

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：82505

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08895

研究課題名(和文) 新しいヒト由来肝細胞を用いた危険ドラッグ代謝予測研究と代謝物データベースの構築

研究課題名(英文) Drug metabolism study using newly developed human hepatocytes and establishment of a database of drug metabolites

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：危険ドラッグ等の摂取を証明するには、含有される薬物成分の代謝情報が必須である。本研究では、近年開発された新しいタイプの肝細胞による乱用薬物代謝予測系の開発を試みた。本研究で評価した肝細胞のうち、肝腫瘍由来細胞株HepaRG及びヒトiPS細胞由来肝細胞については、いずれもCYP活性を有し、薬物代謝予測における有用性が示唆されたが、一部活性の低い代謝反応もあった。一方、ヒト肝臓キメラマウス由来肝細胞は、高い薬物代謝活性と扱いやすさから、現時点では、薬物代謝予測系として最も有用と考えられた。さらに、スペクトル検索、薬物名検索等が可能な代謝物データベースを作成した。

研究成果の概要(英文)：To prove the ingestion of new drugs of abuse, it is necessary to know the metabolic fate of the drug components. In the present study, recently developed new types of human hepatocytes were evaluated for the prediction of the metabolism of drugs. Among the human hepatocytes evaluated in this study, HepaRG, a hepatoma cell line, and the human induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes showed CYP activity, and seemed to be useful for drug metabolism study, however, several metabolic reactions in these cells are quite low. The liver humanized mouse-derived hepatocytes showed the highest activity on phase I and II metabolic reactions and very easy to use, indicating that these cells are the best choice for the metabolism study of new drugs of abuse. Furthermore, a database of the metabolites of the drugs of abuse was established.

研究分野：医歯薬学

キーワード：危険ドラッグ 代謝 肝細胞 iPS細胞 データベース

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である。本研究開始当時、合成カンナビノイド類を含有する「脱法ハーブ」や、カチノン系薬物を含有する「バスソルト」などの乱用が急速に拡大し、これらの薬物を摂取した者が車を運転して重大な交通事故を引き起こすなどの事案が多発し、社会に大きな不安を与える状況となっていた。

このような、薬物が関連する事案において薬物摂取を証明するには、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。以前は、実験動物などを用いた薬物代謝研究を行い、得られた代謝データを薬物摂取証明に利用することが一般的であったが、次々と新種の薬物が出現する最近の状況においては、代謝研究が薬物の流行に追いつかず、結果として、新たに流行する薬物、すなわち危険ドラッグの摂取証明は極めて困難となっていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、多種類の危険ドラッグの代謝を一度に速やかに調べることのできる「体系的でハイスループットな in vitro 代謝実験系」を確立し、さらに、「得られた代謝データを有効に活用可能なデータベース」を構築することである。

本研究では、代謝実験系に培養肝細胞を用いることにした。薬物代謝研究においては、以前より、新鮮な肝臓より分離した初代培養肝細胞が用いられてきた。しかしながら、ヒト初代培養肝細胞には、供給面の不安定性、高価格、細胞解凍時の細胞生存率低下といった問題点もあり、ルーチンで一度に多種類の危険ドラッグの代謝を調べる実験系には不向きであると言わざるを得なかった。そこで、本研究では、新しいヒト由来肝細胞である HepaRG 細胞やヒト iPS 細胞由来肝細胞などを用いた新規 in vitro 代謝実験系の確立とともに、汎用データベースソフトウェアによる乱用薬物代謝物データベースの作成を試みた。

3. 研究の方法

(1) 実験に用いた薬物および代謝物

本研究では、合成オピオイドの一種である鎮痛薬フェンタニルおよびその誘導体であるアセチルフェンタニルをモデル薬物とし(図1)各種肝細胞の薬物代謝予測系としての有用性について評価した。

