

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

サイトカインによる増幅培養臍帯血による
臍帯血移植の臨床試験

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中 畑 龍 俊

平成19 (2007) 年3月

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

Health and Labour Sciences Research Grants,
Translational research, Ministry of Health, Labour and Welfare

サイトカインによる増幅培養臍帯血による
臍帯血移植の臨床試験

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中 畑 龍 俊

先端医療センター 再生医療研究部
京都大学大学院医学研究科発生発達医学講座

はじめに

本報告書は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」の一つである、「サイトカインによる増幅培養臍帯血による臍帯血移植の臨床試験」研究班における平成 18 年度の研究成果をまとめた報告書である。

本研究班は、サイトカインを用いて造血幹/前駆細胞を効率よくかつ安全に増幅する基礎的な研究成果を、臍帯血移植に臨床応用するために平成 14 年度発足し、平成 16 年まで先端医療センターでの総合的な基盤整備を実施してきた(基礎研究成果の臨床応用推進研究事業「*Ex vivo* 増幅臍帯血幹細胞を用いたトランスレーショナルリサーチ」)。トランスレーショナルリサーチとは、基礎的な研究成果を臨床応用するための架け橋にあたる研究であり、ヒト細胞を原料とする細胞治療、再生医療においては、治療の安全性、有効性はもちろんのこと、加工した治療用細胞製剤の安全性、有効性を科学的に証明していかなければならない。

本研究班では、GTP(Good Tissue Practice)に則った製造法の確立、品質管理法、品質保証法の確立、治療の安全性、有効性を検証しうる臨床プロトコルの作成、及び臨床研究実施体制の整備を行い、平成 18 年 4 月 1 日より *ex vivo* 増幅臍帯血を用いた臨床研究「急性白血病患者に対する同種臍帯血由来 *ex vivo* 増幅 CD34 陽性細胞移植に関する臨床第 I 相/前期第 II 相試験」を開始した。

本研究を含め、幹細胞を利用した再生医療に関しては、平成 18 年 9 月 1 日「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」が厚生労働省から施行され、わが国におけるヒト幹細胞臨床研究のあり方、方向性が示されたといえる。今後は、*ex vivo* 増幅臍帯血移植の安全性、有効性を検証すると同時に、治療用細胞製剤をいかに安全に臨床応用すべきかについて具体的に示す先駆け的な研究として本研究を位置づけ、我々が開発した細胞プロセッシング法、品質管理法を普及、発展させること、さらにはわが国のトランスレーショナルリサーチにおける問題点を明確にし、その解決策を示していくことを目標として研究活動を継続する予定である。

本報告書が関係者の参考になれば幸いである。

平成 19 年 3 月 主任研究者 中畑 龍俊

目 次

I. 研究組織	1
II. 平成18年度総括研究報告	3
中畑 龍俊	
III. 平成18年度分担研究報告	
1. GMPおよびGTPに準拠した培養法の確立	
1-1 <i>ex vivo</i> 増幅臍帯血の製造法の確立に関する研究	11
伊藤 仁也 鹿村 真之	
1-2 探索的臨床試験に求められるGMP準拠細胞プロセッシング	23
前川 平	
2. 品質管理法の確立	
2-1 NOG mouse を用いた品質管理	33
平家 俊男	
2-2 臍帯血移植後ウイルス感染症の動態に関する研究	38
清水 則夫	
2-3 神戸バイオメディカル創造センターにおける品質管理試験体制の整備	45
島津 光伸 松本 浩 柳原 玲	
2-4 NOD/SCID マウスを用いた <i>ex vivo</i> 増幅臍帯血移植における 生着促進効果の検討	52
伊藤 仁也 丸山 京子	
3. 臍帯血由来CD34陽性細胞を用いた <i>ex vivo</i> 増幅臍帯血移植の臨床研究	59
4. 臍帯血 DLI に向けた取り組みと基盤整備	
4-1 IL-2 と抗 CD3 抗体を用いた活性化培養法の臍帯血への 応用についての検討	63
伊藤 仁也 鹿村 真之	

