

Bag② $43.9/10^3$ 、Bag③ $58.8/10^3$ であった(Fig. 6)。

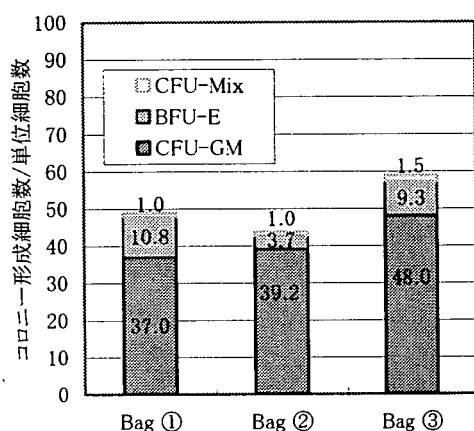


Fig. 6: 培養 12 日目のコロニー形成能

C. まとめと今後の展望

本分担研究において開発された無血清培地の性能は、培地原材料の安定した調整が可能になったこと等により改良が進み、有血清培地を有意に上回る細胞増幅率が得られるようになった。これまでの既存の製品を使用した検討から、総細胞の増幅率が良好な場合、CD34 陽性細胞の増幅率はある程度一定、もしくは低下するケースが多く、これは前駆細胞系の増幅、さらには分化促進がすすんでいることに起因するものと考えられている。一方無血清培地では、総細胞の増幅率に伴って CD34 陽性細胞の増幅率も向上している結果が得られた。また表面抗原だけでなく NOD/SCID Mouse への移植実験結果からも、本培地を用いることにより短期骨髄再建能の高い未分化な細胞を増幅でき、改良後も本培地の特性を保持できていると考えられた。

さらに本分担研究において開発された培養バックと無血清培地を併せて使用す

ることで、現在の実製造における資材を使用した場合と比較して、総細胞、CD34 陽性細胞共に 2 倍以上の増幅率が得られた。また増幅した細胞は CFU-Mix を多く含む傾向にあり、増幅後もより未分化な状態を維持していると推測された。これらの結果から、今後資材ならびに製品の安全性を確認した上で、新資材の実製造への応用が十分期待される。

しかしながら増幅効率が向上したことに伴い、培養 7 日目以降至適細胞密度を上回り続け、細胞生存率が著しく低下する傾向にあった。以上のことから、今後は培養期間および希釈回数、時期等の至適培養方法を含む新資材に最適な製造方法を確立するための検討が必要であると考えられた。

D. 健康危険情報

特筆すべき事項なし

E. 研究発表

- 論文発表
特になし
- 学会発表
特になし

F. 特許

特開 2005-204539

「造血幹細胞および造血前駆細胞の培養方法」

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 わが国における安全な細胞療法・再生治療の実現に向けて

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

細胞治療に用いられる細胞・組織などはヒトあるいは動物由来の細胞・組織を加工した医薬品または医療機器のいずれかに定義される。これらを細胞治療に用いる医薬品や医療機器として企業が開発しようとする場合、わが国では薬事法の下での製造管理や品質管理を行うことになる。しかし、細胞治療に用いられる細胞・組織などの種類や特性、臨床上の適用法は多種多様であり、臨床試験や治験を開始する段階において細胞や組織の安全性および機能の評価方法が必ずしも確立されているとは限らない。細胞治療に関わる臨床試験や治験が進められていく中で、そこで使用される細胞や組織の安全性の確認や機能の評価に必要な技術を開発して行くことも必要となる。

臨床試験や治験において被験者の安全性を保証することは最も重要なことである。研究成果を臨床の現場に還元し、細胞を用いた新しい治療法を広く国民に提供して行くには、先端医療開発の推進力を高めるとともに、開発の初期段階では安全性を確保しながら柔軟な規制の下で研究開発を支援していく環境の整備が不可欠である。開発段階に応じた GMP、いわゆる phase 1 GMP（われわれが提唱してきた、細胞治療用に特化した institutional GMP (iGMP)と同様の概念）を考慮することも必要となってくる。現在、厚生労働省から出されている指針や指導内容から安全な細胞治療を開発してゆくために考慮すべき事項を検討した。

A. 研究目的

現在、ヒト由来の細胞・組織を用いた再生医療や細胞治療などの開発が急速に進んでいるが、これらの開発を進めていくなかで、治療に用いられる細胞や組織の高い品質を維持し、安全性を如何に担保していくかは重要な課題のひとつである。また、細胞プロセッシングに関わる法制度の整備も急務とされ、厚生労働省からは細胞治療に関わる指針などが相次いで発表され施行されている。

本研究は、わが国においても細胞治療や再生治療の開発を推進させるとともに、その安全性を担保するための取り組みがどの様に進められているかを検証し、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提言することを目的とした。

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。また、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、京都大学探索医療センタ

ー、大阪大学未来医療センター、および神戸先端医療センターとの共同作業を通じて、わが国における先端医療開発、とくに先端的細胞治療や再生治療を進めるうえで必要なインフラストラクチャーとはどのようなものであるかについて、とくに安全性や品質評価の観点から検討を行った。

C. 研究結果

1. 品質評価のポイント

治験を開始するまでに必要な確認申請では、製品の特性解析が適切に実施され、一定の品質と安全性が担保されるために適切な規格が設定されているかが評価される。しかし、確認申請の段階で必要な規格を決定することが困難な場合には、その時点で得られている品質および安全性に関するデータ、または関連する情報を基に暫定的な規格値を設定する方策も考えられる。

