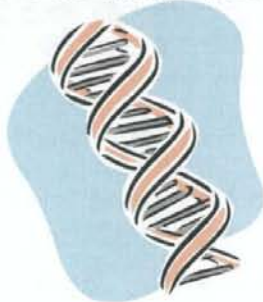


1 遺伝子発現と病気、薬の作用について

遺伝子とは人間の体をつくる設計図に相当するものです。ヒトには約2万5千個の遺伝子があると考えられます。ヒトの体は約60兆個の細胞から成り立っていますが、この細胞一つ一つにすべての遺伝子が含まれています。遺伝子には膨大な情報がDNA(デオキシリボ核酸)の配列という形で記録されています。その一部がRNA(リボ核酸)の配列に移し換えられ、その情報に従って蛋白質が組み立てられて機能を発揮することになります。すなわちヒトの体は遺伝子の指令に基づいて維持されています。それぞれの遺伝子から蛋白質が組み立てられる度合いは細胞の種類によって異なるため、心臓や肝臓などそれぞれの臓器の細胞が違った働きをもつことが可能となるわけです。また、糖尿病や癌など病的な状態ではさまざまな遺伝子の蛋白質への組み立て(これを遺伝子発現といいます)が増減しており、これらの変化は病気の状態と密接に関連しているものと考えられます。同じように、薬の副作用の出やすさの個人差も、いくつかの遺伝子の遺伝子発現量の違いによって説明できるものと考えられます。したがって、さまざまな遺伝子発現の変化を詳しく調べることにより、薬の副作用の予防法や治療法の開発につながるものが期待されます。



2 研究に協力するかどうかを考えるために

残念なことに、あなたにも薬の副作用と思われる症状が出現しました。この研究は、その副作用がでるかでないかが予測可能か、その副作用がどうして生じるのか、その副作用を予防するためにはどうすればよいのかを明らかにすることを目的としています。

そこで、あなたの末梢血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

研究協力に同意するかどうかは任意です。あなたの自由意思で決めてください。協力に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末梢血や遺伝子発現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には、遺伝子発現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、薬の副作用と考えられる症状が出現した方を対象にしていますので、あなたに研究へのご協力をお願いしています。

なお、未成年の方、高度の貧血がある方は、本研究にご協力いただけません。



(3) 研究の目的、意義、方法、期間、試料等の種類及び量

研究の目的

多くの薬は副作用をきたすことがあり、治療をする上で大きな問題となっています。現在のところ、ほとんどの副作用は、どういう患者さんにどのような原因で起こってくるのかはわかっていません。

そこで、この研究では、副作用が起きているとき（または回復後1週間以内）と副作用が完全によくなったときにあなたから末梢血を少量ずついただき、副作用が起こったときに血液（血球）中の遺伝子発現がどのように変化していたかを調べます。そして、遺伝子発現パターンから副作用が生じる原因を解明し、副作用の予防法や治療法を開発することを目指します。

研究の意義

現在は不可能な「副作用の予測」が可能になれば、副作用のでやすい患者さんではその薬を使用しないことによって、副作用に苦しむ患者さんをなくすことができます。また、「副作用がどうして起こるか」がわかれば、副作用がでる危険が高い薬をどうしても使用しなくてはならない場合に、副作用が出現しないように予防することや副作用を適切に治療することが可能になることが期待されます。さらに、副作用のない薬を作ることもできるかもしれません。したがって、この研究の成果は、薬の安全性を向上させることとなります。



研究の方法

この研究のために、あなたの治療法を変更したり、外来を受診していただくことは一切ありません。

あなたにお願いすることは、少量（1回につき計 10 ml）の採血をさせていただくことのみです。採血は、副作用が起きているとき（または回復後 1 週間以内）と副作用が完全になくなったときの 2 回させていただきます。副作用がなくなってからすでに 1 週間以上が経っている場合には、1 回のみ採血をお願いします。また、副作用が完治する前に転院された場合などは、副作用が起きているときの血液のみを研究に使わせていただきます。なお、あなたの臨床情報を、主治医や診療録（電子カルテ）から集めさせていただきます。

遺伝子発現解析は、あなたから頂いた末梢血より RNA を抽出し、マイクロアレイ法という方法を用いて行います。マイクロアレイ法は、すべての遺伝子の発現量を一度に調べることができる方法です。あなたの結果を他の患者さんの結果と合わせて解析し、それぞれの副作用に特徴的な遺伝子発現変化を明らかにします。マイクロアレイ法を用いることにより、1 つや 2 つの遺伝子の発現変化では判定できない場合にも、複数の遺伝子の発現変化を合わせてみることでその特徴を同定できる可能性が高まります。選択した遺伝子群については、real-time PCR 法という方法でも遺伝子発現量を確認します。

こうした遺伝子発現量の測定はやや煩雑なのですが、遺伝子によってはその遺伝子が調節するタンパク質などの血中濃度で遺伝子発現量を代用できるかもしれません。もしも、タンパク濃度を指標とした評価法が確立すれば、簡単ないわゆる血液検査により副作用発現予測が可能になります。また、遺伝子によっては、薬の血中濃度に影響する可能性もあります。そこで今回は、血中のタンパク質や薬物などの濃度の測定が必要になった時のために、遺伝子発現解析用の血液とは別に、あなたの血清も研究期間終了時まで保存させていただきます。

研究期間

平成 21 年 1 月 14 日から平成 23 年 3 月 31 日まで

試料の種類および量

静脈血

1 回 10 ml 2 回（計 20 ml）



(4) 研究責任者の氏名、職名及び所属名

安藤 仁 臨床薬理学 講師

(5) 予想される研究結果

薬の副作用の予測が可能となり、個々の患者さんの副作用予測や副作用を生じない安全な薬の開発ができるようになります。また、副作用の原因が明らかとなり、治療法の開発にもつながります。

