

メーターは default 値を使用、Affymetrix) を用い、各 GeneChip の測定値 (signal) データ及び detection の判定データを取得した。Detection の判定データで present と判定された遺伝子を検出遺伝子として抽出した。

A-2.キメラマウスでの薬物代謝酵素誘導能

使用したヒト肝細胞キメラマウスの肝臓の total RNA は金沢大学横井教授から供与を受けた。ヒト肝細胞キメラマウスは、ドナー肝細胞として IVT079 (白人、男性、9ヶ月) を利用し、生後 12~13 週齢の雄

性キメラマウスで、無処置、rifampicin、3-methylcholanthrene を 4 日間腹腔内投与したものを用いた (Table 1)。Total RNA の純度は電気泳動により確認し、A-1 で示した方法により、標識サンプルを Humen Expression Array 133A (U133A、Affymetrix) 及び Mouse Expression Array 430A (MOE430A、Affymetrix) により解析した。

誘導剤投与による遺伝子の発現変動は、無処置の肝臓 (MTE49-4) に対する誘導剤を投与した肝臓 (CTE8-3 および CTE4-5) の各遺伝子の発現量の比を発現の変化として求めた。

Table 1 使用したヒト肝細胞キメラマウス

	個体No.	処置			置換率 (%)
		投与量	投与日数	投与経路	
無処置	MTE49-7				0
	MTE49-5				71
	MTE49-4				93
Rifampicin (Rif)	CTE2-3	50mg/kg/day	4日間	腹腔内	1
	CTE8-3				80
3-methylcholanthrene (3-MC)	MTE46-4	20mg/kg/day	4日間	腹腔内	6
	CTE4-5				80

置換率: ヒト肝細胞移植 1 月後のキメラマウス血中ヒトアルブミン濃度値から予測

B. 研究結果

B-1. ヒトおよびマウス GeneChip におけるヒトあるいはマウス肝臓由来 RNA のクロスハイブリダイゼーションの評価

ヒトあるいはマウスの肝臓由来の RNA をヒトおよびマウス GeneChip で解析し、検出された遺伝子数から種間でクロスハイブリダイゼーションしている遺伝子を評価した。

ヒト及びマウス肝臓由来 RNA を 100:0、50:50、0:100 の比 (重量比) で混合したサンプルを GeneChip で解析したところ、ヒト GeneChip での検出遺伝子数はそれぞれ 9791、7750、2511 遺伝子であり、マウス GeneChip での検出遺伝子数は、それぞれ 2449、10386、12107 であった (Fig. 1)。ヒト肝臓で検出された 9791 遺伝子のうち、マウス肝臓の検出遺伝子と

2511 遺伝子 (25.6%) が共通であった。これらはマウス及びヒトの肝臓で発現量が高い遺伝子であり、主に regulation of transcription (213 遺伝子)、protein

biosynthesis (192 遺伝子)、protein modification (121 遺伝子) に関わる遺伝子が多数含まれていた。

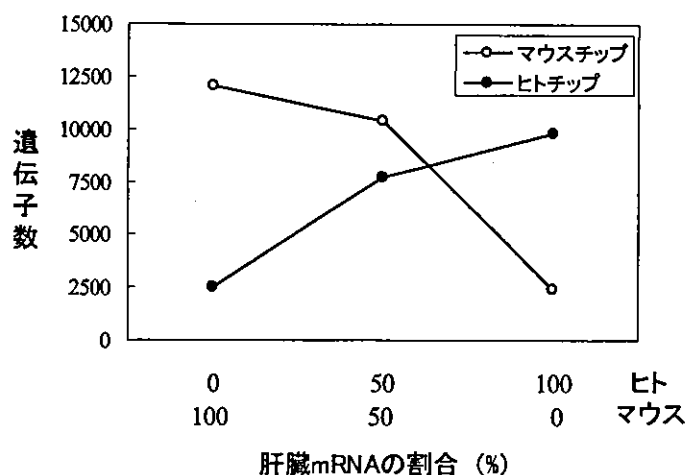


Fig. 1 ヒト及びマウス GeneChip での検出遺伝子数

B-2. ヒト肝細胞への置換率と遺伝子発現との関連

ヒト肝細胞への置換率とヒトあるいはマウス発現遺伝子数の関係について無処置マウス (MTE49-7, 5, 4) を用いて検討した。ヒト肝細胞への置換率が 0% では、ヒト GeneChip で検出された遺伝子は 2548 個、マウス GeneChip で検出された遺伝子は 12891 個であった。置換率が 71% では発現が確認されたヒト遺伝子は 9065 個、マウス遺伝子は 11927 個、置換率が 93% ではヒト遺伝子は 9475 個、マウス遺伝子は 8893 個であった。このように、置換率の上昇に応じて、発現が検出されたヒト遺伝子の数が増加し同時にマウス遺伝子の数が減少した (Fig.2)。

次に代表的な薬物代謝酵素である cytochrome P450 (CYP)、glutathion

S-transferase (GST) および UDP-glucuronosyl-transferase (UGT) の分子種の発現と置換率の関係について検討した。ヒト GeneChip に搭載されている CYP 分子種は 87 個、UGT 分子種は 16 個、GST 分子種は 13 個存在する。これらは置換率 0% では CYP, UGT および GST それぞれ 14, 4 および 5 個の発現が検出された。置換率が 71% ではそれぞれ 62, 13 および 15 個、置換率が 93% ではそれぞれ 62, 13 および 16 個おの検出された。このように、置換率の上昇に応じて、発現が検出されたヒト型薬物代謝酵素遺伝子の数が増加した。(Fig. 3)。

