

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 22 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-5-2 軟寒天コロニー形成試験

B-5-2-1 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プでぬぐい消毒、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る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% トリパンプルー溶液を添加、トリパンプ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-5-2-2 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プでぬぐい消毒、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る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-5-2-3 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. 56)。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、細胞数の評価を、CyQuant (Invitrogen)の蛍光を測定することで行った。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, Hight: standard (approx. 8mm)), ③ File output: Excel5.0 (Microsoft)。また、化学発光の測定条件は以下の通り：① Measurement: Shake (duration: 1sec, speed: fast, diameter 0.1mm, shaking type: linear, repeat operation, yes); CPS (1sec), ② Plate:

operation, yes); Fluorescence (0.1sec), ② Plate: Generic 8x12 size plate (Measure each plate: 6 times, Hight: standard (approx. 8mm)), ③ File output: Excel5.0。

B-5-2-4 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. 57)。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), ② Plate: Generic 8x12 size plate (Measure each plate: 6 times, Hight: standard (approx. 8mm)), ③ File output: Excel5.0 (Microsoft)。また、化学発光の測定条件は以下の通り：① Measurement: Shake (duration: 1sec, speed: fast, diameter 0.1mm, shaking type: linear, repeat operation, yes); CPS (1sec), ② Plate:

Generic 8x12 size plate (Measure each plate: 6 times, Hight: standard (approx. 8mm)), ③ File output: Excel5.0 (Microsoft)。

B-5-3 データ解析

B-5-3-1 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 II6.3.1「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. 58)

B-5-3-2 感度の検討

分析学的には「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. 59)

B-5-3-3 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. 60)

B-5-3-4 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. 61)

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

B-5-3-5 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。

B-6 細胞・組織加工医薬品等の品質評価技術の開発に関する研究

B-6-1 虚血条件下におけるヒト間葉系幹細胞

の遺伝子発現変化

B-6-1-1 使用細胞および細胞培養

骨髄由来 hMSC は、Lonza 社より入手した。各ロットの年齢・性別・人種に関する情報は表 23 の通り。

虚血条件下における hMSC の血管新生関連遺伝子発現変化を検討する目的で、hMSC (継代数 9 (PS#9)) を 1×10^4 cells/well とするよう 96 穴細胞培養プレート上に撒き、MSCBM [Lonza] に MSCGM SingleQuots [Lonza] を加えて調整した基本培地中で 37°C 、5% CO_2 の条件下で 80%コンフルエントになるまで培養した。その後、培養した上記の 96 穴細胞培養プレートを、コントロール群および虚血群に分け、表 24 に示す通常条件または擬似的虚血条件においてさらに 24 時間培養し、Total RNA を抽出した。6つのロット (A, B, C, F, G, H) について、同様の実験を行った。

B-6-1-2 細胞の生存試験

虚血 (低酸素・グルコース欠乏) 処理開始を時間 0 として、細胞の生存の時間経過を評価した。細胞の生存評価は CyQuant 細胞増殖アッセイキット (Invitrogen) を用いた。核酸に結合した CyQuant 色素の蛍光はマルチラベルカウンター ARVOsx (PerkinElmer) を用いて測定した。

B-6-1-3 培養細胞からの Total RNA の抽出

培養細胞からの Total RNA の抽出は、MagAttract RNA Cell Mini M48 Kit [QIAGEN]、BioRobot M48 Workstation [QIAGEN] を使用し、QIAGEN 社のマニュアルに従って行った。RNA サンプル濃度は 260nm の吸光度を測定することで評価し、

260nm の吸光度と 280nm の吸光度の比が 1.6 以上であることを指標に純度を確認した。吸光度測定は NanoDrop ND-1000 [Thermo] を用いて行った。抽出した RNA サンプルは -80℃ にて冷凍保存した。

B-6-1-4 虚血後における血管新生関連遺伝子発現量の測定

血管新生関連遺伝子発現量を網羅的に解析するために、RT² Profiler PCR Array Angiogenic Growth Factors & Angiogenesis Inhibitors [SA Biosciences, cat# PAHS-072] を用いた。測定した遺伝子は表 25 の通りである。

各ロットについて RNeasy Mini Kit [QIAGEN] を用いてサンプルを濃縮し、Total RNA が 1µg/10µL となるよう調整した後、SA Biosciences 社のマニュアルに従い、各 RNA サンプルから cDNA を合成した。

次いで、合成した cDNA を用いて同マニュアルに従い溶液を調整後、ABI PRISM 7000 Sequence Detection System [Applied Biosystems] にて RT-PCR を行い、各サイクルについてリアルタイムでモニターした。サーマルサイクラーの条件設定は表 26 の通りである。

クオリティーコントロールとして、上記のサイクリングプログラム後すぐに融解曲線プログラムを実行し、プレート上の各ウェルの PCR 産物に対して融解曲線を作成した。融解曲線の温度微分曲線において、80℃ 以上に出現するピークが 1 つだけであることを指標に PCR 産物の特異性を確認した。

検出された PCR シグナルからベースラインを設定し、これをもとに PCR 産物の増幅

が指数関数的に起こる領域でシグナルの閾値を設定した。シグナルの閾値に到達するサイクル数 (Ct : Threshold Cycle) を算出し、Ct 値 > 35 の遺伝子については発現がないものとみなした。各遺伝子の mRNA 発現量を補正するための内部標準としては β-actin, β2-microglobulin、Hypoxanthine phosphoribosyltransferase-1、Ribosomal protein L13a の発現量を測定した。

データの正規化には、RT² Profiler PCR Array Data Analysis [SA Biosciences, <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>] を使用した。

B-6-1-5 統計解析

統計ソフトウェア Sigma Stat [SYSTAT Software] または Microsoft Excel [Microsoft] を用いて、コントロール群および虚血群に対する Paired t-test により検定を行い、有意水準を危険率 1%未満 (p < 0.01) として評価した。RT² Profiler PCR Array は多変量解析 (multivariate index assay) の一種と考えられ、84 種の因子についての検定を同時に行う。そこで、期待擬陽性数を下げる目的で、有意水準は一般的な「危険率 5%未満 (p < 0.05)」よりも厳密にした。

B-6-2 虚血条件下におけるヒト間葉系幹細胞の血管新生関連サイトカイン分泌変化

B-6-2-1 使用細胞および細胞培養

虚血条件下における hMSC の血管新生関連サイトカイン分泌変化を検討する目的で、B-1-1 と同様に hMSC (PS#9) を 96 穴細胞培養プレート上で培養後、さらに通常条件または擬似的虚血条件下で 24 時間培養し、

