

Ⅲ. 平成 16 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 に準拠した培養法の確立

1-1 *ex vivo* 増幅臍帯血の培養法の確立

分担研究者：逢坂 敦

（キリンビール（株）医薬カンパニー生産技術研究所 主任研究員）

研究協力者：鈴木 秀文、小林 典孝

（キリンビール（株）医薬カンパニー生産技術研究所）

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が可能なことが知られている。本分担研究では、昨年度までに、サイトカインと無血清培地を用いて、閉鎖系バッグ培養による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 10,000 個/mL、培養液量 15mL/バッグで培養を開始し、継代を行いながら 12 日間培養する方法を開発した。

本年度は、臨床研究の実施を見据えた本培養方法の試験製造を実施し、製造条件の改変と再現性の確認を行なった。更に、実際の製造で必要となる各種手順書・指示書・記録書の作成を行った。その結果、3 期間に分けて計 8 回試験製造を実施し、12 日間の培養により生細胞数は平均で 58.9 ± 30.2 倍、CD34 陽性細胞数は平均で 21.7 ± 15.1 倍に増幅可能であることを確認した。

A. 研究目的

本研究グループは、SCF、TPO、FL (Flt3/Flk2 リガンド)、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、SCF、TPO、FL (Flt3/Flk2 リガンド)、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報告した。

本年度は、確立された培養法を用いて実際に試験製造を行い、製造条件の改変と製造再現性の確認を実施すると共に、製造で必要となる各種手順書・指示書・記録書の作成を行った。

B. 研究方法

凍結されたヒト臍帯血より CD34 陽性細胞を磁気ビーズ法 (CliniMACS) 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。ガス透過性培養バッグは、VueLife™ (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. 増幅用臍帯血の洗浄

増幅用臍帯血は、ニューヨーク血液セ

ンターにおいて Rubinstein らの確立した方法に準じて、保護剤として Dextran 40 及びヒト血清アルブミンを含む生理食塩液を用いて洗浄を実施した。

2. CD34 陽性細胞の分離

洗浄臍帯血からの CD34 陽性細胞の分離には CliniMACS 磁気細胞分離システムを用いた。洗浄臍帯血中の CD34 陽性細胞を CliniMACS の CD34 試薬と反応させ、磁気標識した。この細胞を CliniMACS 装置に供し、自動分離プログラムを作動させることにより CD34 陽性細胞を分離した。取り扱い方法の詳細は、CliniMACS 磁気分離細胞システムの標準作業手順書に従って実施した。

3. CD34 陽性細胞の *ex vivo* 増幅培養

分離した CD34 陽性細胞の *ex vivo* 増幅培養は SCF、TPO、FP6、FL それぞれ 100ng/ml を含む QBSF-60 培地を用いて行った。培養は、ガス透過性のテフロン製バッグ (American Fluoroseal 社製) に細胞を充填して閉鎖的に実施し、CD34 陽性細胞数で約 10,000 個/mL の濃度から開始した。1 バッグあたり、15mL の培養液から開始し、4 日目に 2 倍、7 日目に 2 倍、更に 10 日目に 2 倍に拡張培養を行い、最終的に 120mL の培養液量とした。1 回の製造で培養に使用するバッグの数は、分離された CD34 陽性細胞数に合わせて設定した。尚、第 2 期以降の試験製造においては、使用する QBSF-60 培地について所定の受入れ検査を実施し、決められた規格値を満たした製造ロットのみを使用した。

4. 増幅細胞の洗浄及び製剤化

複数の培養バッグから培養液を1つの輸注用バッグに集め、自動細胞洗浄装置セルウォッシャーACP215を使用して余剰のサイトカインや培地成分を除去した。最終的に0.5%ヒト血清アルブミン含有生理食塩液100mLに懸濁し、輸注用バッグに充填して製品とした。

C. 研究結果

試験製造は、3回の期間に分けて実施し、第1期の試験製造において試験番号KCK016~018の3回、第2期の試験製造において試験番号KCK044~046の3回、第3期の試験製造において試験番号KCK050~052の3回、計9回の試験製造を実施した。この内、第3期の試験製造において、実際の製造に近い条件で試験を実施する目的で、臍帯血バンクに実際に登録され品質が保証された凍結臍帯血（6ヵ月後の追跡調査結果により不合格となった臍帯血）を用いた試験製造を実施した。

各試験製造におけるの培養条件は（表-1）に示した通りであり、第1期の試験製造においては、培養の再現性を確認するために細胞濃度を 1×10^4 個/mLに固定し、各試験製造で3つのバッグを用いて培養を実施した。第2期目の試験製造では、細胞濃度を $2.0 \sim 1.5 \times 10^4$ 個/mLの範囲で変動させて試験製造を行った。第3期の試験製造においては、細胞濃度を 1×10^4 個/mL前後に固定し、臍帯血バンクで保存された臍帯血を原料にして製造を実施した。

尚、第3期の製造番号KCK-051の試験

製造ではCD34陽性細胞の分離工程まで実施したが、品質管理試験が適切でなかった為、培養工程以降は実施しなかった。

1. 製造に使用した臍帯血の解析

9例の凍結臍帯血について、解凍直後の有核細胞数、CD34陽性細胞数および細胞生存率等を測定した結果を（表-2）に示す。有核細胞中に存在するCD34細胞の割合（CD34⁺細胞純度）は $0.47 \pm 0.21\%$ となり、凍結臍帯血の検体ごとに大きな差異が認められた。また、CD34陽性細胞数について、臍帯血バンクにおける凍結前の測定値と試験製造における解凍後の測定値を比較した結果を（表-3）に示す。CD34陽性細胞数は解凍後の測定値では平均で40%程度に減少していた。

2. CD34陽性細胞の分離工程

9例の凍結臍帯血からCliniMACSを用いてCD34陽性細胞を分離した。その結果を（表-4A）に示す。解凍直後のCD34陽性細胞数を100%とした場合、CliniMACSを用いて分離し、最終的に培養液中に回収されたCD34陽性細胞は $47.2 \pm 22.0\%$ となった。CliniMACSに供するCD34陽性細胞数が少ないと回収率も低下する。試験製造の結果から、原料中のCD34陽性細胞数が1,500,000個未満の場合と1,500,000個以上の場合に分けて回収率を算出すると（表-4B）、（表-4C）の通りである。原料中のCD34陽性細胞数が1,500,000個未満の場合には回収率は $29.2 \pm 10.6\%$ となり、回収率は原料中に含まれるCD34陽性細胞数に大きな影響を受けることが認められた。

また、CD34 陽性細胞の純度は $42.8 \pm 12.1\%$ となり、CD34 陽性細胞以外の細胞の混入が認められたが、この純度の CD34 陽性細胞でも増幅培養は十分に可能であった。

