

Cell-able®とヒト初代肝細胞を用いたイメージングによる肝毒性評価法及び
キメラマウス由来新鮮ヒト肝細胞を用いた肝毒性評価法の可能性

東洋合成工業株式会社

目次

➤ Cell-able®とは？

Cell-able®プレートの特徴

肝細胞スフェロイドの形態

肝細胞スフェロイド長期培養時の肝特異的機能の維持

肝細胞培養操作方法

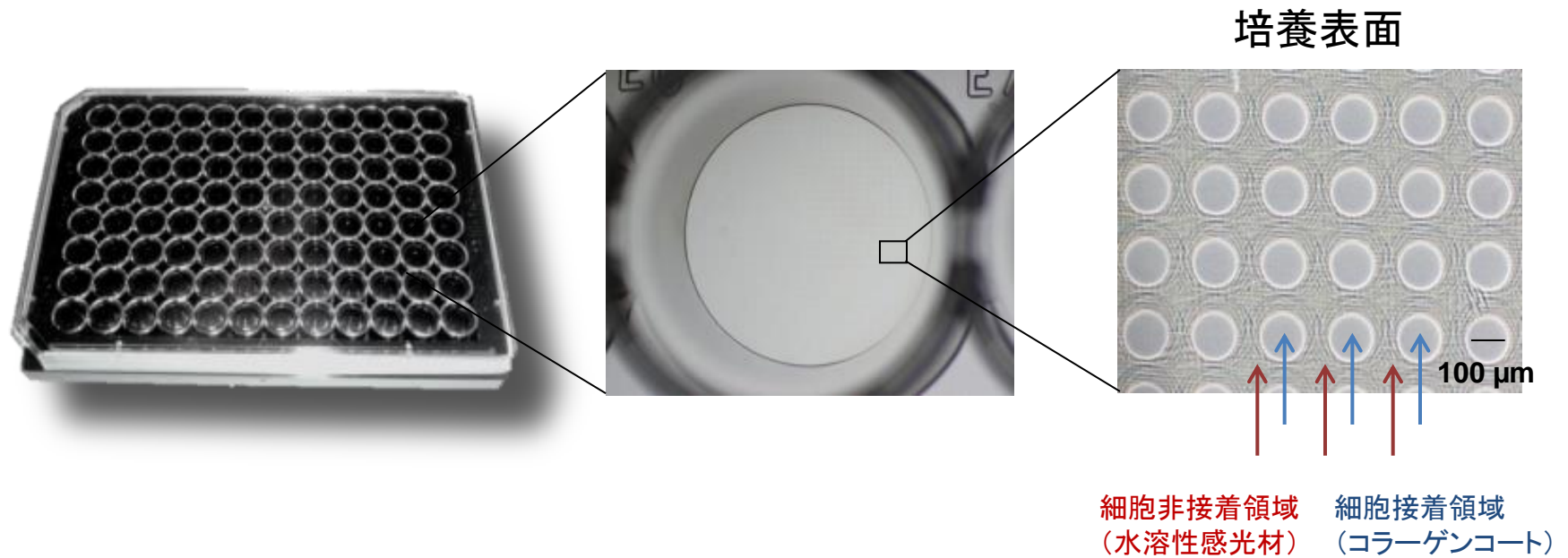
➤ Cell-able®上で培養したヒト初代肝細胞とHCS*を用いたイメージングによる薬物の肝毒性評価法

➤ Cell-able®上で培養したヒト肝臓キメラマウス由来新鮮ヒト肝細胞 (PXB-cells) とHCS*を用いたイメージングによる薬物の肝毒性評価法の可能性

