

博士論文

薬物動態評価のための複合細胞培養

マイクロ流体デバイスに関する研究

東京大学大学院工学系研究科化学システム工学専攻

中山 秀謹

目次

1 序論	1
1.1 緒言	2
1.1.1 体内動態	5
1.1.2 動物実験	8
1.1.3 生理学的毒物動力学モデル	9
1.2 既往の研究	10
1.2.1 体内動態評価のための個別 <i>In vitro</i> 試験	10
1.2.2 複合培養系	13
1.2.3 マイクロ流体デバイスを利用した複合培養	14
1.3 本研究の目的	14
参考文献	21
2 マイクロ複合灌流培養系の開発	27
2.1 緒言	28
2.2 本章の目的	28
2.3 実験	29
2.3.1 スリーコンパートメントマイクロデバイスの設計と作製	29
2.3.2 臓器モデル細胞の固定化と複合灌流培養	35
2.4 結果と考察	38
2.4.1 スリーコンパートメントマイクロデバイスの設計と作製	38
2.4.2 臓器モデル細胞の固定化と複合灌流培養	40
2.5 まとめ	44
参考文献	45
3 複合培養系における薬物の分布評価	48
3.1 緒言	49
3.2 本章の目的	50
3.3 実験	50
3.3.1 脂肪細胞の採取・分離と固定化	50
3.3.2 肝モデル細胞の固定化	52
3.3.3 蛍光モデル薬物の分布評価	52
3.4 結果と考察	54
3.4.1 脂肪細胞の採取・分離と固定化	54
3.4.2 肝モデル細胞の固定化	54

3.4.3	マイクロ複合細胞培養デバイスの3次元培養における課題	55
3.4.4	蛍光モデル薬物の分布評価	55
3.5	まとめ	60
	参考文献	61
4	静脈投与薬物の分布・代謝・毒性発現プロセスの再現	63
4.1	緒言	64
4.2	本章の目的	67
4.3	実験	67
4.4	結果と考察	70
4.4.1	脂肪モデル細胞のオンチップ分化誘導	70
4.4.2	CPT-11の分布評価	71
4.4.3	肝酵素活性評価	72
4.4.4	標的臓器モデル細胞の生存率評価	81
4.4.5	線形結合モデルの構築に向けた肺細胞モデルの検討	86
4.5	まとめ	98
	参考文献	99
5	総括と今後の展望	104
5.1.1	総括	105
5.1.2	問題点の抽出	107
5.2	今後の展望	108
	参考文献	111
	参考	113
	謝辞	116
6	補章	119
	APPENDIX	125

第 1 章 序論

1.1 緒言

近年では薬剤スクリーニングにおいて、動物実験の前段階の有効な手法としてヒト由来培養細胞を用いた様々な評価系が提案されている。また、培養環境をより生体内に近づけるために培養ディッシュを用いた静置培養系にはじまり、マイクロ流体デバイスを用いた灌流培養系の研究も行われている。しかし、従来のマイクロデバイスによる灌流培養系は、送液システムを外部に持つため培養液の体積が大きくなる傾向があり、総培養液体積に対する細胞密度が必ずしも生理学的では無くなり、培養系内の細胞が出すシグナルや代謝物が希釈されてしまうといった問題点があった。また、将来的に有望な細胞ソースである ES 細胞や iPS 細胞を利用するためには、複数の細胞をそれぞれ異なる個別の分化誘導プロトコールに従ってマイクロデバイス上にて並列処理する必要があると考えられる。しかしながら、現在提案されているマイクロ複合灌流培養系には全体灌流回路のみが配備されており、マイクロデバイス外で個別に分化誘導したモデル細胞を回収した後、再度マイクロデバイス内に固定化する必要があるなど、操作性に関しても課題が残されている。そのため、個別の複数異種臓器由来細胞を良好な状態で維持するための培養条件を並列制御する機能と全体灌流時に培養系内に暴露された化学物質の体内動態を評価するための機能を併せ持つ操作性に優れたマイクロ複合細胞培養系がさらに求められる。

そこで本研究では、送液システムを内蔵させることにより培養液量を最小化し、培養液総体積に対する細胞密度を生理学的条件に近づけ、個別灌流路と簡易バルブを配備させることで、デバイス上で全体灌流培養時まで個別の分化誘導操作が並列処理可能な新規マイクロ複合細胞培養系の開発を目的とする。本論文では特に、オンチップ灌流型複合細胞系の開発と体内動態評価への応用について論ずる。

第 1 章では、体内に取り込まれた薬物が経由する体内動態の中で重要な各プロセスについて概説し、動物実験に代わる新規培養系の必要性について述べる。また、既往の研究を例に挙げ、現状の課題と本研究の目的について述べるとともに、本研究の意義を示す。第 2 章では、スリーコンパートメント複合細胞培養マイクロデバイスの提案を行う。また、微細加工技術を応用したマイクロデバイスの製法について述べるとともに、作製したマイクロデバイスの基礎的特性について論ずる。また、送液系の内蔵による細胞密度の改善を先駆研究の細胞密度と比較することにより定量的に明らかにし、本研究で提案するマイクロ複合細胞培養系の有用性を示す。第 3 章では、*In vitro* 試験系では特に評価が困難な分布プロセスに着目し、浮遊性ラット成熟脂肪細胞の 3 次元固定化と疎水性蛍光モデル薬物の非破壊分布評価を検討する。また、細胞の 3 次元固定化による高密度化について、単層培養系と比較し、3 次元固定化の有用性について述べる。第 4 章では、静脈投与モデル薬物の体内動態評価への応用を検討する。特に、分布プロセスに加え、代謝プロセスおよび最終

的な標的臓器モデル細胞に対する毒性を標的臓器モデル細胞の単独培養系と比較することによって、各臓器モデル細胞の分布・代謝・毒性への寄与を明らかにし、本研究で提案するマイクロ複合細胞培養系の体内動態評価への適用可能性について言及する。第5章では、総括として本論文の内容をまとめ、今後の展望について議論する。

本研究の位置付け

本論文における主たる目的は、複数異種臓器由来細胞を可能な限り生理学的条件で複合培養することによって、個別の培養系では必ずしも明らかではなかった *In vivo* 様の応答を生体外で再現・評価することである。このような複合細胞培養系を確立することができれば、個別細胞培養系では評価・観察し得なかった応答を生理学的毒物動態モデルのような数理モデルに反映させることが可能となり、最終的には数理モデル上において動物個体もしくはヒト個体における薬物・毒物の体内動態を予測することが可能になると考えられる。

Fig. 0 に *In vitro* 試験系を利用した人体影響予測の概念図を示す。まず、動物個体レベルの体内動態を予測するためには、体内動態を制御する主たる臓器由来細胞を用いた個別細胞培養系において、対象とする化学物質に対する各臓器由来細胞の応答を取得する必要がある。一方で、本論文で提案するような複合細胞培養系においてオンチップアニマルを作製することにより、臓器由来細胞の個別培養系では取得しえない複合細胞培養系特有の応答の有無を検証しておく必要がある。特に、複合細胞培養系において個別細胞培養系の線形結合では表現し得ない非線形な応答が得られた場合には、数理モデルに反映させる必要がある。このような非線形な応答を数理モデルに記述するためには個別細胞培養系と複合細胞培養系を相補的に改善させながら、随時数理モデルを記述しなおしていくことが重要である。最終的に、動物実験で得られる体内動態の結果と数理モデルで予測される体内動態を比較することによって、作製された数理モデルの妥当性を検証し、動物レベルで信頼性の高い数理モデルを構築する。次いで、この数理モデルに記述されているスケールのパラメータをヒト個体レベルにすることによってヒト個体における体内動態予測が可能になると考えられる。将来的には、ES, iPS 細胞といった有望な細胞ソースから各臓器のヒト正常細胞を作製し、動物個体の影響予測と同様の手法で、ヒト培養細胞ベースの個別・複合細胞培養系を用いてヒト個体における体内動態を記述する数理モデルを構築することができれば、直接ヒト個体レベルの体内動態を予測することが可能になると考えられる。

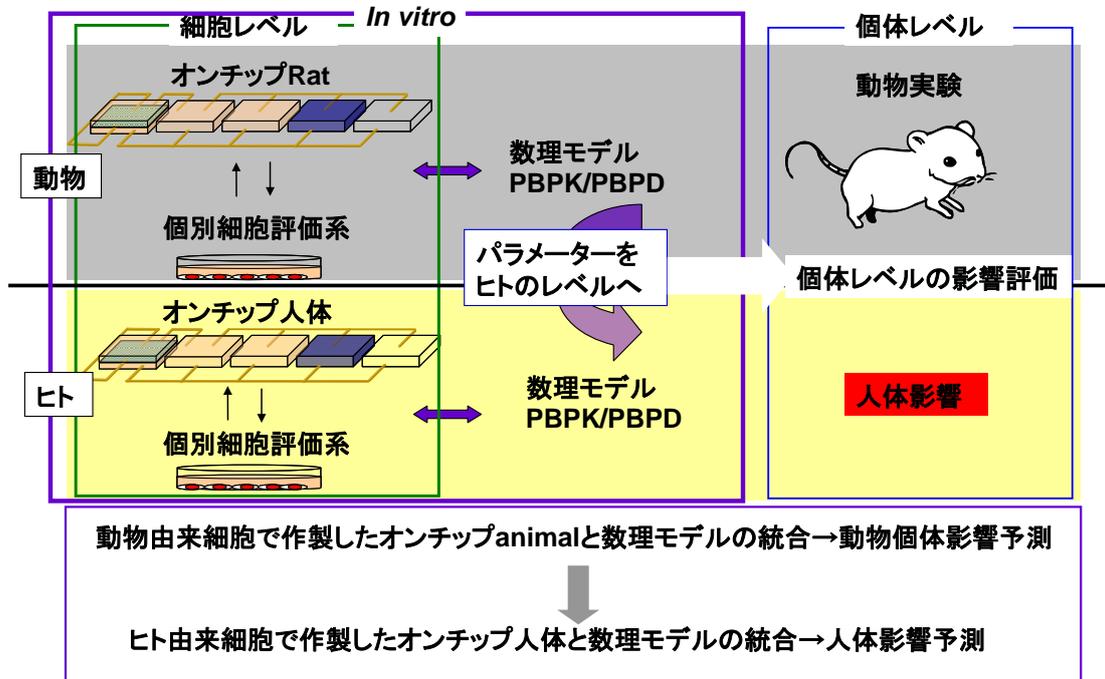


Fig. 0 *In vitro* 評価系を利用した人体影響予測のイメージ

1.1.1 体内動態

体内に摂取された薬物は **ADME/Tox** プロセスと呼ばれる **吸収 (Absorption)**・**分布 (Distribution)**・**代謝 (Metabolism)**・**排泄 (Excretion)** および **毒性発現 (Toxicity expression)** プロセスの各プロセスを経て最終的に毒性や薬効を示す。以下に体内動態を制御する主要なプロセスについて概説する。

吸収プロセス (Absorption)

薬物が体内の各臓器に至る過程は主として血流を介して行われる。吸収過程はその初めのプロセスであり、薬物の吸収経路は複数あるが、経口投与を想定した場合には消化管を経由する吸収が主経路になると考えられる。特に、小腸は体内で吸収を担う主たる臓器であり、その構造も物質の吸収面積を大きくするため、内壁には無数の襞があり、襞表面は多数の絨毛によって覆われているといった極めて特徴的な構造を持つ臓器である。胃で消化された物質は小腸に送られ、腸管の運動によりさらに消化・吸収が促進され、未吸収の残存物が大腸に送られる。吸収はその物質の物理化学的性質、形状、投与経路によって決定される。小腸における吸収過程は大きく4つに分類することができる。

i) 受動輸送

物質が細胞内外の濃度差により勾配に従って拡散・浸透する過程である。濃度差が大きいほど、吸収が促進され、この輸送過程には特にエネルギーを必要としない。

ii) 能動輸送

物質を細胞内外の濃度差に逆らって輸送する過程である。主に細胞膜の膜タンパク質（膜トランスポーター）によって輸送されるため、エネルギーが必要となる。この過程は内因性物質と構造の類似している物質に限られ、様々なイオン、ビタミン、糖、アミノ酸で確認されている。

iii) 促進受動拡散

ある種の分子（例、グルコース）では、膜の透過速度は、その低い脂溶性から予想される値より大きい。1つの理論では、輸送成分が細胞膜外表の基質分子と可逆的に結合し、その輸送体-基質複合体が急速に膜を貫通して拡散し、内表面で基質を離すといわれる。この輸送体介在拡散の過程は、選択性と飽和性によって特徴づけられる。

この輸送体は、比較的特異的な分子形をもつ基質のみ輸送し、その過程は輸送体の利用能により制限される。この過程はエネルギー消費を必要とせず、濃度勾配に逆らう輸送は起こらない。

iv) 食作用

細胞により液体や微粒子が飲み込まれる。細胞膜は陥入し、微粒子や液体を取り囲み、そして再び融合し、小胞を形成し、次いでそれは剥離し細胞内へ移動する。この機序もエネルギー消費を必要とする。食作用は薬物輸送において、蛋白性の薬物を除いて

おそらくわずかな役割しか果たしていない。

分布プロセス (Distribution)

体内に吸収された薬物は、主に血中に取り込まれ、希釈されて体全体へ分散されて、様々な臓器・組織の細胞に影響を及ぼす。しかし、どの組織にも同じような役割で分散されるわけではなく、親和性もしくは組織移行性と呼ばれる、物質によってどの臓器・組織に到達して細胞の中に入り込みやすいかといった性質がある。

一般的に薬物は、血漿タンパク（アルブミン、フィブリノーゲン、免疫グロブリンなど）や脂肪組織、結合組織（リンパ球や肥満細胞などの他の組織の間隙を埋めたり、器官や腱を形成したりする）、骨などに蓄えられやすい性質を持つ。この中でも、薬物の分布の仕方に関連があるのが血漿タンパクである。実験的には、血漿タンパクと結合すると血管壁から組織への移行が妨げられ、組織中での影響が低下すると考えられている。従って、ヒトのタンパク質の一つである血中アルブミンが減少した状態や、他の物質と共存したためそのタンパク質が少ない状況では、遊離型の物質が増加し、同じ量を暴露しても影響が大きくなると考えられている。

また、疎水性の薬物は特に脂肪組織や結合組織との親和性が高く、蓄積されやすい。

代謝プロセス (Metabolism)

生体外から吸収された薬物は、異物として認識され、体内ではその活性を弱めたり、水に溶けやすいようにして体外に排泄させようとしたりして物質の構造を変化させる。主として肝臓がこの役割を担う。一般的に、多くの薬物は代謝を受けると薬物の活性は低下し、無毒化される。しかし、一部の薬物は代謝を受けない、もしくは代謝を受けて活性化される。代謝には、以下に示す4つのパターンがある。

i) 酸化

典型的な代謝パターンで、肝細胞に存在する薬物代謝酵素である P450 (チトクローム) を中心として行われる。P450 によって活性化された酵素が、化学物質の分子と酸化反応して代謝が生じる。

ii) 還元

ニトロ基やアゾ基といった官能基を有する化合物は、還元反応によって代謝を受ける。この反応も P450 を介して行われる。

iii) 加水分解

多くのエステル基を持つ化合物は、加水分解を受けて不活性化される。アセチルコリンはコリンエステラーゼが作用すると加水分解が生じ、コリンと酢酸に分解される。

iv) 抱合

酸化反応を受けた物質は、生体内にある脂質と結合して、より水溶性の高いものに変

化する。グルクロン酸抱合が有名で、この反応には体内のグルコースが利用される。他に、硫酸抱合、グリシン抱合、アセチル抱合、グルタチオン抱合、メチル抱合などがあり、いずれの反応にもエネルギーが必要である。

排泄プロセス (Excretion)

体内に入った薬物は、そのままの形か、代謝された形で体外に出される。排泄の主経路は腎臓からのものであるが、ほかにも糞中や呼気中などがある。腎排泄には以下の 3 つの過程が関連している。

i) 糸球体濾過

血漿中成分の内、分子量 5,000 以下のものは、糸球体を通過し、尿細管に移行して排泄される。タンパクと結合している薬物は分子量が大きいため、糸球体を通過して尿細管に移行することができない。また、腎臓から排泄される物質については、糸球体血液量を増加させると、その物質の尿中排泄量も比例して増加する。したがって糸球体濾過量は糸球体血漿量に比例する。

ii) 尿細管分泌

弱酸性や弱アルカリ性の化学物質は、担体と結合して、血漿中から尿細管へ排泄される性質を持つ。この反応は主として近位尿細管で行われる。

iii) 尿細管再吸収

尿細管に排泄された薬物の一部は、尿細管から再吸収されて体内に戻る。これは主として遠位尿細管で行われる。特に脂溶性の高い物質は再吸収されやすく、尿中から排泄されにくくなっている。また、塩基性の物質は pH が低下すると再吸収が減少し、酸性の物質は再吸収が増加する。これは、非イオン型の物質がイオン型の物質に比べて再吸収されやすい事に起因する。

ここまで概説した通り、体内動態を制御する反応は複数の臓器で起こり、その反応も複雑多岐にわたる。薬物の毒性・薬効を正確に評価・予測するためには、上述した吸収・分布・代謝・排泄の各プロセスを評価することが重要である。生体内では上述した各プロセスが同時並列処理されるだけでなく、臓器間での緻密な相互作用によって恒常性が維持されており、体内動態を制御する各プロセスをメカニズムベースで理解していくことが特に重要である。

1.1.2 動物実験

新規医薬品や食品の開発に際して現状では、ヒト臨床試験に先立ち、実験動物を用いた非臨床試験（薬効、薬物動態、毒性、安全性試験など）を3~5年かけて行い、試験結果をもとにヒトにおける有効性や安全性を予測し、臨床試験への移行の可否を判断している。

しかしながら、動物実験の結果からだけでは臨床時の安全性を予測することは困難である。これはヒトと実験動物の体内動態には相違があり、動物実験の結果をヒトに直接反映できないことがあるためである。その原因の一つとして、主たる消失過程である代謝経路および代謝速度がヒトと異なることがあげられる。このために、動物実験では確認されなかった代謝物が臨床試験において検出される場合や、予測された濃度とかけ離れた結果を得ることがあり、最終的には副作用を発現する場合がある。表 1.1 は日本製薬協会が医薬品開発において臨床試験段階で開発を中止した 150 物質について、臨床での副作用と動物実験結果との対応を調べたものであるが、91 例のうち、36 例で動物実験と関連した結果を得られていないことが分かる。

表 1.1 臨床試験段階における副作用と動物実験結果との対応

副作用の種類	事例数	動物実験との対応			
		関連性あり	多分関連性あり	関連性なし	不明
皮膚反応	6	0	0	5	1
精神・神経系	9	2	1	1	5
消化器系	17	5	8	2	2
肝臓・胆道系	29	0	9	15	5
循環器系	7	3	3	1	0
血液系	4	1	0	3	0
その他	19	4	4	9	2
合計	91	15	25	36	15

(日本製薬協会の調査結果, NO. 61, 平成 5 年 10 月)

また、薬物の有効性については、受容体やイオンチャネルなど（薬物のターゲット分子）の種類や各臓器における分布・発現がヒトと動物間で異なり、ヒトで薬効が認められない場合もある。このような場合にも開発を中止せざるを得ず、臨床試験の安全性や医薬品の研究開発に対する効率化を妨げる大きな問題となっている。

このような問題の原因は、まれにしか発現しないアレルギー反応や、動物実験では観察が困難な悪心、頭痛、めまい、耳鳴り、疲労感のような副作用によることもあるが、実際には薬物の体内動態あるいは組織の薬物感受性においてヒトと動物実験に差があることが大きな要因になっていると考えられる。例えば、医薬品ではヒトとラットで薬物の半減期を比較すると平均で 3 倍前後、イヌとの比較では 2 倍程度の差があるといわれている。ペ

ブチドやタンパク質製剤ではヒトにしか作用を発現しないものが多い。このようなヒトと動物間での差異は代謝速度による理由だけではなく、代謝経路や排泄過程に違いがあるためである。このような種差の問題に対処するための非臨床試験には、複数の動物種の利用、ヒトにできるだけ近い種の動物を使用した評価、**Toxicokinetics** の導入が提案されているが、総じて種差の問題を根本的に解決するには至っていない。

一方、動物実験は種差の問題だけではなく、倫理的な問題も抱えている。OECD（経済協力開発機構）が推奨する初期評価データセットには化学物質の安全性を評価する必要最小限のデータセットが表記されているが、通常、1つの化学物質につき430匹の動物実験の使用が推奨されている。世界では毎年数千の化学物質が合成されていることを考えると、実験動物の犠牲は更に莫大な数になる。このようなことから近年では実験動物の倫理面も考慮されるようになり、欧米や、日本でも実験動物代替の**3Rs (Replacement, Reduction, Refinement)** が考えられるようになってきた。欧州連合（**EU**）では特に規制が厳しくなっており、化粧品の成分については2009年に一切の動物実験が禁止された。今後は化粧品のみならず、医薬品・食品の開発分野においてもこのような規制が拡大されると考えられる。

以上のことから、動物実験に代わる実験系が要求されている。現在もっとも有効で簡便な方法は、ヒト由来細胞もしくはヒト由来組織自体を使用する方法であり、効率的な医薬品開発や臨床実験の実施のためには重要であると考えられている。特に薬物スクリーニングにおいては動物実験の代替法あるいは前段階として主要な手段となりつつある。また、医療分野においても患者の組織を用いた研究は疾病のメカニズム解明や診断と治療、予防のために必須である。さらに、従来は医学的研究に用いられてきた健常人由来のヒト組織を用いることで医薬品開発における薬物反応性の種差問題の多くを克服できると共に、個人差に関する情報を取得することが可能となり、細胞を用いた評価は今後の医薬品の開発において重要であると考えられる。

1.1.3 生理学的毒物動力学モデル

化学物質の毒性発現メカニズムは、化学物質の種類と同様に非常に多種多様であり、これをおおよそでも理解し、評価・予測するためには、作用部位における薬力学、毒力学のみならず、暴露の形態・部位に加えて体内での吸収・代謝・分布・排泄の各ステップの解明とその結果の統合という毒物動態学が必要となってくる (Fig. 1-1)(Theil et al. 2003)。

In vitro 培養細胞を用いた動物実験代替法の適用は、依然として局所毒性や発ガン性の一部に限られており、体内動態が毒性発現に深く関与するような全身毒性については、急性毒性でさえも予測が難しい (Flint 1998)。これに対して現在提案されている有力な手法は、動態制御臓器や標的臓器の個別の培養系で得られた *In vitro* 試験の結果と、*In vivo* のデータを上手く組み合わせながら生理学的毒物動力学モデルを構築し、個体レベルまで積み上げるというものである (Fig. 1-2, 1-3) (Maruyama et al. 2003; Theil et al. 2003; 国立医薬

品食品衛生研究所「化学物質のリスクアセスメント」編集委員会 1998; Blaauboer 2001; Blaauboer 2003; Houston and Galetin 2003; Liu and Pang 2006). このようなモデルが必要となる様々な生理学的なパラメータに関しては、現在までに代表的な動物に関して多く蓄積され、まとめられている (Brown et al. 1997).

一方で、この手法では個別の *In vitro* 試験で再現できていない生体内の現象は数理モデルに反映できないため、複数臓器由来細胞を同時に複合培養することによって、吸収・分布・代謝・排泄・毒性発現の各プロセスにおいて個別の *In vitro* 試験結果と比較して非線形な応答の有無を明らかにしておく必要がある。

1.2 既往の研究

1.2.1 体内動態評価のための個別 *In vitro* 試験

吸収プロセス

薬物の消化管からの吸収率は、薬物の膜透過性、溶解性および消化管腔内及び粘膜中での安定性によって決定される。経口投与後の吸収率を考える場合には膜透過性、溶解性の二つの要因をきちんと評価しておく必要がある。小腸は体内で吸収を担う主たる臓器であり、小腸を対象とした様々な *In vitro* 試験系が提案されている。近年、Caco-2 単層膜などを用いた *In vitro* での膜透過性データから、ヒト経口投与後の薬物吸収率を予測した結果が多数報告されているが、あくまでも薬物を溶液として投与した場合の吸収率であり、溶解性に問題がある場合の消化管からの吸収は溶解律速となるため、いくら膜透過性が高くても吸収率は当然低くなる。膜透過性が低い薬物の場合には、粒子径を小さくしてもほとんど吸収改善効果が得られないのに対し、膜透過性が高い薬物では微粒化に伴って顕著に吸収率が增加する。溶解性の低い薬物に対しても、その経口吸収性を予測する上で薬物の膜透過性の評価は極めて重要であり、特に将来的な製剤化の方向性を考える上で膜透過性に関する情報を整理しておく必要が指摘されている (Amidon et al. 1995)。

人体における薬物の吸収を評価したい場合、当然ヒト正常上皮細胞で実験を行うことが最適であるが、実際には困難であるために細胞株を用いた小腸膜モデルが提案されている。小腸膜モデルの代表的な試験系である Caco-2 細胞をモデル細胞として用いた単層培養系について述べておくと、Caco-2 細胞はヒト結腸癌由来の細胞株で、多孔性のメンブレンフィルター上に培養すると、小腸の円柱上皮細胞に似た刷子縁やタイトジャンクションの形態学的特徴を示すことが知られている (Fig. 1-4) (Eric et al. 2001)。Caco-2 細胞は P-glycoprotein やペプチダーゼなどの代謝酵素を発現する単層の細胞層を形成し、この単層状に培養された細胞層の頂端膜側および基底膜側における薬物濃度を LC-MS などを用いて微量測定することによって薬物の透過性が評価されている。このような Caco-2 細胞や HT-29 細胞を利用した小腸膜モデル培養系に置いて、良好な受動輸送の再現がなされてい

る (Kedinger et al. 1987; Artursson et al. 2001; Yazdanian et al. 1998). また Cho et al. は MDCK 細胞を単層培養することによって同様の検討を行っている. MDCK 細胞は Caco-2 細胞のようにコンフルエント状態で数週間維持する必要が無くスクリーニング手法としては有効な方法の一つといえる (Cho et al. 1989).

代謝プロセス

肝臓は代謝などによって個体レベルでの毒性発現に深く関与している. このことから, 肝臓を対象とした様々な *In vitro* 試験系が提案されており, 肝代謝クリアランスの予測, 代謝産物, 代謝経路の予測, 肝毒性の予測などに用いられている. 代表的な試験系は, ヒトやラットなどの肝ミクロソーム分画 (Chalbot and Morfin 2005; Wang et al. 2006)や, ヒトの代表的な薬物代謝酵素の混合発現系 (Yun et al. 2006), 肝組織のスライス培養 (Haenen et al. 2002; Martin et al. 2002), 単離肝細胞培養系 (Dambach et al. 2005), さらに肝臓そのものを用いた灌流法 (Szelag et al. 2003) などが挙げられる.

それぞれの手法の利点と課題に関しては, いくつかのレビュー中によくまとめられている (Hewitt et al. 2007; Houston and Carlile 1997). 肝ミクロソームや混合発現系は, 非常に簡便に利用できることが利点であるが, トランスポーターによる輸送効果が考慮できないことや, 酵素の発現比がコントロールしにくいことなど, 信頼性では劣る. 肝組織のスライス培養は, 検体が比較的多く取れる上, ヘテロな細胞集団からなる肝組織を残しているが, 切片内部への化学物質の拡散が律速になることが問題である. また, 切片作成時に発生する微弱電流などによる細胞障害が大きく, 切片厚みを薄くすることには限界がある. 肝臓そのものを用いた灌流法の報告例もあるが, 肝クリアランス, 代謝物同定などを目的に行うには非効率的といえる. これに対して, 単離肝細胞培養系, あるいは単離肝細胞懸濁液は, *In vivo* の肝クリアランス予測としては最も優れた方法であるといわれている (Trijtel et al. 2004; Trijtel et al. 2005). 特にヒトなどの高等動物由来の肝細胞を用いたものは, 信頼性の高い試験系として肝毒性や代謝物予測などに広く用いられている (Hewitt et al. 2007; Houston and Galetin 2003).

分布プロセス

分布プロセスは全身に及ぶために, 単一の細胞を培養するような試験では評価できず, 現状では専ら動物実験に頼っている. 具体的には, マウス・ラット・イヌなどに, 同位体標識した評価対象物質を様々な経路で暴露して, 経時的な血液サンプリングや胆管・腎臓へのカニューレーションによるサンプリングによって分布プロセスの評価がなされている (Fig. 1-5) (He et al. 2009; Chun et al. 2009; Dalvie et al. 2008; Chen et al. 2007). また, なんらかの蛍光物質などにより修飾した物質を導入してモニタリングする方法も考えられるが, 溶解性や膜透過性がオリジナル物質と異なると考えられ, 正確な体内分布を評価するためには, 動物実験に頼らざるを得ない. 従って, 体内動態プロセスの中でも分布

プロセスは特に *In vitro* 評価系が必要とされるプロセスであると考えられる。特に、脂溶性物質のような組織に蓄積されやすい物質は、血液-脳関門を通過し、組織に長時間蓄積されると考えられ、薬物が標的臓器に到達して薬効や毒性を発現する前に血中から消失してしまうため、標的臓器に対する薬効や毒性を正確に予測するためには、組織移行性の評価が必要不可欠である。

排泄プロセス

腎臓は薬物の代謝および排泄を行う能力を持つ臓器であり、薬物の排泄を担う主要な臓器の一つである(Hall & Rowland 1983; Rowland & Tozer 1995; Masereeuw & Russel 2001; Walton et al 2004; Shitara et al 2005)。これまでに、基底膜の受動輸送は内腔側の刷子縁膜の受動透過に比べて低いことが明らかにされている(Masereeuw & Russel 2001)。また、腎臓における代謝と排泄クリアランスについては、Fagerholm によるレビューに良くまとめられている(Fagerholm 2007)。

腎臓における排泄評価も小腸膜と同様に、ヒト正常上皮細胞を用いて評価予測することが最適ではあるが、実際に正常上皮を用いることが困難である。現在用いられているモデル細胞株としては MDCK 細胞が挙げられ、MDCK 細胞の受動輸送における膜透過係数が Caco-2 細胞における受動輸送の膜透過係数と同等であることが知られており、膜透過係数評価・予測に使用されている(Fagerholm et al. 1999; Irvine et al. 1999; Lundquist et al. 2002)。Sasaki et al. は形質転換を行い OATP-4 および MRP-2 を共発現させた MDCK-II 細胞の単層培養系で、複数の薬剤透過性を評価してラットの胆汁排泄濃度と比較することによって *In vitro* における胆汁排泄プロセスの模倣を行っている (Fig. 1-6) (Sasaki et al. 2004)。

これまで述べた通り、吸収や代謝プロセスに関しては多岐にわたる検討がなされ、有力な *In vitro* 評価試験系が確立されつつある。また、排泄プロセスに関しても局所的ではあるが、主要なメカニズムを模倣する *In vitro* 試験系の提案がなされている。一方で、分布プロセスに関しては *In vitro* 評価系はタンパク質と薬物の結合性評価などに留まっており、実際の分布評価は専ら動物実験に頼っているのが現状である。

動物実験を行わずに、*In vitro* 個別・複合細胞培養系で得られた実験データと数理モデルを組み合わせて、ヒトもしくは動物個体の体内動態評価を行うためには、実際の個体における体内動態パラメータを正確に設定することが必須であるが、上述してきた通り、体内動態を制御する吸収・分布・代謝・排泄の各プロセスに対して現状では必ずしも十分な *In vitro* 試験系が確立されていないため、個体における体内動態パラメータを正確に予測し得る個別・複合細胞培養系の確立が望まれている。

1.2.2 複合培養系

静置複合培養系

個別の培養系で得られた情報を生理学的毒物動力学モデルで全身に積み上げるという手法では個体レベルでの臓器間相互作用が取り込めないことから、重要な複数の臓器を同じ培養系内で同時に培養するような培養系が当然考えられ、体内動態プロセスと標的臓器細胞での毒性を一括評価するための簡便なスクリーニング系を目指した検討がなされている (Choi et al. 2004; Sakai et al. 2001; Sakai et al. 2003). Sakai et al. は、市販の半透膜型培養器を利用し、標的細胞として TIG-1 (ヒト正常二倍体線維芽細胞) を培養したマルチウェルプレートと小腸上皮モデルとして Caco-2 細胞を培養したカルチャーインサートを積層して複合培養した。この複合培養系での毒性試験で、マウスやラットの急性致死毒性との相関性に改善が見られるなど、化学物質を直接的に標的細胞に負荷するような通常の評価系の前に、培養細胞からなるモデル小腸膜を置くことで、吸収率の大小を補正した評価を簡便に行っている (Sakai et al. 2001). Choi et al. は、同様の培養系で Hep G2 を用い (Fig. 1-7)、小腸や肝臓のチトクローム P450 (CYP 1A1/2) を中心とする解毒メカニズムによって代謝活性化され、強い毒性が発現することが知られるベンゾ[a]ピレン (BaP) などをモデル毒物として、小腸膜の逆輸送および小腸と肝における代謝の毒性発現への寄与を明らかにしている (Choi et al. 2004). このような評価系は、市販の培養器を用いていることから培養維持も比較的簡便に行えると考えられる。しかしながら、厳密には人体での生理学的な血液循環を模しているわけではない。また、その小ささゆえ多数回のサンプリングが必要な速度論的な評価には適さない。さらには、人体に比較して細胞密度が著しく低いものとなっているという問題点がある。

複合灌流培養系

Sakai et al. は、上述の Caco-2 細胞からなる小腸膜モデルと、肝組織モデルとして多孔質マイクロキャリアを用いてヒト肝ガン由来の Hep G2 細胞の高密度培養を行い、生理学的灌流回路で連結した灌流培養システムの開発をおこなった (Fig. 1-8) (Sakai et al. 2003). このシステムは経口摂取を想定したもので、その際の初回通過効果 (吸収代謝) を模倣・評価することを目指している。システム全体を巡回振盪することで酸素供給を確保し、高密度培養下で細胞活性を維持しながら少なくとも 1 週間連続複合培養することに成功している。また、複合灌流培養している両細胞の代謝酵素 CYP 1A1/2 の活性を 3-メチルコラントレン (3MC) を用いて誘導すると、各々の単独培養での誘導時に比べて、酵素活性が 2-3 倍に高まるという結果を得ている (Fig. 1-9). この結果は、両細胞を灌流下で良好な状態で間接的に接触させることによるなんらかの相互作用であると指摘している。このシステムのようにはなれた組織間での相互作用は、単一臓器モデルで得られる結果を線型結合するだけでは予測しえない現象であり、人体のシステムとしての環境応答の一端を示している可能性がある。

このような大型の複合灌流培養系の今後の課題の一つとして、システム内の細胞・培養液総体積比を生体内と同じオーダーまで高める必要があるであろう。例えば Sakai et al. の灌流培養システムのスケールを人体の細胞密度と比較すると、細胞数については 1/7,000~8,000 であるのに対し、それらと接する培養液量はヒト全血液量基準で 1/200 と、1-2 桁低い細胞密度しか達成できていない。人体と同じく微細な毛細血管網を配備させ、細胞生存率を落とさずに高密度化することが可能なデザイン・技術の開発が必要である。

1.2.3 マイクロ流体デバイスを利用した複合培養

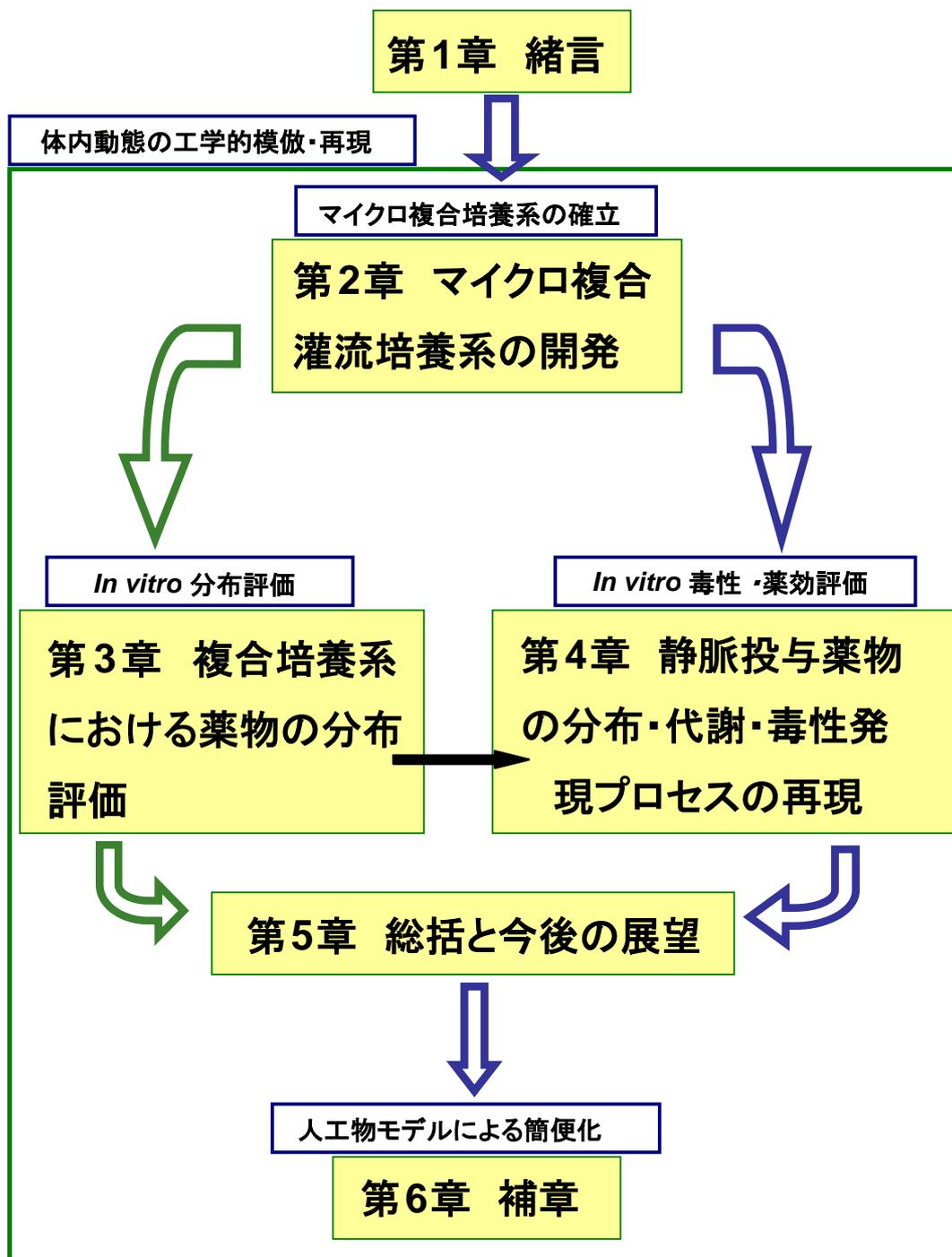
上記のような複合灌流培養は生理学的には正しいが、それを既存の培養技術で再現しようとする、装置も必然的に大型化・複雑化し、実用上の意義が薄くなってしまう。そこで近年、マイクロ流体デバイス技術を活用することで、灌流培養を可能としながらもより実用的なマイクロバイオリアクターの開発が行われている。特に体内動態評価のためのマイクロ複合細胞培養系の検討として、これまでにコーネル大学の Shuler らのグループによる先駆的研究がなされた。Viravaidya et al. は、マウス脂肪前駆細胞株 3T3-L1 を成熟脂肪細胞へ分化誘導して作成する人工的な脂肪組織コンパートメントを提案している (Viravaidya et al. 2004a)。さらに、肺、肝臓、脂肪のモデル細胞を複合培養したマイクロデバイスを作成し (Fig. 1-10)、静脈投与したナフタレンが肝で代謝活性化され、肺に特異的な毒性を発現するという *In vivo* におけるプロセスを *In vitro* で再現することに成功している (Viravaidya et al. 2004b)。また、それらのデバイス技術は HμREL Corporation として企業化され、提供されている。更に Sung et al. は上述の細胞とは異なる細胞の組み合わせにより、抗がん剤の代謝と毒性を評価している (Fig. 1-11) (Sung et al. 2009)。Shuler らのグループとは異なる形状のデバイスを用いて、Chang et al. は TGF- β の選択的毒性を模倣している (Fig. 1-12) (Chang et al. 2009)。このような複合細胞培養システムは、通常の PBTK モデルに仮定として含まれない未解明な臓器間相互作用を実験的に記述・解明するツールとなる唯一の *In vitro* 培養系である (Ghanem and Shuler 2000)。

しかしながら、現在提案されている複合培養系は各コンパートメントの完成度が低く、デモンストレーション的な要素が大きい。実用的な薬効・毒性評価系を目指すには、培養液総体積に対する細胞密度を生理学的条件に近づけるなど、培養系の内部環境の大幅な改善が必須であった。

1.3 本研究の目的

生理学的意義のある *In vivo* 様の応答を取得可能な新規複合灌流培養系を開発することを最終的目的として、細胞密度などの培養条件が *In vivo* に比べて同等かつ分布などの複数臓器の関与する現象を再現可能なマイクロ複合細胞培養系を提案する。また、既存の培養

手法を用いた複合灌流培養系は煩雑な培養操作を必要とすることから、操作性の改善を併せて試みる。現状では、体内動態の全てを同時に再現する *In vitro* 試験系は皆無であり、本研究ではまず分布・代謝・毒性発現プロセスに着目し、上述の各プロセス評価に特化した新規マイクロ複合培養系の検討を行う。本論文の構成を以下に示す。



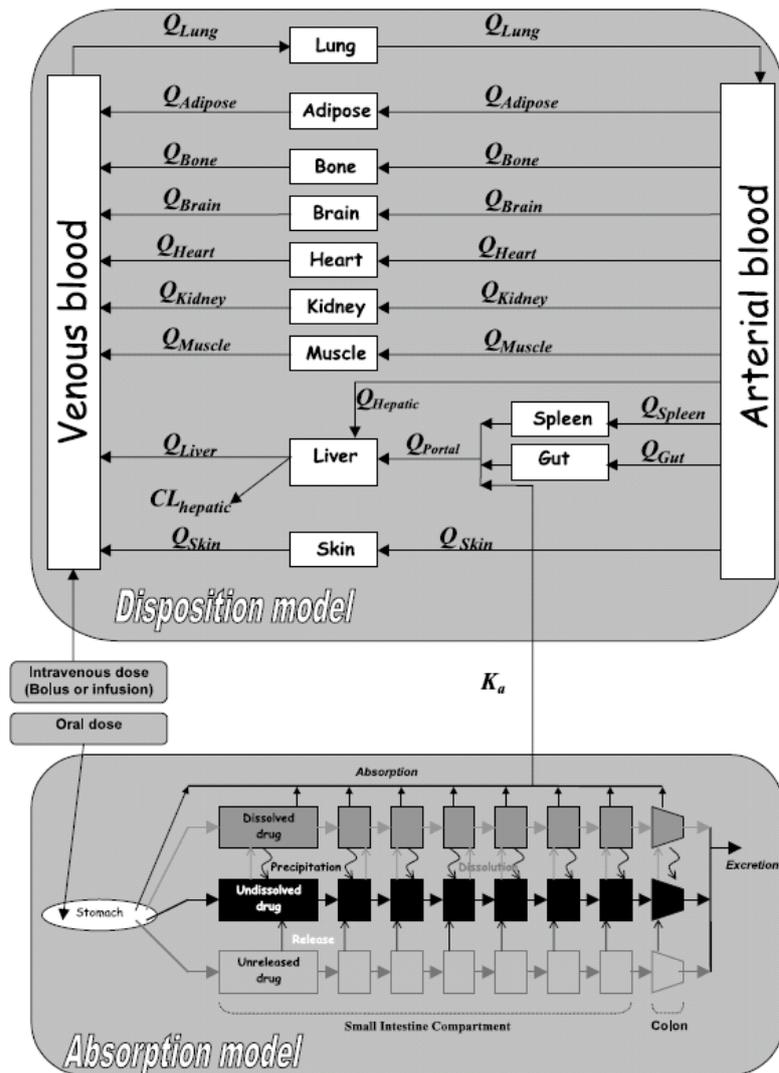


Fig. 1-1

Fig. 1. Conceptual PBPK model structure for a disposition model (Poulin and Theil, 2002b) linked with an oral absorption model (GASTROPLUS[®], graphical presentation modified from Simulations Plus, Inc.). Note that k_a , rate of absorption and Q , blood flow rate.

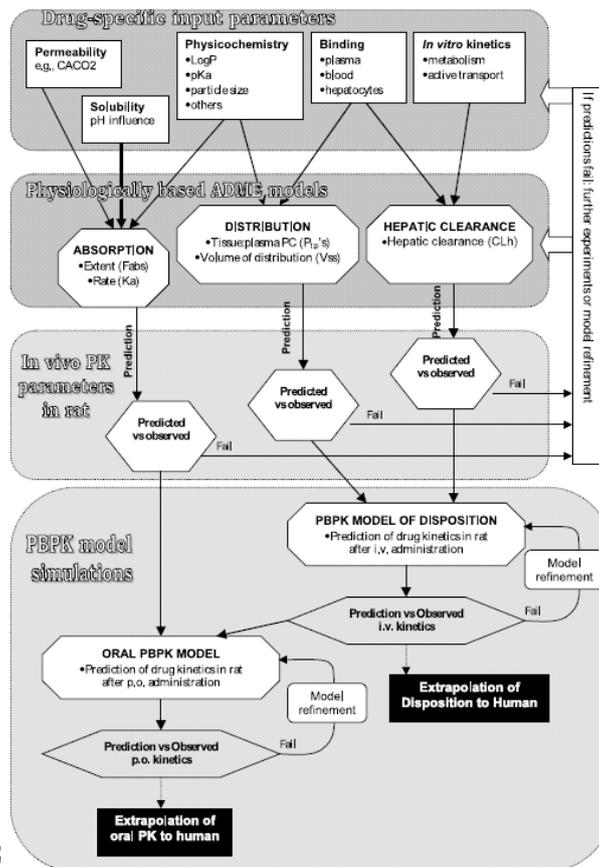


Fig. 1-2

PBPK modeling strategy by using feedback circles between modeling and experimental data. The *in silico/in vitro* based predictions by using PBPK models for distribution, clearance and absorption allow the prediction of *in vivo* PKs prior to *in vivo* studies. *In vivo* studies are performed as confirmatory trials (validation experiments) to justify the model assumptions. First, *in vivo* predictions are focused on disposition. After model confirmation by using *in vivo* data from the rat after intravenous administration, the model is used to predict disposition in humans. Then, the model can be further extended by linking other input models such as absorption models predicting rate and extent of absorption. Again validation with oral PK data from rat will be used for model validation prior to prediction of human oral PK.

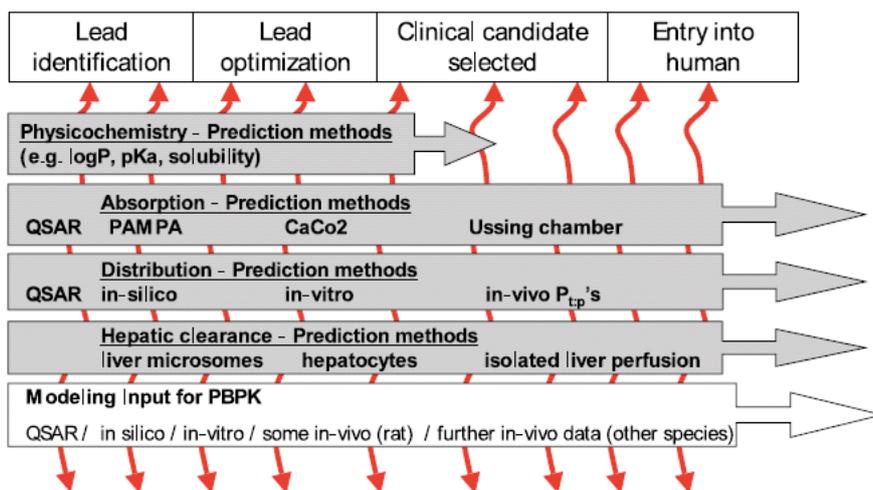


Fig. 1-3 Modeling approach within drug discovery and early non-clinical development by using available data on physicochemistry, absorption, distribution and clearance. Depending on the stage (lead identification, lead optimization, clinical candidate selected, entry in human stage) different quality and quantity of data is available.

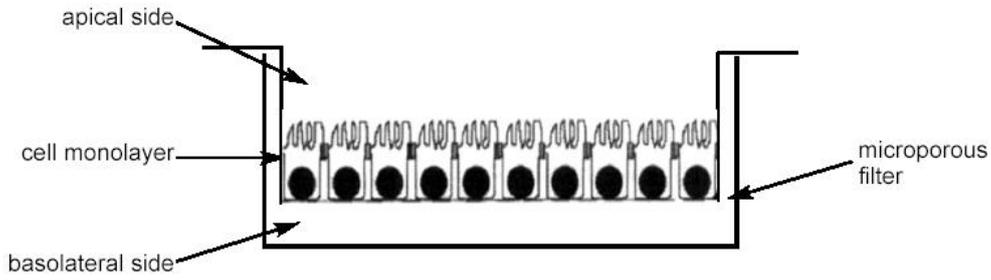
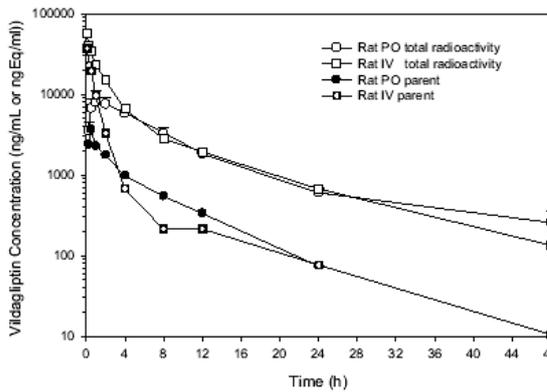


Fig. 1-4

A schematic representation of culture of Caco-2 cells on a microporous filter



Sample	Time post dosing ^a		
	0.25 h	2 h	8 h
Plasma (ng/g) ^b	1370 ± 141	56.9 ± 47.1	17.7 ± 4.55
Brain (ng/g) ^b	16.2 ± 1.77	11.8 ± 9.95	3.91 ± 1.41
B:P ^c	0.0118 ± 7.11E-05	0.361 ± 0.440	0.242 ± 0.148
Heart (ng/g) ^b	298 ± 128	161 ± 128	1.63 ± 2.83
H:P ^c	0.224 ± 0.117	7.79 ± 10.8	0.125 ± 0.216
Kidney (ng/g) ^b	1060 ± 197	169 ± 156	99.3 ± 52.6
K:P ^c	0.787 ± 0.226	4.81 ± 3.71	6.18 ± 2.04
Liver (ng/g) ^b	12900 ± 2450	1960 ± 622	5410 ± 1230
L:P ^c	9.44 ± 0.816	32.1 ± 25.5	310. ± 50.2

^a Data presented as mean ± standard deviation; *n* = 2 for 0.25 h; *n* = 3 for 2 h and 8 h

^b Concentration expressed as nanograms (ng) of ON 01910.Na per gram (g) of matrix (plasma, brain, heart, kidney, or liver)

^c Indicates ratio between organ tissue concentration and plasma concentration

Fig. 1-5

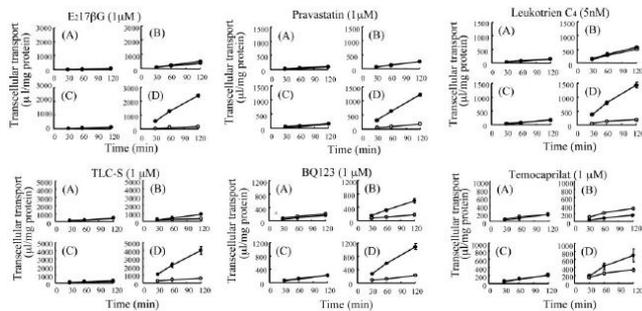


Fig. 1-6

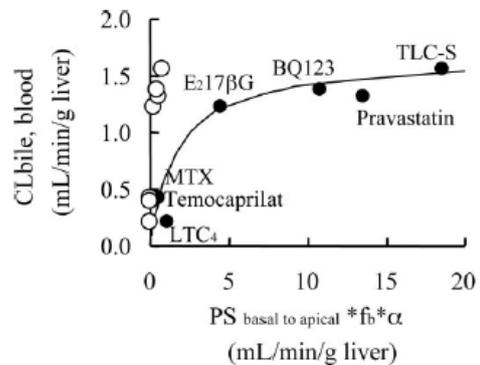


Fig. 9. Comparison of in vivo biliary excretion clearances and in vitro transcellular transport clearance across the double-transflectant. The in vivo biliary excretion clearance of E₂17βG, pravastatin, LTC₄, TLC-S, temocaprilat, methotrexate, and BQ-123 was compared with the transcellular transport clearance of respective ligands across the double-transflectant. Data were taken from Figs. 3 and 8 and Table 1. The x-axis

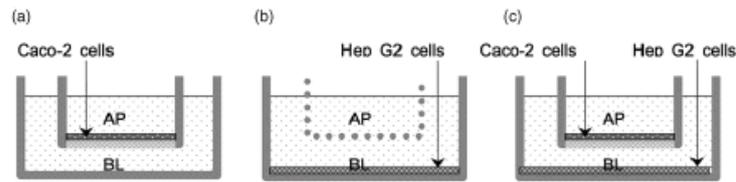


Fig. 1-7

Schematic diagram of the three different culture systems used in this study. (a) Pure culture system using Caco-2 cells; (b) pure culture system using Hep G2 cells; (c) double-layered coculture system using Caco-2 and Hep G2 cells.

