

# アルコール性膵炎の実態調査と原因遺伝子の解析

分担研究者 丸山 勝也 国立療養所久里浜病院 副院長

## 【研究要旨】

本年度は、アルコール性膵炎の実態調査および原因遺伝子の解析を行うための準備を行った。

アルコール性膵炎の実態調査に関しては、大量飲酒が確実であるアルコール依存症者における膵炎の罹患率を調査する目的で、全国の断酒会会員にアンケート調査を行うこととし、アンケートの内容を作成し全国の断酒会宛てに送付した。

アルコール性膵炎の原因遺伝子の解析に関しては、倫理規定などを含む研究計画書を作成し班構成員に検体収集の依頼を行った。原因遺伝子としてアルコールによる酸化的ストレスがアルコール性慢性膵炎の原因となるという作業仮説のもと、細胞毒性物質を無害化する第二相解毒酵素の遺伝子として Glutathione S-Transferase M1 (GSTM1)、Glutathione S-Transferase Theta 1 (GSTT1)、NADPH-Quinone Oxidoreductase 1 (NQO1)、NRH-Quinone Oxidoreductase 2 (NQO2)、N-Acetyl transferase (NAT) を、また膵炎発症の一因子となる高中性脂肪に係る遺伝子として Lipoprotein lipase (LPL) および アポリポ蛋白C-II (アポC-II) 遺伝子をターゲットにして、その遺伝子変異とアルコール性膵炎との関連研究を行うこととした。また既に遺伝性膵炎と有意な因果関係について報告されている cationic trypsinogen (PRSS1)、pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI)、CFTR の3種類の遺伝子および遺伝子群についても検討することとした。

## A. 研究目的

I. アルコール性膵炎の発症頻度：わが国における1995年の厚生省全国集計調査<sup>1)</sup>によると、慢性膵炎のうち飲酒に起因すると考えられるものは約55%で、特に男性では約67%と高率であり、また急性膵炎でも約40%がアルコール性であることが報告されている。また急性膵炎を重症度判定により重症と中等度に限定してみると、その成因にアルコールが他の原因よりも高頻度(46%)に見られ、その致死率も20%に上っていると報告されているように、膵炎の発症にアルコールの多飲が関与していることは明らかである。Haberら<sup>2)</sup>は上記の量および年数の大量飲酒者の中から慢性膵炎を発症する割合は5%以下と報告している。またわが国では1%以下と試算するものもみられる<sup>3)</sup>。しかしアルコール多飲者におけるアルコール性膵炎の発生頻度については未だ明らかにされていない。そこでアルコール性膵炎の発症頻度を明らかにする目的で、アルコール多飲者における膵炎の発症頻度について調査する。

II. アルコール性膵炎の原因遺伝子の解析：アルコール性膵炎の発症に長期の大量飲酒が必要条件ではあるが、大量飲酒者がすべて慢性膵炎になる訳ではなく個人差が大きい。そこでアルコール性膵炎の原因遺伝子について明らかにする目的で、原因となりうる種々の遺伝子の変異について解析する。

## B. 研究方法

### I. アルコール性膵炎の実態調査

対象：本来は日本国民全員における飲酒量調査と膵炎の罹患率について住民調査を行うのが理想だが、そのような調査は現実には不可能であるので、対象を大量飲酒が明らかな全日本断酒連盟の男性会員とする。

調査方法：全日本断酒連盟からの依頼状を添えて各地の断酒会会員へアンケート調査用紙を送付する。

調査項目：年齢、住所(県名のみ)、飲酒を開始した年齢、飲酒量、飲酒期間、断酒開始年齢、酒のつまみの種類と量、膵炎罹患の有無とその年齢およびその診断名(アルコール性か胆石性か・急性膵炎か慢性膵炎か)、その際の腹痛の有無・下痢の有無、症状の発生頻度(飲酒中および断酒後)。

解析方法：アンケート用紙を集計し、各県における男性断酒会員の数に占めるアルコール性膵炎の頻度を調査する。また各年齢における頻度についても調査する。最後に5合以上飲酒者が240万人存在すると言われている日本全体におけるアルコール性膵炎の頻度について推測する。

倫理面への配慮：アンケート調査はすべて無記名としたので個人情報漏れることはない。またアンケート調査も地区の断酒会を通して行っているため、郵便によりアルコール症の専門病院である国立療養

所久里浜病院の名前が会員と関係していることも知れることはない。

## II. アルコール性膵炎の原因遺伝子の解析

対象：アルコール性慢性膵炎患者を対象とし、その対照として非アルコール性慢性膵炎患者、明らかな膵障害のないアルコール依存症者、健康人を置く。

方法：アルコール大量飲用が強度の細胞への酸化ストレスを誘発し、その結果生じるスーパーオキシドや細胞毒性物質がDNA損傷や細胞変性を起こさせる可能性がある。そこで今回は、アルコールによる酸化ストレスがアルコール性慢性膵炎の原因となるという作業仮説のもと、細胞毒性物質を無害化する第二相解毒酵素の遺伝子変異とアルコール性膵炎との相関研究を行うこととした。第二相解毒酵素としては glutathione S-transferase M1 (GSTM1)<sup>40)</sup>、glutathione S-transferase theta 1 (GSTT1)<sup>41)</sup>、NADPH-quinone oxidoreductase 1 (NQO1)<sup>42)</sup>、NRH-quinone oxidoreductase 2 (NQO2)<sup>43)</sup>、N-acetyl transferase (NAT)<sup>44)</sup> をターゲットにして、アルコール性膵炎患者と膵機能障害のないアルコール依存症患者、さらに非アルコール性膵炎、および健康対照者の遺伝子多型を polymerase chain reaction-direct sequencing (PCR) 法により解析する。両群における多型性変異の頻度の違いを統計学的手法により分析し、疾患に対する遺伝的脆弱性因子を見出すことを目的とする。

Lipoprotein lipase (LPL)<sup>78)</sup> および アポリポ蛋白 C-II (アポC-II)<sup>79)</sup> 遺伝子変異による欠損症により血中トリグリセリド (TG) は高値となる。高TG血症は膵炎の原因の一つであり、I型またはV型家族性高脂血症ではしばしば急性膵炎を合併する。一方、アルコール過飲は血中TGの上昇を来すことより、アルコール性急性膵炎では高トリグリセリド血症のみられることが多い。高TG血症がアルコール性膵炎の結果として生じる可能性もあるが、LPL欠損による家族性高脂血症ではアルコール過飲が膵炎の誘因と考えられている。そこでこれらの遺伝子についても上記の遺伝子同様検討を行う。

また既に遺伝性膵炎と有意な因果関係について報告されている cationic trypsinogen (PRSS1)<sup>10)</sup>、pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI)<sup>11)</sup>、CFTR<sup>12)</sup> の3種類の遺伝子および遺伝子群についても、その遺伝子異常とアルコール性膵炎との関連について検討する。

倫理面への配慮：以下に示す研究計画書に書かれているように、倫理面の配慮は充分である。またこの研究に関しては個々の班構成員の施設における倫

理委員会において承認をとるよう依頼している。

## C. 研究結果

I. アルコール性膵炎の発症頻度：本年度は資料1に示すアンケート調査票を作成し、全日本断酒連盟の男性会員に送付した。

## II. アルコール性膵炎の原因遺伝子の解析

資料2に示す研究計画書を作成し、班構成員全員に送付しアルコール性慢性膵炎および非アルコール性慢性膵炎患者からの検体収集を依頼した。

## D. 考察

### I. アルコール性膵炎の発症頻度

対象として全国の全日本断酒連盟の男性会員を選択したが、断酒会員以外にも大量飲酒者は存在するので、今回の調査によりアルコール性膵炎の発生頻度が明らかになるわけではない。しかしある程度の目安となるのではないかと考えられる。ただ、今回のアンケート調査においてどの位回答が得られるか回収率の程度についての問題が生ずる可能性がある。また回収された中から、それぞれの地区におけるアルコール性膵炎の頻度、および年齢構成などについて検討が必要だが、構成員の人数が解析に充分ではない地区が存在するのでこれらについても問題が生ずる。そこでこれらのデータ解析について、今後班員の意見を参考としたい。

### II. アルコール性膵炎の原因遺伝子の解析

今回選択した遺伝子は全部で10種類と多いが、必ずしもこれらの遺伝子のうちにアルコール性膵炎の原因遺伝子があるとは限らない。またすべての解析が16年3月までに終了するとは限らないので、それ以降も研究を継続する必要がある。

## E. 結論

本年度は二種の研究(I. アルコール性膵炎の発症頻度、およびII. アルコール性膵炎の原因遺伝子の解析)を行うための準備を行った。

## F. 参考文献

- 1) 林 櫻松, 玉腰暁子, 大野良之, 川村 孝, 若井建志, 青木利恵, 千田雅代, 松野正紀, 早川哲夫, 成瀬 達, 北川元二, 橋本修三, 藍沢茂雄, 蓑輪眞澄, 稲葉裕. 慢性膵炎の全国疫学調査成績. 厚生省特定疾患難病の疫学調査研究班平成7年度研究業績 1995; 81-5.
- 2) Harber P, Wilson J, Apte M, Korsten M, Pirola R. Individual susceptibility to alco-

holic pancreatitis: still an enigma. *J Lab Clin Med* 1995; 125: 305-12.

