

●凍結ヒト肝細胞を用いた肝クリアランス評価

TN396

Prediction of Hepatic Clearance Using Cryopreserved Human Hepatocytes

[概要]

単離肝細胞は *in vivo* での薬物代謝を定性的/定量的に予測する上で、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。とりわけ、凍結肝細胞は新鮮肝細胞と比べ入手が容易であることから、創薬初期段階では頻繁に利用されています。当社では、凍結ヒト肝細胞を用いた *in vitro* 代謝安定性試験を実施し、HPLC あるいは 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。浮遊法や単層培養法など、ご要望に応じたアッセイフォーマットを提供しております。

[実施例 1] 血清懸濁肝細胞(浮遊法)を用いた肝固有クリアランス評価<sup>1)-4)</sup>

遊離肝細胞を懸濁する際、Krebs-Henseleit Buffer あるいは 100% ヒト血清を用いて被験化合物の代謝安定性試験を実施しました。Krebs-Henseleit Buffer 下で実施した結果と比較して、ヒト血清下では蛋白非結合率が考慮された肝固有クリアランス値を得ることができました(表1)。図1には、*in vitro* 代謝安定性試験より予測された Naloxone および Verapamil の *in vivo* 肝代謝クリアランス結果をそれぞれ示しています。

表1. 凍結ヒト肝細胞を用いた肝固有クリアランス評価

被験化合物	主代謝酵素	肝固有クリアランス値 (mL/min/10 <sup>9</sup> cells)		蛋白非結合率
		Krebs-Henseleit Buffer	100% ヒト血清	
Naloxone <sup>a)</sup>	UGT2B7	24.03±0.43	10.92±0.02	0.596
Phenacetine <sup>b)</sup>	CYP1A2	10.28±0.20	4.90±0.02	0.600
Verapamil <sup>a)</sup>	CYP3A4	17.86±0.71	4.65±0.13	0.100
Midazolam <sup>a)</sup>	CYP3A4	6.50±0.16	0.47±0.03	0.021
Diclofenac <sup>a)</sup>	CYP2C9	12.10±0.23	0.15±0.06	0.003
Imipramine <sup>a)</sup>	CYP2C19	4.08±0.09	1.30±0.03	0.185
Propranolol <sup>a)</sup>	CYP2D6	13.50±0.29	1.44±0.11	0.123
Metoprolol <sup>a)</sup>	CYP2D6	4.59±0.38	4.19±0.01	0.883

凍結ヒト肝細胞 : <sup>a)</sup>Lot No.DET(Gelsis In Vitro Technologies)、<sup>b)</sup>Lot No.1110377(XenoTech)

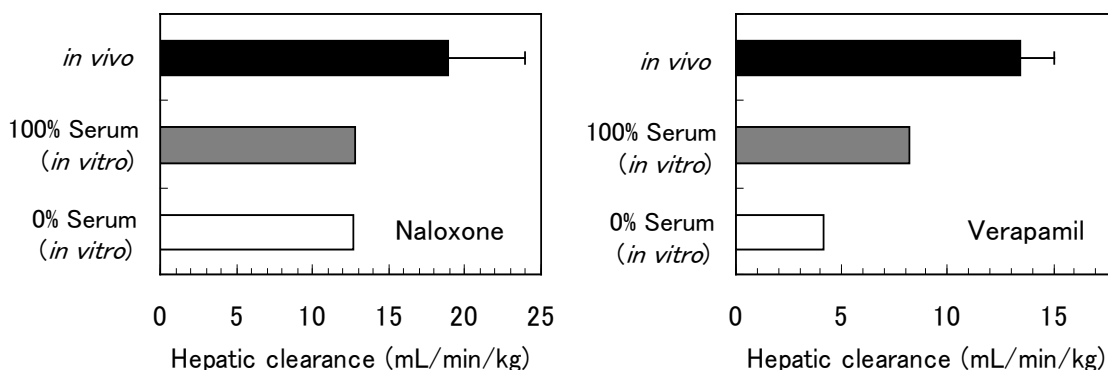


図1. 凍結ヒト肝細胞を用いた Naloxone および Verapamil の肝代謝クリアランス予測結果 (Well-stirred モデル式, スケーリングファクター値: 3.1 × 10<sup>9</sup> cells/kg body weight)