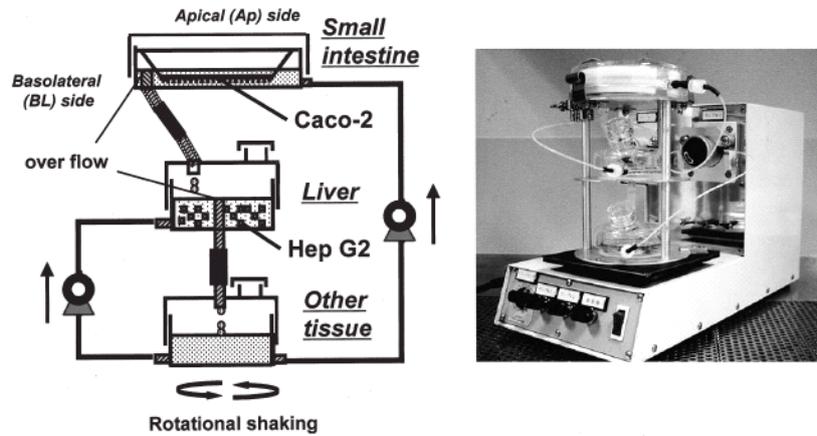


Fig. 1-8

Schematic representation and a photograph of the perfusion coculture system

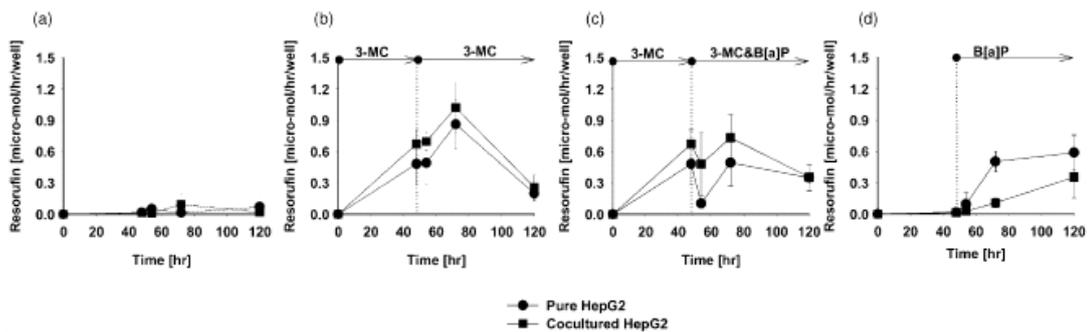
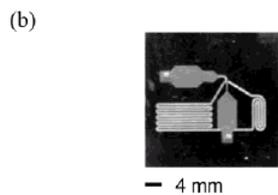
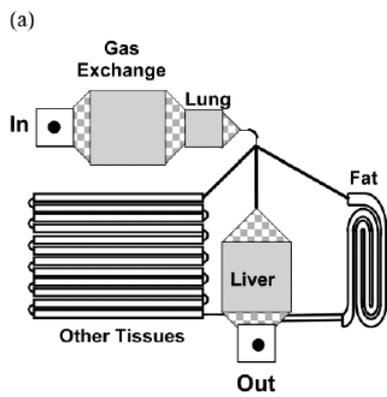


Fig. 1-9

CYP1A1/2 capacity of Hep G2 cells under the four different conditions. (a) control, (b) 3-MC induction, (c) 3-MC induction and B[a]P loading, (d) B[a]P loading. (●) Pure Hep G2; (■), Cocultured Hep G2. Each data point represents the mean \pm SD of four cultures from independently duplicated experiments.



(b) A schematic diagram of 1" × 1" μ CCA design. Dimensions of each chamber are as followed (w × l × d): lung (2 mm × 2 mm × 20 μ m), liver (3.5 mm × 4.6 mm × 20 μ m), fat (0.42 mm × 50.6 mm × 100 μ m), and other tissues (0.4 mm × 109 mm × 100 μ m). Note that, according to the PBPK model, 25%, 9%, and 66% of flow from the lung chamber go to liver, fat, and other tissues chambers, respectively. The fat chamber represents a slowly perfused organ and contains no cells. (b) The actual size of μ CCA; the scale bar indicates 4 mm.

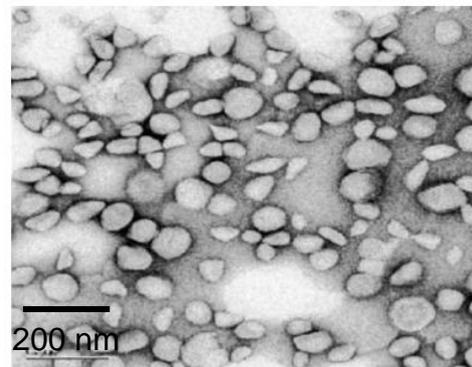
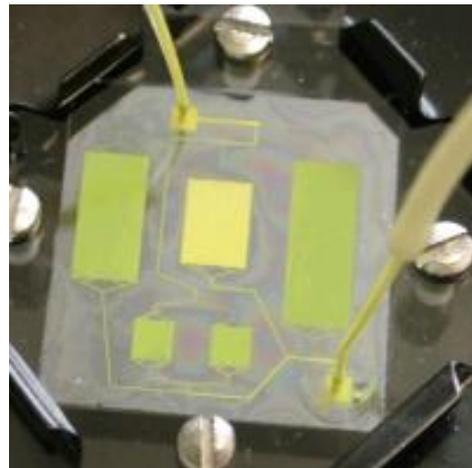


Fig. 1-10

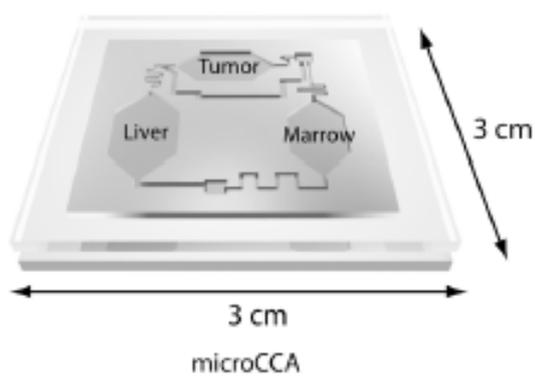


Fig. 1-11

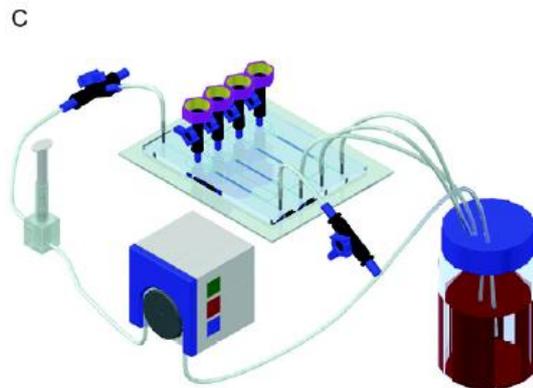


Fig. 1-12

参考文献

- Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. 1995. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res*, **12**(3):413-20
- Artursson P, Palm K, Luthman K. 2001. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev*, **46**:27-43.
- Blaauboer BJ. 2001. Toxicodynamic modelling and the interpretation of in vitro toxicity data. *Toxicol Lett*, **120**(1-3):111-23.
- Blaauboer BJ. 2003. The integration of data on physico-chemical properties, in vitro-derived toxicity data and physiologically based kinetic and dynamic as modelling a tool in hazard and risk assessment. A commentary. *Toxicol Lett*, **138**(1-2):161-71.
- Brown RP, Delp MD, Lindstedt SL, Rhomberg LR, Beliles RP. 1997. Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models. *Toxicol Ind Health*, **13**(4):407-84.
- Chalbot S, Morfin R. 2005. Human liver S9 fractions: metabolism of dehydroepiandrosterone, epiandrosterone, and related 7-hydroxylated derivatives. *Drug Metab Dispos*, **33**(4):563-9.
- Chen LJ, Lebetkin EH, Nwakpuda EI, Burka LT. 2007. Metabolism and disposition of n-butyl glycidyl ether in F344 rats and B6C3F1 mice. *Drug Metab Dispos*, **35**(12): 2218-2224.
- Cho M.J, Thompson D.P, Cramer C.T, Vidmar T.J, Scieszka J.F. 1989. The madin darby canine kidney (MDCK) epithelial cell monolayer as a model cellular transport barrier. *Pharmaceut Res*, **6**: 71-77
- Choi SH, Nishikawa M, Sakoda A, Sakai Y. 2004. Feasibility of a simple double-layered coculture system incorporating metabolic processes of the intestine and liver tissue: application to the analysis of benzo[a]pyrene toxicity. *Toxicol In Vitro*, **18**:393-402.

- Chun AW, Cosenza SC, Taft DR, Maniar M. 2009. Preclinical pharmacokinetics and in vitro activity of ON 01910.Na, a novel anti-cancer agent. *Cancer Chemother Pharmacol*, **65**(1): 177-186.
- Dalvie D, Cosker T, Boyden T, Zhou S, Schroeder C, Potchoiba MJ. 2008. Metabolism distribution and excretion of a matrix metalloproteinase-13 inhibitor, 4-[4-(4-fluorophenoxy)-benzenesulfonylamino]tetrahydropyran-4-carboxylic acid hydroxyamide (CP-544439), in rats and dogs: assessment of the metabolic profile of CP-544439 in plasma and urine of humans. *Drug Metab Dispos*, **36**(9): 1869-1883.
- Dambach DM, Andrews BA, Moulin F. 2005. New technologies and screening strategies for hepatotoxicity: use of in vitro models. *Toxicol Pathol*, **33**(1):17-26.
- Fagerholm U, Nilsson D, Knutson L, Lennernas H. 1999. Jejunal permeability in humans *in vivo* and rats *in situ*: investigation of molecular size selectivity and solvent drug. *Acta Physiol Scand*, **165**(3): 315-324
- Fagerholm U. 2007. Prediction of human pharmacokinetics – renal metabolic and excretion clearance. *J Pharm Pharmacol*, **59**: 1463-1471
- Ferrec E.L, Chesne C, Artusson P, Brayden D, Fabre G, Gires P, Guillou F, Rousset M, Rubas W, Scarino ML. 2001. In vitro model of the intestinal barrier. *ATLA*, **29**: 649-668
- Flint OP. 1998. Predicting In Vivo Toxicity. *Toxicol In Vitro*, **12**:591-595.
- Ghanem A, Shuler ML. 2000. Combining cell culture analogue reactor designs and PBPK models to probe mechanisms of naphthalene toxicity. *Biotechnol Prog*, **16**(3):334-45.
- Haenen B, Rompelberg C, van Twillert K, Hamzink M, Dormans J, van Eijkeren J. 2002. Utility of rat liver slices to estimate hepatic clearance for application in physiologically based pharmacokinetic modeling: a study with tolbutamide, a compound with low extraction efficiency. *Drug Metab Dispos*, **30**(3):307-13.

- Hall S, Rowland M. 1983. Relationship between renal clearance, protein binding and urine flow digitoxn, a compound low clearance in the isolated perfused rat kidney. *J Pharmacol Exp Ther*, **227**: 174-179
- He H, Tran P, Yin H, Smith H, Flood D, Kramp R, Filipeck R, Fischer V, Howard D. 2009. Disposition of vildagliptin, a novel dipeptidyl peptidase 4 inhibitor, in rats and dogs. *Drug Metab Dispos*, **37**(3): 545-554
- Hewitt NJ, Lechon MJ, Houston JB, Hallifax D, Brown HS, Maurel P, Kenna JG, Gustavsson L, Lohmann C, Skonberg C and others. 2007. Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies. *Drug Metab Rev*, **39**(1):159-234.
- Houston JB, Carlile DJ. 1997. Prediction of hepatic clearance from microsomes, hepatocytes and liver slices. *Drug Metab Rev*, **29**(4):891-922.
- Houston JB, Galetin A. 2003. Progress towards prediction of human pharmacokinetic parameters from in vitro technologies. *Drug Metab Rev*, **35**(4):393-415.
- Irvine JD, Takahashi L, Lackhart K, Cheong J, Tolan JW, Selick HE, Grove JR. 1999. MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) cells: a tool for membrane permeability screening. *J Pharm. Sci*, **88**: 29-33
- Kedinger M, Haffen K, Simon-Assmann P. 1987. Intestinal tissue and cell cultures. *Differentiation*, **36**:71-85
- Liu L, Pang KS. 2006. An integrated approach to model hepatic drug clearance. *Eur J Pharm Sci*, **29**(3-4):215-30.
- Lundquist S, Renftel M, Brillault J, Fenart L, Cecchlli R, Dehouck MP. 2002. Prediction of drug transport through the blood brain barrier *in vivo*: a comparison between *in vitro* cell models. *Pharm Res*, **19**: 976-981
- Martin H, Sarsat JP, Lerche-Langrand C, Housset C, Ballardur P, Toutain H, Albaladejo V. 2002. Morphological and biochemical integrity of human liver slices in

- long-term culture: effects of oxygen tension. *Cell Biol Toxicol*, **18**(2):73-85.
- Maruyama W, Yoshida K, Tanaka T, Nakanishi J. 2003. Simulation of dioxin accumulation in human tissues and analysis of reproductive risk. *Chemosphere*, **53**(4):301-13.
- Masereeuw R, Russel FGM. 2001. Mechanisms and clinical implications of renal drug excretion. *J Drug Metab. Rev*, **33**: 299–351
- Rowland M, Tozer TN. 1995. Clinical pharmacokinetics: concepts and applications. Williams & Wilkins, Baltimore, USA
- Sakai Y, Arai T, Sakoda A, Suzuki M. 2001. Development of a simple double-layered cell culture system using Caco-2 and TIG-1 cells as a new cytotoxicity test. *AATEX*, **7**(2-3):47-58
- Sakai Y, Fukuda O, Choi SH, Sakoda A. 2003. Development of a biohybrid simulator for absorption and biotransformation processes in humans based on in vitro models of small intestine and liver tissues. *J Artif Organs*, **6**(4):273-281.
- Sasaki M, Suzuki H, Aoki J, Ito K, Meier PJ, Sugiyama Y. 2004. Prediction of in Vivo Biliary Clearance from the in Vitro Transcellular Transport of Organic Anions across a Double-Transfected Madin-Darby Canine Kidney II Monolayer Expressing Both Rat Organic Anion Transporting Polypeptide 4 and Multidrug Resistance Associated Protein 2. *Mol Pharmacol*, **66**: 450-459.
- Shitara Y, Sato H, Sugiyama Y. 2005. Evaluation of drug-drug interaction in the hepatobiliary and renal transport of drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**: 689–723
- Sung JH, Shuler ML. 2009. A micro cell culture analog (microCCA) with 3-D hydrogel culture of multiple cell lines to assess metabolism-dependent cytotoxicity of anti-cancer drugs. *Lab Chip*, **9**(10): 1385-1394.
- Szelag A, Magdalan J, Rutkowska M, Dziewiszek W, Trocha M, Rzepka M, Piesniewska M, Fereniec L. 2003. Influence of nifedipine, nitrendipine and verapamil at low concentration on antipyrine metabolism examined by extracorporeal rat liver

- perfusion. *Pol J Pharmacol*, **55**(2):203-8.
- Theil FP, Guentert TW, Haddad S, Poulin P. 2003. Utility of physiologically based pharmacokinetic models to drug development and rational drug discovery candidate selection. *Toxicol Lett*, **138**(1-2):29-49.
- Treijtel N, Barendregt A, Freidig AP, Blaauboer BJ, van Eijkeren JC. 2004. Modeling the in vitro intrinsic clearance of the slowly metabolized compound tolbutamide determined in sandwich-cultured rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos*, **32**(8):884-91.
- Treijtel N, van Helvoort H, Barendregt A, Blaauboer BJ, van Eijkeren JC. 2005. The use of sandwich-cultured rat hepatocytes to determine the intrinsic clearance of compounds with different extraction ratios: 7-ethoxycoumarin and warfarin. *Drug Metab Dispos*, **33**(9):1325-32.
- Viravaidya K, Jan E, Shuler ML. 2004a. Lipid-Gel and Poly(Dimethylsiloxane) Film to Mimic Bioaccumulation in Adipocytes. *Biotechnol Bioeng*, **86**(6):643-649.
- Viravaidya K, Sin A, Shuler ML. 2004b. Development of a microscale cell culture analog to probe naphthalene toxicity. *Biotechnol Prog*, **20**:316-323.
- Wang Q, Ye C, Jia R, Owen AJ, Hidalgo IJ, Li J. 2006. Inter-species comparison of 7-hydroxycoumarin glucuronidation and sulfation in liver S9 fractions. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, **42**(1-2):8-12.
- Walton K, Dorne JLCM, Renwick AG. 2004. Species- specific uncertainty factors for compounds eliminated principally by renal excretion in humans. *Food Chem. Toxicol*, **42**: 261–274
- Yazdanian M, Glynn SL, Wright JL, Hawi A. 1991. Correlating partitioning and Caco-2 cell permeability of structurally diverse small molecular weight compounds. *Pharmaceut Res*, **15**(9):1490-1495.
- Yun CH, Yim SK, Kim DH, Ahn T. 2006. Functional expression of human cytochrome P450 enzymes in Escherichia coli. *Curr Drug Metab*, **7**(4):411-29.

Zhang C, Zhao Z, Abdul Rahim NA, van Noort D, Yu H. 2009. Towards a human-on-chip: culturing multiple cell types on a chip with compartmentalized microenvironments. *Lab Chip*, **9**(22): 3185-3192.

国立医薬品食品衛生研究所「化学物質のリスクアセスメント」編集委員会. 1998. 化学物質のリスクアセスメントー現状と問題点ー. 薬事時報社:115-139.

第2章 マイクロ複合灌流培養系の開発

2.1 緒言

化学物質の体内動態評価のための *In vitro* 評価系に求められる生理学的な新規複合培養系として特に重要な点は；細胞密度が生体と同等であること・複数臓器が同時に影響を及ぼす現象を再現可能であること・培養条件の制御が容易であること，が挙げられる．以下に各項目について詳述する．

1. 細胞密度が *In vivo* と同等

第 1 章で触れた既往の研究において，マイクロ流体デバイスを利用した複合灌流培養系においても，外部の送液ポンプと連結して培養を行う必要があったため，培養液総体積に対する細胞密度が生理学的条件ではなくなってしまう，複合灌流培養の意義が薄れてしまうといった課題を解決する必要がある．

2. 分布などの複数臓器が同時に関与する現象を模倣可能

吸収・代謝・排泄プロセスの個別 *In vitro* 試験系の発展と比して，分布プロセスなどの複数臓器が同時に関与する生体内反応の *In vitro* 試験系は皆無であり，複数異種臓器由来細胞が生理学的に連結された培養系内にて複合灌流培養を行う必要がある．特に，分布プロセスは *In vitro* 複合灌流培養系のような複数異種臓器由来細胞を複合培養する試験系において，各臓器の寄与を同時に評価する意義が高い現象の一つであると考えられる．

3. 操作性に優れ自由に培養条件を制御できる

様々なモデル細胞を利用するためには，分化誘導プロトコールなどの各細胞の至適培養条件を個別に並列制御する必要があるが，既往の研究で報告されている複合細胞培養系では個別灌流路が無いために，別々に培養ディッシュ上にて分化誘導処理を行い，播種固定化する必要があるために煩雑な操作が必要で，コンタミネーションなどの雑菌の混入リスクが高まるといった問題がある．また，個別のモデル細胞で生じた剥離・細胞死などの本来評価目的としない影響が他のモデル細胞に波及してしまう可能性もある．

2.2 本章の目的

第 1 章で述べた既往の研究における課題解決に向けて，複数臓器が関与する生体内現象を再現可能な複合細胞培養系の開発を試みる．特に，複数異種の臓器由来細胞を全体灌流培養直前まで，個別の培養条件に従って個別灌流培養可能なマイクロバイオリクターを作製する．また，送液系を内蔵させることにより培養液体積を極力微小化することで，相対的に細胞密度を改善し，生理学的培養条件を満たす培養系を目指す．

2.3 実験

2.3.1 スリーコンパートメントマイクロデバイスの設計と作製

スリーコンパートメントマイクロデバイスの設計

複数異種の臓器モデル細胞を同時に固定化する目的で、本研究では 3 つの並列した同形状の細胞培養部（コンパートメント）が全体灌流回路を介して連結されたマイクロデバイス设计了。また、各臓器モデル細胞の個別誘導分化プロトコルを同時にオンチップで実現する目的で各細胞培養部を独立して灌流培養する個別灌流回路および各コンパートメントを連結する灌流路上にシリコンチューブを利用した簡易バルブを配備させた。AutoCAD を用いて作図したスリーコンパートメントデバイスの概略を Fig. 2-1 に示す。

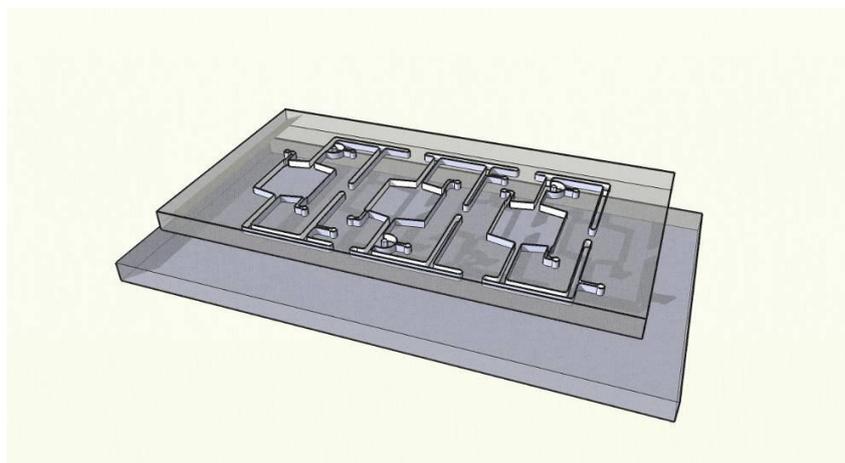
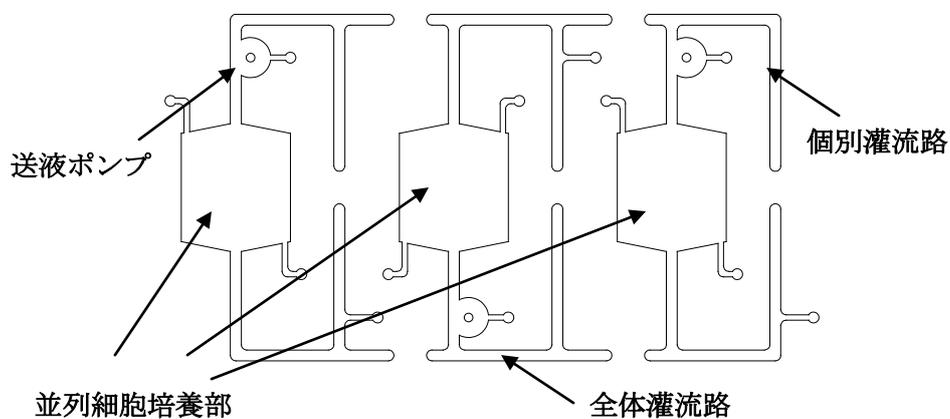


Fig. 2-1 作製するスリーコンパートメントデバイスの概要

スリーコンパートメントデバイスの作製

マイクロデバイスの材質

マイクロデバイスの材料として一般的に用いられるガラスは、比較的細胞培養に向いていると考えられるが、ガス透過性が乏しいためにデバイス内部の酸素不足が懸念される。また、ガラスを用いてマイクロ流路構造を作製するためにはガラス表面を削ることによってマイクロ流路構造を得るのが一般的であるが、手法自体が難しく流路構造の再現性にも限界がある。

ガラス以外の一般的な材料としてはアクリル樹脂 (PMMA) が挙げられる。ガラス同様に光透過性を持ち、適当な処理によって細胞接着が可能な表面を得ることが可能である。また、微細加工を行う手法も多数あり、流路構造の再現性が確保可能な材料である。しかし、ガス透過性に乏しいうえ、熱および有機溶媒への耐性が極めて低いといった特徴をもつため、滅菌処理が困難である。

本研究では、上述したデバイスに要求される事項を満たす材料として、シリコンゴムの一種であるポリジメチルシロキサン (PDMS) を用いる。PDMS は安価で光透過性に優れた材料で、生体適合性を有するので工業や医療などの広範な分野で使用されている (El-Ali et al. 2006; Khademhosseini et al. 2006)。

Nakazawa et al. は、ガラスや PMMA 基板の上に PDMS でくぼみを作成し、成熟ラット肝細胞の自発的なスフェロイド化を促した (Nakazawa et al. 2006)。Ostrovidov et al. は、 $5 \times 5 \mu\text{m}$ の穴を有する PDMS 膜を作成して肝細胞培養を行った (Ostrovidov et al. 2004)。また、PDMS は酸素透過性に優れることから、マイクロデバイスのような微小空間内に高密度に細胞を固定化・培養する際に懸念される酸素不足の問題を回避できる素材である。Nishikawa et al. は PDMS の高酸素透過性を利用して、表面改質した PDMS 上にラット成熟肝細胞を安定固定化することによって、肝細胞に直接的かつ十分な酸素供給を行っている (Nishikawa et al. 2008)。

PDMS は Fig. 2-2 に示すように側鎖にメチル基を有するシロキサン系ポリマーであり、白金を含む触媒溶液を加えることによって重合 (架橋) する。PDMS は射出成形に用いられるような熱可塑性のプラスチックに比べ流動性が高いため、微細な構造であっても侵入・硬化することが可能である。この性質を応用して、マイクロ構造の凹凸を反転した鋳型を用いた型どり (モールドイング) 法による微細構造を製作する手法が提案されている (Effenhauser et al. 1997; Delamarche et al. 1997; Hosokawa et al. 1999; Duffy 1998; Fujii 2002)。この手法はシリコンやガラスを用いたリソグラフィと対比し、「ソフトリソグラフィ」と呼ばれている。鋳型に対してミリ～サブミクロンのサイズまで忠実に再現することができ、同じ鋳型を複数回使用することができるため、再現性よく低コストで使い捨て可能なデバイスの作製が可能である。

PDMS は光学特性にも優れており、可視光領域を用いた光学的な観察が可能である。加えて、酸素透過性に非常に優れているのでデバイス内部が酸素不足になるのを防ぐことがで

きる (Charati et al. 1998). また, 200 °C程度まで変性することなく使用可能であることから, 加熱滅菌 (オートクレーブ) することができる.

灌流培養のための内部送液システム

既存の灌流培養系では, 培養液を灌流するための送液システムとしてペリスタリックポンプなどの外部ポンプを用いており, 大型のシステムになってしまっている. このような大型システムをCO₂インキュベータ内で運転することは汎用性に欠けるため現実的ではない. また, 外部送液システムを用いる場合, マイクロデバイス内部容量の500~1000倍の培養液がタンクに必要となるため細胞数に対する培養液の体積の割合が非生理学的になる. これによって細胞からの分泌物が希釈されてしまうため目的とする臓器間の相互作用を評価することが困難になってしまう. また, 外部ポンプとの接続に用いるチューブ類は全長が長いと滅菌処理が困難で, 雑菌の混入や汚染の危険性が高まる.

これらの問題を解決するための方法として, マイクロデバイス自体に送液システムを内蔵させてしまうことが考えられる. 内蔵型ポンプであれば培養液量を増やす必要がなく, 滅菌処理も比較的容易であると考えられる. これまでも様々な内蔵型ポンプが研究・提案されている (Seiler et al. 1993; Kim et al. 2005; Grover et al. 2003; Jang et al. 2004; Cooney et al. 2004; Li et al. 2003; Kim et al. 2004; Yamahata et al. 2005; Unger et al. 2000; Husband et al. 2004; Jeong et al. 2005; Suh et al. 2005). 特に, 非機械式ポンプとして電気浸透流型, 機械式ポンプとしてダイヤフラム型・蠕動型などのポンプは実用段階に達しつつある. これらのポンプの中で, 磁力を有する回転子をデバイス内部に設置し, この回転子を外部からスターラーモータによって回転させることで流路内に流れを起こす送液システムが提案されている (Ryu et al. 2004; Agarwal et al. 2005, 2007). 磁気駆動のため回転子の軸受け部分の取り付けなどが不要で, 回転方向によって流れの方向が決まるので特別なバルブ機構を必要としない. また, デバイス外部に必要な制御機構は小型のスターラーモータのみであり, 並列に設置することが容易である. さらに, 回転子がある程度大きければ細胞などの異物の混入による回転の障害もない. ポンプチャンバの入口側と出口側の圧力差によって送液量が変化してしまうが, ループ上に密閉されているオンチップ灌流の系においては圧力差が一定となることからこの問題は無視し得る. このような利点から, 本研究においても, 磁気駆動式回転型マイクロポンプのデバイスへの適用を試みる. 送液原理の模式図を Fig. 2-3 に示す.

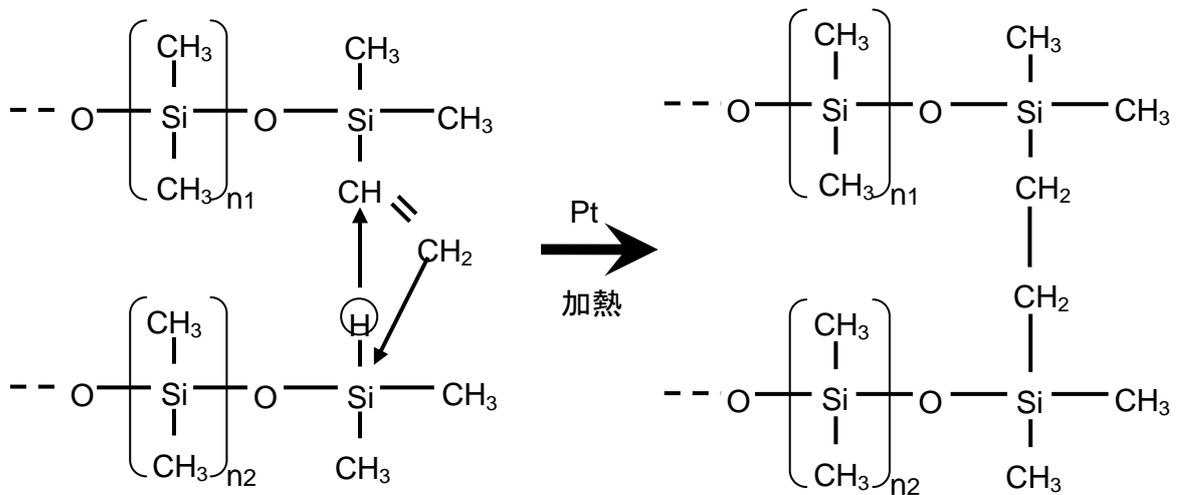


Fig. 2-2 ポリジメチルシロキサン (PDMS) の化学構造と重合過程

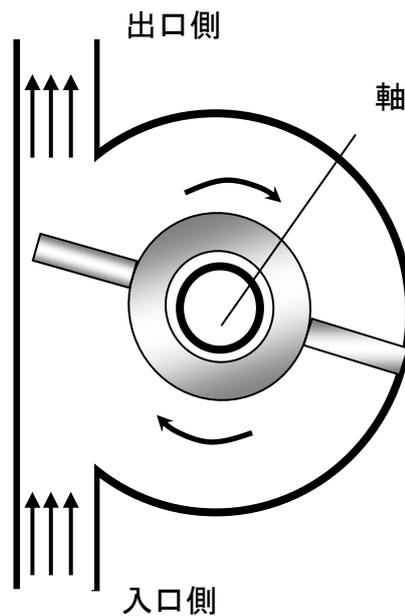


Fig. 2-3 磁気駆動式回転型マイクロポンプの原理

Fig. 2-4 にスリーコンパートメントデバイス作製の流れを示し、以下に具体的な操作条件について述べる。

①PDMS 型の作製

PDMS 型はモールドイング法を用いて作製した。このモールドイング法による微細流路の製作にはモールドイングの鋳型となるモールドマスタが必要となる。本研究では、モールドマスタをシリコンウェハと感光性樹脂であるネガティブフォトレジストを用いてフォトリソグラフィによりマスタモールドを得た。

i) モールドマスタの作製

鋳型構造は SU-8 (2100, Microchem; USA) を用いて作製した。このフォトレジストは比較的厚い膜 (100 μm ~) を構成することができる。通常、このフォトレジストはスピニングコート回転数により膜厚を制御するのが一般的であるが、粘性が高いため 200 μm 以上の場合回転数による制御が困難になる。一方、ある程度経験的に高さや質量の関係を調べる必要があるが、SU-8 の質量であれば粘度によらず、厚膜の場合は再現性に優れている。本デバイスを作製するには、500 μm を超える膜厚のモールドマスタが必要となるため、SU-8 の質量によって膜厚を制御する手法を用いた。スピニングコートによる回転時間を任意に調節し、シリコンウェハ上の SU-8 の質量を調整した。

まず、シリコンウェハ (4 inch, RS-1101, Mitsubishi Material; Japan) 上に SU-8 を厚み 580 μm となるようにスピニングコートし、プリベイクを行った。プリベイク後、AutoCAD によるデザインを基に作製したフォトマスクを用いて紫外光を露光し、ポストベイクを行った。次いで、現像を行い、紫外光非照射部のみを取り除くことによって流路構造の反転型を得た。膜厚に対する SU-8 の質量およびスピニングコートや加熱条件を Table 2-1 に示す。

得られた反転型に対して、離型を容易にするために、SU-8 構造とシリコンウェハの表面に RIE (Reactive Ion Etching, RIE-10NR, Samco; Japan) 装置を用いて CHF_3 プラズマ処理 (CHF_3 50 sccm, 20 Pa, 200 W, 10 min.) を施した。

Table 2-1 SU-8 フォトレジストを用いたモールドマスタの作製

レジスト名 (膜厚)	スピニング 条件	レジスト質量	プリベイク	露光時間	ポストベイク	現像時間
SU-8 2100 (520 μm)	500rpm 5秒	1000rpm 任意時間	5.6g 30分	95 $^{\circ}\text{C}$ 120分	180秒 60分	95 $^{\circ}\text{C}$ 120分

ii) PDMS のモールドイング

未重合の PDMS ポリマーと重合剤 (SYLPOT 184 W/C, Dow Corning Toray; Japan) による表面処理を行った。一般に、フッ素樹脂は摩擦係数が低いことが知られており、容易にコーティング可能な材料として、CYTOP を用いた。

表面処理は、PDMS 型の流路側表面に RIE 装置により O_2 プラズマ処理 (O_2 20 sccm, 26 Pa, 75 W, 10 sec) を行い、ポンプチャンバ部分にのみマイクロピペットを用いて CYTOP 7% 溶液を滴下した。風乾させた後、60 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分加熱し、その後 180 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間加熱した。

以上により、ポンプチャンバ部分にのみ数 μm オーダーのフッ素樹脂コーティングを行った。

②デバイスの組み立て

一般的には、PDMS 流路を作製するためにはモールドイングによって得られた構造 (PDMS 型) を PDMS やガラスなどの平面に貼り合わせる必要がある。本デバイスも底面にガラス基板もしくはフラットな PDMS の平板を別途作製し、PDMS 型と重ね合わせて流路構造を得た。この際に、各回転型マイクロポンプの回転子を挿入した。PDMS 同士の貼り合わせは、接合表面に RIE 装置により O_2 プラズマ処理 (O_2 20 sccm, 26 Pa, 75 W, 10 sec.) を行い、速やかに重ね合わせる。この処理によってパーマネントボンディングをすることができる。

挿入した回転子は磁性を有し、化学的にも比較的安定な SUS-430 (厚み 300 μm , Nilaco; Japan) をワイヤ放電加工によって製作されたものを用いた。

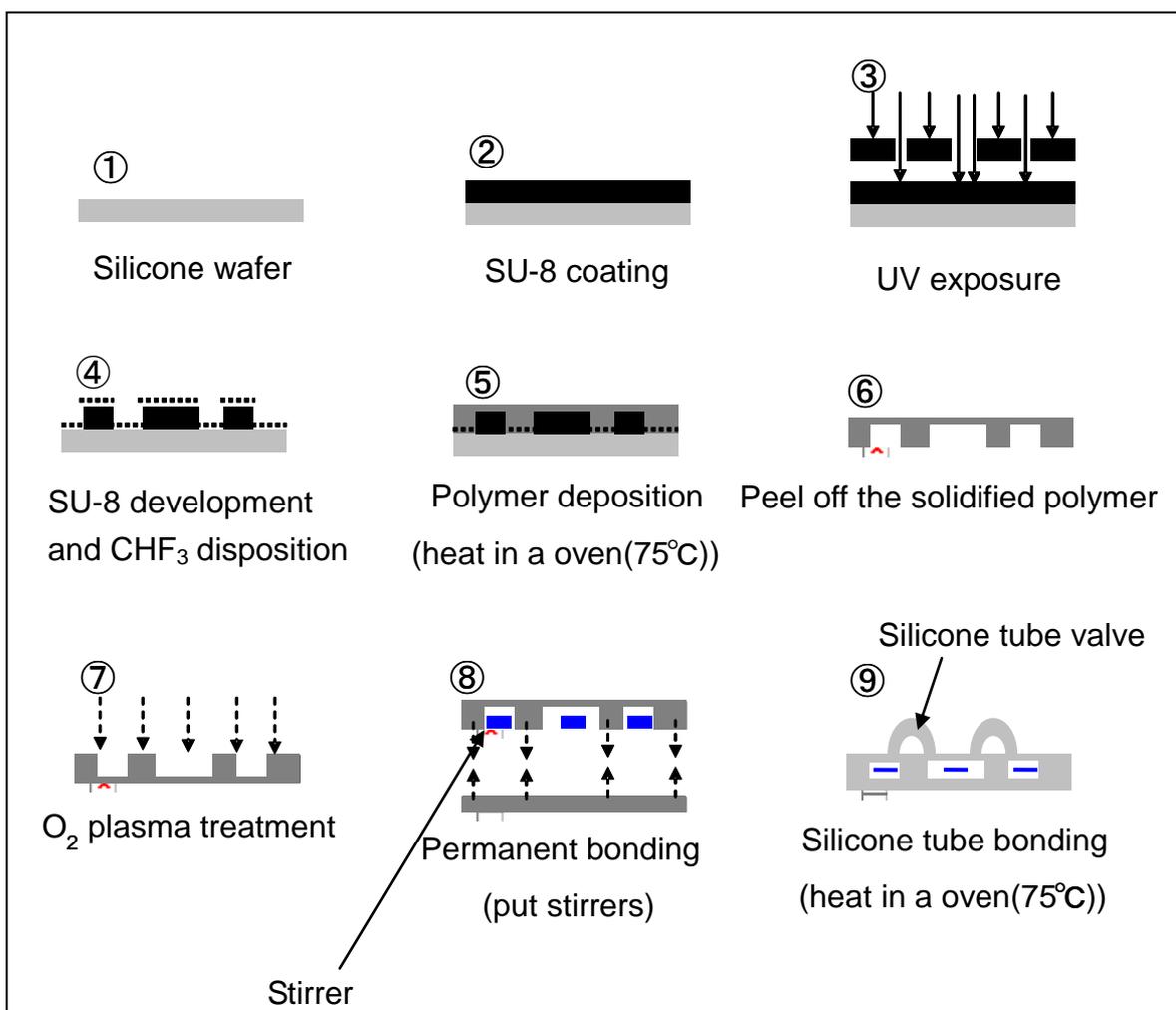


Fig. 2-4 デバイス作製の流れ

2.3.2 臓器モデル細胞の固定化と複合灌流培養

2.3.1 で作製したスリーコンパートメントデバイス内に肺・肝臓・脂肪モデル細胞を実際に固定化し、目的とした個別灌流路を利用した個別分化誘導と全体灌流培養の 2 つの送液モードの動作確認および播種細胞の接着安定性について検討を行った。

まず、標的臓器モデル細胞の例として、肺モデル細胞ラット由来肺上皮細胞株 L-2 細胞 (JCRB9053) を選択した。次に、肝モデル細胞としてラット初代培養肝細胞を用いた。また、脂肪モデル細胞として、マウス由来繊維芽細胞株 3T3-L1 細胞 (JCRB9014) を試験に供した。具体的な培地組成および播種・培養操作については以下に記す。

肺モデル細胞の培養

L-2 細胞の培養は Dulbecco's modified Eagle 培地 (Wako; Japan) を基礎培地とし、20 mM HEPES (Dojindo; Japan), 100 units-penicillin/ml (Wako; Japan), 100 μ g streptomycin/ml (Wako; Japan), 1 μ g amphotericin/ml (Wako; Japan), non-essential amino acid (Gibco; USA) を添加したものを使用した。通常の培養はティッシュカルチャーポリスチレンディッシュ (Iwaki; Japan) で行い、2 日に 1 回培地交換を行った。

コンフルエントの培養ディッシュからトリプシン処理して剥離させた細胞を遠心・洗浄処理後に、 1×10^5 cells/cm² となるように細胞懸濁液を調製し、マイクロデバイス内の肺コンパートメントにアクセスポートを介して播種した。その後、全体灌流路を用いて湿度 100%, 37 °C, 5% CO₂ のインキュベータで 72 時間全体灌流培養を行った。全体灌流時の培地は以下に記述する肝細胞培地を用いた。

肝モデル細胞の単離と培養

・肝細胞の単離

5-8 週齢の Wistar ラットのオス (200-250 g) を使用し、コラゲナーゼ灌流法 (Seglen 1976) を用いて単離した。

初めに、麻酔として用いるネンブタール量を決定するために、ラットの体重 W (g) を測定し、次式によりネンブタール量 V (mL) を決定した。

$$V = 0.0014 \cdot W \quad (250\text{g で } 0.35 \text{ mL となる})$$

デシケーター内でジエチルエーテルを染込ませたキムタオル上にラットを静置し、眠らせた後に腹腔内にネンブタールを確実に注射して麻酔を行った。約 5 分後、下肢を刺激し、深麻酔期にあることを確認した。ラットを解剖台に載せ、充分量の 70 %エタノールで腹部を良く消毒し、片鋭で皮膚を喉元まで切開し、露出した筋層をアルコール綿で消毒した。次いで、腹筋を大きく切開し、肋骨陰状突起を切除した。固く絞ったアルコール綿で腸を腹腔右側に出し、肝臓を上方に寄せた。両鋭で門脈を半切し、前灌流液で血液を流しながら

ら往路用チューブを挿入した（前灌流液およびコラゲナーゼ液の組成は基礎培地の組成と併せて後述した）。チューブの方向を門脈の自然な方向と一致させ、テープで解剖台に固定した。すぐに下大静脈を切断し脱血した。前灌流液を 5 分流した後、ポンプを止めて、空気の混入をさせずにコラゲナーゼ液に替えた。コラゲナーゼ液による消化を約 7-8 分間行い、約 20 mL 残して消化を停止した。間膜を切りながらピンセットで肝臓をつまみ上げ、余分な体液を極力切り、ノントリートメントディッシュ（Iwaki; Japan）に採取した。

・肝細胞の精製

肝組織を入れたディッシュに、残りのコラゲナーゼ液約 20 mL と室温においた MEM low glucose 培地約 20 mL を加え、肝組織をメスで十字に細かく切断した。先端の尖ったピンセットを用いて未消化片を丁寧にほぐし、室温で 15 分間ディッシュ内消化を行った。消化後に残った未消化片を再度ピンセットでほぐし、口径の大きなピペットを用いて数回ピペッティングして 1 重ガーゼ付ビーカーでろ過した。氷浴上においた MEM 培地を加え、2 重ガーゼ付ビーカーでろ過した後、ガラス遠沈管に移し、氷浴 MEM で遠沈管を満たした。640 rpm, 0 °C, 1 分間遠心し上清を破棄し、氷浴 MEM で再度緩やかに懸濁後、再度 640 rpm, 0 °C, 1 分間遠心を行った。この精製操作を 3 回繰り返した後、以下に記述する液性因子を加えた基礎培地に再懸濁して細胞数および生存率の評価に供した。

細胞数および生存率はトリパンブルー染色にて決定し、生存率 80%以上の肝細胞を培養に用いた。肝細胞を細胞密度 1.2×10^5 viable-cells/cm² でマイクロデバイス内の肝コンパートメントにアクセスポートを介して播種した。培養液は播種後 6 時間で 1 回交換した。その後、全体灌流路を用いて湿度 100%, 37 °C, 5% CO₂ のインキュベータで 72 時間複合灌流培養を行った。

ラット初代培養肝細胞基礎培地

Dulbecco's modified Eagle high glucose 培地 (Gibco; USA) を基礎培地とし、20 mM HEPES (Dojindo; Japan), 100 units-penicillin/ml (Wako; Japan), 100 μg streptomycin/ml (Wako; Japan), 1 μg amphotericin/ml (Wako; Japan), non-essential amino acid (Gibco; USA), 10 ng/ml mouse epidermal growth factor (EGF) (Takara; Japan), 0.1 μM insulin (Takara; Japan), 0.1 μM dexamethasone (Wako; Japan), 0.8 μM copper sulfate (CuSO₄, 5H₂O) (Wako; Japan), 20 nM selenious acid (H₂SeO₃) (Wako; Japan), 2.6 μM zinc sulfate (ZnSO₄, 7H₂O) (Wako; Japan), and 0.3 μM manganese sulfate (MnSO₄, 5H₂O) (Wako; Japan) を添加した (Ostrovidov et al. 2004; Sudo et al. 2004)。細胞形態は位相差顕微鏡 DM IRB (Leica; Japan) を用いて観察した。

前灌流液

8.0 g/L NaCl (Wako; Japan), 0.40 g/L KCl (Wako; Japan), 0.078 g/L NaH₂PO₄ · 2H₂O

(Wako; Japan), 0.151 g/L Na₂HPO₄ · 12H₂O (Wako; Japan), 0.90 g/L glucose (Wako, Japan), 0.38 g/L EGTA (Sigma-aldrich; Japan), 0.745 g/L EDTA (Sigma-aldrich; Japan), 0.006 g/L Ph. Red (Wako; Japan), 2.38 g/L HEPES (Dojindo; Japan), 0.35 g/L NaHCO₃ (Wako; Japan)の濃度で純水に溶解させ、オートクレーブして使用した。NaHCO₃については、オートクレーブ後に 7.5 % NaHCO₃ 溶液で加え、NaOH で pH を約 7.2 となるように調整した。

コラゲナーゼ液

8.0 g/L NaCl (Wako; Japan), 0.40 g/L KCl (Wako; Japan), 0.078 g/L NaH₂PO₄ · 2H₂O (Wako; Japan), 0.151 g/L Na₂HPO₄ · 12H₂O (Wako; Japan), 0.006 g/L Ph. Red (Wako; Japan), 2.38 g/L HEPES (Dojindo; Japan), CaCl₂ · 2H₂O (Wako; Japan), 0.35 g/L NaHCO₃ (Wako; Japan), 0.050 g/L Type II Trypsin inhibitor (Sigma-aldrich; Japan), 0.50 g/L Collagenase (Wako; Japan)を純水中で 1 時間攪拌し完全に溶解させ、NaOH で pH を正確に 7.60 に調整し、0.22 mm フィルター付吸引濾過器 (ADVANTECH; Japan)でろ過滅菌して供した。

脂肪モデル細胞 (3T3-L1 細胞) の培養

3T3-L1 細胞の培養は Dulbecco's modified Eagle 培地 (Wako; Japan) を基礎培地とし、20 mM HEPES (Dojindo; Japan), 100 units-penicillin/ml (Wako; Japan), 100 μg streptomycin/ml (Wako; Japan), 1 μg amphotericin/ml (Wako; Japan), non-essential amino acid (Gibco; USA)を添加したものを使用した。通常の培養はティッシュカルチャーポリスチレンディッシュ (Iwaki; Japan) で行い、2 日に 1 回培地交換を行った。

コンフルエントの培養ディッシュからトリプシン処理して剥離させた細胞を遠心・洗浄処理後に、1×10⁵ cells/cm²となるように細胞懸濁液を調製し、マイクロデバイス内の脂肪コンパートメントにアクセスポートを介して播種した。個別灌流路を利用して 2 日個別灌流培養を行った後に、分化誘導処理として 125 μM Insulin, 1 μM Dexamethason, 1 μM Indomethasin を含む DMEM 培地に交換し、更に 2 日間個別灌流培養を行った。その後、ラット肝細胞基礎培地を用いて、湿度 100%, 37 °C, 5% CO₂ のインキュベータで 72 時間複合灌流培養した。

2.4 結果と考察

2.4.1 スリーコンパートメントマイクロデバイスの設計と作製

作製したスリーコンパートメントマイクロデバイスを Fig. 2-5 に示す. 3つの並列した培養部と個別・全体灌流路および各コンパートメントを連結する灌流路上にシリコンチューブを利用した簡易バルブを施した. このバルブを外部から小型クリップで閉塞させることにより個別灌流路のみに培養液を流すことで, 全体灌流直前までの個別培養条件の制御が可能な仕様になっている. また, 各細胞培養部の上部にマイクロスターラーを利用した送液ポンプを配置したことにより, 細胞培養部ごとに流量を制御できる. 灌流路の幅は 1 mm, 流路高さは 580 μm となっている. 各細胞培養部の接着面積は 1.3 cm^2 で, 体積は 63 μL となっている.



