

Table 5 環境化学物質の免疫系に対する影響 (実験1)

曝露物質	Non treatment	EtOH ¹⁾	CNP(L)	CNP(H)	PAP(L)	PAP(H)	CNP PAP(L)	CNP-PAP(H)	DMSO/facetone ²⁾	TM(L)	TM(H)
動物数	4	5	6	6	6	6	6	6	6	6	6
解剖体重重(g)	mean 28.0 SD 1.2	25.5 0.7	25.2 1.0	24.3 1.5	25.1 1.1	25.3 1.2	25.2 1.1	25.6 0.4	26.3 0.6	26.4 0.7	25.7 1.1
脾臓重量(g)	mean 0.003 SD 0.006	0.087 0.011	0.089 0.007	0.079 0.008	0.086 0.013	0.080 0.008	0.087 0.009	0.092 0.004	0.090 0.009	0.087 0.007	0.087 0.008
胸腺重量(g)	mean 0.034 SD 0.007	0.037 0.003	0.052 0.042	0.034 0.003	0.034 0.007	0.038 0.005	0.034 0.002	0.035 0.004	0.033 0.008	0.035 0.006	0.031 0.004
肺重量(g)	mean 0.136 SD 0.011	0.130 0.011	0.130 0.011	0.119 0.012	0.119 0.012	0.124 0.006	0.129 0.003	0.129 0.003	0.141 0.006	0.141 0.006	0.130 0.010
絶対胸腺重 (μg/mL)	mean 696.5 SD 89.0	616.6 92.7	614.5 60.4	771.5 128.8	622.8 62.0	703.6 117.5	663.6 83.7	652.6 98.7	604.5 38.2	576.3 78.6	565.9 79.0
BrdU assay	mean 0.033 SD 0.014	0.079 0.023	0.055 0.025	0.067 0.012	0.051 0.022	0.058 0.024	0.031** 0.010	0.031** 0.012	0.111 0.068	0.073 0.029	0.067 0.017
(-)	mean 0.494 SD 0.095	0.385 0.082	0.517* 0.063	0.469* 0.033	0.459 0.088	0.645** 0.141	0.634** 0.055	0.475 0.176	0.516 0.046	0.421 0.103	0.476 0.047
PHA(-)	mean 17.4 SD 9.0	5.2 1.8	11.5 6.2	7.2* 0.9	10.1* 3.8	12.4* 4.8	22.6** 8.1	18.8* 10.5	5.8 2.6	6.8 3.6	7.3 1.4
(増加率)	mean 0.826 SD 0.139	0.868 0.042	0.878 0.057	0.936 0.116	0.928 0.159	0.972 0.116	1.077* 0.157	0.785 0.352	0.881 0.104	0.792 0.038	0.781 0.067
LPS	mean 30.1 SD 17.8	11.9 3.8	20.2 12.2	14.6 4.0	20.5* 6.7	19.0 7.4	37.8** 12.1	30.3* 17.3	10.4 5.8	12.9 6.6	12.1 2.7
LPS(-)	mean 0.121 SD 0.025	0.066 0.119	0.102 0.039	0.163 0.140	0.011 0.003	0.004 0.005	0.003 0.008	0.009 0.015	0.088 0.079	0.025 0.033	0.020 0.042
産糞	mean 0.121 SD 0.025	0.066 0.119	0.102 0.039	0.163 0.140	0.011 0.003	0.004 0.005	0.003 0.008	0.009 0.015	0.088 0.079	0.025 0.033	0.020 0.042

1) CNP PAP CNP-PAPの媒体対照、2) TMの媒体対照
 * Student's t testによる。媒体対照群に対して有意な変化 (p<0.05)
 ** Student's t testによる。媒体対照群に対して有意な変化 (p<0.01)

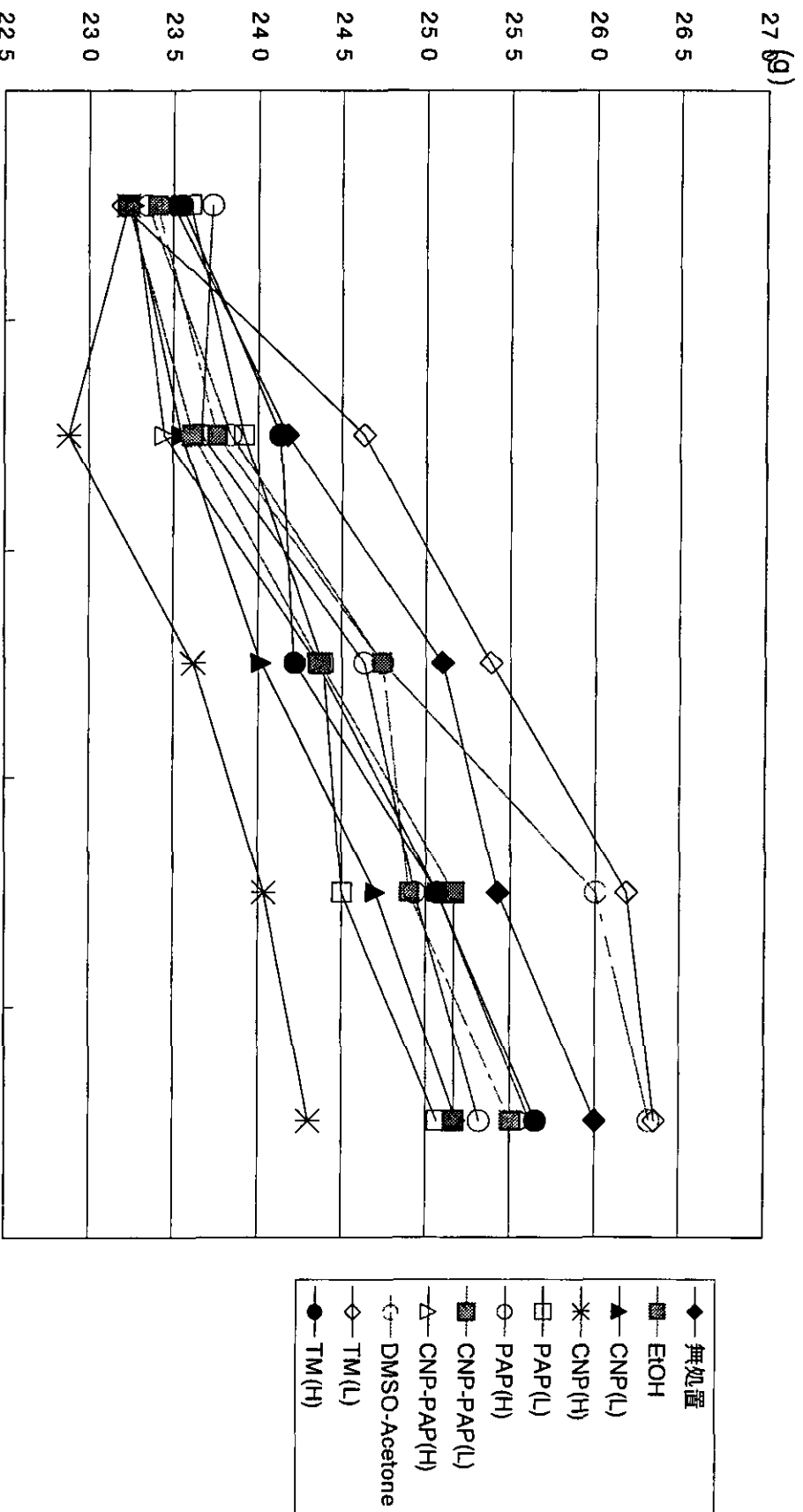


Fig 2 吸入曝露動物の体重推移 (BrdU assay用)

