

我々はこれに対し、ヒトに感染しうるマイコプラズマの共通 DNA 配列をプライマーとした検出系を開発し、Light cyclar による迅速 PCR および定量系を構築した。

### 3) エンドトキシン試験

生化学工業製エンドトキシン試薬であるエンドスペーを用いたカイネティック比色法から和光社製のリムルス ES-II WAKO 試薬とトキシノメーターを用いたカイネティック比濁法への変更を行った。今回これに伴うデータの比較を行った。これは開放系の操作が少なく簡便で全自動で検量線の作成が行われるといた利点がある。

当センター検査室実施の無菌試験法にて、製造練習 IBRI-12 および IBRI-13(09/09/28~09/10/07 実施)の検体を用いて試験を実施した。培養期間9日間のサンプリング時に合わせ、出荷検体には各々、凍結臍帯血解凍後全血(CB)、分離後 CD34 陽性画分(EX0)、CD34 陰性画分(NCB)、培養7日目(EX7)、培養9日目(EX9)、最終製品(FP)の細胞浮遊液を用いた。

ペプトン添加 TSB(BHI および活性炭含有)培地-FA 培養ボトル(好気用)30mL (BIOMERIEUX 社、Cat.No 259791)、および FN 培養ボトル(嫌気用)40mL (BIOMERIEUX 社、Cat.No 259793)に検体 100  $\mu$  L (n=2)を直接接種し、全自動微生物培養検出装置 BacT/ALERT 3D の培養庫内(37 $^{\circ}$ C)にて1週間培養を行った(図.1)。



図.1 専用培地(左)、BacT/ALERT 3D(右)

陽性と判定された場合は、寒天培地による増菌培養を24時間行った後、全自動細菌同定検査装置 VITEC2-compact (BIOMERIEUX 社)による菌種同定試験を行う。

### C : 研究結果ならびに今後の方針

BacT/ALERT 3D による培養を行った結果、いずれの検体からも菌の発育は認められなかった(表.1)。

	IBRI-12	IBRI-13
CB	菌の発育を認めず	菌の発育を認めず
EX0	//	//
NCB	//	//
EX7	//	//
EX9	//	//
FP	//	//

表.1 BacT/ALERT 3D による菌検出結果

以上の結果により、以降の菌種同定試験実施には至らなかった。

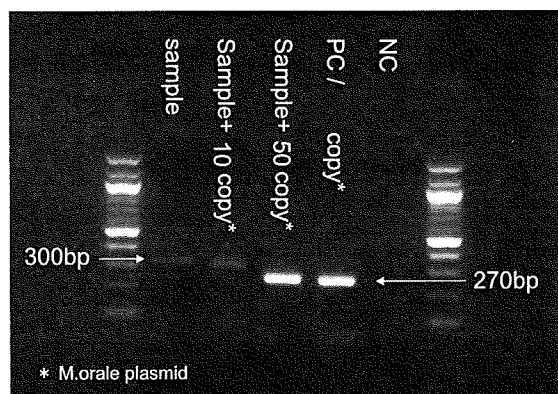
このシステムの採用により、従来は、菌検出試験で2週間を要し、その後、菌同定試験を開始していた一連の行程を10日以内に終わることが可能となる。

今後の課題、方針としては、試験実施

にあたり、検査部との連携体制の整備に加え、本研究での出荷形態に対応した系の確立のため、検体の使用浮遊液による菌の発育阻害活性などの有無を調べるべく、標準菌株接種による添加回収試験を行い、反応干渉作用についての検討を行う必要がある。

## 2) マイコプラズマ試験

培養した細胞およびその上清から DNA を抽出し、PCR を行った。Positive control は *Mycoplasma orale* 遺伝子より組み換え Plasmid を作成し用いた。PCR 産物は 3% agarose ゲル電気泳動法を用いて確認した。



## 4) エンドトキシン試験

比濁法での添加回収試験の結果、無血清培地、0.5%アルブミン含有生理食塩水とも、5倍希釈することにより、局方に定める添加回収率 50~200%の範囲内となり、エンドトキシン反応干渉作用を認めず試験の成立が確認された。今後、無血清培地、0.5%アルブミン含有生理食塩水とも 5倍および 10倍希釈での測定とした。

## D : まとめ

今回、本臨床研究の実施体制の変更に伴い、外注委託で行ってきた無菌試験を

今後、当センター検査部で実施するべく製造練習での検体を用いて検討を行った。

9日間の培養期間中、凍結臍帯血解凍後全血(CB)、分離後 CD34 陽性細画分(EX0)、CD34 陰性画分(NCB)、培養7日目(EX7)、培養9日目(EX9)、最終製品(FP)細胞浮遊液の6ポイントでの出荷を想定し試験を行った。結果、2回の実施での菌検出はなく、定性試験までの実施となった。

このシステムの採用により、全自動微生物培養検出装置 Bact/ALERT 3D (BIOMERIEUX 社)での、リアルタイムな菌の陽性判定と、全自動細菌同定検査装置 VITEC2-compact (BIOMERIEUX 社)による同日中の菌種同定(全 301 菌種)が可能となる。菌検出後の増菌培養も含め、10日以内での出荷判定が可能となり、迅速性の向上、さらには自動測定であるため試験の省力化といった利点があげられる。

