

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

目 次

課題番号				
71253 20000997A	71253	臨床試験の予見性を高めるための、ヒト組織を用いた医薬品の安全性・有効性評価手法の確立に関する研究	大野 泰雄	…… 1
20001001A	72001	日本におけるヒト肝細胞の保存・管理に関する基準の検討	小林 英司	…… 10
20001002A	72002	日本人の肝及び腎の薬物排泄能の個人差と遺伝子多型	遠藤 仁	…… 14
20001004A	72003	ヒト組織新鮮材料を用いた薬物の作用評価の研究 －産学共同のネットワーク作りをめざして－	松浦 成昭	…… 21
20000998A	72004	高機能保持ヒト由来肝培養細胞株を用いた薬物の有効性、安全性評価法の確立	永森 静志	…… 25
20001003A	72005	ヒト薬物代謝酵素遺伝子多型簡易迅速定量法の臨床応用の新展開 －医薬品の適性使用と医療経済の効率化を目的として－	水柿 道直	…… 29
20001005A	72006	臓器移植患者におけるP-糖蛋白質及びCYP3A4の定量的解析を基盤とした免疫抑制剤の適正使用法確立に関する研究	乾 賢一	…… 39
20001000A	72007	エンドトキシン作用の種特異性の機構解明と、医薬品の有効性・安全性評価への応用に関する研究	棚元 憲一	…… 45
20000999A	72008	肝移植により摘出された患者肝細胞の保存方法の確立と病的細胞の分子生物学的解析	香坂 隆夫	…… 55

臨床試験の予見性を高めるための、ヒト組織を用いた 医薬品の安全性・有効性評価手法の確立に関する研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター 薬理部
研究者 大野 泰雄

分担研究者

- | | |
|---------------------|-------|
| 1) 日本製薬工業協会 | 奥田秀毅 |
| 2) 獨協大学医学部 | 上川雄一郎 |
| 3) 東京大学大学院農学生命科学研究科 | 唐木英明 |
| 4) 東京大学大学院農学生命科学研究科 | 土井邦雄 |

要旨

英国の研究倫理委員会について調べた。凍結および非凍結ヒト肝細胞標本がヒトでの代謝や酵素誘導を予測する上で有用であるとの結果を得た。大腸輪状筋、子宮平滑筋収縮の薬物感受性および胎盤の P450 分子種の発現パターンに大きな種差が認められた。

1. 研究目的

医薬品開発においては、臨床試験段階で思わぬ副作用が現れたり、有効性が予期したより弱く、開発停止に至ることが多い。その原因として薬物の体内動態或いは組織の薬物感受性にヒトと実験動物との間に差があることが考えられる。このため欧米では臨床試験前にヒト組織を用いて検討することが当然とされている。特に、最近ではヒト由来のペプチドや蛋白が医薬品として開発されており、ヒトにしか作用を現さないものも多い。従って、ヒト組織と実験動物との感受性の相違を明らかにするとともに、日本でのヒト組織利用体制を整えることは、効率的な医薬品開発や安全な臨床試験実施のために急務である。

そこで、本研究事業ではヒト組織利用体制の整っている欧米の状況を調査することにより、わが国においてもヒト組織を用いた研究開発が行えるよう環境を整備する。また、ヒト組織を利用して研究開発を行うための技術的課題について検討を行い、ヒト組織を使用する際の基本的な技術基盤を確立する。更に、ヒト肝組織を用いた薬物代謝研究および我が国で実際に手術等で得たヒト平滑筋組織を用いた研究を行うことにより、ヒト組織の特性や薬物感受性についての基礎データを得るとともに、実験動物と比較し種差の有無を明らかにする。本研究を通じて、インフォームドコンセントなど倫理上の問題点を明らかにする。

今年度は、英国の研究倫理委員会の調査、凍結融解ヒト遊離肝細胞の代謝活性評価、非凍結ヒト遊離肝細胞を用いる酵素誘導試験系の評価、mercaptobenzimidazole のヒト肝ミクロソームにおける代謝とそれに関与する酵素の検討、大腸および子宮平滑筋の薬物反応性、およびヒト胎盤における P450 分子種の発現について検討した。

2. 研究方法

2-1) ヒト組織の利用法および利用実態についての調査研究

イギリスにおけるヒト組織を用いた研究を審査する地域研究倫理委員会および多地域研究倫理委員会についての資料をインターネットを通じ、また、直接連絡をとり収集し、整理した。なお、資料の収集に際しては生体科学研究所の泉二氏の助力を得た。

2-2) ヒト肝組織を用いた代謝研究

2-2-1) 凍結ヒト遊離肝細胞による代謝評価

凍結遊離肝細胞は、米国の XenoTech, LLC で調製されたものを 3 ロット (H226, H227 および H231) 入手した。代謝酵素活性は 7-エトキシマリンをプローブとして評価した。基質濃度は 75 μM とし、一定時間反応後、細胞浮遊液を遠心し、上清中の未変化体並びに代謝物である 7-ヒドロキシマリニン(7HC)およびそのグルクロニド(7HC/G)とサルフェート(7HC/S)の 3 種を HPLC にて同時定量した。

