

加しなかった場合、やや大型で幼若な核と胞体に明瞭な顆粒を有する前骨髄球様の細胞が大部分を占めるのに対し、阻害剤を添加した場合、好塩基性の胞体を有する幼弱球を多く認める傾向にあった。

5. GSK-3 阻害剤が系統特異的な転写因子の発現、活性に及ぼす影響について

内因性の β -catenin がどのような分子機構で CD34 陽性細胞の分化を調節しているのか、骨髄球系及び赤巨核球系細胞への系統決定に必須の転写因子である C/EBP α と GATA1 の培養前後の発現を RT-PCR 法にて検討した。Control の細胞では、培養 7 日後 C/EBP α の発現が上昇したのに対し、GATA1 の発現はほとんど変化しなかった。阻害剤添加によるこれらの発現に明らかな変化は認められなかった。次に NIH3T3 細胞に C/EBP α 、及び GATA1 のレポーター遺伝子を導入し、C/EBP α 、及び GATA1 各々の転写活性に β -catenin が及ぼす影響についてルシフェラーゼアッセイにより検討を行った。エフェクターとしては wild type の β -catenin (β -catenin^{WT})、及び GSK3 β によるリン酸化部位にアミノ酸変異を加えた恒常的活性化型 β -catenin (β -catenin Δ GSK)を用いた。また同時に分子間の相互作用を検討するために、NIH3T3 細胞に各遺伝子導入 48 時間後のライセートを用いて共沈実験を行った。

C/EBP α によるレポーター遺伝子の活性化は、 β -catenin WT 導入によりほとん

ど影響を受けなかったが、GI9 処理を加えた場合や、 β -catenin Δ GSK を導入した場合には強く抑制された。一方 GATA1 によるレポーター遺伝子の活性化は、活性化 β -catenin により促進された。また強制発現の系において C/EBP α と活性化 β -catenin の結合は認められなかったのに対し、GATA1 と活性化 β -catenin の結合が認められた。以上の結果から、 β -catenin は活性化により間接的に C/EBP α の機能を抑制する一方、GATA1 と直接結合することにより、その機能を増強する可能性が示唆された。

D. 考察及び今後の展望

以上の結果より、少なくとも今回用いた系においては、GSK-3 阻害剤処理により内因性の β -catenin を活性化した場合、CD34 陽性造血幹/前駆細胞を未分化なまま維持することは出来ず、サイトカイン存在下での増幅を抑制すると考えられた。さらに系統決定に重要な転写因子に作用することにより、その分化に影響を与えていると考えられた。

今後はこの分子機構について、hHSC/HPCs を表面抗原により幹細胞分画、各前駆細胞分画に分け、各分画における作用を詳細に検討することを予定している。また一昨年度我々は、合成ペプチドによる内的因子操作により、至適サイトカイン存在下で CB CD34⁺ hHSC/HPCs を比較的効率良く巨核球系細胞に分化誘導可能であることを報告した。今回得た知

見と併せ、両者を併用することにより、より効率良く巨核球系細胞への分化、さらには血小板産生が行える可能性があり、今後検討を行っていく予定である。

尚、本研究の成果は第 68 回日本血液学会総会・第 48 回日本臨床血液学会総会合同開催において発表した。

E. 健康危惧情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

Yoshida H, Maeda T, Ishikawa J, Inoue S, Matsunaga H, Kosugi S, Shiraga M, Oritani K, Kanakura Y, Tomiyama Y. Expression of CD27 on peripheral CD4⁺ T-lymphocytes correlates with the development of severe acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Int J Hematol* 84:367-376, 2006

Ujiie H, Oritani K, Kato H, Yokota T, Takahashi I, Maeda T, Masaie H, Ichii M, Kamada Y, Tamura S, Kihara S, Funahashi T, Tomiyama Y, Kanakura Y. Identification of amino-terminal region of adiponectin as a physiologically functional domain. *J Cell Biochem* 98:194-207, 2006

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

Kato H, Kashiwagi H, Shiraga M, Tadokoro S, Kamae T, Ujiie H, Honda S, Miyata S, Ijiri Y, Yamamoto J, Maeda N, Funahashi T,

Kurata Y, Shimomura I, Tomiyama Y, Kanakura Y. Adiponectin acts as an endogenous antithrombotic factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:224-230, 2006

Kamae T, Shiraga M, Kashiwagi H, Kato H, Tadokoro S, Kurata Y, Tomiyama Y, Kanakura Y. Critical role of ADP interaction with P2Y₁₂ receptor in the maintenance of $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation: association with Rap1B activation. *J Thromb Haemost* 4:1379-1387, 2006

Yu M, Luo J, Yang W, Wang Y, Mizuki M, Kanakura Y, Besmer P, Neel BG, Gu H. The scaffolding adapter Gab2, via Shp-2, regulates kit-evoked mast cell proliferation by activating the Rac/JNK pathway. *J Biol Chem* 281:28615-28626, 2006

Kimura H, Morii E, Ikeda JI, Ezoe S, Xu JX, Nakamichi N, Tomita Y, Shibayama H, Kanakura Y, Aozasa K. Role of DNA methylation for expression of novel stem cell marker CDCP1 in hematopoietic cells. *Leukemia* 20:1551-1556, 2006

Nojima J, Iwatani Y, Suehisa E, Kuratsune H, Kanakura Y. The presence of anti-phosphatidylserine/prothrombin antibodies as risk factor for both arterial and venous thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Haematologica* 91:699-702, 2006

Yamanishi H, Imai N, Ohmine T, Nishiyama M, Suehisa E, Kanakura Y, Iwatani Y. Urine flow cytometer quantification of leukocytes in samples containing a large proportion of lymphocytes. *Clin Biochem* 39:857-859, 2006

Inoue N, Izui-Sarumaru T, Murakami Y, Endo Y, Nishimura J, Kurokawa K, Kuwayama M, Shime H, Machii T, Kanakura Y, Meyers G, Wittwer C, Chen Z, Babcock

W, Frei-Lahr D, Parker CJ, Kinoshita T. Molecular basis of clonal expansion of hematopoiesis in 2 patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood* 108:4232-4236, 2006

金倉 讓. 細胞の増殖・分化・死の制御破綻によるがん化. *がん細胞の生物学* (高井義美, 秋山 徹編), 東京大学出版会, 東京, 2006, pp64-81