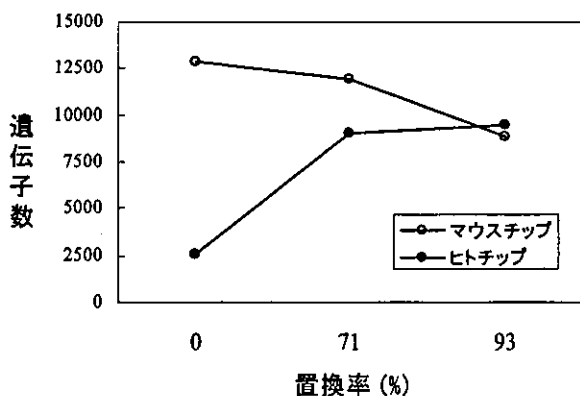


Fig. 2 無処置キメラマウスにおけるヒト肝細胞への置換率と発現が検出されたヒトあるいはマウス遺伝子数の関係

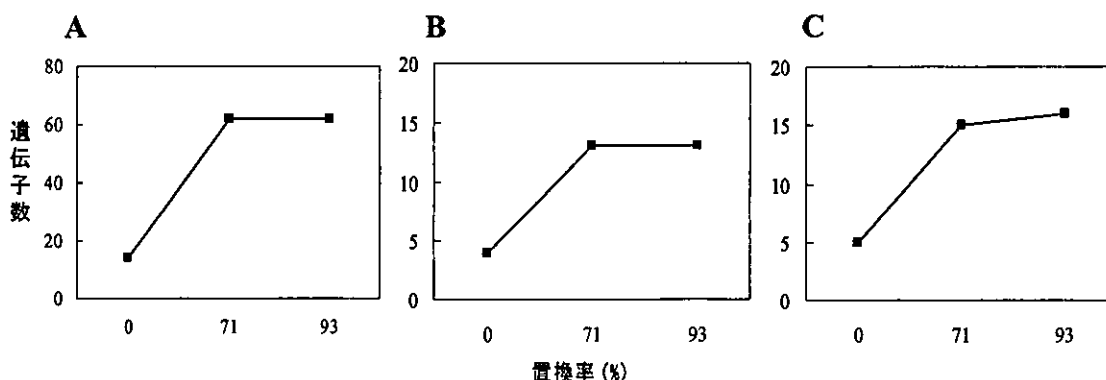


Fig. 3 無処置キメラマウスにおけるヒト肝細胞への置換率と発現が検出されたヒト薬物代謝酵素の数

A: CYP 分子種、B: UGT 分子種、C: GST 分子種、ヒト GeneChip で測定

B-3. キメラマウスでの薬物代謝酵素誘導能

薬物代謝酵素誘導剤としてリファンピシあるいは 3-メチルコランズレンを投与したヒト肝細胞キメラマウスの肝臓での遺伝子発現変動について検討した。高置

換率のキメラマウス (置換率 80%以上) ではリファンピシン、3-メチルコランズレン投与とも、ヒト検出遺伝子数に及ぼす影響はほとんどなかった (Fig. 4)。

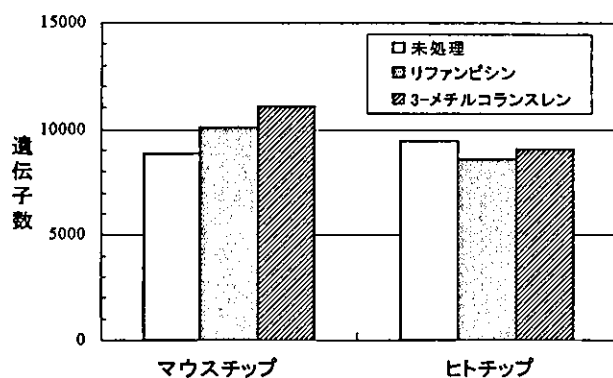


Fig. 4 ヒト薬物代謝酵素誘導剤投与時に検出されるヒトあるいはマウス遺伝子数

置換率が高いキメラマウスに薬物代謝酵素誘導剤としてリファンピシンあるいは3-メチルコランスレンを投与し (CTE8-3、4-5)、無処置マウス (CTE49-4) と比較して肝臓におけるヒト薬物代謝関連遺伝子の発現変動について検討した。リファンピシンを投与した際のキメラマウスの肝臓におけるCYP分子種の発現は、無処置マウスと比較してCYP2A6、CYP2A7、CYP2B6、CYP2C18、CYP3A4、CYP3A43、CYP4F11がそれ

ぞれ1.8、1.7、2.1、1.9、1.6、2.0、1.8倍に、GST分子種ではGSTP1が1.5倍に増加した。一方、UGT分子種の遺伝子発現は変化しなかった。また、3-メチルコランスレン投与した際のキメラマウスの肝臓におけるCYP分子種の発現は、CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2C18がそれぞれ9.0、3.8、8.9、1.7倍に、GST分子種ではGSTM1、GSTP1の発現が1.7、1.9倍にUGT分子種では、UGT1A9が1.5倍に、増加した。

Table 2 リファンピシン投与によるヒト CYP 分子種の遺伝子発現変動

CYP分子種	Rif 投与による 発現変化 (比)	CYP分子種	Rif 投与による 発現変化 (比)
1A1	0.4	3A7	1.2
1A2	0.5	3A43	2.0
1B1	0.9	4A11	0.9
2A6	1.8	4F2	1.4
2A7	1.7	4F11	1.8
2B6	2.1	4F12	0.9
2C8	1.1	4F13	0.9
2C9	1.1	7A1	1.2
2C18	1.9	26A1	1.1
2D6	0.9	27A1	0.9
2E1	0.8	39A1	0.9
2J2	0.7	51A1	1.2
3A4	1.6		
3A5	1.0		

Table 3 リファンピシン投与によるヒト UGT 及び GST 分子種の遺伝子発現変動

UGT分子種	Rif 投与による 発現変化 (比)	GST分子種	Rif 投与による 発現変化 (比)
1A1	0.8	A2	0.9
1A3	0.9	A3	1.1
1A6	0.7	A4	1.3
1A8	1.3	M2	1.4
1A9	1.0	M3	1.1
2B4	1.4	M4	1.3
2B15	1.4	P1	1.5
2B17	1.2	T1	0.9
2B28	1.1	Z1	0.8
		MGST 2	0.9

Table 4 3-メチルコランズレン投与によるヒト CYP 分子種の遺伝子発現変動

CYP分子種	3-MC 投与による 発現変化 (比)	CYP分子種	3-MC 投与による 発現変化 (比)
1A1	9.0	3A7	0.5
1A2	3.8	3A43	0.7
1B1	8.9	4A11	0.9
2A6	0.8	4F2	1.1
2A7	0.6	4F11	1.4
2B6	0.8	4F12	0.9
2C8	0.9	4F13	0.6
2C9	1.0	7A1	0.1
2C18	1.7	26A1	0.7
2D6	0.6	27A1	0.9
2E1	0.8	39A1	0.6
2J2	0.5	51A1	0.8
3A4	0.2		
3A5	0.6		

Table 5 3-メチルコランズレン投与によるヒト UGT 及び GST 分子種の遺伝子発現変動

UGT分子種	3-MC 投与による 発現変化 (比)	GST分子種	3-MC 投与による 発現変化 (比)
1A1	1.3	A2	0.8
1A3	1.4	A3	0.6
1A6	1.1	A4	1.1
1A8	1.3	M1	1.7
1A9	1.5	M2	1.0
2B4	0.9	M3	1.1
2B15	0.8	M4	1.0
2B17	0.3	P1	1.9
2B28	0.9	T1	1.1
		T2	1.0
		Z1	0.8
		MGST 2	1.0
		MGST 3	1.0

