

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

ヒト組織の創薬研究資源化に関する研究

所 属 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部
研 究 者 林 真

分担研究者

| | |
|---------------------|--------|
| 国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部 | 水沢 博 |
| 国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部 | 増井 徹 |
| 国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部 | 田辺 秀之 |
| 三菱化学生命科学研究所先端技術開発部門 | 岩下 新太郎 |
| 杏林大学臓器組織移植センター | 田中秀治 |
| 東海大学医学部血液リウマチ内科 | 萩原政夫 |

要 旨

重要な創薬研究資源であるヒト組織について、提供・研究利用の倫理的問題、保存・搬送に関する技術的問題点の解決を目指す。ヒト組織のまた、それらの研究資源を用いた研究を実際に行って、創薬研究資源としての利用価値を検討する。

1. 目的

2000年改訂版の世界医師会ヘルシンキ宣言に代表されるように、ヒト資料（モノ（試料）と情報を含めて資料という）を用いた研究は創薬研究の中で重要な位置をしめている。欧米を中心にヒト資料を利用したゲノム創薬の動きはその激しさを増している。現状ではヒト資料に関する公的研究資源化について政府指針の中でも検討されていない。しかし、その重要性と体制整備は焦眉の急務である。本事業では、ヒト組織を主題とするので、ヒト組織（試料）にのみ検討を加える。以下の目的で本事業を遂行する。

- 1) 供を受ける際の説明・承諾を得る段階の臨床家の負担と提供者の認知を高めるために何が必要であるかを検討して、包括同意の理論的問題と具体的対応策として、ビデオ製作を開始した。
- 2) 低コストにて保存・搬送する方法を開発し、評価する。
- 3) ヒト組織を薬物代謝に利用するために予備実験としてラット肝臓を材料として凍結保存の開発と評価を行った。
- 4) 増殖から増殖停止へのスイッチ機構への関与が期待される増殖停止関連遺伝子の発現パターンを検討した。

2. 研究方法

1) 包括同意の検討と説明ビデオの製作

HS組織バンクの立上げの議論、我々独自の組織収集の試み、社会での議論を元にして、公的研究資源の問題を検討し、どこに問題があるか、また、どのような具体的解決策があり得るかを研究する。

2) 皮膚組織の保存法の検討

日本熱傷学会スキンバンクマニュアルに準拠し、杏林大学医の倫理委員会の審査を受け、同種皮膚の研究応用の承諾を得た。凍結保存には AATB（アメリカ組織移植学会）マニュアルに準拠したプログラムフリージング法にて $-1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の速度で凍結した。細胞活性の検討にはトリパンプルーを用いた。

3) 肝臓組織の凍結保存法の開発

ラット胎児肝臓を種々サイズ(1mm³又は1cm³)のブロックに細切した。凍結保護剤、牛胎児血清を含む培養液にて-80℃下で凍結し、翌日に-172℃液体窒素保存とした。1ヶ月後に急速解凍(37℃)の上、組織をパラフィン固定又はパラホルムアルデヒド固定を行い、それぞれH.E.染色によって細胞の生存状態又は抗ラットGSH-PO抗体によって同酵素の発現状況を確認した。

4) 増殖停止関連遺伝子eti-1の発現パターンの解析

我々が確立したCre-recombinase誘導型のloxPアデノウイルスベクターをコントロールとして、本遺伝子産物の発現パターンについてヒト組織組織を用いて免疫組織化学染色とTaqMan法とPCR-GeneScan法によって検討した。

3. 研究成果

1) 包括同意についての検討

この分野は未整理未検討の部分が大きい。ヒト組織の公的研究資源化では提供されたヒト組織が保存され、提供時点では未知のあるいは予想もされなかった将来の研究に利用されるという問題がある。この状況はヒト組織の研究資源化に不可欠の問題であり、従来の医療分野でのインフォームド・コンセント(IC)の考えにそぐわないと批判の多いところである。

医療分野で発展してきたICを研究分野で適応することに無理は無いのか。医療というある程度の治療の目途がなければ患者に適用できない行為と、研究と言うそもそも「分らないからはじめる行為」とは異なる。このように、医療と研究において説明すべきものの本質が異なるという点についての議論は少ないように思われる。

