

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：82505

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590866

研究課題名(和文) ヒト肝細胞を用いた乱用薬物代謝物解析システムの構築

研究課題名(英文) Development of an in vitro model system for drug metabolism studies with human hepatocyte

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、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：合成カンナビノイド等の新規乱用薬物のヒト体内での代謝を予測する実験系の開発のため、三次元培養肝細胞による薬物代謝実験を行った。本研究では、市販の三次元培養用プレート上に肝細胞の塊(スフェロイド)を形成させ、これに様々な薬物を添加し、代謝物の生成パターンを調べた。その結果、乱用薬物の実際の生体内での代謝パターンを、今回確立した実験系により良好に再現できることを示した。本研究により確立した実験系は、薬物検査実務において有効に活用されるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：The usefulness of a hepatocyte spheroid array kit that enables simple three-dimensional hepatocyte culture as a tool to predict the metabolic fate of designer drugs was evaluated by comparing the metabolic pattern of designer drugs in hepatocyte culture to that of in vivo studies. The in vivo main metabolites of the designer drugs tested were also detected in the culture medium of the hepatocyte spheroids, indicating that the in vivo metabolic patterns of designer drugs were successfully reproduced using the hepatocyte spheroid array kit. The in vitro system developed in this study was found to be an effective tool for predicting the metabolic fate of designer drugs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：乱用薬物 代謝 肝細胞 スフェロイド

### 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が、最近では、覚せい剤や大麻などの古典的薬物に加え、2,5-ジメトキシ-4-ヨードフェネチルアミン (2C-I) などのフェネチルアミン系薬物、 $\alpha$ -メチルトリプタミン (AMT) などのトリプタミン系薬物、いわゆる「脱法ハーブ」に添加されることの多い合成カンナビノイドなど、多様な新規薬物の乱用が広まっており、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。

薬物事犯において乱用薬物摂取を証明するためには、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り、また、微量の代謝物を検出するために高感度分析が要求される。しかし、新たな薬物の場合、(特にヒトにおける) 代謝に関して全く明らかになっていない場合がほとんどであり、当然のことながら、代謝物の分析法も確立していない場合が多い。しかしながら、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、倫理面の問題から事実上不可能であり、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ための有用なツールとなることが期待される。さらに、肝細胞を三次元的に培養し、擬似的な肝臓組織を作らせることにより、肝細胞本来の機能をより引き出そうとする、いわゆる三次元培養法が近年急速に進展している。このような肝細胞三次元培養システムは、乱用薬物の代謝を予測するための実験系として、有効に活用できるのではないかと考えられた。

### 2. 研究の目的

新たに出現した乱用薬物の代謝様式は、ほとんどの場合不明であり、尿試料等の分析による新規薬物の使用証明は極めて困難となっているのが現状である。

本研究は、新規乱用薬物のヒト生体内における代謝様式を予測するための肝細胞スフェロイドを用いた *in vitro* モデルを確立することを目的とする。

本システムを用いて新規乱用薬物のヒトにおける代謝データを予め取得しておくことにより、代謝物分析方法の確立、質量スペクトル等の分析データの蓄積が可能となり、実際の検査業務において有効に活用されることが期待される。

### 3. 研究の方法

#### (1) 概要

本研究においては、三次元培養プレートの一つである Cell-able™ (東洋合成工業 (株)) を用いた各種薬物の代謝実験を行った。このプレートは、細胞培養用プレートの底面に特殊な加工が施されたもので、このプレートで

肝細胞を培養すると Cell-attaching area と称される直径 100  $\mu\text{m}$  の円形部分に肝細胞の塊 (スフェロイド) が形成される (図 1)。形成されたスフェロイドは、肝細胞の薬物代謝能を長期間維持するとされる。

最初に、培養条件の最適化のため、種々の条件下でラット肝細胞スフェロイドによる薬物代謝実験を行い、得られた薬物代謝データをラット *in vivo* 代謝データと比較し、最適な培養条件を決定した。

次いで、最適化された培養条件でヒト由来肝細胞による薬物代謝実験を行い、当該薬物のヒト *in vivo* 代謝データと比較し、構築したシステムの有効性について評価した。

