

薬物代謝酵素の発現が異なる消化管上皮細胞を用いた薬物の膜透過性比較

柳橋 努, 柚木 芳, 南谷 武春, 渡邊 康春, 小島 理恵子, 相川 幸彦, 薬事研究会生物部会

Comparison of drug-membrane permeability using intestinal epithelial cells with different expressions of drug-metabolizing enzymes

Tsutomu YANAGIBASHI, Kaori YUNOKI, Takeharu MINAMITANI,
Yasuharu WATANABE, Rieko KOJIMA, Yukihiro AIKAWA
and the Biological Analysis Group in Toyama Pharmaceutical Research Association

要 約

経口薬の膜透過性評価には、ヒトや実験動物を用いた*in vivo*試験、および腸管上皮細胞を用いた*in vitro*試験がある。*In vitro*試験においては、従来から広く使用されているCaco-2細胞に加え、ヒト腸管上皮細胞により近い性質を有すヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞や、ハイスループットな評価系である人工脂質膜を用いたPAMPAも利用されている。本研究では、Caco-2細胞とヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞の遺伝子発現プロファイルを比較し、Caco-2細胞ではCYP3A4が発現していないことを確認した。また、Caco-2細胞、ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞、およびPAMPAを用いて、Propranolol Hydrochloride, Furosemide, Hydrochlorothiazide, Atenololの膜透過性を評価し、Biopharmaceutics Classification Systemの透過性分類と一致することを確認した。さらに、上記薬物の膜透過性試験の結果にCYP3A4に代謝される薬物であるMidazolamの膜透過性試験の結果を加え、ヒト試験の文献値と相関性を比較したところ、PAMPAやCaco-2細胞よりもヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞の方が高い相関性を示した。この研究により、特定の薬物についてはPAMPAやCaco-2細胞では正確に評価できない場合があることが確認された。本研究の結果から、薬物の膜透過性評価における適切な試験系の選択の重要性が示された。

Summary

Membrane permeability evaluation of oral drugs includes *in vivo* studies in humans and laboratory animals and *in vitro* studies in intestinal epithelial cells. In addition to Caco-2 cells, human iPS cell-derived intestinal epithelial cells, which more closely resemble human intestinal epithelial cells, and PAMPA, a high-throughput artificial lipid membrane assay system, were used for membrane permeability studies. In this study, we compared the gene expression profiles of Caco-2 cells and human iPS cell-derived intestinal epithelial cells and confirmed that Caco-2 cells do not express CYP3A4. The permeability of propranolol hydrochloride, furosemide, hydrochlorothiazide, and atenolol was also evaluated using Caco-2 cells, human iPS cell-derived intestinal epithelial cells, and PAMPA. The permeability results of these drugs were consistent with the Biopharmaceutics Classification System guidelines. Furthermore, a comparison with previously reported human permeability data showed that the results of permeability studies using human iPS cell-derived intestinal epithelial cells had a higher correlation than those using Caco-2 cells or PAMPA. This study clarified the characteristics of each evaluation system and confirmed that certain drugs may not be accurately evaluated in PAMPA or Caco-2 cells. This demonstrates the importance of selecting an appropriate test system when evaluating the membrane permeability of drugs.

緒 言

経口薬の膜透過性評価は、ヒト薬物動態試験や実験動物を利用した*in vivo*試験に加え、消化管上皮細胞株等を用いた*in vitro*試験による評価が可能である。ヒト結腸癌細胞由来細胞株Caco-2細胞は薬物の膜透過性評価に広く利用される細胞株であるが、一部の薬物代謝酵素発現が低下しているため、ヒトや実験動物を用いた試験と薬物の代謝が異なり、薬物によっては正確に評価できないことがある。一方、近年開発が進め

られているヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞は、Caco-2細胞では発現が低下している薬物代謝酵素についてもヒト腸管組織と同程度の発現が認められるため、Caco-2細胞ではヒトデータと相関性の低い薬物の膜透過性評価への利用が期待されている。また、脂質膜を用いた人工膜透過性評価法（PAMPA）もハイスループットな評価系として広く利用される。令和5年度の生物部会では、Caco-2細胞、ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞、およびPAMPAを用いた膜透過性評価を通じ、各薬物の透過性の特徴について理解を深めるこ

