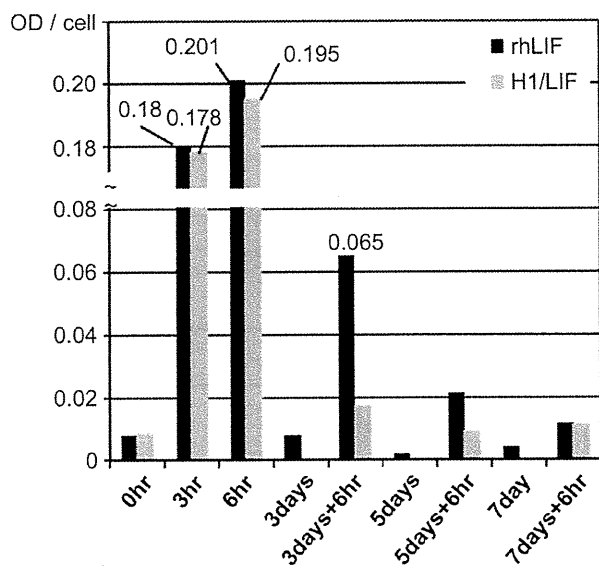


**Fig. 5.** Addition of H1/LIF promotes the growth of pluripotent stem cells in a dose-dependent manner. Results are shown as linear graphs with mean and standard deviation (SD; indicated by error bars) derived from 3 independent experiments. **A:** mouse ES cells proliferate in the presence of H1/LIF polyhedra. Either  $2 \times 10^5$  cubes of H1/LIF polyhedra, LIF/VP3, or CP-H polyhedra were added to  $1 \times 10^4$  EB5 cells at the beginning of the culture, while 10, 25, 50 or 100 ng/mL rhLIF was added at days 0 and 3 of the culture to sustain cell proliferation. The number of cells was assessed at days 3 and 5. **B:** ES cells proliferate by the addition of H1/LIF polyhedra in a dose-dependent manner. Either  $7.5 \times 10^3$ ,  $1.0 \times 10^4$ ,  $5.0 \times 10^4$  or  $2.0 \times 10^5$  cubes of H1/LIF polyhedra were added to  $1 \times 10^4$  EB5 cells at the beginning of the culture, while 10, 25, 50 or 100 ng/mL rhLIF was added at days 0 and 3 of the culture to sustain cell proliferation. The number of cells was assessed at days 3 and 5. **C:** Mouse iPS cells proliferate in the presence of H1/LIF polyhedra. Either  $2 \times 10^5$  cubes of H1/LIF, LIF/VP3, or CP-H polyhedra were added to  $1 \times 10^4$  EB5 cells at the beginning of the culture, and 10 ng/mL rhLIF was added at days 0 and 3 to sustain cell proliferation. The number of cells was assessed at days 3 and 5. **D:** H1/LIF polyhedra sustain the proliferation of mouse ES cells for 2 weeks. Ten thousand EB5 cells were cultured with either 10 ng/mL rhLIF,  $2 \times 10^5$  cubes or  $5 \times 10^5$  cubes of H1/LIF polyhedra,  $2 \times 10^5$  cubes of LIF/VP3 polyhedra, or  $2 \times 10^5$  cubes of CP-H polyhedra for 14 days. The number of cells was assessed at days 3, 5, 7, and 14. rhLIF was added at days 0, 3, 5, 7, 10 and 12, while polyhedra were only added at the start of corresponding cultures.

those seen for a periodic administration of rhLIF protein to the culture media. The mechanism underlying how LIF is released from H1/LIF polyhedra but not from LIF/VP3 polyhedra remains elusive, and further protein crystal analysis is needed to provide full answers. Nonetheless, our findings suggest that inexpensive H1/LIF polyhedra can be productively used to sustain a long-term and a closed mass culture system.

Recently, a biocarrier using immobilized LIF on a maleic anhydride copolymer thin-film was reported [21]. Here, the immobilized LIF protein regulated the pluripotency of ES cells growing on the film

for 2 weeks. The ES cell colony spread radially and notably the cells in the center of the colony, not at the rim of the colony, could use up LIF immobilized in the film, resulting in differentiation from the center of colony due to deficient LIF stimulation. In this report, we demonstrate the biological potential of immobilizing LIF into polyhedra (e.g. H1/LIF), which can then be mixed with the culture medium as a soluble, slow-releasing agent of LIF, thereby obviating the need to add rhLIF to the culture medium every 2–3 days to maintain ES cell proliferation. Furthermore, unlike rhLIF that induces spikes in STAT3 phosphorylation (Fig. 6) and cellular



**Fig. 6.** STAT3 activation at a single cell level. Ten thousand EB5 cells were cultured either with 10 ng/mL rhLIF (black bar) or  $2 \times 10^5$  cubes of H1/LIF polyhedra (gray bar). The activated form of STAT3 (phosphorylated STAT3), measured in OD units at designated time points at a single cell level, is shown.

response [13], use of the slow-releasing agent H1/LIF provided a persistent STAT3-mediated signal activation through continuous LIF release into the culture medium. This slow-releasing property, we presume, will be beneficial for the maintenance and proliferation of ES cells by avoiding the fluctuations (or disruptions) in intracellular signaling through periodic ligand stimulation and starvation.

Recently, two distinct pluripotency stages of the mouse ES cell, namely the inner cell mass (ICM)-type stem cell and Epiblast-type stem cells (EpiSCs) have been reported [22–27]. ICM-type mouse ES cells are “bona fide” pluripotent stem cells representing the pre-implantation blastocysts that are able to contribute to chimerism when placed back into blastocysts, and require LIF for the maintenance and proliferation of ES cells. While EpiSCs ES cells, which represent the post-implantation stage epiblasts, demonstrate the potential to differentiate into three germ lines *in vitro*, these cells are incapable of contributing to chimerism. EpiSCs require basic fibroblast growth factor (bFGF) for the maintenance and proliferation of ES cells. Both human ES cells and human iPS cells seem to correspond to the EpiSCs with respect to colony morphology, gene expression profiles, and cytokine requirement [25], but can be converted to the ICM-type stem cell stage by cultivation [28] or by constitutive activation of *Klf2/Klf4* genes [26,27] in the presence of LIF. These reports suggest the potential applications of H1/LIF polyhedra for the maintenance of ICM-type human ES cells and human iPS cells in a closed culture system in future study. In the course of reviewing process of this paper we have succeeded to culture human naïve iPS cells with H1/LIF and show the result in Supplementary figure.

## 5. Conclusions

Human LIF was immobilized into insect virus polyhedra (LIF polyhedra) and release of LIF protein from LIF polyhedra was observed for at least 5 days. Mouse ES cells and mouse iPS cells were proliferated by adding LIF polyhedra in a dose-dependent manner. Both ES cells and iPS cells formed colonies and were stained by Alkali phosphatase positively. Expression of Oct3/4 and SSEA-1 of ES and iPS colony was also determined. A single addition

of LIF polyhedra to the ES cell culture medium supported the proliferation of both ES cells continuously for 14 days.

## Acknowledgment

This work was supported in part by Regional Innovation Creation R&D Programs (20R5021) of Kansai Bureau of METI, a Grant-in-Aid for JSPS Fellows 2210853, a Grant-in-Aid for JSPS Scientific Research (A) 22241052, and Agrigenome Research Program of MAFF.

## Appendix

Figures with essential colour discrimination. Figs. 1, 5 and 6 in this article are difficult to interpret in black and white. The full colour images can be found in the online version, at doi:10.1016/j.biomaterials.2010.12.063.

## Appendix. Supplementary material

Supplementary data related to this article can be found online at doi:10.1016/j.biomaterials.2010.12.063.

## References

- [1] Smith AG, Nichols J, Robertson M, Rathjen PD. Differentiation inhibiting activity (DIA/LIF) and mouse development. *Dev Biol* 1992;151(2):339–51.
- [2] Moreau JF, Donaldson DD, Bennett F, Witek-Giannotti J, Clark SC, Wong GG. Leukaemia inhibitory factor is identical to the myeloid growth factor human interleukin for DA cells. *Nature* 1988;336(6200):690–2.
- [3] Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 2000;24(4):372–6.
- [4] Hirata H, Kawamata S, Murakami Y, Inoue K, Nagahashi A, Tosaka M, et al. Coexpression of platelet-derived growth factor receptor alpha and fetal liver kinase 1 enhances cardiogenic potential in embryonic stem cell differentiation *in vitro*. *J Biosci Bioeng* 2007;103(5):412–9.
- [5] Hirano T, Nakajima K, Hibi M. Signaling mechanisms through gp130: a model of the cytokine system. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997;8(4):241–52.
- [6] O’Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* 2002;109(2):S121–31.
- [7] Darnell Jr JE. STATs and gene regulation. *Science* 1997;277(5332):1630–5.
- [8] Luttficken C, Wegenka UM, Yuan J, Buschmann J, Schindler C, Ziemiecki A, et al. Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science* 1994;263(5143):89–92.
- [9] Niwa H, Burdon T, Chambers I, Smith A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev* 1998;12(13):2048–60.
- [10] Boeuf H, Hauss C, Graeve FD, Baran N, Keding C. Leukemia inhibitory factor-dependent transcriptional activation in embryonic stem cells. *J Cell Biol* 1997;138(6):1207–17.
- [11] Owczarek CM, Zhang Y, Layton MJ, Metcalf D, Roberts B, Nicola NA. The unusual species cross-reactivity of the leukemia inhibitory factor receptor alpha-chain is determined primarily by the immunoglobulin-like domain. *J Biol Chem* 1997;272(38):23976–85.
- [12] Huyton T, Zhang JG, Luo CS, Lou MZ, Hilton DJ, Nicola NA, et al. An unusual cytokine: Ig-domain interaction revealed in the crystal structure of leukemia inhibitory factor (LIF) in complex with the LIF receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(31):12737–42.
- [13] Davey RE, Onishi K, Mahdavi A, Zandstra PW. LIF-mediated control of embryonic stem cell self-renewal emerges due to an autoregulatory loop. *FASEB J* 2007;21(9):2020–32.
- [14] Belloncik S, Mori H. Cypoviruses. In: Miller LK, Ball LA, editors. *The insect viruses*. New York: Plenum Press; 1998. p. 337–69.
- [15] Coulibaly F, Chiu E, Ikeda K, Gutmann S, Haebel PW, Schulze-Briese C, et al. The molecular organization of cypovirus polyhedra. *Nature* 2007;446(7131):97–101.
- [16] Ikeda K, Nakazawa H, Shimo-Oka A, Ishio K, Miyata S, Hosokawa Y, et al. Immobilization of diverse foreign proteins in viral polyhedra and potential application for protein microarrays. *Proteomics* 2006;6(1):54–66.
- [17] Yoshimizu T, Sugiyama N, De Felice M, Yeom YI, Ohbo K, Masuko K, et al. Germ-line-specific expression of the Oct-4/green fluorescent protein (GFP) transgene in mice. *Dev Growth Differ* 1999;41(6):675–84.
- [18] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126(4):663–76.
- [19] Ijiri H, Coulibaly F, Nishimura G, Nakai D, Chiu E, Takenaka C, et al. Structure-based targeting of bioactive proteins into cypovirus polyhedra and application to immobilized cytokines for mammalian cell culture. *Biomaterials* 2009;30(26):4297–308.

