

平成12年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第3分野

医薬品等の評価・試験方法の開発に関する研究

# 目 次

課題番号			
2.0000970A 31015	結核菌の迅速薬剤感受性試験法の開発	山崎 利雄	1
971A 31028	バイオテクノロジーを用いた薬物代謝酵素の特性解析と医薬品の適正使用化に関する研究	頭金 正博	9
972A 31064	感染症予防効果のある糖鎖を付加した多機能食用難消化性多糖類の開発とその有効性及び安全性を評価する方法の開発	小西 良子	23
973A 31065	食中毒細菌の検出方法の開発と評価	山本 茂貴	29
974A 31093	リポソームを用いた遺伝子導入法の開発、その有効性、安全性に関する研究	北川 隆之	39
975A 31112	ラット初代培養肝細胞を用いる毒性評価系の確立	四宮 貴久	47
977A 31219	生殖細胞系列の完全連続培養系の開発	佐藤 英明	52
978A 31238	精巣細胞各種分化系列を標識する抗体の作成と精巣障害解析の技術基盤の整備	井上 達	55
979A 31239	加速試験で評価できない製剤機能の安定性評価に関する研究	吉岡 澄江	66
980A 31240	新開発食品の食品化学的特性の解析と評価に関する研究	豊田 正武	74
981A 31242	糖タンパク質及び糖鎖関連物質の糖鎖の機能及び構造解析と品質等評価技術の開発	早川 堯夫	83
982A 31244	食品添加物の開発手法及び食品添加物の品質・安全性の評価・試験方法に関する研究	米谷 民雄	93
983A 31249	遺伝子改変テスターを用いる第二世代変異原性試験法の開発	能美 健彦	102
984A 31266	培養細胞を用いたインビトロ発熱性物質試験法の開発に関する研究	村井 敏美	108
985A 31267	薬物代謝活性の多型性とハイリスク患者における薬物評価に関する研究	大野 泰雄	116
2.0000976A 32146	トランスポーター遺伝子発現細胞を用いた薬物吸収・分布・排泄動態評価系の開発	辻 彰	126

## バイオテクノロジーを用いた薬物代謝酵素の特性解析 と医薬品の適正使用化に関する研究

所 属 国立公衆衛生院 衛生薬学部  
研究者 頭金 正博

### 分担研究者

- |                         |        |
|-------------------------|--------|
| (1) 大塚製薬(株) 徳島研究所       | 宮本 剛八郎 |
| (2) 武田薬品工業(株) 薬物機能第一研究所 | 朝日 知   |
| (3) 岡山大学医学部             | 難波 正義  |

### 要旨

ヒト薬物代謝酵素の特性を解析する実験系として、薬物代謝酵素誘導能を有した培養ヒト肝細胞系や薬物代謝酵素を長期間安定発現した培養細胞系を樹立した。また、遺伝子導入マウスを用いたヒト薬物代謝酵素誘導能の評価系を構築した。さらに、末梢血を用いた薬物代謝酵素含量の測定系を開発し、医薬品の適正使用に向けた検討を行った。

### 1. 研究目的

医薬品を適正に使用するには、ヒトにおける薬効・副作用の発現や医薬品間の相互作用をその開発段階で的確に予測する理論が必要になる。更に一旦臨床に供された医薬品を安全に、かつ目的の効能を的確に得るようにするには、個々の患者での薬効や副作用あるいは医薬品の相互作用を投薬段階で事前に予測するシステムが必要になる。

ところで、医薬品の薬効や副作用、相互作用の発現に影響をおよぼす薬物代謝酵素のチトクロムP450(CYP)の特性には種差があることから、実験動物から得られた薬物代謝酵素の特性に関する結果をそのままヒトに外挿することはできない。そこで、ヒトでの薬物代謝能の変動をおこす修飾因子を解析し医薬品の薬効や副作用を予測する実験系の構築が求められている。以上の観点から、本研究ではバイオテクノロジーの手法を用いてヒトでの薬物代謝酵素の特性を解析する実験系の構築を試みた。さらに、これを応用して患者個別の薬物代謝酵素の発現量や薬物代謝能を測定し、個人差、人種差、生理的・病理的状态等の因子に基づいて医薬品の薬効・副作用、相互作用を予測し、ヒトにおける適正使用の予測システムの確立をめざすことを目的とした。本年度はこれまでの2年間の研究によって開発したヒト薬物代謝酵素特性を解析するための培養細胞やヒト遺伝子導入マウス、薬物代謝酵素の微量定量系の有用性を検討した。

### 2. 研究方法

#### (1) CYP誘導能を有するヒト肝細胞培養

人工流産した21週胎児の肝臓をコラゲナーゼ液で処理し分散した細胞を10%ウシ胎児血清を含む

Williams 培地を使用してシャーレに播き、24時間後 SV40LT 遺伝子をリポフェクション法で導入し、その翌日からトランスフェリン、インシュリン、EGF を含む無血清培地で細胞を培養し不死化した。CYP1A1 (1A2) 活性は 7-ethoxyresorufin 脱エチル化反応で、CYP3A4 活性は testosterone 水酸化反応により測定した。

#### (2) CYP 発現ヒト肝細胞の長期間培養

CYP 安定発現株の Hepc/1A1.4, Hepc/2E1.3-8, Hepc/3A4.2-30 は各々 HepG2 に由来し CYP1A1, CYP2E1, CYP3A4 を安定に発現するように遺伝子を組み込み作成した。Hepc は mock 細胞であり pcDNA3.1 を形質転換したものである。また、Siran を純水または PBS 中で Siran (porous glass bead microcarrier, diameter 0.6 mm, vacant capacity 50 % Schott Glaswerke Co (Mainz, Germany)) を 20 分間オートクレーブ滅菌後、PBS と DMEM で交互に 3 回洗浄を繰り返し dish の表面が埋まる程度播種し、CO<sub>2</sub> インキュベータ中で 1 時間以上放置した。その後、トリプシン処理によりはがした細胞を Siran の上に播種し一晩培養することによりし欄固定化細胞を作成した。CYP1A1 (1A2) 活性は 7-ethoxyresorufin 脱エチル化反応で、CYP2E1 活性は p-nitrophenol 水酸化反応で CYP3A4 活性は testosterone 水酸化反応により測定した。LDH の細胞からの漏出は CytoTox 96 Assay Kit により定量した。LDH leakage (ratio) は、release LDH / total LDH とした。

