

Norie Kawahara, Tohru Masui, Jae Kyung Roh, Xishan Hao, David Hill and Hideyuki Akaza. What Should We Do to Raise Awareness on the Issue of Cancer in the Global Health Agenda. Current Asia Pacific Anticancer Therapy and Research Initiative and Strategies. Jpn J Clin Oncol. 2010;40(Supplement): i82-i85

【誌上発表】

増井徹、ファーマコゲノミクス検査を活用する創薬と国際化に向けて、臨床検査。

2010;54(10):1131-1137

増井徹、ヒトを生物として研究する場としてのバイオバンク、日本生命倫理学会ニューズレター。2010; 46: 1.

増井徹、バイオバンクの現状と将来 一人を研究対象とするための社会基盤—「遺伝子診断学(第2版)」日本臨床。2010; 68: 106-111

増井徹 ヘルシンキ宣言の改訂にみる「ヒトを対象とした科学研究」年報医事法学 2010; 25: 20-29.

【書籍】

増井徹、バイオバンク、生命倫理、編集：玉井真理子、大谷いづみ、有斐閣、2011, 95

Masui, T. Researchers' Integrity of Researchers: acquiring reactivity is losing responsibility. in Research Integrity, eds. Tony Mayer and Nick Steneck, 2010 in press.

増井徹 ヒトを対象とする研究の倫理：ヘルシンキ宣言の改訂の意味するもの「生命科学・医学と法・生命倫理—生命倫理基本法に向けて—」編集：位田隆一/ドナルド・チャルマーズ、2011, 印刷中

【国内学会：招待講演】

増井徹：難病研究資源バンクの政策・倫理枠組みについて。第28回日本ヒト細胞学会学術集会、つくば。2010年8月23日

増井徹：難治性疾患克服研究事業 難病研究資源バンクについて。第14回日本内分泌病理学会 公開サテライトシンポジウム 「内分泌難病対策の今後と難病研究資源バンクの活用」。2010年10月30日

増井徹：人を対象とした研究の基盤としてのゲノム情報等と社会。遺伝疾患に関する出生前診断研究会 沖縄。2010年11月20日

増井徹：ヒトのことはヒトで研究する時代の中で—代替法の時代を迎えて。第23回日本動物実験代替法学会 市民講演会。2010年12月5日

増井徹：ヒト由来試料と情報の研究・開発での流通の問題について。日本知的財産学会 ライフサイエンス分科会。2011年2月5日

E. 知的財産の出願・登録状況

該当なし

独立行政法人医薬基盤研究所難病研究資源バンク運営細則(案)

平成23年2月22日

- 第1条 目的
- 第2条 基本方針
- 第3条 役割
- 第4条 難病バンクの管理運営担当者
- 第5条 難病バンク研究倫理審査委員会の審査
- 第6条 他機関との連携
- 第7条 試料等安全管理措置
- 第8条 試料等の受入れと取扱い
- 第9条 研究利用のための分譲
- 第10条 共同事業
- 第11条 用語定義
- 第12条 準拠指針及び規程について

第1条 目的

本細則は、独立行政法人医薬基盤研究所(以下「基盤研」という。)の難病研究資源バンク(以下「難病バンク」という。)において、難治性疾患患者等に由来する組織、細胞等のヒト由来試料および試料情報(以下「試料等」という。)について、収集医療機関(以下「収集機関」という。)からの受入れ、搬送、保管、加工処理等の処置および研究を行う機関(以下「研究機関」という。)への分譲が広く公正に行われ、難治性疾患等克服研究推進のために難病バンクが適正に運営されることを目的として定める。

第2条 基本方針

本細則は試料等の取扱いにあたり、人間の尊厳と人権の尊重および個人情報の保護を前提として、業務の公共性、公正性を確保することを基本方針とする。疾患患者等により提供される試料等は「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)(以下「ゲノム指針」という。)、関連諸指針、及び医薬基盤研究所の諸規程の最新版に基づき取扱うこととする。試料等の分譲にあたっては研究機関の研究者にもこの基本方針の理解を求める。なお、試料等の取扱いの正確性と作業従事者の安全性を確保するために、作業手順の標準化を図る。

第3条 役割

第2条記載の基本方針に従い、難病バンクにおいて、疾患患者等の試料等を収集機関から受入れ、試料等を研究機関の研究者に分譲する。

第4条 難病バンクの管理運営担当者

- (1) 難病バンクは「難病バンク管理運営責任者」を1名置く。
- (2) 難病バンクは、「試料管理責任者」、「試料情報管理責任者」および「研究倫理責任者」各1名を置く。

第5条 難病バンク研究倫理審査委員会の審査

難病バンク研究倫理審査委員会(以下「難病バンク審査委員会」という。)は、「独立行政法人医薬基盤研究所難病研究資源バンク研究倫理審査委員会設置運営細則」に基づき運営される。難病バンク審査委員会は以下の項目について、倫理的妥当性を審査する。

- (1) 試料等の収集にかかわる研究計画とその実施方法。
- (2) 収集機関からの試料等の受入れ。
- (3) 研究機関への試料等の分譲に係わる倫理的事項。
- (4) 試料等の取扱いについて審査委員会での決定が必要と判断される事項。

第6条 他機関との連携

難病バンクは、熊本大学発生医学研究所および理化学研究所バイオリソースセンターと連携して事業を行う。

第7条 試料等安全管理措置

試料等の安全管理については「独立行政法人医薬基盤研究所難病研究資源バンク試料等の取扱いに於ける安全管理要領」に基づき実施する。

第8条 試料等の受入れと取扱い

難病バンクが収集機関から試料等を受入れる際、以下の項目の確認を実施する。

- (1) 難病バンクへの試料等の提供について、収集機関の医師から疾患患者等あるいは代諾者等に十分な説明がなされ、同意が文書で得られていること。
- (2) 難病バンクへの試料等の提供について、収集機関の倫理審査委員会において承認されていること。
- (3) 収集機関で匿名化が行われていること。
- (4) 難病バンクへの試料等の受入れについて、難病バンク審査委員会において承認されていること。

