

をポリエチレンイミン (PEI) 磁気ビーズで濃縮後、NAT により検出することによる高感度検出法を検討してきたが、ウインドウ期の検体では定量的な濃縮ができないという欠点があった。昨年は、このようなウインドウ期の検体の HBV 検出の高感度を行うために、Zn イオンの添加により濃縮を行う方法を開発した。また、抗体を添加することにより、より濃縮効率を上げることが可能であることも示した。しかし、Zn イオンによる濃縮は遠心操作が必要であり、迅速性、簡便性の観点から改良が必要であった。そこで、本年は、Zn イオン存在下に PLL 磁気ビーズを用いて濃縮する方法を開発した。PLL 磁気ビーズを用いることにより、遠心操作を行わなくても磁気分離により簡便にウイルスを濃縮できることが示された。本年度は、主として低濃度 HBV キャリアへの適用を解析し、これまでの手法では HBV-DNA 陰性とされていた検体で、本法を適用することにより、効率的に濃縮可能であることを示した。次年度は、本法を用いてウインドウ期検体への適用を確認する予定である。

2) パルボウイルス B19 の感染系の確立

EPO 依存性網状赤血球細胞 Ku812-E2 細胞を樹立し、この Ku812-E2 細胞を用いてパルボウイルス B19 の *in vitro* 感染系を確立した。確立した感染系ではパルボウイルス B19 による CPE は起こらず、持続感染をした。また、細胞外へ放出されるウイルスのみならず、細胞内のウイルスも感染性を持っていることが示された。パルボウイルス B19 の感染・増幅に最適な培地は血清を含む培地であり、血清成分が増幅に何らか

の影響を与えている可能性が考えられた。パルボウイルス B19 はヒト同種由来細胞組織加工医薬品のガイドラインによりドナースクリーニングを行うように求められているが、従来よりパルボウイルス B19 抗体を持っているレシビエントあるいは、ドナーが抗体を持っているときに感染性にどのような影響を与えるのか論議されてきている。本研究の結果から、抗体存在下では持続感染が強く抑制されたことより、抗体によりウイルス感染価が中和された可能性が考えられた。今回の検討では高い抗体量を用いたが、今後この *in vitro* 感染系を用いてパルボウイルス B19 の抗体の影響、特にどの程度の抗体価で感染が阻害されるのかを明らかにし、パルボウイルス B19 の安全性評価の一助としたい。

E. 結論

HBV の濃縮・高感度検出法として、ポリ-L-リジン結合磁気ビーズを用いたウイルス濃縮法を開発し、低濃度キャリアの高感度ウイルススクリーニング法としての有用性を確認した。また、パルボウイルス B19 の *in vitro* 持続感染系を確立した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 川崎ナナ, 内田恵理子, 宮田直樹: 薬の名前 ステムを知れば薬がわかる 第 21 回, *Pharm Tech Japan*, 2008; 24:651-6.
- 2) 内田恵理子, 川崎ナナ, 宮田直樹: 薬の名前 ステムを知れば薬がわかる 第 24 回, *Pharm Tech Japan*, 2008;241605-11.

- 3) 蜂須賀暁子, 川崎ナナ, 内田恵理子, 宮田直樹: 薬の名前 ステムを知れば薬がわかる 第28回, *Pharm Tech Japan*, 2008;24:2515-23.

2. 学会発表

- 1) Nishimura K, Ohtaka M, Segawa H, Furuta B, Uchida E, Kanayasu-Toyoda T, Yamaguchi T, Nakanishi M: Characterization of Novel Defective Sendai Virus Vectors Capable of Persistent Expression of Therapeutic Genes. ASGT 11th annual meeting, Boston (2008年5月)
- 2) 山口 照英, 内田 恵理子: 核酸医薬品の開発動向とその品質・安全性確保. 第35回日本トキシコロジー学会学術年会, 東京 (2008年6月)
- 3) 西村健, 大高真奈美, 瀬川宏知, 内田恵理子, 古田美玲, 豊田淑江, 山口照英, 中西真人: 細胞質持続発現型 RNA ベクターの性質検討と医療応用に向けた研究. 第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会合同大会, (BMB2008), 京都 (2008年12月)
- 4) 押澤正, 豊田淑江, 内田恵理子, 鈴木孝昌, 鈴木和博, 山口照英: カルシウム結合タンパク質 S100A8 は HL-60 細胞の好中球様分化において増殖・分化に重要な働きをする. 第31回日本分子生物学会年会第81回日本生化学会大会合同大会 (BMB2008), 京都 (2008年12月)
- 5) 古田美玲, 内田恵理子, 押澤正, 山口照英: 造血支持能を持つフィーダー細胞膜タンパク質のプロテオーム解析. 第8回日本再生医療学会総会, 東京 (2009年3月)
- 6) 内田 恵理子: 医薬品のウイルス安全性確保: NATによるC型肝炎ウイルス検出の評価とNATによる高感度検出のためのウイルス濃縮法の開発. 日本薬学会第129年会シンポジウム, 京都 (2009年3月)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1 PLL 磁気ビーズによる HBV DNA の濃縮

Sample no.	原液 (copies/ml)	10 倍濃縮液 (copies/ml)	濃縮効率*
1	1.6E+06	7.8E+06	0.49
2	4.2E+05	2.1E+06	0.50
3	9.0E+04	5.7E+05	0.63
4	2.2E+04	1.6E+05	0.73
5	4.6E+03	3.5E+04	0.76

*濃縮効率= 10 倍濃縮液 (copies/ml)/(原液(copies/ml) x 10)

Table 2 PLL 磁気ビーズによる HBV DNA 濃縮に及ぼす抗 HBs 抗体の影響

原液	10 倍濃縮液		
HBV DNA (copies/ml)	HBsAb (mIU)	HBV DNA (copies/ml)	濃縮効率
120	0	860	0.72
	1024	1400	1.17
	1792	1300	1.08

Table 3 PLL 磁気ビーズによる HBsAg の濃縮に及ぼす HCV 及びパルボウイルス B19 の影響

ウイルス希釈用血漿	AxSYM (s/n ^b)	
	種々の血漿を用いた HBsAg の希釈液	HBsAg 希釈液の 10 倍濃縮
正常血漿	1.39	3.80
HCV 陽性血漿	1.18	3.47
Parvovirus B19 陽性血漿	1.31	3.77

