

日本人由来の手術切除肝組織提供体制構築の試み

簾内桃子[#], 酒見和枝, 窪田敬一^{*1}, 北 順二^{*1}, 上川雄一郎^{*2}, 内田幸介^{*2},
三浦慎一^{*3}, 繁原英治^{*3}, 藤岡弘之^{*4}, 大野泰雄

A network for the collection and distribution of Japanese
liver tissues resected surgically for drug development and research use

Momoko Sunouchi[#], Kazue Sakemi, Kei-ichi Kubota^{*1}, Junji Kita^{*1}, Yuichiro Kamikawa^{*2}, Kohsuke Uchida^{*2},
Shin-ichi Miura^{*3}, Eiji Shigehara^{*3}, Hiroyuki Fujioka^{*4} and Yasuo Ohno

We focused on the establishment of a trial procedure for the collection and distribution of Japanese liver tissues obtained from waste surgical resections for drug development and research use. The following procedures were prepared for this project: the pretreatment of liver tissues before storage, their storage at 4°C, the transport of liver samples, the setting up of a communication network among the participating hospitals and laboratories and the approval of each ethics committee. Thirteen liver samples (1.6-7.6 g) obtained from patients whose livers were excised due to cirrhosis, hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma, or metastasis from colorectal carcinoma and were donated for research. Informed consent was obtained from every patient. Freshly isolated human hepatocytes were prepared from nine liver samples (viability 34.3-86.1%). Four samples were unsuitable to prepare hepatocytes. The profile of testosterone metabolism as 6 β -, 2 β -, 16 β -, 16 α - and 2 α -hydroxytestosterone and androstenedione in freshly isolated hepatocytes was shown to be specific for human liver. The 6 β -hydroxylation activity catalyzed by CYP3A4/5 indicated a high level of metabolism (139-996 pmol/min/million cells). Levels of 7-ethoxycoumarin O-deethylation and glucuronidation activities were sufficient for analysis in freshly isolated human hepatocytes. We conclude that liver tissues from waste surgical resections supplied from a participating hospital can constitute a valuable source of freshly isolated human hepatocytes for drug development and safety evaluation.

Keywords: network, Japanese liver, surgical wastes, freshly isolated human hepatocytes, CYP3A4/5

(Received May 31, 2005)

1. はじめに

薬物動態およびその関連機能には動物種差^{1,2)}が認められることから、実験動物を用いた結果をヒトに外挿出来ない場合があり、医薬品開発の初期段階において、ヒト由来の肝組織および遊離肝細胞を用いた *in vitro* 代謝評価系を利用することが重要となっている。特に、遊離ヒト肝細胞を用いた初代培養系による薬物の誘導能評価は、薬物の相互作用を予見する上で極めて重要と考えら

れている。また、ヒトにおいては人種差が存在することから、日本人に適した医薬品開発のためには、日本人のヒト組織を用いた薬物の有効性と安全性の予測が必要になっている。諸外国、特に欧米先進国においては、医薬品開発および治療のため、移植不適合臓器から得られたヒト組織の研究利用が盛んに行われている。一方、我が国では、1997年に臓器移植法が制定されたもののその施行規則では移植不適合臓器の研究利用は認められなかった。その後、いわゆる黒川答申により、外科手術の際に得られる残余組織の研究利用が認められた。そこで、医薬品開発における有効性と安全性評価向上のためのヒト組織利用研究の一環として、獨協医科大学、国立医薬品食品衛生研究所（国立衛研）および参加研究施設共同で、日本人由来の肝組織・細胞の研究利用について検討した。

本研究においては、厚生労働省等の公的ガイドラインに従い、医療機関において手術により切除した肝組織を研究利用する体制を構築し、提供された肝組織からの遊

[#]To whom correspondence should be addressed: Momoko Sunouchi; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo, 158-8501, Japan; Tel:03-3700-1141 ext.327; Fax:03-3707-6950; E-mail:sunouchi@nihs.go.jp

^{*1} Department of Surgery II, Dokkyo University School of Medicine, ^{*2} Department of Pharmacology, Dokkyo University School of Medicine, ^{*3} Drug Metabolism and Pharmacokinetics Research Laboratories, Sankyo Co., Ltd., ^{*4} Pharmacokinetic Research Center, Kyowa Hakko Kogyo Co., LTD.

