

化学発光測定法による Bile Salt Export Pump 輸送活性の測定

山口佳奈,^a 村井 毅,^a 藪内 光,^b 恵 淑萍,^a 黒澤隆夫*,^a

Measurement of the Transport Activities of Bile Salt Export Pump Using Chemiluminescence Detection Method

Kana YAMAGUCHI,^a Tsuyoshi MURAI,^a Hikaru YABUUCHI,^b
Shu-Ping HUI,^a and Takao KUROSAWA*,^a^aFaculty of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences University of Hokkaido, Kanazawa, Ishikari-Tobetsu, Hokkaido 061-0293, Japan, and ^bGeno Membrane, Inc., 75-1 Ono, Tsurumi-ku, Yokohama 230-0046, Japan

(Received October 22, 2009; Accepted December 15, 2009; Published online December 21, 2009)

Monovalent bile acids, such as taurine- and glycine-conjugated bile acids, are excreted into bile by bile salt export pumps (BSEP, ABCB11). Human BSEP (hBSEP) is physiologically important because it was identified as the gene responsible for the genetic disease: progressive familial intrahepatic cholestasis type 2 (PFIC-2). The evaluation of the inhibitory effect of hBSEP transport activity provides significant information for predicting toxic potential in the early phase of drug development. The role and function of hBSEP have been investigated by the examination of the ATP-dependent transport of radioactively isotopically (RI)-labeled bile acid such as a tritium labeled taurocholic acid, in membrane vesicles obtained from hBSEP-expressing cells. The chemiluminescence detection method using 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase (3 α -HSD) had been developed for a simple analysis of bile acids in human biological fluids. This method is extremely sensitive and it may be applicable for the measurements of bile acid transport activities by hBSEP vesicles without using RI-labeled bile acid. The present paper deals with an application of the chemiluminescence detection method using 3 α -HSD with enzyme cycling method to the measurement of ATP-dependent transport activities of taurocholic acid (T-CA) in membrane vesicles obtained from hBSEP-expressing Sf9 cells. Calibration curves for T-CA was linear over the range from 10 to 400 pmol/ml. The values of the kinetic parameters for hBSEP vesicles obtained by the chemiluminescence detection method were comparable with the values of that obtained by liquid chromatography-mass spectrometry method. This assay method was highly useful for the measurements of bile acid transport activities.

Key words—bile acid; bile salt export pump; chemiluminescence detection

諸 言

肝における胆汁酸排泄は肝細胞内の胆管側膜上に局在する各種 ATP binding cassette (ABC) トランスポーターが関与しており、その主な ABC トランスポーターとして、Bile salt export pump (BSEP, ABCB11), Multidrug resistance protein 2 (MRP2, ABCC2) などが知られている。¹⁻³⁾ BSEP はヒト体液中における主要胆汁酸であるグリシン及びタウリン抱合型胆汁酸 (1 価胆汁酸) の胆汁排泄を担っており、胆汁酸排泄に最も密接に関与するトランス

ポーターとされている。これら胆汁酸排泄型トランスポーターの機能障害は胆汁うっ滞を誘起する一因と考えられており、BSEP の遺伝子変異によって生じる進行性家族性肝内胆汁うっ滞 2 型などの遺伝的疾患も見い出されている。^{4,5)} さらに、BSEP の胆汁酸輸送活性は、各種薬剤の投与により阻害を受けることが明らかにされている。そのため、BSEP の機能解析は、臨床のみならず医薬品開発の初期段階における肝毒性予測に極めて重要と考えられている。⁶⁻⁸⁾

各種 ABC トランスポーターの活性測定法の一つとして、ABC トランスポーターを発現させた反転膜小胞 (vesicles) を利用する薬物輸送実験法が開発されている。^{9,10)} 本法は、vesicles 内に取り込まれたリガンド量から輸送活性を求める方法であり、ト

