

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告書

肝切除症例の臨床的検討

分担研究者	自治医科大学消化器一般外科	永井秀雄
分担研究者	自治医科大学消化器一般外科	安田是和
研究協力者		佐田尚宏

研究要旨

2005年自治医科大学消化器一般外科では60例の肝切除術を施行した（男性43例、女性17例、平均年齢は55.0歳、肝移植ドナー15例を除くと61.8歳）。疾患別の内訳は転移性肝癌18例、肝細胞癌16例、肝移植ドナー15例、その他11例であった。術後合併症発症例は15例、内訳は創感染4例、呼吸器合併症2例、肝機能障害2例がみられた。再手術例は2例、術後入院死亡例は1例であった（morbidity 25.0%、mortality 1.7%）。十分にインフォームド・コンセントを行った上、薬剤曝露、遺伝子発現に関する研究に供するために3例の切除肝を提供した。

- A. 研究目的
- 2005年における当科における肝切除症例を臨床的に検討する。
- B. 研究方法
- 2005年における当科の肝切除症例の病歴および外科データベース¹⁾²⁾から、その臨床的特徴を抽出、検討する。
- C. 研究結果
- 2005年1月より12月までの12ヶ月間、自治医科大学消化器一般外科では2122名の入院症例があり、1407件の手術を行った。
- そのうち肝切除術を施行した症例は60例（男性43例、女性17例、平均年齢は55.0歳、肝移植ドナー15例を除くと61.8歳）であった。疾患別の内訳は転移性肝癌18例、肝細胞癌16例、肝移植ドナー15例、その他11例であった（表1）。術前併存症としては肝硬変、慢性肝炎が9例にみられ、その他高血圧8例、糖尿病5例、高脂血症3例、狭心症2例などがみられた（表2）。術後入院死亡は1例であった。術後合併症としては創感染4例、呼吸器合併症2例、肝不全2例、胆汁漏1例、門脈血栓1例などがみられた（morbidity 25.0%、表3）。

肝切除検体を薬剤曝露、遺伝子発現に関する研究に供するために肝切除量に配慮することはなかった。また検体を上記研究に供するときは、自治医科大学倫理委員会により承認された、説明文書および同意書を用い、十分にインフォームド・コンセントを行い、切除肝を実験に供した。

D. 考察

2005 年当科における入院数、手術件数は、2000 年と比較すると、入院件数で約 2.1 倍、手術件数で約 1.6 倍と著明な増加傾向にある。その中で肝切除術も、2000 年 39 例、2001 年 56 例、2002 年 71 例、2003 年 68 例、2004 年 78 例と増加したが、2005 年は 60 例であった（図 1）。2005 年の疾患別内訳では肝細胞癌、転移性肝癌で 56.7%を占めた。合併症率は 2002 年 18.3%、2003 年 13.2%、2004 年 24.4%と推移し、2005 年は 25.0%と前年並みであった。これは、2004 年以降、術前併存疾患あり症例が過半数を占め、手術高リスク症例が多かったためと考えられる。2005 年肝切除による術後入院死亡例は 1 例で、2003 年 1 例、2004 年 0 例と比較し、大きな変化はなかった。肝臓の薬剤代謝を考える上では、肝細胞癌症例は背景に肝硬変を認めるため、別個に検討する必要がある。転移性肝癌症例などが薬剤曝露、遺伝子発現の検討には有効であると考えられた。

E. 結論

2005 年当科における肝切除症例は 60 例あり、morbidity 25.0%、mortality 1.7%であった。近年当科における肝切除症例は、高リスク症例が増加の傾向にあり、2005 年も例年並みに安全に手術を施行し得た。

F. 参考文献

- 1) 自治医科大学消化器一般外科業績集 2004
- 2) 自治医科大学消化器一般外科業績集 2005

G. 健康危険情報

該当なし。

H. 研究発表

該当なし。

I. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

該当なし。

表 1 肝切除症例の疾患別内訳(2005 年)

転移性肝癌	18 例
肝細胞癌	16 例
肝移植ドナー	15 例
胆内結石症	6 例
肝内胆管癌	2 例
胆管癌	1 例
胆腫瘍・血管腫	1 例
総胆管拡張症	1 例
<hr/>	
計	60 例

