

は移植早期～中期に検出された。赤芽球癆は認められなかったが、1例で生着の遅延を認めた。

6. BKVが検出された症例の解析

BKVが検出された5例のうち臨床症状が無かった例が1例、腸炎が1例、発熱が2例あったが、出血性膀胱炎を呈した患者はいなかった。BKVは移植中期～後期に検出された。CMVと同時に検出される例が多かったが、ウイルス血症と出血性膀胱炎発症との関連は認められなかった。

7. スポット検査例の解析

スポット検査は33症例からえた合計121サンプルに対して行った。検体の種類と症例数、検体数と、それらの症例の臨床症状は以下の図に示す通りである。

<検体>

検体	症例数	検体数
血液	33例	83件
尿	9例	29件
便	1例	2件
髄液	6例	6件
胸水	1例	1件
計	33例	121件

<症状、検査異常>

	症例数	検体数
発熱	19例	23件(血液)
血尿	6例	52件(血液:26,尿26)
肝機能障害	15例	24件(血液)
意識障害	5例	6件(髄液)
HPS	3例	3件(血液)
下血	1例	2件(便)
胸水貯留	1例	1件(胸水)

移植後発熱があった19例23検体のうち48%の検体からウイルスが検出され、CMV(20%),

EBV(16%)の検出率が高かった。ウイルス陰性例では、GVHDが38%、細菌感染が31%だった。血尿を認めた6例52検体(尿26、血液26検体)を測定した結果、ウイルス性の出血性膀胱炎と判定されたのは6例で、ADVが4例、BKVが2例だった。診断時のウイルス量はいずれも 10^5 コピー/ml以上と高値だった。診断時の末梢血はADV陽性例で75%、BKV陽性例で50%がウイルス陽性だった。ADVは治療後臨床症状の改善に相関してウイルス量の減少を認めたら、BKVは症状改善後も高いコピー数が検出される例が多かった。また、71%の検体で複数のウイルスが検出された。

肝機能障害を呈した15例の患者由来の24検体(末梢血)の測定を行ったところ、37%の検体がウイルス陽性(CMV29%, EBV6%, HHV64%)で、CMVが検出された患者においてはGOT, GPTの上昇に先立ってウイルス量の上昇があり、ガンシクロビル投与により改善が認められた。

その他、意識障害6例中1例からHHV6が検出され、サイクロスポリン、FK506による脳症との鑑別に有用だった。血球貪食症候群の症例3例中1例でウイルスが検出され、複数ウイルス感染が証明された。また、胸水貯留例ではHHV6のウイルス血症が先行し、血液中のウイルスが陰性化しても供水からHHV6が検出された。

D: 考察

高感度網羅的迅速ウイルス検査を造血幹細胞移植患者45例に対して行った。作成したマルチプレックスPCR系は、定性検出後に異なる配列のプライマーにより定量を行なう

ため、擬陽性ではないことをダブルチェックにより確認できる。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。PVB19の Genotypel-3のうち今回の系は Genotypelのみ検出可能であるが、臨床検体から検出されるウイルスの大半は Genotypel 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。ADVについても疾患に関係するサブタイプ 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 16, 17, 19, 21, 28, 31, 34, 40, 48全てを十分な感度 (10 コピー/tube) で検出できることを確認している。

高感度網羅的 PCR ウイルス検査によるモニタリングを行うことでウイルス感染症の早期診断、早期治療によって TRM の減少が期待されるが、今回の解析では 12 例と症例数が少なく、その有用性を明らかにすることはできなかった。しかし、241 検体中、高感度網羅的 PCR にて陰性の症例でウイルス感染症と診断された例はなく、ウイルス感染症の否定には有用性が高いと考える。

E: 結論

高感度網羅的迅速ウイルス検査を造血幹細胞移植患者 45 例に対して行った。経時的モニタリングを行った 12 例では、ウイルスが陽性化した 11 例中 10 例で経過中に複数種のウイルスが検出された。CMV においてはウイルス血症に先行して陽性化し、また好中球の生着前においても検出され、CMV 感染症の診断、治療反応の指標となりうることが示唆された。治療を要さない一過性の再活性化も認

めた。高感度網羅的 PCR ウイルス検査によるモニタリングを行うことでウイルス感染症の早期診断、早期治療によって移植関連死亡の減少が期待される。しかし、今回の解析では症例数が少なくその有用性を明らかにするには至っていない。今後、さらに症例の蓄積を行い、検出されたウイルス種、そのコピー数と臨床症状との相関関係を明らかにし、本検査の臨床的意義を確立していく予定である。

F: 健康危険情報 なし

G: 研究発表

論文発表

1. Sugita S, Shimizu N, Kawaguchi T, Akao N, Morio T, Mochizuki M. Identification of human herpesvirus 6 variant A in a patient with unilateral panuveitis. *Arch.of Ophthalmol.* in press.
2. Kido S, Sugita S, Horie S, Miyanaga M, Miyata K, Shimizu N, Morio T, Mochizuki M. Association of varicella-zoster virus (VZV) load in the aqueous humor with clinical manifestations of anterior uveitis in herpes zoster ophthalmicus and zoster sine herpete. *Br. J. Ophthalmol.* in press.
3. Takahashi H, Sugita S, Shimizu N, Mochizuki M. A high viral load of EBV DNA in ocular fluids in a HLA-B27 negative acute anterior uveitis patient with psoriasis. *Jap.J. Ophthalmol.* in press.
4. Watanabe S, Terashima K, Ohta S, Horibata S, Yajima M, Shiozawa Y, Dewan Z, Yu Z, Ito M, Morio T, Shimizu N, Honda M, and Yamamoto N.

Hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL2R γ null mice develop human lymphoid system and induce long-lasting HIV-1 infection with specific humoral Immune Responses. *Blood*. 109:212-218, 2007.

5. Kawaguchi T, Sugita S, Shimizu N and Mochizuki M. Kinetics of aqueous flare, intraocular pressure and virus-DNA copies in a patient with cytomegalovirus iridocyclitis without retinitis. *Int. Ophthalmol.* 27:383- 386, 2007.

6. Watanabe S, Ohta S, Yajima M, Terashima K, Ito M, Mugishima H, Fujiwara S, Shimizu K, Honda M, Shimizu N and Yamamoto N. Humanized NOD/SCID/IL2R γ null mice transplanted with hematopoietic stem cell under non-myeloablative condition show prolonged life spans and allow detailed analysis of HIV-1 pathogenesis. *J. Virol.* 81:13259-13264, 2007.

