

## 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/ $\gamma_c^{null}$  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/ $\gamma_c^{null}$  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/ $\gamma_c^{null}$  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。また、ヒト regulatory T cell の出現も確認しており、造血幹細胞移植に伴う拒絶、GVHD 等の種々免疫反応制御に向けた基盤技術開発が可能となる。

## 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/ $\gamma_c^{null}$  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/ $\gamma_c^{null}$  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/ $\gamma_c^{null}$  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。一方、regulatory T cell に関しては、その発生機構の解析に加えて機能的な解析を行い、異種動物であるマウス、ヒト間において存在する免疫学的寛容状態の機構にせまり、ヒト造血幹細胞移植に伴う拒絶、GVHD 等の免疫現象回避に向けた方策を検討する。

## 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/ $\gamma_c^{null}$  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/ $\gamma_c^{null}$  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。これらの結果を踏まえ、マウス骨髄に、移植可能なヒト造血幹細胞が生着、増幅していることを確認するため、second transplantation の実験を行った。その結果、second transplantation によっても、上記各種組織にヒト造血細胞の出現が同様に確認され、免疫不全マウス NOD/SCID/ $\gamma_c^{null}$  が、ヒト造血幹細胞活性測定に有用であることが、再確認された。また、Fas 抗体による劇症肝炎モデル、CC14 による慢性肝炎モデル等、組織障害の加わった肝臓において、移植ヒト細胞の肝細胞への分化を確認した。さらに、免疫組織染色により、これらの細胞がヒトアルブミンを産生し、機能的にもヒト肝細胞として成熟していることが確認された。ヒトアルブミンは、マウス血清中において ELISA 法を用いて測定可能量産生されており、治療基盤技術開発の面よりも、有用なシステムであることが示された。なお、ヒト細胞の肝細胞への分化は、ヒト細胞とマウス細胞との融合により生成されることが明らかとなった。今後、移植ヒト造血細胞が、どのような分子生物学的機構を介して肝細胞への分化能を獲得するのか、検討の余地を残している。一方、このマウス末梢血には、ヒト

CD4+CD25+ cell を認める。当初は活性型 effector T cell との認識であったが、詳細な検討により FOXP3 を発現することを見出し、抑制性 T cell の細胞機能活性を有することを確認した。

#### D. 考察

免疫不全マウス NOD/SCID/ $\gamma_c^{null}$  において、ヒト臍帯血 CD34+細胞よりの T 細胞を含む全血球への分化が証明された。マウス、ヒトの異種動物間において、免疫学的バリアーを超えて、ヒト血球細胞の出現が確認できたことは驚きに値する。NOD/SCID マウスと NOD/SCID/ $\gamma_c^{null}$  マウスで認める免疫障害の差異を鑑みるに、リンパ球に代表される獲得免疫系に加えて、NK 細胞などの自然免疫系が生着に大きく寄与することが明らかとなった。さらに、NOD/SCID/ $\gamma_c^{null}$  マウスに認める樹状細胞などの機能も、ヒト細胞の生着に大きく関与することが推測される。一方、造血幹細胞よりの分化の過程には、サイトカイン、接着分子等の様々な分子が寄与することが判っている。今回、免疫不全マウス NOD/SCID/ $\gamma_c^{null}$  においてヒト造血幹細胞の分化が確認されたことにより、マウス、ヒト間において分化に必須な分子は redundancy を有することが明らかとなった。また、肝障害下において、移植ヒト臍帯血のヒト肝細胞への分化が確認され、既存の造血細胞供給システムを用いた、新しい治療体系の確立が期待される。しかし、その効率性、安全性を担保するためには、その機構に関して、より一層の検討を必要とする。また、ヒト regulatory T cell の発生機構に関しては、倫理的問題等によりその解明が困難

である。今回、このモデルを用いて、説明が待たれる。また、この regulatory T cell の制御機構を明らかにすることにより、造血幹細胞移植に伴う望まれない免疫反応を回避する方策の検討が可能となる。

#### E. 結論

免疫不全マウス NOD/SCID/ $\gamma_c^{null}$  は、ヒト造血細胞の生着を許容するのみでなく、ヒト臍帯血 CD34+細胞よりの、機能的血球細胞、免疫細胞の分化をも誘導することにより、in vivo での優れたヒト造血幹細胞活性系と成りうることが明らかとなった。また、造血細胞の持つ分化可塑性も評価できるシステムであること、造血幹細胞移植に伴う免疫反応制御に向けた取り組みも可能であることも明らかとなり、NOD/SCID/ $\gamma_c^{null}$  マウスが、ヒト細胞を用いた再生医療の確立の為に必要な有効性、安全性の面より、多くの貴重な知見を提供してくれることが期待される。

#### F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

#### G. 研究発表

- 1 Umeda K, Heike T, Yoshimoto M, Shinoda G, Shiota M, Suemori H, Luo HY, Chui DHK, Torii R, Shibuya M, Nakatsuji N, Nakahata T: Identification and characterization of hemangiogenic progenitors during cynomolous monkey embryonic stem cell differentiation Stem Cells 24: 1348-1358, 2006.
- 2 Kato T, Heike T, Okawa K,

Haruyama M, Shiraishi K, Yoshimoto M, Nagato M, Shibata M, Kumada T, Yamanaka Y, Hattori H, Nakahata T.: A neurosphere-derived factor, Cystatin C, supports differentiation of ES cells into neural stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103: 6019-6024, 2006.

