

クロロホルム溶液

クロロホルムとイソアミルアルコールを24:1 (v/v) の比で混合

10 x PCR緩衝液

670 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 8.8)、
166 mM 硫酸アンモニウム、4.5%
Triton X-100、2 mg/mL ゼラチン

0.5 x TBE

オートクレーブにより滅菌した5 x
TBE (Tris 54.0 g、ホウ酸 27.5 g、
EDTA 4.7 g) を精製水で10倍希釈

B-3. 薬物投与

リファブチン、リファンピシンを
コーン油に溶解・懸濁させ、ソニケ
ーションを行い再懸濁した後、とも
に 50 mg/kg/day で 4 日間腹腔内投
与した。最終投与の 24 時間後に肝臓
を摘出した。

B-4. 肝からの total RNA の調製

ISOGEN に添付のマニュアルに修
正を加え、以下の方法で肝臓から total
RNA を調製した。肝臓に ISOGEN
を加えてホモジナイズした後、サン
プルチューブに分注し、クロロホル
ムを加えて激しく 15 秒間攪拌した。
室温にて 3 分間放置した後、4°C、
14,000 g で 15 分間遠心分離した。
上清を別のチューブに採取し、イソ

プロパノールを加えて室温にて 8 分
間放置した後、4°C、14,000 g で 10
分間遠心分離した。沈殿を 75%エタ
ノールで洗浄した。この沈殿を乾燥
させた後、DEPC 処理精製水に溶解
させ、260 nm における吸光度を測
定することにより定量した。同時に
300 nm の吸収を基準として 280 nm
と 260 nm の吸光度を測定し、その
比をタンパク質混入の有無の指標と
した。

B-5. RT-PCR 法による mRNA 発現 解析

B-5-1. Real-time PCR による mRNA 発現解析

B-4 より得られた total RNA から
cDNA を用いて以下の方法により
real-time PCR を行った。cDNA 溶
液を 1 μ L、5 x SGI 緩衝液を 5 μ L、
10 μ M センスプライマーおよびアン
チセンスプライマーをそれぞれ 1 μ L
を加えて滅菌精製水を用いて全量を
25 μ L とした。Smart cyclor

(TaKaRa) を用いて PCR を行った。
目的の産物が増幅していることを確
認するため、反応終了後にアガロー
スゲルで電気泳動した。本章で使用
したヒト CYP およびマウス Cyp プ
ライマーの配列を Table 2 に示す。
なおヒト CYP3A4、ヒト CYP3A5、
マウス Cyp3a11、マウス Cyp3a13

mRNA 発現解析は本方法により行った。予備検討の結果より、ヒト CYP およびマウス Cyp プライマーは交差反応を示さないことを確認した。

B-5-2. Taq-Man™プローブ法による mRNA 発現解析

CYP3A、Cyp3a 以外の CYP 分子種、トランスポーターおよび核内レセプターの mRNA 発現定量は大塚製薬工場株式会社（東京）に依頼し、Taq-Man™プローブ法にて行った（Nishimura et al., 2002）。予備検討の結果より、使用したプライマーはマウスと交差反応を示さないことを確認した。

B-6. 肝ミクロソームの調製

採取した肝に、肝重量の 3 倍容のホモジナイズ緩衝液を加え、冷却下ポリトロンにより細切後、テフロンホモジナイザーにてホモジナイズした。ホモジネートを 9,000 g、4°C で 15 分間遠心分離後、上清をさらに 105,000 g、4°C で 90 分間遠心分離した。沈殿物にホモジナイズ緩衝液を加えてホモジナイズ後、105,000 g、4°C で 60 分間遠心分離した。得られた沈殿物を肝重量の 1 倍容の TGE 緩衝液に懸濁し、Bradford 法

（Bradford, 1976）に従い、タンパク定量後、使用時まで -80°C で保存

した。

B-7. SDS-PAGE およびウエスタンブロット分析

Laemmli ら（1970）および Towbin ら（1979）の方法に修正を加え、以下の方法により測定した。肝ミクロソームおよび肝サイトゾルにサンプル処理液と 2-メルカプトエタノールを加えた後、100°C で 3 分間煮沸し、ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行った。SDS-PAGE 後、Immobilon 膜（Millipore, Billerica, MA）に電気的に転写した。1 次抗体、2 次抗体、3 次抗体反応後の発色は 0.06% の 3,3'-ジアミノベンチジン四塩酸塩を用い、GS-700 デンシトメーター（Bio-Rad）にて定量した。予備検討の結果より、ヒト CYP 抗体は本実験条件においてマウス Cyp と交差反応を示さないことを確認した。

B-8. 酵素活性測定

B-8-1. テストステロン 6β-水酸化酵素活性の測定

テストステロン 6β-水酸化酵素活性（TESOH）は Arlotto らの方法（1991）に修正を加え、以下の方法により測定した。反応溶液は 100 mM リン酸カリウム緩衝液（pH 7.4）、0.2 mg/ml ミクロソームタンパク、50

μM テストステロン、NADPH 生成系とした。37°C での反応終了後、ジクロロメタン 1.5 mL を添加して激しく攪拌した。650 g で 10 分間遠心分離後、ジクロロメタン相を別の試験管に移し、窒素気流下蒸発乾固させた。残渣を 200 μL の移動相に溶解させ、そのうち 100 μL を HPLC に注入して分析した。HPLC による分析には、ポンプ（日立製作所, Tokyo, Japan, L-7100）、オートサンプラー（日立製作所, L-7200）、カラムオープン（島津製作所, Kyoto, Japan, CTO-6A）、UV 検出器（日立製作所, L-7405）インテグレーター（日立製作所, D-2000）を用いて、溶離液を 240 nm でモニターした。カラムは Mightysil RP-18 GP（関東化学, Tokyo, Japan）を用いた。移動相は 50 %メタノール/10 mM リン酸カリウム緩衝液（pH 7.4）とした。流速は 1.0 mL/min、カラム温度は 35°C とした。

B-8-2. デキサメタゾン 6-水酸化酵素活性の測定

デキサメタゾン 6-水酸化酵素活性 (DEXOH) は Gentile ら (1996) および Tomlinson ら (1997) の方法に修正を加えて以下のように測定した。反応溶液は 100 mM リン酸カ

リウム緩衝液 (pH 7.4)、0.2 mg/ml ミクロソームタンパク、100 μM デキサメタゾン、NADPH 生成系とした。37°C での反応終了後、酢酸エチルを添加することにより反応を停止した。650 g で 10 分間遠心分離後、酢酸エチル相を別の試験管に移し、窒素気流下蒸発乾固させた。残渣を 200 μL の移動相に溶解させ、そのうち 100 μL を HPLC に注入して分析した。6-水酸化デキサメタゾンの標品を入手できなかったため DEXOH 解析時にはデキサメタゾンのモル吸光係数を用いた。HPLC による分析には、L-7100 ポンプ、L-7200 オートサンプラー、Uni-3 ノイズベースクリーン（ユニオン, Gunma, Japan）、CTO-6A カラムオープン、L-7405 UV 検出器、D-2000 インテグレーターを用いて、溶離液を 423 nm でモニターした。カラムは Mightysil RP-8（関東化学）を用いた。移動相 A はアセトニトリル：0.018%ギ酸=18：82 (v/v)、移動相 B はアセトニトリル：0.018%ギ酸=40：60 (v/v) とし、移動相 B：0 (0-15 分)、100 (15-30 分)、0 (30-40 分) のグラジエント条件で分離した。流速は 1.0 mL/min、カラム温度は 35°C とした。

Table 2. Sequences of the primers used in the present study.

