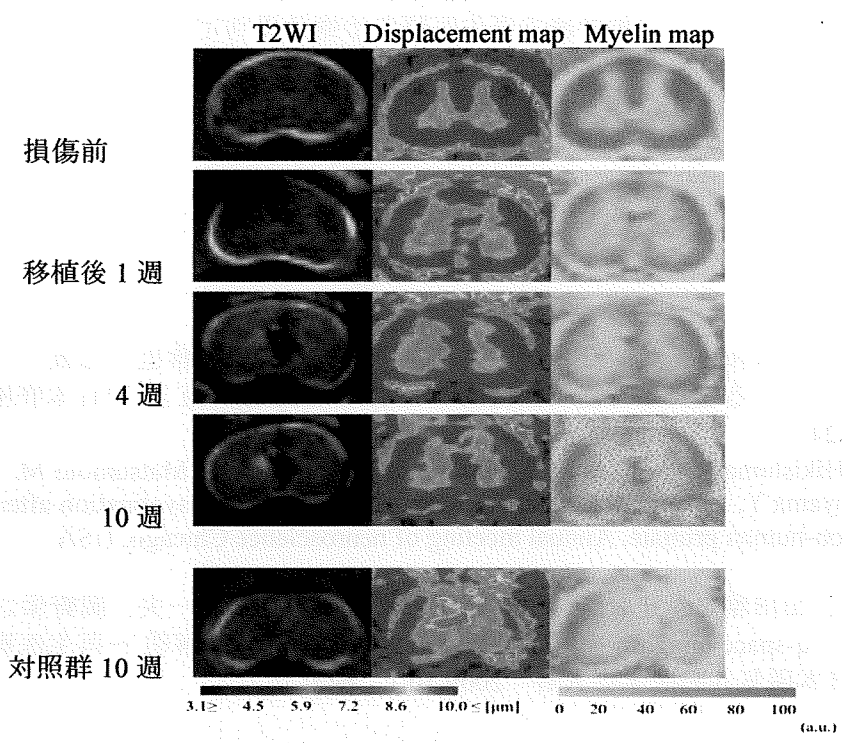


図 3

3) サル損傷脊髄に対するサル胎児由来神経幹細胞後の QSI による髄鞘の可視化  
 最後にサル損傷脊髄に対するサル胎児由来神経幹細胞移植の効果を髄鞘に着目して、QSI により評価ができるか否かを検討した。培養サル神経幹細胞は、分化誘導を行うと neuron, astrocyte, oligodendrocyte へと分化した。サル神経幹細胞移植後の myelin map では、損傷脊髄内で脱髄が進行し、その後再髄鞘化が起こることを myelin map でとらえることに成功した。また、これらの所見は最終病理所見で確認できた。つまり、移植細胞が損傷脊髄内で MBP 陽性の成熟 oligodendrocyte へと分化し、再髄鞘化に寄与している所見をとらえることに成功した。(図 4)



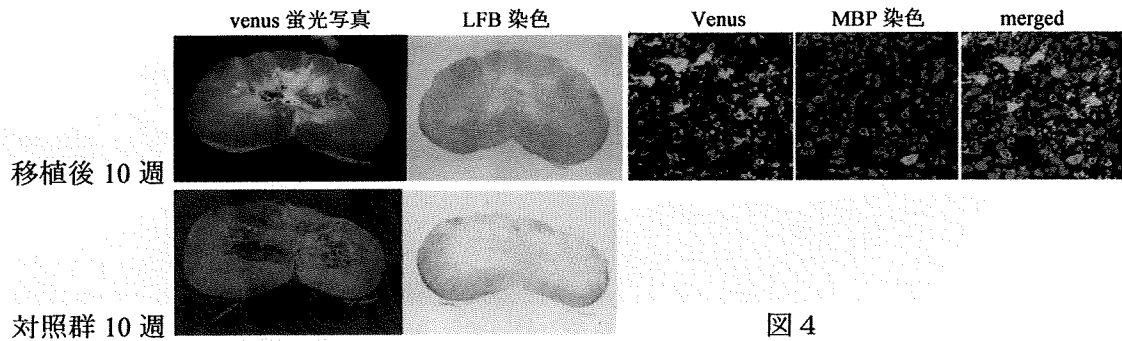


図 4

#### D. 考察

QSI は MRI による拡散もしくは回折現象を観測する手法として提案された。生体に対する回折現象の観測は困難であるが、水分子の拡散変位分布について絶対測定が可能であり、制限する構造の大きさを推定可能として生体での有用性が論じられてきた。一方、髄鞘は軸索を取り囲んだ密な脂質層であり、水分子の移動を強く制限する。われわれは QSI のパラメーターの中で kurtosis が最も鋭敏に水分子の制限を検出することを発見し、これを応用して髄鞘の可視化法である “Myelin map” の開発に成功した。本研究により、Myelin map は従来組織学的に評価せざるを得なかった損傷脊髄内の脱髄変化を非侵襲的かつ定量的に知る方法であることが明らかとなった。

#### E. 結論

QSI による脊髄内髄鞘の可視化に世界で初めて成功した。われわれはこの方法を Myelin map として提唱したい。Myelin map は脊髄損傷の診断は勿論のこと、将来計画している肝細胞増殖因子を用いた中枢神経の再生医療の治療効果判定に大きく役立つものと考えている。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