- 3 Tanaka H, Matsumura I, Itoh K, Hatsuyama A, Shikamura M, Satoh Y, Heike T, Nakahata T, Kanakura Y: HOX decoy peptide enhances the ex vivo expansion of human umbilical cord blood CD34+ hematopoietic stem cells/hematopoietic progenitor cells Stem Cells 24: 2592-2602, 2006.
- 5 Umeda K, Heike T, Nakata-Hizume M, Niwa A, Arai M, Shinoda G, Ma F, Suemori H, Luo HY, Chui DH, Torii R, Shibuya M, Nakatsuji N, Nakahata T.: Sequential analysis of  $\alpha$ - and  $\beta$ -globin gene expression during erythropoietic differentiation from primate embryonic stem cells. Stem Cells 24: 2627-2636, 2006
- 6 Shiota M, Heike T, Haruyama M, Baba S, Tsuchiya A, Fujino H, Kobayashi H, Kato T, Umeda K, Yoshimoto M, Nakahata T: Isolation and characterization of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells with myogenic and neuronal properties Exp Cell Res 313: 1008-1023, 2006.
- 7 Shinoda G, Umeda K, Heike T, Arai M, Niwa A, Ma F, Suemori H, Luo HY, Chui D, Torii R, Shibuya M, Nakatsuji N, Nakahata T.:  $\alpha 4$  integrin+ endothelium derived from primate embryonic stem cells generates both primitive and

definitive hematopoietic cells.  
Stem Cells inpress, 2007.

- 8 Suzuki K, Hiramatsu H,  
Fukushima-Shintani M, Heike T,  
Nakahata T. Efficient assay for  
evaluating human thrombopoiesis  
using NOD/SCID mice transplanted  
with cord blood CD34(+) cells Eur  
J Haematol 78:123-130, 2007

分担研究報告書

2. 品質管理法の確立

2-2 臍帯血移植後ウイルス感染症の動態に関する研究

分担研究者：清水 則夫  
(東京医科歯科大学助教授)

**研究要旨**

臍帯血移植はドナー負担がなく、適切な時期に移植を行なえる長所があるが、移植後に免疫力の回復が遅延するため、重症ウイルス感染症を発症し治療に難渋することが多い。実際、感染症が臍帯血移植における50%に達する移植関連死亡の主要な原因となっているが、その起因ウイルスに関する情報は限られており、治療法、予防用を考える上で問題となる。本研究は、臍帯血移植の重大な合併症の一つである、ウイルス感染症の頻度、出現時期、ウイルスの種類、臨床症状とウイルスゲノム量の間接的関係を経時的に測定し、臍帯血移植後のウイルス感染症の動態を明らかにすることを目的とし、ウイルス検査系の開発と臨床研究プロトコルの作成をおこなった。

## A：研究目的

近年、臍帯血移植は、骨髄移植で問題となるドナー負担がなく、ドナーの事情に配慮した移植時期の遅延の問題がなく適切な時期に移植を行なえる、などの長所があるため、臍帯血移植と骨髄移植の移植数は拮抗するまでに臍帯血移植は普及してきた。しかし、上記の長所がある反面、移植関連死亡が50%に達し、その約半数は感染症による死亡と報告されている。生着不全や拒絶が多いことや生着例でも造血幹細胞の生着が遅れることがその原因であり、移植患者の免疫力の回復が遅れることが感染症のリスクを高めている。しかし、移植後感染症の詳細な起因菌やウイルスの同定に関する研究は不十分であり、そのような情報不足が有効な予防法や治療法を確立するための大きな制約要因となっている。本研究では、臍帯血移植の重大な合併症のひとつであるウイルス感染症の頻度、出現時期、ウイルスの種類、臨床症状とウイルス量の関係を継続的に測定し、臍帯血移植後のウイルス動態を明らかにし、予防法、治療法の確立に向けた基礎資料を提供することを目的とした。

## B：研究方法

### 1. ウイルス検査検体の採取

患者から末梢血 2ml を採取し、そのうちの 200  $\mu$ L を使用した。末梢血の凍結サンプルについては解凍し、室温に戻してから処理した。

### 2. DNAウイルスの定性検査

ウイルス検査項目は、HSV1, 2, VZV, CMV, EBV,

HHV6, HHV7, HHV8, BKV, JCV, ParvoB19, ADV の 12 種類とし、インナーコントロールとして  $\beta$ -globin を使用した(結果の項を参照)。マルチプレックスPCR法により、被検ウイルスを下記A~Cの3つの反応系で出した。なお、ADV はサブタイプが多数存在するため、1つの反応系で検出を行った。

A: HSV-1, -2, VZV, CMV, HHV-6, ParvoB19, BKV, JCV

B: EBV, HHV-7, HHV-8

C: ADV(サブタイプ1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 16, 17, 19, 21, 28, 31, 34, 40, 48を検出可能)

PCR装置：反応を迅速に行なうため、キャピラリーPCR装置ライトサイクラー(ロシュ社)を使用した。

PCR試薬：AccuPrime Taq DNA Polymerase System、Invitrogen社

プライマー、プローブ(FITC標識プローブとLCRed標識の2種類のハイブリプローブを使用)の配列を以下に示す。

HSV1,2

F-gctcgagtgcgaaaaaacgttc

R-tgcggttgataaacgcgcagt

LCRed640-cttgccccgcagatgacgcc-p

g'gcaccagatccacgcccttgatgagc-FITC

VZV

F-tgtccttagaggaggtttatctg

R-catcgtctgtaaagacttaaccag

LCRed705-aagttcgcggtataattgt-p

gggaaatcgagaaaccacccatccgac-FITC

CMV  
F-taccctatcgctgtgttc  
R-ataggaggccaccgtattc  
LCRed705-acaccacttatctgctggcagc-p  
cgtttcgctgtagctacgttacat-FITC