^a北海道医療大学薬学部生命物理科学講座薬品分析化学教室, ^b株式会社ジェノメンブレン 現所属: 神戸大学連携創造本部

*e-mail: kurosawa@hoku-iryo-u.ac.jp

ランスポーターの輸送能を直接評価するものとして、より明確な機能解析が可能とされている。すなわち、リガンドとしてトリチウム標識化タウロコール酸 ($[^3\text{H}]$ T-CA) などを利用すれば、その放射活性より BSEP の輸送活性を求めることが可能である。現在、本活性測定法は、各種薬剤による BSEP 阻害活性評価のスクリーニング法として臨床並びに医薬品開発分野において広く利用されている。しかしながら、ラジオアイソトープ (RI) 使用に関連する様々な制限から本スクリーニングを一般の実験室で実施することは困難であり、汎用性に問題が残されている。これまで、筆者らは RI 標識体を使用しない BSEP 活性測定法として、LC/MS 法による輸送活性測定法を開発し、BSEP における各種胆汁酸の輸送能について検討を加えた。¹¹⁾ 本法は、測定感度及び特異性に優れるものの、上記スクリーニング法の適用には、検体処理能力が不足する。これらのことから、より汎用性、簡便性に優れる活性測定法の開発を検討することとした。

胆汁酸の簡易定量法として、 3α -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ (3α -HSD) の作用により生成する還元型ニコチンアデニンジヌクレオチド (NADH) をモニターする測定系は汎用性に優れ、臨床分野においても広く利用されている。^{12,13)} さらに、生成する NADH を酵素サイクリング法により増幅し、ペルオキシダーゼ並びにルミノールを利用する化学発光検出の組み合わせではピコモルレベルの胆汁酸の検出が可能となる。¹⁴⁻¹⁶⁾ 本分析法は特殊な試薬を必要とせず、簡便かつ高感度に胆汁酸の定量が可能であることから、BSEP の胆汁酸輸送活性測定への応用が十分期待できると考えられる。そこで本研究では、上記酵素サイクリングを組み合わせた測定系を応用して BSEP 輸送活性測定の開発を行い、LC/MS 法による輸送活性測定との相関を検討した。

実験の部

1. 試薬 タウロコール酸 (T-CA)、アルコール脱水素酵素 (ADH)、1-メトキシフェナジンメチルサルフェート (1-MPMS)、ミクロペルオキシダーゼ (*m*-POD) 及び NADH は Sigma 製、NAD⁺ (NADH free) は Roche 製、 3α -HSD はナカライテスク製、リンゴ酸脱水素酵素 (MDH) 及びグルタ

ミン酸-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT) は和光純薬製、オキサロ酢酸及びルミノールは東京化成工業製、L-グルタミン酸ナトリウムは関東化学製を使用した。アデノシン 5'-三リン酸二ナトリウム (ATP) 並びにアデノシン 5'-一リン酸二ナトリウム (AMP) はオリエンタル酵母より購入した。各種有機溶媒は HPLC 用溶媒を使用した。BSEP 輸送実験には、昆虫 Sf9 細胞に human BSEP を発現させた BSEP 反転膜小胞 (hBSEP vesicles, ジェノメンブレン製) を用いた。その他の試薬類は市販の特級品を使用した。

2. 試液 T-CA を 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 9.0) に溶解し 1.0–400 pmol/ml の範囲で胆汁酸標準液を調製した。NAD⁺ (20 μ M) / 3α -HSD (1.5 Units/ml) の混合溶液は、20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 9.0) を用いて調製した。酵素サイクリング用試液として、MDH 溶液 (40 Units/ml, 0.1 M リン酸緩衝液, pH 7.5), ADH 溶液 (22.5 Units/ml, 40 mM ピロリン酸緩衝液, pH 8.8), 並びにオキサロ酢酸 (2 mM) / エタノール (1.2 mM) 混液 (0.1 M トリス塩酸緩衝液, pH 8.0) の 3 種の溶液をそれぞれ 1 : 1 : 2 (v/v/v) の比に混合したものを用いた。NAD⁺ (5 mM) / MDH (20 Units/ml) / GOT (1.0 Unit/ml) / グルタミン酸 (25 mM) 混液は 50 mM 2-アミノ-2-メチルプロパノール緩衝液 (pH 9.5) を用いて調製した。化学発光測定には、3.0 μ M 1-MPMS 水溶液及び *m*-POD (20 μ M) / ルミノール (80 μ M) 混合溶液 (0.4 M 炭酸ナトリウム-塩酸緩衝液, pH 9.5) を使用した。

3. 装置 化学発光測定には、プレートリーダー AB-2300 ルミネッセンサー JNR II (アトー製) を用いた。LC/MS 測定には QP-8000 型液体クロマトグラフ/質量分析計 (島津製作所製) を用いた。