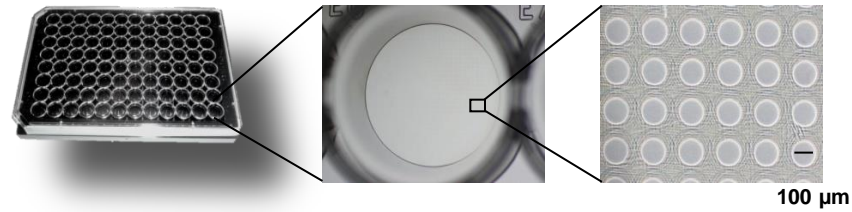
HCS: High content screening

Cell-able[®]とは？

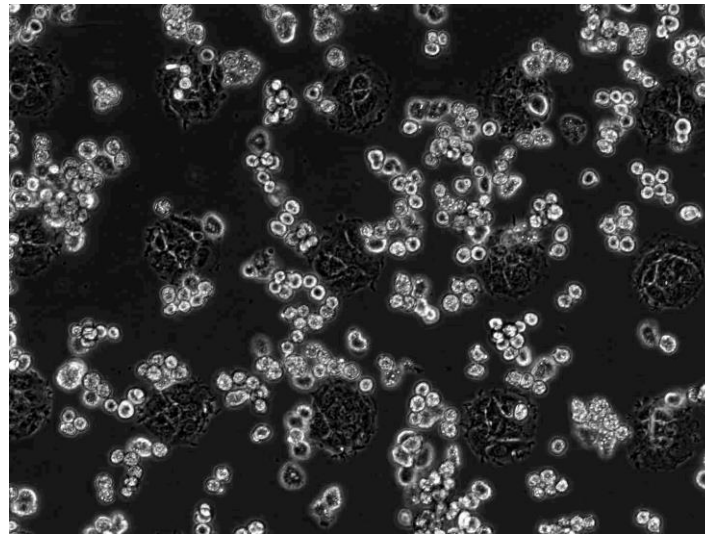
➤ Cell-able® 外観と培養表面



➤ Cell-able® 外観と培養表面

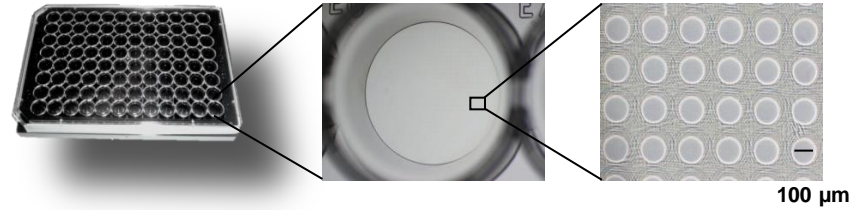


ラット初代肝細胞播種から48時間の動画

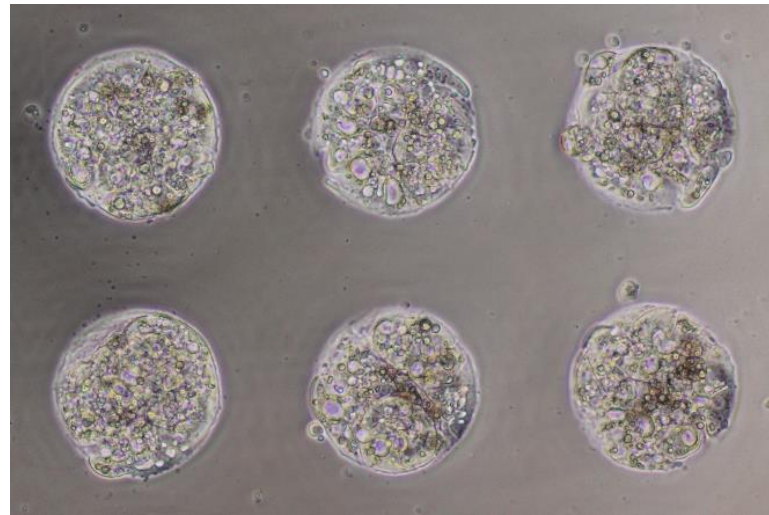


➤ Cell-able® 外観と培養表面

3-3

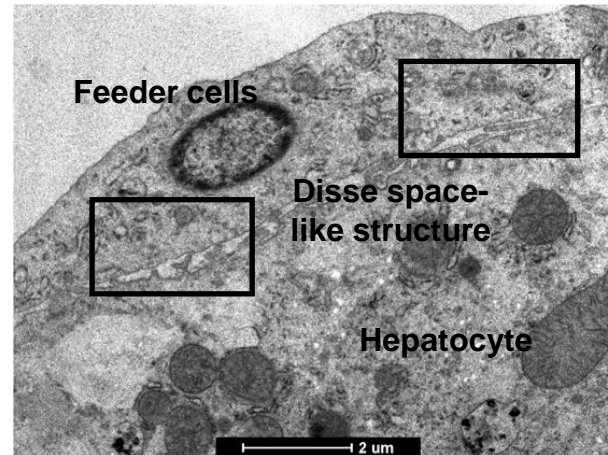


ヒト初代肝細胞播種5日目



通常の培養操作で、直径約100μm、厚み20~40μmの3Dスフェロイドを形成

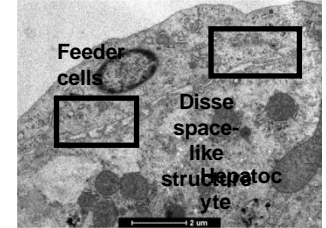
➤ Cell-able®上で培養した初代肝細胞の 形態と肝特異的機能維持



ラット初代肝細胞スフェロイド 断面TEM写真

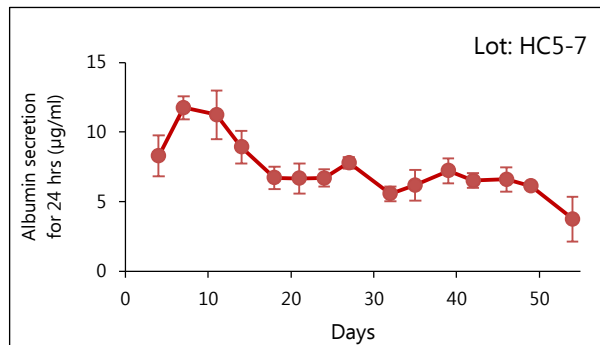
➤ Cell-able®上で培養した初代肝細胞の 形態と肝特異的機能維持

ヒト初代肝細胞アルブミン産生能経時変化

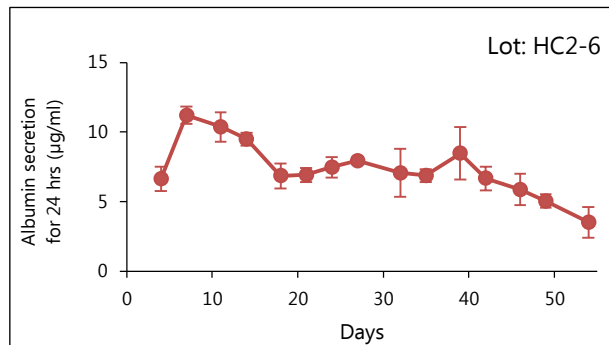


ラット初代肝細胞スフェロイド断面
TEM写真

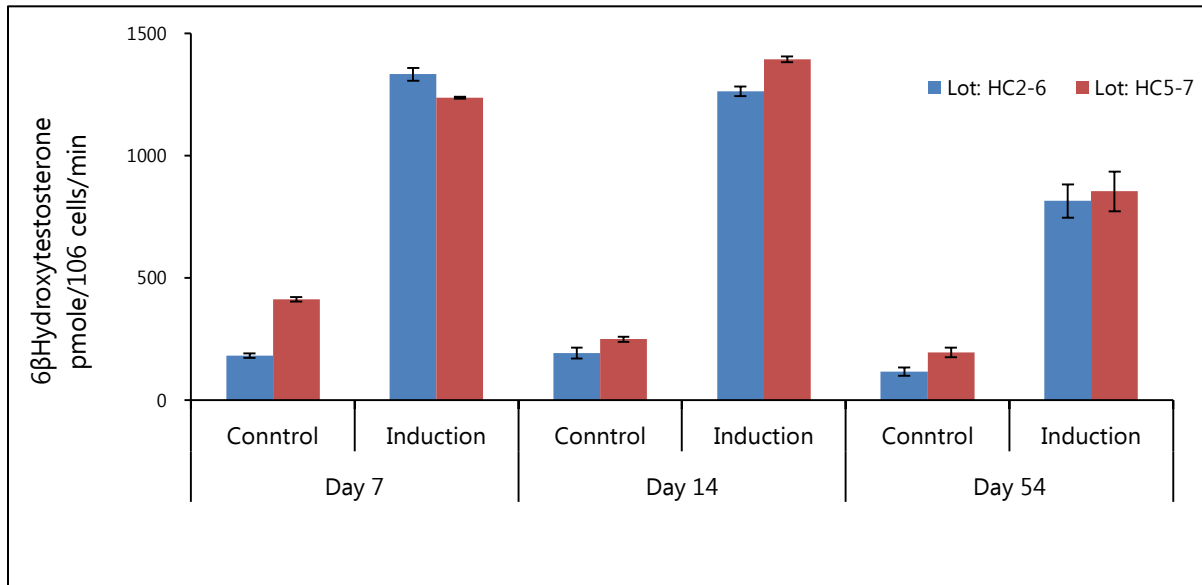
接着ロット



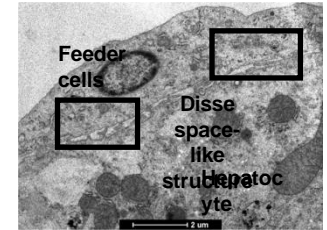
非接着ロット



➤ Cell-able®上で培養した初代肝細胞の 形態と肝特異的機能維持

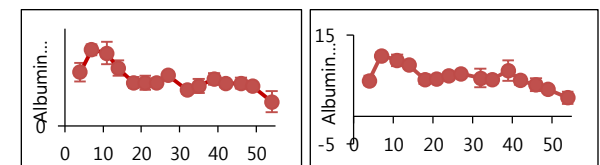


ヒト初代肝細胞CYP3A4 活性(基礎活性と誘導活性)
誘導:リファンピシン



ラット初代肝細胞スフェロイド断面
TEM写真

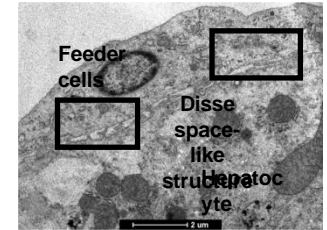
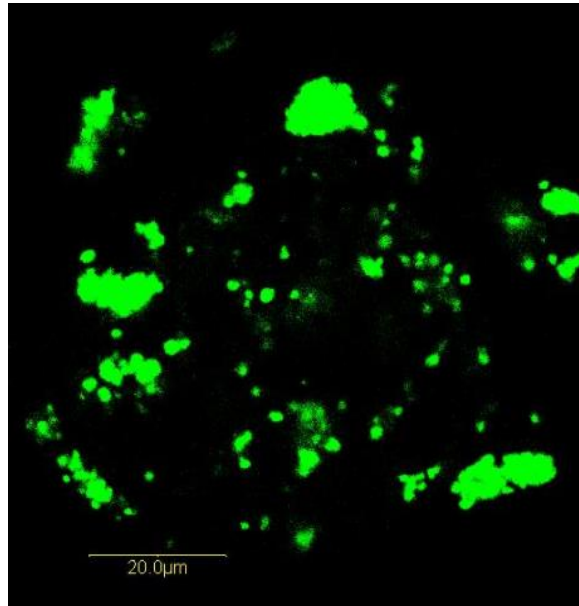
アルブミン産生能経時変化



➤ Cell-able®上で培養した初代肝細胞の 形態と肝特異的機能維持

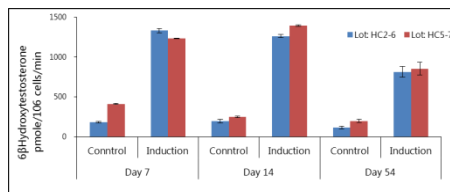
排泄トランスポーター機能
CDFDAは肝細胞に取り込まれた後、蛍光物質であるCDFに加水分解され、ABCCTransporterによって胆汁管へ排泄されます。図は、Cell-able®で培養14日目のヒト初代肝細胞スフェロイドにCDFDA添加10分後の共焦点レーザー顕微鏡写真。

CDFDA; Carboxydichlorofluorescein diacetate
CDF; Carboxydichlorofluorescein

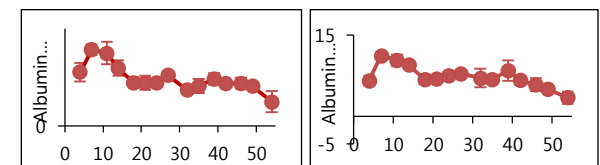


ラット初代肝細胞スフェロイド断面
TEM写真

CYP3A4 活性 (基礎活性と誘導活性)



アルブミン産生能経時変化



肝毒性の発生機序

中毒性

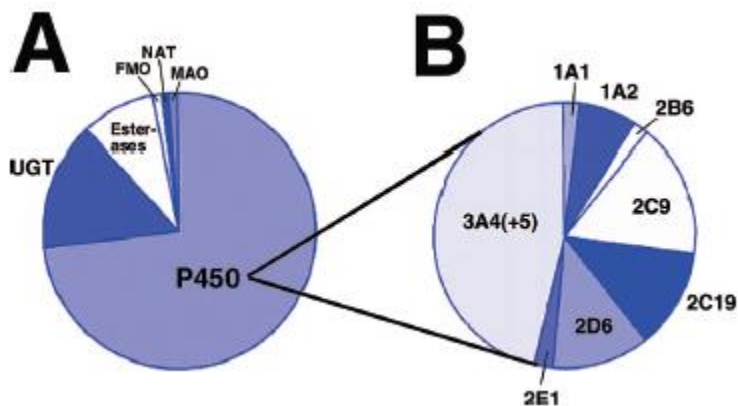
- ・薬物自体またはその代謝物が肝毒性を持ち、用量依存的に肝障害が発生

特異体質性

- ・薬物又はその反応性中間代謝物がハプテンとなり、肝細胞の種々の構成成分と結合して抗原性を獲得してアレルギー反応が起きる

「重篤副作用疾患別対応マニュアル 薬物性肝障害 平成20年4月 厚生労働省」より

薬物の主要な代謝酵素



Guengerich FP. Cytochrome P450 and chemical toxicology. Chem Res Toxicol . 2008 Jan; 21(1):70-83

**Cell-able®上で培養されたヒト初代肝細胞スフェロイドで
1週間以上維持が確認された代謝トランスポーター活性**

| Phase I | | |
|---------------------------------|---|---|
| | Substrate | Metabolite |
| CYP3A4 | Testosterone Midazolam | 6β-hydroxy testosterone 1'-hydroxy midazolam |
| CYP1A2 | Phenacetin | Acetaminophen |
| CYP2C9 | Tolbutamide | Hydroxy tolbutamide |
| CYP2A6 | Coumarin | 7-hydroxy coumarin |
| CYP2D6, CYP2C19 | | |
| Phase II | | |
| UDP- Glucuronosyltransferase | Testosterone Acetaminophen | Testosterone glucronide Acetaminophen glucronide |
| Sulfotransferase | Acetaminophen | Acetaminophen sulfate |
| Phase III | | |
| MRP2 | 5 (and 6)-Carboxy-2',7'- Dichlorofluorescein | Efflux transporter |
| NTCP | taurocholic acid | Up take transporter |

➤ Cell-able®を用いた 凍結ヒト初代肝細胞3次元培養操作方法

Day-1~7



3T3 swiss-albinoをトリプシン処理で回収
培地に分散させてCell-able®に播種
CO2インキュベータに静置

Day0



凍結ヒト肝細胞を37°Cで融解して1回洗浄
37°Cに温めたRM101培地に分散させて播種
CO2インキュベータに静置

Day2



スフェロイドがしっかりしていないため、少し慎重に培地交換
(培地を一部残して培地交換)

Day4~5



通常の培地交換は、週3回
培地交換せずに薬物長期暴露が必要な場合など、7日間まで
培地交換せずに培養可能

**Cell-able®上で培養したヒト初代肝細胞と
HCSを用いたイメージングによる
薬物の肝毒性評価法**

試験概要

Cell-able®で培養したヒト初代肝細胞スフェロイドに19薬物を14日間曝露し、薬物によって引き起こされる肝障害(DILI)を、ImageXpress Micro (Molecular Devices) によるイメージング解析により予測した。

この結果を、サンドイッチ培養24時間薬物曝露(Xu et al.,2008)¹⁾、2次元共培養16日間薬物曝露(Khetani, et al.,2013²⁾)による結果と比較した。薬物のDILI判定は、FDAのLTKB³⁾(Liver Toxicity Knowledge Base)を基に行った。

1) Xu et al. (2008) Cellular Imaging Predictions of Clinical Drug-Induced Liver Injury. *Toxicological Sciences* 105, 97-105

2) Khetani et al. (2013) The Use of Micropatterned Co-cultures to Detect Compounds that Cause Drug induced Liver Injury in Humans. *Toxicological Sciences* 132, 107-117

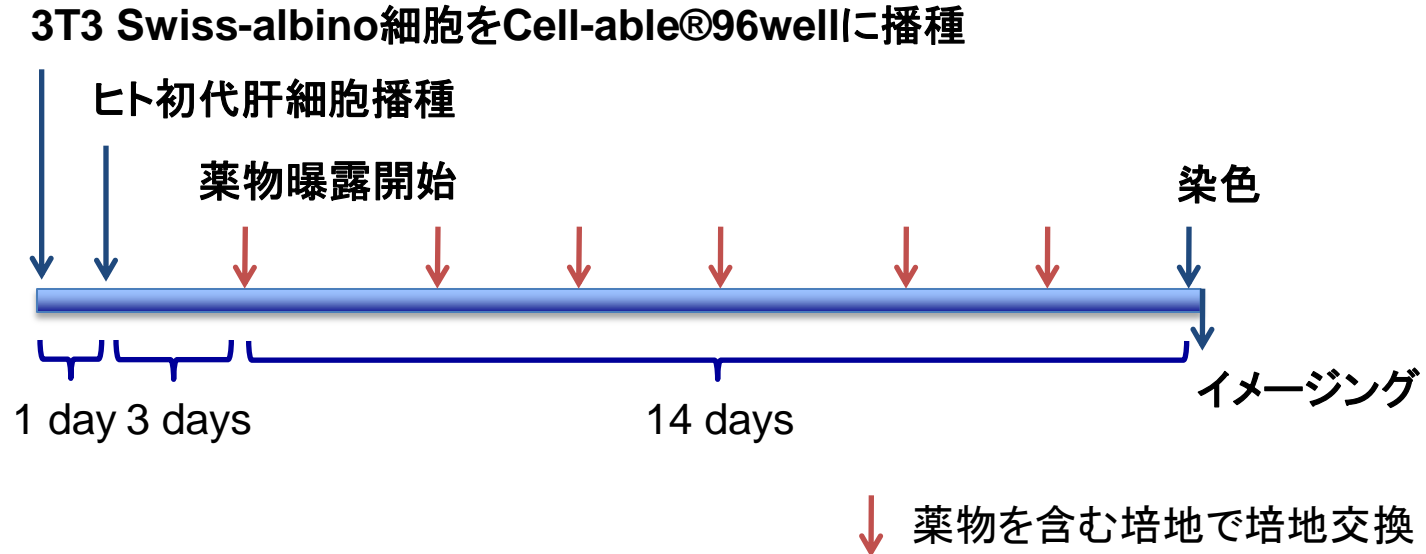
3) Chen et al.(2011) FDA-approved labeling for the study of drug-induced liver injury. *Drug Discovery Today* 16, 697-703

