

- 6-1-4 倫理審査委員会の議事要旨は、公にすることによって、ヒト由来試料等提供者又はその家族等の人権、研究に係る独創性又は知的所有権の保護に支障が生じるおそれがある部分を除き、公開するものとする。
- 6-1-5 倫理審査委員会の委員は、審査を行う上で知り得た個人に関する情報を正当な理由なく漏洩してはならない。
- 6-2 倫理審査委員会の構成等
- 6-2-1 倫理審査委員会は、ヒト由来試料を用いた研究に関する倫理的事項を総合的に審査するに必要な優れた識見を有する人文科学、社会科学等の専門家、研究に関する科学的事項を総合的に審査するに必要な優れた識見を有する専門家、ヒト由来試料等提供者の人権保護について広く一般の人々の意見を反映できると考えられる者等により構成されなければならない。
- 6-2-2 委員会は5名以上の委員によって構成されなければならない。委員のうち自然科学分野以外および研究実施施設と利害関係を有しない外部の者が少なくともそれぞれ1名以上含まれなくてはならない。
- 6-2-3 審査の対象となるヒト由来試料を用いた研究の研究遂行者は、倫理審査委員会の求めに応じて会議に出席し、当該研究計画の説明等科学的意見を述べることはできるが、倫理審査委員会の審議及び採決に参加してはならない。
- 6-2-4 倫理審査委員会は、倫理的事項を審査するに必要な優れた識見を有する人文科学、社会科学等の外部専門家およびヒト由来試料等提供者の人権保護について広く一般の人々の意見を反映できると考えられる者それぞれ1名以上出席しなければ、審議又は採決のための会議を開くことができない。
7. ヒト由来試料等提供者のインフォームド・コンセント
- 7-1 インフォームド・コンセントに係る一連の手続きに関する原則
- 7-1-1 説明事項：倫理審査委員会により認められた研究遂行者は、ヒト由来試料等提供者又は代諾者に対して、説明文書を用いて、次の事項のうち研究の実施上必要な事項について適切かつ十分な説明を行い、ヒト由来試料等提供者又は代諾者が自由意思に基づいて文書を用いてヒト由来試料等の提供の同意を表明するようにすること。ただし、身体障害等により説明文書を読むことができない者のインフォームド・コンセントに係る一連の手続きは、研究遂行者でない者を立ち合わせた上で行われなければならない。
- 7-1-2 ヒト由来試料等の提供は任意であって、いつでも同意は撤回でき、提供に同意しないこと又は同意の撤回により不利益な対応を受けないこと。撤回した場合、その撤回に係るヒト由来試料等及びその研究結果は廃棄されること。ただし、既に研究結果が公表されている場合、廃棄しないことにより個人識別情報を含む情報が明らかになるおそれが小さく、かつ廃棄作業が極めて過大である場合等やむを得ない場合には、研究結果の廃棄はできないことがあること。
- 7-1-3 提供されたヒト由来試料等を連結不可能匿名化する場合には、その匿名化の後は、ヒト由来試料等提供者又は代諾者が同意を撤回しても、その撤回に係るヒト由来試料等及びその研究結果は廃棄できないこと。

- 7-2 ヒト由来試料等提供者として選ばれた理由
- 7-3 研究責任者の氏名及び職名
- 7-4 予測される研究結果及びヒト由来試料等提供者に対して予測される危険・不利益
- 7-5 希望により、そのヒト由来試料等を用いた研究の研究計画書、研究の詳しい方法等の資料を入手又は閲覧できること。
- 7-6 連結可能匿名化・連結不可能匿名化の別及びその匿名化の具体的方法。匿名化できない場合にあっては、その旨及び理由。
- 7-7 ヒト由来試料等又はそれから得られた情報を他の機関へ提供する場合は、倫理審査委員会により、個人識別情報を含む情報の取扱い、提供先の機関名、提供先における利用目的が妥当であることについて、審査されること。
- 7-8 ヒト由来試料等提供者の家族等から、ヒト由来試料等提供者の遺伝子情報を開示する求めがあっても開示しないこと。ただし、ヒト由来試料等提供者がこれと異なる意思を明らかにした場合には、それを尊重すること。
- 7-9 将来、研究の成果が知的財産権を生み出す可能性があること。知的財産権を生み出した場合、当該知的財産権はヒト由来試料等提供者に帰属しないこと。
- 7-10 ヒト由来試料等から得られた情報は、匿名化された上、学会等に公表され得ること。また、データベース化された上で、連結不可能匿名化された情報として他の研究機関等に公表され得ること。
- 7-11 研究終了後のヒト由来試料等の保存又は廃棄の方針。保存する場合にあっては、その必要性、方法、場所、匿名化の方法。廃棄する場合にあっては、廃棄の方法及び匿名化の方法。
- 7-12 ヒト由来試料等を細胞・組織バンク等へ寄託し、一般的に研究用資源として分譲することがあり得る場合には、バンクの学術的意義、当該バンクが設置されている機関の名称、寄託されるヒト由来試料等の匿名化の方法。
- 7-13 ヒト由来試料等の提供の対価はないこと。また、研究の結果に応じて治療が必要になる場合等におけるヒト由来試料等提供者の費用負担に関する事項。
- 7-14 ヒト由来試料等提供者が、痴呆等により有効なインフォームド・コンセントを与えることができないと客観的に判断された場合には、代諾者からヒト由来試料等提供の同意を得ること。
- 7-15 ヒト由来試料等提供者が未成年者であるときは、親権者等の代諾者がインフォームド・コンセントを与えるものであること。ただし、未成年者が16歳以上である場合には、親権者等の代諾者とともに、その未成年者本人のインフォームド・コンセントも必要であること。また、未成年者が16歳未満の場合であっても、その未成年者本人に十分な説明を行い、できる限りその未成年者からもヒト由来試料等提供の同意が与えられるように努めなければならない。
- 7-16 倫理審査委員会により認められた研究遂行者は、ヒト由来試料等提供者の家族又は日常生活において深くヒト由来試料等提供者と関わっていた者等の中から、ヒト由来試料等提供者の人権保護の観点から代

諾者として適当と考えられる者を選んでもらうように、家族等に依頼すること。

8. 既採取ヒト由来試料等の研究利用

8-1 A群ヒト由来試料等の場合（試料採取時に使用目的が明示された同意が得られたもの）

既採取のヒト由来試料等の提供者又は代諾者が既に同意した範囲内で、ヒト由来試料等を研究に利用できる。

8-2 B群ヒト由来試料等の場合（採取時に「医学的研究に用いる事に同意する」などのように利用目的が明示されていない同意のみを得られた者から提供された試料）

原則として、既採取のヒト由来試料等の提供者又は代諾者が研究に用いることの同意を与えた場合は、研究に利用できる。

また、次のいずれかの要件が満たされる場合には利用できる。

(1) 連結不可能匿名化されている場合

(2) 連結可能匿名化された場合においては、研究により既採取のヒト由来試料等の提供者及びその家族等に危険・不利益が及ぶ可能性が極めて小さく、研究に高度の有用性が認められ、他の方法では実際上研究の実施が不可能又は極めて困難であることが倫理審査委員会で確認された場合

8-3 C群ヒト由来試料等の場合（採取時に研究利用に係る同意が得られていない者から提供された試料）

原則として、既採取のヒト由来試料等の提供者又は代諾者が研究に用いることの同意を与えない限り、研究に利用できない。

ただし、次の要件のいずれかが満たされる場合には利用できる。

(1) 連結不可能匿名化されている場合

(2) 連結可能匿名化された場合においては、次の全ての要件を満たしている

ことが倫理審査委員会で確認された場合

1) 研究により既採取のヒト由来試料等の提供者及びその家族等に危険・不利益が及ぶ可能性が極めて小さいこと。

2) そのヒト由来試料等を研究に用いることが、社会の利益に大きく貢献する研究であること。

3) 他の方法では実際上、研究の実施が不可能であること。

4) 研究の実施状況について情報の公開を図り、併せて既採取のヒト由来試料等の提供者に問い合わせ及びヒト由来試料等の研究利用の拒否の機会を保障するための措置が講じられていること。

