

別紙参照図

表2 温度分布測定 (°C)

回数	多段型 6500 上段 測定点(1~15)データ														
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15
1	36 8	36 8	36 7	36 7	36 8	36 6	36 8	36 8	36 6	36 7	36 5	36 5	36 4	36 4	36 5
2	36 8	36 8	36 7	36 8	36 8	36 6	36 8	36 7	36 6	36 7	36 5	36 5	36 4	36 4	36 4
3	36 8	36 8	36 8	36 7	36 8	36 6	36 8	36 7	36 6	36 7	36 5	36 4	36 4	36 4	36 4
4	36 8	36 8	36 7	36 7	36 9	36 6	36 7	36 7	36 6	36 7	36 4	36 4	36 3	36 4	36 4
5	36 8	36 8	36 7	36 7	36 8	36 6	36 8	36 7	36 5	36 7	36 4	36 4	36 3	36 4	36 4
6	36 8	36 8	36 7	36 7	36 9	36 6	36 8	36 7	36 5	36 7	36 4	36 4	36 3	36 3	36 4
7	36 8	36 8	36 7	36 7	36 9	36 6	36 8	36 7	36 5	36 6	36 4	36 4	36 3	36 3	36 4
8	36 9	36 8	36 7	36 8	36 9	36 6	36 7	36 7	36 5	36 6	36 4	36 4	36 3	36 3	36 4
9	36 8	36 8	36 7	36 8	36 9	36 6	36 7	36 7	36 5	36 7	36 4	36 4	36 3	36 3	36 4
10	36 9	36 8	36 7	36 7	36 9	36 6	36 7	36 6	36 5	36 6	36 4	36 4	36 3	36 3	36 3
回数	多段型 6500 下段 測定点(1~15)データ														
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15
1	37 0	37 3	36 9	36 8	37 0	37 0	37 0	36 9	36 9	36 9	36 8	36 8	36 7	36 9	36 8
2	37 0	37 3	36 9	36 8	37 0	36 9	37 0	36 9	36 9	36 9	36 8	36 8	36 7	36 8	36 8
3	37 0	36 9	36 9	36 9	37 1	36 9	37 0	36 9	36 9	36 9	36 8	36 8	36 7	36 8	36 8
4	37 0	36 9	36 9	36 8	37 1	36 9	37 0	36 9	36 9	36 9	36 8	36 8	36 7	36 8	36 8
5	37 0	36 8	36 9	36 8	37 1	36 9	37 0	36 9	36 9	36 9	36 8	36 7	36 6	36 8	36 8
6	37 0	36 9	36 9	36 9	37 2	36 9	37 0	36 9	36 9	36 9	36 8	36 8	36 6	36 8	36 8
7	37 1	36 9	36 9	36 8	37 1	36 9	37 0	36 9	36 9	36 9	36 8	36 8	36 6	36 8	36 8
8	37 1	36 8	36 9	36 8	37 1	36 9	37 0	36 9	36 9	36 9	36 7	36 7	36 6	36 8	36 7
9	37 1	36 8	36 9	36 8	37 1	36 9	37 0	36 9	36 9	36 9	36 8	36 8	36 6	36 8	36 8
10	37 1	36 8	36 9	36 8	37 2	36 9	37 0	36 9	36 9	36 9	36 8	36 7	36 6	36 8	36 8

