

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

目 次

第 1 分野

課題番号

| | | | |
|---------|--|----------|----|
| KH11001 | バイオフィotonクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発 | 川西 徹 …… | 1 |
| KH11002 | 成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発 | 緒方 勤 …… | 11 |
| KH11003 | 創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告) | 松田潤一郎 …… | 13 |
| KH11003 | 創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告) | 松田潤一郎 …… | 17 |
| KH12072 | 変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発 | 野口博司 …… | 25 |

第 2 分野

| | | | |
|---------|--|----------|-----|
| KH21004 | 動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) 受容体 (S1P3) の拮抗薬の開発 | 望月直樹 …… | 31 |
| KH21005 | 遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究 | 田上昭人 …… | 35 |
| KH21006 | 病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明 | 井上和秀 …… | 47 |
| KH21007 | 蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立 | 桃井 隆 …… | 58 |
| KH21008 | 高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索 | 小川誠司 …… | 66 |
| KH21009 | 脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用 | 花田賢太郎 …… | 70 |
| KH21010 | 繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG 1 蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明 | 香坂隆夫 …… | 77 |
| KH21011 | 血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用 | 若宮伸隆 …… | 86 |
| KH21012 | コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用 | 矢野友啓 …… | 96 |
| KH21013 | 免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索 | 阿部 淳 …… | 102 |
| KH21014 | 受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究 | 藤本純一郎 …… | 108 |
| KH21015 | 細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用 | 江崎 治 …… | 113 |
| KH21016 | 過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告) | 野々垣勝則 …… | 117 |
| KH21016 | 過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告) | 野々垣勝則 …… | 120 |

| | | |
|---------|---|--------------|
| KH21017 | 慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告） | 田平 武 …… 124 |
| KH21017 | 慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告） | 田平 武 …… 129 |
| KH21018 | アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析 | 中山 耕造 …… 134 |
| KH21019 | 創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究 | 上出 利光 …… 142 |
| KH21021 | エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究 | 西島 正弘 …… 148 |
| KH21022 | ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発 | 鈴木 哲朗 …… 152 |
| KH21023 | 末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究 | 葛西 正孝 …… 156 |
| KH21101 | DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究 | 佐藤 準一 …… 160 |
| KH22073 | 機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明 | 功刀 浩 …… 167 |
| 第3分野 | | |
| KH31024 | 超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立 | 吉岡 澄江 …… 175 |
| KH31025 | 生薬及び漢方処方の科学的品質保証に関する研究 | 合田 幸広 …… 185 |
| KH31026 | 食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究 | 工藤由起子 …… 194 |
| KH31027 | ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築 | 能美 健彦 …… 200 |
| KH31028 | ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用－非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立－ | 吉里 勝利 …… 210 |
| KH31029 | 高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究 | 檜山 行雄 …… 218 |
| KH31030 | 患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究 | 斎藤 嘉朗 …… 226 |
| KH31031 | 細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発 | 山口 照英 …… 235 |
| KH31032 | 医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究 | 林 讓 …… 243 |
| KH31033 | 医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告） | 頭金 正博 …… 252 |
| KH31033 | 医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告） | 頭金 正博 …… 257 |
| KH31034 | プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発 | 川崎 ナナ …… 261 |

| | | |
|---------|---|--------------|
| KH31035 | 生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究 | 内田恵理子 …… 271 |
| KH31036 | 臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究 | 東 純一 …… 281 |
| KH32074 | IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築 | 永井洋士 …… 288 |
| 第4分野 | | |
| KH41037 | 抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用 | 綱脇祥子 …… 307 |
| KH41038 | ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発 | 梶 龍児 …… 315 |
| KH42075 | 熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究 | 名和行文 …… 319 |
| 第5分野 | | |
| KH51039 | 臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化 | 藤原成悦 …… 327 |
| KH51040 | アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告） | 安枝 浩 …… 336 |
| KH51040 | アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告） | 安枝 浩 …… 342 |
| KH51041 | C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発 | 脇田隆字 …… 349 |
| KH51042 | 個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究 | 石見佳子 …… 359 |
| KH51043 | 食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用 | 山本茂貴 …… 367 |
| KH51044 | 食品添加物等の新機能性に関する研究 | 広瀬雅雄 …… 372 |
| KH51045 | 新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発 | 池田康行 …… 376 |
| KH51046 | 気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究 | 松本健治 …… 383 |
| KH51047 | 呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告） | 竹森利忠 …… 387 |
| KH51047 | 呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告） | 竹森利忠 …… 395 |
| KH51048 | 新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究 | 長谷川秀樹 …… 401 |
| KH51049 | バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発 | 松浦善治 …… 406 |

