

【書類名】 全文訂正明細書

【発明の名称】 ヒト疾患に対するモデル動物

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヒト腫瘍疾患の転移に対する非ヒトモデル動物であって、前記動物が前記動物の相当する器官中へ移植された脳以外のヒト器官から得られた腫瘍組織塊を有し、前記移植された腫瘍組織を増殖及び転移させるに足る免疫欠損を有するモデル動物。

【請求項 2】 動物が無胸腺マウスである、請求項 1 に記載のモデル動物。

【請求項 3】 ヒト腫瘍組織がヒトの肝臓、腎臓、胃、脾臓、結腸、胸部、前立腺、肺又は睾丸から得られる、請求項 2 に記載のモデル動物。

【請求項 4】 腫瘍組織がヒト腎臓から得られる、請求項 3 に記載のモデル動物。

【請求項 5】 ヒト腫瘍腎組織がマウスの腎臓の腎皮質中へ移植される、請求項 4 に記載のモデル動物。

【請求項 6】 腫瘍細胞がヒト胃から得られる、請求項 3 に記載のモデル動物。

【請求項 7】 ヒト腫瘍胃組織がマウスの胃中に、胃の内部粘膜ライニングと胃の外部腹膜コートとの間に移植される、請求項 6 に記載のモデル動物。

【請求項 8】 腫瘍組織がヒト結腸から得られる、請求項 3 に記載のモデル動物。

【請求項 9】 腫瘍結腸組織がマウスの大腸の盲腸中に移植される、請求項 8 に記載のモデル動物。

【請求項 10】 腫瘍組織が女性ヒト胸部から得られる、請求項 3 に記載の雌モデル動物。

【請求項 11】 ヒト腫瘍疾患の転移に対する非ヒトモデル動物を作製する方法であって；移植されたヒト腫瘍組織を前記動物中で増殖及び転移させるに足る免疫欠損を有する実験動物を準備し；

脳以外のヒト器官からの腫瘍組織塊の試料を免疫欠損動物の相当する器官中へ移植する、

ことを含む方法。

【請求項 1 2】 実験動物が無胸腺マウスである、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】 ヒト腫瘍組織がヒトの肝臓、腎臓、胃、膵臓、結腸、胸部、前立腺、肺又は睾丸から得られる、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】 腫瘍組織がヒト腎臓から得られる、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】 ヒト腫瘍腎組織がマウスの腎臓の腎皮質中に移植される、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】 腫瘍細胞がヒト胃から得られる、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 7】 ヒト腫瘍胃組織がマウスの胃中に、胃の内部粘膜ライニングと胃の外部腹膜コートとの間に移植される、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】 腫瘍組織がヒト結腸から得られる、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 9】 腫瘍結腸組織が無胸腺マウスの大腸の盲腸中に移植される、請求項 1 8 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

発明の背景

本発明はヒト腫瘍疾患に対する非ヒトモデル動物に関する。より詳しくは、本発明はヒトの器官から得られ、動物の相当する器官中へ移植された腫瘍組織をもつ非ヒトモデル動物に関する。

ヒト腫瘍疾患に代る代表的モデル動物に対する要求が長い間存在した。そのようなモデル動物は多くの目的に役立つことができよう。例えばそれは、ヒトにおける腫瘍疾患の進行を研究して適当な治療形態の発見を援助するために使用できよう。そのようなモデル動物はまた提案された新抗腫瘍物質の効力の試験に使用できよう。さらに、それは癌患者の腫瘍の個別化した化学的敏感性試験に使用できよう。そのようなモデル動物の存在は薬物スクリーニング、試験及び評価を一層効率的にかつ非常に低コストにするであろう。

ヒトの腫瘍疾患に対するモデル動物の作製における若干の以前の試みは移植可能な動物腫瘍を用いた。これらは齧歯動物中に作製し、通常近交集団において、

動物から動物へ移植された腫瘍であった。他の腫瘍モデル動物は少なくとも動物系中で、発癌性であった種々の物質により動物中に腫瘍を誘発させることにより作製された。なお他の腫瘍モデル動物は自然発生腫瘍をもつ齧歯動物であった。しかし、これらの齧歯動物のモデル動物はしばしば、同じ物質を受けるヒト披験者とは非常に異なって化学療法剤に応答した。

約20年前に始められて開発された他の腫瘍モデル動物は胸腺のないマウスを用いた。これらの動物は細胞に欠陥があり、その結果外来移植組織を拒絶する能力を失なった。該マウスは明確に理解されていない理由のために、実質的に毛がなく、「ヌード」又は「無胸腺」マウスと称されるようになった。