C. 考察

解析に用いた DNA マイクロアレイ (GeneChip) のクロスハイブリダイゼーションを検討した。置換率 0%のキメラマウスの肝臓をヒト GeneChip で解析したところ、約 2500 の遺伝子が検出遺伝子とし

て抽出された。ヒト GeneChip のプローブセットの設計ではマウス遺伝子を区別することは考慮されておらず、クロスハイブリダイゼーションが生じることが考えられた。

DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析からヒト肝細胞キメラマウスの肝臓では、ヒトおよびマウス遺伝子の発現が確認された。また、肝臓におけるヒト肝細胞への置換率の上昇に応じて発現するヒト遺伝子数は増加し、同時にマウス遺伝子の発現数が減少した。このようにヒト肝細胞キメラマウスの肝臓でヒト遺伝子の発現が確認された。さらに、ヒト肝細胞への置換率が高い個体に薬物代謝酵素誘導剤を投与すると肝臓における、ヒト型 cytochrome P450 (CYP)、glutathion S-transferase (GST) および UDP-glucuronosyl-transferase (UGT) の分子種の一部の発現誘導が確認された。すなわち、リファンピシン投与では CYP2B6、CYP2C18、CYP3A4 等の発現量が、3-メチルコランズレン投与では CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2C18 等の発現量が増加した。このように、ヒト肝細胞キメラマウスでは、ヒト肝細胞がその機能を保持した形で発現しており、ヒト肝組織・細胞にかわり薬物の研究・開発に利用できる可能性が示唆された。

D. 結論

DNA アレイを用いた網羅的遺伝子発現解析からヒト肝細胞キメラマウスの肝臓では、ヒトおよびマウス遺伝子の発現が確認された。また、肝臓におけるヒト肝細胞への置換率の上昇に応じて発現するヒト遺伝子数は増加し、同時にマウス遺伝子の発現数が減少した。ヒト肝細胞への置換率が高い個体に薬物代謝酵素誘導剤を投与すると肝臓における、ヒト型

cytochrome P450 (CYP)、glutathion S-transferase (GST) および UDP-glucuronosyl-transferase (UGT) の分子種の一部の発現誘導が確認された。

第Ⅱ章 ドナー肝細胞 IVT-079 を用いて作製された高置換率のヒト肝細胞キメラマウスの個体差

A. 研究方法

ドナー肝細胞として共通に IVT-079 を用いて作製された 15~16 週齢のヒト肝細胞キメラマウスの中から 80% 以上の高置換率を示す 5 例を選択し、肉眼による剖検所見および遺伝子発現プロファイルの比較により、同じ条件で作製されたキメラマウスにおける個体差を調べた。

剖検 2 日前にマウス血中ヒトアルブミン濃度を測定し、剖検時の肉眼的観察により肝臓の色調や大きさ、ヒト肝細胞への置換の程度などについて形態学的変化を調べた。採材した肝臓は病理評価に用いる部位を除き、個体別に凍結プレス破砕機 (CRYO-PRESS) で粉末状に破砕し、第 I 章 A-1 の方法に準じてサンプルを調製した。ヒト肝細胞キメラマウスは 1 個体につき 2 枚のヒト GeneChip により解析し、解析ソフト MAS5.0 で detection の signal が present を 2 枚とも示した遺伝子を検出遺伝子とした。ヒト肝臓は第 I 章 A-1 で用いた試料を個別に解析し、present を示した遺伝子を検出遺伝子とした。さらに、ヒト肝臓で発現する遺伝子を用いてクラスター解析を行い、キメラマウス肝臓の遺伝子発現プロファ

イルを分類した。

B. 研究結果

肉眼所見からキメラマウスのヒト肝細胞への置換状態は CTE49-6 > CTE51-5 > CTE51-6 > CTE51-4 > CTE49-7 の順に高いと推定された。ヒト肝細胞への置換の割合が高いと推定された個体では、肝臓の肥大傾向と共に、色調は薄いベージュを呈した。置換状態が低いと推定された個体では、マウス肝細胞の再生と考えられる赤褐色のコロニーの散在がみられた (Table 6)。

網羅的遺伝子発現解析により、ヒト遺伝子はそれぞれ 8789 (CTE49-6)、7082 (CTE49-7)、6239 (CTE51-4)、8513 (CTE51-5)、7778 遺伝子 (CTE51-6) (CV 値 13.6%) が検出され、ヒト肝細胞への置換状態に応じてヒト遺伝子が多く検出される傾向がみられた。5 個体に共通した検出遺伝子は 5778 遺伝子であり、

クロスハイブリダイゼーションした遺伝子を除くと、4008 遺伝子がヒト特異的な遺伝子として発現していると考えられた (Table 7)。

また、同一条件で解析したヒト肝臓では 11178 遺伝子が検出遺伝子として抽出され、このうちキメラマウスの肝臓で発現していたヒト肝臓遺伝子は 6100 ~ 8230 遺伝子であり、ヒト肝臓で発現していた遺伝子の 54.6 ~ 75.4% を占めた (Table 6)。

ヒト肝臓で検出された 11178 遺伝子を用いて、キメラマウスの肝臓の遺伝子発現プロファイルをクラスター解析により分類したところ、2 例と 3 例に分類され CTE49-6、CTE51-5 がヒト 1 の発現パターンと類似していた (Fig. 5)。分類パターンは検出遺伝子数と関係があるものではなかった。

Table 6 高置換率のキメラマウスの個体差

キメラマウス	個体 No.	1 (CTE49-6)	2 (CTE49-7)	3 (CTE51-4)	4 (CTE51-5)	5 (CTE51-6)
	性別	♂	♂	♂	♂	♂
	週齢	16週齢			15週齢	
ドナー		IVT-079 (9ヶ月 白人男性)				
置換率		80%以上 (移植後1カ月の血中ヒトアルブミン濃度から算出)				
hAlb濃度 (mg/mL)	移植後1カ月	5.7	1.7	2.6	2.5	2.4
	移植後3カ月 (解剖2日前)	15.3	4.3	3.1	5.1	8.8
体重 (g)		15.7	21.0	20.9	19.2	13.5
肝臓重量 (g)		2.9	2.1	2.2	2.0	1.8
肝臓/体重 (%)		18.5	10.1	10.4	10.3	13.3
肝臓の剖検所見	色調	薄いページジュで表面は滑らか	ページジュで多くの赤褐色のコロニーが散在	ページジュ(CTE49-7と同じ)、一部、赤褐色のコロニーが散在 左葉は赤褐色のコロニー少なく、色も薄いページジュ	薄いページジュ、CTE49-6と同じ位の色で表面は滑らか	薄いページジュ、表面滑らかだが、左葉の端の一部表面が白く網状
	形状	全体的に肥大	——	後部右葉は肥大し、マウスの肝と思われる部分が多い	——	——
	ヒト肝細胞への置換状態(推定)	高	中	中	高	中~高
ヒトGeneChipでの検出遺伝子数		8789	7082	6239	8513	7778
ヒト肝臓で発現している遺伝子との共通性	数	8431	6876	6100	8230	7505
	割合 (%)	75.4	61.5	54.6	73.6	67.1
左葉の一断面でのヒト肝細胞の占める割合 (CK8/18抗体免疫染色)		97.8	44.6	82.8	72.2	85.9
クラスター解析		ヒト1に近い	その他	その他	ヒト1に近い	その他