各試験方法の概要比較

| | Xu, 2008 ¹⁾ | Khetani, 2013 ²⁾ | TOYOGOSEI Cell-able® |
|----------------------|-----------------------------------|---|--|
| Cell | Cryo-human hepatocyte | Cryo-human hepatocyte+3T3 J-2 | Cryo-human hepatocyte+3T3 Swiss albino |
| Culture | 2D /Matrigel Overlay | HepatoPac™ co-culture | Cell-able® 3D Co-culture |
| 播種細胞数 (96well plate) | 60,000 Cells/well | 65,000 Cells/well | 20,000 Cells/well |
| 薬物暴露濃度 | 100 × Cmax | 1,30,60,100 × Cmax | 1,10,30,60 × Cmax |
| 薬物曝露時間 | 24時間 | 16日間 | 14日間 |
| 検出マーカー | 核 ミトコンドリア 細胞内グルタチオン 活性酸素 | ATP 細胞内グルタチオン アルブミン産生 尿素産生 | 核 ミトコンドリア 細胞内グルタチオン 活性酸素 |
| 検出方法 | 蛍光イメージング 1ウェルで全てのマーカーを検出 | CellTiter-Glo® assay GSH-Glo™ assay ELISA 呈色反応 | 蛍光イメージング 1ウェルで全てのマーカーを検出 |

Cell-able®を使った共培養スフェロイドを用いた、イメージングによる肝毒性評価

✓ 実験スケジュール



✓ 各マーカーの蛍光染色試薬

核: DRAQ5

...Ex/Em: 647/697nm

ミトコンドリア膜電位: TMRM

...Ex/Em: 548/573nm

GSH: mBCI

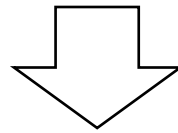
...Ex/Em: 394/490nm

活性酸素: CM-H₂DCFDA

...Ex/Em: 492/520nm

染色方法 (2 steps)

- Step-1 培養上清を除去し、TMRM, DRAQ5, CM-H₂DCFDA, mBCIを含む染色液を添加して45分間インキュベーション
- Step-2 染色液を除去して1回洗浄後、TMRM, mBCIを含む染色液を添加

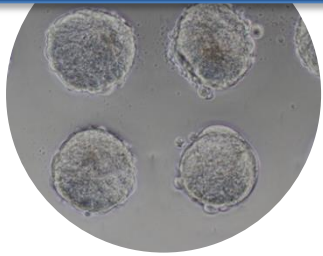


測定、解析

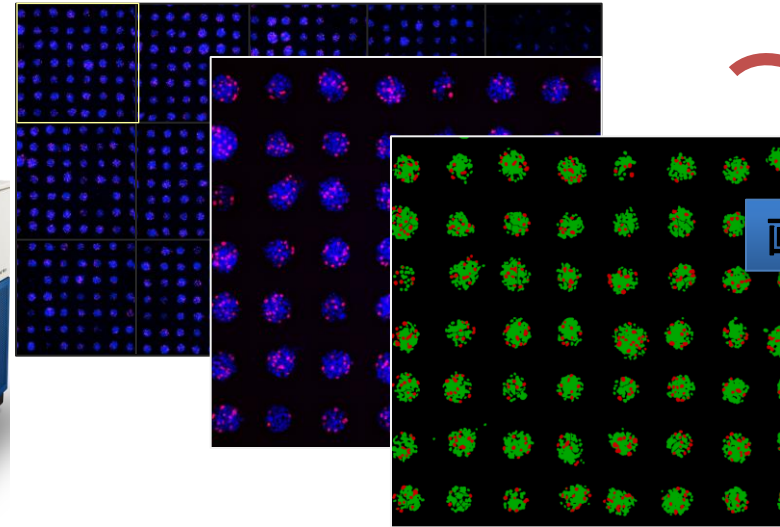
High Content Screening: ImageXpress MICRO (Molecular Devices)

ImageXpress MICROを使った画像取得・解析ワークフロー

細胞播種・薬物処理・
染色



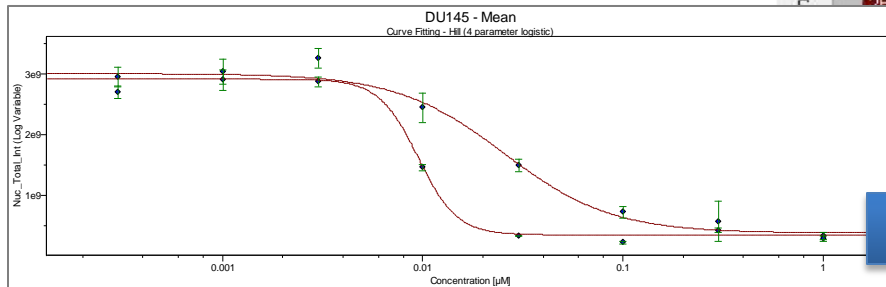
画像撮影



画像解析

撮影時間; 約40分

位相差を含め5波長×z軸 8層× 96well× 各ウェル2視野

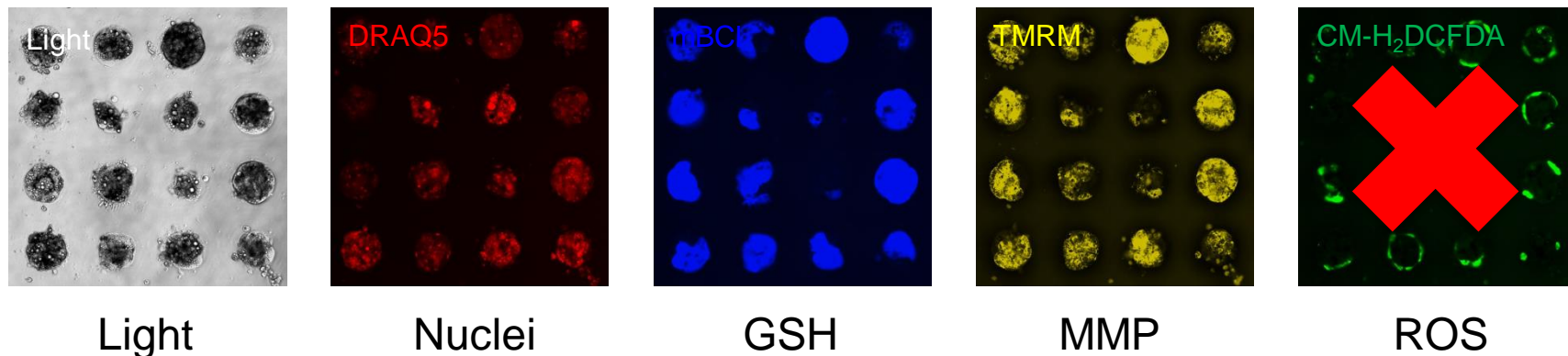


| | 01 | 02 | 03 | 04 | 05 | 06 | 07 | 08 | 09 | 10 | 11 | 12 |
|---|----|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|---------|----|----|
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | 256849.6 | 260379.9 | 275762.3 | 292473.1 | 178000.9 | 57137.2 | 39870.5 | 36500.6 | 43206.5 | | |
| C | | 259261.2 | 283237.3 | 305791.9 | 293779.4 | 190567.8 | 51839.1 | 31243.0 | 111580.6 | 49604.9 | | |
| | | 115.1 | 316491.4 | 310432.7 | 298119.3 | 187794.5 | 52511.7 | 33228.8 | 42670.8 | 30082.0 | | |
| | | 554.1 | 293034.1 | 314510.7 | 334209.4 | 289801.2 | 204853.3 | 121009.1 | 72886.3 | 36657.8 | | |
| | | 497.1 | 268191.1 | 322164.6 | 320817.8 | 266531.6 | 210830.9 | 118369.3 | 68230.4 | 69183.5 | | |
| | | 599.0 | 275667.8 | 267275.2 | 289676.1 | 228464.2 | 167953.8 | 101604.5 | 81380.3 | 73217.6 | | |

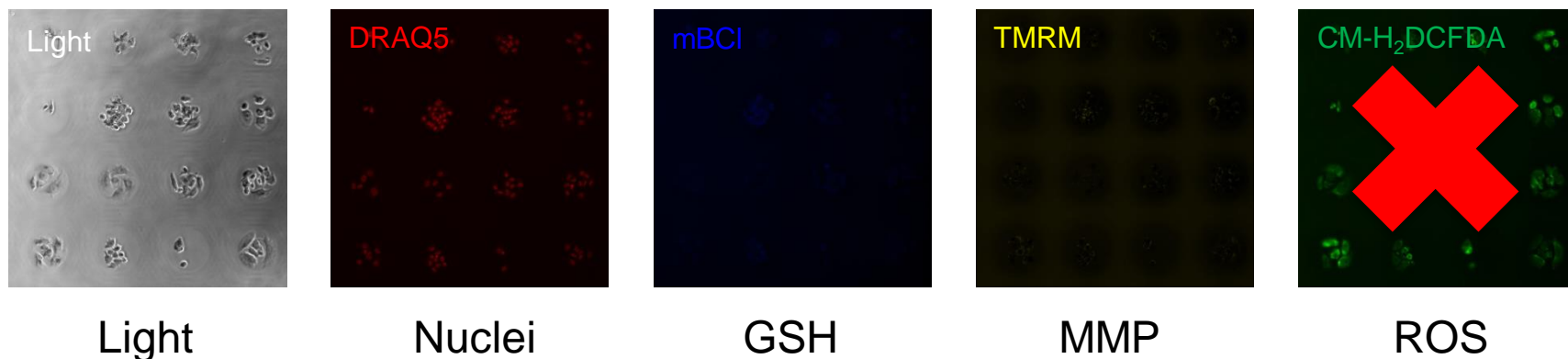
グラフ作成

ヒト初代肝細胞共培養スフェロイド及びフィーダー細胞の イメージング 培養14日後(薬物未処理)

共培養スフェロイド; ヒト初代肝細胞+3T3 swiss-albino



フィーダー細胞; 3T3 swiss-albino



➤ 14日間培養後のフィーダー細胞で、ROSのシグナルが高値を示した

取得画像

例) Acetaminophen

Hepatocytes + feeder cells

Feeder cells only

Vehicle
(0.1% DMSO)

Acetaminophen

Vehicle

(0.1% DMSO)