- [20] Niwa H, Ogawa K, Shimosato D, Adachi K. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature* 2009;460(7251):118–22.
- [21] Alberti K, Davey RE, Onishi K, George S, Salchert K, Seib FP, et al. Functional immobilization of signaling proteins enables control of stem cell fate. *Nat Methods* 2008;5(7):645–50.
- [22] Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, et al. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 2010;467(7313):285–90.
- [23] Ying QL, Wray J, Nichols J, Batlle-Morera L, Doble B, Woodgett J, et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 2008;453(7194):519–23.
- [24] Jaenisch R, Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* 2008;132(4):567–82.
- [25] Hall J, Guo G, Wray J, Eyres I, Nichols J, Grotewold L, et al. Oct4 and LIF/Stat3 additively induce Kruppel factors to sustain embryonic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* 2009;5(6):597–609.
- [26] Hanna J, Cheng AW, Saha K, Kim J, Lengner CJ, Soldner F, et al. Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(20):9222–7.
- [27] Buecker C, Chen HH, Polo JM, Daheron L, Bu L, Barakat TS, et al. A murine ESC-like state facilitates transgenesis and homologous recombination in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2010;6(6):535–46.
- [28] Zhou H, Li W, Zhu S, Joo JY, Do JT, Xiong W, et al. Conversion of mouse epiblast stem cells to an earlier pluripotency state by small molecules. *J Biol Chem* 2010;285:29676–80.

# 「間葉系幹細胞を用いた骨壊死治療」

## 目的

間葉系幹細胞は比較的調製が容易なこと、*in vitro*の実験で増殖因子や栄養素などを添加することによって、さまざまな細胞に分化する能力が実証されていることから、最も早く臨床応用が進められている組織幹細胞の1つである。われわれはこれまでにヒト骨髄由来間葉系幹細胞を用いた基礎細胞生物学的実験、動物疾患モデルを用いた前臨床試験、そして細胞調製施設における臨床用細胞調製実験を経て、自己骨髄由来の間葉系幹細胞を用いた臨床試験を実践している。本臨床試験は2006年9月1日より厚生労働省が施行した「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に準拠してプロトコールを作成し、京都大学大学院医学研究科・医学部及び医学部附属病院医の倫理委員会および厚生科学審議会での審査を経て、京都大学医学部附属病院整形外科にて2007年11月より実施している。本稿では、臨床試験の概要およびこれまでの経過を提示し、細胞治療のフィージビリティ、安全性および有効性を検証した。

## 方法

対象とした疾患は難治性骨壊死疾患である月状骨無腐性壊死症および大腿骨頭無腐性壊死症とした。月状骨無腐性壊死症はレントゲン画像診断でLichtman分類のstage 3Aおよびstage 3B、また大腿骨頭無腐性壊死症においては厚生労働省素案のstage 3Aおよびstage 3Bを病期選択基準とし、それぞれ除外基準を設けて10例を対象とした。臨床試験の概要を以下に記す。はじめに細胞培養用の自己血清を採取する。次に腸骨より骨髓液を採取し、無菌細胞治療施設で間質細胞を分離し、自己血清と培養液を用いて体外培養を行う。壊死体積から月状骨無腐性壊死症に対しては $1 \times 10^7$ 個、大腿骨頭無腐性壊死症に対しては $5 \times 10^7$ 個の間葉系幹細胞を目処に大量培養を行う。手術においては骨壊死部を搔爬した後に人工骨( $\beta$ -TCP:オスフェリオン®)とともに間葉系幹細胞を移植し、血管柄付き骨移植を併用し血行を再建する。成績判定はそれぞれ移植手術2年後のレントゲン画像診断、CT画像から算出した海綿骨占有体積とModified Mayo Wrist Scoreあるいは日本整形外科学会股関節

機能判定基準の臨床評価判定によって行った。

## 結果

2011年3月の時点で月状骨無腐性壊死症5例、大腿骨頭無腐性壊死症10例に対する手術を実施している。これらの症例において移植治療1年後の追跡調査を終了しているが、全例において手術時の出血による貧血や発熱、手術創部痛などの軽微な有害事象以外に本臨床試験に関する大きな有害事象は認めていない。

## 考察

本臨床試験は第I-II相試験の目的で実施されている。第I相試験の目的である安全性の確認についてはほぼ遂行できたものと考えられる。第II相試験の目的にあたる有効性については手術2年後のそれぞれ10症例における画像診断および臨床症状の有効性判定による。これらの結果を踏まえて、本治療法を医療として推進するにあたっては、従来の治療法との優位性を見極め、適切な症例に対して応用することが、最も肝要であると考えており、臨床試験の結果が回答を与えてくれることを期待している。

## 大学病院輸血部門の技師が輸血医学教育において果たす役割とその重要性； 平成 21 年度大学病院輸血部会議「教育に関する調査報告」(1)

藤原 晴美<sup>1)</sup> 渡邊 弘子<sup>1)</sup> 山田千亜希<sup>1)</sup> 大友 直樹<sup>2)</sup> 押田真知子<sup>3)</sup>  
友田 豊<sup>4)</sup> 万木紀美子<sup>5)</sup> 星 順隆<sup>6)</sup> 高橋 孝喜<sup>7)</sup> 前川 平<sup>5)</sup>  
大戸 齊<sup>8)</sup> 竹下 明裕<sup>1)</sup>

卒前、卒後における輸血医学教育は将来の安全かつ適正な輸血医療を推進していく上で重要である。しかし、大学病院の輸血部門が行う業務量は増加する一方で、教官数や教育時間には限界がある。これらの現状を明確にするために、平成 21 年度大学病院輸血部会議において卒前、卒後の輸血医学教育に果たす輸血部門技師の役割が調査された。89 施設中 70 施設より回答があった。

医学部学生に対して小グループ実習を導入している施設は 63 施設 (90%) で、血液型検査は 61 施設 (97%)、交差適合試験は 51 施設 (81%)、不規則抗体関連検査は 13 施設 (21%) が実施していた。新卒医師に対しては 37 施設 (53%) が小グループ実習を導入しており、血液型検査は 35 施設 (95%)、交差適合試験は 26 施設 (70%)、不規則抗体関連検査は 6 施設 (16%) が実施していた。輸血部門技師は卒前、卒後の実習にそれぞれ 59%、78% の施設で携わっていた。卒後に交差適合試験の実習が施行されている施設では、未施行の施設に比較して輸血部門技師数が有意に多かった。

以上から、大学輸血部門技師が輸血医学教育に果たす役割は大きく、教官と協力することで将来の安全かつ適正な輸血医療に貢献するものである。

キーワード：輸血医学教育，医学部学生，研修医，臨床検査技師，カリキュラム

第 58 回日本輸血・細胞治療学会総会座長推薦論文

### 背 景

医師は輸血療法の全ての過程に係わる。科学的な根拠に乏しい輸血療法は患者にリスクをもたらす信頼関係を損なう可能性がある<sup>1)</sup>。既に経験的な輸血療法に慣れた医師に、エビデンスに基づいた輸血療法を理解してもらうために再教育することは大変な労力が必要とされる。このため、医学部学生や新卒医師などに、医学教育の早い段階で輸血医学の基本を理解させることは安全で適正な輸血を遂行していく上で重要である。しかし日本では倉田ら<sup>2)</sup>の報告にあるように、輸血医学

の教育時間や教育担当者の人員不足が問題となっている。これらの問題点を踏まえ、平成 21 年度大学病院輸血部会議において輸血医療従事者、特に医師教育の現状について調査した。今回は、医師に対する教育に果たす輸血部門技師の役割と効果について報告する。

### 方 法

調査は、平成 20 年度大学病院輸血部会議での承認を経て、アンケート方式により行われた。平成 21 年度全国大学病院輸血部会議事務局（浜松医科大学）が、ア

1) 浜松医科大学附属病院輸血・細胞治療部

2) 東京医科歯科大学医学部附属病院輸血部

3) 大阪大学医学部附属病院輸血部

4) 旭川医科大学病院臨床検査・輸血部

5) 京都大学医学部附属病院輸血細胞治療部

6) 東京慈恵会医科大学附属病院輸血部

7) 東京大学医学部附属病院輸血部

8) 福島県立医科大学附属病院輸血・移植免疫部

〔受付日：2011 年 4 月 21 日，受理日：2011 年 8 月 5 日〕

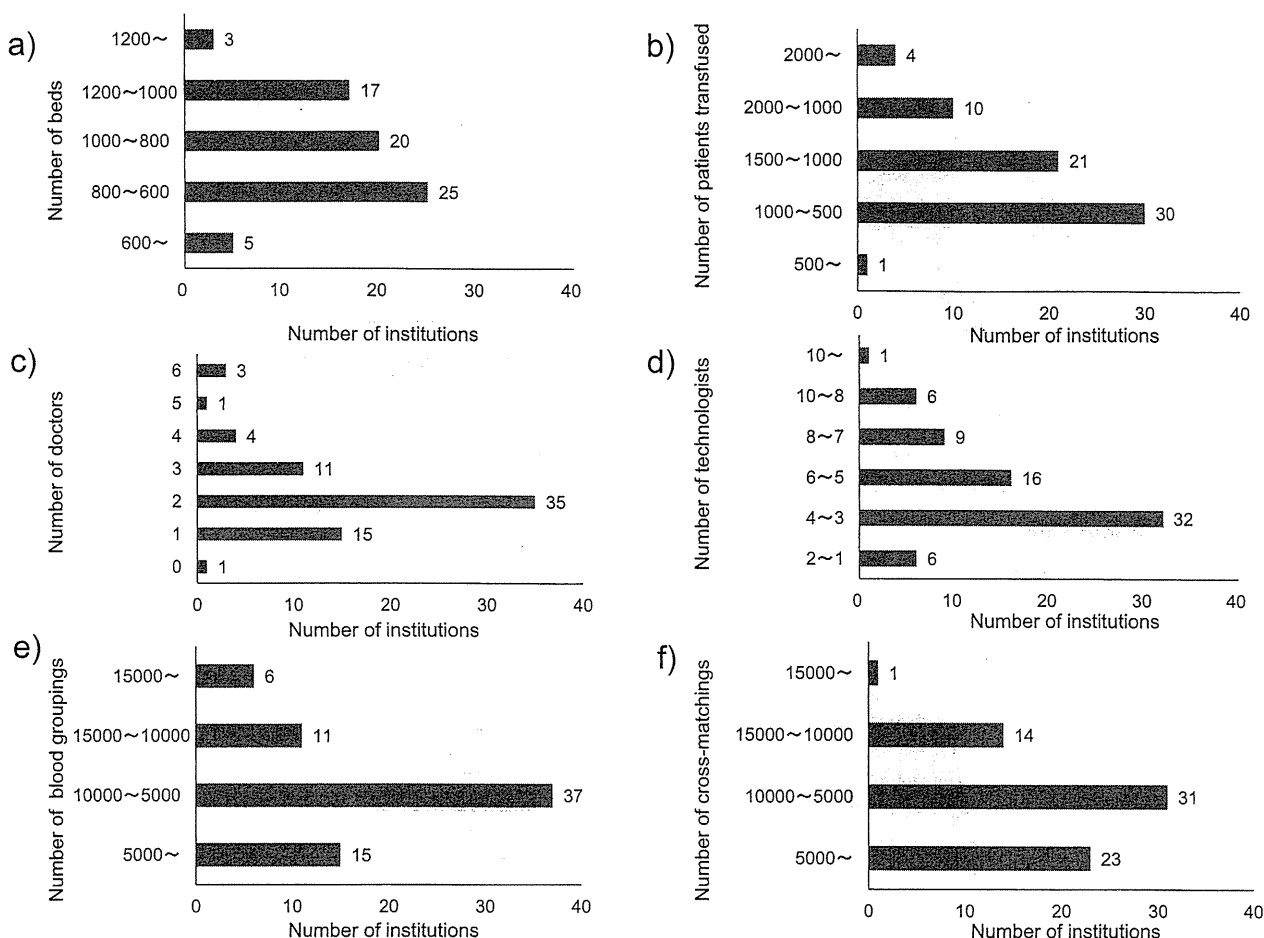


Fig. 1 Basic information of the institutions including a) number of beds, b) number of patients transfused per year, c) number of doctors in the transfusion unit, d) number of medical technologists in the transfusion unit, e) number of ABO-blood grouping tests per year, and f) number of cross-matching tests per year.

