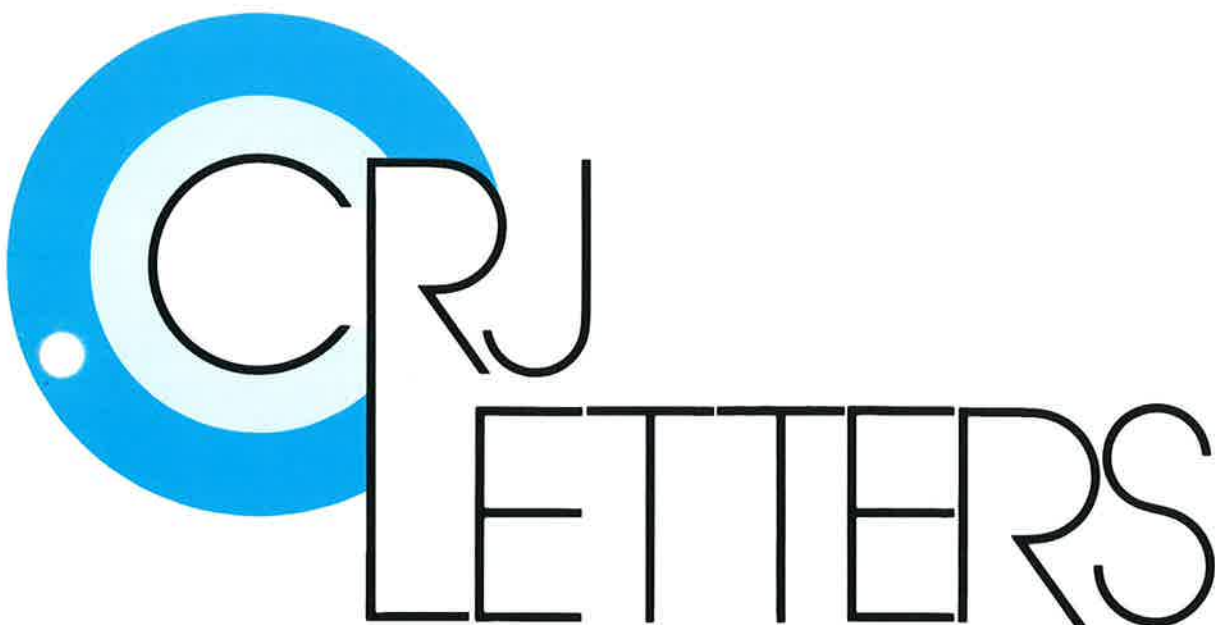


Vol.10 No.2

July 1997



CR LETTERS

—— 巻頭論文 ——

ヒト初代培養肝細胞を用いた薬物動態学的相互作用の評価
～ TerfenadineとRifampinをモデル化合物として ～

ヒト初代培養肝細胞を用いた薬物動態学的相互作用の評価 ～TerfenadineとRifampinをモデル化合物として～

キーワード：

ヒト初代培養肝細胞、薬物動態学、terfenadine、rifampin、薬物代謝、薬物相互作用、薬物毒性、医薬品開発、CYP450

要旨：

近年、薬物相互作用の評価にヒト初代培養肝細胞（以下ヒト肝細胞と記す。）が使用されるようになってきた。ヒトの *in vivo* で認められた薬物相互作用が、ヒト肝細胞を使用した *in vivo* モデルで再現するかどうかを調べることは、ヒト *in vivo* での薬物の相互作用を予測する上で極めて重要である。本研究でモデル薬物として使用したterfenadine及びrifampinはそれぞれCYP 450の阻害及び誘導により薬物相互作用を示す薬物である。

Terfenadineは、ヒト *in vivo* の場合と同様に、ヒト肝細胞においてN-脱アルキル化生成物及びC-酸化生成物に代謝されることが認められた。様々な阻害剤のterfenadine代謝に対するK_i値を、*in vitro* 代謝実験のデータより算出し、以下のように阻害能力のランク付けを行った。

N-脱アルキル化の阻害:ketoconazole>itraconazole>cyclosporin>troleandomycin>erythromycin>naringenin

C-酸化の阻害:itraconazole≥ketoconazole>cyclosporin≥naringenin≥erythromycin≥troleandomycin

この結果から、これらの薬物とterfenadineをヒトに同時に投与するとterfenadineの代謝が阻害を受けることが示唆された。

ヒト *in vivo* では既に知られているrifampinによるCYP3A4の誘導はヒト肝細胞においても再現された。CYP3A4 酵素活性の指標としてtestosterone 6β-hydroxylation活性を調べたところ、rifampinの投与量、及び暴露期間に依存して本酵素活性は増加した。実験が行われた7ドナー（年齢範囲：1.7歳から78歳）から得られたヒト肝細胞で、7ドナーすべてにおいてrifampinによるCYP3A4の誘導が認められた。また、testosteroneと同様CYP3A4の基質であるlidocaineの代謝に及ぼすrifampinの影響を評価したところ、rifampinの暴露量に依存してlidocaine代謝を促進することが確認され、rifampinはtestosteroneのみならずCYP3A4の基質となる薬物の代謝を促進する事が確認された。

これらの結果から、rifampinとCYP3A4の基質となる薬物を同時に投与すると、これらの薬物はヒト肝細胞で短時間に代謝され、有効な薬効を示さなくなる可能性を示唆している。以上の研究結果から、新薬開発において前臨床で薬物相互作用の可能性を評価し、また臨床で認められた薬物相互作用のメカニズムを評価する際に、ヒト肝細胞は、有用な実験系であることが示唆された。

著者プロフィール

Albert P. Li, Ph. D.
In Vitro Technologies社 副社長
1972年 Wisconsin大学卒業(化学系)
1976年 ヒト肝細胞を用いた代謝・毒性研究によりTennessee大学にてPh.d.取得
1977年 New Mexico大学医学部助教授
1982年～ Monsanto社にてヒト肝細胞を用いた医薬品開発研究に従事
1993年～ St.Louis大学教授
1995年～ 現職、趣味：テニス、オセロゲーム、寿司





緒言：

複数の疾病を合併した患者の治療法として、多剤薬物投与治療が、広く実施されてきている。薬物動態学的薬物相互作用、つまり異なった複数の薬物を同時投与することで生体での薬物動態が変化し、薬理学的および／または毒性学的な副作用をもたらす可能性がある。薬物動態学的薬物相互作用は、初回の薬物投与後の吸収、代謝、分布、排泄の段階で起こりうるが、主に薬物代謝の過程で薬物間の相互作用が起こると考えられる。この相互作用は、同時投与された別の薬物による薬物代謝の阻害または誘導を通して起こりうる。薬物代謝の阻害により血漿／組織の薬物濃度が増加するが、特に治療域の狭い薬物では薬物濃度の上昇により毒性が発現する。逆に薬物代謝酵素の誘導により薬物濃度は減少し、その薬物は薬効を失う。

