

2008/2002A
2008/2002B

厚生労働科学研究費補助金
医療機器推進研究事業

細胞内元素アレイ解析の臨床応用に向けた基礎研究

平成20年度 総括研究報告書
平成18年度～平成20年度 総合研究報告書

研究代表者 志村 まり

平成21(2009)年 3月

厚生労働科学研究費補助金
医療機器推進研究事業

細胞内元素アレイ解析の臨床応用に向けた基礎研究

平成18年度～平成20年度 総合研究報告書

研究代表者 志村 まり

平成21(2009)年 3月

目 次

I. 総合研究報告	
細胞内元素アレイ解析の臨床応用に向けた基礎研究に関する研究-----	1
志村まり	
(資料) 患者検体倫理委員会申請書一式	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 23
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 24

細胞内元素アレイ解析の臨床応用に向けた基礎研究に関する研究

研究代表者 志村まり 国立国際医療センター研究所
難治性疾患研究部難治性疾患研究室長

研究要旨

本研究では、未だ解明されていない難病について、病態と細胞内元素プロファイルとの相関を見だし、早期診断へ応用することを目的とする。細胞内元素は、細胞機能を維持するために必須であり、細胞機能を理解する上で元素の増減や分布変化を把握することは極めて重要である。申請者グループが開発した走査型蛍光X線顕微鏡(SXFM)により、原因や治療法が不明であった疾患についても、解明の糸口が得られることが期待される。

研究分担者氏名・所属機関名・役職

石川 哲也・理化学研究所播磨研究所・
大型放射光施設 SPring-8・放射光科学総合
研究センター
山内 和人・大阪大学大学院工学研究科
精密科学加工・教授
三村 秀和・大阪大学大学院工学研究科
精密科学加工・助教
松山 智至・大阪大学大学院工学研究科
精密科学加工・助教
前島 一博・理化学研究所・中央研究所今
本核研究室・専任研究員
岡村 匡史・国立国際医療センター研究所
ヒト型動物開発研究室・室長
萩原 将太郎・国立国際医療センター血
液内科・医長

A. 研究目的

細胞内元素は細胞機能を正常に維持するために必須であり、欠乏することで種々の疾病が生じることが知られている。一方、細胞生物学において、色素染色や組織レベルでのX線顕微鏡観察はこれまでも報告があるが、細胞レベルでの元素変動に焦点をおいた研究は少ない。これは、元素を可視化する方法として、細胞レベルで直接元素を解析する方法が確立されていなかったからと考える。細胞レベルでの元素分布を網羅的に可視化することで、元素変動と蛋白質や遺伝子発現との対応も可能となり、より多角的な視点での細胞機能や病態への理解が可能となることが期待される。本研究では、細胞観察に適した走査型蛍光X

線顕微鏡(SXFM)の開発と、生物学応用を目的とする。

B. 研究方法

細胞観察に適したSXFMシステム開発と生物学応用のための解析法を確立した。

- a. 細胞観察用SXFMシステムの開発
 - 1) ズーム機構付き SXFM
 - 2) 走査型蛍光 X 線 CT の開発
 - 3) クライオ走査型蛍光 X 線顕微鏡の開発
 - 4) 定量化
 - 5) 高速測定システム
- b. SXFM の生物・医学応用のための手法確立。
 - 1) SXFM 専用基板開発
 - 2) 稀少検体からの切片作成法
 - 3) SXFM のための凍結切片試料作成法
 - 4) SXFM のための動物組織固定法
 - 5) エレメントアレイ解析
 - 6) 元素結合蛋白質の精製・同定法
 - 7) 蛋白質結合元素の電気泳動による可視化
 - 8) 院内での臨床検体採得から超低温保存と SXFM 測定
 - 9) 血漿中 23 元素の ICP-MS 同時解析
- c. 次世代放射光源を用いた場合の当該手法の拡張性の検討

(倫理面への配慮)

臨床試料をヒトから用いる場合は、インフォームドコンセントなど十分配慮検討する。当該機関の患者検体倫理委員会

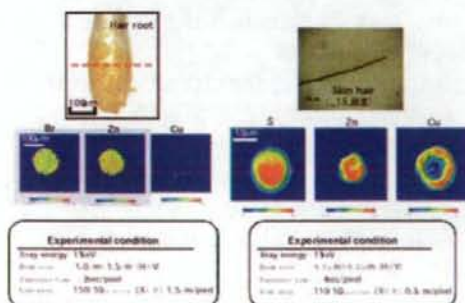
に諮問し検討してから行う（既に国立国際医療センター倫理委員会承認済み、添付資料参照）。再生医療の幹細胞ソースに関わる一連のマウス実験については、予め当該機関の動物委員会に報告し、必要最低限の実験動物を準備使用し、動物愛護への配慮を欠くことのないよう計画する。組換え DNA 実験は、カルタヘナ条約を遵守し実験内容を吟味する。

C. 研究結果

a. 細胞観察用 SXFM システムの開発

1) ズーム機構付き SXFM; SXFM は光源からの距離が 45m あることから、スリットを介することで光子数が制御可能であり、ズーム機構（左図）が可能となった（松山、山内）。これにより、視野内の目的細胞の円滑な測定および測定時間の短縮が図れるようになった。（文献 2, 9）