EBV  
F-cgcataatggcggacctag  
R-caaacaagcccactcccc  
LCRed640-aaccatagaccgcttctctg-p  
aaagatagcagcagcgcagc-FITC

HHV6  
F-acccgagagatgattttgcg  
R-gcagaagacagcagcgagat  
LCRed640-gggtcatttatgttagacggg-p  
taagtaaccgttttcgcca-FITC

HHV7  
F-gaaaaatccgcataatagc  
R-atggaacacctattaacggc  
LCRed705-ttgtgaaatgtgttcgataggc-p  
gccataagaacaggtacagacattgtca-FITC

HHV8  
F-agccgaaaggattccaccat  
R-tccgtgttctactcagccag  
LCRed640-tgatctatataccaccaatgtgtcattatg-p  
ccggatgatgtaaatatggcgggaac-FITC

parvoB19  
F-ccgccaagtacaggaaaaac  
R-cagctacactccacgca  
LCRed640-caccaggtagatcaaaaaatgcgtgga-p  
gcaaaagccattttaggcgggca-FITC

BKV, JCV

F-cacttttggggacctagt  
R-ctctacagtagcaagggatgc  
LCRed705-agtagctgaaattgctgctggagaggctgct-p  
tctgaggctgctgctgccacaggatttt-FITC

PCR反応：95℃2分処理の後、95℃2秒, 58℃15秒, 72℃15秒の反応を40サイクル行なった。  
検出操作：PCR反応終了後、メルティング解析を行ない、各ウイルスに対応したTm値のピークの有無からウイルスゲノムの存否を判定した（Tm値は以下の通り：A HSV-1;57℃, HSV-2;70℃, VZV 62℃, ParvoB19;65℃ [LCRed 640で検出], CMV;61℃, HHV-6;54℃, BKV;66℃, JCV ; 70℃ [LCRed705で検出] B EBV ; 63℃ [LCRed 640で検出], HHV-7 ; 58℃, HHV-8 ; 63℃ [LCRed 705で検出], β-グロビン ; 52℃ [LCRed 640で検出] )

### 3. DNAウイルスの定量検査

定性検査で陽性となった場合にはウイルスゲノムのコピー数をリアルタイムPCR法により定量する。

PCR装置：Prism 7300（アプライドバイオシステムズジャパン）

PCR反応：95℃10分処理の後、95℃15秒, 60℃60秒の反応を45サイクル行なった。

PCR試薬：AmpliTaqGold&Gold Buffer（アプライドバイオシステムズジャパン）

プライマー：配列を以下に示す。

プローブ：Taqman Probeを使用。配列を以下に示す。

ADV

F- gacatgacttttgagggtgga

R- tcgatgacgccgctg

P-FAM-cccattggaYgagcccaccct-TAMRA

HSV1,2

F- cgcatcaagaccacctctc  
R- gctcgcaccacgcga  
P- FAM-tggcaacgcggcccaac-TAMRA  
P- JOE-cggcgatgcgccccag-TAMRA

VZV  
F- aacttttacatccagcctggcg  
R- gaaaacccaacacctctcgag  
P- FAM-tgtctttgacggaggcaaacacgt-TAMRA

CMV  
F- catgaaggtctttgccagtag  
R- ggccaaagtgtaggctacaatag  
P- FAM-tggcccgtaggatccacactagg-TAMRA

EBV  
F- cggaagccctctggacttc  
R- ccctgtttatccgatggaatg  
P- FAM-tgtacacgcacgagaatgcgcc-TAMRA

HHV6  
F- gacaatcacatgcctggataatg  
R- tgtaagcgtgtggaatggactaa  
P- FAM-agcagctggcgaaaagtgtgtgc-TAMRA

HHV7  
F- cggaagtcactggagtaatgacaa  
R- ccaatcctccgaaaccgat  
P- FAM-ctcgcagattgcttgtffccatg-TAMRA

HHV8  
F- cctctggccccattcattg  
R- cgtttccgctgtggatgag  
P- FAM-ccggcgtcagacattctcacaacc-TAMRA

ParvoB19  
F- gggtttcaagcacaagYagtaaaaga

R- cggYaaacttccttgaaaatg  
P- FAM-cagctgccctgtgg-MGB

BKV  
F- ggaaagtctttagggtcttctaccttt  
R- gatgaagatttattYtgccatgaRg  
P- FAM-atcactggcaaacat-MGB

JCV  
F- ggaaagtctttagggtcttctaccttt  
R- gaagacctgtttgccatgaaga  
P- FAM-atcactggcaaacat-MGB

#### 4. 検査系の感度測定法

##### (1) スタンダード作成

各種ウイルスの PCR 産物をクローニングしシーケンスにて配列確認した後、制限酵素 ScaI にて消化、一本鎖にしてフェノールクロロホルム処理し、エタノール沈殿後、OD 値測定。電気泳動の結果と OD 値から濃度算出し、コピー数をもとめ、ロシュ社製 MS2RNA 10ng/ul 溶液にて段階希釈して作成した。

##### (2) 特異性の確認

各種ウイルス Primer、Probe の相同性を GenBank にて検索し特異性を確認した。また引用した文献にて特異性が調べられている場合はそれをもって替えた。陽性コントロールおよび各種ウイルスが検出された臨床検体を用いて、お互いの交差反応性有無の確認をした。