金倉 讓, 江副幸子. トランスレーショナルリサーチの今日と明日. *新医療* 33:109-112, 2006

松村 到, 金倉 讓. 細胞周期制御. *再生医療のための分子生物学* (仲野 徹編), コロナ社, 東京, 2006, pp17-35

松村 到, 金倉 讓. 造血器腫瘍に対する分子標的療法. *日本内科学会雑誌* 95:147-153, 2006

松村 到, 金倉 讓. IL-6 の作用. 1. 造血系への作用. *血液フロンティア* 16:19-25, 2006

松村 到, 金倉 讓. その他の慢性骨髄増殖疾患と JAK2 遺伝子異常. *血液フロンティア* 16:35-43, 2006

松村 到, 金倉 讓. シグナル伝達を標的とする治療: Ras 阻害剤. *Mebio* 23:55-69, 2006

松村 到, 金倉 讓. 細胞内シグナル伝達分子を標的にした分子標的療法. *総合臨床* 55:1609-1615, 2006

松村 到, 金倉 讓. 分子標的療法の真の治療標的: 癌幹細胞. *総合臨床* 55:1624-1628, 2006

松村 到, 金倉 讓. HOXB4 による造血幹細胞制御. *血液・腫瘍科* 52:683-688, 2006

松村 到, 金倉 讓. エリスロポエチン及びその変異体の新たな臨床応用. *Annual Review 血液* 2006 (高久文磨, 溝

口秀昭, 小宮山淳, 坂田洋一, 金倉 讓編), 中外医学社, 東京, 2006, pp56-63

松村 到, 金倉 讓. 消化管悪性リンパ腫の分類と診断. *医学のあゆみ 別冊 消化器疾患* (市倉 隆, 日比紀文編), 医歯薬出版社, 東京, 2006, pp689-693

江副幸子, 金倉 讓. 慢性骨髄性白血病の分子標的療法. *総合臨床* 55:1659-1665, 2006

政家寛明, 織谷健司, 金倉 讓. アディポネクチンの抗炎症作用. *臨床免疫* 45:603-606, 2006

西村純一, 金倉 讓. 発作性夜間ヘモグロビン尿症. *最新医学* 61:413-419, 2006

2. 学会発表

Shiraga M, Kamae T, Akiyama M, Tadokoro M, Kashiwagi H, Oritani K, Kurata Y, Tomiyama Y, Kanakura Y. P2Y₁₂-independent transient activation and P2Y₁₂-dependent prolonged activation of platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. The American Society of Hematology 48th Annual meeting (2006.12.9-12, Orlando, USA)

Tanaka H, Matsumura I, Nakao K, Era T, Kanakura Y. Canonical NF- κ B pathway is required for early mesodermal differentiation from the murine embryonic stem cells. The American Society of Hematology 48th Annual meeting (2006.12.9-12, Orlando, USA)

Ezoe S, Matsumura I, Tanaka H, Shibayama H, Mizuki M, Kanakura Y. NAD-dependent histone deacetylase, SIRT1, plays essential roles in the maintenance of hematopoietic stem cells. The American Society of Hematology 48th Annual meeting (2006.12.9-12, Orlando, USA)

福島健太郎, 前田哲生, 藤田二郎, 齊藤則充, 吉田 均, 石川 淳, 松村 到,

金倉 讓

同種骨髄移植後の腸管 GVHD における腹部造影 CT の有用性の検討

第 28 回日本造血細胞移植学会総会 (2006.2.24-25, 東京)

石橋知彦, 福島健太郎, 前田哲生, 大塚正恭, 吉田 均, 石川 淳, 松村 到, 金倉 讓

非血縁者間同種骨髄移植後早期に両下肢のしびれを発症し, γ グロブリン大量療法が有効であった慢性炎症性脱髄性ニューロパシー (CIDP) の一例

第 28 回日本造血細胞移植学会総会 (2006.2.24-25, 東京)

初山麻子, 伊藤仁也, 田中宏和

NOD/SCID マウス移植モデルにおける臍帯血及び増幅臍帯血の長期体内動態

第 28 回日本造血細胞移植学会総会 (2006.2.24-25, 東京)

高田のぞみ, 田中宏和, 丸山京子, 初山麻子, 鹿村真之, 槻木裕志, 伊藤仁也

ex vivo 増幅臍帯血移植における臍帯血選択基準についての検討

第 28 回日本造血細胞移植学会総会 (2006.2.24-25, 東京)

一井倫子, 織谷健司, 横田貴史, 金倉 讓

ヒト B リンパ球培養系確立と指示機構解析

第 4 回幹細胞シンポジウム (2006.5.19-20, 東京)

金倉 讓

(講演) 白血病治療の進歩と最近の話題
第 34 回日本内科学会四国支部生涯教育講演会 (2006.6.18, 徳島)

山本正樹, 氏家秀敏, 吉田 均, 安見正人, 前田哲生, 石川 淳, 水木満佐央, 富山佳昭, 松村 到, 金倉 讓

骨髄のみに病変が認められた B 細胞性非ホジキンリンパ腫の一例

第 85 回近畿血液学地方会 (2006.6.24, 兵庫, 永井謙一)

富山佳昭, 加藤 恒, 柏木浩和, 白鹿正

通, 田所誠司, 釜江 剛, 秋山正夫, 宮田茂樹, 本田繁則, 山本順一郎, 倉田義之, 船橋 徹, 下村伊一郎, 金倉 讓

アディポネクチンの抗血栓作用

第 43 回日本臨床分子医学会学術集会 (2006.7.20-21, 札幌)

高田のぞみ, 田中宏和, 伊藤仁也, 中畑龍俊

無菌洗浄装置 ACP215 を用いた凍結臍帯血の解凍、洗浄方法の確立

第 9 回日本組織工学会 (2006.9.7-8, 京都)

沈沢尚恵, 柴山浩彦, 村田信介, 水木満佐央, 松村 到, 青笹克之, 金倉 讓

Anamorsin トランスジェニックマウスの作製と解析

第 65 回日本癌学会学術総会 (2006.9.28-30, 横浜)

白鹿正通, 釜江 剛, 秋山正夫, 田所誠司, 柏木浩和, 本田繁則, 富山佳昭, 倉田義之, 金倉 讓

インテグリン $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ 活性化における P2Y₁₂ の重要性 -巨核球系細胞株 CMK を用いた解析-

第 68 回日本血液学会総会・第 48 回日本臨床血液学会総会 合同開催 (2006.10.6-8, 福岡)

横田貴史, 織谷健司, Paul W. Kincade, 高橋 功, 一井倫子, 松村 到, 金倉 讓

リンパ球初期分化を制御する分子の同定とその機能解析

第 68 回日本血液学会総会・第 48 回日本臨床血液学会総会 合同開催 (2006.10.6-8, 福岡)

田中宏和, 松村 到, 伊藤仁也, 多田典子, 中畑龍俊, 金倉 讓

GSK3- β 阻害剤が造血幹/前駆細胞の増殖、分化に及ぼす影響についての検討

第 68 回日本血液学会総会・第 48 回日本臨床血液学会総会 合同開催 (2006.10.6-8, 福岡)

江副幸子, 松村 到, 津森 洋, 佐藤友亮, 石川 淳, 水木満佐央, 織谷健司, 金倉 讓

老化制御因子 Sirt1 が造血幹細胞の未分化

性維持にはたす役割についての解析
第 68 回日本血液学会総会・第 48 回日本
臨床血液学会総会 合同開催 (2006.10.6-8,
福岡)

