

4. Fujino H, Fujita N, Hamamoto K, Oobu S, Kita M, Tanaka A, Matsubara H, Watanabe KI, Heike T, Adachi S.: Ring/marker chromosome derived from chromosome 7 in childhood acute megakaryoblastic leukemia with monosomy 7. Int J Hematol. 92:386-390:2010
5. Matsuse D, Kitada M, Kohama M, Nishikawa K, Makinoshima H, Wakao S, Fujiyoshi Y, Heike T, Nakahata T, Akutsu H, Umezawa A, Harigae H, Kira J, Dezawa M: Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal Cells Differentiate into functional Schwann cells that sustain peripheral nerve regeneration. J Neuropathol Exp Neurol 69:973-985 2010
4. Tsumura M, Okada S, Sakai H, Nishikomori R, Mizoguchi Y, Yasunaga S, Ohtsubo M, Heike T, Nakahata T, Takihara Y, Kobayashi M: Identification of novel mutation in STAT1 and molecular pathogenesis of MSMD. The 72nd Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology 2010
5. Tanaka A, Matsubara H, Fujino H, Watanabe K, Adachi S, Heike T: NK cell leukemia in two years after cord blood transplantation for T-ALL. The 72nd Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology 2010

学会発表

1. Kato I, Niwa A, Heike T, Saito M, Sotoshi Saida, Fujino H, Umeda K, Adachi S, Ito M, Ishikawa F, Nakahata T : A novel therapy for ALL by targeting the extramedullar sites. The 72nd Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology 2010
2. Morishima T, Watanabe K, Niwa A, Fujino H, Adachi S, Nakahata T, Heike T: Neutrophil differentiation from human induced pluripotent stem(iPS)cells for disease investigation. The 72nd Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology 2010
3. Niwa A, Heike T, Umeda K, Oshima K, Kato I, Suemori H, Saito M, Nakahata T: Tracing the development route from human ESC/iPSCs to blood via mesoderm in Serum-free 2D culture. The 72nd Annual

G : 知的財産権の出願・登録状況
なし

分担研究報告書

品質管理法の確立：微生物の迅速検出法の開発

分担研究者：清水 則夫

（東京医科歯科大学准教授）

研究要旨

再生医療用の細胞製剤を調製するための細胞培養工程に混入する可能性がある微生物の迅速検査系の開発を進めている。今年度は昨年度に引き続き、真菌汚染の検査系の作製に加えて細菌の網羅的検査系の開発を行った。いずれも株間での保存性が高いリボゾーナル RNA 遺伝子の共通配列を利用し（真菌：18SrRNA、細菌：16SrRNA）、様々な種類の真菌および細菌を網羅的・迅速に検出することが可能な検査系の構築を行った。さらに、これまでに開発した微生物検査系試薬をキット化するための技術開発を行った。

A. 研究目的

再生医療・細胞治療では、生体由来組織・細胞を原材料として使用し、多くは培養した生細胞を治療に用いるため、原材料および最終製品を滅菌処理することにより安全性を確保することは事実上不可能である。したがって、微生物汚染の問題を克服し、安全な治療用細胞製剤を供給する体制を整えることが再生医療・細胞治療を実用化するために極めて重要である。生体材料には細菌・真菌・ウイルスなど多くの微生物が持続感染していることが知られており、微生物汚染の問題を回避するためには、培養工程中の外来微生物の混入の防止を徹底するだけでは不十分である。したがって、患者に投与する前の最終製品を全数検査することにより治療の安全性を担保することが求められる。

我々は、多くのウイルスを網羅的に検出す

る新しい検査系を完成し、東京医科歯科大学細胞治療センターの安全性検査として実用化した。本研究では、開発した技術を応用し、検査対象を真菌・細菌に拡大する事を目指した技術開発を目的とした。

本研究では、多くの真菌株で保存されている 18S rRNA 遺伝子および細菌の 16SrRNA 遺伝子に存在する共通領域を標的とした真菌および細菌の網羅的・迅速検出系の作成を試みた。また、作製した網羅的・細菌検査系の性能検証用に、細胞製剤製造管理上重要と思われる真菌や細菌の個別検出・定量系の作成もあわせて行った。これまでに、ウイルス・真菌・細菌の網羅的検査系の技術開発を行ってきたが、再生医療・細胞治療の現場で実際に検査を行うためには、試薬のキット化が欠かせない。本研究では、試薬キット化の技術も

行った。

B：研究方法

1. 個別検出系の対象菌種

- a. *Aspergillus* sp (*A.fumigatus*, *A.flavus*, *A.nidulans*,
A.niger, *A.terreus*)
- b. *Candida* sp (*C.albicans* *C.parapsilosis* *C.tropicalis*
C.guilliermondii *C.glabrata* *C.krusei*)
- c. *Pneumocystis carinii*
- d. *Cryptococcus neoformans*
- e. *Trichosporon asahii*
- f. *Acantamoeba* sp (*A.castellanii* *A.rhysodes*
A.lugdunensis *A.polyphaga* *A.hatchetti*)
- g. *Propionibacterium acnes*
- h. *Staphylococcus aureus*
- i. *Staphylococcus epidermidis*
- j. *Streptococcus pyrogenes*
- k. *Streptococcus pneumonia*
- l. *Pseudomonas aeruginosa*
- m. *Streptococcus griseus*
- n. *Escherichia coli*
- o. *Klebsiella pneumoniae*

2. 核酸抽出

菌体から DNA を抽出する際、細胞壁を分解する目的で、リチカーゼ（ザイモリエース）を使用した。リチカーゼを添加後 37℃ 1hr 静置して細胞壁を分解し、その後通常の DNA 抽出キット（キアゲン DNA mini kit）を用いて DNA 抽出を行った。

3. PCR

- a. 細菌 16SrRNA 遺伝子検出用プライマー・プローブ配列

Primer : F-aggcagcagctDRggaat

Primer : R-ggactacYVgggtatctaat

Probe :

FAM-tgccagcagccgcggtaatacRDag-iowaBK

- b. 18SrRNA 遺伝子検出用プライマー・プローブ配列

Forward Primer: F-gcaaggetgaaactaaagRaattg

Reverse Primer: R-ccccgtgttgatcaaattaagc

Probe : FAM-cggAagGgcAcca-TAMRA

(大文字は LNA: 高い結合親和性を有するため、プライマー・プローブの DNA 塩基を LNA で置換することにより、同じ Tm 値を維持しながらプローブの長さを短くできる)

- c. PCR 条件

- 1) 真菌

Denature 95℃0 秒

PCR (45cycle) 95℃0 秒 60℃20 秒

- 2) 細菌

Denature 95℃10 分

PCR (50cycle) 95℃15 秒、60℃1 分

- d. 反応液組成

1mM dNTPs

3mM MgCl₂

25ng/ul Non-acetylated BSA

0.5U taq DNA polymerase (theamo)

Anit-taq antibody (toyobo)

Total volume 20ul

(倫理面への配慮)

