

vivo、in vitroにおいて報告がなされている。健常者にリファブチン 300 mg/day およびリファンピシン 600 mg/day を 7 日間連続投与すると、尿中 6 $\beta$ -hydroxycortisol 排泄量がリファンピシンで 274%、リファブチンで 26%増加したという報告がある (Perucca et al., 1988)。また、ヒト培養肝細胞を用いた実験系で TESOH がリファブチン処置により 4 倍、リファンピシン処置により 10 倍増加したと報告されている (Reinach et al., 1999)。誘導条件が異なるが Li ら (1997) によるとそれぞれ 2.4 倍、3.4-10 倍と報告されている。本章の結果は、キメラマウスの CYP3A 誘導能は mRNA、タンパク、活性レベルと全てにおいてリファブチンはリファンピシンよりも弱いことが示唆され、ヒトにおける報告と一致した。キメラマウスは、誘導薬に対する反応性はヒトと同じ傾向を示すと考えられる。

ヒト CYP3A subfamily には CYP3A4 以外にも CYP3A5、CYP3A7 が存在する。Fig. 5 より、ヒト CYP3A5 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。キメラマウスおよびドナーについて CYP3A5 遺伝子の genotyping を行った結果、

CYP3A5\*3 のホモ接合体であったと報告されている (Kato et al., 2004)。これはイントロン 3 の A6986G の変異であり、splicing defect により分子量が小さく機能を有しないタンパクを産生する。リファブチンに関しては CYP3A5 に関する報告が現在までになされていないが、CYP3A5 の誘導の有無に関しては更なる検討が必要であろう。

CYP3A7 は胎児ヒト肝から単離された分子種であり胎児に特異的な CYP3A 分子種であると考えられていた。しかし、白人成人健常者の 54% (Schuetz et al., 1994)、88% (Greuet et al., 1996)、日本人成人肝癌患者 (Tateishi et al., 1999) の肝において CYP3A7 mRNA の発現が見られたという報告から、成人肝においても発現量は非常に低いものの存在することが明らかにされた。さらに成人肝に発現する CYP3A7 は CYP3A4 と同様、リファンピシンにより mRNA レベルで誘導されることを、Greuet ら (1996) および Schuetz ら (1994) がヒト培養肝細胞を用いた実験系で報告し、Usui ら (2003) はヒト肝癌由来 HepG2 細胞を用いた実験系で約 2.4 倍の誘導が認められたことを報告している。本章の結果よりヒト肝細胞キメラマウスの肝においてもヒト CYP3A7 の発現が認め

られ、リファンピシン投与により平均で 2.1 倍 (0.9-4.0 倍) の mRNA の増加が認められた。これは Usui ら (2003) の報告と大きな矛盾はない。リファブチンの CYP3A7 の誘導に関して現在まで報告されていないが mRNA レベルで平均で 2.3 倍 (1.6-3.0 倍) の誘導が認められた。

CYP3A 以外の分子種に関しては CYP1A2 において、リファブチン投与により健常者において、テオフィリンのクリアランスや AUC に有意な差が見られなかったと報告されており (Gillum et al., 1996)、CYP1A2 を誘導しないと考えられる。本章の結果は mRNA レベルであるがリファブチンは CYP1A2 を誘導しないことが示唆された。リファンピシンについては、CYP1A2 を誘導しないことが mRNA レベル (Nishimura et al., 2002)、タンパク発現レベル、CYP1A2 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 (Meunier et al., 2000) において報告されている。本章の結果は以前の結果と矛盾しないものであった。

本章において、リファブチンとリファンピシンは誘導の強さに差があるものの同じ CYP 分子種を誘導することが mRNA レベルで認められたが、興味深いことに CYP2A6 の誘導に関しては、リファンピシンは誘導する

がリファブチンは誘導しないという結果が認められた。CYP2A6 はリファンピシンの他にフェノバルビタールでも誘導されることから PXR、CAR、RXR が転写活性化に関与する可能性が考えられるが、CYP2A6 の誘導メカニズムに関しては詳細に解明されてはいない。リファンピシンとリファブチンの構造の違い、例えば piperazinyl iminomethyl 基の有無が核内レセプターへの親和性の差の原因となり、リファンピシンでは誘導が認められるが、リファブチンでは認められなかったという可能性は考えられる。

CYP2D6 に関しては、ヒト培養肝細胞を用いた実験系によりリファンピシンでデキストロメトルファン O-脱メチル化酵素活性に有意な増加が認められなかったと報告されている (Madan et al., 2003)。またヒト肝スライスを用いた実験系においてタンパク発現量に有意な増加が認められなかったと報告されている

(Edwards et al., 2003)。本章の結果では mRNA レベルでリファンピシンにより CYP2D6 の誘導が認められず、以前の報告と一致した。リファブチンに関してはヒト培養肝細胞を用いた実験系によりデキストロメトルファン O-脱メチル化酵素活性に影響が認められなかったと報告されて

いる (Li et al., 1997)。リファブチンはリファンピシンと同様 CYP2D6 を誘導しないことが mRNA レベルで明らかとなった。

以上、本章においてリファブチンを用いることでヒト肝細胞キメラマウスに発現するヒト CYP3A4 が誘導能をもつことが明らかになった。また、リファブチンおよびリファンピシンに関して、ヒトで報告されている CYP3A 以外の各 CYP 分子種の変化はキメラマウスにおいてもヒトと同一であったことを mRNA レベルにおいて明らかにした。mRNA レベルにおける検討のみの CYP 分子種に関しては、タンパク、酵素活性レベルの検討も行い、包括的に評価する必要があるだろう。また、本研究は単一ドナーの肝細胞を移植して作製したキメラマウスについてのみの検討であるため、様々なドナーを移植したキメラマウスを用い、誘導の個体差についても更に検討を行う必要があると考えられる。

また、生体外異物や内因性物質の肝外排泄は、循環血中から肝への取り込み、肝における代謝、そして胆汁排泄という一連の流れを経て行われる。従って、肝細胞膜を介した輸送は肝外排泄における重要な因子であり、胆汁排泄には ABCB1、ABCC2 などいくつかのトランスポーターが

