

胞を用いた骨再生治療」における①に相当する細胞調製過程に関する安全性の確認に関して述べた。②に相当する試験全体の安全性、有効性(第I-II相試験)については最終症例の移植手術後2年における最終効果判定が終了(平成23年5月末予定)した時点で解析し、判定を行う。③については本臨床試験結果の考察、さらには多施設での検討が必要である。これらの項目を1つ1つ慎重に検証していくことが、臨床試験から医療へと進めていくために重要な行程であると考えている。

謝 辞

臨床試験を遂行するにおいて、多大なる協力をいただいた探索医療センターをはじめとする医学部附属病院の関連部署の方々、および独立モニタリング委員会の委員の方々に深謝する。本臨床試験は京都大学医学部附属病院負担患者経費、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、および新エネルギー産業技術研究開発機構プロジェクトからの助成により実施された。

●文 献

- 1) Caterson EJ, Nesti LJ, Danielson KG, et al: Human marrow-derived mesenchymal progenitor cells: isolation, culture expansion, and analysis of differentiation. *Mol Biotechnol* 20: 245-256, 2002
- 2) 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(平成20年7月9日 薬食発第0709002号)
- 3) 薬局等構造設備規則(平成17年6月1日 厚生労働省令第101号)
- 4) 間葉系幹細胞p16遺伝子メチル化の解析方法 標準報告書 発行手続き中

細胞解析チップ～生体内のがん細胞の挙動研究を目指して

務 中 達 也¹ 叶 井 正 樹¹ 木 村 晋 也³ 芦 原 英 司⁴ 阿 部 浩 久²
 庄 子 習 一⁵ 前 川 平⁴

要 旨

著者らは μ TASに基づく細胞機能解析チップ（細胞チップ）を開発してきた。このチップの培養室の容積は240 nLときわめて小さいため、培養室中の溶液の見かけ上の粘性が上昇し、対流や攪拌の影響を受けない実験が可能である。また、微細加工技術により作製された μ インジェクタを利用し、数nLの液性因子を再現性良く注入できる。

本稿では、がん細胞の挙動を明らかにすることを目指し、細胞チップを用いた細胞間相互作用の研究を紹介する。まず、微小培養室中で浮遊性・接着性の株細胞・初代培養細胞が培養可能であることを示した。さらに、 μ インジェクタを用いて液性因子を注入し、点源から拡散に支配され拡がることを確認した。その後、免疫担当細胞である $\gamma\delta$ T細胞ががん細胞に誘引されることによりがん細胞からの液性因子の分泌を模擬できることを確認した。

これらの結果により、著者らは、がん細胞の遊走や浸潤などの挙動研究に対して、細胞チップを用いた新しいアプローチを提案する。がんの根治を目指した基礎研究や創薬分野において、有用なツールとなると期待される。

1. はじめに

分析化学の分野では、 μ TAS (micro total analysis systems) と呼ばれる、半導体製造技術を応用して、化学・生化学分析システムをチップ上に構築する研究が活発に行われている^{1)~3)}。島津製作所でも、 μ TASの研究開発を実施しており、一部を製品として販売してきた^{4)~6)}。これまで著者らは、 μ TASの応用として、きわめて小さな培養室 (240 nL) と、数nLの液体を定量的に導入できる μ インジェクタを併せ持つ細胞機能解析チップ（細胞チップ）の開発に取り組んできた^{7)~12)}。細胞チップのコンセプトは、少数の細胞を微小環境で安定に培養し、液性因子によって刺激し、応答をリアルタイムに観測することである（図1）。これを利用して、細胞の機能、あるいは機能の一部を工学的に模擬・再現し、細胞の周囲の微小環境を in

vitro で再現すれば、細胞間や細胞と環境との相互作用の解明に有用となると考えた。例えば、 μ インジェクタによる微量 (数nL) な液体の導入は、サイトカインに代表される液性シグナル伝達物質の細胞からの分泌を、工学的に模擬・再現していると考えられる。実際の生体内では、様々な距離や様態をもつ細胞間相互作用が知られているが、これはパラクラインと呼ばれる近傍細胞間の液性因子によるシグナル伝達の模擬・再現となる。従来の実験方法では、シャーレの培地に液性因子を添加して、培養細胞の反応を

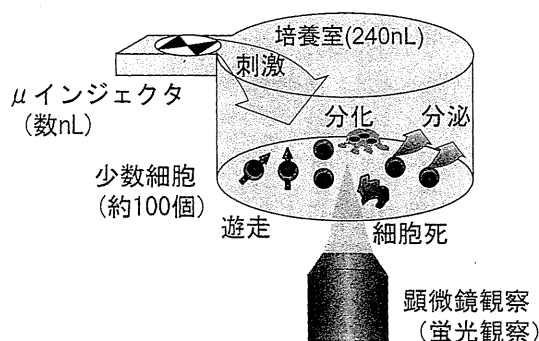


図1 細胞チップの概念図
 Conceptual diagram of cellular analysis device

原稿受理 2010年1月18日

¹ 基盤技術研究所 マイクロTASユニット 博士 (工学)

² 基盤技術研究所 マイクロTASユニット

³ 京都大学医学部附属病院 医学博士 (現在: 佐賀大学医学部)

⁴ 京都大学医学部附属病院 医学博士

⁵ 早稲田大学 工学博士

観察し検討しているが、このようなマクロの実験系では、ピペットなどの実験器具は数 mm の位置精度でしかなく、また $1 \mu\text{L}$ の添加は不可能で、微量な液性因子の細胞への影響を観察することはできない。これと比較して、 μ インジェクタは小さな点から放出された液性因子の拡散を再現できる。また細胞からの液性因子の放出量は $\text{pL} \sim \text{nL}$ オーダであることから、細胞チップは細胞からの分泌現象を忠実に模擬し、チャンバ内の細胞を観察することで細胞から分泌された液性因子による近傍の細胞の挙動を観察できると考えられる。

著者らは、細胞チップの応用として、がん細胞の挙動解析のためのがん細胞の分泌と細胞外環境の模擬を試み、細胞の挙動として細胞遊走を観測した。遊走は、細胞が何らかの化学物質による刺激を受けて、濃度勾配に制御された方向性を持って運動する現象であり、生体内の様々な器官や形態の構成、炎症、さらにはがんの浸潤・転移等に関連があると言われている。チップ内で細胞培養が可能であることを確認後、がん細胞からの液性因子の分泌を μ インジェクタからの微量注入により模擬し、チャンバ内の細胞が作用を受けて反応することを確認した。

2. 細胞チップの構成と動作

細胞チップの構成・作製プロセス・動作について簡単に説明する。詳細は、文献⁹⁾を参照されたい。図2の(a)に作製した細胞チップの概念図を、図2の(b)にその写真を示す。シリコン基板に直径1 mm 深さ0.3 mm の円柱状の貫通穴を形成した後、上部を poly(dimethylsiloxane) (PDMS) と、下部はパイレックスガラスと接合することにより、240 nL の微小培養室を作製した。細胞は、懸濁液にして導入口を通して培養室に導入した。図2の(c)に、 μ バルブ動作による溶液のインジェクション方法を示す。3ポートバルブとなっている μ バルブを、圧縮空気で作動することにより、使用直前にパージ操作を行い、新鮮な試薬で流路を満たす。試薬の送液は、シリンジポンプを用い一定流速でなされる。このとき、3ポートバルブを一定時間培養室へと切り替えることで、数 nL 精度で試薬を送り込むことが可能となる。叶井らの稿⁹⁾のごとく、蛍光試薬であるローダミン B を用いた可視化実験により、 μ インジェクタを用いたサンプルインジェクションは、対流などに影響を受けて乱されることなく、培養室内に点源から拡散することが確認されている。

3. 微小空間での細胞培養

チップ中での細胞機能の解析は、細胞培養が正常であることが前提となる。そこで、細胞チップにおいて培養を行

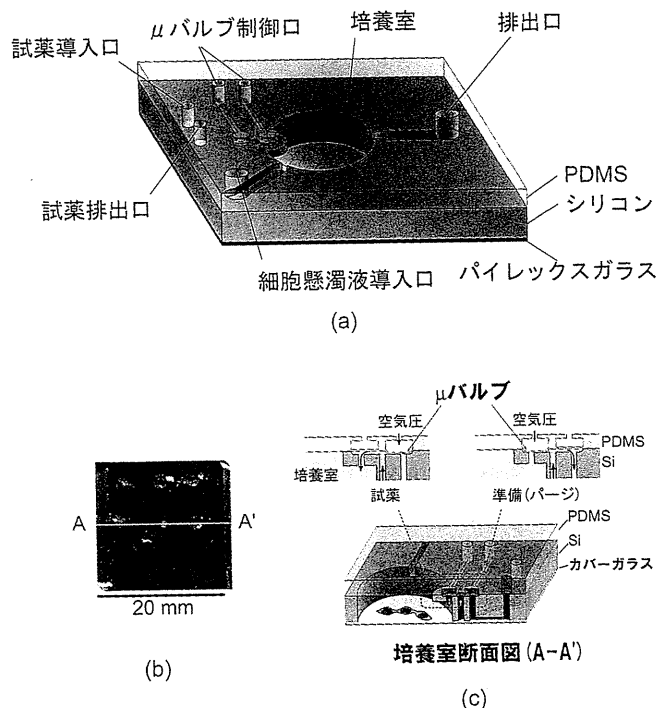


図2 細胞チップの構成と動作方法の概念図

- (a): 細胞チップの概念図
(b): 細胞チップの写真
(c): μ インジェクタの動作方法概念図

Cellular analysis device and micro sample injector

- (a): Schematic diagram of cellular analysis device
(b): Photograph of cellular analysis device
(c): Schematic diagram of the stimulus injection using a dual pneumatic microvalve

