

- 10 前川 平 慢性骨髄性白血病治療の過去、現在、そして未来、第5回京滋エリア血液疾患治療研究会（ホテルグランウィア京都）平成16年2月13日（2004）
- 11 前川 平 血管再生医療におけるGMP細胞プロセッシングと輸血部の関わり、シンポジウムIII「血管再生医療の現状と将来展望」、第51回日本輸血学会総会（北九州、小倉）、平成15年5月29日（2003）
- 12 前川 平 骨髄移植後の顆粒球輸血の効果、第10回日本輸血学会秋季シンポジウム（弘前市）平成15年10月4日（2003）
- 13 前川 平 先端医療開発と臨床検査技師の大学院教育シンポジウム「臨床検査技師の大学院教育」、第43回日本臨床化学会年会、第50回日本臨床検査医学会総会連合大会－検査2003－（広島）平成15年10月30日（2003）
- 14 野河正輝、湯浅 健、木村晋也、前川平 PLK-1 siRNA を用いた膀胱癌治療をめさして（共）第13回アンチセンスシンポジウム（大阪）平成15年12月1-2日（2003）
- 15 前川 平 先端医療開発に必要なイ
- ンフラストラクチャー、JST 異分野研究者交流フォーラム「ケノムケミストリーに基づく総合的遺伝子診断・治療法の新技术創出」（主催 科学技術振興機構）（高知県・芸西村、土佐ロイヤルホテル）平成16年1月22日（2004）
- 16 金倉讓 造血細胞の生存・死と腫瘍化の分子機構 第9回新潟血液疾患・サイトカイン研究会（17新潟）
- 17 高井恵美、柴山浩彦 抗アポトーシス分子 Anamorsin と造血制御 第19回大阪血液学研究会（131大阪大学）
- 18 水木満佑央、松村到、上田周二、石河純、金倉讓、Joachim Schwaeble、Hubert Serve 急性骨髄性白血病の予後不良因子、internal tandem duplication 変異 F113 による STAT 標的遺伝子の発現誘導と骨髄系転写因子の発現抑制 第100回日本内科学会講演会
- 19 金倉讓 血液細胞の癌化分子病態 第26回日本医学会総会（45福岡）
- 20 金倉讓 白血病と新たな治療戦略 平成15年度第2回現代医学講座（512大阪）
- 21 柴山浩彦、高井恵美、金倉讓 抗ア

- ポトース分子 Anamorsin と造血制御 第1回 幹細胞シンポジウム
- 22 高井恵美、柴山浩彦、松村到、森井英、河野道良、北村幸彦、竹田潤二、金倉譲 抗アポトーシス分子 Anamorsin と造血制御 第65回 日本血液学会総会・第45回 日本臨床血液学会総会
- 23 石河純、水木満佐央、上田周平、松村到、金倉譲 Activation loop 変異 Flt3 の恒常的活性化機構の解析 第65回 日本血液学会総会・第45回 日本臨床血液学会総会
- 24 石副幸子、松村到、菅原浩之、水木満佐央、柴山浩彦、金倉譲 PML が Ras/MAPK のシグナル伝達に及ぼす影響についての解析 第65回 日本血液学会総会・第45回 日本臨床血液学会総会
- 25 張弦、待井隆志、松村到、菅原浩之、柴山浩彦、水木満佐央、金倉譲 Rhoファミリー分子によるヘアリーセル白血病細胞の増殖と形態制御についての解析 第65回 日本血液学会総会・第45回 日本臨床血液学会総会
- 26 松村到 血液細胞の増殖・生存 腫瘍化における NF- κ B の機能解析 第26回 分子生物学研究会 (9/16 福岡)
- 27 片岡良久、松村到、水木満佐央、金倉譲 筋肉芽細胞の増殖・分化制御における MyoD と STAT3 の拮抗作用とその分子機構の解析 第62回 日本癌学会総会 (9/25-27 名古屋)
- 28 松村到 血液細胞の増殖 生存における NF- κ B の機能解析 第2回 造血分子研究会 (10/4-5 名古屋)
- 29 佐藤友亮、松村到、金倉譲 細胞周期制御分子を用いた造血幹細胞の体外増幅の試み 血液疾患セミナー (11/1 東京)
- 30 田中弘和、伊藤仁也、多田典子、佐藤友亮、中畑龍俊、金倉譲 転写因子 PBX1 によるヒト臍帯血造血幹細胞の増殖、分化制御機構の解析 第24回 日本炎症・再生医学会 (11/26-27 京都)
- 31 鈴木秀文、伊藤仁也、田中弘和、渋谷和志、河合弘行、菅谷真一、平家俊男、金倉譲、中畑龍俊 サイトカインを用いた臍帯血 CD34 陽性細胞の体外増幅法に関する基礎的検討 平成15年8月29日 第65回日本血液学会
- 32 鈴木秀文、伊藤仁也、小林典孝、田中弘和、渋谷和志、後藤真啓美、平