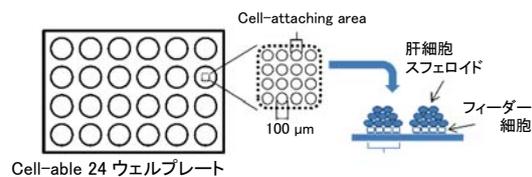


図 1 Cell-able™

#### (2) Cell-able による薬物代謝実験

Cell-able 24 ウェルプレートにフィーダー細胞としてマウス繊維芽細胞を播種し、37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 3 日間培養した。Cell-able プレートのウェル内の Cell-attaching area にフィーダー細胞の単層が形成されているのを確認後、 $2 \times 10^5$  cells/mL となるように RM-101 培地に懸濁させた肝細胞を播種した。37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 2 日間静置培養し、Cell-attaching area のフィーダー細胞上に肝細胞スフェロイドを形成させた。

肝細胞播種後、2~10 日目に薬物を添加し (最終濃度 10  $\mu\text{M}$ )、24 時間及び 48 時間後に培養液を採取した。培養液は、分析まで -30°C で保存した。

#### (3) 薬物の抽出・分析

##### ① 2C-T-2、2C-T-4 及び 2C-T-7

培養液 50  $\mu\text{L}$  に 1% 酢酸 0.5 mL を加え、さらに内部標準物質としてジフェンヒドラミン (カルボキシル基を有しない代謝物用) 及び 2,5-ジメトキシフェニル酢酸 (カルボキシル基を有する代謝物用) を添加し、予めメタノール及び水で平衡化した Oasis MCX カートリッジ (1 cc/10 mg) にロードした。1% 酢酸 1 mL 及び 5% メタノール 1 mL で洗浄した後、アンモニア水を 5% 含有するメタノール 1 mL で溶出した。溶出液にグリセロール-水 (1:1) 20  $\mu\text{L}$  を添加し、窒素気流下にて溶媒を留去した。残渣を初期移動相 200  $\mu\text{L}$  に溶解し、液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) に供した。

##### ② XLR-11

培養液 100  $\mu\text{L}$  に水 0.3 mL 及び  $\beta$ -グルクロニダーゼ/アリルスルファターゼを含有する 0.5 M 酢酸緩衝液 (pH 5) 0.1 mL を加え、60°C で 90 分間加温し、加水分解処理を行った。反

応後の溶液について、クロロホルム-2-プロパノール (3:1) 1 mL で3回抽出し、得られた有機層を合わせ、窒素気流下にて溶媒を留去した。残渣を90%メタノール 200  $\mu$ L に溶解し、LC/MS に供した。

また、XLR-11 使用者の尿試料 (提出者の同意書を得た上で入手) について、同様に加水分解処理した後、抽出・分析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) ラット肝細胞を用いた培養条件の検討及び *in vivo* データとの比較

モデル薬物として 2C-T-7 (麻薬、図 2) を選択し、種々の条件でラット肝細胞による代謝実験を行い、最適な培養条件を決定した。2C-T-7 を選択した理由は、この薬物はラット *in vivo* において、硫黄原子の酸化、アルキル鎖の水酸化、*N*-アセチル化、*S*-脱アルキル化、脱アミノ化等の多様な代謝を受けることが明らかにされており (T. Kanamori *et al.*, *Xenobiotica*, **37**, 679, 2007)、本実験系を評価するのに適していると考えられたためである。

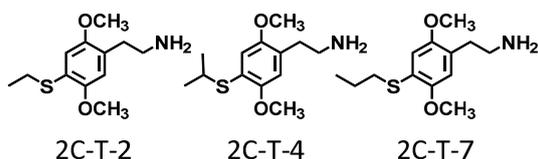


図 2 2C-T-2, 2C-T-4 及び 2C-T-7 の構造

Cell-able プレートに肝細胞を播種後、2 日目、6 日目及び 10 日目のスフェロイド形成の様子を図 3 に示す。2 日目には、肝細胞の塊であるスフェロイドの形成が確認された。形成されたスフェロイドは、10 日目においても維持されていた。



図 3 Cell-able における肝細胞スフェロイド形成の様子

2C-T-7 をラット肝細胞スフェロイドとともに培養した場合の代謝物生成量を図 4 に示す。

グラフは、肝細胞を播種してから薬物を添加するまでの各培養日数 (2 日、6 日もしくは 10 日) における各代謝物生成量 (添加した薬物がどれだけの割合でその代謝物に変化したか) を示している。なお、薬物を添加してから、培養液を回収するまでの時間は、いずれも 48 時間である。