離ヒト肝細胞を調製してその薬物代謝能の評価を行ったので報告する。

2. 方法

2.1 手術切除肝組織の研究利用体制の構築

構築した組織を図1に示した。本組織は、外科手術による肝組織切除施設、脱血処置施設（獨協医科大学）、遊離肝細胞調製・代謝能評価施設（国立衛研）、遊離肝細胞の研究利用施設（国立衛研、参加施設）から構成された。

実験開始に先立ち、

- A) ヒト組織取り扱い施設の環境整備
- B) 各施設間の連絡網整備
- C) ヒト組織を利用した研究のための倫理申請
- D) 肝炎ワクチンの接種
- E) 肝組織片の搬送手段に関する検討
- F) 肝組織片の搬送条件に関する検討
- G) 肝組織片からの脱血と保存液置換の技術指導
- H) 文書による組織授受の確認に関する検討
- I) 組織授受・ドナー情報等文書管理者の設置を行った。

ヒト組織を用いた研究は、バイオハザード関連規則に従い整備・確認された各参加施設において行われた。また、切除された肝組織片が遊離肝細胞調製に適しているか否かは手術後に判明すること、遊離肝細胞を他施設に提供出来るかどうかは勤務時間以降に判明することが多いことから、携帯電話による施設間の連絡網を整備した。同時進行で、各々の参加施設においてヒト組織研究利用のための倫理申請を行い、全施設において倫理委員会の承諾が得られた後、ヒト組織の研究利用実験を開始した。ヒト肝組織は、肝臓の手術により切除された組織の残余部分の研究利用に関して、インフォームドコンセントが得られた患者から提供された。提供組織は、医療機関および国立衛研においてそれぞれ匿名化され、提供者と実験データの連結を不可能とした。また、ヒト組織取り扱い研究者に対しては、C型、B型およびA型肝炎に罹患していないことを確認した後、B型およびA型肝炎ワクチンを接種し、接種証明書（日本検疫衛生協会東京診療所

発行）を得た。肝組織は、HIV、C型およびB型肝炎ウイルスが陰性の場合にのみ研究利用することとした。非凍結組織の搬送前に、バイク便による凍結肝組織の試験搬送を行った。また、ウサギおよびイヌ肝組織片を用いて搬送条件について予備検討を行った。氷冷ヘパリン含有生理食塩水による脱血と氷冷保存液への置換により、氷冷下3時間までの肝組織保存は、肝細胞調製に影響を与えないことを確認した。また、ヒト肝組織片は搬送前に脱血・保存液置換を行う必要があることから、脱血処理を行う施設に対してウサギ肝組織片を用いて当該技術の指導を行った。

2.2 試薬

コラゲナーゼ（細胞分散用）およびヘパリンリチウム塩は、和光純薬工業株式会社のものを用いた。トリプシンインヒビター（Type II-S）はシグマ アルドリッチ株式会社製を、牛血清およびトリパンプルーはインビトロジェン株式会社製を用いた。Lanford's 培地は、日水製薬株式会社から購入した。その他の試薬は、試薬特級品を用いた。

2.3 手術切除肝組織片の脱血・搬送

医療機関においては、切除された日本人肝組織の非病巣部分を軽く洗浄した後、切り口をメスで素早く整形した。肝組織片断面の血管にカニューレをただちに挿入して、氷冷ヘパリン含有（6U/mL）生理食塩水にて肝組織片が脱血されるまで灌流した。引き続き氷冷Leibovitz L-15（L-15）培地（保存液）にて灌流・置換したのち、氷冷保存液に浸漬し、氷冷下、バイク便にて肝細胞調製施設である国立衛研へ搬送した。

2.4 遊離ヒト肝細胞の調製

国立衛研においては、Moldeus³⁾らのコラゲナーゼ二段階灌流法に従い、肝組織片から遊離肝細胞を調製した。トリプシンインヒビター（0.05 g/L）含有コラゲナーゼ（0.5 g/L）灌流液による消化は、肝組織の切断面および肝組織全体の弾力性の消失により確認した。また、ヒト肝組織を用いることから、灌流液は再循環せず一方通行

