

C-3. デブリソキンの代謝に対する
パロキセチンの影響

Test II において、パロキセチ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. 3 に、また、ファーマコキネティックパラメータを Table 3 に示す。各群ともにパロキセチ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、AUC については高 hAlb 群でのみ有意差が認められた。

T_{max} については高 hAlb 群と低 hAlb 群で増加傾向が認められたが、uPA(-/-)SCID マウスでは減少した。4'-水酸化デブリソキンの C_{max} および AUC に関しては、全ての群においてパロキセチンの前投与より有意な減少が認められた。

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

	Debrisoquine			4'-Hydroxydebrisoquine		
	C _{max} (nM)	T _{max} (h)	AUC ₀₋₄ (nM·h)	C _{max} (nM)	T _{max} (h)	AUC ₀₋₄ (nM·h)
High						
Test I	401.4 ± 63.7	2.5 ± 1.2	1350 ± 225	341.9 ± 54.2	1.3 ± 0.3	960 ± 161
Test II	606.4 ± 116.0	5.0 ± 1.3	2971 ± 595 *	13.0 ± 8.0 **	5.3 ± 1.3	55 ± 32 **
Low						
Test I	324.8 ± 82.9	1.3 ± 0.3	1546 ± 363	64.6 ± 10.8	5.3 ± 1.7	233 ± 19
Test II	478.7 ± 55.6	3.3 ± 1.1	2387 ± 328	24.3 ± 7.2 *	4.1 ± 1.5	107 ± 46 *
uPA (-/-)SCID						
Test I	411.3 ± 79.1	2.8 ± 1.8	2489 ± 330	76.7 ± 9.9	1.0 ± 0	338 ± 41
Test II	508.3 ± 50.4	1.8 ± 0.8	2888 ± 277	33.3 ± 14.0 *	1.0 ± 0	95 ± 17 *

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 paroxetine, Test II: 3-day post-

treatment of paroxetine.

D. 考察

CYP2D6 はヒトにおいてデブリソキンやスパルテインの代謝を触媒することは古くから知られているが、その他にも様々な B 遮断薬や抗うつ薬の酸化的代謝に関与する。ヒトにおいて、CYP2D サブファミリーに属する分子種は CYP2D6、CYP2D7 および CYP2D8 が知られているが、CYP2D7 と CYP2D8 は偽遺伝子であるため、CYP2D サブファミリーにおいては CYP2D6 が酵素活性を有する唯一の分子種である。薬物動態試験で頻用されるラットでは、CYP2D1、CYP2D2、CYP2D3、CYP2D4 などが、また、マウスにおいても Cyp2d9 や Cyp2d10 をはじめとして複数の分子種が CYP2D サブファミリーに属している。特に CYP2D の薬物代謝能に関してヒトとげっ歯類の間で大きな種差が存在する理由は、発現する分子種、発現量、基質特異性の違いと考えられている。昨年度までの検討により、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ため、本章では特に CYP2D6 に注目し、キメラマウスを用いて *in vivo* での薬物代謝能および薬物相互作用の予測に関する検討を行った。

本章で使用したデブリソキンは、

ヒトの CYP2D6 に関する研究において古くから頻用されてきた代表的な基質である。デブリソキンはヒトや SD ラットでは 4'-水酸化体へと代謝されるが、Dark Agouti ラットではデブリソキン 4'-水酸化酵素活性が低いことが報告されている (Al-Dabbagh et al., 1981)。また、マウスの肝ミクロソームを用いた実験では、C57BL/6 マウス、DBA/2 マウス、ddY マウスにおいて、本酵素活性は極めて低いことが示されている (Masubuchi et al., 1997)。すなわち、種差のみならず系統差も認められており、動物実験からヒトへの外挿の難しさが改めて認識できる。本酵素活性はマウスにおいて極めて低いことから、キメラマウスにデブリソキンを投与し、血漿中 4'-水酸化デブリソキンを測定することにより、ヒトにおける薬物代謝能を評価・検討することが可能と考えた。そこで本章では、デブリソキン代謝試験 I (Test I) として、デブリソキンの代謝能を血漿中 4'-水酸化デブリソキン濃度を測定することにより評価した。次に、デブリソキン代謝試験 II (Test II) として、CYP2D6 の阻害薬であるキニジンとパロキセチンを 3 日間連続投与後、再度デブリソキンの代謝能を測定することにより、阻害薬

がデブリソキンの代謝に及ぼす影響を検討した。

デブリソキン代謝試験 I (Test I) において、4'-水酸化デブリソキンの AUC が高 hAlb 群のキメラマウスで低 hAlb 群や uPA(-/-)SCID マウスより顕著に高く、また、Cmax も高値を示した。また、デブリソキンの AUC、Cmax については 3 群で顕著な差は認められなかったが、高 hAlb 群でこれらのパラメーターはともに低 hAlb 群や uPA(-/-)SCID マウスよりも低値を示した。これより、*in vivo* においてキメラマウスはヒト型の薬物代謝プロファイルを示すことが明らかになった。

これまでに CYP2D6 が触媒する薬物代謝を予測する実験動物モデルとして、Corchero ら (2001) がヒト CYP2D6 のトランスジェニックマウスを樹立した。彼らはこのトランスジェニックマウスの *in vivo* における CYP2D6 の薬物代謝能を、デブリソキン経口投与後の血漿中 4'-水酸化デブリソキンを測定することにより評価している。それによると、野性型のマウスに比べ、CYP2D6 のホモ接合体であるトランスジェニックマウスは 4'-水酸化デブリソキンの AUC が高く、デブリソキンの AUC は低いという結果が得られている。このトランスジェニックマウスは受精した

マウスの卵にヒト CYP2D6 DNA をマイクロインジェクトして樹立した系であるため、CYP2D6 酵素活性が極めて高い可能性も否定できず、実際のヒトの CYP2D6 酵素活性を反映しているかどうかは不明である。これに対し、本章で使用したキメラマウスは *in vitro* において、ドナーと同程度の薬物代謝能を有することを昨年度明らかにしたため、おそらく、*in vivo* においても、ヒトの代謝能を反映していると推測される。しかし、この点に関しては更なる検討が必要であろう。