Fig. 2-5 作製したスリーコンパートメントデバイスと磁気モーター

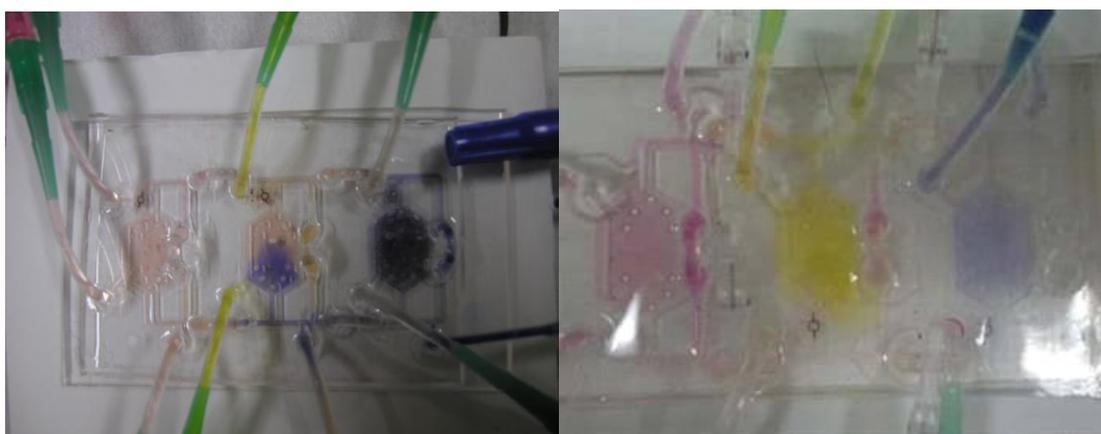
デバイス内臓の送液システムである磁気駆動式回転型マイクロポンプは, ポンプチャンバと回転子 (長さ 3 mm, 幅 200 μm) によって構成され, ポンプチャンバの中央に設置されている軸 (直径 800 μm) を中心に回転子が回転することによって, ポンプチャンバの入口側から出口側に向かって, 溶液が掻き出されるシステムになっている. この回転子は磁性体であり, デバイス下部に設置したスターラモータ CC-101 (AS ONE; Japan) とコントローラ CC-303 (AS ONE; Japan) によって回転駆動され, その回転数はロータリーエンコーダ CH-8501 (Baumer electric; Switzerland) で校正した.

デバイス内部の溶液操作はアクセスポートからシリコンチューブ (ラボランシリコンチューブ, 内/外径 1/2 mm, AS ONE; Japan) を介して外部に設置したディスペンサチップ Precision Tips Green 50 PC, Part5118TT-B (EFD; Japan) とシリンジ SS-01T (Terumo; Japan) によってマニュアルで行う仕様とした.

作製したデバイス内体積に対する細胞密度（単層培養のコンフルエント時）を *In vitro* と比較した結果を Table 2-2 に示す。標的臓器の例として肺と比較すると 1/100 程度、分布制御モデル臓器として脂肪組織と比較すると 1/20 程度であることが分かる。また主たる代謝臓器である肝臓と比較した場合には、1/2000 程度の細胞密度になっていると考えられる。培養液総体積を基準としたデバイス内細胞密度に関しては 2.4.2 で後述する。

送液系の制御および評価

作製したシミュレーター内に満たされた溶液が、コンパートメント間をつなぐ流路のバルブの開閉により、1つのコンパートメント内で独立して灌流できること（個別灌流系）および3つのコンパートメント内全体を灌流できること（全体灌流系）を確認するため、3つのコンパートメント内を色素 I370 special red（コンパートメント左）、I312 yellow（コンパートメント中央）、I374 special green（コンパートメント右）を含む水溶液でそれぞれ満たし、スターラーを用いて回転速度 1,000 rpm で灌流させた。その結果、バルブを閉じた個別灌流系では、コンパートメント右および左の色素（暗色）が、各々のコンパートメントおよび流路に満たされているが、中央のコンパートメントに流入することなく、それぞれのコンパートメント内の色素が他のコンパートメント内の色素と混ざり合うことなく、安定に灌流していた（Fig. 2-6）。一方、バルブを開けた全体灌流系では、右の不織布を導入したコンパートメント（I374 special green）には、多少色素が残っていたが、左のコンパートメント（I370 special red）と中央のコンパートメント（I312 yellow）で明度に違いが無く、3つのコンパートメント内の水溶液の色が10分程度でほぼ同じになったことから、シミュレーター内全体の水溶液がほぼ均一に混ざり合うことが明らかになった。



全体灌流

個別灌流

Fig. 2-6 個別および全体灌流モードの動作性能

Table 2-2 細胞密度の *In vivo* との比較

	<i>In vivo</i>	device
肺	1×10^7 cells/cm ³	1×10^5 cells/cm ³ × 1/100
肝臓	2×10^8 cells/cm ³	1×10^5 cells/cm ³ × 1/2000
脂肪	2×10^6 cells/cm ³	1×10^5 cells/cm ³ × 1/20

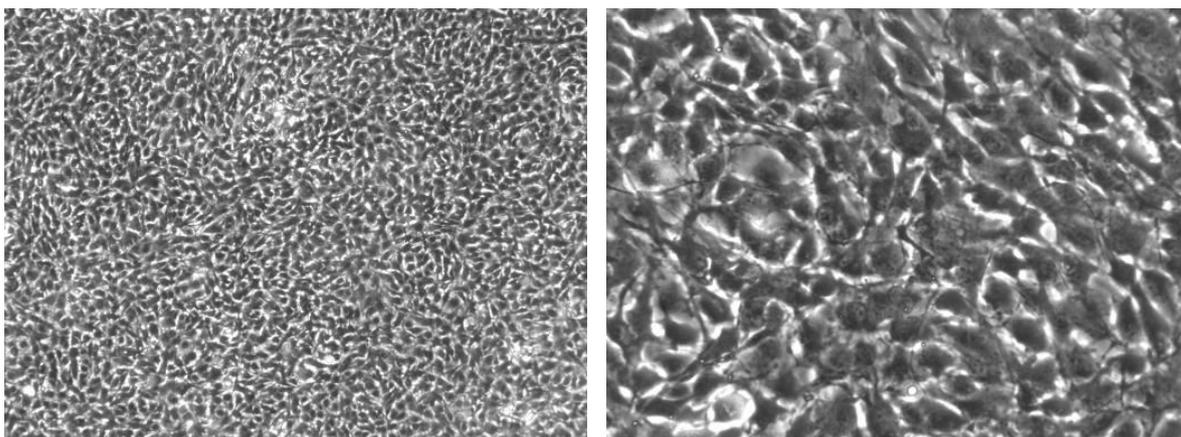
2.4.2 臓器モデル細胞の固定化と複合灌流培養

各コンパートメント内にモデル細胞を導入固定化した際の形態観察の結果を Fig. 2-7 に示す。肺モデル細胞・肝モデル細胞・脂肪モデル細胞の全モデル細胞が全体灌流培養後も顕著な剥離や死滅なく、安定接着していることが分かる。本章では、最大面密度で播種を行ったので、その際の細胞数とデバイス内の全培養液体積比を各臓器コンパートメントについて評価した結果を Fig. 2-8 に示した。本研究の複合細胞培養デバイス内の培養液総体積を基準とした単層培養における細胞密度は、 6.2×10^4 cells/cm³ となっている。一方、Shuler らの先駆研究における複合細胞培養デバイス内の細胞密度は肺コンパートメントでは 3.3×10^4 cells/cm³、肝コンパートメントでは 1.7×10^5 cells/cm³、脂肪コンパートメントでは 5.1×10^4 cells/cm³ になっている。本研究の細胞密度を Shuler らのデバイス内細胞密度と比較すると、肺コンパートメントで 2 倍、肝コンパートメントで 1/2 倍、脂肪コンパートメントで同等の細胞密度になっていると考えられる。また、彼らの複合細胞培養デバイスは細胞培養部の細胞/培養液体積比は生理学的になっているが、外部送液ポンプを使用しているために、細胞培養部の約 15 倍の体積の培養液リザーバーと連結されているために、培養液総体積を基準とした細胞密度は生理学的条件ではなくなってしまう。一方で、本研究では内部送液系を利用していることから、流路高さを更に微小化することで、理論的には現状の細胞密度を 29 倍まで高めることができる。

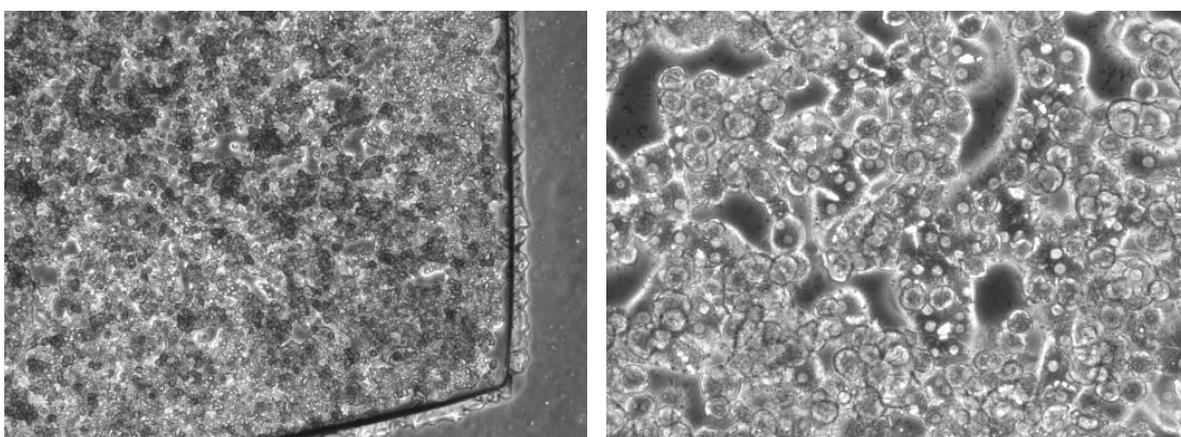
培養液総体積を基準とした細胞密度を *In vivo* に近づけるという視点にたつと、内部送液系を利用した本複合細胞培養デバイスは、外部送液系を使用する既存の複合細胞培養デバイスに比べて拡張性が高いと考えられる。

一方で、生体内を完全に模倣するためには *In vivo* において臓器を形成する細胞が複雑な

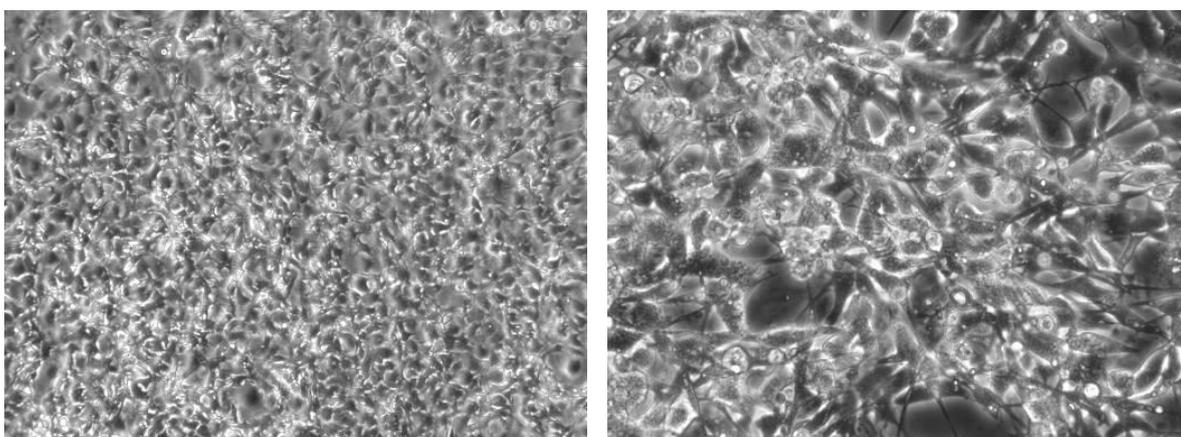
三次元構造を構築しているように、デバイス内においても各臓器の複雑な構造を再現する培養方法の検討が必要であると考えられる。また、培養液量を最小化することで相対的に細胞密度を増加させるのではなく、細胞数自体を増加させる高密度化の方法としても、3次元培養は有望な培養方法と考えられる。そこで、単層培養だけではなく、マイクロ複合細胞培養デバイス内での3次元培養を実現し、細胞数自体を増加させることで細胞密度を生体内の状況により近づける検討も併せて行っていく必要があると考えられる。



肺モデル L-2 細胞の形態 (左 : 対物レンズ x5, 右 : 対物レンズ x20)

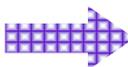


肝モデル Rat 初代培養肝細胞の形態 (左 : 対物レンズ x5, 右 : 対物レンズ x20)



脂肪モデル 3T3-L1 細胞の形態 (左 : 対物レンズ x5, 右 : 対物レンズ x20)
Fig. 2-7 デバイス内各モデル細胞の形態観察 (全体灌流 72 時間後)

培養液総体積に対する細胞密度の比較(シリコンチューブ部分を除く)

<p>Shuler's μCCA 肺: 3.3×10^4 cells/cm³ 肝臓: 1.7×10^5 cells/cm³ 脂肪: 5.1×10^4 cells/cm³</p>	<p>細胞培養部の細胞/培養液体積比は生理学的 リザーバー 100 μL + 細胞培養部分: 6.8 μL 培養部の 約15倍の体積 (細胞接着面積: 0.6 cm² 流路高さ: 20 μm)</p>
<p>本研究 肺: 6.2×10^4 cells/cm³ 肝臓: 6.2×10^4 cells/cm³ 脂肪: 6.2×10^4 cells/cm³</p>	<p>本研究のデバイス 肺: 約58倍 肝臓: 14.5倍 脂肪: 29倍</p> <p>約2倍 $\times 29$倍 約1/2 同等</p> 
<p>更に高さを低くする微小化可能 SU-8 2 μmまで スターラー 300 μm</p>	<p>細胞培養部分: 1.6 mL 細胞接着面積: 3 cm² 流路高さ: 580 μm</p> <p>流路高さを20 μmへ 培養液量が約55 μL</p>

単層培養においても本研究で作製したオンチップ灌流型デバイスなら細胞をさらに高密度化することができる

Fig. 2-8 培養液総体積に対する細胞密度の先駆研究との比較

2.5 まとめ

本章では、*In vitro* 体内動態評価を目指して複数臓器由来細胞の複合培養と既往の研究で課題とされた個別培養プロトコールの並列処理を可能とする、3つの並列した細胞培養部と内部送液ポンプおよび個別・全体灌流回路を配備した新規複合細胞培養マイクロデバイスを設計・作製した。各臓器由来のモデル細胞を複合細胞培養デバイス内に播種・固定化し、個別灌流培養・全体灌流培養が少なくとも72時間は可能であることを示した。脂肪モデル細胞に関してはデバイス内で分化誘導を行い良好な分化を確認し、本複合細胞培養デバイスによって個別の培養プロトコールを並列に処理可能であることも併せて示した。

作製した複合細胞培養デバイス内に単層状に固定化された臓器モデル細胞の各コンパートメント内における細胞密度は、*In vivo* の細胞密度と比較した、肺で約1/100、肝臓で約1/2000、脂肪組織で約1/20程度であった。また、Shulerらの先駆研究における複合細胞培養マイクロリアクター (μ CCA)と培養液総体積に対する細胞密度を比較し、現状の細胞密度でも肺および脂肪細胞では同等以上の細胞密度が達成されていることを明らかにした。さらに、作製した複合細胞培養デバイスにおいて、流路高を原理的に可能な微小化可限界である20 μ mまで低くした場合には総培養液量を55 μ Lまで減量することが可能となり、先駆研究に比べて肺で約58倍、肝臓で約15倍、脂肪組織で29倍の総培養液量に対する大幅な細胞密度の改善が可能であることを示した。これは先行研究では細胞培養部の外部に体積で約15倍の培養液リザーバーを使用しているのに対して、作製した複合細胞培養デバイスでは送液系を内蔵させることにより、外部に培養液リザーバーを使用する必要がなくなり、総培養液量を大幅に微小化することが可能となったためである。個別の静置培養系や既存の大型複合灌流培養器では困難であった *In vivo* と同等な生理学的細胞密度を *In vitro* で再現するうえでは、本章で作製した複合細胞培養デバイスのような送液系を内蔵させたリアクターは有効な手法である。

参考文献

- Agarwal A.K., Dong L., Beebe D.J. Jiang H. 2007. Autonomously-triggered microfluidic cooling using thermo-responsive hydrogels. *Lab on a chip*, **7**(3): 310-315
- Agarwal A.K., Sridharamurthy S.S., Beebe D.J., Hongrui J. 2005. Programmable autonomous micromixers and micropumps. *Journal of Microelectromechanical Systems*, **14**(6):1409-1421
- Charati S.G., Stern S.A. 1998. Diffusion of gases in silicone polymers: Molecular dynamics simulations. *Macromolecules*, **31**(16): 5529-5535
- Cooney C.G., Towe B.C. 2004. A thermopneumatic dispensing miropump. *Sensors and Actuators A: Physical*, **116**(3): 519-524
- Delamarche E., Bernard A., Schmid H., Michel B., Biebuyck H. 1997. Patterned delivery of immunoglobulins to surfaces using microdevice networks. *Science*, **276**(5313): 779-781
- Duffy D.C., McDonald J.C., Schueller O.J.A., Whitesides G.M. 1998. Rapid prototyping of microfluidic systems in Poly(dimethylsiloxane). *Anal. Chem.*, **70**(23): 4974-4984
- Effenhauser C.S., Bruin G.J.M., Paulus A., Ehrat M. 1997. Integrated capillary electrohoresis on flexible silicone microdevice: Analysis of DNA restriction fragments and detection of single DNA molecules on microchips. *Anal. Chem.*, **69**(17): 3451-3457
- El-Ali J., Soger PK., Jensen KF. 2006. Cells on chips. *Nature*, **442**(7101): 403-4011
- Fujii T. 2002. PDMS-based microfluidic device for biomedical applications. *Microelectronic Engineering*, **61-62**: 907-914
- Grover W.H., Skelley A.M., Liu C.N., Lagally E.T., Mathies R.A. 2003. Monolithic membrane valves and diaphragm pumps for practical large-scale integration into glass microfluidic devices. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **89**(3): 315-323

- Hosokawa K., Fujii T., Endo I. 1999. Handling of picoliter liquid samples in a poly(dimethylsiloxane)-based microfluidic device. *Anal. Chem.*, **71**(20): 4781-4785
- Husband B., Bu M., Apostolopoulos V., Melvin T., Evans A.G.R. 2004. Novel actuation of an integrated peristaltic micropump. *Microelectronic Engineering*, **73-74**: 858-863
- Jang W.I., Choi C.A., Jun C.H., Kim Y.T. Esashi M. 2004. Surface micromachined thermally driven micropump. *Sensors and Actuators A: Physical*, **115**(1): 151-158
- Jeong O.C., Park S.W., Yang S.S., Pak J.J. 2005. Fabrication of a peristaltic PDMS micropump. *Sensors and Actuators A: Physical*, **123-124**: 453-458
- Khademhosseini A., Langer R., Borenstein J., Vacanti JP. 2006. Microscale technologies for tissue engineering and biology. *Proc Natl Acad Sci USA*, **103**(8): 2480-2487
- Kim J.H., Kang C.J., Kim Y.S. 2004. A disposable polydimethylsiloxane-based diffuser micropump actuated by piezoelectric-disc. *Microelectronic Engineering*, **71**(2): 119-124
- Kim J.H., Na K.H., Kang C.J. Kim Y.S. 2005. A disposable thermopneumatic-actuated micropump stacked with PDMS layers and ITO-coated glass. *Sensors and Actuators A: Physical*, **120**(2): 365-369
- Li S., Chen S. 2003. Analytical analysis of a circular PZT actuator for valveless micropumps. *Sensors and Actuators A: Physical*, **104**(2): 151-164
- Nakazawa K., Izumi Y., Fukuda J., Yasuda T. 2006. Hepatocyte spheroid culture on a polydimethylsiloxane chip having microcavities. *J Biomater Sci Polym Ed*, **17**(8): 859-873.
- Nishikawa M., Yamamoto T., Kojima N., Komori K., Fujii T., Sakai Y. 2008. Stable immobilization of rat hepatocytes as hemispheroids onto collagen-conjugated poly-dimethylsiloxane (PDMS) surfaces: importance of direct oxygenation through PDMS for both formation and function. *Biotechnol Bioeng*, **99**(6):

1472-1481

- Ostrovidov S., Jiang J., Sakai Y., Fujii T. 2004. Membrane-based PDMS microbio reactor for perfused 3D primary rat hepatocyte cultures. *Biomed Microdevices*, **6**(4): 279-287.
- Ryu K.S., Shaikh K., Goluch E., Fan Z., Liu C. 2004. Micro magnetic stirrer-bar mixer integrated with parylene microfluidic channels. *Lab on a chip*, **4**(6): 608-613
- Seiler K., Harrison D.J., Manz A. 1993. Planar glass chips for capillary electrophoresis: repetitive sample injection, quantitation, and separation efficiency. *Anal. Chem.*, **65**(10): 1481-1488
- Suh R., Takayama S., Smith G.D. 2005. Microfluidic applications for andrology. *Journal of Andrology*, **26**(6): 664-670
- Unger M.A., Chou H.P., Thorsen T., Scherer A., Quake S.R. 2000. Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography. *Science*, **288**(5463): 113-116
- Yamahata C., Lacharme F., Gijis M.A.M. 2005. Glass valveless micropump using electromagnetic actuation. *Microelectronic Engineering*, **78-79**: 132-137

第3章 複合培養系における薬物の分布評価

3.1 緒言

薬物の体内分布

薬物の体内分布とは、血中および脂肪・筋肉・脳などの組織間を薬剤・毒物が移動することを言い、様々な経路から血中に取り込まれた薬物は血液循環に伴って血中から体組織へと移行する。その際に、多くの薬物が各臓器との親和性によって体内で局在することが知られている。特に脂溶性物質はその親和性によって脂肪組織へ集中することが分かっている。一度、局在した薬物は血中濃度に依存して徐々に血中に放出されると考えられている。

上述した通り、分布プロセスは血中濃度を制御する重要なプロセスであることから、分布プロセスを評価することは最終的な薬効・毒性を正確に評価するために必要不可欠である。しかし、薬物の体内分布には複数異種の臓器が複雑に関与するために、*In vitro* で評価することが著しく困難であり、現状では専ら動物実験による同位体を利用した評価に頼っている。そのため、分布プロセスの *In vitro* 評価系の必要性は吸収・代謝・排泄プロセスの評価と比して特に大きいと考えられる。

脂肪細胞

脂肪細胞は種々の特徴をもった細胞である。まず細胞の大部分は脂肪球で占められ、核や細胞質は辺縁に圧迫されて存在している。脂肪球中には中性脂肪を主とする油滴が存在し、その表面には滑面小胞体が分布する。また、飢餓状態にすると細胞容量が縮小し、肥満状態では増大するなど細胞自体が伸縮自在である。細胞容量の変動は大部分中性脂肪の増減に起因している。脂肪細胞は代謝的に不活性な細胞ではないかと考えられていたが、脂肪細胞内での脂肪の合成・分解やアドレナリン、ACTH、成長ホルモン、インスリン等に対して感受性を示し代謝活性が変動することが明らかにされている。

脂肪細胞の生理的機能はエネルギーの貯蔵と供給である。グルコースと遊離脂肪酸の形の化学エネルギーを中性脂肪の形に変え貯蔵している。また、生体内の要求に応じて遊離脂肪酸とグリセロールの形で蓄積された化学エネルギーを放出する。脂肪細胞へのエネルギー貯蔵が正常範囲を超えた状態が肥満である。肥満状態になると運動能力を障害するだけでなく、体内の物質代謝に大きな変化をもたらす。高脂血症、循環器疾患、糖尿病、関節炎などとの合併率が高い。脂肪細胞の単離・培養技術は機能解析に加えて、肥満の病態を生化学的に追及する際には有効な手段となる。

In vivo からの単離だけでなく、*in vitro* において、繊維芽細胞 (3T3-L1 など) や間葉系幹細胞から分化誘導を行うことにより脂肪細胞を得ることができる (Augello et al. 2010; Poulos et al. 2010)。培養系において培地中に添加するウシ胎児血清中の成長ホルモンが脂肪細胞への分化の引き金になることが分かっている。このホルモンは個体では、下垂体から血流中に分泌されるタンパク質であるが *in vitro* においても作用する。しかし、脂肪細胞

の発生を制御するために分泌されるシグナル分子は成長ホルモンだけでなく、成長ホルモンによって刺激された脂肪前駆細胞は IGF-1 (インシュリン様成長因子 I) に対し感受性を示すようになり、これによって分化途上の脂肪細胞の増殖を促進する。また、脂肪細胞の分化は、細胞の形や足場に関係する因子によっても影響される。

以上のように、脂肪細胞は主成分が中性脂肪であり、脂溶性化学物質を蓄積する代表的な組織と考えられる。そのため、疎水性化学物質の初期体内分布を記述するうえでは、主要な臓器といえる。

マイクロ複合細胞培養デバイスの 3 次元培養への適用

2 章ではマイクロ複合細胞培養デバイス内にて各臓器モデル細胞を単層培養し、培養部の流路高さを最小化することによって、細胞密度を向上させることが可能であることを示した。しかし、*In vivo* において臓器を形成する細胞は複雑な三次元構造を構築しており、生体内を詳細に模倣するためには 3 次元培養を行う必要があると考えられる。また、本章で着目している成熟脂肪細胞の主成分は中性脂肪であり、比重が培養液よりも軽いため浮遊状態で存在する。成熟脂肪細胞のような接着依存性を持たない細胞を臓器モデル細胞として用いる場合には 3 次元固定化とマイクロ複合細胞培養デバイス内での安定培養を可能にしておく必要がある。本章では、マイクロ複合細胞培養デバイスの 3 次元培養への適用可能性を明らかにするため、3 次元固定化担体を用いて臓器モデル細胞の 3 次元固定化を試みる。

3.2 本章の目的

マイクロ複合培養系を *In vitro* 試験系では特に評価が困難な複数臓器が関与する分布評価に適用し、特に脂肪細胞の有無による疎水性薬物の分布・蓄積を評価することで、脂肪細胞の薬物分布への寄与を明らかにする。また、分布評価に蛍光イメージングを導入し、評価の簡便化を試みる。上述の検討を通して、本複合細胞培養系の分布評価への適用可能性を明らかにする。

3.3 実験

3.3.1 脂肪細胞の採取・分離と固定化

本研究では当初、大型動物の脂肪組織を得るためにブタの腸間膜周辺の脂肪組織からの単離を試みたが、組織採取から単離までに長時間を要するために、大半の脂肪組織が死滅してしまった。そこで、小型のラットから脂肪組織を採取・単離することとした。また、単離に際して成熟脂肪細胞と同時に、脂肪前駆細胞も得ることができる。得られた脂肪前駆細胞から成熟脂肪細胞への分化誘導も併せて行ったが、確実な分化誘導を行うことは困

難であったので、本節では、ラット由来初代成熟脂肪細胞を単離・固定化する方法について述べる。以下に、具体的な脂肪細胞の分離法について記す。

i) 成熟脂肪細胞の採取・単離操作

まずデシケーター内にてジエチルエーテルを用いて死亡させた5週齢のオスのwisterラットから副睾丸脂肪および内臓脂肪組織を採取した。次いで、血管などを取り除いた後に、10 mg/mL Type-1 collagenase (Wako Pure Chemical Industries 社), 20 mg/mL ウシ血清アルブミン (Wako Pure Chemical Industries 社), 20 mmol/L HEPES (Wako Pure Chemical Industries 社), 100 units/mL ペニシリン (Wako Pure Chemical Industries), 100 µg/mL ストレプトマイシン (Sigma 社), 0.25 µg/mL アンフォテリシン B (Sigma 社) を加えた DME 培地に浸漬させ、湯浴中 37°C で1時間振とうさせながら組織をコラゲナーゼ処理した。その後、100 µm のナイロンメッシュで濾過し、固形物を取り除いた溶液を、~1400rpm で5分間遠心分離し、上澄み液を回収することにより、成熟脂肪細胞を得た。Fig. 3-1 に単離操作の概略を示す。

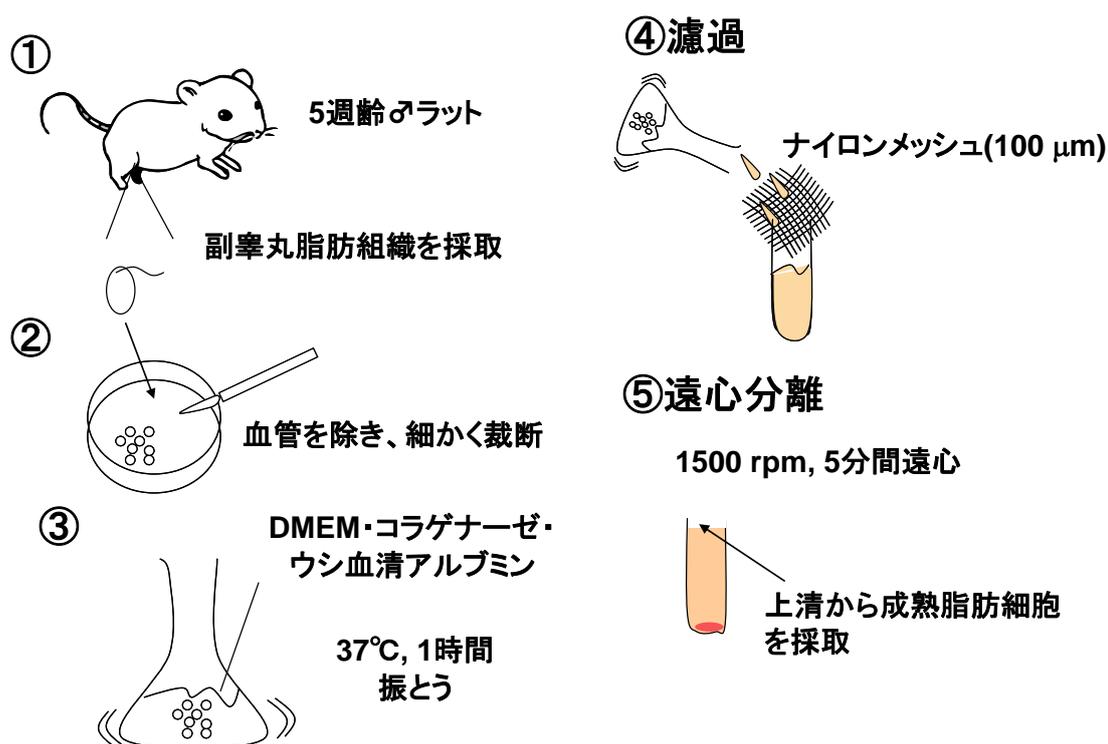


Fig. 3-1 ラット成熟脂肪細胞の単離操作

ii) 成熟脂肪細胞のデバイス内への導入

作製したデバイスにシリンジとコネクタを接続することにより液の導入を行った。まず、70%エタノールをデバイス内に満たし、1時間静置した。その後、滅菌した純水で十分にエタノールを除去した後、10希釈コラーゲン液 (Cell Matrix:新田ゼラチン, 塩酸溶液) を導入し、1時間静置した。内部余剰コラーゲン液を PBS(-) で十分に置換し、デバイス内部のコラーゲン吸着処理を行った。

単離された成熟脂肪細胞を脂肪組織コンパートメントに播種し、緩やかに個別灌流培養を行った。

3.3.2 肝モデル細胞の固定化

第2臓器モデル細胞の例として、ヒト肝ガン由来細胞株 Hep G2 (3×10^5 cells/cm² ~ 1×10^5 cells/cm²) もしくは、ラット初代培養肝細胞 (5×10^5 cells/cm²) を肝臓モデル細胞として、デバイス内に固定化することを試みた。

導入前の操作は脂肪細胞と同様に、作製したデバイスにシリンジとコネクタを接続することにより液の導入を行った。まず、70%エタノールをデバイス内に満たし、1時間静置した。その後、滅菌した純水で十分にエタノールを除去した後、10希釈コラーゲン液 (Cell Matrix:新田ゼラチン, 塩酸溶液) を導入し、1時間静置した。内部余剰コラーゲン液を PBS(-) で十分に置換し、デバイス内部のコラーゲン吸着処理を行った。

細胞培養チップ中の肝組織コンパートメントに播種し、24時間静置して細胞の接着・伸展を観察した。培地は FBS10%添加 DMEM を用いて行った。

3.3.3 蛍光モデル薬物の分布評価

本研究では、薬物の分布動態を可視化するために、蛍光モデル薬物として Fluoranthene を用いた。Fluoranthene は自家蛍光を持つ発がん性物質で、タールやタバコの煙中に含有される物質である。これまでの検討で、Fluoranthene 原体およびニトロ化された Fluoranthene の代謝活性化後の毒性 (変異原性, 遺伝子毒性など) や代謝経路が明らかになりつつある (Mossanda et al. 1976; Babson et al. 1986a, 1986b; Stier et al. 1988; Pothuluri et al. 1990; Horikawa et al. 1991; Vaca et al. 1991; Stocker et al. 1996; Zheng et al. 2004)。参考として、Fig. 3-2 に Fluoranthene の主な代謝経路と代謝物を示す。Stier らの検討によると、 β -ナフソフラボンで予め処理したラットの肝において、代謝物の大半が 8-hydroxyfluoranthene となった。すなわち、通常は経路 A を介して毒性支配的な 2,3-dihydroxyfluoranthene が産生されるが、Cyp1A1/2 が誘導された場合には、経路 B を介して 8-hydroxyfluoranthene が産生されやすくなるため、無毒化されると考えられる。

代謝活性化が知られるベンツ[a]ピレンも同様に、自家蛍光を持ち、肝で代謝活性化を受けた後、急性毒性が大きくなることが明らかになっている物質であるが、蛍光強度が弱いため、本研究のように、分布動態や代謝活性化後の毒性を評価する検討に不適である。

フルオランセンの疎水性は、水/オクタノール分配係数が 4.5 と高く、疎水性蛍光モデル物質の例として適切な化合物であると考え、本章のモデル薬物として試験に供した。

上述した手法で脂肪および肝モデル細胞を各コンパートメント内に固定化し、個別灌流路を利用して 24 時間個別灌流培養を行った後、フルオランセン 50 μM を含む DMEM をデバイス内に導入し、全体灌流路を利用して全体灌流培養を 72 時間行った。化学物質の分布を非破壊的に経時観察する目的で、本研究では蛍光イメージング装置 LAS-3000 (Fuji Film; Japan) を用いた。装置の概要を Fig. 3-3 に示す。各測定時に取得された蛍光画像を基に、各コンパートメント内の蛍光値の変化を Image J により数値化した。

24 時間から 72 時間まで全体灌流培養後の蛍光分布評価を行った際、蛍光値に変化が見られなかったことから同様の濃度で、5, 10, 30, 60 分後における脂肪細胞内の Fluoranthene の分布を蛍光イメージング装置で計測した。定量に関しては、単位面積あたりの蛍光強度で評価した。この際、生理学的な灌流速度を想定し、コンパートメントの体積を基準として、肝臓コンパートメントへは約 60 $\mu\text{L}/\text{min}$ (体内では約 1500 cm^3 に対して 1.5 L/min)、脂肪組織コンパートメントおよび血流と緩慢に平衡状態に達する筋組織などを想定している、その他臓器コンパートメントへは約 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ (体内では約 13600 cm^3 に対して 1.5 L/min) となるように内蔵したスターラーの回転数を調整した (Brown et al. 1997)。

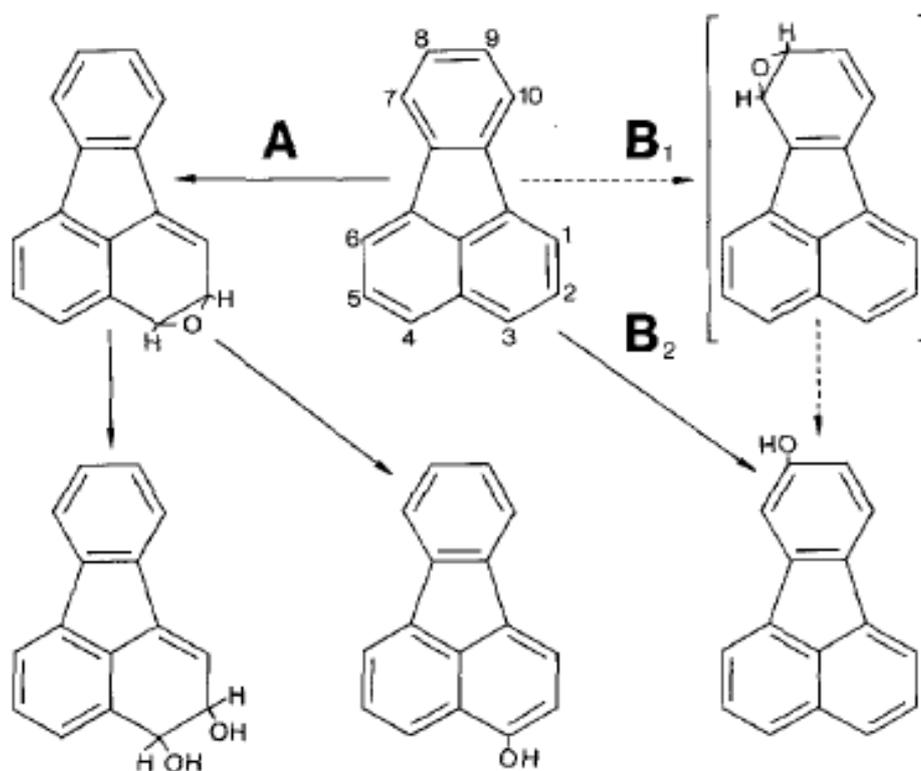


Fig. 3-2 Fluoranthene の代謝経路 (Stier et al. 1988)

3.4 結果と考察

3.4.1 脂肪モデル細胞の固定化

今回は、直径の大きな成熟脂肪細胞に対応するために、可能な限り空隙率の高い担体を用いて固定化することが適していると考え、比較的目的量の少ない不織布を用いた。

不織布担体（材質：ポリ乳酸，線維径：50 μm ，目付け：60 g/m^2 ，導入前厚さ：1 mm）を充填した体積約 0.63 cm^3 （面積 1.3 $\text{cm} \times$ 高さ 0.052 cm ）のコンパートメントに 1.0×10^6 個の成熟脂肪細胞を導入したところ、その細胞は不織布担体内で三次元的かつ高密度に固定化されていることが分かった。このとき、不織布内の脂肪細胞密度は約 5.0×10^5 cells/cm^3 であった。導入した脂肪細胞すべてが不織布に取り込まれると仮定したとき、不織布内の細胞密度は少なくとも約 1.4×10^6 cells/cm^3 になることから、実際に不織布内に取り込まれた脂肪細胞数は、導入した細胞数の 6 分の 1 程度であった。

固定化できた脂肪細胞の充填率は、全ての脂肪細胞の直径を 50 μm と仮定した場合、約 31% であり、組織内で脂肪細胞の占有する体積を、実際のヒト個体内と比較した場合には、約 1/6 程度である。*In vivo* における細胞密度の達成は未だ不十分ではあるが、単層培養 (2D) 時のコンパートメント内の細胞数は 6300 個であり、三次元担体を用いることで 15750 個と約 2.5 倍の細胞数を固定化できることが明らかとなった。従って、浮遊性の成熟脂肪細胞をモデル細胞として用いる場合には、細胞密度を *In vivo* に近づける手法として 3 次元化は有効である。

デバイス内において 3 次元不織布担体に固定化された成熟脂肪細胞は少なくとも 72 時間程度は安定してデバイス内にて培養が可能であることを確認できた。

3.4.2 肝モデル細胞の固定化

全体灌流培養を 2 日間行った場合でも、細胞の剥離や顕著な凝集は確認されなかった。不織布を用いた複合灌流培養においても少なくとも 48 時間は安定した培養を行えることを確認した。今回固定化された肝モデル細胞のコンパートメント内の細胞密度は人体内と比較して約 1/100 程度の細胞密度であった。Hep G2 細胞は癌細胞であり無限増殖能を有しているので、脂肪細胞導入以前に、Hep G2 細胞のみを播種・培養しておき、細胞密度を高めおく必要がある。しかし、今回は 10^5 cells/cm^2 程度で播種したが、予めさらに高密度の細胞懸濁液を導入することにより、初期接着量は増やすことができるであろう。

脂肪モデル細胞と同様に肝モデル細胞についても *In vivo* における細胞密度の達成は未だ不十分ではあるが、単層培養 (2D) 時のコンパートメント内の細胞数は 6300 個であり、三次元担体を用いることで 94500 個と約 15 倍の細胞数をコンパートメント内に固定化できることが明らかとなった。無限増殖能を有していないモデル肝細胞を高密度に固定化する場合にも三次元化が有効な手法であることが示唆された。脂肪モデル細胞と同様に少なくとも 72 時間程度は安定してデバイス内にて培養が可能であることを確認できた。

3.4.3 マイクロ複合細胞培養デバイスの3次元培養における課題

本章ではモデル細胞の固定化のために不織布担体をデバイス内培養部に挿入することで、モデル細胞の3次元固定化を行った。しかし、3次元担体として通常の不織布を裁断して使用するだけでは、裁断面から複数の繊維がチャンバー外の流路・接着面に混入してしまう状況があり、マイクロ培養システム作製の歩留まりが著しく低下してしまうといった実用上、非常に大きな問題があった。そこで、裁断面を加熱固化させて使用するなど改善を試みたが上述の問題を完全に克服するには至らなかった。このようなリアクター内部の3次元化に伴う技術的な問題は、通常の培養スケールに比べてマイクロ培養システムが微小な空間に様々な構造や機能を集積することに起因した課題だといえる。マイクロ複合培養システムに期待される臓器間相互作用や細胞活性の亢進といった非線形応答の評価を考慮すれば3次元化は必要不可欠な要素であり、継続的な3次元化手法の検討が必要である。

3.4.4 蛍光モデル薬物の分布評価

i) 蛍光画像の取得

蛍光イメージング装置を用いて取得したモデル薬物暴露後5, 10, 30, 60分後の蛍光画像をFig. 3-5に示します。灌流を開始して60分後には脂肪細胞が取り込まれた不織布のあるコンパートメントのみに強い蛍光が観測され、脂肪細胞の無いコンパートメントでは、蛍光はデバイス内壁とチューブのみに均一に見られるだけであった。これは、Fluorantheneが脂肪細胞に選択的に蓄積されたためだと考えられる。

比較実験として、脂肪細胞が入っていない状態で、肝臓コンパートメントのみにHep G2細胞が固定化されている細胞培養チップで同様の測定を行ったところ、不織布自体や肝臓コンパートメントにはFluorantheneが吸着および蓄積されることはほとんどなかった。これらのことから、Fluorantheneは主に脂肪細胞内に蓄積されたことが明らかとなった。

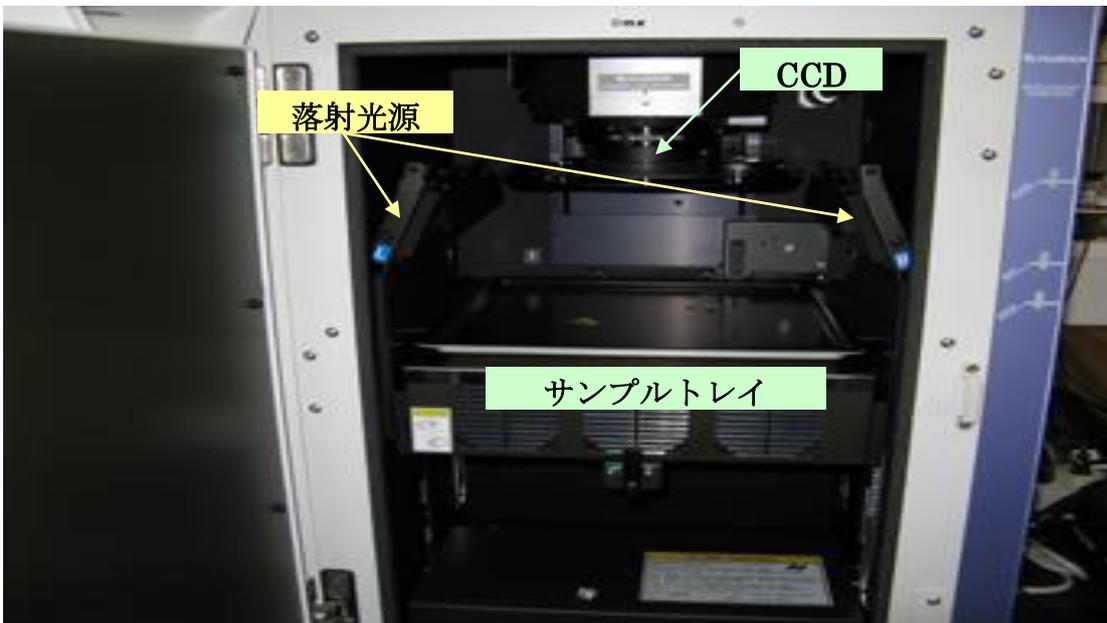
ii) 分布（蓄積量）の経時変化（定量的解析）

次に、Fluorantheneが脂肪細胞に蓄積された量を、蛍光イメージング測定によるFluorantheneの蛍光強度から評価した。その結果、測定した時間内では、脂肪細胞に蓄積されたFluoranthene濃度は、導入直後に急激に蓄積された後、緩やかに脂肪組織コンパートメントに蓄積されていく事が明らかとなった。

以上のことから、脂肪組織が存在する場合には疎水性物質が選択的に蓄積される可能性があり、肝臓やその他臓器コンパートメントへの分布は低くなる、という*In vivo*の一般則をまずは本チップが良好に再現可能であることが確認できた。

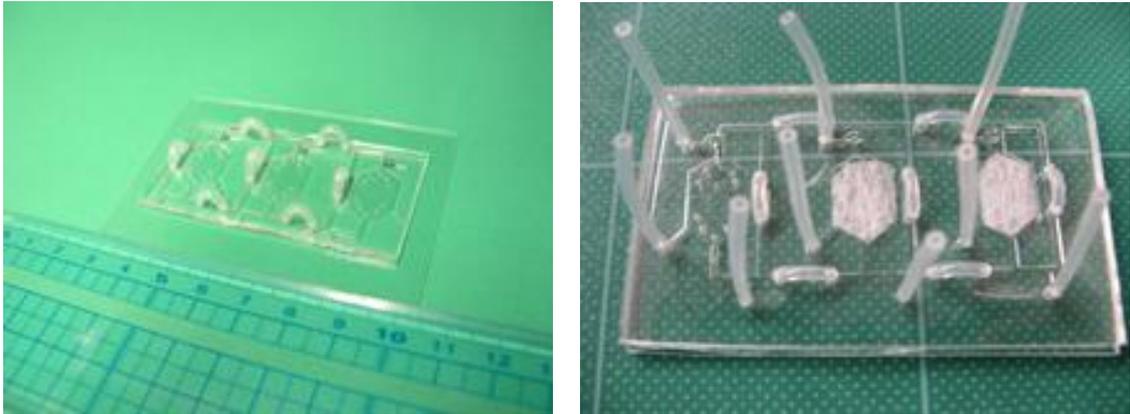


蛍光イメージング装置の概観（蛍光画像取得装置とデータ処理計算機）

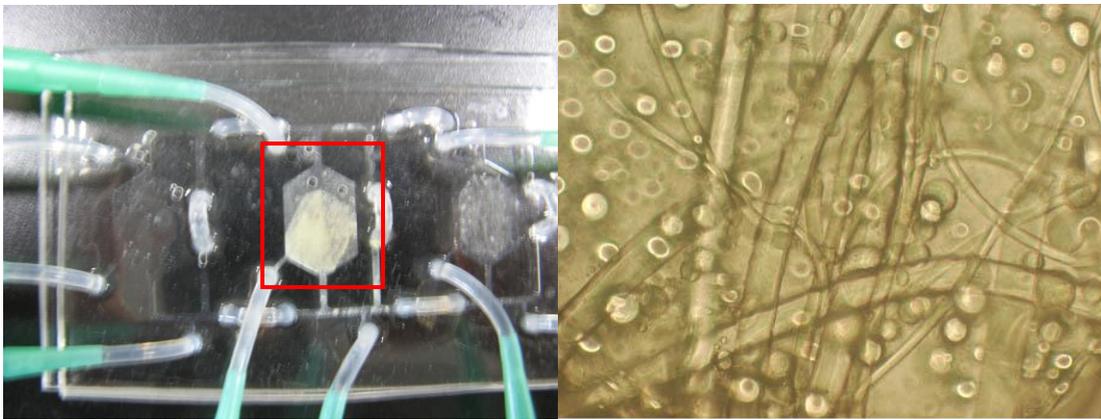


蛍光イメージング装置の仕様（落射光源による励起と CCD カメラによる蛍光値の取得）

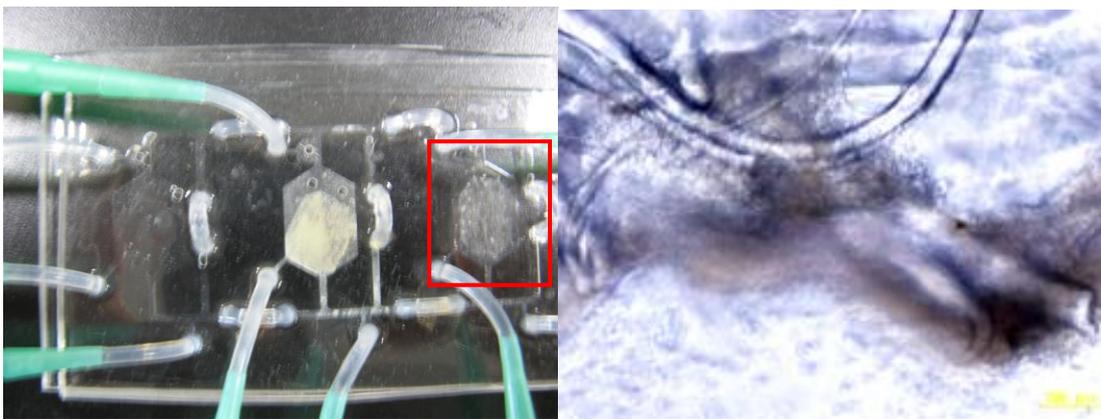
Fig. 3-3 蛍光イメージング装置の概要



不織布を挿入した複合細胞マイクロデバイス



脂肪細胞を固定化した複合細胞マイクロデバイス (右; 位相差顕微鏡画像)



肝モデル細胞を固定化した複合細胞マイクロデバイス (右; 位相差顕微鏡画像)