(6) 試料等を提供した人にとって予想される危険及び不利益

本研究のためにご協力いただくことは通常の方法で行われる腕からの静脈血採血のみであり、その量は比較的少なく、また、高度の貧血を有する患者さんには参加をお願いしていません。この研究のために新たに加わる危険性はほとんどありません。この研究への参加によって、あなたの治療法が変更されたり、受診間隔が変更されたり、医療費が増加することはありませんので、あなたへの不利益もないと予想されます。この研究のために費用をご負担いただくこともありません。

(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、遺伝子発現を調べる方法等に関する詳しい資料が必要な場合も用意いたします。

(8) 個人情報の保護

個人情報は、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、あなたの血液検体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、研究責任者が手書きのノートの上に記載し、施錠の上、厳重に管理します。これを連結可能匿名化といいます。こうすることによって、あなたの遺伝子発現解析を行なう者には符合しか分からず、誰の遺伝子発現を解析しているのが分からなくなります。また、最近はインターネットやパソコン等を通じた個人情報の漏洩がしばしば問題となっていますので、個人を特定できる情報は、一切、電子ファイル化いたしません。



(9) 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可能性

あなたからいただいた試料等またはそれから得られた情報を他の機関へ提供することはありません。

(10) 遺伝子発現解析結果の伝え方

遺伝子発現量の測定は匿名化した状況下でのみ行い、その結果は多くの患者さんの結果と合わせて解析します。その結果、なんらかの結果が見出されたとしても、その意義を明

らかにし、実際に応用するには、更に多くの研究が必要です。したがって、あなた自身の薬の使い方などにすぐに有益な結果が出る可能性は低いので、あなたを含め誰にも解析結果を開示することはありません。

(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。

(13) 試料等の保存、使用及び廃棄の方法

提供いただいた血液検体、血清および抽出した核酸は、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。しかし、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それらを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

提供いただいた試料をヒト細胞・遺伝子・組織バンクに提供することはありません。

(15) 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、厚生労働科学研究費補助金によっています。

(16) 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 0285-58-7550）で受け付けます。

研究責任者：自治医科大学医学部薬理学講座臨床薬理学部門 講師

安藤 仁

〒329-0498 栃木県下野市薬師寺 3311-1 電話 0285-58-7388

資料 6

○自治医科大学動物実験規程

(平成 19 年規程第 40 号)

(趣旨)

第 1 条 この規程は、動物の愛護及び管理に関する法律(昭和 48 年法律第 105 号、以下「法」という。)、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(平成 18 年環境省告示第 88 号、以下「飼養保管基準」という。)、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針(平成 18 年文部科学省告示第 71 号)、日本学術会議が策定した「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」その他の関係法令等(以下「法令等」という。)に基づき、自治医科大学(以下「本学」という。)における動物実験等について、科学的観点、動物愛護の観点及び環境保全の観点並びに動物実験等を行う教職員、学生等の安全確保の観点から適正に行うため、必要な事項を定めるものとする。

(基本原則)

第 2 条 動物実験等の実施に当たっては、次の各号に定める動物実験等の基本の原則に基づき適切に実施しなければならない。

- (1) 代替法の利用(Replacement) 科学上の利用の目的を達することができる範囲において、できる限り動物を供する方法に代わり得るものを利用すること。
- (2) 使用数の削減(Reduction) 科学上の利用の目的を達することができる範囲において、できる限りその利用に供される動物の数を少なくすること。
- (3) 苦痛の軽減(Refinement) 科学上の利用に必要な限度において、できる限り動物に苦痛を与えない方法によってしなければならないこと。

(定義)

第 3 条 この規程において、次の各号に掲げる用語の意義は、当該各号に定めるところによる。

- (1) 動物実験等 実験動物を教育、試験研究又は生物学的製剤の製造の用その他の科学上の利用に供することをいう。
- (2) 飼養保管施設 自治医科大学実験医学センター(以下「センター」という。)及びセンター以外の実験動物を恒常的に飼養若しくは保管又は動物実験等を行う施設・設備をいう。
- (3) 実験室 センター以外で動物実験等のみ(48 時間以内の一時的保管を含む。)を行う動物実験室をいう。
- (4) 施設等 飼養保管施設及び実験室をいう。
- (5) 実験動物 動物実験等の利用に供するため、施設等で飼養又は保管している哺乳類、鳥類又は爬虫類に属する動物(施設等に導入するために輸送中のものを含む。)をいう。
- (6) 動物実験計画 動物実験等の実施に関する計画をいう。

- (7) 動物実験実施者 動物実験等を実施する者をいう。
- (8) 動物実験責任者 動物実験実施者のうち、動物実験等の実施に関する業務を統括する者をいう。
- (9) 管理者 自治医科大学学長（以下「学長」という。）の命を受け、実験動物及び施設等を管理する医学部長、看護学部長、自治医科大学学則第42条に規定する教育研究施設の長、自治医科大学医学部学科目及び講座に関する規程第3条に規定する講座の主任教授及び学長が別に定める者をいう。
- (10) 実験動物管理者 管理者を補佐し、実験動物に関する知識及び経験を有する実験動物の管理を担当する者をいう。
- (11) 飼養者 実験動物管理者又は動物実験実施者の下で実験動物の飼養又は保管に従事する者をいう。
- (12) 管理者等 学長、管理者、実験動物管理者、動物実験実施者及び飼養者をいう。

(適用範囲)

第4条 この規程は、本学において実施される哺乳類、鳥類又は爬虫類の生体を用いる全ての動物実験等に適用する。

2 動物実験責任者は、動物実験等の実施を本学以外の機関に委託等する場合は、委託先においても、法令等に基づき、動物実験等が実施されることを確認しなければならない。

(動物実験委員会)