次に、CYP2D6 阻害薬の前投与がデブリソキンの代謝に及ぼす影響について検討した。キニジンは古くから臨床で使用されてきた抗不整脈薬であり、ヒト CYP2D6 の代表的な阻害薬として知られている。肝ミクロソームを用いた阻害実験で、デブリソキンの 4'-水酸化酵素活性に対するキニジンの Ki 値はヒトにおいて 0.6 μM であるが、ラットにおいては 50 μM であった (Kobayashi et al., 1989)。しかし、マウスについて、キニジンの阻害作用に関する報告はなされていない。キニジンの前投与により、高 hAlb 群で 4'-水酸化デブリソキンの AUC および Cmax が有意に減少した。キメラマウスにおいて、キニジンによる CYP2D6 の阻害作用

が認められたことから、*in vivo*における薬物相互作用を再現できることが示唆された。これに対し、低 hAlb 群や uPA(-/-)SCID マウスでは顕著な変化は認められなかった。従って、ラットと同様、マウスにおいてもデブリソキンの 4'-水酸化酵素活性に対するキニジンの阻害作用は弱いと考えられる。これより、本章で用いたキニジンの投与量では、高 hAlb 群におけるキニジンの阻害作用はヒト特異的と考えられる。*In vivo*における CYP2D6 酵素活性のヒト特異的な阻害が高 hAlb 群のキメラマウスで認められたことから、ヒトで起こりうる薬物相互作用を予測することが可能と考えられる。

CYP の阻害様式には可逆的な阻害と不可逆的な阻害がある。可逆的な阻害様式としては競合阻害、非競合阻害、不競合阻害がある。上述したキニジンのデブリソキン 4'-水酸化酵素活性に対する阻害作用は *in vitro* において競合阻害であると報告されている (Kobayashi et al., 1989)。不可逆的な阻害様式として、mechanism-based inhibition と呼ばれる阻害があり、これは、阻害薬が代謝されて生成した中間体が酵素の活性中心に共有結合することにより酵素を不活性化するものである。そこで、不可逆的な阻害が認められ

るか検討を行うため、ヒト肝ミクロソームを用いた *in vitro* 実験で CYP2D6 の mechanism-based inhibition が報告されているパロキセチンを用いて (Bertelsen et al., 2003)、同様に検討を行った。その結果、パロキセチンの前投与により、いずれの群においても 4'-水酸化デブリソキンの AUC および Cmax の有意な低下が認められた。デブリソキンについても全ての群において、AUC および Cmax の上昇傾向が認められた。mechanism-based inhibition に関して、種差の報告がこれまでになされていないため、ヒト特異的な阻害を検討することはできなかったが、高 hAlb 群において 4'-水酸化デブリソキンの AUC が顕著に減少したことから、異なる阻害様式であるパロキセチンについても阻害が認められることが明らかになった。

以上より、キメラマウスのヒト CYP2D6 酵素活性をキニジンやパロキセチンが阻害することを明らかにした。本章で認められた CYP2D6 阻害薬によるデブリソキンおよび代謝物である 4'-水酸化デブリソキンのキネティックパラメーターの変動を基に、ヒトでの相互作用を予測するためにはさらなる検討が必要と考えられる。しかし、キメラマウスは *in vitro* 実験系や実験動物を用いた *in vivo* 実

験よりもさらにヒトに近い状態で、薬物相互作用の検討を行うことが出来る動物モデルであると考えられる。ヒトへの外挿について様々な検討が行われており、予測方法も改良が重ねられているが、キメラマウスを用いて同様の検討を行うことにより、ヒトにおける薬物相互作用をより詳細に予測することができると期待される。

E. 結論

本章では、*in vivo*においてヒト肝細胞キメラマウスはヒトの薬物代謝能を有することを明らかにした。また、ヒト特異的な薬物相互作用が発現することを明らかにした。これより、キメラマウスはヒトにおける薬物相互作用を *in vivo* で検討することが可能な実験動物モデルとして活用できると考えられる。

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：

ヒト肝細胞キメラマウスにおける *in vivo* 薬物代謝能の検討；日本薬学会第125年会、平成17年3月29-31日、東京

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）

Al-Dabbagh SG, Idle Jr and Smith RL (1981) Animal modelling of human polymorphic drug oxidation—the metabolism of debrisoquine and phenacetin in rat inbred strains. *J Pharm Pharmacol* **33**: 161-164.

Bertelsen KM, Venkatakrishnan K, Von Moltke LL, Obach RS and Greenblatt DJ (2003) Apparent mechanism-based inhibition of human CYP2D6 *in vitro* by paroxetine: comparison with fluoxetine and quinidine. *Drug Metab Dispos* **31**: 289-293.

千葉寛 (1995) チトクローム P450 を介した薬物相互作用. *ファルマシア* **9**: 992-996.

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 HNF4 α on the disposition of debrisoquine in the mouse. *Mol Pharmacol* **60**: 1260-1267.

Guengerich FP (1996) *In vitro* techniques for studying drug metabolism. *J Pharmacokinetic Biopharm* **24**: 521-533.

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.

Kobayashi S, Murray S, Watson D, Sesardic D, Davies DS and Boobis AR (1989) The specificity of inhibition of debrisoquine 4-hydroxylase activity by quinidine and quinine in the rat is the inverse of that in man. *Biochem Pharmacol* **38**: 2795-2799.

Masubuchi Y, Iwasa T, Hosokawa S, Suzuki T, Horie T, Imaoka S, Funae Y and

Narimatsu S (1997) Selective deficiency of debrisoquine 4-hydroxylase activity in mouse liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* **282**: 1435-1441.

Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y and Guengerich FP (1994) Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* **270**: 414-423.