Fig. 3-4 成熟脂肪細胞および肝モデル細胞の3次元固定化

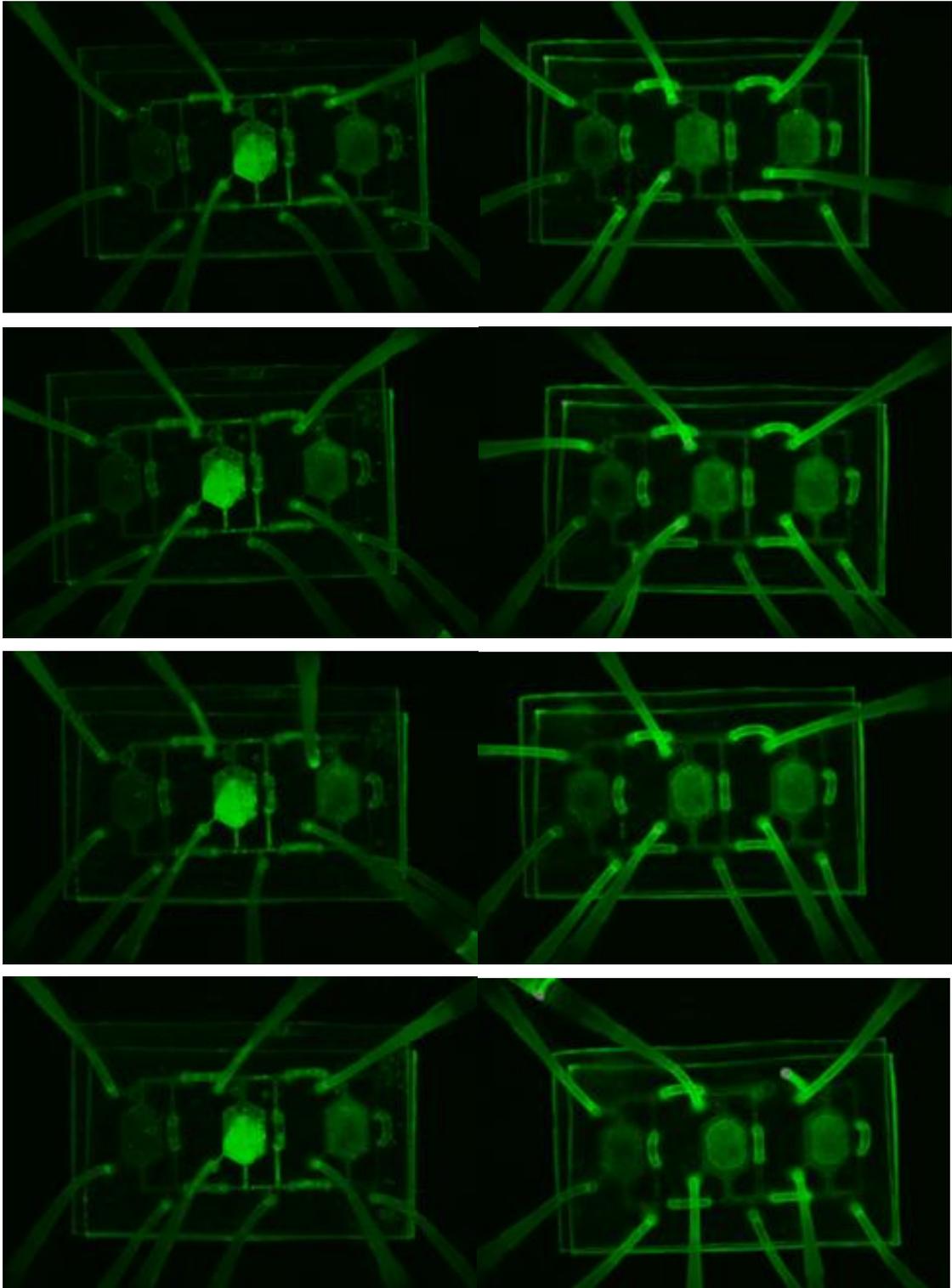


Fig. 3-5 灌流培養 5, 10, 30, 60 分後のフルオランセンの蛍光分布画像
(左 ; 脂肪細胞(+), 右 ; 脂肪細胞(-))

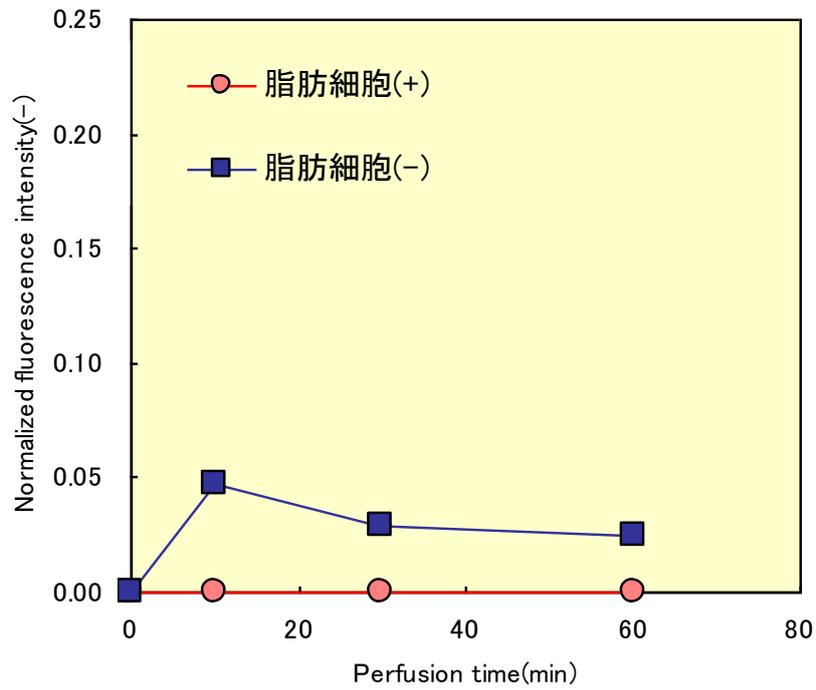


Fig. 3-5a フルオランセンの蛍光分布の時間変化 (肝コンパートメント)

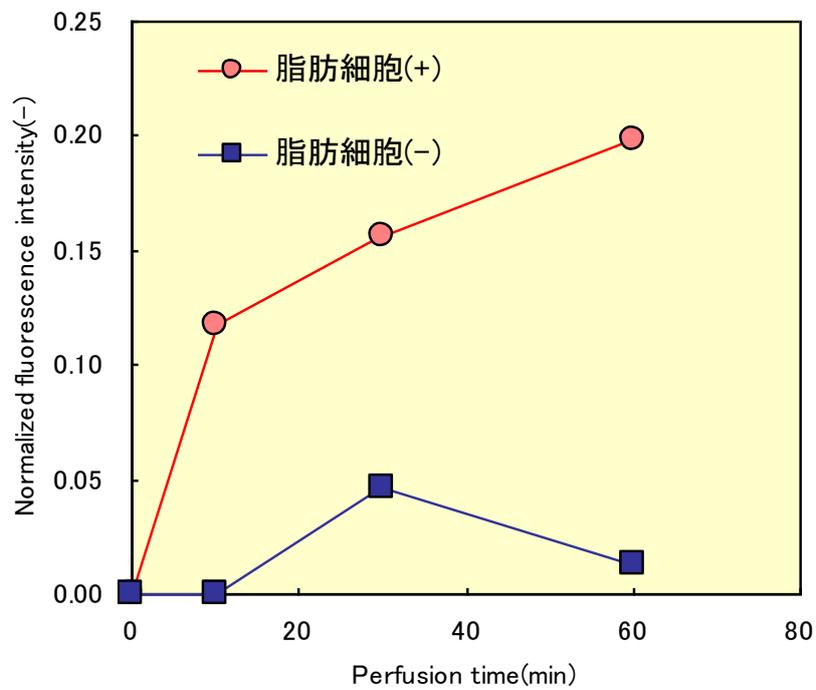


Fig. 3-5b フルオランセンの蛍光分布の時間変化 (脂肪コンパートメント)

3.5 まとめ

本章では、マイクロ複合細胞培養デバイス内にて3次元担体を用いた3次元培養を適用し、体内分布評価に適用する目的で分布を制御する臓器モデル細胞としてラット由来初代成熟脂肪細胞を、第2臓器モデル細胞の例としてHep G2細胞およびラット初代培養肝細胞をデバイス内の各々のコンパートメントに播種し、灌流培養操作を行った。

脂肪細胞に関しては、培養用培地に比べ、わずかに比重が軽いいため、3次元不織布担体を用いて固定化を試みた。形態観察結果からは、3次元担体中に安定分散固定化されていることが観察され、成熟脂肪細胞の密度は*in vivo*に比べて約1/6程度の細胞密度で固定化できた。人体において、全身に分布する脂肪組織であるが、本デバイスでは極めて微小なコンパートメント内への固定化をしたものであり、更に細胞密度を向上させる必要はあるものの、まずは実験に分布評価に耐えうる細胞密度であると考えている。さらなる高密度化のためには、不織布の充填率を向上させるなどの対策が必要である。

肝臓コンパートメントにも3次元担体を挿入し、固定化を行った場合、単層培養の場合と同様に担体への接着と増殖を確認することができた。脂肪細胞との複合灌流培養においても顕著な剥離や死滅は確認されず、72時間に限れば安定培養が可能であった。

一方で、3次元担体として通常の不織布を裁断して使用するだけでは、裁断面から複数の繊維がチャンバー外の流路・接着面に混入してしまう状況があり、マイクロ培養システム作製の歩留まりが著しく低下してしまうといった非常に大きな問題が明らかとなり、マイクロ培養デバイス作製における特有の課題として明らかとなった。

脂肪細胞を固定化した本複合細胞培養デバイスおよび脂肪細胞を固定化していない複合細胞培養デバイス内に疎水性蛍光モデル薬物を負荷した実験から、蛍光イメージングにより複合培養細胞デバイス内の脂肪細胞に蛍光モデル薬物が蓄積している様子が確認された。また、経時的に取得した蛍光画像の蛍光強度を数値化した結果、脂肪細胞が固定化してある場合には蛍光モデル薬物負荷後10分程度で急速に脂肪細胞に蓄積し、その後は緩慢に蛍光強度が増加した。一方で、その際の肝臓コンパートメント内の蛍光強度の値は灌流時間に対して減少することが明らかとなり、脂肪組織が存在する場合には疎水性物質が選択的に蓄積される可能性があり、肝臓やその他臓器コンパートメントへの分布は低くなる、という*In vivo*の一般則をまずは本デバイスが良好に再現可能であることが確認できた。

参考文献

- Augello A, Kurth TB, De Bari C. 2010. Mesenchymal stem cell: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. *Eur Cell Mater*, **20**: 121-133
- Babson J.R., Russo-Rodriguez S.E., Rastetter W.H., Wogan G. N. 1986a. *In vitro* DNA-binding of microsomally-activated fluoranthene: evidence that the major product is a fluoranthene N2-deoxyguanosine adduct. *Carcinogenesis*, **7(6)**: 859-865,
- Babson JR, Russo-Rodriguez SE, Wattlely RV, Bergstein RL, Rastetter WH, Liber HL, Andon BM, Thilly WG, Wogan GN. 1986b. Microsomal activation of fluoranthene to mutagenic metabolites. *Toxicol and Appl Pharmacol*, **85**: 355-366
- Brown RP, Delp MD, Lindstedt SL, Rhomberg LR, Beliles RP. 1997. Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models. *Toxicol Ind Health*, **13(4)**:407-84.
- Horikawa K, Sera N, Otofujii T, Murakami K, Tokiwa H, Iwagawa M, Izumi K, Otsuka H. 1991. Plumonary carcinogenicity of 3,9- and 3,7- dinitrofluoranthene, 3-nitrofluoranthene and benzo[a]pyrene in F344 rats. *Carcinogenesis*, **12(6)**: 1003-1007
- Mossanda K., Poncelet F., Fouawn A., Mercier M. 1978. Detection of Mutagenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in African smoked fish. *Fd Cancer Toxicol*, **17**: 141-143
- Pothuluri JV, Freeman JP, Evans FE, Cerniglia CE. 1990. Fungal transformation of fluoranthene. *Appl Environ Microbiol*, **56(10)**: 2974-2983
- Poulos SP, Dodson MV, Hausman GJ. 2010. Cell line models differentiation: preadipocytes and adipocytes. *Exp Biol Med*, **235(10)**: 1185-1193
- Stier A., Schlenker A., Sidhu J., Kiihnle W., Finch S.A.E. 1988. Heterogeneity of biotransformation of fluoranthene in perfused liver cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, **114**: 39-46

Stocker K.J., Howard W.R., Statham J., Proudlock R.J. 1996. Assessment of the potential *in vivo* genotoxicity of fluoranthene. *Mutagenesis*, **11**(5), 493-496

Vaca C, Tornqvist M, Rannug U, Lindahl-Kiessling K, Ahnstrom G, Ehrenberg L. 1992. On the bioactivation and genotoxic action of fluoranthene. *Arch Toxicol*, **66**: 538-545

Zheng B., Hwang H.M., Yu H., Ekunwe S. 2004. DNA damage produced in HaCaT cells by combined fluoranthene exposure and ultraviolet a irradiation. *Environ Mol Mutagen* **44**: 151-155

LAS-3000 ルミノイメージアナライザー操作ガイド. 2004. Fujifilm

第 4 章 静脈投与薬物の分布・代謝・毒性発現プロセスの再現

4.1 緒言

In vitro 複合細胞培養系の最も重要な意義は、個別の *In vitro* 試験の線形結合では評価し得ない非線形な応答の有無を明らかにすることである。そのためには、分布・代謝といった個別の体内動態制御プロセスを評価するだけでなく、標的臓器における最終的毒性を評価し、*In vivo* における体内動態および毒性（薬効）を比較することによって複合細胞培養系の妥当性を検証しておく必要があると考えられる。

本複合培養系には、吸収プロセスを再現するコンパートメントが無い場合、経口投与物質の体内動態および毒性（薬効）は再現し得ないが、静脈投与物質であれば血中に直接暴露されるため、小腸からの吸収を考慮する必要がないと考えられる。また、吸収プロセスを介さないことから、分布・代謝プロセスの最終的毒性に対する寄与が大きいと考えられ、3つの並列した培養部を持つ本複合細胞培養デバイスにおいて評価が可能であると考えられる。

本複合細胞培養デバイスにおいて2章では単層培養による灌流培養、3章においては3次元灌流培養を試みた。生体内の各臓器細胞が構築する複雑な構造を詳細に模倣するためには3次元培養が必要不可欠であるが、現状では固定化担体を用いた3次元固定化によるデバイス作製の著しい歩留まり低下を回避することができないために、複数の条件で静脈投与物質の分布・代謝・毒性の評価を行うことが現実的に困難である。そこで本章では、3次元培養に比べ、技術的にデバイス作製が容易であった単層培養系によって体内動態および毒性の評価を試みる。

静脈投与モデル物質：塩酸イリノテカン（CPT-11）

抗がん剤は通常の薬物と比較して副作用の発現頻度が高いため、特に体内動態を正確に評価し、投与設計を立てていく必要がある。塩酸イリノテカン（CPT-11）は肺ガンに施行する化学療法剤の中でも有効性が高く、世界的にも第一選択薬として認知されている（井藤、2006）。イリノテカンは蛍光性を持つことが知られており、365 nm 付近で励起すると、440 nm 付近に蛍光が得られる(Caceres et al. 2008)。また、水やジエチルエーテルに溶けにくく、酢酸に溶解しやすい性質を持つ。

臨床試験においては、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、子宮頸癌、卵巣癌、胃癌（手術不能又は再発）、結腸・直腸癌（手術不能又は再発）、乳癌（手術不能又は再発）、有棘細胞癌、悪性リンパ腫（非ホジキンリンパ腫）などの広範な癌細胞に対して薬効が確認されている(Kojima et al. 1996; Takahata et al. 2007)。また、副作用として、骨髄機能抑制・重篤な下痢が明らかにされている。日本における第II臨床段階の胃癌患者に対する奏効率は、初期の癌に対して19.0%、後期の癌に対して18.4%であった(Sakata et al. 1992)。また、シスプラチンなど他の抗がん剤との併用も試みられており、これまでにその効果が明らかにされている(Boku et al. 1999; Takiuchi et al. 2005; Inokuchi et al. 2006; Komatsu et al.

2006; Uedo et al. 2007).

CPT-11はプロドラッグであり、その作用機序は主としてカルボキシルエステラーゼによって活性代謝物SN-38に変換され、SN-38がトポイソメラーゼ I と結合することによって癌細胞の増殖を阻害することによる。 *In vitro*試験によってトポイソメラーゼ I に対するCPT-11の高い活性が示されている(Andoh et al. 1987; Kawato et al. 1991; Kingsbury et al. 1991, Redinbo et al., 1998; Stewart et al., 1998). 更に, Kingsbury et al. はCPT-11自体の活性が活性代謝物SN-38に比べて有意に低いことを指摘している(Kingsbury et al. 1991). また, HuangらによりCPT-11がアポトーシスを促進させることが示された(Huang et al. 1993).

CPT-11 はカルボキシルエステラーゼにより SN-38 に代謝される一方で, 肝臓内においては CYP3A4 により不活性代謝物 APC, NPC に変換され無毒化される. それ以外の代謝経路としてはヒドロキシル化, 脱エチル化および脱水素化が報告されている(Lokiec et al. 1996; Santos et al. 2000; Sai et al. 2001). また, CES により代謝された活性代謝物 SN-38 も UGTによりグルクロン酸抱合体SN-38Gを形成し無毒化され胆汁中に排泄されることが明らかにされている (Sai et al. 2008; Rosner et al. 2008; Lokiec 1996; Chu et al. 1997; Zamboni et al. 1998). CPT-11 の構造および代謝経路を Fig. 4-1 に示す.

Ramesh et al. のレビューによれば, CPT-11 の組織移行性は SN-38 の移行性に比べて高く, 血漿タンパク結合率の SN-38 に比べて良好な体内分布を示す (Ramesh et al. 2009). APC(7-ethyl-10-[4-N-(5-aminopentanoic acid)-1-piperidino]carbonyloxycamptotecin)およびNPC([7-ethyl-10-(4-amino-1-piperidino) carbonyloxycamptotecin])などのSN-38以外のCYP3A4による酸化代謝物は低いトポイソメラーゼ I 阻害作用しか持たない(Rivory et al. 1996; Dodds et al. 1998; Haaz et al. 1998).

CPT-11 については, これまでにヒト膵臓がん由来細胞株を用いた *In vitro* 試験において, p-gp に起因する薬剤抵抗性が報告されている(Takeda et al. 1992). 加えて, CPT-11 の代謝に関わる UGT1A1 をコードする遺伝子には 60 種類以上の多型が報告され, いくつかの遺伝子で CPT-11 の有害反応との関連が明らかになっている, もしくは関連が示唆されている. UGT1A1*28 は, 塩酸イリノテカンの薬物有害反応に関係する最も重要な遺伝子多型である. この UGT1A1*28 は遺伝子発現に関与する 5'-上流のプロモーター領域に存在する TATA ボックスにおける変異である. この変異は, TATA ボックスの野生型においては TA の繰り返し数が 6 回であるのに対し, UGT1A1*28 では 7 回繰り返される. この変異によって UGT1A1 の mRNA やタンパクの発現量が低下するため, UGT1A1*28 をホモ接合体に有する患者においては UGT1A1 の酵素活性の著しい低下を来し, ヘテロ接合体に有する患者はホモ接合体と野生型の中間の強さの活性を示す.

UGT1A1*28 を有する患者における重篤な薬物有害反応を引き起こすリスクが、UGT1A1の野生型を有する患者に比べ約7倍に上昇することが明らかにされている(Ando et al. 2000). また、UGT1A1*28をホモ接合体で有する患者は、グレード4の好中球減少を引き起こすリスクがヘテロ接合体を有する患者や野生型を有する患者に比べ約9倍に高まることが明らかにされている(Innocenti et al. 2004).

一塩基置換であるUGT1A1*6のアレル発現頻度は、日本人を含むアジア人の2-3割に認められる. *In vitro*試験でUGT1A1*6が酵素活性の低下の原因となることが明らかにされている. また、Hanらは塩酸イリノテカンとシスプラチンの併用療法を施行した韓国人の肺癌患者81例を対象に、UGT1A1遺伝子多型と塩酸イリノテカン、SN-38およびSN38Gの薬物動態および臨床効果を解析し、UGT1A1*6をホモ接合体で有する患者の67%にグレード4の好中球減少が認められ、UGT1A1*6をホモ接合体で有する患者は、UGT1A1*6をヘテロ接合体に有する、あるいは野生型の患者に比し、重篤な薬物有害反応を生じる可能性が有意に高いことが明らかにされている(Han et al. 2006).

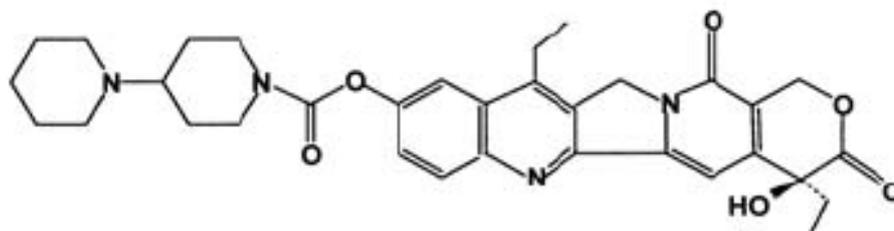


Fig. 4-1a イリノテカン (CPT-11) 原体の構造

DNA複合体を形成し、トポイソメラーゼ I を阻害(増殖阻害)
カルボキシエステラーゼ (CES) およびCYP3A4で代謝

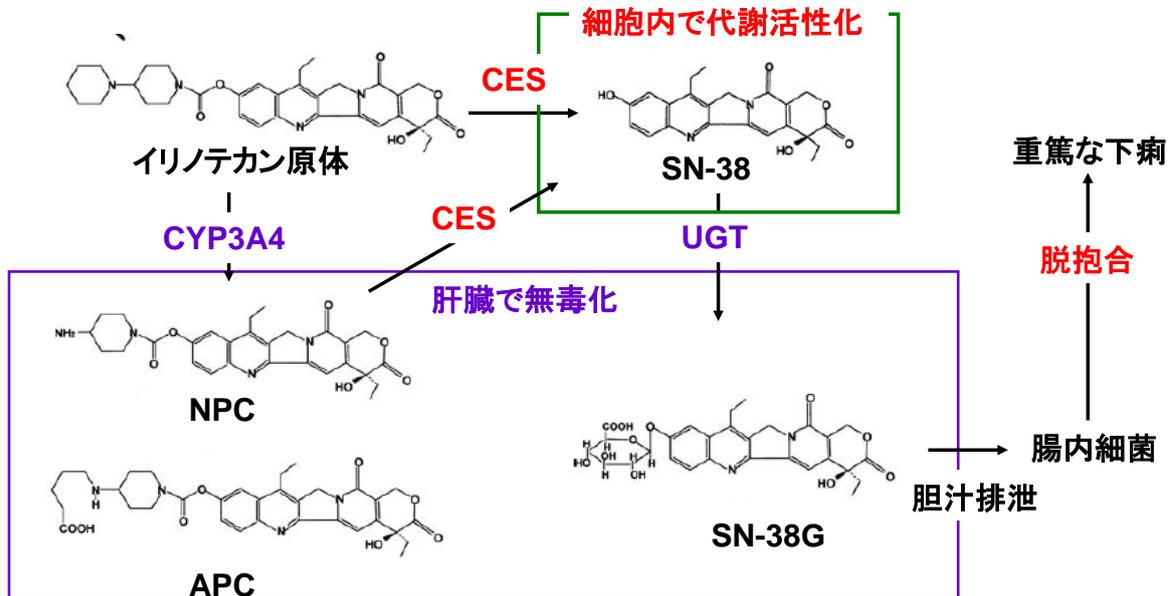


Fig. 4-1b CPT-11 の代謝経路

4.2 本章の目的

CPT-11 を静脈投与モデル毒物として、肺単独培養および脂肪細胞・肝細胞との複合培養系における分布・代謝・毒性を評価することによって、分布（脂肪細胞が初期分布に寄与）、代謝（肝細胞において解毒される）プロセスの標的臓器（肺細胞）における最終的な毒性に対する寄与を明らかにし、*In vivo*における知見と比較することで本複合細胞培養系の有用性を示す。

4.3 実験

・肺モデル L-2 細胞の固定化

2.3.2 に従い、L-2 細胞は生存率評価のために、 $10\mu\text{M}$ の生細胞染色色素 Cell tracker CMTMR (Invitrogen; Japan) を用いて染色した L-2 細胞を、 $1 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ となるように細胞懸濁液を調製し、予め脂肪モデル細胞が固定化されたマイクロデバイスもしくは肝細胞が固定化されたマイクロデバイス内の肺コンパートメントにアクセスポートを介して播種した。1日個別灌流培養後、全体灌流路を用いて複合灌流培養を行った。

・肝モデル初代培養ラット肝細胞の固定化

2.3.2 に従い、ラット初代培養肝細胞は、細胞密度 $1.2 \times 10^5 \text{ viable-cells/cm}^2$ でマイクロデバイス内の肝コンパートメントにアクセスポートを介して播種した。培養液は播種後 6

時間で1回交換し、24時間個別灌流培養を行った。その後、72時間複合灌流培養を行った。

72時間複合灌流培養後、肝細胞を含む複合細胞培養デバイス内の肝コンパートメントを、CYP3Asの蛍光基質BOMR (Invitrogen; Japan)とアニオントランスポーター阻害剤であるプロベネシドをそれぞれ1.5 μM 、2 mM含むDMEM培地に交換し、1時間後の肝細胞内に蓄積させた蛍光代謝物(レゾルフィン)の蛍光画像を取得することによって、各群のCYP3As活性を評価した(Burke et al. 1994; Behnia et al. 2000; Washizu et al. 2001; Henkens et al. 2007; Sakai et al. 2010)。

・脂肪組織モデル3T3-L1細胞の固定化と分化誘導

2.3.2に従い、3T3-L1細胞の培養は、 1×10^5 cells/cm²となるように細胞懸濁液を調製し、マイクロデバイス内の脂肪コンパートメントにアクセスポートを介して播種した。個別灌流路を利用して2日個別灌流培養を行った後に、分化誘導処理として1 μM Insulin, 1 μM Dexamethason, 125 μM Indomethasinを含むDMEM培地に交換し、更に2日間個別灌流培養を行った。その後、湿度100%、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂のインキュベータで72時間複合灌流培養を行った。

・静脈投与モデル物質CPT-11単回暴露試験

各群のモデル細胞が固定化された複合細胞培養デバイスの培養液を、全体灌流培養開始直前に50 μM のCPT-11を含む肝細胞用培地に交換した。その後、蛍光イメージング装置を用いてモデル毒物の分布蛍光画像を経時的に取得した。また、L-2細胞の生存率は共焦点顕微鏡Fluo-view (Olympus; Japan)を用いてCMTMRの蛍光画像を24時間毎に取得して評価した。

個別培養系へのCPT-11およびSN-38単回暴露試験

・個別臓器モデル細胞に対するCPT-11およびSN-38単回暴露試験

複合細胞培養デバイスにおけるCPT-11単回暴露実験によって、複合細胞培養系特有の非線形な応答を観測できているのかを明らかにするために、個別培養系による線形結合モデルを構築し、複合細胞培養デバイスにおけるCPT-11単回暴露実験の結果と比較することによって、非線形応答の有無を検証する。個別細胞培養系におけるCPT-11、SN-38の濃度の時間変化を測定し、個別細胞培養系におけるモデル物質濃度の時間変化を記述する数理モデルを構築した。具体的な手順を以下に記す。

コラーゲン吸着処理を施した24 well-TCPS (Iwaki; Japan)にL-2細胞、初代培養ラット肝細胞、3T3-L1細胞をそれぞれ、 1×10^4 cells/cm²、 1.2×10^5 viable-cells/cm²、 1×10^5 cells/cm²となるように播種し、24時間後にCPT-11を50 μM 含む肝細胞培養用基礎培地に培地交換を行い、湿度100%、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂のインキュベータで72時間培養を行った。24, 48, 72時間で培地のサンプリングを行い、HPLCによる濃度の分析を行った。

標的臓器モデル細胞である L-2 細胞に関しては線形結合モデル構築のために、主たる毒性物質である SN-38 についても CPT-11 と同様の方法で単回暴露試験を行った。播種細胞数は 1×10^4 cells/cm² となるように播種し、24 時間後に SN-38 を 25 μ M 含む肝細胞培養用基礎培地で培地交換を行い、湿度 100%，37 °C，5% CO₂ のインキュベータで 72 時間培養を行った。CPT-11 と同様に 1，2，6，24，48，72 時間で培地のサンプリングを行い、各時間に対する濃度を定量した。また、培養液中濃度測定と平行して CMTMR 染色により各 SN-38 暴露濃度に対する 72 時間後の細胞生存率を決定した。

・ HPLC による CPT-11 および SN-38 濃度の定量

HPLC は、カラム Xbridge Shield RP18 5.0 μ m(4.6 mm · 250 mm column, Waters; USA)，ポンプ LC-10Ai (Shimadzu; Japan)，デガッサ DGU-14A(Shimadzu; Japan)，カラムオーブン(Shimadzu; Japan)，検出器 RF-10A_{XL}(Shimadzu; Japan)がコントローラー SCL-10Avp(Shimadzu; Japan)で構成されたものを使用した。

測定の前処理として対象サンプル 50 μ L を入れたエッペンチューブにアセトニトリル/メタノール (1:1)混液を 100 μ L 加え、ボルテックスミキサーで十分混合させ、15000 \times g，15 分間遠心してサンプル液中のタンパク質を沈殿させた。上清を回収し、5 μ L の 0.1 M HCl を加え、15000 \times g，5 分間遠心したものを測定サンプルとして供した。移動層は、7.5 mM 酢酸アンモニウム/酢酸緩衝液(pH=4.5) に 24% (v/v)でアセトニトリルを加えたものを使用した。また、CPT-11 および SN-38 の検出は、励起波長 380 nm，蛍光波長 540 nm で測定した (Tobin et al. 2005; Hu et al. 2007, Bansal et al. 2008)。サンプル導入量は 10 μ L で行い、保持時間 30 min.まで測定を行った。検量線を作成するために CPT-11，SN-38 を移動層に直接溶解させた溶液を、公比 2 で希釈した溶液を使用してそれぞれ検量線を作成した。

4.4 結果と考察

4.4.1 脂肪モデル細胞のオンチップ分化誘導

本研究で脂肪モデル細胞として用いた 3T3-L1 細胞は, 脂肪コンパートメント内において分化誘導を行うことによって試験に供した. オンチップ分化誘導処理の効果を確かめる目的で, 全体灌流培養直前の 3T3-L1 細胞を Oil Red O 染色した結果を Fig. 4-2 に示した. 4 日間のオンチップ分化誘導処理によって 3T3-L1 細胞の細胞質内に複数の油滴が観察され (Fig. 4-2;細胞質内の赤色部分), 個別灌流路を利用したオンチップ分化誘導処理によって良好な分化誘導が行えることが確認された.

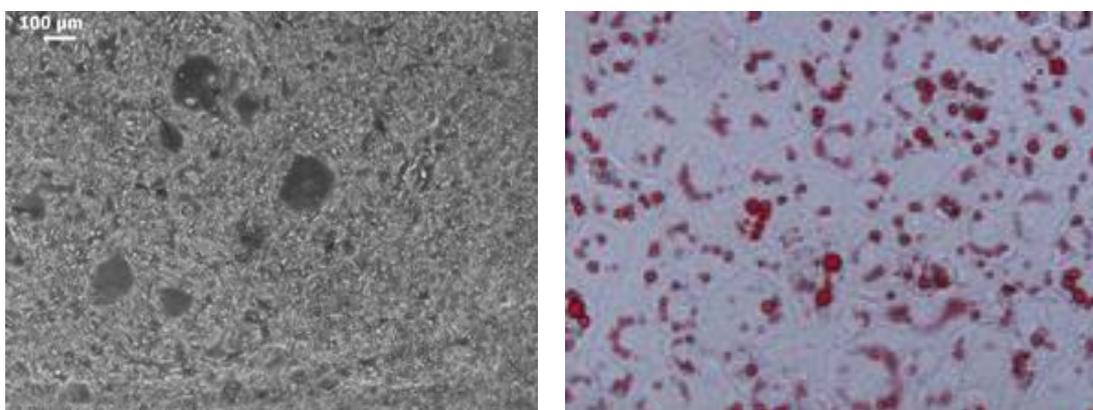


Fig. 4-2 3T3-L1 細胞の Oil Red O 染色の結果

4.4.2 CPT-11 の分布評価

Fig. 4-3a, b, c, d に経時的に取得した各群の CPT-11 の蛍光画像を示した。モデル物質導入後 1 時間後では、肝細胞を含む肝コンパートメント以外に顕著な蛍光は観察されず、脂肪コンパートメントへの特異な蓄積は起こらなかった。肝コンパートメントの蛍光は、CPT-11 を励起するための光源がデバイス下部から照射されることによる、細胞の自家蛍光であると考えられる。灌流培養 24 時間から 72 時間後までの蛍光画像では、肺単独培養時に比べて、肝および脂肪細胞との複合培養時の肺コンパートメントの蛍光値が若干弱いことが散見された。しかしながら、脂肪モデル細胞を導入した脂肪コンパートメントにおける顕著な蛍光の増大は 72 時間後においても確認されず、蛍光画像からは分布に対する脂肪細胞の寄与は明らかではない。

Fig. 4-3 に示した蛍光画像を基に各コンパートメント内の蛍光値を定量した結果を示すため、まず CPT-11 濃度を基準としたデバイス内分布の変化を示すことを目的として、デバイス内にて濃度を変えた CPT-11 の蛍光値から検量線を作成した。次いで、主たる代謝物である SN-38 についても同様に検量線を作成したところ、CPT-11 と SN-38 のモル蛍光係数に 10 倍程度の差があることが明らかとなった。また、デバイス下部からの露光による細胞の自家蛍光も無視し得ないことが明らかとなった。そこで Fig. 4-4a に各モデル細胞の自家蛍光と肝臓、脂肪コンパートメントへの吸着による蛍光値の時間変化を示す。肺モデル細胞、脂肪細胞と比べ、ラット肝細胞の自家蛍光の値が著しく高いことが明らかとなった。また、臓器モデル細胞の固定化されていない、肝臓コンパートメントおよび脂肪コンパートメントにおいても蛍光値が観測され、各コンパートメントへの吸着の影響を無視し得ないことが明らかとなった。特に、肝臓コンパートメントにおいては灌流速度が高いことから、脂肪コンパートメントによりも高い蛍光値を示すことが確認された。Fig. 4-4b に Fig. 4-4a の検討により取得した自家蛍光および各コンパートメントへの吸着による蛍光値を差し引いた各コンパートメントにおける蛍光値の時間変化を示した。得られた蛍光値の値は CPT-11 および SN-38 の蛍光値だけでは説明できない量の蛍光値となっていることが明らかとなった。デバイス内部の蛍光物質(CPT-11, SN-38, 分解物など)の総和は、全ての組み合わせのデバイス内の肺コンパートメントにおいては、灌流開始直後に低下し、その後灌流培養に伴って上昇する傾向が明らかとなった。特に、L-2 細胞を単独で培養した際の蛍光値は 72 時間で最大を示し、顕著な蛍光値の増大が確認された。肝コンパートメントに関しては、肺・肝臓の複合培養を行った場合のみが 72 時間まで 24 時間以降の蛍光値を維持したのに対して、肺単独、肺・肝臓・脂肪の複合培養においては 72 時間までに蛍光値が減少する挙動が明らかとなった。また肺・脂肪の複合培養においては初期に減少した蛍光値は上昇せず灌流培養終了まで低い値を示した。脂肪コンパートメントについては、脂肪細胞が共存する、肺・脂肪もしくは肺・肝臓・脂肪の複合培養系の蛍光値に比べて、脂肪細胞が共存しない場合の蛍光値は低い値を示したことから、デバイス内の蛍光物質が脂肪細胞に吸着していることが示唆されたが、CPT-11 自体が吸着しているのか、培養液中に放出さ

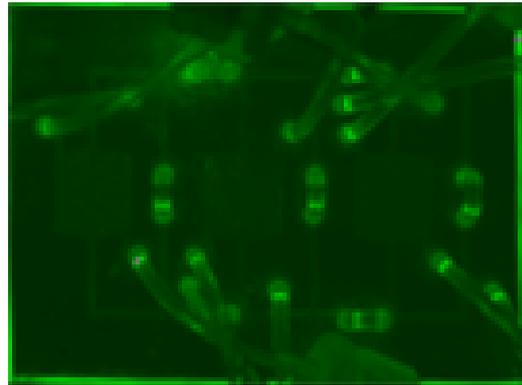
れた SN-38 が脂肪細胞に吸着されたのかは、今回の検討からは明らかではない。各コンパートメントの蛍光値の時間変化と併せて肺コンパートメントにおける蛍光値の時間変化を基準とした濃度曲線下面積（AUC）値を Fig. 4-4b に示した。AUC 値の結果からは、肺単独培養に比べ、肝モデル細胞が共存する場合に有意な AUC 値の減少が確認された。一方で、脂肪細胞との共培養時には明確な AUC 値との差異は確認できなかった。更なる検討を行い、各コンパートメント内の蛍光値の内訳を明らかにすることで、細胞とデバイス内物質の詳細な反応を知ることができると考えられるが、デバイス内培養液量が極めて少ないことから既存の分析機器による各灌流時間に対する各物質濃度を定量することは困難であり、デバイス内へのセンサーの組み込みなど新たな技術の融合活用が必要不可欠であることが本検討により明らかとなった。

4.4.3 肝酵素活性評価

Fig. 4-5a, b に蛍光基質を用いた酵素活性評価の結果を示した。肺・肝臓複合培養時の CYP3As 活性および、肺・脂肪・肝臓複合培養時において毒物非添加時の酵素活性と比較した場合には酵素活性は低下せず、毒物非添加時と同等の酵素活性を示した。後述する細胞生存率の結果においても、肝細胞との複合培養において CPT-11 の細胞毒性が低減されることが確認されたことから、肝コンパートメント内では肝代謝酵素により CPT-11 が細胞毒性の低い酸化代謝物に変換されていると考えられる。



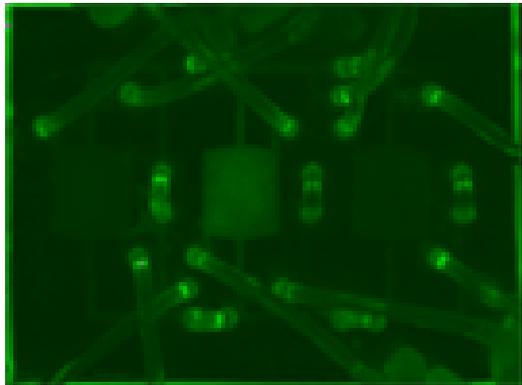
毒物非添加



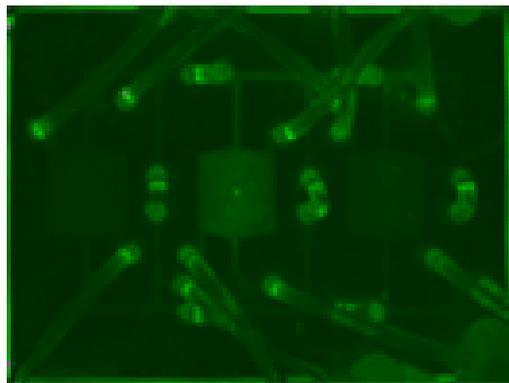
肺単独培養 (脂肪(-), 肝臓(-))



肺・脂肪複合培養 (脂肪(+), 肝臓(-))

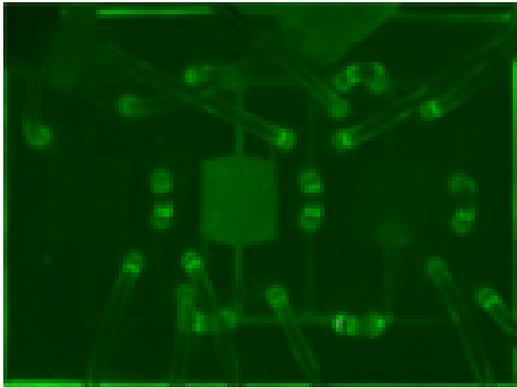


肺・肝臓複合培養 (脂肪(-), 肝臓(+))

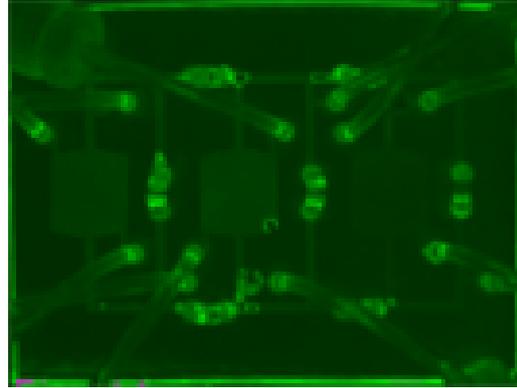


肺・脂肪・肝臓複合培養 (脂肪(+), 肝臓(+))

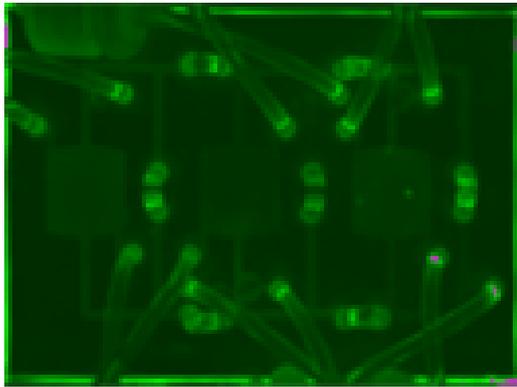
Fig. 4-3a 灌流培養 1 時間後の各群の蛍光画像



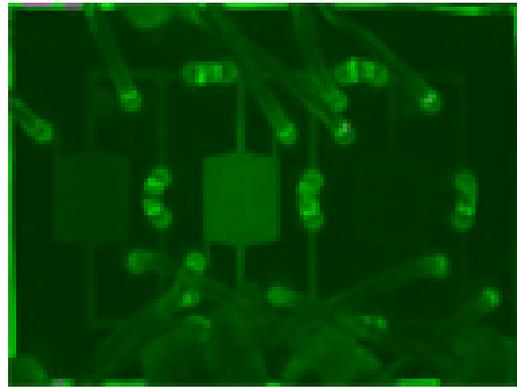
毒物非添加



肺単独培養（脂肪(-), 肝臓(-)）



肺・脂肪複合培養（脂肪(+), 肝臓(-)）

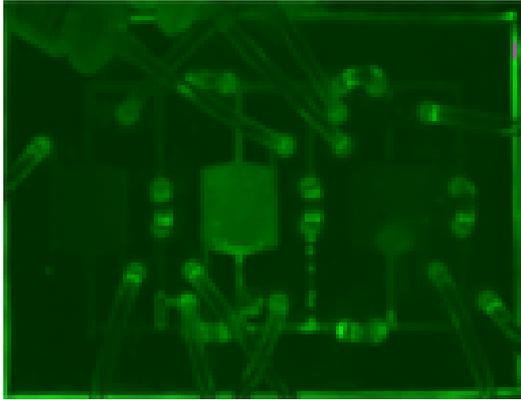


肺・肝臓複合培養（脂肪(-), 肝臓(+))

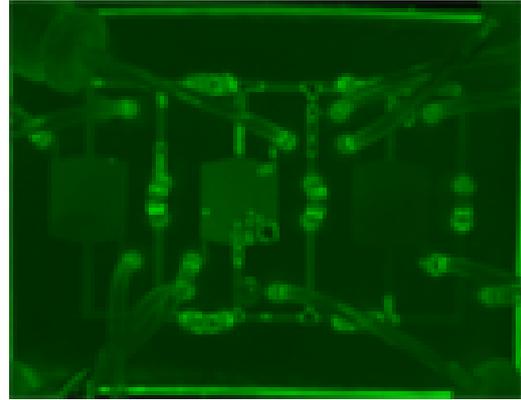


肺・脂肪・肝臓複合培養（脂肪(+), 肝臓(+))

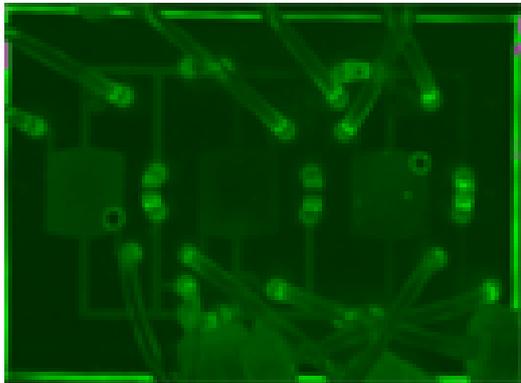
Fig. 4-3b 灌流培養 24 時間後の各群の蛍光画像



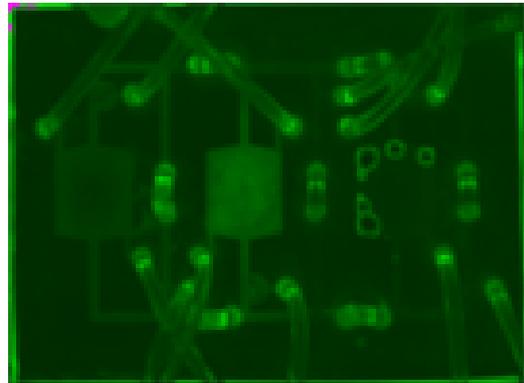
毒物非添加



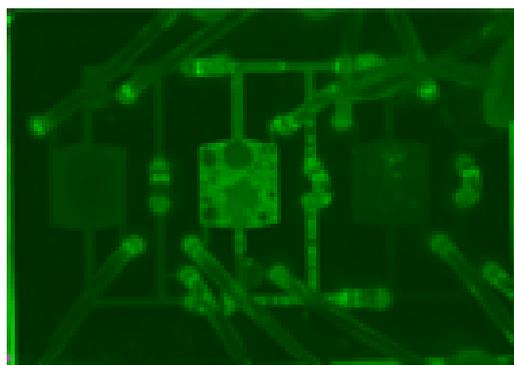
肺単独培養（脂肪(-), 肝臓(-)）



肺・脂肪複合培養（脂肪(+), 肝臓(-)）

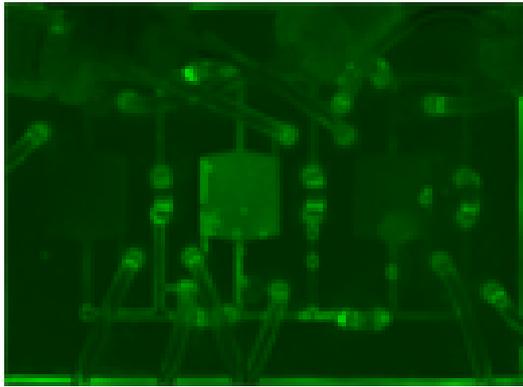


肺・肝臓複合培養（脂肪(-), 肝臓(+))

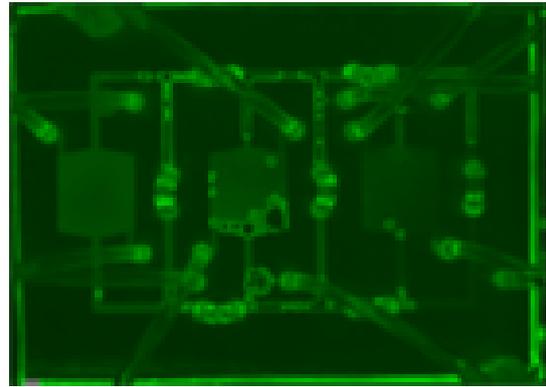


肺・脂肪・肝臓複合培養（脂肪(+), 肝臓(+))

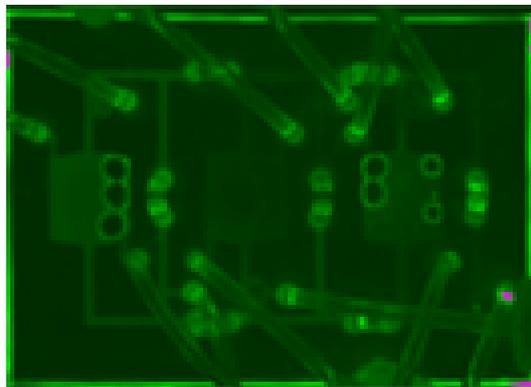
Fig. 4-3c 灌流培養 48 時間後の各群の蛍光画像



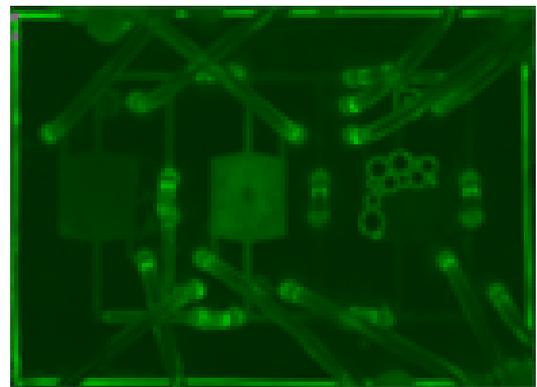
毒物非添加



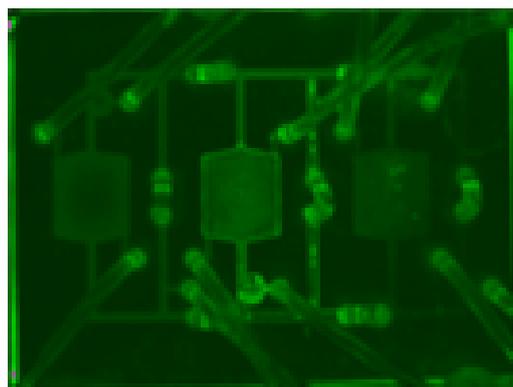
肺単独培養 (脂肪(-), 肝臓(-))



肺・脂肪複合培養 (脂肪(+), 肝臓(-))



肺・肝臓複合培養 (脂肪(-), 肝臓(+))



肺・脂肪・肝臓複合培養 (脂肪(+), 肝臓(+))

Fig. 4-3d 灌流培養 72 時間後の各群の蛍光画像

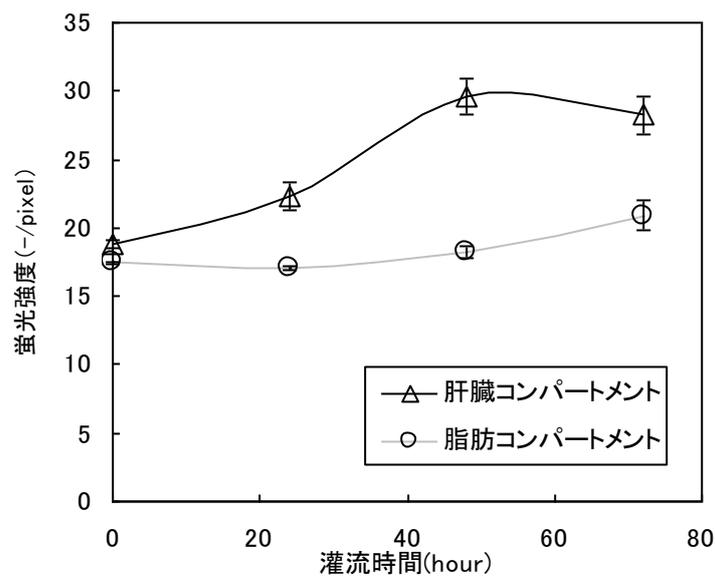
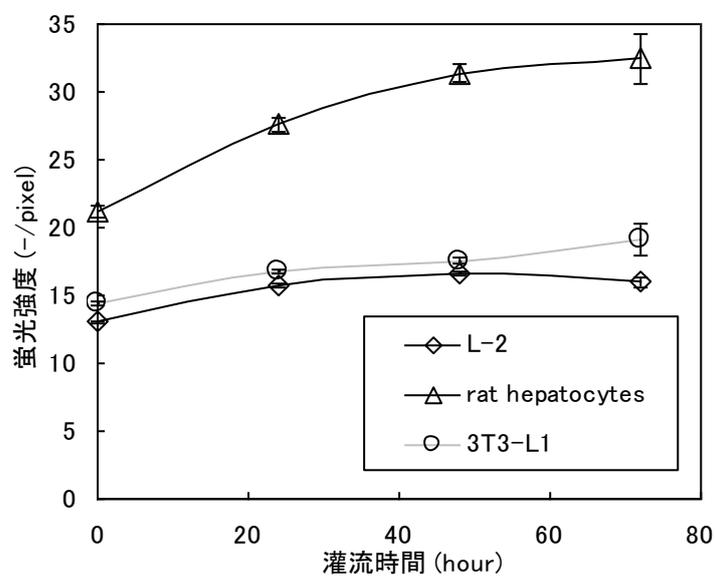


