

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4721752号  
(P4721752)

(45) 発行日 平成23年7月13日(2011.7.13)

(24) 登録日 平成23年4月15日(2011.4.15)

(51) Int. Cl.		F I	
<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/68</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 A
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 F
<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/02</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A
			C 1 2 Q 1/02

請求項の数 4 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2005-109369 (P2005-109369)	(73) 特許権者	503360115
(22) 出願日	平成17年4月6日(2005.4.6)		独立行政法人科学技術振興機構
(65) 公開番号	特開2006-288211 (P2006-288211A)		埼玉県川口市本町四丁目1番8号
(43) 公開日	平成18年10月26日(2006.10.26)	(73) 特許権者	390037327
審査請求日	平成20年1月31日(2008.1.31)		積水メディカル株式会社
			東京都中央区日本橋3丁目13番5号
		(74) 代理人	110000084
			特許業務法人アルガ特許事務所
		(74) 代理人	100068700
			弁理士 有賀 三幸
		(74) 代理人	100077562
			弁理士 高野 登志雄
		(74) 代理人	100096736
			弁理士 中嶋 俊夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 妊娠状態における薬物代謝予測法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

被験薬物、エストロゲン作用物質及びプロゲステロン作用物質の存在下に小型肝細胞を培養し、薬物代謝関連酵素発現の変動を測定することを特徴とする、妊娠状態における被験薬物の薬物代謝予測法。

【請求項2】

薬物代謝関連酵素発現の変動をDNAチップで測定する請求項1記載の薬物代謝予測法。

【請求項3】

薬物代謝関連酵素発現の変動が、エストロゲン作用物質及び/又はプロゲステロン作用物質が非存在下の場合と存在下の場合とを対比するものである請求項1又は2記載の薬物代謝予測法。

【請求項4】

薬物代謝関連酵素が、  
Cytochrome P450, subfamily I、  
Flavin-containing monooxygenase 1、  
Hydroxysteroid dehydrogenase, 11 beta type 2、  
Lysyl oxidase、  
Monoamine oxidase B、  
gluthathione-S-transferase、

Rat alcohol dehydrogenase (ADH)、  
Rat cytochrome P-450j、  
Rat hydroxysteroid sulfotransferase、  
Rattus norvegicus 4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase (Tmadadh)、  
Rattus norvegicus liver cytochrome c oxidase subunit VIII (COX-VIII)、  
7-dehydrocholesterol reductase、  
Glutathione-S-transferase, mu type 2 (Yb2)、  
Aldehyde dehydrogenase 1 (phenobarbital inducible)、  
Glutathione-S-transferase, alpha type (Yc2)、  
Glutathione S-transferase, pi 2、  
Platelet-activating factor acetylhydrolase beta subunit (PAF-AH beta)、  
Plasma glutathione peroxidase precursor、  
Rat NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase、  
Acyl-coA oxidase、  
Rat glutathione S-transferase、及び  
Rat microsomal aldehyde dehydrogenase

10

から選ばれるものである請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の薬物代謝予測法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

本発明は、妊娠中における薬物の代謝を簡便かつ正確に予測する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

生体内における薬物代謝は、新薬開発における毒性評価、既存薬物の毒性評価、副作用の予測等の点で極めて重要であり、特に新薬開発にあたっては必須の評価項目である。ところで、妊娠期間中は、通常の状態と相違し、エストロゲンとプロゲステロンの血中濃度が高い状態が長期間続くというホルモン異常状態である。従って、妊娠期間中の薬物代謝を評価することは、妊娠時の薬剤投与により母体がどのような影響を受けるかを評価するうえで極めて重要である。

【0003】

30

しかしながら、従来、妊娠期間中の薬物代謝についての検討はほとんどなされていない。これは、ヒトの妊娠期間は約9ヶ月あるものの、催奇形性等、安全面で問題があるためであり、実験動物のラットやマウスの妊娠期間は21日と極めて短く、薬剤の感受性や代謝機序の解析が不可能だったことに起因する。かかる観点から、胎児に対する催奇形性について調べることが義務づけられており、医学的に初期3ヶ月以内のいかなる薬剤投与も禁忌とされている。しかし、妊娠中期以降の安定期における薬剤服用は一般的には行われていると思われる。例えば、風邪やアレルギー症状緩和、不眠時における薬剤の服用等の場合が考えられる。しかしながら、妊娠時における薬物投与は注意しながらの医師による投与という根拠のない処方が多くなされているのが現状である。

【発明の開示】

40

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明の目的は、妊娠中における薬物の代謝を、細胞を用いた実験で簡便かつ正確に予測する方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0005】

そこで本発明者は、小型肝細胞の機能及び培養の容易性に着目し、種々検討した結果、小型肝細胞をエストロゲン作用物質及びプロゲステロン作用物質の存在下に培養する系に、被験薬物を添加して培養し、薬物代謝関連酵素発現の変動を観察すれば、妊娠状態における被験薬物の肝代謝が正確に予測できることを見出し、本発明を完成した。

50

## 【0006】

すなわち、本発明は、被験薬物、エストロゲン作用物質及びプロゲステロン作用物質の存在下に小型肝細胞を培養し、薬物代謝関連酵素発現の変動を測定することを特徴とする、妊娠状態における被験薬物の薬物代謝予測法を提供するものである。

## 【発明の効果】

## 【0007】

本発明によれば、細胞を用いた実験系で簡便且つ正確に妊娠中における薬物代謝、ひいては妊娠中に投与された薬物が母体に及ぼす影響を予測できる。本発明は、ヒトでは臨床試験ができない妊娠状態を人為的に作り出して、薬物の反応を推定する方法であり、他に代替する方法が無い画期的な発明であり、薬剤の副作用を未然に防ぐ可能性がある重要な発明である。

10

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0008】

本発明の薬物代謝予測法においては、小型肝細胞を用いる。小型肝細胞は肝組織中に存在する肝幹細胞の一種で肝細胞としての機能を持ちながら、非常に高い増殖活性を持っている。また長期間凍結保存した後、再培養を行ってもその能力を失わない。また、小型肝細胞は培養経過とともに薬物代謝酵素の活性が低下することはなく、成熟化を誘導するとその活性も成熟肝細胞に近づく。従って、小型肝細胞は、薬物代謝酵素誘導能の高い状態を長期間に渡って維持することができる特性を有している。

## 【0009】

小型肝細胞の由来は、ヒト、サルが最も好ましいが、入手可能な動物の中では、ラット、マウス等のげっ歯類由来がよく、ウサギ、ヒツジ、ブタでもよいが、ラット由来が特に好ましい。最近ヒトの小型肝細胞の培養法が報告されているので、これを用いることもできる（特開平10-179148号）。

20

## 【0010】

小型肝細胞は、例えばラットの肝臓よりコラゲナーゼ灌流法によって採取された細胞懸濁物から、遠心操作を繰り返すことによって単離することができる。又、同細胞懸濁物から小型肝細胞特異的抗原に対する特異抗体（CD44、BR13、D6.1A等）やヒアルロン酸を付着した担体などにより分離することができる。

