

優れた臨床効果を示すことが期待される。

5. 細胞純度の影響について

臍帯血から高純度の CD34 陽性細胞を分離することは研究目的では可能であっても、臨床応用を考えた場合、常に高純度の CD34 陽性細胞が分離できるとは限らない。しかし、本年度の研究により、SCF、Flt3/Flk2 リガンド、TPO、FP6 を用いた造血幹細胞/造血前駆細胞の体外増幅培養では、必ずしも高純度の CD34 陽性細胞が必要でないことが示された。50%程度の CD34 陽性細胞の純度においても十分な増幅が可能であることが示唆され、CD34 陽性細胞調製時の1つの指標を得ることができた。

E. 結論

サイトカイン (SCF、Flt3/Flk2 リガンド、TPO、FP6) を用いたヒト造血幹細胞/造血前駆細胞の体外増幅は無血清培養でも可能であることが示唆された。今後、GMP 製造されたサイトカインやバック等を用いた実製造スケールでの培養条件を検討することにより臨床応用が可能になるとと思われる。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

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（基礎研究成果の臨床応用研究事業）

分担研究報告書

GMP 培養システムの開発、基盤整備

分担研究者：前川 平

（京都大学医学部付属病院輸血部教授）

研究要旨

細胞治療(Cell Therapy)とは、輸血、造血幹細胞移植、細胞移入免疫療法、遺伝子治療、再生治療など、ヒト細胞を輸注、移植することにより行う治療法の総称である。こういった細胞をもちいる治療法の開発には、細胞プロセッシング(Cell Processing)というヒト細胞の調製、培養、加工の工程が不可欠であり、その品質管理についてはGMP(Good Manufacturing Practice)を遵守して行わなければならない。

本研究においては、細胞治療・再生治療など大学や先端治療研究センターで行われるヒト細胞をもちいた探索的臨床試験研究（トランスレーショナル・リサーチ）に必要な、品質を保証された臨床用グレードの細胞を作製するために必要なインフラストラクチャーを、施設の構造設備および遵守すべきルールという、いわばハードとソフトの両面について、どのようなことが必要であるのかについて研究を行った。報告書の中で述べるように、世界、とくに米国FDA (Food and Drug Administration)における動向にも考慮しながら、細胞治療・再生治療の開発を正しく推進させるために、我が国においても近い将来策定されるであろう細胞治療・再生治療開発に必要な細胞プロセッシングに関する指針の参考になるべく研究を行い、GMP 準拠細胞プロセッシング施設が具備すべき構造設備基準を提案した。

A. 研究目的

細胞治療 (Cell Therapy) とは、輸血、造血幹細胞移植、細胞移入免疫療法、遺伝子治療、再生治療など、ヒト細胞を輸注、移植することにより行う治療法の総称である。こういった細胞をもちいる治療法の開発には、細胞プロセッシング (Cell Processing) というヒト細胞の調製、培養、加工の工程が不可欠であり、その品質管理については GMP (Good Manufacturing Practice) を遵守して行わなければならない。

臨床試験研究は、ヒトを対象とする研究であることから、ICH-GCP (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use-Good Clinical Practice) を遵守した科学的、倫理的に高い水準と信頼性が当然要求される。科学性は Evidence-Based Medicine (EBM) で求められるものであり、倫理性は GCP (医薬品の臨床試験の実施基準)、および ICH (日米欧医薬品規制ハーモナイゼーション国際会議) で担保される。信頼性はこれらを遵守することで保証される。GCP は、ニュールンベルグ綱領、ヘルシンキ宣言、リスボン宣言などを基盤として作り上げられてきたものであり、ICH は優れた医薬品のグローバルな研究開発の促進と承認審査資料の国際的ハー

モナイゼーションの必要性を指摘したものである。ICH-GCP の遵守は、あたらしい治療法や診断法を患者さんに一刻も早く還元すると言う意味において医療倫理に直結し、わが国における臨床試験を世界に通用させるための基本的ルールである。

ICH-GCP を形作るインフラストラクチャーの重要な部分を、GMP (Good Manufacturing Practice: 医薬品の製造管理および品質管理に関する基準) および GLP (Good Laboratory Practice: 動物実験での標準操作手順と信頼性保証) が形成している。これらことから、今後発展して行くと考えられる細胞治療、再生治療、遺伝子治療など、細胞自体を治療に応用しようとする探索的臨床試験研究にも、こういった GMP 準拠の細胞プロセッシングが不可欠である。

本研究においては、細胞治療・再生治療など大学や先端治療研究センターで行われるヒト細胞をもちいた探索的臨床試験研究 (トランスレーショナル・リサーチ) に必要な、品質を保証された臨床用グレードの細胞を作製するに必要なインフラストラクチャーを、施設の構造設備および遵守すべきルールという、いわばハードとソフトの両面について、どのようなことが必要であるのかについて研究を行った。

B. 研究方法

主任研究者が、平成8年より取り組んできた細胞治療、遺伝子治療、再生治療などを開発する探索的臨床試験研究（トランスレーショナル・リサーチ）のインフラストラクチャーの構築に関する多くの経験をもとに、産官学の研究者やエンジニア、さらに海外の研究者との議論をまとめるかたちで研究を遂行した。

