

Fig 8 Changes of human CYP3A4 expression in rifampicin-treated chimeric mice. The expression levels of human CYP3A4 mRNA (A), protein (B) and the dexamethasone 6-hydroxylase activity (C) in rifampicin-treated chimeric mice were compared with those in non-treated chimeric mice with similar hAlb contents. The concentration of dexamethasone was 100 μ M. The columns of M1, M2, M4 and M5 represent the mean \pm SD (n=3).

M1 Non-treated uPA (+-)/SCID mouse liver microsomes, M2 Rifampicin-treated uPA (+-)/SCID mouse liver microsomes, M4 Non-treated uPA (-)/SCID mouse liver microsomes, M5 Rifampicin-treated uPA (-)/SCID mouse liver microsomes

C-1-2 ヒト CYP2C9 に及ぼす影響

Fig 9AにヒトCYP2C9 mRNA発現量の定量結果を示す。トナーD2由来のキメラマウスC19はC14と比較して4.6倍の増加を示したが、その他のキメラマウスでは1.0-2.1倍の増加であった。

Fig 9BにヒトCYP2C9タンパク発現量の定量結果を示す。トナーD2由来

のキメラマウスC18はC13と比較して3.4倍の増加を示したが、その他のキメラマウスでは1.0-1.6倍の増加であった。

Fig 9Cにシクロフェナク 4'-水酸化酵素活性の結果を示す。リファンピシン投与によりトナーD1由来のキメラマウスで1.5-2.0倍、トナーD2由来のキメラマウスでは0.6-2.4倍の増加であった。uPA (+-)/SCID

マウス、および uPA (-/-)/SCID マウスではリファンピシン投与による活

性値の上昇は認められなかった。

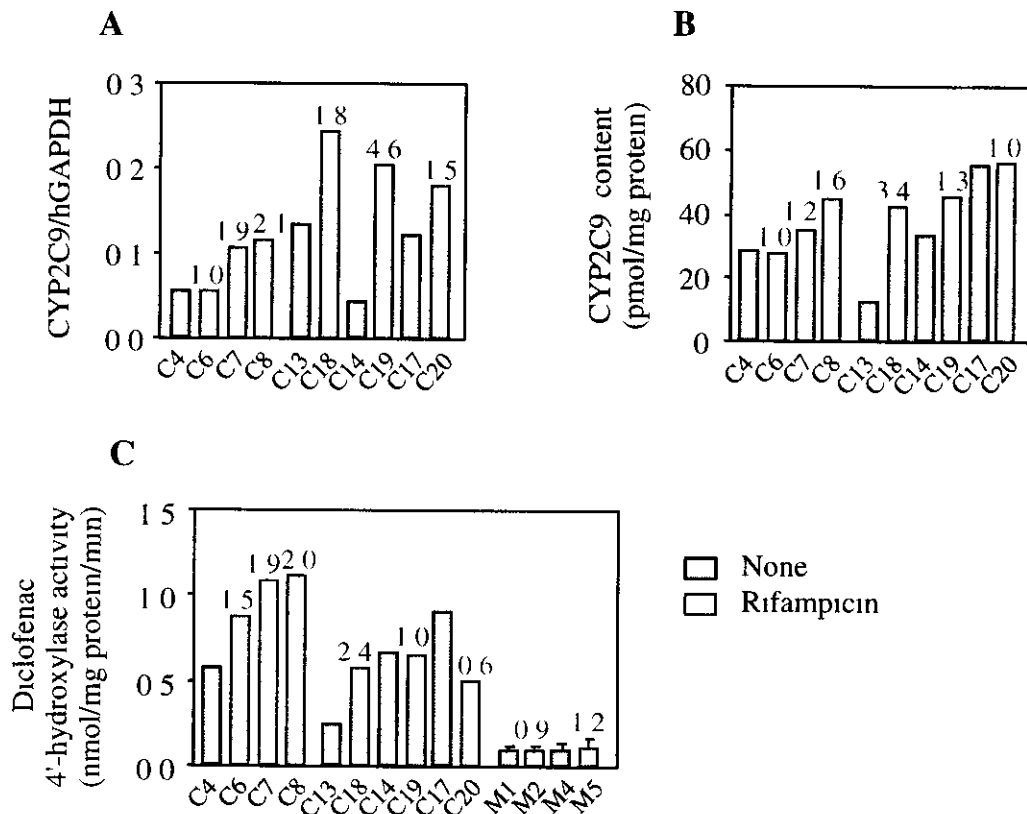


Fig 9 Changes of human CYP2C9 expression in rifampicin-treated chimeric mice The expression levels of human CYP2C9 mRNA (A), protein (B) and the diclofenac 4'-hydroxylase activity (C) in rifampicin-treated chimeric mice were compared with those in non-treated chimeric mice with similar hAlb contents The concentration of diclofenac was 30 μ M The columns of M1, M2, M4 and M5 represent the mean \pm SD (n=3) M1 Non-treated uPA (+/-)/SCID mouse liver microsomes, M2 Rifampicin-treated uPA (+/-)/SCID mouse liver microsomes, M4 Non-treated uPA (-/-)/SCID mouse liver microsomes, M5 Rifampicin-treated uPA (-/-)/SCID mouse liver microsomes

