

平成15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		
20030960A KH71066	免疫抑制剤の体内動態並びに薬効発現に関わる蛋白群の遺伝子解析を基盤とした移植臓器における拒絶反応防御に関する研究	乾 賢一 …… 1
961A KH71067	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	大野泰雄 …… 11
962A KH71068	高機能保持ヒト由来肝培養細胞株を用いた薬物有効性、安全性評価法の確立とその応用	永森静志 …… 21
963A KH71069	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－	松浦成昭 …… 25
964A KH72076	公共的な研究利用ヒト組織バンクシステム構築の検討	小林英司 …… 30
965A KH72077	眼組織からの幹細胞等の同定・単離・細胞株化およびこれらの保存方法に関する研究	篠崎尚史 …… 36
966A KH72078	ヒト組織の創薬研究資源化に関する研究	林 真 …… 42

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

研究要旨 ヒト胃、大腸、子宮平滑筋収縮においてラットと異なる機構を見いだした。手術摘出肝組織より調製した遊離肝細胞は高いCYP3A4活性を示した。非凍結ヒト肝細胞は弱い誘導能の評価に、遺伝的多型者(PM)由来肝細胞はPMの薬物動態予測に有用であった。

分担研究者

- (1) 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部
大野泰雄
- (2) 獨協医科大学 薬理学研究室
上川雄一郎
- (3) 獨協医科大学 病院腫瘍外科 砂川正勝
- (4) 獨協医科大学 病院消化器外科 窪田敬一
- (5) 東京大学 農学部獣医学科 尾崎 博
- (6) 塩野義製薬(株) 新薬研究所 馬場隆彦
- (7) ファイザー(株) 中央研究所 嶋田 薫
- (8) 第一製薬(株) 創剤代謝研究所 岡崎 治
- (9) 田辺製薬(株) 薬物動態研究所 山田泰弘
- (10) 三共(株) 薬剤動態研究所 徳井太郎
- (11) アベンティス ファーマ(株)
薬物動態研究所 森田繁道
- (12) 協和発酵工業(株) 医薬総合研究所
藤岡弘之
- (13) 第一化学薬品(株) 薬物動態研究所
二宮真一
- (14) 大日本製薬(株) 薬物動態研究所
寺内嘉章
- (15) 武田薬品工業(株) 薬物機能研究所
朝日 知
- (16) 中外製薬(株) 前臨床研究第一部
加藤基浩
- (17) 日本新薬(株) 開発研究所 中村明生
- (18) 万有製薬(株) 臨床医薬研究所 安盛俊雄
- (19) 明治製薬(株) 薬品総合研究所 奥平典子
- (20) 持田製薬(株) 創薬研究所 大西修平

A. 研究目的

本研究事業では厚生労働省等の公的ガイドラインに従い、提供者の同意(イン

フォームドコンセント)の取得を必須とし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構築、並びに獨協医科大学及び関西医科大学から提供される日本人組織を用い、日本人に特有な薬物動態並びに薬理作用を明らかにし、臨床での薬効や副作用、薬物相互作用における予測の向上を促して、創薬開発における効率化と被験者の安全性を考慮した臨床試験に資することを目的とした。具体的には、日本人由来の組織を用いて、1)ヒト胃、大腸および子宮平滑筋の生理活性と薬理学的特性、2)ヒト樹立細胞およびヒト大腸癌組織を用いた抗癌剤感受性試験の代替法開発、3)生体肝移植手術における病的肝細胞の機能変化の予測、4)手術切除した日本人肝組織からの肝細胞・肝細胞画分の調製と代謝活性評価、5)非凍結ヒト肝細胞を用いた代謝酵素誘導能評価系のバリデーション、6)凍結ヒト肝細胞を用いたin vivo代謝予測系の確立、および7)小腸組織における代謝酵素の特性について検討した。

B. 研究方法

B-1) ヒト平滑筋組織を用いた研究

大腸癌患者48名(男性28名、女性20名、平均年齢 66.8 ± 1.5 歳)および胃癌患者33名(男性26名、女性7名、平均年齢 65.4 ± 1.7 歳)から切除されたS状結腸および胃体部より肉眼的に癌細胞浸潤のない平滑筋部分を切り出し、冷却リン酸緩衝液中に浸して実験室に運んだ。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°C まで凍結させ、 -80°C に

て一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。平滑筋の反応は、等尺性トランスデューサー（日本光電、TB-651T）を用い、一部の胃輪状筋標本では、高速液体クロマトグラフィー／電気化学検出器システム（エイコム、EC-300）を用いて acetylcholine (ACh) の遊離量を測定した。

また、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。さらに、各種 PKC アイソザイム、その他平滑筋収縮制御系蛋白質の抗体を用い、Western blotting 法により、発現パターンを解析、RT-PCR 法あるいは Real-time RT-PCR 法により mRNA の発現量を比較した。

B-2) 抗癌剤感受性試験の代替法開発

ヒト腎癌、大腸癌、鼻腔癌および口腔癌由来樹立細胞、また、ラット繊維芽細胞とその形質転換した細胞等 19 の樹立細胞を用いた。細胞を 96-well plate に蒔き 37°C で 48 時間培養した後、抗癌剤アクチノマイシン D、シスプラチン、5-FU の存在下にて 24 時間培養した。その後、10% (v/v) アロマブルー中 37°C で、3～4 時間培養し、比色法により細胞の生存率を調べた。nbl mRNA の発現を RT-PCR を用いて測定した。

