

細胞と類洞周囲の伊東細胞から構成される活性化された間葉細胞に囲まれている。肝障害に伴い、ヒトの Ito 細胞はデスミンと平滑筋アクチンを発現する筋繊維芽細胞様表現系を示すようになる。同様に、活性化された Ito 細胞は四塩化炭素により障害されたラット肝臓及び oval cell により活性化されたラット肝臓において出現する。

Ito 細胞は 2-AAF/PH モデルにおいて最初に増殖し、その挙動は oval cell と一致する。両細胞は高密度な網様構造の中で重なりあって存在する。肝再生時において Ito 細胞はラット及びヒトの ECM を供給する上で重要な役割を果たしていると考えられている。さらに、Ito 細胞は ECM に特異的なマトリックスメタロプロテアーゼ "matrix metalloprotease" (MMP) を分泌する。MMP が分泌され肝実質における ECM が分解されると、Ito 細胞が障害を受けた肝実質を移動するための輸送路ができ、oval cell の浸潤が開始されやすくなる。その結果、胆管の増殖、移動、形態形成が促進される。このような反応は Ito 細胞により産生される HGF により促進される。2/3PH 後、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子の早期における上昇に伴い、肝臓 ECM の大規模な再構成が起こる。ヒトの肝再生時において、胆管プレートから移動する未発達な胆管細胞が MMP を発現することから、oval cell も MMP を発現し ECM を分解する可能性が考えられる。Ito 細胞も再生している肝細胞のクラスターを移動する場合、ラミニンを生成する。その際、肝細胞は内皮細胞の増殖を刺激し、類洞内皮の脈管構造を再構成する。増殖性胆管上皮のなかで Ito 細胞は oval cell が肝細

胞に分化後小葉の脈管構造を回復させるだけでなく、肝再生の初期において oval cell の移動を促進させる。

Ito 細胞は細胞移動の初期において oval cell を肝細胞環境から隔離し、肝実質微小環境により誘導される未熟な肝細胞の分化を阻止する。培養 oval cell を同系のラットの肝実質に移植すると肝臓プレート中に素早く生着し、充分成熟した肝細胞の特徴を獲得する。この知見は悪性に形質転換した oval 様細胞の癌化が肝臓微小環境により減少するという知見と一致する。oval cell と間質を構成する要素を緊密に接触させると、門脈間充織に胆管上皮を埋め込んだのと同様な状態が再現される。この接触は分化において重要である。それにより oval cell における胆管様表現型の発現は再生の初期段階において保持され、後期においてはその発現が消失し肝細胞に分化する。oval cell の増殖時に起こる顕著な組織再編成及び遺伝子発現の変化はマトリックスと細胞内接着における変化により影響される可能性が高い。この可能性は肝細胞を ECM タンパク質未添加で培養すると、初期の段階でより未熟な表現系へ分化することから支持される。なお、このような未熟な表現型への分化は ECM タンパク質の添加により抑制される。例えば、肝細胞をタイプIVコラーゲンと接触するとアルブミン合成は維持されるが、ラミニンに変えると AFP を発現するようなより未熟な表現型を発現ようになる。このような肝細胞をタイプIVコラーゲンと接触した場合における肝細胞様表現型の発現は in vivo において限局された肝細胞プレートにおける発現とよく似ている。これに関連し、マトリゲルで肝幹細胞

を培養すると胆管上皮細胞に分化誘導され、胆管様構造を形成することも知られている。

2. 骨髄由来細胞

oval cell の細胞表面マーカーを探索している過程で、そのマーカーは c-kit、CD34、Thy-1 など骨髄の血液幹細胞の表面抗原と共通であることがわかってきた。その後の研究により、骨髄由来の細胞が肝細胞や胆管上皮細胞に分化することが報告された。

2.1 骨髄由来細胞の肝細胞への分化

成熟組織において、局所に存在する幹細胞は同じ細胞系列にのみ分化すると考えられていた。しかしながら、成熟造血幹細胞“hematopoietic stem cell” (HSC)は他の細胞系列への分化能が極めて高い。分離 HSC は骨格、心筋、内皮及び神経細胞、肺、肝細胞のような上皮を含む全ての組織に分化する。ラットにおいて oval cell/肝細胞は循環骨髄細胞に由来することが最初に証明された。Peterson らは致死量の放射線を照射し、その後 oval cell を活性化するために 2-AAF 及び四塩化炭素により肝臓に障害を与えた雌レシピエントラットに雄骨髄細胞を移植し、その後の運命を調べた。肝障害後 9 日目に Y-染色体陽性の oval cell が検出され、oval cell が肝細胞に分化する 13 日目に Y-染色体陽性の肝細胞が検出された。その後、骨髄細胞の肝臓移植に関する知見が全肝臓移植モデルにおいても以下のように得られた。MHC クラス II 抗原 L21-6 陰性の Brown Norway ラットをドナーとし L21-6 陽性 Lewis ラットをレシピエントとして移植を行った。その後の解析を行った結果、移植臓器の胆管は L21-6 陰性と陽性の細胞を含んでいた。この知見から胆管上皮の一部は循環骨髄細胞に由来しており、

その他はレシピエント由来であることが示された。

移植された骨髄細胞のその後の運命を調べるため、マウスにおいて同様な性ミスマッチ骨髄移植のアプローチが Theise らにより行われた。その結果、6ヶ月後までは雌の骨髄に由来する肝細胞が雄の正常肝の 1-2%存在すること明らかになった。この知見から障害を受けていない正常時の肝再生においても骨髄の寄与が示唆された。この場合、200 個の CD34⁺, lin⁻骨髄細胞を用いた場合における肝移植の程度は 2,000 個の未分画骨髄細胞と同様であったことから、移植した骨髄の中に骨髄に由来しない肝幹細胞が含まれていた可能性は低い。ほぼ同時期に、Alison らと Thise らはヒトにおいて骨髄由来の肝細胞の存在を示した。それを証明するためには 2 つのアプローチが用いられた。1 つは男性ドナーから骨髄移植を受けた女性の肝臓について in situ ハイブリダイゼーションにより、ドナー由来の細胞を Y-染色体に特異的な DNA プローブにより調べた。2 番目に、病気の再発により除去された女性患者の肝臓を移植された男性患者における Y-陽性細胞を調べた。その結果、両方の場合で Y-染色体陽性肝細胞が検出された。一般的に、ヒト肝臓への HSC の肝移植の程度は場合によって大きく異なり、肝障害の重症度が高いほど移植の程度は高い。肝臓移植後 C 型肝炎を再発したレシピエントの肝臓において、肝細胞及び胆管上皮細胞の締める割合は最大 40%であった。G-CSF で動員させた CD34⁺幹細胞を用いたその後の研究で男性ドナーから骨髄移植を受けた女性の肝臓において Y-染色体陽性細胞は 4-7%の割合で肝細胞に分化

することも示された。このように、HSCが他の細胞系統に分化するという根拠は男性ドナーから移植を受けた女性レシピエントにおいてY染色体陽性を確認することである。ところが、肝臓のような他の細胞系統への骨髄細胞の分化は既に分化した細胞と骨髄細胞が融合したにすぎないという考えを支持する結果も最近得られている。その結果からは、一方の細胞は他の細胞と融合することが可能であり、その結果得られた4倍対の雑種はレシピエントの表現型を持つことが示唆されている。GFPトランスジェニックマウスの骨髄細胞をES細胞と混合すると、 10^6 個の骨髄細胞当たり2-11個の雑種クローンという非常に少ない割合でES細胞と融合する。その後、これら雑種細胞はES細胞の分化に特徴的な多くの表現型を持つようになる。しかしながら、ハイブリッドの細胞形成頻度はSca⁺Lin⁻分画を用いてもこれ以上増加しない。従って、HSCが肝細胞と融合するとは考えにくい。HSCが肝臓移植に関与する主な骨髄分画であることを考えると、このような低レベルの融合では代謝肝障害モデルにおいて骨髄由来細胞が広範囲にコロニーを形成している場合、その形成に融合細胞が関与している可能性は低い。また、100,000個のCNS細胞当たり1個という非常に低い頻度の融合がマウスCNS細胞とES細胞の間で報告されている。この場合、得られた融合細胞を未分化胚芽細胞に注入した場合、複数の細胞系統に分化し、肝臓に注入した場合が最も顕著である。従って、ある細胞が他の系統の細胞から分化した細胞であるとするならば、細胞融合による可能性を回避するためにその細胞の遺伝子型を調べるのが