C-1-3 ヒトCYP2A6に及ぼす影響

Fig 10AにヒトCYP2A6 mRNA発現量の定量結果を示す。リファンピシン投与によりトナーD2由来のキメラマウスで1.4-4.5倍増加した。

Fig 10BにヒトCYP2A6タンパク発現量の結果を示す。リファンピシン投与によりトナーD2由来のキメラマ

ウスで3.2-3.7倍増加した。

Fig 10Cにクマリン7-水酸化酵素活性の結果を示す。リファンピシン投与によりトナーD2由来のキメラマウスで1.9-2.9倍増加した。

I-3-3-4の結果より、トナーD1およびトナーD1由来のキメラマウスは全欠損型であるCYP2A6*4Aのホモ接合体であり、CYP2A6タンパクおよびク

マリン7-水酸化酵素活性を検出することかてきなかつたため、誘導率を

評価することはてきなかつた。

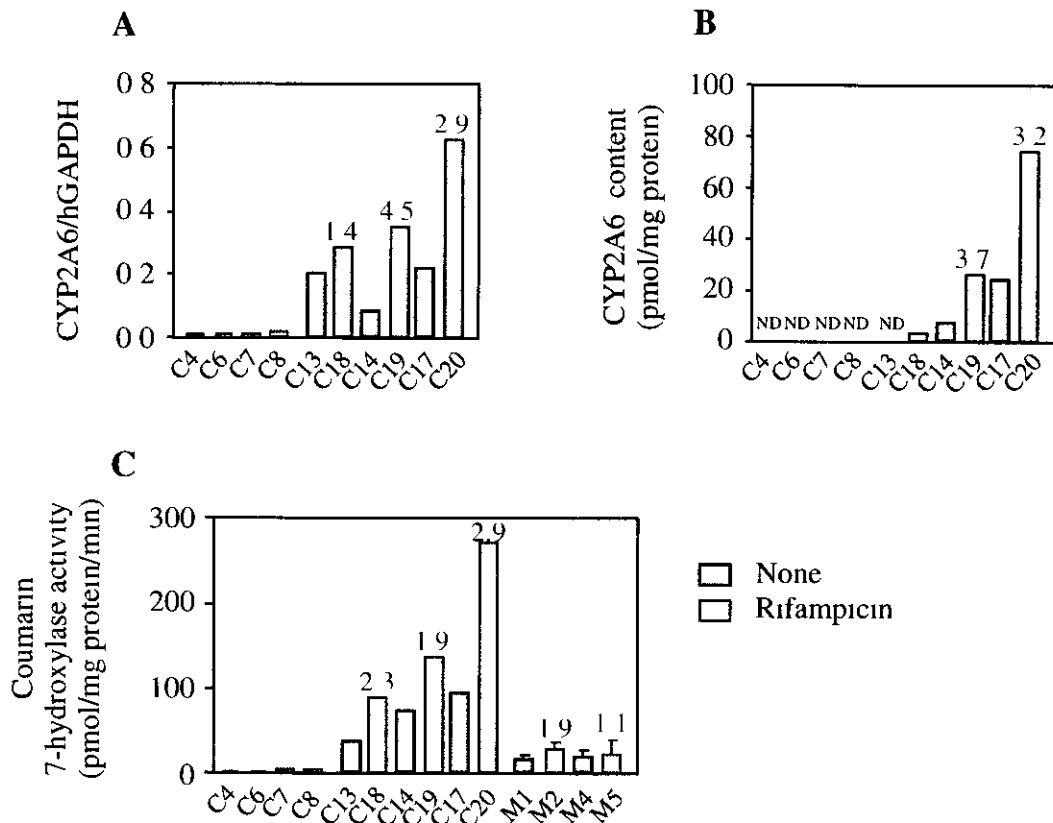


Fig 10 Changes of human CYP2A6 expression in rifampicin-treated chimeric mice The expression levels of human CYP2A6 mRNA (A), protein (B) and the coumarin 7-hydroxylase activity (C) in rifampicin-treated chimeric mice were compared with those in non-treated chimeric mice with similar hAlb contents The concentration of coumarin was 1 μ M The columns of M1, M2, M4 and M5 represent the mean \pm SD (n=3) M1 Non-treated uPA (+/-)/SCID mouse liver microsomes, M2 Rifampicin-treated uPA (+/-)/SCID mouse liver microsomes, M4 Non-treated uPA (-/-)/SCID mouse liver microsomes, M5 Rifampicin-treated uPA (-/-)/SCID mouse liver microsomes, ND not detected

C-1-4 その他のヒト CYP 分子種の発現に及ぼす影響

Fig 11A にヒト CYP1A1 mRNA 発現量の定量結果を示す。両ドナー由来のキメラマウスともに、発現量に大きなはらつきが認められた。

Fig 11B にヒト CYP1A2 mRNA 発現量、Fig 11C にヒト CYP1A2 タンパク発現量の定量結果を示す。両ドナー由来のキメラマウスともに、はらつきは認められるが、リファンピシン投与群と対照群で顕著な差は認められなかった。

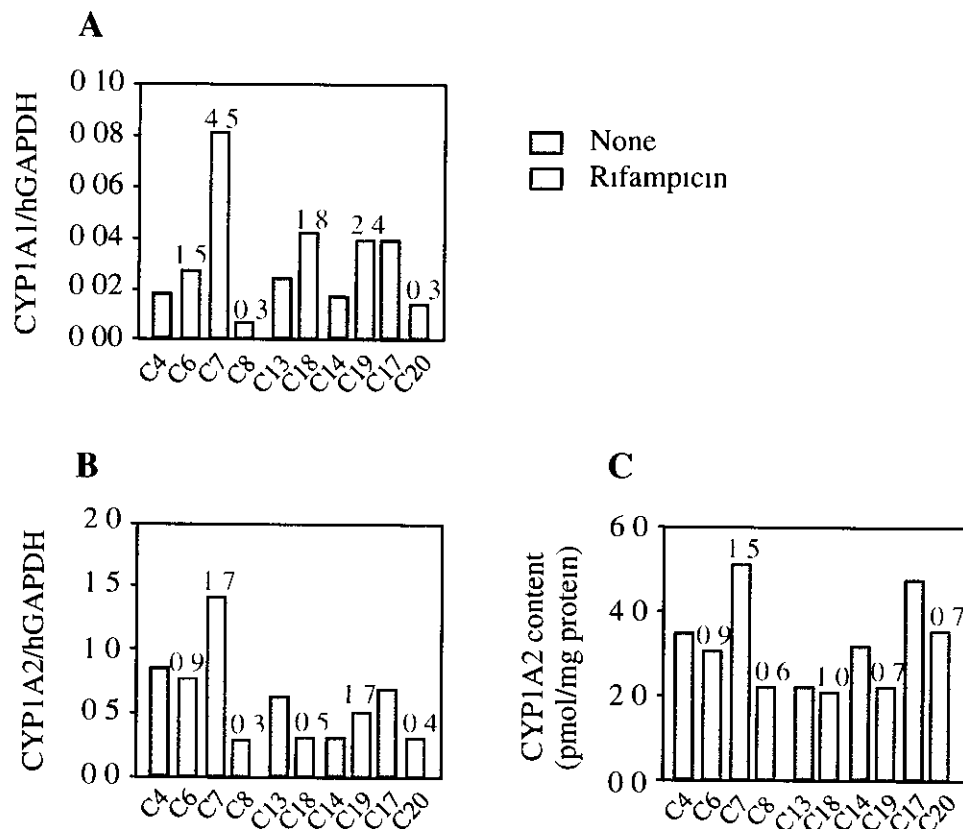


Fig 11 Changes of human CYP1A1 and CYP1A2 expression in rifampicin-treated chimeric mice
 The expression levels of human CYP1A1 and CYP1A2 mRNA (A, B) and CYP1A2 protein (C) in rifampicin-treated chimeric mice were compared with those in non-treated chimeric mice with similar hAlb contents

Fig 12A にヒト CYP2C8 mRNA 発現量の定量結果を示す。リファンピシン投与によりトナー D1 由来のキメラマウスで 3.3-3.7 倍、トナー D2 由来のキメラマウスで 1.4-3.0 倍の増加が認められた。

Fig 12B にヒト CYP2C8 タンパク発現量の結果を示す。リファンピシン投与によりトナー D1 由来のキメラマウスで 1.6-2.5 倍、トナー D2 由来のキメラマウスで 1.7-6.0 倍の増加が認められた。

Fig 12C にヒト CYP2C18 mRNA 発現量の定量結果を示す。リファンピシン投与によりトナー D1 由来のキメラマウスで 1.8-4.0 倍、トナー D2 由来のキメラマウスで 1.6-3.3 倍の増加が認められた。

Fig 12D にヒト CYP2C19 mRNA 発現量の定量結果を示す。リファンピシン投与によりトナー D1 由来のキメラマウスで 1.5-4.3 倍、トナー D2 由来のキメラマウスで 1.4-4.0 倍の増加が認められた。

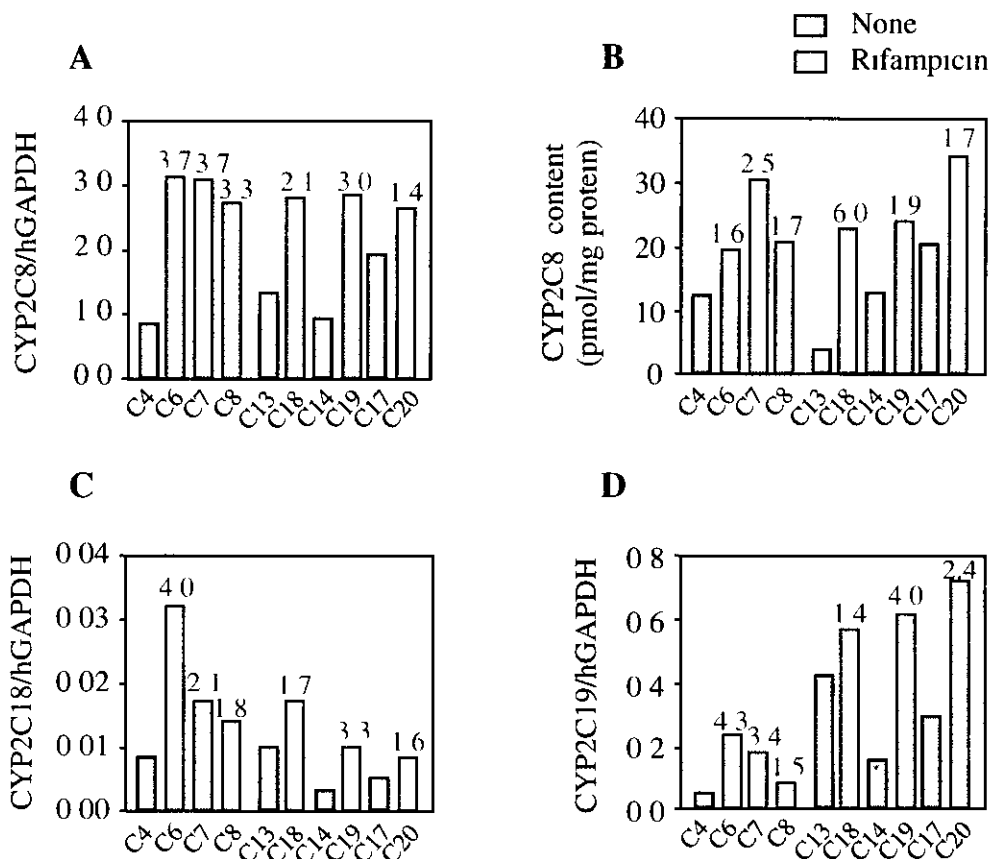


Fig 12 Changes of human CYP2C8, CYP2C18 and CYP2C19 expression in rifampicin-treated chimeric mice
 The expression levels of human CYP2C8, CYP2C18 and CYP2C19 mRNA (A, C, D) and CYP2C8 protein (B) in rifampicin-treated chimeric mice were compared with those in non-treated chimeric mice with similar hAlb contents