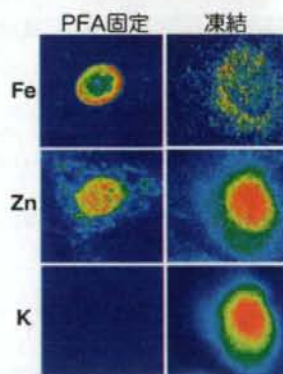
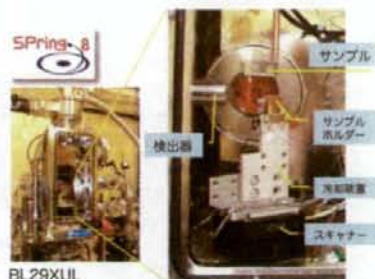
2) 走査型蛍光 X 線 CT による厚みのある生体試料の観察; 走査型蛍光 X 線 CT の医学応用に向けて、厚みのある生体試料の断面元素分布の可視化を試みた。100nm 分解能を達成できるように K-B 光学系と走査システムを構築した。その結果、下図のように、ヒト体毛（直径約 15mm）と毛髪（直径約 100 μm）内部の元素分布の可視化に成功した。



3) クライオ走査型蛍光 X 線顕微鏡; 細胞固定によりカルシウム、カリウム元素等が喪失することから、細胞固定が不要な凍結細胞サンプル測定系の確立が重要であることが示唆された。

本年、細胞の急速凍結処理を行い、クライオ走査型蛍光 X 線顕微鏡の開発を行い、世界で初めて細胞計測まで成功した（松山、山内）（右図）。

瞬間凍結試料



易溶出性の元素分布を確認

4) 定量化; SXFM で観察される蛍光 X 線強度を絶対値評価をするために、いくつかの元素の標準サンプルを作成し、測定した結果から、定量を行うことに成功した（松山）。

5) 高速測定システム; 複数試料測定を行い、統計学的評価が必要な生物医学分野において、現行の SXFM の測定時間は、5 個の細胞当たり約 4-6 時間必要とする。これを 1/17 までに短縮することを目的に改良を行った。第 1 に、MCA (multi-channel analyzer) を新規に開発した。その結果、0.25 μsec のシェーピング時間が達成された。これは現在の設定に比べて 2 倍以上短く、少なくとも 2 倍以上の蛍光 X 線を処理できると期待される。新型の MCA は制御コンピュータとの通信速度が極めて高速であり、データ転送による測定時間の遅延

を最小にすることが可能となった。次に、大面積の半導体検出器を用意した。これによって試料周りの空間に余裕ができ、多数の試料を測定チャンパー内に予め入れておくことが可能となり、試料交換による測定の中断を最小限にすることが出来た(石川、玉作)。さらに、システムのユーザーフレンドリー化を行うことで、限られたマシンタイムを有効に活用できる。計測システムを再構築することで、試料を持ち込むユーザーがラボベースの顕微鏡を扱うように操作できるシステムの開発を行った。新しい SXFM システムでは、システムに備え付けられている試料位置観察用顕微鏡の画像を見ながら、測定したい場所をプログラム上で示すだけで SXFM 観察ができる。さらに、システム全体の処理を 2 台の PC と 3 つのプログラムに分散することで、処理の高速化と高信頼性を実現した(松山)。

b. SXFM の生物・医学応用

1) SXFM 専用基板開発；蛍光 X 線測定の細胞基板は、通常生物実験で使用されているガラスプレートを使用时、圧倒的なガラス成分のバックグラウンドにより、微量元素の測定は不可能となる。そこで、市販 SiN の薄膜を使用してきた。しかし、SiN 基板を用いた SXFM 測定では、Si の存在のために、生体では重要な役割を果たしているリン(P)の計測が困難である。これを可能にするために、プロレンやカーボンをベースにした基板(PCAD)作製に成功した(前島、志村)。

2) 稀少検体からの切片作成法；臨床検体は大変稀少であるために、効率よく複数の解析を行う方法として、電子顕微鏡技術の Tokuyasu 法を改良し、1 μ m の切片を作

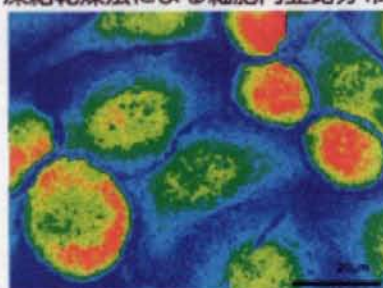
稀少血液検体から薄切片での解析



成し(下図)、PCAD 上での SXFM 測定に成功している。これにより、同一細胞で数枚の切片を作成することが可能となり、例えば、免疫染色、色素染色、SXFM 間での比較検討が可能となる(前島)。

3) SXFM のための凍結切片試料作成法；ヒトガン細胞である HeLa 細胞を SiN 基板上で培養する。細胞の形態を「生きた」状態にできるだけ保つため、基板を液体プロパン中に入れ、瞬間的に急速凍結をおこなった。凍結した細胞は液体窒素温度を保

凍結乾燥法による細胞内亜鉛分布



15 keV, 1.0 (H) X 1.0 (w) μ m, SPring-8, 600 nm/pixel
Maehima K. et al. Sep. 2006

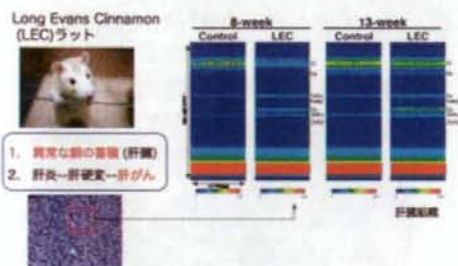
ったまま真空槽に入れ、極低温のまま水分子を昇華させ乾燥させた(前島、上図)。また、細胞に水のある状態での急速凍結処理を行い、クライオ走査型蛍光 X 線顕微鏡での測定を可能とした(松山)。

4) SXFM のための動物組織固定法；SXFM システムの改良により、標的領域観察における時間効率性が向上し、培養細胞ではオルガネラにおける細胞内元素分布の解析も可能であることが、松山、志村らにより示されている(投稿準備中)。そこで、組織切片でも同様の解析が可能かを検討するために、ラット肝臓を 4%パラホルムアルデヒド/1xHBSS で還流固定後、30%シヨ糖溶液に浸した固定組織をクライオスタットにて 3 μ m に薄切を行った。結果、準備試料での SXFM 測定を行うことができた(岡村)。臓器は培養細胞とは異なり、主に血液成分の影響が大きい。しかし洗浄によっては、失われる元素もあることから、どのような洗浄をすべきかは、今後の論点となる。現時点では、固定・洗浄抵抗性の