## 【0011】

得られた小型肝細胞は、凍結保存することができるので、長期保存可能である。

30

## 【0012】

小型肝細胞の培養にあたっては、被験薬物以外に、エストロゲン作用物質及びプロゲステロン作用物質を共存させる。エストロゲン作用物質としては、17- エストラジオール、エストリオール、エストロン、エチニルエストラジオール等が挙げられる。また、プロゲステロン作用物質としては、（遊離型又は結合型）プロゲステロン、プレグナジオール、メドロキシプロゲステロン、ノルエチステロン、デソゲストレル等が挙げられる。エストロゲン作用物質及びプロゲステロン作用物質を添加することにより、小型肝細胞を疑似妊娠状態にすることができ、妊娠状態特有の薬物代謝酵素を誘導することができる。培養液中のエストロゲン作用物質の濃度は、 $10^{-10} \sim 10^{-4}$  M、さらに $10^{-8} \sim 10^{-5}$  M、特に $10^{-5} \sim 10^{-6}$  Mが好ましい。プロゲステロン作用物質の濃度は $10^{-10} \sim 10^{-4}$  M、さらに $10^{-8} \sim 10^{-5}$  M、特に $10^{-5} \sim 10^{-6}$  Mが好ましい。小型肝細胞は、30～50個の細胞よりなるコロニーを形成する培養7～20日目（より好ましくは、8日～14日、特に好ましくは10～12日）に一旦培養皿より剥がして新しい培養皿に再播種するか、凍結保存した小型肝細胞コロニーを500～10000コロニー/60-mm 培養皿（より好ましくは、1000～5000コロニー/60-mm 培養皿、特に好ましくは2000～4000コロニー/60-mm 培養皿）の濃度で播種し、培養する。

40

## 【0013】

培養は、コラーゲンをコートしたディッシュ上で行うのが好ましい。また、培地としては、DMEM培地、William's Medium E培地、RPMI1640培地等

50

を用いることができる。さらに培地中にはFBS、アスコルビン酸、DMSO、ニコチンアミド、上皮細胞増殖因子(EGF, epidermal growth factor)、デキサメタゾン、インスリンを添加することができる。増殖因子としては、EGFの他に、肝細胞増殖因子[HGF, hepatocyte growth factor]、腫瘍増殖因子[TGF-alpha, Transforming growth factor-alpha]、線維芽細胞増殖因子[FGF, fibroblast growth factor]などが挙げられる。培養は、通常 $35 \pm 5$ 、 $3 \sim 7\%$  CO<sub>2</sub>インキュベーター内の条件で行うのが好ましい。

#### 【0014】

小型肝細胞を被験薬物の存在下(エストロゲン作用物質及び/又はプロゲステロン作用物質非存在下)に培養した場合には、通常の状態の薬物代謝酵素が誘導される。一方、小型肝細胞を、被験薬物、エストロゲン作用物質及びプロゲステロン作用物質の存在下に培養した場合には、妊娠状態下特有の薬物代謝酵素が誘導される。従って、エストロゲン作用物質及び/又はプロゲステロン作用物質が非存在下の薬物代謝関連酵素発現と、エストロゲン作用物質及びプロゲステロン作用物質存在下の薬物代謝関連酵素発現とを対比すれば、妊娠状態における薬物代謝が予測できる。

10

#### 【0015】

薬物代謝関連酵素の発現は、当該遺伝子の発現、例えば通常のハイブリダイゼーション法により測定できるが、多くの遺伝子を同時に測定できる点から、DNAチップ(マイクロアレイ)で測定するのが好ましい。ここで、測定対象とできる遺伝子として例えば、チトクロームP450(CYP)遺伝子群を含む第一相及び第二相薬物代謝酵素群、転写因子、各種の受容体などが挙げられる。

20

#### 【0016】

DNAチップの構成としては、各種薬物代謝関連酵素遺伝子(cDNAまたは合成オリゴDNA)を固定化したものが好ましい。細胞から採取したRNAを用いて標識cDNAを合成し、DNAチップ上でハイブリダイズさせ、標識体を検出する。標識としては、蛍光色素、酵素、ラジオアイソトープ等が挙げられるが、検出の容易性、感度の点から蛍光色素が好ましい。

#### 【0017】

薬物代謝酵素発現の変動は、被験薬物非添加時の薬物代謝酵素発現用標識体と、被験薬物添加時の薬物代謝酵素発現用標識体とを、それぞれ異なる標識体を用い、それらの発現量の比を求める。そして、それらの比がエストロゲン作用物質及び/又はプロゲステロン作用物質非添加時に対してエストロゲン作用物質及びプロゲステロン作用物質添加時にどの程度変動したかを検出すれば判定できる。

30

#### 【0018】

得られた薬物代謝関連酵素遺伝子の変動結果から、通常のヒトにおける薬物の肝代謝と妊娠状態における薬物の肝代謝の相違が検出できる。従って、妊娠時の薬剤投与による母体に対する作用、例えば薬剤の副作用、薬剤の効果の遷延の可能性、肝毒性の可能性等が判定できる。その結果、薬剤の投与量、投与間隔の加減、肝庇護剤との併用、妊娠時に投与可能な薬剤の選択等が可能となる。

#### 【実施例】

#### 【0019】

次に実施例を挙げて本発明を説明するが、本発明は何らこれら実施例に限定されるものではない。

40

#### 【0020】

##### 実施例1

##### A: 試験方法

##### 1) 凍結小型肝細胞の調製

メスのラットの肝臓をコラゲナーゼを含む溶液で灌流し、得られた細胞をハクス緩衝液(表1)に懸濁し $50 \times g$ 、1min、4 で遠心して上清を回収する。この操作を3回繰り返す。

$50 \times g$ 、5min、4 で遠心し、沈殿をハクス緩衝液に懸濁する。この操作を3回

50

繰り返す。

150 × g、5 min、4 で遠心し、沈殿をハックス緩衝液に懸濁する。

150 × g、5 min、4 で遠心し、沈殿をDMEM/FBS(表2)に懸濁する。

50 × g、5 min、4 で遠心し、沈殿をDMEM/FBSに懸濁する。

生細胞数を数え、 $6 \times 10^4$ 生細胞/mlになるようDMEM/FBSで調製する。

【0021】

【表1】

\*ハックス緩衝液：組成

Hanks' Balanced Salt Solution (Sigma)

0.2% Bovine Serum Albumin

$10^{-7}$ M デキサメタゾン

0.5 μg/ml インスリン

抗生物質 (ペニシリン、ストレプトマイシン)

10

【0022】

【表2】

\*DMEM/FBS：組成

DMEM (Sigma)

10%ウシ胎仔血清 (HyClone)

10ng/ml 上皮成長因子 (EGF)

10mM ニコチンアミド

$10^{-7}$ M デキサメタゾン

0.5 μg/ml インスリン

1 mM アスコルビン酸 (和光純薬工業)

抗生物質 (ペニシリン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン)

20

【0023】

100-mm 培養皿 (CORNING) に9mlずつ分注し、CO<sub>2</sub>インキュベーター (37℃, 5% CO<sub>2</sub>, 湿度95%) で10日間培養する。この間、2日に1回培地をDMEM/FBSで交換する。培養皿から培地を除き6mlのPBSで2回洗浄した後、2mlの0.02% EDTAを含むPBSを加えて軽く攪拌し、液を除く。37℃に温めたCell dissociation solution (SIGMA) を2ml加え、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で5min静置する。DMEMを1ml加えて小型肝細胞コロニーを回収、50 × g、5minで遠心し、4培養皿分の沈殿を1mlのセルバンカー (三菱化学ヤトロン) に懸濁する。-30℃で30min凍結したのち、-80℃で保存する。

30

【0024】

2) 成熟肝細胞の調製

メスのラットの肝臓をコラゲナーゼを含む溶液で灌流し、得られた細胞懸濁液を50 × g、1min、4℃で遠心し、沈殿を回収する。

ハックス緩衝液に懸濁し、50 × g、1min、4℃で遠心、この操作を3回繰り返す。

細胞を25mlのハックス緩衝液に懸濁し、21.6ml パーコール (Amersham) 、2.4ml 10 × ハックス緩衝液に加えて転倒混合する。50 × g、15min、4℃で遠心し、上清を除く。細胞をPBSで懸濁し、50 × g、1min、4℃で遠心、沈殿を回収する。