欧米のヒト資料提供において、「研究のために」という包括的同意が採られるときがある。そして、包括同意の担保は専門家集団と倫理審査委員会と情報公開という社会の監視機能に任されている。

研究というものの本来的性質を理解していただき、提供者の尊厳を尊重するという必須の条件の下に、「研究のために」という包括同意を本気になって考える必要があるのではないだろうか。そのために研究者集団は、自身が変わる努力をして「研究のために」という、正面切った説明義務を自分たちに課することが重要である。現状のように、入り口では、予想される具体的研究計画を悉皆的に説明することによって自己決定に沿ったICを得て提供していただき。新しい状況になったから、そこではICの取り直し、それが無理だったので倫理審査委員会の審査でという「究極の代諾」へという構造をこの先も延々と続けていくことに、研究資源に携わるものとして、疑問を持たざるを得ない。

いろいろと批判があるにも拘わらずICと異なる包括同意にこだわる。現状では、連結不可能匿名化され、バンクに登録された資料に関するICを取り直そうとしても、提供者を特定できない。このようなヒト資料の研究利用の構造を考えたときに、研究利用する側の倫理的責任が重いことが理解される。そして、それを政府指針や倫理審査委員会という外部からの規制だけで補い、提供者の尊厳が守られるという環境を作るとは不可能であると考えている。そこで以下の二つの戦略が必要であると考えている。一つ目は先に述べた研究者集団の中に社会の信用を得るための自己統括機能力を育てていくこと。二つ目は社会の側にもただ批判するだけでなく、新しい視座と活動を育てていく必要があるように思われる。その一端を担うと考えられるのが、次に述べる包括説明用のビデオ作成である。

これまでの実情を見るとヒト組織提供の説明段階は臨床医に大きな負担を掛ける。この負担の軽減と説明の質をある程度保つことは、今後のヒト組織の創薬研究資源化のために不可欠である。承諾のための説明段階がバラつくことは、以下の理由でヒト組織の創薬資源化を阻むと考えられ、ビデオや説明文書の作成は重要な戦略的位置を占める。ある提供者は丁寧に説明を受け、ある提供者は全く説明を受けないような状態というような説明内容のばらつきが起きると、それは、説明段階自体の信用を損なわせる方向に働くと考えられる。このような状況を最大限に防ぐことを目的として、包括同意説明用ビデオとそれにまつわる説明文書の整備をおこなう。

基本的には、現在の医療と将来の医療の接点としての患者の位置を理解していただくことである。患者はそれまでの医学生物学研究を生かした治療を受けると同時に次の世代の医療を支える立場でもあるということである。このときに、全体のプロセスで信用を担保するシステムが構築或いは議論されていない点が大きな問題である。

これまでの説明手法は将来の研究利用を具体的に説明することが主でした。本事業ではその視点を離れて、提供者が医療消費者として恩恵を受けているその状況を理解することに重点をおいている点で、ユニークである。

2) 皮膚組織の保存法の開発

通常のプログラフリージングを行った移植用皮膚が解凍後、どの程度のダメージが引き起こされているかをトリパンプルーやMMTアッセイを用いて評価した。この結果、1回の冷凍保存によってトリパンプルーによるダイエクスクルージョンでも上皮細胞の80%がダメージを生じていることが判明した。繰り返しプログラフリージングを行う事により細胞へのダメージは大きくなり、10回以上の反復凍結によっては細胞成分はほとんど消滅することが判明した。

3) 肝臓組織の凍結保存法の開発

ラット胎児肝は1mm³サイズ保存によってその生存率及び酵素の発現が維持された。一方1cm³サイズにおいては、脱核など細胞のアポトーシスに陥り、酵素発現も欠落していた。

4) Eti-1の発現パターン

Northern法で発現の高かった前立腺組織での発現が高く、また、PCR-GeneScan法と免疫組織染色でも確認された。TaqMan法による定量によって、他の組織(脳、肝臓、胎盤、精巣、腎臓、膵臓)での発現は前立腺の100分の1以下であることが明らかとなった。

