

分担研究報告書

2. 品質管理法の確立

2-2 ウイルススパイク試験法の開発

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・細胞治療を行なう前に培養系に感染因子が混入した場合のウイルス動態と増幅細胞の挙動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 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) のウイルススパイク試験法を確立し、*ex vivo* 造血幹細胞増幅系のウイルス感受性と増幅、分化能への影響を検討することを目的に研究を行なった。その結果、*ex vivo* 造血幹細胞増幅系に PVB19 が感染しウイルス mRNA が検出されたが、EBV, CMV は感染しないことが示された。また、いずれのウイルスを添加した場合にも造血幹細胞の増幅、分化能に顕著な影響を与えないことが明らかとなった。

A. 研究目的

生体由来組織・細胞の培養操作を伴う再生医療・細胞治療において留意すべき安全性上の極めて重要な課題の一つにウイルス汚染の可能性がある。ウイルス汚染は生体由来組織・細胞に由来して起きる可能性がある。具体的にはヘルペスウイルスなど潜伏感染又は持続感染状態のウイルスあるいは内在的なレトロウイルスが細胞内に存在している可能性がある。また生体外での培養・製造工程中に外来性因子として導入された結果生じる可能性もある。生体由来組織・細胞のウイルスに対する安全性確保を図るための基本的方策の一つとして、あらかじめ製造工程にウイルスが混入した場合の影響を評価しておくことが挙げられる。本研究において我々は *ex vivo* 増幅した臍帯血 CD34 陽性細胞へのウイルススパイク試験法を確立することを目的として研究を行った。

B. 研究方法

臍帯血由来の CD34 陽性細胞の体外増幅培養法については中畑らによって複数のサイトカインと無血清培地を用いて効率的に *ex vivo* で増幅させる技術が開発された。実際の臍帯血移植に応用するために幹細胞源である CD34 陽性細胞のウイルスに対する感受性を研究する必要がある。本研究では中畑らによって確立された *ex vivo* 増幅培養系において最初の工程で高力価のウイルスをスパイクし、CD34 陽性細胞へのウイルス感染の有無、細胞増殖率、コロニー形成能に与える影響を実験

的に解析した。スパイクするウイルスとしてリンパ球系細胞への主要な潜伏感染ウイルスである Epstein-Barr Virus (EBV)、臍帯血移植後に伴って問題となる日和見感染症を引き起こす Cytomegalovirus、赤芽球への感染及び赤血球産生を抑制すると報告されている parvovirus B19 を選定した。またウイルススパイク試験の再現性を実証するために少なくとも 2 回以上の独立した試験を実施した。

1. ウイルスストックの作成

EBV の産生には B95-8 細胞株を用いた。10%FBS を含む RPMI1640 で 4 日間コンフルエント状態で培養した B95-8 細胞の培養上清を回収し、EBV ウイルス液とした。CBMC を用いた LCL アッセイで測定した結果感染価は $10^{2.15} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ であった。ABI7300 で DNA 定量を行ったところ $6.8 \times 10^6 \text{copies}/\text{ml}$ であった。

CMV (Towne 株) の産生には HFL-1 細胞を用いた。2%FCS を含む Eagle MEM で培養した HFL-1 へウイルス接種し、15 日目に培養上清を回収し CMV ウイルス液とした。HFL-1 を用いたプラークアッセイで測定した結果感染価は $1.15 \times 10^6 \text{pfu}/\text{ml}$ であった。ABI7300 で DNA 定量を行ったところ $2.88 \times 10^7 \text{copies}/\text{ml}$ であった。

Parvovirus B19 ウイルス液として患者血清 (日赤血液センターより供与) を使用した。KU812Ep6 細胞を用いた Reed-Muench 法で測定した結果感染価は $6.5 \times 10^6 \text{TCID}_{50}$ であった。ABI7300 で DNA 定量を行ったところ $5.3 \times 10^{11} \text{copies}/\text{ml}$ であ

った。

2. 臍帯血より CD34 陽性細胞の分離

東京臍帯血バンクより入手したヒト臍帯血よりリンホセパール I (免疫生物研究所) を用いて CBMC を分離した。分離した CBMC を約 1 ヶ月間 -80°C で凍結保存した。1 ヶ月後 StemSep Human Monocyte Starter Kit (Stem Cell Technologies Inc) を用いてネガティブセレクション法で凍結 CBMC より CD235a、CD3、CD2、CD56、CD24、CD19、CD14、CD16、CD66b が全てネガティブの細胞 (CD34 陽性細胞) を得た。

3. ウイルススパイク試験

CD34 陽性細胞を QBSF-60 培地 (Quality Biological) に懸濁した。EBV、CMV 各ウイルス液および Parvo B19 陽性血清を添加し、37°C 5%CO₂ 条件で 1 時間培養した。培養後細胞を全て回収した。

4. 造血幹細胞の *ex vivo* 増幅培養

rhSCF、rhTPO、rhIL-6、rhIL-6R (PeproTech)、FL (R&D systems) (全て 100ng/ml) を加えた QBSF-60 に細胞を 2 × 10⁴ 個/ml 細胞濃度で再懸濁し、37°C 5%CO₂ 条件で 12 日間増幅培養を行った。

5. コロニーアッセイ

ex vivo 増幅培養 7 日目及び 12 日目の細胞 10³ 個を MethoCult GF H4434V 培地 (Stem Cell Technologies Inc) に播き、37°C 5%CO₂ 条件で 14 日間培養した。14 日目に倒立顕微鏡下でコロニーの種類別に算定を行った。

6. フローサイトメトリー解析

分離した CD34 陽性細胞、*ex vivo* 増幅培養 7 日目及び 12 日目の細胞について一部を回収して PBS に懸濁した後、フローサイトメーター EPICS XL (Beckman Coulter) により細胞表面マーカーを解析

した。抗体は PC5、PE、FITC 標識した CD13、CD14、CD19、CD33、CD34、CD38、CD41、CD45、HLA-DR に対するマウス抗ヒトモノクローナル抗体 (Becton Dickinson) を使用した。

7. RNA 抽出

ex vivo 増幅培養 7 日目及び 12 日目の細胞からの total RNA 抽出を RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて行った。CMV をスパイクした細胞より得られた RNA についてさらに DNase I (TaKaRa) 処理を行った。

8. RT-PCR および nested PCR (ウイルス mRNA の検出)

EBV 遺伝子 locus として Latent phase から Lytic phase にかけて発現している LMP-1、Lytic phase に発現する BZLF-1 を設定し、これらをもとに 1st step として RT-PCR 次に 2nd step として nested PCR プライマーを設計した (Fig. 1)。

LMP-1

① RT-PCR プライマー配列

LMP-1/F 5' -gatggaacacgacctga-3'

LMP-1/R

5' -agatccagagacctaagacaag-3'

RT-PCR 条件

RT 50°C 30 分

Denature 94°C 2 分 1 cycle

PCR 94°C 15 秒、54°C 30 秒、72°C 30 秒 40 cycle

② nested PCR プライマー配列

2nd/F 5' - ctctccttctcctcctcttg-3'

2nd/R 5' - caggagggtgatcatcagta-3'

nested PCR 条件

95°C 10 分 1 cycle

95°C 15 秒、56°C 30 秒、72°C 15 秒 20 cycle

BZLF-1

① RT-PCR プライマー配列

BZLF-1/F

5' -attgcaccttgccgccacctttg-3'

BZLF-1/R

5' -cggcattttctggaagccacccga-3'

