

A. 研究目的

Ex vivo 増幅臍帯血の製造を行う先端医療センターに隣接した施設である BMA における実製造と連動した品質管理試験体制の整備

B. 研究方法

1. BMA における品質管理試験法の確立

1) マイコプラズマ・ウイルス否定試験

対象とするマイコプラズマは培養細胞を汚染時に見られる種を中心に、ヒト由来のマイコプラズマ 16 種、動物由来のマイコプラズマ 2 種の計 18 種類を対象とした。ウイルスについては、RNA ウイルスは、HCV、HIV-1、HTLV-1 を、DNA ウイルスは、HBV、ParvovirusB19、HSV-1、-2、VZV、CMV、EBV、HHV6、HHV7、HHV8 を対象とした。方法は、マイコプラズマは LightCycler による PCR 法、RNA ウイルスは TaqMan による PCR 法、DNA ウイルスは Multiplex PCR 法、ヘルペスウイルスは Multiplex PCR 法により測定を実施した。

(2) エンドトキシン試験

生化学工業株式会社製エンドトキシン測定試薬エンドスペシー® 及びウェルリダーSK603 を用いたカイネティック比色法によるエンドトキシン測定法を導入し、日本薬局方エンドトキシン標準品を用いて測定精度を確認した。また、日本薬局方のエンドトキシン試験法に従い、検量線の信頼性確認試験を実施した。

2. 実製造試験に連動した試験体制の構築

実試料である凍結臍帯血の融解から、

最終製品（培養 12 日目の Ex vivo 増幅臍帯血）の出荷までをシミュレートした Ex vivo 増幅臍帯血製造規格試験（平成 16 年 11 月 12 日～平成 16 年 12 月 14 日）工程に「1. BMA における品質管理試験法の確立」の試験法を適用し、試料の受付から測定結果報告までの作業内容を確認した。

3. 実試料測定試験

細胞や培養液など実試料の測定においては、試料中に含まれる様々な成分による測定反応への干渉が認められることがある。PCR 反応を用いたマイコプラズマ、ウイルス否定試験についてはプラスミド DNA を用いて PCR 反応阻害の有無を確認した。またエンドトキシン試験については試料にエンドトキシン標準品を添加した添加回収試験を実施し、試料による反応干渉作用の有無を確認した。

C. 研究結果

1. BMA における品質管理試験法の確立

1) マイコプラズマ・ウイルス否定試験

凍結臍帯血解凍後細胞、およびその上清、Ex vivo 増幅臍帯血幹細胞および、その培養上清より抽出した DNA 溶液および、RNA 溶液から合成した cDNA 溶液に、マイコプラズマ (*M. orale*) 遺伝子組み換え plasmid、各 RNA ウイルス、DNA ウイルス遺伝子組み換え plasmid を、最終濃度 10、50copies/PCR tube となるように添加した。

各 PCR を実施し、マイコプラズマは 3% アガロースゲル電気泳動法を、ウイルスの検出には蛍光プローブを用い、遺伝子

の増幅を検出した。

その結果、各材料からマイコプラズマは検出されず、*M. orale* 遺伝子組み換え plasmid を 10copies/PCR tube 添加した DNA 溶液から、マイコプラズマ遺伝子の PCR による増幅が確認された。この結果、各材料のマイコプラズマは、10 copies/PCR tube (150copies/10⁵cells、1000copies/mL) 未満の検出感度で存在が否定された。RNA ウイルス、DNA ウイルスおよびヘルペスウイルスは、各材料からのウイルス遺伝子の増幅が確認されず、ウイルス遺伝子組み換え plasmid を 10-50copies/PCR tube 添加したサンプルよりウイルス遺伝子の増幅が認められたため、10-50 copies/PCR tube (150-750copies/10⁵cells、1000-5000copies/mL) 未満の検出感度で、各ウイルスの存在が否定された。

2) エンドトキシン試験

0.1、0.05、0.025、0.005、0.002 EU/mL の 5 濃度のエンドトキシン標準品測定において相関係数 r は 0.98 以上であった。併行精度 (同時 $n=3$ の 5 日分) は 0.9 ~ 16.7% (CV) であった。室内再現精度は 4.1 ~ 9.7% (CV) であった。

2. 実製造試験に連動した試験体制の構築

1) マイコプラズマ・ウイルス否定試験

培養第 12 日目の培養細胞および、その上清について、マイコプラズマ・ウイルス試験を実施した。試料の受領から 8 時間で FAX による結果報告が可能であった。また、同作業を標準化するための標

準作業書を作成した。

2) エンドトキシン試験

培養第 7 日目細胞培養液及び培養第 1 2 日目の最終製品 (培養後洗浄した Ex vivo 増幅臍帯血細胞を出荷溶液に再懸濁したもの) について、エンドトキシン試験を実施した。試料の受領から 5 時間以内に FAX による報告が可能であった。また同作業を標準化するために標準作業手順書を作成した

3. 実試料測定試験

1) マイコプラズマ・ウイルス否定試験

培養第 12 日目の Ex vivo 増幅臍帯血幹細胞および、その培養上清より抽出した DNA 溶液および、RNA 溶液から合成した cDNA 溶液に、マイコプラズマ (*M. orale*) 遺伝子組み換え plasmid、各 RNA ウイルス、DNA ウイルス遺伝子組み換え plasmid を、最終濃度 10、50copies/PCR tube となるように添加した。

各 PCR を実施し、マイコプラズマは 3% アガロースゲル電気泳動法を、ウイルスの検出には蛍光プローブを用い、遺伝子の増幅を検出した。

その結果、各試料からマイコプラズマは検出されず、*M. orale* 遺伝子組み換え plasmid を 10copies/PCR tube 添加した DNA 溶液から、マイコプラズマ遺伝子の PCR による増幅が確認された。この結果、各試料のマイコプラズマは、10 copies/PCR tube (培養細胞 : 150copies/10⁵cells、培養上清 : 1000copies/mL) 未満の検出感度で存在が

否定された。RNA ウイルスおよび、DNA ウイルスは、各試料からのウイルス遺伝子の増幅が確認されず、ウイルス遺伝子組み換え plasmid を 10-50copies/PCR tube 添加したサンプルよりウイルス遺伝子の増幅が認められたため、10-50 copies/PCR tube (培養細胞:150-750copies/10⁵cells、培養上清:1000-5000copies/mL) 未満の検出感度で、各ウイルスの存在が否定された。

2) エンドトキシン試験

試料に 0.05、0.016 (又は 0.012)、0.005EU/mL のエンドトキシン標準品を添加し、その回収率を調べた。日本薬局方では反応干渉因子試験の添加回収率の適格基準を 50~200%としている。高濃度 (0.05EU/mL) 及び中濃度 (0.016 又は 0.012EU/mL) のエンドトキシンの添加では日本薬局方の基準を満たし、有意な反応干渉は認められなかった。