9. ヒト由来試料等の採取、保存及び廃棄の方法

9-1 試料採取者、研究者およびこれに関わる全ての者は、ヒト組織の提供を受けること若しくは受けたことの対価として提供者側に財産上の利益を供与し、又はその申込み若しくは約束をしてはならない。

9-2 ヒト臓器・組織の採取は医師以外行なってはならない。また、死体からの採取に当たっては、死者に対する礼意を失わないよう特に注意すること。

9-3 ヒト臓器・組織の採取に当たっては、無菌的条件下あるいは除菌条件下で行い、採取の過程における微生物等の汚染防止に留意しなければならない。

9-4 採取されたヒト組織の処理を行う過程においては、滅菌された器具を用い、無菌環境設備内で作業を行う等、ヒト組織への汚染防止に努めるとともに、防衣を着用する等により作業に従事する者へのヒト組織を介した感染症の伝播等の防止にも留意しなければならない。

- 9-5 採取されたヒト組織の処理・保存を行う作業環境については、一定の清浄度が保たれるよう留意するとともに、定期的に作業環境の確認検査を行わねばならない。
- 9-6 上記の記録を作成し、別に定める期間保存しなければならない。
- 9-7 研究遂行者は、研究実施機関内でヒト由来試料等を保存する場合には、ヒト由来試料等提供者の同意事項を遵守し、研究計画書に定められた方法に従わなければならない。
- 9-8 研究遂行者は、ヒト由来試料等を細胞・組織バンク等に寄託する場合には、ヒト由来試料等提供者の同意事項を遵守しなければならない。
- 9-9 研究遂行者は、研究計画書に従い自ら保存する場合及び細胞・組織バンク等に寄託する場合を除き、ヒト由来試料等の保存期間が研究計画書に定めた期間を過ぎた場合には、ヒト由来試料等提供者の同意事項を遵守し、匿名化して廃棄しなければならない。

分 担 研 究 報 告 書

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
—手術臓器の研究利用に関するインフォームド・コンセントの取得に関する検討—

分担研究者：草野 満夫 昭和大学医学部第二外科学教室
協力研究者：伊藤 洋二 昭和大学医学部第二外科学教室

研究の要旨

我々は、平成 11 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において平成 10 年度に行なった 2 例に引き続き検討を行ない、9 人の肝癌患者より本研究計画に基づいた方法によりインフォームド・コンセントを取得し、研究に供した。

本研究においては、我々が作成した摘出臓器の研究への利用に関する同意説明に関する現場での現状、提供者の協力度、問題点および必要な改正点などに関して検討した。

本年度我々がインフォームド・コンセント取得に関して説明を試みた例数は、10 例であり、承諾が得られなかった例は 1 例のみであった。肝臓試料の提供を受けるに際しては、患者、家族には肝組織の採取のために大きく切除されるのではないかという懸念が常にあり、この点に関して、術前説明に十分時間をかけて、病変部を切除するための必要最小限の範囲の切除であることを説明することにより理解度ならびに協力度が向上する事が考えられた。また、非病変部の切除量が少なければ、承諾を得ていても、肝組織が利用出来ない場合もあることを説明する必要性が示唆された。本検討では 1 例非腫瘍部の組織量が少なく、対象から除外された症例があった。さらに、同意説明に際しては、詳細な説明が文書、口頭の双方で必要である事は明確であるが、反面、提供者に対する時間的拘束による負担や、手術前の精神状態等を勘案すると、説明の必要十分条件がいかなる位置にあるのかを今後検討する必要性が示唆された。さらに、今後の病巣摘出に関する動向を勘案すると、現在通常行なわれている術式に加えて、経皮的エタノール注入療法やマイクロ波凝固療法などの非侵襲的治療が増える可能性も考えられ、現在以上に手術材料の入手が難しくなる可能性も考えられる。

本研究により、現状においては、試料提供を受けるに際し、医師側の十分な説明や日常診療を通しての患者との信頼関係が成り立っている事が試料提供を受けるための最重要要件である事が考えられた。また、今後の術式の動向等を勘案すると、貴重な試料を有効に利用するためには切除後の迅速な処置並びに病理医との連携が不可欠であると考えられた。

分担研究者：草野 満夫
協力研究者：伊藤 洋二
昭和大学医学部第二外科学教室

A. 研究目的

ヒトにおける医薬品の安全性や有効性の検討には、動物間の種差等を考えると、最終的にはヒト臓器あるいは組織を用いた検討が最も信頼性が高く、必須の検討となる。

我が国においては、臓器移植法が施行されて移植を目的とした脳死患者の臓器の使用は認められているが、脳死患者からの研究目的での臓器摘出は現段階では認められていない。そのため、我が国においては、新鮮臓器・組織は、手術材料に頼らざるを

えない。

ヒト臓器・組織の研究目的での使用には、提供者のプライバシー保護等の観点から、十分なインフォームド・コンセントが必要であるが、現在の研究社会、特に医療関係者間での認識においては、摘出臓器の研究利用等に関しては、残念ながらこういった認識は低い。我々は、ヘルシンキ宣言にのっとり、ヒト臓器・組織の研究利用に際しての基本的遵守事項を尊重した試料提供の受け方に関して、同意説明の医師側の対応法に関して、実際にインフォームド・コンセントを得る過程を通して、その現状、問題点更に改革点について検討した。

B. 研究方法

昭和大学消化器外科を受診した患者のうち手術適用の肝臓癌患者を対象に、別添の同意説明文書を使用し、口頭説明を加えての手術材料の研究目的での使用に関するインフォームド・コンセントの取得を試みた。

説明に関しては、通常行なっている手術に関する説明、同意とは別に本研究の目的、内容、プライバシーの保護、自由意思による参加である点、試料提供を断っても以後の診療に一切不利益を被らない点を説明し、文書による同意を得た。その過程における患者の対応、認識度、患者の抱く疑念および同意取得が不可能であった場合の背景等を現場の医師の立場で解析する。また、我々が作成した同意取得に関する説明文書を使用し、いかなる形態の説明文書が同意取得時に患者の負担が少なくかつ、誤解無く必要な事柄に対する理解が十分得られるかに関して検討した。

C. 研究結果・考察

本研究計画に基づきヒト臓器・組織の有効利用を図るため、平成10年度および11年度に行なった、当科における肝切除症例に対して、術前患者、家族に手術材料の提供を依頼し実際に、インフォームド・コンセントを行ない、承諾が得られ、肝組織が利用できた11例を表1に示す。

表1 肝組織提供症例

No.	年齢	性	診断	術式
1	75	F	乳癌術後、肝転移	肝後区域切除
2	52	M	肝細胞癌	肝右葉切除
3	69	M	肝細胞癌	中央2区域切除
4	64	M	肝細胞癌	亜区域切除
5	68	F	直腸癌術後、肝転移	亜区域切除
6	57	M	肝細胞癌再発	肝部分切除
7	64	M	肝細胞癌	肝部分切除
8	61	F	盲腸癌、肝転移	肝部分切除
9	72	M	肝細胞癌	肝部分切除
10	76	M	肝嚢胞腺癌	肝左葉切除
11	73	F	S状結腸癌術後、肝転移	肝部分切除

当初予定していた症例数には達していないが、承諾を得るにあたり特記すべき大きな問題は生じなかった。術前、インフォームド・コンセントを行ない、承諾が得られなかった症例は1例のみで、術前十分な説明