B-3) 生体肝移植手術における病的肝細胞の機能変化の予測

経回結腸静脈肝内門脈枝塞栓術 (TIPE) を行った 35 例 (男性 29 例女性 6 例、平均年齢 63.9 歳) の内訳は肝胆道系悪性腫瘍 33 例 (肝門部胆管癌 11 例、中部胆管癌 1 例、肝細胞癌 (HCC) 10 例、胆管細胞癌 (CCC) 1 例、胆嚢癌 4 例、転移性肝癌 6 例)、良性胆管狭窄 2 例であった。

HCC に対する TIPE 術前には、腫瘍への豊富な動脈血流をなくし、かつ腫瘍内の動脈-門脈短絡 (AP shunt) を閉鎖する目的で動脈塞栓術 (TAE) を先行した。また、閉塞性黄疸症例に対する術前減黄は、残存側のみに片葉ドレナージを行い、T-Bil 値 5mg/dl 以下で TIPE を行った。

TIPE 術中の閉塞前後の門脈圧、術前と第 14 病日の ICG-R15、CT volumetry から非塞栓葉容積と脾容積の算定、および Doppler US による門脈血流の推移を測定した。

B-4) 手術切除日本人肝組織からの肝細胞・肝細胞下画分調製と代謝活性評価

獨協医科大学において、切除された日本人の肝組織から、病巣部分を除いた部分を氷冷ヘパリン

含有生理食塩水にて脱血し、氷冷 L-15 培地に交換した後、バイク便にて氷冷下、国立医薬品食品衛生研究所へ搬送した。国立医薬品食品衛生研究所においては、コラゲナーゼ 2 段階灌流法により肝細胞を分離した。肝細胞は 24-well plate に 1 well あたり 4×10^5 cell を播種し、5% CO₂-air 下、37°C にて 30 分間予備インキュベーションを行った。引き続き 250 μM のテストステロン (TS) を基質とし 6β-水酸化活性および 75 μM 7-エトキシマリリンを用い、脱エチル化活性 (ECOD) を 5% CO₂-air 下、37°C にて測定した。生成された代謝物は HPLC を用いて分析した。また、獨協医科大学およびヒューマンサイエンス研究資源バンクより供給された肝組織から 600xg 沈殿画分 (核画分)、9000xg 沈殿画分 (ミトコンドリア画分)、105,000xg 沈殿画分 (ミクロソーム画分) および上清画分 (可溶性画分) を分離した。また、米国 Gentest 社より、欧米人の肝上清画分とミクロソーム画分を購入し、各画分の CYP3A4、CYP3A5 のタンパク含量、ならびに上清画分、核画分に存在する核内受容体含量を、それぞれの特異的抗体を用いてウエスタンブロット法で測定した。また、TaqMan PCR 法で CYP3A4、CYP3A5 をコードする mRNA レベルを測定した。

B-5) 非凍結ヒト肝細胞を用いた代謝酵素誘導能評価系のバリデーション

8 施設が同一ロットの非凍結ヒト肝細胞を米国 GenTest 社から 24-well plate に接着済みのもの (HH139 Lot.64) を購入した。ヒト肝細胞を約 1 週間 Lanford's 培地 (日水製薬) で予備培養したのち、誘導実験を行ない、結果を比較した。誘導剤は、フェノバルビタール (PB) およびリファンピシン (RIF) を用いた。なお、今回の検討では弱い酵素誘導能を検知できるか否かを検討するために各誘導剤の終濃度は以下の様に低濃度まで設定した。PB、10、30、100、300 および 1000 μM ; RIF、0.3、1、3、10 および 30 μM。なお、誘導剤の処理時間は、24～72 時間とした。誘導剤処理の前後において、前項と同様の方法で TS-6β 活性を測定した。誘導試験後、ウェルに水酸化ナトリウム溶液を加え、細胞を破碎、可溶化して、各ウェルのタンパク濃度を求めた。

B-6) 凍結ヒト肝細胞を用いた in vivo 代謝予測のための評価系

CYP2C9 野生型 (EM) の凍結ヒト肝細胞 (lot.ENR) と変異型 (PM) 凍結ヒト肝細胞 (lot.GUY:*2/*3 および lot.WWM:*2/*2) を米国 In Vitro Technologies (IVT) 社より購入し、

CYP2C9 の基質としてジクロフェナック (DIC) およびワルファリン (S 体: S-WAR, RS 体: WAR) 代謝を検討した。また、CYP2D6 について genotyping された IVT 社製のロット ETR (CYP2D6 の *4/*4, PM) および ENR (CYP2D6 の *1/*1, EM) の凍結肝細胞を用い、CYP2D6 の基質としてデブリソキン、トラマドール、デキストロメトルファンおよびブフラロールの代謝試験を行った。凍結肝細胞は IVT 社の方法に従って融解した後、96 穴プレートに播種し、培地に浮遊させた状態で試験に供した。インキュベーション培地は、HEPES (1.5g/L) を添加 Krebs Henseleit Buffer (pH 7.4) を用いた。

B-7) ヒト小腸組織における代謝酵素の特性

代謝実験用のヒト小腸組織を入手できなかったことから、本年度はラットを用いて小腸における代謝活性の特性について検討した。7 週齢 Wistar/ST ラットを用い十二指腸から回腸にかけて切除し反転腸管を調製した、また、十二指腸、空腸、回腸を含んだ 20 cm ほどの 3 つの領域における上皮細胞から、常法に従いマイクロソームを調製した。これら組織における Phase I および Phase II の酵素活性について調べた。

(倫理面への配慮)