| | | |
|---------|--|--------------|
| KH51050 | 可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究 | 田口文広 …… 410 |
| KH51051 | ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発 | 小島朝人 …… 418 |
| KH51052 | 脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究 | 最上知子 …… 422 |
| KH51054 | 核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究 | 武田直和 …… 428 |
| KH51055 | siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用 | 森川 茂 …… 431 |
| KH51056 | プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告） | 鈴木孝昌 …… 437 |
| KH51056 | プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告） | 鈴木孝昌 …… 442 |
| KH51057 | 血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究 | 新見伸吾 …… 452 |
| KH51058 | 天然抗酸化剤を利用した創薬化学 | 福原 潔 …… 459 |
| KH51102 | 内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立 | 長谷川浩二 …… 464 |
| KH52076 | インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告） | 浅沼秀樹 …… 466 |
| KH52076 | インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告） | 浅沼秀樹 …… 471 |
| 第6分野 | | |
| KH61059 | 幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化 | 土屋利江 …… 479 |
| KH61060 | 新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発 | 岸田晶夫 …… 500 |
| KH61061 | 霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発 | 湯尾 明 …… 511 |
| KH61062 | 疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告） | 澁谷統壽 …… 516 |
| KH61062 | 疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告） | 澁谷統壽 …… 524 |
| 第7分野 | | |
| KH71063 | 臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法の確立に関する研究 | 乾 賢一 …… 531 |
| KH71064 | ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立 | 梅澤明弘 …… 540 |
| KH71065 | 創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究－ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作り－（総合研究報告） | 松浦成昭 …… 548 |

| | | |
|---------|--|--------------|
| KH71065 | 創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究－ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作り－（平成17年度報告） | 松浦成昭 …… 554 |
| KH71066 | 創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築 | 絵野沢 伸 …… 559 |
| KH71067 | EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合研究報告） | 森川 馨 …… 569 |
| KH71067 | EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成17年度報告） | 森川 馨 …… 575 |
| KH71068 | ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション | 本間正充 …… 591 |
| KH71069 | 高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発 | 永森静志 …… 601 |
| KH71070 | ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発 | 西尾和人 …… 611 |
| KH71071 | 外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究 | 大野泰雄 …… 617 |
| KH72077 | ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価 | 澤田康文 …… 628 |
| KH72078 | ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（総合研究報告） | 小林真一 …… 634 |
| KH72078 | ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（平成17年度報告） | 小林真一 …… 640 |

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性・安全性に関する研究

ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化 と研究資源高度化に関する研究（平成17年度報告）

所属 聖マリアンナ医科大学 薬理学

研究者 小林真一

研究要旨 ヒト組織のバンクシステム効率化と研究資源高度化を目的として、分担各施設で倫理委員会の承認後、患者より文書で同意を得て、ヒト組織の採取、保存・提供のシステム効率化を検討した。小林（真）と熊井は病理医、外科医とのネットワークと保存・管理体制の整備を、小林（英）は同意取得におけるコーディネーターのあり方を、浅原は包括同意と肝細胞調整を、後藤と西野は筋芽細胞と生検筋デポジトリーの資源化について検討した。これらの成果を本研究班の中で横断的にまとめ、ヒト組織公共バンクへのヒト組織の提供体制の効率化と研究資源としての質の向上が行われた。

分担研究者

- (1) 自治医科大学分子病態治療研究センター 小林英司
- (2) 聖マリアンナ医科大学 熊井俊夫
- (3) 広島大学大学院 浅原利正
- (4) 国立精神・神経センター神経研究所 後藤雄一、西野一三

は脳死からの臓器移植において移植不適合の場合にドナーから得られた組織が研究利用されている。しかし日本では法的に認められていない。そこで、日本人の組織を用いるためには手術などで摘出された組織のうち、病理検査に用いない部分の利用しか方法がない。

本研究は、我が国の現状において日本人のヒト組織を採取し、適切にかつ十分量の組織を多くの研究者に非医療用ヒト試料として研究利用できるよう保存・管理し、さらにヒューマンサイエンスヒト組織公共バンク(HSRRB)へ提供するためのシステム構築の検討を行う。特に我が国で遅れている医療機関の各部門を横断的にまたぐシステムを検討し、将来全国の各医療機関でも構築が可能なヒト組織提供機関としてのモデルシステムについて検討する。また提供する組織もしくは細胞が研究者のニーズに応えられるように質

A. 研究目的

ヒトと動物では各種薬物の反応性が異なり、医薬品の開発研究にヒト組織を利用した研究が必要であることが最近では広く認知されてきた。また薬物の効果や副作用に重要な役割を担っている肝薬物代謝酵素の働きは、人種間での違いが明らかになり、日本人の組織を用いた検討が重要になってきている。欧米で

の確保も検討する。

また各施設で採取したヒト組織の採取過程におけるばらつきが研究結果に大きく影響を与えることが懸念される。そこで昨年度、本研究でヒト組織提供医療機関内バンクシステムのモデルとなる様、コーディネーターを導入したインフォームドコンセント(IC)のあり方、外科医だけでなく病理医も含めた組織の採取の手順の効率化を検討した。これらの検討を踏まえ、本年度は昨年度試行した本システムの見直しを行い、今後 **HSRRB** へのヒト組織提供を前提とした効率的なバンクシステムの構築を目的とした。また筋芽細胞を1つのモデルとして初代培養、不死化、保存法の技術開発をさらに高度化させることで、あらゆる神経・筋疾患の筋芽細胞および生検筋標本をリサーチ・リソースとして用い、質の確保をはかるとともに、創薬の有効性・安全性についての研究を推進させることを目的としている。