をすれば、承諾は比較的容易に得られると思われる。しかし、患者の心理を熟慮すると、これから手術をしてもらう外科医に肝組織の提供を依頼された場合、自由意思に基づく提供と言う前提があったとしても、患者としては不本意であっても通常は断りにくいのではないだろうか。現場にいる医師の立場としては、出来る限り無言の威圧がかからぬよう細心の注意を払って接しているが、現実問題として患者に対する何らかの圧力が僅かたりともかかっている可能性を認識すべきであると考え。このような点を加味して、インフォームド・コンセントを取得する際にどのような立場の人間が説明、同意を得るかが今後の課題となるであろう。特に、このような試験研究用のヒト臓器・組織の提供に関しては、コーディネータのような中立の立場の者が行なう方法も今後検討する必要があると考える。また、このような背景を勘案すると、提供された組織を無駄なく、有効に利用することこそが、患者の誠意に答えることになると思われる。一方、患者、家族においては、このような臓器・組織の提供に関する依頼をすると、研究目的の為の組織の採取のために通常行なう手術よりも大きく切除されるのではないかという懸念が常にあり、この点に関して、術前説明に十分時間をかけて、病変部を切除するための必要最小限の範囲の切除であることを患者が納得できるまで丁寧に説明する必要がある。また、同時に非病変部の切除量が術式の選択により当初予定していたものよりも少なければ、承諾を得ていても、肝組織が利用出来ない場合もあることを説明する必要性も考えられた。実際に、本研究においても、1例であるが非腫瘍部の組織量が少なく、対象から除外された症例があった。

最近の肝癌治療法においては、過去に通常行なわれていた切除のみの施行とは異なり、肝癌に対する集学的治療（エタノール注入療法やマイクロ波凝固療法等の併用）や手術操作（血行遮断）が行なわれ、肝組織が物理的、化学的变化を受けている場合があり、研究目的で使用する場合、提供材料として適さないことがある。当科においても臨床研究の一環として肝癌に対して、複数本の電極を同時に刺入後、マイクロ波

凝固療法を施行した後に、肝切除を行った症例があり、また、肝切除後の残肝機能を高めるために、術前門脈右枝塞栓術を施行した症例があり、これら症例も著しい物理的变化を引き起こしている可能性が考えられたため、対象からは除外された。

また、本検討では担当者が少なく、手術日と学会等が重なった場合などは手術材料が利用できないことがあったが、この点に関して、ヒト組織の供給体制を整えば、人的問題は解決されるものと思われる。

現在、肝臓に対する治療として肝切除の他に経皮的エタノール注入療法やマイクロ波凝固療法などの非侵襲的治療が行われているが、技術の向上により、これらの治療の増加が予想される。このような治療法の進歩に伴い、肝切除は減少することはあっても、決して増加する可能性は少ないであろう。このような今後の現場での展望を考えると、先述の如く、提供された組織を無駄なく、有効に利用することが肝要と思われる。この一つの解決策としては病理解剖時に、なるべく早く臓器を摘出し、これを利用することが考えられ、今後、検討すべき問題と思われる。最後に肝臓が切除された時点から試料を伝達するまでに要する時間に関する問題であるが、本検討の第一例目の症例（平成10年度）は、初めてのこともあり、不手際があり現在と比較して若干余分に時間がかかってしまったが、二例目以降は、短時間で研究担当者への伝達が可能であった。また、切除直後に氷浴上に採取する事による温阻血時間の短縮の可能性も充分検討できた。

以上、手術現場における問題点のいくつかについて述べたが、現在のところヒト肝組織利用に際し、我々の行なっている方法においては、特記すべき問題点あるいは、試料採取前後を通して、大きな支障は認められていない。しかし、今後、ヒト組織バンクが運営を開始し、営利的な面が表面化するような事が起きた場合、現在のように容易に患者、家族からヒト組織提供の承諾が得られるかどうかは疑問が残る。この点が正しく理解してもらえよう社会に対する啓発が充分に行なわれないと、ヒト組織バンクの運用は困難なものになる可能性が考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

第2回 HAB 協議会 霊長類機能研セミナー
手術現場からの意見 - 問題点の明確化 -
伊藤洋二 (1999年11月30日、東京)

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
－手術材料の研究利用に対する信頼性・有用性に関する検討－
（ミクロソーム画分を用いての検討）

分担研究者：安原 一 昭和大学医学部第二薬理学教室
協力研究者：倉田知光、西村有希、岩瀬万里子、李 華
昭和大学医学部第二薬理学教室

研究の要旨

我々は、平成 11 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において 11 例の臓器・組織の一部摘出を受ける患者より自由意思のもと提供された臓器・組織（転移性肝癌 4 例、肝細胞癌 7 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考慮して、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 8 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像に関する検討を行った。転移性肝癌試料では、正常部位における CYP 各分子種の活性は、米国 NDRI より供給されたヒト肝プールドミクロソームと比較して、CYP2C19 で著明な低値を示し、一方、CYP2D6 で約 4 倍、CYP2C9 で約 2 倍の高値を示した以外は、平均 20% から 50% 程度の低値を示した。また、各部位における活性は、CYP1A2 活性が辺縁部で正常部より約 10% の低下を示し、腫瘍部位では、正常部位の約 40% の活性を示した。また、CYP2C9、CYP2D6、CYP2E1 および CYP3A4 においては、正常部位と比較して腫瘍辺縁部で、各分子種とも平均値で約 10% の低下が示された。一方、原発性肝癌試料では、正常部位における CYP 各分子種の活性は、ヒト肝プールドミクロソームと比較して、CYP2C19 で著明な低値を示し、約半数の例ではほぼ完全な活性の消失が認められた。また、CYP2C9 で約 2 倍の高値を示した以外は、平均 20% から 50% 程度の低値を示した。さらに、各部位における活性は、CYP1A2 は正常部位と腫瘍辺縁部ではほぼ同等の活性を示したが、CYP2C9、CYP2C19 で約 15% の低下、CYP2D6、および CYP3A4 では約 30% の活性低下が認められた。肝細胞癌患者より提供された試料は、転移性肝癌患者の試料と比較し、若干活性低下が著しい可能性が示された。また、肝臓切除中の虚血状態に関して、術中に施行される血管閉塞時間と活性および切除後の温阻血時間と活性の関連性について検討した結果、両者間において有意な相関性は認められず、今回提供された肝臓試料では 20 分以内の温阻血状態および、手術中 15 分の阻血、5 分の再灌流を 5 回まで行った場合においても、著明な活性低下は引き起こされないことが示唆された。我々の検討した 11 例の癌患者より提供された肝臓試料の活性評価の結果、各肝臓の有する各種 CYP 分子種活性の分布は極めて広範に渡り、また、1 患者から提供される肝臓の量が少量であることを勘案すると、個々の肝臓を用いての検討よりはむしろプールドミクロソームの形で使用することにより有用性をさらに向上させ得る可能性が示された。

分担研究者：安原 一
協力研究者：倉田知光
西村有希
岩瀬万里子
李 華
昭和大学医学部第二薬理学教室

A. 研究目的

薬物代謝に関する研究や、毒性、安全性に関する研究には、ヒト臓器・組織での検討が不可欠である。欧米で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ことが可能であるが、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二次的に得られる。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。また、手術は患者の予後を勘案しその外科的侵襲による負担を最小限に留めるため、治療に必要な最小限の切除が行われることが基本にあり、切除に伴って二次的に得られる非病巣部は少ないにこしたことはない。

このような、貴重な試料を有効に活用するためには、病巣を含めた種々の部位での薬物代謝酵素活性、含量の把握は重要である。このような理由から、我々は、手術材料を有効利用するための基礎的検討を目的とし、提供された手術材料の各部位での代表的 CYP 分子種活性、含量の検討を行い、手術に伴う種々の影響との関連性について精査した。

B. 研究方法

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、エトキシレゾルフィン、ワルファリン、メフェニトイン、デブリスロキン、クロルゾキサゾン、ミダゾラム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。

B-1 使用薬物

テストステロン、メチルテストステロン、ニトラゼパムは和光純薬（株）より、6-

ヒドロキシテストステロン、1'-ヒドロキシミダゾラムは、住化分析センターより、-NADPH、G-6-P、G-6-PDH はオリエンタル酵母（株）より入手した。ミダゾラムは日本ロシュ（株）より供与された。