ヒト組織を用いた本研究は、それぞれの参加施設において、倫理審査委員会の承認の下に行われた。提供されたヒト組織は、摘出組織の研究利用に関して文書による同意が得られた患者から提供されたものである。提供された組織は、提供機関で匿名化措置された。米国から入手したヒト遊離肝細胞は移殖不適合臓器の研究利用分を材料に調製されたものである。実験操作は、各施設のヒト組織取り扱いに関する規定等に従って実施した。

C. 研究結果

C-1) ヒト平滑筋組織を用いた研究

ヒト大腸輪状筋に対する carbachol (0.01-30 μ M) 収縮および 100mM KCl 収縮を指標にして、各種凍結保存液の有用性を比較検討した。1 ヶ月以上凍結保存後解凍した標本での反応性は、日本製薬の無血清培地 SFM101 或いはリン酸緩衝液に凍害防止剤の DMSO を加えて保存された標本が最も高い反応性を示し、摘出当日における新鮮標本と比較して、EC50 値や最大収縮高の点で収縮性は低下したが、その程度は小さかった。

ヒト胃粘膜筋板標本をフィールド電気刺激 (1-64Hz, 0.3msec, 30V) すると、約半数の症例で頻度依存性弛緩反応が得られた。一酸化窒素 (NO)

合成酵素阻害薬 (L-NAME) を前処置しておくると弛緩反応は消失した。また、ヒト胃粘膜筋板にイソプロスタノール類 (8-sio-PGF_{2 α} , 8-iso-PGE₂) を作用させると、carbachol に匹敵する強い収縮反応が得られた。しかしこれらのイソプロスタノール類はヒト大腸粘膜筋板ではごく弱い収縮しか示さず、著明な部位差があった。一方、ヒト胃輪状筋標本 26 例中 13 例において ACh の自発遊離量を検出できた。この ACh 自発遊離は、nicotine 30 μ M や 5-hydroxytryptamine 10 μ M 処置により有意に増加したが、消化管機能改善薬の cisapride や mosapride (30 μ M) によっては促進されなかった。

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。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され、また、細胞内 Ca 濃度は減少して、収縮蛋白質の Ca 感受性が著しく増加していることが示された。また、脱膜化標本を用いて収縮蛋白質 Ca 感受性に対する PDBu の作用は増強された。これらの反応はラットと異なる事が示された。ラットと同様ヒト子宮筋でも、cPKC、nPKC、aPKC (一部を除く) いずれの PKC ファミリーも発現していた。ただし、PDBu によるヒト子宮筋の収縮は cPKC 選択的阻害剤で強く抑制された。また、妊娠子宮では PDBu による収縮、LY333531 による収縮抑制、ミオシンリン酸化ならびに収縮蛋白質 Ca 感受性に関わる PKC の下流タンパク質である CPI-17 の mRNA の発現量は、非妊娠子宮に比べ有意に増加していた。

ヒト子宮筋において収縮蛋白系制御に関わる RhoA、ROCKI、Rnd2、Rnd3 の mRNA 発現は非妊娠と妊娠の間で差は認められなかった。ただし、ROCKII と Rnd1 の mRNA 発現は非妊娠子宮筋より妊娠子宮筋で有意に増加した。これに対し、妊娠ラット子宮筋では Rnd1、Rnd2、Rnd3 の mRNA 発現が有意に増加した。

C-2) 抗癌剤感受性試験の代替法開発

ほとんどの樹立細胞において、3 種の抗癌剤とも高い細胞密度より低い細胞密度で最大の細胞障害効果を示した。多くの細胞で細胞密度が高いほど nbl mRNA レベルも高い傾向が見られた。また、どの細胞密度においても nbl mRNA レベルが高いほど薬物の細胞障害効果は低下する傾向が見られた。

C-3) 生体肝移植手術における病的肝細胞の機能変化の予測

肝葉切除術以上を行った症例において、術中門脈圧の上昇（塞栓前平均 16.8cmH₂O から塞栓直後 21.6cmH₂O、 $p<0.0001$ ）、非塞栓葉容積の増大（平均 36.1%から 48.9%、 $p<0.0001$ ）、門脈血流の増加（平均 18.4cm/s から 26.2cm/sec、 $p=0.008$ ）、脾容積の増大（平均 180.6ml から 219.1ml、 $p=0.004$ ）の 4 項目にはいずれも有意差が認められた。TIPE 後の非塞栓葉の再生を門脈血流の変化と ICG-R15 の観点から検討すると、非塞栓葉容積の増加率を求める予測式は [非塞栓葉の増加率 = $(0.303 \times \text{門脈血流の増加率}) - (0.084 \times \text{術中門脈圧差}) + (1.778 \times \text{ICG 前値})$] で表された。

C-4) 手術切除日本人肝組織からの肝細胞・肝細胞画分調製と代謝活性評価

今年度は、獨協医科大学において、手術により切除された日本人の肝組織 16 例が、国立医薬品食品衛生研究所に提供された。その内訳は、肝細胞調製用として 6 件、細胞画分調製用としての 10 件である。肝細胞調製には、肝組織片の切断面数が少なく、肝重量が 3g 以上の試料を用いた。また、国立医薬品食品衛生研究所で調製した肝細胞の一部を、氷冷下にて共同研究施設へ配布した。なお、調製直後と調製 12 時間後の Viability に明らかな差は認められなかった。

