(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年9月1日(01.09.2022)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2022/180911 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 35/51 (2015.01) *A61P 7/06* (2006.01)
A61K 35/28 (2015.01) *C12N 5/0775* (2010.01)
A61P 7/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2021/035958

(22) 国際出願日： 2021年9月29日(29.09.2021)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2021-030311 2021年2月26日(26.02.2021) JP

(71) 出願人: 国立大学法人東京大学 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 Tokyo (JP). ヒューマンライフコード株式会社 (HUMAN LIFE CORD JAPAN INC.) [JP/JP]; 〒1030012 東京都中央区日本橋堀留町１丁目９番１０号 Tokyo (JP).

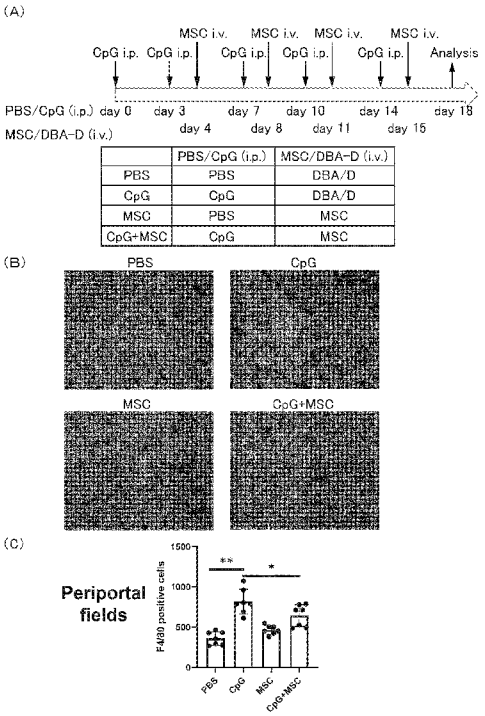
(72) 発明者: 長村 登紀子 (NAGAMURA Tokiko); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 山本由紀 (YAMAMOTO Yuki); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 堀 暁子 (HORI Akiko); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 原田 雅充 (HARATA Masamitsu); 〒1030012 東京都中央区日本橋堀留町１丁目９番１０号 ヒューマンライフコード株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 辻丸 光一郎, 外 (TSUJIMARU Koichiro et al.); 〒6008813 京都府京都市下京区中堂寺南町１３４ 京都リサーチパーク１号館３０１号室 Kyoto (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,

(54) **Title:** CELL PREPARATION FOR USE IN TREATMENT OF HEMOPHAGOCYTIC SYNDROME

(54) 発明の名称： 血球貪食症候群の治療に用いる細胞調製物



	PBS/CpG (i.p.)	MSC/DBA-D (i.v.)
PBS	PBS	DBA/D
CpG	CpG	DBA/D
MSC	PBS	MSC
CpG+MSC	CpG	MSC

(57) **Abstract:** Provided is a cell preparation capable of treating hemophagocytic syndrome. The present invention is a cell preparation for use in the treatment of hemophagocytic syndrome, wherein the cell preparation includes umbilical cord-derived cells.

(57) 要約：血球貪食症候群を治療しうる細胞調製物を提供する。 本発明は、血球貪食症候群を治療に用いる細胞調製物であって、 前記細胞調製物は、臍帯由来細胞を含む。

WO 2022/180911 A1

[続葉有]

HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則4.17に規定する申立て:

— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則4.17(v))

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

明　細　書

発明の名称 ： 血球貪食症候群の治療に用いる細胞調製物

技術分野

[0001]　本発明は、血球貪食症候群の治療に用いる細胞調製物に関する。

背景技術

[0002]　血球貪食症候群（hemophagocytic syndrome：HPS、血球貪食性リンパ組織症（hemophagocytic lymphohistiocytosis：HLH）ともいう）は、骨髄やリンパ節など網内系における組織球・マクロファージによる血球貪食を特徴とする疾患である。ＨＰＳは、一次性（原発性）と、基礎疾患に起因して発症する二次性（反応性）に大別される（非特許文献１）。ＨＰＳの患者では、高熱、肝脾腫（肝脾大および脾肥大）、高トリグリセリド血症、骨髄、脾臓またはリンパ節における血球貪食、高フェリチン血症等の症状が現れる。ＨＰＳの治療としては、デキサメタゾン等のステロイドおよびシクロスポリン等の抗炎症剤の併用療法が行なわれているが、再発等を繰り返す患者、ステロイド不応性の患者も存在し、有効な治療方法が依然として存在しない。このため、ＨＰＳは、難病指定されている。

先行技術文献

非特許文献

[0003] 非特許文献1：熊倉俊一、「血栓止血の臨床―研修医のためにIII　9. HPS の病態・診断・治療」、血栓止血誌, 2008, vol. 19, No. 2, pages 210-215

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004]　そこで、本発明は、血球貪食症候群を治療しうる細胞調製物の提供を目的とする。

課題を解決するための手段

[0005]　前記目的を達成するため、本発明は、血球貪食症候群の治療に用いる細胞調製物（以下、「細胞調製物」ともいう）であって、

前記細胞調製物は、臍帯由来細胞を含む。

発明の効果

[0006] 本発明によれば、血球貪食症候群を治療しうる。

図面の簡単な説明

[0007] [図1]図１は、実施例１におけるＨＰＳモデルの作製方法およびＨＰＳモデルマウスの表現型を示す図である。

[図2]図２は、実施例１におけるＨＰＳモデルマウスの肝臓の染色図を示す写真である。

[図3]図３は、実施例１におけるＨＰＳモデルマウスの血液の染色図を示す写真である。

[図4]図４は、実施例１におけるＨＰＳモデルマウスの血液中の血小板数を示すグラフである。

[図5]図５は、実施例２におけるＨＰＳモデルマウスに対する投与条件、肝臓の染色図およびマクロファージの数を示す図である。

[図6]図６は、実施例３におけるＭＬＲにおいて遊走した臍帯由来細胞の数を示すグラフである。

[図7]図７は、実施例３におけるＭＬＲにおいて遊走した臍帯由来細胞の数を示すグラフである。

[図8]図８は、実施例３における遊走した細胞数を示すグラフである。

[図9]図９は、実施例３におけるＦＢＳを添加した場合において遊走した臍帯由来細胞の数を示すグラフである。

[図10]図１０は、実施例３におけるＭＣＰ－１の濃度を示すグラフである。

[図11]図１１は、実施例４における脾臓の染色像を示す写真である。

[図12]図１２は、実施例４における脾臓の白脾髄の面積比を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0008] ＜定義＞

本発明において、「血球貪食症候群」は、骨髄およびリンパ節等の網内系

における組織球・マクロファージによる血球貪食を特徴とする疾患であり、発熱、リンパ節腫脹、肝脾腫、汎血球減少、凝固異常、肝機能障害、高LDH血症、高トリグリセライド血症、および／または高フェリチン血症等の多彩な症状を呈する疾患を意味する。前記ＨＰＳは、例えば、血球貪食性リンパ組織球症ということもできる。本発明において、前記「血球貪食症候群」は、例えば、一次性（原発性）の血球貪食症候群でもよいし、二次性（反応性）のＨＰＳでもよい。前記一次性のＨＰＳは、家族性血球貪食性リンパ組織球症（Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis：ＦＨＬ）があげられる。前記二次性のＨＰＳは、感染症、悪性疾患、自己免疫疾患に付随またはその罹患を契機に発症するＨＰＳであり、例えば、ウイルス関連血球貪食症候群（Virus-associated hemophagocytic syndrome：VAHS）、細菌関連血球貪食症候群（Bacteria-associated hemophagocytic syndrome：BAHS）、真菌または寄生虫に起因する血球貪食症候群等の感染症関連血球貪食症候群（Infection-associated hemophagocytic syndrome：IAHS）；リンパ腫関連血球貪食症候群（Lymphoma-associated hemophagocytic syndrome：LAHS）等の悪性腫瘍関連血球貪食症候群（Malignancy-associated hemophagocytic syndrome：MAHS）；自己免疫関連血球貪食症候群（Autoimmune-associated hemophagocytic syndrome：AAHS）等があげられる。前記VAHSの原因ウイルスは、多種のウイルスが報告されているが、代表的かつ特殊な病状を呈する例として、ＥＢウイルス（Epstein-Barr virus）があげられる。また、他の原因ウイルスとしては、新型コロナウイルス（SARS-CoV2）があげられる。また、その他のＨＰＳとして、造血幹細胞移植後に生じるＨＰＳがあり、この場合、造血幹細胞の生着不全になる場合もある。前記ＨＰＳは、例えば、以下の診断基準により、診断される。

[0009] （ＨＰＳ診断基準：Revised Diagnostic Guidelines for HLH）

以下の１または２のいずれかを満たせばHLH（HPS）とする。

１．１次性では、FHLに一致した遺伝子異常（PRF1,MUNC13-4,STX11）を有するか家族歴あり。

２．以下の臨床所見基準８項目のうち５項目以上を満たす。

＜臨床所見基準＞

１）発熱

２）脾腫あり

３）血球減少（末梢血の３系統のうち少なくとも２系統以上に異常があること

Hemoglobin（ヘモグロビン）＜９０ｇ／Ｌ （４週以下の乳児の場合：hemoglobin＜１０ｇ／L）

Platelets（血小板）＜１００×１０^{9}／Ｌ

Neutrophils（好中球）＜１．０×１０^{9}／Ｌ

４）高トリグリセリド（ＴＧ）および／または低フィブリノーゲン血漿

空腹時ＴＧ≧３．０ｍｍｏｌ／Ｌ（ie.，≧２６５ｍｇ／ｄL）

Fibrinogen（フィブリノーゲン）≦１．５ｇ／Ｌ

５）ＮＫ細胞活性低値または欠損

６）高フェリチン血症（≧５００μｇ／mL）

７）高可溶性ＩＬ－２受容体（ｓＣＤ２５）血症（≧２４００Ｕ／mL）

８）骨髄、脾臓、またはリンパ節の血球貪食能

９）悪性疾患ではないこと

[0010] 本発明において、「治療」は、対象疾患の発症の抑制、防止、抑止、予防、または遅延、発症した対象疾患もしくはその症状の進行の停止、抑制、抑止、または遅延、および対象疾患の改善または寛解のいずれの意味で用いてもよい。前記「治療」は、例えば、対象疾患を発病する患者に対する治療でもよいし、対象疾患のモデル動物の治療でもよい。前記治療は、処置ということもできる。

[0011] 本発明において、「細胞調製物」は、所望の細胞を含む細胞集団または所望の細胞を含む組成物を意味する。このため、本発明において、細胞調製物は、例えば、細胞集団または組成物ということもできる。前記細胞調製物において、全細胞に占める所望の細胞の割合（「純度」ともいう）は、例えば

、所望の細胞が発現する１以上のマーカー発現する細胞の割合として定量できる。前記純度は、例えば、生細胞中の割合である。前記純度は、例えば、フローサイトメトリー、免疫組織化学的手法、インシチュハイブリダイゼーション等の方法により測定できる。

[0012] 本発明において、前記細胞調製物の純度は、例えば、５０％以上、５５％以上、６０％以上、６５％以上、７０％以上、７５％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９１％以上、９２％以上、９３％以上、９４％以上、９５％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上、または９９％以上である。

[0013] 本発明において、「臍帯」は、胎児と胎盤を繋ぐ白色の管状組織であり、胎盤および臍帯血を含まない組織を意味する。本発明において、「臍帯」の由来は、特に制限されず、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、サル、イルカ、アシカ等の哺乳類の臍帯があげられ、好ましくは、霊長類哺乳動物の臍帯であり、より好ましくは、ヒトの臍帯である。

[0014] 本発明において、「マクロファージ」は、例えば、ＣＤ１４陽性ＣＤ１１ｂ陽性の単球に由来する貪食能を有する細胞を意味する。前記マクロファージは、一般的に、骨髄で作られ、末梢血中に入った単球が血管外の組織へ出た大型細胞とも定義されている。前記マクロファージは、細菌、ウイルス、死細胞等の異物を取り込み（食作用）、食胞がリソソームと融合して分解され、それを抗原提示するとともに、インターフェロンや各種サイトカインを放出して、ヘルパーＴ細胞に伝達できる。前記マクロファージは、所属する臓器または組織により異なる名称で呼ばれることもあり、肝臓では、クッパー細胞、肺では、肺胞マクロファージ、脳内ではグリア細胞またはミクログリアということもできる。

[0015] ＜血球貪食症候群治療用調製物＞

本発明は、血球貪食症候群の治療に用いうる細胞調製物を提供する。本発明は、前述のように、血球貪食症候群の治療に用いる細胞調製物であって、

前記細胞調製物は、臍帯由来細胞を含む。本発明の細胞調製物は、臍帯由来細胞を含むことが特徴であり、その他の構成および条件は、特に制限されない。前記臍帯由来細胞は、後述するように、組織へのマクロファージの集積を抑制することにより、血球貪食症候群の症状を抑制すると推定される。このため、本発明の細胞調製物は、前記臍帯由来細胞を含むことにより、血球貪食症候群を治療しうる。

[0016] 本発明において、前記「臍帯」は、投与、治療、または処置対象（以下、あわせて「投与対象」という）から採取された臍帯であってもよいし、投与対象以外の対象から採取された臍帯であってもよい。調製時に制限を受けないとの観点から、投与対象以外から採取された臍帯を用いることが望ましい。なお、本発明の臍帯由来細胞は、後述する実施例において示されているとおり、投与対象から採取された臍帯由来の細胞（自家細胞）でもよいし、投与対象以外から採取された臍帯由来の細胞（他家細胞）であってもよい。前記臍帯由来細胞は、例えば、免疫拒絶等により排除されることなく治療効果を奏することが確認されている。

[0017] 本発明において、前記臍帯は、例えば、経膣分娩または帝王切開にて娩出された胎盤および／または臍帯を含む産褥組織から適宜胎盤を取り除き回収することができる。本発明において、前記臍帯は、回収された臍帯から臍帯血を除去したものでもよく、さらに、無菌または制菌処理を行なったものでもよい。前記臍帯血の除去は、例えば、ヘパリン等の抗凝固剤を含む溶液ですすぐ、または灌流することによって実施できる。前記無菌または制菌処理は、特に制限されず、例えば、ポピドンヨード等の消毒剤の塗布；ペニシリン、ストレプトマイシン、アムホテリシンＢ、ゲンタマイシン、および／またはナイスタチン等の抗生剤、および／または抗真菌剤を添加した培地またはバッファー中に浸漬；等により実施できる。また、前記臍帯は、例えば、必要に応じて、赤血球を選択的に溶解してもよい。前記赤血球を選択的に溶解する方法としては、例えば、塩化アンモニウムによる溶解による高張培地または低張培地中でのインキュベーション等の当技術分野で周知の方法を使