これらのシステムは FDA、GMP、ISO に準拠しており、今後、標準菌株接種による菌発育阻害試験などバリデーション試験を行い、信頼性の向上をはかることが必要と考えられる。

## E : 健康危険情報

特になし

## F : 研究発表

1. Tabata S, Shimoji S, Murase K, Takiuchi Y, Inoue D, Kimura T, Nagai Y, Mori M, Togami K, Kurata M, Ito K, Hashimoto H, Matsushita A, Nagai K, Takahashi T. :Successful allogeneic

- bone marrow transplantation for myelodysplastic syndrome complicated by severe pulmonary alveolar proteinosis. *Int J Hematol* 90;407-412. 2009
2. Inoue D, Nagai Y, Kimura T, Shimoji S, Mori M, Togami K, Tabata S, Kurata M, Matsushita A, Ito K, Hashimoto H, Maruoka H, Yamashita E, Nagai K, Imai Y, Shirane H, Takahashi T. Refractory de novo myeloid sarcoma.: A case report and therapeutic strategy based on bone marrow minimal residual disease. *Int J Hematol* 90(1);120-3. 2009 Jul
  3. Mori M, Togami K, Fujita H, Inoue D, Kimura T, Shimoji S, Nagai Y, Tabata S, Kurata M, Ito K, Hashimoto H, Matsushita A, Nagai K, Kaji S, Takahashi T. Successful allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelomonocytic leukemia complicated by refractory aortitis. *Bone Marrow Transplant*. 2009 Aug 31. Epub ahead of print
  4. 鹿村真之, 伊藤仁也, 大隈一興, 関根暉彬. リンパ球活性化培養中の細胞表面抗原の経時的変化 *Biotherapy* 23, 257-262, 2009
  5. 伊藤仁也, 中畑龍俊 体外増幅造血細胞移植 *医学のあゆみ* Vol.229 No.9 786-792,5,2009
  6. 田中宏和, 伊藤仁也, 丸山京子, 中畑龍俊、Ex vivo 増幅造血幹/前駆細胞の臍帯血移植の応用、再生医療 11月号、6(4)、61-66、2007
  7. 伊藤仁也、Ex vivo 増幅臍帯血移植の進展、感染・炎症・免疫、37(3)、254-257、2007
  8. 田中宏和, 伊藤仁也、わが国の移植医療における臓器・組織・細胞供給、医学のあゆみ、222(2)、109-112、2007
  9. 田中宏和, 伊藤仁也、造血幹細胞の体外増幅、血液・腫瘍科、55 suppl.5、40-47、2007

G : 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

分担研究報告書

2. 新規培養法の効率と再現性の検証

分担研究者：伊藤 仁也

研究協力者：初山 麻子

（先端医療センター細胞管理室）

研究要旨

治療用細胞製剤の製造には、安全性が担保された原材料が不可欠である。故に本分担研究では、*ex vivo* 増幅臍帯血の製造法に関する研究の一環として、基盤整備を行ってきた。そこから開発された新規無血清培地ならびに新規培養バッグ（Nipro 社製）を用いて製造を行ったところ、有核細胞で 1000 倍、CD34 陽性細胞で 100 倍の増幅が得られるまでに至った。

しかし、増幅効率の向上に伴う過密培養が製品の Viability を低下させたため、新規資材を用いた至適培養条件の検討を行い、新たな培養法を確立した。従来法は培養 4, 7, 10 日目に培地を 2 倍量追加するのに対し、新規培養法は培養 4 日目に 2 倍量、7 日目に 4 倍量の培地を追加、Final を培養 9 日目に変更した。このように培地添加方法を変更し培養期間を短くすることにより、培養細胞の過密状態を回避し、Viability を維持することに成功した。また、短期間で従来と同等の増幅が得られるようになった。

その後、新規資材にいくつかのマイナーチェンジがあり、今年度は、新規培養法の再現性の確認と資材の評価を行った。

新 Nipro バッグは、従来品と同じ素材のポリオレフィン系樹脂であるが、フッ化処理はなく、透明性の増したものである。また、無血清培地ではリコンビナントアルブミン添加量を 4 分の 1 に減量する変更があった。いずれも本研究班の実験系で評価されている。これらの新規資材の組み合わせと従来法との比較による培養を行った。

結果、バッグのフッ化処理の有無に関係なくほぼ同等の増幅が、有核及び CD34 陽性細胞で得られた。また、表面抗原には特に異常な傾向は認められず、*ex vivo* 増幅臍帯血の製造に使用して支障はないと証明された。

本年度行う予定であった書類作成や安全性試験が遅れており、次年度は新たな資材及び培養法による *ex vivo* 増幅臍帯血の製造に必要な書類整備と研究を推進することが急務である。

## A：研究目的

治療用細胞製剤の製造には、安全性が担保された原材料が不可欠である。これまで、本邦では海外で認可された製品を用いて製造を行ってきた。並行して、本分担研究では *ex vivo* 増幅臍帯血の製造に関わる基盤整備として、ポリカブリン系フッ化処理培養バッグ（NIPRO 社製）と Serum Free 培地の開発を行ってきた。前年度には、この新規資材を用いて増幅臍帯血の製造を行い、培養法の変更を検討した。結果、新規培養法では、希釈率を上げることによって過密培養による Viability の低下が改善され、増幅も十分に得られた。