RT-PCR 条件

RT 50°C30分

Denature94°C2分 1 cycle

PCR 94°C15秒、61°C30秒、72°C30秒
40cycle

②nested PCRプライマー配列

2nd/F 5' -gaccaagctaccagagtctat-3'

2nd/R 5' -cagaatcgattcctccagcga-3'

nested PCR 条件

95°C10分 1 cycle

95°C15秒、55°C30秒、72°C30秒 20cycle

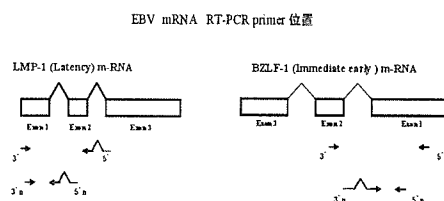


Fig.1 EBV mRNA RT-PCR primerの位置

CMV 遺伝子 locus として Latent phase から Lytic phase 初期にかけて発現している Immediate early 1 (IE-1) gene、Lytic phase 後期に発現する UL89 gene を設定し、これらをもとに RT-PCR および nested PCR プライマーを設計した (Fig. 2)。

IE-1

①RT-PCR プライマー配列

IE-1/F 5' -gatggagtcctctgccaaga-3'

IE-1/R 5' -aaggcgccagtgaatttct -3'

RT-PCR 条件

RT 50°C30分

Denature94°C2分 1 cycle

PCR 94°C15秒、59°C30秒、72°C20秒
40cycle

②nested PCR プライマー配列

2nd/F

5' -ccaaggccaagacgttctctgcagacta-3'

2nd/R

5' -tgctcettgattctatgccgcacca-3'

nested PCR 条件

95°C10分 1 cycle

95°C15秒、58°C30秒、72°C10秒
20cycle

UL89

①RT-PCR プライマー配列

UL89/F 5' -tgatgaaggtgggcttgtg-3'

UL89/R 5' -cgtgtcgcagtttgtgct-3'

RT-PCR 条件

RT 50°C30分 Denature94°C2分 1
cycle

PCR 94°C15秒、59°C30秒、72°C30秒
40cycle

②nested PCR プライマー配列

2nd/F 5' -tggtggacgatatgaagatg-3'

2nd/R 5' -gtggtcgagaacaaaggaca-3'

nested PCR 条件

95°C10分 1 cycle

95°C15秒、55°C30秒、72°C30秒
20cycle

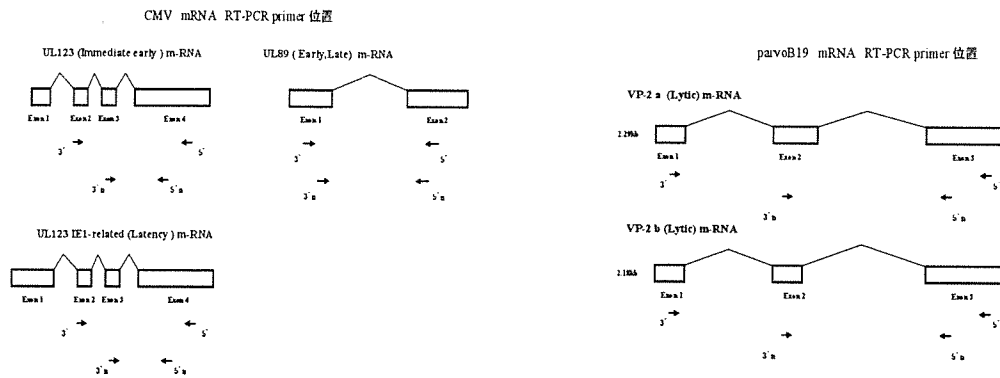


Fig. 2 CMV mRNA RT-PCR primer の位置

Fig. 3 parvovirus B19 mRNA RT-PCR primer 位置

Parvovirus B19 遺伝子 locus として Spliced virus capsid2 protein (VP-2) gene を設定し、これらをもとに RT-PCR および nested PCR プライマーを設計した (Fig. 3)。

VP-2

①RT-PCR プライマー配列

VP-2/F

5' -tttctctggactttcttgctgt-3'

VP-2/R

5' -aactgaagtcacgttggtatt-3'

nested PCR プライマー配列

RT-PCR 条件

RT 50°C30 分

Denature 94°C2 分 1 cycle

PCR 94°C15 秒、53°C30 秒、72°C30 秒
40cycle

②nested PCR プライマー配列

2nd/F 5' - agtttctctccgaagttgtagc-3'

2nd/R 5' -tctgaggcgttgtaagcg-3'

nested PCR 条件

95°C10 分 1 cycle

95°C15 秒、55°C30 秒、72°C30 秒 20cycle

内部コントロールとして全ての細胞について β -actin mRNA の検出を行った。使用したプライマーは β -actin /F:5' -cttccttctctggcat-3'、 β -actin /R:5' - tcttcattgtgctgggt -3' で、RT-PCR 条件は RT で 50°C30 分、Denature で 94°C2 分、PCR で 94°C15 秒、59°C30 秒、72°C30 秒を 40cycle で行った。RT-PCR 試薬は SuperScript III OneStep (Invitrogen) を使用し、結果について 2% agarose gel で電気泳動を行い確認した。

C. 研究結果

1. 総細胞増殖能の評価

12 日間の *ex vivo* 増幅培養で総細胞数は平均 350 倍程度に増幅された。各ウイルスをスパイクした場合とネガティブコントロールとしてウイルスを添加しなかった場合での総細胞数増幅率に有意な差は見られなかった (Fig. 4)。増幅前調製した細胞の 77% に CD34 の発現が認められ、培養 7 日目と 12 日目では各々 16%、10% であった。総細胞増幅率と CD34 発現率から CD34+/CD45+ 細胞分画の増幅率を算定し比較したところ有意な差は見られなかった (Fig. 5)。

