

平成 2 0 年度

実験実習支援センター特別講習会

平成 2 0 年 9 月 2 日～9 月 1 0 日

滋賀医科大学

実験実習支援センター

**平成 20 年度医学総合研究特論（大学院特別講義）集中講義
平成 20 年度実験実習支援センター特別講習会
プログラム**

【第 1 日目 9 月 2 日（火）】

14:00～15:40 遺伝情報解析の基礎－PCRとその応用

上山久雄（生化学・分子生物学 分子病態生化学）

15:50～17:30 遠心機の利用法

洲崎雅史・岡本良平・漆山昇・小山由起子

（実験実習支援センター）

【第 2 日目 9 月 3 日（水）】

14:00～15:40 実験動物の取扱手技（サル類）

鳥居隆三・土屋英明・岡原則夫（動物生命科学研究センター）

15:50～17:30 再生医学・幹細胞研究法

小島秀人（生化学・分子生物学 分子遺伝医学）

【第 3 日目 9 月 4 日（木）】

14:00～15:40 ラジオアイソトープ（R I）取り扱い実験法＊

1）R I 利用の今までとこれから！！

蕪木宏行（パーキンエルマー・ジャパン）

2）放射線測定器の使用法について

福堀順敏・小山由起子・森本国男（実験実習支援センター）

15:50～17:30 ヒューマンサンプルの取り扱い研究法

喜多義邦（社会医学 福祉保健医学）

【第 4 日目 9 月 9 日（火）】

14:00～17:30 組織標本作製法の実際 －講義・実習－

山本好男（社会医学 法医学）

山元武文・森康博（実験実習支援センター）

【第 5 日目 9 月 10 日（水）】

14:00～15:40 マルチメディアセンター（MMC）活用法＊＊

重歳憲治（マルチメディアセンター）

15:50～17:30 遺伝子情報データベースの活用法＊＊

礒野高敬（実験実習支援センター）

講義場所：＊ R I 研究施設 3 階 教育訓練実習室

＊＊マルチメディアセンター演習室

その他は教職員ロビー

遺伝情報解析の基礎 -PCR とその応用

上山 久雄（生化学分子生物学講座・分子病態生化学）

PCR は polymerase chain reaction（ポリメラーゼ連鎖反応）の略である。微量の DNA を、解析可能な量にまで試験管内で増やす方法である。対象の DNA は二本鎖のものが通常であるが、下に記すように RNA も、逆転写反応（reverse transcription）を行っておけば PCR ができる（RT-PCR という）。

PCR の反応液には、対象の DNA（鋳型とよばれる）の他に、DNA 合成の基質となる 4 種の dNTP（デオキシリボヌクレオシド三リン酸）、1 組のプライマー DNA、耐熱性の DNA ポリメラーゼなどが含まれており、保温温度を $[94^{\circ}\text{C} \rightarrow 55^{\circ}\text{C} \rightarrow 72^{\circ}\text{C}] \times n$ と繰り返し変化させるだけで、鋳型の中の、プライマー DNA には含まれた領域だけが増幅される。計算上は 10 回の繰り返し（ n : サイクル）で約千倍、20 回で約百万倍に増幅されるはずであるが、25～30 回程度のサイクルが普通である。

PCR は、(i) 遺伝子の多型あるいは変異の解析、(ii) クローニングと変異の導入、(iii) mRNA 発現量の解析、などを目的として行われる。

(i) の「遺伝子の多型あるいは変異の解析」は最もポピュラーなもので、疾患関連遺伝子の個別解析、個人識別（親子鑑定や犯罪捜査）、病原体の特定、遺伝子組み換え植物の混入の判定、などに用いられる。「増幅されるかどうか」で判定する場合もあれば、増幅された産物を制限酵素切断やシーケンシング、電気泳動などで解析して判定する場合もある。特定の遺伝子の端から端まで解析したいのであれば、ロング PCR でまず遺伝子全体を増幅し、その産物を鋳型にした PCR を行うと楽である。ゲノム DNA からのロング PCR は 30 キロ塩基対近くまでが可能になっている。

(ii) の「クローニングと変異の導入」は、興味ある遺伝子や cDNA（mRNA を上記の逆転写反応で DNA に変換したもの）をクローニング（プラスミドなどのベクター DNA に入れること）するときに行われる PCR である。公表されている塩基配列をもとに自らクローニングする場合や、クローンはあるが中身を別のベクターに移しかえたい場合（制限酵素の切断配列を両端に導入する）、クローンに塩基置換を導入したい場合（変異が入ったプライマーを用いたオーバーラップ伸長法）などである。いずれにしても、重要なのは耐熱性 DNA ポリメラーゼとして、3' → 5' のエキソヌクレアーゼ活性を備えたものを使用することである。この活性を持たないポリメラーゼでは予期せぬ変異が入ってしまうことがある。

(iii) の「mRNA 発現量の解析」はリアルタイム PCR で行われている。リアルタイム PCR は、1 サイクルごとに産物の量を蛍光で測定していくものであり、何サイクル目で産物ができ始めるかをみる。何コピーかが既知の二本鎖 DNA（例えば 10、100、1,000 コピーなど）を鋳型にして標準曲線を作成し、それをもとに mRNA（実際にはその cDNA）を定量するものである。二本鎖 DNA に結合する蛍光色素を用いて産物量を測定する方法がポピュラーであるが、その PCR により正しい産物だけができていることを確認する必要がある。

PCR には以上のように様々な用途がある。この単純な方法を駆使して立派な成果をあげて頂きたい。

遺伝情報解析の基礎 - PCRとその応用

生化学・分子生物学講座
上山久雄

PCRとは

- PCRは、**p**olymerase **c**hain **r**eactionの略
(ポリメラーゼ連鎖反応)
- 微量のDNAを、解析可能な量に増やす方法

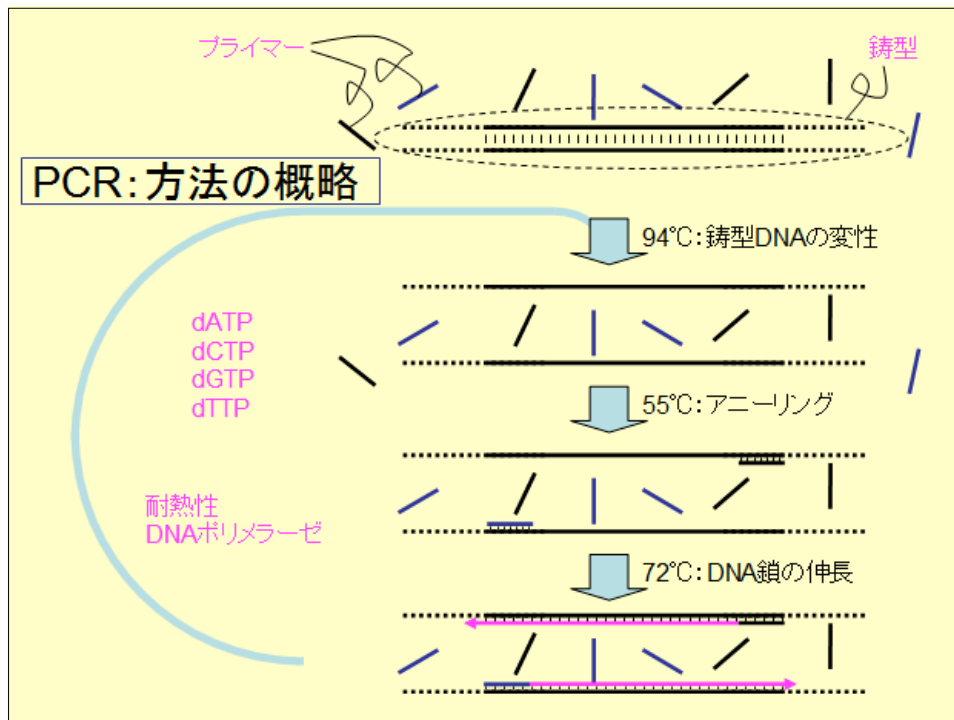
ゲノミックスザン: ゲノムDNAを制限酵素で切断し、
電気泳動でDNA断片を大きさで分け、
その泳動パターンをフィルターに写しとり、
検出用核酸をハイブリダイズさせる方法

ゲノムDNAは
5 μ g以上必要

血液0.17 ml に相当

血液0.33 μ l に相当

PCR: ゲノムDNAは10 ng もあれば十分



PCRがうまくいかない原因

- 鋳型DNA: 阻害物質の混入
極端な断片化
- プライマー: 特異性 - 16merは必要
ヘアピン
ダイマー
- PCR条件: 温度 - アニールングの温度
伸長時間 - 500 bp / 30 s
Mg濃度 - 1.5 mM

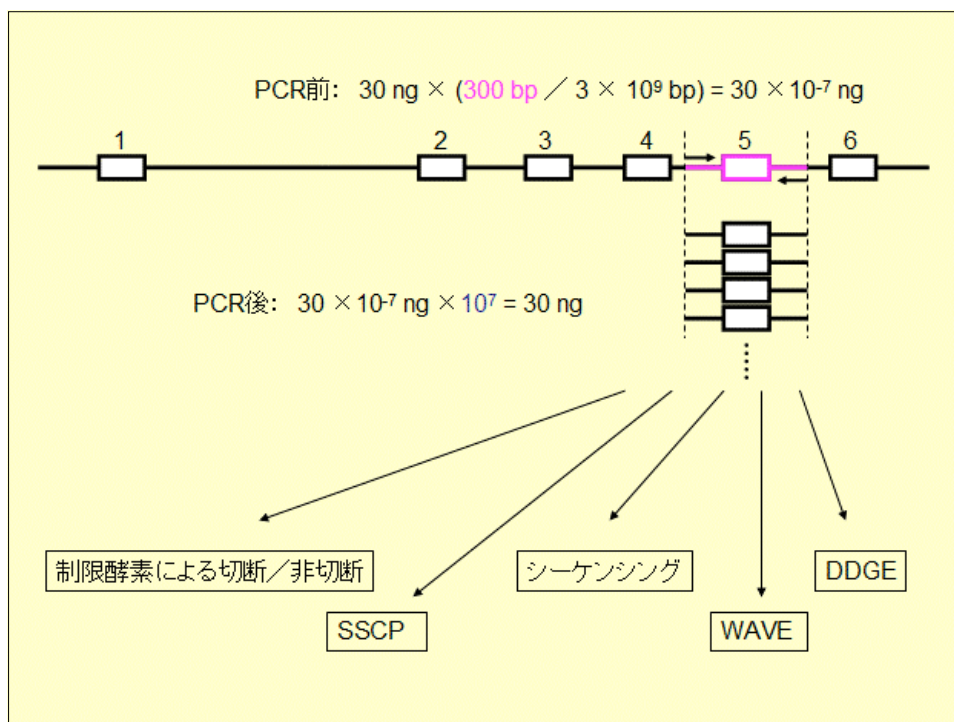
$4^{16} \approx 4 \times 10^9$
ヒトのゲノムサイズ:
 3×10^9 bp

→ nested PCRを試みる

→ FailSafe™ PCR System (Epicentre)やPCR Optimization Kit (Roche)を試みる(様々なバッファーや添加物を試してみる)

PCRの目的

- DNA多型や変異の解析
遺伝性疾患の責任遺伝子、関連遺伝子
個人識別(犯罪捜査、親子鑑定)
病原体の特定、食品検査---
- クローニングや変異の導入
塩基配列情報をもとにクローニング
クローン化DNAの移し替え
クローン化DNAへの変異導入
- mRNA発現量の解析

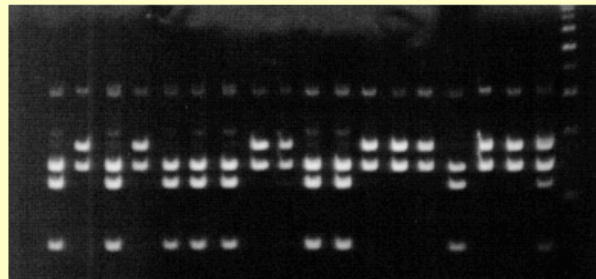


制限酵素による切断／非切断を用いた解析例

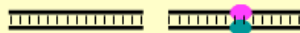
TCCCAA---CTTG---C↓TGG---TACCGT
AGGGTT---GAAC---GG↑ACC---ATGGCA

TCCCAA---C↓TGG---C↓TGG---TACCGT
AGGGTT---G↑ACC---G↑ACC---ATGGCA

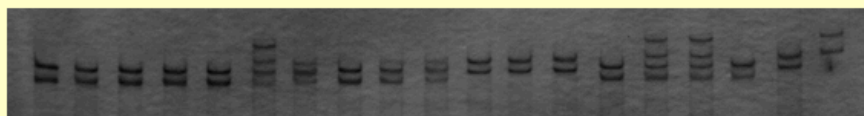
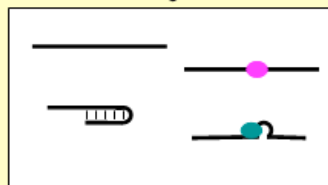
*Mva*I : CCWGG
 GGWCC
 ↑



SSCPによる解析例 (single strand conformation polymorphisms)



↓ 変性後、電気泳動



シーケンシング による解析例

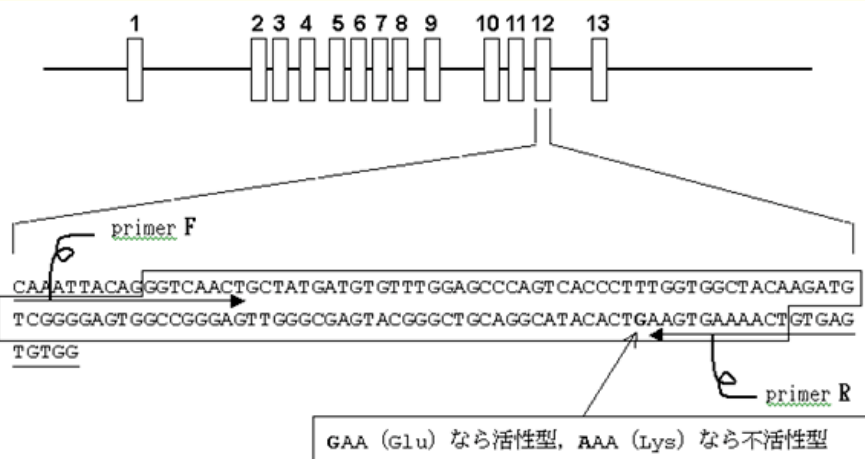
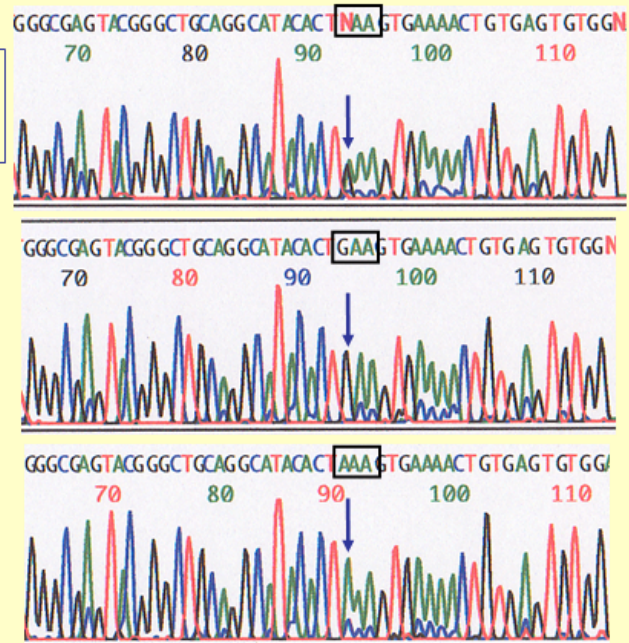
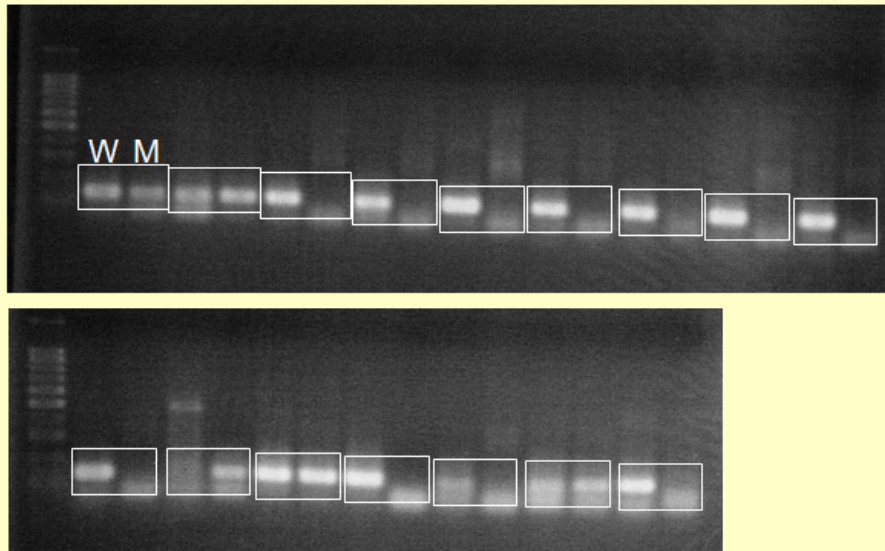


図5 ヒトアルデヒド脱水酵素遺伝子の構造とエクソン12の塩基配列
数字はエクソン番号, —▶ はPCRプライマーの対応位置を示す。

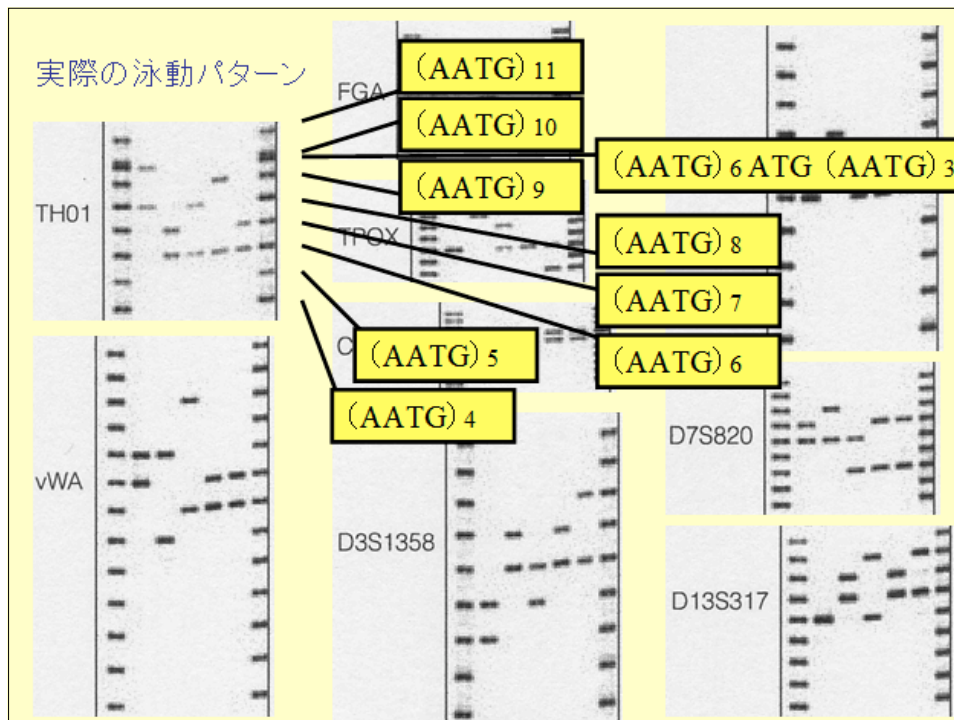
アレル特異的PCRでは
PCRがかかる／かからないで判断する



アレル (allele, 対立遺伝子) 特異的PCR

増幅されたDNA断片長の解析
(警察庁でDNA鑑定に用いられている9座位)

名称	由来	繰り返しの単位
TH01	tyrosine hydroxylase gene	AATG
vWA	von Willebrand factor gene	TCTA
FGA	fibrinogen α gene	TTTC
TPOX	thyroid peroxidase gene	AATG
CSF1PO	CSF-1 receptor gene	AGAT
D3S1358	—	TCTA
D5S818	—	AGAT
D7S820	—	GATA
D13S317	—	TATC



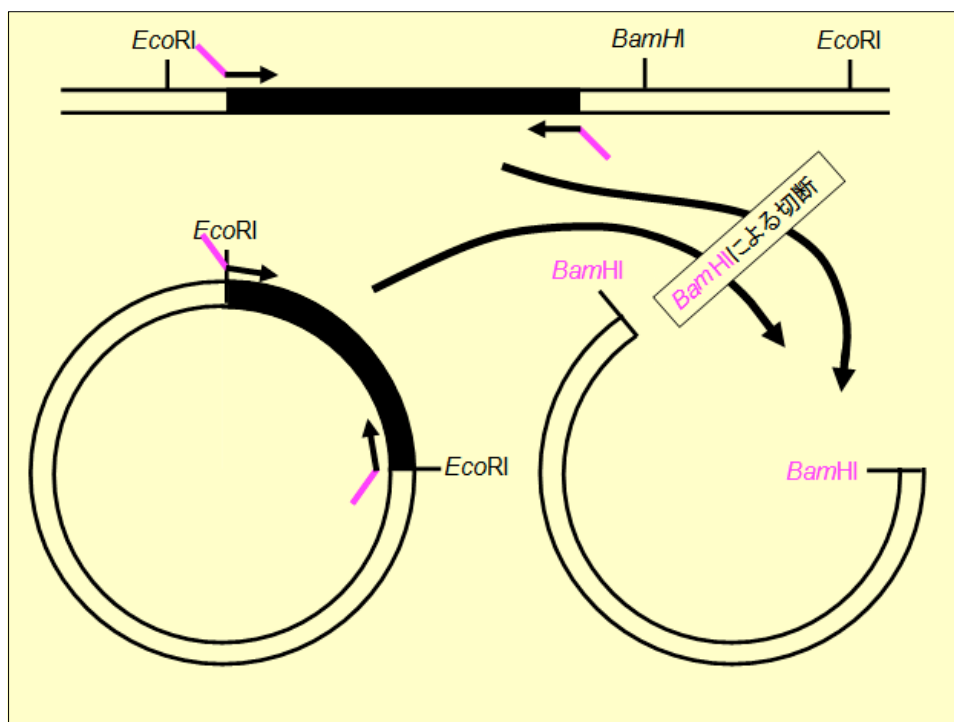
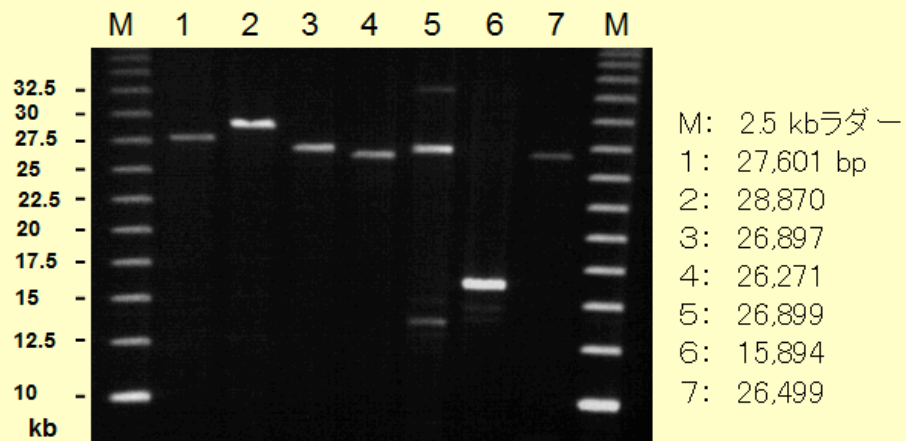
ロングPCR

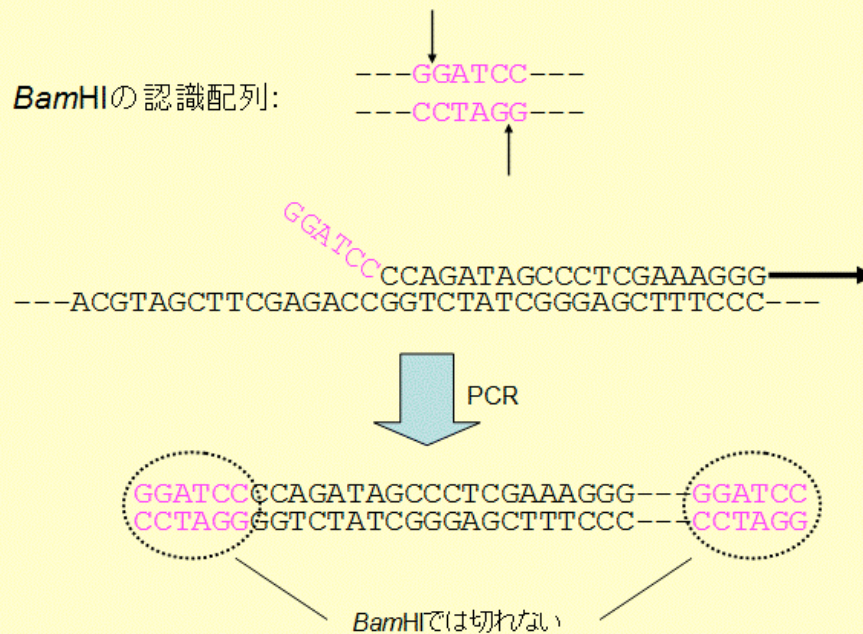
- ゲノムDNAから、ある遺伝子の部分部分を、通常のPCRでそれぞれ増幅するのは大変
- ロングPCRで一旦遺伝子全体を増幅しておき、それを鋳型にしてPCRを行うと楽
- ロングPCRでは30 kbp弱が増幅可能
- ロングPCRに適した酵素が販売されている

Long Range PCR Kit (QIAGEN)

Expand 20 kb^{PLUS} PCR System (Roche) ---

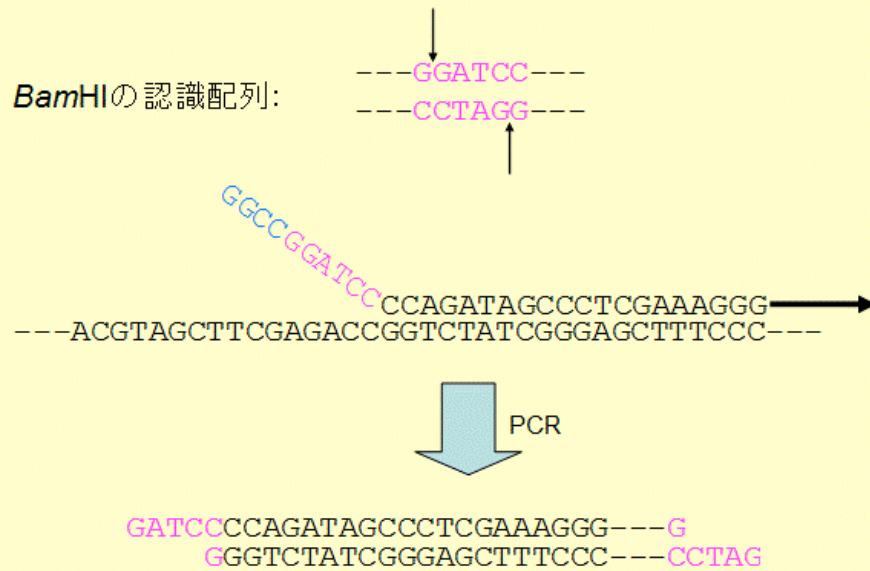
ロングPCR産物のゲル電気泳動 (パルスフィールド電気泳動)



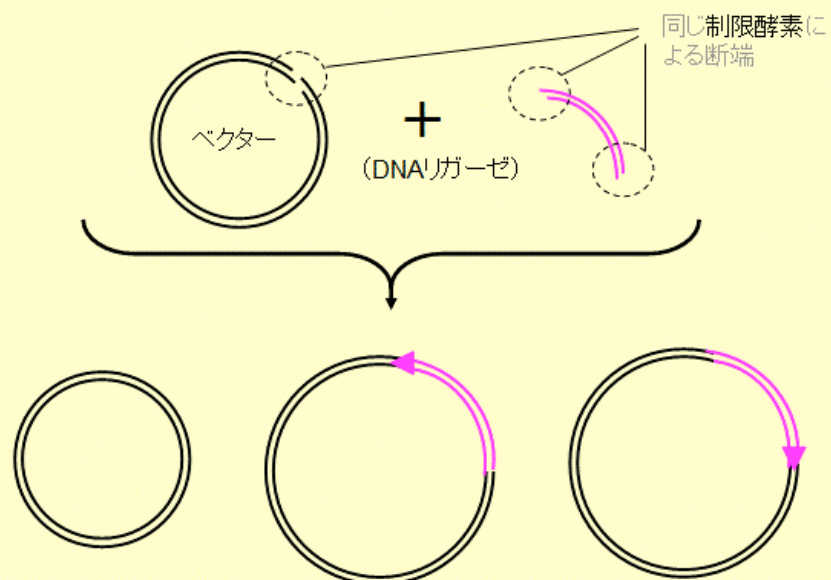


二本鎖オリゴDNAを用いた 制限酵素切断効率の検討

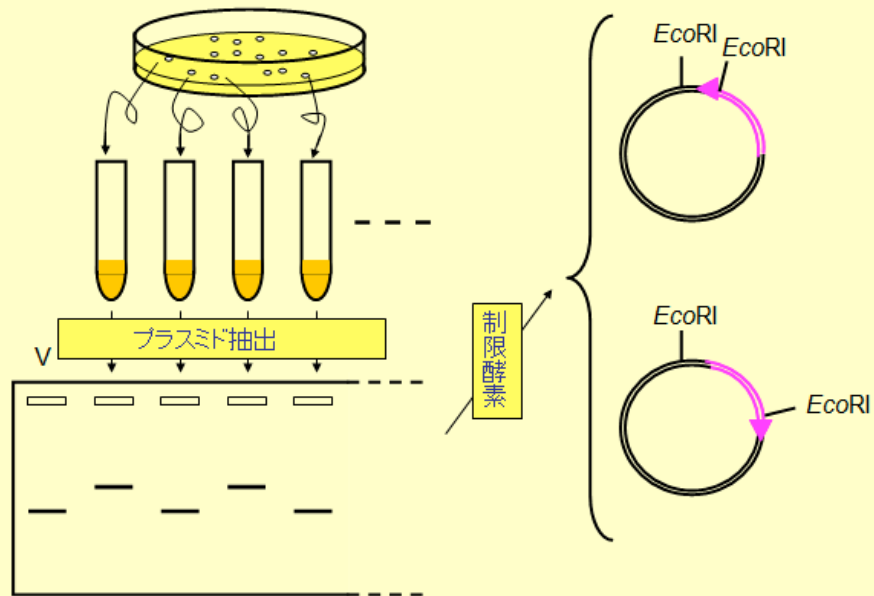
<i>Bam</i> HI:	CGGATCCCG GCCTAGGGC	10%
	CGGGATCCCG GCCCTAGGGC	>90%
<i>Eco</i> RI:	GGAATTCC CCTTAAGG	>90%
<i>Hind</i> III:	CCC A AGCTTGGG GGG T TCGA A CCC	10%



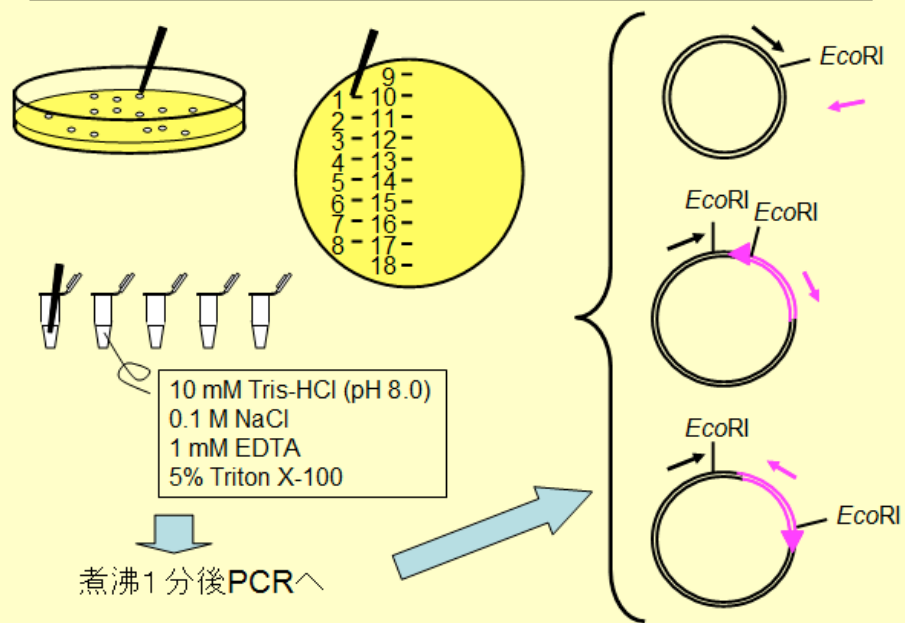
遺伝子(cDNA)クローニングの過程-1



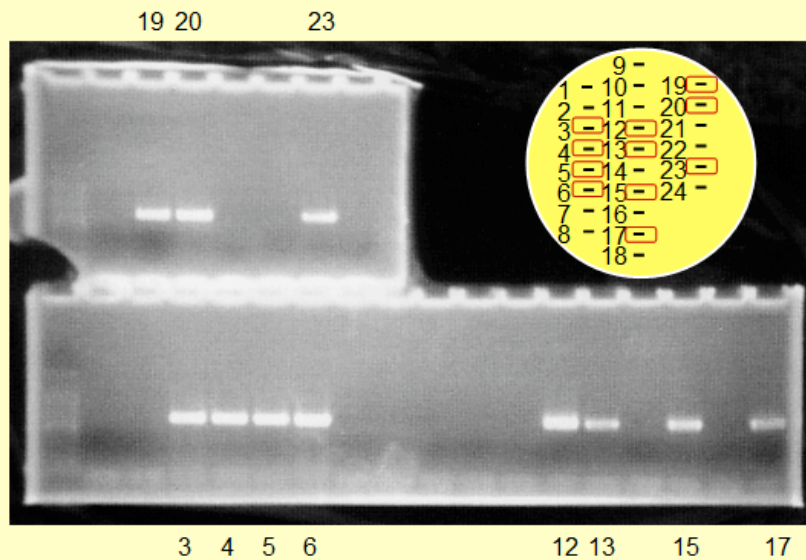
遺伝子(cDNA)クローニングの過程-2



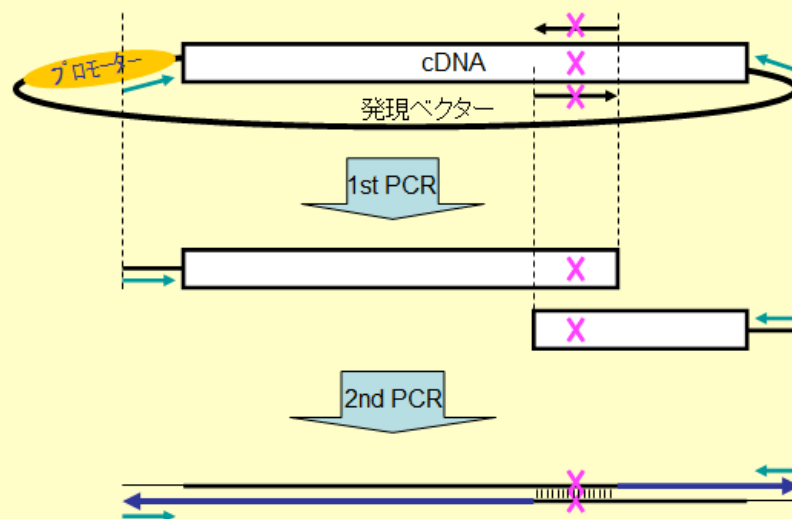
遺伝子(cDNA)クローンのPCRによる選別



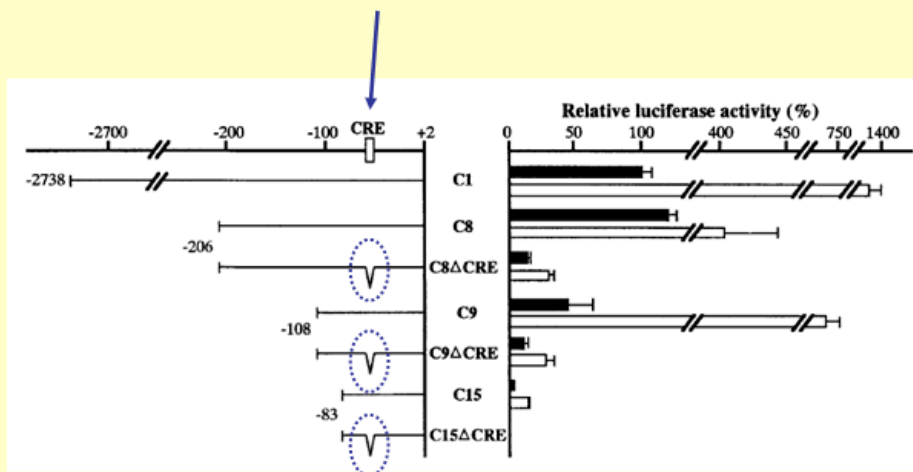
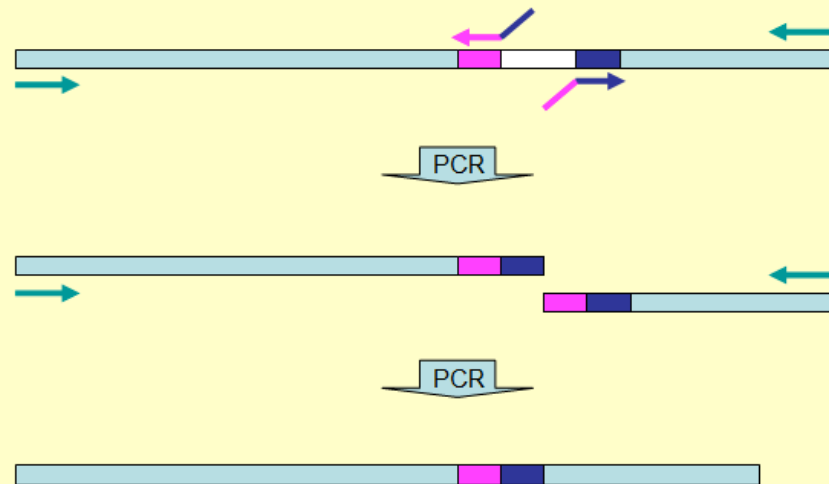
PCRによるコロニースクリーニングの例



オーバーラップ伸長法による変異の導入



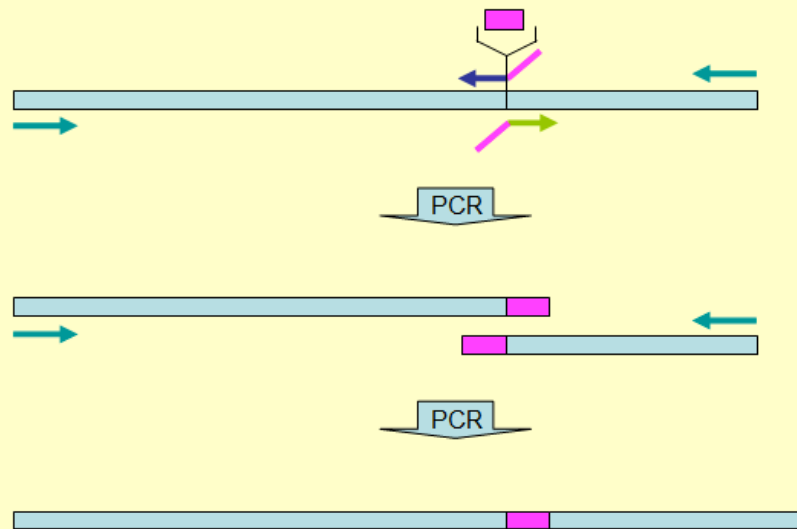
オーバーラップ伸長法による部分欠失の導入



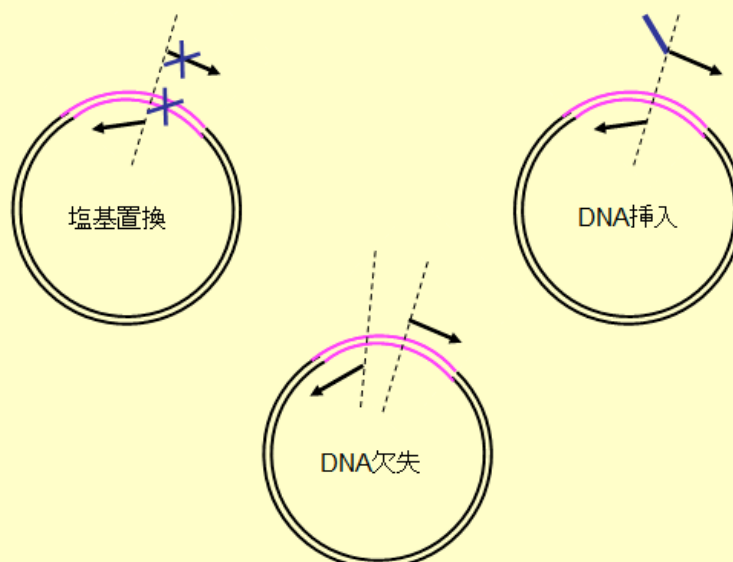
プロモーターのCREを欠失させた例

(CRE: cyclic AMP-responsive element)

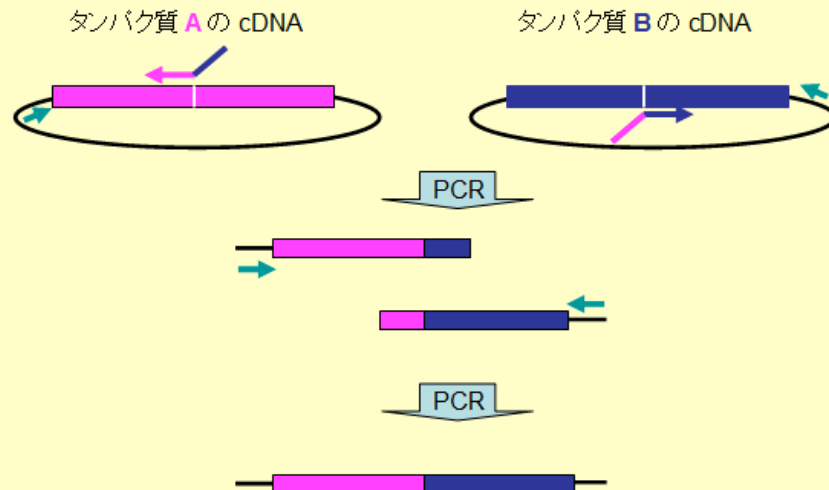
オーバーラップ伸長法によるDNAの挿入



インバースPCR法による変異の導入



オーバーラップ伸長法によるキメラの作製



クローン作製が目的のPCRでは 正確なDNAポリメラーゼを使う必要がある

3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を持つ

5' -ACGTAAGTCCGATAGCCTGATTGAC---
3' -TGCATTCAGGCTATCGGACTAACTG---

Phusion High-Fidelity DNAポリメラーゼ (Finnzymes、コスモ・バイオ)

KOD DNAポリメラーゼ (Toyobo)

ExTaq DNAポリメラーゼ (Takara)

Pfu DNAポリメラーゼ (Promega) ---

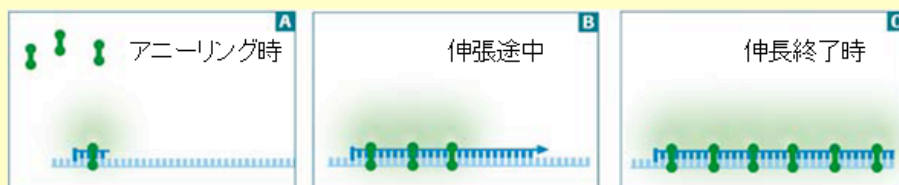
リアルタイムPCR

- RNAは逆転写酵素により一本鎖DNAとする
- PCR産物ができてくる様子をリアルタイムで観察する
- 通常のPCR装置では反応ウェル間に差(到達温度、温度上昇・下降の速度など)があるが、リアルタイムPCR装置では差がないように工夫してある
- リアルタイムPCR装置には、反応中に産物を定量するための光学ユニットが組み込んである(励起光源、蛍光検出器)

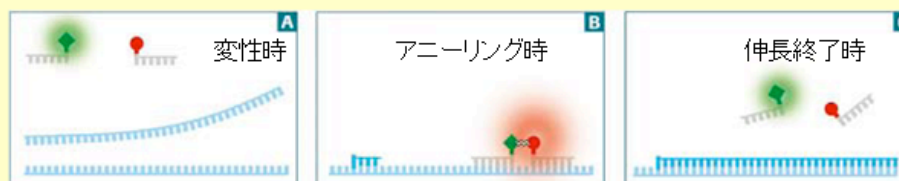


PCR産物の定量

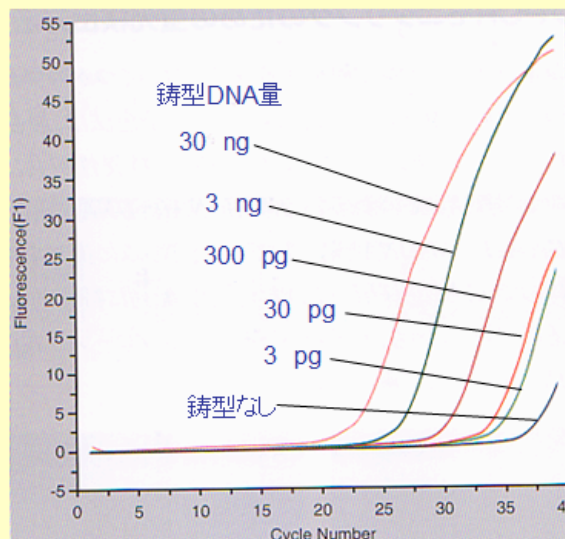
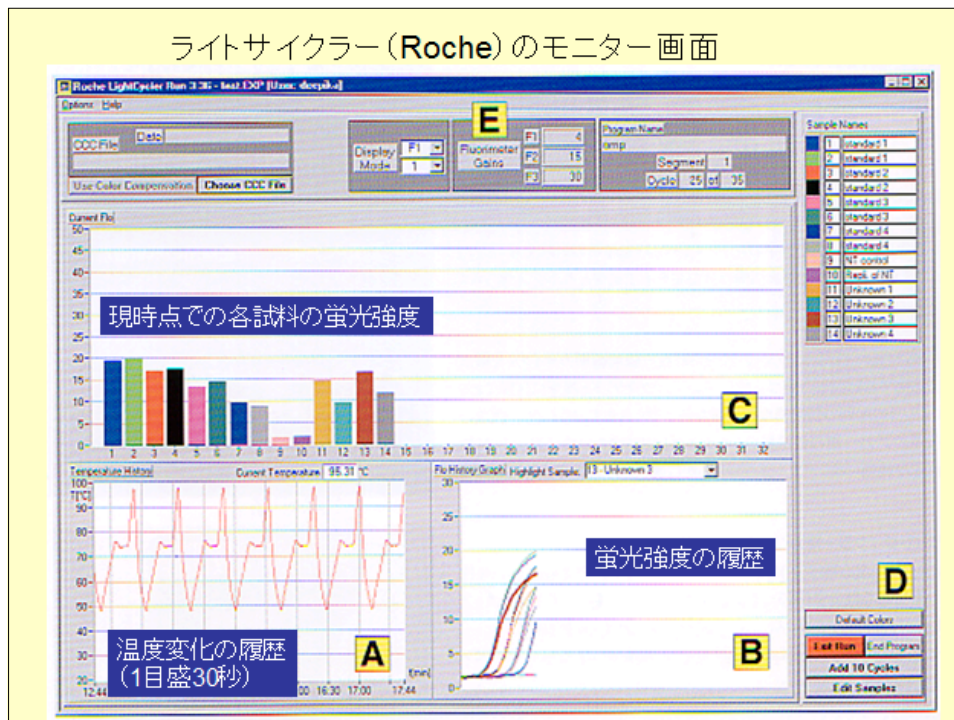
SYBR Green I 法



ハイブリプローブ 法



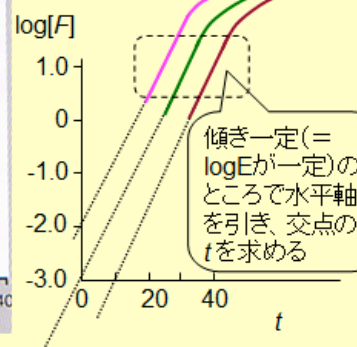
ライトサイクラー (Roche) のモニター画面

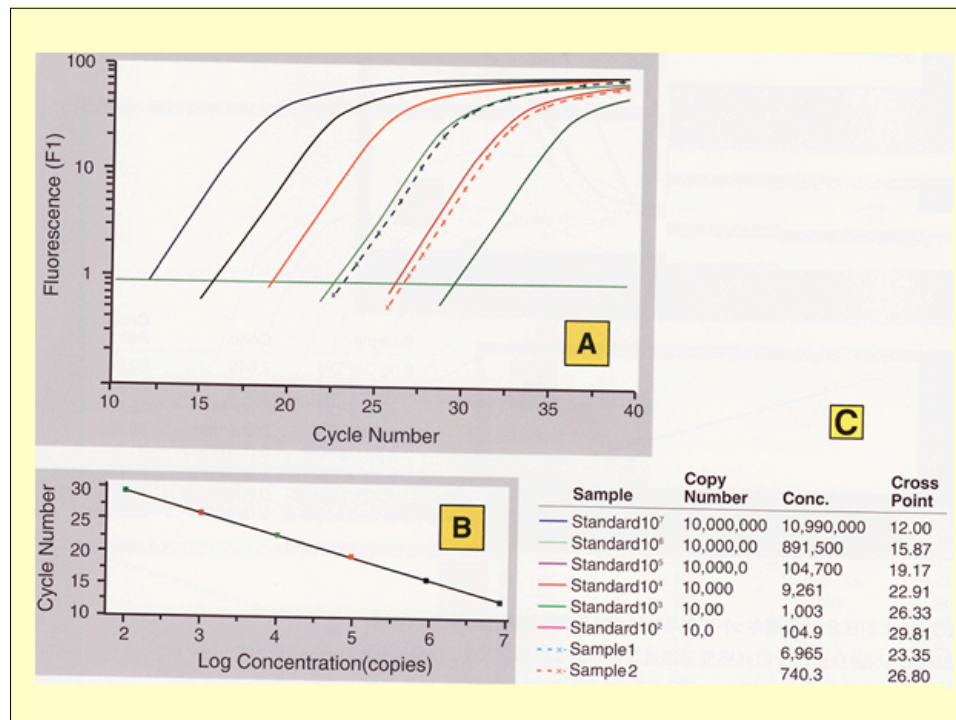


$$N = N_0 \cdot E^t \quad (t: \text{サイクル数})$$

$$\log N = \log N_0 + (\log E) \cdot t$$

$$(y = b + ax)$$





まとめ

- PCRによってゲノムのどの領域も容易に解析することができる
 - PCR産物の解析法は、個別解析からハイスループットまで確立している
- PCRによってクローニングやインサートの移し換え、さらにはコロニーのスクリーニングが容易にできる
- PCRによって変異(塩基置換、DNAの挿入・欠失)の導入、キメラの作製が容易にできる
- PCRによって、遺伝子コピー数の変化、mRNAの量的変動を追うことができる

→ PCRを駆使して素晴らしい研究成果を上げて下さい

遠心機の利用法

洲崎 雅史・岡本 良平・漆山 昇・小山 由起子
(実験実習支援センター)

遠心機は、生化学研究、特にタンパク質や遺伝子の解析を行う実験において、試料の調整等、実験の基礎的な部分で多用される装置です。

最近、遠心機の間違った使用方法に起因すると見られる故障や事故が多く発生しています。

この実習では、これから支援センター内の遠心機（分離用超遠心機、卓上超遠心機、高速冷却遠心機）の利用を予定している方や、すでに利用されている方を対象に、遠心機を安全に、効率良く使っていただくための正しい取り扱い方を、実際に遠心機を操作して体験していただきます。

遠心機の利用法

医学総合研究特論（大学院特別講義）集中講義
実験実習支援センター特別講習会

遠心機とは？

- ☞ 試料を高速で回転させ、
その時得られる遠心力を用いて、
試料を密度の差で分離するための装置

遠心機のしくみ

- ☞ 試料に遠心力をかけるためのローター
- ☞ ローターを回転させるための駆動部
- ☞ 安全確保のためローターを収めるローター室



遠心機の種類

- ☞ 低速遠心機
- ☞ 高速冷却遠心機
- ☞ 超遠心機



低速遠心機

- ☞ 最高回転数3,000rpm程度の遠心機です。
- ☞ 試料中の比較的大きな粒子（培養液中の培養細胞や、血球等）の分離に用います。
- ☞ 試料を冷却できるものもあります。



高速冷却遠心機

- ☞ 最高回転数が20,000rpm程度の遠心機です。
- ☞ ローター（試料）の温度が空気との摩擦熱で上昇しないように強力な冷却機を備えています。
- ☞ 冷却の必要な試料や、低速遠心機では分離できない粒子の分離に用います。
- ☞ ローター室内を減圧（0.5気圧程度）するものもあります。



分離用超遠心機

- ☞ 最高回転数が数万rpmの遠心機で数十万gの遠心力を得ることができます。
- ☞ ローターを非常に高速で回転させるのでローター室内を高真空に保つような仕組みになっています。
- ☞ この遠心機は、強大な遠心力を必要とするようなマイクロソームや、リポタンパク質等の分離に用います。
- ☞ 微量試料を迅速に遠心できる小型のものもあります。



ローター

- ☞ 試料を回転させ、遠心力をかけるためのものです。
- ☞ 大きくわけて2種類あります。
 - ☞ 固定角ローター（アングルローター）
 - ☞ 水平ローター（スィングローター）

固定角ローター

- 通常の遠心分離にはこのローターを使います。
- 駆動軸に対する遠心管の角度や容量など、色々な種類があるので目的に応じたローターを選ぶ必要があります。



水平ローター

- 遠心管を挿入したバケットがローターの回転とともに遠心方向にスイングし水平になるものです。
- バケットは常に遠心力の方向に向いているので、試料が舞い上がったり密度勾配が乱れたりしないため、主に密度勾配法による遠心分離に使用します。

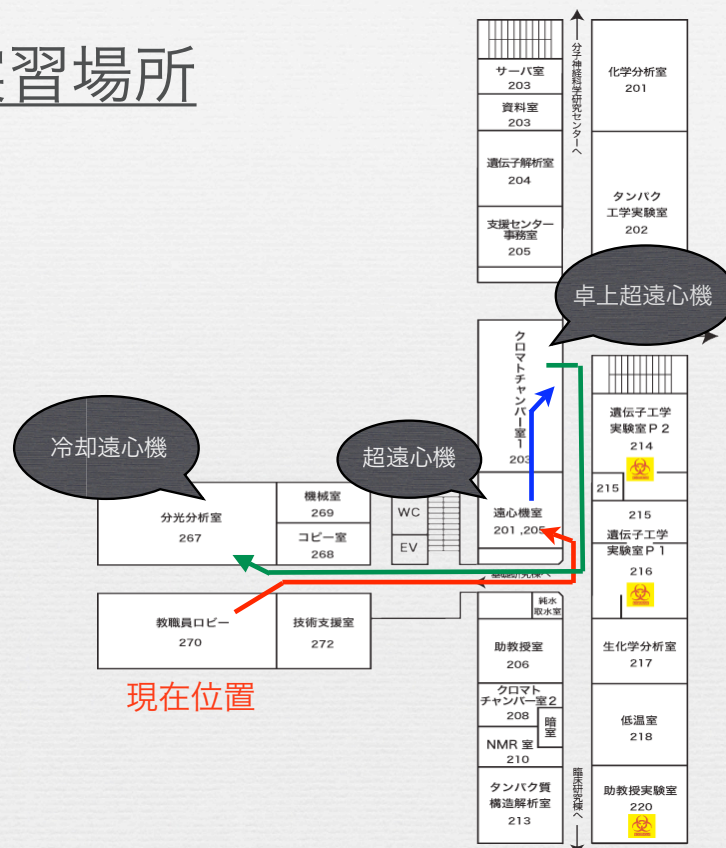


遠心管

- 遠心分離を行なう試料は遠心管と呼ばれる容器に入れます。
- 遠心機やローターに色々な種類があるように、遠心管にも色々な種類（材質、形状）があります。
- 使用するローターに適合したもの（サイズ、耐荷重）を選ぶことは言うまでもなく、使用する溶媒への耐性や、滅菌の必要の有無などから判断し、適切なものを用いることが必要です。
- 必ず純正品を使用してください！！**



実習場所



遠心機の取り扱いについて

遠心機は、試料を高速で回転させ、その時得られる遠心力を用いて、試料を密度の差で分離するための装置で、試料に遠心力をかけるためのローターとそれを回転させるための駆動部よりなっています。そして、安全確保のため回転部は丈夫なチャンバー内に収められています。