まず、2C-T-7 未変化体をみると、いずれの場合もほとんど検出されず、添加した 2C-T-7 は、ラット肝細胞スフェロイドにより 48 時間でほぼ代謝されていた。各代謝物のうち、

2CT7-SO-Ac (スルホキシド-*N*-アセチル体) 及び 2CT7-SO<sub>2</sub>-Ac (スルホン-*N*-アセチル体) の生成量は、肝細胞播種後 2 日目添加の場合と比べ、6 日目及び 10 日目では生成量が少なくなっている。一方、 $\beta$ OH-SO-Ac 及び  $\beta$ OH-SO<sub>2</sub>-Ac (2CT7-SO-Ac 及び 2CT7-SO<sub>2</sub>-Ac がさらに *S*-プロピル鎖の水酸化を受けたもの) は、2 日目に比べ、6 日目及び 10 日目の方が生成量が多い。 $\beta$ OH-SO-Ac 及び  $\beta$ OH-SO<sub>2</sub>-Ac は、2CT7-SO-Ac 及び 2CT7-SO<sub>2</sub>-Ac に比べ、より反応が進んだ代謝物であり、 $\beta$ OH-SO-Ac や  $\beta$ OH-SO<sub>2</sub>-Ac の生成量が多いほど、肝細胞の薬物代謝酵素活性 (特にシトクロム P450 活性) が高いと考えられる。すなわち、Cell-able プレートにラット肝細胞を播種して 2 日目の時点では、スフェロイドは形成されているものの、薬物代謝酵素活性は比較的低い状態となっており、日数を経るにつれ徐々に活性が高まっていくものと考えられた。

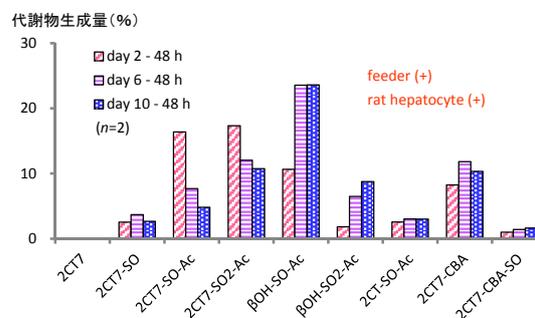


図 4 ラット肝細胞スフェロイドによる 2C-T-7 代謝物生成量

次に、同様に Cell-able プレート及び RM-101 培地を用いて、ラット肝細胞のみを培養し (フィーダー細胞なし)、2C-T-7 の代謝実験を行った結果を図 5 に示す。

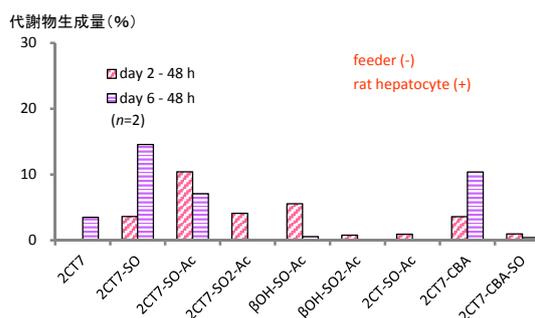


図 5 肝細胞のみ培養時の 2C-T-7 代謝物生成量

肝細胞播種後 2 日目の薬物添加では、各種代謝物の生成が認められ、全体的な代謝物生成パターンは、フィーダー細胞ありの場合 (図 4) の 2 日目の結果に類似していた。一方、フィーダー細胞ありの場合とは対照的に、肝細胞播種後 6 日目に薬物を添加した場合、 $\beta$ OH-SO-Ac の生成はほとんど認められなくなり、代わりに単にスルホキシド化を受けただけの

代謝物である2CT7-SOの生成が多く認められた。すなわち、フィーダー細胞がないと、肝細胞を播種して6日目には、薬物代謝酵素活性の多くが失われたものと考えられた。

以上の結果から、ラット肝細胞スフェロイドの薬物代謝酵素活性を十分に発揮させるためには、フィーダー細胞は必須であり、さらに、肝細胞を播種してから6日以上培養することが望ましいと考えられた。

なお、ブランク試験として、フィーダー細胞のみによる2C-T-7の代謝実験を行ったところ、2C-T-7が脱アミノ化した後、酸化して生成する2CT7-CBAの生成が認められたことから、フィーダー細胞あるいはRM-101培地にこの代謝物を生成させる酵素活性（例えばモノアミノオキシダーゼ活性）があるものと考えられた。ただし、今回の2C-T-7のケースにおいては、モノアミノオキシダーゼによる脱アミノ化とは関係のない代謝物がより多く生成しており、結果の解釈にさほど影響は与えないものと考えられた。