さらにヒト組織の研究利用および **HSRRB** の意義について広く研究者に認知してもらうためにバンク事業従事者とヒト組織を提供していただいたドナーにバンク事業に関するアンケートを企画・実施する。

B. 研究方法

(倫理面への配慮)

本研究は三省共同のガイドライン「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に則している。聖マリアンナ医科大学では、対象は治療目的で外科手術により肝組織等の切除を受ける患者である。事前に臨床試験コーディネーター(CRC)が十分な補助説明をした後、文書による同意を得た。患者の個人情報と個人情報管理者を置き、連結可能または不可能匿名化を行い、個人情報を鍵のかかる保管庫で厳密に管理した。

広島大学では広島大学病院の全入院患者を対象に病理検体の研究・教育利用の理解と同意を得るシステム(包括的同意、一次同意)を導入し、さらに手術摘出組織の研究利用と同意取得(二次同意)および**HSRRB**への組織提供に関して倫理審査委員会の承認を受け、運用を開始した。

国立精神・神経センターでは国立精神・神経センター倫理委員会武蔵地区部会で承認されている。診断、研究使用についてあらかじめインフォームドコンセントを得た患者の骨格筋を利用する。また筋芽細胞データベースへの個人情報、個人情報管理担当者が管理した。

1) **HSRRB**へヒト組織を提供するシステム構築のための検討

(肝組織採取システムの整備、小林(真)班)

昨年度試行した手術で切除された肝組織等から病理検査に影響を与えず、かつ有効に肝組織等を採取するシステムについて外科医および病理医と検討し、見直しを行った。

(バンク事業に従事するスタッフと組織を提供していただいた患者に対する意識調査、小林(真)班)

このバンク事業に従事する医療スタッフおよび組織を提供していただく患者がバンク事業にどのような理解と印象を持っているかについてアンケート調査を行った。

(肝非癌部組織の初代培養、熊井班)

手術で採取した肝組織を氷冷 **HANK'S** 液に入れ運搬後、直ちに肝組織を細切後コラゲナーゼで 37°C 15 分間酵素処理をし、初代肝細胞を単離した。単離した肝細胞は **William E** 液に浮遊させ細胞数を算定した。24 時間静置後、培養液を **FCS** (牛胎児血清) 添加群、非添加群、ヒト血清添加群、ランフォード培地群の4群に分け培養し経過観察した。細胞生存率は **MTS assay** にて細胞生存率を検討

した。

(培養条件による肝薬物代謝酵素の蛋白発現、熊井班)

培養条件を変えて培養した初代肝細胞は経時的に一部回収し、肝機能の指標として CYP3A4 の発現について検討した。肝細胞における CYP3A4 mRNA 発現は RT-PCR 法で、CYP3A4 蛋白はウエスタンブロット法で解析した。また、CYP3A4 活性はルシフェラーゼ発光法で測定した。

(ヒト肝臓組織中の MDR-1 mRNA 発現、熊井班)

手術で得られ、摘出 10 分以内に凍結した患者からの肝組織から総 RNA を抽出した。RT 反応後、リアルタイム PCR にて MDR-1、アルブミン、GAPDH mRNA レベルを定量した。

(病理検体を研究に応用するための包括同意と肝細胞の HSRRB への提供、浅原班)

これまで正常ヒト肝細胞を利用した研究を進めてきた経験を活かし、手術等で摘出されたヒト肝臓組織から肝細胞への分離、保存、培養を行った。一方、HSRRB への組織提供へ向けた患者(提供者)への配慮、施設の準備を行い、分離精製された肝細胞を HSRRB へ提供する準備を行った。

(バンク寄託までの手順、小林(英)班)

現在、HS 重点研究でヒト組織収集と公的バンク協力を実施している施設(聖マリアンナ医科大学、広島大学医学部、東京医科大学、昭和大学医学部ならびに国立精神神経センター)で行っている IC の現状を説明資料や書式等合わせ討議、検討した。

2) 研究資源高度化の検討

(筋芽細胞データベースの構築と供与、後藤班)

国立精神・神経センター神経研究所及び武蔵病院では、共同で神経筋疾患の診断システ

ムと研究資料保存システムを構築し活動している。すでに 1 万件近くの患者登録と凍結筋保存がある。このシステムを基盤にして、患者骨格筋から筋芽細胞を樹立し、HSRRB へ提供する体制の構築を検討する。

(筋芽細胞樹立技術の高度化、後藤班)

初代培養で経代が少ない段階で凍結保存する方法をとっている。筋芽細胞培養における線維芽細胞の混入に対する対処法として、沈殿法(線維芽細胞がよりシャーレの底面に早く付着しやすい性質を利用)を行っているが、新たに凍存する検体(21 検体)の筋芽細胞の割合と、凍結保存された細胞を再融解した検体(8 検体)の筋芽細胞の割合を検討した。筋芽細胞の割合は、デスミンを用いた免疫染色で全細胞中の割合を計算した。

(生検筋標本(レポジトリ)の効率的活用と整備のための問題点抽出、西野班)