い、細胞の性状を確認した。培養は、炭酸ガスインキュベータ (37°C , $5\% \text{CO}_2$, 水蒸気 100% 飽和) を用いて行った。ガス成分は PDMS を十分な速度で透過でき、チップ内の培地はインキュベータ内の環境と速やかに平衡状態に達する。細胞の種類に応じ適切な頻度で培地交換を行った (2~4 日に 1 回)。培地交換には、細胞チップの導入口の上に新しい培地を滴下することで水頭差を作り、ゆるやかな液の流れを利用した。浮遊性細胞であるマウスハイブリドーマ細胞株やヒト単核球の初代培養が可能なることをすでに報告している^{9), 11)}。また、接着細胞の場合には、コラーゲンで培養室底面をコートすることで、ラット肥満細胞^{7), 10)}、種々のがん細胞株の培養 (未報告)、およびヒト血管内皮細胞の初代培養にも成功している。

今回はヌードマウス皮下で増殖させた腫瘍細胞の培養例を示す。これは、手術により摘出された組織、または生検組織から分離・採取した少数の細胞を用いた検討に応用することを目的としている。ヒト非小細胞肺癌細胞株である H358 細胞 (5×10^7 個 / mL) を、ヌードマウス (BALB/cA Jcl-nu/nu 5 週齢 雄) の大腿部外側に $100 \mu\text{L}$ ずつ皮下移植したところ、移植した細胞は 2-4 週間で 2-5 mm

程度の腫瘍を形成した。この腫瘍を採取し、剪刀にてミン
スし、0.05%トリプシン/EDTA溶液処理にて分散させ
て細胞浮遊液を作製した。細胞をチップに導入し、5日間
培養した写真を図3に示す。細胞生存率を確かめるため
に、生細胞をCalcein-AM（発光波長：515 nm）で染色
した結果、細胞生存率は約88%であった（図4）。以上
のことから、細胞チップを用いることで少量の組織から採
取した細胞の培養が可能であることが示された。

4. μ インジェクタによる液性因子の注入

著者らはこれまでに、チップ中で培養した細胞（ラット

肥満細胞）が、 μ インジェクタから注入された刺激物質
（compound 48/80）に対して反応し、細胞質内顆粒を放
出することを確認している¹⁰。これは、チップ内の培養細
胞が正常な刺激応答可能な生理的環境下にあることを示し
ている。また、注入した刺激物質は対流で乱されることな
く拡がり、順次、顆粒を放出していくことも示している¹⁰。

今回はがん細胞からの液性因子の分泌を、 μ インジェク
タによる因子の注入により模擬する。代表的な液性因子で
あるサイトカインの分子量は数万である。液性因子の拡散
の経時変化を観測する目的で、分子量約5万の蛍光物質
（Alexa Fluor[®] 430標識 Annexin V）を24 nL注入した結
果を図5に示す。タンパク質の拡散速度から試算した予

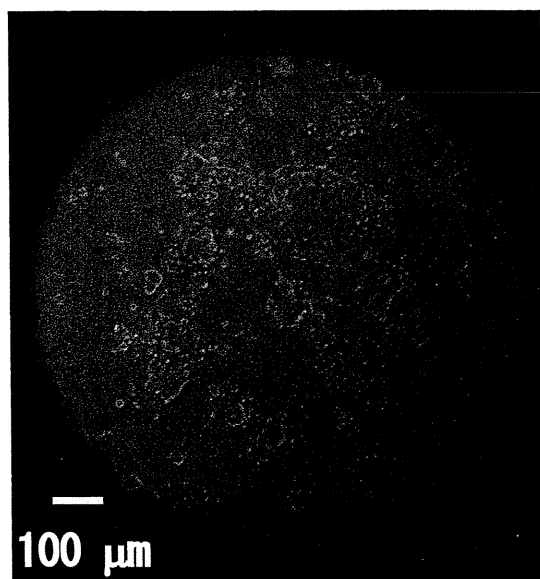


図3 細胞チップ中におけるヒト非小細胞肺癌細胞株
H358の培養
Cultured human non-small cell lung cancer cell line H358
cells (5 days after seeded in the microchamber)

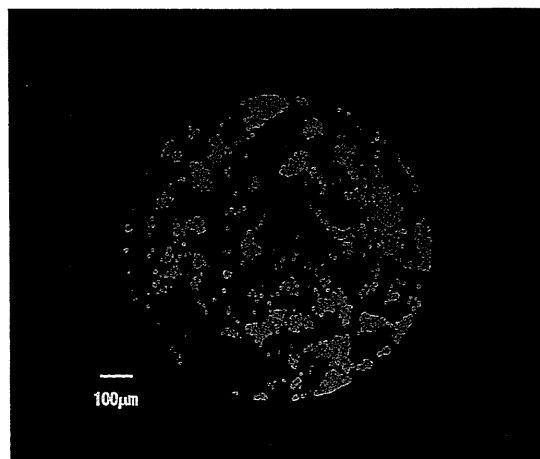


図4 細胞チップ中における H358の生細胞染色結果
Alive H358 cells (stained with Calcein AM dye) in the mi-
crochamber (cultivated for 5 days)

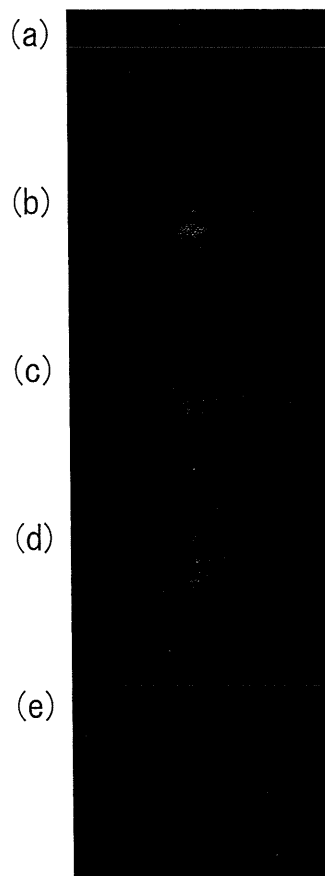


図5 チップ中における誘引物質に
見立てた蛍光剤の拡散
(a) : 導入前
(b) : 導入時
(c) : 24秒後
(d) : 54秒後
(e) : 30分後

Time-lapse images of the fluorescent
dye solution (24 nL) (regarded as hu-
moral factor) diffusing in the device
(a): Before injection
(b): At the time of injection
(c): 24 sec after injection
(d): 54 sec after injection
(e): 30 min after injection

想の通り、30分程度の時間をかけて均一化される様子が観測できた。この微小な空間では、対流などによる攪拌の影響はみられず、拡散のみによって濃度が変化していることが示された。

5. 細胞間相互作用の測定

5.1 血管内皮細胞の遊走

細胞間相互作用として、まず血管新生を模範し検討した。生物の成長の過程において、組織内では血管が新生され、血液を介して栄養の供給と老廃物の除去が行われているが、正常な成長過程だけでなく、がん組織においても盛んに血管が新生され、がんの生長を促している。がん細胞は stromal cell derived factor 1 (SDF-1) や vascular endothelial growth factor (VEGF) などの様々な情報伝達物質を分泌し、血管内皮細胞をがん組織内部へと引きこみ血管新生をもたらす。そのメカニズムの研究が血管新生抑制によるがん治療の開発のため、多くの研究者により行われている。

著者らは μ インジェクタを用いて SDF-1 α をチップ内に導入し、ヒト臍帯血管内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells: HUVEC) の挙動を観察した。HUVEC は主に血管新生の研究に使用されている正常細胞であり、浸潤、遊走能を有することが報告されている¹³⁾。まず微小培養室底面を Type I コラーゲンでコートした細胞チップを用意した。顕微鏡ステージ上の培養チャンバを細胞培養に用いるインキュベータと同じ環境 (37 °C, 5 %CO₂, 水蒸気100 %飽和) にし、その中に細胞チップを設置した。チップの培養室に HUVEC を播種し、1 h 以上静置して接着させたのち、この培養室に、200 nM SDF-1 α / 培地 (血清、増殖因子なし) を μ インジェクタから24 nL 導入

し、HUVEC 細胞塊の挙動を位相差顕微鏡でタイムラプス撮影した。図 6 の (a) に SDF-1 α 導入直後、(b) に導入後 1 h, (c) に導入後 2 h の HUVEC 細胞塊の様子を示す。図の白線で囲んだ領域に示すように、チップ中で培養した HUVEC の細胞塊が、分泌細胞と見立てた SDF-1 α の導入口に対して遊走する現象が観察された。