5. 造血幹細胞の自己複製能機序解明に関する研究	
5-1 GSK-3 阻害剤が造血幹細胞/前駆細胞の増殖、分化に及ぼす影響	71
田中 宏和 金倉 譲 松村 到	
IV. 班会議記録合同研究カンファレンス	97
V. 研究成果の刊行に関する一覧	103
VI. 研究成果の刊行物・印刷物	115

I. 研究組織

平成 18 年度厚生科学研究「サイトカインによる増幅培養臍帯血による
臍帯血移植の臨床試験」研究班

研究組織

	氏名	所属
主任研究者	中畑 龍俊	先端医療センター血液再生研究グループ
分担研究者	前川 平	京都大学輸血細胞治療部
	金倉 謙	大阪大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科
	平家 俊男	京都大学大学院医学研究科発達小児科
	清水 則夫	東京医科歯科大学難治疾患研究所ウイルス感染学分野
	村上 雅義	先端医療センター臨床研究支援部
	永井 謙一	先端医療センター診療開発部
	伊藤 仁也	先端医療センター血液再生研究グループ
	田中 宏和	先端医療センター血液再生研究グループ
	島津 光伸	株式会社三菱化学ビーシーエル
研究協力者	平松 英文	京都大学大学院医学研究科発達小児科
	松村 到	大阪大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科
	山下 武美	キリンビール株式会社
	鈴木 秀文	キリンビール株式会社
	井田 卓見	ヘモネティクスジャパン株式会社
	芦原 義久	株式会社三菱化学ビーシーエル
	松本 浩	株式会社三菱化学ビーシーエル
	柳原 玲	株式会社三菱化学ビーシーエル
	鹿村 真之	先端医療センター血液再生研究グループ
	橋本 尚子	先端医療センター診療開発部
	初山 麻子	先端医療センター血液再生研究グループ
	丸山 京子	先端医療センター血液再生研究グループ
	高田 のぞみ	先端医療センター血液再生研究グループ

Ⅱ. 平成18年度 総括研究報告書

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）

総括研究報告書

サイトカインによる増幅臍帯血による臍帯血移植の臨床試験

総括研究者：中畑 龍俊

（先端医療センター 客員研究員、

京都大学大学院医学研究科 発達小児科学教授）

研究要旨

本研究では、造血幹/前駆細胞の絶対数不足から生じる臍帯血移植の問題点（生着不全、造血回復遅延など）を解決するため、*ex vivo* 増幅臍帯血を臍帯血移植へ臨床応用し、その有効性及び安全性を証明すること、さらには *ex vivo* 増幅臍帯血移植を新たな治療法として確立することを目的としている。本年度は、これまでに我々が実施してきた基礎研究や基盤整備を背景として、*ex vivo* 増幅臍帯血を用いた臨床研究「急性白血病患者に対する同種臍帯血由来 *ex vivo* 増幅 CD34 陽性細胞移植に関する臨床第 I 相/前期第 II 相試験」を 2006 年 4 月 1 日より開始した。

また本臨床研究の実施と並行して、我々の開発した細胞プロセッシング法の検証、品質管理法における評価系の開発、及び検証を行うことにより、各々における具体的なガイドラインを作成すること、さらには移植後の再発や感染症に対する検査法、治療法の開発を行うことにより、移植成績の向上に貢献することを目的として研究を実施した。

今後は臨床研究を推進させると同時に、治療用細胞製剤をいかに安全に臨床応用すべきかについて具体的に示す先駆的な研究として、我々が開発した細胞プロセッシング法、品質管理法を普及、発展させるための研究活動を継続する予定である。