将来 HSRRB へ提供するためにデータベースを用いて、生検筋レポジトリの総検体数および年間検体数を明らかにし、実際にどのような研究に役立つかを明らかにした。

C. 研究結果

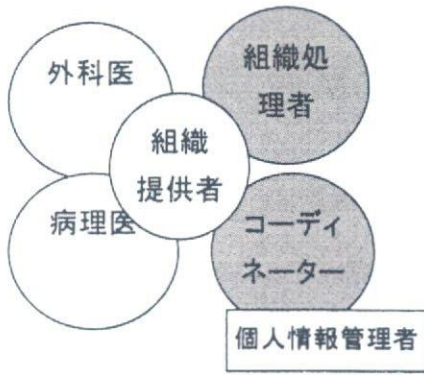
1) 肝組織の採取

本年度は、聖マリアンナ医科大学病院で肝疾患および肝癌で手術を受け、組織を提供された患者 25 例のうち、非感染症で同意の得られた 15 例が HSRRB に提供した。他に膵臓癌で切除される際に術式により切除された小腸を含めると現在までに 75 検体が HSRRB に提供している。

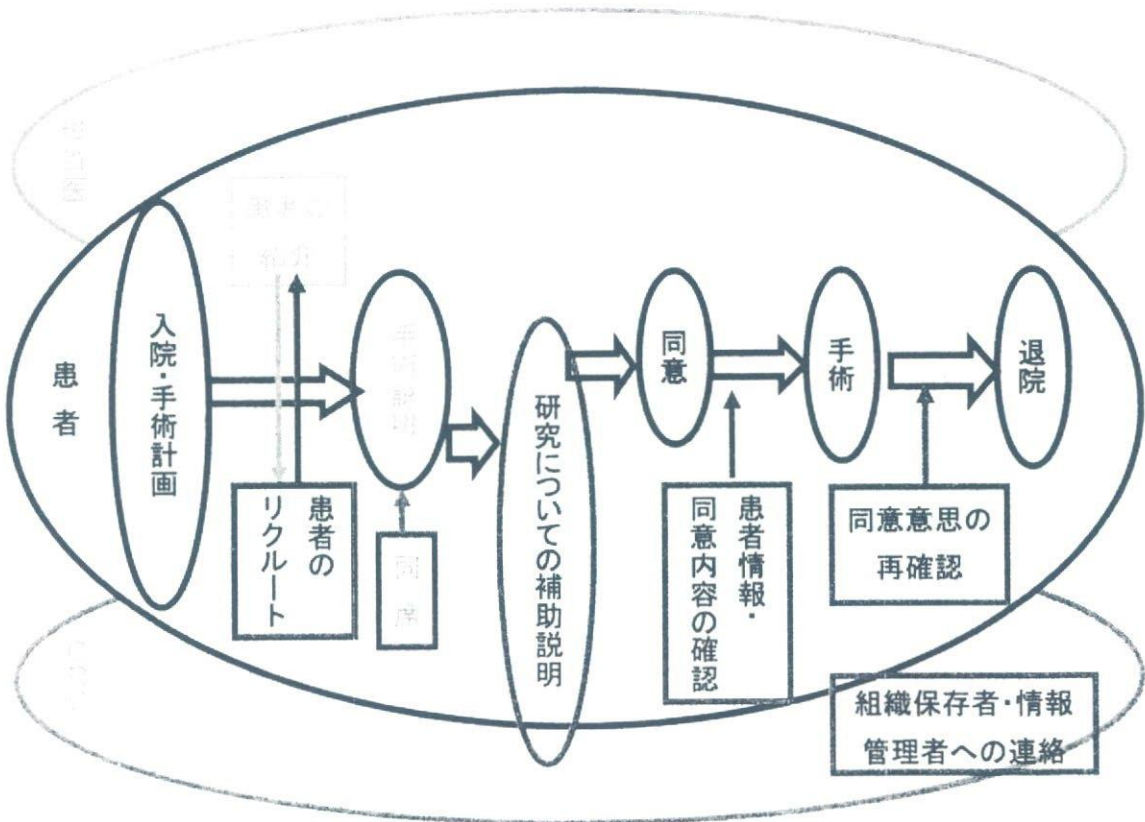
2) 肝組織採取システムの効率化

CRC が患者、外科医、組織採取スタッフ、病理医との間の連絡をコーディネートすることによりバンクシステムがスムーズに運営されている。

バンク事業に関わるスタッフ



ヒト組織の提供過程におけるCRCの役割



i. 手術室での採取の効率化（1次保存）

昨年度までは薬理学スタッフのみで手術室内での組織採取にあっていた。本年度から人的資源の不足を補うために、試験的に消化器・肝臓内科の医師も組織採取スタッフへの参加することを試みた。その結果、手術室内での作業に余裕が生まれ、組織保存がさらに