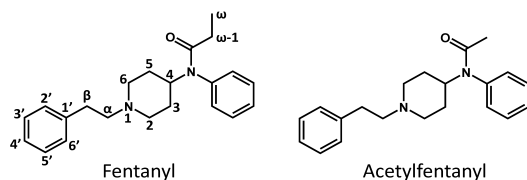


図1 フェンタニル及びアセチルフェンタニルの化学構造

これらの薬物および代謝物(フェンタニル代謝物6種、アセチルフェンタニル代謝物5種)については、いずれも研究代表者が化学合成したものを標準品として用いた。構造の確認は、<sup>1</sup>H-NMRにより行った。

(2) 肝細胞による薬物代謝実験

ア ヒト初代培養肝細胞(h-PRM-HEP)

ヒト初代培養肝細胞(凍結品、クラボウ社より入手)を解凍後、 $5 \times 10^5$  cells/mLとなるよう希釈し、24well プレートへ分注した。これに、薬物を最終濃度  $10 \mu\text{M}$  となるように添加し、振とう(90 rpm)しながら  $37^\circ\text{C}$  のCO2インキュベーター内で3時間培養した。

イ HepaRG 細胞

HepaRG 細胞(凍結品、ケー・イー・シー社より入手)は、肝腫瘍患者より分離・樹立された細胞株であり、従来の肝細胞由来細胞株に比べ、高い薬物代謝能力を有している。

HepaRG 細胞を解凍後、 $7.2 \times 10^5$  cells/mLとなるよう希釈し、24well プレートへ分注した。2日毎に培地交換しながら、 $37^\circ\text{C}$  のCO2インキュベーター内で4日間培養した後、薬物を最終濃度  $10 \mu\text{M}$  となるように添加し、さらに24時間もしくは48時間培養した。

ウ ヒト iPS 細胞由来肝細胞(h-iPS-HEP)

ヒト iPS 細胞由来肝細胞は、ヒト iPS 細胞を肝細胞へ分化させた細胞である。本研究では、タカラバイオ社より入手した Cellartis™ およびリプロセル社より入手した ReproHepato™ を用いた。いずれも凍結品である。

ヒト iPS 細胞由来肝細胞を解凍後、予めコーティング処理(Cellartis については Matrigel™、ReproHepato については専用のコーティング試薬)を施した 24well プレートに分注し、2日毎に培地交換しながら、 $37^\circ\text{C}$  のCO2インキュベーター内で5-6日間培養した。これに、薬物を最終濃度  $10 \mu\text{M}$  となるように添加し、さらに24時間もしくは48時間培養した。

エ ヒト肝臓キメラマウス由来肝細胞

ヒト肝臓キメラマウス由来肝細胞は、肝臓をヒト細胞で置換したマウスより得られた肝細胞である。マウスから取り出したばかりの新鮮な細胞がプレートに播種されたものをフェニックスバイオ社より購入した(PXB-cells™)。

PXB-cells を、2日毎に培地を交換しながら11日間培養した後、薬物を最終濃度  $10 \mu\text{M}$  となるように添加し、さらに24時間もしくは48時間培養した。

(3) 採取した培地の前処理・機器分析

ア 培地の前処理(定性分析)

採取した培地  $25 \mu\text{L}$  に  $15 \mu\text{L}$  の  $0.25 \text{ M}$  酢酸緩衝液(pH 5.0、0.01 unit の  $\beta$ -グルクロニダーゼを含有)を加え、 $60^\circ\text{C}$  で1.5時間加温し、抱合体の加水分解を行った。これに、 $250 \mu\text{L}$  のアセトニトリルを加え除タンパクし、 $10,000 \times g$  で5分間遠心した。上

