

# Cell-able<sup>®</sup> for DILI with PXB-cells<sup>™</sup> を用いた ImageXpress<sup>™</sup> Micro XLS による DILI\* 予測

Cell-able<sup>®</sup> 3次元培養ヒト肝細胞キメラマウス由来新鮮ヒト肝細胞 (PXB-cells<sup>™</sup>)  
を用いた ImageXpress Micro ハイコンテンツスクリーニングシステムによる DILI 予測法

\*DILI; 薬物性肝障害 Drug-induced Liver Injury

## 特徴

### 1. 薬剤の長期曝露が可能

安定した肝細胞培養の実現により薬物を長期間暴露することを可能とし、この特徴を活かした DILI 予測法を確立。

### 2. ハイスループットアッセイを実現

サンプルを多重蛍光染色し、ImageXpress Micro XLS ハイコンテンツスクリーニングシステムを用いることで同時に複数の項目を測定でき、ハイスループットを実現。

### 3. Ready-to-use

Cell-able<sup>®</sup> に PXB-cells<sup>™</sup> を播種した Cell-able<sup>®</sup> for DILI with PXB-cells<sup>™</sup> が入手可能。  
(2014年10月発売予定)

### 4. 携帯可能

Cell-able<sup>®</sup> for DILI with PXB-cells<sup>™</sup> は輸送可能で、薬物曝露と測定を別施設で実施することも可能。  
施設間差、手技間差の悩みも軽減。

## INDEX

- DILI 予測系アクセシワークフロー ..... P3
- Cell-able® で培養した肝細胞を用いた DILI 予測 ..... P4-5  
ヒト肝細胞キメラマウス由来ヒト新鮮肝細胞 (PXB-cells™) VS 凍結ヒト初代肝細胞
- 各試験結果と LTKB+Clinical DILI との比較 ..... P6-7
- 各薬物の DILI 判定基準 ..... P8
- PXB-cells™ について ..... P9
- Cell-able® 3次元培養プレートについて ..... P10
- ImageXpress™ Micro XLS ハイコンテンツスクリーニングシステムについて ..... P11

## SUMMARY

### 1. Cell-able® と PXB-cells™ を用いた DILI 予測系を確立

- Cell-able® 3次元培養プレート上で PXB-cells™ を培養し、ImageXpress Micro XLS ハイコンテンツスクリーニングシステムを用いた薬物性肝障害 (DILI) 予測方法を確立しました。この安定した肝細胞培養の実現により、薬物を長期間曝露することが可能です。
- PXB-cells™ と凍結ヒト初代肝細胞を用いた DILI 予測の結果を比較したところ、一致率 94.4% で、高い相同性を示しました。
- これらの DILI 予測系は過去の報告 \* と比較して、感受性・特異性ともに同等以上でした。
- PXB-cells™ は、PXB マウス® から分離された新鮮ヒト肝細胞で、同ロットの細胞を大量に確保することが可能です。このため、ヒト初代肝細胞の希少性から生じる問題を解決できます。

### 2. ハイスループットアッセイを実現

- 多重蛍光染色を行い、ImageXpress Micro XLS を用いて画像撮影・解析を行うことで、複数の測定項目を同時に計測できるため、高いハイスループットを得る事ができます。  
(384well プレートの場合、4 波長、1 視野 /well、Z-stack 使用の測定で、1 時間以内に撮影が終了します。)

### 3. Ready-to-use

- Cell-able® にフィーダー細胞と PXB-cells™ を播種した状態でお届けいたしますので、すぐに 3次元培養肝細胞を用いた実験を開始できます \*\*。