Primer	Sequence
CYP1A2-S ^a	5'-TGTTC AAGCACAGCAAGAAGG-3'
CYP1A2-AS ^a	5'-TGCTCCAAAGACGTCATTGAC-3'
CYP1A2-probe ^a	5'-CTAGAGCCAGCGGCAACCTCATCCCA-3'
CYP2A6-S ^a	5'-TTTTGGTGGCCTTGCTGGT-3'
CYP2A6-AS ^a	5'-GGAGTTGTACATCTGCTCTGTGTTCA-3'
CYP2A6-probe ^a	5'-TGCCTGACTGTGATGGTCTTGATGTCTGTT-3'
CYP2C8-S ^a	5'-GGACTTTATCGATTGCTTCCTG-3'
CYP2C8-AS ^a	5'-CCATATCTCAGAGTGGTGCTTG-3'
CYP2C8-probe ^a	5'-TTGGCACTGTAGCTGATCTATTTGTTGCTGGA-3'
CYP2C9-S ^a	5'-GACATGAACAACCCTCAGGACTTT-3'
CYP2C9-AS ^a	5'-TGCTTGTCGTCTCTGTCCCA-3'
CYP2C9-probe ^a	5'-AAAACACTGCAGTTGACTTGTTTGGAGC-5'
CYP2C19-S ^a	5'-GAACACCAAGAATCGATGGACA-3'
CYP2C19-AS ^a	5'-TCAGCAGGAGAAGGAGAGCATA-3'
CYP2C19-probe ^a	5'-TAATCACTGCAGCTGACTTACTTGGAGCTGGG-3'
CYP2D6-S ^a	5'-CCTACGCTTCCAAAAGGCTTT-3'
CYP2D6-AS ^a	5'-AGAGAACAGGTCAGCCACCACT-3'
CYP2D6-probe ^a	5'-CAGCTGGATGAGCTGCTAACTGAGCACA-3'
CYP3A4-S ^b	5'-CCAAGCTATGCTCTTCACCG-3'
CYP3A4-AS ^b	5'-TCAGGCTCCACTTACGGTGC-3'
CYP3A5-S ^b	5'-AGTGTCTTTCCCTTCACTTTA-3'
CYP3A5-AS ^b	5'-TTCAACATCTTTCTTGCAAGT-3'
CYP3A7-S ^c	5'-CCTTACCCCAATTCTTGAAGCA-3'
CYP3A7-AS ^c	5'-TCCAGATCAGACAGAGCTTTGTG-3'
CYP3A7-probe ^c	5'-AGTCTTTTGAATTCTGAGAGTCAATCATCAGC-3'
Cyp3a11-S	5'-TATATCCCCAAAGGGTCAACA-3'
Cyp3a11-AS	5'-GAAGGAGAAGTTCTGCATAAT-3'
Cyp3a13-S	5'-GGTGAAGGAATGTTACTCTAC-3'
Cyp3a13-AS	5'-GTGGGCTTTCCTTCTCCTAA-3'
-----	-----
ABCB1-S ^d	5'-AGGAAGACATGACCAGGTATGC-3'
ABCB1-AS ^d	5'-CCAACATCGTGCACATCAAAC-3'
ABCB1-probe ^d	5'-CCTGGCAGCTGGAAGACAAATACACAA-3'
ABCC2-S ^d	5'-ACGGACAGCTATCATGGCTTCT-3'
ABCC2-AS ^d	5'-TGGTACATCCATGAGCTTCT-3'
ABCC2-probe ^d	5'-ACCCTATCCAACCTGGCCAGGAAGGAGT-3'
AHR-S	5'-GGTTGTGATGCCAAAGGAAG-3'
AHR-AS	5'-ATCATTCCGGATATGGGACTCG-3'
AHR-probe	5'-AGCTGTGCACGAGAGGCTCAGGTTATCA-3'
CAR-S ^d	5'-CATGGGCACCATGTTTGAAC-3'
CAR-AS ^d	5'-AGGGCTGGTGATGGATGAA-3'
CAR-probe ^d	5'-TGTGCAGTTTAGGCCTCCAGCTCATC-3'
LXR α -S ^d	5'-AGACTTTGCCAAAGCAGGG-3'
LXR α -AS ^d	5'-ATGAGCAAGGCAAACCTCGG-3'
LXR α -probe ^d	5'-TTCATCAACCCCATCTTCGAGTTCTCC-3'
HNF4 α -S ^d	5'-AAGACAAGAGGAACCAAGTGCC-3'
HNF4 α -AS ^d	5'-GGCTTCCTTCTTCATGCCA-3'
HNF4 α -probe ^d	5'-CTACTGCAGGCTCAAGAAATGCTTCCG-3'
RXR α -S ^d	5'-TCAATGGCGTCTCAAGGTC-3'
RXR α -AS ^d	5'-TTGCCTGAGGAGCGGTCC-3'
RXR α -probe ^d	5'-CCGCCCACCCCTCAGGAAACAT-3'
RXR β -S ^d	5'-TCTCCCTTTCAGTCATCAGTTC-3'
RXR β -AS ^d	5'-CAGGGAGTGACACTGTTGAGTTAA-3'
RXR β -probe ^d	5'-CCTGGTCTGCCCCCTCCAGCT-3'

S: Sense primer, AS: Anti-sense primer.

^a From Nishimura et al. (2002)

^b From Katoh et al. (2004)

^c From Furukawa et al. (2004)

^d From Nishimura et al. (2004)

C. 研究結果

C-1. リファブチン投与によるマウス Cyp3a 発現に及ぼす影響

先ず始めにリファブチンがマウスの Cyp3a を誘導しないことを uPA^{+/-}/SCID マウスおよび uPA^{-/-}/SCID マウスを用いて mRNA、タンパク、酵素活性レベルで検証した。mRNA 発現量はマウス GAPDH (mGAPDH) mRNA 量で補正した。

C-1-1. マウス Cyp3a mRNA への影響

Fig. 2A および 2B にマウス Cyp3a11 および Cyp3a13 mRNA 発現量の定量結果を示す。uPA^{+/-}/SCID マウスにおいて、薬物未処置群と比較してリファブチン投与群でマウス Cyp3a11 mRNA 量、マウス Cyp3a13 mRNA 量ともに顕著な増加は認められなかった。一方、リファンピシン投与群においては、薬物未処置群と比較してマウス Cyp3a11 mRNA 量は 1.7 倍 ($P < 0.05$)、Cyp3a13 mRNA 量は 1.7 倍の増加が認められた。

C-1-2. マウス Cyp3a タンパクへの影響

Fig. 2C にマウス Cyp3a11 タンパ

クの定量結果を示す。マウス Cyp3a11 タンパクはリファブチン投与群では薬物未処置群と比較して、uPA^{+/-}/SCID マウスで 1.4 倍 ($P < 0.05$)、uPA^{-/-}/SCID マウスで 1.7 倍 ($P < 0.01$) の増加が認められた。一方、リファンピシン投与群においては uPA^{+/-}/SCID マウスで 2.9 倍 ($P < 0.001$)、uPA^{-/-}/SCID マウスで 3.5 倍 ($P < 0.001$) の増加が認められた。

C-1-3. マウス Cyp3a 酵素活性への影響

Fig. 2D および 2E に、TESOH および DEXOH の測定結果を示す。TESOH に関しては、両系統においてリファブチン投与群では酵素活性の増加は認められなかった。リファンピシン投与群においては薬物未処置群と比較して、uPA^{+/-}/SCID マウスで 2.0 倍 ($P < 0.01$)、uPA^{-/-}/SCID マウスにおいては 2.3 倍 ($P < 0.05$) の増加が認められた。DEXOH に関しては、両系統においてリファブチン投与群、リファンピシン投与群ともに酵素活性の増加は認められなかった。