釜江 剛, 富山佳昭, 清井映男, 田所誠
司, 本田繁則, 秋山正夫, 白鹿正通, 柏木
浩和, 倉田義之, 金倉 讓
本邦における血小板無力症の遺伝子異常
第 68 回日本血液学会総会・第 48 回日本
臨床血液学会総会 合同開催 (2006.10.6-8,
福岡)

一井倫子, 織谷健司, 横田貴史, 高橋
功, 白銀隆宏, 氏家秀敏, 松村 到, 金倉
讓
ヒト B リンパ球産生調節機構の解明
第 68 回日本血液学会総会・第 48 回日本
臨床血液学会総会 合同開催 (2006.10.6-8,
福岡)

沈沢尚恵, 柴山浩彦, 齋藤有理, 村田信
介, 松村 到, 青笹克之, 金倉 讓, 大阪
リンパ腫研究会
濾胞性リンパ腫における抗アポトーシス
分子 Anamorsin の発現
第 68 回日本血液学会総会・第 48 回日本
臨床血液学会総会 合同開催 (2006.10.6-8,
福岡)

秋山正夫, 柏木浩和, 白鹿正通, 田所誠
司, 釜江 剛, 倉田義之, 富山佳昭, 金倉
讓
Semaphorin 3A は PI3 kinase 系を介して血
小板機能を抑制する
第 68 回日本血液学会総会・第 48 回日本
臨床血液学会総会 合同開催 (2006.10.6-8,
福岡)

白鹿正通, 釜江 剛, 秋山正夫, 田所誠
司, 柏木浩和, 本田繁則, 倉田義之, 富山
佳昭, 金倉 讓
培養巨核球におけるインテグリン $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$
活性化は一過性である
第 29 回日本血栓止血学会学術集会
(2006.11.16-18, 栃木)

秋山正夫, 柏木浩和, 白鹿正通, 田所誠
司, 釜江 剛, 本田繁則, 倉田義之, 富山
佳昭, 金倉 讓

Semaphorin 3A は PI3 kinase 系を介して血
小板機能を抑制する
第 29 回日本血栓止血学会学術集会
(2006.11.16-18, 栃木)

高橋 啓, 徳永正浩, 中澤剛士, 安見正
人, 前田哲生, 石川 淳, 水木満佐央, 織
谷健司, 松村 到, 金倉 讓
地固め療法 1 コース後重篤な呼吸器感染
症を併発したが、非血縁者間 RIST にて完
全寛解を維持している Ph 陽性
biphenotypic acute leukemia の 1 例
第 86 回近畿血液学地方会 (2006.11.18, 和
歌山)

松村 到
白血病原性チロシンキナーゼによる造血
細胞の増殖と系統決定機構についての解
析と新規 Gene Trap 法による協調分子の
単離の試み
癌特定領域項目別班会議 (2006.12.22-23,
つくば)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特願なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

[研究支援者活用事業]
(ヒトゲノム・再生医療等研究推進事業)

研究業務実施報告書

1. 研究支援者

氏 名：鹿村 真之

2. 受入研究者

所 属：先端医療センター 血液再生研究グループ

職 名：主任研究員

氏 名：伊藤 仁也

所在地：兵庫県神戸市中央区港島南町 2 丁目 2 番
先端医療センター研究棟 5 階

3. 研究支援期間

平成 18 年 4 月 1 日 ~ 平成 19 年 3 月 31 日

4. 研究課題

ex vivo 増幅臍帯血の製造法の確立に関する研究

5. 研究業務実施の概要

平成 18 年 4 月 1 日から前年度に引き続き「サイトカインによる増幅培養臍帯血による臍帯血移植の臨床試験(平成 17 年度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)」に関する研究を開始した。

本分担研究では、製造担当者としての実践的な業務を遂行すると同時に、「GMP(Good Manufacturing Practice)に準拠した *ex vivo* 増幅臍帯血の製造法の確立」を目的として、製造バリデーションによる *ex vivo* 増幅法の作業工程、品質管理試験法、及び環境衛生試験法の検証を行った。

ex vivo 増幅臍帯血の製造法の確立に関する研究

【背景】

造血幹細胞は自己複製能と、多分化能を併せ持った血液細胞と定義される。近年、造血幹細胞のもつ自己複製能を利用して *ex vivo* で造血幹/前駆細胞を増幅し、移植医療に応用しようとする研究が行われ、海外では臨床研究も進められている。造血幹細胞の *ex vivo* 増幅は、新たな移植細胞ソースとしての利用だけでなく、造血幹細胞の遺伝子治療、さらにはその可塑性を利用した再生医療など多方面への応用が期待されている技術である。

これまでに我々は、臍帯血中に含まれる CD34 陽性造血幹/前駆細胞を 5 種類のサイトカインを組み合わせることで効率よく増殖させる方法を開発した。さらにこの基礎研究の成果を臨床応用すべく探索的臨床試験研究（トランスレーショナルリサーチ）に取り組み、GTP (Good Tissue Practice) に準拠した培養法、細胞プロセッシング法の開発、増幅臍帯血の品質管理法の確立、さらには臨床プロトコルの作成、臨床研究実施体制の確立など、ソフト面、およびハード面での整備を行ってきた【「*ex vivo* 増幅臍帯血幹細胞を用いたトランスレーショナルリサーチ（平成 14～16 年度厚生労働科学研究費補助金基礎研究成果の臨床研究推進事業）】。これら総合的な基盤整備を背景として、現在我々は「急性白血病患者に対する同種臍帯血由来 *ex vivo* 増幅 CD34 陽性細胞移植に関する臨床第 I 相/前期第 II 相試験」を実施している【「サイトカインによる増幅培養臍帯血による臍帯血移植の臨床試験（平成 17 年度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）】。本研究では、造血幹/前駆細胞の絶対数不足から生じる臍帯血移植の問題点（生着不全、造血回復遅延など）を解決するため、*ex vivo* 増幅臍帯血を臍帯血移植へ臨床応用し、その有効性及び安全性を証明すること、さらには *ex vivo* 増幅臍帯血移植を新たな治療法として確立することを目的としている。

【目的】

本分担研究では、細胞療法を実践する際に不可欠な「GMP に準拠した細胞プロセッシング法を確立すること」を主たる目的としている。本実施期間においては、我々の開発、整備した閉鎖系無血清培養方法、品質管理方法、及び環境衛生のための手順ならびに各文書体系の運用を含めた全作業工程が、GMP に準拠した細胞プロセッシング法として適切であるかどうかを検証するためのバリデーション試験を実施した。また無血清培地の受け入れに関する品質管理試験について検討を行った。

以下に、

1. 無菌培地充填試験
 2. 製造バリデーション試験
 3. 無血清培地の受け入れ試験
- について報告する。

【方法ならびに結果】

1. 「無菌培地充填試験」

「培地充填試験」は、細胞プロセッシングセンター (CPC)内で行う *ex vivo* 臍帯血製剤の製造における無菌性を保証するために、製造担当者の無菌操作をバリデートすることを目的として行われる。