働くことが知られている。そこで、キメラマウスの肝に発現するトランスポーターのうち、胆汁排泄に重要な役割を果たす ABCB1、ABCC2 の 2 つのトランスポーターに注目して、リファブチンおよびリファンピシン投与による影響を検討した。

ABCB1 は肝、腎臓、小腸、血液脳関門など全身に発現しており、多くの生体外異物の吸収、排泄、分布に重要な役割を果たしている。リファンピシンによる ABCB1 の誘導に関しては、HepG2 細胞を用いた実験系で mRNA が 1.3 倍 (Rühl et al., 2004)、ヒト培養肝細胞を用いた実験系で約 1.6 倍 (Nishimura et al., 2002) 増加したという報告がある。本章の結果からリファブチン投与により 0.9-2.0 倍、リファンピシン投与により 0.3-4.5 倍の増加が認められた。本研究は *in vivo* 実験系であり、キメラマウスにおける個体差、薬物処置群と未処置群で hAlb 濃度が正確に同じでないことを考慮しても、以前の報告と矛盾はないと考えられる。

ABCC2 は肝細胞の胆管膜上に局在し、胆汁酸の硫酸抱合体、グルクロン酸抱合体、グルタチオンといった有機アニオンの輸送に関わっているトランスポーターである。ABCC2 の発現は胆管膜において最も高いが、腎臓、回腸、空腸においても発現し

ており、体外への毒性化合物の排泄に関わっていると考えられている。現在までに、リファンピシンにより ABCC2 mRNA の誘導がヒト肝細胞、ヒト小腸において認められている

(Fromm et al., 2000; Kast et al., 2002)。本章の結果において、ヒト ABCC2 mRNA 発現量は 6.3 倍と大きな誘導率を示す個体も存在したが、他のキメラマウスで 0.4-1.7 倍の変動であった。ABCC2 のリファンピシンによる誘導率に関しては、現在までにヒト培養肝細胞を用いた実験系において ABCC2 mRNA 発現量は 1.3-2 倍 (Kast et al., 2002; Nishimura et al., 2002) の増加が認められており、また Hep G2 細胞を用いた実験系において mRNA 発現量は 1.5-2 倍 (Kauffmann et al., 2002; Rühl et al., 2004)、タンパク発現量は 2-2.5 倍 (Schrenk et al., 2001; Kauffmann et al., 2002) の増加が認められたと報告されている。本章で得られた誘導率は以前の報告と大きな矛盾はないと考えられる。また、リファブチンに関しては報告がないが、リファブチン投与によりヒト ABCC2 mRNA 発現量は 1.0-2.1 倍増加するという結果を得た。

以上より、ヒト肝細胞キメラマウスにおいて、ヒトトランスポーターの発現が mRNA レベルで確認できた。

また、リファンピシンが各トランスポーターの mRNA 発現レベルに及ぼす影響を検討し、ヒトにおける今までの報告と同様なことがキメラマウスにおいても再現されていることを確認できた。胆汁酸に関しては、ヒトトランスポーターに対する親和性が taurocholate > glycochenodeoxycholate > glycocholate > taurochenodeoxycholate の順であり、マウスにおいては taurochenodeoxycholate に最も親和性が高いというように、ヒトとマウスで胆汁酸排泄に種差が見られることが知られている (Byrne et al., 2002)。各トランスポーターについてのタンパクレベルでの検討は今後の課題であるが、ヒト肝細胞キメラマウスは薬物代謝能のヒト化と同様、トランスポーターにおいても機能的にヒト化しており、高い hAlb 濃度を示すマウスにおいては、ヒトと同様の排泄経路をとるのではないかと推察される。

薬物代謝酵素の活性に変動をもたらす要因の一つとして、酵素発現の誘導が挙げられる。様々な CYP 分子種が薬物や生体外異物によって誘導されることが報告されており、その誘導メカニズムも明らかになってきた。例えば、CYP3A4 はリファンピ

シンなどのリガンドが核内レセプター-Pregnane X receptor (PXR) に結合し、これが核内レセプター-RXR $\alpha$  とヘテロダイマーを形成して CYP3A4 遺伝子の 5'-上流の ER6

(evereted repeat separated by 6 nucleotides) に結合することにより転写を活性化する (Bertilsson et al., 1998; Lehmann et al., 1998)。

CYP2B6 はフェノバルビタールなどの薬物により核内レセプター-CAR が活性化されて RXR $\alpha$  とヘテロダイマーを形成し、CYP2B6 遺伝子 5'-上流に存在する PBREM

(phenobarbital responsive enhancer module) に結合することにより、転写を活性化する (Sueyoshi et al., 1999)。CYP 遺伝子発現調節や誘導に関する核内レセプターの研究の大多数は *in vitro* において行われている。*In vitro* での知見は重要であるが、肝に発現する多くの遺伝子は多数の制御因子によって制御されているため、必ずしも *in vivo* での環境を反映していないかもしれない。例として、ウサギ CYP2C 遺伝子の promoter 領域への HNF4 $\alpha$  の結合が肝での CYP2C mRNA 発現レベルと相関しなかったことが挙げられる

(Chen et al., 1994)。従って *in vivo* における核内レセプターの変動を検討することは誘導メカニズムを解明

する一助となると考えられる。

PXR は多くの CYP や ABCB1 や ABCC2 といったトランスポーターをコードする遺伝子の重要な制御因子であると言われている。PXR は応答エレメントに結合し転写活性化に寄与する。PXR mRNA 発現量と PXR の標的遺伝子の mRNA 発現量に関しては、parallel に増加しないという報告が今までになされている。Pascussi ら (2000) によると、ヒト培養肝細胞を用いた実験系において、リファンピシンで CYP3A4 mRNA の誘導が認められたが、同じ PXR のリガンドであるデキサメタゾンとは異なり PXR mRNA 発現量に変化がなかったことが報告されている。また、リファンピシン以外にも CYP3A4 やヒト PXR の activator として知られている RU486、クロトリマゾール、フェノバルビタールでは PXR mRNA の誘導が認められなかったことが報告されている。更に興味深いことに、CYP3A の誘導薬でないイソニアジドや perfluorodecanoic acid などで PXR mRNA の強い誘導作用を持つことがラットにおいて報告されている (Zhang et al., 1999)。このことから PXR activator が必ずしも PXR 遺伝子の発現を正に制御しているわけではないと考えられる。その他の核内レセプターにおいても同様である