遊離肝細胞調製に用いられた総提供数は 3 年間で 13 例で、肝細胞を調製できた 9 例の平均 Viability は、61.6% (45.8~84.7%) であった。得られた生細胞数は $0.02 \sim 8.44 \times 10^6$ cells の範囲に、また、収率は、 $0.02 \sim 1.36 \times 10^6$ cells/g の範囲にあり、生細胞数、収率ともに大きなバラツキが認められた。さらに、薬物代謝活性の測定に必要な量の生細胞が得られた 5 例について、薬物代謝能を測定した (表 1)。TS を基質とした場合、代謝物としては 6β -水酸化体がもっと多く、ついで、 2β -水酸化体と Androstendione がほぼ同程度を示した。 6β -水酸化活性は、試料 C で最も高く $996 \text{ pmol/min}/10^6 \text{ cells}$ を、一方、試料 B では $139 \text{ pmol/min}/10^6 \text{ cells}$ と低く、約 7 倍の差が見られた。また、同じく CYP3A4 代謝活性の指標とされる 2β -水酸化活性も高いレベルで認められた。活性の差は約 4 倍と、 6β 水酸化活性より小さかった。ほかに 16β 水酸化活性の発現も認められた。さらに A、B について 7-Ethoxycoumarin を基質として用いた場合、グルクロン酸抱合活性が、最も高かった。

Gentest 社から購入した欧米人由来の肝ミクロソーム (MS) の CYP3A4 含量 (12 検体) は、 $38 \sim 306 \text{ pmol/mg protein}$ 、CYP3A5 含量 (12 検体) は、

$0.4 \sim 18.0 \text{ pmol/mg protein}$ であった。日本人由来の肝 MS 中の CYP3A4 含量 (11 検体) は $16.1 \sim 56.0 \text{ pmole/mg protein}$ 、CYP3A5 含量 (11 検体) は $2.8 \sim 52.1 \text{ pmol/mg protein}$ であった。MS タンパクあたりの CYP3A4 含量は日本人の肝より欧米人の肝の方が 3.7 倍高かった ($p<0.0001$)。CYP3A5 遺伝子のイントロン 3 には A→G 遺伝子多型があり、G 型の対立遺伝子はスプライシング異常が起り CYP3A5 の発現は認められない。この出現頻度は日本人では約 70% にも上るため、約 50% の日本人では CYP3A5 を発現していない。実際、CYP3A5 の分布は明瞭に 2 峰性となり、低発現の 7 検体は $2.6 \sim 7.6 \text{ pmol/min/mg protein}$ 、高発現の 4 検体は $42.6 \sim 52.1 \text{ pmol/min/mg protein}$ であった。CYP3A4 と CYP3A5 の基質特異性は類似しているため、CYP3A5 の発現が低い日本人では総 CYP3A が低くなると考えられ、薬物療法上注意すべき個体と思われる。更に、TaqMan 法により、CYP3A4 や CYP3A5 の mRNA の発現レベルとタンパクの発現レベルの相関を検討した。CYP3A5 タンパク発現が低い個体では、CYP3A5 mRNA の発現もレベルも低く、総 CYP3A レベルは、CYP3A4 および CYP3A5 の発現レベルをタンパク、mRNA の両面から測定すれば解析可能であると考えられた。

C-5) 非凍結ヒト肝細胞を用いた代謝酵素誘導能評価系のバリデーション

8 施設の内 2 施設においては誘導のレスポンスが悪く、3 施設においては濃度依存性あるいは経時変化の誘導を一部について認め得る結果であり、3 施設においてある程度の誘導を認めた。このため、8 施設の結果を総合すると、大きなばらつきを示すこととなり、PB では濃度依存性も経時的な誘導増強も認められなかった。RIF については、経時変化と濃度依存性を認めたが、高い濃度暴露の群で却って活性が減弱する傾向を示した。誘導の強度は、 $RIF > PB$ であった。

C-6) 凍結ヒト肝細胞を用いた in vivo 代謝予測 (遺伝多型を考慮した臨床薬物動態の予測)

CYP2D6 活性の低い 23 ロットのヒト肝細胞を選択し、PM 凍結遊離肝細胞であることを genotyping により確認した。これらを EM とともに用い、CYP2D6 の基質である Dextromethorphan (DEX) をプローブとして用い PM と EM での代謝を 8 研究施設で比較検討した。臨床で DEX は N-脱メチル化、O-脱メチル化とそれに続くグルクロン酸抱合が進行する。

CYP3A4 は N-脱メチル化、CYP2D6 は O-脱メチル化反応を触媒する。DEX の 2 つの代謝物の生成比は、いずれの施設でも 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 のグルクロン酸抱合体も観察された。

同様の検討を他の基質についても行い、いずれも臨床での動態と同様の結果を得た (表 2)。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。遺伝多型者から得た肝細胞を選択使用することにより、PM の動態が予測できる可能性が示された。

C-7) 小腸組織における代謝酵素の特性

小腸のモデルとしてのラット反転腸管の有用性についてマイクロソームと比較した。反転腸管において、EROD 活性、TS-6 β 活性および ECOD 活性は十二指腸から回腸に下降するに従って低下した。EROD 活性と ECOD 活性は、小腸マイクロソームにおいても同様の知見が得られた。一方、ペントキシシレゾルフィン脱アルキル化 (PROD) 活性には、反転腸管およびマイクロソームに部位特異性は認められなかった。CYP1A 酵素活性の阻害剤である α -ナフトフラボン (10 μ M) は EROD 活性を 45% 阻害した。ECOD 活性と PROD 活性はメチラボンでのみそれぞれ 55% および 68% 阻害された。ブフラロール 1'-水酸化活性は CYP2D 酵素活性の阻害剤であるキニン (100 μ M) により 43% 阻害された。また、TS-6 β 水酸化活性はケトコナゾール (1 μ M) によって 88% と顕著に活性が阻害されたが、テストステロン 16 α -水酸化活性の阻害は認められなかった。反転腸管および小腸マイクロソームについて、UDT1A6 の基質 (1-ナフトール)、UGT1A1 の基質 (4-ニトロフェノール)、UGT2B1 および UGT2B12 の基質 (モルフィン) を用いて、グルクロン酸抱合活性を測定したところ、モルフィンのグルクロン酸抱合活性は、小腸上部で低く、下部で高い活性が認められたが、他の基質では小腸の部位による大きな差は認められなかった。反転腸管の 4-ニトロフェノールのグルクロン酸抱合活性は、マイクロソームよりも 10 倍以上の活性を示した。一方、1-ナフトールのグルクロン酸抱合活性は両者がほぼ同程度の活性を示した。モルフィンの 3-グルクロン酸抱合活性は、マイクロソームおよび小腸上部の反転腸管での活性が近似していた。