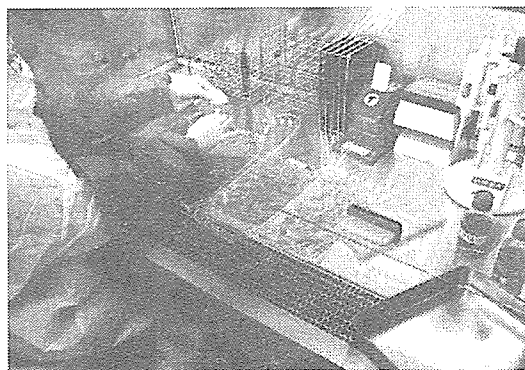
1) 実施方法

試験は標準作業手順書に従って CPC 内にて 2 名で行い、1 名が作業員、もう 1 名が確認者を担当する。試験に用いられる原料等には SCD 培地 (日本ビオメリュー)を用いる (Fig. 1 A)。この SCD 培地は入荷時に品質が保証されていることを確認したものをを用いた。作業開始後、中間品としてダミー培養 7 日目培養液を採取し (Fig. 1 B)、無菌試験により無菌性を確認した。この無菌試験はダミー最終製品についても行い、全作業工程の無菌性の確認を行った。

A)



B)



2) 判定

Fig. 1 閉鎖系培養法における増幅率

最終的な判定は、中間品 (ダミー培養 7 日目培養液)、充填品 (ダミー最終製品)の無菌検査結果及び環境衛生試験結果をもとに作業工程の検証を行った。

3) 結果ならびに判定

(1) 操作：

培地充填試験は指示書に従って実施され、試験結果に影響を与える逸脱操作は無かった。

(2) 環境試験：

環境試験は標準作業手順書に従って実施され、その結果は基準値以下であった。

(3) 中間製品に対する無菌試験 (三菱化学ビーシーエル社への外部委託)：

無菌検査は標準作業手順書に従って実施され、その試験結果は陰性であった。

(4) 充填品に対する無菌試験 (三菱化学ビーシーエル社への外部委託)：

無菌検査は標準作業手順書に従って実施され、その試験結果は陰性であった。

試験の適合基準に基づいて、培地充填試験の適合性について試験の適合性判定を行った。その結果、記録書への記載及び署名は適格であり、すべての試験において規定の基準値を満たしたことを確認した。これより、培地充填試験の実施対象者に対して、製造担当者の承認書が発行された。

2. 「製造バリデーション試験」

「バリデーション試験」は、細胞生物製剤を製造する際に使用する設備や環境、また製造工程や試験方法によって得られた結果が目的とした通りであり、科学的に正しいものであることを検証するために実施されるものである。

1) 実施方法

製造管理責任者は、上述した文書体系に基づき製造に適した臍帯血を決定し、標準作業書に基づいて製造計画書を作成、関係部門に送付した。各関係部門は原料等の在庫確認を行い、不足分の発注を行った。製造部門はCPCの環境モニタリングや環境衛生試験等を行い、細胞を安全に加工できる体制を整えた。培養開始予定日より、以下 Fig. 2 に示す閉鎖系無血清培養を行った。

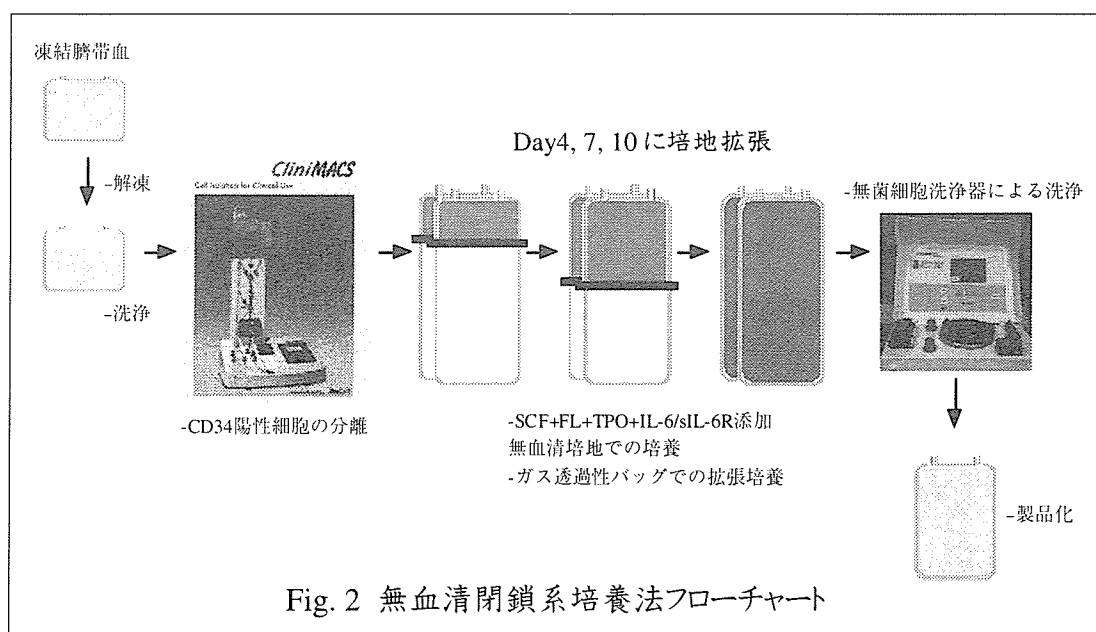


Fig. 2 無血清閉鎖系培養法フローチャート

さい帯血バンクより供与された凍結ヒト臍帯血を解凍後、CD34 陽性細胞を磁気ビーズ法 (Clini MACS)にて分離し、SCF (100 ng / mL)、TPO (100 ng / mL)、FL (100 ng / mL)、FP6 (100 ng / mL)添加 QBSF[®]-60 培地 (米国 Quality Biological 社製) 中で 12 日間培養した。ガス透過性培養バッグは、VueLife[™] (米国 American Fluoroseal Corporation 社製)を用いた。

(1) 増幅用臍帯血の洗浄

増幅用臍帯血は、ニューヨーク血液センターにおいて Rubinstein らの確立した方法に準じて、保護剤として Dextran 40 及び 5%ヒト血清アルブミンを含む生理食塩液を用いて洗浄を実施した。

(2) CD34 陽性細胞の分離

洗浄臍帯血からの CD34 陽性細胞の分離には Clini MACS 磁気細胞分離システムを用いた。洗浄臍帯血中の CD34 陽性細胞を CD34 試薬と反応させ、磁気標識した。細胞を Clini MACS 装置に供し、CD34 陽性細胞を分離した。