3. 培養工程

① 培養 7 日目の増幅効率

CliniMACS を用いて分離した CD34 陽性細胞を用いて培養を行った。KCK016～018 の 3 回の製造では細胞濃度を 1×10^4 個/mL に固定して培養を開始し、7 日目に 15mL から 60mL の拡張操作を行った。その際に実施した品質試験の結果を（表-5A）に示す。7 日間の培養の結果、培養開始時から比較して細胞数は 8.8 ± 1.5 倍、CD34 陽性細胞数は 5.3 ± 1.4 倍、CD34 陽性 CD38 陰性細胞数は 243.3 ± 86.3 倍に増幅された。

同様に KCK044～046 の 3 回の製造では細胞濃度を $2 \sim 1.5 \times 10^4$ 個/mL に変動させて培養を開始し、4 日目に 15mL から 30mL の拡張操作を行い、更に 7 日目に 30mL から 60mL の拡張操作を行った。その際に実施した品質試験の結果を（表-5B）に示す。7 日間の培養の結果、培養開始時から比較して細胞数は 8.3 ± 1.2 倍、CD34 陽性細胞数は 6.0 ± 1.1 倍、CD34 陽性 CD38 陰性細胞数は 73.5 ± 44.6 倍に増幅された。

更に KCK050 および KCK052 の 2 回の製造では実際の製造を想定し、細胞濃度を 1.0×10^4 個/mL を目標値として、分離された CD34 陽性細胞の全量を使用して培養を実施した。4 日目に 15mL から 30mL の拡張操作を行い、更に 7 日目に 30mL から

60mL の拡張操作を行った。その際に実施した品質試験の結果を（表-5C）に示す。7 日間の培養の結果、培養開始時から比較して細胞数は平均で 12.7 倍、CD34 陽性細胞数は 9.6 倍に増幅された。

② 培養 12 日目の増幅効率

更に培養を継続し、10 日目に 60mL から 120mL の拡張操作を行い、12 日目まで培養を継続した。12 日目に細胞を回収し、洗浄前の培養細胞について品質試験を実施した。KCK016～018 の結果を（表-6A）に、KCK044～046 の結果を（表-6B）に、KCK050 および 052 の結果を（表-6C）にそれぞれ示す。KCK016～018 において、培養開始時から比較して細胞数は 99.1 ± 6.8 倍、CD34 陽性細胞数は 26.5 ± 3.8 倍、CD34 陽性 CD38 陰性細胞数は 1538.7 ± 642.4 倍に増幅された。

同様に KCK044～046 において、培養開始時から比較して細胞数は 40.3 ± 11.2 倍、CD34 陽性細胞数は 17.2 ± 5.8 倍、CD34 陽性 CD38 陰性細胞数は 299.8 ± 269.8 倍に増幅された。

更に KCK050 および KCK052 において、培養開始時から比較して細胞数は平均 61.8 倍、CD34 陽性細胞数は平均 35.2 倍に増幅された。

④ 洗浄工程

余剰のサイトカインや培地成分等を除くために自動細胞洗浄装置 ACP215 を用いて細胞洗浄を行った。KCK016～018 においては、最終的に 2.5% ヒト血清アルブミン含有生理食塩液に細胞を懸濁し、最終製品とした。一方、KCK044～046 にお

いては、洗浄条件の変更を行い、最終的に 0.5%ヒトアルブミン含有生理食塩液に細胞を懸濁し、最終製品とした。最終製品の細胞懸濁液の一部を用いて品質試験を実施し、洗浄前後における細胞の回収率を算出した結果を(表-7A)、(表-7B)、および(表-7C)に示す。KCK016~018における洗浄操作前後における生細胞の回収率は $87.9 \pm 7.0\%$ であり、CD34 陽性細胞の回収率は $90.3 \pm 7.8\%$ と算出された。一方、KCK044~046における洗浄操作前後における生細胞の回収率は $88.6 \pm 3.6\%$ であり、CD34 陽性細胞の回収率は $94.6 \pm 23.0\%$ と算出された。更に KCK050 および 052 における洗浄操作前後における生細胞の回収率は平均 85.8% であり、CD34 陽性細胞の回収率は平均 96.4% と算出された。

また、洗浄細胞の細胞生存率は、KCK016~018 において $97.9 \pm 0.8\%$ 、KCK044~046 において $95.4 \pm 1.1\%$ 、KCK050 および 052 において平均 98.4% と非常に高く、洗浄によって細胞が損傷を受けていないと推定された。

⑤最終製品

試験製造により得られた *ex vivo* 増幅臍帯血の最終製品について品質試験を実施した。生細胞数、細胞生存率、並びに CD34 陽性細胞数の測定結果を(表-8A)、(表-8B) および(表-8C)に示す。

KCK016~018 では、生細胞数は 86.3 ± 18.5 倍、CD34 陽性細胞数は 23.8 ± 6.2 倍、CD34 陽性 CD38 陰性細胞は 1710.2 ± 662.1 倍に増幅した。細胞生存率は $97.9 \pm 0.8\%$ であった。

KCK044~046 では、生細胞数は

36.9 ± 11.9 倍、CD34 陽性細胞数は 16.5 ± 6.8 倍、CD34 陽性 CD38 陰性細胞は 316.7 ± 276.3 倍に増幅した。細胞生存率は $95.4 \pm 1.1\%$ であった。

更に KCK050 および 052 では、生細胞数は平均 50.7 倍、CD34 陽性細胞数は平均 32.3 倍に増幅し、細胞生存率は平均 98.4% であった。

尚、KCK052 において、増幅率の低下が観察された。この原因の究明を行った結果、培養バッグに混入した CliniMACS PBS/EDTA Buffer に原因があることが判明した。そこで、CliniMACS PBS/EDTA Buffer の洗浄工程を改良し、それに合わせて標準作業手順を変更した。

最後にこれまで実施した 3 期間の試験製造の結果を(表-9)に示す。計 8 回の培養を実施し、生細胞数は 58.9 ± 30.2 倍、CD34 陽性細胞数は 21.7 ± 15.1 倍と算出された。

D. 考察

本研究の結果、実際の臨床研究を見据えた製造方法により CD34 陽性細胞を平均で 20 倍以上増幅できることが示された。この値は、これまで基礎検討してきた結果に合致するものであり、本製造方法の再現性が高いことが示唆される。

一方、CliniMACS を用いた凍結臍帯血からの CD34 陽性細胞の回収率、或るいは増幅率が原料中に含まれる CD34 陽性細胞数に大きな影響を受けることも認められた。このことは、安定した製造を実施する為には、原料となる凍結臍帯血の受け入れ基準を設定することが必要であることを示唆している。また、使用した臍