用することができる。

[0018] 本発明において、前記「臍帯由来細胞」とは、臍帯を原材料として、調製された細胞集団を意味する。前記「臍帯由来細胞」は、単一の種類の細胞から構成されてもよいし、複数の種類の細胞から構成されてもよい。前記臍帯由来細胞は、臍帯由来間葉系細胞を含むことが好ましい。前記臍帯由来細胞は、前記臍帯由来間葉系細胞を含む複数種類の細胞から構成される細胞集団であってもよい。

[0019] 本発明の臍帯由来細胞は、例えば、下記（ａ）～（ｃ）のいずれか１つまたは複数の特性を有する細胞集団であってもよく、好ましくは全ての特性を有する細胞集団である。

（ａ）培地存在下の培養において、プラスチックに接着性を示す；

（ｂ）ＣＤ１０５、ＣＤ７３、ＣＤ９０、ＣＤ４４、ＨＬＡ－ｃｌａｓｓⅠ、ＨＬＡ－Ｇ５およびＰＤ－Ｌ（Programmed cell death 1 ligand）２が陽性であり、ＣＤ４５、ＣＤ３４、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１９およびＨＬＡ－ＣⅠａｓｓⅠⅠが陰性である；

（ｃ）炎症の条件下でＩＤＯ（indoleamine 2,3-dioxygenase）、PGE_2（Prostaglandin E2）、ＰＤ－Ｌ１の遺伝子および／またはタンパクの発現が誘導される。

[0020] 本発明において、「陽性」は、抗原抗体反応を利用して検出されるフローサイトメトリー等の解析方法により、前記抗原を発現しない陰性対照細胞または前記抗原と反応しない抗体を用いる陰性対照反応と比較して、高いシグナル等が検出されることを意味する。また、本発明において、「陰性」は、前記抗原を発現しない陰性対照細胞または前記抗原と反応しない抗体を用いる陰性対照反応と比較して、同等またはそれ以下のシグナル等が検出されることを意味する。

[0021] 本発明において、前記「HLA-class Ⅰ」とは、ＨＬＡ－Ａ、Ｂ、またはＣを意味する。本発明において、前記「HLA-Class Ⅱ」は、ＨＬＡ－ＤＲ、ＤＱ、またはＤＰを意味する。

[0022] 本発明において、前記「炎症の条件下」は、インターフェロンγ等の炎症性サイトカインと接触させる条件、または添加された条件をいう。

[0023] 本発明において、前記臍帯由来細胞は、前記臍帯由来細胞の抽出物および／または分泌物であってもよい。前記臍帯由来細胞の抽出物は、例えば、前記臍帯由来細胞に対して、濃縮処理、遠心分離処理、乾燥処理、凍結乾燥処理、溶媒処理、界面活性剤処理、プロテアーゼ、糖鎖分解酵素等を用いた酵素処理、タンパク質抽出処理、超音波処理、および／または磨砕処理により得られる処理物、またはこれらの処理の組合せにより得られる処理物等があげられる。前記臍帯由来細胞の分泌物は、例えば、エクソソーム、臍帯由来細胞の細胞培養上清等があげられる。

[0024] 本発明において、前記細胞調製物は、組織へのマクロファージの集積抑制作用を示すことが好ましい。前記マクロファージは、例えば、Ｆ４／８０陽性マクロファージである。前記組織は、例えば、肺、肝臓等があげられる。前記マクロファージの集積抑制作用は、例えば、後述の実施例１に準じて、組織における単位面積あたりのマクロファージの数を指標に評価できる。前記集積は、例えば、所望の細胞が、特定の組織、器官、または臓器の内部もしくは周囲に集まり、蓄積することを意味する。前記集積は、例えば、集合、蓄積等ということもできる。前記細胞調製物は、例えば、前記細胞調製物を投与しない群と比較して、前記組織に集積するマクロファージ数を、５％以上、１０％以上、１５％以上、２０％以上、３０％以上、３５％以上、４０％以上、４５％以上、５０％以上、５５％以上、６０％以上、６５％以上、７０％以上、７５％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上、または９９％以上抑制する。

[0025] 本発明において、前記臍帯由来細胞の生産（調製）方法は、例えば、前記臍帯から細胞を単離する工程を含み、任意に、単離された細胞を継代する工程を含んでもよい。具体例として、前記調製方法は、例えば、（１）臍帯を切断する工程、（２）臍帯切片を培養する工程、および（３）継代する工程を含む。また、他の例として、前記調製方法は、例えば、（Ａ）臍帯を切断

する工程もしくは酵素処理する工程、またはその双方により組織を解離させる工程、（Ｂ）臍帯組織を培養する工程、および（Ｃ）継代する工程を含む。なお、前記臍帯由来細胞は、一様の細胞による集団であってもよいし、不均一な細胞集団であってよい。

[0026] 前記（１）～（３）工程を含む方法、または前記（Ａ）～（Ｃ）工程を含む方法により、前記臍帯由来細胞を調製する場合、一例として以下のように実施できる。なお、前記臍帯由来細胞の調製方法は、以下の例に限定されない。

[0027] まず、前記（１）～（３）工程を含む方法について説明する。前記（１）臍帯を切断する工程では、例えば、前述の方法で入手した臍帯を、羊膜、血管、血管周囲組織および／またはワルトンジェリーを含む状態にて機械力（細断力または剪断力）によって切断することにより実施できる。切断により得られる臍帯切片の大きさは、特に制限されず、例えば、１～１０ｍｍ^3、１～５ｍｍ^3、１～４ｍｍ^3、１～３ｍｍ^{3}または１～２ｍｍ^{3}等があげられる。

[0028] つぎに、前記（２）臍帯切片を培養する工程では、例えば、切断された臍帯切片を、シャーレ、ディッシュ、フラスコ等の培養器に播種し、臍帯由来細胞に適した培養液中にて培養する。前記（２）工程では、前記臍帯切片に対して消化酵素処理を行わないことが好ましい。

[0029] 本発明において、前記「培養器」は、例えば、固体表面を有する培養器であればよい。前記培養器としては、例えば、細胞、組織、および／または臓器の培養に用いられる培養器を使用できる。前記「固体表面」は、例えば、前記臍帯由来細胞との結合を可能とする任意の材料を意味する。具体的には、前記材料は、例えば、その表面への哺乳類細胞の結合を促すように処理（例えば、親水性増加処理）されたプラスチック材料等があげられる。前記固体表面を有する培養容器の種類は、特に制限されず、例えば、シャーレ、ディッシュ、フラスコ等があげられる。

[0030] 本発明において、前記「臍帯由来細胞に適した培養液」は、例えば、基礎培地に、血清等の添加剤を添加することにより調製できる。前記添加剤は、

例えば、血清、および／または、アルブミン、トランスフェリン、脂肪酸、インスリン、亜セレン酸ナトリウム、コレステロール、コラーゲン前駆体、微量元素、２－メルカプトエタノール、３’－チオールグリセロール等の１つ以上の血清代替物があげられる。前記培養液は、例えば、必要に応じて、さらに、脂質、アミノ酸、タンパク質、多糖、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生剤、抗真菌剤、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類などの物質を添加してもよい。前記基礎培地は、特に制限されず、例えば、Minimum Essential Medium Eagle, Alpha Modification（αMEM)、Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium（DMEM）（高グルコースまたは低グルコース）、改良DMEM、DMEM/MCDB 201、Eagle’s 基本培地、Ham’s F10培地（F10）、Ham’s F-12培地（F12）、イスコーブの改変ダルベッコ（IMDM）培地、Fischer’s培地、間葉幹細胞増殖培地（MSCGM）、DMEM/F12、RPMI 1640、CELL-GRO-FREE、およびこれらの混合培地等があげられる。前記血清は、例えば、ヒト血清、ウシ胎児血清（ＦＢＳ）、ウシ血清、仔ウシ血清、ヤギ血清、ウマ血清、ブタ血清、ヒツジ血清、ウサギ血清、ラット血清等の動物由来の血清があげられる。前記基礎培地に対する血清の添加量は、例えば、５ v/v%～１５ v/v%であり、好ましくは、約１０v/v%である。前記脂肪酸は、特に制限されず、例えば、リノール酸、オレイン酸、リノレイン酸、アラキドン酸、ミリスチン酸、パルミトイル酸、パルミチン酸、およびステアリン酸等があげられる。前記脂質は、特に制限されず、例えば、フォスファチジルセリン、フォスファチジルエタノールアミン、フォスファチジルコリン等があげられる。前記アミノ酸は、特に制限されず、例えば、Ｌ－アラニン、Ｌ－アルギニン、Ｌ－アスパラギン酸、Ｌ－アスパラギン、Ｌ－システイン、Ｌ－シスチン、Ｌ－グルタミン酸、Ｌ－グルタミン、Ｌ－グリシン等のアミノ酸のＬ体、これらのＤ体、またはこれらの混合物（ＤＬ体）等があげられる。前記タンパク質は、特に制限されず、例えば、エコチン、還元型グルタチオン、フィブロネクチン、β２－ミクログロブリン等があげられる。前記多糖は、特に制限されず、例えば、ヒアルロン酸、ヘパラン硫酸等のグリコサミノグ

リカン等があげられる。前記増殖因子は、特に制限されず、例えば、血小板由来増殖因子（ＰＤＧＦ）、上皮増殖因子（ＥＧＦ）、線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）、インスリン様増殖因子－１（ＩＧＦ－１）、白血球阻害因子（ＬＩＦ）、塩基性線維芽細胞成長因子（ｂＦＧＦ）、トランスフォーミング増殖因子ベータ（ＴＧＦ－β）、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）、結合組織増殖因子（ＣＴＧＦ）、エリスロポエチン（ＥＰＯ）等があげられる。前記抗生剤および／または抗真菌剤は、特に制限されず、例えば、ペニシリンＧ、ストレプトマイシン硫酸塩、アムホテリシンＢ、ゲンタマイシン、ナイスタチン、およびこれらの混合等があげられる。

[0031] 前記（２）工程において、播種した臍帯切片が培養液中に浮遊することを防ぐため、培養期間中プレート等を用いて前記臍帯切片を押さえることが好ましい。前記プレートは、例えば、特開２０１５－７０８２４に記載のプレートが例示できる。

[0032] 前記（２）工程において、培養条件は、特に制限されず、例えば、細胞、組織、臓器等の一般的な培養条件を参照できる。具体例として、前記（２）工程におけるCO_2濃度は、例えば、０～５％である。前記（２）工程におけるO_2濃度は、例えば、２～２５％であり、好ましくは、５～２０％である。前記（２）工程における培養温度は、例えば、２５～４０℃であり、好ましくは、約３７℃（３５～３９℃）である。

[0033] 前記（２）工程において、前記培養期間は、特に制限されず、例えば、前記臍帯切片から細胞が遊走し、細胞が、培養器に対して５０％、６０％、７０％、８０％またはそれ以上のコンフルエントになるまで培養することが好ましい。

[0034] そして、前記（２）工程では、例えば、前記培養後、非結合状態の細胞および細胞の破片を除去するために、細胞を洗浄し、ＥＤＴＡ等のキレート剤を含む溶液、トリプシン、コラゲナーゼ、ディスパーゼ等のプロテアーゼ、ヒアルロニダーゼ等の糖鎖分解酵素、またはこれらの混合物を含む剥離剤によって剥離する。そして、前記（２）工程では、例えば、前記細胞および前

記臍帯切片を含む剥離溶液を、セルストレーナー等を用いてろ過することで、臍帯由来細胞として細胞のみを入手することができる。得られた臍帯由来細胞は、例えば、前述の培養器へ播種し、前述の培養液を用いて培養できる。

[0035] 前記（３）工程では、継代培養することで、適宜、必要数まで臍帯由来細胞を増殖することができる。前記（３）工程では、前記継代培養において、前記剥離剤によって剥離し、別途用意した培養器に適切な細胞密度で播種して培養を継続してもよい。前記細胞を播種する際の、細胞密度（播種密度）は、例えば、１×１０^{2}～１×１０^{5}細胞／ｃｍ^{2}、５×１０^{2}～５×１０^{4}細胞／ｃｍ^{2}、１×１０^{3}～１×１０^{4}細胞／ｃｍ^{2}、２×１０^{3}～１×１０^{4}細胞／ｃｍ^{2}等があげられ、好ましくは、２×１０^{3}～１×１０^{4}細胞／ｃｍ^{2}である。前記播種密度は、例えば、適切なコンフルエンシーに達するまでの期間が、３～７日間となるように調整することが好ましい。前記（３）工程の継代培養では、必要に応じて、適宜、培地を交換してもよい。

[0036] 前記（３）工程の継代回数は、特に制限されず、例えば、細胞分裂の停止する老化まで行われてもよい。前記（３）工程の継代回数は、例えば、治療に用いるとの観点から、好ましくは、３～２５回継代培養され、より好ましくは、４～１２回継代培養される。

[0037] つぎに、前記（Ａ）～（Ｃ）工程を含む方法について説明する。前記（Ａ）酵素処理する工程では、前述の方法で入手した臍帯を、羊膜、血管、血管周囲組織および／またはワルトンジェリーを含む状態にて酵素処理にて、組織を解離させる工程により実施できる。前記酵素処理に用いる酵素は、特に制限されず、例えば、コラゲナーゼ、ディスパーゼ等のプロテアーゼ；ヒアルロニダーゼ等の糖鎖分解酵素；等があげられる。

[0038] つぎに、前記（Ｂ）臍帯組織を培養する工程、および（Ｃ）継代する工程は、例えば、それぞれ、前記（２）臍帯組織を培養する工程、および前記（３）継代する工程と同様にして実施できる。

[0039] これにより、前記（３）または（Ｃ）工程後、前記臍帯由来細胞を取得で

きる。

[0040] 前記臍帯由来細胞の調製方法で得られた細胞は、前記臍帯由来細胞であることを確認するために、表面抗原等についてフローサイトメトリー等を用いて従来の方法で解析してもよい。また、前記臍帯由来細胞の調製方法で得られた細胞は、前記細胞より産生される各種タンパク質量を測定することで、前記臍帯由来細胞であるかを評価してもよい。