元素、おそらく蛋白結合型などの元素を観察していると考える。

5) エレメントアレイ解析; 細胞や動物組織から得られた元素情報を網羅的に示す方法として、元素アレイ解析と称し提案する。図は、ラット肝臓の測定した組織のピクセル値を横軸に、蛍光 X 線エネルギー

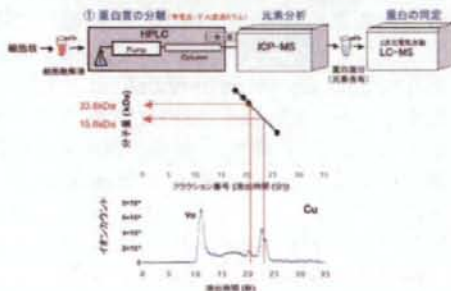
疾患動物モデルでの元素アレイ(網羅的)解析



を縦軸に示した。色が明るいほど多く元素が存在することを意味している(志村)。

6) 元素結合蛋白質の精製・同定法; SXFM によるイメージングで局在が明らかになった元素結合蛋白質を明らかにする系を確立した。肝炎肝がんモデルラット肝細胞に蓄積している銅、亜鉛元素の結合蛋白質分離を、High performance liquid chromatograph (HPLC), Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) の連続測定により可能とした(志

核内の元素結合蛋白の同定



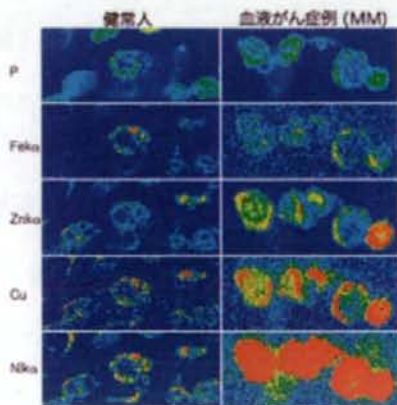
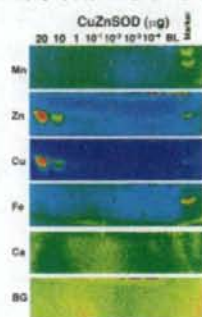
村)。明らかになった細胞内に集積された元素結合蛋白質は、in vitro では DNA 障害を誘導する報告があることから、肝がんへの過程に同定された蛋白質の DNA 障害が関

与していることが示唆された(投稿準備中)。元素イメージングから元素結合蛋白質の同定までが一連の研究として可能になることで、生体機能や病理の多角的な情報を得ることが期待される。

7) 蛋白質結合元素の電気泳動による可視化; 生化学的手法では良く用いられる電気泳動法では、蛋白質の電気的な性質や大きさを分離するために簡便な方法である。等電点電気泳動法は、蛋白質を native な状態で泳動可能であることから、蛋白質に結合している元素の検出も可能と考え、SXFM でのイメージングを行い成功した(志村、松山)。

しかし、既存の泳動法では、buffer をはじめゲルのバックグラウンドが高いために、検出限界は CBB 染色で検出できる蛋白質より少し感度が良いくらいであると考え。専用の泳動装置を考案することで、さらに検出感度を増大できると期待する。

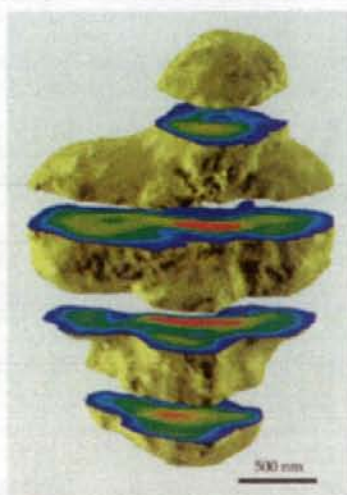
8) 院内での臨床検体採得から超低温保存と SXFM 測定; 血液がん検体(血液・骨髄細胞)の提供者に対するインフォームドコンセントを経て、極低温での保存方法を院内で確立した。多発性骨髄腫患者をはじめ急性骨髄性白血病患者、急性リンパ性白



血病、悪性リンパ腫患者などの血液細胞を採取し、30 検体を採取保存した（萩原）。予備的試験として、1 例ずつの急性・慢性リンパ性白血病、急性・慢性骨髄性白血病、多発性骨髄腫由来骨髄細胞の凍結切片での SXFM 元素解析を行い健康人由来骨髄細胞切片との比較を行った。血液癌の種類により、多発性骨髄腫では、亜鉛、銅、特にニッケルの細胞内局在が著しかった（上図）（志村、萩原）。

9) 血漿中 23 元素の ICP-MS 検査法；細胞内に対して細胞外、すなわち血漿中の元素環境を知ることは、細胞内外との相関や診断情報に有用である。東レリサーチセンターの無機分析部（飯田ら）との共同研究で、500 μ L の血漿から 23 元素の ppt レベルでの解析が可能となった。測定については、当センターでの倫理審査を経て行った。現在、健康人ボランティア 50 例、血液癌患者 30 例の測定を行い、統計学的な比較検討を行なう。健康人とは有為に高い或いは低い値を示す元素が血液癌患者には認められる。これらから、細胞内外において、血液癌環境では、元素局在が変動する可能性が示唆された（萩原、志村）。

c. 次世代放射光源を用いた場合の当該手法の拡張性の検討；光の波がそろった



Nature, Research highlight, 2009
Physics Today, the latest in research, 2009
Nishino and Maeshima, Physical Review Letters, 102, 2009

