

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

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

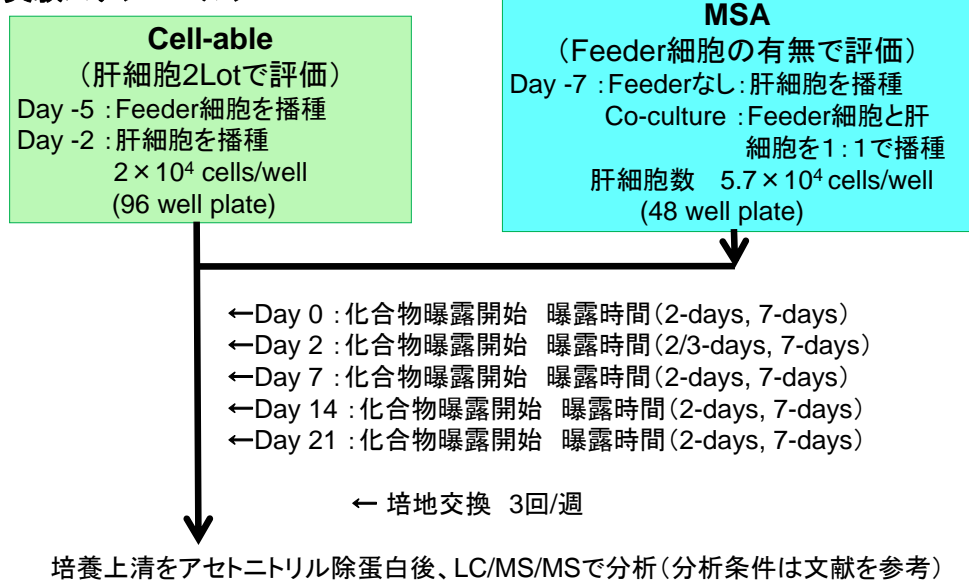
### <培養系>

- 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 × 10<sup>3</sup> 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

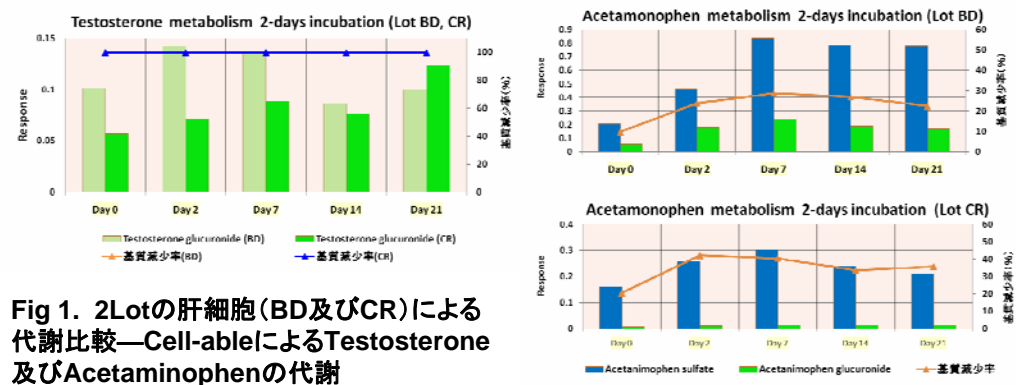


Fig 1. 2Lotの肝細胞 (BD及びCR) による代謝比較—Cell-ableによるTestosterone及びAcetaminophenの代謝

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。

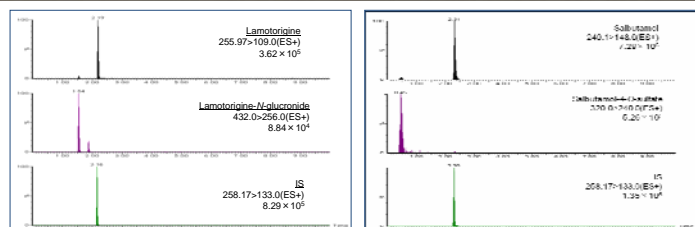


Fig 2. Lamotrigine (左) 及びSalbutamol (右) の代謝物のLC/MS/MS分析

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 (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	○	○				

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<sup>3)</sup>、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。

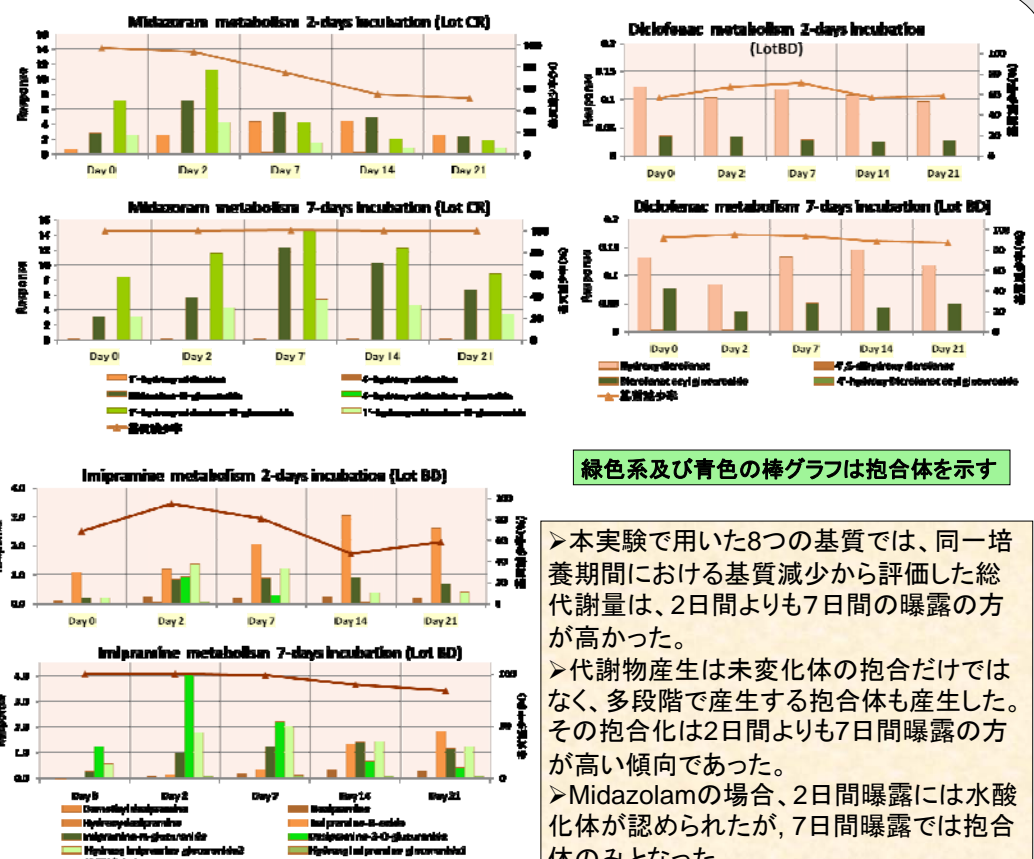


Fig 3. Midazolam, Diclofenac及びImipramineのCell-ableによる代謝物産生と基質減少率の推移

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.

