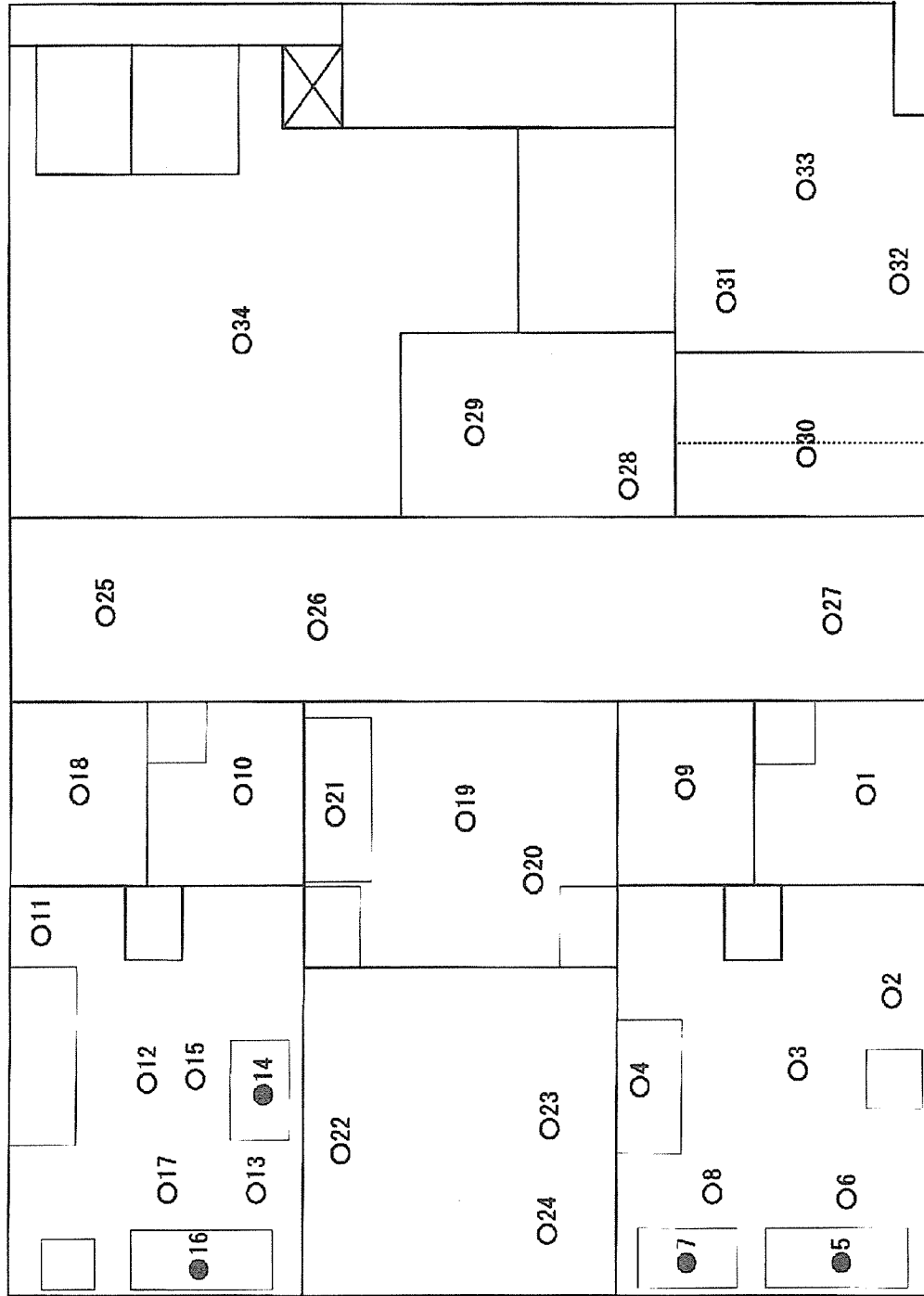


1～34：測定ポイント



浮遊微粒子測定場所

(添付1-4)

調査場所名	サンプリングポイント	一般細菌 / 真菌
着衣室 1	1	0 / 0
操作室 1	2	0 / 0
操作室 1	3	0 / 0
操作室 1	4	0 / 0
安全キャビネット	5	0 / 0
操作室 1	6	0 / 0
安全キャビネット	7	0 / 0
操作室 1	8	0 / 0
脱衣室 1	9	0 / 0
着衣室 2	10	0 / 0
操作室 2	11	0 / 0
操作室 2	12	0 / 0
操作室 2	13	0 / 0
安全キャビネット	14	0 / 0
操作室 2	15	0 / 0
安全キャビネット	16	0 / 0
操作室 2	17	0 / 0
脱衣室 2	18	0 / 0
準備室	19	0 / 0
準備室	20	0 / 0
準備室	21	0 / 0
培養室	22	0 / 0
培養室	23	0 / 0
培養室	24	0 / 0
廊下	25	0 / 0
廊下	26	0 / 0
廊下	27	0 / 0
製品保管室	28	0 / 0
製品保管室	29	0 / 0
AL 室 1	30	0 / 0
前室	31	2 / 0
前室	32	0 / 0
前室	33	0 / 0
AL 室 2	34	0 / 0
原料保管室	35	0 / 0
原料保管室	36	0 / 0

浮遊菌検査結果 (2005 / 12 / 1)