D. 考察

D-1) ヒト平滑筋組織を用いた研究

ヒト大腸輪状筋は DMSO を 10% 添加した無血清培地 SFM101 あるいはリン酸緩衝液に凍結保存することにより最も収縮性の低下が少なかった。一方、ヒト消化管粘膜筋板の自律神経支配については我々の研究を除けばほとんど研究されて来なかった。今回の研究によりヒト大腸では抑制性 NO 作動性神経、興奮性コリン作動性神経、抑制性アドレナリン作動性神経の 3 種類によって支配されているが、胃では抑制性 NO 作動性神経のみによって支配されているという著明な部位差が明らかになった。また、新しい炎症性化学伝達物質であるイソプロスタノイド類の粘膜筋板の反応性にも、著明な部位差のあることが見出された。このことは消化管の炎症性疾患の病態生理を解明する上で、ヒト粘膜筋板を研究対象とすることの重要性を示している。ヒト胃輪状筋からの ACh 遊離量を測定した結果、自発的遊離や薬物誘発遊離を検出できたが、動物実験で ACh 遊離促進作用が報告されている cisapride や mosapride では ACh 遊離促進作用が確認できなかった。これらの消化管機能改善薬の薬効発現機構についてはヒト組織を用いて再検討する必要がある。

ヒトおよびラット子宮平滑筋の薬理的性質を、特に PKC と Rnd の役割の違いを明らかにした。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。ラットではこのジアシルグリセロールが細胞内 Ca 濃度を低下させて収縮抑制的に働くが、ヒトでは逆に収縮蛋白系に働いて促進的に作用していた。ヒト子宮筋の収縮蛋白系への増強作用の中で、妊娠で増強される部分については、cPKC ファミリーのうちで 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。一方、ラット子宮筋における収縮抑制作用には、cPKC ファミリーのうちで PKC α が関与する可能性が示唆された。一方、Rnd に関しては、この蛋白質が妊娠の維持に重要な分子であることが明らかにされたが、特に妊娠時にステロイドホルモン上昇により増加すると考えられた。ヒトの子宮筋では、妊娠に伴う収縮蛋白系の発現パターンはラットの子宮筋とは異なっており、C キナーゼと同様に、大きな種特異性が認められた。

D-2) 抗癌剤感受性試験の代替法開発

抗癌剤による細胞障害効果は、nbl mRNA レベルが低い時ほど強く、nbl mRNA レベルは細胞密度に依存し、高い細胞密度においては高い

nbl mRNA レベルを示し、局所再発あるいは転移巣の nbl mRNA のレベル測定の重要性が示唆された。

D-3) 生体肝移植手術における病的肝細胞の機能変化の予測

門脈塞栓術は門脈圧の上昇をきたし、その結果非塞栓葉の門脈血流を増加させ、肝再生を促進するものと考えられた。現時点では、肝機能が正常で肝切除量が 60% を超える症例、軽度肝機能障害例で肝切除量が 40~60% の症例に門脈塞栓術を適応しているが、この基準で試行した結果、障害肝であっても耐術し、死亡例はなく、門脈塞栓術は肝切除の適応を拡大させる有効な手段と考えられた。

D-4) 手術切除日本人肝組織からの肝細胞・肝細胞画分調製と代謝活性評価

手術切除肝臓片は病巣部分ではないものの多くは肝硬変様、黄色味を帯びた脂肪肝状の試料であり、正常肝とはかなり異なる様相を示していた。また、肝切除術の際の虚血・再灌流処置によりラジカルが発生し実質細胞が障害を受ける可能性がある。これらが原因となって肝細胞の Viability と生細胞収率が低くなったと思われるが、ヒト組織は肝細胞以外に肝鍵状間膜等の結合組織の含量が多いことにも起因していると考えられた。一連の肝細胞調製において、収率の良かった 2 例は、切断面が一面のみで、効率的な灌流には、切断面数の少ないことが重要と考えられた。

ヒト肝細胞の TS-6 β 水酸化活性(CYP3A4)は GenTest 社の調製直後のヒト肝細胞の活性 (81-560 pmol/min/10⁶ cells) や Steinberg らの報告 (DMD 27, 1415-1422, 1999) とほぼ同等、もしくはそれらより高い活性であった。高い活性を示した肝細胞ドナー JPN3JXD6 は、手術 5 日前に、CYP3A4 誘導が知られているフェニトインとウルソデオキシコール酸を服用しており、薬物による影響の可能性も考えられた。一方、調製した肝細胞は TS-6 β 水酸化活性に加え、ヒト肝での発現レベルが高いことが知られている TS-2 β 水酸化活性も次いで発現していること、さらにヒト肝細胞では 16 β -水酸化活性 (CYP2B6) も発現していたことなど、ヒト肝におけるテストステロン代謝パターンのプロフィールを良く示していた。今後はより高い収率のための検討を重ねると同時に、測定系のスモールサイズ化による多検体への適用が検討課題である。