とを目的とした。

方法及び結果

1. Caco-2 細胞およびヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞の単層膜への分化誘導方法の検討

(1)Caco-2 細胞の培養

本研究に使用するCaco-2細胞は、理化学研究所バイオリソースセンターより入手し（細胞番号：RBC0988）、薬事総合研究開発センターにて凍結保存した45継代目の細胞を使用した。Caco-2細胞は、20% Fetal Calf Serum (FCS, NICHIREI), 0.1 mmol/L Non-Essential Amino Acids Solution (Gibco) を含むMinimum Essential Medium Eagle With Earle's salts (Merck) を用いてフラスコで培養し、2回継代した後に、37,500細胞/ウェルになるようトランスウェル 6.5 mm Transwell® with 0.4 µm Pore Polycarbonate Membrane Insert (Corning) に播種した。トランスウェルでの培養は、10% FCS, 100 units/mLペニシリン・0.01% ストレプトマイシン (Nacalai Tesque) を含むDulbecco's Modified Eagle Medium培地 (high glucose, GlutaMAX Supplement, HEPES) (Gibco) を用い、インサートは300 µL、アクセプターは1 mLの容量で培養した。1日置きにインサート 200 µL、アクセプター1 mLの培地を交換した。

(2)ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞の培養

ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞は、富士フイルム和光純薬株式会社より購入したF-hiSIECを使用した。Matrigel Matrix Growth Factor Reduced (Corning) をコーティングしたトランスウェルに100,000個/ウェルで播種した（培養0日目）。培養0日目から1日目はF-hiSIEC Seeding Medium（富士フイルム和光純薬）、培養1日目以降はF-hiSIEC Culture Medium（富士フイルム和光純薬）を用い、インサートは150 µL、アクセプターは600 µLの容量で培養した。1または2日置きに培地を全量交換し、培養9日目以降に実験に供した。

(3)経上皮電気抵抗値（TEER）測定による単層化評価

膜透過性を評価するためには、細胞が単層に培養され、細胞間にタイトジャンクションを形成し、細胞間から評価化合物が漏出しないことを確認する必要がある。細胞の単層化を評価す

るため、抵抗値測定システムミリセルERS-2 (Millipore) を用い、トランスウェルのインサートとアクセプターの電位差を測定してTEERを下記の通り算出した。

$$TEER (\Omega \cdot \text{cm}^2) = (R_m - R_b) \times A$$

R_m: 細胞単層膜を形成したインサートの抵抗値 (Ω), R_b: 細胞の無いインサートの抵抗値 (Ω), A: インサートメンブレンの面積 (0.33 cm²).

本実験で使用する各細胞の電気抵抗値は、Caco-2細胞は参考文献の値を基に280–500 Ω・cm² (1), ヒトiPS細胞についてはデータシートに記載された情報を基に300 Ω・cm²以上に設定した。Caco-2細胞については培養21日目のTEER, ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞については培養11日目のTEERの値を示す（表1）。

(4)ルシファーイエロー漏出割合の測定による単層化評価

Caco-2細胞およびヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞の単層化を評価するため、TEER (Ω・cm²) の計測に加え、蛍光試薬ルシファーイエローがアクセプターに漏出しないことを確認した。Caco-2細胞を培養しているトランスウェルのインサートに300 µmol/Lルシファーイエロー（富士フイルム和光純薬）を300 µL添加した。ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞では110 µmol/L ルシファーイエローを100 µL添加した。それぞれ37℃で60分間培養後アクセプターのルシファーイエロー蛍光値（励起波長 450 nm, 蛍光波長538 nm）をSynergy HTプレートリーダー（BioTek）で測定し、アクセプターに漏出したルシファーイエローの割合（LY Flux）を算出した。

$$LY \text{ Flux } (\%) = \frac{(LY_A \times Vol_A)}{(LY_D \times Vol_D)} \times 100$$

LY_A: アクセプターのルシファーイエロー濃度 (µmol/L), Vol_A: アクセプターの容量 (cm³), LY_D: ドナーのルシファーイエロー濃度 (µmol/L), Vol_D: ドナーの容量 (cm³).