#### (3) ヒト CYP3A4 遺伝子誘導能を評価するレポーター遺伝子測定系の構築

CYP3A4 レポーター遺伝子 (AdCYP3A4-362) の組換えアデノウイルスは CYP3A4 遺伝子上流域 (-362 ~ +11bp) を挿入したルシフェラーゼレポーターベクター (pGL3-Basic) をコスミドベクター (pAxcw) に導入し、COS-TPC 法に従って作製した。CYP3A4 遺伝子上流域にある ER-6 サイト、5'-TGAAGCTCAAAGGAGGTCA-3' (sense, -170 ~ -153bp) の塩基配列に変異を入れた遺伝子 (-362 ~ +11bp) を使って同様に AdCYP3A4-362m を作製した。ヒト PXR を発現するアデノウイルス AdhPXR はヒト PXR 遺伝子を挿入した発現ベクター pCMV4 を pAxcw に導入して作製した。培養細胞を用いるレポーター遺伝子測定の場合は被験物質を含む培地で 24 時間培養した細胞に AdCYP3A4-362 を感染させ、さらに被験物質存在下で 48 時間培養を行った。細胞溶解剤を用いて細胞を溶解した後、ルミノメータを用いて細胞抽出液中のルシフェラーゼ活性を測定した。また、マウスを用いるレポーター遺伝子測定の場合はコーン油に懸濁した被験物質を ddY 系雄性マウス (6 週齢) に 100 mg/kg の用量で 1 日 1 回 3 日間腹腔内投与した。2 回目の被験物質投与後 4 時間にウイルス液を腹腔内投与し、その 2 日後に肝臓を摘出し重量を測定した。また、肝臓ホモジネートの 9,000g 上清中のルシフェラーゼ活性およびテストステロン水酸化活性 (HPLC 法) を測定した。

#### (4) ヒト末梢血液中の CYP1A2 含量の微量測定とテオフィリン代謝能の測定

国立公衆衛生院および被験者が通院している東京慈恵医大のそれぞれの倫理委員会より許可を得て本研究を実施した。文書にて承諾を得たテオフィリン服用患者の血液から CYP1A2 の遺伝子の発現量とテオフィリン血中濃度を測定し、それらの因果関係を検討した。具体的には、気管支喘息の患者でテオフィリン療法を受けている者を対象として、テオフィリン服用後 12 時間の時点で末梢血を採取し totalRNA を抽出し、CYP1A2 mRNA 含量をリアルタイム RT-PCR 法で定量するとともにテオフィリン濃度を EIA 法で測定しテオフィリン全身クリアランスを求めた。

### 3. 研究成果

#### (1) CYP 誘導能を有するヒト肝細胞培養系の確立

薬物代謝酵素の誘導能を保持した細胞株を樹立するためヒト胎児より得た肝臓細胞に SV40LT 抗原を導入し不死化したヒト肝細胞株 (OUMS-29 株) を得た。この肝細胞は無血清培地で培養され、アルブミン、 $\alpha$ フェトプロテイン、トランスフェリンを始め多くのタンパク質を培地中に産生し UDP-glucuronyltransferase 活性を示した。また、芳香族炭化水素化合物である Benz(a)anthracene, Benz(a)pyrene, 3-methylcholanthrene など誘導される CYP1A1, CYP1A2 や多くの医薬品の代謝に関係する CYP3A などの活性を有していた。これらの CYP 誘導能は基質物質の濃度に依存し、また処理時間にも依存していた (図 1、2)。さらに、この肝細胞は polycyclic aromatic hydrocarbon receptor (AhR) と AhR nuclear translocator (Arnt) を発現していた。そこで、この細胞を用いて芳香族炭化水素化合物の細胞毒性調べたところ、CYP を発現していない細胞に比べて有意な毒性の発現が認められた (データは示していない)。

この肝細胞にさらに多くの肝細胞特異的機能を発現させるために、肝細胞で作用する転写因子 (HNF4 $\alpha$ ) を導入したところ、apolipoprotein A1, CII, CIII, blood coagulation factor X,  $\alpha$ 1-antitrypsin, HNF1 $\alpha$  などの発現がみられるようになった (データは示していない)。

#### (2) CYP 発現ヒト肝細胞の長期間培養系の樹立と代謝・毒性評価への応用

薬物代謝や毒性の評価に応用できる CYP の恒常的安定発現細胞株を樹立するため Hepc/1A1.4 細胞を Siran に播種し固定化ヒト細胞を作成した。細胞播種後 5 日目の 3 次元状態を走査型電子顕微鏡で観察した結果、Siran 表面上に存在する孔の中に 3 次元的に埋まるようにして細胞は存在していた (図 3)。また、培養開始直後は単体として存在していた Siran は時間経過に伴い 10 粒程度を 1 グループとして凝集した。次に、作成した Siran 固定化細胞の CYP 活性ならびにグルクロン酸抱合活性を検討したところ時間依存的に代謝物量は増加し固定化による活性の喪失はみられなかった (図 4-A, B)。Hepc/1A1.4, Hepc/2E1.3-8, Hepc/3A4.2-30 を Siran に固定化あるいは単層培養し、長期安定性について比較した。1 X 10<sup>6</sup> cell/well スケールで培養し PBS 洗浄後、reaction mixture 1 ml, 30 min を加えることにより各 CYP 活性を測定し、反応終了後、再び PBS で洗浄し、新たな培地を加え培養を継続した。単層培養系では細胞増殖に伴い活性が急激に上昇し、1 週間後急激に減少した。3 次元培養系においては、単層培養系と比較して活性能は低い値を示したものの、10 日目までゆっくりと活性が上昇し、約 2 週間から 2 ヶ月にわたりの長期にわたり安定した活性を維持した (図 5)。多孔性ガラスビーズ Siran に Hepc/2E1.3-8 を固定化した細胞を用いてアセトアミノフェン (APAP) の代謝活性化試験を行った。培養開始 3 日目から APAP 2.5 mM, BSO 100  $\mu$ M を暴露し続け、その影響を MTT 測定により評価した (図 6)。薬剤暴露されている系では培養 4 日目から細胞数が急激に減少したのに対し、薬剤暴露していないコントロールの細胞系では培養開始から約 2 週間の間、生存細胞数がゆっくりと増加していった。