分担研究者

中畑 龍俊	京都大学大学院医学研究科 発達小児科学教授 先端医療センター 客員研究員
前川 平	京都大学輸血細胞治療部 教授
金倉 讓	大阪大学大学院医学系 研究科血液・腫瘍内科学 教授
平家 俊男	京都大学大学院医学研究科 発達小児科学助教授
清水 則夫	東京医科歯科大学難治疾患 研究所ウイルス感染学 助教授
村上 雅義	先端医療センター臨床 研究支援部研究開発部長
永井 謙一	先端医療センター 診療管理部長
伊藤 仁也	先端医療センター 血液再生研究グループ 主任研究員
田中 宏和	先端医療センター 血液再生研究グループ 主任研究員
島津 光伸	株式会社三菱化学ビニール 研究開発部長

A. 研究目的

臍帯血移植の短所として移植後の造血回復、特に血小板の生着が他の造血幹細胞移植と比べ顕著に遅延することが知られている。これまでの報告から、移植細胞数とくに CD34 陽性細胞数が多いほど造血回復能が高く、予後も良好と考えられており、*ex vivo* 増幅した CD34 陽性造血幹/前駆細胞が移植可能となれば、従来臍帯血移植の対象とならなかった体重の重い患者も対象となるばかりでなく、生着不全の減少や生着日数の短縮が期待される。

一方 *ex vivo* で加工した細胞を用いた臨床研究を実施する場合、GMP (good manufacturing practice) に則った治療用細胞製剤の製造法、品質管理法の確立は重要な課題であるが、本邦では未だ具体的な指針やガイドラインが整備されていないのが実状である。

我々は先端医療センターでの *ex vivo* 増幅臍帯血を用いた臨床研究を行うにあたり、平成 14 年度から総合的な整備を進め、以下のような成果を挙げている(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 *Ex vivo* 増幅臍帯血を用いたトランスレーショナルリサーチ(主任研究者 中畑 龍俊))。

1. GTP (good tissue practice) に準拠した培養法の確立

治療用細胞製剤を調整するためには、まず伝染物質の混入などを防止するための閉鎖系培養や無血清培養法の確立が必

須である。我々は、凍結臍帯血から CD34 陽性細胞を純化し、IL-6/sIL-6R、SCF、TPO、FL 添加無血清培地にて 12 日間培養する方法を開発した。本法により分離から培養、洗浄及び最終製品出荷までのすべての工程を閉鎖系で行うことが可能となった。

2. GMP に準拠した培養システムの開発、基盤整備

ハード面では先端医療センター内に CPC, Cell Processing Center を整備した。また現在個別型インキュベーターや無菌細胞洗浄装置などのデバイス開発を進めている。またソフト面では、作業手順書などの文書体系を作成し、安全な製造法、品質管理法を確立するための整備を行っている。

3. *ex vivo* 増幅した臍帯血幹細胞の品質管理法の確立

ex vivo 増幅臍帯血の安全性及び性能について「ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について」(医薬発第 1314 号、厚労省医薬安全局長通知)に示されている概要に従う形で、*ex vivo* 増幅臍帯血の性能及び安全性を確認した。また製造毎に行う規格試験については、可能な限り最終製品の安全性、品質を担保すべく、製造工程に併せて実施できる体制をとっている。

4. 臨床研究実施体制の確立

隣接する臨床研究情報センターの協力のもと、「トランスレーショナルリサーチ実施にあたっての共通倫理審査指針」

及び「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に従った形での臨床研究の実施体制を構築し、センター内倫理委員会、及び日本さい帯血バンクネットワーク倫理委員会における承認を得た。

