

0.05 で足切りして、2 倍以上差があった同定されたペプチドのみをリストアップした結果、SNIPER (ER) 処理により発現量が増加したタンパク質は 15 タンパク質、発現が減少したタンパク質は 2 タンパク質のみであった。一方で、ウェスタンブロットにおいては、SNIPER (ER) の標的タンパク質である ER $\alpha$  のタンパク量が、SNIPER (ER) 処理により 2 倍以上減少することを確認しているが、MS 解析では検出されなかった。

### 2) ユビキチン化タンパク質の網羅的解析

LC/MS/MS 解析の結果、全体で約 700 ペプチドを同定することができた。また、そのうち 651 ペプチドはユビキチン C 末端由来の GG が付加したペプチドであり、ほとんどがユビキチン化されたペプチドであることが確認された。さらに、非常に多くのユビキチン化ペプチドが SNIPER (ER) 処理により 2 倍以上変動しており、10 倍以上検出が増加するユビキチン化ペプチドとしても、342 ペプチド同定することができた。

### 3) 膜透過性複合ペプチドの合成研究

MCF-7 細胞及び T47D 細胞を用いて膜透過性を検討した結果、FAM-PERM-1、FAM-PERM-3 は膜を透過しなかったが、N 末に膜透過性ペプチド (R7) を結合させた FAM-PERM-1-R7、FAM-PERM-3-R7 は細胞内に導入されることが明らかとなった。ペプチド PERM-1-R7、PERM-3-R7 について *in vitro* レベルにおける ER-コアクチベータ結合阻害能の評価を行った。その結果 R7 修飾された複合ペプチド PERM-1-R7、PERM-3-R7 はペプチド単独である PERM-1、PERM-3 と比較して若干の阻害能の低下が見られたものの優れた ER-コアクチベータ結合阻害能を示した。

PERM が ER に結合するなら、ER はコアクチベータと結合できずに転写阻害が起きる事が期

待される。実際、ペプチド PERM-3-R7 は 3 $\mu$ M において E2 単独添加時と比較し ER 転写活性化を 87% 阻害した。これらペプチドのコンフォメーション解析を行うために、CD スペクトルの測定を行った結果、PERM-1、PERM-3、PERM-1-R7、PERM-3-R7 では 208 nm 及び 222 nm 付近に負の吸収極大を示したことから、PERM-1、PERM-3、PERM-1-R7、PERM-3-R7 のヘリカル構造の形成が示唆された。PERM-1、PERM-3 が示すヘリカル構造は C 末端を R7 修飾した後も保持されると考えられる。

### 4) 多価型ペプチドシート合成技術の確立

従来の多価型ペプチドライブラリー法から得られたモチーフ情報をベースとして、セルロースシート上に多価型ペプチドライブラリーを合成する技術を確立し、最終的に 64 種の部位特異的結合モチーフを得た。このうち 11 種のモチーフを多価型ペプチドライブラリーと同じ核構造に 4 価で組み入れたペプチド性化合物を合成した。これら化合物は、高親和性で Stx1a B-subunit に結合し、Stx1a の細胞毒性を効率よく阻害することが示された。

多価型ペプチドライブラリー法と Intavis 社のスライドスポットターを組み合わせ、1 枚のスライドガラス上に最大 768 種類の多価ペプチドをスパーサーを介してスポット状に合成する新たな系を確立した。本系では、シート合成用のセルロースに比較してアミノ基の密度が 2.5 倍高いディスク状のセルロースを用い、1 つのディスク上に多価型ペプチドを 1 種類ずつ合成してから溶解し、スライドスポットターを用いてスライドガラス上へと固定した。このため、スパーサー長ならびに種類、結合させる多価ペプチドの基盤上の密度、などの合成条件、さらにブロット後標的タンパクを高感度に検出する

ための条件、等を新たに最適化した。

## ⑤ 新規培養基材等を用いた肝代謝・動態等評価系の開発

### 1) 新規肝代謝・動態等評価法の開発

PXB-cells は、株フェニックスバイオ社のヒトキメラマウス由来の hepatocyte で、このマウスはヒトの肝細胞の移植によって、肝臓の70%~90%以上が正常ヒト肝細胞に置換されている。このため PXB マウスの肝臓では、ヒトアルブミンの産生、ヒト代謝酵素及びトランスポーターの発現および活性、ヒト型の胆汁酸組成などが確認されている。今回 PXB-cells をコラーゲンプレートで培養し検討したところ、PXB-cells は HepaRG 細胞と遜色のない代謝活性、薬物代謝誘導能を有していることが明らかとなった。

ad-MED ビトリゲルによる PXB-cells、HepaRG 細胞の培養では、HepaRG の CYP1A2 の発現を亢進することを明らかにした。

### 2) 新規基材を用いた肝代謝・動態等評価系の施設間差データのとりまとめ

ad-MED ビトリゲルで培養した際のヒト凍結肝細胞における代謝酵素活性を検討した (図 22)。CYP3A4、2C9 及び 1A2 の代謝酵素活性は、ad-MED ビトリゲル®で培養した方が従来法と比べてより高い活性を示した。また、これら3分子種については、培養7日においても代謝活性が高いことから、長期にわたり酵素活性が維持できる培養系であることが示唆された。CYP2C19 及び CYP2D6 の代謝酵素活性は、従来法で培養後のそれと比較してほぼ同等の活性を示した。

### 3) 新規基材を用いた肝代謝・動態等評価系構築と化合物を用いた評価

肝内胆管がん由来 TKKK 細胞はコラーゲンをコートしたプラスチックディッシュの底面上、肝外胆管がん由来 TFK-1 細胞は通常の培養用プラスチックディッシュの底面上で良好に接着、伸展および増殖したが、TFK-1 細胞に比べ TKKK 細胞の成長には時間を要することが分かった。両細胞とも十分なストックを調製して、液体窒素中に凍結保存した。

### 4) キメラ動物由来ヒト肝細胞の特性解析

異なる3ドナー由来の凍結ヒト肝細胞を移植して作製された PXB-mouse から分離された PXB-cells は、いずれのマウスからも  $10^8$  個以上得られ、分離した生存率は75%以上を示し、プレートへの高い接着性を示していた。またプレート上に播種された PXB-cells は、培養期間中(3週間)、成熟肝細胞様の形態を呈し、アルブミン産生能を維持していた。

PXB-cells における各薬物代謝酵素の遺伝子発現を経時的に測定したところ、その発現パターンは、1) 発現低下が著しいもの(1/10以下、hCYP2D6, hUGT2B7)、2) 軽微な発現低下を示すもの(1/10以内、hCYP1A1, hCYP2C9など)、3) 同等レベルを維持するもの(hCYP3A4, hUGT1A1など)の3つに分類された(図23)。また、hUGT2B7の遺伝子発現においては、ドナー間差が認められた。

PXB-cells における CYP3A4 酵素活性を経時的に測定したところ、培養2日目にその酵素活性は分離直後に比べ低下するものの、その後回復し、培養3週間目には分離直後と同等の値を示した。また、CYP3A4 活性レベルにはドナー間差が認められた。

PXB-cells において、誘導剤による hCYP1A1, hCYP1A2 および hCYP3A4 遺伝子発現量の増加が確認された。この誘導能は、培養期間中維持さ

れていた。また hCYP1A1, hCYP1A2 および hCYP3A4 誘導能にはドナー間差が認められた。

#### 5) リポタンパク産生系に着目した肝細胞機能評価法の開発

HDL 形成膜トランスポーターABCA1 について、ヒト肝に二種類の肝型 (typeL3 および L2b) mRNA バリエーションとコレステロール低下による誘導を見いだしている。そこで、ABCA1 各バリエーションの発現ならびにコレステロール低下による応答を指標に、ad-Med ビトリゲル培養法の評価を試みた。JHH-5 および HepG2 細胞において、肝型の発現レベルは大きく影響されず、コレステロールによる発現応答は維持された。肝型発現に必須の転写因子 HNF4  $\alpha$  の発現は影響されなかった。一方 HepaRG 細胞の発現誘導能を評価したところ、ABCA1 末梢型の LXR による発現誘導は顕著に認められた一方、肝型 L3 ならびにコレステロール合成酵素の発現が低く、コレステロール応答が認められなかった。

#### 6) リポタンパク産生の解析手法の検討

HDL のコレステロール搬出能を、泡沫化マクロファージのコレステロールを [<sup>3</sup>H] 標識して測定する方法を最適化し、再現性良く解析可能な測定系を確立した。また HDL の構造・組成解析法として、2 次元電気泳動を用いて、血漿中の HDL 亜分画へのタンパク成分 (アポ A-I および A-II) 分布を解析する手法を確立した。