40

【0025】

3) コラーゲンコート培養皿の調製

ラットの尾から調製したコラーゲン液 (5mg/ml) を0.1% 酢酸で100倍に希釈し、60-mm 培養皿 (CORNING) に3mlずつ分注する。室温で1hr静置してからコラーゲン液を除き、クリーンベンチ内で一晚乾燥させたのち、紫外線を1hr照射して滅菌、3mlのPBSを加えて37℃で30minインキュベートする。その後PBSを除き、細胞を播種する。

50

## 【0026】

## 4) 凍結小型肝細胞の培養

凍結小型肝細胞を37℃インキュベーター内で解凍し、37℃に温めたDMEM/FBS培地10mlに加えて50×g、1min遠心する。上清を除き、37℃に温めたDMEM/FBS培地3mlに沈殿した細胞を懸濁してコラーゲンコート培養皿に播種する。CO<sub>2</sub>インキュベーター(37℃, 5%CO<sub>2</sub>, 湿度95%)で培養し、24時間後培地を無血清培地(DMEM/DMSO、表3)に交換し、以後2日に1回培地をDMEM/DMSOで交換する。擬似妊娠状態として培養する場合には、女性ホルモンを添加した培地を細胞播種及び培地交換に用いる。17-β-エストラジオール(SIGMA)及びプロゲステロン(SIGMA)はDMSOに溶解し、それぞれが10<sup>-5</sup>Mの濃度になるよう培地に添加し、培地に含まれるDMSO濃度が1%以下になるよう調製する。

10

培養21日目から培地に薬剤を添加し、培養を続ける。フェノバルビタール(SIGMA)、アセトアミノフェン(SIGMA)はDMSOに溶解し、それぞれ2mM、5mMになるよう培地に添加し、培地に含まれるDMSO濃度が1%以下になるよう調製する。薬剤添加培地を毎日交換して4日間培養したのちに、細胞からのRNA抽出あるいはタンパク質抽出を行う。

## 【0027】

## 【表3】

*DMEM/DMSO: 組成
DMEM
1%ジメチルスルホキシド (Aldrich/Sigma)
10ng/ml 上皮成長因子 (EGF)
10mM ニコチンアミド (片山化学工業)
10 <sup>-7</sup> M デキサメタゾン
0.5μg/ml インスリン
1mM アスコルビン酸 (和光純薬工業)
抗生物質 (ペニシリン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン)

20

## 【0028】

## 5) 蛋白質の抽出とウェスタンブロッティング

解凍後25日間培養した小型肝細胞を3mlのPBSで2回洗浄を行い、1mlのリシス緩衝液(10mM Tris-HCl pH7.4, 5mM EDTA, 150mM NaCl, 5μg/mlペプスタチンA, 5μg/mlロイペプチン)を加えて4℃で1hr静置する。緩衝液に細胞を懸濁させて回収し、氷上で超音波処理(Sonifier, 50% duty, output 1, 30sec)を行った後、1,200×g、5min、4℃で遠心して上清を回収し、蛋白質溶液とする。溶液はBCAプロテインアッセイキット(PIERCE)でタンパク濃度を測定し、濃度標準はBSAを用いる。

30

## 【0029】

SDS-PAGEは以下の条件で行う。

スタッキングゲルは、5% アクリルアミド、0.1% SDS、125mM Tris-HCl (pH6.8)。

40

ランニングゲル、10% アクリルアミド、0.1% SDS、375mM Tris-HCl (pH8.8)。

調製した溶液に3/200量の10% 過硫酸アンモニウム(和光純薬工業)、1/1000量のTEMED(関東化学)を加えて重合した。

サンプルは等量のサンプル緩衝液(62.5mM Tris-HCl (pH6.8)、10% グリセロール、2% SDS、5% 2-メルカプトエタノール、25μg/mlプロモフェノールブルー(関東化学)と混合し95℃で2min熱変性してから20μgタンパク/レーンでアプライする。

分子量マーカーは、Precision Protein marker (BIO-RAD)を用いた。

50

## 【0030】

泳動後ゲルを10mM CAPS 緩衝液で10min×2回洗浄し、ウェット式転写装置でメンブレン (PROTRAN, Schleicher & Schuell) に転写 (1hr, 4 ) する。

転写後メンブレンはブロックエース (大日本製薬) 中で室温、1hr振とうしてブロッキングしてから一次抗体と反応させる。

抗ラットCYP1A2抗体 (Rabbit, 第一化学薬品)、抗ラットCYP2E1抗体 (Goat, 第一化学薬品) は1% ブロックエース (in PBS) で希釈し、それぞれの抗体を含むPBSにメンブレンを浸して室温で1hr振とうする。

メンブレンを0.05% Tween20 (in PBS) で5min×3回洗浄し、1% ブロックエース (in PBS) で1万倍希釈した二次抗体 (AP標識) 液に浸して室温で1hr振とうする。

メンブレンを0.05% Tween20 (in PBS) で5min×3回洗浄し、SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (PIERCE) で発色、検出を行う。

## 【0031】

6) 妊娠ラット肝及び培養細胞からのRNAの抽出

解凍後25日間培養した小型肝細胞を3mlのPBSで2回洗浄し、1mlのISOGEN (ニッポンジーン) を加えて室温で5min静置して細胞溶解液を回収する。成熟肝細胞はPBSに懸濁したのち50×g、1minで遠心して回収し1mlのISOGEN (ニッポンジーン) を加えて室温で5min静置して細胞溶解液を回収する。細胞溶解液に0.2mlのクロロホルムを加えて15sec激しく攪拌後、室温で3min静置する。12,000×g、15min、4 で遠心して水層を回収し、0.5mlの2-プロパノールを加えて攪拌。室温で10min静置して12,000×g、10min、4 で遠心、沈殿を75%エタノールでリンスしてから風乾、DEPC処理水に溶解してRNAサンプルとする。濃度は260nmの吸光度により測定し、OD=1のとき40µg/mlとする。

## 【0032】

7) マイクロアレイによる解析

CyScribe Post-Labeling Kit (Amersham) を用いてRNAから標識cDNAを合成する。

Total RNA 30µgにAnchored oligo (dT) を2µl加え、ヌクレアーゼフリーH<sub>2</sub>Oで11µlにメスアップしてから70 で5min熱変性したのち室温で10min静置する。

5×CyScribe Buffer 4µl、0.1M DTT 2µl、ヌクレオチドミックス 1µl、アミノアシル-dUTP 1µl、CyScribe reverse transcriptase 1µlを加えて攪拌、42 で90minインキュベートする。

2µlの2.5M NaOHを加えて攪拌し、37 で15minインキュベートする。

10µlの2M HEPESを加えて攪拌し、さらに3µlの3M酢酸ナトリウム (pH 5.2)、75µlのエタノールを加えて攪拌、-80 で1時間静置する。

12,000×g、30min、25 で遠心して上清を除き、1mlの75%エタノールを加えてさらに12,000×g、15min、25 で遠心、上清を除き沈殿を風乾させてから15µlのヌクレアーゼフリーH<sub>2</sub>Oに溶解する。

15µlの0.1M NaHCO<sub>3</sub> (pH 9.0) に溶解したCyDyeを加えて攪拌、遮光した。室温で1時間静置後、15µlの4M ヒドロキシルアミンHClを加えて攪拌し15min静置する。