これらのヌードマウスの皮膚の下に皮下的に移植されたときにヒト腫瘍がしばしば増殖することが見いだされた。しかし、そのようなヒト腫瘍組織が実際にマウス中に腫瘍を形成した生着率又は頻度は個々の供与体及び腫瘍の型により変動した。これらのモデル動物において、生着した腫瘍はしばしば、大部分移植の部位で増殖し、もとの腫瘍が供与体中で非常に転移性であってもまれにしか転移しなかった。従って、皮下ヌードマウスのヒト腫瘍モデル動物は、前記齧歯動物のモデル動物よりも良好であるけれども、なお実質的な欠点を有し、すなわち、皮下移植組織は転移する能力を欠いた。

前記不足のないヒト腫瘍疾患のモデル動物に対する要求を満たすために、本発明はヒト中に生ずるような腫瘍疾患の進行に全くよく似た能力を有する新規モデル動物を開示する。

#### 発明の概要及び目的

本発明の主目的はヒト腫瘍疾患に対する改良された非ヒトモデル動物を提供することである。

本発明の主観点によれば、ヒト器官から得られて動物の相当する器官中へ移植された腫瘍組織塊を有し、移植された組織を増殖及び転移させるに足る免疫欠損を有するヒト腫瘍疾患に対する新規非ヒトモデル動物が提供される。

本発明の他の観点はヒト腫瘍疾患に対する非ヒトモデル動物を作製させる方法を提供し、該方法は移植されたヒト腫瘍組織を前記動物中で増殖及び転移させるに足る免疫欠陥を有する実験動物を準備し、ヒト器官からの腫瘍組織塊の試料を

免疫欠損動物の相当する器官中へ移植することを含む。

#### 発明の詳細な説明

本発明のモデル動物は、移植された組織を増殖及び転移させるに足る免疫欠損を有する実験動物中へヒト腫瘍組織塊を移植することにより作製される。この使用に殊に適する実験動物はT細胞免疫を有しない系統のマウスである。これらのマウスは、一般にヌードマウス又は無胸腺マウスとして示され、容易に利用でき、チャールス・リバー・ラボラトリーズ (Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, Massachusetts) [カタログ確認; Crl; nu/nu <CD-1> BR、同型接合28~42日令] から商業的に入手できる。

本発明による免疫欠損実験動物中の腫瘍組織の配置は正位移植により行なわれる。これは、その組織塊が以前に占有していた位置に移植される移植組織塊に関する。本発明において正位移植という語はヒトの器官の新生物腫瘍組織を免疫欠損実験動物の相当する器官中へ移植することを示すために使用される。ここに使用されるヒト腫瘍組織には、例えばヒトの腎臓、肝臓、胃、膵臓、結腸、胸部、前立腺、肺、睪丸及び脳中に生ずる病理学的に診断される腫瘍である外科的に得られた新鮮な試料の組織が含まれる。そのような腫瘍には癌腫並びに肉腫が含まれ、ここに行なわれるそれらの移植はすべての段階、等級及び型の腫瘍を包含する。また、使用されるヒト腫瘍組織は、細胞ごとに分離せず、塊のまま移植する。腫瘍組織を塊のまま移植することにより腫瘍組織が本来もつ三次元的構造が維持されるので、より信頼性の高いヒト腫瘍モデル動物が得られる。

移植の前に、ヒト腫瘍組織は適当な栄養培地、例えば10%ウシ胎児血清及び適当な抗生物質例えばゲンタマイシンを含むイーグル (Eagle) の最少必須培地中に置くことにより維持される。組織を含む培地は次いで約4℃に冷却される。組織はこの方法で約24時間維持できる。

選択した組織試料は選択した器官中の適当に準備した腔中への挿入に適する大きさの塊に形成することにより移植のために準備される。試料の大きさは約0.1×0.5cmから約0.2×0.6cmまで変動することができる。適当な大きさの試料の形成に使用される技術は鉗子などで所望の大きさの片に引き裂くことにより組織を適当な大きさに引き裂くことが含まれる。

本発明による組織移植の実施に典型的に用いる顕微外科器具にはカストロビジョヨ (c u s t r o v i j e o) 針ホルダー、ジュアラ (j e w e l e r) の鉗子 (直及び曲)、虹彩鉗子、虹彩鉗並びに直及び曲組織鉗子が、各有歯及び各無歯のものを含めて、包含される。