さらに、肝細胞スフェロイドによる代謝実験系の有効性を確認するため、2C-T-2、2C-T-4及び2C-T-7の3種の薬物（図2、いずれも麻薬）について、ラット肝細胞スフェロイドによる代謝パターンと、これらの薬物のラット尿中への排泄パターンを比較した。なお、ラット尿中排泄データは別の研究テーマにより取得したものであり、ここでの詳細の説明は省略する。

2C-T-7について、肝細胞による代謝物生成量とラット尿中排泄量の結果を図6に示す。

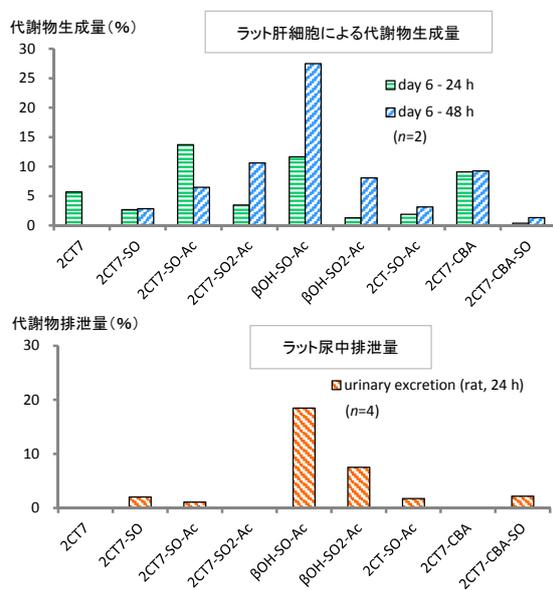


図6 2C-T-7のラット肝細胞スフェロイドによる代謝物生成量及びラット尿中排泄量

2C-T-7のラット尿中主代謝物は、βOH-SO-Ac及びβOH-SO2-Acであり、これらはラット肝細胞においても多く生成が認められた。また、これらの代謝物については、薬物を添加

してから48時間培養することにより、24時間培養した場合に比べ、より多くの生成が認められ、さらに、代謝物全体の生成パターン（各代謝物生成量の比率）が*in vivo*の代謝パターンにより近づいた。

同様に、2C-T-2の場合も、ラット*in vivo*の代謝パターンは、ラット肝細胞スフェロイドにより良好に再現された。一方、2C-T-4の場合は、代謝物の生成パターンには大きな差異が認められたが、定性的には、ラット尿中主代謝物がラット肝細胞スフェロイドにより生成することは確認された。

以上のとおり、構造の類似した2C-T-2、2C-T-4及び2C-T-7の3種類の薬物について、ラット肝細胞スフェロイドによる代謝物生成パターンとラット尿中排泄データを比較したところ、特に2C-T-2及び2C-T-7について、*in vivo*代謝パターンが肝細胞スフェロイドにより良好に再現されることが示され、本実験系の乱用薬物代謝モデルとしての有用性が示唆された。

## (2) 合成カンナビノイド XLR-11 の代謝に関する検討

これまでの検討により、Cell-ableによる肝細胞スフェロイドの代謝モデルとしての有用性が明らかとなったことから、さらに合成カンナビノイドの代謝への応用を試みた。

合成カンナビノイドは、多くの場合、「脱法ハーブ」に添加され、吸煙により使用される。近年、脱法ハーブ使用後の凶行や車の暴走による事故などがしばしば発生し、大きな社会問題となっている。合成カンナビノイドは、未変化体がほとんど尿中に排泄されないことが多く、現状では尿試料の分析による合成カンナビノイド使用の証明は極めて困難となっており、合成カンナビノイドのヒト体内での代謝を予測する実験系の開発が切望されている。

本研究では、合成カンナビノイドのうち、平成26年1月に麻薬指定されたXLR-11（図7）の代謝について検討を行った。また、肝細胞としては、ヒト肝腫瘍由来の細胞株であるHepaRG™細胞を用いた。HepaRG細胞は、2002年に樹立が報告された細胞で（P. Gripon *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 15655, 2002）、シトクロム P450 等の薬物代謝酵素活性を比較的高く維持していることが知られており、近年、薬物代謝研究への応用も多くなされている。なお、HepaRGの初代ヒト肝細胞に対する利点として、安定供給されること、ロット間の差異が小さいこと、凍結品の融解時の細胞生存率が極めて高いこと、比較的安価なこと、などが挙げられる。