#### C：結果

##### 1. ウイルス検査項目の選定

これまでの報告により、移植後ウイルス感染症として重要と考えられているウイルスの中から、下記の DNA ウイルスを選定した。

HSV-1 (I 型単純ヘルペスウイルス)：



HSV-2(II型単純ヘルペスウイルス)  
 VZV (水痘、帯状ヘルペス)  
 CMV (サイトメガロウイルス)  
 EBV (エプスタイン・バールウイルス)  
 HHV-6 (ヒトヘルペスウイルス6)  
 HHV-7 (ヒトヘルペスウイルス7)  
 HHV-8 (ヒトヘルペスウイルス8)  
 JCV (JCウイルス)  
 Parvovirus B19 (パルボウイルスB19型)  
 ADV (アデノウイルス)

## 2. ウイルス定性検査の検出感度測定

各種ウイルススタンダードを用いて感度を測定したところ、すべての検査対象ウイルスを50コピー/キャピラリー以上の感度で検出可能だった。

## 3. ウイルスDNA定量の検出感度測定

各種ウイルススタンダードを用いて感度を測定したところ、すべての検査対象ウイルスを10コピー/Tube以上の感度で検出可能だった。

## 4. 特異性の確認

GenBankのBRAST検索により、検査対象ウイルス間の交差反応性が無いことを確認し、陽性コントロールおよび各種ウイルスが検出された臨床検体を用いて、お互いの交差反応性が無いことを確認した。

交差反応性結果表

	Titer(Copy)	HSV1	HSV2	VZV	CMV	EBV	HHV6	HHV7	HHV8	BKV	JCV	B19	ADV
HSV1	2E+6/ml	○	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
HSV2	1E+9/ml	X	○	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
VZV	1E+7/ml	X	X	○	X	X	X	X	X	X	X	X	X
CMV	2E+2/ugDNA	X	X	X	○	X	X	X	X	X	X	X	X
EBV	2E+3/ugDNA	X	X	X	X	○	X	X	X	X	X	X	X
HHV6	4E+3/ugDNA	X	X	X	X	X	○	X	X	X	X	X	X
HHV7	3E+4/ml	X	X	X	X	X	X	○	X	X	X	X	X
HHV8	1E+9/ml	X	X	X	X	X	X	X	○	X	X	X	X
BKV	1E+10/ml	X	X	X	X	X	X	X	X	○	X	X	X
JCV	2E+7/ml	X	X	X	X	X	X	X	X	X	○	X	X
B19	2E+4/ml	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	○	X
ADV	3E+4/ml	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	○

○は陽性 Xは陰性

縦軸はスパイク、横軸は検出したウイルス

## D: 臨床研究プロトコルの作製

### 1: 検査の方法について

移植前および移植後 7, 14, 21, 28, 35, 42, 56,

70, 84, 100 日目に末梢血を 2ml 採血する。

2: 対象ウイルス: (結果1を参照)

3: 臨床研究(採血および検査)のスケジュール (別表1を参照)

## E: パイロット測定

4名の移植患者について実際に検査を行なった。その結果、4名中3名でなんらかのウイルスが検出され、その内の1名からは3種類のウイルスが同時に検出された。(別表2を参照)

## F: 考察

今回作成されたマルチプレックスPCR系は、定性によって検出した後、別の配列を用いて定量を行なうため、仮に擬陽性がおきても定量で確認できるダブルチェックが可能である。偽陰性は、インナーコントロールによる確認により防止可能である。またプライマー、プローブ配列の選択に際しては、GenBankに登録されている各種ウイルスのサブタイプをできるだけ全てカバーするように配慮した。ParvoB19ウイルスに関しては、Genotype1-3が知られており、今回の系ではGenotype1のみ検出可能である。Genotype2-3をもカバーするプライマーの作成は今後の課題であるが、臨床検体から検出されるウイルスの大半はGenotype1であることが報告されているため、現時点でも検出もれの可能性は非常に低いと考えている。アデノウイルスについても疾患に関係しているサブタイプ1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 16, 17, 19, 21, 28, 31, 34, 40, 48のスタンダードをそれぞれ作成し、全てのサブタイプを十分な感度(10コピー/tube)で検出できることを確認している。現在、主要な真菌、細菌について候補を選定し、順次項目に加えていく予定である。

現在までにパイロット的に 4 名の移植後患者をモニタリングしており、3 名に、また測定回数にして 9 回中 4 回に CMV, EBV, HHV-6、BKV のいずれかのウイルスが検出され、臍帯血移植患者では持続感染ウイルスの再活性かが頻繁に起きていることがうかがえた。従来、臍帯血移植患者では、移植後の感染症が問題となるケースが多いことが知られていたが、多くのウイルスを定期的に調べ症状とウイルス量の相関を明らかにした報告はなかった。今後、作成したプロトコルに従って臍帯血移植患者におけるウイルス動態解析を行えば、臍帯血後移植後のウイルス動態に関する基礎資料となり、治療開始のタイミング決定、GVHD との鑑別診断などを行なう際の、貴重なデータとして活用できると考えている。また、本検査系により、全ての移植患者を定期的に検査すれば、移植後のウイルス感染症を早期に診断・治療することが可能

になり、移植の成功率を大きく改善することに繋がると考えている。

### G: 結論

臍帯血移植の重大な合併症の一つである、ウイルス感染症の頻度、出現時期、ウイルスの種類、臨床症状とウイルスゲノム量の関係を経時的に測定し、臍帯血移植後のウイルス感染症の動態を明らかにするため、新しいウイルス検査系の開発を行った。今後作成した臨床研究プロトコルにしたがって、データの蓄積を行なっていく予定である。