一方、低濃度 (0.005EU/mL) では基準を満たさない例が認められた。

D. 考察

1) マイコプラズマ・ウイルス否定試験

本法は、各材料から抽出した DNA 溶液および、合成 cDNA に、マイコプラズマ・各ウイルスの遺伝子組み換え plasmid をすべて添加するため、サンプルおよび、検査対象毎に PCR 阻害反応の確認、検出感度の特定が可能となる。

今後、これらのデータを基に Ex vivo 増幅臍帯血幹細胞および、その培養上清中に PCR 阻害反応がないことを示すことによって、1PCR tube 中に含まれる Ex vivo

増幅臍帯血幹細胞由来の核酸量を増し、より高感度のマイコプラズマ・ウイルス検査も可能になると考える。

2) エンドトキシン試験

エンドスペシー[®]によるエンドトキシン測定には測定精度や運用面において、特に問題となる事項は認めなかった。試料への低濃度 (0.005EU/mL) のエンドトキシンの添加では添加回収率が基準を満たさない例が認められたが、本濃度は測定方法の検出限界 (0.002~0.001EU/mL) 付近に設定されていることによる可能性が高いと考えられる。また、Ex vivo 増幅臍帯血におけるエンドトキシン許容濃度は 0.12EU/mL 以下であり、0.12EU/mL 以下の濃度で添加回収試験が成立すれば、必ずしも 0.005EU/mL のエンドトキシン濃度測定が保障される必要はないと考えられる。

E. 結論

Ex vivo 増幅臍帯血の実製造を想定した試験体制が整備された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金(基礎研究成果の臨床応用推進研究事業)

分担研究報告書

4・品質管理法の開発

4-3 ex vivo 増幅臍帯血における細胞表面マーカーの測定法の確立

分担研究者: 佐藤隆
(日本ベクトン・ディッキンソン(株) 本郷ラボ ディレクター)
研究協力者:
松崎正晴
(日本ベクトン・ディッキンソン(株) バイオサイエンスラボ 所長)
開原千春
(日本ベクトン・ディッキンソン(株) バイオサイエンス
マーケティングコミュニケーション マネージャー)
廣瀬弥保
(日本ベクトン・ディッキンソン(株) 神戸ラボ 研究員
兼 神戸市地域結集型共同研究事業 特別研究員)
田中聡
(日本ベクトン・ディッキンソン(株) 本郷ラボ 研究員
兼 神戸市地域結集型共同研究事業 特別研究員))

研究要旨

本分担研究は、臍帯血由来の CD34 陽性細胞を *ex vivo* 増幅培養する際の加工工程及び最終細胞製品の品質試験方法を確立することを目的にしている。

品質管理試験として検討した細胞表面マーカーは(1)CD34 陽性細胞数 (CD45/CD34/7AAD)、(2)CD34 陽性/CD38 陰性細胞数 (CD34/7AAD/CD38)、(3)CD34 陽性/CD133 陽性細胞数 (CD34/7AAD/CD133)、(4)Lineage マーカーの発現率 (CD3/CD56/7AAD/CD34, CD19/CD14/7AAD/CD34, CD66b/CD33/7AAD/CD34, GPA/CD41/7AAD/CD34)、および(5)幹細胞マーカーの発現率 (CD38/HLA-DR/7AAD/CD34, CD90/CD117/7AAD/CD34, CD38/CD133/7AAD/CD34, CD38/CD184/7AAD/CD34, CD34/CD135/7AAD/CD34)である。

また最終細胞製品の表面抗原の解析には、CD130/CD45/CD34、CD127/CD45/CD34、CD195/CD45/CD34、CD71/CD45/CD34、BB9/CD45/CD34、LIF/CD45/CD34、MDR/CD45/CD34、CD144/CD45/CD34、CD31/CD45/CD34、CD2/CD45/CD34、CD20/CD45/CD34、CD13/CD45/CD34、CD36/CD45/CD34、CD61/CD45/CD34、CD16/CD45/CD34 を用いた。

その結果、増幅培養工程の品質管理手法としては CD34 陽性細胞数の管理が重要であり、最終細胞製品の品質管理手法には CD34 陽性細胞中の CD38 陰性細胞の割合と Lineage マーカーのチェックが重要であることが示唆された。

A. 研究目的

前年度に引き続き、臍帯血中の CD34 陽性細胞の *ex vivo* 増幅培養工程と増幅細胞の安全性を確認するための品質管理手法として、各種の細胞表面マーカーを解析したので報告する。

B. 研究方法

1. 製品管理のための表面抗原解析

1-1. CD34 陽性細胞数 (CD45/CD34/7AAD)

CD45 FITC/CD34 PE Combination 抗体及び内部標準 Beads を用いて測定を行った。増幅前の細胞に関しては、ISHAGE で推奨された方法に基づき、増幅後の細胞に関しては、CD34 がブロードになるため、アイソタイプコントロールを用いて陰性領域と陽性領域を判断した。2 回測定し、平均値の±10%以内であればその平均値を採用した。

1-2. CD34 陽性/CD38 陰性細胞数 (CD34/7AAD/CD38)

CD34 PE、CD38 APC で染色し洗浄後 FACSCalibur を用いて解析し、前に求めた CD34 陽性細胞数から換算する。2 回測定し、平均値を採用した。

1-3. CD34 陽性/CD133 陽性細胞数 (CD34/7AAD/CD133)

CD34 PE、CD133 APC で染色し洗浄後 FACSCalibur を用いて解析し、前に求めた CD34 陽性細胞数から換算する。2 回測定し、平均値を採用した。

1-4. Lineage マーカーの発現率

下表の組み合わせで 4 種類のパネルを作製し、染色後 FACS で解析を行った。各 2 回測定し、平均値を採用した。

	FITC	PE	-	APC
Panel 1	CD 3	CD56	7AAD	CD34
Panel 2	CD19	CD14	7AAD	CD34
Panel 3	CD66b	CD33	7AAD	CD34
Panel 4	CD41	GPA	7AAD	CD34

1-5. 幹細胞マーカーの発現率

下表の組み合わせで 5 種類のパネルを作製し、染色後 FACS で解析を行った。各 2 回測定し、平均値を採用した。

	FITC	PE	-	APC
Panel 1	CD38	HLA-DR	7AAD	CD34
Panel 2	CD90	CD117	7AAD	CD34
Panel 3	CD38	CD133	7AAD	CD34
Panel 4	CD38	CD184	7AAD	CD34
Panel 5	CD38	CD135	7AAD	CD34

2. 最終細胞製品の表面抗原解析について

CD34 APC と CD45 PerCP-Cy5.5 に CD130 FITC、CD127 Purify、CD195 PE、CD71 PE、BB9 Purify、LIF PE、MDR PE、CD144 Purify、CD31 PE、CD2 FITC、CD20 FITC、CD13 PE、CD61 PE、CD16 FITC の組み合わせで染色を行った。Purify の抗体に関しては 2 次抗体として、Goat-anti Mouse IgG/IgM-FITC を使用した。染色後細胞を固定し FACS で測定を行った。