第5条 本学に、動物実験等の適正な実施に関し必要な事項を審議又は調査するため、自治医科大学動物実験委員会（以下「委員会」という。）を置く。

2 委員会は、次の各号に掲げる事項について審議又は調査し、学長に報告又は助言する。

- (1) 動物実験計画の法令等及びこの規程への適合性に関すること。
- (2) 動物実験計画の実施状況及び結果に関すること。
- (3) 施設等の法令等及びこの規程への適合性並びに実験動物の飼養保管状況に関すること。
- (4) 動物実験等及び実験動物の適正な取扱い並びに法令等に関する教育訓練に関すること。
- (5) 自己点検・評価に関すること。
- (6) その他動物実験等の適正な実施のために必要な事項に関すること。

(委員会の構成等)

第6条 委員会は、次の各号に掲げる委員をもって構成する。

- (1) 動物実験等に関して優れた識見を有する者 2名以上
- (2) 実験動物に関して優れた識見を有する者 2名以上
- (3) その他学識経験を有する者 2名以上

2 委員会に委員長を置き、自治医科大学実験医学センター長（以下「センター長」という。）をもって充てる。

3 委員は、委員長の推薦に基づき、学長が委嘱する。

4 委員の任期は2年とし、再任を妨げない。

5 委員に欠員が生じたときは、その都度補充する。この場合における委員の任期は、前任者の残任期間とする。

6 委員長は、委員会を招集し、その議長となる。

7 委員長は、必要があると認めるときは、委員の中から副委員長を指名することができる。

8 委員長に事故あるとき、欠けたとき又は審議に加われないときは、副委員長又は委員長があらかじめ指名する委員がその職務を代理し、又は職務を行う。

(動物実験計画の立案、申請、審査等)

第7条 動物実験責任者は、動物実験等により取得されるデータの信頼性を確保する観点から、次の各号に掲げる事項を踏まえて動物実験計画を立案し、動物実験計画承認申請書(別記様式第1号)により学長に承認を申請しなければならない。

(1) 研究の目的、意義及び必要性を明確にすること。

(2) 代替法を考慮して、実験動物を適切に利用すること。

(3) 実験動物の使用数削減のため、動物実験等の目的に適した実験動物種の選定、動物実験成績の精度及び再現性を左右する実験動物の数、遺伝学的及び微生物学的品質並びに飼養条件を考慮すること。

(4) 苦痛の軽減により動物実験等を適切に行うこと。

(5) 致死的な毒性試験、感染実験、放射線照射実験その他の苦痛度の高い動物実験等を行う場合は、人道的エンドポイント(実験動物を激しい苦痛から解放するための実験を打ち切るタイミングをいう。)の設定を検討すること。

2 学長は、前項の申請書を受理したときは、委員会に実験計画の適否について審査を付託するものとする。

3 委員会は、前項の審査の過程において、必要に応じ、動物実験責任者に対し、助言を与え、又は動物実験計画を修正させる等、動物実験等の承認に当たって必要な措置を講じることができるものとする。

4 学長は、委員会の審議結果に基づき、実験計画を承認するか否かの決定を行い、速やかに動物実験責任者に通知するものとする。

5 動物実験責任者は、動物実験計画について学長の承認を得た後でなければ、実験を行うことができない。

(動物実験等の実施)

第8条 動物実験実施者は、動物実験等の実施に当たっては、法令等に従うとともに、次の各号の事項を遵守しなければならない。

(1) 適切に維持管理された施設等において動物実験等を行うこと。

(2) 動物実験計画書に記載された事項及び次に掲げる事項に関すること。

ア 適切な麻酔薬、鎮痛薬等の利用

イ 実験の終了の時期(人道的エンドポイントを含む。)の配慮

ウ 適切な術後管理

エ 適切な安楽死の選択

(3) 安全管理に注意を払うべき実験(物理的若しくは化学的に危険な材料、病原体又は遺伝子組換え動物等を用いる実験をいう。)については、関係法令等及び本学における関連規程等に従うこと。

(4) 安全管理に注意を払うべき実験については、安全のため適切な施設や設備を確保すること。

(5) 実験実施に先立ち必要な実験手技等の習得に努めること。

(6) 浸襲性の高い大規模な存命手術に当たっては、経験等を有する者の指導の下で行うこと。

2 動物実験責任者は、動物実験計画を実施した後、動物実験実施結果報告書(別記様式第2号)により、使用動物数、計画からの変更の有無、成果等について、学長に報告しなければならない。

(実験計画の変更又は継続)

第9条 第7条第4項の規定に基づき動物実験計画の承認を得た動物実験責任者は、当該実験計画の内容を変更しようとするとき、又は当該実験計画を次年度においても継続実施しようとするときは、その都度、動物実験計画承認申請書(別記様式第1号)により学長の承認を得なければならない。

2 第7条第2項、第3項、第4項及び第5項の規定は、動物実験計画の内容の変更又は継続申請について準用する。

(実験の中止)

第10条 動物実験責任者は、動物実験計画を中止したときは、動物実験中止報告書(別記様式第3号)及び動物実験実施結果報告書(別記様式第2号)により、学長に報告しなければならない。

(飼養保管施設の設置)

第11条 実験動物の飼養若しくは保管又は動物実験等は、センター又は学長の承認を得た飼養保管施設でなければ行うことができない。

2 管理者は、本学(センターを除く。)に飼養保管施設を設置(変更を含む。)しようとするときは、飼養保管施設設置承認申請書(別記様式第4号)により学長に承認を申請しなければならない。

3 学長は、前項の申請を受けたときは、委員会に調査させ、その調査結果及び助言に基づき、飼養保管施設の設置を承認するか否かの決定を行うものとする。

4 学長は、前項の決定を行ったときは、速やかに当該管理者に通知するものとする。

(飼養保管施設の要件)

第12条 飼養保管施設は、次の各号に掲げる要件を満たさなければならない。

(1) 適切な温度、湿度、換気、明るさ等を保つことができる構造等であること。

(2) 動物種、飼養保管数等に応じた飼養設備を有すること。

- (3) 床、内壁等の清掃、消毒等が容易な構造で、器材の洗浄、消毒等を行う衛生設備を有すること。
- (4) 実験動物が逸走しない構造及び強度を有すること。
- (5) 臭気、騒音、廃棄物等による周辺環境への悪影響を防止する措置がとられていること。
- (6) 実験動物管理者が置かれていること。

