

薬物性肝障害の予測を目指した in vitro評価系の構築

Construction of in vitro system for predicting drug-induced liver injury

竹村 晃典
Akinori Takemura

千葉大学大学院 薬学研究院 生物薬剤学研究室(助教)
Laboratory of Biopharmaceutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University (Assistant Professor)

KEYWORD ▶ 薬物性肝障害 in vitro評価 共培養 肝再生

はじめに

01

薬物性肝障害(Drug-induced liver injury:DILI)は、薬物が安全性の問題によって開発中止となるだけでなく上市後の市場撤退においても主たる原因の1つとなる。その要因として、DILIの多くは用量や薬効とは無関係に(特異体質的に)発症するため、実験動物を用いた前臨床試験での肝毒性検出が困難であることが挙げられる。そのため、DILI予測には様々な細胞種を用いたin vitro肝毒性評価が実施され、ある一定の精度でその予測は可能になりつつあるが、いまだ不十分である。その要因として、i)DILI発症機序が複雑であり、重要な評価ポイントを見落としている可能性、ii)評価に用いる細胞種と生体内肝臓の差異、が考えられる。これらを改善するには、動物や高次な細胞系を用いたDILI発症の詳細な機序の解明ならびに生体内の肝臓を適切に表現するin vitro評価系の開発の両方を進め、構築した評価系の妥

当性を検証することが必須である(図1)。本総説では、これらのポイントについて著者の研究成果と他の研究グループの最新の情報を交えて概説する。

DILI予測評価の取り組み

02

これまでにDILIの予測を指向した様々なin vitro評価系が報告されており、過去10年間ににおける海外メガファーマの取り組みについては著者が以前執筆した総説を参考にさせていただいた¹⁾。簡潔にまとめると、i)従来は単一の評価系で試験を進めていたが、DILI発症の複雑さを考慮し、複数の評価系から得られた結果を適切に解析してDILI判定することが一般的となったこと、ii)実施する評価項目の絞り込みが進み、反応性代謝物の生成に着目した評価、ミトコンドリア障害に着目した評価、胆汁うっ滞に



図1 薬物性肝障害予測に向けた戦略

関わるトランスポーターの阻害能評価が多く実施されたこと、iii) in vitro毒性評価のみならず、薬物動態パラメーターや化合物の物理化学的特性なども加味した解析も盛んに行われていること、がDILI予測の潮流となっている。また、国内の製薬企業においても、近年はDILI予測を目的としたin vitro評価系の構築がなされており(反応性代謝物²⁾、ミトコンドリア毒性³⁾、胆汁うっ滞毒性^{4, 5)}、国内外問わず同じ認識となっている。著者らもDILIRISKに依拠して薬物を抽出し、独自に構築したミトコンドリア毒性評価系ならびに胆汁うっ滞毒性評価系で取得したin vitroデータを基に、加点法や人工ニューラルネットワークにてアルゴリズムを作成することで、DILIRISKを予測する方法を報告している⁶⁾。ここで実施した評価系の一部はスループット性がよく、評価系の安定性なども加味された中で受託試験としても広く採用されている。一方で、これら手法の予測精度は概ね感度・特異度が80%前後であり、DILI予測の精度をさらに向上させるためには新たな評価系を構築する必要がある。その点について、著者らが現状不十分であると考えた毒性機序、その中でもミトコンドリア毒性について、i) 毒性機序に基づいた評価系の構築⁷⁾、ii) 使用する細胞株と新規培養基材を用いた薬物代謝を加味したミトコンドリア毒性評価系の構築^{8, 9)}、について紹介をさせていただきたい。

ミトコンドリア膜透過性遷移に着目した評価系の構築

03

肝臓はエネルギー産生・貯蔵において非常に重要な臓器であり、その中でミトコンドリアは大きな寄与を示す。このため、古くからミトコンドリア毒性とDILI発症の関係については問題提起がなされており、米国では多くの薬物がミトコンドリア毒性を有すると添付文書の黒枠警告に記載されている¹⁰⁾。

