

200401266A

厚生労働科学研究研究費補助金

化学物質リスク研究事業

プライマリーヒト細胞を用いた化学物質曝露、

遺伝子発現に関する研究(H15-化学-001)

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 藤村 昭夫

平成 17(2005)年 4 月

目 次

I. 総括研究報告

プライマリーヒト細胞を用いた化学物質曝露、遺伝子発現に関する研究	1
藤村昭夫・香山不二雄	
別紙1 遺伝子解析研究倫理審査委員会設置規定	7
別紙2 遺伝子解析研究倫理審査提出研究計画書・患者説明文書・同意書	10
別紙3 遺伝子解析研究倫理審査提出研究計画書・患者説明文書・同意書	25
別紙4 ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する取扱規定	41

II. 分担研究報告

1. ヒト肝細胞を用いた研究に提供された転移性肝癌切除例の病理学的検討	60
斎藤 建	
2. 肝切除症例の臨床的検討	62
永井秀雄・安田是和・佐田尚宏	
別紙1 研究計画書・説明文書および同意書	66
3. 臨床腎臓検体の採取	78
森田辰男・大島康雄	
別紙 研究計画書・説明文書および同意書	82
4. DNA マイクロアレー装置管理・データ解析手法の推進に関する研究	97
間野博行	
別紙 遺伝子解析研究倫理審査用研究計画書・説明文書・同意文書	100
5. プライマリーヒト細胞を用いた化学物質曝露・遺伝子発現に関する研究 マイクロアレー実施・データ解析・精度管理	124
大島康雄	
6. バイオインフォマティクス	144
篠原 歩	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	149
---------------------	-----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	添付
-----------------	----

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
総括研究報告書
プライマリーヒト細胞を用いた化学物質曝露・遺伝子発現に関する研究

主任研究者 藤村昭夫 自治医科大学臨床薬理学 教授
分担研究者 香山不二雄 自治医科大学環境医学部門 教授

研究要旨

本研究は日本人のプライマリー肝・腎細胞を用いて、日本人における化学物質の安全性を予測するシステムを構築することを目的とする。平成16年度は前年度までの研究により開発した手順でプライマリーヒト肝・腎細胞を作成し、10種類の化学物質を曝露し、GeneChipを用いて遺伝子発現解析を行った。また、遺伝子発現における個人差を評価する目的で、薬物未曝露の腎臓由来細胞のRNA 11症例分についてGeneChipを用いた遺伝子発現解析を行った。

A. 研究目的

本研究は日本人における化学物質の安全性を予測するシステムを構築するために、ヒト組織を用いた研究に関する基盤を整備することを目的とする。

医薬品の分野では有効性や体内動態に人種差が存在することは広く知られている。したがって、日本人ヒト組織を用いて化学物質リスク研究を行うことは、日本人にとってより安全性の高い化学物質を提供するために有用である。

B. 研究方法

重金属類 [Cadmium Chloride (0.1 mc mole/L), Lead Acetate (10 mc mole/L), Thimerosal (50 n mole/L), Arsenite trioxide (0.1 mc mole/L), WCM Selen (90% v/v), 発生毒性のある物質, Ethanol (1% v/v)], 有機溶媒 [Dimethylsulfoxide (1% v/v)], ホルモン様作用のある化合物 [2,3,7,8-TCDD (10 n mole/L), All-trans retinoic acid (1.0 mc mole/L), 9-cis retinoic acid (1.0 mc mole/L)]の合計10種に

関して化学物質曝露遺伝子発現研究を行った。さらに、この遺伝子発現データについては定量PCRにより発現を確認した。

11人分の腎臓組織由来のプライマリーカルチャーを用いて、化学物質未曝露における基礎的な遺伝子発現の解析を試みた。同様に、海外調整済みの腎臓組織をこれまでのところ8人分入手して、解析を行った。海外調整済みの腎臓組織は市場より調達したサンプルであり、研究目的への使用に関して倫理的に問題はない。日本人由来のサンプルは、当大学の遺伝子解析倫理審査委員会(別紙1)により、研究計画書(別紙2, 別紙3)が審査され承認された。取扱規程(別紙4)に従い同意を得た上で研究へ使用した。

C. 研究結果

2,3,7,8-TCDD と All-trans retinoic acid, 9-cis retinoic acid の経時的発現変化を比較したところ、有意なクラスターが39種類(1309トランスクリプト)認められた。このトランスクリプトの内1