アンケート用紙を 89 施設の大学病院の輸血部門へ発送した。集計と解析は表題に記された施設を中心に行われた。

まず、施設の基本情報と輸血医学教育の実習時間や内容等との関連を検討するために病床数、輸血部門所属の教官数と技師数、年間輸血患者数、年間血液型検査件数、年間交差適合試験数、年間不規則抗体検査件数について調査した。

さらに、医学部学生と新卒医師への卒前卒後の教育について、輸血部門技師の関わりを中心に調査した。調査内容は、「質問 1」輸血医学が取得すべき単位の対象になっているか；「質問 2」小グループでの実習を行っているか；「質問 3」卒前、卒後教育において、一人が受ける実習の合計時間；「質問 4」実習の内容（複数回答可）；「質問 5」実習の担当者（複数回答可）；「質問 6」実習が成果をあげているか、とした。

実習を施行している施設と、していない施設の基本情報（前述）について、項目ごとに有意差があるか検定を行った。統計学的解析は Mann-Whitney's U-test (SAS) を行い、危険率 5% (両側) 未満を有意とした。

## 結 果

アンケートの回答は 89 施設中 70 施設 (79%) より得られた。以下にその内容を示した。

### 1. 病院の基本情報

病床数、輸血部門の教官数と技師数、輸血患者数、血液型検査件数、交差適合試験数、不規則抗体検査件数を Fig.1 に示した。このように大学病院輸血部門においても、施設の基本情報には多様性が認められた。

### 2. 輸血医学の取得単位数

輸血医学に関して、独立した取得単位が割り当てられている施設は、34 施設 (49%) であった。

### 3. 小グループ実習方法と実習時間

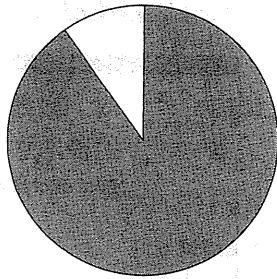
小グループ実習を医学部学生に対して行っている施設は 63 施設 (90%)、新卒医師に対しては 37 施設 (53%) であった (Fig. 2-1)。

実習を施行している施設において実習の合計時間は、医学部学生では平均  $3.8 \pm 3.5$  時間、中央値 3.0 時間 (range, 1~22 時間) であった。ただし、4 時間以下の施設が 78% (49 施設/63 施設) を占めた。

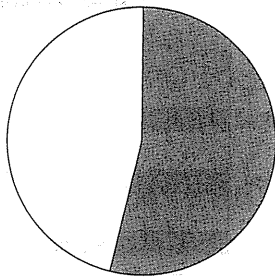
新卒医師一人が卒後に行う実習の合計時間は平均  $2.2 \pm$

(2-1)

## A) Students

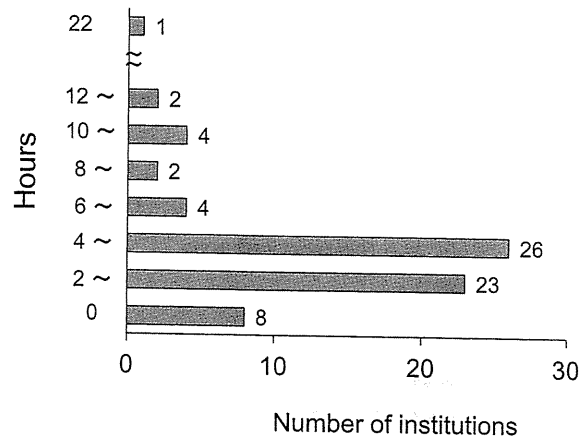
Not adopted  
(7 inst. / 10%)Adopted  
(63 inst. / 90%)

## B) Residents

Not adopted  
(33 inst. / 47%)Adopted  
(37 inst. / 53%)

(2-2)

## A) Students



## B) Residents

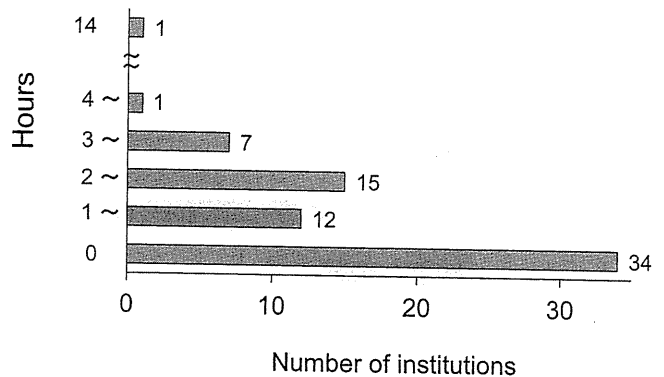


Fig. 2 2-1) Adoption of small group training into education of blood transfusion for students (A) and residents (B). 2-2) Training time period for students (A) and residents (B). The data were reported by 70 institutions. Horizontal and vertical line shows number of institutions and training time periods, respectively.

2.2 時間, 中央値 2.0 時間 (range, 0.5~14 時間) で, 4 時間以下の施設は 95% であった (35 施設/37 施設) (Fig. 2-2).

#### 4. 小グループで行う実習の内容

実習を実施している 63 施設を対象に, 卒前教育の内容について調査した. 血液型検査は 61 施設 (97%), 交差適合試験は 51 施設 (81%), 不規則抗体関連検査は 13 施設 (21%) が実施していた. その他, 採血は 3 施設 (5%), 自己血輸血の講義と採血見学は 3 施設 (5%), 輸血講義は 2 施設 (3%), 輸血の説明と同意のロールプレイ, 輸血回診, 病院輸血部門と血液センター見学, 血痕検査は各 1 施設 (2%) で施行されていた.

実習を実施している 37 施設を対象に行った卒後教育の内容は, 血液型検査は 35 施設 (95%), 交差適合試験は 26 施設 (70%), 不規則抗体関連検査は 6 施設 (16%) が実施していた. その他に輸血依頼の確認, 安全で適正な輸血実施の確認は各 1 施設 (3%) で行っていた (Fig. 3).

#### 5. 小グループ実習の担当者

実習の担当者を Fig. 4 に示した. 卒前教育 (63 施設) で, 輸血部門医師が 20 施設 (32%), 輸血部門医師と技師が 18 施設 (29%), 輸血部門技師が 17 施設 (27%), 輸血部門医師と技師と血液センター見学が 2 施設 (3%), 法医学教室が 2 施設 (3%) であった. 卒前教育では, 59% の施設で実習に輸血部門技師が携わっていた.

卒後教育の担当者を実施 37 施設で検討したところ, 輸血部門医師が 7 施設 (19%), 輸血部門医師と技師が 13 施設 (35%), 輸血部門技師が 16 施設 (43%), 輸血部門医師と看護師が 1 施設 (3%) であった. 卒後教育を施行している 78% の施設において, 輸血部門技師が実習に携わっていた.

#### 6. 小グループ実習の成果

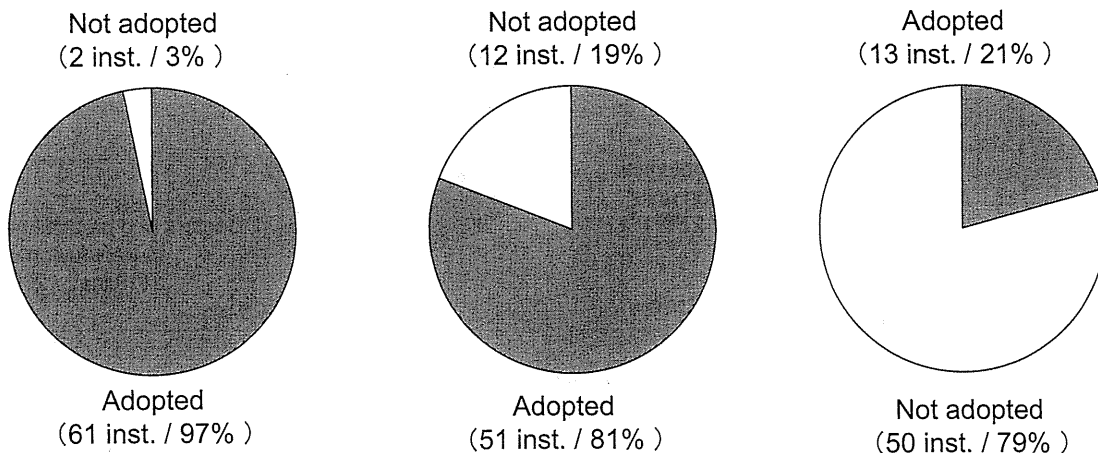
卒前教育 (回答 63 施設中) では, 「非常に成果がある」と回答した施設は 18 施設 (29%), 「成果がある」と回答した施設は 37 施設 (59%), 「少しは成果がある」と回答した施設は 6 施設 (10%), 「あまり成果がない」と回答した施設は 2 施設 (3%) であった.

Blood grouping

Cross-matching

Antibody detection

A) Students (63 institutions)



B) Residents (37 institutions)

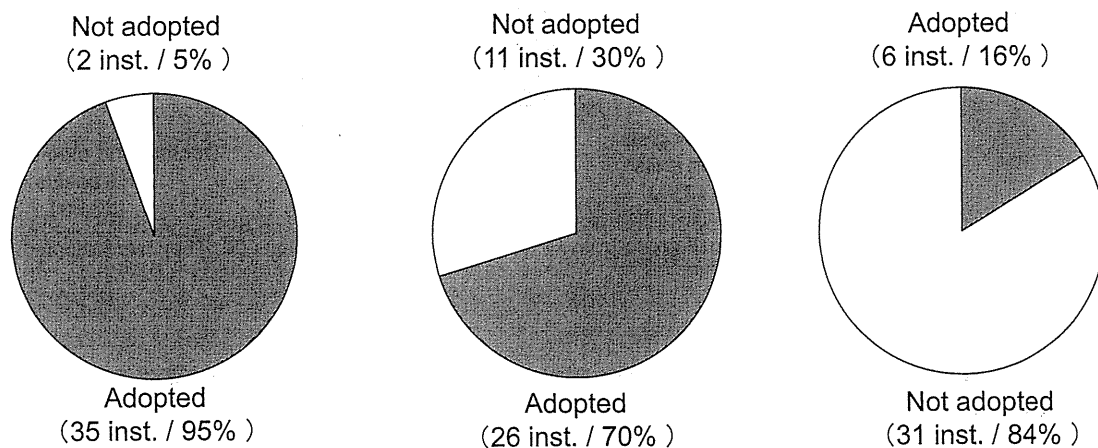


Fig. 3 Subjects and execution rates of small group training for students (A) and residents (B). They were adopted by 63 and 37 institutions, respectively. The training included blood grouping, cross-matching, and detection of erythrocyte irregular antibodies.

