

200934030A

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

新たな移植細胞療法に向けた造血幹細胞の
ex vivo 増幅技術の開発と応用

平成21年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中畑龍俊

平成22(2010)年3月

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

新たな移植細胞療法に向けた造血幹細胞の
ex vivo 増幅技術の開発と応用

平成21年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中畑龍俊

京都大学 物質-細胞統合システム拠点 iPS 細胞研究センター
医療応用技術開発部門疾患解析学分野

はじめに

臍帯血移植が開始されてから 20 年以上経過し、世界各国で造血幹細胞移植の一つの柱になろうとしている。特に我が国では臍帯血バンクも充実し、非血縁者間の臍帯血移植は骨髄バンクからの非血縁者間移植にほぼ匹敵する数の移植が行われている。臍帯血移植が抱える問題点として、生着不全の頻度が高い、血球回復に時間がかかる、感染症の頻度が高いなどの欠点が当初から指摘され、それらの問題を回避するため臍帯血中の造血幹細胞を体外で増幅して移植に用いる試みがなされてきた。われわれはヒト造血幹細胞上に発現しているサイトカイン受容体を解析し、これらに対応するサイトカインである可溶性 IL-6 受容体 (sIL-6R)/IL-6 複合体、SCF, FL, TPO を組み合わせた新しいヒト造血幹細胞の増幅法を開発し報告してきた。臍帯血から分離した細胞をこの条件下で 1 週間培養することにより、造血幹細胞を約 4.2 倍増幅できることがヒト造血幹細胞測定用マウスを用いた実験で明らかとなった。われわれの開発した培養法は従来報告されてきた方法に比べて格段に未分化なヒト細胞を増幅できることから、臨床応用が期待されてきた。

本研究班はこれまで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、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」研究において、サイトカインを用いた臍帯血造血幹細胞の *ex vivo* 増幅という基礎研究成果を臨床に応用すべく、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、治療の安全性と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ってきた。

昨年度から始まった、免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業「新たな移植細胞療法に向けた造血幹細胞の *ex vivo* 増幅技術の開発と応用」では、これまでの集大成として、臨床研究を行い、効果と安全性を検証することを最大の目的としている。既に臨床研究「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、同時に、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てきた。またこれまで産学で取り組んできた完全無血清培地、培養バッグといった培養デバイスの製品化の試みも成功をおさめようとしている。

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、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、さらにはわが国の細胞治療、再生医療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していきたいと考えている。

本報告書が関係者の参考になれば幸いである。

平成 22 年 3 月 主任研究者 中畑 龍俊

目 次

I. 研究組織	1
II. 平成 21 年度総括研究報告	3
中畑 龍俊	
III. 平成 21 年度分担研究報告	
1. <i>ex vivo</i> 増幅臍帯血移植の臨床研究 品質管理・無菌試験	13
伊藤 仁也	
2. 新規培養法の効率と再現性の検証	19
伊藤 仁也	
3. アカデミアにおける細胞治療・再生治療開発に必要な細胞プロセッシングに関する研究	23
前川 平	
4. 臍帯血移植後の免疫機構再構築に関する研究	31
平家 俊男	
5. 品質管理法の確立：真菌汚染の迅速検出法の開発	37
清水 則夫	
6. 分子基盤に基づいた増幅法、分化誘導法の開発	43
田中 宏和、金倉 譲	
7. 可溶型 Notch リガンド Delta1-Fc を用いて増幅した臍帯血造血幹・前駆細胞移植の臨床研究に向けて	51
千葉 滋	
IV. 班会議記録合同研究カンファレンス	55
V. 研究成果の刊行に関する一覧	59
VI. 研究成果の刊行物・印刷物	71

I. 研究組織

平成 21 年度厚生科学研究

「新たな移植細胞療法に向けた造血幹細胞の ex vivo 増幅技術の開発」研究班
研 究 組 織

	氏 名	所 属
主任研究者	中畑 龍俊	京都大学物質-細胞統合システム拠点 iPS 細胞研究センター
分担研究者	前川 平	京都大学医学部附属病院輸血細胞治療部
	金倉 譲	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治療学
	千葉 滋	筑波大学大学院人間総合科学研究科
	永井 謙一	先端医療センター診療開発部
	伊藤 仁也	先端医療センター診療開発部
	田中 宏和	大阪大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科
研究協力者	松村 到	大阪大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科
	橋本 尚子	先端医療センター診療開発部
	初山 麻子	先端医療センター細胞管理室
	丸山 京子	先端医療センター細胞管理室
	高橋 隆幸	神戸市立医療センター中央市民病院免疫血液内科
	松下 章子	神戸市立医療センター中央市民病院免疫血液内科
	田端 淑恵	神戸市立医療センター中央市民病院免疫血液内科
	白数 昭雄	ニプロ株式会社
	吉川 義洋	ニプロ株式会社
	武田 和之	ニプロ株式会社
	細井 裕之	和研薬株式会社
	西川 茂道	和研薬株式会社
	瀬尾 稔	ヘモネティスクジャパン株式会社
	加藤 守孝	ヘモネティスクジャパン株式会社
	松本 建	日水製薬株式会社

Ⅱ. 平成 21 年度 総括研究報告書

総括研究報告書

新たな移植細胞療法に向けた造血幹細胞の
ex vivo 増幅技術の開発と応用

総括研究者：中畑 龍俊

（京都大学物質-細胞統合システム拠点 iPS 細胞研究センター教授）

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医療として確立することを目的としている。また細胞プロセッシングに関連した、製造環境の基準、新規デバイスの開発を含めた閉鎖系培養法の開発、品質管理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てきた。本年度は「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」において拒絶をきたした 1 例についてなぜ拒絶を起したのか徹底的に検証することでさらなる複数臍帯血移植にむけた臨床試験計画づくりに反映させた。