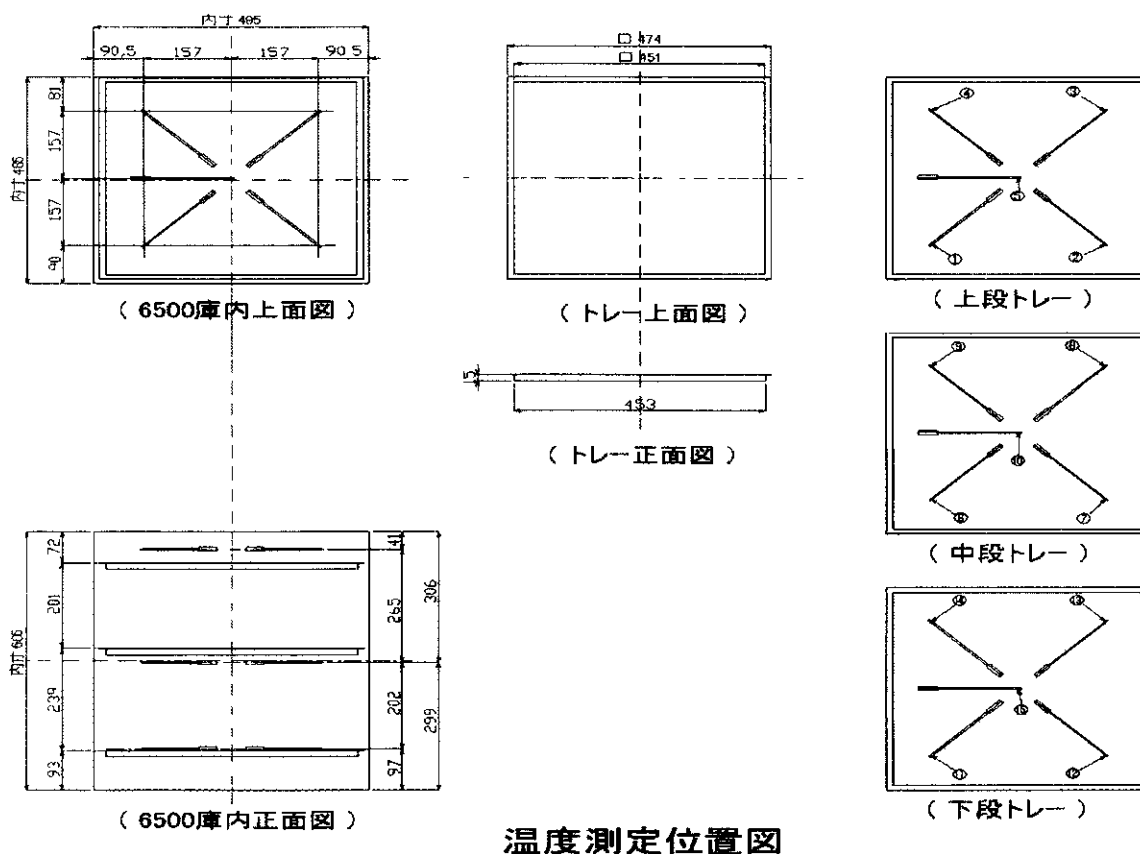
表3 相対湿度、CO2 濃度測定結果

	CO2 濃度 (%)	相対湿度 (%)
	モニター指示値	モニター指示値
多段 6500 上段	49	91
多段 6500 下段	50	96

表4 標準測定器はトレーサビリティの取れた測定機器を使用した試験器一覧を示す。

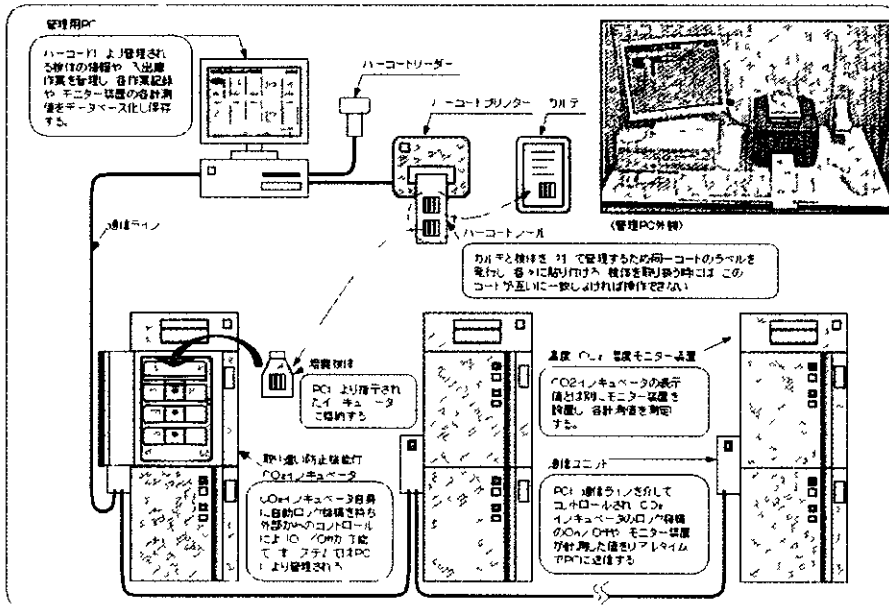
	試験機名称	メーカー名	型式
1	24 打点記録計	横河電機	4370-24
2	シース測温抵抗体	林電工	SR 6-S3 2-100 5ED-A
3	露点温度変換器	ヴァイサラ	HMP247
4	赤外線ガスモニター	理研計器	RI-555
5	標準ガス 5%	大陽東洋酸素	CO2 5%ガス
6	標準ガス 0%	大陽東洋酸素	CO2 0%ガス (N2)

表5 温度センサー15ポイント設定位置を示す。



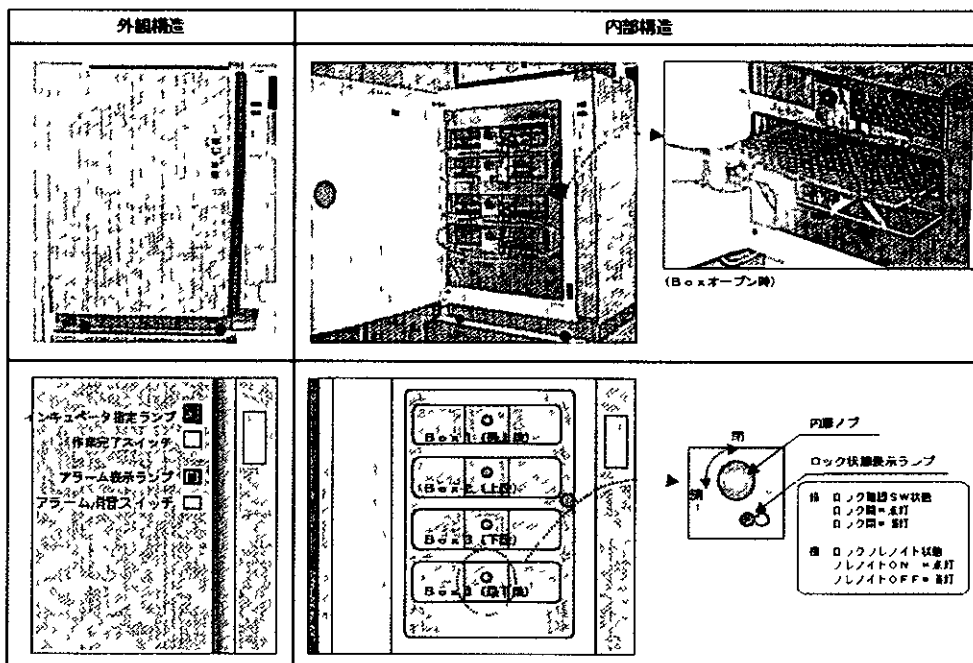
培養細胞カルテシステム構成図①参照

— システム構成 —



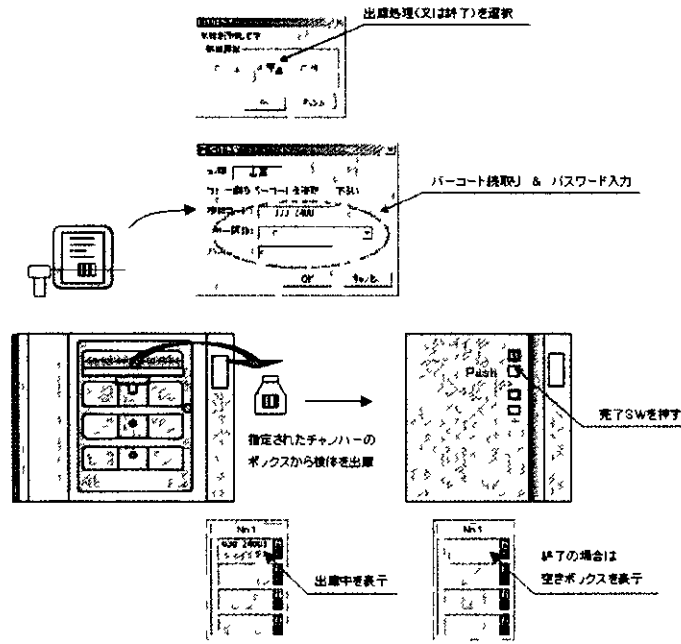
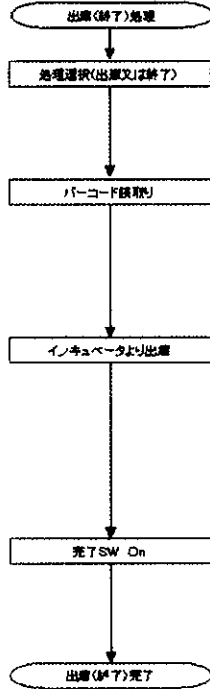
カルテシステム用CO₂インキュベータ構成図②参照

— カルテ管理システム用CO₂インキュベータ構造 —



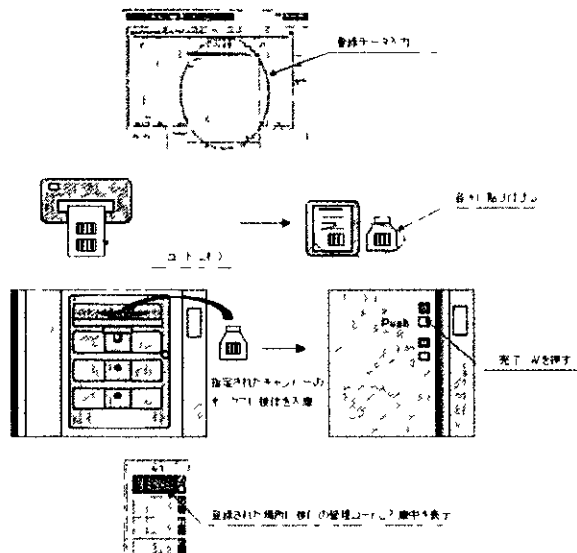
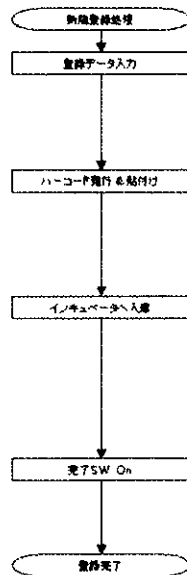
カルテシステム検体出庫説明図③