スムーズに行えるようになった。

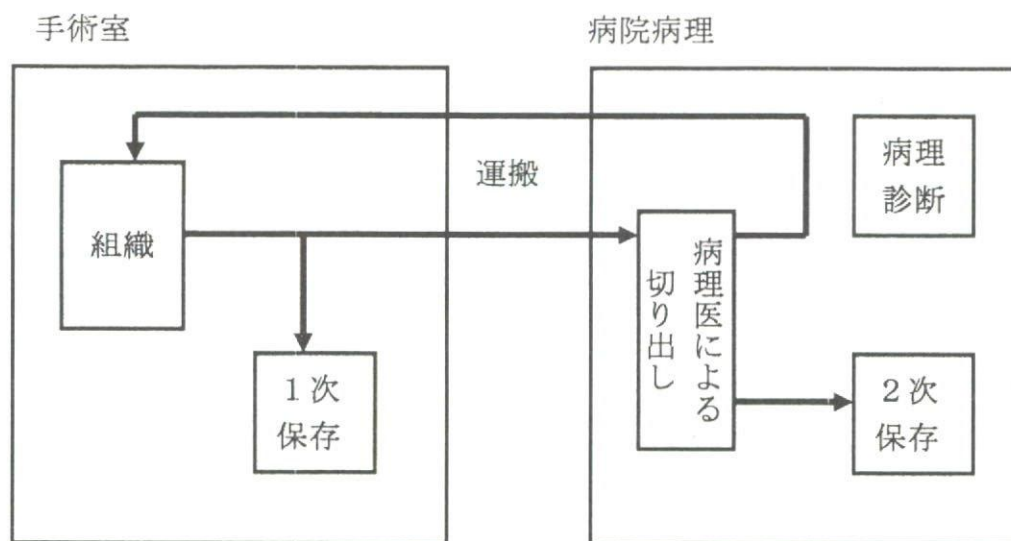
ii. 診断病理での採取の効率化（2次保存）

院内にはキャリアーシステムがあるが、採取した肝組織は組織採取担当者が直接診断病理部まで運搬している。本年度から病理医にも手術予定について予め連絡を入れておくことにより、病理医も当番制で対応することにより、

なり、病理医の負担も軽減させることができた。病理医も本事業への参加が2年目で経験を積んできたことから、バンク事業の意義についても理解が浸透しつつある。その結果、病理診断に用いる部分を除いた残余部分を病

理医の判断のもと切り出し、多い場合には20g程度の組織を研究に用いることが出来るようになった。この事はHSRRBへのヒト組織提供量にも顕著な効果をもたらしている。

組織採取の流れ



3) 学内ヒト組織バンクに関するアンケート実施

学内バンク事業に従事するスタッフおよび組織を提供していただいた患者を対象として、学内ヒト組織バンクについてアンケート調査を実施した。その結果、スタッフおよび組織を提供していただいた患者ともにバンク事業の必要性を認識していた。また、人的資源の増大など、バンク事業のさらなる推進の必要性にも関心を示していた。

4) 肝細胞培養の確立

初代肝細胞の長期培養と薬物代謝酵素活性の維持を目的とするため、培養維持因子添加William E液を基礎培地として、FCS添加群、ヒト血清添加群、ランフォード培地群の4群に分け培養し経過観察した。ランフォード培

地群、ヒト血清非添加群で細胞生存率が高かった。培養2日目からはヒト血清添加群、FCS添加群ともにCYP3A4蛋白発現が低下する傾向を示したが、ランフォード培地群、ヒト血清非添加群では培養5日目までCYP3A4蛋白発現が維持された。また初代肝細胞の長期培養を可能にするため細胞単離方法の改良を行い、cell viability 90%以上の確保が可能になった。

6) ヒト肝臓組織中のMDR-1 mRNA発現

手術で得られた担癌患者からの非癌部および癌部肝臓組織中の薬剤排出トランスポーターMDR-1 mRNA発現について検討した。担癌患者からの非癌部および癌部肝臓中MDR-1 mRNA発現は、その発現に個人差、ばらつきはあるものの肝臓組織中に発現が認め

られた。

7) バンク寄託までの手順

肝組織の治療的肝切除標本より正常部分の肝細胞を研究利用することを検討してきた各施設とも先行する「HS 小林英司班」報告を受け肝組織収集が行われていた。尚、学内バンクを持つ施設として、聖マリアンナ医科大学、昭和大学医学部、広島大学医学部であり、東京医科大学のケースでは、全研究試料を HS バンクへ寄託することが検討されている。

8) HSRRB への肝細胞提供システムの構築

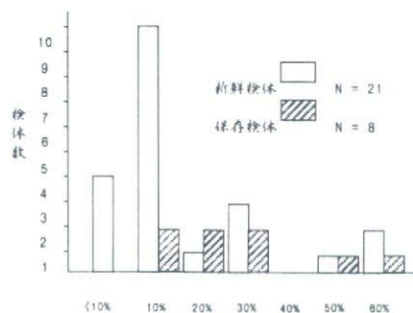
広島大学病院の全入院患者を対象に病理検体の研究・教育利用の理解と同意を得るシステム（包括的同意、一次同意）の導入し、手術摘出組織の研究利用と同意取得（二次同意）および HSRRB への組織提供に関する倫理審査委員会の承認（平成 17 年 4 月、第 420 号）を得た。次に専任の CRC を配置し、説明文書・同意書の作成と倫理審査委員会の承認を得て、CRC による IC 取得を開始した。