7. Kanno H., Watabe S, Shimizu N. and Sawai T. Adhesion of Epstein-Barr virus-positive natural killer cell lines to cultured endothelial cells stimulated with inflammatory cytokines. *Clin.Exp.Immunol.* 151:519-527, 2007.

学会発表

1. 山本紗也香、杉田 直、岩永洋一、臼井友香、菅本良治、望月 學、清水則夫、森尾友宏：急性網膜壊死（ARN）の眼内液のPCR法を用いたヘルペスウイルス遺伝子同定 第41回日本眼炎症学会 2007年7月 東京
2. 宮永 将、川口龍史、杉田 直、望月 學、清水則夫、森尾友宏、宮田和典：経時的に前房水ウイルス量を測定したサイトメガロウイルス

ス前部ぶどう膜炎の1例 第41回日本眼炎症学会 2007年7月 東京

3. 木戸さやか、杉田 直、川口龍史、岩永洋一、望月 學、清水則夫、森尾友宏、宮永 将、宮田和典：VZV虹彩毛様体炎における前房水中のVZV-DNAコピー量と臨床所見との関連性 第41回日本眼炎症学会 2007年7月 東京

4. 木戸さやか、杉田 直、二神百合、堀江真太郎、岩永洋一、佐々木秀次、望月 學、清水則夫、森尾友宏：経過中に上皮型ヘルペスを合併した角膜内皮炎の4症例 第61回日本臨床眼科学会 2007年10月 京都

5. 鴨居功樹、杉田 直、木戸さやか、堀江真太郎、菅本良治、望月 學、清水則夫、森 浩士、宮永 将、宮田和典：皮膚症状を伴わない水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）虹彩毛様体炎の3例 第61回日本臨床眼科学会 2007年10月 京都

6. 清水則夫 森尾友宏、滝澤淳、渡邊健、水上美樹：口腔内骨膜を用いた組織培養におけるマイコプラズマ菌の検出 第7回再生医療学会総会 2008年3月

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

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

（三菱化学メディエンス株式会社研究開発部長）

研究協力者：松本 浩、柳原 玲

（三菱化学メディエンス株式会社応用開発部）

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、 β -D-グルカン試験の基準値の設定を試みた。結果、*Ex vivo* 増幅臍帯血の製造に用いている QBSF 培地は主にロット毎にその β -D-グルカン濃度が大きく異なる場合があり、QBSF 培地のロット毎に基準値を設定する必要があると考えられた。

新しく開発中の無血清培地について、品質試験の適格性を評価するため、無菌試験法、エンドトキシン試験法及び β -D-グルカン試験法について添加回収による適格性評価を行った。結果、いずれの測定法にも反応干渉のない測定条件が見出された。しかし無血清培地自体に高濃度の β -D-グルカンが検出されたため、真菌の迅速な検出法として β -D-グルカン試験を行うには、培地中の β -D-グルカンの由来を特定するなどさらなる検討が必要と考えられた。

また、本年度は *Ex vivo* 増幅臍帯血臨床研究一例目の症例について品質試験を行った。

A. 研究目的

1. β -D-グルカン試験基準値設定の試み

真菌細胞壁の構成成分である β -D-グルカンの測定は、細胞浮遊液の迅速な真菌検出法として期待できる。しかし、臨床検査用に市販されている測定キットに細胞浮遊液の基準値は設定されていない。Ex vivo 増幅臍帯血細胞浮遊液の β -D-グルカン試験を実施するにあたり、同細胞浮遊液の基準値を設定する目的で、細胞浮遊液及び同細胞の培養に用いられた QBSF 培地の β -D-グルカン測定データを蓄積し、基準値の設定を試みた。

2. 無血清培地品質試験の適格性評価

現在先端医療センター血液再生研究グループにおいて、細胞増幅率の向上を目指した新規無血清培地を開発中である。本培地を用いて製造された細胞培養液の品質試験法を構築するにあたり、無菌試験法、エンドトキシン試験法及び β -D-グルカン試験法の添加回収試験による適格性評価を行った。

3. 臨床研究品質試験

本年度は Ex vivo 増幅臍帯血の臨床研究一例目が行われた。その品質試験工程について評価した。

B. 研究方法

1. β -D-グルカン試験基準値設定の試み

菌種により細胞壁成分である β -D-グルカン量が異なる等の理由

により真菌数と β -D-グルカン量には一定の相関がないと言われている。また、 β -D-グルカンは真菌のみならず植物の細胞壁の構成成分でもあるため、環境中に豊富に存在し、セルロース膜によりろ過された試薬等には β -D-グルカンが高濃度に混入していることが知られている。このような背景から、Ex vivo 増幅臍帯血細胞浮遊液の β -D-グルカンのバックグラウンドレベルを調べるために、無菌試験により真菌の存在が否定された Ex vivo 増幅臍帯血細胞浮遊液及び同細胞の培養に用いられた QBSF 培地の β -D-グルカン濃度データを取得した。 β -D-グルカンの測定には生化学工業社のファンギテック G テスト MK を用いた。 β -D-グルカンを測定する際には併行して添加回収試験を行い、反応干渉作用を認めなかった検体のデータを蓄積した。蓄積したデータについて基準値設定の可能性を考察した。

2. 無血清培地品質試験の適格性評価

無菌試験の適格性評価は第十四改正日本薬局方第二追補の無菌試験バリデーション法に準じた。すなわち、無菌試験培地に、試験対象である無血清培地試料と 6 種類の標準菌を 100 CFU 以下となるよう添加した。対照とする標準菌のみを接種した培養液との比較により、無血清培地による菌の発育阻害の有無を評価した。

エンドトキシン試験の適格性評価は、第十四改正日本薬局方の反応干

渉因子試験に準じた。すなわち、試験対象である無血清培地にエンドトキシン標準品を 0.024 EU/mL の濃度となるよう添加し、その回収率を求め、無血清培地による反応阻害の有無を評価した。エンドトキシンの測定には生化学工業社のエンドスペシ-ES-50M を用いた。

β -D-グルカン試験の適格性評価は、エンドトキシン試験法の反応干渉因子試験に準じた。すなわち、試験対象である無血清培地に β -D-グルカン標準品を 20pg/mL の濃度となるよう添加し、その回収率を求め、無血清培地による反応阻害の有無を評価した。 β -D-グルカンの測定には生化学工業社のファンギテック G テスト MK を用いた。