また、種々の薬物について、ヒト遊離肝細胞による代謝を評価した。Mofezolac は、基質濃度を 100 μM とし、一定時間反応後、培養液を有機溶媒で抽出し、抽出物中の未変化体並びに代謝物を定量した。CS-045 は、基質濃度を 50 μM とし、一定時間反応後、培養液を有機溶媒で抽出し、抽出物中の未変化体並びに代謝物を HPLC にて同時定量した。Estriol は、基質濃度を 20 μM とし、一定時間反応後、培養液を有機溶媒で抽出し、抽出物中の未変化体並びに代謝物を HPLC にて定量した。Enoxacin は、基質濃度を 100 μM とし、一定時間反応後、培養液を有機溶媒で抽出し、抽出物中の未変化体並びに代謝物を HPLC にて定量した。YM992 は、基質濃度を 10 mg/mL とし、一定時間反応後、培養液を有機溶媒で抽出し、抽出物中の未変化体並びに代謝物を HPLC にて定量した。

2-2-2) 非凍結ヒト遊離肝細胞

非凍結ヒト遊離肝細胞は、フランス INSERM から入手したものをを用いた。これは、コラーゲンコートされた培養フラスコに接着された状態で輸送されたもので、平均細胞数は 3.5×10^6 cells/フラスコである。

リファンピシン(RIF)或いはフェノバルビタール(PB)による CYP3A 酵素の誘導は、培養液に各々 10 μM および 1 mM 添加して、96 時間暴露した後、プローブ活性であるテストステロンの 6 β 水酸化活性($T_{6\beta}$)を HPLC で経日的に測定した。なお、テストステロンの基質濃度は 250 μM とし、インキュベーション時間は 2 時間とした。また、3-メチルコランズレン(3-MC)による CYP1A 酵素の誘導は、培養液に 1 μM 添加して、24 時間暴露した後、プローブ活性である 7-エトキシレゾルフィンの脱エチル化活性(EROD)を蛍光法で経日的に測定した。なお、7-エトキシレゾルフィンの基質濃度は 8 μM とし、インキュベーション時間は 30 分間とした。これらの酵素誘導評価は、いずれも所定の洗浄期間を挟んで、3 クール繰り返して実施した。

2-2-3) mercaptobenzimidazole の代謝実験

ミクロソーム(ms)は雄性ラット肝 ms、ヒト肝 ms (米国 IAM 社)、ヒト P-450 ないし FMO 発現系 ms (住化分析センター及び第一化学より購入)を用いた。Ms 溶液は通常 MBI 0.1mM、NADPH 5mM 含有 0.1M 磷酸緩衝液(pH=7.4)、総量 0.2ml で、37°C30 分インキュベート後、メタノール 0.4ml を添加し、その遠沈上清を ODS 系カラムを用いた HPLC 法で分析した。肝 ms におけるテストステロン(TS)の代謝は逆相系カラムを用いた HPLC 法で分析した。

2-3)ヒト平滑筋組織を用いた薬物感受性に関する研究

獨協医科大学生命倫理委員会の承認を得て行われ、文書による同意が得られた大腸癌患者 24 名 (男性 15 名、女性 9 名、平均年齢 65.6 ± 1.9 歳) から外科的に切除された S 状結腸より肉眼的に癌細胞浸潤のない平滑筋部分と粘膜部分を切り出し、冷却栄養液中に浸して実験室に運んだ。標本周囲の結合組織を取り除き、幅約 2mm、長さ約 20mm の輪状平滑筋標本と幅約 5mm、長さ約 40mm の縦走粘膜筋板折りたたみ標本を作製した後、95% O_2 + 5% CO_2 混合ガス通気下、37°Cに保温したオルガンバス内の Krebs 栄養液中に懸垂して実験を行った。実験は手術による臓器摘出後約 4-5 時間内に開始した。輪状平滑筋と縦走粘膜筋板の反応は、それぞれ等張性トランスデューサーと等尺性トランスデューサーを用い、ポリグラフ上に記録した。

子宮平滑筋は関西医科大学産婦人科の協力を得て、文書で同意の得られた患者から手術で摘出したものの一部として得た。子宮条片の収縮張力をマグナス法により等尺性に記録した。なお、手術材料の入手は、関西医科大学の倫理委員会の承認を得て行った。細胞内 Ca^{2+} 濃度は蛍光指示薬である fura-2 を用いて行った。収縮蛋白系に対する作用は α 毒素により作成したスキンドファイバーを用いて検討した。更に、各種 PKC アイソザイムの抗体を用い、Western blotting 法により、PKC 発現パターンを解析した。

2-4) 腫瘍組織及び胎盤を用いた研究

ヒト胎盤は東海大学産婦人科において正常分娩時に採取されたものを用い、Western blotting 法および免疫組織化学法により様々な P450 isozymes の発現を検討した。用いた抗体は、ラットでは CYP1A1、CYP2B1、CYP2C6、CYP2C12、CYP2D1、CYP2D4、CYP2E1 CYP3A1、CYP4A1（第一化学またはケミコン）、ヒトでは CYP1A1、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8~19、CYP2E1、CYP3A4、CYP3A5（いずれもケミコン）に対するものである。