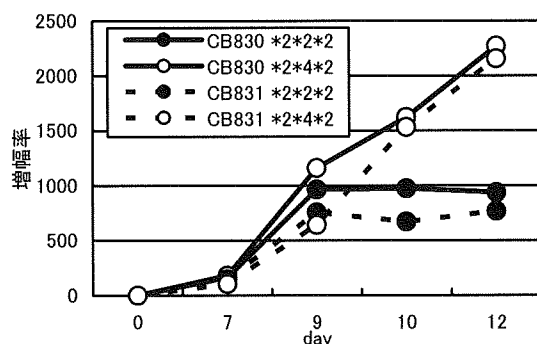


図1：有核細胞の増幅率

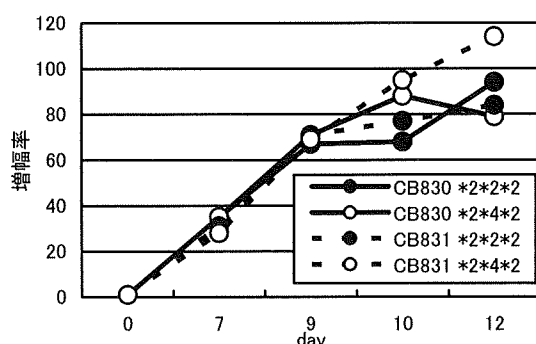


図2：CD34 陽性細胞の増幅率

新規資材による新規培養法では、従来と同等の増幅をより短期間で得られるようになったので培養期間を9日間に短縮した。

今年度は、その新規資材でマイナーチェンジがあり、①培養バッグのフッ化処理がなくなる、②培地組成のリコンビナントアルブミン添加

量の減量、など変更が相次いだので、新規培養法の再現性の確認と、新規資材の組み合わせの評価が必要になった。

## B：研究計画・方法

材料には分離保存された臍帯血由来 CD34 陽性細胞（POIETICS/CatNo:2C-101A）を用いた。培養は5種のサイトカイン SCF, TPO, FL, IL-6, sIL-6 を用い、培養4日に2倍、7日に4倍量の培地を添加して、9日間の培養を行う新規培養法で以下のバッグと培地の組み合わせを検討した。

	培養 Bag	培地
従来法	AFC	QBSF
検討①	AFC	Serum Free
検討②	Nipro New (フッ化処理無)	Serum Free
検討③	Nipro Old (フッ化処理有)	Serum Free

表1：検討項目

評価は、有核細胞、CD34 陽性細胞の増幅、Colony Assay, 表面抗原解析で行った。

## C：研究結果ならびに今後の方針

新規資材の性能並びに培養法の再現性を比較検討した。

結果、有核細胞の増幅では、新ニプロバッグが最も増幅に優れていた。また、無血清培地 (S.F) は QBSF 培地に比べ、約2倍の増幅に優れていた。培養9日目においても Viability は90%以上を保っていた。

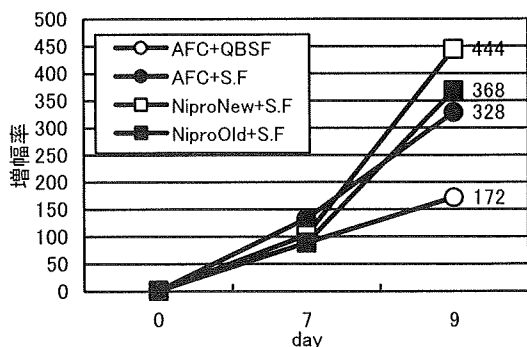


図3：有核細胞の増幅率

CD34 陽性細胞の増幅は AFC バッグが最も増幅に優れていたが、S.F で培養した系と大きな差は認められなかった。

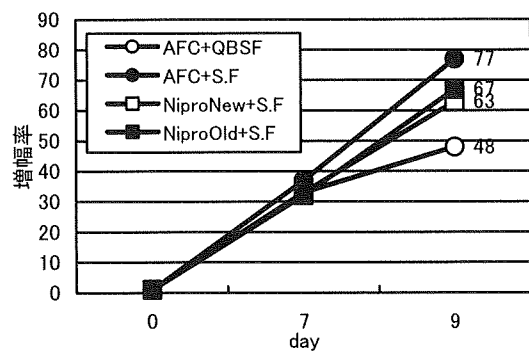


図4：CD34 陽性細胞の増幅率

コロニー形成細胞の増幅は新ニプロバッグが最も優れていた。CD34 陽性細胞と同様に S.F で培養した系には大きな差は認められず、従来法の組み合わせのみ増幅率が低い結果になった。