C. 研究結果

医薬品 GMP では平成 11 年 4 月に「薬局等構造設備規則」第 8 条の 2 として生物学的製剤などの製造所の製造設備に関する規定が、また平成 13 年 4 月には第 8 条の 3 としてヒト細胞・組織医薬品の製造所の構造設備に関する規定が追加されている。しかし、最近の細胞治療、再生治療、遺伝子治療などの進展を考慮したヒト細胞治療用 GMP のハード面（施設の規格面）を指導するガイドラインがまだ制定されていないところに大きな問題があると言わざるを得ない。一方、米国 FDA も 1996 年 4 月に発表された 21 CFR 211 のサブパート C のなかで施設のハード面を規定しているが、取り立てて詳細なものではない。21 CFR 211.42 で” Any such building shall have adequate space for the orderly placement of equipment and

materials to prevent mix-up between different components, drug products, and to prevent contamination” と述べるに留まっている。しかし、この背景にはクロスコンタミネーションの危険性を防止するため、uni-directional な物品と人の流れ、エアロックシステムをもちいた陽圧の室内、差圧によるコントロール、HEPA フィルターをもちいてどのようなレベルの空気を供給すべきか、またセキュリティの方法はどのようにすべきかなどについて、多くの論文があり、また会合が頻回に行われており、細胞プロセッシング施設の規格に対するスタンダードがすでにできあがっているという事実がある。また完成した施設は FDA の査察官の監査を受けるなど、よりよいシステムに改良すべく努力が続けられている。

わが国でも細胞治療や再生治療開発のためには、細胞プロセッシングセンターの必要性がようやく認識されてきたが、なかには単なる実験室のなかにクリーンベンチを置いて、それで大丈夫だとして同じインキュベーターで何人もの患者さんの細胞を同時に培養し、投与している施設がある。現時点ではこれを規制する法律はわが国にはないが、だからこそ、安全性や有効性が十分確認されていない先端医療、とくに細胞治療や再生治療で、

ヒト細胞を培養したり、遺伝子導入したりといった操作を行う場合は、GMP準拠の規格を有するクリーンルームで、GMPの管理手順に従って行う必要があり、先端医療開発にたずさわるものすべてが遵守しなければならない基本的ルールである。安全性や治療効果もまだわからない探索的医療であるからこそ、このような厳格な規制は必要であり、最初からルーズなやり方では取り返しがつかないことになる。規制に従って行い、ここまでは大丈夫だということが明らかになってはじめて徐々に規制を緩和して行く方向に持って行くべきである。

GMP準拠細胞プロセッシングを行う施設が構造設備面において具備すべき基準 (Minimum Requirements)

- (1) 細胞培養室はクラス1万の清浄度を保つ陽圧のクリーンルームであること。
- (2) 細胞培養室での細胞培養などの操作は、クラス100の安全キャビネット内で行うこと。
- (3) 細胞培養室へ入る前に準備室を設けること。
- (4) 準備室のまえに前室を設け、準備室が外部に直接接しないこと。
- (5) 細胞培養室への入口と出口は別にして一方通行であること。
- (6) 作業員および物品の動線が適切な

ものになるように設計されたものであること。

- (7) 遺伝子導入を行う細胞培養室（遺伝子導入室）は、クラス1万の清浄度を保つ陽圧のクリーンルームで、かつ前室あるいは準備室へ空気が流れ込まないような設計であること。
- (8) 遺伝子導入室と前室あるいは準備室との間にはエアロック室を設けること。
- (9) エアシャワー室はコンタミネーションの原因にもなり、クリーン度とは無関係であることが明らかになっており、設置する必要はない。各部屋の独立性は各部屋の差圧によって行うこと。
- (10) 各遺伝子導入室の空調設備は完全に独立したものであること。
- (11) セキュリティーには十分な配慮を行うこと。
- (12) 各部屋にある機器（たとえば、冷蔵庫の温度、インキュベーターの湿度、温度、炭酸ガス濃度等）を外部でモニターできるシステムを構築することが望ましい。
- (13) 各培養室は、作業に支障のない広さを持ち、たとえば表示作業室では、ラベルの貼り間違いを防ぐために、異品目の作業台の間に仕切りをしたり、十分な間隔をとるなどにより、混合、手違いを防

ぐことができるような広さと構造を持つものであること。

品質管理計画に関する要点 (Minimum Requirements)

- (1) 必要な手順 (SOP: Standard Operating Procedure) を文書により整備すること、および古くなった手順も最低 10 年間は保存しておくこと、
- (2) ヒト細胞・組織に由来する「製品」の品質と機能を保証するために適切な分析を行い、その結果を公開すること、
- (3) すべての記録を文書化すること、
- (4) 「製品」の製造にかかわるすべての職員の訓練と教育を確実に行うこと、
- (5) 製造行程における適切なモニタリングシステムを構築すること、
- (6) 記録を正しく管理できるモニタリングシステムを構築すること、
- (7) 「製品」の品質を記録し、万一不良品があった場合はその原因を調査し、文書化して報告すること、
- (8) 以上の過程を最低年に 1 回総合的な評価・検討し、監査を行い、規則を遵守させるための措置を講ずること、
- (9) 以上の過程でコンピューターまたは自動データ処理システムが含まれる場合は、その機器のバリデーションを確実にを行うこと、

