

## 重症低ホスファターゼ症に対する骨髄移植併用同種間葉系幹細胞移植

### 疾患モデルマウスの治療研究および間葉系幹細胞培養増殖

研究分担者 弓場俊輔(産業技術総合研究所健康工学研究部門研究グループ長)

#### 研究要旨

疾患モデルマウスを用いた動物実験を試みるとともに、同種間葉系幹細胞(MSC)の増殖をセルプロセッシングセンターにて行い、品質を保証した細胞を低ホスファターゼ症患者に対する移植用として供給した。

#### A. 研究目的

低ホスファターゼ症患者は骨を作るのに必要なALPが生まれつき正常に働かないことにより、骨を作ることが障害される遺伝性疾患である。本計画では骨形成障害を改善するために、同種MSCを患者に移植して骨形成能を付与することにある。そこで、分担研究者、弓場は、同疾患モデルマウスを用いた動物実験において臨床研究で得られた有効性を検証するとともに、同種MSCをセルプロセッシングセンターにて培養し、品質を保証した細胞を代表研究者に供給することで臨床研究を遂行する。

#### B. 研究方法

#### 1. 疾患モデルマウス

低ホスファターゼ症の原因遺伝子である組織非特異的ALP遺伝子に変異を導入したマウス(TNALP KOマウス)について、米国ジャクソン研究所にて凍結受精卵から個体復元を行い、当該遺伝子についてヘテロ接合体の個体(9週齢)を入手した(図1)。

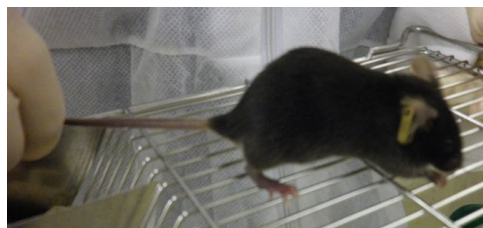


図1. TNALP KOマウス(ヘテロ接合体)

分担者研究機関の動物施設にて、この個体と野生型 BL6 との交配を開始し、ヘテロ接合体個体の繁殖を行った。また、繁殖で得た個体について、解析手法の確認として、軟 X 線写真撮影、 $\mu$ CT、下肢全体の DXA (骨密度) 測定を株式会社クレハ分析センターに、血清 ALP の測定をオリエンタル酵母株式会社に依頼した。さらに、患者同様、新生仔は、未処置では致死性であるため、ピリドキサル (ビタミン B6) 投与の細胞移植前の生存維持にかかる処置についても実験手技を確立した。一方、移植するマウス MSC は、定法に従って 8 週齢マウス大腿骨内腔より採取し、培養を行うとともに、対照として市販のマウス MSC (DS ファーマ社製 C57BL/6 由来 [passage 6]) も入手して培養した (図 2)。

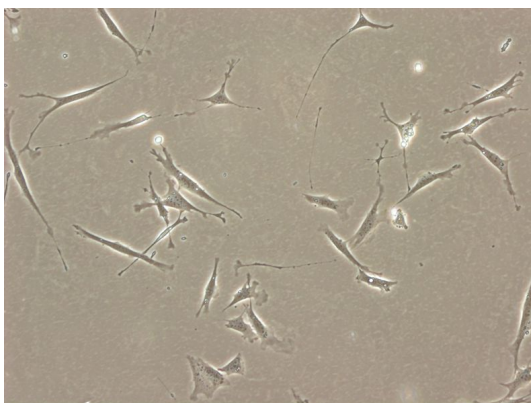


図2. 市販MSC (C57BL/6由来)

## 2. 間葉系幹細胞培養 (詳細は、資料 1)

島根大学で採取された骨髄を産総研に搬送し、セルプロセッシングセンターで

骨髄由来 MSC の培養を行った。搬送中は 10 ~ 30 を保つようにした。培養は 20 $\mu$ g/mL 硫酸ゲンタマイシンと 15% 牛胎児血清を含んでいる液体培地 ( $\alpha$ -MEM) に採取した骨髄を混和し、培養容器を用いて炭酸ガス培養器 (5%CO<sub>2</sub>、37 ) 内で行った。移植に必要な細胞数を得るために、培養容器底面に接着し増殖した MSC を、プロテアーゼを用いて培養容器より剥がし、新たな培養容器で継代培養 (2 次培養) した。培養期間および継代回数は安全性を考え、1 ヶ月以内で継代回数 3 回 (4 次培養) までとした。移植当日に MSC を剥離し、10mL の PBS に浮遊させた状態で島根大学へ搬送した。また移植細胞の安全性は、まず骨髄採取に先立ちドナーのウイルス試験を行い、培養中の無菌試験、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験で確認した。