Fig. 4-4a CPT-11 暴露時の各モデル細胞の自家蛍光および肝臓, 脂肪コンパートメントへの蛍光値の時間変化 (上: 各モデル細胞の自家蛍光, 下: 肝臓コンパートメント, 脂肪コンパートメントへの吸着)

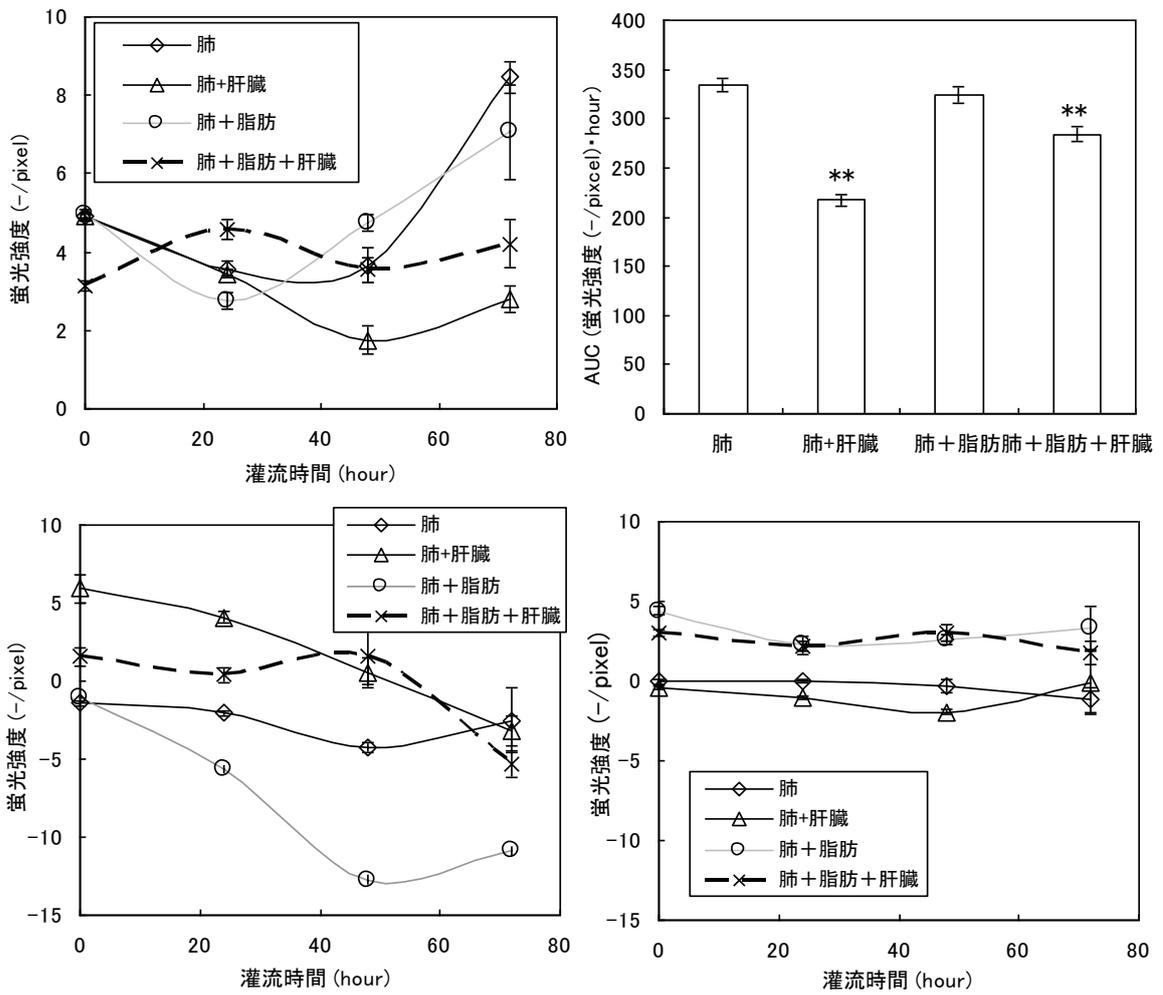
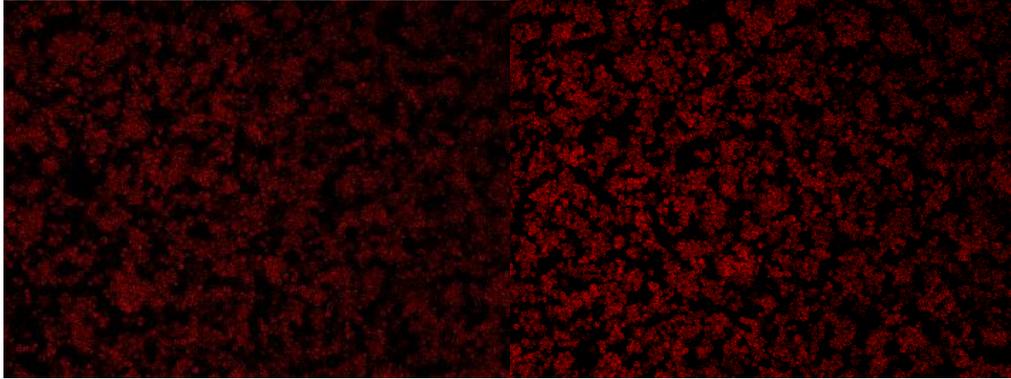
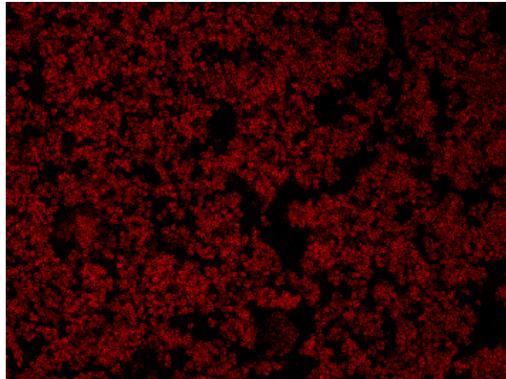


Fig. 4-4b CPT-11 のデバイス内分布の時間変化 (左上：肺コンパートメント，
 左下：肝コンパートメント，右下：脂肪コンパートメント，右上：濃度曲線下
 面積 (肺コンパートメント))



毒物非添加 (肺(+), 脂肪(+), 肝(+)) 肺・肝臓複合培養 (肺(+), 脂肪(-))



肺・脂肪・肝臓複合培養 (肺(+), 脂肪(+))

Fig. 4-5a 各群における肝細胞内レゾルフィンの蛍光画像

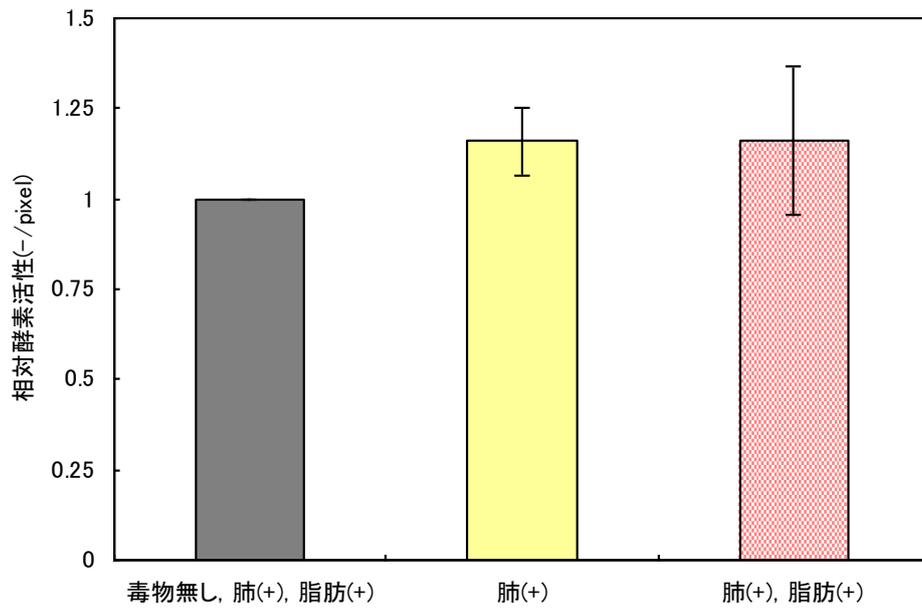


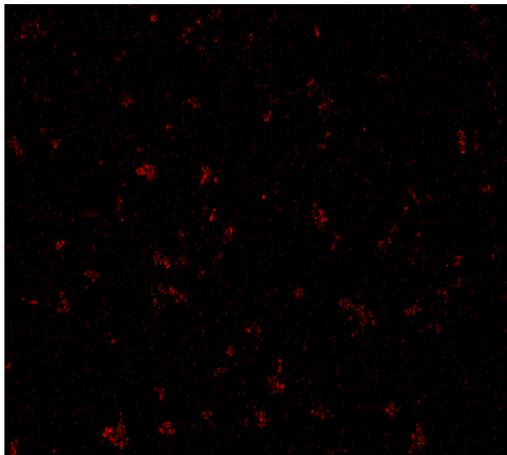
Fig. 4-5b レゾルフィンの蛍光値から算出した各群の CYP3A4 活性

4.4.4 標的臓器モデル細胞の生存率評価

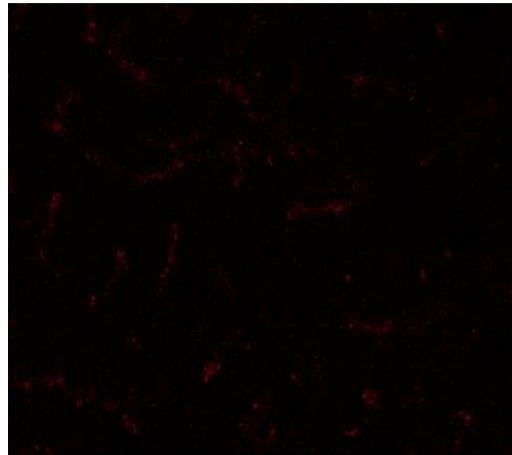
Fig. 4-6a, b, c および Fig. 4-7 に CPT-11 に対する L-2 細胞の生存率の時間変化を評価した結果を示した。24 時間, 48 時間灌流培養後の顕著な細胞生存率の減少はどの組み合わせにおいても観察されなかった。一方, 72 時間灌流培養後に取得した蛍光画像においては, 肺単独培養のみにおいて, L-2 細胞の生存率が 72 時間までに減少していることが明らかとなった。一方, 肝細胞もしくは脂肪細胞が共存する肺・肝臓複合培養, 肺・脂肪複合培養および肺・脂肪・肝臓複合培養においては L-2 細胞の生存率は 72 時間後まで低下せず, CPT-11 の毒性は観察されなかった。これは, 肝細胞共存時には肝代謝によって CPT-11 が代謝・無毒化されたこと, 脂肪細胞共存時には脂肪細胞への吸着などにより相対的に暴露濃度が低減されたこと, などが要因として考えられ, そのために L-2 細胞に対する毒性が結果として低減されたものだと考えられた。

各群における肺コンパートメントの蛍光値の時間変化を基準として算出した AUC の値 (Fig. 4-4b) を用いて, 細胞内 SN-38 濃度曲線下面積に対する細胞生存率 (Fig. 4-11) の関係から蛍光値を基準とした細胞生存率の推定を行った。この際, 蛍光値と濃度の検量線の傾きの違いから SN-38 が CPT-11 の 1/10 濃度と仮定し, SN-38 濃度を決定した。推定された細胞生存率と Fig. 4-7 の細胞生存率とは完全には一致しないが, 肺および肝細胞を複合培養した系で顕著に細胞生存率が高く, 次いで肺・肝臓・脂肪の 3 種を複合培養した系で高い細胞生存率が推定された。また, 肺および脂肪細胞の複合培養においては肺単独培養時に推定された細胞生存率と大きくは変わらない細胞生存率が推定された。この検討からも肝細胞との複合培養による無毒化の効果が示され, 定性的に本章の実験結果と一致することが明らかとなった。

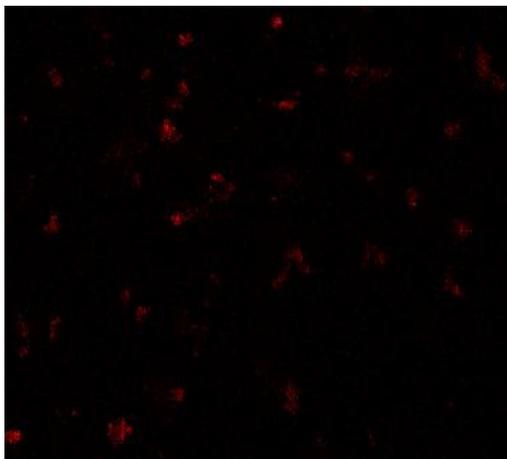
これらの結果は *In vivo* における知見と一致するものであり, 本複合細胞培養系によって *In vivo* における体内動態の一部を再現できたものと考えられる。



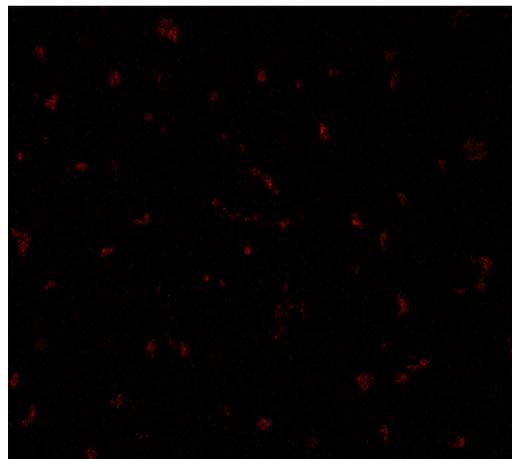
毒物非添加



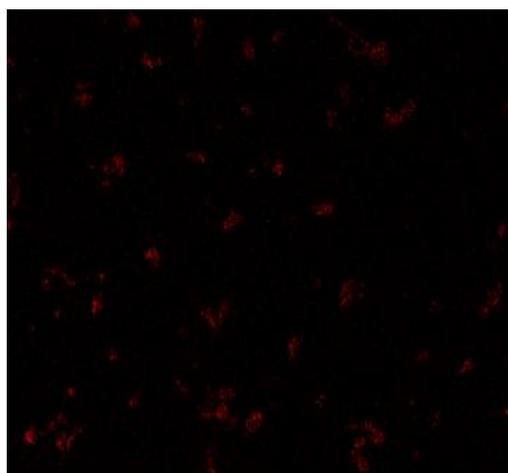
肺単独培養（脂肪(-), 肝臓(-)）



肺・脂肪複合培養（脂肪(+), 肝臓(-)）

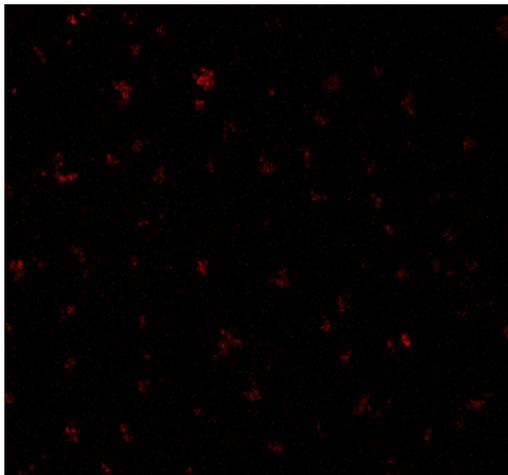


肺・肝臓複合培養（脂肪(-), 肝臓(+))

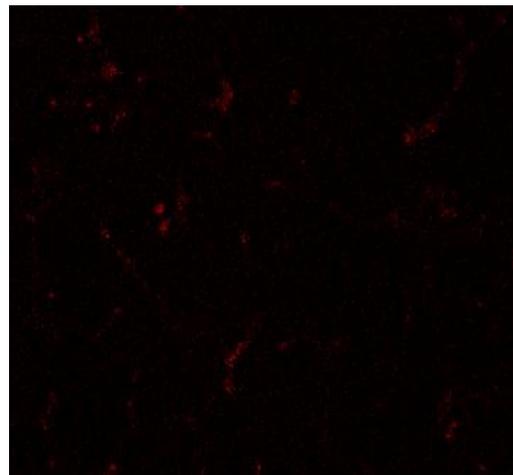


肺・脂肪・肝臓複合培養（脂肪(+), 肝臓(+))

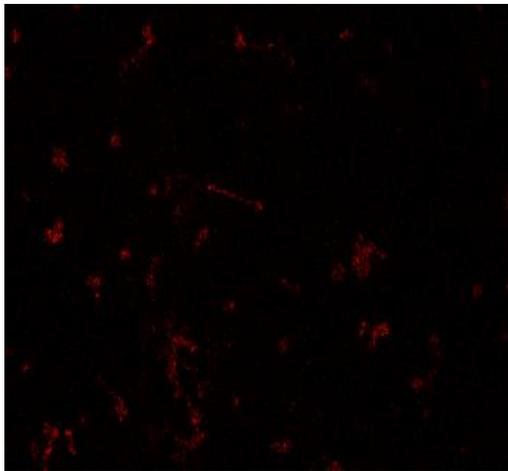
Fig. 4-6a 24 時間後の CMTMR による各群の生細胞染色画像



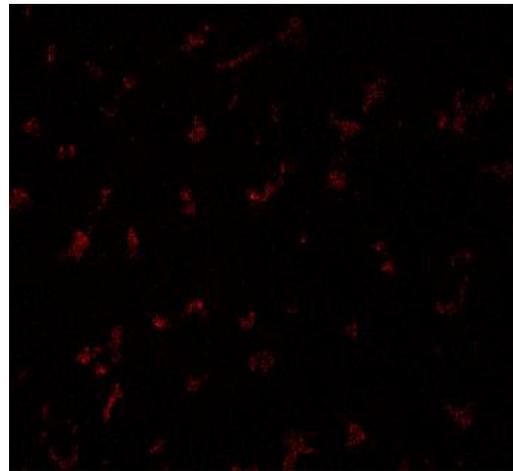
毒物非添加



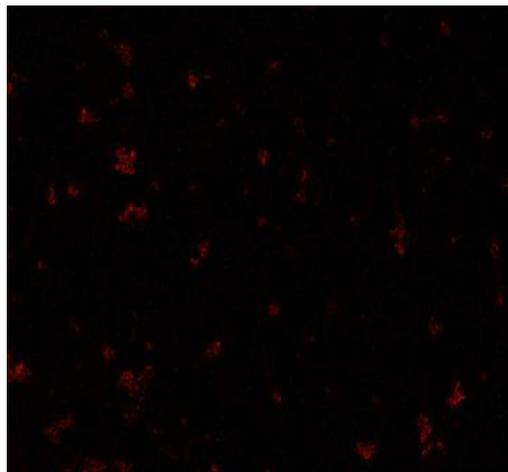
肺単独培養 (脂肪(-), 肝臓(-))



肺・脂肪複合培養 (脂肪(+), 肝臓(-))

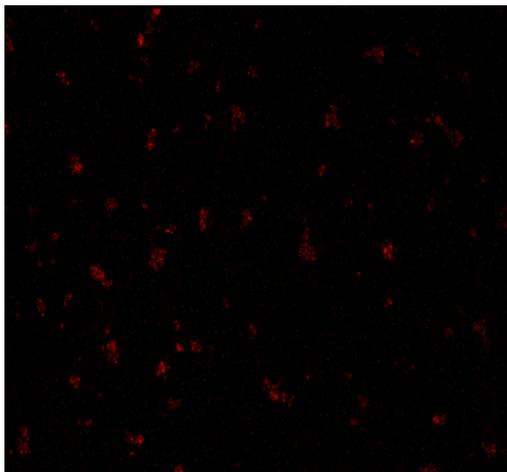


肺・肝臓複合培養 (脂肪(-), 肝臓(+))

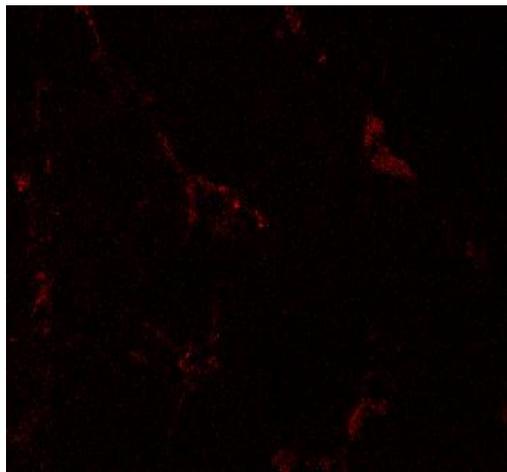


肺・脂肪・肝臓複合培養 (脂肪(+), 肝臓(+))

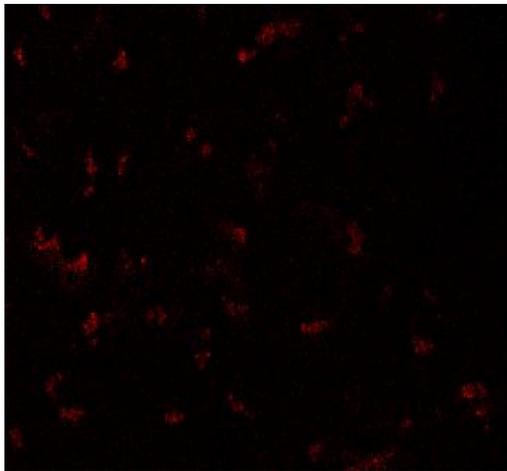
Fig. 4-6b 48 時間後の CMTMR による各群の生細胞染色画像



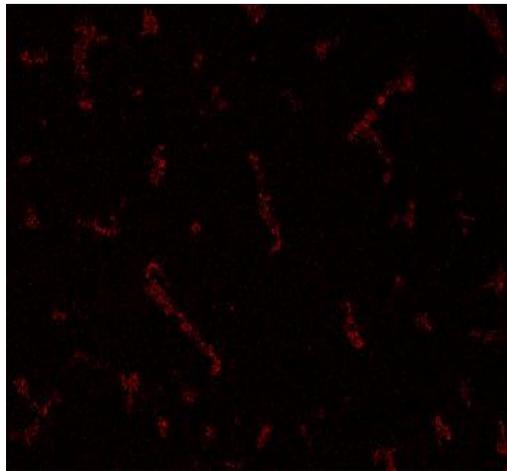
毒物非添加



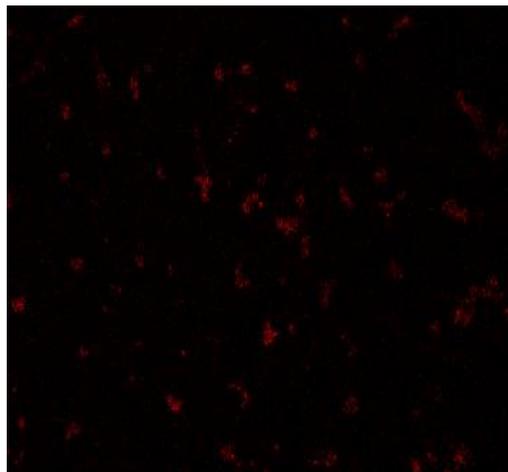
肺単独培養 (脂肪(-), 肝臓(-))



肺・脂肪複合培養 (脂肪(+), 肝臓(-))



肺・肝臓複合培養 (脂肪(-), 肝臓(+))



肺・脂肪・肝臓複合培養 (脂肪(+), 肝臓(+))

Fig. 4-6c 72 時間後の CMTMR による各群の生細胞染色画像

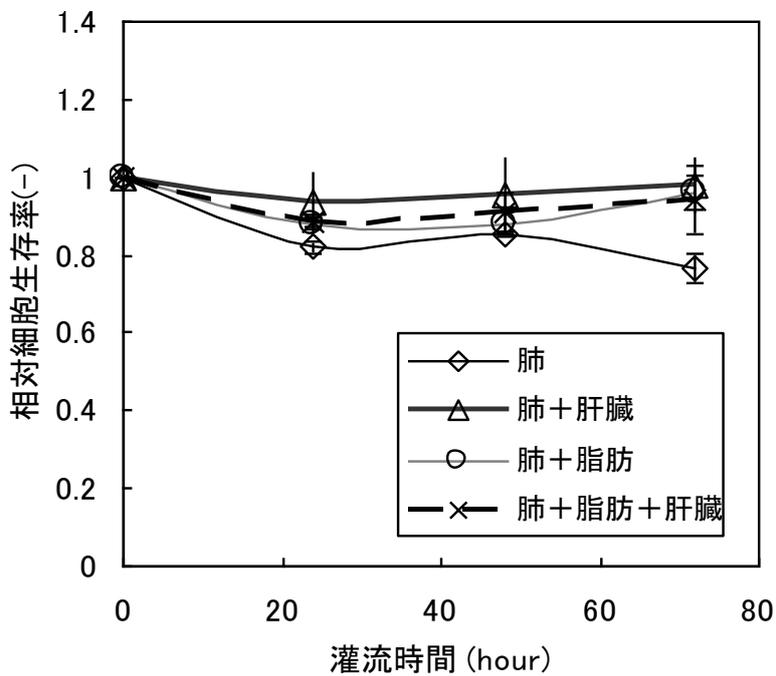
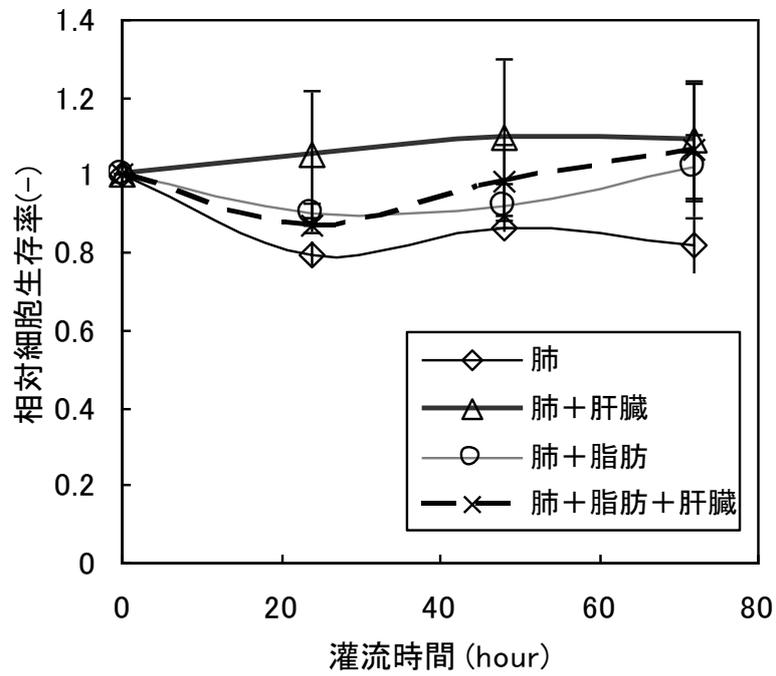


Fig. 4-7 CMTMR による蛍光染色画像から算出した細胞生存率の時間変化
(上 : Run 1, 下 : Run 2)

4.4.5 線形結合モデルの構築に向けた肺細胞モデルの検討

臓器間相互作用のような非線形応答の有無を明らかにするためには、各臓器モデル細胞の薬物原体および代謝物に対する固有の反応速度パラメータを決定し、3種のモデル細胞における反応を数理モデル上で結合した線形結合モデルを構築する必要がある。線形結合モデルによる予測値と本複合細胞培養デバイスで実測された生存率とを比較することで非線形応答の有無を明らかにすることが可能であると考えられる。

本節では、標的臓器細胞である肺モデル細胞に関する CPT-11 に対する細胞生存率予測モデルを構築し、複合細胞培養デバイス内で肺モデル細胞を単独培養した際の生存率と比較することを目的として線形結合モデルの構築方法と問題点について述べる。

・1次反応仮定によるパラメータ推定

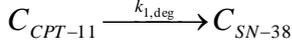
まず、L-2 細胞、ラット初代培養肝細胞、3T3-L1 細胞に CPT-11 を初濃度 50 μM で暴露した際の各モデル細胞に対する CPT-11 および SN-38 の培養液中濃度を HPLC により定量した結果と以下に示す物質収支式を解いて得られる式①、②、③、④によって推定される濃度変化曲線を Fig. 4-8a, Fig. 4-8b, Fig. 4-8c に示した。尚、ここで使用した式中の細胞密度 ρ_{cell} は $2.0 \times 10^4 \text{ cells/cm}^3$ 、培養液体積 V は 0.5 cm^3 である。この際に決定された CPT-11 の消失速度定数および SN-38 の生成速度定数の値を Table 4-1 に示す。

1次反応仮定において推定された CPT-11 の濃度変化は実測値と概ね一致した。しかしながら、SN-38 濃度に関して肝モデル細胞における濃度変化は実測値とは異なった。加えて、CPT-11 を 50 μM で暴露した際に実際に得られた L-2 細胞の細胞生存率と SN-38 を単回暴露して得られた用量作用曲線の間整合性が得られず、CPT-11 を出発物質として細胞生存率を予測する場合には SN-38 の細胞内濃度を基準として細胞生存率を定義する必要性が明らかとなった。

Table 4-1 各モデル細胞における推定された反応速度定数の値 (1次反応仮定)

反応速度定数[/cell/hour]	L-2	3T3-L1	Rat Hep.
$k_{\text{CPT-11,deg}}$	1.36×10^{-5}	1.10×10^{-6}	9.38×10^{-7}
$k_{\text{SN-38}}$	1.90×10^{-8}	1.00×10^{-8}	6.15×10^{-7}
$k_{\text{SN-38,deg}}$	—	—	5.36×10^{-7}

L-2 細胞および 3T3-L1 細胞では SN-38 の生成のみが起こる 1 反応を仮定した際の物質収支式は次式で示され、得られた式①と実際に HPLC により測定された CPT-11 および SN-38 の濃度を用いて反応速度定数を求めた。



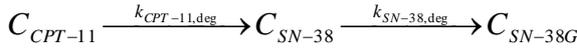
$$\frac{dC_{CPT-11}}{dt} = -V \cdot \rho_{cell} \cdot k_{CPT-11,deg} C_{CPT-11}$$

$$C_{CPT-11} = C_{CPT-11,t=0} \exp(-k_{CPT-11,deg} \cdot V \cdot \rho_{cell} \cdot t) \quad \dots\dots\dots \textcircled{1}$$

$$\frac{dC_{SN-38}}{dt} = V \cdot \rho_{cell} \cdot k_{SN-38} C_{CPT-11}$$

$$C_{SN-38} = \exp(k_{SN-38} \cdot V \cdot \rho_{cell} \cdot t) - 1 \quad \dots\dots\dots \textcircled{2}$$

一方で、ラット初代培養肝細胞においては SN-38 が更に代謝されるため、物質収支式はそれぞれ以下のように記述される。



$$\frac{dC_{CPT-11}}{dt} = -V \cdot \rho_{cell} \cdot k_{CPT-11,deg} C_{CPT-11} \quad \dots\dots\dots \textcircled{3}$$

$$\frac{dC_{SN-38}}{dt} = V \cdot \rho_{cell} \cdot \{k_{SN-38} C_{CPT-11} - k_{SN-38,deg} C_{SN-38}\}$$

$$C_{SN-38G} - C_{SN-38,t=0} = C_{CPT-11,t=0} + C_{SN-38,t=0} - C_{CPT-11} - C_{SN-38}$$

$$\frac{C_{CPT-11}}{C_{CPT-11,t=0}} = \exp(-k_{SN-38} \cdot V \cdot \rho_{cell} \cdot t)$$

また、以下のように式を変形させることにより SN-38 濃度を与える式を得た。

$$\frac{dC_{SN-38}}{dC_{CPT-11}} = -1 + k' \cdot \frac{C_{SN-38}}{C_{CPT-11}} \quad k' = \left(\frac{k_{SN-38,deg}}{k_{SN-38}} \right)$$

$$\frac{C_{SN-38}}{C_{CPT-11}} = \frac{1}{1-k'} \left[\left(\frac{C_{CPT-11}}{C_{CPT-11,t=0}} \right)^{k'} - \frac{C_{CPT-11}}{C_{CPT-11,t=0}} \right] + \frac{C_{SN-38,t=0}}{C_{CPT-11,t=0}} \cdot \left(\frac{C_{CPT-11}}{C_{CPT-11,t=0}} \right)^{k'} \quad k' = \left(\frac{k_{SN-38,deg}}{k_{SN-38}} \right) \neq 1$$

$$\frac{C_{SN-38}}{C_{CPT-11}} = \frac{1}{1-k'} [\exp(-k_2 \cdot \rho_{cell} \cdot t) - \exp(-k_1 \cdot \rho_{cell} \cdot t)] + \frac{C_{SN-38,t=0}}{C_{CPT-11,t=0}} \cdot (\exp(-k_2 \cdot t))$$

$$t = 0 \quad C_{SN-38} = 0$$

$$C_{SN-38} = \frac{C_{CPT-11}}{1-k'} [\exp(-k_{SN-38,deg} \cdot V \cdot \rho_{cell} \cdot t) - \exp(-k_{SN-38} \cdot V \cdot \rho_{cell} \cdot t)] \quad \dots\dots\dots \textcircled{4}$$

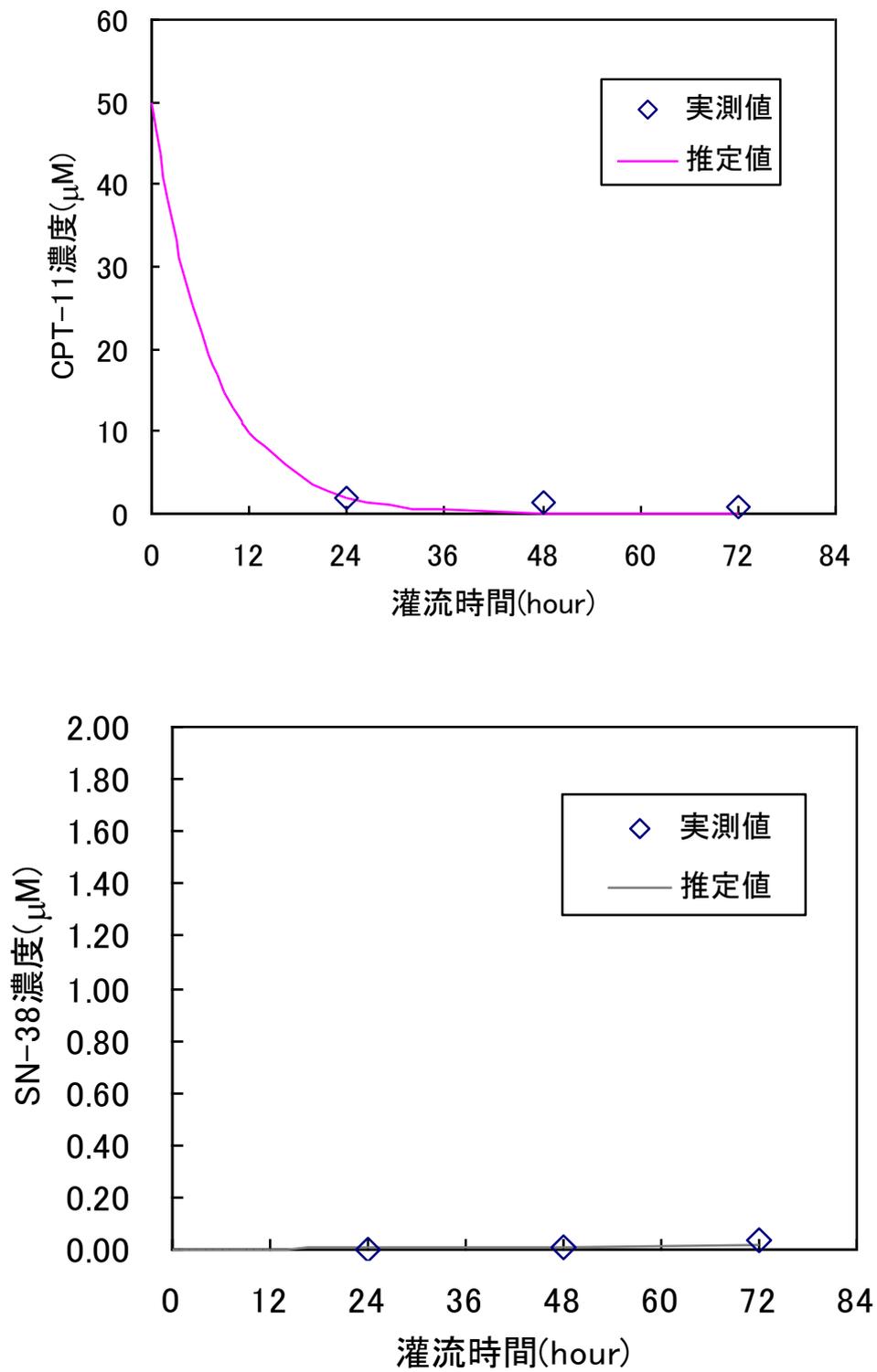


Fig. 4-9a CPT-11 および SN-38 濃度の時間変化 (L-2 細胞)

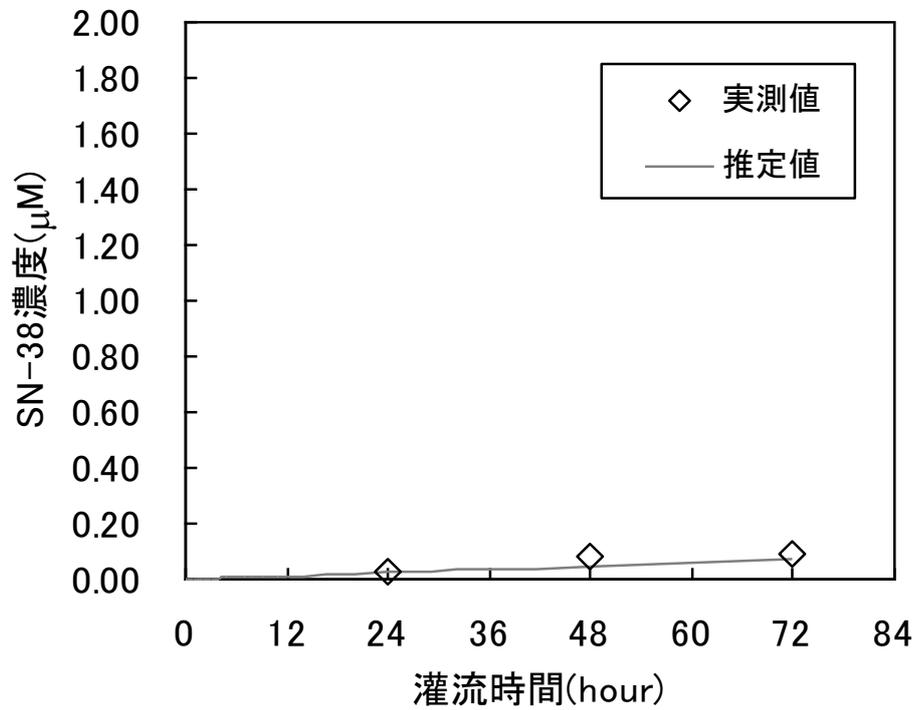
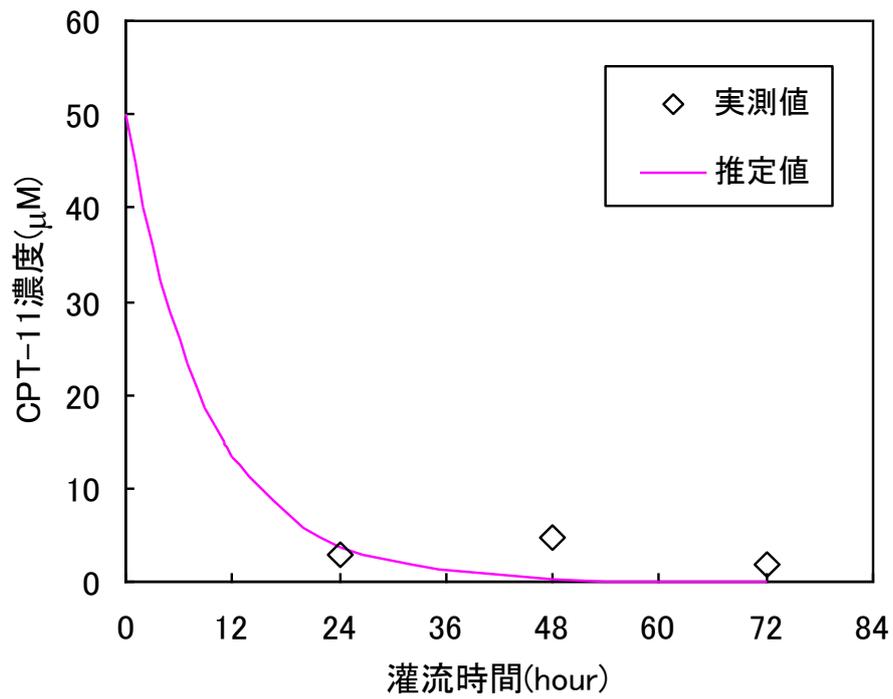


Fig. 4-9b CPT-11 および SN-38 濃度の時間変化 (3T3-L1 細胞)

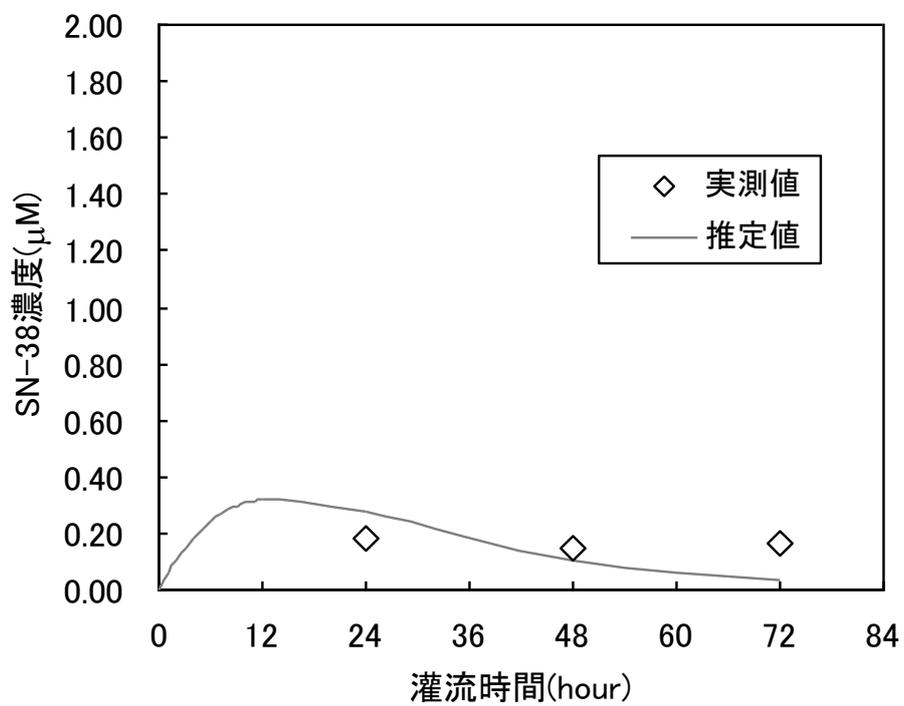
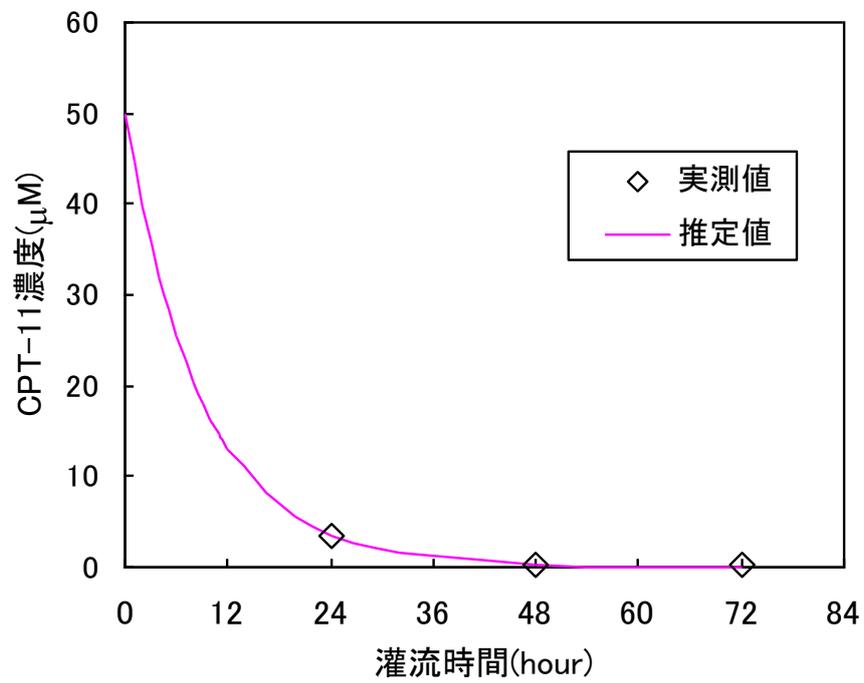


Fig. 4-9c CPT-11 および SN-38 濃度の時間変化 (ラット初代培養肝細胞)

・SN-38 濃度曲線下面積に対する細胞生存率の推定

上述した 1 次反応仮定における反応速度パラメータ推定の検討から、CPT-11 と SN-38 単回暴露試験において細胞生存率に整合性が得られず、CPT-11 を出発物質とする場合には SN-38 の細胞内濃度を基準として細胞生存率を定義する必要性が明らかとなった。

L-2 細胞に対して SN-38 の初濃度を変えて単回暴露した際の SN-38 の用量作用曲線を Fig. 4-10 に示す。SN-38 濃度が 3 μM においても L-2 細胞に対する顕著な細胞毒性が用量作用曲線によって示された。

次に、SN-38 濃度の時間変化曲線から細胞内 SN-38 濃度曲線下面積 $\text{AUC}_{\text{SN-38}}$ を対数台形法によって算出し、各濃度に対する細胞生存率から $\text{AUC}_{\text{SN-38}}$ に対する用量作用曲線を作成した。得られた用量作用曲線をロジスティック式でフィッティングし、 $\text{AUC}_{\text{SN-38}}$ の値から細胞生存率を予測するためのパラメータ m および s を決定した。Fig. 4-11 に細胞内 $\text{AUC}_{\text{SN-38}}$ に対する用量作用曲線およびロジスティック式によるフィッティングを行った結果を示した。

$$y = \frac{1}{\left\{1 + \exp\left(\frac{x - m}{s}\right)\right\}} \quad \dots \dots \quad \text{ロジスティック式}$$

y : 細胞生存率

x : $\log \text{AUC}_{\text{SN-38}}$

m : L-2 細胞の半数を死滅させる $\text{AUC}_{\text{SN-38}}$ の対数

s : 用量作用曲線の傾きを間接的に表すパラメータ

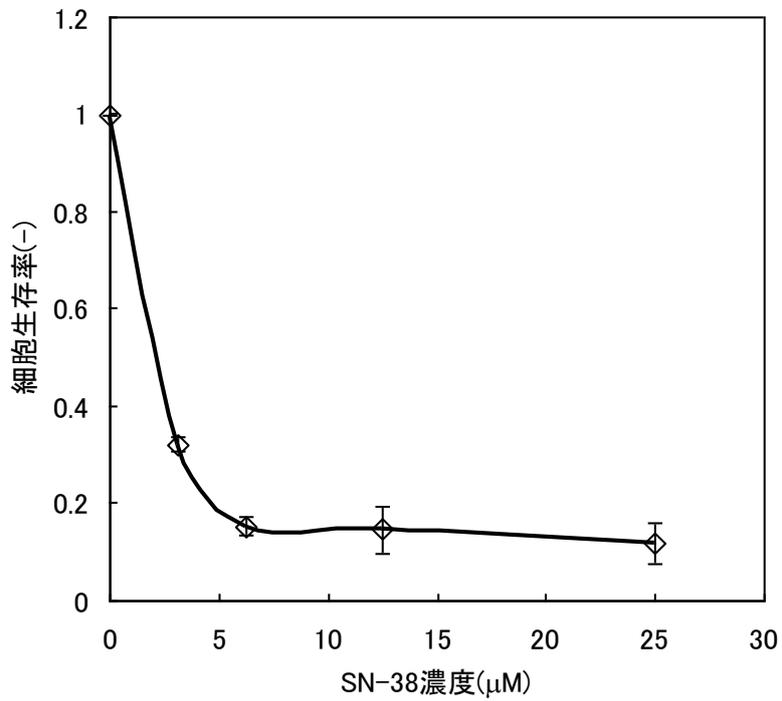


Fig. 4-10 L-2 細胞に対する SN-38 の用量作用曲線

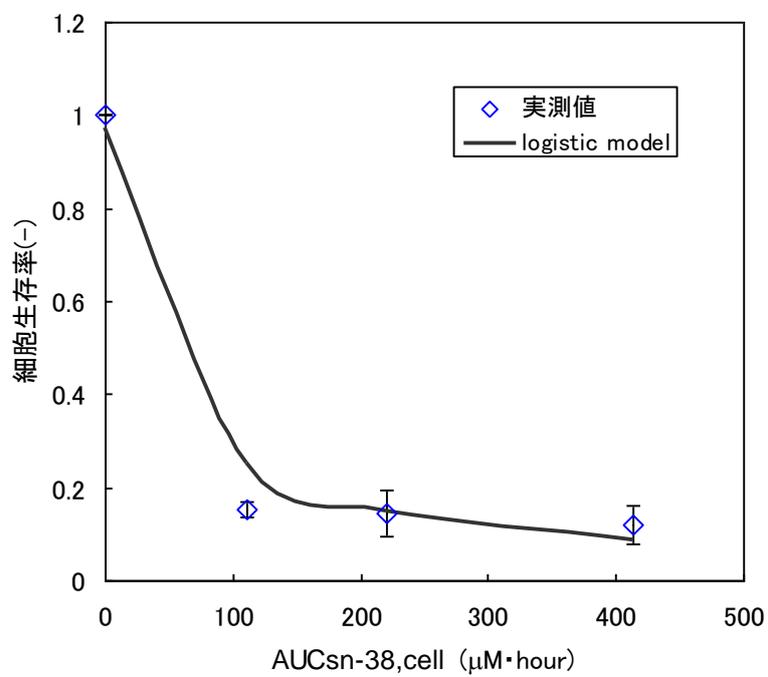


Fig. 4-11 細胞内 SN-38 濃度曲線下面積(AUC)に対する L-2 細胞の細胞生存率変化 (ロジスティックパラメータ ; $x : 1.56, s : 0.45$)