E. 結論

細胞治療、再生治療、遺伝子治療などの細胞をもちいる探索的臨床試験研究のためには、細胞プロセッシングということの重要性を述べてきた。ひとくちに cGMP といっても、大学や研究所附属病院で行う探索的臨床試験研究に要求されるいわゆる institutional GMP と企業等が業として行う full GMP は自ずから異なる。前者では指摘された点を改善して行くことが許されるが、後者では full GMP に明らかな違反があった場合は業務停止となる。

大学や研究所附属病院で前臨床試験あるいはフェーズ I の探索的臨床試験研究を行おうとする場合、これら先端医療開発を支援する部門としては既存の大学輸血部を発展させてゆくのが最適と考えられる。大学などで行う探索的臨床試験研究で有望なものが開発されれば、企業が主導する形で症例数を増やす方向に進捗してゆくであろうし、治療法として確立されれば細胞治療に特化した企業や血液センターが細胞プロセッシングを担当し、一般病院に治療用細胞を供給してゆくようになると考えている。

F. 健康危険情報

特記すべきことはない。

G. 研究発表

2. 論文発表

- (1) 前川 平 : トラブルの予防策と対応法ー過誤輸血ー。クリニシアン、49 (510) :41-47, 2002.
- (2) 前川 平 : ES 細胞と輸血。医学のあゆみ別冊「輸血の現状と課題」(稲葉頌一 編集)。医歯薬出版、東京、p. 239-243, 2002.
- (3) 前川 平 : 自己血輸血。からの科学、226:111, 2002.
- (4) 前川 平 : 輸血管理から先端医療開発へー京都大学輸血部の取り組みー。医学と薬学、48 (2) : 197-198, 2002.
- (5) 前川 平 : 細胞治療・再生治療開発のための GMP 準拠細胞プロセッシングー品質確保に必要なインフラストラクチャーー。臨床病理レビュー特集第122号「最新 造血細胞移植とその実際手技」(原 宏 編)、臨床病理刊行会、pp. 81-91, 2002.
- (6) 万木紀美子、前川 平 : 頭頸部外科手術における輸血事故の予防と対策。JOHNS 19 (3) :290-294, 2003.
- (7) 黒田純也、前川 平 : 生命のクローニングー米国の主張ー。Hematology Insight γ

Congress Report of ASH 44th Annual Meeting, 16-17, 2003.

- (8) Kimura, S., Horie, A., Hiki, Y., Yamamoto, C., Suzuki, S., Kuroda, J., Kobayashi, Y., Yoshikawa, T., Deguchi, M., Mineo, T., Kato, G., Karasuno, T., Hiraoka, A., Maekawa, T. : Nephrotic syndrome with crescent formation and massive IgA deposition and hypothyroidism following hematopoietic stem cell transplantation. Blood2003 Jan 23 [epub ahead of print]
- (9) Kuroda, J., Kimura S., Kobayashi, Y., Yoshikawa, T., Urasaki, Y., Ueda, T., Enjo, F., Tokuda, H., Ottmann, O. G., Maekawa, T. : Zoledronate, a third generation of bisphosphonate, synergistically augments the anti-Ph1 leukemia activity. Blood (in press, 2003)

3. 学会発表

(特別講演)

- (1) 輸血管理から先端医療開発へー京大輸血部の取り組みー
前川 平

- 第 10 回京滋臨床血液研究会
(京都)(特別講演)
平成 14 年 6 月 21 日 (2002)
- (2) 細胞治療、再生治療、遺伝子
治療など先端医療開発に必要な
細胞プロセッシングー治療
用細胞の品質及び安全性確保
のためにー
前川 平
日本 PDA 第 10 回記念会シンポ
ジウム (東京)(特別講演)
平成 14 年 11 月 7 日 (2002)
- (3) 輸血管理から先端医療開発へ
ー新しい輸血部のあり方を求
めて京都大学輸血部の取り組
みー
前川 平
第 4 回福井県輸血懇話会学術
集会 (福井市)(特別講演)
平成 14 年 11 月 16 日 (2002)
- (4) 輸血管理から先端医療開発へ
ー細胞治療、再生治療に必要な
GMP 準拠細胞プロセッシング
前川 平
第 188 回泌尿器科 Monthly
Meeting (京都)(特別講演)
平成 14 年 12 月 14 日 (2002)
- (5) 細胞治療、再生治療、遺伝子治
療のトランスレーショナル・リ
サーチに必要な 21 世紀のイン
フラストラクチャーー如何にし
て基礎研究の成果を臨床応用さ
せるかー
前川 平
第 19 回大阪血液学研究会(大阪
大学、銀杏会館)(特別講演)
平成 15 年 1 月 31 日 (2003)
- (6) 臨床検査技師と先端医療開発
ーGMP 準拠細胞プロセッシング
ー
前川 平
京都大学医療技術短期大学部特
別講演会 (特別講演)
平成 15 年 2 月 3 日 (2003)
- (7) 先端医療開発と臨床検査技師
の将来像
前川 平
京都府臨床衛生検査技師会
輸血検査研究班・血液検査研究
班 合同学術講演会 (特別講
演) (於 京都アスニー)
平成 15 年 3 月 1 日 (2003)
- (8) 細胞治療、再生治療の開発に
必要なインフラストラクチャー
前川 平
京大臨床心血管再生研究会 (京
都 芝欄会館)
第 1 回シンポジウム (Keynote
lecture)
文部科学省 21 世紀型革新的先
端ライフサイエンス技術開発
プロジェクト
平成 15 年 2 月 21 日 (2003)