3. 臨床研究品質試験

SOP に従い、増幅臍帯血 (IBRI-11) の品質試験を行った。試験項目は day0 に無菌試験及びエンドトキシン試験、day7 に無菌試験、day10 にウイルス遺伝子検査、day12 にマイコプラズマ遺伝子検査、 β -D-グルカン試験、エンドトキシン試験及び無菌試験を行った。尚、 β -D-グルカン試験については予め培養に使用する QBSF 培地 (ボトル 7-2 及び 7-3) について β -D-グルカン濃度を測定し、同培地の β -D-グルカン濃度+3.3SD を仮の基準値 (各々 7.5 pg/mL 及び 6.3 pg/mL) として定め、試験判定に供した。

C. 研究結果

1. β -D-グルカン試験基準値設定の試み

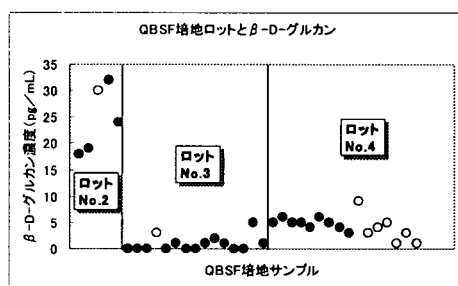
2005年7月から2008年1月までに Ex vivo 増幅臍帯血細胞浮遊液 34 検体及び QBSF 培地 25 検体の β -D-グルカン濃度を測定した。測定した検体に用いられた QBSF 培地のロット数は 6 個であった。

最初の検討ロットとなった QBSF 培地ロット No.2 を用いた 4 検体の細胞浮遊液の β -D-グルカン濃度は 18~32pg/mL であった (いずれも無菌試験により菌は検出されなかった)。 β -D-グルカンの測定に用いたファンギテック G テスト MK の測定レンジは 500pg/mL~3.9pg/mL であるが、血漿及び血清を検体とした場合の深在性深菌感染症の治療選択カットオフ値が 20pg/mL、経過観察の対象となる濃度は 10~20pg/mL であることから、細胞浮遊液のなんらかの成分がある程度の β -D-グルカン様の反応を引き起こしていることが考えられた。ロット No.2 の QBSF 培地そのものの β -D-グルカンを測定した結果 30pg/mL の β -D-グルカンが検出されたことから、QBSF 培地に β -D-グルカンが混入、或いはグルカン様の反応を引き起こす成分が含まれていると推察された。

ロットが更新された QBSF 培地について引き続き β -D-グルカンを測定した結果、QBSF 培地ロット No.3 では細胞浮遊液 (14 検体) も QBSF 培地 (1 検体) もファンギテック G テスト MK

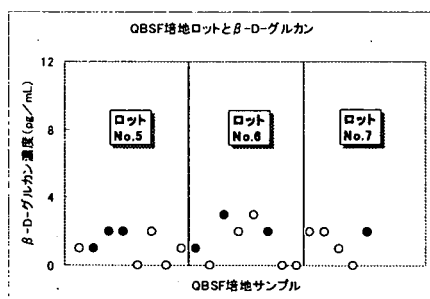
の検出限界 (3.9pg/mL) 付近の β -D-グルカン濃度 (0.9 ± 2.9 pg/mL) を示した。QBSF 培地ロット No. 4 もロット No. 2 に比較して低値を示したが、ロット No. 3 と比較すると若干ではあるものの高値傾向を示した (4.3 ± 3.9 pg/mL 下図 1)。また、同一ロットであっても培地のボトルにより、他のボトルよりも若干の高値 (9pg/mL) を示す例が認められた (ロット No. 4)。

【図 1】 QBSF 培地ロットと β -D-グルカン



さらに継続して β -D-グルカンを測定した。QBSF 培地ロット No. 5、No. 6 及び No. 7 の細胞浮遊液 (7 検体) と QBSF 培地 (14 検体) はいずれもキット仕様の測定レンジ以下であった (No. 5 : 1.1 ± 1.7 pg/mL、No. 6 : 1.4 ± 2.6 pg/mL、No. 7 : 1.4 ± 1.8 pg/mL 下図 2)。

【図 2】 QBSF 培地ロットと β -D-グルカン



以上の結果、QBSF 培地の β -D-グルカン濃度にはロット間差があることが明らかとなった。仮にロット No. 5、No. 6 及び No. 7 について、無菌であった培地及び細胞浮遊液の平均 β -D-グルカン濃度 + 3.3SD を基準値としても (No. 5 : 3.9 pg/mL、No. 6 : 5.7 pg/mL、No. 7 : 4.4 pg/mL)、無菌試験により真菌の存在が否定されたロット No. 4 の 3 検体以上が基準値を超えてしまうため、QBSF 培地共通の基準値設定は困難と考えられた。

2. 無血清培地品質試験の適格性評価

(1) 無菌試験適格性評価

無菌試験培地に接種した標準菌 6 種は共に接種した無血清培地試料の影響を受けることなく、標準菌のみを接種した培養液と同じ速度で発育し、発育阻害は認められなかった (下表 1)。

【表 1】 無菌試験バリデーション

培養液	発育が確認された培養日数
試料 + <i>S. aureus</i>	1日
試料 + <i>P. aeruginosa</i>	1日
試料 + <i>C. sporogenes</i>	1日
試料 + <i>B. subtilis</i>	1日
試料 + <i>C. albicans</i>	2日
試料 + <i>A. niger</i>	2日
<i>S. aureus</i>	1日
<i>P. aeruginosa</i>	1日
<i>C. sporogenes</i>	1日
<i>B. subtilis</i>	1日

<i>C. albicans</i>	2日
<i>A. niger</i>	2日

(2) エンドトキシン試験適格性評価

原濃度の無血清培地、5倍希釈した無血清培地及び10倍希釈した無血清培地に最終濃度 0.024 EU/mL となるよう、エンドトキシン標準品を添加し、その回収率を求めた(下表2)。添加回収率は日本薬局方の基準(50~200%)の範囲内であったことから、原濃度から10倍希釈濃度までの無血清培地に反応干渉作用はないと判断した。

