

平成 1 0 年 度

厚生科学研究費補助金 (医薬安全総合研究事業)

医薬品等の安全性確保の基礎となる研究

研 究 報 告 書

主任研究者 安 原 一

総括研究報告書

医薬品等の安全性確保の基礎となる研究

主任研究者：安原 一 昭和大学医学部第二薬理学教室、主任教授

研究の要旨

本研究は、現在確立に至っていない医薬品の安全性・毒性評価へのヒト臓器・組織使用に関する全般的な標準的操作方法の提示および、ヒト肝臓を始めとする薬物代謝に関与する臓器組織での検討の必要性、有用性並びに必然性に関して、ヒト臓器および汎用されている実験動物の肝臓および小腸を対象に検討を行う。特にヒトの臓器・組織の使用に関しては、欧米では既に確立している脳死患者からの提供臓器で、移植不適合のものへの研究への使用が、現段階では本邦では法的に認められていない。そのため、我が国においては、唯一可能な手段である手術による病巣摘出時の、摘出臓器の一部の使用を行う事以外に方法はない。しかし、その使用の際の倫理性および科学性を熟慮した研究遂行方法に関しては、同意取得および得られた情報の治療への還元方法等を含め何ら規定は無く、各研究者の独自の考えに基づいて行われているのが現状であり、それらの使用に対する一般人からの不信感や疑念をもたれかねない状況にある。また、手術による摘出臓器の薬効、医薬品の安全性・毒性評価への利用に関して、それぞれの臓器の信頼性及び有用性については、十分な比較検討がなされておらず、得られる結果の質に普遍的な信頼性がもてるか否かについては不明である。

上述のような理由から、本研究では、医薬品の安全性、有効性評価に対するヒト臓器・組織の使用に関する科学性と倫理性について、治療を目的とした手術により摘出された臓器・組織を研究用試料として用いるにあたり、いかなる規定を定めるか、また、臓器・組織の提供者である患者に対してどのようなインフォームド・コンセントが必要であるかに関して討議を重ね、インフォームド・コンセントを得るための説明文書等の作成を行った。作成した説明文書、同意書および本研究事業に関する研究計画書を昭和大学医の倫理委員会に提出し、その審査および承認を得た。承認が得られた後、本研究事業として、実際に2例の受術患者に対して、担当医師より、今回承認された説明文書および同意書を用いてインフォームド・コンセントの取得を試みた。手術に関する同意を得た後に、本研究に関する文書および口頭での説明を行った後、自由意思で手術材料の提供に同意した2例の患者に対し肝切除術を施行し、切除された肝臓の一部を本研究事業の試料とした。提供された臓器・組織（転移性肝癌1例、肝細胞癌1例）を試料として、その摘出に要した時間、虚血状態、疾病・病巣の状況、使用薬物およびその使用期間等を総合的に加味して、手術材料が医薬品の安全性評価の検討に対応しうるのか否かに関して代表的な CYP 分子種の基質 6 種を用いて検討した。手術材料を、癌病巣、その周囲（病巣より 1 cm）および見掛け上正常と判断される部位（癌病巣より 1 cm 以遠）に分割し、それぞれの部位での各 CYP 分子種活性、Western blot 法による酵素タンパクの発現状況ならびに顕顕像に関する検討を行った。転移性肝癌の病巣周囲、見掛け上正常と思われる部位の各種 CYP 分子種活性は各分子種間で若干の差はあるものの、総じてその活性は約 2 割から 5 割の低下が認められた。また、肝細胞癌患者より提供された肝臓では、癌病巣周囲および見掛け上正常と考えられる部位での活性含量にはほとんど差は認められなかった。さらに、病巣の CYP 活性について肝細胞癌 1 例を対象に検討したところ、CYP1A2 で他の部位と比較して約 6 割の残存活性が認められ、酵素タンパクの発現は CYP2E1 で認められた。

また、手術切除肝からヘパトサイトを単離し、そのバイアビリティ、培養時の接着性、薬物代謝能に関して予備的に検討を行った結果、115分または60分間温阻血状態にあった手術切除肝でも良好な接着性と高い薬物代謝能を示した。この事実から、手術切除組織も十分に医薬品の開発研究に用い得ることが示唆された。

分担研究者氏名

佐藤哲男 HAB 協議会霊長類機能研究所
鈴木 聡 HAB 協議会霊長類機能研究所
大野泰雄 国立医薬品食品安全研究所
草野満夫 昭和大学医学部第二外科学
伊藤洋二 昭和大学医学部第二外科学
内田英二 昭和大学医学部第二薬理学
倉田知光 昭和大学医学部第二薬理学

A. 研究目的

薬物のヒトでの有効性及び安全性を評価する上で動物実験は欠かせない。しかし、ヒトと動物との間には大きな種差が存在し、ヒトへの外挿を行う上での障害となっている。動物で十分検討したはずの医薬品の開発がヒトの試験で思わぬ結果をもたらし、中断してしまう事が多くある。一方、最近の研究によれば、この差の多くは薬物の生体内動態、特に肝臓での薬物代謝活性の相違に起因する事が明らかにされている。従って、ヒト肝臓あるいはそれに由来する試料を利用した試験を行うことが可能であれば、動物実験や *in vitro* 試験の結果をヒトに結び付けることに威力を発揮し、医薬品の開発やその適切な評価が促進される。また、第1相臨床試験で初めにヒトに薬物を投与する際に志願者の安全性を確保する上で、予めヒト由来肝組織で試験し、動物と比較しておくことが重要である。しかし、欧米諸国においては、ヒト組織の利用に関しては、移植目的で提供され、適合者が見いだせなかった場合の臓器は研究目的で使用する事が可能であるが、我が国ではその使用は法的に認められていない。そのため、ヒト臓器・組織を用いた研究は、手術材料に頼るほか方法はない。しかし、手術

材料より得られる試料は、治療目的で行われる手術に付随して得られるものであり、本来の治療目的を達成した後に二次的に得られる。脳死臓器の場合には、脳死後数分で冷却された灌流液で灌流され、冷蔵保存される。これに対して、手術切除組織は手術中、長時間温阻血状態におかれる。そのため、脳死者から得られる臓器・組織とは異なり、その状態は施行される手術の方法、摘出に要する時間、麻酔薬の種類、手術に伴う阻血状態の時間、摘出後の時間経過および癌、肝硬変などの病態の影響が大きい。これらの要因は提供者個々で異なっており、実際に研究への使用に十分な信頼性を保証するものであるのかに関しては不明な点が多く残されている。このような状況を勘案し、本研究は、ヒト組織を用いた試験の医薬品評価における意義について手術により得られた試料の信頼性と有用性について実験的に検討するとともに、我が国におけるヒト肝臓を用いた試験を行うに当たっての基本的な問題、即ちヒト肝臓の供給、保存、利用および倫理の問題を文献的に検討し、整理する事により将来ガイドライン等を作成する際の基礎的資料とする事を目的とした。