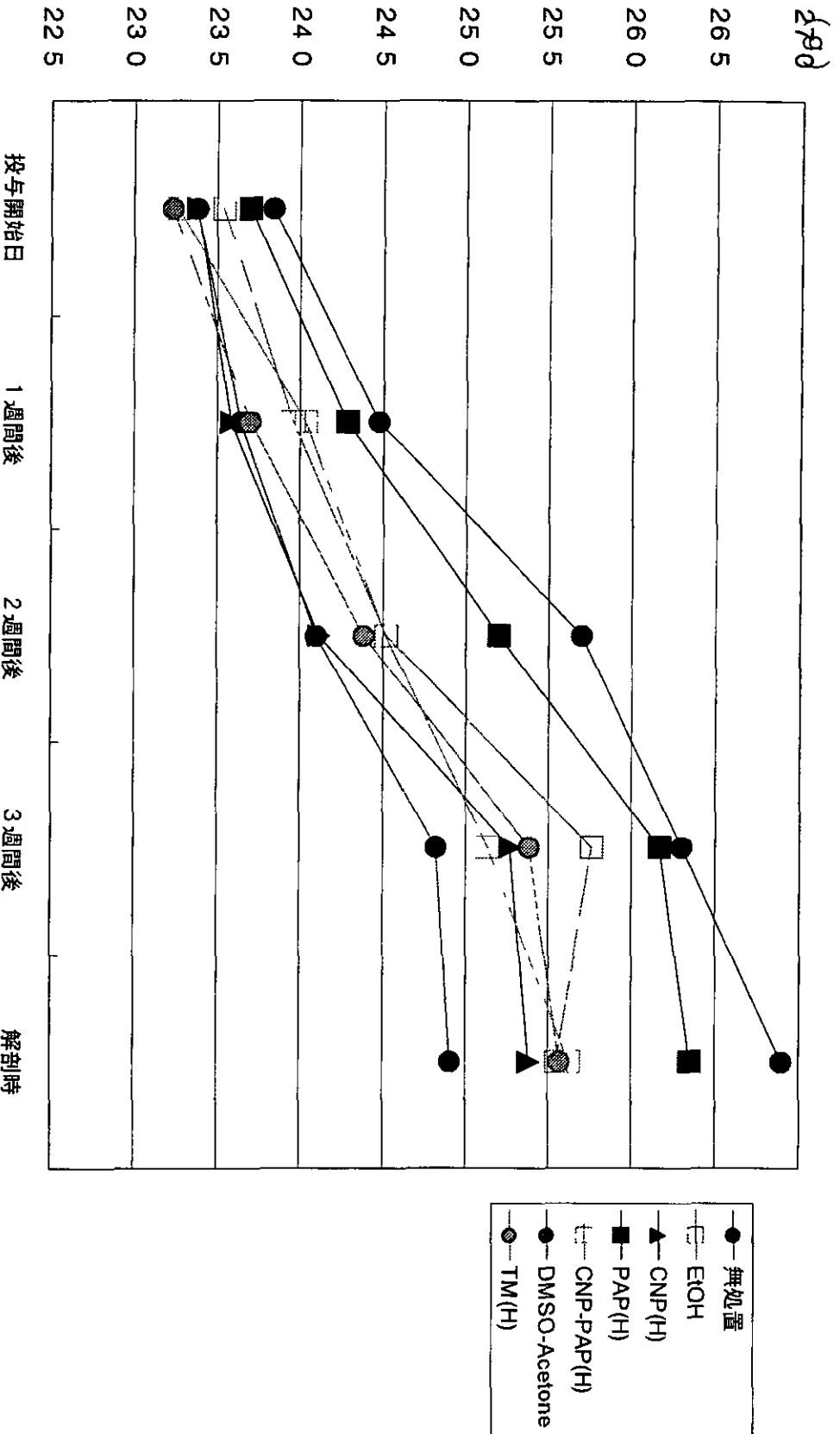


Fig 3 吸入曝露動物の体重推移 (PFC assay用)

Table 6 環境化学物質の免疫系に対する影響 (実験 2 SRBC投与)

曝露物質	Non-treatment	EtOH ¹⁾	CNP (H)	PAP (H)	CNP-PAP (H)	DMSO/acetone ²⁾	TM (H)	
動物数	4	5	6	6	6	6	6	
解剖時体重(g)	mean	26.9	25.6	25.4	26.4	25.6	24.9	25.6
	SD	1.4	0.7	1.1	1.1	1.4	1.2	1.8
脾臓重量 (g)	mean	0.139	0.127	0.124	0.125	0.128	0.126	0.125
	SD	0.014	0.003	0.018	0.010	0.010	0.008	0.008
総白血球数 ($\times 10^6$ /g/mL)	mean	985.2	765.7	677.9	633.3	741.6	833.8	709.9
	SD	95.9	151.3	67.0	129.5	169.8	86.8	105.6
PFC assay ($\times 10^6$ splenocytes)	mean	2072	2058	2252	2107	1958	1984	1792*
	SD	311	196	425	483	185	89	123

¹⁾ CNP、PAP、CNP-PAPの媒体対照、²⁾ TMの媒体対照

* Student's t-testによる。媒体対照群に対して有意な変化 ($p < 0.05$)

厚生労働科学研究補助金（食品安全確保研究事業）
分担研究報告書

肝及び小腸における食品中化学物質の代謝及び吸収の変動と相乗毒性に関する研究

分担研究者 大野泰雄 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部

研究要旨

Prometryn のヒトでの代謝が低濃度では主に CYP1A2 により、高濃度では主に CYP3A4 で行われると考えられた。また、複数の P450 分子種で代謝を受けることから *in vivo* で代謝阻害に起因する相互作用を起こす可能性は少ないと考えられた。今までに確立したヒトの主要な薬物代謝酵素 CYP3A4 の誘導を測定する培養細胞システムを用いて各種農薬の酵素誘導能を検討し、IBP が強い誘導能を有する事を示した。2,4-dichlorophenoxyacetate (2,4-D) の尿細管分泌に関わる有機アニオンの輸送メカニズムを明らかにすることを目的とした。RST と Oat3 の共遺伝子発現系の構築を行い、経細胞輸送が促進されることを確認した。側底膜有機アニオントランスポーター (OAT1・OAT3) について、サル、ラット、ヒト間での種差の検討を行った。その結果、2,4-D の輸送も含めて OAT1 についてはほとんど種差がみられないものの、OAT3 についてはサル ヒト間では種差がみられないものの、サル ラット、ヒト ラット間では種差がみられた。少なくとも、尿細管分泌についてはサルがヒトの良いモデルとなることを明らかにした。

協力研究者 山添 康（東北大学薬学部）
杉山雄一（東京大学薬学部）
紅林秀雄（国立医薬品食品衛生研究所薬理部）

また、そのような活性を *in vitro* でスクリーニングする方法の開発、及び *in vitro* の結果を *in vivo* に外挿する方法を開発することを目的とした。

A. 研究目的

農薬等、食品中化学物質の相乗毒性については以前より懸念されてきたが、それらの間の組み合わせは膨大であり、一つ一つ検討することは不可能である。しかし、今までの経験から相互作用の多くが代謝酵素の誘導や阻害などによる薬物動態学的な相互作用に起因することが明らかになってきた。一方、相互作用予測には化学物質のヒトでの代謝や排泄等に関与する酵素を分子種レベルで明らかにする必要があるが、今まで、生活関連物質については、このような検討はほとんど行われて来なかった。そこで本研究では薬物動態の関係する農薬等生活関連物質の相乗毒性を *in vitro* で予測するために、農薬の代謝や動態に関係するヒト代謝酵素を明らかにすること、

昨年度までに、ヒト肝ミクロソーム及びヒト P450 分子種発現系を用いた研究により、除草剤 prometryn (Pm) の代謝に関与しうる P450 が CYP3A4、CYP1A1、或いは CYP2C9 であることを示した。また、CYP3A 誘導の *in vitro* スクリーニング系を開発し、それを用いた研究により除草剤ジコホールが CYP3A4 誘導作用を持つことを示した。また、除草剤 2,4-dichlorophenoxyacetate (2,4-D) の腎取り込みが OAT1 により、管腔側への排泄が Renal Specific Transporter (RST) により行われることを示した。今年度は 1) Pm の代謝物を LC-MS で明らかにするとともに、代謝に関与する P450 分子種について 3 社の P450 発現系を用いて比較検討するとともに、それらの分子種の関与の程度を明らかにするための酵素力学的な検討を行った。2) 今まで

に確立した CYP3A4 酵素誘導評価系を用いて残留農薬の作用を検討した。

3) 肝臓・腎臓ならびに消化管における化学物質の膜透過 代謝メカニズムについて、種差の検討を行い、ヒトと比較した。また、2,4-D の近位尿細管の尿細管分泌の *in vitro* モデルとして RST と Oat3 との共遺伝子発現系を構築することを試みた。