培養上清を回収した。回収した上清サンプルは -80°C にて冷凍保存した。

B-6-2-2 サイトカイン抗体アレイによる評価

サイトカイン抗体アレイは RayBiotech 社の Human Cytokine Antibody Array AAH-CYT-5 を用いた。サンプルは低酸素・グルコース欠乏処理をした hMSC の培地 1mL を用いた。サイトカイン抗体アレイの測定に関しては製造元のマニュアルに従った。アレイ上に結合したサイトカインの由来の化学発光シグナルの測定は、ルミノ・イメージアナライザー LAS-3000 (FUJIFILM) を用いて行った。

B-6-2-3 虚血後における血管新生関連サイトカイン分泌量の測定

虚血後において遺伝子発現に有意な上昇が見られた5種類のサイトカインについて、実際の分泌量およびその変化率を検討するために、Quantikine ELISA Kit [R&D] を用いて B-1-1 で回収した培養上清中の VEGF 濃度を測定した。測定は、R&D 社のマニュアルに従って行った。使用した ELISA Kit は表 27 の通りである。

B-6-2-4 統計解析

群間の差に対する統計学的検定は、統計ソフトウェア Sigma Stat [SYSTAT Software] または Microsoft Excel [Microsoft] により行った。

血管新生関連サイトカインの濃度データについては Two-way ANOVA を行い、有意差が認められた場合には、多群比較の post-hoc test として Student-

Newman-Keul test を行った。

血管新生関連サイトカインの濃度変化率は、虚血群の濃度とコントロール群の濃度という 2 つの独立変数の比である。すなわち、各濃度の対数を新たな独立変数とすれば、濃度変化率の対数はこれら 2 つの新しい独立変数の差で表わされる。一般に、2 つの独立変数の差の平均値は各独立変数の平均値の差として求められる。また、2 つの独立変数の差の標準偏差は、各独立変数の標準偏差の平方和の平方根として求められ、2 つの独立変数の差の自由度は各独立変数の自由度 (標本数-1) の和となる。これらをもとに、One-way ANOVA を行うことにより、血管新生関連因子の濃度変化率のロット間の差を評価した。有意水準は危険率 5% 未満 ($p < 0.05$) とした。

B-6-3 虚血後における hMSC の VEGF 分泌能と相関する遺伝子の探索

B-6-3-1 虚血前遺伝子発現量と虚血後 VEGF 分泌の相関関係の評価

虚血後において有意なロット差が認められた VEGF 分泌に対して、VEGF 分泌能を予測する因子となり得る遺伝子を探索するために、6 ロットの hMSC における虚血前の遺伝子発現量と虚血後の VEGF 分泌について相関関係を検討した。

虚血前の遺伝子発現量は、本研究で用いた 6 ロットの hMSC (PS#7 および PS#9) と GeneChip HG-U133Plus2.0 [Affymetrix (54,613 Probe Sets, 41,080 Reference Sequence Transcripts)] を用いて筆者の所属する研究室で過去に測定されたデータを利用した。このデータは hMSC の Total RNA から Affymetrix 社の Two-cycle プロ

トコールならびにハイブリダイゼーションの定法に従って遺伝子発現シグナルを取得し、これを GCOS ソフトウェア [Affymetrix] を用いて解析したものである。現在、データは米国 National Center for Biotechnology Information (NCBI) のデータベースである Gene Expression Omnibus (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) に登録されている (Series# GSE7637, Sample# GSM184654-GSM184665)。なお、データの正規化には内部標準 Probe Set リストである MSK ファイル [Affymetrix] を用い、目標強度 (target intensity) は 10,000 としてある。この GeneChip データに次に示すフィルターをかけ、虚血後の VEGF 分泌量または変化率と相関のある遺伝子を抽出した。ここで抽出された遺伝子を、便宜上 VEGF 分泌能予測候補遺伝子 (VSR 遺伝子: VEGF Secretion Related Candidate Gene) と名づけた。

・フィルター①

GeneChip HG-U133Plus2.0 における各 Probe Set のシグナルは Absolute Analysis (発現の有無を判定する解析) の結果、「発現があるもの: P (Present)」、「発現があるかわからないもの: M (Marginal)」あるいは「発現がないもの: A (Absent)」として判定がなされる。6 ロットのうち半数以上 (つまり 3 ロット以上) で P と判定された Probe Set については、hMSC においてその Probe Set がコードする遺伝子が発現していると判断した。逆に 6 ロットのうち P 判定されたものが 2 ロット以下の場合、hMSC においてその Probe Set がコードする遺伝子の発現はないと判断した。

発現が見られる Probe Set については次のフィルターをかけ、発現が見られない Probe Set は棄却した。

・フィルター②

細胞特性指標の大切な要件の一つにシグナル/ノイズ比が大きいことが挙げられる。逆に細胞特性指標候補のロット間のばらつきが小さいことは、シグナル/ノイズ比が低くなることを意味することから避けるべきと考えられる。そこで、発現量データのロット間のばらつきが十分に大きい遺伝子を抽出する目的で、各ロットにおける発現量 (シグナル) の平均値の最低値と最高値の比が 3.0 倍以上ある Probe Set については次のフィルターをかけ、差が 3.0 倍より小さいものは棄却した。

・フィルター③

PS#7 または PS#9 における各 Probe Set の発現量と、治療効果をより直接的に反映すると考えられる PS#9 の hMSC における虚血後の VEGF 分泌量または変化率との間でスピアマンの順位相関係数を算出した。有意水準は危険率 1%未満 ($p < 0.01$) で評価し、以下 4 つの組み合わせ全てにおいて有意な正の相関がある Probe Set を抽出した。

- ① PS#9 における遺伝子発現量 vs. PS#9 での虚血時の VEGF 分泌量
- ② PS#9 における遺伝子発現量 vs. PS#9 での虚血による VEGF 分泌変化率
- ③ PS#7 における遺伝子発現量 vs. PS#9 での虚血時の VEGF 分泌量
- ④ PS#7 における遺伝子発現量 vs. PS#9 での虚血による VEGF 分泌変化率

スピアマンの順位相関係数および有意確率 (p 値) の算出は、群馬大学社会情報学部・青木繁伸「統計学自習ノート」の「スピアマンの順位相関係数」の項 <http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp/lecture/Soukan/spearman.html> に基づき、Microsoft Excel [Microsoft] を用いて行った。

また、虚血後の VEGF 分泌におけるロット差が、単なる細胞数の増加によるものではないことを確認するために、CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit [Invitrogen] を用いて、虚血 24 時間後の hMSC の生存率 (= 虚血群の細胞数/コントロール群の細胞数 = 虚血抵抗性) を測定し、同様に各 Probe Set の発現量との間のスピアマンの順位相関係数を算出し、 $p < 0.01$ で評価した。

B-6-3-2 統計解析

群間の差に対する統計学的検定は、統計ソフトウェア Sigma Stat [SYSTAT Software] または Microsoft Excel [Microsoft] により行った。