コヒーレントな X 線を活用した新しいタイプの X 線顕微鏡 (X 線ナノ CT) を開発し、ヒト染色体の内部構造の可視化に成功している（前島、文献 1）。こうした顕微鏡は、次世代の放射光源 (XFEL) では有用な方法であるという。次世代光源により得られる蛍光 X 線や回折・散乱で得られる情報は、本研究班で得られた情報のように、多角的に生体を理解する上で、大きな発展を導くと考える。

D. 考察

本研究での解析法の確立と、試料測定から、細胞内網羅的要素の測定は、生体反応を理解する上で有用と考える。生物試料の効率の良い測定やユーザーズフレンドリー化を今後完成することで、統計学的なデータに基づいた測定が簡便になり、積極的な医学生物情報を発信できるシステムになると考える。また、将来の SPring-8 での SXFM 専用ビームラインでの貢献が期待される。

E. 結論

細胞内外の微量元素の分布や量を網羅的に調べることは、正常な生体や病態を理解するために有用な方法である。新しい SXFM は、難病疾患において有用な情報を提供すると考える。

F. 研究発表

- 論文発表
 - Nishino, Y., Takahashi, Y., Imamoto, N., Ishikawa, T., and Maeshima, K., Three-Dimensional Visualization of a Human Chromosome Using Coherent X-ray Diffraction. *Physical Review Letters* (2009), 102, 18101-18104.
 - Matsuyama S., Shimura M., Mimura H., Fujii M., Yumoto H., Sano Y., Yabashi M., Nishino Y., Tamasaku K., Ishikawa T. and Yamauchi K., Trace element mapping of a single cell using a hard x-ray nanobeam focused by a Kirkpatrick-Baez mirror system, *X-ray Spectrometry* 38, 89-94, 2009.
 - Eltsov, M., MacLellan, K.M., Maeshima,

- K., Frangakis, A.S., and Dubochet, J. (Three authors have equal contribution) Analysis of cryo-electron microscopy images does not support the existence of 30-nm chromatin fibers in mitotic chromosomes in situ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2008) 105, 19732-7.
4. Maeshima, K., and Eltsov, M. Packaging the genome: the structure of mitotic chromosomes. *Journal of Biochemistry* (2008) 143, 145-153.
5. Iwai Y, Ikeda T, Kojima T-M, Yamazaki Y, Maeshima K, Imamoto N, Kobayashi, T., Nebiki, T., Narusawa T, Pokhil G-P Ion irradiation in liquid of μm^3 region for cell surgery. *Applied Physics Letters* (2008), 92, 23509 (3 pages).
6. Wendt KS, Yoshida K, Itoh T, Bando M, Koch B, Schirghuber E, Tsutsumi S, Nagae G, Ishihara Ko, Mishiro T, Yahata K, Imamoto F, Aburatani H, Nakao M, Imamoto N, Maeshima K, Shirahige K, and Peters J-M. Cohesin is required for the transcriptional insulator function of CTCF binding sites. *Nature* (Article) (2008), 451, 796-801.
7. Tahara, K., Takagi, M., Ohsugi, M., Sone, T. Nishiumi, F., Maeshima, K., Horiuchi, Y., Tokai-Nishizumi, N., Imamoto, F., Yamamoto, T., Kose, S., and Imamoto, N. Importin-beta and small GTPase Ran mediate chromosome loading of human chromokinesin Kid. *Journal of Cell Biology* (2008), 180, 493-596.
8. Yamagishi Y, Sakuno T, Shimura M and Watanabe Y. Heterochromatin links to centromeric protection by recruiting shugoshin. *Nature* 455, 251-255, 2008.
9. Matsuyama S, Mimura H, Shimura M, Yamauchi K, et al., Trace element mapping using a high-resolution scanning X-ray fluorescence microscope equipped with a Kirkpatrick-Baez mirror system. *Surf. Interface Anal.* 40, 1042-1045, 2008.
10. 前島一博 「染色体の内部構造を見る」細胞工学別冊「電子顕微鏡で読み解く生命のなぞ (ナノワールドに迫るパワフル技術入門) (2008) 121-12
11. 石坂幸人, 志村まり, HIV-1感染に伴う非エイズ型悪性腫瘍の発症機序の解明、癌研急進行財団いぶき vol7, 2008.
12. 前島一博, 吉田圭介, 白髭克彦 「姉妹染色体間の接着因子、コヒーシンの新たな機能」蛋白質核酸酵素 (2008), 53, 1337-1344
13. 前島一博, 今本尚子 「細胞周期における核膜孔のダイナミクス」生化学 (2008) 2月号, 118-124

2. 口頭発表

1. Fujii M., Matsuyama S., Wakioka T., Mimura H., Sano Y. and Yamauchi K. Development of Advanced Kirkpatrick Baez System for X-ray Nano-Imaging. First international symposium on Atomically Controlled Fabrication Technology, Osaka Japan, Feb. 2009.
2. Maeshima, K. How is genome DNA compacted into a mitotic chromosome? The 1275th Biological Symposium, National Institute of Genetics (Idenken), Dec 24, 2008, Mishima
3. Maeshima, K. Mitotic chromosome structure: Irregular folding of nucleosome fibers. 日本分子生物学会・生化学会合同年会 (BMB2008) シンポジウム 転写シグナリングと複合体ダイナミクスの新展開、2008年12月11日、神戸
4. 志村まり, 豊田祐介, 他, HIV-1 Vpr による姉妹染色分体の早期分離異常第31回分子生物学会総会、2008年12月、神戸 2008
5. Maeshima, K. Mitotic chromosome structure: Irregular folding of nucleosome fibers. Symposium, "molecular regulation of Chromosome assembly and Segregation", The 3rd Asian Chromosome Colloquium, Dec 1-4, 2008, Osaka
6. 前島一博, 「分裂期染色体の構造」大阪大学・蛋白質研究所セミナー「クロマチン構造とダイナミクス」、2008年10月30-31日、大阪
7. 前島一博, 「分裂期染色体内のヒトゲノムDNAの高次構造」九州工業大学情報工学部生命情報工学科講演会、2008年8月5日、福岡県飯塚
8. 前島一博, 「分裂期染色体の構造」日本細胞生物学会年会ミニシンポジウム「細胞機能の3次元ナノイメージング」、2008年6月29日、横浜
9. Matsuyama S., Shimura M., Mimura H.,