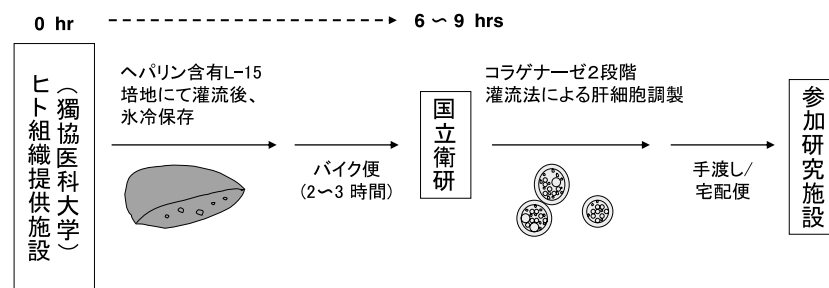


図1 手術肝組織・細胞提供ネットワーク

とした。消化された肝組織片は、氷冷した2% Calf serum 含有L-15培地中でほぐし、十分に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を除去した。さらに、4℃にて遠心分離（50×g, 3分間）を4-5回繰り返す、実質肝細胞を得た。必要に応じPercoll遠心分離・精製を行った。肝細胞液にトリパンブルー染色液を添加し、生細胞と染色された死細胞を計数して細胞数およびViabilityを算出した。

$$\text{Viability}(\%) = \frac{\text{生細胞数}}{(\text{生細胞数} + \text{死細胞数})} \times 100$$

2.5 遊離ヒト肝細胞の代謝能測定

遊離ヒト肝細胞は、24-well plateに1 wellあたり0.03-4.0×10⁵ cellsを播種し、5% CO₂-air下、37℃にて30分間予備インキュベーションを行った。遊離肝細胞の代謝能評価のため、テストステロン（Testosterone；TS, 最終濃度250 μM）および7-エトキシコマリニン（7-Ethoxycoumarin：EC, 最終濃度75 μM）の代謝活性について調べた。代謝活性は、37℃ 5% CO₂-Air下、それぞれLanford's 培地にて60-120分、あるいはHEPES Krebs-Henseleit緩衝液にて120分間反応させ、培地中で生成したTS 6β-, 2β-, 16β-, 16α-, 2α-水酸化体、アンドロステンジオン⁴⁾およびEC脱エチル化体、グルクロン酸抱合体および硫酸抱合体⁵⁾をHPLC（島津製作所, LC-10Aシリーズ）にて測定した。

3. 結果

3.1 日本人手術切除肝組織の提供

平成14年3月から平成16年3月までの約2年間に、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28例が国立衛研に提供された（表1）。その内訳は、遊離肝細胞調製用として13例、細胞画分調製用の凍結肝組織（脱血処置無し）が15例であった。凍結肝組織には、手術が深夜におよびバイク便が確保出来なかった2例が含まれていた。研究当初において、提供された肝組織が硬い場合あるいは肝組織片の切断面が多い場合は、灌流が困難であること、また、肝組織片の重量が3 g以下と小さい場合は、配布に十分な量の遊離ヒト肝細胞の調製は難しいことが判明した。そこで研究後半にお

いて、このような試料は、細胞画分調製用として-80℃にて凍結保存した後、国立衛研に搬送された。凍結肝組織は、薬物動態関連研究に供した。

獨協医科大学から国立衛研への肝組織片の搬送は、バイク便で通常約2時間、降雪時および渋滞時には約3時間を要した。肝組織片は、午後6時から午後10時半の間に受領した。また、肝組織の切除から肝細胞の調製開始までほぼ6時間から9時間が経過していた。肝組織切除から肝細胞調製までの時間が、肝細胞調製および肝細胞の代謝能におよぼす影響については不明であった。