CyScribe GFX Purification Kitを用いて標識cDNAを精製した。Cy5標識cDNA溶液、及びCy3標識cDNA溶液を各45µlずつ混合し、500µlのキャプチャー緩衝液を加えて攪拌してからスピンカラムにアプライする。

10

20

30

40

50

13,800 × g、30 sec、25 で遠心し、溶出液を廃棄する。

カラムに600 μlの洗浄緩衝液(80% EtOH)をアプライし13,800 × g、30 sec、25 で遠心し、溶出液を廃棄する。この操作を計3回繰り返す。

もう一度13,800 × g、30 sec、25 で遠心して溶出液を廃棄する。

50 に保温した溶出緩衝液を60 μlアプライし室温で遮光して5min静置後、13,800 × g、30 sec、25 で遠心して溶出液を回収する。この操作を計2回繰り返す。

回収した溶液を遠心エバポレーターで7.5 μlに濃縮し、95 で2min熱変性してから氷上に静置する。CyScribe Post-Labeling Kit (Amersham) 付属の4 × ハイブリダイゼーション緩衝液を2.5 μl加えて攪拌する。

Takara IntelliGene Rat Toxicology CHIP ver. 1.0 ([http://bio.takara.co.jp/catalog/catalog\\_d.asp?C\\_ID=C1416](http://bio.takara.co.jp/catalog/catalog_d.asp?C_ID=C1416)) を用いて解析を行う。(表4、表5)アレイ上にギャップ付カバーガラスをかぶせ、標識cDNA液をアプライする。ハイブリチャンバー(Takara)内にH<sub>2</sub>Oを100 μl滴下してからアレイをセットし、60 にセットしたウォーターバスにチャンバーを沈め、18時間ハイブリダイゼーションを行う。

アレイは以下の手順で洗浄を行う。洗浄液は全てアレイ1枚あたり50mlで、50ml Falconチューブ中で洗浄を行う。2 × SSC、10min 2 × SSC、0.2% SDS、55、10min振とう × 3回 0.06 × SSC、10 sec。

アレイをスピンドライヤーで1min遠心して水分を飛ばし、GenePix 4000B (AXON) により解析を行う。

データはマーカの蛍光値により補正を行って均一化し、バックグラウンドを除いたMedian値を採用してCy5 / Cy3値を算出する。

【0033】

10

20

【表 4】

TaKaRa IntelliGene Rat Toxicology CHIP Ver 1.0 にスポットされている薬剤代謝遺伝子のリスト (1)

Aconitase 1, soluble	
Acyl CoA synthetase, long chain	
Acyl Coenzyme A dehydrogenase, long chain	
Acyl-coA oxidase	
ADP-ribosyltransferase (NAD <sup>+</sup> ; poly (ADP-ribose) polymerase)	
Alanine-glyoxylate aminotransferase (Serine-pyruvate aminotransferase)	
Aldehyde dehydrogenase 1 (phenobarbital inducible)	
Asparagine synthetase	
Carbonic anhydrase 3	10
Carboxyl ester lipase	
Ceruloplasmin (ferroxidase)	
Cytochrom P450 (cholesterol hydroxylase 7 alpha)	
Cytochrome P450, 11a, cholesterol side chain cleavage	
Cytochrome P450, subfamily I (aromatic compound-inducible), member A2 (Q42, form d)	
Cytochrome P450, subfamily IIA (phenobarbital-inducible)/(Cytochrome P450 IIA3)	
Cytochrome P450, subfamily IIF, polypeptide 1	
Deoxyribonuclease I	
Diaphorase (NADH/NADPH)	
Dipeptidyl peptidase 4	
Enolase 1, alpha	
ER-60 protease	
Fatty acid synthase	20
Flavin-containing monooxygenase 1	
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	
Glutamate-cysteine ligase (gamma-glutamylcysteine synthetase), regulatory	
Glutamic-oxaloacetic transaminase 1, soluble (aspartate aminotransferase, cytosolic) see also D1Mgh12	
Glutathione peroxidase 4	
Glutathione S-transferase, pi 2	
Glutathione synthetase gene	
Glutathione-S-transferase, alpha type (Yc2)	
Glutathione-S-transferase, mu type 2 (Yb2)	
Guanidinoacetate methyltransferase	
Hydroxymethylbilane synthase	
Hydroxysteroid dehydrogenase, 11 beta type 2	
Hypoxanthine phosphoribosyl transferase	
Lactate dehydrogenase A	30
Lactate dehydrogenase B	
Lipoprotein lipase	
Lysyl oxidase	
Metallothionein	
Monoamine oxidase B	
Ornithine decarboxylase	
Pancreatic trypsin II	
Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	

【 0 0 3 4 】

## 【表 5】

TaKaRa IntelliGene Rat Toxicology CHIP Ver 1.0 にスポットされている薬剤代謝遺伝子のリスト (2)

Proprotein convertase subtilisin/kexin type 7	
Protein disulfide isomerase (Prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide)	
R.norvegicus mRNA for glutathione-S-transferase	
R.norvegicus mRNA for macrophage metalloelastase (MME)	
R.norvegicus mRNA for membrane-type metalloproteinase	
R.norvegicus mRNA for pI 6.1 esterase (ES-10)	
R.norvegicus phosphoglycerate mutase B isozyme (PGAM) mRNA, complete cds	
Rat alcohol dehydrogenase (ADH) mRNA, complete cds	10
Rat carnitine palmitoyltransferase I mRNA, complete cds	
Rat collagenase (UMRCase) mRNA, 3' end	
Rat cytochrome P-450 isozyme 5 (P450 IVB2) mRNA, complete cds	
Rat cytochrome P-450j mRNA, complete cds	
Rat gamma-glutamyl transpeptidase mRNA, complete cds, clone 17	
Rat glutathione S-transferase mRNA, complete cds	
Rat GTP cyclohydrolase I mRNA, complete cds	
Rat heme oxygenase-2 (HO2) mRNA, complete cds	
Rat hydroxysteroid sulfotransferase mRNA, complete cds	
Rat microsomal aldehyde dehydrogenase mRNA, complete cds	
Rat mRNA for liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase	
Rat mRNA for mitochondrial enoyl-CoA hydratase (EC 4.2.1.17)	
Rat mRNA for mitochondrial long-chain 3-ketoacyl-CoA thiolase beta-subunit of mitochondrial trifunctional protein, complete cds	20
Rat mRNA for mitochondrial long-chain enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase alpha-subunit of mitochondrial trifunctional protein, complete cds	
Rat NADH-cytochrome b-5 reductase mRNA, complete cds	
Rat NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase mRNA, complete cds	
Rat S-adenosylmethionine decarboxylase mRNA, complete cds	
Rat uricase mRNA, 3' end	
Rattus norvegicus 12-lipoxygenase mRNA, complete cds	
Rattus norvegicus 4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase (Tmabadh) mRNA, complete cds	
Rattus norvegicus 8-oxoguanine-DNA-glycosylase (rogg1) mRNA, complete cds	
Rattus norvegicus biliverdin reductase mRNA, complete cds	
Rattus norvegicus cytochrome b558 alpha-subunit mRNA, complete cds	
Rattus norvegicus cytochrome P450 2D18 mRNA, complete cds	
Rattus norvegicus cytochrome P450 3A9 mRNA, complete cds	30
Rattus norvegicus glutathione s-transferase M5 mRNA, complete cds	
Rattus norvegicus mRNA for 7-dehydrocholesterol reductase, complete cds	
Rattus norvegicus mRNA for aminopeptidase-B, complete cds	
Rattus norvegicus mRNA for hydroxysteroid sulfotransferase subunit, complete cds	
Rattus norvegicus mRNA for plasma glutathione peroxidase precursor, complete cds	
Rattus norvegicus mRNA for protein tyrosine phosphatase	
Rattus norvegicus mRNA for Sulfotransferase K2	
Rattus norvegicus platelet-activating factor acetylhydrolase alpha 1 subunit (PAF-AH alpha 1) mRNA, complete cds	
Rattus norvegicus platelet-activating factor acetylhydrolase beta subunit (PAF-AH beta) mRNA, complete cds	
Superoxide dimutase 1, soluble	
Superoxide dimutase 2, mitochondrial	
Thioredoxin peroxidase 1	
UDP-glucuronosyltransferase 1 family, member 1	40