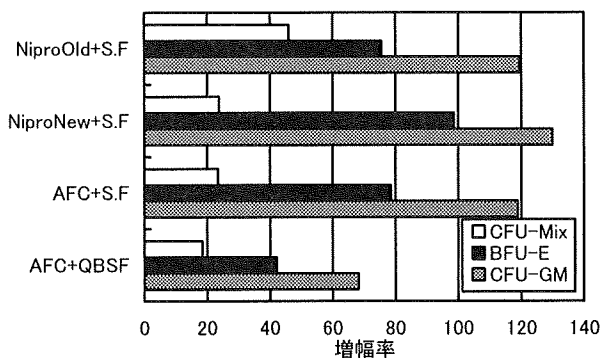


図5：コロニー形成細胞の増幅率

培養細胞の表面抗原解析の結果、単球 (CD14)、赤芽球 (GPA)、顆粒球 (CD33) の発現が認めら

れた。QBSF 培地では顆粒球が突出しているのに対し、S.F は赤芽球と顆粒球の発現が、相関関係にあることが分かった。

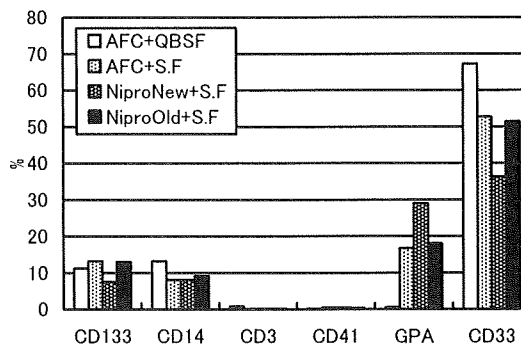


図6：培養細胞の表面抗原解析

以上の結果から、新規資材でも再現性を持って増幅を得られることが分かった。

#### D：まとめ

本研究結果では、バッグのフッ化処理の有無に関係なくほぼ同等の増幅が得られた。また、新規資材を用いた新規培養法においても再現性を持って増幅が得られた。表面抗原にも特に異常な傾向は認められなかった。

以上の結果から新規資材のマイナーチェンジによる培養への影響は認められず、新たなバッグと培地の組み合わせによる *ex vivo* 増幅臍帯血の製造に問題ないと考える。

前年度の課題である、安全性試験やプロトコル、書類整備が遅れている。本研究により、培養法は確定したのでこれらの作業を遂行することが必要である。

#### E：健康危険情報

特筆すべき事項なし

#### F：研究発表

論文発表

1. Tabata S, Shimoji S, Murase K,

- Takiuchi Y, Inoue D, Kimura T, Nagai Y, Mori M, Togami K, Kurata M, Ito K, Hashimoto H, Matsushita A, Nagai K, Takahashi T. :Successful allogeneic bone marrow transplantation for myelodysplastic syndrome complicated by severe pulmonary alveolar proteinosis. *Int J Hematol* 90;407-412. 2009
2. Inoue D, Nagai Y, Kimura T, Shimoji S, Mori M, Togami K, Tabata S, Kurata M, Matsushita A, Ito K, Hashimoto H, Maruoka H, Yamashita E, Nagai K, Imai Y, Shirane H, Takahashi T. Refractory de novo myeloid sarcoma.: A case report and therapeutic strategy based on bone marrow minimal residual disease. *Int J Hematol* 90(1);120-3. 2009 Jul
  3. Mori M, Togami K, Fujita H, Inoue D, Kimura T, Shimoji S, Nagai Y, Tabata S, Kurata M, Ito K, Hashimoto H, Matsushita A, Nagai K, Kaji S, Takahashi T. Successful allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelomonocytic leukemia complicated by refractory aortitis. *Bone Marrow Transplant*. 2009 Aug 31. Epub ahead of print
  4. 鹿村真之, 伊藤仁也, 大隈一興, 関根暉彬. リンパ球活性化培養中の細胞表面抗原の経時的変化 *Biotherapy* 23, 257-262, 2009
  5. 伊藤仁也, 中畑龍俊 体外増幅造血細胞移植 *医学のあゆみ* Vol.229 No.9 786-792,5,2009
  6. 田中宏和, 伊藤仁也, 丸山京子, 中畑龍俊, Ex vivo 増幅造血幹/前駆細胞の臍帯血移植の応用、再生医療 11月号、6(4)、61-66、2007
  7. 伊藤仁也、Ex vivo 増幅臍帯血移植の進展、感染・炎症・免疫、37(3)、254-257、2007
  8. 田中宏和, 伊藤仁也、わが国の移植医療における臓器・組織・細胞供給、医学のあゆみ、222(2)、109-112、2007
  9. 田中宏和, 伊藤仁也、造血幹細胞の体外増幅、血液・腫瘍科、55 suppl.5、40-47、2007
- G : 知的財産権の出願・登録状況  
特開 2005-204539  
「造血幹細胞および造血前駆細胞の培養方法」

分担研究報告書

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

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

細胞治療や再生医療に使用されるヒト由来の細胞や組織の調整には、医薬品と同様に安全性の確保と高いレベルでの品質管理が求められている。しかし、細胞や組織の調整を実施する際には、その特性を考慮し化学物質などを原料として製造される一般的な医薬品とは異なる基準が必要となる。治験においては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が、大学や研究所レベルで行われることの多い細胞治療や再生治療に関する開発研究においては、一般の治験とは異なるレベルでの対応が必要である。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 (Good Manufacturing Practice)、いわゆる phase 1 GMP を考慮することも必要となってくる。