可能性も否定できない。加えて、PXRのリガンドに対する応答性に種差が存在している。リファンピシンに対してマウス PXR の応答性は弱い、ヒト PXR は応答して転写を活性化することが報告されている (Lehmann et al., 1998; Savas et al., 1999; Waxmann, 1999)。この薬物に対するレセプター応答性の種差が CYP3A 誘導能の種差を引き起こしていると考えられている。本研究では、マウスと交差しないヒト PXR のプライマーを設計することができず、ヒト PXR mRNA 発現量を測定することができなかったため、今後の研究課題であると考えられる。

RXRs は steroid/thyroid hormone receptor superfamily に属し、3つの分子種 (RXR $\alpha$ , RXR $\beta$ , RXR $\gamma$ ) が存在し (Levin et al., 1992)、そのうち、RXR $\alpha$ が肝における主要な分子種であると報告されている

(Berrodin et al., 1992)。RXR $\alpha$ は他の核内レセプターとヘテロダイマーを形成する補助的なタンパクとして機能する。RXR $\alpha$ と他の核内レセプターとのヘテロダイマーはリガンド依存的に標的遺伝子を活性化する。従って、RXR $\alpha$ のレベルが標的遺伝子発現量を決定する重要な因子であると考えられる。Pascussi ら (2000) によるとリファンピシンは CYP3A4

タンパク発現量を増加させたが、RXR $\alpha$ タンパク発現量を変化させなかったと報告されている。本結果において、リファンピシンにより 0.3-6.1 倍の mRNA 増加が認められた。以前の結果と比較するためにもタンパクレベルの検討を行う必要があると考える。Pascussi ら (2000) の検討は mRNA レベルで行われていないため不明であるが、リファンピシンによる RXR $\alpha$ レベルへの影響は転写段階においてのみで転写後には影響しないのかもしれない。

以上、本章においてはヒト肝細胞キメラマウスに発現するトランスポーターおよび核内レセプターの誘導薬による変動を見た。本章のように、誘導薬による *in vivo* における複数の核内レセプターの発現変動を検討した研究は少ない。今後、キメラマウスの例数を増して検討すること、ヒト PXR mRNA 発現量の定量を行うことなど更なる検討が必要であろう。本章の結果は今後の各 CYP 分子種の誘導メカニズムの解明に貢献するものと考えられる。

キメラマウスを用いたヒト CYP 誘導実験は、新鮮ヒト肝細胞を用いた場合に比べより生体に近い条件での検討が可能と考えられ、医薬品開発において有用な手段になり得ると予想される。

## E. 結論

ヒト CYP 特異的な誘導薬であるリファブチンを用いて、ヒト肝細胞キメラマウスに発現するヒト CYP3A4 が誘導能をもつことを明らかにした。また、リファブチンおよびリファンピシンに関して、ヒトで報告されている CYP3A 以外の各 CYP 分子種の変化はキメラマウスにおいてもヒトと同一であったことを mRNA レベルにおいて明らかにした。

## F. 健康危険情報：なし

## G. 研究発表

1. 論文発表：なし

2. 学会発表：

In vivo induction potency on CYP3A4 by rifabutin in chimeric mice with humanized liver；第 19 回日本薬物動態学会年会、平成 16 年 11 月 17-19 日、金沢

## 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. 捕捉（文中で使用した引用文献を示す）

Arlotto MP, Trant JM and Estanrool RW (1991) Measurement of steroid hydroxylation reactions by high-performance liquid chromatography as indicator of P450 identity and function. *Methods Enzymol* **206**: 454-462.

Barwick JL, Quattrochi LC, Mills AS, Potenza C, Tukey RH and Guzelian PS (1996) Trans-species gene transfer for analysis of glucocorticoid-inducible transcriptional activation of transiently expressed human CYP3A4 and rabbit CYP3A6 in primary cultures of adult rat and rabbit hepatocytes. *Mol Pharmacol* **50**: 10-16.

Berrodin TJ, Marks MS, Ozato K, Linney E and Lazar MA (1992) Heterodimerization among thyroid hormone receptor, retinoic acid receptor, retinoid X receptor, chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor, and an endogenous liver protein. *Mol Endocrinol* **6**: 1468-1478.

Bertilsson G, Heidrich J, Svensson K, Åsman M, Jendeberg L, Sydow-Bäckman M, Ohlsson R, Postlind H, Blomquist P and Berkenstam A (1998) Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 12208-12213.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.