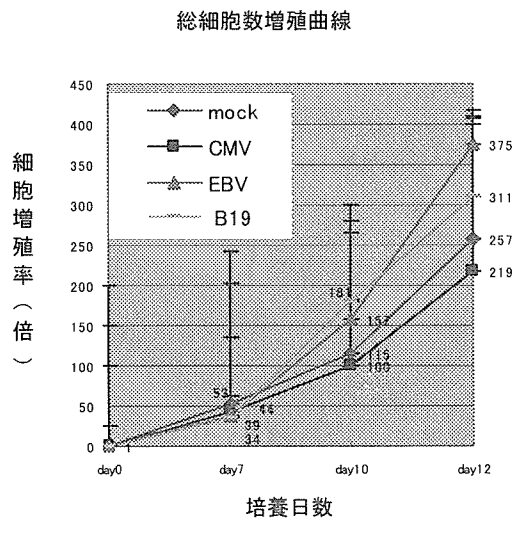


Fig. 4 総細胞数増幅率

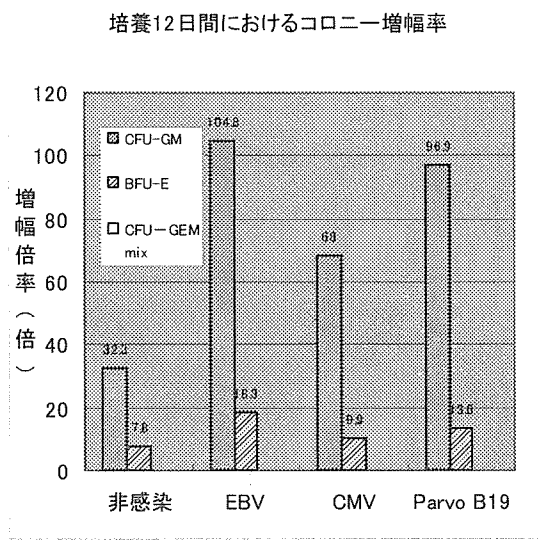


Fig. 7 総コロニー増幅率

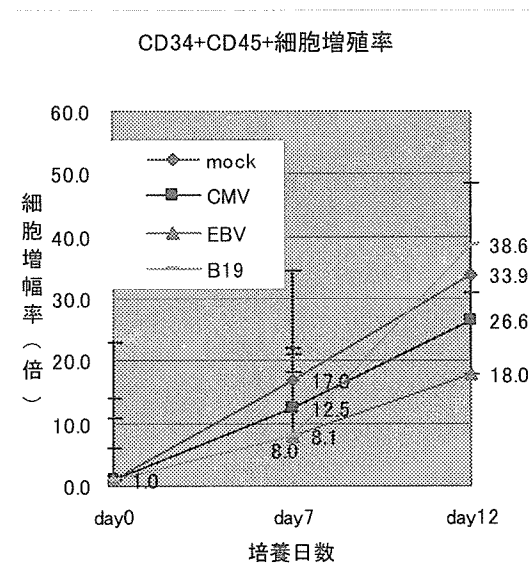


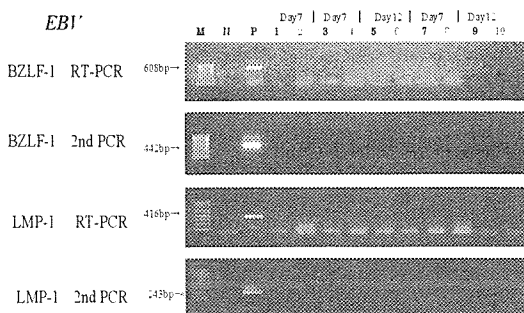
Fig. 5 CD34+/CD45+細胞分画の増幅率

2. コロニー形成能の評価

本培養系でのコロニー形成細胞の増幅率をコロニーの種類別に算定し、スパイクしたウイルス別に比較した。EBV、CMV、parvovirus B19 をスパイクした条件で CFU-GM、BFU-E、CFU-GEM mix のコロニーの形成阻害は認められなかった (Fig. 6)。また総コロニー増幅率について示した (Fig. 7)。

3. RT-PCR によるウイルス mRNA の検出

増幅培養 7 日目、12 日目の細胞の RNA より 1st step として RT-PCR、2nd step として 2nd PCR を行い各ウイルスの mRNA 発現を検討した。EBV BZLF-1、LMP-1 の mRNA は培養 7 日目、12 日目で 2nd PCR でバンドが確認されなかった (Fig. 8 上段)。CMV IE-1、UL-89 の mRNA も同じく培養 7 日目、12 日目で 2nd PCR でバンドが確認されなかった (Fig. 8 中段)。parvovirus B19 vp-2mRNA の発現が培養 7 日目で見られ、12 日目でより強い発現が見られた (Fig. 8 下段)。



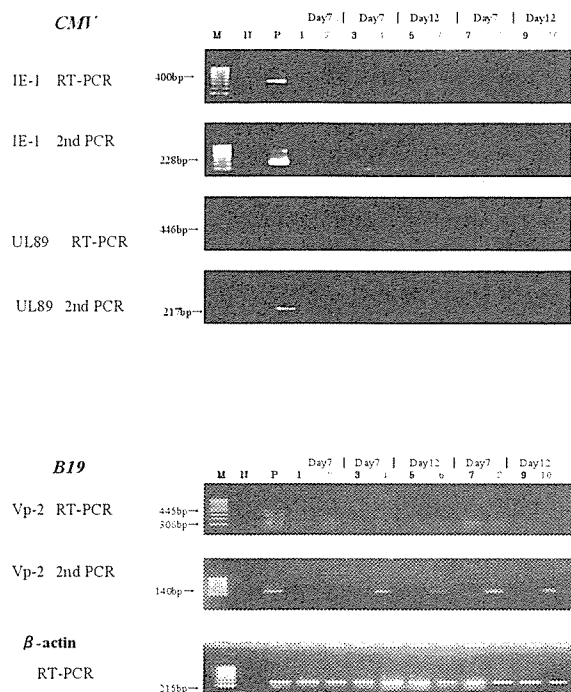


Fig. 8

M : 100base ladder marker

N : negative control

1, 3, 5, 7, 9 : ウイルスをスパイクしなかった細胞
2, 4, 6, 8, 10 : EBV、CMV、B19 をスパイクした細胞

D. 考察

RT-PCR より本培養系においてエリスロウイルス属 parvovirus B19 が増幅した細胞に感染することが示された。B19 レセプターである P 抗原は赤血球膜表面抗原とも呼ばれ、赤血球系前駆細胞、巨核球、血小板その他多くの組織に発現している⁹。B19 が自己複製するためには宿主側の活発な有糸分裂を必要とするため、B19 は赤芽球系など非常に狭い範囲の細胞に選択的に感染していることが分かっている。しかし急性 B19 感染症では血液や扁桃腺由来の単核球より B19 が検出され、貧血のみならず P 抗原を細胞表面に発現しないリンパ球や顆粒球が減少する症例

が報告されている。このことから B19 は P 抗原陽性 erythroid 系細胞に親和性を持つが、non erythroid 系細胞に対しても感染が成立する。それゆえ B19 が組織中ほどの程度存在するかは分かっていない。以上の知見より本培養系において B19 が感染した細胞種は不明である。総細胞増幅率、CD34 陽性細胞増幅率、BFU-E コロニー増幅率、総コロニー増幅率については非感染細胞と比較して有意な差が見られなかった。このことから培養 12 日目の時点で細胞毒性を持つ非構造ウイルス蛋白が発現していない段階である可能性が考えられる。今後蛍光抗体法やギムザ染色などの組織学的な手法を用いて、B19 感染細胞について詳細な解析を行う必要がある。

ヘルペスウイルス科に分類される EBV、CMV については本培養系の細胞に感染する可能性は否定された。EBV レセプターである CD21 は成熟 B 細胞、末梢血 T 細胞や胸腺 T 細胞、脳の神経細胞に発現していることが分かっており、本培養系で増幅された細胞は 12 日間の培養で CD21 を発現しなかったことが考えられる。今回のフローサイトメトリーによる lineage marker の解析においても本培養系の細胞は 12 日間で 90%以上が CD14 (骨髄単球系細胞) を発現しており、CD19 (B 細胞) 及び CD3 (成熟 T 細胞、胸腺細胞) を発現しなかった。

CMV レセプターのひとつとされている EGFR は多くの上皮組織で発現しており、特に重層又は偽重層上皮の基底膜及び、扁平上皮で多く発現している。また最近 CMV の co-receptor として $\alpha v \beta 3$ integrin が報告されており CMV の細胞指

向性と EGFR 及び $\alpha v \beta 3$ integrin 発現との関係が示唆されている。本培養系で増幅された細胞は 12 日間の培養で EGFR 及び $\alpha v \beta 3$ integrin を発現しなかったと考えられる。

本研究より *ex vivo* 増幅臍帯血 CD34 陽性細胞に B19 が感染し、ウイルスの複製・増殖が起こることが示された。このことから *ex vivo* 増幅臍帯血移植後、免疫が回復するまでの期間に B19 感染症のハイリスクになることが予想される。細胞治療・再生医療などに利用する細胞・組織で B19 否定試験と汚染の可能性を排除することの必要性が裏づけられた。現在 B19 感染細胞の同定のため蛍光抗体法による検出条件の検討を行っている。本研究により開発したウイルススパイク試験法は汎用性があり、他の再生医療・細胞治療実用化への貢献が期待できる。