薬物代謝酵素の阻害作用による薬物相互作用を立証する例として、鎮静作用のない抗histamine薬terfenadine、azole系抗真菌薬またはmacrolide系抗性物質を同時投与した患者の心室不整脈の発症があげられる(Monahan et al., 1990; FDA, 1992; Pohjala Sintonen et al., 1993)。TerfenadineはCYP3A4で代謝を受けると考えられている。(Yunetal 1993)。Terfenadine投与による有害な薬物相互作用は、同時投与された薬物がterfenadineの代謝を阻害し、心臓毒性が発現するレベルにまでterfenadineが蓄積することに起因すると考えられている(Woosley et al., 1993)。

薬物代謝酵素の誘導作用による薬物相互作用の例としては、rifampinと経口避妊薬の相互作用があげられる(D'Arcy, 1986; Grange et al., 1994; Strolin Benedetti and Dostert, 1994)。RifampinはヒトのCYP3A4の誘導物質として知られている抗菌薬であり(Ged et al., 1989; Li et al., 1995a)、また、経口避妊薬の主要成分であるestrogenとprogesterone類似化合物はCYP3A4の基質である(Guengerich, 1990)。Rifampin投与により経口避妊薬を服用した女性の子宮の出血や避妊の効果がなくなることが明らかとなった。これはrifampin投与により、活性物質の代謝が促進されたからである(Reimers et al., 1974)。

薬物代謝酵素には種差が存在するため、開発候補化合物の潜在的な薬物相互作用を前臨床段階で評価することは、非常に難しいとされてきた。(Gonzalez, 1989)。どのCYP450がその薬物の代謝に関与しているかは、実験動物での知見が必ずしもヒトに適用できない場合がある。そこで主に肝臓が薬物代謝を司る臓器であるかという観点から、ヒト肝細胞を用いた実験は、薬物相互作用の前臨床段階での評価に有効かつ有用な手段であると考えられる。

著者らは、ヒト肝細胞を使用して薬物動態学的薬物相互作用を評価する系を既に確立した。(Li et al., 1995b; Li, 1997)、今回モデル化合物としてterfenadineとrifampinを使用し、臨床で認められる薬物相互作用がヒト肝細胞内で再現できるかを明らかにすることを目的として本研究を実施した。本研究において、臨床的に観察された酵素阻害によるterfenadine薬物相互作用と、酵素誘導によるrifampinの薬物相互作用が、ヒト肝細胞内で再現されうること及びそのメカニズムを明らかにした。本研究の結果は前臨床段階で、ヒト肝細胞は、薬物相互作用を評価する上で有効かつ適切な本実験系であることを示唆している。

実験材料および実験方法：

化合物および試薬：Terfenadine 代謝物(terfenadineのazacyclonol、アルコールと酸代謝物)の定量用の標準物質はMarion Merrell Dow, Inc. (Cincinnati, OH, USA)から、Cyclosoprin AはSandoz Canada Inc. (Dorval, Quebec, Canada)から、ketoconazoleとitraconazoleはJanssen Pharmaceutica, Inc. (Mississauga, Ontario, Canada)から購入した。その他の試薬はSigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA)から購入した。

ヒト肝臓組織の分与：ヒト肝細胞は、腹部手術中の患者または移植不可能な肝臓からの外科標本から分離された。研究目的で人の組織を使用することは、合法的かつ道徳的な観念に従って行われ、the Institutional Review Board, St Louis Medical Schoolによって認可されている。

ヒト肝細胞の分離と培養：著者らにより確立された方法を使用して、ヒト肝細胞を分離、培養した (Loret et al., 1989; Li et al., 1992)。この方法では “two-step” の collagenase (0.5%, w/v, type I: Sigma) 灌流法を使用し、trypan blue を使用した viability の測定では、分離細胞の 80 % 以上が生細胞であった。培地は無血清培地を使用し、この無血清培地の組成は、11.2mg/L alanine を添付した Waymouth 752/L (Gibco, Long Island, NY, USA)、12.8mg/L serine, 24mg/L asparagine, 2g/L fatty acid-poor bovine serum albumin, 0.168mg/L aminolevulinic acid, 5mg/L oleic acid, 5mg/L d,l-tocopherol, 0.393mg/L dexamethasone, 7.9mg/L d-thyroxine, 0.03mg/L glucagon, 20U/L insulin, 84mg/L gentamicin により成り立っている。ヒト肝細胞は 5 % CO₂/95 % 空気を気相として、37℃ で細胞培養器内で培養された。2 時間の付着期間後、古い培地を除去し、未付着細胞を除去するために、付着細胞を温かい phosphate-buffered saline で 2 回洗浄した後に、新しい培地を補充した。

Terfenadine 代謝物の分析：2 時間のヒト肝細胞付着期間後、terfenadine を dimethyl sulfoxide に溶解し、ヒト肝細胞付着培地に加えた。Terfenadine 代謝の阻害能を調べるための阻害剤を水または dimethyl sulfoxide に溶解し、terfenadine 添加 1 時間前に、最終濃度 10 μM になるまでを加えた。Dimethyl sulfoxide の最終濃度は 1 % 未満になるように調整した。各反応時間毎に氷冷 methanol (1:1, v/v) を加え、細胞を、-20℃ に冷却し反応を終結させた。代謝生成物は、Jurima-Romet et al. の HPLC 法 (Jurima-Romet et al., 1994 を改良した Jurima-Romet et al., 1996 の方法) を使用して測定した。それぞれの阻害物質の血漿濃度に基づく K_i 値と阻害率は、以下の式によって計算した。

$$\% \text{inhibition} = [I] / \{ [I] + K_i \left(\frac{[S]}{K_m} \right) \} \times 100$$
 [I] は阻害物質の濃度、[S] は terfenadine の濃度、K_m は terfenadine 代謝の Michaelis constant (N-dealkylation では 27 μM, Jurima-Romet et al., 1994 によると C-hydroxylation では 60 μM) を表す。Terfenadine の血漿中濃度は K_m 値よりはるかに低く無視される濃度なので、上式は以下のように簡略化できる。

$$\% \text{inhibition} = [I] / ([I] + K_i) \times 100$$

CYP1A と CYP3A 活性の測定：反応終了後、培地を除去し、かわりに、種々の CYP アイソザイム基質を含む Krebs-Ringer buffer を加えた。CYP1A の基質として ethoxyresorufin (10 μM)、CYP3A の基質として testosterone (250 μM) を使用した。Ethoxyresorufin では 30 分間、testosterone では 60 分間反応後、分析に供するまで -80℃ で保存した。CYP 1A 活性は、Burke and Mayer (1983) の方法を使用した ethoxyresorufin-O-deethylation (EROD) で分析した。CYP 3A 活性は、Sonderfan et al., (1987) の HPLC 法を使用した 6 β-hydroxylation 活性を測定することにより定量した。

Lidocaine 代謝物の分析：Lidocaine の主代謝物である monoethylglycinexylidide (MEGX) は、Dellerich et al. (1987) の分析法を使用した蛍光偏光免疫測定法により TDX analyzer (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) と MEGX reagent kit (Aggott Laboratories) を用いて測定した。この reagent kit には、TDK analyzer 使用のための、MEGX 抗血清 (ウサギ)、MEGX-蛍光tracer、MEGX 標準物質、種々の洗浄溶液が含まれている。この方法では、MEGX 生成量は buffer 中で注出操作を行わずに定量測定できる。



