

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790453
 研究課題名（和文） 培養ヒト肝細胞を用いた乱用薬物代謝モデルの構築
 研究課題名（英文） Establishment of a model system for drug metabolism study by human hepatocyte culture
 研究代表者
 金森 達之（KANAMORI TATSUYUKI）
 科学警察研究所・法科学第三部・主任研究官
 研究者番号：40356192

研究成果の概要：市販のラットおよびヒトの三次元培養肝細胞を用いて、新規乱用薬物 3 種の代謝を調べた。その結果、三次元肝細胞と培養することにより、それぞれの薬物の *in vivo* における主代謝物が生成し、また、代謝物によっては、第 II 相反応も進行することが確認された。さらに、薬物によっては、ヒトとラットの代謝パターンの種差が再現され、三次元培養肝細胞の乱用薬物代謝モデルとしての有用性が確認された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	500,000	0	500,000
2008年度	800,000	0	800,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,300,000	0	1,300,000

研究分野：法医学

科研費の分科・細目：裁判化学

キーワード：肝細胞、三次元培養、乱用薬物、代謝、LC/MS/MS

1. 研究開始当初の背景

薬物の乱用は、我が国において依然として重大な社会問題となっている。さらに最近では、覚せい剤、大麻などの古典的な薬物に加え、2,5-ジメトキシ-4-プロピルチオフェネチルアミン (2C-T-7) などのフェネチルアミン系薬物や、5-メトキシ-N,N-ジイソプロピルトリプタミン (5-MeO-DIPT) などのトリプタミン系薬物等の乱用が広まり、薬物問題は、とどまることのない深刻な状況となっている。

薬物事犯における押収薬物そのものの分析については、ガスクロマトグラフィー質量

分析 (GC/MS) 等により、比較的容易に行うことが可能である。一方、薬物の摂取を証明するため、生体試料、例えば尿中の薬物を分析する場合、どのような代謝物がどの程度排泄されるかという、薬物動態に関する情報が必須であるとともに、微量の代謝物を検出するための高感度分析法を確立しておく必要がある。しかしながら、新規乱用薬物については、その代謝様式は全く明らかになっていない場合がほとんどである。そこで新規乱用薬物のヒトにおける代謝様式を明らかにする必要があるが、乱用薬物をヒトに投与し、その代謝について調べることは、倫理上の問

題から困難であり、また、動物実験では種差の問題がある。

一方、薬物代謝の大部分を担う肝臓から単離した新鮮な肝細胞は、薬物代謝能を維持していることが知られており、肝細胞を用いた *in vitro* 代謝実験は、*in vivo* での代謝を予測する有用なツールとなることが期待される。生体から分離した肝細胞による薬物代謝については、特に新規医薬品候補化合物の代謝を予測する目的で以前から注目されており、これまでに多くの報告がある。それらは、コラゲナーゼ灌流法により肝臓から肝実質細胞を分離し、薬物存在下、浮遊状態で培養するか、もしくはシャーレ上で単層培養し、生成される代謝物の確認を行ったものが多い。その結果、薬物によっては *in vivo* に比較的類似した代謝パターンが得られているが、*in vivo* の代謝パターンを再現できない場合も多い。その理由として、生体中の肝臓では、大部分を占める実質細胞の他、クッパー細胞、胆管上皮細胞、繊維芽細胞などの種々の細胞が合わさって組織を形成して相互に作用しており、さらに、豊富な血流により十分な酸素がそれぞれの細胞に供給されているのに対し、実質細胞のみを単離して培養する場合は、そのような細胞間相互作用もなくなり、さらに、細胞への酸素供給量も低下し、肝細胞が本来有している薬物代謝能を十分に果たせなくなるためではないかと考えられる。

近年、生体外において肝細胞本来の機能を発揮させるための培養法の研究が多くなされている。一つは、肝細胞を三次元的に培養し、擬似的な組織を作らせることにより、肝細胞本来の機能を引き出そうとするものである。これを薬物代謝研究に応用することにより、浮遊培養あるいは単層培養では *in vivo* 代謝パターンの再現が困難であった薬物についても、より *in vivo* 代謝パターンに近づけることができ、乱用薬物のヒトでの代謝をより正確に予測することが可能となるものと期待される。