- (5) 試料等の保護預りについては、「独立行政法人医薬基盤研究所難病研究資源バンク試料等保護預かり要領」に基づき実施する。

第9条 研究利用のための分譲

試料等の分譲については、「独立行政法人医薬基盤研究所難病研究資源バンク試料等利用細則」に基づき実施する。

第10条 共同事業の目的

収集事業を促進するために、難病バンクは収集機関と共同事業としてバンク事業を行うことができる。共同事業については、本細則及び「独立行政法人医薬基盤研究所難病研究資源バンク共同事業要領」に基づき実施する。

第11条 用語定義

- (1) 難治性疾患（難病）：症例数が希少で、治療法が確立されておらず、生活への障害性が高い疾患のこと。
- (2) 難病研究資源バンク（難病バンク）：基盤研が運営する難病バンク。
- (3) 難病バンク管理運営責任者：難病バンクの管理運営の全体について責任を負う者。
- (4) 試料管理責任者：試料の安全管理措置の実施について責任を負う者。
- (5) 試料情報管理責任者：試料情報の安全管理措置の実施について責任を負う者。
- (6) 研究倫理責任者：難病バンクの研究倫理について適切な指示を行う者。
- (7) 難病研究資源バンク研究倫理審査委員会（難病バンク審査委員会（ヒトを対象とする研究に関する倫理規程に準ずる））：試料等を受入れ、あるいは分譲する際に研究の倫理性について審査する委員会のこと。現在外部委員、内部委員を含め総勢9名が委員会のメンバーである。
- (8) 収集医療機関（収集機関）：収集研究班に含まれる医療機関を含む、疾患患者等からの試料を収集する機関のこと。
- (9) 試料情報：診療情報を含む、試料に関する情報。
- (10) 試料等：ゲノム指針に準ずる（試料情報を含む）。
- (11) 匿名化：ゲノム指針に準ずる。
- (12) 連結可能匿名化：ゲノム指針に準ずる。
- (13) 連結不可能匿名化：ゲノム指針に準ずる。
- (14) 疾患患者等：難病患者と健常者を含む、試料等提供者のこと。
- (15) 代諾者等：ゲノム指針に準じる
- (16) 提供：疾患患者等から収集機関へ、あるいは収集機関から難病バンクへ試料等を受け渡すこと。ただし難病バンクが主体の場合は、「受入れ」を使用する。
- (17) 分譲：難病バンクから研究機関に試料等を受け渡すこと。

- (18) 研究を行う機関（研究機関）：難病バンクから試料等を分譲する大学、企業、その他の研究機関全般をさす。
- (19) 研究者：難病バンクから分譲を受け、試料等を受領する者のこと。

第12条 準拠指針及び規程について

- (1) 諸指針や諸規程の改正、試料等の取扱いや研究利用に関する科学的進歩や経験の蓄積、その時代の社会通念等により、必要に応じて本細則を見直すものとする。本細則の改訂にあたっては、難病バンク審査委員会の意見を聞いて実施するものとする。

附則

本細則は、平成 23 年 XX 月 XX 日より施行する。

独立行政法人医薬基盤研究所難病研究資源バンク試料等利用細則(案)

- 第1条 目的
- 第2条 基本方針
- 第3条 共同事業
- 第4条 対象とする試料等
- 第5条 難病バンク研究利用委員会の役割
- 第6条 難病バンク研究利用委員会の構成
- 第7条 難病バンク審査委員会による審査
- 第8条 試料情報の管理
- 第9条 守秘義務
- 第10条 試料情報の開示
- 第11条 研究者との関係(研究利用のための分譲)
- 第12条 試料等分譲の要件
- 第13条 試料等を研究利用したことの明示
- 第14条 研究実施経過並びに研究実施結果の報告
- 第15条 研究終了後の試料処理
- 第16条 違反に対する処置
- 第17条 知的財産の所有権の放棄
- 第18条 免責事項
- 第19条 雑則

別紙 各種申請書・報告書(様式 001～009)

第1条 目的

本細則は、独立行政法人医薬基盤研究所難病研究資源バンク(以下「難病バンク」という。)に収集保存された患者試料または患者試料に由来する試料、及びそれらの情報(以下「試料等」という。)が、難治性疾患克服研究に適正に利用されることを目的として定める。

第2条 基本方針

難病バンク事業は医薬基盤研究所の所掌事業として運営し、原則として「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)、関連諸指針、及び医薬基盤研究所の諸規程の最新版に基づき試料等を取り扱う。

試料等の取り扱いにあたり、人間の尊厳と人権の尊重、及び個人情報の保護を前提として、業務の公共性、公正性が確保され、作業に従事する者の安全性が確保されなければならない。

第3条 共同事業

難病バンクは共同事業先への試料等の分譲を行うことができる。共同事業については、「独立行政法人医薬基盤研究所難病研究資源バンク共同事業要領」に基づき実施する。

第4条 対象とする試料等

難病バンクが研究利用のために分譲できる試料等は、次の条件を全て満たすものでなければならない。

- (1) 難病バンクへの試料等の提供について、収集機関の医師から疾患患者等あるいは代諾者等に十分な説明がなされ、同意が文書で得られていること。
- (2) 難病バンクへの試料等の提供について、収集機関の倫理審査委員会において承認されていること。
- (3) 収集機関で匿名化が行われていること。
- (4) 難病バンクへの試料等の分譲について、難病バンク研究倫理審査委員会（以下「難病バンク審査委員会」という。）において承認されていること。
- (5) 難病バンクより試料等を分譲することに、収集機関の合意が得られていること。

第5条 難病バンク研究利用委員会の役割

難病バンクが次の項目の決定を行うにあたり、難病バンク研究利用委員会（以下「難病バンク利用委員会」という。）が科学的妥当性について判断するものとする。

- (1) 研究利用のための分譲申請があった場合の、研究者への分譲に関する事項
- (2) 有限な試料等の有効活用を図る観点から、研究者が分譲請求する試料等の量的、質的適切さについて
- (3) その他、難病バンク利用委員会が判断する必要がある事項