国立衛研において調製した遊離肝細胞の一部を、参加1施設に手渡しにより配布した。遊離肝細胞はLanford's 培地で満たした容器にて、氷冷下、参加施設に運ばれた。遊離肝細胞調製12時間後にTS 6β-水酸化活性を参加施設と国立衛研において同時に測定したが、提供肝細胞数が少なかったことから、配布先では明確な結果を得ることができなかった。国立衛研においては12時間氷冷保存した後のTS 6β-水酸化活性（426 pmol/min/million cells）は、調製直後の活性（346 pmol/min/million cells）と比較してほぼ同等の値を示した。

3.2 日本人手術切除肝組織からの遊離肝細胞調製

遊離肝細胞調製に用いられた肝組織片の総提供数は13例（表2）で、提供者の年齢は51才から79才（男8例、女5例）までの平均年齢64.8才であった。肝切除の病因は、肝細胞癌3例、肝内胆管癌1例、大腸癌からの肝転移8例および肝硬変1例であった。

表2 ドナー情報

性別：	男；8例	
	女；5例	
年齢：	51～79才	
肝細胞片：	1.6～7.6 g	
病因：	肝細胞癌	3 例
	肝内胆管癌	1 例
	大腸癌の肝転移	8 例
	肝硬変	1 例

表1 手術切除肝組織片の提供件数
（平成14年3月～平成16年3月）

	総提供数	内 訳(件数)	
		非凍結肝細胞 (肝細胞調製用)	凍結肝細胞 (細胞画分用)
平成13年度	3	1	2
平成14年度	11	6	5
平成15年度	14	6	8
総数	28	13	15

提供された肝臓13片の重量は平均で4.5 g（1.6-7.6 g）であった。提供された肝組織片のうち、偽小葉が形成されて黄色の脂肪組織状を呈していた肝硬変由来試料と組織が硬い試料は、灌流することが不可能で遊離肝細胞の調製には適さなかった。肝組織片の形状により灌流が不可能な場合は、急遽スライスを作製し浸透法により遊離肝細胞を調製した。肝細胞調製を試みた9例の平均Viabilityは、61.6%（34.3-86.1%）であった。得られた生細胞数は0.02-8.44 million cellsの範囲に、また、収率

は、0.01–1.36 million 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。また、外観の状態が良く肝組織が柔らかい試料においても、大部分が脂肪細胞で占められており肝実質細胞は極めて少ない例が認められた。

なお、組織が硬く灌流が困難なため、肝細胞調製を行わず速やかに滅菌・廃棄処理を行った1例の肝組織片は、HBV陽性試料であるとの連絡を翌朝に受けた。遊離ヒト肝細胞調製は、バイオハザード対応下にて行っていることから、特に問題は生じなかったが、今後、同様のトラブルが再発しないよう提供先に申し入れた。

3.3 日本人由来遊離肝細胞における薬物代謝能評価

調製した肝細胞の代謝活性評価のため、薬物代謝酵素活性の測定に必要な生細胞数が得られた5例について、ヒト肝臓の主要なCYP3A4の指標酵素活性として用いられているTS 6 β -水酸化活性およびその他の水酸化活性、ならびにCYP1A1/2, CYP2B6およびCYP2E1依存性酵素活性の指標として、EC代謝活性を測定した(表3)。TSを基質とした場合、代謝物は6 β -水酸化体が最も多く、ついで、2 β -水酸化体とアンドロステンジオンがほぼ同程度を示した。6 β -水酸化活性は、組織Cで最も高く996 pmol/min/million cellsを、一方、組織Bでは139 pmol/min/million cellsと低く、約7倍のバラツキが見られた。また、CYP3A4代謝活性の指標とされる2 β -水酸化活性も、組織Cで最も高く、組織Bで最も低かった。ほかに16 β -水酸化体も認められたが、16 α -および2 α -水酸化体は少なかった。組織A, BについてEC代謝活性について調べた。組織間における総代謝活性値のバラツキは大きくなかった。また、抱合活性はグルクロン酸抱合が主であり、硫酸抱合活性は検出されないか低いであった。