検査系の性能検証用の臨床検体は、匿名化した上で受け取り、患者の個人情報と解析結果との連結が不可能なように配慮した。また、病原体検査以外の検査(遺伝子検査など)は一切行わないこととした。

C：結果

1. 細菌定量用スタンダードの作製

Staphylococcus aureus の DNA を使用し、PCR 産物を pGEM-T Easy Vector (プロメガ) にクローニングし、プラスミド精製後シークエンス解析により配列を確認した。確認後制限酵

素 ScaI で消化後電気泳動法により濃度を確認し、MS2RNA 溶液 (10ng/ μ l : ロッシュ) に段階希釈し、感度検定スタンダードとした。作成した感度検定用スタンダードを段階希釈し、検査系の感度検定を行った。その結果、作成した検査系は 10 コピー/Reaction の感度を持ち、さらに 6 種類の細菌 (大腸菌、放線菌、肺炎桿菌、肺炎球菌、緑膿菌、コアグラゼ陰性ブドウ球菌) に関し 10 copies/reaction の感度で検出可能なことを確認した。

2. 真菌定量系の作成

下記の菌種に対するスタンダードとして使用する合成 DNA を作製した。

Aspergillus sp , *Candida sp*, *Pneumocystis carinii*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon asahii*, *Acanthamoeba sp* , *Propionibacterium acnes*

作製したスタンダードを使用した実験により検査系は 10 copies/reaction の感度と十分なダイナミックレンジを持つことを確認した。

2. 特異性の確認

作製した個別定量系および GenBank の BLAST 解析により、検査対象細菌および真菌間の交差反応性を確認し、交差反応性が無いことを確認した。

3. 真菌・細菌ブロードレンジ定量 PCR 系の構築

真菌 18SrRNA 遺伝子、細菌 16SrRNA 遺伝子には多くの菌種に共通な領域が存在する。この領域にプライマー・プローブを設定して真菌・細菌のブロードレンジ定量 PCR 系の構築を試みた。代表的な真菌 18 S rRNA 遺伝子および細菌 16SrRNA 遺伝子領域をアライメントし、共通領域にプライマー・プローブを設

定した。

PubMed による BLAST 解析には、真菌 30,000 個の配列は完全一致が 90%以上だった。

細菌に関しては ARB sequence data base の 41,016 配列において 64%完全一致していた。

4. 真菌・細菌のブロードレンジ定量系の改良

作製した真菌のブロードバンド定量系は、陰性コントロールが擬陽性となってしまいう現象がみられてため原因を追究したところ、使用している試薬に真菌 DNA が混入している可能性が考えられた。検討の結果、検査系に添加する Non-acetylated BSA には *Candida* の定量系で検出される真菌 DNA がわずかに含まれていることが判明し、さらに Non-acetylated BSA の代わりに TritonX100 を添加すれば感度低下を招かず偽陽性反応の問題を回避できることが示された (前年度に一部報告)。本年度は、使用する様々な酵素に混入し、擬陽性の原因となる真菌や細菌 rRNA の検討を行った。その結果、真菌の細胞壁を破壊するために使用するリチカーゼや PCR 反応に利用する Taq ポリメラーゼの製造段階で細菌のゲノム DNA が混入していることを確認した。この現象を回避する手段を検討した結果、真菌 DNA を抽出する際にはリチカーゼを使用せずプロテナーゼ K を用いること、増幅酵素にはアプライドバイオシステムズ社の AmpliTaq Gold DNA polymerase LD を使用することにより検査系の性能を落とすことなく擬陽性反応を回避できることが明らかとなった。

5. 検査試薬のキット化の試み

再生医療・細胞治療用細胞製剤を調製する現場で迅速な検査を実施するためには、試薬のキット化が欠かせない。検査キットが利用できれば、品質管理担当者は細胞浮遊液から核

酸を抽出し、検査系に加え PCR 装置にセットするだけの単純な作業で検査を実施することが可能になる。検査キットを作製するための予備検討として、検査に使用する Well（実際には 8 連ストリップを使用）にバッファとプライマー・プローブを投入後乾燥したものを作製したが、満足な性能を得る事は出来なかった。そこで、プライマー・プローブに加えて、バッファと核酸増幅酵素を添加し、-80 度保存する方法を検討した（検査対象として 12 種類のウイルスを 1 つの 8 連ストリップで検査する系を使用した）。この試薬が使用出来れば作業者は検査 Well に検体から抽出した核酸を加えるのみである。作製した 12 種類のウイルス検査系は十分な感度を持ち、非常に簡便に検査出来る事が示された。さらに、作製した検査試薬を実用化するためには、保存安定性が極めて重要である。現在、実際に作製した検査ストリップを -80℃で長期保存し保存安定性を検討する試験を行っているが、最終的な結果を得るためには長期間を要するため、まずは、過酷試験を行った。

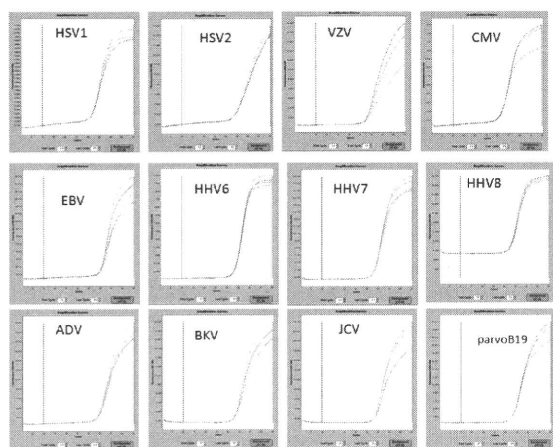


図 1：12 種類のウイルスの検査系（8 連ストリップの 1 well で 3 種類のウイルスをマルチプレックス PCR 法により測定する）。検査試薬は -80℃保存し、1, 3, 5, 7 回凍結融解後に 50copies/well のスタンダードを用いた

検査を実施し、結果を重ね合わせた。

本試験は、-80℃で凍結した試薬を多数回凍結融解し、その性能の変化を検討する方式で行ったところ、図 1 に示すように、7 回の凍結融解を経ても検査試薬は十分な性能を保持している事が示された。

D: 考 察

1. 検査に使用する市販の酵素は菌体由来や組換え体であるため（この場合、ホストの大腸菌のゲノム DNA が混入している可能性が高い）、菌体の rRNA 遺伝子の相同性を利用した検出系では、酵素に混入してくる原材料となる細菌・真菌や組み換え体のホストである大腸菌 DNA による擬陽性反応が懸念される。特に重要な核酸増幅酵素の場合、ABI 社製の AmpliTaq Gold® DNA Polymerase LD は高度に精製されているため、1 反応の標準使用量である 2.5 U 中に含まれる 16SrRNA 遺伝子が 10 コピー未満となっているため擬陽性反応が生じる可能性は低く、実用上問題ないレベルである事が確認された。

2. 再生医療用細胞製剤の製造過程で混入する可能性のあるのは、患者に持続感染している細菌・真菌と培養環境中に浮遊する胞子を含む菌である。細菌・真菌の中には体外で簡単に培養できない菌種も多く、細菌・真菌を網羅的に検出し増幅産物の配列解析から菌種を特定する方法は非常に有用性が高いと思われる。