B. 研究方法

B-1) 農薬の代謝に関与する酵素に関する研究

各種濃度の基質 Pm を NADPH 存在下のヒト肝ミクロソームおよび CYP 発現系 P450 ミクロソーム等のリン酸緩衝液(pH 7.4)中 37°C でインキュベートした。肝細胞は 3×10^5 cells/mL の濃度で HEPES 緩衝 Krebs 液中 37°C でインキュベートした。代謝物は逆相系カラム Inertsil ODS-3(15cm x ϕ 4.6mm) を用いた HPLC (LC-10A) で分離し、UV 検出器および Mass で代謝物を検出した。また、各種阻害剤を用いて Pm 代謝に関与する P450 分子種を推定した。なお、CYP 発現系 P450 ミクロソームで、酵母菌で発現させたものは住化分析センター社、大腸菌で発現させたものは日本農産社、Baculovirus で発現させたものは Gentest 社より購入した。ヒト凍結肝細胞は、日本農産社を通して XenoTech(米国) およびケーエーシー社を通して TTT(米国)または BIOPREDIC(仏)から購入した。

B-2) ヒト型 CYP3A4 誘導検索系の開発

前年度までに構築したアデノウイルス CYP3A4 レポーターベクターを腸管の誘導を予測する培養細胞として大腸ガン由来の LS147T 細胞と肝臓における CYP3A4 誘導が予測可能な HepG2 細胞に導入し、CYP3A4 誘導の評価を行った。さらにこのレポーター遺伝子ベクターをヒト由来の肝細胞である HepG2 の染色体に組み込み、恒常的に CYP3A4 誘導の評価が可能な培養細胞系を開発した。本年度はこの系を用いて 5 種の農薬 (Pm、Alanycarb、Ethiofencarb、Ametryn、IBP) による CYP3A4 誘導評価を行った。方法の詳細は前年度までの報告に記載した。

B-3) 農薬の腎排泄に関する研究

サル腎臓から、RT-PCR 法により OAT1 と OAT3 cDNA のクローニングを行った。HEK293 細胞を用いて、遺伝子発現系を構築した。ディッシュに撒種し、定法に従い輸送実験を行った。また、マウス RST とラット Oat3 を発現させた LLC-PK1 細胞に導入した。多孔性フィルター上にて、細胞を培養し、経細胞輸送実験をおこなった。

(倫理面への配慮)

動物実験及び市販のヒト組織を用いた研究に関しては国立衛研および協力機関の研究倫理委員会の承認をうけて、或いは承認を受ける必要の無い研究であるとの了解のもとで実施した。

C. 研究結果

C-1) 農薬の代謝に関与する酵素に関する研究 (Fig 1)

ヒト肝ミクロソームは、NADPH 存在下において Pm を代謝し、代謝物を LC-MS で分析したところ、昨年までの結果と同様に S 原子が酸化された主代謝物 prometryn-sulfoxide (PmSO)、次に N-脱アルキル化された代謝物 deisopropylprometryn (D-Pm)、アルキル基が水酸化された代謝物 1-hydroxyisopropylprometryn (M1-Pm) は昨年度同様に major な代謝物として検出された。一方、今までの検討では検出できなかった deisopropyl-prometrynsulfoxide (D-PmSO) と考えられる代謝物およびその他の微少な代謝物が検出された(Fig 2)。

一方、P450 分子種の発現系での代謝は cytochrome b5 の存在や脂質環境等によって変わることから、確認のため、今年度は yeast、Baculovirus および E coli で発現させた各種 P450 分子種で代謝の検討を行った。その結果、平成 13 年度の検討では代謝活性の認められなかった CYP2C19 による代謝が yeast (Fig 3) および E coli (Fig 4) の両発現系において著明に認められた。なお、Baculovirus の系では上記 CYP の他 3A4 でも高い代謝活性が得られた(Fig 5)。そこで、ヒトミクロソームを用いた阻害実験を行い、2C19 阻害剤 tranilcypromine(10、60 μ M) 及

び ticlopidine (20、60 μ M)の影響を検討したところ、前者では10 μ Mで約20%、60 μ Mで約40%の代謝阻害が認められた。後者では60 μ Mで約20%の阻害が認められた(Table 1)。そこで、2C19欠損肝より調製したマイクロソームで検討したところ、低濃度での代謝に対してはtranylepromineの阻害は野生型のものとは比べ半分程度にまで減少した(Table 2)。なお、以前報告したのと同様に今回もPm代謝活性はKetoconazole(特にPmSOで)、 α -Naphthoflavone(特にD-Pmで)等で阻害された(Table 1)。

個々のP450分子種の代謝における役割の程度を比較するために、最も良い結果の得られたBaculovirusで発現させた各P450分子種を用いてPmに対する代謝の最大速度定数 V_m とミカエリス定数 K_m を求め、その固有クリアランス $CL_{int}(=V_m/K_m)$ を算出した(Table 3)。 V_m 及び K_m の高い3A4が、その肝臓中での存在量の多さを考慮に入れるとこの肝臓代謝における寄与率は43-50%であった。次いで K_m の低い1A1と1A2は CL_{int} が高く、その肝臓での存在量を考慮すると1A2のこの代謝における寄与率は約40%であった。ついては比活性が高いCYP2C19は、その肝臓中での存在量が少ないためこの寄与率は10%程度であった。ついては2B6および2D6も代謝活性はあるが K_m は高くその肝臓での存在量は少ないことから、この代謝における寄与率は3-1%程度という結果が得られた。

C-2) ヒト型CYP3A4誘導検索系の開発

LS174TおよびHepG2細胞における典型的なジコホールのCYP3A4誘導について、アデノウイルスCYP3A4レポーターベクターを用いて検討した。その結果はFig 6に示したように、肝臓型の誘導を示すHepG2においてジコホールでは10 μ Mの処置濃度で約4倍のCYP3A4誘導が認められた。しかしながら腸管型の誘導を示すLS174T細胞においては同用量でCYP3A4誘導は認められなかったが、100 μ Mでは6倍もの誘導が認められた。一方、データは示さないが、アデノウイルスを用いてヒトPXRをこれらの細胞に過剰発現させたところ、HepG2では誘導の状況はほと

んど認められなかったが、LS174T細胞においては誘導の増強が認められた。

次に恒常的にCYP3A4誘導の評価が可能な培養細胞系を用いて、5種の農薬のCYP3A4誘導について検討した(Fig 7)。先にも述べたように本培養細胞系はHepG2細胞由来のため、肝臓型のCYP3A4誘導の評価が可能となっている。また当研究室ではリファンピシンとクロトリマゾールを添加した時の誘導応答の程度と応答が異なる2種の細胞株(3-1-10および3-1-20)を樹立している。本実験ではこの2種の樹立株の間で誘導が異なるかも合わせて検討した。各農薬をこれらの細胞株に10 μ M処置したところ、いずれの農薬においても誘導が認められた。特にIBPが3-1-20において約7倍もの誘導を示した。また、Pmが約3倍の誘導を示したが、残りのものについては、1.2から2倍程度の弱い誘導が認められた。一方、3-1-10においてもIBPが強い誘導を示し、また他の農薬についても誘導の傾向は、3-1-20と同様であった。

C-3) 農薬の腎排泄に関する研究

単離したサルOAT1とヒト、ラットOAT1との相同性はアミノ酸レベルでそれぞれ97、88%であった。サルOAT3とヒト、ラットOAT3との相同性はアミノ酸レベルでそれぞれ96、79%であった。サルOAT1の機能解析を行ったところ、2,4-Dの輸送活性がもっとも高く、ついてはp-aminohippurate, hippurateといった有機アニオンが続く。一方、サルOAT3では、estrone sulfateの輸送活性がもっとも高く、他の有機アニオンについてはindolacetateを除いて、押しなべて同程度の輸送活性が検出された。各化合物の K_m 値を比較すると、両トランスポーターで2-3倍以内で一致した。PAHとPCGを基準化合物としたときの相対的な輸送活性を比較した際には、OAT1についてはいずれの種についても良好な相関を示し、種差が小さいのに対して、OAT3ではヒト・サル間では種差がほとんどないのに対して、ヒト・ラット間では種差が大きいたことが明らかとなった(Fig 8)。

mRSTをLLC-PK1細胞に発現させたところ、刷子縁膜側への局在を示した。PAHや2,4-Dの経細胞輸送については、rOat1単独

発現細胞でも非発現細胞よりも大きく内因性のトランスポーターの関与が考えられる。rOat3/mRST の共遺伝子発現系では、benzylpenicillin、urate の2化合物で側底膜側から刷子縁膜側への輸送が、単独発現系よりも大きくなることを見出した(Fig 9)。mRST が細胞内からの排出方向に働くことが示唆された。