組織や細胞を利用した製品では、通常の医薬品と異なり加熱や濾過などにより細菌やウイルスなどの感染性物質を不活化または除去することが困難であるため、原料の入手から製品の出荷に至るまで交差汚染防止の対策が重要となる。とくに同種細胞の場合、ドナースクリーニングとして HBV、HCV、HIV、HTLV や、必要に応じてパルボウイルス B19、サイトメガロウイルスや EB ウイルスについて、血清学的検査あるいは PCR 法などで検査を行う必要がある。ただし、これらのウイルス検査では、高感度な検査方法を用

いても検出できないウインドウ期があることから、適切な時期に再検査を行うことも必要である。また、細胞プロセッシング（細胞の培養や組織の分離などの操作）に用いられる培地や試薬などが最終製品の中に不純物として残留する可能性がある場合には、不純物の量が製品の品質や安全性にどのような影響を及ぼすのかを検討しておくことも必要である。

細胞治療に用いる細胞・組織とともに最終製品の一部を構成する組織・細胞以外の原材料（カプセルやマトリックスなど）がある場合には、その原材料の品質および安全性に関する情報と、その原材料と移植される組織・細胞との相互作用が移植細胞自体に及ぼす影響についても明らかにしておくことが必要である。

治験において被験者の安全性を確保することは最も重要なポイントであり、特に感染性物質や不純物の評価に関する適切な情報が確認申請では求められる。

2. 品質管理上の課題

一般的な医薬品製造の場合、一定の品質を有する製品を恒常的に生産するためにバリデーション（評価と検証）を受けた製造工程の中で品質管理がされている原材料を用いて生産が行われる。しかし、細胞治療で使用される組織や細胞のプロセッシング過程では、①原料となる細胞や組織の個体差が大きい、②感染性物質の不活化、不純物の除去が困難、③細胞や組織の機能評価あるいは品質指標の設定が難しい、④製品の製造後、直ちに移植

されることが多く、移植までにすべての検査結果が得られない場合もあるなどの特徴があり、一般の医薬品以上に品質管理の難しさがある。しかし、細胞治療の実用化を目指すためには、その時点の技術水準を反映した合理的根拠に基づいた手法によって、製品の品質管理と安全性の確認を行うことが望まれる。

原料となる細胞や組織の個体差によって、最終製品の規格や工程内試験の試験結果の値がばらつく場合があるが、目的とする細胞の種類、純度、細胞の本質的な特性などが失われていないことが必須である。また、原材料由来ではあっても、目的以外の細胞の混入や工程由来の不純物（酵素や培地に添加されている成長因子など）については、製造工程内で除去できるようなプロセスを設け、不純物除去のバリデーションを行うこと、および残留物が安全上問題のないことを評価できる規格や試験方法を設定する必要がある。

感染物質の汚染を防止するためには、原料の受入から製造工程を経て最終製品の出荷、そして移植が行われるまでの各工程での原材料や製品の管理が重要となる。特に製造工程では細胞プロセッシング専用の施設を利用することが不可欠であり、臨床試験においても製造作業施設の構造設備に関しては治験薬 GMP で求められているレベルの施設を使用しなければならない。詳細については後述する。

細胞や組織を利用した製品の特性や品質解析には、生化学的あるいは免疫学的

生産物の測定、形態学的特徴、細胞表面マーカーなどによる確認などの手法が用いられるが、さらに有効な細胞や組織の機能評価を行うためには、臨床試験の進行とともに品質や安全性に関連する適切なパラメーターを探索する必要がある。

製品の出荷時には無菌検査やマイコプラズマ否定試験、エンドトキシン測定などが必須の項目だが、製造後直ちに出荷され移植される製品では検査結果が後追いになる場合がある。もし、移植後に出た検査結果で無菌性やマイコプラズマなどが否定できなかった場合には、適切な対応処置が迅速に実施できるよう事前に対応策などを取り決めておく必要がある。

その他、異種動物由来細胞・組織を製造する場合は、「異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針について（平成 14 年 7 月 9 日 医政研発第 0709001 号）」に従いドナースクリーニングを行う。また、フィーダー細胞に関しては「『異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針』に基づく 3T3 J2 株及び 3T3 NIH 株をフィーダー細胞として利用する上皮系の再生医療への指針について（平成 16 年 7 月 2 日 日医政研発第 0702001 号）」に従い品質管理を行う必要がある。

3. 細胞調整を行う施設の基準

探索的臨床試験や第 I 相臨床試験においては、安全性の確保とともに、効率よく開発を進めることが要求される。探索的臨床研究では大学や研究所などの比較

的規模の小さな施設において、細胞プロセッシングが行われることが多く、そこでは限られたエリア内で多く

の製品や複数のロットが扱われる場合も想定される。このような環境では、交差汚染の防止や原材料などの取り間違いを防ぐために、原料、資材、製造中間体、そして製品などの保管管理にも十分な配慮が必要となる。これらの要件を満たしながら、医薬品と同等の品質管理と安全性の担保を高い水準で維持するために必要とされる製造施設の基準は、治験薬 GMP で求められている製造施設の構造設備に関する基準などを参考にして設定する必要がある。例えば、以下のような条件を満たすように要求されている。

