



第39回 日本毒性学会学術年会  
シンポジウム12「In vitro毒性試験法の探索毒性試験への展開」  
S12-5

# ヒト肝細胞スフェロイド培養法を用いた in vitro 代謝・毒性評価

○太田 之弘<sup>1,6</sup>, 王鞍 孝子<sup>2,6</sup>, 長井 大地<sup>3,6</sup>, 岩井 久和<sup>4,6</sup>, 片木 淳<sup>5,6</sup>

<sup>1</sup>中外製薬株式会社, <sup>2</sup>丸石製薬株式会社, <sup>3</sup>日本化薬株式会社,  
<sup>4</sup>株式会社三和化学研究所, <sup>5</sup>小野薬品工業株式会社,  
<sup>6</sup>安全性評価研究会 スフェロイド分科会

# 背景



医薬品の開発において化合物及びその代謝物のin vitro肝毒性評価が、肝細胞や組織等を用いた種々の方法により試みられてきた。

しかし、従来法では代謝能を長期間維持することが難しく、より生体に近い機能が維持された肝細胞培養系による毒性評価法の確立が望まれてきた。

また、ヒト-動物種差およびIVIVCの問題をクリアできるin vitro評価系が望まれていた。

近年、より生体に近い培養デバイスとして三次元培養基材が開発されIn vitro代謝毒性評価での使用が可能となってきた。



# 目的

肝細胞の長期培養が可能で、より生体に近い機能維持が可能といわれている三次元(スフェロイド)培養法の有用性について『代謝および毒性』の側面からヒト肝細胞を用い多施設で検討した。

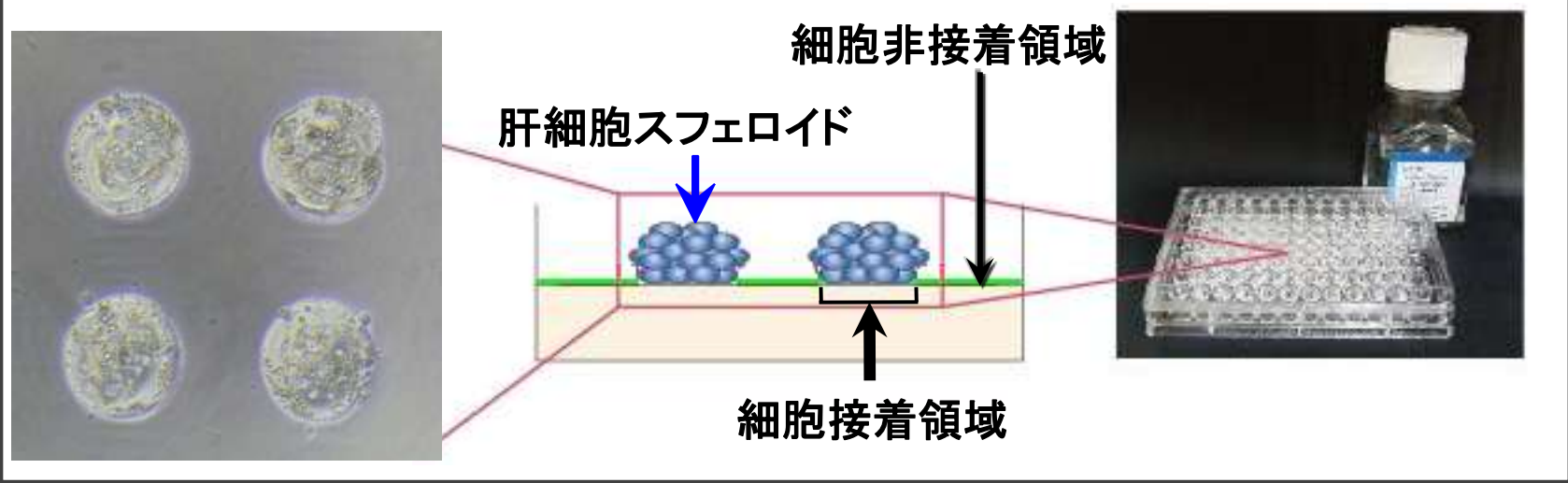
- ・従来法で困難であった代謝物の検出系の構築
- ・長期暴露時に発現する肝毒性の評価系の構築