(実験室の設置)

第 13 条 動物実験等(48 時間以内の一時的保管を含む。)は、飼養保管施設又は学長の承認を得た実験室でなければ行うことができない。

- 2 管理者は、飼養保管施設以外において、実験室を設置(変更を含む。)しようとするときは、実験室設置承認申請(別記様式第 5 号)により学長に承認を申請しなければならない。
- 3 学長は、前項の申請を受けたときは、委員会に調査させ、その調査結果及び助言に基づき、実験室の設置を承認するか否かの決定を行うものとする。
- 4 学長は、前項の規定による決定を行ったときは、速やかに当該管理者に通知するものとする。

(実験室の要件)

第 14 条 実験室は、次の各号に掲げる要件を満たさなければならない。

- (1) 実験動物が逸走しない構造及び強度を有し、実験動物が室内で逸走しても捕獲しやすい環境が維持されていること。
- (2) 排泄物、血液等による汚染に対して、清掃及び消毒が容易な構造であること。
- (3) 常に清潔な状態を保ち、臭気、騒音、廃棄物等による周辺環境への悪影響を防止する措置がとられていること。

(施設等の維持管理及び改善)

第 15 条 管理者は、実験動物の適正な管理並びに動物実験等の遂行に必要な施設等の維持管理及び改善に努めなければならない。

- 2 センター長は、センターにおける前項の維持管理及び改善の状況について、毎年、学長及び委員会に報告しなければならない。

(施設等の廃止)

第 16 条 管理者は、施設等(センターを除く。)を廃止するときは、施設等廃止届(別記様式第 6 号)により学長に届け出なければならない。

- 2 管理者は、施設等を廃止するときは、必要に応じて、動物実験責任者と協力し、飼養保管中の実験動物を他の飼養保管施設に譲り渡すよう努めなければならない。

(マニュアルの作成と周知)

第 17 条 管理者及び実験動物管理者は、飼養保管のためのマニュアル(標準操作手順をいう。)を定め、動物実験実施者及び飼養者に周知しなければならない。

(実験動物の健康及び安全の保持)

第 18 条 実験動物管理者、動物実験実施者及び飼養者は、飼養保管基準を遵守し、実験動

物の健康及び安全の保持に努めなければならない。

(実験動物の導入)

第 19 条 管理者は、実験動物の導入に当たっては、法令等に基づき適正に管理している業者又は機関から導入しなければならない。

2 実験動物管理者は、実験動物の導入に当たっては、適切な検疫、隔離飼養等を行わなければならない。

3 実験動物管理者は、実験動物の飼養環境への順化及び順応を図るために必要な措置を講じなければならない。

(給餌及び給水)

第 20 条 実験動物管理者、動物実験実施者及び飼養者は、実験動物の生理、生態、習性等に応じて、適切に給餌及び給水を行わなければならない。

(健康管理)

第 21 条 実験動物管理者、動物実験実施者及び飼養者は、実験目的以外の傷害及び疾病を予防するため、実験動物に必要な健康管理を行わなければならない。

2 実験動物管理者、動物実験実施者及び飼養者は、実験動物が実験目的以外の傷害を被り、又は疾病に罹った場合は、適切な治療等を行わなければならない。

(異種又は複数動物の飼養)

第 22 条 実験動物管理者、動物実験実施者及び飼養者は、異種又は複数の実験動物を同一施設内で飼養及び保管する場合は、その組み合わせを考慮した収容を行わなければならない。

(記録の保存及び報告)

第 23 条 管理者等は、実験動物の入手先、飼養履歴、病歴等に関する記録を整備、保存しなければならない。

2 管理者は、年度ごとに飼養保管した実験動物の種類、数等について、学長に報告しなければならない。

(譲渡等の際の情報提供)

第 24 条 管理者等は、実験動物の譲渡に当たっては、その特性、飼養保管の方法、感染性疾患等に関する情報を譲渡相手に提供しなければならない。

(輸送)

第 25 条 管理者等は、実験動物の輸送に当たっては、飼養保管基準を遵守し、実験動物の健康及び安全の確保並びに人への危険防止に努めなければならない。

(危害防止)

第 26 条 管理者は、逸走した実験動物の捕獲の方法等をあらかじめ定めなければならない。

2 管理者は、人に危害を加える等の恐れのある実験動物が施設等外に逸走した場合には、速やかに関係機関へ連絡しなければならない。

3 管理者は、実験動物管理者、動物実験実施者及び飼養者への実験動物由来の感染症、実

験動物による咬傷等に対する予防に努めるとともに、感染症等が発生した場合には、必要な措置を迅速に講じなければならない。

4 管理者は、毒へび等の有毒動物の飼養又は保管をする場合は、人への危害の発生の防止のため、飼養保管基準に基づき必要な事項を別に定めなければならない。

5 管理者は、実験動物の飼養又は動物実験等の実施に関係のない者が実験動物等に接触しないよう、必要な措置を講じなければならない。

(廃棄物の処理)

第 27 条 管理者等は、実験動物の飼養及び動物実験等により発生した動物死体及び実験廃棄物類を、医療廃棄物管理規程その他の本学の関連規程等に従って適正に処理しなければならない。

(緊急時の対応)

第 28 条 管理者は、地震、火災等の緊急時に執るべき措置の計画をあらかじめ作成し、実験動物管理者、動物実験実施者及び飼養者に周知するものとする。

2 管理者は、緊急事態発生時において、実験動物の保護及び実験動物の逸走による危害防止に努めなければならない。

(教育訓練)

第 29 条 実験動物管理者、動物実験実施者及び飼養者は、次の各号に掲げる事項に関する所定の教育訓練を受けなければならない。

- (1) 法令等及びこの規程に関する事項
- (2) 動物実験等の方法に関する基本的事項
- (3) 実験動物の飼養保管に関する基本的事項
- (4) 安全確保及び安全管理に関する事項
- (5) その他適切な動物実験等の実施に関する事項