2. 研究の目的

本研究は、新規乱用薬物のヒトでの代謝を、簡便かつ正確に予測可能な実験系を構築することを目的とする。これにより、新規乱用薬物の尿中代謝物分析法をあらかじめ構築しておくことが可能となり、薬物摂取証明をよりの確に行うことができるようになるものと期待される。

3. 研究の方法

(1) 研究方法の概要

本研究では、比較的新しい乱用薬物である 4-ブロモ-2,5-ジメトキシフェネチルアミン (2C-B)、2C-T-7 および 5-MeO-DIPT の 3 種類の薬物をモデル薬物とし (図 1)、それ

ぞれの薬物について TESTLIVER™ (東洋紡) による代謝実験を行い、培養液中の代謝物生成パターンを *in vivo* 代謝データと比較し、その乱用薬物代謝モデルとしての有用性について検証した。

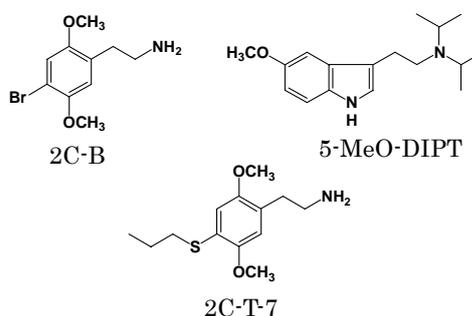


図 1 本研究の対象とした薬物

TESTLIVER™は、中空糸に肝細胞を充填し、三次元培養を行うもので、肝細胞が擬似的な組織を形成した状態となり、本来有する肝細胞の機能が 1 ヶ月以上の長期間にわたり維持される。また、TESTLIVER™は、パッケージから細胞の充填された中空糸を取り出し、薬物を含む培地を加え、CO₂インキュベーター中で振とう培養するのみという、非常に簡便な操作で代謝実験を行うことができる。

なお、TESTLIVER™には、ラット肝細胞を用いた TESTLIVER™-rat と、ヒト肝細胞を用いた TESTLIVER™-human があるが、まずは TESTLIVER™-rat による各薬物の代謝実験を行い、代謝データをラット *in vivo* 代謝データと比較し、三次元培養の効果・有用性について検証した。次いで、TESTLIVER™-human による代謝実験を行い、各薬物のヒトでの代謝を予測した。

(2) TESTLIVER™-rat による薬物代謝実験

12 ウェルプレートの各ウェルに専用培地 1 ml をそれぞれ分注し、TESTLIVER™-rat を各ウェルに 1 バンドルずつ入れ、37°C の CO₂インキュベーターにて 24 時間培養した。各ウェルから培地を吸引除去したのち、2C-B、2C-T-7 あるいは 5-MeO-DIPT を 10 μM の濃度で含有する専用培地 1 ml を加え (各薬物について 4 ウェルずつ使用)、37°C の CO₂インキュベーターにて培養した。培養開始から 24 時間後に各ウェルより 0.25 ml の培地をサンプリングし、48 時間後に残りの培地全量をサンプリングした。サンプリングした培地は、-30°C のフリーザーにて分析まで保存した。

(3) TESTLIVER™-human による薬物代謝実験

TESTLIVER™-rat の場合と同様に、TESTLIVER™-human による上記 3 薬物の代謝実験を行った。

(4) 代謝物の抽出

サンプリングした培養液 50 μ l に、 β -グルクロニダーゼ/アрилスルファターゼを含有する 0.2M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 50 μ l を加え、60°C で 1.5 時間加温し、加水分解処理を行った。これに、0.5M ホウ酸緩衝液 (pH 9.0) 0.5 ml および内部標準としてジフェンヒドラミン溶液 (ジフェンヒドラミン 20 ng 含有) を添加し、コンディショニング済みの Oasis HLB カートリッジ (1 cc/10 mg, Waters) にロードした。5%メタノール 1 ml にて洗浄後、1%ギ酸含有メタノール 1 ml にて溶出し、溶出液を窒素気流下にて乾固したのち、液体クロマトグラフィー (LC) の初期移動相 200 μ l に再溶解した。これを、0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過したものを分析用試料とした。