B-7 細胞組織加工医薬品の特性解析・品質管理に関する研究

B-7-1 試薬

TPO は、キリン・アムジェン社より提供された。VEGF は、Strathmann Biotec 社より購入した。AC133 細胞分離キット及び CD14 細胞分離キットは Miltenyi Biotec から購入した。抗 CD31 抗体-フルオレッセイニンイソチオシアネート (FITC) あるいはフィコエリスリン (PE)、抗 CD34 抗体-FITC、抗 CD45 抗体-FITC、抗 CD44 抗体-PE、抗 VE cadherin(CD144)抗体は、BD Biosciences PharMingen より購入した。抗

VEGFR-2 (Flk-1/KDR) 抗体、抗 p110 PI3K β 抗体、抗 p110 PI3K δ 抗体は Santa Cruz Biotechnology, Inc. より得た。抗 MMP-9 抗体は第一ファインケミカル社より購入した。抗 MMP-2 抗体、抗 p110 PI3K α 抗体は Cell Signaling Technology より購入した。抗 IL-8 受容体抗体は R&G System 社より得た。抗オクルディン抗体は Sigma 社より購入した。p110 PI3K α の阻害剤である PI-103 は Calbiochem 社より購入した。抗ヒト内皮 NO 合成酵素 (eNOS) 抗体は Cayman Chemical より購入した。フィブロネクチン (FN) あるいは IV 型コラーゲンでコーティングされたプレートは、イワキ社から購入した。抗 CD14 抗体-FITC は、Dako Cytomation から購入した。RT2 Profiler PCR Array は Supper Array 社から購入した。培地は内皮細胞用基礎培地 (EBM-2)、血管内皮細胞用増殖培地 (EGM-2、2% FCS、VEGF、bFGF、EGF、R3-IGF、アスコルビン酸、ヒドロコチゾン、ヘパリン) (三光純薬) を用いた。マトリゲルは BD Biosciences 社より購入した。

B-7-2 単核細胞の分離

インフォームドコンセントを得て採取された臍帯血は、東京赤十字血液センター、臍帯血バンクより提供された。献血用に採取された血液 (液量不足等による規格外品) は、埼玉赤十字血液センターより提供された。

血液サンプルは、2mM の EDTA を含むリン酸緩衝食塩水 (PBS) で希釈し、リンフォプレップチューブ (Axis-Shield PoC AS) (密度 = 1.077) に充填し、800g、18°C、20 分の遠心により、単核球を集めた。細胞

を磁気ビーズで標識する場合は、分画用溶液 {2mM の EDTA、0.5% のウシ血清アルブミン (BSA) を含む PBS} で洗浄した。

B-7-3 AC133 陽性細胞及び CD14 陽性細胞の分離

AC133 陽性細胞を分離するため、AC133 マイクロビーズ分離キットを用い抗 AC133 抗体・マイクロビーズと 4℃、30 min で反応させた。陽性細胞の分離は、Auto MACS (Milteny Biotec) を用いて行った。臍帯血と末梢血 AC133 陽性細胞は 20% 牛胎児血清 (FBS)、50 ng/ml VEGF、50 ng/ml TPO、を含む EBM-2 培地に浮遊させ培養した。FN コートディッシュは接着細胞として解析する際に、IV 型コラーゲンコートディッシュはフローサイトメーターによる解析を行う際に用いた。

CD14 陽性細胞は CD14 マイクロビーズ分離キットを用い Auto MACS (Milteny Biotec) で分離した。CD14 陽性細胞は IL-8 に対する遊走実験に用いた。

B-7-4 単核球由来 early EPC の誘導

リンフォプレップチューブにより分離した単核細胞を EGM-2 培地に懸濁し、FN コート 6 穴プレートにおよそ $1\sim 2 \times 10^7$ cells/well 播種した。約 1 週間培養後、プレート上に接着した細胞を early EPC とした。

Early EPC の培養上清 (Conditioned Medium : CM) を採る場合は、early EPC を非酵素的に回収し、EGM-2 培地に懸濁した後、FN コート、48 穴プレートに 5×10^4 /well の密度で播種した。24 時間後、培地を捨て、5% FBS を含む EBM-2 を 0.3 ml/well 加え、24 時間培養した上清を回収

し、 $0.22 \mu\text{m}$ のフィルターでろ過し、 -20°C で保存し、以下の実験に CM として用いた。

B-7-5 単核球由来 late EPC の誘導

臍帯血から調製した単核細胞を培地 (Endothelial Basal Medium-2, 2% FCS, VEGF, bFGF, EGF, R3-IGF1, ascorbic acid, , heparin) に懸濁し、FN コート 6 穴プレートに播種した。播種細胞数は、 1×10^7 cells/well 程度とし、1 週間に 2 回、培地を交換した。培養開始 2~3 週間後に出現する数石状のコロニーを形成する増殖能の高い細胞を late EPC とした。

B-7-6 フローサイトメーターによる解析

Early EPC は分画用溶液 (2 mM EDTA、0.5% BSA を含む PBS) で非酵素的に、late EPC はトリプシンを用いて細胞を剥離・回収し、洗浄後、抗 CD31 抗体-FITC あるいは PE、抗 CD14 抗体-FITC、抗 CD45 抗体-FITC、抗 CD44 抗体-PE で免疫染色した。抗 VE cadherin (CD144) 抗体、抗 VEGF 受容体-2 抗体、抗 MMP-9 抗体の場合、二次抗体として抗マウス IgG-FITC 抗体を用い、抗 MMP-2 抗体、抗 eNOS 抗体は二次抗体として抗ウサギ IgG-ローダミン (Rho) 抗体を用いた。なお、すべての細胞は 7-amino actinomycin D (7-AAD) で染色し、陽性の細胞は死細胞として、解析の際に排除した。

B-7-7 接着細胞の免疫染色

Early EPC は 1 週間培養後、late EPC および HUVEC はコンフルエントになったところで実験に用いた。細胞を PBS で 3 回洗浄、1% ホルムアルデヒド・PBS で固定後、

冷却したエタノール (-20°C) で細胞膜を透過させ、さらに PBS で 3 回洗浄した。1% BSA-PBS を用いて細胞を 4°C、1 時間、ブロッキングした。次に 4°C、1 時間、それぞれの第 1 抗体でインキュベートした。PBS で洗った後に、4°C、1 時間、抗マウス IgG-FITC 抗体、抗ウサギ IgG-Rho 抗体でインキュベートした。PBS で洗浄後、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 LSM 510 (Zeiss) を用いて解析した。