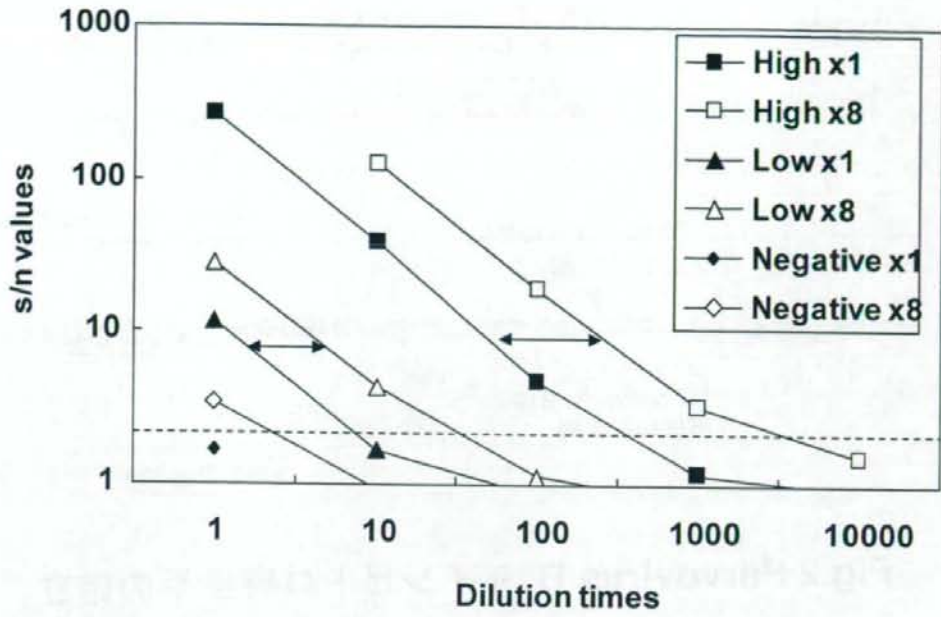


Fig.1 HBVsAg の PLL 磁気ビーズによる濃縮

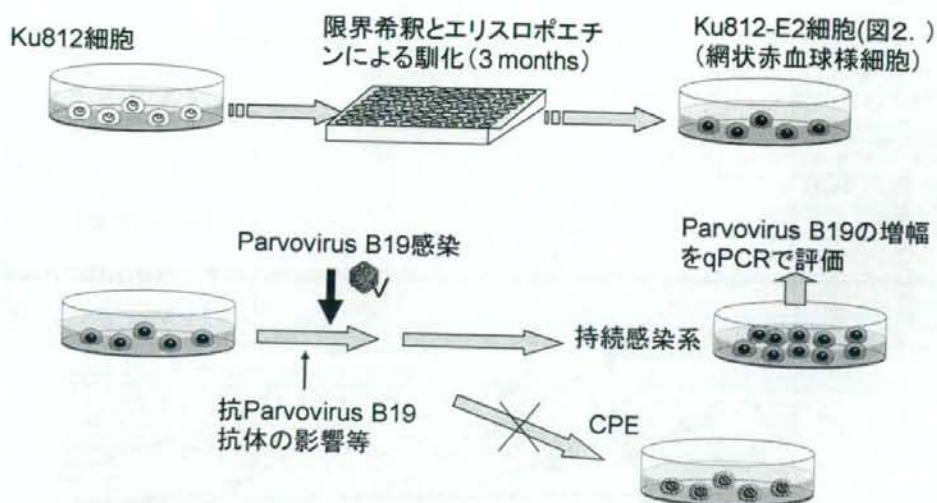
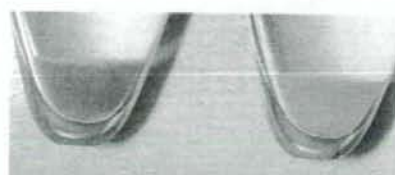