E. 結論

Ex Vivo 造血幹細胞増幅系への CMV, EBV, PVB19 のスパイク試験を行なった。その結果、EBV, CMV は感染しなかったが、PVB19 は感染し、ウイルスの mRNA が検出された。また、PVB19 を含め 3 種類のウイルスはいずれも細胞増殖、分化能に顕著な影響を与えなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 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、梶原道子：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 53 回日本輸血学会総会 (2005/5/26 浦安)

2. 安富英理子、清水則夫、渡辺健、水上美樹、伊藤仁也、山本興太郎： *Ex vivo* 増幅臍帯血 CD34 陽性細胞に対するウイルススパイク試験法の開発 第 5 回日本再生医療学会総会 (2006/3/8 岡山)

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（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

2. 品質管理法の確立

2-3 神戸バイオメディカル創造センターにおける品質管理試験の立ち上げ

分担研究者：島津 光伸

（株式会社三菱化学ビーシーエル研究開発部長）

研究協力者：松本 浩、島田康司

（株式会社三菱化学ビーシーエル研究開発部）

研究要旨

Ex vivo 増幅臍帯血移植を臨床応用化するにあたり、実際の製造工程に連動した品質管理試験体制の整備が必要である。我々は、*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神戸バイオメディカル創造センター（以下BMA）内に、感染性否定試験を実施する品質管理施設を整備してきた。

本年度は、*Ex vivo* 増幅臍帯血サンプルを測定し、検出感度や添加回収率等の精度管理基礎データを蓄積した。また、無菌試験を補完する方法として β -D-グルカン試験を検討した。

A. 研究目的

1. 品質管理試験（感染性否定試験）の基礎データ収集

昨年度整備した *Ex vivo* 増幅臍帯血品質管理試験（感染性否定試験）SOP に従い、精度管理上の参考データとするために、*Ex vivo* 増幅臍帯血サンプルを測定し、データを蓄積した。

2. β -D-グルカン試験の検討

医薬品の無菌性は培養を基本とした無菌試験により確認される。しかしながら、*Ex vivo* 増幅臍帯血のような新鮮な細胞を主材料とする医薬品では、試験に供する材料の長期保存が困難である為、無菌試験の結果が得られる前に増幅臍帯血を投与することになり、試験の目的が達成されない。そこで、無菌試験法を補完する方法として真菌細胞壁成分である β -D-グルカン試験法を検討した。

B. 研究方法

1. 品質管理試験（感染性否定試験）の基礎データ収集

（1）マイコプラズマ否定試験の検出感度

マイコプラズマ遺伝子が検出されなかった *Ex vivo* 増幅臍帯血細胞およびその培養上清各 4 ロットから抽出した DNA に、マイコプラズマ遺伝子組み換えプラスミド DNA を PCR チューブ当たり 10 又は 50 コピー添加し、その検出の有無をもって PCR 反応の検出感度を評価した。

（2）ウイルス否定試験の検出感度

RNA ウイルスとして HCV、HIV-1、HTLV-1、

DNA ウイルスとして HBV、ParvovirusB19 および、HIV-1、HTLV-1 の各 provirus、ヘルペスウイルスとして CMV を対象とした。これらいずれのウイルスも検出されなかった *Ex vivo* 増幅臍帯血細胞浮遊液およびその培養上清各 4 ロットから抽出した DNA 或いは cDNA に、ウイルス遺伝子組み換えプラスミド DNA を PCR チューブ当たり 10 又は 50 コピー添加し、その検出の有無をもって PCR 反応の検出感度を評価した。再活性化が問題となる CMV については他のウイルスと同様に組み換えプラスミド DNA の添加を行ない、検出感度を評価すると共に、TaqMan 法による測定を行い、その定量の精度を確認した。

（3）エンドトキシン試験の添加回収率

5 倍希釈した *Ex vivo* 増幅臍帯血細胞浮遊液に原液換算濃度で 0.25 EU/mL、0.12 EU/mL (*Ex vivo* 増幅臍帯血細胞の品質規格値)、0.05 EU/mL となるようにエンドトキシン標準品を添加し、その回収率を確認した。

2. β -D-グルカン試験の検討

β -D-グルカン測定試薬ファンギテック® G テスト MK 主反応試薬（生化学工業株式会社）及びウェルリーダー-SK603 を用いたカイネティック比色法による β -D-グルカン測定法を導入し、ファンギテック® G テスト MK β -D-グルカン標準品（生化学工業株式会社）を用いて測定精度を確認した。また、*Ex vivo* 増幅臍帯血試料に添加した β -D-グルカン標準品（20pg/mL）の回収率を調べた。

C. 研究結果

1. 品質管理試験（感染性否定試験）の基礎データ収集

（1）マイコプラズマ否定試験の検出感度

PCRにより、*Ex vivo* 増幅臍帯血細胞（ 6.6×10^3 細胞）及びその培養上清（10 μ L）由来 DNA に人為的に添加したマイコプラズマ遺伝子組み換えプラスミド（10 又は 50 コピー/PCR tube）由来 DNA 断片を検出することができた。

（2）ウイルス否定試験の検出感度

PCRにより、*Ex vivo* 増幅臍帯血細胞（ 6.6×10^3 細胞）及びその培養上清（10 μ L）から抽出した DNA 又は cDNA に人為的に添加したウイルス遺伝子組み換えプラスミド（10 又は 50 コピー/PCR tube）由来 DNA 断片を検出することができた。

CMV 遺伝子組み換えプラスミドを PCR tube 当たり 10 copies 添加した細胞サンプルの測定値は 5.7~19.5 copies、培養上清は 7.8~18.4 copies であった。50 copies 添加した細胞サンプルの測定値は 31.9~79.5 copies、培養上清 25.6~69.0 copies であった。

（3）エンドトキシン試験の添加回収率

Ex vivo 増幅臍帯血細胞浮遊液 5 ロットの添加回収試験結果を以下に表す。

添加濃度	回収率
0.25 EU/mL	88.6~57.0%
0.12 EU/mL	78.8~52.1%
0.05 EU/mL	63.0~36.6%

高濃度 0.25 EU/mL 及び規格値 0.12 EU

/mL の添加回収率は第十四改正日本薬局方エンドトキシン試験法の適格基準（回収率：50~200%）を満たした。一方、低濃度（0.05 EU/mL）では昨年度と同様に回収率が 50%以下となる場合（5 例中 3 例）があった。

2. β -D-グルカン試験の検討

（1）測定精度

β -D-グルカン標準品 3.9、10、20、100、250 及び 500 pg/mL を日差 3 測定行い、作成した検量線の相関係数はいずれも 0.980 以上であった。

併行精度は 10、20 及び 500 pg/mL の 3 点について同時 3 測定日差 3 測定行い、CV は 1.7~18.1% であった。また、添加回収試験時に測定した試験用水（ブランク）の同時 n=6 日差 n=12 の標準偏差から算定した理論上の検出限界は 0~3.8 pg/mL であった。

