

『研究方法論基礎』 A-4-1

題 目 臨床試験 I

担当教員 四方賢一

講義目標

医療における薬物治療の進歩はめざましく、それは各種疾患の特殊性に対応した多くの医薬品が開発されてきたことも大きな要因になっている。しかし未だ解決されていない薬物治療も多い。ここでは臨床試験および治験についての考え方・実施方法・体制等について解説する。

講義内容

- 1 非臨床試験から臨床試験
薬理作用の種差；薬物動態の種差；初回のヒトにおける臨床試験等
- 2 臨床薬効評価と治験
臨床試験の目的・意義・段階（相）；臨床試験の信頼性と Good Clinical Practice (GCP)；有効性と安全性；第1－4相臨床試験；プラセボ反応；比較試験；無作為割付；二重遮蔽法（二重盲検法）等

予習事項

臨床試験とは何か、治験とは何か、また GCP, ICH, IRB, IC, CRC, 比較試験, 二重遮蔽法(DBT)等の基本的用語ならびに概念を予習する。

参考文献

- ・ IRB ハンドブック. ロバート・J・アムダー著 中山書店 2003年
- ・ 新 GCP ハンディ資料集. 日本製薬工業会編集 エルゼビアジャパン 2003年

『研究方法論基礎』 A-4-2

題 目 臨床試験 II

担当教員 木浦勝行

講義目標

癌化学療法・分子標療法における臨床試験を例にとり、臨床試験のコンセプト、必要性を認識し、臨床試験の方法を把握する。

講義内容

- ・ 臨床試験の方法論
- ・ 新 GCP
- ・ ICH

予習事項

臨床試験とは何か、新薬の治験を含めその概要を参考文献より予習しておく。

参考文献

- ・ 新臨床腫瘍学（日本臨床腫瘍学会 編）南江堂
- ・ Cancer Medicine BC Decker AACR

『研究方法論基礎』 A-4-3 , A-4-4 , A-4-5

担当教員 松尾俊彦

- A-4-3 講義題目 「特許戦略実例編 I」
講義内容 「ドライアイに対するトレハロース点眼液の開発
－ 基礎研究から臨床試験（自主臨床研究）へ 」
- A-4-4 講義題目 「特許戦略実例編 II」
講義内容 「企業との連携 － 共同研究契約、秘密保持契約、
ライセンス契約（新規遺伝子を例として）」
- A-4-5 講義題目 「特許戦略実例編 III」
講義内容 「異分野との連携 －（人工網膜の開発を例として）」

トレハロースは自然界に存在する二糖類で、乾燥に対して耐性を示す生物、たとえば、酵母や種子など、に多く含まれている。乾燥下で、水分子の代わりに蛋白や細胞膜脂質に結合して、その立体構造を保持していると考えられている。

私は、ドライアイ（シェーグレン症候群などの眼球乾燥症候群）にトレハロース点眼液が効果を示すのではないかと考え、基礎研究、次に、患者さんに協力してもらい臨床試験を行った。

講義の1回目では、トレハロース点眼液の開発を実例にとり、医薬品という製品を開発していく上で必要な過程を見てゆきたい。講義の2回目では、この実例に限らず、基礎研究、臨床研究を進める上で、材料の提供、特許出願、企業との連携、各種契約の過程を見てゆきたい。講義の3回目では、異分野との交流、連携で研究が進む様子を、「人工網膜の開発」を例として見てゆきたい。

「特許戦略実例編 I」

- ・ 基礎研究 培養角膜上皮細胞を使ってトレハロースの効果をみる。
トレハロースの用量設定（効果濃度）を決める。
- ・ 臨床試験 自主臨床研究として、病院の治験審査委員会の審査を受ける。
治験センターによる臨床研究のモニターを受ける。
- ・ 企業との連携 トレハロース、およびその情報の提供、研究成果の通知