○長井 大地<sup>1),14)</sup>, 大辻 摩希子<sup>2),14)</sup>, 柿木 基治<sup>2),14)</sup>, 片木 淳<sup>3),14)</sup>, 松本 範人<sup>3),14)</sup>, 金田 信也<sup>4),14)</sup>, 吉岡 祐一郎<sup>4),14)</sup>, 井上 由紀子<sup>5),14)</sup>, 岩井 久和<sup>5),14)</sup>, 長尾 卓也<sup>6),14)</sup>, 池谷 武志<sup>7),14)</sup>, 小関 恵美子<sup>7),14)</sup>, 城村 友子<sup>7),14)</sup>, 田中 翔<sup>8),14)</sup>, 八尋 寛司<sup>9),14)</sup>, 田村 朋子<sup>9),14)</sup>, 上田 忠佳<sup>10),14)</sup>, 内藤 一史<sup>11),14)</sup>, 和田 一輝<sup>12),14)</sup>, 王鞍 孝子<sup>13),14)</sup>

<sup>1)</sup> 日本化薬株式会社, <sup>2)</sup> エーザイ株式会社, <sup>3)</sup> 小野薬品工業株式会社, <sup>4)</sup> 株式会社大塚製薬工場, <sup>5)</sup> 株式会社三和化学研究所, <sup>6)</sup> 株式会社住化分析センター, <sup>7)</sup> 株式会社トランスパレント, <sup>8)</sup> 財団法人 食品農医薬品安全性評価センター, <sup>9)</sup> STEMバイオメッド株式会社, <sup>10)</sup> DSファーマバイオメディカル株式会社, <sup>11)</sup> 日本チャールス・リバー株式会社, <sup>12)</sup> 日本ベクソン・ディッキンソン株式会社, <sup>13)</sup> 丸石製薬株式会社, <sup>14)</sup> 安全性評価研究会 スフェロイド分科会



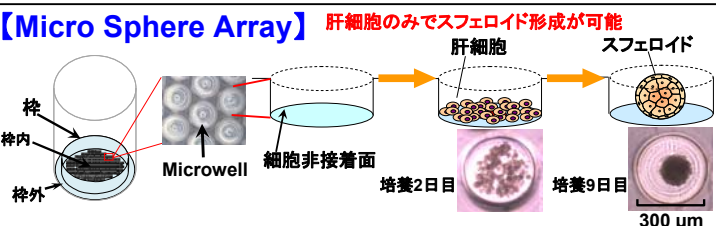
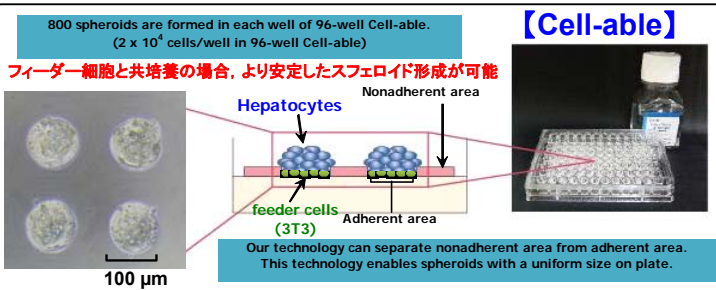
## Introduction

初代培養肝細胞は肝毒性評価に有用な系であるが、従来の単層培養法では、肝臓の有する代謝機能などの長期維持が困難であり、毒性検出のために高濃度の化合物曝露が必要、あるいは、代謝活性化による毒性検出が不十分、など必ずしも生体の反応を反映できていない問題点もあった。

そこで、より生体に近い3次元構造によって種々の肝機能を維持した状態で長期間の培養が可能とされるスフェロイド培養を用いて、ヒト肝細胞に対する長期曝露での化合物の毒性評価を実施し、肝毒性評価におけるスフェロイド培養系の有用性を検討した。

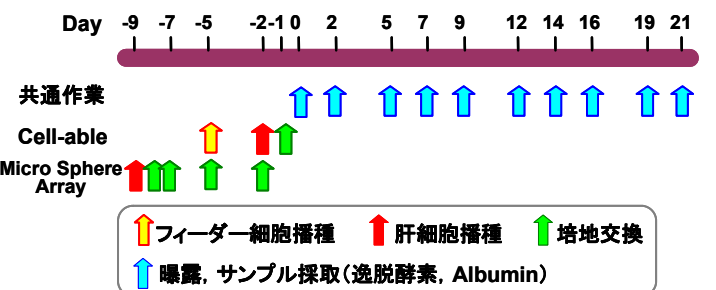
## Methods (culture condition)

	Cell-able™ (96 well) (株)トランスパレント	Micro Sphere Array (in 48 well) STEMバイオメッド(株)
凍結ヒト肝細胞	Lot No.: 228 (日本ベクソン・ディッキンソン(株)) Lot No.: Hu8110 (日本チャールス・リバー(株))	
播種細胞数	2x10 <sup>4</sup> cells/well	5.7x10 <sup>4</sup> cells/well
フィーダー細胞	3T3-Swiss albino (JCRB9019) 8x10 <sup>3</sup> cells/well	-
培地	1%FBS含有RM-101培地	10%FBS, ITS Dex, EGF 添加Williams E培地
培地量	100 μL	400 μL
曝露条件	薬剤含有培地を週3回、3週間曝露	
測定項目	AST, ALT, LDH, γ-GTP, Albumin	