現状のミトコンドリア毒性評価は、i) 培地中の糖源をグルコースからガラクトースに置き換えた培地にて薬物毒性を評価し、グルコースならびにガラクトース培地条件下で得られた値の比からミトコンドリア毒性を評価する手法(glucose/galactose assay)、ii) 蛍光試薬を用いてミトコンドリア膜電位評価やreactive oxygen species (ROS)を検出する手法、iii) Agilent社が販売している細胞外フラックスアナライザーを用いて酸素消費量を測定する手法、によって行われている。比較的簡便に行えるglucose/galactose assayについて当研究室で検証したところ、ミトコンドリアの呼吸鎖阻害や酸化ストレスに起因した毒性を検出することは可能であったが、その他の毒性機序については見落とす可能性があった¹¹⁾。ミトコンドリア膜透過性遷移(mitochondria permeability transition:MPT)がその1つである。MPTとは、ミトコンドリアの内膜と外膜を貫く孔が形成され、制御なく物質が流出入する現象である。MPTは、膜電位の消失によってATP産生を著しく低下させ、また、ミトコンドリアからのアポトーシス誘導因子の放出を介して細胞死を誘導する。劇症肝炎を引き起こす医薬品化合物の一部にもMPT誘導能が

報告されている¹²⁾。従来のMPT評価法としては、げっ歯類の肝臓より単離した新鮮ミトコンドリアを用いる方法が存在する。しかし、特に代謝物の影響を加味できる培養細胞での評価系は未確立であり、MPTがDILIRISKの予測に与える影響は現時点で不明である。当研究室では実験動物を用いた解析により、薬物処置時のMPT感受性増強には虚血再灌流によるミトコンドリアでのROS発生が重要であることを見出し、このような状況を培養細胞系にて模倣することで、MPTに起因した肝細胞毒性を検出できる系の構築に成功した⁷⁾。この系での評価は十数化合物に留まっており、DILI予測能の改善にどこまで影響を与えるか不明であるが、このような試みは継続していきたいと考えている。

薬物代謝を加味したミトコンドリア毒性評価系の構築

04

肝毒性の発症機序の1つとしてミトコンドリア毒性が着目されているが、ミトコンドリアは様々な臓器の実質細胞においてエネルギー産生に関わる非常に重要なオルガネラであり、肝臓は心臓や腎臓よりもミトコンドリア含量が少ないことが知られている。ミトコンドリア毒性のみを持つだけでは肝毒性につながるとは言えず、著者らは肝臓特有の機能が関わっていると考え、まずは肝細胞で産生された代謝物によるミトコンドリア毒性の可能性を検証することにした。第2章に記載したとおり、これまでも代謝活性化によるDILI発症は広く受け入れられていた。例えば、acetaminophenによるDILI発症機序は、cytochrome P450 (CYP) 2E1によって代謝された反応性代謝物がミトコンドリア毒性を誘発すると考えられている。しかしながら、従来のglucose/galactose assayは肝がん由来細胞株であるHepG2細胞が主として使用されるため、薬物代謝の寄与を適切に評価できていない。この問題を解決するために、HepG2細胞に主要な薬物代謝酵素を遺伝子導入した細胞の作製を試みた。遺伝子導入は一般的にアデノウィルスなどが用いられるが、複数の遺伝子を同時に導入することが困難であることや、一過性の発現系に留まりスループット性や評価の安定性が低いといった問題がある。そこで、著者らは鳥取大学香月教授らのグループが開発した人工染色体ベクターを用いてHepG2細胞に主要な薬物代謝酵素(CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4)を発現させ、TC-Hep細胞を作製した⁸⁾。被験物質は、未変化体が強い毒性を示す呼吸鎖阻害剤のrotenoneを使った。TC-Hep細胞とglucose/galactose assayを組み合わせることで、HepG2細胞をガラクトース培養した条件に比べてrotenoneの毒性感受性が低下することを確認した。そこで、この条件にて新薬としての開発が中止された化合物の毒性評価を行うこととした。CP-724714は、臨床試験にて肝障害マーカーの上昇を認めて開発中止となり、in silicoの解析から代謝物がミトコンドリア毒性を示す可能性が示唆された化合物である。そこで、HepG2細胞ならびにTC-Hep細胞を用いて解析したところ、TC-Hep細胞においてグル