遠心機には、低速遠心機、高速冷却遠心機、分離用超遠心機等があり、また、ローターにも固定角ローター（Fixed-angle rotor）、水平ローター（Swinging-bucket rotor）、急速密度勾配で短時間で分離するのに用いる垂直ローター（Vertical tube rotor）などがあり、それぞれのローターには、容量、最高回転数が決められています。実験の目的に合わせて最適なものを選択する必要があります。

遠心機の種類

低速遠心機

最高回転数3,000rpm程度の遠心機で、試料中の比較的大きな粒子（培養液中の培養細胞や、血球等）の分離に用います。試料を冷却できるものもあります。
(日立CF-7D2、ベックマンGPR)

高速冷却遠心機

最高回転数20,000rpm程度の遠心機です。試料の温度が空気との摩擦熱で上昇しないように強力な冷却機を備えています。冷却の必要な試料や、低速遠心機では分離できない粒子の分離に用います。ローター室内を減圧（0.5気圧程度）するものもあります。
(ベックマンJ2-21、J2-21/ME、HP-25、HP-26)

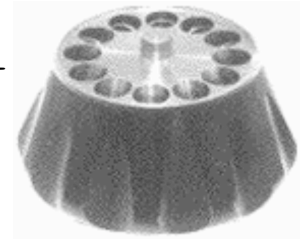
分離用超遠心機

最高回転数が数万rpmの遠心機で数十万gの遠心力を得ることができます。ローターを非常に高速で回転させるのでローター室内を高真空に保つような仕組みになっています。この遠心機は、強大な遠心力を必要とするようなミクロソームや、リポタンパク質等の分離に用います。微量試料を迅速に遠心できる小型のものもあります。
(ベックマンL7-65、TL-100、Optima TL)

ローターの種類

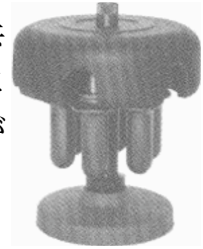
固定角ローター（アングルローター）

通常の遠心分離にはこのローターを用います。アングルローターには、色々な種類（駆動軸に対する遠心管の角度や、容量）があるので目的に応じたローターを選ぶ必要があります。



水平ローター（スイングローター）

このローターは遠心管を挿入したバケットが、ローターの回転と共に遠心方向にスウィングし、水平になるものです。バケットは常に遠心力の方向に向いているので、試料が舞い上がったり密度勾配が乱れたりしないため、主に密度勾配法による遠心分離に使用します。



遠心管について

遠心分離を行なう試料は遠心管と呼ばれる容器に入れます。遠心機やローターに色々な種類があるように、遠心管にも色々な種類（材質、形状）があります。使用するローターに適合したもの（サイズ、耐荷重）を選ぶことは言うまでもなく、使用する溶媒への耐性や、滅菌の必要の有無などから判断し、適切なものを用いる必要があります。必ず純正品を使用してください！！

遠心機使用時の注意事項

遠心機を使用するときには以下の点について注意してください。

1. 遠心機に適合したローターを使用すること。
2. ローターに適合した遠心管を使用すること。
3. 亀裂やひび、傷のある遠心管は絶対に使用してはいけない。
4. 試料は、必ずバランスを取り、ローターへは対称位置にセットする。
5. ローターの最高許容回転数を厳守する。
6. ローターが設定回転数に達するまで、遠心機のそばを離れない。
7. 初めて遠心機を使用する場合や、取り扱いに不明な点のある場合は、前もって支援センター機器部門に連絡し、使用方法、注意事項等の説明を受けること。
8. 必ず予約表に予約して使用し、他の利用者の迷惑にならないようにすること。予定が変更になったときは速やかに予約表を訂正すること。
9. 使用後は、利用ノートに必要事項を記入すること。
10. 実験終了後は、ローター室、ローター、実験台の上をきれいに掃除すること。
11. トラブルが発生したときは、どんなに些細なことでもすぐセンターに知らせること。

高速冷却遠心機使用時の注意事項

高速冷却遠心機を運転するときには、特に以下の点についても注意すること。

1. 遠心機に適合したローターを使用する。
Beckmanの遠心機には、Beckmanのローター。
2. ローターを駆動軸に正しくセットする。
ローターのピンを駆動軸のクラウンにはめ込むようにする。
ローターカバーの中央のネジで駆動軸に固定する。
これらを怠ると、必ずローターが駆動軸からはずれて遠心機を壊します。
3. 実験終了後は、ローター室、ローター、実験台の上をきれいに掃除する。
塩類を使用した場合は念入りに洗浄する。また、必要に応じて消毒も行なうこと。
(液漏れをおこしたときは、ローターだけでなくローター室も必ず洗浄すること。)

分離用超遠心機使用時の注意事項

分離用超遠心機を運転するときには、特に以下の点についても注意すること。

1. 水平ローター使用時は、すべてのバケットをセットして運転すること。

バケットをローターにセットする際はバケットの番号とローターに刻印されている番号を合わせて図のように正しい方向にセットしてください。（試料数が少ないときは、遠心管は入れずに空のバケットをセットしてください。）



2. 固定角ローターは、ローターカバーのシールを確実にすること。

シールチューブを用いるときは必ずスペースキャップを使用してください。（スペースキャップを忘れると遠心管が破裂します。）



3. ローターの最高許容回転数を厳守すること。ローターには寿命があり、最高回転数を制限しているローターもありますので、はり紙等の注意書きを良く読んでください。

比重が1.2を超える試料を遠心するときには最高回転数を次式によって減じること。

$$\text{許容回転数} = \text{最高許容回転数} \times \sqrt{\frac{1.2}{\text{平均比重}}}$$

CsClを用いてIsopycnic法で遠心分離をするときはCsCl凝結曲線を参考にして最高回転数を決める必要があります。

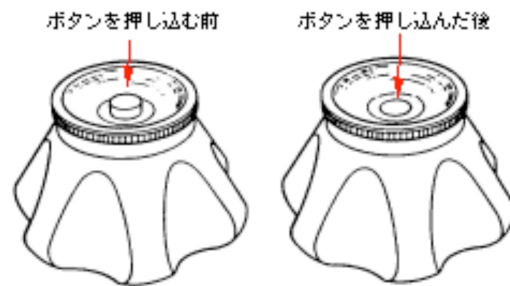
4. 予約表には使用を予定しているローター名も記入すること。予定が変更になったときは速やかに予約表を訂正すること。
5. 使用後は、LOGBOOKに必要事項を記入すること。（ローターの寿命を管理していますので、必ず記入してください。）
6. 実験終了後は、ローター、実験台の上をきれいに掃除しておくこと。

卓上型超遠心機使用時の注意事項

卓上型超遠心機を運転するときには、特に以下の点についても注意すること。

1. ローターを遠心機に正しくセットする。

ローター上部のボタンを押し込んで、駆動軸にローターを固定してください。
これを怠ると必ずローターが駆動軸からはずれ、非常に危険です。



2. 使用後は、LOGBOOKに必要事項を記入すること。
(ローターと本体の寿命を管理していますので、必ず記入してください。)
3. 実験終了後は、ローター、実験台の上をきれいに掃除しておくこと。

ローターについて

支援センター機器部門には下記のローターを用意しております。講座等でお持ちのローターは使用しないでください。

高速冷却遠心機用ローター

アングルローター

ベックマン

JLA10.500 (500ml 6本用) 1台

JA-10* (500ml 6本用) 1台 (HP-25、HP-26では使用できません)

JA-20* (50ml 8本用) 2台

JA-21 (10ml 18本用) 1台 (HP-25、HP-26では使用できません)

超遠心機用ローター

アングルローター

ベックマン

Type 45 Ti (95ml 6本用) 1台

Type 50.2 Ti (39ml 12本用) 1台

Type 70.1 Ti (13.5ml 12本用) 1台

スイングローター

ベックマン

SW28 (38ml 6本用) 1台

SW41Ti (13.2ml 6本用) 1台

！ 日立のローターをベックマンの超遠心機に絶対にセットしないでください。

ローターの構造上、駆動軸にセットしただけで、遠心機が破損します。

卓上超遠心機用ローター

アングルローター

TLA-100.4 (5.1ml 8本用) 2台

TLA-100.4** (5.1ml 8本用) 1台

注 意

*印のローターは、遺伝子工学実験室にも設置してあります。

**印のローターは、病原ウィルス実験室にのみ設置してあります。

遠心管について

高速冷却遠心機用の遠心管には、キャップ無しタイプと、キャップ付きのボトルタイプのもがあります。用途に応じて選択して使用してください。

ただし、JLA10.500（500ml 6本用）とJA-10（500ml 6本用）ローターでは、必ずキャップ付きのボトルを使用して下さい。

超遠心機用の遠心管には、肉薄のキャップ無しタイプと、肉厚のキャップ無しタイプ、キャップ付きのボトルタイプ、および、シールチューブがあります。

1. 肉薄のキャップ無しタイプはスイングローターでのみ使用してください。
2. 肉厚のキャップ無しタイプとキャップ付きのボトルタイプ、および、シールチューブは、アングルローターでのみ使用してください。
3. シールチューブを使用するときには、必ずスペースキャップ（右図）をチューブの上にのせてください。これを忘れると遠心中にチューブが破損し、事故の原因になります。



肉薄タイプの遠心管を使用するときには、液の量に注意してください。キャップ無しタイプの場合はできるだけ液で満たし、シールチューブの場合には、米粒大の気泡が1つ残る程度に液を満たして下さい。

遠心管の材質についての注意点

遠心管の材質としては、ポリアロマー、ポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリエチレン、ステンレススチールなどがあり、用途に応じて使い分けてください。一般には、ポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリアロマーが用いられています。

従来、密度勾配遠心によく用いられていたニトロセルロースチューブは発売中止になり、これに代わるものとしてウルトラクリアーチューブ（ベックマン社）が市販されていますが、ウルトラクリアーチューブに比べて透明度は劣りますが強度的に優れているポリアロマーチューブをニトロセルロースチューブの代わりに使用することを奨めます。最近の製品は透明度もかなり改善されています。使用前に肉眼でキズやユガミがないかよく調べてから使用するようにしてください。なお、ウルトラクリアーチューブやポリアロマーチューブは使い捨て遠心管ですので再使用しないでください。

遠心管は、それぞれのローターに合致した純正品をお使いください。また、遠心管は利用者で用意して頂くことになっております。詳細は、担当者までお問い合わせください。

実験動物の取扱手技（サル類）

鳥居 隆三・土屋 英明・岡原 則夫
(動物生命科学研究センター)

医学研究のための動物実験を行う際には、動物愛護、福祉および生命倫理の観点にたち実験動物を適正に飼育し、取扱うことが基本である。

本学では、動物実験を行う教職員、大学院生等全ての方を対象に我が国で初めての動物実験資格認定制度を平成16年度から導入し、動物実験計画書は「動物実験委員会」による丁寧かつ厳しい審査、さらに動物の福祉、生命倫理の観点から「動物生命科学研究倫理委員会」による審査を行う等、動物実験に対しては慎重かつ厳格に対応している。

平成17年6月22日には「動物の愛護及び管理に関する法律」改正が施行され平成18年6月1日施行されたが、この改正の中で最も重要な点は、動物実験の3R (Replacement, Reduction, Refinement)が明文化されたことであり、動物実験を取り巻く環境は益々その厳しさを増し、適正な動物実験の遂行が強く求められてきている。これを受けて、昨年6月1日から施行された「滋賀医科大学動物実験規程」の中には、1) 動物実験の最終責任者が学長になったこと、2) 3Rの理念が明記されたこと、3) 動物実験計画は学長が承認すること、4) 動物実験は学長の承認を受けた動物実験室で行うこと、5) 教育訓練が義務づけられたこと、6) 自己点検・評価と情報公開を行うこと、等が新たに盛り込まれた。

この様な状況下、本講義では本学が医学研究用サルを全国の大学の中で最も多く飼育し、本学の研究プロジェクトの中核をなし益々需要が増してきたことから、サルを用いる実験を実際に行うに際しての飼育室への入退室から、個体識別法、麻酔法、投与法、採血法に至るまでの具体的な取扱方法を紹介する。

なお、実際にサルを用いる実験を行う場合は、マウスやラットに比べ格段に高度な動物実験倫理と生命倫理観が必要になることから、動物実験（基礎）資格認定に加え、動物実験（サル）資格認定（講習会、資格認定試験および実習）が必要である。

実験動物の取扱手技(サル類)

鳥居隆三、土屋英明、岡原則夫(動物生命科学研究センター)

動物の愛護及び管理に関する法律

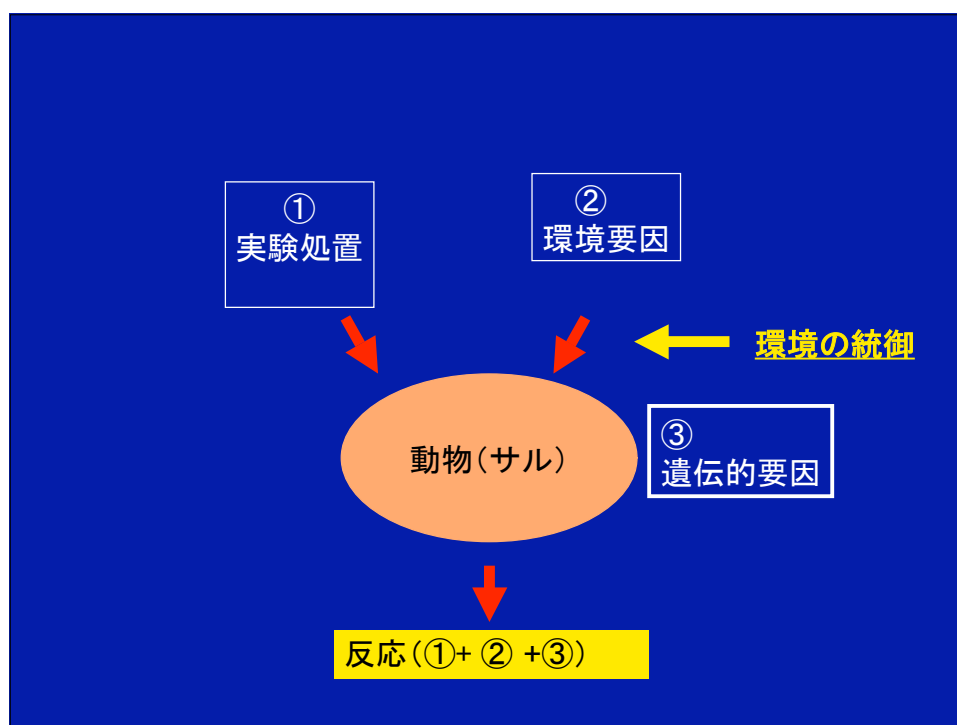
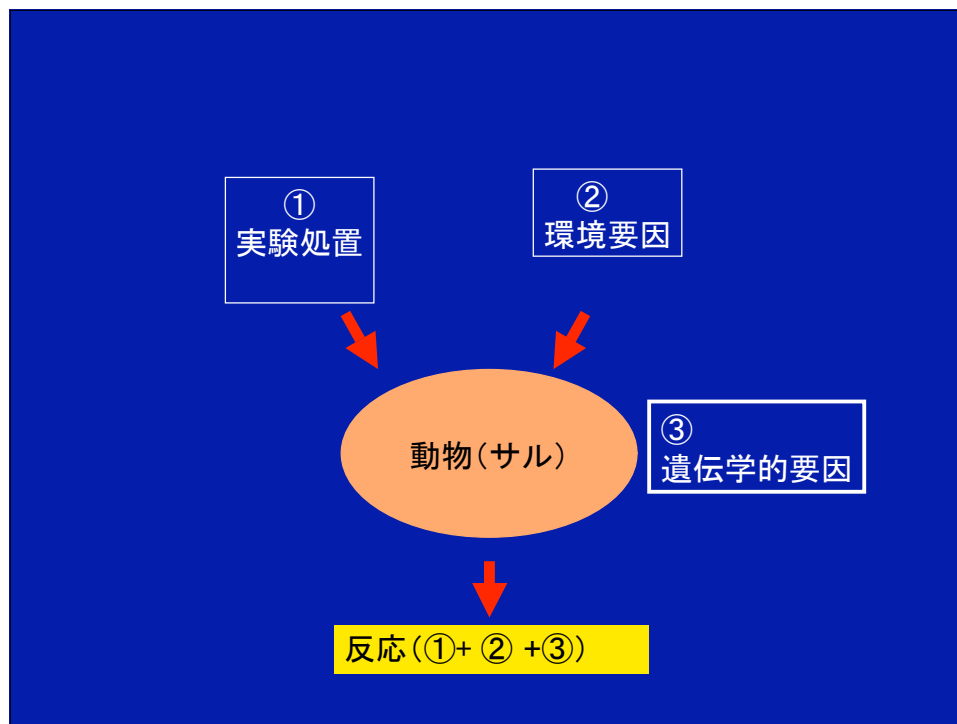
平成17年6月22日 改正

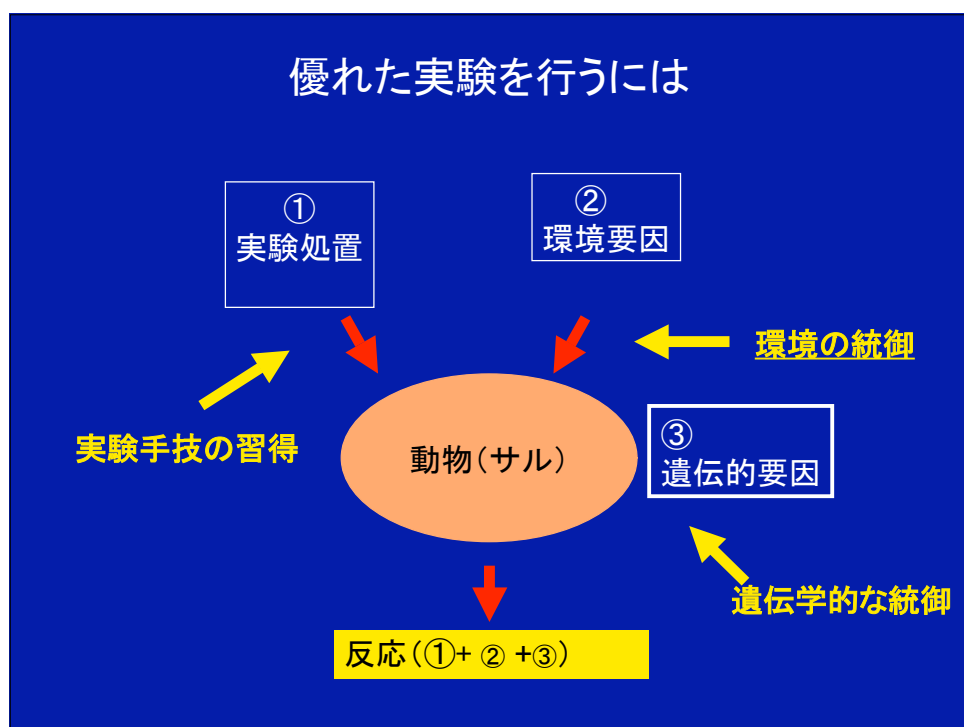
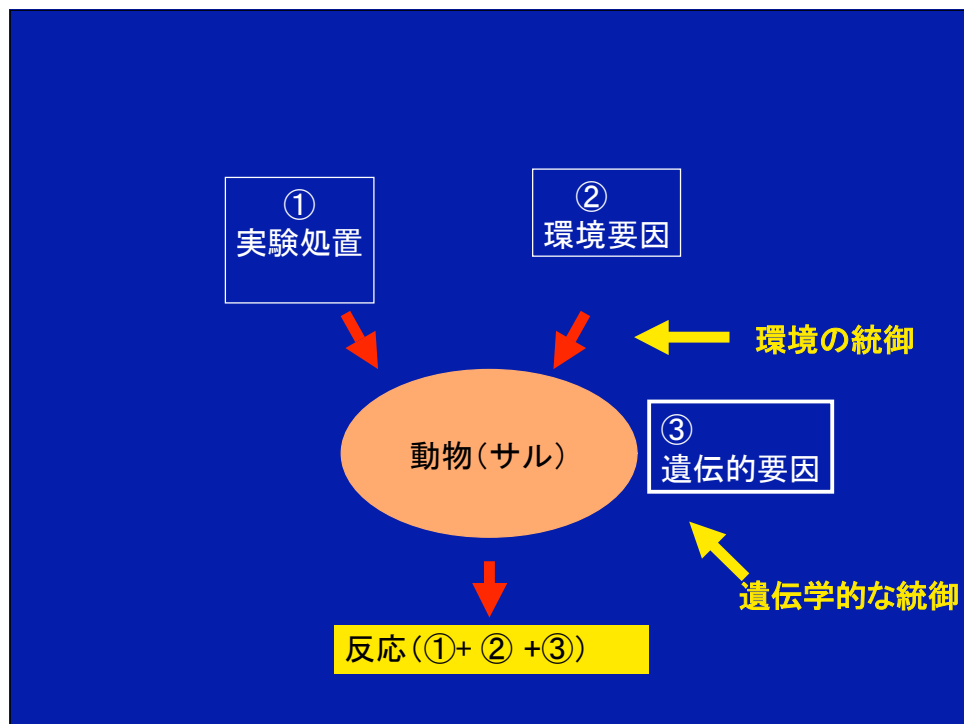
平成18年6月1日 施行

動物実験の3R
(Replacement、Reduction、Refinement)
が明文化



- 遵守しない場合、罰則が課せられる
- 動物実験を行うにあたり、倫理観がより強く求められている





実験手技の習得 → 技術職員の支援
資格認定(実習を含む講習会)

環境の統御が必要 → 当センターの飼育管理体制

遺伝学的な統御 → 計画的室内人工繁殖

目次

- サルについて
- 実験手技について
保定、投与法、採血法
- 飼育管理について
設備、体制
- 計画的室内人工繁殖について

サルの種類と特徴

種類 ツパイからチンパンジー(ボノボ)まで多種多様

特徴 脳: 小脳よりも大脳の方が発達している

目: ほとんどの種で完全な両眼視(立体視)が可能

手指: 物を持つ、握る、つかむ、投げる、弾く、摘むといった複雑な動作ができる

サルの分類

真猿類(高等霊長類)

樹上生活に適した進化をとげた種類
両眼で立体視が可能
上半身を立てて座ることができる

原猿類(下等霊長類)

サルらしくないサル

狭鼻類(旧世界ザル)

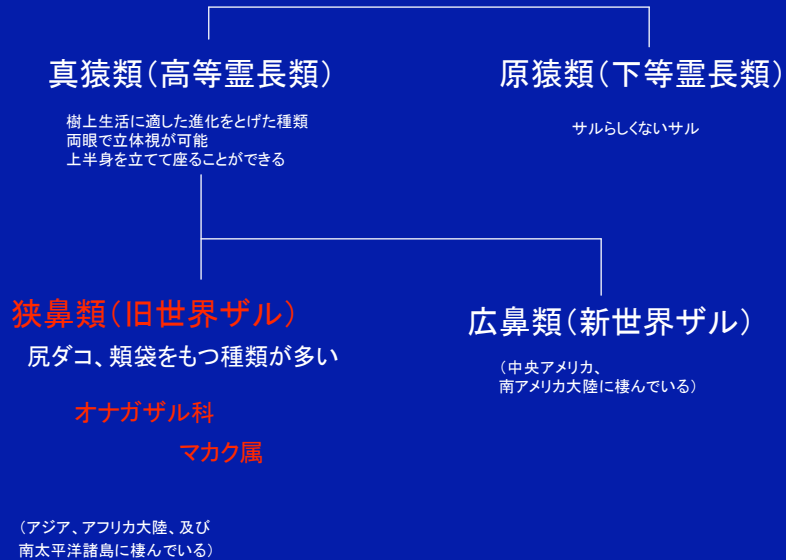
尻ダコ、頬袋をもつ種類が多い

(アジア、アフリカ大陸、及び
南太平洋諸島に棲んでいる)

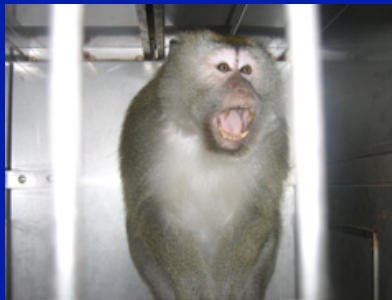
広鼻類(新世界ザル)

(中央アメリカ、
南アメリカ大陸に棲んでいる)

カニクイザル、アカゲザル、ニホンザルの分類学的な位置



カニクイザル



cynomologus monkey

学名: *Macaca fascicularis*

英名: Crab-eating macaque

マカケ属のサルの一種で、インドネシア、フィリピン、マレーシアなど東南アジアの国々に生息する中型のサル

大きさは、ニホンザルに比べ一回り小さい。40～60cm(体長より長い)の長い尾を有する

アカゲザル



学名: *Macaca mulatta*

英名: Rhesus macaque

アジア地域の国々で生息するサルで、医学研究に古くから使われている
体格はニホンザルよりもやや小さく、攻撃性は強い

ニホンザル



Snow monkey

学名: *Macaca fuscata*

英名: Japanese macaque

日本に生息する唯一のサル類である。寒さに強く、北海道を除く
日本各地に暮らしている。7～8cmの短い尾がある。

生理学的特徴

- 呼吸数
- 心拍
- 循環血液量
- 体温
- 血液性状
- 歯式
- 体重 体長
- 寿命
- 繁殖生理

生理学的特徴

- 呼吸数 安静時 30～40回/分
- 心拍 麻酔下の場合 130～190回/分
安静時 80～120 /分(テレメトリーにて測定)
- 循環血液量 1kg当たり50～80ml
- 体温 36～40℃
37.3～40.5

実験動物の基礎と技術 II 各論より

黄色は当センターでの値

血液の性状

	カニクイザル	アカゲザル	ニホンザル	ヒト 男性
赤血球数 ($10^4/\mu\text{l}$)	524±92	448±63	472±74	500
ヘモグロビン量 (g/dl)	11.3±1.6	12.5±1.5	14.1±0.6	13.8±0.5
血液の濃さ				
ヘマトクリット (%) 赤血球の容積の割合	32.3±4.7	40.3±3.5	42±5	45±5
白血球数 ($10^2/\mu\text{l}$)	126±34	115±43	144±51	70±30

実験動物の基礎と技術 II 各論より

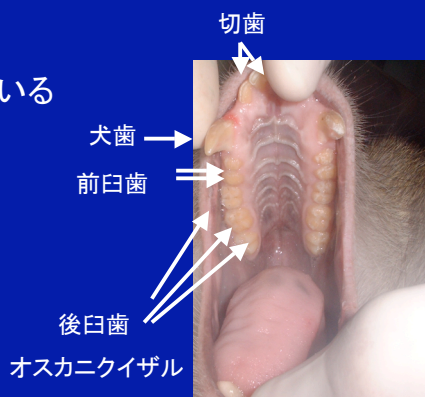
歯式

切歯 (I)	犬歯 (C)	前臼歯 (P)	後臼歯 (M)
$\frac{2}{2}$	$\frac{1}{1}$	$\frac{2}{2}$	$\frac{3}{3}$

乳歯が永久歯にかわる
萌出する年齢がおおよそ決まっている

M1: 1.5歳
I: 2.5歳
M2: 3〜3.5歳
C, P: 3.5歳
M3: 6歳以上

カニクイザルでは



体重、体長(成体)

	体重(kg)		体長(cm)	
	オス	メス	オス	メス
カニクイザル	3.5～8.3 3.38～7.05	2.5～5.7 2.05～5.15	41～65	39～50
アカゲザル	5.6～10.9	4.4～10.7	48～64	47～53
ニホンザル	11.1～18.0 6.34～12.42	8.3～16.3 5.34～11.90	54～61	47～60

実験動物の基礎と技術 II 各論より

黄色は当センターでの値

・ 寿命

約20～30歳

当センターでの最高齢 28歳(オスニホンザル)

繁殖生理

- 性成熟 メス3.5～4歳、オス4～4.5歳
- 月経周期
周期的な月経がみられる
(量、期間は個体により異なる)
月経周期の長さは、平均28日
- 繁殖季節
ニホンザルは厳格な季節繁殖動物
(冬場の数ヶ月のみ繁殖期)

カニクイザルは、1年中繁殖する

繁殖方法

- 放飼繁殖法 複数のオスと複数のメスを1つの囲いで
- ハーレム繁殖法 1頭のオスに複数のメス
- 1対1同居交配法 1頭のオスと1頭のメス
- 発生工学的手法を利用した方法
顕微授精一胚移植

当センターでは、1対1同居繁殖法、発生工学的手法を利用した方法を採用している

- 妊娠期間
ニホンザル 平均175(170～180)日
カニクイザル 平均164(150～225)日



- 出産
夜から明け方に起こる
まれに昼間にも起こる
基本的には、ヒトの看護は必要ない

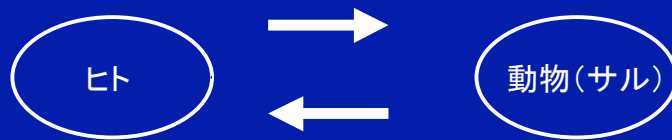
- 出生仔の体重
300～350g(カニクイザル 当センター)
350～400g(ニホンザル 当センター)
470～500g(アカゲザル)



サルを取り扱う前に

- 人獣共通感染症

人獣共通感染症



感染が成立すると**重篤な症状**を引き起こすケースも少なくない

主な感染症

エボラ出血熱 マールブルグ病 **Bウイルス病** 結核
細菌性赤痢 モンキーポックス デング熱 黄熱

サルからヒトへ Bウイルス

- ・ 病原体
Herpes virus simiae ウイルス ヘルペスウイルス科
- ・ 感染経路
接触感染
- ・ 症状
サルにはほとんど病原性を示さない
ヒトは致死的な病気を起こす
死亡例: 1997 年に米国霊長類センターの職員がアカゲザルの生体物質(排泄物)が目に入り、その42日後に死亡
- ・ 診断法
ELISAによる抗体検査
- ・ 治療法
アシクロビル、ガンシクロビルの投与が有効

ヒトからサルへ 結核

- ・ 病原体
Mycobacterium tuberculosis 細菌 マイコバクテリア科
- ・ 感染経路
飛沫感染 伝播が容易に起こる
- ・ 症状
サルには致死的な病気を起こす
- ・ 診断法
ツベルクリン反応
- ・ 治療法
(サル)特になし、陽性ないし擬陽性については安楽死

実験手技について

- ・ 入退室
- ・ 保定法
- ・ 投与法
- ・ 採血法
- ・ 麻酔法

入室

人獣共通感染症の防止のため

入室の制限
専用服の着用



退出

病原微生物の拡散を防止

陰圧空調
消毒薬の設置



仕切りカーテン
サル同士が威嚇し合わないよう

保定法

- 狭体による保定法
- 手による保定法
- モンキーチェアによる保定法
- 体重測定

狭体装置による保定法

比較的安全で、サルへの負担も少ない

筋肉内投与、
撓側皮静脈からの採血
などが可能

サルの動きに注意
咬傷事故の無いように



手による保定法

2人で行う

ケージ外での保定であるため
処置がし易い

経口投与などが可能



ケージ扉を開放するため、
咬傷事故、サルの逸走がないように

モンキーチェアによる保定法

2人で行う

無麻酔下で長時間の
測定、材料採取が可能

サルへの負担が非常に
大きい

十分な順化
倫理委員会の審査が
必要



体重測定

健康状態を把握するの
に有用

麻酔薬などの投薬量を
決定するのに必要



投与法

- 筋肉内投与法
- 皮下投与法
- 皮内投与法
- 経口投与法

筋肉内投与法

狭体での保定で投与可能
1ml程度までに投与量を抑える

針を刺入するとき、
しっかりと筋肉内に

血液が入ってこないこと
を確認

確実に投与



皮下投与法

無麻酔下では、
通常、背中に行う

持続性の薬剤の投与
に向いている

投与量は、数ml



つまみ上げたところに針を刺し、
針先が自由に動くことを確かめる

皮内投与法

ツベルクリン接種

眼瞼に投与

投与量0.1ml



麻酔下でも、片腕でしっかりと頭を固定する

経口投与法

サルでは、
しっかりとした技術や
人手がいります

チューブをかまれないように
器具で口を開ける

ワクチン投与などで使用



採血法

- 撓側皮静脈からの採血法
- 伏在静脈からの採血法
- 大腿静脈からの採血法

大腿静脈からの採血法

2人で行い

血管が見えないため、
走行の把握、手技の習熟
が必要

乾綿でしっかりと止血



23Gの針、シリンジは2.5ml

約2ml採血

撓側皮静脈からの採血法

2名で行う

しっかりとした保定

穿刺部位は指先側ではなく、
腕側に近いところから行う

乾綿でしっかりと止血



針25G
シリンジ1ml

約1mlの採血が可能

麻醉法

- 注射麻醉法
- 吸入麻醉法
- 気管内挿入法

注射麻醉法

投与する前は絶食に

麻醉を投与後は
静かに麻醉が効くまで
待つ

体重1kg当たり
塩酸ケタミン5mg、塩酸キシラジン1mg
の混合液を投与

約30分～1時間 効果がある



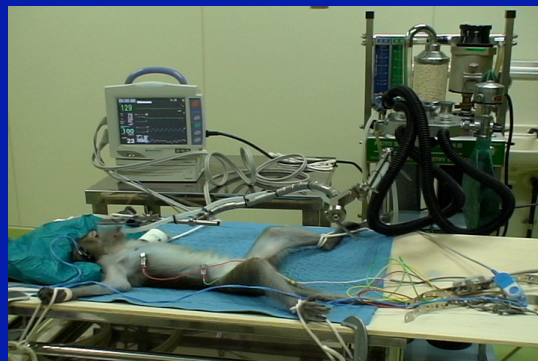
吸入麻醉法

長時間の実験処置
が必要なときに使用

硫酸アトロピン
(0.01-0.02mg/kg)
の前投与が必要

イソフルランは
導入時には、2～3%、
維持には0.5-1.5%

術中は規則正しい呼吸、心拍をモニターし、体温低下防止及び気道の確保



気管内挿管法

2名で行う

補助者は紐で口を開ける
鋭い犬歯に気をつける

チューブを入れる前に
キシロカインを噴霧し、局所麻酔を行う



特定外来生物による生態系等に係る被害の防止に関する法律

特定外来生物による生態系等に係る被害の防止に関する法律 (特定外来生物法)

平成16年10月20日施行

・ どんな法律？

特定外来生物による生態系、人の生命・身体、農林水産業への被害を防止し、生物の多様性の確保、人の生命・身体の保護、農林水産業の健全な発展に寄与することを通じて、国民生活の安定向上に資することです。

そのために、問題を引き起こす海外起源の外来生物を**特定外来生物**として指定し、その飼養、栽培、保管、運搬、輸入といった取扱いを規制し、特定外来生物の防除等を行うこととしています。

カニクイザル、アカゲザルは特定外来生物に該当する！
ニホンザルは、日本に生息し、該当しない

環境省HPより抜粋

特定外来生物法で規制されること



環境省HPより抜粋

個体識別法

- ・ 入墨法
- ・ 首輪、耳標
- ・ マイクロチップ

個体識別法(入墨法)

- ・ 顔面入墨法
- ・ 胸部入墨法
- ・ 大腿部入墨法

ケージ内に居る状態で
容易に識別できる



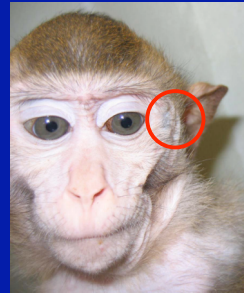
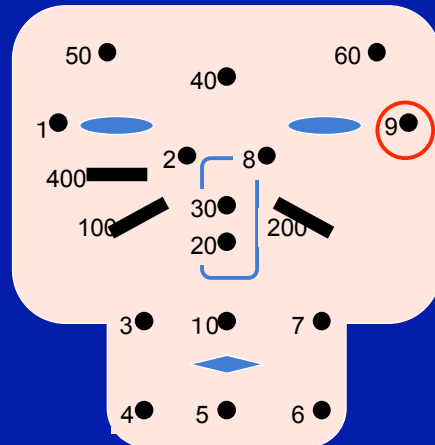
入墨機



入墨の様子



顔面入墨法



9

飼育管理

- ・ 飼育環境
- ・ 飼育設備
- ・ 個体の健康管理

飼育環境

- ・ 照明時間 8時から20時 12時間
- ・ 温度 $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ (カニクイザル)
 $23^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ (ニホンザル、アカゲザル)
- ・ 空調設備 陰圧空調
- ・ 飼料 固形飼料およびサツマイモ、バナナ
- ・ 飲水 フィルター(50 μ)で濾過した市水

餌料

- ・ 固形飼料:旧世界ザル用 発泡飼料 CMK2
体重1kgあたり20〜30g(カロリーとして、73〜108kcal)
- ・ サツマイモ バナナ
食事の多様性を与える
ビタミンCを補う
歯石がつくことを防止(サツマイモ)

飼育設備

- ・ 飼育ケージ

本学の指針に沿ったサイズ

- ・ 消毒薬

弱酸性次亜塩素酸水（スーパー次亜水）

- ・ 排水滅菌処理システム

動物由来の病原微生物を殺菌
廃棄物ゼロ

- ・ 感染実験区域

飼育ケージ

ケージサイズ
500×800×850
(W×D×Hmm)

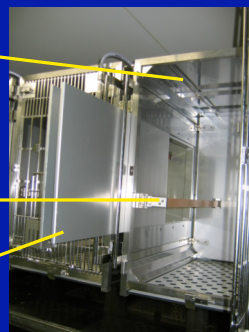


狭体装置

ぶら下がり棒

止まり木

移動用スライド扉



給水ノズル

給餌箱

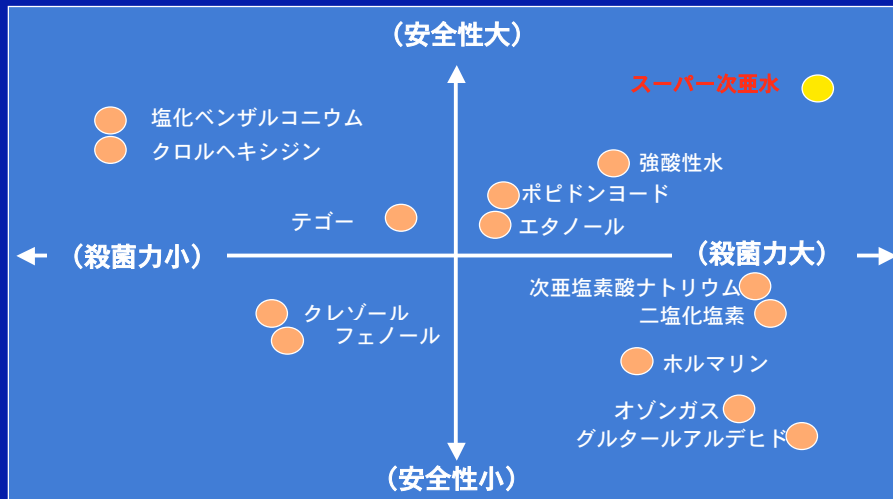


上下スライド式扉



上下左右連結可能

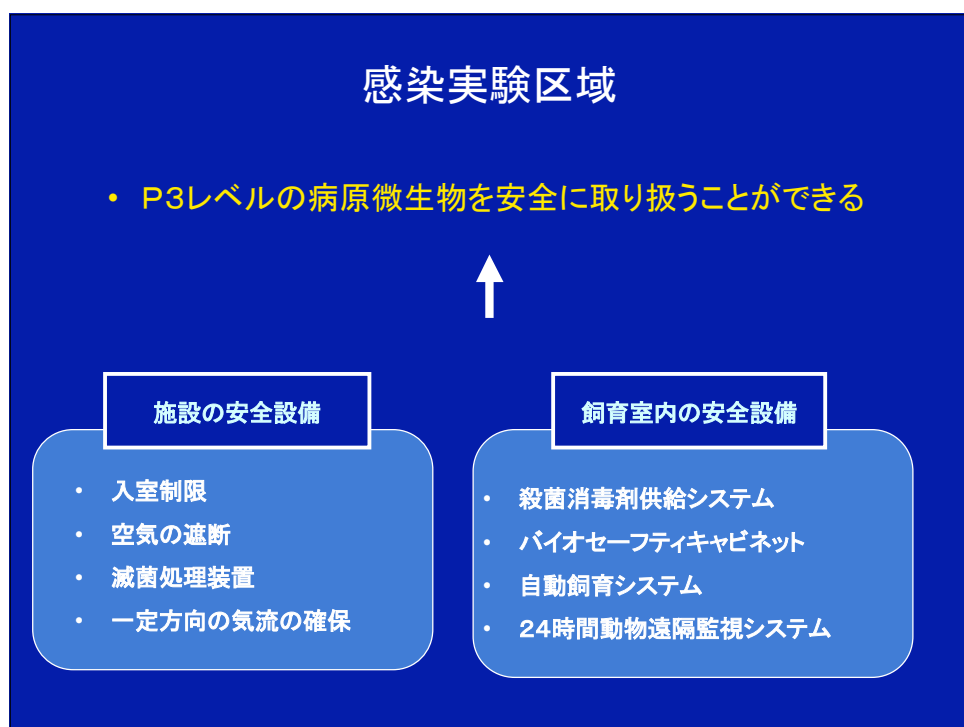
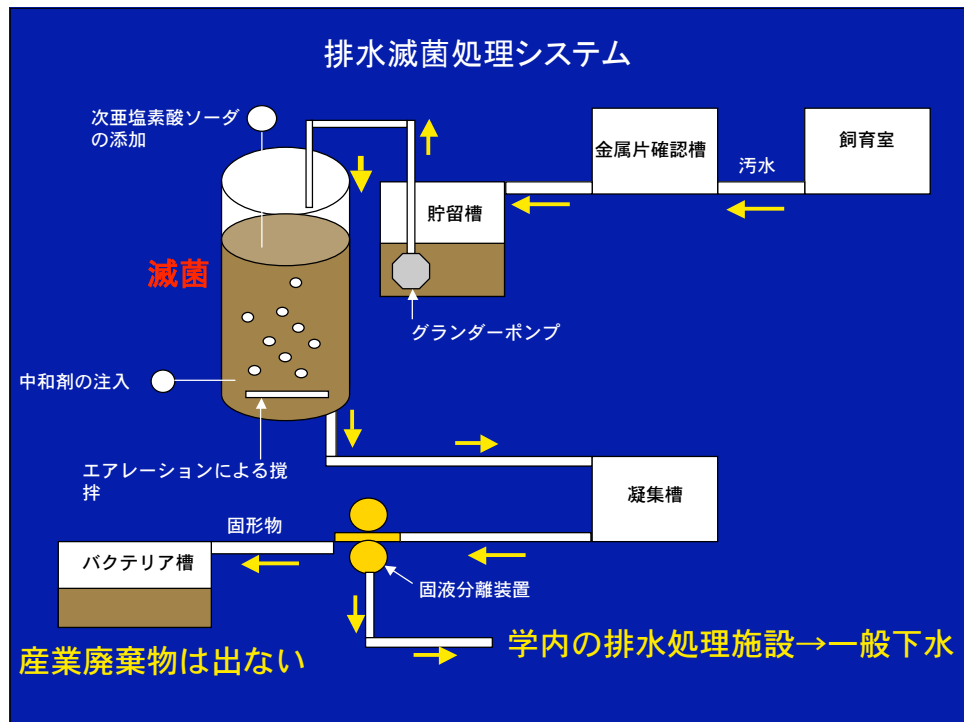
消毒剤の殺菌力と安全性



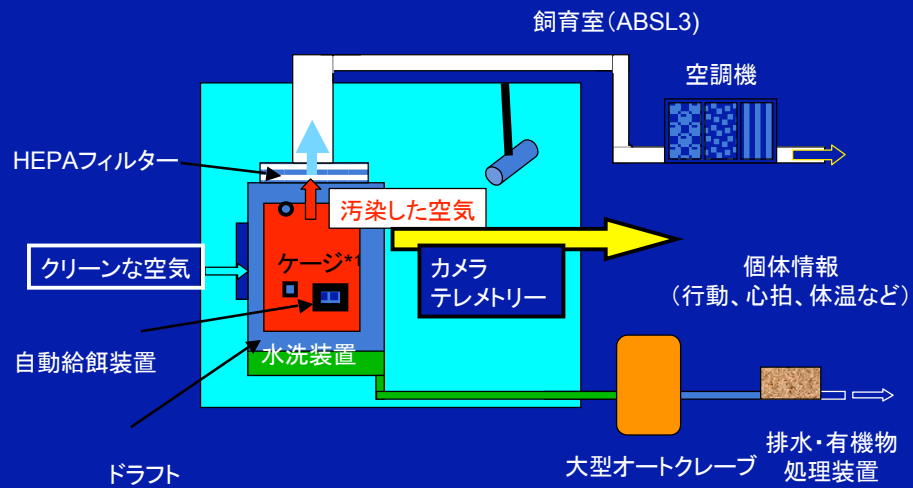
スーパー次亜水

- ・ 次亜塩素酸ナトリウムを一定濃度に希釈すると同時にpHを弱酸性に調整した次亜塩素酸水で、当センター5階に生成装置が設置
- ・ 空間噴霧装置、シャワーノズル、シンク、消毒槽等センター内で常時使用が可能
- ・ スーパー次亜水は芽胞菌やウィルス、MRSAにも有効





感染実験におけるサル用飼育ケージシステム概略図



個体の健康管理

- ・ 個体の観察
- ・ 定期健康診断

個体の観察

- ・ 365日 全頭 技術職員が観察を行い、記録を作成
- ・ その記録は、PCに入力、保管されている

・ 観察項目

- ・ 外観観察: 皮毛の状態、傷、腫瘍等の有無、出血など
- ・ 行動観察: 元気・活力、自傷行為
- ・ 食欲 : 餌の食べ残し
- ・ 糞の状態: 形状、色、量
- ・ 尿 : 色、量

定期健康診断

- ・ 1年に1回実施

・ 項目

- ・ 体重測定
- ・ 外部観察・触診
- ・ 細菌検査 内部寄生虫卵検査
- ・ 血液検査
- ・ Bウイルス抗体検査
- ・ ツベルクリン反応検査
- ・ 歯石の除去

外部観察 触診

- 外部観察
被毛の様子、
痩せすぎ・肥満を観察
外部寄生虫の有無
- 触診



細菌検査 内部寄生虫卵検査

細菌検査
(赤痢菌、サルモネラ菌培養検査)



内部寄生虫検査（糞便検査）
（浮遊法）



血液検査

血液性状検査 血清生化学検査

電極式電解質分析装置 Na K Cl

乾式臨床化学自動分析装置

Glu UA T-Cho TG
BUN T-Bil TP Alb
Ca GOT GPT LDH

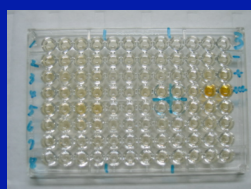


自動血球計数器

WBC RBC HGB
HCT MCV

Bウイルス抗体検査

- ・ 長崎大(共同研究)が開発した検査Kitを用いて、当センター内で実施
- ・ ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)を用いる
- ・ 搬入時には、(社)予防衛生協会へ検査を依頼



反応結果



吸光度計

ツベルクリン反応検査

ウシ型を
0.1ml眼瞼皮内に投与

投与後、24,48,72,96時間
での反応を観察

陽性反応がおこると、
赤く硬結する



計画的室内人工繁殖

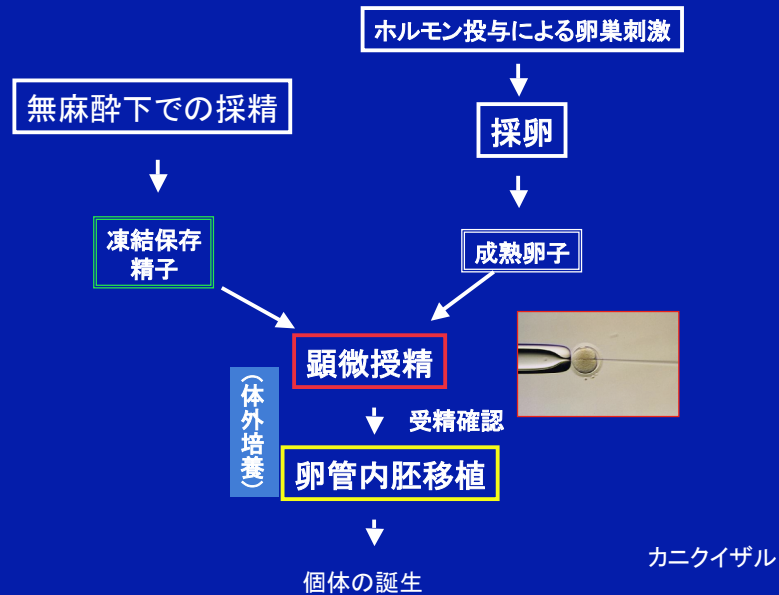
- ・ 遺伝的、微生物学的な統御に必要
両親がはっきりとわかっている
病原微生物を排除

- ・ 統御された個体を十分に供給

- ・ 繁殖方法
1対1同居交配法

顕微授精—胚移植法

顕微授精—胚移植法



研究支援

- **研究者をハード面、ソフト面の両方からサポート**

飼育環境の維持

計画的室内人工繁殖による遺伝的または、微生物学的に統御された個体の作出

実験手技をもちいて、様々な実験を支援

学外との共同研究

(眼科系との
共同研究)
・大学 民間企業



(心臓血管外科系
との共同研究)
・大学



最後に

実験動物としてのサルは、ヒトに最も近縁な動物種であり、そこから得られる実験成績は、ヒトへの外挿が容易である。しかし、動物個体の取り扱いについては、ヒトの医療で使用されている方法を安易に当てはめることは様々な危険を伴います。

当センターでは、長年かけて培ったサルの取り扱いに関する経験と技術を駆使し、研究支援を行っています。

当センターは、医学系大学のなかでは、最大のサル飼育頭数を有し、国内のサル飼育・繁殖施設としても、トップクラスにあります。とくに実験動物としてのサルについては、遺伝学的・微生物学統御を厳格に行い、さらに動物の福祉に重点をおいた飼育管理を行っています。

これらのサルは当センターの利用を希望する研究者へ、研究目的に応じた形でスムーズに供給可能となるよう維持されております。利用資格認定制度等、安易に利用が可能とは言えませんが、前臨床研究成功への一助となると思えます。ライセンスの取得も含め、サルを用いた御研究を検討くださいますよう、この場を借りてご提案させていただきます。

御静聴ありがとうございました。

再生医学・幹細胞研究法

小島 秀人（生化学分子生物学講座・分子遺伝医学）

科学技術の進歩ならびにバイオテクノロジーの発達により、これまで治療困難とされてきた病態に対して、全く新たな手法を用いて治療することが可能になってきた。今日、再生医学と呼ばれる領域である。再生医学は大きく分けて2つに分類できる。一つは細胞療法あるいは細胞移植療法と呼ばれる。未分化で増殖能を持つ幹細胞あるいは前駆細胞より、目的とする細胞・臓器を誘導し、移植することにより疾病の治療を導く方法である。もう一つは遺伝子治療と呼ばれ、細胞内に外来遺伝子を導入し、細胞の持つ機能を修飾することにより、疾病の治療を導く方法である。今日では両者を組み合わせた方法も動物を用いて盛んに研究されている。少なくとも現在対象となる疾患は、もっぱら、薬物や手術などの既存の方法にて治療困難な疾患である。しかし、将来、再生医学の手法が飛躍的に進歩した際には、薬物や手術などに代わって、現行の治療体系を根本的に変えてしまう可能性を有している。ただし、技術的な進歩が偉大であればあるほど、その使い方を誤るとマイナスの側面も想像を超えたものとなってくる。ヒトとしての倫理的な側面を大切に守ることがどれだけ重要であるかの自覚があつてこそ、人類の進歩といえる。

本講演では、再生医学の2代手法を取り入れることにより、どのようなことが可能となるのか、また、どのようなことに配慮しなくてはならないのかについて私たちの研究を含めて解説する。

再生医学・幹細胞研究法

滋賀医科大学 化学分子生物学講座
分子遺伝医学

小島秀人

再生医学の手法

1、細胞移植療法

前駆細胞より、目的とする細胞・臓器を誘導し、移植することにより疾病の治療を導く。

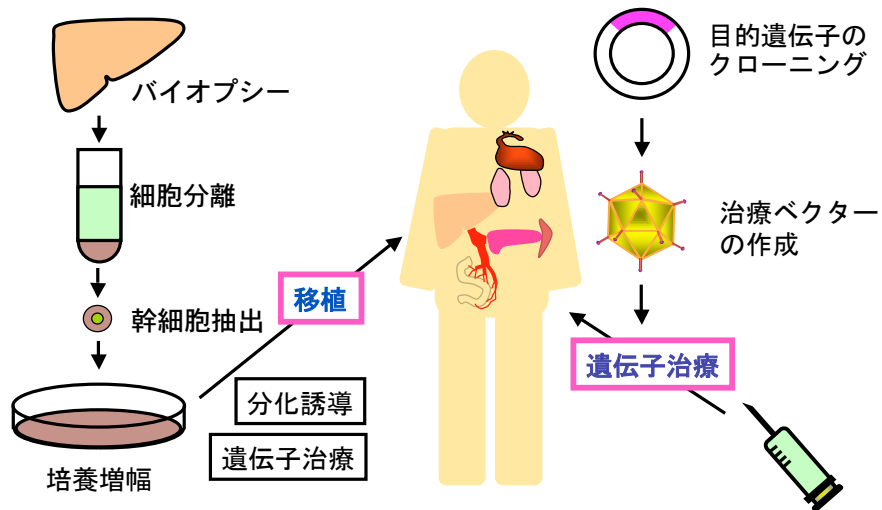
2、遺伝子治療

細胞内に外来遺伝子を導入し、細胞の持つ機能を修飾することにより、疾病の治療を導く。

再生医学技術を用いた治療法

① 細胞治療（臓器移植療法）

② *In vivo* 遺伝子治療



対象疾患

- 1、がん
- 2、遺伝子異常：単一因子異常
- 3、変性疾患：臓器不全、血管障害など
- 4、代謝疾患：糖尿病、神経疾患など
- 5、治療困難な感染症：AIDSなど
- 6、自己免疫疾患
- 7、サイトカインストーム
- 8、染色体異常症：微小欠失症候群など

臍疾患への応用

細胞（移植）療法

+遺伝子治療

どうしてヒトは糖尿病になるのか？

1 型糖尿病

- 1、自己免疫による膵島破壊
- 2、特発性

2 型糖尿病

- 1、遺伝子異常（多因子）
- 2、環境因子（食事、運動）

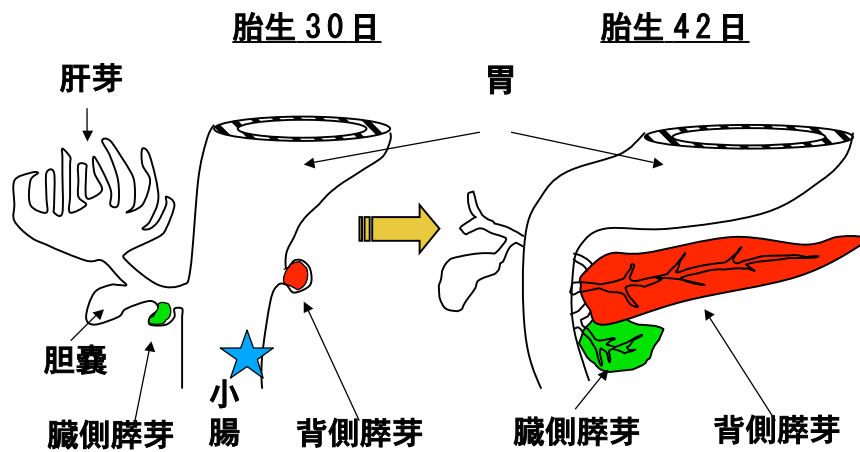
その他の糖尿病

- 1、妊娠
- 2、ミトコンドリア異常

1 型糖尿病の治癒をめざして

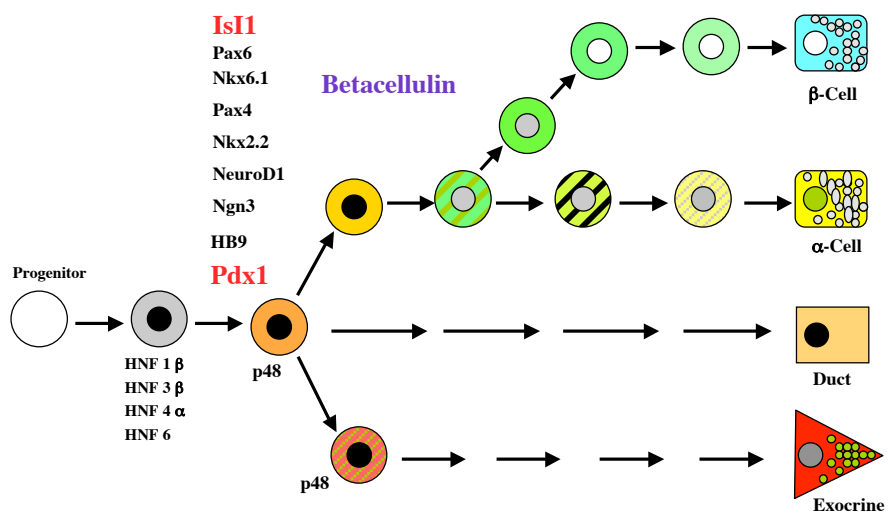
1. 膵移植
 2. 膵島移植
 3. インスリン遺伝子を用いた遺伝子治療
 4. インスリン産生細胞作成とその移植
 5. 遺伝子治療による膵島再生
- + 自己免疫からの離脱