結果：

A. Terfenadine薬物相互作用：

1. Terfenadine代謝：2ドナーからのヒト肝細胞を用いて、terfenadineの代謝を調べた。Fig.1Aに示したように、本実験のHPLCの条件では、terfenadineの代謝物はazacyclonol、terfenadineの酸性代謝物及びアルコール性代謝物として検出された。10 μ M terfenadineとヒト肝細胞を8時間培養した後のプロファイルをFig.1Bに示した。

Terfenadineの経時的な消失プロファイルをFig.2Aに、またterfenadineの生成プロファイルをFig.2BおよびFig.2Cに示した。Fig.2Aにはヒト肝細胞(10⁶cells)とterfenadineを培養した時のterfenadineの消失パターンを示した。Fig.2Cにはterfenadineの代謝物であるazacyclonolの生成パターンを示した。

Figure 1：代表的なHPLCクロマトグラム

(A) Reference standards, Internal standard (LS: metoprolol), terfenadine (TF), および主なterfenadineの代謝物, azacyclonol (I), 酸性代謝物 (II), アルコール性代謝物 (III)
(B) 10 μ M terfenadine (TF) とヒト肝細胞を8時間培養した後の代謝物プロファイル
(C) 10 μ M terfenadine (TF) とヒト肝細胞を10 μ M ketoconazole 存在下に見て8時間培養した後の代謝物プロファイル

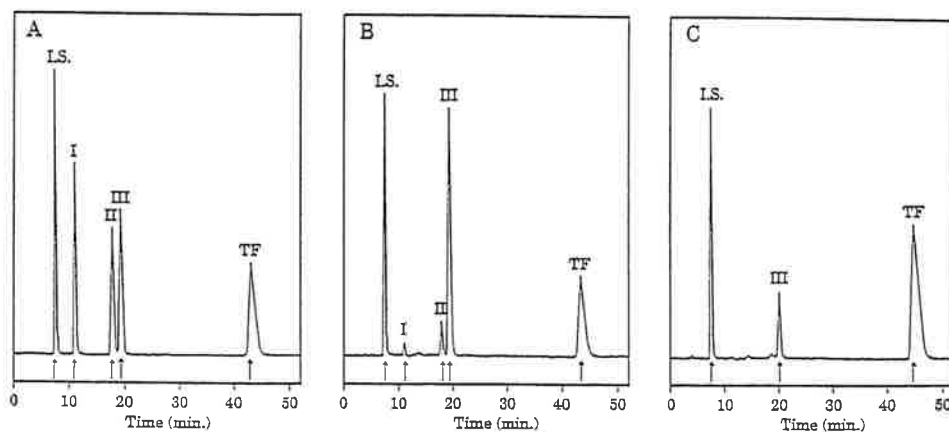
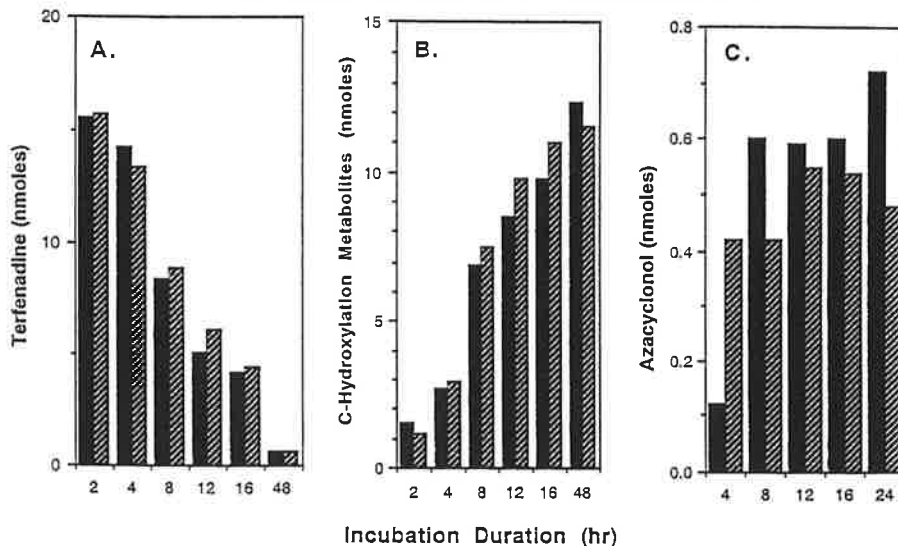


Figure 2：(A) 経時的なterfenadine消失プロファイル

(B) 経時的なC-hydroxylation代謝物(酸性およびアルコール性の代謝物の合計)の生成プロファイル

(C) 経時的なazacyclonolの生成プロファイル

縦方向の棒と波線の部分は、2人のドナー(32歳と57歳)の結果を表している。



2. Terfenadine代謝物阻害の影響：Ketoconazole、itraconazole、erythromycin、troleandomycin、cyclosporinあるいは、naringeninと培養したヒト肝細胞ではterfenadineの代謝が阻害された。Fig. 1Cに示したようにketoconazole(10 μ M)を添加することにより、terfenadine代謝は著しく阻害された。それぞれの阻害物質のK_i値をTable 1に示した。

B. Rifampin薬物相互作用：

1. Rifampin による CYP3A4 活性の誘導：50 μ M rifampin存在下及び非存在下でヒト肝細胞を培養し、経時的にCYP3A4活性(testosterone 6 β -水酸化反

応)を調べた。ヒト肝細胞をrifampin非存在下で3日間培養し、その後、最低2日間rifampin存在下で培養した。結果をFig. 3に示した。CYP3A4活性は、培養時間とともに減少し、培養2日以降に最低レベルに達した。培養2日目以降のrifampin添加により顕著な活性の増加が認められた。Rifampin添加を2日以降の続けた場合、活性の増加は培養5日目(rifampin添加から2日目)に活性がピークに達し、6から8日目に多少減少し平衡状態となった。5日目に培地にrifampinを添加しない場合、CYP3A4活性は時間とともに減少した。

Table 1： ヒト肝細胞におけるterfenadine代謝阻害物質のK_i値、それぞれの阻害物質の血漿中濃度、及びK_i値、それぞれの阻害物質の血漿中濃度、及びK_i値に基づいて算出されたterfenadine代謝に対する推定阻害率

Inhibitor	K _i (μ M)	Plasma concentration		Estimated <i>in vivo</i>	
		<i>N</i> -dealkylation	<i>C</i> -hydroxylation	<i>N</i> -dealkylation	<i>C</i> -hydroxylation
Ketoconazole	<1	3	1-10 μ M ¹	>50->91	25-77
Itraconazole	7	2	0.6-2.8 μ M ²	8-29	23-58
Erythromycin	84	23	0.7-5.0 μ M ³	1-6	3-17
Troleandomycin	22	32	2.5 μ M ³	9	7
Cyclosporin	16	19	0.12-1.0 μ M ⁴	1-6	1-5
Naringenin	No inhibition	22	-	-	-