このような基礎研究や基盤整備を背景として、現在我々は、2006 年 4 月 1 日より、*ex vivo* 増幅臍帯血を用いた臨床研究を実施している。本臨床研究では日本造血細胞移植学会「造血幹細胞移植のガイドライン」の移植適応に合致し、骨髄移植および末梢血幹細胞移植において適切なドナーを得ることができない急性白血病患者を対象としている。本臨床研究は凍結臍帯血を解凍後に分割し、 $2.0 \times 10^7/\text{kg}$ 相当の臍帯血を未処理のまま移植、もう一方は CD34 陽性細胞に純化後、上述した培養法で 12 日間増幅し移植するものであり、主要評価項目としてその安全性さらには増幅培養した CD34 陽性細胞の輸注細胞数と生着率の相関を検討することを予定している。

また本臨床研究の実施と並行して、我々の開発した細胞プロセッシング法の検証及び改良、品質管理法における評価系の開発、検証、及び他分野への応用に向けた基礎的検討を行うことにより、各々の具体的なガイドラインを作成すること、さらには移植後の再発や感染症に対する検査法、治療法の開発を行うことにより、移植成績の向上に貢献することを目的として研究を実施した。

B. 研究方法

本研究を進めるにあたり、以下の分担研究組織を組み研究にあたった。

I. GMP 及び GTP に準拠した培養方法の確立

本分担研究は、細胞療法を実践する際に不可欠な「GMP に準拠した細胞プロセッシング法を確立すること」を主たる目的としている。本年度は、これまでに我々の開発、整備した閉鎖系無血清培養方法、品質管理方法、及び環境衛生のための手順ならびに各文書体系の運用を含めた全作業工程が、GMP に準拠した細胞プロセッシング法として適切であるかどうかを検証するためのバリデーション試験を実施した。また無血清培地の受け入れに関する品質管理試験について検討を行った(1-1. 分担研究者 伊藤)。

さらにわが国において、細胞療法等先端医療開発を進めるために構築すべきインフラストラクチャーに関して、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その道筋を示すことを試みた(1-2. 分担研究者 前川)。

II. 品質管理方法の確立

Ex vivo 増幅臍帯血の効能および安全性評価の為には、前臨床試験としての異種動物を用いた評価が不可欠である。これまでに我々は、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}(NOG マウス)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きた。

本年度は、NOG マウスが、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行うと同時に、近年注目が集まっている造血(幹)細胞の他組織への可塑性について、肝臓におけるヒト細胞の出現、分化、及び機能を中心に検討を行った。また移植後の NOG マウスにおけるヒト regulatory T cell の出現も確認されたことから、造血幹細胞移植に伴う拒絶、GVHD 等の種々免疫反応制御に向けた基盤技術について検討を開始した(2-1. 分担研究者 平家)。

臍帯血移植の重大な合併症の一つであるウイルス感染症に関し、その動態を明らかにすることを目的として、感染症の頻度、出現時期、ウイルスの種類、臨床症状とウイルスゲノム量の関係を経時的に測定することにより、ウイルス検査系の開発と臨床研究プロトコルの作成を行った(2-2. 分担研究者 清水)。

Ex vivo 増幅臍帯血移植を臨床応用化するにあたり、実際の製造工程に連動した品質管理試験体制の整備が必要である。我々は、*Ex vivo* 増幅臍帯血の製造を行う先端医療センターに隣接した神戸バイオメディカル創造センター(BMA)内に、感染性否定試験を実施する品質管理施設を整備してきた。本年度は、先端医療センターから BMA までの検体搬送及び分析開始までの一時保存が試験結果へ及ぼす影響について評価した(2-3. 分担研究者 島津)。

これまでに海外では *ex vivo* 増幅臍帯血

移植が実施され、その安全性は確認されているが、生着、造血回復までの日数の短縮といった効果は得られていない。そこで前臨床試験における効能評価として、我々が新たに開発した *ex vivo* 増幅法 (Nakahata 法) により増幅した細胞と、すでに臨床応用されている McNiece、Kurtzberg らの増幅法により増幅した細胞の *in vivo* における短期骨髄再構築能の比較検討を行った(2-4. 分担研究者 伊藤)。

