

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	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
72001 20001001A	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
72002 20001002A	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
72003 20001004A	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
72004 20000998A	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
72005 20001003A	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
72006 20001005A	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
72007 20001000A	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
72008 20000999A	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

## 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

所 属 自治医科大学 分子病態治療研究センター 臓器置換研究部  
研究者 小林 英司

### 分担研究者

- (1) 京都大学 医学部 移植免疫学講座 田中 紘一
- (2) 東京大学 医学部 附属病院 小児外科 河原崎 秀雄
- (3) 自治医科大学 臨床薬理学教室 藤村 昭夫
- (4) 自治医科大学 病理学教室 斎藤 健
- (5) 国立小児病院小児医療研究センター 実験外科生体工学部 絵野沢 伸
- (6) 自治医科大学 血液学教室 小澤 敬也
- (7) 昭和大学 医学部第二薬理学 安原 一
- (8) HAB 協議会附属霊長類機能研究所 佐藤 哲男

### 要 旨

公共的研究資源としてのヒト組織の利用システム構築のためには、患者保護を徹底させながら、現行にある臨床研究を推進させる必要がある。また、収集されるであろう組織の応用法を明確化し、国民の理解を得るために研究と同時に啓蒙運動が必要である。我が国では、これらの組織収集及び管理は高額とならざるを得ないことより、行政による管理指導が必須である。

### 1.研究目的

ヒト組織(細胞)は医薬品開発やポストゲノムの研究試料として必須である。平成9年12月に出された「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発のあり方について」の答申を受け、我が国においてヒト組織の研究利用の公共システム、特に「肝組織の研究利用」のそれが可能であるか否かを検討した。

### 2.研究方法

平成12年度は、昨年度開始した動物実験及びヒト組織を利用した基礎臨床研究の推進に加え、よりバンク化しやすい組織収集を通してバンク化のパイロット研究を行った。

- ① 動物実験による組織(肝、小腸)の処理、保存基準の検討(小林)
- ② ヒト細胞を利用した人工臓器の開発(藤村)
- ③ 既に切除されていた転移性肝癌の切除範囲についての病理学的検討(斎藤)
- ④ ヒト臓器・組織利用に際してのインフォームド・コンセントの取得法に関する検討(安原)
- ⑤ 診断目的の採取組織の研究への利活用法(田中、河原崎)
- ⑥ バンク構築が可能と考えられる試料とその採取(扁桃:絵野沢、臍帯血:小澤)
- ⑦ ヒト肝組織におけるチトクロームP450の遺伝子解析(佐藤)
- ⑧ 情報の匿名化の具体的検討(小林)

### 3.研究成果

- ① 動物を用いた実験により以下のことが明らかになった。
  - (i) ラット肝ミクロゾームタンパク収率及びチトクローム活性は、摘出肝を4℃に保持することで4時間までほぼ変化なく保つことができた。
  - (ii) ラット新生仔小腸は、摘出後組織のまま凍結保存(1ヶ月以上)しても、再移植により腸管としての機能を再構築できた。
  - (iii) 約10kgのブタを使用し摘出肝にコラゲナーゼ灌流を行ったが、約90%の細胞生存率として肝細胞が得られた。細胞数としては、湿重量10gに対し約 $10^9$ 細胞程度であった。したがってヒト組織において以下の2点が考えられた。肝組織の場合、摘出(切除)後は、肝細胞への分離までの間は、まずクールダウン(4℃)に保持することにより数時間単位でそのパイアビリティーを維持できる。その間に切除範囲に対する妥当性を証明することが重要である。
- ② ヒト培養細胞を用いた人工臓器開発を行うために、MRP-2と共通の膜貫通部位をもつホモロジックDNAをgene bankよりスクリーニングし、ヒト脳より未知遺伝子として登録されていたクローンを発見し全長を求めた。さらに、機能をXenopus oocyte発現系で解析した。
- ③ 最近10年間の転移性肝癌の切除標本(58例)の検討では、手術自体の縮小化があり、研究利用可能となる正常部分が少なくなる傾向にあった。  
したがって、肝細胞へのハンドリングを行う前に切除肝の切除範囲の妥当性を証明する必要があると考えられた。
- ④ ヒト組織の提供を受ける際の提供者のプライバシーの保護と権利の保障を念頭に置いた同意説明文書及び同意書のモデルの作成を行い、問題等の検討を試みた。
- ⑤ 生体肝移植の研究試料としては、末梢血液よりリンパ球及び血清を用い、前者は免疫抑制薬の感受性試験、後者は内因性免疫抑制物質の同定を行った。また診断目的に保存されている既存肝組織に関しては、今後の研究利用に対し、文章配布による同意を得た。今後、文書配布による同意は説明への限界があり、手術前からの研究利用に対する同意が必須であった。
- ⑥ 扁桃や臍帯血などはバンク構築しやすい組織であり、前者では実際に多目的使用のためのバンク化の同意、サンプルを収集した(17検体公共利用可能)。臍帯血についても研究利用に関し多くの同意が得られた(29検体凍結)。このように摘出組織の中には、公共利用可能なシステムを構築しやすいものがあり、また公共的には既存のシステム(臍帯血バンクなど)を利用することで実現化が極めて高いと判定された。
- ⑦ 供給された米国人ヒト肝臓15サンプル及び日本人肝細胞癌患者15名(聖マリアンナ医科大学との共同研究として入手)の非癌部位サンプルを用いてCYP3Aサブファミリーの人種差を比較検討した。CYP3A5は白人では40%を、日本人では33%をしめており、両者には人種差は見られなかった。CYP3A7については、白人で67%、日本人で93%でありその蛋白量はCYP3A4に比べて低かった。
- ⑧ 患者試料の厳重な匿名化を行うためにコンピューターソフトSecure Clinical Data Transfer System(SCTS)21を開発した。本器は先にミレミアム研究用として開発されたSNP2000をベースに匿名化のパッケージ部を改良し、三井情報開発と共同開発した。保存される情報はRelational Data Baseとして256ビット鍵の暗号化により厳格に情報管理される。本器プロトタイプを用いて実際の試料サンプル(肝、血液、など)の匿名化を行った。本器はSNP2000と比し極めて安価に販売可能であり、多くの患者試料提供施設への普及が可能と判断された。