調査場所名	サンプリングポイント	測定値 (CFU)		吸引量 (L)
		一般細菌	真菌	
着衣室 1	1	0	0	250
操作室 1	2	0	0	250
操作室 1	3	0	0	250
操作室 1	4	0	0	250
安全キャビネット	5	0	0	1,000
操作室 1	6	0	0	250
安全キャビネット	7	0	0	1,000
操作室 1	8	0	0	250
脱衣室 1	9	0	0	100
着衣室 2	10	1	0	250
操作室 2	11	0	0	250
操作室 2	12	0	0	250
操作室 2	13	0	0	250
安全キャビネット	14	0	0	1,000
操作室 2	15	0	0	250
安全キャビネット	16	0	0	1,000
操作室 2	17	0	0	250
脱衣室 2	18	0	0	100
準備室	19	0	0	100
準備室	20	1	0	100
準備室	21	0	0	100
培養室	22	0	0	250
培養室	23	0	0	250
培養室	24	1	0	250
廊下	25	0	0	100
廊下	26	2	0	100
廊下	27	0	0	100
製品保管室	28	0	0	100
製品保管室	29	5	0	100
AL 室 1	30	0	0	100
前室	31	3	0	100
AL 室 2	32	4	0	100
原料保管室	33	4	0	100
原料保管室	34	2	0	100

	調査場所名	サンプリングポイント	一般細菌 / 真菌
着衣室 1	床	1	0 / 0
	壁	2	0 / 0
	壁	3	0 / 0
	パスボックス 底面	4	0 / 0
	パスボックス 側面	5	0 / 0
操作室 1	床	6	0 / 0
	床	7	0 / 0
	床	8	0 / 0
	床	9	0 / 0
	壁	10	0 / 0
	壁	11	0 / 0
	壁	12	1 / 0
	天井	13	0 / 0
	安全キャビネット 底面	14	0 / 0
	安全キャビネット 側面	15	0 / 0
	安全キャビネット 天井面	16	0 / 0
	床	17	0 / 0
	安全キャビネット 底面	18	0 / 0
	安全キャビネット 側面	19	0 / 0
安全キャビネット 天井面	20	0 / 0	
脱衣室 1	床	21	0 / 0
	床	22	0 / 0
着衣室 2	壁	23	0 / 0
	床	24	0 / 0
	壁	25	0 / 0
操作室 2	壁	26	0 / 0
	床	27	0 / 0
	床	28	0 / 0
	床	29	0 / 0
	床	30	0 / 0
	壁	31	0 / 0
	壁	32	0 / 0
	壁	33	0 / 0
	天井	34	0 / 0
	安全キャビネット 底面	35	0 / 0
	安全キャビネット 側面	36	0 / 0
	安全キャビネット 天井面	37	0 / 0
	床	38	0 / 0
	安全キャビネット 底面	39	0 / 0
安全キャビネット 側面	40	0 / 0	
安全キャビネット 天井面	41	0 / 0	

	調査場所名	サンプリングポイント	一般細菌 / 真菌
操作室 2	床	42	0 / 0
脱衣室 2	床	43	0 / 0
	壁	44	0 / 0
	パスボックス 底面	45	0 / 0
	パスボックス 側面	46	0 / 0
	床	47	0 / 0
準備室	床	48	0 / 0
	床	49	0 / 0
	壁	50	0 / 0
	壁	51	0 / 0
	パスボックス 底面	52	0 / 0
	パスボックス 側面	53	0 / 0
	パスボックス 底面	54	0 / 0
	パスボックス 側面	55	0 / 0
	天井	56	0 / 0
	床	57	0 / 0
培養室	床	58	0 / 0
	床	59	0 / 0
	床	60	0 / 0
	壁	61	0 / 0
	壁	62	0 / 0
	壁	63	0 / 0
	天井	64	0 / 0
	床	65	1 / 0
廊下	床	66	0 / 0
	壁	67	0 / 0
	壁	68	0 / 0
	床	69	0 / 0
製品 保管室	壁	70	0 / 0
	壁	71	0 / 0
	床	72	2 / 0
AL 室 1	壁	73	0 / 0
	床	74	3 / 0
前室	床	75	4 / 0
	壁	76	0 / 0
	インキュベーター 上	77	0 / 0
培養室	インキュベーター 下	78	0 / 0
	インキュベーター 上	79	0 / 0
	インキュベーター 下	80	0 / 0
	AL 室 2	床	81
原料 保管庫	床	82	0 / 0
	床	83	0 / 0

浮遊菌検査結果 (2005 / 12 / 1)

調査場所名	サンプリングポイント	換算値 (個 / ft ³)		換算値 (個 / 0.1ft ³)	
		≥0.5 μm	≥5.0 μm	≥0.5 μm	≥5.0 μm
着衣室 1	1	552	8	55.2	0.8
操作室 1	2	170	3	17.0	0.3
操作室 1	3	253	7	25.3	0.7
操作室 1	4	127	0	12.7	0.0
安全キャビネット	5	0	0	0.0	0.0
操作室 1	6	257	0	25.7	0.0
安全キャビネット	7	0	0	0.0	0.0
操作室 1	8	50	0	5.0	0.0
脱衣室 1	9	653	10	65.3	1.0
着衣室 2	10	623	0	62.3	0.0
操作室 2	11	267	7	26.7	0.7
操作室 2	12	120	0	12.0	0.0
操作室 2	13	662	13	66.2	1.3
安全キャビネット	14	0	0	0.0	0.0
操作室 2	15	67	3	6.7	0.3
安全キャビネット	16	0	0	0.0	0.0
操作室 2	17	107	0	10.7	0.0
脱衣室 2	18	937	17	93.7	1.7
準備室	19	73	0	7.3	0.0
準備室	20	402	0	40.2	0.0
準備室	21	185	12	18.5	1.2
培養室	22	420	11	42.0	1.1
培養室	23	50	0	5.0	0.0
培養室	24	286	7	28.6	0.7
廊下	25	888	40	88.8	4.0
廊下	26	922	37	92.2	3.7
廊下	27	1,027	42	102.7	4.2
製品保管室	28	986	75	98.6	7.5
製品保管室	29	789	44	78.9	4.4
AL 室 1	30	986	37	98.6	3.7
前室	31	1,333	33	133.3	3.3
前室	32	1,603	47	160.3	4.7
前室	33	988	33	98.8	3.3
原料保管室	34	1,200	44	120.0	4.4