清を分取し、窒素気流下で乾固した。これを、50  $\mu$ L の初期移動相に溶解したものを LC/MS 用の試料とした。

#### イ 培地の前処理 (定量分析)

培地 25  $\mu$ L について、上記アと同様に加水分解処理を行った後、10  $\mu$ L の内部標準物質溶液 (cis-3-メチルフェンタニルを含有) を加え、250  $\mu$ L のアセトニトリルを加えて除タンパクした後、10,000  $\times$  g で 5 分間遠心した。上清を 50  $\mu$ L 分取し、200  $\mu$ L の 0.1% ギ酸を加え、10,000  $\times$  g で 5 分間遠心した。上清を LC/MS に供した。

#### ウ 機器分析

定性分析は以下の条件で行った。

装置: Accela 液体クロマトグラフ + LCQ FLEET 質量分析計 (Thermo Fisher Scientific 社) カラム CORTECS C18 (2.1  $\times$  50 mm、Waters 社) 移動相 A 0.1% ギ酸、移動相 B メタノール、流速 0.2 mL/min、グラジエント条件 20%B - 1 min - 20%B - 8 min - 80%B - 2 min - 80%B - 0.1 min - 20%B、MS インターフェース ESI (ポジティブ)、分析モード スキャンもしくはプロダクトイオン分析 (プリカーサイオン 各化合物のプロトン化分子、正規化コリジョンエネルギー 35%)

定量分析は、NANOSPACE II 液体クロマトグラフ (資生堂社) + TSQ Quantum 質量分析計 (Thermo Fisher Scientific 社) を用い、カラム・移動相、MS インターフェースの各条件は定性分析と同一とし、分析モードに選択反応モニタリング (SRM) を用いて行った。

#### エ 検量線

培地に様々な濃度の薬物及び代謝物の標準品を添加して同様に分析し、作成した検量線をもとに、各化合物を定量した。なお、各化合物の検量線は、0.008-4  $\mu$ g/mL (フェンタニル塩酸塩の場合 0.021-11  $\mu$ M) の範囲で良好な直線性を示した ( $r > 0.99$ )。

#### (4) CYP 反応フェノタイプング

各培養肝細胞によるフェンタニル代謝パターンについて、より深く考察するには、それぞれの代謝物の生成に關与する酵素を明らかにしておく必要がある。そこで、抗 CYP 抗体を用いた CYP 反応フェノタイプングを行った。0.1 M KPi 緩衝液 (pH 7.4) 中にて、各種抗 CYP 抗体 (CYP450-GP 社) とヒト肝ミクロソーム (Corning 社) を 37  $^{\circ}$ C で 3 分間インキュベートした後、基質 (フェンタニル塩酸塩) NADPH 生成系を加え、さらに 37  $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした。反応液に 0.8 mL のアセトニトリルを加えて反応を停止させ、以降は前述の「培地の前処理 (定量分析)」と同様に前処理・定量分析を行った。

#### (5) 乱用薬物代謝物データベースの作成

乱用薬物代謝物データベースにおいて必要な機能として、スペクトル検索機能 (イオンの数値情報から検索するもの)、薬物名検索機能、文献情報表示機能が必須であると考えられたので、これらの機能を有するデータベースを Microsoft 社の Access により作成

した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 培養肝細胞によるフェンタニル及びアセチルフェンタニル代謝物の生成

フェンタニルあるいはアセチルフェンタニル存在下にて培養した h-PRM-HEP の培養液を分析したところ、図 2 及び 3 に示すように、フェンタニルについては 6 種類、アセチルフェンタニルについては 5 種類の代謝物の生成が確認された。