わが国では、上記に相当するものとして治験薬 GMP があるが、必ずしも細胞や組織の特性に配慮しているわけではない。最近、従来の治験薬 GMP が改訂され、「治験薬の製造管理、品質管理等に関する基準（治験薬 GMP）について」とする通知がなされた（薬食発第 0709002 号、平成 20 年 7 月 9 日）（改訂治験薬 GMP）。今回は、この改訂治験薬 GMP に基づき、細胞や組織の適性をふまえ、大学や研究所における開発初期段階におけるトランスレーショナルリサーチに必要な規制はどのようにあるべきかを検討し、そのガイドラインの草案を作成するための必要事項をまとめた。



## A：研究目的

細胞治療や再生医療に使用されるヒト由来の細胞や組織の調整には、医薬品と同様に安全性の確保と高いレベルでの品質管理が求められている。細胞や組織の調整を実施する際には、その特性を考慮し化学物質などを原料として製造される一般的な医薬品とは異なる基準が必要となる。「細胞治療・再生医療のためのヒト細胞・組織調整施設が有すべき構造設備に関するガイドライン」と共に、本ガイドライン「細胞治療・再生治療を目的としたヒト細胞・組織調製施設の運営に関するガイドライン（案）」を遵守して実施することが求められる。本研究は、一般の治験とは異なり、大学や研究所などのアカデミアで行うトランスレーショナルリサーチに焦点を絞った本ガイドラインの概要の作成を目的とするものである。

## B：研究計画・方法と結果

分担研究者が、今までに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：研究結果ならびに今後の方針

### 1. 品質評価の概略

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ィ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。

### 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

レーション（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。

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<sup>7)</sup>。

### 3. 細胞調製を行う施設の基準

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：まとめ

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。現在、「ヒト幹細胞を用いた臨床研究に関する指針」が改訂中であり、また再生医療における制度的枠組み検討会において、「医療機関における再生・細胞医療の実施について（案）」が策定中である。これらのガイドラインをもとに先端的な再生・細胞治療が開発されてゆくと期待した

い。

E : 健康危険情報

特記事項なし

F : 研究発表

1) 論文発表

1. Yuasa, T., Sato, K., Ashihara, E., Takeuchi, M., Tsuchiya, N., Habuchi, T., Maekawa, T., Kimura, S. : Intravesical administration of gd T cells successfully prevents the growth of bladder cancer in the murine model. *Cancer Immunol Immunotherapy*, 58(4):493-502, 2009.
2. Koto, K., Horie, N., Kimura, S., Murata, H., Sakabe, T., Matsui, T., Koto, K., Watanabe, M., Adachi, S., Maekawa, T., Fushiki, S., Kubo, T. : Clinical relevant dose of zoledronic acid inhibits spontaneous lung metastasis in a murine osteosarcoma model. *Cancer Lett*, 274(2):271-278, 2009.
3. Ashihara, E., Kawata, E., Nakagawa, Y., Shimazaki, C., Kuroda, J., Tanaka, R., Yokota, A., Murotani, Y., Takeuchi, M., Kamitsuji, Y., Inaba, T., Taniwaki, M., Kimura, S., Maekawa, T. :  $\beta$ -catenin siRNA successfully suppressed progression of multiple myeloma in a mouse model. *Clin Cancer Res*, 15(8):2731-2738, 2009.
4. Matsumoto, S., Tanaka, F., Sato, K., Kimura, S., Maekawa, T., Hasegawa, S., Wada, H. : Monitoring with a non-invasive bioluminescent in vivo imaging system of pleural metastasis of lung carcinoma. *Lung Cancer*, 66(1):75-9, 2009.
5. Tsubakimoto, Y., Yamada, H., Yokoi, H., Takata, H., Kawahito, H., Matsui, A., Urano, N., Nozawa, Y., Hirai, H., Imanishi, J., Ashihara, E., Maekawa, T., Takahashi, T., Okigaki, M., Matsubara, H. : Angiotensin AT1 receptor on bone marrow stem cells that regulates monocyte/macrophage lineage differentiation from hematopoietic stem cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29(10):1529-1536, 2009.
6. Kaido, T., Egawa, H., Tsuji, H., Ashihara, E., Maekawa, T., Uemoto, S. : In-hospital mortality in adult recipients of living donor liver transplantation: experience of 576 consecutive cases at a single center. *Liver Transpl* 15(11):1420-1425, 2009.
7. Ito, K., Aoyama, T., Fukiage, K., Otsuka, S., Furu, M., Jin, Y., Nasu, A., Ueda, M., Kasai, Y., Ashihara, E., Kimura, S., Maekawa, T., Kobayashi, A., Yoshida, S., Otsuka, T., Nakamura, T., Toguchida, J. : Isolation of mesenchymal stem cells from bone marrow in the closed system using a new device made by non-woven fabrics. *Tissue Engineering* (in press, 2009)
8. Takeuchi, M., Kimura, S., Ashihara, E., Maekawa, T. : Dual BCR-ABL/LYN tyrosine kinase inhibitor, INNO-406. *Drug of the Future* (in press, 2009).
9. Taniguchi, K., Shimazaki, C., Ochiai, N., Maruya, E., Akatsuka, Y., Ashihara, E., Maekawa, T., Taniwaki, M., Saji, H. : Modified elispot assay may predict T-cell hyporesponsiveness to