2 管理者は、教育訓練の実施日、教育内容、講師及び受講者名に関する記録を作成し、5 年間保存しなければならない。

(自己点検・評価)

第 30 条 学長は、委員会に、本学における動物実験等の法令等及びこの規程への適合性に関し、自己点検・評価を行わせなければならない。

2 委員会は、管理者、動物実験実施者、動物実験責任者、実験動物管理者及び飼養者に自己点検・評価のための資料を提出させることができる。

3 委員会は、前項の自己点検・評価が終了したときは、その結果を学長に報告しなければならない。

4 学長は、自己点検・評価の結果について、学外の者による検証を受けるよう努めなければならない。

(情報公開)

第 31 条 本学における動物実験等に関する情報については、年 1 回程度公表しなければならない。

らない。

(準用)

第 32 条 第 3 条第 5 号に定める実験動物以外の動物を使用する動物実験等については、飼養保管基準の趣旨に沿って行うよう努めなければならない。

(その他)

第 33 条 この規程に定めるもののほか、この規程の実施に関し必要な事項は、法令等に規定するものを除き、学長が別に定める。

附 則

1 この規程は、平成 20 年 4 月 1 日から施行する。ただし、第 5 条及び第 6 条の規定は、平成 20 年 1 月 1 日から適用する。

2 前項ただし書きの規定により最初に委嘱された第 6 条第 1 項の委員の任期は、同条第 4 項の規定にかかわらず、平成 20 年 3 月 31 日までとする。

3 自治医科大学動物実験指針規程(平成 5 年 2 月 25 日制定)、自治医科大学動物実験指針規程運用細則(平成 5 年 2 月 25 日制定)及びトランスジェニック動物に関する取扱要領(平成 8 年要領第 4 号)は、廃止する。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍
なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Araki N, Tsuruoka S, Wang N, Hasegawa G, Yanagihara H, <u>Ando H</u> , Omasa T, Enosawa S, Nagai H, <u>Fujimura A</u> .	Human CYP3A4-introduced HepG2 cells: in vitro screening system of new chemicals for the evaluation of CYP3A4-inhibiting activity.	Xenobiotica	38(11)	1355-64	2008
<u>Ando H</u> , Takamura T, Matsuzawa-Nagata N, Shima KR, Eto T, Misu H, Shiramoto M, Tsuru T, Irie S, <u>Fujimura A</u> , Kaneko S.	Clock gene expression in peripheral leucocytes of patients with type 2 diabetes.	Diabetologia	52(2)	329-35	2009
<u>Ando H</u> , Takamura T, Matsuzawa-Nagata N, Shima KR, Nakamura S, Kumazaki M, Kurita S, Misu H, Togawa N, Fukushima T, <u>Fujimura A</u> , Kaneko S.	The hepatic circadian clock is preserved in a lipid-induced mouse model of non-alcoholic steatohepatitis.	Biochem Biophys Res Commun	380(3)	684-8	2009
<u>Koshimizu T</u> , Tsujimoto G.	New topics in vasopressin receptors and approach to novel drugs: vasopressin and pain perception.	J Pharmacol Sci	109(1)	33-7	2009
Hara T, Hirasawa A, Sun Q, <u>Koshimizu T</u> , Itsubo C, Sadakane K, Awaji T, Tsujimoto G.	Flow cytometry-based binding assay for GPR40 (FFAR1; free fatty acid receptor 1).	Mol Pharmacol	75(1)	85-91	2009
Tanaka T, Yano T, Adachi T, <u>Koshimizu T</u> , Hirasawa A, Tsujimoto G.	Cloning and characterization of the rat free fatty acid receptor GPR120: in vivo effect of the natural ligand on GLP-1 secretion and proliferation of pancreatic beta cells.	Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol	377(4-6)	515-22	2008
Tanaka T, Katsuma S, Adachi T, <u>Koshimizu T</u> , Hirasawa A, Tsujimoto G.	Free fatty acids induce cholecystokinin secretion through GPR120.	Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol	377(4-6)	523-7	2008
Hirasawa A, Itsubo C, Sadakane K, Hara T, Shinagawa S, Koga H, Nose H, <u>Koshimizu T</u> , Tsujimoto G.	Production and characterization of a monoclonal antibody against GPR40 (FFAR1; free fatty acid receptor 1).	Biochem Biophys Res Commun	365(1)	22-8	2008

Human CYP3A4-introduced HepG2 cells: *In vitro* screening system of new chemicals for the evaluation of CYP3A4-inhibiting activity

N. ARAKI¹, S. TSURUOKA^{1,6}, N. WANG^{1,2,3}, G. HASEGAWA¹,
H. YANAGIHARA¹, H. ANDO¹, T. OMASA⁴, S. ENOSAWA⁵,
H. NAGAI², & A. FUJIMURA¹

¹Departments of Clinical Pharmacology and, ²General Surgery, Jichi Medical University, Tochigi, Japan, ³General Surgery Department II, China Medical University No. 1 Affiliated Hospital, Shenyang, China, ⁴Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University, Japan, ⁵Department of Innovative Surgery, National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo, Japan and ⁶Department of Nephrology, Institute of Clinical Sciences, University of Tsukuba, Ibaraki, Japan

(Received 24 April 2008; revised 9 September 2008; accepted 10 September 2008)

Abstract

1. The aims were to attest whether HepG2-GS-3A4, a cell line into which the human CYP3A4 gene was introduced, can be used for a screening of chemicals that will inhibit CYP3A4 activity.

2. The capacity of the cells for metabolizing CYP3A4 substrates *in vitro* was evaluated. Also determined was the effect of CYP3A4 inhibitors and non-inhibitors on nifedipine hydroxylation. Western blot, immunohistochemistry and determination of β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-reductase activity were performed.