9) 筋芽細胞と線維芽細胞の樹立

平成 17 年 1 月～12 月までに新たに 85 検体の筋芽細胞の樹立を行った（総数で 708 検体）。またその多くは、皮膚由来の線維芽細胞の樹立も同時に行っている。さらに共同研究として研究者に筋芽細胞を供与した。

10) 筋芽細胞培養技術の高度化

凍結保存する直前の検体 21 検体と再融解した検体 8 検体とで大きな相違はなく、筋芽細胞の割合は思ったより低かった。



培養細胞中の筋芽細胞の割合

11) 筋レポジトリ-収集

2005 年末での凍結筋総検体数は、9300 検体であった。2004 年 1 年間での凍結筋検体増加数は、505 検体であった。

診断目的で全検体について、約 80 枚の連続切片を作製し、26 種類の組織化学染色を行うとともに、筋ジストロフィーの可能性のあるものに関しては、16 種類の抗体を用いた免疫組織化学染色が行われ、極めて見逃しの少ない、高度な診断システムが組み立てられている。最近 10 年間は、年間 400～450 検体で推移していたが、2005 年に関しては、前年比 10%増であった。これは、国内はもとより、世界各国から検体が集まるようになったためと考えられる。

D. 考察

1) ヒト組織を HSRRB へ提供するためのシステム構築のための検討

手術室での検体採取に際し、新たに消化器・肝臓内科の医師も組織採取スタッフへ参加することにより手術室内での作業が効率的になった。さらに組織採取スタッフの人数の増加により、今後当番制を採用して各スタッフの時間的負担の軽減を検討したい。

本年度は診断病理部の本事業への参加が 2 年目となり、システムの見直しを行った。本年度から病理医も診断病理部門内で当番制を

とることにより、各病理医の負担も軽減されるようになった。また、病理医の本事業への参加も2年目となり、組織採取者も手術室内での組織採取を最小限の範囲にとどめ、残りは病理医の判断にゆだねるようになったため、病理診断に用いない部分の範囲がより明確になった。

学内バンク事業に従事するスタッフおよび組織を提供していただいた患者を対象として、学内ヒト組織バンクについてアンケート調査を実施した。バンク事業に対して事業に従事するスタッフおよび組織を提供していただいた患者とも必要性を認識していた。

初代肝細胞の薬物代謝酵素活性を維持した長期培養を行ったところランフォード培地とヒト血清非添加培養による細胞生存率が高かった。さらに本研究では、初代肝細胞の単離法を検討し、これまで問題となっていた薬物代謝酵素 CYP3A4 活性の減少を克服し、数日間 CYP3A4 活性を維持した細胞を得ることが出来た。

手術で得られた担癌患者からの非癌部および癌部肝組織中に薬剤排出トランスポーター MDR-1 mRNA 発現が認められた。この組織を研究に利用する際、この MDR-1 の情報を付加することにより利用価値の高い試料となることが考えられる。

広島大学では平成 16 年度に行ったハード面での準備を踏まえ、今年度は CRC を実際に配置し、医師ではない中立的な立場の CRC による IC 取得を開始した。また説明文書・同意書の作成や連携体制の整備を行った。これらの取り組みにより、ヒト組織研究利用体制は、きめ細やかな倫理的配慮と効率性を併せ持つ組織研究利用システムとして構築され、実践を開始するに至った。また HSRRB へは、特に前例の無い肝細胞提供を開始するための準備・検討を重ね、実際の提供を開始する段階

に至った。これは本邦初となる日本人の肝細胞等のヒト組織を効率的に研究利用するシステム構築であり、ひいては日本の生命科学発展に寄与する重要な研究基盤整備である。

現在の日本で研究用の肝組織を得るためには肝癌の患者がその対象となる。研究にあたって提供する患者の予後の問題も IC を行う上で重要である。また患者は術前の IC のみでは、治療方針を含め 2-3 割くらいしか頭に残っていないことが多い。このため一定時間において理解できなかった部分を再度説明する必要性を考え、複数回の説明を義務付けた。また、筋生検試料は、診断部分に不利な点がなく、増幅させることにより、極めて貴重な研究試料としてバンク化可能と考えられた。

さらに、患者に対するインフォームド・コンセントを行う者としては、治療にあたる医師では患者の心理的背景から自由意思による同意に疑問が残るため、利害関係のない立場の者が行ったほうが良いと考えられ、説明補助者の利用を各施設で検討した。

2) 研究資源高度化の検討

登録細胞の数は順調に伸びており、さらに充実したリソースとなりうる。

一方、筋芽細胞の割合が 10% 程度のものが多いことが判明し、研究目的でより純度の高い筋芽細胞を必要とする場合には、線維芽細胞の割合を減少させることが必要であり、その方法論の開発をめざす必要がある。

また、既に保存されている筋芽細胞を、利用希望の研究者に供与することを推進させる必要があり、HSRRB の分譲を積極的に進める。

国立精神・神経センターにおいて保存されているヒト骨格筋レポジトリリーは、極めて質の高い診断システムと表裏一体のものであり、単なる骨格筋のバンクでなく、付加価値の極

