

平成13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

インフォームドコンセントに基づいた外科手術切除ヒト組織の医学研究利用ネットワーク体制の確立とヒト肝細胞を用いた試験系のバリデーション

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) 獨協医科大学薬理学研究室 | 上川雄一郎 |
| (2) 獨協医科大学病院腫瘍外科 | 砂川正勝 |
| (3) 獨協医科大学病院消化器外科 | 窪田敬一 |
| (4) 東京大学農学部獣医学科 | 唐木英明 |
| (5) 第一化学薬品(株)薬物動態研究所 | 二宮真一 |
| (6) ファイザー製薬(株)中央研究所 | 嶋田 薫 |
| (7) 武田薬品工業(株)創薬研究本部 | 吉村義信 |
| (8) 田辺製薬(株)創薬研究所 | 山田泰弘 |
| (9) 塩野義製薬(株)新薬研究所 | 馬場隆彦 |
| (10) 明治製菓(株)薬品総合研究所 | 石塚恒雄 |
| (11) 万有製薬(株)薬物代謝研究所 | 安盛俊雄 |
| (12) 大日本製薬(株)開発研究所 | 寺内嘉章 |
| (13) 持田製薬(株)総合研究所 | 大西修平 |
| (14) 日本新薬(株)開発研究所 | 中村明生 |
| (15) 三共(株)薬物動態研究所 | 三浦慎一 |
| (16) 中外製薬(株)富士御殿場研究所 | 名瀬義明 |
| (17) 第一製薬(株)創剤代謝研究所 | 岡崎 治 |
| (18) 三菱ウェルファーマ(株)総合研究所 | 藤崎 浩 |

要旨

ヒト結腸および/あるいは子宮平滑筋組織の保存法と薬理学的反応性、抗ガン剤の胃ガン組織への作用について調べた。摘出肝臓片からの遊離肝細胞調製法を確立した。凍結ヒト肝細胞での薬物の代謝は、多くの薬物で *in vivo* と極めて良い対応を示した。

1. 研究目的

本研究事業では厚生労働省のガイドラインに従い、外科手術切除ヒト組織の医学研究利用ネットワーク体制を構築することを目的とした。国立医薬品食品衛生研究所では獨協医科大学より提供された手術で摘出した肝組織を用いて、1) ヒト組織の保存と生理活性、2) 肝細胞調製法とその保存および肝スライスの利用法に関する研究、3) 肝細胞下分画を用いた代謝と毒性研究を行った。なお、本年は初年度であり、ヒト組織の提供が遅れたことから、肝細胞・肝スライス調製および非凍結ヒト肝細胞を用いる研究については予備的な検討を行った。

2. 研究方法

ヒト組織を用いた研究は、各研究施設において事前に生命倫理委員会の承認を得たのち、開始した。

2-1-1) ヒト平滑筋組織を用いた研究

大腸癌患者9名(男性5名、女性4名、平均年齢64.2±4.2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、冷却生理食塩水中に浸して実験室に運んだ。輪状平滑筋標本と縦走粘膜筋板折りたたみ標本を作製した後、95% O₂ + 5% CO₂ 混合ガス通気下、Krebs 栄養液中に懸垂してその収縮張力を等尺性に記録した。実験は手術による臓器摘出後約4-5時間内に開始した。一部の輪状筋標本は凍結保存液に浸してプログラムフリーザーにて-80℃まで凍結させ、1ヶ月以上凍結保存した後に解凍してその薬理的反応性を評価した。一部の粘膜筋板標本では、高速液体クロマトグラフィー/電気化学検出器システムを用いて5-hydroxytryptamine(5-HT)とその代謝物5-hydroxyindol acetic acid (5-HIAA)の遊離量を測定した。

関西医科大学産婦人科の協力を得て、ヒト手術材料より得た子宮平滑筋より条片を作成し、その収縮張力をマグヌス法により等尺性に記録した。細胞内Ca²⁺濃度は蛍光指示薬であるfura-2を用いて行った。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。RT-PCR法によりmRNAの発現量を比較した。

2-1-2) ヒト胃ガン組織を用いた研究

抗ガン剤投与前に、内視鏡下に生検鉗子を用いて癌部より組織採取し、また、抗ガン剤投与後の手術切除標本より癌部と非癌部組織を採取し、thymidylate synthase(TS)活性(FdUMP binding assay法)、dihydropyrimidine dehydro-genase (DPD)活性(radio-enzyme assay法)、TSmRNA、DPDmRNA(real-time RT-PCR法)の測定、apoptosis細胞の検索(TUNEL法)、p53陽性細胞の同定(免疫染色)、血管密度の算定(免疫染色)を行った。

2-1-3) 生体肝移植手術における病的肝細胞の機能変化

Wistar系雄性ラットの45分間全肝虚血を間歇虚血(I)群(15分虚血5分再灌流を3回)と連続虚血(C)群に分け、IP(10分虚血10分再灌流)施行の有無で4群を作製した。全肝虚血は肝門部遮断(Pringle's maneuver)を施行した。45分間の全肝虚血後経時的に血清AST、肝組織中energy charge(EC)と肝血流(レーザードップラー血流計)を検討し、再灌流後120分の血中TNF- α を検討した。180分後の肝組織像(HE染色)から肝組織壊死をCamargo,C.A. et alの分類Grade0-3で評価した。肝細胞のapoptosisは再灌流後180分のTUNEL染色所見、電子顕微鏡所見から検討した。