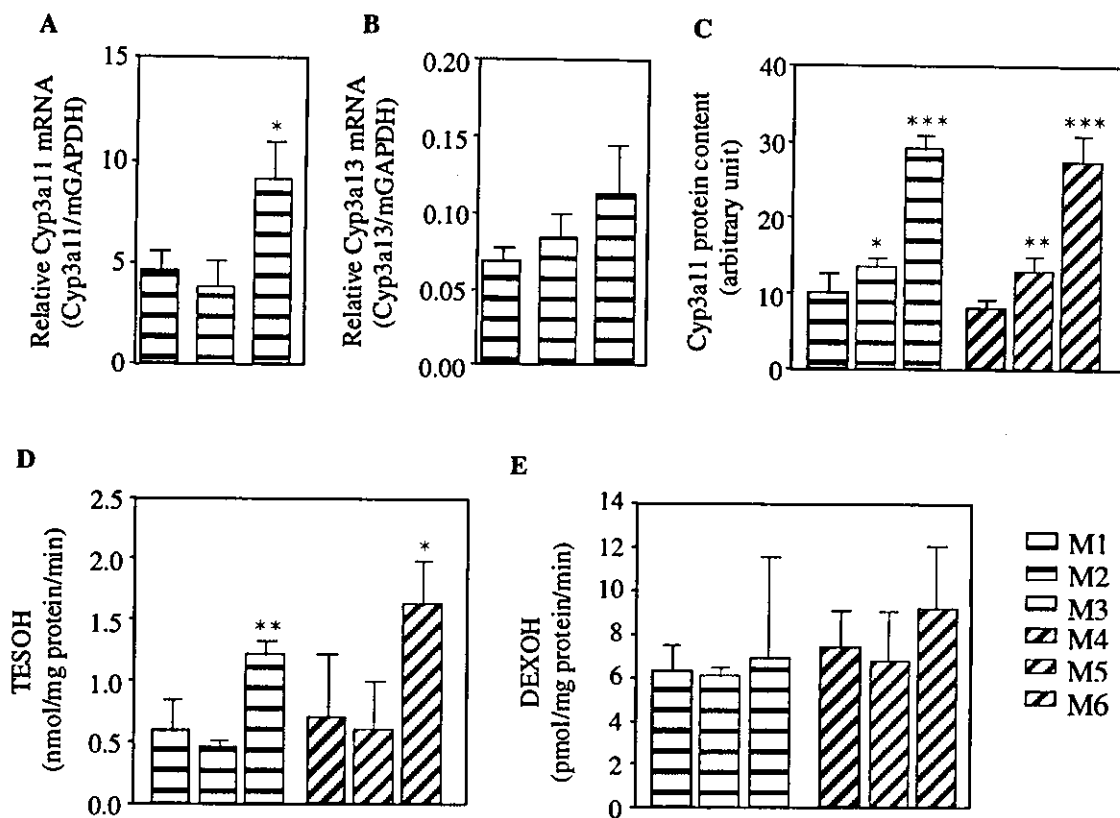


Fig. 2. Changes of murine Cyp3a expression by rifabutin and rifampicin in $uPA^{+/-}/SCID$ mice and $uPA^{-/-}/SCID$ mice.

The expression levels of murine Cyp3a11 mRNA (A), murine Cyp3a13 mRNA (B), murine Cyp3a11 protein (C), TESO2H (D) and DEXO2H (E) in a rifabutin- or a rifampicin-treated $uPA^{+/-}/SCID$ mouse and $uPA^{-/-}/SCID$ mouse were compared to those in a non-treated mouse. The concentration of testosterone and dexamethasone were 50 μM and 100 μM , respectively. Each column represents the mean \pm SD ($n=4$ or 5). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

M1: Non-treated $uPA^{+/-}/SCID$ mouse, M2: Rifabutin-treated $uPA^{+/-}/SCID$ mouse, M3: Rifampicin-treated $uPA^{+/-}/SCID$ mouse, M4: Non-treated $uPA^{-/-}/SCID$ mouse, M5: Rifabutin-treated $uPA^{-/-}/SCID$ mouse, M6: Rifampicin-treated $uPA^{-/-}/SCID$ mouse.

C-2. リファブチン投与ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト CYP3A への影響

本章におけるリファブチンおよびリファンピシンによる各 CYP 分子種の mRNA、タンパク、酵素活性における誘導率は、最も近似した hAlb 濃度を示した薬物未処置のキメラマウスを対照として算出した。mRNA 発現量はヒト GAPDH (hGAPDH) mRNA 量で補正した。

C-2-1. ヒト CYP3A4 の誘導

C-2-1-1. ヒト CYP3A4 mRNA への影響

Fig. 3A にヒト CYP3A4 mRNA 発現量の定量結果を示す。ヒト CYP3A4 mRNA 発現量はリファブチン投与群において平均で 8.6 倍 (5.6-13.2 倍)、リファンピシン投与群において平均で 9.2 倍 (5.5-12.2 倍) の増加が認められた。平均の誘導率で比較すると、リファンピシンがリファブチン

の約 1.1 倍、ヒト CYP3A4 mRNA を誘導することが明らかとなった。

C-2-1-2. ヒト CYP3A4 タンパクへの影響

Fig. 3B にヒト CYP3A4 タンパク発現量の定量結果を示す。ヒト CYP3A4 タンパク発現量はリファブチン投与群において平均で 3.5 倍 (2.7-4.3 倍) の誘導が認められた。リファンピシン投与群においては、キメラマウス No.10 では対照としたキメラマウス No.1 におけるヒト CYP3A4 タンパク発現量が低かったため、見かけの誘導率が約 29 倍と高くなったが、その他のキメラマウスでは平均で 11.9 倍 (10.6-14.3 倍) の誘導が認められた。平均の誘導率を用いて比較すると、リファンピシンがリファブチンの約 3.4 倍、ヒト CYP3A4 タンパクを誘導することが明らかになった。

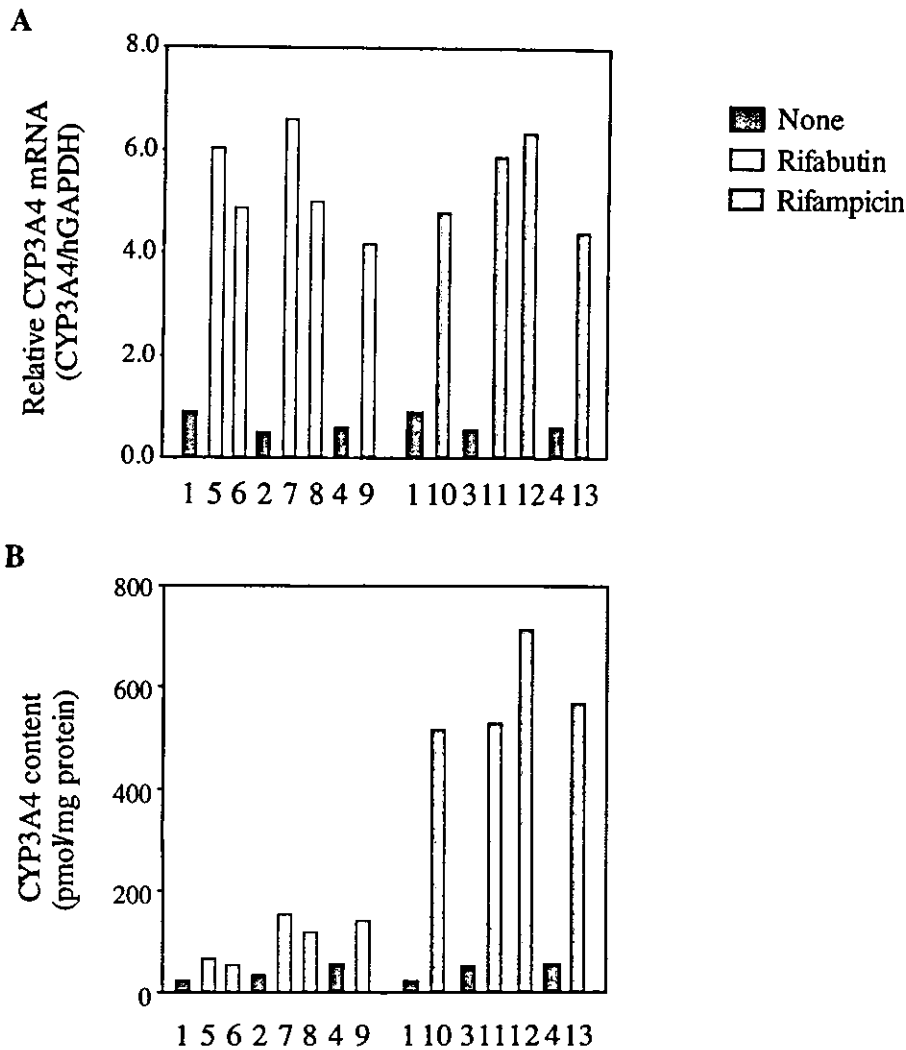


Fig. 3. Changes of human CYP3A4 expression by rifabutin and rifampicin in chimeric mice.

The expression levels of human CYP3A4 mRNA (A) and protein (B) in a rifabutin- or a rifampicin-treated chimeric mouse were compared to those in a non-treated chimeric mouse with a similar hAlb concentration.