なお、代謝物が抱合を受けているかを検証するため、加水分解処理を省略した試料についても分析を行った。

(5) 代謝物の定量分析

分析用試料について、以下の条件にて液体クロマトグラフィー質量分析/質量分析 (LC/MS/MS) を行った。さらに、各代謝物の標準品を培地に添加した試料 (濃度範囲 0.01~3 μ g/ml、5 点) についても、同様に抽出・分析して検量線を作成し、定量を行った。

なお、本研究で分析対象とした代謝物の構造を図 2~4 に、LC/MS/MS におけるモニターイオンを表 1 に示す。

<測定条件>

装置: Acquity UPLC (Waters)

Quattro Premier XE (Micromass)

カラム: Acquity UPLC BEH C18 (Waters)
(2.1 \times 50 mm, 1.7 μ m)

流速: 0.2 ml/min

移動相: A, 20 mM CH₃COONH₄ (pH 5.0)

B, MeOH

B 濃度 5%-15 min-50%-5 min-50%
-2 min-5%-8 min-5%

イオン化法: ESI (+)

測定モード: Selected Reaction Monitoring (SRM)

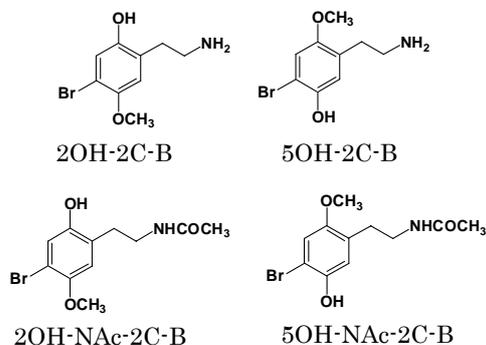


図 2 分析対象とした 2C-B 代謝物の構造

なお、上記分析条件では、2OH-2C-B と 5OH-2C-B を分離できないので、以下、これらを合わせて OH-2C-B とした。

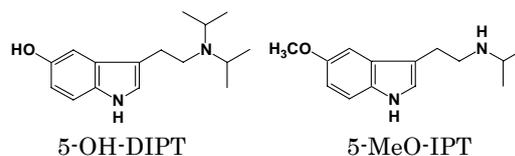


図 3 分析対象とした 5-MeO-DIPT 代謝物の構造

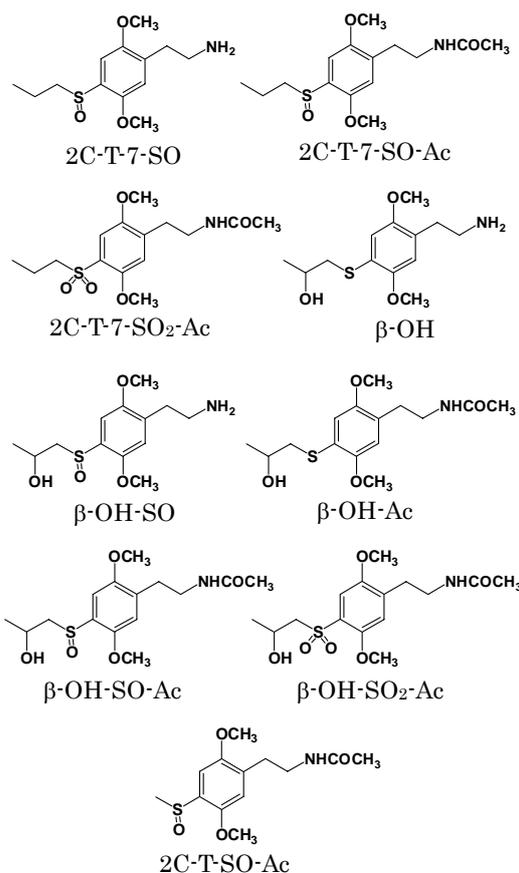


図 4 分析対象とした 2C-T-7 代謝物の構造

表 1 分析対象化合物のモニターイオン

Compound	Ions monitored by LC/MS/MS
2C-B	260 \rightarrow 243
OH-2C-B	246 \rightarrow 229
2OH-NAc-2C-B	288 \rightarrow 229
5OH-NAc-2C-B	288 \rightarrow 229
5-MeO-DIPT	275 \rightarrow 114
5-OH-DIPT	261 \rightarrow 114
5-OH-IPT	233 \rightarrow 174
2C-T-7	256 \rightarrow 239
2C-T-7-SO	272 \rightarrow 213