卒後教育（回答 37 施設中）では、「非常に成果がある」と回答した施設は 5 施設（14%）、「成果がある」と回答した施設は 23 施設（62%）、「少しは成果がある」と回答した施設は 9 施設（24%）、「あまり成果がない」と回答した施設は 1 施設（3%）であった。

7. 施設基本情報と小グループ実習内容

実習を施行している施設と、いない施設の基本情報について、項目ごとに有意差があるか検定を行った。学生実習における血液型検査の施行群と未施行群の 2 群において、病棟数や輸血部門教官数、技師数等を含む各々の施設基本情報との間に有意差は認められなかった。交差適合試験、不規則抗体関連試験についても有意差は認められなかった。

同様に、研修医の実習についても検討した。血液型

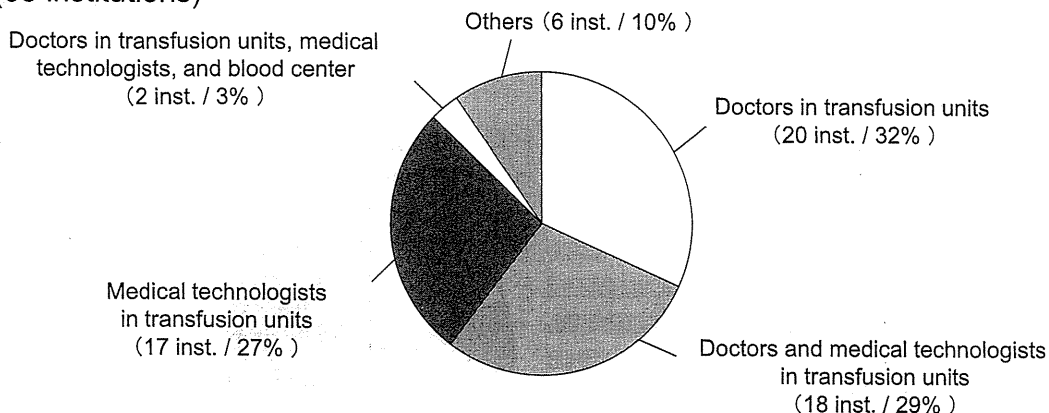
検査、不規則抗体関連試験については、その実施と病棟数や輸血部門教官数、技師数等を含む各々の施設基本情報との間に有意差は認められなかった。しかし交差適合試験施行群では未施行群に比較して有意に輸血部門技師数が多かった ( $p=0.018$ ) (Fig. 5)。

考 察

医師にとって卒前と卒後に輸血に関して教育を受ける大学病院は、安全で適正な輸血医療を学ぶ重要な場となる。英国では、英国患者安全庁 (National Patient Safety Agency : NPSA) からの通達<sup>3)</sup>や The Blood Safety and Quality Regulations 2005 年版<sup>4)</sup>には、それぞれ、輸血を取り扱う全ての医療従事者はトレーニングが必要で、特に大学医学部の輸血教育が重要とされて



## A) Students (63 institutions)



## B) Residents (37 institutions)

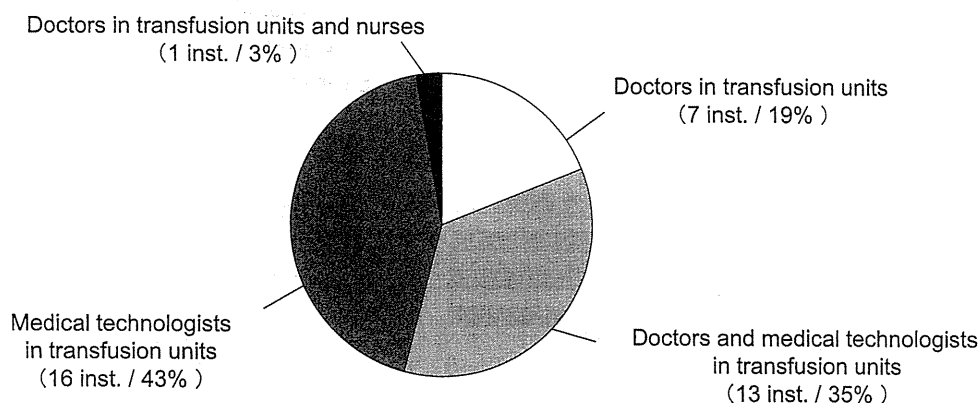


Fig. 4 Type of medical instructors of small group training for students (A) and residents (B). They were adopted by 63 and 37 institutions, respectively.

いる<sup>5)</sup>。米国では1989年に、Transfusion Medicine Academic Awards (TMAA)により輸血医学教育の標準カリキュラムが策定されており<sup>6)</sup>、1995年にはその改訂版も報告されている<sup>7)</sup>。

日本では、2008年に医学教育モデル・コア・カリキュラムが改訂された<sup>8)</sup>。しかし各大学が教育の時間や内容を設定しなくてはならない。輸血部門の技師が教育に関与するにあたっては、より具体的な到達目標が提示され、教官と共有される必要がある。

結果に示すように、輸血部門の教官数は併任教官を合わせても、平均2.2人と、十分な人員が確保されていない。輸血実習において輸血部門技師が、医学部学生に対し59%、新卒医師に対し78%携わっており、技師が輸血医学教育において果たす役割は重要である。技師は、割り当てられた実習時間が、今後の安全な輸血療法に繋げていく上で貴重な時間であることを認識すべきである。そのためには、教官と教育に関する討論の場を持つこと、大学病院輸血部会議の中で定期的な情報交換できる機会を設けること等、が有効であろう。

実習の内容に関して、血液型検査は医学部学生では97%、新卒医師では95%と多くの施設で実習していた。

ABO血液型は輸血検査の基礎であり、ABO不適合輸血の回避や危機的出血等で速やかな製剤の選択にも繋がる。

交差適合試験の実習は医学部学生で81%、新卒医師で70%が行っていたが、交差適合試験の持つ意味を説明できるようにしたい。また、危機的出血時の使用可能な輸血血液型の組み合わせが理解できるようにしたい。

不規則抗体検査に関しては、医学部学生で21%、新卒医師では16%しか行われていなかった。不規則抗体による溶血性輸血副作用では、一部の患者で重篤化する<sup>9)</sup>。不規則抗体検査を行わずに輸血を施行した場合の危険性に関して教育する必要がある。

大学病院では輸血医療を安全に実施するために24時間体制になり、輸血部門には平均5.0人の技師が配属されている。また、認定輸血検査技師数は平均2.2人である。認定輸血検査技師制度は、平成7年に米国の認定資格であるSpecialist in Blood Banking (SBB)、Technologist in Blood Banking (BB)を目指して作られた。カリキュラムは基礎医学、輸血検査、精度管理、血液製剤の適応と管理、輸血療法、輸血副作用、輸血事業、

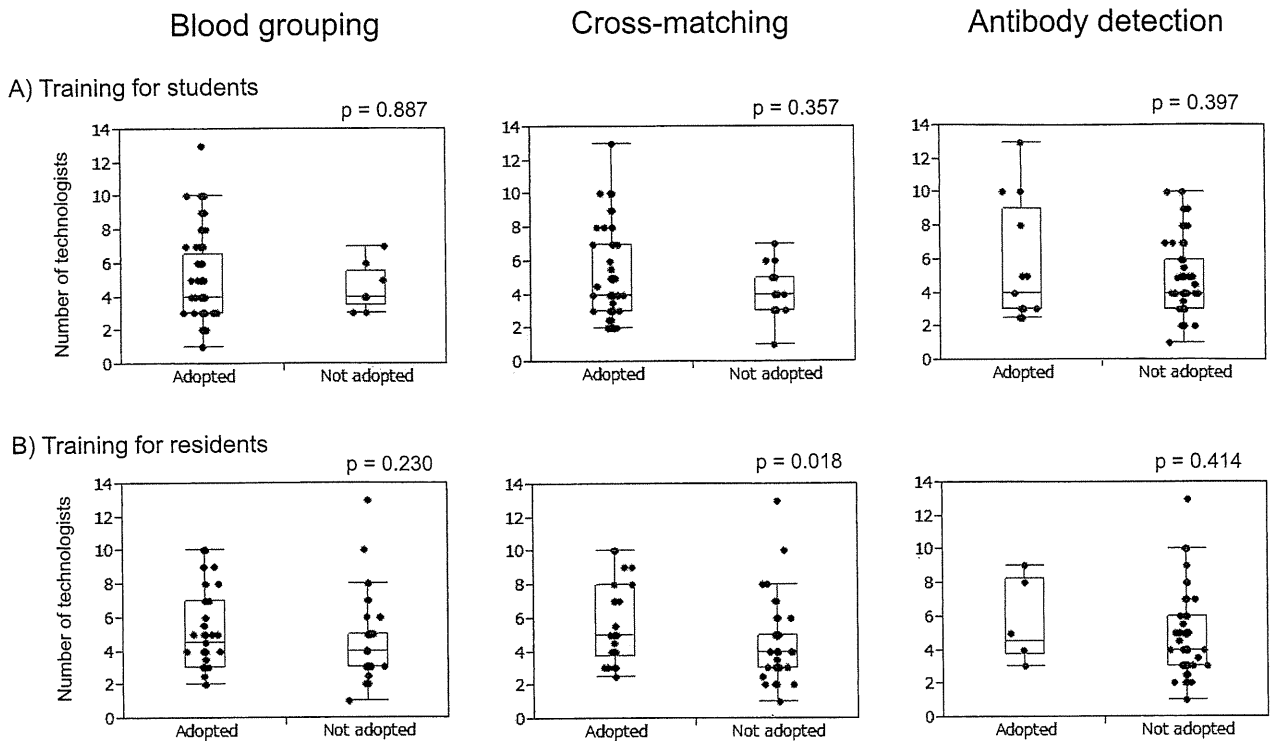


Fig. 5 Number of medical technologists in transfusion units in institutions that adopted ABO-blood grouping, cross-matching and detection of erythrocyte irregular antibodies for students (A) and residents (B). Significance was analyzed by Mann-Whitney's method using the SAS program, and is noted in each figure.

倫理問題、法制度、使用指針と多岐にわたる<sup>10)</sup>。これらは医学部の卒前、卒後教育と重複する部分も多い。輸血部門技師の卒前卒後の教育への参加は教官の不足を補うばかりか、輸血に関する専門知識を提供できる点でも意味がある。さらには安全で適正な輸血の普及にも繋がっていくであろう。本邦の大学病院数では統計学上の有意差を算出するには限界もあったが、卒後実習において、交差適合試験実施施設と未実施施設間に輸血部門技師数に有意差があることが示された。実習の充実を図るために、輸血部門技師数を確保することも今後の目標となり得る。その他、解析結果では卒前教育に比較して卒後教育に関しては施設の特性が反映され、技師の人数と卒後教育の実施程度にばらつきが認められる。施設内での初期研修医が少数であったり、研究機関としての役割も影響すると思われる。私立大学等では附属病院の業務に応じた人員配置が比較的容易である可能性も考えられる。

上述したように、本調査では多くの新事実が明らかになった。輸血医学教育は輸血部門医師を中心として現在行われている。しかしながら、輸血部門医師の定数には限界があり、教官が輸血検査実務に習熟する余裕がない。このため、技師と協同して教育にあたっているという実情が明らかとなった。限られた時間と人材の中で、輸血部門の教官と技師が協力し、輸血医学教育に取り組み、安全で適正な輸血療法を実現させて

いく必要がある。第2報では、輸血医学教育カリキュラムの達成度、講義内容、施設の重点教育項目について報告する。

謝辞：本調査研究は全国大学病院輸血部の共同研究として施行しました。研究にご協力いただいた各大学の担当者の皆さまに深謝いたします。

#### 文 献

- 1) Dorothy S, Hilary J, Deborah A, et al: Serious Hazards of Transfusion: A Decade of Hemovigilance in the UK. *Transfus Med Rev*, 20 (4): 273-282, 2006.
- 2) 倉田義之, 稲葉頌一: 輸血医学教育実態調査報告(平成9年度). *日本輸血学会誌*, 45 (5): 617-622, 1999.
- 3) National Patient Safety Agency Safer Practice Notice 14: Right patient, right blood. NPSA October 2006. <http://www.npsa.nhs.uk> (2011年8月現在).
- 4) The Blood Safety and Quality Regulations 2005. Statutory Instrument 2005 No 50. <http://www.opsi.gov.uk/si/si2005/20050050.htm> (2011年8月現在).
- 5) Jennifer D, Adrian C: Teaching transfusion in UK medical schools: a survey by the National Blood Transfusion Committee. *Med Educ*, 42 (4): 439, 2008.