2-2-1) ヒト遊離肝細胞調製法の検討

ヒト肝臓組織は貴重であることから、ヒト遊離肝細胞の調製に先立ち、ウサギ(New Zealand White および Japanese White、雌雄3.2~3.5 kg) および三共株式会社から提供されたイヌ(Beagle雄3.5 kg)を用いて、ヒト肝細胞調製法について予備的な検討を行った。摘出肝臓片(8-16 g)断面の血管にカニューレを挿入し、氷冷ヘパリン含有生理食塩液(6 U/mL)を灌流して脱血した。さらに氷冷L-15培地(保存液)に置換した後、浸漬して遊離肝細胞調製施設に氷冷下搬送した。コラゲナーゼを用いた2段階灌流法にて、遊離肝細胞を調製した。肝臓片を氷冷した2% Calf serum含有L-15培地にてほぐし、細胞を分散させた後、ガーゼおよび細胞濾過器にて未消化部分等を除去した。細胞懸濁液を数回遠心分離して、無傷の実質肝細胞を得た。Viabilityはトリパンブルー染色法により算出した。

2-2-2) 肝スライスの利用法に関する研究

未処置、phenobarbital 処置(PB, 80 mg/kg, 1日1回3日間投与)および3-methylcholanthrene 処置(3-MC, 40 mg/kg, 1日1回3日間投与)のSD系5週齢雄性ラットの肝を摘出し、Vitron社製tissue slicerで肝スライス(厚さは200~250 μ , 重量は20~25 mg)を作製した。スライスをWaymouths medium(1.7 mL)入りのバイアルに入れ、回転培養した。被験薬物としてはacetaminophen(0, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0 mM)を添加した。薬物暴露処置後、反応液中のLDH活性を測定した。スライスをホモジネートし、スライスのカリウム含量、LDH活性、テストステロン6 β -水酸化酵素(Tes-OH)活性およびetoxyresorfin O-脱エチル化酵素(EROD)活性を測定した。

2-3-1) ヒト肝組織を用いたフッ化ピリミジン系抗癌剤の代謝

ヒト肝ミクロソームおよび上清画分によるテガフル(FT)およびドキシフルリジン(5-DFUR)の5-フルオロウラシル(5-FU)への変換酵素活性測定の実験系は、リン酸カリウム緩衝液下、NADPH下、FTまたは5-DFUR(0.5 mM)、ヒト肝ミクロソームあるいは上清画分から構成された。上清画分へは5-FUの分解酵素であるDPD阻害剤を添加した。5-FUの分解酵素であるDPD阻害剤である37℃で30分間反応させた。ヒト肝上清画分のthymidine phosphorylase (dThdPase)活性の実験系は、リン酸カリウム緩衝液下、thymidine (0.5mM)、gimestat (50 μM) およびヒト肝上清画分から構成された。37℃で10分間の反応を行った。両活性とも酢酸エチルを添加することにより、反応を停止した。5-FUおよびチミンの生成活性は高速液体クロマトグラフィーで測定した。

2-3-2) 非凍結ヒト肝細胞を用いた代謝実験

我々は、CYP1A2の酵素誘導評価について、典型的な誘導剤処理によって強く誘導される場合の判定の再現性きたが、今回は比較的弱い酵素誘導能の評価が可能か否かについて検討した。24-well collagen coated plate 接着型の非凍結ヒト肝細胞は、米国BD GENTEST社から購入した。細胞数は、 2.0×10^5 cells/cm²であった。CYP1A活性の指標として、EROD活性とphenacetin脱エチル化(POD)活性を用いた。EROD活性の代謝物であるresorfinの定量は、逆相系のカラムを用いた蛍光検出器付きHPLCにて行った。POD活性は、LC/MS/MSにより分析を行い、誘導実験系の検討を行なった。CYP1A誘導剤として3-MC、β-ナフトフラボン(BNF)あるいはオメプラゾール(OPZ)を用い、37℃炭酸ガスインキュベーター内で72時間まで暴露させた。基質濃度は7-etoxyresorfinを8 μM、phenacetinを10 μMとした。

2-4-1) 凍結ヒト肝細胞を用いた代謝評価

CYP2D6のPoor Metabolizer (PM)の凍結ヒト肝細胞(ロット64)およびExtensive Metaboliser (EM)の凍結ヒト肝細胞(ロット70)は、米国In Vitro Technologies (IVT)社で調製されたものを用いた。1パイアルあたり、 6×10^6 cellであった凍結ヒト肝細胞は、96 wellプレートに蒔き、培養液に浮遊させた状態で試験に供した。CYP2D6の基質であるdextromethorphan(DXM)を最終濃度0.08, 0.4, 2, 10および50 μMとなるように加え、37℃で反応させた。1時間および2時間後の反応液をサンプリングし、親化合物(DEX)の他、dextrophan(DXO; 主にCYP2D6による代謝物)、3-methoxymorphinan(3-MEM; 主にCYP3A4による代謝物)をそれぞれ定量した。培養液中の未変化体および代謝物の測定には、LC/MS/MSを用いた。