[0041] 前記臍帯由来細胞の調製方法で得られた細胞は、そのまま、治療用に調製されてもよいし、凍結保存してもよい。前記凍結保存は、例えば、臍帯由来細胞を保存可能な凍結保存用溶液中に細胞を懸濁させ、－８０℃～－１８０℃で保存することによって行われる。前記凍結保存用溶液は、特に制限されず、例えば、凍害防御剤およびグルコースを含む水溶液があげられる。前記凍害防御剤は、例えば、ジメチルスルホキシド（以下、「ＤＭＳＯ」ともいう）、デキストラン、グリセロール、プロピレングリコール、および１－メチル－２－ピロリドン等があげられ、好ましくは、ＤＭＳＯおよび／またはプロピレングリコールであり、より好ましくは、ＤＭＳＯである。前記凍害防御剤は、例えば、前記凍結保存用溶液中に、１～１５ｗ／ｖ％含まれ、好ましくは、５～１５ｗ／ｖ％含まれ、より好ましくは、５～１２ｗ／ｖ％含まれ、さらに好ましくは、８～１１ｗ／ｖ％含まれる。

[0042] 前記凍結保存用溶液に含まれるグルコースは、例えば、前記凍結保存用溶液中に、０．５～１０ｗ／ｖ％含まれ、好ましくは、１～１０ｗ／ｖ％含まれ、より好ましくは、２～８ｗ／ｖ％含まれ、さらに好ましくは、２～５ｗ／ｖ％含まれる。

[0043] 前記凍結保存用溶液は、さらに、他の成分を含んでいてもよい。他の成分としては、例えば、ｐＨ調整剤、増粘剤等が挙げられる。前記ｐＨ調整剤は、例えば、炭酸水素ナトリウム、ＨＥＰＥＳ、リン酸緩衝液等があげられる。また、basic Stock Solution（ＢＳＳ）にリン酸緩衝液を添加しない場合、前記ｐＨ調整剤としては、例えば、前記臍帯由来細胞に適したｐＨ付近で緩衝能を持たせる働きを有する塩化ナトリウムを添加したものも用いること

もできる。前記ｐＨ調整剤としては、リン酸緩衝液を用いることが好ましい。前記ｐＨ調整剤は、前記凍結保存用溶液中のｐＨを、例えば、約６．５～９、好ましくは、７～８．５に調整するように用いられることが好ましい。なお、本発明において、前記「リン酸緩衝液」は、例えば、塩化ナトリウム、リン酸一ナトリウム（無水）、リン酸一カリウム（無水）、リン酸二ナトリウム（無水）、リン酸三ナトリウム（無水）、塩化カリウム、およびリン酸二水素カリウム（無水）等を含む緩衝液のことをいい、特に塩化ナトリウム、リン酸一ナトリウム（無水）、塩化カリウム、またはリン酸二水素カリウム（無水）を含む緩衝液が好ましい。前記ｐＨ調整剤は、例えば、前記凍結保存用溶液中に、０．０１～１ｗ／ｖ％含まれ、好ましくは、０．０５～０．５ｗ／ｖ％含まれる。

[0044] 前記凍結保存用溶液は、天然の動物由来成分を含んでいてもよいし、含んでいなくてもよい。前記天然の動物由来成分としては、例えば、前述の血清および基礎培地等があげられる。前記凍結保存用溶液は、天然の動物由来成分を含まないことが好ましい。前記天然の動物由来成分を含まない凍結保存用溶液では、天然の動物由来成分のロット間での品質の違いの問題を生じることがなく、血清に含まれる各種サイトカイン、増殖因子およびホルモン等の成分による臍帯組織中の細胞の性質の変化の可能性を抑制でき、さらに、基礎培地に含まれる由来が不明な成分による影響も抑制できる。このため、前記天然の動物由来成分を含まない凍結保存用溶液は、特に臨床使用において非常に有用である。

[0045] 前記凍結保存用溶液は、さらに、増粘剤を含んでいてもよい。前記増粘剤は、特に制限されず、例えば、前記臍帯組織を十分に保存できる凍結保存用溶液を構成し得るものがあげられる。前記増粘剤は、例えば、カルボキシメチルセルロース（以下、「ＣＭＣ」ともいう）、カルボキシメチルセルロースナトリウム（以下、「ＣＭＣ－Ｎａ」ともいう）、有機酸ポリマー、アルギン酸プロピレングリコール、アルギン酸ナトリウム等があげられる。増粘剤としては、ＣＭＣおよびＣＭＣ－Ｎａが好ましく、ＣＭＣ－Ｎａが特に好

ましい。前記有機酸ポリマーは、ポリアクリル酸ナトリウムが好ましい。前記増粘剤は、例えば、前記凍結保存用溶液中に、０．１～１ｗ／ｖ％含まれ、好ましくは、０．１～０．５ｗ／ｖ％含まれ、より好ましくは、０．２～０．４ｗ／ｖ％含まれる。

[0046] 前記凍結保存用溶液は、水溶液であることが好ましい。前記凍結保存用溶液の浸透圧は、例えば、保存液としての性能を保持するために、好ましくは、１０００ｍＯｓｍ以上であり、より好ましくは、１０００～２７００ｍＯｓｍである。

[0047] 前記凍結保存用溶液は、好ましくは、増粘剤、凍害防御剤、およびグルコースを含み、かつ天然の動物由来成分を含まない水溶液である。前記凍結保存用溶液は、より好ましくは、ＣＭＣ－Ｎａ、ＤＭＳＯ、およびグルコースを含み、かつ天然の動物由来成分を含まない水溶液である。前記凍結保存用溶液は、さらに好ましいくは、ＣＭＣ－Ｎａを０．１～１ｗ／ｖ％含み、ＤＭＳＯを１．０～１５ｗ／ｖ％含み、グルコースを０．５～１０ｗ／ｖ％含み、かつ天然の動物由来成分を含まない水溶液である。

[0048] 前記臍帯由来細胞の調製方法で得られた細胞は、例えば、輸液製剤と混合することで、各種用途の細胞調製物として使用してもよい。また、前記臍帯由来細胞を凍結保存する場合、凍結保存された臍帯由来細胞は、前記凍結保存用溶液に懸濁され、解凍後にそのまま各種用途の細胞調製物として使用してもよいし、解凍後に輸液製剤と混合し、得られた混合物を各種用途の細胞調製物として使用してもよい。前記輸液製剤と混合する場合、前記臍帯由来細胞が懸濁された培養液または凍結保存用溶液を輸液製剤等と混合してもよいし、前記培養液または凍結保存用溶液について、遠心分離等により細胞を溶媒と分離した後、細胞のみを輸液製剤と混合してもよい。前記調製方法では、例えば、手技の煩雑さを回避するため、前記凍結した細胞を解凍後、培養する工程を含まないこと、または融解後の細胞が懸濁された凍結保存液を直接輸液製剤と混合することが好ましい。

[0049] 本発明において、前記「輸液製剤」は、例えば、ヒトの治療の際に用いら

れる輸液等の溶液があげられ、具体例として、生理食塩水、５％ブドウ糖液、リンゲル液、乳酸リンゲル液、酢酸リンゲル液、１号液、２号液、３号液、４号液等があげられる。

[0050] 本発明の細胞調製物は、前記臍帯由来細胞に加えて、前記輸液製剤を含むキットであってもよい。

[0051] 本発明の細胞調製物は、前記輸液製剤に加えて、または代えて、薬学的に許容される担体を含んでもよい。前記担体は、前記細胞調製物を投与するための懸濁剤、溶解補助剤、安定化剤、等張化剤、保存剤、吸着防止剤、界面活性剤、希釈剤、媒体、ｐＨ調整剤、無痛化剤、緩衝剤、含硫還元剤、酸化防止剤等があげられ、本発明の効果を妨げない範囲で適切に添加することができる。

[0052] 前記懸濁剤は、特に制限されず、例えば、メチルセルロース、ポリソルベート８０、ヒドロキシエチルセルロース、アラビアゴム（アラビアガム）、トラガント末、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート等があげられる。

[0053] 前記溶液補助剤は、特に制限されず、例えば、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリソルベート８０、ニコチン酸アミド、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、マクロゴール、ヒマシ油脂肪酸エチルエステル等があげられる。

[0054] 前記安定化剤は、特に制限されず、例えば、デキストラン４０、メチルセルロース、ゼラチン、亜硫酸ナトリウム、メタ硫酸ナトリウム等があげられる。

[0055] 前記等張化剤は、特に制限されず、例えば、Ｄ－マンニトール、ソルビトール等があげられる。

[0056] 前記保存剤は、特に制限されず、例えば、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、ソルビン酸、フェノール、クレゾール、クロロクレゾール等があげられる。

[0057] 前記吸着防止剤は、特に制限されず、例えば、ヒト血清アルブミン、レシ

チン、デキストラン、エチレンオキシドプロピレンオキシド共重合体、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、硬化ヒマシ油、ポリエチレングリコール等があげられる。

[0058] 前記含硫還元剤は、特に制限されず、例えば、Ｎ－アセチルシステイン、Ｎ－アセチルホモシステイン、チオキト酸、チオジグリコール、チオエタノールアミン、チオグリセロール、チオソルビトール、チオグリコール酸およびその塩、チオ硫酸ナトリウム、グルタチオン、炭素原子数１～７のチオアルカン酸等のスルホヒドリル基を有するもの等があげられる。

[0059] 前記酸化防止剤は、特に制限されず、例えば、エリソルビン酸、ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール、α－トコフェロール、酢酸トコフェロール、Ｌ－アスコルビン酸およびその塩、Ｌ－アスコルビン酸パルミテート、Ｌ－アスコルビン酸ステアレート、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、没食子酸トリアミル、没食子酸プロピルまたはエチレンジアミン４酢酸ナトリウム（ＥＤＴＡ）、ピロリン酸ナトリウム、メタリン酸ナトリウム等のキレート剤等があげられる。

[0060] 本発明の細胞調製物は、さらに、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、炭酸水素ナトリウム等の無機塩；クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム、酢酸ナトリウム等の有機塩；グルコース等の糖類；等の一般的に添加される成分を適宜添加していてもよい。また、抗凝固剤および／または前記ｐＨ調整剤として、例えば、ＡＣＤ－Ａ液（クエン酸Ｎａ水和物クエン酸水和物、ブドウ糖等からなる組成）を添加してもよい。

[0061] 本発明の細胞調製物は、例えば、局所投与のために、バイオポリマー等の有機物；ハイドロキシアパタイト等の無機物；等と混合してもよく、具体例として、コラーゲンマトリックス、ポリ乳酸ポリマーまたはコポリマー、ポリエチレングリコールポリマーまたはコポリマーおよびその化学的誘導体と混合してもよい。

[0062] 本発明の細胞調製物は、例えば、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで用いてもよいし、ｉ

ｎ　ｖｉｖｏで用いてもよい。本発明の細胞調製物は、例えば、研究用試薬として使用することもでき、医薬品として使用することもできる。

[0063] 本発明の細胞調製物の投与対象は、特に制限されない。本発明の細胞調製物をｉｎ　ｖｉｖｏで使用する場合、前記投与対象は、例えば、ヒト、またはヒトを除く非ヒト動物があげられる。前記非ヒト動物としては、例えばマウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、サル、イルカ、アシカ等の哺乳類；鳥類；魚類；等があげられる。前記本発明の細胞調製物をｉｎ　ｖｉｔｒｏで使用する場合、前記投与対象は、例えば、細胞、組織、器官等があげられ、前記細胞は、例えば、生体から採取した細胞、培養細胞等があげられ、前記組織または器官は、例えば、生体から採取した組織（生体組織）または器官等があげられる。前記細胞は、例えば、筋細胞、iPS細胞（induced pluripotent stem cells）、幹細胞等があげられる。

[0064] 本発明の細胞調製物をｉｎ　ｖｉｖｏで使用する場合、前記投与対象は、例えば、遺伝性ＨＬＨと一致すると診断された対象、ＨＰＳと診断された対象、ＨＰＳの疑いがある対象等があげられる。前記遺伝性ＨＬＨは、例えば、perforin遺伝子（FHL2）、MUNC13-4遺伝子（FHL3）、syntaxin11遺伝子（FHL4）、Munc18-2遺伝子（FHL5）等に起因するＨＰＳである。ヒトperforin遺伝子は、例えば、NCBIの遺伝子データベース（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/）において、Gene ID: 5551で登録されている遺伝子ある。ヒトMUNC13-4遺伝子は、例えば、NCBIにおいて、Gene ID: 201294で登録されている遺伝子ある。ヒトsyntaxin11遺伝子は、例えば、NCBIにおいて、Gene ID: 8676で登録されている遺伝子ある。ヒトMunc18-2遺伝子は、例えば、NCBIにおいて、Gene ID: 6813で登録されている遺伝子ある。

[0065] 前記ＨＰＳのうち一次性ＨＰＳの診断は、例えば、下記参考文献１を参照できる。前記ＨＰＳのうち二次性ＨＰＳの包括的な診断は、例えば、下記参考文献２を参照できる。前記ＨＰＳのうち成人ＨＰＳの包括的な診断は、例えば、下記参考文献３を参照できる。前記ＨＰＳのうちＡＡＨＳの診断は、例えば、下記参考文献４を参照できる。

参考文献１：JI Henter, et al., “REVIEW HLH-2004: Diagnostic and Therapeutic Guidelines for Hemophagocytic Lymphohistiocytosis,” Pediatr Blood Cancer 2007, vol.48, page 124-131
参考文献２：S. Imashuku, “Differential diagnosis of hemophagocytic syndrome: underlying disorders and selection of the most effective treatment”, Int. J. Hematol., 1997, vol. 66, No. 2, pages 135-151
参考文献３：H. Tsuda, “Hemophagocytic syndrome (HPS) in children and adults”, Int. J. Hematol., 1997, vol. 65, No. 3, pages 215-226
参考文献４：Shunichi Kumakura et.al., “Autoimmune-associated hemophagocytic syndrome”, Mod. Rheumatol., 2004, vol. 14, No. 3, pages 205-215

[0066] 本発明の細胞調製物の使用条件（投与条件）は、特に制限されず、例えば、投与対象の種類等に応じて、投与形態、投与時期、投与量等を適宜設定できる。

[0067] 本発明の細胞調製物の投与方法は、例えば、脳内投与、髄腔内投与、筋肉内投与、皮下投与、静脈内投与等が例示されるが、例えば、投与者の技術によらず、安全におよび安定的に投与できることから、静脈内投与が好ましい。