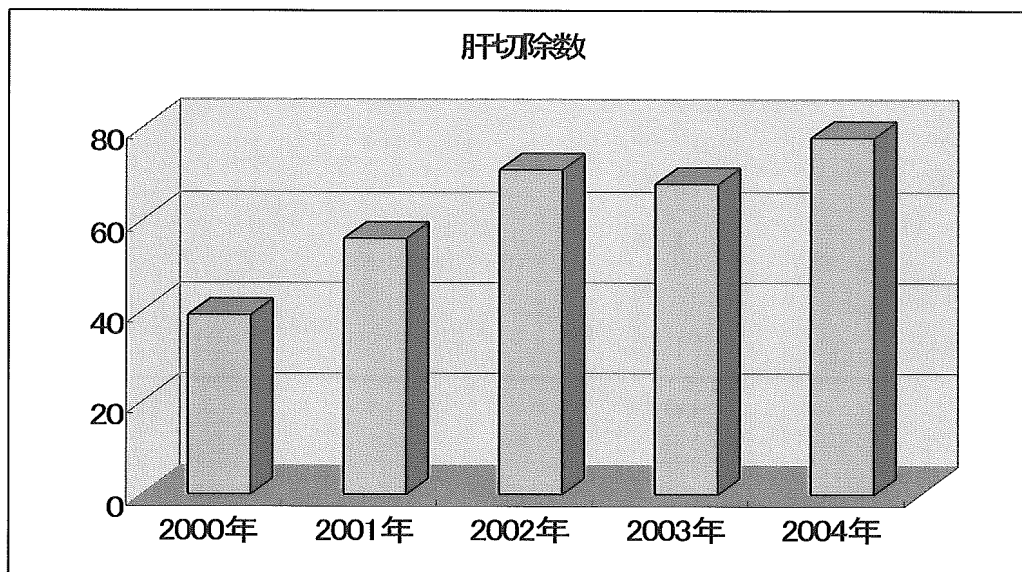
表 2 肝切除症例の術前併存症(2005 年、重複あり)

肝硬変・慢性肝炎	9 例
高血圧	8 例
糖尿病	5 例
高脂血症	3 例
脳梗塞	3 例
心疾患	2 例
その他	4 例
<hr/>	
計	34 例

表 3 肝切除術の術後合併症(2005 年)

創感染	4 例
呼吸器合併症	2 例
肝不全	2 例
胆汁漏	1 例
門脈血栓	1 例
術後せん妄	1 例
腹腔内膿瘍	1 例
その他	3 例
<hr/>	
計	15 例

図1 肝切除数の年別推移(2000-2004年、自治医科大学消化器一般外科)



(別紙 1) 研究計画書・説明文書および同意書

(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 11 月 12 日 変更許可申請, 平成 15 年 1 月 8 日 変更許可再申請, 平成 15 年 2 月 3 日 変更許可決定通知, 平成 15 年 12 月 8 日 変更許可申請)

研究計画書

課題名: 薬物による肝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つては、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。対象は肝臓の腫瘍性疾患など(肝臓原発の腫瘍・他臓器原発の腫瘍性疾患で肝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、医学的に治療上肝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、薬物性の肝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

化学物質のヒト肝細胞障害時の遺伝子発現を明らかにすることにある。化学物質を肝臓の細胞に *in vitro* で作用させた場合の遺伝子発現の変化を肝障害が懸念される化学物質とそうでない化学物質などで GeneChip®を用いて比較検討する。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肝障害(細胞障害)を引き起こさないが、個体

としてのヒトでは肝障害を引き起こす化学物質がある。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肝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

様々な化学物質を *in vitro* で肝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)の肝臓組織を用いて、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。肝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肝障害を来す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、ヒトにおける化学物質性肝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、外科の治療方針に則り、最終的には術前カンファレ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： 肝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

自治医科大学外科学講座 教授 永井秀雄

自治医科大学外科学講座 教授 安田是和

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肝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、化学物質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肝臓の摘出術が必要です。あなたの摘出肝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

研究協力の同意するかどうかは任意です。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肝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、肝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、肝臓組織について調べますので、肝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、肝臓の摘出術が必要と診断されましたので、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

化学物質のヒト肝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肝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

取り出した肝臓組織に様々な化学物質を作用させ、遺伝子発現の変化を解析します

④ 期間

研究許可を得てから平成 19 年 6 月 30 日まで

⑤ 試料等の種類量

試料等の種類：肝臓切除領域のうち非罹患部分²の組織 量：術式によるが最大 10 g 程度（部分切除術 1-2g 程度、区域切除 5g程度、葉切除 10g程度）

4. 研究責任者の氏名、職名及び所属名

大島康雄, 助手, 自治医科大学臨床薬理学講座

² 正常組織が切除されてしまう理由は：

自治医科大学附属病院での肝臓腫瘍の手術では多くの場合、治療目的の病変以外の正常組織もやむなく切除しています。これは例えば部分切除術であれば切除の操作上完全に正常組織と病変部位を分離することが困難であるためです。さらに、安全性を確保する目的で区域切除・葉切除を行う場合には腫瘍と同一の区域内・葉内の正常組織が切除されます。このように本研究で利用させていただきます組織は、病変に付随してやむなく切除されてしまう正常組織であります。さらに術式については本研究へご協力していただくかどうかにかかわらず外科学教室で病気の治療として最善と考えられる方法を選択いたします。実際に'やむなく切除されてしまう正常組織'は、腫瘍部位、腫瘍サイズ、術式により幅があります。