凍結ヒト肝細胞を米国のXenoTech, LLC社より3ロット(H250A, 272, 301B)購入し、生細胞数が約 6.0×10^5 cells/mLとなるようにHEPES-Krebs Henseleit Buffer (pH 7.4)で調製し、インキュベーション細胞溶液を作成した。このインキュベーション細胞溶液を0.25 mL/wellの容量で24-well plateの各wellに播種した後、薬物を添加し、直ちに37℃の炭酸ガスインキュベーター内で一定時間インキュベーションした。終了後、各well中の溶液を回収し、直ちに遠心分離操作を行った。得られた上清中の未変化体および代謝物を直接もしくは有機溶媒にて抽出後、HPLCにて定量した。本反応系を用いて、種々の薬物の代謝評価を行った。なお、Dextromethorphan, Debrisoquin, Bufuralol (50 μM)は、各代謝物(4-Hydroxydebrisoquin, Dextorphan, Hydroxybufuralol)の濃度をHPLC蛍光検出法により測定した。rilmazafoneの代謝物M-1(10および25 μM)の代謝物およびazasetron(75 μmol/L)の代謝物はHPLCにより定量した。imidapril(20 μM)では代謝物をLC/MSを用いて定量した。Zonisamideの代謝は¹⁴C標識体(100 μM)をヒト肝ミクロソームと好氣的条件(大気下)あるいは嫌氣的条件(窒素下)でインキュベーションした。etodolacは¹⁴C標識体(50 μM)を用い、未変化体並びに代謝物であるグルクロニド(etodolac-glc.)、6位および7位水酸化体(6-OHおよび7-OH)とこれらのグルクロニド(6-OH glc.および7-OH glc.)を同時定量した。Estradiolは³H標識体(20 μM)を用いた。これらの試験では反応後、上清をRadio-HPLC分析した。

3. 研究成果

3-1-1) ヒト平滑筋組織の保存と薬理的反応性

ヒト大腸輪状平滑筋に対するcarbachol(0.01-30 μM)の用量依存的収縮反応を指標にして、各種凍

結保存液の有用性を検討した。摘出当日に評価した新鮮標本での carbachol の pD_2 や E_{max} と比較して、1ヶ月以上凍結保存後に解凍した標本では、 pD_2 値、 E_{max} 値ともに低下していた。凍結保存液の比較では、牛胎児血清を含まない培地でも活性は認められたが、凍結氷害防止剤の dimethylsulfoxide (DMSO) を除くと反応は極端に減弱した。また、ヒト大腸粘膜筋板標本をフィールド電気刺激(1-64Hz, 0.3 msec, 30-50 V)すると、頻度依存性弛緩反応が得られた。高頻度刺激では、収縮後弛緩するという二相性反応となった。電気刺激による弛緩反応は tetrodotoxin $1 \mu M$ により抑制されたので、抑制性神経の刺激によるものと考えられる。自律神経節刺激薬 nicotine (0.1-1 mM)によってもヒト大腸粘膜筋板は弛緩後収縮するという二相性反応が得られた。モルモット大腸粘膜筋板標本では、nicotine 1mM により収縮後弛緩するという二相性反応が見られた。このうち収縮反応のみが tetrodotoxin, hexamethonium, atropine によって抑制されたので、コリン作動性神経支配が優位であることがわかった。一方、ヒト大腸粘膜標本からの 5-HT, 5-HIAA の自発的遊離量はモルモット大腸標本からの遊離量より約5倍多いものであった。この 5-HT, 5-HIAA 遊離量は NO donor である GEA3162 (10-30 μM) の前処置により用量依存的に抑制された。

3-1-2) 子宮平滑筋

本研究は関西医科大学産婦人科の協力を得てヒト子宮標本の研究を開始し、3年目を迎えた。すでに80例余りの提供を受けた。これまでに得られた成績を要約すると、1) 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。2) 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した。今年度は3つあるCキナーゼ (PKC) のサブタイプのうち、どのサブタイプが関与するか、さらに PKC の下流に位置するどの様な機能タンパク質が子宮平滑筋収縮に関わるかを検討した。RT-PCR で、上記3つの PKC の発現を妊娠ならびに非妊娠子宮で比べたところ、 β サブタイプ (詳しくは $\beta 1$ と $\beta 2$) の発現が上昇していた。また、PKC の下流に位置するタンパク質の中で収縮タンパク質 Ca 感受性に関わるものとして、CPI-17 に着目した。このタンパク質は、PKC によってリン酸化されることによりミオシン脱リン酸化酵素を抑制する作用を持つ。RT-PCR で発現量を検討したところ、非妊娠子宮で比べ妊娠子宮で有意に増加していた。PKC β の特異的阻害剤としての LY333531 は、糖尿病性の網膜症や腎症の治療薬として臨床治験に入っている。本薬物は PKC $\beta 1$ と $\beta 2$ に対して約 50nM の IC_{50} 値を持ち、他の PKC に対して数百倍強い。さらに、LY333531 ($1 \mu M$) は、妊娠子宮の PDBu による収縮を強く抑制し、また oxycytocin で増強された自発性収縮を部分的に抑制した。

3-1-3) ヒト胃ガン組織におけるピリミジン系抗ガン剤と感受性因子

TS 活性は癌組織内で非癌部に比べ有意に高値であった ($p=0.0003$)。TS 活性と TS mRNA の間には有意な相関を認め ($p=0.0423$)、DPD 活性と DPD mRNA の間にも有意な相関が認められた ($p=0.0016$)。抗ガン剤投与による apoptosis の誘導は TS 活性と TS mRNA の高値群で低値群より低い傾向がみられたが有意差は認められなかった (TS: $p=0.0599$, TS mRNA: $p=0.3049$)。一方 DPD 活性と DPD mRNA では高値群、低値群で apoptosis の誘導に差はなかった。p53 の陽性率と血管新生は TS、DPD の高値群、低値群で差はなかった。