- 平家俊男、前川平 金倉讓、中畑龍俊
ex vivo 増幅臍帯血の非臨床試験(その1)閉鎖系培養法を用いたex vivo 増幅臍帯血の製造 平成15年12月19日 第26回日本造血細胞移植学会
- 33 伊藤仁也 第11回近畿臍帯血移植研究会(大阪)(特別講演)臍帯血を用いたトランスレーショナルリサーチ 平成15年5月10日 (2003)
- 34 伊藤仁也 活性化CD4輸注療法の適心と選択 第51回日本輸血学会シンポジウム 平成15年5月30日 (2003)
- 35 初山麻子、伊藤仁也、田中弘和、中畑龍俊 完全無血清培養による臍帯血幹細胞の性質第65回日本血液学会総会 平成15年8月28日 (2003)
- 36 多田典子、井田卓見、伊藤仁也 無菌閉鎖系濃縮洗浄回収システムの培養リンパ球に及ぼす影響 第6回日本組織工学会 平成15年6月12-13日
- 37 鈴木秀文 伊藤仁也、小林典孝、田中弘和、渋谷和憲、後藤真澄美、逢坂敦、平家俊男、前川平 金倉讓 Ex vivo 増幅臍帯血の非臨床試験(その1)閉鎖系培養法を用いたEx vivo 増幅臍帯血の製造。第26回日本造血細胞移植学会 平成15年12月19~20日
- 38 伊藤仁也、井出陽一、菊池泰子、後藤真澄美、渋谷和憲、鈴木秀文、丸山京子、平家俊男、前川平、金倉讓、中畑龍俊 ex vivo 増幅臍帯血の非臨床試験(その2)増幅細胞の形態学的特徴および増幅細胞が分泌するサイトカイン類の測定 第26回日本造血細胞移植学会 平成15年12月19日
- 39 丸山京子 伊藤仁也、田中弘和 鈴木秀文、槻木裕志、初山麻子、多田典子、高田のそみ、中畑龍俊 臍帯血造血幹細胞の増幅培養法の比較 第26回日本造血細胞移植学会 横浜 2003
- 40 伊藤仁也、渋谷和憲、井出陽一、後藤真澄美、鈴木秀文、平家俊雄、前川平、金倉讓、中畑龍俊 ex vivo 増幅臍帯血の非臨床試験(その3)NOD/SCID 移植モデルにおける評価 第26回日本造血細胞移植学会 平成15年12月19日
- 41 鈴木秀文、伊藤仁也、田中弘和 渋谷和憲、河合弘行、菅谷信一、平家俊男 金倉讓、中畑龍俊 サイトカインを用いた臍帯血 CD34 陽性細胞の体外増幅培養に関する基礎的検討 第65回日本血液学会総会 大阪 平成15年8月28日 (2003)

- 1 Matsumoto, S, Kimura, S, Segawa, H, Kuroda, J, Kono, Y, Tanaka F, Maekawa T, Wada H Efficacy of combining the third generation bisphosphonate, zoledronate with imatinib mesylate in suppressing small cell lung cancer cell line proliferation, The American Society Clinical Oncology (ASCO) Annual Meeting (Chicago, Illinois, USA) (May 31 June 3, 2003), Abstract # 2750
- 2 Kuroda, J Kimura, S, Segawa, H Kobayashi Y, Ottmann, O G Yoshikawa, T Maekawa, T p53 signaling cascade independent apoptotic induction by zoledronate in BV173, leukemic cell line, The 32nd Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology (Paris, France) (5 8th July, 2003) Abstract #107, Experimental Hematology, 31 7(supple1) 95-96 2003
- 3 Segawa, H, Kimura, S, Kuroda, J, Hodohara, K, Fujiyama, Y, Ottmann, O G Maekawa, T YM529, a novel bisphosphonate, inhibits the growth of human leukemic cells in vitro via induction of apoptosis, The 32nd Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology (Paris, France) (6th July, 2003) Abstract #520 Experimental Hematology, 31 7 (supple 1) 233 2003
- 4 Kimura S, Kuroda, J Segawa, H, Ottmann, O G, Maekawa, T The third-generation bisphosphonate zoledronate synergistically augments the anti-Ph+ leukemia activity of imatinib mesylate, The 32nd Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology (Paris, France) (6th July, 2003), Abstract # 109, Exp Hematol 31 96(supple1) 109, 2003
- 5 Matsumoto, S, Kimura S, Kono, Y, Yanagihara, K, Tanaka, F, Maekawa, T, Wada, H Combination Efficacy of Bisphosphonate, Zoledronate with imatinib mesylate (Gleevec) in Small Cell Lung Cancer Cell Line, 10th World Conference on Lung Cancer (Vancouver Canada) (August 14, 2003)