### ⑥ プラスチック製医療機器の化学物質影響評価法 2 種の開発

#### 1) 簡易溶血性試験法の性能評価

3 種の公定法を用いた PE, LG, BR 及び Y 系材料の溶血性試験では、各検体が有する溶血特性と合致する成績が得られた (図 24)。一方、ASTM が推奨する陽性対照材料である NG は ASTM 直接

法及び抽出液法ともに強い溶血活性を示し、NIH 法 (直接法) においても 50%前後の溶血率を示したが、MHLW 法 (抽出液法) では顕著な活性が認められなかった (図 24)。各検体の溶血特性を簡易溶血性試験法により評価した結果、簡易溶血性試験法は MHLW 法/抽出液法と異なり、陽性対照材料である NG の溶血特性を探知することが可能であった (図 25)。また、抽出液法でも LG 及び BR の溶血特性を感度良く評価できる等、3 種の公定法と比較して同等以上の感度で各検体の溶血能を探知できることも明らかとなった (図 25)。また、簡易溶血性試験法は新規血液バックの素材候補である DOTH/DINCH 配合 PVC シートの溶血特性も評価可能であった。

#### 2) 炎症誘導能評価 (図 26)

陰性対照であるコーン油と比較して、DEHP は有意な IL-6 産生能を有することが確認された。DIDP, DOTP, DINCH, DEHA 及び ESBO は DEHP と同程度の活性を示し、DEHP 及び TOTM はこれらの可塑剤よりも有意に高い IL-6 産生誘導能を有することが判明した。一方、ATBC は IL-6 産生誘導能を殆ど示さないことが確認された。

#### 3) TOTM 配合 PVC 製体外循環血液回路用チューブの特性評価

TOTM の 24 時間溶出量 (チューブ表面積あたりの溶出量) は最大 1.45 $\mu$ g/cm<sup>2</sup> であった (図 27)。成人用体外循環用血液回路の PVC チューブ表面積は 10,839 cm<sup>2</sup> であり、成人患者に対する曝露量は 0.26 mg/kg/day と算出された。また、当該チューブの溶血性試験を行った結果、いずれの被験物質にも溶血毒性は認められなかった。

### ⑦ 研究成果の活用

平成 27 年 2 月 26 日 (木) に全日通労働組

合会議室にて、創薬基盤推進研究事業 研究成果発表会を「医薬品・医療機器の実用化促進のための官民共同研究の進捗と展望」のテーマで開催した。プログラムを以下に記す。

医薬品・医療機器の実用化促進のための評価技術手法の戦略的開発

医薬安全科学部 部長 斎藤 嘉朗

リスク評価のための信頼性の高い *in vivo* 遺伝毒性評価スキームの確立

変異遺伝部 室長 山田 雅巳

新規培養細胞株を用いたインフュージョン反応惹起性の評価法開発

医薬安全科学部 室長 中村 亮介

新規培養基材等を用いた肝代謝・動態等評価系の開発

薬理部 室長 石田 誠一

プラスチック製医療機器の化学物質影響評価法 2 種の開発

医療機器部 室長 靱島 由二

まとめ

国立医薬品食品衛生研究所 所長 川西 徹

なお、研究代表者・斎藤の発表中に、他の 2 テーマ（①新規低分子安全性バイオマーカー探索における標準的評価法構築、④分子標的薬のオフターゲット効果の評価法開発）についても紹介した。

## D. 考察

### ①新規低分子安全性バイオマーカー探索における標準的評価法構築

1) 腎障害モデル動物の作製と表現型解析、及び血漿メタボローム解析による腎障害に関連するバイオマーカーの評価手法の構築

既知の 3 種の腎毒性物質を用いて、尿中の各種 BM の変動について検討を行った結果、腎障害の部位、程度、時期によって反応する BM が異なることが明らかになり、腎障害を尿中サンプルより検出するためには、BM の選択の際に注意を要すると考えられた。

一方、血清の脂質メタボローム解析により見出されたアムホテリシン B による腎障害で有意に変動した脂質分子に関しては、各分子種の変動の時間推移を基に、病理変化や既知の BM との比較を行い、BM 候補になりうるかを検討する予定である。また、腎組織や尿中のメタボローム解析を行い、血清中の変動脂質分子種との相関性を比較することも、BM 候補の選定に有用と考える。

### 2) 肝障害モデル動物の作製、及び血漿メタボローム解析による肝障害に関連するバイオマーカーの評価手法の構築

タモキシフェンによる脂肪肝を伴う薬物性肝障害の早期診断、重篤化診断に用いる BM 候補代謝物を同定にあたっては、肝組織の病理評価の結果や既知の BM の変動との関連を解析し、有意差の認められた代謝物 BM 候補から絞り込みを行う予定である。

### 3) バイオマーカー値を用いた、ヒト生体における薬物動態の予測法確立

肝臓における薬物代謝酵素およびトランスポーターの機能を予測する方法として、特異的基質（プローブ）および特異的阻害剤を用いた方法が有効であるが、当該タンパクの基質となる BM を見出すことができれば、薬物を投与することなくヒト生体における薬物動態を予測することができる。本研究では、OATP および CYP2C8 に着目し、阻害剤投与条件下で変動する BM を見出すために臨床試験を実施し、血漿サン

プルを用いたメタボローム解析を実施する予定である。将来的には、OATP および CYP2C8 が関与する複雑な薬物間相互作用の予測等にも応用することを考えている。

#### 4) 薬物動態関連蛋白質のノックアウト動物等の調製とメタボローム測定

Atp8b1 ノックアウトマウス（ホモ型）では、野生型マウスならびにヘテロ型マウスに比較して、一部の血漿中脂質に変動が認められたことから、Atp8b1 は phosphatidylserine のフリッパーゼであるが、生体内では脂質の体内動態にも関与するものと期待される。今後は、同定された BM 候補が、トランスポーターの輸送機能の変動を反映した結果であり、トランスポーターの機能欠損により副次的に生じた結果ではないことを証明するため、機能解析による検証が重要と考えられた。

#### 5) 高血圧発症腎疾患モデル動物の作製と包括的代謝物測定の検討

発症機序の異なる高血圧ラットに食塩を負荷することで、腎障害ラットモデルを作製した。その結果、Dahl 食塩感受性ラットに 4%食塩含有飼料を 8 週間摂取させることで、尿細管に著しい硝子円柱が生じることを認め、対照群である DIR/Eis 群との病理的差異が明確であり、今後の評価系として有用であることが判明した。また、尿の <sup>1</sup>H-NMR スペクトルの包括的なプロファイリング解析より、病態の特徴を把握することができた。尿の NMR-メタボリック・プロファイリングは、非侵襲かつ前処理を必要としないため、腎疾患評価の一手法として有用であることが示された。

今後とも本研究の遂行を通じて、副作用等の発現を予測・評価しうる BM 候補の選定やその測定手法の構築、及び実データでの解析過程で

見いだされる問題点とその解決法等の副作用 BM 評価手法の開発につながる知見が得られ、評価要件の確立に役立つと考えられる。

#### 6) 重篤副作用に関連する複数の安全性バイオマーカーの同時診断系の検討

BIST 法は、ビーズアレイをキャピラリーチップの中に封入した遺伝子多型検出法である。BIST 法を用いることで、1 本の分注チップ内で多種の遺伝子多型を同時に解析でき、かつ、分注に使用するチップ内で全ての反応が行えることから、自動化が容易となる。これまでに開発したカルバマゼピン誘因性重症薬疹関連多型解析法で使用していないタグを選択して、抗てんかん薬であるフェノバルビタールによる薬疹の発症に関連する *HLA-B\*51:01* のタグ多型である 2 か所の遺伝子多型 (rs2596560、rs2442736) について解析を行った。今後は、さらなる実用性を示すために、検体数の追加と、抗てんかん薬の薬疹に関連する複数の安全性 BM の同時診断系を開発する予定である。

#### ② リスク評価のための信頼性の高い *in vivo* 遺伝毒性評価スキームの確立

##### 1) 2-NA の *gpt* 遺伝子突然変異試験 (*gpt* アッセイ : TG 試験の一種)

肝臓における *gpt* アッセイについては、用量依存性は明らかでないものの、複数の投与群で有意な MF 増加が見られたことから、陽性と考えられる。膀胱において高純度で高分子のままの、アッセイに適するゲノム DNA を抽出できなかった原因として、膀胱そのものが小さな臓器であり膀胱粘膜が微小组織であるためと推察される。Ames 試験については、TA100 株において代謝活性化系の有無にかかわらず明確な復帰突然変異の誘発が認められ既存の報告と同様の結果が得られた。