本年度は、手術材料の提供を受けるに際し、ヒト臓器・組織を薬物代謝研究に使用する場合、どのようなインフォームド・コンセントが必要であるかに関して検討し、説明文書の作成および本研究を遂行するための倫理委員会の審査・承認を得るための計画書の提出を行った。また、手術を受ける患者に対して作成した説明文書および口頭での説明を行った後、自由意思に基づき書面での同意を得た。得られた組織を使用してサブセルラーフラクションおよび単離

細胞での薬物代謝活性を各種 cytochrome P450 (CYP) 分子種に対する代表的基質を用いて評価し、手術材料の有用性、信頼性について少数例で検討した。さらに、凍結保存ヒト肝細胞における細胞内カルシウム濃度およびホルモン応答などの生理学的特性について検討するとともにヒト肝 cDNA ライブラリーより新規に単離したアリル硫酸転移酵素(ST)の cDNA(ST1B2 cDNA)がヒトの生体内における T3 の代謝に特異的に関与するアリル ST 分子種であるかについて検討した。また、これら分子種に対する抗体を用い、各々の分子種のヒト肝含量を定量し、可溶性画分における硫酸抱合活性との相関性を比較した。さらに、我が国におけるヒト臓器・組織の供給体制と実施に向けた検討項目について討議、調査を行い、その一環として日本全国の主たる医学部および医療機関の外科医にヒト臓器・組織の利用に関する現状調査を目的としたアンケート調査を実施した。

B. 研究方法

7名の分担研究者に依頼して以下の項目について検討した。

B-1 ヒト肝組織・細胞の利用法に関する研究 (大野 泰雄)

B-1-1. 凍結ヒト肝細胞に関する研究

ヒト単離肝細胞は株式会社ケーエーシーより購入した。細胞の観察および各種パラメーターの測定は、共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。細胞内カルシウムイオン濃度はカルシウム蛍光プローブ indo-1 を細胞内に取り込ませて測定した。蛍光強度の測定は、励起波長 315nm、蛍光波長 400~440nm および 440nm 以上の 2 波長域で行い、その蛍光強度比での映像を得た。ミトコンドリアの形態は Rhodamine123 にて染色し、染色像として捉えた。

B-1-2. ヒト肝硫酸転移酵素に関する検討

ヒト肝試料は、SRI International Toxicology Laboratory, Dr. Charles A. Tyson より供与されたものを用いた。

1)発現ベクターの構築

大腸菌および哺乳動物発現ベクターに挿入するためのインサート cDNA(6xH ST cDNA)は、ST1A1、ST1B1 もしくは ST1C1 cDNA を鋳型とし、それぞれに対応する 5' (ST-Lys) プライマーおよび 3' (ST-3') プライマーを用いた PCR 法により得た。

B-1-3. リコンビナント酵素(6xH ST)の大腸菌による発現および精製

構築した発現プラスミドは、大腸菌株 (M15 [RPE4] 細胞に塩化ルビジウム法にて導入した。得られた形質転換株を一晩培養した後超音波破碎し、超遠心分離法により粗酵素画分(可溶性画分)を得た。得られた酵素源をアーガロースカラムにて精製した。

B-1-4. リコンビナント酵素(Δ6xH)ST)の調製

6xH ST の融合部位は KE により特異的に切断した。

B-1-5. リコンビナント酵素(ST/COS-1)の哺乳動物細胞による発現

構築した発現プラスミド(pCMV4-6xH ST)は、塩化セシウム平衡密度勾配法超遠心法にて精製し、COS-1 細胞にエレクトロポレーション法で導入した。トランスフェクションした細胞はさらに 2 日間培養後、超音波破碎し、超遠心分離法により粗酵素画分(可溶性画分)を得た。

B-1-6. ラット肝可溶性画分の調製

SD系雄性ラット(7日、17日、26日、34日、9週および2年齢)を用いて常法に従い可溶性画分を調製した。得られた可溶性画分酵素源は-80度にて使用するまで保存した。

B-1-7. 抗 6xH ST 抗体の作成

6xH ST1A1、6xH ST1B1、6xH ST1C1(100 μg) をフロインドの完全アジュバントと 1:1 の容量にて混合し、New Zealand 白色ウサギに皮内免疫し、抗 6xH ST 抗体を作成した。

B-1-8. 硫酸抱合酵素活性の測定

α -ナフトール、 β -ナフトール、p-NP、ドパミン、T3、E2 および DHEA に対する硫酸抱合活性は [35S] PAPS 存在下、反応により生成した基質の標識硫酸抱合体を薄層クロマトグラフィーにより分離し、その放射活性を測定することにより定量した。

B-2 ヒト組織利用に関する倫理的配慮
治療を目的とした手術による臓器の部分切除を受ける患者からの臓器・組織の一部を研究目的で提供を受ける場合の同意取得にかかる説明文書および同意書の作成について、倫理的配慮に重点を置き作成した。作成した説明文書および同意書は、研究の趣旨、内容、方法並びにプライバシーの保護に関して明記し、あくまでも自由意思によるものであることを明記した。また、作成した同意取得に関する説明文書および同意書、並びに本研究事業の研究計画書を昭和大学医学部医の倫理委員会に提出し、審査・承認を得た。(内田英二)

B-3 手術材料採取法

本研究において、肝切除により得られた手術材料（ヒト肝）を試験研究の試料とするために、文書および口頭での説明の後、文書による同意を得た肝臓の2症例に対し、肝切除を施行した。

(伊藤洋二)

B-4 サブセルラーフラクションでの薬物代謝酵素活性評価

手術材料の病巣部、病巣辺縁および末梢側での各種 CYP 分子種活性、含量についてミクロソーム画分を用いて検討した。CYP 各分子種の活性測定は、CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 および 3A4 についてカフェイン、ワルファリン、メフェニトイン、デブリソキン、クロルゾキサゾンおよびテストステロンを基質として使用し評価した。また、含量については、CYP1A1, 1A2, 2D6, 2E1 および 3A4 に関してそれぞれのヒト抗体を用いて Western blot 法にて検討した。(倉田知光)

