

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題：ラット膝関節の形態形成-Episcopic Fluorescence Image Capturing (EFIC)を用いた解析-

分担研究者 高桑徹也 京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻 教授

研究要旨

細胞の自家蛍光を検出し画像化することを原理とするEpiscopic Fluorescence Image Capturing (EFIC)は、発生段階における組織構築の高精度な二次元的、三次元的解析という従来の形態学的手法にとっての難題を解決する、新しい技術である。本研究では膝関節の発生過程についてEFICを用いて形態学的に精査した。発生ステージの経過に伴い、十字靭帯や半月板の辺縁部および滑膜において細胞密度の相対的増加を示す所見が認められた。関節腔の形成は細胞のアポトーシスに依らず細胞移動に基づくことを示唆する所見が得られた。関節腔の形成は内外側で非対称性に進行し、腔の開大時に小胞状の構造物の出現が認められた。また三次元的解析では構成組織の空間的位置関係の理解が容易となった。EFICはその手法的性質から従来法と比較してはるかに正確な組織の描出が可能であり、すなわちEFICによる形態評価の信頼性は従来法に比べて極めて高いと言える。

A: 研究目的

発生段階における組織構築機序とその機能を明らかにすることは、形態学および発生生物学に共通する本質的な命題として、今日まで多くの議論の対象となり、様々な手法を用いた研究が展開されてきた。その中で、組織発生過程のダイナミックな変化を三次元的に捉えることは、両研究分野において重要な位置付けであるにも関わらず、組織標本を用いる手法をはじめとした従来法にとって大きな難題であった。

このような中で、細胞の自家蛍光を検出し画像化することを基本原理とする EFIC は、高精度かつ容易に三次元再構築を行う新しい技術として開発された。EFIC システムはマイクロトーム、蛍光顕微鏡、デジタルカメラ、画像解析ソフトウェア、コンピューターシステムを統合したもので、極めて解像度の高い三次元立体像を描出することができる。また、他の三次元化技術である MR 顕微鏡と比較して、EFIC はより高い分解能を有することから¹、小さな標本の観察にも優れ、従って発生期の組織形成過程の観察に好適な手法である。

本研究で着目した膝関節は、骨や軟骨のほか、滑膜や十字靭帯、半月板などの組織により複雑な構造を成しているが、これらの発生に関する現象には未解明である部分が多い。そこで本研究では、膝関節の発生過程について EFIC を用いて二次元的、三次元的に解析し、その特徴を明らかにする。

B: 研究対象および方法

1. 対象

Wister 系ラットの胎生 14 日から 20 日(E14, E16, E17, E18, E19, E20)の胎仔右後肢を各 2 脚ずつ、計 12 脚を使用した。

2. 方法

◆ サンプルの準備

各胎生の Wister 系妊娠ラットから胎仔を摘出し、PBS で洗浄後、4%PFA により一晩固定した。その後右後肢を切除し、各濃度のエタノール系列(70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100%×各 20 分)およびキシレン(20 分×2 回)で脱水した後、ワックス包埋した。

◆ EFIC 撮像

サンプルブロックを滑走式マイクロトームにより 6~10 μ m で薄切し、薄切後のブロック表面に水銀ランプを光源とする光線を DSR フィルタ(フィルタ特性: [励起フィルタ/吸収フィルタ]=[510~560nm/590~650nm])を介して照射した。マイクロトーム画像撮影システムにより撮影環境を設定した後、発生した蛍光シグナルを CCD カメラで撮影した。この一連の操作を膝関節が確認されるすべての薄切面に対して実施した。

◆ 画像解析

得られた二次元画像を画像解析ソフトウェア Osirix によりデータ処理し、三次元的に解析した。

C: 研究結果

E14: 骨形成予定領域と推定される部分において、蛍光強度は一様であり、明確なコントラストが確認されなかった(図 1)。

E16: 大腿骨、脛骨、腓骨の原基が明瞭に観察された。また、大腿骨、頸骨

の両原基に挟まれる領域、すなわち inter zone の三層構造を示唆する所見も見られた(図 2)。

E17：半月板や十字靭帯などの関節組織が明瞭に観察されるようになった。さらに、関節腔の形成が、大腿膝蓋間、内側および外側の大腿半月間で同時に開始していた(図 3)。

E18：十字靭帯周囲において関節腔が見られた。また、E17 で観察された 3 箇所腔に関して、外側大腿半月間ではなお狭いままであるが、他の 2 箇所では拡大が見られた。2 例中 1 例のサンプルについて、脛半月間に初めて腔が出現していた。また、腔の開大部において小さい空胞のようなものが見られた(図 3)。