#### (3) ヒト CYP3A4 遺伝子誘導能を評価するレポーター遺伝子測定系の構築

ヒト CYP3A4 の誘導能を遺伝子転写レベルで評価するためのレポーター遺伝子測定系の構築を目指

して、CYP3A4 レポーター遺伝子の AdCYP3A4-362 を作成した。これを培養細胞である HepG2 (ヒト肝癌由来細胞株)、Ruber (ラット肝癌由来細胞株)、Cos-1 (アフリカミドリザル腎由来 SV40 形質転換細胞株) および LS174T (ヒト結腸腺癌由来細胞株) に感染させると、いずれの細胞においてもルシフェラーゼの発現が認められた。HepG2 細胞をデキサメサゾン (DEX) あるいはクロトリマゾール (CLO) で処理するとルシフェラーゼ発現量が増加し、CYP3A4 遺伝子の転写活性化が認められたが、RIF による作用は観察されなかった (図 7)。リファンピシリン (RIF) による用量依存的な転写活性化作用は LS174T 細胞において見られた (図 8)。LS174T 細胞では DEX および CLO に対する反応は認められず、用いた細胞の種類によって誘導剤に対する応答性が異なっていた。CLO 処理した HepG2 細胞に AdCYP3A4-362 と AdhPXR を同時感染させると AdCYP3A4-362 の単独感染よりも CLO によるルシフェラーゼ活性の上昇率は増加し、CYP3A4 遺伝子の転写活性化が PXR の発現によって増強された (図 7)。マウスを用いた実験系ではアデノウイルスの投与によって肝臓内に発現したルシフェラーゼ活性が DEX、RIF および CLO 投与によって上昇し、CYP3A4 遺伝子の転写活性化が認められた。また、いずれの被験物質投与においても肝臓重量の増加および肝臓内テストステロン 6 $\beta$ 位水酸化活性の上昇が認められ、マウス肝臓内 CYP3A の誘導も確認された (図 9 A)。レポーター遺伝子上の PXR 結合配列に変異を導入した AdCYP3A4-362m を投与した実験では DEX を投与したマウスにおいてルシフェラーゼ活性が対照群に比べて約 2 倍に上昇したが、RIF および CLO 投与群ではルシフェラーゼ活性の上昇は認められなかった。各被験物質による肝臓重量の増加および肝臓内テストステロン 6 $\beta$ 位水酸化活性の上昇は AdCYP3A4-362 の場合と同様に観察された (図 9 B)。

#### (4) ヒト末梢血液中の CYP1A2 含量とテオフィリン代謝能の関係

ヒト末梢血液中の CYP 含量をもちいた薬物代謝能の予測系を構築するため、テオフィリン服用患者のテオフィリン全身クリアランスと血中 CYP1A2 含量の関係を調べた。具体的には健常人血液 4 サンプル、テオフィリン服用患者血液 4 サンプルの CYP1A2 含量をリアルタイム PCR 法で測定した。細胞内での発現がほぼ一定であると言われている  $\beta$ -actin を内部標準物質として測定し、得られた値の補正を行った。その結果、健常人での CYP1A2 含量はほぼ一定であった (図 10)。一方、患者血液中の CYP1A2 含量は患者間でのばらつきがみられ、健常人と比べると非常に少なかった (図 11、表 1)。患者の中には定量限界値以下の例もみられた (患者 3)。同じサンプルを用いて、CYP1A1、CYP2D6、CYP2E1 の定量をそれぞれ行ったが、これらについては健常人群と患者群との間で差はみられなかった (図は示していない)。

テオフィリンの経口徐放性製剤 (テオドール) はバイオアベイラビリティがほぼ 1 であり、投与した量のほとんどが消化管から吸収され、85~90% が肝臓の CYP で代謝を受ける。従って、全身クリアランス ( $CL_{10}$ ) はほぼ腎外クリアランス、この場合は肝クリアランスに相当すると考えられる。つまり、全身クリアランスが CYP による代謝能を反映していると考えられることができる。これらのことから、定常状態の平均血漿中濃度 ( $C_{pss\ ave}$ ) を測定することにより全身クリアランスを推定することができる。テオフィリン徐放性製剤が投与されている患者においては血中濃度は常に一定範囲内に保たれていて、投与間隔内での血中濃度の変動幅は比較的小さく設計されているため、採血時間はあまり重要ではないとされている。一般的には、再現性の高い次回服用直前の値が推奨されており、

また今回は患者毎の比較ができるように次回服用直前時で統一して採血を行った。得られた患者の血中濃度とその値より計算した  $CL_{tot}$  を表 2 に示した。その結果、No. 1, 2, 4 の 3 名の患者のクリアランスは 40mL/min 前後であったが、No. 3 の 1 名の患者では 21mL/min であった。これらの患者の CYP1A2 含量を比較してみると、 $CL_{tot}$  の高い 3 名の CYP1A2 含量の測定値はばらつきが大きかったが、全例で CYP1A2 を検出することができた。一方、 $CL_{tot}$  の低い患者での CYP1A2 含量は定量限界値以下であった(表 1, 2)。