(3) CD34 陽性細胞の *ex vivo* 増幅培養

分離した CD34 陽性細胞の *ex vivo* 増幅培養は SCF、TPO、FP6、FL それぞれ 100 ng / ml を含む QBSF-60 培地を用いて行った。培養は、ガス透過性のテフロン製バッグに細胞を充填して閉鎖的に実施し、CD34 陽性細胞数で約 10,000 個 / mL の濃度から開始した。1 バッグあたり、15 mL の培養液から開始し、4 日目に 2 倍、7 日目に 2 倍、更に 10 日目に 2 倍に拡張培養を行い、最終的に 120 mL の培養液量とした。1 回の製造で培養に使用するバッグの数は、分離された CD34 陽性細胞数に合わせて設定した。尚、第 2 期以降の試験製造においては、使用する QBSF-60 培地について所定の受入れ検査 (ロットチェック、ボトルチェック)を実施し、決められた規格値を満たした培地のみを使用した。

(4) 増幅細胞の洗浄及び製品化

複数の培養バッグから培養液を 1 つの輸注用バッグに集め、自動細胞洗浄装置セルウォッシャー ACP215 を使用して余剰のサイトカインや培地成分を除去した。最終的に 0.5%ヒト血清アルブミン含有生理食塩液 100 mL に懸濁し、輸注用バッグに充填して製品とした。

尚、培養に用いる原料は SCF、FL を除き医薬品グレードのものを用い、それぞれの原料は製品標準書に記載した規格に沿うものを用いた。

・臍帯血 (さい帯血バンクより提供)

インフォームドコンセントのもとに母親から提供され、臍帯血提供機関(兵庫及び東海さい帯血バンク)及び先端医療センターにおいて倫理審査が済んでいるものを用いた。

- ・ サイトカイン
 - ・ Recombinant Human Stem Cell Factor (R&D Systems, Inc.)
 - ・ Recombinant Human Flt-3 / Flk-2 ligand (R&D Systems, Inc.)
 - ・ KRN9000 (麒麟麦酒 (株))
 - ・ FP6 (麒麟麦酒 (株))
- ・ 無血清培地
 - QBSF-60 (QUALITY BIOLOGICAL, Inc.)
- ・ ガス透過性培養バッグ VueLife™ (American Fluoroseal Corporation 社製)
- ・ デキストラン 40 注射液 (テルモ (株))
- ・ 献血アルブミン-Wf (三菱ウエルファーマ (株))
- ・ 献血ヴェノグロブリン-IH ヨシトミ (三菱ウエルファーマ (株))
- ・ 大塚生食注 (大塚製薬 (株))

また各製造工程において使用する器具類は事前にバリデーションを行った。更に、CPC 内での製造に係る作業担当者は、製造管理責任者により作業者として認定された者が行った。作業者の認定は規程の教育訓練を受け、無菌培地充填試験を行い、合格した者に対して行われた。

2) 判定

最終的な判定は、原材料の受け入れ試験をはじめ、以下の臍帯血、中間体、製品の試験検査及び環境衛生試験結果をもとに作業工程の検証を行った。

増幅用臍帯血品質規格、CD34 陽性画分の品質規格、培養 7 日目培養液の品質規格及び増幅 CD34 陽性細胞の製品企画はそれぞれ Table 1-4 の通りであり、各品質管理試験は標準作業手順書に従って実施された。

増幅用臍帯血の品質規格は、製造で必要となる最低限の原料を担保する目的で設定されている。解凍後の臍帯血を対象に受け入れ試験を実施し、製造に使用する CD34 陽性細胞数を最終確認した。また、感染症伝播防止の観点から、培養 7 日目培養液の工程内規格として無菌試験を設定した。また、CD34 陽性画分の品質規格は、安定な培養に必要な最低限の細胞数として設定した。

製品規格として、細胞生存率、無菌試験、エンドトキシン否定試験、ウイルス否定試験、マイコプラズマ否定試験を設定した。細胞生存率については、*ex vivo* 増幅 CD34 陽性細胞の 8 時間後の安定性試験結果が 80~90%の範囲内であったことから、70%以上を製品規格として設定した。無菌試験、エンドトキシン否定試験、ウイルス否定試験、マイコプラズマ否定試験は、感染症伝播防止の観点から実施し、また無菌試験は被験者への投与前に結果を得ることが困難なため、無菌性確認の補助的な試験としてエンドトキシン否定試験を加えた。

May-Giemsa 染色では原材料となる臍帯血に異型細胞がモノクローナルに増殖していないことを確認した。なお、参考試験として CD34 陽性細胞数の測定を実施するが、製品の効能、効果を示す指標として実施するものであり、規格値を設定しなかった。

Table 1 増幅用臍帯血の品質規格

試験検査項目	規格値
CD34 陽性細胞数	6x10 ⁵ 個以上 (解凍後、ISHAGE 法による)
細胞形態	異型性細胞のモノクローナルな増幅を認めない

Table 2 CD 34 陽性画分の品質規格

試験検査項目	規格値
CD34 陽性細胞数	1.2x10 ⁵ 個以上 (ISHAGE 法による)

Table 3 培養 7 日目培養液の品質規格

試験検査項目	規格値
無菌性	菌の発育を認めない

Table 4 増幅 CD34 陽性細胞の製品規格

試験検査項目	規格値
細胞生存率	70%以上 (総細胞数あたり)
無菌性 (結果判定は 14 日後)	菌の発育を認めない
エンドトキシン	0.12 EU / mL 未満
ウイルス (PCR 法)	HBV、HCV、HIV、HTLV、パルボウイルス B19、CMV を認めない
マイコプラズマ (PCR 法)	マイコプラズマを認めない

3) 結果

(1) 環境モニタリング

製造バリデーションにおける操作、環境モニタリング及びサンプルの運搬は標準作業手順書に従って行われ、記録書への記載及び署名も適格であった。

Fig. 3 に操作室内パーティクルカウンター測定結果、Fig. 4 に安全キャビネット内パーティクルカウンター測定結果を示す。測定対象となる微粒子の最小粒子径は 0.5 μm とし、空気吸引量は 1 ft³ / min (1 min) とした。