Fig 13A にヒト CYP2D6 mRNA 発現量、Fig 13B にヒト CYP2D6 タンパク発現量の定量結果を示す。両トナー由来のキメラマウスともに、はらつきは認められるが、リファンピシン投与群と対照群で顕著な差は認められなかった。

Fig 13C にヒト CYP3A5 mRNA 発現量の定量結果を示す。両トナー由来のキメラマウスともに、リファ

ンピシン投与群と対照群で差は認められなかった。

Fig 13D にヒト CYP3A5 タンパク発現量の結果を示す。トナー D1 由来のキメラマウスは、本章での実験条件下では、タンパクを検出することはできなかった。トナー D2 由来のキメラマウスでは C20 か C17 に比へ約 30 倍の増加が認められた。

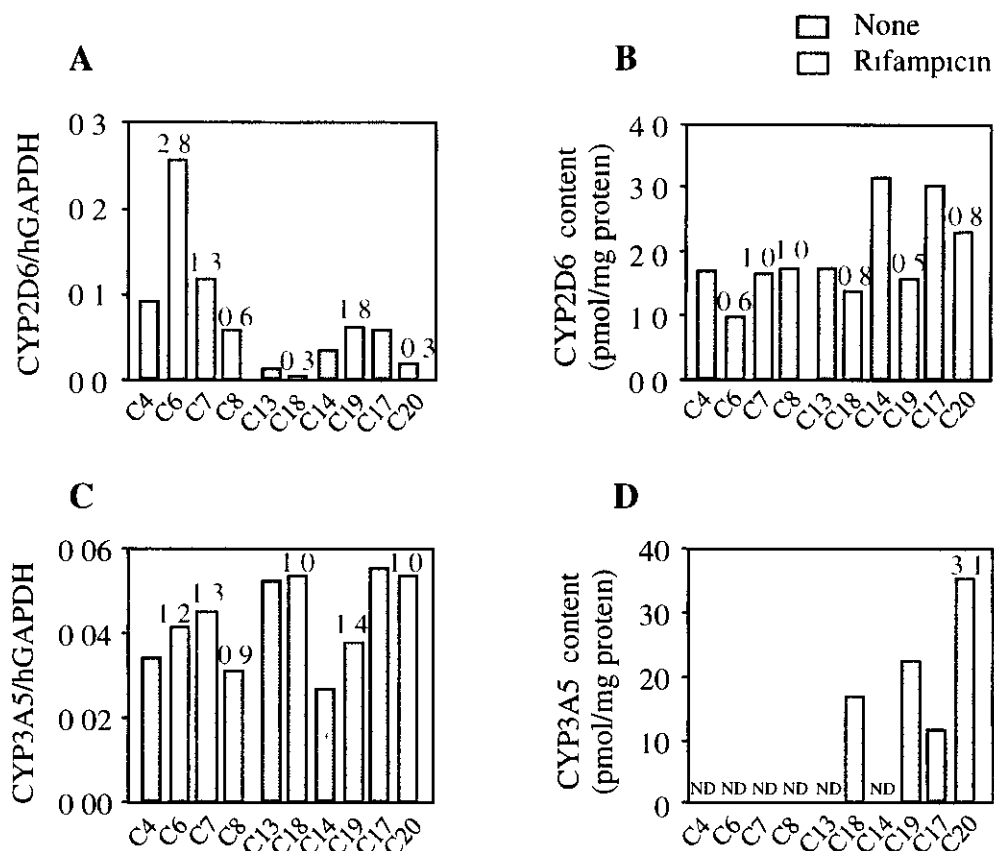


Fig 13 Changes of human CYP2D6 and CYP3A5 expression in rifampicin-treated chimeric mice

The expression levels of human CYP2D6 and CYP3A5 mRNA (A, C) and protein (B, D) in rifampicin-treated chimeric mice were compared with those in non-treated chimeric mice with similar hAlb contents

ND: not detected

C-2 3-MC 投与によるヒト CYP への影響

C-2-1 ヒト CYP1A2 の誘導

Fig 14A にヒト CYP1A2 mRNA 発現量の定量結果を示す。3-MC 投

与により、mRNA 発現量は 2.1-8.2 倍の増加が認められた。

Fig 14B にヒト CYP1A2 タンパク 発現量の定量結果を示す。3-MC 投与により、タンパク発現量は 4.0-9.7 倍の増加が認められた。

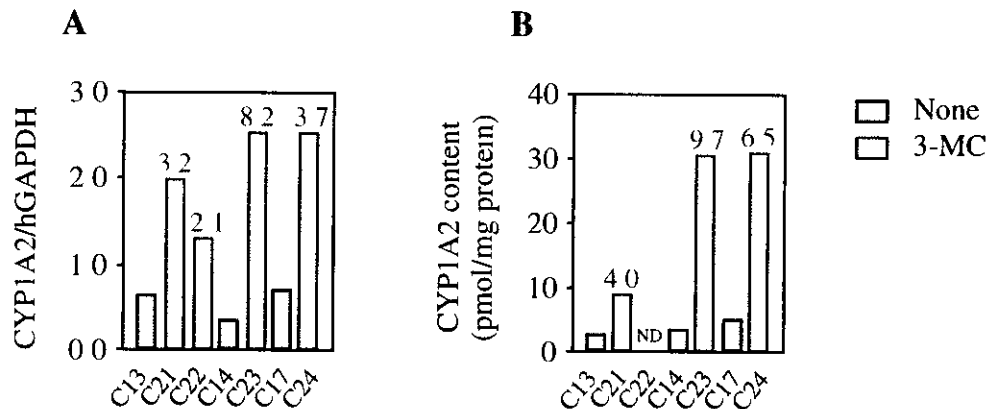


Fig 14 Changes of human CYP1A2 expression in 3-MC-treated chimeric mice
 The expression levels of human CYP1A2 mRNA (A) and protein (B) in 3-MC-treated chimeric mice were compared with those in non-treated chimeric mice with similar hAlb contents
 ND not detected

C-2-2 ヒト CYP3A4 に及ぼす影響

Fig 15A にヒト CYP3A4 mRNA 発現量の定量結果を示す。キメラマウス C24 が C17 に比へ顕著に低い値を示したか、その他のキメラマウスに関しては 3-MC 投与により、mRNA 発現量に顕著な差は認められなかった (0.9-2.0 倍)。

Fig 15B にヒト CYP3A4 タンパク発現量の定量結果を示す。キメラマウス C13 の発現量が低かったためか、C21 と C22 の値が見かけ上、それぞれ約 7.5 倍、約 12.2 倍の増加となった。その他のキメラマウスに

ついては 3-MC 投与群と対照群を比較すると、1.2 および 3.0 倍の差であり、ヒト CYP3A4 タンパクについては大きなはらつきが認められた。

Fig 15C にテキサメタゾン 6-水酸化酵素活性の結果を示す。mRNA 発現量が顕著に低かった C24 は本酵素活性も低かった。その他のキメラマウスについては 3-MC 投与による顕著な変動は認められなかった (0.7-1.1 倍)。uPA (+/-)/SCID マウスおよび uPA (-/-)/SCID マウスでは、3-MC 投与による顕著な変動は認められなかった。