2C-T-7-SO-Ac	314 → 272
2C-T-7-SO ₂ -Ac	330 → 288
β-OH	272 → 255
β-OH-SO	288 → 199
β-OH-Ac	296 → 195
β-OH-SO-Ac	330 → 211
β-OH-SO ₂ -Ac	346 → 223
2C-T-SO-Ac	286 → 244
diphenhydramine (IS)	256 → 167

4. 研究成果

(1) 代謝物の抽出・分析法の検討

本研究では、3種の薬物とそれらの代謝物計17種の化合物を分析対象とした。培養液中のこれらの化合物を効率よく、一斉に抽出するため、Oasis HLB 固相抽出カートリッジを用いた抽出法について検討を行った。その結果、溶出液として1%ギ酸含有メタノールを用いることにより、全ての化合物を90%以上回収することが可能であった。

得られた抽出物の分析は、LC/MS/MSのSRMモードにより行った。SRMモードは、生体資料抽出物等の、夾雑物を多く含む試料中の微量成分を高精度に定量するのに適した手法である。LCのカラムには、ODSタイプのカラムを用い、酢酸アンモニウムメタノール系の移動相によるグラジエント分析を行った。これにより、様々な極性の化合物を一斉に分析することが可能であった。

(2) TESTLIVER™-ratによる薬物代謝

TESTLIVER™-ratによる2C-B代謝物の生成量を表2に示す。2C-B未変化体は、培養開始から24時間後には10.2%、48時間後には1.6%にまで減少し、比較的速やかに代謝された。一方、代謝物としては、5OH-NAc-2C-Bが48時間後で添加量の16.9%、2OH-NAc-2C-Bが3.4%生成した。2C-Bをラットに経口投与した場合、5OH-NAc-2C-Bが最も多く排泄され、次いで2OH-NAc-2C-Bの排泄量が多いことが報告されており (T. Kanamori et al, *J Health Sci*, **49**, 166, 2003)、TESTLIVER™-ratによる代謝物生成パターンは、ラット尿中への代謝物排泄パターンに類似していた。

今回生成が認められた2C-B代謝物は、いずれも水酸基を有している。加水分解処理を省略した場合、これらの代謝物の定量値はいずれも大幅に減少したことから、これらの代謝物の大部分はグルクロン酸もしくは硫酸抱合を受けているものと考えられた。

表2 TESTLIVER™-ratによる2C-B代謝物の生成量

Compound	% of initial amount of 2C-B	
	24 h	48 h
2C-B	10.2±5.0	1.6±2.3

OH-2C-B	0.7±0.4	0.5±0.3
2OH-NAc-2C-B	3.8±1.3	3.4±0.8
5OH-NAc-2C-B	9.5±3.8	16.9±5.2

2ロットの各3バンドル計6サンプルについて定量

TESTLIVER™-ratによる5-MeO-DIPT代謝物の生成量を表3に示す。5-MeO-DIPT未変化体は、24時間後で38.9%、48時間後で24.0%まで減少し、2C-Bと比較すると代謝速度はやや遅いものの、48時間で多くの部分が代謝された。代謝物の生成量は、5-OH-IPTが最も多く、48時間後で添加量の7.1%であり、5-OH-DIPTは5.2%であった。5-MeO-DIPTをラットに経口投与した場合、代謝物として5-OH-DIPTが最も多く排泄され、次いで5-OH-IPTも比較的多く排泄されることが報告されており (T. Kanamori et al, *J Health Sci*, **52**, 425, 2006)、今回得られた代謝パターンとの間に差異が認められたものの、TESTLIVER™-ratにより、5-MeO-DIPTの尿中主代謝物2種がいずれも生成することが確認された。

一方、水酸基を有する5-OH-DIPTは、その大部分が抱合されていた。

表3 TESTLIVER™-ratによる5-MeO-DIPT代謝物の生成量

Compound	% of initial amount of 5-MeO-DIPT	
	24 h	48 h
5-MeO-DIPT	38.9±10.4	24.0±15.2
5-OH-DIPT	2.4±0.8	5.2±1.5
5-OH-IPT	4.8±0.5	7.1±1.7