次に、個別培養細胞に対する CPT-11 の暴露試験における反応の概念図を Fig. 4-13 に記す。まず系内に暴露された CPT-11 は培養細胞内に取り込まれる。その後、細胞内のカルボキシルエステラーゼによって SN-38 に代謝され、生成した SN-38 が培養液中に放出されると考えられる。これらの反応について、各反応速度定数をそれぞれ k_1 , k_2 , k_3 , k_4 , k_{CES} とし、細胞内外の CPT-11, SN-38 の物質収支式は以下のように記述される。この物質収支式から、細胞内 SN-38 濃度の経時変化を決定することが出来れば、細胞内 SN-38 濃度曲線下面積を基準とした L-2 細胞の細胞生存率を Fig. 4-11 の用量作用曲線から推定することが出来ると考えられる。

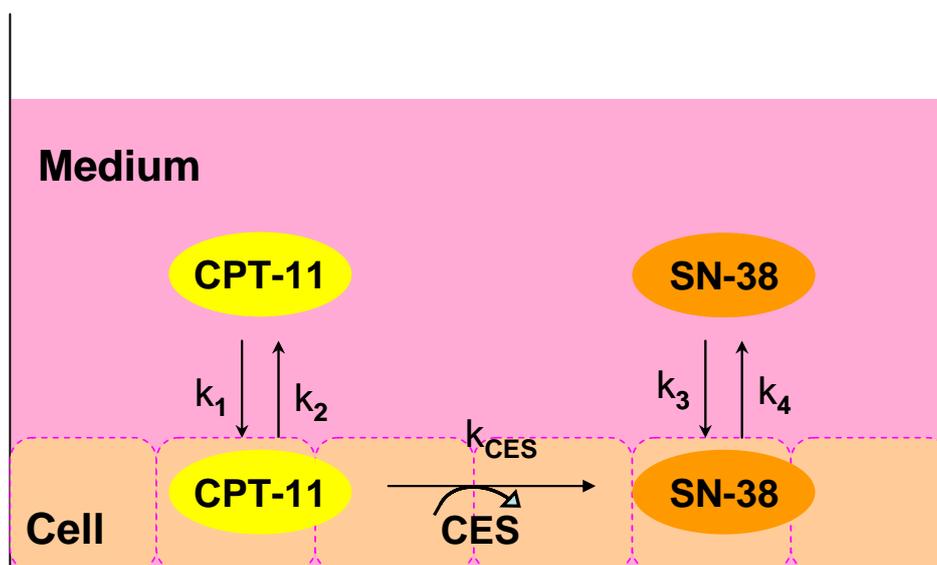


Fig. 4-12 個別培養細胞における CPT-11 の代謝反応のイメージ

培養液中CPT-11に関する物質収支式

$$V \frac{dC_{CPT-11,medium}}{dt} = V^2 \rho_{cell} (k_2 C_{CPT-11,cell} - k_1 C_{CPT-11,Medium})$$

細胞内CPT-11に関する物質収支式

$$V \frac{dC_{CPT-11,cell}}{dt} = V^2 \rho_{cell} (k_1 C_{CPT-11,medium} - k_2 C_{CPT-11,Cell} - k_{CES} C_{cell})$$

培養液中SN-38に関する物質収支式

$$V \frac{dC_{SN-38,medium}}{dt} = V^2 \rho_{cell} (k_4 C_{SN-38,Cell} - k_3 C_{SN-38,medium})$$

細胞内SN-38に関する物質収支式

$$V \frac{dC_{SN-38,cell}}{dt} = V^2 \rho_{cell} (k_3 C_{SN-38,medium} + k_{CES} C_{CPT-11,cell} - k_4 C_{SN-38,cell})$$

Fig. 4-12 に示す反応の概念を基本として、L-2 細胞内外の CPT-11 および SN-38 濃度の時間変化を数値シミュレーションによって求めることができれば、L-2 細胞をデバイス内で単独培養した際の SN-38 細胞内濃度を算出することが可能となり、細胞内 SN-38 濃度曲線下面積を得ることができる。ここで得られた細胞内 SN-38 濃度曲線下面積に対する細胞生存率と実際に実験して得られた細胞生存率を比較することが出来る。

反応速度パラメータの決定

k1 は暴露直後の CPT-11 減少時の直線の傾きから決定した。また、k3, k4 に関しては SN-38 の初濃度を変えて L-2 細胞に暴露した実験から、L-2 細胞に対する吸着等温線を求め、Langmuir の式から吸着定数を決定した。また、SN-38 の初期の濃度減少時の見かけの反応速度から k3 を決定し、k3 および吸着定数から k4 を決定した。Fig. 4-13, Fig. 4-14 に L-2 細胞に対する SN-38 濃度の時間変化とその際の吸着等温線をそれぞれ示した。

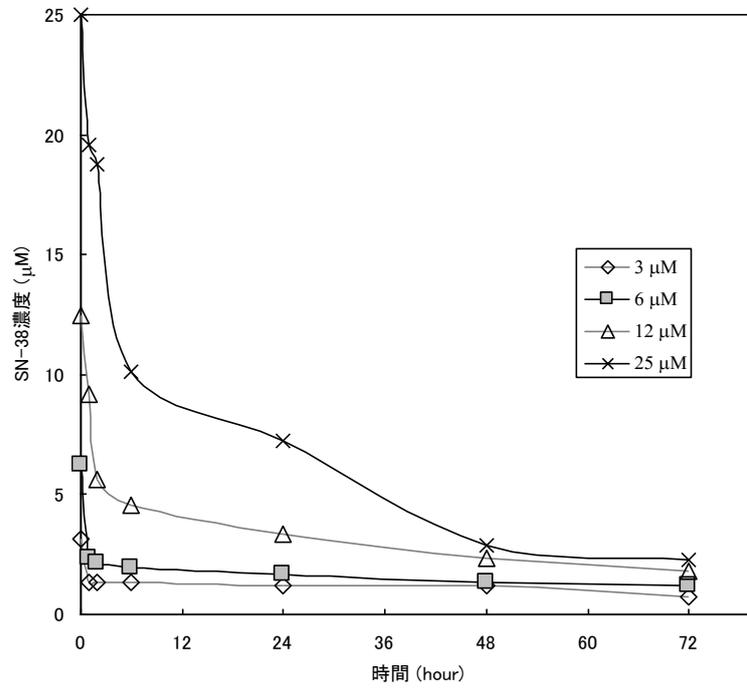


Fig. 4-13 L-2 細胞に対する SN-38 濃度の時間変化

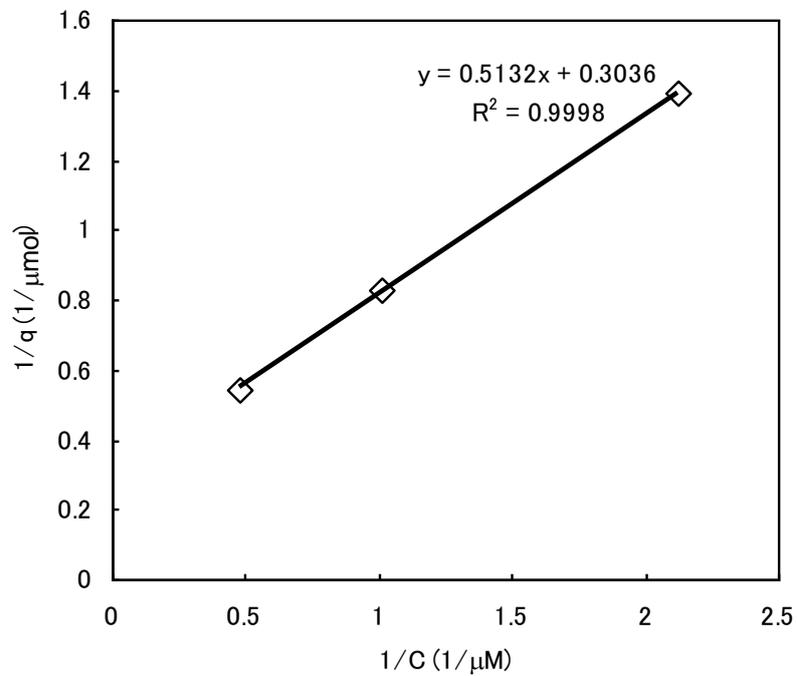


Fig. 4-14 SN-38 の L-2 細胞に対する吸着等温線

濃度の経時変化および吸着等温線から決定したパラメータを用いて、数値解析プログラム gPRMOS による細胞内 SN-38 濃度を予測する検討を行った。gPRMOS を用いたシミュレーションの概要に関しては APPENDIX にて後述する。Fig. 4-15 に代謝反応速度定数 k_{ces} を変化させた際の細胞内 SN-38 濃度の時間変化を示す。シミュレーションにあたり、未知の反応速度定数 k_2 は k_1 の 1/10 と仮定し、細胞内外の CPT-11 および SN-38 の分配反応を即時平衡と仮定した。Fig. 4-15 の結果から、培養液中の CPT-11 濃度および SN-38 濃度が実測値と最も近い、 $k_{ces}=1E-11$ [1/cell/sec]の時の細胞内 SN-38 濃度の時間変化から細胞内 SN-38 濃度曲線下面積 $AUC_{SN-38,cell}$ を算出し、 $AUC_{SN-38,cell}$ に対する用量作用曲線から 72 時間後の L-2 細胞の細胞生存率を予測した結果、細胞生存率は 0.7 と推定された。実際にデバイス内で L-2 細胞を単独培養した際に得られた 72 時間後の細胞生存率は 0.66 であり、シミュレーションによる推定値と実測値が概ね一致した。また、 k_{ces} の値が $k_{ces}=1E-11$ [1/cell/sec]以上の 경우에는 k_2 の値の大小に関わらず実測値とは異なる SN-38 濃度を示した為、 k_{ces} の値を $k_{ces}=1E-11$ [1/cell/sec]に固定して、 k_2 の値を変化させた際の細胞内 SN-38 濃度変化を Fig. 16 に示す。 k_2 の値が k_1 と同じ場合では実験値に比して細胞内 SN-38 濃度曲線下面積が小さく、 k_2 の値が k_1 の 1/100 では細胞内 SN-38 濃度曲線下面積が大きすぎる事が分かり、 k_2 に対する感度解析からも k_2 の値が k_1 の 1/10 が最も実験値と同等な値を示すことが明らかとなった。

$k_2=0.1k_1$, $k_{ces}=1E-11$ [1/cell/sec]において、細胞数 2×10^4 cells の際の細胞当たりの $AUC_{SN-38,cell}$ は細胞数を $3.0E-9$ [$\mu M \cdot hour/cells$]であるのに対して、細胞数を 10 倍 (2×10^5 cells) にした場合の細胞当たりの $AUC_{SN-38,cell}$ は $2.8E-9$ [$\mu M \cdot hour/cells$]であり、細胞当たりの SN-38 負荷量は大きく変化しない事がシミュレーションによって明らかとなった。

本節では L-2 細胞に関する CPT-11 に対する細胞生存率予測モデルを構築した。Fig. 4-12 に示す反応の概念を基本として、ラット初代培養肝細胞および分化誘導した 3T3-L1 細胞についても細胞内外の CPT-11 および SN-38 濃度の時間変化を数値シミュレーションによって求め、数理モデルを構築することができれば、体積・細胞密度の補正を行った後に、L-2 細胞をデバイス内で単独培養した場合および肝・脂肪細胞との複合培養を行った際の SN-38 細胞内濃度を算出することが可能となり、細胞内 SN-38 濃度曲線下面積を得ることができる。ここで得られた細胞内 SN-38 濃度曲線下面積に対する細胞生存率と実際にデバイス内で複合培養して得られた細胞生存率を比較することによって、非線形応答の有無を明らかにすることができるものと考えられる。

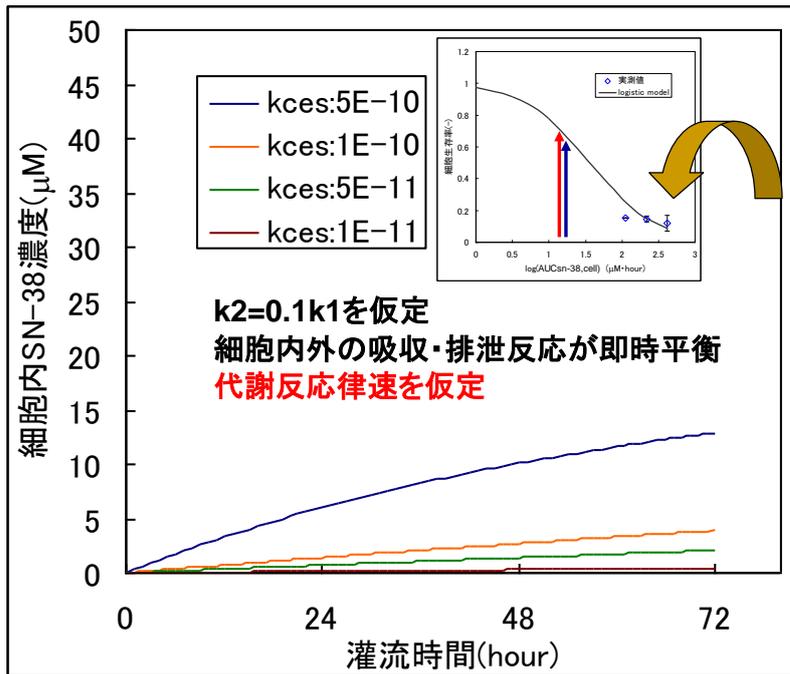


Fig. 4-15 代謝反応速度定数 k_{ces} に対する細胞内 SN-38 濃度の時間変化

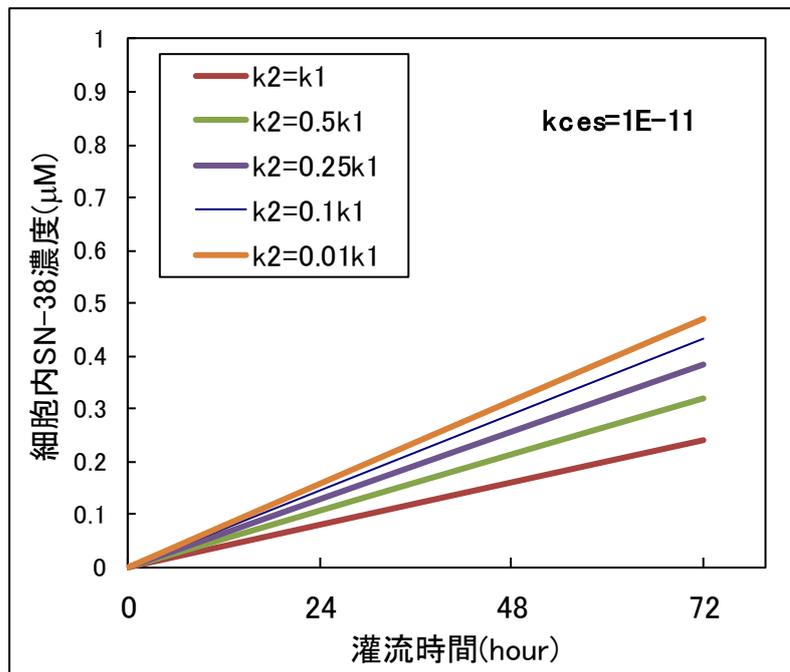


Fig. 4-16 反応速度定数 k_2 に対する細胞内 SN-38 濃度の時間変化

4.5 まとめ

本章では CPT-11 を静脈投与モデル毒物として、肺単独培養および脂肪細胞・肝細胞との複合培養系における分布・代謝・毒性を評価した。その結果、蛍光画像からはデバイス内蛍光物質の一部が脂肪細胞を固定化しているコンパートメントに分布することが認められた。また、肝代謝酵素活性評価においてはモデル毒物暴露した系においても、肝細胞との複合培養によって毒物非添加の系と同等の酵素活性が示された。さらに、毒性評価においては、肺単独培養においてのみ細胞毒性が確認され、肝細胞および脂肪細胞との複合培養系では標的臓器細胞への毒性が低減された。この結果は、肝臓における代謝無毒化および脂肪細胞のモデル物質の吸着効果により毒性が低減されたものと推察される。代謝・毒性発現プロセスの評価において *In vivo* の知見と概ね一致する結果が得られた。

CPT-11 および毒性支配物質と考えられる SN-38 について、各臓器モデル細胞を個別培養した系に単回暴露試験を行い、得られた反応速度パラメータを使用して個別細胞培養の線形結合モデルの構築を試みた。

細胞生存率の低下が確認された L-2 細胞の単独培養系において、暴露 72 時間後の細胞内 SN-38 濃度曲線下面積を基準とした細胞生存率をシミュレーションによって予測した。その結果、デバイス内にて L-2 細胞を単独培養した際に得られた細胞生存率とシミュレーションによって推定された細胞生存率が概ね一致した。従って、L-2 細胞を単独培養した際の細胞生存率は細胞内 SN-38 濃度曲線下面積の推定により精度良く推定することが可能であった。

今後、ラット初代培養肝細胞および脂肪モデル細胞についても、同様の個別培養試験から反応速度定数を決定し、数理モデル上で線形結合して細胞生存率を推定することで、複合細胞培養デバイスで得られた生存率と比較することが可能となる。マイクロ複合培養時に実測された細胞生存率と予測される細胞生存率との相違を明らかにすることが出来れば、複合細胞培養デバイス内における、複合培養による非線形な応答の有無を定量的に明らかにすることが原理的には可能である。しかしながら、マイクロ複合培養系特有の問題として培養液量が極めて微量であり原体・代謝物濃度の経時変化を分析することが極めて困難であり、反応速度パラメータ決定のためには実験量が膨大になることが明らかとなった。本章での検討に加えて、肝モデル細胞・脂肪モデル細胞について数理モデル化を行うためには培養系内の薬物原体および代謝物濃度の経時変化を精度良く連続測定可能な技術が必要であり、オンチップセンサーなどの技術開発が強く望まれる。

参考文献

- Ando Y, Saka H, Ando M, Sawa T, Muro K, Ueoka H, Yokoyama A, Saitoh S, Shimokata K, Hasegawa Y. 2000. Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis. *Cancer Res*, **60**: 6921-6926
- Andoh T, Ishii K, Susuki Y, Ikegami Y, Kusunoki Y, Takemoto Y, Okada K. 1987. Characterization of a mammalian mutant with a camptothecin-resistant DNA topoisomerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 5565-5569
- Bansal T, Awasthi A, Jaggi M, Khar RK, Talegaonkar S. 2008. Development and validation of reversed phase liquid chromatographic method utilizing ultraviolet detection for quantification of irinotecan (CPT-11) and its active metabolite, SN-38, in rat plasma and bile samples: Application to pharmacokinetic studies. *Talanta*, **76**: 1015-1021
- Behnia K, Bhatia S, Jastromb N, Balis U, Sullivan S, Yarmush M, Toner M. 2000. Xenobiotic metabolism by cultured primary porcine hepatocytes. *Tissue Eng*, **6**: 467-479
- Boku N, Ohtsu A, Shimada Y, Shirao K, Seki S, Saito H et al. 1999. Phase II study of a combination of irinotecan and cisplatin against metastatic gastric cancer. *J Clin Oncol*, **17**: 319-322
- Burke MD, Thompson S, Weaver RJ, Wolf CR, Mayer RT. 1994. Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver. *Biochem. Pharmacol*, **48**: 923-936
- Caceres MIR, Meras ID, Soto NEO, Alba PLLD, Martinez LL. 2008. Determination of anticarcinogenic and rescue therapy drugs in urine by photoinduced spectrofluorimetry using multivariate calibration: comparison of several second-order methods. *Anal Bioanal Chem*, **391**: 1119-1127
- Chu XY, Kato Y, Niinuma K, Sudo K, Hakusui H, Sugiyama Y. 1997. Multispecific organic anion transporter is responsible for the biliary excretion of the camptothecin derivative irinotecan and its metabolites in rats. *JPET*, **281**: 304-314

- Dodds HM, Haaz MC, Riou JF, Robert J, Rivory LP. 1998. Identification of a new metabolite of CPT-11 (irinotecan): pharmacological properties and activation to SN-38. *J Pharmacol Exp Ther*, **286**: 578-583
- Haaz MC, Rivory C, Riche C, Vernillet L, Robert J. 1998. Metabolism of irinotecan (CPT-11) by human hepatic microsomes: Participation of cytochrome P-450 3A and drug interactions. *Cancer Res*, **58**: 468-472
- Han JY, Lim HS, Shin ES, Yoo YK, Park YH, Lee JE, Jang IJ, Lee DH, Lee JS. 2006. Comprehensive analysis of UGT1A polymorphisms predictive for pharmacokinetics and treatment outcome in patients with non-small-cell lung cancer treated with irinotecan and cisplatin. *J Clin Oncol*, **24**: 2237-2244
- Henkens T, Vinken M, Vanhaecke T, Rogiers V. 2007. Modulation of CYP1A1 and CYP2B1 expression upon cell cycle progression in cultures of primary rat hepatocytes. *Toxicol In Vitro*, **21**: 1253-1257
- Hu ZP, Yang XX, Chen X, Chan E, Duan W, Zhoua SF. 2007. Simultaneous determination of irinotecan (CPT-11) and SN-38 in tissue culture media and cancer cells by high performance liquid chromatography: Application to cellular metabolism and accumulation studies. *J Chromatogr B*, **850**: 575-580
- Huang RW, Takatsuki K, Tsuda H. 1993. A new derivative of camptothecin, irinotecan hydrochloride (CPT-11) induces programmed cell death in leukemia/lymphoma cell lines. *Int J Oncol*, **3**: 679-685
- Innocenti F, Undevia SD, Iyer L, Chen PX, Das S, Kocherginsky M, Karrison T, Janisch L, Ramírez J, Rudin CM, Vokes EE, Ratain MJ. 2004. Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. *J Clin Oncol*, **22**: 1382-1388
- Inokuchi M, Yamashita T, Yamada H, Kojima K, Ichikawa W, Nihei Z. et al. 2006. Phase I / II study of S-1 combined with irinotecan for metastatic advanced gastric cancer. *Br J Cancer*, **94**: 1130-1135

- Kawato Y, Aonuma M, Hirota Y, Kuga H, Sato K. 1991. Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11. *Cancer Res*, **51**: 4187-4191
- Kingsbury WD, Boehm JC, Jakas DR, Holden KG, Hecht SM, Gallagher G, Caranfa MH, McCabe FL, Faucette LF, Johnson RK, Hertzberg RP. 1991. Synthesis of water-soluble (aminoalkyl)camptothecin analogues: inhibition of topoisomerase I and antitumor activity. *J Am Chem Soc*, **34**: 98-107.
- Kojima A, Hackett NR, Crystal RG. 1998. Reversal of CPT-11 resistance of lung cancer cells by adenovirus-mediated gene transfer of the human carboxylesterase cDNA. *Cancer Res*, **58**: 4368-4374.
- Komatsu Y, Yuki S, Miyagishima T, Asaka M. 2006. Irinotecan plus oral S-1 in patients with advanced gastric cancer-biweekly IRIS regimen. *Jpn J Cancer Chemother*, **33**(suppl 1): 75-78
- Lokiec F, Sorbier BMD, Sanderink GJ. 1996. Irinotecan (CPT-11) Metabolites in Human Bile and Urine. *Clin Cancer Res*, **2**: 1943-1949
- Ramesh M, Preeti A, Nuggehally RS. 2009. Irinotecan and its active metabolite, SN-38: review of bioanalytical methods and recent update from clinical pharmacology perspectives. *Biomed Chromatogr*, **24**: 104-123
- Redinbo MR, Stewart L, Kuhn P, Champoux JJ, Hol WG. 1998. Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA. *Science*, **279**: 1504-1513
- Rivory LP, Riou JF, Haaz MC, Sable S, Vuilhorgne M, Commercon A, Pond SM, Robert J. 1996. Identification and properties of a major plasma metabolite of irinotecan (CPT-11) isolated from the plasma of patients. *Cancer Res*, **56**: 3689-3694
- Rosner GL, Panetta JC, Innocenti F, Ratain MJ. 2008. Pharmacogenetic pathway analysis of Irinotecan. *Clin Pharmacol Therapeut*, **84**(3): 393-402
- Sai K, Kaniwa N, Ozawa S, Sawada J. 2001. A new metabolite of irinotecan whose

formatin is mediated by human hepatic cytochrome P-450 3A4. *Drug Metabol and Disposit*, **29**: 1505-1513

Sai K, Saito Y, Fukushima-Uesaka H, Kurose K, Kaniwa N, Kamatani N, Shirao K, Yamamoto N, Hamaguchi T, Kunitoh H, Ohe Y, Tamura T, Yamada Y, Minami H, Ohtsu A, Yoshida T, Saijo N, Sawada J. 2008. Impact of *CYP3A4* haplotypes on irinotecan pharmacokinetics in Japanese cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol*, **62**: 529-537

Sakai Y, Tanaka T, Fukuda J, Nakazawa K. 2010. Alkoxyresorufin O-dealkylase assay using a rat hepatocyte spheroid microarray. *J Biosci Bioeng*, **109**(4): 395-399

Sakata Y, Nakano I, Futatsuki K, Kambe M, Wakui A, Taguchi T. 1992. An early phase II trial of CPT-11 in patients with advanced gastrointestinal cancer. *J Jpn Soc Cancer Ther*, **27**: 2028-2035

Santos A, Zanetta S, Cresteil T, Deroussent A, Pein F, Raymond E, Vernillet L, Risse ML, Boige V, Gouyette A, Vassal G. 2000. Metabolism of irinotecan (CPT-11) by CYP3A4 and CYP3A5 in humans. *Clin Cancer Res*, **6**: 2012-2020

Stewart L, Redinbo MR, Qiu X, Hol WG, Champoux JJ. 1998. A model for the mechanism of human topoisomerase I. *Science*, **279**: 1534-1541

Takahata T, Ookawa K, Suto K, Tanaka M, Yano H, Nakashima O, Kojiro M, Tamura Y, Tateishi T, Sakata Y, Fukuda S. 2007. Chemosensitivity determinants of irinotecan hydrochloride in hepatocellular carcinoma cell lines. *Bas Clin Pharmacol Toxicol*, **102**: 399-407

Takeda S, Shimazoe T, Sato K, Sugimoto Y, Tsuruo T, Kono A. (1992) Differential expression of DNA topoisomerase I gene between CPT-11 acquired- and native-resistant human pancreatic tumor cell lines: detected by RNA/PCR-based quantitation assay. *Biochem Biophys Res Commun*, **184**: 618-625

Takiuchi H, Narahara H, Tsujinaka T, Gotoh M, Kawabe S, Katsu K. et al. 2005. Osaka gastrointestinal cancer chemotherapy study group (OGSG). Phase I study of S-1 combined with irinotecan (CPT-11) in patients with advanced gastric cancer

(OGSG0002). *Jpn J Cancer Oncol*, **35**: 20-5

Tobin P, Clarke S, Seale JP, Lee S, Solomon M, Aulds S, Crawford M, Gallagher J, Eyers T, Rivory L. 2005. The *in vitro* metabolism of irinotecan (CPT-11) by carboxylesterase and β -glucuronidase in human colorectal tumours. *Br J Clin Pharmacol*, **62**(1): 122-129

Uedo N, Narahara H, Ishihara R, Takiuchi H, Goto M, Fujitani K. et al. 2007. Phase II study of a combination of irinotecan and S-1 in patients with advanced gastric cancer (OGSG0002). *Oncology*, **73**: 65-71

Washizu J, Berthiaume F, Mokuno Y, Tompkins RG, Toner M, Yarmush ML. 2001. Long-term maintenance of cytochrome P450 activities by rat hepatocyte/3T3 cell co-cultures in heparinized human plasma. *Tissue Eng*. **7**: 691-703

Zamboni WC, Houghton PJ, Thompson J, Cheshire PJ, Hanna SK, Richmond LB, Lou X, Stewart CF. 1998. Altered Irinotecan and SN-38 Disposition after Intravenous and Oral Administration of Irinotecan in Mice Bearing Human Neuroblastoma Xenografts'. *Clin Cancer Res*, **4**: 455-462

井藤達也. 2006. 癌化学療法における薬物体内動態解析に関する研究. *薬学雑誌* **126**(9): 723-736

村上優. 2000. [新しい抗癌剤シリーズ] Topoisomerase 阻害剤: 塩酸イリノテカン. *日産婦誌* **52**(12): 433-437

第5章 総括と今後の展望

5.1.1 総括

本論文では、酸素透過性ポリマーを基材として作製したマイクロ流体デバイス内にて異種臓器由来培養細胞を複合灌流培養することによって、静脈投与薬物の*In vivo*における体内動態を再現・評価することが可能な*In vitro*複合培養系を構築することを最終的な目的として、体内動態の中で特に、分布・代謝・毒性発現プロセスに着目して蛍光モデル薬物の体内動態評価を行った。

第1章は緒言であり、本研究の背景及び目的を述べている。冒頭では、体内動態と人体システムについて概説するとともに、薬物や環境中化学物質などの個体レベルの体内動態評価の重要性に言及している。続いて、個体レベルの体内動態を評価・予測するための手法として*In vitro*複合培養系について、最新の知見を交えつつ既往の研究と問題点を述べている。特に、これまでに行われた大型複合培養系・マイクロ流体デバイスを利用した複合培養系における極めて煩雑な操作運転を必要とするといった実用上の課題を解決するための生理学的条件を満たす簡便な複合培養系の確立の重要性を指摘し、本研究の具体的な目的とアプローチを示している。

第2章では、複数異種臓器由来培養細胞の個別・完全灌流培養を可能とするマルチコンパートメントマイクロ複合細胞培養デバイスの作製を目指し、安価・微細造形性に優れる酸素透過性材料であるポリジメチルシロキサン (PDMS) のマイクロ複合細胞培養への適応を検討した成果を述べている。マイクロ細胞培養デバイスに酸素透過性材料を用いる手法は、培養液の酸素化などの煩雑なプロセスが一切不要であるだけでなく、細胞が最も酸素を消費する初期接着時からの酸素供給が可能となるなど、各臓器由来培養細胞の高密度化を目指す上でも最も簡便かつ有用な手法である。本章では、ソフトリソグラフィ法を利用したフォトレジストの鋳型を基に作製したPDMSマイクロ複合細胞培養デバイスの基礎特性を明らかにし、灌流路上に配備したバルブの開閉による個別臓器ごと・複数臓器全体の完全灌流の2つの送液モードの選択が可能であることを示す。また、内部送液ポンプによる送液に伴うせん断応力が接着細胞の剥離を起こさず、複数異種臓器由来細胞の複合灌流培養が可能であることを示している。

第3章では、マイクロ複合細胞培養デバイスによって実現可能となった、成熟脂肪細胞と肝モデル細胞の安定分散固定化および薬物の分布プロセス評価に関する成果を述べている。脂肪細胞は疎水性薬物の初期の分布に大きく関与するとされているが、比重が軽いために接着培養の実現が困難である。本章では、成熟脂肪細胞をデバイス内に高密度安定分散固定化するために3次元ポリ乳酸不織布担体を導入し、成熟脂肪細胞の固定化を行った。また、脂肪細胞と平行して、肝モデル細胞も合わせて3次元担体上に固定化した。さらに、脂肪細

胞の有無による疎水性モデル薬物の分布動態を評価することを試み、脂肪組織の疎水性薬物の初期分布に及ぼす影響を蛍光イメージングにより経時的に非破壊評価する簡便な手法を提案した。以上本章では、マイクロ複合細胞培養デバイス内に固定化した脂肪細胞の初期体内分布に及ぼす影響を可視化し、*In vivo*における一般則の再現が可能であることを示している。

第4章では、静脈内投与薬物の生体外における体内動態の再現を目的として、肺モデル細胞および肝モデル細胞・脂肪モデル細胞をマイクロ複合細胞培養デバイス内に単層上に接着し、生体内で代謝活性化されるモデル薬物の分布・代謝・毒性発現プロセスの再現を試みている。マイクロ複合細胞培養系では培養液量が極めて少量であることから、分布・代謝活性・毒性評価を全て蛍光イメージングにより非破壊評価する検討について述べている。代謝活性・毒性評価において、薬物非添加の系と比べて肝モデル細胞との複合培養系では代謝活性の亢進が明らかとなり、肝・脂肪細胞との複合培養系においては最終的な標的臓器モデル細胞に対する毒性が低減されたことから、本マイクロ複合細胞培養系において肝モデル細胞の毒性発現に対する*In vivo*の知見を一部再現することが可能であることを示している。しかしながら、分布評価においては、複合細胞培養デバイス内のモデル薬物原体および代謝物の蛍光を分離して評価することが困難であったため、脂肪モデル細胞との複合培養においてもモデル薬物の特異的な蓄積を定量的に把握するには至らなかった。本章では、*In vitro*複合細胞培養系を体内動態評価に適用し、生体外における分布・代謝・毒性発現プロセスの再現可能性について言及している。また、マイクロ複合細胞培養系に特有の定量評価の困難性や課題について言及した。

第5章は総括であり、本論文全体のまとめとその意義を述べると共に、個体レベルの薬物動態評価の*In vitro*予測を展望した場合に求められる*In vitro*複合細胞培養系の今後の研究課題についても述べている。

第6章は補章として、煩雑な細胞培養操作を最小化するアプローチとして、肝細胞や脂肪細胞を人工物で代替することを試みている。特に、細胞を代替する人工物として肝ミクロソーム固定化ビーズおよびミネラルオイル包括カプセルの作製と評価について述べている。

以上、本論文は、個体レベルの体内動態評価を目指した*In vitro*複合細胞培養系の実現に向けて、これまで*In vitro*において評価が特に困難であった体内動態の一部を再現することが可能なマイクロ複合細胞培養系を実現し、マイクロ複合細胞培養系特有の課題を解決することにより本複合培養系の有用性を示した。これらの成果は、簡便かつ信頼性の高い*In vitro*複合細胞培養モデルという観点からは工学的アプローチの一つの完成形であると考えられる他、現状のマイクロ複合細胞培養系の限界性に関する知見を示すものであり、生体シス

テム工学・薬理学・医用工学及び化学システム工学へ大きく貢献するものと考えられる。

5.1.2 問題点の抽出

単層培養と 3 次元培養の比較

本論文の 2 章および 3 章の検討から、単層培養 (2D) 時のコンパートメント内の細胞数は脂肪細胞・肝モデル細胞共に 6300 個であり、三次元担体を用いることで脂肪細胞 15750 個、肝モデル細胞 94500 個と単層培養に比べそれぞれ約 2.5 倍、約 15 倍の細胞数を固定化可能なことが本研究から明らかとなった。一方で、不織布担体を用いることで固定化できた脂肪細胞の充填率は、全ての脂肪細胞の直径を 50 μm と仮定した場合、約 31%であり、組織内で脂肪細胞の占有する体積を、実際のヒト個体内と比較した場合には、約 1/6 程度である。また、肝モデル細胞のコンパートメント内の細胞密度はヒト個体内と比較して約 1/100 程度の細胞密度であった。従って 3 次元担体を用いた場合でも、完全に *In vivo* と同等の細胞密度を達成するには至っていない。加えて、本研究のようにマイクロ流体デバイスを活用する際の問題は、3 次元担体として通常の不織布を裁断して使用するだけでは、裁断面から複数の繊維がチャンバー外の流路・接着面に混入してしまう状況があり、マイクロ培養システム作製の歩留まりが著しく低下してしまうといった問題があった。このようなリアクター部分の 3 次元化に伴う技術的な問題は、通常の培養スケールに比べてマイクロ培養システムが微小な空間に様々な構造や機能を集積することに起因した課題だといえる。一方で、単層培養は 3 次元培養に比べて固定化可能な細胞数は制限されるが、流路高さの調整によって飛躍的に細胞密度を向上させることが原理的には可能であり、技術的な障壁も 3 次元化に比べれば低いものと考えられる。現状では、単層培養による高密度化が簡便に実現可能であると考えられるが、マイクロ複合培養システムに期待される臓器間相互作用や細胞活性の亢進といった非線形応答の評価を考慮すれば 3 次元化は必要不可欠な要素であり、継続的な 3 次元化手法の検討が期待される。

モデル化の問題

4 章におけるモデル化の検討において、線形結合モデルに必要な反応速度パラメータを決定する過程で生じたマイクロ複合培養系特有の問題として、培養液量が極めて微量であり原体・代謝物濃度の経時変化を分析することが極めて困難であることが本研究から明らかとなった。現状では既存の分析機器を使用した経時変化測定には膨大な実験量が必要となる為に、本研究では標的細胞の単独培養時における反応速度パラメータを決定するとともに、実測が困難なパラメータに関してはセンシティブィアナリシスで推定することによって、細胞生存率を予測するに留まっている。マイクロ複合培養における非線形応答の有無を定量的に明らかにする為には、本研究で行った検討と同様に肝モデル細胞および脂肪細胞に関して実施し、薬物原体および代謝物に対する個々のモデル細胞固有の反応速度パ

ラメータを 3 種全てのモデル細胞について決定し、線形結合モデルを構築して細胞生存率を予測する必要がある。しかし現状では、薬物原体および代謝物の経時変化を定量するためには既存の分析機器を使用しなければならないため、本研究と同様に膨大な実験量が必要となることは回避である。今後、マイクロ複合培養による体内動態評価のためには、薬物原体および代謝物の経時変化を測定する際に培養液のサンプリングを必要としないオンチップ検出を可能とする技術の開発が必要であると考えられる。

計測の問題

本研究における課題の一つは測定系の確立であった。培養システムに直接検出器（センサー）を組みこむ事も技術的に可能であるが、培養液中のタンパク質の吸着や目的シグナル以外のノイズの影響を無視できないことも想定される。また、通常の細胞生存率試験や増殖阻害試験では、データポイント毎にマイクロ培養システム内の細胞を破壊する必要が生じる為に膨大な数のマイクロ培養システムを準備しなければならない為に経時変化の観察に適用することは困難である。一方で、光学的な検出原理を用いた測定であれば、マイクロ培養システム・培養細胞のどちらも破壊することなく、マイクロ培養システム内部の情報を取得することが可能であり、経時変化を観察するのに最適だと考えられた。しかしながら、本研究で実際に行った蛍光物質を用いた非破壊評価では経時的な測定が可能になった一方で、使用する蛍光物質の蛍光強度・活性寿命および細胞の自家蛍光が測定値に大きく影響し、画像解析における閾値の設定によっては結果が変化してしまう場合があった。得られた測定データが生物学的意義のある変化であるのか、測定原理に起因した測定誤差であるのかを吟味する必要があり、測定結果を明確に解釈することが難しい点も非破壊計測における問題であると考えられた。今後、4章において取得された蛍光値の内訳を明らかにすることで、細胞とデバイス内物質の詳細な反応を知ることが可能であると考えられるが、デバイス内培養液量が極めて少ないことから既存の分析機器による各灌流時間に対する各物質濃度を定量することは困難であり、デバイス内へのセンサーの組み込みなど新たな技術の融合活用が必要不可欠であることが本研究からも明らかとなった。

5.2 今後の展望

まず *In vivo* における体内動態の全てを *In vitro* において完全再現するためには、第一には、おのおのの臓器に相当するコンパートメント内にて臓器最小単位構造をほぼ完全に再現した培養系の開発が挙げられる。本研究で開発した培養系は、複数異種臓器由来細胞を複合培養する簡便な薬効・毒性評価系として有用ではあるが、生体内の臓器は単一細胞から構成されておらず、一つのコンパートメント内においても血管内皮細胞や非実質細胞との共培養を行うなど、生体内臓器の構成を模倣することによって更に高度構造化する必要があると考えられる (Goulet et al. 1988; Sato et al. 1999; Sudo et al. 2004;

Guguen-Guillouzo et al. 1983; Kaihara et al. 2000; Mesnil et al. 1987). また、このような高度構造化の試みは、個別の *In vitro* 試験系における検討と相補的に進める必要があり、例えば肝組織の微小構造に着目した場合、胆汁酸等の肝細胞からの分泌物の回収等を考慮する必要が生じると考えられるため、最小単位における極性を完全に再現することが次の課題となろう (Sudo et al. 2004; Wustner et al. 2002). また、ヒト個体における信頼性の高い体内動態予測をするためには、ヒト正常成熟細胞を利用して各体内動態パラメータを決定する必要があるが、全ての臓器について正常成熟細胞を取得することは困難であるため、今後は iPS 細胞や ES 細胞から分化誘導した細胞を用いた体内動態パラメータの決定が必要不可欠であろう。また、第 4 章で静脈投与モデル薬物として使用した CPT-11 のように遺伝子多型によってその物質の薬効や毒性が変化する物質の体内動態を評価するためにも、iPS 細胞や ES 細胞を導入した様々な遺伝子多型にそれぞれ対応するオンチップ人体デバイスの開発と活用が期待される。

第二には、本研究で取り扱った分布・代謝プロセスに加えて、吸収プロセスや排泄プロセスを再現するコンパートメントを導入することが挙げられる。特に、Kimura et al. らは、PDMS を基材として、半透膜を介した 2 コンパートメントマイクロデバイス内で、小腸および肝臓を複合培養し、吸収プロセスと代謝プロセスを評価する複合培養系を提案している (Kimura et al. 2007; 2008)。今後、このようなデバイスと技術統合していくことが、個体の体内動態を評価可能な複合細胞培養系の実現に道を拓くものと考えられる。

上述した点と平行して、煩雑な培養操作を最小限に留めることで実用性を改善していく必要がある。先行研究も含め、培養細胞を利用する *In vitro* 試験系では培養維持のために非常に煩雑な操作を必要とすることが障壁となってしまっている。ADME プロセスを全て模倣するためには更に複数のコンパートメントが必要となるが、培養維持のための労力が増大してしまうと考えられるため、培養細胞に代わる人工物を固定化することによって省力化を図る必要がある。具体的には Fig. 5-1 に示すように、標的臓器コンパートメント以外の全てのコンパートメントを培養細胞に相当する人工物に置き換えた培養系が想定される。このような培養系は生理学的意義がやや薄れてしまうが、前臨床試験の前段階の簡易スクリーニング系など用途を絞れば、煩雑な培養操作をほぼ必要としないだけでなく、人工物のみをデバイス内に固定化して保存することが可能になるなど実用性が大幅に改善されると考えられる。

以上、今後は生体内環境の完全模倣と人工物によるモデル細胞の代替法の検討を補完的に進めながら、最終的には、動物実験を完全に代替する実用的なオンチップ人体シミュレーターが開発されると期待される。

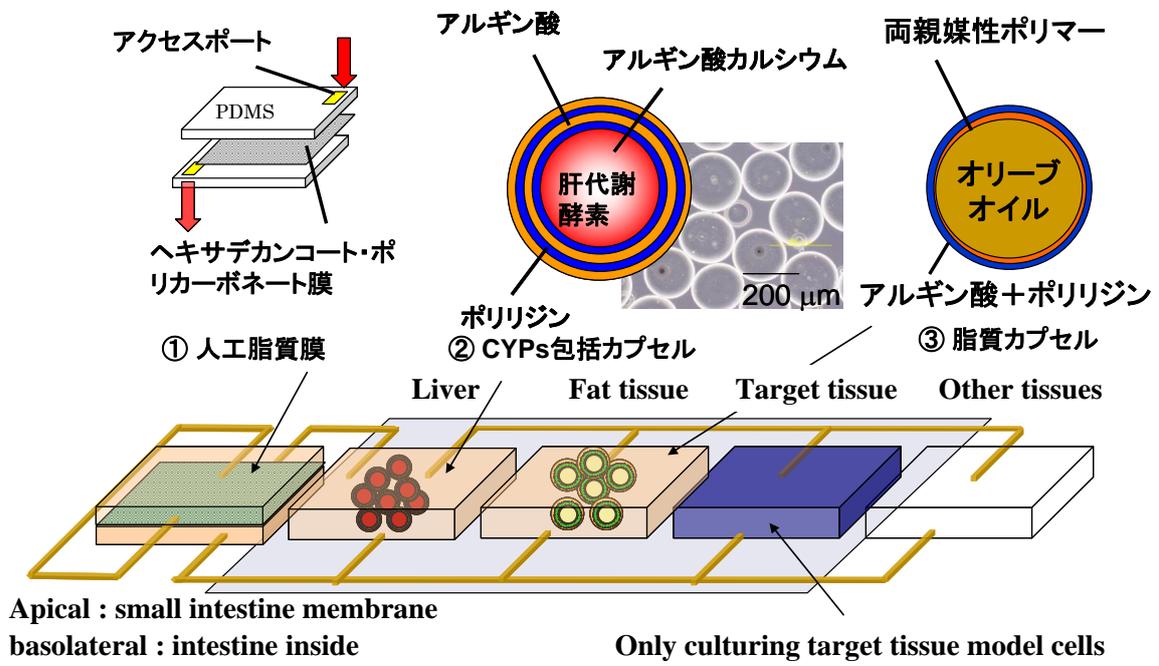


Fig. 5-1 人工代替物を利用した実用的マイクロバイオリクター

参考文献

- Goulet F, Normand C, Morin O. 1988. Cellular interactions promote tissue-specific function, biomatrix deposition and junctional communication of primary cultured hepatocytes. *Hepatology*, **8**(5):1010-8.
- Guguen-Guillouzo C, Clement B, Baffet G, Beaumont C, Morel-Chany E, Glaise D, Guillouzo A. 1983. Maintenance and reversibility of active albumin secretion by adult rat hepatocytes co-cultured with another liver epithelial cell type. *Exp Cell Res*, **143**(1):47-54.
- Kaihara S, Kim S, Kim BS, Mooney DJ, Tanaka K, Vacanti JP. 2000. Survival and function of rat hepatocytes cocultured with nonparenchymal cells or sinusoidal endothelial cells on biodegradable polymers under flow conditions. *J Pediatr Surg*, **35**(9):1287-90.
- Kimura H, Nishikawa M, Yamamoto T, Sakai Y, Fujii T. 2007. Microfluidic perfusion culture of human hepatocarcinoma, *J Robot Mechatron*, **19**: 550-556.
- Kimura H, Yamamoto T, Sakai H, Sakai Y, Fujii T. 2008. An integrated microfluidic system for long-term perfusion culture and on-line monitoring of intestinal tissue models", *Lab Chip*, **8**(5): 741-746.
- Mesnil M, Fraslin JM, Piccoli C, Yamasaki H, Guguen-Guillouzo C. 1987. Cell contact but not junctional communication (dye coupling) with biliary epithelial cells is required for hepatocytes to maintain differentiated functions. *Exp Cell Res*, **173**(2):524-33.
- Sato H, Funahashi M, Kristensen DB, Tateno C, Yoshizato K. 1999. Pleiotrophin as a swiss 3T3 cell-derived potent mitogen for adult rat hepatocytes. *Exp Cell Res*, **246**:152-164.
- Sudo R, Ikeda S, Sugimoto S, Harada K, Hirata K, Tanishita K, Mochizuki Y, Mitaka T. 2004. Bile canalicular formation in hepatic organoid reconstructed by rat small hepatocytes and nonparenchymal cells. *J Cell Physiol*, **199**(2):252-61.
- Wustner D, Herrmann A, Hao M, Maxfield FR. 2002. Rapid nonvesicular transport of

sterol between the plasma membrane domains of polarized hepatic cells. *J Biol Chem*, **277**(33):30325-36.

参考

I. 博士論文に関連する原著論文

*掲載済み(博士論文前半の中核論文)

- 1) **H. Nakayama**, H. Kimura, K. Komori, T. Fujii and Y. Sakai, "Development of a Multi-Compartment Micro-Cell Culture Device as a Future on-Chip Human: Fabrication of a Three-Compartment Device and Immobilization of Rat Mature Adipocytes for the Evaluation of Chemical Distributions", J. Robot. Mechatron., **2007**, 19, 544-549
- 2) N. Yamamoto, K. Komori, K. Montagne, H. Matsui, **H. Nakayama**, S. Takeuchi and Y. Sakai, "Cytotoxicity Evaluation of Reactive Metabolites Using Rat Liver Homogenate Microsome-Encapsulated Alginate Gel Microbeads", J. Biosci. Bioeng., **2011**, 111, 454-458.
- 3) **H. Nakayama**, H. Kimura, T. Fujii and Y. Sakai, "Image-based evaluations of distribution and cytotoxicity of Irinotecan (CPT-11) in a multi-compartment micro-cell coculture device", J. Biosci. Bioeng., *in press*

II. 本論文に直接関係しない原著論文

- 1) 木村啓志, **中山秀謹**, 山本貴富喜, 酒井康行, 藤井輝夫, "体内毒性試験へ向けたオンチップ小腸-肝臓由来細胞共培養システムの開発", 電気学会論文誌E, **2009**, 129, 252-258.
- 2) Kojima, N., Miura, K., Matsuo, T., **Nakayama, H.**, Komori, K., Takeuchi, S. and Sakai, Y., "Rapid and direct cell-to-cell attachment using avidin-biotin binding system: "Large aggregate formation in suspension culture and small tissue element formation having a precise microstructure using optical tweezers.", J. Robot. Mechatron., **2010**, 22, 619-622.
- 3) M. Hamon, T. Ozawa, H. **Nakayama H**, R. Ishii, S. Yamaguchi S, Nagamune T, Ushida T, Sakai Y., "A new methodology for engineering thick liver tissues: Avidin-biotin binding-based efficient formation of heterogenic tissue elements in suspension culture and their lateral organization on a gas permeable (Lumox TM plate) membranes, Tissue Engineering C, submitted.

III. その他報告等(査読なし)

- 1) **H. Nakayama**, H. Kimura, K. Komori, T. Fujii, and Y. Sakai, "Development of a Disposable Three-compartment Micro-cell Culture Device for Toxicokinetic Study in Humans and its

Preliminary Evaluation", AATEX, **2008**, 14 (Special Issue), 619-622.

2) **H. Nakayama**, H. Kimura, K. Komori, T. Fujii, and Y. Sakai, "Development of a Cocultivation Microdevice for Toxicokinetic Study in Humans", AATEX, **2008**, 13 (Supplement), 211.

3) 西川昌輝、**中山秀謹**、木村啓志、山本貴富喜、藤井輝夫、酒井康行, "化学物質の体内動態を再現する複合細胞培養系の開発と利用", バイオインダストリー, **2008**, 25, 17-25

4) Kojima, N., Miura, K., **Nakayama, H.**, Takeuchi, S. and Sakai, Y., "Precise assembly of micro-tissues in a microfluidic device using an avidin-biotin binding system and optical tweezers", Proceedings of the 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2010), **2010**, 1325-1327.

