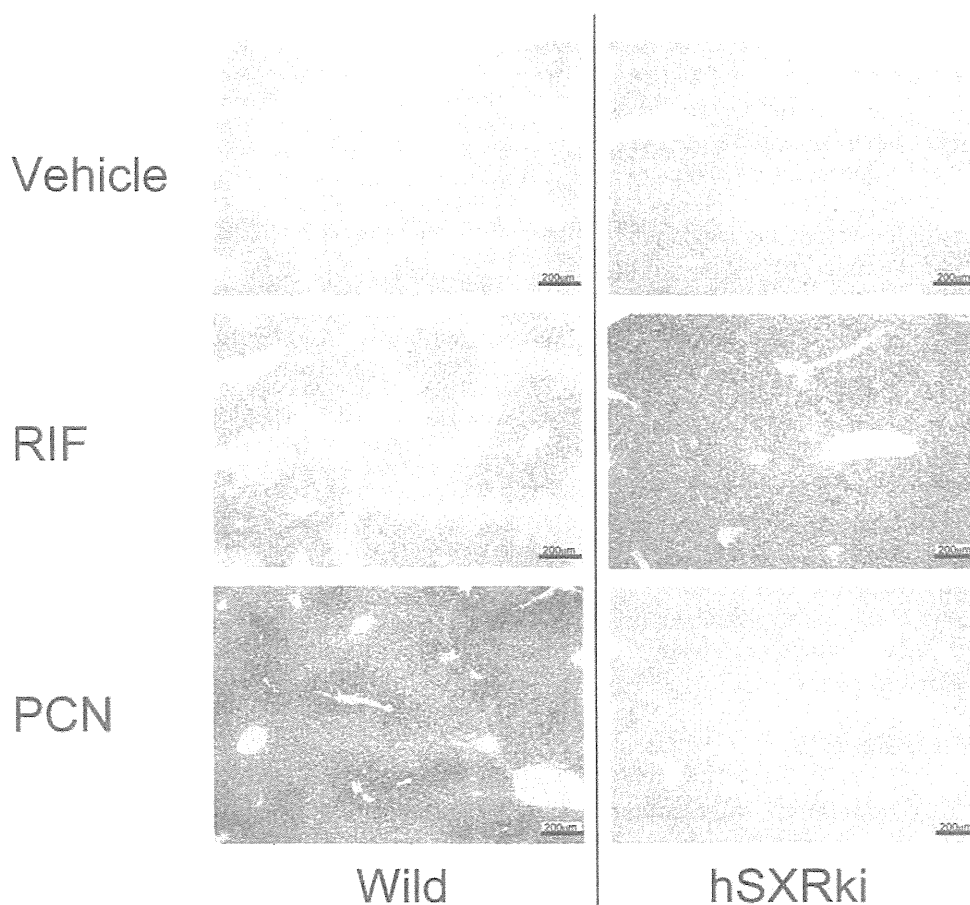


Fig. 4. Humanized response of hSXRki mice to RIF and PCN; *In situ* hybridization for Cyp3a11 mRNA in liver. A DIG-labeled cRNA probe for Cyp3a11 was hybridized and developed for purplish blue chromogenic reaction. Histologically, Cyp3a11 induction was localized around the central veins in both mice with species-specific ligands, respectively.

human-specific ligand RIF to the mice. Induction of the well-known SXR-regulated genes, Cyp3a11 and Ces6 was monitored by Percellome quantitative RT-PCR. As shown in Fig. 3, in the liver and small intestinal mucosa, RIF, but not PCN, induced Cyp3a11 and Ces6 in hSXRki mice (closed column), whereas PCN exclusively induced these genes in WT mice (open column). ISH of Cyp3a11 of the liver also showed humanized responses in hSXRki mice (Fig. 4).

DISCUSSION

We generated a new humanized mouse model in which the ligand binding domain (LBD) of human SXR was homologously knocked-into the murine SXR gene so that systemic response induced by human-selective SXR ligands can be monitored in mice. Firstly, we showed that mRNA from this chimeric gene was expressed at appropriate levels in the same tissues as the endogenous mouse SXR gene in WT mice. Then the humanized response of the mouse was confirmed by monitoring its response to the human-selective activator RIF, and the lack of response to the rodent-selective activator PCN.