—実際の作業— ②出庫(終了)処理



カルテシステム検体入庫説明図④

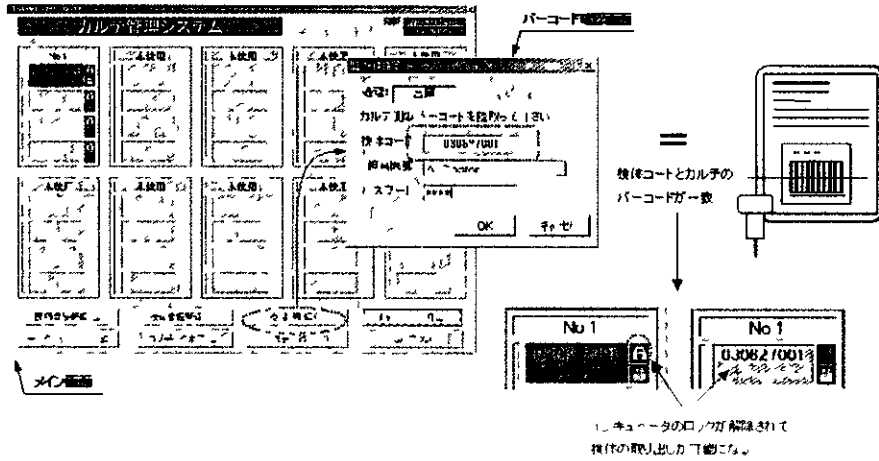
—実際の作業— ①新規登録(入庫)処理



カルテ管理システム説明図⑤

— システムの特徴 ① —

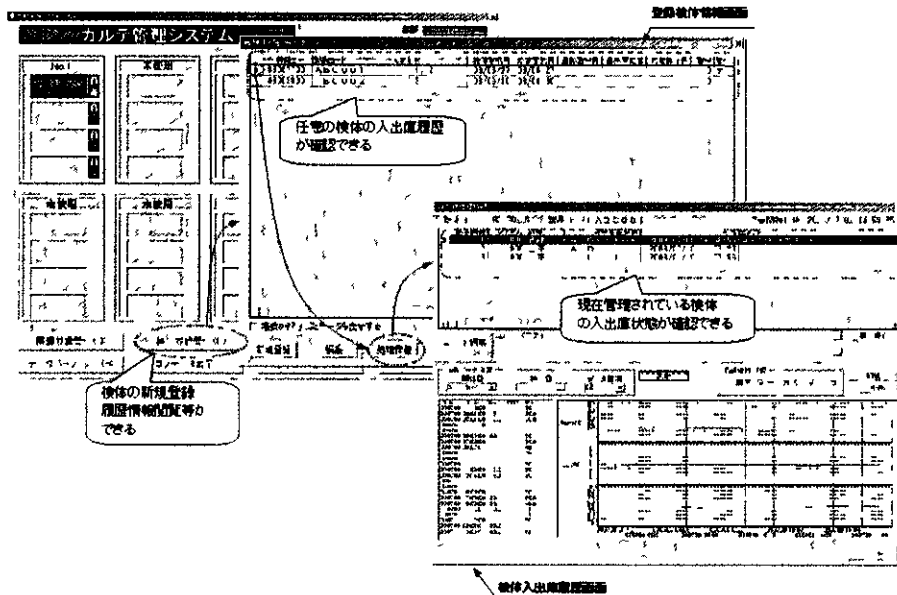
- 培養する検体とそのカルテに1対1で対応するバーコードラベルを発行し、検体をインキュベータに格納する時や、取り出すとき等の作業時にこのバーコードが一致するかどうかを確認し、一致したときのみ検体の取り扱いを可能にするようコンピュータとそれに接続したCO₂インキュベータにより管理する。



カルテ管理システム説明図⑥

— システムの特徴 ② —

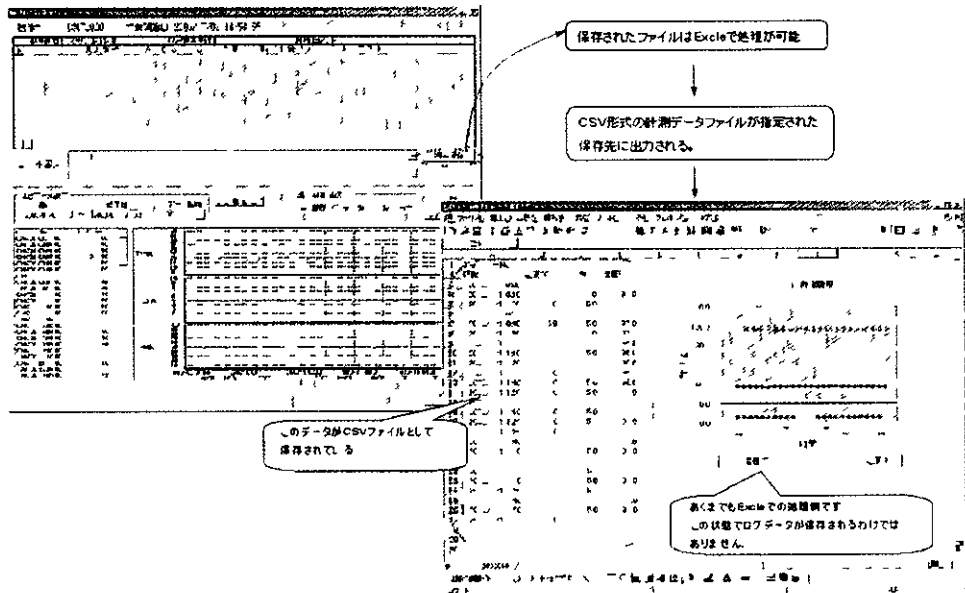
- 検体のインキュベータへの入出庫状況をコンピュータにより管理しデータベースとして保存する。



カルテ管理システム説明図⑦

— システムの特徴 ③ —

・インキュベータとは別にモニター装置を設置し、温度、CO2濃度、湿度のデータを計測する。又、計測データを通信ユニットを介してリアルタイムに送信しPCにデータベースとして保存する。



厚生労働科学研究補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）

分担研究報告書

2・GMPに準拠した培養のシステムの開発、準備整備

2-4 GMPに準拠した細胞製造のためにデバイスの開発(3)
－無菌閉鎖型細胞洗浄装置システムの開発

分担研究者 桜田 洋

ヘモネティクスジャパン株式会社 開発室長(兼務会長)

研究協力者 多田 典子

(先端医療センター再生医療研究部技術員)

研究要旨

細胞を用いる細胞療法（再生医療）の基本整備の1つに細胞プロセッシング過程での細胞の品質管理、安全な細胞操作法の確立が挙げられる。

細胞プロセッシングには、細胞増幅に用いた培養液や薬剤(サイトカイン等)の洗浄操作があり、従来法では遠心チューブに細胞懸濁液を分注し、洗浄液を添加して遠心をかけ、上澄みを除去する操作を2回以上繰り返して洗浄してきた。このような処理方法は開放系の操作となるため、微生物が混入するリスクを除去できない。また、複数の遠心チューブを処理することから他の細胞が混入する可能性も除去できない。