- 6 Segawa, H , Kimura, S , Kuroda J , Hodohara, K , Fujiyama, Y , Maekawa, T ONO 5920/YM529, a third generation bisphosphonate, inhibits the growth of human leukemic cells both in vitro and in vivo The 45th Annual Meeting of The American Society of Hematology (San Diego, California, USA) (7th December, 2003) Abstract # 2191 Blood, 102 11(supple) 594a 2003
- 7 Kuroda, J , Kimura, S Segawa, H , Ottmann, O G , Maekawa, T The anti leukemic effects of third-generation bisphosphonate, zoledronic acid The 45th Annual Meeting of The American Society of Hematology (San Diego, California USA) (7th December, 2003) Abstract # 2199 Blood, 102 11(supple) 596a, 2003
- 8 Kimura, S , Segawa, H , Kuroda, J Maekawa T Inhibition of leukemic cell growth by a novel anti-cancer drug (GUT-70) from *Calophyllum gracilense* that acts by induction of apoptosis via extrinsic pathway The 45th Annual Meeting of The American Society of Hematology (San Diego, California USA) (December, 2003) Abstract # 4550 Blood 102 11(supple) 208b, 2003
- 9 Hirokazu Tanaka, Kiminari Itoh, Itaru Matsumura, Tatsutoshi Nakahata and Yuzuru Kanakura The Peptide Decoy for HOX Proteins Enhances Ex Vivo Expansion of Human Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Cells The 45th Annual Meeting of The American Society of Hematology, 2003
- 10 Jun Ishiko Masao Mizuki, Shuji Ueda, Itaru Matsumura, Hubert Serve and Yuzuru Kanakura Critical Regulatory Roles of Tyr⁸⁹² and Tyr⁹²² in Constitutive Receptor Activation of FLT3 Kinase Domain Mutant The 45th Annual Meeting of The American Society of Hematology, 2003
- 11 Eri Ishiko Itaru Matsumura Yusuke Satoh, Jun Ishiko Hiroyuki Sugahara Masao Mizuki, and Yuzuru Kanakura HES1 inhibits megakaryocytic and erythroid differentiation by suppressing GATA 1 activities The 45th Annual Meeting of The American Society of Hematology, 2003

H 知的財産権の出願・登録状況

特許出願

- ・ 標的核酸の検出法 特願 2003 164799
- ・ 抗癌、抗菌又は抗ウイルス作用を有する医薬組成果物 特願 2003 18321
検体（細胞）取り違い防止及び検体（細胞）管理システム 特願 2003 009157
- ・ 組織培養用装置 特願 2002-165225
- ・ 転写因子操作による造血幹細胞の体外増幅法の開発 特願 2003-392892
リコンヒナントアルフミンを利用した造血幹細胞用無血清培地と培養法
特願 2004-13291

Ⅲ 平成 15 年度 分担研究報告書

厚生労働科学研究補助金（基礎研究成果の臨床応用研究事業）

分担研究報告書

1 GMP に準拠した培養の確立

1-1 ex vivo 増幅臍帯血の培養法の確立

分担研究者 逢坂 敦

（キリンヒール（株）医薬カンパニー生産本部生産技術センター主任研究員）

研究協力者 鈴木 秀文、小林 典孝

（キリンヒール（株）医薬カンパニー生産本部生産技術センター）

研究要旨

複数のサイトカインを組み合わせて培養することによりヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞を体外で増幅することか可能なことか知られている。本分担研究では 昨年度までに サイトカインの組み合わせとして SCF、TPO、FL (Flt3/Flk2 リガント) FP6 (可溶性 IL-6 受容体と IL6 の融合蛋白質) が最適であり、無血清培地では QBSF-60 が最も増幅効率が高いことを示してきた。

本年度は、上記のサイトカインと無血清培地を用いて、閉鎖系ハコク培養による実際規模での製造条件を検討した。その結果、37℃、炭酸ガス濃度 5%、酸素濃度 5% の条件下、SCF、TPO、FL FP6 を各々100ng/mL を含む QBSF-60 培地で、CD34 陽性細胞数 10000 個/mL、培養液量 15mL/ハコクで培養を開始し、継代を行いなから 12 日間培養する方法を開発した。この方法により CD34 陽性細胞数を 20 倍以上に増幅培養可能となった。

A 研究目的

サイトカインを用いてヒト造血幹細胞/前駆細胞を体外で増幅する試みは種々行われているか、本研究グループは、gp130 受容体を介した活性化がこの体外増幅に必要であることを明らかにしてきた。そして、SCF、TPO、FL (Flt3, Flk2 リカント)、IL-6 および IL6 受容体蛋白質を組み合わせるにより、ヒト造血幹細胞/前駆細胞を体外で効率的に培養できることを示してきた。

本分担研究では、本培養法の臨床応用に向けて、ヒト造血幹細胞/造血前駆細胞を無血清培養によって増幅する技術を確立することを目的としている。昨年度は、フラスコを用いた実験で、サイトカインの組み合わせや無血清培地を検討し、SCF、TPO、FL (Flt3/Flk2 リカント)、FP6 (可溶性 IL-6 受容体と IL-6 の融合蛋白質) のサイトカインの組み合わせが最適であり、これらのサイトカインと無血清培地 QBSF⁺-60 を用いることにより、無血清培養下において CD34 陽性細胞の体外増幅が可能であることを確認した。

本年度は、これらのサイトカインと培地を用いて、ハノク培養による閉鎖系培養条件下での培養法を確立するとともに、その増幅効果の確認を行った。

B 研究方法

ヒト臍帯血より CD34 陽性細胞を磁気ヒース法 (MACS ヒース法) にて分離後、SCF (100ng/mL)、TPO (100ng/mL)、FL (100ng/mL)、FP6 (100ng/mL) を添加した QBSF⁺-60 培地 (米国 Quality Biological 社製) 中で培養した。カス透

過性培養ハノクは、VueLifeTM (米国 American FluoroSeal Corporation 社製) を用いた。培養した細胞について、細胞数、細胞表面抗原、コロニー形成細胞数を測定し、培養前後の増幅率等を比較検討した。