「特許戦略実例編 II」

- ・ 新規遺伝子オキキュロメジン为例として。
- ・ 共同研究契約：材料の提供、研究成果の事前通知、
特許出願の条件（出願者、発明者）
- ・ 秘密保持契約：情報の開示、第三者への情報提供の禁止
- ・ ライセンス契約：特許の譲渡、特許の実施許諾料の分配

「特許戦略実例編 III」

- ・ 光電変換色素を使った人工網膜の開発を例として。
- ・ 人工網膜開発の現状と問題点
- ・ 工学部との連携

No. A-4-3 Patent Strategy I

“Development of trehalose eye drops for dry eye:
From laboratory experiments to clinical trial”

No. A-4-4 Patent Strategy II

“Deal with corporation: agreements”

No. A-4-5 Patent Strategy III

“Multidisciplinary approach, collaboration with other fields of research”

Trehalose is a naturally found disaccharide and present in organisms such as seeds and yeasts. It plays a key role in anhydrobiosis, capability of surviving in drying condition. I hypothesized that trehalose eye drop be a better treatment for dry eye such as Sjogren syndrome and conducted laboratory and clinical studies to prove this hypothesis.

In the first part of my lecture, I will show the process how a drug can be developed using trehalose eye drops as an example. In the second part, I will show how to deal with a company to develop a drug. In the third part, I will show multidisciplinary approach and collaboration with other fields of research.

Patent Strategy I

Laboratory studies

To show the effectiveness of trehalose and to determine the appropriate concentration (dose)

Clinical study

To show the safety and the efficacy in patients with dry eye syndrome
Must be approved and monitored by the Institutional Review Board
Negotiation with a company
Supply of trehalose and its related information

Patent Strategy II

Agreements between researcher and company

Research Agreement
Bilateral Confidentiality Agreement
License Agreement
Patent rights transfer
Royalty payments

An example of a novel gene “oculomedin” will be shown.

Patent Strategy III

Collaboration with Faculty of Engineering

An example “The development of photoelectric dye-based retinal prostheses” will be shown.

『研究方法論基礎』 A-5-1

題 目 免疫組織化学：基礎と応用(ELISA と Western blot を含む)

Immunohistology, Elisa and Western blot

担当教員 吉野 正

講義目標

免疫組織化学を用いた研究・診断手段の多くは免疫染色にある。

その簡便性と特異性から基礎臨床とも非常に広く用いられているが、同様原理は Western blotting や ELISA にもある。

発癌機構が精力的に解明され、分子標的薬の開発とその効果は驚くべきものとなっている。その選択においても免疫組織化学法は非常に有力な手段となっており、研究を進める者として正確に行い判断することは必須である。自動染色装置が広く用いられているがその原理を理解なしには危うい部分もある。本講義ではごく基礎的原理からリンパ腫をはじめとして各種臓器における応用まで述べる。

講義内容

1. 検索対象検体をいかに処理するか、固定から標本作成過程を示す。
2. 免疫染色、フローサイトメトリーまで直接法や間接法の原理を示す。
3. 抗原賦活化の方法論を示す。
4. 実際の免染結果の評価方法を示す。対照群をいかに取るかを示す。
5. リンパ腫における応用例、DNA マイクロアレイとの関係を示す。
6. 分子標的薬を使用するにあたっての免疫組織化学の果たす役割を示す。
7. Western ブロット、ELISA 法の原理を示す。

予習事項

免疫学的な基礎的事項、とくに抗原抗体反応、抗体の特性の知識を必要とする

参考文献

病理と臨床臨時増刊号 診断に役立つ免疫組織化学 2007

『研究方法論基礎』 A-5-2

題 目 病理組織検体を用いた分子病理学的解析法

担当教員 竹内真衣・吉野 正

講義目標

病理組織検体を用いた医学研究の基礎知識として、病理検体の標本作成法、病理組織の観察方法、免疫組織化学法ならび *in situ hybridization* の手法と評価、FISH 方の基礎、パラフィン検体からの DNA 抽出と PCR について主に解説する。

講義内容

- 1) 病理組織検体の扱いと標本作成
- 2) 免疫組織化学法・*in situ hybridization*
- 3) FISH 法
- 4) DNA 抽出と PCR