めて高いレポジトリーである。このようなシステムを完備している施設は他になく、質・量ともに世界最高水準にあること国際的にもよく知られている。実際にこのレポジトリーの検体を利用し、これまでに多くの重要な研究業績を上げてきたが、本年も本レポジトリー検体を利用した研究成果が、多くの国際学術雑誌に掲載された。

今後、世界に誇るべきこのシステムを維持するとともに更に発展させていくことが必要なのは言うまでもない。これまで、本システムは半ばボランティア活動に近い形で維持されてきたが、本レポジトリーの規模とその重要性を考えると、既に、人的にも経済的にも限界に達していると言わざるを得ない。早急な事業化と人員の確保が必要である。これらシステムの確立を踏まえて付加価値の高いヒト骨格筋レポジトリーの HSRRB への提供を推進していきたい。

E. 結論

- 1) 聖マリアンナ医科大学病院で肝疾患および肝癌で手術を受けた患者 15 例の切除肝から病理検査に用いない部分の一部を外科医、病理医の協力のもとヒト組織学内バンクで保存するとともに HSRRB へ提供した。個人情報管理者が直接保存に係わることにより効率的な情報管理が行えた。
- 2) 聖マリアンナ医科大学病院で肝疾患および肝癌などで手術を受けた患者 5 例の切除肝から、肝細胞初代培養を施行した。
- 3) 広島大学でも倫理的配慮に重点を置いたヒト組織研究利用システムが整い、実践を開始した。また HSRRB へは初となる肝細胞の提供を開始する段階に至った。
- 4) ヒト組織の研究資源化における各協力施設で行なわれている手順を確認し、その現状と今後の対応を検討した。

5) 筋芽細胞を樹立させることでさらに充実したリソースとなりうる。

6) 生検筋デポジトリーの整備と効率的活用がなされた。

7) これら筋芽細胞、生検筋デポジトリーの HSRRB への提供を検討する。

F. 研究発表

(誌上発表)

1. 中谷祥子、櫻井史穂子、熊井俊夫、田中政巳、松本直樹、松井宏晃、中野浩、朝倉武士、野田真一郎、山田恭二、大坪毅人、小林真一. ヒト組織を研究利用するための課題：公共ヒト組織バンクへ組織を提供する医療機関としての取組. 臨床薬理, 36; 297-303. 2005.
2. 中谷祥子、小林真一. ヒト組織を研究利用するための基盤整備：ヒト組織の提供から保存まで. 日本薬理学会雑誌. 126; 391-398: 2005.
3. 関根進、武半優子、熊井俊夫、松本直樹、小坂橋優、小林真一. イリノテカン活性代謝物 SN-38 によるヒト肝細胞癌株細胞 Huh7 のアポトーシスおよび薬物耐性への影響. 聖マリアンナ医科大学雑誌 33 : 445-454, 2005.
4. Amano H, Itamoto T, Asahara T, et al. 2005. Granulocyte colony-stimulating factor-producing combined hepatocellular/cholangiocellular carcinoma with sarcomatous change. *Journal of Gastroenterology*. 40:1158-1160.
5. Ide K, Ohdan H, Kobayashi T, Hara H, Ishiyama K, Asahara T. 2005. Antibody- and complement-independent phagocytotic and cytolytic activities of human macrophages toward porcine cells. *Xenotransplantation*. 3:181-8.