帯血により凍結前に測定した CD34 陽性細胞数と解凍後に測定した CD34 陽性細胞数との間に乖離が認められた。このことは、解凍後の臍帯血の受け入れ基準も設定することも必要であることを示唆している。これらの基準は、今後、策定する規格書等に反映させていく予定である。

更に実際の臨床研究においては、GMP に準拠した製造を実施する予定であり、各種作業手順書に従った製造施設の整備・管理と製造体制の整備を継続して進めていく予定である。特に製造施設の管理と GMP に準拠した製造管理には、作業者の教育訓練が重要である。

E. 結論

ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞の体外増幅法の開発を行い、計 8 回試験製造を

実施した。その結果、生細胞数は 58.9 ± 30.2 倍、CD34 陽性細胞数は 21.7 ± 15.1 倍に増幅することを確認した。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表

無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

無し

(表-1) 試験製造の培養条件

| 試験番号 | 培養開始時 | | 細胞継代法 | |
|--------|----------------|-------------|------------------------------|-----------------|
| | 培養濃度 (個/mL) | バッグ数 (個) | CD34 ⁺ 細胞数 (個) | 継代日(稀釈率) |
| KCK016 | 10,000 | 3 | 450,000 | 7日(4倍), 10日(2倍) |
| KCK017 | 10,000 | 3 | 450,000 | 7日(4倍), 10日(2倍) |
| KCK018 | 10,000 | 3 | 450,000 | 7日(4倍), 10日(2倍) |
| KCK044 | 20,000 | 1 | 310,000 | 4, 7, 10日(各2倍) |
| KCK045 | 18,000 | 2 | 563,000 | 4, 7, 10日(各2倍) |
| KCK046 | 15,000 | 5 | 1,170,000 | 4, 7, 10日(各2倍) |
| KCK050 | 11,200 | 4 | 704,000 | 4, 7, 10日(各2倍) |
| KCK052 | 13,100 | 1 | 226,000 | 4, 7, 10日(各2倍) |

(表-2) 製造に使用した凍結臍帯血の性状

| 試験番号 | 製造に使用した凍結臍帯血 | | | |
|--------|--------------|-----------------------------|-------------------------------|------------|
| | 有核細胞 (個) | CD34 ⁺ 細胞 (個) | CD34 ⁺ 細胞純度 (%) | 生存率 (%) |
| KCK016 | 655,000,000 | 2,190,000 | 0.47 | 85.1 |
| KCK017 | 454,000,000 | 3,100,000 | 0.84 | 81.0 |
| KCK018 | 439,000,000 | 2,230,000 | 0.38 | 98.4 |
| KCK044 | 666,000,000 | 1,440,000 | 0.22 | 90.7 |
| KCK045 | 900,000,000 | 1,460,000 | 0.32 | 92.6 |
| KCK046 | 714,000,000 | 2,440,000 | 0.73 | 88.8 |
| KCK050 | 325,000,000 | 1,820,000 | 0.56 | 72.4 |
| KCK051 | 231,000,000 | 852,000 | 0.37 | 25.0 |
| KCK052 | 245,000,000 | 777,000 | 0.32 | 39.7 |
| 平均 | — | — | 0.47 | 74.9 |
| SD | — | — | 0.21 | 25.5 |

(表-3) 凍結前の測定値(臍帯血バンク)と解凍後測定値の比較

| 試験番号 | 凍結前測定値 | | 解凍後測定値 | | |
|--------|--------------|------------------------------|--------------|------------------------------|---------------------------------|
| | 有核細胞数 (個) | CD34 ⁺ 細胞数 (個) | 有核細胞数 (個) | CD34 ⁺ 細胞数 (個) | CD34 ⁺ 細胞数 保持率(%) |
| KCK050 | 946,000,000 | 6,970,000 | 678,000,000 | 3,790,000 | 54.4 |
| KCK051 | 781,000,000 | 6,320,000 | 466,000,000 | 1,720,000 | 27.2 |
| KCK052 | 83,800,000 | 4,020,000 | 50,800,000 | 1,610,000 | 40.0 |
| 平均 | — | — | — | — | 40.5 |
| SD | — | — | — | — | 13.6 |

(表-4A) CliniMACS を用いた CD34 陽性細胞の分離効率

| 試験番号 | 培養液懸濁後 | | | |
|--------|------------------------------|------------|-------------------------------|------------|
| | CD34 ⁺ 細胞数 (個) | 回収率 (%) | CD34 ⁺ 細胞純度 (%) | 生存率 (%) |
| KCK016 | 1,190,000 | 54.1 | 62.6 | 43.7 |
| KCK017 | 2,460,000 | 79.4 | 35.8 | 35.8 |
| KCK018 | 1,740,000 | 78.0 | 79.4 | 47.6 |
| KCK044 | 352,000 | 24.6 | 25.3 | 11.5 |
| KCK045 | 650,000 | 44.5 | 37.5 | 41.6 |
| KCK046 | 1,410,000 | 57.9 | 50.5 | 33.9 |
| KCK050 | 763,000 | 38.7 | 60.2 | 23.9 |
| KCK051 | 186,000 | 20.3 | 37.7 | 23.7 |
| KCK052 | 242,000 | 27.3 | 45.3 | 10.7 |
| 平均 | — | 47.2 | 42.8 | 24.2 |
| SD | — | 22.0 | 12.1 | 12.2 |

(表-4B) 出発原料中の CD34 陽性細胞が 1,500,000 個未満の場合の分離効率

| 試験番号 | 培養液懸濁後 | | | |
|--------|------------------------------|------------|-------------------------------|------------|
| | CD34 ⁺ 細胞数 (個) | 回収率 (%) | CD34 ⁺ 細胞純度 (%) | 生存率 (%) |
| KCK044 | 352,000 | 24.6 | 25.3 | 11.5 |
| KCK045 | 650,000 | 44.5 | 37.5 | 41.6 |
| KCK051 | 186,000 | 20.3 | 37.7 | 23.7 |
| KCK052 | 242,000 | 27.3 | 45.3 | 10.7 |
| 平均 | — | 29.2 | 36.5 | 21.9 |
| SD | — | 10.6 | 8.3 | 14.4 |

(表-4C) 出発原料中の CD34 陽性細胞が 1,500,000 個以上場合の分離効率

| 試験番号 | 培養液懸濁後 | | | |
|--------|------------------------------|------------|-------------------------------|------------|
| | CD34 ⁺ 細胞数 (個) | 回収率 (%) | CD34 ⁺ 細胞純度 (%) | 生存率 (%) |
| KCK016 | 1,190,000 | 54.1 | 62.6 | 43.7 |
| KCK017 | 2,460,000 | 79.4 | 35.8 | 35.8 |
| KCK018 | 1,740,000 | 78.0 | 79.4 | 47.6 |
| KCK046 | 1,410,000 | 57.9 | 50.5 | 33.9 |
| KCK050 | 763,000 | 38.7 | 60.2 | 23.9 |
| 平均 | — | 61.6 | 60.2 | 23.9 |
| SD | — | 17.2 | 16.1 | 9.2 |