III. 臍帯血由来 CD34 陽性細胞を用いた *ex vivo* 増幅臍帯血移植の臨床研究

2006 年 4 月 1 日より「急性白血病患者に対する同種臍帯血由来 *ex vivo* 増幅 CD34 陽性細胞移植に関する臨床第 I 相／前期第 II 相試験」を開始した(主任研究者 伊藤仁也)。

IV. 臍帯血 DLI に向けた培養法及び品質管理法の開発

本分担研究では、我々が開発した末梢血リンパ球を固相化抗 CD 3 抗体と IL-2 刺激により活性化、増幅させる培養法を応用し、臍帯血リンパ球の活性化培養法を確立することを目的としている。本年度は、培養の際の抗 CD 3 抗体の排除時期、及び IL-2 濃度に関して、臍帯血リンパ球の細胞増幅率、生存率、及び活性化マーカーの発現を指標に、至適排除時期、至適濃度各々について検討を行った。また培養した臍帯血リンパ球の表面抗原を解析することにより、その特性についての評価を行った(4-1. 分担研究者 伊藤)。

V. 造血幹細胞の自己複製期所の解明

Wnt/ β -catenin 経路は、造血幹細胞の未熟性維持に重要であることが示されており、これまでに活性化型 β -catenin の強制発現系や Wnt 精製蛋白などを用いてこの経路を活性化することで、マウス及びヒト造血幹細胞の自己複製能、多分化能が維持されることが報告されている。本分担研究では、ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞において、GSK-3 阻害剤処理により内因性の β -catenin を活性化した場合、その増殖、分化がどのような影響を受けるかについて検討を行った(5-1. 分担研究者 金倉、田中)。

C. 研究結果ならびに今後の方針

I. GMP 及び GTP に準拠した培養方法の確立

1-1. 品質規格に基づいて臍帯血、中間体、製品の試験検査、及び環境衛生試験結果から製造バリデーションの適合性判定を行った。その結果、操作は標準作業手順書に基づいて行われており、全ての規格試験において規格値を満たしたことが確認された。計 3 回の製造バリデーションはいずれも得られた結果が目的とした通りであり、科学的に正しいものであることが証明された。この結果より、我々の確立した全作業工程が GMP に準拠した細胞プロセッシング法として適切であることが証明された。また「無血清培地の受け入れ試験」では、不適格培地の除外が確実に行われたことから、その有用性が示された。これらの検証をうけ、今後

は臨床研究を推進させると同時に、我々が開発した細胞プロセッシング法を普及、発展させるための研究活動を継続する予定である。

1-2. 2006年1月米国FDAより早期フェーズ I（探索的臨床試験）で用いる IND(Investigational New Drug)の GMP 製造に関するガイドライン草案が公表された。本 phase I GMP 指針で注目すべき点として、1. 臨床開発の段階に応じた IND の品質管理が可能であることを明記したこと 2. 多種類のプロジェクトを請け負う大学などの CPC の実情を考慮し、同一の施設で多種類の IND を製造することを容認していること 3. 清掃の管理などを確実にすることで、異なるプロジェクトを同一の部屋で時間を変えれば可能であることを明記していること 4. 治療用ヒト細胞の製造に関するバリデーションに柔軟性を持たせたこと 5. 無菌検査結果が判明する前に出荷しなければならない状況を容認していることが挙げられる。これは我々が従来から提唱してきた開発段階に応じた GMP、いわゆる iGMP (institutional GMP)の必要性と相通ずるものであると考えられた。今後はわが国における法体系や規制の中でのトランスレーショナルリサーチの現状把握、及びその問題点を明確にすることにより、独自の IND システム構築に向け取り組んでいくことを予定している。