3. 本検査系を実用化するためには、試薬のキット化が欠かせない。図 1 に示す実験結果から明らかになった事は、検査系が少なくとも 50 copies/well の感度を持つ事と、最大 7 回の凍結融解を繰り返した後で測定を行っても性能に全く変化が無い事である。なお、検査の感度は立ち上がりのポイントが一致して

いることで確かめられる：高さのバラつきは検査結果には影響は与えない。

今後、実際に長期間-80℃保存した後に試験を行って保存安定性の結果を出す予定である。その結果良好な結果が得られれば、実際に再生医療・細胞治療を実施している施設でパイロット的な使用を依頼し、データを蓄積する予定である。一方、-80℃保存が可能であっても、-80℃の保存スペースを多く持っている施設は少ないと予想される(古くからのストックで満たされている事が多いだろう)。したがって、今回は満足な結果が得られなかったが、試薬を乾燥固化し常温保存する事ができれば、保存性に優れさらに使いやすくなると思われる。今後乾燥固化する際に安定化剤を加えるなどの試みを通じて、実用性の高い検査キットの作製の試みを続けていく予定である。

F：健康危険情報 なし

G：研究発表

論文発表

- 1.Nagasawa M., Ogawa K., Nagata K., Shimizu N. Serum granulysin as a possible biomarker of NK cell neoplasm *Br J Haematol.* 2010, 148(5):812-814.
- 2.Zhang Y, Ohyashiki JH, Shimizu N, Ohyashiki K. Aberrant expression of NK cell receptors in EB virus-positive gamma delta T-cell lymphoproliferative disorders. *Hematology.* 2010 Feb;15(1):43-7.
- 3.Kariya Y, Hamatake M, Urano E, Yoshiyama H, Shimizu N, Komano J. Dominant-negative derivative of EBNA1 represses EBNA1-mediated transforming gene expression of EB virus infection independent of rapid loss of viral genome. *Cancer Sci.* 2010 Apr;101(4):876-81.

4.Iwata S, Wada K, Tobita S, Gotoh K, Ito Y, Demachi-Okamura A, Shimizu N, Nishiyama Y, Kimura H. Quantitative Analysis of Epstein-Barr Virus (EBV)-Related Gene Expression in Patients with Chronic Active EBV Infection. *J Gen Viro.* 2010, 91(Pt1):42-50.

5.Yamanaka Y., Tagawa H., Takahashi N., Watanabe A., Guo Y-M., Iwamoto K., Yamashita J., Saitoh H., Kameoka Y., Shimizu N., and Sawada K. Aberrant overexpression of microRNAs activate AKT signaling via down-regulation of tumor suppressors in natural killer-cell lymphoma/leukemia. *Blood.* 2010, 114(15): 3265 – 3275.

6. Miyagawa Y., Kiyokawa N., Ochiai N., Imadome K., Horiuchi Y., Onda K., Yajima M., Nakamura H., Katagiri Y., Okita H., Morio T., Shimizu N., Fujimoto J. and Fujiwara S. Ex vivo expanded cord blood CD4 T lymphocytes exhibit a distinct expression profile of cytokine-related genes from those of peripheral blood origin. *Immunology.* 2010, 128(3):405-419.

7. Chan KK, Shen L, Au WY, Yuen HF, Wong KY, Guo T, Wong ML, Shimizu N, Tsuchiyama J, Kwong YL, Liang RH, Srivastava G. Interleukin-2 induces NF- kappaB activation through BCL10 and affects its subcellular localization in natural killer lymphoma cells. *J Pathol.* 2010 Jun; 221(2):164-74

国内学会発表

1. 小川 学、杉田 直、井上 静、望月 學、片山 未来、渡邊 健、清水 則夫、森尾友弘
ヘルペスウイルスの関与が疑われるぶどう膜炎に対する眼内液 PCR 検査の有用性の検討
第 114 回日本眼科学会 名古屋市
2. 小川 学、杉田 直、井上 静、清水 則夫、赤尾信明、望月 學 PCR 法を用いたアカ

ント・アメーバ角膜炎の補助診断 第 21 回臨

床寄生虫学会 東京

3. 山本紗也香、杉田 直、堀江真太郎、清水
則夫、森尾友宏、望月 學 角膜炎を伴わない
単純ヘルペスウイルス 1 型虹彩毛様体炎の 3
例 あたらしい眼科 2010; 27: 252-255.

国際学会発表

Ogawa M, S. Sugita S, Shimizu N, Morio T,
Mochizuki M. Use of Human Herpes Virus (HHV)
PCR Assays to Detect Viral DNA in Ocular Fluids
of Patients with Herpetic Eye Diseases. ARVO
2010, Fort Lauderdale, Florida.

II. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

品質管理の自動化に関するバリデーション

分担研究者：伊藤 仁也

（神鋼病院 血液病センター 細胞治療室）

研究協力者：丸山 京子

（先端医療センター細胞管理室）

研究要旨

本研究では、細胞製剤の品質・安全性を担保するべく、①受け入れ時、②中間、③出荷（最終製品）において必要な品質管理試験（無菌試験、エンドトキシン試験、マイコプラズマ試験、ウイルス試験）を定め、検討を行ってきた。これらの試験は、本研究の実施体制の変更に伴い、三菱化学メディエンス株式会社による外注試験から、当センターでの実施へと移行した。以降、マンパワーの不足、検査実施の環境不備の問題を軽減する対応策として、試験の簡易化、自動化、迅速化を目指し、無菌試験については当センター病院検査部で実施している自動検出システムを採用するなど、検討を重ねてきた。

今回、無菌試験ではBacT/ALERT（BIOMERIEUX 社）システムでの標準菌を用いたバリデーション試験を行い、マイコプラズマ試験においては、新たに、従来のゲル電気泳動法による鑑別を必要としない定量系を採用したので報告する。

A：研究目的

前回の検討で、実製造試験の無菌試験が BacT/ALERT (BIOMERIEUX 社) システムを用いた院内検査で運用可能であることが確認された。今回、局方に定める 6 種の標準菌を用い、①BacT/ALERT システムと局方に定める液状チオグリコール酸培地との菌検出速度の比較（従来の試験管法と遜色なく迅速な検出が可能か）

②リポソーム添加無血清培地による菌発育阻害活性の有無について確認した。

マイコプラズマ試験では、三菱化学メディアエンス株式会社との共同研究で開発した検出系を採用してきたが、この方法では、遺伝子増幅後にゲル電気泳動法での非特異バンドと特異バンドの鑑別行程が不可欠であった。このため、定性試験に留まるということだけでなく、判定の迅速性に欠けること、増幅産物による環境汚染の懸念といった点から、泳動工程を必要としない新たな系の開発が期待されていた。この度、Light cyclar による迅速 PCR のみで定量まで可能な系が開発されたのでその感度試験を行った。