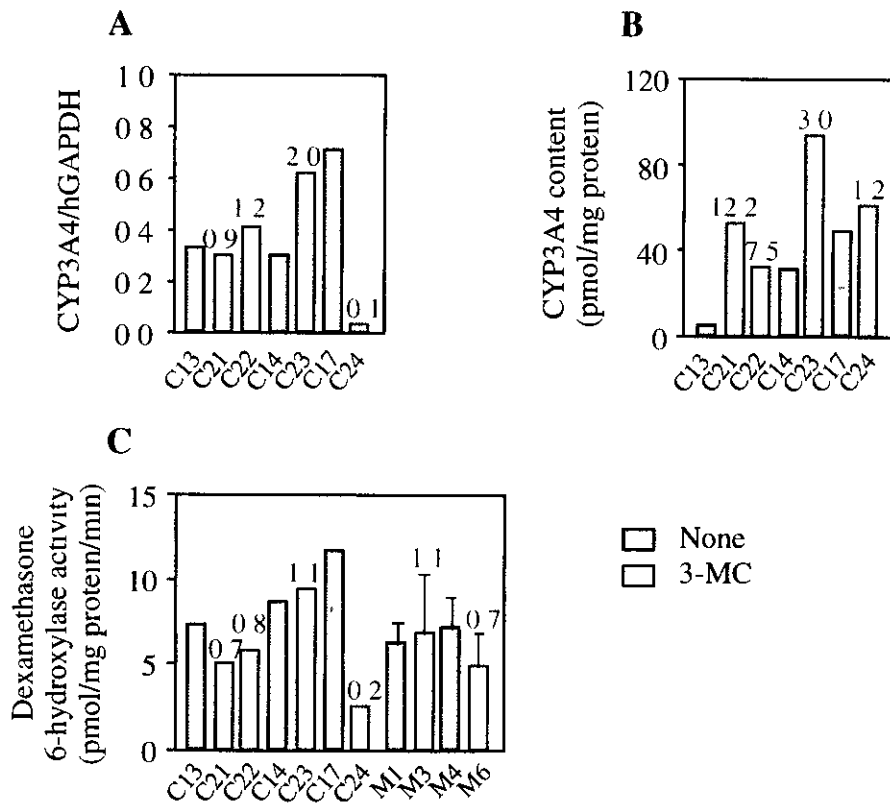


Fig 15 Changes of human CYP3A4 expression in 3-MC-treated chimeric mice
 The expression levels of human CYP3A4 mRNA (A), protein (B) and the dexamethasone 6-hydroxylase activity (C) in 3-MC-treated chimeric mice were compared with those in non-treated chimeric mice with similar hAlb contents. The concentration of dexamethasone was 100 μ M. The columns of M1, M3, M4 and M6 represent the mean \pm SD (n=3).
 M1 Non-treated uPA (+/-)/SCID mouse liver microsomes, M3 3-MC-treated uPA (+/-)/SCID mouse liver microsomes, M4 Non-treated uPA (-/-)/SCID mouse liver microsomes, M6 3-MC-treated uPA (-/-)/SCID mouse liver microsomes

C-2-3 ヒト CYP2C9 に及ぼす影響

Fig 16A にヒト CYP2C9 mRNA 発現量、Fig 16B にタンパク発現量、Fig 16C にシクロフェナク 4'-水酸化酵素活性の結果を示す。3-MC 投

与群と対照群を比較すると、それぞれ 0.4-2.6 倍、0.7-3.0 倍、0.6-2.3 倍程度の変動であった。なお、uPA (+/-)/SCID マウスおよび uPA (-/-)/SCID マウスでは、本酵素活性に差異は認められなかった。

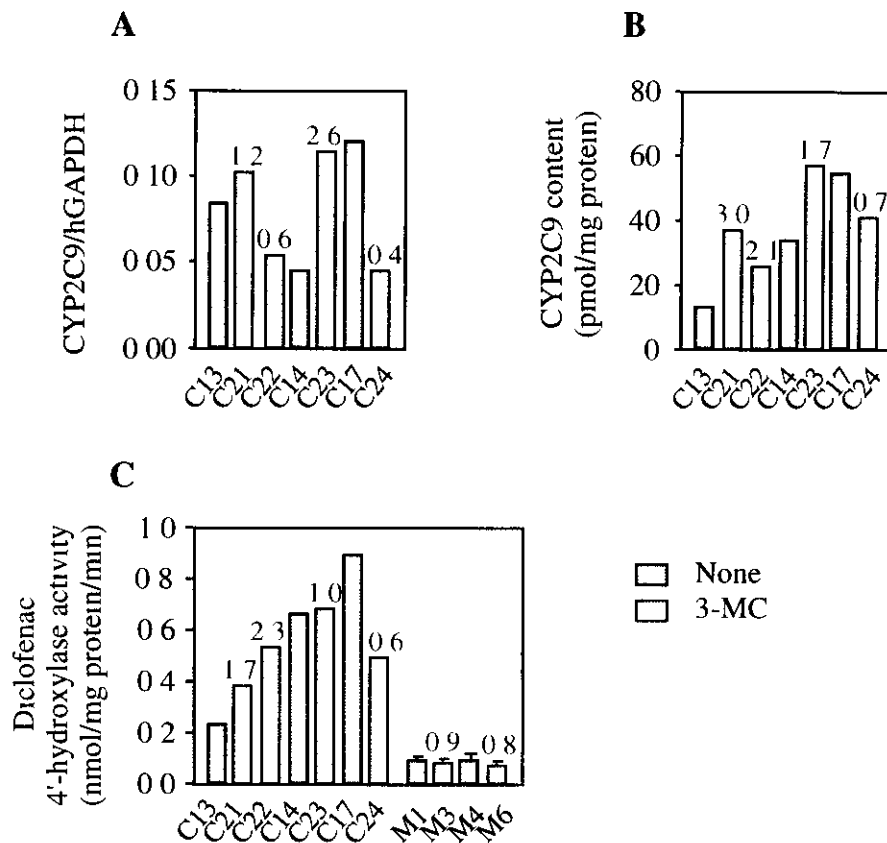


Fig 16 Changes of human CYP2C9 expression in 3-MC-treated chimeric mice
 The expression levels of human CYP2C9 mRNA (A), protein (B) and the diclofenac 4'-hydroxylase activity (C) in 3-MC-treated chimeric mice were compared with those in non-treated chimeric mice with similar hAlb contents. The concentration of diclofenac was 30 μ M. The columns of M1, M3, M4 and M6 represent the mean \pm SD (n=3).
 M1 Non-treated uPA (+-)/SCID mouse liver microsomes, M3 3-MC-treated uPA (+-)/SCID mouse liver microsomes, M4 Non-treated uPA (-)/SCID mouse liver microsomes, M6 3-MC-treated uPA (-)/SCID mouse liver microsomes

C-2-4 ヒトCYP2A6に及ぼす影響

Fig 17A にヒト CYP2A6 mRNA 発現量、Fig 17B にタンパク発現量、Fig 17C にクマリン7-水酸化酵素活性の結果を示す。3-MC 投与群で mRNA 発現量およびタンパク発現量に減少傾向が認められたか、顕著

な変動は認められなかった (0.3-0.9 倍)。本酵素活性に関しても顕著な差は認められなかった。なお、uPA (+-)/SCID マウスと uPA (-)/SCID マウスでは、本酵素活性における誘導率はそれぞれ 2.7 倍、1.3 倍であった。