[0068] 本発明の細胞調製物の投与量は、対象に投与した場合に、投与していない対象と比較して疾患に対してＨＰＳの治療効果または組織へのマクロファージの集積抑制効果を得ることができる細胞量（治療有効量）である。具体的には、前記投与量は、例えば、被験者の年齢、体重、症状等によって適宜決定することができる。具体例として、前記投与量は、例えば、臍帯由来細胞数として、１回の投与当たり10^4～10^9個／ｋｇ体重、10^4～10^8個／ｋｇ体重、10^4～10^7個／ｋｇ体重があげられ、好ましくは、10^4～10^8個／ｋｇ体重、10^4～10^7個／ｋｇ体重である。

[0069] 本発明の細胞調製物の投与回数は、１または複数回である。前記複数回は、例えば、２回、３回、４回、５回またはそれ以上である。前記投与回数は

、対象の治療効果を確認しながら、適宜決定されてもよい。前記複数回投与する場合、投与間隔は、対象の治療効果を確認しながら、適宜決定でき、例えば、１日１回、１週１回、２週１回、１ヶ月１回、３ヶ月１回、６か月１回等があげられる。

[0070] 本発明の細胞調製物は、例えば、他のＨＰＳに用いられる薬剤および／または方法と併用してもよい。前記ＨＰＳに用いられる薬剤としては、例えば、デキサメタゾン等のステロイド；シクロスポリン等の免疫抑制剤；エトポシド（ＶＰ－１６）等の抗がん剤；免疫グロブリン等のガンマグロブリン製剤；等があげられる。また、本発明の細胞調製物は、造血幹細胞移植と併用されてもよい。

[0071] 本発明の細胞調製物は、前述のように、血球貪食症候群を治療しうる。このため、本発明は、血球貪食症候群患者の処置方法を含んでもよい。この場合、本発明は、血球貪食症候群患者の処置方法であって、対象に、前記本発明の細胞調製物を用いる。本発明の血球貪食症候群患者の処置方法は、例えば、前記対象に、前記本発明の細胞調製物を投与する工程を含む。前記投与工程における投与条件は、前述の説明を援用できる。

[0072] ＜細胞調製物の用途＞

別の実施形態において、本発明は、血球貪食症候群における組織へのマクロファージの集積抑制に用いる細胞調製物または血球貪食症候群における組織へのマクロファージの集積抑制方法を提供する。この場合、本発明は、血球貪食症候群における組織へのマクロファージの集積抑制に用いる細胞調製物であって、前記細胞調製物は、臍帯由来細胞を含む。また、本発明は、血球貪食症候群の対象の組織へのマクロファージの集積抑制方法であって、対象に、前記本発明の血球貪食症候群における組織へのマクロファージの集積抑制に用いる細胞調製物を用いる。本発明は、前記本発明の細胞調製物の説明を援用できる。

[0073] ＜細胞調製物の使用＞

本発明は、血球貪食症候群の治療および／または血球貪食症候群における

組織へのマクロファージの集積抑制に用いるための、細胞調製物であり、前記細胞調製物は、臍帯由来細胞を含む。本発明は、血球貪食症候群の治療および／または血球貪食症候群における組織へのマクロファージの集積抑制に用いるための、細胞調製物の製造するための、臍帯由来細胞の使用である。本発明は、前記本発明の細胞調製物の説明を援用できる。

実施例

[0074] 以下、実施例を用いて本発明を詳細に説明するが、本発明は実施例に記載された態様に限定されるものではない。なお、特に示さない限り、市販の試薬およびキット等は、そのプロトコルに従い使用した。

[0075] ［実施例１］

血球貪食症候群のモデルマウスを作製し、本発明の細胞調製物により、血球貪食症候群における組織へのマクロファージの集積が抑制できることを確認した。

[0076] （１）ＨＰＳモデルマウスの作製

ＨＰＳモデルマウスは、Ｂ６系統バックグラウンドマウスのアルビノ系統（B6N-Tyr^{c-Brd}/BrdCrCrl、日本チャールズリバー社製）に対して、TLR9 ligandである、非メチル化CpG ODNを投与することにより、作製した。前記非メチル化ＣｐＧとしては、クラスＢ　ＣｐＧオリゴヌクレオチドであるＯＤＮ　１８２６（5’-tccatgacgttcctgacgtt-3’：配列番号１）を投与することにより誘導した。具体的には、図１（Ａ）に示すように、初回のＣｐＧ　ＯＤＮ投与日（０日目）を基準とし、３日目、７日目、１０日目、および１４日目に、前記マウスにＣｐＧ　ＯＤＮを腹腔内投与（i.p.）した。各回の投与量は、５０μｇ／マウスとした。なお、ＣｐＧ　ＯＤＮの投与回数は、１～５回とした。そして、１８日目にモデルマウスの脾臓、肝臓および血液を回収した。

[0077] つぎに、前記脾臓については、目視にて、大きさを確認の上、重量を測定した。コントロールは、前記ＣｐＧ　ＯＤＮに代えて、ＰＢＳ（リン酸緩衝液）を等量投与した以外は同様にして測定した。そして、５回ＰＢＳを投与

したコントロールの重量１として、相対的重量を算出した。これらの結果を、図１（Ｂ）および（Ｃ）に示す。

[0078] 図１（Ｂ）は、各マウスの脾臓の写真を示し、上段が、コントロールのマウス由来の脾臓であり、下段が、ＣｐＧ　ＯＤＮを投与したマウスの脾臓である。図１（Ｃ）は、各マウスの脾臓の重量の相対値を示すグラフである。図１（Ｃ）において、横軸は、投与物および投与回数を示し、縦軸は、相対的重量を示す。図１（Ｂ）および（Ｃ）に示すように、ＣｐＧ　ＯＤＮを投与すると、いずれの回数でも、脾臓の肥大が観察され、かつコントロールと比較して、重量が増加していた。このため、アルビノ系統に対して、ＴＬＲ９リガンドであるＣｐＧ　ＯＤＮを投与することにより、ＨＰＳの症状の一つである脾肥大と同様の症状を示すことが分かった。

[0079] つぎに、前記肝臓については、マウスから肝臓を採取後、パラフィンブロックを作成し、ついで、得られたパラフィンブロックをスライスして組織切片を作成した。得られた組織切片について、ヘマトキリン・エオジン染色（HE染色）法により染色した。すなわち、Harris Hematoxylin溶液で１０分間、核を染色後、水洗し、ついで、Eosin溶液で細胞質を染色した。その後、得られた組織切片をアルコールで脱水して乾燥した。前記乾燥後、スライドグラスの上にカバーグラスをバルサムで封入した。そして、染色後の組織切片について、光学顕微鏡で観察した。これらの結果を図２示す。

[0080] 図２は、組織切片を示す写真である。図２において、左から、コントロール（５回投与）の結果、ＣｐＧ　ＯＤＮを２回投与したマウスの結果、ＣｐＧ　ＯＤＮを５回投与したマウスの結果を示す。図２に示すように、コントロールでは、肝臓内に液胞構造物の形成や、フィブリンおよび白血球の蓄積は見られなかった。他方、ＣｐＧ　ＯＤＮを投与したマウスでは、肝臓内に液胞構造物の形成が見られ、かつフィブリンおよび白血球の蓄積は見られた。なお、ＣｐＧ　ＯＤＮを１、３または４回投与したマウスでも同様であった。このため、アルビノ系統に対して、ＴＬＲ９リガンドであるＣｐＧ　ＯＤＮを投与することにより、ＨＰＳの症状の一つである肝臓における液胞構

造物の形成、並びにフィブリンおよび白血球の蓄積と同様の症状を示すことが分かった。

[0081] つぎに、血液については、解析日に心臓採血により、サンプルを調製し、自動血球検査機器で血小板数を測定するとともに、スライドグラスに塗抹標本（スメア標本）を作製して光学顕微鏡で観察した。そして、５回ＰＢＳを投与したコントロールの血小板数１として、相対数を算出した。これらの結果を図３および４に示す。

[0082] 図３は、血液の染色図を示す写真である。図３に示すように、コントロールでは、血液中に、網赤血球はほとんど見られなかった。他方、ＣｐＧ ＯＤＮを５回投与したマウスでは、血液中に多数の網赤血球が見られた。なお、ＣｐＧ ＯＤＮを１～４回投与したマウスでも同様であった。

[0083] 図４は、血小板数を示すグラフである。図４に示すように、ＣｐＧ ＯＤＮを１～５回投与したマウスでは、コントロールと比較して、血液中の血小板数が大きく減少していた。

[0084] このため、アルビノ系統に対して、ＴＬＲ９リガンドであるＣｐＧ ＯＤＮを投与することにより、ＨＰＳの症状の一つである血液中の網赤血球数の上昇および血小板減少と同様の症状を示すことが分かった。

[0085] 以上のことから、前記アルビノ系統に、ＣｐＧ ＯＤＮを投与することにより、ＨＰＳモデルマウスとして使用できることを確認した。また、ＣｐＧ ＯＤＮは、ＤＮＡから構成されることから、実施例１のＨＰＳは、ＥＢウイルス等のＤＮＡウイルスに起因するＨＰＳ（ＶＡＨＳ）モデルとして好適に使用できるといえる。

[0086] （２）臍帯由来細胞の調製

臍帯由来細胞は、Ｃｙｔｏｔｈｅｒａｐｙ，１８，２２９－２４１，２０１６に記載の方法で採取した。具体的には、東京大学医科学研究所の倫理委員会の承認を得た上で、提供者の同意を得て採取された臍帯の組織要素すべて（羊膜、血管、血管周囲組織およびワルトンジェリーを含む）を１～２ｍｍ^{3}の断片に細断し、培養皿上へ播種した。そして、セルアミーゴ（株式会社

椿本チエイン製）を被せ、１０％　ｆｅｔａｌ　ｂｏｖｉｎｅ　ｓｅｒｕｍ（ＦＢＳ）と抗生物質とを添加したα－ｍｉｎｉｍａｌ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌ　ｍｅｄｉｕｍ（αＭＥＭ）中で培養する改良エクスプラント法により、臍帯由来細胞を得た。当該細胞の性状はプラスチック付着性である。

[0087]（３）表面抗原の確認

つぎに、得られた臍帯由来細胞について、表面抗原の発現の有無を確認した、前記表面抗原の発現の有無は、それぞれの抗原に対する特異抗体を用いたＦＡＣＳ解析により確認した。臍帯由来細胞の表面抗原としては、ＣＤ７３、ＣＤ１０５、ＣＤ９０、ＣＤ４４およびＨＬＡ－ｃｌａｓｓＩが陽性、ＨＬＡ－ＣｌａｓｓＩＩ、ＣＤ３４、ＣＤ４５、ＣＤ１９、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ４０およびＣＤ１１ｂが陰性を呈した。さらに、ＨＬＡ－Ｇ５およびＰＤ－Ｌ２が陽性を呈した。また、ＨＬＡ－Ｇは弱陽性、ＣＤ４９ｄ（ＩＴＧＡ４）およびＣＤ１８４（ＣＸＣＲ４）は陰性～弱陽性、ＣＤ２９（ＩＴＧＢ１）は陽性を呈した。

[0088]　なお、前記臍帯由来細胞は、平常状態においてＨＧＦ（Ｈｅｐａｔｉｃ　Ｇｒｏｗｔｈ　Ｆａｃｔｏｒ）の遺伝子を高発現していること、炎症の条件下（ＩＦＮ－γ　１００ｎｇ／ｍｌ）においてＩＤＯ（Ｉｎｄｏｌｅａｍｉｎｅ　２，３－ｄｉｏｘｙｇｅｎａｓｅ）の遺伝子発現が誘導されることを、Ｒｅａｌｔｉｍｅ　ＰＣＲによって確認した。特にＨＧＦの発現は、骨髄由来間葉系幹細胞に比べて、臍帯由来細胞でより高いことがわかった。また、臍帯由来細胞を、ＭＬＲ（同種リンパ球混合反応）と共培養することにより、ＰＧＥ２の分泌が誘導されることを、ＥＬＩＳＡにより確認した。

[0089]（４）細胞調製物の調製

得られた臍帯由来細胞を、Corning（登録商標） CellBIND（登録商標） 表面１００ｍｍ　ディッシュ（コーニング社製、Product Number:#3292）に播種し、Passage 1からPassage 4まで継代し、増殖させた。なお、前記継代培養中の培養液は、ヒト間葉系幹細胞用基礎培養液である、ＣｉＭＳ（商標）－ＢＭ（ニプロ株式会社、製品コード：87-070）に、ヒト間葉系幹細胞用基

礎培養液アニマルフリー添加剤であるCiMS（商標）-sAF（ニプロ株式会社、製品コード：87-072）を、添付文書に従った割合で添加したものを用いた。その後、TrypLE（商標） Select Enzyme(1X), no phenol red (ThermoFisher社、製品番号：12563011）を用いて前記細胞を剥離し、１×１０^{6}ｃｅｌｌ／１５０μｌとなるように調製し、本発明の細胞調製物とした。

[0090] （５）ＨＰＳにおけるマクロファージの集積抑制

ＨＰＳでは、肝臓、脾臓等にマクロファージが集積し、前記マクロファージが血球を貪食することにより、血液中の成熟赤血球数および血小板数の減少が生じる。そこで、ＨＰＳモデルマウスに、臍帯由来細胞を投与することで、肝臓におけるマクロファージの集積を抑制できるかを検討した。

[0091] 具体的には、図５（Ａ）に示すように、ＣｐＧ ＯＤＮまたはＰＢＳを、０、３、７、１０または１４日目に投与し、臍帯由来細胞（ＭＳＣ）（１５０μｌ）または臍帯由来細胞の凍結保存液中に含まれる凍結防止剤を含むＰＢＳ溶液（ＤＢＡ－Ｄ）を、４、８、１１または１５日目に投与した。そして、１８日目に各マウスから肝臓を採取した。

[0092] 前記肝臓については、パラフィンに包埋し、得られたパラフィン包埋組織片をスライスして組織切片を調製した。得られた組織切片について、抗マウスＦ４/８０抗体を用いて染色後、ヒツジ抗マウスＩｇＧ ＨＲＰを結合させた。ついで、前記組織切片について、Peroxidase染色により、Ｆ４／８０陽性マクロファージを染色した。そして、染色後の組織切片について、光学顕微鏡で観察した。そして、各組織切片全体にわたり、２０倍対物レンズ（２００倍拡大）にてランダムに１０視野撮像後、得られた写真１０枚（単位面積６．７４ｍｍ^{2}×１０視野）あたりの茶褐色のＦ４／８０陽性マクロファージの数をカウントした。これらの結果を図５（Ｂ）および（Ｃ）に示す。