### (倫理面への配慮)

移植・骨髄採取のたびに島根大にて患者・ドナーへの説明を行い、同意を得た上で行った。

## C. 研究結果

### 1. 疾患モデルマウス

ヘテロ接合体 5 匹と野生型 10 匹の交配を行い、既報通り、メンデルの法則に従ってヘテロ接合体が得られた。また、試験的にヘテロ接合体同士の交配から、疾患モデルになりうるホモ接合体も死産ながら得られた。これら個体の骨形成に

ついでに形態学的解析では、ホモ接合体のみならず、ヘテロ接合体にも異常が疑われた。血清 ALP 値についても、ホモ接合体の検体は得られなかったが、ヘテロ接合体の ALP 値が野生型に比べ、有意に低かった。

移植用のマウスMSCについては、培養直後から血球系細胞(CD45+, TER119+)が混入(図3)し、磁気ビーズによる分離(図4)も試みたが、残存血球系細胞も増殖した。

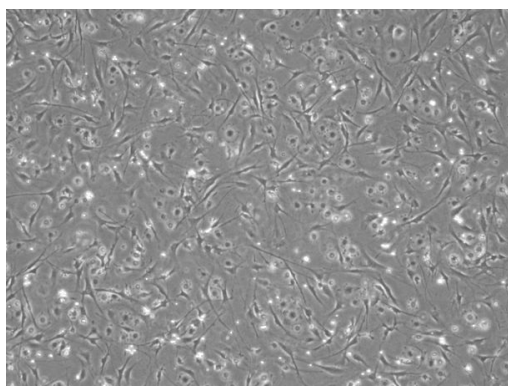


図3. 磁気ビーズ分離前のMSC培養

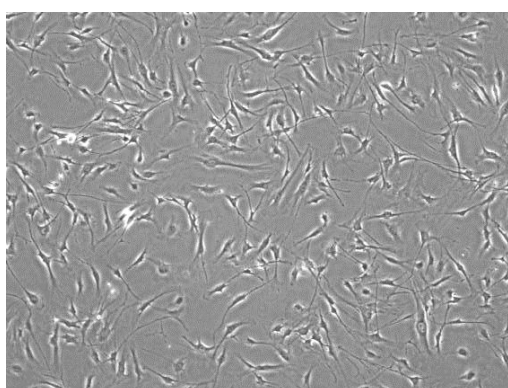


図4. 磁気ビーズ分離直後のMSC培養

## 2. 間葉系幹細胞培養

2例の患者に対する間葉系幹細胞移植用の細胞培養を行った(図5)。15~35mLの骨髄を2~3週間かけて培養し、いずれの場合も体重(kg)あたり $1 \times 10^6$ 細胞以上、細胞生存率80%以上という規定の細胞を調製できた。無菌検査、マイコプラズマ検査、エンドトキシン検査等の安全性試験結果はすべて異常なかった。また培養した間葉系幹細胞は、骨分化能を有していることが確認できた。

症例	1		2	
	移植時期	月齢	移植時期	月齢
	14	7		7
	15	8		8
	16	9		9
	17	10		10
	18	11		11
	19	12		12
	20	1		1
	21	2		2
	22	3		3
	23	4		4
	24	5		5
	25	6		6
	26	7		7
	27	8		8
	28	9		9
	29	10		10
	30	11		11
	31	12		12
	32	1		1
	33	2		2
	34	3		3
	35	4		4
	36	5		5
	37	6		6
	38	7		7
	39	8		8
	40	9		9
	41	10		10
	42	11		11
	43	12		12
	44	1		1
	45	2		2
	46	3		3
		4		4
		5		5
		6		6
		7		7
		8		8
		9		9
		10		10
		11		11