3-1-4) 生体肝移植手術における病的肝細胞の機能変化

IP は有意に C 群だけでなく I 群に対しても再灌流後の血中 AST 値の上昇を抑制した (IP+I: 708 vs I: 1859 IU/L, IP+C: 1107 vs C: 2684 IU/L)。肝組織中の EC と肝血流量は IP による改善を認めなかったが、IP+I 群 I 群が有意に IP+C 群 C 群よりも良好な結果を示した。再灌流後 120 分の血中 TNF- α は IP により有意に抑制されていた (IP+I: 27.6 vs I: 64.8 pg/ml, IP+C: 21.6 vs C: 49.3 pg/ml)。IP は C 群だけでなく I 群に対しても肝組織壊死を有意に改善したが、肝細胞の TUNEL 陽性細胞は I 群に対してのみ IP により有意に減少し C 群に対しては効果を認めなかった。

3-2-1) ウサギおよびイヌ遊離肝細胞調製と肝臓片保存時間の影響

3例のウサギを用いて調製した肝細胞の Viability は $85.2 \pm 6.3\%$ (79~91%) であり、ほぼ良好な

状態の肝細胞を調製できた。得られた生細胞数は肝臓 1g 当たり約 2.02×10^7 cells であった。また、脱血後の 2 時間保存は肝細胞調製に影響を及ぼさなかった。

イヌからの肝臓摘出および脱血は三共株式会社・薬剤動態研究所（品川）にて行い、肝臓片を国立医薬品食品衛生研究所・薬理部へ搬送後、遊離肝細胞を調製した。イヌは麻酔下へパリンを注射し放血致死させた後、肝臓を摘出し氷冷下にて 3 片の肝臓片を切り出した。肝臓片（7.6~16.9 g）を脱血し氷冷保存液に浸漬して、国立医薬品食品衛生研究所まで搬送した。搬送には約 1 時間を要した。肝臓摘出から約 2 時間半~3 時間後に遊離肝細胞の調製を開始した。得られた遊離肝細胞の Viability は $88.3 \pm 2.8\%$ と良好であった。肝臓片の摘出部位による Viability の変動は認められなかった。また、1g 当たりの生肝細胞数は、 $5.96 \pm 0.79 \times 10^7$ であった。肝細胞の Percoll 処理は、Viability を上昇させたが、生細胞の回収率は 66% (n=2) と減少した。

3-2-2) ヒト遊離肝細胞の調製とヒト肝臓片の収集

本年度は、ヒト遊離肝細胞調製用の摘出肝臓片 1 例（66 才、男性、原発性肝癌）の提供を受けた。摘出施設からの当研究所までの搬送時間は、オートパイ便で約 2 時間であった。提供されたスライス状の肝組織 3 片の総重量は 3.6 g で、表面は茶色、暗褐色の斑状を呈し一部は黄土色も示していた。スライス切片のため脱血処理は施されないまま搬送された。そのため、灌流は行わず、急遽スライス状のまま前灌流液およびコラゲナーゼ液中にて振盪し、遊離肝細胞を調製した。本摘出肝臓片は完全に正常部分ではないためか固く、遊離肝細胞の調製は困難であった。また、細胞の消失を防ぐため、濾過を十分に行なわなかったため、膜組織を除去しきれなかった。僅かに得られた遊離肝細胞の Viability は 86.1% を示したが、収量は極めて低く代謝実験用に使用出来なかった。また、代謝研究のため、胆管癌由来の凍結ヒト肝臓小片 2 例の提供を受けた。これらは現在 -80℃ で凍結保存しており、例数が確保できた時点で代謝研究に使用する予定である。

3-2-3) 肝スライスの利用法に関する研究

acetaminophen の濃度依存的肝障害および incubation 時間依存的肝障害性の変化について、未処置、PB または 3-MC 処置ラット肝スライスを用いて検討した。24 時間 incubation 時の肝スライスからの漏出 LDH 活性は、3-MC 処置群において、phenacetin 1.25 mM から 10 mM まで未処置群に較べそれぞれ濃度依存的に有意に上昇した。一方、残存カリウム量は有意に低下した。PB 処置群では 10 mM のみで高い傾向が認められた。酵素活性については、PB 処置群で 5 および 10 mM で Tes-OH 活性が有意に低下した。3-MC 処置群では 2.5, 5 および 10 mM で EROD 活性が顕著に低下した。また、3-MC 処置群で、12 および 24 時間 incubation において LDH の漏出の増加とカリウム含量の低下が有意に認められた。

3-3-1) ヒト肝ミクロソーム画分、および上清画分による FT から 5-FU への変換活性

FT から 5-FU への変換活性は、ヒト肝ミクロソームによる反応系 (pmol/min/mg protein) では、最小で 44.9、最大で 808.3 の酵素活性値が得られた。上清画分による反応系 (pmol/min/mg protein) では、最小で 46.8、最大で 219.0 の酵素活性値が得られた。また、5-DFUR から 5-FU への変換活性は、ヒト肝ミクロソームによる反応系 (pmol/min/mg protein) では、最小で 10 (検出限界)、最大で 160.1 の酵素活性値が得られた。上清画分による反応系 (pmol/min/mg protein) では、最小で 3164、最大で 6026 の酵素活性値が得られた。