B-2 酵素試料調製法

提供された肝臓は、腫瘍部位、腫瘍辺縁より 1 cm (辺縁部) および腫瘍辺縁より 1 cm 以遠(正常部)の 3 部位に分割した。それぞれ肝臓に約 4 倍量の 1.15% KCl を加え、ヒスコトロンにて氷浴中、30 秒間 2 回ホモジナイズし 20% ホモジネートを調製した。得られたホモジネートを 9,000 x g で 20 分間遠心分離後、さらにその上清を 105,000 x g で 90 分間超遠心分離した。得られたミクロソーム画分をタンパク量として 20~30mg/ml となるように 0.1 M Na-K リン酸緩衝液 (pH 7.4) で懸濁し酵素材料とし、以後の実験に供した。これらの操作は全て氷浴上 4℃ 以下で行った。

B-3 酵素活性測定法

B-3-1 カフェイン脱メチル化活性測定法

200 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.4) 0.1 mL, 10 mM MgCl₂ 0.1 mL, 20 mM β -NADPH 0.1 mL、及び、Human liver microsomes 200 μ g/0.1 mL, 50 mM カフェイン 0.1 mL 加え反応系を作成した。37℃、20 分間反応後、後述の抽出測定法に従い、カフェイン主要代謝物の定量を行い活性を算出した。

1,7-Xanthine 抽出法

反応系に内部標準物質として、8-chlorotheophylline 0.1 mL 及び、抽出溶媒としてクロロホルム：イソプロパノール (85:15) 5 mL、0.2 M HCl (0.5 mL) を添加し、1 分間激しく攪拌し抽出を行った。その後、1,800 x g にて 10 分間遠心分離後、有機層を新たな試験管に分取し、45℃ にて溶媒を窒素乾固した。残渣にメタノール 0.1 mL を加え、超音波にて溶解後、HPLC 移動相 0.1 mL を加え希釈後、その 20 μ L を HPLC で分析した。なお、検量線の作成は濃度既知の 1,7-Xanthine 液を反応系最終濃度として、0、0.1、0.25、0.5、1、2.5、5、

10 nmol/tube となるように添加し同様に操作した。また、1,7-Xanthine の定量計算は、内部標準物質と試料のピークの高さの比を用い検量線により求めた。

HPLC 条件

HPLC 装置としてトーソー株式会社製 HPLC システム (System controller ;CO 8010, Auto sampler ;AS 8000, Pump; CCPM , Column oven ; CO 8010, detector; UV 8010) およびデータ解析装置として Shimadzu 社製、C-RA4 integrator を使用した。カフェイン及びその代謝物の分離は、Capcellpak C18 SG120 を用いた。移動相として 0.1 M NaHPO₄:Methanol (5:1) を用いた。流速 1.0 mL/min、カラム温度 35 °C、検出波長 273 nm にて行った。

B-3-2 エトキシレゾルフィン脱エチル化酵素活性測定法

80 mM K₂HPO₄ buffer (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 200 µg microsomal protein, NADPH generating system (5 mM G-6-P, 0.6 mM NADP, 1U G-6-P DH) を含む total volume 475 µL の反応系を作成し、37 °C で 1 分間 pre-incubate した。反応系に 40 µM エトキシレゾルフィン 25 µL を添加し 37 °C、15 分間の incubation 後、氷冷により反応を停止した。反応停止後、ice-cold methanol 2 mL を加えて除タンパクし、1,800 × g、10 分間冷却遠心分離をした。得られた上清 2 mL を蛍光分光光度計 (F-2000 Hitachi, Tokyo, Japan) を用いて励起波長 530nm、蛍光波長 585 nm における代謝物であるレゾルフィンの蛍光強度を測定した。

B-3-3 ブフラロール 1 位水酸化活性測定法

90 mM Na-K phosphate buffer (pH 7.4) 0.09 mL、0.5 mM MgCl₂ 0.015 mL、1 mM β-NADPH 0.015 mL、及び、Human liver microsomes 1000 µg/0.015 mL、10 µM ブフラロール 0.015 mL 加え反応系を作成した。37°C、15 分間反応後、60%過塩素酸 15 µL を添加し反応停止を行った。

2-3 ブフラロール 1 位水酸化物抽出法

反応系を除タンパクのため 7500×g、5 分

間遠心分離し、その上清 20 µL を HPLC で分析した。なお、検量線の作成は濃度既知の 1 水酸化ブフラロールを添加し同様に操作した。

HPLC 条件

HPLC 装置としてトーソー株式会社製 HPLC システム (System controller ;CO 8010, Auto sampler ;AS 8000, Pump; CCPM , Column oven ; CO 8010, detector; UV 8010) およびデータ解析装置として Shimadzu 社製、C-RA4 integrator を使用した。カフェイン及びその代謝物の分離は、Capcellpak C18 SG120 を用いた。移動相として 0.1 M NaHPO₄:Methanol (5:1) を用いた。流速 1.0 mL/min、カラム温度 35 °C、検出波長 273 nm にて行った。

B-3-4 S-ワルファリン 7 位一水酸化酵素活性検討法

44.5 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.4) 157.5 µL、4 mM MgCl₂ 25 µL、10mM β-NADPH 25 µL、5 µM S-ワルファリン 2.5 µL 及び、Human liver microsomes 200 µg/tube となるように加え 250 µL の反応系を作成した。

S-ワルファリン 7 位一水酸化物抽出法

上述の反応系を 37 °C、30 分間インキュベーション後氷冷により反応を停止した。反応系に 60%過塩素酸を添加し、除タンパク後、1,800×g にて 10 分間遠心分離した。得られた上清 50 µL を試料とし、生成した S-ワルファリン 7 位一水酸化物を HPLC で定量した。

HPLC 条件

HPLC 装置としてトーソー株式会社製 HPLC システム (System controller ;CO 8010, Auto sampler ;AS 8010, Pump; CCPM , Column oven ; CO 8010) 検出器として蛍光検出器 FL 8010)、データ解析装置として Shimadzu 社製、C-R7A integrator を使用した。ワルファリンおよびその代謝物の分離は、Capcellpak C18 SG120 (4.6 mm×150 mm) を用いた。移動相として 0.5% H₃PO₄:Acetonitrile (62:38) を用いた。流速 1.2 mL/min、カラム温度 35 °C にて分離を行っ

た。代謝物の検出は励起波長 315 nm、蛍光波長 415 nm にて行った。

B-3-5 S-メフェニトイン 4 位-水酸化酵素活性検討法

89 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.4) 187.5 μ L、4 mM MgCl₂ 25 μ L、1 mM β -NADPH 25 μ L、100 μ M S-メフェニトイン 2.5 μ L 及び、Human liver microsomes 50 μ g/tube となるように加え 250 μ L の反応系を作成した。

S-メフェニトイン 4 位-水酸化物抽出法

上述の反応系を 37 $^{\circ}$ C、60 分間インキュベーション後氷冷により反応を停止した。反応系に内部標準物質として phenobarbital 2 μ g を添加した。その後、100 μ L acetonitrile を添加し、除タンパクした後、1,800 \times g にて 10 分間遠心分離した。得られた上清 40 μ L を試料とし、生成した S-メフェニトイン 4 位-水酸化物を HPLC で定量した。

HPLC 条件

HPLC 装置としてトーソー株式会社製 HPLC システム (System controller ;CO 8010, Auto sampler ;AS 8010, Pump; CCPM , Column oven ; CO 8010, detector; UV 8010) およびデータ解析装置として Shimadzu 社製、C-R7A integrator を使用した。メフェニトインおよびその代謝物の分離は、Capcellpak C18 AG120(4.6 mm \times 250 mm) を用いた。移動相として 0.05M potassium phosphate buffer(pH 4.0): acetonitrile (75:25) を用いた。流速 0.8 mL/min、カラム温度 25 $^{\circ}$ C にて分離を行った。代謝物の検出は 204 nm にて行った。