第6条 難病バンク研究利用委員会の構成

難病バンク利用委員会は、難病バンク以外の医薬基盤研究所職員1名、難病バンク管理運営責任者が指名するもの2名の計3名の委員によって構成され、稟議により審議を行うことができる。難病バンク利用委員会は当該試料を提供した責任者の意見を尊重しなければならない。

第7条 難病バンク審査委員会による審査

難病バンクは、難病バンク利用委員会が科学的に妥当と判断した研究者への試料等の分譲に係わる事項の倫理的妥当性について、難病バンク審査委員会の審査を受けるものとする。難病バンク審査委員会の承認が得られない場合は、難病バンクは分譲を行うことができないものとする。

第8条 試料情報の管理

難病バンクにおける試料情報(試料の臨床情報)の管理は、難病バンク試料情報管理責任者が行う。

難病バンク試料情報管理責任者は医薬基盤研究所個人情報管理者の管轄のもとに、次に掲げる業務を執り行うものとする。

- (1) 受け入れる試料に係わる臨床情報の保護と情報の管理(利用範囲等の条件を含む)
- (2) 難病バンク審査委員会に関する手続きや資料等の書類及び記録の保管
- (3) 分譲する試料に関する情報の対応表廃棄(連結不可能匿名化)の確認

第9条 守秘義務

試料情報の取扱い者は正当な理由なく業務上知り得た情報を漏洩してはならない。職務を辞めた後も同様とする。これに反した場合には、その内容に応じて職務上の処分または措置がとられる。

第10条 試料情報の開示

難病バンクは、難病バンクウェブサイト上で、分譲可能な試料情報を公開するものとする。閲覧または分譲を希望する者は難病バンク管理運営責任者に登録申請し、承認を受けなければならない。登録利用者は「難病研究資源バンクウェブサイト利用者登録について」に従わなければならない。登録利用者の個人情報、難病バンク試料情報管理責任者が、「独立行政法人医薬基盤研究所個人情報管理規程」に従い適正に管理するものとする。

第11条 研究者との関係(研究利用のための分譲)

難病バンクの試料等を研究利用する研究者は、「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)、関連諸指針、及び本細則を遵守し試料等の分譲を受け研究利用するものとする。試料等を研究利用する研究者は、当該試料等の収集機関が求める利用条件を尊重しなければならない。

第12条 試料等分譲の要件

研究者への試料等の分譲に際し、難病バンク管理運営責任者は研究者から次の申

請書類を受け、これを添えて難病バンク利用委員会の審査を受けなければならない。

- (1) 試料等分譲申請書(様式 001)
- (2) 試料等分譲研究計画書(様式 002)
- (3) 当該研究計画に対する研究者が所属する研究機関の倫理審査委員会への申請書(写)
- (4) 当該研究計画に対する研究者が所属する研究機関の倫理審査委員会の承認書(写)
- (5) 試料利用に係る覚書(MTA)(様式 003 または研究機関が指定する様式)

難病バンク利用委員会は研究利用申請内容の科学的妥当性を審査するとともに収集機関が求める利用条件に適合することを判定する。

試料等の分譲にあたり、難病バンクは「独立行政法人医薬基盤研究所生物資源の分譲等に関する規程」に従い、手数料等を徴収できるものとする。

研究者は試料を受け取りしだい、すみやかに「試料受領書(様式 004)」を提出するものとする。

第13条 試料等を研究利用したことの明示

難病バンクから試料等の分譲を受けて実施した研究成果を発表する場合は、発表の内容に難病バンクから試料等の分譲を受けたことを明示しなければならない。

第14条 研究実施経過並びに研究実施結果の報告

研究者は医薬基盤研究所理事長に対し、事前に審査した研究計画に従って実施されているか否かについて、研究終了時に「研究終了報告書(様式 005)」を提出しなければならない。また、研究実施期間が1年を越える場合は、1年ごとに「研究実施経過報告書(様式 006)」を提出しなければならない。研究実施期間の延長を申請する場合は「研究延長申請書(様式 007)」、研究内容の変更を申請する場合は「研究計画変更申請書(様式 008)」を提出のうえ、それぞれの可否について難病バンク審査委員会の審査を受けなければならない。

第15条 研究終了後の試料処理

難病バンクから試料等の分譲を受けて実施した研究が終了した場合は、残存試料は高圧蒸気滅菌などの適切な処理を施したうえ、原則として廃棄しなければならない。試料等の分譲を受けた研究者は、試料等を廃棄したことを難病バンクに報告しなければならない「試料廃棄報告書(様式 009)」。

第16条 違反に対する処置

試料等の分譲を受けた研究者において、申請内容と異なる研究を実施するなどの違反が認められた場合には、医薬基盤研究所理事長は当該研究者に対し、書面による再発防止策の提出を求めるとともに、難病バンク審査委員会に諮った上で、分譲試料の返還請求、以後の分譲の停止などの処置をとることができる。

第17条 知的財産の所有権の放棄

難病バンクから分譲された試料等を利用した研究によって生み出される知的財産について、難病バンクはその所有権の帰属に関与しない。

第18条 免責事項

難病バンクより分譲された試料等により事故が発生した場合、難病バンクはその責務を負わない。

第19条 雑則

本細則は、試料等の取り扱いや研究利用に関しての科学的進歩や経験の蓄積、その時代の社会通念等により、必要に応じて見直し、難病バンク審査委員会に意見を聞くものとする。

附 則(平成23年 XX 月 XX 日)

本細則は、平成23年 XX 月 XX 日より実施する。

独立行政法人医薬基盤研究所難病研究資源バンク共同事業要領(案)

平成23年2月16日

(目的)

本要領は独立行政法人医薬基盤研究所難病研究資源バンク(以下「難病バンク」という。)が公正な試料等の分譲を目指し、「独立行政法人医薬基盤研究所難病研究資源バンク運営細則」および「独立行政法人医薬基盤研究所難病研究資源バンク試料等利用細則」に基づき、難病バンクにおける共同事業での試料等の収集および分譲に関する手続きを定めることを目的とする。

(共同事業)

難病バンクが試料等の収集を行う研究班との共同事業を設定することにより、収集研究班の試料収集の円滑化を図り、難病バンクによる試料の品質管理を行うため、共同事業を行うものとする。