膵臓の発生

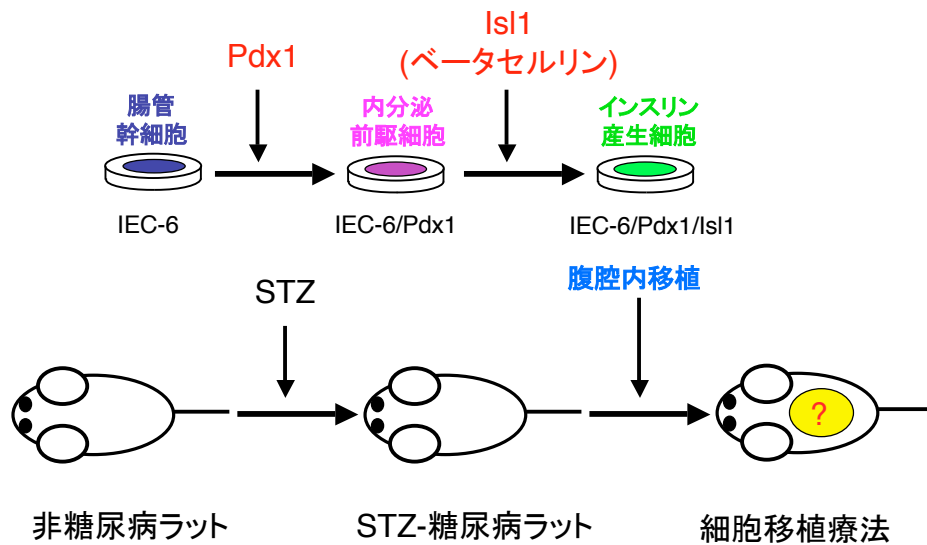


From LANGMAN'S MEDICAL EMBRIOLOGY

膵発生に働く転写因子カスケード

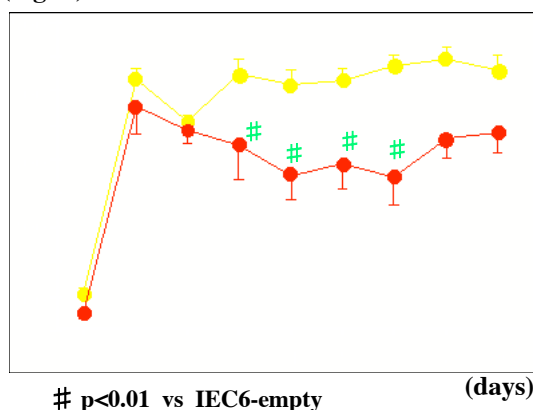


インスリン産生細胞作成とその移植

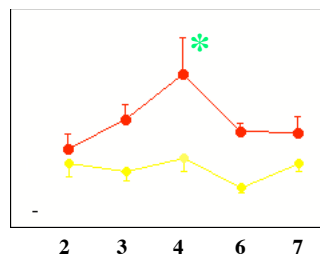


インスリン産生細胞移植による糖尿病ラットの血糖値の変化

Fasting serum glucose
(mg/dl)



Fasting serum IRI
(μU/ml)



From Diabetes, Kojima et al 2002

細胞・臓器移植療法、その他の細胞

■ マウス骨髄細胞

高糖濃度下培養で、インスリン産生細胞の作成
マウス腎皮膜下に移植し、血糖値の低下

Oh et al 2004, Lab invest. Tang et al 2004, Diabetes

■ ヒト培養肝細胞

Pdx1の強制発現で、インスリン産生細胞
SCIDマウス腎皮膜下に移植し、血糖の正常化

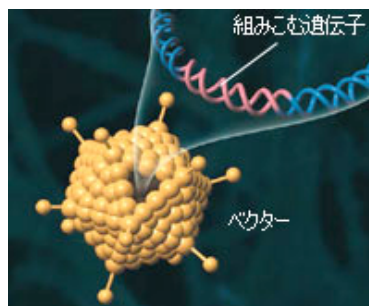
Spir et al 2005, PNAS

■ ES細胞、胸腺細胞、IPS細胞、膵外分泌細胞、その他

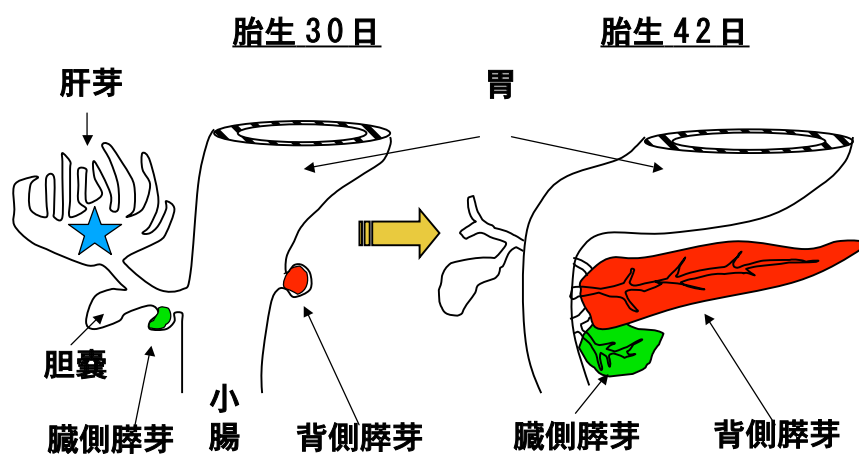
細胞・臓器移植療法の課題

- | | |
|-------------|-----------|
| ■ インスリン産生能 | 移植細胞の種類と量 |
| ■ 血糖値の正常化 | 細胞の成熟 |
| ■ 拮抗ホルモンの分泌 | 臓器としての成熟 |
| ■ 治療効果の持続 | 増殖細胞の含有 |
| ■ 安全性 | 細胞内に安全策 |
| ■ 自己免疫の脱却 | 発現遺伝子の改変 |

In vivo 遺伝子治療



In vivo 遺伝子治療



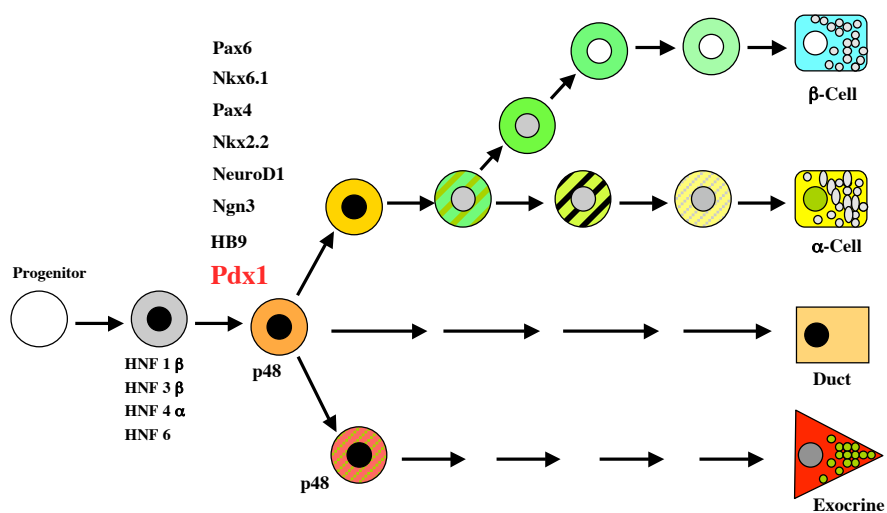
From LANGMAN'S MEDICAL EMBRIOLOGY

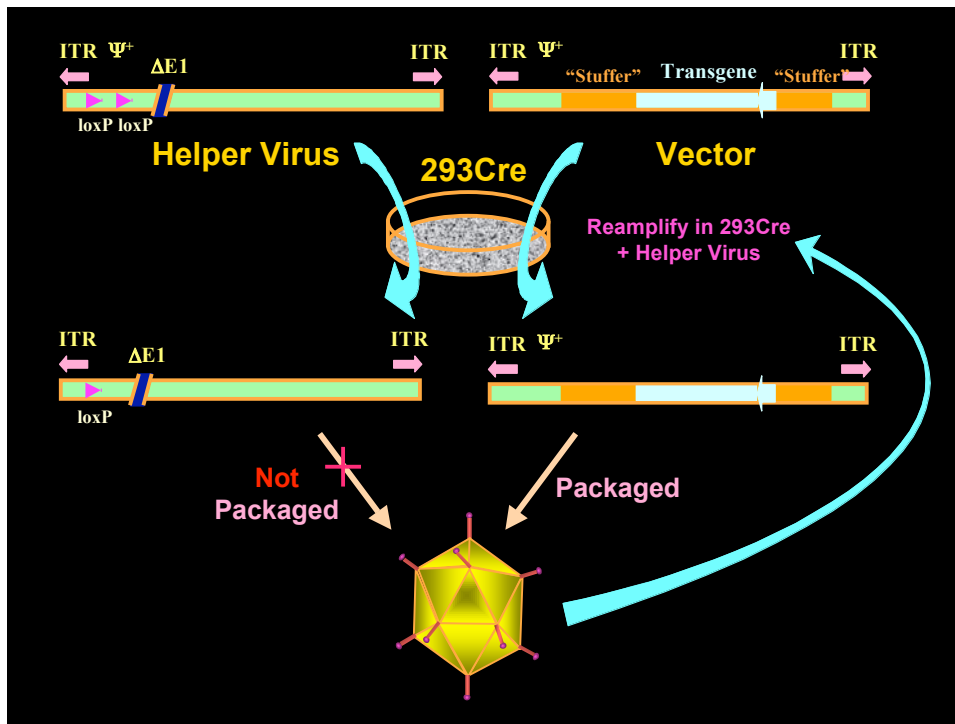
肝臓を標的とするウイルスベクターの条件

- **標的臓器である肝臓に対して**
 - 親和性と特異性を持つ（Molecular ZIP）
 - 遺伝子発現能を持つ（プロモータの選択）
- **確実な遺伝子発現**
 - ゲノム内への組み込みの有無
 - 遺伝子発現特性（分子スイッチ）
- **細胞毒性の回避**
 - 導入遺伝子の性質
 - ベクターの性質

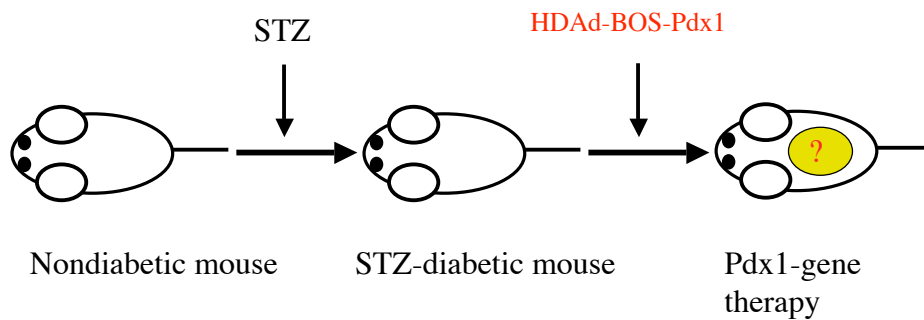
From Diabetes Frontier, Kojima et al 2006

In vivo 遺伝子治療の例、Pdx1(1)

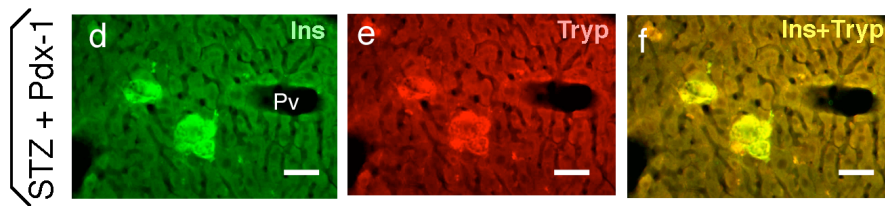




In vivo 遺伝子治療の例、Pdx1(2)

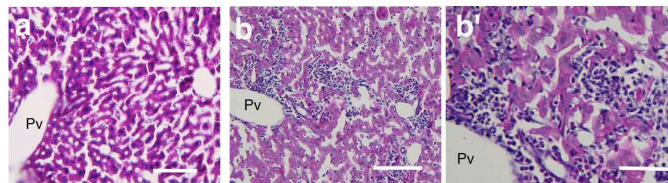


In vivo 遺伝子治療の例、Pdx1(4)



Kojima H. *et. al. Nat Med* 9, 596, 2003

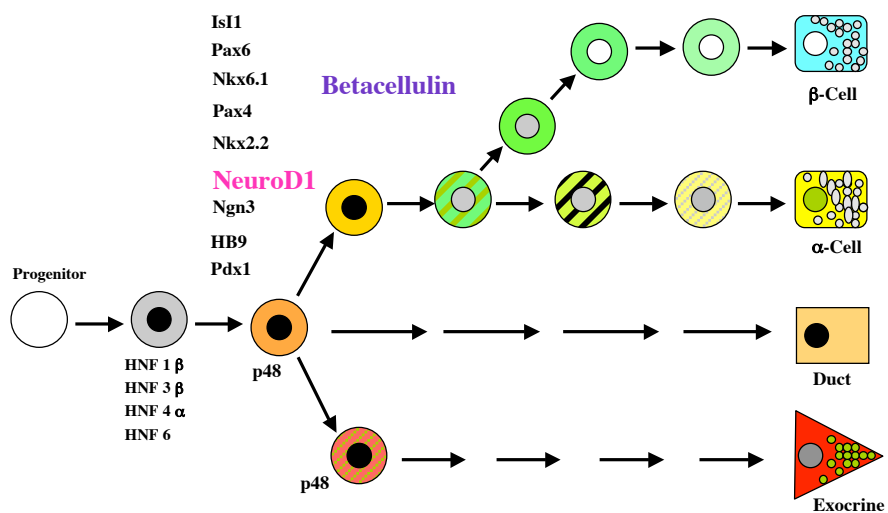
In vivo 遺伝子治療の例、Pdx1(5)



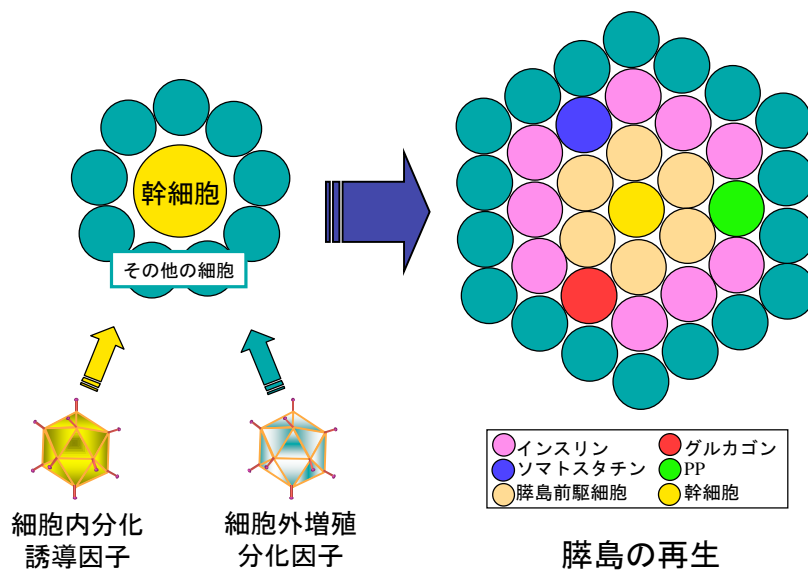
a : STZ-diabetic mouse without *Pdx-1*
 b : STZ-diabetic mouse with *Pdx-1*
 b' : STZ-diabetic mouse with *Pdx-1*
 (high magnification view of b)

Kojima H. *et. al. Nat Med* 9, 596, 2003

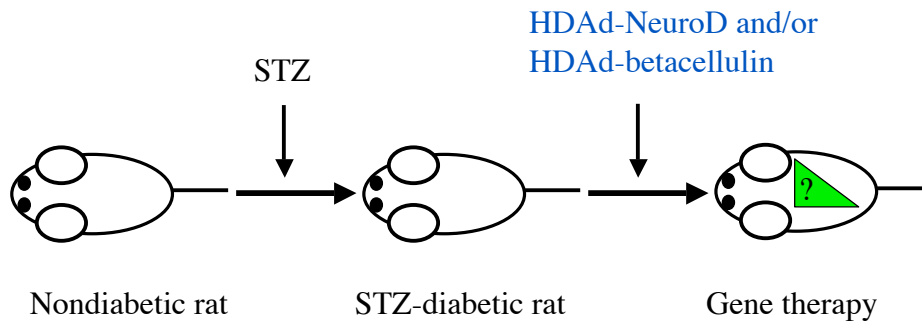
In vivo 遺伝子治療の例、NeuroD+BTC(1)



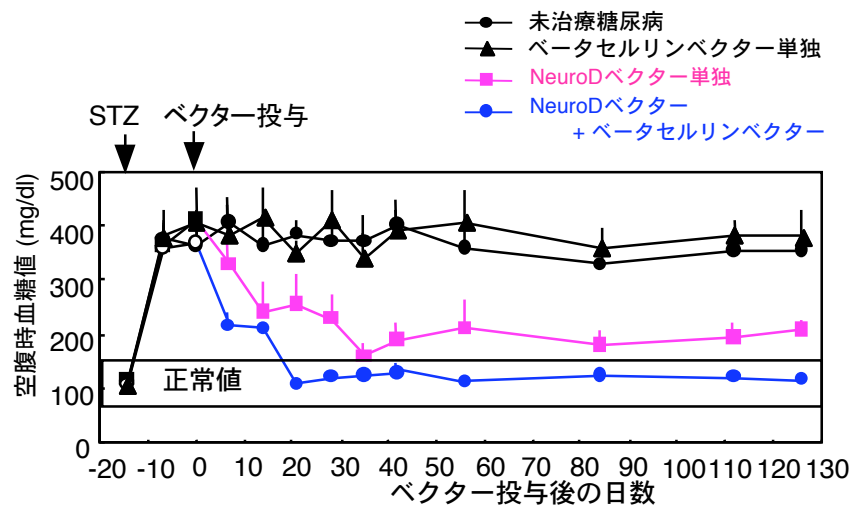
肝内の治療標的細胞と再生膵島の関係



In vivo 遺伝子治療の例、NeuroD+BTC(2)

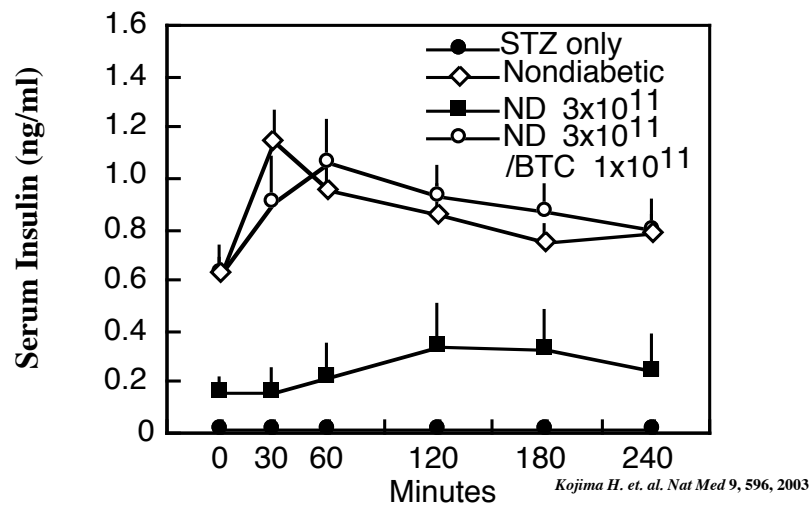


In vivo 遺伝子治療の例、NeuroD+BTC(3)

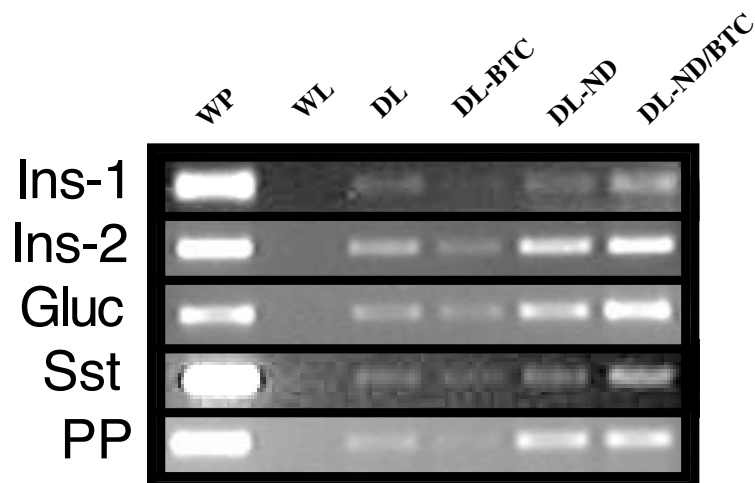


Kojima H. et. al. Nat Med 9, 596, 2003

In vivo 遺伝子治療の例、NeuroD+BTC(6)

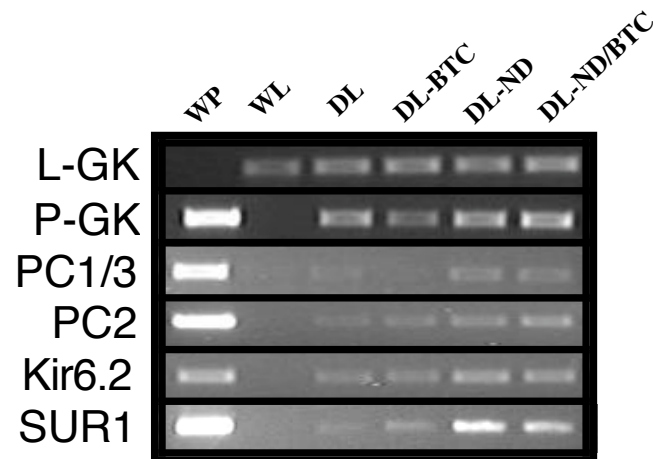


In vivo 遺伝子治療の例、NeuroD+BTC(7)



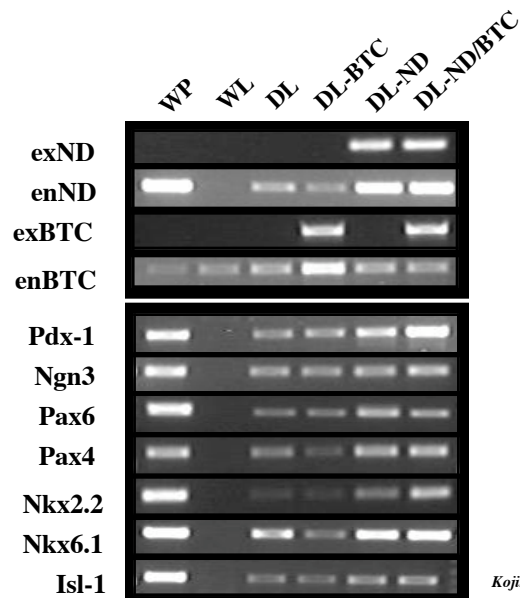
Kojima H. et. al. Nat Med 9, 596, 2003

In vivo 遺伝子治療の例、NeuroD+BTC(8)



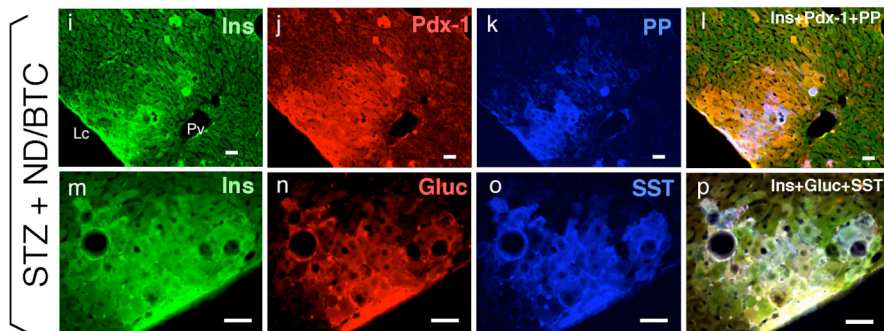
Kojima H. et. al. Nat Med 9, 596, 2003

In vivo 遺伝子治療の例、NeuroD+BTC(9)



Kojima H. et. al. Nat Med 9, 596, 2003

NeuroDならびにベータセルリン遺伝子治療により 糖尿病マウス肝臓に新生した膵ランゲルハンス島



In vivo 遺伝子治療、その他の臓器

■ ラット膵臓

膵管よりAdベクターを用いてPdx1投与
血糖値の低下

Taniguchi et al 2003, Gene Ther

■ 小腸、腎臓、その他

In vivo 遺伝子治療の課題

- | | |
|-------------|-----------|
| ■ インスリン産生能 | ベクターの種類と量 |
| ■ 血糖値の正常化 | 細胞の成熟 |
| ■ 拮抗ホルモンの分泌 | 臓器としての成熟 |
| ■ 治療効果の持続 | 増殖細胞の含有 |
| ■ 安全性 | 標的化 |
| ■ 自己免疫の脱却 | 複合ベクター |

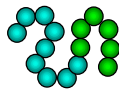
神経疾患への応用

遺伝子治療

標的化

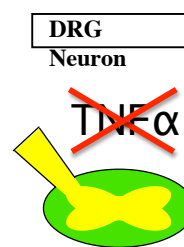
New strategy to cure diabetic neuropathy

1. New peptides or drugs



Targeting

2. Gene therapy



Vector or
drug

→ Specificity →

1. Correction of
abnormal
gene
expression
2. Nutritional
support

→ Cure from
neuropathy

Homing peptide screening by phage display

Filamentous phage
(M13 phage, CX7C)



pIII protein

PIII protein sequence

5'...TTC TGC GCA ATT GCT TTA GTG GCG GCT TTC TAT TCT CAG TGT
3'...AAT AAG TGT TTA GGA AAT CAG CAT GGA AAG ATA GGA GTG GGA
...Leu Phe Ala Thr Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ser His Ser

1. Start of mature protein with leader

GCT TCT HNK HNK HNK HNK HNK HNK HNK TGC GGT GGA GGT TCG
GGA ACA HNK HNK HNK HNK HNK HNK HNK ACC CCA CCA CCA CCA CCA
Ala Cys Phe Asn Asn Asn Asn Asn Asn Cys Asp Asp Ala Ser

Exp1

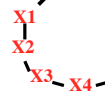
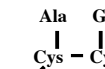
GGC GAA ACT GGT GAA AGT TGT TTA GCA AAA TTC CAT ACA GAA
TGG CTT TGA CAG CTT TCA GCA AAT GGT TTT AAG GGA TGT CTT
Ala Glu Thr Val Glu Asp Lys Asp Lys Asp Lys Thr Glu

... C-terminal region

AAI TGA TTT ACT AAG GTC TGG AAA GAG GAG AAA ACT TTA GAT
TTA AGT AAA TGA TGC CAG ACC TTT CTG TTT TGA AAT CTA
Asn Ser Phe Thr Asn Val Trp Lys Asp Asp Lys Thr Leu Asp

GCT TAC GCT AAG TAT GAG GGC... 3'
GAA AAG GAA TTA AAG TGC GGC... 5'
Arg Tyr Ala Asn Tyr Glu Gly...
... 30-residue region

K-G-W-T-M-A-A-G-C



DRG neurons



$$20^7 = 1.28 \times 10^9$$

In vitro subtractive biopanning

Phage library
(1x10¹¹ pfu)

Apply

Supernatant
Apply

Re-apply

Subtraction
HEK 293
Neuro2A
opposum kidney cell
culture dish

DRG

incubate

DRG

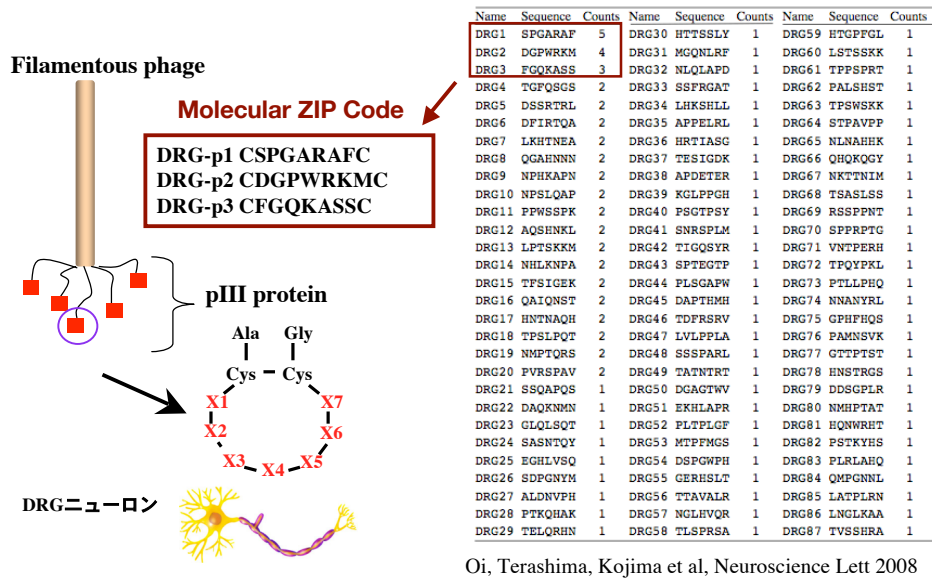
Elute

Purify

Amplify



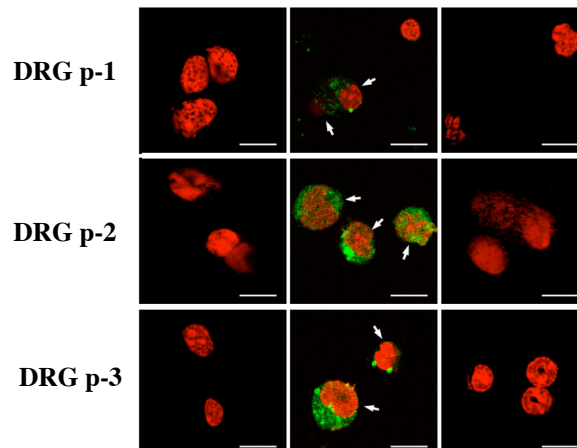
Isolation of DRG-targeting peptides



In vitro phage binding

Anti-phage Ab(-) Anti-phage Ab(+) Adsorption (10^{-4} M)

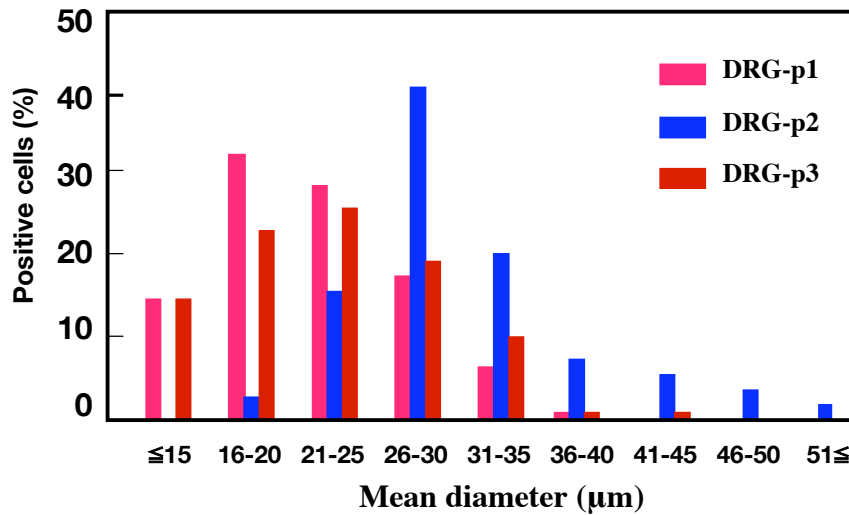
Same peptide Different peptide



Bars = 20μm

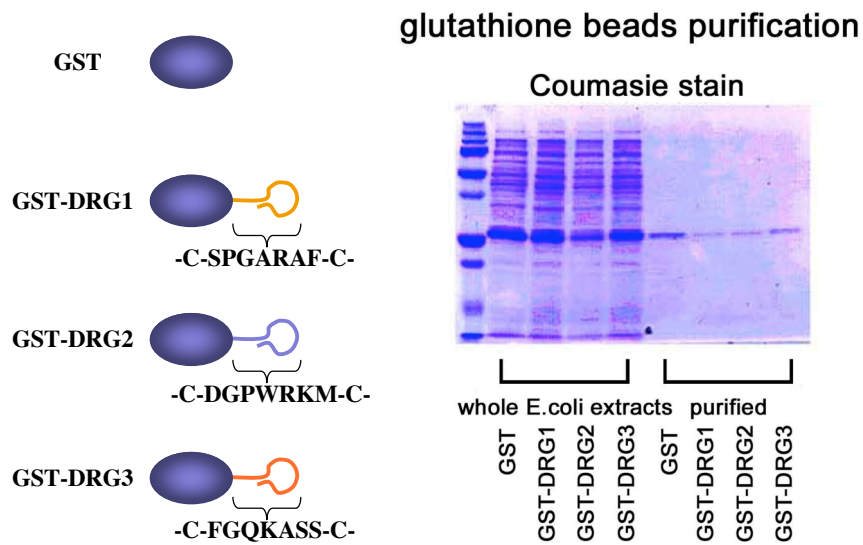
Oi, Terashima, Kojima et al, Neuroscience Lett 2008

Cell-size distribution of positive neurons *in vitro*



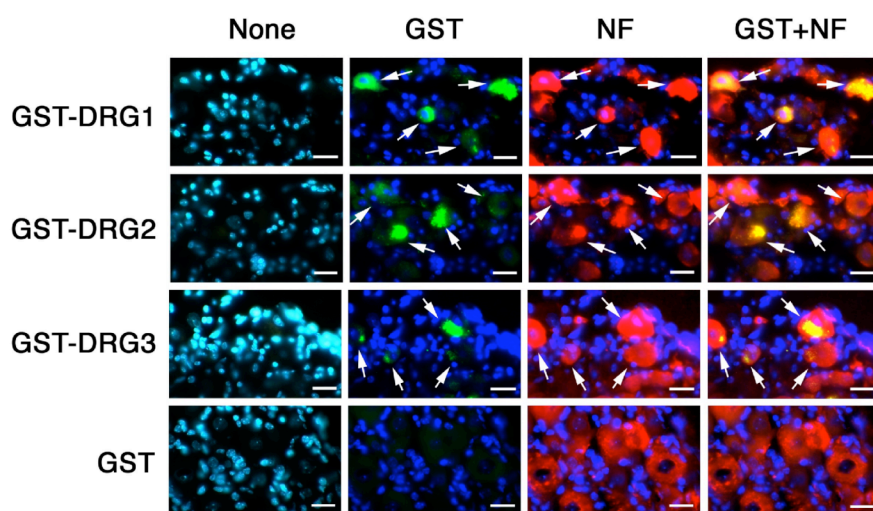
Oi, Terashima, Kojima et al, Neuroscience Lett 2008

Synthesis of GST fusion protein with DRG specific binding motif



Oi, Terashima, Kojima et al, Neuroscience Lett 2008

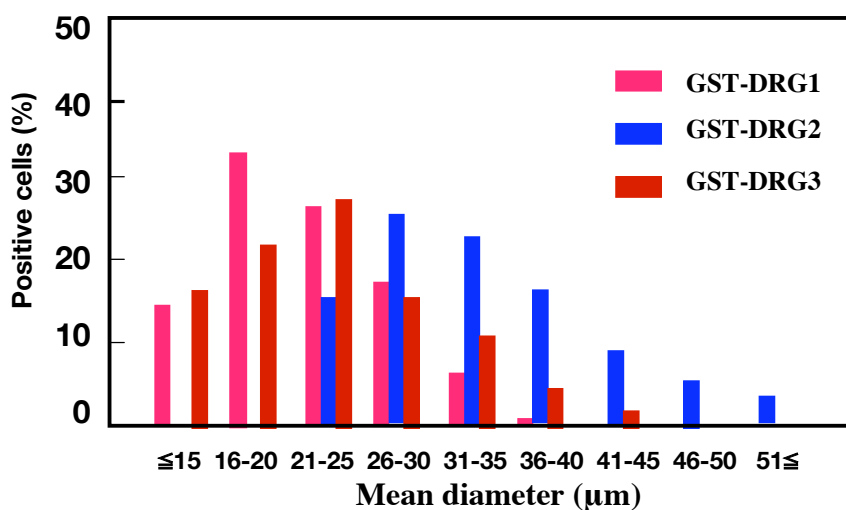
In vivo peptide binding



(DAPI: blue, GST: green NF: red, Bars: 20μm)

Oi, Terashima, Kojima et al, Neuroscience Lett 2008

Cell-size distribution of positive neurons *in vivo*

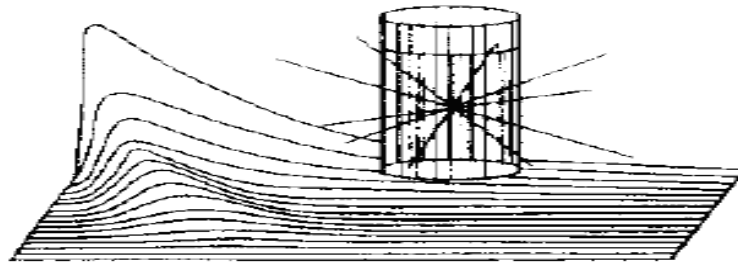


Oi, Terashima, Kojima et al, Neuroscience Lett 2008

ラジオアイソトープ（R I）の取り扱い

蕪木 宏行（パーキンエルマージャパン）

LIQUID SCINTILLATION ANALYSIS Science and Technology



今日、R I（ラジオアイソトープ）測定は最も広範囲に利用されています。

α 、 β 、 γ 各放射線測定はシンチレーション測定です。

特に基礎研究、臨床検査等多岐に渡っていますが、その中でも β 線測定には液体シンチレーションカウンターのは欠かすことが出来ません。

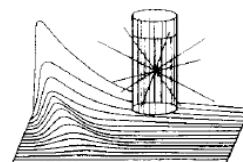
本講習では、この測定装置についての理論、測定上の問題、サンプル調整について説明します。

Liquid Scintillation Counting(LSC) today is the most sensitive and widely used technique for the detection and quantification of radioactivity. This measurement technique is applicable to all forms of nuclear decay emissions (alpha and beta particle, electron capture, and gamma ray emitting radionuclides). Liquid scintillation counting is an analytical technique which measures activity of radionuclides from the rate of light photons emitted by a liquid sample.

The technique of liquid scintillation counting is based on a few well-known physical phenomena. A brief explanation/review of these physical processes is given in this section in order to provide an understanding and appreciation of the power and limitations of the technique in the various studies involving the use of radioactive tracers.

LIQUID SCINTILLATION ANALYSIS

Science and Technolog



滋 賀 医 科 大 学

平成20年度医学総合研究特論 集中講義

OUT LINE

radioisotope and Visitor

Basic Theory of Liquid Scintillation Counting

Quenching and Efficiency

Sample Preparation

Applied Spectrum Analysis

Other Counting Interferences

Special Considerations for ^3H

Counting Statistics

Summary / Questions

ALPHA PARTICLE - [Symbol: α (alpha)] A doubly positively-charged particle emitted by certain radioactive materials. It is made up two neutrons and two protons bound together, hence is identical with the nucleus of a helium atom. It is the least penetrating of the three common types of radiation (alpha, beta, gamma) emitted by radioactive material, being stopped by a sheet of paper. It is not dangerous to plants, animals or man unless the alpha-emitting substance has entered the body. (See DECAY, RADIOACTIVE.)

BETA PARTICLE - [Symbol: β (beta)] An elementary particle emitted from a nucleus during radioactive decay, with a single electrical charge and a mass equal to 1/1837 that of a proton. A negatively charged beta particle is identical to an electron. A positively-charged beta particle is called a positron.

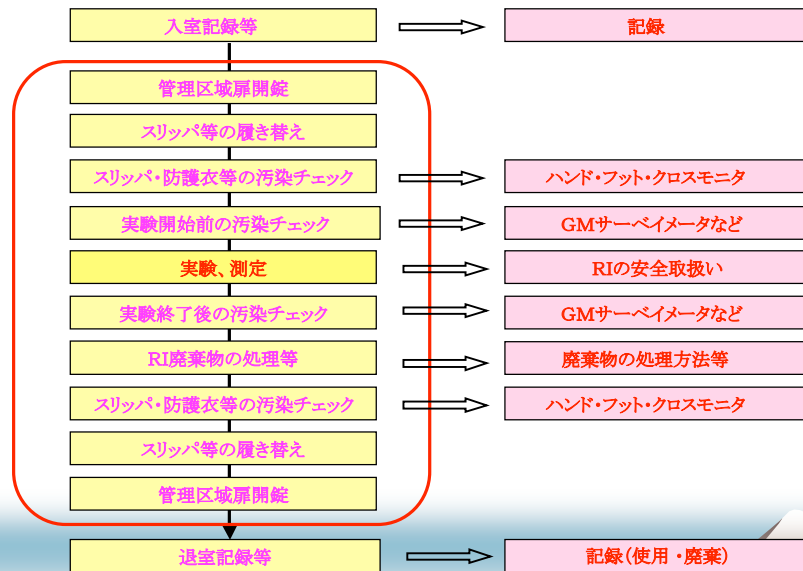
GAMMA RAYS - [Symbol: γ (gamma)] High energy, short-wavelength electromagnetic radiation originating in the nucleus of an atom. Gamma rays are very penetrating and are best stopped by dense materials, such as lead or depleted uranium. Gamma radiation frequently accompanies alpha and beta emissions and always accompanies fission.

Amounts of Radioisotops

$$\begin{aligned} 1\text{Ci (キュリー)} &= 3.7 \times 10^{10} \text{ Bq (ベクレル)} \\ &= 2.22 \times 10^{12} \text{ dpm} \end{aligned}$$

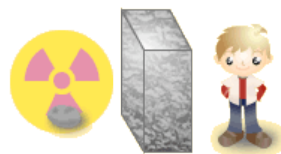
$$\begin{aligned} 1 \mu\text{Ci (マイクロキュリー)} &= 3.7 \times 10^4 \text{ Bq} \\ &= 2.22 \times 10^6 \text{ dpm} \end{aligned}$$

SAFETY PROTECTION(1)



SAFETY PROTECTION(2)

放射線を遮蔽する



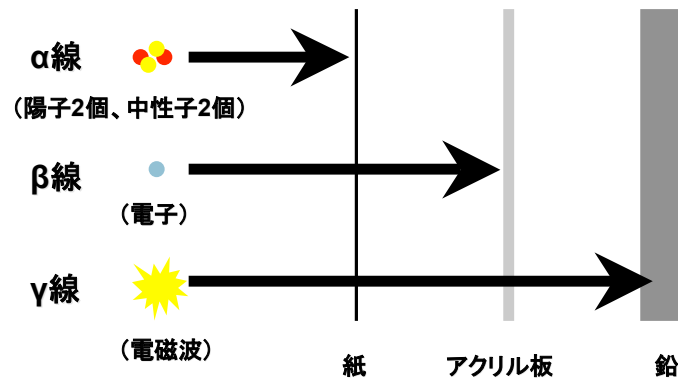
発生源から離れる



作業時間を短くする



SAFETY PROTECTION(1)



Why Liquid Scintillation Counting?

- Utility – all Nobel laureates in Biology for the past 25 years used radiotracers and LSC
- Versatility – applicable to all forms of nuclear decay emissions; α , β , e^- , γ
- Sensitivity
- Specificity

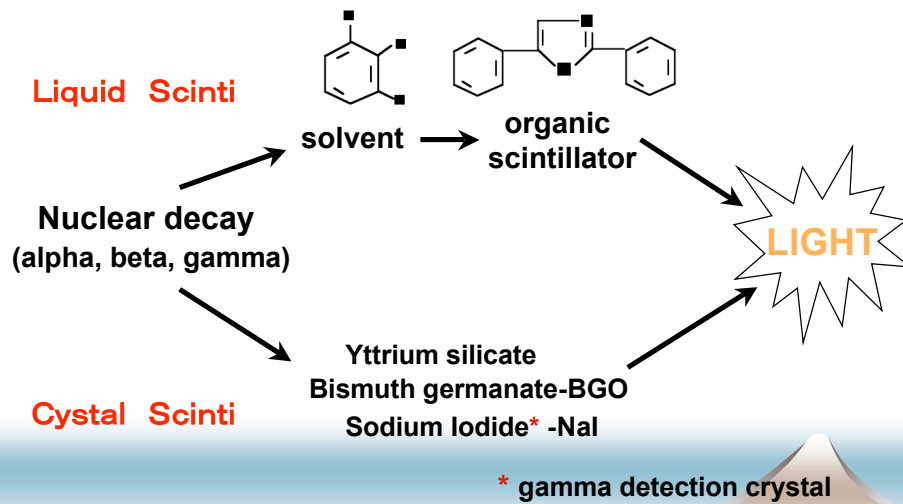
RADIOISOTOPE and ENERGY

R I	(E _{max}) keV	HL
³ H	18.6	12. 3y (6ヶ月)
¹⁴ C	156	5730y (3~1年)
³⁵ S	167	87. 5d (2~2ヶ月)
³² P	1,709	14. 26d
³³ P	249	25. 4d (1~2週間)
⁵¹ Cr	32	27. 7d
¹²⁵ I	35	60. 1d
¹⁸ F (PET)	562	109. 8min

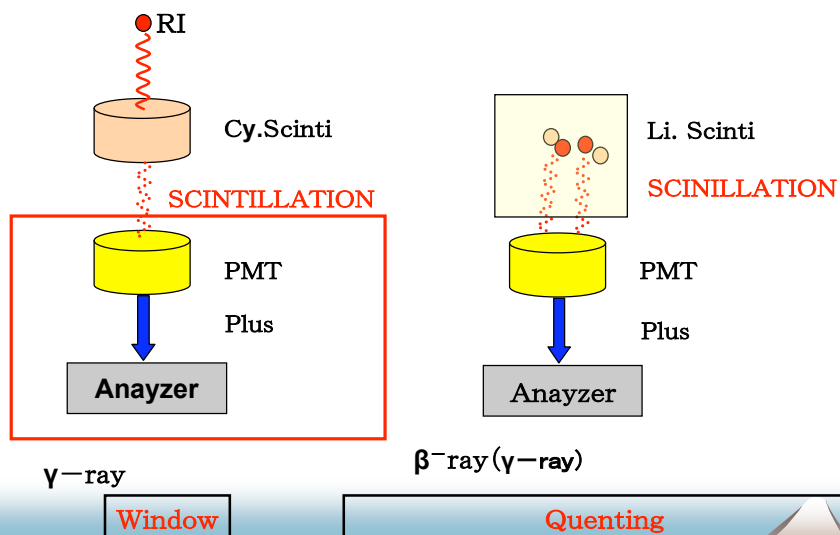
not complete table.

Radionuclide	Half-life	Emission	Energy (keV)	Emanations per 100 Disintegrations
³ H	12.43 yr (108,887 h)	β	18.6	100.0
¹⁴ C	5730 yr	β	156.5	100.0
²² Na	2.602 yr (22,794 h)	β+	545.5	89.8
²⁴ Na	15.00 h	β γ	1390.2 1368.5 2754.1	99.9 100.0 99.9
³² P	14.29 d (342.96 h)	β	1710.4	100.0
³⁵ S	87.39 d (2097.4 h)	β	167.5	100.0
³⁶ Cl	3.00x10 ⁵ yr	β	709.6	98.1
⁴⁵ Ca	163 d (3912 h)	β	256.9	100.0
⁵¹ Cr	27.704 d (664.9 h)	γ	320.1	9.8
⁵⁵ Fe	2.7 yr (23,652 h)	x-ray	5.888 5.899	8.2 16.3
⁵⁹ Fe	44.529 d (1068.7 h)	β γ	273.4 465.8 1099.2 1291.6	45.6 52.8 56.1 43.6
⁶³ Ni	96 yr (604,440 h)	β	65.9	100.0
⁶⁵ Zn	243.9 d (5853.6 h)	β+ γ	329.9 1115.5	1.5 50.8
⁸⁵ Sr	50.5 d (1212 h)	β	1492.4	100.0
⁹⁰ Sr	29.12 yr (255,091 h)	β	546.0	100.0

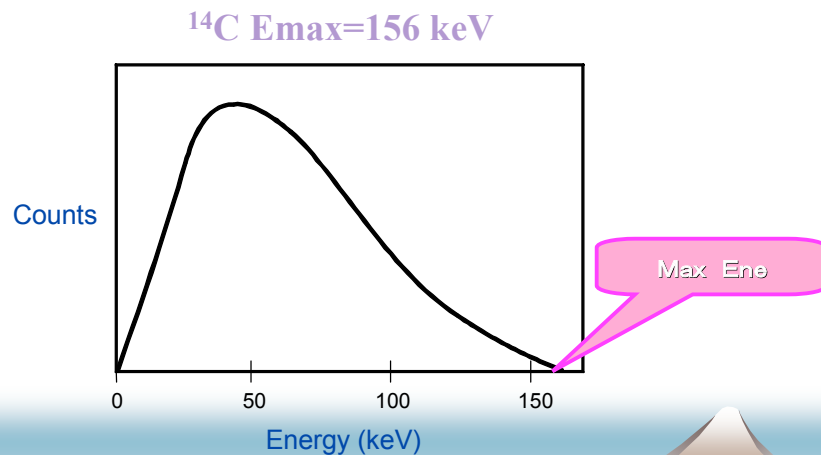
SCINTILLATION TECHNOLOGY



SCINTILLATION TECHNOLOGY



^{14}C Particle Energy Distribution



International Journal of Applied Radiation and Isotopes, 1972, Vol. 23, pp. 407-415. Pergamon Press. Printed in Northern Ireland

The Beta Ray Spectrum and the Average Beta Energy of Several Isotopes of Interest in Medicine and Biology

J. MANTEL

Wayne State University, School of Medicine, Department of Radiology, Detroit, Michigan 48207, U.S.A.

(Received 23 February 1972)

The beta ray spectra and the average energy has been calculated for 59 isotopes of interest in medicine and biology. For each isotope, the average energy, the beta ray spectrum, and a table including the pertinent input data used for computation, is given.

LE SPECTRE DE RAYONS BETA ET L'ENERGIE BETA MOYENNE DE PLUSIEURS ISOTOPES D'INTERET A LA MEDECINE ET A LA BIOLOGIE

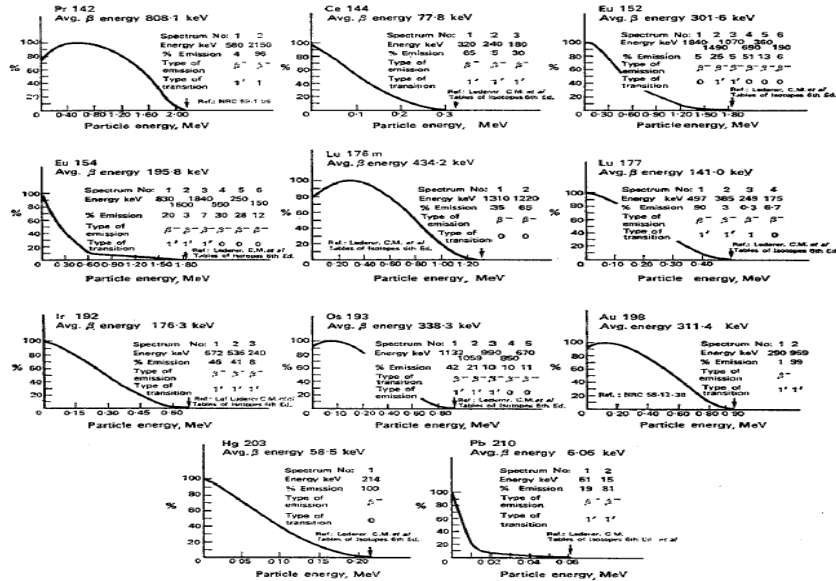
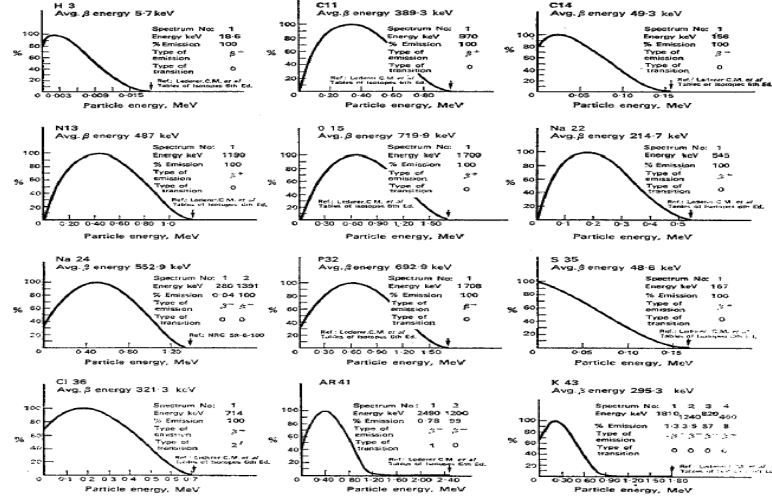
On a calculé les spectres de rayons bêta et l'énergie moyenne pour 59 isotopes d'intérêt à la médecine et à la biologie. On présente pour chaque isotope l'énergie moyenne, le spectre de rayons bêta et un tableau qui comprend les données pertinentes à la computation.

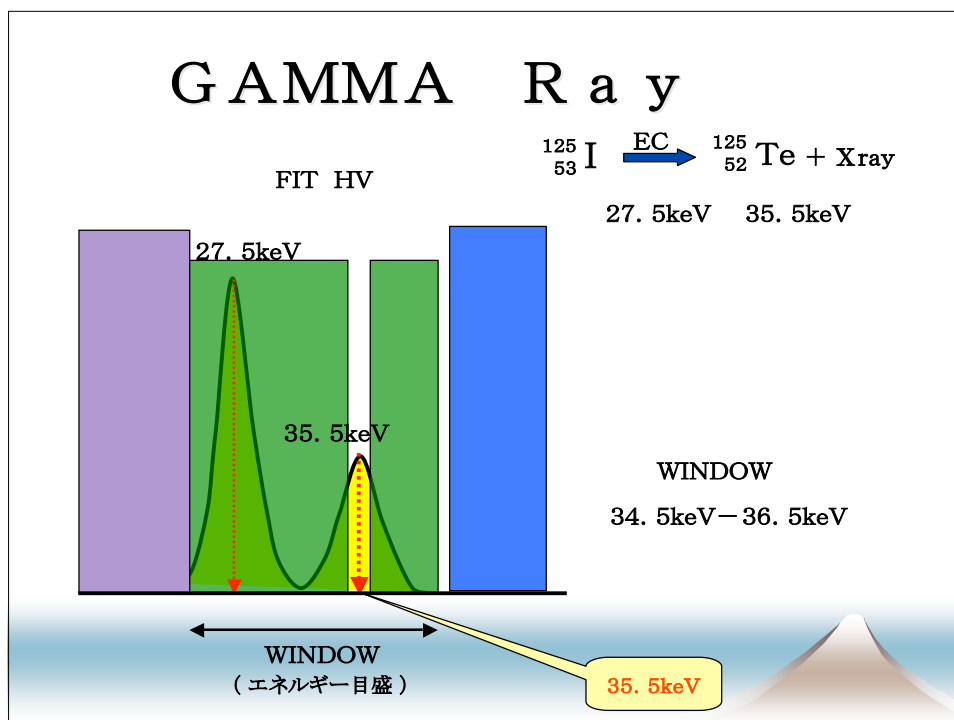
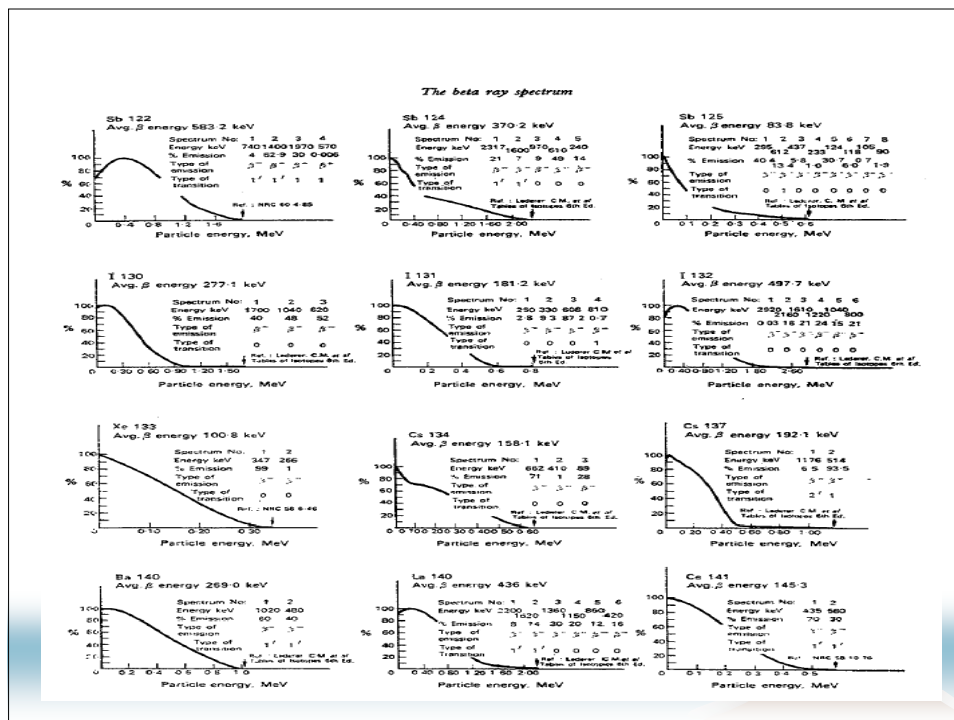
СПЕКТР БЕТА-ИЗЛУЧЕНИЯ И СРЕДНЕЕ ЗНАЧЕНИЕ ЭНЕРГИИ ЕГО В СЛУЧАЕ НЕКОТОРЫХ ИЗОТОПОВ МЕДИЦИНСКОГО И БИОЛОГИЧЕСКОГО ИНТЕРЕСА

Рассчитаны спектры и средние значения энергии бета-излучения для 59 изотопов медицинского и биологического интереса. Для каждого изотопа даны среднее значение энергии, спектр бета-излучения, таблица, включая относящиеся исходные данные для вычислений.