4. 化学発光測定法による T-CA の定量 各種濃度 (1.0–400 pmol/ml) の胆汁酸標準液 (50 μ l) をポリプロピレン製反応チューブにとり、NAD⁺ / 3α -HSD 混合溶液 (50 μ l) を加え、37°C で 30 分間インキュベートした。反応液に 1 M 水酸化ナトリウム (5 μ l) を加え、75°C で 30 分間加温し、過剰の NAD⁺ を分解した。反応溶液 (10 μ l) をとり、それに酵素サイクリング試液 (40 μ l) を加え、酵素サイクリング反応 (4°C, 12 時間) に付した。加熱 (100°C, 3 分間) により反応を停止した後、NAD⁺ /

MDH/GOT/グルタミン酸混液 (200 μ l) を加え、37°C で 30 分間インキュベートした。反応液 (50 μ l) をマイクロプレートの各ウェルに分注し、1-MPMS 溶液 (50 μ l) 及び *m*-POD/ルミノール混液 (50 μ l) を加え、直ちに 5 秒間の発光強度をプレートリーダーで測定した。

5. Human BSEP vesicles を用いた胆汁酸輸送実験

胆汁酸の BSEP 輸送実験には、昆虫 Sf9 細胞に human BSEP を発現させた hBSEP vesicles を用い、未反応の胆汁酸の除去には迅速ろ過法^{8,17)} を利用することとした。T-CA (最終濃度 1.0–50 μ M) 及び hBSEP vesicles (タンパク量 50 μ g) を含む輸送用緩衝液 [100 mM KNO₃, 10 mM Mg(NO₃)₂ 及び 50 mM スクロースを含む 10 mM Hepes-Tris 緩衝液, pH 7.4, 30 μ l] を 37°C で 5 分間プレインキュベート後、10 mM ATP (20 μ l) あるいは 10 mM AMP (20 μ l) を添加し、反応を開始した。2 分間インキュベートした後、氷冷した反応停止用緩衝液 (50 mM スクロース, 100 mM KNO₃ を含む 10 mM Hepes-Tris, pH 7.4, 200 μ l) を添加し、反応を停止した。ついで、反応液をグラスファイバーフィルター (マイクロプレートフィルター, 孔計 1.0 μ m, ミリポア製) を用いて吸引ろ過し、氷冷した反応停止用緩衝液 (200 μ l \times 5 回) で洗浄した。フィルター上に吸着した T-CA (vesicles 内に取り込まれた T-CA) の溶出は既報¹¹⁾ に従い、エタノール (1.4 ml) を用いた。溶出液を減圧下濃縮した後、残渣に 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 9.0, 50 μ l) を加えて溶解し、前項に従って T-CA の定量を行い、活性値 (pmol/min/mg protein) に換算した。なお、ATP 依存輸送活性値は ATP 共存下における活性値から AMP 共存下における活性値を差し引いて求めた。

6. LC/MS 法による hBSEP vesicles 輸送活性測定¹¹⁾

分離カラムには Mightysil RP-18 (150 mm \times 2.0 mm I.D., 5 μ m, 関東化学製) を使用した。溶離液には 35% アセトニトリル/10 mM 酢酸アンモニウム混液を用い、流速を 0.2 ml/min に設定した。イオン化モードはエレクトロスプレーモード (ネガティブイオン検出モード) を使用した。ネブライザーガスには窒素 (4.5 l/min) を用いデフレクター電圧は -45 V に設定した。定量分析には T-CA の分子関連イオン [M-H]⁻ (*m/z* 514) をモニターイオンとする Selected ion monitoring 法を用

い、内標準法により定量した。実験の部 5. と同様に hBSEP vesicles と T-CA をインキュベートした後、LC/MS 法により輸送活性を求めた。

7. 速度論的パラメーター (K_m 値及び V_{max} 値の算出) hBSEP vesicles 輸送活性の速度論的パラメーターは以下の式に従い算出した。

$$v = \frac{V_{max} \times s}{K_m + s}$$

v , s , K_m 及び V_{max} はそれぞれ、輸送の初速度 (pmol/min/mg protein), T-CA 濃度 (μ M), Michaelis-Menten 定数 (μ M) 及び輸送の最大速度 (pmol/min/mg protein) を示す。 K_m 値及び V_{max} 値は Kaleida Graph (Synergy Software 製) を利用し、非線形回帰によって求めた。