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用研究事業）

分担研究報告書

細胞医療

（ex vivo 増幅臍帯血幹細胞をモデルケースとした細胞・
組織医薬品の製造・品質管理体制の検証）

分担研究者：河合 弘行

（キリンビール（株） 医薬カンパニー企画部部長代理）

研究協力者：小林典孝

（キリンビール医薬生産本部セルプロセッシングセンター 研究員
兼 先端医療センター再生医療研究部 特別研究員）

研究要旨

ex vivo 増幅臍帯血幹細胞の製造所として神戸市の先端医療センター4階にセルプロセッシングセンター（CPC）を建設し、製造、品質管理に必用な設備、機器を設置した。これら設備、機器のバリデーションを実施するとともに、CPC 運営のための基本的な GMP 文書類を整備した。今後は、ex vivo 増幅臍帯血幹細胞の製造、品質管理方法を確立、標準化し、GMP のもとで実施する体制を構築する。

A. 研究目的

細胞・組織医薬品を製造する場合、GMP に準拠した製造管理、品質管理が求められるとともに、「ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について(医薬発第1314号)」その他の規制、ガイドライン等に従って安全性、品質が確保されなければならない。本研究では、*ex vivo* 増幅臍帯血幹細胞の製造をモデルケースとして、製造管理、品質管理の体制を立ち上げて運用することにより、細胞・組織医薬品製造所として標準的な設備、機能、管理体制等を検証する。

B. 研究方法

GMP に準拠した製造所としてセルプロセッシングセンターを建設し、製造所運営のために必要な組織機能、設備機器の管理体制等を整備する。また、安全性、有効性が確保された *ex vivo* 増幅臍帯血の製造方法を標準化し、原材料の受入から製品の出荷に至る一連の製造管理、品質管理の手法を手順化し、バリデーションを実施する。この *ex vivo* 増幅臍帯血の製造及び品質管理を体制の整備されたセルプロセッシングセンターで実施、運営することにより、標準的な細胞・組織医薬品製造所としてあるべき姿を検証する。

(倫理面への配慮)

原料として臍帯血を用いるが、これはインフォームド Consent のもとに母親から提供され、臍帯血提供機関

及び先端医療センターにおいて倫理審査が済んでいるものを本研究に用いる。

C. 研究結果

細胞・組織医薬品製造所として標準的な設備、機能を考慮し、先端医療センター4階にセルプロセッシングセンター(CPC)を建設した。本CPCは、製造管理区域、品質管理区域及び居室からなり、製造管理区域の内、細胞処理を行う場所は、清浄度クラス10,000の細胞処理室(開放系作業は清浄度クラス100の安全キャビネット内)及び清浄度クラス100,000の細胞培養室(マルチガスインキュベーターを設置した細胞培養室)であり、非常時の対応も考慮し2系列設置した。本CPCの構成及び各部屋に設置した設備機器の概要は、下記の通りであり(表1)、製造設備機器に関しては、バリデーションを終了している。

本CPCの運営のためには、製造所の運営全般に関して、GMP組織図、製造管理基準書、衛生管理基準書、品質管理基準書、及び、苦情処理、回収処理、自己点検、教育訓練、バリデーション等に関する各種手順書等が必要である。また、*ex vivo* 増幅臍帯血という製品(品目)に関しては、製品標準書で規格等を規定するほか、製造方法、品質管理(分析)方法を手順化した各種標準作業手順書(SOP)、更に、原材料受入から製品出荷に至るまで、各工程の製造作業、試験検査作業を指示する各種指図書及びその結果を記録す

る各種記録書といったものが必要になる。

(表1)

区域	作業室	清浄度	主な設備機器
製造管理区域	原材料保管室	—	液体窒素保存設備
	製品・サンプル保管室	—	液体窒素保存設備 プログラムフリーザー
	殺菌処理室	—	オートクレーブ
	細胞処理室 A/B※	クラス 10,000	安全キャビネット (クラス 100) 遠心分離機、顕微鏡
	細胞培養室 A/B※	クラス 100,000	マルチガスインキュベーター
	準備室 A/B※	—	
	無菌試験室	—	安全キャビネット (クラス 100)
品質管理区域	QC 実験室	—	エンドトキシン測定装置 PCR 装置
	検査室	—	FACS 装置
一般区域	居室	—	空調、インキュベーター、 冷蔵庫、冷凍庫の温湿度、 ガス濃度の監視盤