コース培地条件下と比較してガラクトース培地条件下で毒性感受性が高まった。CP-724714と同様の理由で開発中止に至った他の4つの化合物(ADX-10059, CP-456773, TAK-875, zamifenacin)についても本条件下での評価を実施したところ、zamifenacinにおいて同様の結果を得ることができた。従来法では検出できなかった毒性がわかり、肝毒性発現機序が不明であった化合物の推定も行えたことから、本系は新たな肝毒性in vitro評価法の1つとなりうる可能性が示された。一方、本系は強制発現させた薬物代謝酵素の寄与は評価できるものの、その他の薬物代謝酵素の寄与は考慮されておらず、この点については初代ヒト肝細胞を用いた評価系の構築が望ましい。凍結初代ヒト肝細胞は、肝毒性in vitro評価のゴールドスタンダードであるが、凍結によってミトコンドリアが損傷を受けてその機能が低下しており、ガラクトース培養が困難である¹³⁾。また、従来の初代肝細胞培養法の問題点として酸素供給性が挙げられる。肝細胞はミトコンドリアによる酸素消費が盛んであるが、従来用いられているポリスチレン製の細胞培養用プレートは酸素透過性が低く、気液界面からの酸素供給に限られる。したがって、その供給スピードでは肝細胞の酸素要求量に到達することができず、肝細胞が嫌気条件で培養されることになる¹⁴⁾。これを改善するため、酸素透過性基材を用いたプレートの作製が行われており、その多くがポリジメチルシロキサン製である。しかし、ポリジメチルシロキサンは一般的なインキュベーターの温度条件下ではゴム状の性質を示し、低分子化合物がその間隙に入り込んで収着することが知られており、薬物の評価には不向きであった。これを改善するプレートとして、低収着性・高酸素透過性素材であるポリメチルペンテンで作製されたInnoCellプレート(三井化学株式会社)が開発されている。著者が本プレート上で初代ラット肝細胞を培養すると、乳酸産生量が低下するだけでなく、細胞内のTCA回路の中間代謝物量が上昇し、ミトコンドリア機能の賦活化が確認できた⁹⁾。また、それだけでなく、薬物代謝酵素についても遺伝子発現量ならびにその活性が増強することも確認した。この培養条件下で、反応性代謝物による毒性感受性ならびにミトコンドリア毒性感受性について評価すると、その毒性感受性が増強し、一部の化合物ではCYP阻害剤を前処置することで、その毒性が減弱することも確認した。本検討は初代ラット肝細胞での取り組みに留まっているが、初代ヒト肝細胞の培養条件を様々な点で見直し、生体に近い肝細胞の状態を模倣することで、適切な肝毒性in vitro評価につながると考えている。

胆汁うっ滞に関わるin vitro評価系

05

胆汁うっ滞型肝障害には様々な疾患が知られ、その1つに進行性家族性肝内胆汁うっ滞症(Progressive familial intrahepatic cholestasis:PFIC)がある。PFICの発症には、肝細胞の毛細胆管膜に発現し、胆汁酸の輸送を担うトランスポー

ター(bile salt export pump:BSEP)の遺伝子変異が関与していることがわかっている。この発見を契機とし、胆汁うっ滞型DILI発症機序の1つとして薬物によるBSEP阻害が注目されている。この評価に用いられるBSEP発現膜ベシクルは、簡便に実施できる有用なツールではあるが、いくつかの問題点がある。その1つは薬物代謝の影響が考慮されていないことである。重篤なDILI発症が認められて市場撤退に陥ったtroglitazoneは、その主たる代謝物の硫酸抱合体が未変化体よりも強いBSEP阻害能を有しており¹⁵⁾、このような薬物については過小評価する可能性がある。さらに、BSEP阻害により毒性発症に至るかどうかも不明である点も問題として挙げられる。そこで著者らは、胆汁酸の方向性輸送を有する培養肝細胞(サンドイッチ培養した初代肝細胞やHepaRG細胞)を用いて、胆汁うっ滞型DILIの原因となる肝細胞内への胆汁酸蓄積に伴う細胞毒性を検出するin vitro評価系の構築に取り組んできた⁶⁾。既に報告した論文内容を簡潔に記載する。胆汁酸の方向性輸送を有する肝細胞に至適量の胆汁酸と薬物を共曝露し、細胞内に蓄積した胆汁酸に起因した毒性を評価する系(BAtox)を構築した。しかし、BAtoxは一部の薬物に対して、初代ヒト肝細胞のロット間差の影響を強く受けることが明らかとなった¹⁶⁾。薬物代謝能などのロット間差が生じにくい細胞リソースと組み合わせれば、より安定した評価を継続的に実施できるようになるかもしれない。現在もこの系の改善に向けた評価を実施しており、その詳細は成果がまとまり次第みなさまと共有できればと考えている。