## 【 0 0 3 5 】

## 8) オリジナルアレイを用いた解析

薬剤代謝酵素を中心に 143 遺伝子の塩基配列を乗せたアレイを作成した。(図 1、表 6、表 7、表 8、表 9) 60mer の合成 DNA をスライドガラス上に固定化し、スーパーアルデヒドコートでブロッキングした。

アレイの解析は基本的に 7) の方法と同様だが、以下の点で異なる。

RNA に Panorama Armored RNA E. coli - B1444 (Sigma Genosys) を 1 μl 加えて cDNA を合成し、同配列を載せたスポットの蛍光強度で標準化を行う。

アレイに cDNA 溶液をハイブリさせる前に、スライドガラスに以下の前処理を行う。

0.2% SDS、2min×2 H<sub>2</sub>O、2min H<sub>2</sub>O、boil、3min dry up  
 25% Ethanol、0.1% NaBH<sub>4</sub>(in PBS)、5min 0.2% SDS、  
 1min×2 H<sub>2</sub>O、1min H<sub>2</sub>O、boil、5sec dry up

【0036】

【表6】

オリジナルアレイにスポットされている遺伝子のリスト (1)

Column	Row	Gene name
1	1	ras-GTPase-activating protein SH3-domain binding protein
2	1	Arabidopsis cDNA clone APD03b12 f 3
3	1	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
4	1	glucose-6-phosphate dehydrogenase (Gd, EC 1.1.1.49)
5	1	cytoplasmic beta-actin
6	1	polyubiquitin
7	1	ornithine decarboxylase (ODC)
8	1	MHC class I
1	2	glutathione-S-transferase, alpha type2 (Gsta2)
2	2	cytochrome P450, 2b19 (Cyp2b15)
3	2	cytochrome P450, 2c39 (Cyp2c39)
4	2	cytochrome P450, 1a1 (Cyp1a1)
5	2	cytochrome P450, 1a2 (Cyp1a2)
6	2	Cytochrome P450, subfamily 2e1 (ethanol-inducible) (Cyp2e1)
7	2	Cytochrome P450, subfamily IIC (mephenytoin 4-hydroxylase) (Cyp2c)
8	2	APEX nuclease
1	3	hypoxia-inducible factor-1 alpha (Hif1a)
2	3	Cytochrome P450, subfamily IIA (Cyp2a3a)
3	3	Cytochrom P450 15-beta gene (Cyp2c12)
4	3	Cytochrome P450, subfamily IID2 (Cyp2d2)
5	3	Cytochrome P450, subfamily IIIA, polypeptide 3 (Cyp3a3)
6	3	Cytochrome P450, subfamily IIF, polypeptide 1 (Cyp2f1)
7	3	cytochrome P450 monooxygenase (CYP2J3)
8	3	transcription factor HES-1
1	4	Hsp70-2
2	4	cytochrome P4502F4 (CYP4502F4)
3	4	cytochrome P450 2D18
4	4	cytochrome P450 3A9
5	4	CYP2J4
6	4	Cytochrome P450, subfamily XVII (Cyp17)
7	4	Cytochrome P450 1b1 (Cyp1b1)
8	4	DNA polymerase alpha (pol alpha gene)
1	5	vascular endothelial growth factor-A188
2	5	cytochrome P-450j
3	5	cytochrome P-450 isozyme 5 (P450 IVB2)
4	5	cytochrome P450 IIA3

10

20

30

【0037】

40

【表 7】

## オリジナルアレイにスポットされている遺伝子のリスト (2)

Column	Row	Gene name
5	5	cytochrome P450 PCN2
6	5	(CYP2B1) gene, promoter
7	5	mitochondrial cytochrome P450 (P450C27)
8	5	translation elongation factor 1-delta subunit
1	6	cardiovascular heat shock protein
2	6	cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase (cyp 2C23)
3	6	NADH-cytochrome b-5 reductase
4	6	cytochrome P-450d methylcholanthrene-inducible gene
5	6	testosterone 6-beta-hydroxylase (CYP3A1)
6	6	cytochrome P-450 IV A1 (CYP4A1)
7	6	cholesterol 7-alpha-hydroxylase (CYP7)
8	6	transcriptional intermediary factor 2 (TIF2)
1	7	glutathione transferase subunit 8
2	7	Alcohol dehydrogenase (class I), alpha polypeptide (Adh1)
3	7	carboxylesterase 3 (Ces3)
4	7	carboxylesterase 1 (Ces1)
5	7	alcohol dehydrogenase 4 (class II), pi polypeptide (Adh4)
6	7	aldehyde dehydrogenase family 3, subfamily A2 (Aldh3a2)
7	7	steroid sulfatase (Sts)
8	7	8-oxoguanine-DNA-glycosylase (rogg1)
1	8	GADD45gamma
2	8	cytosolic epoxide hydrolase (Ephx2)
3	8	flavin-containing monooxygenase FMO3
4	8	carboxylic ester hydrolase
5	8	flavin-containing monooxygenase 5 (FMO5)
6	8	flavin-containing monooxygenase 4 (FMO4)
7	8	flavin-containing monooxygenase 2 (FMO2)
8	8	RNA polymerase I 194 kDa subunit (RPA1)
1	9	glutathione S-transferase A3 subunit (GSTA3)
2	9	cholesterol esterase
3	9	liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase
4	9	beta-glucuronidase
5	9	aldehyde reductase
6	9	aldehyde dehydrogenase (ALDH) mRNA
7	9	liver aldehyde oxidase male form (AOX1)
8	9	pancreatic phospholipase A-2

10

20

30

【 0 0 3 8 】

【表 8】

## オリジナルアレイにスポットされている遺伝子のリスト (3)

Column	Row	Gene name
1	10	thioredoxin
2	10	alcohol dehydrogenase (ADH)
3	10	NADPH-cytochrome P-450 reductase
4	10	microsomal aldehyde dehydrogenase
5	10	monoamine oxidase B (Maobf3)
6	10	epoxide hydrolase
7	10	prostaglandin H synthase (PGHS-1)
8	10	alpha-tubulin
1	11	chaperonin 60 (Hsp60) and chaperonin 10 (CPN10)
2	11	glutathione s-transferase M5
3	11	Catecholamine-O-methyltransferase (Comt)
4	11	Acetyl-Co A acetyltransferase 1, mitochondrial (Acat1)
5	11	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2(Acaa2)
6	11	bile acid-Coenzyme A: amino acid N-acyltransferase (Baat)
7	11	fatty acid Coenzyme A ligase, long chain 4 (Faci4)
8	11	ER-60 protease
1	12	cell growth regulator rCGR19
2	12	arylamine N-acetyltransferase-1 (AT-1)
3	12	arylamine N-acetyltransferase-2 (AT-2)
4	12	UDP-glucuronosyltransferase
5	12	glutathione S-transferase P subunit
6	12	thiopurine S-methyltransferase (tpmt)
7	12	bile acid CoA ligase
8	12	telomerase protein component 1 (TLP1)
1	13	Hsp70/Hsp90 organizing protein
2	13	estrogen sulfotransferase
3	13	glutathione S-transferase
4	13	glutathione S-transferase
5	13	hydroxysteroid sulfotransferase
6	13	3-methylcholanthrene-inducible truncated UDP-glucuronosyltransferase
7	13	tryptophan 2,3-dioxygenase (Tdo2)
8	13	cyclin (PCNA, proliferating cell nuclear antigen)
1	14	heat shock related protein
2	14	liver glycogen synthase
3	14	Albumin (Alb)
4	14	carbaryl phosphate synthetase I precursor (cps)