## [実施例 2] 単層培養法による肝固有クリアランス評価<sup>5)</sup>

浮遊法では代謝酵素の失活が早く、長期間に渡っての代謝安定性評価は困難です。一方、細胞外基質上で培養する単層法では、より *in vivo* に近い細胞環境が形成できるため、数日間に渡って高い酵素活性が維持できます。浮遊法では評価の難しい Diazepam や Tolbutamide といった Low-turnover 薬剤を対象に、単層培養下での肝固有クリアランス評価を実施しました。培養後 LC-MS/MS にて残存率を測定・解析し、Diazepam および Tolbutamide を含む数種類の薬剤の肝固有クリアランス値を単層法にて求めることができました(図 2、表 2)。

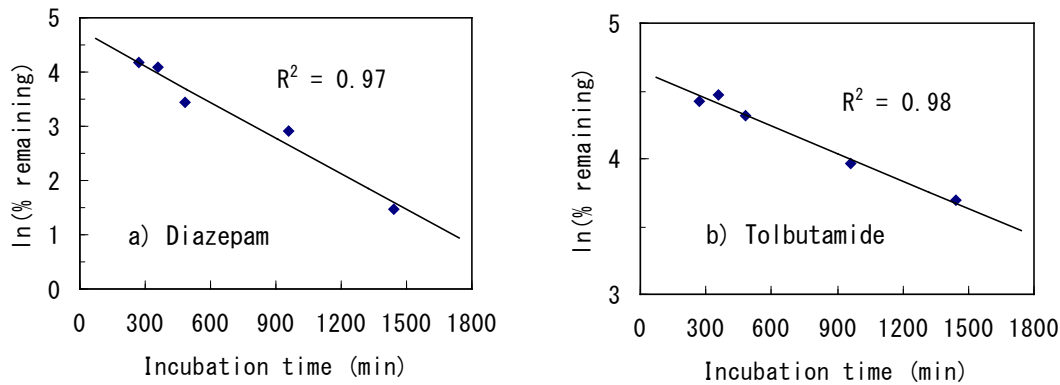


図 2. 残存率直線回帰 a) Diazepam および b) Tolbutamide

表 2. 単層培養法による肝固有クリアランス評価

被験化合物	反応時間 (hr)	肝固有クリアランス値 (mL/min/10 <sup>9</sup> cells)	
		0% ヒト血清	100% ヒト血清
Naloxone	0, 0.5, 1, 1.5, 2, 4	29.92±0.49	20.00±1.58
Verapamil	0, 0.5, 1, 1.5, 2, 4	46.53±0.47	8.39±0.53
Midazolam	0, 0.5, 1, 1.5, 2, 4	9.84±0.56	4.11±0.21
Dextromethorphan	0, 0.5, 1, 1.5, 2, 4	18.14±1.48	13.02±1.43
Diazepam	0, 4, 6, 8, 16, 24	3.31±0.17	—
Tolbutamide	0, 4, 6, 8, 16, 24	1.13±0.16	—

凍結ヒト肝細胞 : Lot No.OHO(Celsis In Vitro Technologies)

## [参考文献]

- 1) Shibata, et al. *Drug Metab Dispos* (2000), 28, 349–360.
- 2) Shibata, et al. *Drug Metab Dispos* (2002), 30, 892–896.
- 3) Blanchard, et al. *Xenobiotica* (2005), 35, 1–15.
- 4) Blanchard, et al. *J Pharma Pharmacol* (2006), 58, 633–641.
- 5) Houston, et al. *Drug Metab Dispos* (2005), 33, 115–120.

## [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

<https://www.scas.co.jp/technical-informations/technical-news/pdf/tn283.pdf>

ヒト肝細胞を用いた *in vitro* CYP 誘導能評価系の構築

<https://www.scas.co.jp/technical-informations/technical-news/pdf/tn394.pdf>