5.2 $\gamma\delta$ T 細胞の遊走

次に著者らは、 μ インジェクタの注入口をがん細胞表面と見立て、免疫担当細胞である $\gamma\delta$ T 細胞の挙動を観察した。京大病院の研究グループは、がんに対する免疫細胞療法の確立を目指して、 $\gamma\delta$ T 細胞の研究を行ってきた。 $\gamma\delta$ T 細胞は主要組織適合性抗原 (major histocompatibility complex: MHC) に拘束されずに抗腫瘍効果を発揮し、細胞療法に有効な免疫担当細胞として注目されている。この研究の中で、一部の $\gamma\delta$ T 細胞が培地の流れに逆らい遊走し、がん細胞を攻撃する様子を発見した^{14),15)}。この現象は、図 7 の (a) に示すようにがん細胞から放出された液性因子を $\gamma\delta$ T 細胞が認識し、方向を定めてがん細胞を攻撃するために遊走したと推察している。そこで著者らは図 7 の (b) に示すように、がん細胞による誘引物質の分泌をチップの μ インジェクタによる微量注入で模擬し、液性因子の効果を観察した。骨髄腫細胞株 RPMI 8226細胞の培養上清を24 nL 注入し、培養室内の $\gamma\delta$ T 細胞の動きを位相差顕微鏡でタイムラプス撮影した。図 8 の (a) に、培養上清注入前の $\gamma\delta$ T 細胞の位相差像を示す (培養室中にある白い輝点が細胞)。図 8 の (b), (c) では、画像処理により、細胞の軌跡を表示した ((b) は培養上清注入後10分間, (c) は30分間の細胞遊走軌跡)。対照実験としては、新鮮な培地を24 nL 注入した。この時の培養上清注入前の $\gamma\delta$ T 細胞の位相差像を図 8 の (d) に、注入後30

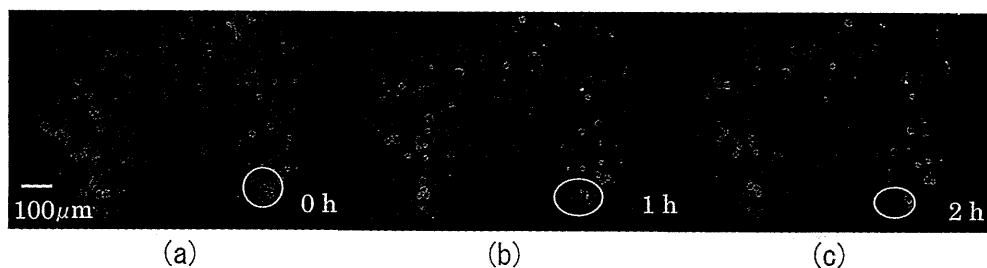


図6 ヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC の SDF-1 α に対する遊走
(a) : 導入直後の位相差像
(b) : 1h 後
(c) : 2h 後

Time-lapse images of the human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) (24 nL) migrating to the stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α) (regarded as secreting cell)
(a): Immediately after injection
(b): 1 hr after injection
(c): 2 hr after injection

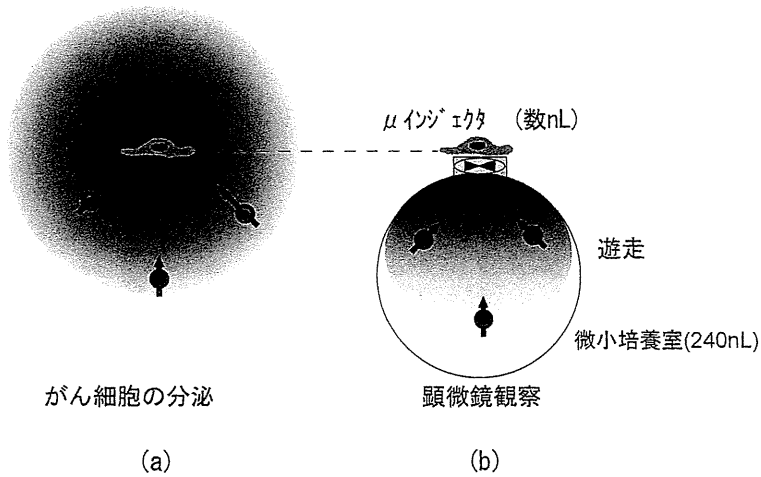


図7 μインジェクタによるがん細胞の分泌の模擬の概念図

(a) : がん細胞の分泌の概念図

(b) : μインジェクタによる分泌の模擬の概念図

Conceptual diagrams of mimic cancer cell secretion by use of the micro injector

(a): $\gamma\delta$ T cells recognize humoral factors released from cancer cells and migrate to attack the cancer cells.

(b): Mimic secretion by use of the micro sample injector.

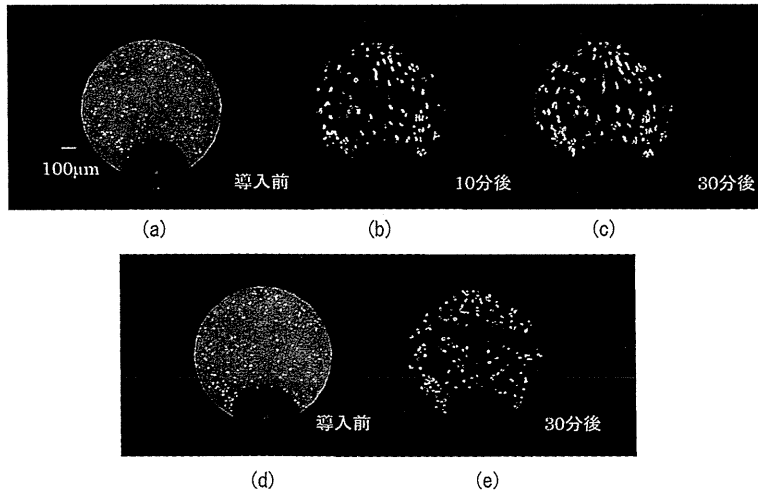


図8 ヒト骨髄腫細胞株 RPMI 8226の培養上清に対する $\gamma\delta$ T細胞遊走

(a) : 培養上清導入前の位相差像

(b) : 培養上清導入後0-10分間の細胞移動軌跡

(c) : 培養上清導入後0-30分間の細胞移動軌跡

(d) : 培地導入前の位相差像 (対照実験)

(e) : 培地導入後0-30分間の細胞移動軌跡 (対照実験)

Time-lapse images of $\gamma\delta$ T cells migrating after the injection of the conditioned medium supernatant of RPMI 8226 human myeloma cells

(a): $\gamma\delta$ T cells before injection of the conditioned medium supernatant (phase-contrast micrograph)

(b): Tracking of $\gamma\delta$ T cells 10 min after injection

(c): Tracking of $\gamma\delta$ T cells 30 min after injection

(d): $\gamma\delta$ T cells before injection of the medium (control) (phase-contrast micrograph)

(e): Tracking of $\gamma\delta$ T cells 30 min after injection (control)

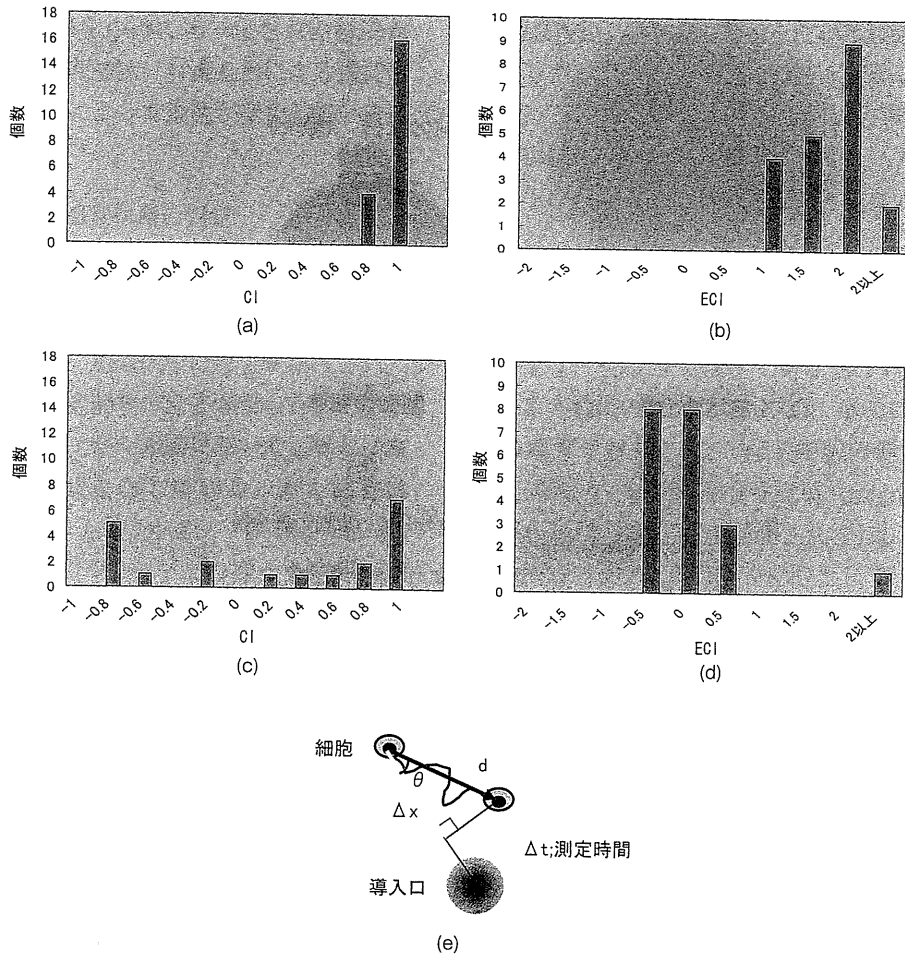


図9 ヒト骨髄腫細胞株 RPMI 8226の培養上清に対する $\gamma\delta$ T細胞遊走解析結果

- (a): RPMI 8226の培養上清に対する $\gamma\delta$ T細胞遊走の方向性
 (b): RPMI 8226の培養上清に対する $\gamma\delta$ T細胞遊走速度分布
 (c): 培地に対する $\gamma\delta$ T細胞遊走の方向性 (対照実験)
 (d): 培地に対する $\gamma\delta$ T細胞遊走速度分布 (対照実験)
 (e): 細胞遊走の指標の概念図

Analysis results of $\gamma\delta$ T cells migrating after the injection of the conditioned medium supernatant of RPMI 8226 human myeloma cells

- (a): Direction distribution of the $\gamma\delta$ T cells migration to the conditioned medium supernatant of RPMI 8226 human myeloma cells
 (b): Velocity distribution of the $\gamma\delta$ T cells migration to the conditioned medium supernatant of RPMI 8226 human myeloma cells
 (c): Direction distribution of the $\gamma\delta$ T cells migration to the medium (control)
 (d): Velocity distribution of the $\gamma\delta$ T cells migration to the medium (control)
 (e): Conceptual diagram of chemotaxis index

分間の細胞の軌跡を図8の(e)に示す。(c)では、多くの $\gamma\delta$ T細胞がRPMI 8226培養上清の導入口を目指して遊走しているのに対して、対照実験として培地を注入した(e)では動きはランダムであった。次に下記の指標を用いて細胞の遊走を定量的に解析した(図9の(e), 文献^{6),17)}より一部改変)。

- (1) 遊走方向指数 Chemotaxis Index : $CI = \Delta x / d$
- (2) 遊走速度 Effective Chemotaxis Index : $ECI = d / \Delta t \times CI (= \Delta x / \Delta t)$
 (d: 遊走開始前と測定最終時の細胞位置間距離,

Δx : dの濃度勾配方向成分, Δt : 測定時間)

解析結果を図9の(a) - (d)に示す。

まず、細胞が遊走する方向を解析した。対照実験である(c)では、CIが1から-1に広く分散しており、細胞の動きに方向性がない。これに対して、培養上清を注入した(a)では、CIが1に集中し、多くの $\gamma\delta$ T細胞がRPMI 8226細胞培養上清の導入口を目指して遊走した。また培地注入時のECIは $0.2 \pm 0.6 \mu\text{m}/\text{min}$ であったが、培養上清注入時は $1.7 \pm 1.4 \mu\text{m}/\text{min}$ と、培養上清注入により著しく増加した。

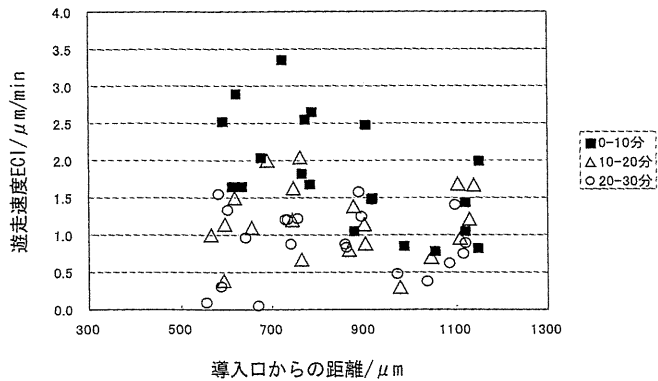


図10 導入口からの距離と $\gamma\delta$ T細胞遊走速度 ECI の関係
Relationship between the distance from the injection source and ECI of $\gamma\delta$ T cells

先に示したように、培養室中の誘引物質の濃度勾配は時間経過とともに変化する。導入口直後には、導入口の近傍に大きな濃度勾配が形成されるが、時間の経過により遠方に拡散し勾配が減少し、30分後には培養室全体がほぼ均一な濃度になる(図5)。そこで次に、導入口からの距離と時間経過による ECI の変化を解析した。図10に、導入口からの距離と $\gamma\delta$ T細胞の遊走速度 ECI の関係を示す。■は培養上清導入後0-10分後、△は10-20分後、○は20-30分後の各々10分間の遊走速度をプロットしたものである。0.8以下の ECI は図9の(d)と同様にランダムな動きであると考えられるが、液性因子導入後の10分間は、導入口から800 μm 以下で遊走速度は大きく、導入口からの距離に反比例し速度は遅くなったが、10分経過以降は距離による速度の差は小さかった。これは導入口からの距離と遊走速度の関係が、培養室内における液性因子の濃度分布の変化とよく対応していることを示唆する結果であった。また、同一距離における速度のパラッキは、位置とは無関係であり、個々の細胞の特性に起因すると考えられる。

従来、細胞遊走研究ではボイデンチャンバ法¹⁸⁾(CorningのTranswell®やBDのMatrigel™ Invasion Chamberなど)が広く用いられている。約 1×10^6 個の細胞を誘引物質の濃度勾配環境に置き、メンブレンの数 μm 径の孔を通過した細胞数をカウントして遊走能を評価する。一般的に遊走測定には数時間を要する^{19),20)}。例えば、24ウェルプレートに対応する孔が3 μm 径の場合、孔密度は 8.0×10^5 pores/cm²であり、一個の細胞の分泌に対する細胞個々の位置や遊走速度の測定は困難であった。これに対して、本解析の細胞の位置精度は検鏡によるため数 μm と同等であるが、遊走測定に要する時間は10分と短く、0.8 $\mu\text{m}/\text{min}$ 以上の遊走速度が測定可能であり、一個の細胞からの距離が500-1200 μm の領域における個々の細胞の動

きを評価できるという特長を持つと考えられる。

6. む す び

本稿では、がん細胞の挙動研究を目指し、 μTAS を応用して作製した細胞チップを用いた細胞間相互作用の研究を紹介した。まず、微小培養室中で、浮遊性・接着性の株細胞・初代培養細胞が、細胞チップ中で培養可能であることを示した。さらに、細胞チップの μ インジェクタを用いて液性因子を注入し、点源から拡散に支配され拡がることを確認した。

細胞間相互作用を模擬する例として、まず血管新生の初期段階である血管内皮細胞の遊走を観察した。注入されたSDF-1 α に対してHUVECの遊走が確認された。がん細胞は自らの生長のためにがん組織内に血管を新生するために、内皮細胞を組織内に遊走させる。細胞チップを用いることにより、がん組織内における血管新生の初期段階である内皮細胞の遊走を観察できた。このことは、細胞チップが、がんの病態解析に適したデバイスであることを示唆している。

次にごん細胞が分泌している液性因子を、 μ インジェクタにより模擬できることを確認した。点源からの放出と拡散による拡がりを再現することにより、がん細胞の分泌を模擬し、免疫担当細胞である $\gamma\delta$ T細胞が誘引されることにより確認した。従来法に比べ、多くの細胞が同時に一方を向って遊走する様子が観察された。 $\gamma\delta$ T細胞は、白血病、肺がん、多発性骨髄腫など、多くの腫瘍細胞株に対して抗腫瘍効果を有している^{14),15)}。細胞チップを用いて、 $\gamma\delta$ T細胞が有するがん細胞の認識能を明らかにできれば、より選択的にがん細胞を認識し、標的とし追尾し殺傷することも可能となると予想され、高精度のDDSを備えた、より副作用の少ない有用な治療法を開発できる期待がもてる。

細胞チップを用いることにより遊走速度も計測可能であった。従来の定常的な濃度勾配(350 μm で100 nM)に対する遊走速度の測定実験によると、ケモカインCXCL12(SDF-1)濃度勾配に対するT細胞の速度は、約7.4 $\mu\text{m}/\text{min}$ 、CCL19濃度勾配に対する速度は約6.2 $\mu\text{m}/\text{min}$ で¹⁶⁾、過去の報告に相当する結果であった。

著者らが開発した細胞チップは、がん細胞の遊走や浸潤などの挙動研究に対して新しいアプローチを提案できたと考えられ、がんの根治を目指した基礎研究や創薬分野において、有用なツールとなると期待される。将来的には、分泌などの細胞の機能を μ インジェクタで工学的に模擬・再現できる利点を生かし、液性因子の種類や濃度をパラメータとして自由に設定し、多彩な評価を簡便に実施可能な

ると考える。さらに、表面コーティング技術により細胞膜の模擬や、多種の細胞をチップ内に適切に配置する技術により組織環境の再現を目指していきたい。

本研究の一部は、生研センター「新事業創出研究開発事業」から委託を受け、平成12年度～平成16年度に実施した。本研究の一部は、JST「産学協同シーズイノベーション事業（顕在化ステージ）」から委託を受け、平成18年度に実施した。また、京都工芸繊維大学・村上章教授、国立遺伝学研究所・五條堀孝教授との共同研究成果を含む。ここで謝意を表す。

本研究で使用したヒト $\gamma\delta$ T 細胞は、京都大学医学部附属病院、医の倫理委員会の指針に則り、ヘルシンキ宣言に基づくインフォームドコンセントを行った健康者ボランティアの末梢血から採取して、増幅したものをを用いた。ヌードマウス (BALB/cA Jcl-*nu/nu* 5週齢 male) は日本クレアより購入した。動物実験は、京都大学動物実験委員会の指針に則って行った。ヒト非小細胞肺癌細胞株 H358は American Type Culture Collection (ATCC) より購入した。ヒト骨髄腫細胞株 RPMI 8226は Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH より購入した。ヒト臍帯血管内皮細胞 HUVEC は Lonza より購入した。