予習事項

特になし

参考文献

文光堂 病理と臨床 免疫組織化学 診断と治療選択の指針

『研究方法論基礎』 A-5-3

題 目 免疫組織化学法の実際

担当教員 伊藤利洋

講義目標

免疫組織化学的方法は、組織上の抗原を同定し、あるいは腫瘍の組織由来を推定する手段として大変有用である。講義では、免疫組織学的手法の原理、方法を解説し、研究基本手技として応用できることを目標とする。

講義内容

- 免疫組織化学的方法の原理と発展の歴史
- 蛍光抗体法から酵素抗体法について、それぞれの方法の利点欠点の比較
- 使用抗体：多クローン性抗体と単クローン抗体
- 現在汎用されている方法論の実際（染色法の細部スケジュール）
- 免疫染色での対照の取り方

予習事項

免疫学的な基礎的事項、とくに抗原抗体反応、抗体の特性についての知識を必要とする。

参考文献

- ・ 組織細胞化学 日本組織細胞化学会編 学際企画, 1996
- ・ 新染色法のすべて 水口国雄ら編 医歯薬出版, 1999
- ・ 免疫学イラストレイテッド（原書第7版）高津聖志 監訳 南江堂, 2009
- ・ 免疫生物学（原書第7版）笹月健彦 監訳 南江堂, 2010

『研究方法論基礎』 A-5-4

題 目 電子顕微鏡観察

担当教員 大塚愛二

講義目標

透過型電子顕微鏡と走査型電子顕微鏡の基本原理とその能力を概説し、その医学生物学分野での応用と問題点を総論的に論ずる。

講義内容

- ・ 透過型電子顕微鏡の基本原理
- ・ 生物試料の透過電顕標本の種類、作成法と問題点
- ・ 走査型電子顕微鏡の基本原理
- ・ 生物試料の走査電顕標本の種類、作成法と問題点

予習事項

細胞学・組織学の教科書などに載っている電子顕微鏡写真を見ておく。

参考文献

- ・ The cell. D. W. Fawcett, Saunders, 1981
- ・ 医学・生物学 電子顕微鏡観察法. 日本電子顕微鏡学会関東支部編 (丸善) 1982
- ・ 現場で役立つ電子顕微鏡試料作成法. 関西電子顕微鏡応用技術研究会編 (金芳堂) 1999
- ・ Procedures in Electron Microscopy. A. W. Robards and A. J. Wilson (eds.), John Wiley & Sons, 1993.
- ・ 走査電子顕微鏡. 日本電子顕微鏡学会関東支部編 (共立出版) 2000

インターネット

社団法人 日本顕微鏡学会のホームページ
<<http://www.soc.nii.ac.jp/jsm/>>

この講義の要旨と参考サイト

<<http://www.okayama-u.ac.jp/user/anatomy/phd/bmem.html>>

題 目 In situ hybridization

担当教員 Hideyo Ohuchi

Goal: To understand the principles and protocols of *in situ* hybridization.

In situ hybridization (ISH) is a method used for the detection of specific nucleic acid sequences in morphologically preserved chromosomes, cell or tissue sections. This method can detect specific RNA or DNA with high sensitivity and spatial resolution even when the sequence of interest is present in only a very small subset of cells. In combination with immunocytochemistry, it can relate microscopic topological information to gene activity at the DNA, mRNA and protein level.

There are many combinations of probes utilized for ISH with regard to types of probe (cDNA, cRNA, oligonucleotides) and labeling methods including use of radioactive and non-radioactive (biotin, digoxigenin, fluorescein analogues) nucleotides.