#### 4. 考察

##### (1) CYP 誘導能を有するヒト肝細胞培養系の確立

一般に肝細胞は培養化されると急速に肝細胞に特異的な機能を失う場合が多く、薬物代謝酵素の関しても *in vivo* で観察される誘導を培養細胞で再現することは難しいとされている。今回ヒト胎児肝臓から調製した細胞に SV40LT 遺伝子を導入して不死化した肝細胞は、CYP1A1, 1A2, 3A などの CYP 活性と誘導能を有しており、*in vitro* でのヒト薬物代謝酵素の誘導能の評価系として有用であると考えられた。しかし、本培養細胞株でも生体より直接得られた肝細胞に比べてその活性は低い。さらに活性の高い細胞の培養化が今後の問題である。また、CYP3A に関しては胎児型の 3A7 の発現が主で成人型の 3A4 の発現はほとんどみられていない。この現象は、培養に用いた肝組織が胎児に由来したためか、あるいは培養条件下で酵素の発現が胎児型になるのか今後の検討が必要である。将来、成人の肝組織から培養化することを試み、より *in vivo* に近い誘導能評価系の構築を目指したい。

##### (2) CYP 発現ヒト肝細胞の長期間培養系の樹立と毒性評価への応用

細胞の様々な活性を長期間にわたって維持する方法として、多孔性樹脂を用いた細胞の 3 次元培養用法がある。本研究では多孔性ガラスビーズ(Siran)に肝細胞を固定化し 5 日間培養した状態で走査型電顕により観察を行ったところガラスビーズの中で細胞は 3 次元的に孔を埋めるように密集していることが観察された。さらに、ガラスビーズが培養経過とともに集合していくことから本培養系では細胞は互いに 3 次元的にコンタクトをとりながら存在していることが推察された。一般に肝細胞の機能発現のためには 3 次元的なコンタクトが必要とされており本培養形態はそのような条件を満たしていると考えられた。単層培養系においては CYP1A1, CYP2E1, CYP3A4 のいずれの発現系においても活性は急激な細胞増殖に伴い上昇し 1 週間後には急激な減少を示し、最終的に活性が消失した。このように単層培養系は、実験系が持つ活性の大きな変動ゆえに長期の安定した評価には不適當である。一方、ガラスビーズ固定化培養系においては単層培養と比較して活性は低い値を示したものの、長期にわたって安定した活性を維持した。さらに、2 週間にわたるアセトアミノフェン (APAP)+BSO による代謝活性化試験を行ったところ薬剤暴露されている系では代謝活性化により細胞毒性が発現したのに対してコントロールの細胞では培養開始から生存細胞数が減少することなく、ほぼ一定の値を示した。このことから、本試験系は長期化にわたる薬剤暴露の影響を観察するのに有用な実験系であると考えられた。

### (3) ヒト CYP3A4 遺伝子誘導能を評価するレポーター遺伝子測定系の構築

ヒト CYP3A4 の誘導能を遺伝子の転写レベルで評価するために作製したヒト CYP3A4 レポーター遺伝子 (AdCYP3A4-362) は実験に用いた全ての細胞に感染し、その細胞内にルシフェラーゼを発現させた。このことから AdCYP3A4-362 は他の培養細胞に対しても感染可能であり、種々の細胞に利用できるものと考えられる。HepG2 細胞を DEX あるいは CLO 処理すると CYP3A4 遺伝子の転写活性化が認められたが、RIF による作用は観察されなかった。LS174T 細胞において RIF による転写活性化作用は見られたが、DEX および CLO に対する反応は認められず、細胞の種類によって誘導剤に対する応答性が異なっていた。一方、マウスを用いた実験では AdCYP3A4-362 によって肝臓内に発現したルシフェラーゼ活性が DEX、RIF および CLO 投与によって上昇し、CYP3A4 遺伝子の転写活性化が認められた。これらのことから薬物の CYP3A4 遺伝子誘導能を評価するには、実験動物を用いた評価系の方がより有用であると考えられる。

また、HepG2 細胞内に CYP3A4 プロモーター領域とヒト PXR を同時発現させると CLO によるレポーター活性の上昇が増強された。さらに、CYP3A4 遺伝子の上流域にある PXR の結合サイト ER-6 に変異を入れ、PXR が結合できないプロモーター領域を持つアデノウイルスをマウスに投与すると誘導剤によるレポーター活性の上昇は大きく減弱したことから、薬物による CYP3A4 遺伝子転写活性化には PXR の ER-6 への結合が関与していることが *in vivo* においても確認された。

### (4) ヒト末梢血液中の CYP1A2 含量とテオフィリン代謝能の関係

テオフィリンはヒトにおいては CYP1A2 によって代謝されることが知られている。そこでヒト末梢血液中の CYP 含量をもちいた薬物代謝能の予測系を構築するため、今回は喘息に用いられるテオフィリン服用患者の血中の CYP1A2 含量とテオフィリン代謝能を測定した。まず、健常人群と患者群において、血液中の CYP1A2 含量について検討した。その結果、健常人血液中における CYP1A2 含量は 4 人ともほぼ一定であった。一方、患者血液中の CYP1A2 含量は患者 4 人の間でばらつきが見られ、健常人と比べると非常に少なく、健常人の約 1/9~1/1600 という結果が得られた(表 1)。No. 3 の患者においては、CYP1A2 は定量限界値以下であった。この結果が CYP1A2 のみで見られるものか、それとも他の分子種でも見られるものか検討するため同じサンプルを用いて他の分子種でも測定を行った。CYP1A2 のサブファミリーである CYP1A1、テオフィリンの代謝には関与していないと思われる CYP2D6、またテオフィリンの代謝にごくわずかに関与しているといわれている CYP2E1 の測定をそれぞれ行ったが、これらについては健常人群と患者群の間で差は見られなかった。CYP1A2 において患者間でばらつきがみられた理由としては、患者は喘息疾患を持っており、その病態が CYP1A2 発現量に関わっているかもしれない。あるいは CYP1A2 は誘導型酵素であることから、テオフィリン投与そのものが CYP1A2 の発現に影響を与えている可能性も考えられる。なお、患者は全員、テオフィリン以外に CYP1A2 によって代謝される薬物は併用していなかった。カフェインも CYP1A2 により代謝されるが、カフェイン飲料の摂取については、全員が緑茶やコーヒー等を同程度摂取していたため、この点については差がないと思われる。健常人群に比べて患者群の平均年齢が高いため、CYP1A2 が加齢により減少するという事も考えられたが、他の分子種ではほとんど差がないためこの点についても原因とは考えにくい。また CYP1A2 は喫煙によっても誘導されるため、喫煙歴についても検討