DAS BETASPEKTRUM UND DIE MITTLERE BETAENERGIE EINIGER FÜR MEDIZIN UND BIOLOGIE INTERESSANTER ISOTOPEN

Das Betaspektrum und die mittlere Energie ist für 59 für Medizin und Biologie interessante Isotopen berechnet worden. Für jedes Isotop wird die mittlere Energie, das Betaspektrum und eine die für die Berechnung massgebenden Eingangsdaten enthaltende Tabelle angegeben.





CERENKOV RADIATION

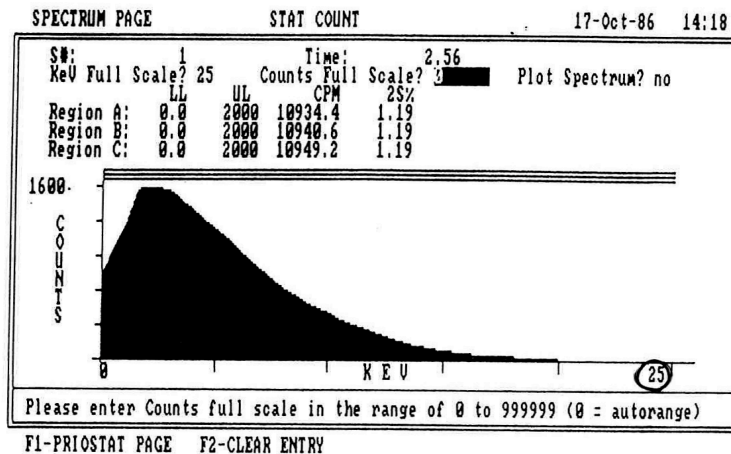
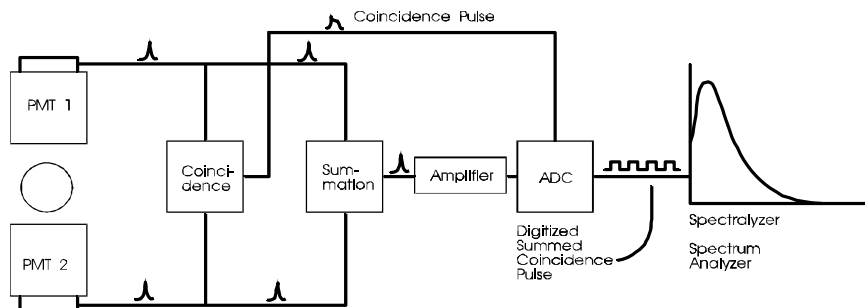


Figure 2. Energy Spectrum of ^{32}P in 16 mL H_2O .

CERENKOV RADIATION - Light emitted when charged particles pass through a transparent material at a velocity greater than that of light in that material. It can be seen, for example, as a blue glow in the water around the fuel elements of pool reactors. Pavel A. Cerenkov was the Russian scientist who first explained the origin of this light.

WATER, ETANOL, ASETON
 $263\text{ KeV} < \beta\text{PARTICLE}$

Block Diagram of a Liquid Scintillation Counter

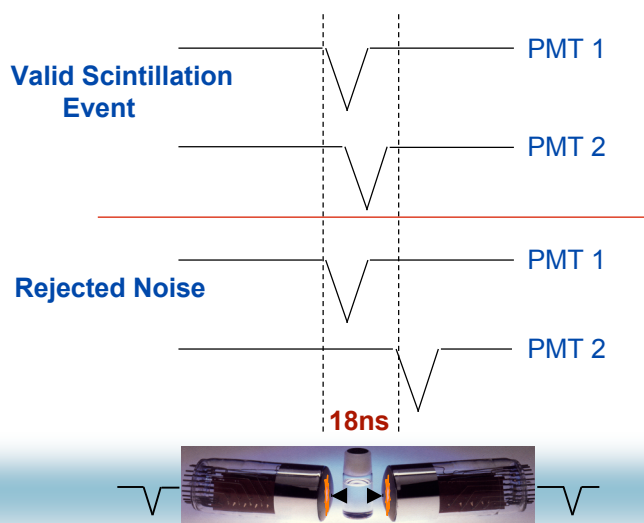


Coincidence Circuit – removes “noise” due to high voltage, temperature variations, etc..

Summation Circuit – amplitude of PMT output is inversely proportional to squared distance between the scintillation event and the photocathode

Analog to Digital Converter – converts PMT pulse amplitude to a digital address in the multichannel analyzer

Coincidence Circuit



The Background Spectrum

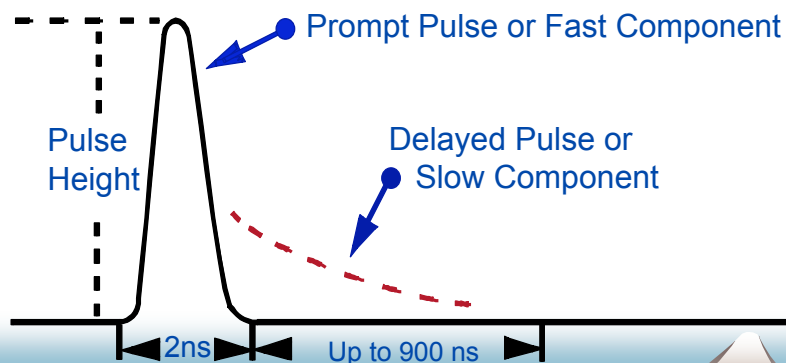
To analyze the shape of a background spectrum (Figure 2-31), we first categorize the contributions to overall background in a typical LSC system:

1. Instrument	10%
2. Crosstalk	22%
3. Vial glass & PMT face	37%
4. Scintillator (14 mL)	31%
	100%

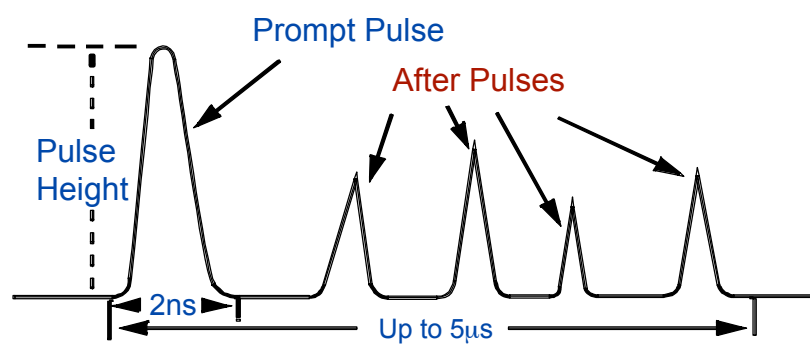
1. Instrument background: This contribution results from the noise (dark noise, after-pulse noise) of the PMTs. In a well-designed counter with a fast-resolving coincidence circuit and low dark noise from the photomultiplier, the background represents only 10% of the total observed background. This background is low energetic.
2. Crosstalk: A scintillation event (e.g. spontaneous release of photoelectrons from the cathode), initiating photons within one PMT (face of envelope body) will be seen by the other PMT. These events are usually within the coincidence resolving time and by summation they may appear as low energy background pulses. PMT masking or electronic crosstalk correction will reduce these background pulses.
3. Vial glass and PMT face: Background scintillation in the vial wall and the PMT face are generated by: effect by cosmic or environmental radiation of glass walls and PMT face. (Radioactive ^{40}K radiation is present as a residue in the glass wall and PMT face.) The distribution of these background pulses is flat over a broad energy range.

ex: 50CPM $(5+17+8)=20$

BETA PULS

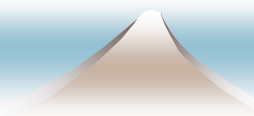


NOISE PULS



Counting Interferences

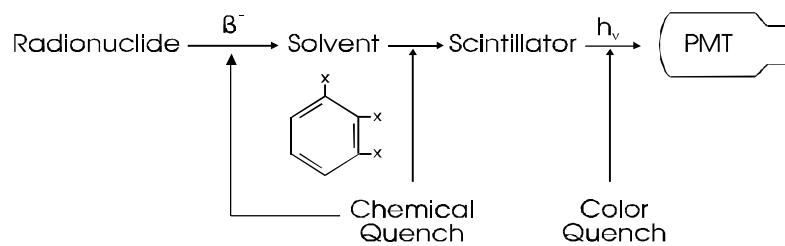
- QUENCHING
- WALL EFFECT
- VOLUME INDEPENDENT



Liquid Scintillation Counting

- $-\beta \rightarrow$ Solvent $\rightarrow$ Scintillator $\rightarrow$ light $\rightarrow$ PMT
- This is a linear conversion, therefore:
 - # photons is directly proportional to $-\beta$ energy
 - 10 photons per KeV

Quench



DPM = actual number of nuclear decay events (goal)

CPM = number of decay events
detected by the liquid scintillation counter

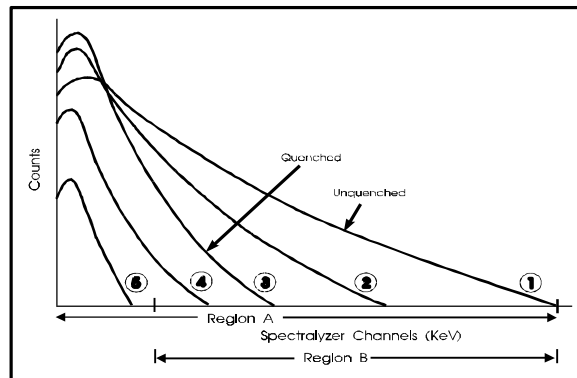
1. chemical quenching
2. color quenching
3. oxygen quenching
4. concentration quenching

FILTER

QUENCHING

	CPM	DPM
Blood	10,000	30,000
Urine	12,000	30,000
Plasma	15,000	30,000
Brain	13,000	30,000
Marrow	17,000	30,000

Quench Indicating Parameter (QIP)



Peak #	CPM	DPM	% Efficiency	QIP
1	60,000	100,000	60	730
2	50,000	100,000	50	480
3	37,000	100,000	37	330
4	20,000	100,000	20	170
5	15,000	100,000	15	140

F I L T E R



59% (55%)



100% (88%)



95% (76%)



COLOR

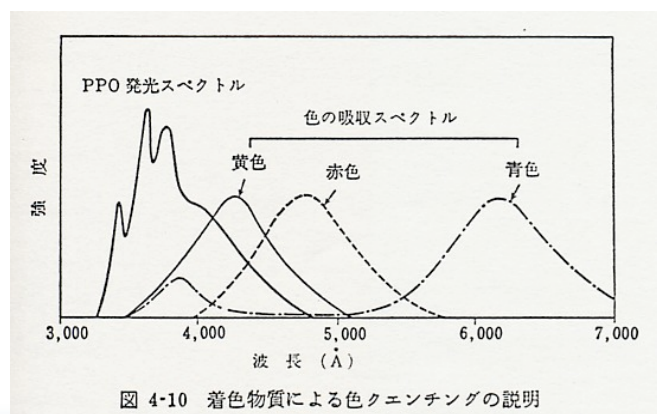


図 4-10 着色物質による色クエンチングの説明

WALL EFFECT

DPM in Plastic Scintillation Vials

Time (hrs.)	Volume (mL)	DPM	% DPM Recovery
0	5	43.567	100.2
0	15	132.759	100.2
12	5	44.009	101.1
12	15	133.693	100.9
24	5	43.657	100.3
24	15	132.639	100.1
36	5	43.466	100.4
36	15	132.487	99.9
48	5	43.692	100.4
48	15	132.419	99.9
60	5	43.595	100.2
60	15	132.387	99.9
72	5	43.568	100.1
72	15	133.120	100.5
84	5	42.984	98.8
84	15	132.570	100.0
Mean		43.567 (5 mL)	132.795 (15 mL)
SD		308.21	479.72
%CV		0.71	0.36

VOLUME INDEPENDENT

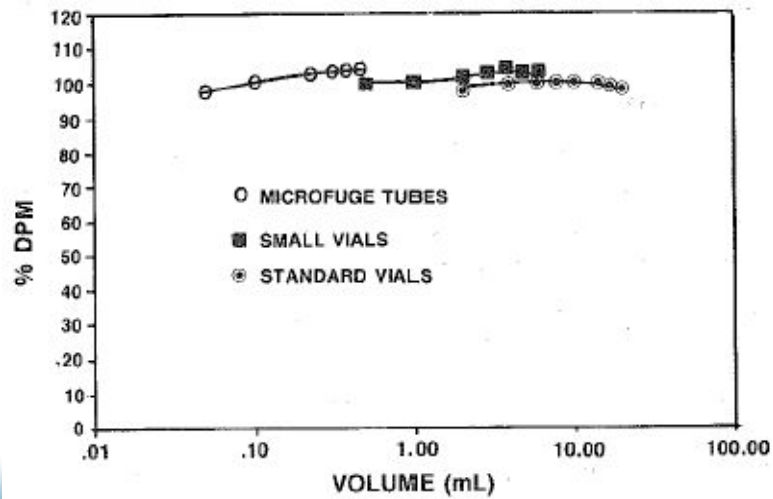


Figure 3-16.

Counting Interferences

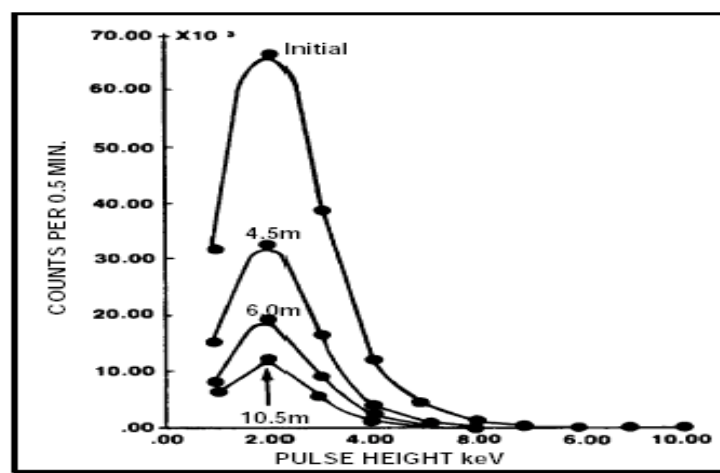
- Luminescence
- Static Discharge
- Background

Luminescence

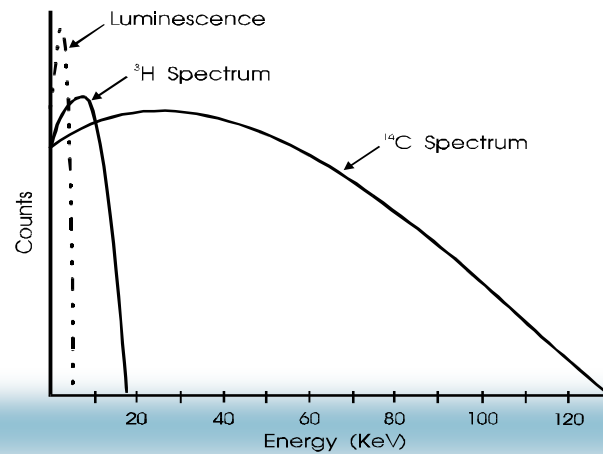
- Caused by:
 - chemical reaction between a high pH sample and scintillation cocktail
 - UV light interacting with the scintillation cocktail or the vial
- Results in a single photon event between 0 and 4 KeV
- Controlled by:
 - moving the lower discriminator up to 4 KeV
 - delayed coincidence
 - neutralizing the sample before adding cocktail
 - temperature control – heat the sample to drive the reaction to completion or cool the sample to slow the rate of the reaction
 - time



LUMINESCENCE



Luminescence, H-3, C-14 Spectrum – LSA



Static Discharge

- Caused by two nonconductive objects being separated (i.e. hands, gloves, plastic, glass)
- Results in non-reproducible high counts in samples that should have low counts
- Controlled by:
 - electrostatic controller
 - wiping vials with a slightly damp paper towel or dryer sheet before counting
 - static free vials

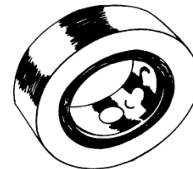


Figure 3-16. Packard Electrostatic Controller.

Equation for Calculating DPM

$$\text{DPM} = \frac{\text{Net CPM}}{\text{Counting Efficiency}}$$

↑
Unknown

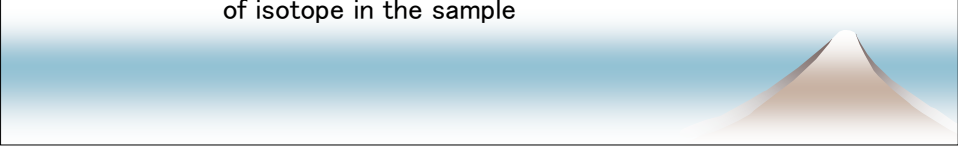
Variable



Optimizing Counting

- Consider quench and other counting interferences
- Homogeneous Sample
 - Clear, not milky
 - No phase separation
 - 4π counting geometry
 - Remember: the detector is in the vial
- Choose the appropriate cocktail and vial

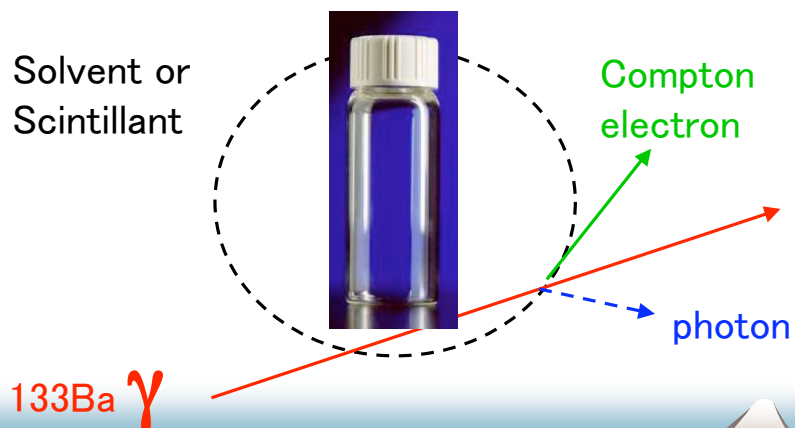
→ GOAL: determine actual amount of isotope in the sample



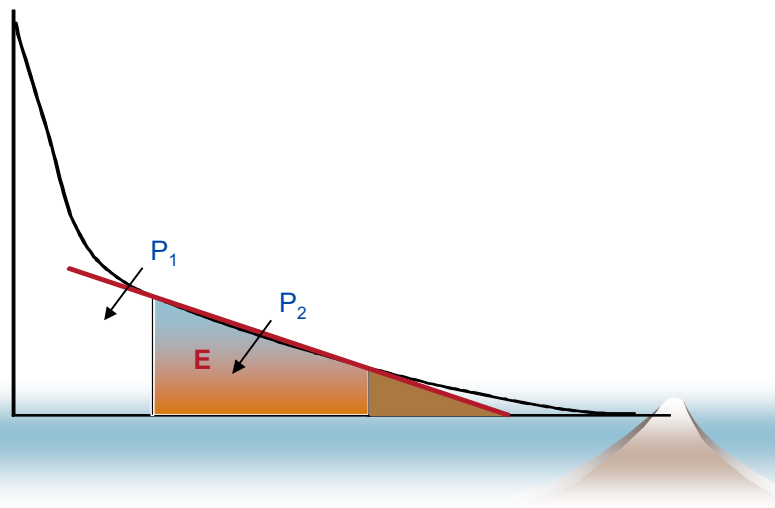
Methods of Determining Counting Efficiency

- Internal Standard
- Quench Indicating Parameter (QIP) based on the sample spectrum (SIS)
- QIP based on the external standard spectrum (tSIE)

External Standard Spectrum

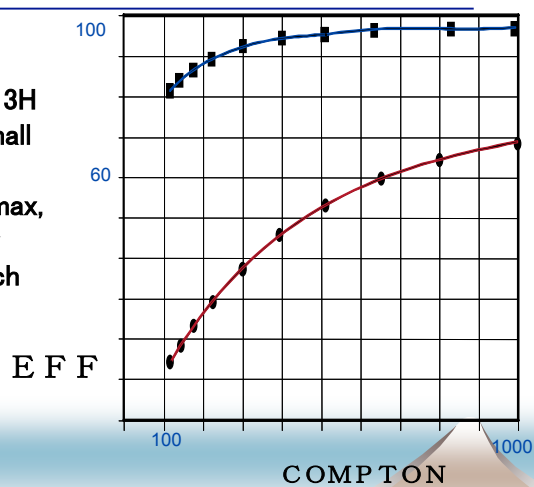


tSIE Calculation using ^{133}Ba External Std)



Quench Curve

- **3H** – Due to low E_{max} , 3H is easily effected by small changes in quench
- **14C** – Due to higher E_{max} , 14C is effected only by moderate to high quench

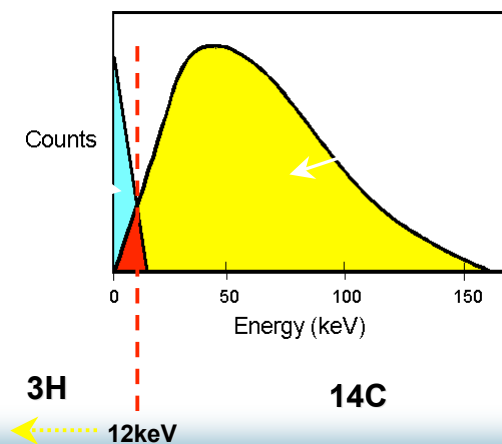


Spectral Index of the External Standard (tSIE)

- Accurate quench determination for all samples, regardless of sample activity, sample volume, or wall effect
- Low energy ^{133}Ba standard ($E_{\text{max}} = 384 \text{ KeV}$) is more sensitive to the subtle changes in quench that effect low energy samples like ^3H and ^{14}C
- Low energy gamma rays require less sample to interact and produce a Compton spectrum (down to $25 \mu\text{L}$)

Bottom positioning of the external source provides optimal geometry, and volume independence

DUAL ISOTOPE ($^3\text{H}/^{14}\text{C}$)



PERFORMANCE NOTE

U

PN NO. 9 OCTOBER 1986

QUANTITATION OF DUAL LABELED $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ SAMPLES AT VARIOUS RATIOS

The quantitation of dual labeled ^3H and ^{14}C samples by liquid scintillation counting has become a very popular and sophisticated technique. This technique involves simultaneous quantitation of two radionuclides in a single sample. The Tri-Carb® liquid scintillation analyzers are able to quantitate $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ samples in the ratio of 50:1 with good accuracy. This is easily accomplished since the spillover of the low energy radionuclide in the high energy region is low at all quench levels. However, when the $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ ratio has an excess of ^{14}C to ^3H , then many liquid scintillation counting systems are unable to compensate for the high spillover of ^{14}C into the ^3H region (refer to Figure 1). This can result in low recoveries for ^3H . The Tri-Carb 2000CA liquid scintillation analyzer gives the results shown in Table 1 for ratios of $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ of 1:1, 1:5, 1:10, 1:20, and 1:50 at various quench levels (tSIE). This table shows accurate recoveries for both ^3H and ^{14}C of 100.31 and 100.65%, respectively, with a coefficient of variation of 0.887.

Table 1. Quantitation of Dual Labeled $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ Samples at Various Ratios and Various Quench Levels

$^3\text{H}/^{14}\text{C}$ RATIO	% RECOVERY ^3H	% RECOVERY ^{14}C	ISIE
1:1	100.6	101.0	808
1:1	100.6	101.3	473
1:1	100.2	98.3	161
1:5	99.9	101.8	828
1:5	102.3	100.5	463
1:5	98.8	102.0	174
1:10	100.1	101.3	786
1:10	99.7	101.1	464
1:10	100.8	101.5	173
1:20	99.7	100.9	780
1:20	99.8	100.5	448
1:20	99.5	100.9	166
1:50	100.9	100.6	786
1:50	101.5	100.2	681
Mean	100.31	100.85	
S.D.	0.890	0.893	
C.V.	0.887	0.886	

A complete series of samples at a $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ ratio of 1:20 (Figure 2) were also assessed at eight different quench levels from a tSIE = 800 to 100. These correspond to an efficiency of 61.6 to 12.6% for ^3H and 83.9 to 62.1% for ^{14}C . It can easily be seen that the Packard Tri-Carb 2000CA liquid scintillation analyzer is able to accurately quantitate dual labeled ($^3\text{H}/^{14}\text{C}$) samples at various quench levels.

Count Time vs. Counting Error

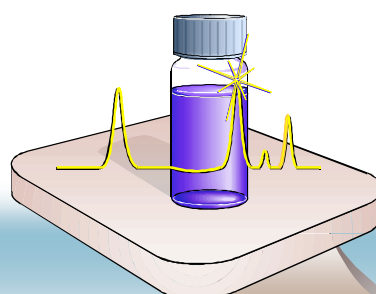
TOTAL COUNTS	ERROR %2S
100	20.0
200	14.1
400	10.0
1,000	6.3
2,000	4.4
4,000	3.2
10,000	2.0
20,000	1.4
40,000	1.0
100,000	0.6
200,000	0.44
400,000	0.32

NOTE: 1,600 counts = 5% error

装置を覚えな
いと研究
い



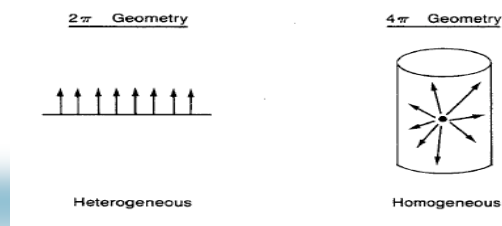
Chemical and Consumables



What Scintillator?

SOLVENT + SCINTILLATOR
+ SOLUBILIZER =

SCINTILLATION COCKTAIL



CHOOSING A SCINTILLATION COCKTAIL

Choosing the appropriate scintillation cocktail is very important in liquid scintillation analysis. The combination of the sample and the scintillation solution is a major determining factor of the quality data (DPM) in the counter. Several factors are important in the quality data:

1. Sample compatibility
2. Counting performance
3. Cost
4. Convenience
5. Safety and disposability

These factors are all interrelated, and each will be discussed separately.

Table 6-6. Toxicity Values on Some Primary Solvents.

	Vapor pressure ¹ at 25°C in mm. of Hg.	Equilibrium ² Vapor Concen- tration at 25°C, ppm	Threshold Limit Value (TLV) ³ ppm	Toxicity Ratio ⁴
High Flash-point solvent ⁵	0.075			
Pseudocumene	2.2	2,900	25	116
p-Xylene	8.8	11,600	100	116
m-Xylene	8.2	10,800	100	108
o-Xylene	6.6	8,700	100	87
Toluene	28.2	37,100	100	371

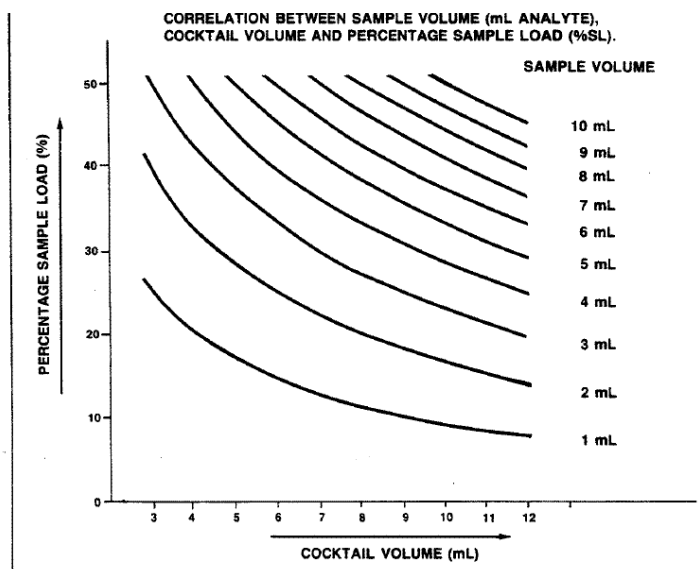


Figure 6-6 Correlation Between Sample Volume (mL Analyte), Cocktail Volume and Percentage Sample Load (%SL).

例

SL20%、サンプルが3mLの場合

- 20% = $3 / (3 + 12)$ 12mlのカクテルが必要

SL50%、サンプルが同じ3mlの場合

- 50% = $3 / (3 + 3)$ 3mlのカクテルで充分



- 1/4 の消費量・廃液量



- 仮に4倍の価格でも等価でかつ有益

Step1: 分解/溶解

20mlガラスバイアルにサンプルを入れて溶解剤を加える(1-2ml)。サンプルが溶解するまで50-60℃で加温。その後、室温まで冷却。

Step2: 脱色

過酸化水素を着色が除去されるまで添加しながら攪拌し、脱色反応が完了するまで15-30分間、50-60℃で加温する

Step3: 測定

カクテル剤(10-15ml)を加えて15-30分間カウンター中で温度と光にサンプルを適合させ測定

※ポリバイアルを使用する場合の加温は75℃までしか耐えられません。ソルエン350からのトルエンがポリバイアル壁を通して拡散してしまうため長時間にわたる50-60℃の加温は禁止

VIAL

PUT ON THE CAP



■ バイアルサイズは？

バイアルには4ml～20mlのサイズが存在
最大20mlバイアルにおいては通常使用されている
光電子増倍管の光電面とほぼ同じ大きさ。

■ どのようなガラスが使用されているか？

Soda-Glassと比較してカリウムの含有量が非常に
低いBorosilicate (Pyrex) Glassが使用
カリウム (40K) はガラスバイアル中のバックグラウンド
に影響

■ どのようなタイプのプラスチックが使用か？

ポリエチレン(石油化学製品)バイアルは測定される
バックグラウンドが極めて低い



Summary – Liquid Scintillation Counting

- Strive for homogeneous samples
- Using a quench curve based on the external standard (tSIE) is the best method for converting CPM to DPM
- Be aware of interferences and how to deal with them
- Consider counting statistics and count time
- Explore methods of waste reduction
- Prepare tritium and dual label samples with extra attention to quench and luminescence
- Always use tSIE/AEC with dual label samples

Sh a n k s Y o u

管 理 区 域

(使用施設)



許 可 な く し て
立 入 り を 禁 む

実験プロトコルシリーズ最新刊

細胞工学別冊 実験プロトコルシリーズ

RIの逆襲

アイントープを活用した簡単・安全バイオ実験

【監修】岡田誠治 徳本堂エッセンス研究所センター長(東京大学) 徳本堂バイオ実験研究所 徳本堂アイントープ(東京)所長

●定価4,200円(本体4,000円+税5%)
●A4製本 194頁 ISBN978-4-87962-362-1

【主な目次】

- I : 生命科学研究に必要なラジオアイソトープを用いた基礎知識 / ラジオアイソトープの安全管理と使用の実務 / 一般実験室で使える少量放射性物質の取り扱いの実務
- II : 細胞の同定法 / ペプチドタンパク質の標識法と実験への応用 / 細胞の同定法
- III : チャネル形成におけるアイントープの活用 - ①を用いたクロロイリジンチャンネルGFPのチャネル形成 / ②を用いたタンパク質の膜化 / ③を用いたアイントープの活用 / アイントープの細胞内への送達 / アイントープのマウス標識を用いたin vivo研究への応用 / PET (positron emission tomography) の生命科学への応用 / 脳科学研究におけるアイントープの活用 / RI標識DNA/RNA / スクレーン法 / アイントープを用いた細胞標識 / ④を用いたin vivo研究への応用 / ⑤を用いた細胞標識 / ⑥を用いた細胞標識 / ⑦を用いた細胞標識 / ⑧を用いた細胞標識 / ⑨を用いた細胞標識 / ⑩を用いた細胞標識
- IV : RI 測定法の使用法とデータ解析法 / RI 測定機器の使用法 (液体シンチレーションカウンタ計測法 / ガンマカウンタの原理と使用法 / オートラジオグラフィ (RI) によるイメージング法)



(表紙の裏面)	細胞工学別冊 実験プロトコルシリーズ RIの逆襲 アイントープを活用した簡単・安全バイオ実験 監修 岡田誠治 発行 徳本堂 定価 4,200 円 (本体 4,000 円 + 税 5%) A4 製本 194 頁 ISBN978-4-87962-362-1	ご注文数
	フリガナ お名前	
株式会社 秀潤社 〒213-0292 東京都大田区東田 3-15-1 電話 03-3761-1111	送付先住所 (〒)	

R I 研究施設利用に際して

福堀 順敏・小山 由起子
(実験実習支援センターR I 部門)

R I 研究施設利用の注意事項

1. 共同利用施設としてのルールを守る。
2. 法律で規制された施設である認識をもつ。
3. 研究を志す者としてのマナーを自覚し行動する。

機器利用に関する注意事項

1. 他の研究者に迷惑をかけない。
2. 機器をR I で汚染しない。
3. 困った時、勝手な判断をしない。

インスタントイメージャーについて

InstantImager 測定原理

1. X 線フィルム、フوسفアープレート (IP) 等二次媒体を使用せずにサンプルを直接測定する。
2. マルチワイアープロポーショナルカウンターの原理を応用し MICAD 検出器により測定。ガスが充填された検出器内でイオン化現象を誘発し、定位、増幅させる。
3. デジタルシグナルプロセッサと光ファイバーにより、リアルタイムに画像情報を外部コンピュータに転送し表示する。

InstantImager の特長

1. 直読型検出器
二次媒体を使用せずサンプルを直接測定。
2. 高感度測定 (スピード)
X 線フィルムの約 100 倍の感度。
フوسفアースクリーン (IP) の約 10 倍の感度。
3. リアルタイム画像表示・データ解析
4. 簡単な操作

InstantImager の性能

1. 高い再現性
二次媒体を使用しない高い再現性
2. 定量性
液シンと同じ CPM として定量解析可能。
3. リニアダイナミックレンジ
10⁶カウントまでのダイナミックレンジ。

InstantImager の仕様

1. 測定可能な核種
¹⁴C、³²P、³³P、³⁵S、¹²⁵I
2. サンプルの大きさ
20 x 24cm 厚さ 1cm まで
3. サンプルの種類
メンブレン、ゲル（ドライ、ウェット）、TLC、組織切片

InstantImager 使用のメリット

1. 実験の迅速化
今行なった実験の結果を直ぐに知ることができます
その結果を基に実験の次のステップへ早く進むことができます
2. 信頼できる定量値

InstantImager アプリケーション

RNA (Northern, RNAgels, transcription assays)

DNA (Southern, DNAgels, DNA Adduct assays)

TLC

CAT Assays

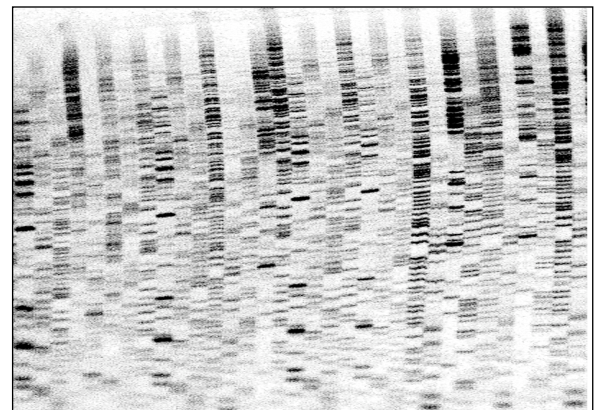
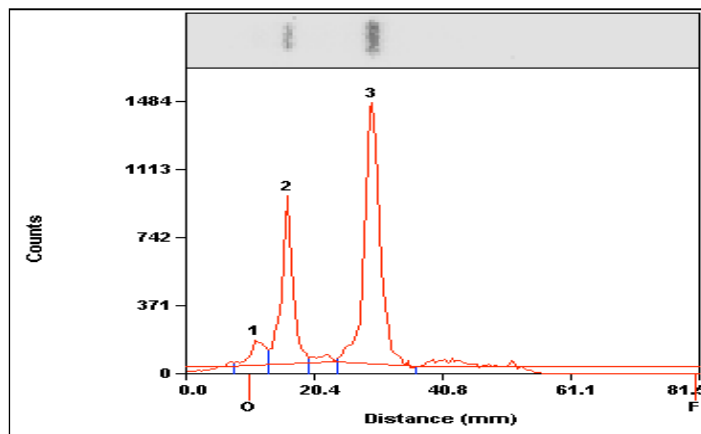
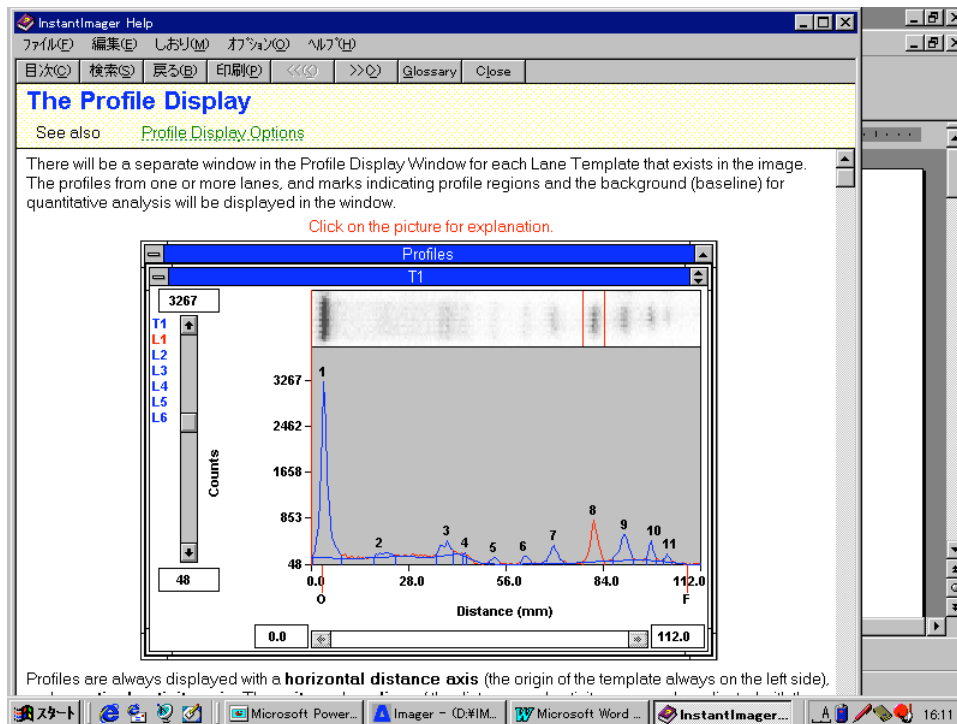
³²P labeled protein (Gel shift, phosphorylation assays)

³⁵S labeled protein

¹²⁵I labeled protein (Western blots)

High density hybridization; colony screening

データ解析法



実験実習支援センターR I 部門

液体シンチレーションカウンターについて

1. 液体シンチレーションカウンターの特徴

- ・ GM 管でも検出できないような、弱い β 線を測ることができる。
- ・ 主な測定対象・・・ ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S など

2. 原理

- ・ β 線を直接測るのではない。
 β 線を蛍光物質に当てて励起させ、基底状態に戻るときに放出される光を検出している。
- ・ シンチレーターカクテル・・・有機溶媒に蛍光物質を溶かしたもの。
- ・ 光電子増倍管・・・光電効果を利用して、光子を電子に変換し、かつ増幅する。

3. 測定の際の注意

- ・ クエンチング・・・色や不純物によって蛍光が阻害され、計数効率が減少してしまう現象。
- ・ シンチレーターカクテルの選び方・・・サンプルの液性などを考慮する。

4. 実際の測定

- ①バイアルにサンプルとカクテルを入れ、よく混ぜる。
- ②プロトコルを設定する。
※ どの番号を使っても構いません。
ただし、1～6 は専用のプロトコルなので、触らないでください。
- ③プロトコル番号と同番号のセレクターをカセットにはめる。
- ④フタを閉め、スタート。

5. その他

- ・ チェレンコフ光の測定について

*使用時にわからないことがあれば、気軽に相談してください。
管理室もしくはR I 施設内か技術支援室にあります。

ヒューマン・サンプルの取得と 長期保存・保存検体を活用した研究の事例

喜多 義邦（社会医学講座 福祉保健医学）

①生体試料の取得に必要な手続き

調査対象者から生体試料を採取する際にはインフォームド・コンセント（IC）が必要となる。これまで、われわれが実施してきた様々な疫学研究の経験を基に、対象者の募集から IC の取得、その後の調査対象者への倫理的な対応などについて詳細を示す。

②生体試料の長期保存に必要な設備とシステム

本学では昨年よりヒューマンサンプルリソースルーム（HSR）が実験実習支援センター内に設置され、運用が開始されている。本施設は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針、疫学研究のための倫理指針、臨床研究に関する倫理指針に基づいて設置されており、各指針の関連する部分について解説する。そのうえで、本施設の設備を説明するとともに管理システムを説明する。

③検体の長期保存と活用例

生体試料の長期保存の方法およびその管理方法について解説する。また、生体試料の活用については、コホート研究で収集された生体試料を用いて一般に行われる Nested case-control study について実例をもとに解説する。

平成20年度実験実習支援センター特別講習会

ヒューマンサンプルの取得と長期保存・ 保存検体を活用した研究の事例

社会医学講座福祉保健医学部門
喜多 義邦

1. 生体試料の取得に必要な手続き その1

- 医学研究に係わる倫理指針

- 1) 疫学研究に関する倫理指針

- 文部科学省厚生労働省 平成14年制定（平成16年改正）

- 2) 臨床研究に関する倫理指針

- 厚生労働省 平成15年制定（平成16年改正）

- 3) ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する
倫理指針

- 文部科学省・厚生労働省・経済産業省 平成13年制定（平成17
年改正）

1. 生体試料の取得に必要な手続き その2

- その他の関連する法規
 - 1) 個人情報保護に関する法律 平成15年制定
 - 2) 医師法、薬事法など医療に関連する法律
 - 3) 住民基本台帳法
 - 4) 統計法

1. 生体試料の取得に必要な手続き その3

- 生体試料の収集に係わる倫理指針の規定

1) 疫学研究に関する倫理指針

(2) 人体から採取された試料の利用

研究者等は、研究開始前に人体から採取された試料を利用する場合には、研究開始時までに研究対象者から試料の利用に係る同意を受け、及び当該同意に関する記録を作成することを原則とする。ただし、当該同意を受けることができない場合には、次のいずれかに該当することについて、倫理審査委員会の承認を得て、研究を行う機関の長の許可を受けたときに限り、当該試料を利用することができる。

1. 生体試料の取得に必要な手続き その4

- ① 当該試料が匿名化(連結不可能匿名化又は連結可能匿名化であつて対応表を有していない場合)されていること。
- ② 当該試料が①の匿名化に該当しない場合において、試料の提供時に当該疫学研究における利用が明示されていない研究についての同意のみが与えられている場合は、以下の要件を満たしていること。
 - ア) 当該疫学研究の実施について試料の利用目的を含む情報を公開していること。
 - イ) その同意が当該疫学研究の目的と相当の関連性があると合理的に認められること。
- ③ 当該試料が①及び②に該当しない場合において、以下の要件を満たしていること。
 - ア) 当該疫学研究の実施について資料の利用目的を含む情報を公開していること。
 - イ) 研究対象者となる者が研究対象者となることを拒否できるようにすること。
 - ウ) 公衆衛生の向上のために特に必要がある場合であつて、研究対象者の同意を得ることが困難な場合であること。

1. 生体試料の取得に必要な手続き その5

2) ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針 要点のみを示す。

- ① 第2章 7. 研究責任者の責務
- ② 第3章 10. 提供者に対する基本姿勢

詳細については添付資料1)を参照。

2. 生体試料の保存 その1

- 生体試料の保存に関する指針

1) 疫学研究に関する倫理指針

第4章10(1) 資料の保存

研究責任者は、疫学研究に関する資料を保存する場合には、研究計画書にその方法等を記載するとともに、個人情報漏えい、混交、盗難、紛失等が起こらないよう適切に、かつ、研究結果の確認に資するよう整然と管理しなければならない。

2. 生体試料の保存 その2

2) ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する 倫理指針

第4章14 試料等の保存及び廃棄の方法

- (1) 保存の一般原則
- 研究責任者は、研究を行う機関内で試料等を保存する場合には、提供者又は代諾者等の同意事項を遵守し、研究計画書に定められた方法に従わなければならない。

2. 生体試料の保存 その1のつづき

- (2) ヒト細胞・遺伝子・組織バンクへの提供

研究責任者は、試料等をヒト細胞・遺伝子・組織バンクに提供する場合には、当該バンクが試料等を一般的な研究用試料等として分譲するに当たり、連結不可能匿名化がなされることを確認するとともに、バンクに提供することの同意を含む提供者又は代諾者等の同意事項を遵守しなければならない。

- (3) 試料等の廃棄

研究責任者は、研究計画書に従い自ら保存する場合及びヒト細胞・遺伝子・組織バンクに提供する場合を除き、試料等の保存期間が研究計画書に定めた期間を過ぎた場合には、提供者又は代諾者等の同意事項を遵守し、匿名化して廃棄しなければならない。

ちなみに その1

- 遺伝子研究に必要なインフォームド・コンセントに含まれるべき事項

- 1) 提供者を選ぶ方針(合理的に選択していることがわかる具体的な方法、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。)
- 2) 研究の意義、目的、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。単一遺伝子疾患等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の特記事項等。)、期間、予測される結果及び危険、個人情報の保護の方法(匿名化しない場合の取扱いを含む。)
- 3) 試料等の種類、量
- 4) 共同研究機関の名称
- 5) 研究責任者等の氏名
- 6) インフォームド・コンセントのための手続及び方法
- 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

ちなみに その1

- 8) 提供者からインフォームド・コンセントを受けることが困難な場合、その研究の重要性及び提供者から試料等の提供を受けなければ研究が成り立たない理由並びに代諾者等を選定する考え方
- 9) 遺伝情報の開示に関する考え方(必要に応じ開示の求めを受け付ける方法を含む)
- 10) 研究実施前提供試料等を使用する場合の同意の有無、内容、提供時期、本指針への適合性
- 11) 他の研究機関から試料等又は遺伝情報の提供を受ける場合のインフォームド・コンセントの内容
- 12) 試料等又は遺伝情報を外部の機関に提供する場合や研究の一部を委託する場合の匿名化の方法等の事項(契約の内容を含む。)
- 13) 試料等の保存方法及びその必要性(他の研究への利用の可能性と予測される研究内容を含む。)
- 14) 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、バンク名、匿名化の方法等
- 15) 試料等の廃棄方法及びその際の匿名化の方法
- 16) 遺伝カウンセリングの必要性及びその体制
- 17) 研究資金の調達方法

3. 研究計画書等の実際例

- 我々が行っている高島研究で用いている研究計画書および説明用資料・教材を以下に示す。
 - 1) 高島研究計画書(添付資料2)
 - 2) 高島研究説明用資料(添付資料3)

4. 本学における生体試料の管理システム その1

ヒューマンサンプルリソースルーム(HSR)



室内



監視システム

4. 本学における生体試料の管理システム その2

- 目的

ヒューマンサンプルリソースルーム(Human Sample Resource Room, HSR)は、大学内における実験、研究等に使用するヒト由来試料等を一括して保管するための施設である。

HSRに保管される試料等は、各講座または講座内の各部門で「滋賀医科大学倫理委員会規程(倫理委員会規程)」に申請し承認されたものに限る。

以上のように、このシステムは前述の倫理指針にのっとり設置されたものである。

4. 本学における生体試料の管理システム その3

- 試料の保管の申し込み
HSRに試料等を保管する場合は、次に掲げる手続きにより冷凍庫を登録すること。
また、冷凍庫ごとに管理担当者を定め、担当者が登録手続きを行うこと。
- 入退出
HSRの入室者は、倫理委員会に提出、承認された「審査申請書」に記載されている「主任研究者」、「分担研究者」、及びその関係者でセンター長が承認した者に限る。
カードキーで職員証を認証し入室退出を管理する
- 試料等の取り扱い
HSRでは冷凍庫からの試料等の出し入れのみとし、試料等の解凍、処理等の実験は行わない

4. 本学における生体試料の管理システム その4

- 冷凍庫の取り扱い
 - ①冷凍庫は必ず鍵をかけ、冷凍庫の管理者以外が試料等を取り出せないようにする。
 - ②入室者本人が取り扱うことのできる冷凍庫以外は操作しない
- 緊急時の措置
 - ①冷凍庫の温度上昇時には、備え付けの緊急時予備冷却装置が作動し、HSRに炭酸ガスが充満し窒息死する可能性があるので、ただちに退室する。
 - ②冷凍庫の異常により庫内温度が上昇した場合、当該冷凍庫の責任者に対し、e-mailにて緊急に連絡する。

5. 保存生体試料の活用 その1

- 保存された生体試料の目的

Research Involving Human Biological Materials: Ethical Issues and Policy Guidance, 1999. NBAC Report

1) がん研究;

例) 病理標本→詳細な医療情報の裏づけによる候補遺伝子の探索が可能

新しい研究のアイデアが浮かぶごとに新たな試料の提供を求めるよりはるかに低コストで実験することが可能である。

5. 保存生体試料の活用 その2

- 保存された生体試料の目的

2) 感染症研究;

未知のウイルスによる感染症が発生した場合は緊急事態と受け止められる場合がある。新たな感染事例と共に過去に当該ウイルスの感染事例があったかどうかを迅速に調査研究しなければならない。特に、広範に急速な感染の拡大が懸念される場合は迅速な調査研究が求められる。このような場合は、保存されている多数の血液試料を調査研究することが有効な研究手段となる。

1993年に米国南西部全域で健康な若者達が肺炎症状の疾患で次々と不可解な死を遂げ始めた。この数ヶ月以内に、病原体としてハンタウイルスが特定され、不可解な疾病の原因が究明され、解決に導かれた。

5. 保存生体試料の活用 その3

- 保存された生体試料の目的

3) 脳研究；

脳や中枢神経系の疾患のような人間がもつ特徴的な行動を指標とする疾患に関する研究を行う場合、疾患モデル動物などを活用することが困難な場合が多い。また、脳の場合、生体試料の提供が得にくい場合が多い。

脳バンクはこうした問題点を解決する有効な方法のひとつである。

5. 保存生体試料の活用 その4

- 保存された生体試料の目的

4) 長期疫学研究(コホート研究)；

コホート研究にはベースライン調査時に血液標本を採取し、長期に保存することを目的に加えている研究が多くある。この研究での生体試料の保存の目的は以下のとおりである。

- ①将来の新たな候補危険因子の測定準備
- ②精度管理(縦断的精度、横断的精度)

5. 保存生体試料の活用 その5

- 保存された生体試料の目的

5) 人由来生体試料バンク(DNAバンク等) ;

疾患関連遺伝子、たんぱく質などの探索、あるいは医学研究結果の再現性の確認などを目的として、不特定多数の研究機関へ厚生に試料を分配することを業務として設立されている。

わが国においては、「オーダーメイド医療実現化プロジェクト」でのバイオバンクなどがある。また、イギリスの

UK Human Genome Mapping Project Resource Centre
などが知られている。

5. 保存生体試料の活用 その6

- コホート研究における保存生体試料の活用

コホート内症例対照研究

(nested case control study) :

追跡中のコホート内に発生した患者を症例とし、対照が症例と同じコホートから選択されるが、その選択が症例の発症後に行われる症例対照研究。

保存しておいた血液検体などを測定して「症例」と「対照」を比較する(例えば、胃がん患者と健康人で血清ビタミンの値を比べる)時などにこの方法が使われる。

5. 保存生体試料の活用 その7

コホート内症例対照研究の利点

- 1) 対照群と症例群の生存時間のバランスがとれるなど、多くの交絡因子が除去される。
- 2) コホートの対象者全員分を分析すると費用がかかるが、「症例」と「対照」として選んだ者の分だけ进行分析すれば、安価に研究ができる。

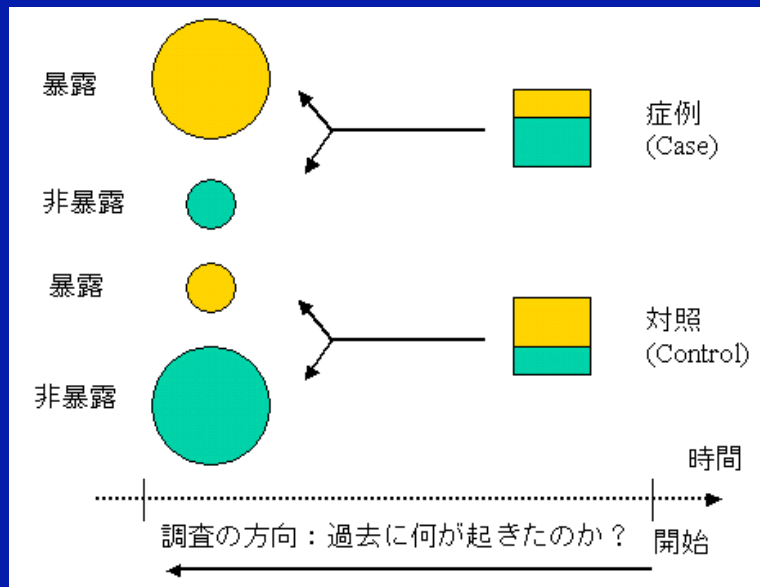
5. 保存生体試料の活用 その8

コホート内症例対照研究の方法

例題)「喫煙すると肺癌が起こりやすくなるのか？」という命題を検証する。

- ①まず、既に発症しているなどOutcome が発生している(肺癌患者)を集め、これを「症例」とする。
- ②次に、Outcome が発生していない(肺癌がない)が、年齢、性別、既往歴など、それ以外の背景因子が「症例」と似ている患者を集め、これを「対照」とする。
- ③「症例」と「対照」のそれぞれについて、検証したい曝露因子(喫煙)があったか否かを調査・測定する。
- ④「症例」と「対照」の曝露因子を持つ多寡により、曝露因子(喫煙)と Outcome(肺癌)の間に関連性があるかどうか、推定する。

5. 保存生体試料の活用 その9



オッズ比 (Odds Ratio)

喫食群の発症オッズと
非喫食群の発症オッズの比

$$\text{発症オッズ比} = \frac{\frac{a/a+b}{b/a+b}}{\frac{c/c+d}{d/c+d}} = \frac{ad}{bc}$$

症例対照研究では発症オッズ比は計算できない

5. 保存生体試料の活用 その9

コホート内症例対照研究の実例をみてみよう。
添付資料を参照

例) ヘリコバクターピロリと胃がんとの関連に関する研究(JPHC)

4. 本学における生体試料の管理システム その5

ヒューマンサンプルリソースセンターを
見に行こう。

同意取得手順書

1. 基本方針

- (1) 国内における以下の各倫理指針および関係法規、および、国際的に標準的とされる研究倫理基準に則る（「疫学研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、滋賀医科大学におけるゲノム倫理審査規定等）。
- (2) 同意取得担当者への事前の倫理的配慮に関する教育・指導を、研究責任者および/または分担研究者が責任をもって行う。
- (3) 十分な事前の説明に基づいて、研究協力者本人からの文書によるインフォームド・コンセントを取得する。繰り返し調査にあたっては、新たに同意を当該時点で取り直す。
- (4) Confidentiality および研究協力者の個人に関する情報の管理を十全に行う。
- (5) 問い合わせ・苦情等に対応する窓口を、滋賀医科大学福祉保健医学部門内に設置するとともに、J-MICC 研究中央事務局および統合研究事務局と連携して対処する。