3. 研究成果

3-1) ヒト組織の利用法および利用実態についての調査研究

昨年度の調査で英国では地域研究倫理委員会があり、ヒト組織を用いた研究や臨床試験の倫理的問題について審議していることが明らかになり、その申請の手引き書を翻訳した。そこで、今年度は更に詳しく調査した結果、英国では地域毎に研究倫理委員会（local research ethics committee: 地域研究倫理委員会）が存在し、その地域における臨床試験及びヒト組織を用いた研究の倫理的問題について審議していることが明らかになった。また、多地域にわたる試験については別に多地域研究倫理委員会があり、審査を担当していた。以下にそれぞれについて説明する。

3-1-1) 地域研究倫理委員会 Local Research Ethics Committee (LREC)

Health Service Guidelines HSG(91)5により全ての国家健康サービス(NHS)区域に設立を義務づけられたもので、イギリス全国で遅くとも92.2.1までに活動を開始した。これは広い意味でNHSが関係するヒトに関する研究の倫理的側面を検討し、地域のNHS事業体に助言を与える事を目的にしている。また、倫理委員会は独立して活動するものである。なお、LRECが助言するNHSとは地域の健康政策当局、特別な健康機関、家族健康サービス機関、NHS信託機関等であるが、依頼があれば、NHS患者が関わらない企業や医学研究協会あるいは大学における研究の倫理的側面にも助言する。

審査の対象としているのはNHSの患者、胎児の組織、NHS患者の関与するIVF、NHS構内で最近死亡した死体、NHS患者の過去および現在の記録へのアクセス、およびNHS構内や施設の使用または施設へのアクセスである。

委員会は8-10人で構成されている。メンバーは広い経験と専門の者、男女、広い年齢層、病院の医療スタッフ、看護スタッフ、一般医、および二人以上の門外漢の者から選択する。なお、実際に治療に携わっている医師や臨床研究経験の深い者も含める。なお、選考に際してはNHS事業体、地域の専門の委員会及び健康を専門とする協会と協議する。また、門外漢委員の選択に際しては地域の健康委員会と協議し、少なくとも一人は医療と全く関係の無い者から選ばれる。なお、委員はグループの代表では無く、健全な判断力と相応の経験を有する個人として、個人的な権利のもと活動することが規定されている。

なお、実際に活動している地域研究倫理委員会について調査したところ、今までに、39の委員会が確認された。Newcastle周辺の地域倫理委員会について詳しい情報が得られた。これはNewcastle地域およびNorth TynesideのHealth AuthorityとUniversity of Newcastle upon TyneおよびUniversity of Northumbria st Newcastleの合同委員会であり、それらの地域および大学からの申請を審議している。委員会は上記の規定よりかなり多い24名のメンバーから構成されていた。その内5名が女性、MDが7名、歯科医師が1名、博士かいは教授でない者が9名いた。また、地域の健康行政当局から推薦を受けた者が11人、Newcastle大学からの推薦が8人、Northumbria大学からの推薦が3人であった。委員長はW.M. Ross博士(放射線科の医師)で、委員会は年に1-2回開催されている。

3-1-2) 多施設研究倫理委員会 Multi-centre Research Ethics Committee (MREC)

Health Service Guidelines HSG(97)23及びその付属文書に基づいて設立されたもので、97.7.1より活動を開始した。これは複数地域にまたがる研究の倫理審査を担当しており、既存の地域倫理委員会の仕事を補い、より適切なタイミングで効果的な倫理審査がなされることを意図している。

審査の対象は上記LRECの場合と同様である。費用は一件あたり1000ポンドであるが、公的な研究費を受けている研究などでは審査費用が免除される。なお、MRECの書面での承認を受けた研究者のみが地域の研究倫理委員会へ多地域研究を申請できる。

3-2) 凍結融解ヒト肝ミクロソーム及び肝細胞を用いた代謝研究

3-2-1) 凍結ヒト遊離肝細胞を用いた代謝評価試験の簡易バリデーション

凍結保存ヒト肝細胞の融解は、細胞入手先である XenoTech, LLC 指定の融解培地キット(パーコール法)を使用した。キットの使用により、初めて取り扱う施設においても容易に融解操作が実施可能であった。実施 7 施設における融解後のバイアビリティーは、H226 が $92.6 \pm 4.4\%$ 、H227 が $85.7 \pm 8.7\%$ および H231 が $91.6 \pm 8.2\%$ と良好であった。