【表2】 エンドトキシン試験添加回収試験

試料	添加回収率
原濃度試料	75%
5倍希釈試料	83%
10倍希釈試料	88%

(3) β -D-グルカン試験適格性評価

原濃度の無血清培地、5倍希釈した無血清培地及び10倍希釈した無血清培地に最終濃度 20 pg/mL となるよう、 β -D-グルカン標準品を添加し、その回収率を求めた。しかし、標準品を添加しない原濃度の試料に測定レンジを超える高濃度の β -D-グルカンが検出された為、原濃度試料の適格性は評価できなかった(下表3)。

【表3】 β -D-グルカン試験添加回収試験

試料	試料の β -D-グルカ	添加回収率

	濃度	
原濃度試料	639pg/mL	
5倍希釈試料	189pg/mL	100%
10倍希釈試料	92pg/mL	160%

しかし、5倍希釈及び10倍希釈試料はともにその回収率が50~200%であったことから、少なくとも5倍希釈及び10倍希釈の無血清培地に反応干渉作用はないと判断した。

3. 臨床研究品質試験

臨床研究1例目 IBRI-11の品質試験を行った。結果を下表4に示す。

【表4】 IBRI-11の品質試験

試験項目	結果
Day0 検体	
エンドトキシン試験	検出限界未満
無菌試験	菌の発育を認めず
Day7 検体	
無菌試験	菌の発育を認めず
Day10 検体	
ウイルス遺伝子検査	検出せず
Day12 検体	
マイコプラズマ遺伝子検査	検出せず
β -D-グルカン試験	2 pg/mL (基準値*以下)
エンドトキシン試験	検出限界未満
無菌試験	菌の発育を認めず

※培養に用いたQBSF培地について臨床研究前に設定した仮の基準値：7.5 pg/mL 及び6.3 pg/mL

品質試験はすべて下表5の精度管理基準を満たし、day12試験は再試験分*を含め期限時間までに報告した。

【表5】精度管理基準

精度管理基準
<p>【エンドトキシン試験】</p> <p>①添加回収率が50～200%の範囲内</p> <p>②試験用水の吸光度変化率が 1.0 mAbs/min 以下</p> <p>③検量線の相関係数 r が0.980以上</p>
<p>【無菌試験】</p> <p>①陰性対照培養液に菌の発育を認めない</p>
<p>【ウイルス遺伝子検査】</p> <p>①陽性コントロールの増幅曲線及び Ct 値が検出される</p> <p>②陰性コントロールに増幅曲線が検出されない</p> <p>③50copies/PCRTube の添加回収試験において増幅曲線及び Ct 値が検出される</p>
<p>【マイコプラズマ遺伝子検査】</p> <p>①陽性コントロールの増幅曲線及び CP 値が検出され、且つ電気泳動により、約 270bp の特異的バンドが検出される</p> <p>②陰性コントロールに、電気泳動による約 270bp の特異的バンドが検出されない</p> <p>③50copies/PCRTube の添加回収試験において増幅曲線及び CP 値が検出される且つ電気泳動により、約 270bp の特異的バンドが検出される</p>
<p>【β-D-グルカン試験】</p> <p>①添加回収率が50～200%の範囲内</p> <p>②試験用水の吸光度変化率が 1.0 mAbs/min 以下</p> <p>③検量線の相関係数 r が0.980以上</p>

※エンドトキシン試験において、作業記録の確認不足による試薬調製ミスが生じ、再検査を行った。

再発を防止するため SOP を改訂した。

D. 考察

1. β-D-グルカン試験基準値設定の試み

QBSF 培地の β-D-グルカン濃度に明確なロット間差を認めたため、一定の基準値を設定することは難しく、QBSF 培地のロットごとに基準値を設定する必要があると考えられた。

また同一ロット内において、ボトルにより若干の高値を示す例も認められた。稀な例ではあるが、検討例数そのものも少ないため、ボトル間差については更なる検討が必要であると考えられた。

2. 無血清培地品質試験の適格性評価

無血清培地の、無菌試験のバリデーション試験、エンドトキシン試験の反応干渉因子試験及び β-D-グルカン試験の反応干渉因子試験はいずれも適合基準を満たし、無血清培地の無菌試験、エンドトキシン試験及び β-D-グルカン試験は可能と考えられた。しかし、原濃度無血清培地の β-D-グルカン濃度が測定レンジ上限 (500 pg/mL) を上回り、10 倍希釈液においても高濃度 (92 pg/mL) を示したことから、このままでは迅速な真菌検出法としては使用することは困難であると考えられた。今後は無血清培地の調製に用いた試薬の確認を行うと共に、別ロットの試薬の β-D-グルカン濃度も測定し、無血

清培地に β -D-グルカン試験が適用できるかどうかを評価していく必要があると考えられた。

なし

3. 臨床研究品質試験

今回初めて臨床研究の品質試験を行った。操作ミスによる再検査はあったが、再検査を含めて期限内に結果報告することが可能であった。精度管理基準もすべての試験において適合し、実製造の細胞でも試験が成立することが確認された。

E. 結論

QBSF 培地の β -D-グルカン試験を行うためには、少なくとも QBSF 培地のロット毎に基準値を設定する必要がある。

無血清培地の無菌試験、エンドトキシン試験は可能であった。 β -D-グルカン試験も無血清培地による反応干渉作用は認めなかったが、無血清培地自体に高濃度の β -D-グルカンが検出されたため、由来を特定し、 β -D-グルカンの混入を防ぐことができなければ β -D-グルカン試験は適用できない。

これまでに構築してきた品質試験体制は実際の臨床研究において有効に機能した。

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

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
安全性に関する検討

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

これまで本分担研究において、我々が開発した臍帯血 *ex vivo* 増幅法(Nakahata 法)と既に海外で臨床応用されている方法にて得られた細胞を用いた免疫不全マウス (NOD/SCID マウス)への移植実験による短期骨髄再構築能の比較検討により、Nakahata 法にて増幅された細胞が高い骨髄再構築能を有することを確認した。本年度は、*ex vivo* 増幅臍帯血の効果に関する評価に引き続き、非臨床安全性試験の一環として、移植細胞がレシピエントの正常な細胞または組織に与える影響を検討すべく、移植後長期のマウス組織における病理組織学的検査を行った。また、移植細胞の *in vivo* における安全性を評価するため、移植後長期のマウス骨髄における生着ヒト血球の染色体解析を行った。

