

○城村友子^{1,2}, 小関恵美子^{1,2}, 畑野泰子³, 荒川 大³, 荻原琢男^{2,4}

¹東洋合成工業株式会社, ²安全性評価研究会 *in vitro* 肝代謝・毒性分科会, ³高崎健康福祉大学薬学部, ⁴高崎健康福祉大学大学院薬学研究科

Introduction

薬物誘発性肝毒性は、医薬品による毒性の最大比率を占める。種差のため動物モデルでは再現できない肝毒性が知られていることから、ヒト肝臓試料による評価が望まれる。しかし、従来のヒト初代肝細胞単層培養では肝機能は十分に保持されない。また肝毒性の作用発現には、代謝物のみならず代謝過程の中間体が重要であるため、ヒト *in vivo* の代謝反応を反映する肝毒性評価系が必要である。そこで我々はこれまでに、**より生体に近い三次元培養ヒト肝細胞(肝細胞スフェロイド)を用い、薬物誘発性肝毒性のハイスループットスクリーニング系を構築した¹⁾**。しかしながらこの系では、肝細胞をプレートに固定するためのフィーダー細胞を使用することから、この細胞に対する毒性も上載せされ、的確な肝毒性の評価が妨害されることがある。そこで今回、**フィーダー細胞なしの条件でスフェロイド培養法を行い、肝毒性マーカーの検出を検討した。**

Methods

凍結ヒト初代肝細胞(ベクトン・ディッキンソン, Lot297)を96ウェルパターンニングプレート(Cell-able®, 東洋合成工業)上に**フィーダー細胞有り(On feeder, 以下OF)**, **フィーダー細胞無し(Feeder-less, 以下FL)**の2条件で20,000 cells/wellで播種し、RM-101培地(1% FBS含有, 東洋合成工業)を用いて培養した。播種2日目に薬物曝露を開始し、以降2-3日おきに14日間、サンプリングと薬物曝露を行った。FL培養では培養2日目及び7日目にマトリゲル(ベクトン・ディッキンソン)を250 µg/mL添加したRM101培地を使用した。薬物はFlutamide, Diclofenac, Isoniazide及びChlorpromazineを用いた。各薬物の曝露用量は、臨床用量での最高血中濃度を参考にして、その100倍を最高用量として5用量を設定した。曝露の各時点における培養上清中のAST, ALT, LDH, γ-GTP及びAlbumin量のそれぞれを定量し、各毒性マーカーの累積値を算出したのち、それぞれのマーカーがコントロール(薬物非添加群)の1.2倍上昇する薬物濃度($F_{1.2}$)を比較し、その有用性を検証した。