※ A, B の 2 系列を設置

D. 考察

本セルプロセッシングセンターは、GMP 準拠し、関連する規制、ガイドラインへ適合していると考えられる。

E. 結論

細胞・組織医薬品製造所として標準的な設備、機能を備えたセルプロセッシングセンターを建設した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ・柳田誠、河合弘行：細胞組織医薬品の品質及び安全性確保に関する

レギュレーション、Medical Science Digest 6月臨時増刊号（中尾眞二編）、ニューサイエンス社（東京）、Vol. 28(7)、33(2002)

2. 学会発表

なし

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

厚生労働科学研究研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）

分担研究報告書

品質管理法・細胞評価系の確立

分担研究者：平家 俊男

（京都大学医学研究科発達小児科学助教授）

研究要旨

我々は、新規のサイトカインを含む様々なサイトカインの組み合わせを用いて、ヒト造血幹細胞の *ex vivo expansion* を試みている。中でも、sIL-6R/IL-6 を含むサイトカインの組み合わせでヒト未熟造血細胞の *expansion* を達成し、その多分化能を *in vitro* で確認した。しかし、正確な造血幹細胞活性は、生体を用いて測定する必要がある。ヒト造血幹細胞活性をヒトを用いて行うことは不可能であり、それに代わるマウスなどの小動物を用いて測定する系の確立が必須である。従来、NOD/SCID マウスがヒト造血幹細胞の生着を許容するヒト型モデルマウスとして使用されてきた、しかし、ヒト T 細胞の出現が確認できないなど、改善すべき点が多い。我々は、NOD/SCID マウスに残存する NK 細胞活性を遺伝的に排除するため、NOD/SCID/ γ cnnull マウスを作成し、このマウスを用いて、ヒト T 細胞をも含むヒト造血細胞の分化、機能が測定できる系を開発した。今後、sIL-6R/IL-6 を含むサイトカインの組み合わせで *expansion* したヒト造血幹細胞活性の評価を行う。さらに、臨床応用には不可欠である無血清培地にて *expansion* したヒト造血幹細胞活性測定を併せて行うとともに、可塑性についても検討を行う予定である。

A. 研究目的

造血幹細胞移植は、骨髄、末梢血、臍帯血から採取され、種々の悪性腫瘍、血液免疫疾患、遺伝性疾患の根本的治療法として確立している。しかし、その適応拡大に伴い、ドナー不足が深刻な問題となっている。我々は、新規のサイトカインを含む様々なサイトカインの組み合わせを用いて、ヒト造血幹細胞の *ex vivo* expansion を試みている。中でも、sIL-6R/IL-6 を含むサイトカインの組み合わせでヒト未熟造血細胞の expansion を達成し、その多分化能を *in vitro* で確認した。しかし、正確な造血幹細胞活性は、生体を用いて測定する必要がある。ヒト造血幹細胞活性をヒトを用いて行うことは不可能であり、それに代わるマウスなどの小動物を用いて測定する系の確立が必須である。従来、NOD/SCID マウスがヒト造血幹細胞の生着を許容するヒト型モデルマウスとして使用されてきた、しかし、NK 細胞活性を抑制するための asialo GM1 抗体の投与の必要性、ヒト T 細胞の出現が確認できない、多量のヒト造血細胞を移植する必要があること、生着後のヒト造血細胞のキメラ率が低いことなど、改善すべき点が多い。我々は、NOD/SCID マウスに残存する NK 細胞活性を遺伝的に排除するため、NOD/SCID/ γ cnull マウスを作成した。このマウスは当初より予期したNK細胞の欠損に加えて、

樹状細胞機能障害などの免疫担当細胞の機能障害を有することが明かとなった。今後、このマウスを用いて、ヒト T 細胞をも含むヒト造血細胞の分化、機能が測定できる系を開発するとともに、sIL-6R/IL-6 を含むサイトカインの組み合わせで expansion したヒト造血幹細胞活性の評価を行う。さらに、臨床応用には不可欠である無血清培地にて expansion したヒト造血幹細胞活性測定を併せて行い、増幅ヒト造血幹細胞の臨床応用システムの確立を試みる。また、このマウスを用いて、近年注目されているヒト造血細胞の可塑性についても、検討を行う。

B. 研究方法

従来、ヒト造血幹細胞の測定は、NOD/SCID マウスを用いて行われてきた。このマウスは多くの免疫不全マウスの中でも、ヒト細胞の生着を効率よく許容できるマウスとして広く用いられてきた。一方で、残存する NK 細胞活性を中和抗体で阻害する必要性があること、ヒト造血幹細胞よりヒト T 細胞の分化が恒常的には確認できないこと等により、ヒト造血幹細胞活性測定の系として改善の余地を残している。このため、NOD/SCID の残存する NK 細胞活性を遺伝的に除去する目的で、NOD/SCID マウスに common γ chain の変異を導入し、NOD/SCID/ γ cnull マウスを作成した。このマウスを使用

し、ヒト造血幹細胞の活性測定のを確立することを試みる。

1) NOD/SCID/ γ cnul1 マウスの免疫能の検索

common γ chain の障害により、NK 細胞の欠損が生じることが指摘されている。NOD/SCID/ γ cnul1 マウスにおいて、NK 細胞活性を測定するとともに、種々の免疫機能についての検索を行う。

