

300-am07

ラット初代肝細胞スフェロイドにおける蛍光プローブを用いたアセトアミノフェンによる肝毒性評価

○山頭 征岳¹, 佐能 正剛¹, 杉原 数美², 江尻 洋子³, 堀江 透⁴, 北村 繁幸⁵, 太田 茂¹(¹広島大院医歯薬保, ²広島国際大薬, ³クラレつくば研セ, ⁴ディ・スリー研, ⁵日本薬大)

【目的】初代肝細胞は高い薬物代謝酵素活性を有しているがその活性は培養時間の延長に伴い急速に失われていくことが分かっており、消失半減期の遅い医薬品の評価ではその代謝による毒性を見誤る可能性も懸念されている。そこで我々は長期にわたって薬物代謝酵素の発現量を維持することが可能であると報告されている初代肝細胞スフェロイドを三次元培養によって形成し、それを用いて医薬品の肝毒性を各種蛍光プローブを用いて評価した。

【方法】Cr1:CD(SD)雄性ラット 7 週齢から初代肝細胞を単離しマイクロ空間培養プレートに播種して 7 日間培養した。形成されたスフェロイドに acetaminophen を 24 時間曝露した後、スフェロイド中の ATP や放出された LDH 等を用いて細胞毒性の評価を行った。また calcein-AM, monochlorobimane 等の蛍光プローブを用いてスフェロイドを蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。各種薬物代謝酵素の発現量はリアルタイム RT-PCR を用いて測定した。

【結果および考察】薬物代謝酵素の発現量は培養 7 日目まで維持していた。Acetaminophen の 24 時間曝露によってスフェロイド内部のグルタチオンの枯渇とそれに伴う細胞毒性がスフェロイドの蛍光観察から確認できた。また cytochrome P450 (CYP) の阻害剤である 1-aminobenzotriazole を併用曝露することでスフェロイド内部のグルタチオン量の枯渇が抑制されたと共に細胞毒性の軽減も確認された。以上の結果より CYP 代謝寄与による細胞毒性をスフェロイド内部で観察できることが示唆された。