2ロットの各3バンドル計6サンプルについて定量

TESTLIVER™-ratによる2C-T-7代謝物の生成量を表4に示す。2C-T-7未変化体は、24時間後に17.5%、48時間後に2.9%まで減少し、2C-Bの場合と同様に、比較的速やかに代謝された。一方、代謝物としては、2C-T-7-SO-Acが、48時間後で添加量の32.6%と最も多く生成し、次いで、β-OH-SO-Ac、β-OH-Ac、2C-T-7-SO₂-Ac、2C-T-SO-Ac、2C-T-7-SO、β-OH-SO₂-Acなどが比較的多く生成した。これらは、いずれも2C-T-7を経口投与したラット尿中への排泄が報告されており (T. Kanamori et al, *Xenobiotica*, **37**, 679, 2007)、TESTLIVER™-ratにより、2C-T-7の*in vivo*代謝が良好に再現されることが確認された。

なお、2C-T-7の各代謝物の定量値は、加水分解処理を省略した場合もほぼ同じであったことから、いずれも抱合されていないと考えられた。この結果は、ラット尿中代謝物の場合と同様であった。

表4 TESTLIVER™-ratによる2C-T-7代謝

物の生成量		
Compound	% of initial amount of 2C-T-7	
	24 h	48 h
2C-T-7	17.5±8.3	2.9±4.7
2C-T-7-SO	2.8±0.7	3.1±1.1
2C-T-7-SO-Ac	27.0±7.3	32.6±5.3
2C-T-7-SO ₂ -Ac	2.3±0.9	4.2±1.5
β-OH	2.0±0.4	2.3±1.0
β-OH-SO	ND	ND
β-OH-Ac	4.4±2.3	6.6±2.8
β-OH-SO-Ac	7.1±3.4	16.1±7.4
β-OH-SO ₂ -Ac	0.5±0.4	1.9±1.4
2C-T-SO-Ac	1.4±0.7	3.4±1.4

2 ロットの各 3 バンドル計 6 サンプルについて定量

(3) TESTLIVER™-human-による代謝

TESTLIVER™-human-による 2C-B 代謝物の生成量を表 5 に示す。2C-B 未変化体は、48 時間後には添加量の 0.7% まで減少し、速やかに代謝された。代謝物としては、OH-2C-B の生成が認められたが、その生成量は 24 時間後で 0.9%、48 時間後で 1.0% とわずかであった。ラットで比較的多く生成が認められた 5OH-NAc-2C-B および 2OH-NAc-2C-B については、TESTLIVER™-human- では全く生成が認められなかった。この結果から、2C-B の N-アセチル化活性については、ラットでは強く認められるのに対し、ヒトではほとんど認められず、ラットとヒトの間の種差が大きいものと考えられた。

2C-B のヒトにおける代謝については、いまだ報告がないが、本研究のデータから、O-脱メチル体 (OH-2C-B) の排泄が予想される。一方、ラットで多く排泄される O-脱メチル-N-アセチル体 (2OH-NAc-2C-B あるいは 5OH-NAc-2C-B) は、ヒトでは排泄されない可能性が高いと考えられる。

今回の TESTLIVER™-human- による 2C-B の代謝実験では、48 時間後において、未変化体の残存量と OH-2C-B の生成量を足しても添加量の 2% 程度であり、ほとんどは今回測定対象外とした化合物へと代謝されたものと考えられた。

表 5 TESTLIVER™-human-による 2C-B 代謝物の生成量

Compound	% of initial amount of 2C-B	
	24 h	48 h
2C-B	10.1±3.9	0.7±0.5
OH-2C-B	0.9±0.9	1.0±0.9
2OH-NAc-2C-B	ND	ND
5-OH-NAc-2C-B	ND	ND

2 ロットの各 3 バンドル計 6 サンプルについて定量

TESTLIVER™-human- による 5-MeO-DIPT 代謝物の生成量を表 6 に示す。5-MeO-DIPT 未変化体は、48 時間後において

も 75.9% 残存し、代謝は緩やかであった。生成した代謝物は、5-OH-DIPT が最も多く、次いで 5-OH-IPT の生成も認められ、この結果は、5-MeO-DIPT のヒト尿中への排泄パターン (T. Kamata et al, *Drug Metab Dispos*, **34**, 281, 2006) とよく類似していた。