B：研究計画・方法

1) 無菌試験

標準菌には表.1 に示す 6 種類の Bio Ball single Shot30 (BIOMERIEUX 社) を使用した。これは、バイアルに 30 CFU (28 ~ 33CFU が保証) の菌が 1 つのボール状に塊として入っているもので、簡便に正確な菌数を接種できる製品である。

	菌株名	Cat.No
1	<i>Aspergillus niger</i> (NCPF*2275)	56022
2	<i>Bacillus subtilis</i> (NCTC**10400)	56024
3	<i>Candida albicans</i> (NCPF*3179)	56026
4	<i>Clostridium sporogenes</i> (NCTC**12935)	56029
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NCTC**12924)	56040
6	<i>Staphylococcus aureus</i> (NCTC**10788)	56045

標準微生物保管機関

* NCPF: National Collection of Pathogenic Fungi (イギリス)

** NCTC: National Collection of Type Culture (イギリス)

表.1 標準菌一覧

標準菌溶解液にはリポソーム添加無血清培地、対照用に生理食塩水を用いた。各バイアルの菌塊を 300 μ L の溶解液で溶解し試験培地への接種 (n=1) を行った。試験培地とその培養条件は次の通りである。

- ・BacT/ALERT 専用培地 FA 培養ボトル(好気用)；ペプトン添加 TSB (BHI および活性炭含有) 培地 (BIOMERIEUX 社 Cat. No 259791) / 37°C
- ・トリプケースソイブイオン (SCD ブイオン；TSB-T) (BIOMERIEUX 社 Cat. No 42100) / 22~25°C

BacT/ALERT 専用培地は全自動微生物培養検出装置 BacT/ALERT 3D、SCD 試験管培地はフラン機にて 1 週間培養を行った。

BacT/ALERT システムでは 10 分ごとに培地の色調変化が測定され、リアルタイムに陽性ボトルを検出することが可能である。試験管法においては、培地の濁度の変化・集塊の有無を目視で観察する。接種後 2 ~ 3 日は可能な限り、数時間単位での観察を行った。また、BacT/ALERT での検出報告があった際には、合わせて試験管培地の観察を必須とし、① BacT/ALERT システムと試験管法の検出速度の比較 ②リポソーム添加無血清培地懸濁標準菌と生理食塩水懸濁標準菌

の検出速度の比較（リポソーム添加無血清培地による菌発育阻害活性の有無）を行った。

2) マイコプラズマ試験

4 パターンの primer、probe の組合せにより、以下の 14 種が検出可能となる。

Mycoplasma hyorhinitis, *Mycoplasma orale*,
Mycoplasma pneumoniae, *Mycoplasma arginini*,
Mycoplasma faucium, *Mycoplasma genitalium*,
Mycoplasma primatum, *Mycoplasma fermentans*,
Mycoplasma hominis, *Mycoplasma lipophilum*,
Mycoplasma salivarium, *Mycoplasma buccale*,
Ureaplasma urealyticum, *Acholeplasma laidlawii*

Light Cycler での感度テストを行うべく、Standard として *Mycoplasma orale* 8.0E+06, +05, +04, +03, +02, +01, +00 コピーの計 7 点を設けた。健常ボランティア末梢血全血 DNA を sample とし、Negative control には注射用蒸留水を用いた。他、局方に定める *Mycoplasma hyorhinitis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Acholeplasma laidlawii* の検出確認も同時に行った。

C：研究結果ならびに今後の方針

1) 無菌試験

判定結果を以下に示す。

	菌株名	検出時間(h)	
		BacT/ALERT 無血清培地 / 生食	SCD試験管培地 無血清培地 / 生食
1	<i>Aspergillus niger</i>	43h / 43h	48~64h / 48~64h
2	<i>Bacillus subtilis</i>	<15h / <15h	40h / 40h
3	<i>Candida albicans</i>	95~110h / 95h	48~64h / 48~64h
4	<i>Clostridium sporogenes</i>	検出せず	検出せず
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17h / 18h	40h / 40h
6	<i>Staphylococcus aureus</i>	18h / 18h	48~64h / 48~64h

表. 2 標準菌検出結果

検出菌のうち、*Candida albicans* を除く 4 種で BacT/ALERT システムでの検出が先行した (*Clostridium sporogenes* は嫌気性菌のため検出されなかった)。

また、懸濁液による比較の結果、リポソーム添加無血清培地での顕著な発育阻害は認められなかった。

従来、外注委託で行っていた無菌試験は、局方無菌試験法に準じ、チオグリコレートブイヨン (THIO) 培地及びトリプケースブイヨン (TSB) 培地に接種し、2 週間培養観察を行う方法であったが、サンプル接種に熟練を要すること、菌検出の判定法が、目視で培地の濁りを観察する方法のため、判定が困難で客観性に欠けるところが欠点であった。

一方、BacT/ALERT (BIOMERIEUX 社) による菌検出法は、培地に検体を接種後、全自動微生物培養検出装置 BacT/ALERT 3D での 1 週間培養を行い、その期間中は培地の色調変化が 10 分ごとに測定されリアルタイムに陽性ボトルを検出することが可能である。さらに、陽性と判定された検体においては、全自動細菌同定検査装置 VITEC2 -compact (BIOMERIEUX 社) にて同日中 (8 時間程度) の菌種同定が可能となる。その測定可能菌種は 301 菌種 (グラム陰性菌 131 菌種、グラム陽性菌 116 菌種、酵母様真菌 54 菌種) である。

今回の検討の結果、本研究で使用する無血清培地に菌阻害反応を認めないこと、また、*Candida* を除く菌種では試験管法より迅速な検出が可能であり、*Candida* においても 30CFU 含有検体の検出が 4、5 日以内には可能であることから、十分有用な系であると判断した。

このシステムの採用により、従来は、菌検出試験で2週間を要し、その後、菌同定試験を開始していた一連の行程を10日以内に終わることが可能となる。

また、これらのシステムは FDA、GMP、ISO に準拠しており、本臨床研究の無菌試験に組み込むことで、迅速性、信頼性、試験の省力化を可能にするものと考えられる。

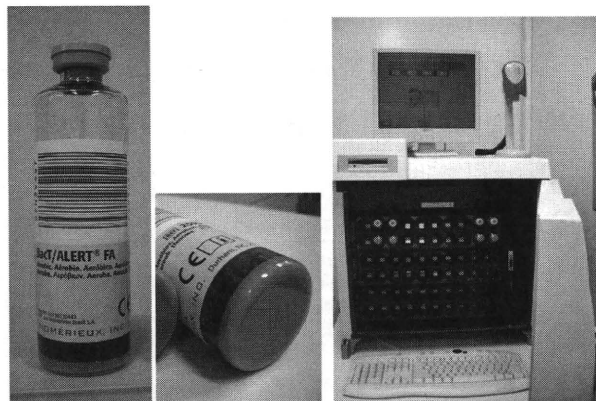


図.1 好気性用ペプトン添加 TSB 培地 (左)、BacT/ALERT 3D(右)