B-3-5 クロルゾキサゾン 6 位-水酸化活性測定法

100 mM Sodium potassium phosphate buffer (pH 7.4) 20 μ L、3.4 mM MgCl₂ (441.6 μ M β -NADPH 含有) 10 μ L、及び、Human liver microsomes 200 μ g/0.01 mL、50 μ M クロルゾキサゾン 0.17mL 加え反応系を作成した。

37 $^{\circ}$ C にて 20 分間反応後、43% リン酸 50 μ L を添加し反応停止した。反応により生

成したクロルゾキサゾン代謝物の定量を後述の抽出測定法に従って行い、活性を算出した。

6 位-水酸化クロルゾキサゾン抽出法

反応停止後の反応系に内部標準物質として、7 β -hydroxypropyltheophylline 0.05 mL 及び、抽出溶媒としてジクロロメタン:イソプロパノール (90:10) 4 mL を添加し、2 分間激しく攪拌し抽出を行った。その後、1,800 \times g にて 10 分間遠心分離後、有機層を新たな試験管に分取し、45 $^{\circ}$ C にて溶媒を窒素乾固した。残渣にメタノール 0.1 mL を加え、超音波にて溶解後、HPLC 移動相 0.1 mL を加え希釈後、その 20 μ L を HPLC で分析した。なお、検量線の作成は濃度既知の 6 位-水酸化クロルゾキサゾンを添加し同様に操作した。

HPLC 条件

HPLC 装置としてトーソー株式会社製 HPLC システム (System controller ;CO 8010, Auto sampler ;AS 8010, Pump; CCPM , Column oven ; CO 8010, detector; UV 8010) およびデータ解析装置として Shimadzu 社製、C-R7A integrator を使用した。クロルゾキサゾン及びその代謝物の分離は、Capcellpak C18 SG120 を用いた。移動相として 0.1%酢酸含有 10% ethanol を用いた。流速 0.8 mL/min、カラム温度 35 $^{\circ}$ C、検出波長 300 nm にて行った。

B-3-6 ミダゾラム 1'-水酸化酵素活性の検討法

チューブに 192 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.4) 65 μ L、40 mM MgCl₂ 20 μ L、1 当量の HCl に溶解して調製した 100 μ M Midazolam 20 μ L、NADPH generating system (8 mM β -NADPH、4 mM G-6-P、G-6-P DH 0.5 U/25 μ L in 100 mM potassium phosphate buffer) 25 μ L、human liver microsomes 100 μ g/tube となるように添加した反応系 200 μ L を作成した。

1'-水酸化ミダゾラム測定法

反応系は、37 $^{\circ}$ C、5 分間インキュベーションし後氷冷により反応停止を行った。氷冷メタノール、アセトニトリル混液 (35:

21) 200 μ L を反応系に添加し、除タンパクを行った。内部標準物質として、75 μ M ニトラゼパム含有メタノール 10 μ L を添加し、15,000 \times g にて 10 分間遠心分離後、その 40 μ L を HPLC で測定した。なお、検量線の作成は濃度既知の 1'-ヒドロキシミダゾラムを既述の反応系に最終濃度として 0、0.08、0.4、2 nmol/tube となるように添加し、同様に操作した。また、1'-ヒドロキシミダゾラムの定量計算は、絶対検量線法にて行った。検量線は $y = 2120.6x + 326.42$ 、信頼計数 $r^2 = 0.999$ であった。

HPLC 条件

HPLC 装置として日本分光株式会社製 HPLC システム (System controller, 802-SC, Autosampler 851-AS, Pump 880-PV, degasser 880-50, Column oven, 860-CO) および検出装置として、Shimadzu 社製 UV detector SPD-6A を用いた。また、データ解析には Shimadzu 社製、C-RA4 integrator を使用した。ミダゾラム及びその代謝物の分離は、Capcellpak C18 SG120 を用いた。Mobile phase として 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4):MeOH+AN(1:1) を Solvent A (70:30)、Solvent B(30:70) を用い solvent 流速 1.0 mL/min、カラム温度 40 $^{\circ}$ C、検出波長 220 nm にて行った。

B-3-7 テストステロン 6 β -水酸化酵素活性検討法

ガラス製試験管に 60 nmol のテストステロン (methanol 溶液) を分取し窒素乾固した。100 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.4) 0.5 mL、15 mM $MgCl_2$ 0.2 mL、10 mM β -NADPH 0.1 mL 及び、Human liver microsomes 100 μ g/ tube となるように加え反応系を作成した。37 $^{\circ}$ C 10 分間 incubate 後、後述の抽出測定法に従いテストステロン 6 β -水酸化物の定量を行い活性を算出した。

6 β -水酸化テストステロン抽出法

各条件に応じた反応系を、37 $^{\circ}$ C、10 分間インキュベートし、氷冷により反応を停止した。内部標準物質として、5 nmol/mL メチルテストステロン含有 methanol 0.1 mL 及び、抽出溶媒としてジクロロメタン 6 mL

を添加し、10 分間激しく攪拌し抽出を行った。その後、1,500 \times g にて 10 分間遠心分離後、有機溶媒層を新たな試験管に分取し、45 $^{\circ}$ C にて溶媒を窒素乾固した。残渣に methanol 0.1 mL を加え、超音波にて溶解後、水 0.1 mL を加え希釈後、その 50 μ L を HPLC で測定した。なお、検量線の作成は濃度既知の 6 β -水酸化テストステロン溶液を反応系最終濃度として、0、0.1、0.25、0.5、1、2.5、5、10 nmol/tube となるように添加し同様に操作した。

HPLC 条件

HPLC 装置として日本分光株式会社製 HPLC システム (System controller ; 802-SC, Auto sampler ; 851-AS, Pump ; 880-PV, degasser ; 880-50, Column oven ; 860-CO) および検出装置として、Shimadzu 社製 UV detector SPD-6A を用いた。また、データ解析には Shimadzu 社製、C-R7A integrator を使用した。テストステロン及びその代謝物の分離は、Capcellpak C₁₈ SG120 (Shiseido) を用いた。移動相として Solvent A (methanol : 水 : acetonitrile = 39 : 60 : 1)、Solvent B (methanol : 水 : acetonitrile = 80 : 18 : 2) を用い、Solvent B を 10% から 70% まで 40 分間かけ直線的な濃度勾配により分離した。流速 1.0 mL/min、カラム温度 40 $^{\circ}$ C、検出波長 254 nm にて行った。

B-4 酵素含量測定法

ミクロソーム画分懸濁液 (2 mg/ml) を同量の 30% ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) 含有可溶化液と混和し、沸騰水浴中 5 分間加熱することにより可溶化し電気泳動用試料とした。SDS-PAGE プレートは、以下に示す組成で作成し (分離ゲル : 30% アクリルアミド (0.8% BIS 含有) 10 ml、0.75M Tris-HCl (pH 8.8) 15 ml、蒸留水 2.9 ml、10% SDS 0.1 ml、75 mg/2.5 ml APS 1.5 ml、2.5% TEMED 0.3 ml。濃縮ゲル : 30% アクリルアミド (0.8% BIS 含有) 1 ml、0.25 M Tris-HCl (pH 6.8) 5 ml、蒸留水 3.3 ml、10% SDS 0.1 ml、75 mg/2.5 ml APS 0.5 ml、2.5% TEMED 0.1 ml) 電気泳動を行った。泳動用緩衝液として SDS-トリグリシン緩衝液を用い、試料 5 μ l ずつをゲルに注入後、室温で 20 mA/枚で約 2 時間通電した。その後、ゲルを PVDF

膜に密着させ転写装置にセットし、50 mA /gel で1時間通電し転写した。転写後、転写膜は5%スキムミルク含有PBS室温で1時間インキュベートしブロッキングを行った後、各種P450抗体液中室温で1時間インキュベートし一次抗体反応を行った。反応後非特異的吸着抗体を除去するため0.1% Tween 20 含有PBSで洗浄した。さらに、アルカリホスファターゼ標識抗ヤギIgG ウサギ抗血清(0.5%スキムミルク含有PBSで5,000倍希釈)中で1時間インキュベートし、二次抗体反応を行った。その後0.1% Tween20 含有PBSで洗浄後、BCIP/NBTにて発色し、各種CYPタンパクの確認を行った。