3. 最終細胞製品のコロニーアッセイについて

Lineage マーカーである CD2、CD3、CD56、CD16、CD19、CD14、CD11b、CD66b、CD41、GPA を FITC と CD34APC を染色し 4 分割し分取後、MethoCult GF H4434V を用いてコロニーアッセイを行った。細胞は 250/dish になるように調整し 3Dish の平均値を採用した。

C. 研究結果

1-1. CD34 陽性細胞数の変化

増幅後 7 日では、総細胞数の増幅率は平均 8.3 倍(7.1-9.5 倍)であるのに対し、CD34 陽性細胞数の増幅率は平均 5.5 倍(4.6-6.7 倍)。増幅後 10 日では、総細胞数の増幅率は平均 22.4 倍(18.2-25.9 倍)であるのに対し、CD34 陽性細胞数の増幅

率は平均 10.9 倍(9.5-13.3 倍)。増幅後 12 日では、総細胞数の増幅率は平均 40.3 倍(27.5-48.2 倍)であるのに対し、CD34 陽性細胞数の増幅率は平均 14.0 倍(9.5-18.4 倍)であった。

1-2. CD34 陽性細胞中の CD38 陰性細胞出現率の変動

細胞数は、CD34 陽性細胞数より算出するので、ここでは CD34 陽性細胞中の CD38 陰性細胞の割合を図 1 に示した。増幅前には CD34 陽性細胞中に CD38 陰性細胞は 10%以下であるが、培養 7 日以降と最終細胞製品では CD34 陽性細胞中の CD38 陰性細胞は 40-50%に達した。

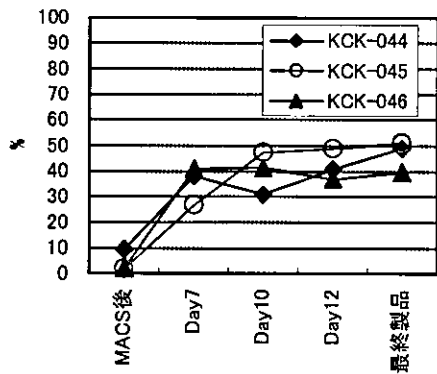


図 1. CD34+/CD38-細胞の培養期間中の変動

1-3. CD34 陽性細胞中の CD133 陽性細胞出現率の変動

細胞数は、CD34 陽性細胞数より算出するので、ここでは CD34 陽性細胞中の CD133 陽性の割合を図 2 に示した。12 日間の増幅培養中に CD34 陽性/CD133 陽性細胞の発現に大きな変化は認められなかった。最終細胞製品についても、増幅前の割合との間に有意差は認められなかった。

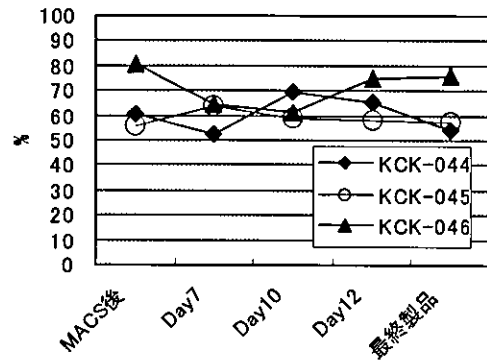


図 2. CD34+/CD133+細胞の培養期間中の変動

1-4. 最終細胞製品(洗浄前後)総細胞中の Linage マーカーの発現率を図 3 に示した。

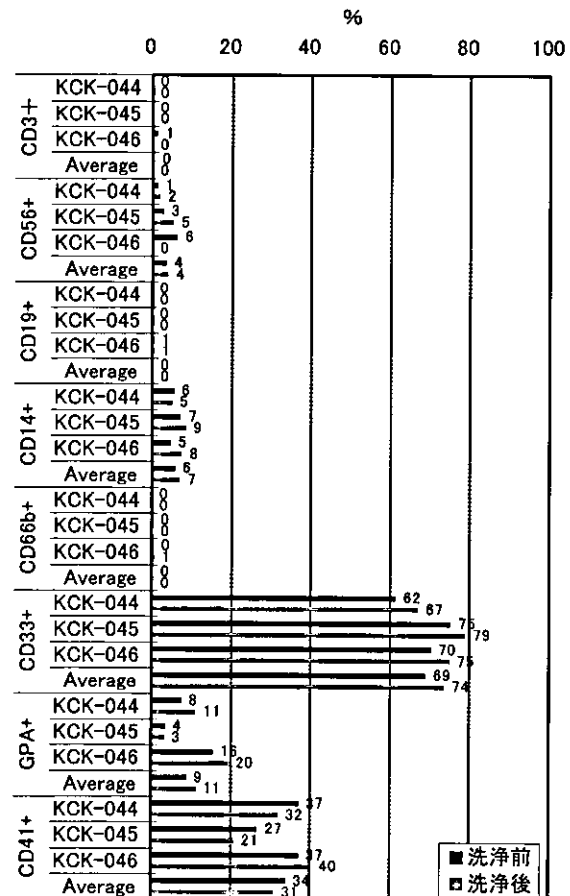


図 3. 最終細胞製品(洗浄前後)総細胞中の Linage マーカーの発現率

最終細胞製品の CD34 陽性細胞中の Lineage マーカー陽性率をみると、細胞洗浄後 CD33 陽性率は平均 84.8%(77.7-92.9%)、GPA 陽性率は平均 5.7%(3.2-7.1%)、CD41 陽性率は平均 18.3%(15.6-23.2%)を示した。細胞洗浄操作の前後では CD34 陽性細胞中の Lineage マーカーの発現率に有意差は認められなかった。

1-5. 最終細胞製品(洗浄前後)総細胞中の幹細胞マーカーの発現率を以下に示した。

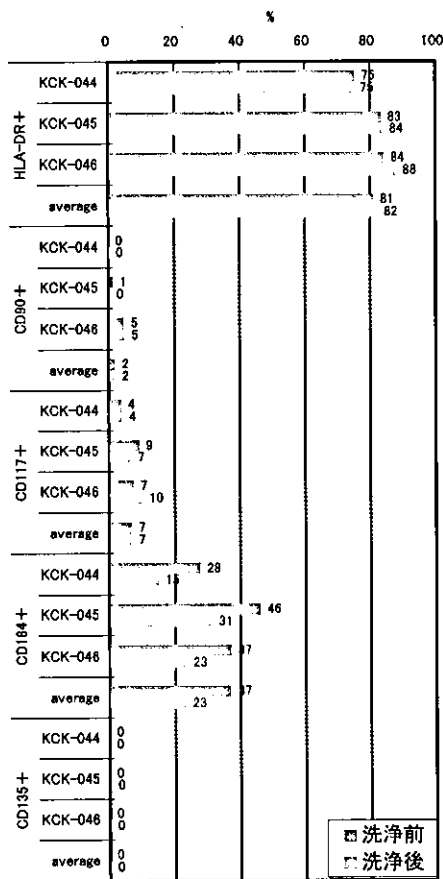


図4. 最終細胞製品(洗浄前後)総細胞中の幹細胞マーカーの発現率

最終細胞製品の CD34 陽性細胞中の幹細胞マーカー陽性率をみると、細胞洗浄後 HLA-DR 陽性率は平均 91.5%(87.0-95.3%)、CD184 陽性率は平均 18.1% (11.1-29.2%)を示した。細胞洗浄操作の前後では CD34