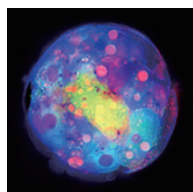
### 4. トランスポートブル

- 輸送が可能のため、例えば薬物曝露と測定を別施設で実施可能。施設間差、手技間差等も軽減できます。

\* 1) Xu et al. (2008).Toxicological Sciences 105, 97-105

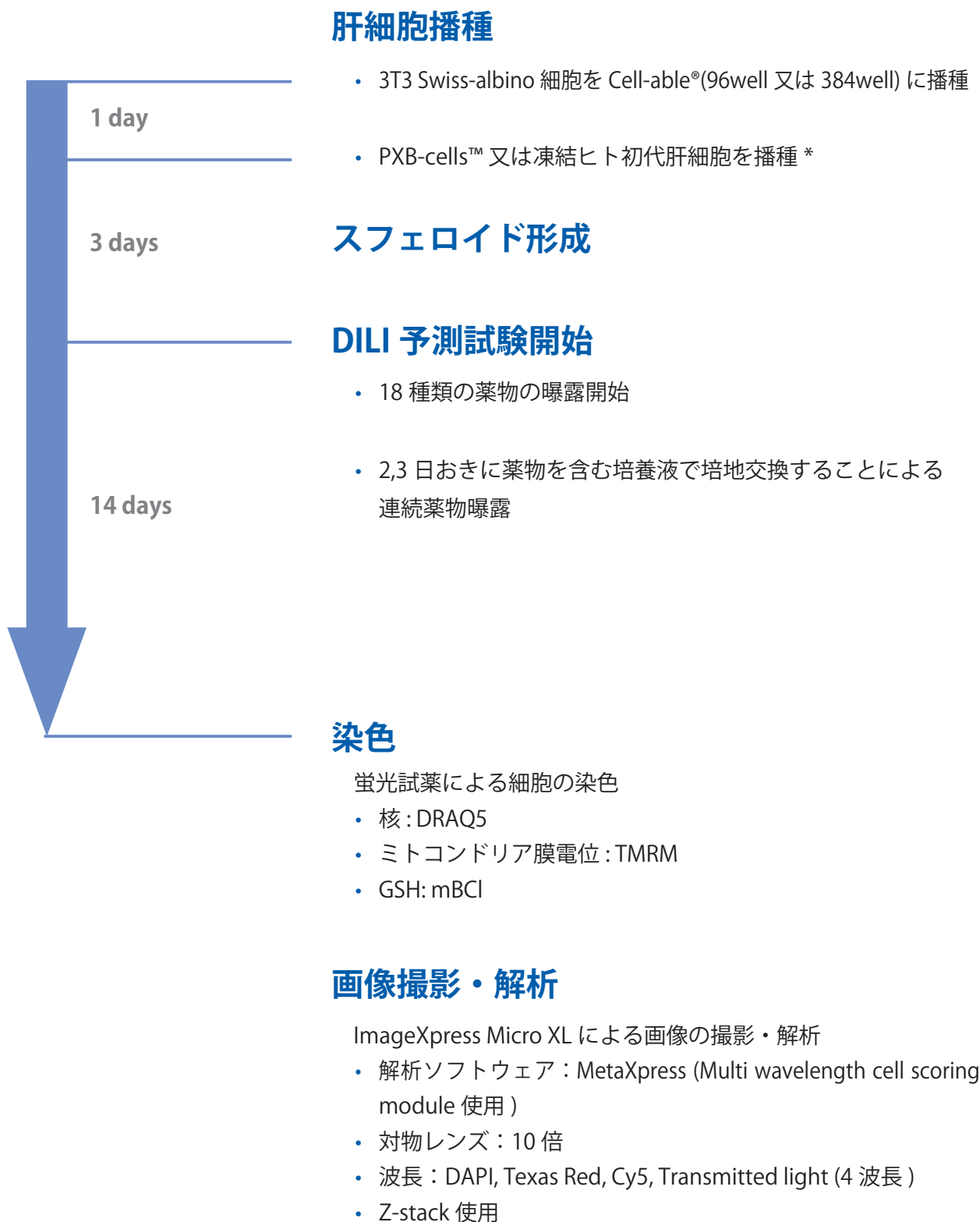
2) Khetani et al. (2013).Toxicological Sciences 132, 107-17

\*\* Cell-able® for DILI with PXB-cells は 2014 年 10 月発売予定です。



# DILI 予測系アッセイ ワークフロー

ヒト肝細胞を Cell-able® に播種し、スフェロイドを形成後テスト薬物を含む培地を用いて 14 日間培養。



\*Cell-able® にフィーダー細胞と PXB-cells™ を播種した Cell-able® for DILI with PXB-cells は 2014 年 10 月発売予定です。