LY Fluxが0.3%–2%の基準値内となったウェルを使用可能なウェルとして判断した (2). Caco-2細胞では9ウェル中8ウェル（表2）、ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞では試験した4ウェル全てで基準をクリアした（表3）。ルシファーイエローおよびTEERの結果から、本実験で使用するCaco-2細胞およびヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞の培養方法により、膜透過性試験に使用可能な状態に分化誘導可能であることが示された。

表1 Caco-2細胞とヒトiPS由来腸管上皮細胞のTEER

	Caco-2細胞	ヒトiPS細胞 由来腸管上皮細胞
TEER ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	355.85 $\pm$ 87.66	1213.28 $\pm$ 512.40
基準をクリアーしたウェル	21/23	9/10

Mean $\pm$ SD

表2 Caco-2細胞のルシファーイエロー漏出割合

Well No.	LY_D ($\mu\text{mol/L}$)	LY_A ($\mu\text{mol/L}$)	Vol_D (cm^3)	Vol_A (cm^3)	$LY_A \times Vol_A$ A	$LY_D \times Vol_D$ B	% LY_{Flux} $100 \times A/B$
Blank 1	300	22.749	0.3	1	22.749	90	25.28
Blank 2	300	26.223	0.3	1	26.223	90	29.14
Blank 3	300	25.511	0.3	1	25.511	90	28.35
1	300	0	0.3	1	0	90	0.00
2	300	0	0.3	1	0	90	0.00
3	300	3.442	0.3	1	3.442	90	3.82 *
4	300	0	0.3	1	0	90	0.00
5	300	0	0.3	1	0	90	0.00
6	300	0	0.3	1	0	90	0.00
7	300	0	0.3	1	0	90	0.00
8	300	1.438	0.3	1	1.438	90	1.60
9	300	0	0.3	1	0	90	0.00

*基準をクリアーしなかったウェル

表3 ヒトiPS由来腸管上皮細胞のルシファーイエロー漏出割合

Well No.	LY_D ($\mu\text{mol/L}$)	LY_A ($\mu\text{mol/L}$)	Vol_D (cm^3)	Vol_A (cm^3)	$LY_A \times Vol_A$ A	$LY_D \times Vol_D$ B	% LY_{Flux} $100 \times A/B$
Blank 1	110	6.659	0.10	0.6	4.00	11	36.32
Blank 2	110	8.279	0.10	0.6	4.97	11	45.16
1	110	0.000	0.10	0.6	0.00	11	0.00
2	110	0.000	0.10	0.6	0.00	11	0.00
3	110	0.000	0.10	0.6	0.00	11	0.00
4	110	0.000	0.10	0.6	0.00	11	0.00

2. Caco-2細胞, ヒトiPS由来腸管上皮細胞, およびヒト成人正常小腸上皮細胞の薬物代謝酵素および腸管上皮細胞マーカーの発現比較

(1) RNA調製

薬物の膜透過性評価の結果を正しく理解する上で、使用する細胞の薬物代謝酵素発現を理解することは必要不可欠である。また、腸管上皮細胞には複数の細胞種が存在することから、膜透過性評価に使用する細胞にどのような腸管上皮細胞が含まれるのかも結果に影響する可能性がある。そこで、Caco-2細胞およびヒトiPS細胞由来腸管上

皮細胞に発現する薬物代謝酵素、腸管上皮細胞マーカーの遺伝子発現量を定量PCRで評価した。Caco-2細胞は21日間、ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞は9日間、それぞれトランスウェルで培養した細胞を使用した。それぞれの細胞にQIAzol Lysis Reagent (QIAGEN) を200 μL 添加して細胞溶解液を回収後、QIAzol懸濁液にクロロホルム 40 μL を添加した後に室温で3分間静置した。4 $^{\circ}\text{C}$, 12,000 $\times g$, 10分間遠心分離後に水相画分を回収し、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いてトータルRNAを抽出した。ヒト成人正常小腸