2) NOD/SCID/ γ cnul1 マウスへのヒト造血幹細胞移植

ヒト造血幹細胞として、ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞を NOD/SCID/ γ cnul1 マウスに移植し、骨髄、末梢血、脾臓などの造血組織の再構築能を検討する。移植後、1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月といった長期にわたり、FACS を用い、ヒト血球各系統を特異的に認識する抗体存在下で、その出現を観察する。特に、NOD/SCID マウスにおいては十分には確認されていないヒト T 細胞の出現に留意し検討する。また、NOD/SCID/ γ cnul1 マウスにおいてヒト血液細胞の出現を確認するのに必要な移植ヒト造血幹細胞数の検討を行い、この測定系の感受性について評価する。

3) 出現するヒト造血細胞の機能的評価を行う

移植ヒト造血幹細胞に由来する各種ヒト血液細胞の機能的評価を行う。ヒト造血細胞移植は、造血組織の再構築

に加えて、リンパ球などの免疫組織の再構築を含む包括的な血液組織の再構築を目的とする。したがって、造血幹細胞活性には、免疫担当細胞の機能的評価が必須である。我々は、リンパ系細胞に属する B 細胞、T 細胞、NK 細胞の出現の有無を検討するとともに、その機能的評価を行う。B 細胞評価としてヒト抗体の産生、T 細胞評価として TCR のレパトア解析、サイトカイン産生能、細胞障害活性測定、NK 細胞評価としては各種 NK 細胞特異的受容体発現、細胞障害活性測定などを行い、NOD/SCID/ γ cnul1 マウスのヒト造血幹細胞活性測定のを確立をはかる。

4) 組織学的検索

機能を有する B リンパ球、T リンパ球の出現のためには、脾臓、胸腺において、秩序だった組織の構築が必要とされる。ヒト血液細胞を特異的に認識する抗体を用いて、脾臓、胸腺において、ヒト免疫細胞の秩序だった再構築が再構築されているか否かについて検討する。

5) 無血清培地で増幅したヒト造血幹細胞活性測定を行う

ヒトへの臨床応用を考慮した場合、ウシ血清を用いる培養系にはプリオン感染等の危険性を除外できないため、無血清培地を用いた培養系の開発が必須である。このためには、臨床応用に適した無血清培地において増幅さ

れたヒト造血幹細胞が、臨床レベルでの使用に合致した細胞であることを検定するため、NOD/SCID/ γ cnull マウスを用いて生体内でのヒト造血細胞の再構築を試みる。これらの結果を元に、増幅システムの改善を試みる。NOD/SCID/ γ cnull マウスがヒト免疫能をも含む再構築が達成できることが確かめられた場合、このシステムを用いて無血清培地で増幅したヒト造血幹細胞活性の測定を行う。

6) 移植ヒト造血幹細胞の分化における可塑性について検討する

近年造血組織には、造血組織に加えて、筋肉、心臓、肝臓、脳組織など、様々な組織に分化し得る幹細胞が存在することが知られるようになった。しかし、ヒト造血細胞の持つ可塑性に関する研究は、その種特異性のため、生体内での機能的評価システムの確立には困難を極める。NOD/SCID/ γ cnull マウスが効率よくヒト造血細胞の生着を許容する場合、ヒト造血細胞の可塑性について生体内での機能評価を行うことが可能となり、筋肉、心臓、肝臓、脳組織などに分化する細胞の同定、効率よい生着などの評価を網羅的に行う。

(倫理面への配慮)

臍帯血提供に協力していただいたボランティアに対するインフォームド consent は書面とする。また、実験動物使用に関しては、動物実験施設での講習を受講し、動物愛護の面よりの配慮を行なう。

C. 研究結果

B. に述べた研究方法に準拠して記述する。

1) NOD/SCID/ γ cnull マウスの免疫能の検索および

1. NOD/SCID/ γ cnull マウスへのヒト造血幹細胞移植

NOD/SCID マウスにヒト造血幹細胞の移植を行う場合、残存する NK 細胞活性を除去するために asialo GM1 抗体を投与する必要がある。一方、NOD/SCID/ γ cnull マウスにおいては NK 細胞活性は同定できず、asialo GM1 抗体の非存在下でもヒト造血幹細胞生着が確認された。さらに、NOD/SCID マウスにおける移植に比し、同数の細胞を移植した場合、キメラ率においてヒト血液細胞の効率よい生着を認めた。このことは、当初予期した NK 細胞欠損に加えて、ヒト血液細胞生着に有利なさらなる免疫機構の障害が存在することを示唆した。我々は、さらに種々の免疫細胞の機能評価を行った。その結果、NOD/SCID/ γ cnull マウスの樹状細胞において、刺激に対するサイトカイン産生障害を認めるなどの機能異常を有することを明らかにした。

また、NOD/SCID/ γ cnull マウスにおいては、NOD/SCID マウスにおいてはその出現が確認できなかったヒト T 細胞の出現を確認した。このことにより、NOD/SCID/ γ cnull マウスにおいては、