6. Onoe T, Ohdan H, Tokita D, Shishida M, Tanaka Y, Hara H, Zhou W, Ishiyama K, Mitsuta H, Ide K, Asahara T. 2005. Liver sinusoidal endothelial cells tolerate T cells across MHC barriers in mice. *J Immunol.* 175:139-46.
7. Onoe T, Ohdan H, Tokita D, Hara H, Tanaka Y, Ishiyama K, Asahara T. 2005. Liver sinusoidal endothelial cells have a capacity for inducing nonresponsiveness of T cells across major histocompatibility complex barriers. *Transpl Int.* 2:206-14.
8. Tokita D, Ohdan H, Onoe T, Hara H, Tanaka Y, Asahara T. 2005. Liver sinusoidal endothelial cells contribute to alloreactive T-cell tolerance induced by portal venous injection of donor splenocytes. *Transpl Int.* 2:237-45.
9. Zhou, W., H. Ohdan, and T. Asahara. 2005. Calcineurin inhibitors block B-1 cell differentiation: the relevance to immunosuppressive treatment in ABO-incompatible transplantation. *Transplant Proc.* 37:1808-1811.
10. 丸山英二, 絵野沢伸, 若林正, 小林英司: インフォームド・コンセント及び、代諾をめぐる諸問題と政府指針 (後半). *Organ Biology* 12(1):65-72, 2005.
11. 若林正, 絵野沢伸, 小林英司: シリーズ「倫理問題」法学者とともに考えるヒト由来研究試料に関するインフォームド・コンセント③—インフォームド・コンセントをめぐる諸問題—. *再生医療* 4 (2) : 108-118, 2005.
12. Kirino Y, Goto Y, Campos Y, Arenas J, Suzuki T: Specific correlation between the wobble modification deficiency in mutant tRNAs and the clinical features of a human mitochondrial disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 7127-7132, 2005.
13. Noguchi S, Fujita M, Murayama K, Kurokawa R, Nishino I: Gene expression analyses in X-linked myotubular myopathy. *Neurology* 65:732-737, 2005.
14. Yan C, Tanaka M, Sugie K, Nobutoki T, Woo M, Murase N, Higuchi Y, Noguchi S, Nonaka I, Hayashi YK, Nishino I: A New Congenital form of X-linked autophagic vacuolar myopathy. *Neurology* 65: 1132-1134, 2005.
15. Wu S, Ibarra C, Malicdan M, Murayama K, Ichihara Y, Kikuchi H, Nonaka I, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I: Central core disease is due to RYR1 mutations in more than 90% of patients. *Brain*, in press.
16. Ibarra C, Wu S, Murayama K, Minami N, Ichihara Y, Kikuchi H, Noguchi S, Hayashi YK, Ochiai R and Nishino I: Malignant hyperthermia in Japan: mutation screening of the entire ryanodine receptor type 1 gene coding region by direct sequencing. *Anesthesiology*, in press.
- (学会発表)
1. 熊井俊夫、中谷祥子、武半優子、櫻井志穂子、向後二郎、都築慶光、田中正巳、中野浩、高木正之、大坪毅人、田所衛、小林真一. 学内ヒト組織バンクシステムの基盤整備と効率の良い組織提供について—診断病理部門の関与—. 第26回日本臨床薬理学会年会.
2. 武半優子、熊井俊夫、関根進、松本直樹、小林真一. ヒト肝細胞癌細胞における p53 を介したイリノテカンのアポトーシス機序の解析. 第112回日本薬理学会関東部会.
3. 武半優子、熊井俊夫、中谷祥子、渡辺実、桜井史穂子、松本直樹、小林真一. ヒト初代肝細胞の培養条件の違いによる薬物代謝酵素 CYP3A4 活性および肝機能維持に関する検

- 討. 第 26 回日本臨床薬理学会年会.
4. 浅原利正：再生医療の展望、JA 尾道総合病院鏡視下手術 2000 例記念講演会、尾道、2005.1.21
 5. 浅原利正：生体部分肝移植手術の工夫と肝疾患未来医療への試み、第 11 回北海道肝胆膵セミナー、札幌、2005.2.10
 6. 浅原敏正：肝疾患の診療の未来—肝移植—、呉肝臓病研究会 特別講演会、呉、2005.3.10
 7. 今岡泰博：肝細胞癌に対する治療戦略、第 88 回広島がん治療研究会、広島、2005.3.19
 8. H.Amano, et al：Establishment of public resource bank of human hepatocytes for research use、第 78 回日本薬理学会年会、横浜、2005.3.22-24
 9. 天野尋暢 他：混合型肝癌における粘液の形質発現の検討、第 105 回日本外科学会定期学術集会、名古屋、2005.5.11-13
 10. 浅原利正：肝癌の治療と肝臓移植の適応について、内科医に必要な外科治療を考える会、広島、2005.5.28
 11. 板本敏行 他：肝細胞癌再発に対する再肝切除の意義と限界、第 46 回広島肝疾患セミナー、広島、2005.7.9
 12. 舩本法生 他：ラットおよびヒト肝キメラマウスへの成長ホルモン投与による肝再生の促進、第 26 回日本炎症・再生医学会、東京、2005.7.12-13
 13. 浅原利正：肝移植治療成績向上を目指して、第 22 回中・四国肝臓病研究会、岡山、2005.9.17
 14. H.Momisako et al: Surgically treated sarcomatous liver cancers, 15th International Symposium of the Hiroshima Cancer Seminar, Hiroshima, Japan, 2005.10.30
 15. 浅原利正：肝癌治療の将来を考える、第 22 回安芸医学会、広島、2005.12.4
 16. 五十嵐由希子 他：当院におけるヒト組織の研究利用体制とインフォームド・コンセント、第 22 回広島・山口肝疾患研究会、広島、2006.1.14
 17. 五十嵐由希子 他：ヒト組織の研究利用における組織提供体制と適正なインフォームド・コンセントへの取り組み、第 5 回日本再生医療学会総会発表予定、岡山、2006.3.8-9
 18. 小林英司, 高久史磨：「ヒト由来資源の応用」. 日本生命倫理学会 第 17 回年次大会, 東京, 平成 17 年 11 月 19 日.
 19. Mimaki M, Komaki H, Kirino Y, Suzuki T, Goto Y. The mitochondrial DNA point mutation at the discriminator base of tRNA-Glutamate is necessary to cause benign infantile cytochrome c oxidase deficiency. The 2006 Annual Meeting of American Society of Human Genetics, 10.26-28, 2005, Salt Lake City, USA
 20. Mimaki M, Nishino I, Nonaka I, Goto Y. Clinical, pathological and genetic study on 223 patients with the mtDNA A3243G mutation. The 1st Congress of Asian Society for Pediatric Research, 11.25, 2005, Tokyo, Japan
- G. 本年度の知的所有権の出願・取得状況
特になし

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

平成18年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社