をめざし実施した。

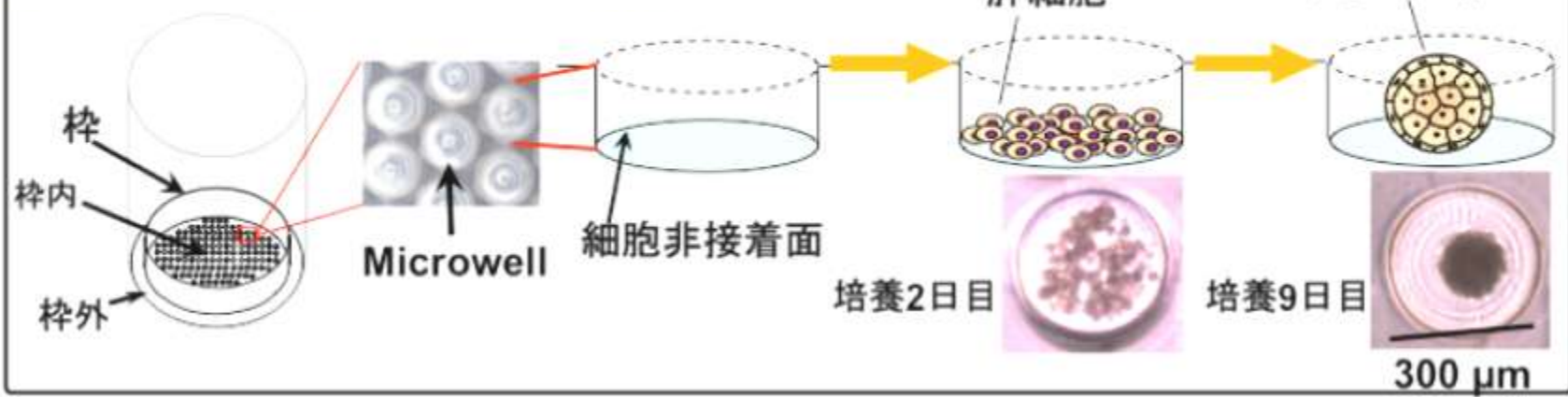
## 使用したプレート



**【Cell-able】** フィーダー細胞と共培養した場合、より安定したスフェロイド形成が可能



**【Micro Sphere Array】** 肝細胞のみでスフェロイドを形成することが可能





## 培養条件

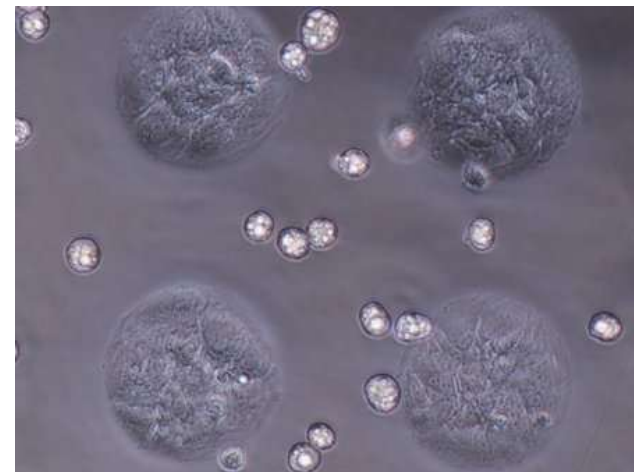
プレート	Cell-able (96well プレート) トランスパレント	Micro Sphere Array (48well プレート) STEMバイオメソッド
ヒト凍結肝細胞	Lot 228 (日本ベクトン・ディッキンソン: BD)	
	Lot Hu8110 (日本チャールス・リバー: CR)	
	2 x 10 <sup>4</sup> cells/well	5.7 x 10 <sup>4</sup> cells/well
フィーダー細胞	3T3-Swiss albino JCRB9019 (Lot 04052005)	
	8 x 10 <sup>3</sup> cells/well	肝細胞と1:1播種
培地	RM101培地(トランスパレント)	Williams' E 培地
	1%FBS添加、フェノールレッド不含 100 μ L/well	10%FBS添加、フェノールレッド不含 400 μ L/well

# Result

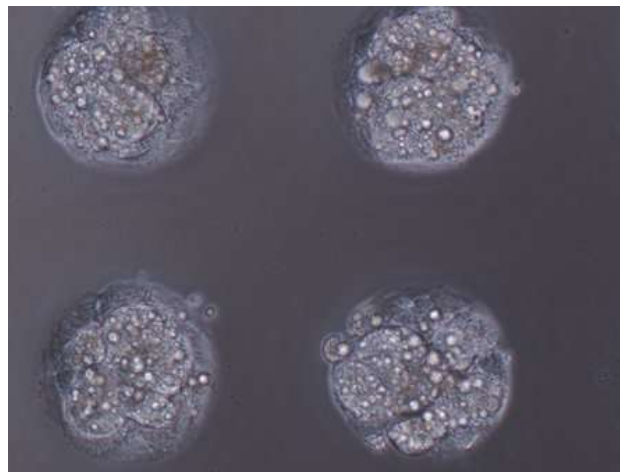
## 長期間の細胞維持 スフェロイド培養における細胞形態の推移



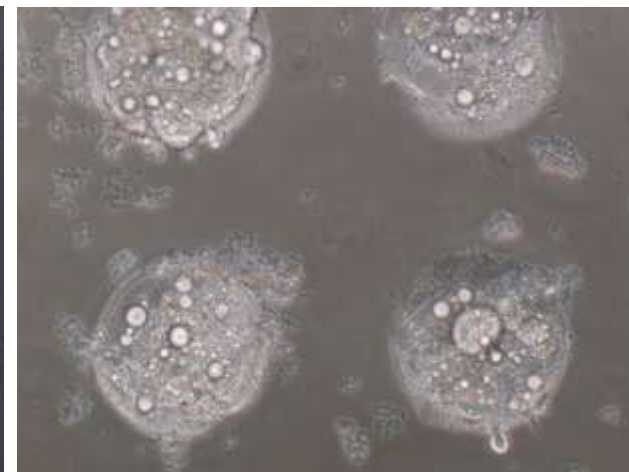
【Cell-able】 Lot Hu8110 (フィーダー細胞有り)



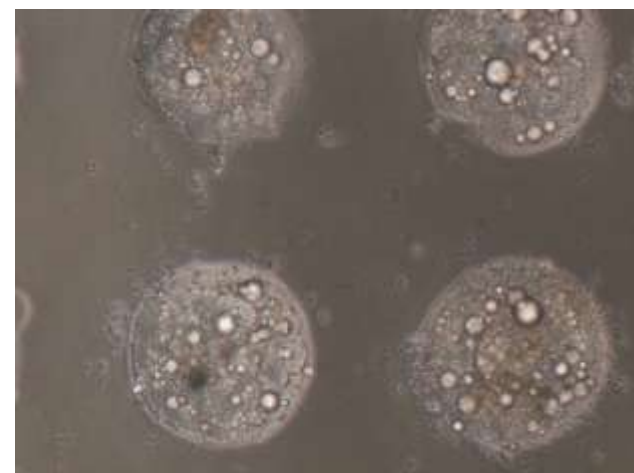
肝細胞播種直後 (Day -4)



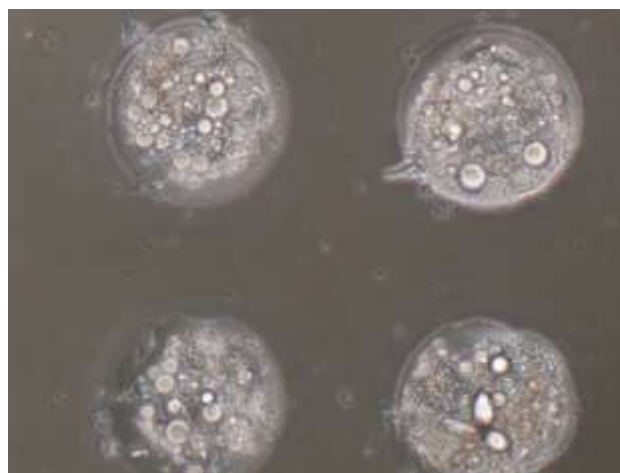
播種1日後 (Day -3)



暴露開始後 (Day 7)



Day 14



Day 21

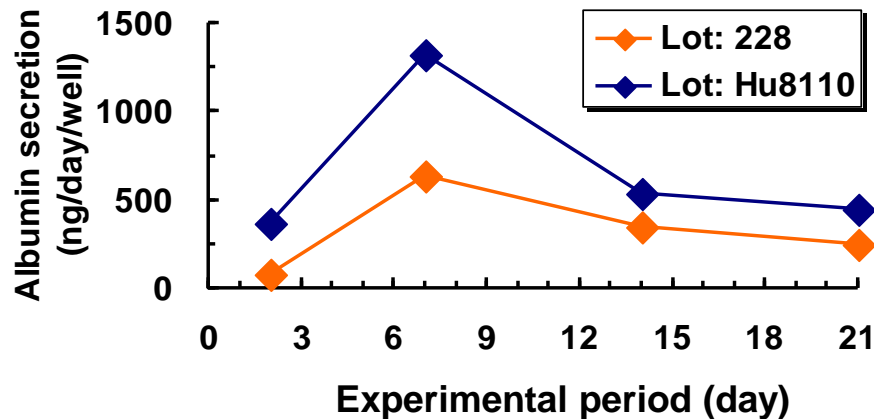
- スフェロイド形成後、約1ヶ月までの培養が可能であり、培養期間中のスフェロイド形態は安定して維持されていた。
- 施設間でハンドリングの差が生じにくい系であると感触を受けた。