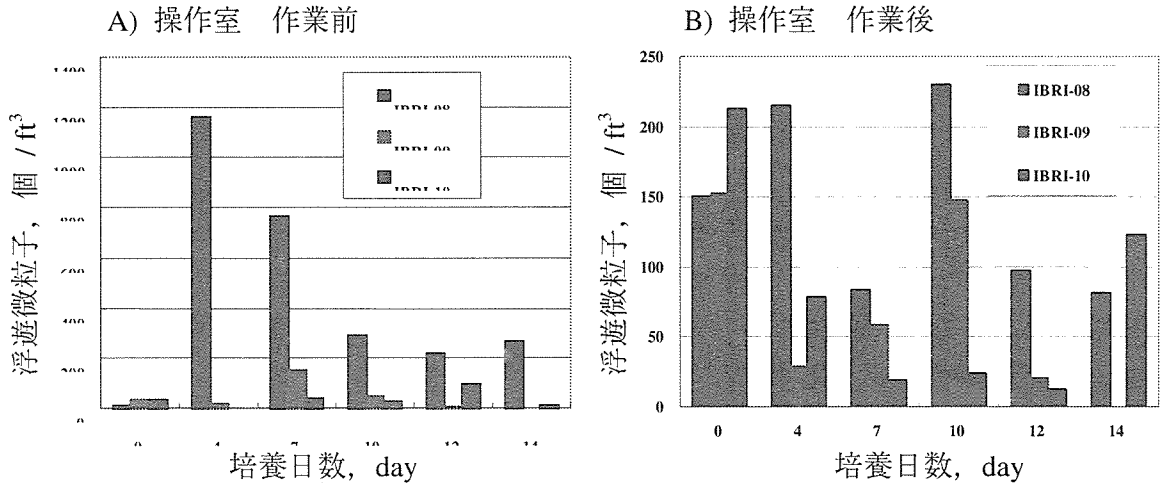


Fig. 3 操作室内パーティクルカウンター測定結果

操作室及び安全キャビネット内の浮遊微粒子数は作業前後でほぼ同様に減少しており、操作環境が一定に保たれていることが確認された。また、操作室及び安全キャビネット内の浮遊微粒子数はいずれも基準値である 5,000 個/ft³、50 個 / ft³ を大きく下回っていた。このことから空調管理は正常に行われており、清浄度が保たれた作業環境が維持できていることが確認された。

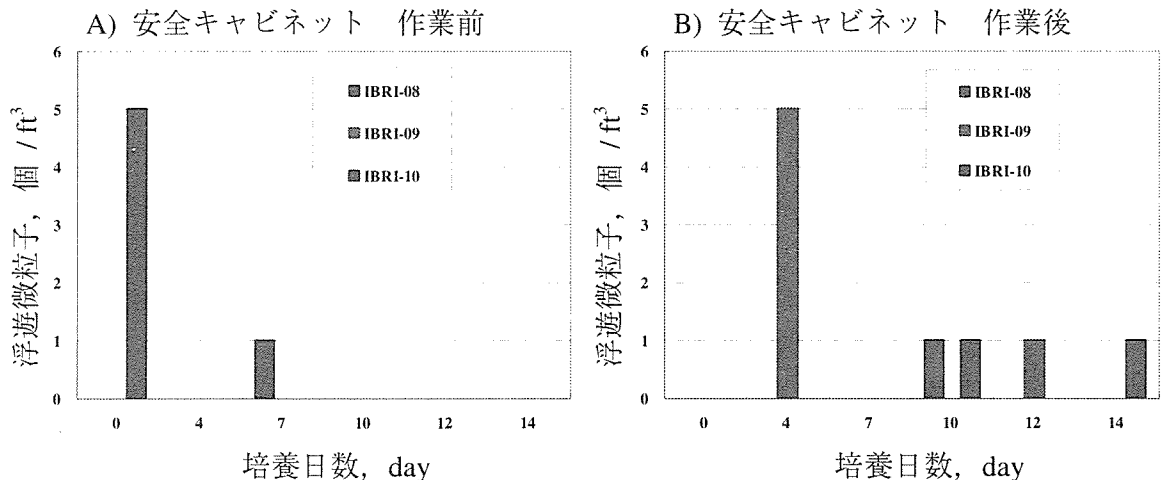


Fig. 4 安全キャビネット内パーティクルカウンター測定結果

また、その他の環境モニタリング試験である浮遊菌、落下菌検査において菌の発育は認められなかった。付着菌検査において一部菌の発育が認められたが、EU の class100 における基準値 (3 CFU / 25 cm²) を下回っており、清浄な環境が保たれていることが確認できた。

これらの環境モニタリングから、製造バリデーションの製造作業工程において清浄な環境が保たれていることが確認された。

(2) CD 34 陽性細胞数、細胞形態観察

Table 5 に製造試験に用いた臍帯血の CD 34 陽性細胞数を示す。臍帯血の品質規格である解凍後 CD 34 陽性細胞数は 6.0×10^5 個以上であり、全ての製造試験において規格値を満たしていた。また、Clini MACS での細胞分離後の CD 34 陽性細胞数の規格値は 1.2×10^5 個以上であり、全ての製造試験で規格値を満たしていた。

解凍後臍帯血の細胞形態を May-Giemsa 染色により観察した (Table 6)。分類の結果、用いた臍帯血は主として成熟好中球 (分節核球) 及びリンパ球から構成され、異型細胞のモノクローナルな増殖は認められなかった。

Table 5 臍帯血 CD 34 陽性細胞数

製造試験 No.	解凍後	Clini MACS 後
IBRI-08	6.6×10^5	5.7×10^5
IBRI-09	7.4×10^5	4.1×10^5
IBRI-10	6.2×10^5	3.4×10^5

Table 6 臍帯血形態解析結果 (%)

		IBRI-08	IBRI-09	IBRI-10
芽球		3.0	0.0	0.0
好中球	前骨髄球	0.0	0.0	0.0
	骨髄球	0.0	0.0	1.0
	後骨髄球	0.0	0.0	0.0
	杆状核球	0.0	1.0	0.0
	分節核球	48.0	57.0	41.0
好酸球		3.0	5.0	4.0
好塩基球		1.0	1.0	8.0
単球		2.0	8.0	9.0
リンパ球		43.0	28.0	37.0
異型リンパ球		0.0	0.0	0.0
赤芽球		0.0	0.0	0.0

(3) 無菌試験 (中間品) (三菱化学ビーシーエル社への外部委託)

中間品として培養 7 日目の培養液を採取し、無菌試験を実施した (Table 7)。全

ての製造試験において菌の発育は認められず、製造試験の無菌性が確認された。

Table 7 培養7日目培養液の無菌試験結果

製造試験 No.	検査結果
IBRI-08	菌の発育を認めない
IBRI-09	菌の発育を認めない
IBRI-10	菌の発育を認めない

(4) 細胞生存率

Fig. 5 に培養細胞の生存率の推移を示した。培養開始時には生存率はいずれの製造試験も 40.0%以下であったが、その後の拡張培養とともに上昇し、最終製品において IBRI-08 では 80.4%、IBRI-09 では 81.0%、IBRI-10 では 75.8%を示した。細胞生存率の規格値は 70% 以上であり全ての製造試験で上回っていた。

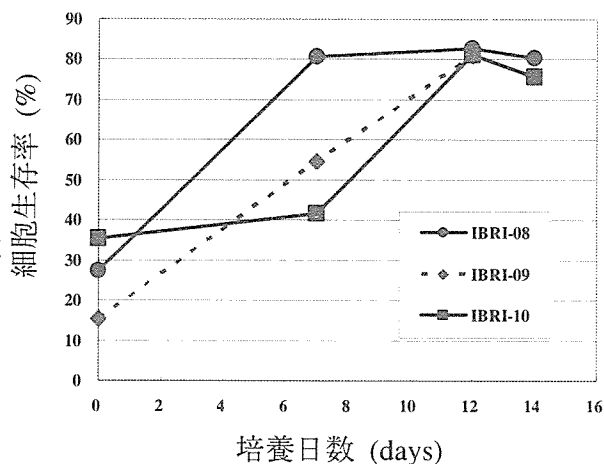


Fig. 5 培養細胞生存率の推移

(5) 無菌試験 (最終製品) (三菱化学ビーシーエル社への外部委託)