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塩酸アモスラロールの代謝に関する 検討および薬物輸送トランスポーターに関する組織学的検討

主任研究者 横井 毅 金沢大学 薬学部

協力研究者 鈴木 勝広 山之内製薬(株)代謝研究所 主任研究員

研究要旨

肝組織をヒト肝細胞で置換したマウスの医薬品開発への応用について検討した。本研究の第I章では、ヒトとそれ以外の動物種で代謝が大きく異なっていることが判明しているβブロッカーの1種である塩酸アモスラロールをキメラマウスに単回経口投与した。この尿および胆汁中代謝プロファイルはヒト肝細胞低置換マウスにおいては、通常のICRマウスの代謝プロファイルに類似していた。高置換マウスの尿における主代謝パターンは低置換マウスのそれと類似していたが、それらに加え、ヒトの主要代謝物であるM3硫酸抱合体(M3S)が置換率と共に増加していることが判明した。胆汁においては置換率よりも個体差の影響が大きいことが明らかとなったが、ヒト肝細胞置換率に応じてM3Sが増加していることが判明した。凍結肝実質細胞を用いて*in vitro*代謝試験においては、ICRマウスとヒトとヒト肝臓キメラマウスから調製した凍結肝実質細胞の反応液を比較したところ、ヒトとヒト肝臓キメラマウスの代謝パターンが類似した。第II章では、マウス肝臓内に着生し増殖した肝細胞の組織学的考察をヒト抗体を用いた各種染色のほか、ヒトトランスポーターの抗体も用いて代謝や毒性学の観点から実施した。ヒト肝細胞は本来の肝小葉、肝細胞索の構造を欠くがヒト肝細胞間で類洞および毛細胆管の形成が観察された。また、ヒトトランスポーターの免疫化学的染色では、apical-basolateralに存在するトランスポーターがそれぞれ局在化し発現していることが確認された。今回用いた薬剤はマウスでヒトよりも大きなクリアランスを示し、これがキメラマウスの残存マウス肝細胞により代謝されることが判明した。今後の検討課題として残存マウス細胞による代謝の影響の回避が上げられた。

ヒトにおける薬物の代謝物を早期に予測することはヒト代謝物の動物における暴露の検証、ヒト特異的代謝物の有無の確認と毒性の確認等が見込まれるため、医薬品開発時および臨床における重要課題である。本研究での*in vivo*代謝に関する基礎的な検討結果より、ヒト肝細胞キメラマウスはヒトにおける薬物動態研究の有用な手段として可能性を有していると考えられた。

A. 研究目的

新規医薬品開発における早期のヒトの代謝の予測は薬理的、毒性学的研究においてヒトの代謝能と相同性の高い動物種を選択するのに貢献すると思われる(Wrighton et al., 1995)。これまでヒトの代謝の予測にはヒトと動物種間での種差が存在し、各種実験動物を用いた薬物のヒトでの有効性、安全性を予測するには必ずしも十分とはいえない状況であった。このような状況を打開すべく、さまざまな試みが世界中でなされてきた。例えばヒトの肝ミクロソーム、肝スライス、凍結肝実質細胞などである(Ekins et al., 2000; Brandon et al., 2003)。これらを用いた方法は調製方法、種差、系統差、ロット間差、酵素活性の発現の有無、第 II 相抱合反応への補酵素の添加の有無等、条件が詳しく検討され方法が確立されている。しかし、これらの*in vitro*代謝がヒトの代謝を反映しているかの確認はヒトの尿および血漿との比較が必要になっている。

また、これら*in vitro*代謝試験においては*in vivo*における吸収、分布および排泄過程が欠除しているが、生体においてはこれらの過程が薬理、薬物動態や毒性発現において重要な要因であり、薬物によってはこの過程で代謝を受けたり毒性を発現に関与する場合も多く*in vitro*代謝でヒトにおける薬物動態等を全て網羅しているとは言えないのが現状である(Guillouzo et al., 1985)。ヒトの代謝予測をする上でこのような問題点を克服する試験方法および材料は常に関心が高く、より*in vivo*に近い系が模索され検討されている。

このような状況の下、本研究では吉里勝利教授(分担研究者)によって開発された「ヒト肝細胞キメラマウス」(Tateno et al., 2004)を用いることにより、従来の*in vitro*試験や動物を用いた各種試験の欠点を補ったヒトにおける薬物動態および安全性を予測するツールとしての有用性を確認することを目的とした。

今回被験試薬として選択した塩酸

アモスラロール（販売名ローガン[®]、Fig. 1）は当社において創製された本態性高血圧を適応症とする β -受容体遮断作用を有する医薬品である（Ando et al., 1992）。その薬物動態および代謝物および代謝経路については詳細に調べられ（Sasaki et al., 1984, Kamimura et al., 1985）、そのPKパラメーター（Kamimura et al., 1984）をTable 1に、代謝物の構造をFig. 2に、マウスとヒトにおける代謝物の尿における投与した未変化体に対する排泄率をTable 2にそれぞれ示した。本物質はマウスとヒトでクリアランスに差があるものの、ヒトとマウスでは代謝物プロファイルが大きく異なり、ヒト肝臓由来による代謝物と残存マウス肝臓による代謝物の差を検証するには最適の薬物と思われた。そこで本研究において、本薬物をキメラマウスに経口投与し、尿中代謝物の未変化体および各種代謝物の濃度を測定した。さらに凍結肝実質細胞（cryopreserved hepatocytes）を用いた *in vitro* 代謝試験を実施し *in vitro* 系での検証も併せて行った。これらの結果を第1章に記す。

他方、ヒト肝細胞の増殖したキメラマウスの肝臓の構造を評価することも代謝上重要と思われた。哺乳類の肝は肝小葉の集まりから成立して

いる。それぞれの肝小葉はグリソン鞘という結合組織で隔てられている。グリソン鞘の中には固有肝動脈、門脈、肝管の枝が一組になって走っている。肝細胞はブロック状に並びこのブロックとブロックの間に類洞と呼ばれる毛細血管が走っている。1つの肝細胞のブロックを肝細胞索という。肝細胞索の内側に毛細胆管の集合したこれが小葉間胆管に繋がり総胆管へ胆汁を分泌する。以上のように肝細胞は血液から薬物などを取り込み胆汁へ排泄するという機能的な構造を有している。マウスに移植されたヒト肝細胞がマウスの肝臓内で定着した後、薬物の取り込みから胆汁へ分泌できる機能的な構造を有しているか知ることは、代謝を考察する上でも重要である。標準的な染色方法のほかに、ヒト特異的タンパクの染色により構造の知見を得ることとした。