- Breckenridge A and Orme M (1971) Clinical implications of enzyme induction. *Ann NY Acad Sci* **179**: 421-431.
- Byrne JA, Strautnieks SS, Mieli-Vergani G, Higgins CF, Linton KJ and Thompson RJ (2002) The human bile salt export pump: characterization of substrate specificity and identification of inhibitors. *Gastroenterology* **123**: 1649-1658.
- Chen D, Park Y and Kemper B (1994) Differential protein binding and transcriptional activities of HNF-4 elements in three closely related CYP2C genes. *DNA Cell Biol* **13**: 771-779.
- 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.
- 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 culture precision-cut human liver slices. *Drug Metab Dispos* **31**: 282-288.
- Freeman DJ, Laupacis A, Keown PA, Stiller CR and Carruthers SG (1984) Evaluation of cyclosporine-phenytoin interaction with observations on cyclosporine metabolites. *Br J Clin Pharmacol* **18**: 887-893.
- Fromm MF, Kauffmann HM, Fritz P, Burk O, Kroemer HK, Warzok RW, Eichelbaum M, Siegmund W and Schrenk D (2000) The effect of rifampin treatment on intestinal expression of human MRP transporters. *Am J Pathol* **157**: 1575-1580.
- Furukawa M, Nishimura M, Ogino D, Chiba R, Ikai I, Ueda N, Naito S, Kuribayashi S, Moustafa MA, Uchida T, Sawada H, Kamataki T, Funae Y and Fukumoto M (2004) Cytochrome p450 gene expression levels in peripheral blood mononuclear cells in comparison with the liver. *Cancer Sci* **95**: 520-529.
- Garcia M, Rager J, Wang Q, Strab R, Hidalgo IJ, Owen A and Li J (2003) Cryopreserved human hepatocytes as alternative in vitro model for cytochrome P450 induction studies. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **39**: 283-287.
- 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.
- Gharaibeh MN, Gillen LP, Osborne B, Schwartz JI and Waldman SA (1998) Effect of multiple doses of rifampicin on the [<sup>14</sup>C N-methyl] erythromycin breath test in healthy male volunteers. *J Clin Pharmacol* **38**: 492-495.
- Gillum JG, Sesler JM, Bruzzese VL, Israel DS and Polk RE (1996) Induction of theophylline clearance by rifampicin and rifabutin in healthy male volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 1866-1969
- Greuet J, Pichard L, Bonfils C, Domergue J and Maurel P (1996) The fetal specific gene CYP3A7 is inducible by rifampicin in adult human hepatocytes in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* **225**: 689-694.
- Guengerich FP (1997) Comparisons of catalytic selectivity of cytochrome P450 subfamily enzymes from different species. *Chem Biol Interact* **106**: 161-182.
- 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.
- Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA, Anisfeld AM, Stoltz CM, Tontonoz P, Kliewer S, Willson TM and Edwards PA (2002) Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem* **277**: 2908-2915.
- Katoh M, Matsui T, Nakajima M, Tateno C, Kataoka M, Soeno Y, Horie T, Iwasaki K, Yoshizato K and Yokoi T (2004) Expression of human cytochromes P450 in chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab Dispos* **32**: 1402-1410.
- Katoh M, Matsui T, Nakajima M, Tateno C, Kataoka M, Soeno Y, Horie T, Iwasaki K, Yoshizato K and Yokoi T (2005) In vivo induction of human cytochrome P450 enzymes expressed in chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab Dispos* in press.
- Kauffmann HM, Pfannschmidt S, Zöller H, Benz A, Vorderstemann B, Webster JI and Schrenk D (2002) Influence of redox-active compounds and PXR-activators on human MRP1 and MRP2 gene expression. *Toxicology* **171**: 137-146.
- Kocarek TA, Schuetz EG, Strom SC, Fisher RA and Guzelian PS (1995) Comparative analysis of cytochrome P450 3A induction in primary cultures of rat, rabbit, and human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **23**: 415-421.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lehmann JM, McKee DD, Watson MA, Willson TM, Moore JT and Kliewer SA (1998) The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds

that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J Clin Invest* **102**: 1016–1023.

Levin AA, Sturzenbecker LJ, Kazmer S, Bosakowski T, Huselton C, Allenby G, Speck J, Kratzeisen C, Rosenberger M and Lovey A (1992) 9-Cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha. *Nature* **355**: 359–361.

Li AP, Reith MK, Rasmussen A, Gorski JC, Hall SD, Xu L, Kaminski DL and Cheng LK (1997) Primary human hepatocytes as a tool for the evaluation of structure–activity relationship in cytochrome P450 induction potential of xenobiotics: evaluation of rifampin, rifapentine and rifabutin. *Chem Biol Interact* **107**: 17–30.

Madan A, Greham 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.

Matheny CJ, Ali RY, Yang X and Pollack GM (2004) Effect of prototypical inducing agents on P-glycoprotein and CYP3A expression in mouse tissues. *Drug Metab Dispos* **32**: 1008–1014.

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.

Meunier V, Bourrie M, Julian B, Marti E, Guillou F, Berger Y and Fabre G (2000) Expression and induction of CYP1A1/1A2, CYP2A6 and CYP3A4 in primary cultures of human hepatocytes: a 10-year follow-up. *Xenobiotica* **30**: 589–607.

Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Wazman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC and Nevert DW (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**: 1–42.

Nelson DR (1999) Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch Biochem Biophys* **369**: 1–10.

Nishibe Y, Wakabayashi M, Harauchi T and Ohno K (1998) Characterization of cytochrome P450 (CYP3A12) induction by rifampicin in dog liver. *Xenobiotica* **28**: 549–557.

Nishimura M, Naito S and Yokoi T (2004) Tissue-specific mRNA expression profiles of human nuclear receptor subfamilies. *Drug Metab Pharmacokin* **19**: 135–159

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.

Pascussi JM, Drocourt L, Fabre JM, Maurel P and Vilarem MJ (2000) Dexamethasone induces pregnane X receptor and retinoid