D 考察

D-1) 農薬の代謝に関与する酵素に関する研究

ヒト肝ミクロソームでの代謝阻害実験や遺伝子発現型酵素を用いて検討した結果、Pm濃度が比較的高濃度時の代謝に於いては主にCYP3A4により、低濃度時に於いてはN-脱アルキル化代謝の特異性が高い1A2により主に代謝されると推定された。これは、ヒト肝細胞を用いた代謝実験でCYP3A4の特異的阻害剤のKetoconazole等で代謝阻害が見られ、また脱アルキル化反応ではCYP1Aの特異的阻害剤 α -Naphthoflavoneで阻害された結果とよい一致が見られた。また、Pm代謝において、生成する代謝物によってTiclopidine、Omeprazole、TranlycypromineやKetoconazole等の阻害剤の感受性がヒトおよびラットの動物種差により微妙に異なっていた。これらはP450分子種の違いに基因すると考えられた。なお、CYP1A1でも代謝されたことから、農薬の接触部位でもある皮膚や肺でも効率的に代謝される可能性がある。

Pmの代謝が複数種のP450でなされることは、例えば一種のCYP3A4で代謝される医薬品を投薬中の人間が、万一この農薬に暴露された場合、一種の代謝酵素3A4が拮抗阻害を受けても他のP450分子種が働いて代謝することで、血中薬物濃度が上昇するような副作用は起こり難いと考えられた。

D-2) ヒト型CYP3A4誘導検索系の開発

酵素誘導能をヒト薬物代謝酵素について明らかにすることは農薬や薬物の安全性評価に重要である。これまで実験動物試験の結果から外挿されて来たが、ヒトと実験動物のあいだに顕著な種差が存在するため予測は困難とされていた。近年、我々は誘導評価系はヒト

の誘導を予測することが可能な系を構築し、本評価系を用いることで薬物によるヒトの誘導を予測することを可能とした。本評価系を用いた今回の研究より、使用したすべての農薬において程度は異なるもののCYP3A4誘導を引き起こす可能性が示めされた。またジコホールについては、誘導の分子機構が肝臓と腸管では異なる可能性も示唆された。本研究結果より、多くの農薬が実際にCYP3A4誘導を引き起こす可能性が予測され、またその誘導が臓器間で異なることも予測された。従って、農薬の詳細な毒性評価を行うためには、本系を用いたさらなるCYP3A4誘導の検討が必要と考えられる。今後は、農薬の種類を増やし、誘導の定量性及び誘導のヒト化した実験動物を用い、より詳細な誘導の分子機構を検討して行く予定である。

D-3) 農薬の腎排泄に関する研究

少なくとも、有機アニオン化合物の側底膜側の輸送については種差が小さいことが明らかとなり、動物実験からヒトへ外挿が可能が可能であることが示唆された。サルを用いた動物実験も有効である。刷子縁膜側の排泄については、mRST以外に分泌に働くトランスポーターが2,4-Dを基質とすることが明らかになった。その他に、LLC-PK1に内因性のトランスポーターも存在しており、更に解析が必要である。また、mRSTが刷子縁膜側で有機アニオンの分泌に働くことが示唆され、Oatとの共遺伝子発現系が有用であることが示唆された。これらの系は、尿中に主に排泄される2,4-Dを含むアニオン性農薬と医薬品との相互作用を検討する評価系として利用可能と考えている。

酵素誘導能をヒト薬物代謝酵素について明らかにすることは農薬や薬物の安全性評価に重要である。これまで実験動物試験の結果から外挿されて来たが、ヒトと実験動物のあいだに顕著な種差が存在するため予測は困難とされていた。今回ヒト酵素遺伝子の転写活性化能をヒト由来の肝細胞株に発現させることが、農薬類を評価することが可能となった。今後、定量性について検討して行く予定である。

E 結論

ヒト肝ミクロソームでの薬物相互作用を考慮した場合、Pm が低濃度時に於いては CYP1A2 で代謝される薬物と、また基質が比較的高濃度時に於いては CYP3A4 等により代謝される薬物との相互作用の可能性が推定される。しかし、Pm の代謝は複数種の P450 でなされることから、例え一種の P450 での代謝を強く抑制する医薬品を投薬中の人間が Pm に暴露された場合でも、他の P450 分子種が働いて代謝され血中濃度が上昇するような毒性作用は起こり難いと考えられる。

典型的な CYP3A4 誘導剤であるリファンピシンとクロトリマゾールを添加した時の誘導応答の程度と応答比の違いから No 10 および No 20 の株を用いて、ヒト CYP3A4 遺伝子の活性化能を農薬について検討した。DDT に構造が類似したジコホールは、約 10 μ M の添加で約 4 倍の誘導が認められた。さらに調べた 5 種の農薬のうち IBP は約 7 倍と、ジコホールよりも強い誘導能が検出された。

RST と Oat3 の共遺伝子発現系の構築を行い、この系ではそれぞれの単独発現系と比べて経細胞輸送が促進されることを確認した。側底膜有機アニオントランスポーター (OAT1・OAT3) について、サル、ラット、ヒト間での種差の検討を行った。その結果、2,4-D の輸送も含めて OAT1 についてはほとんど種差がみられないものの、OAT3 についてはサル ヒト間では種差がみられないものの、サル ラット、ヒト・ラット間では種差がみられた。少なくとも、尿細管分泌についてはサルがヒトのいいモデルとなることを明

らかにした。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1. 論文発表

- 1) Deguchi T, Kusuhara H, Takdate A, Endou H, Otagiri M and Sugiyama Y Characterization of Uremic Toxin Transport by Organic Anion Transporters in the Kidney *Kidney Int*, 2004 65 162-74
- 2) Nozaki Y, Kusuhara H, Endou H and Sugiyama Y Quantitative Evaluation of the Drug-Drug Interactions between Methotrexate and Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs in the Renal Uptake Process based on the Contribution of Organic Anion Transporters and Reduced Folate Carrier *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, 309 226-34

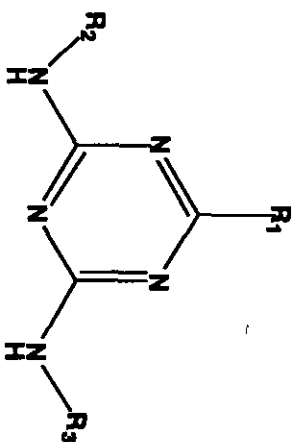
2. 学会発表

- 1) 紅林秀雄, 大野泰雄 除草剤プロメトリンおよびアメトリンのヒト肝ミクロソームにおける代謝 日本薬学会第 124 年会 (2004 3)

H 知的財産権の出願 登録状況

なし

Fig. 1: プロメトリンおよび代謝物の構造



Compounds	R ₁	R ₂	R ₃
Atrazine	Cl	Et	iPr
Ametryn (Am)	SCH ₃	Et	iPr
Prometryn (Pm)	SCH ₃	iPr	iPr
Prometrynsulfoxide (PmSO)	SOCH ₃	iPr	iPr
1-Hydroxyisopropylprometryn (M1-Pm)	SCH ₃	iPr	iPr-OH
Deisopropylprometryn (D-Pm)	SCH ₃	H	iPr
Deisopropylprometrynsulfoxide (D-PmSO)	SOCH ₃	H	iPr
N-bideisopropylprometryn (D-D-Pm)	SCH ₃	H	H

Et, ethyl; iPr, isopropyl; iPr-OH, 1-hydroxyisopropyl; SCH₃, methylthio, SOCH₃, methylsulfinyl