また、5-OH-DIPT の定量値は、加水分解を省略することにより約 20% 減少し、一部が抱合されていることが示唆された。

表 6 TESTLIVER™-human-による 5-MeO-DIPT 代謝物の生成量

Compound	% of initial amount of 5-MeO-DIPT	
	24 h	48 h
5-MeO-DIPT	76.8±4.3	75.9±1.5
5-OH-DIPT	14.1±3.4	19.6±3.6
5-OH-IPT	0.8±0.4	1.8±1.3

2 ロットの各 3 バンドル計 6 サンプルについて定量

TESTLIVER™-human-による 2C-T-7 代謝物の生成量を表 7 に示す。2C-T-7 未変化体は、24 時間後に 19.6%、48 時間後に 5.5% まで減少し、ラットの場合と同様に、比較的速やかに代謝された。

代謝物の生成量は、β-OH が最も多く、48 時間後で添加量の 25.1% であり、次いで 2C-T-7-SO が同じく 22.3% と多く生成し、TESTLIVER™-rat- の場合と代謝パターンが大きく異なっていた。2C-B の場合と同様、TESTLIVER™-rat- で生成が認められた N-アセチル化代謝物 (2C-T-7-SO-Ac、2C-T-7-SO₂-Ac、β-OH-Ac、β-OH-SO-Ac、β-OH-SO₂-Ac および 2C-T-SO-Ac) は、TESTLIVER™-human- ではほとんど生成せず、この反応におけるラットとヒトの種差を反映しているものと考えられた。

2C-T-7 のヒトにおける代謝はいまだ明らかとなっていないが、本研究の結果から、2C-T-7-SO あるいは β-OH が代謝物として排泄される可能性が高いものと考えられる。

表 7 TESTLIVER™-human-による 2C-T-7 代謝物の生成量

Compound	% of initial amount of 2C-T-7	
	24 h	48 h
2C-T-7	19.6±13.0	5.5±6.3
2C-T-7-SO	17.1±6.5	22.3±8.0
2C-T-7-SO-Ac	0.3±0.5	1.3±1.1
2C-T-7-SO ₂ -Ac	ND	ND
β-OH	21.5±8.6	25.1±8.6
β-OH-SO	0.2±0.2	0.5±0.4
β-OH-Ac	0.1±0.2	0.3±0.4
β-OH-SO-Ac	ND	ND
β-OH-SO ₂ -Ac	ND	ND
2C-T-SO-Ac	ND	ND

2 ロットの各 3 バンドル計 6 サンプルについて定量

(4) 総括

市販の三次元培養肝細胞である TESTLIVER™-rat および TESTLIVER™-human による薬物代謝実験を行い、その新規乱用薬物代謝モデルとしての有用性について検討を行った。

今回対象とした 3 種の薬物 (2C-B、5-MeO-DIPT および 2C-T-7) のいずれについても、TESTLIVER™-rat により、ラット *in vivo* における主な代謝物が生成することが認められた。さらに、代謝物によっては抱合反応、すなわち、第 II 相反応まで起こることが示され、三次元培養肝細胞により *in vivo* 代謝が良好に再現されることが明らかとなった。

また、2C-B および 2C-T-7 の *N*-アセチル化活性においては、TESTLIVER™-rat と TESTLIVER™-human の間で大きな差異が認められ、これらの薬物の代謝におけるヒトとラットの種差を明らかにすることができた。

以上の結果から、三次元培養肝細胞は新規乱用薬物のヒトでの代謝を予測するツールとして、極めて有用であると考えられる。特に、今回用いた TESTLIVER™-human は、実験操作も簡便であり、今後も、その活用が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 金森達之、桑山健次、辻川健治、宮口一、岩田祐子、井上博之、三次元培養肝細胞による新規乱用薬物の代謝、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 26 日、京都市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金森 達之 (KANAMORI TATSUYUKI)

科学警察研究所・法科学第三部・主任研究官
研究者番号：40356192

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし