

*王鞍 孝子¹⁾²⁾, 太田 之弘¹⁾³⁾, 長尾 卓也¹⁾⁴⁾, 楠元 久美子¹⁾⁴⁾, 小枝 暁子¹⁾⁵⁾,
上田 忠佳¹⁾⁶⁾, 八尋 寛司¹⁾⁸⁾, 田村 朋子¹⁾⁸⁾, 城村 友子¹⁾⁹⁾, 池谷 武志¹⁾⁹⁾,
小関 恵美子¹⁾⁹⁾, 和田 一輝¹⁾¹⁰⁾, 内藤 一史¹⁾¹¹⁾, 井上 由紀子¹⁾⁷⁾, 高橋 直希¹⁾⁷⁾, 岩井 久和¹⁾⁷⁾

¹⁾安全性評価研究会 スフェロイド分科会, ²⁾丸石製薬株式会社, ³⁾中外製薬株式会社, ⁴⁾株式会社住化分析センター, ⁵⁾株式会社イナリサーチ,
⁶⁾DSファーマバイオメディカル株式会社, ⁷⁾株式会社三和化学研究所, ⁸⁾STEMバイオメソッド株式会社, ⁹⁾株式会社トランスパレント,
¹⁰⁾日本ベクトン・ディッキンソン株式会社, ¹¹⁾日本チャールス・リバー株式会社

Introduction

肝細胞あるいは肝マイクロソームを用いた薬物の *in vitro* 代謝試験は探索研究だけでなく、ヒトに初めて投与するときに必要とされる試験である (ICH-M3 (R2))。特に代謝物の安全性を評価する上で、ヒト代謝物をできるだけ早い段階で検討することが望まれている。これまで単層培養法などの *in vitro* 代謝試験では、臨床で確認されている代謝物の5~6割程度の検出に止まり、その中でも第2相の代謝物生成は低いと報告されている^{1,2)}。そこで、安全性評価研究会スフェロイド分科会では、より生体に近いと考えられている三次元培養系で、長期培養が可能とされるヒト肝細胞スフェロイドを用いて、各種化合物の代謝物の予測性を検討し、スフェロイド培養系の有用性を評価した。

Methods

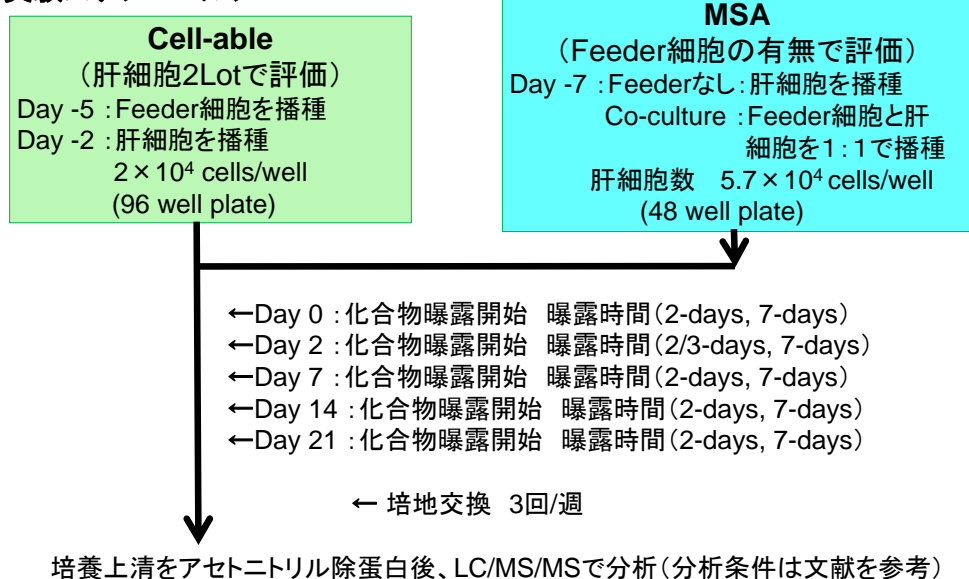
<培養系>

- 凍結ヒト肝細胞 2 Lot, CR (日本チャールス・リバー, lot no. Hu8110), BD (ベクトン・ディッキンソン, lot no.228)
- フィーダー細胞: マウス線維芽細胞3T3-Swiss albino (8 × 10³ cells/well)
- 培養プレート: 2種, Cell-able™ 96well plate (トランスパレント), MSA (Micro Sphere Array, STEMバイオメソッド)
- 培地: Cell-able; RM101 (1%FBSを含む, トランスパレント) MSA; 10%FBS添加ウィリアムスE培地

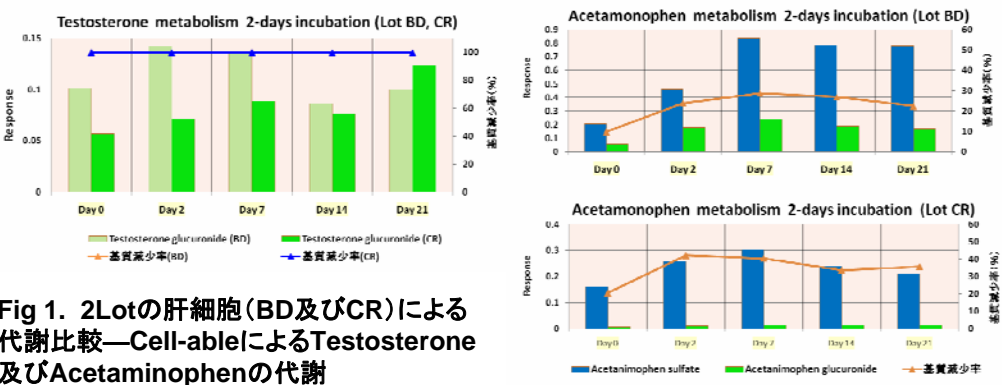
<代謝物産生および検出>

スフェロイドを形成後、Day0, 2, 7, 14及び21に10μMの各種化合物8種 (Acetaminophen, Midazolam, Diclofenac, Lamotrigine, Salbutamol, Propranolol, Imipramine及びTestosterone) を添加し、2~3日間あるいは7日間曝露した。培養上清中に産生された代謝物と基質とをLC/MS/MSを用いて測定し、内標 (IS) に対するresponseを求めた。代謝活性の指標としての基質減少率は、対照wellとして、Feeder cellのみに各基質を添加したものを用意して (Feeder無しの培養系では培地のwell)、対照wellのresponseを100%として減少率を算出した。

<実験スケジュール>



Results



Testosterone及びAcetaminophenで示すように、今回用いた凍結ヒト肝細胞では、代謝の相違は質的な差は小さく、量的な差が認められた。
基質の反応率 (基質減少率) からみた代謝活性はほぼ28日間 (曝露7日間を含む) 持続しており、Day 0の代謝活性に対するDay 21の平均値は、Cell-ableで約98%, MSA (Feederなし) で約82%であった。

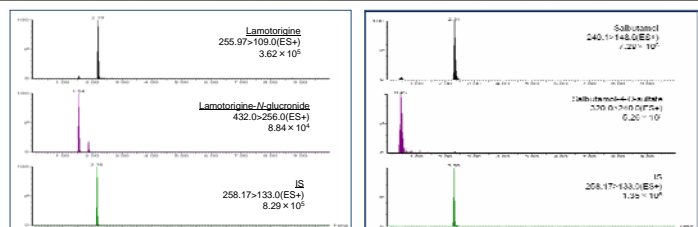
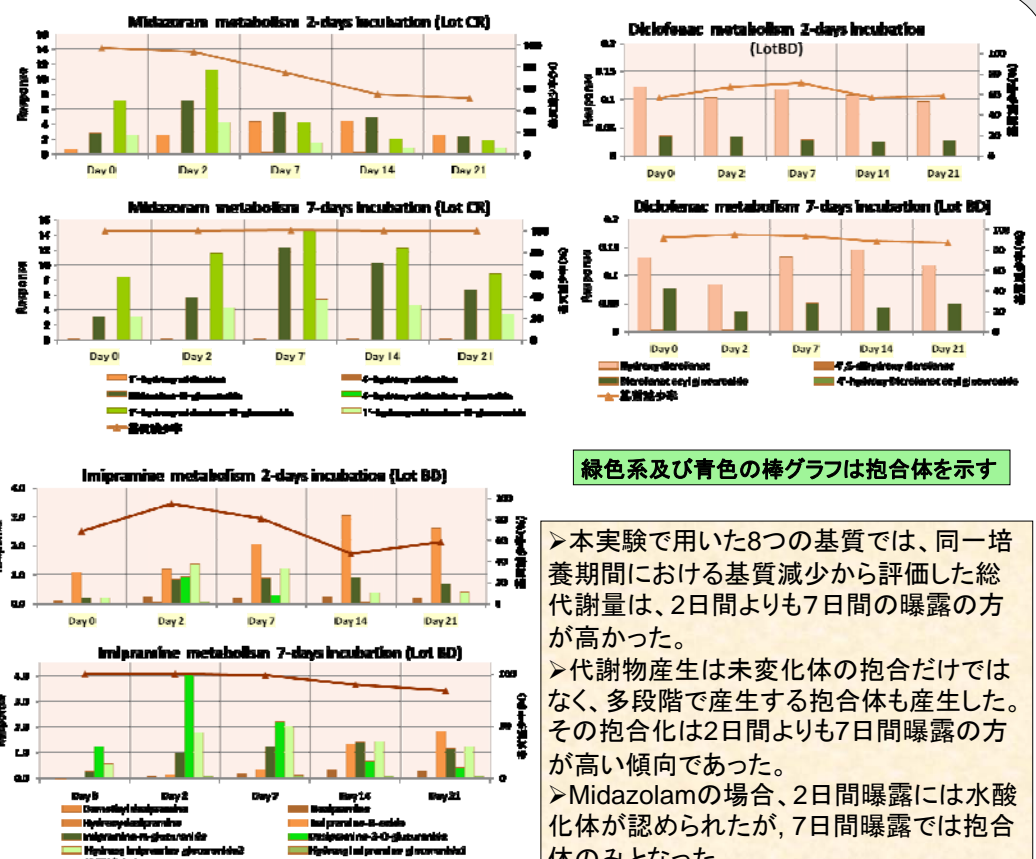