- non-inherited maternal antigens in healthy individuals. *Int J Lab Hematol* (in press, 2009)
10. Ito, K., Aoyama, T., Fukiage, K., Otsuka, S., Furu, M., Jin, Y., Nasu, A., Ueda, M., Kasai, Y., Ashihara, E., Kimura, S., Maekawa, T., Kobayashi, A., Yoshida, S., Niwa, H., Otsuka, T., Nakamura, T., Toguchida, J.: A novel method to isolate mesenchymal stem cells from bone marrow in a closed system using a device made by non-woven fabric. *Tissue Eng Part C Methods* (in press, 2009).
  11. Okabe, S., Tauchi, T., Kimura, S., Maekawa, T., Ohyashiki, K.: The efficacy of vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, against BCR-ABL positive leukemia cells with ABL kinase domain mutation in single therapy and in combination with dasatinib. *Clin Cancer Res*, (in press, 2009)
  12. Ohsaka, A., Kikuta, A., Ohto, H., Ohara, A., Ishida, A., Osada, K., Kimitamari, A., Iwai, A., Kai, T., Maekawa, T., Hoshi, Y.: Guidelines for safety management of granulocyte transfusion in Japan. *Transfusion* (in press, 2009)
  13. Tada, N., Hinotsu, S., Urushihara, A., Kita, F., Kai, T., Takahashi, S., Kato, S., Takanashi, M., Ito, K., Sawai, H., Maekawa, T., Kosugi, S., Kawakami, K.: The current status of umbilical cord blood collection in Japanese medical centers: survey from the obstetricians *Int J Hematol* (in press, 2009)
  14. Yokota, A., Kimura, S., Tanaka, R., Takeuchi, M., Yao, H., Sakai, K., Nagao, R., Kuroda, J., Kamitsuji, Y., Kawata, E., Ashihara, E., Maekawa, T.: Osteoclasts are involved in the maintenance of dormant leukemic cells. *Leuk Res.* (in press, 2009)
  15. Yokoi H, Yamada H, Tsubakimoto Y, Takata H, Kawahito H, Kishida S, Kato T, Matsui A, Hirai H, Ashihara E, Maekawa T, Iwai M, Horiuchi M, Ikeda K, Takahashi T, Okigaki M, Matsubara H.: Bone marrow AT1 augments neointima formation by promoting mobilization of smooth muscle progenitors via platelet-derived SDF-1a • *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (in press, 2009)
  16. Matsumoto S, Tanaka F, Sato K, Kimura S, Maekawa T, Hasegawa S, Wada H: Monitoring with a non-invasive bioluminescent *in vivo* imaging system of successful treatment of disseminated pleural tumors by intra-pleural docetaxel administration. *Lung Cancer* (in press, 2009).
  17. Sekimoto, M., Imanaka, Y., Shirai, T., Sasaki, H., Komeno, T., Lee, J., Yoshihara, K., Ashihara, E., Maekawa, T.: Risk-adjusted assessment of incidence and quantity of blood use in acute-care hospitals in Japan: an analysis using administrative data. *Vox Sanguinis* (in press, 2009)
  18. Ashihara, E., Kawata, E., Maekawa, T.: Future prospect of RNA interference for cancer therapies. *Curr Drug Targets*. In press, 2009 Dec 8. [Epub ahead of print]
  19. Takeuchi, M., Kimura, S., Kuroda, J., Ashihara, E., Kawatani, M., Osada, H.,