3-3-2) 非凍結ヒト初代肝細胞を用いた CYP1A 誘導評価系の確立

非凍結ヒト初代肝細胞を用いた CYP1A 誘導評価試験を実施する際に、前提条件となる resorfin 定量法のバリデーションを実施した。その結果、定量範囲 0.06 から 180 pmol/mL までは原点を通る良好な直線性が示された。0.1 から 300 pmol/mL 定量範囲においては検量線の相関係数(r)は 0.994 を示したが、低濃度範囲に区分すると相関係数は上昇した。resorfin を含有する測定試料において、resorfin 濃度 300 nmol/L および 3 nmol/L での冷蔵および冷凍保存 5 日での測定値の変動が少なかったが、0.1 nmol/L での冷蔵保存 2 日後、冷凍保存 1 日後では測定値の変動が約 50% 以上と大きかった。

CYP1A 活性はいずれの培地においても、インキュベーション時間 15 分間から 30 分間の反応ま

でほぼ比例して増加した。CYP1A 誘導剤の濃度および暴露時間について検討したところ、3-MC (0.1 ~ 0.5 M)、OPZ (5~20 M) および BNF (2~ 10 M) において濃度依存的な活性上昇がみられ、その誘導は 3-MC と OPZ では 48 時間暴露が最も強く、BNF は 24 時間暴露が最も強かった。なお、いずれの誘導剤においても 24 時間の暴露で十分な誘導が認められた。

本 LC/MS/MS 条件における acetaminophen の最小検出感度は 10nmol/L であり、その検量線は 10nmol/L から 10 μ mol/L において accuracy (%) = 100.09、 $R^2=0.9996$ を示し、良好な直線性を示す事が確認された。また、solvent control および 20 μ M β -NF により、72 時間のヒト肝細胞処理後の phenacetin O-deethylation の酵素反応時間については、 β -NF 処理では代謝物である acetaminophen の生成量は酵素反応後 0.5 時間から 4 時間まで直線的に上昇し、6 時間では生成が緩やかになった。solvent control では 6 時間まで微弱な生成ながら直線性を示した。一方、酵素活性値については、 β -NF 処理において 0.5 時間から 6 時間のいずれの時点においても 20pmol/min/mg protein 前後、solvent control において 0.5pmol/min/mg protein 前後を示し、酵素誘導倍率については、40 倍前後を示した。

3-4) 凍結肝細胞による各種化合物の代謝評価

3-4-1) Dextromethorphan

本研究では、遺伝多型が知られている薬物代謝酵素チトクロム P450 のうち、CYP2D6 の欠損した PM 凍結遊離肝細胞を用い、PM の薬物動態 (代謝) が予見できるかどうかを、CYP2D6 の基質である DEX をプローブとして予備的に検討した。DEX の代謝は、臨床では、N-脱メチル化 (3-MEM)、O-脱メチル化 (DXO) とそれに続くグルクロン酸抱合が進行することが知られている。CYP3A4 は N-脱メチル化、CYP2D6 は O-脱メチル化 (DXO) 反応を触媒する。DEX の 2 つの代謝物 3-MEM と DXO の生成量を測定した結果、両代謝物の比 (3-MEM/DXO) は、EM-PM 間で大きな差が見られた。すなわち CYP2D6 PM 肝細胞では、臨床と同様 O-脱メチル化の補償的代謝が働き、3-MEM の生成速度が Em 肝細胞に比べて大きくなっていった。また、DXO の抱合体 (Glucuronide) も観察された。これらの事実は、定性的にヒトの臨床結果とよく一致していた。したがって、PM 凍結ヒト肝細胞を用いた代謝評価試験は、臨床試験以前に PM のヒトの代謝パターンを把握できることから、臨床試験の予見性を高めるために極めて有用で応用性の広い評価法であると考えられる。CYP2D6 PM hepatocytes を用いれば、PM の動態が予測できる可能性が示された。

3-4-2) Dextromethorphan、Debrisoquin、Bufuralol

Debrisoquin の代謝活性は CYP2D6 が高い群と低い (XenoTech, LLC, Lot No.303B, 317, 318) で差が見られた。Dextromethorphan と bufuralol の代謝活性についても同様であった。しかし、CYP2D6 活性の低い細胞は CYP3A4 はじめ他の CYP 活性も低いことからこれらの細胞群は PM とは考え難かった。使用した薬物では bufuralol の CYP2D6 代謝反応は他の薬物 (debrisoquin、dextromethorphan) に比較し代謝速度が速く、モデル化合物として有用であると考えられる。今回検討したロットが PM 由来の細胞であるか否か、CYP2D6 の genotyping を実施しており、hepatocyte の PM と EM が判明すれば今回のロット間での活性の差との関連も明らかになると考えられる。今後、本プロジェクトでは CYP2D6 PM hepatocyte を用いた代謝試験により、CYP2D6 PM 患者において CYP2D6 で代謝される薬物の PK 予測が可能かどうかを CYP2D6 の補償的代謝を含めて検証をする予定である。また、今後は、genotyping され、CYP2D6 の PM であることが判明している細胞をまず入手することが必要である。Caucasian では約 10-15%が CYP2D6 の PM であると報告されており、genotyping により CYP2D6 PM 細胞を検出出来る可能性が示された。

3-4-3) Rilmazafone の活性代謝物 (M-1)

睡眠導入剤 rilmazafone は、プロドラッグであり、消化管や肝臓の酵素で代謝 (脱グリシル化) を受けた後に、自動的に閉環して、ベンゾジアゼピン型の活性代謝物である M-1 を生成する。このものは、ジメチルアミン部分が順次酸化的に N-脱メチル化を受け一方で、アミド部分が加水分解を受けて M-4 を生じる。今回、M-1 の代謝をヒト肝細胞で検討した結果、代謝物の生成についても、基質濃度依存性から考えても、加水分解が酸化的代謝に比べて優位であることが明らかとなり、ヒト in vivo との整合性が認められた。一方、ヒト肝ミクロソームでは酸化的代謝物が多く、肝細胞の方