C-2-1-3. テストステロン 6β-水酸化酵素活性

Fig. 4A に TESO_H の測定結果を示す。キメラマウスにおいて本酵素活性は薬物未処置群と比較してリファブチン投与群において平均で 3.7 倍

(2.0-5.6 倍)、リファンピシン投与群において平均で 3.9 倍 (3.0-5.5 倍) の誘導が認められた。平均の誘導率で比較すると、リファンピシンがリファブチンの約 1.1 倍、TESO_H を誘導することが明らかになった。

C-2-1-4. デキサメタゾン 6-水酸化酵素活性

Fig. 4B に DEXOH の測定結果を示す。キメラマウスにおいて本酵素活性は薬物未処置群と比較して、リファブチン投与群において平均で 3.5

倍 (1.8-5.1 倍)、リファンピシン投与群において平均で 4.5 倍 (3.2-6.5 倍) の誘導が認められた。平均の誘導率で比較すると、リファンピシンがリファブチンの約 1.3 倍、DEXOH を誘導することが明らかになった。

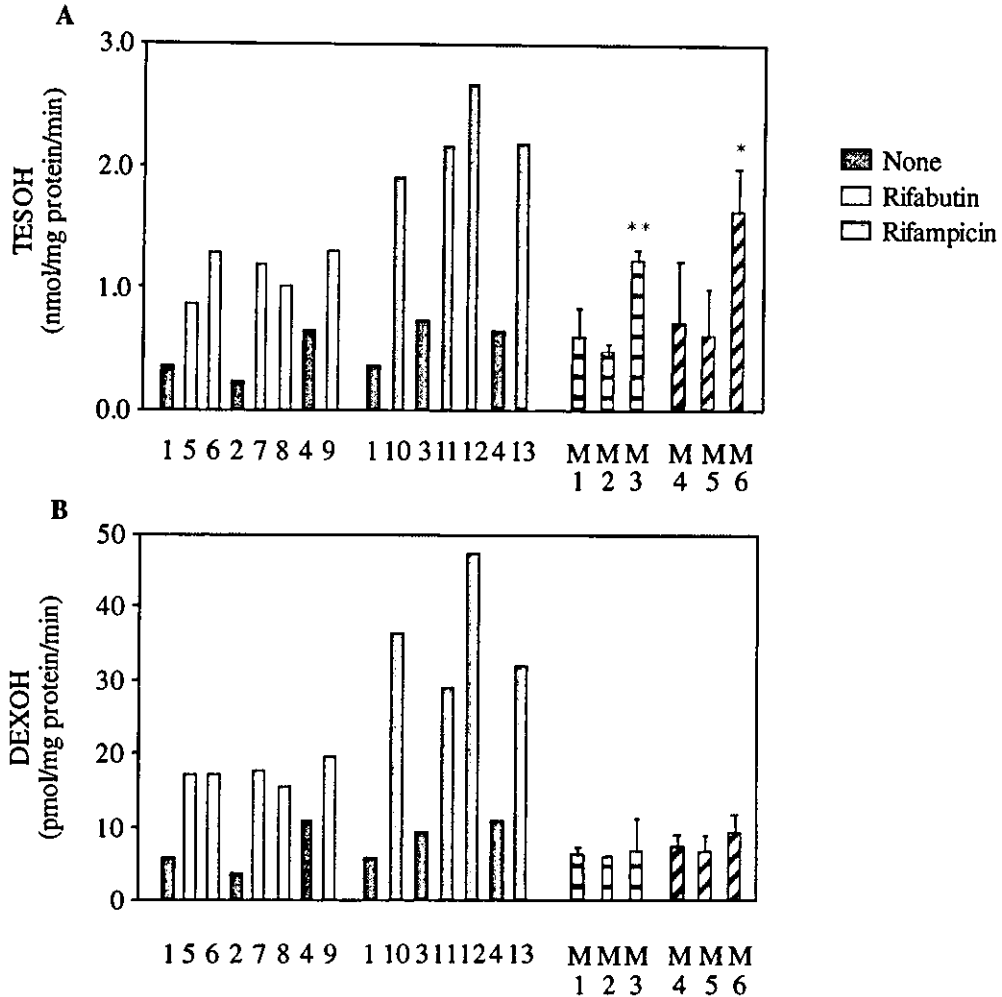


Fig. 4. Changes of human CYP3A4 expression by rifabutin and rifampicin in chimeric mice.

TESOH (A) and DEXOH (B) in a rifabutin- or a rifampicin-treated chimeric mouse were compared to those in a non-treated chimeric mouse with a similar hAlb concentration. The concentration of testosterone and dexamethasone were 50 μ M and 100 μ M, respectively. The columns of M1, M2, M3, M4, M5 and M6 represent the mean \pm SD (n=4 or 5).

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

M1: Non-treated uPA^{+/-}/SCID mouse, M2: Rifabutin-treated uPA^{+/-}/SCID mouse, M3: Rifampicin-treated uPA^{+/-}/SCID mouse, M4: Non-treated uPA^{-/-}/SCID mouse, M5: Rifabutin-treated uPA^{-/-}/SCID mouse, M6: Rifampicin-treated uPA^{-/-}/SCID mouse.

C-2-2. ヒト CYP3A5 に及ぼす影響

Fig. 5A にヒト CYP3A5 mRNA 発現量の定量結果を示す。リファブチン、リファンピシン投与群ともに、薬物未処置群との顕著な差が認められなかった。

Fig. 5B にヒト CYP3A7 mRNA 発現量の定量結果を示す。ヒト CYP3A7 mRNA 発現量はリファブチン投与群において平均で 2.3 倍 (1.6-3.0 倍)、リファンピシン投与群において平均で 2.1 倍 (0.9-4.0 倍) の増加が認められた。

C-2-3. ヒト CYP3A7 に及ぼす影響

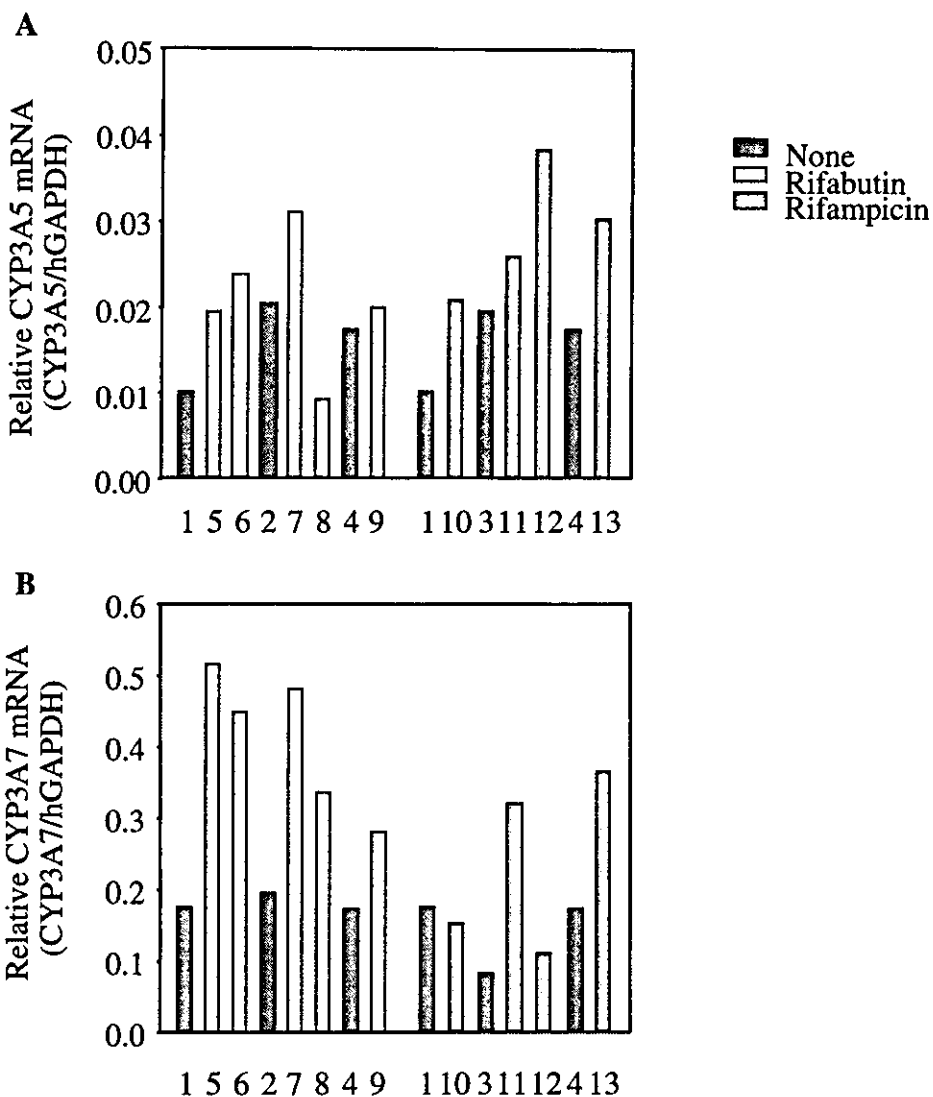


Fig. 5. Changes of human CYP3A5 and CYP3A7 mRNA expression by rifabutin and rifampicin in chimeric mice. The expression levels of human CYP3A5 (A) and CYP3A7 (B) mRNA in a rifabutin- or a rifampicin-treated chimeric mouse were compared to those in a non-treated chimeric mouse with a similar hAlb concentration.