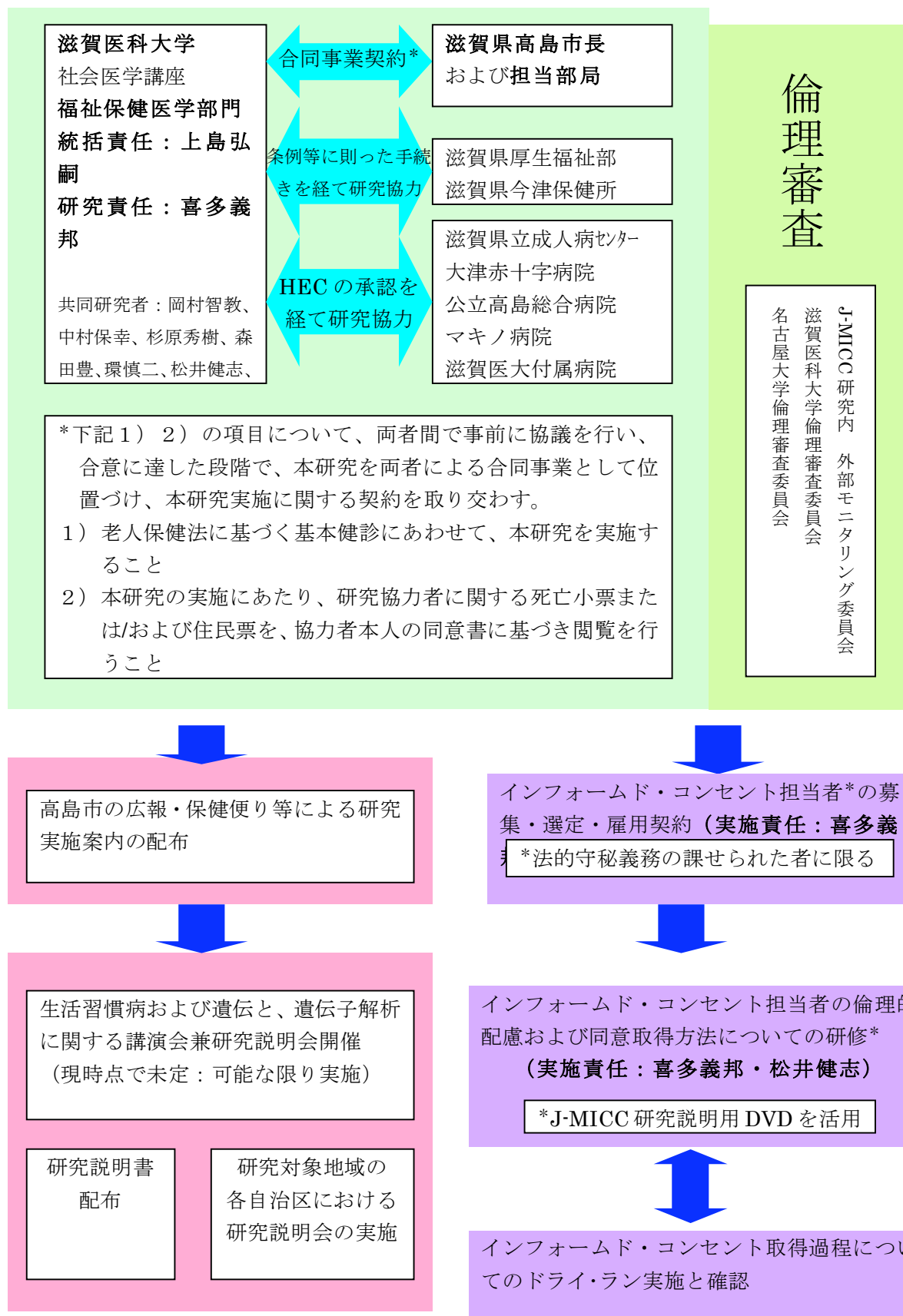
2. インフォームド・コンセント（IC）担当者の選定条件・雇用契約方針

- (1) IC 担当者となる者は、関連法規により守秘義務が課された者（看護師等）に限定する。
- (2) IC 担当者の選定にあたっては、主任研究者 喜多義邦 および 研究補助者 桂田富佐子 が責任をもって行い、滋賀医科大学福祉保健医学分野教授 上島弘嗣と各 IC 担当者が文書により、守秘義務に関する規定を含めた雇用契約を結ぶものとする。雇用契約書の原本は、滋賀医科大学福祉保健医学分野が保管する。
- (3) 研究対象者がリクルートを受ける小地域（旧行政単位上の「町」：（例）旧高島町、旧マキノ町など）に居住する者は、該当小地域における IC 担当者からは外す。
- (4) 原則的に、調査が開始される以前に、すべての IC 担当者の選定・研修を終えるものとする。やむを得ず調査開始以降に新たに IC 担当者を雇用する必要がある場合は、事前の十分な研修を終えた上で IC 担当者としての任に着かせる。
- (5) IC 担当者となった者には、本研究に関する雇用契約が終了した後も、業務上知りえた研究対象者に関する情報を守秘する法的および倫理的義務がある。

3. IC 担当者の研修方法・内容

- (1) 研修にあたっては、主任研究者 喜多義邦が、分担研究者である東京大学大学院医学系研究科医療倫理学分野 松井健志 とともにその任にあたる。
- (2) 主任研究者 喜多義邦、および分担研究者 松井健志による、1) 高島研究の概要に関する説明、2) 研究において理解しておくべき倫理上の配慮等に関する一般的講義、3) 高島研究での IC 手順および各書類の記載方法・取扱い・管理方法に関する説明、4) IC 手順の模擬訓練（ドライラン）、への参加を必須研修項目とする。
- (3) IC 担当者が研修で要求される到達点
 - * 研究対象者への説明を十分に行うことが可能であるレベルまで、高島研究の目的・方法・調査内容・共同研究体制・研究の利益/不利益などを理解しておくこと。
 - * IC の手順、各書類の記載方法
 - * 同意書・アンケート調査票等の取扱い・管理方法

4. 手順のフローチャート





健診・ベースライン調査実施会場において、主任/分担研究者および/または事前に特定された説明者が、口頭による研究説明*を実施。

*小規模集団を一単位として説明を行う

*説明を聞き終わった集団から順次、高島市による健診の問診、本研究のインフォームド・コンセント交渉へと進む

<口頭説明において説明すべき必須項目>

1. 本研究の目的および健診とは別個の「研究」である旨
2. 調査の内容：質問票・健診結果の利用・血液と遺伝子試料の採取/分析/保存・再調査・追跡調査（住民票/死亡小票の閲覧、がん登録・健康保険診療に基づく病名の閲覧、診療録閲覧）
3. 個人情報の管理方法：連結可能匿名化環境下での管理
4. 研究による利益：金銭的利益が無い旨、診療上重要な結果については原則返却する旨
5. 研究による不利益：情報の盗難・漏洩の危険、遺伝的体質を知ることによる精神的ストレスの可能性
6. 研究参加の自由
7. 同意撤回の自由
8. 共同研究の実施：J-MICC 研究、統合研究、および不特定な将来の新たな研究との共同（資料・試料の提供）の旨



「事前確認事項」各項目について、インフォームド・コンセント担当者が個別面接式で確認*を行い、確認終了後に、各該当欄に担当者の署名等を記入する。

*＜確認の目的＞

1. 研究対象者の研究についての理解を確認・評価する
2. 理解が不十分な対象者に対して、再度、インフォームド・コンセント担当者による口頭説明を行うことを可能にする

同意確認文書（「ご協力意思の確認」）*により、研究対象者が研究への参加・不参加を選択し、対象者本人の署名をもって表明する[†]。

*同意確認文書は、複写式2枚綴りとする。

[†]本研究では、原則的に代筆は認めない。やむを得ず代筆を研究対象者が希望する場合は、インフォームド・コンセント担当者が対象者本人に代わり、本人の確認のもとで、各同意項目についての可否を記入することは認めるが、署名に関しては、必ず本人による署名を必要とする。本人が署名をすることが不可能な場合は、その者を対象者から除外する。

同意撤回文書（「研究協力の取り消し請求書」）*をすべての研究参加者に、使用方法・手続きの説明とともに手渡す。

*同意撤回文書は
複写式4枚綴り

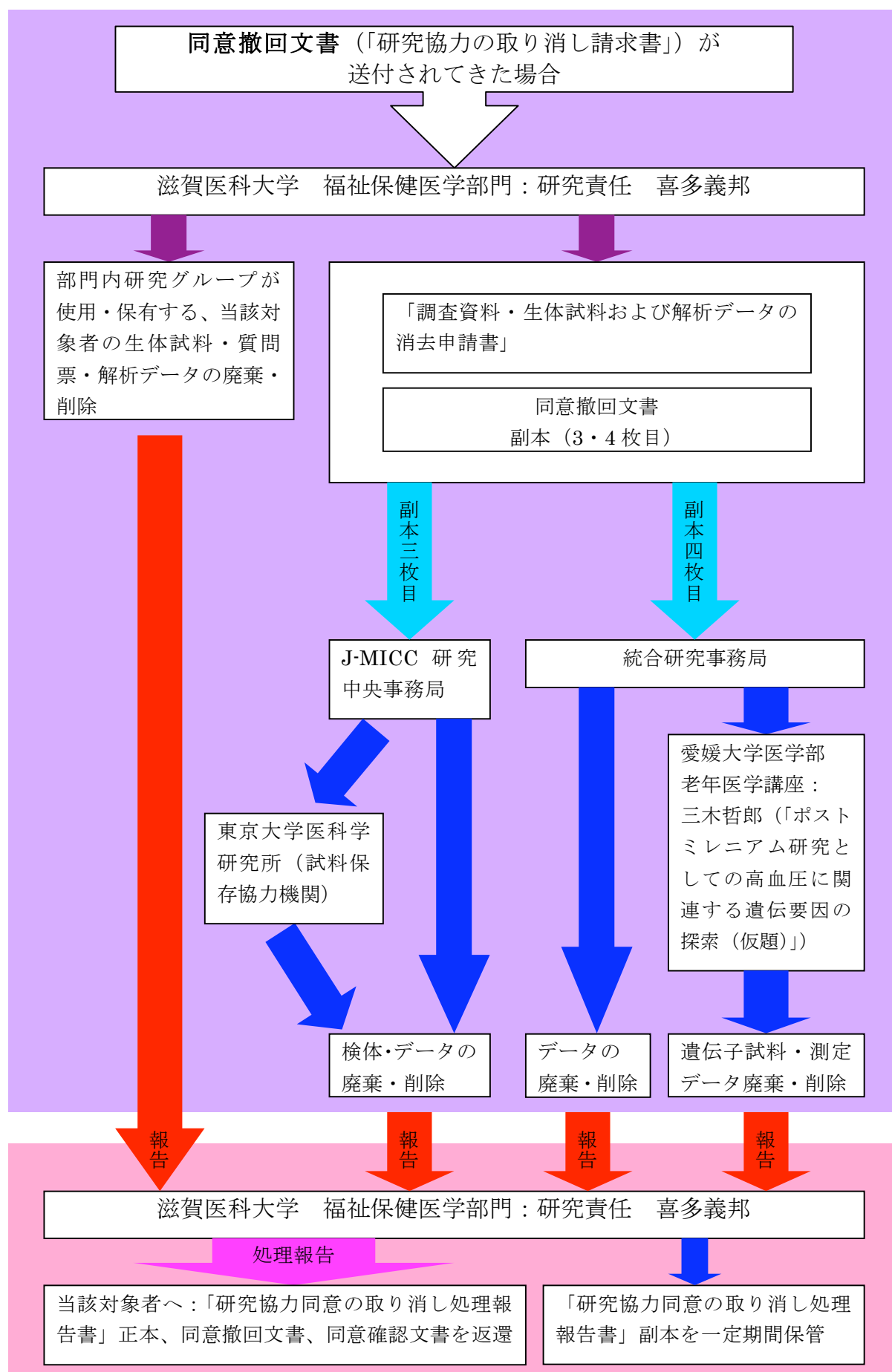
同意確認文書（右下欄）の研究者使用欄および健診者 ID 番号欄に、所定のコード番号シール等を貼付（もしくは番号等を記入または押印）

副本（2枚目）を、すべての研究対象者に手渡す。

正本（1枚目）は即回収し、所定の責任者が一括管理・保管。

滋賀医科大学福祉保健医学部門内の所定の保管空間に施錠保管

研究参加者は、研究用採血・健診へすすむ。
研究不参加者は、健診へすすむ。



滋賀県における生活習慣病の発症要因に 関するコホート研究 研究計画書

Protocol of a Cohort Study for Risk Factors of
Cerebro-cardiovascular Diseases and Cancer in Shiga

--- Takashima Study ---

滋賀医科大学社会医学講座福祉保健医学部門

統括研究者 上島 弘嗣

研究代表者 喜多 義邦

合同事業者 滋賀県高島市

(共同研究)

公益信託 日本動脈硬化予防研究基金による統合研究

文部科学省特定領域研究 日本多施設共同コホート研究

平成 18 年 3 月

1. 研究計画の概要

「滋賀県における生活習慣病の発症要因に関するコホート研究」(Cohort study for a risk factors of cerebro-cardiovascular diseases and cancer in Shiga: Takashima Study) は、本研究計画に基づき、滋賀県高島市との研究協力・合同事業として同市地域住民を研究対象者として実施する、生活習慣病（循環器疾患、糖尿病、高齢者認知症、悪性新生物など：詳細は p. 7 : 2-2 を参照）の危険要因の分析とこれら疾患の発症前診断法の開発を目的とする疫学コホート研究である。

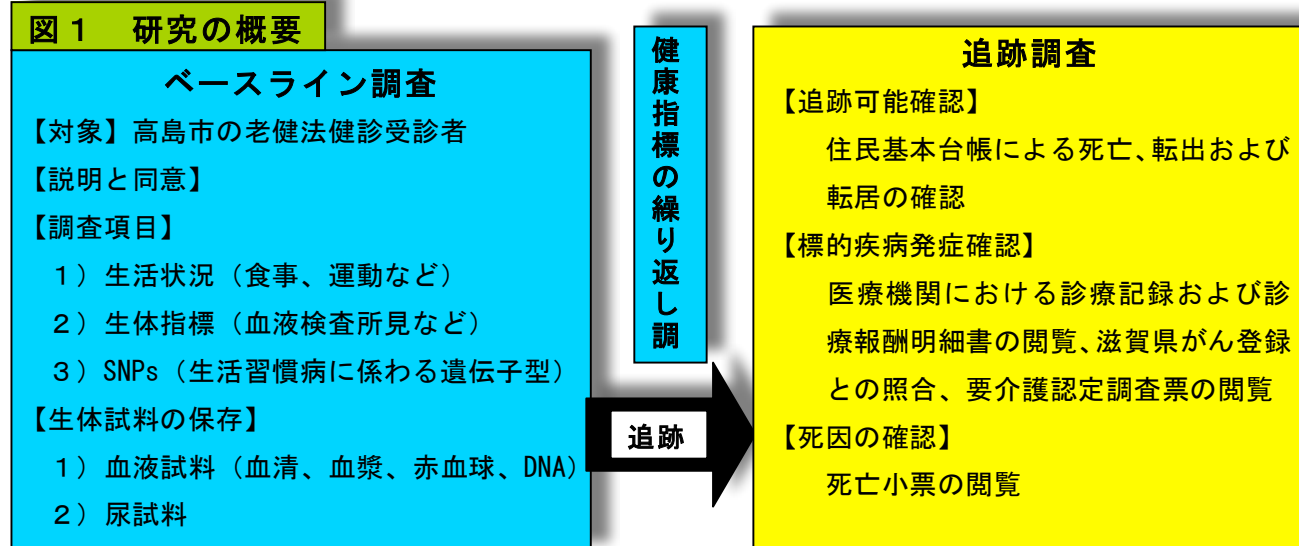
研究協力者の基準、質問票調査の内容、血液検体採取方法、追跡方法は本研究計画書および各実施手順書に従って実施する。

また、本研究は、1) 公益信託日本動脈硬化予防研究基金（運営委員長：矢崎義雄）による国内共同研究「統合研究：JALS (Japan Arteriosclerosis Longitudinal Study)；委員長 滋賀医科大学社会医学講座福祉保健医学部門教授 上島弘嗣」および統合研究の中で実施する文部科学省特定領域研究「ポスト・ミレニアム研究としての高血圧に関連する遺伝要因の探索（仮題）」（主任研究者：愛媛大学医学部老年医学講座教授 三木哲郎）と共同研究を実施するとともに、2) 文部科学省特定領域研究「分子疫学コホート研究の支援に関する研究」班による「日本多施設共同コホート研究：J-MICC 研究 (Japan Multi-Institutional Collaborative Cohort Study)」（主任研究者：名古屋大学大学院医学系研究科予防医学／医学推計・判断学教授 浜島信之）と共同研究を実施し、全国的な規模で研究を行うことにより、より詳細な危険因子の把握を行う。なお、「統合研究：JALS」（但し「ポスト・ミレニアム研究としての高血圧に関連する遺伝要因の探索（仮題）」主任研究者：三木哲郎 愛媛大学医学部老年医学講座教授、を含む）は主に循環器疾患の危険要因の検討を、また「日本多施設共同コホート研究：J-MICC 研究」は主に悪性新生物の危険要因と発症前診断に関する研究を任務としている。

本研究は、研究の開始から追跡までのすべての実務において調査対象地域である滋賀県高島市の協力無くして実施することは不可能である。したがって、本研究の計画段階から高島市担当部局と協議し、最終的に高島市と本研究の統括研究者との間で、研究協力・合同事業に関する正式な契約を交わした上で実施する。

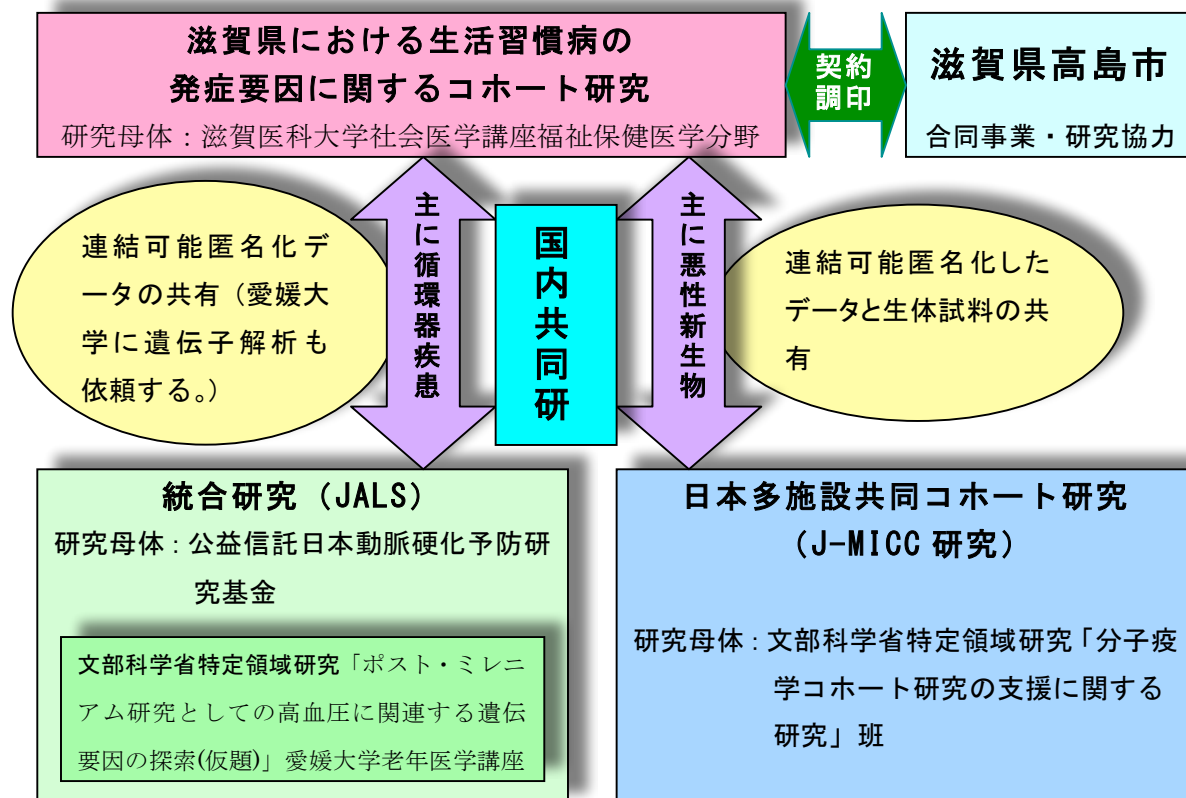
本研究は、図1に示すように、ベースライン調査を出発として、約3年～5年に1回の再調査を経て追跡を行うものである。

図1 研究の概要



ベースライン調査は、高島市住民で老人保健法基本健診受診者のうち研究に対する同意が得られたものを対象として、生活習慣、生体指標、生体試料（血清・血漿・赤血球成分、遺伝子試料、尿試料）を収集する。再調査も遺伝子試料を除いて同様の調査を行う。追跡は、研究協力者の生存、死亡、転出および転居を把握するとともに、本研究の標的疾患である脳卒中、心筋梗塞、突然死、心不全、糖尿病、腎疾患、高齢者認知症、悪性新生物全般の発症および死亡を把握する。

図 2 研究組



なお、高島市における本研究の実施状況は、2002年に旧安曇川町（現高島市安曇川町）旧新旭町（現高島市新旭町）、2003年に旧高島町（現高島市高島）、旧マキノ町（現高島市マキノ町）においてすでに実施されている。これら既調査地域におけるベースライン調査は、公益信託 日本動脈硬化予防研究基金による統合研究で定められた研究計画に従って実施されたものであり、主に循環器疾患の危険要因の分析に供する目的で実施されたものである。2006年以降のベースライン調査は上記の「統合研究」の研究計画および文部科学省特定領域研究日本多施設共同コホート研究で定められた研究計画を併せ持つ計画で実施する。

1-1. 目的

環境要因は遺伝的背景と密接に関連しながら生体に変化を引き起こし、疾病の発症に影響を及ぼす。本研究は、こうした環境要因（生活状況、生体指標など）と遺伝的背景（遺伝子型）をあらかじめ測定し、その後発生する生活習慣病の発症と死亡とを関連付け、疾病発症の危険要因を探索的に明らかにし、さらに日常生活動作能力、認知力、介

護度とも関連付けることによって、生活習慣病の予防対策、身体機能や認知機能の低下予防に必要な戦略とその根拠を提供することを主たる目的とする。

また、本研究では、疾病発症前の生体試料を保存することを計画している。このことによって、標的疾病の罹患に先行して変動する生体指標を探索的に検討することが可能となり、発症前診断の開発を目的とした研究も併せて実施する。

図3 研究の成果

【ベースライン調査成績】

- 1) 生活習慣と生体指標との相互作用に関する検討
- 2) 遺伝子型と生体指標の相互作用に関する検討
- 3) 生活習慣、生体指標と遺伝子型の相互作用に関する検討
- 4) 生体指標の変動に關与する遺伝子型の探索的検討

【健康指標の再調査】

- 1) 生活習慣の変化が生体指標に及ぼす影響
- 2) 生体指標に変化をもたらす遺伝子型の探索的検討
- 3) 生体指標の変化に及ぼす生活習慣と遺伝子型の相互作用に関する検討

【追跡研究】

- 1) 循環器疾患・悪性新生物の発症・死亡の危険因子の検討
- 2) その他の生活習慣病(糖尿病、高齢者認知症など)の発症・死亡と身体機能・認知機能低下の危険因子の検討
- 3) 早期発症症例の生体指標の探索的検討による発症前診断の検討

本研究は生活習慣病の危険要因をあきらかにすることを目的とするものであり、したがって、その成果は生活習慣病を有効に予防しうる戦略を提供する。本研究では、こうした成果を単に学術研究の成果として公表するだけではなく、各研究段階において作成される成績、および開発された予防方法を受診者全員、研究協力者全員、高島市関連部局および国民に対して広く還元することを基本姿勢とする。具体的な還元すべき事項については、インフォームド・コンセントの範囲内で、逐次関係者および関係機関と協議し計画実行する。なお、現計画時点で想定される具体的な還元の内容については図4に示す。

なお、本研究が参加する国内共同研究の成果還元については各共同研究の方針に従う。

図4 成果の還元

研究協力者への還元

- 1) 血液生化学検査成績の返却(HbA1c、hsCRP、BNP など)
- 2) 理学所見の返却(ABI、腹囲 など)
- 3) 上記を組み合わせた現時点で明らかにされている循環器疾患のリスク評価の提示
- 4) 高リスク者に対する健康教育の実施

高島市民への還元

- 1) ベースライン調査成績を用いた高島市民の健康度の評価
- 2) 生活習慣病の新たな危険要因の公表
- 3) 生活習慣病に関する知識の周知
- 4) 生活習慣病を予防するための知識の周知

高島市担当部局への還元

- 1) ベースライン調査成績を用いた地区診断の提示
- 2) 地区診断技術に関する知識の提供
- 3) 生活習慣病に関する知識の提供
- 4) 生活習慣病予防の健康教育の方法論の提供
- 5) 公衆衛生施策立案と実施に対する助言と協力

1－2．研究協力者

滋賀県高島市に在住し、同市が実施する老人保健法基本健診を受診し、かつ、「滋賀県における生活習慣病の発症要因に関するコホート研究説明書」により本研究の主旨、方法、利益と不利益を理解した上で、本研究で使用される「滋賀県における生活習慣病の発症要因に関するコホート研究同意確認文書」に自筆をもって参加の意思を表明した受診者を本研究の研究協力者とする。

なお、研究計画の概要で示した国内共同研究の対象者は、本研究協力者のうち、上述の「同意確認文書」の当該共同研究参加の同意の項目において参加の意思が確認された者をそれぞれの研究協力者とする。

1－3．ベースライン調査

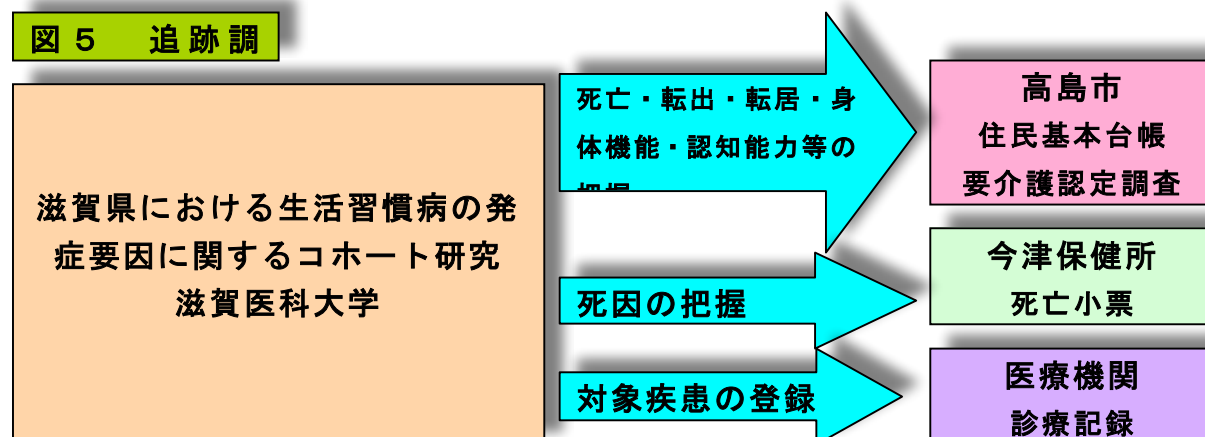
ベースライン調査では、生活習慣および健康状態に関する自記式質問票調査と血液検査、尿検査、理学検査を行う。質問票調査の概要および血液検査、尿検査、理学検査の概要は後述する。また、同時に、将来の新規検査および遺伝子型の探索的測定を想定して保存用血液を採取し、血清、血漿、DNA 採取用バフィーコート、赤血球に分離した上で保存する。生体試料の分離分注の方法に関する詳細は「生体試料収集・処理・保管手順書」にしたがって行う。また、保存期間については後述する。

1－4．繰り返し調査

生活歴の変化および生体指標の変化を調べるために、ベースライン調査から約3年～5年の間隔で、ベースライン調査時と同一の質問紙調査および検査を複数回実施する。但し、遺伝子解析用試料の採取は行わない。また、繰り返し調査については、ベースライン調査時に説明し、同意を得るが、繰り返し調査に際しては再度、本研究の説明を行い同意を得ることとする。なお、繰り返し調査に際して本研究の枠内で新たな調査項目もしくは研究項目が追加された場合には、統括研究者、主任研究者および高島市担当部局とあらかじめ協議し合意が得られた項目について、滋賀医科大学倫理委員会に追加研究として申請した上で調査を実施する。

1－5．追跡調査

研究協力者に対する追跡調査は、死亡および転出の確認、標的疾病の発症および死因の特定の3層からなる。



1-5-1. 死亡、転出および転居

死亡、転出および転居の確認は、本研究の研究者台帳に収録されている研究協力者の氏名、生年月日および住所を基に高島市の住民基本台帳と照合し、該当する研究協力者の毎年12月31日現在までの死亡、転出および転居について死亡の有無、死亡年月日、転出の有無、転出年月日、転出先住所、転居の有無、転居年月日、転居先住所を特定し、高島市から情報の提供を受ける。調査対象地域から転出した者はその時点で観察打ち切りとする。高島市からの住民基本台帳の情報提供については、事前に本統括研究者と高島市長との間で取り交わす本研究の実施に関する契約書にその旨を標記する。

1-5-2. 身体機能、認知機能および介護度

身体機能、認知機能および介護度の確認は、研究協力者の氏名、生年月日および住所をもとに高島市の介護保険法に基づく要介護度認定調査票を閲覧転記し、該当する研究協力者の日常生活動作能力、認知機能に関する調査項目、および認定された介護度等の情報を得る。調査対象地域から転出した者はその時点で観察打ち切りとする。介護保険法に基づく要介護認定調査票の閲覧および転記の実施については事前に本統括研究者と高島市長との間で取り交わす本研究の実施に関する契約書にその旨を標記する。

1-5-3. 対象疾病の発症

本研究が把握すべき疾病は循環器疾患として脳卒中（脳梗塞、脳出血、くも膜下出血）、心筋梗塞および24時間以内の内因性急性死であり、悪性新生物（前がん病変を含む）については全部位の悪性新生物とする。また、その他の生活習慣病として、糖尿病、心不全、高齢者認知症も検討の対象とする。疾病発症の把握は、受診先医療機関における調査対象者の診療記録を閲覧することによって行う。また、悪性新生物の把握については滋賀県がん登録の協力のもとに研究協力者との照合を行い、該当する症例を登録する。

1-5-4. 死因

研究協力者のうち死亡者については今津保健所に保管される死亡小票との照合を行い、死因を特定する。なお、死亡小票の閲覧は総務省の指定統計（人口動態統計）目的外使用の承認を得た上で実施する。

1-6. 研究の精度管理

本研究は、研究の倫理審査手順、研究参加同意手順、生体試料採取手順、生活状況調査手順、生体試料保存手順、検査結果・助言の返却、追跡調査手順、個人情報取り扱い手順およびデータ管理手順を「統合研究」および「日本多施設共同コホート研究」の両研究計画書および各種取り扱い手順書に準拠して行い、研究の精度を均一に維持する。

1-7. 社会的・倫理的事項

本研究の統括研究者以下研究に携わるすべての研究者および研究補助者は、研究協力者の研究参加に伴う危険・不利益から可能な限り保護するために、関係する法令および

指針を遵守し、一定の基準に基づくインフォームド・コンセントの取得、同意撤回の機会の保障、個人情報の保護に努める。また、本研究は、「日本多施設共同コホート研究：J-MICC 研究」のモニタリング委員会および外部評価委員会により研究進捗状況のモニタリングと監査を適宜受けるとともに、本研究の実施に協力する高島市担当部局、医療機関および滋賀県担当部局に適宜進捗状況を報告し、研究の適正化と透明性を確保する。

1－8．進捗状況と研究成果の公表

本研究の進捗状況と研究成果は科学論文誌、研究関連報告書、高島市広報、インターネット等を通して定期的に公表し、研究協力者および国民の理解を得るよう努める。

2．研究計画の詳細

2－1．研究目的

本研究の主要な目的は以下のとおりである。

1) 疾病リスクの総合評価：

生活習慣病の発症、死亡、身体機能低下、認知能力低下および介護度上昇のリスクを環境要因と宿主要因の両者から検討すると共に、その交互作用を明らかにする。(追跡調査)

2) 前臨床的疾患状態の把握：

研究対象のすべての生活習慣病の発生・死亡に先行して変動する生体指標（特に前臨床的がん状態を反映する生体指標）を探索確認する。(発病前診断研究)

3) 生体指標に関連する生活習慣と遺伝子型の探索：

研究開始時に収集された生活習慣、遺伝子型、血液などから得られる生体指標の間の関連を調べ、生体指標に対する生活習慣と遺伝子型との交互作用を探索する。(横断調査)

ベースライン調査時点から約3～5年ごとに複数回実施する繰り返し調査は、生活習慣、生体指標の変化が、生活習慣病発症、死亡、身体機能の低下、認知能力の低下、介護度の上昇とどのように関連するのかを検討する目的（追跡調査）と、2時点にて生体指標を収集することにより発病のどの程度前から発病前の変化が生じるかについての情報を得る目的（発病前診断研究）で実施する。また、生体指標に関連する生活習慣と遺伝子型の関連を確認する（横断調査）。

多くのコホート研究と同様、本研究でも収集された情報および測定予定の情報（付録1に列記された項目）のすべての組み合わせについての関連を解析の対象とする。これには、追跡調査により得られたデータを加えての関連測定のみならず、ベースライン調査時の情報に基づいた横断的な項目間の関連性の検討も含む。また、要因と結果（中間指標、疾病発生、死亡など）との関連の検討のみならず、その関連の強さを修飾する要因の探索、疾病発生リスクを上昇低下させる要因の組み合わせの探索もこの研究の目的に含まれる。

本研究により生活習慣・遺伝子型・生体指標と疾病との関連の多くを明らかにするこ

とができる。その結果、生活習慣病発症、死亡、身体機能の低下、認知能力の低下および介護度上昇のリスクを規定する遺伝的要因、その他の宿主要因、環境要因に基づいて、以下のような個人に対応した疾病発生・死亡のリスク評価システムの構築が可能となる。

- 1) 免疫関連遺伝子多型の遺伝子型に基づく疾病高危険群の特定と、感染・炎症などによるリスク変動の評価
- 2) 薬物・ホルモン代謝およびDNA修復遺伝子の多型に基づく疾病高危険群の特定と喫煙や食習慣によるリスク変動の評価
- 3) 前がん病変（萎縮性胃炎、慢性肝炎など）を持つ高危険群のがん発病リスクの遺伝・環境要因に基づく個別評価
- 4) 生活習慣の変化に伴う生体指標の変動と疾病リスクとの関係、およびそれに及ぼす遺伝的要因の解明

本研究で構築された評価システムは、多様な宿主状態に応じた生活習慣是正（禁煙、適量の飲酒、運動の習慣化、体重の適正化、バランスのとれた食事など）による疾病予防対策の根拠を与えるものとなる。

2-2. 研究対象となる疾患と関連病態

本研究が研究対象とする疾病は、脳卒中（脳梗塞、脳出血、くも膜下出血）、心筋梗塞、24時間以内の内因性の突然死、全部位の悪性新生物である。また、研究対象疾患の関連病態として、前がん病変、動脈硬化性疾患、高齢者認知症、高血圧症、糖尿病、耐糖能異常、肥満、高脂血症、高尿酸血症、肝疾患、胆のう・胆管疾患、腎疾患、呼吸器疾患、血液疾患、骨粗しょう症についても可能な限り把握する。研究対象とする死因はICD10の中分類で定義される全死因とする。健診で収集された生体指標も研究対象とする。

2-3. 個人情報管理者／データ管理責任者（平成18年3月時点）

本研究において、データの匿名化およびデータの安全管理監督を任務とする個人情報管理者は、滋賀医科大学医療情報部教授 永田啓 がこれに当たる。また、データ管理責任者は、本研究の主任研究者である滋賀医科大学社会医学講座福祉保健医学部門講師 喜多義邦がこれに当たる。

2-4. 共同研究機関

以下の研究機関および組織は本研究と共同研究を実施する機関または組織である。さらに本研究の統括研究者以下の共同研究者の検討にもとづき、さらに高島市関連部局、協力医療機関および滋賀県関連部局の承諾を得たうえであらたな共同研究機関および組織を加えることがある。また、原計画に記載のない共同研究を新たに計画し実施する場合は、滋賀医科大学の倫理審査を受けなくてはならない。

- 1) 公益信託日本動脈硬化予防研究基金（運営委員長：矢崎義雄）による国内共同研究「統合研究：JALS (Japan Arteriosclerosis Longitudinal Study)」(委員長：上島弘嗣 滋賀医科大学社会医学講座福祉保健医学部門 教授) (ただし「統合研究：JALS」の中

で実施する文部科学省特定領域研究「ポスト・ミレニアム研究としての高血圧に関連する遺伝要因の探索（仮題）」（主任研究者：三木哲郎 愛媛大学医学部老年医学講座 教授）を含む）

2) 文部科学省特定領域研究「分子疫学コホート研究の支援に関する研究」班による「日本多施設共同コホート研究：J-MICC 研究(Japan Multi-Institutional Collaborative Cohort Study)」(主任研究者：浜島信之 名古屋大学大学院医学系研究科予防医学／医学推計・判断学 教授)

2－5．研究対象者および研究協力者

2－5－1．対象集団

本研究の研究対象者は、滋賀県高島市住民とする。

2－5－2．適格基準

研究対象者の適格基準は以下の通りとする。

- (1) 滋賀県高島市の住民基本台帳に登録されている者
- (2) 滋賀県高島市が実施する老人保健法に基づく基本健診を受診した者

研究対象者のうち、本研究におけるインフォームド・コンセント手続きにおいて、「滋賀県における生活習慣病の発症要因に関するコホート研究同意確認文書」に自筆署名をもって協力を表明した者を、本研究の研究協力者とする。

2－5－3．除外基準

本研究対象者の除外基準は以下の通りとする。

- (1) インフォームド・コンセント手続きを経していないもの
- (2) 「同意確認文書」に自筆による署名の得られないもの
- (3) 質問票への記入が困難であり且つ質問票項目の聞き取りによる調査も困難なもの

ただし、共同研究への情報・データ・生体試料等の提供にあたっては、本研究協力者のうちから、各共同研究が定める除外基準に従い、その除外基準を満たす研究協力者に関するもののみをそれぞれの共同研究に提供するものとする。

2－6．ベースライン調査

2－6－1．実施時期

ベースライン調査は以下に示す計画に沿って実施する。

2006年	高島市朽木村	：「統合研究」「J-MICC 研究」とともに初回調査
2007年	高島市今津町	：「統合研究」「J-MICC 研究」とともに初回調査
2008年	高島市安曇川町・新旭町	：「J-MICC 研究」として初回調査
2009年	高島市マキノ町・高島地区	：「J-MICC 研究」として初回調査

2010年	研究成果の評価と公表および研究の見直し	
2011年	高島市朽木村	: 繰り返し調査
2012年	高島市今津町	: 繰り返し調査
2013年	高島市安曇川町・新旭町	: 繰り返し調査
2014年	高島市マキノ町・高島地区	: 繰り返し調査

なお、繰り返し調査の実施地区および実施時期については適宜高島市と協議のうえ決定・変更する。

2-6-2. 質問票調査

本研究では「統合研究」および「J-MICC 研究」でそれぞれ用いられる質問票を統合した「滋賀県における生活習慣病の発症要因に関するコホート研究」調査票を用いる。本調査票は、「統合研究」の統一問診（既往歴、現在の罹患状況、家族歴）と食生活および日常の活動状況と、「J-MICC 研究」の同様の問診項目のいずれに対しても満足するように作成したものである。

2-6-3. 生体試料の収集

生体試料の収集は、「生体試料収集・処理・保管手順書」で定めた手順により実施する。本研究で収集する生体試料は、DNA、血漿、血清、赤血球および尿とする。収集した生体試料は一定期間内に分注し、滋賀医科大学社会医学講座福祉保健医学部門に本研究の目的遂行のために管理保存する。またこれらのうち DNA を含む遺伝子解析用試料は、遺伝子測定の際に、連結可能匿名化された状態で「統合研究」内の愛媛大学老年医学講座（三木哲郎）に測定を依頼する。なお、分注保管された生体試料のうち、「J-MICC 研究」計画書において定められた必要量を「J-MICC 研究」の中央事務局（名古屋大学）に供出し、当該共同研究の目的遂行のために管理保存される。

2-6-4. 検査項目

ベースライン調査において収集する研究協力者の個人識別情報（氏名、住所、電話番号）に加えて検査項目は以下の通りである。（ただし、検査項目は高島市で実施する老人保健法基本健診として行われるものと、本研究のための追加分として実施されるものとを区分して示す。）なお、本研究では、この計画書内（付録 1）で記述された項目（以下に記載された 2-6-4-1 および 2-6-4-2 内の項目を含む）のすべての組合せを解析対象とする。

2-6-4-1. 高島市が実施する老人基本健診検査項目および研究協力者情報

受診年月日、受診番号、検体番号、生年月日、性別、既往歴、通院歴、服薬状況、家族歴、自覚症状、食習慣、喫煙状況、飲酒状況、身長、体重、血圧（自動血圧計による 2 回測定）、尿検査成績（尿淡白、尿糖、尿潜血、ウロビリルン）、血球検査、血液化学検査成績（GOT、GPT、 γ -GTP、総コレステロール、HDL コレステロール、LDL コレステロール、

中性脂肪、クレアチニン、尿酸、HbA1c、血糖、ALP、BUN)、採血時食後時間、心電図所見、眼底検査

2-6-4-2. 本研究が実施する追加検査

本研究に協力を表明した研究協力者に対し、足関節上腕血圧比および脈波伝播速度 (ABI・PWV)、腹囲、尿検査 (Na、K、クレアチニン)、血液検査 (インスリン、高感度 CRP、BNP、HbA1c) を追加実施する。

なお、ABI・PWV、尿検査 (Na、K、クレアチニン)、血液検査 (HbA1c) については、研究協力者だけでなく希望する受診者全員に測定する。また、HbA1c の測定は老人保健法基本健診で定められている測定要件を満たさない受診者を本研究で網羅する。

2-6-4-3. 本研究が実施する追加検査結果の受診者への還元

本研究で実施する追加検査の結果のうち、ABI・PWV、尿検査 (Na、K、クレアチニン)、HbA1c の結果は評価をつけた上で受検者全員に対して高島市が実施する結果返しに併せて返却する。さらに、研究協力者に対しては、ABI・PWV、尿検査 (Na、K、クレアチニン)、腹囲 (メタボリック・シンドロームの指標)、血液検査 (インスリン、高感度 CRP、BNP、HbA1c) の結果を、高島市が実施する結果返しに併せて返却する。

2-7. 繰り返し調査

2-7-1. 対象者

繰り返し調査の対象者は、ベースライン時の研究協力者のうち、繰り返し調査実施時点までに死亡または高島市外へ転出していない者とする。

2-7-2. 実施時期

繰り返し調査はベースライン調査時点から約 3~5 年 (6 年未満) 毎に実施する。ベースライン調査時点からの間隔を一定にするため、同一調査地区内でも研究協力者により繰り返し調査時期を変えるなどの工夫を行うこととする。

2-7-3. 質問票調査

繰り返し調査における質問票調査は、ベースライン調査の内容に加え、ベースライン調査以降の本研究対象疾患 (2-2) の罹患の有無および発症年月日とする。ただしベースライン調査時点以降の研究の進展等に伴い、調査内容を変更、追加することがある。

2-7-4. 生体試料の収集

繰り返し調査における生体試料の収集は、原則としてベースライン調査と同一内容とする。ただし遺伝子型決定のための DNA 試料収集は行わない。なお、ベースライン調査時点以降の研究の進展等に伴い、調査内容を変更、追加することがある。

2-7-5. 検査項目

繰り返し調査における検査項目および検査結果の返却内容はベースライン調査と同一とする。なお、ベースライン調査時点以降の研究の進展等に伴い、調査内容を変更、追加することがある。また、その際に追加される検査結果の研究協力者に対する返却については高島市担当部局と協議して決定する。

2-7-6. 繰り返し調査、繰り返し調査の質問票調査、生体試料の収集の詳細

以上の原則に基づき、適宜、2-4に掲げた共同研究機関および高島市と協議した上で繰り返し調査の詳細を決定する。また、質問票調査の詳細を「繰り返し調査 調査実施手順書」（未定）、生体試料の収集の詳細を「繰り返し調査 生体試料収集・処理・保管手順書」（未定）として繰り返し調査実施までに別途定める。

2-8. 追跡調査

2-8-1. 追跡期間

追跡期間はベースライン調査最終時点(2009年)から20年後の2029年末までとする。ただし、主任研究者が必要と認めた場合には2029年末を待たずに追跡調査を中止することがある。また、2014年以降に追跡期間の見直しを行う。

2-8-2. 脱落

研究協力者の高島市外への転出、および住民基本台帳からの職権消除は、追跡における脱落として取り扱う。調査地域への再転入があった場合でも最初に転出した時点で追跡打ち切りとする。なお、市内転居（住所変更）者については、引き続き追跡対象とする。

2-8-3. 情報の収集

(1) 死亡

研究協力者の死亡は高島市の住民基本台帳に基づいて同定する。死因等の死亡に関する情報は、高島市を管轄する今津保健所に管理保管されている死亡小票を閲覧し必要事項を転記収集する。

特定すべき死因はICD10の中分類で示される全死因とする。死因の照合は、まず死亡が確認された調査対象者の死亡年月日、性別、生年月日、住所などの情報をもとに人口動態統計データと照合し事件簿番号を特定する。特定された事件簿番号をもとに今津保健所に保管されている死亡小票を特定し、氏名、生年月日、性別および住所を確認した上で必要事項（事件簿番号、氏名、生年月日、死亡年月日、死亡原因イ～二、死亡場所、発症から死亡までの時間など）を所定の転記用紙に記載する。

死亡小票の閲覧については総務省における指定統計の目的外使用の承認を得た上で実施する。総務省への申請については、「統合研究」事務局が本研究を含めて申請する。

(2) 対象疾患の罹患

研究協力者の疾病発症の把握は、高島市住民の受診行動を検討したうえで、基本的に

受診先医療機関における研究協力者の診療記録を閲覧することによって行う。なお、悪性新生物の罹患情報の収集は、医療機関調査に加えて、滋賀県がん登録事業の協力のもとに研究協力者との照合を行い、該当する症例を特定し、必要事項を収集する。さらに対象疾患の発症の把握の補助的な方法として、高島市における診療報酬明細書および高島市を管轄する今津保健所に保管される死亡小票の閲覧を行い、受診医療機関を特定する。特定した医療機関での診療記録の閲覧を行うことによって研究協力者の発症情報を把握する。

(3) 身体機能、認知能力および介護度

研究協力者の身体機能、認知機能および介護度の把握は、高島市との契約に基づき、まずすべての研究協力者の氏名、性別および生年月日の情報をもとに高島市健康福祉部介護保険課に対象者の照会を行う。この結果、該当する研究協力者について介護保険法に基づく要介護認定調査票を閲覧し、身体機能(麻痺・拘縮、移動、複雑移動、特別介護、身の回り)、認知機能(意思疎通、問題行動)、介護度、要介護認定等基準時間、中間評価項目得点、日常生活自立度の組み合わせ、サービスの利用状況などに関する必要事項を転記する。

(4) 死亡、転出および転居

研究協力者の死亡、転出および転居に関する情報は、高島市との契約に基づき住民基本台帳の閲覧、ならびに住民票・除票の照会などによって実施する。死亡、転出および転居に関する情報は、原則として毎年1月1日～12月31日までに該当する研究協力者の情報の提供を得る。死亡情報の項目は、研究協力者の氏名、性別、生年月日、住所、死亡日とし、また転出および転居情報の項目は、氏名、性別、生年月日、転出および転居の有無、転出および転居先住所とする。

2-8-4. 追跡調査の詳細

以上の原則にもとづき、追跡調査の詳細を「追跡調査手順書」に別途定める。

2-9. 追加研究および新たな共同研究等の実施

2-9-1. 追加研究の実施

この計画書で記述されていない研究項目のうち、生体試料(血清、血漿、赤血球、DNAおよび尿)を用いて新たに研究を追加実施する場合には、滋賀医科大学倫理委員会で審査を受け、その追加研究の内容等について高島市に告知する。また、追加研究の内容を滋賀医科大学社会医学講座福祉保健医学所有のインターネットあるいは研究協力者へのニュースレターで告知する。

なお、2-4に掲げた共同研究における追加研究の手続き等については、各共同研究の計画書に従って行うものとし、追加研究の告知は本研究の告知方法に準拠して実施する。

2-9-2. 新たな共同研究等の実施

本研究で収集した調査資料もしくは生体試料を用いて、本研究の枠を超えて新たな共同研究等を計画し実施する場合は、滋賀医科大学倫理委員会の審査を受けるとともに、あらかじめ本研究の「同意確認文書」において示された研究協力者の同意意思に基づいて当該共同研究等に提供する研究協力者を決定する。また、「同意確認文書」において、当該共同研究等への協力にあたり改めて自ら（または家族）の同意を得るよう意思表示している研究協力者については、個々に同意を改めて得るものとする。さらに、当該共同研究等の内容等について高島市に告知するとともに、滋賀医科大学社会医学講座福祉保健医学所有のインターネットあるいはニュースレターで研究協力者に告知する。

2-10. 統計解析

研究目的に従って、収集されたデータを用いて、統計解析を実施する。主要な研究目的は、1)生活習慣病の発症および死亡のリスク、身体機能の低下、認知能力の低下および介護度上昇のリスクを環境要因と宿主要因の両者から検討すると共に、その交互作用を明らかにすること（追跡調査）、2)循環器疾患や悪性新生物を中心とする生活習慣病の発生・死亡に先行して変動する生体指標を探索確認すること（発病前診断研究）、3)研究開始時に収集された生活習慣、遺伝子型、血液などから得られる生体指標の間の関連を調べ、生体指標に対する生活習慣と遺伝子型との交互作用を探索すること（横断調査）であり、これらのすべてを統計解析の対象とする。主たる仮説が事前に設定可能な場合には、検出力の試算など、統計解析の検証性の担保に留意する。主たる仮説の設定が困難な場合には統計解析を探索的に実施し、統計解析結果の解釈ではその探索性に留意する。

データとしては、質問票調査、検診結果、追跡調査および生体試料の検査から得たすべての情報を使用する。統計解析は必要なデータが揃った段階で速やかに実施する。統計解析の方法としては、データ形式がコホート研究では生存時間解析、コホート内症例・対照研究ではオッズ比に関する解析、症例研究では環境要因と遺伝要因の交互作用の解析、横断研究では要因間の関連性の解析を用いる。ハザード比やオッズ比などのパラメータを想定する場合にはその95%信頼区間の推定および検定によるp値の算定を行い、パラメータを想定しない場合には検定によるp値の算定を行う。性別や年齢などの交絡因子が想定される場合には交絡への対処を実施する。

2-11. 情報の管理・入力・更新

2-11-1. 体制・管理

本研究の個人情報管理者は、本研究の計画・実施に関与しない滋賀医科大学医療情報部教授 永田啓 が任に当たる（平成18年3月現在）。この個人情報管理者は本研究協力者から得られた生体試料等についての匿名化作業と対応表の管理および本研究における個人情報管理全般に対する監督を行う。本研究を管理・運営するうえで必要な入出力・データベース構築・検査結果返却等の作業において個人情報を取り扱う場合は、個人情報管理者の監督のもと、付録2に示した本研究に携わる研究者および本研究の統括研究

者と守秘義務を含む雇用契約を交わした研究補助者がこれを行う。ただし、遺伝子解析研究を実施する前には、主任研究者の依頼に基づき個人情報管理者が本研究における生体試料等の匿名化を済ませておかねばならない。

2-1 1-2. 入力

情報の入力は、本研究の研究者および研究補助者もしくは本研究の統括研究者と契約を交わした一定の要件（個人情報保護の要件を含む）を満たす入力業者に委託する。また、本研究のデータベースの構築およびデータクリーニングは本研究の研究者および研究補助者が行う。

2-4に掲げた共同研究事務局へのデータ供出に関するデータ入力およびデータ形式に関しては各共同研究の計画書に従って行う。

2-1 1-3. データの更新

追跡調査および繰り返し調査の実施による研究協力者情報の更新は、個人情報管理者の監督の下、本研究の研究者および研究補助者が適宜実施する。

更新情報および追加情報の2-4に掲げた共同研究への供出は各共同研究の計画書に従って実施する。

2-1 1-4. 生体試料の検査実施

本研究で収集・保存している生体試料を用いた遺伝子型検査および血液成分・尿成分検査は、2-4に掲げた共同研究中央事務局内、共同研究を構成する所属施設内、共同研究が生体試料を提供する他研究の実施機関内、または委託した検査会社内で実施する。ただし検査に供するにあたっては、検査に供される検体は本研究のデータベースにおいて使用する個人識別番号とは異なる新たな番号を用いて連結可能匿名化を行う。

2-1 1-5. 研究終了後の調査資料・生体試料の扱い

本研究で保管する同意文書・調査資料・生体試料は、追跡終了から20年後に復元不可能な方法で廃棄する（詳細は付録4に示す）。

2-1 1-6. 情報の管理・入力・更新の詳細

以上の原則にもとづき、情報の管理・入力・更新の詳細を「調査実施手順書」に別途定める。

2-1 2. 進捗状況と成果の公表

本研究の進捗状況およびデータの管理状況を高島市関連部局、滋賀県がん登録事業および協力医療機関に年1回報告し、本研究の進捗状況および成果を滋賀医科大学社会医学福祉保健部門が所有するホームページあるいは研究ニューズレター、高島市広報で定期的に公表する。また、本研究の進捗状況、データ管理状況を2-4に掲げた共同研究に報告するとともに、共同研究全体の進捗状況および成果を滋賀医科大学社会医学福祉

保健部門が所有するホームページあるいは研究ニュースレター、高島市広報で定期的に公表する。

本研究の成果は、本研究の統括研究者および主任研究者が本研究の共同研究者(付録2)と協議して論文作成担当者を決定し、内容が重複しないよう調整たうえて論文作成を推進する。成果を公表する際には、研究協力者個人が特定されることや、特定の地域の差別につながることをないよう配慮する。

各共同研究全体の成果の公表については各共同研究計画書に従う。

2-13. 社会的・倫理的事項

2-13-1. 研究協力者の保護

本研究を実施する研究者は、本研究の研究協力者を研究参加に伴う危険・不利益から可能な限り保護する義務を有する。

2-13-2. インフォームド・コンセント

(1) インフォームド・コンセントの実施者

インフォームド・コンセントの実施者は、付録2に掲げた本研究に携わる研究者の他、「同意取得手順書」に定める要件を満たす者とする。またインフォームド・コンセント実施者の研修方法、ならびに本研究の統括研究者との契約内容の基準については、本研究の作成する「同意取得手順書」に別途定める。

(2) ベースライン調査時

研究対象者には、追跡調査・繰り返し調査を含めた調査の全体像について事前に説明を行い、同意は文書で取得する。説明にあたっては、事前に配布する説明文書を主たる説明手段とし、口頭による説明はその補助手段とする。文書による説明と同意取得のために、研究説明文書および同意確認文書を別途作成する。また、口頭による説明では、「同意取得手順書」に別途定めた項目について集団を対象とした説明を行う。ただし、同意確認文書を用いた同意確認の時点では、研究対象者とインフォームド・コンセント実施者が必ず一対一の面接形式で確認を行う。

(3) 繰り返し調査時

繰り返し調査にあたっては、ベースライン調査時点からの倫理指針の変更等、状況の変化を鑑み、あらためて文書と口頭による説明を行い、同意を文書で取得する。説明文書、口頭説明、および同意確認文書の内容については、繰り返し調査の開始までに「繰り返し調査 同意取得手順書」(未定)に定める。

(4) 同意取り消しの機会保障

研究協力者には同意取り消しの機会を保障し、それを担保するため、本研究の事務局に研究協力者等の問い合わせに対応する窓口を常設する。同意取り消しの申請があった場合は、「同意取得手順書」の中で示す同意撤回手順および付録4に示す方法に従い該当する研究協力者の調査資料、生体試料およびデータを直ちに復元不可能な方法で廃棄する。また、直ちにその旨を共同研究事務局に共同研究計画書に基づいて連絡するとともに、廃棄の有無と方法を確認する。

2-13-3. 個人情報の保護

本研究が収集した質問票調査、検診結果、追跡調査情報、生体試料の個人情報は、情報の管理・入力・更新(2-11章)、および「調査実施手順書」に従い、研究協力者に危険・不利益が及ばないよう厳格に管理する。

2-13-4. 法令・指針・研究計画書・手順書の遵守

本研究の実施にあたっては、関係する法令および指針（「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「疫学研究に関する倫理指針」など）、本研究計画書および各種手順書の記載を遵守する。