(表-5A) 培養 7 日目の増幅効率(試験製造番号:KCK016~018)

| 試験番号 | 培養開始時 | | 培養7日目終了時 | | | | | | | |
|--------|------------------------------|------------|-----------|--------|----------------------|--------|--|--------|---|--------|
| | CD34 ⁺ 細胞数 (個) | 生存率 (%) | 生細胞 | | CD34 ⁺ 細胞 | | CD34 ⁺ CD38 ⁺ 細胞 | | CD34 ⁺ CD133 ⁺ 細胞 | |
| | | | 細胞数(個) | 増幅率(倍) | 細胞数(個) | 増幅率(倍) | 細胞数(個) | 増幅率(倍) | 細胞数(個) | 増幅率(倍) |
| KCK016 | 450,000 | 88.0 | 4,070,000 | 9.0 | 2,430,000 | 5.4 | 1,160,000 | 273.7 | 1,530,000 | 4.2 |
| KCK017 | 450,000 | 88.7 | 4,610,000 | 10.2 | 2,990,000 | 6.6 | 1,830,000 | 310.3 | 2,170,000 | 7.3 |
| KCK018 | 450,000 | 91.6 | 3,260,000 | 7.2 | 1,770,000 | 3.9 | 1,030,000 | 145.9 | 1,480,000 | 4.3 |
| 平均 | - | 89.4 | - | 8.8 | - | 5.3 | - | 243.3 | - | 5.3 |
| SD | - | 1.9 | - | 1.5 | - | 1.4 | - | 86.3 | - | 1.8 |

(表-5B) 培養 7 日目の増幅効率(試験製造番号:KCK044~046)

| 試験番号 | 培養開始時 | | 培養7日目終了時 | | | | | | | |
|--------|------------------------------|------------|-----------|--------|----------------------|--------|--|--------|---|--------|
| | CD34 ⁺ 細胞数 (個) | 生存率 (%) | 生細胞 | | CD34 ⁺ 細胞 | | CD34 ⁺ CD38 ⁺ 細胞 | | CD34 ⁺ CD133 ⁺ 細胞 | |
| | | | 細胞数(個) | 増幅率(倍) | 細胞数(個) | 増幅率(倍) | 細胞数(個) | 増幅率(倍) | 細胞数(個) | 増幅率(倍) |
| KCK044 | 310,000 | 76.3 | 2,190,000 | 7.1 | 1,680,000 | 5.4 | 639,000 | 22.0 | 883,000 | 4.7 |
| KCK045 | 563,000 | 92.9 | 5,380,000 | 9.5 | 4,030,000 | 7.2 | 1,070,000 | 97.3 | 2,560,000 | 8.1 |
| KCK046 | 1,170,000 | 89.1 | 9,810,000 | 8.4 | 6,240,000 | 5.3 | 2,550,000 | 101.2 | 4,030,000 | 4.3 |
| 平均 | - | 86.1 | - | 8.3 | - | 6.0 | - | 73.5 | - | 5.7 |
| SD | - | 8.7 | - | 1.2 | - | 1.1 | - | 44.6 | - | 2.1 |

(表-5C) 培養 7 日目の増幅効率(試験製造番号:KCK050 および 052)

| 試験番号 | 培養開始時 | | 培養7日目終了時 | | | |
|--------|------------------------------|------------|------------|--------|----------------------|--------|
| | CD34 ⁺ 細胞数 (個) | 生存率 (%) | 生細胞 | | CD34 ⁺ 細胞 | |
| | | | 細胞数(個) | 増幅率(倍) | 細胞数(個) | 増幅率(倍) |
| KCK050 | 704,000 | 92.3 | 14,200,000 | 20.2 | 9,860,000 | 14.0 |
| KCK052 | 226,000 | 92.3 | 1,170,000 | 5.2 | 1,190,000 | 5.2 |
| 平均 | - | 92.3 | - | 12.7 | - | 9.6 |

(表-6A) 培養 12 日目の増幅効率(試験製造番号:KCK016~018)

| 試験番号 | 培養開始時 | | 培養12日目終了時(回収後) | | | | | | | |
|--------|------------------------------|------------|----------------|--------|----------------------|--------|--|--------|---|--------|
| | CD34 ⁺ 細胞数 (個) | 生存率 (%) | 生細胞 | | CD34 ⁺ 細胞 | | CD34 ⁺ CD38 ⁺ 細胞 | | CD34 ⁺ CD133 ⁺ 細胞 | |
| | | | 細胞数(個) | 増幅率(倍) | 細胞数(個) | 増幅率(倍) | 細胞数(個) | 増幅率(倍) | 細胞数(個) | 増幅率(倍) |
| KCK016 | 450,000 | 93.4 | 44,600,000 | 99.1 | 12,300,000 | 27.4 | 877,000 | 2074.3 | - | - |
| KCK017 | 450,000 | 93.4 | 47,700,000 | 105.9 | 13,400,000 | 29.8 | 1,010,000 | 1715.3 | - | - |
| KCK018 | 450,000 | 96.5 | 41,600,000 | 92.3 | 10,100,000 | 22.4 | 584,000 | 826.4 | - | - |
| 平均 | - | 94.4 | - | 99.1 | - | 26.5 | - | 1538.7 | - | - |
| SD | - | 1.8 | - | 6.8 | - | 3.8 | - | 642.4 | - | - |

(表-6B) 培養 12 日目の増幅効率(試験製造番号:KCK044~046)

| 試験番号 | 培養開始時 | | 培養12日目終了時(回収後) | | | | | | | |
|--------|------------------------------|------------|----------------|--------|----------------------|--------|--|--------|---|--------|
| | CD34 ⁺ 細胞数 (個) | 生存率 (%) | 生細胞 | | CD34 ⁺ 細胞 | | CD34 ⁺ CD38 ⁺ 細胞 | | CD34 ⁺ CD133 ⁺ 細胞 | |
| | | | 細胞数(個) | 増幅率(倍) | 細胞数(個) | 増幅率(倍) | 細胞数(個) | 増幅率(倍) | 細胞数(個) | 増幅率(倍) |
| KCK044 | 310,000 | 85.1 | 8,530,000 | 27.5 | 4,060,000 | 13.1 | 1,650,000 | 56.8 | 2,660,000 | 14.2 |
| KCK045 | 563,000 | 93.1 | 27,100,000 | 48.2 | 13,400,000 | 23.8 | 6,520,000 | 590.1 | 7,820,000 | 24.8 |
| KCK046 | 1,170,000 | 91.2 | 56,700,000 | 45.3 | 17,200,000 | 14.7 | 6,350,000 | 252.4 | 1,280,000 | 13.6 |
| 平均 | - | 89.8 | - | 40.3 | - | 17.2 | - | 299.8 | - | 17.5 |
| SD | - | 4.2 | - | 11.2 | - | 5.8 | - | 269.8 | - | 6.3 |