E19：大腿半月間、脛半月間において腔が拡大し、特に内側で顕著であった。このときやはり小空胞の出現を伴っていた(図 3)。

E20：滑膜や十字靭帯の輝度が増加し、周囲組織とのコントラストがより明瞭化していた。また、内側、外側ともに関節腔領域が著しく狭くなっていた(図 3)。

また、E19 について Osirix により三次元処理した結果を図 4 に示す。

さらに E19 について、回収した切片に対して HE 染色を実施した。その結果を図 5 に示す。

D：考察

度に比例して増大し、また、その原因は不明であるが、赤血球は励起光の照射を受けて強く蛍光を発することが明らかとなった(図 5)。

EFIC による画像所見では、各々の関節組織が明瞭に確認される E16 以降の

ステージについて、半月板では、関節腔形成以前ではその輪郭は明瞭でないが、腔形成後は特に腔と接する境界部において周囲との相対的なコントラストが強い。関節腔の形成は細胞のアポトーシスに依らず細胞移動に基づくことが報告されており⁵、境界面における高い蛍光強度は IMZ 細胞の移動による細胞の密集を反映していると思われる。また、十字靭帯について、ステージ数が大きくなるにつれて周囲組織との相対的な蛍光強度が増していることから、IMZ 細胞の移動のため構成細胞が徐々に高密度化していることが考えられる。成熟した靭帯では細胞はこのように高密度で分布しないことから、出生後の成長に伴って細胞が移動し、靭帯が伸長していく可能性が示唆される。関節腔の形成は各ステージを通して内外側で非対称性に進行しているが、このことは膝関節が解剖学的、機能的に内外側で異なることと関連していると推測される。

関節腔の形成機序に関しては、過去にヒトやラットなどを対象とした数多くの報告が存在するが、腔の形成開始時期や開始部位については報告者により異なり、統一された見解はない。これらはいずれも組織染色法によるものであるが、同手法ではサンプルブロックの薄切や切片の伸展、染色等の一連のマニュアル操作による過程で人為的な影響を受けることが本質的に免れられず、各報告の相違はこのことを反映する過程で人為的な影響を受けることが本質的に免れられず、各報告の相違はこのことを反映したものと考えられる。

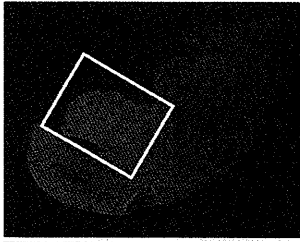


図 1.
EFIC E14 矢状断像
白棒が右脚部分に
対応。

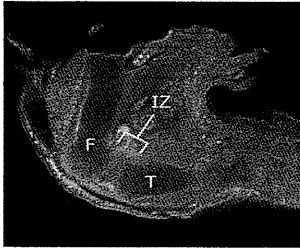
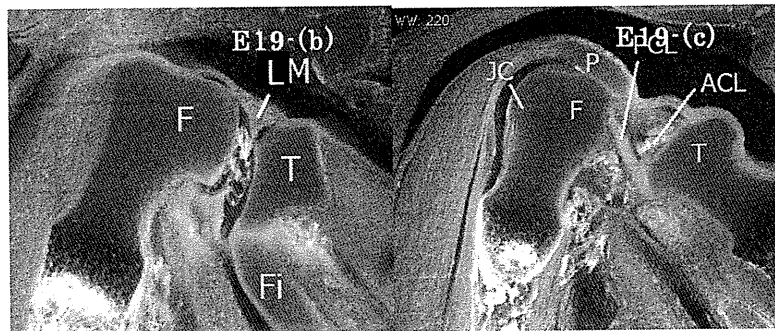
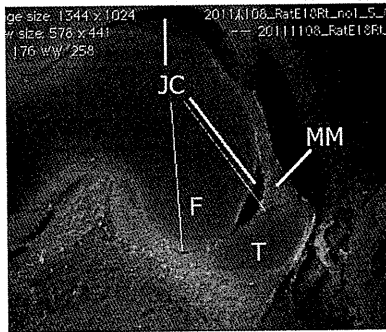
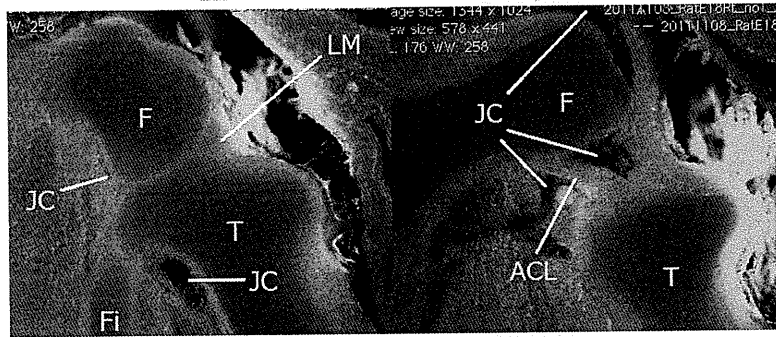
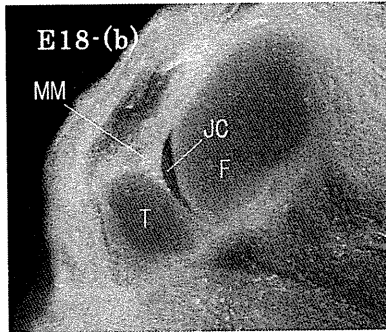
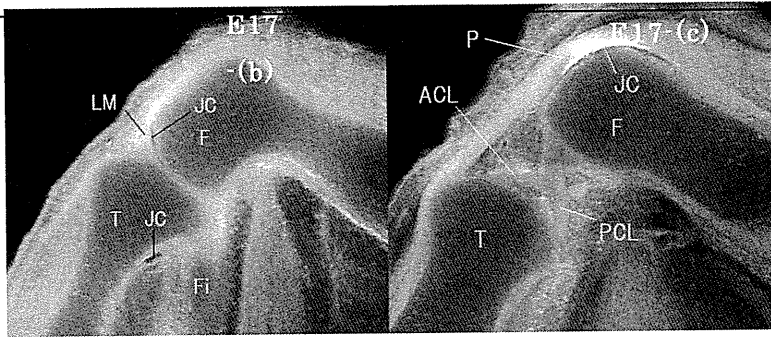