また、近年薬物動態分野では吸収・排泄過程においてトランスポーターが重要な役割を果たしていることが明らかにされ、主要臓器、例えば小腸、肝臓、腎臓、脳血管、胎盤のトランスポーターの種類や遺伝子の同定や機能・構造等が詳細に調べられ、さらに輸送する基質となる医療用薬剤と相互作用も調べられ、知見が集積されつつある（Fig. 3）。また、これら

のヒトトランスポーターの存在を免疫化学的に組織染色し、視覚化できる試薬も市販され入手が容易になってきている。先の述べた肝細胞の構造において一つ一つの肝細胞は血管側と胆管側とに極性を持つ構造をしており、トランスポーターもそれぞれ局在化している。免疫染色することによりキメラマウスの肝臓中のヒト肝細胞にヒト特異的トランスポーターの発現を観察することが可能である。

薬物輸送でよく研究されその機能が明らかになっている取り込みと排出を担う肝細胞のトランスポーター

を例に上げる。肝特異的有機アニオントランスポーター(liver-specific organic anion transporter) LST-1 (OATP2)は肝実質細胞の血管側に発現し血管からの肝細胞への有機アニオンの取り込みに関与している。一方、MRP2 (cMOAT)は肝実質細胞の胆管側に発現し、肝細胞内から胆汁中への有機カチオンの排出に関与している。

ヒト肝細胞にこれらのトランスポーターの存在および局在について確認することも目的とし病理学的観察を行い、その結果を第II章に記す。

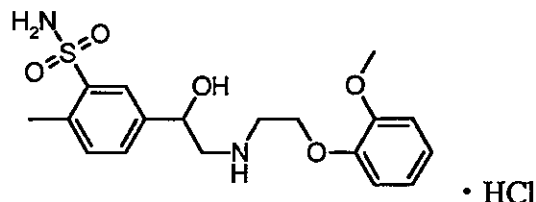


Fig. 1 Structure of amosulalol hydrochloride (Lowgan®)

Table 1 Pharmacokinetic parameters of amosulalol hydrochloride in mice and humans.

Species	Dosing (mg/kg)	N	iv			po				
			$t_{1/2\beta}$ (h)	AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	Cl_{renal} (L/h/kg)	T_{max} (h)	C_{pmax} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	$t_{1/2}$ (h)	AUC _{0-∞} ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	Systemic availability (%)
Mice	10	4	1.1	0.93	10.7	0.25	0.31	1.3	0.36	38.7
	100	4	-	-	-	0.25	7.03	0.9	7.94	**
Humans	0.16	7	2.8	1.22	0.1	-	-	-	-	-
	0.23*	2	-	-	-	4	0.2	4.4	1.67	95

*: 12.5 mg/man, **: Not calculated because of no correlation between dosage and AUC

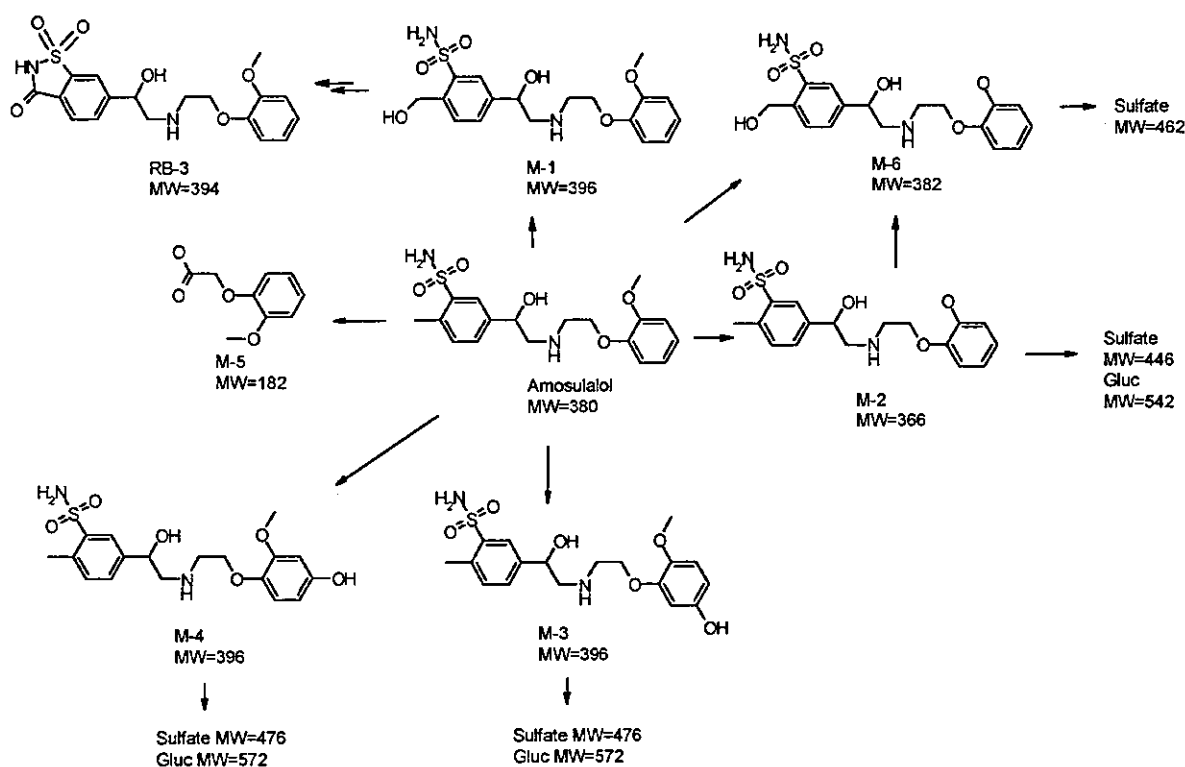


Fig. 2 Metabolic pathways of amosulalol

Table 2 Analysis of Urine of Mice and Humans Administered with Amosulalol Hydrochloride

	Mouse	Human
Amosulalol	7.6 ± 1.6	30.1 ± 5.2
M-1	1.7 ± 0.3	N.D.
M-2	0.9 ± 0.1	N.D.
M-2 glucuronide	22.1 ± 3.5	N.D.
M-2 sulfate	0.2 ± 0.1	N.D.
M-3 glucuronide	5.8 ± 0.6	N.D.
M-3 sulfate	1.4 ± 0.5	12.7 ± 2.5
M-4 glucuronide	4.7 ± 0.8	N.D.
<u>M-6 glucuronide</u>	<u>2.3 ± 0.2</u>	<u>N.D.</u>

IC mice and humans were orally administered with 100 and 50 mg/kg body weight of amosulalol hydrochlorid, respectively.