表3 日本人の手術切除肝組織片から調製した遊離肝細胞の薬物代謝能

組織	A	B	C	D	E
Viability	58.6%	58.5%	34.3%	69.9%	61.8%
生細胞数(×million)	1.52	8.44	0.61	0.07	2.08
収率(×million/g)	0.49	1.36	0.12	0.02	0.38
代謝活性	(pmol/min/million cells)				
テストステロン					
6 β -水酸化体	346	139	996	381	568
2 β -水酸化体	114	59.4	240	143	229
16 β -水酸化体	5.48	11.9	3.19	44.6	17.1
アンドロステンジオン	211	177	173	204	128
7-エトキシマリリン					
7-水酸化体	—	1.59	—	—	2.02
グルクロン酸抱合体	—	32.6	—	—	18.4
硫酸抱合体	—	6.18	—	—	N.D.
総代謝物	—	40.3	—	—	20.4

—; Not determined, N.D.; Not detected

4. 考 察

手術切除肝組織の研究利用体制の構築に若干時間を要

したもの、脱血・灌流に関する技術指導と、ヒト肝組織の授受は円滑に行われた。本研究において提供される肝試料は、HIVおよび肝炎ウイルスに非感染組織に限定しているため、提供数は年間6.2例と多くないことから、複数の提供先の確保が重要と思われた。また、手術が深夜に及ぶこともあり、深夜における肝組織片の搬送手段の確保が必要と考えられた。なお、急な手術も多く、また提供された肝組織片が、遊離肝細胞調製に適しているか否かは手術終了後に判断されることから、受け入れ側のスケジュール調整が難しく、交替要員等何らかの工夫が必要と思われた。

提供された肝組織片は、転移癌等の治療目的で切除された組織の一部であるものの正常肝とは若干異なる様相を示していた。肝組織1 gあたりの遊離ヒト肝細胞の収率(0.01–1.36 million cells/g, n = 9)は、Oliga⁷⁾等の報告(0–16.7 million cells/g liver, n = 19)に比べ低かった。また、肝実質細胞は、肝切除術としての虚血・再灌流により発生するラジカルの影響を最も受けやすい⁶⁾とされることから、Viabilityと生細胞の収率の低さの原因として、疾患による影響と肝切除術としての虚血の影響も示唆された。一連の遊離ヒト肝細胞調製において収率の良かった2例は、切断面が一面であったことから、効率的な遊離肝細胞調製のためには切断面が一面あるいは出来る限り少ないことが望まれる。

日本人の手術肝組織片から調製した遊離肝細胞の薬物代謝能について検討した。ヒト肝臓の主要なP450分子種であるCYP3A4の標的酵素であるTS 6 β -水酸化活性は、GenTest社で調製された直後の遊離ヒト肝細胞(ドナーNo; HH-62, HH-126, HH-128, HH-137, HH-139)とほぼ同程度の活性レベルを示した(図2)。また、