- X receptor- $\alpha$  expression in human hepatocytes: synergistic increase of CYP3A4 induction by pregnane X receptor activators. *Mol Pharmacol* **58**: 361-372.
- Perucca E, Grimaldi R, Frigo GM, Sardi A, Mönig H and Ohnhaus EE (1988) Comparative effects of rifabutin and rifampicin on hepatic microsomal enzyme activity in normal subjects. *Eur J Clin Pharmacol* **34**: 595-599.
- 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, Sousa GD, Dostert P, Ings R, Gugenheim J and 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.
- Rodrigues AD and Rushmore TH (2002) Cytochrome P450 pharmacogenetics in drug development: in vitro studies and clinical consequences. *Curr Drug Metab* **3**: 289-309.
- Roymans D, Van LC, Leone A, Parker JB, McMillian M, Johnson MD, Koganti A, Gilissen R, Silber P, Mannens G and Meuldermans W (2004) Determination of cytochrome P450 1A2 and cytochrome P450 3A4 induction in cryopreserved human hepatocytes. *Biochem Pharmacol* **67**: 427-437.
- Rühl R, Sczech R, Landes N, Pfluger P, Kluth D and Schweigert FJ (2004) Carotenoids and their metabolites are naturally occurring activators of gene expression via the pregnane X receptor. *Eur J Nutr* **43**: 336-343.
- Sakuma T, Takai M, Endo Y, Kuroiwa M, Ôhara A, Jarukamjorn K, Honma R and Nemoto N (2000) A novel female-specific member of the CYP3A gene subfamily in the mouse liver. *Arch Biochem Biophys* **377**: 153-162.
- Savas U, Griffin KJ and Johnson EF (1999) Molecular mechanisms of cytochrome P-450 induction by xenobiotics: An expanded role for nuclear hormone receptors. *Mol Pharmacol* **56**: 851-857.
- Schrenk D, Baus PR, Ermel N, Klein C, Vorderstemann B and Kauffmann HM (2001) Up-regulation of transporters of the MRP family by drugs and toxins. *Toxicology Letters* **120**: 51-57.
- Schuetz JD, Beach DL and Guzelian PS (1994) Selective expression of cytochrome P450 CYP3A mRNAs in embryonic and adult human liver. *Pharmacogenetics* **4**: 11-20.
- Strolin BM and Dostert P (1994) Induction and autoinduction properties of rifamycin derivatives: a review of animal and human studies. *Environ Health Perspect* **102**: 101-105.
- Sueyoshi T, Kawamoto T, Zelko I, Honkakoski P and Negishi M (1999) The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human

- CYP2B6 gene. *J Biol Chem* **274**: 6043–6046.
- Tateishi T, Watanabe M, Moriya H, Yamaguchi S, Sato T and Kobayashi S (1999) No ethnic difference between Caucasian and Japanese hepatic sample in the expression frequency of CYP3A5 and CYP3A7 proteins. *Biochem Pharmacol* **57**: 935–939.
- Tateno C, Yoshizane Y, Saito N, Kataoka M, Utoh R, Yamasaki C, Tachibana A, Soeno Y, Asahina K, Hino H, Asahara T, Yokoi T, Furukawa T and Yoshizato K (2004) Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am J Pathol* **165**: 901–912.
- Towbin H, Staehelin T and Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4350–4354.
- Tomlinson ES, Maggs JL, Park BK and Back DJ (1997) Dexamethasone metabolism in vitro: species differences. *J Steroid Biochem Mol Biol* **62**: 345–352.
- Usui T, Saitoh Y and Kamada F (2003) Induction of CYP3As in HepG2 cells by several drugs.—Association between induction of CYP3A4 and expression of glucocorticoid receptor—. *Biol Pharm Bull* **26**: 510–517.
- Waxman DJ (1999) P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: Central role of nuclear receptors CAR, PXR and PPAR. *Arch Biochem Biophys* **369**: 11–23.
- Yanagimoto T, Itoh S, Sawada M and Kamataki T (1997) Mouse cytochrome P450 (Cyp3a11): predominant expression in liver and capacity to activate aflatoxin B<sub>1</sub>. *Arch Biochem Biophys* **340**: 215–218.
- Zhang H, LeCulyse E, Liu L, Hu M, Matoney L, Zhu W and Yan B (1999) Rat pregnane X receptor: Molecular cloning, tissue distribution, and xenobiotic regulation.

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進事業）

分担研究報告書

ヒト肝細胞キメラマウスにおけるリファマイシン系抗生物質の  
ヒト CYP 誘導能に関する検討

主任研究者 横井 毅 金沢大学 薬学部

協力研究者 岩崎 一秀 ファイザー(株)中央研究所 担当部長

研究要旨

マウス肝細胞をヒト肝細胞で高度に置換したヒト肝細胞キメラマウスは、医薬品開発の初期段階においてヒトにおける薬物動態あるいは CYP 誘導能を予測する有用なシステムになる可能性がある。本研究では、ヒトにおいて CYP 誘導能が報告されているリファマイシン系抗生物質であるリファンピシンおよびリファブチンのヒト肝細胞キメラマウスでの CYP 誘導能を CYP3A で代謝される基質を用いて検討した。

ヒト肝キメラマウスにリファンピシンおよびリファブチンを投与し、肝ミクロソームの CYP3A 代謝活性を測定した。リファンピシン投与により、ヒト肝で置換されたキメラマウス（置換率 50~90%）ではデキサメサゾン 6 $\beta$ -水酸化活性、ミダゾラム 1'-および 4-水酸化活性は対照群に比し有意に上昇した。ヒト肝で置換されていないキメラマウス（置換率 0%）では、リファンピシン投与によりこれらの活性に有意な上昇は認められなかった。リファブチン投与群では、ヒト肝で置換されたキメラマウス（置換率 50~90%）でミダゾラム 1'-および 4-水酸化活性は対照群に比し有意に上昇したが、デキサメサゾン 6 $\beta$ -水酸化活性は上昇傾向を示したものの有意な差は認められなかった。ヒト肝で置換されていないキメラマウス（置換率 0%）ではデキサメサゾン 6 $\beta$ -水酸化活性、ミダゾラム 1'-および 4-水酸化活性は対照群と有意な差は認められなかった。

以上の結果は、ヒト肝細胞キメラマウスはヒトにおける CYP3A 誘導能を予測する有用なシステムであることを示唆する。今回の研究ではヒト肝細胞キメラマウスの各処置群での例数が 3~4 例と少なかったため、キメラマウスの例

数を増やして今回の研究結果を確認することは医薬品開発に大きく貢献する情報を提供するものである。

## A. 研究目的

CYP3A は全医薬品のうち約 50% の代謝に関与していると報告されている。本酵素の代謝能が活性阻害あるいは酵素誘導により変動することは医薬品の体内動態の変動と連関することとなり、その結果生じる薬物相互作用が臨床上大きな問題となっている。従って、CYP3A 誘導能を創薬の初期段階でチェックして CYP3A 誘導能を有さない医薬品を開発することは、より安全な医薬品の創製に大いに寄与すると考えられる。