[0093] 図５（Ｂ）は、各マウスの肝臓の写真を示す。なお、図中の黒い領域がマクロファージの存在する領域を示す。図５（Ｃ）は、各マウスの肝臓におけるＦ４／８０陽性マクロファージの数を示すグラフである。図５（Ｃ）において、横軸は、投与物を示し、縦軸は、マクロファージの数を示す。図５（

Ｂ）および（Ｃ）に示すように、ＣｐＧ　ＯＤＮのみを投与すると（ＣｐＧ）、肝臓においてマクロファージの集積が見られた。これに対して、ＣｐＧに加えて、臍帯由来細胞を投与すると（ＣｐＧ＋ＭＳＣ）、マクロファージの集積が有意に抑制された（$p<0.01$）。このため、臍帯由来細胞によれば、ＨＰＳモデルマウスにおける肝臓のマクロファージの集積を抑制できることがわかった。前述のように、ＨＰＳでは、肝臓にマクロファージの集積が生じ、その後、血球の貪食により、血球が減少する。臍帯由来細胞は、肝臓におけるマクロファージの集積を抑制できるため、その後の血球貪食も抑制できると考えられた。以上のことから、本発明の細胞調製物によれば、血球貪食症候群を治療可能なことがわかった。

[0094] ［実施例２］

臍帯由来細胞が優れた炎症部位への遊走能を有することを確認した。

[0095] 実施例１のＨＰＳモデルマウスでは、ＣｐＧ　ＯＤＮの全身投与により、肝臓等を含めた全身の組織での炎症が生じていると推定される。また、前記実施例１で示すように、前記臍帯由来細胞を投与したＨＰＳモデルマウスでは、肝臓におけるマクロファージの集積が低下している。そこで、本実施例では、前記臍帯由来細胞が、炎症組織に遊走して炎症を抑制している可能性を検討するため、前記臍帯由来細胞の遊走能について検討した。

[0096] （１）臍帯由来細胞の調製

臍帯由来細胞は、前記実施例１（２）として同様に調製した。また、参考例の細胞としては、ヒト髄由来間葉系細胞（ＢＭ－ＭＳＣ、LONZA社製）およびヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞（ＡＤ－ＭＳＣ、LONZA社製）を使用した。

[0097] （２）リンパ球混合反応における遊走

炎症モデルとしては、リンパ球混合反応（ＭＬＲ）を用いた。９６ウェルのメンブレンインサートプレート（Corning社製、メンブレンのポアサイズ：８．０μｍ）のボトムウェルに対して、ヒト末梢血由来単核球、ヒト樹状細胞株（ＰＭＤＣ０５）、および抗ヒトＣＤ３抗体（clone：ＯＫＴ３、細胞科学研究所社製）の混合液を播種した。各ウェルにおける細胞の播種密度およ

び抗体の濃度は、下記のとおりとした。ボトムウェルにおける培養液量は、８００μｌとした。培地は、αＭＥＭとした。なお、下記の細胞の播種密度および抗体の濃度を用いて、ＭＬＲを実施することにより、各種炎症性サイトカインが産生されることを別途確認している。

（ＭＬＲの条件）

単核球：４×１０^{5}cells/well

樹状細胞：４×１０^{4}cells/well　（単核球の１０分の１）

抗ＣＤ３抗体：２．２５ｎｇ／ｍｌ

[0098] つぎに、各ウェルにインサートを入れ、インサート内に、５×１０^{3} cells/200μｌ／wellとなるように、臍帯由来細胞を播種した。そして、３７℃、５％ＣＯ$_{2}$、湿潤環境下で、１７時間培養した。前記培養後、インサートを取出して培地を除き、１０％ホルマリンで固定し、さらに、ＰＢＳで洗浄した。前記洗浄後、4',6-diamidino-2-phenylindole（DAPI：PromoCell GmbH社製）染色し、インサートの裏側（ボトム側）に遊走して出てきた臍帯由来細胞の核を染色した。前記核は、460 nmに青色の蛍光（励起波長360 nm）を発するため、蛍光顕微鏡にてインサート裏全面の細胞核（＝細胞数）をカウントすることにより、遊走した細胞数を算出した（実施例）。ネガティブコントロールは、ボトムウェルでＭＬＲを実施しなかった、すなわち、ボトムウェルに、前記単核球、樹状細胞および抗ＣＤ３抗体に代えて、培養液を添加した以外は同様にして実施した（比較例）。そして、実施例における遊走した細胞数を１として、遊走細胞数の相対値を算出した。これらの結果を、図６に示す。

[0099] 図６は、ＭＬＲにおいて遊走した臍帯由来細胞の数を示すグラフである。図６において、横軸は、サンプルの種類を示し、縦軸は、遊走細胞数の相対値を示す。図６に示すように、ＭＬＲによる炎症が生じていると、臍帯由来細胞は、遊走する細胞数が増加した、すなわち、炎症が起きている方向に向かって遊走していることがわかった。

[0100] （３）リンパ球混合反応における遊走因子

ＭＬＲにおける遊走因子を検討するため、ＡＧ１２９６（血小板成長因子受容体（ＰＤＧＦＲ）阻害剤、Cayman社製）、ＰＰＰ（インスリン様成長因子－１（ＩＧＦ－１）受容体阻害剤、Merck社製）、およびＧＭ６００１（マトリックスメタロプロテアーゼ（ＭＭＰ）阻害剤、Cayman社製）により阻害が生じるかを検討した。具体的には、前記実施例２（２）のボトムウェルに、各阻害剤が所定濃度（ＡＧ１２９６：０、２．５、５、または１０μｍｏｌ／ｌ、ＰＰＰ：０、０．５、１、または２μｍｏｌ／ｌ、ＧＭ６００１：０、１０、２０、または４０μｍｏｌ／ｌ）となるように、各阻害剤を添加した以外は、同様にして遊走した細胞数をカウントした。そして、各阻害剤の濃度が、０μｍｏｌ／ｌであるサンプルの遊走した細胞数を１として、遊走細胞数の相対値を算出した。これらの結果を、図７に示す。

[0101] 図７は、ＭＬＲにおいて遊走した臍帯由来細胞の数を示すグラフである。図７において、横軸は、阻害剤の種類およびその濃度を示し、縦軸は、遊走細胞数の相対値を示す。図７に示すように、いずれの阻害剤を用いた場合においても、臍帯由来細胞の遊走能は、濃度依存的に低下した。これらのことから、臍帯由来細胞の炎症部位への遊走には、血小板成長因子（ＰＤＧＦ）、インスリン様成長因子－１（ＩＧＦ－１）、およびＭＭＰが関与していることがわかった。

[0102] （４）他の細胞との遊走能の比較

前記臍帯由来細胞と、ＢＭ－ＭＳＣおよびＡＤ－ＭＳＣとの遊走能を比較した。具体的には、前記実施例２（２）において、前記臍帯由来細胞をインサートに播種したサンプルに加えて、ＢＭ－ＭＳＣまたはＡＤ－ＭＳＣをインサートに播種したサンプルを調製した以外は、同様にして実施した（実施例および参考例）。ネガティブコントロールは、ボトムウェルでＭＬＲを実施しなかった、すなわち、ボトムウェルに、前記単核球、樹状細胞および抗ＣＤ３抗体に代えて、培養液を添加した以外は同様にして実施した（比較例）。また、ポジティブコントロールは、前記単核球、樹状細胞および抗ＣＤ３抗体に代えて、１０％ＦＢＳ含有αＭＥＭを添加した以外は同様にして、

各ウェルについて遊走した細胞の数をカウントした。なお、ＦＢＳは、非特異的な細胞遊走因子であることが知られている。これらの結果を下記図８に示す。

[0103] 図８は、遊走した細胞数を示すグラフである。図８において、横軸は、細胞の種類を示し、縦軸は、１ウェルあたりの遊走した細胞数を示す。図８に示すように、ネガティブコントロール（培養液）では、いずれの細胞についても、遊走は観察されなかった。これに対して、ポジティブコントロール（ＦＢＳ）では、全ての細胞について、遊走が観察された。他方、ＭＬＲによる炎症が生じていると、臍帯由来細胞は、遊走する細胞数が増加したのに対して、ＢＭ－ＭＳＣおよびＡＤ－ＭＳＣでは、遊走する細胞数は増加しなかった。すなわち、臍帯由来細胞は、炎症部位に遊走するのに対して、ＢＭ－ＭＳＣおよびＡＤ－ＭＳＣに炎症部位に遊走しないことがわかった。

[0104] （５）他の細胞との遊走機序の比較

前記実施例２（４）で示したように、臍帯由来細胞と、ＢＭ－ＭＳＣおよびＡＤ－ＭＳＣとでは、炎症部位への指向性が異なる。そこで、この指向性の違いを検討した。具体的には、前記実施例２（３）において、前記臍帯由来細胞をインサートに播種したサンプルに加えて、ＢＭ－ＭＳＣまたはＡＤ－ＭＳＣをインサートに播種し、ボトムウェルについて、前記単核球、樹状細胞および抗ＣＤ３抗体に代えて、１０％ＦＢＳ含有αＭＥＭを添加したサンプルを調製した以外は、同様にして実施した（実施例および参考例）。そして、各阻害剤の濃度が、０μｍｏｌ／ｌであるサンプルの遊走した細胞数を１として、遊走細胞数の相対値を算出した。これらの結果を、図９に示す。

[0105] 図９は、ＦＢＳを添加した場合において遊走した臍帯由来細胞の数を示すグラフである。図９において、（Ａ）は、臍帯由来細胞の結果を示し、（Ｂ）は、ＢＭ－ＭＳＣの結果を示し、（Ｃ）は、ＡＤ－ＭＳＣの結果を示す。また、図９（Ａ）～（Ｃ）において、横軸は、阻害剤の種類およびその濃度を示し、縦軸は、遊走細胞数の相対値を示す。図９（Ａ）に示すように、い

ずれの阻害剤を用いた場合においても、臍帯由来細胞の遊走能は、濃度依存的に低下した。これに対して、ＢＭ－ＭＳＣおよびＡＤ－ＭＳＣでは、ＡＧ１２９６およびＰＰＰを添加した場合、遊走能の低下が見られたが、ＧＭ６００１を添加した場合、遊走能の低下は見られなかった。これらの結果から、臍帯由来細胞の炎症部位への遊走能には、ＭＭＰが関与していることがわかった。

[0106] （６）ケモカイン産生能

一部のケモカインは、オートクラインに作用する。そこで、臍帯由来細胞、ＢＭ－ＭＳＣ、およびＡＤ－ＭＳＣのケモカイン産生能を検討した。具体的には、前記実施例２（４）と同様にして細胞を培養した。前記培養後、各ウェルの培養液を回収し、培養液中のＭＣＰ－１の濃度を、フローサイトメトリー（BD（商標） Cytometric Bead Array、BD Bioscience社製）により測定した。また、コントロール１は、臍帯由来細胞をインサートに播種しなかった以外は同様にして測定した（ＭＬＲ）。コントロール２は、前記培養液に代えて、ＦＢＳ中のＭＣＰ－１の濃度を測定した（ＦＢＳ）。これらの結果を図１０に示す。

[0107] 図１０は、ＭＣＰ－１の濃度を示すグラフである。図１０において、横軸は、サンプルの種類を示し、縦軸は、ＭＣＰ－１の濃度を示す。図１０に示すように、ボトムウェルでＭＬＲを実施した場合、またはボトムウェルにＦＢＳを添加した場合、臍帯由来細胞の培養群では、ＢＭ－ＭＳＣおよびＡＤ－ＭＳＣの培養群と比較して、ＭＣＰ－１の濃度が大きく増加していた、すなわち、臍帯由来細胞は、ＢＭ－ＭＳＣおよびＡＤ－ＭＳＣと比較して、多量のＭＣＰ－１を産生していた。

[0108] 以上の結果から、前記臍帯由来細胞は、ＭＭＰが関連する経路で、炎症組織に遊走して炎症を抑制している可能性が示唆された。また、前記臍帯由来細胞は、ＢＭ－ＭＳＣおよびＡＤ－ＭＳＣと比較して、炎症組織への遊走能に優れていることが示唆された。

[0109] ［実施例４］

血球貪食症候群のモデルマウスを作製し、本発明の細胞調製物により、血球貪食症候群モデルマウスにおいて生じる脾腫および白脾髄の崩壊を抑制できることを確認した。

[0110] 血球貪食症候群のモデルマウスは、０日目、３日目、および７日目にＣｐＧ　ＯＤＮを投与した以外は、前記実施例１（１）と同様にして誘導した。また、初回投与時（０日目）を基準として、８日目に、前記実施例１（４）と同様にして調製した１×１０^{6}ｃｅｌｌ／１５０μｌに調製した細胞調製物１５０μｌ、または前記凍結防止剤を含むＰＢＳ溶液（ＣｐＧ）を投与した。ネガティブコントロール（ＰＢＳ）は、前記ＣｐＧ　ＯＤＮおよび細胞調製物に代えて、ＰＢＳ溶液を投与した以外は、同様にして実施した。

[0111] 初回投与日を基準（０日目）として１４日目に、各マウスから脾臓を回収し、前記肝臓に変えて脾臓を用いた以外は、前記実施例１（５）と同様にして、組織切片を調製した。得られた組織切片について、ＨＥ染色を行なった。また、別の組織切片について、抗マウスＦ４／８０抗体もしくは抗マウスＣＤ８ａ抗体を用いて染色後、ヒツジ抗マウスＩｇＧ　ＨＲＰを結合させた。ついで、前記組織切片について、Peroxidase染色により、Ｆ４／８０陽性マクロファージ、またはＣＤ８ａ陽性Ｔ細胞を染色した。そして、染色後の組織切片について、前記実施例１（５）と同様にして光学顕微鏡で観察した。また、各組織切片の観察像に基づき、全脾臓（S_A）の面積に占める白脾髄（S_w）の面積の比（S_w／S_A）を算出した。これらの結果を図１１および１２に示す。