総括研究者

中畑 龍俊 京都大学物質-細胞統合システム拠点 iPS 細胞研究センター
医療応用技術開発部門 疾患解析学分野 特定拠点教授

分担研究者

前川 平 京都大学輸血細胞治療部
教授

金倉 譲 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

千葉 滋 筑波大学大学院人間総合科学
研究科疾患制御医学専攻血液
病態制御医学分野 教授

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
細胞管理室長

田中 宏和 大阪大学大学院医学系
研究科血液・腫瘍内科学

研究協力者

松村 到 大阪大学大学院医学系
研究科血液・腫瘍内科学準教授

白数 照雄 ニプロ株式会社総合研究所第 6
班研究開発部部長代行

西川 茂道 和研薬株式会社 (株)
R&D 部部长

松本 健 日水製薬 (株) 先端技術研究所
主任研究員

A：研究目的

成人臍帯血が一般的となり、臍帯血移植数が増加したが、依然として高い生着不全率と移植後の造血・免疫回復が遅延することは、むしろ明らかになってきた。したがって臍帯血造血幹細胞の *ex vivo* 増幅法の確立、及び移植後早期に造血を回復させる方法の確立が急務である。すでに海外では、シアトルグループや MD アンダーソンのグループが複数臍帯血移植の一方に *ex vivo* 増幅した臍帯血を移植する臨床試験を行い、明らかに生着が促進された報告もなされはじめている。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、本邦では未だ指針やガイドラインが十分整備

されていないのが実状である。

申請者らはこれまでサイトカインにより臍帯血 CD34 陽性細胞を体外増幅させる技術に関してのトランスレーショナルリサーチに取り組み、既存の増幅法と比較して有効かつ安全な細胞製剤の製造法、及び品質管理法を確立した。現在急性白血病を対象に、*ex vivo* 増幅臍帯血移植を実施し有害事象、生着促進への寄与につき評価する臨床研究を遂行している。

本研究期間中申請者らは、これまでの研究成果を応用、発展させる形で以下の3点を目標に研究を実施することを計画している。

1. 複数ユニットにおける増幅臍帯血移植の臨床研究を開始し、増幅臍帯血の意義を明確にすることにより、*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
2. 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
3. 申請者らが開発した細胞プロセッシング法及び品質管理法の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し、様々な移植細胞治療に応用、発展させることを目的に本研究班を組織した。

B：研究方法

本研究では、研究の実施にあたっては基盤整備、応用研究を含めた以下の7テーマを他大学や企業との共同で研究を進めた。

I. *ex vivo* 増幅臍帯血移植の臨床研究

I-1. 単一ユニット増幅臍帯血移植

先端医療センターにおいて現在実施中の「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」1年間の観察期間後、安全性及び有効性を検証する。

I-2. 複数ユニット増幅臍帯血移植

他の研究と並行する形で臨床プロトコルを作成し、*in vitro*/*in vivo* の細胞安全性試験 (前臨床試験) を行い、「ヒト幹細胞を用いた臨床研究に関する指針」に係る中央審査を受け、新たな臨床研究を実施する予定である。

II. 新規培養法の効率、安全性の検証と cell processing におけるデバイスの開発

これまでの研究において我々は臍帯血造血幹細胞の完全無血清化に成功し、企業と共同で、無血清培地と培養バッグの開発を進めてきた。これにより、市販の培地より数倍 CD34 が増幅できるようになった。平成 21 年度内に新規デバイスを用いた培養により得られる細胞に関しての有効性、安全性を検証する。またできればこれらのデバイスの販売に向け、期間中に医療器具化に向けた申請を

行う。

III. Cell processing における GMP の構築とガイドライン作成に関する研究

アカデミアにおける細胞治療・再生治療開発に必要な cell processing における製造環境、品質管理、製造組織などの点からヒトに投与する細胞治療の安全性をいかに担保できるか細胞医療の実際の問題点などから提言を行う。

IV. 臍帯血移植後の免疫機構再構築に関する研究

増幅させた細胞から再構築される T 細胞および B 細胞系再構築能に関して、これまでに確立した NOD/SCID/ γ_c^{null} マウスへの異種間移植系を用いて T、B 細胞の分化やその機能、及び特異的抗体産生や CTL の誘導能を解析する。臨床研究においては、臍帯血移植後の免疫能を細胞表面抗原解析、サイトカイン産生能、T 細胞動態につき評価し、増幅臍帯血が免疫機構再構築に及ぼす影響につき解析する。また申請者らが開発した網羅的迅速ウイルス定量解析法により、約 30 種類のウイルスを経時的に測定し、免疫能の回復とウイルス感染症の関係を明らかにする。

V. 治療用細胞製剤の品質管理法・評価系の確立

新たな製造工程に併せた品質管理法を確立するとともに、治療用細胞製剤の品質管理におけるガイドラインを作成する。また迅速かつ網羅的に細菌、真菌成分や液性因子等タンパクの定量解析が可能な系の開発に取り組む。

VI. 臍帯血ドナーリンパ球輸注 (DLI) に向けた基盤整備及び臨床研究

培養法を確立後、臨床研究は多施設共同臨床試験とし、『臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究班』に引き継ぐ。

VII. 分子基盤に基づいた新規増幅法、分化誘導法の開発

細胞増殖の基盤をなす細胞周期制御機構に着目し、細胞周期の進行に対して正に作用する decoy ペプチドを合成し、decoy ペプチドが臍帯血由来 CD34+陽性造血幹/前駆細胞の増殖に及ぼす影響について解析を行った。

VIII. 可溶性 Notch リガンド Delta1-Fc を用いて増幅した臍帯血造血前駆細胞の臨床研究

サイトカインに加えて Delta 1-Fc キメラ蛋白を用いて臍帯血由来 CD133 陽性細胞を増幅する方法を開発した。本年度は Clinical grade での培養試験を行う。