胆汁うっ滞型DILIの評価に関しては、我々だけでなく他の研究グループも細胞ベースの評価系構築が進められている。その1例として、武田薬品工業のグループから報告されたPXB-cells(株式会社フェニックスバイオ)と蛍光基質を用いた評価が挙げられる⁴⁾。PXB-cellsは、凍結することなくユーザーの元に提供される新鮮初代ヒト肝細胞であり、同一ロット由来の肝細胞を使用し続けられるメリットがある。この細胞と凍結初代ヒト肝細胞をサンドイッチ培養し、胆汁酸の蛍光アナログであるcholy-L-lysyl-fluorescein (CLF)を添加して毛細胆管の形成度合を評価すると、PXB-cellsの方が凍結初代ヒト肝細胞よりも顕著に毛細胆管が形成されることが確認された。また、BSEP阻害薬の陽性化合物であるcyclosporin Aを処置してCLFの排泄阻害を評価すると、PXB-cellsの方がより低濃度での阻害が見られることや、凍結初代ヒト肝細胞で見られたロット間のバラつきが軽減されることも確認された。この系に対して45種類の薬物を用いた評価を実施すると、胆汁うっ滞・混合型の薬物についてはより低濃度でCLF排泄が阻害されており、各薬物について最高血中濃度との比を算出し、カットオフ値を20に設定したところ、胆汁うっ滞・混合型に分類される薬物のうち90%以上の化合物が陽性と判定された。また、武田薬品工業のグループはiPS細胞より作製した肝オルガノイドを用いた検討も行っている¹⁷⁾。CYP2C9の野生型・一塩基多型を有する肝オルガノイドをそれぞれ作製し、その遺伝子変異が原因でDILIが発症するとされているbosentanを用いた胆汁うっ滞毒性評価もなされている。新たな実験ツール

が開発されることで、これまで未解明であった毒性発現機序の解析が進み、それを基に適切な評価系が構築され、DILI予測の精度の向上につながることを期待する。

高次な肝毒性in vitro評価系の現状

06

著者らの研究成果も含め、これまでに述べてきた評価系の多くは短期毒性(薬物曝露から24時間以内)を対象としている。しかし、臨床でDILI発症に至るのは薬物の服用から数日後、長い場合は数か月後のことであるから、長期毒性を示す化合物についても適切に評価する必要がある。初代肝細胞は培養に伴い肝細胞機能が急速に低下するため、長期培養が可能なスフェロイド培養法が開発され毒性評価に応用されてきた。実際に初代ヒト肝細胞を用いて作製したスフェロイドに被験化合物123種を14日間曝露すると、感度69%・特異度100%でその毒性を検出できただけでなく、動物の種差を反映した毒性の評価も可能となった¹⁸⁾。しかしながら、引用文献の中では他の培養法との直接的な比較は行われておらず、既報のデータを基に感度・特異度が向上したことを示したに過ぎない。この点について、海外のメガファーマが共同で行った検討が参考になる。この検討では、スフェロイド培養およびマトリゲルを用いたサンドイッチ培養条件下で長期培養時の各種評価を実施した。各条件において薬物代謝酵素の遺伝子発現やその活性を評価すると、概ねスフェロイド条件下で上昇していることが確認された。また、毒性評価についても、acetaminophen、diclofenac、troglitazone、fialuridineといった臨床で重篤なDILIを発症する化合物が、臨床の最高血中濃度の10倍以下の濃度で毒性が検出された¹⁹⁾。このように、適切な比較対象を設定しながら長期培養(長期曝露)を行うこと、また、スフェロイド化によって肝細胞機能を維持することが毒性感受性の増強につながることを示された。