1 培養時の酸素濃度の影響

培養工程における酸素濃度は細胞の増幅に重要であることが知られており、臍帯血 CD34 陽性細胞を無血清培地中で *ex vivo* 増幅する場合には、低酸素条件下で培養するのが一般的である。しかしながら、カス透過性ハノクを用いた場合の酸素濃度の影響については十分なデータが存在せず、実際の製造条件を用いた検討が必要である。そこで、American FluoroSeal 社テフロン製カス透過性ハノクを用いた閉鎖系培養における酸素濃度の影響について検討した。

2 培養時の細胞濃度の影響

細胞濃度は臍帯血 CD34 陽性細胞の増幅率並びにその細胞の質に大きな影響を与えることが基礎研究の結果から判明している。そこで、ハノク培養における培養開始時の CD34 陽性細胞の濃度について検討を行った。10000 個/ml、20000 個/ml 又は 30000 個/ml の各 CD34 陽性細胞濃度で培養を開始し、経時的に細胞を解析した。

3 細胞継代方法

基礎研究の結果から臍帯血 CD34 陽性細胞の効率的な増幅には、新鮮な培養液の供給と適度な細胞濃度が重要であり、特

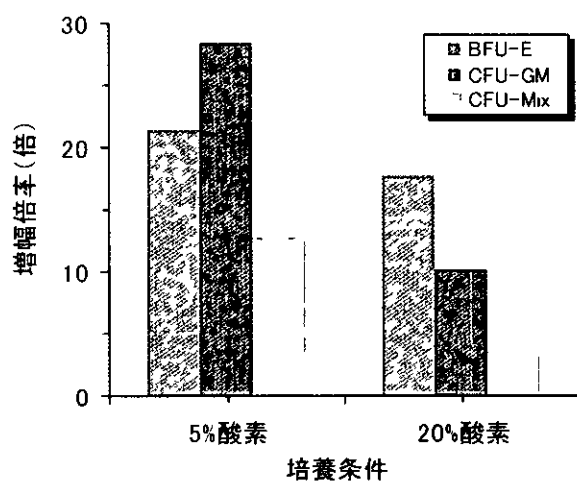
に7日目以降の培養においては適切に培養液の希釈を行うことが重要であることが明らかとなっている。そこで、ハッグ培養における最適な細胞継代の条件を検討した。継代方法として、10000 個/ml、及び 20000 個/ml の細胞濃度で培養を開始し、7日目に2倍希釈又は4倍希釈、10日目に2倍希釈又は4倍希釈する条件を用いた。

C 研究結果

1 培養時の酸素濃度の影響

CD34 陽性細胞を酸素濃度 5%と 20%の条件下で12日間培養した。その結果、CD34 陽性細胞の増幅率に差は認められなかったが、コロニー形成細胞の増幅率は酸素濃度 5%条件下で培養した群が優れていた(図1)。コロニー形成細胞の増幅は *ex vivo* 増幅臍帯血の品質を決定する重要な因子であると考えられることから、実製造では5%の低酸素培養を行うこととした。

(図1)酸素濃度の影響

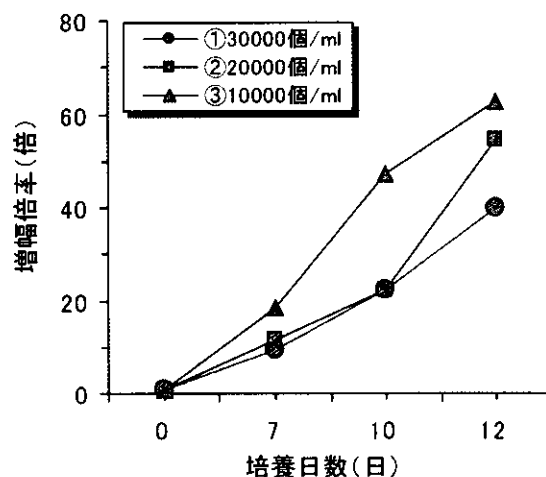


2 培養時の細胞濃度の影響

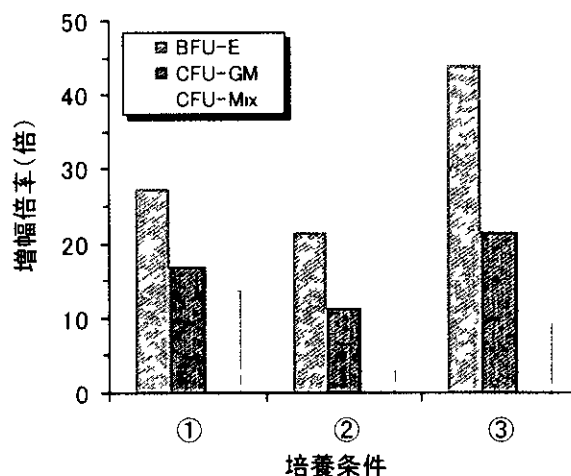
培養液中の細胞濃度が低いほど CD34 陽

性細胞の増幅率、及びコロニー形成細胞の増幅率が高い傾向にあることが判明した(図2、3)。なお、最適な細胞濃度は、細胞継代の条件によっても異なることから、他の条件と合わせて総合的に決定する必要がある。