# Result

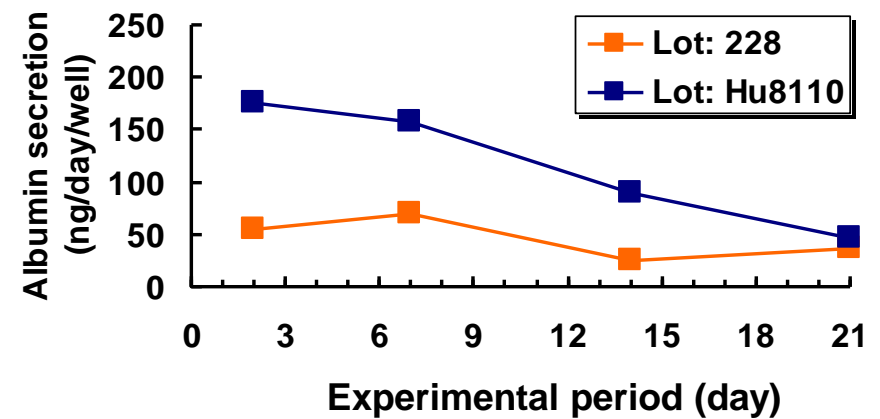


## 長期間の細胞維持: スフェロイド培養における Albumin分泌量及び細胞形態の経時的推移

### 【Cell-able】



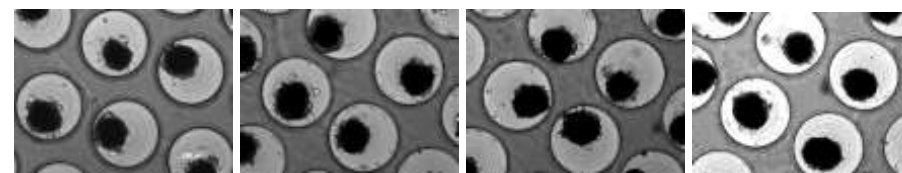
### 【Micro Sphere Array (MSA)】



2                      7                      14                      21

Experimental period (day)

(Lot 228)



2                      7                      14                      21

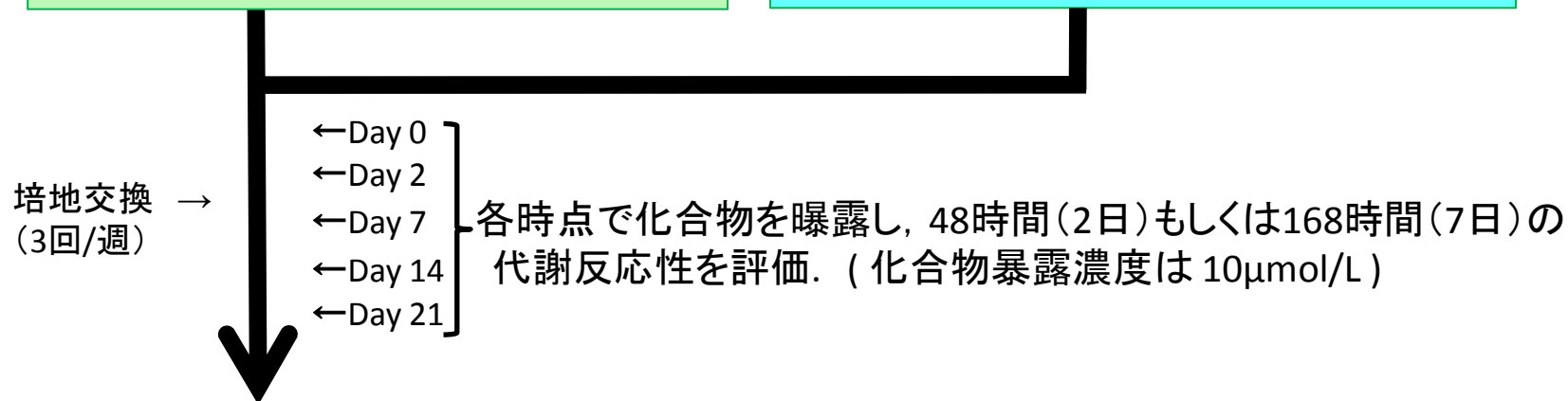
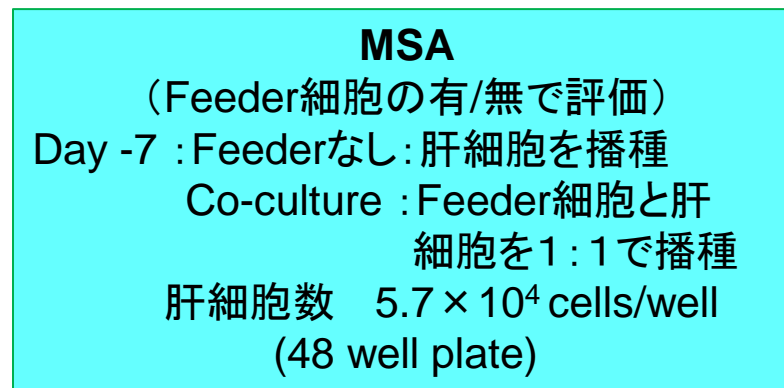
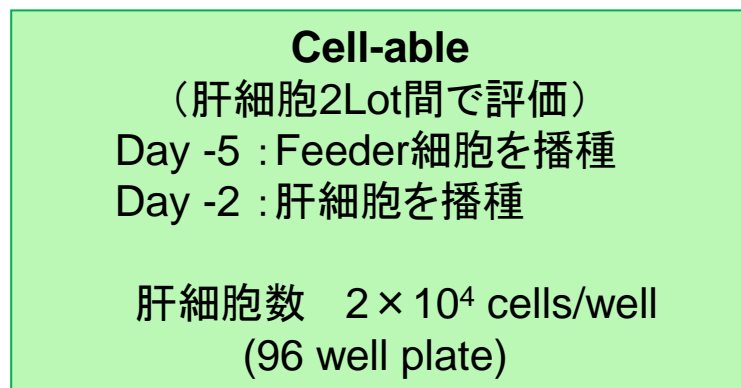
Experimental period (day)

(Lot 228)

- 肝特異機能の一つであるAlbumin産生は、肝細胞ロット間差あるいは培養日数毎の増減はあるものの、培養期間を通じて維持されていることが確認された。

## 代謝物予測に関する検討

### <実験スケジュール>



培養上清をアセトニトリルにより除蛋白後、LC/MS/MSで分析内標(IS)に対するresponseを求めた。

代謝活性の指標として基質減少率を算出。(対照wellのresponseを100%とした時の減少率)  
(対照wellはFeeder細胞のみ(Feeder-freeの系では培地のみ)に化合物を曝露)