がヒト *in vivo* に近く、ヒト肝細胞の有用性を検証することができた。また、従来の酸化的代謝や抱合代謝の事例のみならず、加水分解反応で、このような事例が得られたことは大変に意義深いと考えている。今後、臨床との対比におけるバリエーションをさらに拡充する目的で、還元反応（ニトロ基からアミノ基への還元）について、検証を試みる予定である。

3-4-4) Imidapril

凍結ヒト肝細胞の代謝評価実験として、CYP 以外の代謝酵素で代謝される高血圧治療薬である imidapril は、活性体 M1 のエステル型プロドラッグである。imidapril はヒトの体内において、カルボキシエステルおよび/またはアミド結合の加水分解によって M1~M4 へ代謝される。カルボキシエステルおよびアミド結合の加水分解には、それぞれカルボキシエステラーゼおよびアセチルエステラーゼが関与しており、CYP の関与は認められていない。今回、CYP 以外の酵素の凍結ヒト肝細胞での代謝について検討するために imidapril の代謝について検討した。凍結ヒト肝細胞を用いて imidapril を代謝 (*in vitro*) させたところ、M1 への代謝（エステル結合の加水分解）反応だけが認められ、M2 と M3（あるいは M4）への代謝（アミド結合の加水分解）反応は認められず、ヒトでの体内代謝 (*in vivo*) 反応の一部しか再現できなかった。しかし、ラットとイヌの代謝実験において、M1 への代謝は主として肝臓で行われ、M2 と M3 (M4) は肝臓以外の臓器（主として消化管）で代謝されることが明らかにされている。したがって、ヒトにおいても、M1 への代謝は主として肝臓で行われ、M2 と M3 (M4) は肝臓以外の臓器で代謝される可能性が示唆された。

3-4-5) Zonisamide

代謝研究のためのヒト凍結肝細胞の施設間バリデーションを行う目的で 7-EC の代謝を検討した。また、ヒト凍結肝細胞における還元代謝を評価する目的で、 $[^{14}\text{C}]$ Zonisamide の代謝を検討した。その結果、7-EC を代謝させた時の各代謝物の生成量は、用いた肝細胞 (3Lot) いずれにおいても、7-HC/G > 7-HC > 7-HC/S の順であった。また、ヒト *in vivo* で確認されている Zonisamide から SMAP への還元代謝は、ヒト凍結肝細胞において低酸素条件下でのみ再現することができた。このことから、ヒト凍結肝細胞を用いることにより酸化、抱合代謝のみならず、還元代謝の評価も可能であることが明らかとなったと共に、酸素濃度が代謝反応に影響を及ぼす可能性が示唆された。

3-4-6) Etodolac

凍結保存ヒト肝細胞が医薬品の代謝研究にどの程度利用できるかを明らかにする目的で、非ステロイド性抗炎症薬 etodolac をモデル薬物として選択し、ヒト肝細胞を用いた代謝試験を実施した。臨床第 I 相試験では、etodolac の尿中代謝物として、親化合物のグルクロン酸抱合体、6 位、7 位水酸化体およびそのグルクロン酸抱合体が認められているが、今回のヒト肝細胞 (3ロット) を用いた *in vitro* 代謝試験では、この臨床第 I 相試験の結果を反映した代謝物の生成が確認でき、ヒト肝細胞を用いた *in vitro* 試験が *in vivo* の予測に有用であることが確認できた。

3-4-7) Azasetron

azasetron をヒトに静脈内投与すると、代謝物として血漿中に M2 (N→O 体) が、尿中に M1 (azasetron の N-脱メチル体) および M2 が検出される。その他の代謝物は検出されなかった。凍結ヒト肝細胞による代謝物として、血漿中あるいは尿中で検出されている代謝物 (M1 および M2) の生成を確認した。その生成量は、M2 > M1 の順であった。このように、凍結ヒト肝細胞を反応させた時に生成する主代謝物は M2 であり、*in vivo* での主代謝物も M2 であった。この結果は、これまで我々が検証してきた。凍結ヒト肝細胞での評価により、ヒトでの代謝を定性的に評価することが可能であると言うデータを支持するものである。また別試験にて M2 への代謝には FMO が関与することを確認している。今回、我々がこれまで検討していなかった FMO についても、定性的な予測が可能であることが示唆された。本試験結果は、これまでの凍結ヒト肝細胞が臨床予見性を高めるのに有用なツールであるという結果を支持するものであった。

3-4-8) Estriol

ホルモン補充療法剤である Estriol を用いた凍結保存ヒト肝細胞代謝試験で、in vivo で確認された抱合代謝物が検出された。凍結保存ヒト肝細胞は少なくとも、酸化反応に加えて、抱合代謝物も検出可能な実験系と考えられ、代謝物の動態を定量的に予測する事は困難にしても、臨床試験に入る前に定性的な代謝パターンを知る上で、有用と考えられた。ただし活性値、活性比にはロット差が認められ、複数のロットによる評価の必要性が考えられた。