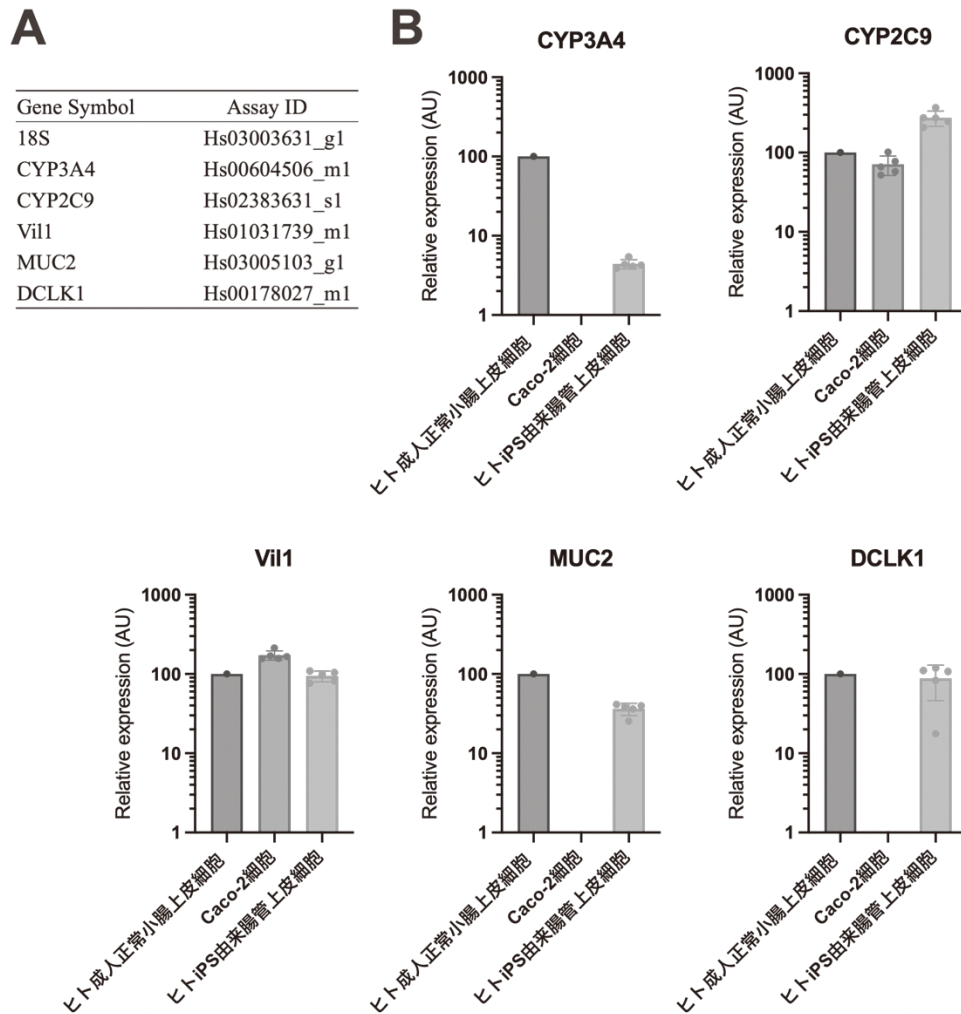


図 1 Caco-2 細胞, ヒトiPS由来腸管上皮細胞, およびヒト成人正常小腸上皮細胞の薬物代謝酵素および腸管上皮細胞マーカーの発現比較

上皮細胞のトータルRNAにはTotal RNA-Human Adult Normal Tissue 5 (BioChain) を使用した。

(2)リアルタイムPCR

Caco-2細胞およびヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞から調製したトータルRNA, ヒト成人正常小腸上皮細胞トータルRNAから, Prime Script RT Master Mix (TaKaRa) を用いcDNAを合成した。このcDNAをテンプレートとし, FastStart Universal Probe Master (ROX) (Roche) およびTaqMan Probe (Thermo Scientific) (図 1 A) を用い, CYP3A4, CYP2C9, Vil1, MUC2, DCLK1のmRNA発現をCFX Opus 96 リアルタイムPCRシステム (Bio-Rad) を用いた定量PCRにより解析した。

内部標準としては, 18S RNAを用い, 各遺伝子の発現は18Sの発現量で補正した値を算出した。CYP3A4はヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞, およびヒト成人正常小腸上皮細胞mRNAで発現が認められたが, Caco-2細胞で発現が認められなかった。また, CYP2C9は全てのサンプルで発現が認められた。Caco-2細胞では, 小腸上皮細胞マーカー Vil1の発現を認めたが, 杯細胞マーカー MUC2, タフト細胞マーカー DCLK1の発現は認めなかったことから, Caco-2細胞は単一細胞種である可能性が高いことを確認した。一方, ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞では, ヒト成人小腸上皮細胞と同様に, Vil1, MUC2, DCLK1全てを発現していた (図 1 B)。

3. 膜透過性評価

(1)膜透過性試験

Caco-2細胞, ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞, およびPAMPA (BD Gentest Pre-coated PAMPA Plate System, BD Biosciences) を用いて膜透過性試験を実施した. 評価化合物には, Biopharmaceutics Classification System (BCS) に基づくバイオウェーバーガイドラインにおい

て中等度膜透過性に分類されているFurosemide (Merck), Atenolol (富士フイルム和光純薬), Hydrochlorothiazide (Merck) および高膜透過性に分類されているPropranolol Hydrochloride (Merck), さらにCYP 3 A 4 依存性薬物であるMidazolam (富士フイルム和光純薬) を用いた (表4).