Fujii F., Yumoto H., Handa S., Kimura T., Sano Y., Yabashi M., Nishino Y., Tamasaku K., Ishikawa T. and Yamauchi K., Trace element mapping using hard X-ray nanobeam focused by a Kirkpatrick Baez mirror system, EXRS 2008, Dubrovnik Croatia, June 2008.

10. Yamauchi K. Synchrotron-radiation-based hard X-ray nanobeam by Kirkpatrick-Baez mirrors, EXRS 2008, Dubrovnik Croatia, June 2008.
11. Maeshima, K., Ito, K., Eltsov, M., Watanabe, A., Hihara, S., Dubochet, J., and Imamoto, N., Mitotic chromosome structure: irregular folding of nucleosome

fiber.International Symposium on Chromosome Dynamics (2008), Ise, May 28-30

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

様式1)

国立国際医療センター倫理審査申請書

平成18年 4月3日
(平成19年12月21日変更)
(平成20年8月29日再変更)
(平成20年10月16日修正)

国立国際医療センター総長 殿

申請者	所属	病院	血液内科
	職名	5階北病棟医長	
	氏名	萩原将太郎	印

1. 審査対象 研究計画 出版公表原稿 報告書
(迅速審査に相当する場合には、その理由)
研究計画の軽微な変更 主たる研究機関で承認済みの共同研究
その他 ()

2. 課題名 走査型蛍光 X 線顕微鏡を用いた血液疾患患者血液・骨髄細胞における細胞内元素変動解析

3. 当センターの研究代表者
所属、職名、氏名 病院 血液内科 5階北病棟医長 萩原将太郎

4. 研究組織
当センターの共同研究者
所属、職名、氏名 研究所 難治性疾患研究部長 石坂幸人
難治性疾患研究室長 志村まり
病院 第1内科(血液内科)医長 三輪哲義

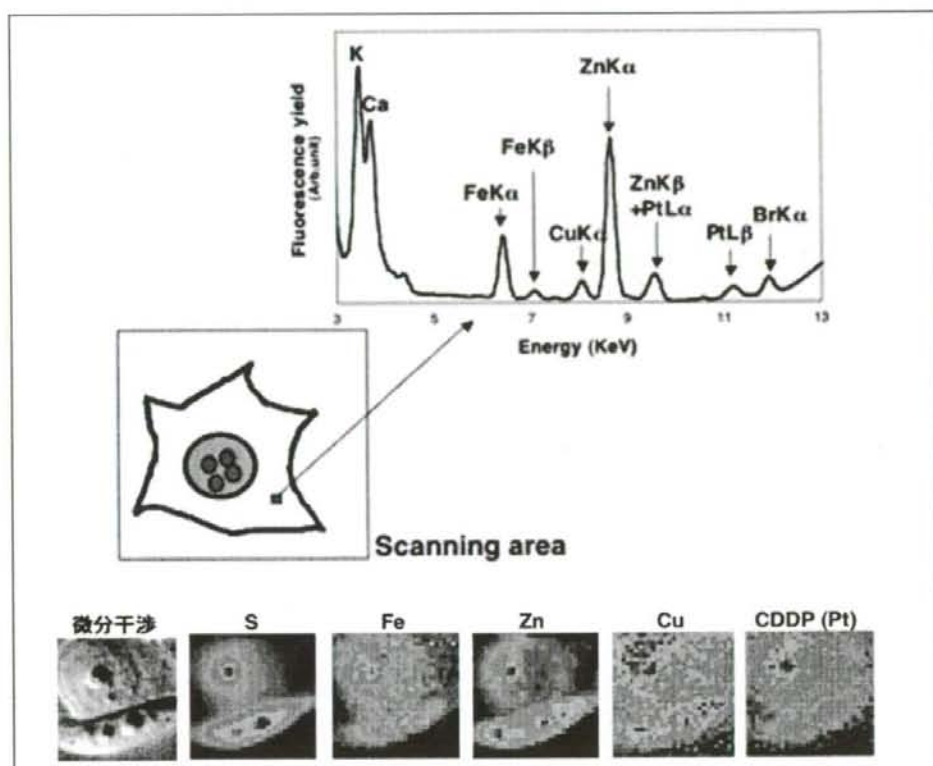
共同研究施設
所属、職名、氏名 理化学研究所播磨研究所 (SPring-8)
X線干渉光学研究室 主任研究員 石川哲也
大阪大学大学院工学研究科
精密科学専攻教授 山内和人

5. 研究の概要

急性白血病、骨髄異形成症候群や再生不良性貧血など難治性血液疾患は、確実な治療法の研究が日々行われ、生存率が徐々に向上しているものの、依然、完治は困難であり、また発症のメカニズムも十分に解明されていない。さらなる有効な治療法の確立と、癌化機序の解明が待たれている。

これらの病態解明の糸口を得るため、造血器腫瘍の一部に対して DNA マイクロアレイ等の解析が行われている〔文献1〕。本研究ではこれまでにないユニークな方法として、走査型蛍光 X 線顕微鏡〔SXFМ;文献2〕を用いた細胞内の元素分析(エレメン