(図2)細胞濃度の検討



(図3)細胞濃度とコロニー形成細胞



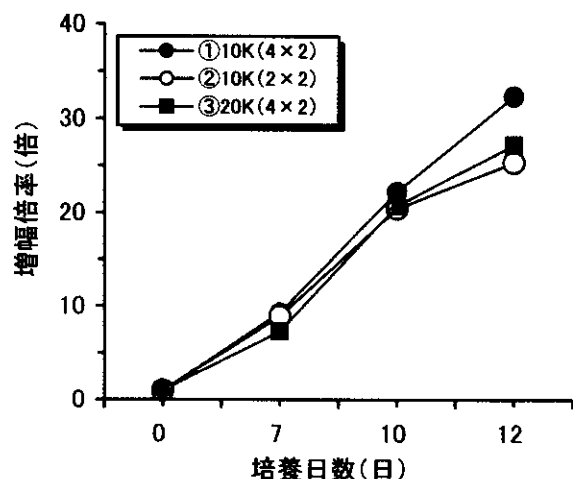
3 細胞継代方法

10000 個/ml の細胞濃度で培養を開始し、7日目に4倍希釈、10日目に2倍希釈する条件で最も優れた CD34 陽性細胞の増幅率、及びコロニー形成細胞の増幅率を達

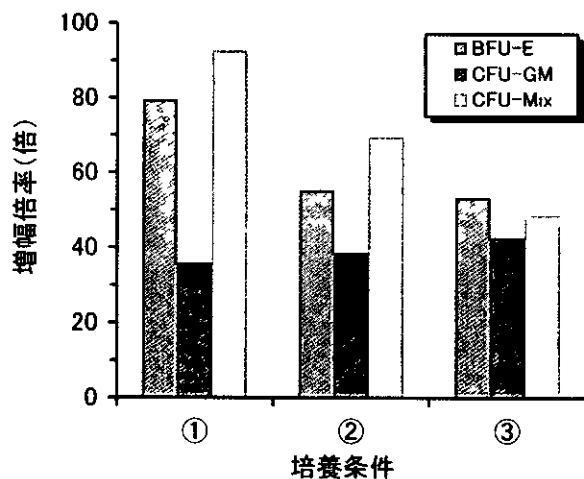
成できることか判明した(図4,5)。また、培養開始時細胞濃度 20000 個/ml で同様に行った条件においても、CD34 陽性細胞の増幅率は同等レベルであることも判明した。

継代条件	培養開始時の細胞濃度	7日目	10日目
①	10000 個/ml	4倍希釈	2倍希釈
②	10000 個/ml	2倍希釈	2倍希釈
③	20000 個/ml	4倍希釈	2倍希釈

(図4)細胞継代方法と細胞増幅率



(図5)細胞継代方法とコロニー形成細胞



D 考察

本研究により、ガス透過性培養ハノクを用いた場合にも無血清培養法によりCD34 陽性細胞を 20 倍以上に増幅可能なことか示された。ガス透過性培養ハノクを用いた培養法は培養時における細菌等のコンタミネーションを最小限にすることか可能であり、培養細胞の安全性を確保する上で重要である。今後、この培養方法の更なる最適化を図るとともに、臨床応用へ向けて GMP に準拠した形での製造体制と手順を構築して行く必要かある。

E 結論

無血清培養でヒト CD34 陽性細胞を閉鎖系ハノク内で体外増幅する培養法として、37°C、炭酸ガス濃度 5%、酸素濃度 5%の条件下、SCF、TPO、FL、FP6 を各々 100ng/mL 含む QBSF[®]-60 培地で、7 日目に 4 倍希釈、10 日目に 2 倍希釈する条件か最も優れた効果を達成できることか判明した。この方法によれば、CD34 陽性細胞数は、20 倍以上に増幅可能である。

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

鈴木秀文 伊藤仁也、田中弘和、渋谷和志、河合弘行、菅谷真一、平家俊男、令倉謙、中畑龍俊 サイトカインを用いた臍帯血 CD34 陽性細胞の体外増幅法に関する基礎的検討 平成 15 年 8 月 29 日 第 65 回日本血液学会

鈴木秀文、伊藤仁也、小林典孝 田中弘和、渋谷和志、後藤真澄美、平家俊男、前川平、令倉謙、中畑龍俊 ex vivo 増幅臍帯血の非臨床試験（その 1）閉鎖系培養法を用いた ex vivo 増幅臍帯血の製造 平成 15 年 12 月 19 日 第 26 回日本造血細胞移植学会

H 知的財産権の出願・登録状況

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推進研究事業）

分担研究報告書

1 GMP に準拠した培養法の確立

1-2 元全無血清培地の開発

分担研究者 伊藤 亓也

（先端医療センター再生医療研究部主任研究員）

研究協力者 初山 麻子

（先端医療センター再生医療研究部技術員）

研究要旨

細胞治療 再生医療における細胞プロセス（Cell Processing）の実践には無血清培養法の確立が安全性の確保において最終目標である。我々はヒト血清および動物血清を排除した元全無血清培地を開発した。この培地により臍帯血中の CD34 陽性細胞を培養したところ、有血清培養と比較して より無分化な造血幹細胞分画を増幅していると考えられ、コロニー形成能、CD34 陽性細胞増幅能ともに優れていた。臨床に用いる培地として GMP 化を目標として開発を進めるとともに未知成分が含まれないことにおいて造血幹細胞の基礎研究には不可欠なものと思われる。