(共同事業内部での試料等利用条件)

共同事業における研究利用については、試料等の分譲を連結可能匿名化で行うことができる。

(共同事業内部での試料等利用期間)

おおむね3年間を共同事業期間とし、この期間を延長する場合は、「独立行政法人医薬基盤研究所難病研究資源バンク試料等利用細則」に従い、難病バンク研究倫理審査委員会の承認を得るものとする。

(共同事業機関以外からの利用申し出への対応)

難病バンクは共同事業機関以外からの試料等の研究利用の申請があった場合は、共同事業期間内であっても、「独立行政法人医薬基盤研究所難病研究資源バンク試料等利用細則」に従い、連結不可能匿名化で分譲を行うことができる。

ヒト疾患関連組織の長期継代維持と保存法研究

研究分担者 野村大成（独）医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー
（研究協力者） 松田潤一郎（独）医薬基盤研究所 研究リーダー）
（研究協力者） 竹森 洋（独）医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー）

研究要旨： ヒト疾患組織の長期継代維持と形態・機能を生かしたままの永久保存を計るため、難病研究バンク開発研究における総括的ヒト難治性疾患組織維持システムの基盤研究を行い、難病の基礎研究、治療研究、創薬研究に結びつける。増殖性ヒト組織（がん等）については、継代維持、凍結保存し、再移植で、形態、機能が非常によく保存されている。難病等非増殖性ヒト疾患組織に関しては、これまで継代移植および再生可能な形で凍結保存は行われたことがない。1つのモデルとして前立腺肥大症組織の移植を行い、その形態、機能（PSA分泌）も維持することに成功した。しかし、原発巣の組織のプログラムフリーザーによる凍結保存では再生能力が少し落ちるので改良を要する。自然発症疾患モデルマウスの発見・解析も平行して行っており、脊髄小脳変性症自然発症マウスを樹立し、遺伝子発現の異常等を証明した。

A. 研究目的

「難治性疾患克服のための難病資源バンク開発研究」開始にあたり、3年計画で、難治性疾患対策のために収集される患者試料を、DNA、RNAレベルでなく、その形態、機能を生かしたままの保存法の確立、さらに、Super-SCIDマウスでの継代維持により難治性疾患組織の形態・機能の長期維持をはかり、難病組織の生理機能の研究、治療研究、創薬研究を可能にする総括的ヒト難治性疾患組織維持システムの研究基盤を確立を行うのを目的とする。また、ヒト組織を用いての研究が困難な疾患に関しては、難病、疾患自然発症モデルマウスの開発と解析を行う。

B. 研究方法

Super-SCID（重度複合免疫不全）マウスを作成し、ヌード、SCIDマウスで増殖困難なヒト悪性腫瘍の継代維持と生きたままの永久凍結保存を行い、ヒト良性腫瘍、前がん病変組織、正常組織・細胞の継代移植維持についても20年以上にわたり実施し、正常ヒト皮膚、甲状腺、肺等組織の長期継代維持（～3年）にも初めて成功した。非増殖性のヒト難病臓器組織に対しても、長期継代移植維持を実施するとともに、組織機能を維持したままの再生可能な凍結保存を試みる。マイクロアレイ等により経時的変化の有無を調査し、生きた組織レベルでの難病の研究・治療のための資源開発を試みる。本年度に非増殖疾患組織のモデルと

して前立腺肥大症組織について検討した。また、医薬基盤研究所の保有する難病・疾患自然発症モデルマウスについて研究協力者 松田潤一郎、竹森 洋博士等の協力のもとに解析する。

（倫理面への配慮）

ヒト（成人、胎児）組織の SCID マウスへの移植に関しては、医薬基盤研究所研および関連施設での研究倫理委員会の承認のもとに実施している。

C. 研究結果

IgG、IgM が検出限界以下（ $<1 \mu\text{g/ml}$ ）の C. B17-*scid* マウスを50代以上選択近交交配することにより、Leaky、白血病の自然発生が殆どなく、マイクロアレイで免疫関連遺伝子の70%近くが機能欠損あるいは減少した。この *scid* 遺伝子を C3H/HeJ マウスに導入し、30代以上兄妹交配した C3H/HeJ-*scid* ; *LPS* マウスを用いる。このマウスではヒト組織が安定して継代維持できる。

1. ヒト組織の継代維持と再生可能な凍結保存法

これまでヌード、SCID マウスにて増殖しなかったヒト悪性腫瘍の増殖に成功したので、その凍結保存を行ってきた。これら可移植性腫瘍組織を20年近く前に、受精卵凍結保存法にならひ、保存液中でプログラムフリーザーにて特定のプログラムで凍結保存した。ヒト卵のう膜腫瘍、頭頸部がん、膵臓がん組織等を解凍し、Super-SCID マウスに再移植を行い、再生能、凍結による組織形態と

機能の変化を調査したところ、凍結、継代維持による病理組織学的変化は殆どなく、機能的変化も

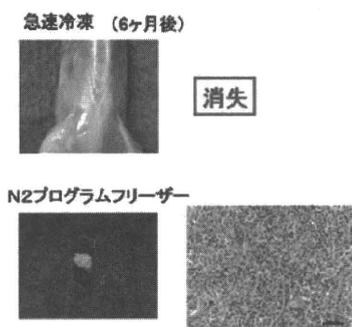


図1. 急速冷凍プログラム冷凍によるがん組織の再移植性の差。

マイクロアレイで遺伝子発現の変化の有無を調査しても、その間には凍結保存がなされているが、継代維持、凍結保存、再生による機能的変化も少なく(4倍以上の遺伝子発現変化を示す遺伝子数が0.17~0.35%)、よく永久保存されているものと考えられる。しかし、このプログラムは、凍結操作に5-7時間を要し、時間と人手が大変なので、短時間の凍結保存を難移植性のがん組織で試みたところ、図-1に示すようにプログラムフリーザーで凍結保存したものは生着、増殖し、きれいな組織像を示したのに対し、瞬間凍結保存した組織は移植後消失した。注意深い凍結が必要である。しかし、これまでの凍結保存の経験で繊維肉腫は急速冷凍しても再移植可能である。