ヒト臍帯血よりすべての系列の細胞への分化を確認した。さらに、NOD/SCID マウスにおいては、少なくとも 10,000 個のヒト臍帯血 CD34 陽性細胞がヒト造血組織の再構築に必要であったが、NOD/SCID/ γ cnul1 マウスにおいては、わずか 1,000 個の細胞でも再構築が可能であることが明らかにされた。この結果は、NOD/SCID/ γ cnul1 マウスが、ヒト造血幹細胞の生着に呈したモデルマウスであることを証明した。

2. 出現するヒト造血細胞の機能的評価を行う

出現するヒト B 細胞、T 細胞、NK 細胞を中心に、その機能評価を行った。マウス血清中に、ヒト IgG, IgM, IgA などの抗体の存在を確認した。さらに、T 細胞の TCR のレパトア解析を行ったところ、ブロードな TCR 出現パターンを示した。この結果、出現するヒト T 細胞は、限られたクローンの腫瘍性増殖ではなく、多様な抗原に対して対応できる生理的な TCR を持つ細胞であることが示唆された。また、T 細胞の刺激に対する増殖性、CTL 活性を測定したところ、両者ともその存在が確認された。併せて、NK 細胞活に由来する細胞障害活性や、NK 細胞特異的受容体の発現、サイトカインの産生も確認した。これらの結果により、機能的なヒトリンパ球が、NOD/SCID/ γ cnul1 マウス体内で確認された。

また、胸腺組織に含まれるヒト細胞を検討したところ、CD4+T 細胞、CD8+T 細胞に加えて、CD4+D8+T 細胞の存在が確認された。CD4+D8+T 細胞はリンパ球発生において、初期の未熟な段階で出現することが知られている。ヒト CD4+CD8+T 細胞が胸腺で確認されたことは、マウス胸腺を使ってヒト T リンパ球が成熟していることを示唆した。

3. 組織学的検索

脾臓、胸腺において、その組織学的検索を免疫組織染色を用いて行った。NOD/SCID/ γ cnul1 マウスの脾臓は、本来リンパ球が存在しないため、PALS 構造は存在しない。しかし、ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を移植した NOD/SCID/ γ cnul1 マウスの脾臓においては、ヒト T 細胞、B 細胞による領域化がなされた PALS 構造が生成されていることが示された。また、胸腺においても、CD4+T 細胞、CD8+T 細胞、CD4+D8+T 細胞の存在が確認され、ヒト T 細胞成熟がマウス胸腺にて行われていることが示唆された。

4. 無血清培地で増幅したヒト造血幹細胞活性測定を行う

現在、臨床応用可能で、ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞増幅に有効な無血清培地の選択を行っている。今後、増幅した細胞の造血幹細胞活性測定を NOD/SCID/ γ cnul1 マウスを用いて行う予定である。

2) 移植ヒト造血幹細胞の分化におけ

る可塑性について検討する
骨格筋、心筋、肝臓、中枢神経系につ
き、移植したヒト造血細胞よりの分化
について検討する予定である。さらに、
種々の組織障害を惹起し、その可塑性
について、併せて検討する。

D. 考察

ヒト造血幹細胞活性測定は、従来、
コロニーアッセイやLTC-ICなどの *in vitro* の方法を用いて評価されてきた。
しかし、近年、これらのアッセイ方法
では、造血幹細胞活性を正確には反映
しないことが指摘されるようになった。
マウスの系においては、実験的な
手技により、造血幹細胞活性測定が行
える。しかし、ヒト造血幹細胞活性測
定は、ヒトを対象としてその評価を行
うことが不可能であるため、それに替
わる方法が模索されてきた。ヒトとマ
ウスといった異種移植においては、拒
絶、GVHD といった免疫反応がその正否
を決定する。そのため、レシピエント
側のマウスの免疫反応を抑制するこ
とにより、異種ヒト細胞の生着を許容
するのではないかとの考えの元、様々
な免疫不全マウスへの移植が試みら
れてきた。その中で NOD/SCID マウス
がヒト造血細胞の生着を許容するこ
とが明らかにされ、多くの研究に供さ
れることとなった。しかし、NOD/SCID
マウスへのヒト造血幹細胞の移植に
関しては、残存する NK 細胞活性を抑

制するために asialo GM1 抗体投与が
必要であること、ヒト血液細胞の生着
には多くの臍帯血 CD34 陽性細胞の移
植が必要なこと、ヒト T 細胞の恒常的
な発現が確認できないことなど、数多
くの問題点を抱えている。今回我々の
開発した NOD/SCID/ γ cnul1 マウスは、
これらの問題点を解決した。さらに、
出現するヒト血液細胞の内、B 細胞、T
細胞、NK 細胞などは機能を有するこ
とが確認された。今後、*ex vivo*
expansion したヒト造血幹細胞の活性
を評価するシステムとして、有用なモ
デルとなることが期待される。一方、
出現する T 細胞の組織適合性抗原に対
して、マウス側が優位に働くのか、ヒ
ト側が優位に働くのかなど解決すべ
き問題が残存する。また、近年注目さ
れているヒト造血細胞の可塑性に対
する *in vivo* での評価など、このマウ
スを用いて検討でき得る課題も多い。
これらの可能性につき、このマウスの
有用性についての検討が待たれる。