図 2.
EFIC E16 矢状断像
F: 大腿骨
T: 脛骨
IZ: inter zone



図 5. (上)E19 EFIC 矢状断像。(下)同一断面に
対応する切片の HE 染色組織像。



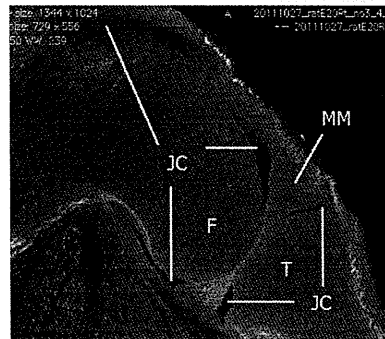
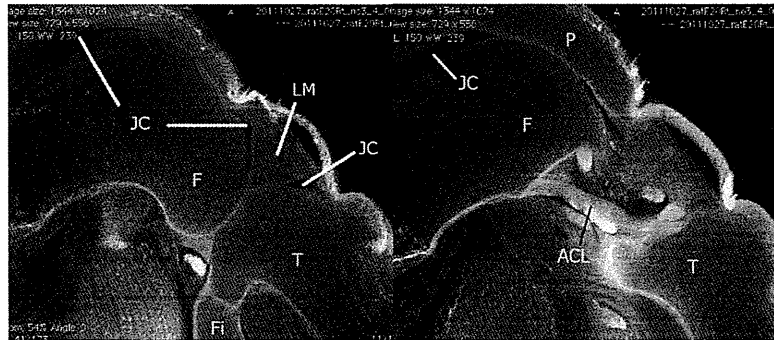
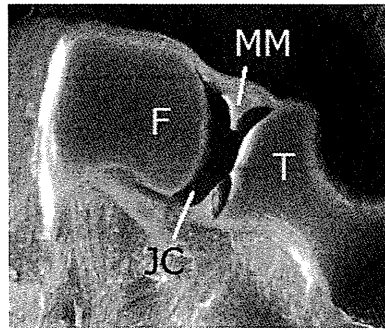


図 3. 各ステージの EFIC 矢状断画像。(a)外側, (b)十字靭帯部分, (c)内側。F: 大腿骨, T: 頸骨, Fi: 腓骨, P: 膝蓋骨, LM: 外側半月, MM: 内側半月, ACL: 前十字靭帯, PCL: 後十字靭帯, JC: 関

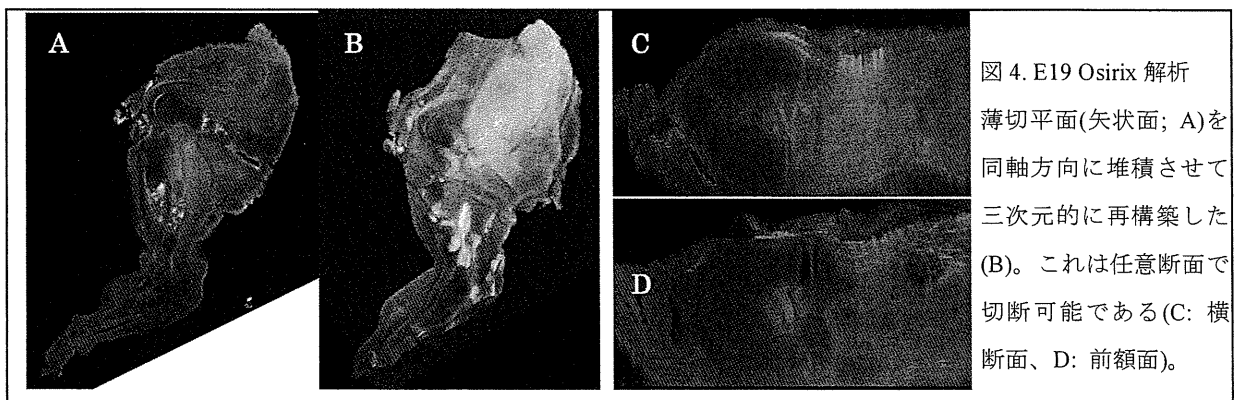


図 4. E19 Osirix 解析
薄切平面(矢状面; A)を
同軸方向に堆積させて
三次元的に再構築した
(B)。これは任意断面で
切断可能である(C: 横
断面、D: 前額面)。

このようなアーチファクトに免れられず、各報告の相違はこのことを反映したものと考えられる。このようなアーチファクトは特に腔の存在する部分で発生しやすく、さらにコラーゲン線維の減少⁶により力学的な脆弱性が亢進した状態にある IMZ 領域においては、同手法は発生期の関節の評価に不相当であると言わざるを得ない。一方 EFIC では評価の対象が薄切した切片でなくブロック表面であることから、標本作成過程での切片の歪みや伸縮によるアーチファクトの影響を受けず、そのため従来法と比較してより正確に対象組織の形態や構造を描出できる。すなわち、EFIC による形態評価の信頼性は、従来手法に比べて極めて高いと言える。