本分担研究では、このような開放系で行われていたこれまでの細胞プロセッシング過程内にヘモネティクスセルウォッシャーACP215を用いて、培養ハッグの細胞懸濁液と処理回路を無菌接続して処理する完全閉鎖型自動洗浄システムを開発し、その導入検討を行った。

その結果、ACP215を用いて製造された細胞製剤の性状及び機能は、洗浄前と比較し同等であること、培養に添加された薬剤は、99%以上除去できることが判明した。この細胞プロセッシングの工程はGMPに準拠した処理が可能であることが確認された。

A. 研究目的

ex vivo 増幅臍帯血細胞(以下 ex vivo 増幅細胞)の洗浄回収工程を完全閉鎖型自動洗浄システムとして確立し、その最適化設定条件を検討し、回収された細胞の性状及び洗浄効率の有用性を評価する。

B 研究方法

B-1) 使用する装置と回路

ヘモネティクスセルウォッシャーACP215(以下 ACP215)による活性化リンパ球細胞(以下リンパ球細胞)の洗浄プロトコールは、既に200ml容量ホウル(以下200mlホウル)を使った回路を用いて無菌閉鎖型細胞洗浄装置システムとしての有用性が確認されている。ex vivo 増幅細胞を対象細胞とする再生医療では、製造される細胞容量を100ml以上にする必要があり、その最終容量は使用するホウル容量に依存することから70ml容量ホウル(以下70mlホウル)が装着された処理回路を選択した。

B-2) リンパ球細胞を用いた基礎検討

用手法冷却遠心機(TOMY LK-130)とACP215を用いてリンパ球細胞に対する最適な遠心回転数を検討した。

B-2-1) 用手法による遠心回転数と洗浄液組成の検討

最適な遠心回転数と洗浄液組成を選択するために、冷却遠心機の遠心回転数を1000rpm~3000rpmの500rpm毎の5条件と洗浄液組成(0.1%と0.5%アルブミン加生食)の違う2条件を用いて処理したリンパ球細胞の回収率と Viability を検討し

た。測定は細胞をトリハンフルーで染色した後、目視によるカウントで行った。

B-2-2) ACP215 による遠心回転数と流速の検討

70mlホウルに対するリンパ球細胞の最適遠心回転数と流速を選択するために、遠心回転数3500 4000 4500rpmの3条件と流速30 50 70ml/minの3条件を組み合わせ、処理したリンパ球細胞の回収率と Viability を検討した。

B-2-3) 遠心回転数と流速によるスピルアウトの検討

遠心回転数3000 3500 4000 4500rpmの4条件と流速30 50 70ml/minの3条件を組み合わせ、前細胞数と細胞スピルアウト数の割合を比較検討した。

B-2-1) ACP215 で洗浄回収したリンパ球細胞の検討

これまでのB-2-1)とB-2-3)の結果から検討した設定条件(遠心回転数3000rpm、流速30ml/min、希釈2回、希釈量140ml×2回、リンス量100ml×3回とリンス速度を30 40 50 60 70ml/minに変えた設定)を用いて洗浄回収したリンパ球細胞の回収率、Viability、及び細胞機能を検討した。

B-3) ex vivo 増幅細胞を用いた検討

実際の再生医療で用いる ex vivo 増幅細胞を用いて以下の検討を行った。

B-3-1) 洗浄効率の検討

培地濃度を変えた3種類の検体(細胞を含まない)を用いてリンス量、リンス速度による洗浄効率を検討した。洗浄効率は

洗浄前後の培養液中のマイクロアルブミンを測定して、その除去率から求めた。
 B-3-2) ex vivo 増幅細胞に対する遠心回転数と流速の検討
 リンパ球細胞で行った細胞スピルアウト試験を ex vivo 増幅細胞でも行った。但し、遠心回転数 3000rpm と 3500rpm の 2 条件と流速 30ml/min と 40ml/min の 2 条件を組み合わせで検討した。

B-3-3) 最適化設定条件の検討
 最適化設定条件を割り出すために、3つのレベルの目標洗浄効率を定め、それぞれのレベルでシュミレーションし、試算した遠心負荷時間を比較して最適化設定条件を検討した。

B-3-4) 最適化設定値による検討
 ex vivo 増幅細胞で割り出した最適化設定値で 2 検体の ex vivo 増幅細胞を洗浄回収し、その回収率、Viability、洗浄効率、細胞機能について検討した。

B-4) GMP 対応への検討
 GMP とは製造管理及び品質管理に係わる品質評価に関する管理規定である。使用される機器は医療用具輸入許可承認が必要であること、細胞プロセシングの記録管理、工程管理、そして装置の操作性と安全面から検討した。

C 研究結果

C-1) B-2-1) の検討の結果、冷却遠心機 (TOMY LK-130) によるリンパ球細胞の遠心回転による Viability は 740G 以上で急激に減少していた。 洗浄液組成による

Viability は 1160G 以上になると 0% アルブミンの方が有意に低下していた。リンパ球細胞に対する遠心負荷は回収率と Viability から検討すると 420G 以下が望ましいことか分かった。また 420G 以下では洗浄液組成の違いによる有意差は認められなかった。(Table 1 参照)

Table 1 機種 TOMY 遠心器 LK-130

回転数	0.1アルブミン溶液		0.5アルブミン溶液	
	回収率 (%)	Viability (%)	回収率 (%)	Viability (%)
190G(1000)	81	92.3	80.1	86.3
420G(1500)	99.4	90.5	99.4	94.3
740G(2000)	73.4	73.2	87.0	76.4
1160G(2500)	53.1	52.8	74.2	66.5
1670G(3000)	40.2	46.3	63.8	63.4

Control 98.2%(Viability)

C-2) B-2-2) の検討の結果、遠心回転数が 3500rpm 以上になると遠心負荷 (G フォース) が強すぎて細胞破壊が極度に進行していることか推察され、十分な回収率は得られなかった。しかし破壊された細胞がスピルアウトして廃液ハックへ流出しているために洗浄後の Viability は高かった。

(Table 2、巻末 Figure 1 参照)

Table 2 機種 ACP215

回転数	流速 (ml/min)	時間 (min)	処理細胞数 (x10 ⁷ cell)	回収率 (%)	機種 ACP215	
					Viability (%)	IL-2除去率 (%)
570G(3500)	30	52	5.4	59.2	76.3	97.8
	50	34	5.4	52.2	84.0	98.0
	70	25	5.4	49.2	82.9	98.0
745G(4000)	70	25	5.4	44.2	78.4	97.8
943G(4500)	70	25	5.4	33.4	92.5	97.9

C-3) B-2-3) の検討の結果、遠心回転数と流速の関係は遠心回転数か上かると細胞スピルアウトは少なくなり、流速か速くなれば細胞スピルアウトが増えていた。3000rpm と 30ml/min の組み合わせでも細胞スピルアウト割合は 0.7% と、スピルアウトによる回収率への影響は殆どないと推察された。(Table 3、Table 4 参照)