Table 7 高置換率のキメラマウスで検出されたヒト遺伝子数

No.	個体No.	ヒトGeneChipで検出された遺伝子数	クロスハイブリした遺伝子数	ヒト特異的な遺伝子数
1	CTE49-6	8789	2084	6705
2	CTE49-7	7082	2040	5042
3	CTE51-4	6239	1931	4308
4	CTE51-5	8513	2080	6433
5	CTE51-6	7778	2075	5703
Mean		7680	2042	5638
S.D		1045	64	987
CV (%)		13.6	3.2	17.5

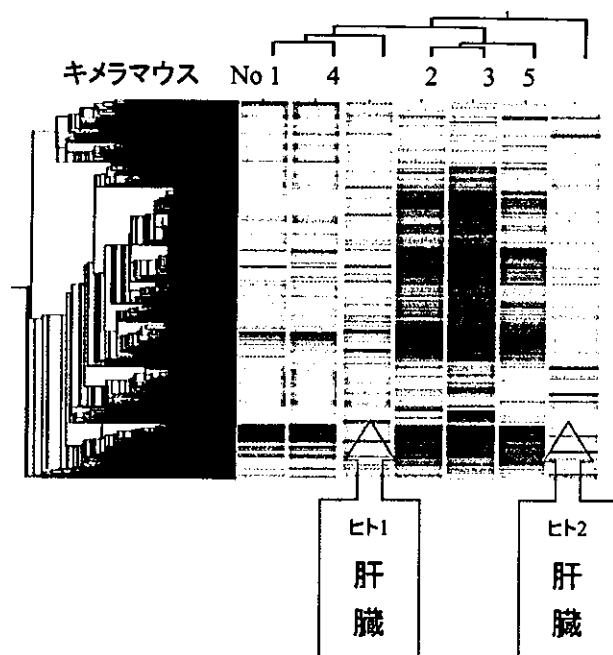


Fig. 5 キメラマウス及びヒト肝臓の遺伝子発現クラスタリング

キメラマウス No.1: CTE49-6、No.2: CTE49-7、No.3: CTE51-4、No.4: CTE51-5、No.5: CTE51-6、ヒト肝臓の検出遺伝子 (11178 遺伝子) を用いて解析した。

総合的な評価では、CTE49-6 は剖検所見でヒト肝細胞への置換状態も高く、ヒト GeneChip で検出された遺伝子数、ヒト肝臓と共通している遺伝子数、肝臓遺伝子発現プロファイル、ヒト肝細胞の占める割合などの点で、5 個体のなかでヒトに近い性質を有していた。この個体は置換率算出時及び剖検 2 日目のマウス血中ヒトアルブミン濃度も高かった。一方、CTE51-4 は剖検 2 日目のマウス血中ヒトアルブミン濃度は 5 個体中最低値を示しており、ヒト検出遺伝子数やヒト肝臓と共通している遺伝子数も少なかった (Table 6)。

(参考: 病理組織学的評価)

剖検時に肝臓左葉を切り出し、10%

中性緩衝ホルマリン液にて固定後、パラフィン包埋し、HE 染色、ヒトサイトケラチン 8/18 (CK8/18) 免疫染色により行なった。一次抗体は抗 CK8/18 マウスモノクローナル抗体 Clone NCL5D3 (Cappel)、二次抗体はビオチン化マウス IgG 抗体 (Vector) を用いた。ヒト肝臓の占める割合は、光学顕微鏡に接続したビデオカメラで肝臓の一断面の切片を撮影後、キメラマウスの肝臓断面積及びヒト CK8/18 抗体の陰性断面積を測定し、面積比から算出した。計算式は $[(\text{肝臓断面積} - \text{CK8/18 陰性領域}) \times 100 / \text{肝臓断面積}]$ を用いた。