^a Mean ± S.E.M. (mol/mol % of dose) of 3 experiments.

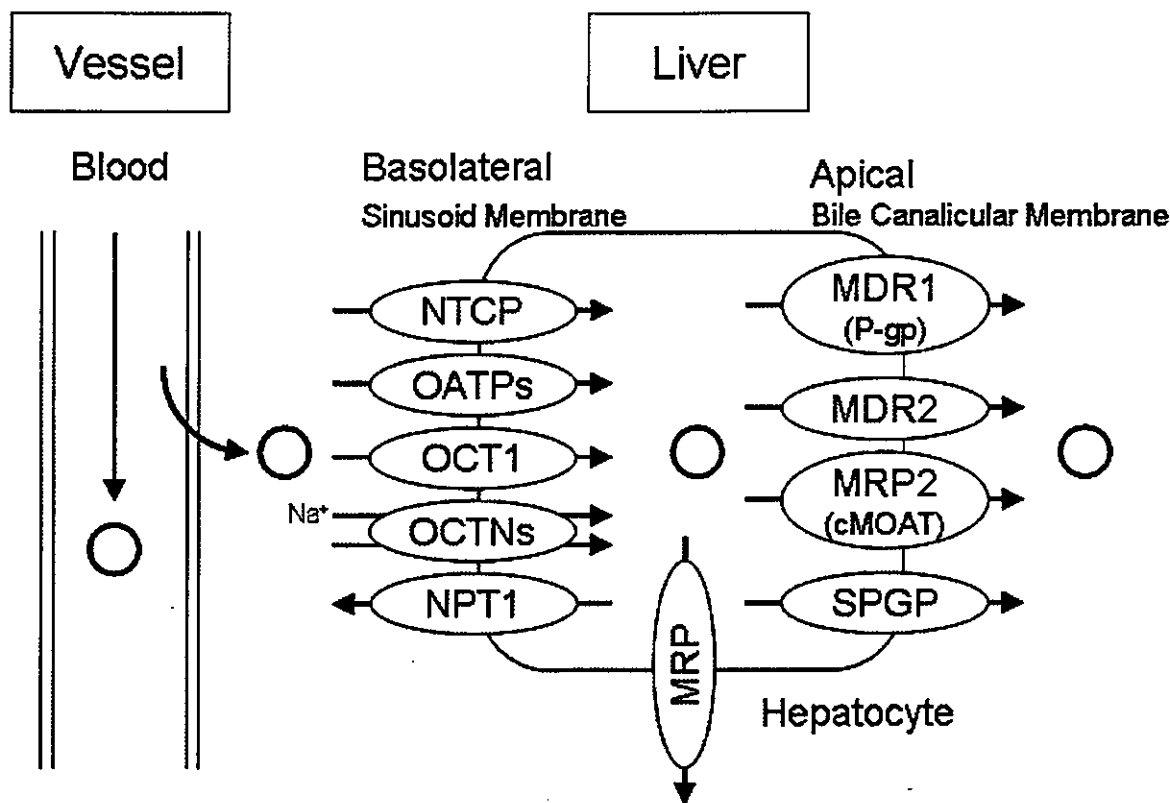


Fig. 3 Illustration of human membrane transporters expressed in liver

第 I 章 ヒト肝細胞キメラマウス における塩酸アモスラロールの代 謝に関する検討

B. 研究方法

B-1. ヒト肝細胞キメラマウス

uPA (+/-)/SCID マウスおよび uPA (-/-)/SCID マウスは日本チャールズ・リバー (Yokohama, Japan) より入手した。本研究ではキメラマウスのドナーとして、In Vitro Technologies (Catonsville, MD) より購入した凍結ヒト肝細胞 D2 (白

人、男性、9ヶ月)を用いた。生後11-14週齢の雄性および雌性のキメラマウスを使用した。なお、ヒト肝臓置換率はELISA法により測定したキメラマウスの血中ヒトアルブミン濃度 (human albumin concn., hAlb) と、ヒト特異的サイトケラチン 8/18 抗体による免疫染色から算出した置換率 (replacement index, RI) により算出した。使用したキメラマウスの性別およびRIをTable 3にまとめて示した。

Table 3 Chimeric mice used to collect urine and bile samples in this study

Animal No.	Gender	RI [%]	Collected Sample
1-7	M	10	bile
1-9	F	<1	bile
13-1	F	60	bile
13-4	M	50	bile
13-11	F	70	bile
65-2	F	>80	urine
65-4	F	60	urine
65-5	F	40	urine
65-7	M	30	urine
65-8	M	<1	urine
65-10	M	30	urine
65-11	M	50	urine
66-1	F	20	urine
66-5	F	<1	urine
66-6	F	40	urine
66-9	M	20	urine
66-10	M	<1	urine
66-11	M	70	urine
66-12	M	70	urine

F: female, M: male

RI: replacement index

B-2. ICR マウス

ICR マウスは日本クレア (Tokyo, Japan) より 4 週令の雄性を購入し、1 週間以上飼育し馴化させた後に使用した。

B-3. 投与および試料採集方法

B-3-1. キメラマウスからの尿採集

未変化体を 10 mg/kg (salt form) の割合で、前日 17 時より絶食処理したキメラマウスに強制経口投与した。ビークルには精製水を用いた。投与

後、代謝ケージ（メタボリカ MM, Sugiyama Gen Iriki, Tokyo, Japan）に1匹ずつ入れ尿は投与直後からドライアイス冷却下で集められ、24時間後に回収し、代謝ケージは精製水で洗い、洗液も回収した。水は投与直後から自由に摂取させ、餌は投与4時間後に開始した。

B-3-2. キメラマウスからの胆汁採集
飽食のキメラマウスにエーテル麻酔し、胆管カニューレーションを施した。麻酔覚醒後に未変化体を10 mg/kg (salt form)の割合で強制経口投与し、ボールマンケージに固定し胆汁を24時間採集した。