4. 考察

1) ヒト組織提供の説明段階は臨床医に大きな負担を掛ける。この負担の軽減と説明の質をある程度保つことは、今後のヒト組織の創薬研究資源化のために不可欠である。承諾のための説明段階がバラつくことは、以下の理由でヒト組織の創薬資源化を阻むと考えられ、ビデオや説明文書の作成は重要な戦略的位置を占める。これまでの説明手法は将来の研究利用を具体的に説明することが主であったのに比較して、本事業では、提供者が医療消費者として恩恵を受けているその状況を理解することに重点をおいている点でユニークである。

2) コンピュータによるプログラフリージングが少なからず同種皮膚細胞に与える影響が存在することが判明した。来年度はガンマ線を用いて同種皮膚を物理的に処理し、常温で残存細菌、ウィルスを0とする常温保存法の着手にあたる予定である。

3) 組織のクオリティーを維持するための条件は1mm³サイズの小細片が適当と考えられる。ただし肝ミクロゾームなどを研究目的とする場合においては、直ちに酵素処理し、単離細胞として保存する方法との比較検討が必要である。

4) 発現パターンが確認されたことを受けて、今後強制発現系を用いて、eti-1の生理作用の解析を進める。

5. まとめ

政府が設定しているヒト組織・細胞の研究利用の枠組みを生かしつつ、補い、創薬研究資源を充実させるためには、社会の理解と協力をえる方策を立て、戦略的動きをしなければならないと同時に、創薬資源の質と量を経済的に見合う形で確保する必要がある。

本事業は、倫理・法・社会的検討から提供現場への働きかけと、提供された組織の保存法の開発、研究利用と多岐にわたるように思われるが、倫理委員会の検討の際に引用されるように、「科学と倫理」の両側面から創薬資源の開発を考える際に重要な活動であると考えている。

6. 研究発表

- 増井徹, 祖父尼俊雄, 林真, 田辺秀之, 水澤博: ヒト資料の研究利用に関する政府ガイドラインの現状, 国立医薬品食品衛生研究所報告, 119, 40-46, 2001.
- 水澤博, 増井徹, 田辺秀之, ヒト培養細胞: 科学と倫理のジレンマ, 科学71(2), 1601-1608, 2001.
- 増井徹: ヒト組織・細胞取扱いについての倫理, 医学のあゆみ, 197(13) 1061-1067, 2001.
- 増井徹: ヒト由来資料の研究・開発利用と倫理, ファルマシア, 38(1) 39-43, 2002
- 増井徹: 資源となる人体, 現代思想, 2月号, 194-210, 2002.
- Iwashita, S., Itoh, T., Takeda, H., Sugimoto, Y., Takahashi, I., Nobukuni, T., Sezaki, M., Masui, T., Hashimoto, K., Gene organization of bovine BCNT that contains a portion corresponding to an endonuclease domain derived from an RTE-1 (Bov-B LINE), non LTR retrotransposable element: duplication of an intramolecular repeat unit downstream of the truncated RTE-1. Gene 268, 59-66, 2001.
- Ishikawa, K., Masui, T., Ishikawa, K., Shiojiri, N. Immunolocalization of hepatocyte growth factor and its receptor (c-Met) during mouse liver development. Histochem Cell Biol. 116, 453-462, 2001.
- 田中秀治, 和田貴子, 島崎修次: 皮膚再生におけるスキンバンクネットワークの役割 第8回皮膚創傷治癒フォーラム, へるす出版, 12-14, 2001.10
- 田中秀治, 島崎修次他: 東京スキンバンクネットワークの活動と治療成績, Medico32号 NO,11 9-14, 2001.11
- 田中秀治, 島崎修次, 篠崎尚史他: 多臓器・組織移植ネットワークのありかた, 今日の移植, 14, NO,6, 697-701, 2001.12
- 田中秀治, 島崎修次, 和田貴子他: 1、皮膚, 組織移植, 日本医学館, 19-38, 2001.12
- 田中秀治, 高見佳宏, 榊聖樹他: 種々の skin substitute の治療効果と選択, 医学のあゆみ, 200 巻3号, 237-242, 2002.1
- 田中秀治, 島崎修次: 凍結保存皮膚, 救急・集中治療, 13号, 109-112, 2001

7. 知的所有権の取得状況

特許取得: 細胞増殖抑制因子、米国特許出願 No. 08/952,736
PCT/JP97/01987 (米国、EPC, 日本)

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