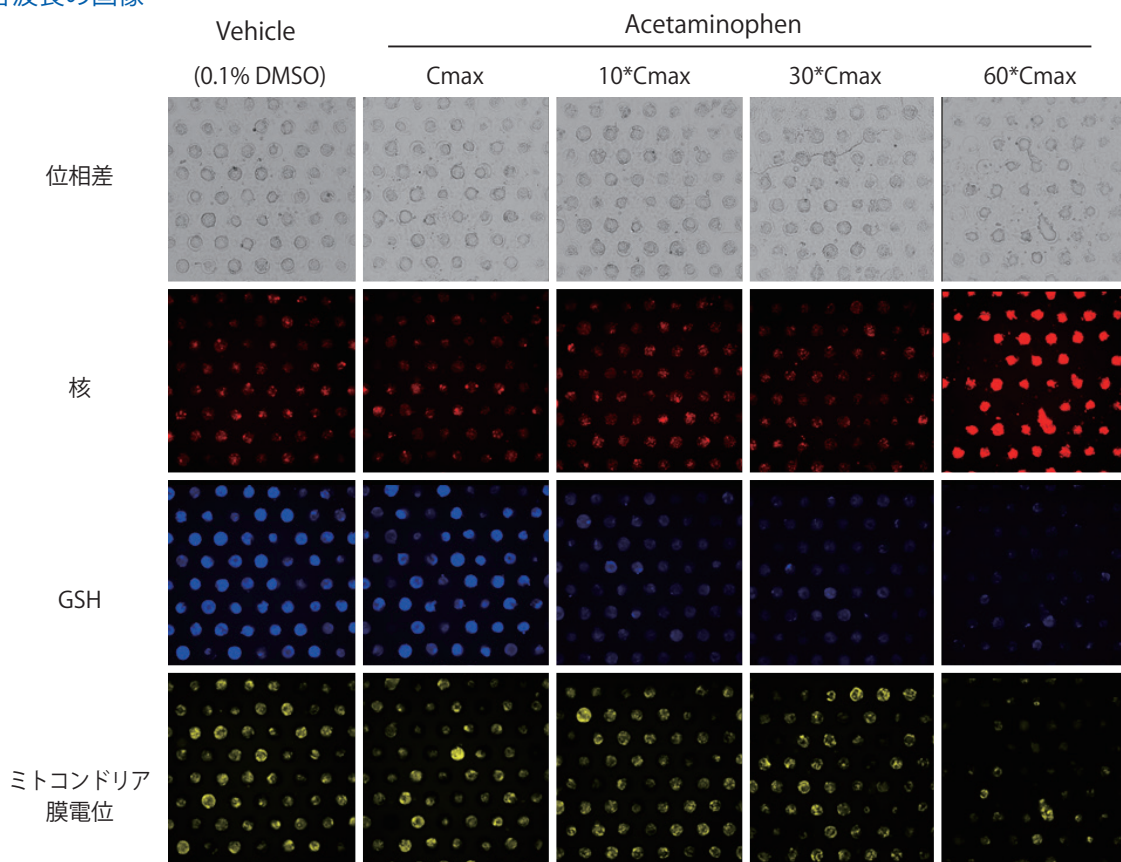
# Cell-able® で培養した肝細胞を用いた DILI 予測 PXB-cells™ vs 凍結ヒト初代肝細胞

PXB-cells™ 又は凍結ヒト初代肝細胞を Cell-able® を用いて 3 次元培養し、18 種類の薬物による薬物性肝障害予測を ImageXpress Micro XL ハイコンテンツスクリーニングシステムにより行いました。