結果と考察

1. 化学発光測定系の条件検討 Human BSEP

の胆汁酸に対する親和性は側鎖アミノ酸抱合形式により異なり、タウリン抱合体 > グリシン抱合体 > 遊離形の順で低下するとされている。^{6,17)} そこで、本研究では輸送基質として、T-CA を用いることとし、化学発光測定法による本胆汁酸の簡易定量法について検討することとした。化学発光測定法による胆汁酸測定の概略を Fig. 1 に示した。^{14,15)} まず、NAD⁺ 存在下、胆汁酸の 3 α -水酸基を酸化する 3 α -HSD の作用により、酸化反応が進行し、NADH が生成する (Production of NADH)。ついで、アルカリ処理により過剰の NAD⁺ を分解後、生成した NADH は酵素サイクリングによりリンゴ酸へと変換、蓄積される (Accumulation of malic acid)。蓄積されたリンゴ酸は、MDH 及び NAD⁺ の再添加により、サイクリング数に応じて増幅された NADH 及びオキサロ酢酸へと変換される (Generation of NADH)。この平衡反応を NADH の生成に偏らせるために、生成したオキサロ酢酸をグルタミン酸並びに GOT によりアスパラギン酸として系外へ除去する。ついで、生成した NADH は、電子伝達体である 1-MPMS と反応し、1-MPMSH₂ を与え、溶存酸素によりスーパーオキシドアニオン (O₂⁻) と過酸化水素 (H₂O₂) が生じ (Generation of H₂O₂)、ルミノールにより化学発光が生じる。その発光量を測定し、胆汁酸の定量を行うものである。

測定系の各段階における酵素反応並びに化学発光条件の最適化を行うこととした。なお、発光測定には操作の簡便性を考慮し発光検出プレートリーダーを用いた。まず、化学発光における O_2^- と H_2O_2 の生成反応について検討した。NADH (2×10^{-7} M) を用いて 1-MPMS の至適濃度を検討したところ、1–5 μ M の範囲で最大の発光量を与えたので、1-MPMS 濃度は 3.0 μ M に設定した [Fig. 2(A)]. 次に、ルミノールの至適濃度を検討したところ、20–100 μ M のときに最大の発光量を与えたので、ルミノール濃度を 80 μ M に設定した [Fig. 2(B)]. さらに、*m*-POD 濃度及び pH を検討し、それぞれ 20

μ M 及び pH 9.5 に設定した。

次に、T-CA の酸化反応 (Fig. 1, Production of NADH) 条件について検討を行った。本反応は塩基性下で進行するので、反応液の pH を検討したところ、pH 9.0 のときに最大の発光量を与えた。さらに、NAD⁺ 並びに 3 α -HSD 濃度を検討し、それぞれ、20 μ M, 1.5 Units/ml に設定し (Fig. 3), 反応時間は 30 分に設定した。設定した条件下、T-CA の検量線を作成したところ、データは示していないが、0.2–20 nmol/ml の範囲で、良好な直線性 ($r > 0.999$) が得られ、本分析法の定量性を確認することができた。しかしながら、この段階における検出限界は 100 pmol/ml と BSEP 輸送活性測定への適用には測定感度が不足することが判明した。そこで、本分析法にさらに酵素サイクリング法を組合せ、高感度化を図ることとした。

NADH の高感度分析法として、MDH 及び ADH を利用する酵素サイクリング法により、先述したように NADH を増幅する方法が確立されている。^{15,16} すなわち、オキサロ酢酸が MDH によりリンゴ酸へ変換される際、補酵素である NADH は NAD⁺ に変換される。この系にエタノールと ADH が存在すれば、NAD⁺ によりエタノールはアセトアルデヒドへと変換され、同時に NADH が再び生成する。この反応が繰り返す (サイクリング) ことによりリンゴ酸が蓄積することとなる (Fig. 1, Accumulation of malic acid)。サイクリング終了後、新たに過剰量の NAD⁺ を加えると MDH により蓄積したリンゴ酸はオキサロ酢酸へと酸化され、その際、蓄積量に応じた NADH が生成する (Fig. 1,