トアレ解析；図参照）を行う。元素は、細胞内酵素、転写活性および膜チャネル機構など細胞代謝に必要な物質である。本研究では正常骨髄・末梢血液と血液疾患患者骨髄・末梢血液の比較においてに特異な元素変動を見出し、疾患発症の機序解明やあらたな診断および治療法の端緒を探索する。



参照図 1 走査型蛍光 X 線顕微鏡 (SXM) を用いた細胞内の元素分析
細胞内の 1 区画当たりの元素分析スペクトルを示す。細胞全領域のスキニングにより、下段写真のように、細胞内元素マッピングが可能となる。写真は Pt 製剤であるシスプラチンを細胞投与後 4 8 時間後の各元素の細胞内分布を示す（文献 2 より引用）。

6. 研究の対象等

研究の対象

文書で同意を得た血液疾患（急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、骨髄異形成症候群、骨髄繊維症、真性多血症、再生不良性貧血、多発性骨髄腫、原発性マクログロブリン血症、発作性夜間血色素尿症）患者の末梢血および骨髄細胞（末梢血液あるいは骨髄細胞の片方の提供の可とする）

*末梢血は約 10ml、骨髄細胞は初診診断あるいは治療上必要な場合に施行される骨髄穿刺

検査の余剰骨髄液約 0.5-1 ml

健康人サンプル：文書で同意を得たボランティア健康人より末梢血約 10ml を採血し、血液細胞あるいは血液中の元素解析を行う。サンプル数は 50 人分を目標としている。

実施場所

患者検体の収集：国立国際医療センター戸山病院

健康人ボランティアの検体収集：国立国際医療センター戸山病院および研究所

解析準備のための細胞処理：国立国際医療センター研究所

血液細胞内元素分析（エレメントアレイ解析）：理化学研究所播磨研究所 SPring-8

元素結合蛋白質の解析：大阪大学工学部および国立国際医療センター研究所

血液中元素解析：東レリサーチ

実施（予定）期間 承認後 ～ 平成 22 年 3 月

7. 研究における倫理的配慮

全ての研究の段階で最大限の倫理的配慮を行っている。

① 研究の対象とする個人の権利の擁護

研究への協力はあくまで自由意志で有ることを前提にしており、患者はサンプル採取を拒否した場合でも、何ら臨床上的の不利益を受けない。健康人ボランティアについてもサンプル提供への協力は自由意志であり、拒否する権利を有する。また、サンプル提供を拒否した場合にいかなる不利益も受けることがないことを保証する。採取されたサンプルはすべて当センターの研究責任者（研究代表者）により連結可能匿名化を行い、解析を担当する研究者にそのサンプルが誰の物であるかがわからない方式をとる。

② 被験者に理解を求め同意を得る方法

主治医から患者に対して、説明文書（別添）および同意書（別添）を用いて、分かり易い言葉で適切かつ十分な説明を行う。同意への能力を欠く者または有効なインフォームドコンセントを与えることが出来ないと客観的に判断された場合あるいは未成年（20歳未満）の場合には保護者などの代諾者の同意を得るものとする。健康人ボランティアに対しては研究代表者あるいは共同研究者から説明文書と同意書を用いて十分な説明を行い文書による同意を得られた場合のみサンプル採取を行う。

③ 研究によって生じる個人の不利益と医学上の利益または貢献度の予測

研究に用いるサンプルは初診時あるいは病状評価際など診療に必要な検査として施行する採血の際に追加採取される末梢血液約 10 ml および骨髄穿刺の際の骨髄液余剰分であり特に患者に不利益を与えない。研究成果とその臨床応用には一定の時間が必要であり、試料提供者に直ちに有益な情報もたらされる可能性は高くはないが、将来的には多発性骨髄腫など難治性血液疾患の病態解明、新たな治療法の開発に貢献すると予想される。

健康人ボランティアに関してはサンプル提供に際してならん不利益が発生することはない。

④ その他

疾患名、年齢、性別以外の個人情報は一切秘匿とし、論文発表などにおいても公開しな

い。

研究計画書

1. 研究課題

走査型蛍光 X 線顕微鏡を用いた血液疾患患者血液・骨髄細胞における
細胞内元素変動解析

2. 研究組織

研究代表者		
病院	血液内科 5階北病棟医長	萩原将太郎
共同研究者		
研究所	難治性疾患研究部長 難治性疾患研究室長	石坂幸人 志村まり
病院	第1内科（血液内科）医長	三輪哲義
共同研究施設		
所属、職名、氏名	理化学研究所播磨研究所 (SPRING-8) X線干渉光学研究室 主任研究員 大阪大学大学院工学研究科 精密科学専攻教授	石川哲也 山内和人

3. 研究目的

難治性血液疾患患者の末梢血液あるいは骨髄細胞について走査型蛍光 X 線顕微鏡 (SXFМ; 文献2) を用いて、細胞内微細構造における元素分析 (エレメントアレイ解析) を行い、難治性の血液疾患患者末梢血液・骨髄細胞に特異な元素変動を見出し、疾患発症の機序解明、新たな診断および治療法の端緒を探索する。

4. 研究方法

①研究対象

当センターに外来通院中あるいは入院中の血液疾患患者 (急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、骨髄異形成症候群、骨髄繊維症、真性多血症、再生不良性貧血、多発性骨髄腫、原発性マクログロブリン血症、発作性夜間血色素尿症) を対象とする。