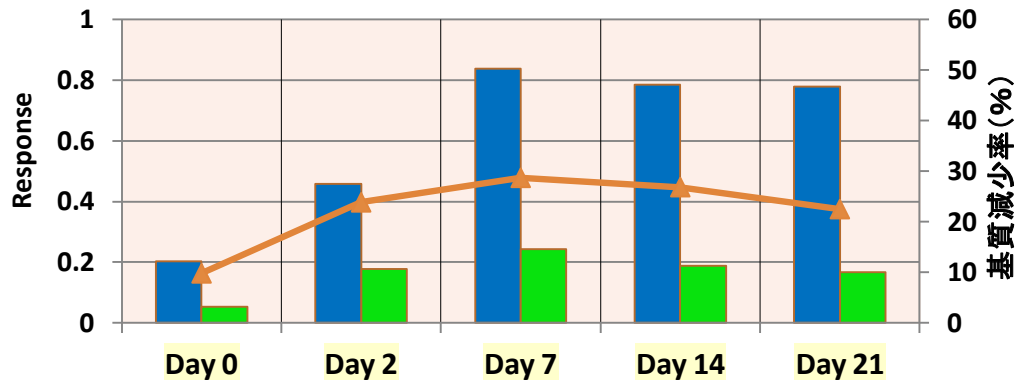


# Acetaminophen

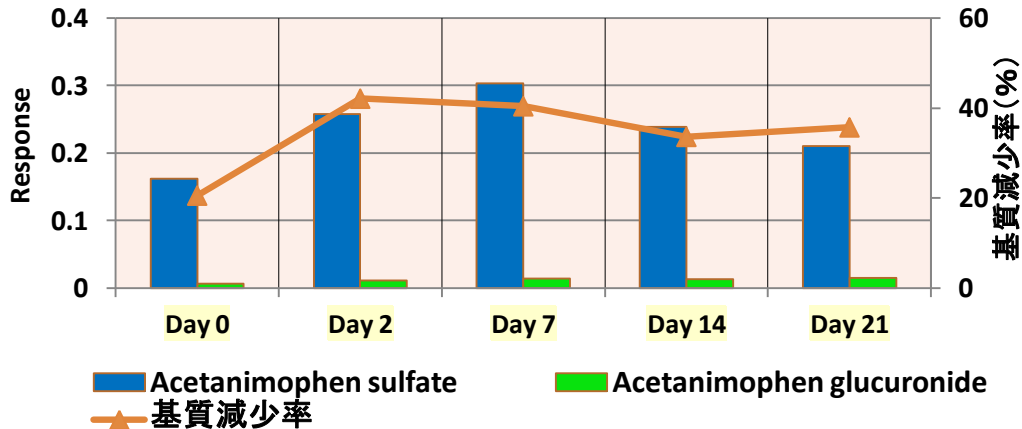
## 肝細胞 2Lot (BD及びCR) 間の代謝能比較 Acetaminophenの48時間反応 (Cell-able)



Lot BD



Lot CR



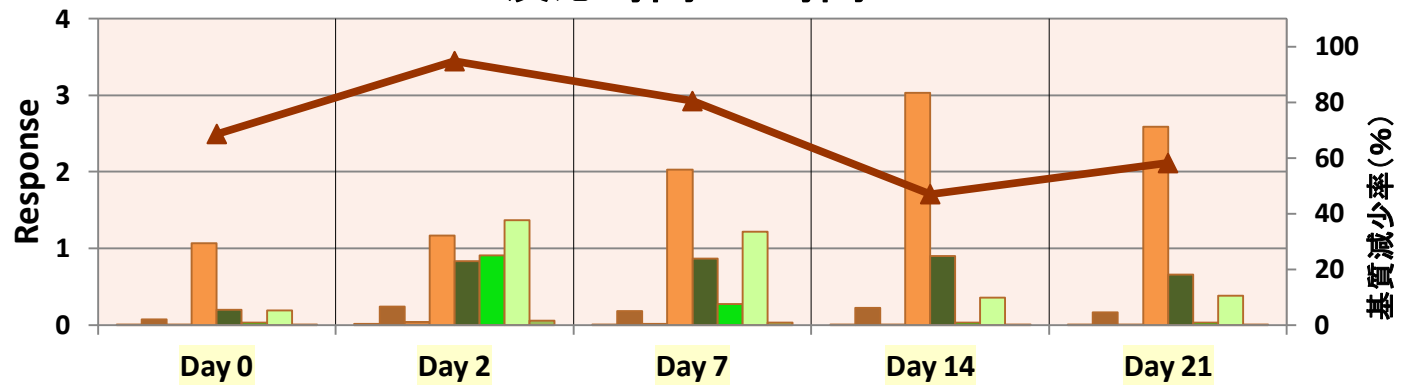
- 用いた2つのロットの凍結ヒト肝細胞では、代謝の相違は質的な差は小さく、量的な差が認められた。
- 基質の反応率(基質減少率)からみた代謝活性はほぼ試験期間中28日間持続していた。
- MSA (Feeder-free) についてもCell-able,と同等に活性を維持していた。

# Imipramine

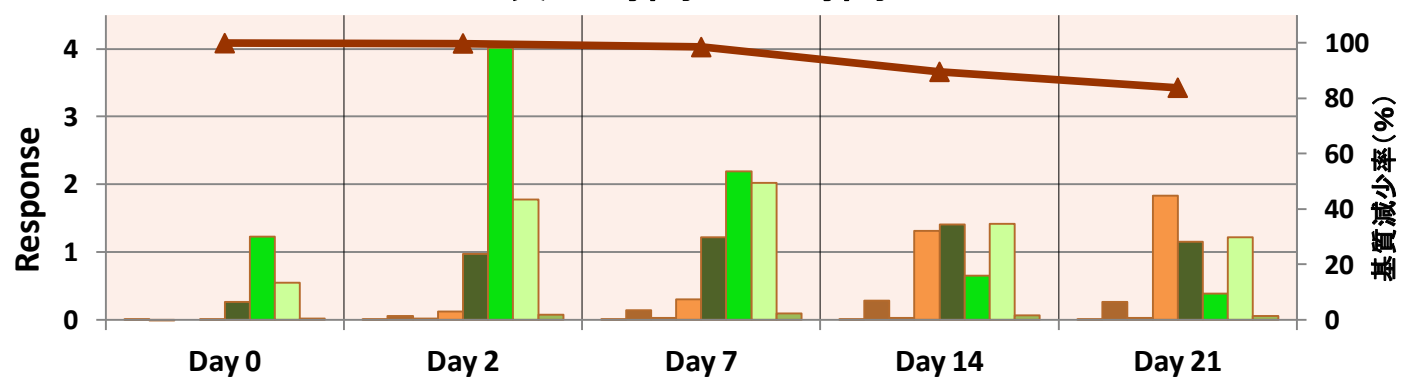


## 反応時間による代謝能の推移の比較 Imipramineの代謝能 (Cell-able, Lot BD)

反応時間: 48時間



反応時間: 168時間



- Demethyl desipramine
- Desipramine
- Hydroxy desipramine
- Imipramine-N-oxide
- Imipramine-N-glucuronide
- Desipramine-2-O-glucuronide
- Hydroxy imipramine glucuronide2
- Hydroxy imipramine glucuronide1
- ▲ 基質減少率