C : 結果と考察

I. *ex vivo* 増幅臍帯血移植の臨床研究

「急性白血病に対する *Ex vivo* 増幅臍帯血移植の Phase I/II 試験」には 2 例の登録があったが、1 例は後述するように拒絶を生じ、もう 1 例は移植前検査の際に甲状腺癌が発見されて非適格となったことは、昨年報告書で記載した。本年度は、独立モニタリング委員会より、拒絶の原因をできるだけ詳細に検討するよう勧告があり、原因究明を行った。

症例報告: 骨髄移植後再発 AML (M3) 例に対し、*Ex vivo* 増幅臍帯血移植を行った。12 日間培養した結果、CD34 陽性細胞として $15.0 \times 10^5/\text{kg}$ という大量 CD34 陽性細胞を移植することができた。(CD34 陽性細胞は 100.4 倍の増幅) Day16 に WBC > 1000 となり、Day 19 の骨髄所見でも Complete chimera が得られ、多数の赤芽球や巨核球までもが出現していたが、結局その後、急激に拒絶された。

レスキューのために行った、1st donor からの PBSCT においても早期に生着したが、臍帯血移植の時と同様敗血症を発症し、Day21 からは汎血球減少が進行した。

サイトカイン測定

拒絶時の骨髄にはレシピエントタイプの活性化 T 細胞が浸潤していたが臍帯血あるいは 2nd PBSCT のグラフトに対する特異的細胞傷害性 T 細胞ではなかった。(Elispot assay) 臍帯血移植後 Day10 で *Streptococcus mitis*, 末梢血幹細胞後 Day10 には *Staphylococcus epidermidis* が検出され、その後 IL-5, IL-6, IL-8, MCP-1 といった炎症性サイトカインが上昇し、拒絶に陥った。細胞移植後感染が生じるまではこれらのサイトカインに変動はなかった。

骨髄非破壊的前処置による臍帯血移植後の生着不全例の特徴について虎ノ門病院グループは、生着不全の一要因である hemophagocytic syndrome (HPS) 発症と移植後 day10 以降の IL-8, MCP-1 高値との相関、pre-engraftment immune reaction (PIR) 発症と移植後 day10 以降の IL-5, IL-8 高値との相関、さらには血流感染症と移植後 day10 以降の IL-6, IL-8 高値との相関を報告している。PIR は生着日 6 日以前に起こる allo-immunization に起因する一連の症候群であり、非感染性の発熱、皮疹、下痢、黄疸、体重増加等を呈する。また PIR (+) 群では生着不全が多いことも報告されている。

本症例では、臍帯血移植とその後の拒絶のレスキューで行った PBSCT において、ともに

移植早期に敗血症の発症に引き続き、IL-6, MCP-1, IL-8 の上昇が認められ、その後、発熱、皮疹、浮腫といった非感染性の免疫反応 (PIR) を発症した。また骨髄非破壊の前処置を行って残存したレシピエント T 細胞はほとんど活性化した状態で、AICD (Activation induced cell death) も欠如しており、制御不十分な状態で、サイトカイン、ケモカインを過剰に産生したと考えられる。これらのサイトカインに刺激された活性化マクロファージ、活性化 T 細胞から TNF- α などの炎症性サイトカインが産生され造血幹細胞などはミトコンドリアが豊富で細胞回転が速い細胞を Apoptosis に陥らせることが知られている。別の試験で *ex vivo* 増幅した臍帯血は、直接これらのサイトカインを産生していないことから *Ex vivo* 増幅臍帯血移植が原因とは考えにくく、敗血症に伴う高サイトカイン血症が引き金となり、Apoptosis 誘導性のサイトカイン、ケモカインが産生され、拒絶に至ったと考えた。

II. 新規培養法の効率、安全性の検証

本分担研究では、より効率で安全な培養法の確立を目的としてリコンビナントアルブミンを担体としたリポソームを用いた新規無血清培地ならびにポリオレフィン系フッ化処理培養バッグ (NIPRO 社製) の開発を行ってきた。新規無血清培地と培養バックを用いて現行の製造方法による製造試験を行った結果、総細胞数 1000 倍、CD34 陽性細胞数 100 倍と、現在使用している資材と比較して 2 倍以上の増幅効果が得られた

本年度は、実製造試験ならびに品質に関するデータを取得した。

その結果、培養日数はこれまでの 12 日間から 9 日に短縮してもこれまでと同等の造血能力を持つ細胞が約同数得ることができるとわかった。

得られた細胞の染色体異常などは伴わずに、一定の安全性確保されると考えられた。

III. GMP 及び GTP に準拠した cell processing におけるデバイス開発

本分担研究では、細胞治療に関わる臨床研究における製造、品質管理、環境管理の基盤整理を前川らが担当し、FDA の cGMP の調査研究から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。

IV. 臍帯血移植後の免疫機構再構築に関する研究

分担研究者の平家らはこれまでに臍帯血 CD34+細胞を主任/分担研究者らが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、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、マウス皮膚において、ヒト肥満細胞の出現を確認し、本モデルマウスがヒトアレルギー疾患解析に向けたツールとなり得ることも明らかとなった。

V. 治療用細胞製剤の品質管理法・評価系の確立

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。本年度は先端医療センター内に細胞管理室 (室長 分担研究者 伊藤) を整備し、ウイルス否定試験、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験をバリデートして迅速に行えるよう整備した。また細胞膜の ATP 活性を鋭敏に定量することにより、細胞毒性試験、細胞傷害性試験を確立した。無菌試験に BacT/ALERT3D システムを導入し、バリデートした。

また分担研究者の清水らは、品質管理試験におけるウイルス、マイコプラズマなどの病原微生物の否定試験を multiplex PCR 法で 2 時間以内に検査できるシステムを構築した。移植後免疫不全状態で潜在する病原体の再活性化を早期に検出・同定し対処することにより、移植関連死亡を減少させる目的で、ヘルペスウイルス属の迅速診断法の開発と移植医療に際して重要な感染症である肝疾患の発症に関与するウイルス群を同時に検出・定量するための検査セットを構築し、その検証を行った。