[0112] 図１１は、脾臓のＨＥ染色像または免疫組織染色像を示す写真である。図１１において、各写真は、左からＨＥ染色像、抗Ｆ４／８０抗体を用いた免疫組織染色像、および抗ＣＤ８ａ抗体を用いた免疫組織染色像を示す。また、図１１において、各写真は、上段から、ネガティブコントロール（ＰＢＳ）、コントロール（ＣｐＧ）およびＭＳＣ投与群（ＣｐＧ＋ＭＳＣ）である。図１１に示すように、コントロールでは、血球貪食症候群のモデルマウスでは、白脾髄の崩壊が見られ、かつ脾腫が観察された。これに対して、前記

細胞調製物を１回投与した場合、白脾髄の崩壊が抑制され、かつ脾腫も抑制されていた。

[0113] つぎに、図１２は、全脾臓に占める白脾髄の面積の比を示すグラフである、図１２において、横軸は、サンプルの種類を示し、縦軸は、比（S_w／S_A）を示す。図１２に示すように、血球貪食症候群モデルマウスでは、白脾髄の崩壊に伴い、脾臓において白脾髄の占める割合が低下した。他方、前記細胞調製物を１回投与した場合、前記白脾髄の崩壊と一致するように、比（S_w／S_A）の低下が抑制された。

[0114] 以上のことから、本本発明の細胞調製物により、血球貪食症候群モデルマウスにおいて生じる脾腫および白脾髄の崩壊を抑制できることが分かった。

[0115] 以上、実施形態および実施例を参照して本発明を説明したが、本発明は、上記実施形態および実施例に限定されるものではない。本発明の構成や詳細には、本発明のスコープ内で当業者が理解し得る様々な変更をすることができる。

[0116] この出願は、２０２１年２月２６日に出願された日本出願特願２０２１－０３０３１１を基礎とする優先権を主張し、その開示の全てをここに取り込む。

[0117] ＜付記＞

上記の実施形態および実施例の一部または全部は、以下の付記のように記載されうるが、以下には限られない。

（付記１）

血球貪食症候群の治療に用いる細胞調製物であって、

前記細胞調製物は、臍帯由来細胞を含む、細胞調製物。

（付記２）

前記臍帯由来細胞は、臍帯由来間葉系細胞を含む、付記１記載の細胞調製物。

（付記３）

前記臍帯由来細胞は、

（ｉ）ＣＤ１０５、ＣＤ７３、ＣＤ９０、ＣＤ４４、ＨＬＡ－ｃｌａｓｓＩ、ＨＬＡ－Ｇ５およびＰＤ－Ｌ２が陽性であり、かつ

（ｉｉ）ＣＤ４５、ＣＤ３４、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１９およびＨＬＡ－ＣＩａｓｓＩＩが陰性である、付記１または２に記載の細胞調製物。

（付記４）

前記臍帯由来細胞は、

（ｉｉｉ）炎症条件下でＩＤＯ、ＰＧＥ２、ＰＤ－Ｌ１のいずれか１つの遺伝子および／またはタンパクの発現が誘導される、付記１から３のいずれかに記載の細胞調製物。

（付記５）

前記臍帯由来細胞が、羊膜、血管、血管周囲組織および／またはワルトンジェリーを含む臍帯組織から調製された細胞である、付記１から４のいずれかに記載の細胞調製物。

（付記６）

前記細胞調製物は、1×10^{6}～1×10^{9}個の臍帯由来細胞を含む、付記１から５のいずれかに記載の細胞調製物。

（付記７）

前記細胞調製物は、前記臍帯由来細胞の抽出物および／または分泌物を含む、付記１から６のいずれかに記載の細胞調製物。

（付記８）

静脈内投与用である、付記１から７のいずれかに記載の細胞調製物。

（付記９）

血小板の減少を伴う血球貪食症候群を治療するための、付記１から８のいずれかに記載の細胞調製物。

（付記１０）

組織へのマクロファージの集積の抑制作用を示す、付記１から９のいずれかに記載の細胞調製物。

（付記１１）

前記組織は、肝臓である、付記１０記載の細胞調製物。

（付記１２）

前記血球貪食症候群は、ウイルス関連血球貪食症候群である、付記１から１１のいずれかに記載の細胞調製物。

（付記１３）

血球貪食症候群における組織へのマクロファージの集積抑制に用いる細胞調製物であって、前記細胞調製物は、臍帯由来細胞を含む、細胞調製物。

（付記１４）

血球貪食症候群患者の処置方法であって、

前記血球貪食症候群患者に、付記１から１２のいずれかに記載の細胞調製物を投与する、処置方法。

（付記１５）

血球貪食症候群の対象の組織へのマクロファージの集積抑制方法であって、対象に、付記１３記載の血球貪食症候群における組織へのマクロファージの集積抑制に用いる細胞調製物を用いる、抑制方法。

（付記１６）

血球貪食症候群の治療に用いるための、細胞調製物であり、

前記細胞調製物は、臍帯由来細胞を含む、細胞調製物。

（付記１７）

血球貪食症候群の対象の組織へのマクロファージの集積抑制に用いるための、細胞調製物であり、

前記細胞調製物は、臍帯由来細胞を含む、細胞調製物。

産業上の利用可能性

[0118] 以上のように、本発明によれば、血球貪食症候群におけるマクロファージの集積を抑制できる。このため、本発明によれば、血球貪食症候群を治療できるといえる。このため、本発明は、例えば、医薬分野等において極めて有用である。

請求の範囲

[請求項1] 血球貪食症候群の治療に用いる細胞調製物であって、
前記細胞調製物は、臍帯由来細胞を含む、細胞調製物。

[請求項2] 前記臍帯由来細胞は、臍帯由来間葉系細胞である、請求項１記載の細胞調製物。

[請求項3] 前記臍帯由来細胞は、
（ｉ）ＣＤ１０５、ＣＤ７３、ＣＤ９０、ＣＤ４４、ＨＬＡ－ｃｌａｓｓｌ、ＨＬＡ－Ｇ５およびＰＤ－Ｌ２が陽性であり、かつ
（ｉｉ）ＣＤ４５、ＣＤ３４、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１９およびＨＬＡ－ＣｌａｓｓＩＩが陰性である、請求項１または２に記載の細胞調製物。

[請求項4] 前記臍帯由来細胞は、
（ｉｉｉ）炎症条件下でＩＤＯ、ＰＧＥ２、ＰＤ－Ｌ１のいずれか１つの遺伝子および／またはタンパクの発現が誘導される、請求項１から３のいずれか一項に記載の細胞調製物。

[請求項5] 前記臍帯由来細胞が、羊膜、血管、血管周囲組織および／またはワルトンジェリーを含む臍帯組織から調製された細胞である、請求項１から４のいずれか一項に記載の細胞調製物。

[請求項6] 前記細胞調製物は、１×１０^{6}～１×１０^{9}個の臍帯由来細胞を含む、請求項１から５のいずれか一項に記載の細胞調製物。

[請求項7] 前記細胞調製物は、前記臍帯由来細胞の抽出物および／または分泌物を含む、請求項１から６のいずれか一項に記載の細胞調製物。

[請求項8] 静脈内投与用である、請求項１から７のいずれか一項に記載の細胞調製物。

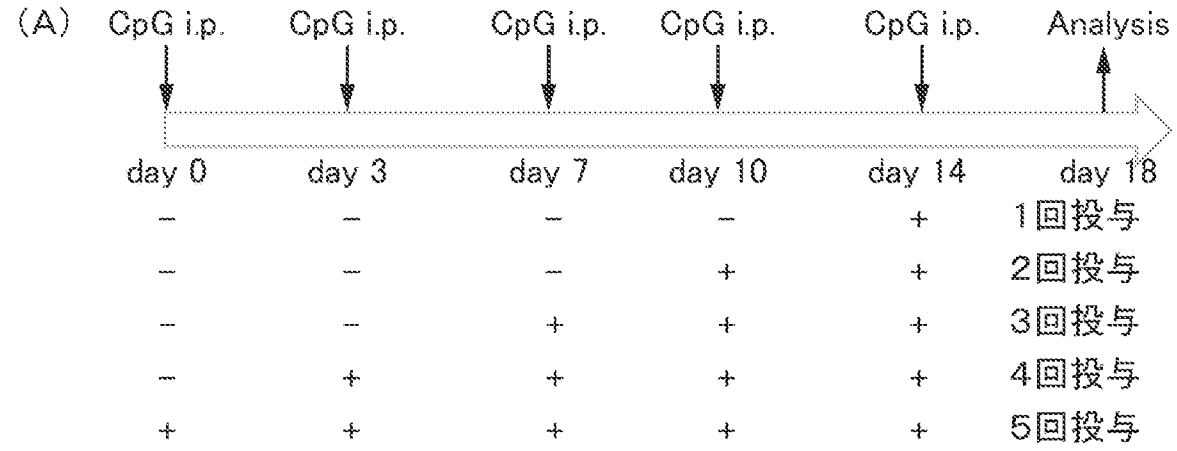
[請求項9] 血小板の減少を伴う血球貪食症候群を治療するための、請求項１から８のいずれか一項に記載の細胞調製物。

[請求項10] 組織へのマクロファージの集積の抑制作用を示す、請求項１から９のいずれか一項に記載の細胞調製物。

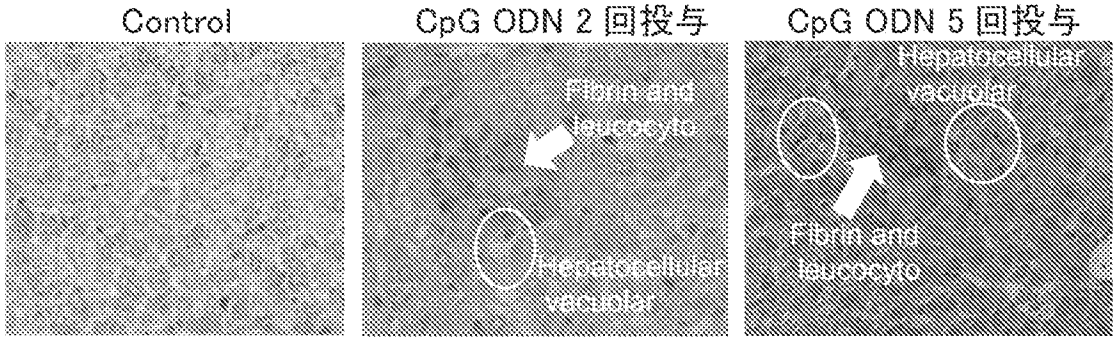
[請求項11] 前記組織は、肝臓である、請求項１０記載の細胞調製物。

[請求項12] 前記血球貪食症候群は、ウイルス関連血球貪食症候群である、請求項１から１１のいずれか一項に記載の細胞調製物。

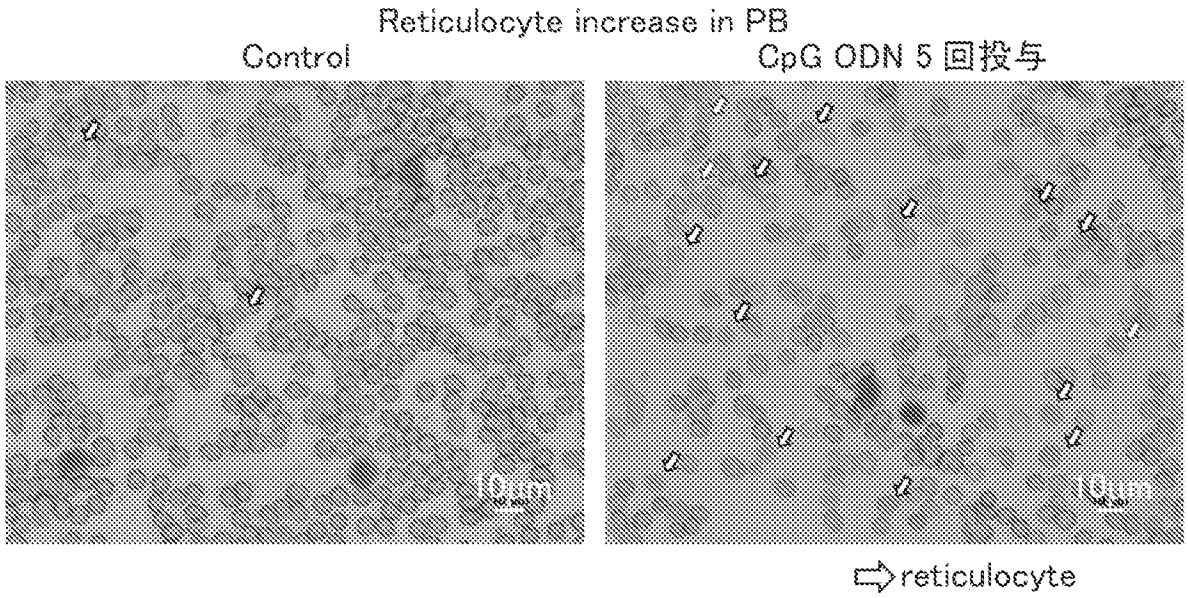
[図1]


(A)
CpG i.p.
CpG i.p.
CpG i.p.
CpG i.p.
CpG i.p.
Analysis
day 0
day 3
day 7
day 10
day 14
day 18
− − − − + 1回投与
− − − + + 2回投与
− − + + + 3回投与
− + + + + 4回投与
+ + + + + 5回投与
(B)
CpG ODN の投与回数
1
2
3
4
5
Control
CpG
(C)
相対的重量（Control=1）
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Control
1
2
3
4
5
CpG ODN の投与回数

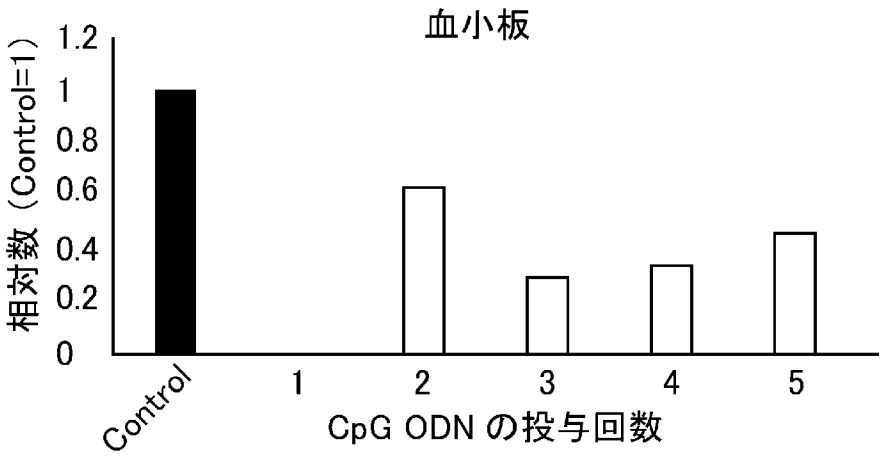
[図2]