茶色系の棒グラフは第1相代謝物

緑色系及の棒グラフは抱合体



# Result

## 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 (1A2, 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 (1A2, 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 (1A2, 2D6, UGT)	Hydroxy propranolol	×	○					
	Propranolol-O-glucuronide	○	○					
	Hydroxy propranolol glucuronide	○	○					

実施施設内訳	
Cell-able	5施設 (A, B, C, D, E)
MSA	1施設 (E)

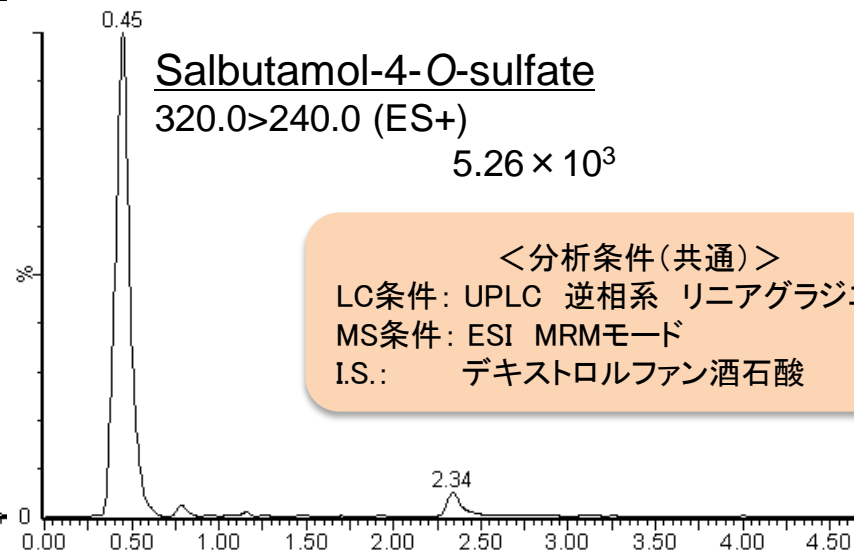
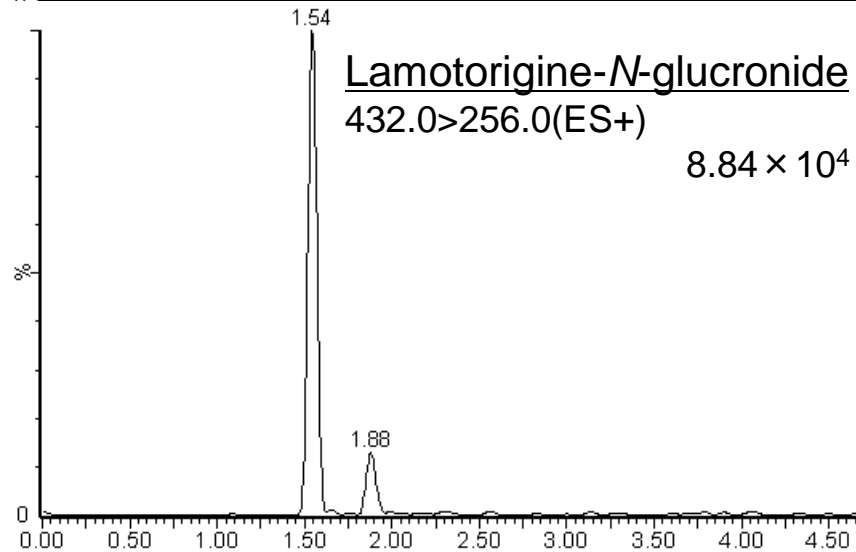
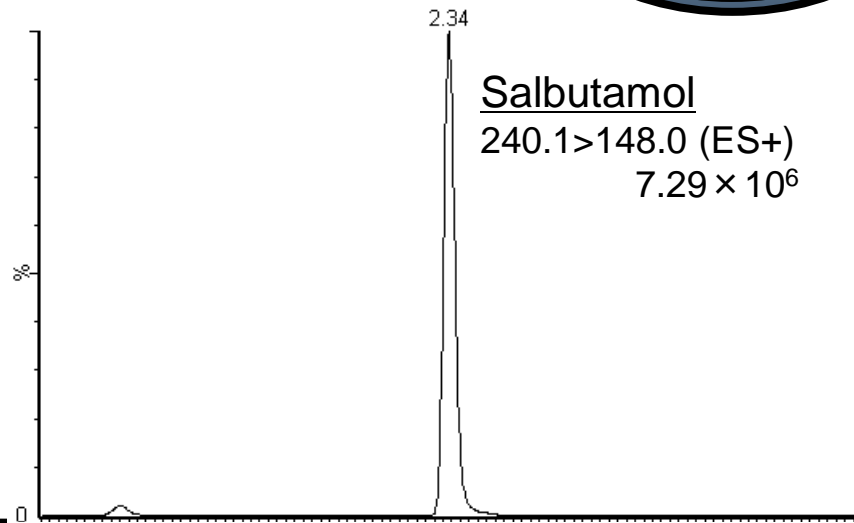
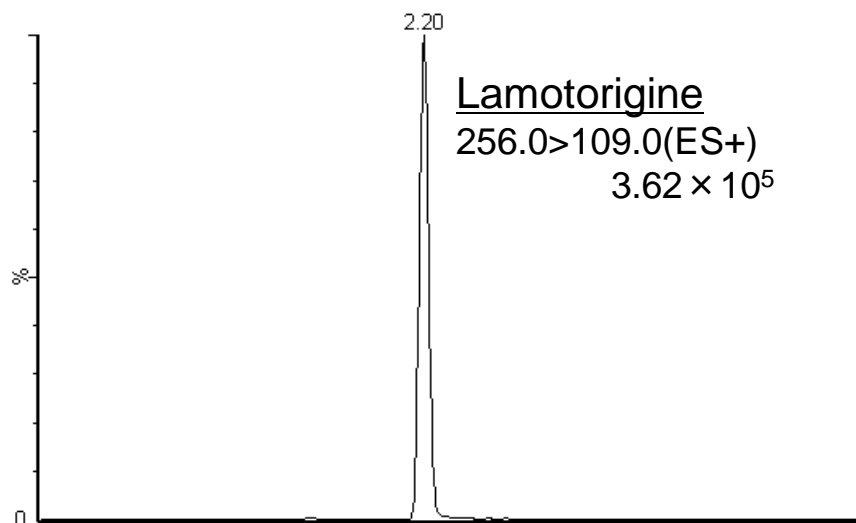
化合物名の下段は主代謝酵素を示す  
\* 保持時間の異なる位置異性体