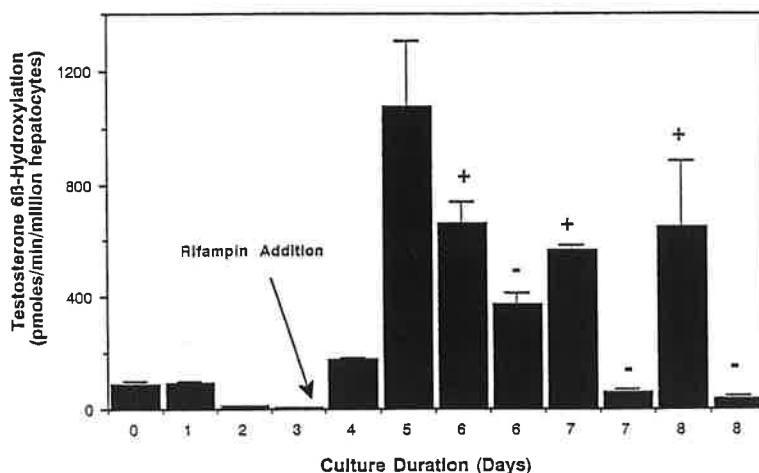
¹Badcock et al., 1987; Daneshmend et al., 1988.

²Grant and Clissold, 1989

³Periti et al., 1989

⁴Faulds et al., 1993; Fahr, 1993

Figure 3： Rifampin存在下(50 μ M)または非存在下において培養した時のtestosterone 6 β -hydroxylation 活性。Rifampinを培養3日目に添加し培養5日目までrifampinの添加を継続した。培養6日目に、50 μ Mのrifampin含有培地と不含培地とさらに培養した。この実験に使用された肝細胞は76歳の男性から調製された。





2. RifampinのCYP3A4活性誘導に於ける濃度依存性：ヒト肝細胞をコラーゲン又はマトリゲルで3日間培養し、その後2日間、異なった複数の濃度のrifampin処理を行った。Fig. 4に示したように、CYP3A4活性は、培地に添加したrifampin濃度とともに増加した。コラーゲンとマトリゲルでの培養で、CYP3A4活性の誘導の差は認められなかった。

3. RifampinによるCYP3A4活性誘導の個体差：1.7歳から76歳の4人のドナーから調製されたヒト肝細胞で、rifampinによるCYP3A4活性の誘導性を調べたところ、全てのドナーでrifampinの濃度に依存したCYP3A4活性の誘導が認められた。

4. Rifampinによるlidocaine代謝の促進：Rifampinはlidocaine代謝を促進することが明らかになった。78歳の男性の肝細胞では、rifampin 20 μ Mでピークに達した。

Figure 4：Matrigelおよびcollagenコートしたplateで培養したヒト肝細胞において、rifampinの濃度に依存したtestosterone 6 β -hydroxylation活性の誘導。この実験に使用された肝細胞は75歳の男性から調製した。

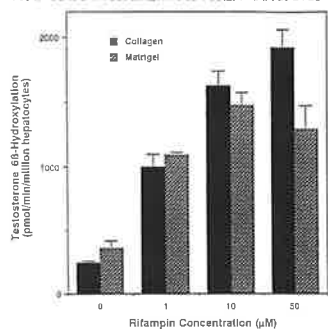
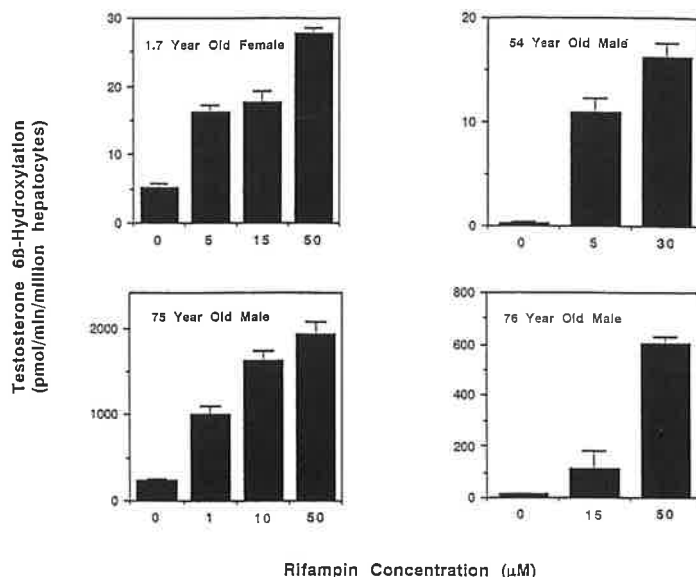


Figure 5：4人のドナーから調製したヒト肝細胞における、rifampinの濃度とtestosterone 6 β -hydroxylation活性誘導の相関性。

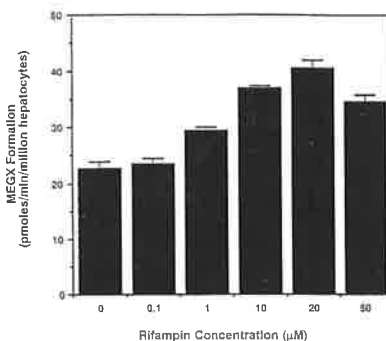


考察：

この十年間、薬物の毒性や代謝の評価のための試験系として、ヒト肝細胞が使用されてきた。Terfenadineとrifampinは、ヒト *in vivo* で薬物相互作用を引き起こす代表的な薬物として知られている。著者らが紹介した研究により、ヒト肝細胞に於いても、terfenadineは酵素阻害による薬物相互作用を示し、また、rifampinは酵素誘導による薬物相互作用を示した。この事は、ヒト肝細胞はヒト *in vivo* の薬物相互作用の評価を行う際に極めて有効なモデルであることをしている。

Ketoconazoleとterfenadineの併用により、重篤な心臓毒性を引き起こす事が既に報告されているが、その毒性は、薬物相互作用により代謝クリアランスが阻害を受け、血漿中のterfenadine濃度が毒性発現領域まで上昇する事に起因していると考えられる。

Figure 6：78歳の男性から調製されたヒト肝細胞を用いた、rifampin濃度とlidocaine代謝の誘導の相関性。



著者らのterfenadine代謝の研究によると、ヒト肝細胞においてterfenadineはC-hydroxylation(アルコール性および酸性の代謝物へ)とN-脱alkylation(azacyclonolへ)を受けて代謝されることが明らかになった。ヒト*in vivo*ではterfenadineの代謝経路としてC-hydroxylationとN-脱alkylationが、知られており(Gartiez et al.,1982)、terfenadineの代謝阻害物質として、ketoconazole、itraconazole、およびグレープフルーツジュース(CYP3A4を阻害する代謝前駆物質bioflavin naringeninを含有している)が報告されている。(Honig et al.,1993a,b,1996;Benton et al.,1996)。今回の実験結果から、ヒト*in vivo*でのterfenadineの代謝阻害データとヒト肝細胞のデータは良く一致していることが明らかとなった。即ち、ketoconazoleとitraconazoleはterfenadine代謝の潜在的な阻害物質であることが再確認された。Table 1に、ヒト肝細胞を用いた場合のK_i値とそれぞれの阻害物質の臨床血漿中濃度を基に計算したヒト*in vivo*でのterfenadine代謝の推定阻害率の割合(%)を示した。これらの代謝阻害物質の中ではketoconazoleとitraconazoleが、常用量使用時に、ヒト*in vivo*でのterfenadine代謝に最も影響を与えることが明らかになった。