Results

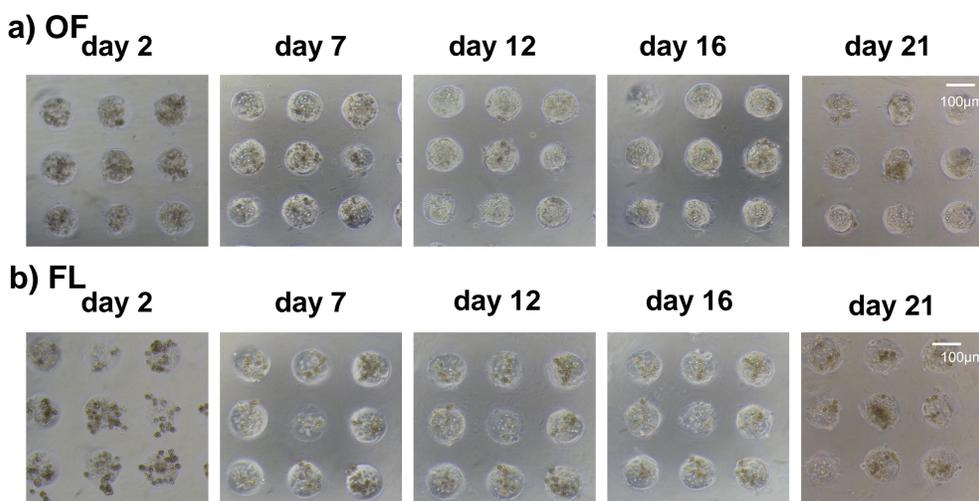


Fig. 1 スフェロイド形態の経時的変化

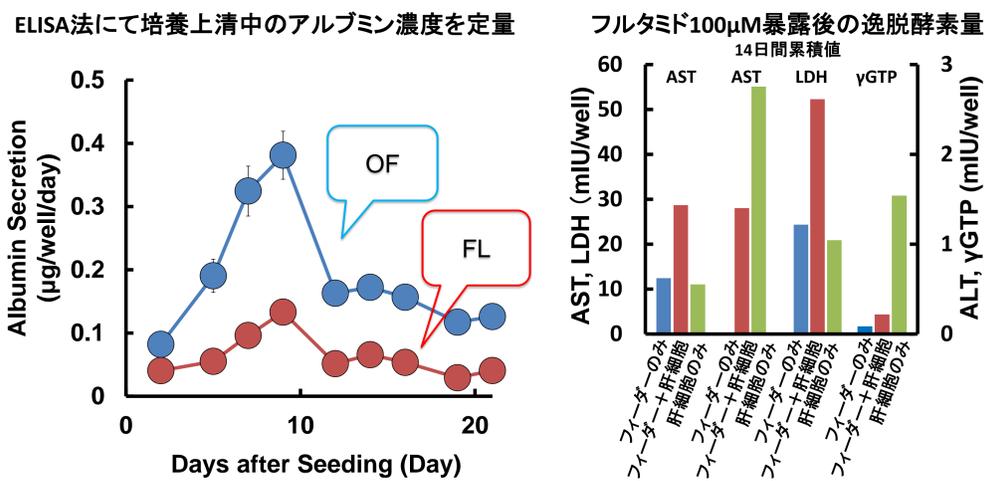


Fig. 2 OF, FLにおける各種毒性マーカー

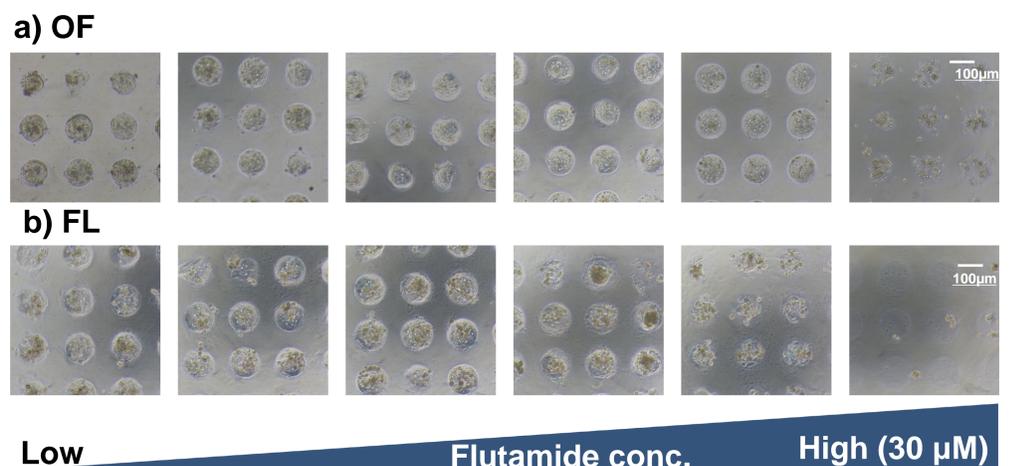


Fig. 3 Flutamide曝露時におけるスフェロイドの形態変化

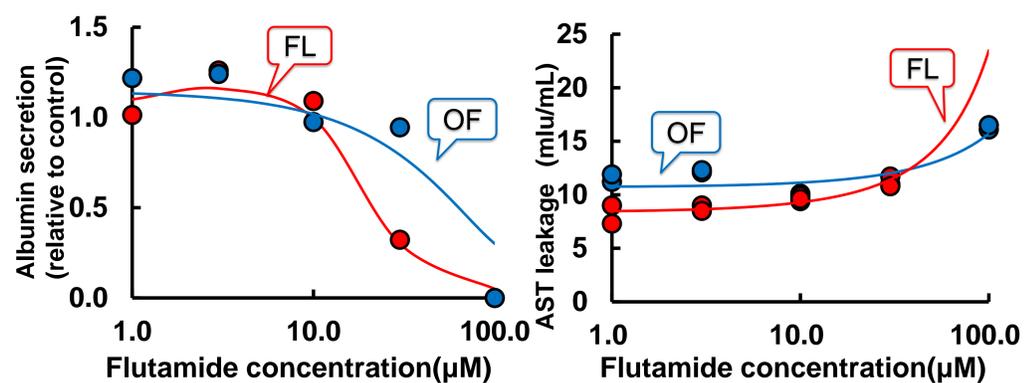


Fig. 4 Flutamide曝露時におけるAlbumin及びAST変化

Table 1 薬物曝露によるAlbumin産生量の IC_{50} 値及び各毒性マーカーの $F_{1.2}$ 値

Toxic Parameter	Flutamide (C_{max} : 4.2 µM)		Diclofenac (C_{max} : 8.1 µM)		Isoniazide (C_{max} : 77 µM)		Chlorpromazine (C_{max} : 1.4 µM)	
	OF	FL	OF	FL	OF	FL	OF	FL
Albumin (IC_{50})	50.4	> 18.5	56.7	> 24.9	14.0	> 12.2	16.9	> 7.6
AST ($F_{1.2}$)	47.7	> 17.7	45.1	> 39.5	—	37.8	5.2	< 8.8
ALT ($F_{1.2}$)	29.4	< 38.8	42.0	> 12.2	—	—	1.2	> 0.5
LDH ($F_{1.2}$)	17.7	> 11.6	68.6	> 61.8	—	47.2	3.2	> 11.7
γ-GTP ($F_{1.2}$)	—	10.5	—	—	—	132.2	—	7.6

Discussion

1. 肝細胞スフェロイド培養における形態変化及びAlbumin産生能の経時的変化 (Fig. 1, 2)

OF, FLともにスフェロイドの形成が確認され、21日間の培養が可能であることが示された。またスフェロイドの形態は培養期間を通じて安定していた。