- 3) 中村光男, 丹藤雄介, 柳町幸. 酒の種類は膵炎に関係するか? *医薬の門* 2000; 41: 348-51.
- 4) Chen C, Liu Q, Pui C, Rivera GK, Sandlund JT, Riberio R, Evans WE, Relling MV. Higher frequency of glutathione S-transferase deletions in black children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1997; 89: 1701-7.
- 5) Harada S, Fujii C, Hayashi A, Ohkoshi N. An association between idiopathic Parkinson's disease and polymorphisms of phase II detoxification enzymes: glutathione S-transferase M1 and quinone oxidoreductase 1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288: 887-92.
- 6) Vatsis KP, Martell KJ, Weber WW. Diverse point mutations in the human gene for polymorphic N-acetyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 6333-7.
- 7) 吉田智彦. 家族性リポ蛋白リパーゼ(LPL)欠損症. *日本臨床* 2001; 59: 22-5.
- 8) Bruin T, Tuzgol S, Mulder WJ, van den Ende AE, Jansen H, Hayden MR, Kastelein JJ. A compound heterozygote for lipoprotein lipase deficiency, Val69-->Leu and Gly188-->Glu: correlation between in vitro LPL activity and clinical expression. *J Lipid Res* 1994; 35: 438-45.
- 9) 岡本康幸. アポリポ蛋白C-II欠損症. *日本臨床* 2001; 59: 26-31.
- 10) Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, Martin SP, Gates LK Jr, Amann ST, Toskes PP, Liddle R, McGrath K, Uomo G, Post JC, Ehrlich GD. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet* 1996; 14: 141-5.
- 11) Witt H, Luck W, Hennies HC, Classen M, Kage A, Lass U, Landt O, Becker M. Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nat Gene* 2000; 25: 213-6.
- 12) Naruse S, Kitagawa M, Ishiguro H, Fujiki

K, Hayakawa T. Cystic fibrosis and related disease of the pancreas. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002; 16: 511-26.

## G. 健康危険情報

該当なし

## H. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 丸山勝也, 高橋久雄, 奥山啓二, 横山 顕, 中村雄二, 小林康徳, 石井裕正. 飲酒中のアルコール依存症者における血清アミラーゼは低値を示す. アルコール医学生物学研究会編. アルコールと医学生物学 Vol. 22. 東京: 東洋書店, 2002: 93-8.

### 2. 学会発表

- 1) 丸山勝也, 高橋久雄, 奥山啓二, 横山 顕, 中村雄二, 小林康徳, 石井裕正. 飲酒中のアルコール依存症者における血清アミラーゼ値は低値を示す. 第22回アルコール医学生物学研究会. 旭川 2002年6月21-22日
- 2) Nakamura Y, Ishikawa A, Sekiguchi S, Kuroda M, Imazeki H, Maruyama K, Higuchi S. Spirits increase the risk for chronic pancreatitis more than beer and sake in 111 Japanese alcoholics. 2002 Digestive Disease Week Annual Meeting. San Francisco May 19-22, 2002
- 3) Maruyama K, Ishikawa A, Nakamura Y, Yokoyama A, Okuyama K, Takahashi H, Ishii H. Change of serum level of pancreatic tests after abstinence; with special reference to amylase. The 11<sup>th</sup> Congress of the International Society for Biomedical Research on Alcoholism. San Francisco June 30-July 4, 2002

### I. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

添付資料 1 : アルコール性膵炎のアンケート調査票

アルコール性膵炎のアンケート調査票

この調査は、「厚生労働省特定疾患対策研究事業 難治性膵疾患に関する調査研究班」の調査研究の一部として行われます。

この調査の目的は大量飲酒によりどの程度のアルコール性膵炎が生ずるのかを明らかにすることです。本来はある地域における住民全員を調査することが必要ですが現実には不可能ですので、大量飲酒をなさっていた男性断酒会員の皆様のなかでどのくらいアルコール性膵炎があるのかを、アンケート調査でお願いする次第です。なおプライバシーの保護については、以下の項目に示しますように個人を特定するようなものではありませんので、ご心配ありません。

ご協力いただけます場合には、以下の質問にお答えいただき（アンダーラインの所に記載してください）、平成 15 年 4 月末までに所属の地域断酒会までお届けいただきますようお願い致します。

1. 年齢： \_\_\_\_\_ 歳
2. 住所（県名のみ）： \_\_\_\_\_ 県
3. 飲酒を開始した年齢： \_\_\_\_\_ 歳
4. 主に飲んでいたものは（1日）：ビール大瓶 \_\_\_\_\_ 本、日本酒 \_\_\_\_\_ 合、焼酎 \_\_\_\_\_ 合、ウイスキーダブル \_\_\_\_\_ 杯、その他 \_\_\_\_\_
5. 飲酒期間： \_\_\_\_\_ 年
6. 断酒を始めた年齢： \_\_\_\_\_ 歳
7. 酒の肴（つまみ）は食べましたか： 多い ・ 普通 ・ 少ない
8. 主な肴の種類： 肉 ・ 魚 ・ 野菜類 ・ おかきなどの乾きもの
9. 今まで膵炎と診断されたことの有無： 有 ・ 無
  - 1) 膵炎が有の場合、その時の年齢： \_\_\_\_\_ 歳
  - 2) もしわかればその診断名：
    - a) ( アルコール性 ・ 胆石性 ・ 不明 )、
    - b) ( 急性膵炎 ・ 慢性膵炎 ・ 不明 )
  - 3) その際の腹痛の有無： 有 ・ 無
  - 4) その際の下痢の有無： 有 ・ 無
  - 5) 過去における、これら膵炎症状の回数： \_\_\_\_\_ 回
  - 6) 断酒中における、これら膵炎症状の有無： 有 ・ 無

ご協力ありがとうございました。

なお、この調査に関してお問い合わせがありましたら、以下にご連絡下さい。

〒239-0841 神奈川県横須賀市野比 5-3-1

国立療養所久里浜病院

副院長 丸山勝也（TEL:0468-48-1550、FAX:0468-49-7743）

## 添付資料 2 : アルコール性膵炎の原因遺伝子の解析についての研究計画書

厚生労働省特定疾患対策研究事業  
難治性膵疾患に関する調査研究班  
(班長 大槻眞)

共同研究プロジェクトⅡ－慢性膵炎－  
「アルコール性膵炎の原因遺伝子の解析」  
アルコール性膵炎の原因遺伝子の解析についての研究計画書

平成 15 年 1 月 30 日

本計画書は文部科学省・厚生労働省科・経済産業省、による「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成 13 年 3 月 29 日)に基づき作製した。

## 目次

研究計画	-----	87～95頁
説明者用説明資料	-----	96～100頁
患者さん用説明資料	-----	101～106頁
同意文書	-----	106頁
研究責任者氏名および研究機関名の連絡先	----	107～109頁

## 《研究計画》

## (1) 研究の目的

遺伝子の解明とヒトゲノムの全塩基配列の解読が進む中で、一人ひとりの遺伝情報の違いと疾病との関連を研究し、それを疾病の予防、早期発見、早期治療に結びつけようとする努力が開始されている。このような研究の成果により患者一人ひとりの体質や薬剤に対する副作用の違いなどがより科学的に明らかになり、その違いに応じて医療を提供し(オーダー・メイド医療)、医薬品の適正使用を行うなど、人々の福祉に大きく貢献することが期待される。