Rifampinに関連したもっとも顕著な薬物相互作用の一つとして、経口避妊薬をrifampinと併用した女性の避妊効果の減少及び出血があげられる。これは、肝臓でのCYP3A4活性の誘導が引き起こすステロイド系成分の代謝促進が原因であると考えられている(Reimers et al.,1974;D'Arcy,1986)。今回の実験結果により、この薬物動態作用はヒト肝細胞で再現できることが明らかになった。RifampinはCYP3A4依存のステロイド酸化経路、つまりtestosterone 6 β -hydroxylase活性を著しく誘導することが観察された。この酵素誘導作用は、暴露量及び暴露期間に依存しており、可逆的であることも明らかになった。Rifampinによる薬物代謝誘導の可逆性は、すでにヒト*in vivo*で報告されている(Grange et al.,1994;Strolin Benadetti and Dostert,1994)。Testosterone 6 β -hydroxylationで認められたCYP3A4誘導が、他のCYP3A4基質でも一般的に当てはまるかどうかを評価するために、lidocaine代謝におけるrifampinの影響を調べた。Lidocaineはヒト*in vivo*ではCYP3A4によりN-脱ethylationを受けMEGXが生成される事が報告されている

(Bargetzi et al.,1989;Imaoka et al.,1990;Hunt et al.,1992)。ヒト肝細胞においても、rifampinの濃度依存的なlidocaine代謝の促進が観察され、1.7歳から78歳までのドナーの年齢に関係なく、すべての7人のドナーから調製されたヒト肝細胞で、rifampinによるCYP3A4誘導が観察されたことは興味深い。このことは、CYP3A4誘導による薬物相互作用が、すべての年齢(新生児から高齢者まで)で起こる可能性があることを示唆している。今回の実験結果は、他の研究所施設で行われた結果と同じく(Pichard et al.,1992;Donato et al.,1995)、CYP450の誘導作用がヒト肝細胞で評価できることを意味している。従って、ヒト肝細胞は、CYP450誘導による薬物相互作用評価系として極めて有用な実験系であることが明らかになった。酵素誘導による薬物相互作用の評価は、各々のアイソザイムに特異的な基質を使用してCYP450の活性(例えばCYP3A4の評価にtestosterone 6 β -hydroxylationを用いることなど)を測定する事により、ある薬物が同じアイソザイムによって代謝される他の薬物と薬物相互作用を引き起こす可能性があるか否かを評価できることを示唆している。ヒトの場合多くの薬物がCYP3A4により代謝されるため(Li et al.,1995a)、CYP3A4の誘導は最も重要な薬物相互作用の一つと言えよう。

医薬品開発にあたって、その薬物の潜在的な薬物相互作用に関するデータを得ることは重要である。ヒトと実験動物では薬物代謝に種差が存在する場合があるので、実験動物のデータがヒトには当てはまらない可能性がある。ヒト肝細胞のようなPhase IとPhase II代謝経路を有する*in vitro*薬物代謝系を使用して得たデータは、実験動物とヒトの*in vivo*データを結びつける手段として極めて有用であるといえる。今回のterfenadineとrifampinの結果により、薬物動態学的相互作用の2つの主な作用(CYP酵素の誘導と阻害)は、ヒト肝細胞で評価が可能であることを明らかにした。すなわち、ヒト肝細胞はヒト*in vivo*での薬物相互作用を評価するための適切な実験モデルであると結論できる。既知の薬物の薬物間相互作用を評価すると同様に、新薬の候補薬物のスクリーニングに於いて、ヒト*in vivo*での薬物相互作用の予測をヒト肝細胞を用いて実施することは極めて意義のある事である。



備考：

ヒト *in vitro* モデル系に於ける Intact cell properties (完全細胞系) の優位性

Intact cell properties (完全細胞系)

ヒト *in vitro* 試験とヒト *in vivo* の相関性を評価する上で、完全細胞系を用いることは極めて重要である。肝細胞や肝組織切片のような完全細胞系は、ミクロゾームのような細胞破碎系に比べ以下の利点がある。

Plasma membrane: 原形質膜

原形質膜は細胞内と細胞外を区別するバリアーとなっており、下記の理由で薬物の細胞内濃度と細胞外 (血中) 濃度が劇的に異なる場合がある。

<理由>

a) 膜透過性 (membrane permeability)

原形質膜は、薬物の血中から肝細胞への取り込みに重要な役割を演じている。低膜透過性薬物は高膜透過性薬物に比べて、取り込み速度は遅い。低膜透過性薬物は肝細胞内での代謝と排泄により血中濃度に比べて細胞内濃度は極めて低濃度となる。

b) 能動輸送 (active transport)

薬物の中には能動輸送により細胞外から細胞内に膜を通過して吸収される薬物があるが、このような薬物の場合は薬物濃度は細胞内の方が血中に比べて高くなる。

c) 能動排泄 (active excretion)

肝細胞内では非生体由来の物質 (exnobiotics) は Gp. 170, MOAT 及び Gp. 110 を含む、エネルギー依存の排泄系経路で胆汁の中に排泄される。もし、この排泄速度が、細胞外からの細胞内への細胞内への薬物の吸収速度よりも高ければ、薬物の細胞内濃度は血中濃度よりも低くなる。ミクロゾームのような細胞破碎系とは異なり、完全細胞系で試験を行う事により、薬物の血中濃度と細胞内の濃度の違いを考慮した、実験モデルを組み立てる事ができる。

完全な薬物代謝系酵素群の具備

ミクロゾームは細胞を破碎し分画したものであるに対し、完全細胞系は細胞が破碎されていない為、

完全な薬物代謝酵素系を備えている。

ミクロゾームと完全細胞系の主な相違点は、完全細胞系は硫酸抱合やグルコン酸抱合のような第II相抱合反応酵素系を備えているのに対し、ミクロゾームではこれらが欠失している。又、ミクロゾームとS9を再構成しても完全細胞系を再現することはほぼ不可能である。

遺伝子発現系の具備

完全な viable な細胞は遺伝子発現と蛋白合成系を備えている為に薬物による酵素誘導の研究に使用することができる。CYP450 の誘導は薬物相互作用の主要なメカニズムのひとつであり、薬物相互作用の解明の為にはミクロゾーム等の細胞破碎物は使用すべきでない。また、ヒト以外の実験動物とヒトでは種差が存在する為に、ヒトでの CYP450 の誘導が原因となる薬物相互作用を予測する研究のためには臨床試験の実施前にヒト初代培養細胞を用いることが必要となる。

薬効・薬理試験

カルシウムイオンや AMP のような細胞内シグナリング物質に起因する生理的な変化、薬物によるサイトカイン放出などの薬効・薬理研究には生細胞を用いることが必要であり、ミクロゾーム等の細胞破碎系モデルではこのような研究はできない。

謝辞：

本冊子で紹介した研究の多くは Health Canada の Malle Jurima-Romet, Ph.D. との共同研究の成果であり、本誌にこれらの成果を掲載することに彼女から快く許諾頂いたことに感謝いたします。