7-エトキシマリンのインキュベーション時間を 1、2 および 4 時間とし、経時的変化を観察した。代謝物の生成量は、何れの施設でも 3 ロット共に、 $7HC/G >> 7HC/S \geq 7HC$ の順となった。それぞれの反応速度(単位: pmol/2 hr/105 cells)は、H226 では各々 272.6 ± 181.7 、 69.8 ± 55.5 および 80.9 ± 44.1 、H227 では各々 509.8 ± 181.1 、 61.8 ± 20.7 および 72.0 ± 39.5 、H231 では各々 373.3 ± 543.3 、 84.0 ± 73.8 および 83.3 ± 69.6 であった。4 時間後の代謝物生成比率は、7HC/G で 60~83%、7HC/S は 9~22%、7HC は 8~18% であった。

まず、施設内での変動については、一部の施設において、 $n=2\sim3$ で 3 ロットについて検討した。H226 を用いた 1 施設で 7HC/SUM の値に 2.4 倍の開きがあったものの、その他では変動は小さかった。

しかしながら、同ロットの活性値においては、施設間で約 3 倍(H227)~12 倍(H231)の開きがあった。この施設間の変動の要因としては、インキュベーションボリュームが $250 \mu\text{L}$ と少ないことによる細胞数の過不足などが考えられる。したがって、インキュベーションボリュームを多くする、或いは、同一反応細胞溶液からのサンプリングについてのプロトコルの見直しが必要かと思われる。また、実際に何らかの化合物の代謝評価を実施する際には、7-エトキシマリンなどを常に対照実験として組み込んでおくことは推奨されよう。

今回の 7-エトキシマリン代謝活性(7HC/SUM)は、平成 11 年度に行った 4 時間接着培養後のインキュベーション結果と比較して、1.3~2 倍高かった。しかしながら、平成 11 年度の予備試験においても、接着培養よりも浮遊培養の方が高い活性が得られていることから、今回用いた 3 ロットと前回のロット間において顕著な差はないと考えた。ただし、今回の 3 ロット間を含め、各ロット間で代謝物の生成量、生成速度ともに多少の差が認められるのも事実である。この差のすべてが各細胞の酵素量の差に基づくとは限らないが、このようなロット間差を踏まえて、実験は複数のロットで行うことが望ましいと考えられる。

3-2-2) 凍結ヒト遊離肝細胞による化合物代謝評価各論

Mofezolac

Mofezolac のヒト遊離肝細胞による代謝物として、健常人に単回経口投与後の血漿中あるいは尿中で検出されている代謝物 (M1、M2 および M3) および Mofezolac のグルクロン酸抱合体の生成を確認した。M1、M2 および M3 の生成量は、 $M1 > M2 > M3$ の順であり、血漿の AUC 値の序列と一致した。代謝物を予測する定性的な試験系として、ヒト凍結肝細胞を用いた代謝実験系は、ミクロソーム用いた代謝実験系よりも有用であると思われる。しかし、*in vivo* においては排泄等の消失過程も存在するため、遊離肝細胞で得られた結果が、血中動態を必ずしも定量的に反映するとは限らないことを念頭に置くべきである。

CS-045

凍結保存ヒト遊離肝細胞および比較のため新鮮ラット遊離肝細胞を使用した。H231 での代謝活性は H226 および H227 の約 1/4 と低かった。H226 と H231 は同じ代謝パターンを示し、キノン体(M3) >> 硫酸抱合体(M1) > グルクロン酸抱合体(M2) であった。H227 では硫酸抱合体(M1) > キノン体(M3) >> グルクロン酸抱合体(M2) であった。ラット遊離肝細胞における代謝パターンはヒト遊離肝細胞と異なり、硫酸抱合体に次いで、グルクロン酸抱合体が多く生成され、キノン体の生成は少なかった。凍結保存ヒト遊離肝細胞の代謝活性はラット遊離肝細胞の約 1/15 と低いものであったが、この原因として、代謝の種差の問題と共に、ヒト肝細胞が一旦凍結保存を施した細胞であり、ラット肝細胞は細胞調製直後の新鮮遊離肝細胞であることなどが考えられる。臨床試験におけるヒト血漿中主代謝物が硫酸抱合体であり、キノン体およびグルクロン酸抱合体の約 5~6 倍であることから、今回のヒト肝細胞の結果はやや異なった。代謝物生成比率の相違の要因として、一旦凍結保存したことによる硫酸抱合体活性の低下や、*in vivo* における代謝物の消失が肝代謝以外によっても支配されている可能性などが考えられる。

Estriol

凍結遊離肝細胞を用いた代謝実験により、ヒトにおける代謝物として報告されているグルクロン酸抱合体の生成がすべてのロットで、また硫酸抱合体の生成が一部のロットで確認された。