- 臨床で認められる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。
- MSAではCo-cultureの方がFeeder-freeの場合よりも代謝物産生能が高かった。
- LamotrigineとSulbtamolの代謝物は、in vitro試験において検出困難と報告されていたが、本検討のspheroid培養(Cell-able)では検出可能であった。

# Lamotrigine, Salbutamol



## Lamotrigine (左)及びSalbutamol (右)の代謝物のLC/MS/MS分析 (Cell-able)

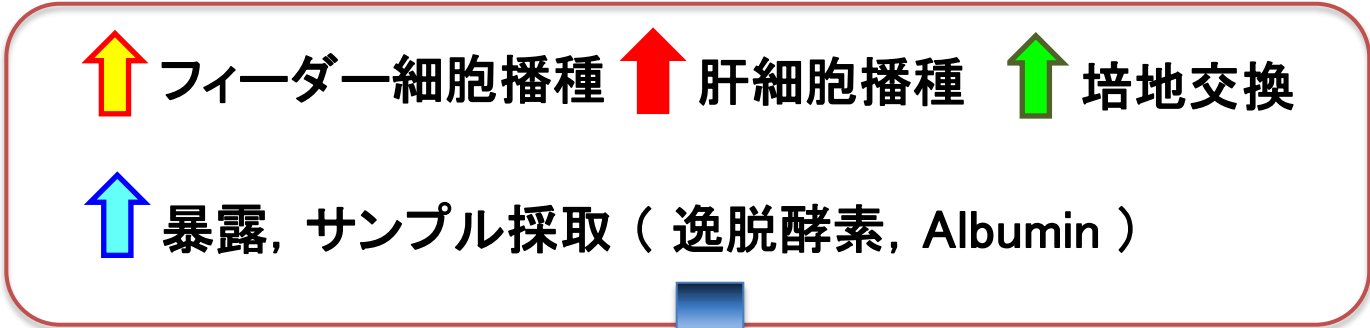
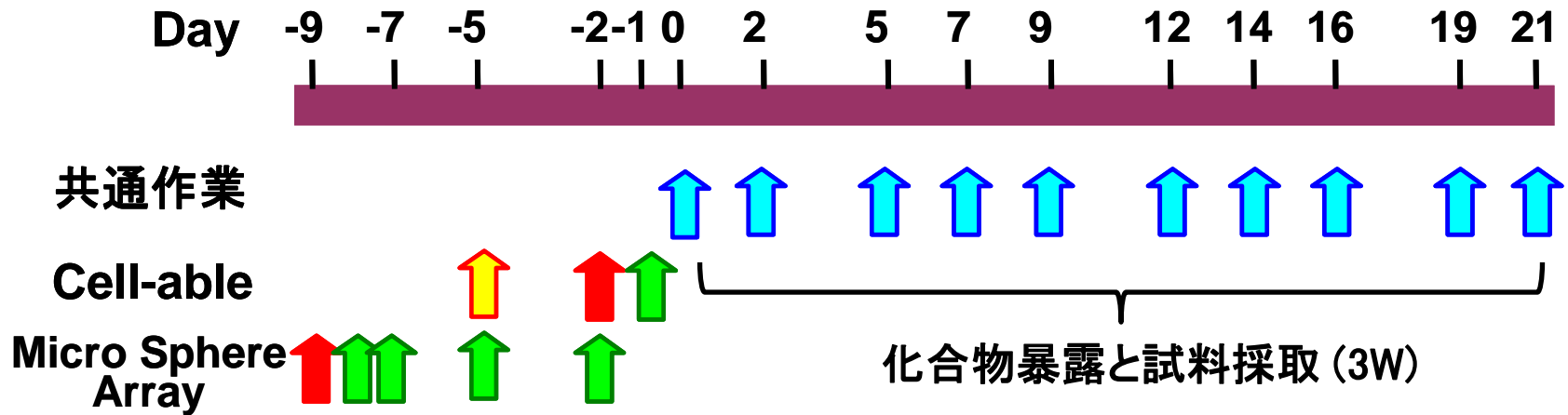


<分析条件(共通)>  
LC条件: UPLC 逆相系 リニアグラジエント  
MS条件: ESI MRMモード  
I.S.: デキストロルファン酒石酸



## 肝毒性評価予測に関する検討

<実験スケジュール>

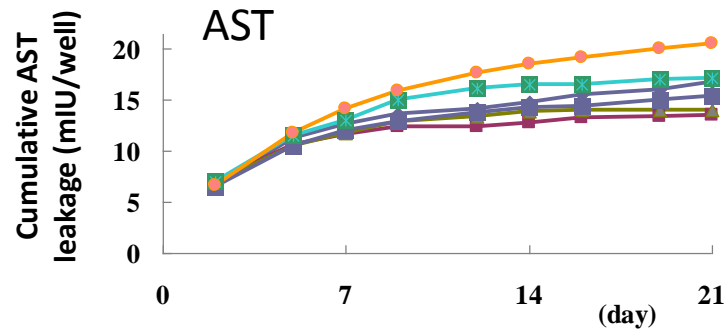
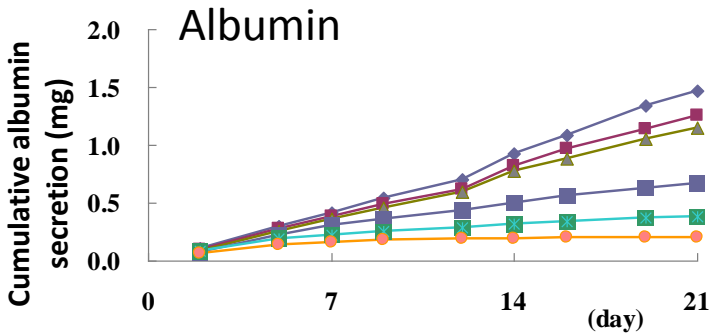