3. HepG2-GS-3A4 selectively metabolized substrates of CYP3A4 (diazepam, nordiazepam, lidocaine, atorvastatin, and nifedipine) to a greater degree than control. The metabolites were easily detected in the culture medium. Values of V_{max} of HepG2-GS-3A4 were about 30- to 100-fold higher than those of the control, while values of K_m were comparable. Pre-incubation of cimetidine and ketoconazole significantly inhibited nifedipine hydroxylation, while addition of inhibitors specific to other isoforms of CYPs had no substantial effect. The HepG2-GS-3A4 expressed a higher amount of CYP3A4 protein and mRNA than control. Most NADPH reductase activity was detected in microsomal fractions.

4. In conclusion, HepG2-GS-3A4 sufficiently and selectively metabolize substrates of CYP3A4, and inhibitors of CYP3A4 reduced the metabolism. Because the metabolites were easily detected in the culture medium, this cell might be useful for the new and easy screening of new drugs for the evaluation of CYP3A4-inhibiting activity *in vitro*.

Correspondence: S. Tsuruoka, Department of Nephrology, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, 305-8575, Japan. Fax: +81-29-853-3202. E-mail: tsuru@md.tsukuba.ac.jp

ISSN 0049-8254 print/ISSN 1366-5928 online © 2008 Informa UK Ltd.

DOI: 10.1080/00498250802468645

Keywords: CYP3A4, screening, drug-interaction, HepG2

Introduction

The drug-related adverse reaction is one of the important problems in clinical practice. It is reported that the incidence of such adverse reactions is increasing with a number of drugs administered at the same time. Pharmacokinetic drug interaction, which is caused by competition of an enzyme for drug metabolism, is the most common reason for drug-drug adverse reactions (Edwards 1997). Cytochrome P450 (CYP) 3A4 is one of the major enzymes for drug metabolism (Edwards 1997), and many drugs such as calcium channel blockers (for example, verapamil and nifedipine), anti-anxiety drugs (for example, diazepam, alprazolam), and macrolide antibiotics (for example, clarithromycin, and erythromycin) are metabolized by this enzyme (Zhou 2008). To develop a new drug, it is important to determine whether a candidate of drugs will inhibit CYP3A4 activity (Spilker 1997) because co-administration of several drugs metabolized by CYP3A4 may cause pharmacokinetic drug-drug interactions (Edwards 1997). Antifungal drugs (for example, ketoconazole and itraconazole), macrolide antibiotics (for example, clarithromycin and erythromycin), and anti-ulcer drugs (for example, cimetidine) are well-known examples which inhibit CYP3A4 activity. Co-administration of such inhibitor and substrate of CYP3A4 causes intoxication of the substrate (Zhou 2008). *In vivo* screening and *in vitro* screening by human hepatocyte or microsome are currently performed to evaluate inhibition of CYP3A4 activity. However, these take time and labour. Therefore, an easy method for evaluation is not available at present.

The authors have previously established a cell line from HepG2, into which genes of human CYP3A4 and glutamine synthetase (GS), enzyme-metabolizing ammonia, were introduced. By using the novel cell and new technology for three-dimensional cell culture, a new bioreactor was developed for the successful treatment of acute liver failure and concomitant diazepam intoxication in an animal model (Omasa et al. 2005; Wang et al. 2005). Because the capacity of drug metabolism via CYP3A4 is extremely high in the cell and metabolites in the culture medium can easily be detected, it is speculated here that our cell might be applied to the new and easy screening of new chemicals that inhibit CYP3A4 activity *in vitro*.

The purpose of this study was to determine whether the cells, named HepG2-GS-3A4, can metabolize several chemicals that are known to be substrates of CYP3A4. Also evaluated by various techniques was the expression of CYP3A4 protein and mRNA. Finally, it was evaluated whether these cells can be used in the screening of chemicals which possess CYP3A4-inhibiting activity by using well-known inhibitors of this enzyme.

Materials and methods

Cells (Omasa et al. 2005; Wang et al. 2005)

The HepG2 cell, a cell line that originated from human hepatoblastoma, was obtained from the RIKEN cell bank (Tsukuba, Japan). HepG2-GS-3A4, a cell transduced from both the hamster GS gene and the human cytochrome p450 3A4 gene, was established as follows: pBudCE4 plasmid (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), which had two multicloning sites, with the human cytomegalovirus gene and the human elongation 1-alpha subunit gene as promoters, was used for the vector. After ligation with the hamster GS gene and the human

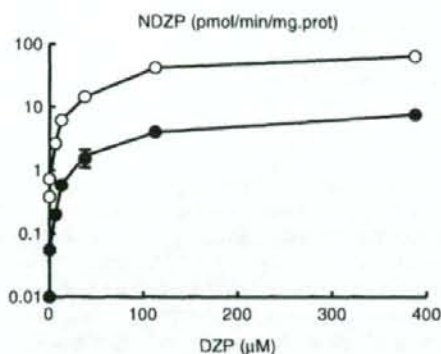


Figure 1. Formation of nordiazepam (NDZP) from diazepam (DZP) in HepG2-GS-3A4 and control (HepG2-GS) cells. DZP was applied in the culture medium, and NDZP was detected in the culture medium. Data are the mean \pm standard error (SE), $n=4-7$ in each (HepG2-GS-3A4, (○); and HepG2-GS, (●)).

cytochrome p450 3A4 gene, it was introduced by lipofection, and a positive clone was selected as an index of resistance against zeocin. HepG2-GS-3A4 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F-12:Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (1:1), with 10% foetal calf serum (FCS) + zeocin ($200 \mu\text{g ml}^{-1}$) at 37°C with 5% CO_2 . HepG2 cells were cultured under the same conditions, except antibiotics were changed to penicillin ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) and streptomycin ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$).