10

20

30

【 0 0 3 9 】

【表 9】

オリジナルアレイにスポットされている遺伝子のリスト (4)

Column	Row	Gene name
5	14	hepatocyte growth factor
6	14	Peroxisome proliferator activated receptor alpha (Ppara)
7	14	peroxisomal membrane protein 3 (Pmp3)
8	14	ribosomal protein L4
1	15	norvegicus liver-specific organic anion transporter
2	15	Solute carrier family 22, member 1 (Slc22a1)
3	15	P-glycoprotein 3/ multidrug resistance 2 (Pgy3)
4	15	vimentin
5	15	Gap junction protein, alpha 1, 43 kD (connexin 43) (Gja1)
6	15	Glutamine synthetase (glutamate-ammonia ligase) (Glu1)
7	15	peroxisome proliferator-activated receptor beta (PPARb gene)
8	15	glucocorticoid receptor
1	16	multidrug resistance protein
2	16	canalicular multispecific organic anion transporter(cMOAT)
3	16	P-glycoprotein sister (spgp)
4	16	cytokeratin-18
5	16	connexin 26 (Cx26)
6	16	transferrin
7	16	proliferator-activated receptor gamma 1 (PPARgamma1)
8	16	elongation factor SIII p15 subunit
1	17	organic anion transporter (oatp)
2	17	mdr
3	17	sodium/bile acid cotransporter
4	17	alpha-fetoprotein
5	17	transforming growth factor-beta 1
6	17	TGF-B2
7	17	TGF-B3
8	17	apolipoprotein A-I (apoA-I)
1	18	E.coli 1444
2	18	Cloning vector pUC19c
3	18	alpha initiation factor
4	18	cytokeratin 8
5	18	gamma-glutamyl transpeptidase (GGT)
6	18	transforming growth factor-b type II receptor
7	18	osteopontin
8	18	E.coli 1444

10

20

30

【 0 0 4 0 】

B : 実験結果

(1) 図 2 に、オリジナルアレイを用いた、妊娠ラットにおける薬物代謝酵素遺伝子の発現解析結果を示す。図 2 中、Cy 3 標識 ( 緑色、モノクロではグレー ) はメスの正常ラットの成熟肝細胞からの cDNA、Cy 5 標識 ( 赤色、モノクロでは白色 ) は妊娠 19 日目ラットの成熟肝細胞からの cDNA である。この結果、in vitro 妊娠ラット肝細胞では薬剤代謝に関わる多くの遺伝子が発現低下していることが確認された ( 表 10 )。

40

【 0 0 4 1 】

【表 1 0】

## 妊娠ラットで発現低下している薬剤代謝遺伝子のリスト

3-methylcholanthrene-inducible truncated UDP-glucuronosyltransferase
Alcohol dehydrogenase (ADH)
Alcohol dehydrogenase (class I), alpha polypeptide (Adh1)
Aldehyde dehydrogenase family 3, subfamily A2 (Aldh3a2)
Bile acid CoA ligase
Bile acid-Coenzyme A: amino acid N-acyltransferase (Baat)
Carboxylic ester hydrolase
Catecholamine-O-methyltransferase (Comt)
Cytochrom P450 15-beta gene (Cyp2c12)
Cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase (cyp 2C23)
Cytochrome P450, 1a2 (Cyp1a2)
Cytochrome P450, 2c39 (Cyp2c39)
Cytochrome P450, subfamily 2e1 (ethanol-inducible) (Cyp2e1)
Cytochrome P450, subfamily IID2 (Cyp2d2)
Cytochrome P450, subfamily IIIA, polypeptide 3 (Cyp3a3)
Cytochrome P-450d methylcholanthrene-inducible gene
Cytochrome P-450j
Epoxide hydrolase
Fatty acid Coenzyme A ligase, long chain 4 (Facl4)
Flavin-containing monooxygenase 5 (FMO5)
Flavin-containing monooxygenase FMO3
Glutathione S-transferase
Glutathione S-transferase
Hydroxysteroid sulfotransferase
Liver aldehyde oxidase male form (AOX1)
Liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase
Microsomal aldehyde dehydrogenase
NADPH-cytochrome P-450 reductase
Steroid sulfatase (Sts)
Testosterone 6-beta-hydroxylase (CYP3A1)
UDP-glucuronosyltransferase

10

20

30

## 【 0 0 4 2 】

( 2 ) 図 3 に、in vitro 疑似妊娠状態における薬物代謝酵素の発現 ( ウェスタンブロッティング ) 結果を示す。図 3 から明らかなように、in vitro では、女性ホルモン存在下 ( 妊娠ラットにおけるホルモン濃度に近い状態を作る ) で小型肝細胞を培養し、CYP 遺伝子の発現を調べた結果、CYP 1 A 2、CYP 2 E 1 は in vivo と同様に発現低下することを確認した。

## 【 0 0 4 3 】

( 3 ) 図 4 に、TAKARA IntelliGene Rat Toxicology CHIP ver. 1.0 による解析結果を示す。

図 4 の、左側中、Cy 5 標識は、妊娠 19 日目ラットの成熟肝細胞からの cDNA であり、Cy 3 標識は正常ラットの成熟肝細胞からの cDNA である。

右側中、Cy 5 標識は女性ホルモン添加培養した小型肝細胞からの cDNA であり、Cy 3 標識は女性ホルモン非添加培養した小型肝細胞からの cDNA である。

この結果、妊娠ラットで発現低下する薬剤代謝に関わる遺伝子のいくつかは、in vitro 妊娠状態で培養した小型肝細胞でも同様に発現低下していることがわかった ( 表 1 1 ) 。

## 【 0 0 4 4 】

40

【表 1 1】

妊娠ラットおよび In vitro 妊娠状態の両方で発現低下した遺伝子のリスト

Aryl hydrocarbon receptor	
Benzodiazepin receptor (peripheral)	
Cannabinoid receptor 1	
Cytochrome P450, subfamily I (aromatic compound-inducible), member A2 (Q42, form d)	
Dipeptidyl peptidase 4	
Fatty acid synthase	
Flavin-containing monooxygenase 1	
Glutamic-oxaloacetic transaminase 1, soluble (aspartate aminotransferase, cytosolic)	10
High mobility group protein 2	
Hydroxysteroid dehydrogenase, 11 beta type 2	
Lysyl oxidase	
Monoamine oxidase B	
Murine thymoma viral (v-akt) oncogene homolog 2	
Pre-alpha-inhibitor, heavy chain 3	
R.norvegicus CCND1 mRNA for cyclin D1	
R.norvegicus mRNA for DNA topoisomerase II	
R.norvegicus mRNA for glutathione-S-transferase	
Rat alcohol dehydrogenase (ADH) mRNA, complete cds	
Rat cytochrome P-450j mRNA, complete cds	
Rat elongation factor SIII p15 subunit mRNA, complete cds	20
Rat F-0-ATPase subunit b mRNA, complete cds	
Rat hydroxysteroid sulfotransferase mRNA, complete cds	
Rat PTP-S mRNA for protein-tyrosine phosphatase	
Rat uricase mRNA, 3' end	
Rattus norvegicus 4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase (Tmabadh) mRNA, complete cds	
Rattus norvegicus 8-oxoguanine-DNA-glycosylase (rogg1) mRNA, complete cds	
Rattus norvegicus liver cytochrome c oxidase subunit VIII (COX-VIII) mRNA, 3' end of cds	
Rattus norvegicus MAP kinase kinase mRNA, complete cds	
Rattus norvegicus mevalonate kinase mRNA, complete cds	
Rattus norvegicus mRNA for 7-dehydrocholesterol reductase, complete cds	
Rattus norvegicus mRNA for proteasome p45/SUG, complete cds	30
Tissue factor pathway inhibitor	
T-kininogen	