## Methods (compounds & schedule)

Compounds	Dose(μM)	臨床Cmax(μM)
Diclofenac	3-300	1.3
Flutamide	1-100	0.05
Benzbromarone	20-1620	5.42
Chlorpromazine	0.3-30	0.03
Troglitazone	1-100	1.13
Tacrine	3-300	0.14



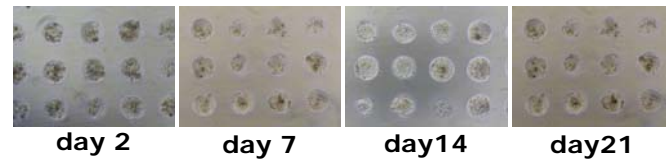
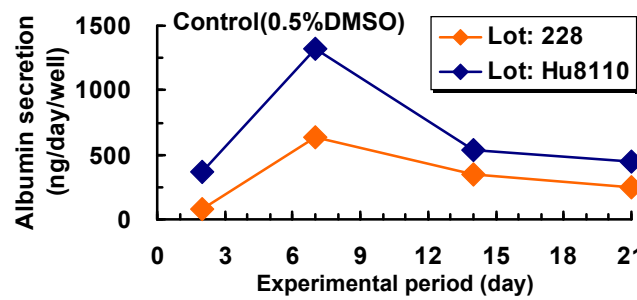
## Conclusions

- スフェロイド培養法は従来の単層培養法に比べて長期間の細胞形態の維持及びAlbumin産生や代謝活性を指標とした肝機能の維持が可能であった。
- 化合物曝露による毒性発現の概略の変化として、高濃度では曝露初期にASTの上昇が、低用量域では曝露期間に応じてASTの上昇あるいはAlbumin分泌量の低下が見られ、単層培養系の短期・高濃度曝露では検出できない反復曝露による肝細胞障害の検出が可能であると考えられた。
- 本培養系は長期服用下で発現する肝障害の評価や肝毒性発現機序解析に有用であると考えられた。

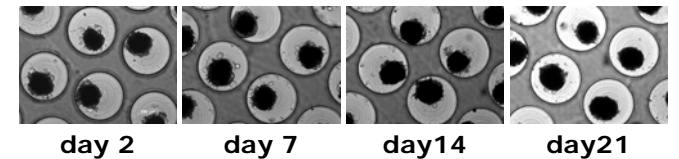
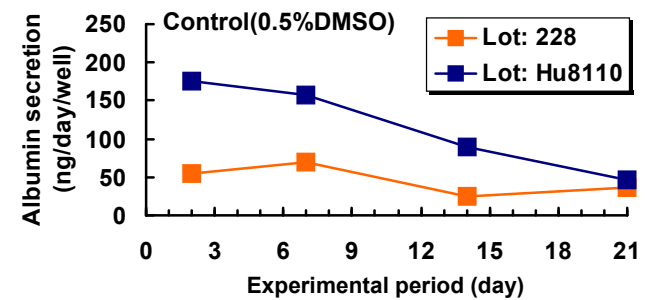
## Results

### 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】

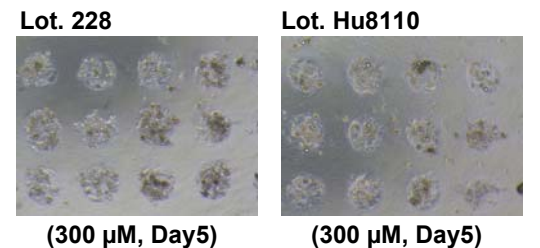
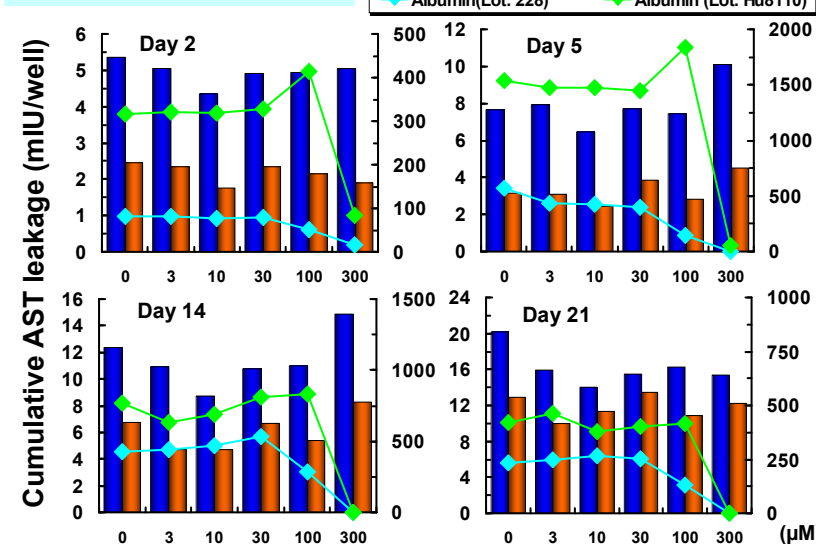