B-5 単離ヘパトサイトを用いての薬物代謝酵素活性評価

手術切除肝臓の非癌部位を用い、常法にしたがってコラゲナーゼ灌流法によりヘパトサイトを単離した。単離ヘパトサイトは、トリパンブルー染色で、生細胞数を計測し、10% FBS 含有培養液中で、コラーゲンコート培養プレートに播種し、オーバーナイトで培養した。その後、培地を無血清培地に換え、検鏡し接着率を観察した。この単離ヘパトサイトを用い、播種 40 時間後に P450 の標識特異基質を添加し、P450 アイソザイムの活性を測定した。(鈴木聡)

B-6 我が国でのヒト組織使用にかかる研究システムの構築

我が国でのヒト組織使用にかかる研究システムの構築を行うに際しては、我々がこれまでに行ってきた海外でのヒト組織利用の現状視察、ならびにそれら機関ですでに定められている使用に関する規定等を参考(2,3)にして行い、わが国におけるヒト組織使用に関する規定整備の概要の提示を行う。また、今後の我が国でのヒト組織使用に対する倫理的側面の規定等の作成に関しては、英国におけるヒト組織の取り扱いに関する倫理、法律についてまとめられた Nuffield council on bioethics, Human tissue ethical and legal issues.1) を参考にし、我が国におけるヒト組織使用に対する倫理的問題点の抽出および欧米諸国と我が国におけるヒト組織利用に係る倫理的、宗教的相違点についてこれまでの調査内容を基に考察した。(佐藤哲男)

B-7 国内の主たる医学部外科学教室および公立病院外科約 90 施設の教授あるいは診療科長に対して、アンケート調査を行った。アンケートの作成に際しては、研究に使用する臓器・組織の対象を手術材料に限定した。また、質問内容は、手術により摘出された臓器・組織のうち病巣部を使用するのがあるいは、必然的に切除される見掛け上正常と思われる部分を使用するのに分け、かつ、その使用目的が診療(治療)

に直接反映されるような研究であるのか否か、臓器・組織の使用に関して患者に対してインフォームド・コンセントはどのようにして取得しているのかなどについて行った。また、切除された臓器・組織の使用が手術を行う外科学教室内部のみで行われているのか、あるいは施設内の他の研究室での使用が行われているのかさらに、外部の施設への分譲が行われているのかについても質問した。一方、研究目的で臓器・組織を使用する旨を患者に説明し、同意を得る場合、患者側からの不安要因の一つとして、研究のために必要以上の切除が行われるのではないかという不安を訴えられる場合がある。そのため、典型的な症例を提示し、執刀医により切除術式がどのように異なっているのかあるいは、一般的方法としてほぼ均一の術式が選択されさほど大きな違いが無いのかについても調査した。作成・実施したアンケートを別添した。(草野満夫)

C. 結果、考察

C-1. 凍結ヒト肝細胞の viability に関する研究

今回用いた2例(HH-018, HH-022)の凍結ヒト肝細胞の viability についてノマルスキー微分干渉装置付き共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した結果、HH-018 に関しては、細胞質中の多くを脂肪滴と思われる顆粒が占め、細胞内オルガネラは明瞭ではなかった。また、ミトコンドリアを rhodamine123 で染色したところ、一定程度の染色像は得られたものの正常ラット肝細胞の場合と比較して輪郭が不明瞭であった。一方、HH-022 に関しては、そのほとんどが接着性を示さず、かろうじて接着した細胞について同様の検討を試みた結果、接着した細胞の約 50% に蛍光プローブの存在が確認できた。また、ミトコンドリアについては明瞭な染色像は認められなかった。

正常ラットの肝細胞を用いた場合には、細胞内オルガネラ、ミトコンドリアともに明瞭な画像が高い viability で示された。

C-2. 細胞内カルシウムイオン濃度

カルシウム蛍光プローブ indo-1 を用いて共焦点レーザー顕微鏡にて蛍光強度比から細胞内カルシウム濃度の定量を行い細胞の状態に関して検討した。その結果、HH-018 細胞では約 5% が indo-1 を取り込んでおらず、細胞死の状態にあった。また、約 8% は、600nM 以上の高値を示したが、約 80% の細胞は 100-300nM の正常値を示した。

一方、HH-022 細胞は、上述の様にほとんどが接着性を示さず、かろうじて接着した細胞でも約 35% の細胞は、indo-1 を取り込まなかった。また、細胞内カルシウムイオン濃度も 100-300nM の範囲にあるものは 40% にすぎなかった。

C-3. ヒト肝硫酸転移酵素に関する研究

ヒト ST 分子種の異種細胞発現

ST1A3, ST1A5, ST1B2, ST1E4 および ST2A3 の酵素化学的性質を明らかにする目的で大腸菌からリコンビナント酵素(6xH ST)を得た。これらの精製酵素は電気泳動上の移動度が全て異なっていた。得られたリコンビナント酵素を精製し、ウサギに免疫して得た抗体を用いてヒト肝可溶性画分中の上述5種の酵素タンパクの Western blot 解析を行った結果、それぞれリコンビナント酵素分子種を移動度が一致した。

C-4. ヒト ST 分子種の硫酸抱合活性の比較

ヒト ST 分子種の硫酸基供与体である PAPS に対する酵素学的速度定数(K_m および K_{cat})を比較した。PAPS に対する ST1B2 の K_m 値(0.87mM)は、ST1A3(0.51mM)および ST1A5(1.00mM)の K_m 値とほぼ同レベルの値を示した。しかし、ST1E4 (2.84mM)および ST2A3(4.81mM)の K_m 値は ST1B2 の K_m 値と比べてそれぞれ約 3.3 および 5.5 倍大きい値を示した。さらに、これら分子種の基質特異性を比較するためにそれぞれの酵素の代表的な基質として報告されている p-NP、ドパミン、T3、E2 および DHEA を用いて検討した。

1) p-NP に対する活性は、5種全てで認められたが、ST1A3 の K_m 値がもっとも低く

0.41mM で他の分子種と比べて 100 から 1,000 倍の差があった。また、最も高値を示した分子種は ST1A5 でありその Km 値は 361.2mM であった。

2) ドパミンに対する活性は ST1 ファミリーに属する ST2A3 以外の 4 種で認められた。この基質に対する ST1A5 の Km はこれら 4 種の中で最も低く 7.1mM であり、次に低い Km を示した ST1A3(100.0mM)と比較しても 2 桁の差があった。

3) T3 もドパミンと同様に ST1 ファミリーに属する ST2A3 以外の 4 種で活性が認められた。この基質に対する ST1B2 の Km はこれら 4 種の中で最も低く 46.2mM であった。この値は他の 3 種と比較して 1 桁から 2 桁の差があった。