2) マイコプラズマ試験

増幅の結果、*Mycoplasma orale* において $8.0E+00$ コピーからの検出が可能であった。また、検量線の相関係数は $r=-1.00$ と良好であった。

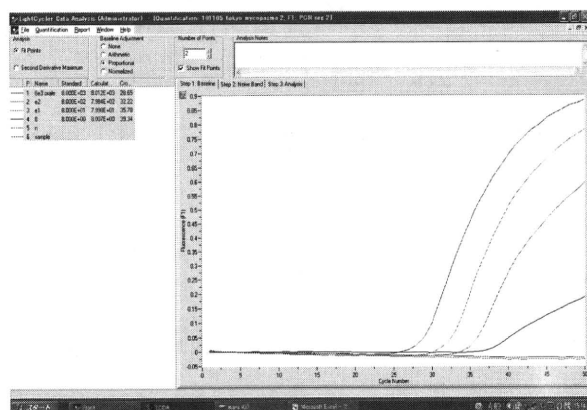


図.2 *Mycoplasma orale*(Std)、健常末梢血 (Sample) 増幅結果

さらに、*Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Acholeplasma laidlawii* の検出も確認することが出来た。

この方法では、従来のゲル電気泳動法による増幅バンドの確認が不要であり、行程が簡略であること、また感度においても十分な結果が得られたことから、今後、この系を採用することとした。

D: まとめ

無菌試験においては BacT/ALERT システムの採用により、全自動微生物培養検出装置 BacT/ALERT 3D (BIOMERIEUX 社) での、リアルタイムな菌の陽性判定と、全自動細菌同定検査装置 VITEC2-compact (BIOMERIEUX 社) による同日中の菌種同定(全 301 菌種)が可能となる。菌検出後の増菌培養も含め、10日以内での出荷判定が可能となり、迅速性の向上、さらには自動測定であるため試験の省力化といった利点があげられる。

また、これらのシステムは FDA、GMP、ISO に準拠しており、本臨床研究の無菌試験に組み込むことで、迅速性、信頼性、試験の省力化を可能にするものと考えられる。

マイコプラズマ試験においては、局方では培養法で増幅させたマイコプラズマを DNA 染色法により証明する方法が推奨されているが、この方法では、やはり迅速性に欠け、出荷判定には直接用いることはできないといった最大の欠点があった。そこで、我々はこれに対し、ヒトに感染しうるマイコプラズマの共通 DNA 配列をプライマーとした検出系を開発し、Light cyclar による迅速 PCR およ

び定量系を構築・検討してきた。しかし、これまでの系では、抽出したDNAにヒトDNAが多量に混入している場合、約300bpの位置にヒト遺伝子由来のバンドが検出されることがあり、遺伝子増幅後、PCR産物をゲル電気泳動法にて特異バンド(約270bp)との鑑別を行う必要があった。

今後、今回検討した系を採用することにより、行程・判定の簡略化、迅速化が可能になり、1ステップで定量試験結果まで得ることが可能になった。次のステップとして、実製造試験検体を用いた添加回収試験の検討を行う必要があると考える。

E：健康危険情報

特になし

F：研究発表

1. 鹿村真之, 伊藤仁也, 大隈一興, 関根暉彬. リンパ球活性化培養中の細胞表面抗原の経時的変化, *Biotherapy* 23 257-262 2009

2. 伊藤仁也, 中畑龍俊 体外増幅造血細胞移植 医学のあゆみ vol.229 No.9 2009

3. Sumie Tabata, Sonoko Shimoji, Kimihiko Murase, Yoko Takiuchi, Daichi Inoue, Takaharu Kimura, Yuya Nagai, Minako Mori, Katsuhiro Togami, Masayuki Kurata, Kiminari Ito, Hisako Hashimoto, Akiko Matsushita, Kenichi Nagai, Takayuki Takahashi
Successful allogeneic bone marrow transplantation for myelodysplastic syndrome complicated by severe pulmonary alveolar proteinosis, *The Japanese Society of Hematology* 2009

4. Mori M, Togami K, Fujita H, Inoue D, Kimura T, Shimoji S, Nagai Y, Tabata S, Kurata M, Ito K, Hashimoto H, Matsushita A, Nagai K, Kaji S, Takahashi T.
Successful allogeneic bone marrow transplantation for chronic

myelomonocytic leukemia complicated by refractory aortitis.
Bone Marrow Transplant. 2009 Aug 31.

5. Inoue D, Nagai Y, Kimura T, Shimoji S, Mori M, Togami K, Tabata S, Kurata M, Matsushita A, Ito K, Hashimoto H, Maruoka H, Yamashita E, Nagai K, Imai Y, Shirane H, Takahashi T.
Refractory de novo myeloid sarcoma: a case report and therapeutic strategy based on bone marrow minimal residual disease.
Int J Hematol. 2009 Jul;90(1):120-3.

6. 永井謙一、橋本尚子、伊藤仁也、松下章子、下地園子、木村隆治、井上大地、森美奈子、永井雄也、田淵淑江、柳田宗之、高橋隆幸
非血縁子通津伊移植後の再発に対する臍帯血移植後に、第1ドナーリンパ球による移植片対白血病効果が認められたTリンパ芽球形リンパ腫
臨床血液 第51巻 第6号 別冊, 2010

7. Sumie Tabata, Minako Mori, Yuya Nagai, Hisako Hashimoto, Hiroshi Arima, Seiji Nagano, Yoko Takiuchi, Daichi Inoue, Takaharu Kimura, Sonoko Shimoji, Soshi Yanagita, Kiminari Ito, Akiko Matsushita, Kenichi Nagai, and Takayuki Takahashi
Successful allogeneic bone marrow transplantation for Diamond-Blackfan Anemia complicated by severe cardiac dysfunction due to transfusion-induced hemochromatosis
Internal Medicine 49 453-456, 2010

G：知的財産権の出願・登録状況

特になし

分担研究報告書

VII. 分子基盤に基づいた新規増幅法、分化誘導法の開発

分担研究者：田中 宏和、金倉 譲

研究協力者：松村 到

研究要旨

我々は、造血幹/前駆細胞の未分化性維持に関与する転写因子や細胞内シグナル伝達分子について解析を行い、それらを人為的に操作することで造血幹/前駆細胞を効率よくかつ安全に増幅、分化させる方法の開発に取り組んできた。

本年度は、至適培養条件を検討する一環として、遊離鉄負荷が造血に及ぼす影響について *in vitro* での解析を行い、急激な鉄負荷が正常造血細胞に対して、細胞内 ROS の蓄積、さらには ROS による p38MAPK の持続的活性化を介して未分化な細胞により強く細胞死を誘導すること、また赤血球系の分化異常など無効造血の病態形成に関与していることを見出した。

今後は転写因子、細胞周期制御因子の内的因子操作、及び培養条件を検討することで、至適な造血幹細胞増幅法、ならびに造血幹細胞からの系統特異的分化誘導法の開発を継続して行う予定である。