B-5 タンパク定量法

タンパク定量は、Lowry法に従って行った。即ち、マイクロソーム画分懸濁液を251倍希釈後、その0.5 mLをガラス製試験管に分取し、Biuret試液(2% Na₂CO₃ in 0.1 M NaOH: 1% Na-K tartrate 0.5% CuSO₄ · 5H₂O (50:1)) 2.5 mLを添加した。10分間放置後Folin-phenol試液(Phenol試液を2倍希釈したもの) 0.25 mLを加え直ちに攪拌し、30分以上放置後、750 nmにおける吸光度を測定し、タンパク定量を行った。また対照は、精製水、標準には、100 μg/mL bovin serum albuminを用い同様の操作を行った。

C. 研究結果

今回提供された肝臓は、転移性肝癌(4例)及び原発性肝癌(7例)の計11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。

C-1 各肝試料の各種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、腫瘍部位から1 cm以内(腫瘍辺縁部)および1 cm以遠(正常部)の3部位に分割し、上述の8種基質に対する代謝活性を測定した(図1)。また、癌種による差が認められるか否かを検討するため、原発性肝癌と転移性肝癌に分別し検討した。(図2、表1)

1) 転移性肝癌試料

転移性肝癌試料(HL1, HL5, HL8, HL11)では、正常部位におけるCYP各分子種の活性は、米国NDRIより供給されたヒト肝プールドマイクロソームと比較して、CYP2C19で1例のみ約50%程度の活性を示した以外は著明な低値を示し、平均約10%程度の活性を示した。一方、CYP2D6で約4倍、CYP2C9で約2倍の高値を示した以外は、平均20%から50%程度の低値を示した。また、各部位における活性は、CYP1A2は正常部位と腫瘍辺縁部でほぼ同等の活性を示したが、CYP2C9、CYP2C19で約15%の低下、CYP2D6、およびCYP3A4では約30%の活性低下が認められた。また、腫瘍部位における各分子種の酵素活性は、CYP1A2で正常部位の約20%、CYP2C9で正常部位の約30%の残存活性が認められたほかは、全て15%以下であった。特に、CYP2C19、CYP3A4ではほぼ完全な活性の消失が認められた。(図2中赤丸で表示)

2) 原発性肝癌試料

原発性肝癌試料(HL2, HL3, HL4, HL6, HL7, HL9, HL10)では、正常部位におけるCYP各分子種の活性は、ヒト肝プールドマイクロソームと比較して、CYP2C19で著明な低値を示し、平均値として約5%程度の活性を示したのみであり、また、約半数の例でほぼ完全な活性の消失が認められた。一方、CYP2C9では約2倍の高値を示し、これら以外の分子種においては、転移性肝癌同様平均20%から50%程度の低値を示した。また、各部位における活性は、CYP1A2活性が辺縁部で正常部より約10%の低下を示し、腫瘍部位では、正常部位の約40%の活性を示した。また、CYP2C9、CYP2D6、CYP2E1およびCYP3A4においては、正常部位と比較して腫瘍辺縁部で、各分子種とも平均値で約10%の低下が示された。腫瘍部位における各種CYP分子種活性はCYP2C9で正常部位の約50%、CYP3A4で約40~50%の高値が示された。また、CYP2D6、CYP2E1においても約20%の残存活性が示され、転移性肝癌と比較して、全般的に高値が示される傾向にあった。(図2中黒丸で表示)

C-2 肝臓試料摘出および摘出後の温阻血の影響に関する検討

切除された肝臓の切除後の試料処置に要した時間（温阻血時間）と各種 CYP 酵素活性に関する検討を行なった（図3）。各肝臓試料の切除から肝臓を氷冷するまでに要した時間に関してその相関性について検討した結果、各 CYP 酵素共に一貫した相関性は認められず、本年度および前年度行なった11例に関しては少なくとも40分程度以内であれば、ミクロソーム画分での検討に使用するには大きな問題は無いと考えられた。

C-3 切除に伴う肝臓虚血-再灌流の影響に関する検討。

本研究においては、一貫して肝臓切除に伴う出血防止の目的で、手術中15分の血流遮断とその後5分間の再灌流を行なう Pringle 法を施行した。本検討における Pringle 法施行回数は、0回から5回であり、殆どの症例で4回の Pringle 法が施行された（図4）。Pringle 法施行回数と CYP 各酵素活性に関する相関性を検討したところ、Pringle 法施行回数が少ない場合でも残存活性が必ずしも高値を示す事は無く、また、5回の施行においても比較的高活性が維持されている例もあり、5回程度の Pringle 法の施行であれば、酵素活性に対する影響は比較的小さいものと考えられた。

C-4 手術材料と米国 NDRI より提供された脳死患者肝臓試料間での各種 CYP 酵素活性の差異に関する検討。

手術材料は先述のとおり、切除術中の虚血-再灌流の影響や切除後の温阻血の影響さらには手術に伴う麻酔薬等の影響を多く受けている。このような手術材料のもつ背景を勘案し、このような影響が殆ど含まれない脳死患者より提供された肝臓試料を HAB 協議会より供与を受け同様の検討を行ない比較検討した（図1中青線で表示）。その結果、殆どの CYP 酵素では脳死患者より提供（米国 NDRI より供給）された肝臓試料と比較して若干低値を示したものの、平均値（図1中赤線で表示）で比較すると研究に使用するのに十分な残存活性が示された。しかし、CYP2C19 に関しては、肝臓患者より提供された試料では殆どのもので活性が

著しく低下し、脳死患者の試料と比較してその活性は5%以下であった。

D 考察

本研究に使用した肝臓患者より得られた肝臓試料11例（内2例は平成10年度研究分）は、転移性、原発性両肝臓病態を有した臓器ではあるが、今回の検討により比較的良好な状態を有しており研究目的の使用に関してはほぼ十分な質的要件を満たしているものと考えられた。今回の検討においては、肝臓試料の採取は、通常行なわれている治療の延長線上にある臓器の使用が可能であるか否かを評価する事を目的として行なった。そのため、試料採取の為の特別な配慮は全く行なっていない。すなわち、通常の手術で得られる試料の信頼性と有用性の評価を主たる目的として行なった。

今回得られた肝臓試料の各種 CYP 酵素活性をミクロソーム画分酵素源の形で評価したところ、その活性の個体間での活性の分布は、極めて広範なものであった。この活性の分布の要因に関して、術中の虚血-再灌流および切除後の温阻血の影響等を考慮し検討したところ、直接これらの影響を示唆する結果は示されず、本来患者が有している酵素活性並びに病態に起因する要因による可能性が示された。今回の検討においては、Pringle 法の施行回数は5回以内、温阻血時間は最長で40分であり、今回行なった検討の範囲では虚血-再灌流および温阻血の影響は酵素に対しては比較的軽微なものである事が示された。一方、腫瘍部位、腫瘍辺縁部および見かけ上正常と考えられる腫瘍より1cm以遠の部位の3部位でその酵素活性を比較したところ、腫瘍辺縁部においては正常部位と比較して若干低値を示したが、その低下は軽微なものであった。また、癌種による腫瘍辺縁部位の活性低下の程度は、原発性癌でより軽度であった。今回使用した肝臓が比較的肝硬変等を有していないものを使用していた事も関連すると考えられるが、極度の肝硬変患者のものを使用していたならば、転移性肝臓患者由来の試料と比較して低値を示した可能性も考えられる。患者間での活性分布の大きさと、患者1名当たりから採取できる肝臓の両を勘案すると、個々の肝臓を研究利用す

る方法も重要と考えるが、プールドミクロソームのような形をとって使用する事により、より信頼性と有用性を向上しうるものとする。今回の検討結果においては原発性肝癌試料における有用性がより強調される形になるが、原発性肝癌患者の試料に関しては、その多くがウイルス性肝炎等を有しており取り扱いに十分な注意と熟練が必要となる。また、二次感染等の危険性も含んでおり、研究者に対するバイオハザードに関する教育と設備の完備が今後の課題となるであろう。