種類の遺伝子 CSNK2A2 (casein kinase2) については、定量 PCR と GeneChip の発現量に相関が認められた。

中間段階の解析であるが、11 人分の腎臓組織由来のプライマリーカルチャーを用いて、化学物質未曝露での基礎的な遺伝子発現の解析を試みた。9 人分のサンプルが解析対象として適格であった。これらのデータについて t-test, p 値 0.01 を有意水準として検定すると、44,000 トランスクリプトのうち 63 は有意に個人間で発現量に差があると判定された。一方、海外調整済みの腎臓組織は、その腎臓組織調整の手順などが明らかとなっておらず単純な比較には注意を要する。その上で、あえて 8 人分入手して、解析を行ったところ、日本人とは 343 遺伝子発現が異なると判定された。

D. 考案

ヒ素は人での発ガン性のある環境汚染物質であり、ヒ素は皮膚、肺、膀胱、肝臓に悪性腫瘍を惹起すると現在考えられている。水質汚染や海産物中の有機ヒ素、試料中のヒ素、毒ガス中のヒ素化合物など、未だに多くの研究すべき課題がある。そのような理由で、ヒ素は toxicogenomics 研究の重要な対象化学物質である。三価のヒ素は 200 以上の酵素群を阻害する。また、皮膚を始め内臓各臓器に悪性腫瘍を惹起する。DNA 修復、DNA メチル化に障害を起こし、酸化ストレスでラジカルを産生し、protooncogene c-myc の誘導など報告されているが、まだ機序の解明には道

は長い。砒素による発ガン実験では、適切な動物実験モデルが無いことも解明を遅らせている(Abernathy CO et al, 1999)。これまで多くのマイクロアレイを用いたヒ素に関する研究が行われてはいるが、未だに明確な解析結果は乏しく、ヒ素の毒性発現における理解は不十分である。

これまでの研究で人での in vivo の toxicogenomics 研究は中国の飲料水に 6-10年間曝露した集団から6名の肝臓の生検サンプルと米国の病院で6名から得られた対照群の肝臓サンプルとを比較した(Lu T et al, 2001)。cDNA マイクロアレイを用いて 588 のガン関連遺伝子について検討を加えた。60 種の遺伝子に差が見られアポトーシス、細胞周期に関する遺伝子、DNA 障害関連遺伝子などの遺伝子群に遺伝子発現に差が見られた。しかし、民族的差が交絡因子となっているので、その評価は慎重にしなければならない。この点を考慮しても、ラットで同様の遺伝子発現の差が観察されている。c-myc、PCNA、cyclin D1 はラット肝臓 TRL1215 細胞株でも同様に発現が上昇していた。この研究では、ヒ素曝露は培養細胞に遺伝子全般に DNA メチル化を低下させる。また、どのような遺伝子発現の差を生じるかマイクロアレイを用いて確認すると、80 遺伝子の発現が変化しており、hsp70 などストレス反応タンパク、細胞

周期制御やシグナル伝達系、アポトーシス、サイトカイン産生、成長ホルモンや性ホルモンレセプター合成関連遺伝子、その他オンコジーンが誘導されることが明らかとなった (Chen H et al. 2001)。

ヒ素は少量を慢性的に投与するとラットの肝臓に上皮系細胞由来の癌腫を誘導するが、長期少量投与した動物に、ヒ素に対する急性毒性耐性ができる。マイクロアレイ解析によると、glutathione S-transferase Pi、多薬剤耐性関連タンパク遺伝子 (MRP1/MRP2)、multidrug resistance gene (MDR1) を誘導することが明らかとなった。(Liu J et al, 2001a) また、無機ヒ素を長期間投与することにより酸化的ストレスにより誘導される遺伝子群が誘導されていることが示された。(Liu J et al, 2001b)

人線維芽細胞に無機ヒ素を投与して誘導する遺伝子群を確認すると、シグナル伝達、転写制御因子、細胞周期、ストレス関連遺伝子、タンパク分解酵素群などの 39 遺伝子の誘導を確認した (Yih LH et al. 2002)。