## 2) 2-NA の膀胱と肝臓におけるコメット試験および骨髄小核試験

hOGG1 は代表的な DNA 酸化損傷である 8-oxo-dG を認識し除去する酵素である。この酵素で処理した時のみ 2-NA 処理した細胞がコメット試験で陽性になったこと、さらに、その変化が抗酸化剤処理により消失したことから、2-NA により DNA 上に酸化損傷が生成される事が強く示唆された。このことから、2-NA の膀胱発がんのメカニズムは、既知の報告にある DNA 付加体によるものだけでは無く、DNA 酸化損傷の関与が考えられた。一方、小核試験と通常のコメット試験では 2-NA の遺伝毒性を検出できなかったこと、さらに、*Pig-a* assay も陰性であったことから、試験の組合せには別の *in vivo* 遺伝子突然変異試験を含める必要があると考えられた。

## 3) 2-NA の TK アッセイ

2-NA は TK アッセイにおいて 0.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$  までは用量依存的に突然変異頻度が増加したが、その上の用量 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (最高用量) では代謝活性化系非存在下、存在下ともに陽性コロニーの形成が見られなかった。したがって、2-NA による遺伝子突然変異誘発作用は認められたが、毒性により細胞が生存できなくなって死滅する割合が高いと考えられる。

## 4) タモキシフェン (TXF) を対象とする試験

TXF は間接的な遺伝子損傷、特に発がん過程に代謝を必要とする抗悪性腫瘍剤の一種であり、エストロゲン受容体阻害作用を持つ。TXF を投与したラットを用いた末梢血小核試験と *Pig-a* assay の結果が陰性であったのに対して、肝臓における小核試験が陽性になった結果は、TXF のような発がん過程に代謝を必要とする化合物では肝臓での評価が有用かつ必要であることを示唆している。末梢血及び肝臓を用いた小核試験と *Pig-a* assay の組合せは、突然変異を含めた複数のエンドポイントでの評価が可

能であり、直接的遺伝子傷害作用のみならず、代謝作用を含めた包括的な遺伝毒性評価につながると期待される。また、同一動物から複数の情報を得ることができるため、動物愛護を考慮した評価系と言える。

## 5) 1、2-ジメチルヒドラジン (DMH) を対象とした試験

DMH 処理による *gp*MF の増加は、大腸および肝臓では顕著に認められたが、骨髄では認められなかった。同様に小核の誘発は肝臓では認められたが、末梢血では認められなかった。DMH は肝臓で代謝を受けメチルアゾキシメタノールになり、それが抱合化された状態で存在し、腸管内に排出された後に腸内細菌により脱抱合される体内動態が報告されている。今回の結果はそれと合致する。また、大腸、肝臓および骨髄の小核試験の結果は以前に実施した F344 系統の非 TG 雄ラットと同様であり、非 TG 動物と同等の結果が TG 動物で得られることが示された。

今回の結果より、DMH を Ames 試験と二種類の *in vivo* 試験の組み合わせで評価する場合に、選択する *in vivo* 試験における評価対象臓器は、発がん標的臓器である大腸に加え、肝臓も選択可能であることが確認された。DMH の骨髄小核試験は短期(単回、2 回)投与において陽性および陰性の両方の結果が存在しているが、28 日間反復投与では小核誘発は認められず、骨髄は大腸や肝臓と比較すると DMH の遺伝毒性を検出するのに適切ではないことが考えられた。このような物質の場合、標準的な骨髄小核試験に加え、同一動物で複数のエンドポイントや臓器を選択することで見逃しのない評価に繋がることが考えられた。

## 6) 結果のまとめと仮説

表 2 に今年度実施した三つの発がん物質についての試験の結果一覧を示す。遺伝子突然変異を検出する試験である *Pig-a* assay や、DNA 損

傷性を検出するコメット試験、さらに染色体異常を検出する小核試験（骨髄・末梢血）は、いずれも陰性の結果であった。一方、同じ遺伝子突然変異を検出する試験でも TG 試験では肝臓を用いた場合、どの化合物も陽性になった。小核試験では、二化合物で対象臓器を肝臓にして実施した場合に陽性の結果を得た。用いた化合物はいずれも発がん物質だが、標的臓器が異なる。にもかかわらず、肝臓の小核試験と肝臓の TG 試験ではいずれも陽性の結果を得たことは、肝臓が遺伝毒性試験に感受性が高いことを示唆している。TG 試験のデータベースによると、TG 試験データがある化合物 123 のうち、肝臓のデータがあるものが 92 で、そのうち陽性が 62、すなわち発がん物質について TG 試験を肝臓で実施した場合、その 68% が陽性という事である。ICH S2(R1)における選択肢 2 で「2 種類の異なる組織における *in vivo* 遺伝毒性試験を推奨していること」を勘案すると、組合せの一つはその感度の高さから肝臓を用いた TG 試験がよく、もう一つは、組織とエンドポイントが異なることから、末梢血もしくは骨髄を用いる小核試験がよいと考えられる。

### ③新規培養細胞株を用いたインフュージョン反応惹起性の評価法開発

#### 1) 牛肉アレルギー患者血清中 IgE のセツキシマブへの交差反応性

今回の検討で、島根県在住の牛肉アレルギー患者は、その血清中 IgE がセツキシマブと交差反応をする可能性が高いことが示唆された。さらに過ヨウ素酸処理により IgE 抗体の結合は著明に減弱したことから、これらの IgE はセツキシマブの  $\alpha$ -Gal 糖鎖を認識していると考えられる。米国の研究グループは、患者の臨床的観察から  $\alpha$ -Gal

糖鎖への感作にはマダニ咬傷による  $\alpha$ -Gal 糖鎖含有タンパク質の刺入が要因と報告している。本研究の対象患者もマダニの生息する地域に在住しており、このことは本邦における感作も米国と同様マダニ咬傷に由来する機序であることを示唆している。

これらの患者はセツキシマブ投与の既往はないが、我々は島根県松江市でのセツキシマブによるアナフィラキシー患者を多く経験しており、セツキシマブ投与の際の今後の指導が重要である。また、マダニ咬傷に起因する  $\alpha$ -Gal 糖鎖への感作状況を国内で調査し、セツキシマブ投与に際して啓発することも極めて重要であると思われる。

#### 2) 加熱 OVA による IgE 架橋活性

EXiLE 法を用いて両抗体の加熱 OVA による架橋活性を調べたところ、E-C1 抗体の応答性は、OVA の加熱時間に応じて増大した (図 19A)。E-C1 のエピトープは加熱にもなっても変化しないことを考えると、この結果は、加熱により OVA 分子が凝固・高分子量化し、これにより一分子あたりのエピトープの価数が上昇し、これが IgE の架橋活性を増大させた可能性が考えられる。

一方 E-G5 抗体は、OVA 分子と明らかに結合するにもかかわらず、EXiLE 法では陰性となった (図 19B) が、そのメカニズムは不明である。いずれにせよ、IgE の抗原への結合性と架橋活性とは別の現象であるということが改めて強調されたといえるであろう。

これまで、セツキシマブや牛肉抗原上の  $\alpha$ -Gal と患者血清中 IgE が結合することは、我々を含め多くのグループにより示されてきたが、本研究では、この結合性が果たして IgE を架橋するに十分であるかどうかについて、今後牛肉

アレルギー患者血清を用いた解析を進めていく。

### 3) 樹状細胞への分化誘導

PMA・IL-4 処理により、1) 樹状突起を有する樹状細胞様細胞に分化したこと、2) 樹状細胞マーカーの発現上昇がみられたことから、本条件により単球様細胞から樹状細胞様細胞への分化に成功したと考えられる。一方、単球マーカーである CD14 の発現量には変化がなく、これは、樹状細胞の成熟化が進んでいない（抗原を取り込む前の状態である）ことを意味するものと考えられる。今後、この培養細胞系を用いてタンパク質医薬品の免疫学的副作用について評価を行っていく。

### ④分子標的薬のオフターゲット効果の評価法開発

SNIPER 法により、エストロゲン受容体 ER $\alpha$  をノックダウンする方法を分子標的薬のモデルとして用いて、タンパク質レベルに影響するオフターゲット効果の評価する方法として、1) 通常のプロテオーム解析、2) 細胞内タンパク質の分解に必要なユビキチン化を網羅的に解析する方法、を主として比較した。

プロテオーム解析では細胞内で発現量の多いタンパク質が検出されやすく、発現量の少ないタンパク質は量の変動しても検出できないと考えられた。一方で、ユビキチン化タンパク質の網羅的検出系においても、ノックダウンした ER $\alpha$  のユビキチン化ペプチドは検出されなかった。ER $\alpha$  のユビキチン化サイトとして 302 番目のリシンが報告されているが、その周辺にはリシンやアルギニンといったトリプシンで末端が切断される塩基性のアミノ酸が豊富にあるため、トリプシン処理により非常に短いペ

プチド断片になってしまい、同定されなかった可能性が考えられた。

またオフターゲット効果を厳密に評価するために、ペプチド工学を用いて標的分子をアイソザイムレベルまで峻別できる分解能を持った制御分子の開発に資するプラットフォーム技術を開発、及びヘリカルペプチドをリガンドとして利用した新規膜透過性複合ペプチドの開発を行い、いずれも次年度以降の研究進展が大いに期待できる有用な成果をあげた。