（2）*Ex vivo* 増幅臍帯血試料への添加回収試験

Ex vivo 増幅臍帯血細胞培養開始日、7 日目、最終日の各培養液 4 ロットの添加回収率は 90~120% であった。

D. 考察

1. 品質管理試験（感染性否定試験）の基礎データ収集

（1）マイコプラズマ否定試験の検出感度

昨年度の検討の範囲内（4 例）では、PCR チューブ当たり 10 コピーのマイコプラズマ遺伝子組み換えプラスミド DNA が全例検出されていたが、本年度の検討で

は10コピーが検出されない例もみられた（細胞：4例中3例、培養上清4例中2例）。検出された添加プラスミドのコピー数から算定したマイコプラズマの検出感度は150-750 copies/10⁵ cells (*Ex vivo* 増幅臍帯血細胞)、1000-5000 copies/mL (培養上清)であった。

(2) ウイルス否定試験の検出感度

検出された添加プラスミドのコピー数から算定したウイルスの検出感度は150-750 copies/10⁵ cells (*Ex vivo* 増幅臍帯血細胞)、1000-5000 copies/mL (培養上清)であった。昨年度の検討時の検出感度が再現され、試験方法が安定していることが確認された。

CMV 遺伝子組み換えプラスミドを PCR tube 当たり 10 copies 添加した時の測定精度は細胞サンプルで 13.3±14.0 (平均±2SD) copies、培養上清では 11.1±10.0 (平均±2SD) copies であった。50 copies 添加したサンプルの測定精度は細胞サンプルで 47.5±44.5 (平均±2SD) copies、培養上清では 49.0±38.2 (平均±2SD) copies であった。

(3) エンドトキシン試験の添加回収率

昨年度の検討時と同様、低濃度域では添加回収率 50%を下回る例が散見されたが(5例中3例)、規格値濃度(0.12EU/mL)以上では問題が無く、試験方法が安定していることが確認された。

2. β-D-グルカン試験の検討

(1) 測定精度

相関係数や併行精度は、測定原理が類

似したエンドトキシン試験法の測定方法と同等であり、特に問題となる事項を認めなかった。

(2) *Ex vivo* 増幅臍帯血試料への添加回収試験

Ex vivo 増幅臍帯血細胞培養液に反応干渉作用は認められず(添加回収率 90~120%)、測定可能と判断した。

【β-D-グルカン試験の課題】

β-D-グルカンにはエンドトキシンのような規格値は無く、独自に検討する必要がある。現在、規格値の設定を最終目標として、まず、無菌試験が陰性であったサンプルを用いて *Ex vivo* 増幅臍帯血細胞培養液のバックグラウンドレベルデータを蓄積中である。

1. *Ex vivo* 増幅臍帯血の実測定を行い、基礎データを蓄積した。

2. 無菌試験を補完する方法として、β-D-グルカン試験法を検討した。*Ex vivo* 増幅臍帯血中のβ-D-グルカン測定は可能であった。しかし、品質検査に用いるためには規格値の設定が必要である。

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（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

4. 臍帯血 DLI に向けた培養法および品質管理法の開発

4-1 免疫不全マウスを用いた活性化 CD 4 輸注療法の有効性、安全性の評価

分担研究者：伊藤 仁也

（先端医療センター 血液再生研究グループ 主任研究員）

研究協力者：鹿村 真之

（先端医療センター 血液再生研究グループ 客員研究員）

研究要旨

我々は免疫不全マウスである NOD / Ltz / SCID を用いて、ヒト細胞をマウスに生着させ、HLA 拘束性の免疫反応を見ることができると高い汎用性の高い動物モデルを作製した。このモデルマウスを用い、臍帯血活性化 T 細胞の抗腫瘍効果、GVHD 等の副作用の検討を行い、臍帯血 DLI の実現に向けた *in vivo* での有効性及び安全性の評価を行った。

今回の検討において、臍帯血活性化 T 細胞は成人末梢血活性化 T 細胞と同等の抗腫瘍効果を示し、活性化することにより臍帯血 T 細胞においても特異的免疫反応を獲得できる可能性が示唆された。また、CD 4 陽性細胞に純化した細胞を輸注することにより、GVHD を軽減できる可能性も示された。

A. 研究目的

近年、臍帯血移植の増加とともに移植後感染症や再発などの問題もクローズアップされてきている。移植後の再発及び Epstein Barr Virus 関連リンパ増殖性疾患 (EBV-LPD) に対してドナーリンパ球輸注療法(DLI) の有効性が報告されているが、臍帯血 (CB) 移植においては、再発後にドナーのリンパ球を採取することは不可能である。また CB 中に含まれる T 細胞は、ほとんどがナイーブ T 細胞であり、IL-2 レセプターの発現が低い、IFN- γ などの Th-1 サイトカインの産生能が低い等の特性があり、DLI の Effector cell として Graft versus leukemia (GVL) effect を惹起できるかどうか疑問がある。

我々はリンパ球を固相化 CD 3 抗体と IL-2 で刺激する活性化培養を CB に応用し、CB 活性化 T 細胞の特性について検討を行ってきた。その結果、CB 活性化 T 細胞は *in vitro* の系において T 細胞機能は成人活性化 T 細胞と変わらないことが確認された。

今回、我々は免疫不全マウスである NOD / Ltz / SCID を用いて、EBV - Lymphoblastoid Cell Line (EBV-LCL) を尾静脈から移植し、マウスに生着させ、HLA 拘束性の免疫反応を見ることができるとともに汎用性の高い動物モデルを作製した。このモデルマウスを用い、CB 活性化 T 細胞の抗腫瘍効果、GVHD 等の検討を行い、CB DLI の実現に向けた *in vivo* での有効性及び安全性の評価を行った。

B. 研究方法

1) T 細胞活性化培養

兵庫さい帯血バンクから得られた CB を実験に使用した。CB は Ficoll Paque (Amersham Biosciences) を用いて分離を行い、単核球を採取した。培養培地は RPMI 1640 +7 (日研生物医学研究所) に 10% となるよう FCS (JRH BIOCIENCES) を添加し、更に IL-2 (CHIRON) を 700 Units / mL で添加したものをを用いた。その後、OKT-3 抗体 (ヤンセン協和) で固相化した、抗 CD 3 抗体固相化フラスコに採取したリンパ球を 1.0×10^6 / mL となるように播種し、37 °C、RH 97%、CO₂ 5% のインキュベーター内で 2 週間培養した。培養開始 7 日目に OKT-3 刺激を排除し、培養液を添加し、IL-2 濃度を 350 Units / mL とした。その後、培養液を経日的に添加し最終 IL-2 濃度を 175 Units / mL とした。また、比較として成人ボランティアから採血した末梢血 (PBMC) も同様に培養を行った。

2) EBV-LCL 培養

EBV-LCL の培養は、EBV 細胞株である B 95-8 の培養上清を用いて行った。培養上清を RPMI +7 (10% FCS) に添加し、PBMC 及び CB 細胞の長期間培養を行い、EBV-LCL を作製した。

3) *in vivo* 実験

免疫不全マウスである NOD / Ltz / SCID (5W、♂) を用いて *in vivo* 実験を行っ

た。

RI を照射したマウスに尾静脈より細胞を移植し、経時的な観察及び解析を行った。マウスは PBMC 全血+EBV-LCL 同時輸注群 (A 群)、CB 全血+EBV-LCL 同時輸注群 (B 群)、CB CD 4 陽性細胞+EBV-LCL 同時輸注群 (C 群) 及び EBV-LCL 輸注群 (D 群) の 4 群とした。また、各群のマウスは 7 匹とした。PBMC、CB 全血及び CD 4 陽性細胞は 1.0×10^7 cells / mouse、EBV-LCL は 1.0×10^6 cells / mouse で輸注し、同時輸注の群では輸注直前に細胞を混合して行った。輸注後は経時的に眼窩採血、骨髓穿刺を行い、輸注 14 日目に屠殺し、病理組織染色等を行った。