腫瘍組織の移植の前に、選ばれた免疫欠損動物は適当な麻酔薬で麻酔される。肺組織を除いて前記すべての器官組織の移植が、エチルエーテルを用いる普通の麻酔法により便宜に行なわれる。肺組織が移植される場合にはペントバルビタールが麻酔薬として使用される。

ヘパトームからの組織又はヒト肝臓からの腫瘍の移植は移植部位として受容体動物の肝臓の尾状葉を用いて行なわれる。若干のゆるい縫合が薬上に置かれ、大きさは約  $0.2 \times 0.5$  cm の腫瘍塊を収容するために縦方向に切開される。切り口中に腫瘍を配置した後、それを適所に確保するために縫合糸を腫瘍上にきちんと引張る。

ヒト膵臓腫瘍からの組織を移植する方法は受容体動物の膵臓中に、十二指腸に近い器官の頭部で切開することにより行なわれる。無血管領域を選ぶことに注意する。切開は選んだ領域中に行なわれ、約  $0.5 \times 0.2$  cm の腫瘍塊が前記と同じ方法で移植される。すべての段階及びすべての等級の膵臓癌の組織をこの方法で移植することができよう。

ヒト乳癌からの組織の移植は受容体雌動物の胸上にポケットを外科的に形成することにより行なわれる。ポケットは好ましくは大きさは約  $0.2 \times 0.5$  cm の腫瘍塊を収容するに足る大きさである。ポケット中に腫瘍を配置した後、ポケットを縫合で閉じる。すべての段階及び等級の乳癌をこの方法で移植することができよう。

受容体動物の前立腺中へのヒト前立腺癌の組織の移植は、前立腺中に切り口を外科的に形成し、次いで内腔中に大きさは約  $0.2 \times 0.3$  cm の組織試料を配置することにより行なわれる。組織試料の配置後、切り口を適当な縫合で閉じる。移植組織が初めの位置から移動できないように2つの追加縫合が前立腺の頸部に置かれる。

受容体動物の睾丸中へのヒト睾丸癌の組織の移植は18番ゲージ針を睾丸に縦

軸に沿って挿入し、大きさ約0.1×0.5cmの腫瘍塊を針を通して導入することにより行なわれる。組織試料の端が穿刺のときに見えると、針をゆっくり引抜きその間可視腫瘍組織を鉗子で適所に保持する。針により作られた孔は次いで1つの縫合により閉ざされる。

受容体動物の肺中へ腫瘍肺組織を移植する準備中に、気管切開が行なわれ、シリステック管が挿管される。その後次の移植操作のいずれかを用いることができる；

(1) 気管切開管を肺葉(類)に達するまで進め；小細長(2×6mm)の腫瘍塊を管を通して導入し、次いで管を取出し、気管の創傷を縫合で閉じる；又は

(2) 予防管を気管中へ挿入し；右胸上に小穿刺創傷を作り、右肺の葉を引き上げて胸部腔をふさぎ、それにより肺の虚脱を防ぎ；肺葉を基部で弱くクランプして2つの結紮糸を肺の上にゆるく置き；肺上に切り口を作り、約0.2×0.5cmの腫瘍をその中へ埋め、結紮糸をきちんと結び；肺葉を胸部腔中へ戻し、創傷を閉じる。

すべての段階及び等級の小細胞及び非小細胞肺癌の組織を前記操作のいずれかにより移植することができよう。

腫瘍ヒト脳組織を受容体動物脳中へ移植するために、パー孔を動物の頭頂頭蓋骨を通して作る。約0.2×0.4cmの腫瘍塊を選んで脳中へ移植する。次いで頭蓋骨中の孔を骨ロウにより封じる。

本発明のモデル動物はヒト腫瘍疾患の進行の研究において殊に有用である。これらの研究は、他の臨床試験モダリティ例えば診断映像化と組合せて、治療の最も適切な形態の選択に役立つ。

例えば、本発明のモデル動物を腫瘍映像化にかけると、臨床医は腫瘍増殖の一次及び二次両部位を確認し、動物上の腫瘍の全体的な広がりを推定することができる。腫瘍映像化は動物に標識抗腫瘍抗体例えば放射性同位体で標識された抗体を注入し；抗体に腫瘍内で局在する時間を許し；次いで放射線デテクターを用いて動物を走査することにより普通に行なわれる。コンピューターを動物の体中に検出された放射能の映像のコンパイルに使用するときコンピューターは放射線の強度に従って映像をカラーコードすることができる。抗体又はその代謝物質の蓄