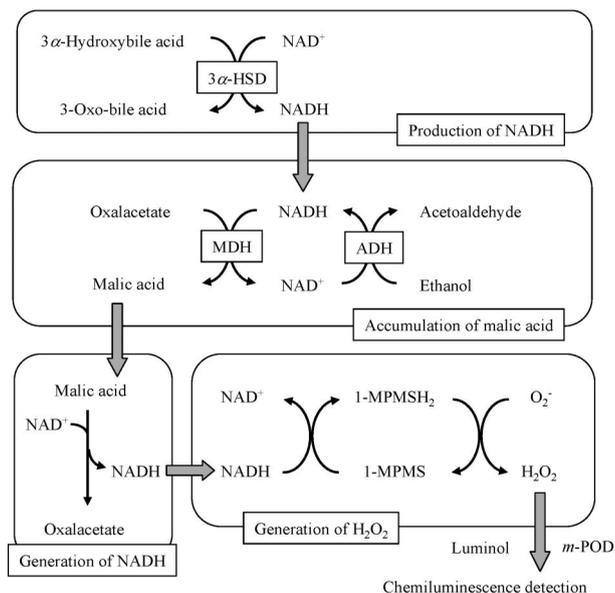


Fig. 1. Principle of the Chemiluminescence Detection Method for Bile Acids Using 3 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase with Enzyme Cycling Reaction

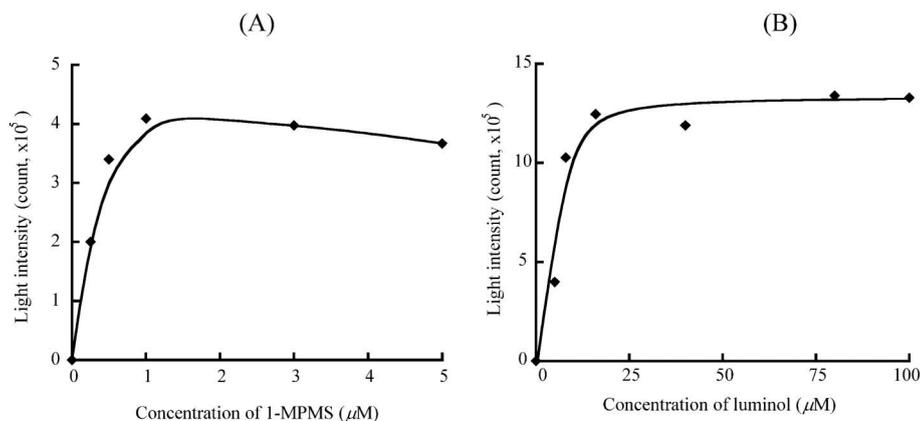


Fig. 2. Effects of 1-MPMS Concentration (A) and Luminol Concentration (B) on Chemiluminescence Intensity

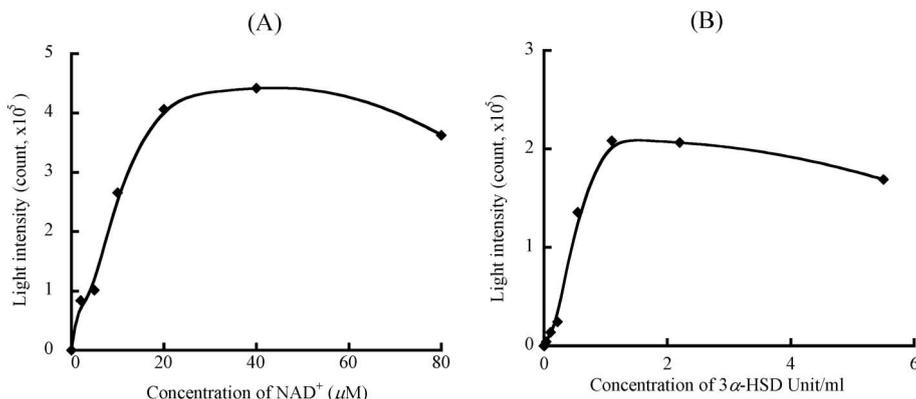


Fig. 3. Effects of NAD⁺ Concentration (A) and 3α-HSD Concentration (B) on Oxidation Reaction

Generation of NADH). 本サイクリング反応では、NADHが約3000サイクル/時間のサイクリング率で増幅するとされており、その測定感度は、サイクリング反応を利用しない場合に比し、数十倍に達するとされている。¹⁶⁾ NADHをモニターする上記T-CAの定量法にも適用が可能と推測された。そこで、T-CAの測定感度向上を目指し、本サイクリング法の適用を検討することとした。