E: 結論

膝関節の発生過程について EFIC を用いて形態学的に精査した。発生ステージの経過に伴い、十字靭帯や半月板の辺縁部および滑膜において細胞密度の相対的増加を示す所見が認められた。関節腔の形成は細胞のアポトーシスに依らず細胞移動に基づくことを示唆する所見が得られた。関節腔の形成は内外側で非対称性に進行し、腔の開大時に小胞状の構造物の出現が認められた。また三次元的解析では構成組織の空間的位置関係の理解が容易となった。EFIC はその手法的性質から従来法と比較してはるかに正確な組織の描出が可能であり、すなわち EFIC による形態評価の信頼性は従来

法に比べて極めて高いと言える。

参考文献

1. Yamada S et al.: Developmental Atlas of the Early First Trimester Human Embryo: Developmental Dynamics: 2010: 239: 1585-1595
2. Rosenthal J et al.: Rapid High Resolution Three Dimensional Reconstruction of Embryos with Episcopic Fluorescence Image Capture: Birth Defects Research (Part C): 2004: 72: 213-223
3. Juan A et al.: Development of the Human Knee Joint: The Anatomical record: 1997: 248: 269-278
4. Gardner E and O'Rahilly R: The early development of the human knee joint in staged human embryos: J Anat.: 1968: 102: 2: 289-299
5. Itoh M et al.: Morphological and biochemical re-evaluation of the process of cavitation in the rat knee joint: cellular and cell strata alterations in the interzone: J Anat.: 2000: 197: 4: 659-679
6. Dowthwaite G P et al.: An essential role for the interaction between hyaluronan and hyaluronan binding proteins during joint development: J Histochem Cytochem: 1998: 46: 5: 641-651

F: 健康危険情報

なし

G : 研究発表

1. 論文発表

1. Takakuwa T: Pyothorax-associated lymphoma: Loss of Epstein-Barr virus nuclear antigen-3B protein expression as a result of mismatch repair phenotypes. *Kenkou Kagaku* 7,17-22,2011.
2. Yamada S, Takakuwa T: Introduction: Overview human embryos. *Human Embryo*(1)3-20, InTech – Open Access Publisher, Rijeka, Croatia, 2012.
3. Yamada S, Takakuwa T et al: Developmental Anatomy of the Human Embryo-3D-Imaging and Analytical Techniques. *Human Embryo* (7)111-126, InTech – Open Access Publisher, Rijeka, Croatia, 2012.
4. Kagurasho M, Yamada S, Takakuwa T et al: Movement of the external ear in human embryo. *Head Face Med* 8:2, 3-9,2012.
5. Nakashima T, Yamada S, Takakuwa T et al: Morphometric analysis of the brain vesicles during the human embryonic period by magnetic resonance microscopic imaging,. *Congenit Anom (Kyoto)* 52(1):55-58, 2012.
6. Hirose A, Yamada S, Takakuwa T et al: Embryonic liver morphology and morphometry by magnetic resonance microscopic imaging. *Anat Rec (Hoboken)*. 295(1):51-59,2012.
7. Tsuruyama T, Maruyama Y, Kanaya K, Takakuwa T et al: MLV integration induces the formation of transcription factor complexes on palindromic

sequences in the Stat5a gene during the development of pre-B lymphomagenesis. *Am J Pathol.* 178(3):1374-86, 2011.

8. 塩田浩平、山田重人、土屋真衣子、中島 崇、高桑徹也、他:マイクロイメージング法を用いたヒト胚子・胎児の骨格系と中枢神経系の観察ならびにその定量的解析. *精神・神経疾患研究開発費一総括研究報告書*
2. 学会発表
 1. ヒト胚子期における隣接器官による肝臓の形態形成への影響、51 回先天異常学会(2011, 7/22-24、東京)
 2. ヒト胚子期における脳室の形態計測学的解析、51 回先天異常学会(2011, 7/22-24、東京)
 3. “京都コレクション”を用いたヒト胚子 3 次元立体像 (Virtual Human Embryo) の作成、遺伝医学合同学術集会 2011(2011, 6/16-19、京都)
 4. ヒト胚子 MRI 画像を用いた胃の発生の形態計測学的解析、遺伝医学合同学術集会 2011(2011, 6/16-19、京都)
 5. ヒト胚子期における脳室の形態計測学的解析、遺伝医学合同学術集会 2011(2011, 6/16-19、京都)
 6. Virtual Human Embryo を用いたヒト胚子の観察、第 100 回日本病理学会総会(2011, 4/28-30、横浜)
 7. ヒト胚子 MR 画像からの 3 次元立体像の作製、第 100 回日本病理学会総会(2011, 4/28-30、横浜)