Enoxacin

凍結肝細胞による代謝実験により得られた代謝物は、定性的には *in vivo* の結果（尿中代謝物組成）と一致した。特に、M-4（アセチル化体）および M-3（ホルミル化体）など酸化代謝物以外の代謝物も生成していることから、*in vivo* の代謝物を定性的に予測するには、凍結肝細胞は非常に有用だと考える。しかし、尿中の主代謝物と肝細胞での主代謝物は一致しなかった。この原因の一つとして、生成した代謝物の代謝や排泄が *in vivo* と異なることが考えられる。肝細胞での主代謝物であった M-3 は、尿中ではマイナーな代謝物であることから、*in vivo* ではさらに代謝されているのではないと思われる。また、今回は検出感度の関係で基質濃度を 100 μM と設定したが、*in vivo* の血漿中濃度は C_{max} で 10 μM （蛋白結合率 32%）であり、この差も主代謝物が *in vivo* と一致しなかった原因の一つと推察される。Enoxacin の代謝物組成はロット間で大きく異なった。この一因として、酵素含量の差によるものと考えているが、代謝酵素が同定されていないので詳細は不明である。凍結肝細胞での実験の際には、このようなロット差を考慮し、複数のロットを使用することが必要であると考えられる。

YM992

今回の代謝実験に用いたすべてのロットで、*in vivo* で認められた抱合体を含む 4 種の代謝物の生成を確認した。

3-3) 非凍結ヒト遊離肝細胞を用いる酵素誘導試験の簡易バリデーション

3-3-1) リファンピシンによる CYP3A 酵素の誘導

7 施設において、Ts6 β 活性の誘導をモニターしたところ、3 サイクルとも、RIF 処理後 1 日目と 2 日目にはコントロール活性に対して 40~30 倍と、強い誘導が観察され、処理後 4 日目でも、コントロール活性に対して 10 倍前後と、明瞭な誘導が認められた。施設間の活性データの偏差については、50%前後の値となった。これは、サイクル 1~3 間や RIF 処理後 1~4 日目において、ほぼ一定であった。

3-3-2) リファンピシンおよびフェノバルビタールによる CYP3A 酵素の誘導比率

次に、7 施設において、2 種の誘導剤による Ts6 β 活性の誘導をモニターし、その誘導比率について評価した。その結果、施設間の活性データの偏差については、サイクル 1 では、やはり 50%前後の値となった。また、誘導剤処理後 1~4 日目の中で比較すると、1 日目と 2 日目はほぼ一定で、4 日目になると偏差が大きくなる傾向にあった。また、サイクル 2 および 3 では偏差が非常に大きく、特にサイクル 3 では、大部分の時点で偏差が 100%近い値となった。これに対して、2 種の誘導剤による誘導比率で評価した場合、偏差は小さくなり、サイクル 1 および 2 の 1 日目と 2 日目では、30%程度の値に納まった。従って、陽性対照化合物との誘導比率を、この範囲で評価すれば、より安定した結果が得られるものと考えられた。

3-3-3) 3-メチルコラントレンによる CYP1A 酵素の誘導

8 施設において、EROD 活性の誘導をモニターしたところ、3 サイクルとも、3-MC 処理後 1 日目と 2 日目にはコントロール活性に対して約 5 倍および約 3 倍と、明瞭な誘導が観察された。この活性は経日的に減弱し、処理後 5 日目ではコントロール活性に対して 1.5 倍前後となり、7 日目には無処置レベルとなった。

施設間の活性データの偏差については、50%前後の値となった。これは、サイクル 1~3 間や 3-MC 処理後 1~4 日目において、ほぼ一定であった。

3-4) ヒト組織を用いたメルカプトベンズイミダゾール (MBI) の代謝研究

MBI の代謝をヒトとラット肝ミクロゾーム分画で検討した。MBI をラットないしヒト肝 *ms* でインキュベートした

場合、NADPH 添加により、HPLC 上で MBI ピークの減少と同時に benz-imidazole(BI)の生成が認められ、この BI ピークの生成に lag time が認められた。ヒトではラットの約 1/4 の活性であった。また、各種の P450 阻害剤の影響を検討したところ、Quinidine で抑制されたが、他の阻害剤 (ANF、Sulfaphenazole、Omeprazole、Ketoconazole、SKF525A) では抑制されなかった。一方、FMO 阻害剤である Methimazole (1mM)で強く抑制された。そこで、遺伝子発現で作成されたヒト FMO を用いて代謝活性を検討したところ、強い MBI 代謝活性が認められた。また、各種ヒト P-450 発現系マイクロゾームでは BI の生成を確認できなかった。一方、肝マイクロゾームにおけるテストステロン(TS)の代謝 (6 β -hydroxyTS の生成) は 10 μ M 程度の MBI によって阻害されることが判明した。また、この抑制は MBI とのプレインキュベーションにより増加した。

3-5) ヒト平滑筋組織を用いた薬物感受性に関する研究

3-5-1) 大腸輪状平滑筋

ヒト大腸輪状平滑筋は、acetylcholine、carbachol、neurokinin A、bradykinin に対して用量依存性に強い収縮反応を示したが、histamine や substance P ではごく弱い収縮しか認められなかった。この標本を経壁電気刺激 (4Hz、0.3 msec、20V) するとコリン作動性壁内神経の刺激に基づく収縮反応が得られるが、新しく発見された内因性大麻様物質 2-arachidonoylglycerol はこのコリン作動性収縮を用量依存性に、また刺激頻度依存性に抑制した。しかし、2-arachidonoylglycerol は外来性 acetylcholine による用量依存的な収縮反応にはまったく影響しなかった。一方、モルモットから摘出した大腸平滑筋では 2-arachidonoylglycerol は用量依存的な収縮反応を示し、これは atropine (1 μ M)や tetrodotoxin (1 μ M)により完全に抑制された。