Table 3 機種 ACP215

回転数 rpm	細胞濃度 x10 ⁴ /ml	30ml/min		50ml/min		70ml/min	
		濃度	割合	濃度	割合	濃度	割合
3000	49.7	0.35	0.7%	0.7	1.4%	1.06	2.1%
3000		0.41	0.8%	0.74	1.5%	1.14	2.3%

Table 4 機種 ACP215

回転数 rpm	細胞濃度 x10 ⁴ /ml	30ml/min		50ml/min		70ml/min	
		濃度	割合	濃度	割合	濃度	割合
3500	63.8	1.10	1.7%	1.90	3.0%	2.77	4.3%
4000		0.76	1.2%	1.54	2.4%	2.25	3.5%
4500		0.52	0.8%	0.99	1.6%	1.30	2.0%

このことから 70ml ホウルに対する ACP215 の遠心回転数と流速はそれぞれ 3000rpm と 30ml/min の組み合わせで使用できることか示唆されたので、200ml ホウルの設定条件を参考に希釈回数 2 回、希釈量 140ml、140ml とリンス量 100ml、100ml の設定でリンパ球細胞の洗浄を行った。その結果 Viability と洗浄効率はそれぞれ 95.5%、99.7% と良好であった。(Table 5 参照)

Table 5 機種 ACP215

使用 ザノル	遠心回 転数	流速	処理 細胞数	回収率	Viability	IL-2 除去率
(ml)	rpm	(ml/min)	x10 ⁷ (cells)	(%)	(%)	(%)
70	3000	30	11.9	77.3	95.5	99.7

C-4) B-2-4) の検討の結果、回収率、Viability、IL-2 の除去率は、それぞれ平均で 83.2%、96.1%、99.0% であった。またこの結果からリンス速度の違いによる影響は見られなかった。(Table 6 参照)

Table 6 回転数 419G(3000rpm) 機種 ACP215

処理量 (ml)	リンス 流速 (mm)	処理細胞数 (x10 ⁷ cells)	回収率 (%)	Viability (%)	IL-2除去 率 (%)
500	30	16.8	89.8	93.8	99.3
500	40	19.6	66.1	92.6	98.5
500	50	16.3	84.7	97.1	99.3
500	60	14.2	95.1	98.1	99.4
500	70	16.0	80.1	99.1	98.8
Ave			83.2	96.1	99.1

洗浄後の細胞機能は、走査電顕像による細胞骨格の変形や微絨毛の脱落を認めず洗浄による形態の変化は認められなかった。(巻末 Figure 2 参照)

リンパ球の機能は PHA に対するリンパ球幼若化反応、LAK 活性化においては洗浄前後で差は認めなかった。(巻末 Figure 3、Figure 4 参照)

洗浄後長期 (2W) に渡る IL-2 による増殖反応でも、洗浄による影響は認められなかった。(巻末 Figure 5 参照)

C-4) B-3-1) の検討の結果、従来の 200ml ホウルではリンス量を増やしても、洗浄効率は上からなかった。70ml ホウルでは、ホウル構造の違いからリンス量を増やすほど、そして検体濃度が薄くなるほど洗浄効率は格段に向上していた。しかし、リンス速度を速くしても洗浄効率への影響は見られなかった。(Table 7 参照)

Table 7

洗浄効率 (除去率)

培地濃度 1%

Rinse speed ml/min	Rins Volume		
	50	100	150
70	59.5%	73.4%	82.2%
50	57.7%	77.0%	82.5%
30	55.9%	79.1%	90.9%
Ave	57.7%	76.5%	85.2%

培地濃度 30%

70	47.0%	56.8%	61.2%
50	47.3%	55.4%	59.7%
30	47.0%	54.3%	60.1%
Ave	47.1%	55.5%	60.3%

培地濃度 100%

70	43.6%	55.6%	58.2%
50	44.0%	53.7%	66.3%
30	42.5%	52.2%	56.4%
Ave	43.3%	53.8%	60.3%

C-5) B-3-2) の検討の結果、3000rpm より 3500rpm のスピルアウト%が低値を示すものの細胞スピルアウトは 10%と高値の結果であった。3000rpm では一部逆転タータもあり、リンパ球細胞と比べても非常に高値であった。(巻末料 Table 8 参照)

Table 8

遠心回転数	流速	
	30ml/min	40ml/min
3000rpm	10.1%	9.9%
	14.9%	9.5%
	17.1%	11.9%
	10.1%	12.3%
3500rpm	9.3%	8.5%
3500rpm	6.8%	6.3%

しかし検体サンプルの Viability は 84.9%と死細胞の比率が高いことからスピルアウト細胞は死細胞か流出したと考えられた。その傾向は細胞数測定装置の図からも推察された。(巻末 Figure 6 参照)

C-6) B-3-3) の検討の結果、70ml ホウルに対する ACP215 の設定パラメーターである遠心回転数、流速、リンス速度はそれぞれ 3000rpm、30ml/min、50ml/min とし、最終目標とする洗浄効率を 3つのレベルを仮定してシミュレーションした。洗浄効率を上げると 2 回希釈との比較で、3 回希釈の方が遠心負荷時間は短くなり有効であった。(巻末 Table 9 参照)

Table 9

目標洗浄効率	99.80%		99.65%		99.50%	
処理液の重量	300	300	300	300	300	300
希釈回数	2	3	2	3	2	3
遠心回転数	3000	3000	3000	3000	3000	3000
リンス量	50	50	50	50	50	50
再リンス量#1	150	100	100	50	100	50
再リンス量#2	150	100	150	50	150	50
再リンス量#3	0	150	0	150	0	50
希釈量#1	260	70	210	70	140	100
希釈量#2	210	70	140	70	140	100
希釈量#3	0	70	0	70	0	70
遠心負荷時間	37.3	32.0	32.3	30.0	30.0	30.0

C-7) B-3-4) の検討の結果、最適化設定値を決定した。(Table 10 参照)

Table 10

最適設定パラメーター値

項目	設定値	項目	設定値
処理量	****	再リンス量(#2)	150
ナウルサイズ	70	再リンス量(#3)	150
エンジンシート	3000	再リンス速度(#1)	70
希釈回数	3	再リンス速度(#2)	70
リンス量	50	再リンス速度(#3)	70
リンス速度	70	リコーンテレイ	5
希釈量 (#1)	100	濃縮速度	30
希釈量 (#2)	100	再濃縮速度	30
希釈量 (#3)	40	洗浄回数	1
希釈速度(#1)	200	洗浄量 (#1)	20
希釈速度(#2)	200	洗浄速度(#1)	100
希釈速度(#3)	200	保存液の添加	0
再リンス量(#1)	100	ナウル流出速度	100

その設定条件を用いて ex vivo 増幅細胞を洗浄回収して製造された細胞の回収率は 87.8%, 72.5%, 77.4% であった。Viability は 94.9%, 95.2%, 96.0% であった。洗浄効率 (SCF サイトカインの除去率) は 99.76% と 99.8% であった。(Table 11 参照)