II. 品質管理方法の確立

2-1. *ex vivo* 増幅した細胞を、NOG マウスへ

の一次、二次移植実験により検討した結果、各種組織にヒト造血細胞の出現が確認され、胸腺や末梢血中においては制御性 T 細胞を含むヒト T 細胞の出現が確認されたことから、NOG マウスはヒト造血幹細胞活性測定だけでなく、移植後免疫についての研究においても有用であることが確認された。また組織障害の加わった NOG マウスの肝臓において、移植ヒト造血細胞の肝細胞への分化が確認され、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、この分子生物学的機構について検討を進めると同時に、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を目指す予定である。

2-2. 移植後ウイルス感染症として重要なウイルスの中から、12種類の DNA ウイルスを選定、患者末梢血中のウイルスの定性、定量法を確立し、その感度、特異性について検証を行った。さらに臨床プロトコルを作成し、4名の移植後患者をパイロット的にモニタリングした結果、3名に、また測定回数にして9回中4回に CMV, EBV, HHV-6、BKV いずれかのウイルスが検出され、臍帯血移植患者では持続感染ウイルスの再活性化が頻繁に起きていると推測された。今後臨床症状の相関等を含めデータの蓄積を行なっていく予定である。

2-3. 搬送バリデーション試験の結果、マ

イコプラズマ遺伝子検査、ウイルス遺伝子検査、エンドトキシン試験、及びβ-D-グルカン試験は搬送の影響を受けないことが確認された。一方無菌試験では、現行の搬送法では検体中の標準菌が検出できない場合があり、無菌試験の検体については、試験用培地に直接サンプリングするなどの工夫が必要と考えられた。今後も定期的なバリデーション試験を実施することにより、検査系の検証を行っていく予定である。

2-4. Nakahata 法により *ex vivo* 増幅した細胞を移植した群では、他の群と比し移植後早期からマウス骨髄および末梢血において、高いヒト血球キメリズムが得られた。またいずれの Lineage においても、他の群と比しより早期から出現する傾向にあった。これらの結果より Nakahata 法では他の増幅法と比較してより高い骨髄再構築能を有する細胞を増幅できると考えられた。今後は同様に NOD/SCID マウスへの異種間移植系を用いて、安全性に関する評価、検討を行う予定である。

III. 臍帯血由来 CDF34 陽性細胞を用

いた *ex vivo* 増幅臍帯血移植の臨床研究

3-1. 2006 年 4 月 1 日より臨床研究を開始すると同時に、患者リクルートに対する協力を呼びかけたが、適格基準に合致した患者の登録はなく、2007 年 3 月 31 日現在での登録数は 0 症例である。今後は適格基準における疾患に移植適応のある骨髄異形成症候群を加えること、年齢を 55 歳まで引き上げること、及び臍帯血の基

準を $2.7 \times 10^7/\text{kg}$ 以上まで引き下げることなど適応を拡大することにより、目標を達したいと考えている。

IV. 臍帯血 DLI に向けた培養法及び品質管理法の開発

4-1. 培養条件を種々設定し検討を行うことで、最も効率よく臍帯血リンパ球を増幅するための至適 IL-2 濃度、及び抗 CD 3 抗体刺激の至適排除を決定することができた。また本活性化培養により増幅した臍帯血リンパ球は、末梢血リンパ球と同レベルにまで活性化されており、DLI に応用可能な性質を有している可能性が示唆された。今後 *in vitro*, *in vivo* における詳細な機能解析、及び安全性の評価を行うと同時に、臨床応用に適した培養方法へと改良を進めていく予定である。

V. 造血幹細胞の自己複製期所の解明

5-1. GSK-3 阻害剤による内因性の β-catenin の活性化は、造血幹/前駆細胞におけるサイトカイン存在下での増殖のみでなく、系統決定に重要な転写因子に作用することで、その分化に影響を与えていることが明らかとなった。今後この分子機構について詳細に検討すること、また我々が開発した合成ペプチドによる内的因子操作と組み合わせることにより、効率の良い系統特異的な血球産生に向けた検討を行う予定である。