膵炎(急性膵炎および慢性膵炎を含む)の原因の第一はアルコール過飲とされるが、アルコールに対する個々人の感受性の違いもあり、その病態は不明な点が多い。アルコール性慢性膵炎と関連する候補遺伝子はすでに幾つか報告されており、私どももアルコール代謝関連酵素としてのアルコール脱水素酵素 2 型 (ADH2)、アルデヒド脱水素酵素 2 型 (ALDH2)、サイトクローム P4502E1 (CYP2E1) について検討した結果、ADH2 のみに関連を認めたと、いまだ臨床への応用に耐えうるものではない。アルコール性膵炎の成因にはさらに多数の遺伝子型が関与している可能性があり、それらの原因遺伝子の特定ができれば、アルコール性膵炎の病態の解明および将来の新しい治療方法の開発に寄与するばかりでなく、急性あるいは慢性を問わず膵炎全般の病態解明に役立つと考えられる。

アルコール大量飲用が強度の細胞への酸化ストレスを誘発し、その結果生じるスーパーオキシドや細胞毒性物質が DNA 損傷や細胞変性を起こさせる可能性がある。そこで今回は、アルコールによる酸化ストレスがアルコール性慢性膵炎の原因となるという作業仮説のもと、細胞毒性物質を無害化する第二相解毒酵素の遺伝子変異とアルコール性膵炎との関連研究を行うこととした。第二相解毒酵素としては glutathione S-transferase M1 (GSTM1), glutathione S-transferase theta 1 (GSTT1), NADPH-quinone oxidoreductase 1 (NQO1), NRH-

quinone oxidoreductase 2 (NQO2), N-acetyl transferase (NAT)をターゲットにして、アルコール性膵炎患者と膵機能障害のないアルコール依存症患者、さらに非アルコール性膵炎、および健常対照者の遺伝子多型をpolymerase chain reaction-direct sequencing (PCR) 法により解析する。両群における多型性変異の頻度の違いを統計学的手法により分析し、疾患に対する遺伝的脆弱性因子を見出すことを目的とする。

Lipoprotein lipase (LPL)およびアポリポ蛋白 C-II (アポ C-II) 遺伝子変異による欠損症により血中トリグリセリド (TG) は高値となる。高 TG 血症は膵炎の原因であり、I 型または V 型家族性高脂血症ではしばしば急性膵炎を合併する。一方、アルコール過飲は血中 TG の上昇を来すことより、アルコール性急性膵炎では高トリグリセリド血症のみられることが多い。高 TG 血症がアルコール性膵炎の結果として生じる可能性もあるが、LPL 欠損による家族性高脂血症ではアルコール過飲が膵炎の誘因と考えられている。そこでこれらの遺伝子についても上記の遺伝子同様検討を行う。

また既に遺伝性膵炎と有意な因果関係について報告されている cationic trypsinogen (PRSS1)、pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI)、CFTR の 3 種類の遺伝子および遺伝子群についても、その遺伝子異常とアルコール性膵炎との関連について検討する。

## (2) 試料提供者を選ぶ方針、考え方または基準

本研究は下記の 4 群の試料提供者を対象とする。

### (2-1) アルコール性慢性膵炎患者

胆石・膵奇形・高脂血症・副甲状腺機能亢進症・遺伝性膵炎などの他の成因による可能性が除外できるもので、1日のアルコール摂取量が日本酒換算 3 合(エタノールで 80 g)以上あり、かつ 10 年以上の飲酒歴がある慢性膵炎患者。慢性膵炎の診断は「日本膵臓病学会、慢性膵炎臨床診断基準 (2001 年)」に従う。

### (2-2) 非アルコール性慢性膵炎患者

アルコール多飲歴のない慢性膵炎患者。その原因として胆石・高脂血症・副甲状腺機能亢進症などが含まれる。

### (2-3) 膵障害のないアルコール依存症患者

日本酒換算で 3 合以上、10 年以上の飲酒歴があり、血清膵酵素、画像診断などにより明らかな膵障害のみられないアルコール依存症患者。

### (2-4) 健常対照者

本研究に自発的に協力する通常の健康状態の人であって、膵炎に罹患しているかどうか明らかでない人。遺伝子解析研究の結果はその人の健康状態の評価や疾病の予防、診断または治療方針に影響しないと考えられる。

## (3) 提供を受けようとする試料等の種類とそれぞれの量

本研究は体細胞遺伝子解析研究 (体細胞の DNA に起きた病的な変化を調べるため、DNA の塩基配列等の構造を解析する研究) であり、体細胞として末梢血白血球を用いるため、試料提供者に末梢血液 10mL の提供をお願いする。

## (4) 研究方法と予想される成果

### (4-1) 解析対象遺伝子

アルコールによる酸化ストレスがアルコール性慢性膵炎の原因となるという作業仮説のもとでは、細胞毒性物質を無害化する以下に示す 1~5 までの第二相解毒酵素の遺伝子変異がアルコール性膵炎発症に関連している可能性が想定される。6~9 の遺伝子については、アルコール性膵炎との関連は低いと思われるが念のために確認する。その他の遺伝子については本研究の対象とはしないが、提供頂いた資料は同意のうえ保存する。他の遺伝子についての解析研究の必要性が生じた場合は、新たに研究計画書の作成を行い、再び当該研究に関する同意書を得た後、保存された資料を研究に供する。

1. Glutathione S-Transferase M1 (GSTM1)
2. Glutathione S-Transferase Theta 1 (GSTT1)
3. NADPH-Quinone Oxidoreductase 1 (NQO1)
4. NRH-Quinone Oxidoreductase 2 (NQO2)
5. N-Acetyl transferase (NAT)
6. Cationic Trypsinogen (PRSS1)
7. 膵分泌性トリプシンインヒビター(PSTI)
8. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)
9. Lipoprotein lipase (LPL)およびアポリポ蛋白 C-II (アポ C-II)

現在までの報告等について個々に概説する。

#### (4-1-1) Glutathione S-transferase M1(GSTM1)

GST(E.C.2.5.1.18)は細胞毒性物質、環境変異原物質、化学発癌物質を glutathione 抱合により代謝し解毒化する酵素である(Manervik, 1985)。また多くの分子種からなりスーパーファミリーを構成し、mu (GSTM), alpha(GSTA), pi(GSTP), theta(GSTT), kappa(GSTK), sigma(GSTS)のクラスがこれまで報告されている。更に、それぞれのクラスには幾つかのサブファミリーが見出されている。GSTM は M1 から M5 まで 5 種のサブファミリーに分けられる。

GSTM1 には 2 種類の多型性変異が報告されている。すなわち GSTM1 遺伝子全体が欠損した deletion(GSTM1\*O) および exon 7 におけるミスセンス変異(Lys535Asn)である(Board, 1990; Seidegard et al. 1988)。特に、GSTM1\*O をホモ接合型で持つ個体では様々な毒性物質や発癌物質に対する代謝能が低下していることが報告されている(Pearson et al. 1993)。疾患との関連では GSTM1\*O は肺癌と相関する研究 (Seidegard et al.1986, 1990) のほか、大腸癌、肝癌においては GSTM1\*O の頻度が対照群に比べ高いことが報告されている (Zhong et al. 1993, Harada et al. 1987)。GSTM1 は常染色体 1p13.3 に位置する。遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列の検索は BC0240005 を参照。

#### (4-1-2) Glutathione S-transferase theta 1(GSTT1)

GSTM1 と同様細胞毒性物質、環境変異原物質、化学発癌物質を glutathione 抱合により代謝し解毒化する酵素である。Pemble et al. (1994)は一般集団のうち 38% が GSTT1 遺伝子の欠損を示すことを報告した。これは nonfunctional GSTT1 allele (GSTT1\*O)により生じる活性を持たない変異遺伝子が原因である。これまで GSTT1\*O 型と毒性物質との関連が指摘されており sister chromatid exchanges (SCE) との関連では ethylene oxide や ethyl bromide による遺伝子損傷が報告されてきた(Schroder et al. 1995)。染色体マッピングは 22q11.2 である。また遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列の検索は BC007065 を参照。