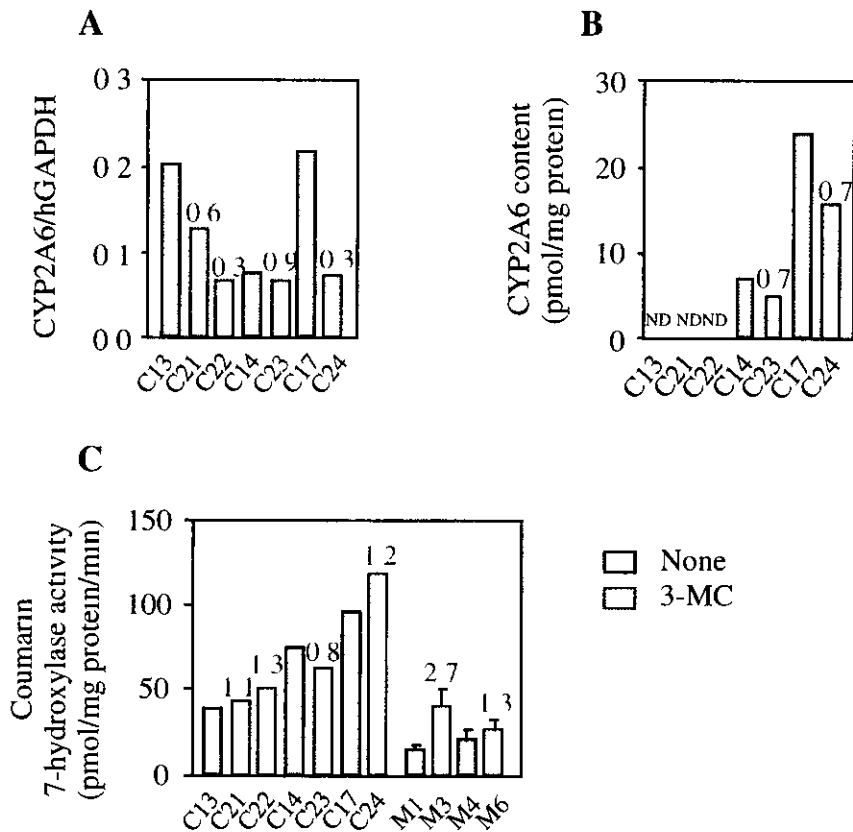


Fig 17 Changes of human CYP2A6 expression in 3-MC-treated chimeric mice
 The expression levels of human CYP2A6 mRNA (A), protein (B) and the coumarin 7-hydroxylase activity (C) in 3-MC-treated chimeric mice were compared with those in non-treated chimeric mice with similar hAlb contents. The concentration of coumarin was 1 μ M. The columns of M1, M3, M4 and M6 represent the mean \pm SD (n=3).
 M1 Non-treated uPA (+-)/SCID mouse liver microsomes, M3 3-MC-treated uPA (+-)/SCID mouse liver microsomes, M4 Non-treated uPA (-)/SCID mouse liver microsomes, M6 3-MC-treated uPA (-)/SCID mouse liver microsomes, ND not detected

C-2-5 その他のヒト CYP 分子種の発現に及ぼす影響

Fig 18A にヒト CYP1A1 mRNA 発現量の定量結果を示す。3-MC 投与により mRNA 発現量は、10.0-38.4 倍の顕著な増加が認められた。

Fig 18B にヒト CYP2C8 mRNA 発現量、Fig 18C にタンパク発現量の定量結果を示す。3-MC 投与による mRNA 発現量およびタンパク発現量の顕著な変動は認められなかった。
 (0.5-1.1 倍、0.7-1.9 倍)

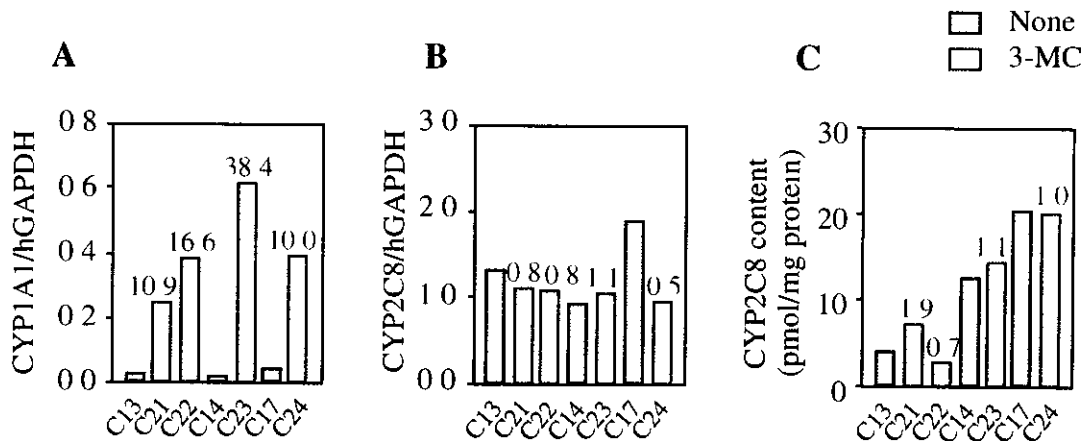


Fig 18 Changes of human CYP1A1 and CYP2C8 expression in 3-MC-treated chimeric mice

The expression levels of human CYP1A1 and CYP2C8 mRNA (A, B) and CYP2C8 protein (C) in 3-MC-treated chimeric mice were compared with those in non-treated chimeric mice with similar hAlb contents

Fig 19A にヒト CYP2C18 mRNA 発現量の定量結果を示す。C13 の mRNA 発現量か他のキメラマウスと比較して高かったため、C22 の mRNA 発現量を C13 と比較すると見かけ上、約 0.3 倍に減少した。しかし、hAlb 値の高い C14 の mRNA 発現量は C13 の約 30%程度であるため、C14 と C22 を比較した場合、顕著な差は認められなかった。その他のキメラマウスに関しては 0.7-1.0 倍の変動であった。

Fig 19B にヒト CYP2C19 mRNA 発現量の定量結果を示す。C13 の mRNA 発現量か他のキメラマウスと比較して高かったため、C22 の mRNA 発現量を C13 と比較すると見かけ上、約 0.4 倍に減少した。しかし、hAlb 値の高い C14 の mRNA

発現量は C13 の約 35%程度であるため、C14 と C22 を比較した場合、顕著な差は認められなかった。その他のキメラマウスに関しては 0.5-1.1 倍の変動であった。

Fig 20A にヒト CYP2D6 mRNA 発現量、Fig 20B にタンパク発現量の定量結果を示す。比較的高い hAlb 値を示したキメラマウス C23 および C24 で対照群と比較して約 0.1 倍と mRNA の顕著な減少が認められた。しかしタンパク発現量に関しては、3-MC 投与による顕著な変動は認められなかった (0.7-1.6 倍)。

Fig 20C にヒト CYP3A5 mRNA 発現量の定量結果を示す。キメラマウス C23 以外の 3-MC 投与群では、対照群と比べて mRNA 発現量が 0.3-0.5 倍と減少した。キメラマウス C23 は対照群と

比へて顕著な変化は認められなかった。

Fig 20D にヒト CYP3A5 タンパク発現量の定量結果を示す。比較的 hAlb 値の高い C17 と C24 以外では、

本章の実験条件ではタンパクを検出することが出来なかったが、C24 は C17 と比較して約 0.7 倍のタンパク発現量の減少が認められた。

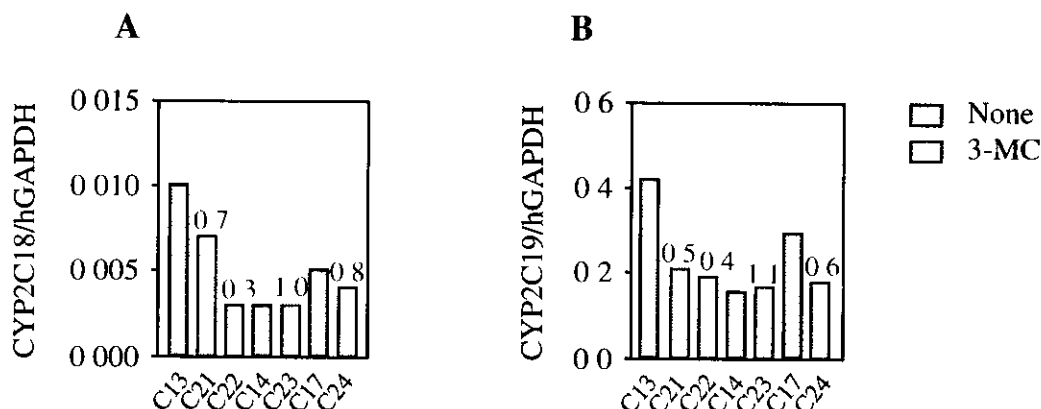


Fig 19 Changes of human CYP2C18 and CYP2C19 expression in 3-MC-treated chimeric mice

The expression levels of human CYP2C18 and CYP2C19 mRNA (A, B) in 3-MC-treated chimeric mice were compared with those in non-treated chimeric mice with similar hAlb contents