肝ミクソソームの CYP3A4 含量は日本人の方が欧米人に比べて低かった。また、欧米人検体で

は、CYP3A5 は CYP3A4 に比較してタンパクレベルは低かった。CYP3A5 の発現はスプライシングバリエーションを伴う一塩基多型により規定されることが知られており、日本人、欧米人ともに発現レベルが高い群、低い群に分かれると考えられている。実際、日本人では、CYP3A5 が高い群と低い群とに分かれ、CYP3A5 含量が高い群では、その含量は CYP3A4 含量とほぼ同等であった。CYP3A4 で代謝を受ける薬物の数は多く、また、CYP3A4 と CYP3A5 の基質特異性はかなり類似している。CYP3A5 レベルが低い日本人では薬物療法上注意すべきであると考えられる。また、医薬品の代謝能につき日本人組織を用いて評価することが医薬品開発等に不可欠であると考えられる。

D-5) 非凍結ヒト肝細胞を用いた代謝酵素誘導能評価系のバリデーション

今回の検討では、すべての施設のすべての処理条件において、ウェル間のばらつきが大きかった。また、同一ロットの肝細胞を用いたにも関わらず誘導の程度に施設により大きなばらつきが認められたことは、未知検体を調べる際には陽性対照をおくことが重要であることを示している。また、誘導の有無についての判定は、複数ロットでの結果を総合的に判断することが推奨される。今回の細胞は入手当初、細胞の状態は劣悪ではなかったため、試験可能と判定したが、品質の見極めの困難さを痛感させられた。

D-6) in vivo 代謝の予測のための凍結ヒト肝細胞の有用性

D-7) 小腸組織における代謝活性の特性

一般に小腸由来の試料からの酵素などの調製は、小腸に蛋白分解酵素が高濃度で存在するために比較的困難を伴う。我々は蛋白分解酵素阻害剤と共にグリセロールを添加した緩衝液を用いてラット小腸ミクソソームを調製した。典型的な基質を用いた代謝活性はほぼ肝と同様の P450 分子種によって触媒されていると思われた。一方、ECOD 活性は ANF により阻害されず、ラット小腸ミクソソームでの ECOD は主に CYP2B によって触媒されていると思われた。一般的に、第一相薬物代謝活性は小腸上部で高かったが、第二相代謝活性にはそのような分布の差は少なかったが、文献 (Koster et al. 1985) とは異なり、モルフィンの 3-グルクロン酸抱合活性は小腸下部では上部よりも 10 倍高い活性を示した。

E. 結論

ヒト大腸輪状筋組織は 10%DMSO 添加リン酸緩衝液中で凍結保存が可能であった。ヒト消化管粘膜筋板の自律神経支配は、大腸では抑制性 NO 作動性神経とアドレナリン作動性神経および興奮性コリン作動性神経によって行われていたが、胃では抑制性 NO 作動性神経のみによって支配されていた。また、胃粘膜筋板は大腸とは異なり、イソプロスタノール類によって強く収縮することが明らかになった。ヒト胃輪状筋標本の ACh 遊離に消化管機能改善薬は促進作用を示さなかった。

子宮収縮制御機構はヒトとラットで大きな差があった。このことは、ヒト臓器を用いた機能解析研究の重要性を単に示すだけでなく、実験動物での成績からは全く予想できない、新しい創薬への糸口が、ヒト臓器を用いることで見いだされる可能性を示唆している。

遠隔地より搬送した手術切除肝組織30例のうち13例から調製した遊離肝細胞は、TS-6 β 水酸化活性が十分に高かった。一方、日本人肝組織の CYP3A4 レベルは欧米人由来組織に比べて低かった。日本人では CYP3A5 レベルが相対的に高いことが示唆された。手術摘出肝臓片から調製した遊離肝細胞および細胞下画分は、創薬研究等への利用が可能と判断されたが、提供件数に限りがあり、さらに日本人肝組織の供給拡大を計る必要がある。

非凍結ヒト遊離肝細胞を用いる酵素誘導試験系で RIF については、弱い誘導レスポンスでも、CYP3A4/5 誘導を検出できた。一方、本試験系を実際に使用する際には複数ロットの良質肝細胞を用い、陽性対照と比較・検討するのが望ましいことが明らかになった。

遺伝多型が知られている CYP2C9, CYP2C19, 及び CYP2D6 の 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検討した結果、いずれの基質の場合も代謝物の生成速度において、臨床結果と同様の結果が再現された。CYP2D6 PM 凍結遊離肝細胞で、従来マイクロソーム系で観察されなかった補償的代謝反応が観察されたことは、肝細胞の有用性を明確に示すものである。

ラット小腸の上部は P450 が関与する初回通過効果に影響を及ぼすと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Domae, M., Sagara, H., Sakaue, M., Fukuda, T. & Kamikawa, Y.: The antiallergic drug oxatomide promotes human eosinophil apoptosis and suppresses IL-5-induced eosinophil survival. *J. Allergy Clin.*

Immunol. 111: 567-572, 2003.