測定項目: AST, ALT, LDH,  $\gamma$ -GTP, Albumin

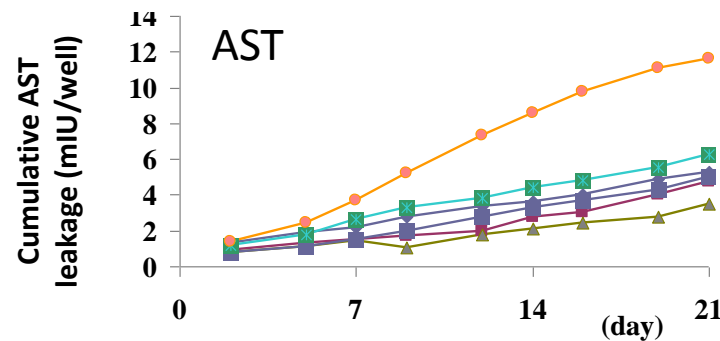
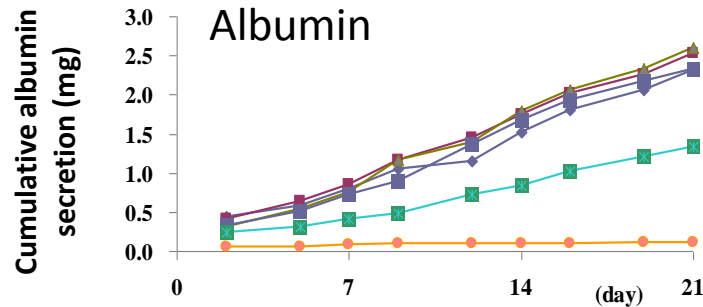
# Acetaminophen



Cell-able (Lot 228)



Cell-able (Lot Hu8110)



◆ 0 μmol/L ■ 250 μmol/L ▲ 500 μmol/L ▣ 1000 μmol/L □ 2000 μmol/L ● 4000 μmol/L

Cell-able (Lot 228)

Day7, Control



Day7, 4000uM



Day21, Control



Day21, 250uM

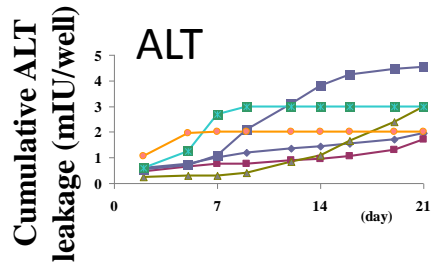
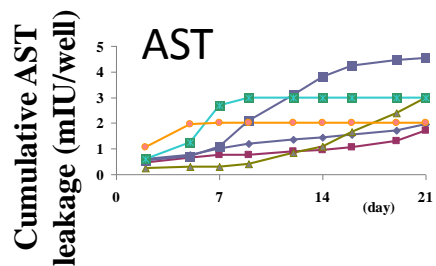
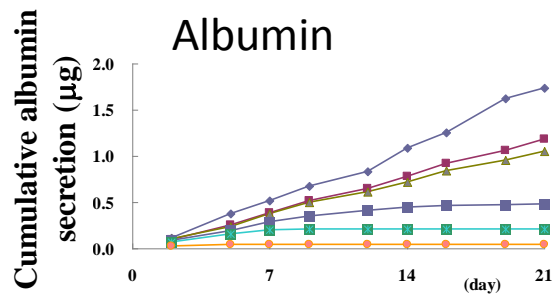


- 両lotのスフェロイドとも高用量で早期からAlbumin産生量の低下がみられ、投与の延長により低用量でも同様の変化がみられた。
- Lot 228は最高用量でASTの増加がみられたが、その他の項目では明らかな逸脱酵素の増加はみられなかった。
- 一方lot Hu8110ではAST以外にもALTやLDHの増加がみられ、その変化は用量依存的であった。

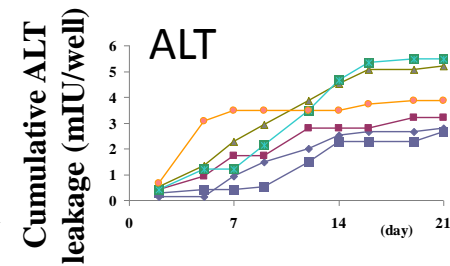
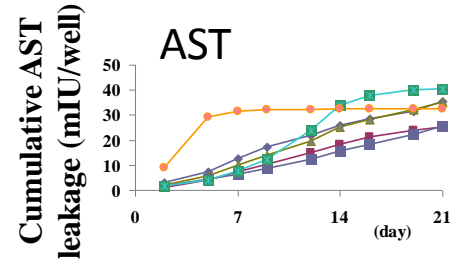
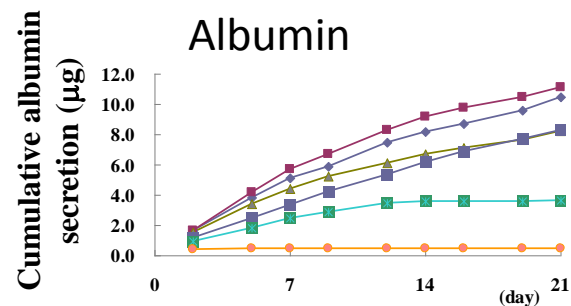
# Imipramine