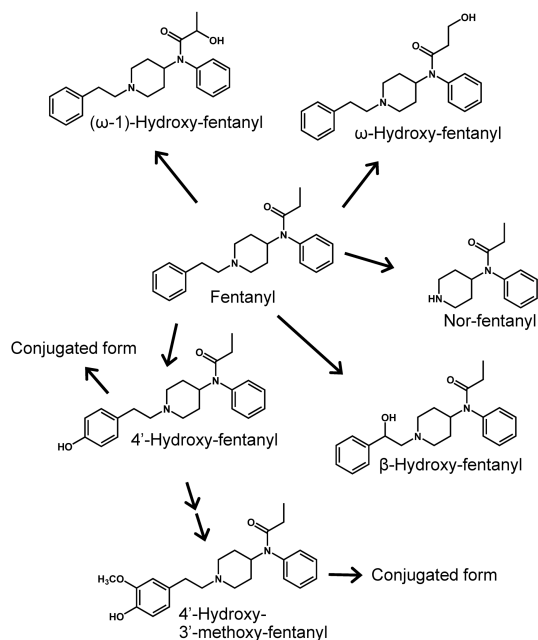


図 2 フェンタニルの代謝経路

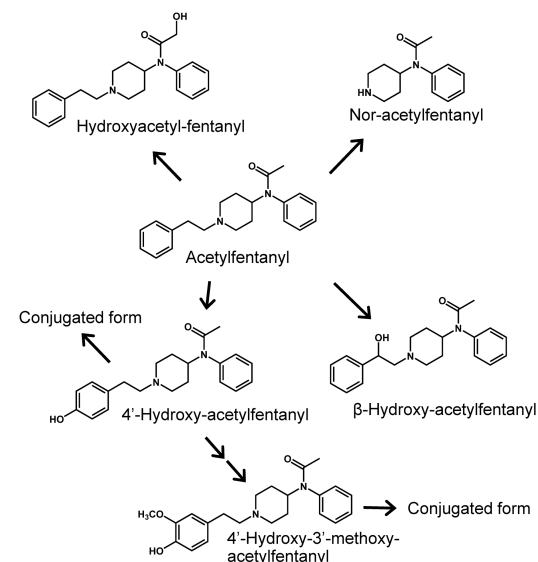


図 3 アセチルフェンタニルの代謝経路

PXB-cells の培養液についても、同様の代謝物が検出された。

一方、h-iPS-HEP については、フェンタニル及びアセチルフェンタニルのいずれについても、4'-ヒドロキシ-3'-メトキシ体が検出されなかった。また、HepaRG については、

フェンタニルの  $\beta$ -ヒドロキシ体が検出されなかった。

### (2) CYP 反応フェノタイピング

ヒト肝ミクロソームを各種抗 CYP 抗体で処理した際のフェンタニル各代謝物の生成量を図 4 に示す。

フェンタニルの各代謝物のうち、nor-fentanyl、 $(\omega-1)$ -ヒドロキシ体及び  $\beta$ -ヒドロキシ体については、抗 CYP3A4 抗体の処理により、生成量が著しく減少したことから、これらの代謝物の生成に CYP3A4 が関与することが示唆された。一方、4'-ヒドロキシ体の生成は CYP2D6 により半減し、この代謝物の生成に CYP2D6 が部分的に関与することが示唆された。

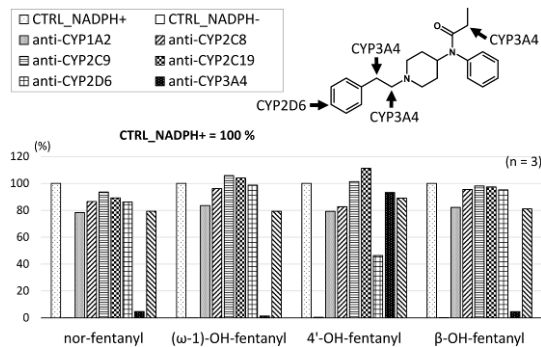


図 4 各種抗 CYP 抗体によるフェンタニル代謝物生成阻害

### (3) 各肝細胞による代謝物生成パターン

各肝細胞によるフェンタニル代謝物生成量及び未変化体残存量をまとめて図 5 に示す。

PXB-cells と HepaRG では、所定の時間培養後の未変化体の残存量が 10%以下であり、これらの細胞が比較的高い薬物代謝活性を有していることが示された。一方、代謝物については、nor-fentanyl が非常に多く生成し、最初に添加したフェンタニルの 70%以上に達した。その他の代謝物の生成量は、0-3%程度であった。