Fig.2 Parvovirus B19 インビトロ感染系の確立



Ku812-E2 **Ku812**
細胞 細胞

Ku812細胞とKu812-E2細胞、それぞれ 10^7 細胞を遠心して沈殿させた。Ku812-E2細胞は網状赤血球様にヘモグロビンを産生している。

Fig.3 Ku812 と Ku812-E2 細胞の比較

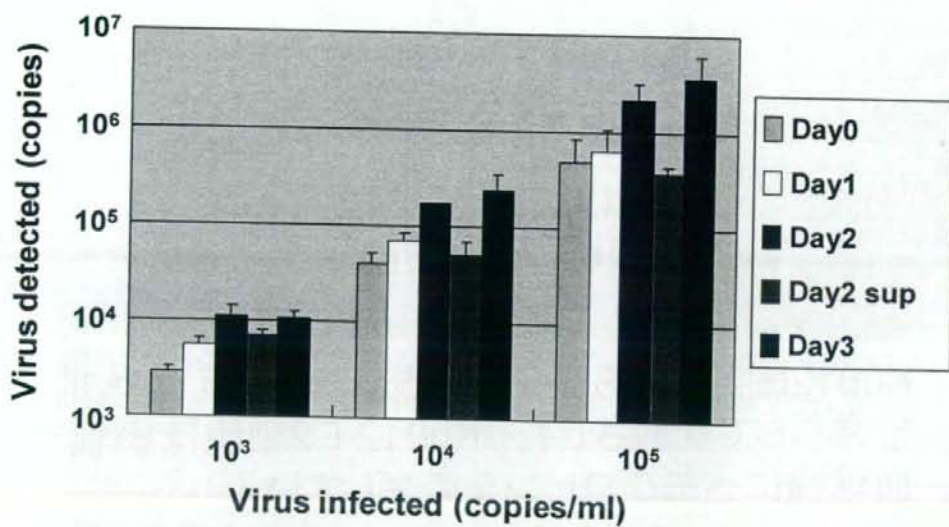


Fig.4 Ku812-E2 細胞への ParvovirusB19 の感染増幅

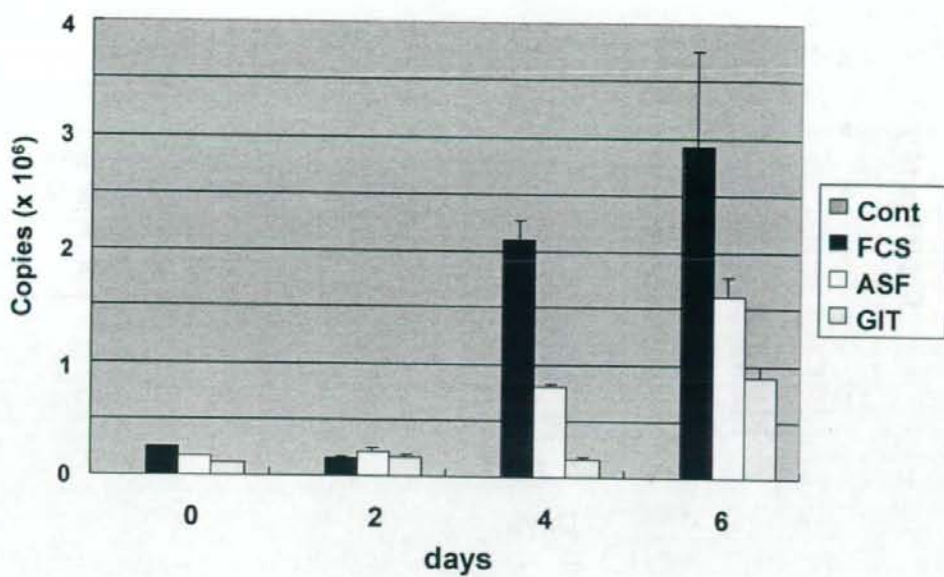


Fig.5 Ku812-E2 細胞での ParvovirusB19 の増幅に及ぼす培地の影響

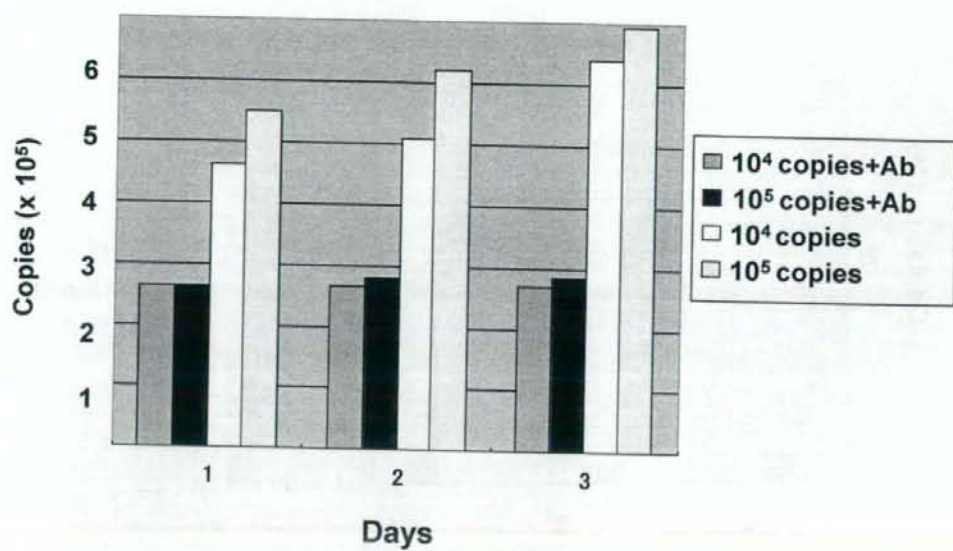


Fig.6 Ku812-E2 細胞での ParvovirusB19 の増幅と抗体の影響

細胞組織加工医薬品の造腫瘍性・異常増殖性評価技術の開発に関する研究

研究分担者 佐藤 陽治 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部・第2室・室長

研究要旨 細胞・組織加工医薬品等（細胞組織製品）の造腫瘍性を評価する際に試験系に要求される事項として、正常細胞集団中に微量に存在する造腫瘍性細胞を特異的かつ高精度で検出可能であることが挙げられる。軟寒天コロニー形成試験法は悪性細胞を検出するための *in vitro* アッセイ系としては古くから知られる方法であるが、細胞組織製品の造腫瘍性を評価する目的での使用に関しては、有用性・妥当性に関するバリデーションが十分にされていない。軟寒天コロニー形成試験法はコロニーの計数における主観の介在が、科学的分析法としては問題とされており、これまでに、MTT アッセイや核酸結合性蛍光色素などを用いた細胞数評価法とカップリングさせて、細胞数をバイアスなしに定量する方法が開発されている。本研究ではハイスループットに改良された軟寒天コロニー形成試験法の悪性細胞の検出限界、感度、悪性細胞に対する選択性、および精度のバリデーションを行うと同時に、同試験法における細胞検出系の最適化を検討した。ハイスループット軟寒天コロニー形成試験法の細胞検出系を、核酸結合性の蛍光色素による検出から、細胞内 ATP 感受性の化学発光による検出へと変更した結果、検出感度や検出限界の顕著な改善が認められたが、悪性細胞に対する選択性および検出精度に関してはむしろ低下することが明らかとなった。これらの結果より、細胞組織製品の造腫瘍性評価という観点からすれば、細胞内 ATP 感受性の化学発光検出系よりも核酸結合性の蛍光色素による細胞数評価系のほうが適していると考えられた。

A. 研究目的

再生医療および細胞治療に使用することを目的とした細胞・組織加工医薬品等（細胞組織製品）は国内外で開発が進み、最近では重症熱傷治療用培養皮膚製品が国内初の製品として薬事法上の承認を受けるに至っている。また、世界に先駆けて本邦で開発されたヒト人工多能性幹細胞（iPS 細胞）も再生医療・細胞治療への応用に熱い期待が集まっており、細胞組織製品の熾烈な開発競争が繰り広げられている。しかし、細

胞組織製品の本格的な実用化・産業化の展開には、その安全性評価方法の確立が必須である。細胞組織製品の原料となる細胞および組織は、複雑な構造と「生きている」という動的な特性を持つため、従来の医薬品等に適用されてきた品質管理の必要事項が必ずしも適用できるとは限らない。従って、細胞組織製品の安全性に関しては特別な配慮が必要となる。

細胞組織製品の安全性に関しては、製品へのウイルス等感染因子混入や製品の免疫

原性ととも製品に造腫瘍性が大きな課題となる。細胞組織製品の造腫瘍性を評価する際には特に試験系に要求される事項として、正常細胞集団中に微量に存在する造腫瘍性細胞を特異的に高感度・高精度で検出可能であることが挙げられる。現在、造腫瘍性試験法としては、ヌードマウスへの細胞移植試験に代表される *in vivo* の試験系および軟寒天コロニー形成試験に代表される *in vitro* の試験系がある。