HepaRG細胞を用いた代謝実験の条件は、フィーダー細胞あり、肝細胞播種後6日目に薬物添加、薬物添加後48時間目に培養液採取とした。また、実際のXLR-11使用者の尿試料の分析も合わせて行い、XLR-11のHepaRGスフェロイドによる代謝物生成パターンと尿中排

排泄パターンの比較を行った。

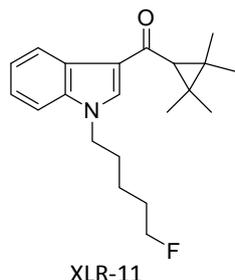


図7 XLR-11の構造

XLR-11をHepaRGスフェロイドと反応させた培養液の抽出物を分析したところ、XLR-11のプロトン付加分子( $m/z$ 330)の抽出イオンクロマトグラム(EIC)上にXLR-11のピークは検出されず、XLR-11はHepaRGスフェロイドにより48時間で完全に代謝されていた。

一方、想定されるXLR-11代謝物のプロトン付加分子のEIC上には、代謝物と考えられるピークが複数確認された。これらのうち、 $m/z$ 328及び342のEIC上に検出されたピークは、それぞれN-(5-hydroxypentyl) metabolite (M328)及びN-pentanoic acid metabolite (M342)であり、これらのピークの保持時間及びプロダクトイオンスペクトルは購入した標準品と一致した。また、 $m/z$ 344及び358のEIC上に検出されたピーク(M344-1、M344-2及びM358)は、それぞれM328及びM342に比べ分子量が16増加していることから、M328及びM342が酸化を受けた代謝物と推定された。M346は、XLR-11に比べ分子量が16増加していることから、XLR-11の酸化体であると考えられた。ただし、これらの代謝物の正確な構造は不明である。

なお、加水分解操作を省略して同様に分析を行った場合、多くの代謝物ピークについて、ピークの消失もしくはピーク強度の低下が認められ、代謝物の多くがグルクロン酸もしくは硫酸による抱合を受けているものと考えられた。

次に、XLR-11使用者の尿試料を分析したところ、 $m/z$ 330のEIC上には、やはり未変化体のピークは認められなかった。代謝物としては、XLR-11の培養液の場合と同様に、複数のピークがEIC上に認められ、また、代謝物ピークの多くは抱合体として排泄されていた。

ところが、XLR-11培養液とXLR-11尿試料より得られたデータについて、主なピークの保持時間及びプロダクトイオンスペクトルを詳細に比較すると、多くのピークについてデータが一致しなかった。

$m/z$ 328及び342のEICについて、ピーク部分を拡大したものを図8に示す。XLR-11の培養液より得られたクロマトグラム上のピークM328及びM342(図8(a))と同様の保持時間を有するピークは、尿試料より得られたクロマトグラムにもわずかに認められた

(図8(b))。一方、より大きなピークM328d及びM342dが尿試料のクロマトグラムには認められた。これらのピークは、XLR-11の培養液のクロマトグラムには全く認められなかった。

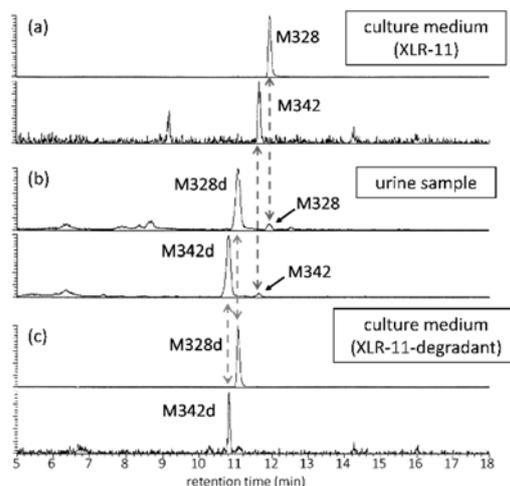


図8  $m/z$ 328及び342のEICの拡大図

以上のように、HepaRGにより生成したXLR-11代謝物と尿中に検出されたXLR-11の主代謝物と推定される化合物のデータが一致しなかったことから、XLR-11が、体内に摂取される前に別の化合物に変化していることが考えられた。