A：研究目的

我々は、造血幹/前駆細胞の未分化性維持に関与する転写因子や細胞内シグナル伝達分子について解析を行い、それらを人為的に操作することで造血幹/前駆細胞を効率よくかつ安全に増幅、分化させる方法の開発に取り組んできた。また、*ex vivo* 増幅臍帯血の製造法の確立に関する研究の一環として、新規無血清培地の開発を行い、本培地を用いることで既存の製品よりも良好な臍帯血 CD34 陽性細胞の増幅効果が得られることを示してきた。含有成分、特に細胞増殖にとって必須の金属である鉄に関しては、ほぼ 100%の飽和状態で鉄を含む細胞培養用 holo トランスフェリンを一定量含有するよう調整し用いており、培養液中から細胞内への鉄すなわちトランスフェリンの取込みはそのレセプターであるトランスフェリンレセプター 1(CD71)を介したエンドサイトーシスにより行われる。細胞内の鉄濃度は種々機構により極めて厳密にコントロールされている一方で、鉄過剰状態では鉄の取込み、利用、貯蔵という過程の中で細胞内小器官間を速やかに行き来する不安定な鉄のプール(labile iron pool, LIP)が生じていることが知られているが LIP の生理的意義や病態との関連は明らかではない。そこで本研究では至適培養条件を検討する一環として、マウス造血細胞を用いて遊離鉄負荷が造血に及ぼす影響についての *in vitro* での解析を行った。

B：研究計画・方法

1. 解析には硫酸アンモニウム鉄(II)(FerAS)を用い、コントロールとして溶媒である 2mM クエン酸ナトリウム(CTL)を用いた。
2. マウス骨髄からの造血幹/前駆細胞の分離
Akashi らが確立した方法(Nature 404, 193-197, 2000)に準じ、6-8 週齢のマウス骨髄

より下記表面マーカーの細胞を分離した。

Lin-, Sca-1 high, c-kit high (LSKs)

3. 細胞培養、コロニーアッセイ

分離した LSKs をサイトカイン(SCF, FL, TPO, IL-6, IL-3)添加培地にて培養し、4 日、7 日における増殖率を ATP アッセイにて測定した。培養後の細胞をメチルセルロース培地(MethoCult H4434)に播種し、各々から形成されるコロニーの種類を 2 週後に観察した。

4. フローサイトメトリー

細胞内 ROS, LIP については RedCC-1, Calcein-AM(Invitrogen 社)を用いて半定量的に測定した。表面抗原については培養細胞を用いて各分化段階に特異的なマーカーにて染色し評価した。また細胞内 MAPK, NF-kB のリン酸化変化については PhosphoFlow を用いて検討を行った。

4. OP9 システム

マウス ES 細胞を LIF 非存在下に OP9 stroma 細胞と共培養し、day4.5 に中胚葉系の細胞を採取、至適サイトカイン存在下で再度 OP9 stroma 細胞と共培養し、得られた成熟血球につき解析した。

(倫理面の配慮)

大阪大学医学部動物実験施設における委員会の承認のもと本実験を実施した。

C：研究結果ならびに今後の方針

マウス骨髄細胞を用いた liquid culture の系における鉄負荷の影響を解析した結果、培養液中に FerAS を添加した場合、CTL と比較して、濃度依存的に LSK 細胞の増殖が抑制された。

次に培養 2 日目の LSK 細胞内の Fe 量ならびに細胞内 ROS 量について検討した。Fe 量の判定には Calcein-AM を、ROS 量の判定には RedCC-1 を用いた。Calcein-AM は細胞内

に取り込まれ、細胞内エステラーゼによって加水分解されることで緑色の蛍光を発生し、Feなどの重金属存在下ではキレート形成によりその蛍光は消失する。一方RedCC-1はROSにより生じた細胞内の過酸化脂質と反応し赤色の蛍光を発生する。FACSにて解析した結果、CTLと比較してFerASを添加した場合、細胞内Fe量が多い細胞においてより多くのROSの蓄積が認められ、また細胞内Fe量が多い細胞は7-AAD陽性であり、鉄負荷により細胞死が誘導されていることが示唆された。

次に同じ2日間培養したLSK細胞を用いて、種々ストレス応答に重要なMAPK及びNF- κ Bのリン酸化変化についてFACSにて検討した結果、FerAS添加によりp38MAPK及びJNK/SAPKのリン酸化がCTLと比較して増強していた。さらにFerAS添加によるp38MAPKのリン酸化は、抗酸化剤であるNACにより、また細胞死はp38MAPK inhibitor, SB203580やNACにより抑制されたことから、鉄負荷による造血細胞の増殖抑制、細胞死には、生じたROSにより持続的に活性化されたp38MAPKを中心とした経路が強く関与していると推測された。

次に、より生理的な条件下での鉄負荷による影響を解析するため、マウス骨髄単核球及びLSK細胞を造血支持細胞であるMS5と共培養した。この系では培養4日ごろより未分化な血液細胞がMS5の下に潜り込み、敷石上のcobblestone-like areaを形成、その後盛んに増殖、分化した血液細胞が浮遊してくる像が観察される。この系にFerASを添加し検討を行った。

まず共培養によるcobblestone-like area形成能に鉄負荷が及ぼす影響について検討した。共培養7日目CTLではcobblestone-like

area形成が認められ、多くの浮遊細胞の出現が観察されたのに対し、FerASを添加した場合、濃度依存的に潜り込みの頻度は低下し、さらに浮遊細胞の数も減少する傾向にあった。

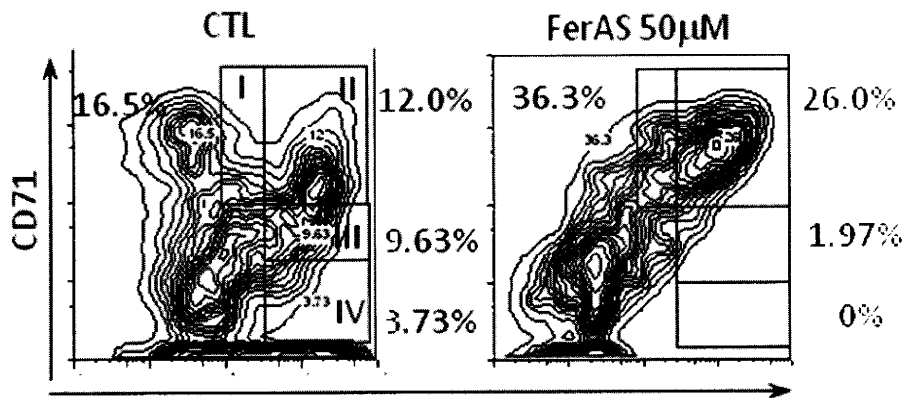
共培養による未分化細胞の維持についてFACSにて検討を行った結果、共培養7日目FAS添加の有無にかかわらず、多くの細胞がlin陽性を示しており分化が誘導されていたが、CTLでは表面マーカー上LSK細胞と同様の細胞を数パーセント認めたのに対し、FerASを添加した場合これらの細胞を認めなかった。また7日間培養後の細胞のコロニー形成能は、FerAS添加によりCFU-Mix, GM, Eその種類にかかわらず濃度依存的に減少する傾向にあった。