これまでの評価系は肝細胞単独での評価に留まっているが、一部の薬物は様々な経路を介して自然免疫もしくは獲得免疫を活性化し、DILIを発症させることがある。国内であれば金沢大学・名古屋大学で研究室を主宰されていた横井毅先生のグループ、海外ではトロント大学のDr. Jack Uetrechtのグループが多くのDILIモデルを作出しており、詳細についてはそれぞれの総説を参照いただきたい^{20, 21)}。このように、in vivoで見出された機序を基にin vitroで模倣する試みもなされ、その1つとして薬物処置後に肝細胞から放出されるdamage-associated molecular patterns (DAMPs)に着目した評価系も構築されてきた。大阪薬科大学の加藤隆児教授のグループは、スフェロイド培養により薬物代謝酵素活性などの肝細胞機能が向上するヒト肝がん由来細胞(functional liver cell-4:FLC-4)に被験薬を曝露し、その培養上清を急性単球性白血病由来のヒト単球株であるTHP-1細胞に添加すると、IL-1 β の産生が顕著に上昇することをamodiaquine、niraparitin、carbamazepineなどで見出

した^{22, 23)}。特にcarbamazepineの評価ではCYPによる代謝物がインフラマソームを活性化させる可能性を示しており、炎症反応に起因した評価を簡便に行えると思われた。肝臓には実質細胞である肝細胞のほかに類洞内皮細胞や星細胞などの非実質細胞が存在しており、これらを共培養した検討も進められている。In sphero社の3D human liver microtissues (hLiMT)を用いた検討は²⁴⁾、DILI陽性化合物を2週間曝露した際の毒性検出感度が向上することを示している。しかし、その比較対象は2次元培養された初代ヒト肝細胞に薬物を2日間曝露した条件が設定されており、この毒性感受性がどこに起因したのかは不明である。この疑問点への回答をアストラゼネカ社のグループがacetaminophenを代表薬として解析している²⁵⁾。非実質細胞と共培養した条件ではacetaminophenによる毒性感受性が低下したこと、また、生成された代謝物や薬物代謝酵素の遺伝子発現解析の結果より、反応性代謝物が生成しにくい条件に起因して本現象が生じたと考えられた。より高次な系としては、iPS細胞由来の肝オルガノイドや生体模倣システム(microphysiological system:MPS)の利用などが挙げられる。このような複雑なin vitro評価モデル(complex in vitro model:CIVM)は非常に高価であり、スループット性にも欠けているため、CIVMの開発者はユーザーニーズを十分にくみ取りながらそのモデルの有用性を適切に主張し、従来の簡便な評価系(2次元培養や非細胞系)で評価すべき事項と区別する必要がある。ユーザー側も正しく情報を解釈するために、i)比較対象の評価系は適切か、ii)流路系が存在する場合は流路の体積を加味した評価になっているか、iii)被験化合物で用いられている化合物が恣意的に選択されていないか、などを読み取りながら評価系を構築することが必要だと考える。特にiii)の化合物選択については、開発者とユーザーの両者にとって、より多くの化合物を評価してあることが望ましいが、その限度は存在する。本年公開された論文にて、専門家によってDILI陽性化合物・陰性化合物の代表薬として10化合物ずつ選択されたことから²⁶⁾、この基準のもとで評価を行い、それを基に議論することが必要だと考えられる。

肝再生過程に着目した研究

07

上述してきた評価系はシンプルな評価系からCIVMまで様々なあるが、それらのほとんどは肝細胞死もしくは肝細胞内での機能異常をとらえる評価系となっている。一方、臨床の現場では、致死性のDILIに至る症例としてHy's lawの基準を満たすような血漿マーカーの値(高ALT値、高ビリルビン値)を示し、被疑薬の服用を休止しても、ALT値は低下するがビリルビン値は高値を示し続ける症例が存在する²⁷⁾。このことから、薬物により肝機能の回復(肝再生)が遅延し、むしろ増悪していると想定できる。そこで著者らは、“薬物による肝再生プロセスの阻害が、肝障害の増悪・重篤化を引き起こし、それが重篤なDILIにつながっているのでは