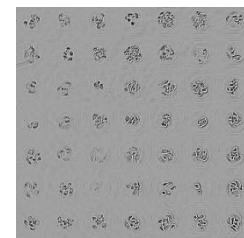
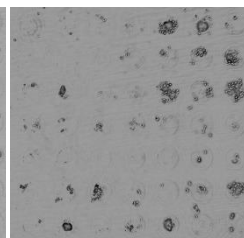
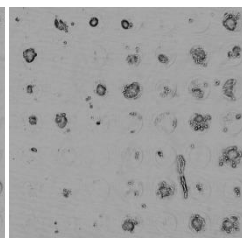
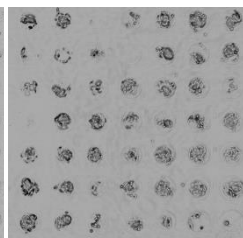
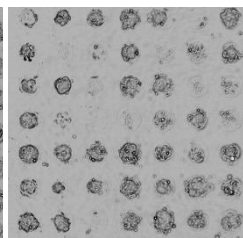
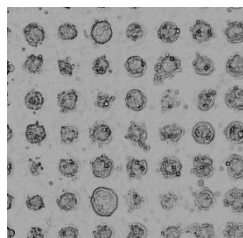
Cmax

10*Cmax

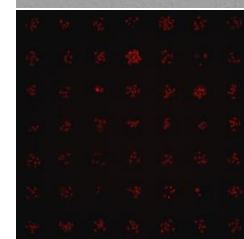
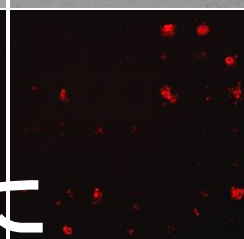
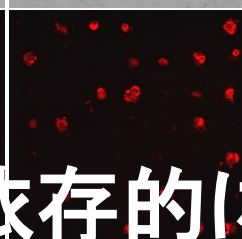
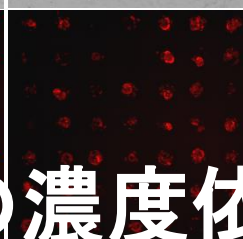
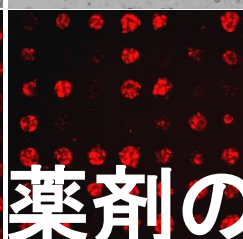
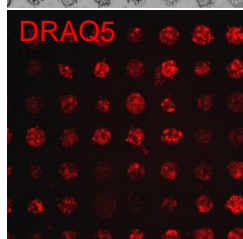
30*Cmax

60*Cmax

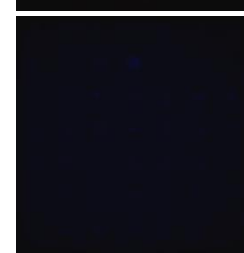
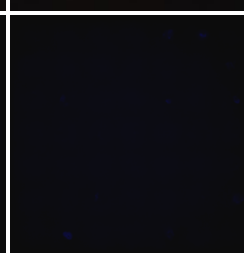
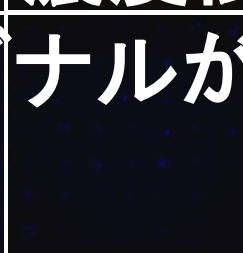
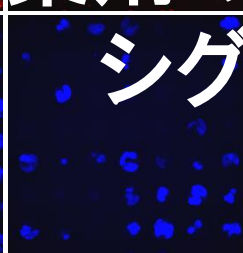
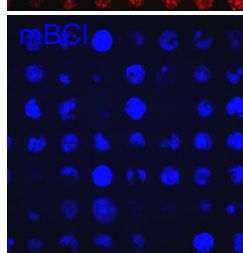
PC



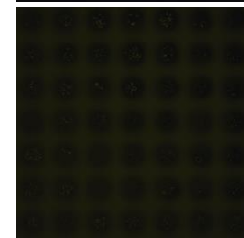
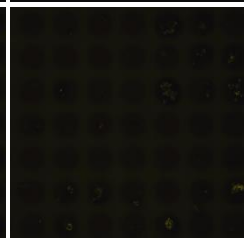
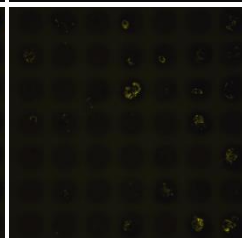
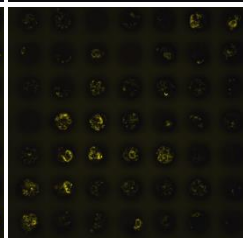
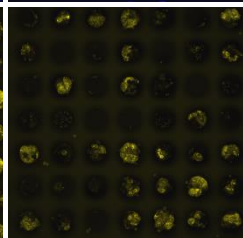
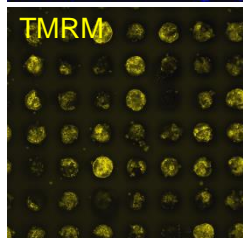
Nuclei



GSH



MMP



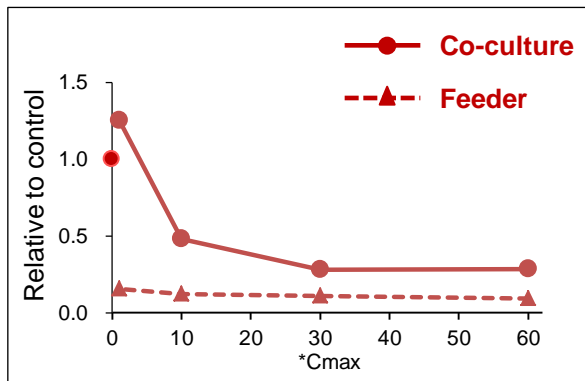
薬剤の濃度依存的に
シグナルが低下

数値データ解析

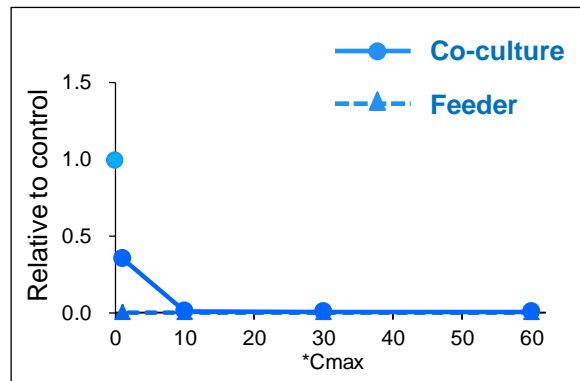
Vehicleの数値データを1とした場合の
各数値データの比率を基に解析

例) Acetaminophen

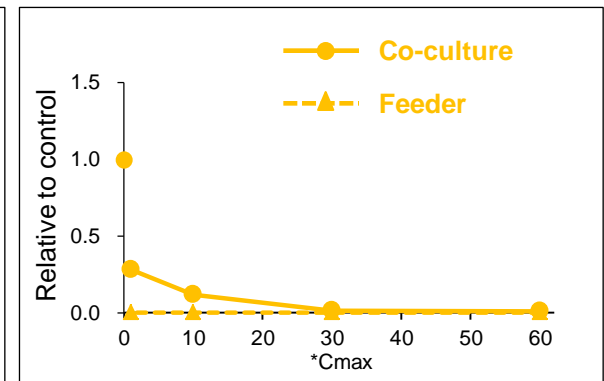
核



GSH



ミトコンドリア膜電位



n=3 (3well). 1ウェルにつき2画像を取得し、解析を行った。

各試験におけるDILI判定基準

| 試験 | DILI陽性判定基準 |
|--|--|
| <p>TOYO GOSEI Cell-able® 1-60 × Cmax 14日間曝露</p> | <p>イメージングによる検出 コントロールに対する比が 核: 総輝度値(△フィーダー細胞) <0.4 ミトコンドリア膜電位: 面積値 <0.4 GSH: 面積値 <0.4 陽性判定: 1-30 × Cmaxの濃度で少なくとも1項目が陽性</p> |
| <p>Xu, 2008 100 × Cmax 24時間暴露</p> | <p>イメージングによる検出 コントロールに対する比が 核: 面積値 <0.4 ミトコンドリア膜電位: 輝度値 <0.4 GSH: 面積値 <0.65, 総輝度値 <0.4 ROS: 総輝度値 >2.5 陽性判定: 少なくとも1項目が陽性</p> |
| <p>Khetani, 2013 1-100 × Cmax 16日間曝露</p> | <p>化学発光: ATP IC₅₀; GSH IC₅₀ 呈色反応: urea IC₅₀ ELISA: albumin IC₅₀ 陽性判定: 1-100 × Cmaxの濃度で少なくとも1項目が陽性 (IC₅₀が100 × Cmax以下)</p> |

薬物のDILI 判定基準

今回用いた薬物の判定

LTKBを参考に判定基準を決定

| Status/ label | DILI Severity score | | |
|------------------|---------------------|-----|-----|
| | 2,3 | 4,5 | 6-8 |
| NM | N | | |
| AR | +/- | | |
| WP | +/- | P | P |
| D | P | | |
| BW | P | | |
| WD | P | | |

N; Drugs of no concern for DILI
 +/-; Drugs of less concern for DILI
 P; Drugs of most concern for DILI

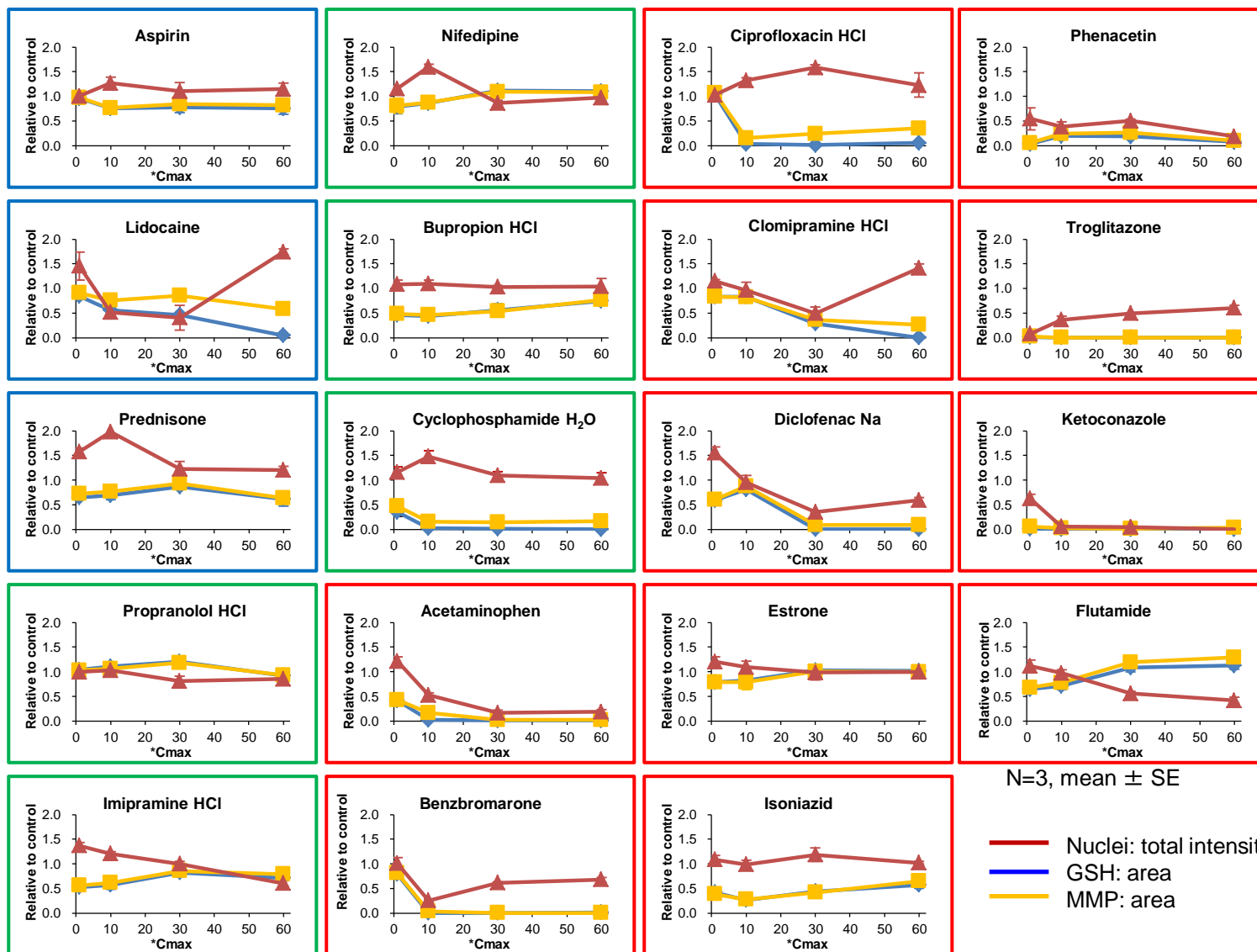
[Liver Toxicity Knowledge Base](http://www.fda.gov/ScienceResearch/BioinformaticsTools/LiverToxicityKnowledgeBase/ucm226811.htm)

