

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4669758号
(P4669758)

(45) 発行日 平成23年4月13日(2011.4.13)

(24) 登録日 平成23年1月21日(2011.1.21)

(51) Int. Cl.		F I			
C 1 2 N	5/071	(2010.01)	C 1 2 N	5/00	2 0 2 A
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 Q	1/26	(2006.01)	C 1 2 Q	1/26	

請求項の数 6 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2005-225708 (P2005-225708)	(73) 特許権者	503360115
(22) 出願日	平成17年8月3日(2005.8.3)		独立行政法人科学技術振興機構
(65) 公開番号	特開2007-37466 (P2007-37466A)		埼玉県川口市本町四丁目1番8号
(43) 公開日	平成19年2月15日(2007.2.15)	(73) 特許権者	390037327
審査請求日	平成20年5月12日(2008.5.12)		積水メディカル株式会社
			東京都中央区日本橋3丁目13番5号
		(74) 代理人	110000084
			特許業務法人アルガ特許事務所
		(74) 代理人	100068700
			弁理士 有賀 三幸
		(74) 代理人	100077562
			弁理士 高野 登志雄
		(74) 代理人	100096736
			弁理士 中嶋 俊夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ラット肝細胞におけるリファンピシンによるCYP3A誘導法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

リファンピシン存在下にコラーゲンコート培養皿上でラット小型肝細胞を培養することを特徴とする、CYP3A誘導法。

【請求項2】

前記ラット小型肝細胞が成熟化ラット小型肝細胞である請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記ラット小型肝細胞が成熟化していないラット小型肝細胞である請求項1記載の方法

【請求項4】

被験薬物及びリファンピシン存在下にコラーゲンコート培養皿上でラット小型肝細胞を培養し、薬物代謝酵素誘導能を測定することを特徴とする、被験薬物とリファンピシンの相互作用の検定法。

【請求項5】

前記ラット小型肝細胞が成熟化ラット小型肝細胞である請求項4記載の方法。

【請求項6】

前記ラット小型肝細胞が成熟化していないラット小型肝細胞である請求項4記載の方法

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

【 0 0 0 1 】

本発明は、ラット肝細胞におけるリファンピシンによるCYP3A誘導法及びラット肝細胞を用いたリファンピシンと被験薬物の相互作用の検定法に関する。

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

リファンピシンは抗結核薬として使われている肝排泄型の薬剤であるが、ヒト肝臓中に存在するシトクロム系薬物代謝酵素であるCYP3A4を誘導するために、併用すると効果が得られない薬剤や肝臓に重大な障害を及ぼす薬剤が多数あると考えられ、リファンピシン投与状態での薬物代謝系の研究が必要である。しかし動物実験で頻繁に使われるラット等のげっ歯類では、ヒトCYP3A4に相当するCYP3A1及びCYP3A2のリファンピシンによる誘導が認められないことがわかっているため、これらの動物を使った従来の研究方法では正確な評価は困難である。また、ヒト肝細胞を用いた実験は細胞の入手が難しく、研究を行うのは困難である。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 3 】

本発明の目的は、ラット肝細胞において誘導が認められないことが知られているリファンピシンによるCYP3A誘導法を提供するとともに、ラット肝細胞を用いた被験薬物とリファンピシンとの相互作用検定法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

20

【 0 0 0 4 】

そこで本発明者は、種々の動物の細胞を用いて薬物代謝酵素誘導能の検討をしてきたところ、全く意外にもラット小型肝細胞をリファンピシン存在下に培養すれば、従来ラット肝細胞では誘導されないと考えられていたCYP3A誘導が生じることを見出した。さらに、この培養系を用いれば、生体内における被験薬物とリファンピシンとの相互作用が検定できることも見出した。

【 0 0 0 5 】

すなわち、本発明は、リファンピシン存在下にラット小型肝細胞を培養することを特徴とする、CYP3A誘導法を提供するものである。

さらに本発明は、被験薬物及びリファンピシンの存在下にラット小型肝細胞を培養し、薬物代謝酵素誘導能を測定することを特徴とする、被験薬物とリファンピシンの相互作用の検定法を提供するものである。

30

【発明の効果】

【 0 0 0 6 】

本発明によれば、従来、ラット肝細胞ではリファンピシンによって誘導されないと考えられていたCYP3Aを、培養が容易で、凍結保存も可能なラット小型肝細胞で誘導させることが可能となった。この培養系を用いることにより、種々の被験薬物とリファンピシンとを併用した場合の生体内における相互作用、すなわち、薬効、肝障害の可能性等が予測可能となった。