- 2) Hiyama, T., Kamikawa, Y., Ota, M., Nakano, Y. & Sagara, H.: Airway remodeling in a guinea pig model of chronic asthma: its influence on airway responsiveness and pharmacological properties of airway smooth muscle, and its prevention by corticosteroids. *Dokkyo J. Med. Sci.* 30: 29-38, 2003.
- 3) Kojima, S., Ueda, S., Ikeda, M. & Kamikawa, Y.: Calcitonin gene-related peptide facilitates serotonin release from guinea-pig colonic mucosa via myenteric neurons and tachykinin NK2/NK3 receptors. *Br. J. Pharmacol.* 141: 385-390, 2004.
- 4) Yoon-Sun Kim, Bokyung Kim, Hideaki Karaki, Masatoshi Hori, and Hiroshi Ozaki. Up-regulation of Rnd1 during pregnancy serves as a negative feedback control for Ca²⁺ sensitization of contractile elements in rat myometrium *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311, 972-978, 2003
- 5) Hiroshi Ozaki, Katsuhiko Yasuda, Yoon-Sun Kim, Makoto Egawa, Hideharu Kanzaki, Hiroshi Nakazawa, Masatoshi Hori, Minoru Seto and Hideaki Karaki Possible role of the protein kinase C/CPI-17 pathway in the augmented contraction of human myometrium after gestation *Br. J. Pharmacol.* 140: 1303-1312, 2003
- 6) Bokyung Kim, Yoon-Sun Kim, Jiyeun Ahn, Junghwan Kim, SungIl Cho, Kyung-Jong Won, Hiroshi Ozaki, Hideaki Karaki & Sang-Mok Lee Conventional-type protein kinase C contributes to phorbol ester-induced inhibition of rat myometrial tension. *Br. J. Pharmacol.* 139: 408-414, 2003
- 7) K-J Won, S Torihashi, M Mitsui-Saito, M Hori, K Sato, T Suzuki, H Ozaki, H Karaki, Increased Smooth Muscle Contractility of Intestine in the Genetic Null of the Endothelin ETB Receptor, a Rat Model for Long-Segment Hirschsprung's Disease *Gut* 50: 355-360, 2002
- 8) K.Nemoto, Studies on relationship between nbl(S3a) mRNA levels, cell density chemosensitivity in various rat and human cell lines. *Dokkyo Journal of Medical*

Sciences 31 (in press)

- 9) Kei Takemoto, Hiroshi Yamazaki, Yuko Tanaka, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi: Catalytic activities of cytochrome P450 enzymes and UDP-glucuronosyltransferases involved in drug metabolism in rat everted sacs and intestinal microsomes. *Xenobiotica*, 33: 43-55 (2003)
 - 10) Niwa T, Shiraga S, Yamasaki S., Ishibashi K, Ohno Y, Kagayama A., In vitro activation of 7-benzyloxyresorufin O-debenzylolation and nifedipine oxidation in human liver microsomes. *Xenobiotica* 33, 717-729, 2003.
 - 11) 大野泰雄、摘出ヒト組織・細胞を用いた非臨床研究、大野泰雄監修、エル・アイ・シー出版社、2004 出版予定。
2. 学会発表
- 1) 上川雄一郎：外科手術切除ヒト平滑筋組織を用いた薬理学研究の重要性とその問題点。ミニシンポジウム「動物実験代替・削減とヒト組織の利用」、東京、6月、2003.
 - 2) 上川雄一郎、渋谷朝子、内田幸介、佐々木欣郎、砂川正勝、大野泰雄：手術摘出ヒト大腸平滑筋の薬理学的反応性を指標とした凍結保存方法の検討。第45回日本平滑筋学会総会、富士吉田、7月、2003.
 - 3) 上川雄一郎、内田幸介、高山尚美： β_2 刺激薬の気管支拡張作用における機能的パーシャルアゴニスト活性の評価。Airway Club in Sendai 第12回研究会、仙台、9月、2003.
 - 4) 上川雄一郎、高山尚美： β_2 刺激薬の気管支拡張作用における機能的パーシャルアゴニズムの評価。第53回日本アレルギー学会総会、岐阜、10月、2003.
 - 5) 児嶋修一、上田秀一、池田雅志、上川雄一郎：カルシトニン遺伝子関連ペプチドはタキキニン NK2/NK3 受容体を介して大腸粘膜セロトニン貯蔵細胞からのセロトニン放出を促進する。第31回獨協医学会、壬生、12月、2003.
 - 6) 阪上守人、上川雄一郎：抗アレルギー薬オキサトミドによる Akt/PKB リン酸化の抑制とカスパーゼ活性の上昇。第77回日本薬理学会年会、大阪、3月、2004.
 - 7) 児嶋修一、上田秀一、池田雅志、上川雄一郎：カルシトニン遺伝子関連ペプチドはタキキニン NK2/NK3 受容体を介してモルモット大腸粘膜からのセロトニン放出を促進する。第77回日本薬理学会年会、大阪、3月、2004.
 - 8) 嶋田 薫：PM/EM ヒト肝細胞を用いた代謝研究。第10回 HAB 研究機構学術年会 2003
 - 9) 根本一宏、砂川正勝、nbl 活性の検討。第15回北関東外科研究学術集会、2004.2.7
 - 10) 松本茂樹、大西修平、山田泰弘、中村明生、馬場隆彦、桐田史朗、嶋田 薫、村瀬茂夫、名瀬義明、中川俊人、朝日 知、館林智子、二宮真一、酒見和枝、大野泰雄：代謝研究のためのヒト肝細胞のバリデーション(8) -非凍結ヒト肝細胞を用いた CYP1A 酵素の誘導評価法の検討-。第18回日本薬物動態学会、札幌 2003.10.8
 - 11) 糸川健一、岡崎 治、嶋田 薫、高島忠之、山田泰弘、森田繁道、寺内嘉章、中村明生、安盛俊雄、簾内桃子、大野泰雄：代謝研究のためのヒト肝細胞のバリデーション(9) -CYP2D6 PM/EM 凍結ヒト肝細胞を用いたデキストロメトルファン代謝の評価-。第18回日本薬物動態学会、札幌 2003.10.8
 - 12) 簾内桃子、酒見和枝、窪田敬一、上川雄一郎、内田幸介、繁原英治、藤崎 浩、大野泰雄：代謝研究のためのヒト肝細胞のバリデーション(10) -手術摘出肝臓片からの遊離ヒト肝細胞調製の現状-。第18回日本薬物動態学会、札幌 2003.10.8
 - 13) 酒見和枝、宮島敦子、簾内桃子、大野泰雄：ゴム老化防止剤 2-Mercaptomethylbenzimidazole の非凍結ヒト肝細胞薬物代謝酵素に及ぼす影響。第18回日本薬物動態学会、札幌 2003.10.8
 - 14) 紅林秀雄、大野泰雄：除草剤プロメトリンおよびアメトリンのヒト肝ミクロソームにおける代謝：第124年会 日本薬学会、大阪 2004.3.29
 - 15) 宮島敦子、簾内桃子、酒見和枝、大野泰雄：尿素系農薬 Linuron のヒト培養肝細胞における薬物代謝酵素に及ぼす影響：第124年会 日本薬学会、大阪 2004.3.29
 - 16) 六角 丘、根本猛彦、下田 貢、北 順二、佐久間 敦、窪田敬一。肝大量切除術に対する術前肝内門脈塞栓術(TIPE)の効果、肝再生についての評価。第1回日本再生医療学会総会
 - 17) 六角 丘、根本猛彦、下田 貢、北 順二、佐久間 敦、窪田敬一。肝右葉切除術に対する術前肝内門脈塞栓術(TIPE)の効果と肝再生因子に関する検討。第57回日本消化器外科学会総会
 - 18) 六角 丘、根本猛彦、加藤正人、下田 貢、