FDA で承認されている、薬物がDILIを引き起こす度合いを示す指標の知識基盤
<http://www.fda.gov/ScienceResearch/BioinformaticsTools/LiverToxicityKnowledgeBase/ucm226811.htm>

LTKBに記載が無い薬物については、2008年Xuらの論文のClinical DILIの判定に従った。

| ID | LTKB* Label/DILI score | Clinical DILI Xu, 2008 論文より | 判定 LTKB+ Clinical DILI |
|-----------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| Aspirin | | Negative | Negative |
| Lidocaine | | Negative | Negative |
| Prednisone | | Negative | Negative |
| Bupropion HCl | AR/5 | Negative | +/- |
| Cyclophosphamide H ₂ O | AR/5 | Positive | +/- |
| Imipramine HCl | AR/3 | Positive | +/- |
| Nifedipine | WP/3 | Positive | +/- |
| Propranolol HCl | WP/3 | Negative | +/- |
| Acetaminophen | | Positive | Positive |
| Benzbromarone | WD | Positive | Positive |
| Ciprofloxacin HCl | WP/7 | Positive | Positive |
| Clomipramine HCl | | Positive | Positive |
| Diclofenac Na | WP/7 | Positive | Positive |
| Estrone | | Positive | Positive |
| Isoniazid | BW/8 | Positive | Positive |
| Phenacetin | | Positive | Positive |
| Troglitazone | WD/NA | Positive | Positive |
| Ketoconazol | BW/8 | NA | Positive |
| Flutamide | BW/8 | Positive | Positive |

Quantitative analysis of each drug in DLI imaging



各試験結果の比較

| ID | 判定 LTKB+ Clinical DILI | Xu, 2008, 1-d, Matrigel, 100x Cmax | | Khetani, 2013, 16-d, co-culture, 1-100x Cmax | TOYOGOSEI, 14-d, co-culture Cell-able®, 1-30x Cmax | |
|-----------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|----------|--|--|-------------|
| Aspirin | Negative | Negative | | Negative | Negative | |
| Lidocaine | Negative | Negative | | Positive | Negative | |
| Prednisone | Negative | Negative | | Negative | Negative | |
| Bupropion HCl | +/- | Negative | | NA | Negative | |
| Cyclophosphamide H ₂ O | +/- | Negative | | Positive | Positive | GSH, MMP |
| Imipramine HCl | +/- | Negative | | Positive | Negative | |
| Propranolol HCl | +/- | Negative | | Negative | Negative | |
| Nifedipine | +/- | Negative | | Negative | Negative | |
| Acetaminophen | Positive | Positive | MMP | Positive | Positive | GSH, MMP, N |
| Benzbromarone | Positive | Positive | MMP, ROS | Positive | Positive | GSH, MMP, N |
| Ciprofloxacin HCl | Positive | Negative | | Positive | Positive | GSH, MMP |
| Clomiplamine HCl | Positive | Negative | | Positive | Positive | GSH, MMP |
| Diclofenac Na | Positive | Positive | ROS | Positive | Positive | GSH, MMP, N |
| Estrone | Positive | Negative | | Negative | Negative | |
| Isoniazid | Positive | Negative | | Positive | Positive | GSH, MMP |
| Phenacetin | Positive | Positive | MMP, N | Positive | Positive | GSH, MMP, N |
| Troglitazone | Positive | Positive | GSH, MMP | Positive | Positive | GSH, MMP, N |
| Ketoconazol | Positive | NA | | Positive | Positive | GSH, MMP, N |
| Flutamide* | Positive | Negative | | NA | Negative | |

*Flutamideの活性代謝物HydroxyflutamideのCmaxは、Flutamideの約30倍である。 <http://www.drugs.com/pro/flutamide.html>
 ⇒2008年Xuらの論文、今回の検討ともにFlutamideのCmaxを基に暴露濃度を設定しているため、暴露濃度が低すぎ、結果が陰性となった可能性がある。このため比較対象外とした。

各試験結果とLTKB+Clinical DILIとの相関

| | | Cell-able® | | | | Xu, 2008 | | | | Khetani, 2013 | |
|---------------------|----------|------------|----------|---------------------|----------|----------|----------|---------------------|----------|---------------|----------|
| | | negative | positive | | | negative | positive | | | negative | positive |
| LTKB*+Clinical DILI | negative | 3 | 0 | LTKB*+Clinical DILI | negative | 3 | 0 | LTKB*+Clinical DILI | negative | 2 | 1 |
| | +/- | 4 | 1 | | +/- | 5 | 0 | | +/- | 2 | 2 |
| | positive | 1 | 9 | | positive | 4 | 5 | | positive | 1 | 9 |

| | Cell-able® | Xu, 2008 | Khetani, 2013 |
|-----|------------|----------|---------------|
| 特異性 | 100% | 100% | 67% |
| 感度 | 90% | 56% | 90% |

*LTKB: [Liver Toxicity Knowledge Base](#)

Cell-able®とHCSを用いたイメージングによる 薬物の肝毒性評価法

まとめ

- Cell-able®で培養したヒト初代肝細胞と蛍光検出器を組み合わせ、細胞の核、グルタチオン量、ミトコンドリア膜電位の測定系を確立し、薬物による肝毒性の評価を行った
- 全てのマーカーは1ウェルで同時に測定することが出来た。また、96wellプレート1枚の測定時間は40分程度であった
(5波長 × Z軸8層 × 2視野 × 96well)
- 19薬物を用いた肝毒性を予測した結果、従来のXuら、Khetaniらの論文^{1,2)}と比較して、感受性、特異性、ともに同等以上の結果を示した