【発明を実施するための最良の形態】

40

【 0 0 0 7 】

本発明においては、ラット小型肝細胞を用いる。ラット小型肝細胞は肝組織中に存在する肝幹細胞の一種で肝細胞としての機能を持ちながら、非常に高い増殖活性を持っている。また長期間凍結保存した後、再培養を行ってもその能力を失わない。また、ラット小型肝細胞は培養経過とともに薬物代謝酵素の活性が低下することはなく、成熟化を誘導するとその活性も成熟肝細胞に近くまで上がる。従って、ラット小型肝細胞は、薬物代謝酵素誘導能の高い状態を長期間に渡って維持することができる特性を有している。

【 0 0 0 8 】

ラット小型肝細胞は、例えばラットの肝臓よりコラゲナーゼ灌流法によって採取された細胞懸濁物から、遠心操作を繰り返すことによって単離することができる。また、同細胞

50

懸濁物から小型肝細胞特異的抗原に対する特異抗体（CD44、BR13、D6.1A等）やヒアルロン酸を付着した担体などにより分離することができる。

【0009】

得られたラット小型肝細胞は、凍結保存することができるので、長期保存可能である。

【0010】

CYP3A誘導法にあたっては、リファンピシンの存在下にラット小型肝細胞を培養する。培養液中のリファンピシンの濃度は、10～100 μ M、さらに30～100 μ Mが好ましい。また、ラット小型肝細胞は、30～50個の細胞よりなるコロニーを形成する培養7～20日目（より好ましくは、8～14日目、特に好ましくは10～12日目）に一旦培養皿より剥がして新しい培養皿に再播種するか、凍結保存した小型肝細胞コロニーを500～10000コロニー/60mm培養皿（より好ましくは、1000～5000コロニー/60mm培養皿、特に好ましくは2000～4000コロニー/60mm培養皿）の濃度で播種し、培養するのが好ましい。

10

【0011】

また、被験薬物とリファンピシンの相互作用検定法においては、上記培養条件に被験薬物を添加した系でラット小型肝細胞を培養する。リファンピシン及び小型肝細胞濃度は前記と同様である。

【0012】

培養は、コラーゲンをコートしたディッシュ上で行うのが好ましい。また、培地としては、DMEM培地、William's Medium E培地、RPMI1640培地等を用いることができる。さらに培地中にはFBS、アスコルビン酸、甲状腺ホルモン、DMSO等を添加することができる。培地中に加えるのが好ましいものとしては、ニコチンアミド、増殖因子、デキサメサゾン、インスリンが挙げられる。増殖因子としては、肝細胞増殖因子[HGF, hepatocyte growth factor]、腫瘍増殖因子[TGF-alpha, Transforming growth factor-alpha]、線維芽細胞増殖因子[FGF, fibroblast growth factor]などが挙げられる。培養は、通常35 \pm 5、3～7%CO₂インキュベーター内の条件で行うのが好ましい。また試験を行うまでの培養時間は、2日以上であるのが好ましい。

20

【0013】

ラット小型肝細胞のCYP3A活性は、リファンピシンの濃度に依存して高くなる。従ってこの培養系を用いれば、リファンピシンと被験薬物との相互作用が検定できる。リファンピシンと被験薬物との相互作用を検定するには、被験薬物非添加時のCYP3Aを含む薬物代謝酵素誘導能と被験薬物添加時の薬物代謝酵素誘導能とを対比すればよい。ここで、CYP3Aを含む薬物代謝酵素誘導能は常法、例えば酵素反応の基質を含む緩衝液をラット小型肝細胞に加えて酵素反応を行い、代謝産物をHPLCにより測定すればよい。ここで、CYP3Aとしては、CYP3A1、CYP3A2、CYP3A23が挙げられ、このうち、CYP3A2、CYP3A23が好ましい。CYP3A以外の薬物代謝酵素としては、CYP1A、CYP2B、CYP2E等が挙げられる。