また、正常細胞および正常血漿中の元素分析を行うため健康人ボランティアを募る。予定数は50名である。

②研究期間 承認後 ～ 平成22年3月

③検体の解析方法

患者末梢血と骨髓液を採取（どちらか一方でも可）、ボランティアは末梢血液。

蛍光 X 線専用基板に細胞を接着後固定する。

試料は理化学研究所播磨研究所 SPring-8 に搬送。

細胞の形態学的分類を施行した後走査型蛍光 X 線顕微鏡による元素分析を行う。

さらに、変動している特異元素に結合している蛋白質の解析を行うために、High performance liquid chromatograph (HPLC)-Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) の連続測定による解析を行う。必要であれば、Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (マトリックス支援レーザー脱離イオン化法) - Time of Flight Mass Spectrometry (飛行時間型質量分析法) (MAIDI-TOFMS) での蛋白質同定を行い、難治性の血液疾患発症の機序解明、新たな診断および治療法の端緒を探索する。

また血液中の元素は東レリサーチにて ICM-MS を用いて分析する。

④目標症例数

各疾患最低 3 例、目標総数 50 例とする。

健常人サンプル：目標 50 例とする。

5. 患者および健常人ボランティアへの説明と同意

対象者には、血液疾患末梢血・骨髓細胞の特性に関する研究目的のためにサンプルを採取することを説明する。その際に、説明文書（別紙）を対象者に渡すと共にその内容を担当医が説明する。具体的には研究協力の任意性と撤回の自由、研究計画、研究目的、試料提供者にもたらされる利益および不利益、個人情報の保護、研究成果の公表、得られた医学情報の権利、費用負担に関する事項について説明する。患者（あるいは代諾者）・健常人ボランティアの同意が得られた場合は同意書（別紙）に署名してもらい保存する。患者・健常人ボランティアが研究目的の採取を拒否した場合はサンプルの採取は行わない。

6. 個人情報の保護

当センター病院の患者検体や診療情報は、解析する前に試料の整理簿から、住所、氏名、生年月日などを削り、代わりに新しく符号をつけ、分析を行う研究者にも、患者および健常人ボランティアの個人情報が漏れないようにする。解析後のサンプルは適切に処理される。個人情報管理責任者は国立国際医療センター戸山病院 運営局長とする。

7. 解析結果の開示

本研究は、血液疾患患者の協力を得て、難治性血液疾患の末梢血液および骨髓細胞における疾患特有な元素変動を調べるものである。この結果、患者個人の病気の治療などに有益な結果が出る可能性は低い原則として解析結果を本人に開示することはしない。しかし解析の結果、診療上重要な情報が見つかった場合には、診療を担当する医師から患者あるいは家族へ結果の説明を行うことがある。

研究の進み具合やその成果、学術的な意義については、定期的に、また、患者の求めに応じ、分かりやすい形で、公表あるいは説明を行う。

健康人ボランティアに関しては、本人の希望がある場合のみ解析結果を本人へ開示する。

8. 研究成果の公表

研究の成果を学会発表や学術雑誌およびデータベース上で公表する際には、患者および健康人ボランティアの個人名を匿名とし、その他のプライバシーに関することも、すべて配慮する。

9. 知的財産権の扱い

患者から提供された末梢血液あるいは骨髄細胞を用いた研究によって新たな血液疾患の診断あるいは治療に役立つような情報が発見されることも考えられる。この場合、知的財産権は研究施設に帰属し、検体を提供した患者には帰属しないことを患者・健康人ボランティアに説明し了解を得た後、同意書を得る。

10. 解析研究終了後の試料等の取扱の方針

解析終了後のサンプルはすべて廃棄する。

参考文献

文献 1 Fabris S, et al. Characterization of oncogene dysregulation in multiple myeloma by combined FISH and DNA microarray analysis. *Genes Chromosomes Cancer* 2005;42(2):117-127.

文献 2 Shimura M, et al. Element array by scanning X-ray fluorescence microscopy after cis-diamminedichloro-platinum treatment. *Cancer Research* 2005;65(12):4998-5002.

説明文書

研究課題名

走査型蛍光 X 線顕微鏡を用いた血液疾患患者血液・骨髄細胞における
細胞内元素変動解析

1. はじめに（本研究の意義及び目的）

血液疾患の多くは、その発症メカニズムが十分に解明されておらず、有用な診断法、また有効な治療法についての研究開発が必要です。本研究は、走査型蛍光 X 線顕微鏡⁽¹⁾という新しい技術を用いて、血液細胞や骨髄細胞のミネラル（元素）変動を調べるものです。ミネラル（元素）は、細胞代謝に必須であり、バランスを損なうと体調に変化が出ることも知られています。最近、このミネラルが、腫瘍細胞などの特徴と密接に関連していることが徐々にわかってきました。この研究により、今までわからなかった血液疾患の血液細胞や骨髄細胞のミネラル変動を詳しく調べることができます。この研究により新しい診断法や治療法の開発の助けになる可能性があります。

これからご説明することをご理解いただいた上で、この新しい技術を用いた研究のために、検査の際に末梢血液および骨髄液（どちらか一方でも結構です）を提供して頂きたく御協力をお願い致します。

（注）走査型蛍光 X 線顕微鏡とは？

生体内では、適切な量の鉄、銅、カルシウム、マグネシウム、カリウム等ミネラル（元素）は代謝に必須な成分であることが知られています。この顕微鏡では、被写体（細胞）の生体内の大半全てのミネラル（元素）を観ることができます。また、生体内では様々な細胞が存在し、それぞれ役割分担があります。近年、細胞は外界の刺激に対して、細胞のミネラル（元素）に変動を起こすことを、この顕微鏡を用いて世界で初めて観ることができるようになりました。現在、日本はこの分野において世界最高水準にあります。

2. 研究協力は任意であり、撤回も自由であること

この研究への協力への同意はあなたの自由意志で決めて下さい。また同意しなくてもそのことによって治療上何ら不利益を受けません。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試料（末梢血液や骨髄液）や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。