以上の結果より、Cell-able®上で培養したヒト初代肝細胞を用いたイメージングによる肝毒性評価系は、薬物の毒性評価系として有用であると考えられた

**Cell-able[®]とヒト肝臓キメラマウス由来
新鮮ヒト肝細胞(PXB-cells)を用いた
イメージングによる肝毒性評価法の可能性**

凍結ヒト初代肝細胞の利点と問題点

➤ 利点

ヒト由来の肝臓細胞を用いることにより、動物実験や動物由来肝細胞を使用したin-vitro試験における種間差の問題を克服することが可能

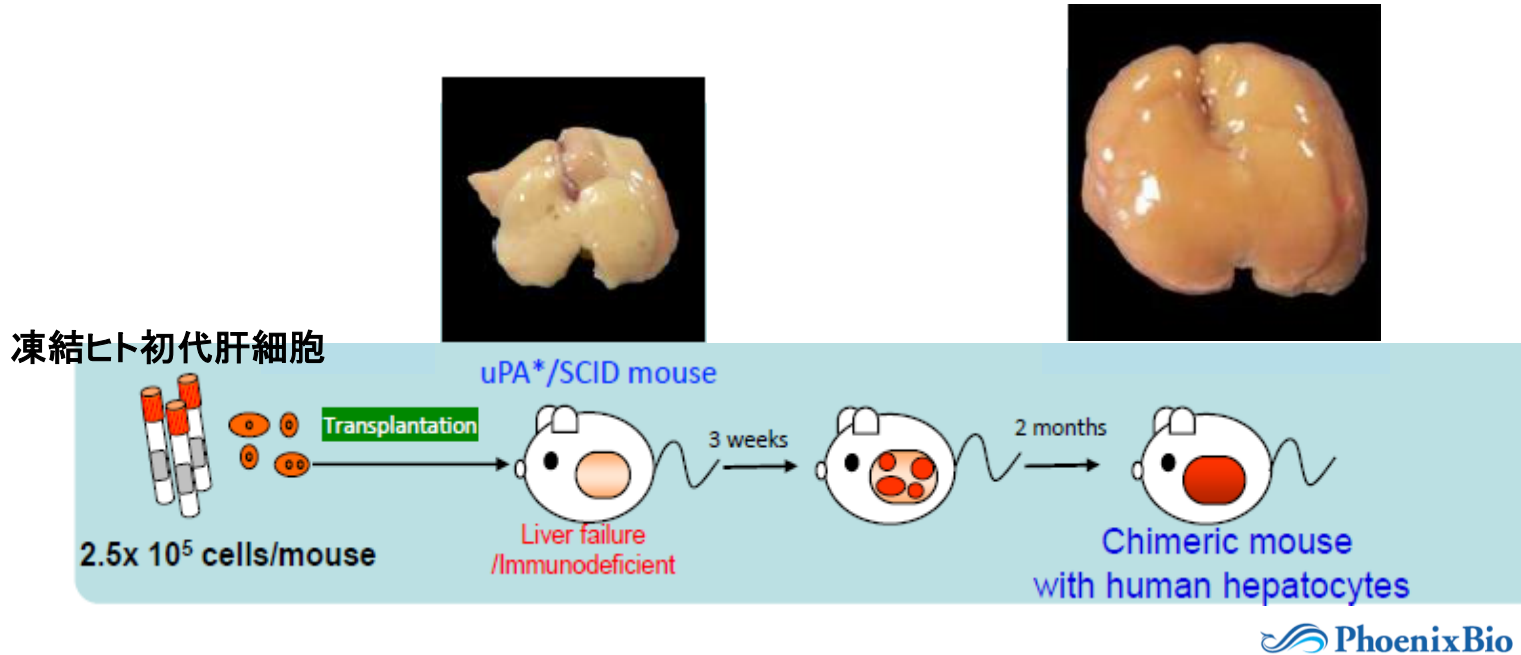
➤ 問題点

ドナー由来であるため、1ロットの量が限られている
高価である
凍結融解によるダメージがある
安定した培養が難しい



PXB-cellsに着目

PXB-cellsとは



コラゲナーゼ灌流法により肝細胞を採取

Yield; 1~2 × 10⁸ cells/mouse

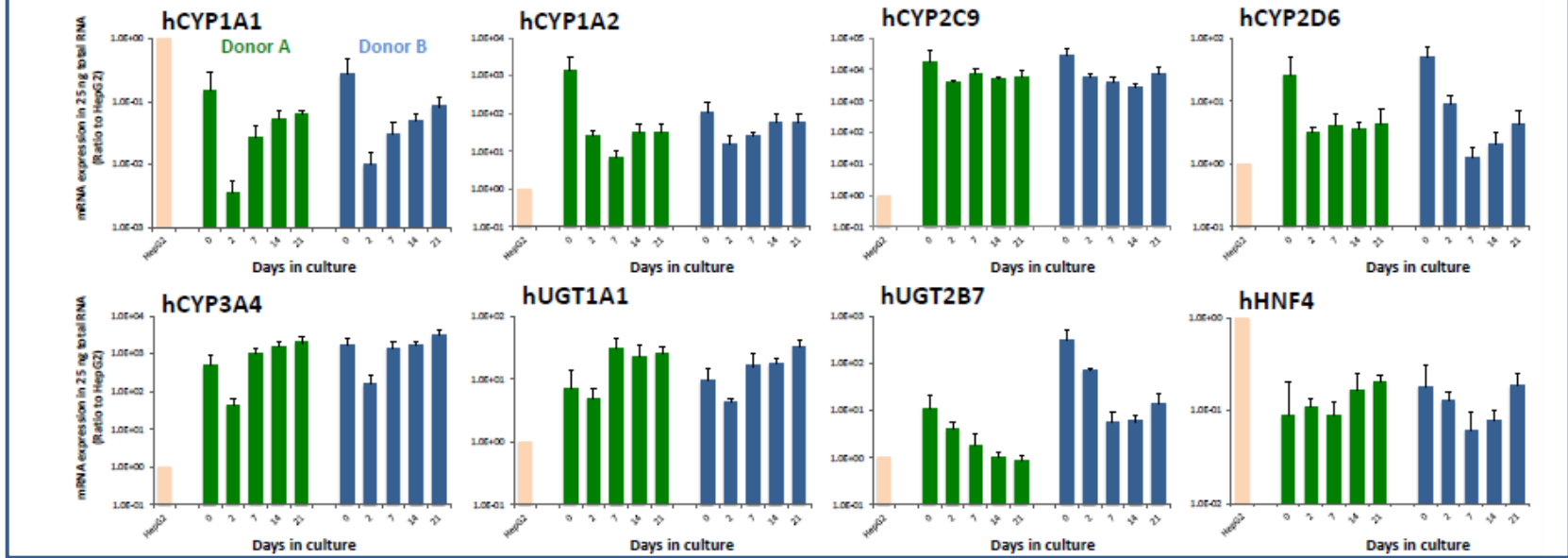
細胞数 約1,000倍！

採取した肝細胞の90%がヒト肝細胞
残りのマウス肝細胞は1週間程度の培養でほぼ消失(遺伝子で確認)

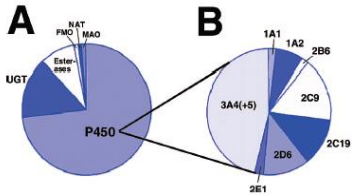
PXB-cellsのヒト肝細胞としての性質



2ドナー由来PXB-cellsにおけるヒト代謝酵素などの遺伝子発現



JSSX 2013, P-20

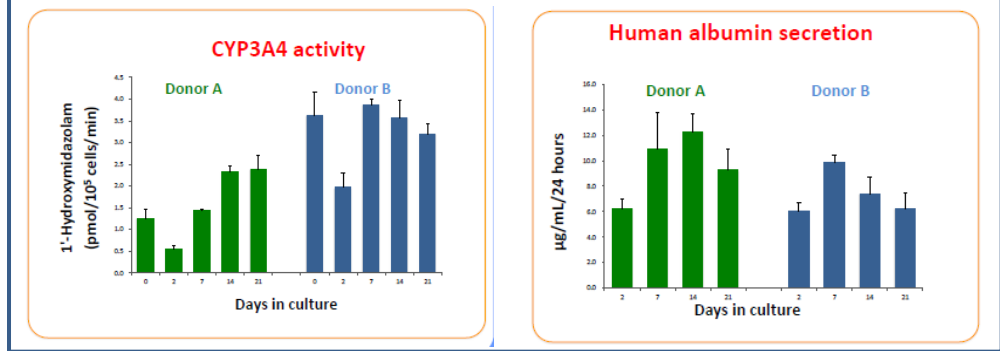


ヒト肝細胞の各CYPの発現量を比較

| CYP |
|------------------------------------|
| 1A1 |
| 7A1 |
| 3A7 |
| 2C19 |
| 1A2, 2A6, 2C8, 2C9, 2E1, 3A4, 26A1 |
| 1B1, 2B6 |
| 2D6, 2J2, 4F2, 4F3, 8B1, 39A1 |
| 2C18, 3A43, 4A11, 7B1 |
| 3A5 |
| - |

細胞vol.45(7), 2013

CYP3A4活性、アルブミン産生能



主要なCYPの遺伝子発現量がヒト初代肝細胞に近い

JSSX 2013, P-20

凍結ヒト初代肝細胞の利点と問題点

➤ 利点

ヒト由来の肝臓細胞を用いることにより、動物実験や動物由来肝細胞を使用したin-vitro試験における種間差の問題を克服することが可能

➤ 問題点 ⇒PXB-cellsにより解決

ドナー由来であるため、1ロットの量が限られている

⇒ヒト初代肝細胞数をキメラマウスにより約1,000倍に増やすことにより、大ロットの細胞が安定供給可能

高価である

⇒凍結ヒト初代肝細胞の1/2～1/3の価格

凍結融解によるダメージがある

⇒凍結融解を経ない新鮮ヒト肝細胞である

安定した培養が難しい

⇒100日まで安定した培養実績がある

➤ さらに

Cell-able®プレートに細胞を播種した状態で輸送可能

⇒ready-to-useで入手可能

⇒実験施設間差、手技間差などを低減することが出来る

Cell-able®上で培養したPXB-cellsを用いたイメージングによる毒性評価試験

| 実験方法の比較 | TOYOGOSEI Cell-able® | |
|------------------|--|-----------------------------------|
| Cell | Human primary hepatocyte +3T3 swiss-albino | PXB-cells+3T3 swiss-albino |
| Cell-able® Plate | 96well plate | 384well plate |
| Culture | Cell-able® 3D, Co-culture | |
| 播種細胞数 | 20,000 Cells/well | 8,000 cells/well |
| 薬物暴露濃度 | 1,10,30,60 × Cmax (Flutamideの暴露濃度のみ10,100,300,600 × Cmax) | |
| 薬物曝露時間 | 14日間 | |
| 検出マーカー | 核 ミトコンドリア 細胞内グルタチオン 活性酸素 | |
| 検出方法 | 蛍光イメージング 1ウェルで全てのマーカーを検出 | |
| 測定 | プレート5枚 測定時間;約200分 | プレート1枚 測定時間;約60分 |