E 結論

本検討により、これまで比較的否定的に考えられていた手術材料の研究利用に対する信頼性と有用性が確認できた。また、その使用に関しては、患者個々の肝臓を利用する方法も重要な場合はあるが、スクリーニング的に使用するためには、プールドミクロソームの形で使用する事により、有用性、信頼性の向上を計りうるものとする。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

第6回 HAB 協議会学術年会

ヒト肝薬物代謝酵素活性評価 I - 手術材料の有用性と信頼性に関する検討 I -

倉田知光、西村有希、岩瀬万里子 李 華、
鈴木 聡、伊藤洋二、草野満夫、佐藤哲男、
大野泰雄、内田英二、安原 一

(1999年5月、東京)

第20回日本薬物動態学会年会

ヒト肝手術材料の薬物代謝研究への利用に関する検討

倉田知光、西村有希、岩瀬万里子 李 華、
内田英二、安原 一

(1999年10月、浜松)

第12回日本臨床薬理学会

薬物代謝研究におけるヒト肝手術材料の有用性に関する検討

倉田知光、西村有希、岩瀬万里子 李 華、
植田孝子、内田英二、安原 一

(1999年12月、横浜)

第73回日本薬理学会年会

ヒト肝手術材料の薬物代謝研究への利用に関する検討

倉田知光、西村有希、岩瀬万里子 李 華、
安原 一

(2000年3月、横浜)

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

表1 各種CYPの各部位における癌種別活性

		正常部位	腫瘍辺縁部	腫瘍部位
Caffeine	Total	64.77 ± 36.67	58.64 ± 52.97	22.19 ± 30.96
	肝細胞癌	66.90 ± 39.50	58.37 ± 62.39	26.64 ± 37.45
	転移性癌	61.03 ± 36.49	59.11 ± 39.61	14.14 ± 16.24
Ethoxyresorfin	Total	20.85 ± 11.61	18.90 ± 14.29	3.99 ± 3.70
	肝細胞癌	19.83 ± 10.01	17.87 ± 15.34	4.63 ± 4.36
	転移性癌	22.54 ± 16.26	20.60 ± 15.39	2.91 ± 2.69
Warfarin	Total	5.69 ± 3.22	5.00 ± 3.03	2.60 ± 4.06
	肝細胞癌	5.75 ± 4.00	5.17 ± 3.72	3.06 ± 5.01
	転移性癌	5.60 ± 1.54	4.71 ± 1.68	1.79 ± 1.80
Mephenytoin	Total	6.33 ± 12.73	7.60 ± 14.07	0.02 ± 0.08
	肝細胞癌	3.64 ± 4.28	6.27 ± 11.27	0.04 ± 0.09
	転移性癌	11.02 ± 21.39	9.93 ± 19.85	0.00 ± 0.00
Bufuralol	Total	136.95 ± 153.82	109.30 ± 151.18	15.65 ± 17.66
	肝細胞癌	66.66 ± 60.26	61.40 ± 61.17	15.66 ± 19.87
	転移性癌	259.97 ± 199.74	193.11 ± 232.33	15.63 ± 15.83
Chlorzoxazone	Total	529.11 ± 438.29	442.85 ± 362.29	101.94 ± 68.49
	肝細胞癌	591.06 ± 531.96	531.46 ± 437.24	125.48 ± 70.79
	転移性癌	420.70 ± 223.03	287.78 ± 69.09	60.76 ± 45.39
Midazolam	Total	794.74 ± 346.83	658.44 ± 411.52	266.14 ± 384.13
	肝細胞癌	711.60 ± 348.65	617.14 ± 531.05	403.84 ± 439.62
	転移性癌	933.30 ± 363.08	727.28 ± 131.65	37.24 ± 64.51
Testosterone	Total	1320 ± 520	1070 ± 510	300 ± 490
	肝細胞癌	1160 ± 570	1030 ± 630	410 ± 590
	転移性癌	1600 ± 270	1140 ± 230	100 ± 80