陽性細胞中の幹細胞マーカーの発現率に有意差は認められなかった。

2. 最終細胞製品の表面マーカーのうち、特に CD34 陽性細胞中の発現率が高かった CD13、CD31、CD71 についてそのパターンを図5に示した。

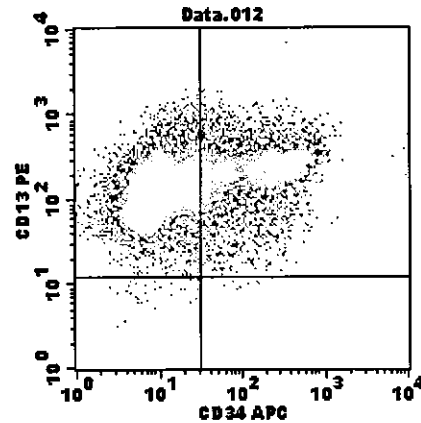


図5-1. 最終細胞製品の表面マーカー(CD34/CD13)の発現

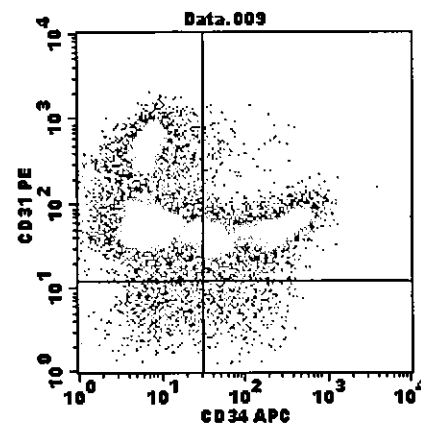


図5-2. 最終細胞製品の表面マーカー(CD34/CD31)の発現

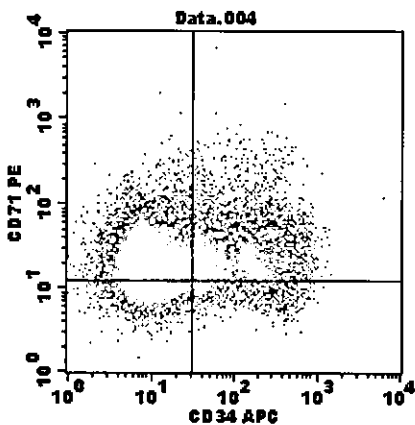


図 5-3. 最終細胞製品の表面マーカー (CD34/CD71) の発現

3. 最終細胞製品 (KCK-046) の Linage 陰性分画における CD34 陽性細胞及び、CD34 陰性細胞のコロニー形成能を図 6 に示した。

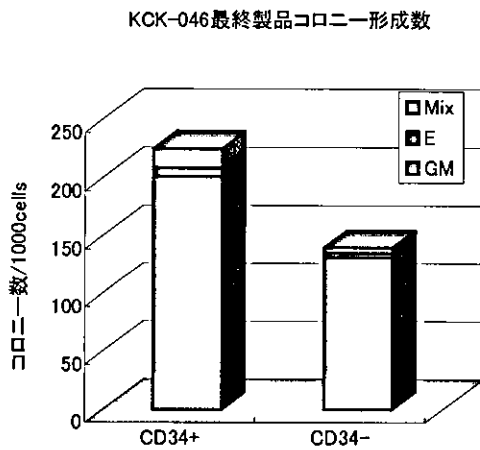


図 6. 最終細胞製品の Lin-/CD34+分画及び Lin-/CD34-分画のコロニー形成

D. 考察

臍帯血 CD34 陽性細胞を ex vivo で増幅培養する追加製造試験を、昨年の製造試験 (KCK-16, KCK-17, KCK-18) と同様の方法でおこなった。

前回の結果と今回の結果を比べると、今回の実験では明らかに増幅効率が劣化

しており、それは出発材料の細胞数と純度と生存率に依存しているように思われる。そのため、細胞加工工程で細胞の増幅具合を指標としながら出荷基準を上回る細胞数を確保できるかどうかを CD34 陽性細胞数として判断する基準が重要と考えられる。

本増幅培養系では、CD34 陽性細胞の割合は増幅するにつれ低下する傾向を示したが、各培養日の増加した細胞数を CD34 陽性率に掛けることから算出される CD34 陽性総細胞数は培養期間を通して増加を示した。CD34 陽性細胞数で判断する限り、本増幅培養法の有用性が認められた。

さらに、CD34 陽性細胞数が増加しているので、その CD34 陽性細胞の性状を検証するための評価測定系として、未熟な血液幹・前駆細胞の表現形式である CD34 陽性かつ CD38 陰性細胞の検出及び、CD133 陽性の細胞が各培養の段階でどの程度含まれるかについて検証した。

本増幅培養系では、CD34 陽性細胞中の CD38 陰性の割合は、解凍直後は 10%程度であるが、増幅培養することにより 40%程度まで大幅に増加する傾向が全例で認められた。また、この変化は最終培養日以前の培養 7-10 日に既に 40-50%に達することが判明した。このことから培養途中であっても、CD34 総細胞数の把握と共に CD34 陽性分画中の CD38 陰性細胞の割合を検証することにより、細胞加工工程での細胞の成熟程度をチェックすることが可能と考えられた。

CD133 表面抗原に関しては、CD34 強陽性細胞分画で CD133 も陽性であり、CD34 弱陽性から陰性分画においては CD133 の発現も陰性であることが知れた。

このため、CD133 を細胞の品質管理上の項目として用いる場合は、CD34 強陽性の発現を観察するのと同義と考えられた。

さらに、増幅培養細胞の分化を詳しく検証する目的で、細胞分化に伴って出現する Linage マーカーを検証した。Linage マーカーは、増幅加工細胞にはほとんど発現しておらず、最終出荷細胞の洗浄前後でもこれらの発現変動はなかった。CD41, GPA の発現が若干認められたが、

これらは CD34 陰性分画の細胞に発現しており、CD34 陽性の細胞は、CD38 陰性であり、同時に Linage マーカーの発現も認められなかったことから、未分化な細胞が増幅されたと考えられた。

最後に、CD34 以外の血液幹・前駆細胞に発現するマーカーがあれば、それを測定することによって細胞増幅の評価を与えられると考えられるが、現在までにその目的に適した表面抗原は知られていない。いくつか報告されている幹細胞マーカーのうち本増幅培養系を用いて生成された CD34 陽性分画で発現が認められたものは、HLA-DR 抗原のみであった。