### 4.考 察

日本におけるヒト組織バンクシステム構築のためには組織摘出機関と研究機関の機能をあわせ持つ組織作りが不可欠と判断した。その組織内の必須要件としては、

- ① 適切なインフォームド・コンセントと個人情報の匿名化

② 切除標本の妥当性の確認（病理医による切除標本の剖面等の写真資料等）

これらは、患者と医師の信頼関係に基づき医療機関が行うものである。更に提供される試料が具体的にバンク化されるためには、

③ 教育病院に勤務する研究者は、積極的にバンクと sharing できる体制にする。

④ バンクは公的なものである必要がある。

⑤ 組織の提供に対する国民の理解を得るために、ヒト組織の研究利用に対する啓蒙運動が必須である（尚、平成 12 年度は、本研究成果を患者及びその家族に報告する発表会を開催した）。

これらの条件を全国的規模で早急に整え、透明で公正なシステム作りが不可欠である。

## 5. 結 論

公共的研究資源としてのヒト組織の利用システム構築のためには、患者保護を徹底させながら、現行にある臨床研究を推進させる必要がある。同時に、収集されるであろう組織の応用法を明確化し、国民の理解を得るための啓蒙運動が必要である。収集組織には、始めから公共利用を目的にできる場合と他の臨床研究目的で採取されたサンプルの利活用がある。我が国では、いずれのケースの場合も組織収集及び管理は高額とならざるを得ないことより、行政による管理指導が必須である。

## 6. 研究発表

[論文発表]