2-13-5. 倫理審査委員会の承認

本研究計画は滋賀医科大学の倫理審査委員会の承認を受けるものとし、ベースライン調査の開始にあたっては本研究計画書および「同意取得手順書」を、また、繰り返し調査の実施にあたっては、その時点で改訂された本研究計画書および「繰り返し調査 同意取得手順書」(未定)を、それぞれの時点における審査に提出する。本研究計画書および「同意取得手順書」、「繰り返し調査 同意取得手順書」(未定)の変更にも滋賀医科大学倫理審査委員会の承認を必要とする。

追跡調査のうち、診療記録に基づく疾病発症調査の協力を依頼する医療機関(付録2)においても本研究の実施に関する当該医療機関の倫理審査委員会の承認を得る。なお、協力医療機関内に倫理審査委員会が設置されていない場合は、当該医療機関と協議の上、適切な施設における倫理審査委員会の承認を得るものとする。

また、本研究計画書は、「日本多施設共同コホート研究：J-MICC 研究」との共同研究にあたっては、当該共同研究が設置する「研究モニタリング委員会」による監査・モニタリング受けるとともに、「日本多施設共同コホート研究：J-MICC 研究」の主任研究者による承認も受けけるものとする。研究計画の変更に際しても同様に、各共同研究による承認を受けけるものとする。

2-13-6. 生体試料の解析結果

本研究において収集された生体試料のすべての解析結果について、本研究の中で診療上重要と判断される結果に関しては、原則的にすべて必要な助言と共に研究協力者に返却する。遺伝子解析結果についても同様とする。ただし、ある時点において診療上重要かどうか不明な結果については、研究協力者の希望が文書により提示された場合を除いて、返却は行わない。また、生体試料の遺伝子解析結果を含むすべての解析結果の返却に対する研究協力者の意思を、ベースライン調査時のインフォームド・コンセント手続きの中で確認する。

また、本研究が参加する共同研究が共同で実施する生体試料の解析に関して、その解析結果を返却するかどうかの判断については、本研究計画書ではなく、各共同研究が別途定める研究計画書に従う。

2-13-7. 手順書作成

ベースライン調査の開始までに、インフォームド・コンセントの手順については「同意取得手順書」に定めるとともに、個人情報の保護を含めた調査実施の手順を「調査実施手順書」に定める。また、繰り返し調査の開始までに、同様に「繰り返し調査 同意取得手順書」「繰り返し調査 調査実施手順書」を定める。

2-13-8. モニタリング・監査

2-13-8-1. 目的

モニタリング・監査の目的は、研究計画を遵守して本研究が適正に実施されていることを定期的に確認・保証することである。

2-13-8-2. 実施組織

本研究の個人情報の適正な管理運営状況のモニタリング・監査は、本研究の個人情報管理者が随時行う。また、「J-MICC 研究」との共同研究にあたっては、「J-MICC 研究」の研究計画書に基づいて実施されるモニタリング・監査をうける。

2-14. 研究計画の見直し

本研究計画は約5年ごと（繰り返し調査ごと）、または必要に応じて見直しを行う。それに伴い本研究計画を変更する場合は、各共同研究の研究計画書に定められた手順で共同研究の承認を受けるとともに、滋賀医科大学倫理審査委員会からあらためて承認を受ける。

2-15. 研究費

本研究には多額の研究実施費用が必要であり、2-4に掲げた各共同研究からの研究費のみならず、広く研究費および財政援助を求める必要がある。本研究にかかわる研究者は研究費の確保に努める。

2-16. 知的財産権

2-16-1. 特許申請

個別研究としての本研究の発明の特許として申請する場合、付録2に含まれる研究者のうち、申請する発明に関与した者ならびに統括研究者および主任研究者が共同で行う。2-4に掲げた共同研究に提供した調査資料・生体試料による特許申請の場合については、各共同研究の研究計画書に定められた規則に準ずる。

2-16-2. 特許の帰属

個別研究としての本研究における特許の帰属に関しては、滋賀医科大学の規定の範囲内で、申請する発明に関与した者の間で協議して決定する。2-4に掲げた共同研究における特許の帰属に関しては、各共同研究の研究計画書の規定に準ずる。

2-17. 手順書

本研究では、本研究計画書の他に、以下の手順書を作成する（ベースライン調査時に 1)～4)、繰り返し調査時に 5)～7)を作成）。

- 1) 同意取得手順書
- 2) 調査実施手順書
- 3) 生体試料収集・処理・保管手順書
- 4) 追跡調査手順書
- 5) 繰り返し調査 同意取得手順書（未定）
- 6) 繰り返し調査 調査実施手順書（未定）
- 7) 繰り返し調査 生体試料収集・処理・保管手順書（未定）

付録1 研究の対象とする項目

要因、中間指標、もしくは結果として以下の項目を解析に用いる。なお、研究の対象となる調査項目および検査項目は、研究の進捗状況によって変更される場合がある。

1. 人口学的特徴

性年齢をはじめ質問票から得られた人口学的情報。

2. 生活習慣等

質問票から収集された全調査項目。

3. 検診結果

受診番号、生年月日、性別、受診日、身長、体重、肥満度、腹囲、血圧（2回測定分）、尿糖、尿蛋白、尿潜血、尿中Na・K・クレアチニン、採血時食後時間、中性脂肪、総コレステロール、HDLコレステロール、LDLコレステロール、GOT、GPT、 γ -GTP、高感度CRP、BNP、尿酸、クレアチニン（以上、血清）、ヘモグロビン、ヘマトクリット、赤血球数、白血球数、血小板数、血糖、HbA1c、インスリン、足関節上腕血圧比および脈波伝播速度(ABI・PWV)、心電図

4. 血液成分（想定される保存血清・血漿・赤血球の測定項目）

	総蛋白、アルブミン、蛋白分画、アルブミン・グロブリン比
サイトカイン	IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-18、 TNF- α 、GM-CSF、IFN- γ
ケモカイン	MIP-1 α 、MIP-1 β 、MCP-1、エオタキシン、RANTES
炎症マーカー	d-ROM、ハプトグロビン、フィブリノーゲン β
腫瘍マーカー	PSA
ホルモン関連	エストラジオール、エストロン、テストステロン、 DHEA（デヒドロエピアンドロステロン）、 プロゲステロン、SHBG（性ホルモン結合グロブリン）
肥満関連	アディポネクチン
成長因子関連	VEGF、bFGF、IGF-I、IGF-II、IGFBP-3
血漿DNA量、血漿RNA量	
糖尿病関連	Cペプチド
ストレス関連	DHEA-S、ATCH、コルチゾル、エピネフリン ノルエピネフリン、ドーパミン、セロトニン、チオレドキシン
微量金属	セレンウム
栄養素	各種カロテノイド、レチノール、トコフェロール、コエンザイムQ10
脂質	酸化LDLコレステロール、総コレステロール、脂肪酸分画
植物エストロゲン	エクオール、ダイゼイン、ゲニステイン

ウイルス関連	HBs 抗原、HBs 抗体、HBc 抗体、HCV 抗体、HCV-RNA、 HCV 遺伝子型、HTLV-I 抗体
その他	ピロリ菌抗体、ペプシノゲン、ヒアルロン酸

5. DNA のメチル化

血漿中に遊離される体細胞由来 DNA のメチル化の状態を、がん発生に関与する遺伝子のプロモーター領域について検査する。

検査対象の遺伝子：*CDKN2A*、*RASSF1A*、*RASSF2*、*RASSF4*、*DAPK1*、*MGMT*、*APC*、*HIC1*、*CDH1*、*RARB2*、*GSTP1*、*MYOD1*、*MLH1*、*BRCA1*、*RIZ1*、*XIST*、*ESR1*、*CALCA*、*PGR* など。

また、末梢血リンパ球 DNA について全 DNA のメチル化状態の定量的評価を含めて検査する。

6. 血漿中遊離 DNA の変異・欠失・増幅

血漿中に遊離される体細胞由来 DNA における、癌抑制遺伝子および発癌遺伝子の変異・欠失・増幅について検査する。対照として、同一人から調整したリンパ球 DNA を用いる。以下に示すのは検査対象の遺伝子の例である。

変異・欠失：*KRAS2* コドン 12, 13, 61、*BRAF* コドン 599、
TP53 エクソン 5～8、*EGFR* エクソン 18～21 など。

増幅：*EGFR*、*ERBB2*、*MDM2*、*MYC*、*ACTB*（内部標準）など。

7. 遺伝子型

これらはすべて遺伝子多型であり、遺伝病の原因となるような浸透率の高い遺伝子の塩基変異は含んでいない。アレル頻度が 1 %を超えるものを対象とした。括弧内の遺伝子名は別名である。多型名の後ろの括弧はほぼ完全に連鎖していることが分かっている多型名である。重複して機能を持つ物質の遺伝子は、主たる機能と思われるグループに入れた。遺伝子型のみで多型名のないものは、多型の組み合わせで遺伝子型が定義されている遺伝子である。アミノ酸名で挟まれている数字はアミノ酸置換を伴う多型のコードンの位置を示す。塩基によって挟まれている数字は転写開始点を 1 としたときの遺伝子多型の位置を示す。また、塩基の挿入/欠失は Ins/Del で、RFLP による多型は制限酵素名で示した。ミトコンドリア DNA にコードされている遺伝子については、ミトコンドリア DNA 上の位置で示してある。その他の多型は通称で表記した。

1) 発がん物質代謝酵素および薬剤代謝酵素

<i>APEX1</i> Asp148Glu	<i>COMT</i> Val1158Met
<i>CYP1A1</i> MspI, Val462Ile	
<i>CYP1A2</i> A734C	<i>CYP1B1</i> Val432Leu, Ala453Ser
<i>CYP2A6</i> wt/del/con	<i>CYP2B6</i>
<i>CYP2C9</i>	<i>CYP2C19</i>
<i>CYP2E1</i>	<i>CYP3A4</i>
	<i>CYP2C8</i>
	<i>CYP2D6</i>
	<i>CYP3A5</i>

<i>CYP3A7</i>	<i>DPYD</i> T85C	
<i>EPHX1</i> (<i>mEh</i>) Tyr113His, His139Arg		<i>GPX1</i> Pro197Leu
<i>GSTA1</i>	<i>GSTA2</i>	<i>GSTM1</i> present/null
<i>GSTP1</i> Ile105Val	<i>GSTT1</i> present/null	
<i>NAT1</i>	<i>NAT2</i>	
<i>NQO1</i> C609T	<i>UGT1A1</i> 6/7rpt	<i>UGT1A7</i> Asn129Lys
<i>UGT2B4</i>	<i>UGT2B7</i>	<i>UGT2B15</i>
<i>VKORC1</i> C1173T		

2) DNA 修復酵素

<i>BRCA2</i> Asn372His, Met784Val	<i>ERCC1</i> C8092A
<i>ERCC2</i> (<i>XPD</i>) Asp312Asn, Lys751Gln	<i>ERCC4</i> (<i>XPF</i>) Arg419Gln
<i>ERCC5</i> Ser311Cys, Thr411Met, Glu672Ala	<i>IGHMBP2</i> Thr671Ala
<i>LIG1</i> A14271C (in exon 6)	
<i>MLH1</i> G-93A, Val219Ile	
<i>MSH2</i> gIVS12-6T/C, Met688Ile, Leu390Phe	
<i>NBS1</i> Phe196Val, Asn716Asp	<i>OGG1</i> Ser326Cys
<i>POLG</i> Pro18Ser, Glu1145Gly	
<i>POL1</i> Arg71Gly, Ile236Met, Phe507Ser	<i>RAD51</i> G135C
<i>XRCC1</i> Arg194Trp, Arg399Gln	<i>XRCC3</i> Thr241Met
<i>XRCC4</i> Ala168Val, Pro379Ser, Thr706Ile, Glu912Gly	
<i>PRKDC</i> (<i>XRCC7</i>) G6721T	

3) DNA 複製、核酸代謝酵素および葉酸代謝酵素

BUB1 Ser375Phe, T26145C (also called IVS9-8T/C) *CBS* 844ins68, C699T
ECGF1(Thymidine phosphorylase) Leu471Ser, Arg263Gly, Gln255Leu
HDAC10 Gly588Cys *ITPA* Pro32Thr *MTHFR* C677T, A1298C
MTR Asp919Gly *MTRR* A66G *SHMT1* C1420T
TPMT Tyr240Cys *TS* 28bpVNTR, 1494del6, IVS6-68C/T
RFC1(reduced folate carrier) G80A
UMPS(Orotate phosphoribosyl transferase:OPRT) Ala213Gly, Val446Ile
URKL1(Uridine kinase like 1) Phe423Leu, Ins/Del(rs11476611)
UPP2(Uridine phospholyrase 2) Ser10Arg, Leu78Met

4) 細胞周期およびアポトーシスに関与する物質

<i>CCND1</i> G870A	<i>CDKN2A</i> Ala148Thr, Val20Leu
<i>CHEK2</i> Ile157Thr	<i>CDKN1A</i> (<i>p21</i>) Ser31Arg
<i>CDKN1B</i> (<i>p27</i>) Val109Gly	<i>P2RX7</i> Glu496Ala
<i>TP53</i> Arg72Pro	<i>TP73</i> G698A (C708T)

5) サイトカイン/ケモカイン/成長因子およびその受容体、炎症関連物質

CRP C1444T, C9834T, A84010T, -286C/T/A
EGFR (CA)_n in intron 1, G-261T, C-191A

<i>EPO</i> Pro358Leu	<i>FBG</i> C148T	<i>FCGR2A</i> His165Arg
<i>FCGR3A</i> Val212Phe	<i>FCGR3B</i> NA1/NA2	<i>FGF1</i> A-1385G
<i>GDF15</i> (<i>MIC-1</i>) His6Asp	<i>HP</i> Hp1/2	
<i>IFNG</i> A874T	<i>IGF1</i> G2502T, (CA) _n	
<i>IGFBP3</i> A-202C (G227C), C3804G, C5827T(5606A Ins/Del)		
<i>IL1A</i> T-889C	<i>IL1B</i> C-31T (T-511C), C3954T	
<i>IL1R1</i> C-116T	<i>IL1R2</i> Codon199	<i>IL1RN</i> 86bpVNTR
<i>IL2</i> T-330G	<i>IL4</i> C-33T, Gln575Arg	<i>IL8</i> A-251T
<i>IL8RB</i> (<i>CXCR2</i>) C785T	<i>IL10</i> T-819C	<i>IL12B</i> Ser226Asn
<i>IL12RB1</i> Gln214Arg, Gly378Arg		
<i>IL13</i> C-1112T, Arg130Gln		<i>CCL2</i> (<i>MCP-1</i>) A-2518G
<i>LTA</i> (<i>TNFB</i>) A252G(Thr26Asn)		
<i>MPO</i> G-463A	<i>NOS1</i> G-84A	<i>NOS2</i> (CCTTT) _n
<i>NOS3</i> 27-bpVNTR, T-786C, Glu298Asp		<i>TGFB1</i> Lue10Pro
<i>TNF</i> (<i>TNFA</i>) G-308A, C-857T, C-1031C		
<i>VEGF</i> C936T		

6) 上記以外の遺伝子でシグナル伝達に関与する物質と受容体

<i>CASP9</i> Gln221Arg	<i>CD14</i> C-260T	<i>GAB1</i> C/T
<i>IRS1</i> Thr608Arg, Gly972Arg		
<i>HIF1A</i> Pro582S, Ala588Thr		
<i>IRS2</i> Gly1057Asp		
<i>NFKB2</i> -10G Ins/Del	<i>NFE2LS</i> (<i>NRF2</i>) G-686A, G-684A, C-650A, (CCG) _n	
<i>PTPN1</i> A36171G, C58359T, C64840T, A69103G, C69535T, A69866G, G69934T, 1848insG,		
<i>PTPN11</i> G33861A	<i>PTPN22</i> Arg620Trp	
<i>PTPRJ</i> Gln276Pro, Arg326Gln, Asp872Glu		
<i>RUNX1</i> C/G in intron 6	<i>SHC1</i> Met300Val	
<i>STAT6</i> (GT) _n	<i>TLR2</i> Arg677Trp, Arg753Gln	
<i>TLR4</i> Asp299Gly Asp259Gly		
<i>TNFRSF6</i> (<i>FAS/CD95/APO-1</i>) A-670G, G-1377A		

7) ホルモン代謝酵素と受容体

<i>AIB1</i> /(<i>SRC-3</i>) CAG/CAA repeats	<i>AR</i> (CAG) _n , (GGC) _n	
<i>CYP11A</i> (TAAAA) _n	<i>CYP17</i> T-34C	<i>CYP19</i> Trp39Arg, (TA) _n
<i>ESR1</i> (<i>ER</i>) A34334G(<i>Xba</i> I), C34288T(<i>Pvu</i> II), (TA) _n , C-105857T, G-9929T, A261G, T70312C, C136475G, A197150G, A291048G, C292083T		
<i>HSD17B1</i> (<i>EDH17B2</i>) Ser312Gly		
<i>SHBP</i> Asp327Asn	<i>SRD5A2</i> Val189Leu, 2bpVNTR	
<i>NR3C1</i> (<i>GR</i>) Asn363Ser, Arg23Lys, <i>Bcl</i> I		

8) アルコール代謝酵素 (2 遺伝子)

<i>ADH2</i> Arg47His	<i>ALDH2</i> Glu487Lys
----------------------	------------------------

9) 脂質代謝に関する物質

ABCG5 Gln604Glu
ABCG8 Asp19His, Tyr54Cys, Thr400Lys, Ala632Val
APOA4 His360Gln *APOB* C526T
APOE G-219T, G113C, Cys112Arg(E4), Arg158Cys(E2)
ADRB2 (BAR2) Gln27Glu *ADRB3 (BAR3)* Trp64Arg *CD36* A52C, Pro90Ser
CETP Taq1B1, Ile405Val, Asp442Gly
LIPC (HL, HTGL) T-514C *LEP* A-2548G *LEPR* Gln223Arg
LPL Ser447Ter *LRP1* C766T
PLA2G7(PAF-AH) Val279Phe *PLD2* Thr192Ile
PON1 Gln192Arg *PPARA* Leu162Val
PPARG Pro12Ala, C161T, Pro115Gln
PTGS1 (COX1) Arg8Trp, L15-L16del, Pro17Leu, Leu237Met
PTGS2 (COX2) G-765C, C-163G, T10G
UCP2 G-866A

10) 糖代謝および移送に関する物質

CAPN10 (Calpain10) UCSNP-19, -43, -63 *GCGR* Gly40Ser
GSK3B T-50C
SLC2A1 (GLUT1) Enhancer-1, Enhancer-2 SNP1, SNP2, Enhancer-3, *HaeIII*, *XbaI*
SLC2A2 (GLUT2) A-269C, A-44G, A103G *SLC2A4 (GLUT4)* G-30A

11) 血圧調節に関与する物質

ACE 287bpIns/Del *ADD1* GLy460Trp *AGT* Met235Thr, C10A
CYP11B2(AS) C-344T *GNB3* C825T

12) 神経伝達物質の代謝酵素および受容体

CCK C36T *CCKBR (CT)n*
DRD2 *EcoRI*, *MboI*, *TaqIA* *DRD4* C-521T, 48bpVNTR
MAOA 30bpVNTR *MAOB* G/A in intron 13
OPRM1 Asn40Asp *SLC6A4 (5-HTT)* LPR Ins/Del
TPH C218A *ADRB1* Arg389Gly, Ser49Gly
ADRB2 Aeg16Gly, Gln27Glu, Thr164Ile *ADRB3* Trp64Arg
ADRA2A Asn251Lys, G-5871A, T-3168C, T-2210A, C-1808A, C-1291G, G1543T, C1780A, C5290A *ADRA2B* Ins/Del301-303, G-6159A, C-5377G, C-2167G, C361A, G4588T, G7541C, T9429C
ADRA2C Ins/Del322-325, G-6853A, C-3848T, G-3640A, C1678G, G2453A, C2969G

13) 薬物移送物質

ABCB1 (MDR1) G2677T/A, C3435T
ABCC2 (MRP2) Val417Ile
ABCG2 (MXR1) Val112Met, Gln126Stop, Gln141Lys, Ile206Leu, Phe431Leu, Phe489Leu, Asn590Tyr

SLC15A1(PEPT1) Thr114Ile, Ser117Asn, Val122Met, Val416Leu, Gly419Ala,
Val450Ile, Thr451Asn, Arg459Cys, Pro586Leu

SLC21A6(OATP-C) Asn130Asp, Arg152Lys(Asp241Asn), Val174Ala

SLC21A9(OATP-B) Thr392Ile, Ser486Phe

SLC22A1(OCT1) Phe160Leu, Pro283Leu, Arg287Gly, Pro341Leu

SLC22A4(OCTN1), *SCL22A5(OCTN2)* E1, -1, G1, F1, H1, I1, -2, -3, -4, -5, -6, J1

14) 血液凝固に関する物質

F5 (Factor V Leiden) G1691A

F7 (Factor VII) A-670C, G-402A, G-401T, Arg353Gln

F13A1 (Factor XIII) Val34Leu

ITGB3 (GPIIb-IIIa) PLA1/PLA2

PAI1 4G/5G *PLAU* (Urokinase) C/T at in 3' UTR

15) 基質合成分解酵素

COL1A1 T1121G *MMP1* 1G/2G

MMP2 C-1306T, T-790G, C-735T *MMP3* 5A6A, Glu45Lys

MMP9 C-1562T *MMP12* A-82G

16) 上記に含まれない遺伝子多型

APC Asp1822Val *CDH1(E-cadherin)* C-160A

CTSW (Cathepsin W) Phe217Ser (His248Tyr, Ile250Thr), Arg218Gln *FUT3* (Le)
T59G *FUT2* (Se, sej, se5) Gly247Ser, Phe280Ser

HER2 Val655Ile *HMOX1* (GT)_n in 5' flank

KLK3(PSA) A-5429G, C-5412T, A-4643G

MYCL1 (L-myc) L/SEcoRI *ODC1* G316A *PGC* VNTR

PRT G20210A *SOD2(MnSOD)* Ala16Val

SFTPb A-18C, C1580G

TIMP2 G-418C *VDR* *TaqI*, *BsmI* *TCF1* Ala98Val

17) ミトコンドリア遺伝子

MTRNR1 (12S rRNA) A663G, T681C, G709A, C752T, A856G, C1310T, A1382C, T1391C,
A1438G, G1442A

MTTV (tRNA Valine) G1664A

MTRNR2 (16S rRNA) C2766T, C2772Del, C2835T, G3010A, T3027C

MTTL1 (tRNA Leucine 1) A3243G, C3254A

MTND1 (NADH dehydrogenase 1) G3421A, G3496T, C3497T, T3535C, A3537G, C3546T,
3552T/A/C, T3593C, 3644T/C/G, A3714G, A3759G, C3970T, G4048A, C4071T, C4086T

MTTE (tRNA Glutamine) A4343G, T4386C

MTND2 (NADH dehydrogenase 2) G4491A, C4505T, C4538T, 4541G/A/T, G4655A, T4688C,
A4715G, G4820A, A4833G, C4850T, C4883T, A4895G, T5048C, A5051G, T5108C, A5127G,
G5147A, A5153G, C5178T, G5231A

MTCO1 (Cytochrome c oxidase I) A5951G, T5964C, G6018A, G6023A, T6086C, A6146G,

G6179A, T6253C, T6680C, C6689T, A6752G
MTCO2 (Cytochrome c oxidase II) G7600A, T7861C, A8188G, T8200C
MTNC7 (non-coding region 7) A8271T
MTATP8 (ATP synthase 8) T8383C, G8392A, T8450C, A8453G, T8473C
MTATP6 (ATP synthase 6) C8684T, A8701G, T8762C, G8764A, A8784G, T8793C, C8794T, C8829T, 8856G/A/C, T8955C, T9090C, A9115G, G9123A, A9180G
MTCO3 (Cytochrome c oxidase III) A9242G, C9296T, G9755A, T9833C, G9932A, T9950C
MTND3 (NADH dehydrogenase 3) T10238C, G10310A, A10397G, 10398A/G/T, C10400T
MTTR (tRNA Arginine) T10454C
MTND4 (NADH dehydrogenase 4) G11016A, T11017C, A11084G, G11149A, C11151T, C11215T, T11255C, G11696A, G11963A, A12026G, C12088T, C12092T
MTND5 (NADH dehydrogenase 5) G12372A, G12406A, G12501A, A12654G, C12705A, A12753G, G12771A, T12811C, C12816T, T13143C, A13263G, A13563G, G13759A, A13827G, 13928G/T/A/C, C13934T, A13942G
MTND6 (NADH dehydrogenase 6) T14308C, G14364A, G14476A
MTCYB (Cytochrome b) G14861A, A14893G, 14914A/C/G, A14927G, C14944T, T14979C, G14996A, C15040T, G15043A, G15047A, T15067C, G15323A, G15346A, T15440C, A15487T, G15497A, C15508T, C15518T, A15524G, C15535T, A15562G, T15850C, A15851G, A15860G, A15874G, G15883A
MTTT (tRNA Threonine) 15924A/Del/G, G15927A, T15940Del, T15941C, A15951G
mCR (D-Loop) T16519C

8. 罹患

脳卒中（脳梗塞、脳出血、くも膜下出血、その他の脳卒中）、心筋梗塞、突然死、心不全、糖尿病、閉塞性動脈硬化性疾患、腎疾患、高齢者認知症、および部位病型など国際疾病分類に基づいて細分された良性・悪性新生物ならびに前がん病変。

9. 死因別死亡

全死亡、部位病型などに基づいて細分された新生物死亡。病名病型などに基づいて細分された循環器系の疾患死亡。その他、国際疾病分類に基づいた病名別死亡のうち、糖尿病、肥満（症）、高脂血症、高尿酸血症、肝疾患、胆のう・胆管の疾患、腎疾患、呼吸器系の疾患、血液および造血器の疾患、骨粗しょう症に関するもの。

10. 身体機能、認知能力および介護度

介護保険法に基づく、身体機能（麻痺・拘縮、移動、複雑移動、特別介護、身の回り）、認知機能（意思疎通、問題行動）、介護度、要介護認定等基準時間、中間評価項目得点、日常生活自立度の組み合わせ、サービスの利用状況。

付録 2 研究組織構成員一覧

統括研究者	: 滋賀医科大学社会医学講座福祉保健医学分野	教授	上島 弘嗣
主任研究者	: 滋賀医科大学社会医学講座福祉保健医学分野	講師	喜多 義邦
合同事業者	: 滋賀県高島市		
共同研究者	: 滋賀医科大学社会医学講座福祉保健医学分野客員教授		中村 保幸
	公立高島総合病院内科医長		杉原 秀樹
	マキノ病院院長		森田 豊
	公立甲賀病院内科医長		環 慎二
	東京大学大学院医学系研究科医療倫理学分野助手		松井 健志
	東京大学大学院医学系研究科教授		大橋 靖雄
	滋賀医科大学社会医学講座福祉保健医学部門		山本 貴子
	滋賀医科大学社会医学講座福祉保健医学部門		チューリン・チョトリ

研究協力依頼機関(予定) :

公立高島総合病院
マキノ病院
大津赤十字病院
滋賀医科大学付属病院
滋賀県立成人病センター
滋賀県厚生福祉部
滋賀県今津保健所

- 共同研究組織 : 1. 公益信託日本動脈硬化予防研究基金(運営委員長: 矢崎義雄) による国内共同研究「統合研究: JALS (Japan Arteriosclerosis Longitudinal Study)」(委員長: 上島弘嗣 滋賀医科大学社会医学講座福祉保健医学部門 教授) および統合研究の中で実施する文部科学省特定領域研究「ポスト・ミレニアム研究としての高血圧に関連する遺伝要因の探索(仮題)」(主任研究者: 三木哲郎 愛媛大学医学部老年医学講座 教授)
2. 文部科学省特定領域研究「分子疫学コホート研究の支援に関する研究」班による「日本多施設共同コホート研究: J-MICC 研究 (Japan Multi-Institutional Collaborative Cohort Study)」(主任研究者: 浜島信之 名古屋大学大学院医学系研究科予防医学/医学推計・判断学教授)

検査試料処理施設: 近畿予防医学研究所

個人情報管理者 : 滋賀医科大学医療情報部 教授 永田 啓

付録3 用語の定義

1. 「研究対象者」・「研究協力者」

「研究対象者」は本研究に参加する要件を満たしている者を指す。そのうち、実際に研究に参加した者を「研究協力者」と定義する。

2. 「個人情報」・「個人識別情報」・「個人識別番号」

他に断りのないかぎり、本研究計画書でいう「個人情報」は、特定個人を識別可能か否かにかかわらず、個人（生存者・死亡者を問わない）に関する情報一般を指す。「個人識別情報」とは特定個人の識別を可能にする情報（氏名、住所、電話番号）を指す。「個人識別番号」とは、個人識別情報で把握される個人に対応する本研究データベースで 사용되는番号を指す。

3. 「対応表」

「対応表」とは、個人情報管理者が個人情報を匿名化する場合に、当該個人情報に係る個人と当該情報とを連結し得るよう新たに試料・資料等に付された符号や記号等を指す。

付録4 収集情報/資料・データベース・生体試料の保存および廃棄方法

1. 本研究に関するすべての収集情報、資料、データベース、生体試料は滋賀医科大学社会医学講座福祉保健医学分野が保存・管理の責任を担う。保存・管理の統括責任は統括責任者（付録2）がこれを担う。また、本研究の主任研究者（付録2）がその実務に関する責任を負う。

2. 個人情報の管理責任者として、本研究に関与しない個人情報管理者（付録2）を設置し、この個人情報管理者により、随時、本研究における個人情報の管理・取り扱いについての監督・監査を受ける。

3. 収集情報、資料、データベース、生体試料の管理運営

3-1. 管理

本研究の主任研究者は、個人情報管理者の監督の下、収集された個人情報を含むすべての収集情報、資料、データベース、生体試料の管理を行う。また、主任研究者およびその許可を受けた共同研究者および研究補助者に限り、これらの収集情報、資料、データベース、生体試料の管理補助業務および閲覧など、解析研究等の準備として必要な作業を行うことができる。

3-2. 運営

これらの収集情報、資料、データベース、生体試料を用いて具体的に解析研究等を行う際には、それ以前に、主任研究者は個人情報管理者に匿名化処理を依頼し、匿名化を終えた収集情報、資料、データベース、生体試料に限り、解析研究等に使うことができる。対応表は個人情報管理者が管理する。

4. 保存期間

本研究で収集されたすべての情報、資料、データベース、生体試料は、追跡調査が終了する 2029 年末まで保存し、本研究の遂行のために使用する。ただし、研究の途中で本研究の研究計画が倫理審査委員会の承認を経た上で修正あるいは改訂された場合は、その中で定められる保存期間への変更を妨げるものではない。

また、当初予定の保存期間が終了した時点で、保存されたすべての収集情報、資料、データベース、生体試料のうち、連結不可能匿名化されたものについては、その後の学術研究に供することを目的として継続して保存することを妨げない。ただし、この場合は、事前に倫理審査委員会への報告もしくは倫理審査委員会による承認を得るものとする。

5. 収集情報、資料およびデータベースの取り扱い

5-1. 保存方法

本研究に関する、生体試料を除くすべての収集情報、資料および構築されたデータベースを記したすべての紙媒体および各種保存用リムーバブル電子媒体（Hard disk、Floppy disk、CD-ROM、DVD-ROM、USB フラッシュメモリ等）は、福祉保健医学分野内に設置・指定された保管空間に保存される。この保管空間は厳重な施錠管理のもとにおかれ、それへのアクセスは、主任研究者からあらかじめ許可を受けた特定の研究者と特定の研究補助者を除いてすべて禁止される。この保管空間の鍵は、個人情報管理者の監督のもと、主任研究者が管理する。また、これらの媒体に保存された内容はみだりに複製してはならない。解析研究等の準備に必要な場合は、主任研究者の許可を得た場合に限り複製ができるものとする。

収集情報、資料、生体試料の検査結果および解析結果等から成り、且つ、個人情報管理者による匿名化を終えていない情報を含むデータベースを保有する電子計算機（コンピュータ）は、すべての外部ネットワークから切り離された状態に置き、パスワードとともに、福祉保健医学部門内の厳重に施錠された保管空間の中で管理する。この電子計算機へのアクセスは、個人情報管理者の監督のもとで、主任研究者および主任研究者が許可した研究者または研究補助者に限り与えられる。

ただし、連結不可能匿名化されたものについてはこの限りではない。

5-2. 廃棄方法

収集情報、資料、データベースは、所定の保存期間が終了した時点で個人識別情報が付いていないことを確認した上で、滋賀医科大学内で焼却または細断処理機等

によって再生不可能な形に破壊し廃棄する。途中で研究協力の同意を撤回した者の資料等については、同意撤回文書を受理した時点で同様に再生不可能な形に破壊し廃棄する。ただし、電子媒体（ハードディスク、各種リムーバブルディスク等）に保存された資料等については、同じく個人識別情報が付いていないことを確認した上で、可能であれば上記に示す方法で処分を行い、それが可能でないものについては、物理的な破壊などのその他の代替方法によって、同じく再生不可能な形に破壊し廃棄する。

ただし、連結不可能匿名化されたものについてはこの限りではない。

6. 生体試料の取り扱い

6-1. 保存方法

福祉保健医学分野内の所定の冷蔵保管庫（-80 度）にて凍結保存する。この冷蔵保管庫が設置された保管空間は、厳重な施錠管理の下におかれ、個人情報管理者の厳正な監督の下、主任研究者が管理を行う。

生体試料を保存する場合、生体試料を収めたスピッツ等は記号・バーコード等の所定の匿名化コードのみによって管理し、定められた手続きに従わない限り生体試料から提供者個人を特定することができないようにしなければならない。

保存・管理された生体試料を保管空間より外部へ持ち出す場合は、必ず主任研究者の立会いまたは事前の許可を得なければならない。

生体試料の測定・解析のために、共同研究機関や組織あるいは検査・測定委託機関に移送する場合は、その移送先機関とあらかじめ定められた方法にのっとり匿名化された状態で移送しなければならない。詳細については各機関との個別の契約によりこれを定める。

6-2. 廃棄方法

所定の保存期間が終了した時点で、残っている生体試料はすべて滋賀医科大学内で焼却等によって再生不可能な形に破壊し廃棄する。

ただし、連結不可能匿名化されたものについてはこの限りではない。

7. 研究途中で同意撤回があった場合の取り扱い

本研究の途中で、所定の手続きに従って研究協力者から同意撤回の意思表示が同意撤回文書によりなされた場合は、それを受理した時点で、同意が撤回された項目に応じて、収集情報、資料、データベース、生体試料の該当項目・内容について、それぞれ所定の廃棄方法に従って破壊し廃棄する。また、共同研究等に対してこれらの収集情報、資料、データベース、生体試料を提供している場合は、各共同研究計画書において定められた所定の手続きに従って適切に処理を行う。

Effect of *Helicobacter pylori* Infection Combined with CagA and Pepsinogen Status on Gastric Cancer Development among Japanese Men and Women: A Nested Case-Control Study

Shizuka Sasazuki,¹ Manami Inoue,¹ Motoki Iwasaki,¹ Tetsuya Otani,¹ Seiichiro Yamamoto,² Shinobu Ikeda,¹ Tomoyuki Hanaoka,¹ and Shoichiro Tsugane¹
for the Japan Public Health Center Study Group

¹Epidemiology and Prevention Division and ²Statistics and Cancer Control Division, Research Center for Cancer Prevention and Screening, National Cancer Center, Tokyo, Japan

Abstract

Background: Although accumulating evidence suggests that *Helicobacter pylori* plays a role in gastric carcinogenesis, the magnitude of the risk remains uncertain.

Aim: We aimed to estimate the magnitude of the risk of gastric cancer associated with *H. pylori* infection by a large case-control study nested within a prospective cohort. Possible effect modification by CagA status, and serum pepsinogen status, as a marker of atrophic gastritis, was also considered to see its effect on developing gastric cancer.

Subjects and Methods: Subjects ($n = 123,576$) were followed up from 1990 to 2004; 511 gastric cancer cases matched to 511 controls were used in the analysis. Plasma immunoglobulin G antibody to *H. pylori*, CagA, and pepsinogen I and II were measured.

Results: The adjusted odds ratio (95% confidence interval) of gastric cancer associated with *H. pylori* infection was 5.1 (3.2-8.0). Assuming all CagA-positive subjects are true *H. pylori* positives doubled this risk. Atrophic gastritis was also associated with an elevated risk of gastric cancer and the risk increased further with pepsinogen levels.

Conclusions: Subjects with pepsinogen levels indicative of severe atrophic gastritis may need careful examination regularly regardless of *H. pylori* infection. Those who have other pepsinogen levels but who are *H. pylori* seropositive are likely to benefit from *H. pylori* eradication therapy. Considering both the cost and the potential for misclassification that may occur using multiple serologic tests, caution is needed in interpreting or extrapolating these findings into a screening strategy. (Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2006;15(7):1341-7)

Introduction

Accumulating evidence suggests that infection with *Helicobacter pylori* plays a role in gastric carcinogenesis (1). Estimates of risk range considerably between studies and the magnitude of the risk remain uncertain. The variation in the results may be explained by different distribution of gender, age, cardia and noncardia cancers, and study design. In retrospective case-control studies, *H. pylori* infection is, by necessity, assessed after the development of cancer in patients. For some years before cancer diagnosis, many of the patients likely would have had severe atrophic gastritis and intestinal metaplasia, conditions that favor the loss of *H. pylori* colonization and a subsequent loss of seropositivity (2). Because this result will not occur to the same extent in controls, such differential misclassification leads to underestimation of the risk of *H. pylori* infection. However, few studies have attempted to correct the underdetection of *H. pylori*, and more epidemiologic studies with precise analyses are needed.

H. pylori is known to exhibit great genetic diversity. *H. pylori* strains possessing the CagA pathogenicity island cause more extensive inflammation of the gastric mucosa (3-5), which is more likely to progress to atrophic gastritis (6). Furthermore, antibodies to CagA persist longer after *H. pylori* eradication than surface antibodies detected by conventional immunoglobulin G (IgG) ELISA (7). The pepsinogen level reflects the secretory function of the gastric glands. Levels are decreased significantly in subjects with chronic atrophic gastritis, an important precursor of gastric carcinoma (8-11). However, few studies have considered both CagA and pepsinogen status when investigating the relation between *H. pylori* infection and gastric cancer.

We aimed to estimate the magnitude of the risk of gastric cancer associated with *H. pylori* infection by conducting a large case-control study nested within a prospective cohort. We also aimed to consider possible effect modification by the CagA status of *H. pylori*. Serum pepsinogen status, as a marker of atrophic gastritis, was also considered to see its effect on developing gastric cancer and how the severity of atrophic gastritis affects the relation between *H. pylori* and gastric cancer.

Materials and Methods

Study Population. The Japan Public Health Center (JPHC)-based prospective study on cancer and cardiovascular diseases (JPHC Study) was established in 1990 for cohort I and in 1993 for cohort II; part of the study was reported elsewhere (12-14). The JPHC Study was approved by the institutional review board of the National Cancer Center (Tokyo, Japan).

Received 11/28/05; revised 4/18/06; accepted 5/12/06.

Grant support: Grant-in-Aid from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan for Cancer Research and for the Third Term Comprehensive 10-Year Strategy for Cancer Control and Grants-in-Aid for Scientific Research for Young Scientists (B; 17790400) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan and Japan Society for the Promotion of Science.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Requests for reprints: Shizuka Sasazuki, Epidemiology and Prevention Division, Research Center for Cancer Prevention and Screening, National Cancer Center, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan. Phone: 81-3-3542-2511, ext. 3378; Fax: 81-3-3547-8578. E-mail: ssasazuk@gan2.res.ncc.go.jp

Copyright © 2006 American Association for Cancer Research.

doi:10.1158/1055-9965.EPI-05-0901

Cohort I of four PHC areas (Ninohe PHC area of Iwate Prefecture, Yokote PHC area of Akita Prefecture, Saku PHC area of Nagano Prefecture, and Chubu PHC area of Okinawa Prefecture) and cohort II of five PHC areas (Mito PHC area of Ibaraki Prefecture, Nagaoka PHC of Niigata Prefecture, Chuo-higashi PHC of Kochi Prefecture, Kamigoto PHC of Nagasaki Prefecture, and Miyako PHC of Okinawa Prefecture) were used in the present analysis. The study population was defined as all inhabitants in the study areas (27 cities, towns, or villages in nine PHC) and ages 40 to 59 years in cohort I and 40 to 69 years in cohort II at the baseline of the survey. A subcohort in Suita City that was set up by the National Cardiovascular Center was also added. As a whole, a population-based cohort of 61,009 men (27,062 in cohort I and 33,947 in cohort II) and 62,567 women (27,436 in cohort I and 35,131 in cohort II) was established.

Baseline Survey. In 1990 for cohort I and in 1993 to 1994 for cohort II, subjects were asked to reply to a lifestyle questionnaire covering sociodemographic characteristics, medical history, smoking and drinking habits, and diet. A total of 99,808 (81%) subjects, 47,525 men and 52,283 women, responded to the questionnaires.

A total of 10 mL blood was provided voluntarily by subjects during their health checkups. The plasma and buffy layer were divided into four tubes each holding 1.0 mL (three tubes for plasma and one tube for the buffy layer) and stored at -80°C . The blood was collected from 1990 to 1992 in cohort I and from 1993 to 1995 in cohort II.

We excluded subjects with a self-reported cancer at baseline ($n = 2,136$), subjects who were not Japanese ($n = 18$), and subjects who had already moved away at baseline ($n = 11$), which left 46,803 eligible men and 50,841 women. Among them, 13,467 (29%) men and 23,278 (46%) women donated their blood samples at baseline and were included in the study.

Follow-up and Identification of Gastric Cancer

Death and Relocation. Subjects were followed from January 1, 1990 to December 31, 2004 for cohort I and from January 1, 1993 (1994 for Tomobe Town) to December 31, 2004 for cohort II. In Japan, all death certificates are submitted to a local government office and forwarded to the PHC in the area of residence. The changes in residency status, including death, were identified annually through the residential registry in each area. Among study subjects, 6,133 (6.3%) had relocated, 6,035 (6.2%) had died, and 82 (0.08%) were lost to follow-up within the study period.

Cancer Registry for JPHC Study. Newly diagnosed cases of cancer were collected through two data sources, one from local major hospitals and the other from population-based registries (usually prefecture-wide). Candidate patients were linked by name, address, and date of birth and entered in the cancer registry for the JPHC Study when the date of birth and residence fulfilled cohort inclusion criteria.

Identification of Gastric Cancer and Selection of Control Subjects. Cases of gastric cancer were extracted from the cancer registry for the JPHC Study based on site [International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) code C160-169; ref. 15]. Among 1,681 cases with a histologically proven diagnosis made from 1990 to 2004 for cohort I and from 1993 to 2004 for cohort II, as of July 2004, plasma at baseline had been obtained from 512 cases.

Until quite recently in Japan, the upper third of the stomach has been called the "cardia" based on the guidelines for gastric cancer classification (16). Because it seemed difficult to distinguish a so-called cardia, which is located mainly in the esophagogastric junction, from the upper third of the stomach, we combined tumors at these sites into one group for analysis in this study (ICD-O code C160-161). A tumor located on the

lower side of the stomach was classified as distal gastric cancer (ICD-O code C162-167). Those subsites that could not be classified because of a diffuse lesion (ICD-O code C168) or those with no information (ICD-O code C169) were categorized as an unclassified subsite. Histologic classification was based on one of the author's (S.S.) review, in consultation with a pathologist, of the record reported by each hospital. The subdivisions were made based on a classification derived by Lauren (17).

For each case, we selected one control matched for gender, age (± 3 years), study area, blood donation date (± 2 months), and fasting time at blood donation (± 5 hours). The final analysis included 511 sets each of 511 cases and 511 controls, excluding 1 case with technical error in *H. pylori* antibody measurement and the matched control.

Laboratory Analysis. IgG antibodies to *H. pylori* were measured with a direct ELISA kit (E Plate "Eiken" *H. pylori* Antibody, Eiken Kagaku Co. Ltd., Tokyo, Japan). Levels of IgG were categorized as seropositive and seronegative for *H. pylori* according to a selective cutoff value (492 nm). Using the same kit, Fujioka and Tokieda reported the sensitivity and specificity of the kit with respect to cell culture and rapid urease test in 70 Japanese subjects and the value was 100% and 80.0%, respectively (18). These values were highest among other commercially available kits. Furthermore, the values reported by the assay supplier was 100% and 93.8%, respectively. Assays of CagA were done with the use of an ELISA kit, in which horseradish peroxidase was used as enzyme tracer (CagA IgG EIA, Sceti Co. Ltd., Rome, Italy). During the first incubation, the sample anti-CagA IgG antibodies, if any, are bound to the CagA antigen-coated wells. A second antibody (anti-human IgG conjugated with peroxidase) will bind to the CagA-antigen-antibody complex. The specificity and sensitivity were reported in the protocol of the kit by the assay supplier with respect to a Western blot assay, and the result was 100% and 93.7%, respectively. Serum levels of pepsinogen I and II were measured by two-step enzyme immunoassay by using commercial kits (E Plate "Eiken" Pepsinogen I, Eiken Kagaku) and (E Plate "Eiken" Pepsinogen II, Eiken Kagaku). Results were defined as "atrophic" when the criteria of both pepsinogen I levels ≤ 70 ng/mL and pepsinogen I/II ratio ≤ 3.0 were fulfilled (pepsinogen index +, $\sim 3+$). Miki et al. (19) reported that the values measured by the same kit showed a good correlation (correlation coefficient 0.983 for pepsinogen I, 0.991 for pepsinogen II, and 0.935 for pepsinogen I/II) with those measured by RIA (pepsinogen I/II RIA-BEAD, Dinabot Co. Ltd., Tokyo, Japan), in which a sensitivity of 70.5% and a specificity of 97.0% for atrophic gastritis, compared with histology, have been reported (20). These criteria have been applied widely to mass screening for gastric cancer in Japan (18). Among atrophic cases, more severe cases with a pepsinogen I level ≤ 30 ng/mL and pepsinogen I/II ratio ≤ 2.0 were defined as pepsinogen index 3+, whereas cases with a pepsinogen I level ≤ 50 ng/mL and pepsinogen I/II ratio ≤ 3.0 but excluding pepsinogen 3+ cases were defined as pepsinogen index 2+. Pepsinogen I level ≤ 70 ng/mL and pepsinogen I/II ratio ≤ 3.0 but excluding pepsinogen index 2+ and 3+ cases were defined as pepsinogen index +. All measurements were conducted by a person blinded to the case-control situation.

Statistical Analysis. χ^2 test or one-way ANOVA were used to calculate the *P* for difference between cases and controls (Table 1). Matched odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95% CI) were calculated to indicate the relationship between *H. pylori* infection or pepsinogen index and the risk of gastric cancer. Multiple conditional logistic regression analysis was conducted to control for potential confounding factors, such as smoking status, consumption of fish gut, green-yellow vegetables, other vegetables, fruit, green tea, body mass index, and family history of gastric cancer. Smoking status was

Table 1. Baseline characteristics of cases and control subjects

	Cases (n = 511)	Controls (n = 511)	P for difference*
Age (matching factor)	57.4 (0.32)	57.4 (0.32)	1.00
Male (matching factor; %)	66.8	66.8	1.00
Current smoker (%)	35.7	30.3	0.06
Alcohol drinking, 1+ d/wk (%)	50.8	50.2	0.85
Body mass index	23.0 (0.13)	23.4 (0.13)	0.02
Family history of gastric cancer (%)	11.9	7.8	0.03

NOTE: Numbers are mean (SE) unless specified otherwise.

* χ^2 test or one-way ANOVA.

divided into current or noncurrent smokers. The frequencies of consumption of each food and body mass index were categorized into three groups so that each category included an equal number as possible of controls. Family history of gastric cancer was regarded positive if at least one of their parents or siblings had gastric cancer. Because adjustment for confounding factors did not alter the results essentially, only adjusted ORs are listed in the tables. Trend was assessed by assigning ordinal values for categorical variables. To express the effect of the combination of *H. pylori* infection with either CagA or pepsinogen status on occurrence of gastric cancer among this population, we estimated the population attributable fraction (PAF; %) as follows: $\text{Pr}(\text{OR} - 1) / \text{OR}$, where Pr is the proportion of cases exposed to the factor and OR is the adjusted OR (21). The PAF (95% CI) was estimated by the formula of Greenland (22). Reported *P*s were two-sided, and all statistical analyses were done with the use of the SAS software version 9.1 (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

Results

Baseline characteristics are shown in Table 1. Cases had a lower body mass index and more family history of gastric cancer than controls. In addition, these differences were statistically significant. Other variables, including matching variables, did not significantly differ between cases and controls.

Adjusted OR of gastric cancer associated with *H. pylori* IgG seropositivity was shown for all subjects and by stratification with gender, age at baseline, duration between blood donation and cancer diagnosis, tumor location, and histologic type (Table 2). *H. pylori* IgG seropositivity was significantly associated with an increased risk of gastric cancer; adjusted ORs and 95% CIs were calculated as 5.1 (3.2-8.0). PAF (95% CI) for *H. pylori* IgG seropositivity was calculated as 75.2% (63.3-83.2%). The OR for *H. pylori* infection was large in men compared with women; however, the 95% CIs overlapped widely. *H. pylori* infection seemed to be more important in young subjects (40-49 years) than in older subjects (≥ 50 years). OR tended to decrease for gastric cancer when the duration between blood donation and cancer diagnosis became longer; the matched ORs (95% CIs) of *H. pylori* infection for the duration 0 to 4, 4 to 8, and ≥ 8 years were 7.4 (3.4-16.2), 4.9 (2.2-10.9), and 4.5 (1.8-11.4). This result did not differ when the tumor was restricted to the distal part of the stomach. *H. pylori* infection was associated with the development of gastric cancer located in the distal portion of the stomach, whereas a statistically significant association was not observed for cancer in the upper third of the stomach. Some 104 cases, which correspond to 20% of the total number of cases, could not be classified by subsite because of diffuse lesion (*n* = 16) or no information (*n* = 88) and further analysis was not restricted to distal gastric cancer. When the cases were separated by

histologic type, the association was statistically significant for both differentiated-type and undifferentiated-type gastric cancers. Although the 95% CIs greatly overlapped, the ORs were larger in the differentiated type than in the undifferentiated type.

Table 3 shows the proportion of cases and controls defined as positive for *H. pylori* CagA seropositivity or pepsinogen index alone and their combination with *H. pylori* IgG antibody together with the matched ORs (95% CIs). PAF also was calculated for each combination group of CagA, pepsinogen, and *H. pylori* IgG. CagA seropositivity was associated with a statistically significant increased risk of gastric cancer as well as *H. pylori* IgG seropositivity, although the magnitude was different; adjusted OR (95% CI) was calculated as 1.5 (1.1-2.1). When IgG-based *H. pylori* and CagA were combined, a statistically significant >3 -fold risk was observed among those who were *H. pylori* IgG negative but CagA positive. However, PAF (95% CI) for this group was calculated as only 3.6% (1.1-6.1%). When this group was excluded from the *H. pylori*-seronegative group, the OR (95% CI) for *H. pylori* infection was calculated as 11.4 (4.4-29.2). Among the *H. pylori*-seropositive group, the OR for CagA-negative group was 9.5, whereas the value for CagA positive was 12.5. When the *H. pylori* IgG-seronegative and CagA-positive group was included in the *H. pylori*-seropositive group, the OR (95% CI) for *H. pylori*-positive and/or CagA-positive group to develop gastric cancer was calculated as 10.2 (4.0-25.9).

The overall risk (95% CI) of having a pepsinogen value indicative of atrophy was calculated as 3.8 (2.7-5.4). ORs were shown by pepsinogen index (–) (~3+) according to the severity of atrophic gastritis and the risk increased further with pepsinogen levels, reflecting more severe gastritis (*P* < 0.0001). When *H. pylori* infection and pepsinogen status were combined, *H. pylori*-negative subjects with pepsinogen status indicative of the atrophic gastritis group showed a statistically significant association with gastric cancer; the adjusted OR (95% CI) was 4.9 (2.0-12.1). However, the PAF (95% CI) was

Table 2. Adjusted ORs (95% CIs) of developing gastric cancer for all subjects with *H. pylori* IgG seropositivity and with stratification by several factors

	No. <i>H. pylori</i> -positive cases/controls	Adjusted OR* (95% CI)
All subjects (511 pairs)	478/383	5.1 (3.2-8.0)
Gender		
Men (342 pairs)	327/259	6.8 (3.6-12.6)
Women (169 pairs)	151/124	4.6 (2.1-9.9)
Age at baseline (y)		
40-49 (77 pairs)	72/52	7.0 (1.8-27.4)
50-59 (235 pairs)	220/180	4.4 (2.2-8.7)
60-69 (199 pairs)	186/151	5.4 (2.5-11.6)
Duration between blood donation and cancer diagnosis (y)		
0-4 (205 pairs)	190/144	7.4 (3.4-16.2)
4-8 (181 pairs)	170/141	4.9 (2.2-10.9)
≥ 8 (125 pairs)	118/98	4.5 (1.8-11.4)
Tumor location		
Upper third of stomach, including cardia (39 pairs)	37/33	3.7 (0.2-68.4)
Distal portion of stomach (368 pairs)	344/274	5.1 (3.0-8.6)
Histologic type		
Differentiated type (299 pairs)	281/223	5.8 (3.1-10.8)
Undifferentiated type (159 pairs)	149/122	5.1 (2.1-12.3)

*Matched for age, gender, resident area, blood donation date, and fasting times at blood donation. Adjusted for smoking status, consumption of fish gut, green/yellow vegetables, other vegetables, fruit, green tea, body mass index, and family history of gastric cancer.

Table 3. Matched ORs (95% CIs) for association of gastric cancer with CagA strains and pepsinogen index alone and in combination with *H. pylori* IgG

	No. cases/controls	Adjusted OR* (95% CI)	PAF (95% CI), %
CagA status			
CagA (–)	121/153	1.0	
CagA (+)	390/358	1.5 (1.1-2.1)	
<i>H. pylori</i> (IgG) and CagA combined			
IgG (–) and CagA (–)	6/51	1.0	
IgG (–) and CagA (+)	27/77	3.2 (1.1-9.0)	3.6 (1.1-6.1)
IgG (+)	478/383	11.4 (4.4-29.2)	
IgG (+) and CagA (–)	115/102	9.5 (3.6-25.0)	20.1 (15.7-24.4)
IgG (+) and CagA (+)	363/281	12.5 (4.8-32.5)	65.4 (57.5-71.8)
IgG (+) and/or CagA (+)	505/460	10.2 (4.0-25.9)	89.1 (73.4-95.6)
Pepsinogen status			
Pepsinogen index (–)	92/216	1.0	
Pepsinogen index (+)	21/18	3.2 (1.5-7.0)	
Pepsinogen index (2+)	171/141	3.3 (2.2-4.8)	
Pepsinogen index (3+)	227/136	4.6 (3.1-6.9) [†]	
Pepsinogen index (+, ~3+)	419/295	3.8 (2.7-5.4)	
<i>H. pylori</i> (IgG) and pepsinogen index combined			
IgG (–) and pepsinogen index (–)	16/108	1.0	
IgG (–) and pepsinogen index (+, ~3+)	17/20	4.9 (2.0-12.1)	2.6 (1.0-4.3)
IgG (+)	478/383	7.9 (4.5-14.0)	
IgG (+) and pepsinogen index (–)	76/108	4.2 (2.2-8.0)	11.3 (7.4-15.1)
IgG (+) and pepsinogen index (+, ~3+)	402/275	10.1 (5.6-18.2)	70.9 (63.6-76.7)
IgG (+) and/or pepsinogen index (+, ~3+)	495/403	7.6 (4.3-13.4)	84.1 (73.1-90.6)

NOTE: Pepsinogen index (–), pepsinogen I >70 or pepsinogen I/II ratio >3; (+), pepsinogen I ≤70 and pepsinogen I/II ratio ≤3, excluding pepsinogen index 2+ and 3+; (2+), pepsinogen I ≤50 and pepsinogen I/II ratio ≤3, excluding pepsinogen index 3+; (3+), pepsinogen I ≤30 and pepsinogen I/II ratio ≤2.

*See footnote in Table 2.

[†] $P_{\text{trend}} < 0.0001$.

calculated as only 2.6% (1.0-4.3%). When this group was excluded from the *H. pylori*–seronegative group, the OR (95% CI) for *H. pylori* infection to develop gastric cancer became 7.9 (4.5-14.0). When this type of *H. pylori*–negative subjects with pepsinogen status indicative of atrophic gastritis group was added to the *H. pylori*–positive group, the OR (95% CI) for *H. pylori*–positive and/or pepsinogen-positive group to develop gastric cancer became 7.6 (4.3-13.4).