(表-6C) 培養 12 日目の増幅効率(試験製造番号:KCK050 および 052)

| 試験番号 | 培養開始時 | | 培養12日目終了時(回収後) | | | |
|--------|--------------------------|---------|----------------|--------|----------------------|--------|
| | CD34 ⁺ 細胞数(個) | 生存率 (%) | 生細胞 | | CD34 ⁺ 細胞 | |
| | | | 細胞数(個) | 増幅率(倍) | 細胞数(個) | 増幅率(倍) |
| KCK050 | 704,000 | 76.3 | 67,300,000 | 95.5 | 41,800,000 | 59.4 |
| KCK052 | 226,000 | 92.3 | 6,340,000 | 28.1 | 2,470,000 | 10.9 |
| 平均 | | 84.3 | - | 61.8 | - | 35.2 |

(表-7A) 細胞洗浄工程における細胞の回収率(試験製造番号:KCK016~018)

| 試験番号 | 洗浄前(サンプリング後) | | | 洗浄後(最終製品) | | | | |
|--------|--------------|--------------------------|---------|------------|------------|--------------------------|-----------------------------|---------|
| | 生細胞数(個) | CD34 ⁺ 細胞数(個) | 生存率 (%) | 生細胞数(個) | 生細胞回収率 (%) | CD34 ⁺ 細胞数(個) | CD34 ⁺ 細胞回収率 (%) | 生存率 (%) |
| KCK016 | 48,000,000 | 13,300,000 | 93.4 | 44,200,000 | 92.1 | 11,300,000 | 85.0 | 98.4 |
| KCK017 | 46,900,000 | 13,200,000 | 93.4 | 43,100,000 | 91.9 | 13,100,000 | 99.2 | 98.3 |
| KCK018 | 36,600,000 | 8,890,000 | 96.5 | 29,200,000 | 79.8 | 7,710,000 | 86.7 | 97.0 |
| 平均 | - | - | 94.4 | - | 87.9 | - | 90.3 | 97.9 |
| SD | - | - | 1.8 | - | 7.0 | - | 7.8 | 0.8 |

(表-7B) 細胞洗浄工程における細胞の回収率(試験製造番号:KCK044~046)

| 試験番号 | 洗浄前(サンプリング後) | | | 洗浄後(最終製品) | | | | |
|--------|--------------|--------------------------|---------|------------|------------|--------------------------|-----------------------------|---------|
| | 生細胞数(個) | CD34 ⁺ 細胞数(個) | 生存率 (%) | 生細胞数(個) | 生細胞回収率 (%) | CD34 ⁺ 細胞数(個) | CD34 ⁺ 細胞回収率 (%) | 生存率 (%) |
| KCK044 | 6,080,000 | 2,890,000 | 85.1 | 5,140,000 | 84.5 | 2,050,000 | 70.9 | 95.7 |
| KCK045 | 24,700,000 | 12,200,000 | 93.1 | 22,200,000 | 89.9 | 11,700,000 | 95.9 | 96.3 |
| KCK046 | 54,200,000 | 16,500,000 | 91.2 | 49,600,000 | 91.5 | 19,300,000 | 117.0 | 94.1 |
| 平均 | - | - | 89.8 | - | 88.6 | - | 94.6 | 95.4 |
| SD | - | - | 4.2 | - | 3.6 | - | 23.0 | 1.1 |

(表-7C) 細胞洗浄工程における細胞の回収率(試験製造番号:KCK050 および 052)

| 試験番号 | 洗浄前(サンプリング後) | | | 洗浄後(最終製品) | | | | |
|--------|--------------|--------------------------|---------|------------|------------|--------------------------|-----------------------------|---------|
| | 生細胞数(個) | CD34 ⁺ 細胞数(個) | 生存率 (%) | 生細胞数(個) | 生細胞回収率 (%) | CD34 ⁺ 細胞数(個) | CD34 ⁺ 細胞回収率 (%) | 生存率 (%) |
| KCK050 | 67,300,000 | 41,800,000 | 96.2 | 56,900,000 | 84.6 | 39,500,000 | 94.3 | 96.7 |
| KCK052 | 6,340,000 | 2,470,000 | 98.1 | 5,500,000 | 86.9 | 2,430,000 | 98.5 | 100.0 |
| 平均 | - | - | 97.2 | - | 85.8 | - | 96.4 | 98.4 |

(表-8A) 最終製品の増幅効率(試験製造番号:KCK016~018)

| 試験番号 | 培養開始時 | | 最終製品 | | | | | | | |
|--------|--------------------------|---------|------------|--------|----------------------|--------|--|--------|---|--------|
| | CD34 ⁺ 細胞数(個) | 生存率 (%) | 生細胞 | | CD34 ⁺ 細胞 | | CD34 ⁺ CD38 ⁺ 細胞 | | CD34 ⁺ CD133 ⁺ 細胞 | |
| | | | 細胞数(個) | 増幅率(倍) | 細胞数(個) | 増幅率(倍) | 細胞数(個) | 増幅率(倍) | 細胞数(個) | 増幅率(倍) |
| KCK016 | 450,000 | 98.4 | 44,200,000 | 98.1 | 11,300,000 | 25.1 | 8,140,000 | 1924.3 | 8,670,000 | 24.0 |
| KCK017 | 450,000 | 98.3 | 43,100,000 | 95.7 | 13,100,000 | 29.2 | 9,470,000 | 2238.9 | 4,800,000 | 13.3 |
| KCK018 | 450,000 | 97.0 | 29,200,000 | 65.0 | 7,710,000 | 17.1 | 4,090,000 | 967.6 | 4,660,000 | 12.9 |
| 平均 | - | 97.9 | - | 86.3 | - | 23.8 | 7,233,333 | 1710.3 | 6,043,333 | 16.7 |
| SD | - | 0.8 | - | 18.5 | - | 6.2 | 2,802,255 | 662.1 | 2,275,837 | 6.3 |