In situ hybridization protocols

Tissue preparation

Pretreatments of materials on slide (protease treatment)

Prehybridization

Hybridization

Posthybridization washes

Immunocytochemistry (alkaline phosphatase)

Preparations

Basic histology and basic molecular biology

『研究方法論基礎』 A-6-1

題 目 細胞生物学実験法

担当教員 山田浩司

講義目標

アミノ酸、ペプチド、タンパク質は生体内で神経伝達物質、ニューロモジュレーター、生体ホルモン、運搬、触媒（酵素）、構造タンパク質として働き生体機能とその恒常性に深く関与している。現在も種々の生体分子が発見され、その機能が明確にされてきている。

その成果は、物質代謝、情報伝達等の生命現象を分子レベルで解明し、治療にも応用されている。これらの生体分子の構造と機能を明らかにするためには、生体分子を分離したり、検出したりする必要がある。本講義は生体分子の中でホルモンや、タンパク質の細胞における機能解析を中心に応用研究例をまじえて、講義する。

講義内容

1. Introduction to analytical methods for cellbiology
2. Chromatography
3. Electrophoresis
4. Functional analysis of proteins in cells

予習事項

アミノ酸、ペプチド、タンパク質の性質を予め復習しておく。

参考文献

- ・ タンパク質実験ノート(上下, 羊土社)
- ・ タンパク質実験の進めかた(羊土社)

『研究方法論基礎』 A-6-2

題 目 DNA・RNA

担当教員 大内田 守

講義目標

DNA・RNA の化学構造及び遺伝子としての機能・意義等を復習講義した後，遺伝子解析や遺伝子治療に不可欠である DNA・RNA の抽出法・定量法を解説する。さらに，現在の遺伝子工学で用いられている様々な技法を用いる為には様々な DNA・RNA の抽出法・定量法を用いる必要があることを紹介し，基本的テクニック及び考え方の重要性を理解させる。

講義内容

- DNA・RNA の化学構造と性質
- 遺伝子としての DNA・RNA の生理的意義について
- DNA の抽出法
- RNA の抽出法
- DNA・RNA の定量法
- 遺伝子工学で用いられる基本的 DNA・RNA の分離法
- 遺伝子工学で用いられるその他の基本的操作及びその応用

予習事項

化学物質としての DNA・RNA 及び遺伝子としての DNA・RNA の性質，意義を予習しておくこと。また，学部の講義で習った，遺伝子に関わる各酵素の働きについて予習しておくこと。

参考文献

- ・ 遺伝子の分子生物学. (J.D.Watson et al) 松原謙一，他，監訳，第4版，トッパン社，1997
- ・ バイオ実験イラストレテッド. 中山広樹，他，秀潤社，1995
- ・ 遺伝子工学実験ノート. 田村隆明，羊土社，1997

『研究方法論基礎』 A-6-3

題 目 脂質代謝

担当教員 松浦栄次

講義目標

脂質代謝(内因系、外因系、逆転送系)についての概要を講義し、併せて、それらの異常により発症する病態について説明する。

講義内容

- ・ 脂質の基本構造
- ・ 脂質の代謝経路
- ・ 脂質代謝の異常

予習事項

学部生化学レベルの知識を復習しておくこと。

参考文献

細胞の分子生物学

『研究方法論基礎』 A-6-4

題 目 臨床研究デザイン

担当教員 樋之津史郎

講義目標

臨床研究のデザインを列挙し、それらの特徴を理解する

講義内容

臨床研究の必要性を理解し、解決すべき臨床的疑問に最適な研究デザインを選択するために必要な基礎的事項を概説する。臨床研究を分類する際に考慮する様々な因子（介入の有無、前向きか後ろ向きか、単施設か多施設かなど）を正しく理解できるように情報提供する。また、個々の臨床研究デザインの特徴、利点、限界について解説する。さらに、実施可能性も含めた研究デザインの選択方法についても概略を説明する。

予習事項

特になし

参考文献

医学的研究のデザイン（第3版）木原雅子著、訳、木原正博訳、メディカルサイエンスインターナショナル

『研究方法論基礎』 A-7-1

題 目 分子クローニングのコツ Molecular cloning tips

担当教員 近藤英生・大塚文男

講義目標

分子クローニングのための分子生物学の基礎を理解し、効率的なクローニングのためのポイント、および方法について学習する。

講義内容

- DNA polymerase の種類と特徴
- Overlap extension PCR について
- Colony direct PCR
- Gene expression の種類と方法