- 6) Simon TL: Comprehensive curricular goals for teaching transfusion medicine. Curriculum Committee of the Transfusion Medicine Academic Award Group. *Transfusion*, 29: 438—446, 1989.
- 7) Cable RG, Thal SE, Fink A, et al: A comprehensive transfusion medicine curriculum for medical students. *Transfusion*, 35: 465—469, 1995.
- 8) 文部科学省ホームページ：モデル・コア・カリキュラムの改訂に関する連絡調整委員会. 医学教育モデル・コア・カリキュラム—教育内容ガイドライン—(平成 19 年度改訂版) [http://www.mext.go.jp/b\\_menu/shingi/chousa/koutou/033/toushin/1217987\\_1703.html](http://www.mext.go.jp/b_menu/shingi/chousa/koutou/033/toushin/1217987_1703.html) (2011 年 8 月現在).
- 9) Brecher M.E: Noninfectious complication of blood transfusion. In: American Association of Blood Banks Technical Manual, 14th ed, 2002, 585—612.
- 10) 認定輸血検査技師制度協議会カリキュラム委員会：スタンダード輸血検査テキスト 第 2 版, 2007.

## MEDICAL TECHNOLOGISTS AT UNIVERSITY HOSPITAL BLOOD TRANSFUSION DEPARTMENTS PLAY AN IMPORTANT ROLE IN EDUCATION IN TRANSFUSION MEDICINE: THE 2009 TRANSFUSION CONFERENCE OF JAPANESE UNIVERSITY HOSPITALS. SURVEILLANCE REPORT ON MEDICAL EDUCATION (1)

Harumi Fujihara<sup>1)</sup>, Hiroko Watanabe<sup>1)</sup>, Chiaki Yamada<sup>1)</sup>, Naoki Ohtomo<sup>2)</sup>, Machiko Oshida<sup>3)</sup>, Yutaka Tomoda<sup>4)</sup>, Kimiko Yurugi<sup>5)</sup>, Yasutaka Hoshi<sup>6)</sup>, Koki Takahashi<sup>7)</sup>, Taira Maekawa<sup>5)</sup>, Hitoshi Ohto<sup>8)</sup> and Akihiro Takeshita<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Transfusion and Cell Therapy, Hamamatsu University School of Medicine

<sup>2)</sup>Blood Transfusion Center, Tokyo Medical and Dental University Hospital of Medicine

<sup>3)</sup>Transfusion Unit, Osaka University

<sup>4)</sup>Clinical Laboratory and Blood Centre, Asahikawa Medical College Hospital

<sup>5)</sup>Transfusion and Cell Therapy, Kyoto University

<sup>6)</sup>Division of Transfusion Service, Tokyo Jikei University Hospital

<sup>7)</sup>Department of Transfusion Medicine and Immunohematology, the University of Tokyo Hospital

<sup>8)</sup>Blood Transfusion and Transplantation Immunology, Fukushima Medical University

### **Abstract:**

Initial education and training for medical students and residents are important to the establishment of appropriate and safe blood transfusion. Nevertheless, recent diversification in blood transfusion has enlarged routine work in transfusion units, especially in medical university hospitals. At the same time, many medical universities have limitations on the number of medical instructor positions and available class time. Therefore, many institutions cannot provide enough education time. In this study, we investigated education for blood transfusion medicine in a university hospital and the role of the clinical laboratory technologist in clinical training.

The surveys were done as part of collaboration studies for the 2009 Transfusion Conference of University Hospitals. The investigation items included training methods, content, person in charge, time, and degree of achievement. Among the 89 hospitals surveyed, responses were obtained from 70. In addition to lecture style education, small group training of medical students and residents was adopted in 63 (90%) and 37 (53%) institutions, respectively. Medical technologists played considerable roles in small group training of students and residents in 37 (59%) and 29 (78%) institutions, respectively. The small group training of students and residents included blood typing (97% and 95%, respectively), cross-matching (81% and 70%, respectively) and analysis of irregular erythrocyte antibodies (21% and 16%, respectively). The institutions adopting cross-matching for residents had significantly more technologists.

It was clear that clinical laboratory technologists in blood transfusion sections played a major role in blood transfusion studies and education. With limited time and human resources, transfusion physicians and clinical laboratory technologists have cooperated with each other and are actively working in blood transfusion medical education. The end goal is to supply safe, reasonable blood transfusion therapy to patients; however, deteriorating conditions in medical university hospitals makes achieving this ever more difficult.

### **Keywords:**

Education of transfusion medicine, Medical students, Residents, Medical technologists, Curriculum

# 再生医療に用いる生体由来物搬送容器ユニットの開発

Development of Transporting Unit for Regenerative Medicine

青山朋樹<sup>\*1</sup> 笠井泰成<sup>\*2</sup> 上田路子<sup>\*3</sup> 井沼俊明<sup>\*4</sup> 高橋 稔<sup>\*5</sup>  
海平和男<sup>\*6</sup> 山田 実<sup>\*7</sup> 戸口田淳也<sup>\*8</sup> 前川 平<sup>\*9</sup>

再生医療は大きく期待される次世代の医療技術であるが、その発展のための法整備、インフラストラクチャー完備は重要である。その一つとして最終製品である細胞、組織を安全で高品質に搬送するシステムの構築が不可欠である。本稿においては、搬送システムの基幹部である搬送容器ユニットの解説を行う。

## 1. はじめに

再生医療は病変組織を自家あるいは他家の細胞、組織を用いて新しい組織に置換することで、これまでの治療で治癒が困難であった難治性疾患に対する新しい治療法として大きな期待が寄せられている。このためには細胞あるいは組織を医薬品同等の高い品質で調製することが不可欠であり、移植も高度の医療技術で実施される必要がある。しかしながら無菌性が担保された無菌細胞調製施設 (cell processing center ; CPC) で細胞、組織の調製を行っても移植施設までの搬送技術が不十分であればその品質は保証されない。

平成 22 年 3 月 30 日に厚生労働省医政局から「医療機関における自家細胞・組織を用いた再生・細胞医療の実施について」が発表され、再生医療における留意点、技術的助言がなされた<sup>1)</sup>。この中で「搬送には、採取した細胞・組織の搬送と加工したものの搬送があるが、いずれも温度、気圧、無菌性のバリデーション、搬送時間の管理が重要である」と記されている。その他にも搬送体制、搬送担当者の教育等が記されているが、本稿においては、搬送容器の技術的な解説に焦点をおいて記す。

<sup>\*1</sup>Tomoki Aoyama 京都大学 大学院医学研究科 人間健康科学系専攻 准教授

<sup>\*2</sup>Yasunari Kasai 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

<sup>\*3</sup>Michiko Ueda 京都大学 大学院医学研究科 人間健康科学系専攻 教務補佐

<sup>\*4</sup>Toshiaki Inuma (株)日立物流 技術本部 担当部長

<sup>\*5</sup>Minoru Takahashi (株)日立プラントテクノロジー 空調システム事業本部 バイオメディカルエンジニアリング部 部長

<sup>\*6</sup>Kazuo Umihira (株)ウミヒラ 専務取締役

<sup>\*7</sup>Minoru Yamada 京都大学 大学院医学研究科 人間健康科学系専攻 助教

<sup>\*8</sup>Junya Toguchida 京都大学 再生医科学研究所 教授

<sup>\*9</sup>Taira Maekawa 京都大学 医学部附属病院 輸血細胞治療部 教授

## 2. 細胞搬送容器ユニットの開発

筆者らは、近～中距離のCPCから移植施設への細胞搬送を想定して、まず以下の初期条件が必要と考えた。

- ・無菌性保証
- ・定温維持
- ・耐気圧
- ・耐衝撃

CPC内部は清浄度が使用用途によって段階的に規定されており、最終製品である細胞をパッケージする細胞培養室のバイオハザードキャビネット内は無菌性と高い清浄度が要求される。この高い清浄空間を搬送中も維持するためにオートクレーブ滅菌が可能で、高い密封性を持つ内容器の開発を行った(写真1)。この内容器は耐気圧機能を有するものの定温維持機能は有していない。そこで日立製作所、日立物流、東京女子医科大学先端生命医科学研究所で2005年から開発が進められていた搬送容器<sup>2)</sup>を外容器として用いることを検討した。この外容器は定温維持、耐衝撃、耐気圧機能を有しており、無菌性保証に関しては検討中の課題であった。この内容器と外容器の合体は単なるお互いの技術補完だけでなく技術要素の融合により、CPCという清浄空間から一般空間を経て再び移植治療施設という清浄空間までを

結合する動線技術を作ったことになる。

そこで次に、それぞれの要素技術のバリデーション結果を記す。

## 3. 無菌性

搬送容器は、その中に細胞や組織を収納した状態で一般的な環境の中を搬送するため、輸送中に細菌などが内部に入り込まないように高い気密性と無菌性の維持が要求される。

内容器の無菌性を確認するために、内容器をオートクレーブで滅菌した後、CPCの細胞培養室に設置されたバイオハザードキャビネット内で内容器の中に寒天培地を入れ、蓋を開けてから、表1に示す環境に静置した。また、それぞれの静置場所で寒天培地を開放状態で3時間静置して落下菌検査も実施した。なお、使用した寒天培地はソイビーン・カゼイン・ダイジェスト寒天培地で、サンプリング後30℃で10日間培養した後に、コロニー数のカウントを行った(写真2、表1)。

いずれの条件下でも内容器に入れておいた培地にコロニーは確認されなかった(表1)。また、内容器に培地を入れ屋外に3日間静置した場合でも、中に入れた培地の表面はほとんど乾燥していなかった(図2)。

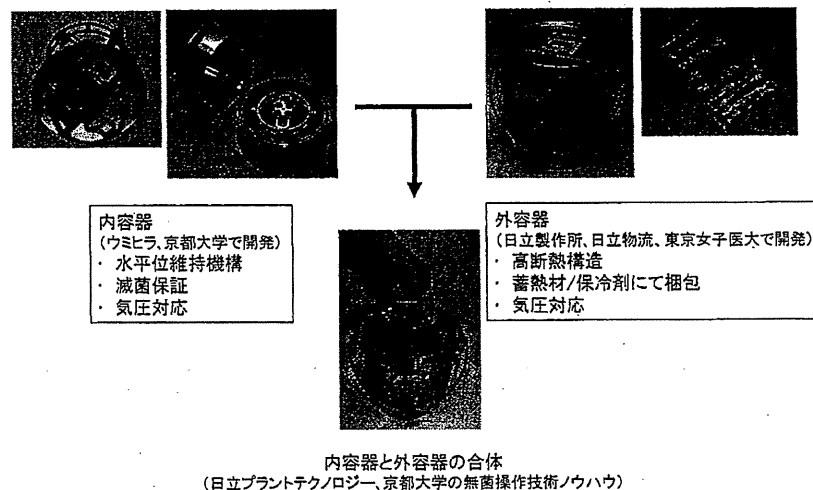


写真1 細胞搬送容器ユニットの開発

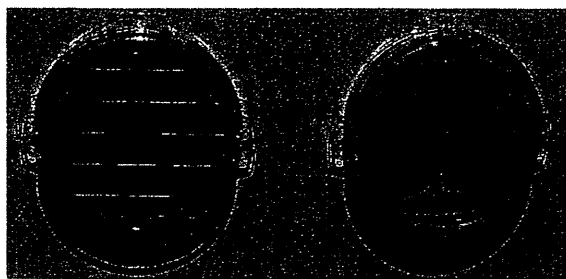


写真2 無菌性試験

左側は屋外に3時間静置した培地、右側は同じ場所で3日間内容器に入れた状態で静置した培地。それぞれ30℃で10日間培養した時の状態である。

表1 培地の静置場所と検出されたコロニー数

静置場所	内容器の内部		落下菌検査 (CFU/3h)
	(CFU)	静置時間	
屋外(建物の日陰部分)	0	3 days	22
機械室	0	24 h	2
居室(事務室)	0	24 h	2
パイプスペース	0	24 h	112
暗室	0	24 h	3