足場非依存的な増殖は細胞の腫瘍性獲得の指標となることが知られており、悪性形質転換を検出するための *in vitro* アッセイ系としては最も正確な系だとされている。足場非依存的な細胞増殖を検出する方法として、軟寒天コロニー形成試験法がこれまで一般的に用いられてきた。軟寒天コロニー形成試験の利点としては、①ヌードマウス移植試験ほどは長期間を要しない（半年以上 vs. 1ヶ月程度）、②ヌードマウス移植試験よりも安価、③培養条件を変化させることで様々な環境下で細胞の特性評価が可能、などが挙げられる。逆に欠点としては、①実験の手間が煩雑、②通常 80-100mm ディッシュを用いるため多検体に向かない、③コロニーの計数・コロニーサイズのカットオフ値等に主観が入り、実験者間で結果がばらつく、④ *in vivo* 試験系の結果と整合しないことがある、などが挙げられる。また、軟寒天コロニー形成試験は非常に古典的な試験法だが、新種の製品群である細胞組織製品の造腫瘍性評価における有用性・妥当性を裏付けるデータが不十分である点も問題である。つまり、正常細胞中に混入した微量な悪性細胞の検出を目的としたバリデーションが不十分である。そこで、本

研究ではハイスループットに改良された軟寒天コロニー形成試験法の悪性細胞の検出限界、感度、悪性細胞に対する選択性および精度のバリデーションを行うと同時に、同試験法における細胞検出系のさらなる改良を試みた。

B. 研究方法

B-1 セルバンクの調製

Hela 細胞 (JCRB9004, Lot:24222006, 継代数: 114) は (財) ヒューマンサイエンス振興財団研究資源バンクから入手した。Hela 細胞増殖培地としては研究資源バンク推奨の Suppl-MEM (10%ウシ胎児血清 (FBS) (ICN, Cat: 2916754, Lot: 1604H)、2mM L-グルタミン (SIGMA, Cat: G7513) および 100U/mL ペニシリンG・100μg/mL ストレプトマイシン (GIBCO, Cat: 15140) を含む Eagle's minimum essential medium with non-essential amino acids (SIGMA, Cat: M5650) を用いた。培養は CO₂ インキュベーター (SANYO MCO-175, 37°C, 二酸化炭素分圧 5%) で行い、培地量は 10mL/10cm ディッシュ、培地交換は 1 日おきに行った。継代は、細胞が培養容器中でおよそ 80%コンフルエントになった際に行った。継代の操作としては、まず培養容器から培地を吸引除去し、1X リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (SIGMA, Cat: D8537, 10mL/10cm ディッシュ) を添加、細胞を 1 回洗浄した。次に 1X PBS を吸引除去し、0.25%トリプシン・EDTA (GIBCO, Cat: 25200, 2mL/10cm ディッシュ) を添加、細胞に行き渡らせた後にすぐさま吸引除去し、細胞が個別に分離するまで 2~3 分間室

温で静置した。この際、細胞塊の発生を防ぐため、培養容器を振ったり叩いたりして細胞を強制的に剥がす操作は行わなかった。トリプシンの消化反応は Suppl-MEM (6mL/10cm ディッシュ) を細胞に添加することにより停止させ、緩やかなピペッティング (3 mL/sec 以下) により細胞をよく分散した。分散した細胞は希釈倍率 1/2~1/6 で継代した。細胞のストックを調製するために、トリプシン消化により分散した細胞を遠心分離 (Sakuma RSL-05A, 800rpm, 5min, 室温) により回収し、10%ジメチルスルホキシド (DMSO, SIGMA, Cat: D2650) を含む Suppl-MEM (1 mL/10cm ディッシュ) で再懸濁した後、一晚掛けて Cryo1°C Freezing Container (NALGENE, Cat: 5100-0001) 中で -80 °C までゆっくりと凍結し、そのあと -150 °C の冷凍庫中に保存した。継代数 118~119 をワーキングセルバンクとし、それよりも若い細胞をマスターセルバンクとして保存した。

骨髄由来 hMSC は Lonza 社から入手した (Cat: PT-2501, 継代数: 2)。使用した hMSC の各ロットのドナーの詳細については Table 1 に示した。hMSC 増殖培地としては、MSCGM (Mesenchymal Stem Cell Growth Medium BulletKit, Lonza, Cat: PT-3001) を用いた。培養は CO₂ インキュベーター (SANYO MCO-175, 37°C, 二酸化炭素分圧 5%) 内で行い、培地量は 15mL/10cm ディッシュ、培地交換は 1 日おきに行った。継代は、細胞が培養容器中でおおよそ 90% コンフルエントになった際に行った。継代の操作としては、まず培養容器から培地を吸引除去し、1X PBS (SIGMA, Cat: D8537, 10mL/10cm ディッシュ) を添

加、細胞を 1 回洗浄した。次に 1X PBS を吸引除去し、0.25% トリプシン・EDTA (GIBCO, Cat: 25200, 2mL/10cm ディッシュ) を添加、細胞に行き渡らせた後にすぐさま吸引除去し、細胞が個別に分離するまで 1~2 分間室温で静置した。この際、培養容器側面を時々叩いて細胞を揺らして剥がす。トリプシンの消化反応は MSCGM (6mL/10cm ディッシュ) を細胞に添加することにより停止させ、緩やかなピペッティング (3 mL/sec 以下) により細胞をよく分散した。分散した細胞を孔径 40µm のセルストレーナーに通して細胞塊を除去した。新たな MSCGM を空になった培養容器に加えて洗浄し、洗浄液も同じセルストレーナーに通して培養容器に残った細胞を回収した。回収した細胞の懸濁液を 300,000~500,000 細胞/10cm ディッシュとなるように MSCGM で希釈して継代した。また、細胞のストックを調製する場合には、回収した細胞懸濁液を遠心分離 (Sakuma RSL-05A, 800rpm, 5min, 室温) することにより細胞を集め、上清を除去した後、500,000~5,000,000 細胞に対して細胞保存液セルバンカー-1 (十慈フィールド) を 1mL 添加し、細胞を懸濁した後、1mL/tube でクライオチューブに分注し、-80°C で凍結、翌日に -150°C の冷凍庫中に保存した。継代数 5 をワーキングセルバンクとし、それよりも若い細胞をマスターセルバンクとして保存した。