#### 【Micro Sphere Array (MSA)】



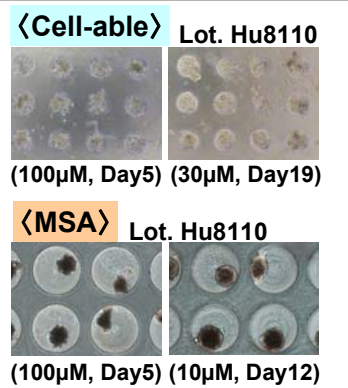
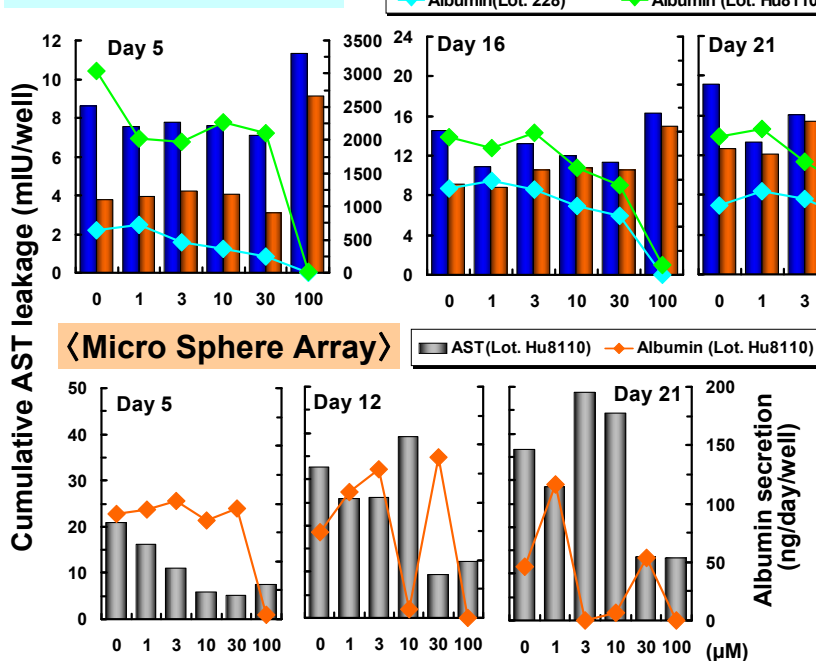
- 両培養系ともスフェロイド形成後、約1ヶ月の培養が可能であり、培養期間中のスフェロイド形態は安定して維持されていた。
- 肝特異機能の一つであるAlbumin産生は、肝細胞ロット間差あるいは培養日数毎の増減はあるものの、培養期間を通じて維持されていることが確認された。
- 薬物代謝活性(基質減少率, I・II相系代謝物生成)は、ほぼ21日間維持していることが確認された(ポスターP-144参照)。

### Diclofenac (Cell-able)

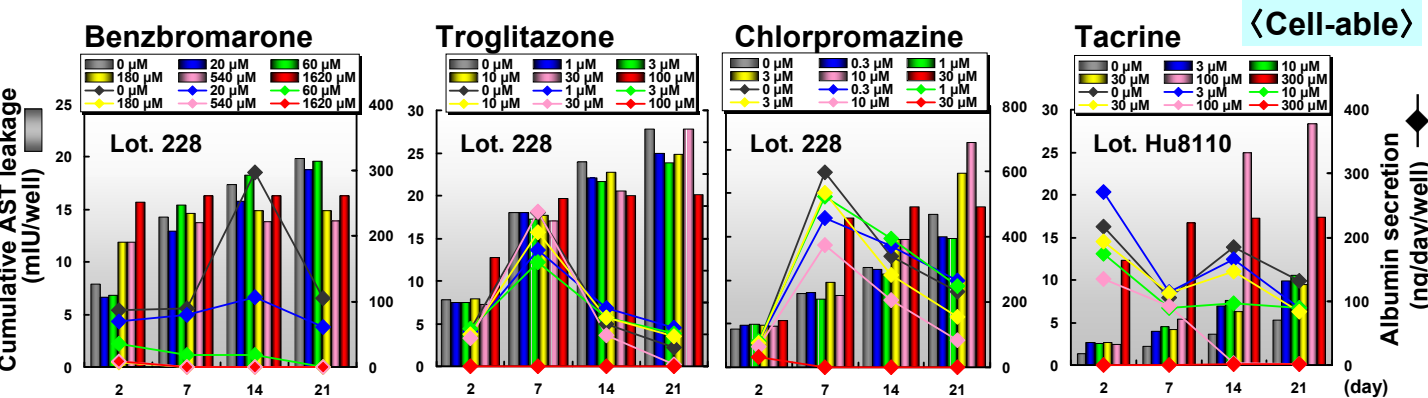


- Diclofenac曝露において、AST逸脱量の増加及び形態的变化がDay5以降で認められ、Albumin分泌量の低下はASTの変化に先行して、かつ低用量から認められた。
- 両肝細胞ロットでの変化は、ほぼ同様であったが、Albumin分泌量ではロット228でより低用量から低下を示し、高感受性傾向であった。

### Flutamide (Cell-able)



- Flutamide曝露において、AST逸脱量の増加がCell-ableでDay5以降、MSAでDay12以降に認められた。なお、MSAでは高用量で低値傾向、中・低用量で逸脱量の増加傾向が認められた。
- Albumin量は両培養系共に曝露期間に応じておおよそ用量に依存した低下を示した。
- Albumin生成能はAST逸脱量の変化が見られない用量から低下を示し、肝機能評価の鋭敏な指標として有用であると考えられた。



## Acknowledgments

本発表にあたり、ご助言・ご指導を頂い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。

# 肝毒性評価におけるヒト肝細胞スフェロイド培養法の有用性検討(2)

○岩井 久和<sup>1)</sup> 14), 井上 由紀子<sup>1)</sup> 14), 柿木 基治<sup>2)</sup> 14), 大辻 摩希子<sup>2)</sup> 14), 田中 翔<sup>3)</sup> 14), 長井 大地<sup>4)</sup> 14), 上田 忠佳<sup>5)</sup> 14), 八尋 寛司<sup>6)</sup> 14), 田村 朋子<sup>6)</sup> 14), 池谷 武志<sup>7)</sup> 14), 城村 友子<sup>7)</sup> 14), 小関 恵美子<sup>7)</sup> 14), 太田 之弘<sup>8)</sup> 14), 金田 信也<sup>9)</sup> 14), 吉岡 祐一郎<sup>9)</sup> 14), 松本 範人<sup>10)</sup> 14), 片木 淳<sup>10)</sup> 14), 楠元 久美子<sup>11)</sup> 14), 内藤 一史<sup>12)</sup> 14), 王鞍 孝子<sup>13)</sup> 14)  
<sup>1)</sup>株式会社三和化学研究所, <sup>2)</sup> エーザイ株式会社, <sup>3)</sup> 財団法人食品農医薬品安全性評価センター, <sup>4)</sup> 日本化薬株式会社, <sup>5)</sup> DSファーマバイオメディカル株式会社, <sup>6)</sup> STEMバイオメッド株式会社, <sup>7)</sup> 株式会社トランスパレント, <sup>8)</sup> 中外製薬株式会社, <sup>9)</sup> 株式会社大塚製薬工場, <sup>10)</sup> 小野薬品工業株式会社, <sup>11)</sup> 株式会社住化分析センター, <sup>12)</sup> 日本チャールス・リバー株式会社, <sup>13)</sup> 丸石製薬株式会社, <sup>14)</sup> 安全性評価研究会 スフェロイド分科会