#### 4. 定温維持

周囲に基質を有していない細胞にとって、定温維持はその生存率を左右する重要な因子である。一例として間葉系幹細胞をトリプシン-エチレンジアミン四酢酸(ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA)にて培養皿から剥離し、遠心管に密封し、4℃、24℃、37℃の温度帯で6時間静置して、トリパンブルーにて染色し生細胞率を算定した(表2)。その結果、細胞の生存率は37℃で最も低い結果となった。また、それぞれの温度で静置後の細胞を再度培養皿の上に播種し、37℃、5% CO<sub>2</sub>濃度(通常の培養条件)で1晩培養し、観察を行った。その結果37℃で静置したもの(写真3c)については、4℃(同3a)、24℃(同3b)で静置したものに比べて明らかに培養皿への付着が少なく、培養液上に浮遊している細胞が多く、トリパンブルーで計測した生細胞数よりも細胞ダメージが大きいことが示された。このことから間

葉系幹細胞を培養皿から剥離した形態では、4℃もしくは24℃の定温保存が必要であることが明らかになった。

定温維持のために外容器開発には以下のような

表2 静置温度による細胞生存率

	0時間	6時間		
		4℃	20℃	37℃
生存率(%)	99.0	93.6	92.1	78.8

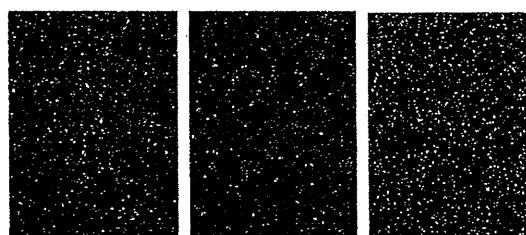


写真3 間葉系幹細胞の保存温度と生存率

a: 4℃, b: 24℃, c: 37℃で6時間静置後に再度培養皿に播種し1晩培養後の細胞。白く光って見える細胞は培養皿に付着できず浮遊している細胞。(Bar = 500 μm)

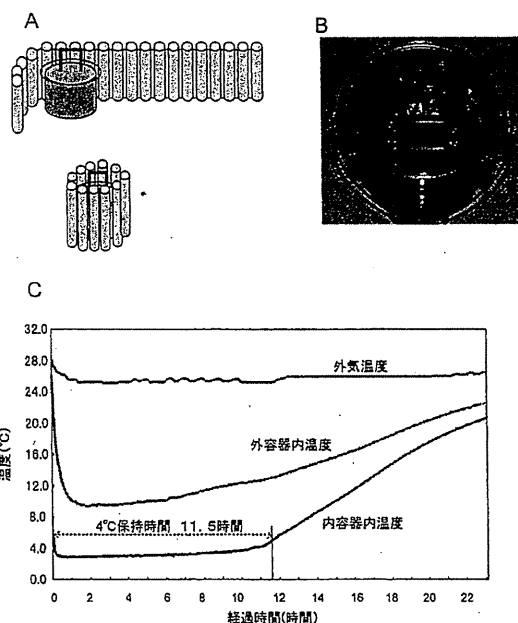


図1 定温維持機構

A: 蓄熱保冷剤による内容器の梱包  
B: 外容器の中に蓄熱保冷剤と共に設置した内容器  
C: 温度管理データ

工夫がされている。蓋つきの真空断熱金属製容器の内側に断熱材を張りめぐらし、外気による影響を最小限におさえ<sup>3)</sup>、蓄熱保冷剤(4℃に設定)により内容器周辺を覆う(図1A, B)。このことで周囲の温度変化にも関わらず、内容器の温度は4℃を11.5時間維持することが可能になった(図1C)。定温管理に蓄熱材を用いることは今回のような携行型細胞搬送容器ユニットを想定し、構築されたコンセプトである。他の定温輸送技術にはペルチェ素子を用いた方式があるが、蓄電池を必要とするため重量が大きくなること、搬送中に蓄電池切れの可能性があること、さまざまな移植施設搬送に対応するため携帯性が必要であることから蓄熱材を用いた方法が採用された<sup>2,3)</sup>。さらにこの外容器は恒温槽におさまるサイズであることから恒温槽と併用すれば、さらに長距離輸送あるいは移植施設での待機時にも定温性を維持することが可能であるという特徴も備えている。

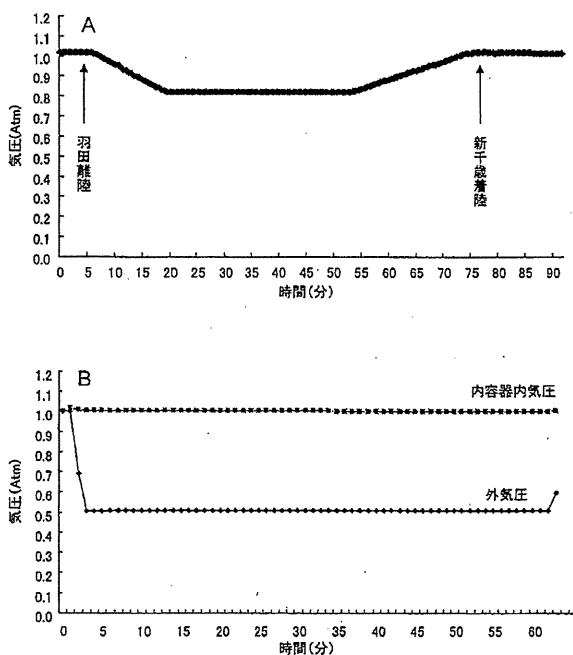


図2 耐気圧試験結果

- A: 航空機内圧の変動グラフ。データは羽田空港を離陸し、新千歳空港に着陸するまでの気圧データ。約0.8気圧まで低下する。
- B: 内容器に0.5気圧以下の減圧負荷をかけた際の容器内の測定データ。1気圧を維持している。

## 5. 耐気圧

航空機の機内に細胞入りの輸送容器を持ち込む場合や、新幹線で高速走行中にトンネルを通過する時、エレベーター乗車時など急激な気圧変化が生じた際に、基質を持たない繊細な細胞への影響を最小限にするために耐気圧対応は必要である。実際に航空機内の気圧を測定すると0.8気圧まで減圧されている(図2A)。そこで内容器に0.5気圧以下の減圧負荷をかけた際の容器内の気圧変動をデシケーターにて測定した(図2B)。その結果、容器内は常に1.0気圧を維持できており、容器の破損などは認めなかった。このことは耐気圧対応の結果であるが、同時に容器の密封性、気密性を示す結果でもある。

## 6. 耐衝撃

搬送時に細胞に加わる衝撃や振動を軽減することは重要な点である。今回の携帯用搬送ユニットは歩行しながら携行することを想定しており、この時に生じる衝撃や振動に関して簡単な分析を行った。肘関節を伸展固定して携行する場合にはほぼ体重心移動と同様の運動軌跡を描く(図3A)。このため上下、左右方向におこる振動は、定温維持のために用いている蓄熱保冷剤の持つクッション機能によって緩衝することにした(図1B)。容器固有に生じるスイング運動(図3A)に対しては内容器の中の細胞をパッケージしたチューブを固定するホルダーにジャイロ機能を搭載することで水平位維持を試みた(図3B)。外容器の外側と内容器のチューブ固定部のジャイロ部分にジャイロセンサーを装着し、スイング運動を引き起こした際の角加速度を測定した。この結果、外容器に加わるスイング運動(図3C)は内容器内のチューブ固定部では大幅に減衰されていた(図3D)。

これらは歩行時に容器におこるスイング運動に対する水平位維持対応策であり、転倒や物がぶつかるなどの大きな衝撃に対応したものではなく、細胞や出荷形態によって耐衝撃性や水平位維持の



要否などが異なるため、個々の細胞のニーズによってこれらの耐衝撃機能は検討する必要がある。また、今回の携帯型搬送容器ユニットは歩行時に携行することを想定しているため、車両に搭載する際には免振台や、固定器具など車両搬送に特化したユニットの追加が必要である。

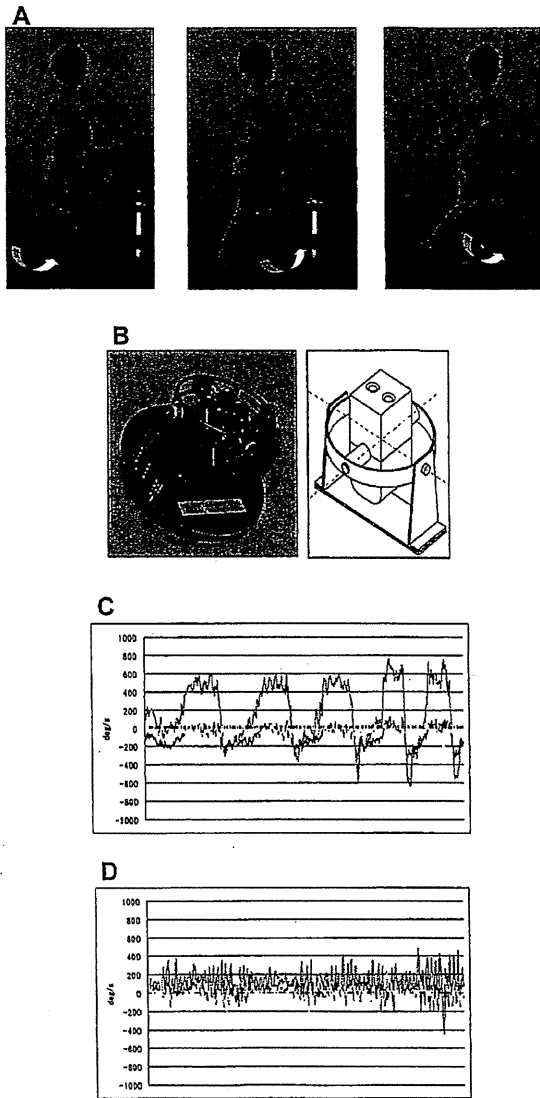


図3 耐衝撃試験結果

- A: 歩行時の搬送容器の運動軌跡。容器にはスイング運動が起こる。
- B: ジャイロ機能による水平位維持機構。
- C: スイング運動を搬送容器に加えた際の外容器の角加速度運動。
- D: スイング運動時の内容器内細胞ホルダーの角加速度運動。