Waring ら (Waring JF et al, 2001) は肝臓毒性を示す 15 化学物質 (allyl alcohol, amiodarone, Aroclor 1254, ヒ素、carbamazepine, 四塩化炭素、diethylnitrosamine,

dimethylformamide, diquat, etoposide, indomethacin, methapyrilen, methotrexate, monocrotaline, 3-methylcholanthrene) を肝細胞に曝露し、肝細胞の mRNA のプロファイルを解析した。それぞれ化学物質は肝細胞衛視や DNA 障害、肝硬変、肥大、肝癌など反応は異なるが、mRNA プロファイルは、それぞれの病理学的変化や血液生化学、遺伝子発現に対応する変化であった。ヒ素の解析結果では、そのデータのクラスター・アルゴリズムを用いた解析では、ヒ素は methapyriline が含まれる群に属し、肝毒性物質として periportal necrosis をどちらも惹起することから、同様の毒性発現機序を介していることが推察されることが報告している。

クラスター解析

mRNA 発現が増加または低減する遺伝子をどのように分類するかは、当該化学物質の毒性発現メカニズムを確認する上で重要である。

それぞれの遺伝子がどのような生体分子のメッセージなのかを物質から分ける方法は、酵素、免疫関連のタンパクなのか、転写因子、シグナル伝達系分子、トランスポーター、構造タンパクかなどと分けることができる。そのデータとしては重要である。

また、機能面から分類する方法もあ

る。たとえば、細胞増殖に関する遺伝子群、アポトーシスに関連する遺伝子群等の機能によるクラスター分類も有用な解析方法である。しかし、この新たな手法により新たな機能連携を解析するために因子分析の手法により関連する遺伝子群をクラスター化して、そこに潜在するメカニズムに関する洞察を得ることが出来る可能性は大きい。

遺伝子発現の変化は、その遺伝子の転写を制御している転写因子の活性が反映されている場合が少なくない。これら遺伝子発現変化をもたらしている主要な転写因子が何であるかを推測する上で、それぞれの遺伝子上流の転写因子結合配列を検索することが必要となる。しかし、こうした上流配列を検索するために適したツールはこれまで公開されていなかったため、バイオインフォマティクス部門において上流配列を検索するソフトウェアを開発した。これは、既知の 5,000 にもおよぶ転写因子結合配列をデータベースとして保有する一方、ヒトゲノムデータ build 34 の遺伝子データを元に、遺伝子上流に転写因子結合配列が存在するかどうかを網羅的に検索する機能も有する。このデータベースを活用して上記 CSNK2A2 遺伝子上流を検索したところ、レチノイン酸レセプター結合配列である RARE motif が観察され、レチノイン酸類曝露による遺伝子発現制御がレチノイン酸レセプターと関連していることが示唆された。これは解析手順や開発したソフトウェアが期待通りに機能していることを裏付けるデータと考え

られる。

(参考文献)

Abernathy CO, Liu YP, Longfellow D, Aposhian HV, Beck B, Fowler B, Goyer R, Menzer R, Rossman T, Thompson C, and Waalkes MP. Arsenic: health effects, mechanisms of actions, and research issues, *Environ. Health Perspect.* 107(7), 593, 1999

Warling JF, Ciurlionis RG, Jolly RA, Heindel M and Ulfich RG. Microarray analysis of hepatotoxins in vitro reveals a correlation between gene expression profiles and mechanisms of toxicity, *Toxicol Lett.* 120(1-3), 359, 2001

Lu T, Liu J, LeCluyse EL, Zhou YS, Cheng ML and Waalkes MP. Application of cDNA microarray to the study of arsenic-induced liver diseases in the population of Guizhou, China. *Toxicol Sci.* 59(1), 185, 2001

Liu J, Chen H, Miller DS, Saavedra JE, Keefer LK, Johnson DR, Klaassen CD and Waalkes MP. Overexpression of glutathione S-transferase II and multidrug resistance transport

proteins in associated with acquired tolerance to inorganic arsenic Mol. Pharmacol, 60(2), 302, 2001a

Liu J, Kadiiska MB, Liu Y, Lu T, Qu W and Waalkes MP. Stress-related gene expression in mice treated with inorganic arsenicals. Toxicol Sci, 61(2), 314, 2001b

Chen H, Liu J, Merrick BA and Waalkes MP. Genetic events associated with arsenic-induced malignant transformation: applications of cDNA microarray technology. Mol Carcinog, 30(2), 79, 2001

Yih LH, Peck K, Lee TC. Changes in gene expression profiles of human fibroblasts in response to sodium arsenite treatment. Carcinogenesis, 23(5), 867, 2002

Warling JF, Jolly RA, Lum PY, Praestgaard JT, Morfitt Dc Buratto B, Roberts C, Schadt E and Ulrich RG. Ciurlionis RG, Heindel M and Ulfich RG. Clustering of hepatotoxins based on mechanism of toxicity using gene expression profiles. Toxicol. Appl. Pharmacol,