30

【実施例】

【0014】

次に実施例を挙げて本発明を説明するが、本発明は何らこれら実施例に限定されるものではない。

40

【0015】

実施例1

A：試験方法

1) 凍結小型肝細胞の調製

オスのラット肝臓を灌流し、得られた細胞をハンクス緩衝液（表1）に懸濁して50 \times g、1min、4で遠心し、上清を回収する。この操作を3回繰り返す。

50 \times g、5min、4で遠心し、沈殿をハンクス緩衝液に懸濁する。この操作を3回繰り返す。

150 \times g、5min、4で遠心し、沈殿をハンクス緩衝液に懸濁する。

50

150 × g、5 min、4 で遠心し、沈殿をDMEM/FBS（表2）に懸濁する。

50 × g、5 min、4 で遠心し、沈殿をDMEM/FBSに懸濁する。

細胞数を数え、 6×10^4 細胞/mlになるようDMEM/FBSで調製する。

【0016】

【表1】

*ハンクス緩衝液：組成
Hanks' Balanced Salt Solution (Sigma)
0.2% Bovine Serum Albumin
10^{-7} M デキサメタゾン
0.5 μg/ml インスリン
抗生物質（ペニシリン、ストレプトマイシン）

10

【0017】

【表2】

*DMEM/FBS：組成
DMEM (Sigma)
10%ウシ胎仔血清 (HyClone)
10ng/ml 上皮成長因子 (EGF)
10mM ニコチンアミド
10^{-7} M デキサメタゾン
0.5 μg/ml インスリン
1 mM アスコルビン酸 (和光純薬工業)
抗生物質（ペニシリン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン）

20

【0018】

調製した細胞懸濁液を100mm 培養皿 (CORNING) に9mlずつ分注し、CO₂ インキュベーター (37 °C, 5% CO₂, 湿度95%) で培養する。培養2日目に培地をDMEM/FBSで交換し、その後2日に1回、培地をDMEM/FBS/DMSO (表3) で交換する。10日間培養後、培養皿から培地を除き6mlのPBSで洗浄し、2mlの0.02% EDTAを加えて攪拌、液を除く。37 °C に温めた Cell dissociation solution (SIGMA) を2ml加え、CO₂ インキュベーター内で5min静置する。DMEMを1ml加えて細胞を回収、500rpm、5minで遠心し、沈殿を1ml (4培養皿分) のセルパンカー (三菱化学ヤトロン) に懸濁する。-30 °C で30min凍結したのち、-80 °C で保存する。

30

【0019】

【表3】

*DMEM/FBS/DMSO：組成
DMEM
10%ウシ胎仔血清 (HyClone)
1%ジメチルスルホキシド (Aldrich/Sigma)
10ng/ml 上皮成長因子 (EGF)
10mM ニコチンアミド (片山化学工業)
10^{-7} M デキサメタゾン
0.5 μg/ml インスリン
1 mM アスコルビン酸 (和光純薬工業)
抗生物質（ペニシリン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン）

40

【0020】

2) コラーゲンコート培養皿の調製

50

ラットの尾から調製したコラーゲン液 (5 mg/ml) を 0.1% 酢酸で 100 倍に希釈し、60 mm 培養皿 (CORNING) に 3 ml ずつ分注する。室温で 1 hr 静置してからコラーゲン液を除き、クリーンベンチ内で一晚乾燥させたのち、紫外線を 1 hr 照射して滅菌、3 ml の PBS を加えて 37 °C で 30 min インキュベートする。その後 PBS を除き、解凍した小型肝細胞を 3,000 ~ 5,000 コロニー / 培養皿で播種する。

【0021】

3) 小型肝細胞の培養

凍結小型肝細胞を 37 °C インキュベーター内で解凍し、37 °C に温めた DMEM / FBS 培地 10 ml に加えて 50 × g、1 min 遠心する。上清を除き、37 °C に温めた DMEM / FBS 培地 3 ml に沈殿した細胞を懸濁してコラーゲンコート培養皿に播種する。CO₂ インキュベーター (37 °C, 5% CO₂, 湿度 95%) で培養し、24 時間後培地を無血清培地 (DMEM / DMSO、表 4) に交換し、以後 2 日に 1 回、培地を DMEM / DMSO で交換する。

10

【0022】

【表 4】

*DMEM/DMSO : 組成
DMEM (Sigma)
1%ジメチルスルホキシド (Aldrich/Sigma)
10ng/ml 上皮成長因子 (EGF)
10mM ニコチンアミド
10 ⁻⁷ M デキサメタゾン
0.5 μg/ml インスリン
1 mM アスコルビン酸 (和光純薬工業)
抗生物質 (ペニシリン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン)

20

【0023】

4) 小型肝細胞の成熟化

凍結小型肝細胞を 14 日間培養したのち、成熟化を行う。Matrigel (ベクトンデキンソン) を 4 °C に冷却した DMEM 培地で 1 mg/ml になるよう希釈し、氷上で静置する。培養皿から培地を除き Matrigel 溶液を 1 ml ずつ分注し、CO₂ インキュベーター内で 1 時間培養したのち、DMEM / DMSO 培地を 2 ml 加えて培養を続ける。

