

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

ヒト組織新鮮材料を用いた薬物の作用評価の研究
ー産学共同のネットワーク作りをめざしてー

所属 大阪大学医学部保健学科
研究者 松浦 成昭

分担研究者

- | | |
|-------------------------|------|
| (1) 大阪大学大学院医学系研究科 | 門田守人 |
| (2) 大阪大学大学院医学系研究科 | 吉川秀樹 |
| (3) 東北大学大学院医学系研究科 | 堀井 明 |
| (4) 東京大学大学院医学系研究科 | 名川弘一 |
| (5) 東京慈恵会医科大学 | 大石幸彦 |
| (6) 杏林大学医学部 | 村田厚夫 |
| (7) 京都大学大学院医学系研究科 | 今村正之 |
| (8) 奈良県立医科大学 | 中島祥介 |
| (9) 熊本大学医学部 | 小川道雄 |
| (10) 大阪府立成人病センター | 今岡真義 |
| (11) 箕面市立病院 | 吉川宣輝 |
| (12) NTT西日本大阪病院 | 門田卓士 |
| (13) 関西労災病院 | 富田尚裕 |
| (14) 住友製薬株式会社総合研究センター | 金丸 博 |
| (15) 第一製薬株式会社東京研究開発センター | 田中紀子 |
| (16) 大鵬薬品工業株式会社第二がん研究所 | 福島正和 |
| (17) 大日本製薬株式会社開発研究所 | 藤井敏彦 |
| (18) 武田薬品工業株式会社創薬第二研究所 | 日下雅美 |
| (19) 田辺製薬株式会社創薬研究所 | 仁藤新治 |

要 旨

手術標本からヒト組織新鮮材料を採取する場合に、時間経過が問題になるが、切除後12時間程度まではタンパク質、酵素活性、DNAなどは保持されと考えられた。一方、RNAは短時間に分解を受け、トータルの量としては3時間程度まで維持されていた。しかし、個々のmRNAについてはもっと短い時間で壊れる可能性があり、さらに細かい検討が必要であると考えられる。

ヒト組織新鮮材料を用いた薬物の作用評価の研究を行うにあたり、組織提供側である病院における患者へのインフォームドコンセントに基づく十分な説明がなされること、提供者側、利用者である研究者側の双方の倫理委員会による承認を受けることが必要である。

1. 研究目的

本研究は手術あるいは病理剖検時に得られるヒトの新鮮組織を用いることにより、薬物の有効性、安全性を評価する方法を検討していくものである。また、欧米に見られるようなヒト組織のバンクの将来の設立をめざして、産学共同のネットワーク・システム作りを企図するものである。

医薬品の研究開発において、ヒトと動物の間に薬物の代謝や反応性に相違が見られ、動物を用いた薬理試験等の結果が必ずしもヒトに適合しないことがあり、ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性の検討は欠かせない。本研究により、人体に対する薬物の作用や代謝機序の正確な把握が可能となることから、無用な臨床試験や動物実験の排除、被験者の保護に充分配慮した臨床試験の実施が期待できるとともに、薬物相互作用の予測も可能となる。また、このように、新薬開発を効率化するだけでなく、直接的にヒトの病変部位を用いることによって、疾病メカニズムの解明や治療方法、診断方法の開発などに大きく貢献できるものと期待される。

ヒト組織新鮮材料の提供に当たり、通常は手術で摘出された臓器の一部が当てられることになるが、理想的な状態で材料を採取することは通常困難である。すなわち、ヒト組織材料は手術で摘出してから、家族に見せたり、病変を確認するための種々のプロセスを経てから採取され、かなりの時間が経過することになる。本研究の目的の1つは手術標本の時間経過から、どれくらいまで組織材料が利用可能であるか、明らかにすることにある。また、ヒト組織新鮮材料入手に際しての提供者からの同意を得るに際して、インフォームドコンセントの書式および対応する倫理委員会等について調査研究を行うことも重要な問題であり、検討した

2. 研究方法

手術標本からのヒト組織材料の採取に際して、摘出後の時間経過により、どれくらいまで使用可能か、タンパク質、mRNA、DNAレベルに分けて検討した。さらに、剖検材料から、研究の目的とするタンパク質、mRNA、DNAを得ることが出来るかどうか、基礎的検討を行った。