酵素サイクリング反応における、各種酵素、基質濃度等の反応条件は既報¹⁵⁾の条件を採用することとし、実験の部4.に従って、T-CAの分析を行った。その結果、得られた検量線は、10–400 pmol/mlの範囲で、良好な直線性 ($r > 0.999$) を示し (Fig. 4)、各測定ポイントを4回測定した場合の相対標準偏差 (R.S.D.) は1.2–9.4%であった。また検出限界は2.0 pmol/mlとなり、酵素サイクリング反応を利用しない場合に比し、約50倍の測定感度向上が認められ、BSEP輸送活性測定への適用も十分に可能であると推測された。

2. Human BSEP vesicles の輸送活性測定 本化学発光測定法を用いてhBSEP vesiclesにおける輸送活性測定を行うこととした。本法の実試料への適用に際しては、輸送実験に使用した各種緩衝液由来の塩類が、少量ではあるが夾雑物としてT-CAと共存することとなり、これら夾雑物が発光強度あるいはT-CAの輸送活性値に影響を及ぼす可能性がある。そこで、予備検討として、T-CAを添加せずに、実験の部5.に従って得られた抽出物を調製し、この抽出物に既知量のT-CAを添加し、実験の部4.に従ってT-CAの定量を行った。その結果、データは示していないが、抽出物の有無による

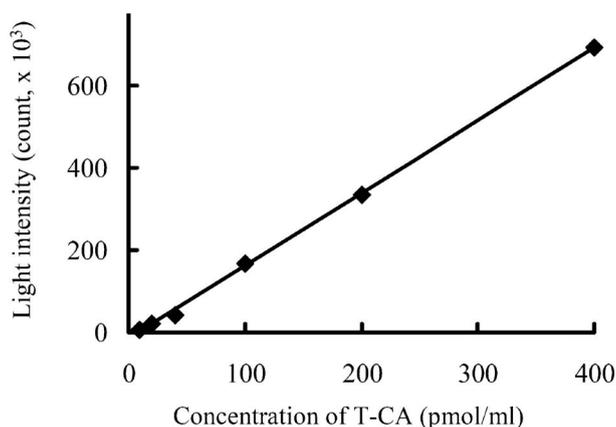


Fig. 4. Calibration Curve for T-CA

定量値の大きな変動は認められなかった。次に、本法並びにLC/MS法によりT-CAの輸送活性を測定し、得られた活性値を比較することとした。ATPあるいはAMP共存下、T-CA (最終濃度: 5 μM) とhBSEP vesicles (タンパク量: 50 μg) を37°Cで2分間インキュベートし、vesiclesに取り込まれたT-CAを本化学発光測定法並びにLC/MS法により定量し、輸送活性値を求めた (Table 1)。その結果、本法により得られたATP, AMP存在下より得られた活性値及びATP依存活性値は、LC/MS法により得られた結果とよく一致する結果を与えた。以上のことから、上記塩類等の夾雑物が活性値に及ぼす影響は極めて少ないと推察された。さらに、本化学発光測定法を用いてATP依存輸送活性値におけるT-CAの濃度依存性について検討したところ、ATP依存輸送活性値は基質濃度依存的に上昇するとともに飽和性を示した (Fig. 5)。T-CAに対する速度論的パラメーター (K_m 値及び V_{max} 値) を

Table 1. Transport Activities of T-CA by Human BSEP-expressing Membrane Vesicles

Method	with ATP ^{a)}	with AMP ^{a)}	ATP dependent activity ^{b)} (pmol/min/mg protein)
Chemiluminescence (n=3)	79.3±12.3	32.0±5.5	47.3±13.9
LC/MS (n=3)	83.1±5.6	28.9±2.7	54.2±6.4

Each value represents the mean ± S.D. of 3 determinations. *a)* Membrane vesicles (50 μg of protein) from hBSEP-expressing Sf9 cells were incubated in medium containing 5.0 μM T-CA at 37°C for 2 min with 4 mM ATP or AMP. *b)* ATP-dependent transport activity was calculated by subtracting the transport activity in the presence of AMP from that in the presence of ATP.