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

1. GMP および GTP に準拠した培養法の確立

1-2 治療用細胞の作製に特化した GMP システム構築の必要性

分担研究者：前川 平

（京都大学輸血細胞治療部 教授）

研究要旨

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。細胞プロセッシングを受けたヒトの組織や細胞を「細胞医薬品」として治療に応用するためには、これらの作業行程に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求められていることは容易に理解できる。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（トランスレーショナル・リサーチ）に GMP（Good manufacturing Practice）準拠の細胞プロセッシングが必須とされている。今後、我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する臨床研究には GMP に準拠した細胞プロセッシングが不可欠となる。GMP 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、研究開発の安全性試験の実施については GLP（Good Laboratory Practices）が制定され、臨床試験のルールとしては GCP（Good Clinical Practices）を遵守しなければならない。

A. 研究目的

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。細胞プロセッシングを受けたヒトの組織や細胞を「細胞医薬品」として治療に応用するためには、これらの作業行程に医薬品や治療薬の製造と同等の安全性と高い品質管理が求められている。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(トランスレーショナル・リサーチ、Translational Research, TR) に GMP (Good Manufacturing Practice) 準拠の細胞プロセッシングが必須とされている。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 TR 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、細胞プロセッシングセンターである京都大学医学部附属病院輸血細胞治療部に隣接して設置された分子細胞治療センター(Center for Cell and Molecular Therapy)での経験をもとに、どのように構築すべきかについて、欧米での取り組みも参考にしながら、その道筋を示すことを目的とした。

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. 細胞治療に必要なインフラストラクチャー

細胞治療(Cell Therapy)とは、輸血、造血幹細胞移植、細胞免疫療法などのヒト細胞を輸注、移植することにより行う治療法の総称である。現在脚光を浴びている再生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。これらの先端医療開発により恩恵を受けると考えられる人々は1億人を超えると試算する報告もある。当然、こういった細胞治療に関する TR の開発には、科学的、倫理的に高い水準と透明性、そして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(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。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 グレードで製造されたものが用いられる。治療に用いるヒト細胞を「細胞医薬品」と考えれば、細胞治療に関する探索的臨床試験研

究にも、GMP 準拠の細胞プロセッシングを受けた細胞を準備して用いる必要があることは容易に理解される。すなわち、治療に用いる細胞は、細胞プロセッシングという一定のルールに基づいた過程を経て作製されなければならない。したがって、細胞プロセッシングがなければ細胞治療の臨床応用開発はできない。言い換えれば、細胞治療や再生治療に関しては、施設や GMP 基準など細胞プロセッシングに関するインフラストラクチャーが構築できなければ、いくら基礎研究の成果が得られてもそれだけでは臨床応用は不可能である。

米国では開発中の新薬は IND(Investigational New Drug)として FDA から認可されたものが臨床試験に用いられ、わが国でも医薬品に関して同様の体制がとられている。細胞治療に用いるヒト細胞も米国では IND として認可され、FDA は細胞を作製する細胞プロセッシングセンターの査察を行う。さらに、治療用ヒト細胞の作製は、2001 年 1 月 FDA の提言、cGTP(Good Tissue Practice : Current Good Tissue Practice for Manufacturers of Human Cellular and Tissue-Based Products; Inspection and Enforcement; Proposed Rule) に準拠して行わねばならないとしている。cGTP はおもに細胞治療による感染症の伝播を危惧したものであり、その防止方策に関係するルールや規制を記載したものである。わが国では、2003 年 7 月から発効した改正薬事法で“生物由来製品については、その感染リスク等を踏まえ、

原材料の採取及び製造から市販後に至る各段階において、一般の医薬品、医療機器等における各種基準に加え、以下に掲げる付加的な基準を定めることにより、一層の安全確保を図ることとしたこと。

(中略) 製造段階においては、構造設備、製造管理及び品質管理の方法について、生物由来製品の特性に応じた付加的な基準を設けること”とし、これらに関する下位の法令は平成 17 年 4 月に公布予定とされている。しかし、これらは血漿分画製剤などを念頭に置いたものであり、血漿分画製剤と治療に用いようとするヒト細胞では、そのプロセッシング方法は大きく異なる。現時点で、わが国では治療用ヒト細胞の作製に関するルールがなく、このことが、細胞治療に関する医師主導型の探索的臨床試験研究を大きく遅らせる原因のひとつとなっている。

最近、米国 CBER から preliminary concept paper として、“Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing Draft”が発表された。序文には“Poor cGMP conditions at a manufacturing facility can ultimately pose a life threatening health risk to a patient”と明記されている。この中で、無菌的プロセッシング施設が具備すべき機能やその設計基準、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念頭に置いてはいるが、細胞の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。