- ・ 作業管理区域は 4 段階のゾーニングが施され、無菌操作が行える環境を維持する（各区域の清浄度レベルと環境微生物の評価基準は表 1 と表 2 を参照）。
- ・ 無菌室には専用の前室を附置し、通常当該前室を通じてのみ作業室内に出入りできるような構造とする。
- ・ 作業室又は作業管理区域は、製造工程に応じて適切な温度、湿度及び清浄度を維持できる構造及び設備を備えている。
- ・ 温度、湿度、室圧等の環境条件の監視測定を行うための設備を有している。
- ・ 製造施設の構造設備は、円滑かつ適切な作業を行うのに支障のないよう配置されており、清掃及び保守が容易である。

- ・ 作業室は、塵埃または微生物による汚染を防止するのに必要な構造及び設備を有する。
- ・ 原料や製造中間体などが飛散しやすく、他の製品に影響を及ぼすおそれのある場合には、それぞれの作業室を分離し、かつ空気処理システムを別系統にする。
- ・ 天井、壁及び床の表面は、消毒液等による洗浄に耐える素材で作られている。
- ・ 作業室は、粒子が溜まったり気流を妨げたりする構造でないこと。
- ・ 重要区域においては、製品及び重要表面の無菌性を維持するような気流パターンとなっている。
- ・ 異なる清浄度レベルの区域間にはエアロックを設置し適切な室間差圧を維持している。
- ・ 複数のロット、または異なる製品が同一作業室で製造される場合には、製品の製造設備が専用かつ閉鎖式である。
- ・ 原料、資材、中間製品及び製品を区分して、衛生的かつ安全に貯蔵するために必要な設備を有している。
- ・ 貯蔵設備は、恒温装置、自記温度計その他必要な計器を備えたものである。
- ・ 原料、資材及び製品の試験検査に必要な設備及び器具を備えている。
- ・ 設備や機器類は適切な間隔で点検が行われ、計器類は定期的に校正を行う。

D. 結論

現在、ヒトまたは動物由来の成分を用

いた細胞療法に関わる指針として「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:平成12年12月26日)」がその規制の中核となっているが、平成19年9月には自己由来に限定した細胞・組織加工製品などの品質および安全性の確保に関する指針案が厚生労働省から提示されパブリックコメントの募集が行われた。今後、細胞治療の安全性を高めていくために、様々な角度から法的な規制の整備も進めてゆく必要がある。

E. 健康危険情報

特記事項なし

F. 研究発表

1) 論文発表

1. Yokota, A., Kimura, S., Masuda, S., Ashihara, E., Kuroda, J., Sato, K., Kamitsuji, Y., Kawata, E., Deguchi, Y., Urasaki, Y., Terui, Y., Ruthardt, M., Ueda, T., Hatake, K., Inui, K., and Maekawa, T.: INNO-406, a novel BCR-ABL/Lyn dual tyrosine kinase inhibitor, suppresses the growth of Ph⁺ leukemia cells in the central nervous system and cyclosporine A augments its *in vivo* activity. *Blood*, 109(1):306-314, 2007.
2. Horie, N., Murata, H., Kimura, S., Takeshita, H., Sakabe, T., Matsui, T., Maekawa, T., Kubo, T., Fushiki, S. :

- Combined effects of a third-generation bisphosphonate, zoledronic acid with other anti-cancer agents against osteosarcoma. *Brit J Cancer*, 96(2):255-261, 2007.
3. Ashihara, E., Tsuji, H., Sakashita, H., Haga, H., Yurugi, K., Kimura, S., Egawa, H., Manabe, T., Uemoto, S., Maekawa, T.: Anti-donor antibody in patients receiving ABO-identical and HLA-mismatched living donor liver transplants: effect on survival. *Transplantation*, 83(4):506-509, 2007.
 4. Uchida, R., Ashihara, E., Sato, K., Kimura, S., Kawata, E., Taniguchi, K., Okamoto, M., Shimura, K., Kiyono, Y., Shimazaki, C., Taniwaki, M., Maekawa, T.: $\gamma \delta$ T cells kill myeloma cells by sensing mevalonate metabolites and ICAM-1 molecules on cell surface. *Biochem Biophys Res Commun*, 354(2):613-618, 2007.
 5. Egawa, H., Ohmori, K., Haga, H., Tsuji, H., Yurugi, K., Miyagawa-Hayashino, A., Oike, F., Fukuda, A., Yoshizawa, J., Takada, Y., Tanaka, K., Maekawa, T., Ozawa, K., Uemoto, S.: B-cell surface marker analysis for improvement of rituximab prophylaxis in ABO-incompatible adult living donor liver transplantation. *Liver Transpl*. 13(4):579-588, 2007.
 6. Yurugi, K., Kimura, S., Ashihara, E., Tsuji, H., Kawata, E., Kamitsuji, Y., Hishida, R., Takegawa, R., Egawa, H., Maekawa, T.: Rapid and accurate measurement of anti-A/B IgG antibody in ABO-unmatched living donor liver transplantation by surface plasmon resonance. *Transfusion Med*, 17(2):97-106, 2007.
 7. Wada, M., Kawahito, Y., Kimura, S., Kohno, M., Ishino, H., Kimura, M., Omoto, A., Yamamoto, A., Hamaguchi, M., Tsubouchi, Y., Ashihara, E., Tokunaga, D., Hojo, T., Maekawa, T., Yoshikawa, Y.: Small interfering RNA targeting PLK-1 induces the apoptosis of synoviocytes of rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun* 357(2):353-359, 2007.
 8. Sakashita, H., Haga, H., Ashihara, E., Wen, M-C., Tsuji, H., Miyagawa-Hayashino, A., Egawa, H., Takada, Y., Maekawa, T., Uemoto, S., Manabe, T.: Significance of C4d staining in ABO-identical/compatible liver transplantation. *Modern Pathol*, 20(6): 676-684, 2007.
 9. Munaka, T., Abe, H., Kanai, M., Sakamoto, T., Nakanishi, H., Shoji, S.,