B-3-3. ICRマウスからの尿採取
前日の17時より絶食処理したICRマウスに未変化体を10あるいは100 mg/kg (salt form)の割合で強制経口投与し、代謝ケージにおいて尿を24時間採集した。水は投与直後から自由に摂取させ、餌は投与4時間後に開始した。

B-3-4. ICRマウスからの胆汁採取
前日の17時より絶食処理したICRマウスにエーテル麻酔し、胆管カニューレーションを施した。麻酔覚醒後に未変化体を100 mg/kg (salt form)の割合で強制経口投与し、ボールマ

ンケージに固定し胆汁を24時間採集した。水は投与直後から自由に摂取させ、餌は投与4時間後に開始した。

B-4. 凍結肝実質細胞を用いた *in vitro* 代謝実験

ヒトの凍結肝実質細胞は In Vitro Technologies Inc. (Baltimore, MD, USA)より購入した。ICRマウスの凍結肝実質細胞は XenoTech LLC (KA, USA)より購入した。キメラマウス (Lot No. CTE7-1)の凍結肝実質細胞は広島県産業科学技術研究所より入手した。

B-5. 凍結肝実質細胞を用いた *in vitro* 代謝実験

B-5-1. 細胞の融解

凍結保存肝実質細胞の融解操作は、XenoTech, LLC 発行のプロトコルに従い、Hepatocyte Isolation Kit (XenoTech, LLC) を用いて行った。Hepatocyte Isolation Kit の Tube A および B 内の培地は使用前に恒温槽中（温度設定 37℃）にて予め保温した。

液体窒素を充填した凍結保存容器より凍結保存肝実質細胞のバイアルを取り出し、恒温槽中（温度設定 37℃）で穏やかに攪拌しながらバイアル内の細胞懸濁液を融解した。融

解時間は約 1.5 分間とした。融解した細胞懸濁液は Kit の Tube A に移した。細胞の入っていたバイアル内は Tube B 内の培地 1.5 mL で洗い、その洗液も Tube A に移した。細胞懸濁液を遠心分離 (600 rpm, 20 °C, 5 分) した後、上清を吸引除去した。得られた細胞沈査に Tube B 内の残りの培地全量を加え穏やかに懸濁した後、遠心分離 (500 rpm, 20 °C, 3 分) した。上清を吸引除去して、目的の細胞濃度となるように Krebs-Henseleit 緩衝溶液 (pH 7.4) を加えて穏やかに懸濁した後、CO₂ インキュベータ (温度設定 37 °C, 5% CO₂-95% air) 中にて 30 分間プレインキュベーションした。

B-5-2. 其質溶液の調製

1 mM 塩酸アモスラロール水溶液を Krebs-Henseleit 緩衝溶液 (pH 7.4) にて希釈して 20 μM 塩酸アモスラロール溶液を調製した。この溶液 125 μL を、反応時間ごとに n=1 となるように、24 穴プレートに分注した後、CO₂ インキュベータ (温度設定 37 °C, 5% CO₂-95% air) 中に静置して 10 分間プレインキュベーションした。

B-5-3. 代謝反応の開始および停止
プレインキュベーション終了後、塩

酸アモスラロールの分注された well に細胞懸濁液 125 μL を添加し十分に懸濁した。24 穴プレートを CO₂ インキュベータ (温度設定 37 °C, 5% CO₂-95% air) 内に静置し反応を行った。この時点における塩酸アモスラロール濃度は 10 μM であった。また各ロットの細胞濃度は、Lot No. 104 は 4.8×10⁵ cells/mL、Lot No. CYE は 1.0×10⁶ cells/mL、Lot No. 079 および Lot No. CTE7-1 は 5.0×10⁵ cells/mL に調製した。

反応開始後 4 時点 (0, 3, 6, 24 時間) において、反応液上清を回収し、これにアセトニトリル 125 μL を添加し、反応を停止させた。

B-6. ICR マウス胆汁中代謝物の単離

胆管カニュレーションを施した ICR マウスに 100 mg/kg の割合で未変化体を経口投与し、得られた胆汁を分析したところ、分子量 600 の未同定代謝物が検出された。そこでこの代謝物を単離し構造解析をするために 100 mg/kg の割合で未変化体を強制投与し 24 時間採集した 3.5 mL のマウス胆汁を用いて、以下の精製により単離を行った。

マウス胆汁 3.5 mL に 4 倍量の 100 mM 酢酸アンモニウムを加え希釈した後、予めメタノール 20 mL 次いで精製水で活性化させておいた Oasis

HLB 20 cc/1 g (Waters, MD; USA) を用いて固相抽出を行った。Oasis に胆汁希釈液を通液後、水 20 mL で水洗し、メタノールの比率を 4 段階に変えた 100 mM 酢酸アンモニウム-ギ酸緩衝液でステップワイズ溶出した。その緩衝液の組成は以下の通りであった。100 mM 酢酸アンモニウム-メタノール-水-ギ酸 (100:250:650:1)、(100:500:500:1)、(100:750:250:1)、(100:900:0:1)。目的の代謝物を含むメタノールが 50% と 75% の画分を合わせて減圧濃縮し、溶媒を溜去した。得られた乾固物を分取 HPLC に付した。このときの分取条件を Table 4 に示す。このとき代謝物は保持時間 28.5-29 分に溶出した。この画分を Oasis HLB を用いた固相抽出により脱塩・回収し、溶出区から 0.6 mg の代謝物を得た。これを LC/MS および NMR で構造解析を行った。

B-7. LC/MS 分析

LC/MS 分析に供する試料の前処理は凍結肝実質細胞反応液を Fig. 4 に、胆汁を Fig. 5 に示した。尿は遠心ろ過処理後のろ過液を直接注入した。LC/MS の分析条件を Table 5 にまとめて示した。MS の取り込み時間は各