3. 研究のあらまし

研究名：走査型蛍光 X 線顕微鏡を用いた血液疾患患者血液・骨髄細胞における元素分析
研究の目的：血液疾患患者の末梢血液および骨髄細胞について走査型蛍光 X 線顕微鏡を用いて、細胞内の様々な元素分析を行い、血液疾患患者血液・骨髄細胞に特徴的な元素の変動を調べます。

研究機関名及び研究者・研究責任者氏名：

研究責任者

所属機関		職名	氏名
国立国際医療センター病院	血液内科	5階北病棟医長	萩原将太郎

共同研究者

国立国際医療センター病院	血液内科	第1内科医長	三輪哲義
国立国際医療センター研究所	難治性疾患研究部部長		石坂幸人
	難治性疾患研究部難治性疾患研究室		志村まり

研究の方法：

血液検査の際に末梢血液約10mlおよび骨髄穿刺の検査を受ける際に余った骨髄液を約0.5-1.0ml程度いただきます。末梢血液か骨髄液のどちらか一方のご提供でも結構です。また、この研究のために新たに骨髄採取を行うものではありません。提供して頂いた末梢血液あるいは骨髄液中の血液細胞を分離し、走査型蛍光X線顕微鏡という特殊な装置をもちいて、細胞の中に含まれる元素を測定します。また ICP-MS という装置を用いて血液中の元素を測定します。特定の元素に変動がある場合には、血液細胞・血清や骨髄液に含まれる元素に結びついている蛋白質を解析します。

本研究の研究期間は、現在から平成22年3月までです。

御希望があれば、この研究の計画のさらに細かい内容（研究計画書）をお渡しします。

4. 予測される結果、研究協力者にもたらされる利益および不利益について

この研究は、血液疾患の患者さんの協力を得て、血液疾患の血液および骨髄における元素を調べるものです。研究の結果から、将来の血液疾患の患者さんにとって役に立つ情報が得られる可能性があります。しかし、あなたにとって直ちに役に立つような結果は出ないかもしれません。ただし、解析の結果、特に診療上重要と思われると判断される情報が得られることがあるかも知れません。この場合には、研究代表者より担当医師へ連絡し、担当医よりご本人へ御説明いたします。

研究から得られた解析結果につきましては、特に何かお知りになられたいことがございましたら、担当の医師を通じて研究責任者に御連絡いただければ御返事いたします。

5. 個人情報第三者から保護され、匿名化され、研究成果が公表されること

個人名につきましては当センターの個人識別情報管理者が番号で置き換えてわからないようにしてから、年齢、性別、検査所見などに関係するデータのみを添付して研究に使わせていただきます。研究の結果は、学会や学術雑誌等に発表しますが、その場合もプライバシーは保護されます。

あなたの協力によって得られた研究の成果を学会発表や学術雑誌およびデータベース上で公表する際にはあなたの個人名を匿名とし、あなたが特定されるような状況はないように配慮されます。

本研究では、あなたの末梢血液あるいは骨髄液に含まれる元素や元素似結びついている蛋白を調べますが、遺伝情報についての解析は行いません。測定後の検体（末梢血液および骨髄液）は適切な方法（オートクレーブ＝高熱処理）により廃棄されます。

あなたの検体（末梢血液および骨髄液）は、研究に用いられる前に氏名や診療番号など

の個人情報を取り除かれ、本研究の研究代表者によって新たに番号が付されます。これを試料の匿名化といいます。本研究ではこのように匿名化された試料を用いることで、あなたのプライバシーが保護された状態で解析を行います。また本研究計画の結果を論文として公表する際にも個人の特定化が可能になるようにはいたしません。

6. 研究から生じるかもしれない知的財産権は研究協力者（あなた）には属さないこと

解析研究の結果として特許権などが生じる場合でも、残念ですが、試料を提供して下さった方ものにはなりません。あなたから提供していただいた試料を用いた研究によって、疾患の診断や治療に役立つような情報が発見され特許権などが生じることも考えられます。この様な知的所有権は研究者又は研究者の所属する施設に帰属し、試料を提供して下さったあなたには帰属しないこととなります。何卒ご了解下さい。

7. 研究協力は無償で行われ、研究協力者に費用の負担はないこと

検体の提供は無償でお願いいたします。もちろん研究協力者の方に費用の御負担はありません。

平成 年 月 日

お問い合わせ先

国立国際医療センター血液内科 5階北病棟医長
萩原将太郎

国立国際医療センター血液内科 第1内科医長
三輪哲義

〒162-8655 東京都新宿区戸山1-21-1

TEL 03-3202-7181 (代表)

FAX 03-3207-1038 (代表)

研究協力についての同意書

申請番号 ()

国立国際医療センター総長殿

私は、走査型蛍光 X 線顕微鏡を用いた血液疾患患者血液・骨髄細胞における元素分析について、下記説明者より説明文書を用いて以下の項目の説明を受けました。

- ・研究協力は任意であり、撤回も自由であること
- ・研究の意義、目的と方法
- ・研究から生じるかもしれない知的財産権は研究協力者に属さないこと
- ・研究終了後の試料等の取り扱い方法
- ・研究は無償に行われ、研究協力者に費用の負担はないこと

特に、以下の項目に関しては了解したことを□にチェックし、確認いたします。

- 血液検査および骨髄穿刺検査の際に末梢血液および骨髄液を提供していただくこと
(末梢血液あるいは骨髄液のどちらか一方でも可)
- 研究協力者にもたらされる利益および不利益について
- 個人情報第三者に漏れることなく、匿名化された上で研究成果が公表されること
- 末梢血液および骨髄細胞の解析が終了した後は直ちに試料は廃棄されること

以上より、私は上記の研究に協力することに (下記を○で囲んで下さい)

同意します

同意しません

平成 年 月 日

研究協力者氏名 (署名または記名、捺印)

説明者の職名、氏名 (署名または記名、捺印)