E. 結論

ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を
NOD/SCID/ γ cnul1 マウスに移植し、ヒ
ト血液細胞の分化を評価できる系を
確立した。この系は、細胞表面形質の
獲得に加えて、生成細胞の機能をも評
価できるシステムであることが明ら
かにされた。この結果により、臨床応
用を目指して無血清培地を用いて生

体外で増幅されたヒト臍帯血 CD34 陽性細胞について、その幹細胞活性を測定することが可能となった。また、ヒト造血細胞を用いた可塑性の研究にも、生体内での動態を評価できるシステムとして、その利用が期待される。

F. 健康危険情報

この研究に関して、国民の生命、健康に重大な影響を及ぼすと考えられる事項は含まれない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Heike, T., and Nakahata, T.: Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells by cytokines. *Biochim Biophys Acta* 1592:313-312, 2002.
2. Ito, M., Kobayashi, K., Suzue, K., Kawahata, M., Hioki, K., Ueyama, Y., Koyanagi, Y., Sugamura, K., Tsuji, K., Hiramatsu, H., Heike, T., Nakahata, T.: NOD/SCID gnull mouse: An excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 100:3175-3182, 2002.
3. Ishibashi, H., Hihara, S., Takahashi, M., Heike, T., Yokota, T., and Iriki, A.: Tool-use learning induces BDNF expression

in a selective portion of monkey anterior parietal cortex.

Molecular Brain Research 102: 110-112, 2002

4. Ishibashi, H., Hihara, S., Takahashi, M., Heike, T., Yokota, T., and Iriki, A.: Tool-use learning selectively induces expression of brain-derived neurotrophic factor, its receptor trkB, and neurotrophin 3 in the intraparietal multisensory cortex of monkeys. *Cognitive Brain Research* 14: 3-9, 2002
5. Yamanaka Y, Hamazaki Y, Sato Y., Ito K, Watanabe K, Heike T., Nakahata T, Nakamura Y: Maturation sequence of neuroblastoma revealed by molecular analysis on cDNA microarrays. *Int J Oncol* 21:803-807, 2002

2. 学会発表

—国内学会—

1. 長谷川浩二、和田啓道、平井希俊、平家俊男、中畑龍俊：シンポジウム、心筋の発生、アポトーシス、再生のプロセス、第66回日本循環器学会学術集会、2002
2. 平家俊男：臨床応用に向けたヒト造血幹細胞の体外増幅について、静岡県立こども病院 院内候講習

- 会、2002
3. 平家俊男：Exvivo 造血幹細胞増幅の臨床応用にむけて、第10回関西分子医学研究会、平成14年2月16日
 4. 平松英文、鈴木健一、平家俊男、中畑龍俊、伊藤守：NOD/SCID/ γ_c^{NULL} マウスを用いたヒト造血幹細胞の測定系の開発。第43回日本臨床血液学会総会 2001年11月13-15日（13日） 神戸市
 5. 平家俊男、平松英文、中畑龍俊男：ヒト造血幹細胞の体外増幅とその臨床応用 第105回日本小児科学会学術集会
 6. 平家俊男：ヒト造血幹細胞の体外増幅とその臨床応用 第8回遺伝子診療セミナー、平成14年9月10日
 7. 平家俊男、中畑龍俊：造血幹細胞を用いた再生医療 第23回日本炎症・再生医学会、平成14年7月2日-3日
 8. 平家俊男：ヒト造血幹細胞の体外増幅とその臨床応用 2nd cardio-vascular protection Club、平成14年10月26日
 9. 和田啓道、平井希俊、長谷川浩二、飯田みどり、平家俊男、中畑龍俊：p300によるGATA-4のアセチル化は心筋細胞分化に重要である 平成14年第1回日本再生医療学会総会
 10. 長門雅子、平家俊男、加藤竹雄、飯田みどり、吉本桃子、西小森隆太、中畑龍俊：細胞表面マーカーを用いた神経幹細胞同定の試み 平成14年第105回日本小児科学会学術集会
 11. 吉本桃子、平家俊男、中畑龍俊：血液幹細胞の骨格筋における可視的・経時的変遷 平成14年第1回日本再生医療学会総会
 12. 平家俊男：再生医学、平成14年8月9日、平成14年度医学部オープンキャンパス
 13. 吉本桃子、平家俊男、中畑龍俊：骨格筋における造血幹細胞の動態 平成14年9月12-15日第64回日本血液学会
 14. 平松英文、西小森隆太、平家俊男、山上義人、伊藤守、中畑龍俊：NOD.SCID/gnull マウスモデルにおけるヒト造血及び免疫系再構築の検討 平成14年9月12-15日第64回日本血液学会
 15. 中畑龍俊、平松英文、平家俊男、伊藤守：NOD/SCID/gnull マウスを使ったヒト免疫系の再構築の検討 平成14年11月18日第22回日本血液幹細胞シンポジウム
- 八角高裕、片村憲司、目黒敬章、西小森隆太、平家俊男、中畑龍俊：マウス樹状細胞(DC)サブセットによる免疫応答の誘導とその調節 平成14年11月28-30日第52回日本アレルギー学会