C-3. リファブチン投与ヒト肝細胞キメラマウスにおけるその他のヒト CYP への影響

C-3-1. ヒト CYP2C8 に及ぼす影響

Fig. 6A にヒト CYP2C8 mRNA 発現量の定量結果を示す。ヒト CYP2C8 mRNA 発現量はリファブチン投与群において平均で 2.5 倍 (1.6-3.4 倍)、リファンピシン投与群において平均で 2.7 倍 (0.8-5.9 倍) の増加が認められた。

C-3-2. ヒト CYP2C9 に及ぼす影響

Fig. 6B にヒト CYP2C9 mRNA 発現量の定量結果を示す。ヒト CYP2C9 mRNA 発現量はリファブチン投与群において平均で 1.4 倍 (1.1-1.7 倍)、リファンピシン投与群においては平均で 2.6 倍 (0.5-6.5 倍) の増加が認められた。

C-3-3. ヒト CYP2C19 に及ぼす影響

Fig. 6C にヒト CYP2C19 mRNA 発現量の定量結果を示す。CYP2C19 mRNA 発現量はリファブチン投与群において平均で 2.7 倍 (1.7-3.5 倍) の増加が認められた。リファンピシン投与群においては大きなばらつき

が認められた。

C-3-4. ヒト CYP1A2 に及ぼす影響

Fig. 7A にヒト CYP1A2 mRNA 発現量の定量結果を示す。ヒト CYP1A2 mRNA 発現量はリファブチン、リファンピシン投与群ともに、薬物未処置群との顕著な差が認められなかった。

C-3-5. ヒト CYP2A6 に及ぼす影響

Fig. 7B にヒト CYP2A6 mRNA 発現量の定量結果を示す。リファブチン投与群においては mRNA 発現量に増加は認められなかった。リファンピシン群においては平均で 3.2 倍 (1.3-4.2 倍) の増加が認められた。

C-3-6. ヒト CYP2D6 に及ぼす影響

Fig. 7C にヒト CYP2D6 mRNA 発現量の定量結果を示す。ヒト CYP2D6 mRNA 発現量はリファブチン、リファンピシン投与群ともに、薬物未処置群との顕著な差が認められなかった。

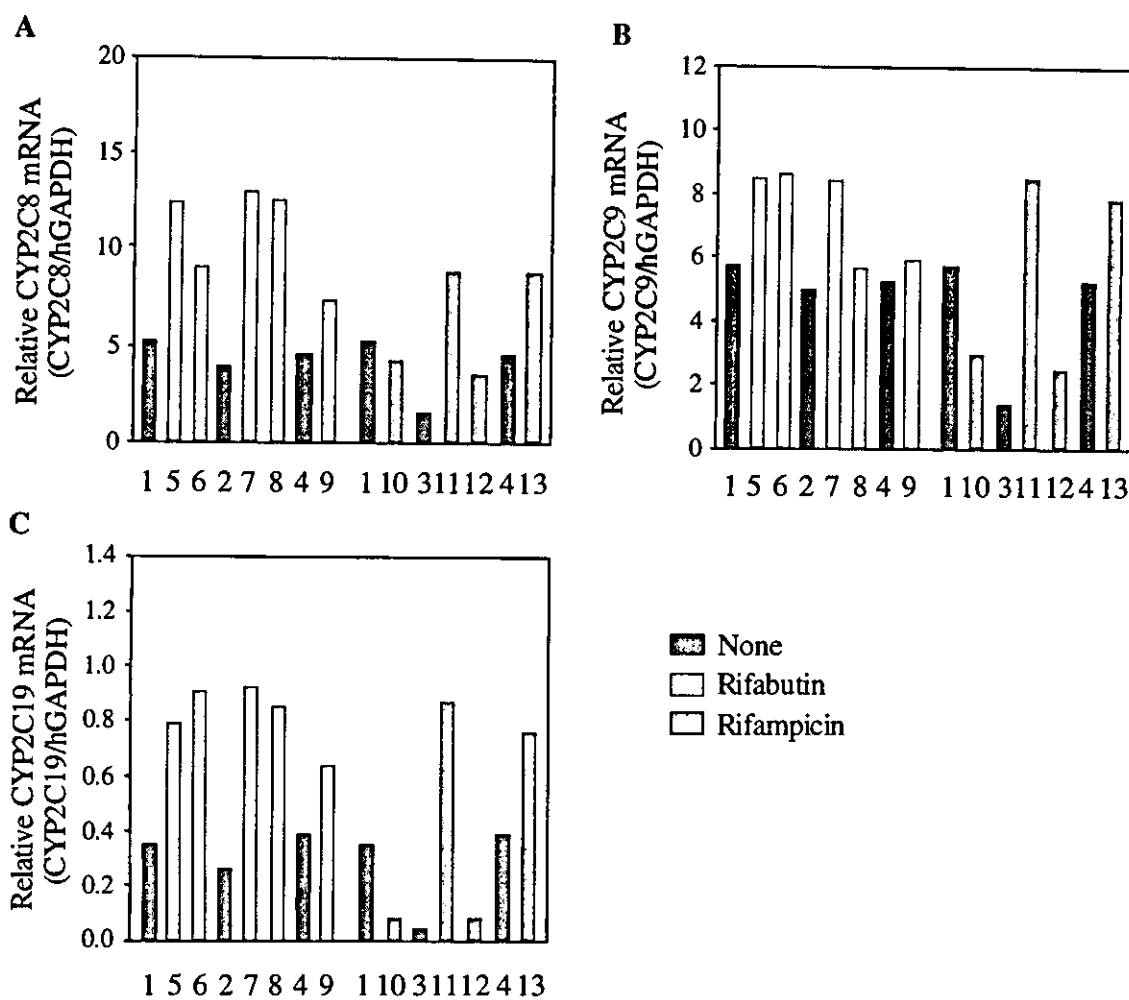


Fig. 6. Changes of human CYP2C8, CYP2C9 and CYP2C19 mRNA expression by rifabutin and rifampicin in chimeric mice. The expression levels of human CYP2C8 (A), CYP2C9 (B) and CYP2C19 (C) mRNA in a rifabutin- or a rifampicin-treated chimeric mouse were compared to those in a non-treated chimeric mouse with a similar hAlb concentration.