(表-8B) 最終製品の増幅効率(試験製造番号:KCK044~046)

| 試験番号 | 培養開始時 | | 最終製品 | | | | | | | |
|--------|--------------------------|--------|------------|--------|----------------------|--------|--|--------|---|--------|
| | CD34 ⁺ 細胞数(個) | 生存率(%) | 生細胞 | | CD34 ⁺ 細胞 | | CD34 ⁺ CD38 ⁺ 細胞 | | CD34 ⁺ CD133 ⁺ 細胞 | |
| | | | 細胞数(個) | 増幅率(倍) | 細胞数(個) | 増幅率(倍) | 細胞数(個) | 増幅率(倍) | 細胞数(個) | 増幅率(倍) |
| KCK044 | 310,000 | 95.7 | 7,200,000 | 23.2 | 2,870,000 | 9.3 | 1,170,000 | 40.2 | 1,550,000 | 8.3 |
| KCK045 | 563,000 | 96.3 | 24,400,000 | 43.3 | 12,900,000 | 22.9 | 6,550,000 | 592.8 | 7,400,000 | 23.5 |
| KCK046 | 1,170,000 | 94.1 | 51,800,000 | 44.3 | 20,200,000 | 17.2 | 7,970,000 | 317.0 | 15,300,000 | 16.2 |
| 平均 | - | 95.4 | - | 36.9 | - | 16.5 | - | 316.7 | - | 16.0 |
| SD | - | 1.1 | - | 11.9 | - | 6.8 | - | 276.3 | - | 7.6 |

洗浄操作前に実施したサンプリング操作による細胞損失を補正するために、実測値に次の計数を乗じる補正を行っている。KCK-044: 1.402 倍、KCK-045: 1.098 倍、KCK-046: 1.045 倍

(表-8C) 最終製品の増幅効率(試験製造番号:KCK050 および 052)

| 試験番号 | 培養開始時 | | 12日目 | | | |
|--------|--------------------------|--------|------------|--------|----------------------|--------|
| | CD34 ⁺ 細胞数(個) | 生存率(%) | 生細胞 | | CD34 ⁺ 細胞 | |
| | | | 細胞数(個) | 増幅率(倍) | 細胞数(個) | 増幅率(倍) |
| KCK050 | 704,000 | 96.7 | 55,400,000 | 78.7 | 3,840,000 | 54.6 |
| KCK052 | 226,000 | 100.0 | 5,100,000 | 22.6 | 225,000 | 10.0 |
| 平均 | - | 98.4 | - | 50.7 | - | 32.3 |

(表-9) 最終製品の増幅効率(全試験製造)

| 試験番号 | 最終製品(サンプリング後) | | 最終製品(サンプリング後) | | 生存率(%) |
|--------|---------------|--------|--------------------------|--------|--------|
| | 生細胞数(個) | 増幅率(倍) | CD34 ⁺ 細胞数(個) | 増幅率(倍) | |
| KCK016 | 44,200,000 | 98.1 | 11,300,000 | 25.1 | 98.4 |
| KCK017 | 43,100,000 | 95.7 | 13,100,000 | 29.2 | 98.3 |
| KCK018 | 29,200,000 | 65.0 | 7,710,000 | 17.1 | 97.0 |
| KCK044 | 7,200,000 | 23.2 | 2,520,000 | 8.1 | 95.7 |
| KCK045 | 24,400,000 | 43.3 | 1,010,000 | 18.0 | 96.3 |
| KCK046 | 51,800,000 | 44.3 | 13,800,000 | 11.8 | 94.1 |
| KCK050 | 55,400,000 | 78.7 | 3,840,000 | 54.6 | 96.7 |
| KCK052 | 5,100,000 | 22.6 | 225,000 | 10.0 | 100.0 |
| 平均 | - | 58.9 | - | 21.7 | 97.1 |
| SD | - | 30.2 | - | 15.1 | 1.8 |

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

1. GMP に準拠した培養法の確立

1-2 完全無血清培地の開発

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）

分担研究者：伊藤 仁也

（先端医療センター再生医療研究部主任研究員）

研究要旨

細胞治療、再生医療における細胞プロセッシング(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完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-3 ligand), 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 などの幹細胞の未成熟の検討および、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。

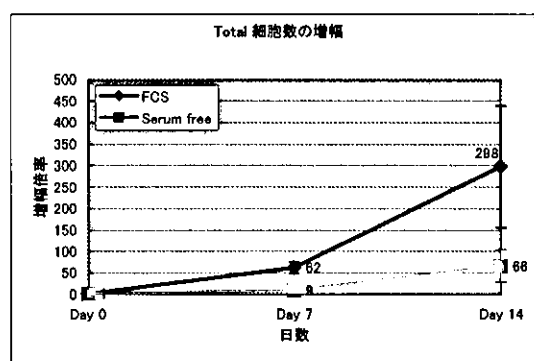


Fig1-1

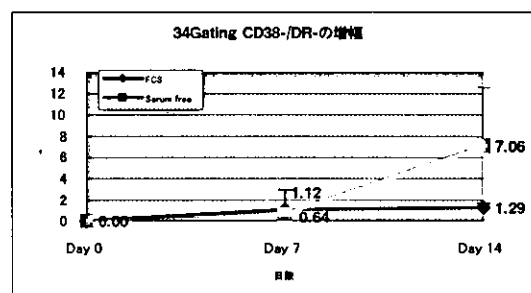


Fig1-2

全体の細胞増幅率においては、有血清培養法の法が優るが、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

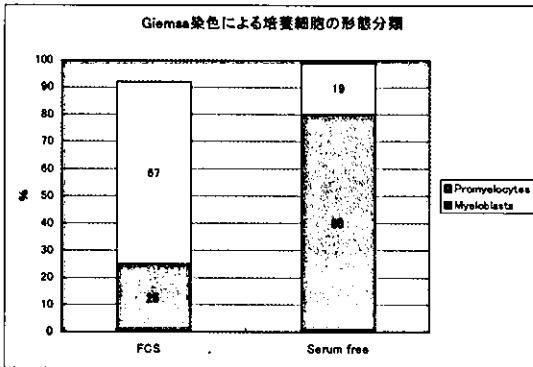


Fig-2

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

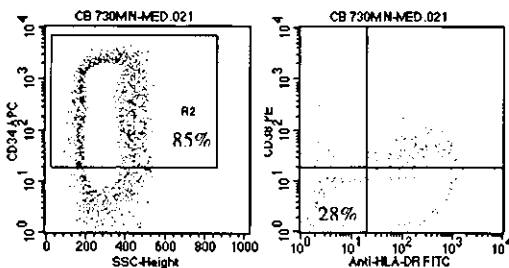


Fig 3-1 Serum free

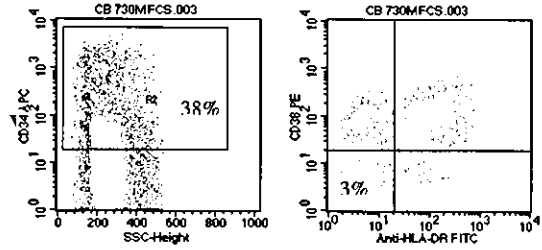


Fig 3-2 FCS

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) Lineage marker 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