3-5-2) 大腸縦走粘膜筋板

ヒト大腸縦走粘膜筋板は自動運動や自発的な筋緊張を持たないが、acetylcholine、carbachol、prostaglandin F₂ α 、neurokinin A により用量依存的な収縮反応を示した。しかし、histamine や 5-hydroxytryptamine、bradykinin では有意な反応は認められなかった。一方、モルモットから摘出した大腸縦走粘膜筋板では自動運動が認められ、acetylcholine、carbachol、neurokinin A に加えて histamine により強い収縮反応が見られたが、prostaglandin F₂ α や 5-hydroxytryptamine、bradykinin では弱い収縮しか認められなかった。また、ラット大腸粘膜筋板では acetylcholine、carbachol、neurokinin A、bradykinin により強い収縮反応が認められたが、histamine、prostaglandin F₂ α 、5-hydroxytryptamine ではほとんど反応が認められなかった。

3-5-3) 子宮平滑筋

この2年間に関西医科大学産婦人科よりヒト子宮標本をすでに 70 例余り提供を受け、これまでに行ってきた実験動物 (ラット) の知見と比較することができた。特に本年度は、平滑筋収縮におけるCキナーゼの役割について以下のような興味ある知見を得た。

ヒト子宮筋はCキナーゼの活性化薬であるホルボールエステル (PDBu) によって収縮した。収縮は妊娠筋 (帝王切開で得られた標本) で有意に大きかった。他方、ラット子宮筋では収縮反応は示さなかった。また、高濃度Kで刺激した筋に PDBu を投与すると、ヒト子宮筋では収縮が増強された。他方、ラット子宮筋では収縮が抑制され、ヒトとは全く逆の反応を示した。高濃度K存在下に PDBu を添加した場合、ヒト子宮筋ならびにラット子宮筋いずれにおいても細胞内 Ca 濃度は減少した。すなわち、ヒト子宮筋では収縮蛋白質の Ca 感受性が著しく増加していることが示された。脱膜化標本を用いて収縮蛋白質 Ca 感受性に対する PDBu の作用を調べたところ、ラット子宮筋では影響がなかった。ヒト子宮筋においては増強された。ヒト子宮筋では、cPKC、nPKC、aPKC (一部を除く) いずれの PKC アイソザイムも発現していた。ヒト子宮筋の PDBu 収縮は、cPKC 選択的阻害剤で強く抑制された。

3-6) ヒト胎盤における P450 分子種の発現について

3-6-1) ラット胎盤における P450 の発現

Western blotting の結果、胎齢 9 日以降の胎盤で CYP3A1 の強い発現を確認した。免疫組織化学では栄養膜巨細胞と

子宮胎盤境界部の円形細胞に CYP3A1 の強く発現がみとめられた。CYP2B1 と CYP4A1 は胎齢 9 日～11 日で発現が認められたが、それ以降は陰性であった。CYP2C12 は胎齢 9 日でのみごく弱い発現がみられた。他の P450 (CYP1A1、CYP2C6、CYP2D1、CYP2D4、CYP2E1) は観察期間 (胎齢 9～19 日) を通じていずれも陰性であった。

3-6-2) ヒト胎盤における P450 の発現

Western blotting の結果、CYP2E1 の弱い発現が確認されたが、発現の程度は個体によって異なっていた。免疫組織化学では CYP1A1 と CYP2C8～19 が絨毛間質と脱落膜細胞に、CYP3A4 が脱落膜細胞に発現していた。他の検索した P450 (CYP1A2、CYP2B6、CYP2E1、CYP3A4、CYP3A5) はいずれも陰性であった。

4. 考察

臨床試験やヒト組織を用いた試験・研究を行うためには、社会の研究に対する理解を得ることが欠かせない条件である。自ら志願者として臨床試験に参加してもらうために、また組織提供者として協力してもらうためには、研究の意義を理解してもらうとともに、試験が適切な手順で行われること、また、研究内容や結果の公開が必要である。我々は社会の理解を得るための一つの手段として施設毎に倫理委員会を設置し、試験内容の倫理的適切性について審議してもらい、その承認に基づいて、ヒト組織を用いた薬物代謝に関する研究を進めてきた。一方、英国では地域に研究倫理委員会があり、研究の可否について検討していることが判明した。従来より我が国の倫理委員会や IRB はいずれも研究施設や医療機関が独自に設立し、運営しているものであるが、この地域研究倫理委員会は実施に臨床試験やヒトに関する研究を行う機関からは独立して運営されていることが明らかになった。また、委員は地域の行政による基準よりもかなり多く指名されていた。このような倫理委員会は臨床試験やヒト組織を用いた研究に対する地域住民の理解と信頼を得るために極めて有効と思われた。