リファマイシン系抗生物質は肺結核の治療に使用されている。このうちリファンピシンが汎用されている。本剤はヒト CYP を誘導するが、特にヒト CYP3A に強力な誘導作用を示す。また、高用量ではマウスの CYP も誘導する。リファブチンによりヒト CYP3A は誘導されるが、マウスでは CYP の誘導は認められていない。これらの結果は、ヒト肝キメラマウスにおいてヒト CYP3A の誘導を予測するのに、リファンピシンおよびリファブチンが適切なプローブであることを示している。

本研究では、リファンピシンおよびリファブチンをヒト肝細胞キメラ

マウスに投与して、肝ミクロソームでの CYP3A 酵素活性の変動をデキサメサゾンおよびミダゾラムをモデル基質として検討した。

## B. 研究方法

### B-1. ヒト肝細胞キメラマウスおよび前処置

今回の報告で使用したヒト肝細胞キメラマウスを Table 1 に示す。ヒト肝臓のドナーは Caucasian (男性、9 ヶ月、Lot. No. 79、In Vitro Technologies 社) であった。

リファンピシンおよびリファブチンは 50mg/kg/day の投与量で 4 日間キメラマウスに腹腔内投与した。対照群には corn oil を投与した。

### B-2. 肝ミクロソームの調製

リファンピシンおよびリファブチンを投与したキメラマウスより採取した肝に、肝重量の 3 倍容のホモジナイズ緩衝液を加え、ポリトロンで細切後、テフロンホモジナイザーによりホモジナイズした。ホモジネートを 9,000 g、4℃で 20 分間遠心分離後、上清をさらに 105,000 g、4℃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℃で 60 分間遠心分離した。得られた沈殿物を TGE 緩衝液に懸濁し、使用まで - 80℃で

保存した。タンパク定量はウシ血清アルブミンを標準タンパクとして、常法に従って実施した。

Table 1. Chimeric mice used in this induction study

Animal	Animal number	Gender	Age (weeks old)	hAlb <sup>1)</sup> (mg/ml)	Replacement index (%)	Treatment
Chimera	C1	Male	15	3.1	50	None
Chimera	C2	Male	13	9.3	70	None
Chimera	C3	Male	14	13.7	90	None
Chimera	C4	Male	12	3.2	50	Rifabutin
Chimera	C5	Male	12	6.5	70	Rifabutin
Chimera	C6	Male	12	9.7	70	Rifabutin
Chimera	C7	Male	12	17.2	90	Rifabutin
Chimera	C8	Male	13	5.7	60	Rifampicin
Chimera	C9	Male	13	4.2	60	Rifampicin
Chimera	C10	Male	12	11.4	80	Rifampicin
Chimera	C11	Male	12	15.5	80	Rifampicin
Chimera	C12	Male	11	0.0	0	None
Chimera	C13	Male	13	0.0	0	None
Chimera	C14	Male	13	0.0	0	None
Chimera	C15	Male	12	0.0	0	Rifabutin
Chimera	C16	Male	11	0.0	0	Rifabutin
Chimera	C17	Male	11	0.0	0	Rifabutin
Chimera	C18	Male	11	0.0	0	Rifampicin
Chimera	C19	Male	13	0.0	0	Rifampicin
Chimera	C20	Male	12	0.0	0	Rifampicin

<sup>1)</sup> hAlb : Human albumin concentration

### B-3. デキサメサゾン 6β - 水酸化活性の測定

デキサメサゾン 6β - 水酸化活性として、反応生成物である 6β - 水酸化デキサメサゾン を高速液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) により定量した。

反応液の組成 (最終濃度) はリン酸緩衝液 (67 mM, pH 7.4)、デキサメサゾン (5 μM)、β - NADPH (5 mM)、MgCl<sub>2</sub> (10 mM)、およびミクロソーム (0.5 mg/ml) であり、最終容量は 100 μl に調整した。

NADPH を除いた反応液を 10 分間 37℃ でプレインキュベーションし、NADPH 10 μl 添加して反応を開始した。反応 30 分後に 50% アセトニトリル溶液 (LC/MS に内部標準物質を含む) 200 μl を加えて反応を停止した。混合液を超音波処理後に 2000 rpm、30 分遠心して得られた上清を LC/MS で定量した。LC/MS の測定条件を Table 2 に示す。

### B-4. ミダゾラム 1' - および 4 - 水酸化活性の測定

ミダゾラム 1'- および 4- 水酸化活性として、反応生成物である 1'- 水酸化ミダゾラムおよび 4- 水酸化ミダゾラムを LC/MS により定量した。

反応液の組成（最終濃度）はリン酸緩衝液（100 mM、pH 7.4）、ミダゾラム（50  $\mu$ M）、 $\beta$ -NADPH（5 mM）、MgCl<sub>2</sub>（3.3 mM）、およびミクロソーム（0.03 mg/ml）であり、最終容量は 200  $\mu$ l に調製した。

NADPH を除いた反応液を 5 分間 37°C でプレインキュベーションし、NADPH 50  $\mu$ l 添加して反応を開始した。反応 5 分後に 75% アセトニトリル溶液（LC/MS に内部標準物質を含む）200  $\mu$ l を加えて反応を停止した。混合液を 2000 rpm、15 分遠心して得られた上清を LC/MS で定量した。LC/MS の測定条件を Table 2 に示す。

Table 2. Assay conditions in LC/MS

Analyte	6 $\beta$ -Hydroxydexamethasone	1'- and 4-Hydroxymidazolam
Mass spectrometer	API-3000	API-4000
LC and injector	Agilent LC1100 + CTC-PAL	Agilent LC1100 + CTC-PAL
Injection volume	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
Flow rate	300 $\mu$ l/min	600 $\mu$ l/min
Column oven	40°C	40°C
Column	Luna 3 $\mu$ m C18(2), 50 x 2.0 mm	YMC ODS L-80, 35 x 2.0 mm
Mobile phase	A 10% AcCN containing 10mM AcNH <sub>4</sub> (pH 3.5)	5% AcCN/95% 20mM CH <sub>3</sub> COOH (adjusted to pH 4.0 with NH <sub>4</sub> solution)
	B 80% AcCN containing 10mM AcNH <sub>4</sub> (pH 3.5)	95% AcCN/5% 20mM CH <sub>3</sub> COOH (adjusted to pH 4.0 with NH <sub>4</sub> solution)
Gradient condition	Time 0min, A 100%; Time 0.5min, A 100%; Time 1min, A 80%; Time 3min, A 80%; Time 3.5min, A 20%; Time 4min, A 20%; Time 4.2min, A 100%; and Time 9min, A 100%.	Time 0min, A 80%; Time 3min, A 40%; Time 4min, A 40%; Time 4.5min, A 80%; and Time 5.5min, A 80%.
Internal standard	Alprazolam	Tolbutamide