5. 予想される研究結果

非腫瘍性(または非罹患部)の肝臓組織を用いて、様々な化学物質を作用させた場合の遺伝子発現情報が得られます。肝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情報を比較すると肝障害を来しやすい化学物質に特異的な遺伝子発現情報を得られることが予想されます。中期的には、これらの情報と齧歯類での遺伝子発現情報の相関を検討し、ヒトにおける化学物質性肝障害の発現を齧歯類などの小動物での研究や動物を使用しない試験管内での実験などで予測する方法を探ります

6. 試料等を提供した人にとって予想される危険、利益及び不利益

提供いただく試料肝組織の採取は、手術で切除された肝臓を処理して使用します。手術そのものは試料の提供の有無にかかわらず最善と判断される方法で常に行いますので、試料提供により加わる危険性は全くありません。試料をいただきましたら個人情報と完全に切り離して解析されますので、解析結果がいかなるものであれ個人情報とリンクしてご提供いただいた方にとって不利益となる可能性はありませんが、解析結果を今後の患者さんご本人の治療へ直接結びつけて役に立てることもできません。研究データが蓄積し、肝臓に障害を引き起こしうる化学物質を早期に発見することができるようになれば、これらのデータが社会に還元され、多くの方の役に立つと言う意味では間接的には患者さんへの利益になると言えます。

7. 研究計画などを見たいとき

希望があれば、個人情報の保護や研究の独創性の確保に支障を来さない範囲内で、この研究計画の内容を見ることができます。また、遺伝子を調べる方法等に関する資料が必要な場合も用意いたします。

8. 個人情報の保護

遺伝子解析の結果は、いろいろな問題を引き起こす可能性があるために、他人に漏れないように取扱いを慎重にしています。解析を開始する前に、あなたの肝組織や診療情報からは住所、名前等が削られ、代わりに新しい符号がつけられます。これを匿名化といいます。

あなたとこの符号とを結びつける対応表は、本研究では作成されません。これを連結不可能匿名化といいます。

9. 試料等又はそれから得られた遺伝情報を他の機関へ提供する可能性

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可能性があります。本研究と並行して行われる, 動物や細胞株などを使用した基礎研究は厚生労働省の研究所などで行われ, 我々の研究と照らし合わせて, それらは完成した研究成果となります。この場合も, 遺伝子発現の情報は, どの患者さん由来の細胞における遺伝子発現であるかは完全に判らない形で情報が提供されます。

10. 遺伝子解析結果の伝え方

この研究では, どの解析結果がどの患者さんの肝臓由来の情報であったか完全にわからない形で行われますので, 解析結果を個々の患者さんやご家族に伝えることは不可能です。

11. 知的財産権が生じたとき

遺伝子解析の結果として特許権などが生じる可能性があります, その権利は, 大学や研究者等に属し, あなたには属しません。また, その特許権などにより経済的利益が生じる可能性があります, あなたはこれについても権利がありません。

12. 研究結果の公表

ご協力によって得られた結果は, 個人が誰であるか分からないようにした上で, 学会や学術雑誌, データベース上などで公に発表されることがあります。また, 研究資金の提供者である厚生労働省や文部科学省やその関連機関などや民間の研究助成団体などとの間に結ばれた契約に従い, それぞれの資金提供者へ報告書を作成提出することになります。この場合も研究へ参加した個人が特定できない様にした上で報告書が作成されます。

13. 試料等の保存、使用及び廃棄の方法

提供いただいた試料である非罹患部肝臓組織およびこれより抽出いたしました核酸は, 自治医科大学臨床薬理学において厳重に保管し, 本研究のために使用されます。一方, 病理組織は通常の手術標本として自治医科大学附属病院病理診断部で臨床診断のために処理され, 通常の方法で保管されます。非罹患部の組織に関しまして, もし, あなたが同意してくだされば, 将来の研究のための貴重な資源として研究終了後も保管させていただきます。この場合も, (8)で説明した方法により, 誰の試料か分からないようにしたまま, 試料を使い切るまで保管します。試料を廃棄する場合は, 匿名のまま密封容器に廃棄するか又は焼却処分します。将来, 試料を医学研究に用いる場合には, 改めて研究計画書を提出し, 自治医科大学生命倫理委員会等の承認を受けます。