## 7. 今後の検討課題

今回、搬送を想定した間葉系幹細胞は現在最も再生医療応用が進んでいる体性幹細胞のひとつである。理由としては比較的調製が容易なこと、*in vitro*の実験で様々な細胞に分化する能力が証明されていることなどがあげられ、調製過程<sup>4)</sup>や移植後の安全性<sup>5)</sup>に関する報告もされ始めている。しかしながら間葉系幹細胞はかなり繊細な側面も持ちあわせており、体外にて大量培養する過程で細胞周期調節因子である p16 遺伝子の発現亢進による増殖の停止<sup>6)</sup>や長期培養後の分化能低下<sup>7)</sup>も認められる。これらは現状の間葉系幹細胞培養過程における 20% O<sub>2</sub> 濃度での培養条件<sup>8)</sup>が影響している可能性もある。これらのことから培養条件に関する基礎的検討とあわせて、搬送条件の検討、実証実験も必要である。特に今回の搬送容器ユニットで欠けている条件として定 O<sub>2</sub> 濃度、定 CO<sub>2</sub> 濃度維持の問題については今後も取り組む必要がある。

## 8. おわりに

今回開発した搬送容器ユニットを 2009 年 11 月 10 日にニューヨークで開催された“Kyoto University Technology Show Case in New York 2009”に展示し、米国の製薬関連企業、ベンチャー企業、研究、医療機関を対象に反響を試みた。この結果、滅菌保証や、蓄熱材を用いるコンセプトに対して高い評価を得た。また国内でも多くのメディアに取り上げられ<sup>9,10)</sup>、再生医療学会やインターフェックスジャパンに展示した際には、「畜産に用いる精子卵子の搬送に用いることはできないか？」といった当初想定外のニーズもあった。この容器ユニットはあくまでひとつの細胞の搬送形態を示しただけではあるが、今回の搬送容器の開発を契機に今後も「生きたものを運ぶ」ということについてさらに議論や技術開発が進展することを期待したい。

【本容器に関する問い合わせ先】

細胞搬送容器ユニット：(株)日立物流技術本部

内容器：(株)ウミヒラ

【謝辞】本容器の開発，検証に多大なるご協力を頂いた京都大学産学連携本部に深謝する。本容器の開発は厚生労働省科学研究費，文部科学省科学研究費，文部科学省橋渡し研究支援プログラムの助成により実施された。

文 献

1) 医政発 0330 第 2 号, 平成 22 年 3 月 30 日

- 2) T. Nozaki *et al.*, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 2 (4), 190 (2008)
- 3) 大滝俊一, 週刊東洋経済, p.82 (2008)
- 4) 青山朋樹ほか, 再生医療, 9, 25 (2010)
- 5) 大串始ほか, 再生医療, 9 (3), 116 (2010)
- 6) K.R. Shibata *et al.*, *Stem Cells*, 25 (9), 2371 (2007)
- 7) 青山朋樹ほか, 間葉系幹細胞, 幹細胞の分化誘導と応用, p.55 (2009)
- 8) Y. Jin *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2391 (3), 1471 (2010)
- 9) 日本経済新聞, 2009年12月21日, 12面
- 10) 日刊工業新聞, 2009年12月21日, 15面

発行元：(株)サイエンスフォーラム／販売：(株)シーエムシー出版

# 細菌毒素ハンドブック

編集委員：櫻井純，本田武司，小熊恵二

★ 感染症の病原因子として重要な細菌毒素を初めて網羅！  
 ★ 最新知見を手軽に利用。精製法，測定法，試薬としての応用をマニュアル的に詳述した画期的バイブル！

## 【第1部 エキソトキシン】

- 概説1 細菌毒素の分類
- 概説2 細菌毒素の構造と作用
- 概説3 細菌毒素の応用
- 1 アクテノバチルス菌
- 2 炭疽菌
- 3 セレウス菌
- 4 テューリンゲンシス菌
- 5 ボツリヌス菌
- 6 テイフシル菌
- 7 ウエルシュ菌
- 8 クロストリジウム・セプチカム
- 9 クロストリジウム・スピロフォルム
- 10 クロストリジウム・ソルデリー
- 11 破傷風菌
- 12 ジフテリア菌
- 13 黄色ブドウ球菌
- 14 化膿レンサ球菌
- 15 アエロモナス・ソブリア
- 16 百日咳菌
- 17 大腸菌
- 18 ヘリコバクター・ピロリ
- 19 リステリア・モノサイトゲネス
- 20 パスツレラ・マルトシダ
- 21 ポルフィロモナス・ジンジバリス
- 22 緑膿菌
- 23 赤痢菌
- 24 ビブリオ・ブルニフィカス

- 25 コレラ菌
- 26 ナグビブリオ
- 27 ビブリオ・ミミカス
- 28 腸炎ビブリオ
- 29 エルシニア・エンテロコリチカ
- 30 エルシニア・シュードツベルクローシス

## 【第2部 エンドトキシン】

- 概説
- 1 構造
- 2 受容体
- 3 測定法
- 4 臨床
- 5 生物活性Ⅰ
- 6 生物活性Ⅱ

## 【第3部 エフェクター】

- 概説
- 1 腸管病原性大腸菌
- 2 ヘリコバクター・ピロリ
- 3 レジオネラ・ニューモフィラ
- 4 サルモネラ
- 5 赤痢菌

## 【第4部 フェロモン様因子】

- 概説
- 1 ウエルシュ菌
- 2 腸球菌

■体裁/A4判・602頁 ■発行/2002年2月 ■定価/34650円(本体33000円+税5%)

<http://www.cmcbbooks.co.jp>

シーエムシー出版ウェブサイトでは，研究開発に有用な技術書・参考書・ハンドブック・マーケット情報を多数ラインナップし，横断的に検索・注文いただけます。ぜひご利用ください。

## 細胞移植・治療

## 各種指針を順守して、健全な発展を

今年3月に骨髄バンクを介した第1例目の非血縁者間末梢血幹細胞移植(PBSCT)が実施された。第33回日本造血細胞移植学会では、同学会・日本輸血細胞治療学会・日本再生医療学会合同シンポジウム「細胞移植・細胞治療に関する国・学会の指針と基盤整備」(座長=東海大学基盤診療学系再生医療科学・加藤俊一教授、京都大学病院輸血細胞治療部・前川平教授)が行われた。PBSCTなどの先端医療技術が致死性や障害性の高い疾患の新規治療につながる事が期待される中、臨床応用を前に実施施設には安全管理、品質保証などの基盤整備が求められている。

## ～PBSC動員・採取ガイドライン～

## 年齢やアフェシス上限などに変更

九州大学病院遺伝子・細胞療法部の豊嶋崇徳准教授は、非血縁者間PBSCTの認可を契機に昨年改訂された「同種末梢血幹細胞移植のための健康人ドナーからの末梢血幹細胞動員・採取に関するガイドライン」の変更点を解説した。各施設は運用開始前に具体的な運用法を決定し、開始後はデータを集積し、結果をフィードバックしていく必要がある。

## 全国的な成績集積、フィードバックを

昨年6月、7年ぶりに行われた大幅な改訂の具体的な変更点としては、採取実施施設を従来のアフェシス30回以上の経験を有する医師の存在から血縁者間では30回以上の施設に緩和した。非血縁者間では医師の30例以上の経験(または10例以上の経験を持つ医師の下、施設で30例以上の経験)に加えて、過去1、2年の実績が加味されることとなったほか、CD34陽性細胞数を迅速に測定できる体制(非血縁間については当日に結果判明)の確立が条件に加えられた。

また、わが国の血縁者間末梢血幹細胞(PBSC)ドナーフォローアップ事業などによる安全性の点検の結果、ドナー年齢の上限が54歳から60歳に引き上げられたが、非血縁ドナーについては骨髄ドナー同様の22～55歳

が採用されたほか、これまで詳細な記載がなかった適格性について、血圧、コレステロール、血糖値などについて基準が設けられた。

PBSC採取については、アフェシスの上限が設定され(血縁300mL/kg、非血縁250mL/kg)、CD34陽性細胞の目標数も4～5×10<sup>6</sup>/kgから2×10<sup>6</sup>/kgに変更し、非血縁で目標数に足りない場合は採取を2回まで許容した。採取スタッフも非血縁では、医師の常時監視が必須となった。

以上の基準に従い昨年10月から5カ月で20施設が非血縁者間PBSCT・採取施設に認定されたが、実施施設は運用開始前に採取が土日にかかる場合の対応を含めた入院スケジュールなど具体的な運用方法を決定しておく必要がある。さらに、リスクが分散するPBSC採取では顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)投与から採取まで一貫してフォローするドナーコーディネーターを置くなどの方策も必要である。

最後に、豊嶋准教授は「非血縁者間PBSCTでは生着が早いなどのメリットがある反面、移植片対宿主病(GVHD)の懸念もある。当初は各施設が慣れた方法で前処置やGVHD予防を行うと同時に、全国的に成績を集積し、結果を速やかにフィードバックすることが肝要だ」と指摘した。

## 免疫細胞療法も各種指針順守の対象

悪性腫瘍や自己免疫疾患、炎症性疾患などの治療手段として期待される免疫細胞療法にも各種指針を順守した品質管理・安全確保体制が求められている。東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野の森尾友宏准教授は、兼務する同大学病院細胞治療センター長としての経験から、主に文書体系構築を支援するシステムや、品質管理を共有できるようなシステムが必要との見解を示した。

## 文書体系や品質管理の支援システムが必要

免疫細胞治療に用いられる樹状

細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、NKT細胞、抗原特異的T細胞、抑制性T細胞などのうち、間葉系幹細胞以外は「幹細胞」ではないが、幹細胞由来か否かにかかわらず「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」を参照することが基本である。さらに、基礎研究から治験に至るまで、同指針をはじめとした各種指針を順守し、実施体制についても「医療機関における自家細胞・組織を用いた再生・細胞医療の実施について」(再生医療における制度的枠組み検討会)に留意して行っていく必要がある。

各種指針で定められている品質管

理・安全確保体制は、①セルプロセスセンター(CPC)：交叉汚染防止対策など設備の衛生、維持、点検②管理体制・人員：製造管理責任者と品質管理責任者を分けるなど③文書体系：標準作業手順書(SOP)など④品質保証・安全管理：微生物の検出や細胞変異のチェッカーであり、これらの条件を満たすために各施設での体制整備が重要となる。

森尾准教授は、各種指針を順守した免疫細胞治療を行うために求められている施設基準、組織構成・作業人員、文書体系、品質保証・管理、臨床研究、情報公開などの要素のうち特に困難な点として、文書体系と品質保証・管理を挙げた。例えば品

## わが国初の細胞処理・管理ガイドラインが策定

造血細胞移植はわが国では既に確立した治療法であるにもかかわらず、これまで細胞処理・管理に関するガイドラインは存在しなかった。国立がん研究センター中央病院臨床検査科の田野崎隆二副科長は、同学会と日本輸血・細胞治療学会の共同指針として昨年初めて策定された「院内における血液細胞処理のための指針」を紹介。安全で高い品質を確保するためにも普及・周知し、適宜見直しを加えて、将来的にグローバルな指針にしていくことが重要であるとした。

## 学会として検査・処理の推奨案提示を

「院内における血液細胞処理のための指針」は、血液細胞製剤の製造工程において安全で高い品質を確保し、問題が認められた場合には原因などの遡及調査を可能にすることを目的とするが、本来は造血細胞移植導入時点から必要なものだった、と田野崎副科長は指摘した。

同指針は、造血幹細胞移植に関連して院内で実施される細胞採取・処理・凍結保管と、それを実施する全施設を対象(臨床研究での細胞処理は対象外)にしている。策定に当

り品質管理や安全性検証システムを定型的なシステムで運用すると、その整備だけで費用がかさむため、同センターでは微量測定、高感度、多項目、迅速、低価格を兼ね備えた測定法の開発を目指しているという。