Control
CpG ODN 2 回投与
CpG ODN 5 回投与
Fibrin and leucocyte
Hepatocellular vacuolar
Fibrin and leucocyte
Hepatocellular vacuolar

[図3]

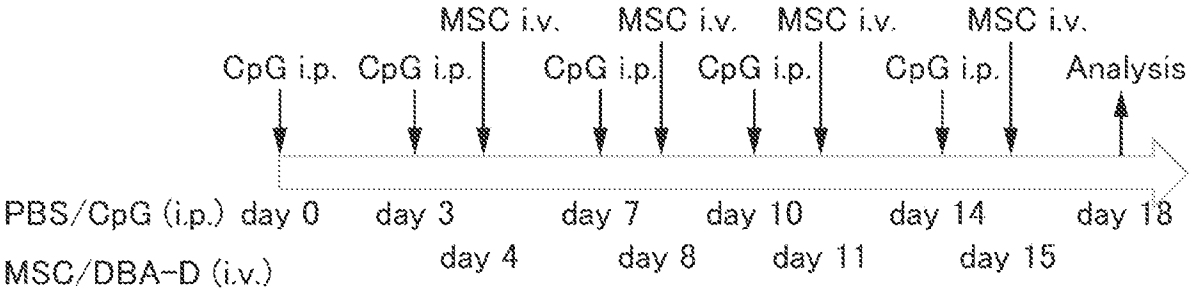

Reticulocyte increase in PB
Control
CpG ODN 5 回投与
10μm
10μm
reticulocyte

[図4]


血小板
相対数（Control=1）
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Control
1
2
3
4
5
CpG ODN の投与回数

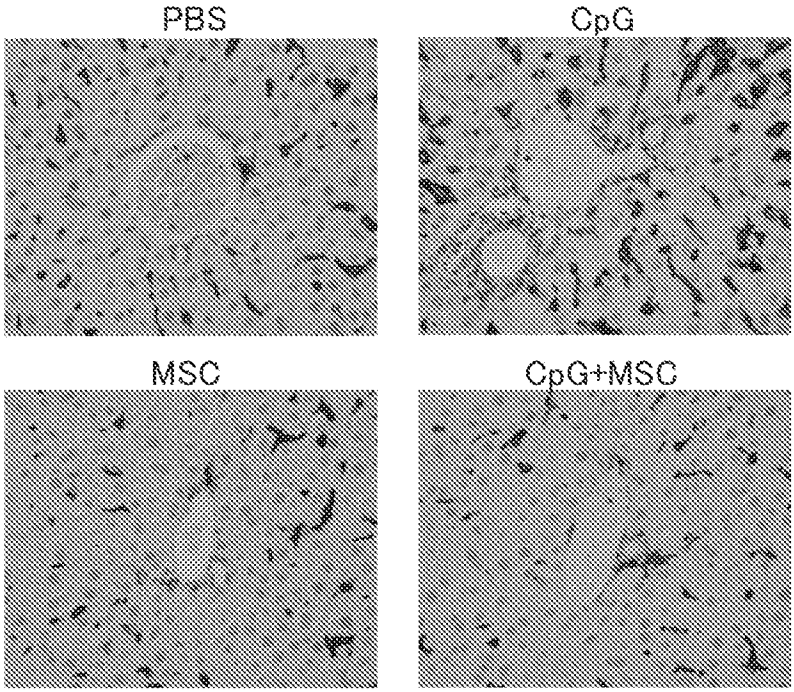
[図5]

(A)

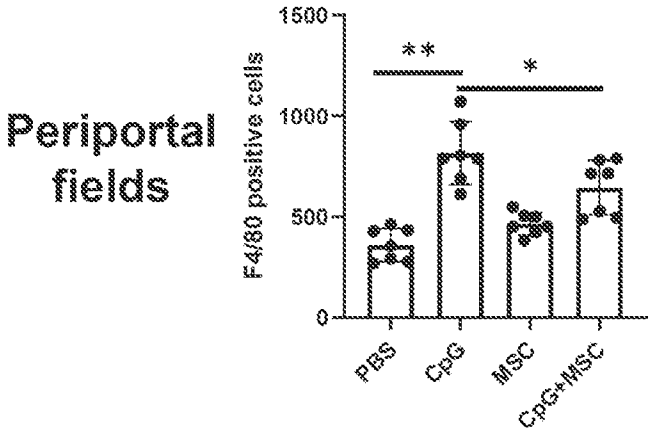


	PBS/CpG (i.p.)	MSC/DBA-D (i.v.)
PBS	PBS	DBA/D
CpG	CpG	DBA/D
MSC	PBS	MSC
CpG+MSC	CpG	MSC

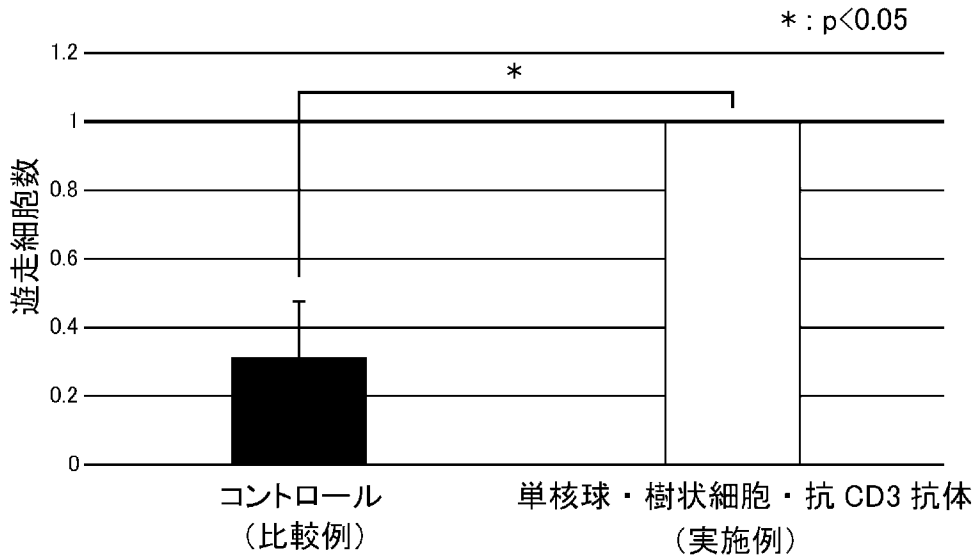
(B)



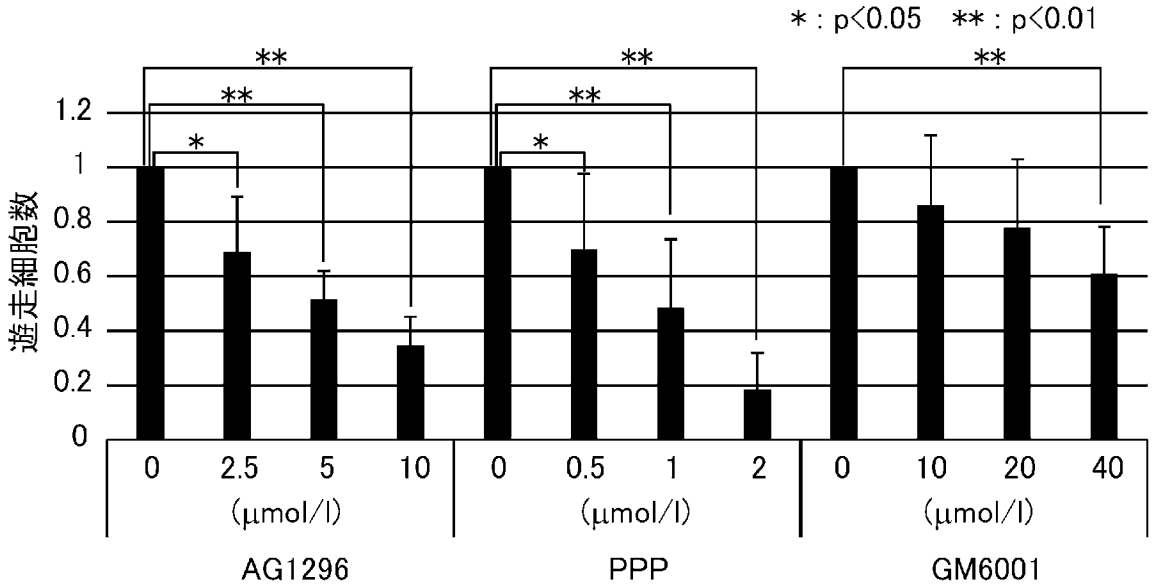
(C)



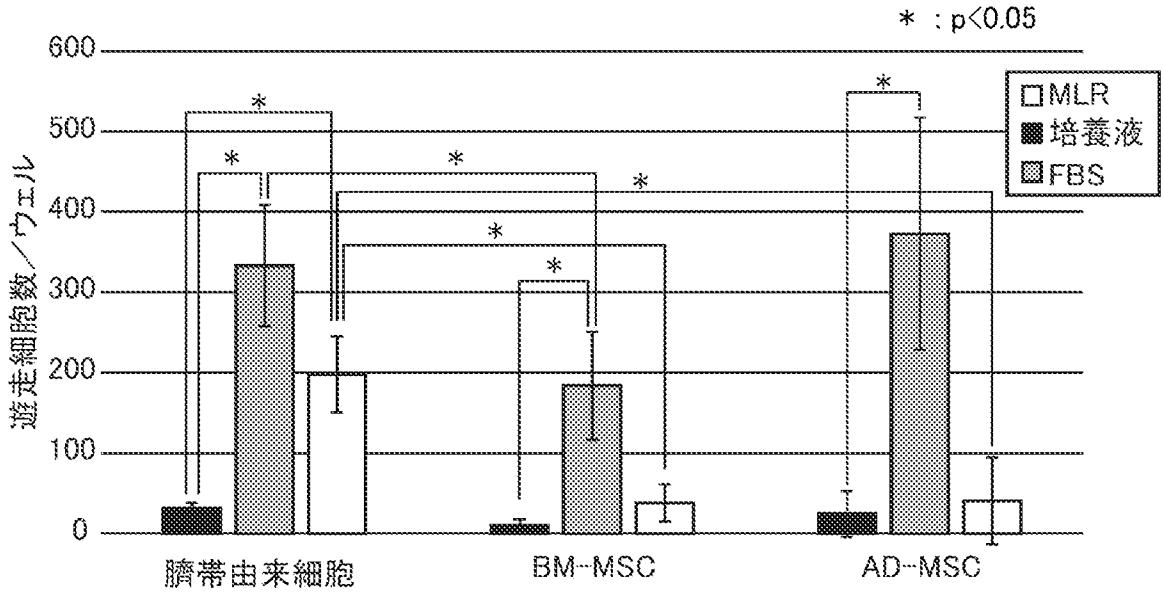
[図6]


＊：p<0.05
遊走細胞数
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
＊
コントロール
（比較例）
単核球・樹状細胞・抗 CD3 抗体
（実施例）

[図7]


＊：p<0.05 ＊＊：p<0.01
遊走細胞数
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0 2.5 5 10
(μmol/l)
AG1296
0 0.5 1 2
(μmol/l)
PPP
0 10 20 40
(μmol/l)
GM6001

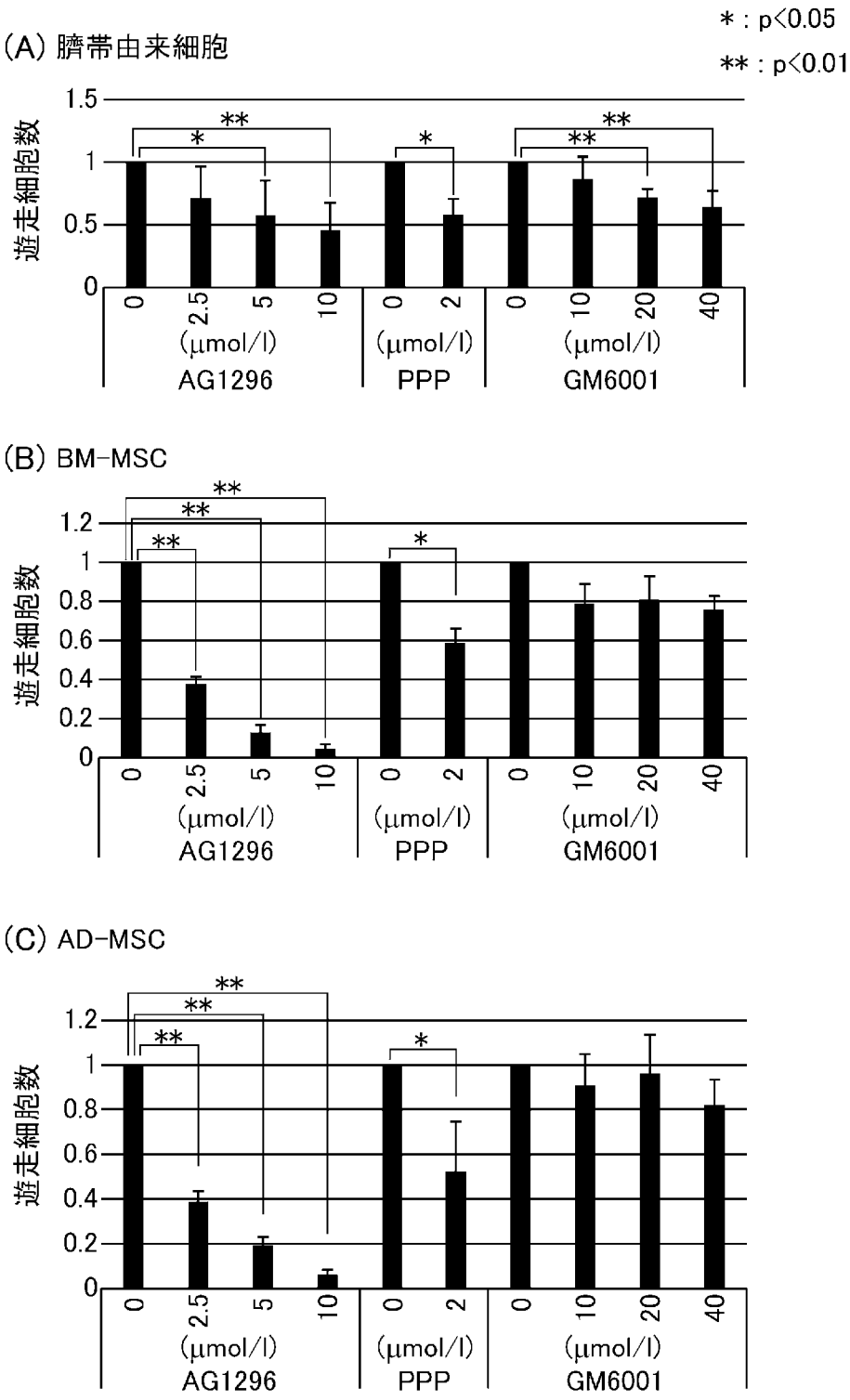
[図8]