Discussion

To our knowledge, this is the largest nested case-control study, with >500 gastric cancer cases, to investigate the relationship between *H. pylori* infection and the subsequent risk of gastric cancer. The largest previous investigation of the kind was a Norwegian study that included only 208 gastric cancer cases (23). Including the Norwegian study, 12 studies were needed to pool 1,228 gastric cancer cases and to estimate the pooled OR of *H. pylori* infection for developing gastric cancer (1). Although the interpretation of a pooled analysis of several studies from different countries with different study methods may be limited, a carefully designed, single, large study may contribute significantly to solving the question of whether *H. pylori* infection induces gastric cancer. Our study showed a 5-fold elevated risk of gastric cancer for *H. pylori* infection determined by IgG antibody. According to the 12 case-control studies nested within prospective cohorts, the OR (95% CI) of *H. pylori* infection ranged from 1.50 (0.70-3.22) to 6.0 (2.1-17.3) and the pooled OR (95% CI) of these estimates was calculated as 2.36 (1.98-2.81; ref. 1). The largest OR among these studies was 6.0 in a study of Japanese American men living in Hawaii (24). In our study, the OR (95% CI) for men [6.8 (3.6-12.6)] was larger than even the Japanese American study. Only a few prospective studies have shown an association between *H. pylori* infection and gastric cancer for men and women separately. During 9-year follow-up in a prospective cohort study conducted in Japan, 67 gastric cancer cases were identified and the adjusted relative risks (95% CI) for *H. pylori* infection were calculated as 2.90 (1.14-7.38) for men and 1.01

(0.34-2.97) for women (25). On the other hand, Parsonnet et al. (26) showed that the OR (95% CI) of *H. pylori* infection was 2.0 (0.9-4.5) for men among 76 pairs and 18.0 (2.4-134.8) for women among 33 pairs. However, the 95% CIs are large because of the small numbers of subjects, making it difficult to interpret the results precisely. The different ORs of different age groups were in line with previous studies, which showed higher OR for the young subjects (23-25, 27-30). The effect is reduced in older subjects presumably because of increased seroprevalence among the older controls and little change in the seroprevalence among cases with age. In our study, ORs for *H. pylori* infection decreased as the follow-up time increased. Previous pooled analysis showed an association between an increasing time interval between sample collection and cancer diagnosis and a higher OR (1), although this association has not been seen in some individual studies (27, 28, 31). If gastric cancer is diagnosed only a short time after blood donation, it is hypothesized that the disease already would be in an advanced stage with gastric atrophy, which favors the loss of *H. pylori* infection and would lower the association between *H. pylori* infection and gastric cancer (32). However, several studies indicate that many subjects may still be seropositive in spite of the presence of atrophic gastritis (33-35). The OR for pepsinogen index also declined as the duration between the blood donation and cancer diagnosis increased (data not shown). The stronger association at relatively short follow-up times of pepsinogen index as a sign of atrophic gastritis can be understood on the basis that advanced atrophic gastritis is closely associated with gastric cancer. Previous studies have shown an increased risk of distal gastric cancer for *H. pylori*–seropositive subjects compared with seronegative subjects, whereas no association was observed among upper third gastric cancer (25-27) but not all (23, 36, 37). The discrepancy in results between studies may, to some extent, be due to different levels of misclassification of cardia cancers, such as the recent introduction of a separate diagnostic code, the lack of consensus for a definition of cardia, and an increased interest in cardia cancers (38, 39). The definition of cardia cancer (upper third) was more inclusive than most definitions used outside Japan and would include

an unknown proportion of what others would categorize as noncardia cancers. This will dilute any cardia-specific risk associations. The similar estimated risk by histologic type is in line with most of the previous studies.

Antibodies to CagA remain longer after *H. pylori* eradication than surface antibodies detected by conventional IgG ELISA (7). Thus, several studies recommend using both *H. pylori* IgG antibody test and CagA seropositivity to define *H. pylori* infection appropriately (36, 40-44). *H. pylori*-seronegative group with CagA positivity showed a statistically significant 3-fold risk of gastric cancer. When subjects in this group were further divided by pepsinogen status, the OR (95% CI) for those having a pepsinogen index indicative of atrophic gastritis was elevated to 10.2 (2.8-37.5), whereas the value for those having a pepsinogen index indicative of normal mucosa was 2.0 (0.7-6.2). This indicates that among this group those with developed atrophic gastritis are strongly associated with gastric cancer development. In dealing with the false-negatives for *H. pylori* status, we excluded the *H. pylori* IgG-seronegative and CagA-positive group from the *H. pylori*-seronegative group or added this group to the *H. pylori*-seropositive group. Then, the OR of *H. pylori* infection to develop gastric cancer was doubled to ~10 by either approach. This means that, even in a prospective study followed for >10 years like this, the effect of *H. pylori* infection might be underestimated by a single test of *H. pylori* IgG.

Although CagA was effective to define the false-negative group of *H. pylori* infection, its effect modification among the *H. pylori*-positive group was not as marked as expected. Accumulating evidence indicates there is an association between clinical outcome and genotype of the CagA pathogenicity island as well as CagA serology in Western patients but not in Japanese patients (45-47). However, a recent case-control study (48) conducted in Japan showed a >13-fold risk of noncardia gastric cancer for both *H. pylori* IgG- and CagA-positive subjects compared with subjects who are negative for both. Furthermore, Tatemichi et al. (49) investigated ethnic differences of CagA serology in two sets of case-control subjects, Japanese Brazilians and non-Japanese Brazilians; the CagA antibody also was found to be a useful marker for gastric cancer in Japanese subjects. Nevertheless, numerical results from studies using different antigens and different protocols may not be comparable, and Yamaoka and Graham pointed out that serologic tests yield a lower estimate of CagA status than PCR or immunoblotting of *H. pylori* isolates (50). They also examined the reliability of the serum anti-CagA antibody assay using four different tests and concluded that none could be recommended for determining the CagA status (51). Our measurement of CagA status was based on ELISA kit from Scti. Misclassification due to measurement tool and assay performance may be inevitable. Thus, much caution may be needed in interpreting the results regarding CagA status.

The severity of atrophic gastritis indicated by the pepsinogen index was associated with gastric cancer with a significant trend. In addition, for the combination of *H. pylori* and pepsinogen status, subjects were further divided by the severity of atrophic gastritis among *H. pylori*-seronegative and pepsinogen-positive groups. More severe atrophy was associated with a higher OR of developing gastric cancer. The ORs for pepsinogen index 2+ and 3+ were 3.3 and 6.5, respectively. Likewise, the severity was associated with a high OR among *H. pylori*-seropositive subjects; the value for *H. pylori* seropositivity and pepsinogen index +, 2+, and 3+ were calculated as 7.8, 8.7, and 12.6, respectively.

A recent prospective endoscopic cohort study showed the combination of serum pepsinogen and anti-*H. pylori* antibody provides a good predictive marker for the development of gastric cancer (52). Compared with "normal" pepsinogen and negative *H. pylori* antibody group, the hazard ratios (95%

CI) of developing gastric cancer for normal pepsinogen and positive *H. pylori* antibody group, atrophic pepsinogen and positive *H. pylori* antibody group, and atrophic pepsinogen and negative *H. pylori* antibody group were 1.1 (0.4-3.4), 6.0 (2.4-14.5), and 8.2 (3.2-21.5), respectively. In addition, a case-control study conducted in Japan showed the largest OR of gastric cancer in the positive pepsinogen and negative *H. pylori* infection group compared with other combination groups (53). In our study, although a statistically significant, ~5-fold risk of developing gastric cancer was observed among those who were *H. pylori* IgG-seronegative and pepsinogen-positive, the PAF (95% CI) was calculated as only 2.6% (1.0-4.3%).

One of the disadvantages of the present study is that the diagnosis of atrophic gastritis is based on a serologic rather than a pathologic test. The reported sensitivity was not high, so there may be misclassification of pepsinogen status.

Our study subjects are restricted to those who participated at the baseline health checkup survey. Among 97,644 eligible subjects of the JPHC Study cohort, 36,745 (38%) men and women participated in the survey and provided blood samples. As reported previously, when compared with nonparticipants, participants in the health checkup survey, especially women, had a different socioeconomic status and a favorable lifestyle profile, such as smoking less, participating in more physical exercise, and eating more green vegetables or fruits (54). This finding means that caution is needed in generalizing or interpreting the results in this report.

In our study, a 5-fold elevated risk of gastric cancer was observed for *H. pylori* infection determined by IgG antibody. Assuming all CagA-positive subjects are true *H. pylori* positives approximately doubled this risk. The large PAF relating *H. pylori* infection and gastric cancer also indicates that controlling infection might prevent gastric cancer. However, whether eradication of *H. pylori* is the best approach remains to be seen. The best timing for treatment is not known with certainty (55, 56), and as only a limited number of people with *H. pylori* infection develop gastric cancer, indiscriminate eradication may not be a practical, cost-effective approach. Subjects with pepsinogen levels indicative of severe atrophic gastritis may need careful examination regularly regardless of *H. pylori* infection. Those who have other pepsinogen levels but who test seropositive for *H. pylori* infection are likely to benefit from *H. pylori* eradication therapy. Considering both the cost and the potential for misclassification that may occur using multiple serologic tests, caution is needed in interpreting or extrapolating these findings into a screening strategy.

Appendix Notes

The members of the JPHC-based Prospective Study Group are S. Tsugane, M. Inoue, T. Sobue, and T. Hanaoka (National Cancer Center, Tokyo); J. Ogata, S. Baba, T. Mannami, and A. Okayama (National Cardiovascular Center, Suita); K. Miyakawa, F. Saito, A. Koizumi, Y. Sano, and I. Hashimoto (Iwate Prefectural Ninohe PHC, Ninohe); Y. Miyajima, N. Suzuki, S. Nagasawa, and Y. Furusugi (Akita Prefectural Yokote PHC, Yokote); H. Sanada, Y. Hatayama, F. Kobayashi, H. Uchino, Y. Shirai, T. Kondo, R. Sasaki, Y. Watanabe, and Y. Miyagawa (Nagano Prefectural Saku PHC, Saku); Y. Kishimoto, E. Takara, T. Fukuyama, M. Kinjo, M. Irei, and H. Sakiyama (Okinawa Prefectural Chubu PHC, Okinawa); K. Imoto, H. Yazawa, T. Seo, A. Seiko, F. Ito, and F. Shoji (Katsushika PHC, Tokyo); A. Murata, K. Minato, K. Motegi, and T. Fujieda (Ibaraki Prefectural Mito PHC, Mito); K. Matsui, T. Abe, M. Katagiri, and M. Suzuki (Niigata Prefectural Kashiwazaki and Nagaoka PHC, Kashiwazaki and Nagaoka);

M. Doi, A. Terao, and Y. Ishikawa (Kochi Prefectural Chuohigashi PHC, Tosayamada); H. Sueta, H. Doi, M. Urata, N. Okamoto, and F. Ide (Nagasaki Prefectural Kamigoto PHC, Arikawa); H. Sakiyama, N. Onga, and H. Takaesu (Okinawa Prefectural Miyako PHC, Hirara); F. Horii, I. Asano, H. Yamaguchi, K. Aoki, S. Maruyama, and M. Ichii (Osaka Prefectural Suita PHC, Suita); S. Matsushima and S. Natsukawa (Saku General Hospital, Usuda); M. Akabane (Tokyo University of Agriculture, Tokyo); M. Konishi and K. Okada (Ehime University, Matsuyama); H. Iso and Y. Honda (Tsukuba University, Tsukuba); H. Sugimura (Hamamatsu University, Hamamatsu); Y. Tsubono (Tohoku University, Sendai); M. Kabuto (National Institute for Environmental Studies, Tsukuba); S. Tominaga (Aichi Cancer Center Research Institute, Nagoya); M. Iida and W. Ajiki (Osaka Medical Center for Cancer and Cardiovascular Disease, Osaka); S. Sato (Osaka Medical Center for Health Science and Promotion, Osaka); N. Yasuda (Kochi Medical School, Nankoku); S. Kono (Kyushu University, Fukuoka); K. Suzuki (Research Institute for Brain and Blood Vessels Akita, Akita); Y. Takashima (Kyorin University, Mitaka); E. Maruyama (Kobe University, Kobe); the late M. Yamaguchi, Y. Matsumura, S. Sasaki, and S. Watanabe (National Institute of Health and Nutrition, Tokyo); and T. Kadowaki (Tokyo University, Tokyo).

Acknowledgments

We thank all the staff members in each study area for their painstaking efforts to conduct the baseline survey and follow-up.

References

1. *Helicobacter* and Cancer Collaborative Group. Gastric cancer and *Helicobacter pylori*: a combined analysis of 12 case-control studies nested within prospective cohorts. *Gut* 2001;49:347–53.
2. Karnes WE, Jr., Samloff IM, Siurala M, et al. Positive serum antibody and negative tissue staining for *Helicobacter pylori* in subjects with atrophic body gastritis. *Gastroenterology* 1991;101:167–74.
3. Crabtree JE, Covacci A, Farmery SM, et al. *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with CagA positive phenotype. *J Clin Pathol* 1995;48:41–5.
4. Cover TL, Glupczynski Y, Lage AP, et al. Serologic detection of infection with CagA⁺ *Helicobacter pylori* strains. *J Clin Microbiol* 1995;33:1496–500.
5. Blaser MJ. Intrastrain differences in *Helicobacter pylori*: a key question in mucosal damage? *Ann Med* 1995;27:559–63.
6. Kuipers EJ, Perez-Perez GI, Meuwissen SG, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the CagA status. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:2111–5.
7. Klaamas K, Held M, Wadstrom T, Lipping A, Kurtenkov O. IgG immune response to *Helicobacter pylori* antigens in patients with gastric cancer as defined by ELISA and immunoblotting. *Int J Cancer* 1996;67:1–5.
8. Samloff IM, Varis K, Ihmaki T, Siurala M, Rotter JL. Relationships among serum pepsinogen I, serum pepsinogen II, and gastric mucosal histology: a study in relatives of patients with pernicious anemia. *Gastroenterology* 1982;83:204–9.
9. Miki K, Ichinose M, Shimizu A, et al. Serum pepsinogen as a screening test of extensive chronic gastritis. *Gastroenterol Jpn* 1987;22:1323–41.
10. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process. *Cancer Res* 1992;52:6735–40.
11. Kabuto M, Imai H, Tsugane S, Watanabe S. Correlation between atrophic gastritis prevalence and gastric cancer mortality among middle-aged men in 5 areas in Japan. *J Epidemiol* 1993;3:35–9.
12. Watanabe S, Tsugane S, Sobue T, Konishi M, Baba S; for the JPHC Study Group. Study design and organization of the JPHC Study. *J Epidemiol* 2001;11:S3–7.
13. Tsugane S, Fahey MT, Sasaki S, Baba S. Alcohol consumption and all-cause and cancer mortality among middle-aged Japanese men: seven-year follow-up of the JPHC Study cohort I. *Am J Epidemiol* 1999;150:1201–7.
14. Sobue T, Yamamoto S, Hara M, Sasazuki S, Sasaki S, Tsugane S; for the JPHC Study Group. Cigarette smoking and subsequent risk of lung cancer by histologic type in middle-aged Japanese men and women: the JPHC Study. *Int J Cancer* 2002;99:245–51.
15. WHO. International classification of diseases for oncology. 2nd ed. Geneva: WHO; 1990.
16. Japanese Research Society for Gastric Cancer. The general rules for gastric cancer study. 12th ed. Tokyo: Kanehara; 1993.
17. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. *APMIS* 1965;64:31–49.
18. Fujioka T, Tokieda M. Validity of serum anti-*Helicobacter pylori* antibody using enzyme immunoassay for the diagnosis in eradication of *Helicobacter pylori* [in Japanese]. *Jpn J Med Pharm Sci* 2000;43:573–9.
19. Miki K. Basic evaluation of pepsinogen EIA kit [in Japanese]. *Jpn J Med Pharm Sci* 1997;37:1013–21.
20. Watanabe Y, Kurata JH, Mizuno S, et al. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. A nested case-control study in a rural area of Japan. *Dig Dis Sci* 1997;42:1383–7.
21. Miettinen OS. Proportion of disease caused or prevented by a given exposure, trait or intervention. *Am J Epidemiol* 1974;99:325–32.
22. Greenland S. Letter to the editor. Re: “Confidence limits made easy: interval estimation using a substitution method.” *Am J Epidemiol* 1999;149:884.
23. Hansen S, Melby KK, Aase S, Jellum E, Vollset SE. *Helicobacter pylori* infection and risk of cardia cancer and non-cardia gastric cancer. *Scand J Gastroenterol* 1999;34:353–60.
24. Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Kato I, Perez-Perez GI, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N Engl J Med* 1991;325:1132–6.
25. Yamagata H, Kiyohara Y, Aoyagi K, et al. Impact of *Helicobacter pylori* infection on gastric cancer incidence in a general Japanese population. The Hisayama Study. *Arch Intern Med* 2000;160:1962–8.
26. Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, et al. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1991;325:1127–31.
27. Siman JH, Forsgren A, Berglund G, Floren CH. Association between *Helicobacter pylori* and gastric carcinoma in the city of Malmö, Sweden. A prospective study. *Scand J Gastroenterol* 1997;32:1215–21.
28. Webb PM, Yu MC, Forman D, et al. An apparent lack of association between *Helicobacter pylori* infection and risk of gastric cancer in China. *Int J Cancer* 1996;67:603–7.
29. Aromaa A, Kosunen TU, Knekt P, et al. Circulating anti-*Helicobacter pylori* immunoglobulin A antibodies and low serum pepsinogen I level are associated with increased risk of gastric cancer. *Am J Epidemiol* 1996;144:142–9.
30. Lin JT, Wang LY, Wang JT, Wang TH, Yang CS, Chen CJ. A nested case-control study on the association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer risk in a cohort of 9775 men in Taiwan. *Anticancer Res* 1995;15:603–6.
31. Forman D, Newell DG, Fullerton F, et al. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *BMJ* 1991;302:1302–5.
32. Forman D, Webb P, Parsonnet J. *H. pylori* and gastric cancer [letter]. *Lancet* 1994;343:243–4.
33. Karnes WJ, Samloff IM, Siurala M, et al. Positive serum antibody and negative tissue staining for *Helicobacter pylori* in subjects with atrophic body gastritis. *Gastroenterology* 1991;101:167–74.
34. Kuipers EJ, Uytterlinde AM, Pena AS, et al. Long-term sequelae of *Helicobacter pylori* gastritis. *Lancet* 1995;345:1525–8.
35. Cutler AF, Prasad VM. Long-term follow-up of *Helicobacter pylori* serology after successful eradication. *Am J Gastroenterol* 1996;91:229–32.
36. Limburg PJ, Qiao YL, Mark SD, et al. *Helicobacter pylori* seropositivity and subsite-specific gastric cancer risks in Linxian, China. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:226–33.
37. Yuan JM, Yu MC, Xu WW, Cockburn M, Gao YT, Ross RK. *Helicobacter pylori* infection and risk of gastric cancer in Shanghai, China: updated results based upon a locally developed and validated assay and further follow-up of the cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:621–4.
38. Powell J, McConkey CC. Increasing incidence of adenocarcinoma of the gastric cancer and adjacent sites. *Br J Cancer* 1990;62:440–3.
39. Misumi A, Murakami A, Harada K, Baba K, Akagi M. Definition of carcinoma of the gastric cardia. *Langenbecks Arch Chir* 1989;374:221–6.
40. Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelstein H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1997;40:297–301.
41. Kikuchi S, Crabtree JE, Forman D, Kurosawa M. Association between infections with CagA-positive or -negative strains of *Helicobacter pylori* and risk for gastric cancer in young adults. Research Group on Prevention of Gastric Carcinoma among Young Adults. *Am J Gastroenterol* 1999;94:3455–9.
42. Torres J, Perez-Perez GI, Leal-Herrera Y, Munoz O. Infection with CagA⁺ *Helicobacter pylori* strains as a possible predictor of risk in the development of gastric adenocarcinoma in Mexico. *Int J Cancer* 1998;78:298–300.
43. Ekstrom AM, Held M, Hansson L-E, Engstrand L, Nyren O. *Helicobacter pylori* in gastric cancer established by CagA immunoblot as a marker of past infection. *Gastroenterology* 2001;121:784–91.
44. Brenner H, Arndt V, Stegmaier C, Ziegler H, Rothenbacher D. Is *Helicobacter pylori* infection a necessary condition for noncardia gastric cancer? *Am J Epidemiol* 2004;159:252–8.
45. Censini S, Lange C, Xiang Z, et al. Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:14648–53.
46. Ito Y, Azuma T, Ito S, et al. Analysis and typing of vacA gene from CagA-positive strains of *Helicobacter pylori* isolated in Japan. *J Clin Microbiol* 1997;35:1710–4.
47. Shimoyama T, Fukuda S, Tanaka M, Mikami T, Saito Y, Munakata A. High prevalence of the CagA-positive *Helicobacter pylori* strains in Japanese

- asymptomatic patients and gastric cancer patients. *Scand J Gastroenterol* 1997;32:465–8.
48. Montani-Machida A, Sasazuki S, Inoue M, et al. Association of *Helicobacter pylori* infection and environmental factors in non-cardia gastric cancer in Japan. *Gastric Cancer* 2004;7:46–53.
 49. Tatemichi M, Hamada GS, Nishimoto IN, et al. Ethnic difference in serology of *Helicobacter pylori* CagA between Japanese and non-Japanese Brazilians for non-cardia gastric cancer. *Cancer Sci* 2003;94:64–9.
 50. Yamaoka Y, Graham DY. CagA status and gastric cancer: unreliable serological tests produce unreliable data. *Gastroenterology* 1999;117:745–51.
 51. Yamaoka Y, Kodama T, Graham DY, et al. Comparison of four serological tests to determine the CagA or VacA status of *Helicobacter pylori* strains. *J Clin Microbiol* 1998;36:3433–4.
 52. Watabe H, Mitsuhsima T, Yamaji Y, et al. Predicting the development of gastric cancer from combining *Helicobacter pylori* antibodies and serum pepsinogen status: a prospective endoscopic cohort study. *Gut* 2005;54:764–8.
 53. Kitahara F, Shimazaki R, Sato T, Kojima Y, Morozumi A, Fujino M. Severe atrophic gastritis with *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Gastric Cancer* 1998;1:118–24.
 54. Iwasaki M, Otani T, Yamamoto S, et al.; for the JPHC Study Group. Background characteristics of basic health examination participants: the JPHC Study baseline survey. *J Epidemiol* 2003;13:216–25.
 55. Kikuchi S. Epidemiology of *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Gastric Cancer* 2002;5:6–15.
 56. Parsonnet J, Forman D. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: for want of more outcomes. *JAMA* 2004;291:244–5.

組織標本作製法の実際 - 講義と実習 -

山本 好男（社会医学講座・法医学）

ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色は、ほとんど全ての染色の基本をなすものであって病理組織学的検討、形態学的観察に欠かせない染色法である。薄切した組織標本を脱パラフィン後ヘマトキシリン溶液およびエオジン溶液で染色する。その染色態度は、核はヘマトキシリンで紫藍色に、原形質、結合組織および各種細胞間物質などはエオジンで種々の濃さに赤染される。また、赤血球は強く赤染する。したがって、この染色法は標本がどのような組織から構成されるかを把握するために都合のよい染色法である。

また、免疫組織化学は、組織細胞の形態学的な観察およびタンパク質や酵素、ホルモンなどの機能的な証明が一度に行える手法であり、構造と機能の同時証明（観察）が可能である。この方法は抗原抗体反応の特異反応を基盤としており、抗原と結合した特異抗体の局在を、酵素組織化学を用いて証明するもので、現在、形態研究法として幅広く用いられている方法である。

今回の講習会では、組織標本作製法の実際として、まず、①ホルマリン固定 ②脱水、パラフィン包埋 ③切片・薄切作製 ④脱パラフィン ⑤染色・脱水および抗原抗体反応・可視化 ⑥封入 ⑦顕微鏡観察について知っておかなければならない点、知っておけば便利な点を解説する。

さらに、実習として、固定、薄切、HE 染色、免疫染色、観察法についてそれぞれの実際を体験する。また、実際に組織学的な検討を加えようとする際の準備すべき試薬や器具類、従来から使用されているものや有ると便利なものなどについての解説および応用編としてのその他の染色方法についても概説する。

実習内容

実習1 パラフィン包埋ブロック薄切法

ミクロトームの使い方と薄切標本の作製

実習2 ヘマトキシリン-エオジン染色 (HE 染色)

各自、HE 染色を行う

実習3 免疫組織染色法

各自、免疫染色を行う

実習4 標本観察法

光学顕微鏡使用法の解説と標本観察についての実習を行う

組織標本作製法の実際 ー講義と実習ー

社会医学講座法医学	山本好男
実験実習支援センター	山元武文
実験実習支援センター	森 康博

H20大学院集中講義・特別講習会

はじめに

病理組織診断学、解剖組織学、動物
実験・培養細胞実験等の分野では鏡
顕に耐えうる正確な組織標本作製
することが重要である。⇐作製者の
技術と経験

組織の固定、切り出し、脱灰、脱水、包埋、薄切、
染色、封入等について解説を加える。

H20大学院集中講義・特別講習会

組織の摘出

- 目的臓器の目的場所を切り出す。
- 極力小さい組織片とすることが安定した良好な結果を得ることにつながる。

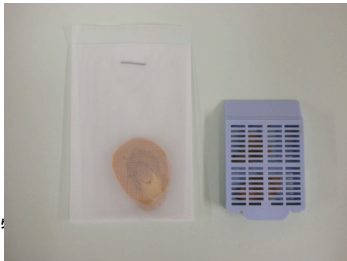
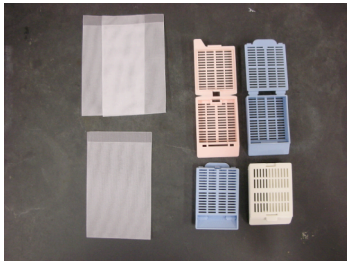
H20大学院集中講義・特別講習会

固 定

- 組織・細胞を生活状態にあるままで観察できればそれに勝るものは無い。しかし、摘出された臓器は直ちに死後変化を開始する。固定の目的はこの変化を停止させ、一定の構成成分を凝固、沈殿させる（タンパク質の変性）とともに、一部の物質を溶出させることにより、組織細胞学的検索に適した状態に整える。
- さらに組織化学では、検出系に用いる活性を保存したまま、目的物質を細胞内に固定させる必要がある。

H20大学院集中講義・特別講習会

固定・トリミング



院集中講義・

固定



図 2 各種固定液による 10 時間
固定後の組織片の状態

表 2 各種固定液による組織片容積の変化	
固定液	容積比 (%)*
10% 緩衝ホルマリン	97.4
5% ホルマリン	101.9
10% ホルマリン	97.7
20% ホルマリン	95.8
カルノア液	77.8
純アルコール	82.6
ブアン液	88.4

数値は何れも平均値
* 容積比(%)=固定後の容積/固定前の容積×100

脱水・包埋

- 薄切に際して組織片のままでは組織の柔軟性や硬度のばらつき、空所や間隙の存在などから均一な厚さの切片を得ることができない。そのため適当な硬度を有する包埋剤を組織に浸透させ、固化、支持する。
- なお、組織化学や脂肪染色などの固定または脱水作用を避けたい場合は未固定または試料を凍結固化し、薄切する。

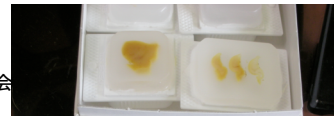
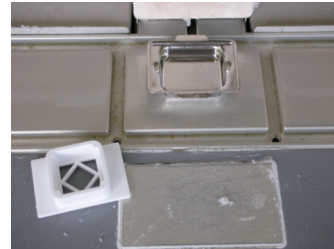
H20大学院集中講義・特別講習会

自動包埋装置



H20大学院集中講義・特別講習会

パラフィンブロック作製装置



Tissue-Tekコンソール
H20大学院集中講義・特別講習会

組織片の容積変化

表 3 固定からパラフィン包埋までの組織片の容積の変化

	肺 臓	心 臓	肝 臓
組 織 片 数	8	8	10
固 定	100	100	100
水 洗	102.6±4.2*1	102.1±7.9	98.8±3.9
70% アルコール	96.0±4.7	85.9±5.3	95.3±4.3
80% アルコール	83.3±5.1	77.5±6.2	88.2±4.9
90% アルコール	79.7±6.4	74.0±5.7	84.0±5.2
95% アルコール	79.1±5.8	74.5±5.4	85.6±9.5
99.5% アルコール	78.0±7.8	69.5±5.3	81.4±3.3
無水 アルコール	78.1±9.2	70.7±5.3	80.0±3.7
安息香酸メチル*2	73.1±10.5	74.2±6.5	80.5±4.3
安息香酸メチル*2	71.6±9.7	73.9±8.4	77.6±4.6
ベンゼン	69.5±4.2	66.4±6.0	70.5±2.5
軟パラフィン	59.7±10.6	57.0±6.9	60.2±1.9
硬パラフィン	—	—	—
硬パラフィン	55.4±9.3	60.6±1.5	58.9±5.0
包 埋	49.4±2.6	49.1±2.4	52.5±5.7

各操作終了時に計測

*1: 平均±標準偏差

*2: 安息香酸メチル+1% セロイジン

薄 切

- 一般に透過型の顕微鏡観察では、光線を透過し、組織の重積による像の煩雑さを解消するために試料の厚さを極力薄く切ることが望ましい。
- 薄切の方法と切片の厚さ

一般のミクロトーム・パラフィン包埋 4 - 10 μm

一般のミクロトーム・セロイジン包埋 20 - 100 μm

一般のミクロトーム・凍結試料 20 - 100 μm

クリオスタット・凍結試料 2 - 20 μm

ウルトラミクロトーム・樹脂包埋（電顕用） 50 - 70nm

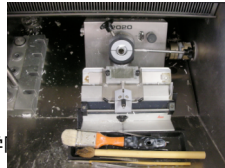
H20大学院集中講義・特別講習会

薄 切

ユング式
ミクロトーム



凍結切片作製用
クリオスタット

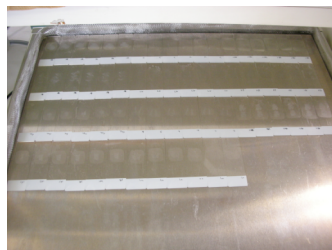


貼 付

- 多くの場合、薄切後切片をスライドグラスに貼付ける。薄切した切片を水やお湯の上に浮かべ、切片をよく伸展させ、スライドグラス上にとる。その後伸展器や孵卵器内で温度をかけ伸展・貼付する。
- 脳組織などのようにはがれやすい組織や免疫染色を施す場合には、あらかじめメリジンやシランで表面処理（コート）したスライドグラスを用いるとはがれにくい。

H20大学院集中講義・特別講習会

貼付・伸展



院集中講義・特別

染 色

- 顕微鏡用標本に用いる染色液の大部分は水溶性である。そこで染色に先立って疎水性の包埋剤（パラフィンなど）を除去しなくてはならない。
- パラフィン包埋の場合、キシレンでパラフィンを溶かし、アルコールでキシレンを除去し、水洗することにより親水化する。その後、目的の染色液で染色する。

H20大学院集中講義・特別講習会

HE染色



H20大学院集中講義・特別講習会

脱水・透徹・封入

- ・ 封入剤の多くは、水になじまない油溶性である。包埋の操作で述べたと同様の手順でアルコールにより切片中の水分を除去する（脱水）とともにキシレンで切片を透明にする（透徹）。
- ・ さらに封入剤を用い切片の透明度を保ち乾燥を防ぎ、カバーガラスで覆う。

H20大学院集中講義・特別講習会

観 察

- ・ 顕微鏡は、試料を照明し、対物レンズと接眼レンズで拡大された像を観察するもので、観察する標本・研究目的に応じてさまざまな改良が加えられている。



H20大学院集中講義・特別講習会

Hematoxylin Eosin染色（HE染色）

- | | | | |
|-------------------------|--------|---|------|
| 1) 脱パラフィン | | 5) 水洗 | |
| キシレン | 5分 | 余分の色素を洗い流す程度（軽く・省略可） | |
| キシレン | 5分 | 6) 脱水（エオジンの分別および脱水） | |
| キシレン | 10分 | 70%エタノール | 1～3分 |
| 100%エタノール | 1～5分 | 80%エタノール | 1～3分 |
| 100%エタノール | 1～5分 | 90%エタノール | 1～3分 |
| 95%エタノール | 1～5分 | 100%エタノール | 1～3分 |
| 90%エタノール | 1～5分 | 100%エタノール | 1～3分 |
| 80%アルコール | 1～5分 | 7) 透徹（脱水補助および透徹） | |
| 70%アルコール | 1～5分 | キシレン | 1～2分 |
| 水洗 | | （カルボールキシレンまたはフェノールキシレンを使用することがある） | |
| 流水洗または水を換えながら5～6回洗う | | キシレン | 3～5分 |
| 2) ヘマトキシリン（核染色） | | キシレン | 3～5分 |
| マイヤーのヘマトキシリン液 | 3～5分 | 8) 封入 | |
| ヘマトキシリン液により時間を変える | | エンタランニューなどの封入剤を用い組織にカバーガラスをかける（永久標本完成）。 | |
| 3) 水洗（色出し） | | | |
| 流水 | 10～20分 | | |
| 核のみが染色され、背景が無色かごく薄く染まる。 | | | |
| 4) エオジン（細胞質、細胞間質などの染色） | | | |
| | 2～4分 | | |

H20大学院集中講義・特別講習会

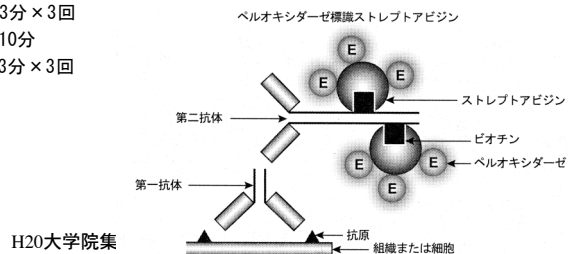
HE染色態度

- 細胞核、軟骨組織、石灰部位：青紫色～暗青紫色
 - 細胞質、結合組織の膠原線維、筋肉線維：淡紅色～濃桃色
 - 骨（非脱灰）：青紫色
 - 骨（脱灰）：淡紅色
 - 赤血球、好酸球：鮮紅色
- ＜コツ＞水溶性のエオジン液が濃く染まりすぎると構造の鮮明な輪郭がつかなくなる。
最適な染色：核をやや濃くヘマトキシリンで染色し、エオジンを薄くかける

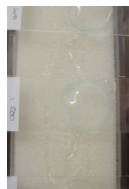
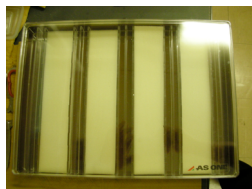
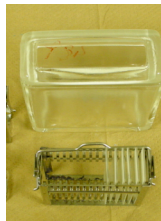
H20大学院集中講義・特別講習会

Streptavidin – biotin peroxidase complex法（S-ABC法）

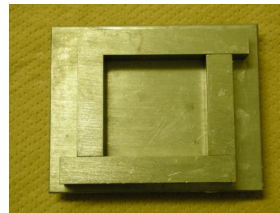
- | | |
|----------------------------|---------------------------------|
| 1) パラフィン後水洗（HE染色の項参照） | 11) HRP標識ストレプトアビジン 5分 |
| 2) PAP-PENにて組織の周囲を囲む | 12) PBS 3分×3回 |
| 3) PBS 2～3分 | 13) DAB solution 5～10分 |
| 以後、組織を乾燥させないように、湿潤箱内で反応させる | （顕微鏡下で反応を確認する） |
| 4) 3%過酸化水素メタノール溶液 10分 | 14) 水洗蒸留水（反応停止をかねる）5～6回上下する。 |
| 5) PBS 2分×3回 | 15) ヘマトキシリンまたはメチルグリーンで核染 30～60秒 |
| 6) 10%正常血清 10分 | 16) 色出し（流水） 5～10分 |
| 7) 一次抗体（目的の抗体） 60分 | 17) アルコール脱水、透徹、封入（HE染色の項参照） |
| （室温） | |
| 8) PBS 3分×3回 | |
| 9) ビオチン化二次抗体 10分 | |
| 10) PBS 3分×3回 | |



免疫染色

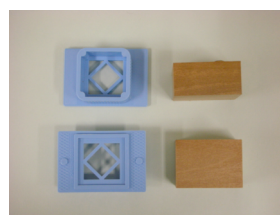
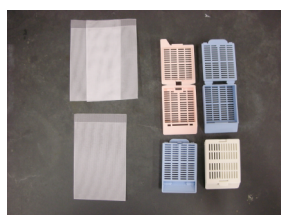


染色に便利なもの



H20大学院集中講義・特別講習会

有ると便利なもの



H20大学院集中講義・特別講習会

有ると便利なもの



H20大学院集中講義・特別講習会

組織標本作製法の実際 - 講義と実習 -

山本好男（社会医学講座・法医学）

山元武文（実験実習支援センター）

森 康博（実験実習支援センター）

組織標本作製に関する事項

組織標本の作製手順は、(1)組織の摘出、(2)固定、(3)脱水・包埋、(4)薄切、(5)貼付、(6)染色、(7)脱水・透徹・封入からなる。

1 組織摘出（切り出し）

目的臓器の目的場所を切り出す。極力小さい組織片とすることが安定した良好な結果を得ることにつながる。

2 固定

組織・細胞を生活状態にあるままで観察できればそれに勝るものは無い。しかし、摘出された臓器は直ちに死後変化を開始する。固定の目的は、この変化を停止させ、一定の構成成分を凝固、沈殿させる（タンパク質の変性）とともに、一部の物質を溶出させることにより、組織細胞学的検索に適した状態に整えることにある。

さらに組織化学では、検出系に用いる活性を保存したまま、目的物質を細胞内に固定させる必要がある。

2-1 固定の方法

灌流固定：麻酔下で生きている動物の新血管系から固定液を灌流

注入固定：生体または摘出後の臓器、とくに管腔臓器に固定液を注入

浸漬固定：摘出後の組織を固定液に浸漬

蒸気固定：切片、または新鮮臓器の組織小片を蒸気発生容器内に置く

2-2 固定剤の種類

凝固性：エタノール、メタノール、アセトン、ピクリン酸など

架橋性：ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒドなど

その他：重クロム酸カリウム、四酸化オスミウム、酢酸など

2-3 ホルマリン（浸漬固定に広く使用されている）

ホルマリンとは 40%ホルムアルデヒド溶液のことである。したがって、10%ホルマリン溶液は 4%ホルムアルデヒド溶液のことである。

中性ホルマリンは、炭酸カルシウムを加えてよく混和後沈殿させた上澄を用いる。

緩衝ホルマリンは、緩衝液で中性化したホルマリンであるが、組織化学ではパラホルムアルデヒドから溶かしたアルデヒド溶液を緩衝液で希釈して用いる。

パラホルムアルデヒドはホルムアルデヒドの重合体の一つで白色粉末である。水に溶けにくいので、アルカリ性の熱水 70-80℃に溶かしてホルムアルデヒド溶液を得る。4%ホルムアルデヒド溶液がよく用いられる。

2-4 代表的な固定液

10%ホルマリン水溶液：汎用

BOUIN 液：汎用、ホルマリン 25ml＋ピクリン酸飽和水溶液 75ml＋氷酢酸 5ml

純アセトン：血液塗抹標本や培養細胞の固定に汎用

純アルコール：水溶性物質、糖、粘液などの一般染色用、塗抹や培養試料

Canoy 液：汎用、純アルコール 60ml＋クロロホルム 30ml＋氷酢酸 10ml

Zenker 液：一般染色用とくに蛋白、重クロム酸カリ 2.5g＋硫酸ナトリウム 1g＋昇汞 5g＋氷酢酸 5ml＋水 100ml

3 脱水・包埋

薄切に際して組織片のままでは組織の柔軟性や硬度のばらつき、空所や間隙の存在などから均一な厚さの切片を得ることができない。そのため適当な硬度を有する包埋剤を組織に浸透させ、固化、支持する。

なお、組織化学や脂肪染色などの固定または脱水作用を避けたい場合は未固定または試料を凍結固化し、薄切する。

1) 脱水剤：エタノール、ブタノール、アセトン

50%、70%、90%、100%と順次脱水剤の濃度を上げていくことにより、急激な組織の収縮を防ぎながら脱水する。

2) 仲介剤：主としてパラフィン包埋時に、アルコール等の脱水剤とパラフィンの相方に親和性のあるものを用いる。キシレン、ベンゼン、安息香酸メチルなど

3) 包埋剤：パラフィン、セロイジン、寒天、ゼラチン、エポン（超薄切用）、OCT-compound（凍結切片用）

4 薄切

一般に透過型の顕微鏡観察では、光線を透過し、組織の重積による像の煩雑さを解消するために試料の厚さを極力薄く切ることが望ましい。

薄切の方法と切片の厚さ

薄切の方法	切片の厚さ
一般のミクロトーム・パラフィン包埋	4-10 μ m
一般のミクロトーム・セロイジン包埋	20-100 μ m
一般のミクロトーム・凍結試料	20-100 μ m
クリオスタット・凍結試料	2-20 μ m
ウルトラミクロトーム・樹脂包埋（電顕用）	50-70nm

5 貼付

多くの場合、薄切後切片をスライドグラスに貼付ける。薄切した切片を水やお湯の上に浮かべ、切片をよく伸展させ、スライドグラス上にとる。その後伸展器や孵卵器内で温度をかけ伸展・貼付する。脳組織などのようにはがれやすい組織や免疫染色を施す場合には、あらかじめリジンやシランで表面処理（コート）したスライドグラスを用いるとはがれにくい。

6 染色

顕微鏡用標本に用いる染色液の大部分は水溶性である。そこで染色に先立って疎水性の包埋剤（パラフィンなど）を除去しなくてはならない。

パラフィン包埋の場合、キシレンでパラフィンを溶かし、アルコールでキシレンを除去し、水洗することにより親水化する。その後、目的の染色液で染色する。

6-1 色素について

色素を水溶液とした場合、その有する基により、負または正に荷電する。その荷電状態により酸および塩基性色素に分ける。負が酸性、正が塩基性。

酸性色素：細胞質の染色に適する。OH, COOH, NO₂, SO₂OH 等の基を有する。

エオジン、ライト緑、酸性フクシンなど

塩基性色素：核、粘膜、神経要素、特殊分泌顆粒の染色に用いる。

NH₂、NHCH₃、N(CH₃)₂、NH 等の基を有する。

ヘマトキシリン、メチレン青、トルイジン青、アニリン青、

塩基性フクシン、チオニン、メチル緑など

なお、直接染料であるトリパン青、油溶性色素の Sudan 系、カルミン色素のアゾカルミン G などは、上記のどちらにも属さない。

MEMO

6-2 一般染色法・染色態度

染色法	色素	染色態度	
ヘマトキシリンエオジン染色	ヘマトキシリン	青	核
	エオジン	薄赤～桃色	細胞質
AZAN 染色	アゾカルミン	赤	核、赤血球
	オレンジ G	黄赤	分泌顆粒、コロイド
	アニリン青	青	膠原線維
Sudan 染色	ズダン 3	橙～赤	脂肪滴
	ズダン黒	黒	脂肪滴
PAS 染色	塩基性フクシンを含む schiff 液	紫紅～赤紫	多糖類
アルデヒドフクシン／アルデヒドチオニン染色	アルデヒドフクシン	濃紫色	-SS-基や-SH 基を有する物質に色素をつける。下垂体前葉・膵ランゲルハンス島の β 細胞、神経分泌物、弾性線維
	アルデヒドチオニン	深青色	
渡銀法	硝酸銀	褐色～黒褐色	神経細胞、神経線維、細網線維 好銀細胞、親銀細胞

7 脱水・透徹・封入

封入剤の多くは、水になじまない油溶性である。包埋の操作で述べたと同様の手順でアルコールにより切片中の水分を除去する（脱水）とともにキシレンで切片を透明にする（透徹）。さらに封入剤を用い切片の透明度を保ち乾燥を防ぎ、カバーグラスで覆う。

疎水性封入剤：ツェダックス、オイキット、エンテラン（合成樹脂）

水溶性の封入剤：グリセリン、ゴムシロップ 脂肪染色や組織化学などで脱水や透徹ができない場合に用いる。永久標本ではない。

8 観察

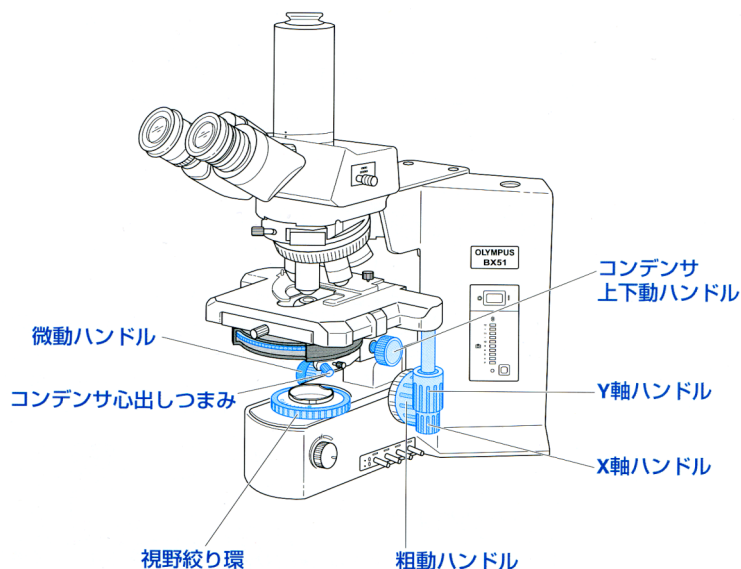
顕微鏡は、試料を照明し、対物レンズと接眼レンズで拡大された像を観察するもので、観察する標本・研究目的に応じてさまざまな改良が加えられている。手順（ステージ上下式の顕微鏡）

1. 光源の電源を入れる。
2. プレパラートをステージにのせる。
3. 最初は低倍率のレンズにしておく。
4. 横から見ながら調節ねじを回し、対物レンズの先端をプレパラートぎりぎりまで上げる。
5. のぞきながらステージを下げ、ピントを合わせる。いちばんよく見えるようにしぼりも変えてみる。
6. 倍率を上げるときは、見たいものが真中にくるようにしてからレボルバーを回し、高倍率の対物レンズにする。

9 顕微鏡の軸調整

現在の光学顕微鏡は、ケーラー照明法というフレアーやゴーストをできるだけ除去し、ムラが少なくコントラストのよい照明法が採用されている。

観察や写真撮影の際に、より鮮明な画像を取得するには、ケーラー照明の軸調整が必要となる。



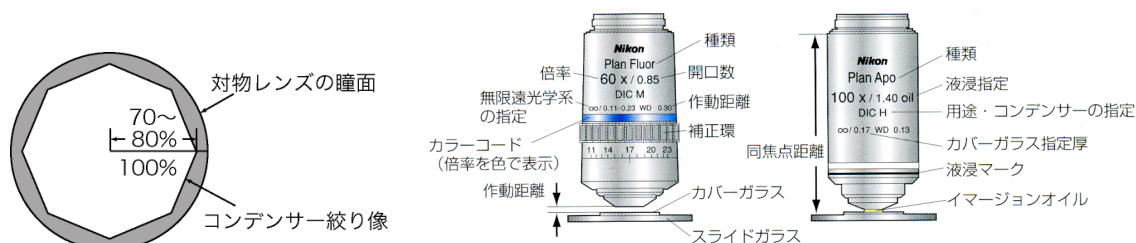
【手順】

- 1) 対物レンズを10倍にする。
- 2) 標本に焦点を合わせる。
- 3) 視野絞りを小さく絞り込み、コンデンサーレンズを上下させ、視野絞り像を標本面に結像させる。
- 4) 視野絞り像が視野の中心部にない場合は、視野絞り像をコンデンサーレンズの心出しつまみを回し中心部に移動させる。(このとき、絞りを徐々に開いてゆき調整するとよい。)
- 5) 観察するために、視野絞りを接眼レンズの視野に外接する程度まで広げる。



- 6) 対物レンズの倍率毎に、コンデンサー絞りを調整する。

- ・ 対物レンズの開口数 $\times 0.7 \sim 0.8 =$ コンデンサーレンズの目盛り
- ・ 接眼レンズを外して、コンデンサー絞り像を調整



実習1 パラフィン包埋ブロック薄切法

パラフィン包埋が終わった組織を、ミクロトームを用いて、 $2\text{--}6\mu\text{m}$ ($1\text{--}20\mu\text{m}$) の厚さに薄切する。ミクロトームには、メスが前後に動きブロックがわずかに上に動きながら切れる形式（滑走式）のものにユング型、シャンツエ型があり、メスは固定しブロックが少しずつ前進しながら上下に動くことによって切れる形式（回転式）のものにミノー型、スペンサー型などがある。

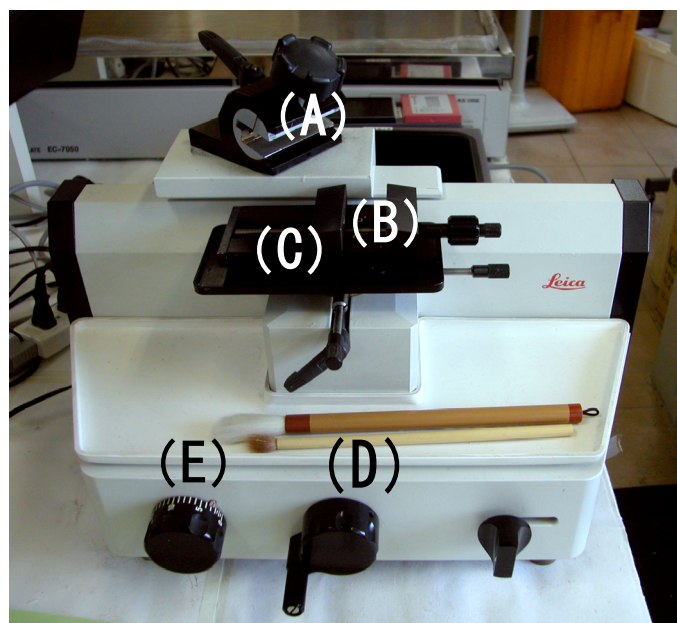
現在最も広く用いられているミクロトームはユング型で、替刃を用いれば $1\text{--}15\mu\text{m}$ の切片が可能である。回転式（ミノー型）は軟らかい組織から比較的厚い連続切片 ($10\text{--}20\mu\text{m}$) を作製するのに適している。

今回の実習に用いるユング型は図-1 に示すような型で、(A)部にメスを固定し、(B)部にブロックを挟んで固定する。続いて、(D)を回転することにより試料台(C)が上下する。薄切の厚さは(E)の目盛りで調節設定し、メスを装着した(A)を前後させることにより、所定の厚さの切片を薄切する。

薄切は以後の染色や組織化学を行う過程での、標本の出来、不出来を決定する非常に重要な操作であるが、理論を知ることよりも実際に習得することが大切である。

ミクロトームを用いて $5\mu\text{m}$ ($1\text{--}15\mu\text{m}$) に薄切した切片を、水に浮かべた後、ぬるま湯 ($40\text{--}50^{\circ}\text{C}$) に浮かべ、皺が伸びればスライドグラスにすくい取る。 60°C の孵卵器内で1時間以上（通常は 40°C 程度で一晩）乾燥させた後、一般染色や組織化学反応に進む。染色中に剥離しやすい組織や免疫組織化学を行う時は、あらかじめポリエリジンコートしたスライドグラスを使用する。

図-1 ユング型ミクロトーム



実習2 ヘマトキシリンエオジン染色

ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色は、ほとんど全ての染色の基本となるものであって病理組織学的検討に欠かせない染色法である。その染色態度は、核はヘマトキシリンで紫藍色に、原形質、結合組織および各種細胞間物質などはエオジンで種々の濃さに赤染される。また、赤血球は強く赤染する。したがって、この染色法は標本がどのような組織から構成されるかを把握するために都合がよい。

薄切した組織標本を脱パラフィン後、ヘマトキシリン溶液およびエオジン溶液で染色する。

【Hematoxylin Eosin 染色（HE 染色）】

1) 脱パラフィン

キシレン 5分

キシレン 5分

キシレン 10分

100%エタノール 1～5分

100%エタノール 1～5分

95%エタノール 1～5分

90%エタノール 1～5分

80%アルコール 1～5分

70%アルコール 1～5分

2) 水洗

流水洗または水を換えながら 5～6 回洗う

3) ヘマトキシリン（核染色）

マイヤーのヘマトキシリン液 *¹ 3～5分

ヘマトキシリン液により時間を変える

4) 水洗（色出し）

流水 10～20分 核のみが染色され、背景は無色かごく薄く染まる

エオジン *² 2～4分 細胞質、細胞間質などの染色

5) 水洗

余分の色素を洗い流す程度（軽く・省略可）

6) 脱水（エオジンの分別および脱水）

70%エタノール 1～3分

80%エタノール 1～3分

90%エタノール 1～3分

100%エタノール 1～3分

100%エタノール 1～3分

7) 透徹（脱水補助および透徹）

キシレン 1～2 分

（カルボールキシレンまたはフェノールキシレンを使用することがある）

キシレン 3～5 分

キシレン 3～5 分

8) 封入

エンテランニュー等の封入剤を用いて組織にカバーガラスをかける

（永久標本完成）

＊1 マイヤーのヘマトキシリン液（Mayer' s Hematoxylin）

ヘマトキシリン	1.0 g（色素）
ヨウ素酸ナトリウム	0.2 g（酸化剤）
硫酸アルミニウムカリ	50 g（媒染剤）
包水クロラル	50 g（安定剤）
クエン酸	1 g（酸）
蒸留水	1000 ml（溶媒）

ヘマトキシリン粉末を蒸留水に入れ加熱溶解し、続いてヨウ素酸ナトリウムと硫酸アルミニウムカリを入れて振盪して溶かす。その後、クエン酸と包水クロラルを加える。塩酸アルコールなどで脱色、分別すること無くそのまま水洗、色出しをする。液の保存は約3ヶ月。他に、Carazzi、Delafield、Weigert、Heidenhain、Gill、Bohmerらの処方がある。

＊2 Eosin 液

1.0%エオジン Y 水溶液	25 ml
1.0%フロキシシ	2.5 ml
95%エタノール	170 ml
酢酸	1.5 ml

9) 染色態度：核はヘマトキシリンで青色。細胞質、結合組織、各種細胞間物質はエオジン液にて種々の濃さに赤染される。

ヘマトキシリン (Hematoxylin)

Hematoxylin campechianum の心材のチップを水で抽出、抽出乾燥物をエーテルで連続抽出後、再結晶して製造された天然色素。ヘマトキシリン自身染色性はないが、酸化するとヘマチンが生じ、初めて可視部に吸収を持つ色素になる。

ヘマトキシリンは OH を持つので少しは生体部位と結合するが、強くないので、媒染剤（金属塩； Al^{3+} 、 Fe^{3+} ）を添加すると、ヘマチン中の OH と金属イオンがイオン結合し、ヘマチン-媒染剤結合物、すなわちレーキを形成する。レーキになるとヘマチンよりも長波長側（560nm）に吸収極大をもち、紫色を呈する。ヘマトキシリンの染色機序は一般に塩基性色素の性質を有し、組織内の負（-）に帯電している部分の DNA の PO_4^{3-} 、 SO_4^{2-} 、 COO^- とヘマトキシリンの Al^{3+} レーキとイオン結合して核を染めるといわれている。

エオジン Y (eosin yellowish)

合成色素。酸性色素であるエオジンの色素分子は、水溶液中では負（-）に荷電し、組織中の正（+）に荷電している部分と結合するが、組織構成成分の蛋白質は等電点がやや低く、pH3.5 から 5.5 に帯電している部分が多い。氷酢酸などの酸（+）を少量加えることにより組織成分が正（+）に荷電し、負（-）のエオジンとイオン結合して蛋白成分を赤く染める。

MEMO

実習 3 免疫組織化学染色

免疫組織化学は、組織細胞の形態学的な観察およびタンパク質や酵素、ホルモンなどの機能的な証明が一度に行える手法であり、構造と機能の同時証明が可能である。

組織切片を作製する場合、パラフィン切片あるいは凍結切片が広く用いられている。パラフィン切片を作製する場合は、固定後の組織をエタノール脱水、キシレンに置換の後、パラフィン包埋する。その後、新しいパラフィンに組織を包埋する。パラフィンブロックは長期保存できる。二次抗体を可視化するための標識物質としては、蛍光色素、酵素、金コロイドなどがある。

なかでも ABC 法は、一次抗体、ビオチン化二次抗体およびあらかじめ調製したアビジン-ビオチン標識酵素複合体 (Avidin-Biotinylated Enzyme Peroxidase Complex) を用いる方法である。①抗原に対する一次抗体と組織切片の反応。②ビオチン化二次抗体を加え、一次抗体の位置に導入させる。③アビジン-ビオチン化酵素の ABC 複合体 (アビジンとビオチン化西洋ワサビペルオキシダーゼの複合体) を加え、ビオチン化二次抗体と結合。④酵素基質溶液 (過酸化水素加ジアミノベンジジン (H_2O_2 - DAB)) との反応によって染色され、抗原の局在を可視化 (褐色) する。これは還元型色素ジアミノベンジジンと過酸化水素が酵素作用により 2 分子の水とジアミノベンジジンとなり、さらに重合してこれが酸化的環形成を起こし、可視の褐色物を形成することによるものである。二次抗体の標識にビオチン (biotin: ビタミン B 複合体の一つで、卵白に存在するアビジンというタンパク質に特異的かつ強固に結合する) を用いるのは、このビオチンに、アビジンと酵素の複合体を結合させることで、抗体 1 分子当たりに結合する酵素の量が増し、高感度に検出できるからである。