培養後の細胞における分化マーカーの発現について解析を行った結果、FerAS添加の有無にかかわらず多くの細胞がGr-1、B220といった顆粒球、単球系、及びB cell系のマーカーを発現していたが、FerAS添加により赤芽球系のマーカーであるTer119を発現している細胞を濃度依存的に多く認めた。

さらに血球の発生、分化過程に鉄負荷が及ぼす影響について、OP9 systemを用いることでより詳細に検討を行った。SCF, IL-3, EPO存在下で分化を誘導した場合、赤芽球系の他、顆粒球や巨核球など種々の細胞が確認されたが、FerASを添加した場合、CTLと比較して多くの細胞がTer119陽性を示し、またより多くの細胞が7-AAD陽性を示した。

Ter119及びTfR(CD71)で展開し、赤芽球系細胞の成熟度をI, II, III, IVと時計周りにproerythroblast, immature-, mature-erythroblast, erythrocyteの分画に分類した場合、分化誘導後CTLではいずれのfractionの細胞も確認できたが、FerAS添加により細胞の分化が

Fig. 1



immature erythroblast で停止していた(Fig. 1)。

形態的には CTL では正染性～多染性の赤芽球に加え、一部には脱核した赤血球が観察されたのに対し、FerAS 添加により大型で多核の異形成の強い細胞が多く観察された。またサイトカインの組み合わせを変えることで骨髄単球系、巨核球系へ分化を誘導した場合、いずれの lineage においても FerAS 添加によって若干強く分化が誘導される傾向にあり、またより多くの細胞に細胞死が誘導された。しかしながら各 lineage、形態的には赤芽球系ほど強い異形成は認められず CTL に近い形態を示した。

D：まとめ

過剰鉄は造血細胞において ROS の産生、p38MAPK, SAPK/JNK pathway の活性化を誘導し、増殖抑制、細胞死誘導、赤血球系の分化異常など無効造血の病態をもたらす可能性が示唆された。今後は転写因子、細胞周期制御因子の内的因子操作、及び培養条件を検討することで、至適な造血幹細胞増幅法、ならびに造血幹細胞からの系統特異的分化誘導法の開発を継続して行う予定である。

なお本研究の成果の一部は第 72 回日本血液学会総会、第 69 回日本癌学会学術総会において発表した。

E：健康危険情報

特記事項なし

F：研究発表

1) 国内

口頭発表 46 件

原著論文による発表 1 件

それ以外（レビュー等）の発表 43 件

そのうち主なもの

論文発表（著者・題名・発表誌名・巻・頁・発行年等も記入）

1. Nakamichi N, Wada N, Kohara M, Fukuhara S, Sugiyama H, Ogawa H, Hino M, Kanamaru A, Kanakura Y, Morii E, Aozasa K.

Polymorphous lymphoproliferative disorder: a clinicopathological analysis.

Virchows Arch 456:269-276, 2010

2. Chihara T, Wada N, Kohara M, Matsui T, Masaya H, Maeda T, Shibayama H, Kanakura Y, Tani M, Morii E, Aozasa K.

Peripheral T-cell lymphoma of Lennert type complicated by monoclonal proliferation of large B-cells.

Pathol Res Pract 206:185-190, 2010

3. Wada N, Kohara M, Ikeda J, Hori Y, Fujita S, Okada M, Ogawa H, Sugiyama H, Fukuhara S, Kanamaru A, Hino M, Kanakura Y, Morii E, Aozasa K.

Diffuse large B-cell lymphoma in the spinal epidural space: A study of the Osaka Lymphoma Study Group.

- Pathol Res Pract 206:439-444, 2010
4. Nakaoka H, Sakata Y, Yamamoto M, Maeda T, Arita Y, Shioyama W, Nakaoka Y, Kanakura Y, Yamashita S, Komuro I, Yamauchi-Takahara K. Pulmonary hypertension associated with bone marrow transplantation. J Cardiol cases 2:23-27, 2010
5. Nagai T, Takeuchi J, Dobashi N, Kanakura Y, Taniguchi S, Ezaki K, Nakaseko C, Hiraoka A, Okada M, Miyazaki Y, Motoji T, Higashihara M, Tsukamoto N, Kiyoi H, Nakao S, Shinagawa K, Ohno R, Naoe T, Ohnishi K, Usui N. Imatinib for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: results of a prospective study in Japan. Int J Hematol 92:111-117, 2010
6. Tokunaga M, Ezoe S, Tanaka H, Satoh Y, Fukushima K, Matsui K, Shibata M, Tanimura A, Oritani K, Matsumura I, Kanakura Y. BCR-ABL but not JAK2 V617F inhibits erythropoiesis through the Ras signal by inducing p21CIP1/WAF1. J Biol Chem. 285 (41): 31774-82, 2010
7. Matsumura I, Tanaka H, Kanakura Y. Effects of excessive iron on hematopoiesis J of Stem Cells. in press
8. Matsumura I, Tanaka H, Kanakura Y. Improved hematopoiesis by iron chelation therapies Trends in Cell & Mol Biol. in press
9. Matsumura I, Tanaka H, Kanakura Y. Effects of excessive iron on hematopoiesis Porphilins. in press
10. Hara M, Mizote I, Nakaoka Y, Tanaka H, Asano Y, Sakata Y, Komuro I. A case of non-cardiogenic acute pulmonary edema in a patient with POEMS syndrome-associated pulmonary arterial hypertension. Ann Hematol. in press
11. 金倉 讓, 松村 到 第11章 血液疾患 (1.総論、2.赤血球異常、3.白血球異常) 口腔外科学 (白砂兼光, 古郷幹彦編), 医歯薬出版株式会社, 東京, 2010, pp430-447
12. 金倉 讓 骨髓増殖性疾患の概念 臨床検査 54:227-233, 2010
13. 金倉 讓 総論:白血病治療の進歩 -特集に寄せて-BIO Clinica 25:16-17, 2010
- 学会発表
1. Tokunaga M, Ezoe S, Tanaka H, Satoh Y, Matsumura I, Kanakura Y. BCR-ABL but not JAK2 V617F inhibits erythropoiesis through the Ras signal by inducing of p21CIP1/WAF1. 15th Congress of the European Hematology Association (2010. 6. 10-13, Barcelona, Spain)
2. Saitoh Y, Shibayama H, Tanaka H, Tanimura A, Matsumura I, Kanakura Y. A cell-death-defying factor, anamorsin, contributes cell growth through inactivation of p38MAPK. 15th Congress of the European Hematology Association (2010. 6. 10-13, Barcelona, Spain)
3. Tanaka H, Matsumura I, Satoh Y, Kanakura Y. Excessive Reactive Iron Affects Both Immature Hematopoietic Cells and Stromal Cells, Thereby Impairing Total Hematopoiesis 1st JSH International Symposium (2010. 7. 17-18, Akita, Japan)
4. Tanaka H, Matsumura I, Satoh Y, Matsui K,

Shibata M, Kanakura Y

Iron-overload impairs normal hematopoiesis and would contribute to disease progression of MDS