必要かもしれない。しかしながら、細胞融合が起きたとしても組織のほとんどは本来倍数体細胞を多数有しており、本稿で扱っている骨髄細胞の肝細胞への分化が融合による可能性は低い。

これに関連し、以下のように男の子を出産した母親の上皮組織を調べた知見は興味深い。分娩前において甲状腺炎の悪化が場合によっては起こるが、それは胎盤から獲得された胎児細胞によるものであり、その細胞は自己免疫疾患と考えられる免疫異常疾患を引き起こす。特筆すべきことは、完全に分化しX及びY染色体両方を有する甲状腺胞状細胞のクラスターを有する女性患者がいることである。もちろん、他方向に分化した細胞は移植ではなく胎児に由来する。しかしながら、胞状細胞はXXXYではない。従って細胞融合はこの現象に関与していない。同様に、女性レシピエントにおいて表皮、肝臓及び腸管細胞に分化した男性ドナーの末梢血球幹細胞の核型をFISHにより調べた結果、1つのX染色体及び1つのY染色体のみ存在することが明らかになった。

障害を受けている肝臓機能の増加を目的とする場合、あるいは単一遺伝子疾患における正常遺伝子及び抗炎症性サイトカインのような治療用遺伝子の運搬を目的する場合、骨髄は極めて有用となる可能性がある。従って、骨髄細胞の機能を調べることは重要である。倍数体の形成は肝細胞の分化と増殖において重要な特徴であることから、肝細胞の倍数体についてY染色体検出の技術を用いて調べることが重要となっている。雌のマウス全身に致死量の放射線を照射後、雄の骨髄を移植すると雌において雄HSC

由来の二倍体及び多倍体肝細胞が同定された。また、男性ドナーから骨髄を移植された女性及び女性から同所性肝移植を受けた男性の肝臓生検内において二倍体及び多倍体型の Y-染色体陽性の肝細胞が同定された。さらに、Y-染色体陽性肝細胞は分裂を繰り返しているクローンにおいて頻繁に観察されることから、移植片が生着後、肝臓においてそれに由来する細胞の分裂が示唆された。これらの知見から、骨髄由来肝細胞はマウス及びヒトにおいて多数倍を形成し、正常肝細胞として機能するとともに肝再生にも寄与することも示された。さらに、マウスにおいて以下のように骨髄細胞が代謝性肝臓疾患を治癒できることが示された。チロシン同化経路において重要な酵素である Fumarylacetoacetate hydrolase 欠損 (FAH^{-/-}: 致命的なチロシン血症タイプ 1) は FAH 野生型である 10⁶ 個の未分画骨髄細胞により治癒できることが生化学的な解析により明らかになった。さらに、2×10⁵ 個の FAH^{-/-} 先天性成人雌骨髄細胞により造血が維持される場合、わずか 50 個の精製 HSC (c-kit high, Thy low, Lin⁻, Sca-1⁺) を肝に移植生着すると FAH 欠損を治癒できる。骨髄由来細胞が機能を発現することは、雄 dipeptidyl peptidase IV 陽性 (DPPIV⁺) の骨髄が移植された放射線照射 DPPIV⁻ 雌ラットで示されている。この場合、胆管表面において DPPIV⁺ 肝細胞クラスターの出現が観察される。

ラット肝実質障害のモデルの 1 つであるアシルアルコール誘導胆管障害において、胆管周囲の増殖性細胞は造血由来である可能性が高い。また、ラットにおいて骨髄由来肝幹細胞 “bone marrow-derived

hepatocyte stem cell” (BDHSCs) の分画が $\beta 2$ -ミクログロブリン陰性、Thy-1 陽性に基づいて同定されている。BDHSCs と胆汁うっ滞性肝細胞を半透明膜で分離して共培養すると、BDHSCs は肝細胞に分化し、肝細胞と同様な効率でアンモニアを尿素に代謝する。このような BDHSCs から肝細胞への分化は正常な肝細胞との共培養ではおきない。従って、肝臓の障害は骨髄由来細胞において生着だけでなく、肝臓への分化にも必要と思われる。

2.2 HSC の肝臓への生着へ関与する因子

肝臓の障害は HSC が肝臓に生着するうえで刺激になると考えられるが、その促進因子については現在不明である。マウスにおいては C1q 受容体のマウスホモログである AA4 分子が HSC の胎児肝へのホーミングに関与しており、障害を受けた肝臓に対して生着する HSC にこの受容体タンパク質が発現しているものと考えられる。その他、胆管/間質細胞が幹細胞遊走因子 “stromal derived factor-1” (SDF-1) を発現し、HSC がその受容体 CXCR4 を発現する。最近の研究によると、SDF-1 が肝臓で生産されて障害を受けた組織に遊離され、その受容体である CXCR-4 陽性骨髄幹細胞は走化性勾配に沿って障害部位に運ばれることも明らかになっている。

2.3 HSC の肝細胞への分化に関与する因子

HGF は HSC の肝細胞系統への分化を誘導することが *in vitro* で示されており、骨髄細胞は HGF の受容体を発現している。生体においては肝臓に存在する星細胞が HGF を産生することから、HSC の分化誘導を促進すると考えられる。

3. その他の肝幹細胞

3.1 胚性幹細胞

マウス胚性幹“embryonic stem” (ES) 細胞は成熟肝細胞へ分化することが示されている。この場合、肝細胞の分化を誘導するための条件及び分化を調べるマーカーは他の肝幹細胞とは異なっている。また、ES細胞は *in vivo* においても肝細胞へ分化可能であり、細胞を脾臓へ移植すると奇形腫が形成される。さらに、ES細胞由来肝細胞を肝臓に移植すると、肝細胞分化表現型を維持する。しかしながら、特にヒト ES細胞は肝幹細胞としてだけではなく他の幹細胞としても細胞治療等に用いる場合、以下のような問題点がある。①ES細胞そのものは移植により奇形腫を形成するが、分化誘導した細胞でも高いテロメラーゼ活性が保持されていれば腫瘍化の危険性がある。②目的の細胞に分化する細胞のみを選択し、他の細胞に分化する細胞を除去する必要がある、選択した細胞が他の細胞に分化しないという安全性の保証も必要である。③分化した細胞が形態や一部の機能だけでなく、本来の細胞機能を発現するかどうか未知数である。④自家移植を除き免疫学的に拒絶反応を制御する必要がある。特に④に関しては、骨髄移植のように HLA 適合移植を行うか、対象者の体細胞核を移植した ES細胞を樹立するなどの方法が理論的には可能であるが、ES細胞の移植細胞ソースとしての魅力を大きく損なうものである。

3.2 小型肝細胞

成熟ラットの肝細胞を分離し、無血清 DMEM を基本とした培地にビタミンの一種であるニコチンアミドを 10 mM 加え、EGF や HGF、TGF- α などの増殖因子を添加して培養すると、5~6 日目から小型とい

う以外形態的にはまわりの肝細胞と区別がつかない細胞のコロニーが検出されるようになる。この細胞はアルブミン陽性、トランスフェリン陽性、AFP 陰性、CK8 陽性、CK18 陽性など、成熟肝細胞とほぼ同様の表現型をもち、超微細構造的にも肝細胞としての特徴をもっていることから、小型肝細胞と名付けられた。この細胞は増殖能力が非常に旺盛で、1 個の細胞が 10 日間に 30 個以上に増殖する。小型肝細胞はクローンとして増殖しコロニーがある程度の大きさになると、その一部は大型化・成熟し、中には 2 核をもつ細胞も出現してくる。しかしながら、コロニーを形成する全ての細胞が成熟化することはなく、小型肝細胞も必ず存在しており、肝幹細胞の特徴をもっているようである。また、この細胞は継代培養も可能である。最近、ヒトの肝臓にもラットと同様に小型肝細胞が存在していることが報告された。