HE 染色においては薄染されている領域が、ヒト CK8/18 免疫染色においては陽性領域がヒト肝細胞領域と考えられた

(Fig. 6)。ヒト肝細胞領域をマウス肝細胞領域と比較したところ、ヒト肝細胞領域では肝細胞のサイズが大きく、空胞化も認め

られた。5 個体のキメラマウス肝臓左葉の一断面におけるヒト肝細胞領域の占める割合は 44.6~97.8%であった。

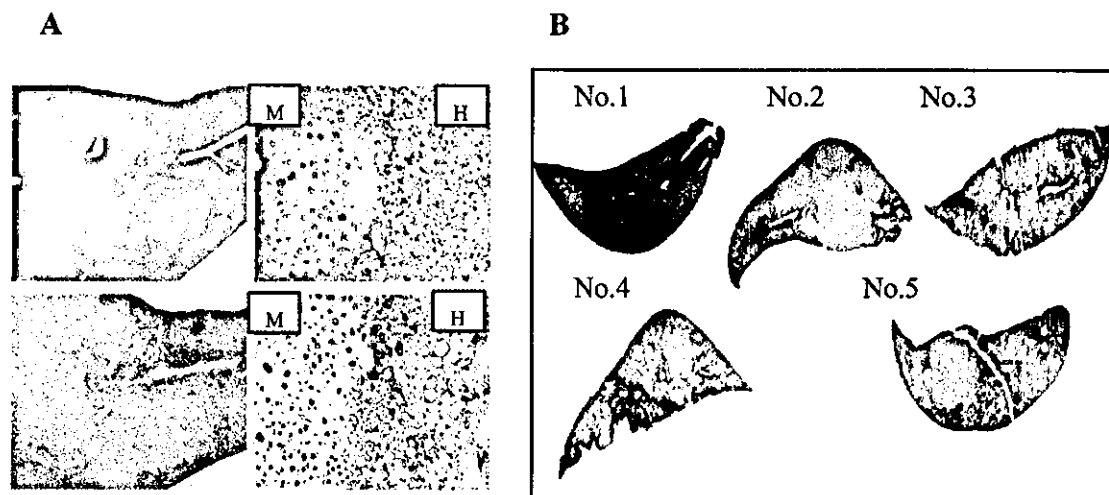


Fig. 6 キメラマウス肝臓左葉の組織学的評価

(A) 上段: HE 染色、下段: ヒト CK8/18 免疫染色、M: マウス領域、H: ヒト領域

(B) ヒト CK8/18 免疫染色におけるヒト肝臓の占める割合

キメラマウス No.1: CTE49-6、No.2: CTE49-7、No.3: CTE51-4、No.4: CTE51-5、No.5: CTE51-6

C. 考察

同一ドナー肝細胞で作製されたヒト肝細胞キメラマウスで高置換率を示す 5 例を選択し、肝臓での遺伝子発現解析を行なったところ、6239~8789 個のヒト遺伝子 (CV13.6%) が発現し、同一解析条件で確認されたヒト肝臓での発現遺伝子の 55~75%を占めていた。また、キメラマウス肝臓の遺伝子発現プロファイルは 2 例と 3 例に分類され、そのパターンは検出遺伝子数と関係があるものではなかった。このように、同一ドナーで作製し、同程度の置換率を示すキメラマウスでもヒト遺伝子の発現数やヒト肝臓との発現プロファイルの類似性に個体差が認められた。

キメラマウスの肝臓で発現していたヒト

遺伝子はヒト肝臓遺伝子の 54.6~75.4%を占めていたが、24.6~45.4%のヒト遺伝子は検出遺伝子として捉えられなかった。キメラマウスの肝臓にはマウスの肝臓が再生した領域が認められる。本研究ではそれらの領域を区別せず評価したため、非検出遺伝子にはヒト遺伝子の発現が GeneChip の検出限界以下になったものも含まれていると考えられ、ヒト肝細胞と思われる領域の解析により、検出されるヒト遺伝子は増加するものと考えられる。

本キメラマウスは薬物代謝や安全性の予測ツールとしての利用が期待されている。本研究で示されたように同一の条件で作製され、同程度のヒト肝細胞への置換率を示すマウスであっても個体差がか

なりみられることから、均質なヒト型モデルとして個体を利用することは難しいと考えられる。第 I 章で示したように本マウスではヒト薬物代謝酵素遺伝子の多くが発現しており、2 種の誘導剤を用いた実験ではヒトと同様の誘導能を有することが確認され、薬物の研究・開発に利用できる可能性はあるものの、その利用においては個体差を十分に考慮する必要があると思われる。

D. 結論

同一ドナー肝細胞で作製されたヒト肝細胞キメラマウスの中からヒト肝細胞への置換率が高い 5 例について、肝臓における遺伝子発現プロファイルならびに肝臓左葉の組織学的解析からの同一条件で作製されたヒト肝細胞キメラマウスの個

体差について検討した。同一ドナー肝細胞で作製され同等の置換率を示すヒト肝細胞キメラマウスであっても遺伝子発現パターンに個体差があるため、その利用においては、個体差を考慮する必要があることがわかった。

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：なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

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 *in vivo* 薬物代謝能の検討

分担研究者 中島 美紀 金沢大学薬学部 助教授
協力研究者 加藤 美紀 金沢大学薬学部

研究要旨

ヒト肝細胞キメラマウスについて、昨年度までに *in vitro* においてヒトの薬物代謝能を有していることを明らかにしたが、*in vivo* における薬物代謝能に関しては不明である。そこで本年度は *in vivo* の薬物代謝能を検討することを目的として、ヒトと実験動物で大きな種差が認められている分子種の一つである CYP2D6 に着目し、代表的な基質であるデブリソキンの 4'-水酸化酵素活性を指標として検討を行った。また、薬物相互作用の予測をめざし、CYP2D6 の阻害薬を併用することによるデブリソキンの代謝能の変化を検討した。

ヒトにおいて、デブリソキンは CYP2D6 により 4'-水酸化デブリソキンに代謝される。しかし、マウスではほとんど代謝されないことが報告されている。そこで、キメラマウスにデブリソキンを単回経口投与後、血漿中のデブリソキンおよび 4'-水酸化デブリソキンを経時的に測定した。その結果、キメラマウスでは uPA(-/-)SCID マウスと比べ、4'-水酸化デブリソキンの AUC および Cmax は顕著に高い値を示し、また、デブリソキンの AUC および Cmax は低い傾向が認められた。すなわち、キメラマウスは *in vivo* においてヒト型の代謝プロファイルを示すことが明らかになった。また、CYP2D6 の代表的な阻害薬であるキニジンおよびパロキセチンを 3 日間連続腹腔内投与後、同様にデブリソキンを投与し、血漿中デブリソキンおよび 4'-水酸化デブリソキンの変動を検討した。キニジンやパロキセチンの前投与により、キメラマウスの血漿中 4'-水酸化デブリソキンの AUC と Cmax が著しく低下したため、キメラマウスの肝に発現するヒト CYP2D6 が阻害されることが明らかとなった。なお、uPA(-/-)SCID マウスではキニジンの前投与により 4'-水酸化デブリソキンのキネティックパラメーターに大きな変化は認められなかったため、キメラマウスにおいてヒト特異的な相互作用が再現できたと考えられる。

ヒトにおける薬物動態および薬物相互作用を早期に予測することは医薬品開発の効率化、医薬品の適正使用ならびに安全性評価において重要課題である。キメラマウスを用いて、ヒトの薬物相互作用を予測するためには更なる検討が必要であるが、本章の結果より、キメラマウスは *in vivo* においてヒトの薬物代謝能を有し、ヒト特異的な薬物相互作用の再現モデルとして極めて有用であることが示された。

A. 研究目的

現代の医療における薬物療法の役割は極めて大きい。今日、日常化している多剤併用において、薬物相互作用の回避は、重篤な副作用回避のために不可欠である。薬物相互作用はそのメカニズムから、薬力学的もしくは薬物動態学的な相互作用の2種に大別できるが、約3分の1以上は薬物動態学的な代謝過程によるものであると言われている。さらに、代謝が関与する薬物相互作用の中で、チトクロム P450 (CYP) が関与するものは95%にも及ぶ(千葉, 1995)。CYP を介した薬物相互作用は阻害によるものが約70%、誘導によるものが23%と言われている。従って、臨床における薬物の適正使用だけでなく医薬品の開発段階においても、CYPの阻害による薬物相互作用を予測することは極めて重要である。