B-7-8 マトリゲルを用いた *in vitro*, *in vivo* 管腔形成アッセイ

B-7-8-1 *In vitro* アッセイ

マトリゲルを氷上で融解し、24 穴プレートの場合は 300 μ l/well、48 穴プレートの場合は 200 μ l/well 添加した。37°C、CO₂ インキュベーター中に 30 分静置しゲル化させた。ヒト冠状動脈内皮細胞 (HCAEC) または、late EPC はトリプシンを用いて回収した。方法(4)で回収した CM を 5 倍、10 倍に希釈して 5% FBS-EBM-2 に添加した。HCAEC は 1x10⁵ cells/0.5 ml/well、Late EPC は 5x10⁴ cells/0.5 ml/well になるようゲル上に播種した。37°C、CO₂ インキュベーターで一晩培養した。形成された管腔の写真有位相差顕微鏡 Axiovert2000 で撮影し、顕微鏡画像解析ソフト AxioVision を用いて管腔の長さを定量した。

B-7-8-2 *In vivo* アッセイ

Early EPC を 5 x 10⁵ cells/0.5 ml になるようにマトリゲルに懸濁し、6 週令のヌードマウスの皮下に移植した。マウスの体温でゲル化したマトリゲルを 2 週間後に採り出し、凍結超薄切片を作製し、抗マウス CD31 抗体で免疫染色し、共焦点顕微鏡で解析し

た。

B-7-9 細胞遊走

48 穴の改良型ボイデンチャンバーを用いて遊走実験を行った。CM に対する遊走の場合、下室には 5 倍、10 倍に希釈した CM を含む 5% FBS-EBM-2 を 30 μ l 加えた。IL-8、VEGF に対する遊走の場合、下室には種々の濃度の IL-8, 10 ng/ml VEGF を含む 2% FBS-EBM-2 を 30 μ l/well 加えた。上室には、5% FBS-EBM-2 (IL-8、VEGF の時は 2% FBS) に懸濁した種々の細胞を、2 x 10⁴ cells/well/50 μ l 加えた。上室と下室を挟むメンブランフィルターはポアサイズが 8 μ m のポリカーボネートフィルターを用いた。改良型ボイデンチャンバーを 37°C、CO₂ インキュベーターに 3 時間静置した。メンブランフィルターをはずし、上室側に付いた細胞は拭き取り、遊走してきた下室側の細胞を固定・染色し、顕微鏡下で計数した。

PI3K 阻害剤 wortmannin (100 nM)、p110 PI3K α 阻害剤、PI-103 (250 nM) を用いる際には、15 分間、細胞を前処理し、さらに阻害剤をチャンバーの上室及び下室の両方に加えた。

B-7-10 Early EPC および late EPC の特性指標の探索

臍帯血より分離した単核球を EGM-2 培地を用いて FN 上で培養し、early EPC および late EPC を分化誘導した。Early EPC、late EPC および HUVEC の RNA を、RNeasy (QIAGEN) を用いて回収した。Early EPC の RNA サンプルは、TURBO DNase (Ambion) で処理後、再度 RNeasy で精製した。調製した RNA の品質を

Agilent RNA 6000 Nano Assay を用いたキャピラリー電気泳動により確認した。RT2 First strand kit を用いて、逆転写反応により 1 本鎖 cDNA を調製し、血管新生に関連する遺伝子 84 種類について、定量的 PCR (RT2 Profiler PCR Arrays; Super Array) により発現プロファイルを解析した。Real-Time PCR の装置は ABI7000 を用いた。β アクチンを内部標準として、各遺伝子について β アクチンとの Ct 値の差を求め、 $2^{-\Delta Ct}$ を各遺伝子と β アクチンの発現量の比とした。

B-7-11 細胞の浸潤活性

マトリゲルに対する各種細胞の浸潤を BD BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamber を用い、BD Biosciences 社の示すプロトコールに従って測定した。メンブランフィルターのポアサイズは 8 μm を用いた。マトリゲルをコートしたインサートに 2% FBS-EBM-2 に懸濁した early EPC、late EPC、HUVEC および HCAEC を 2.5×10^4 cells/0.5 ml/インサートになるように播種した。下室には 10 ng/ml VEGF を含む 2% FBS-EBM-2 を 0.75 ml/well 加え、37°C、CO₂ インキュベーターにチャンバーを 23 時間静置した。浸潤した細胞は固定・染色し、顕微鏡下で計数した。

MMP-2/MMP-9 阻害剤 V (500 nM、Calbiochem) を用いる際には、インサート及び下室の両方に加えた。

B-7-12 MMP-2/MMP9 のウエスタンブロット及びザイモグラフィ

細胞培養上清は非還元下でサンプル調製を行い、10% アクリルアミドゲルを用いて

電気泳動した。転写は 10% Methanol を含む 10 mM CAPS バッファー (pH 11.0) を用いて 0.3 A で 2 時間行った。MMP-2 及び MMP-9 に対する抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

Early EPC の分画には 0.25M Sucrose/10 mM Tris (pH 7.4) を用い、凍結融解により細胞を破壊し、2000 rpm、4°C、5 min 遠心して核分画である沈査を除去した。さらに 100,000g、4°C、40 min で遠心し、上清を細胞質分画、沈査を細胞膜分画とした。電気泳動用サンプルバッファーを加え、ウエスタンブロットを行った。

ザイモグラフィにはゼラチンザイモグラフィ用ゲルを用いた。非還元条件下で培養上清を電気泳動し、MMP-2/MMP9 酵素活性により分解された部分をクーマシー染色液で可視化し、Typhoon 9400 (Amersham) で画像化した。

B-7-13 PI3K アイソフォーム、オクルディンのウエスタンブロット

種々の細胞は回収後 lysis buffer に溶解した。電気泳動用サンプルバッファーを加え、電気泳動後ウエスタンブロットを行った。

抗 PI3K アイソフォーム抗体及び抗オクルディン抗体ブロット後、抗アクチン抗体を対照として用いた。

B-8 人工多能性幹細胞の品質・安全性に関する研究

B-8-1 細胞の同一性・同等性評価法の開発

細胞の培養、増幅、加工過程を通じての細胞の恒常性や、目的とする細胞への分化誘導による特性の付与を、細胞表面糖鎖の恒常性・変化から適切に捉えるために、網羅的な全細胞糖鎖の解析法を開発する。同

時に、開発した糖鎖プロファイリング技術を細胞特性解析、がん化予測法開発、製造工程由来不純物検出法開発等への応用に関する研究を行う。

B-8-2 特性解析法の開発

細胞治療薬は有効性・安全性に関わる品質特性の評価法開発の一環として、ヒト血管内皮前駆細胞やヒト間葉系幹細胞、さらには iPS 細胞由来機能性細胞を用いて、その品質を評価するための特性指標を探索する。DNA マイクロアレイ、プロテインアレイ等を利用した細胞特性指標探索法としての有用性を評価する。開発した小型マイクロアレイを含め特性指標探索法の標準化に必要な要素を明らかにし、指針等への反映を目指す。