肝特異的機能の一つであるAlbumin産生能は、両条件において培養7日目で最も高く、21日間の培養期間を通じて維持されていることが明らかとなった。

AST, ALT, LDH及びγ-GTPはフィーダー細胞からも分泌されることから、OFと比較しFLではこれらのマーカーを感度よく検出できることが明らかとなった。

2. Flutamide曝露による形態, Albumin産生能, AST逸脱量変化 (Fig. 3, 4)

OF, FLそれぞれにFlutamideを曝露し、21日目におけるスフェロイドの形態を観察した。その結果、**FLにおいてより低濃度のFlutamideで細胞障害が観察された。**

また肝毒性の指標としてAlbumin分泌量及びAST逸脱量へのFlutamide濃度依存的影響を検討した。その結果、**いずれの毒性マーカーにおいてもFLはOFよりも低値の IC_{50} 値または $F_{1.2}$ 値を示した。**

3. 肝毒性誘発性薬物の各毒性パラメーター (Fig. 5, Table 1)

検討した全ての薬物でAlbumin分泌に対する IC_{50} 値はOFよりFLが低値を示した。また $F_{1.2}$ 値のうちFlutamideのALT, ChlorpromazineのAST, LDH以外はOFよりFLが低濃度を示した。

Conclusion

フィーダー細胞ありの培養条件においては、Albumin以外のマーカーが評価できない場合が散見され、フィーダー細胞自身に対する薬物の毒性が認められる場合があることが示唆された。さらに $F_{1.2}$ 値が算出可能であった場合には、概ねフィーダーレスのほうがその値が低く、毒性が鋭敏に観察されるものと考えられた。以上の結果から、**フィーダーレスの条件においても培養ヒト肝細胞を用いたスフェロイドによる毒性評価は可能であり、より感度よく毒性を検出できる可能性が示唆された。**

References

1) Ogihara T et al., *Fund. Toxicol. Sci.*, 2(1), 41-48(2015)