175 (1), 28, 2001

E. 結論

化学物質 10 種類をヒトプライマリーカルチャー細胞へ曝露させ、遺伝子発現解析を行った。これにより、これまで明らかとなっていなかった化学物質曝露後の日本人腎臓由来プライマリーカルチャー組織の遺伝子発現が判明した。9 人分の日本人腎臓由来プライマリーカルチャー細胞における化学物質未曝露の状態での遺伝子発現解析を行い、63 の遺伝子発現に個人差を認めた。今後、検体数を追加し、遺伝子発現における個人差をさらに明らかにする予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 国内 発表論文

大島康雄, 藤村昭夫: 日本人組織を用いたトキシコゲノミクス研究: 臨床薬理 2005年1月号; 36(1): 11-12

学会発表

大島康雄, 藤村昭夫: シンポジウムトキシコゲノミクス-現状と臨床薬理学への応用- 日本人組織を用いたトキシコゲノミクス研究: 臨床薬理学会 年会 2004年9月 静岡

2) 海外 発表論文

Oshima Y, Tojo A, Fujimura A, Niho Y, Asano S.: Potent receptor-mediated cytotoxicity of granulocyte colony-stimulating factor-Pseudomonas exotoxin, a fusion protein against myeloid

leukemia cells: Biochem Biophys Res Commun. 2004 Jun 25;319(2):582-589

Oshima Y, Komatsu N, Ozawa K, Fujimura A.: CML Developed in a Japanese Family Transmitting a Novel Point Mutation in the Thrombopoietin Gene (TPO): blood. 2004 Nov; 104(11- part 2 of 2 parts): 141b (Abs# 4220)

Oshima Y, Kurokawa S, Tokue A, Mano H, Saito K, Suzuki M, Imai M, Fujimura A: Primary Cell Preparation of Human Renal Tubular Cells for Transcriptome Analysis: Toxicol Mechanisms and Methods, 2004 Sep/Oct; 14(5): 309-316

Oshima Y, Ishida Y, Shinohara A, Mano H, Fujimura A: Expression Profiling of Gene with Upstream AML1 Recognition Sequence in Hematopoietic Stem Cell-Like Fractions from Individuals with The M2 Subtype of Human Acute Myeloid Leukemia: Experimental Hematology, 2004 Jul; 32(suppl): 34 (Abs# 14)

学会発表

Yasuo Oshima, Yusuke Ishida, Ayumi Shinohara, Hiroyuki Mano, Akio Fujimura.: Expression Profiling of Gene with Upstream AML1 Recognition Sequence in

Hematopoietic Stem Cell-Like Fractions from Individuals with The M2 Subtype of Human Acute Myeloid Leukemia: 33rd Annual Meeting of International Society for Experimental Hematology, Jul 2004, New Orleans, USA

Fujimura A: Recent advances of clinical pharmacology: Toxicogenomics: Japan-China Joint Meeting Of Basic And Clinical Pharmacology Sep 2004, Shizuoka, Japan

Fujimura A, Oshima Y: Toxicogenomics: The 17th Korea-Japan Joint Seminar on Pharmacology, Oct 2004, Jeonju, Korea

Kishimoto S, Oshima Y, Gemba M, Fujimura A: Cisplatin induced gene expression in primary human renal cortical cell ~ an approach to get rid of cisplatin's nephrotoxicity ~: Toxicogenomics International Forum 2004, Oct 2004, Kyoto Japan

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得:なし
2. 実用新案登録:なし
3. その他:なし

別紙1 遺伝子解析研究倫理審査委員会設置規定

遺伝子解析研究倫理審査委員会設置規程

(目的)

第1条 この規程は、自治医科大学及び自治医科大学看護短期大学(以下「大学」という。)

において行われるヒトゲノム・遺伝子解析研究(以下「遺伝子解析研究」という。)について、人間の尊厳を確保し、試料等提供者、その家族又は血縁者の人権を保障しながら適正に実施されるよう、倫理的、法的及び社会的観念を中心に、科学的観点を含めて審議及び審査することを目的とする。

(設置)

第2条 前条の目的を達成するため、自治医科大学生命倫理委員会設置規程(平成7年5月1日制定)第9条第1項の規定に基づき、大学に遺伝子解析研究倫理審査委員会(以下「委員会」という。)を置く。

(審議及び審査事項)