予習事項

特になし

参考文献

Current protocols in molecular biology
Molecular cloning

『研究方法論基礎』 A-7-2

題 目 酸化ストレス Oxidative Stress

担当教員 浅沼幹人

講義目標

ミトコンドリア電子伝達系とその異常を酸素代謝の面から考えることにより、生物と酸素と酸化ストレスとの関係の理解を目指す。また、ミトコンドリアと活性酸素・窒素種などの酸化ストレス、アポトーシスとの関係を理解する。さらに、活性酸素種を含むフリーラジカルの測定法、様々な疾患の病態に関与している酸化ストレスの評価法などを紹介する。

講義内容

- ・ ミトコンドリア電子伝達系での酸素代謝の解説
- ・ 活性酸素・窒素種による酸化ストレスと細胞障害（アポトーシスを含む）の解説
- ・ ミトコンドリア機能測定法の理論と問題点
- ・ 一酸化窒素、活性酸素種を含むフリーラジカル測定法の理論と問題点
- ・ その他の酸化ストレスの評価法とその問題点

予習事項

ミトコンドリアの電子伝達系と解糖系との関係を把握しておく。また、フリーラジカルとはなにかについても予習しておく。

参考文献

1. Essential 細胞生物学（原著第2版）中村桂子，松原謙一，監訳（南江堂）
第14章 pp453-477 2005.
2. 別冊医学のあゆみ 酸化ストレス フリーラジカル医学生物学の最前線 Ver.2,
吉川敏一編（医歯薬出版株式会社）2006.
3. 活性酸素とシグナル伝達，レドックス制御と生物の生存戦略，井上正康編
（講談社サイエンティフィク）1996.
4. 浅沼幹人，小川紀雄：酸化ストレスによる神経障害と神経保護療法.
医学のあゆみ 215 (10) 785-792, 2005

『研究方法論基礎』 A-7-3

題 目 レセプター, 情報伝達 Receptors, signal transduction

担当教員 浅沼幹人

講義目標

各細胞・各臓器は、生体の膨大な情報の中からレセプターを介して必要な情報だけを正確に選別している。したがって、レセプターを知ることは生体内の細胞間情報伝達系を知ることである。また、レセプターは β -ブロッカー、ARB、ドパミンアゴニストをはじめとする効果の優れた薬剤の作用点でもある。このような背景から、臨床的にも研究的にもレセプター学は必須のものである。

本講義ではシグナル伝達概念、レセプター研究の利点、実験方法、分析方法、レセプター後の二次情報伝達系について学ぶ。さらに、レセプター作用薬についても学ぶ。

講義内容

- 情報伝達総論
- 細胞間情報伝達の一般原則
- リガンドとレセプター
- レセプター研究の有用性
- レセプター結合実験の原理, 実験手技の実際
- レセプター結合実験の医学応用—薬剤の作用機序, 治療薬に対する生体反応
- 細胞内セカンドメッセンジャー系: 運搬/変型/増幅/配分
- イオンチャネル共役型レセプター
- Gタンパク質共役型レセプター
 - アデニル酸シクラーゼ, cyclic AMP
 - ホスホオリパーゼC, イノシトール-3-リン酸, ジアシルグリセロール
- 酵素共役型レセプター
- レセプター作用薬 (アゴニスト), レセプター遮断薬 (アンタゴニスト)

予習事項

学生時代の薬理学の教科書で、レセプターの項と β -ブロッカーやドパミンアゴニストなど代表的なレセプター作用薬の項を復習しておくこと。また、細胞内セカンドメッセンジャー系については、同じく学生時代の生化学の教科書で復習しておくことが望ましい。

参考文献

- (1) 単行本
 - ・中村佳子・松原謙一 [監訳] : Essential 細胞生物学 (原著第3版) 南山堂, 2011.
 - ・田中千賀子, 加藤隆一 [編] : NEW 薬理学 (改訂第5版) 南江堂, 2007.
- (2) 総説
 - ・小川紀雄: リガンドとの結合実験による受容体機能の解析. 日本臨床, 第55巻, 1999年増刊号, 現代臨床機能検査 (下巻), 444-449, 1997.
 - ・中西徹, 小川紀雄: レセプター結合実験の高速・高感度化. [バイオマニュアルUPシリーズ] シグナル伝達実験法 (宇井理生, 編), 羊土社, 43-53, 1996.