また洗浄前後のコロニ形成能においても有意差はなかった。

Table 11

洗浄前			
Sample No	細胞数 x10E6	SCF濃度 pg/ml	Viability
1	11.56	10931.4	97.50%
2.1	7.66	6254.8	95.50%
2.2	0.77	-----	95.50%
洗浄後			
1	10.15	17.86	94.9%
2.1	5.55	14.75	95.2%
2.2	0.59	-----	96.0%
	細胞回収率	洗浄効率 SCF	
1	87.8%	99.80%	
2.1	72.5%	99.76%	
2.2	77.4%	-----	

C-8) B-4) の検討の結果、ACP215 は既に医療用具として承認 (承認番号 21300BZY00239000) された製品であること、細胞プロセッシング終了後毎に処理情報を印刷 (印字内容は、装置 No、実施日、検体 No、処理時間、処理条件、最終製品量 実施者名等) できること等、管理記録及び操作上の面からも簡便であり GMP に準拠した処理が可能である。

D 考察

再生医療に用いる ex vivo 増幅細胞を 70ml ホウルで処理するときの ACP215 の遠心回転数は 3000rpm、流速は 30ml/min に設定することか回収率、Viability の検討から最適であること、また洗浄効率では希釈回数を 3 回とし、希釈量は 100ml, 100ml, 40ml に、リンス量はサイクル後半に多く設定する方がより高い洗浄効率か得られることから 50ml, 100ml, 150ml 150ml が最適設定値であることか判明した。

E 結論

本分担研究では 70ml ホウルを用いて ex vivo 増幅細胞を ACP215 で処理する時の最適化設定値を開発した。開発された設定条件を用いて洗浄回収した ex vivo 増幅細胞の回収率は 79.2% と若干低値であったが、Viability は 95.4% で問題なかった。また洗浄効率は 99.8% と十分な洗浄効率であった。コロニ形成能は洗浄前後で有意差は認められなかった。回収率についての更なる改善検討が必要であるものの、この最適化設定値を用いて製造された細胞は十分な細胞機能を保持してお

り、洗浄による細胞性状への傷害は認められなかった。完全閉鎖型自動洗浄システムとしての装置取り扱いも非常に簡便であり、GMP に準拠した記録管理ならびに品質管理上の安全性も確保できた。

F 健康危険情報

特になし

G 研究発表

1 論文発表

なし

2 学会発表

多田典子、井田卓見、伊藤仁也 無菌閉鎖系濃縮洗浄回収システムの培養リンパ球に及ぼす影響 第6回日本組織工学会、平成15年6月12～13日

鈴木秀文、伊藤仁也、小林典孝 田中弘和、渋谷和憲、後藤真澄美、逢坂敦、平家俊男、前川平、金倉譲 Ex vivo 増幅臍帯血の非臨床試験（その1）閉鎖系培養法を用いた Ex vivo 増幅臍帯血の製造。第26回日本造血細胞移植学会。平成15年12月19～20日

H 知的財産権の出願・登録状況

1 特許取得

なし

2 実用新案登録

なし

3 その他

なし

巻末 Figure

Figure 1

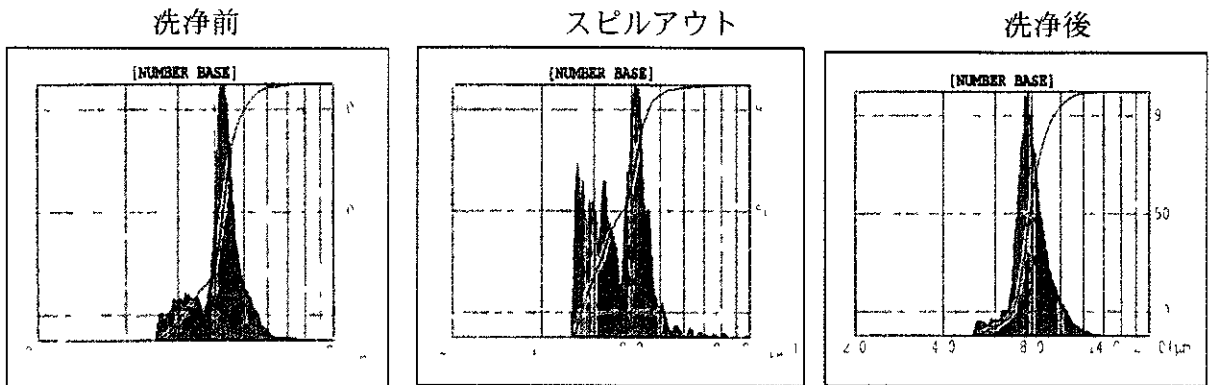


Figure 2

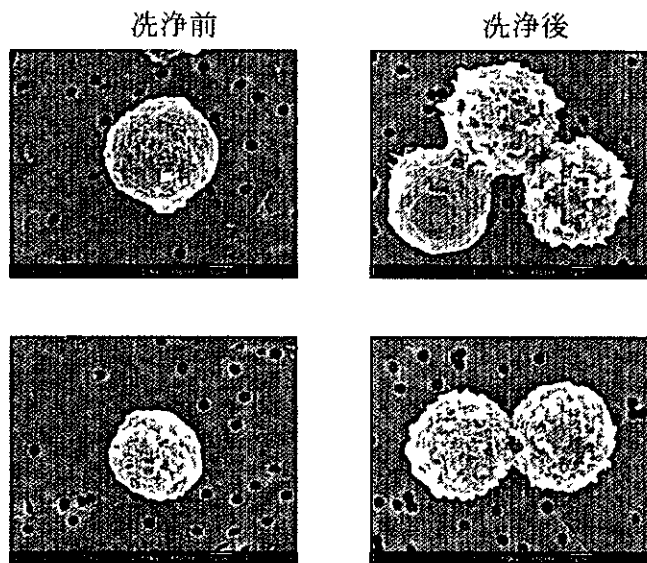


Figure 3

リンパ球幼若化試験
(分離培養法)

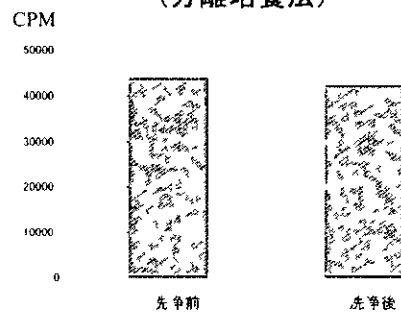


Figure 4

LAK細胞活性(誘導)