Fig 2: LC-MSによるPrometryn代謝物の分析

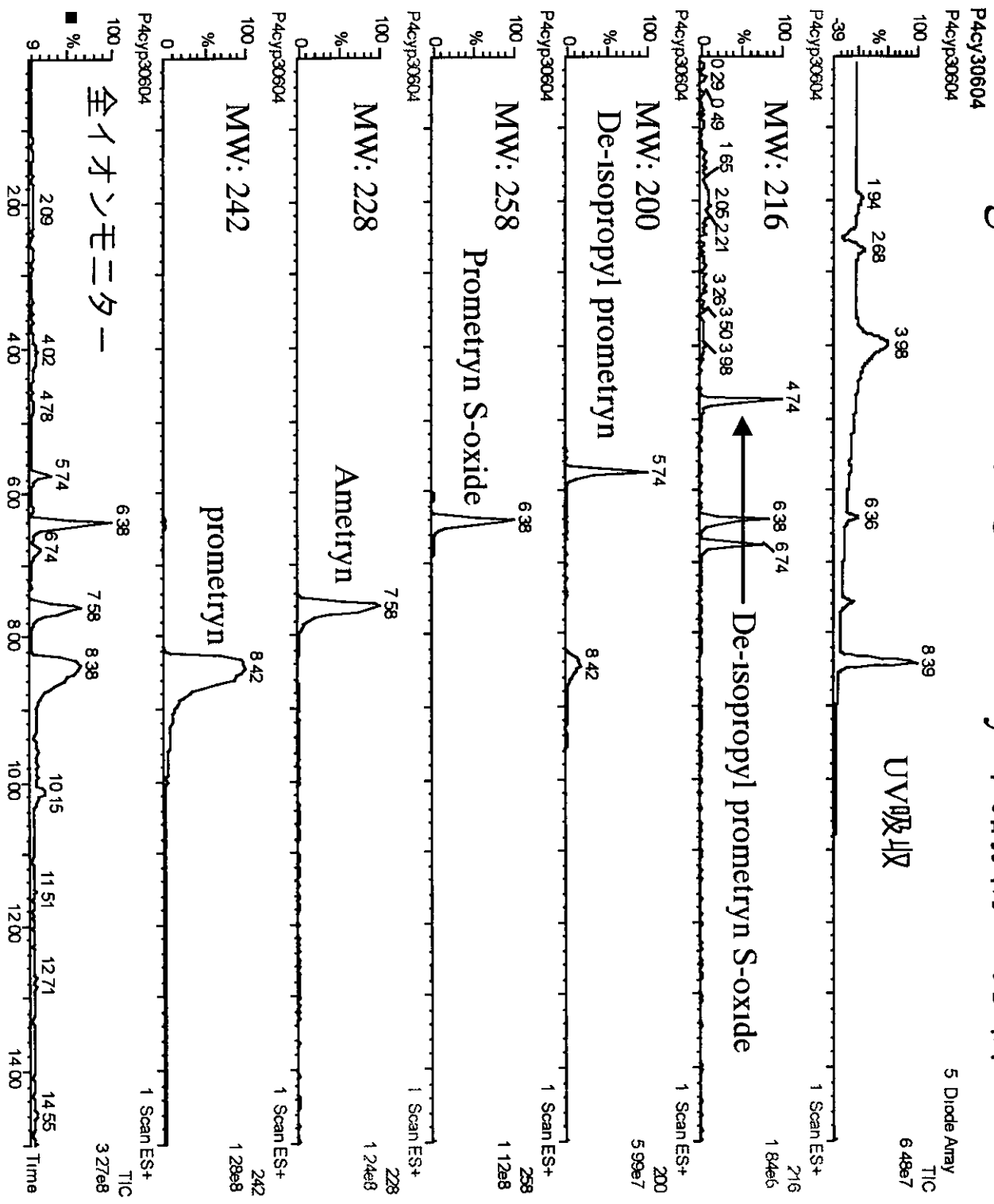


Fig. 3: 酵母で調製したP450発現系でのプロメトリンの代謝

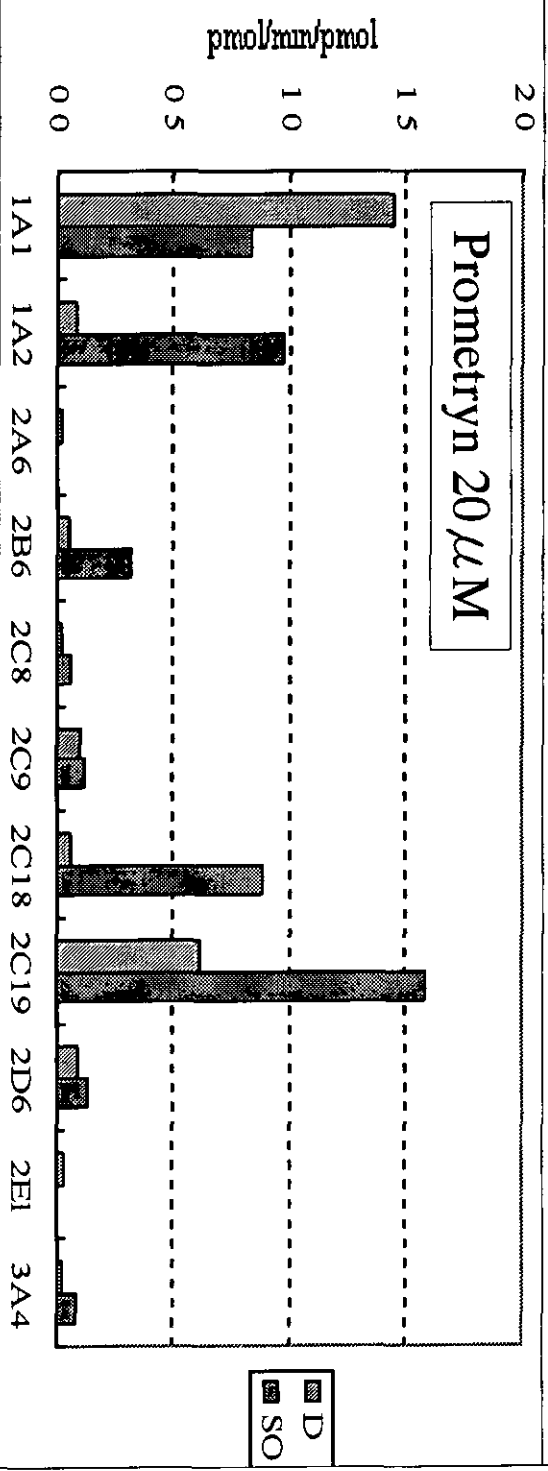
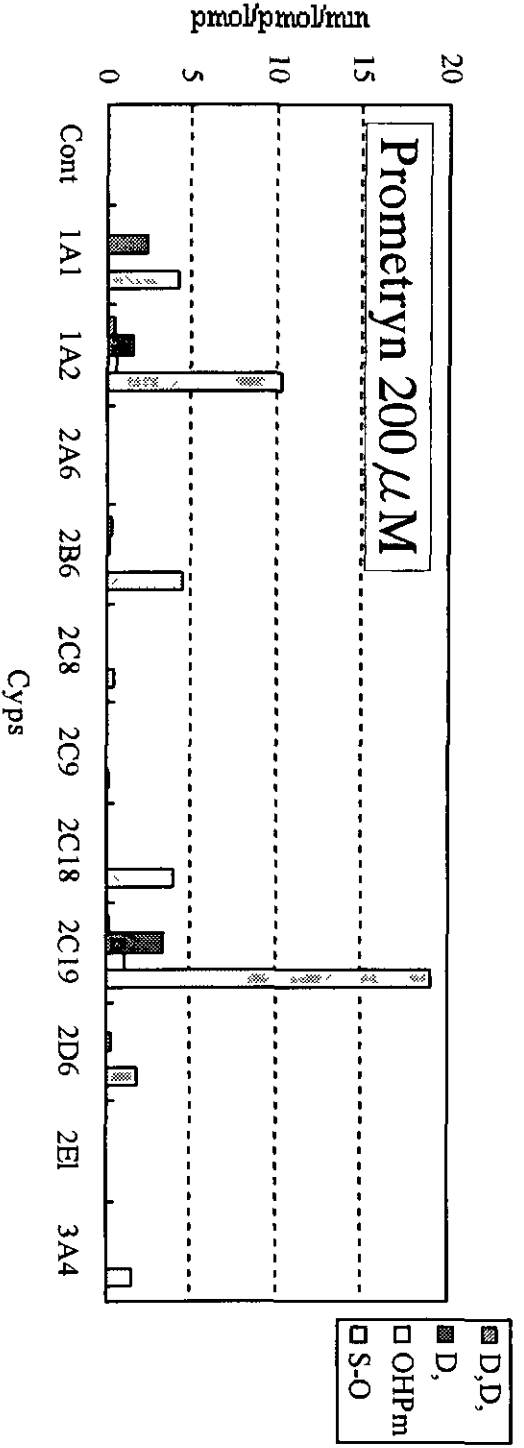