細胞プロセッシングに GMP は本当に

必要なのかとの疑問を聞く。臨床試験研究は ICH-GCP (Good Clinical Practice) を遵守して行う必要があり、それに用いる新薬は GMP グレードで作製したものを用いることを理解しておれば、細胞医薬品であるヒト細胞はどのように作製されたものを用いるべきかは明白であろう。実験室の片隅で、明確な基準や記録もなく、品質管理されずに作製された細胞を、誰も移植されたくはないであろう。

II. Institutional GMP (iGMP)の必要性

「そのようなインフラストラクチャーの構築は大学で行うべきことでなく、企業に任せておけば良い」と言う批判もある。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、大学などで開発しようとしているのは、基礎研究の成果をもとにした、まだ TR の段階のものがほとんどである。今後治療法として確立されるかどうか分からない段階の実験的医療開発の細胞プロセッシングにかかわる GMP の構築に、企業がリスクをとって積極的に参入することは困難である。加えて、企業の中でも、細胞プロセッシングに必要な GMP のノウハウを確立しているところはきわめて少ない。このような現状では、大学や先端医療センターが主導、あるいは施設としての場を提供するかたちで、研究者、臨床研究医、薬剤師、技師、GMP コンサルタント、企業の先端医療開発部門の研究者が一致協力して、世界的ルールにもとづいたものを構築し

て行く必要がある。

米国では、先端医療開発を行っている大学や先端医療センターには、細胞プロセッシングセンターを併設しているところが多い。臨床応用可能であると言う目処がつけば、企業も参入が容易になるであろうし、また将来的に治療法として確立され、保険適用もされるようになれば、輸血製剤と同様に、全国にある血液センターが細胞プロセッシングセンターの役割を担い、各病院へ供給するようになると考えている。

「細胞プロセッシングはサイエンスではない。大学や先端医療研究センターで行う必要はない」と言う意見もある。確かに、細胞プロセッシングはピュアー・サイエンスではない。わが国では、基礎研究の成果を臨床応用しようとしても、そのインフラストラクチャーが不十分であるために欧米の後塵を拝している。基礎研究の成果を社会に還元する「実学」の必要性が認識されるようになり、細胞治療の開発に関しては、そのインフラストラクチャーの一部を細胞プロセッシングが占める。科学知を社会に還元することの必要性を主張し、それを行うのが大学や先端医療研究センターであるべきと考えるならば、先端医療開発のための細胞プロセッシングをどこで行うべきかは明白であろう。

では、米国の大学や先端医療開発センターで行われている細胞プロセッシングに、FDA はどのようにかかわっているのだろうか？ 基礎研究の成果を臨床応

用しようとする際、まず研究者や臨床研究医が臨床試験計画書を作成するとともに、それが細胞治療、再生治療、遺伝子治療などにかかわる場合には、細胞プロセッシングに必要な施設の詳細やバリデーション・マスタ

順書、標準作業手順書（SOP）など 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 はこれらの研究計画に使用される治療用細胞を、IND として審査を開始するが、同時に施設の査察、および GMP 書類についても指導を行う。この際、FDA の係官は、企業などに要求される GMP(=full GMP)の内容をもとにしつつも、大学などの実情を考慮した実験的治療開発に必要な GMP(=institutional GMP, iGMP)の作成に協力を惜しまない。たとえば、膝臓ランゲルハンス島細胞移植に必要な細胞プロセッシングに関しては、FDA の係官が施設を査察するとともに、大学の人的余裕などを考慮し、研究者や臨床研究医とともに GMP 構築に必要な書類を点検し、最低限必要な事項を示し、不備な点があれば改善するように指導を行っている。Full GMP と iGMP の大きな違いは、前者では違反や不備があれば製造中止命令が出され罰則を伴うが、後者では改善するように勧告を行う、と言うことである。成文化された iGMP があるわけではないが、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ベ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国家戦略をとってい

る FDA が行っているような iGMP を考慮した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がそのスタンダードを構築する必要がある。わが国において iGMP を構築する必要があると主張する所以である。

2006 年 1 月、米国 FDA から” Guidance for Industry, INDs – Approaches to Complying with CGMP During Phase I”、および “ Guidance for Industry, Investigators, and Reviewers – Exploratory IND Studies “というポジションペーパーが発表された。まだ draft guidance の段階であり、パブリックコメントを聴取している最中であるが、大学などで行なわれる TR（フェーズ I）における GMP 基準の在り方を示したものであり、iGMP の考え方と共通するものである。本報告書の末尾に参考資料として添付する。

D. 結論

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同時に培養したり、あるいは施設の倫理委員会で承認されたから良しとして、ウシ胎児血清で培養したヒト細胞や、マウス細胞と共培養したヒト細胞を人に投与する計画を申請しているところがある。FDA は無血清での培養を基本として指導を行い、またマウス細胞と共培養するこ

とは異種移植であるとして原則認めていない。未知のウイルスの危険性や、通常なら人への感染は生じないはずの動物ウイルスも、遺伝子に変異することにより、人へ感染する可能性が危惧されるからである。無血清培養系あるいは異種細胞をもちいない培養系が望まれることには誰も異論はないであろう。研究者は、これらの培養系の開発に努力すべきである。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る、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実験的探索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。

E. 健康危険情報

特記事項なし

F. 研究発表

1). 論文発表

1. Kimura, S., Ito, C., Jyoko, N., Segawa,

H., Kuroda, J., Okada, M., Adachi, S., Nakahata, T., Yuasa, T., Filho, V.C., Furukawa, H., Maekawa, T.: Inhibition of leukemic cell growth by a novel anti-cancer drug (GUT-70) from *Calophyllum brasiliense* that acts by induction of apoptosis. *Int J Cancer*, 113(1):158-165, 2005.