A 研究目的

再生医療・細胞治療の実現には安全な Cell processing の確立が不可欠である。原材料に効能や組成、安全性が明らかになったものを用いることは重要な課題であり、とりわけ無血清培養法の開発は必要不可欠な技術である。これまで造血幹細胞をはじめ、primary cell の培養には血清の使用が不可欠であった。しかし、細胞治療を行なうためには、動物血清やヒト血清を用いることにより、細胞に検査不能な未知のウイルスやプリオンが感染してしまう可能性がある。

我々はこれらの危険を排除するため、完全無血清培地の開発とその培地によって培養された細胞の性質を詳細に検討し、より安全なセルプロセッシングが行なえる基盤をつくることを目標に本に分担研究を開始した。

B 研究方法

完全無血清培地として、Minimal essential medium- α を基礎培地として血清の代わりに rh-Albumin, コレステロール, リン脂質, トランスフェリン, インスリン, ビタミン類を加え、調整した。培地の性能試験として、臍帯血 CD34 陽性細胞を分離し、Stem cell factor (SCF), FL (Flk-2/Flt-3ligand), Thrombopoietin (TPO), Interleukin-6 (IL-6), soluble IL-6 receptor (sIL-6R) を培地に添加した。10% FCS 添加 α -MEM で培養した臍帯血 CD34 陽性細胞の増幅率、細胞

形態、表面抗原、コロニー形成能を比較した。細胞の形態は培養後の細胞をサイトスピンにて固定し、May-Giemsa 染色、および特殊染色を行ない、細胞の形態分類を行なった。表面抗原の検討は CD34 の陽性率の他、CD38, HLA-DR、CD90, CD117, CD133 などの幹細胞の未熟成の検討および、分化をみるため、CD3, CD19, CD41, Glycophorin A, CD14, CD33 などの lineage marker を検討した。造血前駆細胞の機能的評価としては、メチルセルロースコロニーアッセイを行ない、コロニー形成能を比較した。

C 研究結果

A) 細胞の増殖能の評価

完全無血清培養と有血清培養法での臍帯血有核細胞の増幅率および最も未分化な幹細胞分画と考えられている CD34+/CD38-/HLA-DR-細胞の増幅率を比較した。結果を Fig1-1, Fig1-2 に示す。

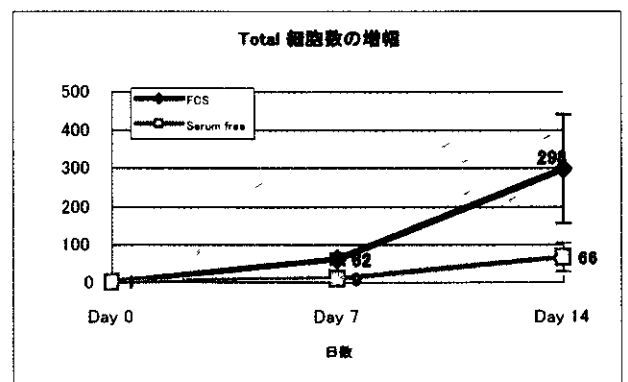


Fig1-1

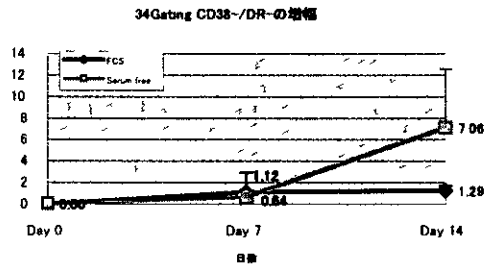


Fig1-2

全体の細胞増幅率においては、有血清培養法の法が優るか、未熟な分画である、CD34+/CD38-/HLA-DR-細胞においては、無血清培養が有意に増殖を示し、有血清培養では臍帯血幹細胞が自己複製に伴って分化していくのに対して無血清培養法においては、分化を抑えて未分化な細胞が増殖することがわかった。

(B) 増幅した細胞形態

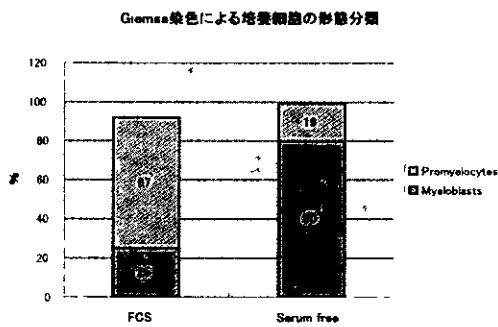


Fig-2

有血清培養および無血清培養を2週間行なった後にサイトスピンにより固定した細胞の形態をMay-Giemsa染色、および特殊染色によって分類したグラフをFig-2に示した。無血清培養では80%の細胞が芽球の形態を示し、有血清培養と比較して有意に芽球の割合が高かった。