上記小型肝細胞との異同について明らかではないが、レトロルシン/PH の肝臓においては、小型肝細胞のコロニーが出現する。この小型肝細胞は肝細胞へと分化・増殖し、肝部分切除後 30 日目には肝細胞の 90% を占めるようになる。この小型細胞は *small hepatocyte-like progenitor cell* と名付けられている。

3.3 胎児肝臓由来肝幹細胞

肝幹細胞の解析系として *in vitro* におけるコロニー形成能を指標として、FACS で分離したマウス胎仔肝臓における様々な細胞画分で増殖能の解析が行われた。その結果、c-kit⁺、CD49⁺、CD29⁺、CD45⁻、TER119⁻の細胞画分に、増殖能の高い細胞が高頻度に存在することが明らかになった。

この細胞の多分化能について1個の同細胞から派生したコロニーを用いて分化マーカーの発現を検討した結果、肝細胞マーカーと胆管細胞マーカーを発現した細胞の存在が確認された。従ってこの細胞は肝細胞と胆管細胞に分化可能であることが明らかになった。また、この細胞にマーカー遺伝子を導入後脾臓内に移植した結果、肝臓組織や胆管を形成することが明らかになった。

3.4 非実質細胞由来肝幹細胞

成熟ラット肝臓より分離した非実質細胞を低張処理すると、凝集する細胞画分と凝集しない細胞画分に分かれる。その中で凝集しない細胞画分の中に AFP、E-cadherin、アルブミンを発現するが、CK19、 α -平滑筋アクチン、VE-cadherin を発現しない細胞が検出された。さらに、この細胞は培養すると形態的にも機能的にも肝細胞に分化する。

3.5 肝上皮細胞

正常及び発癌物質投与ラットから分離したほとんどの細胞は初代培養においてまもなく死亡し、“liver epithelial cells” (LEC) あるいは“rat liver epithelials” (RLE)細胞と呼ばれる小型の非実質上皮細胞がコロニーとして急速に増殖し、培養細胞において優勢を占める。この細胞は胆管細胞と肝細胞の特徴を共有しており、活性化されたげっ歯類肝臓の oval cell から由来する多くのセルラインとよく似ている。またこれらの細胞は肝臓に分化する。しかし、この細胞の由来や肝臓における存在場所などは不明である。

3.6 膵臓細胞

膵臓と肝臓の間で細胞が出入りすることはないが、膵臓細胞が胎児肝に類似した表

現型に分化するという事は明らかである。これは Krakowski らによる *in vivo* の実験により示された。彼らはインスリンのプロモーターにより調節される“keratinocyte growth factor” (KGF) を作製した。その結果6ヶ月以内に機能を有する肝細胞がランゲルハウス島に多数出現した。*in vitro* においてデキサメタゾンとオンコスタチンMの組み合わせにより膵外分泌細胞が肝細胞という異なった細胞系統に非常に効率良く分化した。この実験においてプロモデオキウリディン標識を行った結果、膵外分泌細胞の多くはこの過程において増殖しないことが示された。この分化誘導は転写因子である C/EBP β の誘導によるものであることが明らかになった。C/EBP β は脂肪酸アシル CoA の産生を促進することが知られているが、HNF4 α と結合し、HNF4 α の核への移行を起こす。核に移行された HNF4 α は初期の肝細胞分化に特徴的な AFP 及びトランスレチンのような遺伝子を活性化する。なお、オンコスタチン M は胎児肝の造血細胞において産生される生理的な肝細胞誘導因子である。

4. 肝幹細胞の臨床応用の可能性と将来の展望

今日まで人工肝臓や幹細胞移植に用いる細胞はヒトからの高度に分化した肝細胞、ヒト肝癌セルライン、動物からの肝細胞が主であった。しかし、成人肝細胞を得ることは事実上困難であり、たとえ得られたとしても大量調製ができず必要に応じてすぐに調製することは困難なため、その使用は限られたものであった。一方、胎児肝や小児肝は倫理上の問題がある。ヒト肝癌セルラインはウイルス感染や発癌のリスクがあ

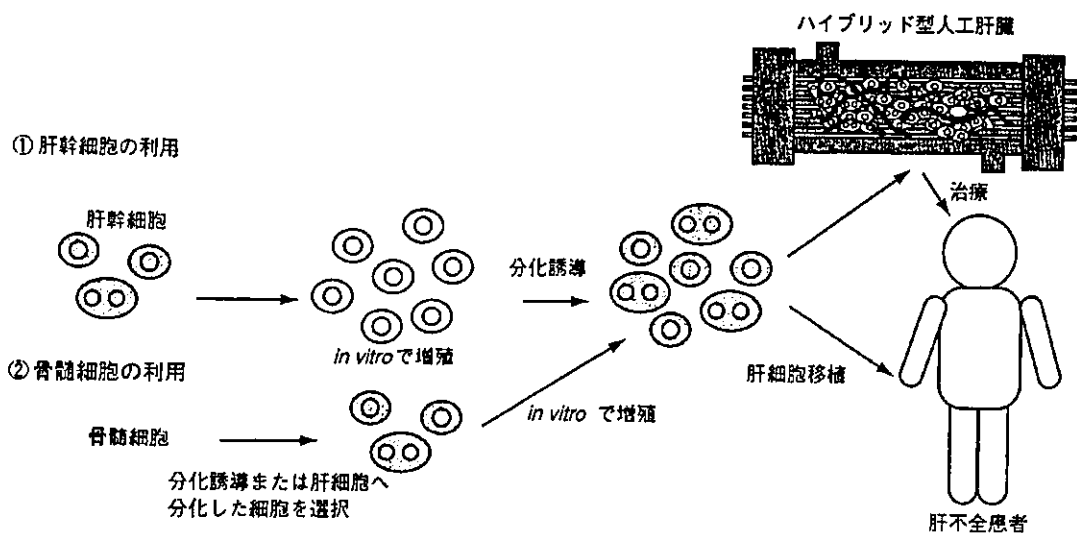


図2 肝幹細胞の臨床応用

る。動物からの肝細胞はヒト血漿やアルブミン合成の代用はできない。また、種の間で酵素活性が異なり、ウイルス感染のリスクもある。異種組織の免疫拒絶に加えて異種性移植の倫理上の問題もある。従って、これら3種類の細胞は要求を満たすものではない。しかしながら、ヒト幹細胞は *in vitro* で広範囲に増殖し、肝細胞に分化する。従って、幹細胞を未分化な表現系のままで増殖後十分な量が得られたら、成熟肝細胞の表現型を発現できるように操作し大量の肝細胞を得ることが可能である。このように、肝幹細胞は肝臓疾患の細胞治療、人工肝臓装置、遺伝子治療の担体として必要な肝細胞を無限大に供給することが可能である。図2に肝幹細胞の臨床応用について模式的に示している。

肝幹細胞は成熟肝細胞に比べて以下のような利点がある。(1) 肝幹細胞の提供者の範囲を広げることができる。(2) 移植細胞の容量を少なくできる。(3) 高い増殖能と凍結保存が可能なることから操作が容易である。(4) 肝幹細胞移植は同所性肝移植という利点がある。(5) 移植などにおいて問題となる免疫

抑制について、患者自身の肝幹細胞を用いることにより回避できる。(6) 長期間にわたり1つの病気について治療を行える。病気の発症機構について正確な機構を知る必要がない。