参 考 文 献

- 1) K. Ohno, K. Tachikawa and A. Manz: Microfluidics: applications for analytical purposes in chemistry and biochemistry, *Electrophoresis*, **22**, 4443 (2008)
- 2) P.S. Dittrich, K. Tachikawa and A. Manz: Micro total analysis systems. Latest advancements and trends, *Anal. Chem.*, **12**, 3887 (2006)
- 3) D. Janasek, J. Franzke and A. Manz: Scaling and the design of miniaturized chemical-analysis systems, *Nature*, **442**, 374 (2006)
- 4) 荒井昭博, 藤分秀司, 田中宏, 西根勤, 阿部浩久, 明地将一, 中西博昭: マイクロチップ電気泳動装置 MCE-2010 の開発とその応用例, *島津評論*, **58**, 101 (2002)
- 5) 鈴木功一, 荒井昭博, 宇都宮真一, 柏木克也, 中山博之, 二宮健二, 山根真由, 児嶋浩一, 関克彦, 西田大悟, 原田亨, 中村伸, 森田直樹: DNA/RNA 分析用マイクロチップ電気泳動装置 MCE-202“MultiNA” —開発とその応用—, *島津評論*, **64**, 117 (2008)
- 6) 熊谷英郷, 宇都宮真一, 山本林太郎, 原田亨, 加地徹, 狭間一, 大橋鉄雄, 稲実淳史, 池上孝, 宮本敬介, 遠藤直也, 吉見健一, 中村伸: 大量処理型 BioMEMS DNA シーケンサ DeNOVA-5000HT の開発, *島津評論*, **64**, 123 (2008)
- 7) 叶井正樹, 務中達也, 阿部浩久, 藤山陽一, 中西博昭: 細胞機能解析デバイスの開発, *島津評論*, **61**, 91 (2004)
- 8) M. Kanai, H. Abe, T. Munaka, Y. Fujiyama, D. Uchida, A. Yamayoshi, H. Nakanishi, A. Murakami and S. Shoji: Micro chamber for cellular analysis integrated with negligible dead volume sample injector, *Sens. Actuators A*, **114**, 129 (2004)
- 9) T. Munaka, H. Abe, M. Kanai, T. Sakamoto, H. Nakanishi, T. Yamaoka, S. Shoji and A. Murakami: Real-time monitoring of antibody secretion from hybridomas on a microchip by time-resolved luminescence anisotropy analysis, *Anal. Biochem.*, **353**, 1 (2006)
- 10) T. Munaka, H. Abe, M. Kanai, T. Sakamoto, H. Nakanishi, T. Yamaoka, S. Shoji and A. Murakami: Monitoring Cellular Events in Living Mast Cells Stimulated with an Extremely Small Amount of Fluid on a Microchip, *Jpn. J. Appl. Phys., Part 2*, **45**, L634 (2006)
- 11) T. Munaka, H. Abe, M. Kanai, T. Sakamoto, H. Nakanishi, S. Shoji, S. Kimura, T. Maekawa and A. Murakami: Real-time monitoring of antibody secretion from B-cells on a microchip stimulated with a minute amount of mitogen, *Analyst*, **132**, 512 (2007)
- 12) 叶井正樹, 務中達也, 阿部浩久, 中西博昭, 庄子習一: マイクロバルブを有する細胞機能解析デバイスの開発, *電学論E*, **127**, 63 (2007)
- 13) R. Salcedo, K. Wasserman, H. A. Young, M. C. Grimm, O. M. Howard, M. R. Anver, H. K. Kleinman, W. J. Murphy and J. J. Oppenheim: Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells, *Am J Pathol*, **154**, 1125 (1999)
- 14) K. Sato, S. Kimura, H. Segawa, A. Yokota, S. Matsumoto, J. Kuroda, M. Nogawa, T. Yuasa, Y. Kiyono, H. Wada and T. Maekawa: Cytotoxic effects of $\gamma\delta$ T cells expanded ex vivo by a third generation bisphosphonate for cancer immunotherapy, *Int J Cancer*, **116**, 94 (2005)
- 15) R. Uchida, E. Ashihara, K. Sato, S. Kimura, J. Kuroda, M. Takeuchi, K. Taniguchi, M. Okamoto, K. Shimura, Y. Kiyono, C. Shimazaki, M. Taniwaki and T. Maekawa: $\gamma\delta$ T cells kill myeloma cell by sensing mevalonate metabolites and ICAM-1 molecules on cell surface, *Biochem Biophys Res Commun.*, **354**, 613 (2007)
- 16) F. Lin and E.C. Butcher: T cell chemotaxis in a simple microfluidic device, *Lab Chip.*, **6**, 1462 (2006)

- 17) Francis Lin, Connie Minh-Canh Nguyen, Shur-Jen Wang, Wajeeh Saadi, Steven P. Gross, and N. L. Jeon: Effective neutrophil chemotaxis is strongly influenced by mean IL-8 concentration, *Biochem Biophys Res Commun.*, **319**, 576 (2004)
- 18) S. Boyden: The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes, *J Exp Med.*, **115**, 453 (1962)
- 19) K. Mohan, Z. Ding, J. Hanly and T.B. Issekutz: IFN-gamma-inducible T cell alpha chemoattractant is a potent stimulator of normal human blood T lymphocyte transendothelial migration: differential regulation by IFN-gamma and TNF-alpha, *J. Immunol.*, **168**, 6420 (2002)
- 20) A. Albini, Y. Iwamoto, H. K. Kleinman, G. R. Martin, S. A. Aaronson, J. M. Kozlowski, and R. N. McEwan: A Rapid in Vitro Assay for Quantitating the Invasive Potential of Tumor Cells, *Cancer Research*, **47**, 3239 (1987)

Microfluidic Cellular Analysis Device – A Promising Approach for the Study of Cancer Cell Behaviors

by Tatsuya MUNAKA¹, Masaki KANAI¹, Shinya KIMURA², Eishi ASHIHARA³,
Hirohisa ABE¹, Shuichi SHOJI⁴, and Taira MAEKAWA³

¹*MicroTAS Unit Technology Research Laboratory, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan*

²*Kyoto University Hospital, Kyoto, Japan (Present address: Saga University, Saga, Japan)*

³*Kyoto University Hospital, Kyoto, Japan*

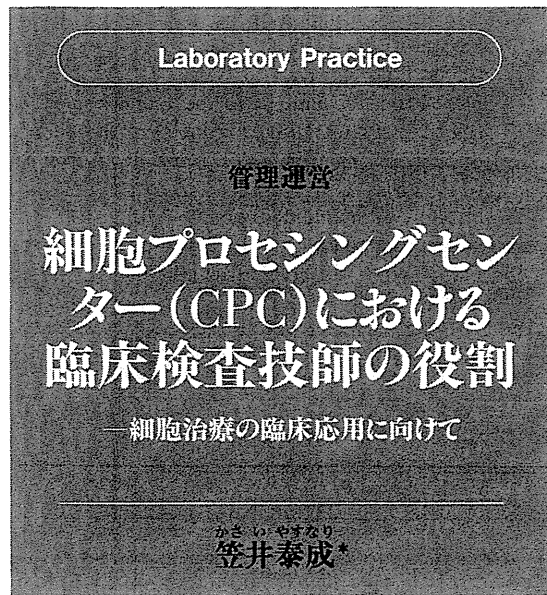
⁴*Waseda University, Tokyo, Japan*

(Received January 18, 2010)

Abstract

We have developed a microfluidic cellular analysis device based on the micro total analysis system. The microfluidic device is equipped with a micro incubation chamber integrated with a micro sample injector. A minute volume (240 nL) of the chamber increases apparent viscosity of the fluid, which ensures microfluidic experiments free of influence from convection and stirring. The micro injector permits injection of a small amount (several nL) of humoral factor with high reproducibility. The present paper describes the analysis of the intercellular interactions using the microfluidic device. We demonstrate that cells can be cultivated in the microchamber. It was confirmed that the injected humoral factor spread from an injection point in a diffusion-dependent manner. Furthermore, we observed that $\gamma\delta$ T cells, immunocompetent cells, migrated to the injected conditioned medium of cancer cells. In our study, the injection of humoral factor by use of the micro injector was used as a mimic of the secretion from a cancer cell. The results suggest that the microfluidic device is useful for the study of cell behaviors such as cancer cell migration and invasion, which leads to our expectation that the device would be an attractive tool in the field of basic researches and drug discovery for cancer therapy.

Keywords : Micro total analysis systems (μ TAS), Microfluidics, Cellular analysis device, Intercellular interaction, $\gamma\delta$ T cell, Chemotaxis, Migration, Cancer cell behavior



* 京都大学医学部附属病院分子細胞治療センター
〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町 54

はじめに

細胞治療とは、再生医療や遺伝子治療、細胞免疫療法などヒト由来の細胞や組織を利用して行われる治療方法の総称であり、細胞プロセッシングセンター (cell processing center, CPC) は、その細胞治療を実施する際に患者へ移植される細胞や組織の調製や加工を行うための専用の施設である (図)。また、臓器から特定の機能を有する組織の分離作業や、細胞培養や遺伝子導入などさまざまな工程を「細胞プロセッシング」と呼んでいる。

細胞治療を目的として患者へ移植される細胞や組織は、その安全性を担保し高品質を保証するため、医薬品などと同じレベルでの製造管理や品質管理が要求される。そのため、細胞プロセッシングには製造管理や品質管理が厳密に行える環境が整った CPC が不可欠となる。

わが国でも、さまざまな細胞や iPS 細胞を利用した細胞治療の基礎研究が盛んに進められており、既に医療用具として承認を受けた再生医療製品もある。しかし、基礎研究の成果を速やかに臨

床応用するためには、関連する法令の改訂やインフラストラクチャーの整備、そして CPC の管理や細胞プロセッシングを行える人材の育成など多くの課題が山積している。なかでも人材の育成は喫緊の課題である。現時点では CPC の管理や細胞プロセッシングに国家資格は必要ではない。しかし、製造管理や品質管理といった事項には種々の検査手技と検査理論に関する知識が必須であり、臨床検査技師はそのプロトタイプ的人材として最短距離に位置するのではないかと考えられる。本稿では CPC における臨床検査技師の役割と今後の課題について述べる。なお、細胞プロセッシングに携わる人員としては、臨床検査技師のほか、当然、薬剤師、農学部、理学部などの出身者も含まれるが、筆者は京大病院に勤務する臨床検査技師であり、本誌の読者層も考慮し、臨床検査技師にスタンスを置いた記載になっていることをお許し願いたい。

細胞治療と規制

医薬品などの安全性を担保するために、その開発や製造における管理方法は薬事法や関連する省令などによって厳密に規制されている。しかし、盛んに開発が進められている細胞治療においては、その安全性や品質評価に関する基準が十分に整備されているとは言えないのが現状である。この分野に関連した厚生労働省からの最初の指針は、2006年(平成18年)7月に施行された「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」である¹⁾。わずか4年前のことであるが、この指針が施行された後に iPS 細胞を用いた研究も進展し、新しい技術に対応するため、全面的に改正された新しい指針が2010年11月に施行されている²⁾。

医薬品の製造管理や品質管理には GMP (good manufacturing practice) という基準があり、現行の薬事法にも GMP の要求事項が組み込まれ運用されている。GMP は医薬品などを製造する際に起こりうる人為的な過誤を防止し、製品の品質を保証し、よりよい製品の開発を進めていくことを目的として作られた国際基準である。現在は、医薬品だけでなく、医療機器や食品、化粧品などにもその範囲が広がられている。細胞治療も医薬品と同等の安全性と高い品質を保証するため、

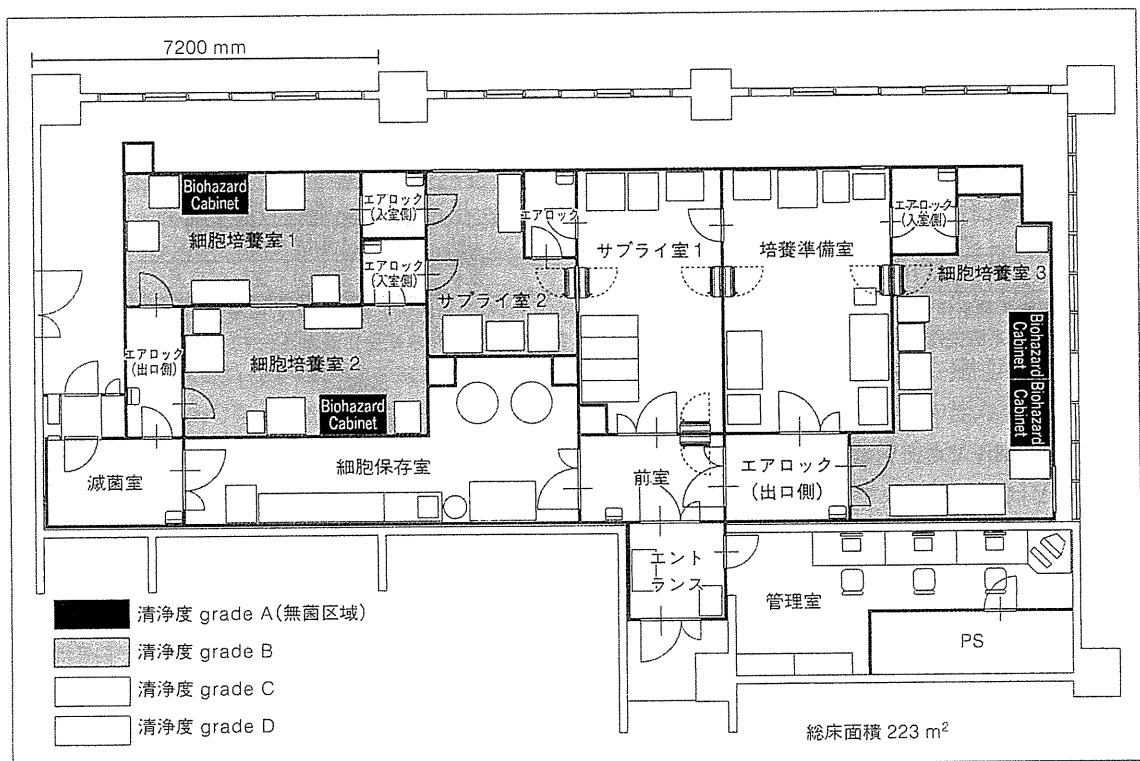


図 CPC 平面図(京都大学医学部附属病院 分子細胞治療センター)

GMP の要求事項に沿って開発段階に対応した製造管理や品質管理を実施することが必要である³⁾。大学などで実施される細胞治療の臨床研究では、主に治験薬 GMP など^{4,5)}に準拠した運用基準や施設基準が求められており、厚生労働省の承認を得て市場に出る際には薬事法によって運用が規制されることになる。錠剤などの医薬品に適用されてきた従来の薬事法をそのまま細胞製剤の調整に当てはめるには種々の問題点もあるが、この議論は別の機会に譲ることとしたい。

GMP が要求する製造管理 および品質管理

CPC から出荷される細胞や組織(以下、細胞加工製品)の品質を保証し、その安全性を担保するためには、製造管理や品質管理を厳密に実施しなければならない。GMP の要求に準じて細胞プロセスを実施する際に必要とされる管理の概要は次のとおりである。

1. 製造管理

まず、すべての製造工程の手順について、事前

にその妥当性を評価しておく。例えば、作業手順書に従って作業を行えば目的とする規格(無菌性や品質など)の製造物が得られることを立証し、定められた品質の製造物を恒常的に製造できることを確認しておく必要がある。妥当性が確認された手順は、「標準作業手順書(standard operation procedure, SOP)」として文書化し管理する。すべての作業は、標準作業手順書の指示内容に従って実施される。次に、作業を実施したら、その作業内容を記録し保管する。また、作業中に発生したトラブルなどもその内容を作業記録に残す。製造物の品質に影響を及ぼすトラブルが発生した場合には、原因を究明し再発防止のため是正を行う。

その他、製造施設内の無菌状態を管理し、交差汚染の防止を図る。また、施設内の設備や機器などが常に安定した状態で稼働していることを監視し、その記録を保管しておく。

2. 安全性の確保

製造物に混入する恐れがある異物については混入防止策を講じ、製造工程由来物質(製造過程で

表 無菌医薬品製造のための空気清浄度

(第15改訂 日本薬局方より転載)

管理区分	清浄度	最大許容微粒子[0.5 μm 以上] (個/立方フィート)		環境微生物の評価基準 空中微生物数(CFU/m ³)	作業内容
		非作業時	作業時		
無菌区域	grade A	100	100	<1	開放系調整作業*
清浄区域	grade B	100	10,000	10	閉鎖系調整作業**
	grade C	10,000	100,000	100	細胞・資材の保管, 二次更衣
	grade D	100,000	—***	200	細胞・資材の受入, 一次更衣

* 開放系調整作業：調整を受ける細胞や組織が、作業者のいる空間の空気と接している作業。

** 閉鎖系調整作業：調整を受ける細胞や組織が、作業者のいる空間から完全に隔離されている作業。

*** 作業形態により、この区域の許容微粒子数は異なる。

使用する薬剤などで、最終製造物には含まれない物質)などは適切な方法で除去する。微生物が感染したりエンドトキシンなどが混入したりしないよう細心の注意を払う。

細胞加工製品の安全性と品質を高いレベルで保証するためには、完成した細胞加工製品を対象とした検査だけでは不十分である。例えば、微生物などが極少量混入していても、出荷判定で検出限界以下となれば製品はそのまま出荷されるが、出荷後にそれらが増殖する恐れがある。したがって、最終製造物だけでなく、原材料の受入の際や、製造中の中間体に対しても適時必要な品質管理を実施する必要がある。

3. 品質評価

細胞加工製品の品質の恒常性を保証するためには、事前に妥当性が評価された試験方法を定めておく必要がある。細胞や組織は構造が複雑で、かつ変化しやすい物質であるため、その特性や品質について物理化学的、免疫学的あるいは生化学的手法などを駆使して品質評価方法や機能評価方法を確立しなければならない。また、測定値の正確さを保証するため、標準物質からのトレーサビリティも要求されている。

ここで必要とされている品質評価の方法は通常の臨床検査とは目的が異なっている。細菌検査を例に挙げると、臨床検査では病原菌の同定や感受性の検査などを行っているが、細胞プロセッシングでの品質評価では無菌試験やマイコプラズマ否定試験など微生物の感染がないことを厳密に評価する。すなわち、より高感度の検出方法で検査を行う必要がある。医薬品などの品質評価方法については日本薬局方⁶⁾に記載されている試験方法で実

施しなければならないが、細胞や組織を試料とした場合、日本薬局方に記載されている試験方法では共存物質などの影響により正確に測定できない場合がある。今後、細胞や組織などを対象とした新たな品質評価法の開発も不可欠である。