H: 健康危険情報      なし

I: 研究発表          なし

別表 1

項目	登録時	前処置開始日	移植日	観察期間					
		Day -5	Day 0	Day 28	Day 42	Day 56	Day 70	Day 84	Day 100
患者背景情報	○								
自覚症状・他覚所見		生着日まで毎日			○	○	○	○	○
バイタルサイン		生着日まで毎日			○	○	○	○	○
急性 GVHD			移植日から Day 100 まで毎週						
移植関連合併症			移植日から Day 100 まで毎週						
生着不全・拒絶			移植日から Day 42 まで						
【臨床検査】									
血液学的検査		○	生着日まで隔日		○	○	○	○	○
血液生化学検査		○	生着日まで隔日		○	○	○	○	○
尿検査		○		○					○
心電図		○			○				○
骨髄検査		○		生着日 + 7 日以内					○
免疫グロブリン		○		○	○				○
細胞表面マーカー		○		○		○			○
ウイルス検査				Day 14, 21, 28, 35, 42		○	○	○	○
染色体キメリズム		○		○		○			○

別表 2

検体	測定日				
	ウイルス (コピー数/ml)				
A1	Day54 CMV( $1.0 \times 10^6$ )	Day 61 N	Day 89 CMV( $3.0 \times 10^5$ )	Day 110 N	Day 130 N
A2	Day 19 N	Day 33 N			
A3	Day 17 CMV( $4.0 \times 10^6$ ) EBV( $6.0 \times 10^1$ ) BKV( $2.0 \times 10^2$ )				
A4	Day17 HHV-6 ( $1.0 \times 10^5$ )				

# 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

### 2. 品質管理法の開発

#### 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体制の整備

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、柳原玲

（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、先端医療センターから BMA までの検体搬送及び分析開始までの一時保存が試験結果へ及ぼす影響について評価した。結果、マイコプラズマ遺伝子検査、ウイルス遺伝子検査、エンドトキシン試験及び $\beta$ -D-グルカン試験は搬送の影響を受けないことが確認された。しかしながら無菌試験では、検体をそのまま搬送した場合に検体中の標準菌が検出できない場合があった。無菌試験用の培地に検体と菌を同時に接種すると菌は発育し、検出されることから、搬送条件下において検体中の菌の数が減少又は死滅していると考えられた。無菌試験の検体については、検出感度を低下させない対策として、試験用培地に直接サンプリングするなどの工夫が必要と考えられた。

## A. 研究目的

BMA において *Ex vivo* 増幅臍帯血の品質管理試験を実施する場合には、先端医療センター内 CPC における品質試験用検体のサンプリングから BMA における分析開始までに1時間以上のタイムラグが生じる。本研究では、BMA において品質管理試験を実施する場合の検体の搬送が、品質管理試験の結果に影響を及ぼすか否か検討した。

## B. 研究方法

### 1. マイコプラズマ遺伝子検査検体の搬送保存バリデーション

実際の製造において、マイコプラズマ遺伝子検査を実施する *Ex vivo* 増幅臍帯血培養最終日培養液に相当する検体（製造練習-08-FM）に0コピー、50コピー、100コピー及び500コピーのマイコプラズマゲノムに相当する *M. orale* 菌液を添加し、検体の搬送及び分析までの一時保存と同じ温度条件（冷蔵：4.0±3.0℃内）に0時間、6時間及び25時間置いた。前記時間の経過後に、検体を300 G×10分間の遠心により培養上清と細胞に分画し、それぞれについてマイコプラズマ遺伝子の検出を行った（各 n=3）。時間経過に伴う検出率の変化の有無をもって、搬送の影響の有無を評価した。

### 2. ウイルス遺伝子検査検体の搬送保存バリデーション

実際の製造において、ウイルス遺伝子検査を実施する *Ex vivo* 増幅臍帯血培養10日目培養液に相当する検体（製造練習-08-V10）に0コピー、50コピー、100コピー及び1,000コピーのウイルスゲノムに相当する HBV 陽性プール血清又は HCV 陽性プール血清を添加し、検体の搬送及び分析までの一時保存と同じ温度条件（冷蔵：4.0±3.0℃内）に0時間、6時間及び25時間置いた。前記時間の経過後に、検体を300 G×10分間の遠心により培養上清と細胞に分画し、それぞれについてウイルス遺伝子の検出を行った（各 n=3）。

時間経過に伴う検出率の変化の有無をもって、搬送の影響の有無を評価した。

### 3. エンドトキシン試験検体の搬送保存バリデーション

実際の製造において、エンドトキシン試験を実施する CD34 陰性画分検体及び *Ex vivo* 増幅臍帯血最終製品に相当する検体（製造練習-08-NE 及び製造練習-08-FE）に日本薬局方エンドトキシン標準品を0.12 EU/mLの濃度（希釈測定時：0.024 EU/mL）となるよう添加し、検体の搬送及び分析までの一時保存と同じ温度条件（冷蔵：4.0±3.0℃内）に0時間、5時間、23時間又は46時間置いた。前記時間の経過後に5倍希釈した検体のエンドトキシン濃度を測定し（カイネティクス比色法）、時間経過に伴う回収率の変化をもって、搬送の影

響の有無を評価した。

#### 4. $\beta$ -D-グルカン試験検体の搬送保存バリデーション

実際の製造において、 $\beta$ -D-グルカン試験を実施する *Ex vivo* 増幅臍帯血培養最終日培養液に相当する検体（製造練習-08-EXF グルカン）に  $\beta$ -D-グルカン標準品（生化学工業社製）を 20pg/mL の濃度となるよう添加し、検体の搬送及び分析までの一時保存と同じ温度条件（冷蔵：4.0±3.0℃内）に 0 時間、5 時間及び 45 時間置いた。前記時間の経過後に 5 倍希釈した検体の  $\beta$ -D-グルカン濃度を測定し（カイネティクス比色法）、時間経過に伴う回収率の変化の有無をもって、搬送の影響の有無を評価した。

