

●肝細胞を用いた代謝安定性試験

TN396

Metabolic Stability in Hepatocytes

[概要]

肝細胞は生体内での薬物代謝を予測する上で、肝細胞分画や肝スライスに比べ優れた *in vitro* 試験材料であることが知られています。当社では、ヒトの他に、サル、ラット、イヌなどの凍結肝細胞を用いた *in vitro* 代謝安定性試験を実施し、LC-MS/MS を用いた残存率評価法により医薬品候補化合物の肝固有クリアランス値を評価いたします。また、CYP の非特異的阻害剤を用いることにより、グルクロン酸転移酵素 (UGT) などの非 CYP 系の代謝酵素の影響について評価することができます。

Keywords : 非 CYP 代謝、serum incubation method

[実施例 1] 凍結肝細胞を用いた肝固有クリアランス評価¹⁾⁻⁴⁾

Krebs-Henseleit Buffer (KHB) および 100% ヒト血清をそれぞれ用いて凍結肝細胞を懸濁し、被験化合物の代謝安定性試験を実施しました。結果、KHB 下で実施した場合と比較して、ヒト血清下では蛋白非結合率が加味された肝固有クリアランス値を得ることができました (Table 1)。代謝安定性試験より予測された Naloxone および Verapamil の肝代謝クリアランスと *in vivo* データ⁵⁾⁶⁾との比較結果を以下に示します (Fig. 1)。蛋白結合率が低い Naloxone では KHB 下とヒト血清下の肝代謝クリアランスに差は認められませんでした。蛋白結合率が高い Verapamil では KHB 下と比較して、ヒト血清下でより *in vivo* に近い肝代謝クリアランスが得られました。

Table 1 In vitro intrinsic clearances in cryopreserved human hepatocytes

(凍結ヒト肝細胞を用いた肝固有クリアランス評価)

Sample	Main metabolic enzyme	Hepatocyte intrinsic clearance (mL/min/10 ⁹ cells)		Unbound fraction in serum
		Krebs-Henseleit Buffer	100% Human serum	
Naloxone	UGT2B7	24.03 ± 0.43	10.92 ± 0.02	0.596
Phenacetine	CYP1A2	10.28 ± 0.20	4.90 ± 0.02	0.600
Verapamil	CYP3A4	17.86 ± 0.71	4.65 ± 0.13	0.100
Midazolam	CYP3A4	6.50 ± 0.16	0.47 ± 0.03	0.021
Diclofenac	CYP2C9	12.10 ± 0.23	0.15 ± 0.06	0.003
Imipramine	CYP2C19	4.08 ± 0.09	1.30 ± 0.03	0.185
Propranolol	CYP2D6	13.50 ± 0.29	1.44 ± 0.11	0.123
Metoprolol	CYP2D6	4.59 ± 0.38	4.19 ± 0.01	0.883

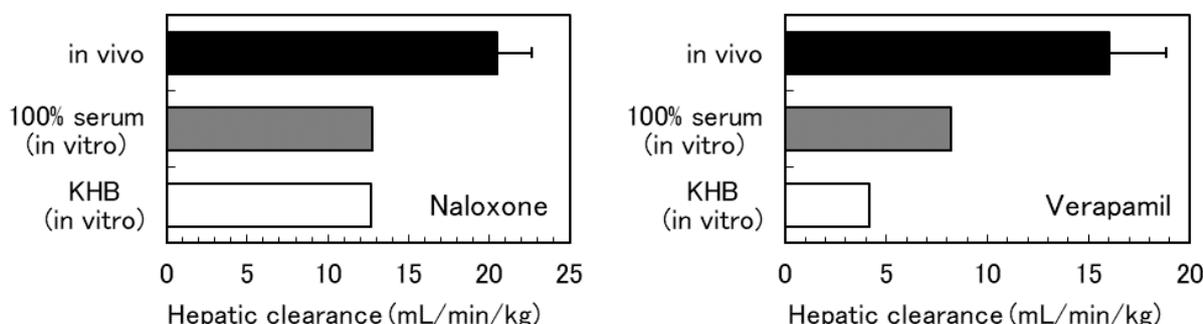


Fig. 1 Predicted hepatic clearance of naloxone and verapamil in cryopreserved human hepatocytes

(Well-stirred model, Scaling factor; 3.1×10^9 cells/kg body weight)

(凍結ヒト肝細胞を用いた Naloxone および Verapamil の肝代謝クリアランス予測結果)