4.1 今後の検討課題

しかしながら、肝幹細胞を臨床治療に用いるためには、以下の様な検討課題が残されている。(1) ヒト肝幹細胞の分離と精製 動物からの肝幹細胞は分離されているが、ヒトから肝幹細胞を分離精製することは困難である。密度勾配遠心及びエリユトリエーション遠心がげっ歯類から oval cell を分離するうえでは有効な方法である。しかしながら、この方法がヒト肝幹細胞の分離に適しているかどうかについては今後検討する必要がある。(2) 肝幹細胞分化誘導機構の解明 この解明は肝幹細胞を誘導し、解剖学的に肝臓と同等な構造と機能を持つ小葉及び肝臓様組織を形成させることを目的としている。分化誘導機構を明らかにするためには、肝幹細胞の分化及び肝幹細胞と他の細胞の相互作用が自由に操作できるような新しい培養系を構築する必要がある。こ

のような培養系が構築できれば、それを用いて人工肝臓の構築と *ex vivo* 肝臓組織の形成も可能となる。(3) 肝細胞セルラインの確立 マウスの肝幹細胞と比較すると、ヒト肝幹細胞は培養において増殖が遅く短期間で容易に分化し、その後増殖能を消失する。このように増殖能が低いことから、ヒト肝幹細胞セルラインを増殖させ確立することは現在困難である。この点に関し以下のようなアプローチが試みられている。レトロウイルスにより SV40T 抗原遺伝子を導入すると肝幹細胞が不死化する。この細胞は無限大に *in vitro* で増殖し、アルブミン、CK7、CK19 及び内在性テロメラゼを発現する。門脈を介してこの細胞を肝臓に移植すると、腫瘍を形成することなく肝実質に生着する。移植3週間後、この細胞はアルブミンを発現しCK19を発現しないことから、肝幹細胞は肝細胞に分化したと考えられる。p53 ノックアウトマウスからの肝臓を用いたセルラインの確立も試みられている。p53 が発現しないと細胞は通常の限界を超えて細胞周期が進行し、不死化する。この点に着目し、p53 のノックアウトにより不死化された肝幹細胞セルラインが確立された。このセルラインは分化の機構を研究するうえでは有用であるが、癌原性の潜在的なリスクがある。また、テロメラゼ活性を高発現することによりヒト胎児肝細胞を無限大に複製することも可能となっている。このように肝幹細胞セルラインに確立に向けて多くの努力がなされているが、安全かつ十分な機能を有するものは得られていない。(4) 肝幹細胞の移植とその臨床適応 これは治療効果の評価と移植の安全性を確かめることを目的としている。

その場合、疾患に関連するある特定の遺伝子が欠損しているマウスあるいはイヌが肝幹細胞移植を行う上で有用かもしれない。

(5) 肝幹細胞、正常肝細胞、肝癌細胞における遺伝子発現の違いの比較 このような違いが明らかとなれば肝癌の発生機序の解明とその治療に役立つと考えられる。

4.2 肝幹細胞を用いた治療戦略

4.2.1 肝細胞移植

肝細胞移植は人工肝臓装置を用いた移植への橋渡し、あるいは全肝臓移植に代わる細胞治療として用いられている。肝幹細胞を用いた細胞治療として臨床的に有用と思われる疾患は原発性肝臓病、肝臓における異常な遺伝子発現あるいはタンパク質産生の欠損による肝臓外の疾患である。内在性の肝臓病としては α 1-アンチトリプシン欠損血色素症、高脂血症、ポルフィン症、1型チロシン血症、ウイルソン病(銅の蓄積)などの遺伝子異常があげられる。肝臓に起因する肝臓外の病気としては1型 Crigler-Najjar 症候群(ビリルビン抱合活性の欠如)のような代謝欠損、家族性高コレステロール症、家族性アミロイド性多発性神経障害(シュウ酸症)、第IX因子欠損(血友病A)のような凝固欠損などがある。このような患者を対象とした肝細胞移植は比較的少数の報告しかない。肝幹細胞ではないが、肝実質の5%に相当する量の分離肝細胞を Crigler Najjar 症候群の患者に対し門脈を介して肝臓に注入すると、血清ビリルビンの中程度の減少及び胆汁に抱合したビリルビンの増加がみられる。また、可逆的に不死化した肝細胞にビリルビン-UDP-glucuronosyl-transferase (BUGT) 遺伝子を導入後、Gunn ラット(Crigler

Najjar 症候群のモデル) に移植すると、胆汁に抱合したビリルビンの増加がみられる。さらに後天性の肝臓病、特に肝臓毒あるいはウイルス障害による急性肝臓障害について胎児及び成人肝細胞を用いた臨床実験も限定的ではあるが行われている。今後、肝幹細胞の移植効率と治療効果との関係及び治療に適している肝幹細胞の種類についても検討する必要がある。

4.2.2 人工肝臓装置

人工肝臓装置は急性肝臓障害の患者の延命及び移植への橋渡しを目的として臨床的に用いることが可能かもしれない。しかしながら、人工肝臓装置が代謝をはじめとする各種機能を十分に維持するためには大量の細胞が必要となる。一方、人工肝臓装置は急性肝炎の患者に有益であるかもしれない。例えば、ラットにおいて可逆的に不死亡した肝細胞を正常肝臓容積の約5%に相当する量脾臓内に投与すると90%肝切除で短期間は生存する。なお、この切除によりラットは急性肝不全により通常死亡する。また、多くの急性肝不全モデルにおいて異種肝細胞を人工肝臓装置として用いて成功した例もある。一方、慢性肝臓病を有する患者において人工肝臓装置を使用する場合には長期にわたり細胞を補充する必要がある。この場合、肝幹細胞は培養において高い増殖能を長期にわたって保持できることから、肝細胞の大量調製に有用と考えられる。また、人工装置に幹細胞を直接注入すると、患者の血液中に循環しているケモカイン及びサイトカインにより肝幹細胞が肝細胞へより効率よく分化誘導されるかもしれない。会社によっては慢性肝炎の患者から肝幹細胞を分離培養後人工肝臓装置に注

入し、肝臓病が治癒するまでの橋渡しとして肝臓の機能を維持することが可能かどうか検討を行っているところもある。

4.2.3 遺伝子治療

肝幹細胞は遺伝子治療の担体として用いることが可能かもしれない。ここで述べる遺伝子治療とは遺伝的に改変を加えた肝幹細胞を直接患者に移植し、各種肝臓病を治癒することを指している。遺伝的な改変とは例えば遺伝的代謝異常のような遺伝子変異を正常に戻すことである。現在、遺伝子治療の問題の1つは、遺伝子改変を加えた成熟肝細胞は増殖及び継代培養が困難という点である。高い増殖能を持つ肝幹細胞は遺伝的改変を加えても継代培養が可能であり、遺伝子治療の大きな障壁を克服できる新しい戦略となりうる。例えば、遺伝的代謝異常において欠損酵素遺伝子を肝臓特異的なアルブミンのプロモーターにつないで肝幹細胞に遺伝子導入し、この遺伝子導入肝幹細胞を肝臓に移植すると、細胞は安定な集団として肝臓に生着し欠損酵素を生理的なレベルで長期間産生することが可能である。

また、以下の様に非遺伝病の治療にも用いることができる。例えば肝硬変のラットモデル(ジメチルニトロソアミンによる誘導)において骨格筋に HGF 遺伝子を導入すると、肝硬変において病的に顕著な特徴が軽減される。一方、HGF は多くの細胞において増殖因子として作用することから、他の組織に対する影響も懸念される。この点、HGF 遺伝子を導入した骨髄由来肝幹細胞は障害肝を標的として運ばれ、肝臓においてより高濃度の HGF を発現できる。以下に B 型肝炎の遺伝子治療への応用について

述べる。現在、世界において3億5千万のヒトが慢性B型肝炎に感染しているが、このウイルスは除去できないため持続的な肝細胞破壊がおき、肝硬変及び肝癌を生じる。臨床的には持続的なB型肝炎感染の治療にIFN- α が用いられており、30%の確率でウイルスが除去される。しかしながら、毒性が強いためその使用量が制限され、低用量でしか用いることができない。このような問題点を克服する試みとして、IFN- α を *ex vivo* で導入した肝幹細胞特に骨髄由来肝幹細胞を肝臓に移植し、遺伝子導入されたIFN- α が肝臓で局所的に産生されるならば、副作用を軽減した状態で病態を改善できる。