4. 考察

貴重なヒト摘出標本を薬効評価に利用できるように保存する技術の開発は重要である。今回、ヒト大腸輪状筋を凍結保存するための基礎的検討を開始した。生理機能を温存した凍結保存にとって最も重要なことは、凍結時および解凍時の氷害防止である。現在までに検討した結果ではまだ明らかに優秀な凍結保存剤は見つっていないが、無血清培地の有用性とプログラムフリーザーを用いた凍結時間経過の管理に焦点を絞って検討を続けていく予定である。今回、はじめてヒト大腸粘膜筋板の神経性反応を検出できたが、モルモットと異なり抑制性神経刺激効果のみが見出された。今後、この抑制性神経の伝達物質を解明していく予定である。また、ヒト大腸粘膜標本は自発的に 5-HT やその代謝物の 5-HIAA を遊離させていることが明かとなった。この遊離は NO donor により著明に抑制されたので、内因性 5-HT の動態は NO による調節を受けている可能性が示唆された。今後、炎症性ケミカルメディエーターの影響を検討することによって、炎症性腸疾患の病態解明に結び付けたいと考えている。

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促進的に作用していることを示している。収縮蛋白系への作用の中で妊娠で増強される部分については、cPKC の中でも PKC β が関与すること、さらにその下流に位置する CPI-17 が関与することも確かめられた。

抗ガン剤の効果を検討するため TS、DPD 活性の測定と、抗ガン剤投与前後で apoptosis の変化の検討をヒト胃ガン組織を用いて行った。抗ガン剤投与によって apoptosis の誘導が認められたが、TS、TSmRNA 高値群で apoptosis の誘導が低値群に比べ低い傾向が認められた。TS、TSmRNA が高い症例で予後不良や抗ガン剤に対する抵抗性が指摘されており、TS がフッ化ピリミジン系抗ガン剤の apoptosis を阻害している可能性が示唆された。しかし今回は 7~10 日間という短期投与ということもあり、有意差は得られなかったと考えられる。p53、TS の発現については 5-FU を基本とする化学療法の効果との関連についての報告があるが、詳細については明らかでない。血管新生については腫瘍の増殖や転移において重要な役割を担っているとされているが、今回の検討では TS、DPD の値と p53、血管密度に関連はみられなかった。

IP による間歇的肝温虚血後の I/R は 4 群間で最も軽度であり、血中への TNF- α 放出を抑制し肝細胞壊死抑制および anti-apoptosis 作用が肝保護効果を示す機序のひとつであると考えられた。IPC は C 群に対しては anti-apoptosis 作用を示さなかったが、連続的肝虚血群は虚血侵襲が著しく肝組織中の EC が低値を示し、能動的細胞死である apoptosis を起こさず、necrosis が著明となり anti-apoptotic 作用を示さず肝細胞壊死作用のみ示したと考えられた。

ウサギおよびイヌ肝臓片を用いヒト肝細胞調製法について検証した結果、本方法により品質の高い肝細胞を調製出来ることを確認した。また、脱血後 3 時間の氷冷ヘパリン含有生理食塩液もしくは氷冷 L-15 保存液下での保存は、肝細胞調製に影響を及ぼさないことを明らかにした。遊離肝細胞調製用に提供されたヒト摘出肝臓片は、スライス状のため肝細胞調製は困難であった。

肝スライスの凍結保存が可能になれば、ヒト肝スライスの利用が推進されると考えられる。すなわち、必要時にいつでも検討でき、異なった研究機関でもデータの比較が容易になることが期待される。本研究ではラット肝スライスを用いた予備的検討を行ったが、最適な保存条件を見出すには至っていないため、さらに検討を続ける予定である。

肝細胞下分画を用いた薬物の代謝の一例として、本研究において経口フッ化ピリミジン系抗ガンブロドラッグの代謝を調べた。FT、および 5-DFUR は投与後肝薬物代謝酵素により 5-FU に変換され

て効果を発揮する。FT は、肝において cytochrome (CYP) 2A6 等、または、上清画分酵素により代謝活性化され、5-DFUR は、主として腸管、腎、肺を除く臓器において、正常組織に比して腫瘍組織内で高い活性を示す dThdPase により代謝活性化を受ける。これら代謝活性の個人間変動を細胞下分画を用いて調べるため、フッ化ピリミジン系抗ガン剤をはじめ種々の基質に対する代謝活性を測定した。その結果、ヒト肝上清画分に含まれる dThdPase 様活性に比較し、ヒト肝ミクロソーム画分を用いて測定した *in vitro* での FT および 5-DFUR の代謝活性化能力、phenacetin の O-脱エチル化の個体差、テストステロン-6 β 水酸化活性には大きな個体間変動が認められた。dThdPase のような核酸代謝系の酵素は生存に重要であるために低値の活性を示す個体が認められなかったと考えられた。

非凍結ヒト肝細胞による CYP1A 酵素の低誘導評価系の施設間バリデーションを実施するために、各施設共通のプロトコールを作成した。レゾルフィン は 0.06 から 180 pmol/mL の低濃度域での定量がcaのうとなった。なお、高濃度域では低濃度域とは別個の検量線を使用する等の工夫が必要と考えられる。今回得た結果の様に resorfin 濃度が 3 nmol/L および 300 nmol/L 測定試料について、日内再現性(C.V. \leq 1.2%)および日間再現性(C.V. \leq 7.7%)は充分確保できた。また、これらの濃度の試料は 1 日、2 日および 5 日間の冷蔵保存において安定 (C.V. \leq 6%)であった。

したがって、本検討結果から、非凍結ヒト初代肝細胞を用いた CYP1A 誘導試験において、想定される酵素活性の変動を安定的に評価することが可能であることが明らかとなった。しかしながら、試料を凍結保存した場合には、その信頼性は確保できない。