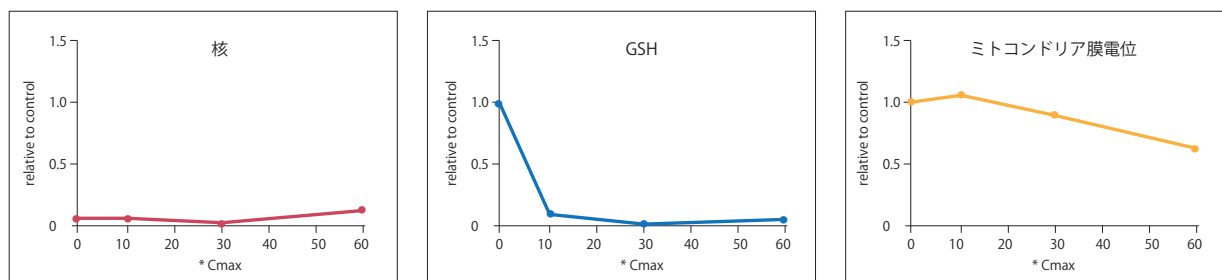
## ➤ PXB-cells™

### Acetaminophen 曝露の結果

- 各波長の画像



- 各波長の輝度変化



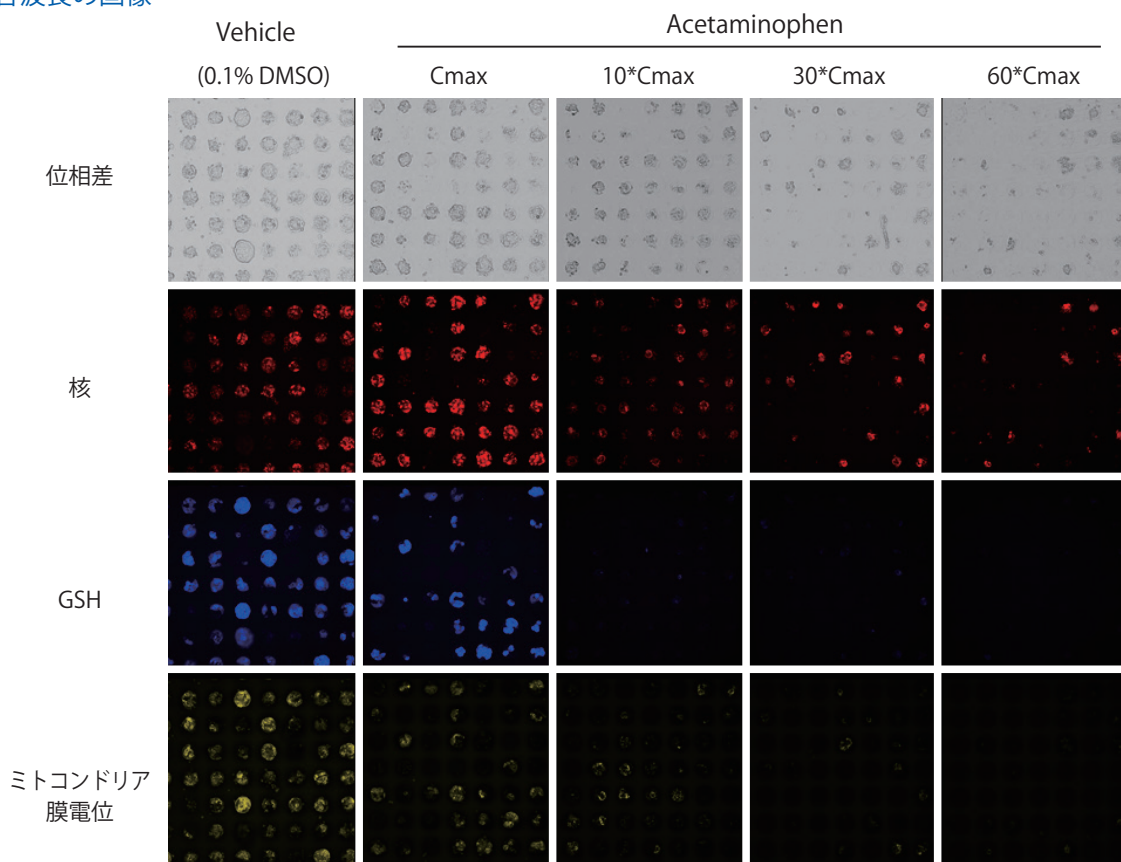
ImageXpress Micro XLにて各波長の画像を取得し、MetaXpressソフトウェア Multi wavelength Cell Scoring moduleを用いて画像を解析、種々のパラメーターを算出しました。GSH、ミトコンドリア膜電位は、薬物の濃度依存的な活性の低下が見られました。一方、核の染色は、凍結ヒト初代肝細胞では薬物濃度依存的に輝度が低下しましたが、PXB-cells™では、薬物の影響を受けたものほど輝度が上昇しました。

また、PXB-cells™のスフェロイドは、凍結ヒト初代肝細胞と比較して形状が均一で安定しており、薬物曝露によるスフェロイドの剥離も認められませんでした。

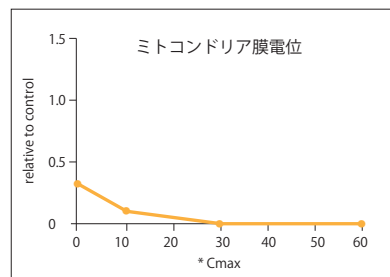
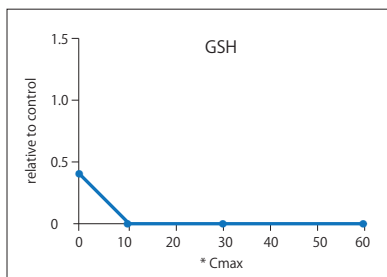
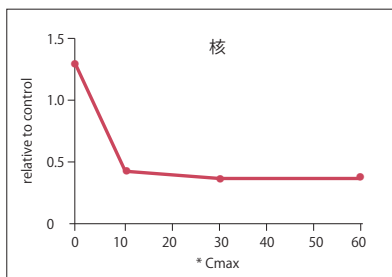
## ▶ 凍結ヒト初代肝細胞

### Acetaminophen 曝露の結果

- 各波長の画像



- 各波長の輝度変化



# 各試験結果と LTKB+Clinical DILI との比較

LTKB\* を基に定めた薬物の陰性又は陽性判定（P8 参照）と、Cell-able® 上に培養した PXB-cells™ 又は凍結ヒト初代肝細胞を用いて行った DILI 予測の結果を比較しました。

