

● ヒト肝細胞を用いた *in vitro* CYP 誘導能評価系の構築

TN394

Development of *in vitro* CYP Induction Assay Using Cryopreserved Human Hepatocytes

[概要]

ある薬物により薬物代謝酵素が誘導された場合、併用薬が誘導された酵素により代謝されると、併用薬の血中濃度低下、または、プロドラッグの場合は有効成分の血中濃度上昇が起こり、薬効が得られない、または、薬効が増強される可能性があります。特に主要な薬物代謝酵素であるチトクロム P450 (CYP) で代謝される薬物は、酵素誘導による併用薬の血中濃度変化に注意する必要があります。

当社では、試験化合物の CYP 誘導能に関する評価系として、凍結ヒト肝細胞を用いた酵素誘導能評価試験に関して、酵素活性値レベル (LC-MS/MS 測定) および mRNA レベル (Real-time PCR 測定) での受託サービスを行っております。以下に、当社での評価系の概要を簡単に示します。

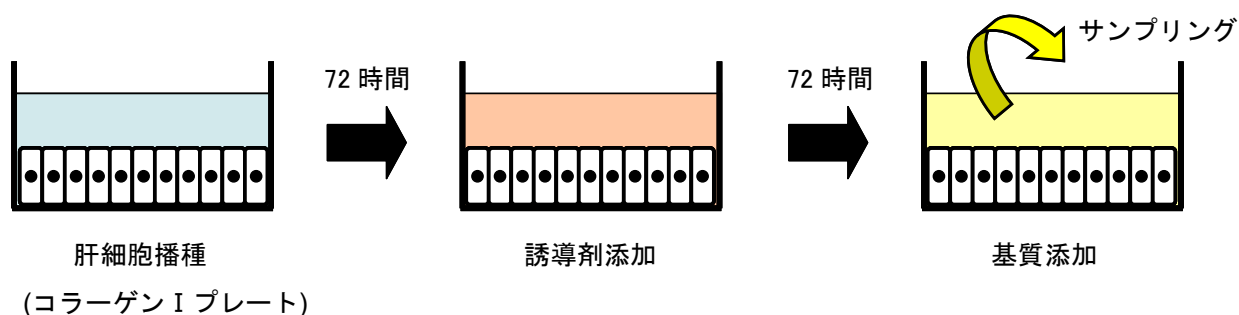


図 1 酵素誘導評価の概略

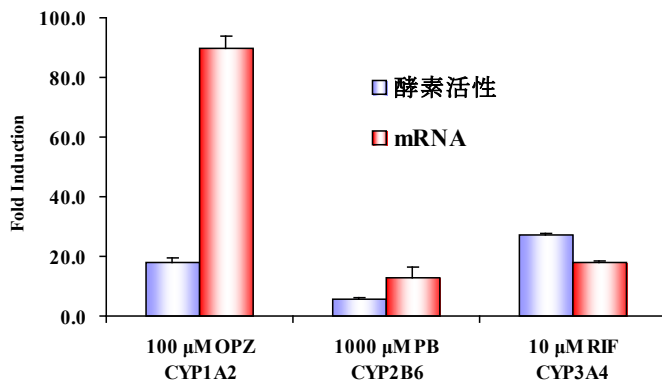
[実施例 1] 誘導剤による各 CYP 分子種の誘導

FDA ドラフトガイダンス¹⁾で重要視・推奨されている CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4 の酵素誘導能について酵素活性レベルおよび mRNA レベルでの検討を行いました。実験条件を表 1 に実験結果を図 2 に示します。なお、酵素活性値はサンプリング後の各ウェルにおける総タンパク質量で補正を行いました。

表 1 実験条件

分子種	誘導剤 (濃度)	基質 (濃度)
CYP1A2	オメプラゾール (100 μM)	フェナセチン (150 μM)
CYP2B6	フェノバルビタール (1000 μM)	ブプロピオン (500 μM)
CYP3A4	リファンピシン (10 μM)	テストステロン (100 μM)

細胞播種濃度 : 0.6 x 10⁶ viable cells / mL



CYP 分子種	酵素活性※ Fold Induction	mRNA Fold Induction
CYP1A2	18.2 ± 1.0 (14 - 24)	89.9 ± 3.9
CYP2B6	5.8 ± 0.6 (5 - 10)	12.8 ± 3.5
CYP3A4	23.9 ± 2.5 (4 - 31)	17.8 ± 0.7

※ () 内は FDA の指標 (Fold Induction) を表す

図 2 各 CYP 分子種の誘導

当社の結果は FDA 推奨の Fold Induction にほぼ一致し、信頼性の高い評価系であることが検証出来ました。

[実施例 2] CYP3A4 誘導におけるリファンピシンの EC₅₀

CYP3A4 誘導におけるリファンピシンの EC₅₀ の検討を行いました (図 3、図 4、各 n = 3)。リファンピシン濃度は 0.25, 0.5, 1.0, 5.0, 10, 25, 50 μM で実施しました。

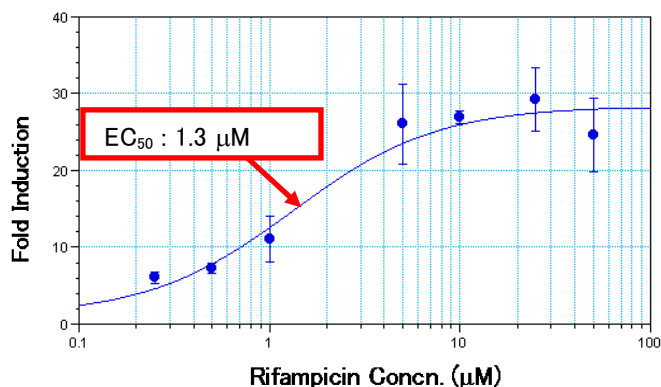


図 3 酵素活性レベルでのリファンピシンの EC₅₀

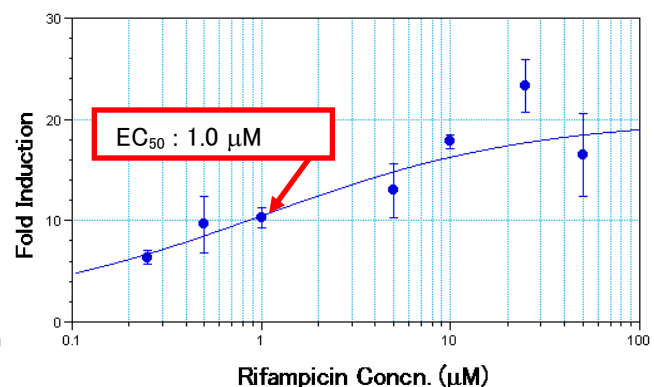


図 4 mRNA レベルでのリファンピシンの EC₅₀

当社の結果より、文献値²⁾ (0.4 - 1.3 μM) とほぼ同等の EC₅₀ が得られました。

[引用]

- 1) Guidance for Industry Drug Interaction Studies –Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) February 2012
- 2) Nireesh Hariparsad et al., Comparison of Immortalized Fa2N-4 Cells and Human Hepatocytes as in Vitro Models for Cytochrome P450 Induction. (2008) *DRUG METABOLISM AND DISPOSITION* 36:1046-1055

[キーワード]

酵素誘導、凍結ヒト肝細胞、ヘパトサイト、CYP、P450