B-2 軟寒天コロニー形成試験

B-2-1 アッセイ用 Hela 細胞の調製

凍結されている継代数 118~119 の Hela 細胞を -150°C のフリーザーから液体窒素

中に移し、37°Cのウォーターバスの脇まで移動、クライオチューブ中に凍結保存された細胞を37°Cのウォーターバス中で素早く解凍した。クライオチューブの周囲を、70%エタノールを染み込ませたキムワイブでぬぐい消毒、内容物を1mLピペットで数回攪拌後、注意深く吸出し、あらかじめ用意した9mL Suppl-MEM(室温)入り15mL コニカルチューブに加えた。次に、細胞懸濁液を遠心分離 (Sakuma RSL-05A, 800rpm, 5min, 室温) することにより細胞を集め、DMSO を含んだ上清を除去した。細胞を6mLの Suppl-MEM (室温) 中で懸濁した後、あらかじめ7mLの Suppl-MEM (室温) が分注されている10cm ディッシュに3mLずつ分注し、ディッシュを前後左右に揺らすことにより細胞を均等に分散させた。細胞は、CO₂ インキュベーター (SANYO MCO-175, 37°C, 二酸化炭素分圧 5%) 中で1晩培養し、翌日培地交換 (10mL/10cm ディッシュ) を行い、翌々日に軟寒天コロニー形成試験に使用した。軟寒天コロニー形成試験の開始時には、以下のように細胞を分離した。すなわち、直径100mmの細胞培養ディッシュ上でHela細胞が80~90%コンフルエントであることを確認した後、培地を吸引除去し、1X リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (SIGMA, Cat: D8537, 10mL/10cm ディッシュ) を添加、細胞を1回洗浄した。次に1X PBSを吸引除去し、0.25%トリプシン-EDTA (GIBCO, Cat: 25200, 1.5mL/100mm ディッシュ) を添加、細胞に行き渡らせた後にすぐさま吸引除去し、細胞が個別に分離するまで2~3分間室温で静置した。この際、細胞塊の発生を防ぐため、培養容器を振ったり叩いた

りして細胞を強制的に剥がす操作は行わなかった。トリプシンの消化反応は、MSCGM (6mL/10cm ディッシュ) を細胞に添加することにより停止させ、緩やかなピペッティング (3 mL/sec 以下) により細胞をよく分散した。分散した細胞の懸濁液 90 μ L に 10 μ L の 0.5% トリパンブルー溶液を添加、トリパンブルーで染まらない生細胞をピルケルチュルク血球計算盤で計数し、細胞の濃度に基づいて MSCGM で適宜希釈した。

B-2-2 アッセイ用 hMSC の調製

凍結されている継代数 5 の hMSC を -150°C のフリーザーから液体窒素中に移し、37°Cのウォーターバスの脇まで移動、クライオチューブ中に凍結保存された細胞を37°Cのウォーターバス中で素早く解凍した。クライオチューブの周囲を、70%エタノールを染み込ませたキムワイブでぬぐい消毒、内容物を1mLピペットで数回攪拌後、注意深く吸出し、あらかじめ用意した9mL MSCGM (室温) 入り15mL コニカルチューブに加えた。次に、細胞懸濁液を遠心分離 (Sakuma RSL-05A, 800rpm, 5min, 室温) することにより細胞を集め、細胞保存液である上清を除去した。細胞を10mLの MSCGM (室温) 中で懸濁した後、あらかじめ10mLの MSCGM (室温) が分注されている10cm ディッシュに5mLずつ分注し、ディッシュを前後左右に揺らすことにより細胞を均等に分散させた。細胞は、CO₂ インキュベーター (SANYO MCO-175, 37°C, 二酸化炭素分圧 5%) 中で1晩培養し、翌日培地交換 (15mL/10cm ディッシュ) を行い、翌々日に軟寒天コロニー形成試験に使用した。軟寒天コロニー形成試験の開始時に

は、以下のように細胞を分離した。すなわち、2枚の直径100mm細胞培養ディッシュ上でMSCが40~50%コンフルエントであることを確認した後、培地を吸引除去し、1Xリン酸緩衝生理食塩水(PBS)(SIGMA, Cat: D8537, 10mL/10cmディッシュ)を添加、細胞を1回洗浄した。次に1X PBSを吸引除去し、0.25%トリプシン・EDTA(GIBCO, Cat: 25200, 2mL/100mmディッシュ)を添加、細胞に行き渡らせた後にすぐさま吸引除去し、細胞が個別に分離するまで1~2分間室温で静置した。この際、細胞を効率的に剥がす目的で、培養容器を適宜振ったり叩いたりした。トリプシンの消化反応は、MSCGM(5mL/10cmディッシュ)を細胞に添加することにより停止させ、緩やかなピペッティング(3 mL/sec以下)により細胞をよく分散した。2枚分の細胞懸濁液を合わせて、1本のポリプロピレン製遠心管に移し、遠心分離(Sakuma RSL-05A, 800rpm, 5min, 室温)することにより細胞を集めた。培地を除去し、新たに1mLのMSCGMを細胞に添加、懸濁した後、孔径40 μ mのセルストレーナーを通した。得られた細胞懸濁液90 μ Lに10 μ Lの0.5%トリパンブルー溶液を添加、トリパンブルーで染まらない生細胞をビルケルチュルク血球計算盤で計数し、細胞の濃度に基づいてMSCGMで適宜希釈した。

B-2-3 CytoSelect CBA-130 (生細胞回収なし, 蛍光検出) によるアッセイ

Cell Biolabs社のプロトコールに従い、底部寒天層および細胞含有寒天層を調製した(Fig. 1)。細胞の播種密度は96穴細胞培養プレートにHela細胞およびMSCをそれぞれ

れウェルあたり0.75~75個および25~2,500個とした。細胞は10日、20日もしくは30日間培養し、細胞数の評価を、CyQuant(Invitrogen)の蛍光を測定することより行った。蛍光の測定は、ARVO-SX(Perkin-Elmer)及びWallac1420 Workstationを用いて行った。測定条件は以下の通り: ① Measurement: Shake (duration: 3sec, speed: normal, diameter 0.1mm, shaking type: orbital, repeat operation, yes); Fluorescence (0.1sec), ② Plate: Generic 8x12 size plate (Measure each plate: 6 times, Height: standard (approx. 8mm)), ③ File output: Excel5.0。

