

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

ヒト組織・細胞の新鮮材料を用いた薬物の作用評価の
研究－ヒト組織バンクの効率的運用へ向けて－

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) 山形大学医学部 | 倉智博久 |
| (5) 東京大学大学院医学系研究科 | 名川弘一 |
| (6) 東京慈恵会医科大学 | 大石幸彦 |
| (7) 杏林大学医学部 | 村田厚夫 |
| (8) 京都大学大学院医学系研究科 | 今村正之 |
| (9) 近畿大学医学部 | 塩崎 均 |
| (10) 熊本大学医学部 | 小川道雄 |
| (11) 大阪府立成人病センター | 今岡真義 |
| (12) 箕面市立病院 | 吉川宣輝 |
| (13) N T T西日本大阪病院 | 門田卓士 |
| (14) 労働福祉事業団関西労災病院 | 富田尚裕 |
| (15) 医療法人祥仁会西諫早病院 | 鬼塚伸也 |
| (16) 国立大阪病院 | 辻仲利政 |
| (17) 国立療養所広島病院 | 横崎恭之 |
| (18) 住友製薬株式会社 | 金丸 博 |
| (19) 大鵬薬品工業株式会社 | 福島正和 |
| (20) 大日本製薬株式会社 | 藤井敏彦 |
| (21) 武田薬品工業株式会社 | 日下雅美 |
| (22) 日本オルガノン株式会社 | 吉野公一郎 |

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 などは保持されると考えられた。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。手術手技、阻血などの影響は少なかったが、小サンプルの場合は取扱いに注意が必要であった。

ヒト組織バンクが関係者の努力により本年度に発足し、今後組織の収集が重要な課題となる。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を得ることが必要であることが言うまでもないが、研究の必要性を十分に説明して理解を得るには、多くのハードルがあると考えられた。種々の啓発活動を通じて、組織バンクの存在を世間に認識してもらい、理解を得ることが最も重要であると考えられた。

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、本年度においてすでに設立されたヒト組織のバンクの効率的な運用をめざして、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い、問題点を点検する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、また阻血時間など手術の影響はどの程度あるのか、タンパク質、mRNA、DNA

レベルに分けて検討した。また、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。さらに生検組織について手術摘出材料との比較を行った。

これらの研究はヒト組織を用いる場合、インフォームドコンセントを得た上で、倫理委員会の承認が必要であるが、現段階では倫理委員会の承認を得ていないので、大部分は動物（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がそれぞれどの程度、傷害を受けるかを検討した。生検組織については分担研究施設・関西労災病院の協力を得て、検討を行った。

また、本ヒューマンサイエンス総合研究において関連した研究を行っている小林英司研究班の班会議、公開シンポジウムに参加し、意見交換を行った。さらに、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、意見交換を行った。

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がそれぞれどの程度、傷害を受けるかを動物および一部ヒト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、摘出後の状態（室温・氷冷）の影響をほとんど受けなかった。また、摘出後の時間経過の検討からも大部分の臓器では6時間まで保持された。しかし、脾臓は時間経過とともに活性の低下を認めた。また、脾臓以外は死後3時間までの摘出で活性の低下は見られなかった。一方、DNAは12時間以内であれば、RNAは3時間以内であれば、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。

剖検材料についても同様に癌胎児性抗原（CEA）を例に検討した。剖検材料は死亡直前の状態に大きく左右されるが、タンパク質やDNAレベルはおおむね保たれており、多くの場合、解析が可能であった。mRNAレベルは一般的には解析困難であるが、死後1時間程度ではRT-PCRで解析可能であった。

生検標本はタンパク質、DNAは良好に得られたが、mRNAは短時間で凍結しない限り、大幅な活性低下を認めた。また、凍結からもどす時にRNaseの阻害剤を用いない場合は活性低下が見られた。生検標本は小さなサンプルで温度の影響を受けやすく、そのために種々の要因で活性低下がおこると考えられた。小サンプルは取扱いに慎重さを要すると考えられた。

2, 組織バンクの扱うサンプルの中に血液細胞、骨髄細胞、さらに未分化幹細胞が重要な1つの群を形成すると考えられる。血液細胞を材料に細胞表面抗原である接着分子およびCD16の発現をフローサイトメトリーで測定した。定性的には採取後48時間程度でもヒストグラムパターンには大きな変化は見られなかったが、定量性が必要な場合には短時間のプロセスが必要であると考えられた。

3, ヒトおよび実験動物(ラット、イヌ、サル)の凍結肝細胞とマイクロゾームを用いて薬物の代謝を検討した結果、凍結肝細胞はマイクロゾームに比べて代謝経路の検討に有用性が高いことが明らかになった。