図5. CPCスケジュール

## D. 考察

### 1. 疾患モデルマウスを用いた動物実験

ヘテロ接合体同士の交配で得られた個体は、同腹仔3匹で、予備的に加えた形

態学的解析・血清学的解析結果については個体差の可能性が排除できない。

また、これまでに予備的に得たホモ接合体は全個体死産であり、親の育児放棄による哺乳障害もその原因の一つとして考えられる。

また、大腿骨から新鮮採取した骨髓細胞からの MSC 分離は、ヒトやラットの MSC のような接着性の差異、さらに磁気ビーズによる血球系細胞の選別を利用しても困難であり、さらなる培養法の改善が求められる。

## 2. 間葉系幹細胞培養

1 例目は 5 回、2 例目は 9 回、移植用間葉系幹細胞の培養を行ったが、有害事象は発生しなかった。培養した間葉系幹細胞は骨分化能を有しており、患者の骨の石灰化が改善していることから、移植細胞が臨床症状の改善に寄与している可能性が示された。

細胞の搬送は当初、陸路で行っていたが、実施期間の途中から空路で行うことになった。空路の場合は通常 X 線検査を受けなければならないが、航空会社に申請し、国土交通省から特別に許可を得た上で X 線検査の免除を受けることが可能となった。ただし搭乗毎に申請が必要で、許可が下りるまで約 10 日を要する。さらに搭乗便も指定されるため、次便に変更することさえ不可能であり、急な予定変更に対応出来ない。今後、医療界全体で細胞等の航空機搬送の枠組みが必要であると考えられる。

## E. 結論

疾患モデルマウスである、TNALP KO マウスのホモ接合体個体は生直後からその維持は困難を極め、治療モデル確立に至らなかった。移植用マウス MSC についても、ラットで可能な通常分離方法では血球系細胞の分離が難しく、分離方法のさらなる改善が求められる。

本研究計画実施期間全体で、安全性が担保された移植用間葉系幹細胞を計 11 回、島根大学へ供出できた。しかしながら、ヒト幹細胞臨床研究の計画どおりドナーより毎回新鮮骨髓を採取し培養した回数は頻回に及んだ。そのため、原料である骨髓細胞数、その後の細胞増殖率等が毎回同一ではなく、品質の管理は決して簡単なことではなかった。何よりも採取にかかるドナーの負担が大きいことから、今後は凍結細胞の利用をぜひとも考慮すべきである。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

(巻末に別記載)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許所得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

## 資料 1

### < 骨髄提供者の細胞培養 >

#### **: 依頼受付工程**

1. 島根大学附属病院は骨髄提供者名を患者医療機関IDに変換し、産業技術総合研究所に培養を依頼する。
2. 産業技術総合研究所は、患者および骨髄提供者がインフォームドコンセントを受け、研究に同意している事を確認する。また、感染症検査の結果が陰性であること等を確認し、島根大学附属病院に受け入れの可否を連絡する。
3. 産業技術総合研究所では患者医療機関IDを更に症例IDに置き換え、当研究所内での作業には症例IDを用いる。

#### **: 運搬容器発送工程**

1. 産業技術総合研究所は搬送専用のクーラーボックスを準備し島根大学附属病院に送る。
2. 清拭した搬送専用クーラーボックスに患者医療機関IDを記入し、以下の物品を入れておく。

- ・ 温度記録計
- ・ 50mLチューブで二重包装されたアシストチューブ入りヘパリン/PBS溶液
- ・ チューブラック
- ・ ヘパリンナトリウム注射液
- ・ 保冷剤

保冷剤は島根大学附属病院で骨髄採取当日まで凍結しておく。

#### **: 骨髄採取工程**

1. 担当医師は搬送専用クーラーボックスを、島根大学附属病院の手術室や無菌室等の骨髓採取場所へ持ち込む。
2. 骨髓提供者の自家骨髓を所定のチューブに採取する。担当医師が必要に応じて、骨髓採取時にヘパリンナトリウム注射液を用いる。
3. あらかじめ凍結しておいた保冷剤を搬送専用のクーラーボックスに入れ、担当医師は産業技術総合研究所まで骨髓を搬送する。搬送中はクーラーボックス内の温度が10 以上30 未満で保たれるようにし、骨髓採取から12時間以内に産業技術総合研究所CPCに搬入するようにする。