## Cell-able (Lot 228)

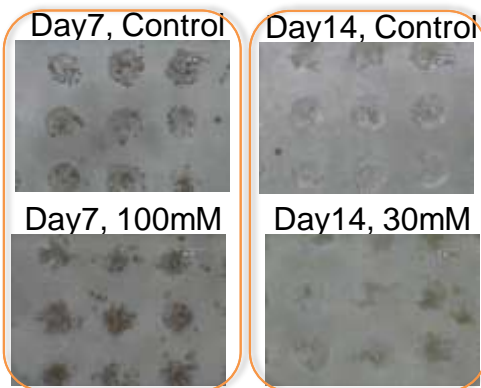


## MSA (Lot 228)

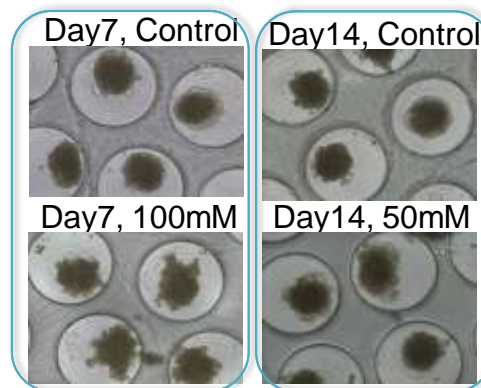


◆ 0 µmol/L ■ 3 µmol/L ▲ 10 µmol/L ▣ 30 µmol/L □ 50 µmol/L ○ 100 µmol/L

## Cell-able (Lot 228)



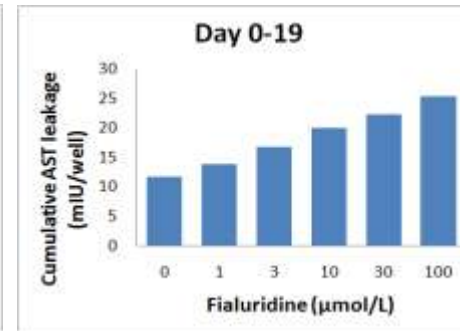
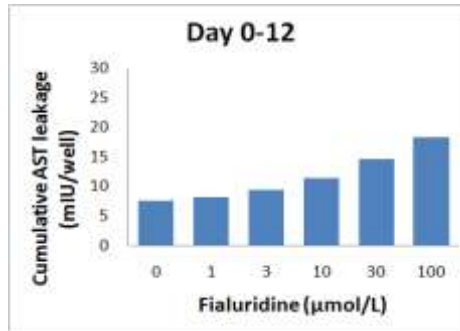
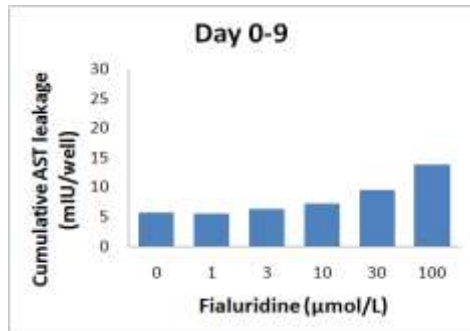
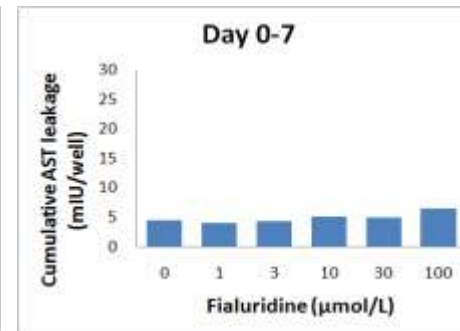
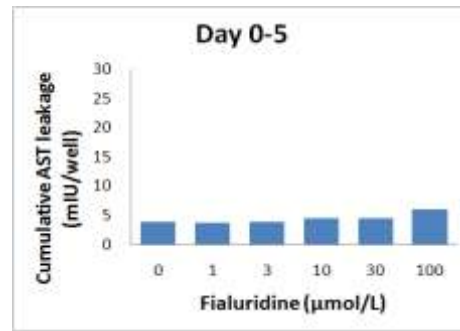
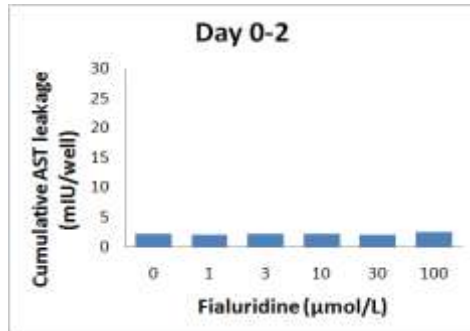
## MSA (Lot 228)



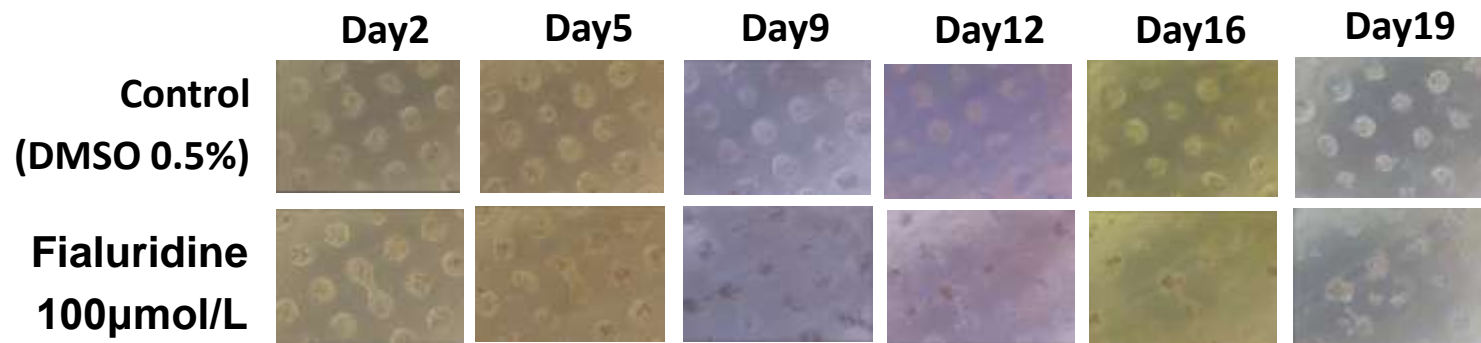
- Cell-ableにおいて100umol/Lでは曝露初期よりAlbumin産生能の低下がみられ、5日目には殆ど産生能は見られなかった。
- 100umol/Lに続き、50umol/L、30umol/Lの順に、濃度依存的な時間の遅延を伴い、Albumin産生能低下と、AST、ALTの上昇が見られた。
- これらの変化はMSAにおいても同様の推移を示した。

# Fialuridine

## 培養液中のASTの漏出 (Lot Hu8110)



## ヒト肝細胞スフェロイドの形態変化 (Lot Hu8110)



➤ Day7までFialuridineによる変化は認められなかったが、Day9以降、AST量増加および形態変化が、Fialuridineの臨床Cmax 1μmol/Lより濃度に応じて認められた。なお、Lot 228も同様の結果であった。





## まとめ

- 今回の検討において、ヒト肝細胞スフェロイド培養法は従来法では困難であった代謝物検出や肝毒性評価を可能とするポテンシャルを有していることを示唆する結果が得られた。
- 長期間の細胞維持が可能となり初めて検出可能な評価系として有用性が認められた。
  - 第2相代謝生成物の検出，経時的な代謝物生成の追跡
  - 長期培養で発現する毒性評価 ， etc.
- 代謝・毒性を総合的に評価可能なIn vitro試験系の構築が可能となる。
- ハンドリングが容易で，施設間差が比較的少なく，「In vitro 代謝・毒性試験法」として1つの試験法の確立も考えられた。

# 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 スフェロイド分科会の会員各位に感謝申し上げます

## アドバイザー

小島 肇（国立医薬品食品衛生研究所）

絵野沢 伸（国立成育医療センター）

荻原 琢男（高崎健康福祉大・薬）

## 安全性評価研究会 スフェロイド分科会 参加会員

旭化成ファーマ株式会社  
小平 輝朋

丸石製薬株式会社  
王鞍 孝子

日本ベクトン・ディッキンソン株式会社(実施時)  
和田 一輝

小野薬品工業株式会社  
片木 淳, 松本 範人

株式会社三和化学研究所  
岩井 久和, 井上 由紀子, 高橋 直希

日本チャールス・リバー株式会社  
内藤 一史

株式会社大塚製薬工場  
金田 信也, 吉岡 祐一郎

財団法人食品農医薬品安全性評価センター  
田中 翔

株式会社トランスパレント  
城村 友子, 小関 恵美子, 池谷 武志

エーザイ株式会社  
柿木 基治, 大辻 摩希子

株式会社イナリサーチ  
小枝 暁子

STEMバイオメソッド株式会社  
八尋 寛司, 田村 朋子

日本化薬株式会社  
長井 大地

株式会社住化分析センター  
長尾 卓也, 楠元 久美子

(順不同, 敬称略)

DSファーマバイオメディカル株式会社  
上田 忠佳

中外製薬株式会社  
太田 之弘

ご静聴ありがとうございました。



安全性評価研究会  
スフェロイド分科会