CYP 阻害試験は1997年にFDAよりガイダンスが発表され、また、我が国においても、厚生労働省より

2001年に薬物相互作用の検討方法について通知がなされ、医薬品開発におけるCYP阻害の重要性が広く認識されるようになった。現在のところ、薬物の代謝を司る主要な臓器である肝由来の試料を用いた *in vitro* でのCYP阻害実験の結果からヒトにおける薬物相互作用を予測する試みがなされているが、肝細胞中で酵素と反応する薬物濃度が不明であることやタンパク結合などの問題から、現状では *in vitro* から *in vivo* への外挿は極めて難しい。また、医薬品開発時にはラット、イヌ、サルなどの実験動物を用いて *in vivo* における薬物動態試験が実施されるが、薬物の代謝には大きな種差が存在する。その原因は、ヒトと実験動物ではCYPの基質特異性が異なり、かつ、肝における発現の程度が異なるためと考えられている。従って、実験動物からヒトへの正確な外挿もかなり困難である。

昨年度までに我々はヒト肝細胞キメラマウスの肝にヒトCYPが発現し

ていることを明らかにした (Kato et al., 2004)。これより、相互作用を予測する際に *in vitro* で問題となる肝で酵素と反応する薬物濃度や、*in vivo* で問題となる CYP の種差などを、キメラマウスを用いることによりクリアできる可能性が示唆された。そこで、本章ではキメラマウスの *in vivo* における薬物代謝能を測定し、また、併用薬存在下での薬物代謝能を検討することにより、ヒトでの薬物相互作用を予測する有用なモデル動物になりうるか検討を行った。なお、本章では CYP2D6 に着目し検討を行った。CYP2D6 はヒトにおいて、全肝 CYP の約 2%程度の発現量であるにも関わらず (Shimada et al., 1994)、約 30%の医薬品の代謝反応に関与する (Guengerich, 1996)。実際に、これまで CYP2D6 を介した薬物相互作用が多く報告されており、加えて、遺伝子多型が存在することからも、CYP2D6 の基質を臨床で使用する場合には、細心の注意を払わねばならない。CYP2D6 を介した薬物相互作用を検討することは、臨床での薬物の適正使用ならびに医薬品開発における相互作用の予測から重要であると判断した。なお、本章では CYP2D6 の代表的な基質であるデブリソキンの 4'-水酸化酵素活性を指標とし、相互作用の検討には CYP2D6 の代表的

な阻害薬であるキニジンとパロキセチンを用いて検討を行った。

B. 研究方法

B-1. 実験動物

ヒト肝細胞キメラマウスは株式会社フェニックスバイオ (Hiroshima, Japan) に依頼生産した。uPA(-/-)SCID マウスは日本チャールズ・リバー (Yokohama, Japan) より入手した。本章で使用したマウスは全て雌性とした。

本章では In Vitro Technologies (Baltimore, MD) より購入した凍結ヒト肝細胞 (白人、男性、9ヶ月) を用いてキメラマウスを作製した。キメラマウスは血中ヒトアルブミン (hAlb) 濃度が 5.0 mg/ml 以上を高 hAlb 群、0.6 mg/ml 以下を低 hAlb 群と定義した。なおコントロールマウスとして uPA(-/-)SCID マウスを使用した。

B-2. 試薬

デブリソキン硫酸塩は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) より、4'-水酸化デブリソキンは Ultrafine chemicals (Manchester, England) より購入した。キニジン硫酸塩二水和物、イミプラミン塩酸塩は和光純薬工業 (Osaka, Japan) より、パロ

キセチンは Toronto Research Chemicals (Brisbane, Canada) より購入した。そのほかの試薬は特級、生化学用および高速液体クロマトグラフィー用のものを用いた。

B-3. 薬物投与および採血

試験スケジュールは下記の通り行った。

Day 1: デブリソキン代謝試験 I (Test I)

デブリソキン硫酸塩をミリ Q 水に溶解し、デブリソキンとして 2.0 mg/kg/day で単回経口投与した。投与後 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 時間後に眼底より採血し、遠心分離後約 20 μ l の血漿を得た。

Day 2, Day 3, Day 4: 休薬

Day 5, Day 6, Day 7: 阻害薬投与

CYP2D6 の阻害薬であるキニジンもしくはパロキセチンを 3 日間連続腹腔内投与した。キニジン硫酸塩二水和物はミリ Q 水に溶解し、キニジンとして 50 mg/kg で 1 日 2 回 (100 mg/kg/day)、パロキセチンはミリ Q 水に溶解し、30 mg/kg/day とした。

Day 8: デブリソキン代謝試験 II (Test II)

Test I と同様、デブリソキンを 2.0 mg/kg/day で単回経口投与後、所定の時間に眼底より採血した。なお、

デブリソキン投与 12 時間前には薬物の投与を終了した。

B-4. LC-MS/MS による血漿中デブリソキンおよび 4'-水酸化デブリソキン濃度の測定

Corchero ら (2001) および Pereira ら (2000) の方法に修正を加えて以下のように行った。血漿 10 μ l にミリ Q 水 400 μ l を添加した後、内標準物質として 20 nM イミプラミンを 40 μ l 添加し、ジクロロメタン: イソプロパノール (6:4, v/v) 1.3 ml で抽出した。1,000 g で 10 分間遠心分離を行い、有機溶媒層を採取した。採取した有機溶媒層を窒素気流下留去し、残渣に移動相 30 μ l を加えて溶解した。そのうちの 10 μ l をインジェクトし LC-MS/MS により分析した。

LC 装置は HP1100 システム (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) を用いた。カラムは Symmetry C18 (Waters, Tokyo, Japan, 4.6 mm ID \times 150 mm, 5 μ m) を使用し、カラム温度は 35°C とした。移動相は 40% アセトニトリル、0.1% ギ酸とし、流速は 0.3 ml/min とした。質量分析装置は API2000 (Applied Biosystems, Langen, Germany) を用いた。ターボガスは

550°C とし、ネブライジングガス、ターボガスおよびカーテンガスには窒素を用い、それぞれ 65、85、30 psi とした。コリジョンエネルギーは 25–27 V とした。イオンは positive-ESI mode を用い、MRM (multiple reaction monitoring) mode で検出した。デブリソキンは m/z 176 および 134 のイオンを、4'-水酸化デブリソキンは m/z 192 および 132 のイオンを、イミプラミンは m/z 281 および 86 のイオンを検出した。

B-5. ファーマコキネティックパラメータの解析

デブリソキンおよび 4'-水酸化デブリソキンの血中濃度時間曲線下面積 (AUC) は最小二乗法 (MULTI) により投与後 8 時間までの血中濃度より台形法にて求めた。最高血漿中濃度 (Cmax) および最高血漿中濃度到達時間 (Tmax) をデータから得た。