表4 膜透過性試験に供した化合物

試薬名	分子量	透過性	Human P_e (cm/s)	試験濃度 ($\mu\text{mol/L}$)
Propranolol Hydrochloride	295.80	高	0.0002900 (3)	100
Furosemide	330.74	中等度	0.0000050 (3)	100
Hydrochlorothiazide	297.74	中等度	0.0000040 (3)	100
Atenolol	266.34	中等度	0.0000200 (3)	100
Midazolam	325.77	高	0.00007901 (4)	100

Caco-2細胞は21日間, ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞は11日間トランスウェルで培養し, それぞれTEERが基準を満たしたウェルを使用した. インサートおよびアクセプターの培地を1% DMSO-Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Gibco) に置換し37℃で1時間静置した. 1% DMSO-HBSSを除去した後, 100 $\mu\text{mol/L}$ /1% DMSO-HBSSとなるよう調製した各化合物 (t0溶液) をインサートに添加した. アクセプターには1% DMSO-HBSSを添加した. Caco-2細胞, ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞共に37℃で静置し, 1時間後にアクセプター中の溶液を回収した (t60溶液). PAMPAでは, レシーバープレートにドナーとして1% DMSO-HBSSで100 $\mu\text{mol/L}$ に調製した各化

合物 (t0溶液) を300 μL , フィルタープレートにアクセプターとして1% DMSO-HBSS を200 μL 添加した. 37℃で5時間静置した後にアクセプターから溶液を回収した (t300溶液).

(2)LC-MS/MS測定サンプルの調製

膜透過係数 (P_{app}) および有効膜透過係数 (P_e) を算出するため, t0溶液, t60溶液およびt300溶液中の化合物濃度をLC-MS/MS (Xevo TQ-XS, ACQUITY UHPLC H-Class Waters) で測定した. それぞれの溶液は表5に示す希釈倍率に従い1% DMSO-HBSSで希釈した.

表5 膜透過性試験サンプルの希釈倍率

化合物	Caco-2細胞		ヒトiPS細胞由来腸管 上皮細胞		PAMPA	
	t0	t60	t0	t60	t0	t300
Propranolol Hydrochloride	1000	100	1000	100	1000	100
Furosemide	1000	10	1000	100	1000	10
Hydrochlorothiazide	1000	10	1000	10	1000	10
Atenolol	1000	10	1000	10	1000	10
Midazolam	1000	100	1000	100	1000	100

LC条件

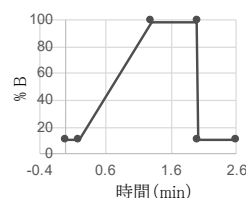
装置	Waters ACQUITY UPLC H-Class
注入量	1 μ L
カラム	ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μ m, 2.1 x 50mm
カラム温度	50°C
移動相	A: 0.1% ギ酸水溶液 B: 0.1% ギ酸メタノール溶液

MS条件

装置	Waters Xevo TQ-XS
イオン化モード	ESIポジティブ
キャピラリー電圧	0.5 kV
脱溶媒ガス	1200 L/hr, 500°C

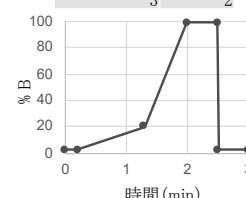
グラジエント①

時間 (min)	B(%)
0	10
0.2	10
1.3	99
2	99
2.01	10
2.6	10



グラジエント②

時間 (min)	B(%)
0	2
0.2	2
1.3	20
2	99
2.5	99
2.51	2
3	2



化合物	グラジエント	測定イオン
Propranolol	①	260.2 > 116.1
Furosemide	①	329.0 > 205.0
Hydrochlorothiazide	②	296.0 > 269.0
Atenolol	②	267.1 > 144.8
Midazolam	①	325.8 > 290.9

図 2 LC-MS/MS測定条件

希釈した溶液と30 nmol/L Diclofenac-Methanol溶液を1 : 2で混和し, 20°C, 20,400 $\times$ g, 5分間, 遠心分離した. 遠心分離後の上清と0.1% ギ酸を1 : 2で混和し, これをLC-MS/MS測定サンプルとした. LC-MS/MSの測定条件を図2 A-Cに示す.