VI. 臍帯血ドナーリンパ球輸注 (DLI) に向けた基盤整備及び臨床研究

分担研究者の伊藤らは臍帯血 DLI に向け、安全性試験、効果検証のための前臨床試験 (免疫不全マウスである NOD / Ltz / SCID マウスを用いて、ヒト腫瘍細胞とヒト免疫担当細胞の *in vivo* における免疫反応を見た) を終

了させて、臨床プロトコルの作成を行った。この臨床研究は臍帯血バンクとの連携が必要であるため、『臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究班』にて50例の多施設共同臨床研究に移行する予定である。

VII. 分子基盤に基づいた増幅法、分化誘導法の開発

細胞周期制御因子 CDK4 に対する膜透過型 decoy ペプチドは、臍帯血由来 CD34+陽性造血幹/前駆細胞に対してほぼ 100%の導入効率を得られ、導入直後も高い viability が保持されていた。また導入量の調節が可能であり、その発現が7日間維持されていた。さらに核移行シグナルの有無により細胞内局在を制御することが可能であり、核内で CDK4/INK4 複合体の活性を変化させた。またより未分化な細胞においてその細胞周期を亢進させた。

VII. 可溶性 Notch リガンド Delta1-Fc を用いて増幅した臍帯血造血前駆細胞の臨床研究
ヒト臍帯血 CD133 陽性細胞を可溶性 Notch リガンド Delta1-Fc キメラ蛋白を固相化条件で培養し、筑波大学細胞プロセッシングファクトリーにて Clinical grade の培養法の確立を行った。

E : まとめ

通常の臍帯血移植後に 2×10^7 /kg より過剰分の細胞を Ex vivo 増幅し、12日後に追加輸注する臨床研究では一旦は、迅速な生着を確認したが、引き続いて生じた敗血症後の PIR により、急激に拒絶に至った。保存血清や細胞を用いたさまざまな試験において増幅臍帯血移植との因果関係は低いものの、臍帯血移植の拒絶の原因となる PIR に関しては改善効果が乏しかったということになる。今後複数臍帯血移植の一方と増幅させ、一方を増幅させない試験を準備しているが、移植免疫担当細胞を強化させるため、CD34 だけではなくすべての細胞を移植することに反映させたい。

F : 健康危険情報

Ex vivo 増幅臍帯血移植時に拒絶を生じた。詳細な報告書は独立モニタリング委員会、臍帯血バンクネットワーク、厚生労働省に提出した。

G : 研究発表

1. Okafuji I, Nishikomori R, Kanazawa N,

Kambe N, Fujisawa A, Yamazaki S, Saito M, Yoshioka T, Kawai T, Sakai H, Tanizaki H, Heike T, Miyachi Y, Nakahata T.: Role of the NOD2 genotype in the clinical phenotype of Blau syndrome and early-onset sarcoidosis. *Arthritis Rheum.* 60:242-250, 2009.

2. Watanabe M, Adachi S, Matsubara H, Imai T, Yui Y, Mizushima Y, Hiraumi Y, Watanabe K, Kamitsuji Y, Toyokuni S, Hosoi H, Sugimoto T, Toguchida J, Nakahata T.: Induction of autophagy in malignant rhabdoid tumor cells by the histone deacetylase inhibitor FK228 through AIF translocation. *Int J Cancer* 124:55-67, 2009.

3. Matsubara H, Watanabe M, Imai T, Yui Y, Mizushima Y, Hiraumi Y, Kamitsuji Y, Watanabe K, Nishijo K, Toguchida J, Nakahata T., Adachi S.: Involvement of extracellular signal-regulated kinase activation in human osteosarcoma cell resistance to the histone deacetylase inhibitor FK228 [(1S,4S,7Z,10S,16E,21R)-7-ethylidene-4,2,1-bis(propan-2-yl)-2-oxa-12,13-dithia-5,8,20,23-tetraazabicyclo[8.7.6]tricos-16-en-3,6,9,19,22-pentone]. *J Pharmacol Exp Ther.* 328:839-848, 2009.

4. Niwa A, Umeda K, Awaya T, Yui Y, Matsubara H, Hiramatsu H, Watanabe KI, Adachi S, Itoh T, Uemoto S, Nakahata T.: Successful autologous peripheral blood stem cell transplantation with a double-conditioning regimen for recurrent hepatoblastoma after liver transplantation. *Pediatr Transplant.* 13:259-262, 2009.

5. Hiraumi Y, Iwai-Kanai E, Baba S, Yui Y, Kamitsuji Y, Mizushima Y, Matsubara H, Watanabe M, Watanabe KI, Toyokuni S, Matsubara H, Nakahata T., Adachi S.: Granulocyte colony-stimulating factor protects cardiac mitochondria in the early phase of cardiac injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 296:823-832, 2009.

6. Chang H, Yoshimoto M, Umeda K, Iwasa T, Mizuno Y, Fukada SI, Yamamoto H, Motohashi N, Suzuki YM, Takeda S, Heike T, Nakahata T.: Generation of transplantable, functional satellite-like cells from mouse embryonic stem cells. *FASEB J.* 23:1907-1919, 2009.

7. Fukushima-Shintani M, Suzuki KI, Iwatsuki Y, Abe M, Sugawara K, Hirayama F, Kawasaki T, Nakahata T.: AKR-501 (YM477) a novel orally-active thrombopoietin receptor agonist. *Eur J Haematol.* 82:247-254, 2009.