また、Linage 陰性分画の CD34 陽性、陰性のコロニー形成能は CD34 陽性分画のほうが高かった。

本検討では、一定の条件で一定の細胞加工が施された場合は、培養細胞の性状についても一定の表現系が出現し、表面抗原のそれぞれの発現には同様な傾向が認められると考え、その発現パターンをデータとして規格化し品質保証に利用することを考えている。

現在までに CD34 陽性細胞数の増幅倍数については一定の基準を設けるには至っていない。この原因は、出発臍帯血によって得られる細胞数と細胞の生存率がそれぞれの材料間で大きく異なり、精製後の CD34 陽性細胞の純度も一定しないことに依存していると考えられる。

しかし、本細胞培養系では CD38 の出現に一定の傾向が認められ、また Lineage マーカーの発現についても多くの実験例で同様な出現傾向が観察されているので、これらの実験例が増えれば細胞加工工程中での品質管理基準に充分応用できるものと考えられる。

E. 結論

サイトカインによる造血幹細胞/前駆細胞の *ex vivo* 増幅で、CD34 陽性細胞数および各種細胞表面マーカーを測定は、細胞加工の工程と最終細胞製品の品質管理に利用することができると考えられた。今後、症例数をさらに増やして検討し、

臨床応用に用いられる品質保証、品質管理のデータを蓄積することが必要である。

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
なし

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

分担研究報告書

4・品質管理法の開発

4-4 ウイルス否定試験、ウイルス増幅試験法の開発

分担研究者：清水 則夫

東京医科歯科大学助教授

研究要旨

ヒトには様々な感染因子が持続感染しているため、生体材料に病原体が混入する危険性を避けることはできない。したがって、再生医療・細胞治療を行なうためには、目的の培養系に感染因子が混入した場合、その培養系において混入した感染因子が培養中にどのような挙動を取るのかをあらかじめ把握し、対策を立てることが必要となる。研究分担者は、*ex vivo* 増幅臍帯血を使用した造血幹細胞移植を行う前の安全性試験としてウイルススパイク試験法を確立することを目的に研究を行なった。スパイクするウイルスとして血液中に検出されること、血液細胞に感染することが知られていることから EB ウイルス (EBV)、サイトメガロウイルス (CMV)、パルボウイルス B19 型 (PVB19) を選定した。それぞれのウイルスについてウイルスストックを作成し、十分な感度を持つウイルスゲノム定量系、ウイルス mRNA 検出系を構築し、ウイルススパイク試験の実施が可能になった。今後、造血幹細胞増幅系にウイルスを添加し、ウイルスの動態と造血幹細胞増幅に与える影響を評価する予定である。

A. 研究目的

ヒトには様々な感染因子が持続感染しているため、生体材料に病原体が混入する危険性を避けることはできない。したがって、再生医療・細胞治療を行なうためには、目的の培養系に感染因子が混入した場合を想定し、混入した感染因子がその培養系においてどのような挙動を取るのかを予め把握し、対策を立てておくことが必要となる。ex vivo 増幅臍帯血を使用した造血幹細胞移植を行際に混入の可能性が強いウイルスに対する安全性試験として、ウイルススパイク試験系を確立するための基盤整備を行なうことを目的に研究を行なった。

B. 研究方法

造血幹細胞の ex vivo 増幅系に対するウイルス添加の影響を評価するため、以下のプロトコルで実験を行なうこととした。

1. 添加ウイルスの選定：多くのヒト血液細胞に持続感染していること、造血細胞への感染で重篤な症状を呈することなどの理由から、スパイク試験を行なうべきウイルスとして EB ウイルス (EBV)、サイトメガロウイルス (CMV)、パルボウイルス 19 型 (PVB19) を選定した。
2. 臍帯血から造血幹細胞を分離して 2 群に分け、1 方に感染価が既知のウイルスを添加する。
3. ウイルス添加、非添加細胞を増幅系に移し、造血幹細胞増幅実験を行なう。
4. 定期的にサンプリングし、ウイルスゲノムの増減、ウイルス mRNA 出現の有無、ウイルスタンパク質出現の有無を検

査する。

5. ウイルス添加が造血幹細胞の増幅、分化、コロニー形成能に与える影響を評価する。

ウイルススパイク試験の基盤整備として、以下の準備をおこなった。

1. 選定した各ウイルスの標準ウイルス株の入手
2. ウイルス増幅を許容する細胞の入手とその細胞を利用したウイルスストック液の作成
3. ウイルス感染価測定
4. 定量 PCR 法によるウイルスゲノム定量系の作成 (ロッシュ社定量 PCR 機 LightCycler を使用:PCR 条件 酵素:EBV、PVB19 は Fast Start PCR Taq、CMV は AmpliTaq Gold を使用、条件:EBV,PVB19 は、denature 95°C 10 min の後、denature 95°C 15sec, annealing 57°C 10 sec, extension 72°C 8 sec を 50 Cycle, CMV は、denature 95°C 10 min の後、denature 95°C 15sec, annealing/extension 60°C 60 sec を 45 Cycle
5. RT-PCR 法によるウイルス mRNA 検出系の作成 RT-PCR はインビトロジェン社製 スーパースクリプト 3 ワンステップ RT-PCR を使用:RT 反応 50°C 30 min、その後 denature 94°C 2 min、PCR は 94°C 15 sec Annealing (β -actin 51°C, BZLF1 60°C, CMV 59°C parvoB19 53°C) 30 sec、extension 72°C 30 sec の条件で 40 Cycle 行った。Nested PCR 条件は、denature 94°C 2 min 処理し、その後 denature 94°C 15 sec、annealing (BZLF1、CMV、parvoB19 共通)

55°C30 sec、extension 72°C 30 sec の条件で 30 Cycle 行った。

6. 蛍光抗体法によるウイルスタンパク質検出系の作成 : EBV ; EBNA は蛍光抗体補体法、EA、VCA は蛍光抗体間接法、LMP-1 は蛍光抗体直説法、CMV; 蛍光抗体間接法、PVB19; 蛍光抗体間接法

C. 研究結果

1. 標準ウイルス株

以前から保持していた B95-8 株 EBV、TOWNE 株 CMV を使用した。ParvoB19 は *in vitro* での感染増殖が難しく標準ウイルス株が存在しないため、日本赤十字社から分与された PVB19 陽性血漿を使用した。

2. ウイルスストックの作成

EBV : 細胞株 B95-8 から持続的に産生される EBV (B95-8) 株の培養上清をろ過滅菌後に EBV ストックとした。

CMV : ヒト胎児肺細胞由来 HFL-1 細胞を細胞バンクから入手し、TOWNE 株 CMV を感染した。感染後に寒天を重層し、培養 14 日後に独立したコロニーを分離し、新しい HFL-1 細胞に感染した。2 週間後に上清を分離し、遠心・ろ過液を CMV ストックとした。