#### 5. 無菌試験検体の搬送保存バリデーション

実際の製造において、無菌試験を実施する CD34 陰性画分、培養 7 日目細胞浮遊液及び *Ex vivo* 増幅臍帯血最終製品に相当する検体（CD34 陰性画分：製造練習-08-NS、製造練習-09-NS、製造練習-10-NS、培養 7 日目細胞浮遊液：製造練習-08-S7、製造練習-09-S7 及び *Ex vivo* 増幅臍帯血最終製品：製造練習-08-FS、製造練習-09-FS）に 6 種類の標準菌株（*Staphylococcus aureus*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Clostridium sporogenes*、*Bacillus subtilis*、*Candida albicans*、

*Aspergillus niger*）、を 1~100 CFU 添加し、検体の搬送及び分析までの一時保存と同じ温度条件（冷蔵：4.0±3.0℃内）に 1~7 時間以上置いた。前記時間の経過後に無菌試験用培地に検体を接種し、検体中の菌が検出（液体培養液の濁度変化）できるか否か或いは菌数（平板培養上のコロニー数）が維持されているか否かをもって、搬送の影響の有無を評価した。

### C. 研究結果

#### 1. マイコプラズマ遺伝子検査検体の搬送保存バリデーション

検体に添加した 50 コピー、100 コピー及び 500 コピーのマイコプラズマは、培養上清画分では添加直後（保存時間 0hr）に検査を実施した場合と同様、保存 6 時間後、25 時間後ともに培養上清画分に 100%（3/3）検出された。細胞画分では 500 コピーのマイコプラズマを添加した場合のみ、100%（3/3）検出された（表 1）。

表 1. 検体中のマイコプラズマの時間経過に伴う検出率の変化

保存時間	培養上清		細胞	
	添加菌数	検出率	添加菌数	検出率
0 hr	0	0/1	0	0/1
	50	3/3	50	2/3
	100	3/3	100	2/3
	500	3/3	500	3/3

6 hr	0	0/1	0	0/1
	50	3/3	50	0/3
	100	3/3	100	3/3
	500	3/3	500	3/3
25 hr	0	0/1	0	0/1
	50	3/3	50	3/3
	100	3/3	100	3/3
	500	3/3	500	3/3

## 2. ウイルス遺伝子検査検体の搬送保存バリデーション

検体に添加した50コピー、100コピー及び1000コピーのHBV又はHCVは、培養上清画分では添加直後（保存時間0hr）に検査を実施した場合と同様、保存6時間後、25時間後ともに培養上清画分に100%（3/3）検出された。細胞画分では1000コピーのHBV又はHCVを添加した場合のみ、100%（3/3）検出された（表2、表3）。

表2. 検体中のHBVの時間経過に伴う検出率の変化

保存時間	培養上清		細胞	
	添加菌数	検出率	添加菌数	検出率
0 hr	0	0/1	0	0/1
	50	3/3	50	2/3
	100	3/3	100	2/3
	1000	3/3	1000	3/3
6 hr	0	0/1	0	0/1
	50	3/3	50	2/3
	100	3/3	100	3/3
	1000	3/3	1000	3/3
25 hr	0	0/1	0	0/1
	50	3/3	50	3/3
	100	3/3	100	3/3
	1000	3/3	1000	3/3

表3. 検体中のHCVの時間経過に伴う検出率の変化

保存時間	培養上清		細胞	
	添加菌数	検出率	添加菌数	検出率
0 hr	0	0/1	0	0/1
	50	3/3	50	3/3
	100	3/3	100	3/3
	1000	3/3	1000	3/3
6 hr	0	0/1	0	0/1
	50	3/3	50	3/3
	100	3/3	100	3/3
	1000	3/3	1000	3/3
25 hr	0	0/1	0	0/1
	50	3/3	50	2/3
	100	3/3	100	3/3
	1000	3/3	1000	3/3

## 3. エンドトキシン試験検体の搬送保存バリデーション

結果を表4及び表5に示す。検体に添加したエンドトキシン標準品の回収率は時間の経過に関係なく50%（試験成立基準の下限値）以上であった。また、搬送保存時間の経過とともに大きく低下することなかった。

表4. *Ex vivo* 増幅臍帯血最終製品中のエンドトキシンの時間経過に伴う検出率の変化

保存時間	回収率
0hr	66.2%
5hr	62.5%
46hr	56.8%

表 5. *Ex vivo* 増幅臍帯血最終製品中のエンドトキシンの時間経過に伴う検出率の変化

保存時間	回収率
0hr	79.6%
5hr	70.0%
23hr	69.6%

4.  $\beta$ -D-グルカン試験検体の搬送保存バリデーション

結果を表 6 に示す。検体に添加した  $\beta$ -D-グルカン標準品の回収率は、時間の経過に関係なく 50%（試験成立基準の下限値）以上であった。しかし、搬送保存時間が 5 時間を過ぎた後に回収率が低下する傾向が認められた。