8. Higashi A.Y., Ikawa T, Muramatsu M,

- Economides A.N., Niwa A, Okuda T, Murphy AJ., Rojas J, Heike T, Nakahata T, Kawamoto H, Kita T, Yanagita M.: Direct hematological toxicity and illegitimate chromosomal recombination caused by the systemic activation of CreER^{T2}. J Immunol. 182:5633-5640, 2009.
9. Hasegawa D., Manabe A., Yagasaki H., Ohtsuka Y., Inoue M., Kikuchi A., Ohara A., Tsuchida M., Kojima S., Nakahata T.: Treatment of Childhood MDS Study Group Trial (MDS99). *Pediatr. Blood Cancer* 53:1011-1015, 2009.
 10. Kato M, Sanada M, Kato I, Sato Y, Takita J, Takeuchi K, Niwa A, Chen Y, Nakazaki K, Nomoto J, Asakura Y, Muto S, Tamura A, Iio M, Akatsuka Y, Hayashi Y, Mori H, Igarashi T, Kurokawa M, Chiba S, Mori S, Ishikawa Y, Okamoto K, Tobinai K, Nakagama H, Nakahata T, Yoshino T, Kobayashi Y, Ogawa S: Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature* 459:712-716, 2009.
 11. Niwa A., Umeda K., Chang H., Saito M., Okita K., Takahashi K., Nakagawa M., Yamanaka S., Nakahata T., Heike T: Orderly Hematopoietic Development of Induced Pluripotent Stem Cells via Flk-1⁺ Hemoangiogenic Progenitors. *J. Cell. Physiol.* 221:367-377, 2009.
 12. Miyara M., Yoshioka Y., Kitoh A., Shima T., Wing K., Niwa A., Perizot C., Taflin C., Heike T., Valeyre D., Mathian A., Nakahata T., Yamaguchi T., Nomura T., Ono M., Amoura Z., Gorochoy G., Sakaguchi S.: Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 30:899-911, 2009.
 13. Yokoo N., Baba S., Kaichi S., Niwa A., Mima T., Doi H., Yamanaka S., Nakahata T., Heike T.: The effects of cardioactive drugs on cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 387:482-488, 2009.
 14. Kusunoki T, Morimoto T, Nishikomori R, Heike T, Fujii T, Nakahata T.: Allergic status of schoolchildren with food allergy to eggs, milk or wheat in infancy. *Pediatr Allergy Immunol.* 20:642-647, 2009.
 15. Kusunoki T, Morimoto T, Nishikomori R, Yasumi T, Heike T, Fujii T, Nakahata T.: Changing Prevalence and Severity of Childhood Allergic Diseases in Kyoto, Japan, from 1996 to 2006. *Allergol Int.* 2009 Aug 25;58(4). [Epub ahead of print]
 16. Kato I., Umeda K., Tomonari Awaya T., Yui Y., Niwa A., Fujino H., Matsubara H., Watanabe K., Heike T., Adachi N., Endo H., Mizukami T., Nunoi H., Nakahata T., Adachi S.: Successful treatment of refractory donor lymphocyte infusion-induced immune-mediated pancytopenia by Rituximab. *Pediatr. Blood Cancer* in press
 17. Ueno H, Blanck JP, Sidney J , Zurawski SM, Bourdery L, Bentebibel SE, Zurawski G, Nicewander D, Heike T, Nakahata T, Arai K, Arai N, Blankenship D, Sette A, Banchereau J: Circulating CD4+ T cells Specific for H5 Hemagglutinin in Healthy Subjects. *J. Infectious Diseases* in press
 18. Sakai H., Ito S., Nishikomori R., Takaoka Y., Kawai T., Saito M., Okafuji I., Yasumi T., Heike T., Nakahata T.: A case of early-onset sarcoidosis with a six-bases deletion in the *NOD2* gene. *Rheumatology* in press.
- 文献 (邦文) 2009
1. 丹羽明, 中畑龍俊: I. 造血幹細胞 1. iPS 細胞からの造血分化. *Annual Review 血液* 2009 : 1-8 : 1, 2009
 2. 澤田明久, 井上雅美, 近藤統, 木本富子, 山田佳世, 中山雅弘, 桑江優子, 西川正則, 大川洋二, 井田孔明, 徳田桐子, 眞部淳, 土屋邦彦, 奥山宏臣, 窪田昭男, 川原央好, 長谷川利路, 米田光宏, 竹本理, 山田淳二, 川端秀彦, 田村太資, 木内恵子, 平野慎也, 宇野誠, 竹下泰史, 石原卓, 岡村隆行, 坂田尚己, 水谷修紀, 中畑龍俊, 迫正廣, 多和昭雄, 尾路祐介, 坪井昭博, 小山真穂, 岡芳弘, 安井昌博, 杉山治夫, 河敬世: 小児がんに対する WT1 ペプチドによるワクチン療法. *日本小児がん学会雑誌* (46 巻 1 号) 6-16, 2009
 3. 深尾大輔, 加藤裕, 梅田雄嗣, 徳舛麻友, 瓜生久美子, 馬場志郎, 松原央, 渡邊健一郎, 土井拓, 足立壮一, 中畑龍俊, 水嶋康浩, 片岡昭浩, 若園吉裕: 感染性心内膜炎合併後に安全に非血縁臍帯血移植を施行し得た乳児白血病の 1 例. *日本血液学会雑誌* (第 23 巻第 2 号) 126-130, 4, 2009
 4. 河井昌彦, 中畑龍俊: プロトロンビン時間を重視した早期新生児の DIC 診断基準. *日本産婦人科・新生児血液学会誌* (第 18 巻 2 号) 85-90, 2009
 5. 長井静世, 依藤亨, 土井拓, 河井昌彦, 百井亨, 岡本晋弥, 土井隆一郎, 中本裕