PVB19 : 効率良い *in vitro* 増殖系がないため、PVB19 陽性血漿を直接 PVB19 ストックとして使用した。

3. ウイルス感染価測定

EBV : 臍帯血単核球を使用し、感染 3 週間後の不死化 EBV 感染 B 細胞コロニーの出現を指標に EBV 感染価を測定したところ、 3.0×10^4 TCID₅₀/ml だった。

CMV : HFL-1 細胞を利用したプラーク法により CMV ストックの感染価を測定し

たところ、 1.15×10^6 pfu/ml だった。PVB19 : PVB19 に感受性を持つ細胞株 KU18Ep6 細胞に PVB19 陽性血漿を加え、間接蛍光抗体法陽性細胞の出現を指標に感染価を測定したところ、 6.5×10^6 TCID₅₀/ml だった。

4. 定量 PCR 法によるウイルスゲノム定量系の作成

EBV: EBV ゲノム BamHIW 断片の DNA 配列をもとにプライマー、プローブ配列を設定した (Primer: cgca-taatggcggacctag, caaacaagcccactcccc,

Hybriprobe: LC-aaccatagaccgcttctctg, aagatagcagcagcgcagc-FITC)。細胞中に約 50 コピーのウイルス DNA を安定に保持している Raji 細胞の DNA を用いてスタンダードを作成し、感度検定を行なったところ、10 コピー/capillary の感度で EBV ゲノムを定量することが可能だった。

CMV: Glycoprotein B gene の DNA 配列をもとにプライマー、プローブ配列を設定した (Primer: taccacct- tcgctgtgtc, ataggaggcggccacgtattc, Hybriprobe: LC-accacttatctgctggcagc,

cgtttcgctgtagctacgcttacat-FITC)。PCR 産物をクローニングしてスタンダードを作成し感度検定を行なったところ、10 コピー/capillary の感度で CMV ゲノムを定量することが可能だった。

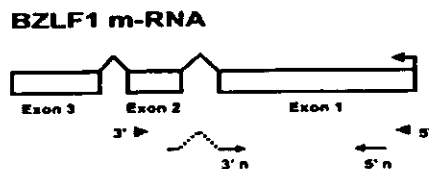
PVB19: NS-1gene の DNA 配列をもとにプライマー、プローブ配列を設定した (Primer: ccgccaagtacagg- aaaaac, cagctacactccaccgca, Hybriprobe: LC-caccaggtagatcaaaaaatgcgtgga,

caaaagccatttagcgggca-FITC)。PCR 産物をクローニングしてスタンダードを作成し感度検定を行なったところ、10 コピー

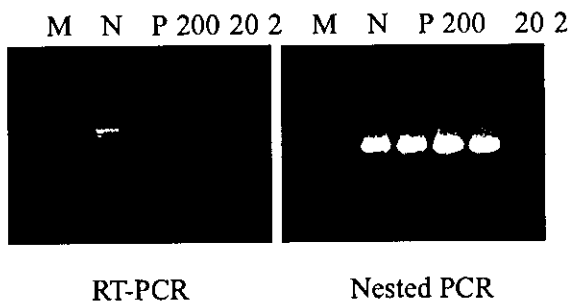
/capillary の感度でPVB19ゲノムを定量することが可能だった。

5. RT-PCR 法によるウイルス mRNA 検出系の作成

EBV : EBV 感染細胞に発現する前早期遺伝子 BZLF1 の mRNA 検出系を作成した。プライマーは 5'プライマーは Exon 1、3'プライマーは Exon2 から Exon1 に Intron をまたぐように設定した(R-PCR primer: acaggacaacacctcactacac, actgccttgactggtgacagc, Nested PCR primer: caaacagacgcagatgaggc, gcggtg- cctaggtgacagc)。RT-PCR では 608bp、Nested PCR では 442bp のバンドが検出される。



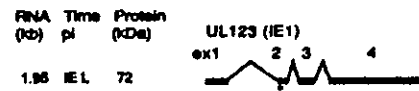
RT-PCR 産物をクローニングして in vitro transcription によりスタンダードを作成し感度検定を行なった結果、下図のように 2 コピー/tube の mRNA が検出可能だった (N: Negative control, P: Positive control, 200, 20, 2: 定量スタンダード copies/tube, M: Marker)。



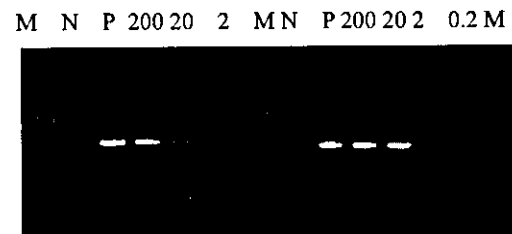
CMV: CMV 感染細胞に発現する前早期遺伝子 IE-1 遺伝子の mRNA 検出系を作成した。プライマーは Intron をまたぐように

Exon2, 4 に設定した (RT-PCR: gatggagtcctctgccaaga, aaggcgcag- taatttct, Nested PCR primer: ccaaggccacgacg- ttctgcagacta, tgctccttgattctatgccgacca)。RT-PCR では 400bp、Nested PCR では 228bp のバンドが検出される。

IE-1 gene mRNA



RT-PCR 産物をクローニングして in vitro transcription によりスタンダードを作成し感度検定を行なった結果、下図のように 20 コピー/Tube の mRNA が検出可能だった。

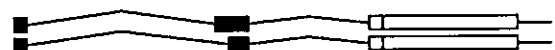


RT-PCR

Nested PCR

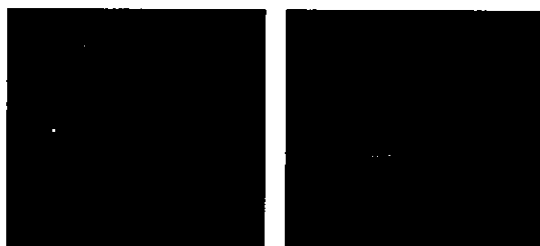
PVB19 : PVB19 感染細胞に発現するウイルス遺伝子 VP-2 の mRNA 検出系を作成した。プライマーは Exon1,3 に Intron をまたぐように設定した (RT-PCR primer: ttctctggactttctgtctgt, aactgaagtc- Atgcttggtatt, Nested PCR primer: agtttctcgcg- Aagttgtagc, tctgaggcgtgtaagcg)。このプライマーセットではスプライシングパターンが違う 2 つの mRNA を検出できる。RT-PCR では 445,308bp、Nested PCR ではいずれの mRNA から 140bp のバンドが検出される。

VP-2 mRNA (上: 2.29kbp、下: 2.18kbp)



RT-PCR 産物をクローニングして *in vitro* transcription によりスタンダードを作成し感度検定を行なった結果、下図のように 2 コピー/Tube の mRNA が検出可能だった。