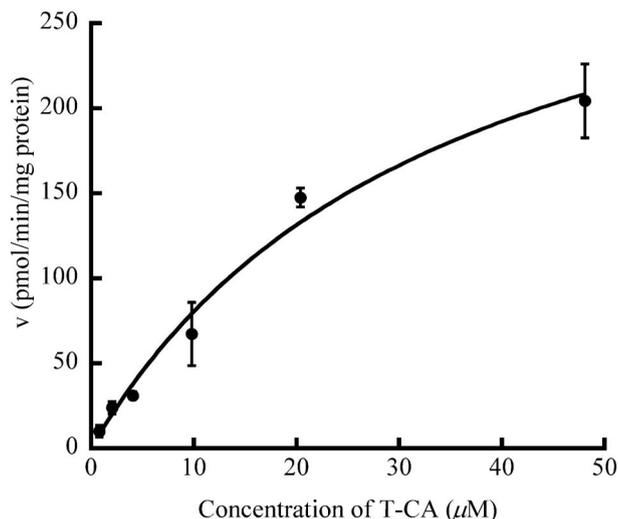


Fig. 5. Concentration Dependence of T-CA Uptake by Human BSEP-expressing Membrane Vesicles

ATP-dependent transport activity was calculated by subtracting the transport activity in the presence of AMP from that in the presence of ATP. Each value represents the mean ± S.D. of 3 determinations.

Table 2. Kinetic Parameters of Human BSEP-expressing Membrane Vesicles

Method	K_m (μM)	V_{max} (pmol/min/mg protein)
Chemiluminescence (n=3)	34.6±9.7	358.1±54.0
LC/MS (n=3)	32.0±8.0	342.7±44.6

The K_m and V_{max} values for T-CA were determined by nonlinear least-squares regression analysis using the data shown in Fig. 5. Each value represents the mean ± S.E. of 3 determinations.

Michaelis-Menten 式から算出したところ、得られた K_m 値及び V_{max} 値は化学発光測定法及び LC/MS 法の両測定法でほぼ同様な結果を示した (Table 2)。以上の結果より、本化学発光測定が hBSEP vesicles による胆汁酸輸送活性測定に適用可能であることが判明した。

これまで、シクロスポリン A、グリベンクラミ

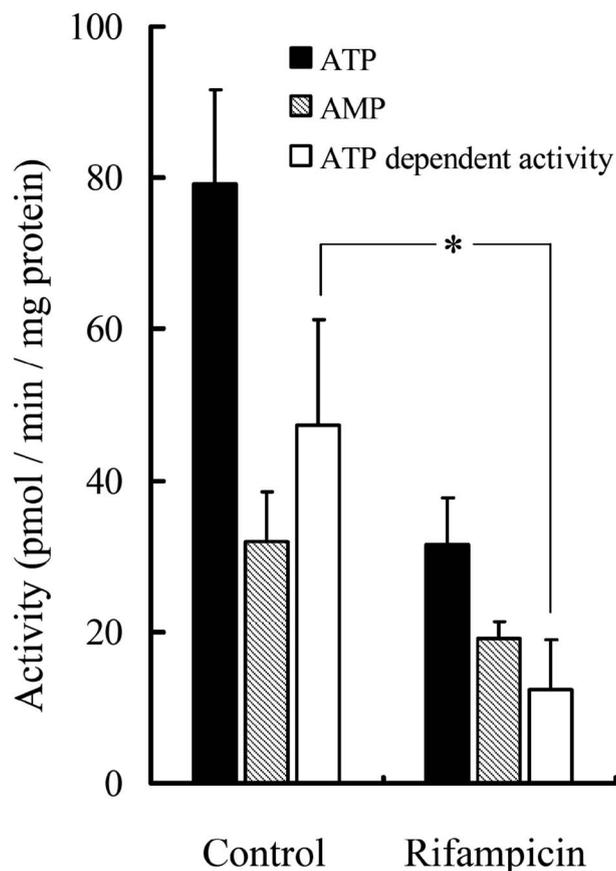


Fig. 6. Inhibitory Effects of Rifampicin on the Uptake of T-CA by Human BSEP-expressing Membrane Vesicles

The uptake of T-CA (5.0 μM) was determined after the incubation with an inhibitor (rifampicin, 100 μM) in the presence of ATP or AMP for 2 min at 37°C in transport buffer (pH 7.4). ATP-dependent transport activity was calculated by subtracting the transport activity in the presence of AMP from that in the presence of ATP. Each value represents the mean ± S.D. of 4 determinations. Statistical analysis was performed using Student's *t* test, with $p < 0.01$ considered as indicating a significant difference. * $p < 0.01$.