B-9 細胞特性・品質解析技術としての糖鎖解析技術の開発

B-9-1 細胞総糖タンパク質分画の調製

ヒト培養癌細胞を 1 M EDTA を含む PBS (50 μ L) 中に懸濁し、2 M Thiourea および 5 M Urea 水溶液 (267 μ L)、1 M DTT (16.7 μ L) および Benzonase 溶液 (125 units) を加え室温で 30 分間インキュベートした。インキュベート後、12000 g、15 分間遠心分離後の上清を回収した。回収した上清に 5% 酢酸、5% 水、5% トリエチルアミンを含むアセトン溶液を加え、-20°C で 30 分間タンパク質を沈殿させたのち、12000 g、15 分間遠心分離した。得られた沈殿に 75% エタノールを加え、12000 g、15 分間遠心分離後の沈殿を細胞総タンパク質として糖鎖分析に用いた。

B-9-2 O-結合型糖鎖を含む糖ペプチド分画の調製

細胞総タンパク質の凍結乾燥物を 50 mM

Tris-HCl 緩衝液(pH 8.0、0.2 ml)に懸濁し、プロナーゼ (50 μ g) を加え 37°C で 24 時間反応した。反応後、反応液を沸騰水浴中で 10 分間煮沸し、遠心分離後の上清に 2 M NaBH₄ (500 μ L) を加え、室温で 30 分間インキュベートした。反応液に氷酢酸を注意深く滴下し限外ろ過フィルター (MWCO 5000) を用いて脱塩し、フィルター上部を O-結合型糖ペプチド分画として回収した。

B-9-3 高速糖鎖自動切断装置による O-結合型糖鎖の遊離と蛍光標識

装置は当研究室で開発した O-結合型糖鎖自動切り離し装置 (AutoGlycoCutter-2 (AGC-2): 島津製作所) を使用した。糖鎖切り離しのためのアルカリ溶液として 0.5 M 水酸化リチウム水溶液を用い、糖鎖遊離反応温度は 45°C とし、反応時間は 3 分で行った。細胞から得られた糖ペプチド分画の水溶液 (50 μ l) を AGC-2 に導入し、得られた O-結合型糖鎖を回収し凍結乾燥した。上記操作により遊離されたムチン型糖鎖の凍結乾燥物に 2AA および NaBH₃CN をそれぞれ 3% の濃度で含む 2% ホウ酸/4% 酢酸ナトリウム/メタノール溶液 (100 μ l) を加えて 80°C で 1 時間加温した。反応後 SephadexLH-20 のゲルろ過クロマトグラフィーにより最初に溶出される蛍光性画分を回収し細胞由来の糖鎖とした。

B-9-4 セロトニンアフィニティークロマトグラフィーによる O-結合型糖鎖の分画

ポンプには JASCO PU-980 型、検出器には JASCO FP-920 型蛍光検出器を使用し、流速 0.5 mL/ min で分析した。カラムは LA-Serotonin (Japan Oil Mills, 4.6 x 150 mm) を用い、カラム温度は 25°C とした。検出は励起波長(Ex) 350 nm、蛍光波長(Em) 425 nm

により行った。移動相の溶液 A には水、溶液 B には 50 mM 酢酸アンモニウム水溶液を用いた。グラジエント条件は、試料注入後 2 分間溶出液 B 5%とし、溶出液 B が 20 分後に 40%となるように直線グラジエント溶出を行い、O-結合型糖鎖のうちムチン型糖鎖を溶出させ、その後 10 分間、溶出液 B を 1M NaCl としグリコサミノグリカン型糖鎖を溶出させた。ムチン型糖鎖の各分画は減圧濃縮乾固した。一方、グリコサミノグリカン型糖鎖は透析 (1000 Da cut)を用いて脱塩し、減圧濃縮乾固した。

B-9-5 順相分配型 HPLC によるムチン型糖鎖の分析

カラムには Shodex NH2P-50 4E (4.6 mm x 250 mm、昭和電工)を用い、溶離液 A を 2% CH₃COOH/CH₃CN、溶離液 B に 5% CH₃COOH、3% Triethylamine/H₂O を用いた。溶出は 70%の溶離液 A によりあらかじめ平衡化した後、80 分で溶離液 B が 95%となるように直線グラジエント溶出を行った。また、検出は励起波長 350 nm、蛍光波長 425 nm で蛍光検出した。分離された糖鎖は Voyager DE-PRO (Applied Biosystems 製)を用い、2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB)を試料マトリックスとしてリニア-ネガティブイオンモードにより測定した。

B-9-6 グリコサミノグリカン鎖不飽和二糖の調製と蛍光標識

セロトニンアフィニティークロマトグラフィーにより得られたグリコサミノグリカン分画は酵素消化により不飽和二糖に分解した。コンドロイチン硫酸 PGs は、試料を 50 mM Tris-HCl (pH 8.0、100 μL) に溶解後、Chondroitinase ABC(0.5 unit、10 μL)を加え 37°C で 24 時間反応した。ヘパリン/ヘパラン

硫酸 PGs は、試料を 100 μL の 100 mM Sodium acetate/0.1 mM calcium acetate(pH 7.0) に溶解後、Heparitinase 1 および Heparitinase 2(それぞれ 5 mU/10 μL)を加え、37°C で 24 時間反応した。両酵素反応物は、沸騰水浴上で 5 分間煮沸した後、15000 xg で 5 分間遠心分離し、上清を減圧濃縮乾固した。上記操作により遊離されたグリコサミノグリカン鎖不飽和二糖の凍結乾燥物に 2AA および NaBH₃CN をそれぞれ 3%の濃度で含む 2%ホウ酸/4%酢酸ナトリウム/メタノール溶液 (100 μl) を加えて 80°C で 1 時間加温した。反応後 SephadexLH-20 のゲルろ過クロマトグラフィーにより最初に溶出される蛍光性画分を回収した。

B-9-7 キャピラリー電気泳動によるグリコサミノグリカン鎖不飽和二糖の分析

装置には Beckman MDQ Glycoprotein system を用い、キャピラリーはフューズドシリカキャピラリー(内径 50 μm、有効長 30 cm)を用いた。泳動用緩衝液は 100 mM Tris-phosphate buffer (pH 3.0)を用いた。印加電圧は 25 kV とし電気泳動を行った。分析温度は 25 °C で、試料注入は加圧法で 1.0 psi で 10 秒間注入した。検出は、He-Cd レーザー励起蛍光検出を用いた(Ex 325 nm、Em 405 nm)。