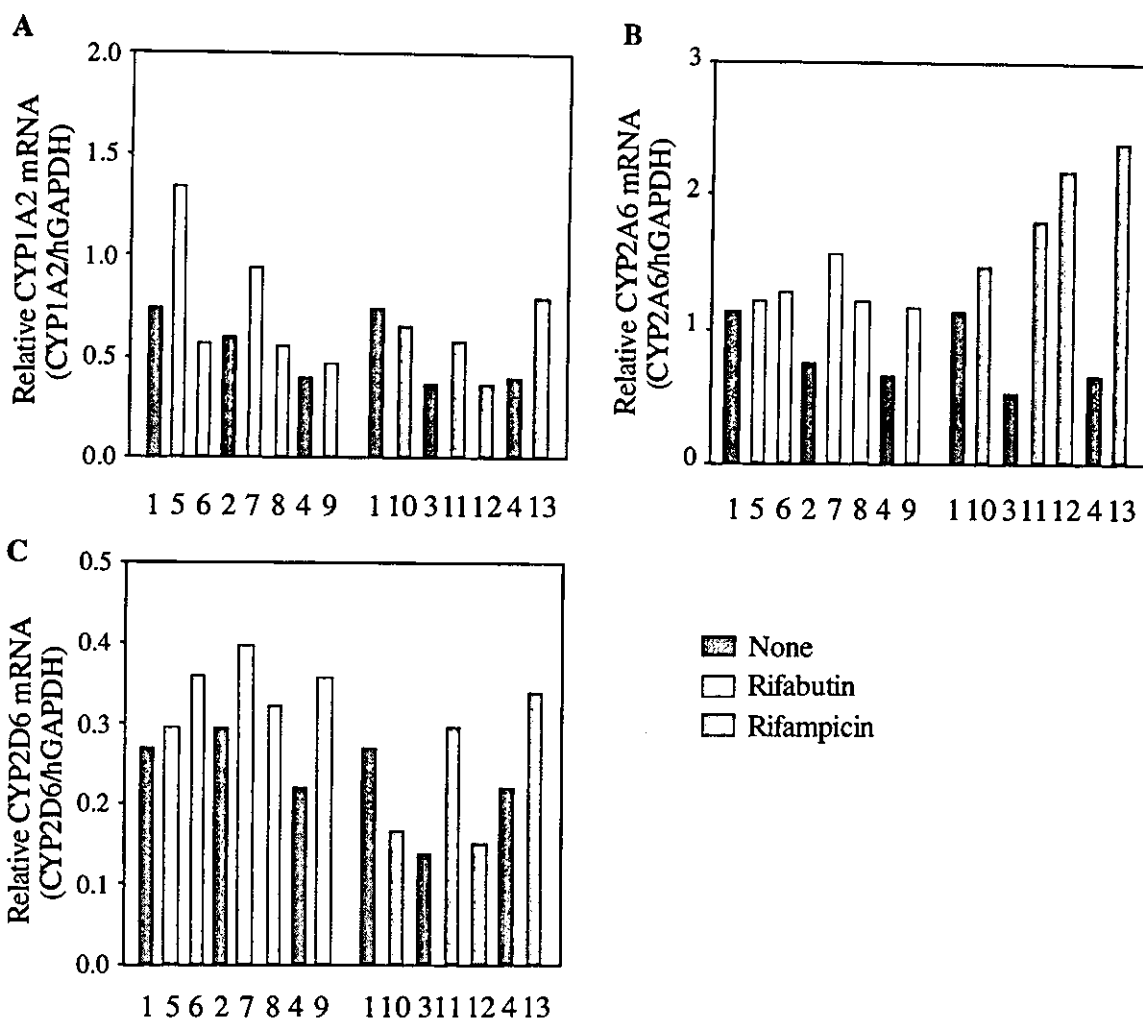


Fig. 7. Changes of human CYP1A2, CYP2A6 and CYP2D6 mRNA expression by rifabutin and rifampicin in chimeric mice. The expression levels of human CYP1A2 (A), CYP2A6 (B) and CYP2D6 (C) mRNA in a rifabutin- or a rifampicin-treated chimeric mouse were compared to those in a non-treated chimeric mouse with a similar hAlb concentration.

C-4. リファブチン投与によるトランスポーターへの影響

C-4-1. ヒト ABCB1 mRNA に及ぼす影響

Fig. 8A にヒト Adenosine triphosphate-binding cassette transporter B1 (ABCB1, P-gp)

mRNA 発現量の定量結果を示す。ヒト ABCB1 mRNA 発現量はリファブチン投与群において 0.9-2.0 倍の変動が認められた。リファンピシチン投与群においては 0.3-4.5 倍の変動であった。

C-4-2. ヒト ABCC2 mRNA に及ぼす影響

Fig. 8B にヒト Adenosine triphosphate-binding cassette transporter C2 (ABCC2, MRP2) mRNA 発現量の定量結果を示す。ヒト ABCC2 mRNA 発現量はリファブチン投与群において 1.0-2.1 倍の変

動が認められた。リファンピシン投与群においては、キメラマウス No. 11 では対照としたキメラマウス No. 3 におけるヒト ABCC2 mRNA 発現量が低かったため、見かけの誘導率が 6.3 倍となったが、その他のキメラマウスにおいては顕著な変動が認められなかった。

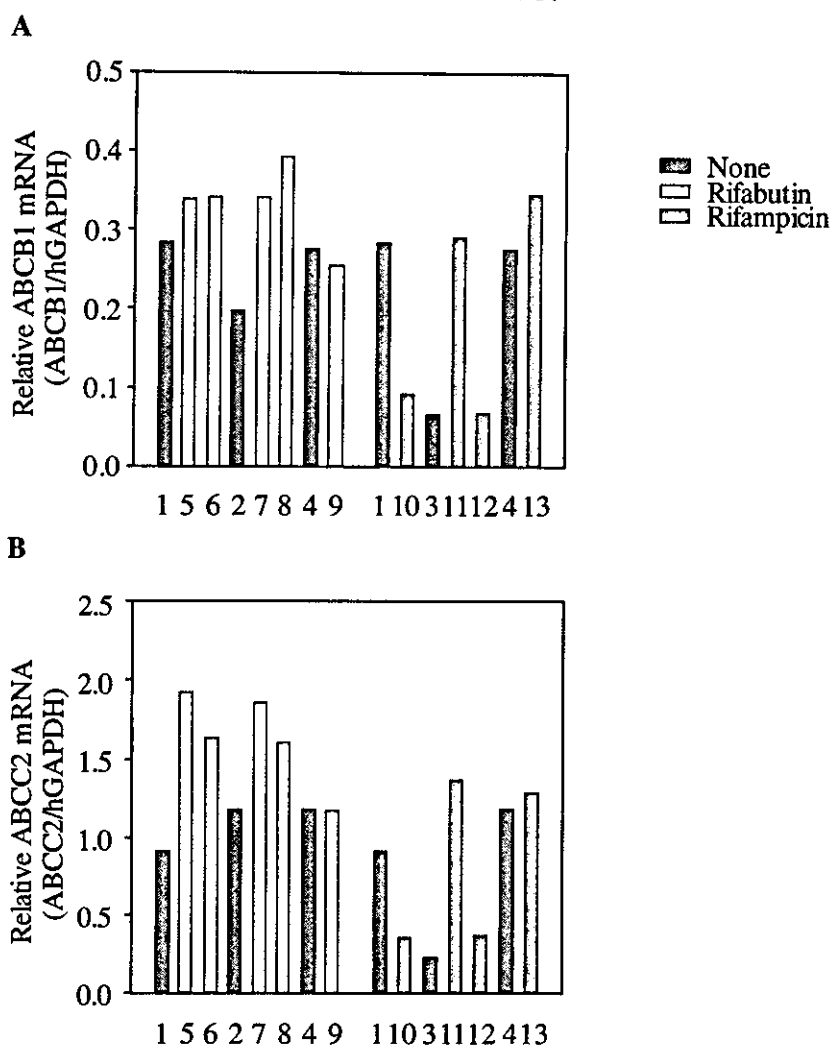


Fig. 8. Changes of human ABCB1 and ABCC2 mRNA expression by rifabutin and rifampicin in chimeric mice. The expression levels of human ABCB1 (A) and ABCC2 (B) mRNA in a rifabutin- or a rifampicin-treated chimeric mouse were compared to those in a non-treated chimeric mouse with a similar hAlb concentration.

C-5. リファブチン投与による核内レセプターへの影響

C-5-1. ヒト CAR mRNA に及ぼす影響

Fig. 9A にヒト Constitutively activated receptor (CAR) mRNA 発現量の定量結果を示す。ヒト CAR mRNA 発現量はリファブチン投与群においては、1.1-1.8 倍、リファンピシン投与群においては 0.5-5.5 倍の変動が認められた。

C-5-2. ヒト AHR mRNA に及ぼす影響

Fig. 9B にヒト Aryl hydrocarbon receptor (AHR) mRNA 発現量の定量結果を示す。ヒト AHR mRNA 発現量は、リファブチン投与群において 0.8-1.5 倍の変動が認められた。リファンピシン投与群に関してはキメラマウス No. 11 で 3.9 倍と高くなったが、その他のキメラマウスでは減少傾向が認められた。