D. 結論

現在までに、動物及びヒトにおいて多様な種類の肝幹細胞の存在が確認され、その性状についても一部は明らかになってきた。また、様々な検討から肝幹細胞の細胞治療などへの臨床応用が肝疾患の治療において有用となる可能性が示唆されており、一部の動物モデル実験では肝幹細胞を細胞移植することにより病態が改善されるとのも報告されている。しかしながら、ヒトにおける肝幹細胞の研究は始まったばかりであり、単一集団として分離精製し、その後増殖分化させるという基礎的段階まで達していないというのが現状である。今後のヒト肝幹細胞の基礎的な研究の進展に期待すると共に将来的には肝幹細胞を用いた肝臓移植をはじめとする肝疾患治療法の有効性及び安全性が確立され、1日も早い臨床応用がなされることを願っている。

E. 参考文献

- [1] M. R. Alison, M. Golding, and C. E. Sarraf, Liver stem cells: when the going gets tough they get going, *Int J Exp Pathol* 78 (1997) 365-381.
- [2] M. Alison, and C. Sarraf, Hepatic stem cells, *J Hepatol* 29 (1998) 676-682.
- [3] M. Alison, Liver stem cells: a two compartment system, *Curr Opin Cell Biol* 10 (1998) 710-715.
- [4] M. R. Alison, R. Poulsom, and S. J. Forbes, Update on hepatic stem cells, *Liver* 21 (2001) 367-373.
- [5] R. A. Faris, T. Konkin, and G. Halpert, Liver stem cells: a potential source of hepatocytes for the treatment of human liver disease, *Artif Organs* 25 (2001) 513-521.
- [6] G. Feldmann, Liver transplantation of hepatic stem cells: potential use for treating liver diseases, *Cell Biol Toxicol* 17 (2001) 77-85.
- [7] S. Forbes, P. Vig, R. Poulsom, H. Thomas, and M. Alison, Hepatic stem cells, *J Pathol* 197 (2002) 510-518.
- [8] Z. P. He, Y. F. Tang, Y. B. Liu, and M. F. Feng, Advances in studies on hepatic stem cells, *Prog Nat Sci* 13 (2003) 166-172.
- [9] A. D. Min, and N. D. Theise, Prospects for cell-based therapies for liver disease, *Panminerva Med* 46 (2004) 43-48.
- [10] T. Mitaka, Hepatic stem cells: from bone marrow cells to hepatocytes, *Biochem Biophys Res Commun* 281 (2001) 1-5.

- [11] S. H. Oh, H. M. Hatch, and B. E. Petersen, Hepatic oval 'stem' cell in liver regeneration, *Semin Cell Dev Biol* 13 (2002) 405-409.
- [12] B. E. Petersen, Hepatic "stem" cells: coming full circle, *Blood Cells Mol Dis* 27 (2001) 590-600.
- [13] S. Sell, The role of progenitor cells in repair of liver injury and in liver transplantation, *Wound Repair Regen* 9 (2001) 467-482.
- [14] D. A. Shafritz, and M. D. Dabeva, Liver stem cells and model systems for liver repopulation, *J Hepatol* 36 (2002) 552-564.
- [15] A. J. Strain, and H. A. Crosby, Hepatic stem cells, *Gut* 46 (2000) 743-745.
- [16] R. Susick, N. Moss, H. Kubota, E. Lecluyse, G. Hamilton, T. Luntz, J. Ludlow, J. Fair, D. Gerber, K. Bergstrand, J. White, A. Bruce, O. Drury, S. Gupta, and L. M. Reid, Hepatic progenitors and strategies for liver cell therapies, *Ann N Y Acad Sci* 944 (2001) 398-419.
- [17] C. J. Vessey, and P. M. de la Hall, Hepatic stem cells: a review, *Pathology* 33 (2001) 130-141.
- E. 健康危機情報
なし
- F. 研究発表
1. 論文発表
- 1) Niimi, S., Harashima, M., Takayama, K., Hara, M., Hyuga, M., Seki, T., Ariga, T., Kawanishi, T., Hayakawa, T. (2005) Thrombomodulin enhances the invasive activity of mouse mammary tumor cells. *J. Biochem (Tokyo)* (in press)
- 2) Niimi, S., Harashima, M., Gamou, M., Hyuga, M., Seki, T., Ariga, T., Kawanishi, T., Hayakawa, T. (2005) Expression of annexin A3 in primary cultured parenchymal rat hepatocytes and inhibition of DNA synthesis by suppression of annexin A3 using RNA interference. *Biol. Pharm. Bull.* (in press)
- 3) Niimi, S., Hyuga, M., Harashima, M., Seki, T., Ariga, T., Kawanishi, T., Hayakawa, T. (2004) Isolated small hepatocytes express both annexin III and terminally differentiated hepatocyte markers, tyrosine aminotransferase and tryptophan oxygenase at the mRNA level. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 1864-1866
2. 学会発表
- 1) Shingo Niimi, Mizuho Harashima, Youko Nagaoka, Chieko Saito, Taiichiro Seki, Toyohiko Ariga, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa: Mechanism of inhibition of dexamethasone-dependent induction of tyrosine aminotransferase activity by the proteasome inhibitor lactacystin. 第77回日本生化学会 (2004年、横浜)
- 2) Mizuho Harashima, Shingo Niimi, Masaru Gamou, Masashi Hyuga, Taiichiro Seki, Toyohiko Ariga, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa: Expression of annexin III in primary cultured rat hepatocytes and its role on

DNA synthesis. 第 77 回日本生化学会
(2004 年、横浜)

会議 (2005 年, スイス)

- 3) Shingo Niimi, Mizuho Harashima,
Masaru Gamou, Masashi Hyuga,
Taiichiro Seki, Toyohiko Ariga, Toru
Kawanishi, Takao Hayakawa
Expression of annexin III in primary
cultured rat hepatocytes and its role on
DNA synthesis. 第 3 回アネキシン国際

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

異種細胞治療薬の品質・安全性・有効性確保のための 試験法や基準についての国際動向の研究

分担研究者 山口照英 国立医薬品食品衛生研究所

欧州医薬品庁（EMA）の異種細胞治療薬の品質・安全性・有効性確保のための留意事項等について調査・研究した。本文書はEUにおいて異種細胞治療薬の承認申請に当たって必要とされる基本事項について書かれたものである。特に、異種細胞治療薬の最も重要な点として、感染性因子の伝播を如何に防止、あるいは潜在的な感染を含めて検出するかに力点が置かれている。また、感染症に関する安全性は患者のみならず、患者と密接な接触を持つ人や医療従事者、さらには公衆衛生の観点からも十分な対処を求めている。感染症の伝播に関連して、治療に用いた細胞等の検体の保管、記録の保管等に加え、感染性因子の動物を用いた検査を行っている場合に必要に応じてその試験に使用した動物の検体も保管することを推奨している。本留意事項文書では、異種細胞治療薬の基礎から前臨床開発、臨床開発、さらには市販後を含めたサーベイランスの広範囲の事項について、基本的考え方が述べられており、我が国での異種細胞治療薬の品質・安全性・有効性確保のための指針作成に非常に有用な情報を与えるものと考えられる。

A. 目的

近年、バイオテクノロジー応用技術の進歩や幹細胞研究・再生医学の技術的進歩により、ヒトまたは動物の細胞や組織を培養、加工し、様々な疾患の治療に直接投与する医療（細胞治療）の開発が急速に進展している。このような細胞や組織から構成される細胞・組織利用医薬品等を医療に用いることができれば、ガン、筋ジストロフィー、再生不良性貧血、心筋梗塞などの致死的な疾患、あるいは糖尿病、リウマチ、骨粗しょう症、重篤な肝疾患、神経疾患、熱傷、創傷等に対してきわめて有効な治療法になる可能性が高い。我が国においても、様々な形での細胞・組織加工医薬品等の開発が進められており、その数は200以上に上ると言われている。しかし、本格的な実用化に至るためには検討すべき課題は多い。