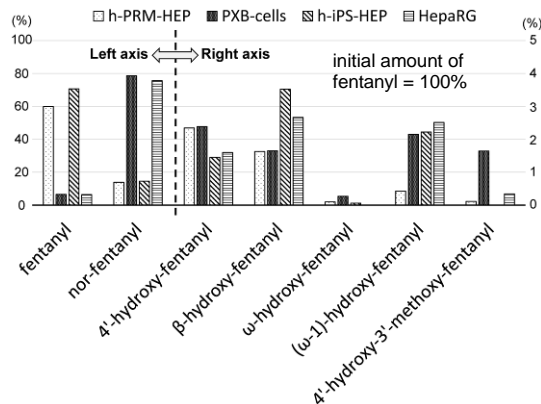


図 5 フェンタニル代謝物の各細胞による生成パターン

一方、h-PRM-HEP 及び h-iPS-HEP では、

60-70%程度の未変化体が残存し、薬物代謝活性が比較的低いと考えられた。Nor-fentanyl の生成量も、これらの細胞では 10 数%程度であった。

h-iPS-HEP では、4'-ヒドロキシ-3'-メトキシ体の生成が全く認められなかった(全ての製品・ロットにおいて)よって、h-iPS-HEP では、*O*-メチル化酵素(例えば COMT)が発現していない可能性が考えられる。

HepaRG では、 $\beta$ -ヒドロキシ体の生成が認められなかった。 $\beta$ -ヒドロキシ体の生成には、CYP2D6 が関与していると推定される(未発表データ)。HepaRG により、この代謝物が生成しなかったのは、この細胞における低い CYP2D6 活性 (Drug Metab Dispos. 2008 Jul;36(7):1444-52) によると考えられる。

本研究で扱った 4 種類の細胞のうち、測定対象とした代謝物全ての生成が確認されたのは、h-PRM-HEP と PXB-cells のみであった。特に、PXB-cells は薬物代謝活性が高く、乱用薬物の代謝予測において有用であると考えられた。なお、アセチルフェンタニルについても、各細胞の代謝活性において、フェンタニルの場合と同様の傾向が認められた。

また、各細胞の抱合活性について評価するため、採取した同一の培地について、加水分解処理をした場合としなかった場合のそれぞれの試料を分析し、比較した結果を図 6 に示す。グラフは、加水分解しなかった場合の定量値を、加水分解した場合を 100%として示している。

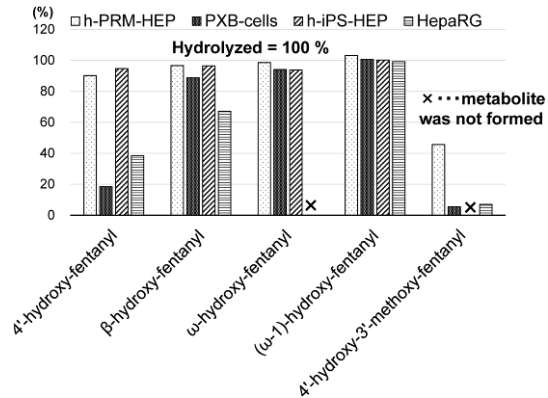


図 6 フェンタニル代謝物の加水分解処理の有無による定量値の差異

PXB-cells と HepaRG の場合、加水分解処理を行わないと、4'-ヒドロキシ体及び 4'-ヒドロキシ-3'-メトキシ体の定量値が著しく減少していることから、これらの細胞において、これらの代謝物の多くが抱合されている、すなわちこれらの細胞が高い抱合活性を有していることが示唆された。一方、h-PRM-HEP と h-iPS-HEP では、加水分解処理の有無で 4'-ヒドロキシ体の定量値にほとんど差異が認められなかったことから、これらの細胞では、この代謝物がほとんど抱合を受けていないと考えられた。