Fig. 4: 大腸菌で調製したP450発現系でのプロメトリンの代謝

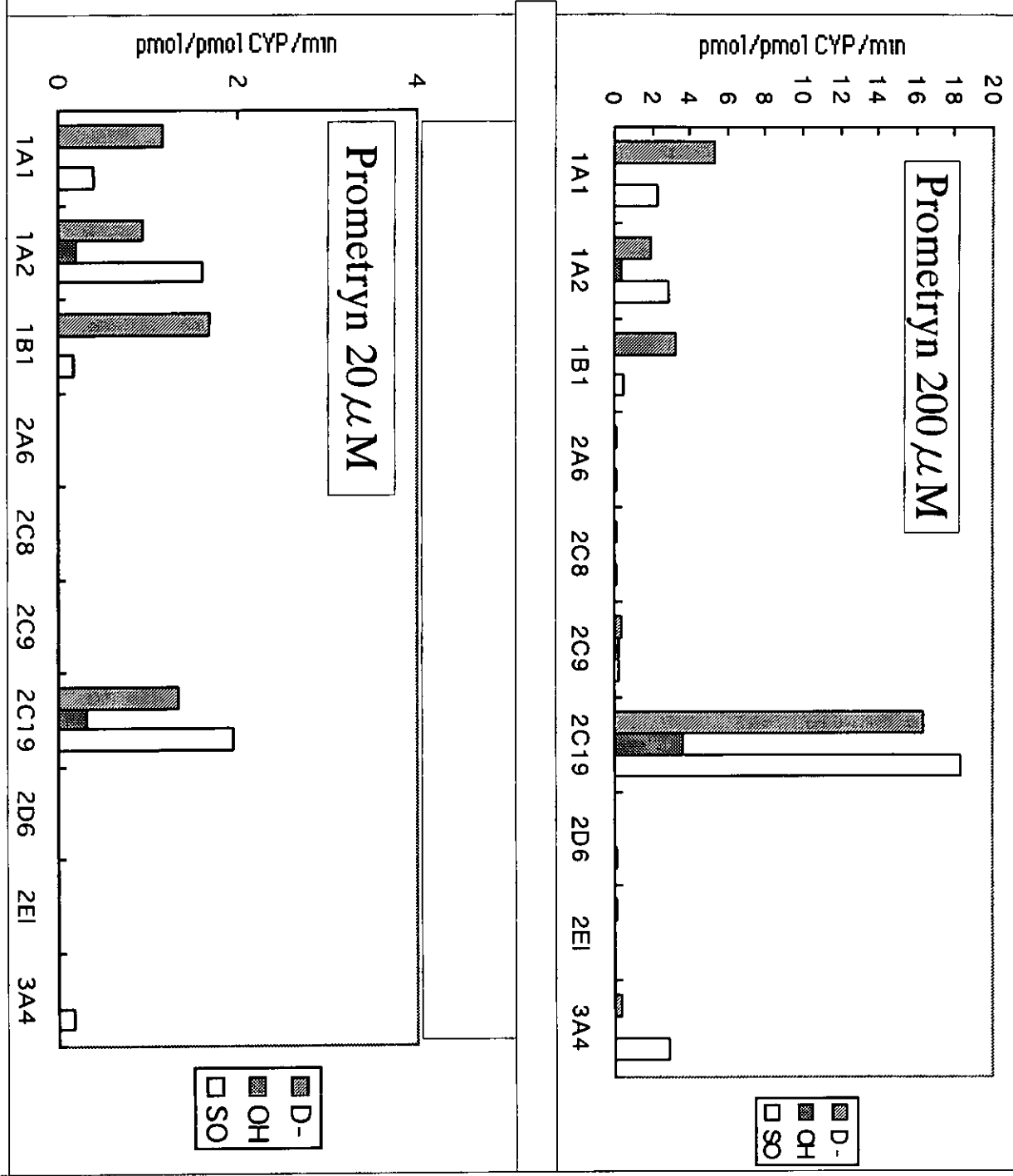


Fig. 5: Baculovirus で調製した P450 発現系でのプロメトリンの代謝

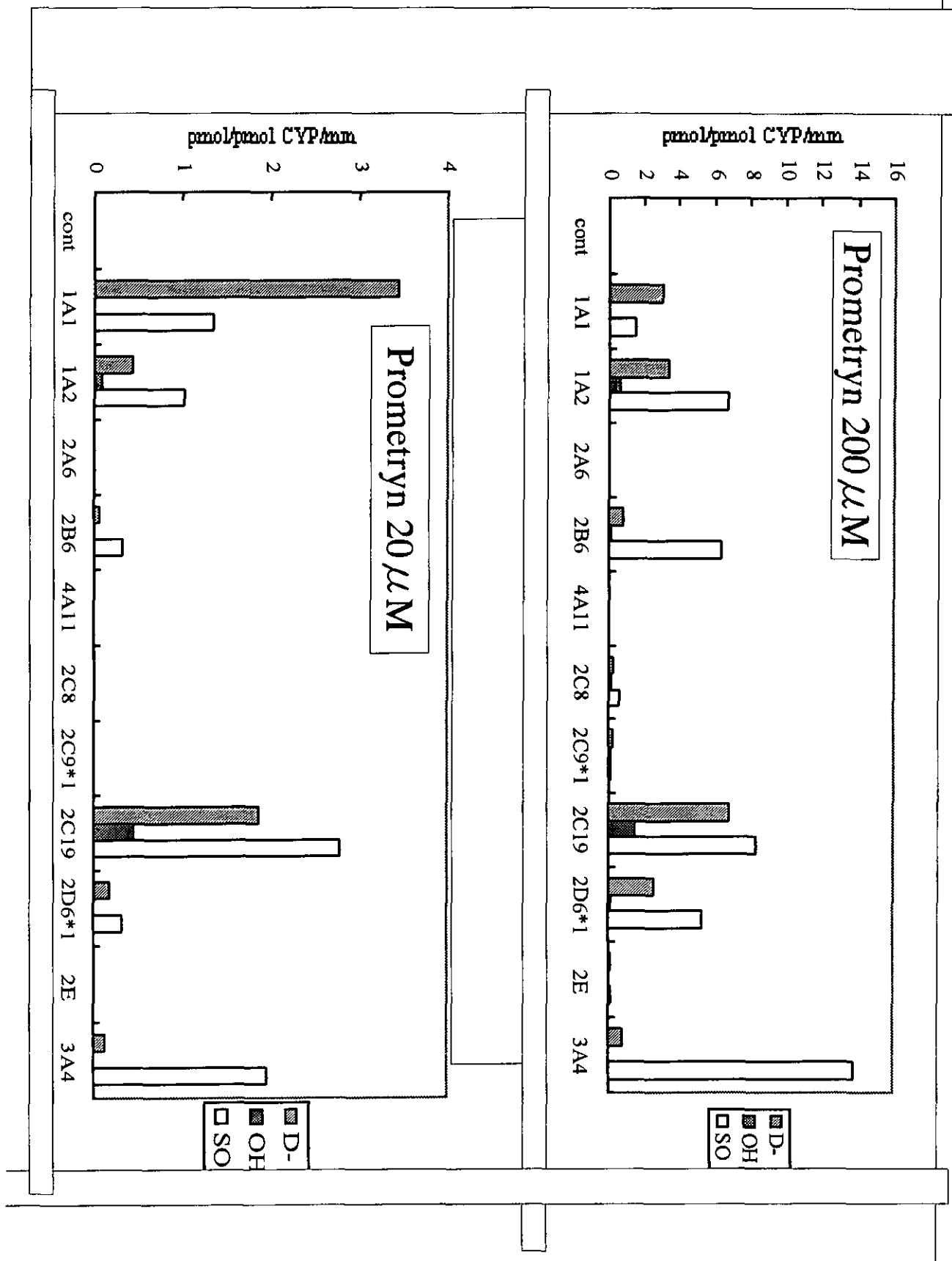


Fig. 6: アデノウイルスCYP3A4レポーターベクターを用いたジコホールのCYP3A4誘導評価