## 各試験と LTKB+Clinical DILI の比較 — 薬物ごとの陰陽判定

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

PXB-cells™ 又は凍結ヒト初代肝細胞を用いて行った DILI 予測の結果は、いずれも陰性薬物をすべて陰性と判断しました。また、陽性薬物 10 例中、凍結ヒト初代肝細胞では 9 例、PXB-cells™ では 8 例を陽性と判定し、LTKB をベースとした判定と高い相関性を示しました。

## 各試験と LTKB+Clinical DILI の比較 — LTKB+Clinical DILI との相関

LTKB+Clinical DILI	Cell-able® PXB-cells™		Cell-able® Human Hepatocyte		Xu, 2008 <sup>1)</sup>		Khetani, 2013 <sup>2)</sup>	
	negative	positive	negative	positive	negative	positive	negative	positive
	negative	positive	negative	positive	negative	positive	negative	positive
negative	3	0	3	0	3	0	2	1
+/-	4	1	4	1	5	0	2	2
positive	2	8	1	9	4	5	1	9

PXB-cells™ を用いた DILI 予測と凍結ヒト初代肝細胞も用いた DILI 予測を比較すると、94.4% という高い判定一致率を得ることができました。

\*LTKB (Liver Toxicity Knowledge Base: 米国 FDA における毒性研究国家プロジェクトで公開している DILI 予測判定 (薬物の陰性・陽性判定。P8 参照)

• 各試験と LTKB+Clinical DILI の比較 — LTKB+Clinical DILI との相関

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

特異性は、陰性判定の薬物を陰性と判定した割合、感度は陽性判定の薬物を陽性と判定した割合です。PXB-cells™を用いた DILI 予測系、凍結ヒト初代肝細胞を用いた DILI 予測系ともに、Xu ら（2008 年）や Khetani ら（2013 年）の結果と同等以上の特異性と感度を示しました。

• 各試験と LTKB+Clinical DILI の比較 — LTKB+Clinical DILI との相関

	Cell-able®		Xu, 2008	Khetani, 2013
	PXB-cells™+3T3 Swiss albino	Cryo-human hepatocyte+3T3 Swiss albino	Cryo-human hepatocyte	Cryo-human hepatocyte+3T3 J-2
Cell				
Culture	Cell-able®, 3D Co-culture 384 well plate	Cell-able®, 3D Co-culture 96 well plate	2D /Matrigel Overlay 96well plate	HepatoPac™, 2D co-culture 96well plate
肝細胞播種数	8,000 cells/well	20,000 cells/well	60,000 cells/well	65,000 Cells/well
薬物曝露濃度	1,10,30,60 x Cmax		100 x Cmax	1,30,60,100 x Cmax
薬物曝露時間	14 日間		24 時間	16 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		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
検出方法	蛍光イメージング 多重蛍光染色		蛍光イメージング 多重蛍光染色	CellTiter-Glo® assay GSH-Glo™ assay ELISA 呈色反応
撮影視野数	1 site/well	2 sites/well		
プレート枚数	1 枚	5 枚		
撮影時間	約 60 分	約 175 分 (5 枚合計)		

PXB-cells™を用いたアッセイでは、384 ウェルの Cell-able®を用いました。384 ウェルでは 18 種類の薬物を、各 4 濃度水準、n=4 の条件で 1 枚のプレートで全て評価でき、96 ウェルに比べて播種細胞数・試薬量及び撮影時間の大幅な節約ができます。これにより、ハイスループット、ハイコストパフォーマンスを実現しました。また、PXB-cells™のスフェロイドは形質が均一で、各ウェルの撮影視野数を 1 視野に減らしても安定した結果を得ることができました。

# 各薬物の DILI 判定基準

## 薬物の DILI 判定基準

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 H2O	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	WP/8	Positive	Positive
Phenacetin		Positive	Positive
Troglitazone	WD/NA	Positive	Positive
Ketoconazol	BW/8	NA	Positive
Flutamide	BW/8	Positive	Positive

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

- Drugs of no concern for DILI: Negative, N
- Drugs of less concern for DILI: Plus or minus, +/-
- Drugs of most concern for DILI: Positive, P

\*LTKB; FDA における毒性研究国家プロジェクトにおける薬物が DILI を引き起こす度合いを示す指標の知識基盤<sup>3)</sup>  
<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 の判定に従いました。

## 各測定項目における DILI 判定基準

試験	DILI 陽性判定基準
PXB-cells™	ImageXpress Micro XL による解析 (Multi wavelength Cell Scoring module 使用) コントロールに対する比が ・ミトコンドリア膜電位: 面積 <0.7 ・GSH: 面積 <0.7 ≧ 陽性判定: 1-60 x Cmax の濃度で少なくとも 1 項目が陽性
Human hepatocyte	ImageXpress Micro XL による解析 (Multi wavelength Cell Scoring module 使用) 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 <0.4 ・GSH: 面積 <0.4 ≧ 陽性判定: 1-30 x Cmax の濃度で少なくとも 1 項目が陽性