ないか”と仮説を立てた。ビリルビン値が高値を示していたことから、胆汁排泄の起点となる毛細胆管構造の形成・伸長に着目して検討を進め、重篤なDILIを発症し、国内において緊急安全性情報が発出されたbenzbromarone²⁷⁾をモデル薬物として解析を行った。サンドイッチ培養したマウス肝細胞にbenzbromaroneを曝露すると毛細胆管構造の形成が著しく抑制され、著者らが独自に作製したマウスのin vivoモデルでは、benzbromarone処置によってALTや総ビリルビン値が上昇することを確認した²⁸⁾。このことから、薬物による毛細胆管構造の形成・伸長の抑制が肝再生過程を介して肝障害に影響を与えることを示すことができた。しかし、この毛細胆管伸長は肝細胞だけで起こる肝再生プロセスを観察しているにすぎない。一般的に肝再生プロセスは障害時に惹起される炎症反応により進行することが知られている。活性化した炎症関連細胞が傷害を受けた細胞を除去し、その後放出される増殖因子により肝細胞の増殖が進行する。この点について、実験動物で肝障害を引き起こすことができるacetaminophenを用いた研究が盛んに行われ、Yangらのグループは好中球に着目した検討を行っている²⁹⁾。一般的に、障害部位に遊走された好中球はプロテアーゼやROSにより障害の増悪に関与することが知られているが、炎症反応を収束させる液成因子を放出することや、組織修復の機能があることなども報告されている。本仮説を検証するために、acetaminophen投与6時間後に好中球の中和抗体を投与し、72時間後の血清マーカーを測定したところ、中和抗体投与群でALTが高値を示し、壊死した領域が多く残存することが示された。また、一般的に肝再生能は年齢を重ねるに伴いその能力が低下する。東京大学医科学研究所の谷水直樹准教授のグループは、若齢マウスと老齢マウスにacetaminophenを投与すると、48時間後までの生存率が老齢マウスで顕著に低下することを見出している³⁰⁾。その要因として、遊走するマクロファージ数が減少し、傷害を受けた肝細胞が残存することで、肝臓の修復が遅延することが提唱されている。現状wound-healing processを反映できるin vitro評価系は存在せず、この現象をin vitroで評価することは難しいが、今後の細胞培養技術の発展により可能になることを期待している。

おわりに

08

DILI発症のメカニズムの解明とそれに基づくin vitro評価系の構築は古くから行われているが、ここ数年の研究に着目してもその進歩は著しい。本総説では触れなかったが、大量のデータを基にしたin silicoによるDILI予測も盛んに実施され、それに伴いどこが重要なポイントなのか判別できない状況になりつつある。これを打破するためには、毒性研究者だけでなく、医学・工学・データサイエンスなど様々な分野の研究者が協力して適切な解析を行うことが必要不可欠である。評価系を実際に使用する企業研究者とも密にコミュニケーションを取り合い、より良いDILI評価系が構築されることを期待する。