D 考察

薬物を反復投与すると、その薬物もしくは併用薬の薬効の減弱が認められることがある。これは薬物代謝酵素誘導に基づく相互作用であり、CYPの誘導に関して多くの報告がなされている (Niemi et al, 2003, Zhou et al, 2003)。また、臨床で用いられている酵素誘導を起こす薬物は、肝障害を惹起することがあり、副作用の面からも酵素誘導能の有無を検討することは重要であると言われている (堀江と横井, 2003)。薬物代謝酵素誘導実験はラットやイヌで行うこと

か一般的であるか、投与量がヒトにおける臨床用量と乖離している場合もあり、そのままヒトを予測することか難しい場合もある。また、*in vitro* 実験系において、誘導実験に用いられる細胞株は、細胞培養や遺伝子の導入技術のめざましい発展により改良されてきたか、転写因子や一部の遺伝子のみの発現であることが多い。これより全CYP分子種が発現しているヒトおよび実験動物の肝細胞が誘導実験に頻用されている。また、肝細胞を用いた*in vitro* 実験系で認められたCYPの誘導は、*in vivo* においても同程度の誘導を示すと考えられてい

る (Schuetz et al, 2002)。CYPに関しては、ヒト肝細胞での実験において CYP1A、CYP2A、CYP2B、CYP2C、CYP2EおよびCYP3Aサブファミリー

が誘導されることか明らかになっている (Gerbal-Chaloin et al, 2001, Madan et al, 2003)。

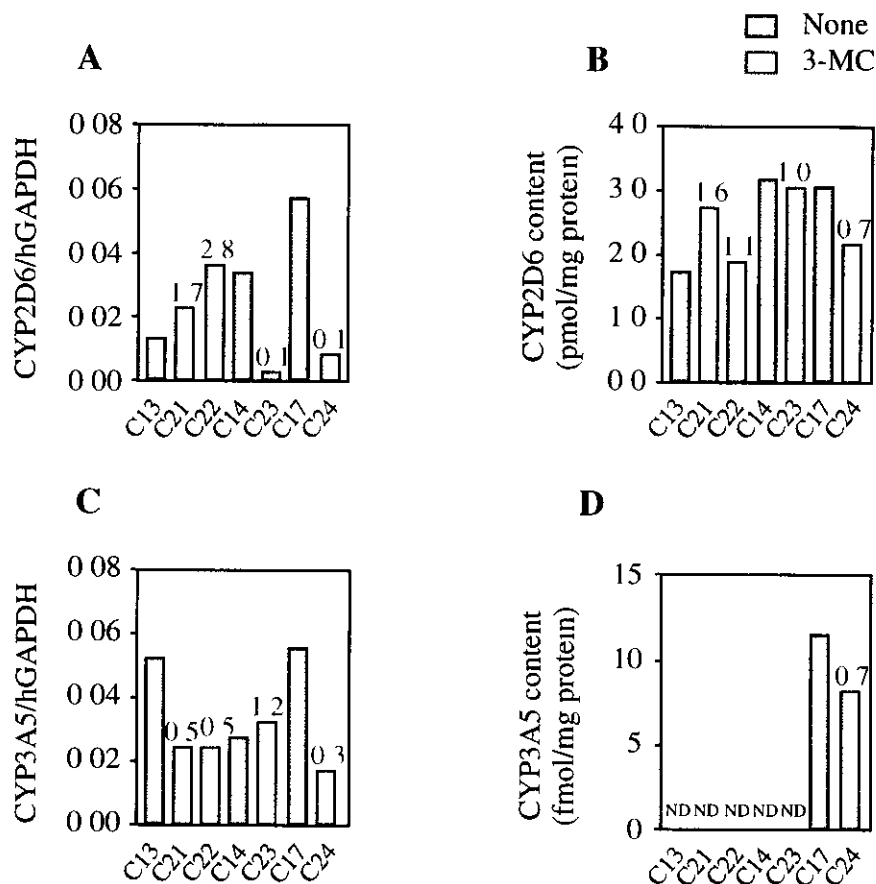


Fig 20 Changes of human CYP2D6 and CYP3A5 expression in 3-MC-treated chimeric mice

The expression levels of human CYP2D6 and CYP3A5 mRNA (A, C) and protein (B, D) in 3-MC-treated chimeric mice were compared with those in non-treated chimeric mice with similar hAlb contents

ND not detected

第I章より、ヒト肝細胞キメラマウスの肝においてヒトCYPが発現していることを明らかにした。そこで、本章ではヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒトCYPの誘導能について検

討を行った。CYPの代表的な誘導薬であるリファンピシンと3-MCをキメラマウスに投与し、各CYP分子種の変動をmRNA、タンパク、酵素活性レベルで検討した。

リファンピシンはヒトCYP3A4を誘導することか*in vitro*、*in vivo*実験系で明らかになっている (Runge et al, 2000, Madan et al, 2003, Niemi et al, 2003)。本章の結果より、リファンピシンの投与によりキメラマウスのヒトCYP3A4 mRNAおよびタンパク発現量はそれぞれ約6-27倍、2.5-10.4倍増加した。また、デキサメタゾン6-水酸化酵素活性は、5.1-14.5倍の増加が認められた。ヒト肝細胞を使った誘導実験において、曝露条件などは異なるが、リファンピシンはCYP3A4 mRNAを約12倍 (Drocourt et al, 2001)、約13倍 (Desai et al, 2002)、5.0倍 (Nishimura et al, 2002)、2.8-14.8倍 (Raucy et al, 2002) 誘導するとの報告がなされている。また、タンパク発現量に関しては、ヒト肝スライスを用いた実験において3.3倍 (1.0-18.4倍) (Edwards et al, 2003)、ヒト肝細胞を用いた実験で約3倍 (Runge et al, 2000)、4.2倍 (Drocourt et al, 2001)、9.4倍 (Desai et al, 2002)、1.2-8.2倍 (Raucy et al, 2002) の増加が示されている。ヒト肝細胞を用いた実験でリファンピシンの投与によりCYP3A4の指標活性であるテストステロン6 β -水酸化酵素活性が10.5倍 (Desai et al, 2002)、2.1-10.1倍 (Remach et al, 1999)、4-30倍 (Lu and Li, 2001)、平均約10倍 (1.0-145倍)、(Madan et al, 2003)、

7.1-26倍 (Runge et al, 2000) 増加したと報告されている。本章での結果は*in vivo*実験系であり誘導条件が異なることに加え、対照としたキメラマウスのhAlb値およびRI値が、誘導群のキメラマウスと正確に同じではないことなどを考慮すると、これらの報告と本章での結果には大きな矛盾はないと考えられる。また、uPA (+/-)/SCIDマウスおよびuPA (-/-)/SCIDマウスにおいて、デキサメタゾン6-水酸化酵素活性の上昇が認められなかった。ddYマウスにリファンピシンを100 mg/kg/dayで4日間腹腔内投与すると、Cyp3a11 mRNA発現量が約50倍に増加したとの報告がなされている (Yanagimoto et al, 1997)。従って、uPA (+/-)/SCIDマウスおよびuPA (-/-)/SCIDマウスにおいてもCyp3a11が誘導されていると考えられるが、マウスの主代謝物は6-水酸化デキサメタゾンではないため、リファンピシンによるデキサメタゾン6-水酸化酵素活性の誘導が認められなかったのかもしれない。以上より、キメラマウスはヒトCYP3A4の誘導能を有することを明らかにした。

また、リファンピシンはヒト肝細胞もしくはヒト肝スライスを用いた実験系で、ヒトCYP3A4以外にも、様々なCYPを誘導することが明らかになっている。特にCYP2Cサブファミリー

一に関する検討が多くなされているが、CYP2C8については、mRNA発現量では5.5倍 (Gerbal-Chaloin et al, 2001)、3.4倍 (Nishimura et al, 2002)、タンパク発現量では2.6-15.8倍 (Donato et al, 2000)、約4倍 (Drocourt et al, 2001)、2.8倍 (Gerbal-Chaloin et al, 2001)、2.7-9.9倍 (Madan et al, 2003)の増加が示されている。一方、CYP2C8タンパク発現量は変化しないとの報告もなされている (Edwards et al, 2003)。CYP2C9については、mRNA発現量が3.3倍増加し (Gerbal-Chaloin et al, 2001)、また、タンパク発現量が約4倍 (Drocourt et al, 2001)、2.4倍 (Gerbal-Chaloin et al, 2001)、 2.1 ± 1.8 倍 (Raucy et al, 2002)増加したとの報告がある。CYP2C9の指標活性であるトルブタミト4'-水酸化酵素活性が3.7倍 (Gerbal-chaloin et al, 2001)、シクロフェナク4'-水酸化酵素活性が1.3-10倍 (Madan et al, 2003)増加したと報告されている。また、ヒトの*in vivo*での実験において、リファンピシンとCYP2C9の基質であるワルファリンとの併用により、ワルファリンのAUCが減少したと報告されている (Niemi et al, 2003)。これに対し、ヒト肝細胞の実験において、mRNAおよびタンパク発現量に変化は認められなかったとの報告もなされている (Runge et al, 2000, Nishimura et al, 2002,