### 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, 107-17
- 3) Chen et al.(2011) FDA-approved labeling for the study of drug-induced liver injury. Drug Discovery Today 16, 697-703

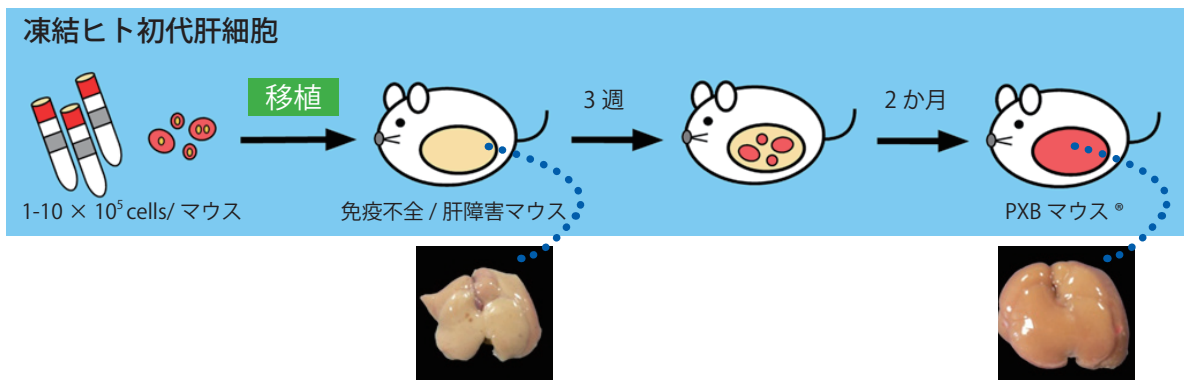


# PXB-cells™ とは？



## PXB-cells™ とは？

PXB-cells™ は、株式会社フェニックスバイオで安定生産している PXB マウス® (ヒト肝細胞キメラマウス) から分離した新鮮ヒト肝細胞です。薬物代謝・酵素誘導・阻害・安全性試験・トランスポーター評価・HBV の薬効評価など種々のインビトロ研究にご利用頂けます。



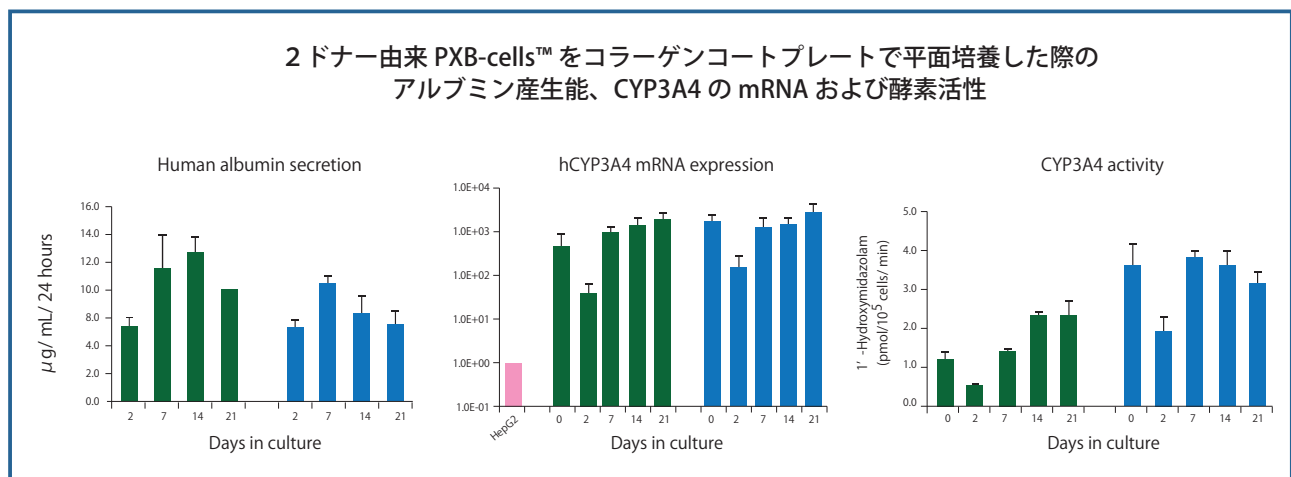
**Yield; 1 ~ 2 × 10<sup>8</sup> cells/ マウス**