著者の利益相反:開示すべき利益相反はない。

参考文献

1. 竹村 晃典, 伊藤 晃成. In vitro 肝毒性評価の進歩. 日本薬理学雑誌. 2020, 155, 6, 401-405.
2. K. Harada, H. Kohara, T. Yukawa, K. Matsumiya, and T. Shinozawa. Cell-based high-throughput screening for the evaluation of reactive metabolite formation potential. *Toxicol In Vitro*. 2021, 74, 105159.
3. Y. Sanuki, T. Araki, O. Nakazono, and K. Tsurui. A rapid mitochondrial toxicity assay utilizing rapidly changing cell energy metabolism. *J Toxicol Sci*. 2017, 42, 3, 349-358.
4. H. Kohara, P. Bajaj, K. Yamanaka, A. Miyawaki, K. Harada, K. Miyamoto, T. Matsui, Y. Okai, M. Wagoner, and T. Shinozawa. High-Throughput Screening to Evaluate Inhibition of Bile Acid Transporters Using Human Hepatocytes Isolated From Chimeric Mice. *Toxicol Sci*. 2020, 173, 2, 347-361.
5. T. Koga, K. Takeuchi, and K. Umehara. Establishment of an in vitro cholestasis risk assessment system using two-dimensional cultured HepaRG cells and 12 bile acids. *J Toxicol Sci*. 2023, 48, 1, 47-56.
6. M. Kawaguchi, T. Nukaga, S. Sekine, A. Takemura, T. Susukida, S. Oeda, A. Kodama, M. Hirota, H. Kouzuki, and K. Ito. Mechanism-based integrated assay systems for the prediction of drug-induced liver injury. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2020, 394, 114958.
7. Y. Ikeyama, T. Sato, A. Takemura, S. Sekine, and K. Ito. Hypoxia/reoxygenation exacerbates drug-induced cytotoxicity by opening mitochondrial permeability transition pore: Possible application for toxicity screening. *Toxicol In Vitro*. 2020, 67, 104889.
8. A. Takemura, S. Gong, T. Sato, M. Kawaguchi, S. Sekine, Y. Kazuki, T. Horie, and K. Ito. Evaluation of Parent- and Metabolite-Induced Mitochondrial Toxicities Using CYP-Introduced HepG2 cells. *J Pharm Sci*. 2021, 110, 9, 3306-3312.
9. A. Takemura, S. Ishii, Y. Ikeyama, K. Esashika, J. Takahashi, and K. Ito. New in vitro screening system to detect drug-induced liver injury using a culture plate with low drug sorption and high oxygen permeability. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2023, 52, 100511.
10. J.A. Dykens and Y. Will. The significance of mitochondrial toxicity testing in drug development. *Drug Discov Today*. 2007, 12, 17-18, 777-785.
11. C. Liu, S. Sekine, and K. Ito. Assessment of mitochondrial dysfunction-related, drug-induced hepatotoxicity in primary rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2016, 302, 23-30.
12. G. Labbe, D. Pessayre, and B. Fromenty. Drug-induced liver injury through mitochondrial dysfunction: mechanisms and detection during preclinical safety studies. *Fundam Clin Pharmacol*. 2008, 22, 4, 335-353.
13. Y. Ikeyama, T. Sato, A. Takemura, S. Sekine, and K. Ito. Successful energy shift from glycolysis to mitochondrial oxidative phosphorylation in freshly isolated hepatocytes from humanized mice liver. *Toxicol In Vitro*. 2020, 65, 104785.
14. Y. Sakai, M. Nishikawa, F. Evenou, M. Hamon, H. Huang, K.P. Montagne, N. Kojima, T. Fujii, and T. Niino. Engineering of implantable liver tissues. *Methods Mol Biol*. 2012, 826, 189-216.
15. C. Funk, C. Ponelle, G. Scheuermann, and M. Pantze. Cholestatic potential of troglitazone as a possible factor contributing to troglitazone-induced hepatotoxicity: in vivo and in vitro interaction at the canalicular bile salt export pump (Bsep) in the rat. *Mol Pharmacol*. 2001, 59, 3, 627-635.
16. T. Susukida, S. Sekine, M. Nozaki, M. Tokizono, and K. Ito. Prediction of the Clinical Risk of Drug-Induced Cholestatic Liver Injury Using an In Vitro Sandwich Cultured Hepatocyte Assay. *Drug Metab Dispos*. 2015, 43, 11, 1760-1768.