Edwards et al, 2003)。CYP2C18については報告数が少ないが、mRNA発現量に影響を及ぼさないことが示されている (Gerbal-Chaloin et al, 2001, Nishimura et al, 2002)。CYP2C19については、mRNA発現量が1.8倍の上昇であり (Gerbal-Chaloin et al, 2001)、また、タンパク発現量は、2.4倍 (Gerbal-Chaloin et al, 2001)、2.7倍 (Edwards et al, 2003)の増加であった。CYP2C19の指標活性であるS-メフェニトイン4'-水酸化酵素活性は8.3倍 (Gerbal-Chaloin et al, 2001)、4.9-19.0倍 (Madan et al, 2003)増加した。しかし、mRNAおよびタンパク発現に影響を及ぼさない (Runge et al, 2000, Nishimura et al, 2002)、あるいは、CYP2C19タンパクの誘導は 5.7 ± 5.3 倍であり個体差が大きいとの報告もある (Raucy et al, 2002)。本章の結果と比較すると、CYP2C8およびCYP2C9に関しては、過去の報告ほと誘導は認められなかったが、リファンピシンによる増加傾向は認められた。シクロフェナク4'-水酸化酵素活性に関しては、ドナーの異なるキメラマウス間での増加傾向に差が認められ、また、誘導率の算出は対照群の活性値に大きく左右されるため、誘導されたと判断するには、例数を増やすなど更なる検討が必要と考えられる。また、CYP2C18とCYP2C19について

はmRNA発現量のみを検討であるため、タンパク、酵素活性レベルで誘導について検討が必要であろう。CYP2A6について、ヒト肝細胞でリファンピシンによるタンパクレベルでの誘導が認められたとの報告がなされているか (Dalet-Beluche et al, 1992)、mRNA発現量が1.7倍程度の増加であったとの報告や (Nishimura et al, 2002)、タンパク発現量は平均2.1倍の増加が認められたがばらつきは大きかった (Edwards et al, 2003) との報告がある。クマリン7-水酸化酵素活性について、増加したか有意差は認められなかったとの報告や (Madan et al, 2003)、0.8-1.1倍の増加であったとの報告がなされている (Donato et al, 2000)。リファンピシンによるCYP2A6の誘導については、過去の報告でも指摘されているが、発現量が低く、さらに個体差が大きく、そのうえ例数が少ないため明確な結論を出すに至っていない。本章の結果では、mRNA、タンパク、酵素活性全てにおいてリファンピシンにより2-3倍程度の増加が認められ、これまでの報告と大きく矛盾することはなかった。CYP1A2についてはNishimuraら (2002) によるとリファンピシン投与によりmRNA発現量に変化は認められず、また、Edwardsら (2003) によるとCYP1A2タンパク発

現量に変化は認められなかった。CYP1A2の指標活性であるエトキシレゾルフィンO-脱エチル化酵素活性について、2-3倍の上昇が認められたとの報告 (Lu and Li, 2001) がある一方、2.3倍上昇したが有意差は認められなかったとの報告がある (Madan et al, 2003)。これらの報告は本章の結果とほぼ一致すると考えられる。CYP2D6についてもタンパク発現量や指標活性であるデキストロメトルファンO-脱メチル化酵素活性に影響を及ぼさないことが示されており (Edwards et al, 2003, Madan et al, 2003)、本章の結果と一致した。

リファンピシンはCYP3A4を誘導するが、興味深いことに同じサブファミリーに属するCYP3A5について、タンパクレベルでの誘導が認められなかったことが示されている (Schuetz et al, 1993)。しかし、mRNA発現量は2.8倍に増加したとの報告がある

(Nishimura et al, 2002)。本章での結果については、ウエスタンブロット分析の実施に際し、対照群とリファンピシン投与群で実験日が異なること、CYP3A5のタンパク発現量が低いことを考慮すると、さらに例数を増やした上で考察する必要があると考えられる。以上より、リファンピシンに関して、これまでに報告されているCYP分子種の発現変動は、本章

て得られた結果とほぼ一致したと考えられる。

3-MC に関しては、ヒト肝細胞での実験について報告はあまりないが、3-MC の曝露により CYP1A2 タンパクやエトキシレソルフィン O-脱エチル化酵素活性が検出可能になったため、ヒト肝細胞での CYP1A2 は誘導されたことが明らかになっている (Runge et al, 2000)。なお、Runge ら (2000) によると、CYP1A1 タンパクは誘導されず、また、CYP2C9 および CYP2C19 タンパクも変動は認められなかったと報告している。本章の結果より、3-MC 投与により CYP1A2 mRNA およびタンパクレベルで誘導が認められたことは、これらの報告と一致する。しかし、CYP1A1 mRNA の増加が認められたため、CYP1A1 については更なる検討が必要と考えられる。また、他の分子種に関して、キメラマウスの例数が少なく大きなはらつきが認められるか、一般的に 3-MC 投与によりタンパク、酵素活性レベルはほぼ同程度、もしくはやや減少傾向を示した。

E 結論

本章においてヒト肝細胞キメラマウスはヒト CYP 誘導能を示すことを明らかにした。今後、例数を増や

すとともに、さらに様々な誘導薬に関して検討を行う必要かあると考えられる。キメラマウスを用いた誘導実験はヒト肝細胞を用いた場合に比べ、活性が低い分子種についても検討が可能であり、さらにより生体に近い *in vivo* の状態で検討を行うことができるなど多くの利点かあると考えられる。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1 論文発表 なし

2 学会発表

ヒト肝細胞を有するキメラマウス由来の初代肝細胞培養系を用いた酵素誘導試験，日本薬学会 123 年会、平成 15 年 3 月 27-29 日、長崎

ヒト肝細胞キメラマウスにおける *in vitro* 薬物代謝能の検討，第 18 回日本薬物動態学会年会、平成 15 年 10 月 8-10 日、札幌

ヒト肝細胞キメラマウスにおける薬物代謝酵素の誘導能に関する検討，第 18 回日本薬物動態学会年会、平成 15 年 10 月 8-10 日、札幌

EXPRESSION OF HUMAN CYP IN CHIMERIC MICE WITH HUMANIZED

LIVER , The 7th International ISSX (International Society for the Study of Xenobiotics) Meeting、平成 16 年 8 月 29 日～9 月 2 日、バンクーバー、カナダ

IN VIVO INDUCTION POTENCY OF HUMAN CYP IN CHIMERIC MICE WITH HUMANIZED LIVER , The 7th International ISSX (International Society for the Study of Xenobiotics) Meeting、平成 16 年 8 月 29 日～9 月 2 日、バンクーバー、カナダ

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得 なし

実用新案登録 なし

その他 なし

I 補足（文中で使用した引用論文を示す）

Bogaards JJ, Bertrand M, Jackson P, Oudshoorn MJ, Weaver RJ, van Bladeren PJ and Walther B (2000) Determining the best animal model for human cytochrome P450 activities a comparison of mouse, rat, rabbit, dog, micropig, monkey and man *Xenobiotica* **30** 1131-1152

Corchero J, Granvil CP, Akiyama TE, Hayhurst GP, Pimprale S, Feigenbaum L, Idle JR and Gonzalez FJ (2001) The *CYP2D6* humanized mouse effect of the human *CYP2D6* transgene and HNF 4alpha on the disposition of debrisoquine in the mouse *Mol Pharmacol* **60** 1260-1267

Dalet-Beluche I, Boulenc X, Fabre G, Maurel P

and Bonfils C (1992) Purification of two cytochrome P450 isozymes related to CYP2A and CYP3A gene families from monkey (baboon, *Papio papio*) liver microsomes Cross reactivity with human forms *Eur J Biochem* **204** 641-648