B-2-4 CytoSelect CBA-140 (生細胞回収あり, 蛍光検出および化学発光検出) によるアッセイ

Cell Biolabs社のプロトコールに従い、底部寒天層および細胞含有寒天層を調製した(Fig. 2)。細胞の播種密度は96穴細胞培養プレートにHela細胞およびMSCをそれぞれウェルあたり0.75~75個および25~2,500個とした。細胞は10日、20日もしくは30日間培養したのち、Matrix Solubilization Bufferにより寒天成分を溶解して細胞懸濁液を得た。得られた懸濁液中の細胞数をCyQuant(Invitrogen)の蛍光もしくはCellTiter Glo (Promega)の化学発光により評価した。CellTiter Gloの操作はPromega社のプロトコールに従った。蛍光および化学発光の測定は、ARVO-SX(Perkin-Elmer)及びWallac1420 Workstationを用いて行った。蛍光の測定条件は以下の通り: ① Measurement: Shake (duration: 3sec, speed: normal,

diameter 0.1mm, shaking type: orbital, repeat operation, yes); Fluorescence (0.1sec), ②Plate: Generic 8x12 size plate (Measure each plate: 6 times, Hight: standard (approx. 8mm)), ③File output: Excel5.0 (Microsoft)。また、化学発光の測定条件は以下の通り：①Measurement: Shake (duration: 1sec, speed: fast, diameter 0.1mm, shaking type: linear, repeat operation, yes); CPS (1sec), ②Plate: Generic 8x12 size plate (Measure each plate: 6 times, Hight: standard (approx. 8mm)), ③File output: Excel5.0 (Microsoft)。

B-3 データ解析

B-3-1 検出限界の検討

ICH Q2(R1)ガイドラインによる「分析法の検出限界 (Detection Limit (DL))」の定義は、「試料中に存在する分析対象物の検出可能な最低の量のことである。ただし、このとき必ずしも定量できる必要はない。」となっている。検出限界を求めるためにはいくつかの手法を利用でき、分析法が機器分析であるか否かによって異なる。本研究では、ICH Q2(R1) Part II 6.3.1 「レスポンスの標準偏差と検量線の傾きに基づく方法」により、検出限界を次式により決定した。

$$DL = 3.3\sigma / S$$

ここで、 σ は測定シグナルの標準偏差を、 S は検量線の傾きを表す。また、傾き S は、細胞数 vs. 蛍光 (化学発光) 関係の検量線から推定した。標準偏差 σ については、種々の推定方法があるが、ICH Q2(R1)ガイドラ

イン中に例示されている「ブランクの標準偏差に基づく方法」を採用した。すなわち、適当な数 (本研究では 6 例) のブランク試料を分析し、その測定シグナルの標準偏差を計算することによって、分析法のバックグラウンドの標準偏差の大きさを見積った。(Fig. 3)

B-3-2 感度の検討

分析的には「感度 (Sensitivity)」は、分析対象物 1 ユニット分の差でどの程度の測定シグナルの差が得られるか、すなわち検量線の傾斜を指し、検量線が線形性を示す限りいかなる点においても測定可能な係数である。しばしば「検出限界」と「感度」とが混同される場合が見受けられるが、その理由は「検出限界が低い」という意味に相当する言葉が英語にも日本語にもなく、"sensitive" という言葉が一般に使われてしまうためである。本研究では、複数のアッセイ系の感度を比較する必要があるため、バックグラウンド値の平均値に対する検量線の傾斜 S の比を「感度」の指標とした。(Fig. 4)

B-3-3 特異性 (選択性) の検討

ICH Q2(R1)ガイドラインによれば、「特異性 (Specificity)」とは「共存が予想される不純物、分解物、配合成分等の存在下で、分析対象物を正確に測定できる能力」のことである。本研究では悪性細胞 (Hela 細胞) と正常細胞 (hMSC) の 2 種の細胞間での「感度」の比を指標として検討した。ただしこの比が、分析法のがん細胞に対する「特異性 (Specificity)」を示すほどの普遍性を持つとは考えにくいので、本研究ではこれ

を「選択性 (Selectivity)」と呼ぶ。(Fig. 5)

B-3-4 精度の検討

ICH Q2(R1)ガイドラインの分析法の「精度 (Precision)」の定義は、「均質な検体から多数回採取して得られた複数の試料について、記載された条件に従って測定して得られた一連の測定値間の一致の程度 (又はばらつきの程度)」となっている。精度には、併行精度、室内再現精度及び室間再現精度の3つのレベルがある。併行精度 (Repeatability)とは、短時間の間に同一条件下で測定する場合の精度のことである。Intra-assay precision ともいう。室内再現精度 (Intermediate precision)とは、同一施設内において、試験日、試験実施者、器具、機器等を変えて測定する場合の精度のことである。また、室間再現精度 (Reproducibility)とは、異なった施設間で測定する場合の精度のことである (通常、分析法を標準化する際の共同研究において評価が必要とされる)。本研究では、精度の1指標として併行精度の検討を行うこととし、悪性細胞 (Hela 細胞) と正常細胞 (hMSC) の2種の細胞間での分析法の「感度」の差に対する有意確率 (P 値) を指標とした。「感度」(検量線の傾き)の差に対する有意確率 (P 値) は、Glantz SA の方法*に従った。(Fig. 6)

*Glantz SA "Primer of Biostatistics 5th Ed" (McGraw-Hill, 2002)

B-3-5 アッセイ系の最低要件

細胞組織加工製品の *in vitro* 造腫瘍性評価系として応用する際の実用性を鑑み、暫定的に2つの条件を設定した。すなわち、

①Hela 細胞 (悪性細胞) に対するアッセイ形の選択性が、hMSC (正常細胞) と比較して100倍以上であることと、②Hela 細胞と hMSC とを区別する精度 (併行精度) の指標としての有意確率が可能な限り低いこと、の2条件を最低要件とした。

(倫理面への配慮)

Lonza社のhMSCはヒト由来細胞であるが、提供者の同意を取り適切に細胞を採取していることが確認されている。また、Hela細胞も確立された株化細胞である。このため両者ともに国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会規程には該当しなかった。

C. 研究結果

C-1 コロニー形成

細胞の軟寒天培地中でのコロニー形成能について、顕微鏡下の観察をしたところ、Hela 細胞は、培養期間とともにコロニーを形成し、コロニーサイズも大きくなっていくのに対し、軟寒天培地中の hMSC (lot C) は、明らかなコロニーは認められなかった。Fig. 7にCBA-130用軟寒天培地中での細胞のコロニー形成の様子を示す。CBA-140用軟寒天培地中での細胞のコロニー形成についても、同様の結果であった (データ省略)。

C-2 用量作用関係

1 ウェルあたりに播種した細胞数と、10日、20日もしくは30日後に測定した蛍光シグナルまたは化学発光シグナルとの間の用量作用関係を Fig. 8 に示す。CBA-130 (生細胞回収なし、蛍光検出)、CBA-140 (生細胞回収あり、蛍光検出)、

CBA-140+CellTiter Glo (生細胞回収あり、化学発光検出)の3種のアッセイ系のいずれにおいても、Hela 細胞における検出シグナルは、hMSC (lot C)における検出シグナルと比較し、低用量で発現し、かつ培養期間に依存する増加が顕著であることが認められた。