採取した細胞の約 90% がヒト肝細胞。

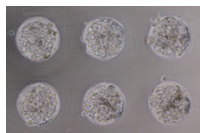
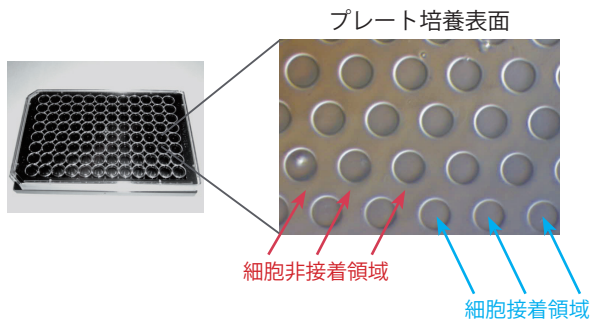
マウス Cyp3a11 (マウス肝細胞が発現する薬物代謝酵素の一つ) の mRNA 発現は、培養 14 日間で 1/1000 以下に低下します。

## PXB-cells™ のヒト肝細胞としての性質

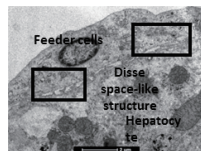
PXB マウス® から採取するため、同一ドナーのヒト新鮮肝細胞の安定供給が可能です。ヒト型の高い代謝酵素活性やトランスポーター活性を示します。細胞生着性も高く、5 日毎の培地交換で最高 100 日間の長期培養も可能です。



# Cell-able® とは？



ヒト初代肝細胞播種 5日目



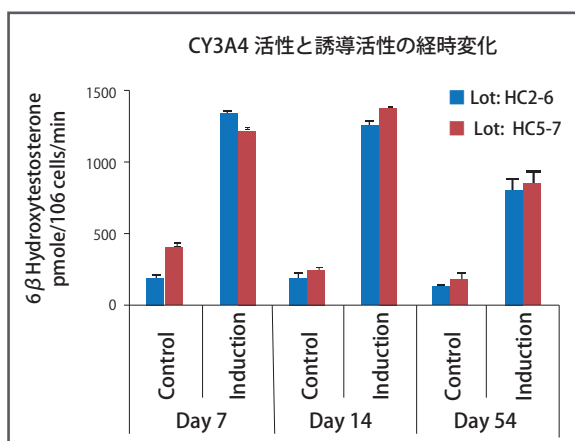
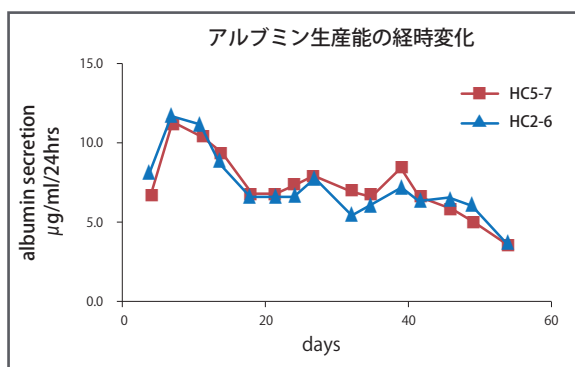
ラット初代肝細胞  
スフェロイド断面 TEM 写真

## Cell-able® とは？

培養用マイクロプレートの培養表面を特殊なポリマーで微細加工することにより、簡単な操作で、直径 100 $\mu$ m, 高さ 20-40 $\mu$ m の均一なスフェロイドを形成することを可能にしたマルチウェル培養プレートです。

## 共培養によるスフェロイド形成

あらかじめフィーダー細胞を播種した Cell-able® プレートに初代肝細胞を播種することにより、48 時間後には肝細胞はスフェロイドを形成します。スフェロイドにはディッセ腔様の微細構造が観察され、微小構造が再構築されています。



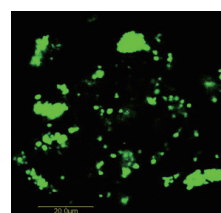
## Cell-able® を使うと、

## ヒト初代肝細胞を、肝特異機能を保持したまま約 2 か月間培養可能です

ヒト初代肝細胞 2 ロットを Cell-able® を使って 54 日間培養した結果、アルブミン生産能、CYP3A4 基礎活性及び誘導活性とも保持されていました。