XLR-11のガスクロマトグラフィー質量分析(GC/MS)を行うと、熱分解物のピークが検出されることが報告されている(<http://www.swgdrug.org/Monographs/XLR11.pdf>)。そこで、XLR-11の熱分解について確認するため、ガラスアンプルにXLR-11を封入し、300°Cで5分間加熱したところ、ほとんどが分解することが明らかとなった(図9)。XLR-11は、脱法ハーブに添加され吸煙により使用されることが多く、使用時に熱分解している可能性があると考えられた。

XLR-11の熱分解物(XLR-11-degradant)は、市販品として入手可能であったことから、改めてXLR-11-degradantのHepaRGスフェロイドによる代謝実験を行った。

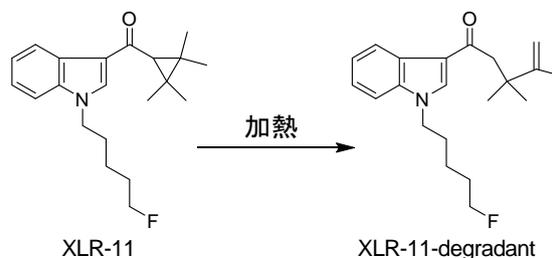


図9 XLR-11の熱分解

XLR-11-degradantの培養液の抽出物より得られた $m/z$ 328及び342のEIC(図8(c))上には、M328d及びM342dのピークが検出された。また、その他の尿中に検出された代謝物の多

くが、XLR-11-degradant の培養液中においても確認された。

以上の結果から、本研究で取り扱った XLR-11 使用者尿のケースにおいては、XLR-11 を吸煙使用する際に、大部分が熱分解し、生成した XLR-11-degradant が体内へ吸収され、代謝を受け、XLR-11-degradant の代謝物が尿中へ排泄されたものと考えられた (図 10)。

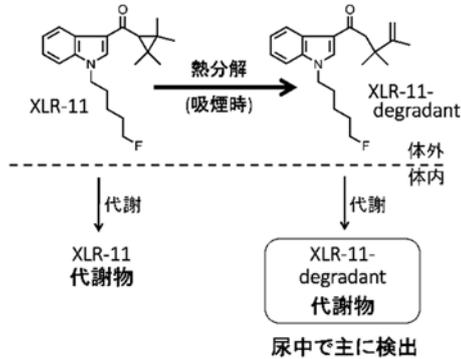


図 10 XLR-11 の摂取前後の挙動

XLR-11 と XLR-11-degradant の分子量は同一であり、また、それぞれの代謝物も同一の分子量のものが存在することから、仮に肝細胞による代謝データが存在しなかった場合、尿中の XLR-11-degradant 代謝物を XLR-11 の代謝物であると誤って判断してしまった可能性がある。本研究で用いた HepaRG スフェロイドによる薬物代謝実験系は、実際の XLR-11 使用者尿中に XLR-11-degradant の代謝物が排泄されることを明確に示すデータを与え、本実験系が乱用薬物の代謝を予測する目的において極めて有効に活用できることが示された。

### (3) 総括

市販の三次元肝細胞培養用プレート Cellable 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。

まず、市販のラット凍結肝細胞を用いて実験系の最適化及び評価を行ったところ、本実験系においては、肝細胞の薬物代謝酵素活性が少なくとも 10 日間は高度に維持され、また、乱用薬物の *in vivo* 代謝物生成パターンが良好に再現されることが示された。

さらに、本実験系を、最近大きな問題となっている合成カンナビノイドの代謝予測に適用したところ、当該薬物の挙動を正確に再現することができ、本研究により確立した実験系が薬物検査実務において有効に活用可能なが示唆された。

### 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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 金森達之他、肝細胞スフェロイドアレイ培養キットの新規乱用薬物代謝予測への応用、日本法中毒学会第 32 年会、2013 年 7 月 5 日、千葉県柏市
  - ② Kanamori, T. et al., In vitro metabolism study of designer drugs using a hepatocyte spheroid array kit, 10th International ISSX Meeting, 2013 年 10 月 1 日、トロント (カナダ)
  - ③ Kanamori, T. et al., Hepatocyte spheroid array kit as a tool for predicting in vivo drug metabolism, PITTCO 2014, 2014 年 3 月 5 日、シカゴ (アメリカ)
- [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：