第3条 委員会は、次の事項について審議及び審査する。

- (1) 大学で行われる遺伝子解析研究計画の実施の可否
- (2) 自治医科大学生命倫理委員会(以下「生命倫理委員会」という。)委員長から遺伝子解析研究に関して付託された事項

(構成)

第4条 委員会は、次に掲げる委員をもって構成する。

- (1) 大学の教員 4名
 - (2) 学外の人文・社会科学面(倫理・法律を含む。以下同じ。)の有識者、自然科学面の有識者又は市民の立場の者 4名
- 2 前項第2号の委員のうち半数以上は、人文・社会科学面の有識者又は市民の立場の者でなければならない。
- 3 第1項に規定する委員は、生命倫理委員会の議を経て、自治医科大学学長(以下「学長」という。)が委嘱する。

(任期)

第5条 委員の任期は、2年とし、再任を妨げない。ただし、補欠により委嘱された委員の任期は、前任者の残任期間とする。

(委員長等)

第6条 委員会に、委員長及び副委員長を置く。

2 委員長及び副委員長は、第4条第1項第1号の委員の中から、生命倫理委員会の議を経て、学長が委嘱する。

3 委員長に事故があるとき、又は欠けたときは、副委員長がその職務を代理し、又は職務を行う。

(会議)

第7条 委員長は、委員会を招集し、その議長となる。

2 委員会は、委員の3分の2以上の出席がなければ会議を開くことができない。この場合において、第4条第2項に規定する委員が1名以上出席しなければならない。

3 委員会の議事は、出席委員の3分の2以上の合意をもって決する。

4 委員会は、原則として、非公開とする。

5 委員会は、必要があると認めるときは、当該研究責任者、その所属長又は学内外の学識経験者の出席を求め、研究計画の内容等について説明を受け、又は意見を聴くことができる。

6 委員が当該研究に直接関わりがある場合は、当該委員は、当該研究に係る審議及び審査に加わることはできない。

(報告)

第8条 委員長は、委員会の審議及び審査の結果を遺伝子解析研究審査結果報告書(別記様式)により生命倫理委員会委員長に報告するものとする。

(議事録の作成)

第9条 委員長は、委員会の議事について、次に掲げる事項を記載した議事録を作成しなければならない。

- (1) 開催日時及び場所
- (2) 委員の現在数
- (3) 会議に出席した委員の氏名
- (4) 議決事項
- (5) 議事の経過及び発言の要旨
- (6) その他必要な事項

2 議事録には、委員長及び委員長の指名する委員1名が署名押印するものとする。
(議事録の公開)

第 10 条 委員会の議事録は、公開するものとする。ただし、公開することによって、
試料等提供者、その家族若しくは血縁者の人権、研究の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は、非公開とすることができる。

2 委員会は、議事録の全部又は一部を非公開とする場合は、その理由を公開しな
ければならない。

(議事録の保存)

第 11 条 委員会の議事録(委員会提出資料を含む。)は、委員会開催日の属する年
度の翌年度の初日を起算日として 5 年間保存しなければならない。

(守秘義務)

第 12 条 委員会の委員は、審議及び審査を行う上で知り得た情報を法令又は裁
判所の命令に基づく場合等、正当な理由なしに漏らしてはならない。

(庶務)

第 13 条 委員会の庶務は、大学事務部学事課が行う。

(規程の改正)

第 14 条 この規程の改正は、生命倫理委員会の議を経て、自治医科大学教授会の
承認を得るものとする。

(その他)

第 15 条 この規程に定めるもののほか、委員会の運営に関し必要な事項は、生命
倫理委員会の議を経て、学長が別に定める。

附 則

この規程は、平成 13 年 4 月 1 日から施行する。

別紙 2 遺伝子解析研究倫理審査提出研究計画書・患者説明文書・同意書

<平成14年3月11日申請,平成14年5月16日再提出,平成14年6月10日再々提出>

<平成14年6月21日研究許可決定通知,平成14年8月26日変更申請>

<平成14年9月27日変更許可決定通知,平成14年11月12日変更申請>

<平成15年1月15日変更再申請,平成15年2月3日変更許可決定通知>

<平成15年8月31日変更申請>

研究計画書

課題名:薬物による腎障害の予防に関する研究

研究責任者の所属・職・氏名:自治医科大学臨床薬理学講座 助手 大島康雄

- (1) 試料等提供者の選定方針(合理的に選択していることがわかる具体的な方法。試料等提供者が疾病や薬剤反応性異常を有する場合等にあっては、病名又はそれに相当する状態像の告知方法等。)