B-6. 統計解析

各群におけるファーマコキネティックパラメータは Mann-Whitney U-

test および Student t-test により解析し、 $P < 0.05$ の時、統計学的に有意であると判断した。

C. 研究結果

C-1. ヒト肝細胞キメラマウスにおけるデブリソキンの代謝

Fig.1 に Test I における各群のデブリソキンおよび 4'-水酸化デブリソキン血漿中濃度の時間推移を、Table 1 にファーマコキネティックパラメータを示した。デブリソキンの Cmax、Tmax および AUC について、高 hAlb 群では uPA(-/-)SCID マウスと比べ有意な差は認められなかったが、減少傾向が認められた。低 hAlb 群は uPA(-/-)SCID マウスと同程度の値を示した。これに対し、4'-水酸化デブリソキンの Cmax および AUC に関しては、高 hAlb 群において uPA(-/-)SCID マウスと比べて有意に高い値を示し、Cmax においては約 4 倍、AUC では約 2.5 倍であった。Tmax に関しては顕著な差は認められなかった。また、低 hAlb 群は uPA(-/-)SCID マウスと同程度の値を示した。

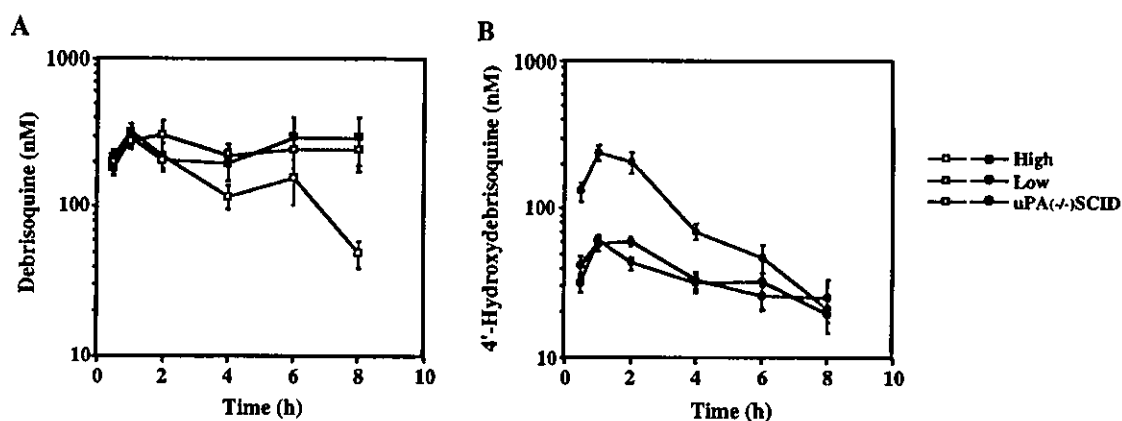


Fig. 1. Plasma concentration of debrisroquine and 4'-hydroxydebrisroquine in chimeric mice and uPA(-/-)SCID mice in Test I.

Time dependent changes of the plasma concentration of debrisroquine (A) and 4'-hydroxydebrisroquine (B) in chimeric mice and uPA(-/-)SCID mice after single oral administration of debrisroquine (2.0 mg/kg). Data represent the mean \pm SE (n = 10). High: chimeric mouse with a high hAlb concentration, Low: chimeric mouse with a low hAlb concentration.

Table 1 Pharmacokinetic parameters of debrisroquine and 4'-hydroxydebrisroquine in chimeric mice and uPA(-/-)SCID mice after single oral administration of debrisroquine (2.0 mg/kg).

	Debrisroquine			4'-Hydroxydebrisroquine		
	C _{max} (nM)	T _{max} (h)	AUC ₀₋₈ (nM·h)	C _{max} (nM)	T _{max} (h)	AUC ₀₋₈ (nM·h)
High	387.1 \pm 53.3	2.0 \pm 0.6	1286 \pm 165	273.3 \pm 34.6***	1.1 \pm 0.1	813 \pm 87***
Low	418.0 \pm 67.8	4.3 \pm 1.0	1814 \pm 320	65.5 \pm 6.1	1.4 \pm 0.2	253 \pm 31
uPA(-/-)SCID	475.1 \pm 92.3	4.9 \pm 1.0	1961 \pm 340	67.6 \pm 8.6	1.5 \pm 0.5	302 \pm 31

Data represent the mean \pm SE (n = 10). ***P < 0.001, compared with uPA(-/-)SCID mice.

High: chimeric mouse with a high hAlb concentration, Low: chimeric mouse with a low hAlb concentration.

C-2. デブリソキンの代謝に対するキニジンの影響

Test II において、キニジン前投与後のデブリソキンおよび 4'-水酸化デブリソキン血漿中濃度推移を Fig. 2 に、また、ファーマコキネティックパラメータを Table 2 に示す。各群

ともにキニジンの前投与によりデブリソキンの C_{max} および AUC は増加傾向を示したが、有意差は認められなかった。T_{max} については高 hAlb 群と uPA(-/-)SCID マウスで増加傾向が認められたが、低 hAlb 群では減少した。4'-水酸化デブリソキンの

Cmax および AUC に関しては、高 hAlb 群においてキニジンの前投与より有意な減少が認められた。しかし、低 hAlb 群および uPA(-/-)SCID マ