<倫理面への配慮>

動物実験を行う際には、動物実験指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実験を実施した。また、ヒト由来の生体試料を用いる場合は、試料提供者に一切不利益、危険性が伴わないように配慮し、人権擁護を含めたインフォームドコンセントのもとに試料を採取するとともに、研究目的を含め、研究内容の倫理的、科学的妥当性について適正な倫理

委員会等による審査・承認を得た上で研究を実施した。

C. 結果

C-1 細胞組織加工医薬品のウイルス安全性評価技術の開発

C-1-1 HBV の濃縮・高感度検出法の開発

現在、HBV 感染症のスクリーニング検査には HBV 表面抗原 (HBsAg) 検査、HBc 抗体検査を実施し適合を確認した上で、より高感度な NAT によるスクリーニング検査が実施されている。しかし、近年、HBs 抗原陰性にもかかわらず血中や組織中に HBV-DNA が認められる、いわゆるオカルト HBV (潜伏性 HBV) 感染の存在が大きな問題となってきている。従来、HBs 抗原が陰性で、HBs 抗体、HBc 抗体の両者あるいはいずれか一方が陽性である場合は、HBV の一過性感染経過後または HBV キャリアからの離脱後 (HBV 感染の既往) の状態と考えられていた。しかし近年、このような状態にある人の肝臓の中には、ごく微量の HBV が持続感染し、血液中にもごく微量の HBV が存在し続けており、移植により感染する可能性があることが明らかになってきた。今回、このようなごく微量の HBV を検出するための方法として、2 価金属イオン存在下でウイルスと凝集体を形成する PLL 磁気ビーズによりウイルスを濃縮後に検出する方法を検討した。

まず、種々の濃度の HBV を含む溶液を調製し、PLL 磁気ビーズによる HBV DNA の濃縮効率を検討した (Table 1)。HBV の濃度が 10^3 copies/ml から 10^6 copies/ml に

いて、HBV は PLL 磁気ビーズで濃縮されるが、HBV のコピー数が増加するにつれて、濃縮効率は 7.6 から 4.9 倍に低下した。

PLL 磁気ビーズによる HBsAg の濃縮を Fig.1 に示す。高濃度の試料、低濃度の試料はいずれも希釈により検出限界以下となったが、この希釈液を PLL 磁気ビーズにより 8 倍濃縮すると HBsAg の検出が陽性となった。さらに、陰性の試料でも濃縮により検出可能となった。濃縮効率は高濃度試料で約 5.9~6.4 倍であった。

次に、HBV の PLL 磁気ビーズ濃縮に及ぼす HBs 抗体の影響を検討した。PLL 磁気ビーズによる HBV DNA の 10 倍濃縮の濃縮効率は、抗体の添加により 7.2~12 倍へと大きく改善された (Table 2)。しかし、抗 HBs 抗体を添加すると、HBsAg の検出は阻害された (data not shown)。

HBV の PLL 磁気ビーズ濃縮時に他のウイルスが共存する場合の影響を検討したところ、陰性血漿、HCV 陽性血漿、PVB19 陽性血漿で希釈した HBV の濃縮効率に差は認められなかった。(Table 3)。

以上の結果から、PLL 磁気ビーズを用いることにより、ごく微量の HBV を含む血漿から HBV を濃縮して HBV DNA 及び HBsAg を高感度に検出することが可能であること、また濃縮の際、HBV 表面抗原に対する抗体を共存させるとより濃縮効率が向上すること、さらに HCV や PVB19 が共存しても HBV の濃縮が可能であることが示された。

なお本濃縮法については、埼玉県赤十字血液センターにおいて、HBcAb 陽性、HBsAg 陰性の献血血液を用いて実用性を検証した結果、従来の NAT 検査では HBV

DNA が陰性とされた 61 検体中 25 検体で、PLL 磁気ビーズ濃縮により HBV-DNA が新たに検出されること、また、HBsAg 陰性の 78 検体中 29 検体で PLL 磁気ビーズ濃縮により HBsAg が新たに検出されることを確認した。以上の結果より、PLL 磁気ビーズ濃縮がごく低濃度の HBV の濃縮・高感度検出に有用であり、オカルト HBV 感染でも検出可能であることが実証された。

C-1-2 PVB19 の感染系の確立

PVB19 は網状赤血球細胞でのみ増幅すると言われる。そこで、EPO 存在下に赤芽球系細胞株 Ku812 細胞を限界希釈して培養を行い、EPO 依存的にクローナルに増幅する細胞を選別し、2 つの細胞株 Ku812-E2 及び Ku812-E4 を得た。これらの細胞は、クローニングに 1 ヶ月を要し、さらに 2 ヶ月間の培養を行っても EPO 依存的な増幅能は維持されていた。また、培養後沈殿させた細胞がヘモグロビンを含んでいることから、網状赤血球細胞様の特性を持つことが確認された (Fig.2, 3)。PVB19 を Ku812-E2 細胞及び Ku812-E4 細胞に感染させたところ、両細胞とも細胞変性は起こらなかったが、持続感染の可能性が考えられた。経時的に細胞を含む培養液から DNA を抽出し、PVB19 のコピー数の変化を測定したところ、両細胞とも培養の時間経過と共に PVB19 のコピー数が増加し、Ku812-E2 細胞の方がより高いコピー数の増加が認められたことから、以後の検討では Ku812-E2 細胞を用いた。培養上清と細胞のコピー数を比較したところ、培養初期では培養上清と細胞のウイルス量大きな差はなかった (細胞を除くことによりコピー数は 1/3 ほどに減

少した) (Fig.4)。細胞あたりの感染ウイルス量が多いほど上清中のウイルス量は増加するが、細胞との比率はむしろ減少し、上清に見出されたのは細胞に含まれるウイルス量の約 1/5 量程度であった (Fig.4, Day2 と Day2 sup)。細胞内に含まれる PVB19 の感染性が維持されているか確認するために、PVB19 を感染させた細胞を沈殿させ、低張処理により細胞を破碎し、その上清を再び Ku812-E2 細胞に感染させたところ、それほど高い感染性ではないが、再び持続感染させることが可能であった。

次に、Ku812-E2 細胞での PVB19 の増幅に最も適した条件を検討した。無血清培地と FCS 含有培地ではウイルスの増幅に大きく差が認められた (Fig.5)。ASF104 無血清培地では細胞そのものの増幅が高くないが、GIT 無血清培地では細胞の増幅は血清存在下と同等であったことより、血清培地での PVB19 の高い増幅作用は別の要因が考えられた。以降の検討は 10%FCS 含有培地を用いて行った。

次に、PVB19 感染における抗 PVB19 抗体の影響について検討した (Fig.6)。抗体存在下で感染させた場合、PVB19 の持続感染は殆ど認められなかった。このことから、十分な PVB19 抗体が存在すれば PVB19 の感染性はそれほど高くないことが示唆された。