本実験における肝細胞播種Cell-able®プレートの移動

フィーダー細胞の播種
PXB-cellsの播種



フェニックスバイオ
広島県 



薬物暴露
培養



東洋合成工業
千葉県 

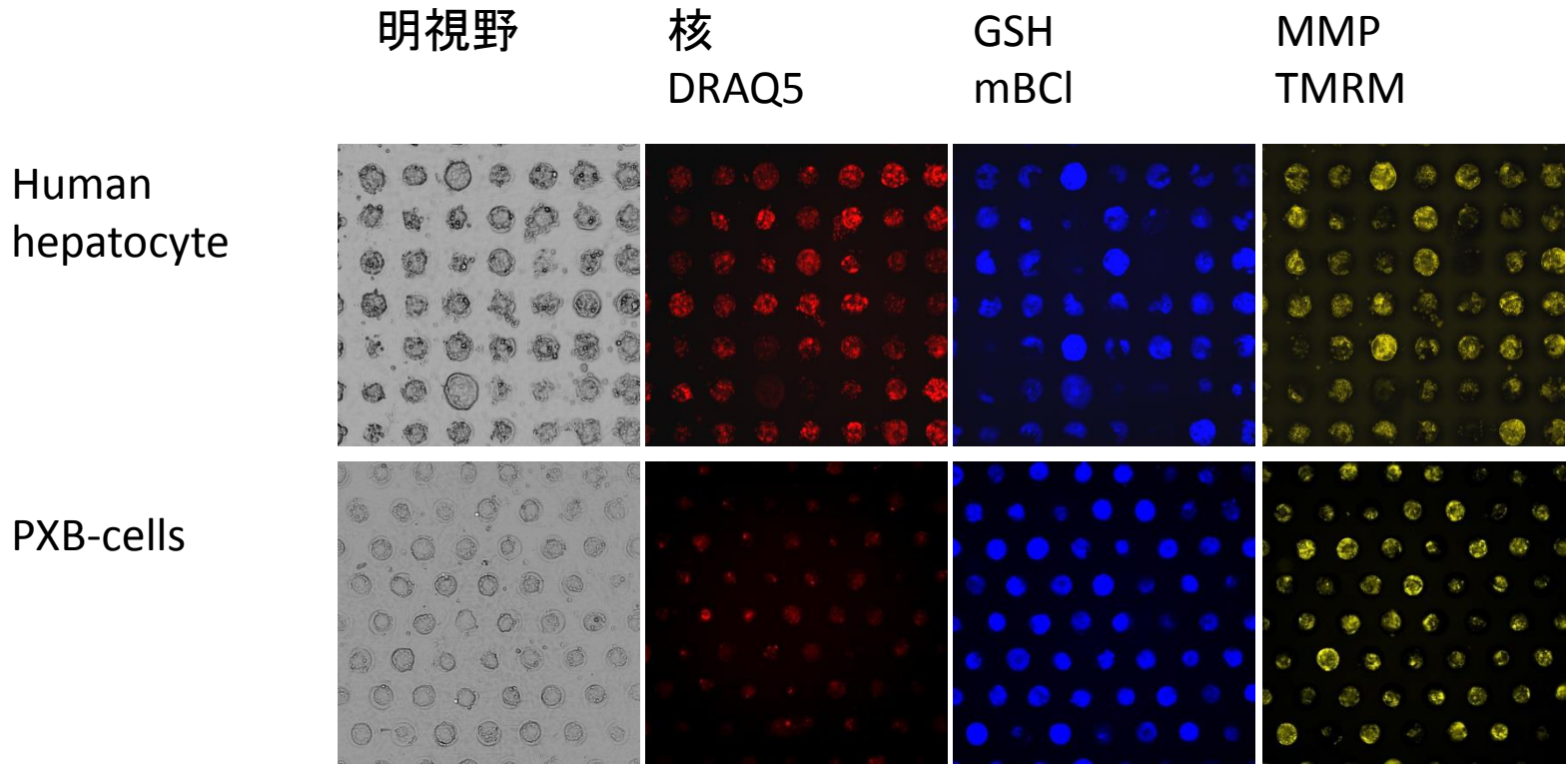


マーカー染色
画像取得
解析

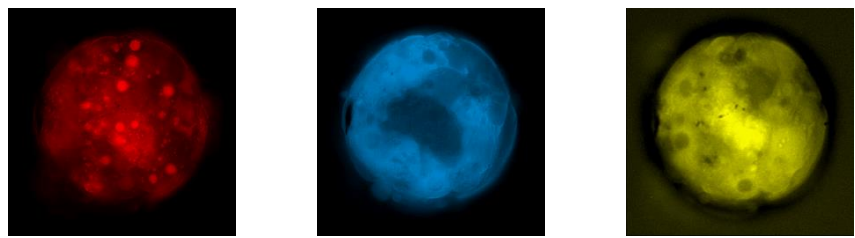


モレキュラーデバイスジャパン
東京都 

ヒト初代肝細胞とPXB-cellsの比較



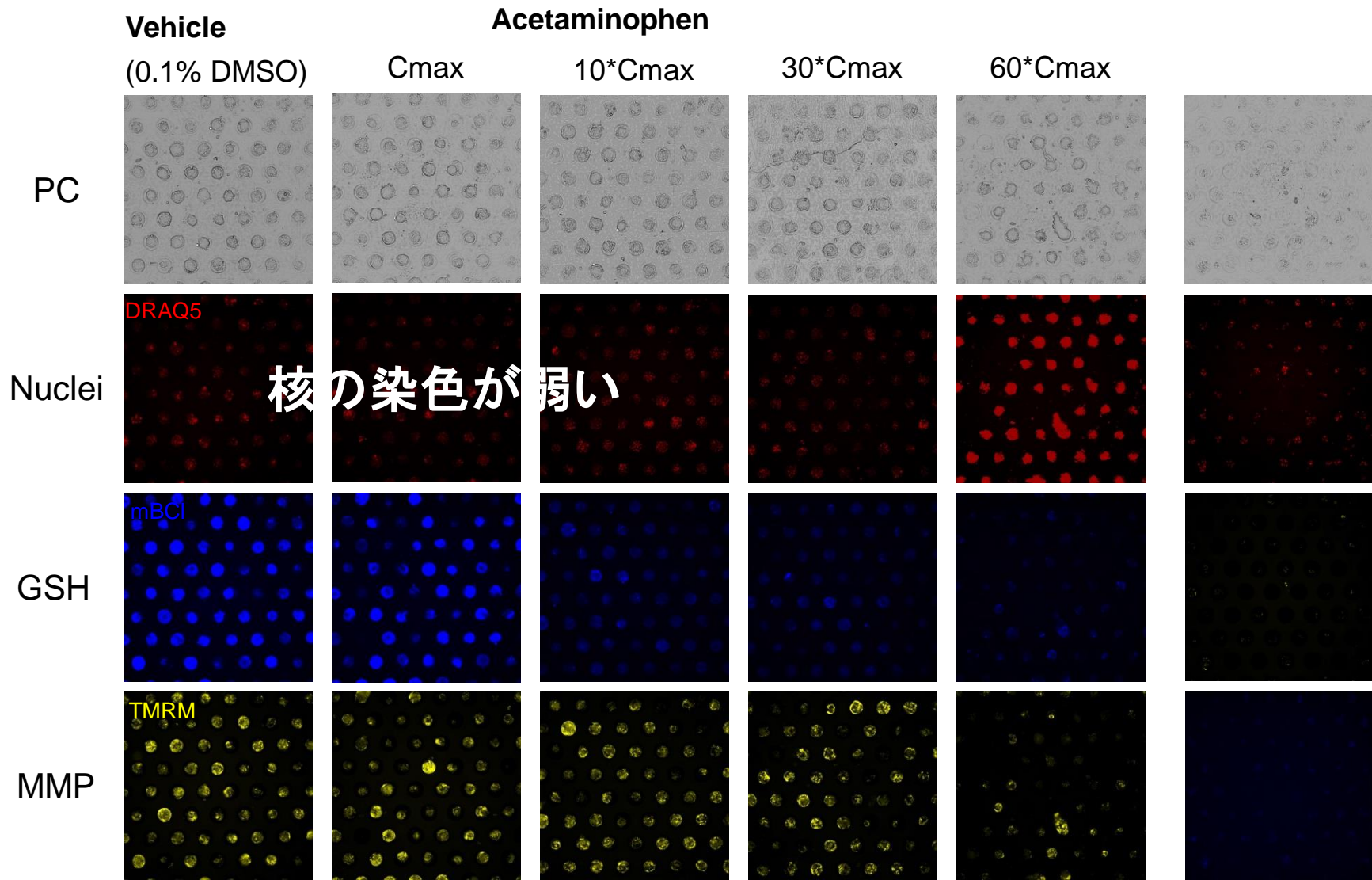
PXB-cells spheroid



Human hepatocyteと比べ、スフェロイドの形状が均一でばらつきが少ない

Hepatocytes + feeder cells

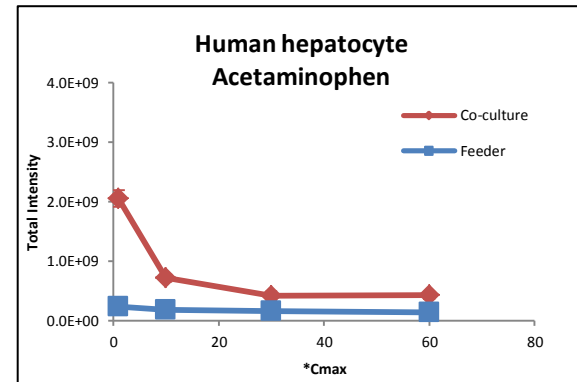
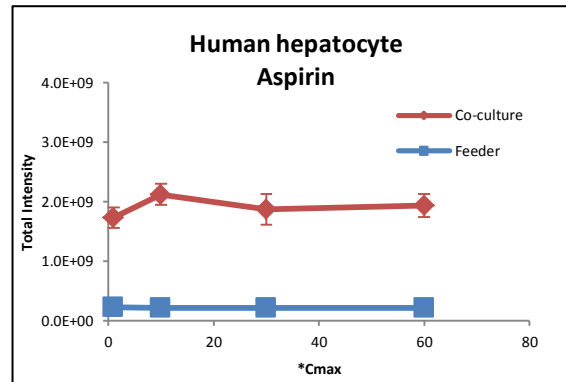
Feeder cells



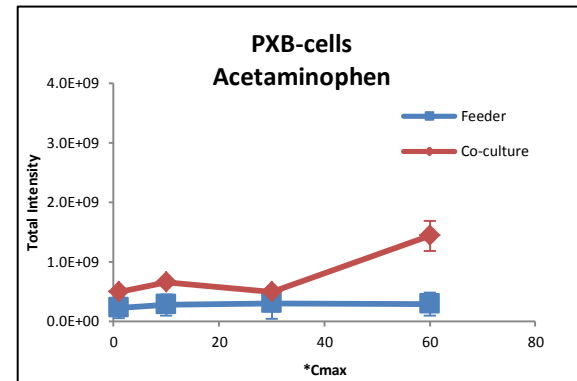
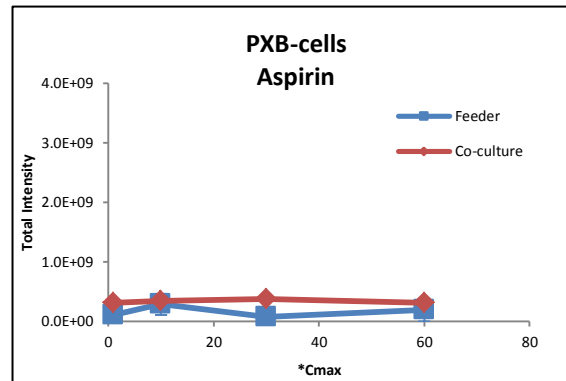
DRAQ5 染色 数値データ比較1

Human hepatocyte vs. PXB-cells

Human primary
hepatocyte



PXB-cells



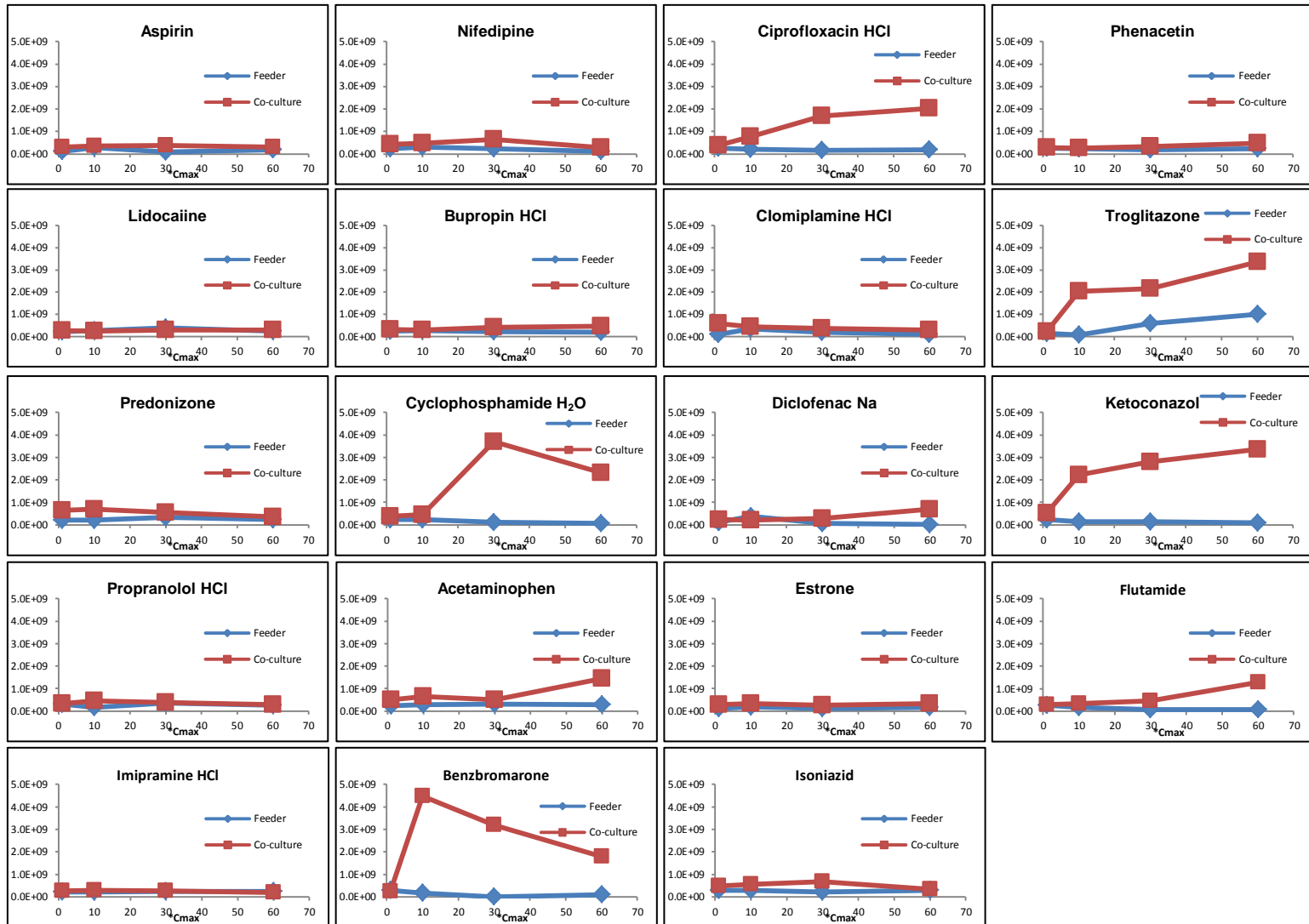
PXB-cellsでは、ダメージを受けていない肝細胞ほど染色が弱く、ダメージを受けた細胞ほど強く染色される傾向