- Umezawa, K., Yasui, E., Imoto, M., Tsuruo, T., Yokota, A., Tanaka, T., Nagao, R., Nakahata, T., Fujiyama, Y., Maekawa, T.: Glyoxalase-I induction during hypoxia adaptation in Bcr-Abl positive leukaemic cells. Cell Death Diff (in press, 2010)
20. 万木紀美子、前川 平: IV. 血液製剤.  
2) 輸血療法の実際. 総合臨床第 58 巻増刊号「今すぐに役立つ 輸液ガイドブック」、永井書店、大阪、58:390-398, 2009.
21. 八尾尚幸、芦原英司、前川 平: 支持療法—輸血・成分輸血、Epo, G-CSF など—. 特集「骨髄性白血病—病因・治療研究の進歩」、日本臨床 67(10):1951-1957, 2009.
22. 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)
23. 八尾尚幸、前川 平: 造血器腫瘍治療における輸血療法の適応は?. 特集「支持療法・輸血」.EBM 血液疾患の治療 2010-2011:493-497, 2009.
- 2) 学会発表ほか (細胞プロセッシング関係)
1. Maekawa, T.: Molecular target and cellular therapeutics developed in the department of transfusion medicine and cell therapy. MD Anderson Cancer Center & Kyoto Univ. Grad. School of Medicine International Symposium 2009 (Kyoto University Alumni Hall, Kyoto, Japan) (22<sup>nd</sup> March, 2009)
2. Ikeguchi R, Kakinoki R, Aoyama T, Goto K, Maekawa T, Nakamura T, Toguchida J: Clinical application of bone marrow stromal cells to avascular necrosis of the femoral head combined with vascularized iliac bone graft. American Society for Reconstructive Microsurgery, Annual scientific meeting (Maui, Hawaii, USA) (Jan. 12, 2009)
3. 伊藤錦哉、青山朋樹、吹上謙一、大塚聖視、金 永輝、那須 輝、上田路子、笠井泰成、木村晋也、前川 平、小林 明、吉田進也、大塚隆信、中村孝志、戸口田淳也. 骨髄間葉系幹細胞分離法デバイスの開発. 第 8 回 日本再生医療学会総会 (東京)平成 21 年 3 月 6 日 (2009)
4. 前川 平: 細胞治療・再生治療とは—研究成果を患者さんに届けるために今何が必要か— (特別講演) 臨床検査展開学細胞育成士養成プロジェクトセミナー「細胞治療の最先端とそれを支える細胞治療センターの役割」 (京都)平成 21 年 10 月 14 日 (2009)
5. 松岡玲子、片上幹子、笠井泰成、芦原英司、前川 平: 細胞治療・再生治療の開発に必要な細胞プロセッシングセンターにおける課題. 第 53 回日本輸血・細胞治療学会近畿支部総会 (京都) 平成 21 年 11 月 28 日 (2009)
6. 片上幹子、松岡玲子、笠井泰成、芦原英司、前川 平: 治療用ヒト細胞の品質管理に必要なエンドトキシン測定時の反応阻害軽減を目的とした前処理方法の検討. 第 53 回日本輸血・細胞治療学会近畿支部総会 (京都) 平成 21 年 11 月 28 日 (2009)

分担研究報告書

4. 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：平家 俊男  
(京都大学医学研究科発達小児科学准教授)

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/ $\gamma_c^{null}$  に移植し、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。出現ヒト血液細胞分画として、従来免疫不全マウスでは認められないヒト T 細胞の出現も確認し、すべての系統への分化を確認した。また従来検討では触れられていない肥満細胞についても、マウス皮膚においてヒト肥満細胞の出現を確認した。一方、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/ $\gamma_c^{null}$  を用いて検討し、ヒト造血細胞の出現を確認することにより、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するとともに、ヒト特異的免疫機構の解析、ヒト特異的感染症防御機構の解析、アレルギー疾患の解析等、幅広い領域での応用展開を試みている。

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、より精微なヒトモデル系の確立に向けて、検討を進めている。

一方、NOD/SCID/ $\gamma_c^{null}$  の新生児マウスに対して、患者さん由来の造血幹細胞を移植することにより、その病態の再構築を試みている。現在、安定して移植が可能となっており、病態の再構築に関して、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/ $\gamma_c^{null}$  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/ $\gamma_c^{null}$  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/ $\gamma_c^{null}$  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。

さらに、ヒト免疫機構をもったモデルマウスにおいては、ヒト特異的な病態解析が可能となる。例えば、ヒト特異的感染症の解析、アレルギー疾患の解析等の研究が可能となり、治療基盤開発等に大きく寄与することが期待できる。

一方、患者さん由来の造血幹細胞を移植することにより、マウスにおいてその病態が再構築できる可能性も秘めている。

## B : 研究計画・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/ $\gamma_c^{null}$  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/ $\gamma_c^{null}$  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/ $\gamma_c^{null}$  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/ $\gamma_c^{null}$  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、このようにして作成したヒト造血組織、免疫組織を有するモデルマウスにおいて、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とともに、ヒト特異的感染症、アレルギー免疫疾患の病態解析、治療基盤開発を行う。

さらに、患者さん由来の造血幹細胞を NOD/SCID/ $\gamma_c^{null}$  マウスに移植することにより、その病態をマウスにおいて再構築できることが期待される。そのためには、新生児マウスへの移植系を確立することが必須であり、繁殖能力の低下を認める NOD/SCID/ $\gamma_c^{null}$  新生児マウスの安定作成、移植を含めたシステムの開発を行う。



#### C : 研究結果ならびに今後の方針

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/ $\gamma_c^{null}$  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。

一方、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し、末梢血中には、ヒト IgM, IgG が確認できるが、既知抗原の投与による特異抗体の産生は確認できていない。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。

また、新生児マウスに対しても、安定してヒト造血幹細胞移植が可能となった。今後、疾患病態の再構築に向けた検討を進めていく。

#### D : まとめ

免疫不全マウス NOD/SCID/ $\gamma_c^{null}$  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を証明した。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。この結果、ヒト造血組織構築、免疫組織構築に機構解析に有用な知見が得られるばかり