目標解析数は120で、研究参加に同意された順に研究に参加していただくことを基本方針とする。対象は腎臓の腫瘍性疾患など(腎臓原発の腫瘍・他臓器原発の腫瘍性疾患で腎臓への転移などが考えられるがこれらに限定はしない)のために、医学的に治療上腎臓の切除の適応があると判断された18才以上の患者で、書面で確認されたインフォームドコンセント((7)インフォームドコンセント説明文書および同意文書)を得ることができた患者でかつ以下の除外項目を有しない患者。

除外項目は、薬物性の腎障害を起こしている疑いが強い場合、遺伝性の疾患またはその疑いが濃厚である場合、またはその他担当者が不適切と認める場合。

- (2) 研究の目的、意義、方法(対象とする疾患、分析方法等。将来の追加、変更が予想される場合はその旨。第一群試料等提供者の場合には研究の必要性、不利益を防止するための措置等。)、期間、予測される結果、予測される試料等提供者に対する危険及び不利益並びに個人に関する情報の保護の方法(匿名化しない場合の取扱いを含む。)

① 目的

薬物のヒト腎細胞障害時の遺伝子発現を明らかにすることにある。従来の前臨床試験としての毒性試験において、齧歯類などの小動物や細胞株を用いた検討では腎障害(細胞障害)を引き起こさないが、個体としてのヒトでは腎障害を引き起こす薬物がある。このような現在の前臨床研究では見過ごされるような場合でも、遺伝子レベルでは何らかの変化が生じている可能性は高いと考えられる。そこで、本研究ではこの遺伝子レベルでの変化を検出することを目的とする。

② 意義

遺伝子発現情報を基に腎障害を来しうる薬物を、開発段階で検出するための基礎データの構築

③ 方法

様々な化学物質(医薬品を含む)を *in vitro* で腎臓の細胞に作用させた場合の遺伝子発現の変化を GeneChip®を用いて検討する

④ 期間

研究許可を得てから平成 19 年 6 月 30 日まで

⑤ 予測される結果

当研究班でのデータとしては、非腫瘍性(または非罹患部)の腎臓組織を用いて、様々な化学物質を作用させた場合の遺伝子発現プロファイルが得られる。腎障害が懸念される化学物質とそうでない化学物質の遺伝子発現プロファイルを比較することにより腎障害を来た可能性の高い化学物質に特異的な遺伝子発現プロファイルデータベースを構築することが予定されている。中期的には、これらの情報と齧歯類や細胞株での遺伝子プロファイリングの相関を検討し、ヒトにおける腎障害の発現を齧歯類などの小動物での研究や細胞株を利用した *in vitro* 実験で予測する方法を探る

⑥ 予測される試料等提供者に対する危険及び不利益

手術は全て臨床上適応がある場合のみであり、切除範囲も臨床上必要な範囲のみに限定する。手術の臨床上適応・切除範囲および術式は、泌尿器科の治療方針に則り、最終的には術前カンファランスの出席者の合意をもとに選択される。本研究では予定切除範囲内の非腫瘍部分（または非罹患部）を分離して使用する。術者や助手など手術に直接関わるスタッフは検体を切除し、これを控えている検体処理要員へ渡すのみであるので、手術時間が著しく延長する可能性は低いと考えられる。これまでも病理検査目的での試料の処理は当院で安全に行われてきており、本研究のための試料提供により手術上の危険性および不利益はないと考える

⑦ 個人に関する情報の保護の方法

本学の個人識別情報管理者により連結不可能匿名化が行われる

(3) 試料等の種類及び量

試料等の種類: 腎臓切除領域のうち非罹患部分の組織 量:1-10 g 程度. 予定人数:120 人

(4) 共同研究機関の名称(あらかじめ共同研究機関を特定できない場合にはその理由及び将来参加が予測される共同機関の類型)。共同研究者の職・氏名

厚生労働省(国立医薬品衛生研究所), 毒性部室長 菅野純 ら との共同研究となる予定である

(5) 研究責任者、インフォームド・コンセントのための説明者その他研究実施担当者の所属・職名及び氏名

研究責任者

自治医科大学臨床薬理学講座 助手 大島康雄

インフォームド・コンセントのための説明者その他研究実施担当者

自治医科大学泌尿器科学講座	教授	徳江章彦
自治医科大学泌尿器科学講座	病院助手	黒川真輔
自治医科大学臨床薬理学講座	教授	藤村昭夫
自治医科大学臨床薬理学講座	助手	大島康雄