17. T. Shinozawa, M. Kimura, Y. Cai, N. Saiki, Y. Yoneyama, R. Ouchi, H. Koike, M. Maezawa, R. R. Zhang, A. Dunn, A. Ferguson, S. Togo, K. Lewis, W. L. Thompson, A. Asai, and T. Takebe. High-Fidelity Drug-Induced Liver Injury Screen Using Human Pluripotent Stem Cell-Derived Organoids. *Gastroenterology*. 2021, 160, 3, 831-846.
18. S. U. Vorrink, Y. Zhou, M. Ingelman-Sundberg, and V. M. Lauschke. Prediction of Drug-Induced Hepatotoxicity Using Long-Term Stable Primary Hepatic 3D Spheroid Cultures in Chemically Defined Conditions. *Toxicol Sci*. 2018, 163, 2, 655-665.
19. C. C. Bell, A. C. A. Dankers, V. M. Lauschke, R. Sison-Young, R. Jenkins, C. Rowe, C.E. Goldring, K. Park, S. L. Regan, T. Walker, C. Schofield, A. Baze, A. J. Foster, D. P. Williams, A. W. M. van de Ven, F. Jacobs, J. V. Houdt, T. Lähteenmäki, J. Snoeys, S. Juhila, L. Richert, and M. Ingelman-Sundberg. Comparison of Hepatic 2D Sandwich Cultures and 3D Spheroids for Long-term Toxicity Applications: A Multicenter Study. *Toxicol Sci*. 2018, 162, 2, 655-666.
20. 横井 毅. 薬物性肝障害評価研究の進歩. 日本薬理学雑誌. 2020, 155, 5, 323-328.
21. J. Uetrecht. Mechanistic Studies of Idiosyncratic DILI: Clinical Implications. *Front Pharmacol*. 2019, 10, 837.
22. R. Kato and J. Uetrecht. Supernatant from Hepatocyte Cultures with Drugs That Cause Idiosyncratic Liver Injury Activates Macrophage Inflammasomes. *Chem Res Toxicol*. 2017, 30, 6, 1327-1332.
23. R. Kato, Y. Ijiri, T. Hayashi, and J. Uetrecht. The 2-Hydroxyiminostilbene Metabolite of Carbamazepine or the Supernatant from Incubation of Hepatocytes with Carbamazepine Activates Inflammasomes: Implications for Carbamazepine-Induced Hypersensitivity Reactions. *Drug Metab Dispos*. 2019, 47, 10, 1093-1096.
24. W. R. Proctor, A. J. Foster, J. Vogt, C. Summers, B. Middleton, M. A. Pilling, D. Shienson, M. Kijanska, S. Ströbel, J. M. Kelm, P. Morgan, S. Messner, and D. Williams. Utility of spherical human liver microtissues for prediction of clinical drug-induced liver injury. *Arch Toxicol*. 2017, 91, 8, 2849-2863.
25. C. C. Bell, B. Chouhan, L. C. Andersson, H. Andersson, J. W. Dear, D. P. Williams, and M. Söderberg. Functionality of primary hepatic non-parenchymal cells in a 3D spheroid model and contribution to acetaminophen hepatotoxicity. *Arch Toxicol*. 2020, 94, 4, 1251-1263.
26. A. Segovia-Zafra, M. Villanueva-Paz, A. S. Serras, G. Matilla-Cabello, A. Bodoque-García, D. E. Di Zeo-Sánchez, H. Niu, I. Álvarez-Álvarez, L. Sanz-Villanueva, S. Godec, I. Milisav, P. Bagnaninchi, R. J. Andrade, M. I. Lucena, J. C. Fernández-Checa, F. J. Cubero, J. P. Miranda, and L. J. Nelson. Control compounds for preclinical drug-induced liver injury assessment: Consensus-driven systematic review by the ProEuroDILI network. *J Hepatol*. 2024, 81, 4, 630-640.
27. M. Arai, O. Yokosuka, K. Fujiwara, H. Kojima, T. Kanda, H. Hirasawa, and H. Saisho. Fulminant hepatic failure associated with benzbromarone treatment: a case report. *J Gastroenterol Hepatol*. 2002, 17, 5, 625-626.
28. A. Takemura, S. Gong, S. Sekine, and K. Ito. Inhibition of biliary network reconstruction by benzbromarone delays recovery from pre-existing liver injury. *Toxicology*. 2019, 423, 32-41.
29. W. Yang, Y. Tao, Y. Wu, X. Zhao, W. Ye, D. Zhao, L. Fu, C. Tian, J. Yang, F. He, and L. Tang. Neutrophils promote the development of reparative macrophages mediated by ROS to orchestrate liver repair. *Nat Commun*. 2019, 10, 1, 1076.
30. N. Tanimizu, N. Ichinohe, H. Suzuki, and T. Mitaka. Prolonged oxidative stress and delayed tissue repair exacerbate acetaminophen-induced liver injury in aged mice. *Aging (Albany NY)*. 2020, 12, 19, 18907-18927.

受理日: 2024年11月7日