30

【0024】

5) 誘導剤の添加

リファンピシン (SIGMA) を 10 mM になるよう DMSO (SIGMA) に溶解し、さらに DMEM 培地で 100 倍に希釈して孔径 0.2 μm のフィルターで濾過し、4 °C で保存する。それをさらに DMEM / DMSO 培地で希釈し、0、1、3、10、30 μM のリファンピシンを含む培地を調製する。

成熟化後 7 日間、および成熟化せず播種後 21 日間培養した小型肝細胞をリファンピシン添加培地で培養する。リファンピシン添加後 3 日間培養を行ったのちに酵素反応を行う。

40

【0025】

6) 酵素反応

リファンピシン添加および非添加で 3 日間培養した小型肝細胞を 37 °C の KH 緩衝液 (表 5) 3 ml で 2 回洗浄したのち、10 μM のミダゾラム (ULTRAFINE Chemicals) を含む KH 緩衝液を 1.5 ml 加えて CO₂ インキュベーターで 1 時間反応させる。反応液を回収し、-80 °C で保存する。

【0026】

【表 5】

<p>* KH緩衝液：組成</p> <p>9.6g Krebs-Henseleit buffer powder (Sigma)</p> <p>0.373g CaCl₂·2H₂O</p> <p>2.1g NaHCO₃</p> <p>pH 7.5</p> <p>H₂O to 1000 ml</p> <p>0.2 μm フィルターで濾過</p>
--

【 0 0 2 7 】

10

7) サンプル処理

サンプル 400 μl をフィルター（ウルトラフリー、C3LH、日本ミリポア）を用いて、遠心分離（2400 × g、4、5分）する。

得られたる液 250 μl に内部標準溶液（Phenacetin のメタノール溶液、10 μg/ml）10 μl を加え、そのうちの 50 μl を HPLC に注入する。

【 0 0 2 8 】

8) 検量線溶液

1'-ヒドロキシミダゾラム溶液（100、30、10、3、1、0.3、0.1 μM）250 μl に内部標準溶液 10 μl を添加し、そのうちの 50 μl を HPLC に注入する。

20

【 0 0 2 9 】

9) HPLC 分析条件

カラム：Xterra RP18、5 μm、4.6 × 150 mm (Waters)

移動相：A 液；10 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4)

B 液；メタノール/アセトニトリル (5/7, v/v)

溶出条件：グラジエント

Time(min)	0	5	17	25	26	35
B conc. (%)	30	30	60	60	30	30

流速：1 ml/min

カラム温度：40

UV 検出波長：263 nm

分析時間：35 min

30

【 0 0 3 0 】

10) タンパク濃度測定

酵素反応を行った培養皿に 1 ml のリシス緩衝液（表 6）を加えて 4 で 1 hr 静置したのち、緩衝液に細胞を懸濁させて回収し、氷上で超音波処理（Sonifier、50% duty、output 1、30 sec）を行う。

1, 200 × g、5 min、4 で遠心し上清を回収、BCA protein assay kit (PIERCE) でタンパク濃度を測定する。濃度標準は BSA を用いる。

【 0 0 3 1 】

40

【表 6】

<p>* リシス緩衝液：組成</p> <p>10mM Tris-HCl pH7.4 (Sigma)</p> <p>5mM EDTA-2Na</p> <p>150mM NaCl</p> <p>5 μg/ml pepstatin A</p> <p>5 μg/ml leupeptin</p>

【 0 0 3 2 】

11) データ処理

50

HPLCで得られた代謝産物量を培養皿あたりのタンパク量で割り、酵素活性 (pmol / min / mg protein) とする。各項目3培養皿ずつの実験と4培養皿ずつの実験を行い、リファンピシン非添加条件での酵素活性を1として相対値を算出する。

【0033】

B. 結果

リファンピシンを0 ~ 30 μ Mになるように添加して培養したラット小型肝細胞を図1に示す。また、そのときのCYP3A活性を測定した結果を図2に示す。

【0034】

図1から明らかなように、1 ~ 30 μ Mの濃度範囲においてリファンピシンはラット小型肝細胞の培養に影響を及ぼさなかった。

10

【0035】

図2から明らかなように、リファンピシンを0、1、3、10、30 μ Mになるよう加えてラット小型肝細胞を培養し、CYP3A活性を測定した結果、リファンピシン1 μ Mの条件下では活性は無添加の条件と比べると若干低下するが、リファンピシン濃度を高くすると活性は濃度依存的に上昇し、30 μ M条件下では無添加に比べて活性は高くなることが判明した。従って、この系に被験薬物を添加し、CYP3A活性その他の薬物代謝酵素活性を測定すれば、被験薬物とリファンピシンとの相互作用が検定できる。