- 士、増江道哉、加古伸雄、岡本浩之、加藤英治、長沖優子、上本伸二、中畑龍俊：集学的アプローチにより腫瘍核出術をしえた局所型先天性高インスリン血症。日本小児科学会雑誌（113 巻 5 号）838-842, 5, 2009
6. 伊藤仁也、中畑龍俊：対外増幅造血細胞移植。医学のあゆみ Vol. 229 No. 9 786-792, 5, 2009
 7. 徳舛麻友、松原央、瓜生久美子、加藤格、梅田雄嗣、渡邊健一郎、足立壮一、仲俣岳晴、中山富貴、坪山直生、戸口田淳也、中畑龍俊：京大病院にて治療を行なった6歳以下発症の骨肉腫4例の検討。小児がん(第46巻第2号)195-200, 5, 2009
 8. 堀部敬三、土田昌宏、鶴澤正仁、中畑龍俊：わが国の小児造血器腫瘍診療施設の実態。日本小児科学会雑誌（第113巻第1号）105-111, 2009
 9. 中畑龍俊：さい帯血造血幹細胞の発見からさい帯血移植へ。日本さい帯血バンクネットワーク設立10周年記念『そして明日から』26-27, 2009
 10. 瓜生久美子、松原央、加藤格、徳舛麻友、梅田雄嗣、今井剛、渡邊健一郎、足立壮一、中畑龍俊：小児T細胞型急性リンパ性白血病に合併した groove 膵炎の1例。日本小児血液学会誌（第23巻第3号）209-212, 6, 2009
 11. 中畑龍俊：疾患特異的 iPS 細胞。『学術の動向』第14巻第9号, 78-83, 9, 2009
 12. 中畑龍俊：I. 総論 インフォームド・コンセント 2 - システムとしての対応。(特集 医療事故とリスクマネジメント) 『小児科診療』第72巻10号, 1793-1800, 2009
 13. 中畑龍俊：疾患特異的 iPS 細胞。『MSD メディカル・サイエンス・ダイジェスト』10月臨時増刊号(第35巻第12号通巻459号) 9-12, 2009
 14. 中畑龍俊：序 ～さまざまな幹細胞を用いた今後の再生医療～(特集：再生医療の現状と進歩～ES細胞, iPS細胞と体性幹細胞の臨床への応用～)。『血液フロンティア』11月号 (Vol. 19 No. 11) 17-18, 2009
 15. 中畑龍俊：疾患特異的 iPS 細胞の医療応用。(巻頭言) 『再生医療』Vol. 8/No. 4, 7p, 11, 2009

学会発表

-特別講演-

中畑龍俊：iPS細胞などの幹細胞を用いたこれからの小児医療の可能性。第1回日本小児科学会長野地方会 6月7日 松本市 信州大学医学部附属病院

中畑龍俊：iPS細胞を用いた今後の医療。第19回日本小児リウマチ学会総会・学術集会 10月2-4日(4日) 京都リサーチパーク 京都市

中畑龍俊：iPS細胞産業化の課題に関する論点整理。BioJapan 2009～World Business Forum～ 10月9日 パシフィコ横浜 横浜市(セッション『iPS細胞産業化の課題—生命倫理、標準化の観点から』)

-基調講演-

中畑龍俊：再生医療研究の現状と将来。第14回静岡健康・長寿学術フォーラム 10月2-4日(3日) 静岡県コンベンションアーツセンター 静岡市

-シンポジウム-

中畑龍俊、遠藤文夫：再生医療の近未来と iPS 細胞。第112回日本小児科学会学術集会総合シンポジウム1 4月17日 奈良文化会館 奈良県奈良市

中畑龍俊：iPS細胞を用いた今後の医療の可能性。第112回日本小児科学会学術集会総合シンポジウム1 4月17日 奈良文化会館 奈良県奈良市

依藤亨、川北理恵、野村安隆、河井昌彦、百井亨、長井静世、中畑龍俊：先天性高インスリン血症の遺伝子解析。第112回日本小児科学会学術集会分野別シンポジウム 4月17日 奈良文化会館 奈良県奈良市

才田聡、足立壮一、野村安隆、加藤竹雄、栗屋智就、森嶋達也、藤野寿典、松原央、渡邊健一郎、中畑龍俊：副腎白質ジストロフィーに骨髄非破壊的処置を用いて臍帯血移植を施行した2例。第112回日本小児科学会学術集会分野別シンポジウム 4月17日 奈良文化会館 奈良県奈良市

-国際学会-

Tatsutoshi Nakahata: Clinical applications of various stem cells. The Fourth iCeMS International Symposium(Integrated Physical/Chemical Biology of The Cell: From Genes to Membrane Systems) May 27-29(28), 2009 Hotel Fujita Kyoto

Tatsutoshi Nakahata: Future of regenerative medicine with various stem cell. Morning Symposium 3-2 Regenerative Medicine, The 9th World Congress on Inflammation July 6-10, 2009 Keio

Plaza Hotel, Tokyo

Tatsutoshi Nakahata: Future of regenerative medicine with various stem cell. Plenary Lecture, The 3rd International Symposium of Lysosomal Storage Diseases. Sep. 26-27, 2009 Nagoya Noh Theater, Nagoya

-国内学会- (一般演題)

伊藤仁也、田中宏和、戸上勝仁、橋本尚子、森美奈子、永井雄也、井上大地、木村隆治、丸山京子、初山麻子、鹿村真之、高田のぞみ、高橋隆幸、中畑龍俊: Ex Vivo 増幅臍帯血移植を行った旧姓骨髄性白血病の1例. 第31回日本造血細胞移植学会 2月5-6日(6日)北海道厚生年金会館 北海道札幌市

森嶋達也、松原央、野村安隆、才田聡、新里亜紀、渡邊健一郎、足立壮一、森尾友宏、中畑龍俊: 臍帯血移植後に一時的に donor 由来の芽球の出現をみた乳児白血病の再発例. 第31回日本造血細胞移植学会 2月5-6日(6日)北海道厚生年金会館 北海道札幌市