試料のマトリクスが溶出し終わり、代謝物が溶出する前の注入後 10 分からデータの取り込みを開始した。

B-8. 使用機器

LC/MS の分析は LC が HP1100 シリーズ(G1311A ポンプ、G1316A カラムコンパートメント、G1329A オートインジェクター、G1323B システムコントローラー、Hewlett Packard, CA, USA)、UV 検出が Surveyor PDA (ThermoQuest, CA, USA)、MS が Finnigan LCQ^{Deca} (ThermoQuest, CA, USA)を用いた。MS の大気圧イオン化法は ESI (ThermoQuest, CA, USA)を用いた。代謝物の精製には島津製作所製 HPLC (LC-10AT ポンプ、SIL-10A オートサンプラー、SPD-10AV UV 検出器、CTO-10A カラムオーブン、SCL-10A コントローラー、Chromatopack C-R7A、Kyoto, Japan) を用いた。NMR 測定は JNM-A500 (日本電子, Tokyo, Japan) を用い、内部標準は tetramethylsilane を用いケミカルシフトには ppm を、結合定数には Hz を用いて表記した。測定は methanol-*d*₄を用いて行った。

Table 4 Conditions of preparative HPLC for unidentified biliary metabolite in ICR mice

LC conditions

Column: Inertsil ODS-3, s-5 μm , 10.0 mm i.d. \times 250 mm (GL Science, Tokyo, Japan))

Column Temp.: 40_C

Flow Rate: 4.6 mL/min

UV detection: 248 nm

Mobile phase: (A) 100 mM AcONH₄-MeOH-H₂O-HCOOH (100:100:800:1)

Mobile phase: (B) 100 mM AcONH₄-MeOH-H₂O-HCOOH (100:800:100:1)

Solvent gradient program

Time	0	5	60	[min]
(A)	95	95	0	[%]
(B)	5	5	100	[%]

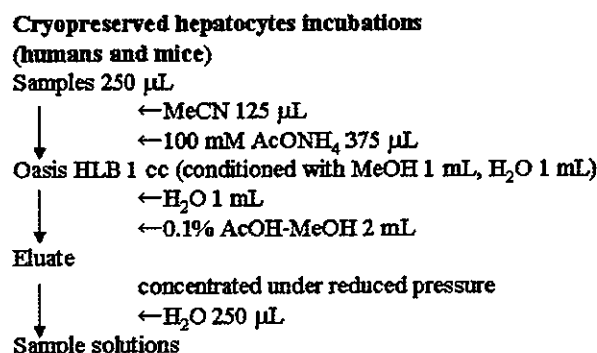


Fig. 4 Sample preparation of cryopreserved hepatocytes incubations for LC/MS analysis

Table 5 Analytical conditions of LC/MS

LC conditions

Column: CAPCELL PAK UG120, s-5 μm , 2.0 mm i.d. \times 250 mm (Shiseido, Tokyo, Japan)

Column Temp.: 40_C

Flow Rate: 0.21 mL/min

UV detection: 271 nm

Mobile phase: (A) 10 mM AcONH₄ (pH9.0)-MeOH (95:5)

Mobile phase: (B) 10 mM AcONH₄ (pH9.0)-MeCN-MeOH (5:47.5:47.5)

Solvent gradient program

Time	0	10	20	30	[min]
(A)	100	70	65	20	[%]
(B)	0	30	35	80	[%]

MS detections

ThermoQuest LCQ^{DECA}, ESI-positive/negative, Heated Capillary Temp.: 300_C

Full scan range: *m/z* 150-1000

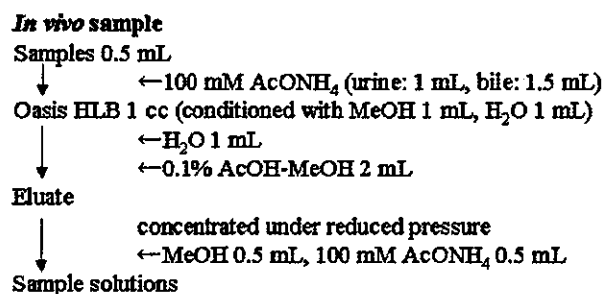


Fig. 5 Sample preparation of mouse bile samples for LC/MS analysis

C. 研究結果

C-1. マウス尿中代謝物プロファイル

ICR マウスおよびキメラマウスの尿を LC/MS で分析したときの結果を Fig. 6 に示した。代謝物の濃度が低いため UV および Total ion chromatogram (TIC) ではピークが確認することが出来なかったため、代謝物と見変化体の分子量を積算したマスキロマトグラムを記載した。ICR マウスのクロマトにおいて代謝物の主要なピーク、M2, M3, M4 の各グルクロン酸抱合体および M-3 の硫酸抱合体は定量値とほぼ一致したピーク強度であった。

ICR マウス、ヒト肝臓低置換 (RI<1%未満) および高置換 (RI>80%) キメラマウスを比較すると低置換マウスのクロマトは ICR マウスのク

ロマトと比較的類似していた。しかし、M2 グルクロン酸抱合体(M2G)のピークが小さくなり M2 硫酸抱合体(M2S)が増加した。また、M3 硫酸抱合体(M3S)が ICR マウスではほとんど検出されていない一方、低置換率マウスでは ICR マウスより代謝能が亢進していることが示唆された。高置換と低置換マウスを比較すると低置換キメラマウスに見られた代謝物は置換率に関係なく同様なパターンおよび含量を示した。ヒト肝細胞により代謝されると予想される M3S は置換率に応じて増加していることが判明した。しかし、高置換マウスの M3S の未変化体に対する排泄率はヒトと比して低いものであった。また、ヒトでは M1 および M2 に代謝されないがヒト肝臓置換率に応じて排泄率が増加していた。