凍結ヒト遊離肝細胞を用いた代謝評価における簡易バリデーション試験については、今回のプロジェクトで初めて作業した施設が多く、確かに施設間での多少の偏差はあったものの、当初の懸念よりも小さな範囲に納まった。完璧とはいかないものの、添付書の手順に従って試験する限り、多少の練習をすれば、どこでもある程度まとまった結果を得られることが明らかとなった。すなわち、特殊な能力を要求するものではなく、この試験系が一般的なものとして受け入れられる可能性を明確にすることができた。

7-エトキシマリンの代謝以外に、各社で開示可能な化合物の代謝試験を行った。その結果、in vivo での血中および尿中等で確認された代謝物が、凍結保存ヒト肝細胞によっても検出された。代謝物の動態を定量的に予測することは困難としても、臨床試験に入る前に定性的な代謝パターンを知る上で、ヒト凍結保存肝細胞は大変に有用である。また、酸化反応と抱合反応などの複数の代謝経路を持つ化合物ではミクロソーム系より適しており、より in vivo に近い評価系として今後の活用が期待される。また、実際に凍結保存ヒト遊離肝細胞を用いて薬物代謝活性を評価する場合には、薬物代謝酵素の代表的基質の活性との並行評価が望まれる。

酵素誘導試験についても、今回のプロジェクトで初めてヘパトサイトを取り扱った施設が多かったため、確かに施設間での偏差があった。これを解消する手段として、陽性対照化合物との誘導比率で評価することが推奨されると考えられた。これに加えて、より本質的な問題点としては、フラスコへの細胞播種の過程と、輸送過程での安定性に起因すると考えられるフラスコ間の偏差が挙げられる。これを解消するためには、アルブミン生成能や LDH 漏出をモニターして、フラスコ毎の生細胞比率を加味した評価が望ましい。

今後、これらの点に留意し、添付書の手順に従って試験する限り、多少の練習をすれば、どこでもある程度まとまった結果を得られることが明らかとなった。すなわち、特殊な能力を要求するものではなく、この試験系が一般的なものとして受け入れられる可能性を明確にすることができた。

ゴムの老化防止剤として多量に使用されている MBI がヒト肝ミクロソームにおいて Flavin 含有モノオキシゲナーゼにより代謝されることが明らかになった。一方、MBI は反復投与によりミクロソームにおける薬物代謝活性を抑制することが明らかになっているが、今回、特に CYP3A 依存性の薬物代謝活性を非可逆的に抑制することが明らかになった。これらは MBI が他の薬物等と代謝レベルでの相互作用を起こす可能性を示唆している。この in vitro での CYP3A4 をはじめとする肝ミクロソーム cyt. P-450 との相互作用から in vivo での肝障害との関連性が示唆された。MBI およびその類縁化合物はプロトンポンプ阻害剤の代謝物としても生成することから、プロトンポンプ阻害剤の使用に際してはその代謝物の特性お

よびそれらがどの程度生成するか検討する必要がある。

ヒト摘出大腸輪状平滑筋における薬物反応性をモルモット摘出標本と比較すると、histamine や substance P の収縮反応に大きな違いが認められた。これらは炎症反応の重要なメディエーターであるが、ヒトの病態時での役割はモルモットとは異なることが示唆される。新しい免疫・炎症反応のメディエーターと見られている 2-arachidonoylglycerol は、ヒト大腸輪状平滑筋のコリン作動性収縮を抑制したが、外来性 acetylcholine 収縮に対しては抑制しなかったため神経終末からの acetylcholine 遊離抑制作用があると考えられる。しかしモルモットでは逆に神経終末からの acetylcholine 放出を促進することによる収縮反応を示した。一方、消化管粘膜表面の動きを調節する縦走粘膜筋板は消化管粘膜の消化・吸収能に重要な役割を果たしているが、これまで系統的に研究されていない。今回はじめてヒト大腸粘膜筋板の反応を検出できたが、モルモットやラットと異なり自動運動や自発的筋緊張がなく、histamine や bradykinin、5-hydroxytryptamine の反応性がきわめて低いことなどの特徴が明らかになった。今後、下痢や便秘、潰瘍性大腸炎、クローン病などの治療薬の標的として粘膜筋板が想定されるが、今回の結果はこれらの治療薬の薬効評価にはヒト標本での検討が欠かせないことを示している。

今回の成績から、ヒトとラット子宮筋収縮におけるCキナーゼの役割の違いが明らかとなった。すなわち、受容体刺激によってPI代謝回転が活性化されCキナーゼの内因性活性化因子であるジアシルグリセロールが産生されるが、ラットではこのジアシルグリセロールが細胞内Ca濃度を低下させて抑制的（ネガティブフィードバック）に働くが、ヒトでは逆に収縮蛋白系に働いてポジティブフィードバックに作用していることを示している。収縮蛋白系への作用はcPKCが関与することも阻害剤の効果の差から明らかになった。また、妊娠に伴いヒト子宮筋におけるCキナーゼに対する感受性が増大していることも明らかとなった。子宮筋収縮薬は分娩補助薬として、子宮筋弛緩薬は切迫流産防止薬として使用されるが、これらの薬剤開発に当たっては、ヒト臓器で検証することの重要性が再認識された。