H：知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案特許

なし

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）

分担研究報告書

分担研究課題：電位印加によるウイルス感染細胞検出系の開発に関する研究

分担研究者 伊吹 謙太郎 京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻
准教授

研究要旨

安全なセルプロセシング作業を脅かす大きな因子として微生物感染が挙げられる。その中でも特にウイルスの感染は通常の培養検査での検出は困難であり、再生医療を実施するうえで大きな脅威となる。本研究では、ウイルス感染細胞の迅速で簡便な検出法を開発することを目的として、電位印加を利用したウイルス感染細胞検出系について検討を行った。1 × 10⁵個の CD4 陽性 T 細胞株（MT-4 細胞）に 5 ボルト(V)・10 分間、直流電流を印加すると、通常では細胞の膨化、形態異常、細胞死を特徴とする細胞変性効果は見られない（細胞傷害率約 6%）が、免疫不全ウイルス感染 MT-4 細胞では細胞傷害率が 81.3%と高値を示した。5V・5 分間の電位印加処置では感染、非感染細胞群で細胞傷害率に有意な差は認められず、一方、10V・10 分間の処置では非感染細胞群においても細胞傷害率 49.3%と高値となった。これらの結果から、一定の電位印加を細胞に処置することにより、非感染細胞に傷害を与えることなくウイルス感染の有無を識別することが可能であることがわかった。今後、さらに詳細な条件検討を行うことにより、迅速で簡便なウイルス感染細胞検出法の開発が可能であると考えられる。

A: 研究目的

セルプロセシングセンター(CPC)を管理・運営するには安全で高品質なセルプロセシング作業が必須となる。安全なセルプロセシング作業を脅かす大きな因子として微生物感染が挙げられるが、その中でも特にウイルスの感染は通常の培養検査での検出が困難であるため、再生医療を実施するうえで大きな脅威となる。そのため再生医療や細胞治療での治療用細胞の品質を保証するには、ウイルス感染細胞を迅速かつ簡便に検出できる検査法の構築が必要であると考えられる。

通常、培養細胞でのウイルス感染を確認する検査法としては、細胞培養中の細胞変性効果の観察、蛍光抗体法や ELISA 法を用いたウイルス抗原検出、PCR やリアルタイム PCR 法を用いたウイルス遺伝子の検出等が行われる。これらの方法はいずれも結果を得るのに長時間かかることや、アッセイに多くの細胞数を必要とすることなど、治療用細胞の品質保証のための検査法としては十分なものではない。

熊谷ら（Kumagai E., *Microbiol Biotechnol.*, 77(4) : 947-953 (2007)）は、ヒ

ト免疫不全ウイルス (HIV) を感染させた細胞群に直流電流を印加させると、HIV に感染した細胞が非感染細胞に比して選択的に傷害されるということを報告した。この報告は、HIV 感染症の治療法を目指したものであったが、我々は細胞に電位印加させるこの方法が、ウイルス感染細胞と非感染細胞を容易に識別する検査法に応用出来るのではないかと考えた。そこで本研究では、ウイルス感染細胞の迅速で簡便な検出法を開発することを目的として、電位印加を利用したウイルス感染細胞検出系について検討を行った。

B: 研究方法

CD4 陽性 T 細胞の株化細胞である MT-4 細胞に HIV の近縁のウイルスであるサル免疫不全ウイルス (SIV) を M.O.I. (multiplicity of infection) 1 で感染させ、48 時間培養したものをウイルス感染細胞とした。細胞への電位印加には定電圧・電流電源装置 (AE-8750、ATTO、東京) を用い、デジタルオシロスコープ (Picoscope 20MHz、秋月電気、東京) で印加電圧を確認し定電圧環境を維持した。電位を印加する作用極には酸化インジウム (indium-tin oxide、ITO) 線を、対極には白金線を用いた。参照極には銀/塩化銀線を使用した。細胞数を調整したウイルス感染・非感染 MT-4 細胞を 1.5ml チューブに 1ml ずつ入れ、上記の電極をセットし 5V ~10V の範囲の定電圧を 1 ~15 分間で一定時間印加した。電位印加後の細胞は生・死細胞を 10^3 個以上カウントし細胞傷害率を算出した。細胞の形態異常の解析はフローサイトメーター (FACScant II Flowcytometer、BD Bioscience、米国) を用いた。

C: 研究結果

まず初めに非感染 MT-4 細胞における細胞傷害の検討を行った。非感染 MT-4 細胞の 10 倍段階希釈系列 ($1 \times 10^4 \sim 10^8$ 個/ml) を作製し、電位印加条件 5V・5min、10V・5min、5V・10min および 10V・10min の 4 条件で電位印加し細胞傷害率を算出した。5V・5min では 1×10^7 個/ml 以上で細胞傷害率が 10% を越えることがわかった。5V・10min では 1×10^5 個/ml では 6% であったが、 1×10^6 個/ml になると 42% を越える高値となった。10V・5min では 1×10^5 個/ml で 7.2%、 1×10^6 個/ml では 22% であった。10V・10min では 1×10^4 個/ml ですでに細胞傷害率は 47% となった。次に SIV 感染細胞について同様の電位印加条件で実験したところ、5V・10min で 1×10^5 個/ml の場合に細胞傷害率が 81.3% となり、同条件での非感染細胞の細胞傷害率 (6%) と最も差があることがわかった。そこで、この条件をさらに詳細に検討するため、次に電位印加時間を 0~15 分の範囲で比較した。ウイルス感染細胞では、印加時間 8 分で細胞傷害率 50% を越え、10 分で 80% 以上となった。一方、非感染細胞では 12 分まで細胞傷害率は 10% 以下と低値を示した。