PXB-cellsは凍結融解されておらず、膜のダメージが少ないため色素が細胞に入りにくい？

DRAQ5 染色 数値データ2

19薬物のDRAQ5染色

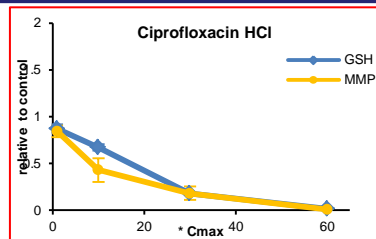
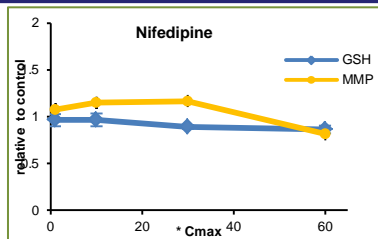
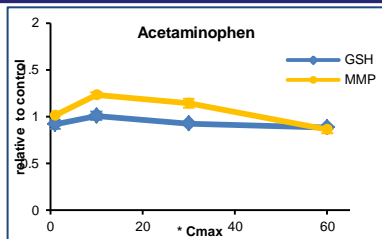


PXB-cellsでは細胞膜に損傷が無いと思われる系ではDRAQ5の染色が弱く、毒性が強い薬物の濃度が高いほど強く染色される傾向が認められた。

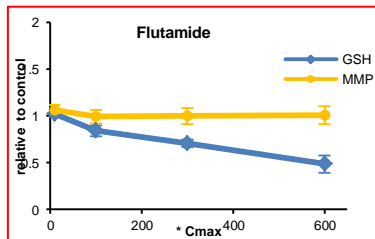
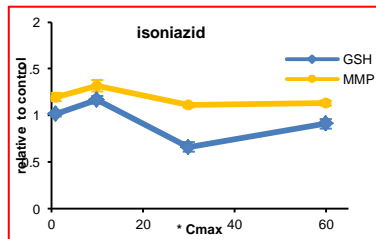
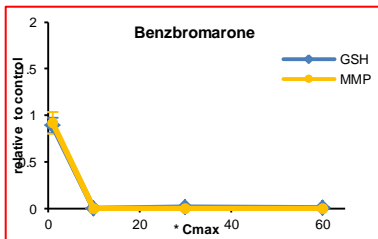
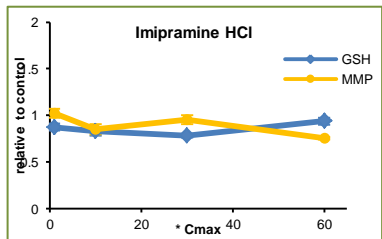
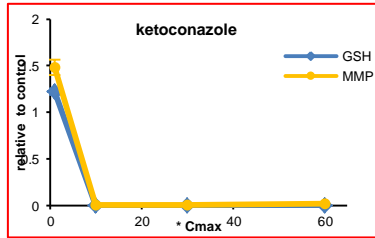
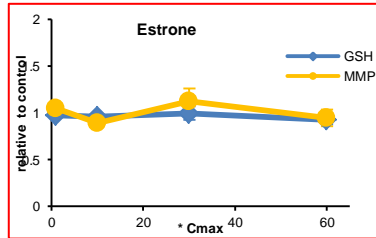
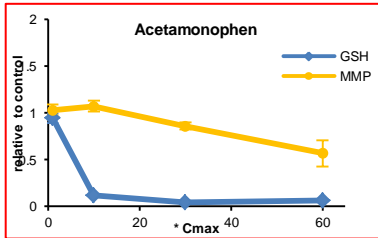
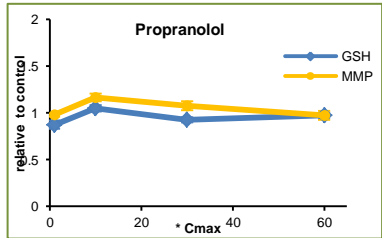
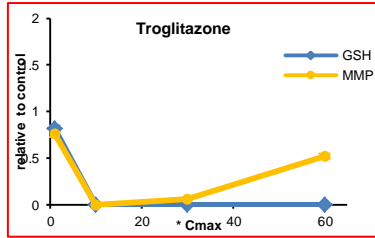
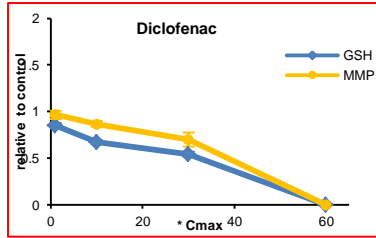
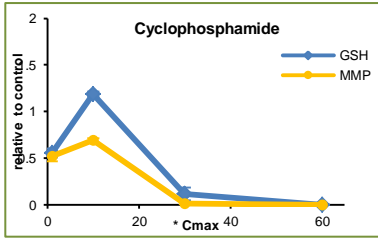
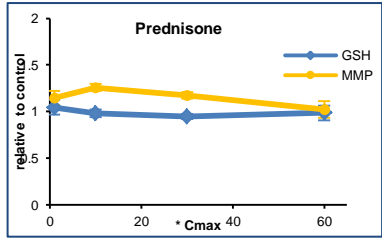
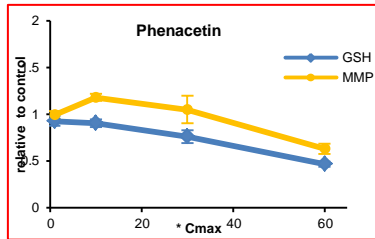
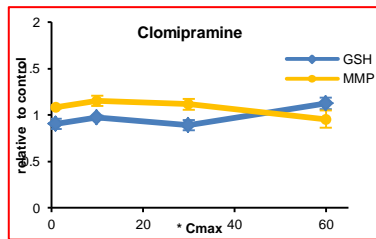
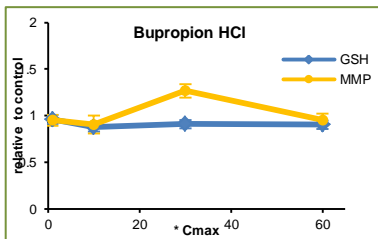
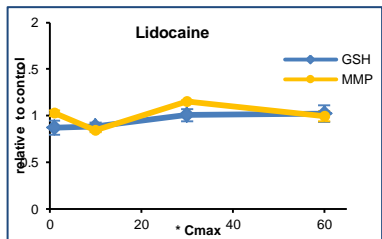
以上のことより、核染色は今回の判定から除外した。

今後、染色条件を検討する、死細胞染色など別のマーカーを検討するなどの必要がある。

Quantitative analysis of each drug in DILI imaging with PXB-cells



Cut off : GSH < 0.7
MMP < 0.7
 陽性判定 ; 1-60 × Cmaxの濃度で少なくとも1項目が陽性



各試験結果の比較

| ID | 判定 LTKB+ Clinical DILI | Xu, 2008, 1-d, Matrigel, 100x Cmax | Khetani, 2013, 16-d, co-culture, 1-100x Cmax | TOYOGOSEI, 14-d, co-culture Cell-able®, 1-30x Cmax | | PXB-cells, 14-d, co-culture Cell-able®, 1-60x Cmax | |
|-------------------|------------------------------|--|--|--|-------------|--|----------|
| Aspirin | Negative | Negative | Negative | Negative | | Negative | |
| Lidocaine | Negative | Negative | Positive | Negative | | Negative | |
| Prednisone | Negative | Negative | Negative | Negative | | Negative | |
| Bupropion HCl | +/- | Negative | NA | Negative | | Negative | |
| Cyclophosphamide | +/- | Negative | Positive | Positive | GSH, MMP | Positive | GSH, MMP |
| Imipramine HCl | +/- | Negative | Positive | Negative | | Negative | |
| Propranolol HCl | +/- | Negative | Negative | Negative | | Negative | |
| Nifedipine | +/- | Negative | Negative | Negative | | Negative | |
| Acetaminophen | Positive | Positive | Positive | Positive | GSH, MMP, N | Positive | GSH, MMP |
| Benzbromarone | Positive | Positive | Positive | Positive | GSH, MMP, N | Positive | GSH, MMP |
| Ciprofloxacin HCl | Positive | Negative | Positive | Positive | GSH, MMP | Positive | GSH, MMP |
| Clomiplamine HCl | Positive | Negative | Positive | Positive | GSH, MMP | Negative | |
| Diclofenac Na | Positive | Positive | Positive | Positive | GSH, MMP, N | Positive | GSH, MMP |
| Estrone | Positive | Negative | Negative | Negative | | Negative | |
| Isoniazid | Positive | Negative | Positive | Positive | GSH, MMP | Positive | GSH |
| Phenacetin | Positive | Positive | Positive | Positive | GSH, MMP, N | Positive | GSH, MMP |
| Troglitazone | Positive | Positive | Positive | Positive | GSH, MMP, N | Positive | GSH, MMP |
| Ketoconazol | Positive | NA | Positive | Positive | GSH, MMP, N | Positive | GSH, MMP |
| Flutamide* | Positive | Negative | NA | Negative | | (Positive) | GSH |

肝毒性評価結果の比較

Cell-able®×ヒト初代肝細胞
VS.
Cell-able®×PXB-cells

| | | Cell-able®×PXB-cells | |
|---------------------------------|----------|----------------------|----------|
| | | negative | positive |
| Cell-able®× Human hepatocyte | negative | 8 | 0 |
| | positive | 1 | 9 |

判定一致率 94%

各試験の判定結果比較

Flutamideは暴露濃度が異なるため、比較対象から除外

| | Cell-able® | | Xu, 2008 | Khetani, 2013 |
|-----|------------------|-----------|------------------|------------------|
| | Human hepatocyte | PXB-cells | Human hepatocyte | Human hepatocyte |
| 特異性 | 100% | 100% | 100% | 67% |
| 感度 | 90% | 80% | 56% | 90% |

Cell-able[®]とPXB-cellsを用いた イメージングによる肝毒性評価法の可能性

まとめ

- Cell-able[®]384プレートを用いて培養したPXB-cellsを用いて、イメージングによる肝毒性評価を行った。
- DILI陰性薬物におけるシグナルの安定性が、ヒト初代肝細胞と比較して良好であった。
- 19薬物を用いて試験した。同条件で行ったヒト初代肝細胞を用いた評価と比較して判定不一致は18例中1例のみで、良好な相関関係を示した。
- 今回、PXB-cellsをCell-able[®]プレートに播種した状態で長距離輸送を行ったが、細胞の状態は非常に良好であり、毒性評価試験が実施可能であった。

以上の結果より、Cell-able[®]でスフェロイド培養したPXB-cellsは、ヒトにおける薬物の肝毒性評価に有用であると考えられた。

謝辞

モレキュラーデバイスジャパン株式会社
鈴木 真帆海 様

株式会社フェニックスバイオ
松見 達也 様
石田 雄二 様

参考文献

- 1) Xu et al. (2008) Cellular Imaging Predictions of Clinical Drug-Induced Liver Injury. *Toxicological Sciences* 105, 97-105
- 2) Khetani et al. (2013) The Use of Micropatterned Co-cultures to Detect Compounds that Cause Drug induced Liver Injury in Humans. *Toxicological Sciences* 132, 107-117
- 3) Chen et al.(2011) FDA-approved labeling for the study of drug-induced liver injury. *Drug Discovery Today* 16, 697-703