なお、 $(\omega-1)$ -ヒドロキシ体については、

いずれの細胞においても、ほとんど抱合活性が認められなかったことから、この代謝物はそもそも抱合を受けにくいと考えられた。

以上の結果から、今回扱った4種類の細胞の乱用薬物代謝物予測系としての有用性について評価すると、第I相・第II相の薬物代謝酵素活性の高さ、取り扱いの簡便さから、これらの中では、PXB-cellsが最も有用であると考えられた。h-iPS-HEPは、CYP活性は認められるものの、O-メチル化活性など、発現が認められなかったものもあり、肝細胞への分化が不十分であることが示唆された。本細胞については、今後の発展が期待されることである。

#### (4) 乱用薬物代謝物データベース

Microsoft社のデータベースソフトAccessを用いて、乱用薬物代謝物データベースを作成した。以下に、概要を示す。

##### ア レコードの登録内容

薬物名、構造式(画像ファイル)、分析試料、分析条件(GC/MS、LC/MS)、文献情報(書誌情報及びPDFファイルへのリンク)、未変化体・代謝物情報(化合物名及び質量スペクトルの主要イオンの数値上位6つまで。代謝物は最大10化合物)とした(図7)。

乱用薬物代謝物データベース

ID: 1

<薬物>

薬物名: アセチルフェンタニル

別名: acetylfentanyl

<試料>

試料1: 肝細胞(ヒト初代肝細胞)

試料2:

試料3:

分子量: 322.44

<化合物名、構造式>

<未変化体情報>

未変化体: acetylfentanyl RT (min): 備考

プリカーサ/M+ (m/z): 323

フラグメント/フラグメント (m/z): 188, 202, 281, 105, 146

OE (eV):

<代謝物情報>

代謝物1: nor-acetylfentanyl RT (min): 備考

プリカーサ/M+ (m/z): 219

フラグメント/フラグメント (m/z): 84, 202, 136, 177

OE (eV):

代謝物2: 4-hydroxy-acetylfentanyl RT (min): 備考

OE (eV):

<スペクトル情報>

MS種別:

<文献情報>

PDF: Fentanyl\_metabolism\_iPS ファイル: オビオイド系麻薬

1. Biol Pharm Bull. 2018;41(1):106-114. doi: 10.1248/bpb.b17-00709

Metabolism of Fentanyl and Acetylfentanyl in Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Hepatocytes

Kanamori T(1), Togawa Iwata Y(1), Segawa H(1), Yamamuro T(1), Kuwayama K(1), Tsujikawa K(1), Inoue H(1)

Author information

<文献情報>

図7 代謝物データベースの登録情報

##### イ 検索機能

スペクトルの数値を最大3つまで入力して検索することができる(図8)。また、薬物名による検索も可能である。スペクトル検索の活用法として、例えば、どのような薬物を摂取したのか分からない生体試料を分析し、代謝物と思われるピークが検出された場合、その質量スペクトルの主なイオンを入力・検索することで、速やかに使用薬物を特定することが可能である。

乱用薬物代謝物データベース検索フォーム

<スペクトル検索>

プリカーサ/分子イオン: フラグメントイオン:

検索実行

<薬物名検索>

薬物名:

検索実行

図8 検索フォーム

検索結果は、リストに表示される(図9)。質量スペクトル情報は、主要イオンの数値の羅列として表示される。リストの行をダブルクリックすると、当該化合物のデータ登録画面(図7)に移行し、詳細情報を確認することができる。

<検索結果一覧> 4件のレコードが該当します。

ID	薬物名	分析方法	未変化体	代謝物1
12	ベンジルピペラジン	GC/MS	272 91 181 56 69 146	384 203 18
4	レミフェンタニル	LC/MS	377 345 317 285	291 259 23
7	5-MeO-DIPT	GC/MS	114 72 160 174 145	114 72 146
8	メタンフェタミン	GC/MS	154 118 110 91 69	118 140 91