した。健常人は全員非喫煙者であったが、患者では2名が1日数本(10本以下)喫煙していた。しかし、今回の結果からは血液中のCYP1A2含量と喫煙との相関は認められなかった。

患者のテオフィリン血中濃度を測定し、全身クリアランス( $CL_{101}$ )を推定した。その結果、No.1,2,4の3名の患者の $CL_{101}$ は40mL/min前後であったが、No.3の1名の患者では21mL/minであった(表2)。

なお、全ての患者において、テオフィリンのクリアランスに影響を及ぼすと報告されている薬剤は併用されていなかった。また130%以上の肥満もテオフィリンクリアランスに影響を与えるとされているが、患者には著しい肥満はみられなかったため、この点についても影響はないと思われる。これらの患者のCYP1A2含量を比較してみると、 $CL_{101}$ の高かった3名のCYP1A2含量の測定値はばらつきが大きかったが、この3例は全例でCYP1A2を検出することができた(表1)。一方、 $CL_{101}$ の低かった1名の患者でのCYP1A2含量は定量限界値以下であったため、この患者の血中CYP1A2含量は非常に少ないものと考えられた。また、 $CL_{101}$ の高かった3名の患者間で $CL_{101}$ とCYP1A2含量を比較したが、この3人の間では関係は見いだせなかった。この理由としては、今回は1点の採血により $CL_{101}$ を推定したため、詳細な個人差までは見いだすことができなかつたためと考えられる。

これらの結果より、血中のCYP1A2含量とテオフィリンの全身クリアランスの間に関係がある可能性が示唆された。今後の課題としては、テオフィリン投与患者でCYP1A2が検出できなかった例があったことからCYP1A2定量の測定感度をさらに上げる必要がある。また、より正確なクリアランスを求めるためには、今後は徐放性ではない製剤を用いて数点の採血を行い、AUCを求めて検討する必要があると思われる。一方、テオフィリンの代謝能を評価する別の方法として、代謝物の血中濃度を定量するという方法も考えられる。これらのテオフィリン代謝能をより正確に推定できる方法を利用し、ヒト血液細胞中CYP1A2含量との相関を詳細に検討していくことが望まれる。

## 5. 結論

ヒト薬物代謝酵素の特性を解析する実験系の樹立を目指して以下の実験系の構築を行った。従来 *in vitro* では誘導能を評価する事が難しかったCYP1A2とCYP3A4の誘導能を有したヒト細胞株を樹立した。また、CYP1A1, 3A4, 2E1などを安定に発現させたHepG2細胞を多孔性ガラスビーズに固定化したところ、2ヶ月以上の長期にわたり安定した機能を発現した。ヒト遺伝子を導入したマウスを用いてヒトCYP3A4の誘導能を評価する *in vivo* 系を構築した。ヒト末梢血液中のCYP含量を定量し、薬物代謝能との関係を調べた。このようなシステムは今後の薬物代謝・毒性研究の新規ツールとして有用であると考えられる。

## 6. 研究発表

秦 聡美, 頭金 正博、ヒト末梢血液中のCYP分子種の定量と薬物代謝能の評価 日本薬学会  
第121回年会 札幌 2001年

Oka, T., Fukuhara, M., Ushio, F., and Kurose K. Molecular cloning and characterization of three novel cytochrome P450 2D isoforms, CYP2D20, CYP2D27, and CYP2D28 in the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 127, 143-152 (2000)

Tohkin, M.; Fukuhara, M.; Elizondo, G.; Tomita, S.; Gonzalez, F.J. Aryl hydrocarbon receptor is required for p300-mediated induction of DNA synthesis by adenovirus E1A. *Mol. Pharmacol.* 58, 845-851 (2000)

Fukaya, K, et al., Establishment of a human hepatocyte line (OUMS-29) having CYP 1A1 and 1A2 activities from fetal liver tissue by transfection of SV40LT. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal*(2001 in press).

Nozaki, I et al., Establishment of a human hepatoma cell line, HLE/2E1, suitable for detection of P450 2E1-related cytotoxicity. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal* 36,566-570(2000).

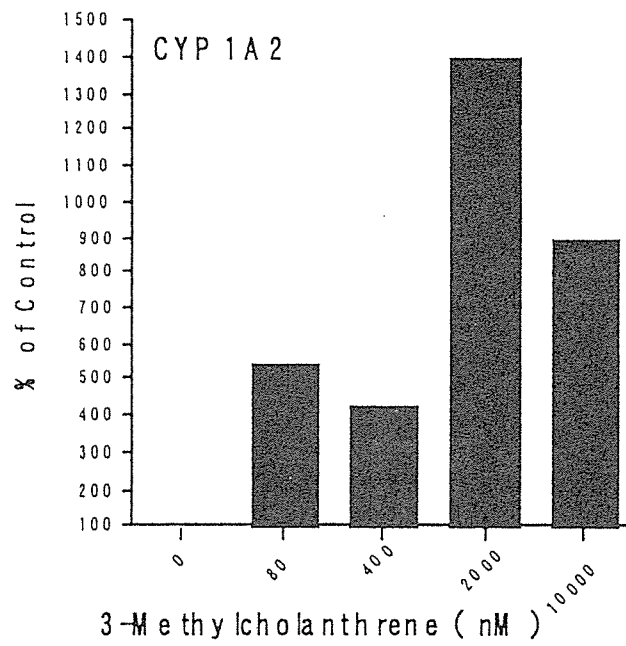


図1 ヒト肝細胞株 (OUMS-29 株) での 3-methylcholanthrene による CYP1A2 の誘導

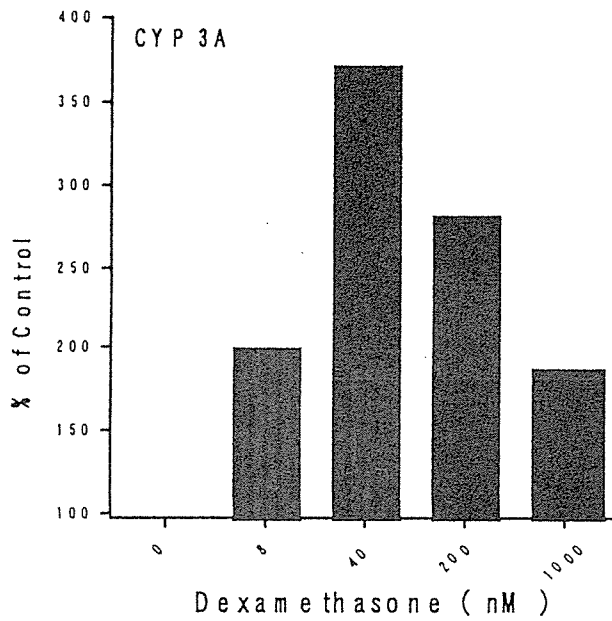


図2 ヒト肝細胞株 (OUMS-29 株) での Dexamethasone による CYP3A の誘導

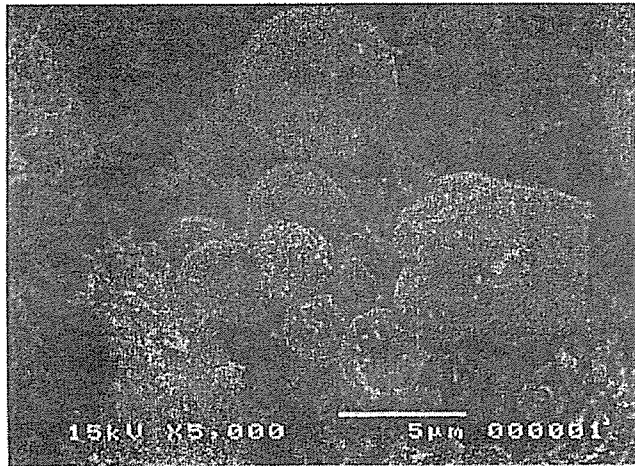
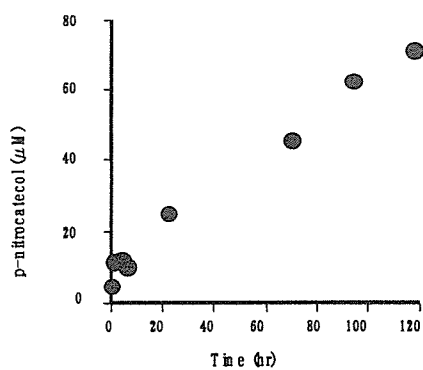


図3 多孔性ガラスビーズに固定化した Hepc/1A1.4 細胞の走査型電子顕微鏡写真

Hepc / 2E1.3-8 PNP 水酸化反応



7-HC グルクロン酸抱合

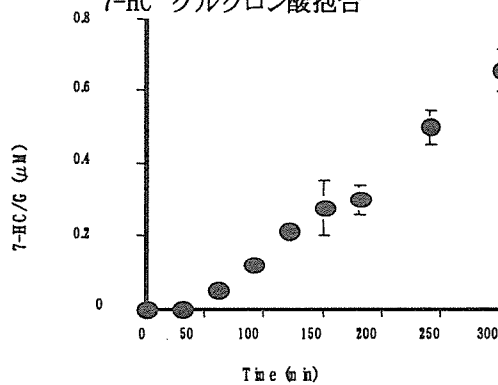


図4 多孔性ガラスビーズに固定化した Hepc/2E1.3-8 細胞の CYP2E1 活性とグルクロン酸抱合活性

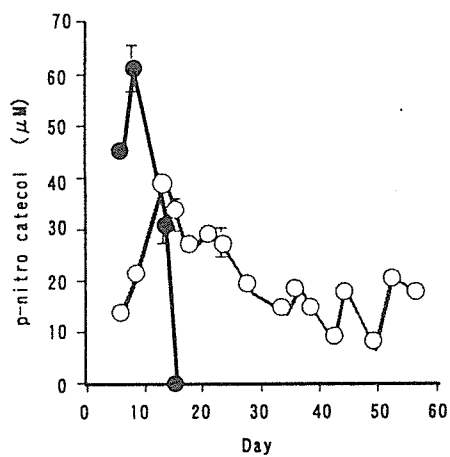


図5 単層培養と Siran 固定化培養を行った Hepc/2E1.3-8 の長期培養での CYP2E1 活性の経時変化

● : 単層培養、○ : Siran 固定化培養

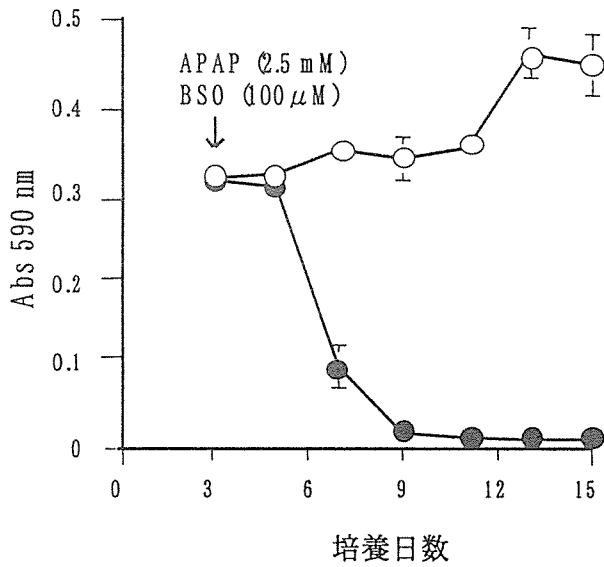


図 6 多孔性ガラスビーズに固定化した Hepc/2E1.3-8 細胞の APAP の代謝活性化 ○:無添加 ●:APAP+BSO

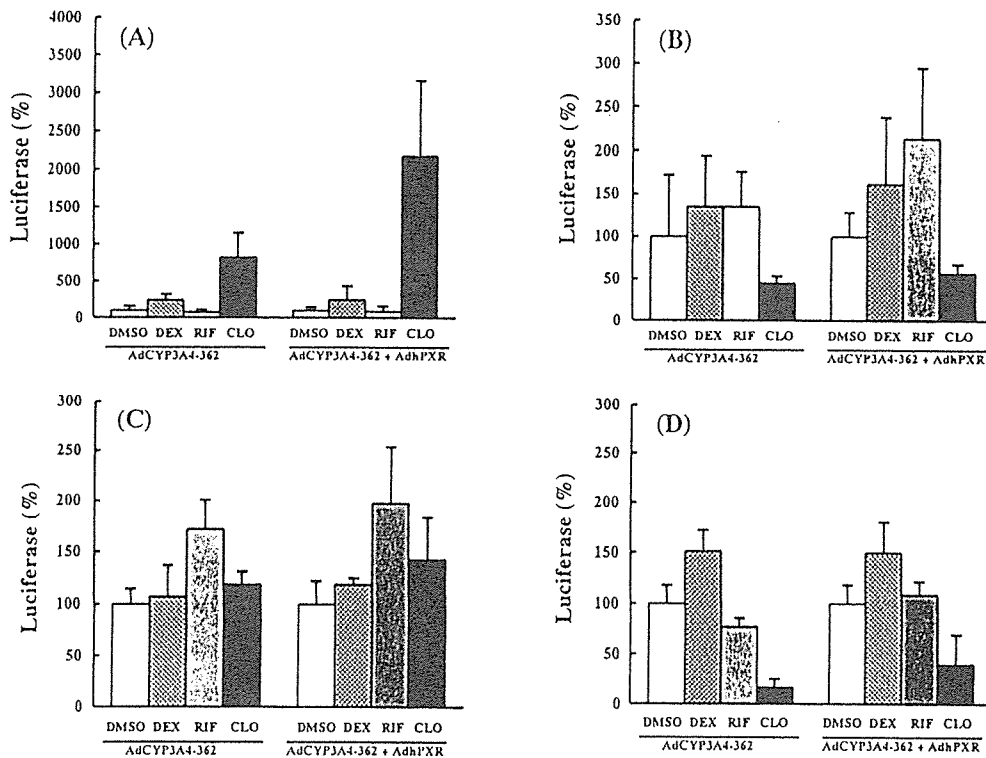


図 7 ヒト CYP3A4 レポーター遺伝子(AdCYP3A4-362)を導入した種々の細胞での転写活性と PXR 発現 (AdhPXR)の影響

(A):HepG2, (B):Ruber Cell, (C):LS174T Cell, (D):Cos01 Cell

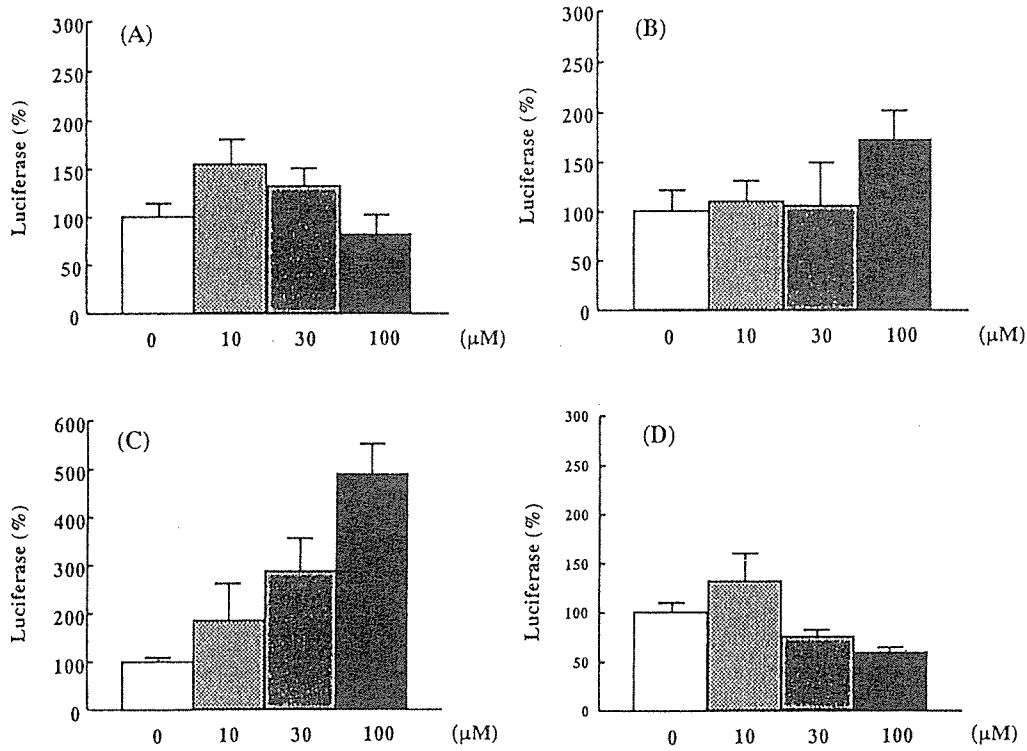


図8 ヒト CYP3A4 レポーター遺伝子(AdCYP3A4-362)を導入した種々の細胞でのリファンピシリンによる転写活性への影響

(A):HepG2, (B):Ruber Cell, (C):LS174T Cell, (D):Cos01 Cell

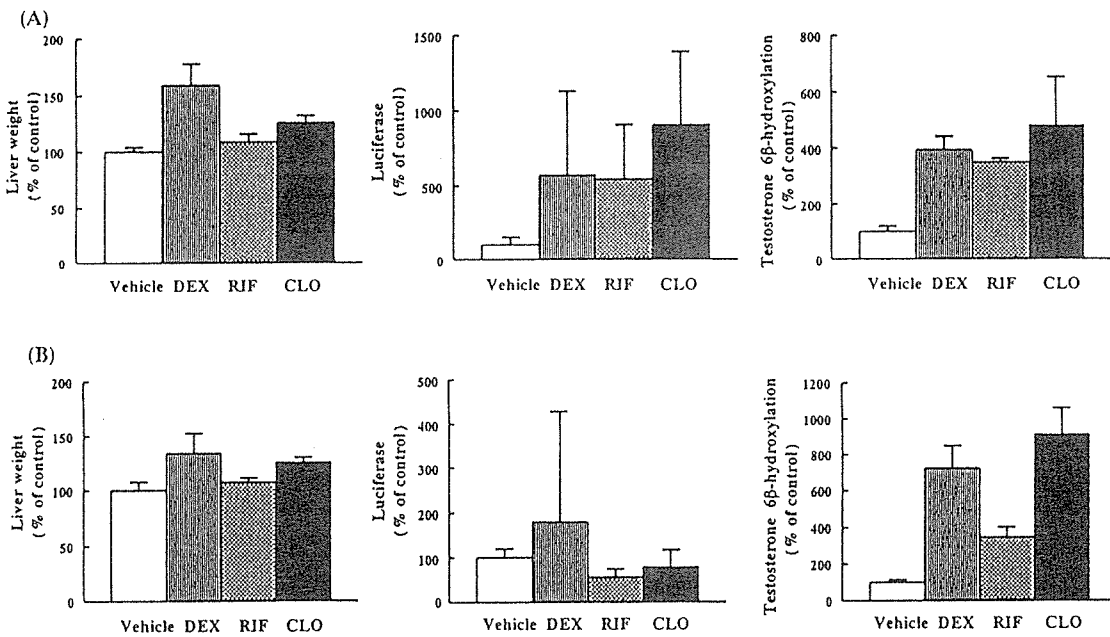


図9 ヒト CYP3A4 レポーター遺伝子を導入したマウスでの肝重量、転写活性とテストステロン活性の誘導に対する種々の誘導剤の影響

(A): AdCYP3A4-362, (B): AdCYP3A4-362m