2. 非増殖性ヒト難病組織の移植

非増殖性ヒト疾患組織および正常組織に関しては、Super-SCIDで継代維持は可能であるが、数代で縮小消失する。30例近くの皮膚疾患患者(色素性乾皮症、乾癬等)の皮膚組織、正常皮膚、肺、甲状腺等多くの組織移植実験を行ったが、同じ傾向であった。通常凍結保存では、Super-SCIDにも組織レベルで再生は難しかった。いまのところ、本研究班では、難治性疾患(がんを除く)組織が入手できないので1つのモデルとして、成年男子が60才をすぎると多くが発症し治療薬も存在しなく、QOLも低下させる疾患として前立腺肥大症組織の継代移植をおこなってきた。22年2月に移植した2症例での経過を報告する。図-2に示した如く、切除前立腺肥大組織は、電気メスで細片に削られて切除されるので、こげている部分が多く、こげを除去した後、雄C3H/HeJ-*scid*; LPSおよびC57BL/6J-*scid*マウスに移植した。一部テストステロンデポー(1.5mg)を皮下に注入した。移植7ヶ月例では、移植片はきれいに残存している。図-3に示す如く、原発巣組織では、間質の増生を伴うきれいな一層円柱上皮よりなる腺腔を形成

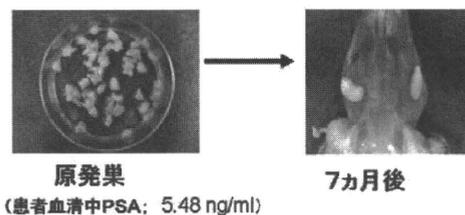


図2. 前立腺肥大摘出組織と移植7ヵ月後。



図3. 前立腺肥大症組織像。原発巣、移植7ヵ月後、14.5ヵ月後。

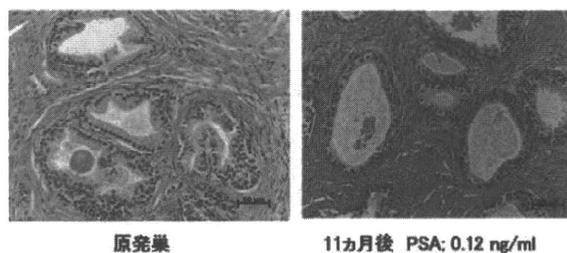


図4. 前立腺肥大症組織像。原発巣と移植11ヵ月後。

している。C57BL/6J-*scid*マウスへの移植例では、7ヵ月後では一部扁平上皮像がみられ、14ヵ月後安楽死例でも同様に扁平上皮化がみられた。しかし、一部組織(11ヶ月安楽死)では、きれいな一層円柱上皮の腺腔を形成しているものがみられた。マウス血中にPSA(0.12 ng/ml)も検出されている(図4)。平成22年12月に行ったC3H/HeJ-*scid*; LPS雄マウスへの移植例ではテストステロン投与と関係なく、きれいな一層円柱上皮でおおわれた腺構造がみられた、組織像は原発巣組織と大差なく維持されており、ほぼヒト前立腺肥大組織の長期維持に成功したものである(図5)。PSAも当該患者血中濃度(5.45 ng/ml)とほぼ同じ値(5.25 ng/ml)を移植2ヵ月後には示

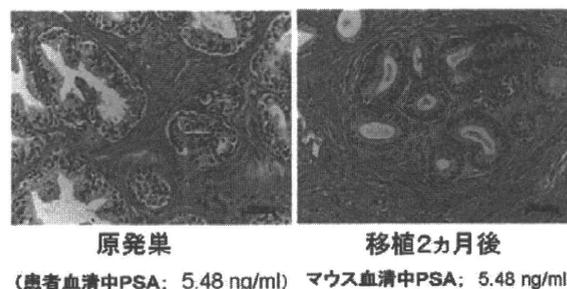


図5. 前立腺肥大症組織像と血中PSA値。原発巣と移植2ヵ月後。

している。さらに長期維持、移植を継続中である。また、摘出前立腺肥大組織をプログラムフリーザーで凍結保存してあるので、解凍、移植し、組織学的、機能的観点から経過を見る予定である。

3. 難病自然発症モデル動物研究

難病・疾患資源研究部疾患モデル小動物研究室では、いくつかの難病モデルマウスについて研究を行っている（研究協力者；松田潤一郎：難治性ネフローゼマウス、ライソゾーム病マウス、拡張性心筋症マウス、難治性てんかんマウス）。また研究協力者、竹森 洋は、最近、脊髄小脳変性マウスの自然発症モデルマウスを樹立し、病態解析を行った。本症は、男女差なく発症し、約 10 万人 3 人の希な難病である。脚の痙攣（こむら返り）に始まり序々に歩行困難になるが、対症療法しかない。約 40 の責任遺伝子が報告されており、優性、劣性遺伝する。KO マウスが作成されているがヒト病態を正確には反映していない。図-6 に示す如く、本モデルマウスはヒトとよく似た症状を示している。形態学的にも、小脳神経層の萎縮があり、マイクロアレイを用い遺伝子発現の変化を認めている。

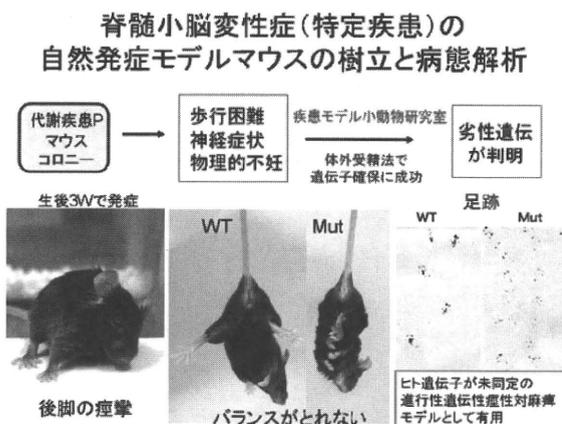


図 6. 脊髄小脳変性マウスの自然発症モデルマウス。

難治性疾患に指定されていないが、日本でも 1000 万人もの患者がおり治療薬もなく対症療法しかなく、QOL を著しく低下させる疾患として変形性骨関節症 (OA) がある。OA 自然発症モデルマウスは野村が 1979 年に発見している。男女比 (3:7)、レントゲン像は本症患者に極似しており、1 年でほぼ 100% 発症する。OA 発症は、単一劣性遺伝子に支配されており、第 2 染色体上にあることも証明しており、22 年度までに、ほぼ遺伝子座を *pa-bp* 間に同定している。マイクロアレイ解析よりその部位にリンクする重要な遺伝子を見つけしており、詳細な解析を行っている。