# P-160

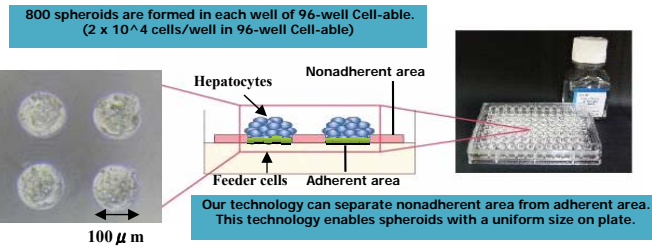
## Introduction

肝臓は化合物などの生体異物に対し高い曝露を受けることから毒性が発現しやすい臓器である。そのため医薬品等の開発では、生体により近い状態での代謝能を維持した肝細胞を用いた種々の毒性評価が各施設にて試みられている。我々安全性評価研究会スフェロイド分科会では、ヒト肝細胞による長期培養が可能とされ、より生体に近いと考えられている3次元 *in vitro* 評価系であるスフェロイド培養を用いて、化合物の長期曝露による毒性評価を複数施設にて実施し、その有用性を検討した。

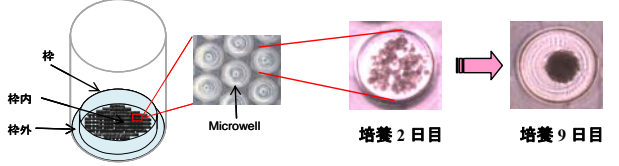
## Methods (culture condition)

	Cell-able™ (96wellプレート) トランスパレント	Micro Sphere Array (48wellプレート) STEMバイオメッド
ヒト凍結肝細胞	Lot No. 228 (日本ベクトン・ディッキンソン) or Lot No. Hu8110 (日本チャールス・リバー)	
フィーダー細胞	3T3-Swiss albino JCRB9019 8x10 <sup>3</sup> cells/well	—
培地	1% FBS含有RM-101培地	10%FBS, ITS Dex, EGF添加Williams E培地
培地量	100μL/well	400μL/well
培養条件	各培地に溶解した薬液を週3回, 3週間曝露, 95%空気, 5%CO <sub>2</sub> , 37°C, インキュベータ	
測定項目	AST, ALT, LDH, γ-GTP, Albumin	

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

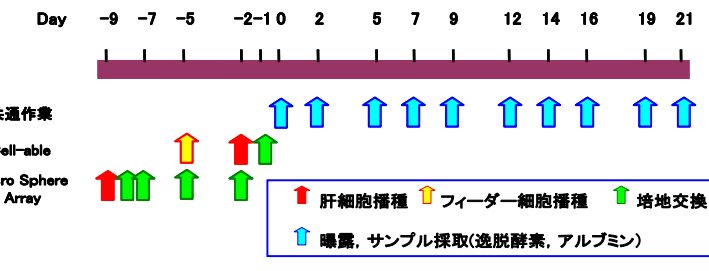


Micro Sphere Array 肝細胞のみでスフェロイドを形成することが可能



## Methods (Test article & schedule)

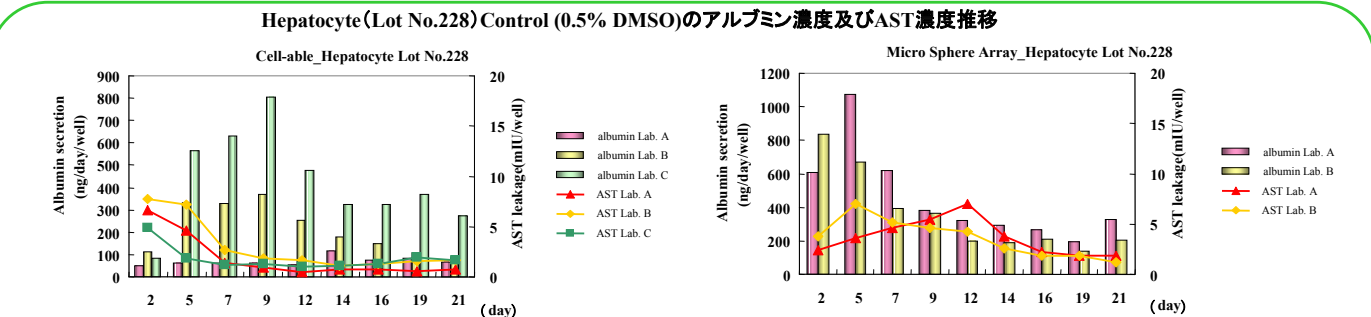
Test article	Dose (Concentration)
Acetaminophen	250, 500, 1000, 2000, 4000μM
Amiodarone	20, 60, 180, 540, 1620μM
Imipramine	3, 10, 30, 50, 100μM
Ticlopidine	1, 3, 10, 30, 100μM
Isoniazid	10, 30, 100, 300, 1000μM
Cyclosporin A	1, 3, 10, 30, 100μM