C. 研究結果

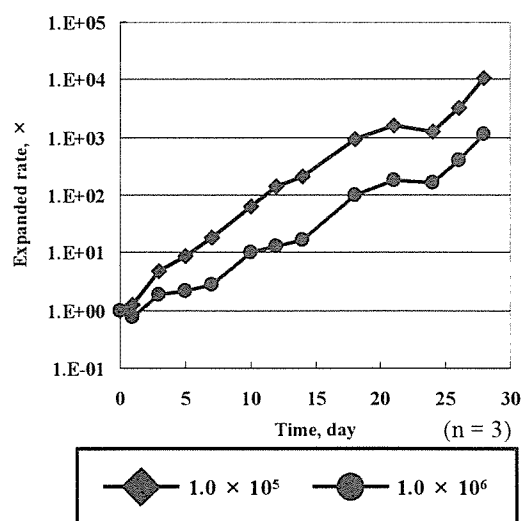


Fig. 1 EBV-LCL の増殖

1) EBV-LCL の特徴

今回樹立した EBV-LCL は 1 ヶ月の培養で 1,000 倍から 10,000 倍の増殖を示し、ダブリングタイムは約 2.4 日であった (Fig.

1)。また、この細胞の表面抗原を解析すると CD 19 の発現が 98.47% であり、B 細胞の集団であることが確認できた。特異的な表面抗原の解析を行うと、pro、pre B 細胞に見られる CD 117 (33.94%)、127 (1.91%) の発現が低く、成熟 B 細胞に見られる CD 21 (78.07%)、23 (98.97%) が発現していた。また、細胞表面上に Ig M (15.04%)、Ig D (29.92%) が確認された。このことから樹立した細胞は成熟 B 細胞であると考えられた。

これらのことから、マウス血中での EBV-LCL の指標として CD 23 を選択し、CD 23 陽性細胞率の推移からマウスの白血化及び腫瘍化の進行を推察した。

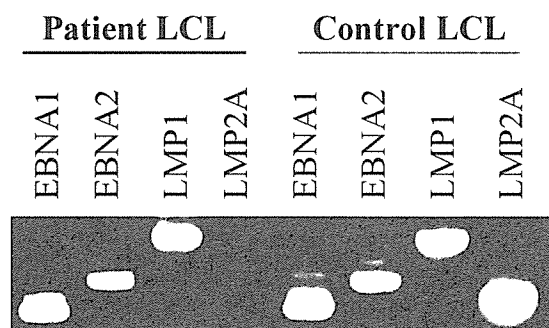


Fig. 2 Phenotype 解析

また、EBV-LCL の Phenotype 解析を行うと、EBNA 1、EBNA 2 及び LMP-1 の発現が確認され、LMP-2 は認められなかった (Fig. 2)。通常の EBV-LCL では、Latent III 型の潜伏感染であり、全ての EBNA および LMP が発現する。このことから、今回樹立した EBV-LCL は III 型とは確定できず、今後再検討が必要である。

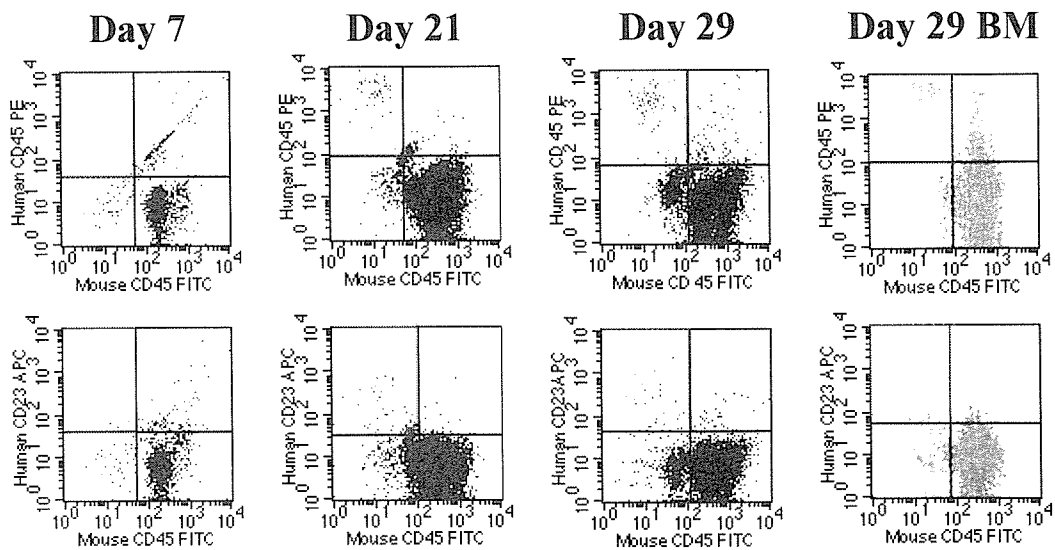


Fig. 3 マウス生体内中 CD 23 陽性細胞率の推移

2) in vivo 実験

EBV-LCL をマウスに輸注すると、マウス体重の減少が起こり、マウス血中及び骨髄液中に CD 23 陽性細胞の発現が確認された。CD 23 の発現は Day 7 で 0.82%、Day 21 で 1.51%、Day 29 マウス末梢血中で 0.45%、Day 29 骨髄液中で 2.01%。であった (Fig. 3)。以上のことからこのモデルマウスが白血化していることが確認された。また、このモデルマウスでは白血化が先行して起こり、その後腎臓や肝臓等の臓器中へ浸潤していた。肉眼での観察において肝臓、胸腺、リンパ節、肺に浸潤が見られ、肺への浸潤が見られたマウスにおいては胸水も確認された。死亡したマウスは全匹腎臓の肥大が確認された。腎臓は正常マウス腎臓と比較して約 1.5

倍であり、腎皮質を中心に腫瘍が浸潤し、髄質にまでびまん性に腫瘍化していることが確認できた (Fig. 4)。これら腫瘍に浸潤している細胞は成熟 B 細胞であり、EBER 反応陽性であった。