C-3 検出限界

3種のアッセイ系の検出限界を Fig. 9 に示す。3つのアッセイ系に共通して、Hela 細胞の検出限界が hMSC (lot C)の検出限界よりも10倍以上低く、また Hela 細胞の検出限界は培養期間依存的な低下が認められた。また、蛍光検出系に比べ、化学発光検出系の方が検出限界が顕著に低いことが明らかとなった。

C-4 感度

3種のアッセイ系の感度を Fig. 10 に示す。3つのアッセイ系に共通して、Hela 細胞の検出限界が hMSC (lot C)の検出限界よりも10倍以上高く、また Hela 細胞の感度は培養期間依存的な上昇が認められた。また、蛍光検出系に比べて化学発光検出系の方が、検出限界が顕著に高いことが明らかとなった。

C-5 選択性

hMSC (lot C)と比較した場合の、3種のアッセイ系の Hela 細胞への選択性を Fig. 11(top)に示す。3つのアッセイ系に共通して、Hela 細胞への選択性は培養期間依存的に上昇することが認められた。また、蛍光検出系に比べ、化学発光検出系の方が Hela 細胞への選択性が低い傾向にあった。10日

間の培養では蛍光検出系を用いた場合は100倍以上の選択性は得られず、化学発光検出系を用いた場合は20日間以下の培養では100倍以上の選択性が得られなかった。

C-6 精度

3種のアッセイ系について、Hela 細胞と hMSC (lot C)とを峻別する精度(併行精度)を検討した結果、培養期間に係らず、CBA-130 (生細胞回収なし、蛍光検出)のアッセイ系が他の2種のアッセイ系と比較して低いP値(=高い精度)を示した。(Fig. 11(bottom))

C-7 hMSC の製造ロット(ドナー)による差異

Hela 細胞は樹立された細胞株であるが、hMSC はロットを構成し、各ロットは単一ドナー由来である。したがって、上で観察されたアッセイ形の特性は、製造ロット(またはドナー)に特異的である可能性が考えられる。そこで、アッセイ系の特性が、hMSC の製造ロットもしくはドナーに依存しているかを検討する目的で、上で検討したロット(C)に加えて2つのロット(B, H)を用いた場合のアッセイ系の特性を評価した。hMSC (lot C)と比較した場合の、3種のアッセイ系の Hela 細胞への選択性は、培養期間依存的に上昇することが認められたため、培養期間はロットCを用いて検討した中での最長期間である30日間を選択した。その結果、Fig. 12に示すとおり、ロットBおよびHにおいても、検出限界および感度については3種のアッセイ系のうちCBA-140+CellTiter Glo (生細胞回収あり、化学発光検出)が優れており、一方、選択

性および精度は CBA-130 (生細胞回収なし, 蛍光検出) が優れていることが明らかとなった。

D. 考察

細胞組織加工医薬品等は製品内に細胞あるいは組織という極めて複雑な構造かつ「生きている」という動的特性を含むという点で、従来の医薬品等に適用されてきた品質管理の必要事項が必ずしも適用できるとは限らない。つまり、細胞組織製品の安全性に関しては特別な配慮が必要となってくる。特に造腫瘍性試験のような生きた細胞の特性を評価する試験においては、最終製品中の細胞の状態 (細胞種・生存率・保存条件等) や試験条件 (培養条件・分散酵素処理条件等) のばらつきによって施設ごとに、あるいは実験者ごとに試験の特性および結果が大幅に異なる可能性が高い。したがって、絶対値として定められた規格がすべての細胞組織製品の試験法に一律に課されるのは合理的ではなく、各施設 (各実験者) においてまず、試験系の特性に関するバリデーションを行い、得られた特性値に基づいて品目ごとに適切な品質管理用規格を設定する必要がある。そこでは試験法のバリデーション法の開発および標準化という新たな課題が生まれる。

細胞組織加工医薬品等の造腫瘍試験では、正常細胞中に微量に存在する造腫瘍性細胞を高感度かつ正確に検出する手法が必要となる。そこで、本研究では細胞組織加工医薬品等の造腫瘍性評価を目的とした場合の、軟寒天コロニー形成試験のバリデーションのケーススタディとして、三種の軟寒天コ

ロニー試験法の悪性細胞と正常細胞に対する性能試験を行った。

悪性細胞の例としては、世界各国で汎用され、品質管理された株が入手可能かつ表現型・遺伝型の詳細な解析がなされている Hela 細胞を採用した。正常細胞の例としては、現在再生医療および細胞治療の領域で研究開発および実用化が進む hMSC を用いた。軟寒天コロニー試験法としては Cell Biolabs 社の CBA-130 CytoSelect 96-well Cell Transformation Assay および CBA-140 CytoSelect 96-well Cell Transformation Assay (Cell Recovery Compatible) を採用した。これらのアッセイ系を選択した理由は、従来の軟寒天コロニー試験法と比較しこれらの方法が①ハイスループトかつ定量的であり、②主観的計数のプロセスを含まず、また③短期間 (6~8 日) で済む、とされる点で優れていると判断したからである。CBA-130 と CBA-140 のいずれも、オリジナルのプロトコールでは、軟寒天層を可溶化したのち、コロニー中の細胞数を蛍光色素の CyQuant GR を用いて評価することに変わりはない。CBA-130 と CBA-140 の大きな違いは、軟寒天を可溶化した際に前者では細胞が死滅するのに対し、後方で細胞が死滅せず、生きたまま回収できる点にある。CyQuant GR は溶解した細胞の総核酸量に比例して蛍光を発する試薬で、細胞の核酸と結合すると蛍光が増し、他の細胞成分からの干渉はおこらないことが知られており (最大励起/蛍光=480/520 nm)、簡便で迅速かつ高感度な方法で、培養物中の細胞密度を測定することができる。

化学発光検出法は概して蛍光検出法より

もバックグラウンド値が低いため、検出限界が低くかつ測定感度が高い傾向にある。そこで本研究では、CBA-130 もしくは CBA-140 の生細胞数評価法としてオリジナルプロトコールにある CyQuant GR の蛍光検出法を用いるのではなく、化学発光検出法を用いることができれば、より性能のよいアッセイ法となる可能性があるとの仮説を立てた。