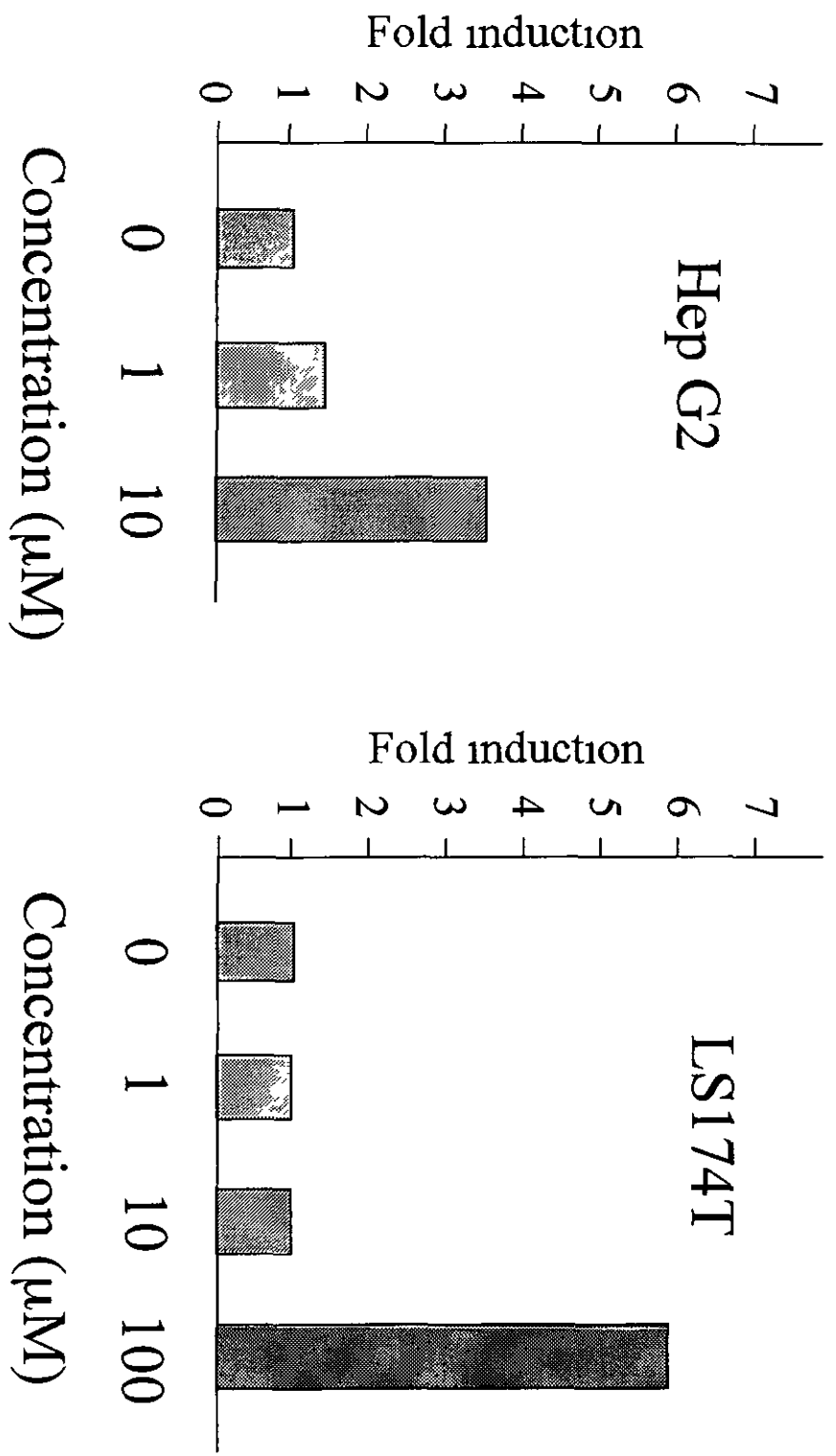
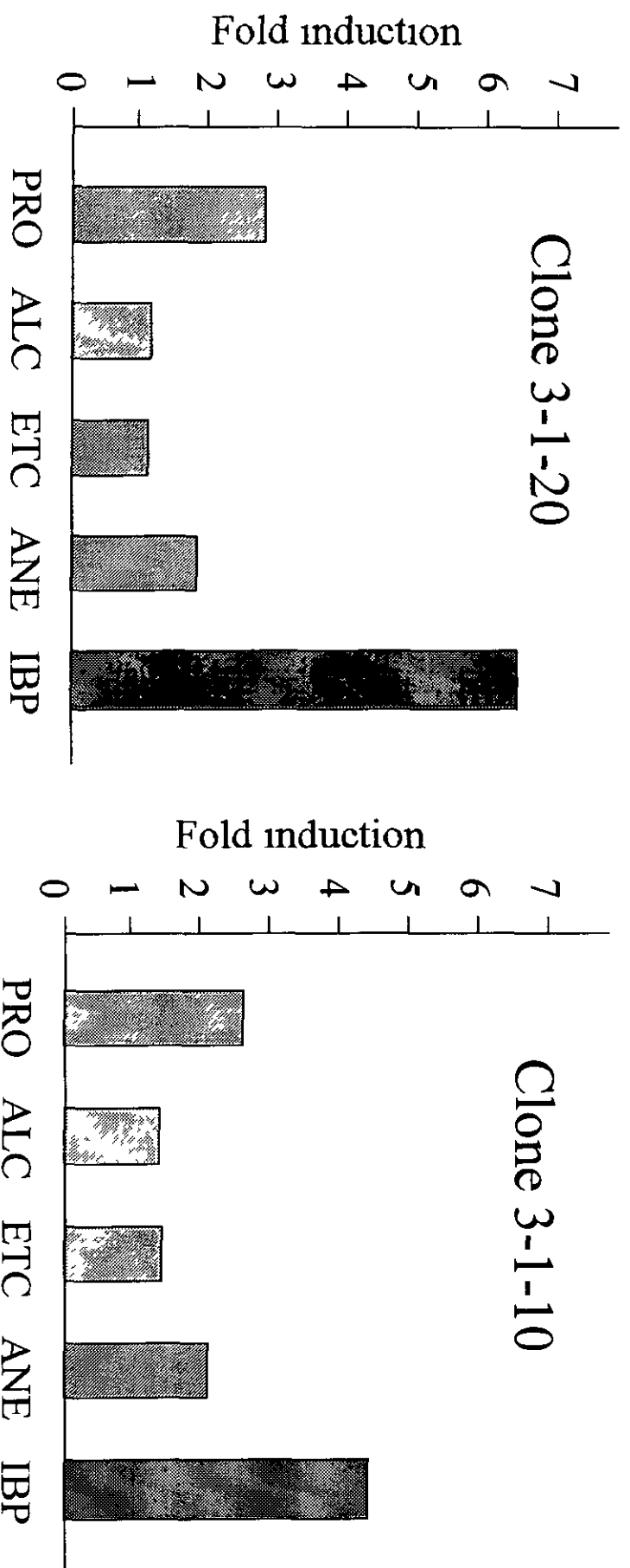


Fig. 7: CYP3A4誘導培養細胞を用いた農薬によるCYP3A4誘導評価



PRO: Prometryn, ALC: Alanycarb, ETC: Ethiofencarb, ANE: Ametryn, IBP: o, o-Diisopropyl-S-benzyl thiophosphate

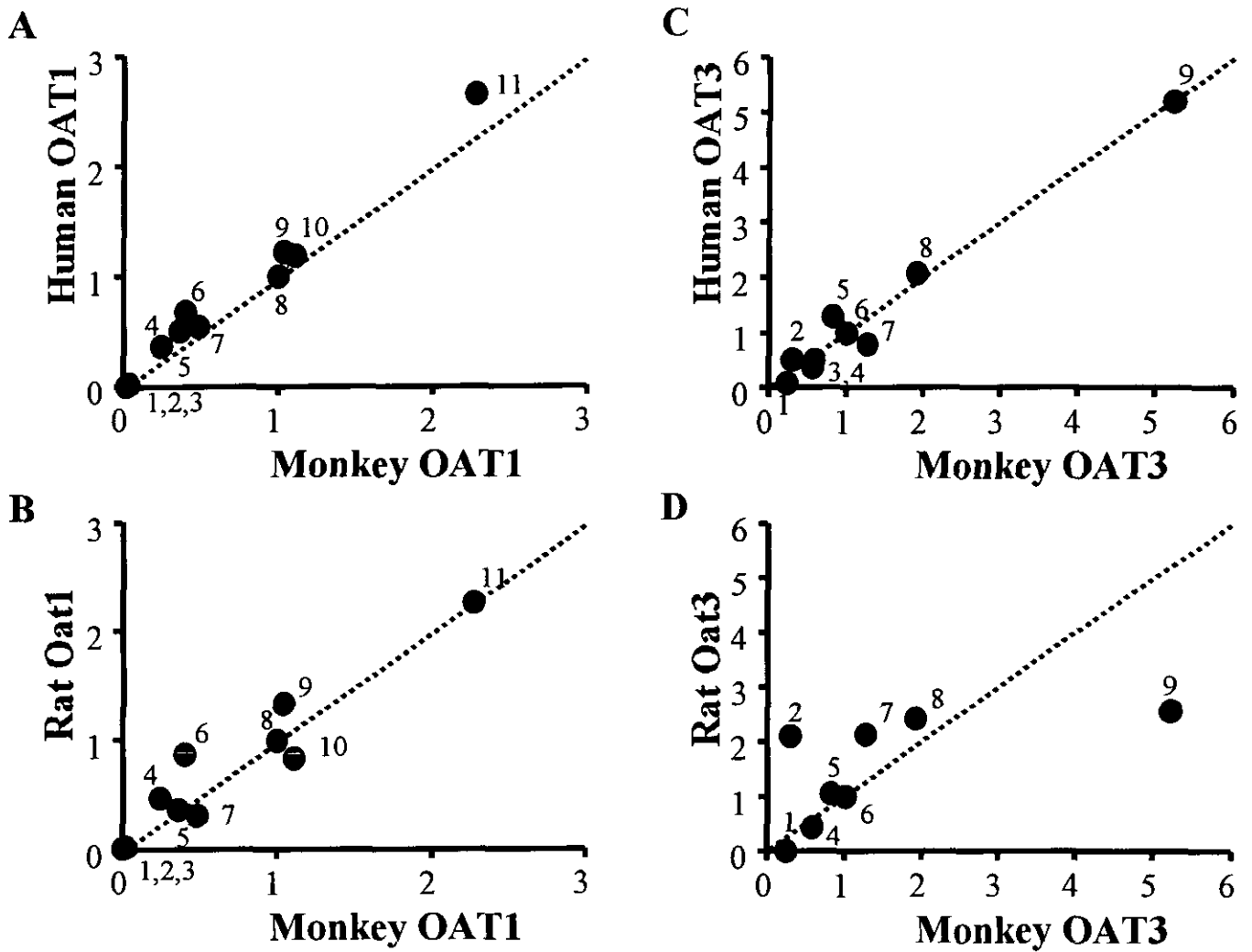


Fig. 8: サル-ヒト間、サル-ラット間のOAT1 (A, B)、OAT3(C, D)の輸送活性の比較
 Panel A,-B 1, PCG. 2, ACV. 3, cimetidine. 4, CMPF. 5, IA .6, IS. 7, AZT. 8, PAH. 9, OTA. 10, HA. 11, 2,4-D.
 Pane C, -D 1, ACV. 2, IS. 3, 2,4-D. 4, PAH. 5, cimetidine. 6, PCG 7, CMPF. 8, OTA. 9, estrone sulfate

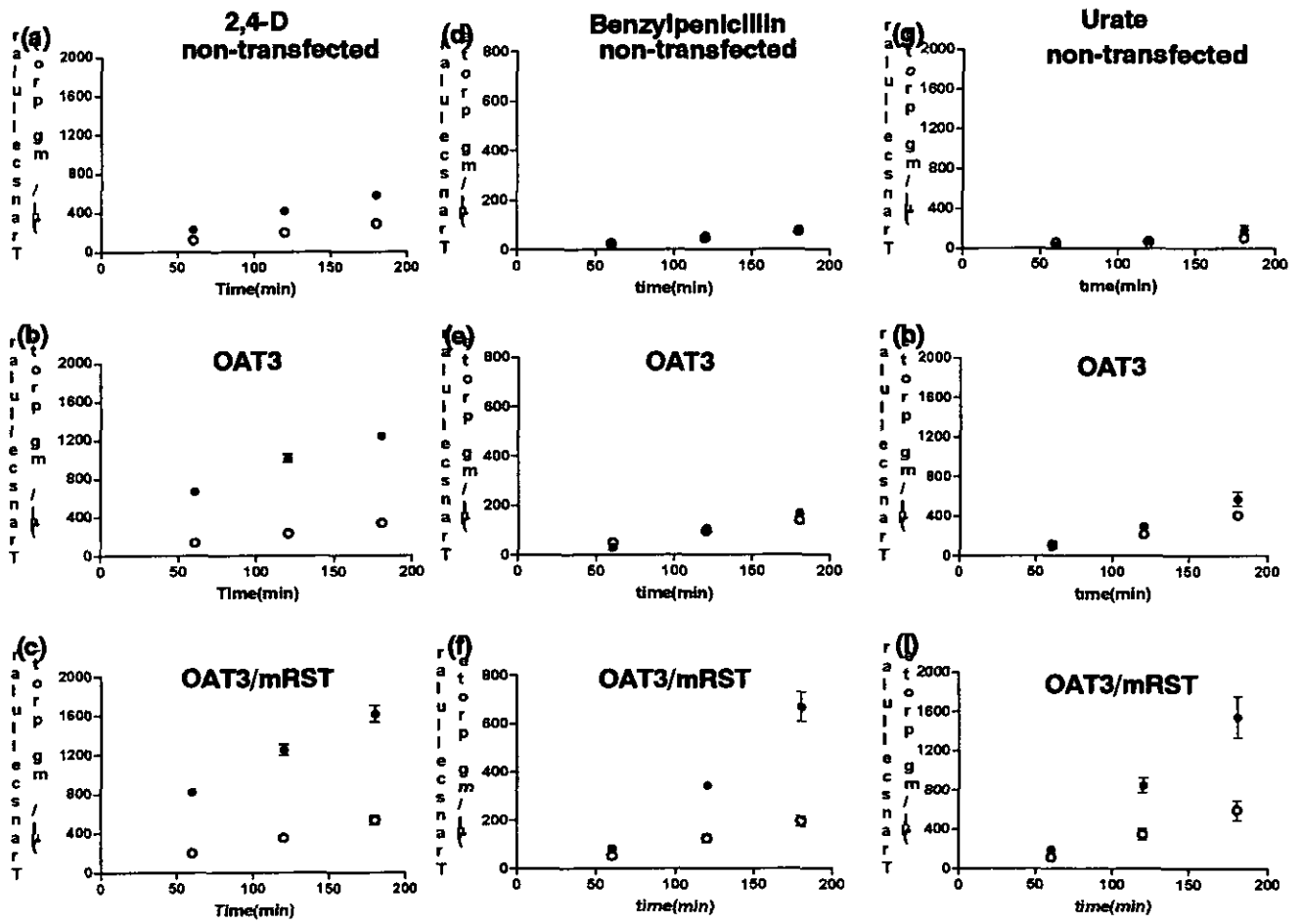


Fig. 9: 有機アニオン化合物の経細胞輸送

control (a, d, g), rOat3-LLC (b, e, h), rOat3/mRST (c, f, i)

rOat3単独発現系でも、2,4-Dはベクトリアル輸送を示す

(panel b)、それに対してbenzylpenicillinやurateは対称的

な輸送である。しかし、ここにmRSTを共発現させてや

ると、これらの化合物についてもベクトリアル輸送が観

察される (f, i)。

Table 1 ヒト肝ミクロソームにおけるプロメトリン代謝に及ぼすP450阻害剤の影響

阻害剤	濃度 (μM)	Prometryn (200 μM)			Prometryn (20 μM)		
		PM-DP	PM-OH	PM-SO	PM-DP	PM-OH	PM-SO
α-Naphthoflavone	5	57	13	70	20	21	
Ketoconazole	0.3	15	52	10	14	20	
	1	20	61	9	9	26	
Ticlopidine	20	11	4	40	40	22	
	60	18	17	46	53	28	
Tranylcypromine	20	18	15	20	41	37	
Furafylline	4	14	4				
	8			38	40	30	
	20	24	17				
Sulfaphenazole	20	16	25	20	10	18	
Quinidine	20	12	11	9	14	12	

PM-DP deisopropylprometryn, PM-OH hydroxyprometryn, PM-SO prometryn S-oxide

Table 2 CYP2C19欠損ヒト肝ミクロソームにおけるプロメトリン代謝に及ぼすP450阻害剤の影響

阻害剤	濃度 (μM)	Prometryn (200 μM)			Prometryn (20 μM)		
		PM-DP	PM-OH	PM-SO	PM-DP	PM-OH	PM-SO
α-Naphthoflavone	5	81	82	27	84	50	39
Ketoconazole	0.3	11	23	40	7	18	15
	1	10	16	50	6	-	24
Ticlopidine	20	18	27	28	21	12	17
Tranylcypromine	20	45	28	49	-1	-	20
Furafylline	8	15	46	14	35	20	26
Sulfaphenazole	20	15	30	38	16	-7	20
Quinidine	20	34	36	66	3	8	-4

PM-DP deisopropylprometryn, PM-OH hydroxyprometryn, PM-SO prometryn S-oxide

Table 3 ヒト肝臓におけるprometryn代謝における各種P450分子種の貢献

P450分子種	apparent Km (μ M)	Vmax pmol/min/ pmol	Clint (Vmax/Km) mL/min/ nmol	ヒト肝ミクロ ソーム中含量 pmol/mg	存在量で補正 したClint %
1A1	12.5	12.4	0.99		
1A2	23.6	13.8	0.58	45	38
2B6	233	13	0.06	39	3
2D6*1	228	8.5	0.04	10	1
3A4+b5	148	42	0.28	108	44
2C19+b5	37	19	0.51	19	14

Vacuovirusで発現させたP450 (Gentest)を使用した。
+b5 cytochrome b5を添加したミクロソームを使用