これらの研究は患者に対するインフォームドコンセント等から十分に行うことが難しかったので、動物（マウス、ラット）を用いて、手術標本からの組織材料の採取について、摘出前の血管の結紮、摘出後の状態、時間経過などにより、タンパク質、DNA、RNAがそれぞれの程度、傷害を受けるかを検討した。

また、ヒト組織を用いる研究を実施する研究者および提供する方と考えられる外科医にインタビューを実施し、インフォームドコンセントの書式および倫理委員会の対応などについて、調査を行った。

3. 研究成果

1, 手術標本からの組織材料の採取について、摘出前の血管の結紮、摘出後の状態、時間経過などにより、タンパク質、DNA、RNAがそれぞれの程度、傷害を受けるかをラットの種々の組織を用いて検討した。総蛋白質量、酵素活性は血管の結紮の有無、摘出後室温状態・氷冷状態、摘出後時間（3時間まで）の影響をほとんど受けなかった。膵臓のみが死後（3時間）摘出で低下を認めた。一方、DNA、RNA量も検討した範囲では大きな差を認めなかった。このことから、摘出後、3時間くらいまでに液体窒素で凍結すれば、材料として大きな活性低下がない可能性が示唆された。

2, ヒト、ラット、イヌおよびサル由来の凍結肝細胞（いずれも市販）を用いて、薬物代謝能の持続性および薬物代謝パターンの種差を比較した。薬物代謝能の持続性はヒト、イヌ、サル肝細胞の方がラット肝細胞よりも良好であった。薬物代謝パターンにおいても、ヒト肝細胞はイヌ、サル肝細胞と類似パターンを示し、ラット肝細胞とは異なる結果を得た。

3, ヒト大腸由来細胞Caco-2を用いて、薬物の消化管からの吸収性が予測できるかの検討を行った。Caco-2単層細胞はタイトジャンクションの形成、トランスポーター機能の点から、細胞播種後19日目から25日目のものが吸収性評価に使用可能と考えられた。これを用いて、15種類の薬物について透過性を測定し、文献上のヒト消化管からの吸収率との相関を検討したところ、両者の間に良好な相関が認められた。また、DMSO等の溶解補助剤共存下での透過性を測定した結果、溶解補助剤を使用した場合においてもヒト消化管での吸収率との間に良好な相関が認められ、その使用に問題のないことが明らかとなった。

4, ヒト組織を用いる研究を実施する研究者および提供する方と考えられる外科医にインタビューを実施し、インフォームドコンセントにおける問題点および倫理委員会の対応などについて、調査を行った。患者に対するインフォームドコンセントの点では、研究のためにヒト組織を提供することに関して、臓器の摘出に不利益を被ることがないことを説明する難しさが多くの外科医から寄せられた。また、患者のプライバシー保護の点で、どこまで患者情報を与えるかについての問題点も指摘された。一方、研究者からは感染症などのバイオハザードの危惧が寄せられた。

4. 考察

手術標本からの組織材料については一般的にはタンパク質レベル、酵素の活性、DNAレベルの解析は手術後12時間くらいは安定であり、十分に行えると考えられた。一方、mRNAレベルは3時間程度までは問題なかったが、条件に左右されることが多く、今後の課題と考えられた。また、個々のmRNAについてはもっと短い時間で壊れる可能性があり、さらに細かい検討が必要であると考えられる。剖検材料もタンパク質レベル、DNAレベルの解析は十分に行えると考えられた。

ヒト組織を医薬品の研究開発に用いる場合、提供者である患者より得るインフォームドコンセントのあり方およびその倫理委員会における取扱いが大変重要なポイントであることが強調された。特に手術の摘出範囲に全く影響を及ぼさないことはもちろん、患者情報のプライバシー保護の点から研究者側に伝わる情報と研究から得られた情報をどう扱うかも今後の問題点である。手術そのものが患者の麻酔による意識の及ばない、いわば「密室」での行為であり、背景に医療不信がある限り、組織提供の行為は進まないと考えられる。一方、研究者の立場からは感染症などに対する対策の必要性に関する意見が寄せられた。