### ⑤ 新規培養基材等を用いた肝代謝・動態等評価系の開発

新規培養法として開発されたコラーゲンビトリゲル薄膜チャンバー (ad-MED ビトリゲル) を肝代謝・動態評価に導入することを目的にヒトキメラマウス由来の hepatocyte PXB-cells、ヒト肝細胞前駆細胞 HepaRG、ヒト凍結肝細胞を ad-MED ビトリゲルで培養した後、ヒトにおけるチトクローム P450 (CYP) 代謝酵素活性、遺伝子発現について検討した。その結果、それぞれの CYP 特異的な代謝物が検出された。また、ヒト凍結肝細胞を播種した際の ad-MED ビトリゲルにおける代謝酵素活性は、従来法のコラーゲン単層培養を用いた時のそれと比較していずれの分子種においても同等あるいはそれ以上の活性を示した。ad-MED ビトリゲルを用いた培養法は、創薬段階における開発化合物の肝代謝評価へ応用できる可能性が示唆された。

3 種類のドナー由来の凍結肝細胞を用いて作製された PXB-mouse から分離された PXB-cells は、いずれも高い生存率とプレートへの接着性を示し、培養期間中その肝機能を非常によく維持していることが確認された。このことから PXB-cells は、*in vitro* 試験利用に有用なヒ



ト肝細胞ソースとなり得ることが示された。また、いくつかの肝機能において、3種類のドナー由来のPXB-cells間で差がみられた。これは移植したドナー肝細胞が本来持つ性質を反映しているものと考えられた。

HDLは血管内壁等に蓄積したコレステロールを引き抜き、動脈硬化を抑制する機能を持つ。肝ABCA1にはコレステロール搬出能の高いHDLを産生する独自の機能が予想されており、肝型ABCA1 mRNAバリエーションと独自の遺伝子発現機構を見いだしている。ABCA1肝型発現とコレステロール応答は、肝細胞機能の指標としての有用性が高いと考えられ、本研究では、ビトリゲルやHepaRG細胞の評価に応用できる可能性が示された。またABCA1の産生するHDLのコレステロール搬出能ならびにHDLの構造組成の解析方法を検討した。今後は肝細胞ソースや培養器材評価への応用をめざす。

## ⑥プラスチック製医療機器の化学物質影響評価法2種の開発

簡易溶血性試験法は、採血のために家兎を飼育する必要がないと共に、青酸化合物を含むDrabkin試薬を利用しない利点を有している。また、ヘモグロビン型の定性能力には劣るが、ヘモグロビンの第一吸収極大であるソーレー帯(415nm)で測定するため、感度的に優れており、試験スケールを1/10に縮小しても良好な成績が得られる。公定法では血液を直接試験に供するが、簡易溶血性試験法ではバックグラウンドを低下させることを目的として、赤血球をPBSにより洗浄する。この洗浄操作に伴い血漿成分が除去されるため、赤血球自体は不安定になるが、溶血剤に対する感度は逆に上昇すると思われる。また、簡易溶血性試験法はASTM法

及びNIH法と異なり、使用する血液のヘモグロビン濃度や吸光度調整が不要である利点もある。このように、公定法と比較して簡易溶血性試験法は操作性に優れていると共に、医用材料の溶血特性を十分探知できる基本性能を有することが確認されたことから、今後、その標準化を目指した研究を行う。

新規血液バッグの基本的な設計コンセプトとして、既存製品の可塑剤暴露量を超えることなく、同等の溶血抑制能を示すことが要求される。DOTH/DINCH配合PVCシートの溶血抑制能と可塑剤溶出量を評価した結果、両者間には明瞭な相関性が観察され、新規血液バッグ素材としてはDEHP配合PVCシートと同等の溶血抑制能及び可塑剤溶出挙動を持つ組成比25:33のDOTH/DINCH配合シートが最適であると思われる。

DEHPが炎症誘導能を有することは過去の報告と一致している。可塑剤は脂溶性物質であるが、血液との相互作用により溶出することが既に明らかになっており、その危険性を単純な*in vitro*試験によって評価できる点において、ヒト細胞を使用したIL-6産生誘導能評価法は優れた試験系と言える。DEHPと比較して有意に高い活性を示すTOTMは、DEHP代替可塑剤として既に医療機器に利用されているため、その使用にあたっては炎症誘導能に着目した検討を要すると思われる。一方、炎症誘導能を示さないATBCは比較的 안전한可塑剤であることが示唆され、透析熱の原因が究明されていない現状において、新たな血液回路を作製するための有益な代替可塑剤となり得る。次年度以降は可塑剤が示すIL-6産生誘導能の作用機序を分子生物学的手法により解析する予定である。

医療機器から溶出する化学物質の摂取許容値(TI:mg/kg/day)は、無毒性量(NOEL)又

は最小毒性量 (LOAEL) を Modifying Factor で除して求めることが ISO 10993-17 により提唱されている。SD 系ラットに対する TOTM の NOAEL は 32mg/kg (静脈内投与) であることが報告されており、Modifying Factor を 100 とした際の TI は 0.32 mg/kg/day となる。本研究で使用した PVC 製血液回路使用時の成人患者に対する TOTM 暴露量は 0.26 mg/kg/day であり、当該 TI を下回ることから、患者に対する毒性影響は認められないことが示唆された。このように、TOTM 配合 PVC 製体外循環血液回路のリスクアセスメントでは有害事象の発生を回避できる結果が得られたが、TOTM はハザードとして炎症誘導能を有する可塑剤である。医用材料の選定にあたっては、無毒性又は低毒性の化学物質を利用することが理想であるため、今後、ハザードとしても炎症誘導能を示さない ATBC を利用した血液回路の開発について検討する予定である。

#### ⑦研究成果の活用

本年度は3年間の研究計画の初年度であることから、成果発表会が必ずしも実用化に直接つながるものとはならないものの、簡便な評価法やより精度の高い評価方法等に発展する可能性のある研究成果の提示がなされたことから、今後の2年間の研究成果が期待される場所である。

## E. 結論

### ①新規低分子安全性バイオマーカー探索における標準的評価法構築

各種モデル動物の血液のメタボローム解析を行い、対照群と比較して有意差が認められる

代謝物を探索すると共に、BM 候補として絞り込む際の評価法を標準化するための検討を開始した。モデル動物の血液を用いたメタボローム解析結果に基づく実践的検討を主として行い、腎障害や体内薬物動態の評価につながりうる複数の BM 候補を見いだした。さらに有意差が認められる代謝物から BM 候補を絞り込む際には、多変量解析やクラスター解析が有用であると考えられ、また選定には、変動幅、再現性、共通性、背景としての個体差等、統計学的な数値、病理診断結果や生物学的な関連性等が重要であると考えられた。薬物動態ならびに有害事象に関連するトランスポーターの機能変動を検出する BM 探索においては、機能解析による検証が重要と考えられた。並行して実施している臨床試験では、内因性物質の変動とプローブ薬物の薬物動態を比較することで、効果的に BM を見出すことができると考えられる。さらに、安全性ゲノム BM の迅速な検出法の開発において、全自動機器による診断の可能性を示すことができた。

### ② リスク評価のための信頼性の高い *in vivo* 遺伝毒性評価スキームの確立

*gpt* アッセイにおいて用量依存性は明らかでないが、2-NA の肝臓での点突然変異誘発性が検出できることがわかった。2-NA について実施した Ames 試験では、TA100 株において代謝活性化系の有無にかかわらず明確な復帰突然変異の誘発が認められ、既存の報告が検証できた。

hOGG1 処理により、2-NA の膀胱発がんメカニズムに DNA 酸化損傷が関与することが示唆された。小核試験と通常のコメット試験では 2-NA の遺伝毒性を検出できなかったことから、試験の組合せとして別の *in vivo* 試験系を含める必要性が示唆された。

2-NA を用いた *in vitro* 遺伝子突然変異試験が陽性であったことから、既知の報告、Ames 試験および染色体異常試験の陽性の結果も含めて、2-NA は *in vitro* の試験では陽性になる物質であることが確認できた。

TXF を投与したラットを用いた末梢血小核試験と *Pig-a* assay の結果が陰性であったのに対して、肝臓における小核試験が陽性になった結果は、TXF の肝発がん誘発作用を支持するものであり、遺伝子改変動物を用いた既存の遺伝毒性試験結果とも合致した。代謝活性化を経て発がん作用を示す化合物には、肝臓を用いる小核試験が有用であることが示唆された。