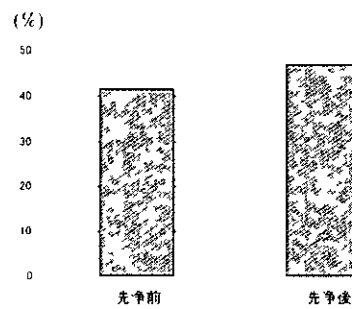


Figure 5

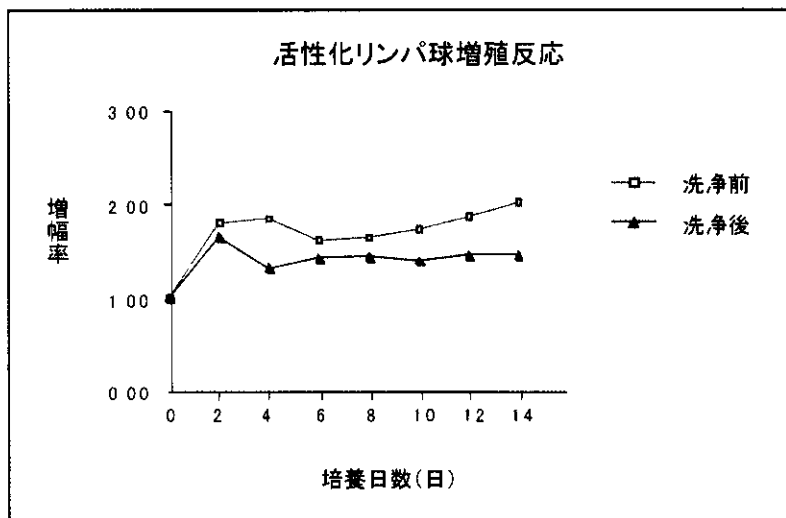
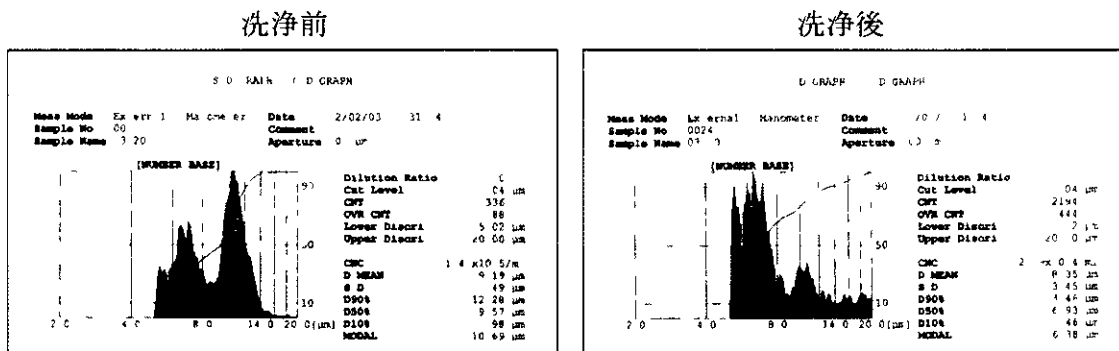


Figure 6



厚生労働科学研究補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）

分担研究報告書

3・品質管理の確立

3 1 ex vivo 増幅臍帯血の安全性試験(1)

分担研究者 逢坂 敦

(キリンヒール（株）医薬カンパニー生産本部生産技術センター主任研究員)

研究協力者 渋谷 和憲 井出 陽一、後藤 眞登美

(キリンヒール（株）医薬カンパニー開発本部医薬開発研究所)

研究要旨

ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞は、SCF、TPO、FL (Flt3/Flk2 リカント)、FP6 (可溶性 IL-6 受容体と IL-6 の融合蛋白質) を含む無血清培地 QBSF-60 で培養することにより体外増幅が可能である。

本分担研究では、上記の方法で得られた ex vivo 増幅臍帯血の以下の安全性試験を行った。1) 透過型電子顕微鏡による形態学的検査により ex vivo 増幅臍帯血には造血幹細胞の他に形態学的に分化の進んだ細胞も存在していたか、造血幹細胞様細胞については形態から異常を示唆する所見は認められなかった。2) ex vivo 増幅臍帯血を NOD/SCID マウスに移植して病理組織学的検査を実施したところ、移植した増幅ヒト細胞が主に骨髄、脾臓、肝臓、腎臓及び腸間膜リンパ節に分布することか確認できたか、肉眼的及び病理組織学的にも細胞浸潤や壊死等の異常を示唆する所見や、腫瘍形成などは認められなかった。3) ex vivo 増幅臍帯血が分泌するサイトカインの解析を実施したところ 増幅細胞は高濃度の IL-8 を産生することか明らかとなった。

A 研究目的

本研究グループでは、臍帯血由来のヒト CD34 陽性細胞の体外増幅について検討を行っており、SCF、TPO、FL (Flt3/Flk2 リカント) 及び FP6 (可溶性 IL-6 受容体と IL-6 の融合蛋白質) を含む無血清培地で培養することにより、体外増幅が可能であることを確認した。

本分担研究では、上記の方法で得られた ex vivo 増幅臍帯血の安全性試験として、増幅細胞の形態学的検査、移植マウスの病理組織学的検査及び増幅細胞の分泌サイトカイン解析を実施したので報告する。

B 研究方法

ヒト臍帯血より磁気ヒース法で分離した CD34 陽性細胞を SCF、TPO、FL、FP6 をそれぞれ 100 ng/mL を添加した QBSF-60 培地 (QUALITY BIOLOGICAL 社製) にて 1×10^4 個/mL の濃度で培養し得られた細胞を以下の検討に用いた。

1・増幅細胞の形態学的検査

増幅細胞の性質のうちその形態学的特徴を明らかとするため、電子顕微鏡による観察を実施した。増幅後の細胞について、2.5%グルタルアルデヒド及び 1% 四酸化オスミウムにて固定し、エポキシ樹脂にて包埋後、透過型電子顕微鏡 (H-7600 型、日立製作所) による観察を実施した。同時に、光学顕微鏡観察のため、セミシン切片を作製し、トルイーンフルー染色を施した。電子顕微鏡学的観察は、増幅細胞の全体像及び牛痘に関与

する造血幹細胞について実施した。なお、観察は 3 ロットの増幅細胞を使用した。

2 ex vivo 増幅臍帯血を移植された NOD/SCID マウスの病理組織学的検査

増幅細胞の投与かレパリエントとなる患者の正常な細胞又は組織に影響を与える可能性 および移植後のレパリエント体内におけるトナー細胞の分布を確認するため、増幅細胞 (ヒト由来) を移植した NOD/SCID マウスモデルにおいて、増幅細胞の分布を確認した。同時に、増幅細胞か正常な細胞又は組織に与える影響を検討するため、同一のマウス移植モデルについて病理組織学的検査を実施した。

雄性 NOD/SCID マウス (7~10 週齢) に X 線照射装置 (MBR1520R、日立メテコ社製) にて 200cGy の放射線を照射し、その後 anti-asialo-GMI 抗体を 1 匹あたり 20 μ L 静脈内に投与し、引き続き増幅細胞を静脈内投与により移植した (移植細胞数 CD34 陽性細胞数として 50,000 個または 100,000 個/匹)。移植約 3 ヶ月後に、剖検および各臓器 (皮膚、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、副腎、胃、小腸、大腸、腸管膜リンパ節、脳、骨格筋、大腿骨) の病理組織学的検査を実施した。また、移植したヒト細胞を同定するため、汎白血球マーカーである抗ヒト CD45 抗体 (クローン名 RP2/18) を用いた免疫染色を実施した。なお、ヒト臍帯血由来の CD34 陽性細胞を増幅せずに移植した NOD/SCID マウスを、比較対照とした。