細胞治療薬の開発が世界的な広がりを見せているが、承認にまで至っている製品はそれほど多

くない。また、わが国においてもいくつかの製品が治験前の確認申請や承認申請中である。一方で、大学や病院等で多岐にわたる細胞治療の臨床研究が行われているが、このような臨床研究の成果はなかなか細胞治療薬の開発に結びついてはいない。その一つの要因として、このような臨床研究が治療薬開発を視野に入れた研究となっていないことや、企業が臨床研究の成果を細胞治療薬開発につなげようとする際にどのようなデータが治験申請やさらには承認申請に必要なのかが十分に理解されていないということもあげられる。

本研究では、2004年6月に施行されたEMAの「異種細胞治療医薬品に関する留意事項」について詳細な解析を行った。我が国においても平成12年に、「ヒト由来細胞・細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」が出されているが、異種細胞製品についてはまだ関連する指針等が作成されていない。また、異種細

胞治療医薬品に関連する我が国の指針として、異種移植に関しては「異種移植の実施に伴う公衆衛生的な見地からの感染症問題に関する指針(案)」が公表されている。また、FDAは「異種移植にともなう感染症伝播についての指針(PhS Guideline on Infectious Disease Issues in Xenotransplantation)」が出されている。我が国における将来の動向を見据え、異種細胞を用いた製品の開発に対応するために、「異種細胞治療薬等の品質・安全性の確保に関する指針」を作成していくことが求められている。本研究では、異種細胞治療薬に関する指針作成の基礎として、EMAの「異種細胞治療医薬品に関するPTS」を調査・検討を行うこととした。

B. 方法

本年度は、EMAの「異種細胞治療医薬品に関する留意事項」(1)を中心に調査研究を行った。また、関連する各種基準やガイドライン等(2-4)についても調査研究を行い、我が国やFDAとの規制の違いや、共通する重要事項などを明らかにした。

C. 結果及び考察

EMAの「異種細胞治療医薬品に関する留意事項」は表1のような項目から構成されており、異種細胞治療薬の基礎的研究、開発、製造、治験、臨床使用、長期フォローアップと遡及調査と、非常に多岐に渡る事項について記載されている。特に、異種細胞に内在しているウイルス等の感染性因子の伝播を如何に防止するかについて最も力点が置かれており、異種細胞を採取するドナー動物の樹立から、繁殖、採取する際のドナー動物の適格性評価、採取した組織・細胞の受け入れ基準、検査、保存等において留意すべき事項について詳細に書かれている。製造工程の設計、原料としての細胞・組織の品質基準、製剤設計、出荷試験と安定性に関する試験等で求められる事項についての基本的考え方が述べられている。前臨床試験に関しては薬理試験と毒性試験についての記載があ

り、特に毒性試験に関しては細胞治療薬の特性から毒性を示す最大投与量を明らかにするというよりも、期待される薬効効果を得るために許される異種細胞の投与量を確認するための試験であることが明確に示されている。さらに、注目すべき点として、ヒトでの有効性と安全性に関して非常に多くの紙面を割いて書かれていることである。特に異種細胞を用いた治療は、対象となる患者が非常に少ないと考えられること、これまで経験のない人獣共通感染症が発症する可能性もあること、未知・未経験の要素がきわめて多いことから治療を行う施設は限定されるべきで、総合的なチーム医療が可能であり、感染症発症の発症に備えて適切な検査が院内で行えるなどの要件を備えていることが求められている。また、同種細胞治療が可能である場合には、異種細胞治療薬を選択しなければならない理由を明確にする必要性を求めている。感染症や免疫学的な有害事象への適切な対応が必要とされている。最後に、ファーマコビジランス及びサーベランスシステムの要件についても記載があり、想定されるリスクや予想が困難なリスクに適格に対応するために患者の重要な兆候を素早く捉えられるようなシステムを作る必要があるとされている。また、感染症に対するサーベランスでは、患者ばかりでなく、患者に身近に接する人や公衆衛生の観点からのサーベランスも求めている。

以下に本研究の対象とした、EMA「異種細胞治療医薬品に関する留意事項」の概要を示す。

異種細胞治療医薬品に関する留意事項 (Point to consider on Xenogenic Cell Therapy Medicinal Products)

1. 序論

1.1 はじめに

異種細胞治療薬の定義が記されている。異種細胞治療薬としては、生きている異種細胞を様々な疾患の治療に用いられるものと定義される。使用形態としては、異種細胞を患者に移植、注入、血

管注入したり、体外でヒトの血液や体液等と接触させる治療などがあげられている。異種細胞の遺伝形質や表現型の改変が行われる場合もあり、加工操作として、分離、培養、増幅、薬の処理などが想定される。異種細胞治療では、宗教上、倫理上、さらには法的な様々な議論すべき問題点も残されているが、この文書ではその点はふれないとされている。本文書は、異種細胞治療薬の承認申請において求められる基本的原則について書かれている。

1. 2 異種細胞治療医薬品の範囲

異種細胞治療医薬品は、その有効成分として異種細胞を含むものと定義される。

個々の異種細胞治療薬が医薬品に分類されるのか他に分類されるかは、最新の薬事法上に規制に従って判断されることになる。

本指針は、各々の医療行為や国内法の適応についての先入観を持たずに異種細胞治療薬の開発や評価を行うために考慮すべき基本的事項を明らかにしておくことを目的に作成された。

基本的な考え方として、医薬品原料として動物組織を用いる医薬品にも適応可能と考えられる。その場合、投与される製品が受け入れ可能な品質や基準への適合、さらには感染性物質が無いことを保証することがキーポイントとなる。原料を採取した動物の健康状態や製造工程全般に渡って有効成分としての細胞品質・安全性に注意を払う必要がある。異種細胞治療薬の開発では前臨床試験や臨床試験ばかりでなく、原料を採取した動物の適正やそれを判断するための試験、製法や品質管理にも十分に注意を払う必要がある。公衆衛生の観点からの考察を行うことも必要であり、人獣共通感染症を含む適切な感染サーベランスの実施方法についても十分な対応を取る必要がある。

異種細胞治療薬は様々な形で適用されると考え

られる；細胞の患者へ移植や注入、あるいは体内還流などによる適応、あるいは患者血液や体液、組織、細胞などとの異種細胞と体外で接触させるなどが想定される。従って、製品のリスクはその使用方法によって大きく異なり、本指針ではその基本原則や適応基準を明確にすることを目的としている。

臨床適用やファーマコビジランスプログラムと同様に前臨床試験をどの様にデザインし、どの程度実施するかは、個々の製品のリスクベネフィットにより大きく異なると考えられる。

異種細胞治療薬の製品の特性として次のようなバリエーションが考えられる。

- レシピエントの免疫システムとの間にバリアーがあるかどうか。
- 投与方法—in vivo か ex vivo か
- 投与経路；静脈内投与や動脈内投与、外科的処置を伴うような移植、外皮的移植、体外循環での使用等
- 用いる細胞の性質、生着性、増殖能など
- 期待される薬理作用や効能
 - 特定の生理活性分子の生産を期待しないヒトの細胞の置換
 - タンパク質、ホルモン、神経伝達物質などの生理活性物質の生産を期待する場合
- 投与する細胞がどの程度の期間生体で作用することが期待されているか（用いる細胞の一過性のつなぎ的な機能を期待するのか恒常的な代替を目的とするのか、さらに移植した細胞が増殖・分化するなどして恒常的な代替を期待するのか）

2. 原料の採取動物

2. 1 動物選択

異種細胞治療薬に用いられる動物や実験動物として長年用いられていたものであることが想定される。用いられる動物の確立や由来は感染性因子やその動物特有の病歴などについて詳細に

記述されている必要がある。最初に樹立された動物や育種動物は健康で、少なくとも特定の病原菌に感染していないことが求められ、健康状態の管理や隔離などにより特定の病原菌の無い状態で育てられなければならない。また隔離に対する外的ストレスを最小限にすることも必要である。