(3) P_{app} , P_e の算出

下記計算式を基に, LC-MS/MSより得られたResponseの値から有効膜透過係数 P_e および膜透過係数 P_{app} を算出した.

$$P_{app} \text{ (cm/sec)} = (dQ/dt) / (C_0 \times S)$$

dQ : アクセプターの化合物濃度, dt : 培養時間 (秒), C_0 : ドナーの化合物初濃度 (μ mol/L), S : インサートメンブレンの面積 (0.33 cm^2)

$$P_e \text{ (cm/sec)} = [1 - C_A(t) / C_{eq}] / [A \times (1/V_D + 1/V_A) \times t]$$

A: インサートメンブレンの面積 (0.3 cm^2), V_D : ドナー容量 (0.3 mL), V_A : アクセプター容量 (0.2 mL), t : 培養時間 (秒), $C_A(t)$ = アクセプターの化合物濃度, $C_D(t)$ = ドナーの化合物濃度, $C_{eq} = [C_D(t) \times V_D + C_A(t) \times V_A] / (V_D + V_A)$

ヒト P_e については参考文献の値を使用した (表4) (3, 4). PAMPA, Caco-2細胞, ヒトiPS

細胞由来腸管上皮細胞のいずれにおいても, 中等度膜透過性化合物Furosemide, Atenolol, Hydrochlorothiazideに比べ, 高透過性化合物Propranolol Hydrochlorideは高い膜透過性を示し, BCSに基づくバイオウェーバーガイドラインに記載された分類に一致する結果が得られた (図3 A). さらに上記化合物にMidazolamを加えた5化合物について, PAMPA, Caco-2細胞, ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞それぞれの P_e または P_{app} と, ヒト試験から得られた P_e の文献値との相関性を比較した (3, 4) (図3 B). Caco-2細胞の P_{app} とヒト試験の P_e では $R^2 = 0.7155$ と正の相関を認めた. ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞 P_{app} とヒト試験の P_e では $R^2 = 0.7724$ となり, Caco-2細胞よりも高い正の相関性を示した. PAMPAとヒト試験の相関性は $R^2 = 0.2624$ とCaco-2細胞やヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞よりも低い値となった.

考 察

本研究で実施したCaco-2細胞, ヒトiPS由来腸管上皮細胞, およびヒト成人正常小腸上皮細胞の遺伝子発現比較では, 腸管上皮細胞マーカーや薬物代謝酵素について, ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞とヒト成人正常小腸上皮細胞で類似した発現プロファイル