4) E2 に対しては、ST1B2 以外全ての分子種で活性が認められた。この基質に対する ST1E4 の Km は 0.25mM で最も低く、その値は他の 3 種と比較して 1~3 桁もの差があった。

5) DHEA に対しては、ST1E4 および ST2A3 のみに硫酸抱合活性が認められた。この基質に対する ST1E4 の Km は 0.70mM であり ST2A3 の Km(3.3mM)と比較して約 5 倍の差が認められた。

C-5. ヒト ST 分子種の肝における発現

ヒト ST 分子種の肝での発現含量を調べる目的で 6 例のヒト肝可溶性画分を用いて検討した。その結果、ST1E4 が 93%、ST1B2 が 90%と他の分子種と比較して大きな値を示したのに対し、ST1A5 が 33%、ST1A3 が 20%および ST2A3 が 4%という値を示した。それぞれの分子種の含量に個体差は認められたが、ST1B2 および ST1E4 の含量の個体差は顕著であった。

C-6. ヒト ST 分子種の肝含量と硫酸抱合活性の相関性

6 例のヒト肝可溶性画分における各々のヒト ST 分子種の含量と p-NP、ドパミン、T3、E2、DHEA に対する硫酸抱合活性との相関性について検討した。その結果、ST1A3 含量と p-NP に対する硫酸抱合活性 ($r=0.99$)、ST1A5 含量とドパミンに対する

活性($r=0.95$)、ST1B2 含量と T3 に対する活性($r=0.96$)、ST1E4 含量と E2 に対する活性($r=0.88$)および ST2A3 含量と DHEA に対する活性($r=0.78$)との間に高い相関性が示された。また、ST1A3 含量と E2 に対する活性($r=0.90$)および ST1B2 含量と p-NP 活性($r=0.96$)との間にも高い相関性が認められた。

C-7. 手術切除肝臓に関する研究

C-7-1. 本研究における肝切除症例

1) 症例 1 : 75 歳、女性。左乳癌術後、肝転移 (肝 S6~7、単発、径 5 cm)。両側肋弓下切開に上方正中切開を追加し、開腹した。肝 S6~7 に鶏卵大の腫瘍を認め、横隔膜へ浸潤していた。術中エコーにて腫瘍の大きさ、位置を確認。肝の表面は平滑で、辺縁は鋭であった。手術操作はまず腫瘍と横隔膜の間の癒着を剥離した。肝円索を結紮、切離し、右副腎との癒着も剥離。次に冠状靭帯、右三角間膜を切離し、肝右葉を授動した。胆摘施行後、肝十二指腸間膜に taping をした。腫瘍より 1 cm 以上離して、切除線をつけ、Pringle 法 (15 分 clamp、5 分 declamp) を 5 回くり返し、キューサーを用いて肝実質を切離した。後区域のグリソンを結紮、切離し、右肝静脈の分枝を結紮、切離し、後区域を切除した (図 25)。次に横隔膜浸潤部を切除したが、開胸になったため、胸腔ドレナージを施行し、穿孔部を縫合閉鎖した。なお、本例は肝部分切除に近い術式と考えられるが、腫瘍が大きく、ほぼ後区域が切除された。手術時間 5 時間 10 分、出血量 504 ml、輸血量 0 ml であった。

症例 2 : 52 歳、男性。肝細胞癌 (S5~8、単発、径 7 cm)、C 型肝炎。両側肋弓下切開に上方正中切開を追加し、開腹。肝表面は比較的平滑であった。術中エコーにて、肝 S7~8 に径 6 cm のモザイクパターンを呈する腫瘍を認めた。肝右葉を授動し、肝十二指腸間膜に taping した。肝門部で右肝管、右肝動脈、門脈右枝を分離し、taping した。胆摘を施行し、下大静脈の短枝群を結紮、切離してゆく。右肝管、右

肝動脈、門脈右枝を結紮、切離。門脈切離断端は縫合閉鎖した。肝外側区域が小さいため、肝実質の切離線はカントリー線よりやや右側とした。Pringle法(15分 clamp、5分 declamp)を4回施行して、肝実質をキューサーを用いて切離した。右肝静脈は肝内において切離し、切離断端は縫合閉鎖した。手術時間5時間40分、出血量785ml、輸血量400mlであった。いずれの症例に於いても、摘出に要した時間、阻血回数等は通常診療において行われている条件とほぼ同等であった。(伊藤洋二)

C-7-2. サブセルラーフラクションでの薬物代謝酵素活性評価

今回提供された肝臓は、転移性肝癌(乳癌より転移、(Sample No.1:HL 1))及び原発性肝癌(肝細胞癌、Sample No. 2:HL 2))の各1例ずつの計2例であった。それぞれの肝臓に関して、切除に要した時間経過および切除後の試料の処理に要した時間経過と、残存酵素活性、含量との関連性について検討した。

(1) 肝臓試料摘出および摘出後の処理に要した時間。

HL 1の摘出に要した時間は、5時間10分、手術中の阻血はPringle法を施行し(15分阻血、5分再灌流)、これを合計5回行った。また、肝切除後試料を等張緩衝液で冷却するまでに要した時間は約40分、その間、撮影のため2回(約3分間)写真用照明下に置かれた。一方、HL 2においては、摘出に要した時間は、5時間40分、手術中の阻血はPringle法を施行し(15分阻血、5分再灌流)、これを合計4回行った。また、肝切除後試料を等張緩衝液で冷却するまでに要した時間はほぼ0分であり、直後に冷却した。

(2) 各肝臓試料の各種CYP分子種活性および酵素含量の腫瘍部位からの距離による差異に関する検討

各肝臓試料を、腫瘍部位から1cm以内(腫瘍辺縁部)と1cm以遠(正常部)で分割し上述の6種基質に対する代謝活性を

測定した。その結果、転移性肝癌試料(HL1)では、CYP1A2活性が腫瘍辺縁組織で腫瘍より1cm以遠の部分より約20%の高値を示した。他の分子種の活性は、腫瘍辺縁部で見掛け上正常と考えられる部位に比べその活性はCYP2C9、2D6、2E1および3A4でそれぞれ、約20%、約40%、約45%および約50%程度の活性の低下を示した。また、CYP2C19においてはその活性は腫瘍辺縁部ではほぼ完全に消失していた。一方、肝細胞癌試料(HL2)では、CYP1A2およびCYP2C9活性が腫瘍辺縁部でそれぞれ約20%、約15%の活性低下を示した。他の分子種ではCYP3A4活性が腫瘍辺縁部で約30%の高活性を示した他は、腫瘍辺縁部との差はほとんど無く、同様の活性が認められた。