表 6. *Ex vivo* 増幅臍帯血培養最終日培養液中の  $\beta$ -D-グルカンの時間経過に伴う検出率の変化

保存時間	回収率
0hr	95.0%
5hr	90.0%
45hr	65.0%

5. 無菌試験検体の搬送保存バリデーション

(1) CD34 陰性画分

検体に標準菌 6 種を添加し（各菌種 n=3）、冷蔵にて 8 時間以上経

過した後に無菌試験培養すると *Bacillus subtilis* のみが検出されなかった（表 7）。無菌試験培地に検体と *Bacillus subtilis* を同時に接種すると菌は発育することから、CD34 陰性画分中で冷蔵に 8 時間以上置いた *Bacillus subtilis* は死滅していると考えられた。

表 7. CD34 陰性画分 8 時間保存

菌種	発育
検体 + <i>S. aureus</i>	+
検体 + <i>P. aeruginosa</i>	+
検体 + <i>C. sporogenes</i>	+
検体 + <i>B. subtilis</i>	+
検体 + <i>C. albicans</i>	+
検体 + <i>A. niger</i>	+
検体 + <i>S. aureus</i> + 8hr	+
検体 + <i>P. aeruginosa</i> + 8hr	+
検体 + <i>C. sporogenes</i> + 8hr	+
検体 + <i>B. subtilis</i> + 8hr	-
検体 + <i>C. albicans</i> + 8hr	+
検体 + <i>A. niger</i> + 8hr	+

*Bacillus subtilis* の死滅の原因を調べるため、CD34 陰性画分に標準菌 6 種を添加した直後に培養した。すると *Bacillus subtilis* はやはり発育しなかった（*Aspergillus* も菌のみの発育に比較し、発育が遅延した）。冷蔵保存の影響を調べるために生理食塩水に懸濁した *Bacillus subtilis* を冷蔵に 2 時間置いた後に、懸濁液中の菌数を調べると菌数は 10 分



の 1 に低下していた。しかし、生理食塩水中では 24℃でも 37℃でも菌数が 10 分の 1 以下に低下したことから、*Bacillus subtilis* は非栄養下では長時間保存できないと考えられた。また、検体と同時に無菌試験培地に接種した *Bacillus subtilis* を 2 時間冷蔵保存しても、菌数は 3 分の 1 以下に低下した。

(2) 培養 7 日目細胞浮遊液

検体に標準菌 6 種を添加し（各菌種 n=3）、冷蔵にて 8 時間以上経過した後に無菌試験培養するといずれの菌種も検出された。

*Bacillus subtilis* について再確認するため、検体に添加後、2 時間冷蔵保存した後に培養した。結果、菌は遅延することなく発育し、菌数も維持された。

(3) *Ex vivo* 増幅臍帯血最終製品

検体に標準菌 6 種を添加し（各菌種 n=3）、冷蔵にて 8 時間以上経過した後に無菌試験培養すると *Bacillus subtilis* のみ 3 本の培養液中 1 本が発育しなかった。保存時間を 1 時間とした場合には、菌のみの培養と同じ培養日数で菌の発育を認めたが、菌数により評価すると 6 分の 1 程度にまで減少していた。検体に標準菌を添加した後に、無菌試験培養を開始しても、試験培地に検体と標準菌を同時に接種しても、菌を単独培養した場合と比較し遅延することなく

発育することから、検体中での冷蔵保存により *Bacillus subtilis* の菌数が減少していると考えられた。

D. 考察

1. マイコプラズマ遺伝子検査検体の搬送保存バリデーション

検体に添加したマイコプラズマの遺伝子は、搬送保存の時間（最大 25 時間）に関わらず、培養上清画分から検出された。分画条件である 300 G×10 分間の遠心分離では、マイコプラズマは培養上清に分画されると推定される。よって、検体中のマイコプラズマ遺伝子の検出は搬送及び分析までの一時保存の影響を受けないと考えられる。

2. ウイルス遺伝子検査検体の搬送保存バリデーション

検体に添加した HBV 及び HCV の遺伝子は、搬送保存の時間（最大 25 時間）に関わらず、培養上清から検出された。分画条件である 300 G×10 分間の遠心分離では、ウイルスは培養上清画分に分画されると推定される。よって、検体中の HBV 及び HCV 遺伝子の検出は搬送及び分析までの一時保存の影響を受けないと考えられる。

3. エンドトキシン試験検体の搬送保存バリデーション

検体に添加したエンドトキシンは、

搬送保存の時間（最大 23 時間）に関わらず、ほぼ一定の回収率が得られた。よって、検体中のエンドトキシン測定は搬送及び分析までの一時保存の影響を受けないと考えられる。

#### 4. $\beta$ -D-グルカン試験検体の搬送保存バリデーション

検体に添加した  $\beta$ -D-グルカンは、最大 5 時間までは回収率が低下することなく測定することが可能であった。5 時間を超過した場合、回収率の低下する傾向が認められたが、先端医療センターにおいて製造される *Ex vivo* 増幅臍帯血の品質試験は 5 時間以内に分析を開始することが可能であるため、搬送及び分析までの一時保存の影響は受けないと考えられる。

#### 5. 無菌試験検体の搬送保存バリデーション

CD34 陰性画分及び *Ex vivo* 増幅臍帯血最終製品に添加した標準菌のうち、*Bacillus subtilis* は搬送保存の影響を強く受けた。CD34 陰性画分の場合、添加した直後に菌が発育しなくなることから、CD34 陰性画分自身に *Bacillus subtilis* への強い傷害活性があると推定される。*Ex vivo* 増幅臍帯血最終製品は生理食塩水とアルブミンからなり、栄養に乏しいため、*Bacillus subtilis* の菌数が維持されなかったと考えられる。一方、培養 7 日目細胞浮遊液は細胞の培養液であるため、*Bacillus subtilis*