IV. 学会発表

*口頭発表

1) **H. Nakayama**, H. Kimura, K. Komori, T. Fujii, and Y. Sakai

"Development of a Disposable Three-Compartment Micro-Cell Culture Device for Toxicokinetic Study in Humans and its Preliminary Evaluation" 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Tokyo, (Aug 21-25, 2007)

2) **中山秀謹**、木村啓志、小森喜久夫、藤井輝夫、酒井康行

"化学物質動態解析のためのマルチコンパートメント複合細胞培養チップの開発"
化学工学会第39回秋季大会, 北海道, (9月13日-15日, 2007)

3) **H. Nakayama**, H. Kimura, M. Nishikawa, K. Komori, T. Fujii and Y. Sakai,

"Development of a Disposable Multi-Compartment Micro-Cell Culture Device"
International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, Nagoya, (Nov 11-14, 2007)

5) 山本尚子、**中山秀謹**、小森喜久夫、佐々木澄志、田中憲穂、酒井康行

"肝代謝酵素群存在下 Bhas42 細胞を用いた毒性試験系の構築"
化学工学会第 73 回大会, 静岡, (3月17日-19日, 2008)

6) 高見澤尚寛、小澤卓生、**中山秀謹**、山口哲志、牛田多加志、長棟輝行、酒井康行

"機能性高分子を用いた細胞表層でのポリイオンコンプレックス薄膜層ゲルの形成"
化学工学会第 74 年会, 横浜, (3月18日-20日, 2009)

7) 小森喜久夫、山本尚子、松井 等、中山秀謹、竹内昌治、酒井康行
"肝ミクロソーム内包ゲル微粒子の作製と細胞アッセイへの利用"
第 17 回 HAB 研究機構 学術年会, 東京, (5 月 21 日-22 日, 2010)

***ポスター発表**

1) Y. Sakai, H. Nakayama, H. Kimura, M. Nishikawa, K. Komori, T. Fujii
"Towards the Development of a Multi-Compartment Micro-Cell Culture Device"
International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, Nagoya, (Nov 6-8,
2006)

2) Hidenari Nakayama, Hiroshi Kimura, Teruo Fujii and Yasuyuki Sakai
"Visualization of chemical distributions in the multi-compartment cell culture system for
toxicokinetic study in humans and development of artificial cell models to mimic the organ specific
functions"
International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, Nagoya, (Nov 6-9,
2008)

3) 中山秀謹、木村啓志、小森喜久夫、藤井輝夫、酒井康行
"化学物質体内動態評価のための複合培養チップの開発"
日本動物実験代替法学会第 21 回大会, 埼玉, (11 月 13 日-14 日, 2008)

謝辞

本研究は、筆者が2006年4月に東京大学大学院工学系研究科化学システム工学専攻酒井研究室にて修士課程に入学して以来5年間に亘り行われたものです。また、博士課程に進学してから2011年3月までの3年間は日本学術振興会特別研究員補助金の助成の下に行われたものです。本研究を行うにあたり多くの方々からご指導、ご支援を頂きました。この場を借りて感謝の言葉を述べさせて頂きたいと思います。

酒井康行教授には、修士課程と合わせて5年間に亘り、日々のディスカッションを通して本研究を導いて下さいました。研究のみならず、合宿や飲み会など、普段のコミュニケーションにおいても非常にフランクに接して頂き、時に厳しく、時に楽しく、充実した研究生活を送れましたこと、心から感謝いたします。

生産技術研究所の藤井輝夫教授には、デバイス作製において全面的なバックアップをしてくださり、自由に実験させて頂きました。また、日頃から温かい励ましやご指導を頂きましたこと、心から感謝いたします。

迫田章義教授には、御多忙の中、副査を快くお引き受けくださり多くの示唆に富んだ御指摘とアドバイスを賜りました。また迫田・酒井研究室の密接なつながりから、分析機器を使用させていただき、様々な形でお世話になりました。心から感謝致します。

船津公人教授には、ご多忙の中、副査を快くお引き受けくださっただけでなく、数理シミュレーションとのつながりなど様々な角度からのご指摘を頂いたこと、心から感謝いたします。

伊藤大知准教授には、同じくご多忙の中、副査を快くお引き受けくださっただけでなく、多くの示唆に富んだご指摘とアドバイスをいただき、常に温かい対応をして頂きましたこと、心から感謝いたします。

一木隆範准教授には、専攻外であるにもかかわらず、副査を快くお引き受けくださり、本研究の意義について貴重なご意見を頂きましたこと、心から感謝いたします。

岡田文雄教授には、ご多忙の中、モデル化のための書籍を提供していただくなど、本研究の改善点を明確に指摘していただき、大変温かく接して頂きましたこと、心から感謝いたします。

小島伸彦助教（現横浜市立大学准教授）には、分子生物学の基礎知識、手技、考え方を教えて頂きました。また私的な飲み会などにも誘っていただくなど、公私にわたり大変温かく接していただきましこと、心から感謝いたします。

小森喜久夫助教には，電気化学分野の違った角度から数々のアドバイスを頂きました。心から感謝いたします。

迫田研究室の藤井隆夫技官には，いつでも快く装置を点検・修理していただきました。心から感謝いたします。

本研究室の鶴達郎技官には，廃液処理をはじめとして，研究がしやすい環境をつくっていただきました。心から感謝いたします。

生産技術研究所の西山祐司氏，YMA 株式会社の船岡氏には，二重円管ノズル作製に置いて，何度も無理なお願いを聞いてくださいました。心から感謝いたします。

酒井研究室秘書の清水敦子氏には，学生の不手際をその都度的確に処理して頂き非常に助かりました。ありがとうございます。

修士，博士課程を通じて多くの先輩，同期，後輩にお世話になりました。特に，花田三四郎博士，西川昌輝博士には，研究の細かなアドバイスだけでなく，生き様に至るまで，公私に亘って本当にお世話になり，心から感謝いたします。

また酒井研究室の Fanny Evenou 博士，Morgan Hamon 博士，Kevin Montagne 博士，Serge Ostrovidow 博士，山本尚子さん，黄紅雲博士，阪井仁美さん，高宮寿美さん，高村里佳さん，成戸宏介さん，松尾朋樹さん，三浦健さん，岡田直也さん，武田典子さん，小田スコット大智さん，名田順君，石井隆聖君，高橋亨君，大久保亮君，Mohammad Mahfuz Chowdhury さん，小澤卓生君，亀田一平君，勝田毅君，高見澤尚寛君，大原圭子さん，宮島翔太郎君，鈴木宏明君，宮崎和雄君，藤井翔君，田中玄也君，宇田川麻里さん，篠原満利恵さん，堀口一樹君，高晟齊君，白璐君，厩媛さん，皆様のおかげで楽しい研究室生活を送ることができました。

株式会社ホギメディカルの清一雄さんには短い期間ではありましたが，いつも暖かく接していただき，公私にわたり大変お世話になりました。心から感謝いたします。

藤井研究室の木村啓志助教（現東海大学講師）には，デバイス作製に関して全くの素人かつ研究室が違うにも関わらず非常に多くの時間を割いて実験方法を教えていただき，共同研究をさせていただきました。困った時にはいつも優しく相談にのっていただき，私生活でも様々な場所に連れて行っていただき，本当に感謝しております。

同じく藤井研究室の金田祥平博士には，人生を楽しく生きることの大切さを改めて教わりました。また，藤井研究室で伸び伸びと研究できたのも，両先輩を筆頭に藤井研究室の

皆様のおかげです。公私に渡る多方面でのご指導，心から感謝いたします。

恵まれた環境で存分に研究に打ち込むことができたのも，上述の方々だけでなく多くの方々の支えがあったおかげです。本研究を支え，助けて下さった全ての人に感謝致します。

母，叔母，姉，兄など家族には，長い学生生活を通じて経済面，精神面ともに多大な支援を頂きました。深く感謝致します。

私の博士取得を誰よりも楽しみにしてくれた亡き祖母に，心から感謝の気持ちを捧げます。

最後に，私の生活の全てを支え，背中を押してくれた妻 陽子に謝して筆をおきます。

平成 26 年 3 月

中山 秀謹

補章 人工物モデルによる簡便化

A-1 肝ミクロソーム包括カプセルの調製と酵素活性評価

目的

これまでの *In vitro* 複合培養系における煩雑な細胞操作を最小限に留めるアプローチとして、やや生理学的意義を犠牲にしながらも、人工物モデルの開発による体内動態制御臓器の代替可能性を検証することを目的とした。

実験

肝モデル細胞の人工物モデルとして、肝代謝酵素固定化アルギン酸ビーズの調製を行った。ラット肝ミクロソーム S9 (Kikkoman; Japan) と 5 wt%アルギン酸(Wako; Japan)を 1:1 で混合し 5 mL のシリンジ中に入れ、Fig. A-2 に示す 2 重円管ノズルを介して流速 250 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、窒素流量を 2 L/min で、5 wt%塩化カルシウム溶液中に混合溶液を滴下した。出来上がったゲルは生食で軽く洗い、その後 1.5 wt%ポリリジン溶液に 5 分間浸漬させた後、10 分間血清入り培地に浸して肝代謝酵素固定化アルギン酸ビーズを調製した。EROD 活性評価として、調製した酵素固定化ビーズと CYP1A1/2 の基質であるエトキシレゾルフィン を反応させ、生成するレゾルフィンの蛍光を経時的に取得することによって酵素固定化ビーズのみかけの反応速度を決定した。

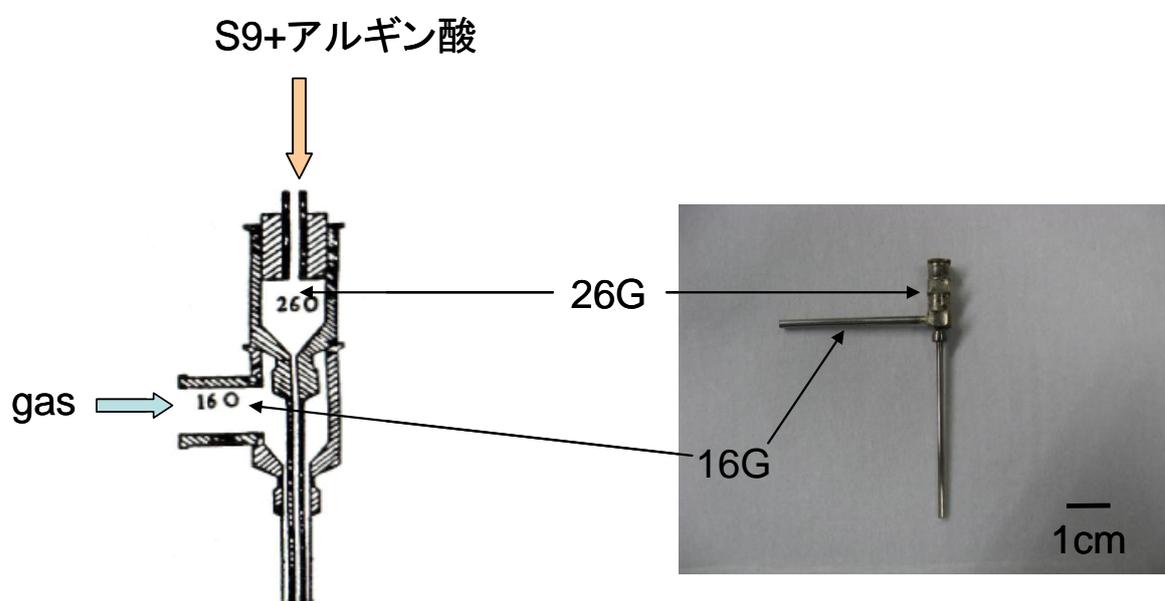


Fig. A-2 2重円管ノズルの概要

結果と考察

Fig. A-2 に酵素固定化ビーズの形態を示した. 均一な約 $200\ \mu\text{m}$ のビーズが作製されたことが分かる. 酵素固定化ビーズの見かけの反応速度は S9 を直接基質と反応させた場合の見かけの反応速度の $1/4$ 程度であった. また, 調製したビーズを基質と 1 時間反応させた後に除去した系では基質の更なる代謝は観察されなかったことから, 少なくとも 1 時間は酵素活性でもビーズ外への溶出はないことを確認した. 反応速度を改善するためには, さらに微小粒径のビーズによって表面積を増大させる必要があると考えられた.

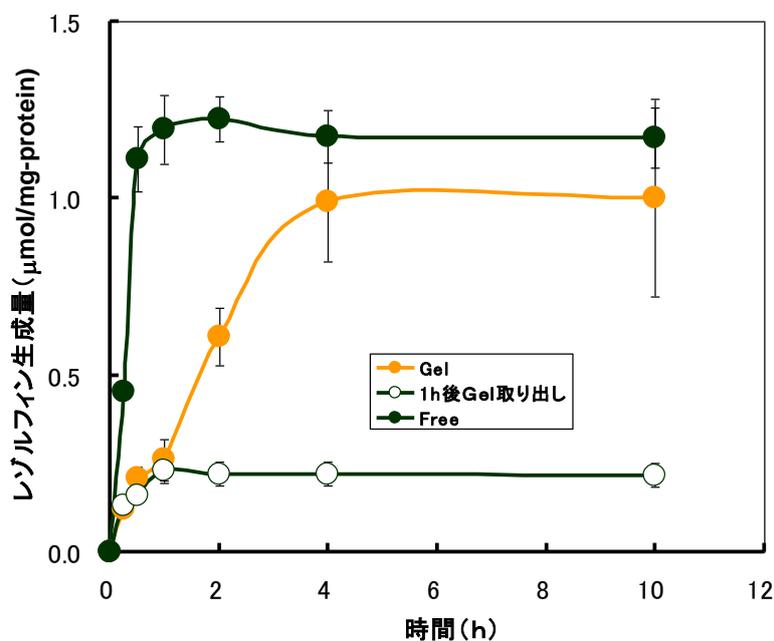
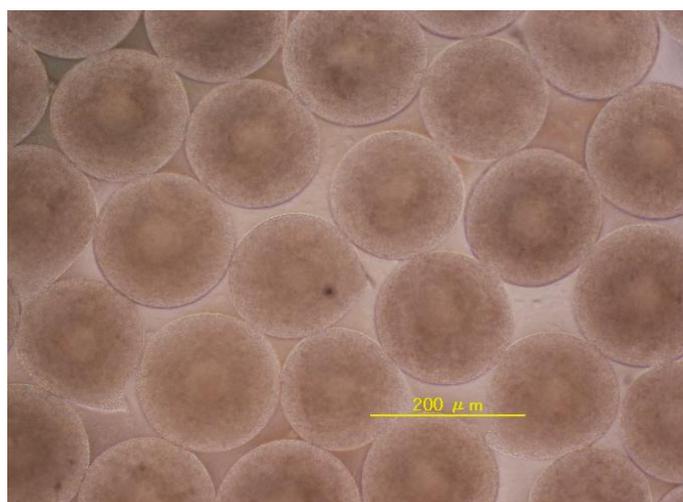


Fig. A-2 酵素固定化ビーズと代謝活性評価結果

A-2 両親媒性ポリマーを用いたミネラルオイルカプセルの調製

ポリイオンコンプレックス膜

アルギン酸は人体に無害な物質で、電気泳動などに用いられるアガロースの様に、熱などを利用してゲル化するのでは無く、イオン交換のみでゲル化するため、様々な用途に使用される。アルギン酸ナトリウムが水溶液中にあると、COONa のナトリウムが遊離する事でイオン化して COO⁻ となり、アルギン酸分子全体が負電荷を帯びる。このアルギン酸分子の負電荷と、ポリリジンなどの正電荷物質が静電的相互作用により結合することでポリイオンコンプレックス膜を作製することができる。アルギン酸・ポリリジンの静電的相互作用を利用して、反応を繰り返せば表層のポリイオンコンプレックス膜を積層させることができるため、膜厚制御による物質透過性をある程度コントロールできると考えられる。

Biocompatible Anchor for Membrane(BAM)

BAM は、東京大学工学系研究科長棟研究室と日本油脂株式会社により共同開発された生体適合性ポリマーである。BAM は、細胞の脂質二重膜に疎水性相互作用によって突き刺さるオレイル基と PEG 鎖を含み、PEG 鎖の先端に任意の分子を持たせる事が可能であるため、任意の電荷を付与することができる。また、オレイル基を持つことから両親媒性ポリマーとして使用することが可能である。そこで、ミネラルオイルカプセルの開始点として、BAM を利用することとした。つまり、この BAM 分子 PEG 鎖末端にアミノ基などの正電荷の官能基を導入することによりミネラルオイル表層に正電荷を付与することで、アルギン酸-ポリリジンのポリイオンコンプレックス膜作製の足場とすることができる。

実験方法

1.5 ml エッペンドルフチューブ(以下エッペン)に BAM-NHS 19.8 mg と、DMSO(脱水)450 μ L を入れボルテックスミキサーでしっかり溶解させた。(10 mM BAM-NHS/DMSO) 次に、ドラフト内でエッペンチューブに ethylenediamine 30 μ L と DMSO(脱水) 420 μ L を入れ、全量 450 μ l にし、ボルテックスミキサーでしっかり懸濁させた。(1000 mM Ethylenediamine/DMSO)その後、150 μ L ずつ3本の新しいエッペンに分注した。分注した Ethylenediamine/DMSO に、先程調整した 10 mM BAM-NHS/DMSO を 150 μ L ずつポタポタと滴下した。*この際、2~3滴毎に反応溶液をよく転倒混和した。滴下後、室温で24時間以上静置して反応させた。反応後、0.1 M Tris-HCl pH8.35 を 250 μ L ずつ各チューブに加え反応を停止させた。

反応停止後、miliQ 970 μ L を各チューブに加え反応溶液を透析膜に導入し、十分な miliQ で2~3日透析を行い、反応溶液中の DMSO・未反応物のエチレンジアミンを除去した。

透析後透析膜から反応溶液を 15 ml 円沈管に移し、凍結乾燥を行った。白色固体を得て、保存は-20 $^{\circ}$ Cで行った。Fig. A-3 に BAM-NH₂ の合成反応を示す。また、¹H-NMR による分析結果を Fig. A-4 に示した。

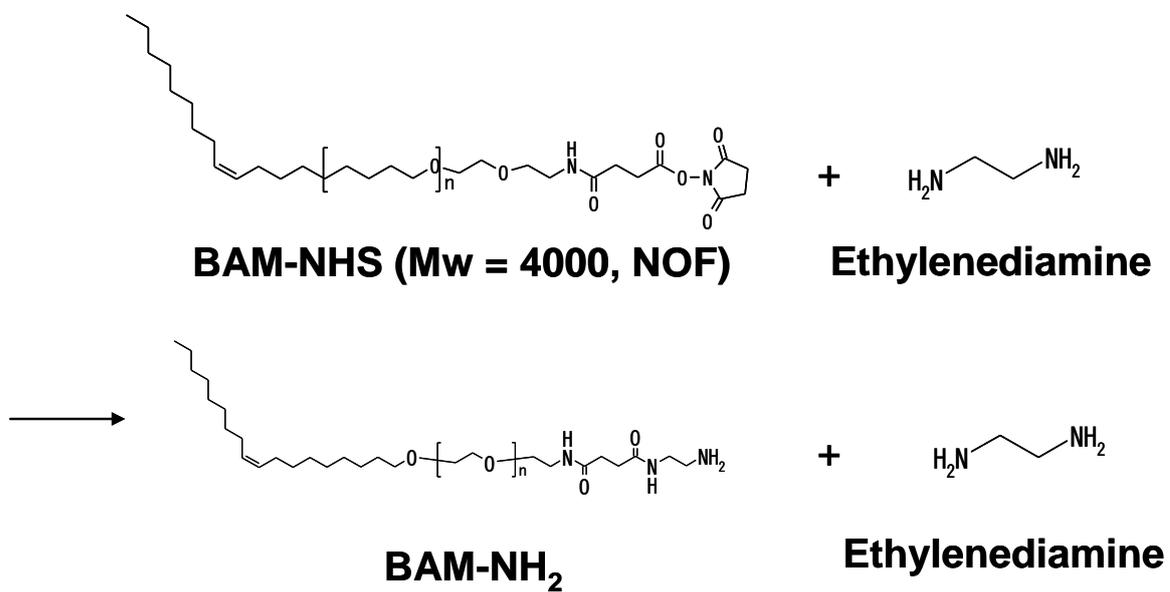
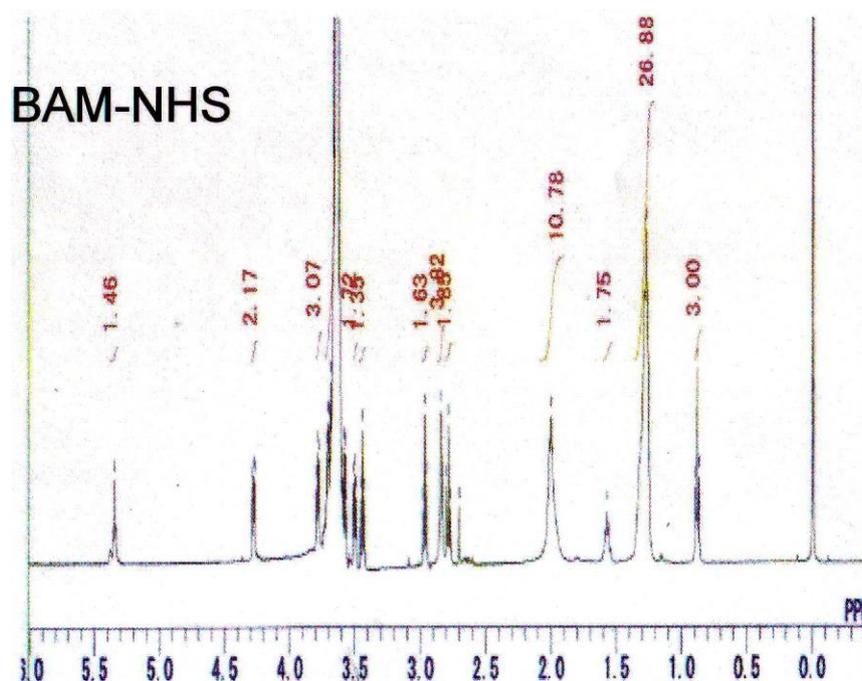
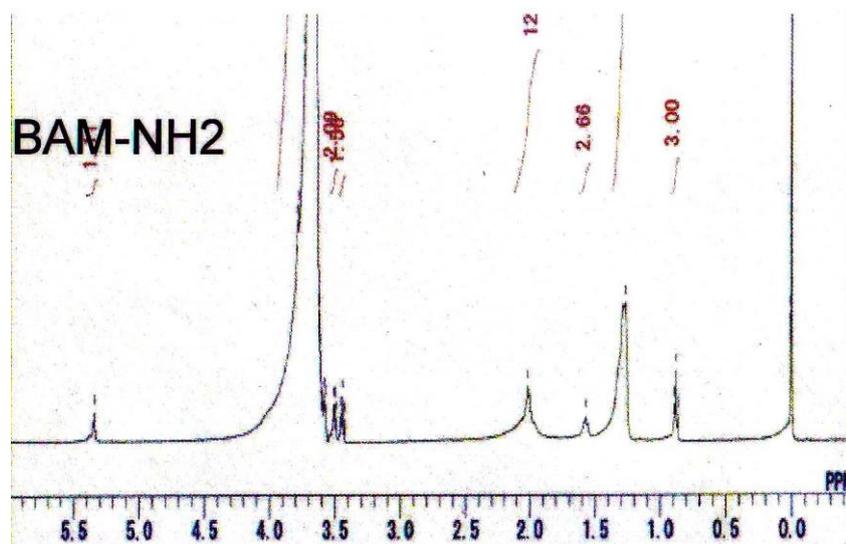


Fig. A-3 BAM-NH₂ 合成反応



BAM-NHS の H-NMR 分析結果

Fig. A-4 BAM-NHS および BAM-NH₂ の NMR 評価



BAM-NH₂ の H-NMR 分析結果

Fig. A-4 BAM-NHS および BAM-NH₂ の NMR 評価

Fig. A-4 で示した BAM-NHS および BAM-NH₂ の NMR 評価結果から、BAM-NH₂ においては BAM-NHS におけるイソシアネート基のピークが消失していること、別途行った TLC においてアミンの存在が確認できたことから、少なくとも何らかのアミンが導入された BAM 修飾体が合成できたことが分かった。

合成した BAM-NH₂ を 50 μM の PBS 溶液とミネラルオイル (Wako; Japan) を体積比 1:1 で混合し, ボルテックスミキサーで充分攪拌した.

その後, 1000 rpm で 5 分間遠心分離を行い, 上清を回収して, アルギン酸と反応させた. 反応後, 1000 rpm で 5 分間遠心分離を行い, 上清を回収して, PLL を 1 ml 加えて反応させた. 共焦点顕微鏡を用いて BAM 分子に標識してある FITC の蛍光を観察した. 共焦点顕微鏡画像を Fig. A-5 に示した. この結果から, サイズは不均一であるが, FITC 標識された BAM 分子を介したポリイオンコンプレックス膜を持つミネラルオイル内包性カプセルを形成できたことが確認された. 脂肪細胞モデルとして複合細胞培養系に組み込むためには, サイズを均一にする事や固定化法について更に検討を行う必要があると考えられた. また, 形成された膜の透過性を分子量や logP が既知の物質を用いて評価していく必要がある.

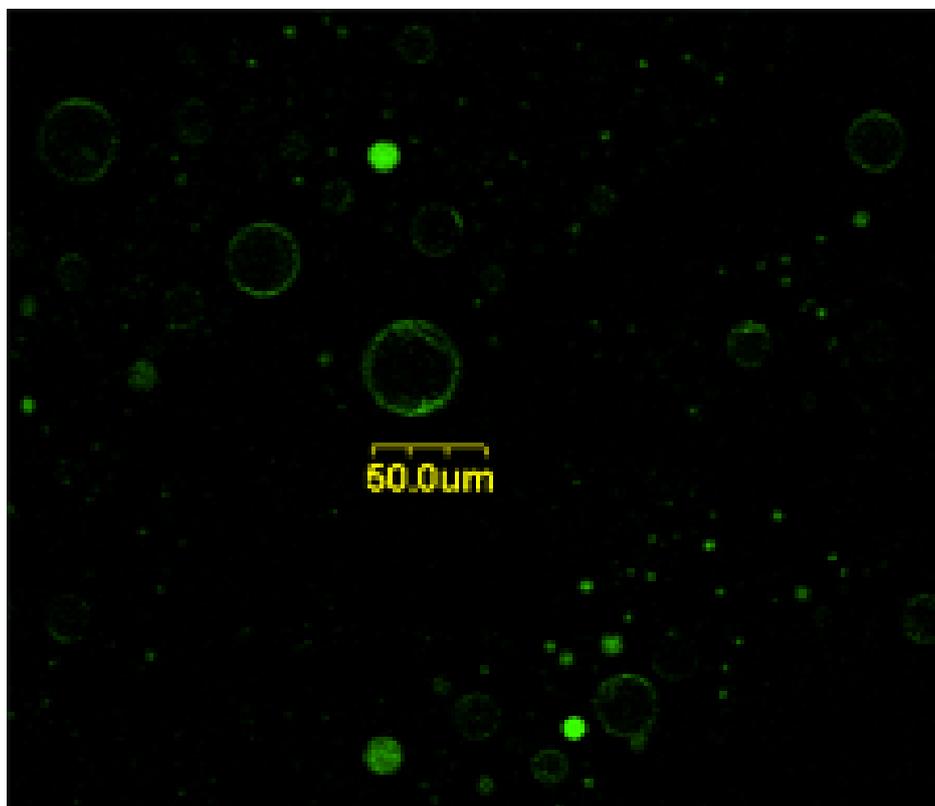
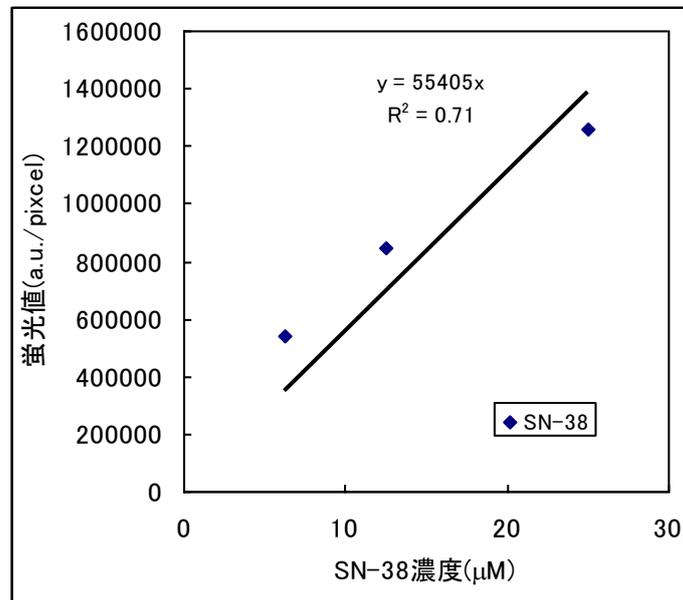
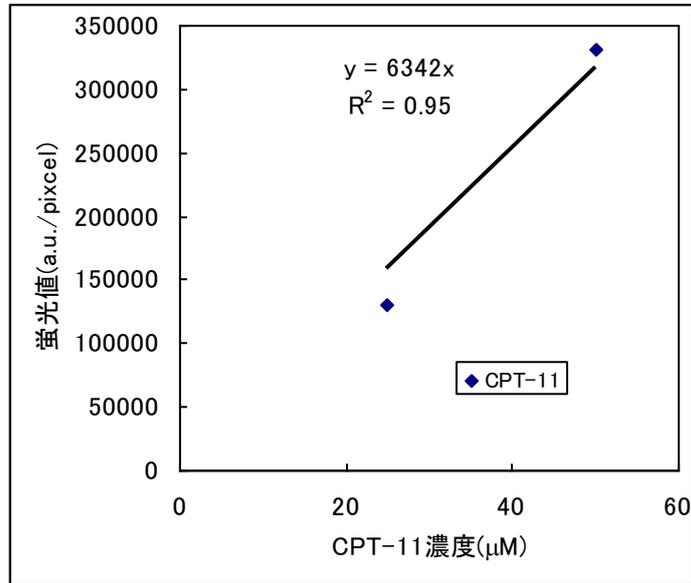


Fig. A-5 作製したミネラルオイルカプセル

APPENDIX

・蛍光値とモデル毒物濃度の関係

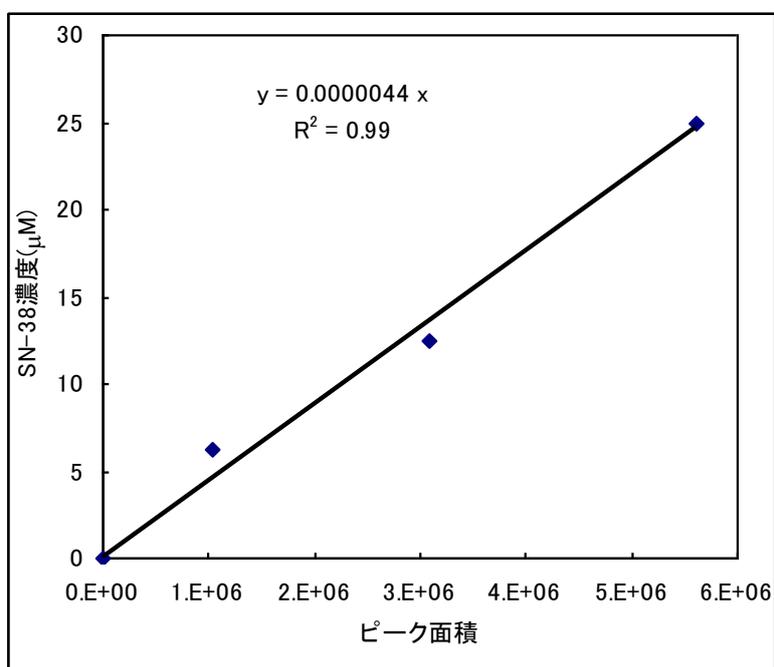
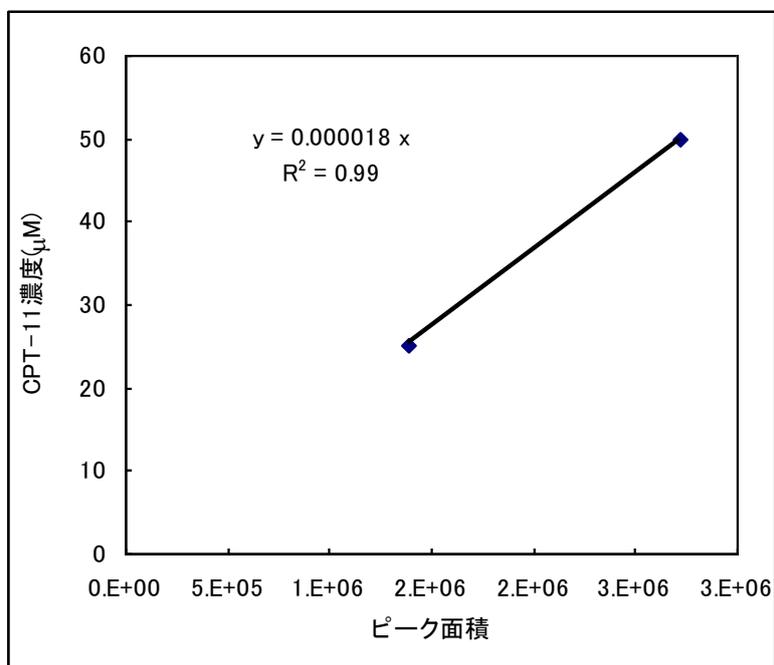
CPT-11 および SN-38 濃度と蛍光値の検量線を示す。



CPT-11 と SN-38 のモル蛍光係数は約 9 倍異なることが明らかとなった。細胞の自家蛍光を除いても、CPT-11 および SN-38 の蛍光値だけでは蛍光値の増減を説明できなかったことから、SN-38 以外の代謝物の蛍光も考慮する必要があるとあり、本論文で取得された蛍光画像から直接モデル毒物濃度を算出することは困難であった。

・ HPLC 分析

HPLC 測定における CPT-11 および SN-38 の検量線を以下に示す.



・ gPRMOS を用いた数値解析

使用した数理モデルのソースコードを以下に示す.

PARAMETER

Constant

V as real #Medium volume[mL]

rou as real #Cell density[cells/mL]

K1 as real #CPT-11 rate constant from medium to cells[1/cell/sec]

K2 as real #CPT-11 rate constant from cells to medium[1/cell/sec]

KCES as real #conversion rate constant[1/cell/sec]

K3 as real #SN-38 rate constant from medium to cells[1/cell/sec]

K4 as real #SN-38 rate constant from cells to medium[1/cell/sec]

Variable

#CPT-11 medium concentration

CCM as Concentration #[microM]

CCC as Concentration #[microM]

CSM as Concentration #[microM]

CSC as Concentration #[microM]

EQUATION

#####Equations#####

V*(CCM)=V*V*rou*(K2*CCC-K1*CCM); #(1)

V*(CCC)=V*V*rou*(K1*CCM-K2*CCC-KCES*CCC); #(2)

V*(CSM)=V*V*rou*(K4*CSC-K3*CSM); #(3)

V*(CSC)=V*V*rou*(K3*CSM+KCES*CCC-K4*CSC); #(4)

#####

gPRMOS に直接連立微分方程式および反応速度定数を入力することにより, 細胞内外の CPT-11 および SN-38 濃度の時間変化を得ることができる. ここで, CCM, CCC, CSM, CSC とはそれぞれ, 培養液中 CPT-11 濃度, 細胞中 CPT-11 濃度, 培養液中 SN-38 濃度, 細胞中 SN-38 濃度である. 以下に実際の入力方法とシミュレーション結果を示す.

```

UNIT
CPT11 AS CPT11

SET
#Volume
CPT11.V:=0.5; #[mL]

#Cell density
CPT11.rou:=20000; #[cells/mL]

#rate constant
#CPT-11 equaiburium
CPT11.K1:=0.000000176; #rate constant from medium to cells
CPT11.K2:=0.000000176; #rate constant from cells to medium

#SN-38 equaiburium
CPT11.K3:=0.0000001; #rate constant from medium to cells
CPT11.K4:=0.000000169; #rate constant from cells to medium

#CPT-11 conversion
CPT11.KCES:=0.00000000001; #conversion rate constant

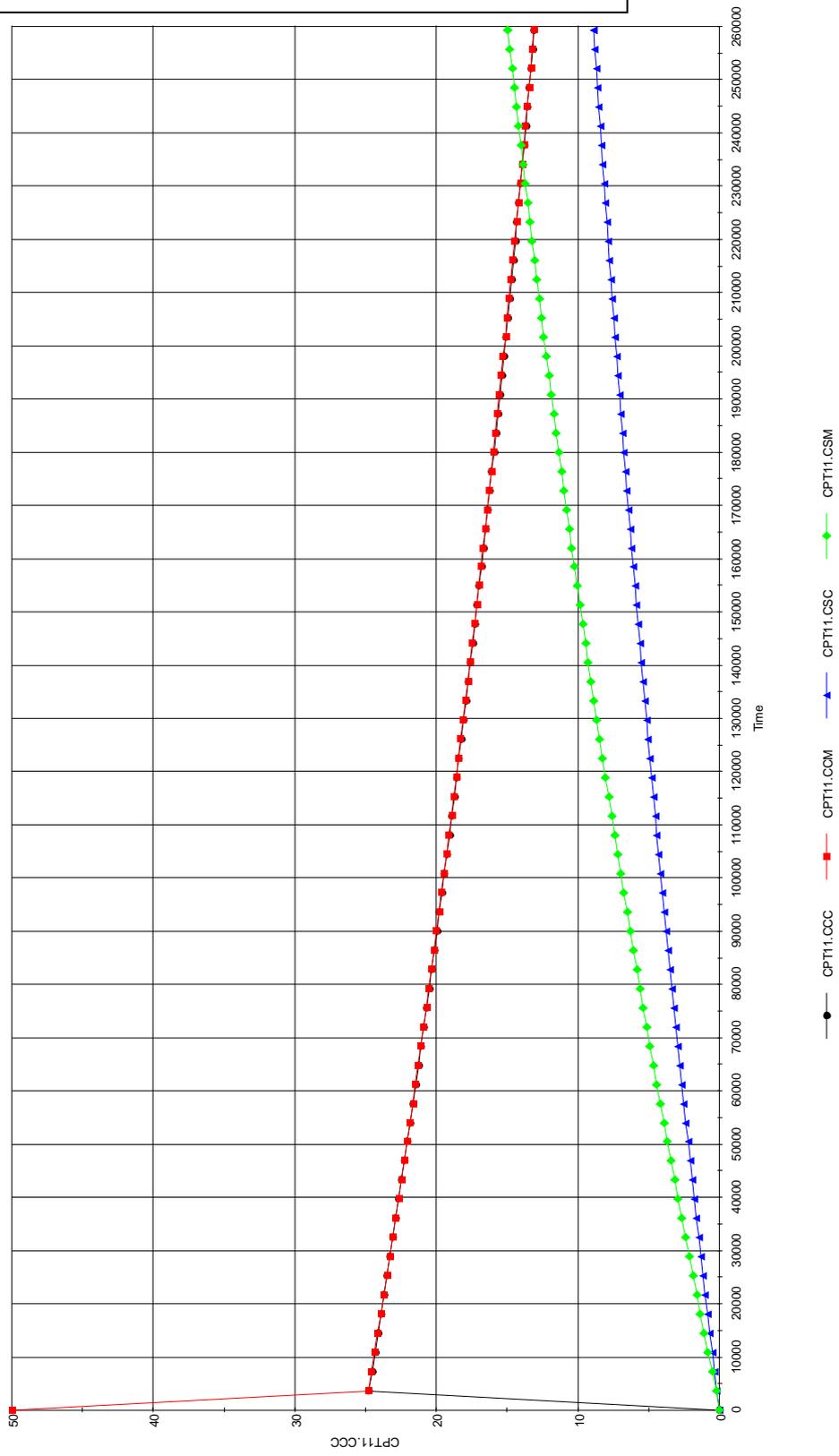
Initial
CPT11.CCM = 50; # CPT-11 initial concentration of medium
CPT11.CCC = 0; # CPT-11 initial concentration in cells
CPT11.CSM = 0; # SN-38 initial concentration of medium
CPT11.CSC = 0; # SN-38 initial concentration in cells

SCHEDULE
  Continue for 259200

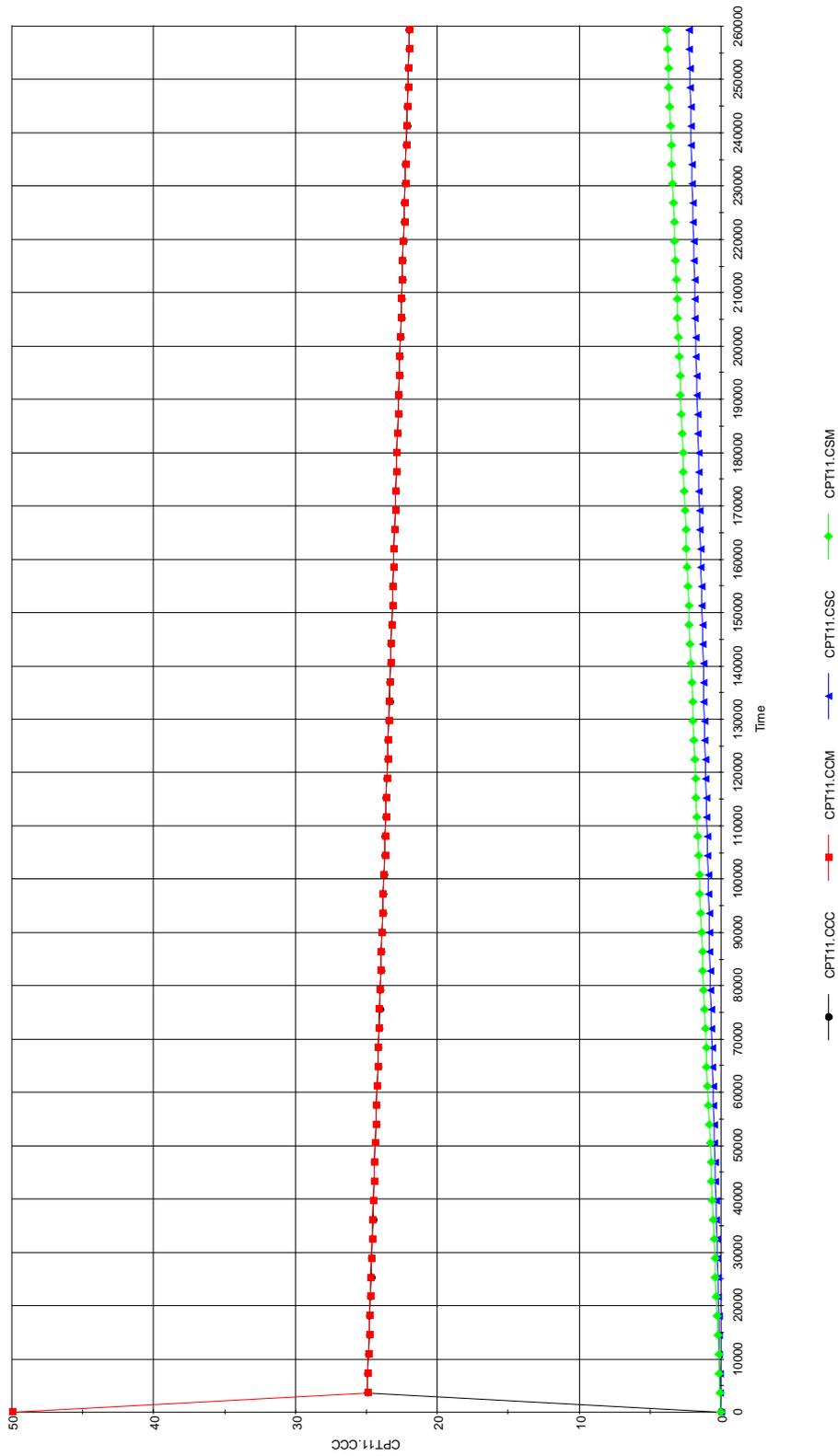
```

kces の入力値を変化させて、初期値を入力し、gPRMOS による数値計算を行うことで細胞内外の CPT-11 および SN-38 の濃度変化を推定することができる。未知の反応速度パラメーター k_2 、kces の値を変化させた際の細胞内外 CPT-11 および SN-38 濃度の経時変化をシミュレーションした結果を以下に示す。

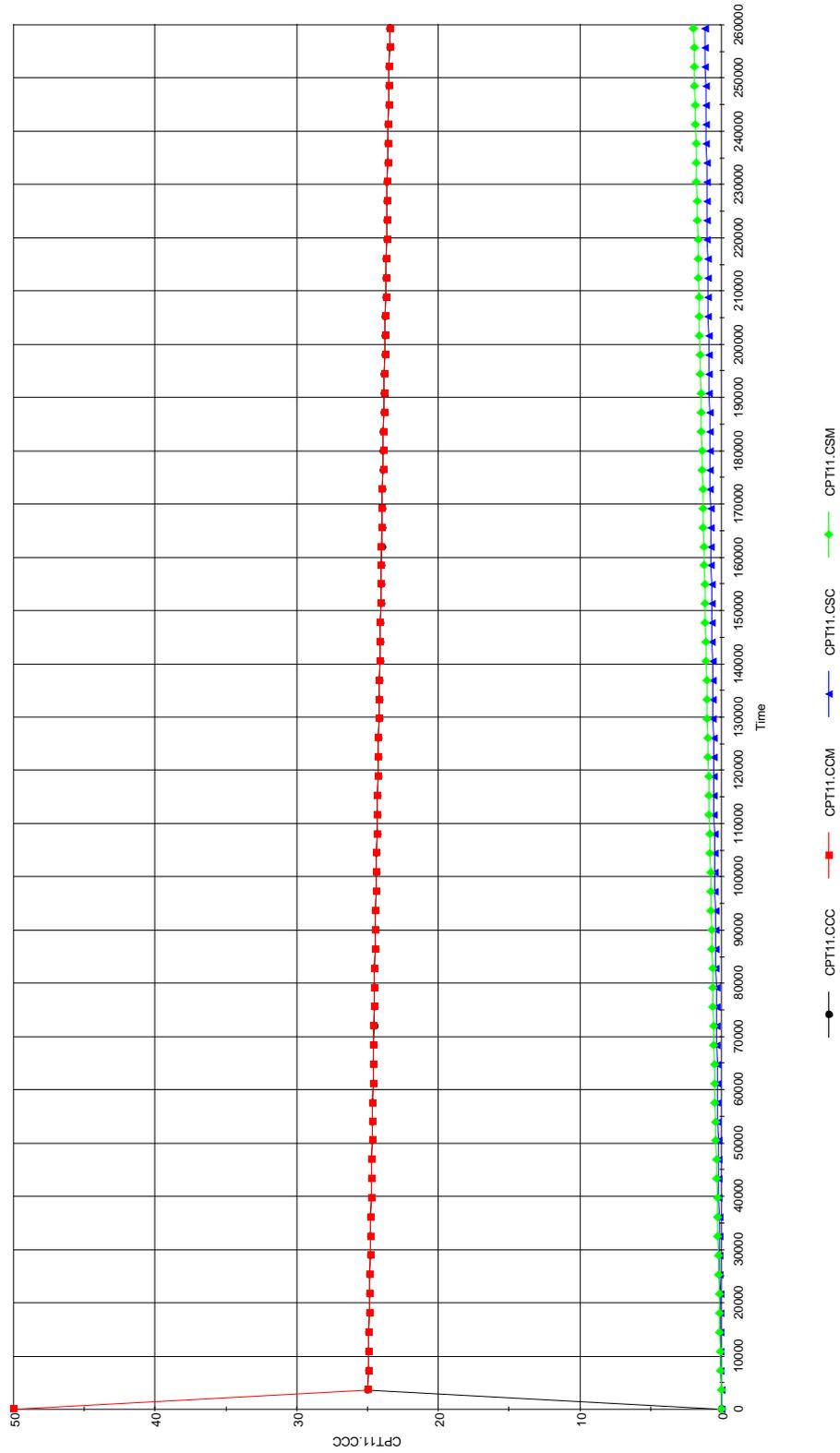
$k_2=k_1$ [/cell/sec], $k_{ces}=5E-10$ [/cell/sec]



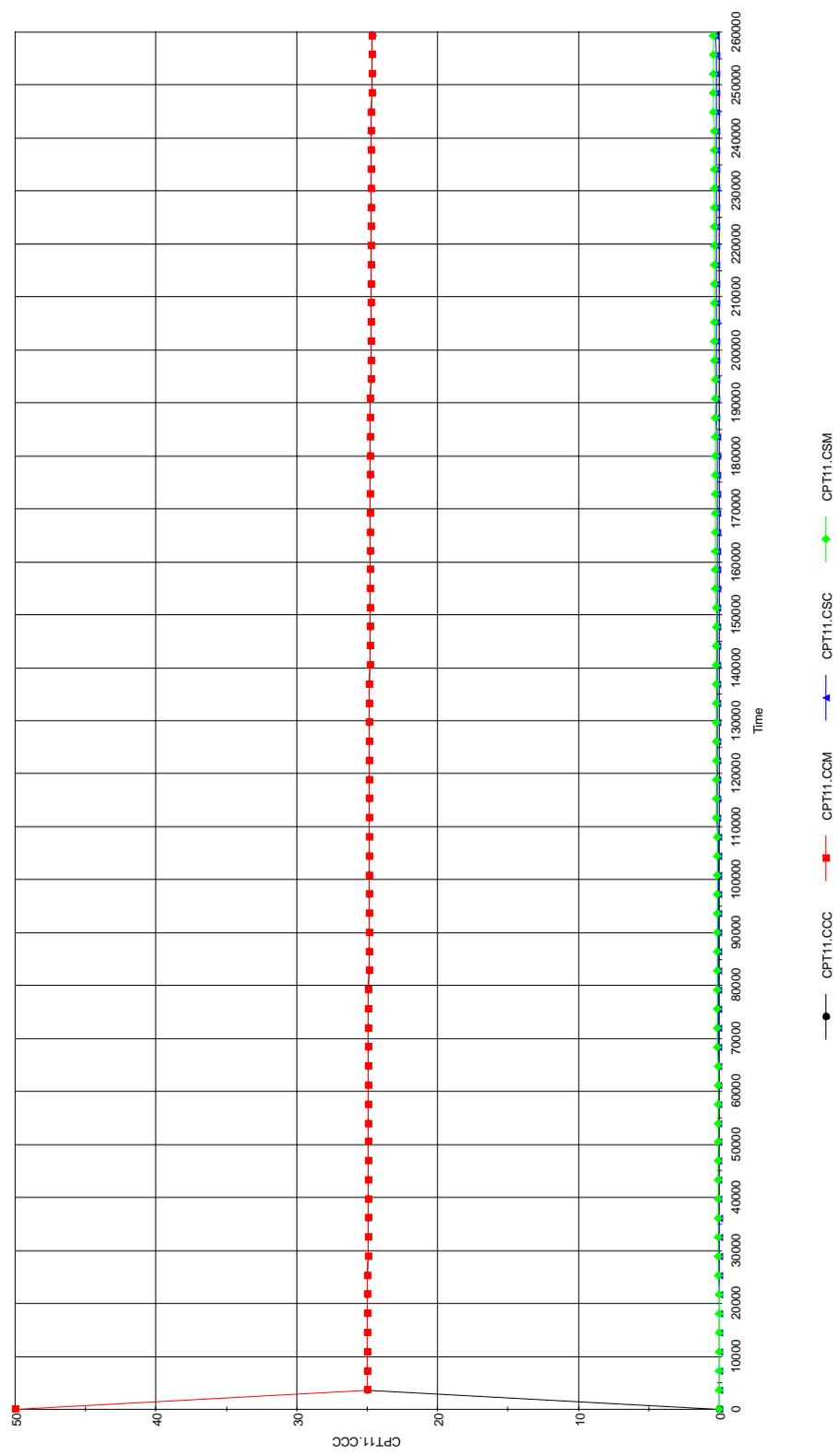
$k_2=k_1$ [/cell/sec], $k_{ces}=1E-10$ [/cell/sec]