環境管理

患者に移植される組織や細胞への細菌やウイルスの感染を防止し、異物などの混入を防ぐためには、環境が整備されているCPCで細胞プロセッシングを実施しなければならない。まず、作業エリアの無菌状態を維持するためには、定期的な環境モニタリング(空中浮遊菌検査や落下菌検査、付着菌検査、空中浮遊微粒子の測定など)が必要であり、定期的に作業環境のサニテーション(清掃と消毒)も実施する。また、無菌作業を行う区域の清浄度は、grade A(0.5 μmより大きな粒子が1立方フィート内に最大100個を超えない環境)が要求されている。この環境を維持するには、grade Dからgrade Aへ段階的に清浄度を上げたゾーニング(表)を施し、CPC外部からの塵や埃など異物の進入を防ぐ。さらに、保存している試薬や資材への汚染を防ぐための運用基準を定めたり、組織や細胞の取り間違いを防止するためにバーコードなどを利用した厳重な管理システムなどが必須となる。

教育訓練

患者に移植される組織や細胞の安全性を担保し高いレベルでの品質を保証するためには、高い技術力と豊富な経験をもつ技術者がCPCの管理運用にかかわる必要がある。今後、CPCの管理運用を

専門の業務とする技術者の需要は増加すると予測される。

臨床検査技師の教育制度は既に改組され、大学院への進学も可能となっている。より専門的な知識を学び、研究開発を行える環境を整えば、細胞や組織の品質評価方法や機能評価方法の開発も可能となるであろう。臨床検査技師は、医学の基礎知識と臨床検査に関する専門的な知識をもっている。細胞や組織は人体を構成するものであり、細胞や組織の機能評価は臨床検査と共通する部分もある。これまでの「臨床検査」という分野で培われてきた経験や技術に新たな知識を融合させれば、先に述べた細胞治療にかかわる開発の段階や臨床応用の場で、臨床検査技師も大いに活躍できるのではないであろうか。

既に京都大学では、平成 21 年度より医学部人間健康科学専攻の修士課程の学生(実際には他学部の学生や卒業生も参加していた)を対象にした研修コースを試験的に開始している。初年度は講義のみで GMP の概論や京都大学で実施している臨床研究の解説を行ったが、平成 22 年度からは細胞培養の実習や CPC の管理運営などのカリキュラムも予定している。しかし、このような教育環境が整っている施設はまだ少ない。今後は、学生だけでなく既に現場で活躍をしている技術者や、将来的には、薬学部、農学部など他の学部の卒業生も対象とした新たな研修システムの構築も予定されている。

おわりに

細胞治療は、臨床応用に向けて技術開発が盛んに進められている新しい医療技術の一つである。

しかし、関連する法令や安全基準などの整備は遅れており、細胞治療が安全に実施できるような環境を整えることが急務となっている。質の高い細胞治療を実施し、その安全性を担保するには、十分な知識と豊富な経験をもつ人員によって細胞プロセッシングを行う必要がある。その担い手候補として臨床検査技師の活躍も大いに期待されている。将来、細胞プロセッシングにかかわる新しい資格制度が設けられる可能性もあるが、臨床検査技師がこれまでの経験を生かし、知識や技能を磨き上げれば、新しい分野でもその能力を十分に発揮できる可能性がある。臨床検査技師のさらなる活躍に期待したい。

謝 辞

本稿の執筆にあたり、貴重なご意見をいただいた京都大学医学部附属病院 分子細胞治療センター長 前川 平 教授に深謝致します。また、本研究の一部は平成 22 年度厚生労働省科学研究費(医療技術実用化総合研究事業(臨床研究基盤整備推進研究事業))の補助を受けた。

文 献

- 1) 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, 厚生労働省)
- 2) <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/iryousai/sei06/pdf/03.pdf>
- 3) 笠井泰成, 前川平: 細胞プロセッシングと GMP, 臨床検査 48: 1141-1146, 2004
- 4) 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(平成 20 年 7 月 9 日, 薬食発第 0709002 号)
- 5) 薬局等構造設備規則(平成 17 年 6 月 1 日, 厚生労働省令第 101 号)
- 6) 第 15 改正 日本薬局方(平成 18 年 3 月 31 日, 厚生労働省告示第 285 号)

「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髓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、自己骨髓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 1×10^7 個、大腿骨頭無腐性壊死症に対しては 5×10^7 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(β -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¹⁾ 渡邊 弘子¹⁾ 山田千亜希¹⁾ 大友 直樹²⁾ 押田真知子³⁾
友田 豊⁴⁾ 万木紀美子⁵⁾ 星 順隆⁶⁾ 高橋 孝喜⁷⁾ 前川 平⁵⁾
大戸 齊⁸⁾ 竹下 明裕¹⁾

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¹⁾。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²⁾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〕

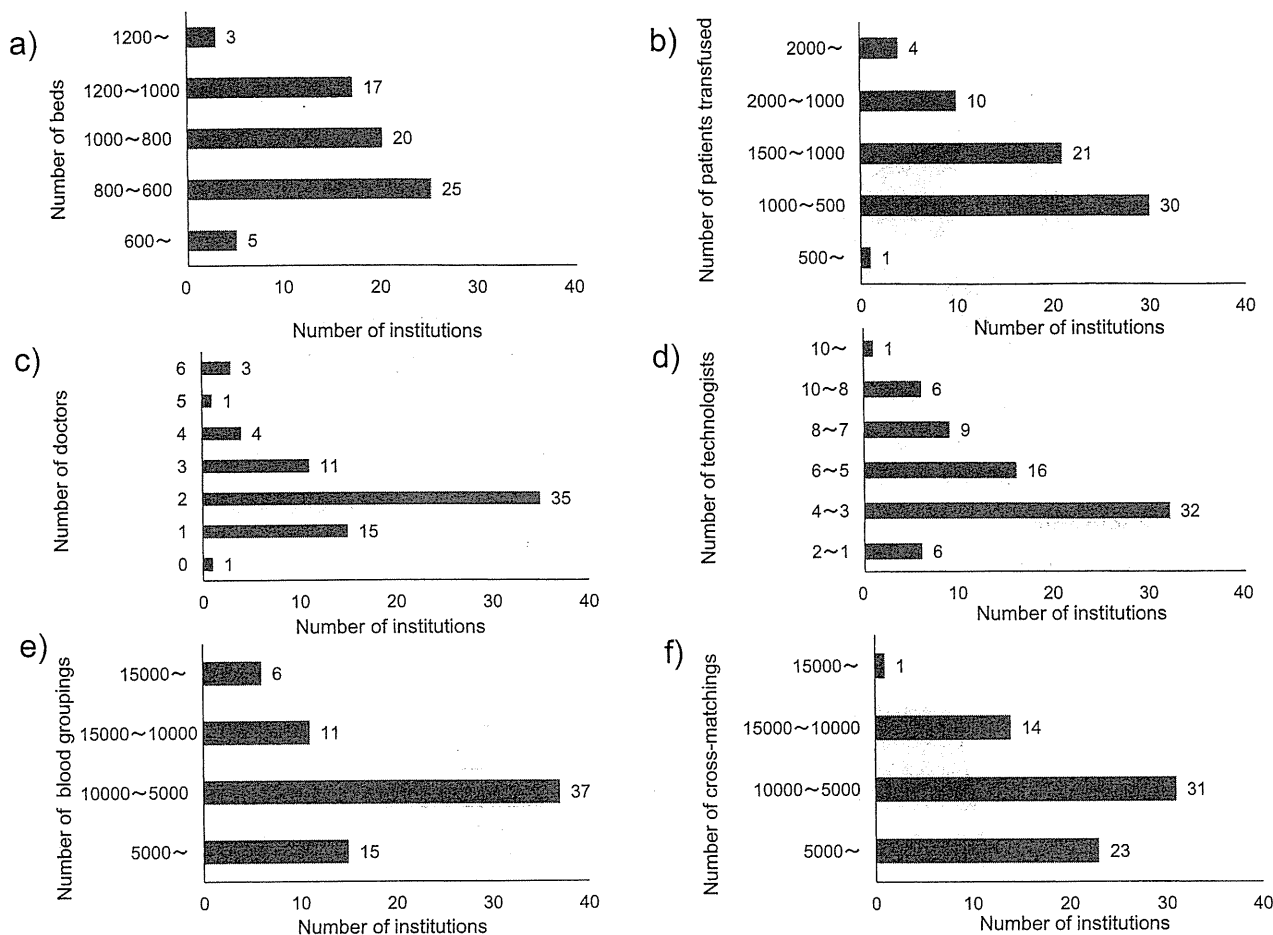


Fig. 1 Basic information of the institutions including a) number of beds, b) number of patients transfused per year, c) number of doctors in the transfusion unit, d) number of medical technologists in the transfusion unit, e) number of ABO-blood grouping tests per year, and f) number of cross-matching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

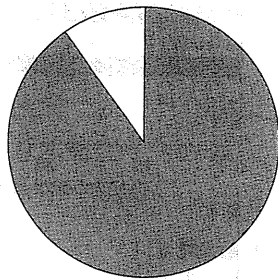
小グループ実習を医学部学生に対して行っている施設は 63 施設（90%）、新卒医師に対しては 37 施設（53%）であった（Fig. 2-1）。

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 ± 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。

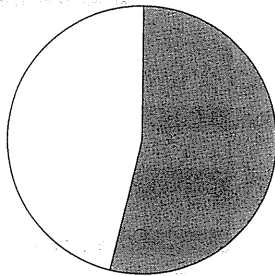
新卒医師一人が卒後に行う実習の合計時間は平均 $2.2 \pm$

(2-1)