Evaluation of CYP3A4 and glutamine synthetase activities

The 10^5 cells were inoculated to a 10-cm dish. When cells were nearly confluent, the medium was replaced by 10 ml of medium containing ammonia, diazepam (DZP; at a concentration of $0.38-385 \mu\text{M}$; $0.1-100 \mu\text{g ml}^{-1}$), nordiazepam (NDZP; $0.38-385 \mu\text{M}$; $0.1-100 \mu\text{g ml}^{-1}$), a metabolite of diazepam (Figure 1), lidocaine (at a concentration of $0.03-7.0 \mu\text{M}$), atorvastatin (at a concentration up to $100 \mu\text{M}$), nifedipine (at a concentration of $0.1-114 \mu\text{M}$; $0.5-40 \mu\text{g ml}^{-1}$), or ammonia ($0.01-1 \text{ mM}$). Of the samples, 0.25 ml were collected from the medium sequentially at zero, 1, and 4 h after the incubation at 37°C with 5% CO_2 . Finally, the medium was replaced by 10 ml of 1 M NaOH to digest the cells for measurement of protein concentration.

In order to evaluate the inhibitory effect of drugs on nifedipine hydroxylation (as an index of CYP3A4 activity), cimetidine (up to $0.57 \mu\text{M}$; $1.0 \mu\text{g ml}^{-1}$), ketoconazole (up to $3.96 \mu\text{M}$; $0.3 \mu\text{g ml}^{-1}$), omeprazole (an inhibitor and substrate of CYP 2C19; Quinn and Day 1997; $0.87 \mu\text{M}$; $0.3 \mu\text{g ml}^{-1}$), fluvoxamine (an inhibitor of CYP1A2; Quinn and Day 1997; $1 \mu\text{M}$), quinidine (an inhibitor of CYP2D6; Quinn and Day 1997; $10 \mu\text{M}$), and sulfaphenazole (an inhibitor of CYP2C9; Quinn and Day 1997; $10 \mu\text{M}$) were pre-treated for 1 h. Nifedipine concentration in the medium for the inhibition assay was $28.5 \mu\text{M}$ ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$).

Assays

Concentrations of DZP, lidocaine, nifedipine, atorvastatin, and their metabolites were measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) (Chen et al. 1992;

Azzam et al. 1998; Jemal et al. 1999; Maezono et al. 2005). The amount of protein in the cell lysate was measured by spectrophotometry using a protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Ammonia was measured by Berthelot reactions (Hindriks and Groen 1978).

Western blot analysis and immunohistochemistry for human cytochrome P450 3A4

The 10^5 cells were disrupted with isotonic buffer by nitrogen cavitation. A total of 20 μ g of protein was resolved by 7% sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) electrophoresis, transferred onto nitrocellulose membrane and immunoblotted with human CYP3A4 antibody (WB human CYP3A4 kit, BD Genetest, Franklin Lakes, NJ, USA). Pooled human liver microsome (BD Genetest) was used as a standard. The chemiluminescence method was used for signal detection. For quantitative measurement, densitometric analysis was performed. Immunohistochemistry was performed with the same antibody using the LSAB2/HRP (DAB)-kit (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) after fixation of the cells.

Determination of NADPH-cytochrome reductase activity in the microsome

The cell suspension was homogenized and centrifuged at 600g for 5 min to remove unhomogenized cells. The supernatant was centrifuged at 10 000 g for 20 min to remove nuclei and mitochondria. The supernatant was further centrifuged at 105 000 g for 1 h. The microsomal fraction was suspended to sucrose buffer with glycerol and kept at -80°C until the assay.

NADPH-cytochrome P450 reductase activity was determined spectrophotometrically as the reduction rate of cytochrome c, as described elsewhere (Strobel and Dignam 1978). Briefly, the reaction mixture contained 40 nmol l^{-1} cytochrome c, 100 nmol l^{-1} NADPH, 270 $\mu\text{mol l}^{-1}$ potassium phosphate, and protein (70–172 μg) in 100 μl , with pH 7.7. The reaction was started by the addition of NADPH and detected the increase of absorbance at 550 nm at room temperature. The activity was calculated using an extinction coefficient of 21 $\text{cm}^{-1}\cdot\text{mmol l}^{-1}$.

Statistics

Values were expressed as the mean \pm standard error (SE). Analysis of variance (ANOVA) and a Student's *t*-test were used as appropriate for statistical comparison. $p < 0.05$ was regarded as being statistically significant.

Results

Metabolism of DZP, lidocaine, atorvastatin, and ammonia by HepG2-GS-3A4 cells in vitro

After the incubation of HepG2-GS-3A4 cells with DZP, time- and concentration-dependent reductions were observed from 0.38 to 385 μM (0.1–100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) of DZP. At the same time, NDZP and temazepam (TZP; the metabolites of DZP) were also detected. The production of NDZP was higher than that of TZP, and it was the main metabolite in this system. The amounts of these metabolites appearing in the medium were time- and DZP concentration-dependent. Such capacities were significantly higher in HepG2-GS-3A4 than in HepG2 cells (Figure 1). Also evaluated was the metabolism of NDZP using the same cells. NDZP in

Table I. Mean values of K_m and V_{max} of drugs in HepG2-GS-3A4 and HepG2-GS cells.^a

	HepG2-GS		HepG2-GS-3A4	
	K_m (μ M)	V_{max} (pmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)	K_m (μ M)	V_{max} (pmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)
Diazepam <i>N</i> -desmethylation	14.97	2.48	24.05	106.90
Diazepam 3-hydroxylation	39.63	0.13	42.26	85.13
Nordiazepam dehydroxylation	21.92	0.05	22.28	1.49
Lidocaine monoethylation	3.9	209	5.8	5722
Atrovastatin acid 2-hydroxylation	n. d. ^b	n. d.	58.7	1852
Atrovastatin lactone	167	68	175	62
Nifedipine hydroxylation	n. d.	n. d.	21.4	136

^aConcentrations of metabolites in the culture medium were measured; $n = 5-7$ in each.

^bn. d., Concentrations of 2-hydroxyl-atrovastatin acid and hydroxyl-nifedipine in the medium of HepG2-GS cells were less than the detection limit of the assay; therefore K_m and V_{max} for HepG2-GS cells were not obtained.