次にウイルス感染細胞の電位印加による細胞の形態的变化を FACS により詳細に解析したところ、細胞内部の状態を表す側方散乱光 (SSC) や細胞膜上に発現する CD3 抗原量については、電位印加していないウイルス感染細胞と有意な差は認められなかった。しかしながら、細胞の大きさを表す前方散乱光 (FSC) の中央値については、電位印加していないウイルス感染細胞と比較して約 20% 上昇していることがわ

かった。

なし

D: 考察

今回、我々は電位印加を利用したウイルス感染細胞の検出系の作製を試みた。この検出系では、細胞濃度 1×10^5 個/ml で、5V、10 分間の直流電位の印加により、ウイルス感染細胞群では細胞の形態異常や細胞死を特徴とする細胞変性効果等の細胞傷害が出現し、尚かつ、非感染細胞にはほぼ影響を与えないということを明らかにした。また、電位印加時間は 12 分間にまで延ばしてもその影響に変化がないことを明らかにした。

H: 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案特許

なし

E: 結論

再生医療や細胞治療には、治療用細胞の品質は生命線であり、微生物などの汚染を防ぐためには、CPC の絶対的な環境管理だけでなく、安全で高品質なセルプロセッシング作業および迅速な品質検査が必須となる。本研究では、ウイルス感染細胞を迅速かつ簡便に検出できる電位印加を用いた新たな検査法の開発について検討を行った。今後、この方法を骨髄造血幹細胞など再生医療や細胞治療に実際に用いられる生体材料を用いて検討していく予定である。

F: 健康危険情報

なし

G: 研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題：セルプロセッシングにおける人材育成と運営管理に関する研究

分担研究者 笠井泰成 京都大学医学部附属病院分子細胞治療センター 主任技師

研究要旨

細胞プロセッシングを伴う再生医療や細胞治療の臨床研究は既に多くの領域で開始され、その有効性も報告されてきている。また、その安全性を担保するために「ヒト幹細胞を用いる臨床に関する指針」を始めとする指針や細胞プロセッシングセンター（以下 CPC）設立、その運用システムなどの基盤整備が徐々に進んでいる。しかし、実際に CPC の運用管理、あるいは CPC 内で細胞調製などの作業を行う人材の教育システムは現在全く存在していない。本研究では GMP や GCP 教育プログラムを通して、安全で高品質な細胞プロセッシングの作業に精通した再生医療の現場で即戦力となる人材を育成し、再生医療の推進加速に資する事を目的とする。本プロジェクトを推進するにあたり、再生医療の安全性を確保するために必要となる運用管理に関する研究を行った。

A：研究目的

再生医療や細胞治療では、ヒト由来の細胞や組織などを利用して治療が行われるが、その安全性を担保するためには、細胞の培養や調整工程（以下、細胞プロセッシング）における製造管理および品質管理を充実させることが重要であり、わが国でも関連するガイドラインなどの整備が急務となっている。大学や先端医療施設で実施される臨床研究であっても細胞プロセッシングの適切な管理は必須であり、治験薬と同等の安全性確保と品質保証を行うためには GMP に沿った製造管理

や品質管理が求められる。細胞プロセッシングには、バリデートされた設備や機器の設置に加え、製造や試験検査を適切に実施するために必要

な技術と経験を持つ人材の育成も重要な課題となる。我々は、今後整備が進められていく規制等の方向性を見極めながら細胞プロセッシングに適した人材の育成と環境の整備を目的として研究を進める。

B：研究方法

細胞プロセッシングに係わる人材の育成の一環として、平成 21 年度から

京都大学医学部人間健康科学系専攻を卒業した修士課程の学生を対象として、CPCの運営管理に必要とされる基礎的な知識と関連する臨床研究についての講座を開設し人材育成を目的とした研修を開始した。

また、再生医療や細胞治療に係わる規制について、国内だけでなく欧米の規制についても調査を行い、CPCの運営管理を充実させるための施設基準や運用基準などに関する運用基準の草案を策定する。更に策定した運用基準の草案を元にCPC間の相互監査や自己点検を行い、草案の実用性を高めていく。

細胞プロセッシングを受けた細胞や組織はCPCから出荷され移植施設まで搬送されるが、移植される細胞や組織を搬送する間に一定の温度を保ち、無菌性を担保しながら安全に搬送するためには、専用の搬送容器が不可欠である。しかし、細胞などを安全に搬送できる容器は実用化されておらず、新たに専用の搬送容器の開発が必要となる。無菌性や恒温、衝撃吸収などの機能を備え再生治療や細胞治療に適応した専用の搬送装置の開発し評価を行う。

(倫理面への配慮)

実施するシーズは全て学内の倫理委員会の審査を受けた上で実施している。更にヒト幹細胞を用いるシーズについては、厚生労働省の「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針(平成18年7月3日)」を遵守して実施され