Dandri M, Burda MR, Torok E, Pollok JM, Iwanska A, Sommer G, Rogiers X, Rogler CE, Gupta S, Will H, Greten H and Petersen J (2001) Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus *Hepatology* **33** 981-988

Desai PB, Nallani SC, Sane RS, Moore LB, Goodwin BJ, Buckley DJ and Buckley AR (2002) Induction of cytochrome P450 3A4 in primary human hepatocytes and activation of the human pregnane X receptor by tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen *Drug Metab Dispos* **30** 608-612

Donato MT, Vitale P, Rodriguez-Antona C, Lindfors A, Castell JV, Raunio H, Gomez-Lechon MJ and Pelkonen O (2000) CYP2A5/CYP2A6 expression in mouse and human hepatocytes treated with various in vivo inducers *Drug Metab Dispos* **28** 1321-1326

Drocourt L, Pascussi JM, Assenat E, Fabre JM, Maurel P and Vilarem MJ (2001) Calcium channel modulators of the dihydropyridine family are human pregnane X receptor activators and inducers of CYP3A, CYP2B, and CYP2C in human hepatocytes *Drug Metab Dispos* **29** 1325-1331

Edwards RJ, Price RJ, Watts PS, Renwick AB, Tredger JM, Boobis AR and Lake BG (2003) Induction of cytochrome P450 enzymes in cultured precision-cut human liver slices *Drug Metab Dispos* **31** 282-288

Gentile DM, Tomlinson ES, Maggs JL, Park BK

- and Back DJ (1996) Dexamethasone metabolism by human liver in vitro Metabolite identification and inhibition of 6-hydroxylation *J Pharmacol Exp Ther* **277** 105-112
- Gerbal-Chaloin S, Pascussi JM, Pichard-Garcia L, Daujat M, Waechter F, Fabre JM, Carrere N and Maurel P (2001) Induction of CYP2C genes in human hepatocytes in primary culture *Drug Metab Dispos* **29** 242-251
- Gomez-Lechon MJ, Donato MT, Castell JV and Jover R (2003) Human hepatocytes as a tool for studying toxicity and drug metabolism *Curr Drug Metab* **4** 292-312
- Guengerich FP (1995) Human cytochrome P450 enzymes, in *CytochromeP450 structure, mechanism and biochemistry* (Ortiz de Montellano PR ed) pp 473-565, Plenum, New York
- 堀江 透 横井 毅 (2003) 臨床薬物代謝化学 pp307-318 廣川書店, 東京
- Hwang DY, Chae KR, Shin DH, Hwang JH, Lim CH, Kim YJ, Kim BJ, Goo JS, Shin YY, Jang IS, Cho JS and kim YK (2001) Xenobiotic response in humanized double transgenic mice expressing tetracycline-controlled transactivator and human CYP1B1 *Arch Biochem Biophys* **395** 32-40
- Imaoka S, Hayashi K, Hiroi T, Yabusaki Y, Kamataki T and Funae Y (2001) A transgenic mouse expressing human CYP4B1 in the liver *Biochem Biophys Res Commun* **284** 757-762
- Ingelman-Sundberg M (2002) Polymorphism of cytochrome p450 and xenobiotic toxicity *Toxicology* **181-182** 447-452
- Ishikawa T, Sekiguchi F, Fukase Y, Sawada N and Ishitsuka H (1998) Positive correlation between the efficacy of capecitabine and doxifluridine and the ratio of thymidine phosphorylase to dihydropyrimidine dehydrogenase activities in tumors in human cancer xenografts *Cancer Res* **58** 685-690
- Klose TS, Blaisdell JA and Goldstein JA (1999) Gene structure of CYP2C8 and extrahepatic distribution of the human CYP2Cs *J Biochem Mol Toxicol* **13** 289-295
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature* **227** 680-685
- Li AP, Kaminski DL and Rasmussen A (1995) Substrates of human hepatic cytochrome P450 3A4 *Toxicology* **104** 1-8
- Li Y, Yokoi T, Kitamura R, Sasaki M, Gunji M, Katsuki M and Kamataki T (1996) Establishment of transgenic mice carrying human fetus-specific CYP3A7 *Arch Biochem Biophys* **329** 235-240
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent *J Biol Chem* **193** 265-275
- Lu AY (1998) Drug-metabolism research challenges in the new millennium individual variability in drug therapy and drug safety *Drug Metab Dispos* **26** 1217-1222
- Lu C and Li AP (2001) Species comparison in P450 induction effects of dexamethasone, omeprazole, and rifampin on P450 isoforms 1A and 3A in primary cultured hepatocytes from man, Sprague-Dawley rat, minipig, and beagle dog *Chem Biol Interact* **134** 271-281
- Madan A, Graham RA, Carroll KM, Mudra DR, Burton LA, Krueger LA, Downey AD, Czerwinski M, Forster J, Ribadeneira MD, Gan LS, LeCluyse EL, Zech K, Robertson P Jr, Koch P, Antonian L, Wagner G, Yu L and Parkinson A

- (2003) Effects of prototypical microsomal enzyme inducers on cytochrome P450 expression in cultured human hepatocytes *Drug Metab Dispos* **31** 421-431
- Mankowski DC, Lawton MP and Ekins S (2000) Characterization of transgenic mouse strains using six human hepatic cytochrome P450 probe substrates *Xenobiotica* **30** 745-754
- Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, Douglas DN, Hao C, Rinfret A, Addison WR, Fischer KP, Churchill TA, Lakey JR, Tyrrell DL and Kneteman NM (2001) Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers *Nat Med* **7** 927-933
- Meyer UA and Zanger UM (1997) Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37** 269-296
- Morgan K, French SW and Morgan TR (2002) Production of a cytochrome P450 2E1 transgenic mouse and initial evaluation of alcoholic liver damage *Hepatology* **36** 122-134
- Nakajima M, Kuroiwa Y and Yokoi T (2002) Interindividual differences in nicotine metabolism and genetic polymorphisms of human CYP2A6 *Drug Metab Rev* **34** 865-877
- Nelson DR (2002) Introductory remarks on human CYPs *Drug Metab Rev* **34** 1-5
- Niemi M, Backman JT, Fromm MF, Neuvonen PJ and Kivisto KT (2003) Pharmacokinetic interactions with rifampicin clinical relevance *Clin Pharmacokinet* **42** 819-850
- Nishimura M, Yoshitsugu H, Naito S and Hiraoka I (2002) Evaluation of gene induction of drug-metabolizing enzymes and transporters in primary culture of human hepatocytes using high-sensitivity real-time reverse transcription PCR *Yakugaku Zasshi* **122** 339-361
- Nunoya KI, Yokoi T, Kimura K, Kainuma T, Satoh K, Kinoshita M and Kamataki T (1999) A new CYP2A6 gene deletion responsible for the in vivo polymorphic metabolism of (+)-cis-3,5-dimethyl-2-(3-pyridyl)thiazolidin-4-one hydrochloride in humans *J Pharmacol Exp Ther* **289** 437-442
- Oscarson M, McLellan RA, Gullsten H, Yue QY, Lang MA, Bernal ML, Sinues B, Hirvonen A, Raunio H, Pelkonen O and Ingelman-Sundberg M (1999) Characterisation and PCR-based detection of a CYP2A6 gene deletion found at a high frequency in a Chinese population *FEBS Lett* **448** 105-110
- Pelkonen O and Raunio H (1997) Metabolic activation of toxins tissue-specific expression and metabolism in target organs *Environ Health Perspect* **105** 767-774
- Pelkonen O, Maenpaa J, Taavitsainen P, Rautio A and Raunio H (1998) Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes *Xenobiotica* **28** 1203-1253
- Raucy JL, Mueller L, Duan K, Allen SW, Strom S and Lasker JM (2002) Expression and induction of CYP2C P450 enzymes in primary cultures of human hepatocytes *J Pharmacol Exp Ther* **302** 475-482
- Reinach B, de Sousa G, Dostert P, Ings R, Gugenheim J, Rahmani R (1999) Comparative effects of rifabutin and rifampicin on cytochromes P450 and UDP-glucuronosyl-transferases expression in fresh and cryopreserved human hepatocytes *Chem Biol Interact* **121** 37-48