Table 1. Cell-ableとMSAの培養系における各代謝物の検出結果 (全培養期間)

化合物	代謝物	Cell-able				MSA	
		肝細胞 CR		肝細胞 BD		肝細胞 BD / 実施E	
		A	D	A	B	Feederなし	Co-culture
Acetaminophen (IA2, 2E1, UGT, SULT, GST)	Acetaminophen sulfate	○	○	○	○	○	○
	Acetaminophen glucuronide	○	○	○	○	○	○
	NAPQI GSH	×	×		×	×	×
Diclofenac (2C9, UGT)	Hydroxy diclofenac	○	○	○	○	○	○
	4',5'-dihydroxy diclofenac	×	○	×	×	×	×
	Diclofenac acyl glucuronide	○	○	○	○	○	○
	4'-hydroxy diclofenac acyl glucuronide	○	×	○	○	×	○
Midazolam (3A4, UGT)	1'-hydroxy midazolam	○			○		○
	4-hydroxy midazolam	○			○		○
	Midazolam-N-glucuronide	○			○		○
	4-hydroxy midazolam-glucuronide	○			○		○
	1'-hydroxy midazolam-O-glucuronide	○			○		○
	1'-hydroxy midazolam-N-glucuronide	○			○		○
Lamotrigine (UGT)	Lamotrigine-N-glucuronide	○			○		×
Salbutamol (SULT)	Salbutamol-4-O-sulfate	○			○		×
Testosterone (3A4, UGT)	Hydroxy testosterone	×	×	×	×	×	×
	Testosterone glucuronide	○	○	○	○	○	○
Imipramine (IA2, 2D6, UGT)	Demethyl desipramine	○			○		○
	Desipramine	○			○		○
	Hydroxy desipramine	○			○		○
	Imipramine-N-oxide	○			○		○
	Hydroxy imipramine	×			×		×
	Imipramine-N-glucuronide	○			○		○
	Desipramine-2-O-glucuronide	○			○		○
	Hydroxy imipramine glucuronide 1*	○			○		○
Hydroxy imipramine glucuronide 2*	○			○		○	
Propranolol (IA2, 2D6, UGT)	Hydroxy propranolol	×	○				
	Propranolol-O-glucuronide	○	○				
	Hydroxy propranolol glucuronide	○	○				

Cell-able
5施設 (A, B, C, D, E)
MSA
1施設 (E)
化合物名の下段は主代謝産物を示す
* 保持時間の異なる位置異性体

臨床で認められる代謝物の検出結果はTable 1のとおり、グルクロン酸抱合及び硫酸抱合の第2相代謝物の検出が可能であった。
特に、LamotrigineとSalbutamolの代謝物は、*in vitro* 試験において検出が不可能と報告されていたが³⁾、今回のspheroid培養 (Cell-able) では検出できた (Fig. 2)。
MSAではCo-cultureの方がFeederなしの場合よりも代謝物産生能が高かった。



緑色系及び青色の棒グラフは抱合体を示す
本実験で用いた8つの基質では、同一培養期間における基質減少から評価した総代謝量は、2日間よりも7日間の曝露の方が高かった。
代謝物産生は未変化体の抱合だけではなく、多段階で産生する抱合体も産生した。その抱合化は2日間よりも7日間曝露の方が高い傾向であった。
Midazolamの場合、2日間曝露には水酸化体が認められたが、7日間曝露では抱合体のみとなった。
一方、Diclofenac及びImipramineの場合では、7日間曝露においてもそれぞれ水酸化体及びN-oxideが認められた。

Conclusion

長期培養可能な本スフェロイド培養系はヒトの代謝物を予測する上で有用なツールになることが分かった。

Acknowledgment

本発表にあたり、ご助言、ご指導頂きました安全性評価研究会 (谷学) のスフェロイド分科会の会員各位に感謝申し上げます。

Reference
1) Anderson S, Luffer-Atlas D, Knadler MP. (2009). *Chem Res Toxicol* 22, 243-256.
2) Dalvie D, Obach RS, Kang P, Prakash C, Loi C-M, Hurst S, Nedderman A, Goulet L, Smith E, Bu H-Z, Smith DA. (2009). *Chem Res Toxicol* 22, 357-368.
3) Wang WW, Khetani SR, krzyzewski S, Duignan DB, Obach RS. (2010). Published online before print. *DMD* October 2010 vol. 38 no. 10 1900-1905.