D. まとめ

本年度、これまでの総合的な基礎研究、基盤整備を背景として、臨床研究を開始

した。また我々が確立した細胞プロセッシング法、品質管理法の検証を行い、その有用性、及び安全性を確認した。

本研究を含め、幹細胞を利用した再生医療に関しては、「ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について」(医薬発第1314号、厚労省医薬安全局長通知)、「トランスレーショナルリサーチ実施にあたっての共通倫理審査指針」、さらには2006年9月1日「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」が厚生労働省から施行され、わが国におけるヒト幹細胞臨床研究のあり方、方向性が示されたといえる。しかしながら現状の法体系や指針の枠組みの中で、円滑に研究を進めていくためには、治療用細胞製剤の品質管理方法一つをとっても、その項目、規格値設定等未だ多くの解決すべき課題が残されている。

今後は臨床研究を推進させると同時に、治療用細胞製剤をいかに安全に臨床応用すべきかについて具体的に示す先駆的な研究として、我々が開発した細胞プロセッシング法、品質管理法を普及、発展させること、さらにはわが国のトランスレーショナルリサーチにおける問題点を明確にし、その解決策を示していくことを目標として研究活動を継続する予定である。

E. 健康危険情報

特筆すべき事項なし

F. 研究発表

研究成果の刊行に関する一覧表参照

G. 特許

特筆すべき事項なし

Ⅲ. 平成18年度 分担研究報告書

分担研究報告書

1. GMP および GTP に準拠した培養法の確立

1-1 *ex vivo* 増幅臍帯血の製造法の確立に関する研究

分担研究者：伊藤 仁也

（先端医療センター 血液再生研究グループ 主任研究員）

研究協力者：鹿村 真之

（先端医療センター 血液再生研究グループ 客員研究員）

研究要旨

本分担研究では、細胞療法を実践する際に不可欠な「GMP に準拠した細胞プロセッシング法を確立すること」を主たる目的としている。本実施期間においては、我々の開発、整備した閉鎖系無血清培養方法、品質管理方法、及び環境衛生のための手順ならびに各文書体系の運用を含めた全作業工程が、GMP に準拠した細胞プロセッシング法として適切であるかどうかを検証するためのバリデーション試験を実施した。また無血清培地の受け入れに関する品質管理試験について検討を行った。

製造バリデーションの結果より、我々の確立した全作業工程が GMP に準拠した細胞プロセッシング法として適切であることが証明された。また「無血清培地の受け入れ試験」では、不適格培地の除外が確実に行われたことから、その有用性が示された。

これらの検証をうけ、今後は臨床研究を推進させると同時に、我々が開発した細胞プロセッシング法を普及、発展させるための研究活動を継続する予定である。

A. 研究目的

これまでに我々は、臍帯血中に含まれる CD34 陽性造血幹/前駆細胞を 5 種類のサイトカインを組み合わせることで効率よく増殖させる方法を開発した。さらにこの基礎研究の成果を臨床応用すべく探索的臨床研究（トランスレーショナルリサーチ）に取り組み、GTP (Good Tissue Practice) に準拠した培養法、細胞プロセッシング法の開発、増幅臍帯血の品質管理法の確立、さらには臨床プロトコルの作成、臨床研究実施体制の確立など、ソフト面、およびハード面での整備を行ってきた。これら総合的な基盤整備を背景として、現在我々は「急性白血病患者に対する同種臍帯血由来 *ex vivo* 増幅 CD34 陽性細胞移植に関する臨床第 I 相/前期第 II 相試験」を実施している。本研究では、造血幹/前駆細胞の絶対数不足から生じる臍帯血移植の問題点（生着不全、造血回復遅延など）を解決するため、*ex vivo* 増幅臍帯血を臍帯血移植へ臨床応用し、その有効性及び安全性を証明すること、さらには *ex vivo* 増幅臍帯血移植を新たな治療法として確立することを目的としている。