#### (4-1-3) NAD(P)H: Quinone oxidoreductase 1 (NQO1)

NQO1 は様々なキノンならびにその誘導体を還元するフラビン酵素であり、細胞内の酸化的ストレス、癌化に対する防御作用を担う(Benson et al., 1980)。多型性変異が幾つか報告されているが、重要なものは Traver et al.(1992)により見出された Pro187Ser(609C>T)である。塩基置換部をホモ接合型 (TT) で持つ個体では蛋白の産生がきわめて少なく、酵素活性も失われる(Traver et al. 1997)。このため細胞毒性のリスクが高くなる。常染色体 16q22.1 にNQO1 は位置する。塩基配列およびアミノ酸に関しては BC000906 を参照。

#### (4-1-4) NRH: Quinone oxidoreductase 2 (NQO2)

NQO2 の機能は NQO1 と同様に解毒に関係するフラビン酵素である。ただし NQO1 と異なり補酵素としては NRH(dihydronicotinamide riboside)が適しており、アミノ酸配列も短い。Jaiswal et al. (1990) により DNA およびアミノ酸配列が決定された。多型性変異もミスセンスを含め幾つか報告されている (Iida et al. 2001, Harada et al. 2001)。特にプロモーター領域における 29bp の insertion/deletion 多型は Parkinson disease と相関する(Harada et al. 2001)。NQO2 は常染色体 6q25 に位置する。塩基配列およびアミノ酸に関しては NM000904 を参

照。NQO2 の多型には酵素活性を失わせるような変異は報告されていないが、プロモーター領域に見出される 29bp の insertion/deletion は遺伝子の転写産物に対して影響を及ぼす可能性がある。

#### (4-1-5) N-Acetyl transferase 2 (NAT2)

Isoniazid, hydralazine などのサルファ剤は特定の酵素により代謝される。INH (イソニコチン酸ヒドラジド) 系薬物の代謝速度の遅いタイプ (slow inactivators) はしばしば肝臓に障害を与える (Timbrell et al., 1977). Schnakenberg et al. (1998) は血液から抽出した DNA を用いて NAT2 gene を分析した結果、膀胱癌患者の 70% に slow acetylators が見出されたのに対して controls グループは 61% であった。遺伝子型は NAT2\*5B/NAT2\* が疾患群に多く見出された。McQueen et al. (1982) は acetylator phenotype と DNA 損傷との関連につき研究し、NAT2 多型は様々な毒性物質や発ガン物質に対する脆弱性に関与することを報告した。Vatsis et al. (1991) は NAT2 の多型性変異のうち 481T, 590A, and 857A が slow acetylator 遺伝子であることを報告している。とりわけ 857A mutation はアジア系民族に多く見出される。染色体マッピングは 8p23.1-p21.3 である。また遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列の検索は D10871 を参照。

#### (4-1-6) Cationic trypsinogen (PRSS1)

1996 年、ポジショナルクローニングと呼ばれる分子遺伝学的手法により、遺伝性膵炎の疾患遺伝子としてカチオニックトリプシノーゲン (cationic trypsinogen) が同定され、白人の遺伝性膵炎家系において遺伝子異常が報告された。この報告以来、世界の遺伝性膵炎における解析が行われ、現在まで合計 511 種類の遺伝子異常が報告されている。これらの変異の中で最も高頻度に見られる遺伝子異常はエクソン 3 の点突然変異であり、122 番目のアミノ酸でアルギニン(R)からヒスチジン(H)への置換を生ずる。現在まで、白人の遺伝性膵炎あるいは家族性膵炎 50 家系以上でこの遺伝子異常が確認されている。次に多い変異はエクソン 2 の点突然変異であり、29 番目のアミノ酸でアスパラギン(N)からイソロイシン(I)へのアミノ酸置換を生ずる。この遺伝子異常は白人の遺伝性および家族性膵炎の 10 家系以上で報告されている。これら 2 つの遺伝子変異は膵炎の家族集積性と合致することより、膵炎の原因遺伝子としてほぼ間違いない。本邦の遺伝性および家族性膵炎においても、R122H が 9 家系、N29I が 3 家系報告され、これらの遺伝子変異に人種特異性のないことが示されている。その他の変異については現在のところ稀な変異であり (A16V および K23R, D22G K23R, L104P, R116C, C139F, P36R, E79K, G83E, K92N は各々遺伝性膵炎および家族性膵炎数家系での報告)、家族歴のない膵炎患者にもみられることより (-28TCCdel は特発性膵炎でのみの報告)、膵炎発症との直接的な因果関係については今後の検討を要する。なお、トリプシノーゲンアイソザムであるアニオニックトリプシノーゲンおよびメゾトリプシノーゲンについては現在まで遺伝子異常は報告されていない。

#### (4-1-7) 膵分泌性トリプシンインヒビター(PSTI)

膵分泌性トリプシンインヒビター(pancreatic secretory trypsin inhibitor ; PSTI)はトリプシンの蛋白分解活性を抑制する蛋白で、4 つのエクソンにコードされ、79 アミノ酸残基より構成される。遺伝性および家族性膵炎、および家族歴のない散発性膵炎で種々の遺伝子異常が報告されている。最も頻度の高い遺伝子異常はエクソン 3 の N34S で 1 家系の遺伝性膵炎、1 家系の家族性膵炎、18 例の散発性膵炎、2 人の正常人で確認されている。その他 P56S, M1T, L14P, R67C 等の変異が報告されているが、いずれも頻度の低い遺伝子異常であり膵炎発症との関連については今後の検討が必要である。

#### (4-1-8) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)は嚢胞性線維症(cystic fibrosis, CF) の責任遺伝子として発見された。ゲノム DNA は全長 250Kb であり、cDNA は 27 のエクソンで構成される。mRNA は約 6.5kb で、1,480 アミノ酸からなる分子量約 170KD の内因性 cyclic AMP 依存性 Cl<sup>-</sup>チャンネル蛋白をコードする。嚢胞性線維症は常染色体劣性遺伝を示し、膵臓、呼吸器、消化管などの全身の外分泌腺臓器障害を来す疾患である。北

ヨーロッパの白人に多く、欧米では出生児 2,500 人あたり 1 人の発症頻度であるが、黒色および黄色人種での発症は極めて稀で、遺伝性膵炎とは異なり発症率に人種間で大きな違いがみられる。本邦では、厚生労働省特定疾患-難治性膵疾患研究班の全国調査により 29 例の嚢胞性線維症の確診例が報告されているが、本邦の嚢胞性線維症症例における CFTR 遺伝子異常は白人と比較して大きく異なると考えられている。近年、特発性膵炎において上記 CFTR の遺伝子変異（ヘテロ接合体）が報告され注目されている。特に、イントロン 8 の T の繰り返し配列数の多型において、5T 遺伝子型（5 個の T）を持つ頻度が有意に高いとされる。この遺伝子型では正常の CFTR 蛋白の合成が低下する。しかし、これらの検討は嚢胞性線維症の多い白人での統計学的検討であり、同疾患の少ない本邦での再検討が必要である。

#### (4-1-9) Lipoprotein lipase (LPL), アポリポ蛋白 C-II (アポ C-II)

Lipoprotein lipase (LPL)は I 型または V 型家族性高脂血症の疾患遺伝子で、遺伝子変異による欠損症により血中トリグリセリド (TG) は高値となる。また、LPL の補酵素であるアポリポ蛋白 C-II (アポ C-II) の欠損でも同様の病態をきたす。高 TG 血症は膵炎の原因であり、I 型または V 型家族性高脂血症ではしばしば急性膵炎を合併する (各々38%、41%)。また、家族性高脂血症に合併する膵炎は腹痛発作を頻回に反復する慢性再発性膵炎の臨床像を示す傾向がある。一方、アルコール過飲は血中 TG の上昇を来すことより、アルコール性急性膵炎では高トリグリセリド血症のみられることが多い。高 TG 血症がアルコール性膵炎の結果として生じる可能性もあるが、LPL 欠損による家族性高脂血症ではアルコール過飲が膵炎の誘因と考えられている。同様に妊娠後期にみられる急性膵炎も、妊娠による生理的高 TG 血症が膵炎の原因と考えられる。LPL あるいはアポ C-II 欠損による家族性高脂血症はいずれも常染色体劣性遺伝であり、通常ホモあるいはコンパウンドヘテロ接合体の変異で発症する。ヘテロ接合体単独の変異の表現型は軽度の高 TG 血症あるいは無症状である。以上の事実よりアルコール性膵炎では<LPL あるいはアポ C-II 遺伝子のヘテロ接合体変異→潜在的高 TG 血症素因→アルコール過飲による血中 TG の上昇→膵炎>の病態が想定され、LPL あるいはアポ C-II 遺伝子はアルコール性膵炎の疾患感受性遺伝子である可能性がある。