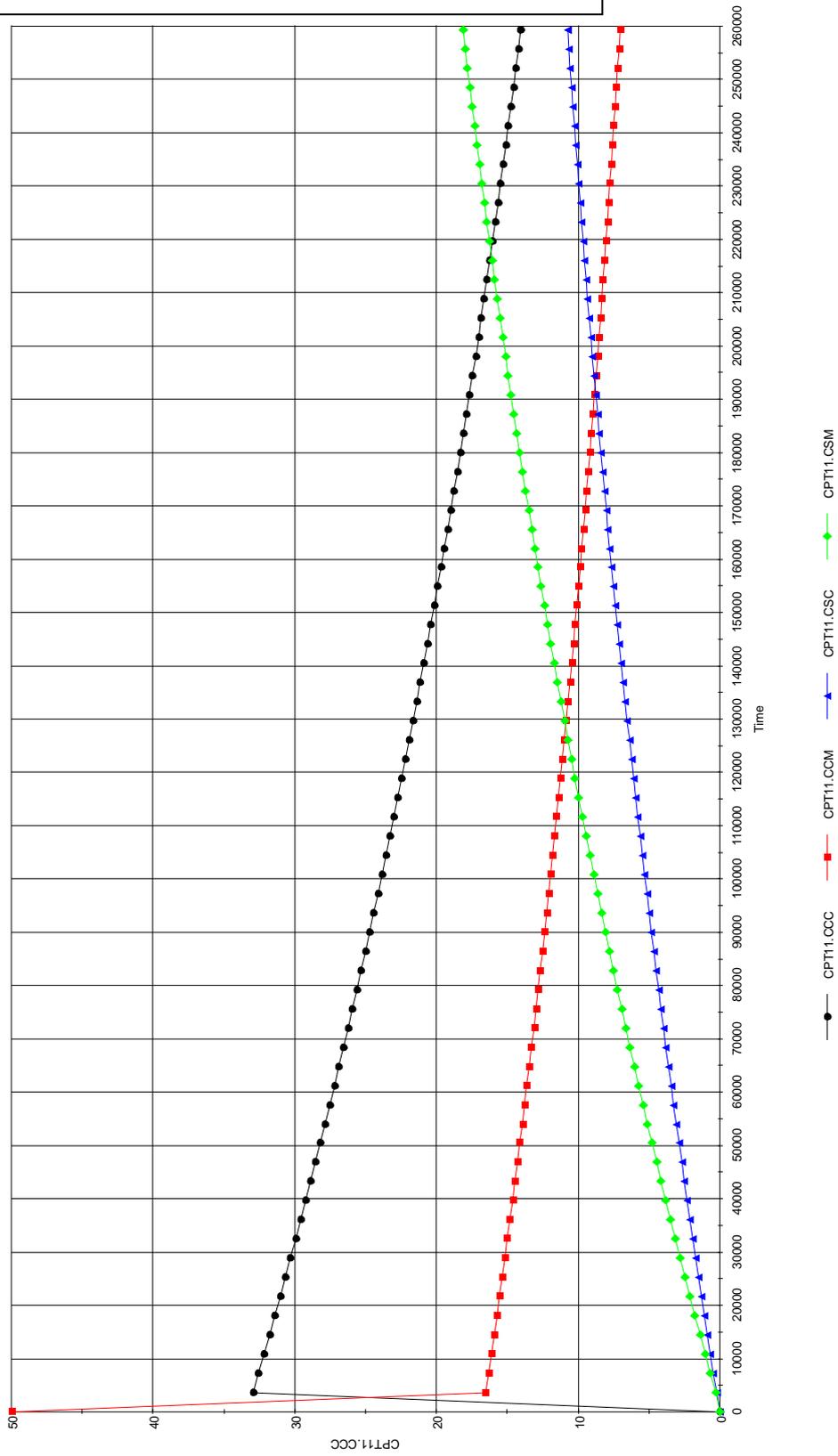
$k_2=k_1[\text{cell}/\text{sec}]$, $k_{\text{ces}}=5E-11 [\text{cell}/\text{sec}]$



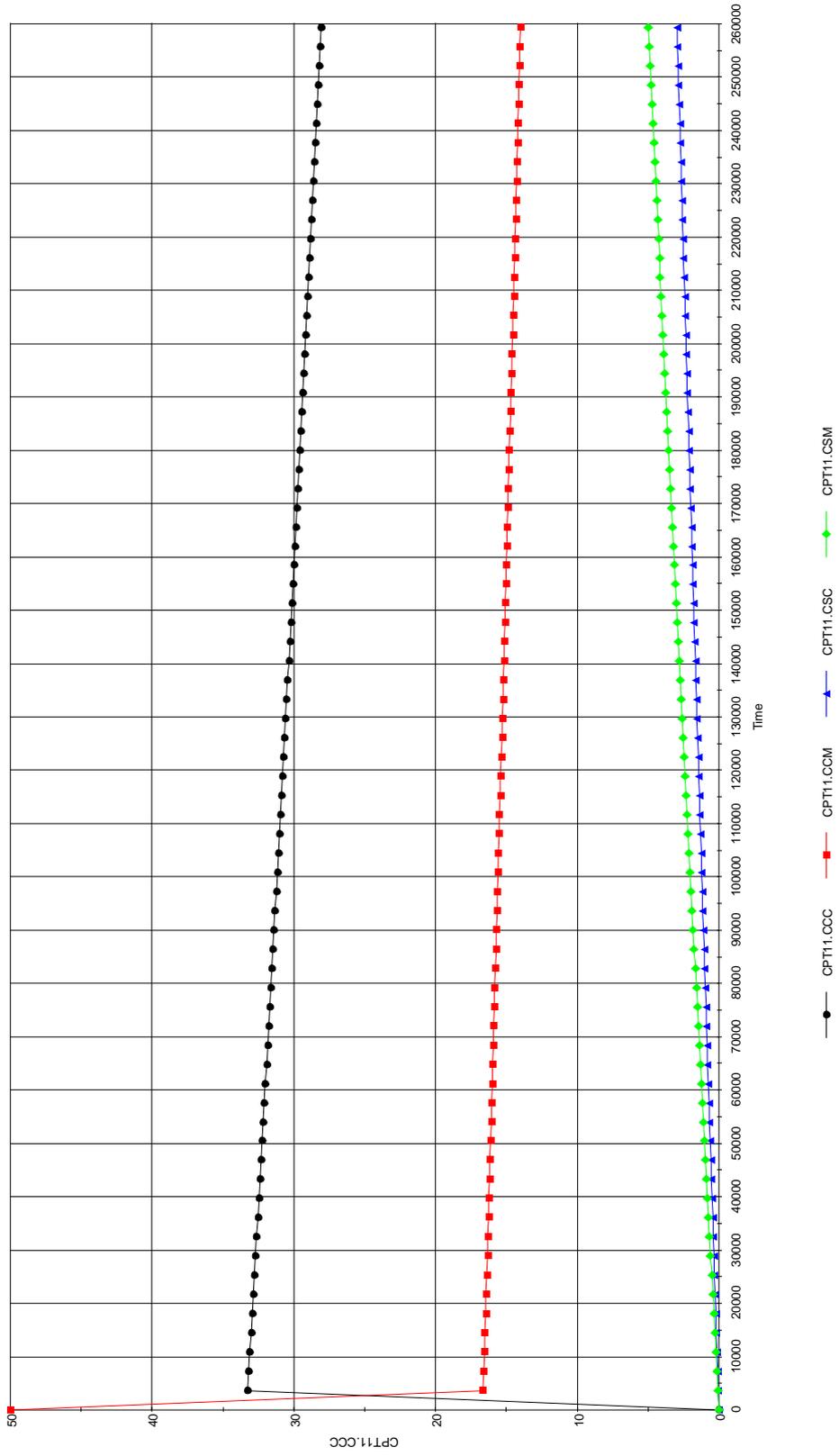
$k_2=k_1$ [cell/sec], $k_{ces}=1E-11$ [cell/sec]



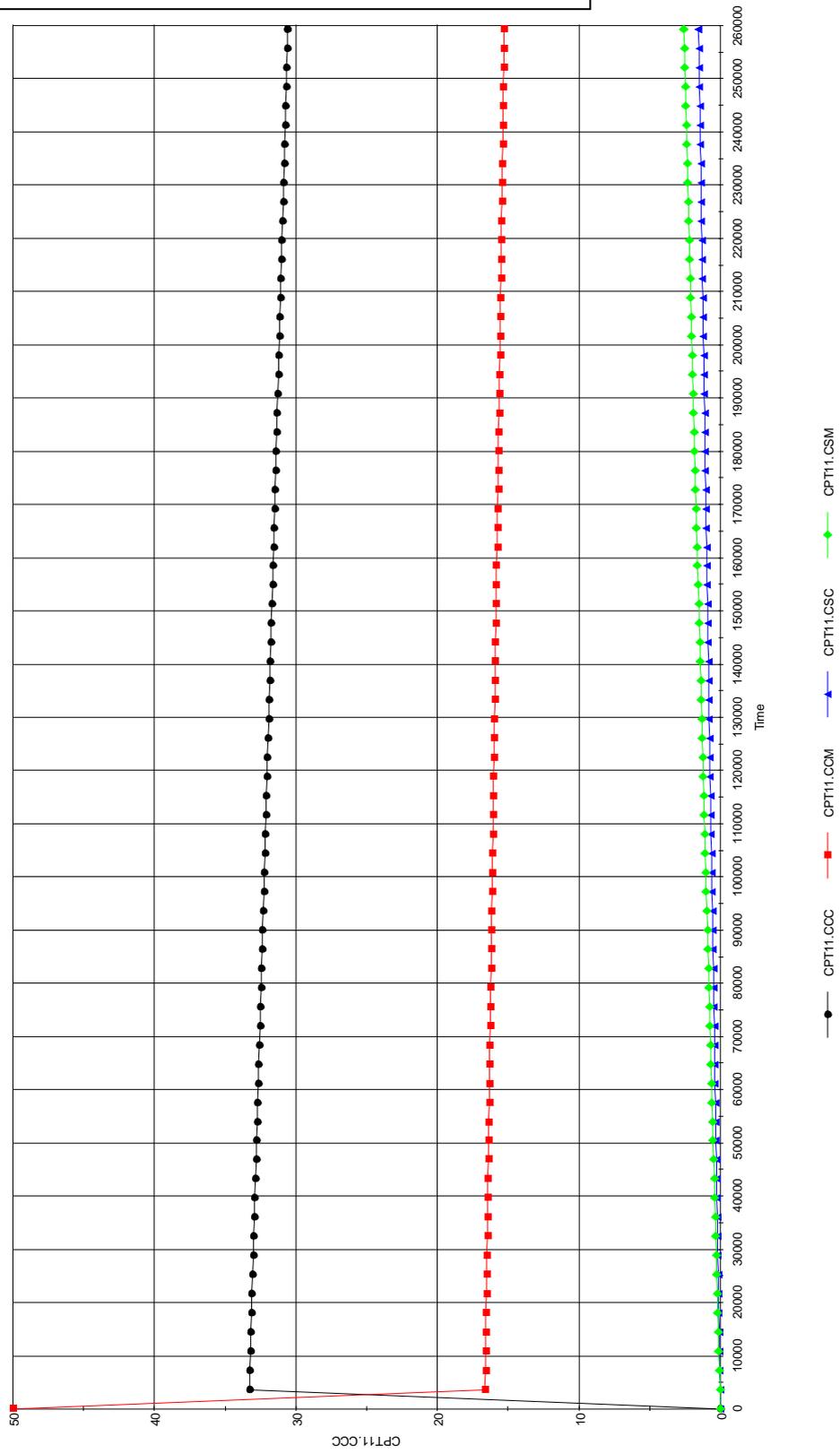
$k_2=0.5k_1$ [/cell/sec], $k_{ces}=5E-10$ [/cell/sec]



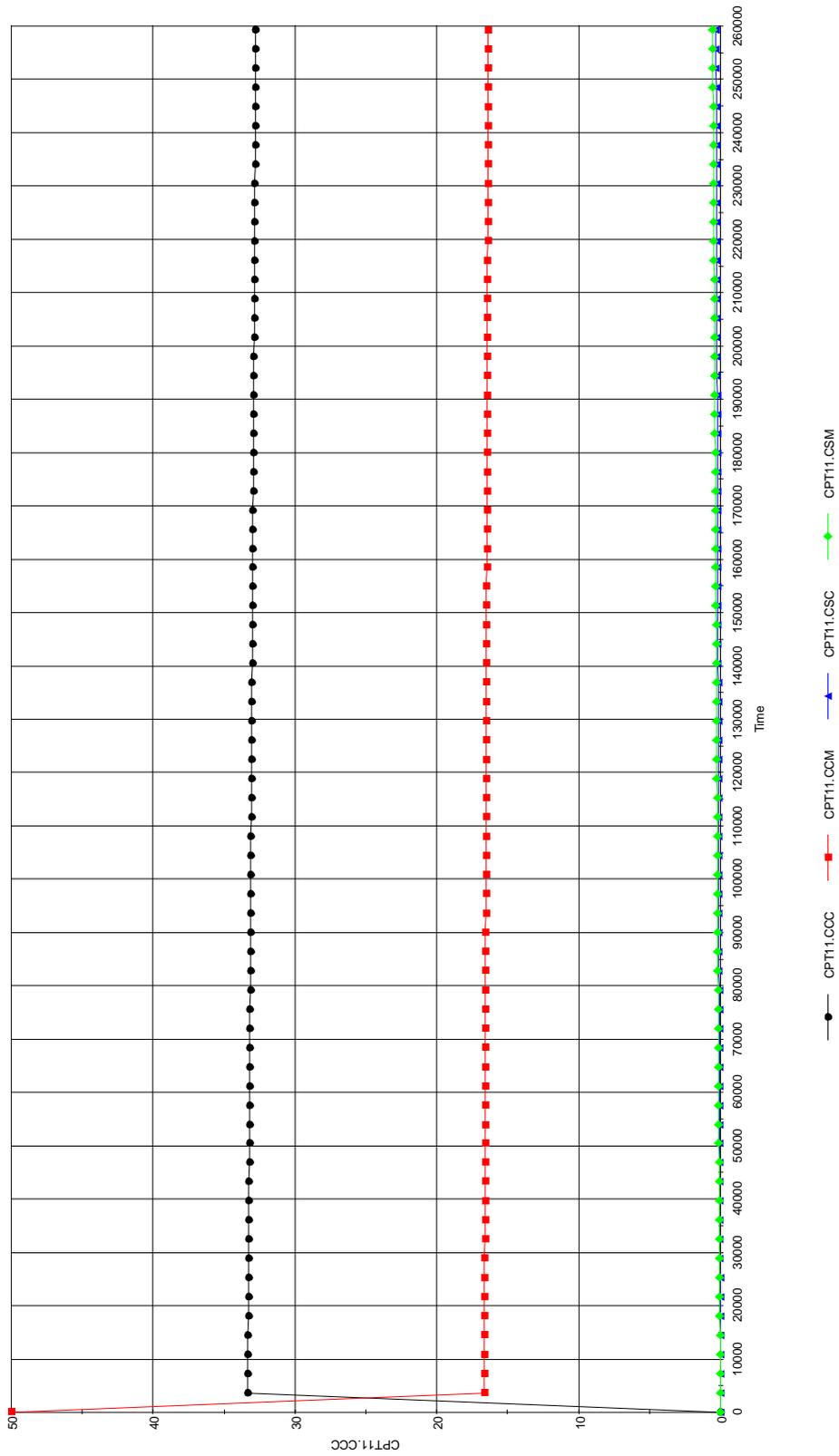
$k_2=0.5k_1$ [cell/sec], $k_{ces}=1E-10$ [cell/sec]



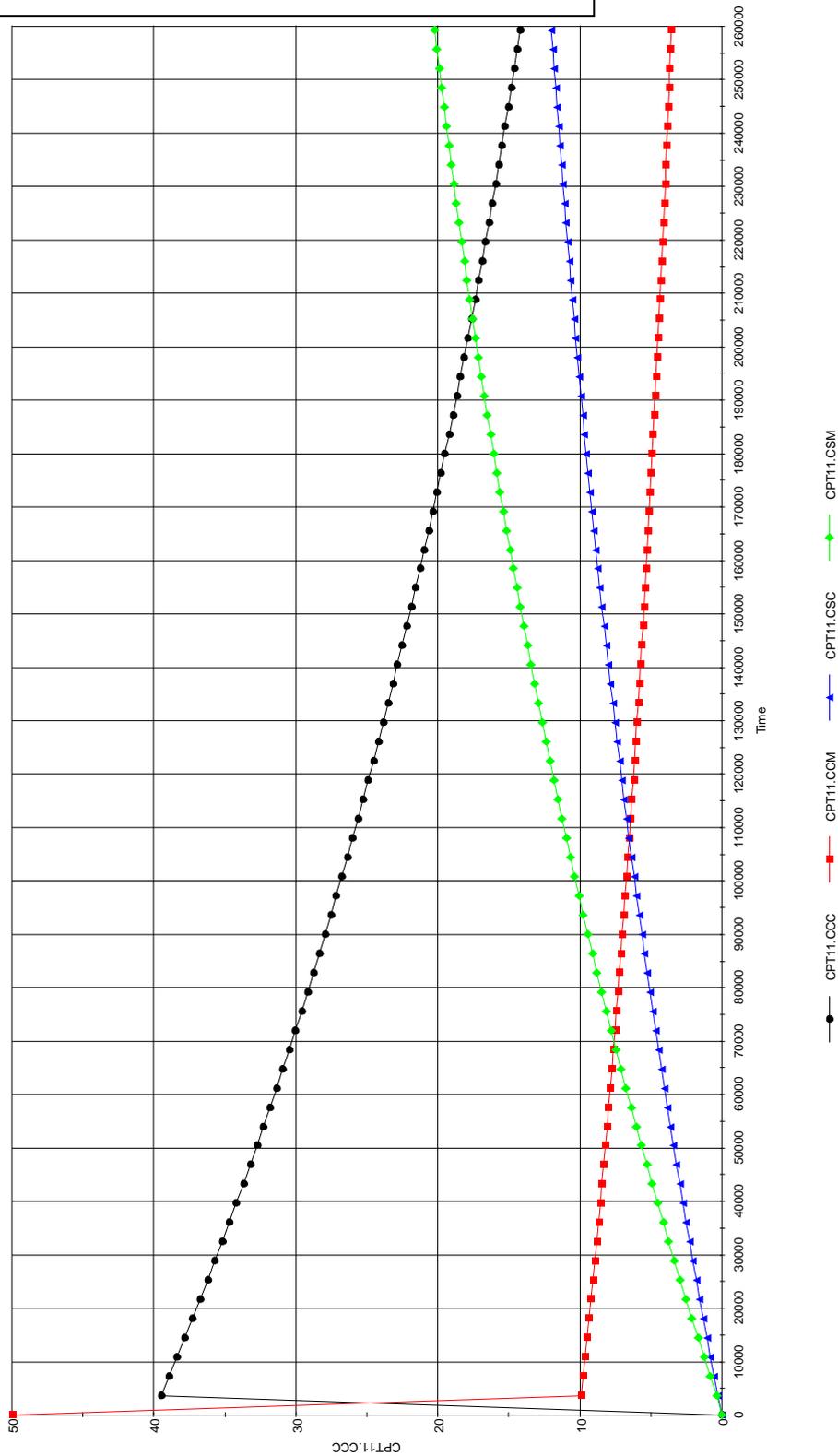
$k_2=0.5k_1$ [/cell/sec], $k_{ces}=5E-11$ [/cell/sec]



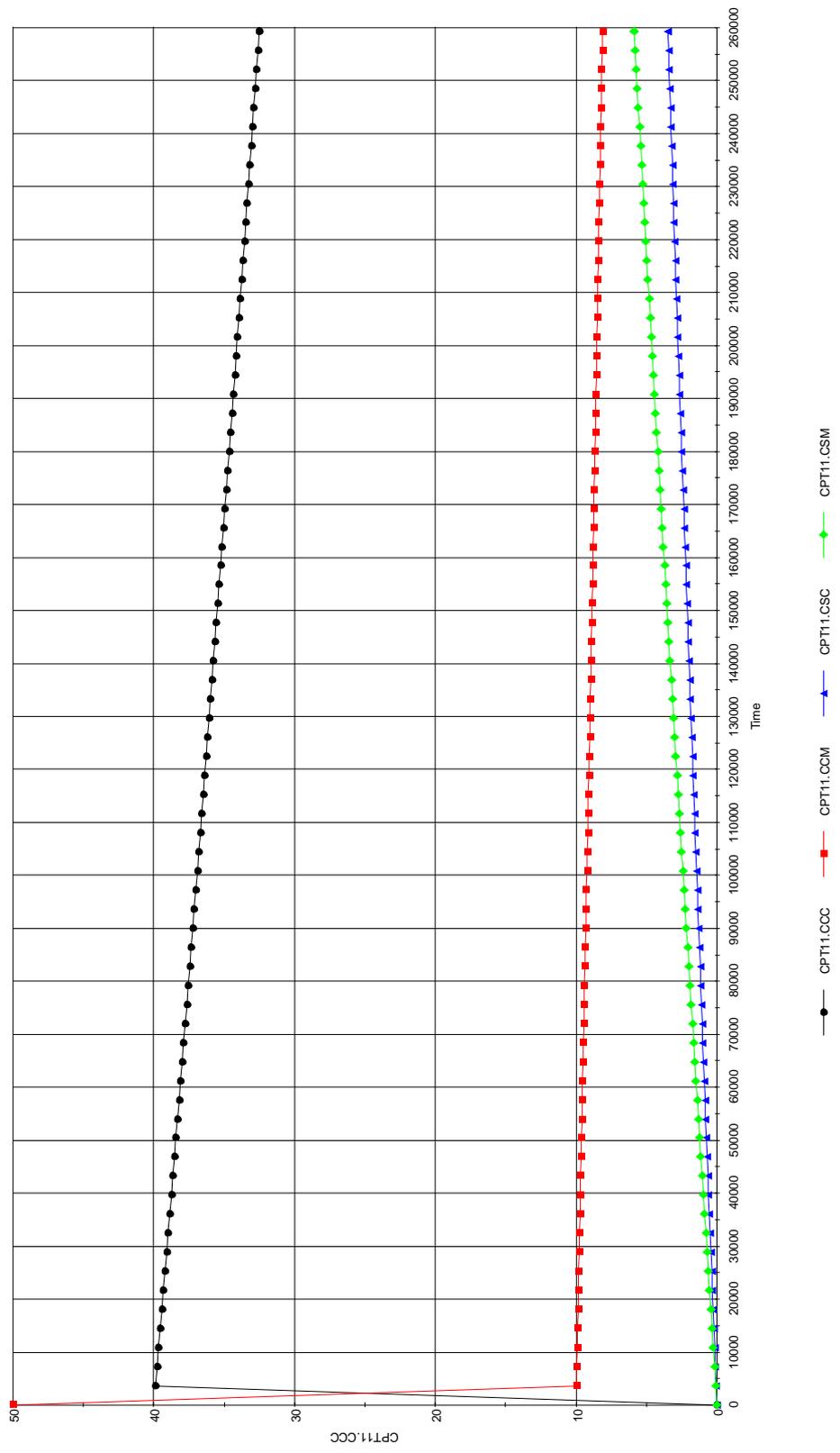
$k_2=0.5k_1$ [/cell/sec], $k_{ces}=1E-11$ [/cell/sec]



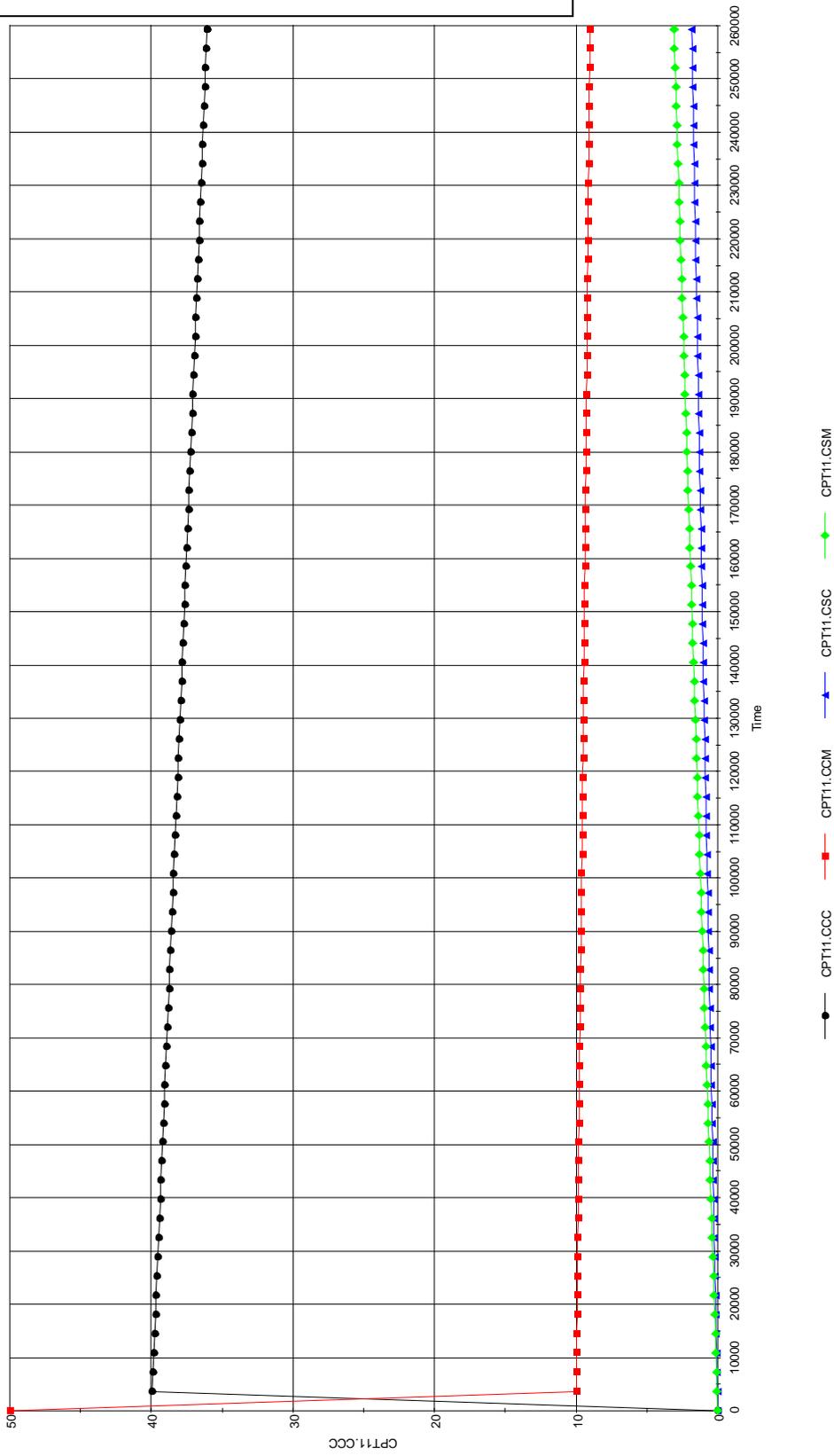
$k_2=0.25k_1$ [/cell/sec], $k_{ces}=5E-10$ [/cell/sec]



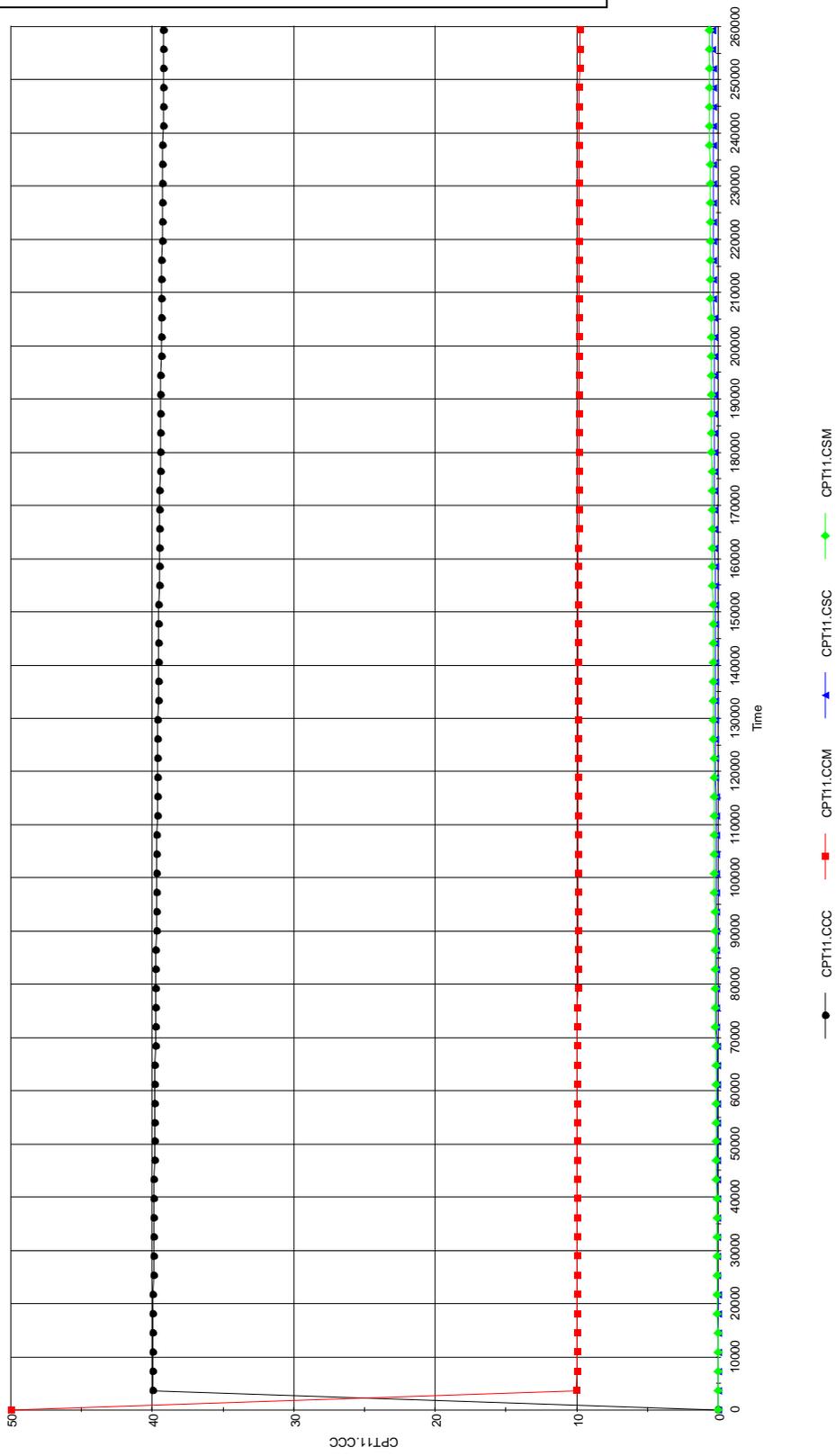
$k_2=0.5k_1$ [cell/sec], $k_{ces}=1E-10$ [cell/sec]



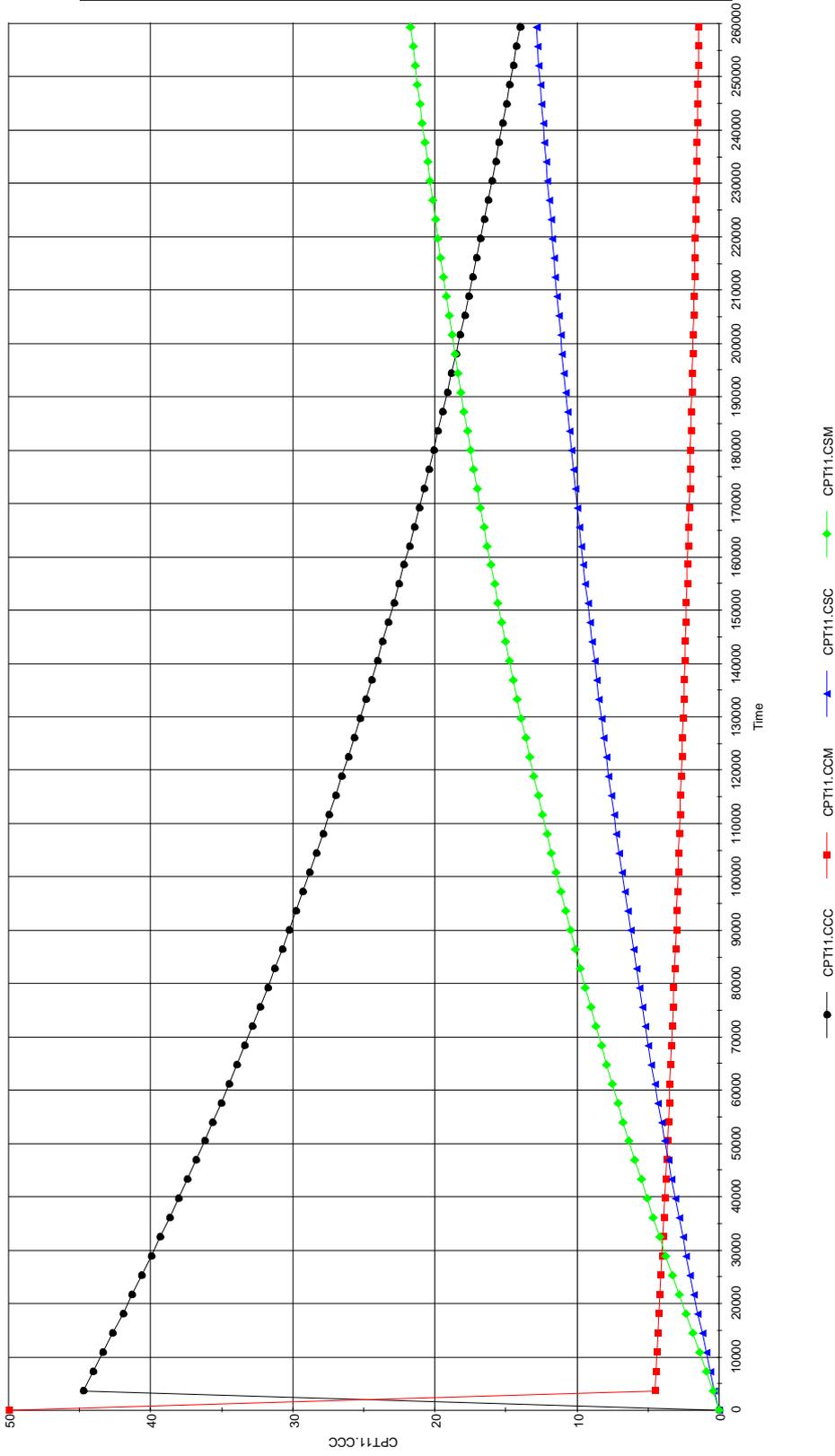
$k_2=0.25k_1$ [/cell/sec], $k_{ces}=5E-11$ [/cell/sec]



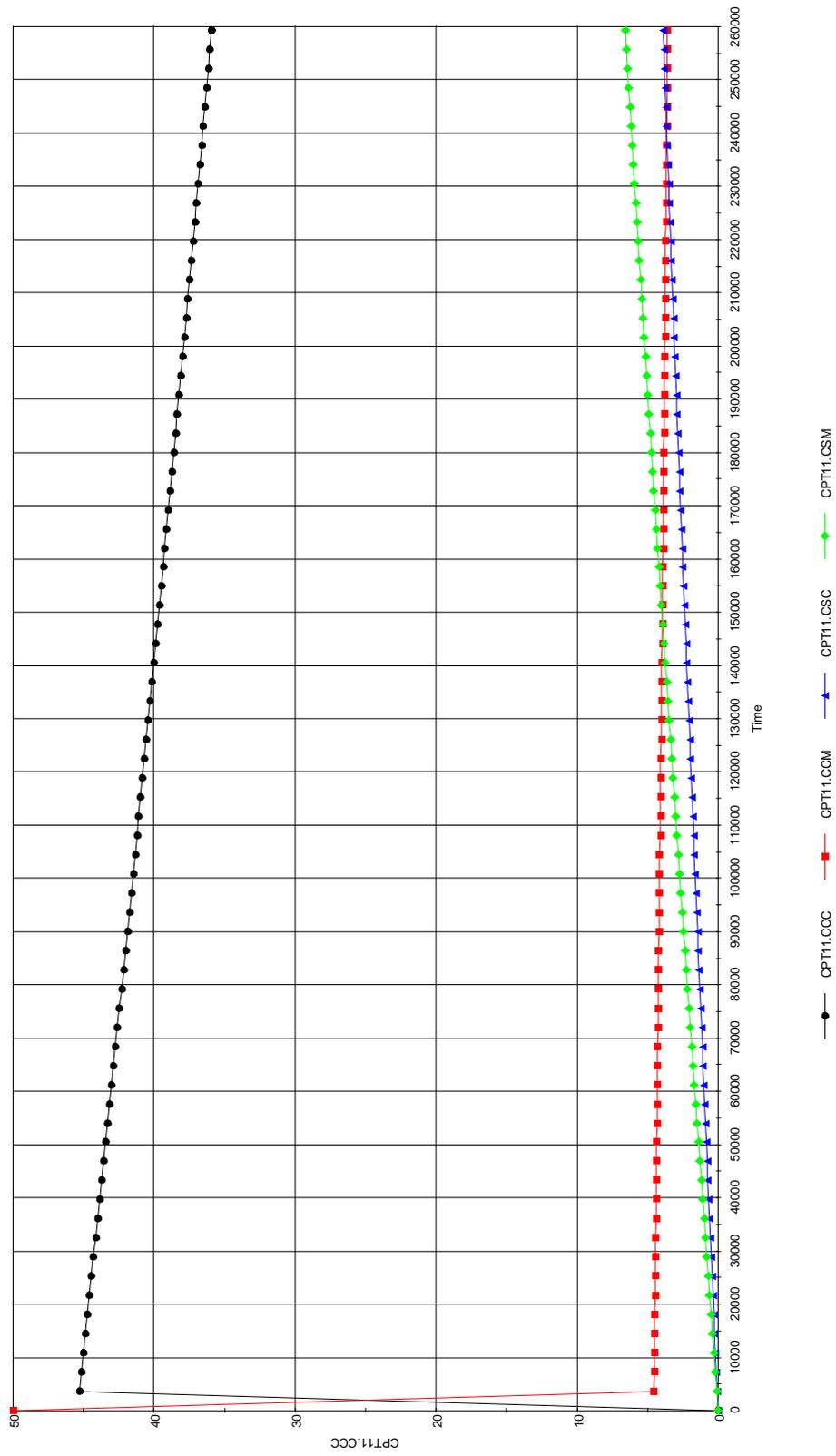
$k_2=0.25k_1$ [/cell/sec], $k_{ces}=1E-11$ [/cell/sec]



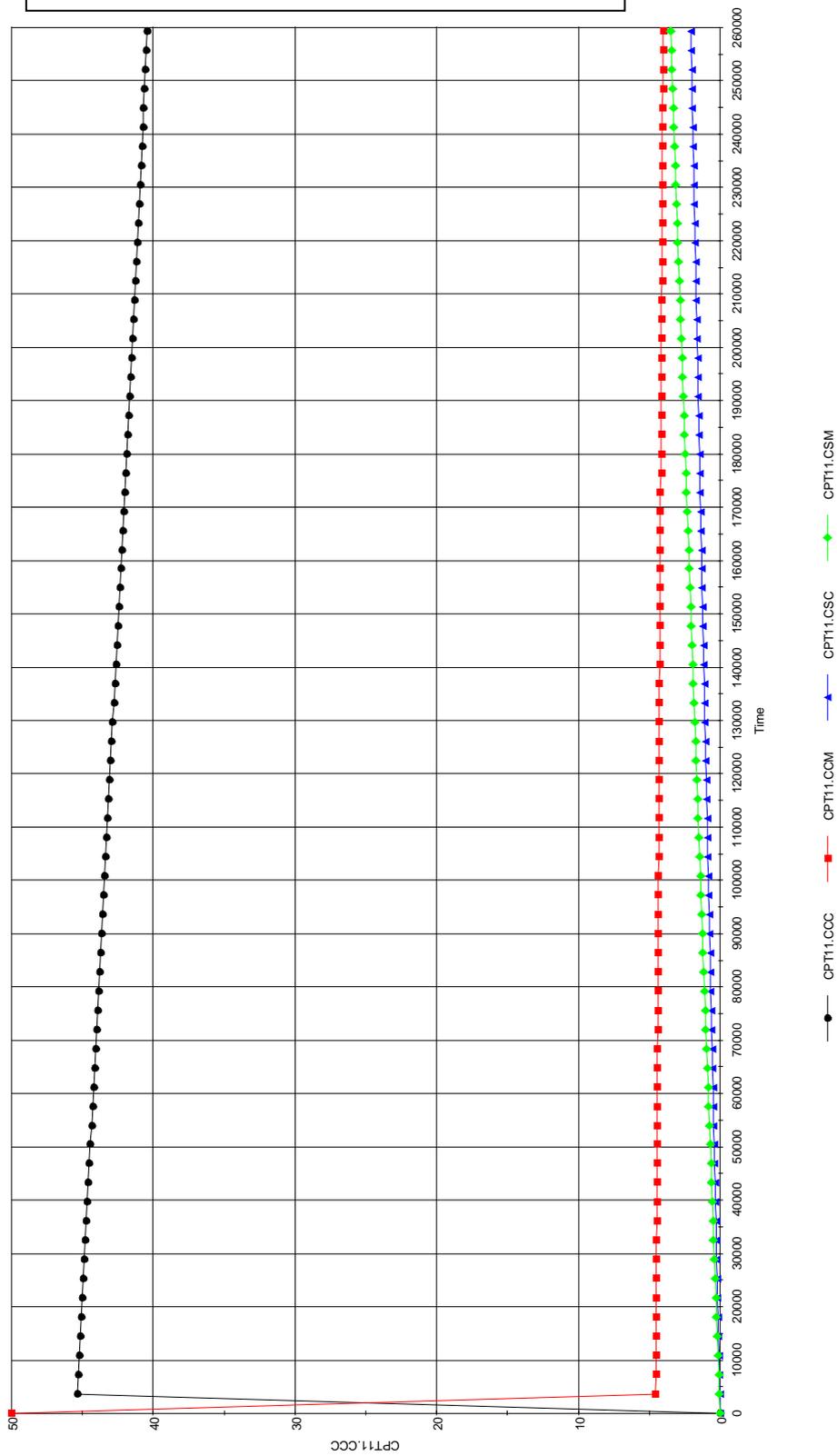
$k_2=0.1k_1$ [/cell/sec], $k_{ces}=5E-10$ [/cell/sec]



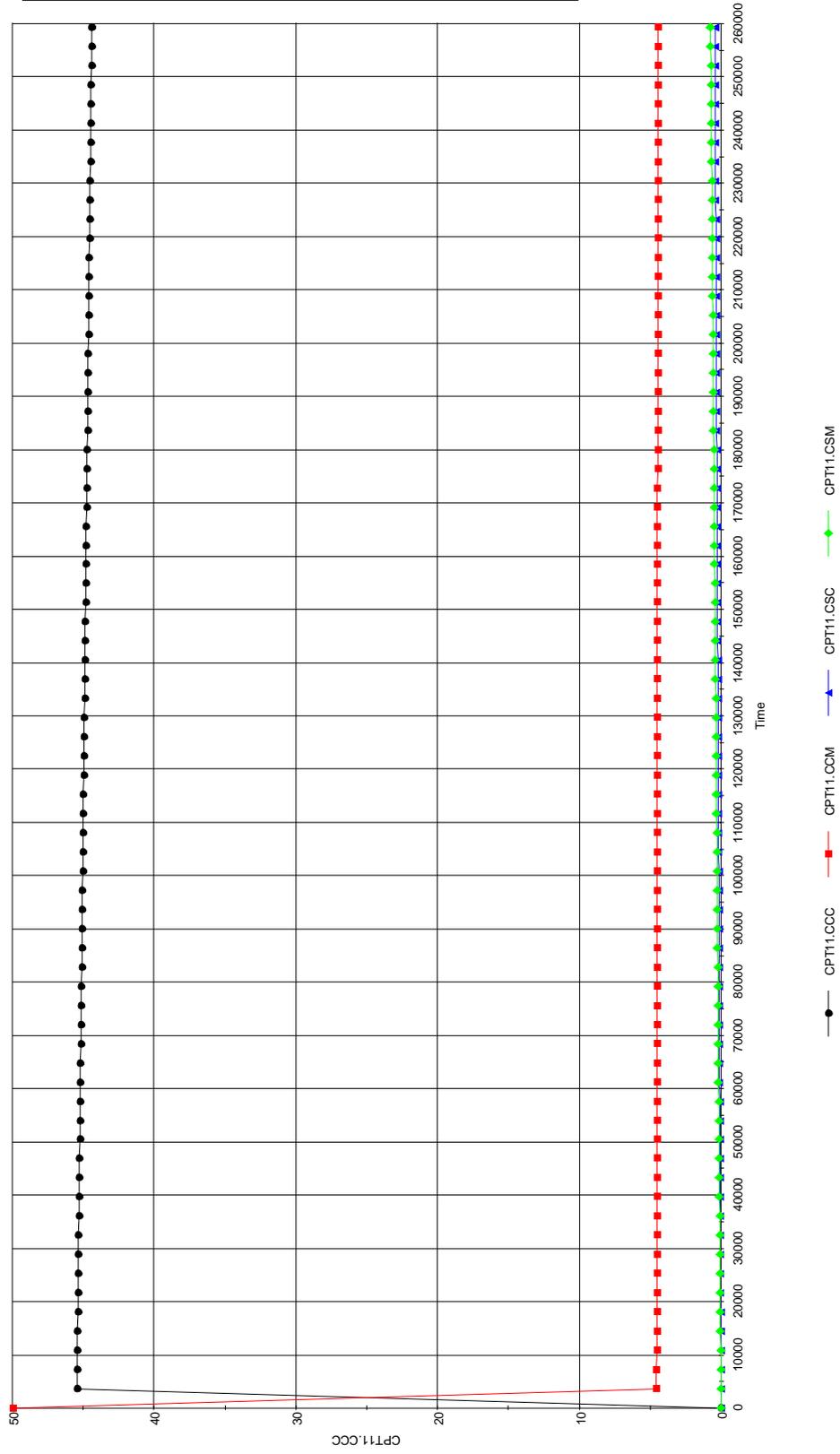
$k_2=0.1k_1$ [1/cell/sec], $k_{cs}=1E-10$ [1/cell/sec]



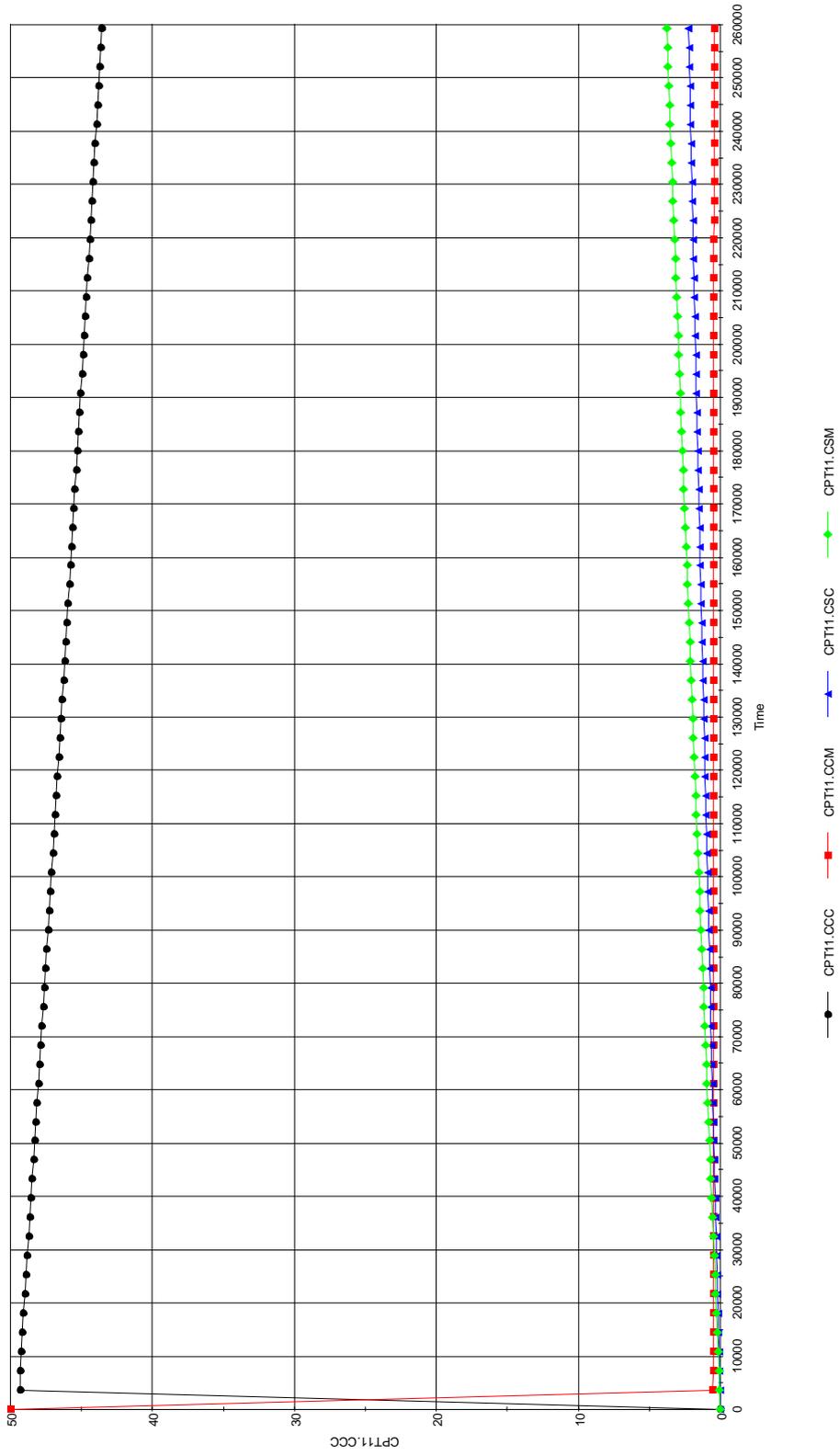
$k_2=0.1k_1$ [1/cell/sec], $k_{cs}=5E-11$ [1/cell/sec]



$k_2=0.1k_1$ [/cell/sec], $k_{ces}=1E-11$ [1/cell/sec]



$k_2=0.01k_1$ [/cell/sec], $k_{ces}=5E-11$ [1/cell/sec]



$k_2=0.01k_1$ [/cell/sec], $k_{ces}=1E-11$ [1/cell/sec]