## 【 0 0 4 5 】

(4) 図 5 にアセトアミノフェン添加による薬物代謝酵素の発現を示す。図 5 中、Cy 5 標識は、5 mM アセトアミノフェン添加培養 4 日後の小型肝細胞からの cDNA であり、Cy 3 標識は、コントロールである。左側は、女性ホルモン添加 ( $10^{-5}$  M エストラジオール +  $10^{-5}$  M プロゲステロン)、右側は女性ホルモン非添加である。アセトアミノフェン添加時の薬物代謝酵素の発現変動を示す。表 1 2 中の数値は Cy 5 / Cy 3 値 (normal: 女性ホルモン非添加、Preg: 女性ホルモン添加) である。

40

## 【 0 0 4 6 】

【表 1 2】

アセトアミノフェン添加時の薬物代謝酵素の発現変動

Cy 5 / Cy 3 値 (normal : 女性ホルモン非添加, preg. : 女性ホルモン添加)

Gene name	normal	preg.
Glutamate-cysteine ligase (gamma-glutamylcysteine synthetase)	1.11	0.6
Glutathione-S-transferase, mu type 2 (Yb2)	1.52	0.83
Aldehyde dehydrogenase 1 (phenobarbital inducible)	1.18	0.66
Rat uricase mRNA, 3' end	0.8	0.48
Glutathione-S-transferase, alpha type (Yc2)	1.73	1.13
Glutathione S-transferase, pi 2	2.09	1.37
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	1.58	1.06
Dipeptidyl peptidase 4	1.22	0.83
Platelet-activating factor acetylhydrolase beta subunit (PAF-AH beta)	0.56	0.85
Diaphorase (NADH/NADPH)	0.56	0.88
Plasma glutathione peroxidase precursor	1.24	1.96
Rattus norvegicus mRNA for APEX nuclease, complete cds	0.77	1.23
Guanidinoacetate methyltransferase	0.78	1.3
Protein phosphatase 2 (formerly 2A), catalytic subunit, beta isoform	0.56	0.99
Rat NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase mRNA, complete cds	0.78	1.8

10

20

## 【0047】

(5) 図6にフェノバルビタール添加による薬物代謝酵素の発現を示す。図6中、Cy 5 標識は、2mMフェノバルビタール添加培養4日後の小型肝細胞からのcDNAであり、Cy 3 標識は、コントロールである。左側は女性ホルモン添加 ( $10^{-5}$ M エストラジオール +  $10^{-5}$ M プロゲステロン)、右側は女性ホルモン非添加である。フェノバルビタール添加時の薬物代謝酵素の発現の変動を示す。表13中の数値はCy 5 / Cy 3 値 (normal : 女性ホルモン非添加、Preg: 女性ホルモン添加) である。

30

## 【0048】

【表 1 3】

フェノバルビタール添加時の薬物代謝酵素の発現変動

Cy 5 / Cy 3 値 (normal : 女性ホルモン非添加, preg. : 女性ホルモン添加)

Gene name	normal	preg
Rat NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase mRNA, complete cds	0.87	0.48
Acyl-coA oxidase	1.01	1.58
Rat glutathione S-transferase mRNA, complete cds	0.67	1.08
Guanidinoacetate methyltransferase	0.74	1.19
Rat mRNA for mitochondrial enoyl-CoA hydratase (EC 4.2.1.17)	0.73	1.18
Rat microsomal aldehyde dehydrogenase mRNA, complete cds	0.84	1.4

40

## 【0049】

アレイの結果から、薬剤代謝酵素のデータを抽出し、さらに通常の培養条件と妊娠状態での発現変動が異なる遺伝子を抽出した。表12及び表13より妊娠状態において薬剤を添加することにより、幾つかの薬剤代謝酵素が通常とは異なる発現変動を示すことがわかった。

【図面の簡単な説明】

50

【0050】

【図1】オリジナルアレイのスポット図及びスポットされた遺伝子の分類を示す。ColumnとRowの番号は表6、表7、表8、表9の番号に一致する。

【図2】オリジナルアレイを用いた、妊娠ラットにおける薬物代謝酵素遺伝子の発現解析結果を示す。

【図3】in vitro疑似妊娠状態における薬物代謝酵素の発現（ウェスタンブロッティング）結果を示す。

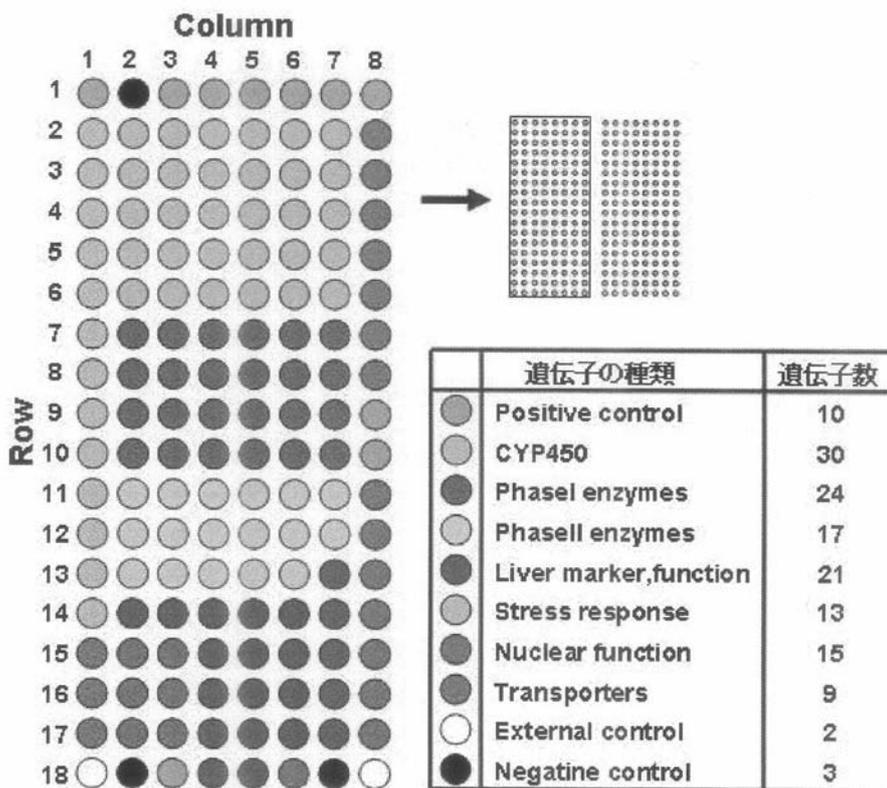
【図4】タカラ社DNAチップによる解析結果を示す。画像は全スポット領域のうち左上（Block 1）の領域である。