### **:受入工程**

1. 産業技術総合研究所の居室において、グループ長もしくは管理責任者が骨髓の状態等の確認をする。
2. 産業技術総合研究所まで骨髓を搬送した担当医師は、骨髓採取時間や骨髓に関する報告を行う。
3. 製造管理責任者は骨髓採取から12時間以内にCPCへ搬入できることを確認する。同様に温度記録計より搬送中、骨髓が10 以上30 未満に保たれていたことも確認する。

以降は産業技術総合研究所CPC細胞調製室での作業

産業技術総合研究所CPC細胞調製室へは、決められた手順に従い入室する。

CPC細胞調製室に持ち込む試薬、消耗品についての情報、各工程の作業記録は製造指示図記録書に記録する。

### **:FBS(牛胎児血清)培地調製工程**

FBS培地の調製

1. 分注し凍結保存されているFBSを骨髓採取日の前日にサプライ室薬品保冷库(冷凍)から必要本数取り出し細胞調製室薬品保冷库(冷蔵)に移し解凍する。
2. 硫酸ゲンタマイシン(40mg/mL)1mLをPBS7mLで希釈し5mg/mLの濃度に調製する。
3. -MEM 500mLに解凍したFBS 88mLと希釈したゲンタマイシン2.4mLを添加する。
4. ボトルトップフィルター 150mL 0.22µmで吸引濾過する。

5. 同様の手順で必要量を調製する。
6. 調製後のFBS培地を一部採取して持ち出し、無菌試験Aおよびエンドトキシン試験を行う。

培養に用いる FBS は牛海綿状脳症の発生していない地域原産で放射線照射処理されたものを使用する。

### **:細胞培養工程(1次培養)**

#### (1) 骨髄の播種

1. 骨髄を採取したアシストチューブは4 にて900rpm、10分間、遠心分離を行う。ただし、分離が悪ければ追加で遠心分離する。
2. 遠心分離後の骨髄は、下層から赤血球層、有核細胞層(buffy coat)、血漿の3層に分離されるので確認する。
3. 注意深く血漿を吸引除去する。
4. 新しい50mLチューブに残った赤血球層と有核細胞層をプールする。
5. 骨髄を搬送してきたアシストチューブにPBSを添加して、無菌試験Aを行う。
6. 75cm<sup>2</sup>フラスコ当たりの分注量(骨髄+培地)が15mLとなるように、FBS培地をプールした赤血球層と有核細胞層に追加する。
7. フラスコに症例ID、作業日、継代数を記載する。
8. フラスコに骨髄を播種する。
9. 37℃、CO<sub>2</sub>濃度5%のインキュベータにフラスコを収納し培養する。

#### (2) 間葉系幹細胞の増殖

1. 目視にて培養フラスコを観察し、凝固・血餅塊の有無、血球成分の残り具合等を調べる。
2. 培養上清を吸引除去する。
3. FBS培地は13mL/Flaskで、出来るだけゆっくり注ぐ。培地量の不足が予想される場合、製造管理責任者と協議の上、10mL/Flaskとするなど調整する。
4. ×40、×100の位相差顕微鏡像をデジタルカメラで撮影しスマートメディアにJPEG形式で保存する。
5. 細胞増殖の状態、細胞集団の状態を適宜製造管理責任者に伝え、継代の時期等を含め