各肝臓試料の各部位でのCYP分子種タンパク量と活性の相関性について検討した結果、HL2においては、Western blotにより示されたそれぞれの分子種タンパクのバンドと活性はほぼ相関した結果が示されたが、HL1においては、CYP1A2およびCYP3A4で活性に比較して高い酵素タンパク含量がそれぞれの正常部で示された。この結果は、HL1は、手術による摘出および摘出後の処理に要した時間と大きく関連するものと考ええる。すなわち、HL1では、摘出後温阻血状態が約40分続いた事から、抗体認識部位のタンパクは十分に残存しているものの、活性中心はすでに分解あるいは何らかの障害を受けていることに由来するものと考ええる。このことは、温阻血時間がその状態では極めて短かったHL2の活性と含量の相関性が比較的保たれていることから推察できる。しかし、今回の検討では、病態の事なる2例の間での比較の結果であり、さらに例数を増やしての検討が必要と考える。

C-7-3. 単離ヘパトサイトを用いた肝薬物代謝酵素活性評価

2例の手術切除肝臓の非癌部位が、本試験に供された。(表1)

表1. 本試験に供された切除肝

試料番号	試験日	肝重量
1	1999.10.07	4.0 g
2	1999.12.09	10.1 g

試験に供与された切除肝臓小片をコラゲナーゼ灌流法によりヘパトサイトを単離した。組織小片の灌流は良好に行われ、トリパンブルー染色で、生細胞数を計測した。オーバーナイトで培養した後、培地を無血清培地に換え、検鏡し接着率を表2に示す。

表2. 単離ヘパトサイトの回収率

試料番号	総細胞数	接着率
1	8.0×10^6 cells	80 %
2	1.5×10^7 cells	100 %

試料2に関しては、さらに P450RI 標識特異基質を添加し、P450 アイソザイムの活性を測定した。

表3. 単離ヘパトサイトの P450 分子種活性

測定項目 (基質)	活性
CYP2C9 (トルブタミド)	487 nmol/min/dish
CYP2D6 (デニアリソク)	216 nmol/min/dish
CYP3A4 (ジアセパム)	122 nmol/min/dish
CYP3A4 (テストステロン)	1720 nmol/min/dish
CYP4A1 (ラリソ酸)	6270 nmol/min/dish
CYP1A 他(エトキシマリソ)	3020 nmol/min/dish

手術切除組織は、摘出時に長時間温阻血状態におかれる。本試験に供された試料も115分(試料1)、60分(試料2)と、それぞれ温阻血状態にあったため、単離ヘパトサイトの viability の低下が予想された。脳死肝を用いた試験報告では約 1×10^7 cells/g の回収率である。本試験の回収率はそれよりも低い。手術切除組織は切断面が電気メスで焼かれているため、肝重量当たりの回収率は単純には比較できない。それにもかかわらず、本試験で単離された

ヘパトサイトは高い接着性を示し、また、播種40時間後にP450アイソザイムの活性を測定した結果、高い薬物代謝能を示した。したがって、手術切除組織でも十分に医薬品の開発研究に使い得ることが示唆された。

C-8. ヒト組織利用・供給の現状

C-8-1. ヒト組織の薬物動態研究における有用性

医薬品の代謝、動態試験の研究においては、従来肝臓ミクロソームが主として使用されてきた。しかし、近年、ミクロソーム以外の成分を含む肝細胞を使用することによりさらに多くの情報が得られ、それらはヒトにおける医薬品の代謝、安全性の予測に大きく貢献することが常識となっている。さらに、薬物の代謝は、肝臓のみならず、小腸、皮膚なども重要な場であり、特に、医薬品の経口投与においては小腸における代謝、吸収が肝臓での代謝、排泄に先行することから、薬物の効果、副作用の判定に大きな意義を有する。また、経皮吸収により効果を期待する軟膏、貼付剤、パップ剤の場合は、薬効、毒性ともに皮膚における吸収、代謝に依存することからそれらの重要性は言うまでもない。

C-8-2. ヒト組織、細胞の種類

薬物動態研究では主として肝ミクロソームを使用するが、単離肝細胞(ヘパトサイト)、培養ヘパトサイト、皮膚、小腸ミクロソームなども有効に利用することが出来る。

C-8-3. ヒト組織使用に関する規定要項

1) 申請書ならびに研究計画書の提出

ヒト組織の使用にあたっては、使用者は原則として各事業体の倫理委員会の承認を得た後、所定の申請書と共に使用計画概要書を供給機関に提出することが必要とされる。申請書の作成にあたっては次の諸点を明記しなければならない。

(1) 提供を受ける組織または細胞の種類と量

(2) 使用目的としては医薬品の開発研究ならびに関連する基盤研究を対象とする。

(3) ヒト組織または細胞の使用にあたって、取扱者の安全性（バイオハザード）を担保するに十分な施設

(4) 申請者は供給機関の承認を受け、かつ、所定の実費を供給者に支払った後で、組織または細胞の供給を受ける。

2) 組織、細胞の取り扱いに関する注意事項（バイオハザード）

(1) 組織や細胞を取り扱うときには常にゴム手袋を着用すること。

(2) 実験室内では実験着をつねに着用すること。

(3) 実験室内では、喫煙、飲食または化粧をしないこと。

(4) 汚染したゴム手袋で、清潔なもの、機器などを操作したり、皮膚をさわってはならない。

(5) 溶液の計量、添加などの際は自動ピペットを使用し、口で直接ピペットを操作してはならない。

(6) 作業を完了した後、机上などの作業面を10倍希釈の家庭用漂白剤(0.525%次亜塩素酸ナトリウム)で消毒すること。

(7) 汚染のおそれのあるものはすべて廃棄前に滅菌すること。

(8) 実験室を出る前に、ゴム手袋や実験用衣類を廃棄し、必ず手を洗うこと。

C-8-4. 倫理的考察、ヒト組織の所有権、インフォームドコンセント

最近の様に、科学技術が急速に進歩すると、それに伴って倫理に関する深刻な問題が生じ、また、新たな混乱が引き起こされるという現実がある。ヒト試料を学術的研究に使用する場合に最も重要なことは、試料を提供する患者個人の人格の尊重を前提とした理念が確立されねばならない。つまり、人体の一部は当然ながらその個人に帰属するものであるため、提供者が自発的に納得して譲渡された場合にのみ有効活用が可能となる。この場合でも、ヒト組織に無償性を求める代償として、ユーザーを代表するコミュニティーは提供者を代表するコミュニティーに何らかの形で利益を還元するルールを確立し、両者の円滑な協力関