14. 試料等をヒト細胞・遺伝子・組織バンクに提供し、一般的に研究資源として分譲する可能性

試料等をヒト細胞・遺伝子・組織バンクに提供し、一般的に研究資源として分譲する予定はありません

15. 遺伝カウンセリングの利用

本研究に関連した遺伝子解析結果と関連した遺伝カウンセリングは行いません。疑問点は担当医にご相談ください。

16. 試料等の提供は無償・無報酬

遺伝子解析は研究費によって行なわれますので、あなたが費用を負担することはありません。また、この研究への協力に対して、あなたへの報酬は支払われません。

この研究の費用は、厚生労働省など公的機関からの研究費や民間の研究助成金などの研究費によっています。

17. 問い合わせ、苦情の受付

この遺伝子解析研究についてのお問い合わせは、研究責任者までご連絡下さい。苦情がある場合は、自治医科大学大学事務部学事課(電話 0285-44-7044)で受け付けます。

平成 年 月 日

研究責任者:自治医科大学[臨床薬理学講座・助手・大島康雄]

〒329-0498 栃木県河内郡南河内町薬師寺 3311-1 電話 0285-58-7388

遺伝子解析研究への協力についての同意書

自治医科大学学長 高久史麿 殿

私は、遺伝子解析研究:研究題目薬物による肝障害の予防に関する研究に関して、 から説明文書を用いて説明を受け、その方法、危険性、分析結果のお知らせの方法等について十分理解しました。については、次の条件で研究に協力することに同意します。

説明を受け理解した項目(□の中にご自分でチェックの印を付けてください。)

- 遺伝子について
- 研究の協力は任意で協力しなくても不利益を受けないこと。同意の撤回も文書によって自由にできること。
- 研究の目的と方法
- 希望により研究計画書等を見ることができること。
- 試料等提供者にもたらされる利益と不利益
- 個人情報の保護の方法
- 遺伝子解析結果の説明の方針
- 研究結果の公表
- 研究から財産権が生じても試料等提供者には帰属しないこと。
- 研究終了後の試料等の取扱の方針
- 解析に関する費用負担は無く、試料等の提供に対する報酬の支払いも無いこと。
- 希望により遺伝カウンセリングが受けられること。

1 私は上記の項目のすべての□にチェックの印を記入した上で、私の提供する試料(肝組織)等が、本遺伝子解析研究に使用されることに同意します。

本人又は代諾者の署名又は記名・捺印

2 上記 1 で同意された方は、下記の 2-1 又は 2-2 のどちらかを選択し、番号を丸で囲み、署名又は記名・捺印してください。

2-1 提供する試料等を本研究のみに使用し、かつ本研究の終了時には速やかに破棄してください。

2-2 提供する試料等が本研究に使用されるとともに長期間保存され、将来新たに計画・実施される遺伝子の解析を含む医学研究に使用されることに同意します。

本人又は代諾者の署名又は記名・捺印

平成 年 月 日

本人の氏名

住所

電話

本人又は代諾者の署名又は記名・捺印

代諾者の場合は本人との関係

代諾者の住所

電話

説明者の職名・氏名

説明者の署名又は記名・捺印

(患者が未成年の場合は本人と代諾者の2通必要です。患者が痴呆などのため代諾者が同意する場合は本人の同意書は必要ありません)

分担研究者 森田辰男 自治医科大学腎泌尿器外科学教授

分担研究者 大島康雄 自治医科大学臨床薬理学助手

研究要旨

本プロジェクト目的は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であり、ヒト腎臓検体の採取における臨床試料の安定供給ならびに品質管理は本研究の根幹をなす。また、日本人のプライマリー腎臓細胞を安定して得ることは今後、様々なin vitroの薬物曝露・毒性研究において、人種間の薬物に対する反応性の相違や、日本人における個人差を検討する上でも重要となる。さらに得られた細胞が凍結した状態で保存され、再度培養曝露実験に使用することができれば、そのハンドリング上の自由度が増すために研究を推進する上で大きなメリットといえる。本プロジェクトの開始より平成17年度までの間に本院で片腎摘出術が施行された症例で、インフォームドコンセントを得て本研究へエントリーし細胞分離に成功した12症例の細胞につき、細胞の増殖・形態の変化・凍結保存の影響等につき検討した。