(C) 各培養で増幅される細胞の表面抗原の解析

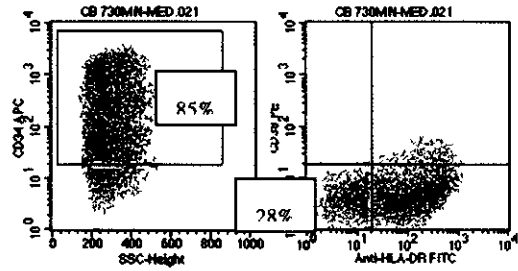


Fig 3-1 Serum free

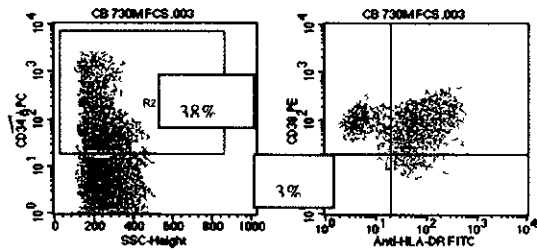


Fig 3-2 FCS

培養2週間後の増幅された細胞を比較すると無血清培養で85%の細胞が、CD34を表出しているのに対し、有血清培養では38%に減少している。またCD34+/CD38-/HLA-DR-分画ではそれぞれ23%と3%で未熟な幹細胞分画は無血清培養で上回っていた。

(1) Lineagemarker の比較においても有血清培養では特にCD14 (単球系) に分化する傾向が認められた。

(D) コロニー形成能

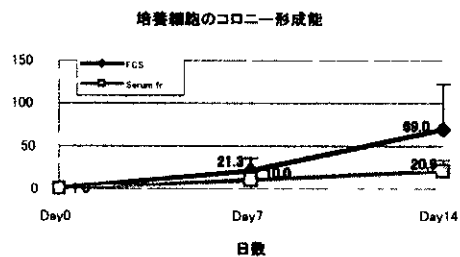


Fig 4-1 Expand rate of total colony

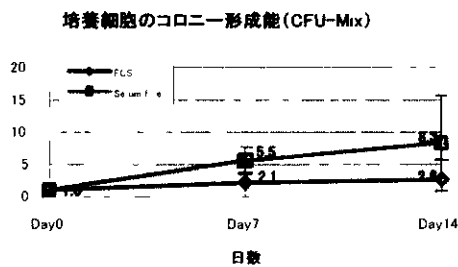


Fig 4-2 Expand rate of Mix colony CFU-GM のように顆粒球、単球系に分化したコロニー形成能を中心とした総コロニー形成細胞の増幅率は有血清培養を上回るか、より未熟な前駆細胞の指標である CFU-Mix の増幅率は無血清培養の法が高かった。

D 結論

血清成分および動物由来蛋白を排除した完全無血清培地を開発した。完全無血清培地で培養した臍帯血幹細胞は有血清培養に比べ分化を抑え、より幹細胞に近い分画を増殖させることかてきることか確認された。この培地は安全な造血幹細胞の増幅培養に貢献するだけではなく、未知の成分を排除した点において、サイトカインそのものの作用の確認や薬効試験などに有用であり、造血幹細胞研究を支えるものと考えられる。今後、この培地の GMP 化を行ない、製品化を目指して開発を進める予定である。

E 健康危険情報

特記すべきことはない。

F 研究発表

(1) 論文発表

- 1 伊藤仁也、中畑 龍俊、臍帯血造血幹細胞の ex vivo 増幅 細胞 36 (2), P48-51 2004
- 2 伊藤仁也 活性化リンパ球輸注療法 今日の移植 17 (1) P89-98 2004
- 3 伊藤仁也、中畑 龍俊 造血幹細胞の ex vivo 増幅 最新医学 57 (1) P23-30 2002
- 4 伊藤仁也 培養 CD4 陽性 T 細胞による再発白血病の治療 分子細胞治療 1 (3) P307-313, 2002

(2) 学会発表

(特別講演)

- 1 伊藤仁也 Ex vivo 臍帯血移植に向けての基盤整備 第 10 回近畿臍帯血移植研究会 (大阪) 平成 15 年 5 月 10 日 (2002)
- 2 伊藤仁也 厚生労働科学研究ヒトケノム・再生医療等研究事業 四研究班合同研究シンポジウム (東京) 平成 15 年 2 月 27 日 (2003)
- 3 伊藤先生 第 51 回日本輸血学会シンポジウム 活性化 CD4 輸注療法の適応と選択 平成 15 年 5 月 30 日 (2003)

- 4 伊藤仁也、初山麻子、田中宏和、中畑
龍俊 第65回日本血液学会総会
元全無血清培養による臍帯血幹細胞の
性質 平成15年8月28日(2003)

G 知的財産権の出願・登録状況

特許願 (特願2004-13291)

リコンヒナントアルフミンを利用した造
血幹細胞用無血清培地と培養法

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

2 GMP に準拠した培養のシステムの開発、基準整備

2-1 Institutional GMP 構築の必要性

分担研究者 前川 平

（京都大学医学部附属病院輸血部教授）

研究要旨

細胞治療に関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 TR）には、科学的、倫理的に高い水準と信頼性が要求される。細胞治療の原型は輸血であり、造血幹細胞移植、養子免疫療法、遺伝子治療、再生治療も、ヒト細胞を治療に用いることから細胞治療に包括される。細胞治療や再生治療等の先端治療の開発には、目的とする細胞を分離培養し、人工的な操作を加えることが不可欠で、従来の医薬品とは異なり 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) に準拠した細胞プロセスという工程が必須である。我が国では、こういった細胞治療や再生治療に必要な細胞プロセスを具体的にどのように実施するべきかという詳細な指針がない。臨床研究医、技師、エンジニア、薬剤師、GMP コンサルタント、それに行政を担当する官僚が同じテーブルについて 致協力し、TR を正しく推進させるためのルールづくりを早急に行う必要がある。また FDA が行っているような教育的指導が現時点では期待できないわが国では 研究者や臨床研究医自らから 先端医療開発を行う人や先端医療センターに特化した Institutional GMP を構築する必要がある。