ている。

C: 研究結果

平成23年10月5日から14回の公開講座を開催し、GMPに準拠したCPCの運営管理や学内で実施されている臨床研究の詳細についての講義が行われた。公開講座には、修士課程の学生だけでなく、学部生や学内の各研究室からも聴講者が参加し、受講者はのべ352名に達した。また昨年度に引き続き細胞培養やその品質管理に関する実習も実施し、7名の学生が参加した。更に、今年度は実地講習として神戸先端医療振興財団を訪問し、細胞治療の治験を目指す施設の見学と討論会を行った。討論会では、学生からCPCにおける製造管理や品質管理について質問や意見が出され、積極的な議論が行われた。

また、厚生労働省から出されている指針などを元に、CPCの「施設基準」と「運用管理基準」の草案をそれぞれ策定し、これらの内容についてCPCを運営している他大学の担当者とも意見交換を行ったが、定期バリデーションや細胞や組織の品質評価方法についてその経費の含め多くの課題が残されていることが明らかになった。

一昨年より開発を進めているヒト由来細胞の搬送容器は、内部の温度を一定に保ちながら輸送中の外気圧の変化にも影響を受けず搬送する組織や細胞の無菌性を保ちながら、安全に輸送できることが確認できた。この専用容器を利用すれば、近距離での細胞

や組織の輸送が可能となった。

D: 考察

再生治療や細胞治療に必要なとなるセルプロセッシングに関わる人材を育成するための人材研修プログラムを開始し、このプロジェクトに関心を持つ多くの学生や研究者の参加があった。更に、今年度は実務に即した実習を行い、GMP 準拠の CPC 管理運営の一部を実際に体験し、参加した学生からも多くの反響を得ることができた。しかし、講義や実習だけでは時間的な制限もあり、今後は講義や実習の内容に則した教材や資料なども充実させ、より高いレベルでの細胞プロセッシングに特化した人材の育成を進めていきたい。

また、再生医療や細胞治療に利用されるヒト由来の細胞や組織の品質を保証し安全性を担保するためには、細胞プロセッシングを行う CPC の施設基準や運用管理基準を設定する必要がある。我々はこの細胞プロセッシングに特化した基準の草案を策定した。更に、この施設基準や運用基準の内容に沿って施設間で CPC の相互監査システムの構築が可能になると考えられる。

E: 結論

再生医療や細胞治療において、その品質を保証し患者の安全性を確保することは最も重要な要因である。そのためには、細胞プロセッシングを行う際には適切な管理が必要であり、CPC の運営管理や構造機能面での基準策定

だけでなく作業に携わる人材の育成も必須となる。平成 21 年度からの 3 年間で、学内での公開講座や実習を開催したり学外の施設見学を行うことで、学生だけでなく関連する研究開発者からも大きな反響を得ることができた。

また、新しい医療技術の開発と平行して、細胞や組織の品質評価方法に関する新たな技術の開発や、その標準化も必要となってくる。再生医療や細胞治療の実用化に向けて多くの課題が残されているが、優秀な人材の育成し、更に CPC を管理する施設間で様々な情報を共有し連携をとることが、わが国の再生医療や細胞治療などの研究開発において大きな推進力になると考える。

F: 健康危険情報

なし

G: 研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. 論文発表

1. Kitawaki T, Kadowaki N, Fukunaga K, Kasai Y, Maekawa T, Ohmori K, Kondo T, Maekawa R, Takahara M, Nieda M, Kuzushima K, Ishikawa T, Uchiyama T.: A phase I/IIa clinical trial of immunotherapy for elderly patients with acute myeloid leukemia using dendritic cells co-pulsed with WT1 peptide and zoledronate. *Brit J Haematol* 153: 796-799, 2011
2. 青山朋樹、笠井泰成、上田路子、

- 井沼俊明、高橋 稔、海平和男、山田 実、戸口田淳也、前川 平。再生医療に用いる生体由来物搬送容器ユニットの開発。バイオインダストリー 28(5) : 29-34, 2011
3. Kitawaki T, Kadowaki N, Fukunaga K, Kasai Y, Maekawa T, Ohmori K, Itoh T, Shimizu A, Kuzushima K, Kondo T, Ishikawa T, Uchiyama T.: Cross-priming of CD8(+) T cells in vivo by dendritic cells pulsed with autologous apoptotic leukemic cells in immunotherapy for elderly patients with acute myeloid leukemia. *Exp Hematol* 39: 424-433, 2011
 4. 戸口田淳也、青山朋樹、後藤公志、柿木良介、笠井泰成。大腿骨頭無腐性壊死症に対する細胞治療。日本臨床 69(12) : 2225-2230, 2011

2. 学会発表

1. 北海道大学高度先進医療支援センター主催 講演会「京大病院における細胞治療臨床研究の現状と課題」(2012年2月17日)

H: 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

現時点で特許取得計画は未定。

2. 実用新案特許

現時点で実用新案特許取得計画は未定。

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題：GMP,GCP 教育、CPC 運用教育・実習に関する研究