なお、著者の Dr. Li から入手した原稿はすべて英文であり、弊社第二営業部幸村が彼の許可を得て、幸村と石原が日本語に翻訳したものであります。

原著は1997年に Academic Publishers, Lancaster, 英国から出版される "Cell Biology and Toxicology" に掲載される予定です。

References:

- Badcock, N.R., Bartholomeusz, F.D., Frewin, D.B., Sansom, L.N. and Reid, J.G. (1987). The pharmacokinetics of ketoconazole after chronic administration in adults. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 33:531-534.
- Bargetzi, M.J., Aoyama, T., Gonzalez, F.J., Meyer, U.A. (1989). Lindocaine metabolism in human liver microsomes by cytochrome P450 IIIA. *Clin. Pharmacol. Ther.* 46:521-527.
- Benton, R.E., Honing, P.K., Zamani, K., Cantilena, L.R., and Woosley, R.L. (1996). Grapefruit juice alters terfenadine pharmacokinetics, resulting in prolongation of repolarization on the electrocardiogram. *Clin. Pharmacol. Ther.* 59:383-388.
- Burke, M.D. and Mayer, R.T. (1993). Different effects of phenobarbitone and 3-methylcholanthrene of the hepatic microsomal metabolism and cytochrome P450 binding of p-gonoxazone and a homologous series of its n-alkyl ethers. *Chem. Biol. Interact.* 45:243-258.
- D'Arcy, P.F. (1986). Drug interactions with oral contraceptives. *Drug Intell. Clin. Pharm.* 20:353-362.
- Daneshmend, T., and Warnock, d.W. (1988). Clinical pharmacokinetics of ketoconazole. *Clin. Pharmacokinet.* 14:13-34.
- Dellerich, M., Raude, E., Burdelski, M., Schultz, M., Schmidt, F.W., Ringe, B., Lamesch, P., Pichmayr, R., Raith, H., Scheruhn, M., Wrenger, C.H. (1987). Monoethylglycinexylidide formation kinetics: A novel approach to assessment of liver function. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 25:845-853.
- Donato, M.T., Castell, N.V., Gomez-Lechon, M.J. (1995). Effect of model inducers on cytochrome P450 activities of human hepatocytes in primary culture. *Drug Metab. Disp.* 23:256-258.
- Fahr, A. (1993). Cyclosporin clinical pharmacokinetics. *Clin. Pharmacokinet.* 24:472-495.
- Faulds, D., Goa, K.L., and Benfield, P. (1993). Cyclosporin: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in immunoregulatory disorders. *Drugs* 45:953-1040.
- FDA (1992). Warnings issued on non-sedating antihistamines terfenadine and astemizole. *JAMA* 268:705.
- Ged, C., Rouillon, J.M., Pichard, L., Combalbert, J., Bressot, N., Bories, P., Michel, H., Beaune, P., and Maurel, P. (1989). The increase in urinary excretion of 6 β -hydroxycortisol as a marker of human hepatic cytochrome P450 IIIA induction. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 38:373-387.
- Gonzalez, F.J. (1989). The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol. Rev.* 40:243-288.
- Grange, J.M., Winstanley, P.A. and Davies, P.D. (1994). Clinically significant drug interactions with antituberculosis agents. *Drug Saf.* 11:2425-251.
- Grant, S.M., and Clissold, S.P. (1989). Itraconazole: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in superficial and systemic mycoses. *Drugs* 37:310-344.
- Guengerich, F.P. (1990). Metabolism of 17 α -ethynylestradiol in humans. *Life Sciences*, 47:1981-1988.
- Honing, P.K., Wortham, D.C., Zamani, K., Conner, D.P., Mullin, J.C. and Cantilena, L.R. (1993a). Terfenadine-ketoconazole interaction: pharmacokinetics and electrocardiographic consequences. *JAMA* 269:1513-1518.
- Honing, P.K., Wortham, D.C., Hull, R., Zamani, K., Smith, J.E., and Cantilena, L.R. (1993b). Itraconazole affects single-dose terfenadine pharmacokinetics and cardiac repolarization pharmacodynamics. *J. Clin. Pharmacol.* 33:1201-1206.
- Honing, P.K., Wortham, D.C., Lazarev, A., and Cantilena, L.R. (1996). Grapefruit juice alters the systemic bioavailability and cardiac repolarization of terfenadine in poor metabolizers of terfenadine. *J. Clin. Pharmacol.* 36:345-351.
- Hunt, C.M., Westerkam, W.R., Stave, G.M. (1992). Effect of age and gender on the activity of human hepatic CYP3A. *Biochem. Pharmacol.* 44:275-283.
- Imaoka, S., Enomoto, K., Yutaka, O., Asada, A., Jujimori, M., Shimada, T., Fujita, S., Guengerich, F.P., and Funae, Y. (1990). Lindocaine metabolism by human cytochrome P-450s purified from hepatic microsomes: Comparison of those with rat hepatic cytochrome P-450s. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255:1385-1391.



- Jurima-Romet, M., Crawford, K., Cyr, T. and Inaba, T. (1994). Terfenadine metabolism in human liver: In vitro inhibition by macrolide antibiotic and azole antifungals. *Drug Metab. Dispos.* 22:849-857.
- Jurima-Romet, M., Huang, H.S., Beck, D.J. and Li, A.P. (1996). Evaluation of drug interaction in intact hepatocytes: Inhibitors of terfenadine metabolism. *Toxicol, In Vitro* (in press)
- Li, A.P., Roque, M.A., Beck, D.J., and Kaminski, D.L. (1992). Isolation and culturing of hepatocytes from human liver. *J. Tissue Culture, Meth.* 14:139-146.
- Li, A.P., Kaminski, D.L., Rasmussen, A. (1995 a). Substrates of human hepatic cytochrome P4503A4. *Toxicology* 104:1-8.
- Li, A.P., Rasmussen, A., Xu, L., Kaminski, D. L. (1995b). Rifampicin induction of lidocaine metabolism in cultured human hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 274:673-677.
- Li, A.P. (1997). Primary human hepatocytes as an experimental system in toxicology and drug metabolism. *Comments in Toxicology* (in press).
- Loretz, L.J., Li, A.P., Flye, M.W. and Wilson, A.G.E. (1989). Optimization of cryopreservation product for rat and human hepatocytes. *Xenobiotica* 19:489-498.
- Monahan, B.P., Ferguson, C.L., Killesvy, E.S., Lloyd, B.K., Troy, J. and Cantilena, Jr., L.R. (1990). Torsades de pointes occurring in association with terfenadine use. *JAMA* 264: 2788-2790.
- Priti, P., Mazzei, T., Mini, E., and Novelli, A. (1989). Clinical pharmacokinetic properties of the macrolide antibiotics: effects of age and various pathophysiological states. *Clin. Pharmacokinet.* 16:193-214.
- Pichard, L., Fabre, I., Daujat, M., Domergue, J., Joyeux, H., and Maurel, P. (1992). Effect of corticosteroids on the expression of cytochromes P450 and on cyclosporin A oxidase activity in primary cultures of human hepatocytes. *Mol. Pharmacol.* 41:1047-1055.
- Pohjala-Sintonen, S., Viistsalo, M., Toivonen, L. and Neuvonen, P. (1993). Torsades de pointes after terfenadine-itraconazole interaction. *Brit. Med. J.* 306:186.
- Reimers, D., Nocke-Finck, L., Breuer, H. (1974). Rifampicin and the "pill" do not go well together. *JAMA* 227:607.
- Sonderfan, A.J., Arlotto, M.P., Dutton, D.R., McMillen, S.K. and Perkinson, A. (1987). Regulation of testosterone hydroxylation by rat liver microsomal cytochrome P450. *Arch. Biochem. Biophys.* 255:27-41.
- Strolin Benedetti, M., Dostert, P. (1994). Induction and autoinduction properties of rifamycin derivatives: a view of animal and human studies. *Environ. Health Perspect.* 102:101-105.
- Woosley, R.L., Chen, Y., Freiman, J.P. and Gillis, R.A. (1993). Mechanism of the cardiotoxic actions of terfenadine. *JAMA* 269:1532-1536.
- Yun, C.H., Okerholm, A. and Guengerich, F.P. (1993). Oxidation of the antihistamine drug terfenadine in human liver microsomes. Role of cytochrome P4506A(4) in N-desalkylation and C-hydroxylation. *Drug Metab. Disp.* 21: 403-409.