積が予想されない体の領域中の高い放射能の帯域は腫瘍の存在の可能性を示す。

本発明のモデル動物はまた新抗腫瘍剤をスクリーニングして一次部位及び遠い転移部位における腫瘍に作用するか又は遠い転移の発生を防ぐそのような物質の能力を決定するために使用できる。該モデル動物はまた癌患者の腫瘍の個別化した化学的敏感性試験に有用であろう。

さらに本発明のモデル動物はヒト腫瘍疾患の進行に対するミトルシオン (mitrution) の効果の研究に有用である。これらの研究は健康な被験者に対する種々の欠失の実証衝撃を考えると殊に重要であることができる。

#### 実施例 I

ヒト腎臓から切除した腫瘍の組織の外科的に得られた新鮮な試料を5匹の動物受容体の腎臓中へ移植した。腎細胞癌として病理学的に診断された組織試料は前記引き裂き操作により適当な大きさに調製した。

4～6週令の5匹の無胸腺ヌードマウスを移植のための動物受容体として選んだ。外科のための準備中にマウスをエーテルで麻酔した。

各動物中に切開を行ない腎臓に到達した。各受容体腎臓の腎皮質の切除によりくさび状腔を形成し、約0.5×0.2cmの腫瘍組織の塊を欠損腔中に置いた。次いでマットレス縫合を用いて移植組織を適所に確保した。

この実施例の5匹のマウスはその後なお6か月生存している。組織移植の約1か月後にマウスを外科的に切開し、移植腫瘍を観察した。各事例において腫瘍が生着したと認められた。これは移植腫瘍組織が隣接組織に侵潤したことを意味する。このとき、組織学的分析を組織移植片で行なった。そのような分析には各動物から組織試料を取出し、試料を組織供与体の組織試料と比較することが含まれた。

組織学的分析に対する組織試料の調製は、(1)試料をホルマリン中で固定し；(2)固定した試料をパラフィン中に埋め；(3)固定し埋めた試料の5ミクロンの切片を調製し；(4)切片をヘマトキシリン及びエオシンで染色し；(5)各切断面中の組織構造を顕微鏡的に観察することにより行なった。

組織学的分析は、受容体動物中の組織が(1)その構造及び組織型を保持し、(2)ヒト供与体中の疾患の進行によく似ていることを示した。

## 実施例 II

胃から切除し、胃癌として病理学的に診断されたヒト組織の試料を前記切り裂き操作により適当な大きさに調製した。

4～6週令の5匹の無胸腺ヌードマウスを移植のための動物受容体として選んだ。外科のための準備中にマウスをエーテルで麻酔した。

それぞれの麻酔したマウスを切開して胃に到達した。No. 11小刀を用い、粘膜層に侵入しないように注意して胃壁中に切り口を作った。約0.5×0.2cmの腫瘍塊を受入れるに足る大きさのポケットを形成した。近似的にこの大きさの腫瘍を選び、ポケット中へ挿入し、切り口を7-0縫合糸を用いて閉じた。

この実施例の5匹のマウスは約3～4か月間生存し、他の点では異常がないと思われる。これらのマウスの胃の以後の外科切開は腫瘍が生着したことを証明した。

## 実施例 III

ヒト結腸から取出され、結腸癌として病理学的に診断されたヒト組織の試料を前記切り裂き操作により適当な大きさに調製した。4～6週令の5匹の無胸腺マウスを移植のための動物受容体として選んだ。外科のための準備中にマウスをエーテルで麻酔した。

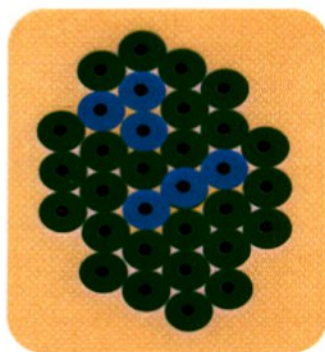
それぞれの麻酔したマウスを切開して結腸に到着した。腔のポケットを内腔に入らないように注意して漿膜筋層中に外科的に形成した。約0.5×0.2cmの選んだ腫瘍塊をポケット中へ挿入し、次いでそれを縫合で閉じた。

この移植外科を行なった5匹のマウス中の4匹は3～4か月生存し、良好な健康であると思われる。組織移植の約1か月後にマウスを外科的に切開し、腫瘍が生着したことが観察された。腫瘍はいずれも、このとき他の器官に転移しなかったと思われなかった。