でなく、ヒト疾患の解析、治療基盤開発といった臨床展開が大きく期待できる。

また、新生児マウスへに移植のシステムが確立したことで、ヒト疾患病態の再構築を模索する系が確立した。

#### E : 健康危険情報

特記すべき事項なし。

#### F : 研究発表

##### 1) 論文発表

1. Okafuji I, Nishikomori R, Kanazawa N, Kambe N, Fijisawa A, Yamazaki S, Saito M, Yoshioka T, Kawai T, Sakai H, Tanizaki H, Heike T, Miyachi Y, Nakahata T: Role of NOD2 genotype in the clinical phenotype of Blau syndrome and early-onset sarcoidosis. *Arthritis & Rheumatism* 60: 242-250, 2009
2. Chang H, Yoshimoto M, Umeda K, Iwasa T, Mizuno Y, Fukuda S, Yamamoto H, Motohashi N, Suzuki Y, Takeda S, Heike T, Nakahata T: Generation of transplantable, functional satellite-like cells from mouse embryonic stem cells. *FASEB J* 23:1907-1919, 2009.
3. Higashi AY, Ikawa T, Muramatsu M, Economides AN, Niwa A, Okuda T, Murphy AJ, Heike T, Nakahata T, Kawamoto H, Kita T, Yanagida M: Direct hematological toxicity and illegitimate chromosomal recombination caused by the systemic activation of CreER. *J*

- Immunol 182:5633-5640, 2009.
4. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, Patrizon 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(+) cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 30:899-991, 2009.
  5. Yokoo N, Baba S, Kaichi S, Niwa A, Mima T, Doi H, Yamanaka S, Nakahata T, Heike T: The effects of cardiac drugs on cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 387:482-488, 2009.
  6. 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.
  7. 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 Immu* in press 2009.
  8. 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. *Allergology International* in press 2009.
  9. Nie C, Sato K, Misawa N, Kitayama H, Fujino H, Hiramatsu H, Heike T, Nakahata T, Tanaka Y, Ito M, Koyanagi Y: Selective infection of CD(4)+ effector memory T lymphocytes leads to preferential depletion of memory T lymphocytes in R5 HIV-infected humanized NOD/SCID/IL-2Rgamma(null) mice. *Virology* in press 2009.
  10. Yoshimoto M, Heike T, Chang H, Kanatsu-Shinohara M, Baba S, Varnau JT, Shinohara T, Yoder MC, Nakahata T: Bone marrow engraftment but limited expansion of hematopoietic cells from multipotent germline stem cells derived from neonatal mouse testis. *Exp Hematol* in press 2009.
  11. 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-base deletion in the NOD2 gene. *Rheumatology* in press 2009.
  12. Kato I, Umeda K, Awaya T, Yui Y, Niwa A, Fujino H, Matsubara H, Watanabe KI, Heike T, Adachi N, Endo F, Mizukami T, Nunoi H,

Nakahata T, Adachi S: Successful treatment of refractory donor lymphocyte infusion-induced immune-mediated pancytopenia with rituximab. *Pediatr Blood Cancer* in press 2009.

## 2) 学会発表

1. 酒井秀政、西小森隆太、斎藤潤、河合朋樹、田中尚子、田中孝之、村田祐樹、井澤和司、平家俊男、中畑龍俊：高 IgD 症候群の 1 家系。厚生労働省難病治性疾患克服研究事業 原発性免疫不全症候群に関する調査研究班 平成 20 年度班会議総会 2009. 1
2. 酒井秀政、西小森隆太、河合朋樹、斎藤潤、八角高裕、平家俊男、中畑龍俊、水野隆久、荒川浩一、小原収：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 2 回日本免疫不全症研究会 2009. 1
3. 酒井秀政、岡藤郁夫、西小森隆太、田中尚子、村田祐樹、河合朋樹、斎藤潤、八角高裕、平家俊男、中畑龍俊：本邦における若年性サルコイドーシス 23 症例～早期診断・治療を目指して。第 8 回小児免疫・アレルギー研究会 2009. 2
4. 甲原貴子、河北理恵、八角高政、西小森隆太、平家俊男、中畑龍俊：乳児喘息と鑑別を要した慢性好酸球性肺炎の一例。第 12 回京都小児喘息・アレルギー研究会 2009. 2
5. 丹羽明、梅田勝嗣、張 璽、深津智樹、才田聡、加藤格、森嶋達也、田中孝之、沖田圭介、高橋和則、中川誠人、山中伸弥、平家俊男、中畑龍俊：マウス iPS 細胞からの試験管内分化誘導における、一次・二次造血の経時的分化。第 8 回再生医療学会総会 2009. 3
6. 深津智樹、丹羽明、梅田勝嗣、張 璽、森嶋達也、沖田圭介、酒井宏水、山中伸弥、平家俊男、中畑龍俊：マウス iPS 細胞からの in vitro 選択的赤血球分化誘導における経時的解析と機能評価。第 8 回再生医療学会総会 2009. 3
7. 水野雄太、張 璽、丹羽明、梅田勝嗣、栗屋智就、深田宗一郎、山本元、山中伸弥、平家俊男、中畑龍俊：マウス iPS 細胞からの移植可能な骨格筋前駆細胞の作成。第 8 回再生医療学会総会 2009. 3
8. 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、2009. 4
9. 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、2009. 4
10. 酒井秀政、田原昌博、桑門克治、西小森隆太、重松陽介、水野隆久、荒

川浩一、小原収、大嶋宏一、八角高  
裕、平家俊男：本邦における高 IgD  
症候群と欧米症例との臨床的差異。  
第 19 回日本小児リウマチ学会総会・  
学術集会、2009. 10

G：知的財産権の出願・登録状況  
なし