グラフ上段；アルブミン生産能経時変化

グラフ下段；CYP3A4 基礎活性・誘導活性経時変化。CYP3A4 の誘導はリファンピシシにより行いました。



培養 7 日目、CDFDA を用いて排泄トランスポーター活性が確認されました。

CDFDA;  
Carboxydichlorofluorescein diacetate

# ImageXpress Micro XLS

## ハイコンテンツスクリーニングシステムとは？

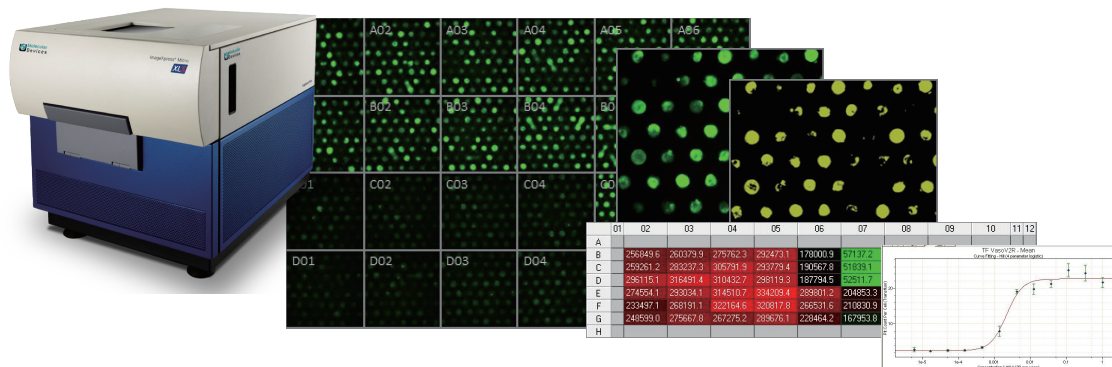


### 広視野高画質な最新型イメージングシステム

ImageXpress Micro XLS は、ハイスピードかつ応用性抜群のイメージングスクリーニングシステムで、画像取得からデータマイニングまでトータルにサポートしております。

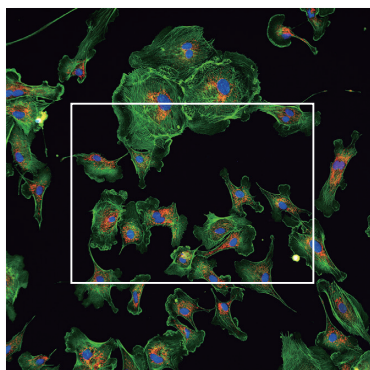
#### ▶ 画像撮影から解析、データマイニングまで1つのシステムで完了

- ・ 画像取得から解析まで簡単な操作で実行できるオールインワンソフトウェア
- ・ 豊富な解析機能を標準搭載
- ・ 複数の解析コンピュータでプレートデータをパラレルに解析（オプション）

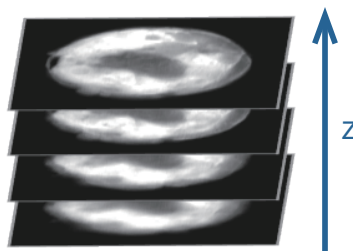


#### ▶ 特徴

- ・ 広視野型 sCMOS カメラ搭載で視野が従来の3倍に拡大  
→ 384 ウェルなら4倍レンズ（96 ウェルなら2倍レンズ）でウェル全体を一視野で撮影
- ・ 光源に長寿命（10,000 時間以上）新型白色光源搭載で、メンテナンスフリー。長期間のアッセイにも安心
- ・ 1-100 倍まで広範な対物レンズに対応
- ・ 5 波長まで撮影可能
- ・ 明視野ユニットオプション、ロボットにも対応
- ・ Z フォーカスにリニアモーター採用で、高速かつ正確な Z-stack を実現



ImageXpress Micro XLS の撮影画像 (2160 x 2160 pixel)  
中央四角は一般的な CCD カメラ (1392 x 1040 pixel) の撮影範囲



Z-stack 機能標準搭載  
厚みのあるサンプルの撮影も可能



明視野ユニット搭載時

## Cell-able® for DILI with PXB cells™, Cell-able® に関するお問い合わせ

東洋合成工業株式会社 事業開発部

〒111-0053 東京都台東区浅草橋1丁目22番16号 ヒューリック浅草橋ビル8階

TEL : 03-5822-6186

Mail : Cell-able@toyogosei.co.jp

URL : <http://www.toyogosei.co.jp/product/medical/>

## PXB-cells™ に関するお問い合わせ

株式会社フェニックスバイオ 営業部 営業課

〒739-0046 広島県東広島市鏡山3丁目4番1号

TEL : 082-431-0016 FAX : 082-431-0017

Mail : pxb-cells@phoenixbio.co.jp

URL : <http://www.phoenixbio.co.jp>

## ImageXpress Micro XLS に関するお問い合わせ

モレキュラーデバイスジャパン株式会社

東京本社

〒103-0002 東京都中央区日本橋馬喰町2-7-8 7階

TEL : 03-6362-5260

大阪支社

〒532-0003 大阪府大阪市淀川区宮原4-6-18 8階

TEL : 06-7174-8831

Mail : MDC.Japan@moldev.com

URL : [www.nihonmdc.com](http://www.nihonmdc.com) | [www.moleculardevices.com](http://www.moleculardevices.com)