才田聡、野村安隆、栗屋智就、森嶋達也、新里亜紀、梅田雄嗣、松原央、渡邊健一郎、足立壮一、中畑龍俊: 副腎白質ジストロフィー進行例に骨髄非破壊的処置を用いて臍帯血移植を施行した2例. 第31回日本造血細胞移植学会 2月5-6日(6日)北海道厚生年金会館 北海道札幌市

酒井秀政、水野隆久、西小森隆太、斎藤潤、八角高裕、平家俊男、小原収、荒川浩一、中畑龍俊: 新規 MVK 変異による高 IgD 症候群が疑われる1家系～周期熱の鑑別における IgD の役割. 第112回日本小児科学会学術集会 4月17日 奈良文化会館 奈良県奈良市

浅井浩一、井澤和司、納富誠司郎、大野光洋、北村律子、矢野潤、加藤文英、菊池清、足立壮一、中畑龍俊: 骨髄移植後に合併した特発性器質性肺炎(BOP)にRSV感染の関与が推定されたDown症の1例. 第112回日本小児科学会学術集会 4月17日 奈良文化会館 奈良県奈良市

酒井秀政、伊藤周作、西小森隆太、岡藤郁夫、河合朋樹、斎藤潤、八角高裕、平家俊男、中畑龍俊: NOD2 遺伝子に6塩基欠失の変異を認めた若年性サルコイドーシスの一例. 第112回日本小児科学会学術集会 4月17日 奈良文化会館 奈良県奈良市

栗屋美絵、馬場志郎、鶏内伸二、加藤竹雄、柴田実、後藤雄一、西野隆宏一三、依藤亨、土井拓、中畑龍俊: 低身長精査で偶然発見されたダノン病の一男児例. 第112回日本小児科学会学術集会 4月17日 奈良文化会館 奈良県奈良市

酒井秀政、西小森隆太、田中孝之、河合朋樹、斎藤潤、八角高裕、平家俊男、中畑龍俊: 新規 MVK 変異による高 IgD 症候群が疑われる1家系～周期熱の鑑別における IgD の役割. 第53回日本リウマチ学会総会・学術集会 4月23-26日 グランドプリンスホテル新高輪 東京都

才田聡、藤野寿典、甲原貴子、渡邊健一郎、田中篤志、松原央、足立壮一、中畑龍俊: 胆道原発横紋筋肉腫の1例. 第441回日本小児科学会京都地方会学術集会 5月16日 京都府立医科大学合同講義棟(図書館ホール) 京都市

河井昌彦、松倉崇、丹羽房子、中畑龍俊: 早期新生児期のDICパラメーターの出生体重・日齢に伴う変化についての検討. 第19回日本産婦人科・新生児血液学会 6月12-13日(12日) 北海道大学学術交流会館 札幌市

松倉崇、河井昌彦、丹羽房子、中畑龍俊: 新生児管理における簡易 PT 測定装置 (CoaguChek XS) の有用性に関する検討. 第19回日本産婦人科・新生児血液学会 6月12-13日(12日) 北海道大学学術交流会館 札幌市

河井昌彦、磯目賢一、松倉崇、丹羽房子、中畑龍俊: SGA 児とメタボリックシンドロームのリスクについての検討. 第45回日本周産期・新生児医学会総会および学術集会 2009年7月12-14日(14日) 名古屋国際会議場 名古屋市

松倉崇、河井昌彦、磯目賢一、丹羽房子、中畑龍俊: 新生児における簡易 PT 測定装置の有用性と重症出血傾向スクリーニングに関する検討. 第45回日本周産期・新生児医学会総会および学術集会 2009年7月12-14日(14日) 名古屋国際会議場 名古屋市

横尾憲孝、土井拓、美馬隆宏、鶏内伸二、馬場志郎、土井孝浩、中畑龍俊: 左室縮小手術後6年で再増悪した心不全に対し、除細動器付両心室ペースメーカー(CRT-D)植え込みを施行し症状の改善を得た、小児期発症二次性拡張型心筋症の1例. 第45回日本小児循環器学会総会・学術集会 2009年7月15-17日 神戸国際会議場 神戸市

鶏内伸二、土井拓、横尾憲孝、美馬隆宏、馬場志郎、岡本晋弥、上本伸二、中畑龍俊: 生体部分肝移植後、epoprostenol 持続静注から離脱し得た門脈肺高血圧(PPHTN)の2例. 第45回日本小児循環器学会総会・学術集会 2009年7月15-17日 神戸国際会議場 神戸市

加藤元博、真田昌、加藤格、佐藤康晴、竹内賢吾、丹羽明、野本順子、中釜斉、石川雄一、中畑龍俊、吉野正、小林幸夫、小川誠司: B

細胞性悪性リンパ腫に対する網羅的ゲノム解析によるがん抑制遺伝子 A20 の同定. 第 68 回日本癌学会学術総会 10 月 1-3 日 パシフィコ横浜 横浜市

Motohiro Kato, Masashi Sanada, Itaru Kato, Yasuharu Sato, Junko Takita, Kengo Takeuchi, Akira Niwa, Yuyan Chen, Kumi Nakazaki, Junko Nomoto, Yoshitaka Asakura, Yasuhide Hayashi, Hiraku Mori, Takashi Igarashi, Mineo Kurokawa, Shigeru Chiba, Shigeo Mori, Yuichi Ishikawa, Koji Okamoto, Kensei Tobinai, Hitoshi Nakagama, Tatsutoshi Nakahata, Tadashi Yoshino, Yukio Kobayashi, Seishi Ogawa. : Frequent inactivation of A20 through gene mutation in B-cell lymphomas. 第 71 回日本血液学会学術集会 10 月 23-25 日 国立京都国際会館 京都市

加藤格、丹羽明、平家俊男、藤野寿典、才田聡、足立壮一、中畑龍俊：白血病細胞と髄外微小環境の解析. 第 71 回日本血液学会学術集会 10 月 23-25 日 国立京都国際会館 京都市