研究分担者：川真田伸（公財）先端医療振興財団 細胞療法評価事業部門

研究要旨 細胞培養施設（CPC）で製造される細胞製剤の品質・安全性を担保するためには、CPC での細胞培養操作実施者に対して、入退出時・操作時の手順を含む安全教育が確実に行われていることが必須である。今年度は、GMP 教育の一環として、教育訓練に必要な GMP 教育図書を整備と教育訓練の実施、on the job training (OJT)実施による教育訓練内容の検証等を行った。

- A. 研究目的
細胞製剤をもちいた再生医療の普及を図るためには、薬事対応のGMP教育が必須である。本研究では、CPCで実際に細胞培養を実施する際の教育図書の作成を行った。
- (8) 防虫防鼠 4F、5FCPC の昆虫調査
- 【製造管理教育訓練】の教育図書作成
- B. 研究方法
作成した教育図書をOJTを実施しながら検証した。
(倫理面への配慮)
OJTで使用したヒト細胞は、個人情報管理がされている試料を使用した。
- (1) 製品の製造工程
(2) 製造時環境測定方法
(3) 検体採取
(4) 製品梱包
(5) 検体ラベル
(6) 製品ラベル
(7) 廃棄物処理
- C. 研究結果
【衛生管理教育訓練】の教育図書作成
- (1) 清浄度区分、
(2) 入室者の健康管理及び安全管理
(3) 入退室方法
(4) 手洗方法
(5) 消毒方法
(6) 微生物汚染の防止
(7) 搬入搬出方法
- 【品質管理教育訓練】
- (1) 品質管理試験方法の確認
(2) 委託試験
(3) 検体保管
(4) 参考品保管
(5) 製造時環境測定
(6) 検体ラベル
(7) 製品ラベル
(8) 出荷判定
- D. 考察

GMP レベルでの細胞製剤の製造・出荷を担保する CPC 操作員の教育図書の整備は必須であるが、今回の研究で作成した教育図書はその雛型作成に貢献できたと考える。

E. 結論

本研究は、幹細胞研究指針適合確認に基づく臨床研究、高度医療実施、及び治験を実施するうえで必要とされる CPC 図書文書体系のうちの教育図書の提供を目指しており、わが国の再生医療研究の進展を促進するものと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

Efficient generation of transgene-free human iPSCs by temperature-sensitive Sendai virus vectors. Ban H, Nishishita N, *Fusaki N, Tabata T, Saeki K, Shikamura M, Takada N, Inoue M, Hasegawa M, Kawamata S and Nishikawa S-I. *Proc.Nat.Aca.Sci.*2011 23;108(34):14234-9.

G. 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

細胞培養士育成学コース系講義

プログラム等関連資料

細胞治療・再生治療開発への挑戦

細胞育成学連続講演会2011

このシリーズでは、京都大学内外で細胞治療・再生治療の研究、臨床をされている先生方に、最先端の話題を提供していただきます。また、細胞治療を支える細胞治療センターの重要な役割にスポットをあてます。学生、教員の皆様の聴講を歓迎致します。

場所: 人間健康科学科 高井ホール(171号室)

日時: 毎週水曜日 16:30~18:00 (計14回)

- ◇ 10月 5日(水): 前川 平 (京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部 教授)
京都大学における細胞治療・再生治療開発への挑戦ー概論ー
- ◇ 10月12日(水): 笠井 泰成 (京都大学医学部附属病院 分子細胞治療センター
主任技師)
細胞治療における臨床検査技師の役割
- ◇ 10月19日(水): 伊藤 達也 (京都大学医学部附属病院 探索医療センター 助教)
治験、臨床試験に関わる規制について
- ◇ 10月26日(水): 岩田 博夫 (京都大学 再生医科学研究所 教授)
人工材料への細胞の接着
- ◇ 11月 2日(水): 川真田 伸 ((財)先端医療振興財団 再生医療支援グループ GL)
CPCの運営コストと事業化について -神戸での取り組み-
- ◇ 11月 9日(水): 神田 輝 (愛知県がんセンター研究所・腫瘍ウイルス学部 室長)
ウイルス抗原・がん抗原に特異的なT細胞を用いた細胞療法
- ◇ 11月16日(水): 仙石 慎太郎 (京都大学 細胞一物質統合拠点 (iCeMS) 准教授)
幹細胞の品質評価・安定培養技術とイノベーション
- ◇ 11月30日(水): 森本 尚樹 (京都大学医学部附属病院 形成外科 講師)
自家培養真皮を用いた皮膚潰瘍治療
- ◇ 12月 7日(水): 門脇 則光 (京都大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科 准教授)
癌免疫療法としての細胞療法
- ◇ 12月14日(水): 青井 貴之 (京都大学 iPS細胞研究所 教授)
細胞治療に向けたiPS細胞の現状と課題
- ◇ 12月21日(水): 井家 益和 ((株)J-TEC製品開発部 部長)
ヒト細胞を組み込んだ日本初の再生医療製品の開発
- ◇ 1月 4日(水): 青山 朋樹 (京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専 准教授)
間葉系幹細胞を用いた臨床応用
- ◇ 1月11日(水): 細田 公則 (京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻 教授)
iPS細胞由来脂肪細胞を用いた脂肪萎縮症の成因解明、および細胞治療法の開発
- ◇ 1月18日(水): 一山 智 (京都大学医学部附属病院 検査部 教授)
免疫不全患者における感染症の診断と治療