- Kimura, S., Maekawa, T., Murakami, A.: Real-time monitoring of antibody secretion from B-cells on a microchip stimulated with a minute amount of mitogen. *Analyst*. 132(6):512-514, 2007.
10. Yuasa, T., Kimura, S., Ashihara, E., Habuchi, T., Maekawa, T.: Multiplicity for anti-cancer activity with zoledronic acid. review. *Curr Med Chem*, 14(20):2126-2135, 2007.
11. Kuroda, J., Kimura, S., Strasser, A., Andreeff, M., O'Reilly, L.A., Ashihara, E., Kamitsuji, Y., Yokota, A., Kawata, E., Deguchi, Y., Takeuchi, M., Tabe, Y., Taniwaki, M., Maekawa, T.: Dual molecular targeting by INNO-406, a second generation Bcr-Abl inhibitor, and ABT737, an inhibitor of anti-apoptotic Bcl-2 proteins against Bcr-Abl-positive leukemia. *Cell Death Diff*, 14(9):1667-77, 2007.
12. Maekawa, T., Ashihara, E., Kimura, S.: The Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitor imatinib and promising new agents against Philadelphia chromosome positive leukemias. Review. *Int J Clin Oncol* 12(5):327-340, 2007.
13. Kawata, E., Kuroda, J., Wada, K., Kamiuchi, K., Nakayama-Harusato, I., Kimura, S., Maekawa, T., Kitagawa, Y.: Hypereosinophilic syndrome accompanied with Buerger's disease-like femoral arterial occlusion. *Intern Med*. 46(23):1919-1922, 2007.
14. 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, 2007).
15. Kageyama, S., Iwaki, H., Inoue, H., Isono, T., Yuasa, T., Nogawa, M., Maekawa, T., Ueda, M., Kajita, Y., Ogawa, O., Toguchida, J., Yoshiki, T.: A novel tumor-related protein, C7orf24, identified by proteome differential display of bladder urothelial carcinoma. (*Proteomics*, in press, 2007)
16. Kuroda, J., Kimura, S., Kamitsuji, Y., Yokota, A., Ashihara, E., Kawata, E., Takeuchi, M., Tanaka, R., Tanaka, H., Matsumoto, Y., Andreeff, M., Taniwaki, M., Maekawa, T.: ABT-737 is a useful component of combinatory chemotherapies for chronic myelogenous leukaemias with diverse drug resistance mechanisms (*Brit J Haematol*, in press 2007)
17. Deguchi, Y., Kimura, S., Ashihara, E.,

- Niwa, T., Hodohara, K., Fujiyama, Y., Maekawa, T. Comparison of imatinib, dasatinib, nilotinib, and INNO-406 in imatinib-resistant cell lines (Leuk Res, in press 2007)
18. Kitawaki, T., Kadowaki, N., Kondo, T., Ishikawa, T., Ichinohe, T., Teramukai, S., Fukushima, M., Kasai, Y., Maekawa, T., Uchiyama, T.: Potential of dendritic cell immunotherapy for relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, shown by WT1 peptide- and keyhole limpet hemocyanin-pulsed, donor-derived dendritic cell vaccine for acute myeloid leukemia. *Am J Hematol.* 2007 Dec 14; [Epub ahead of print]
19. Morinaga, K., Yamauchi, T., Kimura, T., Maekawa, T., Ueda, T.: Overcoming imatinib resistance using Src inhibitor CGP76030, Abl inhibitor nilotinib, and Abl/Lyn inhibitor INNO-406 in newly established K562 variants with *BCR-ABL* gene amplification (*Int J Cancer*, in press 2007)
20. Tanaka, R., Kuroda, J., Stevenson, W., Ashihara, E., Ishikawa, T., Taki, T., Kobayashi, Y., Kamitsuji, Y., Kawata, E., Takeuchi, M., Murotani, Y., Yokota, A., Hirai, M., Majima, S., Taniwaki, M., Maekawa, T., Kimura S.: Detection of the V617F mutation in JAK2 using a novel, fully automated, SNP super-rapid detector. (*Leuk Res*, in press 2008)
21. Shimura, K., Ashihara, E., Shimazaki, C., Matsunaga, S., Taniguchi, K., Uchiyama, H., Matsumoto, Y., Kimura, S., Matsubara, H., Taniwaki, M., Maekawa, T.: Kinetics of circulating endothelial progenitors in patients with sclerodermatous chronic graft-versus-host disease (*Biol Blood Marrow Transplant*, in press 2008)
22. Muramatsu, H., Kimura, S., Ichinohe, T., Ashihara, E., Ishikawa, T., Maekawa, T., Uchiyama, T. : Consulting clinic for related family donors in hematopoietic stem cell transplantation (*Bone Marrow Transplant*, in press 2008)
23. 前川 平:「日本における抗がん剤の臨床開発」欧米からの周回遅れを挽回するために一学の立場から一: イマチニブ耐性 CML に対する新規 Bcr-Abl/Lyn チロシンキナーゼ阻害剤の開発を例にあげて. 第一回抗悪性腫瘍薬開発フォーラム、癌と化学療法、34(2):301-304, 2007.
24. 前川 平: 輸血・成分輸血. 内科学 (第九版). (杉本恒明、矢崎義雄総編集)、朝倉書店、東京、pp. 166-174, 2007.