『研究方法論基礎』 A-7-4

題 目 細胞外マトリックス

担当教員 大橋俊孝

講義目標

細胞外マトリックスと細胞外マトリックス/細胞相互作用は現在細胞生物学の最も盛んに扱われるトピックスのひとつになっている。分子生物学や細胞生物学の研究が盛んになるにつれ、細胞外マトリックス分子とその遺伝子発現制御の情報なくして細胞の動きや行動を語るができなくなっている。

講義は、

- 1) 細胞外マトリックスとは何か？
- 2) どのようにして生合成されるか？
- 3) 細胞に対してどのような影響を与えるか？

について、概念的に理解することを目標とする。

講義内容

- 細胞外マトリックスとは？
- 細胞外マトリックスを構成する分子群とその特徴
- 細胞外マトリックスからの情報伝達とインテグリン
- 細胞外マトリックス分子の遺伝子とその特徴
- 細胞外マトリックス分子の転写、翻訳
- 細胞外マトリックス分子の分解に関わる酵素群
- 基底膜とがんの転移
- 細胞外マトリックス分子の異常によって引き起こされる疾患
- 細胞外マトリックス分子の機能
- 遺伝子改変技術による疾患モデルと治療
- マトリックス生物学の最近の話題

予習事項

コラーゲン、プロテオグリカン、ラミニン、フィブロネクチン、基底膜、コラゲナーゼ、MMP、インテグリン

参考文献

- 1) [Khoshnoodi J, Pedchenko V, Hudson BG.](#) Mammalian collagen IV. [Microsc Res Tech.](#) 2008;71(5):357-70.
- 2) [Kalluri R.](#) Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. [Nat Rev Cancer.](#) 2003;3(6):422-33.
- 3) [Kuo DS, Labelle-Dumais C, Gould DB.](#) COL4A1 and COL4A2 mutations and disease: insights into pathogenic mechanisms and potential therapeutic targets. [Hum Mol Genet.](#) 2012; 21(R1): R97-110.
- 4) [Lu P, Weaver VM, Werb Z.](#) The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. [J Cell Biol.](#) 2012;196(4):395-406.
- 5) [Hynes RO.](#) The extracellular matrix: not just pretty fibrils. [Science.](#) 2009;326(5957): 1216-9.
- 6) [Fox MA, Sanes JR, Borza DB, Eswarakumar VP, Fässler R, Hudson BG, John SW, Ninomiya Y, Pedchenko V, Pfaff SL, Rheault MN, Sado Y, Segal Y, Werle MJ, Umemori H.](#) Distinct target-derived signals organize formation, maturation, and maintenance of motor nerve terminals. [Cell.](#) 2007;129(1):179-93.

『研究方法論基礎』 A-7-6

題 目 細胞培養の基礎と応用

担当教員 阪口政清

講義目標

培養細胞を用いた研究を紹介し、培養細胞の有用性を理解させる。

講義内容

培養細胞を用いて標的とするタンパク質の機能を解析するためにはどのようなストラテジー立てて研究を進めていくのかについて以下の方法に主体をおき講義する。

- 細胞の培養
- 培養細胞を用いた Western Blot 解析/免疫染色法による解析
- 培養上清中タンパク質の濃縮およびその解析
- 培養細胞を用いた Northern Blot 解析
- 培養細胞への外来タンパク質および DNA の導入

予習事項

特になし。

参考文献

- ・ 細胞培養なるほど Q & A 許 南浩編、羊土社、2004
- ・ 培養細胞実験ハンドブック改訂版 黒木登志夫、許 南浩, 中村幸夫 編、羊土社、2009