ラット結腸発がん物質である DMH を *gpt* delta 雄ラットに 5、10 mg/kg/day で 28 日間強制経口投与し、最終投与翌日 (day29) および 3 日後 (day31) に採取した骨髄、肝臓、大腸において、*gpt* アッセイおよび小核試験を実施したところ、肝臓、大腸において点突然変異体頻度および小核誘発頻度の増加が確認できたが、骨髄では認められなかった。投与期間中および day29、31 に採取した末梢血では小核の誘発は認められなかった。以上のことから、DMH による突然変異および小核の誘発は共通した臓器特異性を示し、標的臓器および肝臓での評価が有用であることが示唆された。

本年度は、2-NA、TXF、DMH の三種類の発がん物質について、それぞれ対象臓器とエンドポイントが異なる遺伝毒性試験を組合せて評価した。結果を総合的に考察し、「未知の化合物の場合、*in vivo* 試験の組合せの第一選択は小核試験 (骨髄もしくは末梢血) と TG 試験 (肝臓) がよい」という仮説を立てた。

### ③新規培養細胞株を用いたインフュージョン反応惹起性の評価法開発

セツキシマブによる IF 反応において問題とされる  $\alpha$ -Gal 特異的 IgE の臨床的意義を評価す

る上では、IgE の固相抗原への結合性を調べるのみでは不十分であり、ヒト化マスト細胞株などを用いた、IgE の架橋活性に基づく試験法の開発が有効であろうことが、モデル抗原を用いた試験により示唆された。

米国の牛肉アレルギー患者はセツキシマブに交差反応することが報告されたが、島根県在住の牛肉アレルギー患者においてもセツキシマブと交差反応をする可能性が高く、セツキシマブ投与に際して牛肉アレルギーに関する十分な問診と検査が望まれる。

今後、十分な量の牛肉アレルギー患者血清の収集を待ち、患者血清中 IgE の架橋活性を評価していく。

また、THP-1 細胞を PMA および IL-4 存在下で 72 時間培養することにより、単球様細胞から樹状細胞様細胞へ分化させることが可能となった。今後、この細胞系を用いたタンパク質医薬品の免疫学的副作用の開発に取り組む。

### ④分子標的薬のオフターゲット効果の評価法開発

LC/MS によるタンパク質の発現解析は網羅的に非常に多数のタンパク質の変動を検出できるが、発現量の少ないタンパク質は検出しにくいことが懸念される。ユビキチン化の網羅解析は、発現量にはあまり影響されずに、感度良く多数のユビキチン化タンパク質のみを選択的に解析できるが、ユビキチン化サイトの周辺のアミノ酸配列によっては、トリプシン消化により検出することが困難なペプチドがあることが問題となる。このような問題を解決する手法、もしくは解析法を検討すれば、高感度にユビキチン化に由来するオフターゲット効果を網羅的に解析できる技術になると期待される。

標的タンパク質の表面に結合できるヘリカルペプチドをリガンドとして用い、ユビキチンリガーゼに結合できるリガンドと繋ぐことで標的タンパク質の分解を誘導できる分子を開発することを目的として、エストロゲン受容体の表面に結合するヘリカルペプチドの細胞内移行に成功した。そのためには細胞膜透過性ペプチドが有効であることを明らかにした。さらに、そのヘリカルペプチドが ER-コアクチベータ結合阻害能、転写阻害活性を有することを明らかにした。これは膜透過ペプチドを結合させた複合ヘリカルペプチドが細胞内でエストロゲン受容体のタンパク質表面に結合すると考えられる。この複合ペプチドを用いてプロテインノックダウン分子の開発を行う予定である。

多価型ペプチドライブラリー法と多価型ペプチドシートスクリーニング法を組み合わせることにより、標的分子に対する高親和性結合モチーフの取得効率を飛躍的に亢進させる系が確立できた。さらにモチーフ取得の効率ならびに精度を一層促進させるため、スライドグラスを基盤とした多価型ペプチドライブラリー作製技術の確立を目指している。上記手法ではモチーフ決定にアミノ酸シーケンスを用いないため、ユニットとしての構成分子にアミノ酸を使用するという制約がない。このため、様々なアミノ酸誘導体、低分子化合物がユニットとして使用可能である。さらに、 dendromer 化や PEG 化などにより、分子全体としての形状多様化も可能である。これらの新規ユニットを用いることにより、格段に高精度化した高親和性化合物の取得が可能になると期待される。

#### ⑤ 新規培養基材等を用いた肝代謝・動態等評価系の開発

新規培養法として開発されたコラーゲンビトリゲル薄膜チャンバー (ad-MED ビトリゲル) 上でのヒトキメラマウス由来の hepatocyte PXB-cells、ヒト肝細胞前駆細胞 HepaRG、ヒト凍結肝細胞の培養を検討した結果、ad-MED ビトリゲルを用いた培養法は、創薬段階における開発化合物の肝代謝評価へ応用できる可能性が示唆された。

PXB-cells は、*in vitro*において、ドナー細胞が異なっても長期間にわたり肝機能を維持し、それぞれの移植ドナー肝細胞が固有に持つ性質を有していると考えられ、*in vitro* 試験利用に有用なヒト肝細胞ソースとなり得ることが示された。

リポタンパク質産生系の評価指標への利用をめざし、HDL の機能と物性の解析を進めた。また HDL 産生トランスポーター ABCA1 の肝型発現誘導が ad-MED ビトリゲルや肝培養細胞ソースの評価に利用できる可能性が示された。

#### ⑥ プラスチック製医療機器の化学物質影響評価法 2 種の開発

簡易溶血性試験法は各公定法と同等以上の感度で各検体の溶血能を探知できると共に、新規血液バックの素材候補である DOTH/DINCH 配合 PVC シートの溶血特性も評価可能であった。また、当該シートの溶血抑制能と可塑剤溶出量の間には明瞭な相関性が観察されたことから、簡易溶血性試験法は十分な基本性能を有することが確認された。

可塑剤の炎症誘導能はヒト細胞に対する IL-6 産生誘導能を指標として評価できることが判明した。ATBC は炎症誘導能の低い代替可塑剤として利用できると共に、臨床使用条件下における TOTM 配合 PVC 製血液回路からの可塑剤溶出

量は非常に低く、炎症誘導を惹起する可能性は低いことが示唆された。

### ⑦研究成果の活用

本研究事業では、保健・医療・福祉分野での公益性に寄与する国立試験研究機関等と社会へ医薬品や医療機器等を提供する医薬関連企業の研究者が共通の問題意識を持って共同研究を実施することにより、これまで有効な治療薬が見出されていない疾患に対して画期的な治療方法等を提供することが期待されている。また、進歩が著しい分析技術を応用した新たな医療・診療技術、あるいは再生医療など新たな医療の形態への対応については、評価科学等も含めた官民共同研究が必須であり、有用な新規医療技術の開発に繋がるものと期待される。

成果発表会といった情報発信を通じて、開発された医薬品・医療機器の評価法が実用化に取り組み民間企業に活用されるとともに、この研究領域での官民での取り組みの拡大に貢献していきたい。

### F. 健康危機情報

特になし

### G. 研究発表等

#### 論文発表等

- 1) Saito K, Maekawa K, Ishikawa M, Senoo Y, Urata M, Murayama M, Nakatsu N, Yamada H, Saito Y. : Glucosylceramide and Lysophosphatidylcholines as Potential Blood Biomarkers for Drug-Induced Hepatic Phospholipidosis. *Toxicol Sci.*, 2014; 141: 377-386.
- 2) Saito K, Ishikawa M, Murayama M, Urata M, Senoo Y, Toyoshima K, Kumagai Y, Maekawa K, Saito Y. Effects of sex, age, and fasting conditions on plasma lipidomic profiles of fasted sprague-dawley rats. *PLoS One*, 2014; 9: e112266.
- 3) Saito K, Maekawa K, Pappan KL, Urata M, Ishikawa M, Kumagai Y, Saito Y. Differences in metabolite profiles between blood matrices, ages, and sexes among Caucasian individuals and their inter-individual variations. *Metabolomics*, 2014; 10: 402-413.
- 4) 前川京子, 佐井君江 : 薬物相互作用に影響を及ぼす遺伝子多型とその人種差. *ファルマシア*, 2014; 50 : 669-673.
- 5) Iwamoto S, Yonekawa T, Azuma E, Fujisawa T, Nagao M, Shimada E, Nakamura R, Teshima R, Ohishi K, Toyoda H, Komada Y. : Anaphylactic transfusion reaction in homozygous haptoglobin deficiency detected by CD203c expression on basophils. *Pediatr Blood Cancer*, 2014; 61: 1160-1161.
- 6) Wan D, Wang X, Nakamura R, Alcocer MJC, Falcone FH. : Use of Humanized Rat Basophil Leukemia (RBL) Reporter Systems for Detection of Allergen-Specific IgE Sensitization in Human Serum. Basophils and Mast Cells : Methods and Protocols, *Meth Mol Biol*, 2014; 1192: 177-184.
- 7) Wan D, Ludolf F, Alanine DG, Stretton O, Ali Ali E, Al-Barwary N, Wang X, Doenhoff MJ, Mari A, Fitzsimmons CM, Dunne DW, Nakamura R, Oliveira GC, Alcocer MJ, Falcone FH. : Use of Humanised Rat Basophilic Leukaemia Cell Line RS-ATL8 for the Assessment of Allergenicity of *Schistosoma mansoni* Proteins. *PLoS Negl*