さらに、比較的弱い酵素誘導について、どの程度正確に判定評価出来得るかを POD 活性を指標として検討すること、および、肝細胞の使用量削減の兼ね合いから、24 穴プレートに接着したヒト肝細胞をもちいて検討することであった。これら 2 つの課題を達成する手法として、高感度測定が期待される LC/MS/MS の測定法を開発した。本測定系において、10nmol/L から 10 μ mol/L の検量線範囲において直線性が得られており、かつ solvent control 処理の酵素反応時間 0.5 時間における acetaminophen の生成量を検出できるものであり、十分に POD 活性の測定に使用できる事が確認された。また、酵素反応時間については、solvent control および β -NF 処理ともに 4 時間まで直線性を示している事から、ヒト肝細胞の個体差および LC/MS/MS 測定系の最小検出感度を考慮し、1 時間もしくは 2 時間に設定する事が望ましいものと考えられた。以上の事から今回検討を行った LC/MS/MS 測定系は、24 穴プレートに接着したヒト肝細胞を用いても POD 活性を特異性良く、比較的弱い酵素誘導についても測定が可能である事が推察された

5. まとめ

ヒト摘出大腸標本を用いて、凍結保存方法の開発、粘膜筋板の神経支配、粘膜標本からの 5-HT 遊離量を検討し、実験動物におけるそれと比較した。凍結保存液として無血清培地でも有用である可能性が得られた。粘膜筋板を支配する神経として抑制性神経が優位であることがわかった。ヒト大腸粘膜標本は自発的に 5-HT を遊離しており、この遊離は NO による制御を受けることが明かとなった。

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、さらに PKC_αあるいは CPI-17 阻害剤が、切迫早産治療薬として有効である可能性が示唆された。

TS、DPD 活性の測定は胃ガン補助化学療法を行う上で必須のものである。今回の研究で TS、DPD 活性と TS、DPDmRNA 発現レベルは相関していた。TS、DPDmRNA は術前の生検組織で測定可能であり、抗ガン剤の効果判定や有害事象の発現の目安となり、臨床的意義が高いと考えられた。

IPC は間歇的肝虚血に対しても肝保護作用を示し、臨床における肝切除術、生体肝移植への応用も充分期待されると考えられた。

ヒト肝細胞の調製法の検討を、ウサギとイヌを用いて検討した結果、本方法により品質の高い遊離肝細胞の調製が確認された。また、氷冷保存液中におけるウサギおよびイヌ摘出肝臓片の保存は、3 時間まで遊離肝細胞調製に影響を及ぼさないことを示した。ヒト摘出肝臓片 1 例の提供を受け遊離肝細胞調製を行ったが、Viability は高かったものの実験に使用出来るほどの細胞数は得られなかった。他に、今年度は、代謝実験用にヒト肝臓片 2 例の提供を受けた。次年度は、ヒト摘出肝臓片の提供を受け、ヒト肝細胞調製に習熟し、品質の高い肝細胞調製のため基本的な検討を行う予定である。

また、凍結肝スライスの使用条件についてはさらなる検討が必要である。

今回測定した肝ミクロソーム画分における異物の代謝活性は、上清画分に存在する核酸代謝経路の一つであるチミジンホスホリラーゼ活性に比べると大きな個体間変動を示した。

非凍結ヒト初代肝細胞を用いた CYP1A 誘導評価試験を実施する際に、前提条件となる resorfin 定量法のバリデーションを実施した。その結果、検量線の直線性、日内再現性、日間再現性および保存安定性に問題は認められず、想定される CYP1A 酵素活性の変動を安定的に評価することが可能であることを明らかにできた。

各施設における非凍結ヒト肝細胞を用いた CYP1A 酵素誘導評価系実験のバリデーションを実施するためのプロトコールを作成した。本年度は、十分な量の非凍結ヒト肝細胞を入手することが出来なかったため、各施設間のバリデーション実験は実施できなかったが、来年度はこの作成されたプロトコールを用いて、各施設で CYP1A 酵素誘導評価実験を実施し、評価系のバリデーションを行う予定である。

ヒト肝細胞を用いた薬物代謝評価の結果は、多くの薬物で *in vivo* と極めて高い相関を示し、ヒト肝細胞が極めて有用なツールとして利用されることが判明したが、評価に際し、例数を増やし、また他の複数の施設間での再現性を見ることが必要である。

6. 研究発表

Kojima, S., Ikeda, M., Shibukawa, A. & Kamikawa, Y. Modification of 5-hydroxytryptophan-evoked 5-hydroxytryptamine formation of guinea pig colonic mucosa by reactive oxygen species. *Jpn. J. Pharmacol.*, 88: 114-118, 2002.

Murayama, N., Sai, K., Nakajima, Y., Kaniwa, N., Ozawa, S., Ohno, Y. and Sawada, J.: Expression of CYP2A6 in tumor cells augments cellular sensitivity to tegafur. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92, 524-528, 2001.

Ozaki, H., Kim, Y.-S., Yasuda, K., Egawa, M., Kanzaki, H., Nakazawa, H., Hori M. and Karaki. H., The role of protein kinase C/CPI-17 pathway in the augmented contraction of human myometrium after gestation. *Biology of Reproduction* 投稿中

尾崎博、唐木英明、創薬におけるヒト組織の利用とこれに関連した倫理諸問題：ヒト子宮筋の利用、第75回日本薬理学会総会(2002.3.18)

7. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許取得
- 2) 実用新案登録
- 3) その他

平成13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14年9月10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