

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様子が反映され、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感謝いたします。

## 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、蓋を閉めてから、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)。

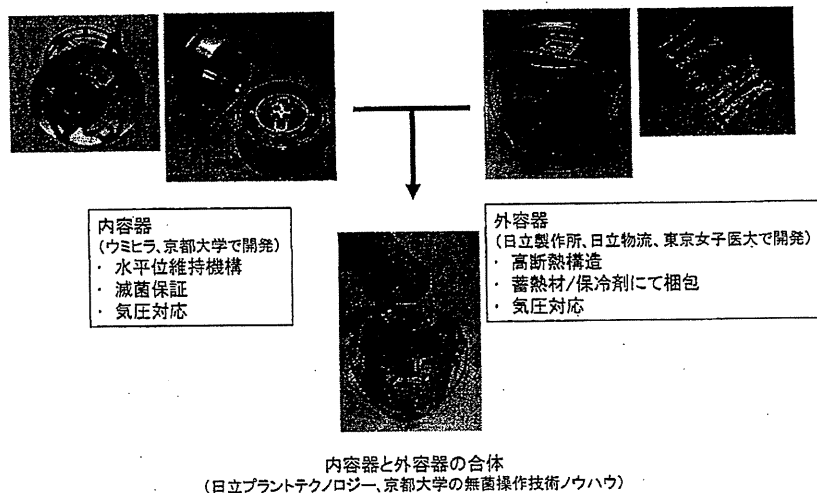


写真1 細胞搬送容器ユニットの開発

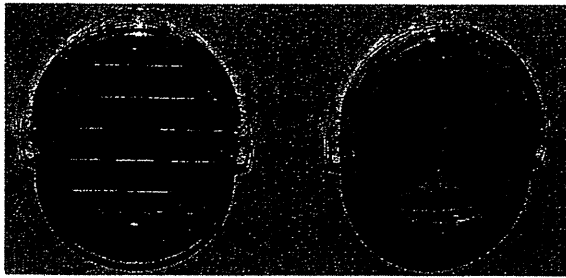


写真2 無菌性試験

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、トリパンプ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、トリパンプ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

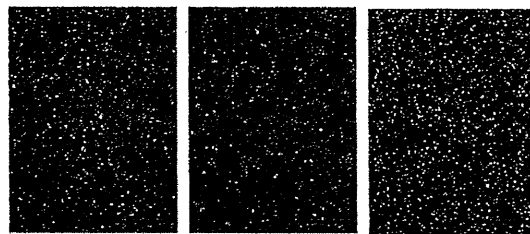


写真3 間葉系幹細胞の保存温度と生存率

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)

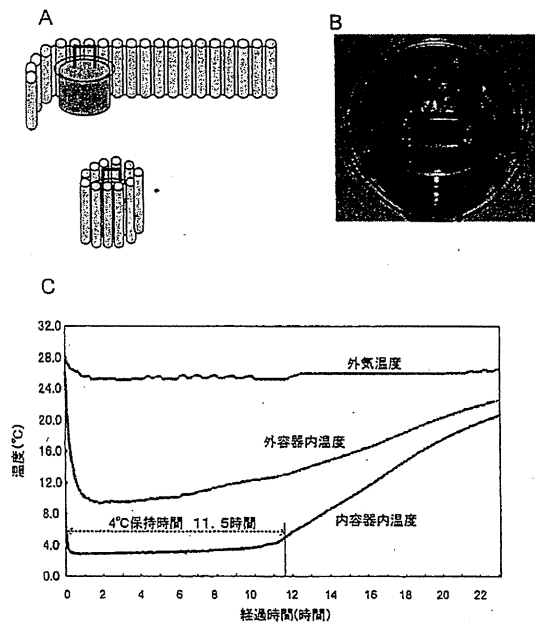


図1 定温維持機構

- 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。

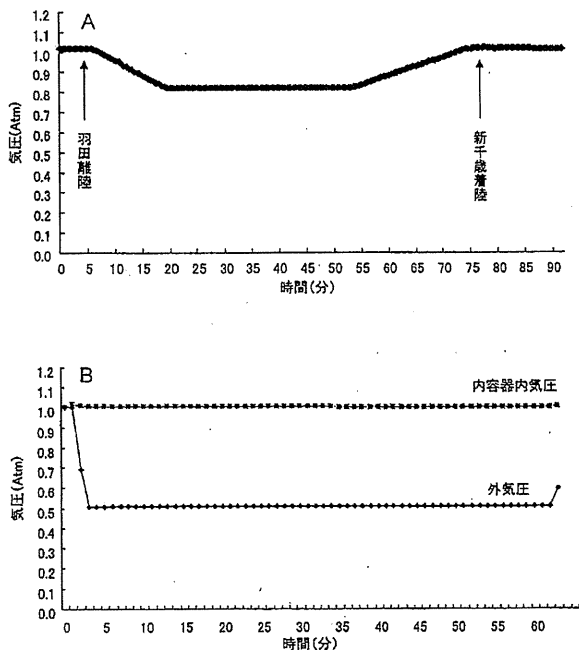


図2 耐気圧試験結果

- 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内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、今回の携行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。

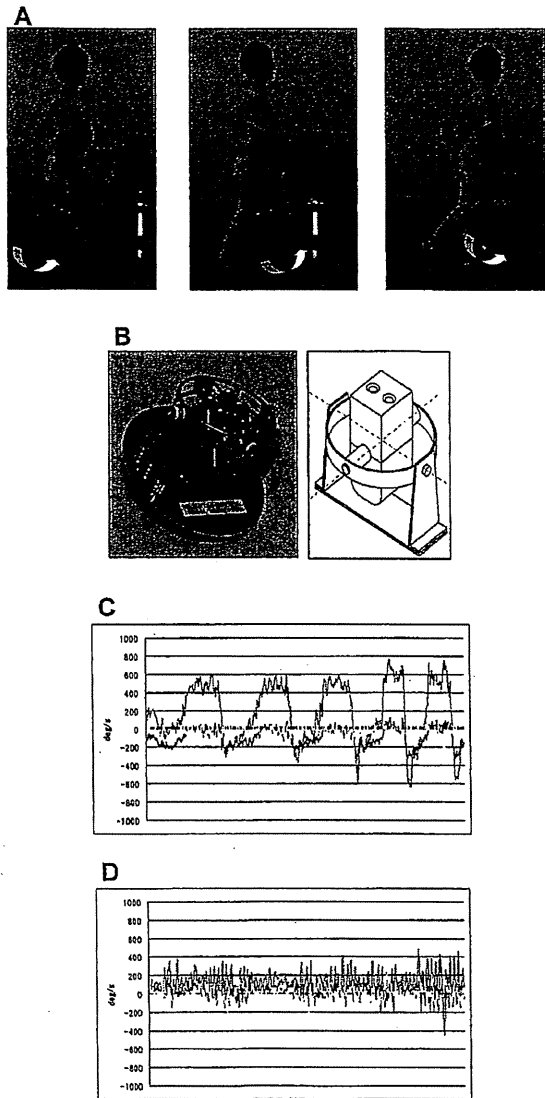


図3 耐衝撃試験結果

- 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.*, 239:1 (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 細菌毒素の種類
- 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 チューリンゲンシス菌
- 5 ボツリヌス菌
- 6 デイフィシル菌
- 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 シンテリア菌
- 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 パストレルラ・マルトシダ
- 21 ボルフィロモナス・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方法を決定し、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(非血縁者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半面、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。

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。

各種指針で求められる品質管

理・安全確保体制は、①セルプロセッシングセンター(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クであり、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

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。

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

たっ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-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、

次ページへ続く

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

# 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

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。

## 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

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「病気や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)②①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応じ、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知氏は、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、東京大学医科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年生存例は認められなかったのに対して、180日以上症例では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。

バ性白血病(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。

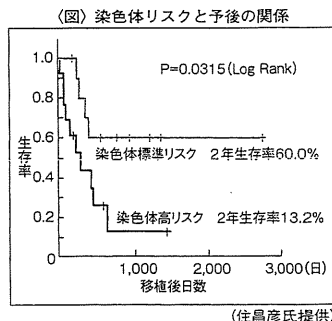
CB移植の適応決定から移植日までの期間は中央値41.5日(21～98日)で、移植片対宿主病(GVHD)予防のための免疫抑制薬は、graft versus leukemia(GVL)効果誘導のため血中濃度を低めに調整している(タクロリムス $10 \sim 12 \text{ ng/mL}$ )。

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VOD 1例のは

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。



(記録) 第 31 回 日本臨床薬理学会年会 2010 年 12 月 1~3 日 京都  
シンポジウム 3: 細胞治療

## 座長のまとめ

木村 貴文\*<sup>1</sup>  
前川 平\*<sup>2</sup>

本シンポジウム「細胞治療」は、細胞治療・再生医療を臨床の現場で先駆的に展開されている、あるいは今後の展開がおおいに期待されているリーダーの方々の発表を通して、多くの研究者や医師が関心を寄せるがんや難治性疾患に対する治療戦略の現状と問題点および将来への展望についての認識を共有いただくことを目的として企画した。

そのためにまず、現在すでに厚生労働省の承認を経て進められているがん特異的 T 細胞輸注療法および骨髄間葉系幹細胞を用いた骨再生治療の 2 つの臨床研究についてそれぞれご発表いただいた。続いて本邦発の革命的医療として実現に向けた加速化がはかられている人工多能性幹 (iPS) 細胞を用いた再生医療の現状と問題点について自家移植および同種移植を目指す立場からそれぞれご発表いただくこととした。

研究的意味合いの強い先端医療についてのセッションであることから、まずは個々の発表の十分な情報量の確保をはかるためにパネルディスカッションは行わず、発表に続く質疑応答という従来の形式で進めさせていただいた。

### 1. がん特異的 T 細胞輸注療法の新展開

最初のシンポジストの池田裕明先生からは、三重大学を拠点として実施されている分子標的がん免疫療法の実際について詳しい解説をいただいた。悪性黒色腫以外のがんにおいて従来はほとんど不可能とされてきたがん特異的 T 細胞の大量調整であるが、長期培養後の細胞の老化とその数の少なさという 2 つの問題を克服するためにユニークな工夫が凝らされた。すなわち、がん抗原特異的 T 細胞受容体 (TCR) を人工的に

患者 T リンパ球に発現させてしまおうという発想である。研究は、多くの固形腫瘍が悪性黒色腫抗原 MAGE-4 を発現していることを確認することから始まった。その結果、食道がんでは 50% 以上、頭頸部がんや卵巣がんでは 30% 以上、その他にも肺がんや胃がんあるいは子宮体がん等においても 20% 前後の症例で MAGE-4 を発現していることが明らかとなった。これらの知見は、MAGE-4 特異的 HLA-A24 拘束性キラー T 細胞から単離した TCR を患者の CD8<sup>+</sup>T 細胞に発現させた「人工キラー T 細胞」の誕生へとつながる。三重大学では現在、MAGE-4 や NY-ESO-1 などの腫瘍抗原が陽性の固形腫瘍患者を対象とする「がんワクチン療法」と同時に、治療抵抗性進行期食道がん症例を対象とする「T 細胞受容体遺伝子導入リンパ球輸注療法 (TCR 遺伝子治療)」が臨床試験としてすでに実施されている。

また、MAGE-4 特異的 TCR 導入による内因性 TCR ( $\alpha$  と  $\beta$  によって構成される) とのミスペア形成についても言及された。導入 TCR の発現低下や予期せぬペア形成による自己免疫反応の惹起が懸念されることから、siRNA による内因性 TCR の発現抑制を試みたところ、導入 TCR の発現効率と腫瘍細胞障害性のいずれもが改善されたという。さらには、がん特異的 TCR 導入 T 細胞輸注療法の効果がワクチンとの併用によってさらに増強されること、がん特異的 TCR 導入 CD8<sup>+</sup>細胞を CD4<sup>+</sup>T 細胞と混合培養すると CD8<sup>+</sup>細胞の生存性向上と抗腫瘍効果が増強することなども新たな知見として報告された。治療効果のさらなる改善に期待を抱かせる研究成果として興味深い。

### 2. 難治性骨壊死疾患に対する間葉系幹細胞 (MSC) を用いた臨床試験

続いて京都大学医科学研究所を中心に行われている臨床研究について青山朋樹先生から報告いただいた。大腿骨頭無腐性壊死症 (10 例) と月状骨無腐性壊死症

\*<sup>1</sup> 京都大学 iPS 細胞研究所規制科学部門  
〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町 53

\*<sup>2</sup> 京都大学医学部附属病院輸血・細胞治療部、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

(10例)に対する自家骨髄由来MSCを用いた骨再生治療が目的である。両疾患とも原因不明であり若年層にも好発する。また、有効な根治療法はこれまで存在しなかった。本臨床研究を開始するにあたっては、(1)骨髄MSCの生物学的検討、(2)前臨床試験、(3)GMP対応と細胞調整施設(CPC)との連携、(4)臨床試験実施申請という4つのステップが設定された。(1)、(2)および(4)の詳細については青山先生の稿に委ねたい。本臨床研究では(3)GMP対応とCPCとの連携を重要なステップと位置づけ、従前よりさまざまな細胞製剤の調製ですでに実績のあった京都大学医学部附属病院分子細胞治療センター(CCMT)と早い段階からの連携をはかった。この取り組みによってGMPをはじめとする種々の規制への対応が可能となり、細胞治療で最も重要な調製細胞の安全性と有効性および品質が担保されるのである。

これまで治療を受けた大腿骨頭壊死症例10例(ほとんどが20~30歳代)に移植後1年を経過した時点で有害事象は認められず、日常生活の改善度も極めて良好との報告があり、高度先進医療への展開が期待される場所である。

### 3. iPS細胞を用いた網膜疾患治療

理化学研究所の高橋政代先生からは、山中伸弥博士(現京都大学iPS細胞研究所所長)らによって2007年に発表されたヒトiPS細胞の世界初の臨床応用例として期待されている研究計画についてご報告いただいた。ES細胞を用いたこれまでのご自身の研究によって網膜色素上皮細胞(RPE)への非常に効率よい*in vitro*分化誘導法をすでに開発されていたこともあり、加齢黄斑変性(AMD)の視機能維持や改善を目的とした自家iPS細胞由来RPE移植が実現可能となった。これを臨床研究として実施するためには、移植片としての有効性と安全性が担保されなければならない。そこで、細胞調製施設と連携し、製剤と品質管理の整備を行うとともに、規制当局への相談や面談を通じて安全性と品質の担保に必要な検証項目を整理し、動物実験も含めて安全性についての検討を十分に行ったとの

報告がなされた。一日も早いFirst-in-manの実施を期待したい。また、AMDの原因遺伝子によってアポトーシスの機序が異なり、薬剤の効果も異なることが明らかとなったことから、細胞治療にとどまらず、病態解明および治療法の判定や開発にもiPS細胞の貢献が期待されるとの興味深い研究成果も報告された。

### 4. iPS細胞研究の現状と課題

最後に、難治性疾患に対する同種移植片の原料細胞として期待されるiPS細胞の臨床応用を可能にするためにどのような研究が行われており、新たな規制的枠組の制定も含めてどのような社会的取組みが必要となってくるかについて、京都大学iPS細胞研究所の青井貴之先生から包括的なご講演をいただいた。iPS細胞作製技術の問題点として「多様性」が提起された。つまり、樹立法の多様性とクローンの多様性である。現在、iPS細胞を樹立するための主要要素は、由来細胞、導入因子、遺伝子導入法(ベクターなど)であるが、それぞれ多岐にわたり、それらの組合せは理論上膨大な数となる。安全で高品質の移植用iPS細胞を作製するための最適の組合せを選択しなければならないが、そのためにはiPS細胞の特性や機能を正当に評価する項目の設定が急務であるとの解説があった。新たな規制的枠組の設定を意味することから、規制当局との連携が重要と考えられる。また、同じドナーから作製したiPS細胞であってもクローンごとにその増殖性や分化指向性に違いがあることも分かってきており、クローン選択基準についても評価項目の設定が重要とのことである。あらかじめ分化多能性に優れたクローンが選択できれば、多くの患者に使用可能な移植用細胞として保存しておくことができる。この方法は、適切な病期での移植やiPS細胞治療のコストダウンの観点から有望であるので、HLAホモタイプ・ドナーからiPS細胞を作製しバンク化することを目指しているとの紹介がなされた。世界に先駆けてiPS細胞技術が多くの難病に対する細胞治療に応用されることに期待したい。

(記録) 第31回 日本臨床薬理学会年会 2010年12月1~3日 京都  
シンポジウム3: 細胞治療

## 1. がん特異的 T 細胞輸注療法の新展開

池田裕明\*

### 1. がん抗原の発見は特異的免疫療法を可能とした

腫瘍免疫学の歴史、とくにヒトがんの治療への応用を考えると、重要な一歩として、1990年代はじめの Boon らや Kawakami らの仕事に始まる、T 細胞が認識するがん抗原の同定が挙げられる<sup>1,2)</sup>。ヒトがん抗原の発見は、特異的免疫療法の開発を可能とした。ひとつの方法は、同定されたがん抗原を直接がん患者に投与し、体内で当該のがん抗原に対する特異的免疫応答を誘導する、がんワクチン療法である。もう一つの方法は患者のリンパ球とがん抗原を体外で混合培養し、腫瘍反応性リンパ球を大量に調整しこれを患者に輸注する、免疫細胞輸注療法である。いずれの場合も誘導/調整されたがん抗原特異的なリンパ球ががん細胞を攻撃、破壊することを目指している。

### 2. 期待される腫瘍特異的 T 細胞輸注療法

近年、上記第2の方法である、抗原特異的な T 細胞の輸注療法が有効ながん免疫療法として期待されている。具体的には、末梢血やがん浸潤リンパ球 (tumor infiltrating lymphocytes: TIL) を、腫瘍抗原ペプチドや腫瘍細胞等により体外で刺激し、腫瘍特異的な T 細胞を大量調整し輸注する方法である<sup>3)</sup>。

本治療も初期には臨床的な効果や輸注した T 細胞の患者体内生存が限られているという結果が多かった<sup>4-6)</sup>。これらの報告例にはおもに2つの問題点があったと考えられる。第1には、担がん生体における免疫抑制機構の存在がある<sup>7-10)</sup>。第2には、輸注する T 細胞のクオリティーの問題がある。初期の輸注療法では長期に *in vitro* 培養を繰り返した T 細胞が用いられる場合が多かった。近年の T 細胞研究が示すところでは、長期培養 T 細胞は *in vitro* におけるエフェクター機能は強いが、*in vivo* における生存性に劣り、輸注療法に用いた場合の抗腫瘍効果が弱い<sup>11-16)</sup>。

米国の Rosenberg らのグループは T 細胞輸注療法実施患者に化学療法剤や放射線照射の前処置を加え、担がん生体の免疫抑制機構の解除を目指している<sup>3)</sup>。これらの前処置により、がん患者中の Treg が抑制されるとともに、輸注されたリンパ球がホメオスタティック拡大により活性化され増殖する<sup>17)</sup>。同時に、輸注する T 細胞の *in vitro* 調整時間は短く設定される傾向にある。実際、彼らは進行期の悪性黒色腫患者を対象として、化学療法剤にて前処置をした後に、TIL を用いた特異的 T 細胞輸注を行い、50%近く

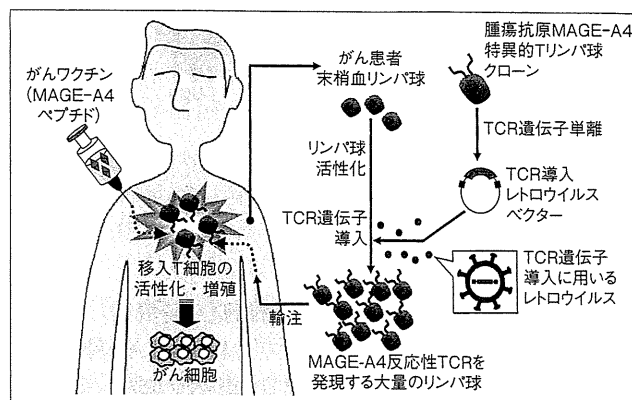


Fig. 1

抗原受容体 (TCR) 改変 T 細胞輸注. ここではさらにペプチドワクチンを加えて生体内での輸注細胞の活性化と増殖をめざす複合的免疫療法を示す。

の患者に RECIST 基準で有効性 (PR+CR) を認めたと報告した。さらに前処置に放射線照射を加えることにより、RECIST 基準で 72% という有効率を報告している<sup>18)</sup>。進行期悪性黒色腫では標準的な化学療法の奏効率は 20% 未満と考えられ、免疫療法が抗癌剤による治療成績を大きく上回る可能性を示している。

### 3. TCR 遺伝子治療

以上のごとく、大きく期待される腫瘍特異的 T 細胞輸注療法であるが、現在克服すべきいくつかの大きな課題がある。ひとつには、悪性黒色腫を除く多くのがん種では十分な数の腫瘍特異的 T 細胞を体外で調整することが極めて困難であり、この治療法の適用は現在ほぼ悪性黒色腫に限られている。また、大量の特異的リンパ球の調整には患者リンパ球を体外で長期培養することが必要な場合が多く、長期培養 T 細胞は輸注後に *in vivo* 生存性が低い。これらの問題点の克服法の1つとして、がん抗原特異的キラー T 細胞クローンから得られた TCR 遺伝子を患者末梢血より得られた CD8<sup>+</sup> T 細胞に導入し、がん特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞を短期間に人為的に大量に作製し輸注するアプローチ、いわゆる TCR 遺伝子治療が検討されている (Fig. 1)。

我々はタカラバイオ(株)との共同研究として、がん精巢抗原 MAGE-A4 を標的とした TCR 遺伝子治療を開発している。MAGE-A4 特異的キラー T 細胞クローン (HLA-A24 拘束性) 由来の TCR 遺伝子を発現するレトロウイルスベクター (ベクター A) を作製した。この遺伝子導入細胞は

\* 三重大学大学院医学系研究科遺伝子・免疫細胞治療学  
〒514-8507 津市江戸橋 2-174

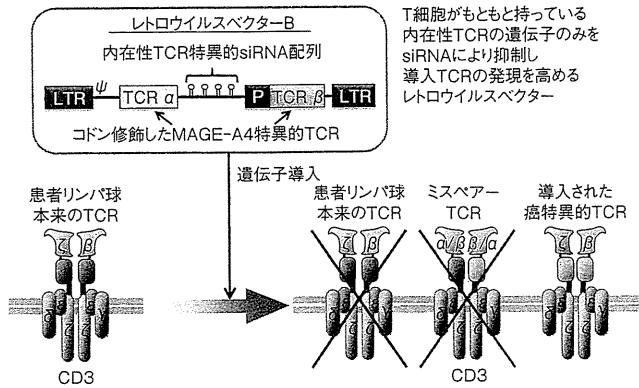


Fig. 2

レトロウイルスベクター B の開発は内在性 TCR の発現抑制と導入 TCR の更なる高発現を可能にした (一部文献 21 より改変引用)。

MAGE-A4 陽性 HLA-A24 陽性腫瘍細胞を特異的に傷害した<sup>19)</sup>。さらに、重度免疫不全マウスに MAGE-A4 陽性ヒト腫瘍細胞株を皮下接種し、この TCR 遺伝子改変 T 細胞を輸注することにより腫瘍の成長を抑制することを確認した。

#### 4. TCR ミスペアリングを防ぐ新規ベクターの開発

TCR 遺伝子導入 T 細胞を用いた治療法において、現在問題点のひとつと考えられているのが、患者 T 細胞がもともと持つ内因性 TCR の存在である。遺伝子導入された腫瘍特異的 TCR と内因性 TCR はリンパ球上の CD3 分子を競合し、結果的に導入 TCR の発現を阻害する。さらに、遺伝子導入された TCR の  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖は内因性 TCR の  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖との間で望まれないヘテロダイマー (ミスペア TCR) を形成する可能性がある。このことは腫瘍特異的 TCR のヘテロダイマー形成の確率を減少させるとともに、予測不可能な特異性や自己反応性をもつ TCR が出現する可能性もはらむ<sup>20, 21)</sup>。

我々は、この問題の解決策として、内因性 TCR の発現を特異的に阻害する siRNA を含む新規レトロウイルスベクター (ベクター B) を開発した (Fig. 2)。導入する腫瘍特異的 TCR にはコドン修飾を施し、siRNA の効果を受けないようにした。本ベクターを用いると、内因性 TCR の発現が特異的に低下し、導入 TCR の発現が向上した。その結果、TCR 改変 T 細胞は効率良く腫瘍細胞を傷害した<sup>22)</sup>。当然、内因性 TCR の発現減少はミスペアリングの減少を意味する<sup>21)</sup>。さらに、本ベクターは導入されたベクターコピー数が少ない状況においても効率良く導入 TCR を発現し、安全に高効率な TCR 遺伝子導入を可能とした。

#### 5. 免疫抑制機構を防ぐ手だて

担癌宿主の免疫抑制機構が T 細胞輸注療法に及ぼす障壁について我々は腫瘍抗原特異的 TCR トランスジェニックマウスを用いた研究を行ってきた。この研究の中で、輸注した T 細胞が生体内でマルチファンクション性 (1 つの細胞がさまざまなサイトカインや細胞障害顆粒産生などの

多機能を持つこと) を獲得することが重要であり、しかし腫瘍の進展に伴い Treg を介してこのマルチファンクション性獲得が阻害されることを見いだした<sup>23, 24)</sup>。この解決策として、TCR 遺伝子導入 T 細胞を輸注後、抗原ペプチドによるワクチンを接種し *in vivo* の活性化を付加し、腫瘍特異的 CD8 陽性 T 細胞とともに CD4 陽性 T 細胞を混合し培養すると CD8 陽性 T 細胞のマルチファンクション性が向上し、抗腫瘍効果が増強することが明らかとなった。

これらの基礎的検討の結果、臨床試験のプロトコールにおいても T 細胞輸注療法に引き続き抗原ペプチドによるワクチンを付加すること、TCR 遺伝子導入 T 細胞の *in vitro* 培養の際に CD8 陽性 T 細胞に純化せずに CD4 陽性 T 細胞とともに培養を行うことを計画した。この TCR 遺伝子改変 T 細胞を用いた T 細胞輸注療法の臨床試験は厚生労働省により承認され、三重大学において実施中である。登録された患者において、輸注したリンパ球が投与患者の末梢血中に輸注後 100 日を超えて生存し、機能を維持し続けていることが確認されている。

このように、腫瘍特異的 T 細胞の輸注療法とがんワクチン療法を複合することにより、担癌宿主における免疫抑制機構を一定程度防ぐことができると考えられる。今後はより積極的に免疫抑制機構を防ぐ手だてを組み合わせることが肝要である。具体的には STAT3, IDO 等のがん局所における免疫抑制機構に関わる分子に対する低分子阻害剤や、免疫抑制性細胞やその機能分子に対する抗体医薬等が挙げられる。がんワクチン、細胞療法、免疫抑制阻害剤の有効な組合せにより、単なる補助療法を超えた強力ながん免疫療法が開発されると期待される。

#### 文 献

- 1) Boon T, et al. *Annu Rev Immunol.* 2006; 24: 175-208.
- 2) Kawakami Y, et al. *J Exp Med.* 1994; 180(1): 347-52.
- 3) Gattinoni L, et al. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6(5): 383-93.
- 4) Topalian SL, et al. *J Clin Oncol.* 1988; 6(5): 839-53.
- 5) Rosenberg SA, et al. *N Engl J Med.* 1988; 319(25): 1676-80.
- 6) Rosenberg SA, et al. *J Natl Cancer Inst.* 1994; 86(15): 1159-66.
- 7) Sakaguchi, S et al. *Immunol Rev.* 2001; 182: 18-32.
- 8) Bronte V, et al. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5(8): 641-54.
- 9) Pure E, et al. *Nat Immunol.* 2005; 6(12): 1207-10.
- 10) Khong H, et al. *Nat Immunol.* 2002; 3(11): 999-1005.
- 11) Jameson SC, et al. *Immunity.* 2009; 31(6): 859-71.
- 12) Klebanoff CA, et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102(27): 9571-6.
- 13) Hinrichs CS, et al. *Blood.* 2008; 111(11): 5326-33.
- 14) Mueller K, et al. *Eur J Immunol.* 2008; 38(10): 2874-85.
- 15) Araki K, et al. *Nature.* 2009; 460(7251): 108-12.
- 16) Gattinoni L, et al. *Nat Med.* 2009; 15(7): 808-13.
- 17) Dudley ME, et al. *Semin Oncol.* 2007; 34(6): 524-31.
- 18) Dudley M, et al. *J Clin Oncol.* 2008; 26(32): 5233-39.
- 19) Hiasa A, et al. *Gene Ther.* 2008; 15(9): 695-9.
- 20) Bendle GM, et al. *Nat Med.* 2010; 16(5): 565-70.
- 21) Brenner M. *Nat Med.* 2010; 16(5): 520-1.
- 22) Okamoto S, et al. *Cancer Res.* 2009; 69(23): 9003-11.
- 23) Imai N, et al. *Eur J Immunol.* 2009; 39(1): 241-53.
- 24) Imai N, et al. *Cancer Sci.* 2009; 100(7): 1317-25.

〈記録〉第31回 日本臨床薬理学会年会 2010年12月1~3日 京都  
シンポジウム3：細胞治療

## 2. 難治性骨壊死疾患に対する間葉系幹細胞を用いた臨床試験

青山 朋 樹<sup>\*1,\*2</sup> 笠井 泰 成<sup>\*3</sup> 上田 路 子<sup>\*1,\*2</sup>  
前川 平<sup>\*3,\*4</sup> 中村 孝 志<sup>\*5</sup> 戸口田 淳 也<sup>\*1</sup>

### 1. はじめに

再生医療とは病変組織を自家あるいは他家の細胞、組織を輸注あるいは移植することで、新しい組織に置換する治療であり、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。用いられる細胞の中で間葉系幹細胞は比較的調製が容易なこと、*in vitro*の実験でさまざまな細胞に分化する能力が証明されていることなどから、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。

本臨床試験で対象にした疾患は大腿骨頭壊死症と月状骨壊死症（キーンベック病）である。両者とも無腐性骨壊死という原因も治療法も明らかになっていない疾患である。病理像としては血流の途絶と生細胞の消滅が認められ、関節軟骨の近傍に生じた際には、関節破壊による強い痛みと可動域低下による日常生活能力の低下が引き起こされる。現状においては壊死部を治癒するための根本的治療法は存在しない。

本稿においては臨床試験までの概要、臨床試験の実施経過を提示し、探索的医療における細胞治療の実際を解説する。

### 2. 基礎細胞生物学的検討

現時点では間葉系幹細胞に明確な定義はなく、その存在部位も骨髄、脂肪、滑膜、臍帯血等さまざまであり、調製法も一定ではない。そこではじめに世界中で最もポピュラーな調製法である骨髄液から遠心法によって間葉系幹細胞の調製を行い、その性質を調べてみた。29人のドナー由来の骨髄から調製した間葉系幹

細胞は、培養初期では全例、明確に骨、脂肪、軟骨の三方向への分化する能力を示したが、長期間培養（10継代）後には脂肪、軟骨への分化能は低下していた。増殖能に関しては、平均151日で増殖が停止したが、1例では300日以上培養可能であった。この細胞を精査すると染色体異常とp16遺伝子転写調節領域のメチル化を認めた。この細胞が腫瘍を形成することはなかったが、100日以上という長期間の培養工程中には、ゲノムあるいはエピゲノムの異常が発生する可能性があることが示された<sup>1)</sup>。これらの基礎細胞生物学的検討から間葉系幹細胞を臨床応用する際には、そのパフォーマンスと安全性の観点から“調製を短期間に終了することが必要”という結論が導き出された。

### 3. 前臨床試験

無腐性骨壊死における病巣部は前述のように血流が途絶し、生きた細胞が存在しない壊死組織が充満した極めて劣悪な環境である。ここに間葉系幹細胞を移植しても、その機能を十分に発揮することは困難であると想定される。そこで血流を回復させるために血管柄付き骨移植を、さらに新たな骨母床を構築するために生体分解性人工骨であるベータリン酸三カルシウム（オスフェリオン®）を足場として併用する治療法を考案した。まずヒトの月状骨に相当するイヌ月状舟状骨（イヌでは月状骨と舟状骨が愈合）内の海綿骨を搔爬した後、搔爬部を液体窒素で凍結する処理により無腐性月状骨壊死モデルを作成した。そこにあらかじめ体外培養した間葉系幹細胞を人工骨とともに移植し、さらに血管柄付き骨を移植した。結果として、移植手術後わずか1カ月で極めて良好な骨形成が認められ、1年間の観察でも安全性に問題は生じなかった。この組織所見ではLacZでラベルした間葉系幹細胞が骨芽細胞に分化して定着しているだけでなく、一緒に移植した人工骨が良好に分解され新しい骨に置き換わる骨り

\*1 京都大学再生医学研究所

〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町 53

\*2 京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻

\*3 京都大学医学部附属病院分子細胞治療センター

\*4 京都大学医学部附属病院輸血細胞治療部

\*5 京都大学大学院医学研究科整形外科



モデリング像を呈していることから、移植した間葉系幹細胞が単に分化するだけでなく、良好な骨環境を構築していることが示された<sup>2)</sup>。

#### 4. 臨床用細胞調製実験

ヒトの体に移植する細胞を調製する操作は、手技的には通常の細胞培養実験と同等であっても、高い品質の操作が必要であり、医薬品と同等の調製が要求される、そのためにはGMP (Good Manufacturing Practice) の知識を十分習熟してから開始する必要がある。そこで、これまでに樹状細胞移植、膝関節移植を実施しており、GMP基準の細胞治療に関する知識が蓄積されている京都大学医学部附属病院分子細胞治療センター (Center for Cell and Molecular Therapy, 以下CCMT) において、GMP講習(1.5時間×5回)を受講した。GMP習熟の後に細胞を調製するための標準作業手順書の作成を行い、一つ一つの作業手順がGMP基準ののっとなっているかを検証した。作業の際に用いる物品についてもすべて品質保証、ロット管理、トレーサビリティが可能なものという観点から医薬品、GMP準拠、ISO対応、JIS対応のものを選定した。そこで完成した標準作業手順書に沿って、実際のCCMTの無菌細胞調製室内で模擬培養実験を繰り返し、標準作業手順書の微調整、動線の確認を行った。また最終製品の出荷判定のために最も妥当な判定項目を選定し、判定項目に対するバリデーションを十分に行い、最終製品に対する責任体制を構築した。

#### 5. 臨床試験実施申請

予備検討を十分に行い、臨床試験実施申請を行った。対象とした疾患は月状骨無腐性壊死および大腿骨頭無腐性壊死それぞれ10例で、いずれも画像診断分類上Stage 3とこれまでに有効な治療方法が確立されていない病期である。治療の概要は、はじめに腸骨より採取した自家骨髄液から間葉系幹細胞を分離し、自己血清を用いて約1000~10000倍まで体外培養する。骨壊死部を搔爬した後に人工骨(オスフェリオン®)と間葉系幹細胞を移植し、血管柄付き骨移植を併用し、血行を再建するというものである。エンドポイント評価は術後2年とし、評価項目は厚生労働省粗案に基づくX線画像診断、CT画像から算出した海綿骨占有体積と臨床評価点数による。本試験の目的を第I~II相試験と位置付け、これらの実施計画を京都大学大学院医学研究科・医学部および医学部附属病院 医の倫理委員会に2006年7月19日に提出した。2006年9月1日から施行予定であった「ヒト幹細胞を用いた臨床研究に

関する指針」に沿った臨床試験に対応するために、審査が長期化し、最終的に倫理委員会から許可を得たのは2007年5月17日である。そのうち厚生科学審議会での審査を経て最終的に臨床試験「大腿骨無腐性壊死患者に対する骨髄間葉系幹細胞を用いた骨再生治療の検討」「月状骨無腐性壊死患者に対する骨髄間葉系幹細胞を用いた骨再生治療の検討」の実施許可を得ることができたのは2007年11月7日である。

#### 6. 臨床試験実施経過

本臨床試験の第1例の症例登録は2007年11月29日である。以後順調に臨床試験は遂行され2010年12月の時点で月状骨壊死症例5例、大腿骨頭壊死症例10例(いずれも10例予定)に対して移植治療が実施されている。これらの移植治療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<sup>3)</sup>。

#### 7. おわりに

今回の臨床試験の最終結果は10例の移植治療後2年の安全性、有効性判定による。今後この治療を推進していくにあたっては、本臨床試験の安全性、有効性の結果はもちろんであるが、本治療と従来の治療法との優位性を比較し、適切な症例に対して応用することが重要である。

#### 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) Shibata KR, Aoyama T, Shima Y, Fukiage K, Otsuka S, Furu M, et al. Expression of the p16INK4A gene is associated closely with senescence of human mesenchymal stem cells and is potentially silenced by DNA methylation during in vitro expansion. *Stem Cells*. 2007; 25(9): 2371-82.
- 2) Ikeguchi R, Kakinoki R, Aoyama T, Shibata KR, Otsuka S, Fukiage K, et al. Regeneration of osteonecrosis of canine scapholunate using bone marrow stromal cells: possible therapeutic approach for Kienbock disease. *Cell Transplant*. 2006; 15(5): 411-22.
- 3) 青山朋樹, 笠井泰成, 上田路子, 前川平, 中村孝志, 戸口田淳也. 大腿骨頭無腐性壊死症に対する自己骨髄間葉系幹細胞を用いた臨床試験: 細胞調製の安全性管理体制に関して. *再生医療*. 2010; 9(4): 437-43.

〈記録〉第31回 日本臨床薬理学会年会 2010年12月1~3日 京都  
シンポジウム3:細胞治療

### 3. iPS細胞を用いた網膜疾患治療

高橋 政代\*

iPS細胞はES細胞と同様に身体のあらゆる組織細胞を作ることが可能な多能性幹細胞である。その中でも網膜色素上皮細胞(RPE)は*in vitro*で成熟細胞にまで分化誘導することができ、色素を持っているためにFACSを用いることなく純化することが可能である。また、必要な移植細胞数が10の5乗個と少ないために1枚の培養皿で移植細胞を確保できるという大きな利点もある。これらの性質からiPS細胞を用いた細胞移植の中でも最も臨床応用に近い細胞と考えられている。現在は、移植用網膜色素上皮細胞の臨床応用可能な作成法や品質管理法の整備、そして移植治療が安全であることを動物実験で確認している。

RPEは視細胞の維持に必須であり、その障害は二次的な視細胞変性による視機能の低下につながるが、RPE細胞移植の効果は移植の際の視細胞の状態によって異なる。視細胞の回復力が残存している場合は視機能の向上が望めるが、最初の臨床研究のように安全性が重視され重篤な患者への応用であれば、視細胞はすでに変性しているので見えるようになるというわけではなく、疾患にとっては進行を止める、遅らせるという効果のみと考えられる。視機能の真の再生には

視細胞移植を待たねばならない。

iPS細胞のもうひとつの応用として疾患の発生機序の解明や薬物の効果判定がある。我々は原因遺伝子が異なる5症例の網膜色素変性患者の皮膚線維芽細胞からiPS細胞を作成し視細胞を分化誘導した。正常iPS細胞では視細胞分化後30日以上培養しても視細胞数は変化しないが、網膜変性患者由来iPS細胞から分化した視細胞は30日の培養によってその数が有意に減少した。これは遺伝子変異に伴う酸化ストレス、小胞体ストレスなどによるアポトーシスと考えられた。それぞれのアポトーシスの機序は変異遺伝子によって異なり、抗酸化作用のあるビタミンEの保護効果も遺伝子変異によって異なった。このように、同じ網膜色素変性であっても、原因遺伝子によってアポトーシスの機序が異なり、薬剤の効果も異なることがiPS細胞によって確認された。上記のような薬剤効果判定システムが簡便に安価に可能となれば個別医療へとつながる可能性がある。

【当日のプログラム・抄録集より転載】

\* 理化学研究所発生再生科学総合研究センター  
〒650-0047 神戸市中央区港島南町 2-2-3

〈記録〉第31回 日本臨床薬理学会年会 2010年12月1~3日 京都  
シンポジウム3:細胞治療

## 4. iPS細胞研究の現状と課題

青井 貴之\*

### 1. はじめに

人工多能性幹 (induced Pluripotent Stem, iPS) 細胞は、体細胞に少数の因子を導入して樹立される多能性幹細胞である。これは、既知の因子により体細胞を初期化することができるという、基礎生物学における重大なインパクトを持つとともに、その種々の応用により研究・開発・医療に新たな方法をもたらすものとして大きく注目されている。iPS細胞は、ES細胞と同様に分化多能性と自己複製能を有している。一方、ES細胞が受精卵から樹立されるのに対し、iPS細胞は体細胞から樹立するという違いがあるが、このことは、胚の滅失という倫理的問題の回避に加え、個性の明らかにされているさまざまな個人に由来する多能性幹細胞が樹立可能であることを意味する。ここでいう個性とは、人種や性別といった遺伝的背景であり、また、何らかの遺伝性疾患を有しているか否かであり、さらには、移植免疫に関わるHLAタイプなどである。このことから、iPS細胞の応用方法として、その開発の原点となった「自己由来の多能性幹細胞による再生医療」というモデルのみならず、他家移植も含む再生医療や創薬、病態研究等への幅広い展開が期待されている。

### 2. iPS細胞の応用方法

従来、創薬における毒性等の試験はおもに動物を用いて行われ、実際のヒトに投与する臨床試験を行う前にヒト細胞を用いた検討を行うには、初代培養細胞を用いた検討のみが可能であって、これは使用できる細胞数が限定的であるし、さまざまな遺伝的背景の各種初代培養細胞を揃えることは困難である。薬剤の副作用は遺伝的背景によって異なるものがあることから、種々の遺伝的背景を有するiPS細胞から目的の細胞を大量に作製して試験に用いることは有用であろう。また、何らかの遺伝性疾患を有する患者の体細胞からiPS細胞を作製し、その疾患の標的細胞を作製し病態を再現することができれば、その病態の解明に大きく資する可能性が考えられるし、そうして得られた細胞を用いた薬剤スクリーニングなどにより、治療法の開発が可

能となる。たとえば、心筋が侵される疾患の患者から心筋を多量に採取して実験に用いることは不可能であるが、その患者の皮膚等の組織を僅かに採取し、そこからiPS細胞を経て心筋細胞を作りさまざまな実験に供することは、すでに現実の技術となっている。現在、薬剤の候補となる多数の化合物からなるライブラリーをさまざまな研究機関や企業が保有しており、一方で、細胞培養工程等の自動化により、これらライブラリーを用いたハイスループット・スクリーニングを可能とする技術もすでに稼働している。iPS細胞の医療における具体的成果は、まず初めにこうした手法による創薬、とくに、何らかの遺伝子異常による単因子疾患に有効な薬剤の同定という形で出てくるものと筆者は考えている。

iPS細胞を用いた細胞移植治療については、上述の病態研究や創薬に比べて実施には時間を要すると考えられるものの、その実現に向けた積極的な取り組みは続いている。

### 3. iPS細胞研究の現状と課題

iPS細胞をさまざまな分野に真に役立てるためには、我々は品質の安定性や、感染や造腫瘍のリスクなどを制御しなければならない。このためには、iPS細胞を用いた細胞移植に特徴的ないくつかの点に留意する必要がある。