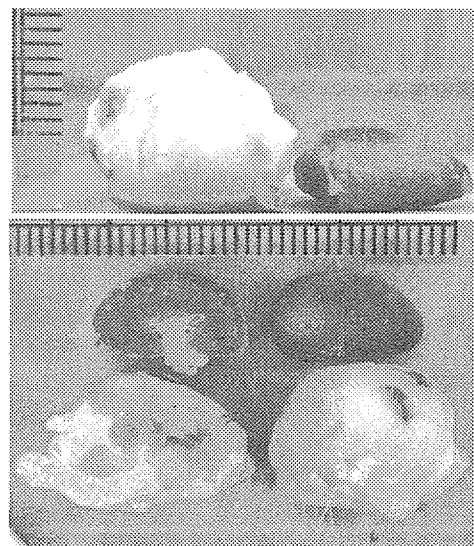


Fig. 4 マウス腎臓写真

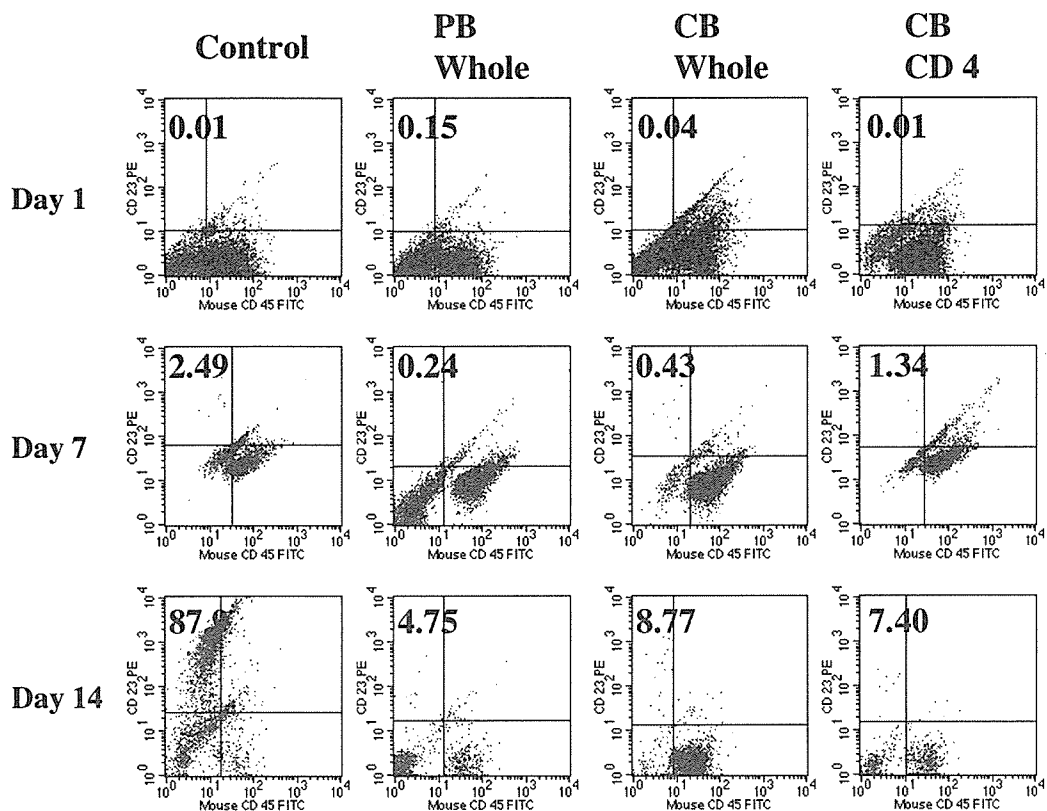


Fig. 5 各群におけるマウス生体内 CD 23 陽性細胞率の経時的変化

マウス末梢血中 CD 23 陽性細胞率の経時的変化を Fig. 5 に示す。

D 群では、輸注直後には認められなかった CD 23 は 1 週間後から発現が認められ、14 日目には 87.9%±8.70 まで上昇した。骨髓液中にも認められた (12.4%±7.47) ことから、モデルマウスは白血化されていることが確認できる。また、D 群と比較すると、A 群、B 群及び C 群において CD 23 の発現を有意に減少させていることが認められた (vs A 群 : $P < 0.001$ 、vs B 群 : $P < 0.001$ 、vs C 群 : $P < 0.001$)。このことから T リンパ球が CD 23 の増殖を抑制していることが考えられ、T リンパ球の抗腫瘍効果が示唆された。

A 群と B 群では同等の抗腫瘍効果が認められた (A 群 vs B 群 : NS)。また、B 群と C 群においても抗腫瘍効果は同等であった (B 群 vs C 群 : NS)。これらのことから PB と CB の活性化したリンパ球では抗腫瘍効果は同等であり、CD 4 に純化した細胞においても全血と同様の効果が得られることが示唆された。

CD 4 陽性率で 4 群を比較すると、T リンパ球を輸注した A 群、B 群、C 群において CD 4 陽性細胞率の上昇が認められた (Fig. 6)。

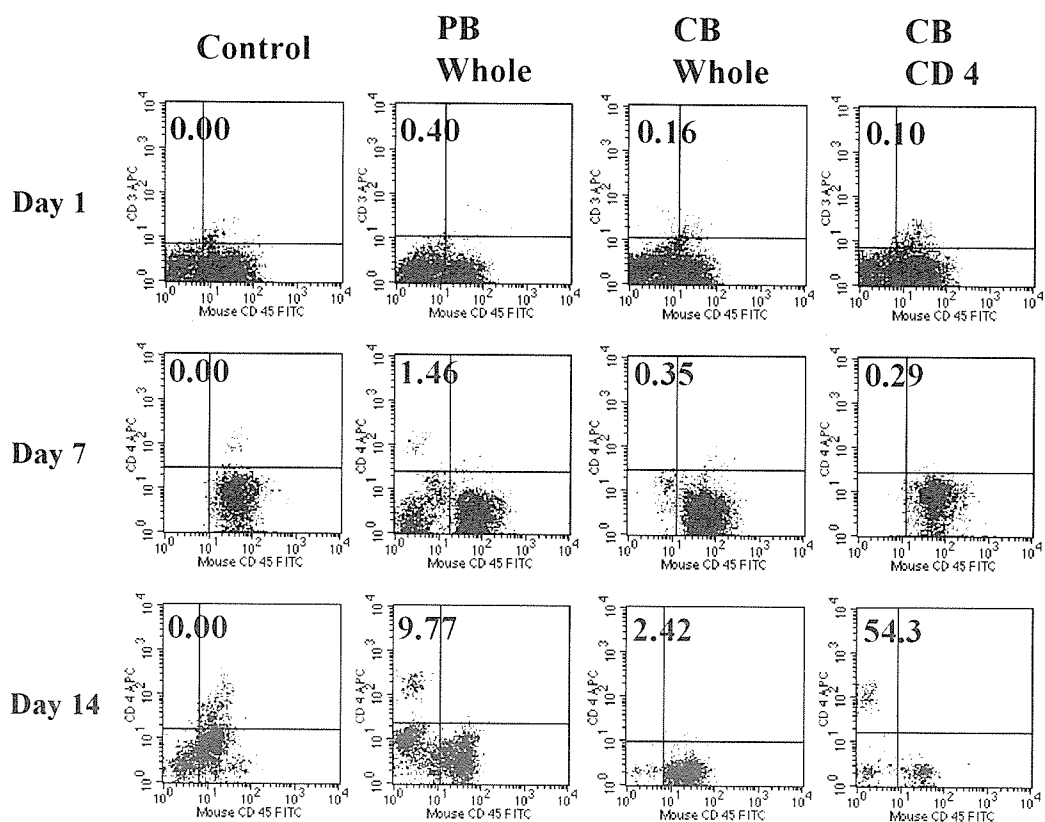


Fig. 6 各群におけるマウス生体内 CD 4 陽性細胞率の経時的変化

これより、マウス生体内で T リンパ球が増殖していることが認められた。

抗腫瘍効果を肉眼的に観察するためにマウス腎臓の病理標本を作製し、HE 染色を行った (Fig. 6)。D 群においては腎皮膜下及び血管周囲にかけての腎皮質に斑状に腫瘍の浸潤が認められた。同様に C 群においても血管周囲に同心円状に浸潤した腫瘍が認められたが、D 群と比較して浸潤範囲は明らかに狭かった。

肝臓の HE 染色により GVHD の検討を行った (Fig. 8)。B 群においては、門脈周囲にリンパ球の浸潤と piece meal necrosis が認められた (図中矢印)。また、肝小葉構造が一部破壊され、うっ血を呈してい

た。一方、C 群においてはリンパ球の浸潤が軽度であり、肝小葉構造は保たれていた。これらのことから、CD 4 細胞の選択輸注により、GVHD が軽減された可能性が考えられる。

D 群 (Control)