動物の飼育記録（例えばどのような飼料を用いて育てるか）や最初に樹立した動物の履歴の情報を明らかにしておく必要がある。

原料を採取した動物が死亡したり安楽死させた場合には、十分な剖検を実施するべきである。また可能であれば検体を保管しておくべきである。また、原料を採取した動物や施設など関連する飼育群の記録についても保管しておくべきである。

組織や細胞を採取するためにドナー動物を犠牲にする場合には、病歴や感染歴の評価のために十分な剖検を実施する必要がある。その際、検体を将来の試験のために保管しておくべきである。

異種細胞治療薬製造に用いられる細胞や組織、器官は、医薬品製造のために外界とは隔離された環境で育てられた動物より得る必要がある。また、野生動物や畜殺場からの細胞、組織、器官と混在するような場所であってはならない。

遺伝子改変された動物の使用

遺伝子改変動物から異種細胞治療用細胞採取したり、採取した細胞を *in vitro* で遺伝子改変する場合も想定される。遺伝子改変にはヒト補体制御因子の発現と言った新たな機能を細胞に付与する場合や、異種細胞の拒絶反応を防止するために糖鎖抗原である $\alpha 1-3\text{Gal}$ などの特定抗原を修飾することなどが考えられる。遺伝子改変動物を用いたり、動物や細胞への遺伝子改変を行う場合には、可能であれば 2001/18/EC 指令や 90/219/EEC (98/81/EEC 修正版) 指令に従うことが求められる。

遺伝子改変動物から細胞を得る場合には、十分な特性解析を行う必要がある、また挿入あるいは欠損された遺伝子の確認を行うことが必須である。製造工程は関連する CPMP 指針に従って確立されなければならない（薬事法上の規制文書や将来修正される規制に従うこと）。またヒト化動物（Humanized Animal）を用いる場合には、感染症の罹患状態について、潜在的な感染も含めて十分な検討が求められる。

2. 2 動物の飼育

動物の飼育に当たっては、群れやコロニーの健康に望ましくない事故等を充分把握できるようにしておくとともに、その防止対策を確立しておく必要がある。また群れの隔離状況や SPF 環境に望ましくない影響を与えるようなことを防止する取り組みが必要である。

動物飼育の標準操作手順（S.O.P.）では次のような点に留意が必要である

- 詳細な動物の飼育状況や隔離の状態
- 給水
- 敷きわら等の状態
- 定期的な健康状態の監視とモニタリング
- 動物や動物の排泄物等の廃棄と清掃
- 動物個体の認識法、施設内外への移動記録
- 動物の受け入れと出荷
- 動物の輸送
- 動物の組織や死体の保管
- 餌の入手先、給餌のため処理方法、どのような餌を与えていたか
- 隔離と検疫

獣医学的な管理

群れの病気や感染症発症をモニタリングするためのプロトコールをたてておく必要がある。その際、適切な獣医学的検査や検査室での試験などのスクリーニングが含まれていなければならない。ウイルス、細菌、マイコプラズマ、真菌、伝

達性海綿状脳症（TSE）や寄生虫を含め、細胞・組織のドナー動物種に存在が知られている全ての感染性因子について考慮しておく必要がある。全ての獣医学的な処置を含めた群れの健康サーベイランスシステムを確立しておくべきである。細胞・組織のドナー動物に抗生物質やワクチンの接種は推奨できない。動物の健康のために何らかの薬を投与する必要がある場合には、投与の必要性について十分に評価を行い、規制当局に相談するべきである。ワクチンの使用については必ず妥当性を評価しておくこと。

検疫

施設に入れる全ての動物はスクリーニングを完了するまで一定の期間検疫を必ず行わなければならない。必要な検疫期間はそれぞれの動物種や管理している動物の群れの特性やサーベイランスの状況に依存している。

2. 3 動物施設

最初に樹立された動物や細胞・組織のドナー動物用の隔離された動物施設が必要である。相互汚染を防御するために各動物施設はそれぞれ隔離されていなければならない。また動物の感染性因子への暴露を最小限にするためのバリアーをもうけておく必要がある。施設に入れる全ての材料は滅菌あるいは汚染の除去を行う必要がある。予め品質基準が定められた飼料や敷きわら等を十分な品質管理が行われているソースあるいは業者から入手するとともに十分に管理された条件で保管する必要がある。空気の流れ（HEPAフィルターや陽圧条件）や水といった飼育環境は適切にコントロールするとともに、モニタリングを行う必要がある。動物飼育ゲージや動物使用後の檻のクリーニング、除染、滅菌の方法、また使用した動物、飼料、敷きわら、器具、試薬等の廃棄方法が確立されていなければならない。

以上のような事項が実行可能な十分な数の従業員が必要であり、正職員として獣医師がいるかあ

るいは常に相談できる獣医師と連携できている必要がある。動物飼育に関わる職員は文書化された教育訓練を受けるとともにワクチンの接種記録を含めた定期的な健康診断を受け、その記録を保管しておく必要がある。動物飼育に関わる職員の仕事と責任に関する標準操作手順を作成しておくべきである。

換気、動物の取り扱い、職員の作業着等は動物由来の感染症がヒトに伝播するのを防ぐものでなければならない。

2. 4 輸送

動物の移動は通常の飼育環境では暴露されないようなリスクを動物に与える可能性があり、必ず最小限にしなければならない。例外的に輸送が必要な場合は、動物が汚染しないように移動中は施設におけるのと同様あるいはそれ以上の隔離条件を維持するべきである。輸送は使用する動物が他の動物と接触しないような専用の乗り物を使用すべきあり、どの様な方法を採用したかを記載しておく必要がある。輸送後、施設に入れて次の工程に進む前に、受け入れ評価を行うまでの期間検疫を行うための施設も必要である。

器官や組織の輸送において、あるいは初代培養細胞の輸送においても、輸送の間の試料の品質が十分に担保されるような輸送条件を確立しておき、品質の劣化や汚染を防止するための対策が取られなければならない。

2. 5 細胞・組織のドナー動物や最初に樹立した動物の感染性因子検査

細胞・組織のドナー動物は既知あるいは未知の感染性因子に汚染されている可能性がある。細胞・組織のドナー動物の適格性は感染性因子の伝播の防止対策とドナー動物の十分な検査に依存している。

既知感染性因子のスクリーニングや検出プロ

グラムはドナー動物の種類に応じて、また異種細胞治療薬をどのような臨床用途で用いるかに応じて設定すべきである。試験方法や対象とする感染因子等はドナー動物種での感染症に関する最新の情報に基づいて定期的に見直していくことが必要である。可能であれば、ヒト及び動物薬に関する指針を参考にするべきである（動物免疫グロブリン製剤やヒト抗血清の製造及び品質管理に関する CPMP 指針を参考。）

選択した試験法はドナー動物種に特有の感染因子を検出できるものばかりでなく、幅広い範囲の感染性因子を検出できる試験を採用すべきである。ヒトへの病原性をもつこと知られている感染性因子を検出できるような適切な *in vivo* 及び *in vitro* 試験の設定も必要である。異種動物由来の病原性を持つ可能性のあるレトロウイルスやドナー動物細胞や組織・器官に持続感染しているウイルスも十分な注意を払うべきである。

採用した感染性因子のスクリーニング法や試験法は特異性、感度、再現性、妥当性が十分に検証されている必要がある。適切な品質保証基準を整備しておかなければならない。

既知の感染性因子に対する十分に妥当性が検証された診断手法やサーベイランス法が臨床試験の開始までに確立されている必要がある。

ドナー動物のスクリーニングでは次のような感染性因子に対する配慮が必要となる：

- 動物種特有の感染性因子や寄生虫
- 内在性レトロウイルス（ERV、例えばブタ ERV）
- 人に感染することが知られている人獣共通感染症（例えば rabies（狂犬病））やトキソプラズマのような他の人獣共通感染因子（トキソプラズマは通常では人獣共通感染症とは考えられていないが治療に異種細胞薬を用いることにより感染が引き起こされる可