25. 前川 平 : Cell Therapy-基礎研究から臨床応用へ . BioClinica, 22(12):1036-1037, 2007.
26. 笠井泰成、前川 平 : 細胞プロセッシングセンター. 遺伝子MOOK 別冊「歩みつづける細胞移植療法の実際?再生医療の実現に向けた科学・技術と周辺要素の理解-」、メディカル ドゥ、大阪 . (印刷中)
27. 前川 平 : 輸血関連急性肺障害の予防と治療方針は? EBM—血液疾患の治療. (押見和夫、別所正美、岡本真一郎、加藤淳 編集)、中外医学社、東京、pp.568-573, 2007.
28. 笠井泰成、前川 平 : 再生医学のいま 臨床応用に向けて- その基盤整備の重要性 -. 治療、89(10): 2888-2893, 2007.
29. 笠井泰成、前川 平 : 本邦における安全な細胞療法の実施に向けて. 血液フロンティア、18(1): 69-73, 2008.
- 2) 学会発表(細胞プロセッシング関係のみ)
30. Maekawa, T. : Phase 1 GMP for cell therapy and academia. 2nd Franco-Japanese Translational Research Initiative (Paris, France) (29th May, 2007)
31. Kasai Y, Nakagawa Y, Matsuoka R, Maekawa T: Establishment of Cell Processing Center for Advanced Cell Therapy in Kyoto University Hospital. Kyoto University 21st Century COE Symposium (Kyoto, Japan) (29th-30th June, 2007)
32. Maekawa T: Current status and future prospects of cell therapy in Japan. (Plenary Lecture, Invited) First Symposium of Innovative Research Institute for Cell Therapy (Lee Kun-Hee Hall, Cancer Research Institute, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea) (18th May, 2007)

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た。さらに、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、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、ヒト造血細胞の出現、胸腺等においてはヒト T 細胞の出現を確認し、ヒト造血幹細胞活性を評価するモデル系としての妥当性を確認した。出現する T 細胞、NK 細胞の機能成熟も、TCR レパトア解析、サイトカイン反応性、細胞障害性の観点より確認した。

また、このマウスにおいては、骨髄、脾臓において、成熟した B 細胞の出現が確認でき、末梢血液においては、ヒト IgM, IgG の存在が確認できた。しかし、特異抗体産生は確認できず、その確立に向けて、検討を進めている。

一方、末梢血に出現する T 細胞分画に、CD4+CD25+ regulatory T cell が存在することを見出した。今後、安全で効果的な造血幹細胞移植医療確立のため、ヒト regulatory T cell の発生機構を明らかとし、造血幹細胞移植に伴う種々免疫反応に及ぼす影響についても考察を進めている。

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。また、ヒト regulatory T cell の出現も確認しており、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開発が可能となる。

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、NOD/SCID/ γ_c^{null} マウスにおいて構築されるヒト免疫機構において、T 細胞、NK 細胞、B 細胞の機能評価を行う。一方、regulatory T cell に関しては、その発生機構の解析に加えて機能的な解析を行い、異種動物であるマウス、ヒト間において存在する免疫学的寛容状態の機構にせまり、ヒト造血幹細胞移植に伴う拒絶、GVHD 等の免疫現象回避に向けた方策を検討する。

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。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。

骨髄、脾臓においては、成熟した B 細胞の出現が確認できる。また、末梢血中には、ヒト IgM, IgG が確認できる。しかし、既知抗原の投与による特異抗体の産生は確認できなかつた。今後、特異抗体産生が可能となる条件設定に向けて、さらなる検討を行う。

一方、このマウス末梢血には、ヒト CD4+CD25+ cell を認める。当初は活性型 effector T cell との認識であったが、詳細な検討により FOXP3 を発現することを見出し、抑制性 T cell の細胞機能活性を有することを確認した。

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。また、ヒト regulatory T cell の発生機構に関しては、倫理的問題等によりその解明が困難である。今回、このモデルを用いて、解明が待たれる。また、この regulatory T cell の制御機構を明らかにすることにより、造血幹細胞移植に伴う望まれない免疫反応を回避する方策の検討が可能となる。

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が明らかとなった。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、造血幹細胞移植に伴う免疫反応制御に向けた取り組みも可能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) 論文発表