#### (4-2) 遺伝子解析方法

上記に示した 8 種類の遺伝子および遺伝子群について DNA 配列を解析する。まず、採取された末梢血白血球より DNA を分離し、以下の方法にて一次スクリーニングおよび直接 DNA 配列決定を行う。遺伝子異常のある場合、forward および reverse 両方向からの DNA 配列決定を行い、再確認および PCR エラーを除外する。

##### (4-2-1) Glutathione S-transferase M1(GSTM1)

次に示す 2 種類の primer を用いて GSTM1 遺伝子を polymerase chain reaction (PCR) 法にて増幅し、PCR 産物をアガロースゲルにて電気泳動後、バンドの有無により deletion か non-deletion かを判定する(Chen et al. 1997)。

Sense primer : 5'GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C

Antisense primer : 5'GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G)

同時に  $\beta$ -globin を内部コントロールとして増幅する。

$\beta$ -globin primers sense primer : 5'GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC

$\beta$ -globin antisense primer : 5'CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC

##### (4-2-2) Glutathione S-transferase theta 1(GSTT1)

次に示す 2 種類の primer を用いて GSTT1 遺伝子を PCR 法にて増幅し、PCR 産物をアガロースゲルにて電気泳動後、バンドの有無により deletion か non-deletion かを判定する(Chen et al. 1997)。

GSTT1 sense primer : T1-5'TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC

GSTT1 antisense primer : T2-5'TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA

同時に  $\beta$ -globin を内部コントロールとして増幅する。

$\beta$ -globin sense primer : 5'GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC

$\beta$ -globin antisense primer : 5'CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC

(4-2-3) NAD(P)H: Quinone oxidoreductase 1 (NQO1)

Pro187Ser (C>T)の同定のため次の2種類の primer を作製し、制限酵素 *Hinf*I にて RFLP パターンによる型判定を行う。

Forward primer: 5'-TCCTCAGAGTGGCATTCTGC

Reverse primer: 5'-TTCTCCTCATCCTGTACCTCT

(4-2-4) NRH: Quinone oxidoreductase 2 (NQO2)

プロモーター領域に見出される 29bp の insertion/deletion 検出のため、次の primer を作製し PCR 法にて増幅し、PCR 産物はアガロースゲル電気泳動によりバンドサイズから判定する。

Forward primer: 5'-CTGCCTGGAAGTCAGCAGGGTTC

Reverse primer: 5'-CTCTTTACGCAGCGCCCTAC

(4-2-5) N-Acetyl transferase 2 (NAT2)

PCR-RFLP 法が一般的に用いられている。多くの変異個所があるので、primer 配列および制限酵素の種類に関しては Leff et al. (1999) の文献を参照。

(4-2-6) Cationic trypsinogen (PRSS1)

トリプシノーゲンの5つのエクソン近傍のイントロン領域にプライマーを設定し(配列特異性に乏しい場合は nested primer を設定)、PCR 法により DNA 断片を増幅する。得られた DNA 断片の塩基配列を PCR を用いたサイクルシーケンス(ダイデオキシ法)により決定する。カチオントリプシノーゲンのエクソン3、R122Hの遺伝子異常については、同エクソンを PCR で増幅後、制限酵素 *Afl*IIIによる切断の可否にて判定する一次スクリーニングを併用する。

(4-2-7) Pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI)

膵分泌性トリプシンインヒビターの4つのエクソン近傍のイントロン領域にプライマーを設定し(配列特異性に乏しい場合は nested primer を設定)、PCR 法により DNA 断片を増幅する。得られた DNA 断片の塩基配列を PCR を用いたサイクルシーケンス(ダイデオキシ法)により決定する。エクソン3のN34S、エクソン4のR67Cの遺伝子異常については、既に報告された変異遺伝子配列を有するミスマッチプライマーを用い、PCR による増幅の可否にて判定する一次スクリーニングを併用する。

(4-2-8) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)

CFTR 遺伝子イントロン8の遺伝子配列解析は、イントロン8とエクソン9のジャンクション部分を含む領域を、特異的なプライマーを用いて PCR 法により増幅し、得られた PCR 産物をダイデオキシ法によりシーケンスし、遺伝子多型をみることにより行う。

(4-2-9) Lipoprotein lipase (LPL)およびアポリポ蛋白 C-II (アポ C-II)

Lipoprotein lipase (LPL)遺伝子は10個のエクソンからなり、このうち遺伝子変異はエクソン4、5、6に比較的集中して見られる。従って、本研究ではまずこの3つのエクソン近傍のイントロン領域にプライマーを設定し、ゲノム DNA より PCR 法にて各エクソンを増幅する。得られた DNA 断片の塩基配列をサイクルシーケンス(ダイデオキシ法)により決定し、遺伝子変異を検索する。変異のない場合、他のエクソンの解析も検討する。一方、アポリポ蛋白 C-II (アポ C-II) 遺伝子は4つのエクソンからなり、遺伝子変異は翻訳領域を含むエクソン2、3、4で報告されている。従って、LPL 遺伝子と同様の方法で、まずこの3つのエクソンについて解析し、遺伝子異常のみられない場合検討範囲の拡充を考慮する。