[実施例 2] 1-Aminobenzotriazole (ABT) を用いた non-CYP 代謝酵素の寄与の検討

CYP の非特異的阻害剤として知られる ABT⁷⁸⁾を肝細胞と混合して、プレインキュベーションを行った後、化合物を添加し、経時的に残存率を求めました(ABT(+))。ABT を添加しなかった場合(ABT(-))と残存率を比較した結果を以下に示します (Fig. 2)。

CYP3A4 が主な代謝酵素となる Buspirone では ABT 添加群で代謝が阻害され、4 時間後の残存率がほぼ 100%であったのに対し、UGT2B7 が主な代謝酵素となる Naloxone では ABT による代謝阻害は限定的で、4 時間後の残存率は ABT 添加群、非添加群いずれも 10%以下であり、代謝が維持されていました。この結果が示すように、本試験系により、UGT など CYP 以外の酵素が被験化合物の代謝に関与しているかどうかを評価することができます。

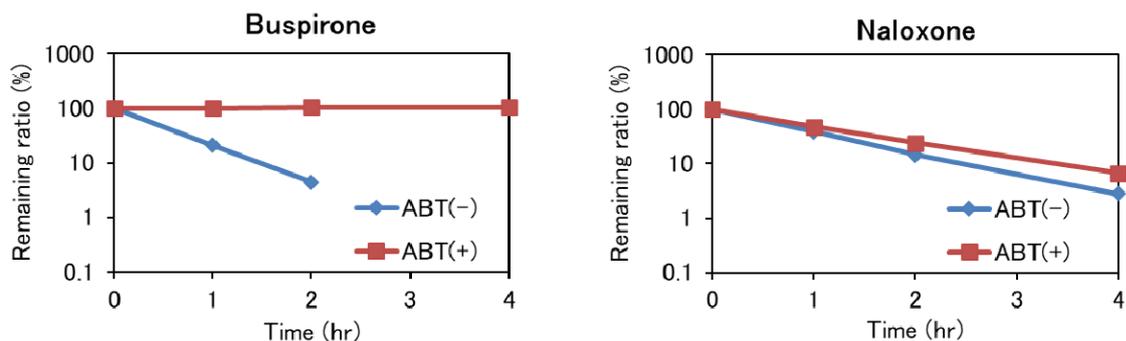


Fig. 2 Remaining ratio of buspirone and naloxone with or without ABT in cryopreserved human hepatocytes
(ABT 添加による残存率の変化)

[文献]

- 1) Yoshihiro Shibata, Hiroyuki Takahashi, Yasuyuki Ishii: *Drug Metab Dispos*, **28**, 349–360 (2000).
- 2) Yoshihiro Shibata, Hiroyuki Takahashi, Masato Chiba, Yasuyuki Ishii: *Drug Metab Dispos*, **30**, 892–896 (2002).
- 3) N. Blanchard, E. Alexandre, C. Abadie, T. Lave, B. Heyd, G. Mantion, D. Jaeck, L. Richert, P. Coassolo: *Xenobiotica*, **35**, 1–15 (2005).
- 4) Nade`ge Blanchard, Nicola J. Hewitt, Paul Silber, Hannah Jones, Philippe Coassolo and Thierry Lave: *J Pharma Pharmacol*, **58**, 633–641 (2006).
- 5) YAU YI LAU, ELPIDA SAPIDOU, XIAOMING CUI, RONALD E. WHITE, K.-C. CHENG: *Drug Metab Dispos*, **30**, 1446–1454 (2002).
- 6) A.-K. Sohlenius-Sternbeck, L. Afzelius, P. Prusis, J. Neelissen, J. Hoogstraate, J. Johansson, E. Floby, A. Bengtsson, O. Gissberg, J. Sternbeck, C. Petersson: *Xenobiotica*, **40** (9), 637–649 (2010).
- 7) Norimasa Jinno, Mizuka Tagashira, Kazuyuki Tsurui, Shizuo Yamada: *Xenobiotica*, **44** (8), 677–686 (2014).
- 8) Chie Emoto, Shigeo Murase, Yasufusa Sawada, Barry C. Jones, Kazuhide Iwasaki: *Drug metabolism pharmacokinetics*, **18** (5), 287–295 (2003).

[関連技術リンク]

肝ミクロソーム代謝安定性の高速スクリーニング <http://www.scas.co.jp/analysis/pdf/tn283.pdf>

ヒト肝細胞を用いた *in vitro* CYP 誘導能評価系の構築 <http://www.scas.co.jp/analysis/pdf/tn394.pdf>