【図面の簡単な説明】

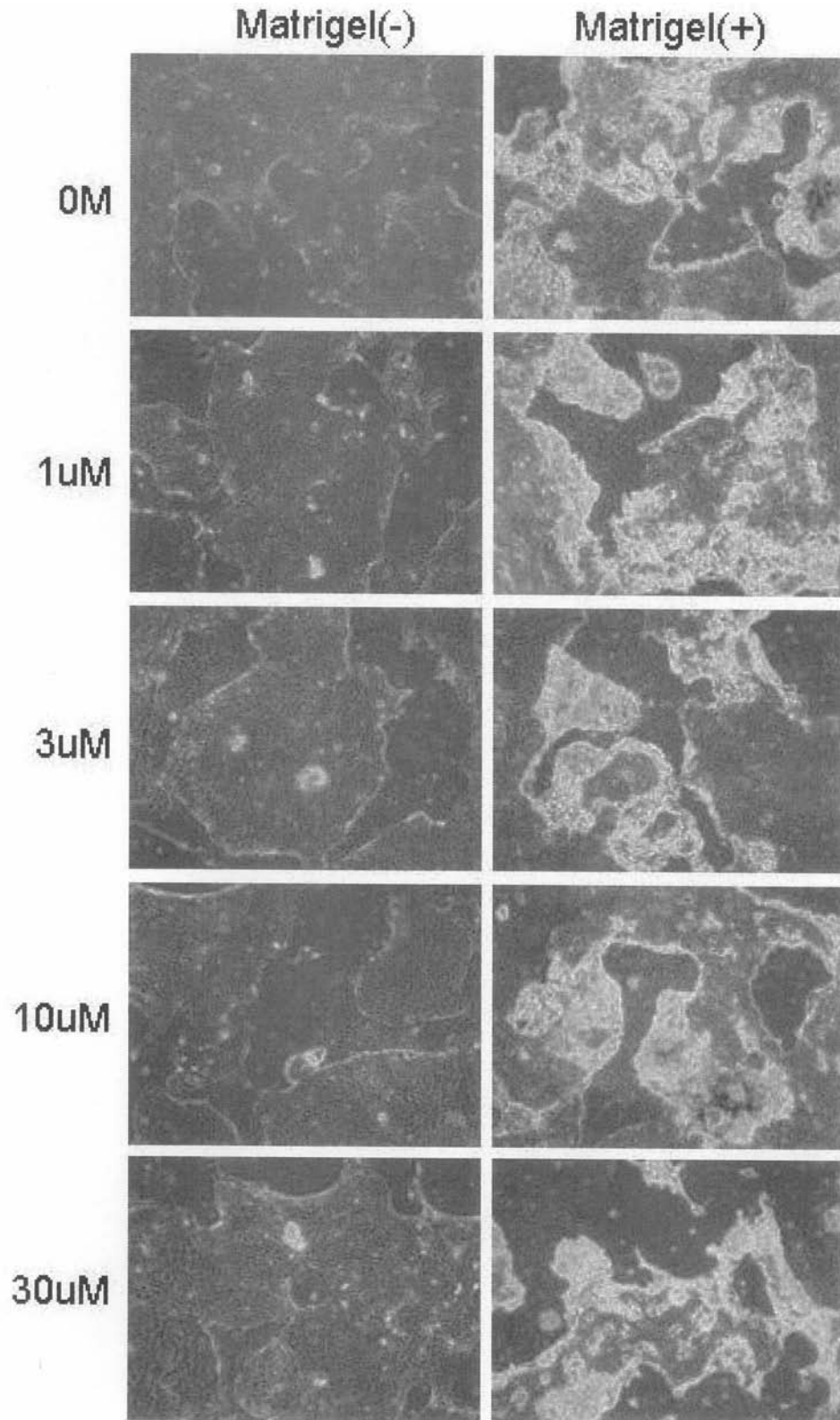
【0036】

【図1】リファンピシン存在下に培養したラット小型肝細胞の位相差顕微鏡像を示す。

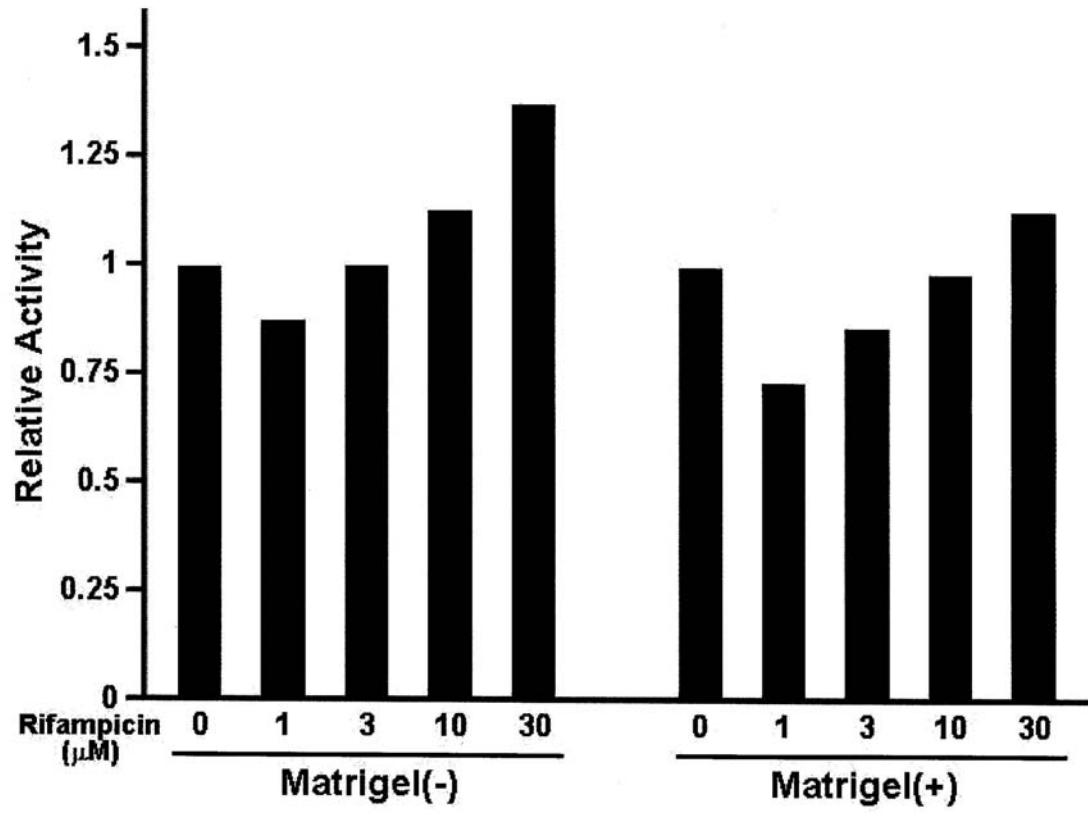
20

【図2】リファンピシン存在下に培養したラット小型肝細胞のCYP3A活性を示す。リファンピシン濃度0の時の値を1として、各濃度における活性を相対値で表す。

【 図 1 】



【 図 2 】



フロントページの続き

- (74)代理人 100117156
弁理士 村田 正樹
- (74)代理人 100111028
弁理士 山本 博人
- (74)代理人 100089048
弁理士 浅野 康隆
- (74)代理人 100101317
弁理士 的場 ひろみ
- (74)代理人 100121153
弁理士 守屋 嘉高
- (74)代理人 100134935
弁理士 大野 詩木
- (74)代理人 100130683
弁理士 松田 政広
- (72)発明者 三高 俊広
北海道札幌市清田区北野3条1丁目10番49号
- (72)発明者 大栄 秀和
北海道札幌市北区北26条西5丁目2番1号511
- (72)発明者 今 純子
北海道札幌市北区北17条西6丁目20-318 パークホームズ北大前803号

審査官 太田 雄三

- (56)参考文献 Proceedings of the 31st Annual Meeting, 2004年10月, p. 451, P7-26
薬物動態, 2000年, Vol. 15, No. 1, pp. 52-56
第16回日本薬物動態学会年会, 2001年 9月17日, p. S286, 18PE-05
第41回日本肝臓学会総会講演要旨, 2005年 5月25日, p. A296, P-221
北大法学論集, 2003年 5月22日, Vol. 54, No. 2, p. 44-55
代62回日本癌学会総会, 2003年 8月25日, p. 322, 1500-PA

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/071

C12Q 1/02

C12Q 1/26

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed

CiNii