また、今年度の結果からラットとヒトでは胎盤におけるP450 isozymesの発現分布パターンが異なることが明らかになった。したがって、ヒトにおける医薬品などの胎仔・胎盤毒性および薬効の評価にはヒト組織の利用が望ましいと考えられた。現在、さらに様々なP450 isozymesの抗体を用いて検索を継続しており、近い将来さらに詳細な発現パターンを明らかできるであろう。また、ヒトでは同一のCYP isozymesでも個体によって発現の程度が異なっていたが、これは遺伝あるいは飲酒・喫煙歴など生活習慣の相違によると思われる。ヒトの胎盤組織が継続的に入手可能になったので、今後は遺伝的背景・生活習慣との関連、さらには臨月以前の胎盤での発現についても検索したいと考えている。

5. 結論

英国の研究倫理委員会についての情報が集積した。英国で広くかつスムーズにヒト組織を用いた研究や臨床試験が行われている背景には地域に根ざした公的な研究倫理委員会が存在しており、地域住民の信頼を高めているものと思われた。今後、更に実地調査を行い、どのように活動しているか検討する必要がある。また、凍結及び非凍結肝細胞はそれぞれ代謝研究および酵素誘導能の研究に有用であると思われた。また、凍結ヒト肝ミクロソームを用いることにより代謝における種差の検討が可能で、ヒトでの薬効や毒性予測に有用な情報を提供すると思われた。

ヒト大腸輪状筋はモルモットに比べて histamine や substance P の反応性が低かった。また 2-arachidonoylglycerol はコリン作動性収縮を前シナプス性に抑制したが、モルモットでは促進した。ヒト大腸縦走粘膜筋板はモルモットに比べて prostaglandin F₂α に対して強い収縮反応を示したが、自動運動や自発的筋緊張などは見られなかった。

子宮筋収縮薬は分娩補助薬として、子宮筋弛緩薬は切迫流産防止薬として使用されるが、これらの薬剤開発に当たっては、ヒト臓器で検証することの重要性が再認識された。今後は、ヒト子宮筋におけるCキナーゼの役割についてさらに検証していく予定である。特に、Cキナーゼのターゲット蛋白質が何であるかを生化学的あるいは分子生物学的に明らかにする。さらに、ヒト子宮筋の特性を考慮しながら、新たな子宮平滑筋作動薬の検討を行う。現在真に有効な切迫流産防止薬の開発が望まれているが、ヒト子宮標本を用いて、収縮蛋白系に作用する薬物に関する検索を行うことも今後のテーマとなろう。

ラットとヒト胎盤における P450 isozymes の発現分布パターンの解析を行ったところ、両者におけるパターンが異なっていた。

6. 研究発表

- 大野泰雄、簾内桃子、ヒト初代培養肝細胞を用いた毒性試験法、非臨床試験マニュアル —ICH への対応と新しい試み—、エル・アイ・シー出版社 (印刷中)
- Ejiri,N., Katayama,K., and Doi,K. Expression of cytochrome P450 (CYP) isozymes proteins in rat placenta. Proc. 2nd AsiaTox. 200 (2000)
- Katayama,K., Ishigami,N., Suzuki,M., Ohtsuka,R., Kiatipattanasakul,W., Nakayama,H., and Doi,K. Teratologic studies on rat perinates and offspring from dams treated with ethylnitrosourea (ENU). Exp. Anim. 49: 181-187 (2000)
- Katayama,K., Ishigami,N., Uetsuka,K., Nakayama,H., and Doi,K. Ethylnitrosourea (EUN)-induced apoptosis in the rat fetal tissues. Histol. Histopathol. 15: 707-711 (2000)
- Ishigami N., Shinozuka J., Nakayama H., and Doi K. Apoptosis In mouse fetuses from dams exposed to T-2 toxin at different days of gestation. Exp. Toxicol. Pathol.. (in press)
- Katayama K., Uetsuka K., Ishigami N., Nakayama H., and Doi K. Apoptotic cell death and cell proliferative activity in the rat fetal central nervous system from dams administered with ethylnitrosourea (EUN). Histol. Histopathol. (in press)
- Kojima S, Ikeda M & Kamikawa Y: Investigation into the 5-hydroxytryptophan-evoked luminal 5-hydroxytryptamine release from the guinea pig colon. Jpn. J. Pharmacol. 84: 174-178, 2000.
- Uchida K, Saito K, Kitajima T & Kamikawa Y: Effects of Ba²⁺ on SK&F96365-sensitive sustained contraction of rat pulmonary artery. J. Pharm. Pharmacol. 52: 1513-1518, 2000.
- Kamikawa Y, Shibukawa A, Uchida K, Kojima S, Sakuma A, Kubota K, Ohno Y & Okuda H: Comparison of motor reactivity of the human colon cold-stored in different preservative solutions to carbachol and noradrenaline. Pol. J. Pharmacol. 52: 299-305, 2000.

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社