移植後長期観察の結果、体重減少、脱毛といった外観の異常所見は認めず、剖検時の肉眼的観察では組織肥大等の異常所見は認めなかった。病理組織学的にも各組織の構造は保たれており、細胞浸潤や壊死等の異常を示唆する所見は認めず GVHD を疑う所見は確認されなかった。また、これらの所見は対照マウス（未処理 CD34 陽性細胞移植マウス）においても同様で両者に明らかな違いは認められず、増幅細胞の移植によるレシピエントの細胞、組織への影響はないと考えられた。染色体解析においても G-band 分染法、m-FISH 法にて異常所見は確認されず、Nakahata 法では以前の検討にて移植後生着細胞の自己複製能の高さが示唆されていたが、生着ヒト血球細胞の分裂過程において染色体異常が生じる可能性は否定された。本研究は、異種間移植系を用いての治療用細胞製剤の安全性に関する前臨床試験として位置づけられるものである。

A. 研究目的

Ex vivo 増幅臍帯血を含むヒト由来の細胞・組織を加工した医薬品等の品質及び安全性の確保に関しては「ヒト由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(医薬発第 1314 号)」に製造方法、製造工程、及び最終製品におけるその基本的要件が示されている。とくに最終製品に関しては“安全性及び効能を、技術的に可能かつ科学的に合理性のある範囲で、実験動物を用いた適切に設計された試験により検討すること”が求められている。

これまで本分担研究では、我々が開発した方法(Nakahata 法)、及び海外で臨床応用されている方法を用いて増幅した細胞を免疫不全マウス (NOD/SCID マウス) に移植し、短期骨髄再構築能の比較検討を行うことで *ex vivo* 増幅した臍帯血の効力および性能についての評価を実施してきた。

その結果、Nakahata 法により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、マウス骨髄および末梢血において移植後早期から高いヒト血球キメリズムが得られることが確認された。さらに骨髄中の赤芽球系、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、他の群に比し、より早期から出現する傾向にあり、Nakahata 法により増幅された細胞が高い骨髄再構築能を有することが確認されたことから、

Nakahata 法により増幅した細胞を用いることにより、先行した臨床研究では得られなかった移植後の生着促進効果が期待できると推測された。

本年度は、*ex vivo* 増幅臍帯血の効果に関する評価に引き続き、非臨床安全性試験の一環として、増幅した細胞を移植した際の体内動態、ならびに移植細胞がレシピエントの正常な細胞または組織に与える影響を検討するため、移植後長期のマウス組織における病理組織学的検査を行った。また移植細胞の *in vivo* における安全性を評価するため、移植後長期のマウス骨髄における生着ヒト血球の染色体解析を行った。

B. 研究方法

1. NOD/SCID マウスへの移植

・移植細胞: 臍帯血由来 CD34 陽性細胞 1E+04 個を SCF, FL, IL-6/sIL-6R 各 100ng/ml, TPO 10ng/ml 添加無血清培地 QBSF-60 (Quality Biological 社)にて 2 週間培養(37℃, 5%CO₂, humidity 95%)し得られた細胞

なお、未処理 CD34 陽性細胞 1E+04 個を移植したマウスを対照とした。

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

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

2. 解析

1) 移植後マウス組織の病理評価

移植後 21 週にマウスの剖検(増幅細胞移植マウス、対照マウス 各 n=1)を行い、脾、肝、肺、骨髄、腹大動脈、腎、膵、心、胸腺、リンパ節、精巣、皮膚(背部)、脳、回盲部を摘出した。各臓器を 10%ホルマリンでの固定後、パラフィン切片による H-E 染色を行い、各組織において変性、炎症所見の有無の確認を行った。なお剖検マウスの骨髄血におけるヒト血球キメリズムは、増幅細胞移植マウス: 64.4%、対照マウス: 42.8%であった。

2) 生着ヒト血球細胞の染色体検査

移植後 30 週のマウス骨髄血を採取し、サイトカイン(Nakahata 法)および 10%FCS 添加 α MEM 培地にて 24 時間より(PHA 非添加)し、G-band 分染法、及び multi color-FISH(m-FISH)法にて解析を行った。なお用いたマウス骨髄血におけるヒト血球キメリズムは、増幅細胞移植マウス: 82.55%、対照マウス: 78.02%であった。

3. 倫理面の配慮

本研究で用いた臍帯血はインフォームドコンセントのもと臍帯血提供機関(兵庫さい帯血バンク)に提供され、日本さい帯血バンクネットワーク、及び先端医療センター内の倫理委員会にて承認されたものを用いた。

C. 研究結果

1. 病理学的検討

Ex vivo 増幅臍帯血移植および、対象群として通常の臍帯血移植を行ったマウス

において全身の体重減少および脱毛等の外観変化は認められなかった。

組織学的検討を臓器毎に示す。

1) 脾臓

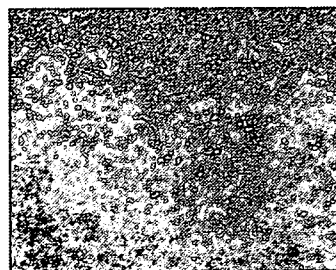


Fig. 1 増幅細胞移植後 21 週のマウス脾臓組織標本 (H-E 染色, $\times 100$)

濾胞構造は保たれ、赤脾髄、白脾髄とその中央部にある胚中心が確認された。ヒト細胞は脾洞とその周囲に多く認められたが、胚中心を伴う濾胞中のリンパ球は主にマウスリンパ球であることが確認された。(Fig.1)。

2) 肝臓

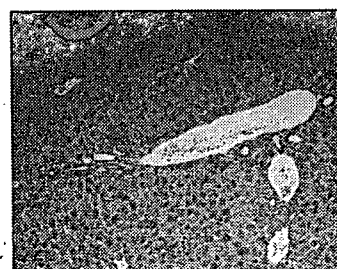


Fig. 2 増幅細胞移植後 21 週のマウス肝臓組織標本 (H-E 染色, $\times 100$)

肝小葉は大小不同なく、中心静脈周囲から Glisson 鞘ともにマウス肝細胞から成り、リンパ球の浸潤などの炎症所見、繊維化などの慢性的炎症所見は見られなかった。(Fig.2)。

3) 肺



Fig. 3 増幅細胞移植後 21 週のマウス肺組織標本 (H-E 染色, ×25)