の菌数が維持されたと考えられる。

いずれの材料であっても、無菌試験培地に検体と菌を同時に接種すると、菌を単独培養した場合と比較し遅延することなく菌が発育することから、無菌試験培地にサンプリングし、少なくとも真菌の培養温度（20～25℃）で搬送保存すれば、検出感度を低下させることなく、菌が検出できると考えられる。

#### E. 結論

BMA において実施する *Ex vivo* 増幅臍帯血のマイコプラズマ遺伝子検査、ウイルス遺伝子検査、エンドトキシン試験及び  $\beta$ -D-グルカン試験は搬送及び一時保存の影響を受けないことが確認された。

無菌試験は搬送保存の影響を受けたが、無菌試験培地にサンプリングし、少なくとも真菌の培養温度（20～25℃）で搬送保存することで、検出感度を低下させることなく、菌が検出できると考えられた。

#### 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

分担研究報告書

2. 品質管理法の確立

2-4 NOD/SCID マウスを用いた *ex vivo* 増幅臍帯血移植における  
生着促進効果の検討

分担研究者：伊藤 仁也

研究者協力者：丸山 京子

(先端医療センター 血液再生研究グループ)

研究要旨

海外ではすでに *ex vivo* 増幅臍帯血移植が実施され、その安全性は確認されているが、生着、造血回復までの日数の短縮といった効果は得られていない。

本研究では、我々が新たに開発した *ex vivo* 増幅法(Nakahata 法)により増幅した細胞と、すでに臨床応用されている McNiece、Kurtzberg らの増幅法により増幅した細胞の *in vivo* における短期骨髄再構築能の比較、評価を行った。各々の細胞を免疫不全マウス(NOD/SCID マウス)への移植後 16 週までの骨髄、末梢血でのヒト血球のキメリズム、及び生着血球における各 lineage マーカー発現の各々の継時的変化について比較検討した結果、Nakahata 法により *ex vivo* 増幅した細胞を移植した群では、他の群と比し移植後 16 週まで有意に CD34 陽性細胞が維持されており、移植後早期からマウス骨髄および末梢血において、高いヒト血球キメリズムが得られた。また骨髄中の赤芽球系、末梢血中の成熟顆粒球、血小板、及び B 細胞系いずれの Lineage においても、他の群と比しより早期から出現する傾向にあった。これらの結果より Nakahata 法では McNiece、Kurtzberg らの増幅法と比較してより高い骨髄再構築能を有する細胞を増幅できると考えられた。

本研究は治療用細胞製剤の効能に関する前臨床試験として位置づけられるものであり、今後は同様に NOD/SCID マウスへの異種間移植系を用いて、安全性に関する評価、検討を行う予定である。

## A. 研究目的

海外ではすでに *ex vivo* 増幅臍帯血移植が実施され、その安全性は確認されているが、十分な CD34 陽性造血幹/前駆細胞の増幅が得られていないため、生着日数短縮などの効果は得られていないのが現状である。

以前我々は本分担研究において、我々が新たに開発した増幅法(Nakahata 法)と、すでに臨床応用されている McNiece、Kurtzberg らの増幅法との *in vitro* での比較検討を行ない、Nakahata 法では培養に伴う CD34 陽性細胞の分化を抑制し、より未分化な状態を維持しながら細胞を増幅しうることを報告してきた。

そこで本研究では、*ex vivo* 増幅した細胞の *in vivo* における短期骨髄再構築能を評価することを目的として、免疫不全マウス(NOD/SCID マウス)への移植後 16 週までの 1. 骨髄、末梢血でのヒト血球のキメリズム 2. 生着血球における各 lineage マーカー発現の各々の継時的変化について比較検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 臍帯血 CD34 陽性細胞の *ex vivo* 増幅

・ CD34 陽性細胞: AutoMACS にて分離、凍結保存 (純度 >95%)

・ 使用培地:

無血清培地 QBSF-60 (Quality Biological 社)

・ 添加サイトカイン:

Nakahata 法; SCF, FL, IL-6/sIL-6R 各

100ng/ml, TPO 10ng/ml

McNiece 法; SCF, TPO, G-CSF 各 100ng/ml

Kurtzberg 法; GM-CSF, IL-3 各 50ng/ml, FL 25ng/ml, EPO 0.1U/ml

・ 培養開始細胞数: CD34 陽性細胞 1E+04 cells/ml/well (24well plate)

・ 培養期間: 14 日間

・ 希釈: 7 日目×2、10 日目×4、12 日目×2 (Nakahta 法, McNiece 法のみ)

・ 培養条件: 37°C, 5%CO<sub>2</sub>, humidity 95%

### 2. NOD/SCID マウスへの移植実験

・ 移植細胞

freshly isolated CD34+ cells(1E+04 cells)

: Fresh

expanded cells (CD34+ 1E+04 cells を増幅し得られた全ての細胞 )

: Nakahata 法、McNiece 法、Kurtzberg 法

・ マウス: 6~8 週齢の NOD/LtSz-Prkdcscid (NOD/SCID)マウス 各群 8 匹

・ 移植前後処置: day0 に全身放射線照射 2.4Gy、day0, 7, 14, 21 に抗アシアロ GM1 抗体を腹腔内投与

### 3. 解析

1) 移植後 16 週までの

(1) 骨髄(BM)、末梢血(PB)中のヒト血球キメリズムの継時的変化

(2) 生着ヒト血球における系統特異的なマーカーの発現の継時的変化

2) 移植後 12 週の生着血球におけるコロニー形成能の評価

3) 移植後 20 週の各組織 (BM・PB・肝臓・脾臓・肺・胸腺・リンパ節(LN)) におけるヒト血球の分布