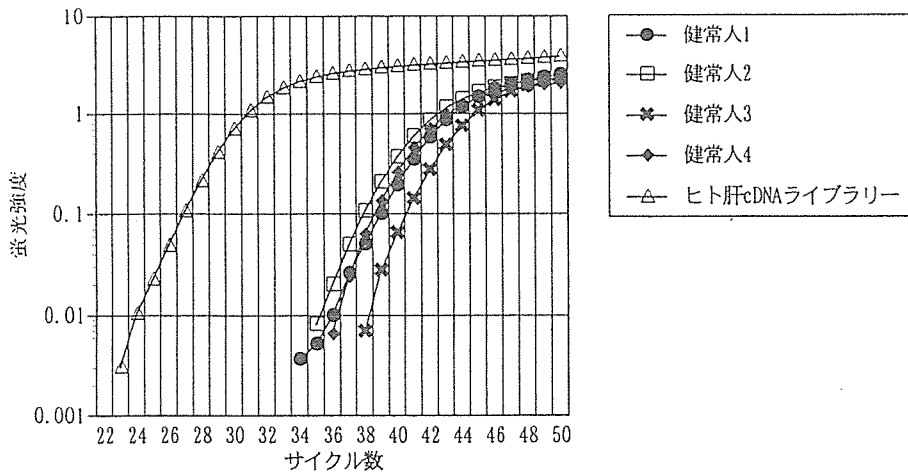


図 1 0 健康人血液からの CYP1A2 の検出

健康人 4 人の血液より mRNA を調製して cDNA とし、リアルタイム PCR を行って CYP1A2 を検出した。縦軸に蛍光強度の対数値、横軸にサイクル数を示した。

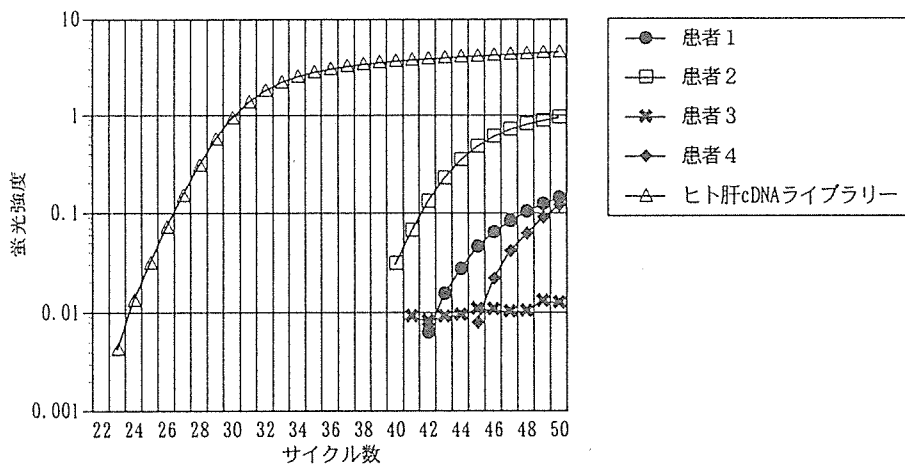


図 1 1 患者血液からの CYP1A2 の検出

患者 4 人の血液より cDNA を調製して cDNA とし、リアルタイム PCR を行って CYP1A2 を検出した。縦軸に蛍光強度の対数値、横軸にサイクル数を示した。

表1 健常人と患者の CYP1A2 含量

	Cl	$\Delta Cl$	健常人との含量差 ( $2^{\Delta Cl}$ )
健常人平均	38.3		1
患者1	48.0	-9.7	1/830
患者2	41.5	-3.2	1/9
患者3	—	—	—
患者4	49.0	-10.7	1/1660

健常人の Cl 値は、健常人 4 人の平均値で表した。健常人平均と患者の Cl 値の差 ( $\Delta Cl$ ) をとり、CYP1A2 含量の差を計算した。

表2 患者のテオフィリン血中濃度とクリアランス

患者	投与量 (mg/day)	血中濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	CLtot (mL/min)
1	200	3.2	43.4
2	400	7.2	38.58
3	200	6.6	21.04
4	400	6.9	40.26



---

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第3分野

医薬品等の評価・試験方法の開発に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル（小伝馬町駅前）4F  
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社