藤吉兼浩、疋島啓吾、北村和也、辻収彦、岡野栄之、戸山芳昭、中村雅也：拡散テンソルトラクトグラフィによる霊長類脊髄圧挫損傷の in vivo imaging 第 38 回日本脊椎脊髄病学会 2009.4.24

Fujiyoshi Y, Tsuji O, Hikishima K, Yamada M, Kitamura K, Momoshima S, Matsumoto M, Chiba K, Okano H, Toyama Y, Nakamura M: q-space MR imaging depict demyelination after spinal cord injury in non-human primate. Annual meeting of neuroscience Chicago, USA 2009.10.20

藤吉兼浩、疋島啓吾、山田雅之、辻収彦、小牧裕司、百島祐貴、八木一夫、岡野栄之、戸山芳昭、中村雅也：q-space imaging を用いた脊髄再生メカニズムの解明～再生医療への応用～ 第 37 回日本磁気共鳴医学会大会 2009.10.1 横浜

藤吉兼浩、辻収彦、疋島啓吾、北村和也、高橋勇一郎、海苔聡、安田明正、千葉一裕、岡野栄之、戸山芳昭、中村雅也：q-space imaging を用いた脊髄損傷における脱髄評価  
第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会 2009.11.5 横浜

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

「GMP 基準による HGF 原薬の製造」

研究分担者： 安達 喜一（クリングルファーマ株式会社 取締役副社長）  
共同研究者： 井上 逸男（クリングルファーマ株式会社 品質保証部長）  
内本 敬子（クリングルファーマ株式会社 品質保証部）

### 研究要旨

肝細胞増殖因子（HGF）を筋萎縮性側索硬化症に応用するために必要な非臨床試験に使用する HGF 原薬を GMP 基準で製造し、すべての規格に適合した組換え HGF 蛋白質の原薬を製造することができた。

#### A. 研究目的

肝細胞増殖因子（HGF）の筋萎縮性側索硬化症に対する臨床試験を開始するに先立ち、非臨床試験（GLP 試験）としてカナクイザルに HGF を髄腔内投与し、その安全性を確認する必要がある。この GLP 試験に供給するため、組換え HGF 蛋白質の原薬を GMP 品質で製造した。

#### B. 研究方法

HGF 原薬の製造は東洋紡バイオロジクス株式会社（TBI）に委託し、GMP 品質で製造した。

培養工程では、HGF 産生細胞のマスターセルバンク（MCB）から作製したワーキングセルバンク（WCB）の 1 本を融解し、三角フラスコに播種した。三角フラスコの本数を増やすことで拡大した細胞を 5L 培養槽に播種し、通気攪拌培養を行った。5L 培養槽から 20L 培養槽、100L 培養槽へと順次拡大し、最終的に 600L 培養槽に播種して生産培養を実施した。生産培養はフェッドバッチ培養法により培養した後、ろ過によって細胞を除去して約 600L の培養液を得た。培養液中に含まれている不活性な一本鎖 HGF を活性型の二本鎖

HGF に変換した後、精製工程に移行した。

精製工程では多段階のカラムクロマトグラフィーを実施し、工程中に有機溶媒／界面活性剤（S/D）処理によるウイルス不活化工程及びナノフィルターによるウイルス除去工程を挿入し、限外ろ過によって濃度調整した後、約 300mL ずつ小分けして HGF 原薬とした。

上述の製造はすべて GMP 基準で実施した。すなわち、クリングルファーマ株式会社からの技術移管に基づいて TBI で製造方法を構築し、作成した製造標準書に従って製造した。また、製造した HGF 原薬は、品質標準書に従って規格試験を実施し、それらの結果に基づいて出荷の可否を判定した。

#### C. 研究結果

培養工程では順調に細胞は増殖し、予定通り 600L 規模まで拡大することができた。生産培養においても異常は認められず、回収した培養液を精製工程に移管することができた。

精製工程においても異常は認められず、製造標準書通りに製造することができた。

以上の通り、今回の製造において重篤な逸脱は発生せず、再現性のよい製造を実施することができた。製造した HGF 原薬について規格試験を実施したところ、すべての規格に適合し、出荷可否判定において合格と判定された。

#### D. 考察

試作を含め、今回の製造は7回目の600L規模の原薬製造になるが、これまでに実施した製造結果と同等の結果が得られ、製造工程は再現性良く、非常に安定したものであった。今回の製造によって、GLP試験を実施するのに必要な原薬量を製造できたと考えられた。規格試験においてもすべての項目に適合しており、非臨床試験はもちろん臨床試験にも用いることのできる品質の HGF 原薬が製造できたと考えられた。

#### E. 結論

HGF の非臨床試験 (GLP 試験) を実施するのに必要な品質の HGF 原薬を十分量製造することができた。

#### F. 健康危険情報

特記なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし。

##### 2. 学会発表

なし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし。

##### 2. 実用新案登録

なし。

##### 3. その他

なし。

\*\*\*\*\* 事務局 \*\*\*\*\*

東北大学大学院医学系研究科神経内科

〒980-8574 仙台市青葉区星陵町 1-1

担当 金森洋子

電話 022-717-7189 / Fax 022-717-7192