図9 検索結果

文献PDFファイルのファイル名をデータベースに登録し、当該PDFファイル本体を所定のフォルダに置いておけば、「PDF」ボタン(図7)をクリックすることで、文献PDFファイルが表示される。

本データベースに肝細胞を用いた乱用薬物代謝実験データや文献上の代謝物データを登録することで、代謝物データのより効率的な活用が可能となることが期待される。

##### (5) 結論

フェンタニル及びアセチルフェンタニルをモデル薬物とし、初代培養肝細胞、ヒトiPS細胞由来肝細胞、ヒト肝腫瘍由来細胞株及びヒト肝臓キメラマウス由来肝細胞について、薬物代謝能力・扱いやすさ等について評価した結果、ヒト肝臓キメラマウス由来肝細胞が最も有用であった。本細胞は、例えば24wellプレートで培養する場合、1薬物に2wellを割り当てれば一度に12薬物について代謝実験を行うことが可能であり、代謝研究のスピードアップが期待される。

また、スペクトル検索・薬物名検索が可能な乱用薬物代謝物データベースを作成した。以上の成果により、新規乱用薬物代謝様式の速やかな解明・代謝データの効率的な活用が可能となり、薬物事犯捜査への貢献が期待される。

## 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)

[雑誌論文](計4件)

Kanamori, T., Iwata, Y.T., Segawa, H., Yamamuro, T., Kuwayama, K., Tsujikawa, K., Inoue H., Use of hepatocytes isolated from a liver-humanized mouse for studies on the metabolism of drugs: application to the metabolism of fentanyl and acetylfentanyl, Forensic Toxicol., 査読有, in press, DOI:10.1007/s11419-018-0425-x

Kanamori, T., Iwata, Y.T., Segawa, H., Yamamuro, T., Kuwayama, K., Tsujikawa, K., Inoue H., Metabolism of fentanyl and acetylfentanyl in human-induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes, Biol. Pharm. Bull., 査読有, Vol. 41, 2018, 106-114

Kanamori, T., Iwata, Y.T., Segawa, H., Yamamuro, T., Kuwayama, K., Tsujikawa, K., Inoue H., Characterization and differentiation of geometric isomers of 3-methylfentanyl analogs by gas chromatography/mass spectrometry, liquid chromatography/mass spectrometry, and nuclear magnetic resonance spectroscopy, J. Forensic Sci., 査読有, Vol. 62, 2017, 1472-1478

金森 達之、岩田 祐子、辻川 健治、桑山 健次、山室 匡史、瀬川 尋貴、井上 博之、TLC, GC/MS および LC/MS によるフェンタニル類 18 化合物の一斉分析、法科学技術、査読有、21 巻、2016、139-147

[学会発表](計5件)

金森達之、新規乱用薬物の代謝研究、日本薬学会第 138 年会、2018

金森達之他、ヒト肝細胞キメラマウス由来新鮮ヒト肝細胞によるフェンタニル類の代謝、日本法中毒学会第 36 年会、2017

Kanamori, T. et al., Metabolism of fentanyl and acetylfentanyl by hepatocytes isolated from a liver-humanized mouse, 14th European ISSX Meeting, 2017

金森達之他、ヒト iPS 細胞由来肝細胞によるフェンタニル類の代謝、日本薬学会第 137 年会、2017

Kanamori, T. et al., The

characterization and differentiation of 21 fentanyl analogues by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS), liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS), and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, AAFS 69th Annual Scientific Meeting, 2017

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

金森 達之 (KANAMORI, Tatsuyuki)  
科学警察研究所・法科学第三部化学第一研究室・主任研究官  
研究者番号：40356192

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )