

機関番号：12601
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008年度～2010年度
 課題番号：20590535
 研究課題名（和文） 細胞療法・トランスレーショナルリサーチにおける投与製剤及び試験システムの品質管理
 研究課題名（英文） Study on Quality Management of Processing and System Management of Cell Therapy in Translational Research.
 研究代表者
 長村 文孝（NAGAMURA FUMITAKA）
 東京大学・医科学研究所・准教授
 研究者番号：90282491

研究成果の概要（和文）：

大学でのトランスレーショナルリサーチにおける効率的な投与製剤の品質保証の方法とシステムの構築を検討した。患者への投与前に迅速に細菌の混入を検出する方法としてのPCR法は細胞が混入すると感度が低下するため不適であり、グラム染色法が感度、利便性、即時性から有用であることが示された。調製施設の継続的環境測定では細菌が検出された場合にはヒト常在菌であり、対象の絞り込みが可能である事が示された。

研究成果の概要（英文）：

We studies on the effective quality assurance methods and manufacturing system for products utilized in Translational Research of academia. PCR analysis for the detection of bacterial contamination in cell products was shown to be useless due to the impaired sensitivity. Existence of cells was considered to affect the sensitivity. On the other hand, Gram stain was proved to be useful in terms of sensitivity, convenience, and instantaneousness. Floating bacteria detected by continuous environmental measurement were shown to be human resident ones, and this result indicated that we should focus on human resident bacteria, when we operate cell processing facility.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：細胞調製、トランスレーショナルリサーチ、品質管理、無菌保証

1. 研究開始当初の背景

大学における探索型医療研究（トランスレーショナルリサーチ：TR）においては再生療法、移植療法、自己改変細胞を利用した免疫療法等の細胞療法が大きな柱である。しかし、細胞療法の開発における最大の障害は、調製施設・環境の整備と品質管理である。現在の

GMPを含めた法規・ガイドラインは大学等の小規模施設を念頭においたものではないために実際に適応する場合には多大な労力を要する。一方、諸外国の大学における承認申請を前提としない臨床試験のための細胞調製施設と我が国の差は、構造設備よりも品質保証のための検査の策定と運用であり、改

善を恒常的に行い担保するものである。また、米国第一相試験の品質管理ではグラム染色と検体保管を柱として、投与前に現実的にチェックする体制となっており、運用との関連性がますます重視されている。

2. 研究の目的

本研究では、大学等の研究機関が推進する細胞療法を効率的に、そして多くの機関が実施可能となるように品質保証システムの構築を、病原体の検出システムという観点から行う。混入する病原体等の混入の発生場所の検討、生じやすい作業工程、これらを検討し、特定の場所の特定の検査というポイントを押さえ、大学等研究機関で GMP や関連ガイドラインの運用を容易にできるようにする。また、迅速かつ効率的な検査を目的として、上記の検査では古典的ではあるがグラム染色の価値を再確認する。これらを通じて、大学における TR を主とした細胞療法の臨床試験が迅速かつより効率的に施行することを可能とすることを旨とする。

3. 研究の方法

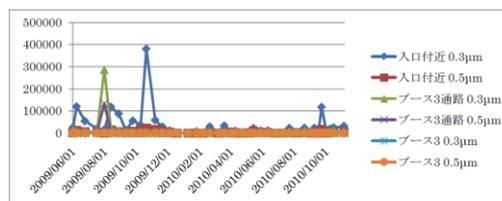
臨床に用いる調製細胞は、ヒト幹細胞臨床研究に関する指針では、治験薬 GMP 準拠が求められているが、その他の指針に準拠する指針でも準拠することが一般化している。その基準の検討のためには、調整細胞を投与した臨床試験の実施計画書と SOP 及び調整の記録、GMP、治験薬 GMP、「ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について」、米国 FDA による第一相試験に関するガイドライン、等を比較検討する必要があるため行った。これに基づき、細胞調製施設としての問題点を明らかにするために長期間の継続的な浮遊細菌、Particle の測定を行い、随時改善を実施し病原体、汚染ルートの検討を行った。浮遊細菌は、検出された場合には菌種を同定した。

解析に時間を要せず、かつ大学施設で実施可能な製品品質保証としての細菌検出は、通常実施されている培養検査との比較対照として改善が図れるように検討した。1つはグラム染色であり、本邦では近年は軽視されがちであるが米国における第一相試験での細菌チェックでは第一義的地位を依然占めており有用性と汎用性の確認を行った。もう1つは PCR 法である。細菌全体がカバーでき、検出感度が優れていれば時間的にも主義的にも優れており、至適条件の検討を含め解析を行った。

4. 研究成果

細胞調製施設の Particle の測定は、 $0.3\mu\text{m}$ と $0.5\mu\text{m}$ について約 2 年半継続的に実施した。入り口、3 ブースの通路、ブー

ス、出口と実施した。Particle 持ち込み防止の措置は行っていたが、下記グラフのように最も入り口で検出されており、ブース内ではほぼ検出されなかった。これは 3 ブースともに同様であり、入り口における Particle 持ち込み防止策の強化（防塵服の着衣方法等）が有効と考えられ、この措置により改善ができた。今後は、入り口での持ち込みの防止が最も留意する点と考えられた。



浮遊菌の測定では、試験期間中に全測定中 9 回検出された。浮遊菌の同定検査では 7 回菌群を同定することができ、*Escherichia coli*, *Lactobacillus* sp., *Enterococcus* sp., *Bifidobacterium* sp. が同定されたものであった。これらはヒトの常在菌であるが、手指を介しての浮遊が考えられ、手指消毒後の手袋の着用の徹底が有効と考えられ、無菌操作における注意点が明らかとなった。また、細胞調製施設の拭き取りによる菌検査では、クリーンベンチからは検出はされなかったが、構造物から *Staphylococcus* 群と *Candida* 群を主に認めた。

現在血液培養と同様の手法で培養液の一部を用いて菌培養が行われるのが一般的であるが 1-2 週間の培養期間を必要とする。菌の迅速診断について、培養終了後の菌検査の手法としてグラム染色を検討した。しかし初期検討において細胞培養中の細胞集団の塗抹標本では液量が少なく検討するには不十分であること、細胞浮遊液を遠心後に塗抹した場合には多数の細胞と培養中の Debris 存在下に染色された菌体を発見するには熟練が必要であり、検査に慣れていない者が行う場合には信頼性に乏しい点が問題と考えられた。そこで Bacterial 16S ribosomal RNA をターゲットにした PCR 法について検討した。菌類では 16S rRNA の conserved sequence 部位(91E-13B)が共通のシーケンスを有していることから、この部位を認識する primer を作成した。手法としては、菌コロニープレートからコロニーを適量分取し、生理食塩水に懸濁し細胞浮遊液 (K562 を使用) と混合または菌単独浮遊液を遠心上清を除去後に滅菌水を添加し煮沸を行い、再度遠心後に上清を回収し等量の AmpliTaq Gold Master Mix (Applied Biosystems) と混合した。なおより検出感度を上げるために DEXPAT, DNase, RNasin 等の有無で検

討を行った。その結果、細胞浮遊液と菌のみでは PCR 法でのバンドは検出されなかったが、上記 3 試薬の追加によりコントロール（菌のみ）と同様にバンドが検出された。これにより PCR 法の至適条件を確立することができた。

この至適条件を基に、*S. epidermidis* と *P. aeruginosa* の 2 系統をヒト由来細胞と共に培養し最適な検出条件を検討した。この際、培養液、回収した細胞等幾つかの対象を設定し検討を行った。培養液では高感度で検出できたものの、細胞の PCR 法の検討では、菌数 4×10^6 CFU/ μ l が検出限界であった。

<結果>

① *S. epidermidis*

検討 1 : 4×10^6 CFU/100 μ l (正味: 1) $\sim 4 \times 10^7$ CFU/100 μ l (正味: 1×10^6) all negative

検討 2 : 4×10^6 CFU/100 μ l (正味: 1) $\sim 4 \times 10^7$ CFU/100 μ l (正味: 1×10^6) all negative

② *P. aeruginosa*

検討 1 : 4×10^6 CFU/100 μ l (正味: 1) $\sim 4 \times 10^7$ CFU/100 μ l (正味: 1×10^6) 1 log 増加で実施

・ 4×10^6 CFU/100 μ l (正味: 1×10^6) : weak +
・ 4×10^7 CFU/100 μ l (正味: 1×10^6) : +

検討 2 : 4×10^6 CFU/100 μ l (正味: 1) $\sim 4 \times 10^7$ CFU/100 μ l (正味: 1×10^6) 1 log 増加で実施

・ 4×10^6 CFU/100 μ l (正味: 1×10^6) : +
・ 4×10^7 CFU/100 μ l (正味: 1×10^6) : +

また、*S. epidermidis* の K562 存在下での細胞の状態を変えた実験では 5×10^6 CFU が検出の下限であった。

これらの結果からは、実際にヒトに投与できる品質であることを保証することができる感度に達していない事が示された。

実際の臨床試験もモデルとして混入試験を設定したが同様であった。これにより、低速心で回収した培養液の PCR 法と、回収した細胞の一部を培養液に再度遊離させグラム染色を行うことが最も有効であることが示された。微生物は環境から混入することが多いが、細胞調製施設の構造物の拭き取り検査では *Staphylococcus* 群と *Candida* 群を主に認め、浮遊菌からはヒトの常在菌を認めた結果からは、調製した細胞の移植直前の品質チェックとしては、グラム染色と培養液の PCR 法が現在の標準的検出方法であるステリテストと同等の検出力を有しており、かつ、実際の臨床試験において、最終チェックから移植までの許容時間内に実施が可能と考えられ、実施計画に組み込むことが可能な時間で容易に行うことができることから、両者を施行することが現在最も効果的であり、しかも対象となる微生物

物を環境測定結果を日常的に把握し、その傾向を踏まえた対策と併せて評価することが有用であると考えられた。しかしながら、細胞そのものからの検出手法は今回の研究では実用に達することはなかったため、今後、新たな手法を開発することが課題であることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 56 件)

- ① Matsumoto K, Nagamura F, et al. (5 人中 2 番目) Difficulties of Nursing Staff Involved in Phase 1 Oncology Trials in Japan. *Cancer Nurses* 査読有・印刷中・掲載確定
- ② 田嶋麻紀子、長村文孝、倫理審査委員会における e ラーニングの位置づけ、臨床評価、査読有、38 巻、2011、839-853
- ③ Sato A, Nagamura F, et al. (11 人中 8 番目)、Unrelated cord blood transplantation after myeloablative conditioning in adults with advanced myelodysplastic syndromes、*Bone Marrow Transplan*、査読有、46 巻、2011、pp.257-261
- ④ 長村文孝、臨床安全性 (有害事象) が原因で中止となった薬剤の分析、月刊ファームステージ、査読無、2 巻、2011、pp.3-5
- ⑤ Sakabe S, Nagamura-Inoue T, et al、Cytokine production by primary human macrophages infected with highly pathogenic H5N1 or pandemic H1N1 2009 influenza viruses、*J Gen Virol*、査読有、92 巻、2011、pp.1428-1434
- ⑥ Kagami H, Agata H, Tojo A、Bone marrow stromal cells (bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells) for bone tissue engineering: basic science to clinical translation、*Int J Biochem Cell Biol*、査読有、43 巻、2011、pp.286-289
- ⑦ Tian Y, Tojo A, et al. (10 人中 9 番目)、Leukemic T cells are specifically enriched in a unique CD3(dim) CD7(low) subpopulation of CD4(+) T cells in acute-type adult T-cell leukemia、*Cancer Sci*、査読有、102 巻、2011、pp.569-577
- ⑧ 松本和史、長村文孝 他 (6 人中 2 番目) 看護系大学院におけるトランスレーショナルリサーチ看護学の教育プログラムの構築、看護教育、査読有、51 巻、2010、pp.696-700
- ⑨ Hishizawa M, Nagamura-Inoue T, et al.

- (25人中19番目)、Transplantation of allogeneic hematopoietic stem cell for adult T-cell leukemia: a nationwide retrospective study、Blood、査読有、116巻、2010、pp.1369-1376
- ⑩ Nagayama H, Nagamura F, et al、Gastrointestinal bleeding during the anti-angiogenic peptide vaccination in combination with gemcitabine for advanced pancreatic cancer、Clin J Gastroenterol、査読有、3巻、2010、pp.307-317
- ⑪ Chi HT, Nagamura F, et al、(7人中4番目) Detection of exon 12 type A mutation of NPM1 gene in IMS-M2 cell line、Leu Res、査読有、34巻、2010、pp.261-262
- ⑫ Inoue Y, Tojo A, et al. (5人中4番目) Timing of imaging after d-luciferin injection affects the longitudinal assessment of tumor growth using in vivo bioluminescence imaging、Int J Biomed Imaging、査読有、2010巻、article ID 471408
- ⑬ Kotani A, Tojo A, et al (5人中5番目)、miRNAs in normal and malignant B cells、Int J Hematol、査読有、92巻、2010、pp.255-261
- ⑭ Inoue Y, Tojo A, et al. (7人中6番目)、Integrated imaging approach to tumor model mice using bioluminescence imaging and magnetic resonance imaging、Mol Imaging、査読有、9巻、2010、pp.163-172
- ⑮ Mizuno D, Tojo A, et al. (10人中9番目)、Limited but heterogeneous osteogenic response of human bone marrow mesenchymal stem cells to bone morphogenetic protein-2 and serum、Growth Factors、査読有、28巻、2010、pp.34-43
- ⑯ Agata H, Tojo A, et al. Characteristic change and loss of in vivo osteogenic abilities of human bone marrow stromal cells during passage、Tissue Eng Part A、査読有、16巻、2010、pp.663-673
- ⑰ 長村文孝、国内外がん診療ガイドラインから見る今後の標準療法予測と治療薬開発戦略、月刊 PHARMASTAGE、査読無、5巻、2010、pp.12-16
- ⑱ Ooi J, Nagamura F, et al. (13人中10番目)、Unrelated cord blood transplantation after myeloablative conditioning in adults with ALL、Bone Marrow Transplant、査読有、43巻、2009、pp.455-459
- ⑲ Ishige I, Nagamura-Inoue T, et al. (8人中2番目)、Comparison of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton's jelly explants of human umbilical cord、Int J Hematol、査読有、90巻、2009、pp.261-269
- ⑳ Isoyama K, Nagamura-Inoue T, et al. (11人中4番目)、Long-term outcome of cord blood transplantation from unrelated donors as an initial transplantation procedure for children with AML in Japan、Bone Marrow Transplant、査読有、10巻、2009、pp.69-77
- 21 Usuki K, Nagamura-Inoue T, et al. (8人中3番目)、CD8+ memory T cells predominate over naïve T cells in therapy-free CML patients with sustained major molecular response、Leu Res、査読有、33巻、2009、pp.164-165
- 22 Yazaki M, Nagamura-Inoue T, et al. (17人中12番目)、Incidence and risk factors of early bacterial infections after unrelated cord blood transplantation. Biol. Blood Marrow Transplant、Biol. Blood Marrow Transplant、査読有、15巻、2009、pp.439-446
- 23 Atsuta Y, Nagamura-Inoue T et al. (18人中3番目)、Disease-specific analyses of unrelated cord blood transplant compared with unrelated bone marrow transplant in adult patients with acute leukemia、Blood、査読有、113巻、2009、pp.1631-1638
- 24 Masuda S, Tojo A, et al. (13人中7番目)、Dual antitumor mechanisms of Notch signaling inhibitor in a T-cell acute lymphoblastic leukemia xenograft model、Cancer Sci、査読有、100巻、2009、pp.2444-2450
- 25 Agata H, Tojo A, et al. (8人中7番目)、Feasibility and efficacy of bone tissue engineering using human bone marrow stromal cells cultivated in serum-free conditions、Biochem Biophys Res Commun、査読有、382巻、2009、pp.353-358
- 26 Inoue Y, Tojo A, et al. (6人中5番目)、Comparison of subcutaneous and intraperitoneal injection of D-luciferin for in vivo bioluminescence imaging、Eur J Nucl Med Mol Imaging、査読有、36巻、2009、pp.771-779
- 27 Ooi J., Nagamura F. et al. (13人中10番目)、Unrelated cord blood transplantation after myeloablative conditioning in adults with ALL Bone Marrow Transplant、査読有、43巻、2008、pp.455-459
- 28 Ooi J., Nagamura F. et al. (13人中10番目)、Unrelated cord blood transplantation after myeloablative conditioning in adults

- with acute myelogenous leukemia、査読有、14 巻、2008、pp.1341-1347
- 29 大木桃代、長村文孝、探索型臨床研究において利益相反問題が参加者の意思決定と人権に及ぼす影響の予備的検討、人間科学研究、査読無、30 巻、2008、pp.115-120
 - 30 Nagamura-Inoue T., Nagamura F., Tojo A., et al. (15 人中 1 番目、12 番目、13 番目)、Unrelated cord blood transplantation in CML: Japan Cord Blood Bank Network analysis、Bone Marrow Transplant、査読有、42 巻、2008、pp.241-251
 - 31 Yoshimi A., Nagamura-Inoue T., et al. (11 人中 9 番目)、Unrelated cord blood transplantation for severe aplastic anemia、Biol Blood Marrow Transplant、査読有、14 巻、2008、pp.1057-1063
 - 32 Konuma T., Nagamura-Inoue T., et al. (14 人中 11 番目)、Cardiovascular toxicity of cryopreserved cord blood cell infusion、Bone Marrow Transplant、査読有、41 巻、2008、pp.861-865
 - 33 Inoue Y, Tojo A., et al. (6 人中 5 番目)、Bioluminescent evaluation of the therapeutic effects of total body irradiation in a murine hematological malignancy model、Exp Hematol、査読有、36 巻、2008、pp.1634-1641
 - 34 Watanabe N, Tojo A., et al. Recipient-derived cells after cord blood transplantation: dynamics elucidated by multicolor FACS, reflecting graft failure and relapse、Biol Blood Marrow Transplant、査読有、14 巻、2008、pp.693-701
 - 35 Futami M, Tojo A. et al. (6 人中 6 番目)、RNAi-mediated silencing of p190Bcr-Abl inactivates Stat5 and cooperates with imatinib mesylate and 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in selective killing of p190Bcr-Abl-expressing leukemia cells、Leukemia、査読有、22 巻、2008、pp.1131-1138
- [学会発表] (計 31 件)
- ① Kurosawa S, Nagamura-Inoue T., et al., Changes In Incidence and Causes of Non-Relapse Mortality (NRM) After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation (allo-HCT): Are Transplants Improving? American Society of Hematology Annual Meeting、2010 年 12 月 7 日、米国オーランド
 - ② Ishiyama K, Nagamura-Inoue T., et al., *DEK/NUP214* Fusion Gene Predicts Good Outcome In Acute Myeloid Leukemia In Complete Remission After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation、American Society of Hematology Annual Meeting、2010 年 12 月 5 日、米国オーランド
 - ③ 河野美那子、長村文孝、他、進行がん患者を対象とした臨床試験における被験者の疼痛コントロール状況の調査、CRC と臨床試験のあり方を考える会議、2010 年 10 月 2 日、別府・ビーコンプラザ
 - ④ 長村登紀子、造血細胞移植における細胞検査、日本輸血・細胞治療学会秋季シンポジウム、2010 年 9 月 22 日、福岡国際会議場
 - ⑤ 長村登紀子、他、制御性 T 細胞の誘導増幅による免疫抑制療法の基礎的開発、日本輸血・細胞治療学会総会、2010 年 5 月 29 日、名古屋国際会議場
 - ⑥ 湯沢美紀、長村登紀子、他、臍帯血単核球分離における採取後の経過時間の影響、日本輸血・細胞治療学会総会、2010 年 5 月 29 日、名古屋国際会議場
 - ⑦ 和田由花、長村登紀子、他、東大医科研における造血幹細胞移植時の輸血対応について、日本輸血・細胞治療学会総会、2010 年 5 月 28 日、名古屋国際会議場
 - ⑧ Ishige I, Nagamura-Inoue T., et al., Comparative study of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton's jelly explants of human umbilical cord、International Society of Cell Therapy, Annual Meeting、2010 年 5 月 25 日、米国フィラデルフィア
 - ⑨ 長村文孝、日米の抗がん剤審査 pivotal 試験の比較検討、日本臨床試験研究会、2010 年 1 月 22 日、東京ニッショホール
 - ⑩ 松本和史、長村文孝、他、看護大学院での体験型授業を活用したトランスレーショナルリサーチにおけるコーディネータ教育、日本臨床試験研究会、2010 年 1 月 22 日、東京ニッショホール
 - ⑪ 田野崎隆二、長村登紀子、他、Establishment of standards for processing cellular therapy product routinely used for hematopoietic stem cell transplantation in Japan、XXth Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion(ISBT), Asia、2009 年 11 月 16 日、名古屋国際会議場
 - ⑫ 村田誠、長村-井上登紀子、他、原発性骨髄線維症に対する臍帯血移植、日本血液学会、2009 年 10 月 25 日、国立京都国際会館
 - ⑬ Matsumoto K, Nagamura F., et al., The Development of the Scholastic Program for