A 研究目的

21世紀に入り爆発的スピードで進展する生命科学研究を鳥瞰すれば、基礎研究の成果を一刻も早く病める人々に治療法として還元することか社会的に強く要請されていることは明らかである。脚光をあびている再生治療、あたらしい理論に基づいた免疫細胞治療や遺伝子治療の多くも、ヒト細胞を治療に用いることから「細胞治療」に包括される。こういった先端治療の開発には、科学的、倫理的に高い水準と信頼性が要求される。

現在、一般の治療に用いられる医薬品は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) を遵守して製造されている。欧米では、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 (トランスレーショナル・リサーチ) には、GMP 準拠の細胞プロセスが必須であるとされている。

本研究は、GMP 準拠無菌的細胞プロセスについて、とくに先端医療開発、なかでも治療法として確立するかまた判然としない (= 企業が本格的に参入することかまた難しい) 実験的治療の色彩の濃い、ヒト細胞をもちいた治療開発を行うおうとする大学や研究所の目的に特化したGMP、すなわち institutional GMP を構築することを目的としたものである¹⁾。なお、具体的なハードに関してはすでに報告しているのを参照されたい²⁾。

B 研究方法

分担研究者か、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

I GMP 準拠細胞プロセッシングが必要な理由

新薬の開発は基礎研究の成果をもとに前臨床試験、フェーズ I へと進行する。医薬品はこの段階から GMP クレートで製造されたものか用いられる。米国では IND (Investigational New Drug) として FDA から認可されたものか臨床試験に用いられ、わか国でも医薬品に関して同様の体制かとられている。治療用ヒト細胞を「細胞医薬品」と考えれば、その作製も GMP 基準に準拠すべきことは容易に理解できる。

細胞治療の原型は輸血であり、血液センターでは GMP 基準に則って血液製剤か作製されている。医薬品と異なりロットを構成しないヒト細胞を用いるため、伝播される可能性のある感染症のチェックを個々の製品について行う必要かある。ヒト細胞を用いた探索的臨床試験研究の多くは大学や先端医療センターで行われる。実験室の片隅で、明確な基準や記録

もなく作製された細胞を移植されてもよいとは誰も考えないであろう。

II 米国の体制とわが国の現状

米国では 2001 年 1 月 FDA から cGTP (Good Tissue Practice)¹⁾ が提言され、とくに感染症の伝播を防ぐため、治療用ヒト細胞の作製に必要な事項を規定している。さらに 2002 年 9 月 CBER から “Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing Draft” が発表された²⁾。序文には “Poor cGMP conditions at a manufacturing facility can ultimately pose a life threatening health risk to a patient” と明記され、無菌的プロセッシング施設の設計基準、および無菌的プロセッシング技術や管理の必要事項が具体的に示されている。これは主に医薬品の無菌的プロセッシングを含頭に置いてはいるか、細胞プロセッシングにも適応可能であるように考慮されている。

一方、わが国では 2003 年 7 月発効した改正薬事法で “³⁾生物由来製品” については、高度な製造工程管理を必要とすることを踏まえ、製造所における構造設備や製造管理・品質管理の方法(いわゆる GMP) に関し、通常の医薬品・医療機器等における製造基準に加え、厚生労働省令で定める付加的な基準に適合しなければならない⁴⁾ としている。下位の法令は 2005 年 4 月公布予定である。

III 先端的細胞治療開発に対する米国 FDA のかわりかた

米国で細胞治療開発を行う際、研究者や臨床研究医が臨床試験計画書を作成し、GMP 準拠細胞プロセッシングに必要な書類を FDA に提出する。FDA はこれらの治験で使用される治療用細胞を IND として審査すると同時に、施設の査察および GMP 書類作成について指導する。FDA の係官は医薬品 GMP と細胞プロセッシングに必要な GMP との差異を認識し、企業に要求する完成した製品を作製するのに必要な GMP (=full GMP) の内容をもとに、大学などの失念を考慮した実験的治療開発に必要な GMP (=institutional GMP) の作成に協力を惜しまない(図 1)。このように米国では、明確な基準がないために開発研究へのヘクトルが弱まることを懸念し、大学などにおけるあたらしい治療法の開発を積極的に支援するというスタンス(国家戦略)をとっている。

IV わが国における問題点

「GMP 準拠細胞プロセッシングの構築は大学でなく、企業に任せておけば良い」という意見もある。確かに、培養皮膚などすでに臨床応用されているような分野では企業の参入も期待できる。しかし、大学や先端医療センターで開発するのは、基礎研究の成果をもとにした実験的医療段階のものかほとんど、治療法として確立できるかどうか不透明なのか現状である。このような段階で、企業かリスク