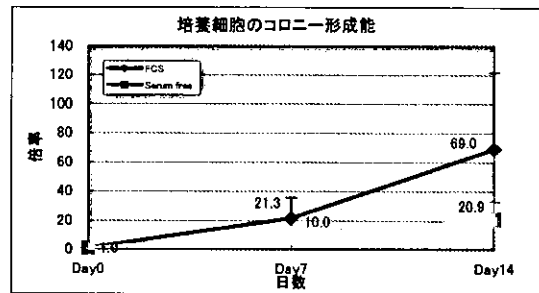


Fig 4-1 Expand rate of total colony

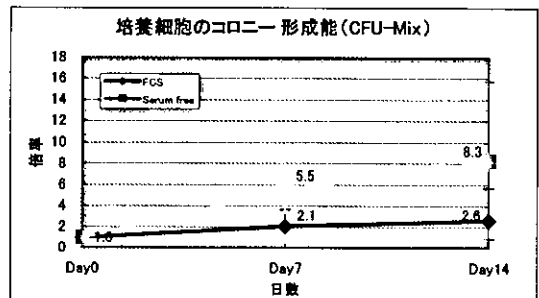


Fig 4-2 Expand rate of Mix colony

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が上回るが、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。

(E) 造血再構築能の確認

NOD/SCID マウス移植系におけるヒト細胞の生着を経時的に解析することにより、ヒト造血機能動態を観察した。表面抗原解析のドットプロットを Fig5-1 に示した。

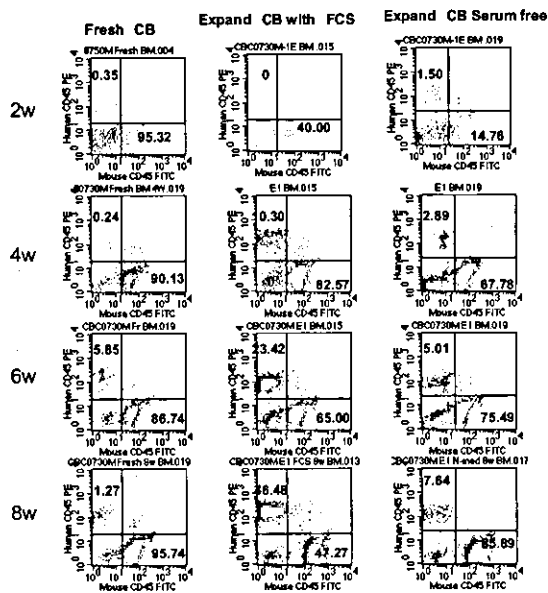


Fig5-1

早期にはFreshと無血清が移植後2週目に生着が確認された。しかし4週目以降は有血清のキメリズムが高い値を示した。

さらに、このヒト細胞生着マウスの骨髄を採取し、2nd BMTを行い、ヒト造血機能動態を観察した。表面抗原解析のドットプロットを Fig5-2 に示した。

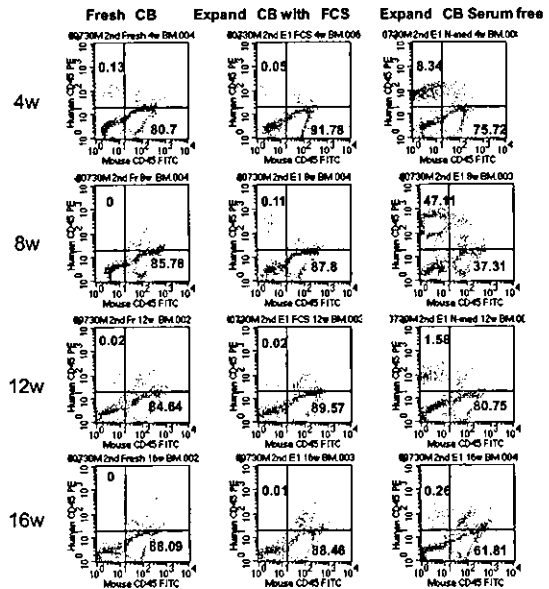


Fig5-2

2nd BMT で生着する造血幹細胞はより未熟性、未分化性を有しているとされている。結果、移植後4週目では全てのマウスに生着が確認されたが、週数を重ねるとヒト血液細胞が拒絶されることが確認された。しかし、無血清では16週目でもキメリズムが確認できた。

E. 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ができることが確認された。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ている。

H. 特許

造血幹細胞・造血前駆細胞の増幅方法
特願 2004-13291

F. 健康危険情報

特記すべきことはない。

G. 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. 学会発表

(1) 伊藤 仁也、中畑 龍俊 造血幹
細胞の体外増幅の基盤整備;平成15年度
厚生労働科学研究ヒトゲノム・再生医療
等研究事業 合同公開シンポジウム
シンポジウム 2004. 2. 28 東京

(2) 伊藤 仁也 造血幹細胞を用いた
再生医療のための基盤整備;第107回本
小児血液学会総合シンポジウム;
2004. 4. 9 岡山

(3) 伊藤 仁也 臍帯血造血幹細胞の
体外増幅;第27回日本造血細胞移植学会
シンポジウム 2004. 12. 16 岡山

(4) 臍帯血造血幹細胞の増幅培養系に
おける完全無血清培地の性能評価
初山 麻子、伊藤 仁也、田中 宏和、
中畑 龍俊
第 27 回日本造血細胞移植学会総会
2004. 12. 16 岡山

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
（京都大学輸血部 教授）

研究要旨

近年、造血器幹細胞移植、細胞移入免疫療法、遺伝子治療、再生医療などを含む細胞治療の開発研究が盛んに進められている。細胞治療には、細胞プロセッシング (Cell Processing) という細胞の調整、培養、加工などの工程が必要となるが、これらの工程には安全性と信頼性を担保する目的で GMP に準拠した品質管理が必要とされている。細胞治療に関する基礎研究の成果を新しい治療法として臨床応用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）にも、GMP に準拠した細胞プロセッシングが必要不可欠である。今後、わが国でも細胞治療を発展させるためには、インフラや規則などの環境整備が急務である。

A. 研究目的

ヒトの身体を構成している細胞や組織を利用して医療に用いる細胞治療の開発研究が盛んに進められている。細胞治療とはヒト由来の細胞を輸注、移植することによって行う治療法の総称であり、造血器幹細胞移植、細胞移入免疫療法、遺伝子治療、再生医療などがこれに含まれる。従来から行われている輸血治療はその原型と言える。

細胞治療には、細胞プロセッシング (Cell Processing) という細胞の調整、培養、加工などの工程が必要となる。細胞治療に用いられる組織や細胞は、医薬品や治験薬の製造と同等の安全性と高い品質管理が要求されるのは必然的なことである。欧米では細胞自体を治療に応用しようとするトランスレーショナルリサーチ (Translational Research) に GMP 準拠の細胞プロセッシングが必須とされているが、わが国においては細胞プロセッシングに対する規制の整備がいまだ不十分であるのが現状である。