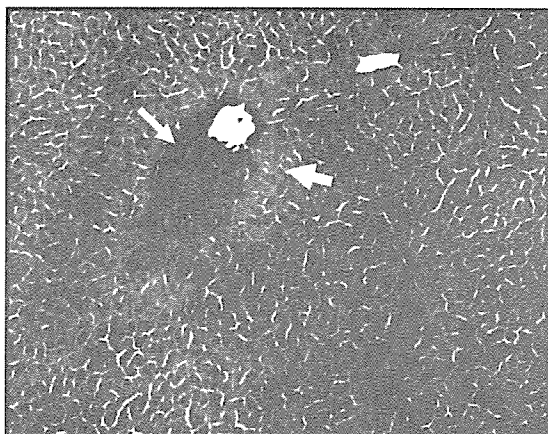


C 群 (CB CD 4)



Fig. 7 マウス腎臓 HE 染色

B 群 (CB Whole)



C 群 (CB CD 4)

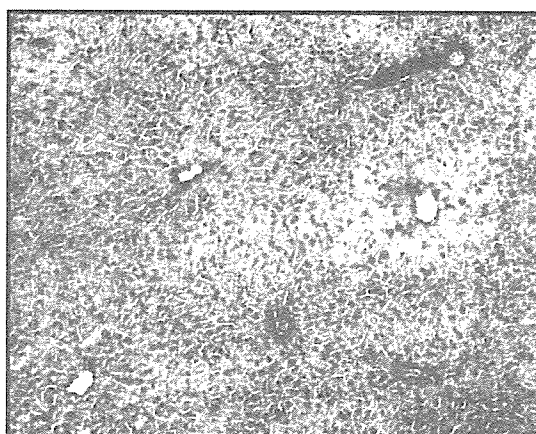


Fig. 8 マウス肝臓 HE 染色

マウス末梢血でのヒト細胞のRepertoire解析を行うと、培養細胞とは異なる発現が認められた。TCR V β 5.2、5.3、9、13.6、18、23 において発現の上昇が見られた。これらのことから、マウス生体内で T リンパ球が抗原に暴露され、それらの抗原に対応する T 細胞レパトアが増殖したことが考えられた。

そこで、マウス血中ヒト細胞の特異的免疫を確認するために、T リンパ球の EBV-LCL に特異的な IFN- γ の産生の検討を行った。

マウス血液を採血し、EBV-LCL の Tumor Lyset と 24 時間インキュベータ内で共培養にて刺激し、CD 4 陽性細胞中の IFN- γ 産生細胞を測定した。

活性化培養を行った CB リンパ球では Tumor Lyset と反応して IFN- γ を産生する CD 4 細胞は CB Whole 培養で 1.80%、CB CD 4 培養で 2.80% であった。一方、担癌 2 週間後のマウス血中に存在する CB リンパ球で同様の検討を行うと、CB Whole (B 群) で 99.5%、CB CD 4 (C 群) で 100.0% であった。また、特異的免疫反応獲得能

は B 群と C 群では同等であった。このことより、CB リンパ球をマウスに輸注することによりマウス生体内にて EBV-LCL

の抗原を認識し、CB リンパ球が EBV-LCL に特異的な免疫反応を獲得することができたと考えられる (Fig. 10)。

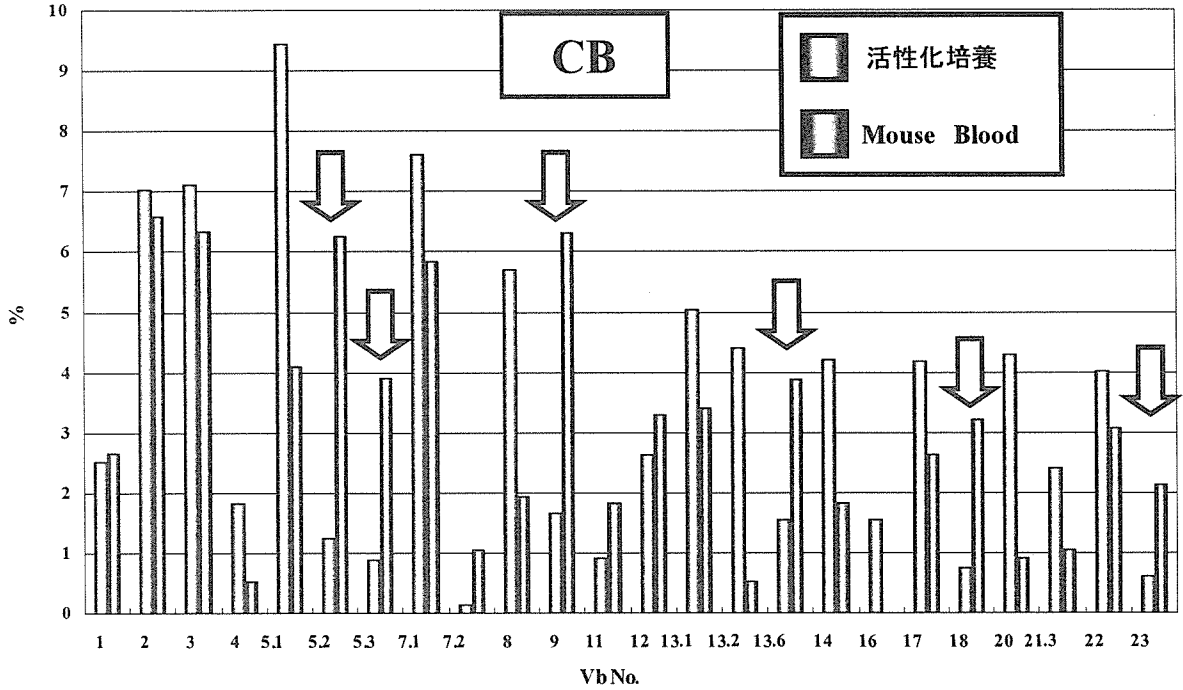


Fig. 9 TCR Vβ Repertoire 解析

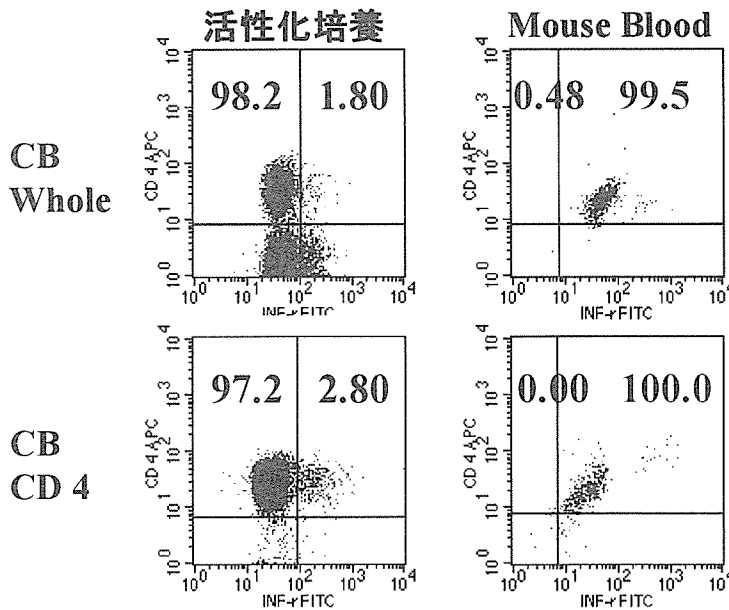


Fig. 10 EBV-LCL に対する IFN-γ 産生細胞