2. Matsumoto, S., Kimura, S., Segawa, H., Kuroda, J., Yuasa, T., Sato, K., Nogawa, M., Tanaka, F., Maekawa, T., Wada, H. : Efficacy of the third-generation bisphosphonate zoledronic acid alone and combined with anti-cancer agents against small cell lung cancer cell lines. *Lung Cancer*, 47(1):31-39, 2005.
3. Kimura, S., Yurugi, K., Segawa, H., Kuroda, J., Sato, K., Nogawa, M., Yuasa, T., Egawa, H., Tanaka, K., Maekawa, T.: Rapid quantitation of IgG antibodies specific for blood group antigens A and B by surface plasmon resonance. *Transfusion*, 45(1):56-62, 2005.
4. Nogawa, M., Yuasa, T., Kimura, S., Kuroda, J., Sato, K., Segawa, H., Maekawa, T.: Monitoring luciferase-labeled cancer cell growth and metastasis in different in vivo models. *Cancer Lett*, 217(2):245-253, 2005.

5. Nogawa, M., Yuasa, T., Kimura, S., Kuroda, J., Segawa, H., Sato, K., Koizumi, M., Maekawa, T.: Zoledronic acid mediates Ras-independent growth inhibition of prostate cancer cells. *Oncol Res*, 15(1):1-9, 2005.
6. Sato, K., Kimura, S., Segawa, H., Yokota, A., Matsumoto, S., Kuroda, J., Nogawa, M., Yuasa, T., Kiyono, Y., Wada, H., Maekawa, T.: Cytotoxic effects of gamma delta Tcells expanded ex vivo by a third generation bisphosphonate for cancer immunotherapy. *Int J Cancer*, 116(1) : 94-99, 2005.
7. Maekawa, T., Kimura, S., Kasai, Y.: Development of novel advanced cell and gene therapy and GMP-controlled cell processing. *JMAJ*, 48(2):1-4, 2005.
8. Yuasa, T., Tsuji, H., Kimura, S., Niwa, N., Yurugi, K., Egawa, H., Tanaka, K., Maruya, E., Saji, H., Asano, H., Maekawa, T.: HLA in Japanese patients with biliary atresia - a retrospective analysis in the patients with living donor liver transplantation -. *Hum Immunol* 66(3): 290-295, 2005.
9. Segawa, H., Kimura, S., Kuroda, J., Sato, K., Nogawa, M., Yuasa, T., Yokota, A., Hodohara, K., Fujiyama, Y., Maekawa, T.: The anti-leukemic efficacy of the third generation bisphosphonate ONO5920/YM529. *Leuk Res*, 29(4): 451-457, 2005.
10. Nogawa, M., Yuasa, T., Kimura, S., Tanaka, M., Kuroda, J., Sato, K., Yokota, A., Segawa, S., Toda, Y., Kageyama, S., Yoshiki, T., Okada, Y., Maekawa, T.: Intravesical administration of small interfering RNA targeting PLK-1 successfully prevents the growth of bladder cancer. *J Clin Invest*, 115(4): 978-985, 2005.
11. Maekawa, T.: Establishment of institutional GMP is mandatory for the development of translational research in cell therapy. *J Pharmacol Sci*, 97:20, 2005.
12. Yuasa, T., Nogawa, M., Kimura, S., Yokota, A., Sato, K., Segawa, H., Kuroda, J., Maekawa, T.: A third generation bisphosphonate minodronic acid (YM529), augments the interferon a/b-mediated inhibition of renal cell cancer cell growth both in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res*, 11(2 Pt 1):853-859, 2005.
13. Yuasa, T., Niwa, N., Kimura, S., Yurugi, K., Tsuji, H., Egawa, H., Tanaka, K., Asano, H., Maekawa, T.: Intraoperative

- blood loss during living related liver transplantation: analysis of 635 cases at a single center. *Transfusion*, 45(6):879-884, 2005.
14. Matsumoto, S., Okitsu, T., Iwanaga, Y., Noguchi, H., Nagata, H., Yonekawa, Y., Yamada, Y., Fukuda, K., Tsukiyama, K., Suzuki, H., Kawasaki, Y., Shimodaira, M., Matsuoka, K., Shibata, T., Kasai, Y., Maekawa, T., Shapiro, A.M.J., Tanaka, K.: Insulin independence after living-donor distal pancreatectomy and islet allo-transplantation. *Lancet*, 365(9471): 1642-1644, 2005.
 15. Segawa, H., Kimura, S., Kuroda, J., Sato, K., Yokota, A., Kawata, E., Kamitsuji, Y., Ashihara, E., Yuasa, T., Fujiyama, Y., Ottmann, O.G., Maekawa, T.: Zoledronate synergizes with imatinib mesylate to inhibit Ph⁺ primary leukaemic cell growth. *Br J Haematol*, 130: 558-560, 2005.
 16. Kimura, S., Naito, H., Segawa, H., Kuroda, J., Yuasa, T., Sato, K., Yokota, A., Kamitsuji, Y., Kawata, E., Ashihara, E., Nakaya, Y., Naruoka, H., Wakayama, T., Nasu, K., Asaki, T., Niwa, T., Hirabayashi, K., Maekawa, T.: NS-187, a potent and selective dual Bcr-Abl/Lyn tyrosine kinase inhibitor, is a novel agent for imatinib-resistant leukemia. *Blood*, 106(12): 3948-3954, 2005.
 17. Okitsu, T., Matsumoto, S., Iwanaga, Y., Noguchi, H., Nagata, H., Yonekawa, Y., Maekawa, T., Tanaka, K.: Kyoto islet isolation method: the optimized one for non-heart-beating donors with highly efficient islet retrieval. *Transplant Proc*, 37:3391-3392, 2005.
 18. Matsumoto, S., Okitsu, T., Iwanaga, Y., Noguchi, H., Yonekawa, Y., Nagata, H., Yamada, Y., Fukuda, K., Seino, Y., Shibata, T., Kasai, Y., Maekawa, T., Tanaka, K.: Successful islet transplantation from non-heart-beating donor pancreata using modified Ricordi islet isolation method. (Transplantation, in press)
 19. Horie, N., Murata, H., Nishigaki, T., Segawa, H., Yuasa, T., Kimura, S., Maekawa, T., Fushiki, S., Kubo, T.: The third-generation bisphosphonates inhibit tumor proliferation and induce apoptosis in murine osteosarcoma in vitro. (Cancer Lett, in press).
 20. Kimura, S., Maekawa, T.: Stem cell transplantation for Ph⁺ leukemias in the imatinib and post-imatinib eras. *In*, "Bone Marrow Transplantation: New Research." (Nova Science Publishers, Inc. review, in press, 2005)