肺胞壁構造は保たれ、肺胞内への浸出液、炎症細胞浸潤も認めなかった。(Fig.3)。

4) 骨髄

細胞数は正形成で血管周囲にヒト細胞の集簇が見られた。ヒト細胞は赤芽球、巨核球、顆粒球、リンパ球が認められ、細胞種による偏りは認めなかった。

5) 腹部大動脈

内皮、筋層に変成、炎症細胞の浸潤を認めず、ヒト細胞の分布はなかった。

6) 腎臓

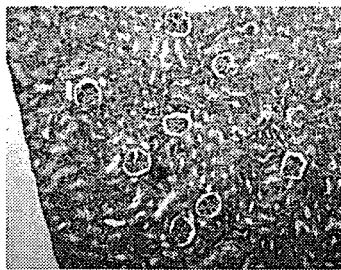


Fig. 4 増幅細胞移植後 21 週のマウス腎組織標本 (H-E 染色, ×100)

皮質には腎小体を認め、糸球体に炎症等の所見は認めなかった。髓質では腎盂に注ぐ集合管が確認され各構造は維持されていた。

7) 脾臓

結合組織によって小葉に分かれ、小葉

内にはランゲルハンス島、脾管を認めた。また、脾管にそって血管を認め、炎症所見等は確認されなかった。

8) 心臓

心筋層には血管を認め、炎症所見の他、心筋の変性といった異常所見は認めなかった。

9) 胸腺

多数の小葉から成り構造異常は認めなかった。皮質には T リンパ球と思われる細胞が多数認められた。

10) リンパ節

皮質にはリンパ小節を単位として認め、その中心部である胚中心には特徴的な明瞭部が確認され構造異常は認めなかった。

11) 精巣

精細管と間質から成り、血管は少ない。組織の変性といった異常所見は確認されなかった。

12) 皮膚 (背部)

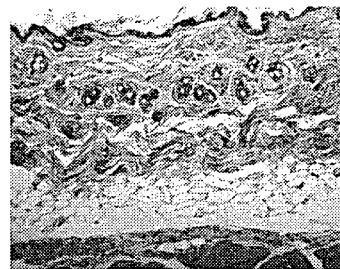


Fig. 5 増幅細胞移植後 21 週のマウス皮膚組織標本 (H-E 染色, ×100)

表皮、真皮、皮下組織の 3 層構造に乱れはなく、深部には筋層を認めた。皮下組織には毛包を認めた。GVHD を疑う皮下組織へのリンパ球浸潤等の所見は認めなかった (Fig.4)。

13) 脳

大脳、小脳とも萎縮等の所見は認めず、ともに皮質と髄質の構造に異常は認めなかった。

14) 回盲部

絨毛部の粘膜層、筋層構造に異常はなく炎症所見も確認されなかった。

以上の所見は対照マウスの組織所見とほぼ同様であった。

2. 生着ヒト血球細胞の染色体検査

1) G-band 分染法

対照マウス、Nakahata 法 (Fig.3) による増幅細胞移植マウスともに生着ヒト血球細胞の染色体異常を示唆する所見は認めなかった。



Fig. 6 Nakahata 法による増幅後、マウス骨髄に生着したヒト血球における G-band 分染解析 (分析バンドレベル; 300、観察細胞数: 30、核型; 46,XX)

2) m-FISH 法

対照マウス、Nakahata 法 (Fig.4) による増幅細胞移植マウスともに生着ヒト血球細胞の染色体レベルでのゲノム構造異常を示唆する所見は認めなかった。

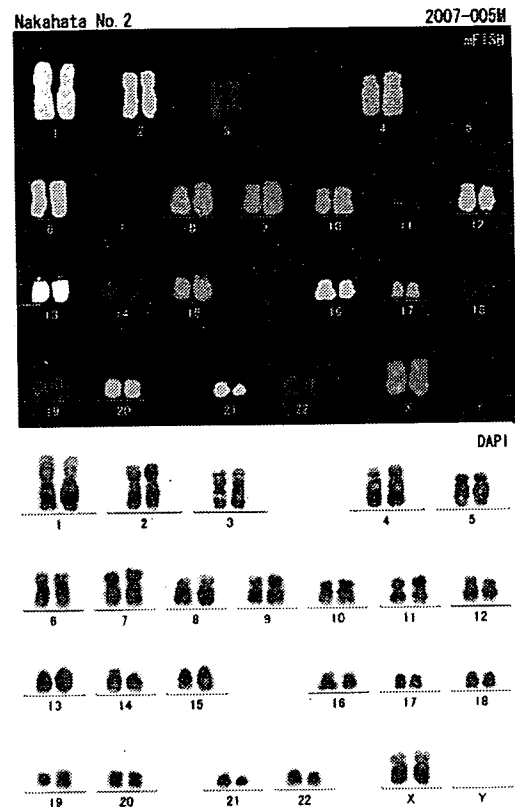


Fig. 7 Nakahata 法による増幅後、マウス骨髄に生着したヒト血球における m-FISH 解析 (観察細胞数: 10、核型; 46,XX)

D. 考察及び今後の展望

移植後長期観察の結果、体重減少、脱毛といった外観検査における異常所見は認めず、移植後 21 週でのマウス剖検時の肉眼的観察では組織肥大等の異常所見は認めなかった。

病理組織学的にも各組織の構造は保たれており、細胞浸潤や壊死等の異常を示唆する所見は認めず GVHD を疑う所見は

確認されなかった。また、これらの所見は対照マウス（未処理 CD34 陽性細胞移植マウス）においても同様の結果を示し、両者に明らかな違いは認められず増幅細胞の移植によるレシピエントの細胞、組織への影響は及ぼさないと考えられた。

染色体解析に関しては、増幅により細胞は染色体の分裂を繰り返し行うため、増幅過程での染色体異常が起きていないことを確認すべく、増幅後臍帯血における染色体解析を行い G-band 分染法、m-FISH 法にて染色体異常は起きていないことを確認した。

昨年 of *in vivo* での生着効果の検討において、Nakahata 法では他の臨床研究グループの増幅細胞および未処理 CD34 陽性細胞移植群に比べ、移植後長期の骨髄でのヒト血球キメリズムが高く、CD34 陽性細胞が一定の割合で維持され続けた（他の移植群では減少傾向）ことから Nakahata 法での移植後生着細胞の自己複製能の高さが示唆された。このため、生着ヒト血球細胞の分裂過程において染色体異常が生じる可能性を否定すべく、今回、移植後長期のマウス骨髄を用いて生着ヒト血球細胞の染色体検査を行った。結果、G-band 分染法、m-FISH 法にて異常所見は確認されず（対照マウスにおいても同様）、生着細胞がレシピエントの体内で染色体異常を起こす可能性は否定された。