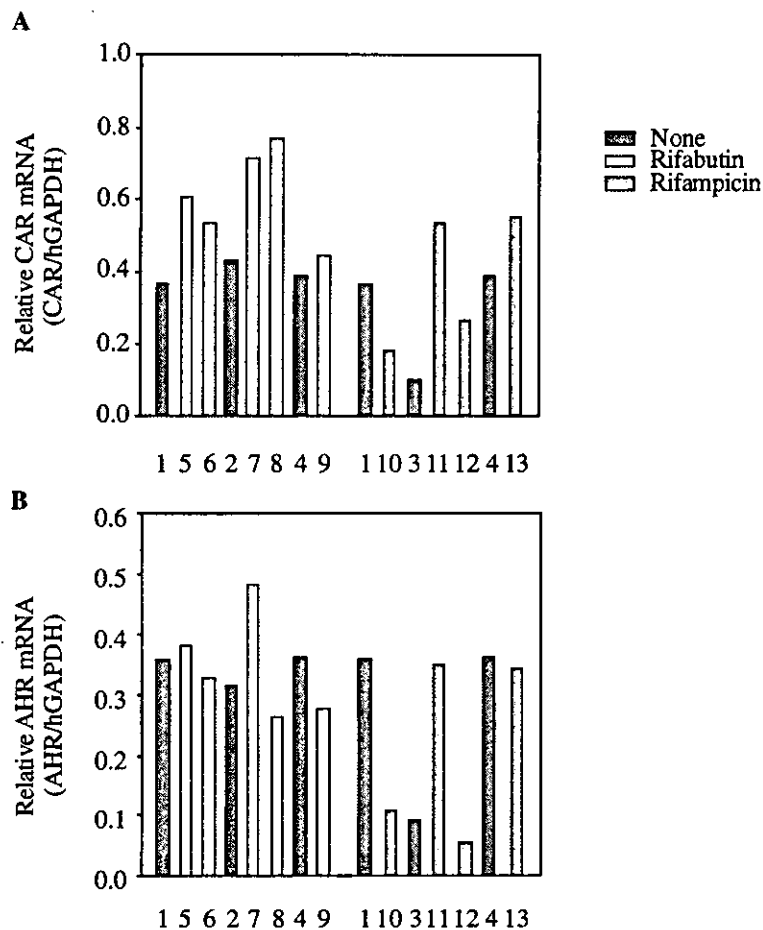


Fig. 9. Changes of human CAR and AHR mRNA expression by rifabutin and rifampicin in chimeric mice. The expression levels of human CAR (A) and AHR (B) mRNA in a rifabutin- or a rifampicin-treated chimeric mouse were compared to those in a non-treated chimeric mouse with a similar hAlb concentration.

C-5-3. ヒト HNF4 α mRNA に及ぼす影響

Fig. 10A にヒト Hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α) mRNA 発現量の定量結果を示す。ヒト HNF4 α mRNA 発現量はリファブチン投与群においては、1.2-1.7 倍の変動が認められた。リファンピシン投与群においては、0.3-6.1 倍の変動が認められた。

C-5-4. ヒト LXR α mRNA に及ぼす影響

Fig. 10B にヒト Liver X receptor α (LXR α) mRNA 発現量の定量結果を示す。ヒト LXR α mRNA 発現量は、リファブチン、リファンピシン投与群ともに、薬物未処置群との顕著な差は認められなかった。

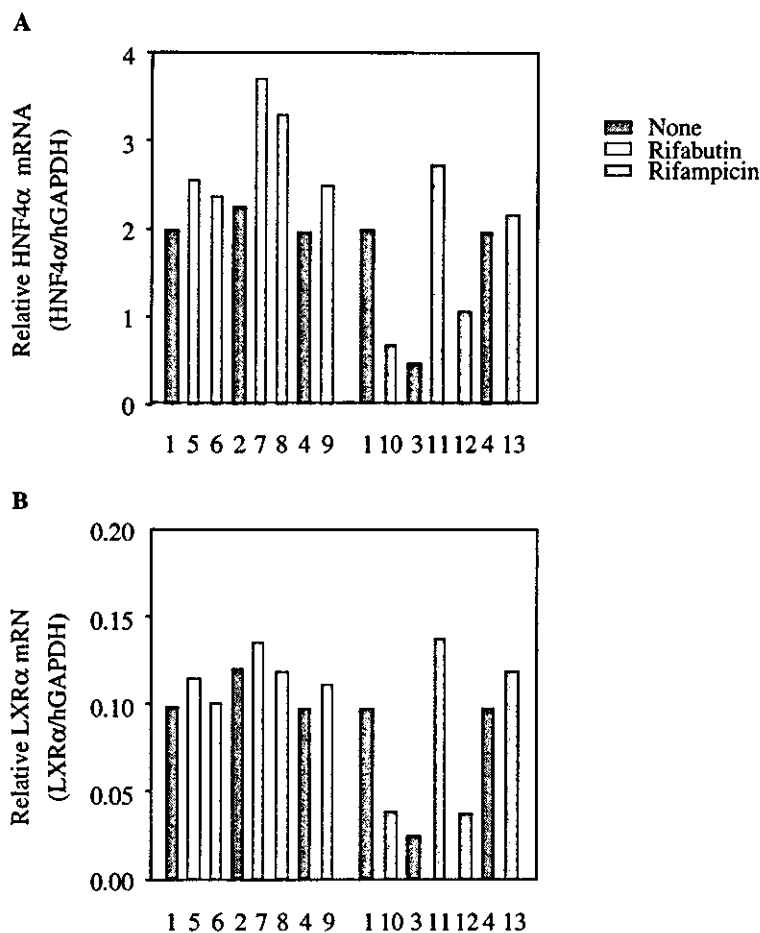
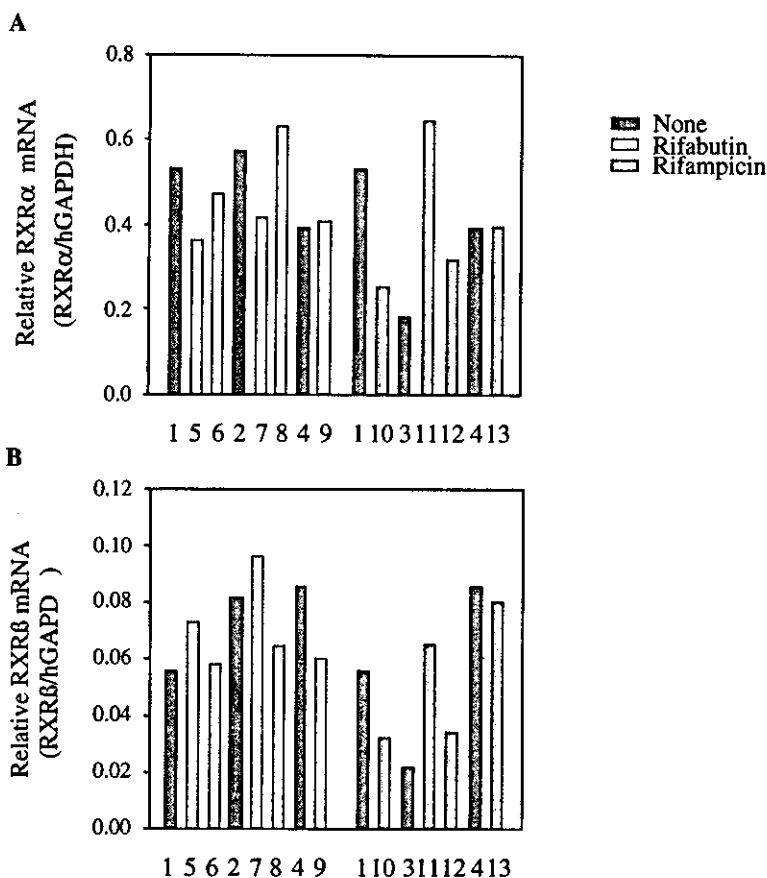


Fig. 10. Changes of human HNF4 α and LXR α mRNA expression by rifabutin and rifampicin in chimeric mice.

The expression levels of human HNF4 α (A) and LXR α (B) mRNA in a rifabutin- or a rifampicin-treated chimeric mouse were compared to those in a non-treated chimeric mouse with a similar hAlb concentration.

C-5-5. ヒト RXR α mRNA に及ぼす影響

Fig. 11A にヒト Retinoid X receptor α (RXR α) mRNA 発現量の定量結果を示す。ヒト RXR α mRNA 発現量は、対照としたキメラマウス No. 3 のヒト RXR α mRNA 発現量が顕著に低かったため、キメラマウス No. 11 で見かけ上増加傾向が見られるが、その他のキメラマウスにおいては両誘導薬による顕著な影響は認められなかった。



C-5-6. ヒト RXR β mRNA に及ぼす影響

Fig. 11B にヒト Retinoid X receptor β (RXR β) mRNA 発現量の定量結果を示す。ヒト RXR β mRNA 発現量は、対照としたキメラマウス No. 3 のヒト RXR β mRNA 発現量が顕著に低かったため、キメラマウス No. 11 で見かけ上増加傾向が見られるが、その他のキメラマウスにおいては両誘導薬による影響は認められなかった。

Fig. 11. Changes of human RXR α and RXR β mRNA expression by rifabutin and rifampicin in chimeric mice. The expression levels of human RXR α (A) and RXR β (B) mRNA in a rifabutin- or a rifampicin-treated chimeric mouse were compared to those in a non-treated chimeric mouse with a similar hAlb concentration.