＊：p<0.05
遊走細胞数／ウェル
600
500
400
300
200
100
0
MLR
培養液
FBS
臍帯由来細胞
BM-MSC
AD-MSC

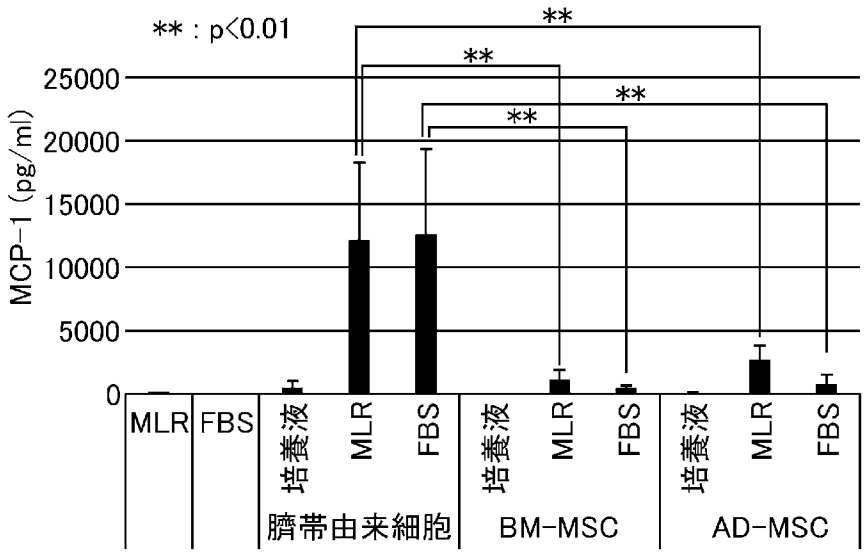
[図9]

＊：p<0.05

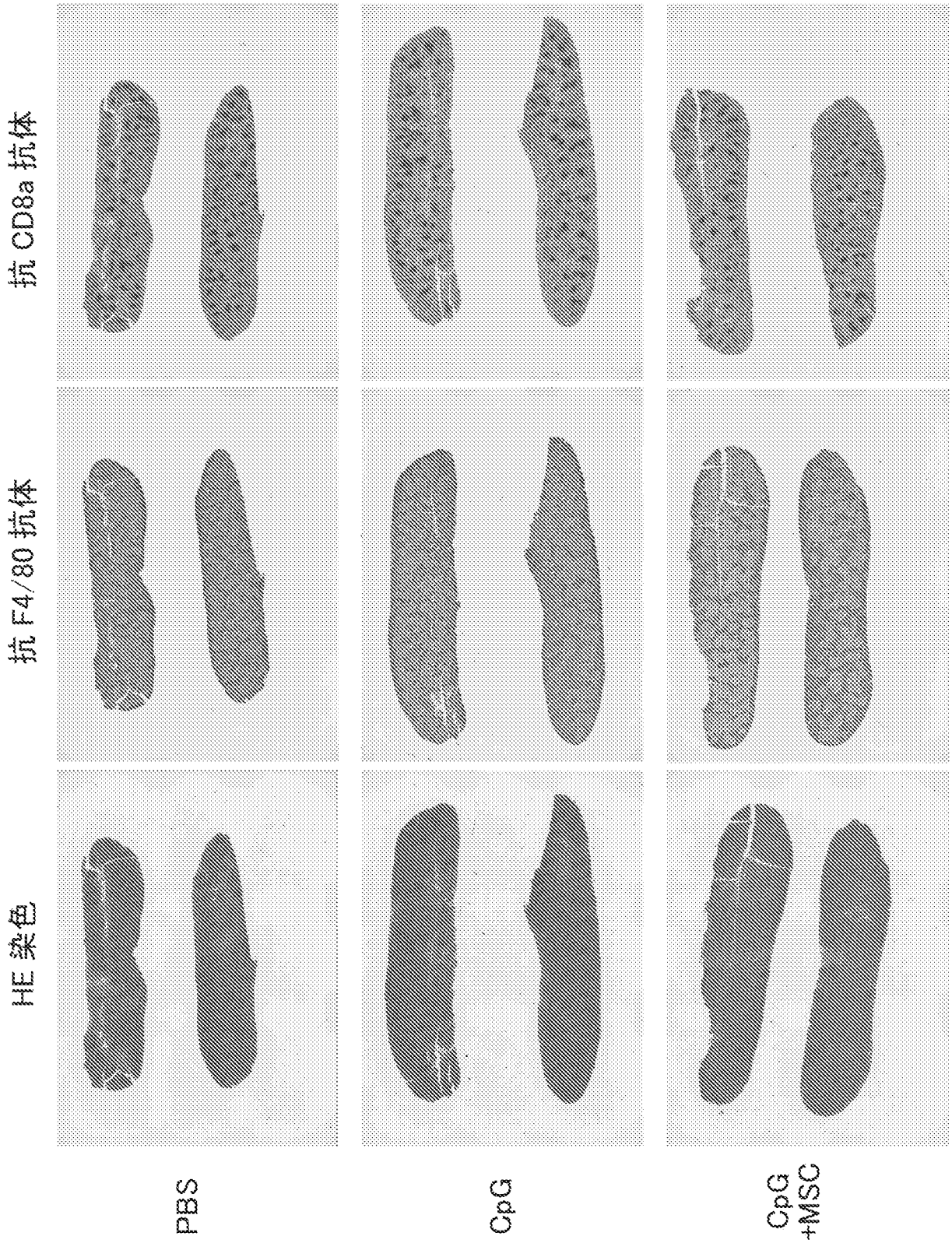
＊＊：p<0.01


(A) 臍帯由来細胞
遊走細胞数
1.5
1
0.5
0
0
2.5
5
10
(μmol/l)
AG1296
0
2
(μmol/l)
PPP
0
10
20
40
(μmol/l)
GM6001
(B) BM-MSC
遊走細胞数
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
(C) AD-MSC
遊走細胞数

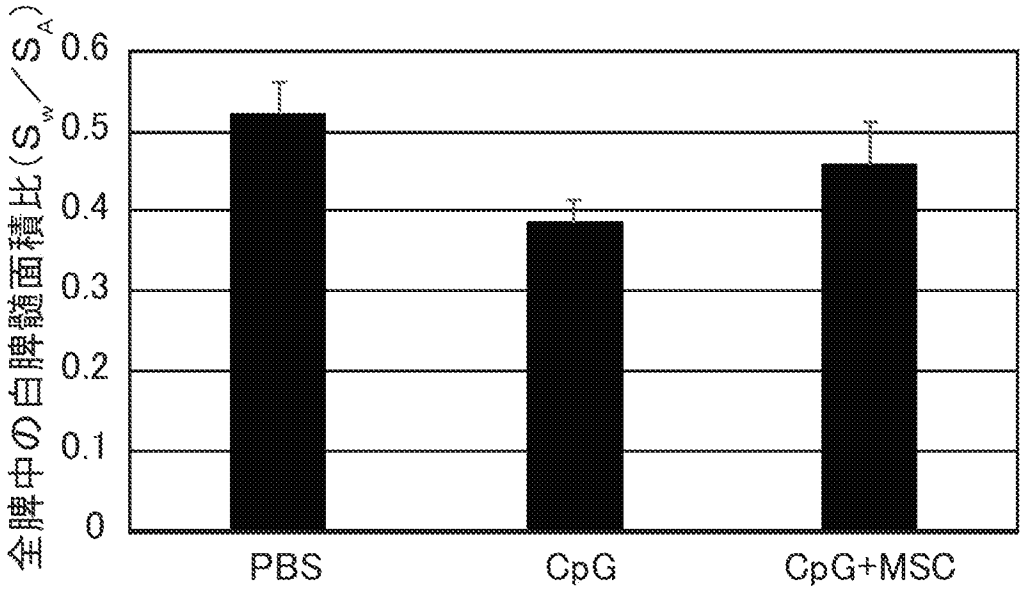
[図10]


**：p<0.01
**
**
**
**
25000
20000
15000
10000
5000
0
MCP-1（pg/ml）
MLR
FBS
培養液
MLR
FBS
臍帯由来細胞
培養液
MLR
FBS
BM-MSC
培養液
MLR
FBS
AD-MSC

[図11]



[図12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/035958

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 35/51(2015.01)i; ***A61K 35/28***(2015.01)i; ***A61P 7/00***(2006.01)i; ***A61P 7/06***(2006.01)i; ***C12N 5/0775***(2010.01)i
FI: A61K35/51 ZNA; A61K35/28; A61P7/00; A61P7/06; C12N5/0775

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K35/51; A61K35/28; A61P7/00; A61P7/06; C12N5/0775

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2021
Registered utility model specifications of Japan 1996-2021
Published registered utility model applications of Japan 1994-2021

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); PubMed; 医中誌WEB (Ichushi WEB)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017/204231 A1 (THE UNIV. OF TOKYO) 30 November 2017 (2017-11-30) claims 8-11, paragraph [0050]	1-8, 10-12
X	YANG, X. et al. Treatment of refractory secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis with umbilical cord mesenchymal stem cells. The Journal of International Medical Research. 2019, vol. 47, no. 5, pp. 2135-2144, doi:10.1177/0300060519836533, ISSN 0300-0605 particularly, title, p. 2135, "abstract"	1-2, 5-10, 12
Y	ZHANG, Z. et al. Mesenchymal stem cells prevent podocyte injury in lupusprone B6.MRL-Faslpr mice via polarizing macrophage into an anti-inflammatory phenotype. Nephrology, Dialysis, Transplantation. 2019, vol. 34, no. 4, pp. 597-605, doi:10.1093/ndt/gfy195, ISSN 0931-0509 particularly, title, p. 597, "abstract"	1-2, 5-10

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
22 November 2021	**07 December 2021**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/035958

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	庄田 宏文, 全身性エリテマトーデスとマクロファージ, 医学のあゆみ, 2016, vol. 259, no. 5, pp. 539-542, 539-542, ISSN 0039-2359, non-official translation (SHODA, Hirofumi. Systemic lupus erythematosus and macrophages. History of medicine.) particularly, p. 539, abstract, p. 542, 「ループス腎炎におけるマクロファージ」及び「血球貪食症候群」, non-official translation ("Macrophages in lupus erythematosus" and "Hemophagocytic syndrome")	1-2, 5-10
A	長村 登紀子, 臍帯由来間葉系細胞, 医学のあゆみ, 2020, vol. 272, no. 10, pp. 994-1002, ISSN 0039-2359, non-official translation (NAGAMURA, Tokiko. Umbilical cord-derived mesenchymal cells. History of medicine.) entire text, all drawings	1-12
A	小内伸幸, 樗木俊聡, 血球貪食症候群, 医学のあゆみ, 2016, vol. 259, no. 5, pp. 503-510, ISSN 0039-2359, non-official translation (KOUCHI, Nobuyuki, HIBIKI Satoshi. Hemophagocytic syndrome. History of medicine.) entire text, all drawings	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/035958

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2021/035958

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2017/204231 A1	30 November 2017	(Family: none)	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2021/035958

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

A61K 35/51(2015.01)i; A61K 35/28(2015.01)i; A61P 7/00(2006.01)i; A61P 7/06(2006.01)i; C12N 5/0775(2010.01)i
FI: A61K35/51 ZNA; A61K35/28; A61P7/00; A61P7/06; C12N5/0775

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

A61K35/51; A61K35/28; A61P7/00; A61P7/06; C12N5/0775

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２１年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２１年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２１年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); PubMed; 医中誌WEB (Ichushi WEB)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	WO 2017/204231 A1 (国立大学法人　東京大学) 30.11.2017 (2017-11-30) 請求項8-11, 段落[0050]	1-8,10-12
X	YANG, X. et al., Treatment of refractory secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis with umbilical cord mesenchymal stem cells, The Journal of International Medical Research, 2019, Vol.47, No.5, p.2135-2144, doi:10.1177/0300060519836533, ISSN 0300-0605 特に, 標題, p.2135「Abstract」	1-2,5-10,12
Y	ZHANG, Z. et al., Mesenchymal stem cells prevent podocyte injury in lupus-prone B6.MRL-Faslpr mice via polarizing macrophage into an anti-inflammatory phenotype , Nephrology, Dialysis, Transplantation, 2019, Vol.34, No.4, p.597-605, doi:10.1093/ndt/gfy195, ISSN 0931-0509 特に, 標題, p.597「ABSTRACT」	1-2,5-10
Y	庄田 宏文, 全身性エリテマトーデスとマクロファージ, 医学のあゆみ, 2016, 第259巻, 第5号, p.539-542, ISSN 0039-2359 特に, p.539 要約, p.542「ループス腎炎におけるマクロファージ」及び「血球貪食症候群」	1-2,5-10

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
"E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
"L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
"P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
"T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
"X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
"Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
"&" 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
22.11.2021	07.12.2021

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
春田　由香 4U 4147
電話番号 03-3581-1101 内線 3439

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	長村 登紀子，臍帯由来間葉系細胞，医学のあゆみ，2020，第272巻，第10号，p.994-1002，ISSN 0039-2359 全文，全図	1-12
A	小内 伸幸，樗木 俊聡，血球貪食症候群，医学のあゆみ，2016，第259巻，第5号，p.503-510，ISSN 0039-2359 全文，全図	1-12

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2021/035958

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
　☑ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式

b. ☐ 国際出願とともに、ＰＣＴ規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表

c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
　☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(ＰＣＴ規則13の3.1(a))
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式（ＰＣＴ規則13の3.1(b)及びＰＣＴ実施細則第713号）

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2021/035958

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2017/204231 A1	30.11.2017	（ファミリーなし）	