ウスにおいてはキニジンの前投与による影響は認められなかった。Tmax に関しては高 hAlb 群で増加傾向が認められた。

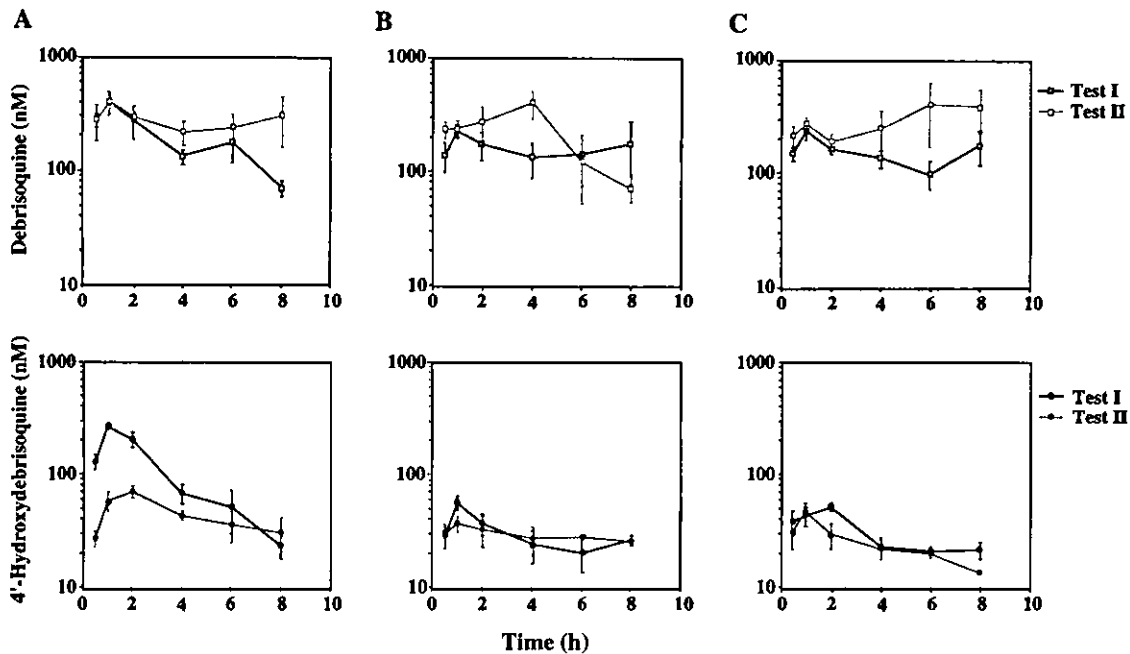


Fig. 2. Effects of quinidine treatment on plasma concentrations of debrisoquine and 4'-hydroxydebrisoquine in chimeric mice and uPA(-/-)SCID mice.

Plasma concentrations of debrisoquine (upper panel) and 4'-hydroxydebrisoquine (lower panel) in the chimeric mice with high hAlb concentrations (A), the chimeric mice with low hAlb concentrations (B) and uPA(-/-)SCID mice (C) were measured. Data represent the mean \pm SE (n = 4). Test I: 3-day pre-treatment of quinidine, Test II: 3-day post-treatment of quinidine.

Table 2. Pharmacokinetic parameters of debrisoquine and 4'-hydroxydebrisoquine in chimeric mice and uPA(-/-)SCID mice 3-day post-treatment of quinidine.

	Debrisoquine			4'-Hydroxydebrisoquine		
	C _{max} (nM)	T _{max} (h)	AUC ₀₋₈ (nM·h)	C _{max} (nM)	T _{max} (h)	AUC ₀₋₈ (nM·h)
High						
Test I	464.3 ± 91.8	2.5 ± 1.2	1552 ± 226	274.0 ± 19.5	1.3 ± 0.3	815 ± 91
Test II	481.4 ± 102.0	3.0 ± 1.7	2122 ± 417	67.9 ± 9.1***	2.5 ± 0.5	345 ± 41**
Low						
Test I	321.6 ± 81.8	4.2 ± 1.7	1366 ± 439	56.0 ± 7.7	1.0 ± 0	203 ± 51
Test II	533.8 ± 96.8	2.8 ± 0.8	1914 ± 283	41.4 ± 6.3	1.0 ± 0.4	181 ± 48
uPA(-/-)SCID						
Test I	261.7 ± 43.0	4.5 ± 2.0	1115 ± 127	51.3 ± 4.6	2.0 ± 0	219 ± 28
Test II	562.5 ± 211.9	5.7 ± 1.7	2230 ± 801	54.4 ± 6.7	2.3 ± 1.3	196 ± 46

Data represent the mean ± SE (n = 4). **P < 0.01, ***P < 0.001, compared with Test I. High: chimeric mouse with a high hAlb concentration, Low: chimeric mouse with a low hAlb concentration, Test I: 3-day pre-treatment of quinidine, Test II: 3-day post-treatment of quinidine.

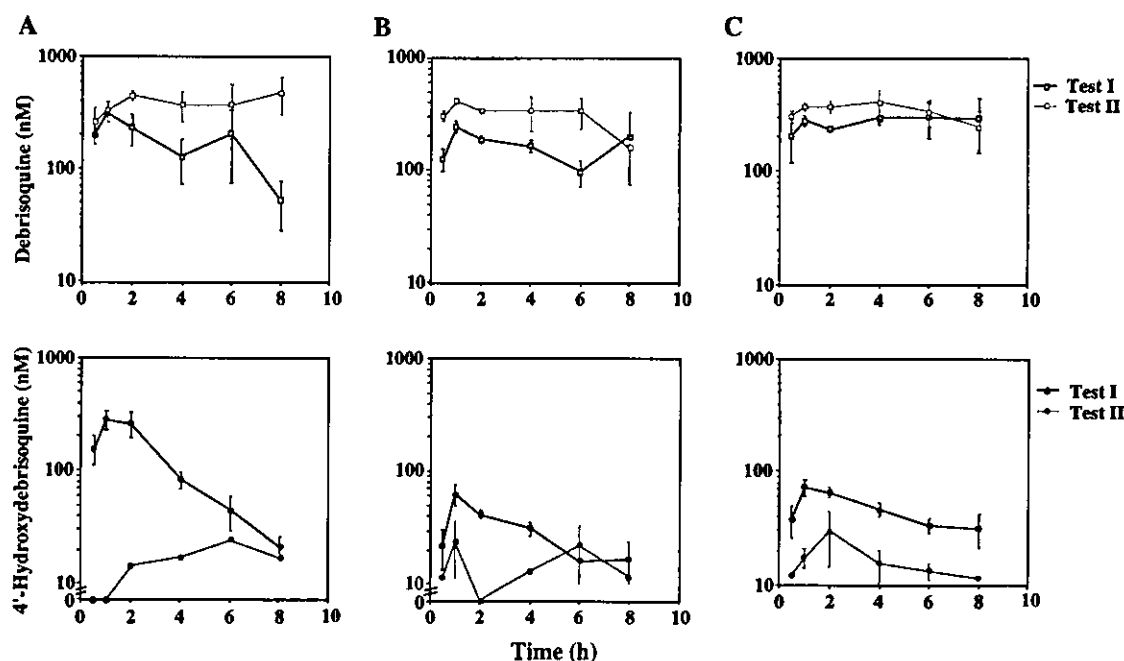


Fig. 3. Effects of paroxetine treatment on plasma concentrations of debrisoquine and 4'-hydroxydebrisoquine in chimeric mice and uPA(-/-)SCID mice.

Plasma concentrations of debrisoquine (upper panel) and 4'-hydroxydebrisoquine (lower panel) in the chimeric mice with high hAlb concentrations (A), the chimeric mice with low hAlb concentrations (B) and uPA(-/-)SCID mice (C) were measured. Data represent the mean ± SE (n = 4). Test I: 3-day pre-treatment of quinidine, Test II: 3-days post-treatment of quinidine.