(6) インフォームド・コンセントのための手続及び方法

別紙説明書により研究責任者または説明者が説明する。同意が得られた場合には書面として記録に残す

(7) インフォームド・コンセントを受けるための説明文書及び同意文書

別紙のとおり

(8) 代諾者等を必要とする試料等提供者が予定されている場合には、その試料等が研究のために必須である理由及び代諾者等の選定に関する基本的な考え方

試料等提供者が未成年である場合は本研究においては本人の同意および代諾者の同意を必要とする。痴呆などのため代諾が必要となる場合は代諾者の同意を必要とする。代諾者の選定は、試料提供者の意志を尊重することができ、試料提供者について十分理解をしている成人であって、任意後見人・親権者・後見人もしくは保証人が定まっているときはその人または本人の配偶者・成人の子・父母・成人の兄弟姉妹・孫・祖父母・同居の親族またはそれらに準ずると考えられるひとを優先的に代諾者として考慮する。

(9) 遺伝情報の開示に関する考え方

連結不可能匿名化のため開示しない

(10) 研究実施前提供試料等を使用する場合には、その試料等の提供の時期、提供を受けたときの同意の有無、同意を得ている場合にはその内容、同意がない又は不十分な場合には研究対象として使用する必要性

本研究において研究実施前提供試料等を使用する予定はない

- (11) 他の研究実施機関から試料等又は遺伝情報の提供を受ける場合には、他の研究実施機関が受けるインフォームド・コンセントの内容

本研究において国立衛生研究所を含む基礎研究を行っている他の研究機関から動物実験などの基礎的遺伝情報の提供を受ける可能性がある。本研究では発現解析が目的であり、ヒトゲノム遺伝子情報の提供を受ける可能性はない。

- (12) 試料等又は遺伝情報を国内外の公的研究機関、営利を目的としない団体の研究機関又は他の大学に対して提供する場合には、次の事項
- ア 提供の必要性
 - イ 提供先の機関名
 - ウ 大学において行われる匿名化の方法
 - エ 匿名化しない場合には、その理由及び個人識別情報を含む情報の保護の方法
 - オ 試料等を提供する機関において、提供する試料等の遺伝子解析研究を行うか否か
 - カ 反復、継続して提供するか否か

本研究において収集された試料を国内外の公的研究機関／営利を目的としない団体の研究機関または他の大学に対して提供する予定はない

- (13) 試料等若しくは遺伝情報を国内外の営利を目的とする団体の研究実施機関に提供する場合又は国内外の民間の機関に遺伝子解析の一部の作業若しくは研究用資材の作成を委託する場合には、次の事項
- ア 提供の必要性
 - イ 提供先の機関名
 - ウ 大学において行われる匿名化の方法
 - エ 提供先における責任者の氏名、責任体制及び予定する契約の内容

本研究において試料等若しくは遺伝情報を国内外の営利を目的とする団体の研究実施機関に提供する場合又は国内外の民間の機関に遺伝子解析の一部の作業若しくは研究用資材の作成を委託する予定はない

- (14) 研究期間の終了後に研究遂行者が試料等を大学で保存する場合には、保存の方法及び必要性(他の研究への利用の可能性及び予測される研究内容を含む。)

試料は研究期間終了後まではフリーザーに凍結保存される。基本的には研究期間終了後は廃棄処分される。しかし、他の研究への利用について同意が得られた検体については、研究期間終了後に保存されている検体を使用して追加解析を行うことがある。これは学会で発表した時または論文を投稿した時に他の科学者から、研究の学術的価値をより高める目的で追加実験をすすめられることが希でないし、また、より学術的価値の高い研究へと発展させることは全ての研究について求められていることである。一方、本研究と明らかに趣旨の異なる研究への利用に関しては再度遺伝子解析研究の許可を申請してから行う。

- (15) ヒト細胞・遺伝子・組織バンクに試料等を提供する場合には、当該バンクを運営する機関の名称、当該バンクの名称及び責任者の氏名並びに試料等の匿名化の方法

本研究においてヒト細胞・遺伝子・組織バンクに試料等を提供する予定はない

- (16) 試料等を廃棄する場合には、廃棄の方法及びその際の匿名化の方法

試料を廃棄する時はオートクレーブした後に廃棄される。この時点では試料には、個人情報とは連結不可能な ID コードが付されているのみであるため、またオートクレーブ後は試料から遺伝情報を抽出するのが困難となるため通常の廃棄物として処分される