4, インフォームドコンセントの取得の点において、臓器を摘出する側の外科医から説明の難しさが指摘された。病気や手術に関して気持ちが落ち着かない手術前の説明で、ヒト組織バンクの説明を十分に理解させるのはかなり難しいのではないかという意見が多く見られた。手術前に十分な説明を行わずに、臓器を組織バンクの目的でプロセスすることは出来ないため、その説明を容易にするためのマニュアルが必要であるという意見も多かった。また、摘出臓器の量的な妥当性、その一部を組織バンクに回すことが患者の診断上、不利益を被らないかどうかの判断を公平にする役割を病理医に求めるべきであるという指摘も見られた。小林英司グループの班会議では、一般参加の患者サイドからの疑問の声が多く寄せられ、インフォームドコンセントを得る際の、組織バンク事業の必要性を世間的に啓発していくことが重要であると考えられた。

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。手術手技や阻血影響は予想より少ない結果が得られた。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。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。生検標本からのmRNAは取扱いに慎重さを要し、小サンプルの場合の難しさを示していた。

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難しさが指摘された。ヒト組織バンク事業の必要性の理解を世間的に十分に啓発していく必要が感じられた。

5. まとめ

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。手術手技、阻血などの影響は少なかったが、小サンプルの場合は取扱いに注意が必要であった。

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。さらに、研究の必要性を十分に説明して理解を得るには、多くのハードルがあると考えられた。種々の啓発活動を通じて、組織バンクの存在を世間に認識してもらい、理解を得ることが最も重要であると考えられた。

6. 研究発表

- 1) 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.
- 2) Imanaka H, Shimaoka M, Matsuura N, Nishimura M, Ohta N, Kiyono H: Ventilator-induced lung injury is associated with neutrophil infiltration, macrophage activation, and TGF- β 1 mRNA upregulation in rat lungs. *Anesth Analg* 92: 428-436, 2001.
- 3) Ito Y, Higashiyama S, Takeda T, Okada M, Matsuura N: Bimodal expression of heparin-binding EGF-like growth factor in colonic neoplasms. *Anticancer Res* 21:1391-4, 2001.
- 4) Ito Y, Takeda T, Wakasa K, Tsujimoto M, Matsuura N: Expression and possible role of cyclin D3 in human pancreatic adenocarcinoma. *Anticancer Res* 21:1043-8, 2001.
- 5) Kobayashi Y, Fukushima N, Sawa Y, Nishimura M, Ohtake S, Horiguchi K, Kawaguchi N, Matsuura N, Matsuda H: Effects of gene transfection of human BCL-2 on graft coronary arteriosclerosis in hamster-to-rat cardiac xenografts. *Transplant Proc* 33:751-2, 2001.
- 6) Ito Y, Takeda T, Wakasa KI, Tsujimoto M, Sakon M, Matsuura N: Expression of p73 and p63 proteins in pancreatic adenocarcinoma: p73 overexpression is inversely correlated with biological aggressiveness. *Int J Mol Med* 8:67-71, 2001.
- 7) Noura S, Yamamoto H, Sekimoto M, Takemasa I, Miyake Y, Ikenaga M, Matsuura N, Monden M: Expression of second class of KIP protein p57KIP2 in human colorectal carcinoma. *Int J Oncol* 19:39-47, 2001.
- 8) Ito Y, Takeda T, Sakon M, Tsujimoto M, Higashiyama S, Noda K, Miyoshi E, Monden M, Matsuura N: Expression and clinical significance of erb-B receptor family in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 84:1377-1383, 2001.
- 9) Miyake Y, Yamamoto H, Fujiwara Y, Ohue M, Sugita Y, Tomita N, Sekimoto M, Matsuura N, Shiozaki H, Monden M: Extensive micrometastases to lymph nodes as a marker for rapid recurrence of colorectal cancer: a study of lymphatic mapping. *Clin Cancer Res* 7:1350-7, 2001.
- 10) Ito Y, Kawakatsu H, Takeda T, Sakon M, Nagano H, Sakai T, Miyoshi E, Noda K, Tsujimoto M, Wakasa K, Monden M, Matsuura N: Activation of c-Src gene product in hepatocellular carcinoma is highly correlated with the indices of early stage phenotype. *J Hepatol.* 35:68-73, 2001.
- 11) Kobayashi Y, Fukushima N, Sawa Y, Ohtake S, Matsumiya G, Horiguchi K, Kawaguchi N, Matsuura N, Kaneda Y, Matsuda H: Effects of gene transfection of human bcl-2 on concordant cardiac xenografts in hamster to rat model. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg* 49:570-5, 2001.
- 12) Hayashi N, Yamamoto H, Hiraoka N, Dono K, Ito Y, Okami J, Kondo M, Nagano H, Umeshita K, Sakon M, Matsuura N, Nakamori S, Monden M: Differential expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in human bile duct epithelial cells and bile duct neoplasm. *Hepatology* 34:638-50, 2001.
- 13) Okada Y, Fujiwara Y, Yamamoto H, Sugita Y, Yasuda T, Doki Y, Tamura S, Yano M, Shiozaki H, Matsuura N, Monden M: Genetic detection of lymph node micrometastases in patients

with gastric carcinoma by multiple-marker reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay.
Cancer 92:2056-64, 2001.

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

いずれも特記事項なし。

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