最終製品における無菌性試験を実施した。全ての製造試験で菌の発育は認められず、最終製品の無菌性が確認された (Table 8)。

Table 8 最終製品の無菌試験結果

製造試験 No.	検査結果
IBRI-08	菌の発育を認めない
IBRI-09	菌の発育を認めない
IBRI-10	菌の発育を認めない

(6) エンドトキシン否定試験 (三菱化学ビーシーエル社への外部委託)

エンドトキシン否定試験においては IBRI-08、IBRI-10 で検出限界未満、IBRI-09 で 0.002 EU / mL であった (Table 9)。全ての検査は成立判定で適合しており、エンドトキシン否定試験として成立することを確認した。エンドトキシンの製品規格は 0.12 EU / mL 未満であり、全ての製造試験において規格値を満たしていた。

Table 9 最終製品のエンドトキシン試験結果

製造試験 No.	検査結果 (5倍希釈試料)	本検査の検出限界	本検査の定量限界
IBRI-08	検出限界未満	0.0007 EU / mL	0.0022 EU / mL
IBRI-09	0.002 EU / mL	0.002 EU / mL	0.006 EU / mL
IBRI-10	検出限界未満	0.0008 EU / mL	0.0024 EU / mL

(7) ウイルス否定試験 (三菱化学ビーシーエル社への外部委託)

各製造試験においてウイルス (PCR 法) 否定試験を行った。ウイルス試験は RNA ウイルス、DNA ウイルス及びヘルペスウイルスについて検査を行い、培養細胞及びその上清による PCR 反応阻害は認められなかった。以下に代表例として IBRI-08 のウイルス試験結果を示す (Table 9-11)。

全ての製造試験サンプルにおいて HBV、HCV、HIV、HTLV、パルボウイルス B19、CMV は認められず、製品規格を満たしていた。

Table 9 IBRI-08 ウイルス試験結果 (RNA ウイルス)

サンプル	RNA ウイルス	PCR 結果	検出感度 (copies / PCR tube)
培養細胞	HCV	検出せず(750 copies / 10 ⁵ cells 未満)	50
	HIV-1	検出せず(750 copies / 10 ⁵ cells 未満)	50
	HTLV-1	検出せず(150 copies / 10 ⁵ cells 未満)	10
上清	HCV	検出せず(1000 copies / mL 未満)	10
	HIV-1	検出せず(1000 copies / mL 未満)	10
	HTLV-1	検出せず(1000 copies / mL 未満)	10

Table 10 IBRI-08 ウイルス試験結果 (DNA ウイルス)

サンプル	DNA ウイルス	PCR 結果	検出感度 (copies / PCR tube)
培養細胞	HBV	検出せず(150 copies / 10 ⁵ cells 未満)	10
	HIV-1(provirus)	検出せず(750 copies / 10 ⁵ cells 未満)	50
	HTLV-1(provirus)	検出せず(150 copies / 10 ⁵ cells 未満)	10
	Parvovirus B19 NS1	検出せず(150 copies / 10 ⁵ cells 未満)	10
	Parvovirus B19 VP2	検出せず(150 copies / 10 ⁵ cells 未満)	10
上清	HBV	検出せず(1000 copies / mL 未満)	10

	HIV-1(provirus)	検出せず(1000 copies / mL 未満)	10
	HTLV-1(provirus)	検出せず(1000 copies / mL 未満)	10
	Parvovirus B19 NS1	検出せず(1000 copies / mL 未満)	10
	Parvovirus B19 VP2	検出せず(1000 copies / mL 未満)	10

Table 11 IBRI-08 ウイルス試験結果 (ヘルペスウイルス)

サンプル	ヘルペスウイルス	PCR 結果	検出感度 (copies / PCR tube)
培養細胞	CMV	検出せず(150 copies / 10 ⁵ cells 未満)	10
上清	CMV	検出せず(1000 copies / mL 未満)	10

(8) マイコプラズマ否定試験 (三菱化学ビーシーエル社への外部委託)

培養細胞及びその上清についてマイコプラズマ否定試験を行った。全ての製造試験において培養細胞、上清にマイコプラズマは検出せず、製品規格を満たしていた (Table 12)。

Table 12 最終製品のマイコプラズマ試験結果

製造試験 No.		PCR 結果	検出感度 (copies / PCR tube)
IBRI-08	細胞	検出せず(10 copies / 10 ⁵ cells 未満)	10
	上清	検出せず(1000 copies / mL 未満)	10
IBRI-09	細胞	検出せず(150 copies / 10 ⁵ cells 未満)	10
	上清	検出せず(5000 copies / mL 未満)	50
IBRI-10	細胞	検出せず(750 copies / 10 ⁵ cells 未満)	50
	上清	検出せず(1000 copies / mL 未満)	10

4) 考察

品質規格に基づいて臍帯血、中間体、製品の試験検査及び環境衛生試験結果から製造バリデーションの適合性判定を行った。その結果、操作は標準作業手順書に基づいて行われており、全ての規格試験において規格値を満たしたことが確認された。これより今回実施した計 3 回の製造バリデーションはいずれも得られた結果が目的とした通りであり、科学的に正しいものであることが証明された。さらに今後も *ex vivo* 増幅臍帯血の品質を担保するために、定期的な製造バリデーション試験を行う必要があると考えられた。

3. 「無血清培地の受け入れ試験」における検討

本製造に使用する原材料に関しては、受け入れの際に各々規定を設け、受け入れ試験を実施している。特に無血清培地に関しては、ロットごとの培地受け入れ試験 (ロットチェック)、及び使用するすべてのボトルにおける培地受け入れ試験 (ボトルチェック)を実施し、可能な限り安定した製造を行うための体制をとっている。

1) 実施方法

以下に我々が実施している無血清培地の受け入れ試験の概略を述べる。

<培地受け入れ試験 (ロットチェック)>

(1) 細胞調整方法

AutoMACSシステムを用いて臍帯血中のCD34陽性細胞を分離、液体窒素中に凍結保管する。培養直前に解凍し、その純度を確認する。

(2) 細胞培養方法

対象となるQBSF-60培地にサイトカインを添加し、SCF, FL, FP6を終濃度で各々100ng/ml、TPOを10ng/mlになるよう調整する。(1)で調整したCD34陽性細胞を各培地に浮遊させ、24wellプレートに細胞濃度 1×10^4 cells/1ml/wellで播種、37℃, 5%CO₂, 湿度95%で培養する。各培地triplicate、またコントロールとしてサイトカイン添加10%FBS MEM- α 培地での培養を行う。培養4日目に培地を添加、2倍希釈し培養を継続する。