本研究は異種間移植系を用いての、治療用細胞製剤の安全性に関する前臨床試

験として位置づけられるものである。

E. 健康危惧情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表
特になし
2. 学会発表
特になし

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

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

3. 臍帯血 DLI に向けた取り組みと基盤整備

3-1 IL-2 と抗 CD 3 抗体を用いた活性化培養法の臍帯血への応用についての検討

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

本分担研究では、固相化抗 CD 3 抗体と IL-2 刺激による臍帯血リンパ球の活性化培養法を確立し、臍帯血ドナーリンパ球輸注療法を新たな医療として確立することを目的としている。

本年度は、臨床応用に適した培養方法として Bag を用いた閉鎖系培養を行い、臍帯血リンパ球の細胞増幅率及び生存率について検討を行った。また培養した臍帯血リンパ球の表面抗原を解析することにより、増幅した細胞の機能的分類を行った。

培養 Bag を用いることにより最大で総細胞数 52.2 倍、CD3 陽性細胞数 147.5 倍の増幅を得ることができた。また培養した臍帯血リンパ球は、活性化マーカーを十分に発現していること、T 細胞分画にはエフェクター細胞やメモリー細胞が誘導されていることから、本活性化培養により増幅した臍帯血リンパ球は、DLI に応用可能な性質を有している可能性が示唆された。

今後 *in vitro*, *in vivo* における詳細な機能解析、及び安全性の評価を行うと同時に、より臨床応用に適した培養法への改良を進めていく予定である。

A. 研究目的

ドナーリンパ球輸注療法(DLI)は骨髄移植、あるいは末梢血幹細胞移植後の再発、混合キメラ、ウイルス感染症に効果が期待される治療法の一つである。一方臍帯血(CB)移植においては、移植後にドナーのリンパ球を採取することは不可能であり、また採取可能であったとしてもCB中に含まれるリンパ球の表面抗原、サイトカイン産生能等の特性が他の細胞ソースのものと異なることから、輸注後十分な Graft versus leukemia (GVL) effect や速やかな抗ウイルス活性を惹起できない可能性も示唆されている。

本分担研究では、これまでに我々が開発した末梢血リンパ球を活性化、増幅させる培養法(ドナー末梢血中より単核球を分離し、固相化 CD3 抗体と IL-2 刺激により選択的に T リンパ球を増幅、活性化する方法)を応用し、CB リンパ球の活性化培養法を確立すること、さらには活性化 CB リンパ球を用いた臍帯血 DLI を新たな医療として確立することを目的としている。

本年度は、CB リンパ球の培養において、より効率よくかつ安全に細胞を増幅するため、培養期間後期より培養 Bag として培養用 BP 培地 SPin(リンフォテック)を用いた閉鎖系培養法を開発することを目的として以下の検討を行った。

B. 研究方法

1. 使用臍帯血

解析には兵庫さい帯血バンクから供与頂いた3ユニットの実験用 CB(CB 707、CB 733、CB740)を使用した。各々Ficoll Paq (Amersham Biosciences) を用いて分離を行い、単核球層を採取、CP-1 (KYOKUTO) を用いて凍結保存した。

2. 臍帯血活性化培養

基礎培地として 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 700 IU/mL となるように IL-2 (CHIRON) を添加したものをを用いた。培養は 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て行った。各 CB を解凍後 1.0×10^6 cells / mL となるように固相化フラスコへ播種し、37.0℃、97.0%RH、5.0% CO₂ のインキュベータ内で培養を開始した。

IL-2 濃度に関しては、昨年度までに確立した臍帯血リンパ球の至適活性化培養法に準じて、培養液を添加することにより 7 日目には 350 IU/mL に、10 日目には 175 IU/mL に減じ、以降は 14 日目まで 175 IU/mL で培養した。IL-2 濃度の希釈に伴い、各 CB は統一して拡大培養を行い、培養 Bag には培養 10 日目に移入した。

また抗 CD3 抗体刺激に関しては、培養 7 日目に排除した。

3. 細胞数測定

培養4日目、7日目、10日目及び14日目に培養フラスコ中から細胞浮遊液を適量採取、細胞浮遊液と Trypan Blue stain 0.4% (GIBCO) を混合し、血球計算盤にて細胞数及び生存率を算定した。

4. フローサイトメトリー

培養0日目、4日目、7日目、10日目及び14日目に培養フラスコ中から細胞浮遊液を適量採取し、FACS Calibur (Becton Dickinson) にて細胞表面抗原の解析を行った。Subclass Control は IgG1 とし、以下の表面抗原について解析した。

CD3、CD4、CD8、CD16、CD19、CD20、CD25、CD56、CD69、CD95、CD122、CD45RO、CD62L、TCR $\alpha\beta$ 、TCR $\gamma\delta$ 、HLA-DR

C. 研究結果

1) 生存率及び細胞増幅率

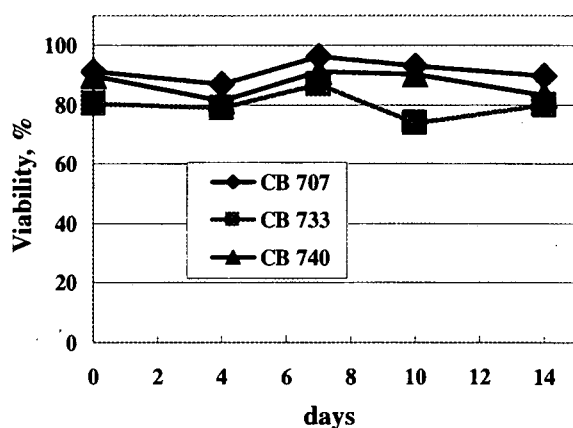


Fig. 1 活性化培養における各 CB 生存率の変化

培養期間における各 CB の生存率の推

移を示す(Fig. 1)。各 CB 共に培養期間を通じて 90.0%前後の生存率を保ち、細胞状態は良好であったと考えられた。

次に各 CB 細胞増幅率の比較を行った。CB 707 のみ良好な増幅が得られ、14日間で総細胞数 52.2 倍、CD3 陽性細胞数で 147.5 倍の増幅を示した。