第 72 回日本血液学会総会 (2010. 9.24-26 横浜)

5. Tanimura A, Tanaka H, Saitoh Y, Shibayama H, Matsumura I, Kanakura Y

Anti-apoptotic molecule Anamorsin is crucial for stromal function to support embryonic hematopoiesis

第 72 回日本血液学会総会 (2010. 9.24-26 横浜)

6. Tokunaga M, Ezoe S, Tanaka H, Satoh Y, Matsumura I, Kanakura Y

BCR-ABL suppresses erythropoiesis through Ras signaling by the induction of p21CIP1/WAF1

第 72 回日本血液学会総会 (2010. 9.24-26 横浜)

7. Fujita J, Mizuki M, Ohtsuka M, Ezoe S, Tanaka H, Satoh Y, Fukushima K, Tokunaga M, Matsumura I, Kanakura Y.

Leukemia-related gene abnormalities affect Flt3-ligand-mediated dendritic cell differentiation

第 72 回日本血液学会総会 (2010. 9.24-26 横浜)

8. 松村 到、田中宏和

AML 幹細胞の特性解析

第 69 回日本癌学会学術総会 2010 (2010. 9. 22-24 大阪)

9. Tanaka H, Matsumura I, Satoh Y, Matsui K, Shibata M, Kanakura Y.

Effects of iron-overload on normal hematopoiesis and disease progression of myeloid malignancies

第 69 回日本癌学会学術総会 (2010. 9. 22-24

大阪)

10. Tokunaga M, Ezoe S, Tanaka H, Satoh Y, Matsumura I, Kanakura Y.

The activated Ras signal suppresses erythropoiesis downstream of BCR-ABL by inducing p21CIP1/WAF1 第 69 回日本癌学会学術総会 (2010. 9. 22-24 大阪)

11. Fujita J, Mizuki M, Ohtsuka M, Ezoe S, Tanaka H, Satoh Y, Fukushima K, Tokunaga M, Matsumura I, Kanakura Y.

Leukemia-related gene abnormalities affect steady state dendritic cell differentiation

第 69 回日本癌学会学術総会 (2010. 9. 22-24 大阪)

12. Saitoh Y, Shibayama H, Tanaka H, Tanimura A, Matsumura I, Kanakura Y.

A cell-death-defying factor, anamorsin, yields cell growth through inactivation of p38MAPK

第 69 回日本癌学会学術総会 (2010. 9. 22-24 大阪)

G：知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし

分担研究報告書

可溶性 Notch リガンド Delta1-Fc を用いて増幅した
臍帯血造血前駆細胞の臨床研究

分担研究者：分担研究者:千葉 滋

(筑波大学大学院人間総合科学研究科 教授)

研究要旨

我々はヒト臍帯血 CD133 陽性細胞を可溶性 Notch リガンドである Delta1-Fc キメラ蛋白を固相化した条件で培養することにより、特異的に免疫不全マウスで長期間造血可能な細胞（SCID0 repopulating cell, SRC）を増幅可能であることを示してきた。

この成果に基づいて臨床試験を行うため、筑波大学附属病院内に設置された細胞プロセッシング・ファクトリー（CPF）での臨床試験用 GMP 基準書の作成を行った。書類整備にあたり先端医療センターの協力を得たことで、基本部分をなす製品標準書と製造管理・衛生管理・品質管理の3基準書において膨大な記載作業を伴う GMP 関連書式の整備を比較的短期間に、筑波大学 CPF での使用に適した形式として行うことが可能となった。また、実臨床試験に向けて fresh cord blood から frozen cord blood の利用への切り替えを想定した予備実験を遂行した。解凍後の臍帯血は極めて凝集を生じやすくその処理に工夫を要したが、作業環境を 4℃付近の低温状態で維持し、抗 CD133 抗体との反応を希釈した状態で行うことで造血幹細胞を含む分画の回収率向上が図られることが分かった。

A：研究目的

体外で増幅したヒト臍帯血を用いた移植法の開発が本研究班全体の目的であるが、この分担研究では、ヒト臍帯血中の造血幹細胞をより効率よく増幅するために見いだした新規方法論を基盤として、新たな臨床試験を行うための基盤整備を行うことを目的とした。

B：研究計画・方法

Notch 受容体の可溶性リガンドである Delta1-Fc を用いて臍帯血を培養し、別ユニットのフレッシュな臍帯血と同時に移植を行うことで生着に必要な細胞数が確保し難い臍帯血を安全に利用することを可能にする、という臨床プロトコールに向けた基盤整備を行った。この研究に必須の Delta1-Fc を産生する細胞はマスターセルバンクを作製しており、Delta1-Fc を大量に供給する基盤は整っている。

基盤整備の一つとして、筑波大学内に設置された細胞プロセッシング・ファクトリー (CPF) で培養を行うため、GMP 作業に関わる書式整備と CPF の設備整備を行った。書式整備に関しては、秘密保持契約に基づいて、先端医療センターで用いられている書式を入手し、Delta1-Fc を用いる培養作業を筑波大学内施設で行い GMP グレードの細胞製剤を製造することが可能な様に改編作業を行うこととした。

基盤整備の二つ目として、臨床試験の安全性と効率を確立するため、実験動物を用い確立している新規臍帯血増幅法の実臨床レベルへの橋渡し実験を行った。

C：研究結果ならびに今後の方針

先端医療センターにおいて整備された GMP 作業書類は、筑波大学内施設での作業ルールと異なる点も多く、特に書類管理・ラベル管理・購入管理等の作業手順以外の部分に大規模

な変更が必要であった。しかし、衛生管理基準を除く製造管理・品質管理においては共通点が多く、書式整備に費やす時間の効率化を図ることが可能であった他、必要な設備改修を効率よく洗い出すことができた。これらにより Delta1-Fc を用いる培養によって GMP レベルの輸注用細胞を調整するための SOP が完成に近づいた。Delta1-Fc の GMP 製造をすすめ、臨床試験で行う培養法を完成させ、ヒト幹細胞を臨床応用するための倫理指針に基づいた臨床試験を実行に移す基盤ができあがった。

一方で、新鮮臍帯血を使用した知見を実臨床段階では凍結臍帯血に移し替えるための橋渡し実験では、解凍した臍帯血の洗浄・造血幹細胞指標を持つ細胞の分離において凝集塊の発生による回収率の低下が大きな問題となり、至適条件の設定に困難が生じた。しかし、低温作業環境を維持すること、造血幹細胞指標を標的とした抗体との細胞の混和条件を希薄にすることにより解決を見出した。

D：まとめ

ヒト臍帯血 CD133 陽性細胞を可溶性 Notch リガンドである Delta1-Fc キメラ蛋白を固相化した条件で培養して移植する臨床試験の基盤整備を進めた。

E：健康危険情報

該当なし。

F：研究発表

(論文)

1. Kozuma Y, Sawahata Y, Takei Y, Chiba S, Ninomiya H. Procoagulant properties of microparticles released from red blood cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol*, in press