5. 結論

手術材料からの時間経過の検討および、剖検材料を用いた検討では、タンパク質レベル、DNAレベルの解析は採取後12時間後までは十分に行えるが、mRNAレベルは数時間以内に分解され、今後さらに細かい検討を必要とすると考えられた。

ヒト組織新鮮材料を研究目的に用いる場合、十分なインフォームドコンセントに基づく患者の理解、倫理委員会の承認を得ることが必要であることが再確認された。特に患者のプライバシー保護、倫理面からの厳重な検討による統一的な書式を作成していくことが大きな課題であると考えられる。

6. 研究発表

- 1) Takiguchi S, Matsuura N, Hamada Y, Taniguchi E, Sekimoto M, Tsujinaka M, Shiozaki H, Monden M, Ohashi S: Influence of CO₂ pneumoperitoneum during laparoscopic surgery on cancer cell growth. *Surg Endosc* 14: 41-44, 2000.
- 2) Tsujie M, Yamamoto H, Tomita N, Sugita Y, Ohue M, Sakita I, Tamaki Y, Sekimoto M, Doki Y, Inoue M, Matsuura N, Monden T, Shiozaki H, Monden M: Expression of tumor suppressor gene p16INK4 products in primary gastric cancer. *Oncol* 58: 126-136, 2000.
- 3) Ito Y, Monden M, Takeda T, H Eguchi, Umeshita K, Nagano H, Nakamori S, Dono K, Sakon M, Nakamura M, Tsujimoto M, Nakahara M, Nakao K, Yokosaki Y, Matsuura N: The status of Fas and Fas ligand expression can predict recurrence of hepatocellular carcinoma. *Brit J Cancer* 82:1211-1217, 2000.
- 4) Shamma A, Yamamoto H, Doki Y, Okami J, Kondo M, Fujiwara Y, Yano M, Inoue M, Matsuura N, Shiozaki H, Monden M: Up-regulation of cyclooxygenase-2 in squamous carcinogenesis of the esophagus. *Clin Cancer Res* 6: 1229-1238, 2000.
- 5) Ito Y, Takeda T, Sasaki Y, Sakon M, Monden M, Yamada T, Ishiguro S, Imaoka S, Tsujimoto M, Matsuura N: bcl-2 Expression in Cholangiocellular Carcinoma Is Inversely Correlated with Biologically Aggressive Phenotypes. *Oncology*. 59:63-67, 2000.
- 6) Okami J, Dohno K, Sakon M, Iwao K, Yamada T, Yamamoto H, Fujiwara Y, Nagano H, Umeshita K, Matsuura N, Nakamori S, Monden M: Genetic detection for micrometastasis in lymph node of biliary tract carcinoma. *Clin Cancer Res*. 6:2326-32, 2000.
- 7) Takemasa I, Yamamoto H, Sekimoto M, Ohue M, Noura S, Miyake Y, Matsumoto T, Aihara T, Tomita N, Tamaki Y, Sakita I, Kikkawa N, Matsuura N, Shiozaki H, Monden M: Overexpression of CDC25B phosphatase as a novel marker of poor prognosis of human colorectal carcinoma. *Cancer Res* 60: 3043-3050, 2000.
- 8) Eguchi H, Umeshita K, Sakon M, Nagano H, Ito Y, Kishimoto S, Dono K, Nakamori S, Takeda T, Gotoh M, Wakasa K, Matsuura N, Monden M: Presence of active hepatitis associated with liver cirrhosis is a risk factor for mortality caused by post-hepatectomy liver failure. *Digest Dis Sci* 45: 1383-1388, 2000.
- 9) Ito Y, Miyoshi E, Takeda T, Sakon M, Noda K, Tsujimoto M, Monden M, Taniguchi N, Matsuura N: Expression and possible role of ets-1 in hepatocellular carcinoma. *Am J Clin Pathol* 114:719-25, 2000.
- 10) Kitada T, Miyoshi E, Noda K, Higashiyama S, Ihara H, Matsuura N, Hayashi N, Kawata S, Matsuzawa Y, Taniguchi N: Addition of bisecting N-acetylglucosamine residues to E-cadherin downregulates the tyrosine phosphorylation of beta-catenin. *J Biol Chem* 276:475-480, 2001.

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