- Trop Dis*, 2014; 8:e3124. 1.
- 8) Takahashi H, Chinuki Y, Tanaka A, Morita E. Laminin  $\gamma$ -1 and collagen  $\alpha$ -1 (VI) chain are galactose- $\alpha$ -1, 3-galactose-bound allergens in beef. *Allergy*, 2014; 69: 199-207.
  - 9) 千貫祐子, 伊藤和行, 武田真紀子, 竹内 薫, 高橋 仁, 森田栄伸. セツキシマブによるアナフィラキシーショックの4例- $\alpha$ -gal糖鎖特異的IgE 検出による回避の可能性-. *日皮会誌* 2014; 124 : 179-183.
  - 10) 森田栄伸, 千貫祐子, 高橋 仁. 蕁麻疹～牛肉による蕁麻疹はセツキシマブのアナフィラキシーを予知している～. *アレルギー・免疫*, 2014; 21 : 81-85.
  - 11) 森田栄伸, 千貫祐子, 高橋 仁. 重症薬疹としてのアナフィラキシー. *アレルギー・免疫*, 2014; 21 : 66-71.
  - 12) Ohoka N, Nagai K, Hattori T, Okuhira K, Shibata N, Cho N, Naito M. : Cancer cell death induced by novel small molecules degrading the TACC3 protein via the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell Death Dis.*, 2014; 5: e1513.
  - 13) Nagakubo T, Demizu Y, Kanda Y, Misawa T, Shoda T, Okuhira K, Sekino Y, Naito M, Kurihara M. : Peptides as Inhibitors of Estrogen Receptor-Mediated Transcription. *Bioconjugate Chem.*, 2014; 25: 1921-1924.
  - 14) Yamashita H, Demizu Y, Shoda T, Sato Y, Oba M, Tanaka M, Kurihara M. : Amphipathic short helix-stabilized peptides with cell-membrane penetrating ability. *Bioorg. Med. Chem.*, 2014; 22: 2403-2408.
  - 15) 出水 庸介, 三澤 隆史, 栗原 正明: 短鎖ペプチドのヘリカル構造制御と機能化. 有機合成化学協会誌, 2014; 72: 1336-1347.
  - 16) Kato M., Watanabe-Takahashi M., Shimizu E., and Nishikawa K. : Identification of a wide range of motifs inhibitory to Shiga toxin by affinity-driven screening of customized divalent peptides synthesized on a membrane. *Appl Environ. Microbiol*, 2015; 81: 1092-1100.
  - 17) Dubois-Pot-Schneider H, Fekir K, Coulouarn C, Glaise D, Aninat C, Jarnouen K, Le Guével R, Kubo T, Ishida S, Morel F, Corlu A. : Inflammatory cytokines promote the retrodifferentiation of tumor-derived hepatocyte-like cells to progenitor cells. *Hepatology*, 2014; 60: 2077-2090.
  - 18) Nagamoto Y, Takayama K, Tashiro K, Tateno C, Sakurai F, Tachibana M, Kawabata K, Ikeda K, Tanaka Y, Mizuguchi H. : Efficient engraftment of human iPS cell-derived hepatocyte-like cells in uPA/SCID mice by overexpression of FNK, a Bcl-xL mutant gene. *Cell Transplant*, in press.
  - 19) Tateno C, Yamamoto T, Utoh R, Yamasaki C, Ishida Y, Myoken Y, Oofusa K, Okada M, Tsutsui N, Yoshizato K. : Chimeric Mice with Hepatocyte-humanized Liver as an Appropriate Model to Study Human Peroxisome Proliferator-activated Receptor- $\alpha$  *Toxicol Pathol*, in press.
  - 20) Ohtsuki S, Kawakami H, Inoue T, Nakamura K, Tateno C, Katsukura Y, Obuchi W, Uchida Y, Kamiie J, Horie T, Terasaki T. : Validation of uPA/SCID mouse with humanized liver as a human liver model: protein quantification of transporters,

- cytochromes P450, and  
 UDP-glucuronosyltransferases by  
 LC-MS/MS. *Drug Metab Dispos*, 2014; 41:  
 1039-1043.
- 21) Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi A,  
 Yoshizane Y, Fujikawa K, WatashiK, Abe  
 H, Wakita T, Hayes CN, Chayama K, Tateno  
 C: Novel robust in vitro hepatitis B  
 virus infection model using fresh human  
 hepatocytes isolated from humanized  
 mice. *Am J Path*, . in press.
- 22) Sanoh S, Naritomi Y, Fujimoto M, Sato K,  
 Kawamura A, Horiguchi A, Sugihara K,  
 Kotake Y, Ohshita H, Tateno C, Horie T,  
 Kitamura S, Ohta S: Predictability of  
 plasma concentration-time curves in  
 humans using single-species allometric  
 scaling of chimeric mice with humanized  
 liver. *Xenobiotica*, in press.
- 23) Yamazaki H, Kuribayashi S, Inoue T,  
 Honda T, Tateno C, Oofusa K, Ninomiya S,  
 Ikeda T, Izumi T, Horie T: Zone analysis  
 by two-dimensional electrophoresis with  
 accelerator mass spectrometry of in vivo  
 protein bindings of idiosyncratic  
 hepatotoxicants troglitazone and  
 flutamide bioactivated in chimeric mice  
 with humanized liver. *Toxicol Res*, in  
 press.
- 24) Haishima Y, Kawakami T, Fukui C, Tanoue  
 A, Yuba T, Ozono S, Kumada H, Inoue K,  
 Morikawa T, Takahashi M, Fujisawa A,  
 Yamasaki K, Nomura Y, Isama K, Chung U,  
 Ogawa K, Niimi S, Yoshida M.: Characte-  
 rization of alternative plasticizers in  
 polyvinyl chloride sheets for blood  
 containers. *J Vinyl Add. Technol*, 2014,  
 in press.
- 学会発表等
- 1) Saito Y, Saito K, Ishikawa M, Urata M,  
 Tajima Y, Inoue M, Kumagai Y, Pappan K,  
 Maekawa K.: Metabolomic profiles in rat  
 blood vary between genders, ages and  
 fasting conditions, and their  
 qualitative comparisons with human  
 samples. 2014 AAPS Annual Meeting and  
 Exposition (2014. 11 San Diego, CA, USA).
- 2) 鈴木 慶幸, 小松 弘幸, 門田 利人, 及川 剛,  
 田口 景子, 筑広 紗弥香, 菅谷 健, 齋藤 明  
 美: SD ラットのゲンタマイシン腎障害にお  
 ける尿中L-FABP と他の尿中腎障害バイオマ  
 ーカーの比較. 第41回日本毒性学会学術年  
 会 (2014.7, 神戸)
- 3) T. Kadota, Y. Suzuki, H. Komatsu, K.  
 Taguchi, T. Sugaya. Evaluation of  
 Urinary L-FABP As a Nephrotoxicity  
 Biomarker in Rats. 53th annual meeting,  
 Society of Toxicology (2015.3, Phoenix,  
 AL, USA)
- 4) Saito K, Urata M, Toyoshima K, Ishikawa  
 M, Murayama M, Tajima Y, Senoo Y,  
 Takemoto K, Kumagai Y, Maekawa K, Saito  
 Y.: Comparison of plasma lipidomic  
 profile of humans with preclinical  
 animals. 19th North American ISSX and  
 29th JSSX Joint Meeting (2014.10, San  
 Francisco, CA, USA).
- 5) Maekawa K, Saito K, Pappan K, Ishikawa M,  
 Urata M, Tajima Y, Murayama M, Kumagai Y,  
 Saito Y.: Impact of gender, age,  
 fed/fasted state of rats on their serum