免疫組織染色用試薬

- ・キシレン
- ・エタノール: 100%、95%、90%、80%、70%
- ・3%過酸化水素/メタノール溶液: 過酸化水素 (30% (w/v))
- ・リン酸バッファー (PBS)
- ・ブロッキング試薬: (10%ヤギ正常血清; ニチレイ)
- ・1 次抗体: 今回の実習では抗 Cystatin C 抗血清を用いる
- ・ビオチン標識二次抗体: ビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体 (ニチレイ)
- ・酵素試薬: ペルオキシダーゼ (HRP) 標識ストレプトアビジン (ニチレイ)
- ・発色基質: DAB (ジアミノベンジジン) キット
 - 〔試薬 A〕 DAB 原液
 - 〔試薬 B〕 緩衝液
 - 〔試薬 C〕 基質試薬 (過酸化水素水)
- ・対比染色液 (マイヤーヘマトキシリン溶液)
- ・封入剤 (エンテランニューなど)

今回の実習では、最も広く用いられている Streptavidin - biotin peroxidase complex (S-ABC 法)を行う。

Streptavidin - biotin peroxidase complex (S-ABC 法)

- 1) 脱パラフィン後、水洗 (HE 染色の項参照)
- 2) PAP-PEN にて組織の周囲を囲む
- 3) PBS 2～3 分
以後、組織を乾燥させないように、湿潤箱内で反応させる
- 4) 3%過酸化水素メタノール溶液 10 分
- 5) PBS 2 分×3 回
- 6) 10%正常血清 10 分
- 7) 一次抗体 (目的の抗体) 60 分 (室温)
- 8) PBS 3 分×3 回
- 9) ビオチン化二次抗体 10 分
- 10) PBS 3 分×3 回
- 11) HRP 標識ストレプトアビジン 5 分
- 12) PBS 3 分×3 回
- 13) DAB solution 5～10 分 (顕微鏡下で反応を確認する)
- 14) 水洗蒸留水 (反応停止をかねる) 5～6 回上下する。
- 15) ヘマトキシリンまたはメチルグリーンで核染 30～60 秒
- 16) 色出し (流水) 5～10 分
- 17) アルコール脱水、透徹、封入 (HE 染色の項参照)

DAB solution

DAB 20mg

0.05M Tris Buffer (pH7.6) 100ml

上記液をよく混和後、過酸化水素水 (H₂O₂) を 17 μ l 加え、混和後濾過して直ちに使用する。

注 1) 各抗体は市販の抗体を用いる。(自作の場合もある)

注 2) DAB は発がん物質であるので、使用に際しては手袋を使用する。

参考事項：その他よく用いられる染色法の手順を以下に示す。

【AZAN 染色】

- 1) 脱パラフィン（キシレンⅠ-Ⅲ・アルコール下降系列）
- 2) 水洗
- 3) DW を通す
- 4) アゾカルミン G 56-60℃ 30～60 分 *注 1
- 5) 室温（冷却） 10～30 分
- 6) DW で軽く水洗
- 7) アニリンアルコールで脱色・分別 *注 2
- 8) 酢酸アルコール 1～2 分（アニリンを洗い去る）*注 3
- 9) DW で軽く水洗
- 10) 5%リンモリブデン酸水 1～3 時間又は一晩
（リンタングステン酸でも可）
- 11) DW で軽く水洗
- 12) アニリン青・オレンジ G 1 時間 *注 4
- 13) DW で水洗
- 14) 純アルコールで分別・脱水
- 15) キシレンⅠ、Ⅱ、Ⅲ 各 5 分
- 16) エンテランニューで封入

注 1) アゾカルミン G 0.1g を水 100ml に溶かし、酢酸 1ml を加える。

注 2) アニリンが 0.1%になるよう 95%エチルアルコールに加える

注 3) 純アルコールに酢酸を 1%になるよう加える。

注 4) アニリン青 0.5g、オレンジ G 2G、氷酢酸 8ml に DW 100ml を加え、煮沸、冷却、濾過する。使用時、この原液を 2 倍又は 3 倍量の DW で希釈する。

MEMO

【脂肪染色】

固定：10%ホルマリン

- 1) 凍結切片またはゼラチン包埋切片
- 2) 蒸留水で軽く水洗
- 3) 1%水酸化カリウム液 数秒
- 4) 蒸留水で水洗
- 5) 40～60%アルコール 軽く通す（なじませる程度）
- 6) Sudan III 70%アルコール飽和溶液 *注1
37℃ 40 分から 1 時間
- 7) 40～60%アルコールで洗う（十分に染色液を落とす）
- 8) 水に移す
- 9) 核染色・マイヤーのヘマトキシリン 3 分位
- 10) 色出し・流水 10 分
- 11) グリセリン、グリセリン・ゼラチンなどで封入

注1) 70%アルコールに少し沈渣が出来るぐらいに Sudan III (2g/100ml 程度) を入れ、振盪、密栓して 50～60℃に一晩置き十分に飽和した溶液をつくる。
染色液は必ず濾過してから用いる。

【PAS 染色】

- 1) 脱パラフィン（キシレン I-III・アルコール下降系列）
- 2) 流水洗 2～3 分（時間厳守）
- 3) 酸化・0.5%過ヨウ素酸水溶液 5 分 *注1
- 4) 洗浄・精製水水洗 1 分×2 回
- 5) 呈色・シッフ試薬 15 分 *注2
- 6) 洗浄・亜硫酸水 3 分×3 回 *注3
- 7) 洗浄・流水洗 3 分
- 8) 核染色・マイヤーのヘマトキシリン 3 分位（心持ち短く）
- 9) 色出し・流水 5～10 分
- 10) 脱水・アルコール上昇系列 各 3～5 分
- 11) 透徹・キシレン I～III 各 5 分
- 12) エンテランニューで封入

注1) HIO_4 0.5g、DW 100ml、毎回新調すること。

注2) Hot Schiff と Cold Schiff があるが Cold Schiff (Lillie) を推奨。

注3) 10%重亜硫酸ナトリウム水 6ml、1N 塩酸 5ml に DW100ml を加える。
毎回新調する方がよい。

【渡銀染色（渡辺法）】

- 1) 脱パラフィン（キシレンⅠ-Ⅲ・アルコール下降系列）
- 2) 流水洗 2～3分（時間厳守）
- 3) 0.5%過マンガン酸カリ 3分
- 4) 水洗 → 蒸留水
- 5) 2%シュウ酸 2分
- 6) 水洗 10分
- 7) 蒸留水を通す
- 8) 2%鉄ミョウバン水 50秒
- 9) 水洗 5分
- 10) 蒸留水で2回洗う 各2分
- 11) アンモニア銀液 20分 *注1
- 12) 局方エタノール 1秒
- 13) 還元液 1分 *注2
- 14) 水洗 → 蒸留水
- 15) 0.2%塩化金 1晩
- 16) 蒸留水 5分
- 17) 2%シュウ酸 5分
- 18) 水洗 5分
- 19) 蒸留水 3分
- 20) 5%チオ硫酸ナトリウム7分
- 21) 水洗 15分
- 22) 脱水、透徹・キシレン
- 23) エンテランニューで封入

注1) アンモニア銀液：10%硝酸銀溶液10mlに4%水酸化カリウム5mlを加える。

黒褐色の沈殿物をよく振盪しながらアンモニア水で溶かす。

完全に透明になる直前でやめる。

注2) 還元液：ホルマリン1ml、2%鉄ミョウバン液2mlに蒸留水を加えて100mlとする。

参考図書

佐野豊：組織学研究法 第6版 南山堂、1981

慶応大学医学部病理学教室編：病理組織標本の作り方 第6版 医学書院、1986

病理技術研究会編：病理標本の作り方 第1版 文光堂、1992

準備

伸展機 切った切片を伸展させるための温浴槽 約 40℃

古いブロックやパラフィンの鮮度が古い場合は切片がバラバラになるので、35～38℃で伸展

伸展台 スライドガラスになじませる 約 40℃。パラフィンは高温だと溶けるので注意。

筆 細いものと太いもの

ピンセット 先のとがったもの

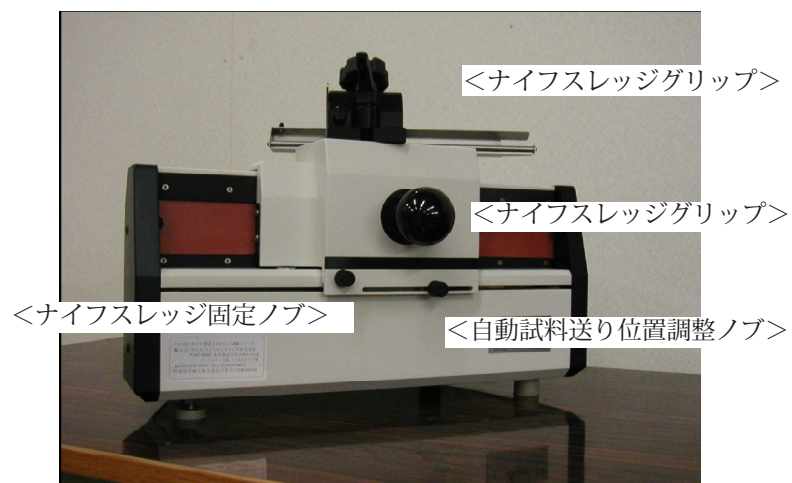


スライドガラス 裏表に注意（表はすりガラス）。先にラベルを書いておく（専用のペンまたは鉛筆）

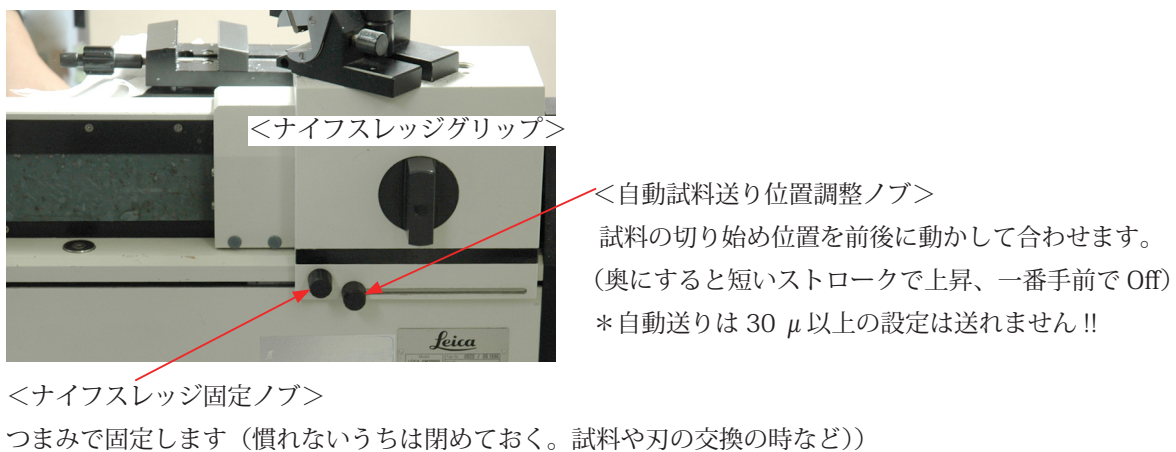
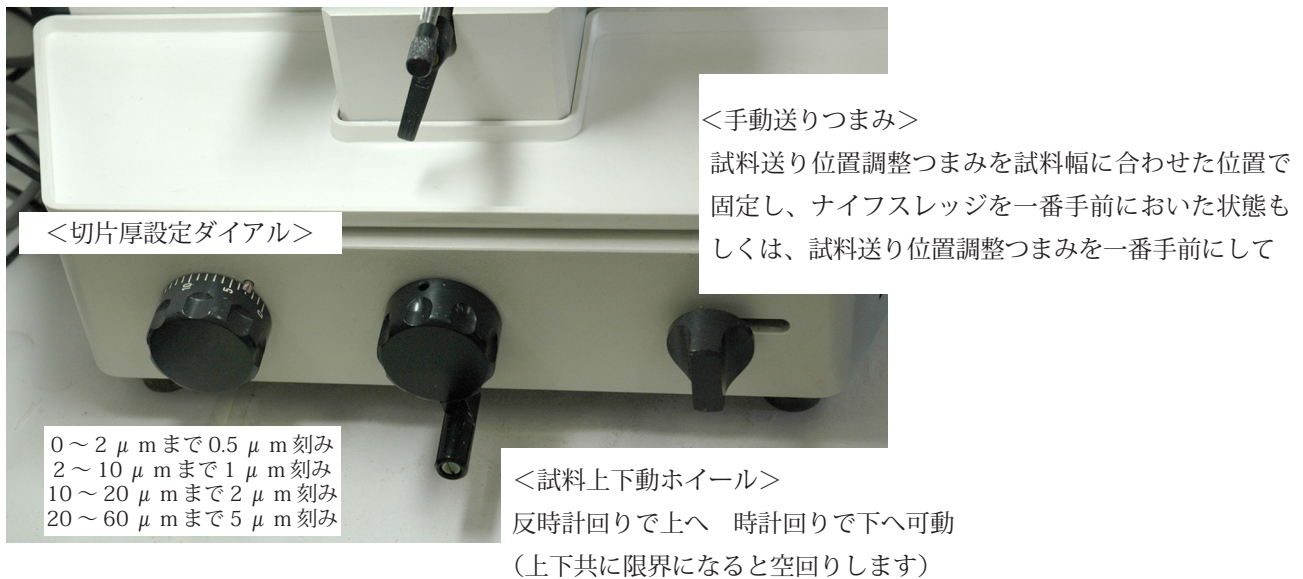
ミクロトームの準備

周辺をきれいにしてから開始すること。刃にパラフィンが付着していると切れないので、筆でパラフィンを掃う（又はキムワイプで拭く）。強固な汚れの場合はキシレンで磨く。

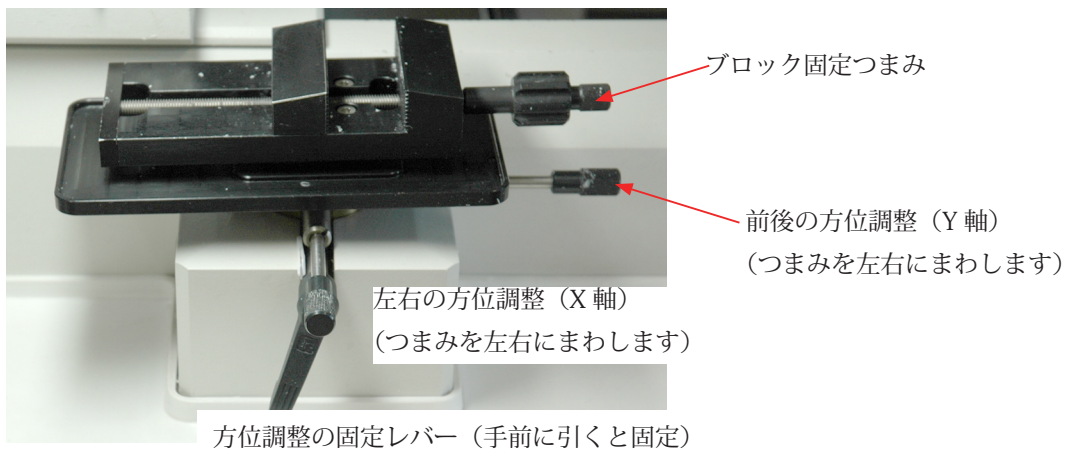
パラフィンが刃に付いていると切片に筋がつくことがある。



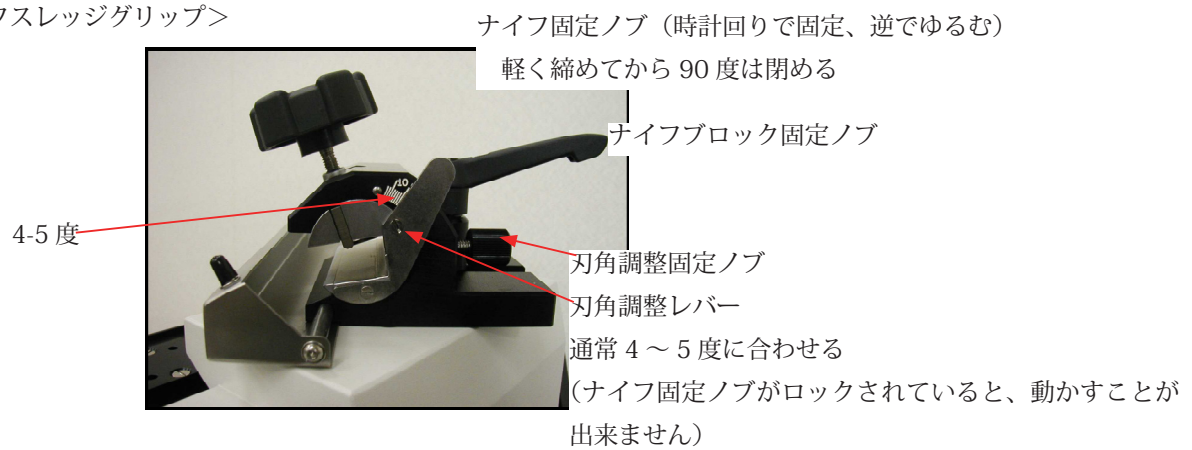
ミクロトームの説明



＜試料クランプの方位調整＞



<ナイフスレッジグリップ>

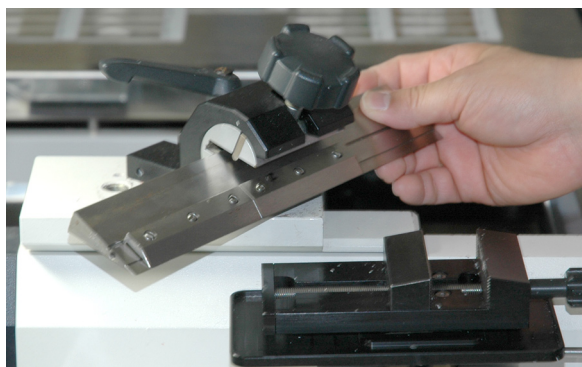


ミクローム替え刃は FEATHER A35 を使用。

刃は矢印の方向へスライドさせて入れる
(1 枚または 2 枚)

刃を溝の後ろに当ててセットし、ドライバーで均等に閉める。

刃をスライドさせると高さが極端に変わるため、刃のセットが溝の後にきっちりとはめる。
端から使用し、切れなくなったらずらして使う
ブロック 5 個程度が限度。薄く切れば多く切れるが、荒削りなら刃が傷みやすい

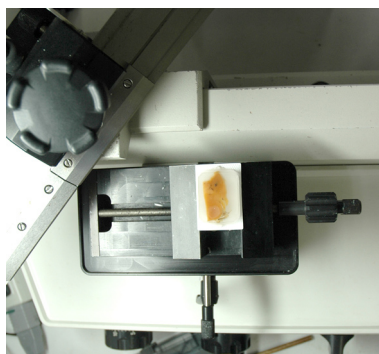


刃をつけたブレードを装着

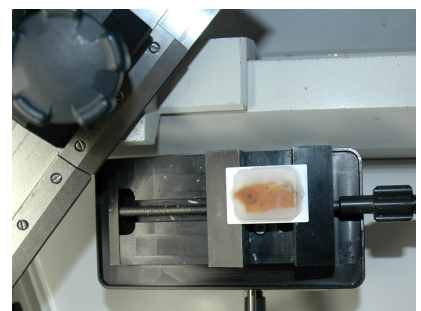
ナイフ固定ノブ時計回りで固定。軽く締めてから 90 度は閉める

刃が 2 枚セットできる場合は、片方が荒削り用

ブロック固定



ブロックを置く際、中心に目印を入れていると真中にサンプルを置くことができる
横長のブロックは横向きにおく
試料の角度が鋭利な方向で薄切する。



荒削り 30 ミクロンで始める

ゆっくり引いて刃が当たらないことを確認し、手前に左つまみを回して上げる

本削り 刃が当たり始めたら面出しをしていく (3 ミクロン)

刃の表にパラフィンが付いたら、手前の方で筆ではらう

刃の裏にパラフィンが付いたら、奥の方で筆ではらう

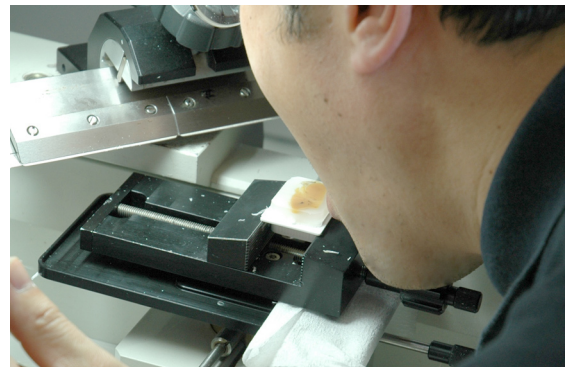


パラフィンが刃に付いていると
スジがつく→やり直し

パラフィンを切る時は息を吹きかけて蒸気を当ててから切る

(切りにくいものは特にしっかり)

切ったパラフィンがカールしないように筆を宙に浮かせて刃に
添える (そのとき、腕が震えるので肘を机につけておくとよい)



刃を交換したら、そのまま3 ミクロンで面出しをし、当たったら本削りをする



ダメなものはピンセットで溶ける前に伸展機から除去する

パラフィンを伸展機に浮かべるときは、裏表に注意する

(裏返ったものは使用しない)

すくい方

左手でスライドガラスを垂直につけ、パラフィンを中心 (少し下寄りでも OK) に付着させる

失敗したらもう一度スライドガラスから伸展機にパラフィンを
はずしてやり直し



マルチメディアセンター（MMC）活用法

重歳 憲治（マルチメディアセンター）

マルチメディアセンターでは、Windows（XP Pro）120 台および Macintosh（MacOSX 10.4）16 台（一部 24 時間利用可能）を維持・管理しており、本学における教育研究活動をサポートしている。また、研究発表用資料を作成するための設備を有しており、大判印刷（B0 サイズ）が可能なプロッター、写真画質で印刷可能なレーザープリンタ、レントゲンスキャナ等の専用機器が設置されている。その他、ウィルス駆除ソフトの無料配布や、SSL-VPN サービスによる学外からの文献検索等、利用者の経済的負担の軽減および利便性の向上に努めている。本講演では、マルチメディアセンターの設備および学内外で利用可能な各種サービスについて説明する。

マルチメディアセンター(MMC)活用法

2008年9月10日
マルチメディアセンター
重歳憲治

目次

- MMC提供サービスの紹介
- MMC施設紹介
- 研究発表用機器の紹介
- 用語の説明
- プレゼン用素材について
- 知っておきたい規格
- 施設内見学

MMC提供サービスの紹介

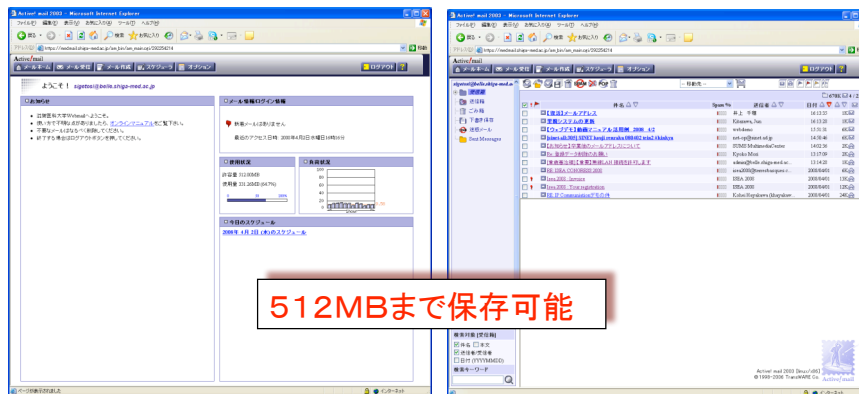
- ・メールアドレスの付与
- ・Webメールの利用
- ・ウィルス駆除ソフトの無償配布
- ・VPN接続
- ・モノクロ／カラー印刷
- ・無線アクセスポイントの利用
- ・ノートPC, プロジェクター等の貸出
- ・迷惑メールのフィルタリング
- ・個人ホームページの設置
- ・個人PCの学内LANへの接続
- ・新規メーリングリストの利用登録
- ・各種講習会の実施

メールアドレスの付与

- 半角8文字以下の任意の文字列で利用者IDを申請すると、以下のメールアドレスが付与される。
利用者ID@belle.shiga-med.ac.jp
利用者IDは、病院システム(Synaps)と同じだが、パスワードは異なるため管理に注意すること。
- 一度発行された利用者IDは変更できない。

Webメールの利用

□ 学外でもメールの利用が可能



ウィルス駆除ソフトの無償配布

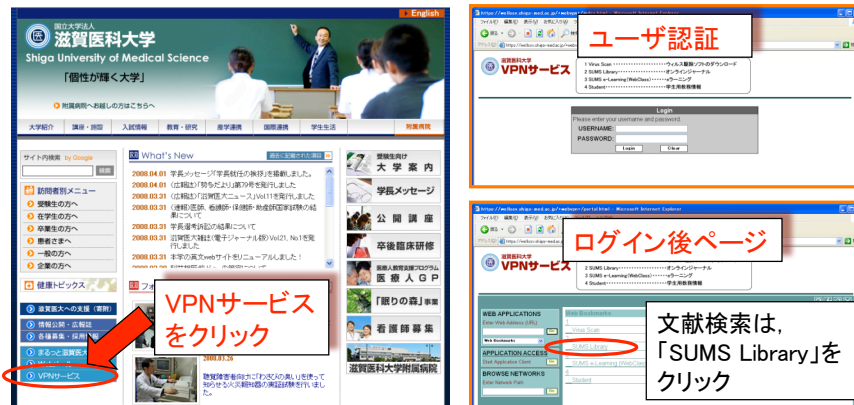
□ 自宅のコンピュータにもインストール可能



マルチメディアセンターのホームページからダウンロード
<http://www.shiga-med.ac.jp/mmc/>

VPN接続

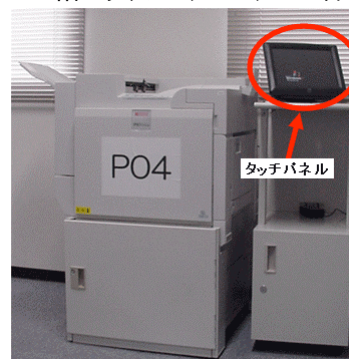
- 学外から文献検索等が可能



モノクロ／カラー印刷

- プリンタは館内5箇所に設置
- オンデマンド印刷を採用しているため、空いているプリンタから出力できる(図中のタッチパネルから利用者IDとパスワードでログイン)
- 利用可能ポイント: 500/年
[消費ポイント]
カラー: 4ポイント/枚
モノクロ: 1ポイント/枚

演習室: 2台
ブラウジング室: 1台
1階オープンフロア: 1台
2階ブラウジングコーナー: 1台



- 講義室を中心に設置
- SSID: sums-wireless
- 無線LANカードのMacアドレスをMMCホームページから登録すれば利用可能
- コンピュータの設定方法については, MMCホームページを参照のこと



- WindowsノートPC
 - ・Windows XP Pro
 - ・Microsoft Office 2003
 - ・Photoshop Elements4
 - ・Acrobat7.0
 - ・B's Recorder Gold9 等
- MacintoshノートPC
 - ・Mac OS X v10.4
 - ・Microsoft Office 2004
 - ・iWork '06
 - ・Toast 7 Titanium 等
- プロジェクター
 - ・小型軽量タイプ
 - ・高輝度タイプ

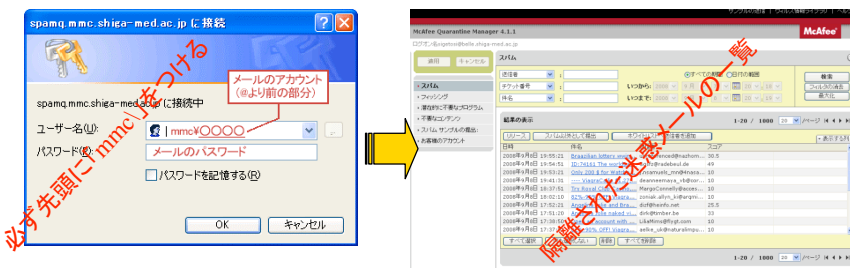


MMCホームページから予約

迷惑メールのフィルタリング

- 迷惑メールは、利用者に届く前にサーバ側で隔離
- もし、誤認識した場合でも、隔離された迷惑メールの確認が可能

<http://spamq.mmc.shiga-med.ac.jp/MQMUserUI/>



その他

- 個人ホームページの設置
- 個人PCの学内LANへの接続
- 新規メーリングリストの利用登録
- 各種講習会の実施
 - ・ホームページ作成
 - ・Microsoft Office
 - ・医療統計 等

MMC施設紹介

- ・演習室
- ・ブラウジング室
- ・画像処理室
- ・オープンフロア
- ・MMC会議室
- ・サイバーカンファレンスルーム1, 2
- ・入出力室
- ・館内での禁止事項

演習室

- 利用時間： 平日9:00～19:00
- 76台のWindowsノートパソコン(OS:Windows XP)
- 注)講義優先. 講義使用以外は自由に利用可.



ブラウジング室

- 利用時間: 平日9:00~19:00
- 24台のWindowsノートパソコン(OS:Windows XP)
- 注)講義優先. 講義使用以外は自由に利用可.



画像処理室

- 利用時間: 平日9:00~17:30
- 8台のiMac(OS:MacOS10.4)
- 注)講義優先. 講義使用以外は自由に利用可.



オープンフロア

□ 24時間利用可能



1階ホール (WindowsノートPC 4台)
2階ホール (iMac 4台)



2階ブラウジングコーナー
(WindowsノートPC 10台)

MMC会議室

- 収容人数34人
- LANコンセント
- ホワイトボード
- 天吊プロジェクター
- 電動スクリーン



MMCホームページから利用予約が必要

サイバーカンファレンスルーム1, 2

- 収容人数12人
- LANコンセント
- ホワイトボード
- スクリーン(手動)



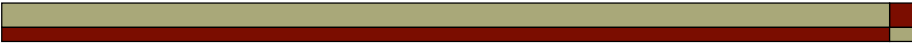
MMCホームページから利用予約が必要

入出力室

MMCのホーム
ページから要予約

- 利用時間: 平日9:00~17:30
(休日および時間外の利用は**時間外利用カード**が必要)
- ポスター印刷, レントゲンフィルムスキャナ等





館内での禁止事項

- 喫煙
- 飲食および飲食物の持ち込み
- 携帯電話の利用
- 大声での雑談等, 他の利用者への迷惑行為
- 設置機器へのソフトウェアのインストール



研究発表用機器の紹介

入出力室設置機器の紹介

大判プリンタ(プロッタ)

特 徴 : 1mを超えるサイズでプリント可能

解 像 度 : 標準300dpi, 最高600dpi

印刷サイズ : B0サイズまでプリント可能
(長軸方向はさらに延長可能)

料 金 : 光沢紙

B0 2,300円/枚

A0 2,070円/枚

コート紙

B0 500円/枚

A0 450円/枚



レーザ露光熱現像転写プリンタ

特 徴 : 銀塩写真と同等の画質

解 像 度 : 400dpi

印刷サイズ : A3サイズまでプリント可能

料 金 : A4 300円/枚

A3 500円/枚



昇華型プリンタ

特 徴 : 銀塩写真と同等の画質
解 像 度 : 300dpi
印刷サイズ : A4サイズ
料 金 : A4 200円／枚



ラミネーター

特 徴 : フィルムが用紙に直接接着される
ので, はがれにくい
サ イ ズ : A0サイズまでラミネート可能
料 金 : A0 300円／枚



X線フィルムデジタイザ

特 徴 : X線フィルム等の透過フィルムの
スキャン用. 連続15枚まで取込可能な
オートフィーダ付

解 像 度 : 300dpi

濃度分解能 : 8bit(256階調),
12bit(4096階調)

サ イ ズ : 六切, 四切, 大四切,
大角, 半切, B4

料 金 : 0円



フィルムスキャナ

特 徴 : 各種サイズのフィルムをスキャン可能

解 像 度 : 2000dpi × 4000dpi

サ イ ズ : 4×5inch, 6×7cm, 6×6cm, 35mm

料 金 : 0円

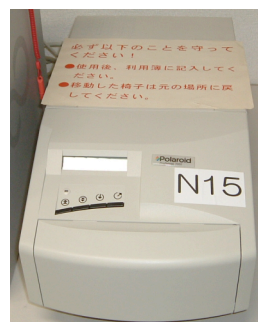


フィルムレコーダ

特 徴 : パワーポイントのスライドを35mmフィルムに撮影する

持 参 物 : 35mmフィルム

料 金 : 0円



フラットベッドスキャナ

特 徴 : 透過原稿, 反射原稿どちらでも
スキャン可能

解 像 度 : 1600dpi × 3200dpi

サ イ ズ : A3まで

料 金 : 0円



動画編集システム

特徴：動画の取り込みから編集，書き出し(DVD，
パワーポイント貼り付け用)まで処理可能

主に使用するソフトウェア(Windows)：
Adobe Premiere, TMPGEnc XPress

利用可能なメディア：
VHSテープ，DVテープ，
ミニDVテープ

料金：0円



CD/DVDデュプリケータ

特徴：自動でCD/DVDのコピーが
可能(DVD書込み16倍速)

操作：マスターディスクとブランク
ディスクをセットするだけ

料金：0円



料金表

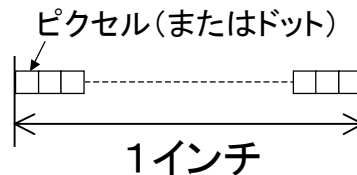
機器名	機器番号	消耗品	金額
コダック / プロフェッショナル8660	N07	専用紙＋カラーリボン	¥ 200/枚 (A4)
HP / DesignJet5500ps	N08	コート紙＋インク	¥ 500/枚 (B0) ¥ 450/枚 (A0)
	N09	光沢紙＋インク	¥ 2,300/枚 (B0) ¥ 2,070/枚 (A0)
明光商会 / MSパウチ PHL-960	N10	ラミネートフィルム	¥ 300/枚 (A0)
FUJIFILM / PICTROGRAPHY4500	N11	写真感光材料 (受像紙＋ドナー)	¥ 300/枚 (A4) ¥ 500/枚 (A3)

用語の説明

解像度

解像度とは、画像を表現する格子のきめの細かさのことをいう。

ppi (pixels per inch)や**dpi** (dots per inch)という単位が
用いられる。



コーデック (CODEC)

- コーデック (Codec) は、符号化方式を使ってデータのエンコード(符号化)とデコード(復号)を双方向にできる装置やソフトウェアなどのこと。また、そのためのアルゴリズムを指す用語としても使われている。(ウィキペディア,「コーデック」より引用)

プレゼン用素材について

画像の種類(1)

BMP (Bit MaP; ビットマップ):

無圧縮, フルカラー(1677万色)

GIF (Graphics Interchange Format; ジフ):

可逆圧縮, 256色, アニメーション可, 透明色可

JPEG (Joint Photographic Experts Group; ジェイペグ):

非可逆圧縮, フルカラー(1677万色), 圧縮率高,
透明色不可

PNG (Portable Network Graphics; ピング):

可逆圧縮, フルカラー(281兆色), アニメーション不可,
透明色可(透明度の指定可), GIFより圧縮率高

画像の種類(2)

TIFF (Tagged Image File Format; ティフ):

無圧縮／可逆圧縮, フルカラー(1677万色)

DICOM (Digital Imaging and Communication in
Medicine; ダイコム):

CT, MRIなどで撮影した医用画像のフォーマット
画像以外の情報も含められる

PICT (ピクト):

Apple社のMac OSが標準でサポートしている
画像形式の一つ

解像度の種類

画像解像度 : ppi (pixels per inch)

モニタ解像度 : ppi (pixels per inch)

プリンタ解像度 : dpi (dots per inch)

※モニタに出力するだけなら, 72ppi程度で十分

※プリントアウト時にきれいに出力するためには, 200
～300ppi程度の画像解像度が必要.

解像度とファイルサイズ

- BMP(ビットマップ)形式の画像を例に -

解像度の目安

モニタ出力では, 72ppi

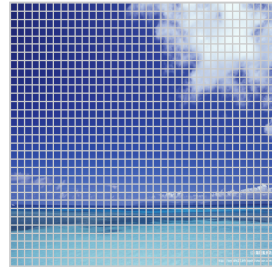
プリンタ出力では, 300ppi

大きさ1インチ四方の画像なら

$72 \times 72 \times 3 = 15,552$ [byte]

$300 \times 300 \times 3 = 270,000$ [byte]

※フルカラー表示には, 1ピクセルあたり
3byteのデータが必要



約17倍の差があり, 用途
に応じて解像度を変えな
いと非常に大きなファイル
になってしまう!

画像を使用する上での注意点

- 解像度
プレゼン用なら72ppi程度,
印刷用なら200~300ppi程度
- 画像の種類
色数に応じて画像の種類を使い分ける.
イラスト(256色以下)ならGIF,
写真ならJPEG

動画の種類

AVI (Audio Video Interleave): 画像と音声を交互に格納する. 任意のコーデックが使える.

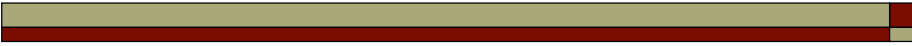
WMV (Windows Media Video): Microsoftが開発したコーデック. Windows標準対応.

MOV: QuickTimeで使用する動画像の形式. Macintoshでよく用いられる.

RM: Real Playerで使用する動画像の形式

国際標準のCODEC(MPEG)

- **MPEG**: ISOのMPEG (Moving Picture Experts Group) が制定した動画フォーマットの規格. 規格は「映像」, 「音声」, 「映像と音声の多重化」の3つから成り立っている. DVDやBSデジタル, CSデジタル放送などでは, MPEG2形式が使われている.
- **MPEG1**: ISO/IEC11172によって国際的に定められたデジタルビデオファイル形式の規格. VHSビデオ並みの画質でCD上にデータを収録する. MPEG1はVideo CDなどで使用されている. 解像度は, 352×240ピクセル.
- **MPEG2**: ISO/IEC1318によって定められたMPEG1の上位に位置するCODEC(圧縮／伸張方式). 圧縮にも再生にもMPEG1と比較して高いスペックを要求する. MPEG2はDVDなどで使用されている. 解像度は, 720×480ピクセル



動画を使用する上での注意点

- AVIで利用できるコーデックは任意のため、自分のコンピュータで再生できても、他人のコンピュータで再生できるとは限らない.
- Windowsであれば、プレゼン用の動画は、WMVにしておくとい(ファイル容量も格段に圧縮される).
- WindowsXP以降なら標準でインストールされている「Windows ムービー メーカー」を使ってAVIからWMVに変換できる.



知っておきたい規格

モニター外部出力コネクタの規格



アナログRGBコネクタ
(ミニD-Sub15ピン)

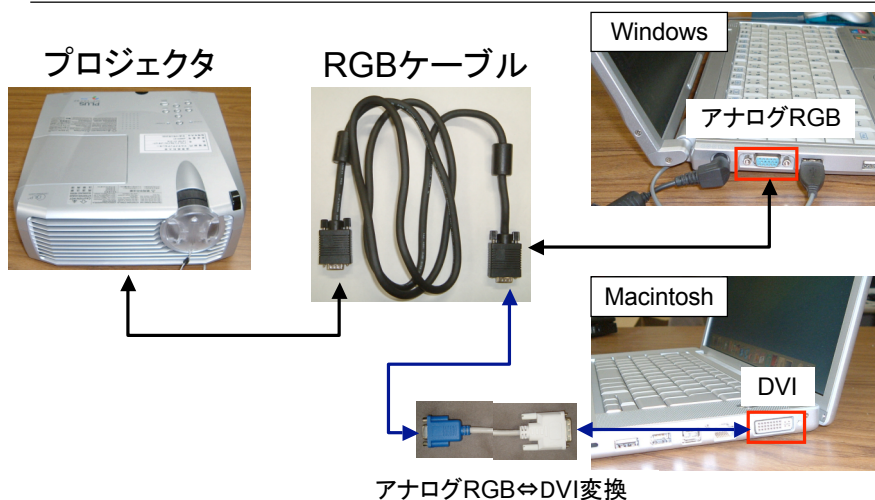


DVI (Digital Visual Interface)コネクタ



アナログRGB⇄DVI変換コネクタ

プロジェクタに「ミニD-Sub15ピン」のケーブルで接続する場合



モニタ解像度

呼称	解像度(pixel)
QVGA (Quarter-VGA)	320 × 240
VGA	640 × 480
SVGA (Super-VGA)	800 × 600
XGA	1024 × 768
SXGA (Super-XGA)	1280 × 1024
SXGA+	1400 × 1050

用紙サイズ(Aサイズ, Bサイズ)

用紙サイズ(定型一覧)

規格	寸法(mm)
ISO A0	841 × 1189
ISO A1	594 × 841
ISO A2	420 × 594
ISO A3	297 × 420
ISO A4	210 × 297
ISO A5	148 × 210
JIS B0	1030 × 1456
JIS B1	728 × 1030
JIS B2	515 × 728
JIS B3	364 × 515
JIS B4	257 × 364
JIS B5	182 × 257

遺伝子情報データベース活用法

How to make good use of the databases of gene information

磯野 高 敬 (実験実習支援センター)
Takahiro Isono (Central Research Laboratory)

ヒトゲノム計画により、ヒトのゲノムの全塩基配列が解読され、この塩基配列情報を辞書として活用する研究が盛んに行われている。演者は、癌組織や癌細胞に含まれるタンパク質を網羅的に解析できるプロテオミクス解析を行っており、この時にこのゲノム情報を活用している。解析の流れとしては、電気泳動によって癌細胞で特異的の変動しているタンパク質のスポットやバンドを切り出して、質量分析計を用いて得られた情報を、遺伝子情報データベースを用いて検索し同定するということになる。しかし、タンパク質を同定しただけで研究は終わらず、その同定されたタンパク質の遺伝子情報を更にデータベースで検索して、そのタンパク質の機能解析や臨床応用へ展開していくことになる。

本講義では、実験実習支援センターにある液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計 (LC/MS/MS: Thermo Fisher LCQ) で得られた結果から、インターネットで実際に遺伝子情報データベースに入っていくとどのような情報が得られるかを紹介する。

In this lecture, all slides are presented in English.

English questions are acceptable at the end of this lecture.

遺伝子情報データベース活用法

磯野高敬(実験実習支援センター)

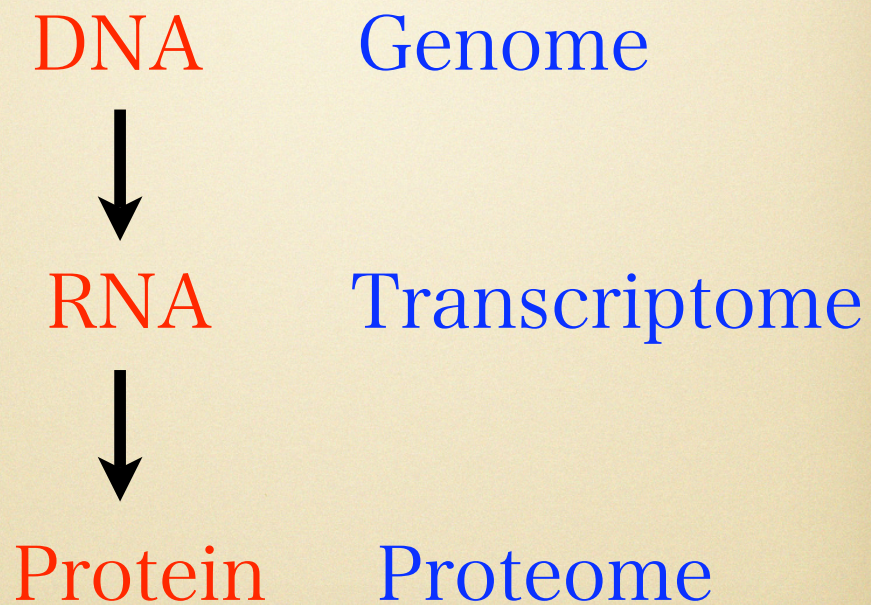
How to make good use of
the databases of gene information

Takahiro Isono (Central Research Laboratory)

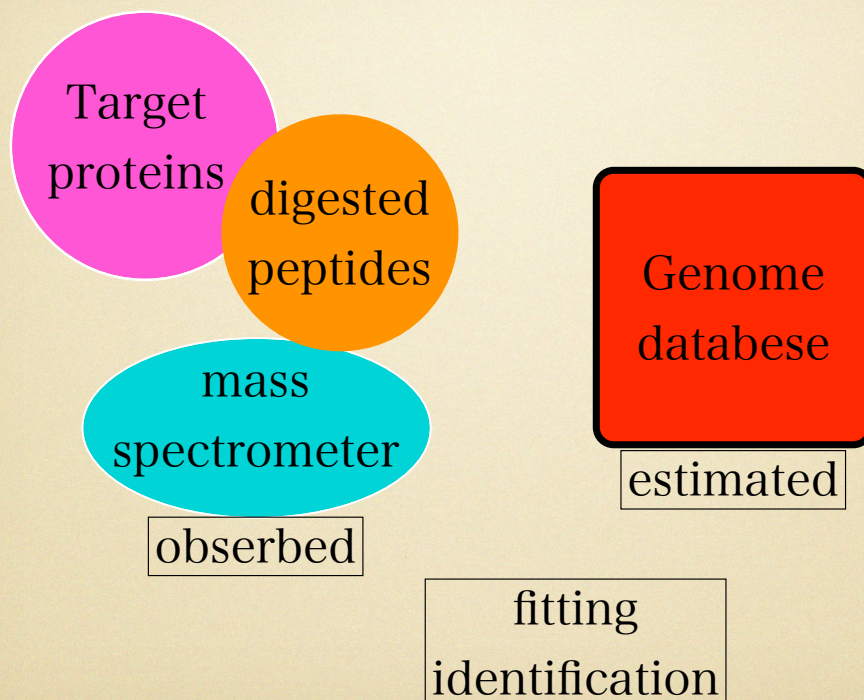
Human Genome Project

[http://www.ornl.gov/sci/techresources/
Human_Genome/home.shtml?vb](http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/home.shtml?vb)

Flow of gene information

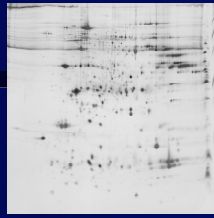


Proteomics



Protein Identification

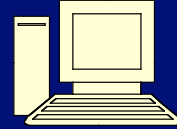
① 2-DE



⑤ Peptide Mass Database

② Spot Cutting

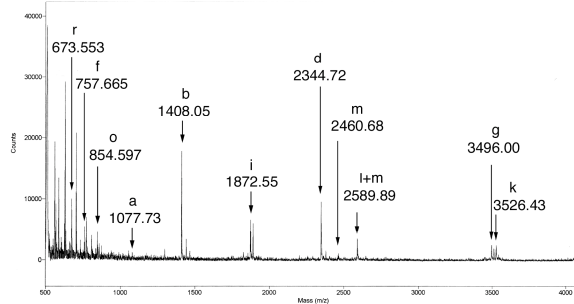
④ MALDI/TOF-MS



③ In Gel Digestion



observed



PSA

Table 1. Peptide map of mature PSA digested by trypsin

Fragment	Amino acid sequence	Mass
a	NH2-IVGGWECEK/	1078
b	HSQPWQVLVASR/	1408
c	GR/	213
d	AVCGGVLVHPQWVLTAAHCIR/	2344
e	NK/	242
f	SVILLGR/	757
g	HSLFHPEDTGQVSHSFPHPLYDMSLLK/	3494
h	NR/	270
i	FLRPGDSSHDMLLR/	1872
j	LSEPAELTDAVK/	1273
k	VMDLPTQEPALGTTTCYASGWGSEIEPEEFLTPK/	3525
l	K/	128
m	LQCVDLHVISNDVCAQVHPQK/	2460
n	VTK/	328
o	FMLCAGR/	854
p	WTGGK/	548
q	STCSGDSGGPLVCNGVLQGITSWGSEPCALPSLYTK/	4138
r	VVHYR/	673
s	K/	128
t	WIK/	428
u	DTIVANP-COOH	729

Table 1. Peptide map of mature PSA digested by trypsin

Fragment	Amino acid sequence	Mass
a	NH2-IVGGWECEK/	1078
b	HSQPWQVLVASR/	1408
c	GR/	213 Low mass
d	AVCGGVLVHPQWVLTAAHCIR/	2344
e	NK/	242 Low mass
f	SVILLGR/	757
g	HSLFHPEDTGQVSHSFPHPLYDMSLLK/	3494
h	NR/	270 Low mass
i	FLRPGDSSHDMLLR/	1872
j	LSEPAELTDAVK/	1273
k	VMDLPTQEPALGTTTCYASGWGSEIEPEEFLTPK/	3525
l	K/	128 Low mass
m	LQCVDLHVISNDVCAQVHPQK/	2460
n	VTK/	328 Low mass
o	FMLCAGR/	854
p	WTGGK/	548
q	STCSGDSGGPLVCNGVLQGITSWGSEPCALPSLYTK/	4138
r	VVHYR/	673
s	K/	128 Low mass
t	WIK/	428 Low mass
u	DTIVANP-COOH	729

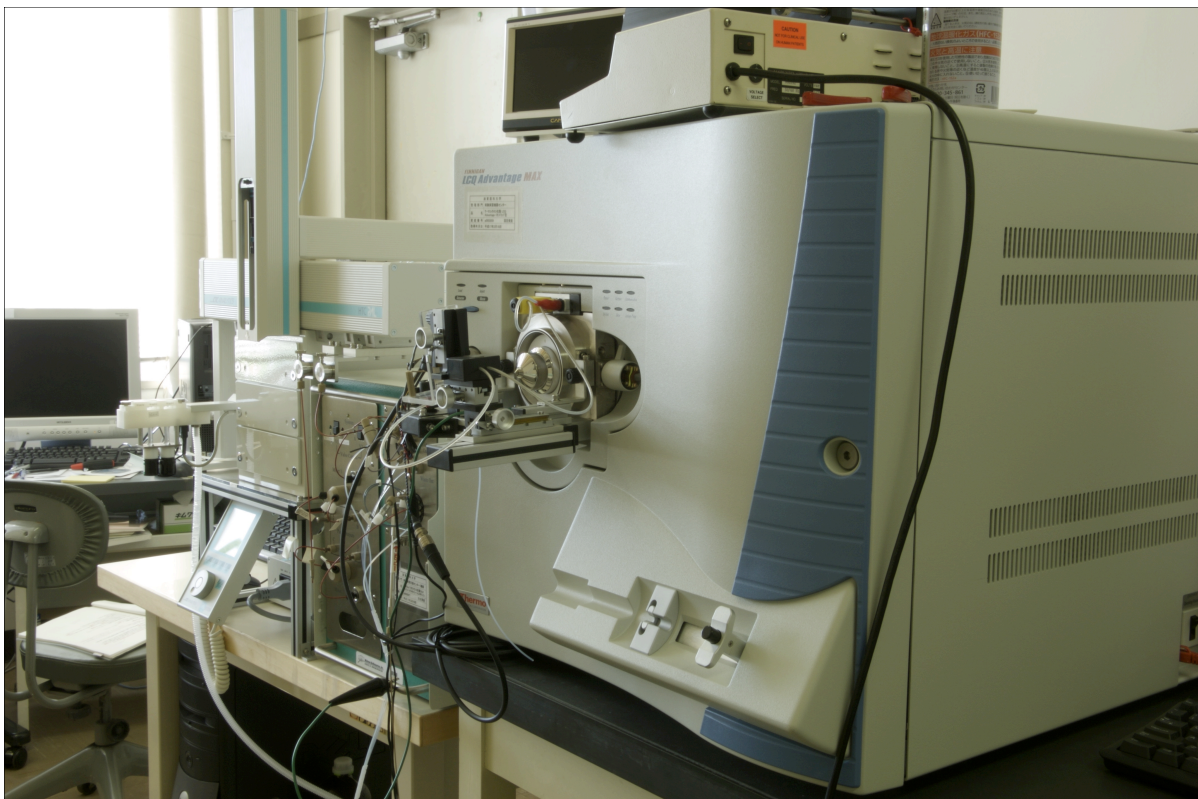
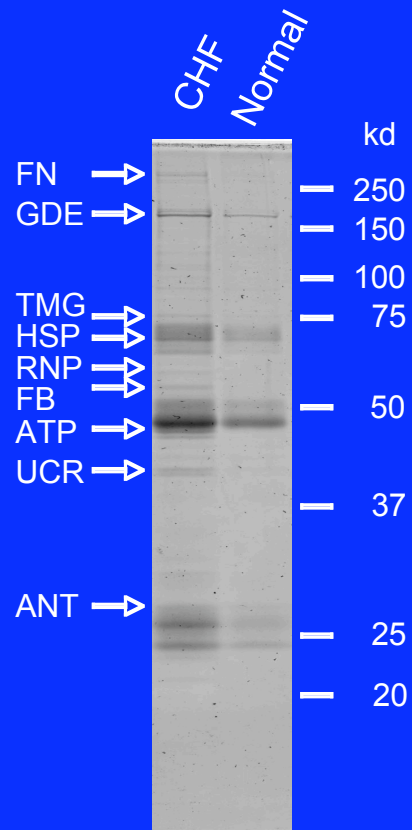
estimated

fitting

SYPRO Ruby stained image of
SDS-PAGE gels of
O-GlcNAc-modified proteins
in muscles of heart failur

Immunoprecipitated fractions
by anti-*O*-GlcNAc antibodies

Identification of proteins by LC/MS/MS



LC/MS/MS (Paradigm MS4 + LCQ Advantage MAX)

SRF File: C:\Xcalibur\sequest\isono\070301\srf\12.srf
Database... 070302familiaris-canis.fasta
Filter(s)... peptide sf>=0.85 ; # matches=1 ; peptide probability<=1e-003

Reference Scan(s)	Sequence	MH+	z	P P	Sf Sf	Score XC	Coverage DeltaCn	Accession Sp	RSp	Ions	Count
PREDICTED: similar to Protein-glutamine gamma-glutamyltransfer											
520	K.LTEKEETGLAM*R.I	1393.70	2	4e-006	0.88	3.388	0.345	670.1	1	17/22	
660	K.VM*DVPDPVEAGEEVK.V	1629.77	2	2e-005	0.93	3.688	0.395	905.1	1	23/28	
698	K.YC#EC#LTESNLIK.V	1529.70	2	0.0005	0.92	3.271	0.395	1262.9	1	17/22	

3 of 8 peptide matches reported, 5 removed due to filtering

species

score of fitting

SRF File: C:\Xcalibur\sequest\isono\070301\srf\12.srf
Database... 070302familiaris-canis.fasta
Filter(s)... peptide sf>=0.85 ; # matches=1 ; peptide probability<=1e-003

Reference Scan(s)	Sequence	MH+	z	P P	Sf Sf	Score XC	Coverage DeltaCn	Accession Sp	RSp	Ions	Count
PREDICTED: similar to Protein-glutamine gamma-glutamyltransfer											
520	K.LTEKEETGLAM*R.I	1393.70	2	4e-006	0.88	3.388	0.345	670.1	1	17/22	
660	K.VM*DVPDPVEAGEEVK.V	1629.77	2	2e-005	0.93	3.688	0.395	905.1	1	23/28	
698	K.YC#EC#LTESNLIK.V	1529.70	2	0.0005	0.92	3.271	0.395	1262.9	1	17/22	

3 of 8 peptide matches reported, 5 removed due to filtering

protein name

species

score of fitting

SRF File: C:\Xcalibur\seq\est\isono\070301\srf\12.srf
 Database... 070302familiaris-canis.fasta
 Filter(s)... peptide sf>=0.85 ; # matches=1 ; peptide probability<=1e-003

Reference Scan(s)	Sequence	MH+	z	P	Sf	Score	Coverage	Accession
					Sf	XC	DeltaCn	Sp RSp Ions Count
PREDICTED:	similar to Protein-glutamine gamma-glutamyltransfer			4e-006	2.74	30.2	5.7	73992406
520	K.LTEKEETGLAM*R.I	1393.70	2	4e-006	0.88	3.388	0.345	670.1 1 17/22
660	K.VM*DVPDPVEAGEEVK.V	1629.77	2	2e-005	0.93	3.688	0.395	905.1 1 23/28
698	K.YC#EC#LTESNLIK.V	1529.70	2	0.0005	0.92	3.271	0.395	1262.9 1 17/22

3 of 8 peptide matches reported, 5 removed due to filtering

protein name

protein accession ID

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

National Center for Biotechnology Information

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Protein ID

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?
db=protein&cmd=search&term=](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=protein&cmd=search&term=)

Gene ID

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?
db=gene&cmd=search&term=](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=search&term=)

Bioinformatic Harvester

<http://harvester.fzk.de/harvester/>

<http://harvester.embl.de/>

Making of expression plasmids

Making of specific antibodies

Getting of tg/KO mice/MEF

Our isolated proteins

- calreticulin
- gamma-synuclein
- c7orf24
- BiP
- TAB1
- rab24
- sHSPs
- TGM2
- NPM
- SNF5