- 1 Shiota M, Heike T, Haruyama M, Baba S, Tsuchiya A, Fujino H, Kobayashi H, Kato T, Umeda K, Yoshimoto M, Nakahata T: Isolation and characterization of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells with myogenic and neuronal properties *Exp Cell Res* 313: 1008-1023, 2007.
- 2 Shinoda G, Umeda K, Heike T, Arai M, Niwa A, Ma F, Suemori H, Luo HY, HK Chui D, Torii R, Shibuya M, Nakatsuji N, Nakahata T: $\square 4$ integrin+ endothelium derived from primate embryonic stem cells generates both primitive and definitive hematopoietic cells. *Stem Cells* inpress, 2007.
- 3 Suzuki K, Hiramatsu H, Fukushima-Shintani M, Heike T, Nakahata T. Efficient assay for evaluating human thrombopoiesis using NOD/SCID mice transplanted with cord blood CD34(+) cells *Eur J Haematol* 78:123-130, 2007
- 4 Baba S, Heike T, Umeda K, Iwasa T, Kaichi S, Hiraumi Y, Doi H, Yoshimoto M, Kanatsu-Shinohara M, Shinohara T, Nakahata T. *Generation of Cardiac and Endothelial Cells from Neonatal Mouse Testis-derived Multipotent Germline Stem Cells *Stem Cells* 25:1375-1383, 2007
- 5 Fujino H, Hiramatsu H, Tsuchiya A, Niwa A, Noma H, Shiota M, Umeda K, Yoshimoto M, Ito M, Heike T, Nakahata T: Human cord blood CD34+ cells develop into hepatocytes in the livers of NOD/SCID/ γ_c^{null} mice through cell fusion. *FASEB J* 21:3499-3510, 2007
- 6 Ma F, Wang D, Hanada S, Ebihara Y, Kawasaki H, Zaike Y, Heike T, Nakahata T: Novel method for efficient production of multipotential hematopoietic progenitors from human embryonic stem cells. *Int J Hematol* 85:371-379, 2007
- 7 Baba S, Heike T, Yoshimoto M, Umeda K, Doi H, Iwasa T, Lin X, Matsuoka S, Komeda M, Nakahata T : Flk1(+) cardiac stem/progenitor cells derived from embryonic stem cells improve cardiac function in a dilated cardiomyopathy mouse model. *Cardiovasc Res* 79: 119-131, 2007.

2) 学会発表

Strategy to set up regenerative medicine with safety and efficiency using embryonic stem cells 国際シンポジウム 2:Current topics and future of regenerative medicine

平家俊男

第110回日本小児科学会学術集会
2007.4

梅田勝嗣、平家俊男、丹羽明、松原央、
横尾憲孝、美馬隆宏、足立壮一、末盛
博文、鳥居隆三、渋谷正史、中辻憲夫、
中畑龍俊：霊長類 ES 細胞からのヘマ
ンギオブラストの分化誘導における
VEGF 関連因子の作用の検討：第 6 9
回日本血液学会第 4 9 回日本臨床血
液学会合同総会 平成 1 9 年 1 0 月
1 1 日-1 3 日

平家俊男、篠田現、梅田勝嗣、中畑龍
俊：霊長類 ES 細胞からの造血系細胞
の作成 第 4 9 回日本小児血液学会
シンポジウム 1 遺伝子治療による
造血系・免疫系の再生 平成 1 9 年 1
2 月 1 4 日～1 6 日 仙台

Sequential analysis of the alpha and
beta-globin gene expressions during
erythropoietic differentiation from
primate ES cells

Umeda K, Heike T, Niwa A, Matsubara H,
Shinoda G, Arai M, Adachi S, Suemori H,
Torii R, Shibuya M, Nakatsuji N,
Nakahata

The 5th annual meeting of International
Society for Stem Cell Research

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

2-2 造血幹細胞移植後ウイルス感染症の動態に関する研究

分担研究者：清水 則夫
（東京医科歯科大学準教授）

研究要旨

移植後は免疫抑制剤の使用などにより免疫不全状態となるため、患者は様々なウイルス感染症に罹患し、しばしば致命的な経過をとる。移植後免疫不全状態でのウイルスの再活性化と症状発現の関係を明らかにすることは移植関連死亡を減少させる上で重要な課題である。本研究は、造血幹細胞移植患者に発生するウイルス感染症の頻度、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明らかにすることを目的とし、45例の造血幹細胞移植患者に対して高感度網羅的迅速ウイルス検査を行った。経時的モニタリングを行えた12例のうちウイルスが陽性化したのは11例で、うち10例では経過中に複数のウイルス種が検出された。今回は症例数が少なく検出されたウイルス種・ゲノムコピー数の臨床的意義を解析出来なかったが、今後症例数の蓄積を行って関係を明らかにしていきたい。

A: 研究目的

移植後の免疫抑制剤の使用、あるいは GVHD の発症により、移植患者は深い免疫不全状態に陥るため CMV、EBV、アデノウイルスなどの感染症に罹患し、しばしば致命的な経過をとることも経験される。特に、臍帯血移植は、骨髄移植で問題となるドナー負担がなく、ドナーの事情に配慮した移植時期の遅延の問題がなく適切な時期に移植を行なえる、などの長所があるため、臍帯血移植と骨髄移植の移植数は拮抗するまでに臍帯血移植は普及してきたが、上記の長所がある反面、移植関連死亡が 50%に達し、その約半数は感染症による死亡と報告されている。生着不全や拒絶が多いことや生着例でも造血幹細胞の生着が遅れることがその原因であり、移植患者の免疫力の回復が遅れることが感染症のリスクを高めている。移植後免疫不全状態でのウイルスの再活性化と症状発現の関係を明らかにすることは移植関連死亡を減少させる上で重要な課題と考えられる。また移植後には発熱、下痢、肝障害、皮疹、血球減少など様々な合併症が起こるが、複合的な病態が絡んでいるため、どのようなウイルスがどれくらいの率で関与しているのか詳細な解析はなされていない。