3 分泌サイトカイン解析

生体内へ移植された *ex vivo* 増幅臍帯血が産生するサイトカイン類によりレシピエントとなる患者に影響を及ぼす可能性が考えられる。現時点では、生体内へ移植後の増幅細胞が産生するサイトカイン評価系は確立されていないため、増幅細胞を洗浄した後に再びサイトカインを含まない培養液中で培養することにより、増幅細胞が産生する可能性のあるサイトカイン種を検索した。

ex vivo 増幅臍帯血細胞を 1×10^6 cells/mL の濃度で QBSF-60 培地、もしくはヒト AB 型血清を最終濃度で 10% となるように添加した QBSF-60 培地中で 37°C 5% CO_2 濃度の条件でフラスコ培養し、24 時間後の培養上清について RayBio protein array V (RayBiotech 社) を用いて 79 種類のサイトカインを網羅的に検索した。

また、IL-8 については ELISA (Human IL-8/CXCL8 QuantiGlo ELISA Kit R&D systems 社) による定量も併せて行った。

C 研究結果

1 増幅細胞の形態学的検査

ex vivo 増幅臍帯血には、造血幹細胞と推測される円型核を有す小型細胞以外に、空胞を有する大型細胞、分葉核を有する細胞、核が偏在し細胞内小器官が発達した大型細胞等の幹細胞から分化の進んだと考えられる細胞が認められた。

次に、増幅細胞の中で造血幹細胞様の形態を示した細胞 (3 ロット 合計 106 個) について観察を実施した。これらの

造血幹細胞様細胞は、円または不整型を呈し、核/細胞比は大きく、核は不整または陥凹かみられる円型であり、ヘテロクロマチンおよび核小体は比較的明瞭であった。さらに、細胞質では、比較的発達した粗面小胞体および顆粒を有す細胞が多く認められた。

2 *ex vivo* 増幅臍帯血を移植された NOD/SCID マウスの病理組織学的検査

増幅細胞を移植した NOD/SCID マウスにおいて、抗ヒト CD45 抗体に対する陽性反応が骨髓、脾臓、肝臓、腎臓及び腸間膜リンパ節に認められた。特に、脾臓では白脾髄に、肝臓では類洞に局在が認められた。また、レシピエントのマウスでは肉眼的及び病理組織学的にも細胞浸潤や壊死等の異常を示唆する所見は認められなかった。なお、上述した所見は未処理 CD34 陽性細胞を移植したマウスについても同様の結果を示し、明らかな差は認められなかった。

3 分泌サイトカイン解析

24 時間後の培養上清に含まれる各種サイトカインを protein array によって検出したところ、IL-8 の顕著な産生が認められ、IL-1 α 、IL-1 β 、MIP-1 β 、SDF-1、FGF-4、IGFBP-1、IP-10、LIF、NAP-2、TIMP-1 及び TIMP-2 についても産生が認められた。

Protein array によって顕著な産生が確認された IL-8 について ELISA による定量を行った結果、QBSF-60 培地での培養上清中濃度は 0.349~1.058 ng/mL であり、

10%の AB 型血清を含む QBSF-60 培地での培養上清中濃度は 2 609~5 204ng/mL であった。

D 考察

形態学的観察により、増幅後の細胞は造血幹細胞と推測される円型核を有す小型細胞以外に、各種血液細胞に分化した細胞が認められ、増幅後の細胞は形態学的に一様な細胞集団ではなく、分化の進んだ細胞が出現していることが明らかとなった。また、増幅細胞の中で造血幹細胞様の形態を示した細胞の細胞質に認められた比較的発達した粗面小胞体および顆粒は細胞内における蛋白合成が盛んなことを示唆している。しかし、核型や細胞内小器官の異常な発達は認められなかったことから、これらの細胞については異常を示唆ものではないと考えられた。

また、*ex vivo* 増幅臍帯血を移植された NOD/SCID マウスの病理組織学的検査により、移植した増幅ヒト細胞が骨髄、脾臓、肝臓、腎臓及び腸間膜リンパ節に分布することが確認でき、腫瘍形成は認められなかったことから増幅操作は、レムピエント体内における移植細胞の分布や正常組織に影響を及ぼさず、腫瘍形成能などもないと考えられた。なお、投与直後の移植細胞の体内動態については Zimmerman らの報告 (Bone Marrow Transplant 2000 26 (5) 505-10) によると、インシウム-111 ラベルした末梢血幹細胞由来増幅細胞を患者に静脈内投与した場合、移植細胞は循環末梢血から 10 分以内に消失し、90%以上が肺へ集積した。その後、肺への集積は投与後 4 時間

以内に減少し、肝臓や脾臓への移行が認められた。また、投与 1 時間後より大腿骨類縁部への集積が認められ、時間の経過とともに大腿骨への集積が多くなることか確認されている。

造血幹細胞が産生するサイトカインを検討する研究としては、Majka (Blood, 2001 97 (10) 3075-85) らは骨髄由末の CD34 陽性細胞を無血清培地にて 24 時間培養し、培養上清に含まれるサイトカインを測定している。その報告によると、骨髄由末の CD34 陽性細胞は VEGF、HGF、SCF、FL、IGF-1 IL-16、TGF- β 1、TGF- β 2、TPO、MIP-1 α MIP-1 β 、RANTES、IL-8、PF-4 を産生していることが明らかとなっている。今回検出された IL-8 は CD34 陽性細胞自体が産生した可能性が考えられるか ヒト臍帯血 (CD34 陽性細胞から TPO 刺激により分化させた巨核球を無血清培地中にて 24 時間培養した際、比較的高濃度 (1000 pg/mL 以上) の IL-8 を産生することが報告されている (Higuchi et al Br J Haematol 1997, 99 (3) 509-16)。本培養法においても CD34 陽性細胞を増幅培養することによって巨核球系細胞への分化、および高濃度の IL-8 を産生するとされる単球への分化が認められているので、CD34 細胞以外の分化した細胞から IL-8 が分泌されている可能性も考えられる。なお、臨床においては造血幹細胞を移植直後のレムピエント患者血清から IL-8 が高濃度で検出されている (Min, et al Bone Marrow Transplant 2001 28 (10) 935-40)。

E 結論

ex vivo 増幅臍帯血中の細胞は、造血幹細胞の他に形態学的に分化の進んだ細胞も存在していたか、造血幹細胞様細胞については形態から異常を示唆する所見は認められなかった。

NOD/SCID マウス移植モデルにおいては、移植した増幅ヒト細胞が主に骨髄、脾臓、肝臓、腎臓及び腸間膜リンパ節に分布することを確認でき、また、肉眼的及び病理組織学的にも細胞浸潤や壊死等の異常を示唆する所見は認められなかった。更に、腫瘍形成なども認められなかった。

分泌サイトカイン解析では、増幅細胞は高濃度の IL-8 を産生すること明らかとなった。

F 健康危険情報

特になし

G 研究発表

1 論文発表

なし

2 学会発表

伊藤仁也、井出陽一、菊池泰子、後藤眞澄美、渋谷和憲、鈴木秀文、丸山京子、平冢俊男、前川平、金倉譲、中畑龍俊 *ex vivo* 増幅臍帯血の非臨床試験（その2）増幅細胞の形態学的特徴および増幅細胞が分泌するサイトカイン類の測定 平成15年12月19日 第26回日本造血細胞移植学会

H 知的財産権の出願・登録状況

なし