A. 研究目的

臨床腎臓検体のプライマリーカルチャーで得られた細胞の培養および凍結融解の影響の検討。

検討した。また、凍結融解の影響については凍結前の培養細胞より抽出したRNAと凍結融解後に培養して抽出したRNAの遺伝子発現解析を行い、凍結融解前後における遺伝子発現の差の有無について検討した。

B. 研究方法

本プロジェクトの開始より平成17年度までの間に本院で片腎摘出術が施行された症例で、インフォームドコンセントを得て本研究へエントリーし細胞培養に成功した12症例の細胞につき検討した。得られた細胞はその形態から線維芽細胞とは明らかに異なる上皮性の細胞であったため、尿管細胞と考えられたが、確認のために膜表面Glut-2タンパク質の発現をFACSで、 γ GTPの発現を細胞化学的にそれぞれ評価した。さらに培養上清中の β 2ミクログロビンとNAGの濃度を測定した。長期の培養による影響を倒立位相差実体顕微鏡を用いて形態を観察することにより

(倫理面への配慮)

本研究に用いた細胞はすべて、当大学の倫理評価WGが承認した方法で得た臨床検体である。

C. 研究結果

本プロジェクトの開始より平成17年度までの間に本研究へエントリーし解析した症例において、細胞の分離に成功したのは12例であった。得られた細胞は、形態的には上皮由来のほぼ均一なものであった。これらの細胞には膜表面Glut-

2、 γ GTP、NAGが発現しており、検討した範囲では尿細管由来の細胞として矛盾がなかった。これらの細胞形態は、培養開始より約4週間目まではほぼ変化がないものと考えられた。しかし5週間目から6週間目にかけて、紡錘形でより細長い形態の細胞が散在してくるようになった。この細長い形態の細胞は線維芽細胞の形態と類似しており、また長期のプライマリーカルチャー細胞を培養するに従い増殖してくる点からも、線維芽細胞として矛盾がなかった。プライマリーカルチャー腎臓細胞を用いたその凍結前後で、無刺激の遺伝子発現を比較したところ、Cross Gene Error Modelingで発現解析に供することができると考えられたデータレンジにある範囲では、有意な遺伝子発現の差を呈した遺伝子は認めなかった。

D. 考察

臨床腎臓検体のプライマリーカルチャーで得られた細胞群は、組織特異的な純化の手順を含まないために、腎臓皮質に存在する様々な種類の細胞群の混在したものである。しかし、細胞純化の過程で行う遠心や酵素処理に対する細胞の感受性などの差により、結果として得られた細胞群の多くは尿細管細胞であった。プライマリーカルチャー細胞は、多くの場合増殖速度が遅い。一方、線維芽細胞などの混入細胞の一部は比較的増殖速度が速い。したがって、当初検鏡上ほとんど確認することのできないほど少数のポピュレーションであった線維芽細胞が、長期の培養により増殖してくることが考えられる。このため、当初均一な、ほとんどが尿細管由来と考えられる細胞集団であったものが、5週目以降は線維

芽細胞と思われる細胞が増殖し、培養6週目頃には培養細胞の半数近くまでが線維芽細胞様の細胞に置き換わった。したがって、腎臓の細胞を用いた薬物曝露遺伝子発現解析は、このような線維芽細胞の増殖が生じる前に行うことが望まれる。4週間目程度までに曝露実験を行うことが必要と考えられた。未刺激の細胞を用いた実験では、凍結融解前後の遺伝子発現に有意な変化は全く見られなかった。このように凍結融解前後で細胞の基本的な性質に有意な変化があるという証拠は得られなかった。従って、凍結細胞を研究に用いても、未凍結のプライマリーカルチャーと同様の研究結果を得ることができると期待された。一方、近年腹腔鏡下での手術などの普及に伴い、手術中に研究用の細胞を得る機会はますます減少してくるものと考えられる。このため、手術のスケジュールに依存しない、凍結プライマリーカルチャー細胞の利用は、このような研究をさらに推進する上で非常に有用と考えられる。また、これらの細胞の利用を希望する学外の共同研究者への配布も凍結状態で行えるため、より好ましいと考えられる。

E. 結論

臨床腎臓検体のプライマリーカルチャー細胞は培養開始後4週間以内に研究に使用することが必要である。凍結融解は細胞の遺伝子発現に有意な変化を与えず、凍結保存の細胞への影響は考慮しなくて良いと思われる。今後様々な研究に凍結細胞を応用することが可能であると考える。