#### 1) iPS細胞における2つの多様性

##### ① 樹立法の多様性

iPS細胞とES細胞との比較において、上で述べた点に加え、もうひとつ重要な相違点がある。それは、その樹立法について、ES細胞は基本的には受精卵を培養するという1つの方法であるのに対し、iPS細胞では樹立法が多様であるということがある。最初に報告されたiPS細胞は、線維芽細胞をその由来とし、4つの転写因子を、レトロウイルスベクターを用いて導入することで樹立された。その後、現在に至るまでに、由来細胞、導入因子、因子導入法において、さまざまな手法によるiPS細胞樹立が報告されている。そして、これらの樹立方法の違いは、iPS細胞の性質の違いに繋がることが分かっている。

たとえば、樹立の際にcMycを用いることは、iPS細胞樹立効率を上昇させるとともに、キメラマウスにおけるキ

\* 京都大学 iPS 細胞研究所 規制科学部門  
〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町 53

メラ率や生殖細胞へ寄与する能力に対して正の効果がある。一方、cMycをレトロウイルスベクターで導入することはiPS細胞のキメラマウスにおける造腫瘍性につながる、すなわち安全性に負の効果があることが分かっている。

ここで注意すべきことは、「よい樹立法」を明らかにするための総合的評価の必要性である。三浦らは、種々の樹立法によるマウスiPS細胞から*in vitro*で神経分化誘導を行い、これを免疫不全マウスの脳に移植する実験を行った。すべてのiPS細胞株は*in vivo*で神経組織に寄与したが、一部の株では移植片由来の奇形腫を発症することが分かった。樹立方法と奇形腫発生の有無の関係を検討した結果、由来細胞がそれに大きく関与していることが分かった。一方、意外なことにこの系においては、樹立時におけるcMyc導入の有無は結果に影響を与えなかった。

このように、評価方法によって、得られる結果が異なるのである。現在、iPS細胞の樹立法は、由来細胞、導入因子、因子導入法のそれぞれにおいて多様であり、その組み合わせは膨大なものとなる。また、個々のiPS細胞の評価には多くのコストがかかる。樹立方法の最適化を目指すには、系統的に選ばれた株のレパトリーを用いて、包括的な評価を、綿密なマネジメントの下に進めることが重要であり、それを可能とする体制整備は急務である。

#### ② クローンごとの多様性

樹立法による多様性に加え、現状の技術ではiPS細胞の株(クローン)ごとの多様性が重大な問題である。たとえ同一のドナー由来の細胞から、同じ方法、さらには1回の樹立工程で得られる複数の株間でも、クローンごとに性質が異なることが明らかになってきている。その差異を決定づける因子が何であるのかを明らかにし、さらには制御する方法の開発への取組みが盛んに行われているが、現時点では未解決である。

#### 2) クローン選抜の重要性

iPS細胞は同一の作製方法、同一の作製工程で樹立されたクローンであってもその質が多様である現状において取るべき方策は、質の良いクローンを選抜する方法を確立することである。iPS細胞は自己複製能、すなわち「同じ性質を保ったまま無限に増殖する性質」を有しているので、いったん良いクローンを選抜できれば、それを多量に増やして用いることが、現実的な対応である。実際、種々の評価法において、「良い」クローン、「悪い」クローンは各々、再現性をもって同様の結果を示すことが観察されている。

#### 3) 「良いクローン」とは何か

では、「良いクローン」とはいかなるものであろうか。iPS細胞はそもそも通常の発生過程には存在しない人工的

な細胞であり、「本来あるべき姿」というものがあるわけではない。多能性幹細胞の維持機構等の基礎的研究を別にすれば、iPS細胞は未分化状態のままに用いられることはなく、何らかの細胞に分化させて有用性を発揮するものである。すなわち、iPS細胞は最終的な目的の細胞からみると、材料であるともいえる。したがって、応用の立場からみれば、種々の応用への目的に照らして、その材料とするのに適したiPS細胞であることをもって「良いクローン」と言えるのである。

#### 4) 現状における2つの方策

このような現状において、考えられる方策は2つある。

第1に少数の「選りすぐり」そして「汎用性の高い」クローンをできるだけ広く有効に活用することである。たとえば、細胞移植に用いるならば、HLA3座(A, B, DR)がホモのドナーから樹立したiPS細胞のうち、再生医療のターゲットとして有望な細胞への分化能力が高いiPS細胞クローンとそこからの分化細胞を多量にストックし、供給できる体制を構築することが考えられている。クローン選抜に費やすコストや時間を鑑みたとき、HLAが適合するiPS細胞を用いた他家移植は現実的に有力なモデルと考えられる。また、脊髄損傷等、治療が有効な時期が発症後限定される疾患には他家細胞を用いた移植のみが適応となる。

第2の方策としては、分化誘導後、あるいは移植後の振る舞いを反映する、未分化状態における特性(評価項目)を明らかにするものである。これができれば、クローン選抜の効率を大幅に上昇させることができ、自家iPS細胞を用いた再生医療をより安全に行う道も開かれ、さらに、「良いクローン」を増幅する際に「良い状態」を保ってそれを行うことができているかの有効な指標ともなる。このことは、応用面からみたiPS細胞研究の現時点での最も重要な課題の1つといえるだろう。

#### 4. おわりに

iPS細胞が誕生してからわずか数年の間に、それに関連する研究は急速な進歩を遂げている。これは、iPS細胞を用いてのみ成し得ると考えられることへのニーズの大きさとともに、ES細胞研究等、過去の知見の蓄積が強力な基盤となっていることによる。関連する種々の科学技術の導入のみならず、規制の枠組みや社会・倫理的問題への対応なども含め、横断的、融合的に取り組むことが、iPS細胞を1日も早く、有効に社会に役立てるためにますます重要となっている。