C-1-3 マイコプラズマの迅速測定法

マイコプラズマは無細胞壁の原核生物で、細菌の 1/10 程度の大きさの自己増殖能を持つ最小の微生物である。培養細胞では血清やトリプシン、培養作業従事者等を介して種を超えて感染することが知られているが、

ウイルス感染のような細胞変性を伴わず、一般の細菌感染で認められるような培養液の混濁も起こらないため、汚染には気づかないことが多い。ペニシリン系薬剤は無効であり、0.22 μm のろ過滅菌フィルターを通過し、カナマイシン、ゲンタマイシンなどには耐性を持つものもあることから、培養細胞のマイコプラズマ汚染は実験室レベルでは高頻度に認められている。しかし、マイコプラズマに感染した細胞は増殖性や形態の変化、サイトカインの産生など、細胞の本来の機能や性質が様々な影響を受けることが知られており、ヒトに投与する細胞が汚染されていると重大な事態を招く可能性がある。このため、細胞を医薬品として用いるヒト自己及び同種由来細胞組織加工医薬品では、最終製品について、適切なマイコプラズマ否定試験を実施することが指針により求められている。

日本薬局方（局方）の参考情報には、細胞基材のマイコプラズマ否定試験法として現時点で適切と考えられる方法として、培養法、指標細胞を用いた DNA 染色法、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法が収載されている。局方では、基本的には従来より実績のある培養法と DNA 染色法による実施を求めているが、DNA 染色法はマイコプラズマ以外の DNA も検出するため、DNA 染色法のみ陽性を示した場合には、PCR 法でマイコプラズマの存在を否定することができるとしている。しかし、培養法は試験に 4 週間以上、DNA 染色法でも 1 週間程度時間がかかり、細胞の調製から投与まで十分な時間がないことが多い細胞組織加工医薬品では、より迅速、高感度で広範なマイコプラズマを検出可能な、試験法の開発が望ま

れている。

最近、マイコプラズマの迅速測定法として、酵素活性に基づくマイコプラズマ検出法（MycoAlert）が簡易迅速検査法として市販され、培養細胞汚染の調査等にも使用されている。また、研究用あるいは細胞基材の品質管理試験用として、PCR 法をベースとした複数のマイコプラズマ検出キットが市販されている。そこで、酵素活性に基づくマイコプラズマ検出法と 3 種類の PCR 法（局方 Nested PCR 法、リアルタイム PCR 法、PCR-ELISA 法）について、操作性、迅速性、検出感度等を比較検討した。

C-1-3-1 *M. fermentans* 培養液の測定比較

1) MycoAlert 法

MycoAlert は、マイコプラズマの膜を溶解して放出されるマイコプラズマ特有の酵素が特異的な基質と ADP から ATP を産生することを利用し、産生された ATP 量をルシフェリン・ルシフェラーゼ発光系により測定する方法である。抽出した DNA を測定する PCR 法と異なり生きたマイコプラズマを検出することが可能である。試料は細胞培養上清を用いる。細胞が試料に混入すると結果に影響を与えるため、遠心処理により細胞を除去する必要があるが、測定の前処理はこの遠心のみであり、測定の所要時間は 30 分程度である。

M. fermentans 培養液の 10 倍希釈列（室温保存品及び冷凍保存品）100 μl を用いて、MycoAlert で測定した結果、室温保存品では希釈倍率 10^3 倍 (4.5×10^3 CFU/ml) まで陽性、凍結保存品では 10 倍希釈は陽性であったが、 10^2 倍希釈 (10^4 CFU/ml) は偽陽性であった (Fig.7)。

2) 局方 Nested PCR 法

Nested PCR 法はマイコプラズマ DNA をマイコプラズマに特異的なアウタープライマーとその内側にあるインナープライマーを用いて 2 段階で PCR 増幅することにより検出する方法である。2 段階の増幅により検出の感度と特異性を増すことができる。局方では、比較的多くのマイコプラズマを検出する領域として rRNA オペロン内の 16S rRNA 遺伝子と 23S rRNA 遺伝子間のスペーサー領域から、広範囲のマイコプラズマ種に相同性のある領域を選択したプライマーが例示されている。このプライマーを用いた場合、マイコプラズマの菌種により 2nd PCR で得られる増幅断片のサイズが異なり、さらに制限酵素消化を行うことで細胞を汚染したマイコプラズマ菌種を推定することが可能である。局方では培養上清ではなく細胞懸濁液を試料として DNA を抽出することとされる。所要時間は 1st PCR までで 6 時間程度、Nested PCR を行って検出するにはさらに 4 時間程度必要となる。

M. fermentans 培養液の 10 倍希釈液から DNA を抽出後、1st PCR, 2nd PCR を実施したが、室温保存品及び冷凍保存品のどちらの場合も 1st PCR の段階で既に、*M. fermentans* 培養液の最大希釈倍率である 10^5 倍 (45 CFU/ml) まで PCR の増幅バンドが検出された (Fig.8)。陽性対照 DNA の *M. fermentans* DNA は 500 fg/PCR reaction に相当するが、1st PCR のバンドは希釈倍率 10^5 倍の培養液から抽出した DNA の増幅により得られたバンドはより明瞭であったことから、希釈倍率 10^5 倍の培養液から得られた DNA は 500 fg/reaction

以上と推測された。一方、陽性対照 DNA として用いた *M. orale* も *M. fermentans* と同量を PCR 反応に供したが、1st PCR ではバンドがほとんど検出されず、マイコプラズマの種によって検出感度が異なることが示唆された。

3) リアルタイム PCR 法

リアルタイム PCR 法によるマイコプラズマの検出は、MicroSEQ mycoplasma detection assay kit を使用した。欧州薬局方 (EP) では 2007 年にマイコプラズマ試験法が改正され、EP 収載のバリデーション試験に適合すれば、PCR 法などの核酸増幅検査 (NAT) を従来のマイコプラズマ否定試験の代替法とすることが可能になったが、本キットは細胞基材の品質管理試験用に開発され、EP のバリデーションに適合しているとされる。リアルタイム PCR 検出用キットで使用しているプライマーは、マイコプラズマの 16S rRNA 領域に対する複数のプライマーを組み合わせたもので、90 種類以上のマイコプラズマ及び近縁種を特異的に検出可能という。マルチプレックス PCR となるため、SYBR Green で検出を行う。そのため、試料は培養細胞ではなく、細胞培養上清を使用し、ホストセル由来の核酸が混入しないように注意が必要である。リアルタイム PCR では増幅反応後、dissociation 反応を行い、増幅曲線と融解曲線から検出の有無を判定する。所要時間はカタログでは全工程 4 時間とあるが、DNA 抽出に 3 時間程度、リアルタイム PCR も 2~3 時間程度必要であった。