CellTiter-Glo は、細胞の内在性の ATP を定量することで、生存する細胞数を測定する試薬で、“添加→攪拌→測定”だけの簡便なホモジニアスアッセイのキットであり、試薬の添加後、短時間で結果が得られる高感度なアッセイ系であるとされている。CellTiter-Glo を軟寒天コロニー形成試験に適用するには軟寒天層中の細胞を生きのまま取り出す必要があるため、CBA-130 と CBA-140 のうち、後者とカップルさせるのが適当であった。そのため、本研究では 2 種の異なる軟寒天層溶解法と 2 種の異なる検出方法の組み合わせで 3 種のアッセイ法を検討することとした。

3 種のアッセイ法を比較した結果、CellTiter-Glo を用いたアッセイ法が最も検出限界が低くかつ、測定感度が格段に高いことが明らかとなった。ただし、細胞組織加工医薬品等の造腫瘍性を評価するための *in vitro* 試験としては、悪性細胞を正常細胞よりも選択的かつ高精度で検出する能力が要求される。選択性および精度の面から見れば、3 種のアッセイ法の中では CBA-130 が最も優れていると考えられる。CBA-140 (CellTiter-Glo 検出) の試験系の選択性および精度が、CBA-130 および CBA-140 (CyQuant 検出) よりも劣っていたことの

原因としては、細胞 1 個あたりの ATP 含有量が Hela 細胞と hMSC とで異なる、個々の細胞の ATP 含有量のばらつきが大きい、あるいは軟寒天層の可溶化時の細胞生存率のばらつきが大きい、などの可能性が考えられる。

今後は、選択性および精度の優れた CBA-130 の系を用いて、①悪性細胞と正常細胞を混合培養した際の、悪性細胞の検出能の評価、②CBA-130 の試験系における細胞培養条件の最適化 (培地、酵素濃度、side population の利用など)、③より適切なネガティブもしくはポジティブコントロールとなりうる細胞株の探索とその妥当性評価、などが課題となる。

E. 結論

細胞組織製品の造腫瘍性を評価することを目的とした *in vitro* 試験系として、軟寒天コロニー形成試験を用いた場合の、悪性細胞検出能を評価することを目的に、3 種のハイスループット軟寒天コロニー形成試験系、すなわち CBA-130 (細胞溶解+蛍光検出)、CBA-140 (生細胞回収+蛍光検出) および CBA-140+CellTiter Glo (生細胞回収+化学発光検出) の 3 試験系のバリデーションを行った。その結果、悪性細胞 (Hela 細胞) の検出限界および検出感度の点では CBA-140+CellTiter Glo が最も優れていたが、悪性細胞 (Hela 細胞) と正常細胞 (hMSC) との選択性および悪性細胞 (Hela 細胞) の検出精度においては CBA-130 が優れていることが明らかとなった。すなわち、検出感度や検出限界の優劣と悪性細胞選択性および悪性細胞検出精度の優劣は必ずしも正には相関しないことが示唆された。つ

まり、細胞組織製品の造腫瘍性検出という観点からすれば、蛍光から化学発光へ細胞検出系の変更は、性能の向上をもたらすことではないと考えられた。今後は様々な細胞種を使用して CBA-130 のバリデーションを行うと同時に、悪性細胞を高選択的（特異的）かつ高精度で検出するために、軟寒天層封入細胞の培養条件の最適化を行うことが必要となる。

F. 研究発表

F-1 論文発表

Kiyonaka S, Kato K, Nishida M, Mio K, Numaga T, Sawaguchi Y, Yoshida T, Wakamori M, Mori E, Numata T, Ishii M, Takemoto H, Ojida A, Watanabe K, Uemura A, Kurose H, Morii T, Kobayashi T, Sato Y, Sato C, Hamachi I, Mori Y. Selective and direct inhibition of TRPC3 channels underlies biological activities of a pyrazole compound. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009 (in press)

Nishida M, Sato Y, Uemura A, Narita Y, Saito H, Nakaya M, Ide T, Suzuki K, Inoue K, Nagao T, Kurose H. P2Y6 receptor-G α 12/13 signaling in cardiomyocytes triggers pressure overload-induced cardiac fibrosis. *EMBO J*. 2008;27:3104-15.

Nishimaki-Mogami T, Tamehiro N, Sato Y, Okuhira K, Sai K, Kagechika H, Shudo K, Abe-Dohmae S, Yokoyama S, Ohno Y, Inoue K, Sawada J. The RXR agonists PA024 and HX630 have different abilities to activate LXR/RXR and to induce ABCA1 expression in macrophage cell lines. *Biochem Pharmacol*. 2008;76:1006-13.

Suzuki T, Tamehiro N, Sato Y, Kobayashi T, Ishii-Watabe A, Shinozaki Y, Nishimaki-Mogami T, Hashimoto T, Asakawa Y, Inoue K, Ohno Y, Yamaguchi T,

Kawanishi T. The novel compounds that activate farnesoid x receptor: the diversity of their effects on gene expression. *J Pharmacol Sci*. 2008;107:285-94.

Tanabe S, Sato Y, Suzuki T, Suzuki K, Nagao T, Yamaguchi T. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells for identification of novel markers in early- and late-stage cell culture. *J Biochem*. 2008;144:399-408.

Haghighi K, Chen G, Sato Y, Fan GC, He S, Kolokathis F, Pater L, Paraskevidis I, Jones WK, Dorn GW 2nd, Kremastinos DT, Kranias EG. A human phospholamban promoter polymorphism in dilated cardiomyopathy alters transcriptional regulation by glucocorticoids. *Hum Mutat*. 2008;29:640-7.

F-2 学会発表

柳野 紗智子, 佐藤 光利, 鈴木 和博, 佐藤 陽治 血管平滑筋における弾性関連遺伝子の甲状腺ホルモンによる制御 日本薬学会第129年会 (平成21年3月26-28日, 京都)

Yanagino S, Satoh M, Suzuki K, Sato Y. Thyroid hormone targets genes associated with arterial elasticity. 第82回日本薬理学会年会 (平成21年3月16-18日, 横浜)

鈴木 孝昌, 田邊 思帆里, 小木 美恵子, 押澤 正, 佐藤 陽治, 山口 照英, 鈴木 和博 ヒト間葉系幹細胞の染色体安定性の解析 第8回日本再生医療学会総会 (平成21年3月5-6日, 東京) 再生医療. 2009;8(Suppl.): 248.

佐藤 陽治 細胞組織加工医薬品の品質・安全性確保に関する最近の動向 日本トキシコロジー学会「応用トキシコロジーリカレント講座」(平成20年9月11日, 京都)

G. 知的財産権の出願・登録状況