第2回国際薬物相互作用シンポジウム 開催のお知らせ

開催日 : 1997年11月20～21日
開催場所 : 米国・メリーランド州・パルティモア市

趣旨 本シンポジウムは、薬物相互作用に関し学界、臨床、産業界及び日米欧の政府研究機関の専門家による最新の研究成果の発表を通して、参加された方々の情報交換を行うことを目的としております。

プログラムの概略

I. Mechanism of Clinically Significant Drug-Drug Interactions

Terfenadine Interactions

-M. Jurima-Romet, Health Canada

The H₁-receptor antagonist terfenadine has been associated with cardiac adverse events during concomitant therapy with some antifungals and antibiotics. The mechanism of the interaction has been elucidated by clinical and *in vitro* investigations and will be discussed.

Sorivudine Interactions

-R.B. Diasio, University of Alabama, USA

Concomitant administration of sorivudine, a synthetic analog of deoxythymidine nucleoside with antiviral activity, with fluoropyrimidine drugs has resulted in fatalities in Japan. Clinical studies elucidating the mechanism of interaction will be discussed.

Ritonavir Interactions

-G. Kumar, Abbott Laboratories, USA

HIV-1 protease inhibitor ritonavir inhibits CYP3A activity and may induce some CYP and UDPGT isoforms as well. Ritonavir may enhance the pharmacokinetic profile of other protease inhibitors. Theoretical and experimental aspects will be discussed.

Grapefruit Juice Interactions

-D.G. Bailey, London Health Sciences Centre, Canada

Grapefruit juice augments the effects of the dihydropyridine calcium channel antagonist, felodipine. The active ingredients involved and the mechanism of the interaction are described. Potential for grapefruit juice to interact with other drugs will be discussed.

II. Mechanism-Based Evaluation of Drug-Drug Interactions

Definition of Interaction Potential Based on Mechanism

-A.P. Li, In Vitro Technologies, USA

Human *in vitro* systems are useful in elucidating drug interaction mechanisms by identification of metabolic pathways; and by evaluation of the potential for enzyme inhibition and induction.

Systems derived from the human liver (hepatocytes, slices, microsomes, and cDNA expressed microsomes) will be discussed.

Intracellular Interactions

-D.J. Back, University of Liverpool, U.K.

Anti-HIV nucleoside analogs require intracellular metabolism to their active forms for clinical efficacy. Special considerations needed for combination therapy (multiple analogs, analogs plus protease inhibitors, drugs for other infections) will be discussed.

In Vitro: In Vivo Correlation

-K.-H.J. Ling, Hoechst Marion Roussel, USA

In vitro pharmacokinetic/metabolic models are useful in the prediction of *in vivo* behavior. Two in-house drug candidates metabolized by CYP isoforms will be used to illustrate the applications and limitations of *in vitro* models for predicting drug interactions.

Prediction of Human Enzyme Induction

-P. Maurel, Institut National de la Sante et de La Recherche Medicale, France

The use of human hepatocyte cultures to predict drug interactions resulting from CYP enzyme induction is discussed. Emphasis is on experimental conditions; comparison of CYP families: & *in vitro*: *in vivo* correlations.

Prediction of Induction Potential of Drugs

-J.M. Silva, Merck Frosst, Canada

Primary hepatocytes can serve as an *in vitro* assay to predict CYP inducibility by drug candidates. Aspects of *in vitro* methods will be discussed, including culture conditions, structure activity relationships, intraspecies comparisons, *in vivo*-*in vitro* correlation, and the use of cryopreserved hepatocytes.

III. Clinical Evaluation of Drug Interactions

Study Design and Data Analysis

-K.D. Gallicano, Health Canada

Choice of study design, pharmacokinetic characteristics, and statistical methods for analysis of data are important considerations in planning clinical pharmacokinetic studies. Each will be discussed.



Pitfalls in Clinical Evaluation

-P. Hansten, University of Washington, USA

Common mistakes in the clinical application of drug interaction information are discussed. Determining the risk requires attention to drug administration factors such as dose, route and duration; and patient factors such as disease, pharmacogenetics, and diet.

Clinical Relevance and Management

-J.R. Horn, University of Washington, USA

Management of drug interactions should be based on potential risk to the patient, available alternatives, and actions necessary to avoid harm. A clinical-risk classification system for drug interactions based on management options will be presented.

HIV Protease Inhibitors

-R. Polk, Medical College of Virginia, USA

The HIV-1 protease inhibitors (PIs) have potent effects on human metabolic enzymes. As non-specialists begin to use these drugs, and as clinical experience with new combinations of PIs and other drugs increases, the risk from potential drug interactions will require caution in their use.

Rifampin Analogs

-K. Reith, Hoechst Marion Roussel, USA

The antimicrobial drug rifampin is a well-studied potent inducer of CYP enzymes, and has been shown to increase clearance of other drugs. *In vitro* and *in vivo* methods for determining human CYP enzyme induction will be discussed with reference to rifampin analogs.

IV. Regulatory Perspectives

U.S. FDA Perspectives: Pharmacological

-J.M. Strong, U.S. Food and Drug Administration

Factors to consider when conducting *in vitro* human liver metabolism and drug interaction studies will be discussed. Examples using S9 fractions, microsomes, hepatocytes, and liver slices, including investigations of CYP and nonmicrosomal enzymes, will be presented.

U.S. FDA Perspectives: Clinical

-P.K. Honing, U.S. Food and Drug Administration

Pharmacokinetic variability due to intrinsic metabolic variability and extrinsic factors (e.g. drug and food interactions) impacts design strategies for Phase 2 and 3 studies and interaction studies. Regulatory perspectives on how *in vitro* studies fit into a drug development program will be presented with examples.