#### (5) 研究の期間

平成15年2月1日から平成16年3月31日

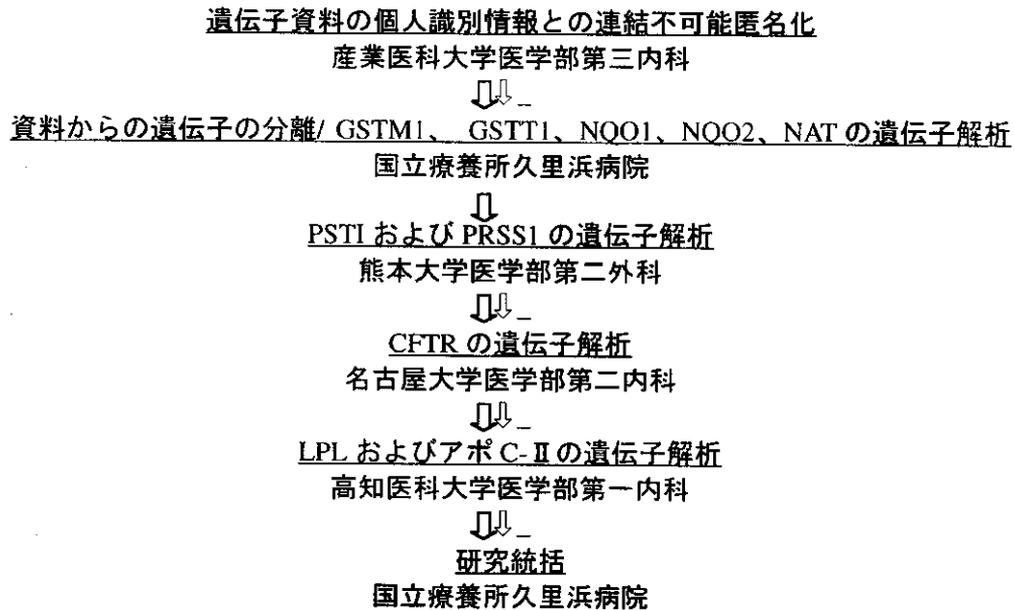
## (6) 共同研究機関および研究者の名称と役割

この研究が行われる研究機関と責任者、および役割を下表に示す。

研究機関名	研究責任者名	職名	役割
国立療養所久里浜病院	丸山勝也	副院長	・研究統括 ・GSTM1,GSTT1,NQO1,NQO2,NAT などの遺伝子解析 ・症例および検体の収集
名古屋大学大学院医学 研究科病態修復内科	成瀬 達	助教授	・CFTR の遺伝子解析 ・症例および検体の収集
熊本大学医学部 第二外科	廣田昌彦	講 師	・PSTI および PRSSI の遺伝子解析 ・症例および検体の収集
産業医科大学医学部 第三内科	大槻 眞	教 授	・個人識別情報管理者 ・症例および検体の収集
高知医科大学医学部 第一内科	西森 功	講 師	・LPL およびアポC-II の遺伝子解析 ・症例および検体の収集
東北大学大学院 消化器病態学分野	下瀬川徹	教 授	・症例および検体の収集
慶応義塾大学医学部 消化器内科	石井裕正	教 授	・症例および検体の収集
金沢大学がん研究所 腫瘍内科	澤武紀雄	教 授	・症例および検体の収集
札幌厚生病院	須賀俊博	院 長	・症例および検体の収集
順天堂大学医学部 第一病理	須田耕一	教 授	・必要時、症例の病理学的検討
弘前大学医学部 保健学科	中村光男	教 授	・症例および検体の収集
名城病院	早川哲夫	院 長	・症例および検体の収集
神戸大学大学院医学系 研究科消化器外科	黒田嘉和	院 長	・症例および検体の収集
千葉大学大学院 医学研究院腫瘍内科	税所宏光	教 授	・症例および検体の収集
東北大学大学院医学系 研究科消化器外科	松野正紀	教 授	・症例および検体の収集
三重大学医学部 第一外科	伊佐地秀司	助教授	・症例および検体の収集
九州大学大学院医学 研究院病態制御内科	伊藤鉄英	講 師	・症例および検体の収集
名古屋市立大学医学部 第一内科	大原弘隆	講 師	・症例および検体の収集
京都大学医学部附属 病院光学医療診療部・ 消化器内科	岡崎和一	助教授	・症例および検体の収集
京都府立医科大学 第三内科	片岡慶正	講 師	・症例および検体の収集
都立駒込病院内科	神澤輝実	医 長	・症例および検体の収集

研究機関名	研究責任者名	職 名	役割
信州大学医学部 第二内科	川 茂幸	助教授	・症例および検体の収集
山形大学医学部 第一外科	木村 理	教 授	・症例および検体の収集
大垣市民病院消化器科	桐山勢生	医 長	・症例および検体の収集
大原総合病院附属 大原医療センター	小泉 勝	院 長	・症例および検体の収集
東京女子医科大学 消化器内科	白鳥敬子	教 授	・症例および検体の収集
杏林大学医学部 第一外科	杉山政則	助教授	・症例および検体の収集
名古屋大学大学院 医学系研究科 健康社会医学専攻社会 生命科学講座予防医学	玉腰暁子	助教授	・症例および検体の収集
自治医科大学 消化器一般外科	永井秀雄	教 授	・症例および検体の収集
昭和大学医学部 第二内科	三田村圭二	教 授	・症例および検体の収集
東京慈恵会医科大学 呼吸器内科	吉村邦彦	講 師	・症例および検体の収集

なお、遺伝子解析研究の手順（資料の流れ）を次に示す。



**(7) 試料等提供者に対し、予測される危険や不利益**

本研究はアルコール性膵炎の発症に関連した遺伝子異常を解析するものであり、その解析結果は本人、担当主治医、および個人識別情報管理者以外には漏洩されない（本人が解析結果の告知を拒否する場合には本人には開示されない）。従って、社会的な危険あるいは不利益は発生しないが、試料提供者が遺伝性膵炎素因を有することが確定した場合、将来同疾患への罹患が予測可能となることより、試料提供者およびその家族における遺伝性膵炎罹患への疑問や不安などの心理的、精神的影響が予測される。これらに対しては、遺伝カウンセリングにより援助、支援を行う。なお、末梢血 10mL の採取に際する危険以外に、本研究により生じる身体的危険はない。

**(8) 個人識別情報を含む情報の保護の方法**

個人識別情報は個人識別情報管理者により連結不可能匿名化を行う。提供された試料は連結不可能匿名化を行った後、遺伝子解析研究に供する。個人識別情報管理者は個人識別情報に関してコンピューターを用いずに厳重に保管する。遺伝子解析研究結果は担当主治医を通じて試料提供者本人にのみ報告する。試料提供者の家族等または代諾者から試料等提供者の遺伝子解析研究結果を開示する求めがあっても開示しないが、試料等提供者が家族等へ開示してもよいことを表明する場合には、それを尊重する。

**(9) インフォームド・コンセント**

インフォームド・コンセントに係る一連の手続きにおける説明は原則として主治医が行う。説明者用説明資料、患者さん用説明文書、同意文書については後述する。

## 《説明者用説明資料》

インフォームド・コンセントに係る一連の手続きにおいて  
説明を担当する者に対する説明用資料

厚生労働省によるミレニアム・プロジェクトの一環として実施される「遺伝子解析による疾病対策・創薬等に関する研究」では、個体の持つ遺伝的な多様性と様々な疾病との関連を研究し、それを疾病の予防、早期発見、早期治療さらには薬剤の開発へ応用する計画をすすめている。一方、遺伝子解析により、被験者、その家族・血縁者さらには関連する疾病の罹患者が、様々な倫理的・法的・社会的問題に直面する可能性がある。この問題に対処するため、被験者およびその関係者の尊厳、人権および利益を保護することを目的とし、厚生科学審議会において、「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」が作成された。この指針では試料等提供者（遺伝子解析研究のために試料等を提供した人）を次の4群に分けており、説明者への情報として下記に概説する。

第一群 試料等 提供者	単一遺伝子疾患（一つの遺伝子の変化による遺伝素因の明らかな疾患）の患者など。すなわち、研究開始の時点において、遺伝素因の関与が明らかな遺伝性疾患や重篤な薬剤反応性異常を有する人、およびその可能性のある人をいう。ただし、試料等提供の依頼をできるのは、その病名などの告知を受けている人に限られる。遺伝子解析研究を通じた原因遺伝子の特定など新たな知見が、その人の健康状態の評価および疾病の予防、診断および治療方針に影響すると考えられる。
第二群 試料等 提供者	第一群試料等提供者以外の疾患の患者など。すなわち、研究開始の時点においては、遺伝素因の関与の程度が明らかでない疾病や薬剤反応性異常等を有する人、およびそれらの可能性のある人をいう。ただし、試料等提供の依頼をできるのは、その病名などの告知を受けている人に限られる。遺伝子解析研究の結果は、その人の健康状態の評価や疾病予防、診断または治療方針に直ちには影響しないと考えられる。
第三群 試料等 提供者	ふつうの健康状態の人。すなわち、集団検診等の健康診断受診者およびこの研究に自発的に協力する人であって、研究の対象となる病気にかかっているかどうか明らかでない人をいう。遺伝子解析研究の結果は、ほとんどの場合その人の健康状態の評価や疾病の予防、診断または治療方針に影響しないと考えられる。
第四群 試料等 提供者	コホート研究への参加者など。すなわち、健康の維持や疾病にかかることについて、環境要因と遺伝素因との相互作用等の解明を目的としたコホート研究などに自発的に協力する人をいう。コホート研究などに参加後ある病気にかかった人は、集団の構成員の一人として引き続きコホート研究などに参加する場合には、第四群試料等提供者である。遺伝子解析研究の結果は、ほとんどの場合、その人の健康状態の評価や疾病の予防、診断または治療方針に影響しないと考えられる。

「アルコール性膵炎の原因遺伝子の解析」研究（以下、本研究と略す）では上記の分類に従い、対象とする試料提供者を次の2群とした。試料提供者への説明に当たっては、被験者や家族のプライバシーを最大限に保護し、被験者からの質問に対しては必要に応じて後述の「遺伝カウンセリングの実施」に従って対応しなければならない。各群試料提供者への説明に当たっての注意事項は下記を参照のこと。

試料提供者	対象者	説明に当たっての注意事項
第二群	遺伝性および家族性膵炎以外の原因による膵炎罹患者。この研究ではすなわちアルコール性膵炎患者と非アルコール性膵炎患者および非膵障害アルコール依存症患者	遺伝子解析研究を通じて得られた情報が、疾患等の予防・診断・治療の方針に影響を与える可能性は低いと考えられるが、説明に当たっては、被験者が遺伝子解析研究の持つ特殊性を十分に理解した上で、研究協力への同意を与えることができるよう配慮する必要がある。
第三群	健常対照者（本研究に自発的に協力する通常の健康状態の人であって、膵炎に罹患しているかどうか明らかでない人）	研究の結果は集団として解析されるため、個々の被験者の健康状態の評価や疾病の予防・診断・治療に影響する可能性は極めて低いものと予測される。しかし、得られた遺伝情報が、被験者やその家族等に対し様々な不利益を被らせる可能性を否定することはできない。そこで、研究協力に関するインフォームド・コンセントのための説明に当たっては、被験者が遺伝子解析研究の持つ特殊性を十分に理解した上で、研究への協力または非協力を自発的に決定できるよう配慮する必要がある。