データは平均値±SDで表示した。

平均活性はpmol/mg protein/minで表示した。

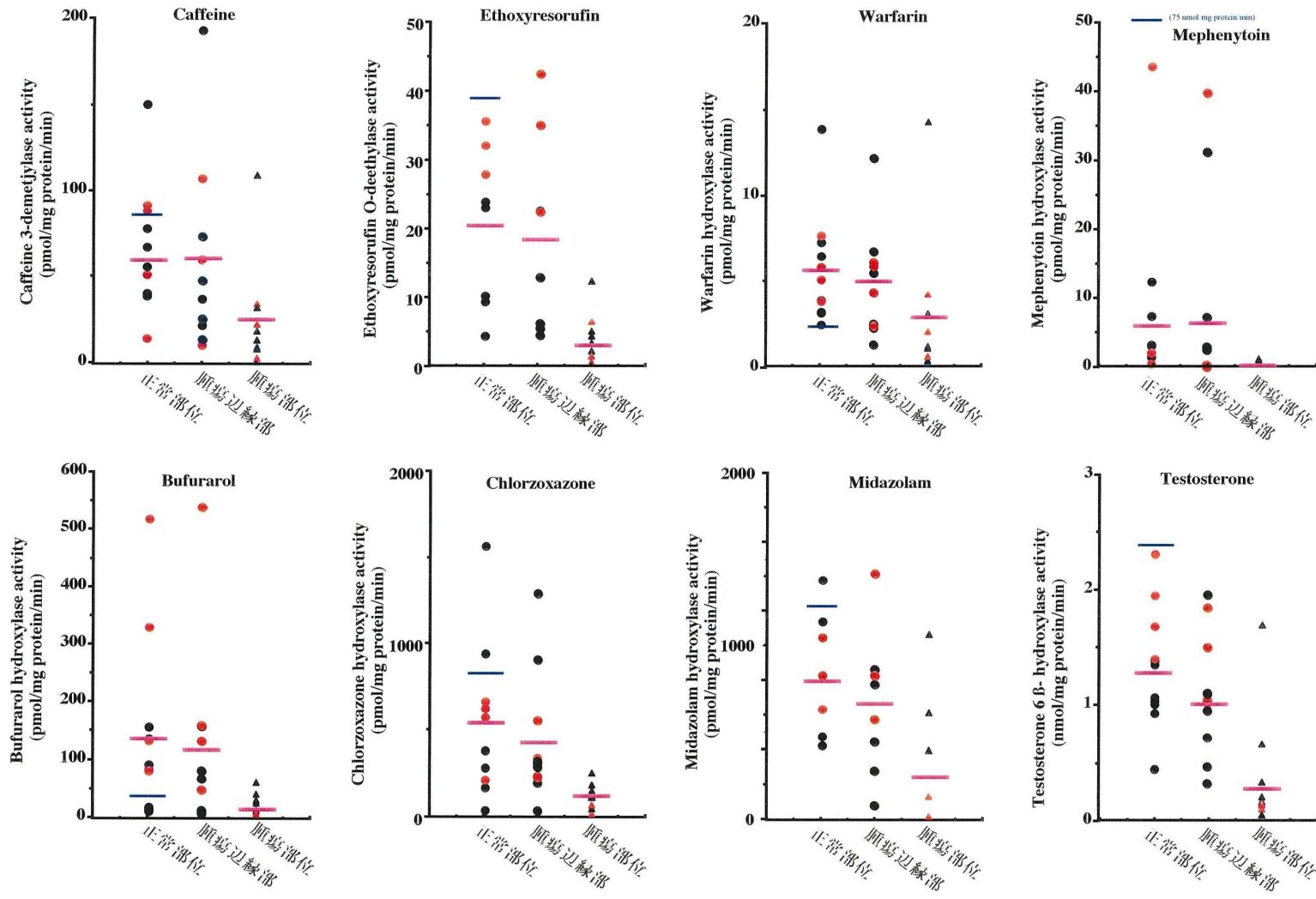


図1 手術材料各部位における各種CYP活性

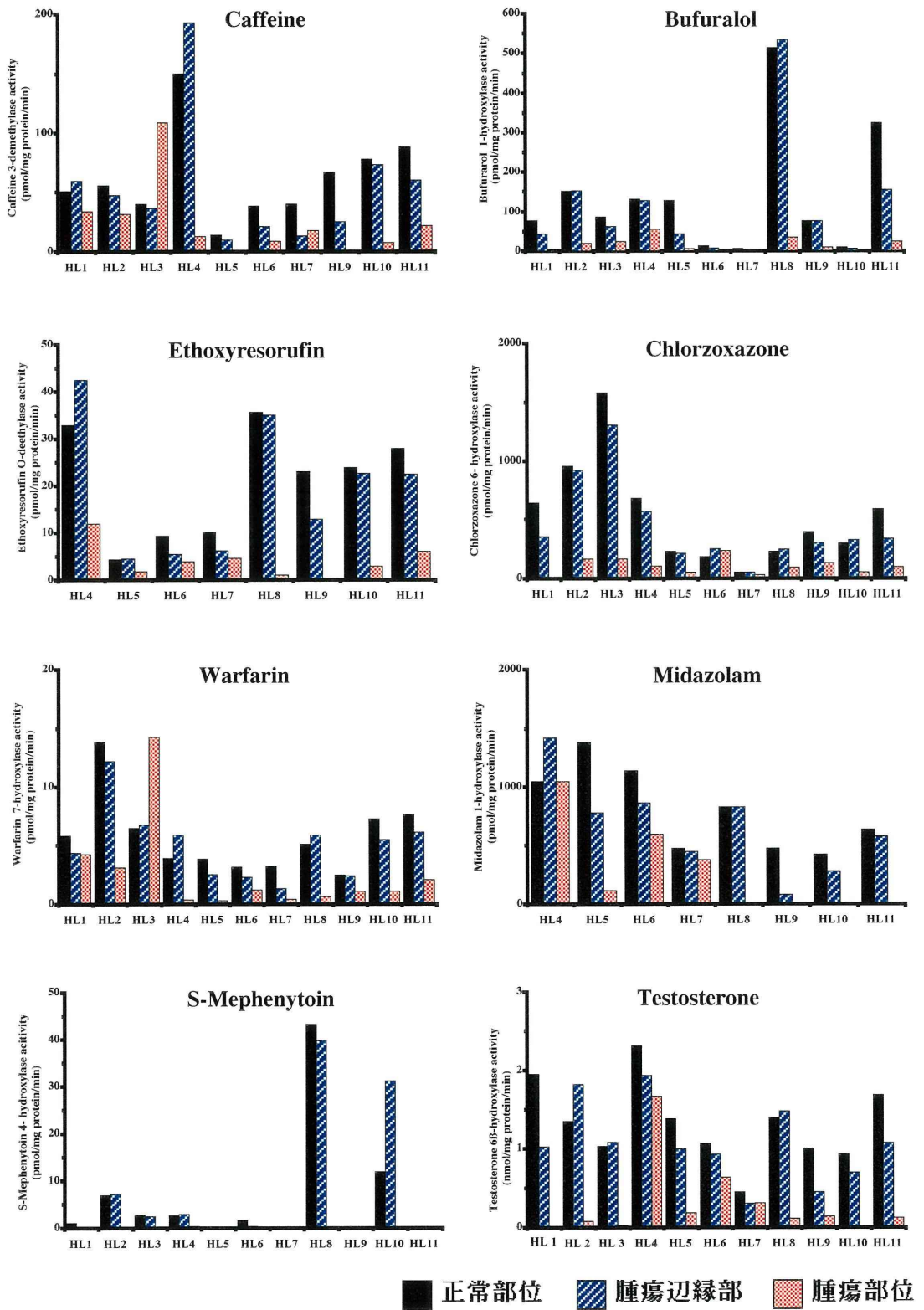


図2 手術材料各試料における各種CYP酵素活性

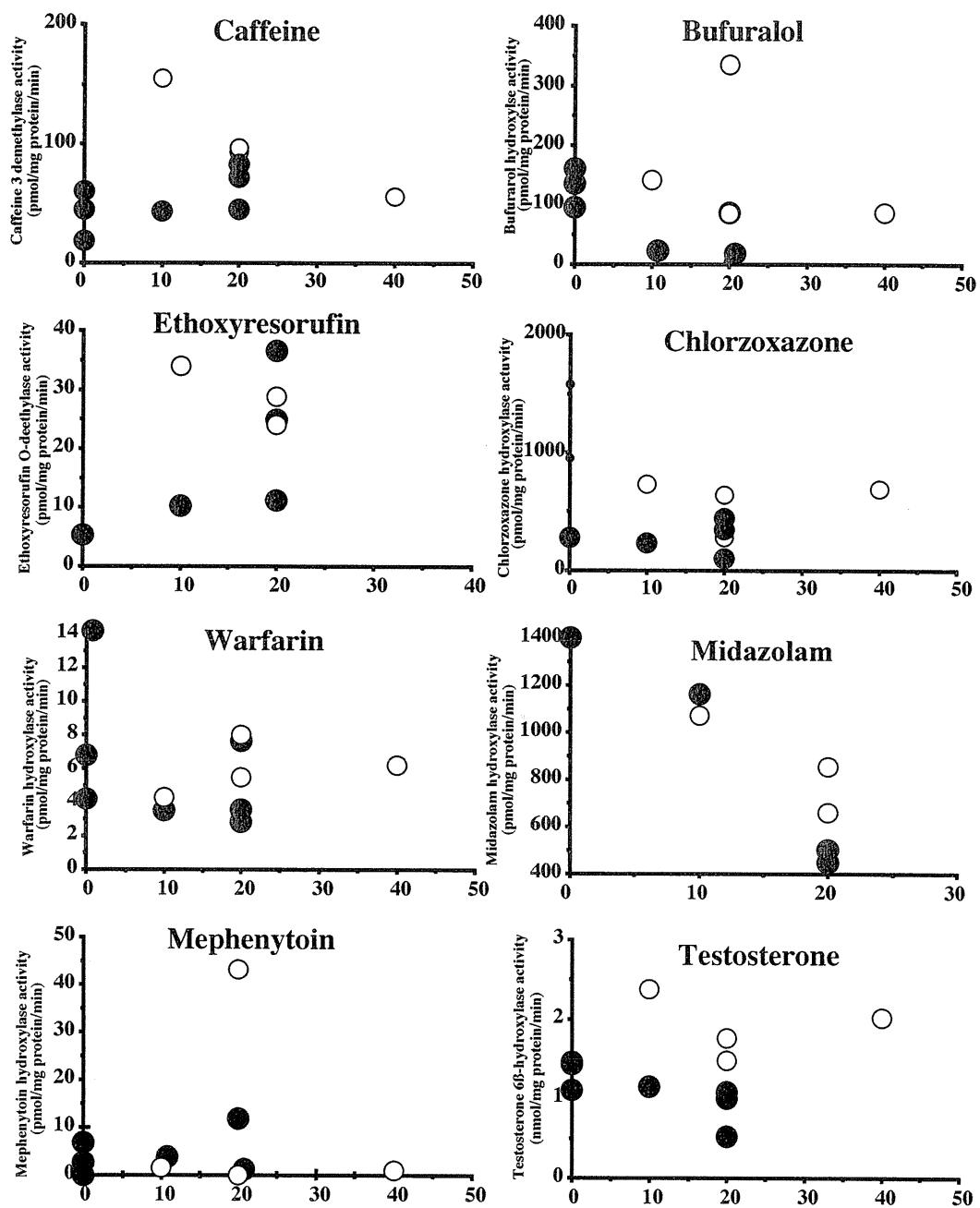


図3 各種CYP分子種活性に及ぼす温阻血時間の影響