D. 考案

増殖性ヒト組織（がん等）については、卵の

う膜腫瘍、頭頸部がん、膵臓がんを例にとり、継代維持、凍結保存、再移植で、形態、機能が非常によく保存されていることを示してきた。難病組織等非増殖性の組織は本質的に継代維持、再生可能な凍結保存は困難と考えられたが、Super-SCID マウスでは正常組織もこれまで 1—3 年にわたり継代維持してきたので、モデルとして前立腺肥大症組織の移植をおこなったところ、1 年以上にわたり、移植組織は維持され、組織学的にもなんとか原発巣に近いものが維持され、PSA も分泌されていることから機能も維持されているものと考えられる。今後テストステロン投与により更なる改良がみられるか検討する必要がある。再生可能な形での凍結保存は来年度の課題である。

難病疾患自然発症モデルマウスに関しては、脊髄小脳変性症自然発症モデルマウスの樹立と病態解析が画期的であり、更なる成果が期待される。変形性膝関節症についても、専任遺伝子（劣性単一）の同定がまたれる。

E. 結論

難病組織等非増殖性の組織は本質的に継代維持、再生可能な凍結保存は困難と考えられたが、Super-SCID マウスでは正常組織でも 1—3 年にわたり継代維持できているので、非増殖性疾患のモデルとして前立腺肥大症組織の移植をおこなったところ、1 年以上にわたり移植組織は維持され、組織学的にもなんとか原発巣に近いものが維持され、PSA も分泌されていることから機能もよく維持されているものと考えられる。また、多くの培養がん細胞（上皮性悪性腫瘍）の Super-SCID マウスへの継代移植では、本来のヒトがん組織の構造を保てない。

難病疾患自然発症モデルマウスに関しては、脊髄小脳変性症自然発症モデルマウスの樹立と病態解析が画期的であり、小脳組織層の萎縮、遺伝子発現の変化が検出された。更なる成果が期待される。変形性膝関節症についても、劣性単一遺伝子を第 2 染色体上にマップした。

F. 健康危険情報

該当するものはない。

G. 研究発表

- 論文発表
英文 (3)

Nomura T. Transgenerational health concerns from radiation in mice and humans. In: Bersimbay RI, Au W, eds. Genome-environment interactions and genetic toxicology. 15th Alexander Hollaender Course, Astana: Eurasian National University Press; 2010; 19-23.

Asian Conference on Environmental Mutagens.
Dec. 15-18, 2010.

Iwamori M, Iwamori Y, Adachi S, Nomura T.
Excretion into feces of asialo GM1 in the murine
digestive tract and Lactobacillus johnsonii
exhibiting binding ability toward asialo GM1. A
possible role of epithelial glycolipids in the
discharge of intestinal bacteria. Glycoconj. J.
E-published Dec. 21, 2010.

Taisei Nomura. Biological Consequence and
Health Concern from Low Dose and Low Dose
Rate Radiations in Mice and Humans. Health
Physics., 100: 266-268, 2011.

A. Yogo, T. Maeda, T. Hori, H. Sakaki, K. Ogura,
M. Nishiuchi, A. Sagisaka, H. Kiriyama, H.
Okada, S. Kanazawa, T. Shimomura, Y. Nakai, M.
Tanoue F. Sasao, P. R. Bolton, M. Murakami, T.
Nomura, S. Kawanishi, and K. Kondo,
Measurement of relative biological effectiveness of
protons in human cancer cells using a laser-driven
quasimonoeenergetic proton beamline, APPLIED
PHYSICS LETTERS 98, 053701, 2011

和 文 (1)

野村大成、梁 治子、足立成基、時田偉子、堀
家なな緒、畑中英子、菊谷理絵、中島裕夫、本
行忠志、藤川和男、伊藤哲夫、落合俊昌、行徳
淳一郎、若命浩二。宇宙環境の人体影響評価と
防護に関する研究。Space Util. Res., 2011 (in
press).

2. 学会発表

英 文 (3) (国際会議の招待講演)

Taisei Nomura. Biological Consequences and
Health Concern from Low Dose and Low Dose
Rate Radiations in Mice and Human Tissues.
International workshop “Biological consequences
and health risks of low-level exposure to ionizing
radiation” Richland, USA, May 3-5, 2010.

Taisei Nomura. Biological Consequences and
Health Risk from Low and Low Dose Rate
Radiation Exposures in Mice and Humans.
LOWRAD 2010, Dec. 13-15, 2010.

Taisei Nomura. Carcinogenicity Of Urethane
(Ethyl Carbamate) In Mice And Humans. 2nd

- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得 なし
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

疾患関連細胞の品質評価ならびにキャラクタライズ研究

分担研究者 小原 有弘（独）医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部 研究員

研究要旨：（独）医薬基盤研究所・培養資源研究室は国内初の公的細胞バンクとして事業を開始し、厚生労働省の細胞バンクとして創薬研究・疾患研究に供するヒト細胞資源の収集、品質管理、保管、供給を行ってきた。中でも細胞の品質管理に重点を置き、細胞のマイコプラズマ・ウイルス汚染、細胞のクロスコンタミネーションの問題に取り組んで来た。本研究班においてはこれらの品質管理技術の応用・発展により、資源を利用するために必要な情報を付加するための技術開発を行い、疾患関連細胞の品質評価を実施する。