#### 《説明に当たる者の資格》

インフォームド・コンセントの手続きにおける説明は、第二群試料提供者においては担当主治医が行い、第三群試料提供者においては研究計画書の中で定められた研究遂行者の一員が行わなければならない。

#### 《代諾について》

被験者が痴呆等の疾患のため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、かつ本研究がそれらの人から試料等の提供を受けないと成り立たないと倫理審査委員会が認めた場合、その人に代わってインフォームド・コンセントを与える者として、代諾者に対し説明を行い、同意を得る必要がある。

一方、被験者が未成年者の場合、試料等の提供に当たって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必要がある。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同意も必要である。また、未成年者が16歳未満の場合には、代諾者の同意によって試料を提供して頂くことが可能であるが、この場合におい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試料提供の同意が与えられるように努めなければならない。

代諾者は次の中から選ばれるのが一般的と考えられる。

- (1)任意後見人、親権者、後見人や保佐人が定まっているときはその人。
- (2)試料等提供者本人の配偶者、成人の子または父母、およびそれらの人に準ずると考えられる人。

具体的にはこれらの者のいずれかに依頼して、それらの関係者間で協議して選定して頂くべきである。なお、代諾者が被験者と血縁関係を有し、自らの遺伝的問題について不安を持った場合には、代諾者自身に対する説明と遺伝カウンセリングについても十分配慮する必要がある。

#### 《具体的な手順》

インフォームド・コンセントの手続きにおける説明に当たっては、説明者は倫理審査委員会で認められた説明文書を用い、以下に述べる項目について適切かつ十分な説明を行い、説明を受ける者が自由意思に基づいて、試料等の提供への同意を表明できるようにしなけ

ればならない。なお、身体障害などにより説明文書を読むことができない被験者に対しては、研究遂行者でない者を立ち会わせて上で、説明を行わねばならない。その上で、説明者は署名した同意書の写しを被験者または代諾者に渡し、同意書を所定の場所に保管する。

《説明事項》

(1) 研究協力の任意性と撤回の自由

被験者に対し、試料等の提供は任意であっていつでも同意は撤回できることを伝える。さらに、被験者が試料提供に同意しない場合、あるいは同意を撤回した場合においても、疾病等の診療において不利益な扱いを受けないことを説明する。同意を撤回した場合、その撤回に係わる試料および研究結果は廃棄されるが、既に研究結果が公表されている場合、あるいは廃棄しないことにより被験者の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、試料や研究結果の廃棄はできないことがあることを説明する。

(2) 研究協力を要請する理由

第二群と第三群に分け、次の研究協力を要請する理由を説明した上で、アルコール性膵炎の遺伝素因に関連すると推測される遺伝子について調べることを方法も含め説明する。

試料提供者	対象者	説明に当たっての注意事項
第二群	遺伝性および家族性膵炎以外の原因による膵炎罹患患者。この研究ではすなわちアルコール性膵炎患者と非アルコール性膵炎患者および非膵障害アルコール依存症者	被験者がいかなる理由で、膵炎に罹患している、あるいはその可能性があるかと判断されたかを述べ、診断が確定している者とそうでない者などに分け、被験者の試料や診療情報をどのような研究に用いるかを説明する。
第三群	健常対照者（本研究に自発的に協力する通常健康状態の人であって、膵炎に罹患しているかどうか明らかでない人）	遺伝子解析研究に自発的に協力する意思を持ち、ランダムに選ばれた者であることを説明する。その上で、この研究の目的が被験者を健康対照群として遺伝子解析を行い、膵炎における分析結果などを解釈するために重要な役割を果たすこと、さらに、遺伝子解析による検診技術の開発などを旨とするものであることを説明する。

(3) 研究責任者の氏名および職名

研究責任者の氏名および職名を告げる（研究計画書（6）を参照）。

(4) 予測される研究結果と被験者の危険・不利益

遺伝子解析研究の成果が、アルコール性膵炎の診断の確定に役立つ可能性を伝える。一方、遺伝子解析を実施しても診断が確定できない可能性がある場合や、仮にアルコール性膵炎の原因遺伝子が確定しても、今後の診療方針に大きな変更をもたらさない可能性のあることを説明する。また、被験者が遺伝性膵炎素因を有することが確定された場合などには、将来同疾患の罹患が予測可能になることより、被験者およびその家族における遺伝性膵炎罹患への疑問や不安などの心理的、精神的影響がでる可能性があることも告げる。

(5) 研究計画、方法の開示

希望により、他の試料等提供者の個人情報保護や遺伝子解析研究の独創性の確保に支障が生じない範囲で、その試料等を用いた遺伝子解析研究の研究計画、遺伝子解析の方法等の資料を入手または閲覧することができることを告げる。

(6) 試料および診療情報の匿名化

匿名化（氏名、生年月日、住所などの個人を特定できる情報を取り除き、代わりに新たな符号をつけることなどによって、試料や情報の由来する個人を特定できなくすること）

を行うこと、提供者と新たにつける符号との対応表は厳重に管理され、解析を行う研究者は誰のものかわからない状態で研究を行うことなどを説明する。

(7) 試料、診療情報、遺伝情報の他の研究機関への提供

試料、診療情報、またはそれから得られた遺伝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、審査されていることを説明する。

(8) 研究結果の開示

被験者本人の求めに応じて遺伝情報を開示できることを説明する。この場合、遺伝情報は診療を担当する医師（主治医）からそれぞれ被験者のみに開示され、それ以外の者にはたとえ家族であっても、被験者の承諾がない限り開示しないこと、さらに、結果の開示を望む場合は、一定期間内（血液採取後 3 年間）に結果の開示を求めるべきこと、およびこの期間が過ぎた場合は結果の開示が不可能になる場合があることをも告げる。また、一旦結果の開示を望んだ場合でも、実際に開示を受ける前であれば、いつでもこの要求を撤回できることを告げる。

被験者が未成年者である場合には、基本的には試料提供に同意した親権者の求めに応じて遺伝情報が開示できること、この場合にあつては当該未成年者の意向を確認し、それを尊重することもあわせて説明する。また、未成年者の遺伝情報はその未成年者が開示を明確に希望している場合には基本的に開示できること、この場合にあつても親権者の意向を確認し、それを尊重することをあわせて説明する。なお、被験者が未成年者であつて、遺伝子解析結果が本人に説明されなかった場合で、成人後に被験者が説明を受けることを希望したときは、一定期間内（血液採取後 3 年間）であれば本人に説明することを告げる。

代諾者（親権者として代諾した人を除く）が提供者の遺伝情報の開示を望む場合には、その理由や必要性について倫理審査委員会で審議された上、対応が決定されることを説明する。

(9) 知的財産権、研究成果の公表

将来、遺伝子解析研究の成果が知的財産権を生み出す可能性があり、その場合、当該知的財産権は国や研究者などに属し、被験者には帰属しないことを説明する。また、試料から得られた遺伝情報などの研究成果は、匿名化により試料等提供者を特定できなくした上で、学会発表やデータベースとして公表される場合があることを告げる。

(10) 試料、診療情報の保管と廃棄

被験者の生体試料や診療情報は研究計画書に明記され、倫理審査委員会の承認を得たうえで、インフォームド・コンセントの範囲内で将来の研究のための資源として保管されることがあること、この場合、被験者に対し、その必要性、保管の方法、期間、場所、および匿名化の方法を告げる。

(11) 試料提供の対価

試料提供に当たっての対価はないこと、また、研究結果によって診療が必要になった場合、被験者の医療費負担が生じうることを告げる。

(12) 遺伝カウンセリングの実施

患者やその家族の求めに応じ、遺伝性膵炎やその遺伝子解析についての疑問や不安を解消できるよう援助・支援するための遺伝カウンセリングについて説明する。原則として遺伝カウンセリングは担当主治医が当たる。なお、遺伝カウンセリングは以下のような倫理規範に基づいて行われるものである。

- 1) 相談に訪れたひと（クライアント：患者やその家族であり、膵炎罹患の有無は問わない）やその家族のプライバシーを保護する。
- 2) 第三者機関により遺伝情報が悪用される可能性についてクライアントに注意を促す。
- 3) クライアントに、家族も含めた第三者の個人情報と保護しつつ、疾患などに関する正確な知識や情報を伝える。
- 4) クライアントの自己決定を尊重する。