## Conclusions

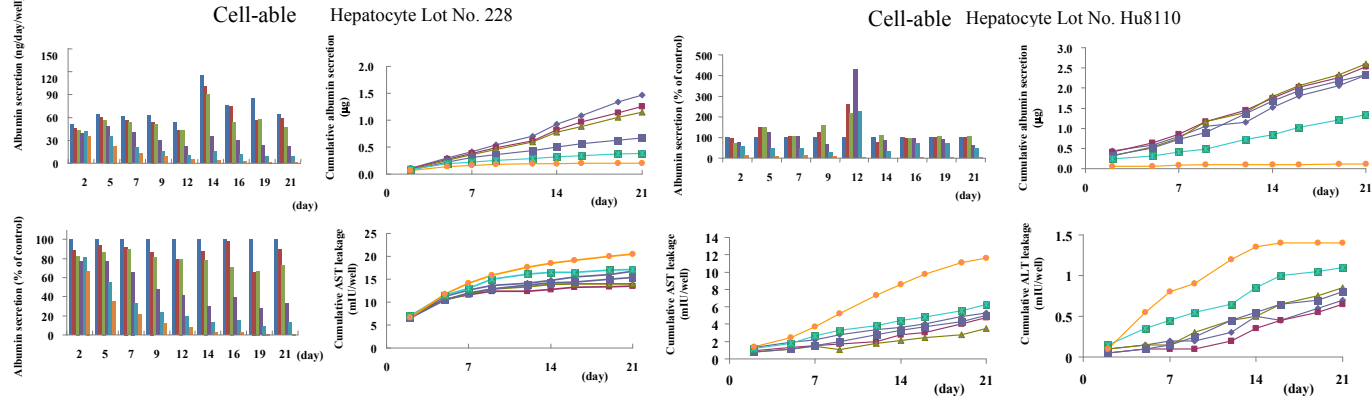
- スフェロイド培養は、これまでの培養法に比べより長期間の培養が可能である事が各施設にて実施したアルブミン産生量の結果から確認された。
- 化合物の長期間曝露により、比較的低用量でも肝細胞に対して化合物の毒性を検出する事ができた。
- 評価した逸脱酵素の中ではどの化合物ともASTの上昇が認められた。ALTやLDHは化合物により反応性が異なり、共通の指標とはならなかった。γ-GTPに関しては予備検討では相関する傾向がみられたが、今回実験した化合物では毒性を捉える指標として適当ではなかった。
- 共同研究のP-144の結果からもスフェロイド培養では種々の代謝物が確認されており、本評価系は代謝物を含めた化合物の肝臓に対する毒性評価が可能であると考えられた。

## Results



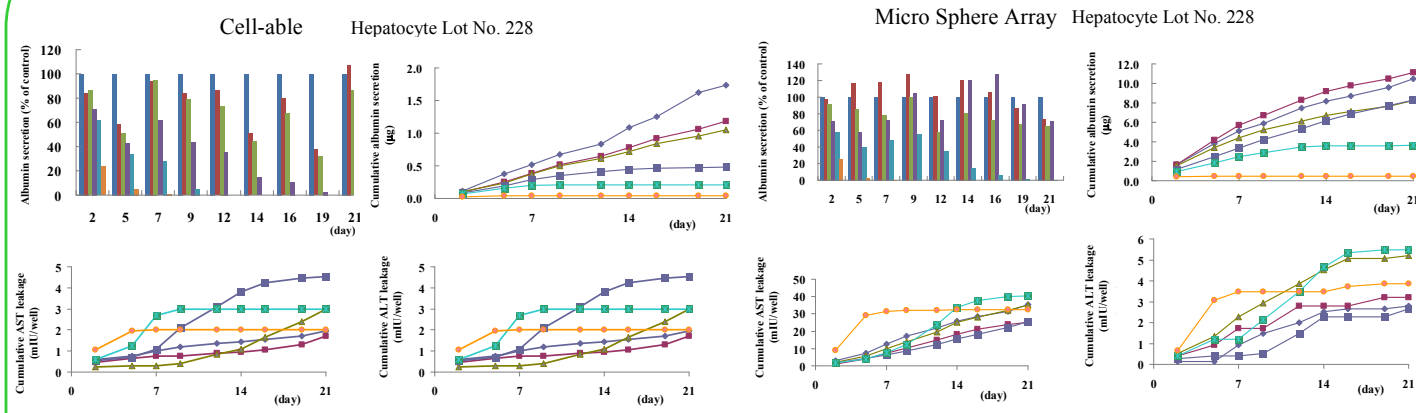
- ◆施設間差はあるものの、曝露開始21日までアルブミンの産生能が維持された。14日目頃を境にアルブミン産生能が低下する場合も見られたが、その後はその濃度レベルを維持した。
- ◆ASTは曝露期間を通じ、大きな変動はみられなかった(Cell-ableでは曝露初期のスフェロイド形成が未熟であった可能性も考えられた)。

## Acetaminophen



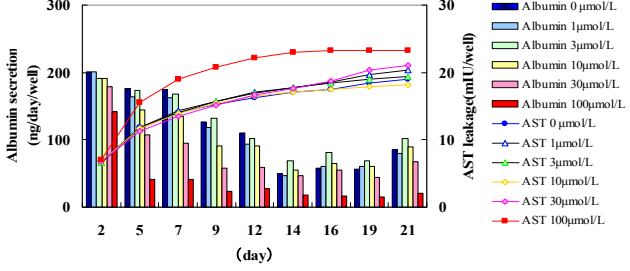
- ◆両ロットのスフェロイドとも高用量で早期からアルブミン産生量の低下がみられ、投与の延長により低用量でも同様の変化がみられた。
- ◆Lot No.228は最高用量でASTの増加がみられたが、その他の項目では明らかな逸脱酵素の増加はみられなかった。
- ◆Lot No.Hu8110ではAST以外にもALTやLDHの増加がみられ、その変化は用量依存的であった。
- ◆アルブミン産生能の変化は、肉眼的なスフェロイド形態変化とよく相関していた。

## Imipramine



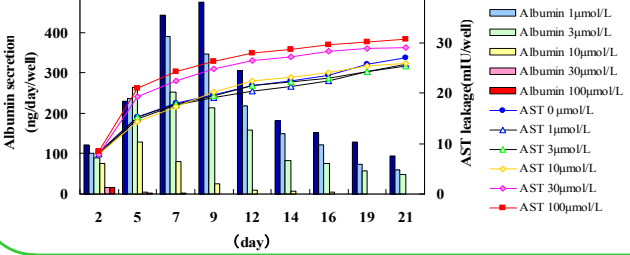
- ◆Cell-ableにおいて100μmol/Lでは曝露初期よりアルブミン産生能の低下がみられ、5日目にはほとんど産生能はみられなかった。
- ◆50μmol/Lでは100μmol/Lに遅れる形でアルブミン産生能, AST, ALTの上昇が見られた。
- ◆30μmol/Lではさらに細胞への影響が遅れる形で同様の変化が見られた。
- ◆これらの変化はMicro Sphere Arrayでの反応においても同様の変化推移を示した。