本年度、遺伝性疾患患者由来細胞を対象として G-band 法を中心とした、染色体の詳細解析を実施した。細胞におけるゲノム情報は病因・病態を解明するために非常に重要な情報であり、これらの詳細解析による情報は研究者にとって有用な情報となる。今後更なる詳細解析を実施し、難治性疾患患者由来の資源に適用することで、研究者にとって有用な情報の付加に勤めるよう技術開発を行う予定である。また、難治性疾患患者からの細胞株樹立についても共同研究実施し、それらの詳細解析による病因・病態解析ならびに創薬研究への応用を期待して研究を進める。

A. 研究目的

細胞資源は多岐にわたる基礎・応用・開発研究において必須の研究資源として利用されており、難治性疾患の克服に関してもこれら有用な研究資源の供給が必要である。（独）医薬基盤研究所・培養資源研究室（JCRB 細胞バンク）は国内初の公的細胞バンクとして研究者への研究資源の供給に勤めてきた（年間分譲 3500 アンプル、保有資源数 3000 株）。中でも細胞の品質管理に重点を置き、細胞のマイコプラズマ・ウイルス汚染、細胞のクロスコンタミネーションの問題に取り組んで来た。これまでの実績を踏まえ、難治性疾患克服のための細胞資源を整備するとともに、これらの品質管理技術の応用・発展により、資源を利用するために必要な情報を付加するための技術

開発を行い、疾患関連細胞の品質評価を実施する。

B. 研究方法

1) 細胞資源化

（独）医薬基盤研究所・培養資源研究室においては、遺伝性疾患患者由来細胞約 2700 種を情報登録しており、そのうち難治性疾患に該当する色素性乾皮症および再生不良性貧血であるファンコニ貧血症はそれぞれ 411 種と 128 種登録されている。これらの細胞を増殖させ、様々な品質管理検査を実施した。

2) 染色体解析

細胞は直径 100mm のプラスチックディッシュで培養し、継代後約 2 日目にコルセミドを加

え、37°Cで2時間インキュベートした後、トリプシンで剥離し、ディッシュから回収した。次に0.075M・KC1低張処理後、カルノア液で固定した。染色体数の測定には metaphase spread chromosome を DAPI 染色し、AxioPlan II imaging microscope (Carl Zeiss, GmbH) で観察し、プログラムソフト LeicaQFISH を用いて画像の取得と解析をした。pFISH 解析には 13 番染色体、17 番染色体に特異的なプローブ (XCP13-kit-FITC、XCP17-kit-Texas Red) (MetaSystems, GmbH) を、mFISH の解析にはマルチカラープローブ (24Xyte-MetaSystems' 24color kit) を用いた。方法は MetaSystems 社のプロトコールに従った。FISH 像は Zeiss Axio imaging microscope (Carl Zeiss Microimaging, GmbH) で観察し、プログラムソフト mBAND/mFISH (MetaSystems, GmbH) で解析した。

3) CGH アレイ解析 (アジレント社)

サンプルDNAは約 5×10^6 の細胞から AllPrep DNA/RNA Mini kit (QIAGEN Co., Japan) を用いて抽出・精製した。2種類のDNA試料は、それぞれ Alexa FluorR3 または Alexa FluorR5 (BioPrime® Total Genomic Labeling System, Invitrogen Co., Japan) で標識した。標識したDNAと Cot-1 DNA をハイブリダイゼーション溶液 (10 x Blocking Agent, 2 x Hybridization Buffer) に溶かした。95 °C 3分処理でDNAを変性したのち、37 °C 30分インキュベーションした。CGH マイクロアレイスライド (Human Genome CGH 244A Oligo Microarray kit, Agilent Co., Japan) にアプライし、65 °C 40時間ハイブリダイゼーションした。Agilent Oligo aCGH 洗浄バッファ 1 で室温、5分間、Agilent Oligo aCGH 洗

浄バッファ 2 で 37 °C、1分間洗浄したのち各スポットの蛍光量を DNA Microarray Scanner (Agilent Co., Japan) で測定し、Agilent Feature Extraction (Agilent Co., Japan) を用いてデータを解析した。

4) SNP アレイ解析 (アフィメトリックス社)
サンプルDNAは約 5×10^6 の細胞から AllPrep DNA/RNA Mini kit (QIAGEN Co., Japan) を用いて抽出・精製した。解析には Genome-Wide Human SNP Array 6.0 を用いた。抽出した Genomic DNA を制限酵素 (NspI, StyI) で切断し、4塩基の特異的突出末端に対応するアダプターをライゲーションした。アダプター配列に対応する1種類のプライマーを用いて、アダプター付加DNAフラグメントをPCR増幅した。200~1100bpサイズのフラグメントを優先的に増幅するようにPCRを行い、増幅産物を断片化し、Terminal Deoxynucleotidyl Transferase にて末端 Biotin 標識した。標識したDNAは GeneChip Mapping 500K Set アレイにハイブリダイゼーション後 (Hybridization Oven 使用)、専用装置 Fluidics Station (GeneChip Fluidics Station 450) を用いて洗浄および streptavidin-phycoerythrin の染色を行い、レーザースキャナー (GeneChip Scanner 3000) でデータ収集を行った。

C. 研究結果

1) 細胞資源化

情報登録されている色素性乾皮症およびファンコニ貧血症について、細胞増殖ならびに品質管理検査を実施し、色素性乾皮症 14 株、

ファンコニ貧血症を6株資源化し(表1)、研究者に分譲できる体制を整備した。

2) 難治性疾患患者由来細胞資源の G-band 法による染色体解析

色素性乾皮症、ファンコニ貧血症ともに常染色体劣性遺伝性の疾患であり、原因となる遺伝子変異によってそれぞれの疾患でタイプ分けされている。

色素性乾皮症は DNA 修復機能の低下をもたらす遺伝子異常が原因となっており、損傷された DNA を正確に修復できないために発がん頻度が非常に高い。これに伴い、患者由来の培養細胞においても遺伝子変異を起こす頻度が高いと考えられ、資源化した細胞においても染色体異常が認められた。

ファンコニ貧血症は原因遺伝子として少なくとも13の遺伝子が報告されており、マイトマイシンGなどのDNA架橋剤に対して感受性を示す。今回資源化したhTERT遺伝子を導入することによって不死化した細胞の染色体解析を行ったが、G-bandでは見逃しかねない異常を認めた(図1、2)。