5) クライアントの血縁者に疾患素因があることがわかり、それに対する対応策があるような場合には、そのことを血縁者に伝えることが望ましいことを説明する。

6) 拳児を望むなら、本人が配偶者パートナーに自分は特定の疾患に関する遺伝子の保有者であるか、その可能性があることを伝えることが望ましいことを説明する。さらに、その開示が結婚に望ましくない結果をもたらす可能性のあることも説明する。

7) いかなる時も、子ども、思春期の青少年を、年齢からして理解できないだろうという理由で遺伝カウンセリングの対象から外してはならない。カウンセリングにあたっては、本人に分かりやすい言葉、方法が用いられるよう、できる限りの配慮が払わなければならない。

## 《患者さん用説明文書》

ヒト由来資料の提供を依頼する患者さんなどに説明するための説明用文書

厚生労働省特定疾患対策研究事業  
難治性膵疾患に関する調査研究班  
(班長 大槻眞)

## 共同研究プロジェクト

「慢性膵炎」

アルコール性膵炎の原因遺伝子の解析についての研究

**遺伝子とは** - - - - -

「遺伝」という言葉は、「親の体質が子に伝わること」を言います。ここでいう「体質」の中には、顔かたち、体つきのほか、性格や病気に罹りやすいことなども含まれます。ある人の体の状態は、遺伝とともに生まれ育った環境によって決まりますが、遺伝は基本的な部分で人の体や性格の形成に重要な役割を果たしています。「遺伝」という言葉に「子」という字が付き「遺伝子」となりますと、「遺伝を決定する小単位」という科学的な言葉になります。人間の場合、10万個以上の遺伝子が働いていますが、その本体は「DNA」という物質です。「DNA」は、A、T、G、Cという四つの印（塩基）の連続した鎖です。印は、一つの細胞の中で約30億個あり、その印がいくつかつながったものが遺伝子です。

一つの細胞の中には10万個以上の遺伝子が散らばって存在しています。この遺伝情報を総称して「ゲノム」という言葉で表現することもあります。人間の体は、60兆個の細胞から成り立っていますが、細胞の一つ一つにすべての遺伝子が含まれています。

遺伝子には二つの重要な働きがあります。第一は、遺伝子が精密な「人体の設計図」であるという点です。受精した一つの細胞は、分裂を繰り返してふえ、一個一個の細胞が「これは目の細胞」、「これは腸の細胞」と決まりながら、最終的には60兆個まで増えて人体を形作りますが、その設計図はすべて遺伝子に含まれています。第二は「種の保存」です。両親から子供が生まれるのもやはり遺伝子の働きです。人類の先祖ができてから現在まで「人間」という種が保存されてきたのは、遺伝子の働きによっています。

**遺伝子と病気** - - - - -

こうした非常に大事な役割を持つ遺伝子の違いは、さまざまな病気の原因になります。完成された人体を形作る細胞で遺伝子の違いが起きると、違いのある細胞を中心にその人限りの病気が発生することがあります。これを体細胞変異といい、がんがその代表的な病気です。一方、ある遺伝子に生まれつき違いがある場合には、その違いが子、孫へと伝わってしまいます。この場合、遺伝する病気が出てくる可能性が生じます。

このように説明すると、遺伝子の変化が必ず病気を引き起こすと思われるかもしれませんが、実際には遺伝子の変化が病気を引き起こすことはむしろきわめてまれなことと考えられています。たとえば、一人一人の顔や指紋が違っているのと同じように、人によって生まれつき遺伝子に違いが見られ、その大部分は病気との直接の関わりがないことがわかってきました。また、人体を形作る60兆個の細胞では頻りに遺伝子の変化が起きていますが、そのほとんどは病気との関わりがありません。遺伝子の変化のうち、ごく一部の変化のみが病気を引き起こし、遺伝する病気として気が付かれるのだと思われます。

**遺伝病における原因遺伝子解析研究の特徴** - - - - -

遺伝子には、「人体の設計図」、「種の保存」という二つの重要な役割があることをすでに述べました。ある病気の原因となる遺伝子に生まれつきの違いが生じている場合には、この二つの役割に応じた遺伝子解析の研究が役立つと考えられます。まず、原因となる遺伝子が生まれつき他人と違う人では、将来かかる病気を予測することが可能となり、その

情報をもとに病気を予防したり、早期発見をすることができます。また、患者さんの血縁者の中から患者さんを見つけだし、予防につとめ、また早期発見、早期治療により病気を治すことが可能となります。

しかし、今は健康な人に対し将来病気になることを告げること、あるいは一人の患者さんの診療によって、その家族の遺伝病を予測してしまうということは従来の医療には見られなかったことです。この結果、新たな倫理的、法的、社会的問題が生じてきますが、これには将来の発病に対する不安、就職・結婚・生命保険加入などへの影響、家族の中での不安など、様々な問題が考えられます。研究への協力の可否を決めるに当たっては、遺伝子解析研究の持つ利点と不利な点に配慮していただかねばなりません。

#### アルコール性膵炎の原因遺伝子解析研究への協力について - - - - -

この研究は遺伝子の形態や働き具合を調べ、アルコール性膵炎との関係を明らかにする目的で行います。アルコール性膵炎は、一般に日本酒で毎日 3 合以上を 10 年以上飲み続けている人にみられる病気ですが、必ずしも全員がなるわけではなく個人差がみられます。最近の研究では、飲んだアルコールをアセトアルデヒドに代謝する酵素であるアルコール脱水素酵素 2 型が関係することが示されていますが、必ずしもアルコール性膵炎に特徴的でなく、アルコール性肝硬変でもその関連が指摘されています。そこで今回は、大量飲酒により引き起こされることが考えられる DNA(遺伝子)の損傷に対して保護作用がある種々の解毒酵素 (1) glutathione S-transferase M1 (GSTM1)、(2) glutathione S-transferase Theta 1 (GSTT1)、(3) NADPH-quinone oxidoreductase 1(NQO1)、(4) NRH-quinone oxidoreductase 2 (NQO2)、(5) N-acetyl transferase (NAT)について検討します。すなわち、これら酵素の遺伝子形態の違いがアルコール性膵炎になりやすいか否かを明らかにします。また (6) トリプシノーゲン、(7) 膵分泌性トリプシンインヒビター、(8) cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) という 3 つの遺伝子に変化があると遺伝性膵炎という病気にかかりやすい可能性がわかってきましたので、これらの遺伝子がアルコール性膵炎にも関係しているか否かについても検討します。また膵炎の発症の一因となる高中性脂肪に関係する遺伝子として (9) Lipoprotein lipase (LPL)およびアポリポ蛋白 C-II (アポ C-II)遺伝子についても検討します。この研究で、アルコール性膵炎の診断技術をさらに向上させ、原因となる新しい遺伝子を探し出すことなどにより、アルコール性膵炎になりやすい人をそうならないように予防することが可能になると期待されます。

これらの目的のため、あなたの血液 10mL を診療記録とともにこの研究に利用させていただきます。血液の採取には大きな危険は伴いません。具体的には、あなたにこの研究への協力をお願いするため、まず、研究の内容を含め、あなたが同意するための手続きについて説明を行います。あなたがこの説明をよく理解でき、あなたが研究に協力して血液の一部を提供することに同意しても良いと考える場合には、遺伝子解析研究「アルコール性膵炎の原因遺伝子の解析」への協力の同意書に署名することにより同意の表明をお願いいたします。

#### 同意の表明の前提：研究協力の任意性と撤回の自由 - - - - -

この研究への協力の同意はあなたの自由意志で決めてください。強制いたしません。また、同意しなくても、あなたの不利益になるようなことはありません。一旦同意した場合でも、あなたが不利益を受けることなく、いつでも同意を取り消すことができ、その場合は採取した血液や遺伝子を調べた結果などは廃棄され、診療記録などもそれ以降は研究目的に用いられることはありません。ただし、同意を取り消した時すでに研究結果が論文などで公表されていた場合などのように、血液や遺伝子を調べた結果などを廃棄することができない場合があります。

#### 研究計画 - - - - -

研究題目：

「アルコール性膵炎の原因遺伝子の解析」