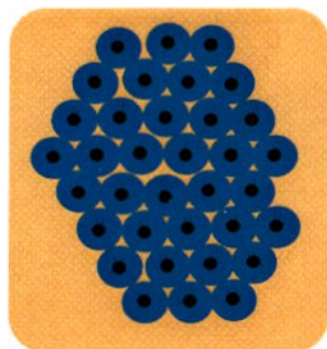
本発明は平明な理解のために例示及び実施例によって若干詳細に記載されたけれども、一定の変更及び改変を請求の範囲内で行なうことができることは明らかであろう。



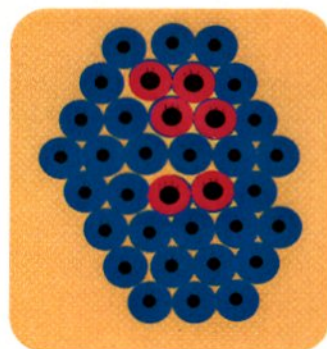
# 図1. 大腸癌の発生・進展とTK腫瘍株の成立過程



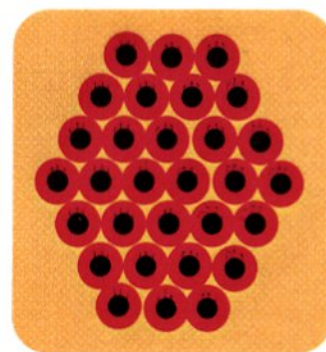
1. 正常上皮組織内に  
良性腫瘍細胞が発生



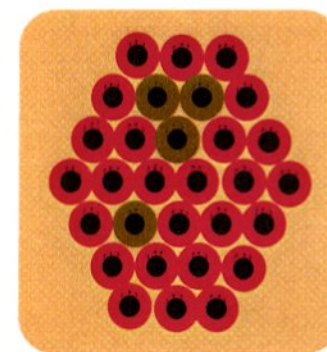
2. 良性腫瘍を形成



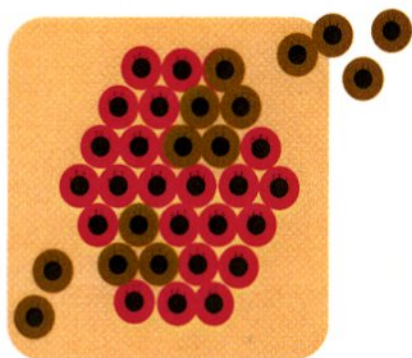
3. 良性腫瘍内に悪性  
腫瘍(癌)細胞が発生



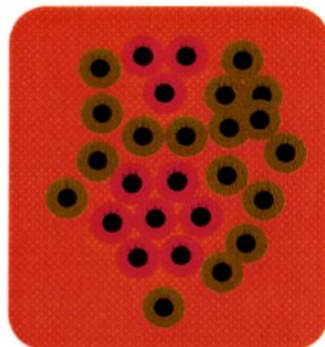
4. 癌組織を形成



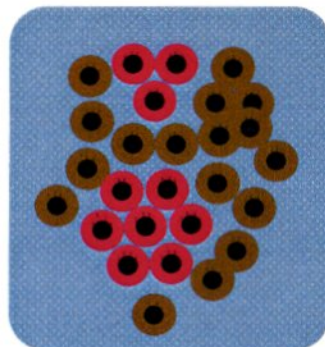
5. 一部の癌細胞が浸潤・  
転移能が高度な細胞に変化



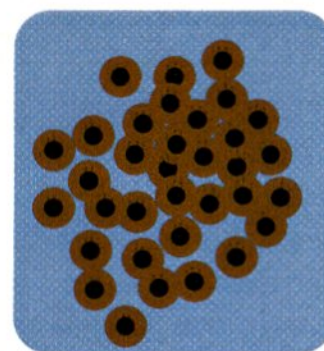
6. 悪性度を増した癌細胞  
が増殖し、周囲組織に浸潤、  
遠隔臓器に転移



7. 肝臓に転移巣を形成



8. ノードマウス皮下  
に移植後間質組織がマ  
ウスのものに置き変わ  
る



9. 継代を繰り返す事  
によって悪性度の高  
度な癌細胞が生き残  
り増殖

-  正常上皮細胞
-  良性腫瘍細胞
-  癌細胞
-  高度な浸潤・転移能を有する悪性度が増強した癌細胞
-  ヒト間質組織
-  ヒト肝組織
-  マウス間質組織