

創薬安全性評価におけるスフェロイド細胞培養について

堀井郁夫

日本ロシュ(株)研究所・前臨床科学研究部

創薬安全性評価におけるハイスループット・トキシコロジーと In vitro 細胞培養の必要性と有用性

創薬の早期段階での安全性評価には早く、出来るだけ高い検出力で、多くの検体に付いて毒作用の評価が出来る事、すなわち In vitro の細胞培養系を中心とした HTP-Tox スクリーニング・システム系の構築が求められる。その評価としては、(1) 当該化合物の毒作用の予知、(2) 毒性学的標的变化を基とした化合物のランキング、(3) 医薬品開発における安全性評価上の問題点の早期指摘などを常に考慮することが求められる。よって、HTP-Tox による安全性評価の毒性学的なエンドポイントの設定は、通常の毒性試験と異なる事が多々ある。また、未だ他に良い検出方法がなく評価システムのバリデーションは完全でなくても、ある程度の毒作用判定が出来るような場合は、その手法は積極的に系として取り上げるようになってきている。

In vitro HTP-Tox の導入とスフェロイド細胞培養系

HTP-Tox の毒性評価に有効な結果が得られる方法の一つとして、In vitro のシステムの開発が広く求められてきているが、In vitro 試験は少量の化合物でも実施可能であり、分子および細胞レベルでの毒性評価を行うことができる。必要とあらばヒト細胞・組織の利用が考慮され、また初代単層細胞培養だけでなく細胞集合塊(スフェロイド)の利用も有効な手段である。この手法では、分子および細胞レベルでの毒性に加え、機能的および形態学的な評価が可能となってくる利点がある。更には、これらの評価にあたっては、主要臓器およびその薬物の標的臓器を用いた細胞による In vitro 細胞培養システムや遺伝子チップシステムを平行して利用することにより、より有意義な結果が得られると考えられる。すなわち、In vitro 細胞培養システムや遺伝子チップシステムはそれ自体、一つのリード化合物のスクリーニングシステムとして有用である。

機能細胞としてのスフェロイドの有用性と意義、将来の展望については、創薬におけるモレキュラー・ターゲッティングからリード化合物設定、リード化合物適正化、臨床適用候補化合物選定までの過程で、より In vivo に近い状態での系が望まれている事からも、スフェロイド細胞培養による HTP-Tox In vitro

系の必要性は、将来、益々高くなると考えられる。

スフェロイド細胞培養の特長(長所・短所：Monolayer 細胞培養との比較)

スフェロイド細胞培養の優れた点：

1. 細胞の構築が3次元的で、臓器の構造に類似するために、形態学的評価が可能である。
2. 細胞間の相互作用、及び細胞と細胞間物質との相互作用が In Vivo に近い状態に保たれるために、細胞の機能が長期間維持できる。
3. 単一の細胞集団だけではなく、臓器を構成する種々の細胞種を含んだ培養系を構成することができるために、標的細胞等の評価もできる。
4. 種類の異なる臓器からの Spheroids を供培養することにより、複雑な臓器間の相互作用を考慮に入れた系を構成することができる。

スフェロイド細胞培養の劣る点：

1. 培養開始から Spheroids を構成するまでに一定期間を要する。
2. 培養条件が、やや複雑である。
3. Spheroids の大きさによっては、中心部が低酸素、低栄養状態になる場合がある。
4. 単純な細胞毒性の評価には向かない。

創薬安全性評価におけるスフェロイド細胞培養の利用例

一般的には、創薬における In vitro スクリーニング系として、毒性学的に主要な器官・組織の細胞培養の基本的な系は確立しておく事が要求され、それを基とした当該化合物に合わせた応用的な系を用いる事が創薬には要求される。もちろん当該化合物特有の毒作用標的臓器・組織に対応した In vitro HTP-Tox スクリーニング系を設定する事は、最優先にやらねばならない事となる。これらのいくつかの例について、系のバリデーションのための陽性対照例の結果を含めて以下に簡単に紹介する。その他、In vitro HTP-Tox スクリーニング・システムで利用され得る細胞・組織・器官系についても紹介するが、これらの系の選択については、当該プロジェクト毎に適宜採用されるべきで、ケース・バイ・ケース的に柔軟な利用が効果を高めるので、固定化してシステムにスクリーニング系として導入しない事が重要である。

以下に、いくつかの検討例を示す。

- (1) In vitro 肝毒性評価系としてのラット・サル肝スフェロイド系の検討
- (2) In vitro 神経毒性評価系としてのラット脳スフェロイド系の検討
- (3) In vitro 甲状腺スフェロイド培養系の毒性試験系の検討
- (4) ラット胎仔初代培養肺細胞を用いた in vitro 毒性評価系の検討
- (5) その他の系の可能性