21. Naito, H., Kimura, S., Nakaya, Y., Naruoka, H., Kimura, S., Ito, S., Wakayama, T., Maekawa, T. and Hirabayashi, K.: *In vivo* inhibitory effect of NS-187, a dual Bcr-Abl/Lyn tyrosine kinase inhibitor, on the proliferation of leukemic cells harbouring Abl kinase domain mutations (Leuk Res, in press, 2006)
22. Kimura, S., Niwa, T., Hirabayashi, K., Maekawa, T.: Development of NS-187, a potent and selective dual Bcr-Abl/Lyn tyrosine kinase inhibitor. Cancer Chemo Pharmacol (in press, 2006)
23. 木村晋也、黒田純也、前川 平 : Ras 関連蛋白質シグナルを標的とした造血器腫瘍の分子標的治療. Annual Review 血液 2005 (高久史磨、溝口秀昭、坂田洋一、金倉 讓、小島勢二 編集)、中外医学社、東京、p.179-189, 2005.
24. 木村晋也、黒田純也、前川 平 : Ras superfamily シグナル伝達経路を標的とした白血病治療. 分子標的療法の基礎と臨床 (鶴尾 隆 監修)、篠原出版社、東京、pp. 175-184, 2005.
25. 木村晋也、前川 平 : 細胞内シグナル伝達系を阻害する薬剤. 3. Ras 阻害剤、2) Zoledronate. 分子標的治療薬—作用機序と臨床—. (元吉和夫、大野竜三編)、メディカル・レビュー社、東京、pp.143-151, 2005.
26. 辻 博昭、湯浅 健、前川 平 : 消化管出血の輸血療法. 消化器疾患診療実践ガイド (千葉勉、井廻道夫 編)、文光堂、東京、pp.266-269, 2005.
27. 湯浅 健、木村晋也、前川 平 : RNA を標的としたがん治療の可能性. 臨床腫瘍内科学入門 (金倉讓 編著)、永井書店、大阪、pp.117-121, 2005.
28. 前川 平 : 輸血療法の基礎と実際. 三輪血液病学 (浅野茂隆、池田康夫、内山 卓 監修)、文光堂、東京、pp.672-733, 2005.
29. 木村晋也、前川 平 : イマチニブ以後の白血病に対する分子標的療法薬. Annual Review 血液 2006 (高久史磨、溝口秀昭、坂田洋一、金倉 讓、小島勢二 編集)、中外医学社、東京、p.99-113, 2006.
30. 湯浅 健、野河正輝、木村晋也、前川 平 : 膀胱癌. 遺伝子医学 MOOK (中村義一編)、メディカル ドゥ
31. 前川 平 : 輸血・成分輸血. 内科学 (第九版). (矢崎義雄、小俣正男、水野美邦 監修)、朝倉書店、東京 (印刷中)

32. 湯浅 健、木村晋也、前川 平：Bisphosphonate の抗腫瘍作用. *Cancer Frontier*, 7:70-76, 2005.
33. 笠井泰成、前川 平：これからの臨床検査技師教育を考える—期待される活動領域と技師教育：高度先進医療部門. *臨床検査*, 49(8):872-873, 2005.
34. 万木紀美子、前川 平：ABO 血液型不適合移植と輸血—臓器移植看護を理解するためのキーワード—. *看護技術 (臨時増刊号「臓器移植看護の現在」)*, 51(12): 15-19, 2005.
35. 万木紀美子、木村晋也、前川 平：抗A, 抗B抗体価測定法の検討—表面プラズモン共鳴を応用した新規測定法—. *日本臨床検査医学会誌* 53(11):1011-1018, 2005.
36. Maekawa, T.: Establishment of institutional GMP is mandatory for the development of translational research in cell therapy. *J Pharmacol Sci*, 97:20, 2005.
37. 前川 平：RNA 干渉—その基礎と臨床応用—. *Front Wave in Hematology*, 15:4-7, 2005.
38. 木村晋也、上辻由里、前川 平：急性リンパ性白血病. *癌治療と宿主*, 18(1): 69-80, 2005.
39. 湯浅 健、丹羽紀実、辻 博昭、万木紀美子、江川裕人、田中紘一、木村晋也、前川 平：外科医のための輸血医学講座—肝移植における輸血—. *外科*, 67(5): 555-558, 2005.
40. 河田英里、芦原英司、木村晋也、前川 平：GVHD と腎障害. *腎と透析*, 59 (6) :970-976, 2005.
41. 芦原英司、前川 平：結腸がん細胞に対する $V\gamma 9V\delta 2T$ 細胞の腫瘍細胞認識機構. *分子細胞治療*, 5(2): 98-100, 2006.
42. 木村晋也、黒田純也、前川 平：Abl 点突然変異. *血液・腫瘍科 (印刷中)*
43. 黒田純也、木村晋也、前川 平：ビスフォスフォネート製剤の抗腫瘍作用. *感染免疫腫瘍 (印刷中)*
44. 木村晋也、芦原英司、前川 平：新規 dual Bcr-Abl/Lyn kinase inhibitor (血液・腫瘍科、2006 印刷中)