- hydrophilic metabolites. 19th North American ISSX and 29th JSSX Joint Meeting (2014. 10, San Francisco, CA, USA).
- 6) Ishikawa M, Saito K, Uebanso T, Maekawa K, Senoo Y, Murayama M, Tajima Y, Nishimaki-Mogami T, Nakanishi H, Ikeda K, Arita M, Taguchi R, Fujii M, Shibazaki Y, Yoneyama H, Nammo T, Saito Y, Yasuda K.: Characterization of hepatic lipid profiles of insulin-dependent NASH and following cirrhosis using mouse model. (2014. 10, San Francisco, CA, USA).
- 7) Maekawa K, Saito K, Ishikawa M, Minamino M, Kumagai Y, Saito Y.: Metabolomic biomarker exploration highlights issues of species specificity. KSCPT-JSCPT Joint symposium (2014. 11, Busan, Korea).
- 8) 楠原洋之: 薬物トランスポーターの種差と遺伝子多型による医薬品体内動態の個人間変動. 第 54 回日本先天異常学会学術集会 (2014. 7, 東京).
- 9) 楠原洋之: メタボロームによる薬物動態バイオマーカーの探索と薬物間相互作用の定量的解析への適用. 第 5 回杉山特別研究室理研公開シンポジウム (2015. 2, 東京).
- 10) 河原崎正貴, 鎌田彰, 矢口文, 江成宏之, 根本直: LDL-コレステロールが高めの成人男性に対する魚食の脂質代謝改善効果の検証, 日本農芸化学会 2015 年度大会 (2015. 3)
- 11) 斎藤嘉朗, 齊藤公亮, 児玉進, 熊谷雄治, 前川京子: ヒト試料を用いたバイオマーカー研究のためのレギュラトリーサイエンス. 第 35 回日本臨床薬理学会学術総会 (2014. 12, 愛媛)
- 12) 前川京子, 水澤精穂, 北本綾, 北本卓也, 中村亮介, 杉山永見子, 上田真由美, 外園千恵, 池田浩子, 矢上晶子, 松倉節子, 木下茂, 村松正明, 古谷博和, 高橋幸利, 松永佳世子, 相原道子, 関根章博, 日本 PGx データサイエンスコンソーシアム, 斎藤嘉朗. 日本人におけるカルバマゼピン誘因性薬疹発症の危険因子 HLA-A\*31:01 のサロゲートマーカー多型を対象としたタイピング系の構築. 日本薬学会 135 回年会 (2015. 3, 神戸)
- 13) 堀妃佐子, 田中康浩, 堤絵梨, 百南綾華, 増村健一, 山田雅巳, 藤居互, 北川義徳: DMH を用いた F344 系統 *gpt delta* ラット突然変異試験と小核試験 (末梢血、骨髄、肝臓、大腸) の統合法の検討. 日本環境変異原学会第 43 回大会 (2014. 12, 東京).
- 14) 山田雅巳, 堀端克良, 鶴飼明子, 木本崇文, 千蔵さつき, 伊東悟, 武藤重治, 宇野芳文, 真田尚和, 高島理恵, 志賀野美幸, 高沢博修, 濱田修一, 山本美佳, 堀妃佐子, 堤絵梨, 和田邦生, 前田晃央, 小坂瑞樹, 木村葵, 菊月隆太, 荻原庸介, 京谷恭弘, 足立秀樹, 上松泰明, 吉田唯真, 成見香瑞範, 福田隆之, 鈴木裕太, 後藤玄, 森田健, 本間正充: *Pig-a*/PIGRET アッセイに関する短期試験への有用性: MMS 共同研究報告. 日本環境変異原学会第 43 回大会 (2014. 12, 東京).
- 15) 須井哉, 川上久美子, 根岸沙記, 増渕恵美, 園原啓太, 山田雅巳: ハイ・スループット微生物遺伝毒性試験法の検討 9. 日本環境変異原学会第 43 回大会 (2014. 12, 東京).
- 16) Yamada M, Takamune M, Matsuda T.: Novel mutation assay with non-selective protocol using a next-generation DNA



- sequencer. 4th Asian Conference for Environmental Mutagen Society (2014. 12, Kolkata, India).
- 17) Nakamura R, Kaniwa N, Ueta M, Sotozono C, Sugiyama E, Maekawa K, Yagami A, Matsukura S, Ikezawa Z, Matsunaga K, Tokunaga K, Aihara M, Kinoshita S, Saito Y. HLA association with antipyretic analgesics-induced Stevens-Johnson syndrome / toxic epidermal necrolysis with severe ocular surface complications in Japanese patients. Drug Hypersensitivity Meeting (DHM) (2014. 4, Bern, Switzerland).
- 18) Nakamura R. Biomarkers for risk of SJS/TEN in Japanese compared to other populations. DIA: Drug - Induced Injury of Liver, Heart, Kidney, and Skin: Employing Recent Advanced to Improve Patient Safety and Speed Up the Pipeline. (2014. 5, North Bethesda, MD, USA.).
- 19) 木戸 博, 亀村典生, 中村亮介, 手島玲子, 深尾敏幸. 臍帯血の抗原特異的低親和性 IgE 検出と, 生後 6, 14 ヶ月の高親和性 IgE への変化. 第 26 回日本アレルギー学会春季臨床大会. (2014. 5, 京都).
- 20) 中村亮介. 培養細胞を用いるアレルギー試験「EXiLE 法」の開発. 第 41 回日本毒性学会学術年会. (2014. 7, 神戸).
- 21) Sakai S, Nakamura R, Adachi R, Fukutomi Y, Saito Y, Nishimaki-Mogami T, Teshima R. Experimental assessments of the cross-reactivity of IgE from patients sensitized with acid-hydrolysed wheat protein in a cosmetic soap. Food Allergy and Anaphylaxis Meeting (FAAM) 2014. (2014. 10, Dublin, Ireland).
- 22) 亀村典生, 川本典生, 中村亮介, 手島玲子, 下条直樹, 深尾敏幸, 木戸 博. 新規蛋白チップによる臍帯血特異的 IgE の検出と、離乳完了期までに見られる IgE 抗体の低親和性から高親和性への変化. 第 51 回日本小児アレルギー学会. (2014. 11, 四日市).
- 23) 秋山晴代, 河又小夏, 中村亮介, 福富友馬, 甲斐茂美, 松藤 寛, 宮澤眞紀. EXiLE 法を用いた口腔アレルギー症候群の新たな in vitro 検査法の検討. 第 37 回日本分子生物学会年会. (2014. 11, 横浜).
- 24) 岡本(内田)好海, 中村亮介, 相馬愛実, 石井明子, 最上知子, 川崎ナナ, 川上 浩, 手島玲子, 斎藤嘉朗. 架橋誘導活性の異なるモノクローナル IgE の抗原認識様式の違いについて. 日本薬学会第 135 年会. (2015. 3, 神戸).
- 25) 秋山晴代, 河又小夏, 政岡智佳, 中村亮介, 福富友馬, 甲斐茂美, 松藤 寛, 宮澤眞紀. 口腔アレルギー症候群における新たな in vitro 試験法の検討. 日本薬学会第 135 年会. (2015. 3, 神戸).
- 26) Morita E, Chinuki Y, Takahashi H, Takeda M, Takeuchi K, Ito K. Galactose- $\alpha$ -1,3-galactose ( $\alpha$ -gal)-specific IgE test is highly useful for predicting cetuximab-induced anaphylaxis. Drug Hypersensitivity Meeting (DHM) (2014. 4, Bern, Switzerland).
- 27) Naito M.: SNIPER: Inducing protein degradation via recruitment to IAP. 248th ACS National Meeting and Exposition

- (2014. 8, San Francisco, USA).
- 28) 栗原正明：マルチアプローチによる転写制御分子の創製. 化学系シンポジウム有機化学の最前線, 第 58 回日本薬学会関東支部大会 (2014. 10, 東京) .
- 29) 高橋美帆, 清水英子, 加藤美帆子, 西川喜代孝: 受容体結合部位特異的 Stx 阻害薬の組み合わせによる阻害効果の増強. 第 18 回腸管出血性大腸菌感染症研究会 (2014. 7, 京都).
- 30) 石田誠一、久保崇、北條麻紀、黒田幸恵、金秀良、関野祐子：VECELL 培養器を用いた肝星細胞培養の検討. 日本組織培養学会 第 87 回大会 (2014. 5, 東京) .
- 31) 松下琢、石井貴晃、市川雄大、金秀良、石田誠一、宮島敦子、関野祐子：胎児及び成人肝細胞のメタボロームと化学物質毒性発現の比較解析. 日本組織培養学会 第 87 回大会 (2014. 5, 東京) .
- 32) 石田誠一、金秀良、久保崇、黒田幸恵、北條麻紀、宮島敦子、松下琢、関野祐子：ヒト胎児および成人肝細胞のメタボローム解析による基礎代謝能の比較と化学物質による毒性発現の比較解析. 第 41 回日本毒性学会 学術年会 (2014. 7, 神戸) .
- 33) Ishida S, Kim S, Kubo T, Kuroda Y, Ishii T, Hojyo M, Miyajima A, Matsushita T, Sekino Y. : COMPARATIVE ANALYSIS OF HUMAN FETAL AND ADULT HEPATOCYTES BY METABOLOMICS AND GENOMICS. 第 29 回日本薬物動態学会・第 19 回国際薬物動態学会合同年会 (2014. 10, サンフランシスコ) .
- 34) 石田誠一、シュナイダーヘレナ、久保崇、堀環、堀内新一郎、黒田幸恵：ヒト肝前駆細胞 HepaRG の分化過程のゲノミクス/エピジェネティクス解析. 日本動物実験代替法学会 第 27 回大会 (2014. 12, 横浜) .
- 35) 石田誠一：肝臓の代謝酵素誘導評価法の確立. 第 11 回医薬品レギュラトリーサイエンスフォーラム ヒト iPS 細胞を利用した安全性薬理試験法の実現に向けて (2014. 12, 東京) .
- 36) 石田誠一、久保崇、北條麻紀、黒田幸恵、金秀良、関野祐子：新規培養基材で培養した星細胞培養細胞 LI90 の機能変化の解析. 第 28 回肝臓洞壁細胞研究会学術集会 (2014. 12, 岡山) .
- 37) 柿木基治：「創薬を支援する先端培養技術：PKPD 予測に有用なヒト細胞の培養モデル」日本組織培養学会第 87 回大会 (2014. 5, 東京).
- 38) Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Watashi K, Abe H, Wakita T, Chayama K, Tateno C: Hepatitis B Virus Spread in Primary-cultured Human Hepatocytes Isolated from Chimeric Mice with Humanized Liver. 2014 TASL-Japan Hepatitis B Workshop (2014. 4, Taipei, Taiwan).
- 39) 石田雄二 山崎ちひろ 吉実康美 柳愛美 山尾美香留 阿部弘美 茶山一彰 立野知世: キメラマウスから分離した初代培養ヒト肝細胞における HBV の水平感染. 第 50 回日本肝臓学会 (2014. 5, 東京).
- 40) Ishida Y, Yamasaki C, Yoshizane Y, Kageyama Y, Iwasaki Y, Tateno C: In vitro evaluation of fresh human hepatocytes isolated from chimeric mice with humanized livers (PXB-mice®). 第 87 回組織培養学会 (2014. 5, 東京).