今後、わが国でも細胞治療や再生治療に関する基礎研究の成果を新しい治療法として臨床応用をめざして開発しようとするトランスレーショナルリサーチを進める上でも GMP に準拠した細胞プロセッシングが必要不可欠となる。安全性を確保しながら信頼性の高い細胞プロセッシングを実施するために、国内でも早急な環境整備が求められる。本研究は、わが国における細胞治療、再生治療などのヒト細胞を治療にもちいる先端医療開発

を進めるために整備しなければならないインフラストラクチャーをどのように構築すべきかについて道筋を示すことを目的とした。

GMP

GMP (Good Manufacturing Practice) とは医薬品などの製造管理および品質管理に関する国際基準である。医薬品では、研究開発段階から生産→流通→使用されるまでの一貫した品質の保障管理体制が要求されており、前臨床段階での安全性試験の実施については GLP (Good Laboratory Practices)¹⁾が制定され、臨床試験研究実施の際のルールとしては ICH-GCP (International Conference on Harmonization - Good Clinical Practices)²⁾を遵守しなければならない。

現在、GMP は医薬品や治験薬だけでなく医薬部外品の一部や医療用具に対しても法制化が進められている。生物学的製剤 (ヒトやその他の植物を除く生物に由来するものを原材料として製造される医薬品等で厚生労働大臣が告示するもの) 等については、平成 9 年に『『生物学的製剤等の製造管理及び品質管理基準』及び『生物学的製剤等の製造所の構造設備規準』 (生物学的製剤等 GMP) について』として薬発第 506 号が出されている。また、ヒト細胞・組織医薬品 GMP は「細胞・組織医薬品等の取り扱いおよび使用に関する基本的考え方 (薬務公報第 1867 号別添 1、平成 13 年 2 月 21 日)」および「ヒト由来細胞・組織加工医薬品等の品質および安

全性の確保に関する指針（同別添 2）」として示されている。さらに、平成 15 年 7 月から施行されている改正薬事法で定められた「特定生物由来製品」（生物由来製品のうちヒト由来のもの）や「生物学的製剤等」についても、医薬品と同様の安全性と信頼性が求められており、この改正薬事法では生物由来製品の特性に応じた付加的な基準も設けられている。しかし、これらに関連した下位の法令は平成 17 年 4 月に公布される予定であり、わが国の細胞治療に関する規制や関連指針の整備はいまだ不十分である。

米国では治療用ヒト細胞の作製は、2001 年 1 月に FDA(Food and Drug Administration) が提言した cGTP(current Good Tissue Practice : Current Good Tissue Practice for Manufacturers of Human Cellular and Tissue - Based Products; Inspection and Enforcement; Proposed Rule) [<http://www.fda.gov/cber/rules/gtp010801pr.pdf>] に準拠して行わねばならないとしている。cGTP は主に細胞治療による感染症の伝播を危惧したものであり、その防止策に関するルールや規制を記載したものである。

B. 研究方法

分担研究者が、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

I. GMP の規制を受ける細胞操作

GMP の規制を受ける細胞操作とは、一体どの様なものであろうか。米国 FDA は、細胞操作が最低限度 (minimally manipulated) である場合には特に規制の対象とならないが、それを上まわる有意な操作が行われる場合 (more than minimally manipulated) には規制の対象となり、FDA の承認が必要であるとしている。

” minimally manipulated ” の定義は、「操作がその組織の本来の性質 (=再生や修復の機能をつかさどる能力に関する性能) を損なわない場合」とされている。また、” more than minimally manipulated ” は、細胞を培養したり、骨髄細胞から血管内皮細胞を分離・培養したり、またサイトカインなどを用いてある細胞分画を増幅させたり、樹状細胞や抗原特異的細胞障害性 T 細胞の培養、遺伝子導入、脾臓ランゲルハンス島細胞を分離して門脈経路で肝臓に移植したりする場合などがこの範疇に含まれる。当然、将来的には ES 細胞をもちいた再生治療も含まれよう。

細胞治療に関連する細胞プロセッシングの課程で、細胞機能をいかに保ち、その安全性と品質を維持し、保証するかが重要な問題となってきている。細胞治療に関するガイドラインもその根

底には GMP があり、GMP はこれらガイドラインの必須の要件として機能している。

II. Full GMP と Institutional GMP

医薬品 GMP では医薬品の製造を行う際に、原料の受け入れから最終製品の出荷に至る全行程について、高い品質を保証するために、管理組織、製造管理、品質管理、および構造設備の面で種々の方策が定められており、以下の基本的な三つの要件を満たさなければならない。

- ① 人為的な誤りを最小限にすること
- ② 医薬品に対する汚染および品質低下を防止すること
- ③ 高品質を保証するシステムの設計

これらは、さらに管理面 (GMP ソフト) と構造機能面 (GMP ハード) に分けられる。これらの要件が細胞プロセッシングを行う際にも必要であると考えられる。

医薬品 GMP など企業等が業 (なりわい) として行うものに要求される GMP を full GMP とすれば、大学や研究所附属病院で行われる探索的臨床試験研究に要求される GMP は institutional GMP といえる。企業が医薬品を製造し販売する事業に対して、大学の附属病院などで行われる臨床試験研究を比較すれば、大学では人的資源や運用資金において制限があることは明らかである。そのような制限を考慮すれば研究者や臨床研究医自らがそのスタンダードを構築する institutional GMP の必然性が理解できる。Full GMP と Institutional GMP にはいくつかの相違点がある。いずれの GMP もその目的は「最

終産物の安全性と信頼性の担保」であるが、Full GMP では違反や不備があれば製造中止命令や罰則を受けるが、institutional GMP では改善するように勧告を受けることになる。また、バリデーションについて、institutional GMP では治験開発段階の目的に応じたバリデーションを実施すればよいと考える。

III. 細胞プロセッシングセンターの基準

GMP ハード (構造機能面) の要件を満たすためには、細胞プロセッシングを行うためのクリーンルームを備えた専用の施設 (細胞プロセッシングセンター : CPC) の構築が必要となる。

平成 14 年度厚生労働科学研究費の援助を受けて行った研究報告書の中にある、GMP 準拠細胞プロセッシングを行う施設が具備すべき基準 (minimum requirements) の概略の一部を下記に示す。

- ① 細胞培養室は清浄度クラス 10,000 を保つ陽圧のクリーンルームであること。
- ② 細胞や組織が空気に暴露されるような作業は、清浄度クラス 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 遺伝子導入操作を行うエリアは清浄度クラス 10,000 を保つ陰圧のクリー