係を築くことを考えるべきである。公正性の概念に基づいて、提供者の負担と提供者への利益配分の配慮が必要である。具体的にヒト組織を入手する場合には、現状を正確に認識し、社会通念に乗っ取って行う必要がある。臨床医学においては、組織提供患者の診断あるいは治療に益する内容の研究が必要である。すなわち、患者の組織を分析、検査し、その成績を患者本人に還元することは我が国の社会通念として受け入れられる内容である。

C-8-5. わが国における研究システムの整備と今後の戦略

わが国では、移植肝を米国の様な方法で用いることは将来共望むべくもない。したがって、これらの研究を行う場合、移植肝に代わるものとしては手術切除された組織の一部を有効活用する以外に方法は見当たらない。この場合、患者と医師間の信頼関係に基づくインフォームドコンセントを得ることが前提となる。一方、ヒト肝を学術研究の目的に用いる場合、組織を提供した患者個人への利益になるときと、個から社会への貢献の場合が考えられる。後者では、患者本人が、医学、薬学の研究にヒト組織を使用することが人類全体に計り知れない利益をもたらすとする考え方を持っている場合にのみ実現するのである。欧米に比較して特殊な事情にある我が国にあって、国内のネットワークづくりを具体化するためには、既に述べた必要性と問題点を明確にするのみならず、(1) 研究体制の確立とそれを運営するための経済基盤の確保 (2) 広報と世論の支持 (3) 臨床医の理解と協力 (4) 医師と患者との信頼関係の確保、(5) 患者のインフォームドコンセント、などの環境整備が必要である。一方、これを具体化する場合には、社会環境、倫理感、宗教感、法制度などの点で欧米とわが国の間でかなりの隔りがあるため、結局はわが国独自の路線を考えなければならない。将来の国際的協調を考えるとき、これが国家的プロジェクトとして、この領域の専門家、一般学識経験者、法律家、などが結集し、具体的思索を

検討すべきである。

C-9. アンケート調査

アンケート調査の集計に関しては、現在回収を行っている。

詳細に関しては、次年度報告する。

E. 結論

ヒト臓器・組織を用いた薬物代謝研究において、冷凍保存された単離肝細胞の有用性・信頼性には若干の疑問が残された。一方、手術材料は、提供患者の背景に種々の問題を含んでいるが、総じて、代謝試験への応用については、現在のところ問題点は少ないと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

なし

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

分担研究報告書

医薬品等の安全性確保の基礎となる研究：

ヒト臓器・組織利用に際してのインフォームド・コンセントの取得法に関する研究

分担研究者：内田 英二 昭和大学医学部第二薬理学教室

研究の要旨

本研究は、治療を目的とした手術により摘出された臓器・組織を研究用試料として用いるにあたり、その倫理性を考慮して、いかなる規定を定めるか、また、臓器・組織の提供者である患者に対してどのようなインフォームド・コンセントが必要であるかに関して、患者からの手術材料の研究目的での使用に関して、インフォームド・コンセントを得るための説明文書等の作成を行った。作成した説明文書、同意書および本研究事業に関する研究計画書を昭和大学医の倫理委員会に提出し、その審査および承認を得た。承認が得られた後、本研究事業として、実際に2例の受術患者に対して、担当医師より、今回承認された説明文書および同意書を用いてインフォームド・コンセントの取得を試みた。

分担研究者：内田 英二
昭和大学医学部第二薬理学 助教授

A. 研究目的

治療を目的とした手術により摘出された臓器・組織の研究目的での使用は古くから大学内において行われてきた。しかし、その使用に対しての患者への説明、使用に対する同意の取得等は近年までほとんど行われずになされてきている感がある。実際に、手術により摘出された臓器・組織の一部は、術後の確定診断のための病理検査に使用され、その残りの部分が研究に使用されている。治療目的で切除された臓器・組織は、以後、他の目的で使用されたとしても、直接患者の予後に影響することはない。そのため、これまでは、暗黙の了解のうちに特に患者に対する詳細な説明や、同意の取得等を行うことなく使用されてきた。しかし、実際には、そこから得られる情報には測り知れないものがあり、遺伝子解析等を行うことにより、患者のプライバシーが著しく犯される場合もある。このような現状を勘案し、本研究では、ヒト臓器・組織を研究目的で使用する場合の倫理的配慮および臓器・組織提供患者の保護を目的としたイン

フォームド・コンセントの取得にかかる諸手続きに関する文書の作成、特に説明文書および同意書の作成を行うこと、ならびに本研究事業を遂行するための学内倫理委員会の審査・承認を得るための研究計画書等の作成を行うことを目的とした。

B. 研究方法

治療を目的とした手術による臓器の部分切除を受ける患者からの臓器・組織の一部を研究目的で提供を受ける場合の同意取得にかかる説明文書および同意書の作成について、倫理的配慮に重点を置き作成した。作成した説明文書および同意書は、研究の趣旨、内容、方法並びにプライバシーの保護に関して明記し、あくまでも自由意思によるものであることを明記した。また、作成した同意取得に関する説明文書および同意書、並びに本研究事業の研究計画書を昭和大学医学部医の倫理委員会に提出し、審査・承認を得た。

C. 結果・考察

本研究において、作成された同意取得に関する説明文書および同意書並びに研究計画書は、昭和大学医学部医の倫理委員会の審査・承認を得た。承認後、2例の肝臓癌

患者に対して、摘出後の臓器の一部を研究に使用する事に関しての同意の取得を試みた。

本研究において、作成された同意取得に関する説明文書による同意取得が少なくとも現状では可能であることが示された。しかし、同意取得に係る患者の不安要因等に関しては、現段階では不明な点が多く残されており、更に詳細に患者の心理を含めた検討が必要であると考えます。

今回作成した同意取得に関する説明文書ならびに同意書に関しては別添した。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

なし

審査結果通知書

承認番号 46

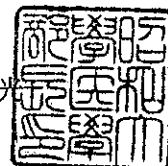
平成10年9月24日

第二薬理学

教授 安原 一 殿

昭和大学

医学部長 中井 康 光



課題名：ヒト臓器・組織の有効利用を図るための基礎的検討

研究者名：第二薬理学 教授 安原 一

さきに申請のあった上記課題に係る実施計画を、平成10年9月24日の医学部医の倫理委員会で審議し、下記のとおり判定したので通知します。

記

判定 承認

手術材料の研究への提供に関する同意説明文書

今回の研究に関する説明を行います。この研究に同意するかしないかは、あなたの自由です。たとえ研究に同意しなくても、以後の治療に不利益を受けることは絶対にありません。