丹羽明、深津智樹、梅田雄嗣、張璽、森嶋達也、才田聡、齊藤潤、沖田圭介、酒井宏水、山中伸弥、平家俊男、中畑龍俊：iPS 細胞由来赤芽球系分化の経時的解析と成熟血球の機能評価. 第 71 回日本血液学会学術集会 10 月 23-25 日 国立京都国際会館 京都市

才田聡、田中篤志、森嶋達也、藤野寿典、松原央、渡邊健一郎、足立壮一、中畑龍俊：高リスク急性リンパ性白血球 (ALL) に対する臍帯血移植の経験. 第 71 回日本血液学会学術

集会 10 月 23-25 日 国立京都国際会館 京都市

河田紗耶架、甲原貴子、阿部純也、才田聡、藤野寿典、渡邊健一郎、松原央、足立壮一、中畑龍俊、岡本晋弥、山内智香子、秋山祐一：胆道原発横紋筋肉腫の 1 例. 第 25 回日本小児がん学会 11 月 27-29 日 東京ベイホテル東急

久保田優、永井亜矢子、小嶋千明、足立壮一、中畑龍俊、谷澤昭彦、宇佐美郁哉、濱畑啓吾、松原康策、若園吉裕：外来経過観察中の小児癌経験者の疲労度のアンケートによる調査 - 肥満度や生活習慣との関連. 第 51 回日本小児血液学会・第 25 回日本小児がん学会 11 月 27-29 日 東京ベイホテル東急

才田聡、渡邊健一郎、野村安隆、八木英哉、納富誠司郎、森嶋達也、藤野寿典、松原央、足立壮一、中畑龍俊、荒川芳輝、岸陽：Anaplastic ependymoma の 1 歳女児例. 第 31 回近畿小児がん研究会 3 月 14 日 大阪市 大阪市総合医療センター

才田聡、田中篤志、藤野寿典、松原央、渡邊健一郎、足立壮一、中畑龍俊：低毒性骨髄破壊的処置を用いて臍帯血移植を施行した進行期副腎白質ジストロフィーの 2 例. 第 17 回近畿臍帯血幹細胞移植研究会 5 月 9 日 大阪市 ホテルグランピア大阪

H：知的財産権の出願・登録状況

特になし

Ⅲ. 平成 21 年度 分担研究報告書

分担研究報告書

1. *ex vivo* 増幅臍帯血移植の臨床研究

品質管理・無菌試験

分担研究者：伊藤 仁也

研究協力者：丸山 京子

（先端医療センター細胞管理室）

研究要旨

これまでの研究から専門性の高い細胞治療製剤の品質管理規格試験は外注委託で行ってきた。アカデミアが行う細胞治療においては、非常に有用な方法ではあるが、迅速性、出荷責任などの問題がある。今回、品質管理試験（無菌試験、エンドトキシン試験、マイコプラズマ試験、ウイルス試験）を、細胞製剤の製造チームで行い、より簡便で信頼のおける検査系を構築する目的で本研究を立案した。本年度は無菌試験、エンドトキシン試験、マイコプラズマ否定試験について検討を行ったので報告する。

A：研究目的

これまでの臨床研究は細胞の品質を保証するための品質管理試験に関しては、検査会社に委託、外注を行ってきた。しかし、高額であること、出荷判定時間が長く迅速に患者に投与できないなどの欠点があることから、本年度からは、院内検査法を確立し、実製造試験において、院内品質管理試験を実施できるか検討を行った。

B：研究計画・方法

検討項目としては、細胞治療製剤の中間試験および出荷判定試験として必須である試験項目の決定および、従来法との比較を行った。細胞の品質管理において必要な検査を以下のように定めた。

行程	試験名
受け入れ試験	細胞形態（ギムザ） 生細胞数 無菌試験
中間試験 （行程検査）	ウイルス試験 無菌検査
出荷試験	エンドトキシン試験 マイコプラズマ試験 生細胞試験

これら細胞の安全性を定める試験の他、効果の予測に用いるため、細胞の表面抗原、コロニーアッセイを行うことに決定した。

このうち無菌試験、マイコプラズマ試験、エンドトキシン試験について院内検

査への技術移転を行い、バリデーションを実施した。

1) 無菌試験

従来、外注委託で行っていた無菌試験は、局方無菌試験法に準じ、チオグリコレートブイヨン (THIO) 培地及びトリプケースブイヨン (TSB) 培地に接種し、14 日間培養観察を行う方法であったが、サンプル接種に熟練を要すること、菌が生え、無菌試験陽性時は目視による培地の濁りを観察する方法のため、判定が困難で客観性に欠けるところが欠点であった。

BacT/ALERT (BIOMERIEUX 社) による菌検出法は培地に検体を接種後、全自動微生物培養検出装置 BacT/ALERT 3D による 1 週間の培養期間中、培地の色調変化が 10 分ごとに測定され、リアルタイムに陽性ボトルを検出することが可能である。また、陽性と判定された検体においては、全自動細菌同定検査装置 VITEC2-compact (BIOMERIEUX 社) にて同日中 (8 時間程度) の菌種同定が可能であり、その測定可能菌種は 301 菌種 (グラム陰性菌 131 菌種、グラム陽性菌 116 菌種、酵母様真菌 54 菌種) である。

これらのシステムは FDA、GMP、ISO に準拠しており、本臨床研究の無菌試験に組み込むことで、迅速性、信頼性、試験の省力化を可能にするものと考えられ、同法にて試験を実施した。

2) マイコプラズマ試験

マイコプラズマ試験は局方では、培養法で増幅させたマイコプラズマを DNA 染色法により証明する方法が推奨されているが、この方法では、やはり迅速性に欠け、出荷判定には直接用いることはできない最大の欠点がある。