そのような情報不足が有効な予防法や治療法を確立するための大きな制約要因となっている。本研究では、臍帯血移植の重大な合併症のひとつであるウイルス感染症の頻度、出現時期、ウイルスの種類、臨床症状とウイルス量の関係を継続的に測定して移植後免

疫不全状態でのウイルス再活性化の特徴を調べ、高感度網羅的迅速ウイルス検査の有用性を検討したので報告する。

B: 研究方法

1. 対象

2007 年 4 月～10 月に神戸医療センター中央市民病院および先端医療センターで造血幹細胞移植を施行した 12 例（経時的検査）と有症状あるいは検査値異常を示した患者 33 例（スポット検査）を対象とした。

2. ウイルス検査の日程と検体の採取

造血幹細胞移植後の経時的ウイルスモニタリングは移植後 day 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 56, 70, 100 に行った。スポット検査は、主に発熱、血尿などの症状出現時に行った。患者から末梢血 2ml を採取し、そのうちの 200 μ L を使用した。凍結保存血清については解凍し、室温に戻してから処理した。また、尿、髄液、便などの検体も随時使用した。

2. DNAウイルスの定性検査

ウイルス検査項目は、これまでの報告により、移植後ウイルス感染症として重要と考えられているウイルスの中から、下記の DNA ウイルスを測定した。

単純ヘルペスウイルス I 型: HSV-1

単純ヘルペスウイルス II 型: HSV-2

水痘、帯状ヘルペス: VZV

サイトメガロウイルス: CMV

エプスタイン・バーウイルス: EBV

ヒトヘルペスウイルス 6: HHV-6

ヒトヘルペスウイルス7：HHV-7

ヒトヘルペスウイルス8：HHV-8

JCウイルス：JCV

パルボウイルスB19型：PVB19

アデノウイルス：ADV

インナーコントロールとして β -globin を使用した。

マルチプレックスPCR法により、被検ウイルスを下記A~Cの3つの反応系で出した。なお、ADVはサブタイプが多数存在するため、1つの反応系で検出を行った。

A：HSV-1, -2, VZV, CMV, HHV-6, ParvoB19, BKV, JCV

B：EBV, HHV-7, HHV-8

C：ADV(サブタイプ1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 16, 17, 19, 21, 28, 31, 34, 40, 48を検出可能)

PCR装置：反応を迅速に行なうため、キャピラリーPCR装置ライトサイクラー（ロシュ社）を使用した。

PCR試薬：AccuPrime Taq DNA Polymerase System、Invitrogen社

プライマー、プローブ（FITC標識プローブとLCRed標識の2種類のハイブリプローブを使用）の配列を以下に示す。

HSV1,2

F-gctcgagtgcgaaaaacgttc

R-tgcggttgataaacgcgcagt

LCRed640-cttgccccgcagatgacgcc-p

gcgaccagatccacgcccttgatgagc-FITC

VZV

F-tgtcctagaggaggtttatctg

R-catcgtctgtaaagacttaaccag

LCRed705-aagttcgcggtataattgt-p

gggaaatcgagaaaccaccctatccgac-FITC

CMV

F-taccctatcgcgtgtgttc

R-ataggaggcggccacgtattc

LCRed705-acaccacttatctgctgggcagc-p

cgtttcgctgtagctacgcttacat-FITC

EBV

F-cgcataatggcggacctag

R-caaacaagcccactcccc

LCRed640-aaccatagaccgcttctctg-p

aaagatagcagcagcgcagc-FITC

HHV6

F-acccgagagatgattttgcg

R-gcagaagacagcagcgagat

LCRed640-gggtcatttatgtatagacggp

taagtaaccgttttcgccc-FITC

HHV7

F-gaaaaatccgcataatagc

R-atggaacacctattaacggc

LCRed705-ttgtgaaatgtgtgcgataggc-p

gccataagaacaggtacagacattgtca-FITC

HHV8

F-agccgaaaggattccaccat

R-tccgtgtgtctacgtccag

LCRed640-tgatctatataccaccaatgtgtcattatg-p

ccggatgatgtaaataatggcggaac-FITC

PVB19

F-ccgccaagtacaggaaaaac

R-cagctacactccacgca

LCRed640-caccagggtagatcaaaaaatgcgtgga-p

gcaaaagccattttaggcgggca-FITC

BKV, JCV

F-cacttttggggacctagt

R-ctctacagtagcaaggatgc

LCRed705-agtagctgaaattgctgctggagaggtgct-p

tctgaggctgctgctgccacagatttt-FITC

PCR反応：95℃2分処理の後、95℃2秒、58℃15秒、72℃15秒の反応を40サイクル行なった。

検出操作：PCR反応終了後、メルティング解析を行ない、各ウイルスに対応したT_m値のピークの有無からウイルスゲノムの存否を判定した（T_m値は以下の通り：A HSV-1;57℃, HSV-2;70℃, VZV 62℃, ParvoB19;65℃ [LCRed 640で検出], CMV;61℃, HHV-6;54℃, BKV;66℃, JCV ;70℃ [LCRed705で検出] B EBV ;63℃ [LCRed 640で検出], HHV-7;58℃, HHV-8 ;63℃ [LCRed 705で検出], β-グロビン ;52℃ [LCRed 640で検出])