試験の目的および方法

病気の予防や治療に用いられる医薬品のほとんどは、肝臓にある薬物代謝酵素と呼ばれる酵素によって分解されたり、活性化されたりします。この薬物代謝酵素は、一種類だけではなく、非常に多くのものがあり、それぞれが、色々な医薬品の分解や活性化に重要な役割をはたしています。

医薬品を安全かつ有効に用いるためには、その医薬品がどのような酵素で分解されるかを知る事は大変重要なことです。そのため、これまでは、実験動物を用いてその予測を行ってきました。しかし、最近になり、実験動物の結果とヒトの結果が必ずしも一致せず、ヒトの薬物代謝酵素を実験動物で予測することは不可能であるとまで言われてきています。さらに、この薬物代謝酵素のある種のもは、特定の一部のヒトで極端にその作用が弱かったり、あるいは全くその酵素を持っていない、いわゆる遺伝的欠損者がいることが知られてきています。この遺伝的欠損とは、身近な例としてお酒が飲めるヒトと飲めないヒトがいることでよく知られています。これは、エチルアルコールを分解する酵素を持っているヒトといないヒトがいることを示しています。酵素を持っていないヒトがお酒を飲むとすぐに顔が赤くなったり、気分が悪くなったり、ひどい場合には死に至る事もあります。医薬品でも同様のことが起こりうるのです。また、病気の治療には数種類の医薬品が同時に使用されます。そのときに、用いられた医薬品の全てが別々の酵素で分解される場合は問題ないのですが、一つの酵素が2種類以上の医薬品の分解にかかわるような場合には、一方のみが分解され、他の一方は全く分解されないことも起きてきます。このような場合には、分解されなかった方の薬は、見掛け上、過量に与えられたような状況になり、中毒を引き起こしたり、ひどい場合には、死に至ることもあります。このような理由から、医薬品がどのような酵素で分解されるのかを知る事は病気の治療を安全に、効率的に行うために非常に重要なことです。しかし、現在の日本では、欧米のようにヒトの臓器・組織を使用した試験研究は試料の供給が出来ないために現在使用されている医薬品の分解にどの酵素が関わっているのかについての日本人での研究は、殆ど行われていません。

このような研究には新鮮な臓器・組織が必要とされます。今回あなたにお願いすることは、治療の目的で切除する肝臓の一部をこの研究のために提供して頂くことと、研究のために使用することを承諾して頂くことです。承諾して頂いたからと言って、この研究のために余分に臓器を取ったりすることは絶対にありません。あくまでも治療のために切除したものの一部を使用させて頂きます。

予想される利益、不利益、有害事象

この研究では、前述のとおり、治療目的で切除した臓器の一部を使用させていただきます。そのため、この試験のために直接的に不利益や、有害反応が生じることはありません。また、この研究であなたの薬物代謝酵素のもつ処理能力等を知ることにより、今後の安全かつ効果的な薬物療法に大きく役立ちます。

同意の撤回

この研究の趣旨を理解し、同意して頂いた後でも、いつでも自由に同意を撤回する事が出来ます。同意を撤回しても、そのためにあなたが、以後の治療等で不利益を受けることは絶対にありません。

その他、提供者の人権の保護に関する事項

本研究において得られた全ての情報は、厳重に管理され、医学的に重要な事柄を研究成果の報告するときにも、あなたの実名やプライバシーにかかわる内容は一切公表いたしません。この研究は昭和大学医の倫理委員会の審査および承認を得て行われています。

あなたが、この研究について更に情報が欲しい時やご自身の結果等で知りたいことがあるときは、下記の研究総括責任者まで、ご遠慮なくお問い合わせ下さい。

研究総括責任者	〒142-8555 東京都品川区旗の台1-5-8 昭和大学医学部第二薬理学教室 主任教授 安原 一 TEL 03-3784-8128 FAX 03-3784-3200
責任医師	昭和大学医学部第二外科学 主任教授 草野 満夫
研究期間	平成10年9月30日～平成12年3月31日
予定症例数	20例

同意書

平成 年 月 日

研究総括責任者 _____

私は、「ヒト臓器・組織の有効利用を図るための基礎的検討」についての、研究の目的、方法、研究内容の性質、安全性、有害事象等に関する説明文書により十分な説明を受けこれを理解しました。そこで自らの自由意思に基づき、手術材料を本研究に用いることに同意いたします。

但し、何時如何なる時でも、理由の如何を問わず、私の臓器・組織にかかわる研究を中止することが出来、中止した場合でも何ら不利益を被らない事を確認しています。

私は、本研究で知りえた情報に関して、如何なる第三者にも漏洩致しません。

住 所 _____

同意者氏名 _____

説明者氏名 _____

説明年月日 _____

研究実施計画書

本研究は、ヒト臓器・組織を用いた薬物代謝研究を行う際の、臓器・組織の有効利用を図るための基礎的検討を目的とし、以下の項目を精査する。

①手術材料の科学的信頼性および有用性の検討

臓器・組織の一部摘出を受ける患者は、個々に異なった状況を有していることから、健常者の場合とは明かに異なった臓器・組織の機能を有している状況にある。特に担癌患者では組織学的にみかけ上正常と判断されても、酵素学的に障害を有している場合も予想される。また、疾病を有していることから、種々の薬剤の投与がなされている可能性があり、これら薬物の影響も個々に大きく異なっていることが考えられる。更に、提供された臓器・組織が試料として使用される過程では、手術に伴う虚血、再灌流は細胞に対して大きな障害を与える。このような状況を勘案し、摘出された臓器・組織が有する試料としての信頼性、有用性の評価を摘出に要した時間、虚血状態、疾病、病巣の状況、使用薬物、使用期間等を総合的に加味して行い、米国で移植不適合と判断された臓器と比較して、どの程度データ上異なっているのかを比較検討し、手術材料が医薬品の安全性・毒性評価の検討に対応しうるのか否かに関して検討する。主な検討内容は以降の検討項目の内容を含むこととする。

②手術材料（新鮮臓器）と保存臓器の有用性の比較検討

（安全性・毒性評価の予測性の検討）

脳死提供者からの臓器・組織は通常液体窒素による瞬間冷凍を施し、冷凍状態で輸送される。そのためサブセルラフラクションを用いた検討には何ら支障は無いと考えられているが、これらから得られる薬物代謝の情報には限界がある。そのため、よりin vivoに近い情報が得られるセルやスライスを用いた検討が必要な場合が生じてくる。しかし、冷凍保存された状況の臓器・組織でこれらの要望を満たすことは極めて困難な状況にある。そのため、種々の要因を含んでいながらも手術材料を用いた、セルやスライスの検討は重要な項目となる。このような状況を勘案し、これらの要因を含まない脳死患者から提供された凍結保存された臓器との比較を行うために、手術材料を分割し、一部を新鮮なまま、他の一部を一旦窒素凍結した後解凍してサブセルラフラクション化し、同一サンプルでのセル、スライルとの薬物代謝酵素系の変化、相異点、有用性および欠点について検討する。この検討には、動物臓器も同様に行い、種差に関する検討を行い、ヒト臓器・組織を用いることの必要性あるいは必然性の有無、さらに、動物臓器での検討の有用性の有無、必要性の有無に関して考察する。また、手術材料に関しては、肉眼的に正常と考えられている部分に関しても、病理標本の作成を行い、顕微鏡的に正常であるか否かについて調べる。