【図5】アセトアミノフェン添加による薬物代謝酵素の発現を示す。画像は全スポット領域のうち左上（Block 1）の領域である。

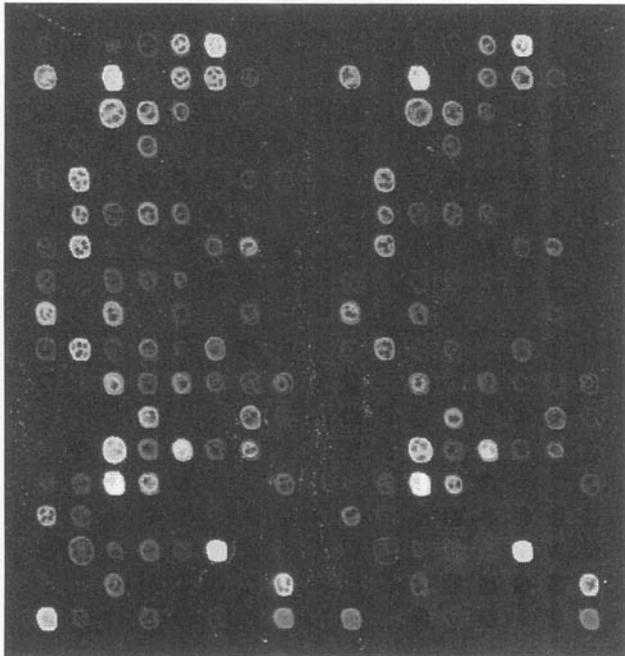
【図6】フェノバルビタール添加による薬物代謝酵素の発現を示す。画像は全スポット領域のうち左上（Block 1）の領域である。

10

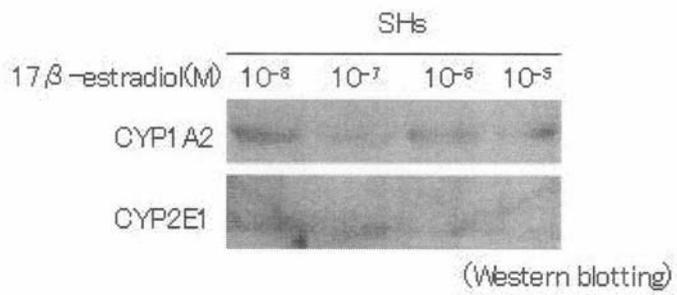
【図1】



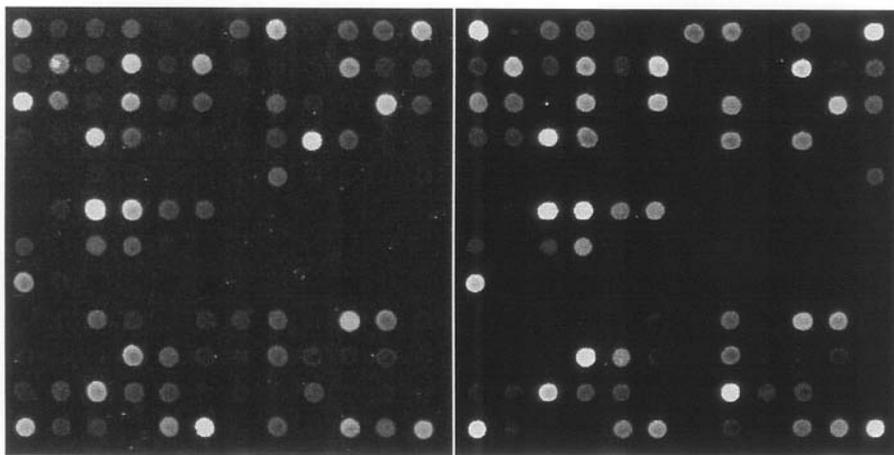
【 図 2 】



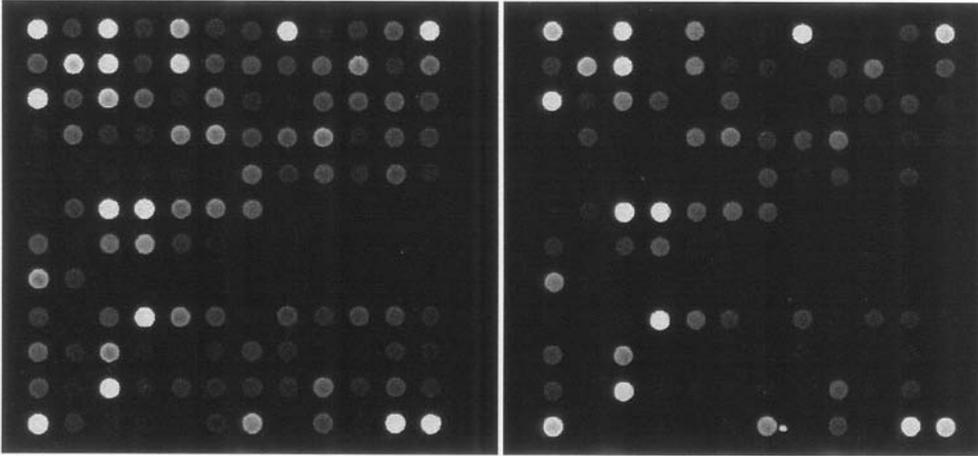
【 図 3 】



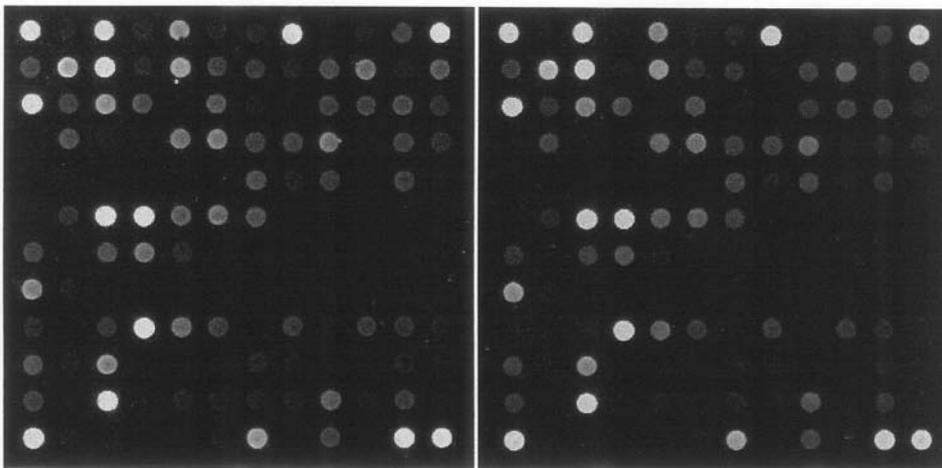
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



## フロントページの続き

- (74)代理人 100117156  
弁理士 村田 正樹
- (74)代理人 100111028  
弁理士 山本 博人
- (74)代理人 100089048  
弁理士 浅野 康隆
- (74)代理人 100101317  
弁理士 的場 ひろみ
- (74)代理人 100134935  
弁理士 大野 詩木
- (72)発明者 三高 俊広  
北海道札幌市清田区北野3条1丁目10番49号
- (72)発明者 大栄 秀和  
北海道札幌市北区北26条西5丁目2番1号511
- (72)発明者 今 純子  
北海道札幌市北区北17条西6丁目20-318 パークホームズ北大前803号

審査官 濱田 光浩

- (56)参考文献 特表2002-503696(JP,A)  
国際公開第2002/088332(WO,A1)  
国際公開第2001/096866(WO,A1)

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00  
C12N 15/00  
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)  
PubMed