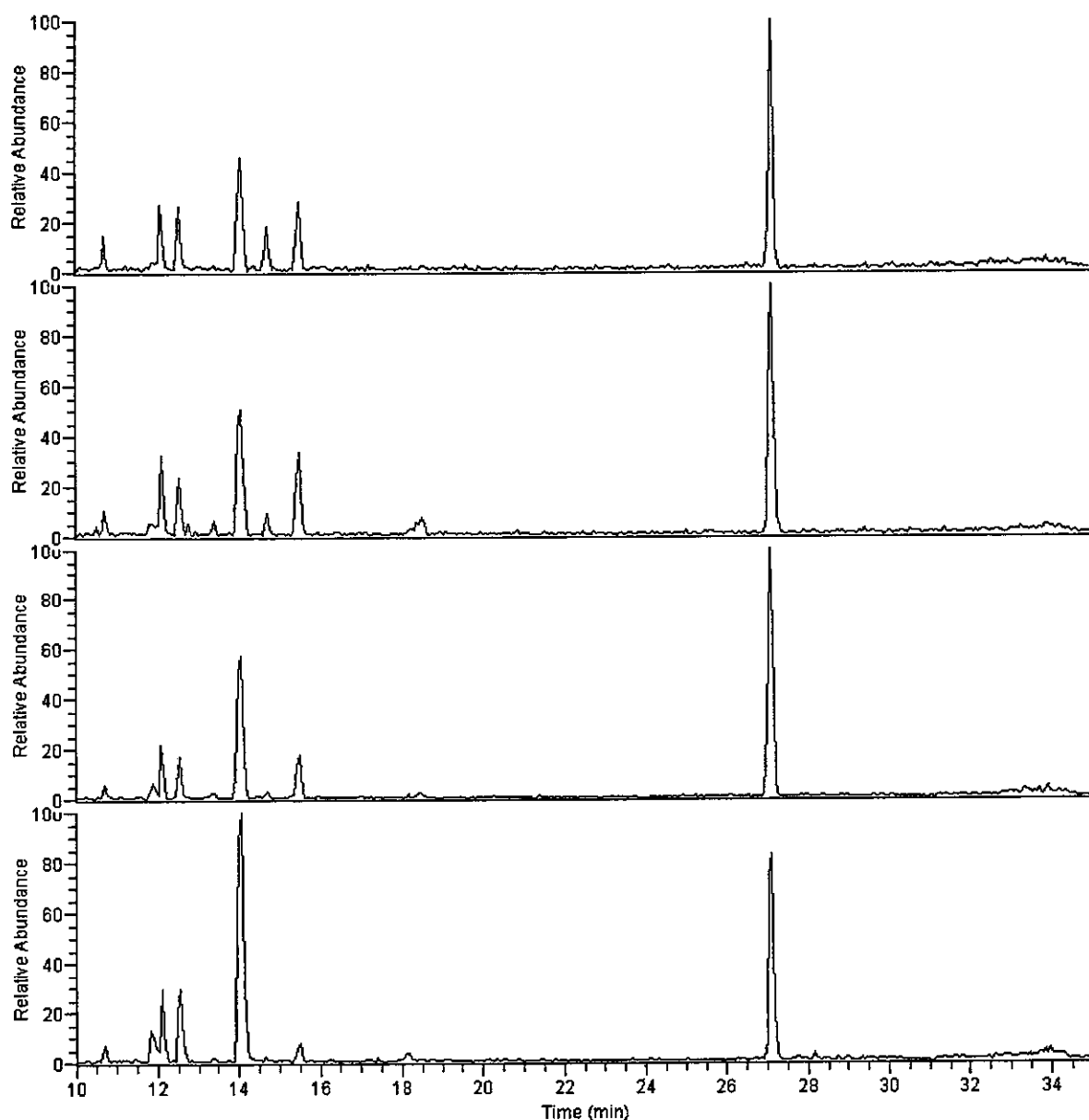


Fig. 6 Representative mass chromatograms of chimeric mice (RI>80%, A), (RI=40%, B), (RI<1%, C) and ICR mice (D) urine samples collected for 0 to 24 h after single oral administration at a dose of 10 mg/kg (A-C) and 100 mg/kg (D)

C-2. マウス胆汁中代謝物プロファイル

キメラマウスに常法に従って胆管カニューレーションを施したが、体重が少なく胆管が細いこと。ICR マウスと比較して肝臓が肥大している

こと、ICR マウスと比較してエーテル麻酔に対して感受性が高く麻酔中に死亡し易いこと等から、胆管カニューレーションが非常に困難であった。ICR マウスおよびキメラマウスの胆汁を LC/MS で分析した結果

を Fig. 7 に示した。尿同様、代謝物と見変化体の分子量を積算したマスキロマトグラムを記載した。

ICR マウスの 10 mg/kg 投与では尿同様、M2G が主代謝物であることが判明した。しかし、100 mg/kg 投与では保持時間約 21 分にこれま構造が明らかにされていない代謝物が主代謝物として排泄されていることが判明した。この未同定代謝物の構造解析については C-4 で記述する。このほかに M2G の相対的ピーク強度が低下し M1, M2S, M3S および ラットの胆汁中代謝物 RB-3 が検出された。

ICR マウスとヒト肝臓低置換キメラマウスのクロマトを比較すると低置換マウスのクロマトは 100 mg/kg の ICR マウスのクロマトと類似していた。キメラマウス間で比較すると高置換マウスでは M3S の排泄率が他の代謝物と相対的に増加している傾向が認められた。しかし、それ以外の代謝物のプロファイルと比較すると代謝物プロファイルと置換率に何らかの相関を見出すことは出来なかった。

C-3. マウス胆汁中代謝物の構造解析

今回初めて採取され分析されたマウス胆汁中に未同定の代謝物がある

ことが判明した。この代謝物は LC/MS 分析において m/z 618, 623 を与え、これらはそれぞれ代謝物のアンモニウムおよびナトリウムのアダクトイオンと考えられ、分子量を 600 と推定した。 m/z 618 での MS/MS より未変化体と推定されるアグリコンのフラグメントイオン m/z 381 が得られたことから、その差分から未変化体にグルクロン酸残基と 28 u が付加した代謝物と推定した。1H-NMR においてアノメリックプロトンのシグナルが δ 5.43, 5.45 [0.5H ($J=7.8$ Hz) each] に分裂したダブルットピークとして観測された。この低磁場シフトしたアノメリックプロトンのケミカルシフトと、2 つのコンフォーマーによりシグナルが分裂したことから、グルクロン酸がカルボニル基に結合していると推定された。アグリコン部分のケミカルシフトは 2 級アミンに結合している部分を除いて、ほとんど未変化体と同じであった事からこのカルボニル基は 2 級アミンに結合し、未変化体のカルバモイルグルクロン酸 (carbamoyl glucuronide) と推定した。アノメリックプロトンの大きな結合定数からグルクロン酸は β 結合していると推定した。推定された代謝物と未変化体の構造と NMR の帰属を Fig. 8 に示した。