M N P 200 20 2 0.2 M N 200 20 2 0.2 M



RT-PCR

Nested PCR

6. 蛍光抗体法によるウイルスタンパク質検出

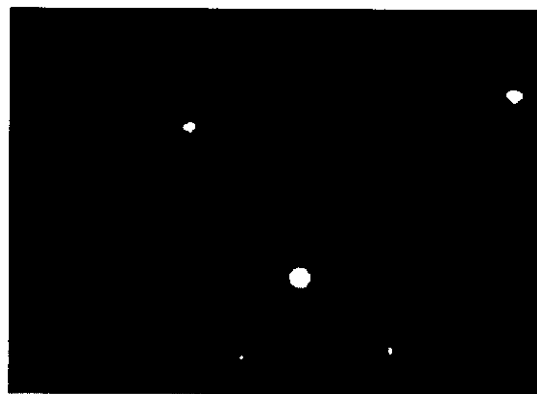
EBV: 蛍光抗体間接法による潜伏感染遺伝子 EBNA、LMP-1、ウイルス複製サイクル遺伝子 EA、VCA の検出系を作成した (EBNA、EA、VCA は陽性ヒト血清を使用。

LMP-1 は単クローン抗体 S-12 を使用)。

CMV: 蛍光抗体間接法によるウイルス複製サイクル遺伝子の検出系を作成した (抗体は精製ウイルス粒子免疫源としたポリクロナル抗体を使用)。

PVB19: 蛍光抗体間接法によるウイルス複製サイクル遺伝子の検出系を作成した (抗体は精製ウイルス粒子免疫源としたポリクロナル抗体を使用)。

蛍光抗体法によるウイルスタンパク質の検出例: KU812Ep6 細胞に PVB19 陽性血清を添加後 24 時間後に細胞固定・検出操作を行った。



D. 考察

1. 作成した EBV、CMV ウイルスストック液は十分な感染価を持っているため、実験に使用可能と判断した。また、何人かの患者から PVB18 陽性血漿を入手したが、いずれも定量 PCR 法では高いゲノム DNA コピー数が検出されたが、KU812Ep6 細胞への感染性はなかった。これらの患者血漿は血液を採取できた時期が遅く抗体により血中のウイルスが中和されている可能性が考えられたため、日本赤十字社の献血の中から PVB19 陽性として除外されたものの提供を受け、実験に用いたところ高い感染性を持つことが明らかとなったため、ウイルスストックとして直接使用することとした。なお、KU812Ep6 細胞は PVB19 に感受性をもっているものの、感染細胞の培養上清に検出されるウイルス量は極わずかで、本試験に用いるには不相当と判断した。

2. ウイルス感染の有無を調べるために構築したウイルスゲノムの定量系は、配列の違う多くのプライマー・プローブを作成し、また温度・時間などの条件も変えて実験をおこなった。その結果、10 コピー/capillary、ウイルス mRNA の検出系は 2~20 コピー/tube と実験には十分な検出感度を得られたため、上記の配列を使用することとした。

E. 結論

造血幹細胞増幅系へのウイルススパイク試験を行なうため、CMV,EBV,PVB19 を添加するウイルスとして選定し、実用に耐えるウイルスストック、ウイルス感染細胞の検出系の作成に成功した。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 張 宇、高久智生、本多聖子、大屋敷一馬、大屋敷純子、清水則夫、山本興太郎：鼻腔 T/NK リンパ腫における Epstein-Barr ウイルス遺伝子の包括的解析。第 153 回東京医科大学医学会総会（2004/6/5）。
2. 張 宇、大屋敷純子、高久智生、本多聖子、大屋敷一馬、清水則夫、山本興太郎：鼻 T/NK リンパ腫における Epstein-Barr ウイルス遺伝子の包括的解析。第 66 回日本血液学会／第 46 回日本臨床血液学会同時期開催（2004/9/17～9/19）。
3. 清水則夫、水上美樹、渡辺 健、渡辺 哲、森尾友宏、馬場憲三、山本興太郎、再生医療・細胞治療の製品保証に関する研究：多項目迅速ウイルス検査システムの開発と運用 第 52 回日本ウイルス学会学術集会（2004/11/21～11/23：横浜）
4. 清水則夫、水上美樹、渡辺 健、森尾友宏、馬場憲三、熊谷麻理、山本興太郎 再生医療をサポートする網羅的微生物汚染検出システムの開発 第 4 回再生医療学会総会（2005/03/1-2：大阪）

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

4. 品質管理法の開発

4-5 培地性能試験・細胞毒性試験法の確立

分担研究者：白数昭雄

（ニプロ株式会社 総合研究所 第6研究開発部部长代行）

研究協力者：槻木裕志

（ニプロ株式会社 総合研究所 第6研究開発部研究員
兼 先端医療センター再生医療研究部 特別研究員）

研究要旨

閉鎖系の臍帯血 CD34 陽性細胞を培養するためのバッグに関する検討を行っていたが、実製造試験において増殖不良が発生し、原因が培地の不良であると考えられた。培地が不良であるとバッグの評価も困難となるため、培地を選別する系の検討を行なった。新しいロットが市場に出てきた時に、そのロットが使用可能かを判定するロットチェック法と、各培地ボトルごとに使用直前に判定するボトルチェック法の検討を行なった。ロットチェック法の規格は、ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞の7日培養での増幅倍率が87倍以上を合格とした。ボトルチェック法の規格は、Daudi 細胞株の48時間培養後のATP量が69.3nM以上を合格とした。

A. 研究目的

臍帯血中の CD34 陽性細胞を分離後、培養増幅するためのバッグに関する検討を行っていたが、実製造試験において増殖不良が発生し、原因が培地の不良であると考えられた。培地が不良であるとバッグの評価も困難となるため、培地を選別する系の検討を行なった。

B. 研究方法

培地の評価系として、2段階の系を検討した。新しいロットが市場に出てきた時に、そのロットが使用可能かを判定するロットチェック法と、各培地ボトルごとに使用直前に判定するボトルチェック法の検討を行なった。ロットチェック法は、5ボトルの培地で、ドナーの異なる3つのヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞を培養し、培養開始7日後と12日後に総細胞数、CD34 陽性細胞の増幅倍率を測定した。ボトルチェック法は、ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞が貴重であるため、細胞株を用いた評価系を検討した。上記の5ボトルの培地で細胞株数種を培養し、ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞の増幅と関連する細胞株を選定し、MTS法、ATP法などで短時間に評価する系を検討した。

C. 研究結果

ロットチェック法の検討を行なった結果、培地1から培地5の5種類の培地のうち、培地1、4、5では、培養7日で総細胞数増幅倍率が 114.6 ± 21.3 倍、CD34 陽性細胞増幅倍率が 34.1 ± 8.0 倍、培養12日で総細胞数増幅倍率が 501.6 ± 132.4 倍、CD34 陽性細胞増幅倍率が 86.9 ± 13.2

倍で良好であった。培地3では、培養7日で総細胞数が 17.0 ± 11.9 倍、CD34 陽性細胞が 7.83 ± 6.22 倍、培養12日で総細胞数が 254.8 ± 202.3 倍、CD34 陽性細胞が 21.2 ± 18.6 倍で不安定であった。培地2では培養7日、12日とも総細胞数、CD34 陽性細胞とも0倍で不良であった。