#### B-5. 病理組織検査

ヒト肝細胞置換率 < 1% ~ 95% までのキメラマウス 36 例、uPA+/- SCID マウス 5 例、および uPA-/- SCID マウス 9 例を用いた。マウスの肝臓および主要臓器について、病理組織学的検査を行った。肝臓については、未固定凍結切片を作製し、

CK8/18 および hAlb の発現を免疫組織化学的に調べた。

#### C. 研究結果

##### C-1. デキサメサゾン 6 $\beta$ -水酸化活性

今回検討したデキサメサゾン 6 $\beta$ -水酸化活性の実験結果を Table 3 に



示す。

プールしたヒト肝ミクロソームによるデキサメサゾン 6 $\beta$ -水酸化活性はヒト肝で置換されたキメラマウス（置換率 50~90%、対照群）あるいは ddY マウスの約 4 倍であった。ヒト肝で置換されていないキメラマウス（置換率 0%）では本活性はほとんど検出されなかった。

リファンピシンを投与すると、デキサメサゾン 6 $\beta$ -水酸化活性は、ヒト肝で置換されたキメラマウス（置換率 50~90%）では対照群に比し約 4 倍に上昇し有意な差が認められたが、ヒト肝で置換されていないキメラマウス（置換率 0%）で有意な上昇は認められなかった。

リファブチンを投与すると、デキサメサゾン 6 $\beta$ -水酸化活性は、ヒト肝で置換されたキメラマウス（置換率 50~90%）では対照群に比し増加する傾向を示したものの有意な差は認められなかった。

Table 3. Metabolism of dexamethasone (6 $\beta$ -hydroxydexamethasone formation)

Group	Treatment	Animal number	hAlb <sup>1)</sup>	RI <sup>2)</sup>		Enzyme activity <sup>3)</sup>	
				Individual	Mean	Individual	Mean <sup>4)</sup>
Chimera mice	Corn oil	C1	3.1	50	70	0.927	1.84 ± 0.81 <sup>a)</sup>
		C2	9.3	70		2.49	
		C3	13.7	90		2.09	
	Rifabutin	C4	3.2	50	70	2.90	3.64 ± 0.67 <sup>b)</sup>
		C5	6.5	70		3.71	
		C6	9.7	70		3.46	
		C7	17.2	90		4.50	
	Rifampicin	C8	5.7	60	70	9.10	9.63 ± 2.75 <sup>a,b)</sup>
		C9	4.2	60		7.70	
		C10	11.4	80		13.7	
		C11	15.5	80		8.07	
Chimera mice	Corn oil	C12	0.0	0	0	n.d.	—
		C13	0.0	0		0.777	
		C14	0.0	0		n.d.	
	Rifabutin	C15	0.0	0	0	n.d.	—
		C16	0.0	0		n.d.	
		C17	0.0	0		n.d.	
	Rifampicin	C18	0.0	0	0	n.d.	—
		C19	0.0	0		2.50	
C20		0.0	0	2.09			
ddY mice	None	—	—	—	—	2.51	
Human	None	—	—	—	—	10.6	

- a) Significantly different between Corn oil and Rifampicin treatment group ( $p < 0.01$ ).  
 b) Significantly different between Rifabutin and Rifampicin treatment group ( $p < 0.01$ ).  
 1) hAlb: Human albumin concentration (mg/ml)  
 2) RI: Replacement index (%)  
 3) Enzyme activity: 6 $\beta$ -Hydroxydexamethasone formation (pmol/mg/min)  
 4) The values represent mean or mean  $\pm$  S.D.

## C-2. ミダゾラム 1'-および4-水酸化活性

今回検討したミダゾラム 1'-および4-水酸化活性の実験結果を Table 4 に示す。

プールしたヒト肝ミクロソームによるミダゾラム 1'-および4-水酸化活性は ddY マウスとほぼ同等であったが、ヒトでは 1'-水酸化活性が高く、ddY マウスではその逆で4-水酸化活性が高かった。ヒト肝で置換されたキメラマウス（置換率 50～90%）およびヒト肝で置換されていないキメラマウス（置換率 0%）での本活性はプール肝ミクロソームあるいは ddY マウスに比べて低かったが、1'-水酸化活性より4-水酸化活性が高く、ddY マウスと同等であった。

リファンピシン投与により、ミダゾラム 1'-および4-水酸化活性はヒト肝で置換されたキメラマウス（置

換率 50～90%）では対照群に比し有意に増加していたが、ヒト肝で置換されていないキメラマウス（置換率 0%）で対照群に比し上昇する傾向を示したもののバラツキが大きく有意な差は認められなかった。また、1'-水酸化活性と4-水酸化活性の比率はリファンピシン処置で変わらなかった。

リファブチンを投与すると、ヒト肝で置換されたキメラマウス（置換率 50～90%）では対照群に比し有意に上昇していたが、増加の度合いはリファンピシンの約半分であった。ヒト肝で置換されていないキメラマウス（置換率 0%）ではミダゾラム 1'-および4-水酸化活性は対照群と有意な差は認められなかった。

Table 4. Metabolism of midazolam (1'- and 4-hydroxymidazolam formation)