以上をまとめて、同准教授は「免疫細胞療法を今後わが国で汎用化していくためにも、各施設は指針を順守し、文書体系構築を支援するシステム、単施設では困難な品質管理システムを共有できる体制を構築する必要がある。また、施設認定や加工者に求められる知識、細胞別の加工・管理法、搬送基準、再生・細胞医療のEBMづくりなど、関連学会に求められる役割も大きい」と述べた。

たつては国際規格であるFACT-JACIE基準を参考にし、既に実地臨床として確立している治療に支障を来さないように調整した。費用や人員、建造物などについては最小限とし、標準作業手順書(SOP)、記録および保存、整備・管理・維持の方法、責任体制の明確化など、対応しやすい点を重視するよう心がけられている。

また、細胞処理、払い出し、保存と解凍、検体保存、投与、破棄などの具体的な項目とは別に、「付」として代表的な細胞処理法を取り上げ、手順などを解説。SOPや記録シートのサンプルを提示し、記録書などが整備されていない施設が使用しやすいように工夫されている。

最後に同副科長は、今後の課題として①施設認定制度に組み込むなど、指針を普及・周知させ、定期的に見直し・更新ができるようにする②検査法や細胞処理法の学会推奨案を提示し、標準化を図る③産官学連携による研究開発の推進④医師・技師に対する教育の推進(認定証や技術講習会)⑤FACT-JACIEなどと連携し、将来的には同等レベルにする一を挙げた。

## 臨床研究から治験への流れをスムーズに

大阪大学大学院心臓血管外科の澤芳樹教授は、日本再生医療学会の立場から、医療機関同士の細胞の共通利用や未承認医療機器などの臨床研究での使用など、最近の規制緩和を評価した一方で、今後は審査体制の質量両面の強化が必要との見解を示した。新しい医療技術を広く国民の元に届けるためには、臨床研究から治験の流れをスムーズにしてい

くことが肝要となる。

## 最近の規制緩和を評価

わが国の再生医療関連技術は卓越しており、国際的にも特許出願件数は多い。一方、現在承認されている再生医療製品は1つ(培養皮膚)だけにとどまっているのは、薬事法が基礎・臨床研究の成果を臨床試験、

## 第33回日本造血細胞移植学会

前ページから続く

治験に結び付けることを困難にしているためであり、開発を促進する体制整備が必須だ、と澤教授は指摘した。

こうした中、以前に比べてわが国にも再生医療臨床試験施設が増え、複数のプロジェクトが進行、計画されている。同大学病院にも未来に向けた新規治療法を開発し、日常医療に定着、医療産業化の推進を目指す施設として、2002年に未来医療センターが設立された。同教授は、CPCの運用時に苦労した点は①汚染防止対策②品質保証システムの構築③人為的ミスの防止—という「医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準(GMP)」の3大要件だったと述べ、運用経費の問題とともに、施設基準や人員基準などについて検討していく必要性を訴えた。

また、日本再生医療学会では従来、日本発の先端医療技術開発研究の成果を国民に還元するために、規制一辺倒ではなく、技術を育成する視点を持った規制緩和を訴えてきた。最近ではヒト幹細胞臨床研究に関する指針改正などで、医療機関同士の培養細胞の共通利用や、未承認医療機器/再生医療製品の臨床研究利用、

ヒト胚性幹(ES)細胞・ヒト人工多能性幹(iPS)細胞の臨床試験の可能性、確認申請の廃止などの規制緩和が見られるようになった。しかし、引き続き細胞治療・再生医療の法制度・整備の在り方を検討していく必要性を求めた。

一方、今後の課題としては①審査のあらゆるステージでの専門家の関

### 適正な実施・推進のために 改正指針の順守を

昨年11月、厚生労働省の告示である「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」(ヒト幹指針)が改正された。同省医政局研究開発振興課ヒト幹細胞臨床研究対策専門官の田邊裕貴氏は、改正の経緯と概要を紹介。ヒト幹細胞臨床研究が適正に実施・推進されるためにも指針の順守を求め、指針に該当する新規性のある研究かどうか判断に迷う場合には担当課に確認するよう呼びかけた。

#### 新規性の判断など担当課に確認

2006年に、将来有用な医療につながる可能性があるヒト幹細胞臨床研究の適正な実施・推進のため、専門委員会による4年間の検討の後に旧

与②審査期間の限定③審査内容のオーバースペック防止—など、審査体制の確立が急務である。学会としても疾患ごとに品質・安全性・有効性に求められる水準の作成や、審査側への情報・人材提供、各領域の治療効果に関するデータベースの構築など、EBM確立に努力していくことが重要だと指摘した。

指針が策定された。その後、ES細胞やiPS細胞などが開発されたことで、2009年から「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針の見直しに関する専門委員会」を12回、パブリックコメントの募集、厚生科学審議会科学技術部会の2回の審議を経て、昨年11月改正指針が告示、施行された。

改正ヒト幹指針では、その適応範囲を「病気がけがで失われた臓器や組織の再生を目的とし、ヒト幹細胞等を人の体内に移植又は投与する臨床研究」と明記。対象となるヒト幹細胞などを、①ヒト幹細胞およびこれを豊富に含む細胞集団(全骨髄細胞、G-CSF動員末梢血幹細胞、臍帯血な

ど)②③を調製して得られた細胞および血球③ヒト分化細胞を調製して得られた細胞および血球—と記載している。さらに、ヒトES細胞、ヒトiPS細胞も対象とし、新たなヒト幹細胞技術を用いた臨床研究にも対応するものとした。

また、調製機関については「調製されるヒト幹細胞調製品の特徴に並び、ヒト幹細胞等の生存能力を保ちつつ無菌的に調製できる構造及び設備を有している」と具体的に記し、取り違えへの配慮や研究者の教育・訓練の必要性にも言及。情報公開の義務付けや、万一の健康被害時の補償についても記述を加えた。

なお、具体的な申請・審査の流れは、研究責任者が実験計画書(安全対策や人権保護についても記入)および添付資料(使用するヒト幹細胞の品質や内外の研究状況など)を作成し、当該研究機関の長は、倫理審査委員会の了承を得た後に、厚生労働大臣に申請する。

以上をまとめて、田邊氏は「新規の医療技術を用いて臨床研究を行う場合は技術的なリスクを事前に検討すること。新規性の判断など不明な点は担当課に相談してほしい」と述べた。

### ～非血縁CB再移植～

## HSCT後AML/MDS再発の治療に有用

同種造血幹細胞移植(HSCT)後に再発した急性骨髄性白血病(AML)/骨髄異形成症候群(MDS)は極めて予後不良であることが知られている。虎の門病院(東京都)血液内科の田結庄彰氏は、同学会のワークショップ「臍帯血」(座長=兵庫医科大学病院輸血部・甲斐俊朗教授、東京大学医学研究所分子療法分野・高橋聡准教授)で、非血縁臍帯血(CB)を用いた再移植は、移植後再発し、非寛解状態のAML/MDS症例に対しても長期生存が期待できる治療法だと紹介した。

#### 非寛解状態でも長期生存に期待

田結庄氏は今回、HSCT後に再発したAML/MDSに対して、CBを用いた再移植を施行した34例を後方視的に解析した結果を報告した。対象はde novo AML 19例とMDS overt AML 15例。年齢中央値は54歳(18～69歳)。再移植時の病期は全例が非寛解の症例だった。

同氏は全例に対して、フルダラビンとアルキル化剤による前処置を行ったほか、10例に対しては2～8 Gyの全身照射(TBI)を加えた後、CBを用いた再移植を行った。

その結果、移植後28日までの早期死亡例を除く25例中22例で生着を確認。生着不全の3例中2例は再発拒絶。全体の2年生存率は15%、非再

発死亡率は32%、再発死亡率は52%だった。

生存率に寄与する因子について単変量解析を行ったところ、2年生存率は初回移植から100日以降に再発した症例(20%)が100日未満で再発した症例(8%)よりも有意(P=0.02)に高かった。初回移植と再移植の期

### ～移植後再発例へのCB移植～

## 速やかな施行で長期生存が可能

CBは非寛解例や同種移植後再発など緊急性を要する移植の代替ドナーソースとして期待が高い。長野赤十字病院血液内科の住昌彦副部長は、予後不良と推測される症例でも染色体標準リスクの症例であれば速やかなCB移植の施行と免疫抑制薬の減量で長期生存が期待できることを明らかにした。

#### 免疫抑制薬減量でGVL効果を誘導

同科では同種移植後再発を含む非寛解期急性白血病/高リスクMDSに対して、全身状態の良いうちに可及的速やかにCB移植を行っている。住副部長は今回、2003年7月～10年6月に同方針に基づき、非寛解期でCB移植を行った24例について後方視的に検討を加えた。

対象の年齢中央値は49歳(19～66歳)。原疾患はAML 17例、急性リン

間が180日未満の症例で2年生存率は認められなかったのに対して、180日以上で2年生存率は27%と有意に良好な成績が得られた(P=0.03)。

以上の成績をまとめて、同氏は「HSCT後に再発したAMLは極めて予後不良なことで知られるが、非血縁CBを用いた再移植によって、移植後再発し非寛解状態のAML/MDS症例でも長期生存が期待できる可能性がある」と報告した。

パ性白血病(ALL)4例、芽球増加性不応性貧血(RAEB)2が3例で、病期は再発17例、初回寛解導入不能2例、無治療5例。同種移植歴の有無は各12例。移植CBの有核細胞数(NCC)の中央値は $2.45 \times 10^7/\text{kg}$ ( $1.92 \sim 3.70 \times 10^7/\text{kg}$ )だった。

CB移植の適応決定から移植日までの期間は中央値41.5日(21～98日)で、移植片対宿主病(GVHD)予防のための免疫抑制薬は、graft versus leukemia(GVL)効果誘導のため血中濃度を低めに調整している(タクロリムス $10 \sim 12\text{ng/mL}$ )。

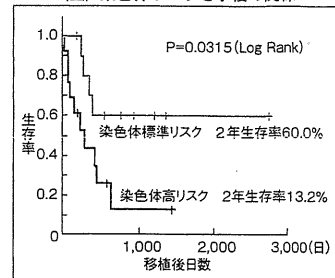
その結果、移植後に肝中心静脈閉塞症(VOD)で早期死亡した1例と生着不全(拒絶)2例を除く、21例で生着が認められ(好中球 $>500/\mu\text{L}$ までの中央値30日)、拒絶2例についてもCB再移植により生着が確認できた。非再発死亡(NRM)はVOD1例のほ

か、アデノウイルス感染が2例認められた。また、GVHDはグレードII～IVの急性GVHDを23例中15例(65.2%)、extensive typeの慢性GVHDが20例中12例(60.0%)で認められ、再発率は6カ月28.3%、2年58.8%だった。

観察期間の中央値は847.5日(163～1,442日)で、24例中10例が生着。生存率は6カ月79.2%、2年35.9%。予後に寄与する因子の解析の結果、染色体標準リスク群では長期生存が期待できるほか(図)、慢性GVHD合併例および移植ドナーソースが宿主対移植片(HVG)、移植片対宿主(GVH)方向ともに1座不一致例の予後が良好な傾向が見られた。

以上から、同副部長は「同種移植後再発など予後不良と推測される場合でも速やかにCB移植を行い、免疫抑制を低めに設定することが有効な症例がある。一方で、今後は染色体高リスク群に対する前処置の工夫などの治療戦略をさらに検討していく必要がある」と報告した。

(図) 染色体リスクと予後の関係



(住昌彦氏提供)