- 41) 立野 知世：ヒト肝細胞キメラマウスの改良と応用. 第 21 回 肝細胞研究会 (2014. 6, 東京).
- 42) 石田雄二、山崎ちひろ、吉実康美、柳愛美 田中靖人、立野知世：ヒト肝細胞キメラマウス由来新鮮ヒト肝細胞を用いた HBV genotype の性状比較. 第 21 回 肝細胞研究会 (2014. 6, 東京).
- 43) 山崎ちひろ、岩成宏子、島田卓、木村達治、岩崎由美子、加国雅和、石田雄二、立野知世：ヒト ALT-1 特異的 ELISA を用いたヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト肝毒性の検出. 第 21 回 肝細胞研究会 (2014. 6, 東京).
- 44) 柳愛美、山崎ちひろ、吉実康美、石田雄二、立野知世：ヒト肝細胞キメラマウス肝臓におけるヒト EpCAM の発現. 第 21 回 肝細胞研究会 (2014. 6, 東京).
- 45) 石田雄二 山崎ちひろ 吉実康美 柳愛美 山尾美香留 阿部弘美 茶山一彰 立野知世：ヒト肝細胞キメラマウス由来の新鮮培養ヒト肝細胞における HBV の水平感染第 10 回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム (2014. 7, 広島)
- 46) Yanagi A, Yamasaki C, Yoshizane Y, Ishida Y, Tateno C : Characterization and proliferation assessment of hCK19- and hEpCAM-positive cells in bile duct-ligated chimeric mice with humanized livers. 2014 FASEB Summer Research Conference (2014. 7, Keystone, CO).
- 47) 内田 宅郎, 平賀 伸彦, 今村 道雄, 柘植 雅貴, 阿部 弘美, 相方 浩, 石田 雄二, 立野 知世, 茶山 一彰: cDNA-uPA/SCID マウスを用いたヒト肝細胞キメラマウスの作製および肝炎ウイルス感染. 第 18 回日本肝臓学会大会 (2014. 10, 神戸).
- 48) 平賀伸彦, 今村道雄, 内田宅郎, 柘植雅貴, 阿部弘美, 相方 浩, 石田雄二, 立野知世, 茶山一彰: 超免疫不全 TK-NOG マウスを用いたヒト肝細胞キメラマウス. 第 18 回日本肝臓学会大会 (2014. 10, 神戸).
- 49) Nelson CN, Abe H, Akamatsu S, Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, Miki D, Aikata H, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Chayama K: Hepatitis B virus infection efficiency and immune response decrease with cell density in primary cultured hepatocytes. 65TH AASLD (2014. 11, Boston).
- 50) Uchida T, Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, Abe H, Hayes CN, Aikata H, Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K, Murakami K, Chayama K: A novel humanized cDNA-iPA/SCID mouse for the study of HBV and HCV infections. 65TH AASLD (2014. 11, Boston).
- 51) Hiraga N, Imamura M, Uchida T, Kawaoka T, Tsuge M, Abe H, Hayes CN, Aikata H, Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K, Chayama K: A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infection. 65TH AASLD (2014. 11, Boston).
- 52) DebRoy S, Hiraga N, Imamura M, Canini L, Pohl RT, Persiani S, Uprichard SL, Perelson AS, Tateno C, Chayama K, Dahari H: HCV kinetics in uPA-SCID chimeric mice with humanized livers during intravenous silibinin monotherapy. 65TH AASLD (2014. 11, Boston).
- 53) Ishida Y, Chung TL, Imamura M, Hiraga N, Canini L, Uprichard SL, Perelson AS, Tateno C, Dahari H, Chayama K: HBV

- infection in humanized chimeric mice has multiphasic viral kinetics from inoculation to steady state and an HBV half-life of 1 hr. 65TH AASLD (2014. 11, Boston).
- 54) Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Kageyama Y, Iwasaki Y, Ishida Y, Tateno C: In vitro evaluation of human hepatocytes isolated from chimeric mice with humanized livers (PXB-mice®) transplanted using cells from three different donors. 19th North American ISSX Meeting/29th JSSX Meeting (2014. 10, San Francisco, CA).
- 55) 土居 茜, 佐能 正剛, 山崎ちひろ, 石田雄二, 加国雅和, 立野知世, 太田茂: ヒト肝細胞移植キメラマウスを用いた CYP2D6 基質のヒト体内動態予測. 第 53 回日本薬学会中国四国支部学術大会 (2014. 11, 広島).
- 56) Tateno C: Development of novel chimeric mice with humanized livers and infected with HBV as hosts. The 11th JSH Single Topic Conference Hepatitis B-Recent progress in basic and clinical research (2014. 11, Hiroshima).
- 57) 山崎ちひろ, 吉実康美, 柳愛美, 景山豊, 岩崎由美子, 石田雄二, 立野知世: ヒト肝細胞キメラマウス由来新鮮ヒト肝細胞 "PXB-cellss" の性状解析. 細胞アッセイ研究会シンポジウム (2015. 1, 東京).
- 58) 立野知世: ヒト肝細胞を担持するキメラ非ヒト動物. 第 8 回ラットリソースリサーチ研究会 (2015. 1, 京都)
- 59) 高橋美和, 立野知世, 石田雄二, 井上薫, 吉田緑: ヒト肝細胞キメラマウス (PXB マウス) における卵胞発育不全. 第 31 回日本毒性病理学会 (2015. 1, 東京).
- 60) 齧島由二, 福井千恵, 山崎佳世, 野村祐介, 小園 知, 熊田秀文, 藤澤彩乃, 井上 薫, 森川朋美, 市村亮平, 前田 潤, 高橋美和, 河上強志, 伊佐間和郎, 柚場俊康, 鄭 雄一, 小川久美子, 新見伸吾, 吉田 緑: 新規血液バッグ用代替可塑剤 DOTH のラット亜慢性毒性試験. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014. 11, 船堀).
- 61) 齧島由二, 河上強志, 福井千恵, 田上昭人, 柚場俊康, 向井智和, 野村祐介, 伊佐間和郎, 新見伸吾: 新規血液バッグ素材 DOTH/DINCH 配合 PVC シートの性能評価. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014. 11, 東京).
- 62) 野村祐介, 福井千恵, 柚場俊康, 新藤智子, 坂口圭介, 谷川隆洋, 杉山知子, 竹ノ内美香, 新見伸吾, 齧島由二: 簡易溶血性試験法の性能評価と公定法との比較検証. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014. 11, 東京).
- 63) 齧島由二, 福井千恵, 野村祐介, 藤澤彩乃, 山崎佳世, 熊田秀文, 井上 薫, 森川朋美, 高橋美和, 河上強志, 伊佐間和郎, 柚場俊康, 宮崎謙一, 鄭 雄一, 小川久美子, 新見伸吾, 吉田 緑: PVC 製血液バッグに適用可能な新規可塑剤 NJC-NP の毒性評価. 日本薬学会第 135 年会 (2015. 3, 神戸).
- 報道発表等  
なし
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- 1) 齧島由二, 福井千恵, 河上強志, 迫田秀行, 野村祐介, 伊佐間和郎, 新見伸吾, 柚場俊康, 向井智和, 清麻里子. 「医療用バッグ」. 出願