本分担研究では、細胞療法を実践する際に不可欠な「GMP に準拠した細胞プロセッシング法を確立すること」を主たる目的としている。本実施期間においては、我々の開発、整備した閉鎖系無血清培養方法、品質管理方法、及び環境衛生のための手順ならびに各文書体系の運用を含めた全作業工程が、GMP に準拠した細胞

プロセッシング法として適切であるかどうかを検証するためのバリデーション試験を実施した。また無血清培地の受け入れに関する品質管理試験について検討を行った。

以下に、

1. 無菌培地充填試験
 2. 製造バリデーション試験
 3. 無血清培地の受け入れ試験
- について報告する。

B. 研究方法ならびに結果

1. 「無菌培地充填試験」

「培地充填試験」は、細胞プロセッシングセンター (CPC) 内で行う *ex vivo* 臍帯血製剤の製造における無菌性を保証するために、製造担当者の無菌操作をバリデートすることを目的として行われる。

1) 実施方法

試験は標準作業手順書に従って CPC 内にて 2 名で行い、1 名が作業員、もう 1 名が確認者を担当する。試験に用いられる原料等には SCD 培地 (日本ビオメリュー) を用いる。この SCD 培地は入荷時に品質が保証されていることを確認したものをを用いた。

作業開始後、中間品としてダミー培養 7 日目培養液を採取、無菌試験により無菌性を確認した。この無菌試験はダミー最終製品についても行い、全作業工程の無菌性の確認を行った

2) 判定

最終的な判定は、中間品 (ダミー培養 7 日目培養液)、充填品 (ダミー最終製品) の

無菌検査結果及び環境衛生試験結果をもとに作業工程の検証を行った。

3) 結果ならびに判定

(1) 操作：

培地充填試験は指示書に従って実施され、試験結果に影響を与える逸脱操作は無かった。

(2) 環境試験：

環境試験は標準作業手順書に従って実施され、その結果は基準値以下であった。

(3) 中間製品に対する無菌試験 (三菱化学ビーシーエル社への外部委託)：無菌検査は標準作業手順書に従って実施され、その試験結果は陰性であった。

(4) 充填品に対する無菌試験 (三菱化学ビーシーエル社への外部委託)：無菌検査は標準作業手順書に従って実施され、その試験結果は陰性であった。

試験の適合基準に基づいて、培地充填試験の適合性について試験の適合性判定を行った。その結果、記録書への記載及び署名は適格であり、すべての試験において規定の基準値を満たしたことを確認した。これより、培地充填試験の実施対象者に対して、製造担当者の承認書が発行された。

2. 「製造バリデーション試験」

「バリデーション試験」は、細胞生物製剤を製造する際に使用する設備や環境、

また製造工程や試験方法によって得られた結果が目的とした通りであり、科学的に正しいものであることを検証するために実施されるものである。

1) 実施方法

製造管理責任者は、上述した文書体系に基づき製造に適した臍帯血を決定し、標準作業書に基づいて製造計画書を作成、関係部門に送付した。各関係部門は原料等の在庫確認を行い、不足分の発注を行った。製造部門はCPCの環境モニタリングや環境衛生試験等を行い、細胞を安全に加工できる体制を整えた。培養開始予定日より、Fig. 1 に示す閉鎖系無血清培養を行った。

さい帯血バンクより供与された凍結ヒト臍帯血を解凍後、CD34 陽性細胞を磁気ビーズ法 (Clini MACS)にて分離し、SCF (100 ng / mL)、TPO (100 ng / mL)、FL (100 ng / mL)、FP6 (100 ng / mL)添加 QBSF[®]-60 培地 (米国 Quality Biological 社製)中で 12 日間培養した。ガス透過性培養バッグは、VueLife[™] (米国 American Fluoroseal Corporation 社製)を用いた。

(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 5%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 Clini MACS 磁気細胞分離システム