- (1) 小林英司, 他. 21 世紀における創薬と研究資源バンク. *Human Science*12 : 4-12, 2001.
- (2) Tahara K, Uchida H, Kawarasaki H, Hashizume K, and Kobayashi E. Experimental Small Bowel Transplantation Using Newborn Intestine in Rats:III. Long-Term Cryopreservation of Rat Newborn Intestine.*J.Pediat.Surg.*(in press).
- (3) Uchida H, Tahara K, Takizawa T, Inose K, Takahashi Y, Hashizume K and Kobayashi E. Experimental Small Bowel Transplantation Using a Newborn Intestine in Rats:IV. — Effect of Cold Preservation on the Graft Neovasacularization. *J.Pediat Surg*36 : 602-604,2001.
- (4) Takatsuki M, Uemoto S, Inomata Y, Egawa H, Kiuchi T, Fujita S, Hayashi M, Ueda M, Tanaka K. Weaning of immunosuppression in living donor liver transplant recipients. *Transplantation* (in press).
- (5) Takatsuki M, Uemoto S, Inomata Y, Sakamoto S, Fujita S, Hayashi M, Ueda M, Kanematsu T, Tanaka K. Analysis of alloreactivity and intragraft cytokine profiles in living donor liver transplant recipients with graft acceptance. *Tranplant Immuno*(in press).
- (6) 水田耕一、河原崎秀雄、吉野浩之、田辺好英、川野陽一、菅原寧彦、今村 宏、高山忠利、幕内雅敏：東京大学における免疫抑制剤 conversion の検討。今日の移植.14:110-111,2001.
- (7) Tsuruoka, S., Osono, E., Nishiki, K., Kawaguchi, A., Arai, T., Saito, T., Takata, T., Sugimoto, K., Kurihara, S., Fujimura, A. Removal of digoxin by column for specific adsorption of B2-microglobulin, -a potential use for digoxin intoxication-. *Clin. Pharmacol. Ther.* (in press).
- (8) 絵野沢伸、鈴木盛一、雨宮浩、土橋信明、川城信子、宇津木伸、高村政範、松村外志張。公共的な研究用ヒト組織バンク設立のための検討—国立小児病院における摘出ヒト扁桃リンパ組織バンク構築の試み—。 *Tiss.Cult.Res.Comm.*19: 163-183,2000.
- (9) 雨宮浩、絵野沢伸、鈴木盛一。ヒト組織の利用—日本における現状と将来展望。 *ファルマシア* 36:1059, 2000.
- (10) Kishino, K., Muroi, K., Kawano C., Obata, T., Sugano, N., Nakagi Y., Nagashima, T., Watari, K., Iwamoto, S. & Ozawa, K. Evaluation of Engraftment by ABO Genotypic Analysis of Erythroid Burst-Forming Units after Bone Marrow Transplantation. *Leukemia Research* (in press)
- (11) Kogure, K., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Sato, Y., Monahan, J., & Ozawa, K. Targeted

integration of foreign dna into a defined locus on chromosome 19 in K562 cells using AAV-derived components. *Int. J. Hematol.* (in press)

(12) Hanazono, Y., Terao, K., & Ozawa, K. Gene transfer into non-human primate hematopoietic stem cells: implications for gene therapy. *Stem Cells* (in press)

(13) Kawano, C., Muroi, K., Kuribara, R., Matsumoto, Y., Ohtsuki, T., Hatake, K., & Ozawa, K.: Engraftment syndrome after autologous peripheral blood stem cell transplantation with high numbers of peripheral blood stem cells followed by granulocyte colony-stimulating factor administration. *Bone Marrow Transplant.* 25, 228-229 (2000).

(14) Kume, A., Xu, R., Ueda, Y., Urabe, M., & Ozawa, K.: Long-term tracking of murine hematopoietic cells transduced with a bicistronic retrovirus containing CD24 and EGFP genes. *Gene Ther.* 7, 1193-1199 (2000).

(15) Hanazono, Y., Dunbar, C.E., Donahue, R.E., Kato, I., Ueda, Y., Hasegawa, M., Urabe, M., Kume, A., Terao, K., & Ozawa, K.: Basic studies toward hematopoietic stem cell gene therapy. In *Cell Therapy* (ed. by Ikeda, Y., Hata, J., Koyasu, S., Kawakami, Y., Hattori, Y.), Springer-Verlag, Tokyo, pp.159-169 (2000).

(16) Ozawa, K., Xu, R., Matsuda, K.M., Nagashima, T., Ueda, Y., Hasegawa, M., Hanazono, Y., & Kume, A.: Development of selective amplifier genes for hematopoietic stem cell gene therapy. *Proceeding of the International Workshop "Stem Cell Biology and Cellular and Molecular Treatment"*, pp.135-140 (2000).

[学会発表]

(1) 清水竜、鈴木聡、小林英司、佐藤哲男. 肝の保存条件とタンパク収率およびチトクロム P450 との関連—手術切除組織の有用性の検証—. 第 121 回日本葉学会 (2001.3.28-30 札幌)

(2) 水田耕一、河原崎秀雄、吉野浩之、橋詰浩平、菅原寧彦、今村 浩、高山忠利、幕内雅敏: 肝移植患者における免疫抑制剤 conversion の検討. 第 36 回 日本移植学会総会. (2000.10.11-13 岐阜)

(3) 佐藤哲男、鈴木聡、清水竜、安原一、倉田知光、小林英司. ヒト型資源の有用性とバンク化にかかわる問題点. 第 73 回日本組織培養学会 (2000.9.7-8 岡山)

(4) 安原一. 「日本における適正なヒト組織の利用」ヒト組織の利用とインフォームド・コンセント. 第 7 回 HAB 協議会学術年会 (2000.5 東京)

(5) 安原一. 「摘出組織の研究利用」薬物代謝評価とインフォームド・コンセント. 第 24 回医学系大学倫理委員会連絡会議 (2000.12 東京)

---

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