A) Students

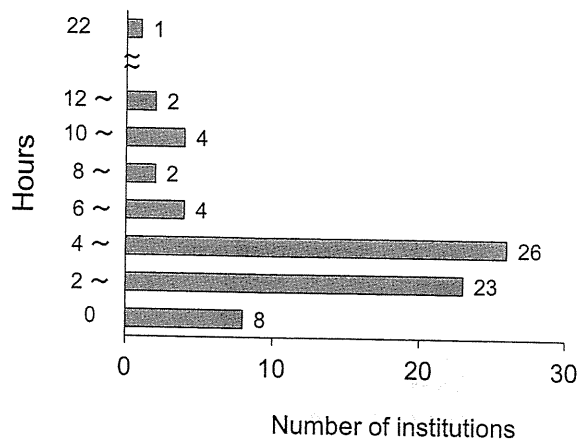
Not adopted
(7 inst. / 10%)Adopted
(63 inst. / 90%)

B) Residents

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

(2-2)

A) Students



B) Residents

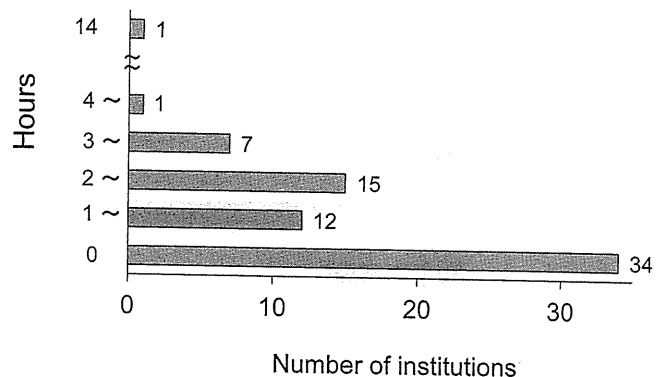


Fig. 2 2-1) Adoption of small group training into education of blood transfusion for students (A) and residents (B). 2-2) Training time period for students (A) and residents (B). The data were reported by 70 institutions. Horizontal and vertical line shows number of institutions and training time periods,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

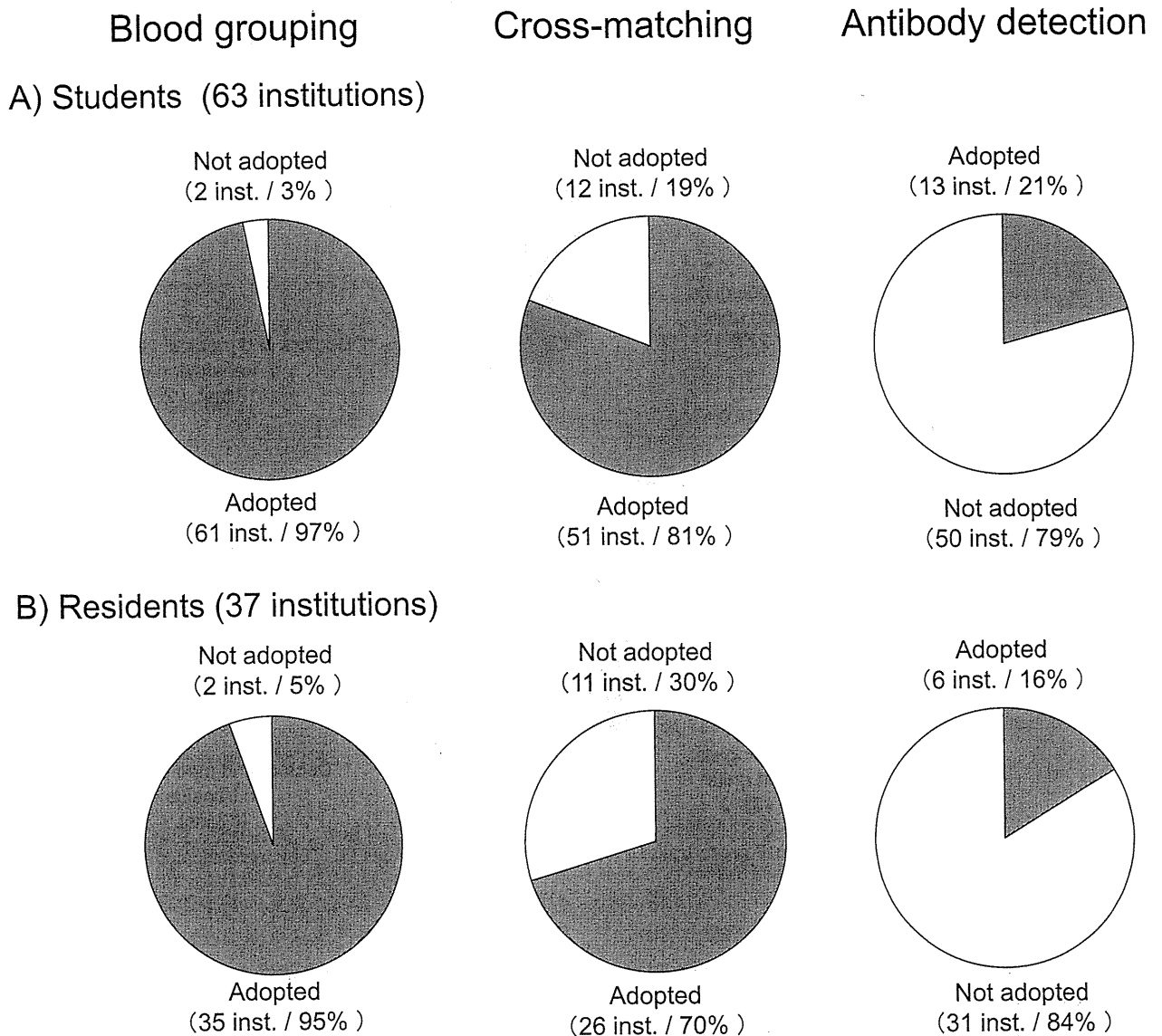


Fig. 3 Subjects and execution rates of small group training for students (A) and residents (B). They were adopted by 63 and 37 institutions, respectively. The training included blood grouping, cross-matching, and detection of erythrocyte irregular antibodies.

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関しても有意差は認められなかった。

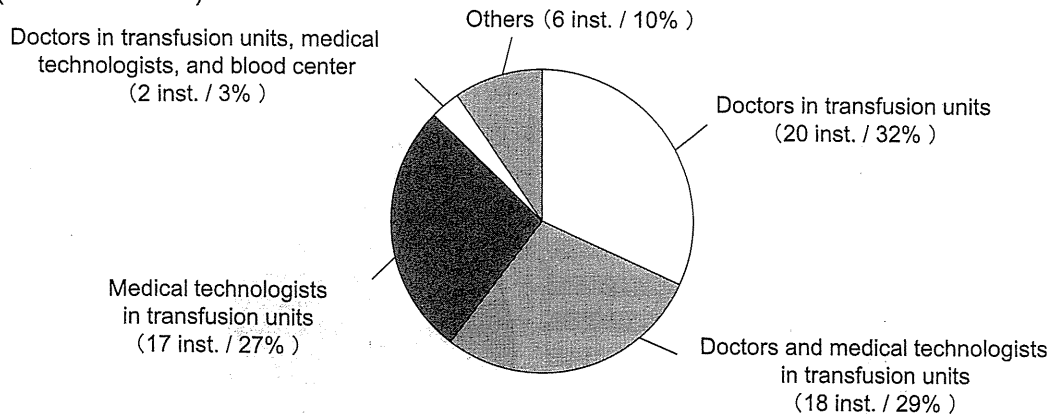
同様に、研修医の実習についても検討した。血液型

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³⁾や The Blood Safety and Quality Regulations 2005 年版⁴⁾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)

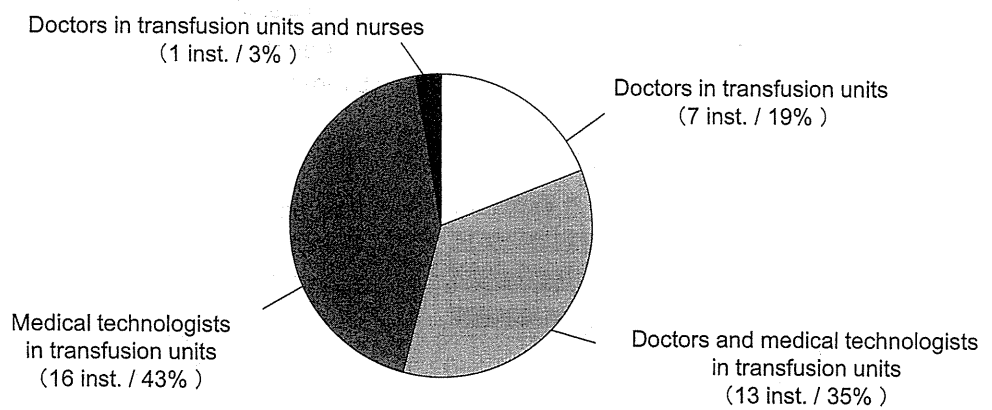


Fig. 4 Type of medical instructors of small group training for students (A) and residents (B). They were adopted by 63 and 37 institutions, respectively.

いる⁵⁾。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⁶⁾、1995年にはその改訂版も報告されている⁷⁾。

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⁸⁾。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⁹⁾。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、