北 順二、佐久間 敦、窪田敬一。肝内門脈塞栓術（TIPE）における非塞栓葉の肝再生因子に関する検討。第 2 回日本再生医療学会総会

19) 六角 丘、根本猛彦、加藤正人、下田 貢、北 順二、佐久間 敦、窪田敬一。術前肝内門脈塞栓術（TIPE）における非塞栓葉の肝再生因子に関する検討。第 15 回日本肝胆膵外科学会

20) 六角 丘、根本猛彦、加藤正人、下田 貢、北 順二、佐久間 敦、窪田敬一。術前肝内門脈塞栓術（TIPE）における非塞栓葉の肝再生因子に関する検討。第 58 回日本消化器外科学会総会

21) 六角 丘、根本猛彦、加藤正人、下田 貢、北 順二、佐久間 敦、窪田敬一。術前肝内門脈塞栓術（TIPE）における非塞栓葉の肝再生に関する検討。第 103 回日本外科学会総会

22) Ohno Y, In vitro drug metabolism and interaction evaluation: Drug administration prospects. 2004 International Workshop on In Vitro Drug Metabolism and Interaction Evaluation (2004.3.5)上海

G.知的財産権の出願・登録状況

1. 知的所有権の取得状況

特許出願 嶋田薫 平成 14 年 8 月 30 日（特願 2002-255626）

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1. 日本人由来ヒト遊離肝細胞の薬物代謝能評価

Sample No.	A	B	C	D	E	
Code No.	JPN3WNJ8	JPN3QTH7	JPN3JXD6	JPN3JXD9	JPN3KFT5	JPN4NWA3
Substrate/Metabolites	pmol/min/million cells					
Testosterone						
6 β -Hydroxy-	568	139	996	996	346	381
2 β -Hydroxy-	229	59.4	240	240	114	143
16 β -Hydroxy-	17.1	11.9	3.2	3.2	5.5	33.5
Androstenedione	128	177	173	173	211	204
7-Ethoxycoumarin						
7-Hydroxy-	2.02	1.59	—	—	—	—
Glucronide	18.4	32.6	—	—	—	—
Sulfate	N.D.	6.18	—	—	—	—
Total	20.4	40.3	—	—	—	—

—; Not determined

N.D.; Not detected

表 2: 遺伝多型を考慮した臨床薬物動態の予測検討のために用いた薬物とヒト肝細胞

施設	評価薬物	CYP分子種	使用細胞Lot (変異型)	測定代謝物
アベンティス ファーマ	S-Warfarin	CYP2C9	WWW(*2/*2), GUY(*2/*3)	4'-, 6-, 7-水酸化体
萬有製薬	Bufuralol	CYP2D6	ETR(*4/*4)	1'-水酸化体
第一製薬	S-Warfarin	CYP2C9	WWW(*2/*2), GUY(*2/*3)	4'-, 6-, 7-水酸化体
	S-Mephenytoin	CYP2C19	ETR(*4/*4)	4'-水酸化体、脱メチル体
大日本製薬	Dextromethorphan	CYP2D6	ETR(*4/*4)	N-, O-脱メチル化体
ファイザー製薬	Warfarin	CYP2C9	WWW(*2/*2), GUY(*2/*3)	4'-, 6-, 7-, 8-, 10- 水酸化体
	Diclofenac	CYP2C9	WWW(*2/*2), GUY(*2/*3)	4'-水酸化体、Glu抱合体
日本新薬	tramadol	CYP2D6	ETR(*4/*4)	M1, M2

EM細胞はいずれもENR(wt/wt)を用いた。

平成15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16年9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