分担研究報告書

2. 品質管理法の確立

2-1 NOG mouse を用いた品質管理

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

我々は既に臍帯血 CD34+細胞を我々の開発した免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} 移植し、末梢血、骨髄、脾臓、胸腺等におけるヒト血液細胞の出現を確認している。さらに、その分化の方向性についても検討し、従来の免疫不全マウスでは認められないヒト T 細胞をも含むすべての系統への分化を確認した。また、我々の見出した、ヒト造血幹細胞の増幅に対して有効である sIL-6R を含むサイトカインの組み合わせを用いて増幅した細胞の幹細胞活性を、免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} を用いて検討した。その結果、上記各種組織にヒト造血細胞の出現が同様に確認され、胸腺等においてはヒト T 細胞の出現を確認した。

近年、造血細胞のもつ分化可塑性が注目されている。この分化可塑性の制御が可能となれば、造血細胞を用いて、肝臓、骨格筋、心筋等の様々な組織の再生が可能となり、既存の造血細胞供給システムを用いた新しい医療の展開が期待できる。今回我々は、ヒト臍帯血移植 NOD/SCID/ γ_c^{null} マウスを用いて、肝臓におけるヒト細胞の出現、分化、機能について検討を行った。Fas 抗体を用いた劇症肝炎モデル、CC14 を用いた慢性肝炎モデルのいずれにおいても、ヒト細胞由来肝細胞の出現が確認された。機能的にもヒトアルブミンの産生が免疫組織染色のみならず、血清中においても確認され、機能的にもヒト肝細胞が再生されていることが確認された。ヒト肝細胞再生に寄与する細胞分画の同定、その機構について検討を進めている。

A. 研究目的

Ex vivo 増幅造血幹細胞の臨床応用の為には、造血幹細胞の異種動物を用いた活性評価が不可欠である。異種動物への移植に際して、移植細胞の生着を許容するには、異種動物の持つ免疫機構が大きな障害となる。我々は、種々の免疫機構の障害を有する免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} を作成し、ヒト臍帯血の生着が可能であることを確認している。本研究においては、免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} が、ヒト造血幹細胞の幹細胞活性評価における有用性について検討を進める。さらに、近年、造血（幹）細胞の他組織への可塑性について注目が集まっているが、寄与する細胞分画やその機構に関しては、不明の点が多い。NOD/SCID/ γ_c^{null} マウスを用いることにより、ヒト細胞における分化可塑性の検討が可能となる。

B. 研究方法

ヒト臍帯血由来 CD34⁺細胞を、放射線照射した免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} に移植し、末梢血、骨髄、脾臓、胸腺への、ヒト細胞の生着の動態を検討する。従来の免疫不全マウス NOD/SCID においては、ヒト T 細胞の出現が明らかでなかったが、NOD/SCID/ γ_c^{null} マウスを用いることにより、ヒト T 細胞を含むすべての系統への分化の検証がなされ、ヒト幹細胞活性評価のために、同マウスが有用であることが示された。本研究においては、IL-6/soluble IL-6R を含むサイトカインで ex vivo 増幅を行ったヒト造血幹細胞について、同様の方法にて造血幹細胞活

性測定を行う。さらに、ヒト臍帯血 CD34⁺細胞移植を行った NOD/SCID/ γ_c^{null} マウス由来骨髄細胞を用いて second transplantation を行い、骨髄再構築の有無について検討する。また、ヒトへの応用を視野に入れ、無血清培地で ex vivo 増幅したヒト臍帯血 CD34⁺細胞を用いて、同様の実験を行う。さらに今回は、現在注目を集めている造血幹細胞の可塑性についても、様々な組織障害を与え、肝臓、筋肉、神経等の組織における移植ヒト細胞の再生過程における寄与について、検討する。

C. 研究結果

我々は、既に臍帯血 CD34⁺細胞を我々の開発した免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} 移植し、末梢血、骨髄、脾臓、胸腺等におけるヒト血液細胞の出現を確認している。さらに、その分化の方向性についても検討し、従来の免疫不全マウスでは認められないヒト T 細胞をも含むすべての系統への分化を確認した。これらの T 細胞は、TCR の多様性を持ち、CTL 活性等の機能も有することを明らかにした。また、我々の見いだしたヒト造血幹細胞の増幅に対して有効である sIL-6R を含むサイトカインの組み合わせを用いて増幅した細胞の幹細胞活性を、免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} を用いて検討した。その結果、上記各種組織にヒト造血細胞の出現が同様に確認され、胸腺等においてはヒト T 細胞の出現を確認した。この結果により、我々のサイトカインを用いたヒト造血幹細胞増幅システムの有用性が、in vivo のシステムを用いて確認された。こ