ド、プラバスタチン、リファンピシンなどの種々の薬剤が BSEP の輸送活性を阻害することが明らかにされている。⁶⁻⁸⁾ 各種薬剤による BSEP の阻害評価は、臨床のみならず新規医薬品開発分野において極めて重要な情報を提供する。そこで、阻害剤としてリファンピシンをとりあげ、本分析法の BSEP

阻害活性評価への適用を試みた。リファンピシンの共存下あるいは非共存下における T-CA の輸送活性を本分析法により測定した。その結果、BSEP 輸送活性は阻害剤非共存下 (コントロール) に比し、リファンピシン共存下では明らかに低下しており、コントロールにおける ATP 依存活性値を 100% とした場合の相対活性値は 12.6% であった (Fig. 6)。 ^3H T-CA をトレーサーとして用い同様の検討を行った数内らは、その相対活性値は 9.0% と報告しており、⁸⁾ ほぼ同様の結果を得ることができた。

結 論

本法では 3α -HSD を始めとする種々の酵素を利用していることから、BSEP 阻害活性測定に適用する場合、あらかじめ、各種阻害剤がこれらの酵素反応に及ぼす影響について検討する必要がある。また、酵素サイクリング反応に比較的長時間 (12 時間) を必要とする。しかしながら、煩雑な前処理操作を必要とする LC/MS 法並びに従来の RI 標識化胆汁酸を使用する方法に比し、本法は多数検体の同時測定が可能なマイクロプレートリーダーを利用する発光測定法であり、より汎用性に優れた活性測定法であると考えられた。今後、さらに検討を加えることにより、本法が BSEP 阻害活性評価のスクリーニング法として展開されることが期待される。

REFERENCES

- 1) Jansen P. L., Sturm E., *Liver Int.*, **23**, 315–322 (2003).
- 2) Harris M. J., Le Couteur D. G., Arias I. M., *J. Gastroenterol Hepatol.*, **20**, 807–817 (2005).
- 3) Stieger B., Meier Y., Meier P. J., *Pflugers Arch.*, **453**, 611–620 (2007).
- 4) Strautnieks S. S., Bull L. N., Knisely A. S., Kocoshis S. A., Dahl N., Arnell H., Sokal E., Dahan K., Childs S., Ling V., Tanner M. S., Kagalwalla A. F., Nemeth A., Pawlowska J., Baker A., Mieli-Vergani G., Freimer N. B., Gardiner R. M., Thompson R. J., *Nat. Genet.*, **20**, 233–238 (1998).
- 5) Jansen P. L., Muller M., *Gut*, **47**, 1–5 (2000).
- 6) Byrne J. A., Strautnieks S. S., Mieli-Vergani G., Higgins C. F., Linton K. J., Thompson R. J., *Gastroenterology*, **123**, 1649–1658 (2002).
- 7) Iwanaga T., Nakakariya M., Yabuuchi H., Maeda T., Tamai I., *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 739–744 (2007).
- 8) Yabuuchi H., Tanaka K., Maeda M., Take-mura M., Oka M., Ohashi R., Tamai I., *Biopharm. Drug Dispos.*, **29**, 441–448 (2008).
- 9) Ishikawa T., *J. Biol. Chem.*, **264**, 17343–17348 (1989).
- 10) Loe D. W., Almquist K. C., Cole S. P., Deeley R. G., *J. Biol. Chem.*, **271**, 9683–9689 (1996).
- 11) Yamaguchi K., Murai T., Yabuuchi H., Kurosawa T., *Anal. Sci.*, **25**, 1155–1158 (2009).
- 12) Mashige F., Imai K., Osuga T., *Clin. Chim. Acta*, **70**, 79–86 (1976).
- 13) Mashige F., Tanaka N., Maki A., Kamei S., Yamanaka M., *Clin. Chem.*, **27**, 1352–1356 (1981).
- 14) Tanabe K., Kawasaki T., Maeda M., Tsuji A., Yabuuchi M., *Bunseki Kagaku*, **36**, 82–87 (1987).
- 15) Maeda M., Ishizawa H., Tsuji A., *Bunseki Kagaku*, **38**, 495–499 (1989).
- 16) Kato T., Berger S. J., Carter J. A., Lowry O. H., *Anal. Biochem.*, **53**, 86–97 (1973).
- 17) Hayashi Y., Adachi T., Ito Y., Hirano K., Sugiura M., Sawaki S., *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 3796–3799 (1982).