(3) 細胞数測定方法

7日間培養後、細胞を回収し、トリパンブルー染色法にて各wellの生細胞数、死細胞数を測定する。細胞密度、生存率を算出し、各細胞、培地3wellの平均値から生細胞数増幅率を算出する。

(4) 判定規格値

細胞数増幅率 87倍以上

<培地受け入れ試験 (ボトルチェック)>

(1) Daudi細胞の継代培養方法

凍結保管してあるDaudi細胞を解凍後、10%FCS添加RPMI1640培地(SIGMA R0883)にて37℃, 5% CO₂, 湿度95%で培養する。2~ 10×10^5 cells/mlの範囲内で培養するために2~3日ごとの継代作業を行う。

(2) 細胞増殖判定法 (ATPアッセイ法)

継代培養4~16日間、直前の継代から2日培養後のDaudi細胞を用い、評価するQBSF-60培地に 1×10^3 cells/100 μ lの細胞密度で暴露する。96 well白色プレートにて

37℃, 5% CO₂, 湿度95%で48時間培養後、CellTiter-Gro Luminescent Cell Viability Assay Kit (Promega G7571/2/3)による細胞増殖測定 (ATPアッセイ法)を行う。本システムは代謝活性のある細胞に由来するATPを定量することで培養中の生細胞数を決定するシステムである。尚測定は各培地triplicateにて、またnegative controlとして培地のみのwellを設定して行う。

室温と平衡にしたプレートにATP標準濃度溶液(0, 1.0, 10, 100nM, 1.0μM)を設定し、添付文書に従い各wellに試薬を100μl/well添加、10分経過後にルミノメータLmax Pro (Molecular Devices)での測定を行う。

(3) 測定結果の解析

解析は付属のソフトSOFTmax Pro (Molecular Devices)にて行い、ATP標準溶液の蛍光強度をもとに検量線を作成し、各サンプルの蛍光強度よりATP値を算出する。

(4) 判定規格値

ATP値 154.4nM 以上

2) 事例

2006年3月27日 QBSF-60 培地 10本を、阪急交通社を通じ伊藤忠ケミカルフロンティア社より搬入、手順(手順書B-F-112「QBSF-60 培地管理手順」)に従い目視による「受け入れ時製品確認」が行われた。製品は発注時の型番 Cat. No. 160-204-101 と同一のものであり、輸送に伴う培地の泡立ちは認めるものの明らかな色調変化等認めず、また未開封の状態で4℃にて維持搬送されていたことから、いずれも合格品として搬入された。製造管理責任者より各々に対し管理番号QB4-9~QB4-18が付与され、CPC内の冷蔵保管庫(管理番号CPC-50-01)において4℃保管された。尚今回入荷した培地のlot No.はQB4-9~QB4-18いずれも2005年11月29日入荷分QB4-1~QB4-8と同様のNo.714093であり、製造元への試験成績書の請求、並びにロット試験(2005年12月19日に実施、合格を確認)は実施されなかった。

2006年6月7日製造管理責任者より品質管理責任者にQB4-9~QB4-13のボトル試験依頼があり、2006年6月8日手順書B-F-208「培地試験」に従いCPCにおける培地サンプリング、培地搬出が実施され、2006年6月7日よりB-F-418「培地受け入れ試験(ボトルチェック)」に従いボトル試験が実施された。

3) 結果

(1) 培地受け入れ試験(ボトルチェック)

(1)-1 外観観察

外観観察を行ったところ色調変化は認められなかったが、QB4-10においてボ

トル底部に白色沈殿物が認められた。この沈殿物は攪拌によっても消失しなかった。また、QB4-15 以外の他のボトルにおいても、微量ではあるが同様の沈殿物が確認された。

白色沈殿が確認された QB4-10 をサンプリングし、96Well プレートに播種し、顕微鏡下での確認を行った。弱拡大では全体に線状、一部それらが屈曲したような異物が観察された。強拡大では、金属様の色調を呈した針状のものや、粒球状の異物が観察され、時にこれらが集簇している像が観察された。これらの異物に運動性はなく、静置により沈降した。また、QB4-4 の他、外観上微量の沈殿物が確認されたボトルではこのような異物は検鏡では確認されなかった。

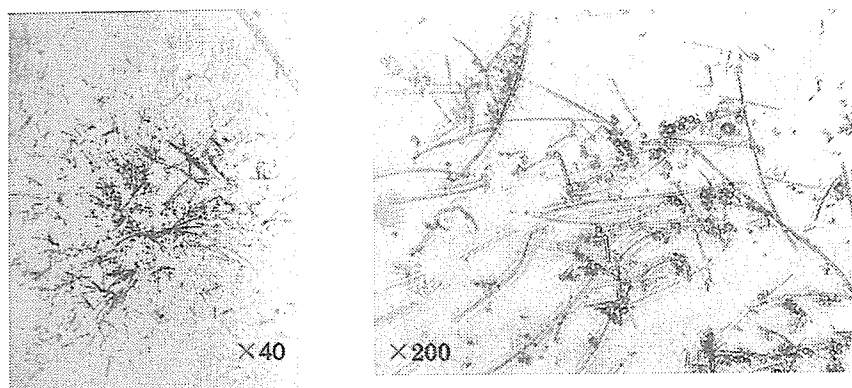


Fig. 6 白色沈殿検鏡写真

QB4-4, QB4-10 における 4℃ 保管時、並びに 37℃ 加温時の pH について pH メータ (MP225, METTLER TOLEDO) を用い測定した結果、QB4-4: pH7.11 (4℃), pH7.02 (37℃)、QB4-10: pH7.06 (4℃), pH6.91 (37℃) であり、いずれも製品の試験成績書に記載されている pH7.0±0.2 の範囲内であった。

(1)-2 Daudi細胞の継代培養

継代培養3日目のDaudi細胞 (生存率86.4%)をQB4-4及びQB4-10の混合培地に5, 24, 48時間暴露し、各々の生存率をトリパンブルー染色法により算出した。培養は96 wellプレートにて 1×10^4 /well/100 μ lの細胞密度、37℃, 5% CO₂, 湿度95%の条件下で行った。

QB4-10 のみの培地 QB4-10 %100 に暴露した場合、5 時間後には 4.4% まで生存率が低下しており、以後回復することはなかった。また QB4-4 と QB4-10 を 1:1 の割合で混合した培地 QB4-10 %50 に暴露した場合、5 時間後 34.6%、24 時間後には 11.8%、48 時間後には 2.1% と漸減した。一方 QB4-4 と QB4-10 を 9:1 の割合で混合した培地 QB4-10 %10、及び QB4-4 のみの培地 QB4-10 %0 に暴露した場合にはほとんど生存率に変化を認めなかったことから、QB4-10 の混合比率依存的に生存率が低下すると考えられた (Table 13)。