これらの結果を踏まえ、マウス骨髄に、移植可能なヒト造血幹細胞が生着、増幅していることを確認するため、second transplantation の実験を行った。その結果、second transplantation によっても、上記各種組織にヒト造血細胞の出現が同様に確認され、免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} が、ヒト造血幹細胞活性測定に有用であることが、再確認された。また、Fas 抗体による劇症肝炎モデル、CC14 による慢性肝炎モデル等、組織障害の加わった肝臓において、移植ヒト細胞の肝細胞への分化を確認した。さらに、免疫組織染色により、これらの細胞がヒトアルブミンを産生し、機能的にもヒト肝細胞として成熟していることが確認された。ヒトアルブミンは、マウス血清中において ELISA 法を用いて測定可能量産生されており、治療基盤技術開発の面よりも、有用なシステムであることが示された。なお、ヒト細胞の肝細胞への分化は、ヒト細胞とマウス細胞との融合により生成されることが明らかとなった。今後、移植ヒト造血細胞が、どのような分子生物学的機構を介して肝細胞への分化能を獲得するのか、検討の余地を残している。

D. 考察

免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} において、ヒト臍帯血 CD34+細胞よりの T 細胞を含む全血球への分化が証明された。マウス、ヒトの異種動物間において、免疫学的バリアーを超えて、ヒト血球細胞の出現が確認できたことは驚きに値する。NOD/SCID マウスと NOD/SCID/ γ_c^{null} マウスで認める免疫障害の差異を鑑みるに、

リンパ球に代表される獲得免疫系に加えて、NK 細胞などの自然免疫系が生着に大きく寄与することが明らかとなった。さらに、NOD/SCID/ γ_c^{null} マウスに認める樹状細胞などの機能も、ヒト細胞の生着に大きく関与することが推測される。一方、造血幹細胞よりの分化の過程には、サイトカイン、接着分子等の様々な分子が寄与することが判っている。今回、免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} においてヒト造血幹細胞の分化が確認されたことにより、マウス、ヒト間において分化に必須な分子は redundancy を有することが明らかとなった。また、肝障害下において、移植ヒト臍帯血のヒト肝細胞への分化が確認され、既存の造血細胞供給システムを用いた、新しい治療体系の確立が期待される。しかし、その効率性、安全性を担保するためには、その機構に関して、より一層の検討を必要とする。

E. 結論

免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} は、ヒト造血細胞の生着を許容するのみでなく、ヒト臍帯血 CD34+細胞よりの、機能的血球細胞、免疫細胞の分化をも誘導することにより、in vivo での優れたヒト造血幹細胞活性系と成りうることを明らかとなった。また、造血細胞の持つ分化可塑性も評価できるシステムであることも明らかとなり、NOD/SCID/ γ_c^{null} マウスが、ヒト細胞を用いた再生医療の確立の為に必要な有効性、安全性の面より、多くの貴重な知見を提供してくれることが期待される。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

G. 研究発表

- 1 Kato T, Heike T, Okawa K, Haruyama M, Shiraishi K, Yoshimoto M, Nagato M, Shibata M, Kumada T, Yamanaka Y, Hattori H, Nakahata T A neurosphere-derived factor, Cystatin C, supports differentiation of ES cells into neural stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2006 in press
- 2 Kanazawa N, Okafuji I, Kambe N, Nishikomori R, Nakata-Hizume M, Nagai S, Fuji A, Yuasa T, Manki A, Sakurai Y, Nakajima M, Kobayashi H, Fujiwara I, Tsutsumi H, Utani A, Nishigori C, Heike T, Nakahata T, Miyachi Y. : Early-onset sarcoidosis and CARD15 mutations with constitutive nuclear factor- κ B activation: common genetic etiology with Blau syndrome Blood 105:1195-1197, 2005.
- 3 Yasumi, T., Katamura, K., Okafuji, I., Yoshioka, T., Meguru, T., Nishikomori, R., Kusunoki, T., Heike, T. and Nakahata, T.: Limited ability of antigen-specific Th1 responses to inhibit Th2 cell development in vivo. J. Immunol. 174:1325-1331, 2005.
- 4 Nagato, Heike T., Kata T., Yamanaka Y., Yoshimoto M., Shimazaki T., Okano H., and Nakahata T.: Prospective characterization of neural stem cells by flow cytometry analysis using a combination of surface markers. J Neurosci Res 80: 456-466, 2005.
- 5 T. Kusunoki, I. Okafuji, T. Yoshioka, M. Saito, R. Nisikomori, T. Heike, M. Sugai, A. Shimizu, T. Nakahata :SPRINK5 polymorphism is associated with disease severity and food allergy in children with atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol 115: 636-638, 2005
- 6 Kawamura T., Ono K., Morimoto T., Wada H., Hirai M., Hidaka K., Morisaki T., Heike T., Nakahata T., Kita T, and Hasegawa K.: Acetylation of GATA-4 is involved in the differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. J. Biol. Chem. J Boil Chem 280: 19682-19688, 2005
- 7 Yoshimoto M., Chang H., Shiota M., Kobayashi H., Umeda K., Kawakami A., Heike T., and Nakahata T.: Two different roles of purified CD45+ c-kit+ Sca-1+ Lin- cells after transplantation in muscles Stem Cells 23: 610-618, 2005.
- 8 Saito, M., Fijisawa, A., Nishikomori, R., Kambe, N., Nakata-Hizume, M., Yoshimoto, M., Ohmori, K., Okafuji, I., Yoshioka, T., Kusunoki, T., Miyachi, Y., Heike, T., and Nakahata, T.: Somatic mosaicism of CIAS1 in a patient with chronic infantile neurogenic, cutaneous, articular syndrome. Arthritis & Rheumatism 52: 3579-3585, 2005.