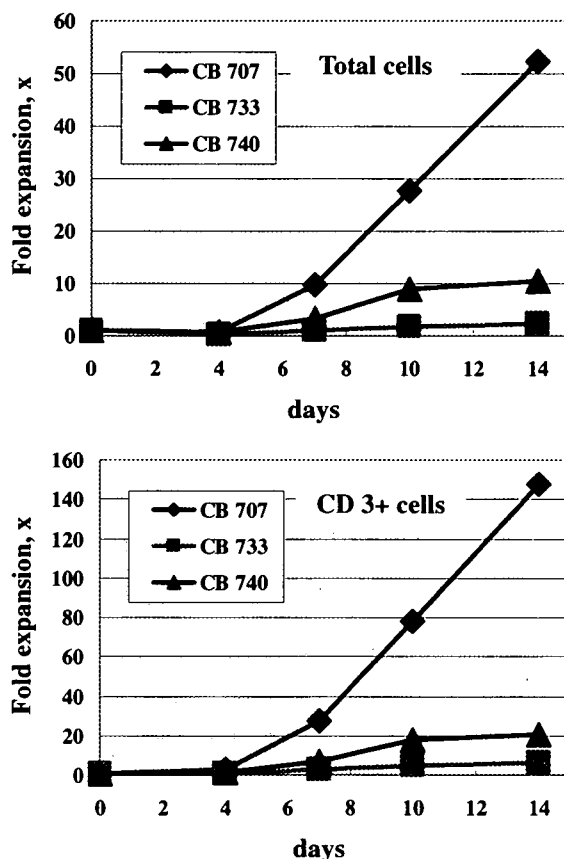


Fig. 2 活性化培養における各 CB の総細胞、CD3+細胞増幅率

尚 CD3 陽性細胞数は細胞数算出後にフローサイトメトリーにて得られた CD3 陽性率をかけて算出している。一方で CB 733 及び CB 740 は十分な増幅が得られなかった(CB 733 : Total, 2.34 倍、CD 3+, 5.8 倍、CB 740 : Total, 10.5 倍、CD 3+, 20.3 倍)。

2) フローサイトメトリー

培養0日目、4日目、7日目、10日目及び14日目の培養細胞における表面抗原の解析を行った。

細胞増幅率にかかわらず、表面抗原の発現率において各CBはほぼ同等であった。

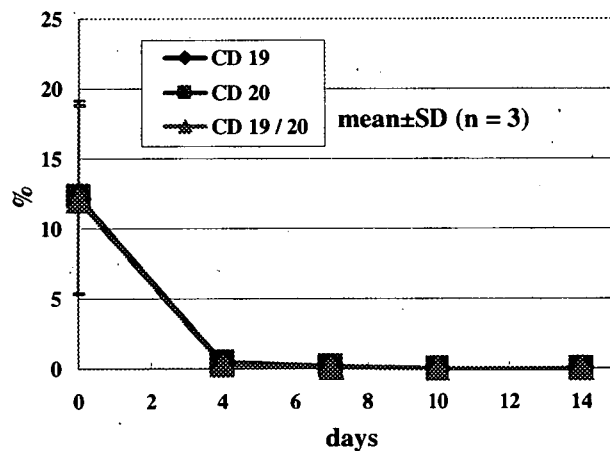
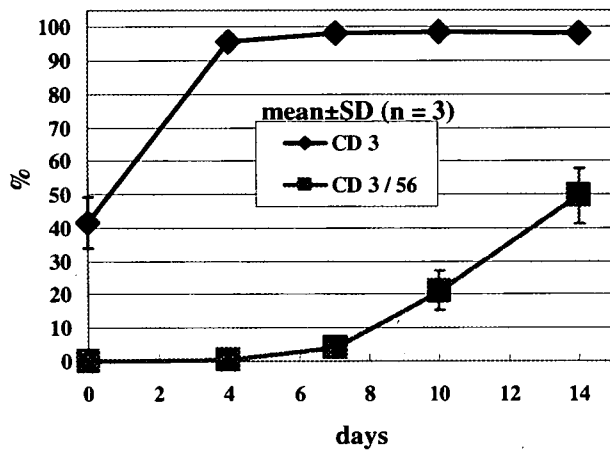


Fig. 3 活性化培養における表面抗原の発現変化 (T細胞、B細胞)

まず活性化CBの継時的なsubsetの変化を解析した(Fig. 3)。解凍時のCB中にはT細胞(CD3)、B細胞(CD19)、NK細胞(CD56)が存在していたが、培養4日目においてCD3陽性率は90.0%を超え、CD19及びCD56の陽性率は著しく低下した。その後

CD3陽性率はほぼ100.0%になったことから、本活性化培養ではCD3陽性細胞が選択的に増幅されていることが確認された。一方CD3/CD56共陽性のNK-T細胞の割合は培養7日目以降上昇し、14日目には50.0%前後の細胞がCD3/CD56共陽性を示した。

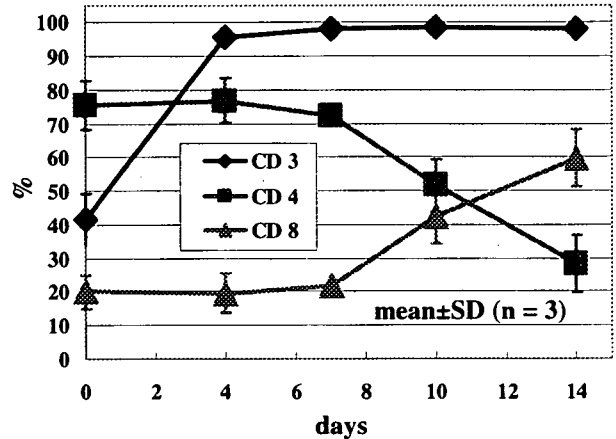


Fig. 4 活性化培養における表面抗原の発現変化 (T細胞)

次に活性化培養により増幅したCD3陽性細胞について表面抗原の発現による機能的分類を行った(Fig. 4)。解凍時にはCD4陽性細胞、CD8陽性細胞がCD3陽性細胞数中各々75.0%、20.0%程度であったが、活性化培養に伴いCD4陽性率が減少し、CD8陽性率が上昇する傾向にあった。CD4、CD8陽性細胞各々の絶対数の変化に関しては、CD4陽性細胞は10日目以降ほぼ一定であり、CD8陽性細胞は増幅し続ける傾向にあった。

T細胞レセプター(TCR)であるTCR $\alpha\beta$ 、TCR $\gamma\delta$ について解析した結果、培養期間を通じてTCR $\alpha\beta$ を発現している細胞が90.0%以上を占めていた。