## Ticlopidine Cell-able Hepatocyte Lot No.228



- ◆Ticlopidine, Cyclosporin Aとも高用量では曝露初期にアルブミン産生量やASTの上昇といった肝細胞の障害が見られた。
- ◆肝細胞障害は、曝露期間の延長とともに低用量でも認められた。
- ◆いずれの化合物ともアルブミンの産生能の変化が顕著であり、それに相関するようにASTの上昇が見られた。
- ◆ALTやLDHについては、化合物によって上昇する場合とあまり変化が見られない場合があった(データ未掲載)。
- ◆Amiodarone 及びIsoniazidについては現在データ集計中である。

## Cyclosporin A Cell-able Hepatocyte Lot No.228



## Acknowledgments

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



## ヒト肝細胞スフェロイド培養法を用いた反応性代謝物アシルグルクロニドあるいはミトコンドリアDNAポリメラーゼγ阻害剤による肝障害の検出

○片木 淳<sup>1)14)</sup>, 松本 範人<sup>1)14)</sup>, 金田 信也<sup>2)14)</sup>, 吉岡 祐一郎<sup>2)14)</sup>, 長尾 卓也<sup>3)14)</sup>, 楠元 久美子<sup>3)14)</sup>, 柿木 基治<sup>4)14)</sup>, 大辻 摩希子<sup>4)14)</sup>, 城村 友子<sup>5)14)</sup>, 小関 恵美子<sup>5)14)</sup>, 池谷 武志<sup>5)14)</sup>, 長井 大地<sup>6)14)</sup>, 上田 忠佳<sup>7)14)</sup>, 八尋 寛司<sup>8)14)</sup>, 田村 朋子<sup>8)14)</sup>, 太田 之弘<sup>9)14)</sup>, 和田 一輝<sup>10)14)</sup>, 内藤 一史<sup>11)14)</sup>, 王 鞍 孝子<sup>12)14)</sup>, 岩井 久和<sup>13)14)</sup>

所属機関: <sup>1)</sup>小野薬品工業株式会社, <sup>2)</sup>株式会社大塚製薬工場, <sup>3)</sup>株式会社住化分析センター, <sup>4)</sup>エーザイ株式会社, <sup>5)</sup>株式会社トランスパレント, <sup>6)</sup>日本化薬株式会社, <sup>7)</sup>DSファーマバイオメディカル株式会社, <sup>8)</sup>STEMバイオメソッド株式会社, <sup>9)</sup>中外製薬株式会社, <sup>10)</sup>日本ベクトン・ディッキンソン株式会社, <sup>11)</sup>日本チャールス・リバー株式会社, <sup>12)</sup>丸石製薬株式会社, <sup>13)</sup>株式会社三和化学研究所, <sup>14)</sup>安全性評価研究会 スフェロイド分科会

### Introduction

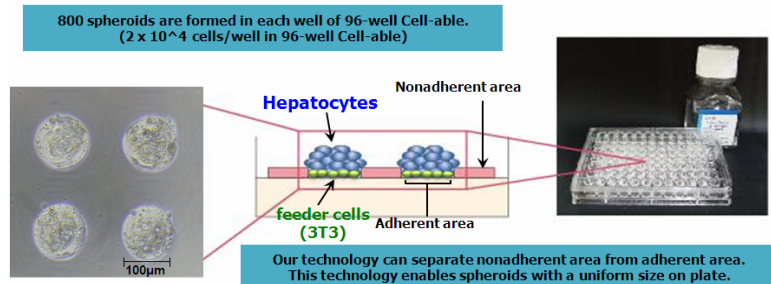
抗ウイルス剤として用いられるヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬は、ヒトミトコンドリアDNA合成酵素(DNA polymerase γ)も阻害し、長期投与によりミトコンドリア障害が原因で肝障害を引き起こすことが知られている。また、非ステロイド性抗炎症剤などカルボン酸を有する薬物がグルクロン酸抱合を受けて生成する反応性代謝物アシルグルクロニドは、肝臓組織蛋白等に共有結合し、肝障害を誘発することが推定されている。これらは薬剤性肝障害により市場から撤退している(Fialuridine, Ibufenac, Fenclofenac, etc.)。これらの薬剤性肝障害は動物実験や培養肝細胞等を用いたin vitro試験では、その毒作用は殆ど検出されないのが実情である。

近年開発されたヒト肝細胞スフェロイド培養により、代謝機能を維持し長期間の肝細胞の培養が可能となってきた。本研究では、DNA polymerase γ阻害作用や反応性代謝物アシルグルクロニドに基づく肝障害を検出することを試みた。

### Methods

#### 培養方法

- ・凍結ヒト肝細胞(日本チャールス・リバー (lot Hu8110), ベクトン・ディッキンソン (lot 228),  $2 \times 10^4$  cells/well)
- ・フィーダー細胞: マウス線維芽細胞3T3-Swiss albino ( $8 \times 10^3$  cells/well)
- ・培養プレート: Cell-able™ 96well plate (トランスパレント)
- ・培地: RM101 (トランスパレント)