3. DNAウイルスの定量検査

定性検査で陽性となった場合にはウイルスゲノムのコピー数をリアルタイムPCR法により定量する。

PCR装置：Prism 7300（アプライドバイオシステムズジャパン）

PCR反応：95℃10分処理の後、95℃15秒、60℃60秒の反応を45サイクル行なった。

PCR試薬：AmpliTaqGold&Gold Buffer（アプライドバイオシステムズジャパン）

プライマー：配列を以下に示す。

プローブ：Taqman Probeを使用。配列を以下に示す。

ADV

F- gacatgacttttgagggtga

R- tcgatgacgccgctgtg

P-FAM-cccattggaYgagcccaccct-TAMRA

HSV1,2

F- cgcacaaagaccacctctc

R- gctcgcaccacgcga

P- FAM-tggcaacgcggcccaac-TAMRA

P- JOE-cggcgatgcgccccag-TAMRA

VZV

F- aactttatcatccagcctggcg

R- gaaaacccaaaccgttctcgag

P- FAM-tgtctttgacggaggcaaacactg-TAMRA

CMV

F- catgaaggtctttgccagtag

R- ggccaaagtgtaggctacaatag

P- FAM-tggcccgtaggtcatccactagg-TAMRA

EBV

F- cggaagccctctggacttc

R- ccctgtttatccgatggaatg

P- FAM-tgtacacgcacgagaaatgcgcc-TAMRA

HHV6

F- gacaatcacatgcctggataatg

R- tgtaagcgtgtgtaatggactaa

P- FAM-agcagctggcgaaaagtgtgtgc-TAMRA

HHV7

F- cggaagtcactggagtaatgacaa

R- ccaatccttcgaaaccgat

P- FAM-ctcgcagattgctgtffccatg-TAMRA

HHV8

F- cctctgtccccattcattg

R- cgtttccgtcgtggatgag

P- FAM-cggcgtcagacattctcacaacc-TAMRA

PVB19

F- gggttcaagcacaagYagtaaaaga

R- cggYaaactccttgaatg

P- FAM-cagctgcccctgtgg-MGB

BKV

F- ggaaagtctttagggtctctacctt

R- gatgaagatttattYtgccatgaRg

P- FAM-atcactggcaaacat-MGB

JCV

F- ggaaagtctttaggtcttctacctt

R- gaagacctgtttgccatgaaga

P- FAM-atcactggcaaacat-MGB

4. 検査系の感度測定法

(1) スタンダード作成

各種ウイルスのPCR産物をクローニングしシークエンスにて配列確認した後、制限酵素ScaIにて消化、一本鎖にしてフェノールクロロホルム処理し、エタノール沈殿後、OD値測定。電気泳動の結果とOD値から濃度算出し、コピー数をもとめ、ロシュ社製MS2RNA 10ng/ul溶液にて段階希釈して作成した。

(2) 特異性の確認

各種ウイルスPrimer、Probeの相同性をGenBankにて検索し特異性を確認した。また引用した文献にて特異性が調べられている場合はそれをもって替えた。陽性コントロールおよび各種ウイルスが検出された臨床検体を用いて、お互いの交差反応性が無いことを確認した。

(倫理面への配慮)

ウイルス陽性検体は、匿名化した上で受け取り、患者の個人情報と解析結果との連結が不可能なように配慮した。また、ウイルス検査以外の検査(遺伝子検査など)は一切行わないこととした。

C: 結果

1. ウイルスモニタリングによる陽性率

経時的ウイルスモニタリングができた12例

のうち、11例で何らかのウイルスが検出された。各ウイルスの検出率は、CMV 67%、EBV 42%、BKV 42%、HHV6 33%、PVB19 33%、JCV 8%で、他の披検ウイルスは陰性だった。複数のウイルスが検出された例は、2種が5例、3種が4例、4種が1例だった。

2. CMVが検出された症例の解析

アンチゲネミア測定によりCMV抗原血症と診断された症例8例は全てPCR検査陽性で、そのうちの2例が血小板減少、4例が肝機能障害、3例が下痢・消化器症状を呈していた。CMVは移植中期(30~60日)に検出される傾向にあり、アンチゲネミア陽性に先立って検出される例が多かった。また、CMVが好中球生着前の移植後早期に検出される例も認められ、血小板減少、肝障害、消化器症状とウイルス量が相関する例も認められた。

3. EBVが検出された症例の解析

EBVが検出された5例のうち、なんら症状がない症例が4例、汎血球減少が見られた例が1例だった。EBV陽性例でも多くの場合ゲノムコピー数は100コピー/μgDNA以下の低値であり、EBV-LPDは認めなかった。

4. HHV6が検出された症例の解析

HHV6が検出された4例のうち発熱が2例、発疹が2例あり、肺炎、神経症状、消化器症状、骨髄抑制が認められた例は無かった。HHV6は移植早期に検出される傾向にあり、臨床症状とウイルス検出との相関は認められなかった。

5. PVB19が検出された症例の解析

PVB19が検出された5例のうち臨床症状が無かった例が1例、貧血が1例、汎血球減少が1例、発熱が1例、発疹が1例だった。PVB19