M. fermentans 培養液について、リアルタイム PCR で測定したところ、Negative

control は陰性であったが、室温保存品及び冷凍保存品のいずれも最大希釈倍率の 10^5 倍 (45 CFU/ml) まで検出は陽性であった (Table 4)。

4) PCR-ELISA 法

PCR-ELISA キットは、細胞培養上清を試料とし、マイコプラズマをアルカリで溶解後、中和したものをテンプレートとして用いる。PCR 増幅時に DIG 標識し、PCR 増幅産物をビオチン結合プローブとハイブリダイズさせて、ストレプトアビジンコートプレートにトラップする。これを抗 DIG-POD と TMB 基質による ELISA 反応により検出する方法である。今回の検討では、PCR 以降の反応のみ実施し、測定の所要時間は PCR 反応が 3 時間程度、ELISA 反応が 4 時間程度であった。全工程としては DNA 抽出にさらに 1 時間以上の時間が必要である。

M. fermentans DNA を PCR-ELISA で測定したところ、凍結保存品のほうが室温保存よりも数値は低い、最大希釈倍率の 10^5 倍 (45 CFU/ml) までどちらも陽性と判定された (Fig 9)。PCR-ELISA 法は定性試験であるが、陽性対照 DNA として用いた *M. fermentans* (1 pg/PCR reaction) と室温保存の 10^5 倍の吸光度は同程度であったことから、 10^5 倍で使用した DNA 溶液には 1 pg 程度の DNA が含まれていたと考えられる。なお、陽性対照 DNA として用いた *M. orale* も *M. fermentans* と同じく 1 pg/PCR reaction を使用したが、*M. fermentans* と比較して ELISA 反応は弱く、陰性と判定された。マイコプラズマの種類によって PCR-ELISA の検出感度には

差異があることが示唆された。

以上の 4 種類のマイコプラズマ試験法による *M. fermentans* 培養液の検出結果を Table 5 にまとめた。今回検討した PCR 法 3 種類はいずれも最大希釈である 10^5 倍 (45 CFU/ml) まで検出可能であったが、MycoAlert は PCR 法より少なくとも 100 倍から 1000 倍以上検出感度が低いことが明らかになった。

C-1-3-2 *M. orale* 及び *M. hyorhinitis* の genomic DNA の測定

リアルタイム PCR 法と PCR-ELISA 法については、局方の DNA 染色法の陽性対照である 2 種類のマイコプラズマ、*M. hyorhinitis* 及び *M. orale* の genomic DNA を用いて検出限界を検討した。これらの測定法は、いずれも培養上清を試料とし、DNA の抽出キットと PCR 検出キットから構成されている。しかし、今回の検討では、PCR の検出についてのみ比較することとし、精製 DNA の希釈列を使用し、PCR の 1 反応当たりの検出限界として 2 種類の方法を比較した (Table 6)。その結果、リアルタイム PCR 法は *M. hyorhinitis* DNA 及び *M. orale* DNA とともに 100 fg/reaction まで検出可能であった。一方、PCR-ELISA 法では、*M. hyorhinitis* DNA は 1 pg/reaction, *M. orale* DNA は 10 pg/reaction が検出に必要であった。

C-1-4 HEV 標準パネルの樹立

再生医療製品を含むヒト由来成分を原料とする医薬品のウイルス安全性確保には、NAT によるウイルスの高感度検出が採用されているが、NAT の実施にはウイルスの標

標準品や参照パネルを用いた検出法の評価が不可欠である。B型及びC型肝炎ウイルスやヒト免疫不全ウイルスについては既に標準品や参照パネルが国内外で樹立されている。一方、加熱の不十分なブタ等の内臓肉の摂取により感染して肝炎を起こすHEVは、最近、輸血によっても感染するケースがあることが明らかにされた人獣共通感染症であるが、HEV(genotype 3)の標準品の策定がWHOで予定されているものの、参照パネルは作成されていない。そこで、HEVのNATによる検出の評価に用いる標準パネルの樹立を検討した。

HEVパネル候補品として、国内4クラスターに属し、実験感染ブタ糞便から得た4株と培養細胞で増幅した1株の計5株をヒト血清で約 10^5 copies/mlに希釈したものをを用いた(Table 7, Fig 10)。5種類のパネルのうち4種類はブタの糞便から抽出したものであり、ウイルス凝集の可能性が考えられる。そこで標準パネルの定量を行う前に、低濃度下でもウイルスの分散が均一であるかどうかを確認するため、希釈系列における均一性試験を実施した。HEVパネルのうち、swJB-H7について、ヒトACD血漿を用いて、10倍、100倍、1000倍、10000倍の希釈液を調製した。HEV原液及び希釈列からの溶出液について定量RT-PCRで測定した。また、原液から抽出した1本よりRNAの10倍希釈列を作成し、これを同時に定量RT-PCRで測定して比較した。その結果、定量PCRでの検量線となるHEV希釈列とCtをプロットすると、検量線がほぼ直線にのることが確認された(Fig.11)。予備的検討でもswJR-P5、swJB-E10、swJB-E10cul、swJB-M8について均一性試験を実施し、ウ

イルスはほぼ分散していることを確認した。これらの結果より、ウイルスパネルの均一性が確認され、ウイルス希釈列を用いても定量性に問題はないものと考えられた。

次に、HEVパネル候補品について、共同検定に参加した6施設において定量を行い、各パネルのコピー数を算出した。HEVはheterogeneityが高く、参加施設数も少ないことから、共同検定では可能な限り統一したプロトコールに従って行うこととした。ウイルス核酸の抽出は、ブタ糞便由来でRNase等のRT-PCRを阻害する不純物が多く含まれると想定されるため、カラム法が適していることから、カラム法の同一キットを採用した。また、RT-PCRのキット、検出に用いるプライマー、プローブもすべての機関で統一した。RT-PCRに用いる機器は施設により異なり、ABI 7500が2施設、ABI 7500fast、ABI 7900、ABI 7000、Roche LightCyclerが各1施設であった。使用機器及び施設により、PCR反応系の容量やプライマー、テンプレートの量などは適宜変更した。

各施設では、パネル3セットについて日を変えて核酸抽出とリアルタイムRT-PCRを行うことにより定量を実施した(Log copies/mlをN=3で算出)。全6施設の平均値を求めたところ、どのパネルメンバーにおいてもSDが0.5以上と非常にばらつきが大きくなり、特に、6施設のうち1施設のデータが値のばらつきが大きく、また他施設よりも定量値がかなり低い傾向が認められたことから、測定系になんらかの問題があることが考えられた。この1施設を除いた5施設の平均値は参考値に近い値となりSDも0.5以内となった。そこで、この5施