Group	Treatment	Animal number	hAlb <sup>1)</sup>	RI <sup>2)</sup>		Enzyme activity <sup>3)</sup>			
				Indiv.	Mean	1'-OH		4-OH	
						Indiv	Mean <sup>4)</sup>	Indiv.	Mean
Chimera mice	Corn oil	C1	3.1	50	70	126	159 ±	228	261 ±
		C2	9.3	70		185	30.2	287	30.3 <sup>a,c)</sup>
		C3	13.7	90		165	<sup>a,c)</sup>	268	
	Rifabutin	C4	3.2	50	70	259	330 ±	359	428 ±
		C5	6.5	70		357	49.1 <sup>b,c)</sup>	451	49.4 <sup>b,c)</sup>
		C6	9.7	70		336		429	
		C7	17.2	90		368		473	
	Rifampicin	C8	5.7	60	70	793	794 ±	1010	972 ±
		C9	4.2	60		720	142 <sup>a,b,c)</sup>	913	145 <sup>a,b,c)</sup>
		C10	11.4	80		993		1150	
		C11	15.5	80		671		813	
Chimera mice	Corn oil	C12	0.0	0	0	59.3	79.4 ±	162	192 ±
		C13	0.0	0		148	60.8	289	86.2
		C14	0.0	0		31.2		124	
	Rifabutin	C15	0.0	0	0	55.6	75.3 ±	155	172 ±
		C16	0.0	0		86.0	17.1	178	14.9
		C17	0.0	0		84.3		183	
	Rifampicin	C18	0.0	0	0	38.5	247 ±	123	394 ±
		C19	0.0	0		473	218	687	283
		C20	0.0	0		230		374	
	ddY mice	None	—	—	—	—	707	—	950
Human	None	—	—	—	—	890	—	753	

- a) Significantly different between Corn oil and Rifampicin treatment group (p<0.01).  
 b) Significantly different between Rifabutin and Rifampicin treatment group (p<0.01).  
 c) Significantly different between Corn oil and Rifabutin treatment group (p<0.05).  
 1) hAlb : Human albumin concentration (mg/ml)  
 2) RI : Replacement index (%)  
 3) Enzyme activity : 1'- and 4-hydroxymidazolam formation (pmol/mg/min)  
 4) The values represent mean or mean ± S.D.

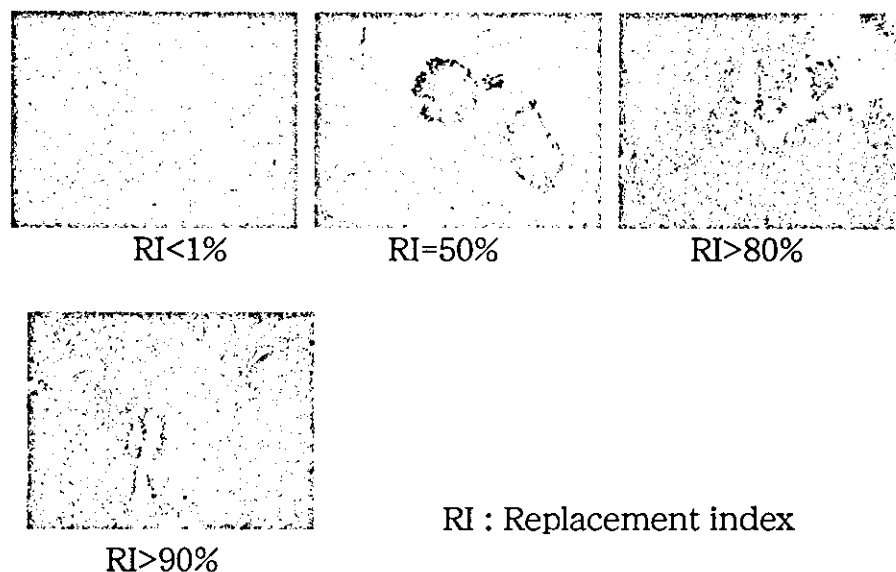
### C-3. 病理組織検査

マウス肝臓に生着したヒト肝細胞は、やや大型で淡明な細胞質を有し、結節状ないし敷石状にマウスの肝臓を置換していた。この置換率はヒト血清アルブミン値から予測された置換率とほぼ一致していた。高置換率の肝臓において、ヒト肝細胞領域は正常な肝組織を思わせる血管構築と肝細胞配列を示していた。ヒト肝細胞

は hAlb 陽性、CK8/18 陽性であった。hAb の染色性には個体間、ヒト肝細胞結節間で差が認められ、肝細胞の分化に伴い発現が増強する傾向が認められた。Figure 1 に CK8/18 免疫染色で褐色に陽染されたヒト肝細胞の生着状況を示した。

その他、ヒト肝細胞キメラマウスでは、腎臓糸球体基底膜の肥厚が高率にみられ、胃や十二指腸の潰瘍が

約半数で認められた。これら腎臓や消化管の変化は uPA+/-SCID や uPA-/-SCID では認められなかった。



RI : Replacement index

Figure 1. Immunostaining of human hepatocytes in chimeric mouse liver with CK8/18.

#### D. 考察

临床上問題となっている医薬品の相互作用に CYP が重要な役割を果たしている。CYP 活性が阻害されると体内からの消失遅延に起因する副作用の発現、CYP が誘導されると消失促進による薬効の消失が相互作用の大きな部分を占めている。このような観点から、CYP 阻害作用や誘導作用を有しない医薬品を開発することは、より安全かつコントロールの容易な医薬品、つまり使いやすい医薬品の創製に重要な項目の一つである。

マウス肝細胞をヒト肝細胞で高度に置換したヒト肝細胞キメラマウス

は、医薬品開発の初期段階においてヒトにおける薬物動態あるいは CYP 誘導能を予測する有用なシステムになるポテンシャルがある。本報告では、ヒトにおいて CYP 誘導能が報告されているリファマイシン系抗生物質であるリファンピシンおよびリファブチンのヒト肝細胞キメラマウスでの CYP 誘導能を CYP3A で代謝される基質を用いて検討した。ヒト肝細胞で置換されたキメラマウスにリファンピシンおよびリファブチンを投与すると、CYP3A で代謝される基質の代謝活性は有意に上昇あるいは有意差はつかないものの増加する傾