U.S. FDA Perspectives: Survey of Approved NDAs

-P.J. Marroum, U.S. Food and Drug Administration

A survey of all NDAs approved between 1987 and 1997 has been conducted to determine whether advances in *in vitro* metabolism and drug interaction studies has had an impact on the conduct of interaction studies drug new chemical development. Results, including *in vitro*: *in vivo* correlations, will be presented.

European Community Perspectives

-T. Salmonson, Medical Product Agency, Sweden

Questions raised by studies of the mechanism of drug interactions include the value of *in vitro* data, prediction of interaction from *in vivo* data for specific substrates/inhibitors, and how to provide new knowledge to drug prescribers. An European perspective on these issues will be presented.

Japan Health and Welfare Ministry Perspectives

-Yasuo Oho, National Institute of Health Sciences, Japan

Soribudine incident remind us the importance of drug interaction. Just after that, NHW formed working group to consider how to check the drug interaction in the process of NAD reviewing. We have also been reconsidering the Guidelines for nonclinical pharmacokinetic studies to incorporate the items which is necessary to discuss on the possibility of drug interaction. Those studies are not completed. I will introduce those interim reports.

なお、本お知らせは同シンポジウム開催運営委員会の許可を得て本誌に掲載致しました。
正式なプログラムをご希望の方は、弊社第2営業部までご連絡下さい。

問
い
合
わ
せ
先

日本チャールス・リバー株式会社

第2営業部

TEL 045(474) 9 3 3 6

FAX 045(474) 9 3 4 1



日本チャールス・リバーからのお知らせ

弊社は自社生産動物以外に海外のブリーダーより広く実験動物を輸入しお届けしております。前回のマーシャル社に続き、今回はチャールス・リバーグループのフランス・IFFA CREDO 社についてご紹介致します。

IFFA CREDO

IFFA CREDO 社は高品質の特徴あるラット、マウス、モルモットに加えて、実験用繁殖ネコも生産し、ヨーロッパだけではなく広く日本、アメリカにも実験用動物として長年安定供給を行ってまいりました。

IFFA CREDO 社は、1966年に免疫研究で著名な Institute Merieux と当時のCaworth Farm により共同で設立され、1968年には Institute Merieux の完全な子会社となると同時に現在のIFFA CREDO の社名となり、そして1991年チャールス・リバー グループの一員となりました。

同社は、フランス リヨン市の北西約30km の田園地帯の60ヘクタール以上の敷地の中に位置し、ブリーディングに相応しい環境下にあります。

今回は、幅広い同社の実験動物の中より、実験用繁殖ネコと特徴あるラット、マウス5種類をご案内致します。



実験用 繁殖ネコ

1. 名 称 : Ico:FecEur(Tif)
2. 猫 種 : アビシニアンとヨーロッパ家ネコ(タビー)との交配種
3. 由 来 : スイス チバガイギ社より1977年に導入
4. 微生物状況 : 帝王切開にて作出し、バリアーシステム下に飼育
5. ワクチネーション : Parvovirus, Herpesvirus, Calcivirus, Rabies, について実施
(ご要望によりワクチン未接種のネコも輸入可能です。但し、ブリーダー動物は全てワクチン接種済動物です。)



ラット

The Wistar Furth Rat

1. 系統名 : WF/Ico
2. 由 来 : 1945年に Roswell Park Memorial 研究所のWistar ラットのコロニーよりこの系が分離確立されました。このラットは白血病を自然発症するラットであります。
3. 毛 色 : アルビノ
4. 特 性 : 近交系
 寿命 雌=25-30ヶ月 : 雄=27-36ヶ月
 発癌頻度 下垂体腫瘍 = 27% 乳腺癌 = 21%
 副腎癌 = 3% 白血病 = 9%
 悪性リンパ腫 = 7% 脂肪腫 = 3%
5. 用 途 : 癌腫学、人の下垂体腺腫モデルで、炎症モデルとしても有用であります。



The Hairless Rat

1. 系統名 : Ico:OFA-hr/hr
2. 由 来 : 1947年にIFFA CREDO で生産している OFA(Sprague Dowley) の中から発見されたミュータントラットより確立されたヘアレスラットであります。
3. 特 性 : この動物は生まれてから離乳までの期間軽く被毛がはえていますが4週齢以降消失いたします。
4. 用 途 : 皮膚科学領域、化粧品領域 医薬研究領域及び経皮毒性学で用いられています。



The BDIX Rats

1. 系統名: BDIX/OrlIco
2. 由来: 1937年にベルリンで H.DRUCKREY によって、ピンクアイで毛色が黄色である系統の動物から発見されたラットであります。Max Planck 研究所で BDIX系として作出され、1971年にFreiburgによりフランスの免疫研究所に持ち込まれ、兄妹交配により維持され、この間、Dr.MS MARTINによってこの動物の開発と研究が進められた。そして、1991年にIFFA CREDO に導入いたしました。
3. 毛色: アグーチ
4. 特性: 近交系、黒色眼、従順でおとなしい。
寿命: 2年、自然発症の腫瘍の発現率は低い。
5. 用途: 精神薬理学の研究にモデルとして使用されており、また免疫領域、癌腫学においても用いられています。



マウス

The SJL Mouse

1. 系統名: SJL/OrlIco
2. 由来: 1938年から1943年の間にThe Jackson Labより導入した Swiss-Webster より、1955年にJames LAMBERT により選抜されました。そして1990年にIFFA CREDO に導入されました。
3. 毛色: アルビノ
4. 特性: 近交系、非常に高い闘争性があるため8週齢以降は個別飼育が必要。
寿命=雄 472日、雌 395日
5. 用途: 薬理学/毒性学、免疫学、感染試験、癌腫学、遺伝子組み替え領域で用いられています。



The NMRI Mouse



1. 系統名: Ico:NMRI(I.O.P.S) Han
2. 由来: 1937年にClare LynchがPoilleyに与えたSwiss-typeのマウスに由来し、The Naval Medical Research Institute に移されるまで彼により51代まで近交系で維持され、1982年 IFFA CREDO へはThe Central Institute for Laboratory animale breeding ,Hannover(Germany)より導入されました。
3. 毛色: アルビノ
4. 特性: クローズドコロニー、発育が良い
寿命=SPF環境下 約3年
自然発症病理: 糸球体腎炎=27.2%
5. 用途: 汎用型

IFFA CREDO 社のネコ、マウス、ラットは日本チャールス・リバー(株)が直接輸入、販売しております。
ご注文・お問い合わせは下記までご連絡下さい。

TEL 045-474-9333 FAX 045-474-9341

《非売品》

CRJ LETTERS Vol.10 No.2

この小冊子に関するご意見、ご要望を下記までお寄せください。

発行日: 平成9年8月

発行所: 日本チャールス・リバー株式会社

〒222 横浜市港北区新横浜2-3-8

東伸24新横浜ビルB-4階

電話 045(474) 9340

企画・編集: 日本チャールス・リバー株式会社

制作: 株式会社 オービックO.A



日本チャールス・リバー株式会社

●弊社の英文社名は **Charles River Japan, Inc.** です。

動物についてのお問合せ、ご注文先

国内飼育動物	☎045(474)9350	ファックス045(474)9351
輸入動物	☎045(474)9333	ファックス045(474)9341