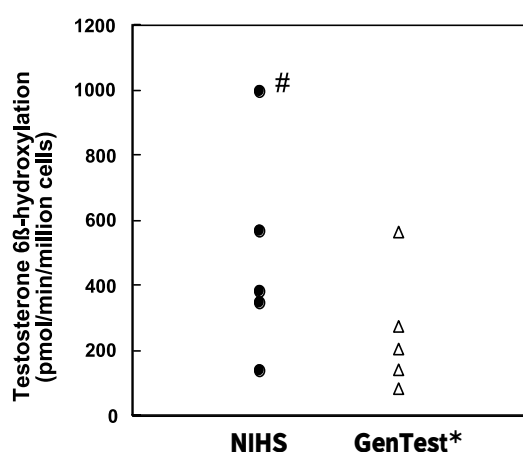


図2 国立医薬品食品衛生研究所(NIHS)およびGenTest^{*}にて調製された遊離ヒト肝細胞のテストステロン6 β -水酸化活性

*; ドナー No. HH-128, HH-126, HH-62, HH-139, HH-137

#; フェニトイン(100 mg $\times$ 2/day), ウルソデスオキシコール酸(100 mg $\times$ 3/day)を手術5日前に服用

TS 6 β -水酸化活性は、Olingaら⁷⁾の報告と比較してもほぼ同等、もしくは、高いレベルの活性が確認された。同様にCYP3A4依存性であることが知られているTS 2 β -水酸化活性も6 β -水酸化活性に次いで高い活性を発現していた。さらに16 β -水酸化活性(CYP2B6)も発現しており、ヒト肝における典型的なTS代謝パターン⁸⁾を示していた。また、EC代謝においては、主な抱合活性はグルクロン酸抱合活性でヒト肝の特徴を示し、その活性値はOlinga等の値⁷⁾とほぼ同様であった。TS 6 β -水酸化活性には大きな個体差が認められた。高い活性を示したCは、手術5日前ではあるが、CYP3A4を誘導することが知られているフェニトイン(100 mg $\times$ 2/day)とウルソデスオキシコール酸(100 mg $\times$ 3/day)を服用しており^{9,10)}、これらの薬物による影響の可能性も考えられた。なお、本研究では、遺伝子解析に関するインフォームドコンセントを得ていないため、これら活性レベルの差が、薬物以外にSNPs等個体差に起因するか否かについては確認出来なかった。

このように手術切除肝組織から調製された遊離ヒト肝細胞の代謝活性は、バラツキが見られたものの代謝酵素活性は十分に高い値を示し、代謝研究に十分に利用できる代謝能を有していることが判明した。また、得られたデータは、薬歴情報と遺伝子解析データを踏まえて評価することが重要であることが示唆された。今後は、測定系のスモールサイズ化を図ると共に、提供施設の複数化、並びに遺伝子解析のためのインフォームドコンセントを取得するための環境整備、最終的には移植不適合臓器の研究利用を可能にするための取り組みが必要と思われる。

5. 結 論

- 1) 医学・創薬研究のための日本人由来手術切除ヒト肝組織の提供体制を構築した。
- 2) 遠隔地より搬送した手術切除ヒト肝組織片から、CYP3A等薬物代謝能の高い遊離肝細胞を調製できることを確認した。
- 3) ヒト遊離肝細胞を用いた代謝データは、薬歴情報と遺伝子解析データを踏まえて評価することが重要で

ある。

- 4) 手術切除肝組織からは、代謝や安全性研究のために十分な量の遊離ヒト肝細胞を調製することが困難であり、移植不適合臓器(肝臓)の研究利用が必要と考えられた。

なお、本研究はヒューマンサイエンス振興財団の援助を受けて実施された。

文 献

- 1) Chuang, L. and Albert, P. L.: *Chem. Biol. Interact.*, **134**, 271-281 (2001)
- 2) Vaclavikova, R., Soucek, P., Svobodova, L., Anzenbacher, P., Simek, P., Guengerich, F.P. and Gut, I.: *Drug Metab. Dispos.*, **32**, 666-674 (2004)
- 3) Moldéus, P., Högborg, J. and Orrenius, S.: *Methods in Enzymology*, **50**, 60-71(1987)
- 4) Sonderfan, A., Arlotto, M.P., Dutton, D.R., Mcmillen, S.K. and Parkinson, A.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **255**, 27-41 (1987)
- 5) Hiller, D. L. and Cole, R. O.: *Anal. Biochem.*, **227**, 251-254 (1995)
- 6) Ikeda, T., Yanaga, K., Kishikawa, K., Kakizoe, S., Shimada, M. and Sugimachi, K.: *Hepatology*, **16**, 454-461 (1992)
- 7) Olinga, P., Merema, M., Hof, I.H., De Jong, K.P., Slooff, M.J.H., Meijer, D.K.F. and Groothuis, G.M.M.: *Drug Metab. Dispos.*, **26**, 5-11 (1998)
- 8) Steinberg, P., Fischer, T., Kiulies, S., Biefang, K., Platt, K., Oesch, F., Bottger, T., Bulitta, C., Kempf, P. and Hengstler, J.: *Drug Metab. Dispos.*, **27**, 1415-1422 (1999)
- 9) Bodin, K., Bretillon, L., Aden, Y., Bertilsson, L., Broome, U., Einarsson, C. and Diczfalussy, U.: *J. Biol. Chem.*, **276**, 38685-38689 (2001)
- 10) Bodin, K., Lindbom, U., and Diczfalussy, U.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1687**, 84-93 (2005)