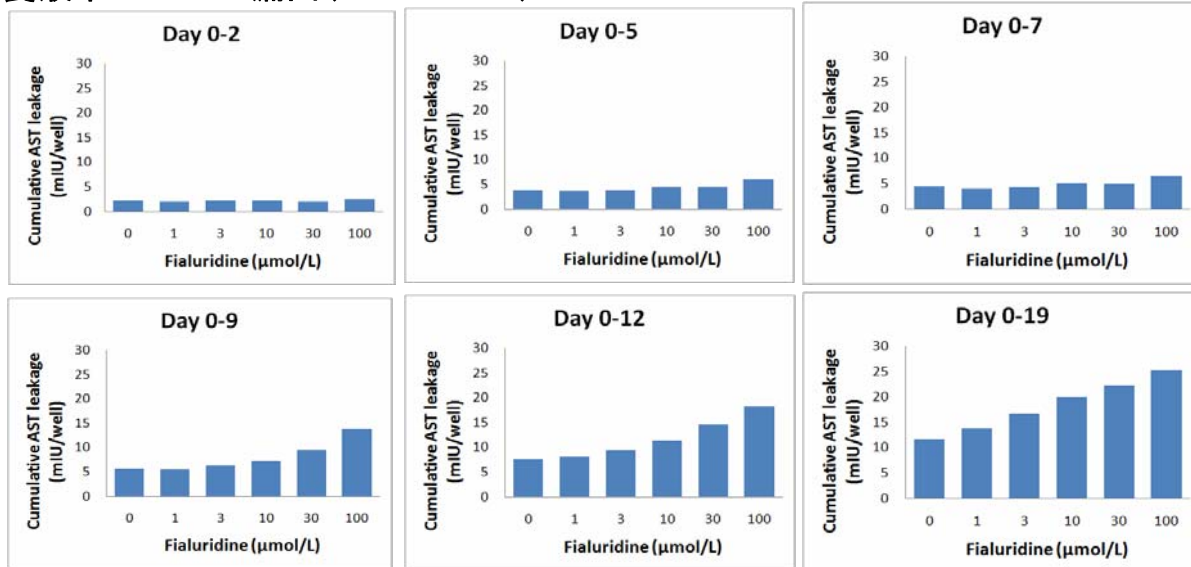
- ← Day -5 : フィーダー細胞を播種
- ← Day -2 : ヒト肝細胞を播種
- ← Day 0 : 化合物曝露開始
- ← Day 2,5,7,9,12,14,16,19 :  
培地交換(化合物を含む)  
培地中AST量の測定(日立自動分析装置7080)  
写真撮影(OLYMPUS IX70/DP12)

化合物 (μmol/L)	臨床Cmax (μmol/L)	毒性メカニズム
Fialuridine (1-100)	1.0	DNA polymerase γ 阻害作用 (長期に投与するとミトコンドリア障害が原因で肝障害を引き起こす)
Ibufenac (30-3000)	-	反応性代謝物アシルグルクロニドを生成(肝臓組織蛋白等に共有結合することにより肝障害を誘発することが推定される)
Fenclofenac (30-3000)	340	

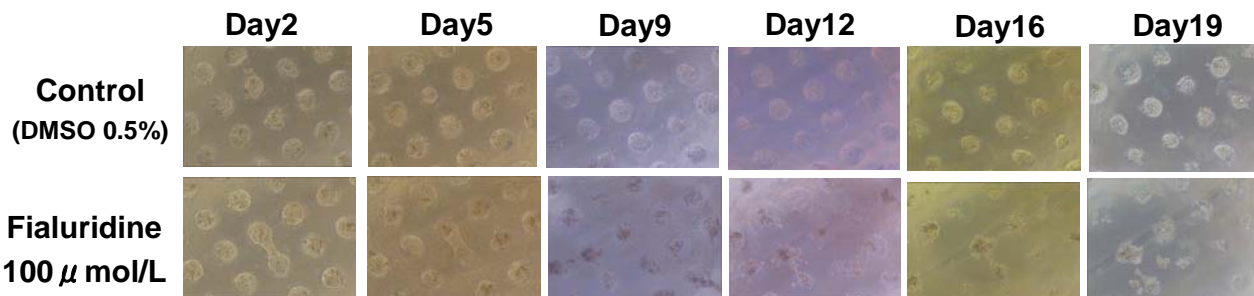
### Results

#### Fialuridine

##### 培養液中のASTの漏出 (lot Hu8110)

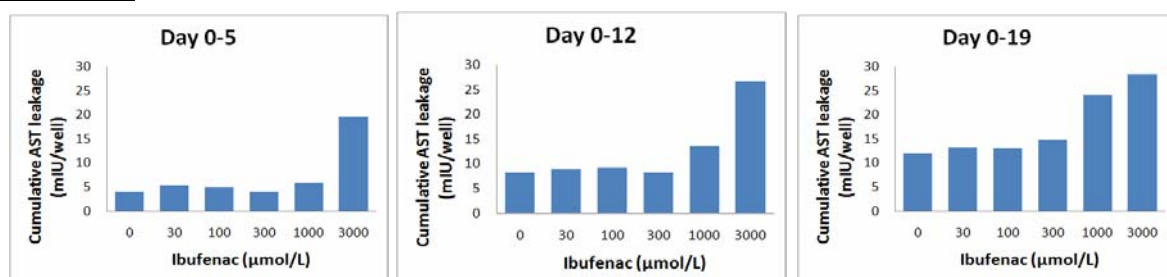


##### ヒト肝細胞スフェロイドの形態変化 (lot Hu8110)

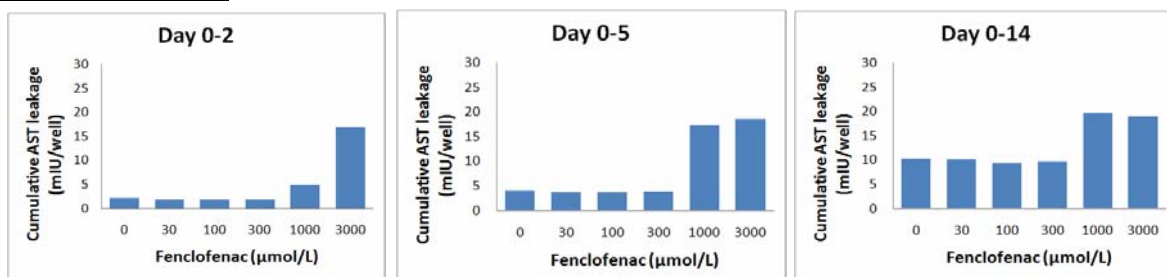


Day7までFialuridineによる変化は認められなかったが、Day9以降、AST量増加および形態変化が、Fialuridineの臨床Cmax 1 μmol/Lより濃度に応じて認められた。なお、lot 228も同様の結果であった。

#### Ibufenac



#### Fenclofenac



### Conclusions

DNA polymerase γ 阻害作用を示すFialuridineは、Day7まで変化が認められなかったが、Day9以降、臨床Cmaxより濃度に応じたAST量増加および形態変化が認められた。長期間の培養可能なヒト肝細胞スフェロイドを用いることにより、長期間の化合物曝露によって初めて肝毒性が発生する薬物の毒性検出が可能であり、有用な評価系と考えられた。

### Acknowledgments

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