③ヒトcDNA発現薬物代謝酵素系との比較（それぞれの利点、欠点）

限りあるヒト臓器の使用を配慮し、また、実験動物の臓器・組織の使用に関する

有用性等を考慮し、現在多数使用されてきているヒト薬物代謝酵素のリコンビナントを用い、安全性・毒性評価に対する有用性並びに欠点に関して、ヒト臓器・組織と比較検討する。

上記①～③の検討は、対象酵素として薬物代謝に重要な役割を果たしている cytochrome P450を中心に行い、種々cytochrome P450分子種の代表的基質の代謝を指標として行う。用いる基質は、以下の通りとする。

CYP1A	カフェイン (カフェイン脱メチル化)
CYP2C9	ワルファリン (ワルファリン水酸化)
CYP2C19	メフェニトイン (メフェニトイン水酸化)
CYP2E1	クロルゾキサゾン (クロルゾキサゾン水酸化)
CYP2D6	デブリソキン (デブリソキン水酸化) ブフラロール (ブフラロール水酸化)
CYP3A4	テストステロン (テストステロン6位水酸化)

また、臓器・組織提供者が多く以後の治療に高い頻度で使用すると思われる抗癌剤の代謝に関しても以後の患者の薬物療法を踏まえ、可能なかぎり検討する。特に、CYP分子種に限らず、遺伝的欠損が明かにされている、Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD)活性の評価は以後の5-FUを用いた薬物療法の安全性と有効性に大きく寄与するものとする。

酵素活性評価は、常法にしたがい行い、測定は主要代謝物を高速液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー、高速液体クロマトグラフィー/マススペクトロメトリー法により行う。得られた活性に関する結果を更に詳細に調査する目的で、各試料の総cytochrome P450含量、各CYP分子種含量についても免疫学的手法により評価を行い、各CYP分子種の代表的基質に対する活性との相関性に関して検討する。

④臓器・組織提供患者に対する情報の還元

臓器提供を行った患者に対しては、提供した臓器より得られた薬物代謝酵素活性を含めた個人の情報および以後の治療に用いる予定の薬物に対する代謝能の検討結果等を還元し、薬物療法を行う際の有害反応の予防のための一助とする。

⑤その他

本試験計画は昭和大学医の倫理委員会の審査および承認を受けた後遂行するものとする。

以上

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

分担研究報告書

医薬品等の安全性確保の基礎となる研究：

新薬の有効性・安全性評価のためのヒト肝組織・細胞の利用法に関わる研究

分担研究者	大野泰雄	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、薬理部長
研究協力者	佐藤哲男 山添 康	HAB 協議会霊長類機能研究所 東北大学薬学部衛生化学教室

研究の要旨

凍結ヒト単離肝細胞について、細胞の微細形態、細胞内イオン濃度に関して検討した。細胞内には脂肪滴様の顆粒が数多くあり、細胞質領域のかなりの空間を占めており、細胞内オルガネラが明瞭には確認できない状態にあった。しかし、細胞内イオン濃度調節は正常に働いており、ホルモン性刺激による細胞内カルシウムイオン濃度上昇も正常に生じた。しかしロットによっては細胞内イオン濃度は正常ではなく、医薬品の安全性評価へこれらの細胞を使用するにあたっては、ロットを選別することが重要であると考えられた。

ヒト肝組織およびリコンビナント酵素を用い T3 の代謝に関与する 硫酸転移酵素(ST) 分子種の同定を試みた。ST1B2 分子種が T3 に対し最も高い親和性を示すことが明らかとなった。さらに、ヒト可溶性画分における T3 硫酸抱合活性は ST1B2 の肝含量との間にのみ高い相関性を示した。以上の結果から、ST1B2 は、ヒト生体内における T3 の代謝に関与する ST 分子種であることが示唆された。また、ラットにおける T3 の代謝に関与する ST 分子種は、ST1B1 および ST1C1 であることを示した。

わが国においてヒト組織を医学、薬学の基礎研究に用いるための課題について検討し、1) 医療機関の協力ネットワークの設立と円滑な運営、2)患者へのインフォームドコンセント、3) 医療機関において入手した手術組織（正確には種々の検査に用いた残余物）の処理（人手、作業項目）、4) 医療機関から Research Resource Center(RRC)（仮称）への手術組織の運搬（人手、費用）、5) RRCにおける手術組織の品質保証（バリデーション）、6) 2年後の臓器移植法見直しに際して、移植不適合肝の基礎研究への有効利用に関する法改正、7) すべての業務に関わる経費負担を受益者負担の原則で行うか、あるいは国策として国が一部負担するか、という点が問題であることを示した。また、これらの機能を運営する人的資源と財政基盤の確保の問題がある。

A. 研究目的

薬物のヒトでの有効性及び安全性を評価する上で動物実験は欠かせない。しかし、ヒトと動物の間には大きな種差が存在し、ヒトへの外挿を行う上での障害となっている。動物で十分検討したはずの医薬品の開発がヒトでの試験で思わぬ結果をもたらし、中断してしまうことが多くある。一方、最近の研究によれば、この差の多くは薬物の生体内動態、特に肝臓での薬物代謝活性の相違に起因することが明らかになっている。従って、ヒト肝臓あるいはそれに由来する標本を利用した試験を行うことが可能ならば、動物実験や in vitro 試験結果をヒトに結びつ

けることに威力を発揮し、医薬品の開発やその適切な評価が促進される。また、第一相臨床試験で初めてヒトに薬物を投与する際に志願者の安全性を確保する上でも、予めヒト由来肝組織で試験し、動物と比較しておくことが重要である。

そこで、本研究ではヒト組織を用いた試験の医薬品評価における意義について実験的に検討するとともに、わが国におけるヒト肝臓を用いた試験を行うに当たっての基本的な問題、即ちヒト肝臓の供給、保存、利用及び倫理の問題を文献的に検討し、整理することにより、将来ガイドライン等を作成する時の基礎資料とするも