次に、使用直前に各培地ボトルをチェックする方法の検討を行なった。ヒト血球系細胞の様々な分化段階にある細胞株 (K-562、HL-60、Molt-4、KG-1a、Daudi) を、良好な培地と不良な培地で一週間培養したところ、Daudi 細胞株でヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞との相関が見られた。そこでこの細胞株を用い、短時間で培地を評価する系の検討を行なった。まず、細胞株を凍結状態から解凍して培養した後、評価する培地で慣らし培養・暴露培養した後、遠心濃縮して MTS アッセイにて評価する系を開発した。良い培地の吸光度は 0.369 ± 0.125 、不良培地の吸光度は 0.016 ± 0.006 であった。さらに、検出感度の良い ATP アッセイ法を用いた検討を行ない、培地への暴露培養48時間の後に ATP アッセイを行なった。良好な培地1、4、5ではそれぞれ 155.6 ± 28.2 nM、 195.0 ± 31.0 nM、 227.2 ± 31.3 nM であり、不安定な培地3では 148.2 ± 24.5 nM、不良な培地2では 12.5 ± 18.9 nM であった。

D. 考察

ロットチェック法に関しては、総細胞数増幅倍率、CD34 陽性細胞増幅倍率のうち、培養7日後の総細胞数増幅倍率で大きな差が見られたため、この値で規格値を設定した。平均値、標準偏差より計算

して、良好な培地のおよそ80%が含まれるよう、総細胞数増幅倍率87倍以上を合格とする基準を設定した。この規格では、不安定な培地3も除外することが出来た。

ボトルチェック法に関しては、感度の良いATP法を採用した。ATP量69.3nM以上を合格とする、との規格を設定した。

E. 結論

ロットチェック法の規格は、ヒト臍帯血由来CD34陽性細胞の7日培養での増幅倍率が87倍以上を合格とした。ボトルチェック法の規格は、Daudi細胞株の48時間培養後のATP量が69.3nM以上を合格とした。

F 健康危険情報

特になし

G 研究発表

なし

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

分担研究報告書

4. 品質管理法の開発

4-6 NOG mouse を用いた品質管理

分担研究者：平家 俊男

（京都大学医学研究科発達小児科学助教授）

研究要旨

我々は既に臍帯血 CD34+細胞を我々の開発した免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} 移植し、末梢血、骨髄、脾臓、胸腺等におけるヒト血液細胞の出現を確認している。さらに、その分化の方向性についても検討し、従来の免疫不全マウスでは認められないヒト T 細胞をも含むすべての系統への分化を確認した。また、我々の見出した、ヒト造血幹細胞の増幅に対して有効である sIL-6R を含むサイトカインの組み合わせを用いて増幅した細胞の幹細胞活性を、免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} を用いて検討した。その結果、上記各種組織にヒト造血細胞の出現が同様に確認され、胸腺等においてはヒト T 細胞の出現を確認した。

近年、造血細胞のもつ分化可塑性が注目されている。この分化可塑性の制御が可能となれば、造血細胞を用いて、肝臓、骨格筋、心筋等の様々な組織の再生が可能となり、既存の造血細胞供給システムを用いた新しい医療の展開が期待できる。今回我々は、ヒト臍帯血移植 NOD/SCID/ γ_c^{null} マウスを用いて、肝臓におけるヒト細胞の出現、分化、機能について検討を行った。Fas 抗体を用いた劇症肝炎モデル、CC14 を用いた慢性肝炎モデルのいずれにおいても、ヒト細胞由来肝細胞の出現が確認された。機能的にもヒトアルブミンの産生が免疫組織染色のみならず、血清中においても確認され、機能的にもヒト肝細胞が再生されていることが確認された。ヒト肝細胞再生に寄与する細胞分画の同定、その機構について検討を進めている。

A. 研究目的

Ex vivo 増幅造血幹細胞の臨床応用の為には、造血幹細胞の異種動物を用いた活性評価が不可欠である。異種動物への移植に際して、移植細胞の生着を許容するには、異種動物の持つ免疫機構が大きな障害となる。我々は、種々の免疫機構の障害を有する免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} を作成し、ヒト臍帯血の生着が可能であることを確認している。本研究においては、免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} が、ヒト造血幹細胞の幹細胞活性評価における有用性について検討を進める。さらに、近年、造血（幹）細胞の他組織への可塑性について注目が集まっているが、寄与する細胞分画やその機構に関しては、不明の点が多い。NOD/SCID/ γ_c^{null} マウスを用いることにより、ヒト細胞における分化可塑性の検討が可能となる。

B. 研究方法

ヒト臍帯血由来 CD34⁺細胞を、放射線照射した免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} に移植し、末梢血、骨髄、脾臓、胸腺への、ヒト細胞の生着の動態を検討する。従来の免疫不全マウス NOD/SCID においては、ヒト T 細胞の出現が明らかでなかったが、NOD/SCID/ γ_c^{null} マウスを用いることにより、ヒト T 細胞を含むすべての系統への分化の検証がなされ、ヒト幹細胞活性評価のために、同マウスが有用であることが示された。本研究においては、IL-6/soluble IL-6R を含むサイトカインで ex vivo 増幅を行ったヒト造血幹細胞について、同様の方法にて造血幹細胞活

性測定を行う。さらに、ヒト臍帯血 CD34⁺細胞移植を行った NOD/SCID/ γ_c^{null} マウス由来骨髄細胞を用いて second transplantation を行い、骨髄再構築の有無について検討する。また、ヒトへの応用を視野に入れ、無血清培地で ex vivo 増幅したヒト臍帯血 CD34⁺細胞を用いて、同様の実験を行う。さらに今回は、現在注目を集めている造血幹細胞の可塑性についても、様々な組織障害を与え、肝臓、筋肉、神経等の組織における移植ヒト細胞の再生過程における寄与について、検討する。

C. 研究結果

我々は、既に臍帯血 CD34⁺細胞を我々の開発した免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} 移植し、末梢血、骨髄、脾臓、胸腺等におけるヒト血液細胞の出現を確認している。さらに、その分化の方向性についても検討し、従来の免疫不全マウスでは認められないヒト T 細胞をも含むすべての系統への分化を確認した。これらの T 細胞は、TCR の多様性を持ち、CTL 活性等の機能も有することを明らかにした。また、我々の見出したヒト造血幹細胞の増幅に対して有効である sIL-6R を含むサイトカインの組み合わせを用いて増幅した細胞の幹細胞活性を、免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} を用いて検討した。その結果、上記各種組織にヒト造血細胞の出現が同様に確認され、胸腺等においてはヒト T 細胞の出現を確認した。この結果により、我々のサイトカインを用いたヒト造血幹細胞増幅システムの有用性が、in vivo のシステムを用いて確認された。こ