D. 考察

昨年度までの検討により、CYPの代表的な誘導薬であるリファンピシンと3-MCで、キメラマウスの肝に発現しているヒトCYPが誘導されることをmRNA、タンパク、酵素活性レベルで明らかにした。しかし、リファンピシンと3-MCはマウスのCypも誘導することが現在までに多く報告されている (Strolin and Dostert, 1994; Kocarek et al., 1995; Nishibe et al., 1998)。キメラマウス作製に用いるuPA(+/+)-SCIDマウスは重度の肝不全・免疫不全を呈することから、キメラマウスにおけるマウスCypの寄与は非常に小さいと考えられる。しかし、キメラマウスは100%ヒト肝細胞を有する訳ではないため、ヒトCYP誘導能を詳細に検討するにはヒト特異的誘導薬をキメラマウスに投与する必要があると考えられる。

本章では、ヒト肝細胞キメラマウスにヒトCYP3Aを特異的に誘導するリファブチンを投与し、*in vivo*における各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。

リファブチンに関して、64 mg/kg/dayで5-10日間連続経口投与した場合、マウス肝ミクロソーム

のアミノピリンN-脱メチル化酵素活性の誘導が認められなかったという報告がなされている (Strolin and Dostert, 1994)。まず、マウスにおいてリファブチンでマウスCyp3aが誘導されないことを検証した。キメラマウス作製に用いるuPA(+/+)-SCIDマウスは本研究で使用したキメラマウスと同じ週齢まで生存することは不可能であるため、本章ではuPA^{+/-}/SCIDマウスおよびuPA^{-/-}/SCIDマウスを使用した。この結果、リファブチン投与によりマウスCyp3a11 mRNA量、マウスCyp3a13 mRNA量、TESOHおよびDEXOHに変化が認められなかった。なお、マウスCyp3aタンパクについてはマウスCyp3aに特異的な抗体は市販されていないため、ウサギ抗ラットCYP3A2抗体を使用した。本実験条件では、ウサギ抗ラットCYP3A2抗体と交差する2本のバンドが検出された。雄性マウス肝においては、主にCyp3a11およびCyp3a13が存在し、Cyp3a11がCyp3a13よりも数倍高く発現していることが報告されている (Yanagimoto et al., 1997)。ラットCYP3A2とマウスCyp3a11のアミノ酸相同性が84.9%であること、Cyp3a11はCyp3a13よりも分子量が大きい (Sakuma et al., 2000) ことからリファンピシンで主に誘導

されたのは Cyp3a11 と判断した。Cyp3a13 タンパクもわずかに検出したが、定量限界以下であった。これよりマウスにおいてリファブチンは Cyp3a を誘導しないと考えられる。従って、Fig. 3 で認められたリファブチンを投与したキメラマウスにおける酵素活性増加は、キメラマウスに発現しているヒト CYP によるものであると示唆される。

また、リファンピシンがマウス Cyp を誘導することも検証した。これまでに、雄性 ddY マウスにリファンピシン 100 mg/kg/day、4 日間腹腔内投与すると、Cyp3a11 mRNA が約 50 倍、Cyp3a13 mRNA が約 3 倍増加したと報告されている

(Yanagimoto et al., 1997)。本章での結果はリファンピシンによる Cyp3a11 mRNA 誘導率が Yanagimoto らの報告 (1997) より低かった。また雄性 FVB マウスにリファンピシン 250 mg/kg/day、5 日間経口投与すると Cyp3a11 タンパクが 3.5 ± 1.1 倍増加したと報告されている (Matheny et al., 2004)。本章での結果はリファンピシンにより Cyp3a11 タンパクは uPA^{+/+}/SCID マウスで 2.9 倍、uPA^{-/-}/SCID マウスで 3.5 倍の増加が認められた。マウスの系統や投与量、投与日数が異なるがリファンピシンによりマウス

Cyp3a が誘導されたと考えられる。

マウスにリファブチン 64 mg/kg/day までの用量を 5-10 日連続経口投与した場合、マウス肝における Cyp3a の誘導が認められなかったと報告されている (Strolin and Dostert, 1994)。また、当研究室の以前の検討において、ヒト肝細胞キメラマウスはリファンピシン 50 mg/kg/day を 4 日間連続投与した場合、ヒト CYP3A が誘導されることを確認している。従って、本研究ではリファブチンとリファンピシンのヒト CYP 誘導能を直接比較するために、リファンピシンの誘導条件と同用量に設定した。マウスに対する毒性については、180 mg/kg/day を長期投与した場合に、リファブチンによる癌原性が認められなかったと報告されている (Physicians' desk reference, 2002)。また、リファブチン 30 mg/kg/day を投与するとビリルビン上昇および肝重量増加といった肝障害が認められたが、リファブチンは分布容積が非常に大きく、血漿中からの消失は代謝よりも分布により制限されているため、肝機能の変化がリファブチンの薬物動態に及ぼす影響はないと考えられている。従って、本章で用いた投与量はヒト CYP 誘導能を評価するのに支障を来すものではないと考える。

マウス Cyp3a をリファブチンが誘導しないことを確認後、キメラマウスにおいてリファブチン投与による各 CYP 分子種の変動を検討した。Fig. 3 の結果より、リファブチン投与によりキメラマウスのヒト CYP3A4 mRNA は平均で 8.6 倍、タンパク発現量は平均で 3.5 倍の増加が認められた。また、TESOH および DEXOH はそれぞれ平均で 3.7 倍、平均で 3.5 倍の増加が認められた。TESOH に関しては、誘導条件が異なるが、ヒト培養肝細胞を用いた *in vitro* 実験系において、2.4 倍 (Li et al., 1997)、4 倍 (Reinach et al., 1999) 増加したとの報告がある。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、薬物未処置のキメラマウスとリファブチン投与キメラマウスで hAlb 濃度が正確に同じでないことを考慮しても、CYP3A の誘導においては以前の報告と大きな矛盾はないと思われる。リファブチンの対照薬として用いたリファンピシンのヒト CYP3A4 誘導については、*in vivo*、*in vitro* 実験系において現在まで多数の報告がなされている。Fig. 3 の結果より、リファンピシン投与によりキメラマウスのヒト CYP3A4 mRNA は平均で 9.2 倍、タンパク発現量は平均で 11.9 倍の増加が認められた。また、TESOH および DEXOH はそ

れぞれ平均で 3.9 倍、平均で 4.5 倍の増加が認められた。CYP3A4 mRNA の誘導に関しては、ヒト培養肝細胞を用いた *in vitro* 実験系において 3.4-10 倍 (Li et al., 1997)、8-16 倍 (Nishimura et al., 2002)、2.8-14.8 倍 (Raucy et al., 2002)、4-8 倍 (Garcia et al., 2003) と報告されている。タンパク発現量に関しては、ヒト肝スライスを用いた *in vitro* 実験系において、平均で 3.3 倍 (1.0-18.4 倍) (Edwards et al., 2003)、ヒト肝細胞を用いた実験系で 4.2 倍 (Drocourt et al., 2001)、9.4 倍 (Desai et al., 2002)、1.2-8.2 倍 (Raucy et al., 2002) 増加したとの報告がある。TESOH に関しては、ヒト培養肝細胞を用いた *in vitro* 実験系において、10 倍 (Reinach et al., 1999)、10.5 倍 (Desai et al., 2002)、5-8 倍 (Garcia et al., 2003)、平均で 6.2 倍 (Roymans et al., 2004) 増加したとの報告がある。また *in vivo* においては、Gharaibeh ら (1998) によって Erythromycin Breath Test の測定値がリファンピシンにより 46-123%上昇したと報告されている。リファンピシンにおいても以前の報告と本章における結果に大きな矛盾はないと考えられる。

リファブチンとリファンピシンの CYP3A4 誘導能の強弱に関しては *in*