3) 難治性疾患患者由来細胞資源の mFISH 法による染色体解析

次に、G-band法によって異常が認められた細胞についてmFISH法による染色体解析を行った。

JCRB3006:FA9JTO hTERT-1についてはG-band解析で認められた4番染色体への付加が詳細に解析でき、20番染色体とX染色体由来の染色体断片が付加していると推測された。このようにG-band解析だけでは詳細な情報を得ることが出来ず、また見逃す可能性が高い染色体異常も、mFISH解析を行うことで詳

細な解析が可能であることがわかった。

また、JCRB3007:FA18JTO hTERTについてもmFISHで解析を行ったところ、X染色体に見られた付加は7番染色体、16番染色体に由来することが判明した。さらにG-band法で正常核型とされたものにおいても14番染色体に13番染色体由来の付加が起こっていることがわかり、mFISH解析による詳細解析が、染色体異常を起こしやすい細胞の解析に非常に有効であることがわかった。

4) 難治性疾患患者由来細胞資源のアレイ CGH によるゲノム詳細解析

JCRB3006:FA9JTO hTERT-1につてアレイCGHによるゲノム詳細解析を行った。今回コントロールとしたデータはHapMapプロジェクトにおける270人分のゲノムデータをコントロールとして比較したところ、mFISHで認められた4番染色体の異常は4番染色体長腕末端部の増幅、X染色体の一部の転座(X染色体増加が認められない)、20番染色体短腕部の増幅転座を伴う異常であることが推測された(図3)。

D. 考察

本研究では、培養細胞、特に難治性疾患患者由来細胞資源の染色体解析による細胞特性解析の可能性について研究を行った。G-band法は職人的技術を要するが比較的安価に解析が可能である。しかし、構造異常や大きな染色体の変化を捉える事は可能であるが、mFISH法やアレイCGH法と比べると染色体の異常を見逃す可能性が高いといえる。今回の研究においてもG-band解析において正常核型と判定された細胞においてmFISH法によって異常が見出された。しかし、mFISH法、アレイ

CGH 法は設備や試薬コストが非常に効果であり、すべての細胞に対して解析を実施すると非常に大きなコストがかかり、研究者への負担も増加する。これら技術を組み合わせることで、より多くの情報を細胞に付加した形で研究者に細胞供給することが我々細胞バンクにとって重要な意味を持ち、今後の研究の基盤になると考えられる。

E. 結論

細胞のゲノム詳細解析技術を用いて、難治性疾患患者由来細胞資源の特性解析を実施したが、細胞プロファイル情報として非常に有用なデータを取得することが出来、細胞評価法として重要な意味を持つことが明らかとなった。今後、本研究班で資源化した細胞が細胞ツールとして難治性疾患研究に貢献し、研究が進展・発展する可能性があり、そのために必要な情報を付加する技術を開発することが出来た。今後細胞細胞のコンタミネーションやマイコプラズマ汚染、ウイルス汚染チェックなどの品質管理技術とともに細胞を供給する立場として研究者に必要な資源、情報を提供していく必要があると考えられる。

F. 健康危険情報

適用なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Cell line cross-contamination initiative: An interactive reference database of STR profiles covering common cancer cell lines. Dirks WG, Macleod RA, Nakamura Y, Kohara A, Reid Y, Milch H, Drexler HG, Mizusawa H. *Int J*

Cancer. 126:303-4 (2010)

- (2) Cell line misidentification: the beginning of the end. American Type Culture Collection Standards Development Organization Workgroup ASN-0002. *Nat Rev Cancer*. 10(6):441-8(2010)
- (3) Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. Capes-Davis A, Theodosopoulos G, Atkin I, Drexler HG, Kohara A, MacLeod RA, Masters JR, Nakamura Y, Reid YA, Reddel RR, Freshney RI. *Int J Cancer*. 127(1):1-8(2010).
- (4) Recommendation of short tandem repeat profiling for authenticating human cell lines, stem cells, and tissues. Barallon R, Bauer SR, Butler J, Capes-Davis A, Dirks WG, Elmore E, Furtado M, Kline MC, Kohara A, Los GV, Macleod RA, Masters JR, Nardone M, Nardone RM, Nims RW, Price PJ, Reid YA, Shewale J, Sykes G, Steuer AF, Storts DR, Thomson J, Taraporewala Z, Alston-Roberts C, Kerrigan L. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 46(9):727-32(2010).
- (5) Growth factor-defined culture medium for human mesenchymal stem cells. Mimura S, Kimura N, Hirata M, Tateyama D, Hayashida M, Umezawa A, Kohara A, Nikawa H, Okamoto T, Furue MK. *Int J Dev Biol*.(in press)

2. 学会発表

国内会議

①マイコプラズマ汚染の現状と論文投稿
 における国際動向、小原有弘，古江
 楠田美保、第 83 回日本組織培養学会
 5 月(岡山)

表 1 資源化した難治性疾患患者由来細胞資源

	細胞番号	細胞名	疾患名	タイプ
1	JCRB0301	XP2OS(SV)	色素性乾皮症	A
2	JCRB0302	XP2YO(SV)	色素性乾皮症	F
3	JCRB0303	XP3OS	色素性乾皮症	A
4	JCRB0304	XP35OS	色素性乾皮症	A
5	JCRB0305	XP2SA	色素性乾皮症	V
6	JCRB0306	XPL3KA	色素性乾皮症	C
7	JCRB0307	XP15OS	色素性乾皮症	A
8	JCRB0325	XPEMB-1	色素性乾皮症	A
9	JCRB0326	XP39OS	色素性乾皮症	A
10	JCRB0327	XP40OS	色素性乾皮症	C
11	JCRB3012	XP24KO	色素性乾皮症	E
1	JCRB0315	FA18JTO	ファンconi貧血症	
2	JCRB3006	FA9JTO hTERT-1	ファンconi貧血症	G
3	JCRB3007	FA18JTO hTERT	ファンconi貧血症	A
4	JCRB3010	FA20P	ファンconi貧血症	A