the Graduate Students of Nurses in the Area of Translational Research、1st International Nursing Research Conference of World Academy of Nursing Science、2009年9月19日、神戸国際展示場

- ⑭ 長村登紀子、国内外の臍帯血や造血幹細胞処理基準から振り返ってみた院内細胞処理基準における課題、日本輸血・細胞治療学会、2009年5月28日、大宮ソニックシティ
- ⑮ Nagamura-Inoue T、Large Scale Selective *Ex Vivo* Expansion of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Regulatory T Cells from Peripheral Blood、American Society of Hematology, Annual meeting、2008年12月7日、Moscone Center, San Francisco, USA
- ⑯ 河野美那子、長村文孝、他、歯槽骨再生臨床研究における薬剤師TRCの支援、日本医療薬学会年会、2008年9月20日、札幌コンベンションセンター
- ⑰ 大木桃代、長村文孝、探索型臨床研究において利益相反問題が参加者の意思決定と人権に及ぼす影響の検討(1)、日本心理学会第72回大会、2008年9月20日、北海道大学
- ⑱ 大木桃代、長村文孝、探索型臨床研究において利益相反問題が参加者の意思決定と人権に及ぼす影響の検討(2)、日本健康心理学会、2008年9月13日、桜美林大学
- ⑲ Nagamura-Inoue T、Large scale ex vivo expansion of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells from peripheral blood、International Society of Cellular Therapy Annual meeting、2008年5月19日、Florida, USA

[図書] (計5件)

- ① 長村文孝、他、日本心理学会、心理学ワールド50号刊行記念出版、トランスレショナルリサーチにおける医学と心理の連携、2011、pp. 215-220
- ② 長村文孝、他、情報機構、FDA申請・査察対応の留意点、2011、pp. 389-400
- ③ 長村文孝、他、真興交易(株)、がん患者のところに寄り添うために、2010、pp. 39-42、pp. 57-60

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長村 文孝 (NAGAMURA FUMITAKA)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号：90282491

(2) 研究分担者

長村 登紀子 (NAGAMURA TOKIKO)
東京大学・医科学研究所・講師
研究者番号：90332585

(3) 連携研究者

東條 有伸 (TOJO ARINOBU)
東京大学・医科学研究所・教授
研究者番号：00211681