能性がある）

- ヒトに感染することが知られている因子
 - ヒト感染性因子の受容体がトランスジェニック動物で発現していないか。例えば麻疹ウイルスに対する細胞受容体として働く補体制御タンパク質である CD46（膜結合コファクタータンパク質、MCP-1）
 - 抗生物質耐性菌
 - トリパノゾーマやアフリカ黄熱病やアフリカブタコレラなど地理的に重要な感染因子
- さらに、次のような点についても考慮を払うべきである
- ドナー動物の食性
 - ヘルペスウイルスの経子宮感染のように潜在的な感染因子の伝播の可能性
 - 不顕性感染を検出できるような感受性の高い動物の使用

最初に樹立した動物やドナー動物は伝達性海綿状脳症の感染の可能性がないものでなければならず、ドナー動物の群れを樹立してからの給餌記録が保存されており、その餌には伝達性海綿状脳症因子の混入の可能性が否定されている必要がある。ウシ、羊、山羊を用いる場合には、医薬品や動物薬品を介した伝達性海綿状脳症因子の伝播のリスクを最小限にするための CPMP/CVMP の通知が適応される。

2. 6 細胞・組織や記録の保存

用いた組織や細胞、あるいはその記録を長期にわたって保存しておくべきである。保存期間は、現在製薬企業に求められている期間より長期にわたるべきであり、20－40年が目安になる。製造者は製造プラントや動物施設においてそのように長期間にわたって試料や記録を保存する計画案を規制当局に提出する必要がある。これは医薬品の品質・安全性をモニタリングし、長期にわたって投与された患者の安全性に関して遡及調査を行うための基本的要件である。

トレーサビリティを担保し、十分な遡及調査が可能な様に組織サンプルの保存方法を確立するとともに、その妥当性が検証されている必要がある。注意深く保管する全ての検体は、可能な限り医薬品として製造された原料を代表するものでなければならない。保管検体は適切な条件下に置かれ、火災や洪水に遭遇しないような条件に置かれなければならない。保管検体に責任をもつ者を指名し、それ以外の者の保管検体への立ち入りを制限しておく必要がある。

病理検査、ハイブリダイゼーションアッセイ、抗体検査、PCR といった様々な方法で解析できる様に様々な検体が保管されている必要がある。検体には少なくとも検査対象となるべき組織（例えば、脾臓、肝臓、骨髄、中枢神経系、肺）、体液、血液などが含まれていなければならない。アッセイに動物を用いた場合は、その試験動物検体を実際のドナー動物の検体と同様の方法で保存しておくべきである。保管に際しては、適切な方法で採取され、将来の検査が可能な保管条件を選択する必要がある。血液検体は、 -70°C で保管するべきであり、またパラフィン包埋検体などでは冷暗所に保管するべきである。長期の保存のためにはパラフィン包埋ブロックを作成することが推奨される。

異種細胞治療薬の全てのバッチについてラベルをして、保管検体が適切にトレースできるようにしておくべきである。保管検体は研究など他の目的には使用してはならない。

動物群の給餌記録や健康記録、ドナー動物の病歴等の全ての記録は少なくとも保管検体の保存されている期間は保管しておく必要がある。これらの記録は保管検体とは別のところで保存することも可能である。電子媒体による記録を行う場合には、コンピュータシステムの安全性を評価しておく必要がある。すなわち電子データが保存期間の終わりまで、保護できるように適切な注意を払

うべきである。

3. 製造

3. 1 一般的留意事項

異種細胞治療薬の有効成分は、一定数あるいは一定量の生きている異種細胞と規定することができる。また、最終製品は臨床使用目的に応じて製剤化された一定数の異種細胞と規定できる。

有効成分は次のような原料から製造工程を経て作られたものである。

— 器官や組織。一定数の細胞は、新鮮な組織／器官／体液等から分離された初代培養細胞から製造されることになる。製造工程では、工程内中間製品としての細胞プールも含む場合もある。この細胞プールは初代細胞そのものである場合もあるし、限られた継代を経た後、保存される場合も想定される。一定量の細胞プールが製剤の製造に用いられることになる。細胞プールは新鮮な組織や器官から一定のサイクルで製造されることになる。

以上の他、有効成分の細胞はマスターセルバンクやワーキングセルバンクと言った特性解析された細胞バンクシステムから作られる場合もある。このような細胞バンクシステムは、限られた寿命を持つ初代培養細胞を形質転換したり、あるいは形質転換せずに作成される場合も考えられる。

製造施設は動物施設や動物から組織や器官を調製する施設と物理的に隔離されていなければならない。一つの施設で、多様な組織や細胞を採取、加工、保管する場合や、液体窒素保管デュアーでの保管等では、細胞のクロスコンタミネーションの可能性が高くなるため、クロスコンタミネーションを防止する十分な方策をたてておく必要がある。

3. 2 製造工程の設計

フローチャート

組織/器官あるいは細胞バンクからの全ての工程のフローチャートを作成し、重要な工程や工程内製品（中間工程細胞プール）を示すとともに、そのモニタリングのためのパラメーターやインプロセスコントロールについても明らかにしておくべきである。

組織/器官

様々な組織や器官が異種細胞製品の原料になると考えられる。そのような原料の採取に当たっては環境や採取者からの汚染を防止しなければならない。

細胞や組織を採取場所から製造施設へ輸送する必要がある場合には、製造全般にわたっての品質が確保されるようにその輸送条件をバリデートされていないとしない。

組織や器官の受け入れ基準として品質管理パラメーターを設定しておく必要があり、際輸条件や保存条件も考慮して設定する必要がある。特に、出発原料の機能に関して十分に特性解析を行い、受け入れ規格を定めておくべきである。特性解析された細胞バンクシステムを製造に用いる場合には、CPMP 通知の「ヒト体細胞治療薬の製造と品質管理に関する指針」に書かれている、MCB や WCB の樹立とその特性解析と試験方に関する情報を参考にすべきである。

細胞加工法

上記したような適切な品質管理プロトコルを確立した上で、組織/器官の加工に関して次のようなステップに従い行うべきである：

- 組織/器官の分離
- 目的とする細胞の分離
- 細胞培養
- 細胞の形質転換（物理化学的手法や遺伝子挿入等）

組織/器官の分離

用いる酵素、培地を含め、細胞/組織から細胞を

分離する手法について詳細に記載していなければならない。原料を得たドナー動物由来のウイルス安全性や感染性プリオンが含まれないことを明確にする必要がある。細胞としての機能を維持しながら組織等の分散のためにどの程度の酵素処理等を施すのかを十分に検討しておくべきであり、目的以外の細胞のクロスコンタミネーションを最小限にする方策についても検討しておくなければならない。

目的細胞の分離

目的とする細胞の分離方法を記載しておくなければならない。分離した細胞の純度や均一性等の観点からその手法の妥当性を明らかにしておく必要がある。

細胞培養

分離した細胞は、その増殖性が十分に保証された最適の条件で培養しなければならない。培養の各工程は、細胞のバイアビリティや機能が十分に保持されるようにデザインされている必要がある。各操作工程を詳細に記述しておくとともに、適切な工程管理を行い、それぞれの工程をモニターできるようにしておく必要がある。微生物汚染の防止は、工程管理や品質保証の柱である。培養中の細胞のモニタリングにおいては、いくつかの工程を選び、細菌、酵母、真菌、マイクログラズマなどの感染性因子の否定試験を行う必要がある。培養においては、手順書や細胞の増殖能の変化等をモニターすることにより微生物汚染が無いことを確認しなければならない。特定のウイルスを検出するための試験法を確立しておく必要とされる。細胞培養工程の一定性や再現性を示すデータが必要である。細胞のバイアビリティ、細胞密度/培養上限の指標、純度、全培養期間、許容される最大 PDLs 数などの規格値（限界値）を設定しておく必要がある。

－ 不均一な細胞集団のなかでの目的細胞の確認試験と細胞純度