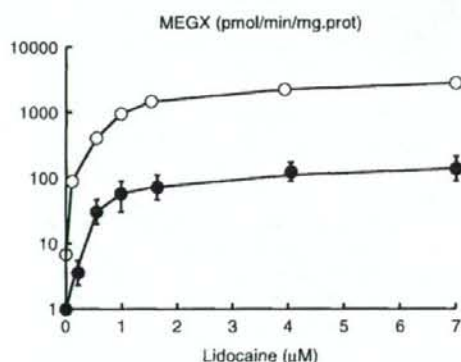


Figure 2. Formation of monoethylglycyxyloide (MEGX) from lidocaine in HepG2-GS-3A4 and control (HepG2-GS) cells. Lidocaine was applied in the culture medium, and MEGX was detected in the culture medium. Data are the mean \pm standard error (SE), $n = 4-7$ in each (HepG2-GS-3A4, (○); and HepG2-GS, (●)).

the medium significantly decreased and oxazepam (OZP), a metabolite of NDZP, increased in the medium in a concentration- and time-dependent manner. These capacities were significantly higher in HepG2-GS-3A4 than in control cells. K_m - and V_{max} -values for DZP metabolism in HepG2-GS-3A4 were 24.05 μ M and 106.90 pmol min⁻¹ mg⁻¹ protein for DZP *N*-demethylation, and 42.26 μ M and 85.13 pmol min⁻¹ mg⁻¹ protein for DZP 3-hydroxylation, respectively (Table I). Compared with HepG2-GS, V_{max} -values of diazepam metabolism in HepG2-GS-3A4 were more than ten-fold higher than those in HepG2-GS, while K_m -values were rather comparable (Table I).

The metabolite lidocaine, another substrate of CYP3A4, was also detected in the medium. The formation was also significantly higher in HepG2-GS-3A4 cells than in the control cells (Figure 2). Formation of 2-hydroxyl atorvastatin acid was also significantly higher in the HepG2-GS-3A4 cells than in the control cells (Table I). The formation was increased in a concentration- and time-dependent manner. K_m - and V_{max} -values were

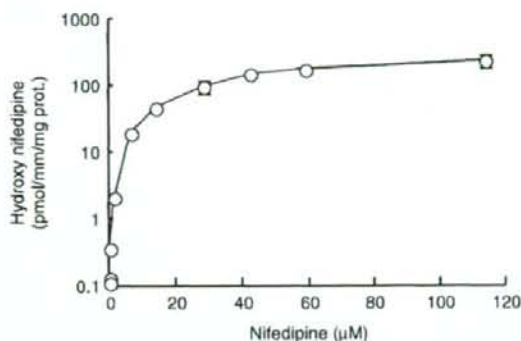


Figure 3. Formation of hydroxylated nifedipine from nifedipine in HepG2-GS-3A4 cells. Nifedipine was applied in the culture medium, and hydroxy-nifedipine was detected in the culture medium. Data are the mean \pm standard error (SE), $n = 4-7$ in each. Hydroxyl-nifedipine in control (HepG2-GS) cells was less than the detection limit of the assay at all concentrations (HepG2-GS-3A4, (○)).

58.7 μM and 1852 $\text{pmol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein. On the other hand, formation of atorvastatin lactone, the metabolite of atorvastatin via several CYPs, was not different between the two cell groups (Table I). Metabolism of nifedipine, a substrate of CYP3A4, was also evaluated. Formation of hydroxyl-nifedipine in HepG2-GS-3A4 cells was time- and concentration-dependent. K_m - and V_{max} -values were 21.4 μM and 136 $\text{pmol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein, respectively (Figure 3 and Table I). In the medium of the HepG2-GS cells, concentrations of hydroxylated nifedipine and hydroxylated atorvastatin were less than the detection limit in all experiments. The ammonia concentration was decreased with a time of incubation up to 4 h. The reduction rate was not different between HepG2-GS-3A4 and HepG2-GS cells (40.7 ± 1.62 (95% confidence interval (CI) = 36.7 and 44.2) and 39.5 ± 2.47 (95% CI = 34.8 and 44.9) $\text{mg mg}^{-1} \text{protein h}^{-1}$, respectively). Because the reduction was not saturated up to 1 mM, K_m - and V_{max} -values were not obtained.

Inhibition of nifedipine hydroxylation by ketoconazole, cimetidine and non-CYP3A4 inhibitors in HepG2-GS-3A4 cells

Next, the effect of pretreatment of several drugs known to be inhibitors of CYP3A4 activity on nifedipine hydroxylation was evaluated. Nifedipine was used at a concentration of 28.5 μM (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$). As shown in Figure 4, pretreatment of cimetidine (as a non-selective inhibitor of CYPs) and ketoconazole (as an inhibitor of CYP3A4) for 1 h inhibited the formation of hydroxyl-nifedipine in a concentration-dependent manner only in HepG2-GS-3A4 cells. These effects were not observed in HepG2-GS cells because hydroxylated nifedipine was not detected. On the other hand, pretreatment of 0.87 μM (0.3 $\mu\text{g ml}^{-1}$) of omeprazole (an inhibitor and substrate of CYP 2C19), 1 μM of fluvoxamine (an inhibitor of CYP1A2), 10 μM of quinidine (an inhibitor of CYP2D6), and 10 μM of sulfaphenazole (an inhibitor of CYP2C9), for 1 h did not affect the formation of hydroxyl-nifedipine – the transforming rate of hydroxyl nifedipine with the addition of 28.5 μM nifedipine = 133.8 ± 8.6 (95% CI = 118.5 and 142.8; $n = 6$), 131.7 ± 9.0 (95% CI = 114.5 and 141.1; $n = 6$), 124.8 ± 9.3 (95% CI = 112.0 and 140.2) $n = 4$), 121.0 ± 9.7 (95% CI = 115.8 and