- (17) 第二群、第三群又は第四群試料等提供者から試料等の提供を受ける場合には、遺伝カウンセリングの必要性の有無(第一群試料等提供者から試料等の提供を受ける場合には、試料等提供者等からの求めに応じ、遺伝カウンセリングを実施するものとする。)

本研究は第三群試料等提供者*からの試料提供となる。連結不可能匿名化を実施しての解析なので遺伝カウンセリングは必要ない

(18) 研究資金の調達方法

厚生労働省・文部科学省・経済産業省などの公的グラント(研究資金)及び民間の研究助成金などをもって研究を実施する

遺伝子解析研究(研究題目薬物による腎障害の予防に関する研究)への協力のお願いと説明文書

これから、あなたにこの遺伝子解析研究への協力をお願いするため、研究の内容や研究協力に同意していただくための手続などについて説明します。

この説明を十分に理解し、研究に協力しても良いと考えられた場合には、「遺伝子解析研究への協力についての同意書」に署名又は記名・押印し、同意したということをはっきり示して下さるようお願いいたします。

1 遺伝子と病気

「遺伝」とは、「親の体質が子に伝わること」です。「体質」には、顔かたち、体つきのほか、病気にかかりやすいことなどが含まれます。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」に「子」という字が付き「遺伝子」となると、「遺伝を決定する小単位」という科学的な言葉になります。遺伝子の本体は「DNA」という物質です。「DNA」はA、T、G、Cという四つの塩基の連続した鎖です。塩基がいくつもつながって遺伝子になります。

1つの細胞の中には数万種類の遺伝子が散らばって存在しています。全ての遺伝情報を総称して「ゲノム」といいます。人体は約60兆個の細胞から成り立っていて、細胞の一つ一つに全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。一つは、精密な「体の設計図」です。受精した一つの細胞は分裂を繰り返して増え、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、最終的には約60兆個まで増えて人体を形作ります。二つ目は、「種の保存」です。先祖から現在まで「人間」という種が保存されてきたのも、遺伝子の働きによります。

ほとんど全ての病気は、その人の生れながらの体質(遺伝素因)と病原体、生活習慣などの影響(環境因子)の両者が合わさって起こります。遺伝素因と環境因子のいずれか一方が病気の発症に強く影響しているものもあれば、がんや動脈硬化などのように両者が複雑に絡み合っているものもあります。遺伝素因は遺伝子の違いに基づくものですが、遺伝子の違いがあればいつも病気になるわけではなく、環境因子との組合せも重要です。

2 研究に協力するかどうかを考えるために

この研究は、現在解析可能な全ての遺伝子発現について、その発現を解析し、薬物の有害反応を予測することが可能かどうかを調べることを目的としています。

あなたは、何らかの病気のために腎臓の摘出術が必要です。あなたの摘出腎臓組織を診療記録とともに、この研究に使用させていただきたいのです。

次に、あなたが、この研究に協力するかどうかを決めるために理解していただきたい事項について、順次説明します。

(1) 研究協力の任意性と撤回の自由

研究協力の任意性は任意です。あなたの自由意志で決めてください。協力の同意されてもされなくても、当院では同じように最善の医療を提供いたします。

いったん同意された場合でも、不利益を受けることなく、いつでも一方的に文書により同意を撤回することができます。その場合は提供いただいた腎臓組織や遺伝子解析の結果は破棄され、診療記録もそれ以降は本研究のために用いられることはありません。ただし、同意を撤回したとき既に研究結果が論文などで公表されていた場合や試料等が誰のものか完全に分からないようにする連結不可能匿名化されていた場合など、腎臓組織や遺伝子解析の結果を破棄できないことがあります。

(2) あなたが選ばれた理由

この研究では、腎臓組織について調べますので、腎臓の摘出術が必要と診断された方全てに研究への協力をお願いしています。あなたは、腎臓の摘出術が必要と診断されたので、研究への協力をお願いすることにしました。

(3) 研究の目的、意義、方法、期間、試料等の種類及び量

① 目的

化学物質(医薬品を含みます)のヒト腎細胞障害時の遺伝子発現を明らかにすることにあります。

② 意義

遺伝子発現情報を基に腎障害を来しうる化学物質を、開発段階で検出するための基礎データの構築

③ 方法