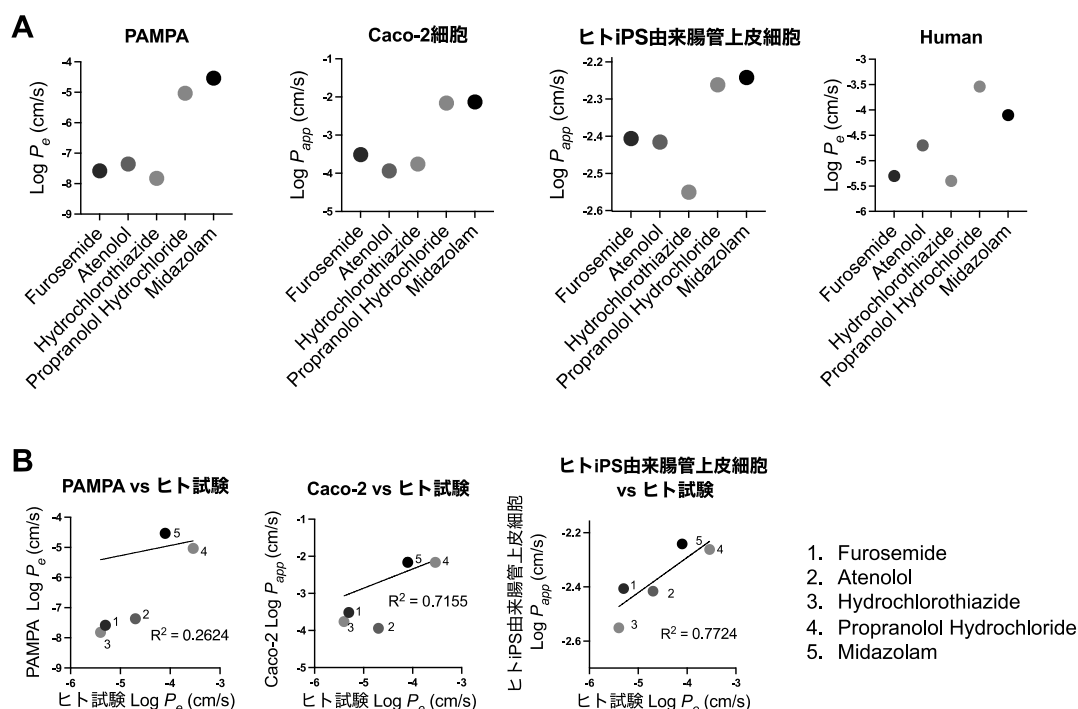


図3 PAMPA, Caco-2細胞, ヒトiPS由来腸管上皮細胞の P_e または P_{app} とヒト試験 P_e との相関性

を得た (図1B)。一方、過去に示された論文の通り、Caco-2細胞ではVil1の発現は認められるものの他の腸管上皮細胞の分子マーカーやCYP3A4の発現が認められなかったことから、Caco-2細胞は腸管上皮細胞中でも一部の細胞についての特徴を模倣した評価系であることが確認された (図1B) (5)。ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞に比べ、Caco-2細胞でヒト P_e との相関性が低い結果になったことは、Caco-2細胞ではCYP3A4を発現していないため、CYP3A4依存性の薬物であるMidazolamの透過性がヒト P_e よりも高い値として検出されたことに起因すると推察された (図3B)。従って、薬物代謝酵素により代謝される化合物の評価においては、ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞がCaco-2細胞やPAMPAに対し優位性があると考えられた。

PAMPAの P_e はヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞やCaco-2細胞に比べヒト P_e との相関性が低かったが、中等度膜透過性よりも高膜透過性の方が高い膜透過性を示したことから (図3A)、*in vitro*の膜透過性評価系に利用可能であることを再確認した。PAMPAはハイスループットな実験系であり、創薬探索の初期スクリーニングにおいて強力なツールとなり得る。Caco-2細胞はヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞に比べ、ヒト P_e との相関性が劣ったが、これまでに蓄積され

たデータの豊富さや、通常のバイオセーフティーレベルで実験が可能なおことから、ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞に対しアドバンテージがあると考えられる。それぞれの評価系にメリットとデメリットがあることから、例えばPAMPAを一次スクリーニングとして利用し、Caco-2細胞やヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞で二次スクリーニングを行うことなど、特性を理解した上で各評価系を使い分けることにより*in vitro*で効果的なスクリーニングが実施可能であると考えられた (表6)。

参考文献

- 1) Lee JB, Zgair A, Taha DA, *et al.* Quantitative analysis of lab-to-lab variability in Caco-2 permeability assays. *Eur J Pharm Biopharm* 2017;114:38-42.
- 2) Drug Transport Assay for Falcon® 24-Multiwell Inserts Protocol
- 3) Alsenz J and Haenel E. Development of a 7-day, 96-well Caco-2 permeability assay with high-throughput direct UV compound analysis. *Pharm Res* 2003;20:1961-9.
- 4) Karlsson FH, Bouchene S, Hilgendorf C, *et al.*

表 6 PAMPA, Caco-2 細胞, ヒトiPS腸管上皮細胞を用いた膜透過性試験のメリットとデメリット

	メリット	デメリット
PAMPA	- 膜透過性をハイスループットで評価可能 - 再現性が良い	トランスポーターを介する化合物や、脂質親和性の高い化合物の透過性を正しく評価できない
Caco-2細胞	- 生体内環境に近い透過性評価が可能 - 自己増殖能を有す	- 一部の化合物代謝酵素やトランスポーターの発現が低い - 単層膜の形成までに約3週間を要す
ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞	Caco-2で発現が認められない化合物代謝酵素やトランスポーターも発現している	- コストが高い - 市販細胞は自己増殖能なし - BSL2実験施設が必要

Utility of in vitro systems and preclinical data for the prediction of human intestinal first-pass metabolism during drug discovery and preclinical development. *Drug Metab Dispos* 2013;41:2033-46.

- 5) Kabeya T, Mima S, Imakura Y, *et al.* Pharmacokinetic functions of human induced pluripotent stem cell-derived small intestinal epithelial cells. *Drug Metab Pharmacokinet* 2020;35:374-82.