た培養スケジュールを再検討する。

上記手順の操作を、細胞が増殖するまで週3回繰り返し行う。

### (3) 間葉系幹細胞の回収

1. TrypLE Select (動物由来成分不含のトリプシン様酵素) をサプライ室薬品保冷庫 (冷蔵) から必要本数持ちこむ。
2.  $\times 40$ 、 $\times 100$ の位相差顕微鏡像をデジタルカメラで撮影しスマートメディアにJPEG形式で保存する。
3. フラスコの培養上清の一部をチューブに採取し無菌試験Aに出す。
4. 残りの培養上清は吸引除去する。
5. PBSにて洗浄する。
6. TrypLE Selectを75cm<sup>2</sup>フラスコに2mL添加し、インキュベーター内で3分間反応させる。3分間で接着細胞が剥離しない場合、反応時間を延長する(15分以内)。
7. FBS培地で反応を停止させ、数回Suspensionする。
8. 50mLチューブに回収後、フラスコ内に残っている細胞をFBS培地で回収する。
9. 全ての培養フラスコを上記の手順で処理し間葉系幹細胞を回収する。
10. 回収した細胞浮遊液の一部をマイクロチューブに採取する。
11. Nucleo Counterにて死細胞数、全細胞数を測定し、生細胞数を計算する。
12. 回収した細胞浮遊液は4にて900rpm、5分間、遠心分離を行ない、培養上清を吸引除去する。
13.  $5 \times 10^5$  cells/mLにResuspensionする。
14. 継代に必要な細胞浮遊液 ( $5 \times 10^5$  cells/75cm<sup>2</sup>) を50mLチューブにとる。

### **:細胞培養工程(2次培養)**

#### (1) 間葉系幹細胞のフラスコへの播種

1. 播種する75cm<sup>2</sup>フラスコに症例ID、作業日、継代数を記載する。
2. 培養スケジュールと培養培地残量より10~13mLの範囲でフラスコあたりの培地量を決定する。
3. 継代用細胞浮遊液の入った50mLチューブにFBS培地を加える。



4. フラスコに細胞浮遊液を播種する。
5. 37℃、CO<sub>2</sub>濃度5%のインキュベータにフラスコを収納し培養する。
6. マイコプラズマ否定試験用として細胞浮遊液2000 μL ( $1 \times 10^6$  cells) にFBS培地を加え、6 well plateの2 wellへ播種し、それもインキュベータで培養する。
7. サプライ室薬品保冷库(冷蔵)に保存してあるTCプロテクター(動物由来成分不含の細胞凍結保護液)を必要本数持ち込み、余剰細胞は凍結保存する。

必要細胞数が多い場合は、75cm<sup>2</sup>フラスコでは本数が多くなるので、225cm<sup>2</sup>フラスコの使用を製造管理責任者は検討する。その場合、培地量および播種する細胞数は面積に合わせて調整する。

#### (2) 間葉系幹細胞の増殖

1. 培養上清を吸引除去する。
2. FBS培地は13mL/Flaskで、出来るだけゆっくり注ぐ。培地量の不足が予想される場合、製造管理責任者と協議の上、10mL/Flaskとするなど調整する。
3. ×40、×100の位相差顕微鏡像をデジタルカメラで撮影しスマートメディアにJPEG形式で保存する。
4. マイコプラズマ否定試験用プレートも2mL/well で培地交換を行う。
5. 細胞増殖の状態、細胞集団の状態を適宜製造管理責任者に伝え、継代の時期等を含めた培養スケジュールを再検討する。

上記手順の操作を、細胞が増殖するまで週3回繰り返す。

225cm<sup>2</sup>フラスコ使用の場合、培地量は面積に合わせて調整する。

#### (3) 搬出前、最終培地交換

1. 培養上清の一部をチューブに採取して持ち出し、無菌試験Bを行う。
2. 残りの培養上清は吸引除去する。
3. FBS培地は13mL/Flaskで、出来るだけゆっくり注ぐ。培地量に不足が見られる場合、製造管理責任者と協議の上、10mL/Flaskとするなど調整する。
4. ×40、×100の位相差顕微鏡像をデジタルカメラで撮影しスマートメディアにJPEG形式で保存する。
5. マイコプラズマ否定試験用プレートを持ち出し、マイコプラズマ否定試験を行う。

225cm<sup>2</sup>フラスコ使用の場合、培地量は面積に合わせて調整する。

#### (4) 間葉系幹細胞の回収

1. サプライ室薬品保冷庫(冷蔵)のTrypLE Selectを必要本数持ち込む。
2. ×40、×100の位相差顕微鏡像をデジタルカメラで撮影しスマートメディアにJPEG形式で保存する。
3. 培養上清の一部をチューブに採取し無菌試験Aに出す。
4. 残りの培養上清は吸引除去する。
5. PBSにて洗浄する。
6. TrypLE Selectをフラスコに2mL(225cm<sup>2</sup>フラスコの場合は5mL)添加し、インキュベータ内で3分間反応させる。3分間で接着細胞が剥離しない場合、反応時間を延長する(15分以内)。
7. FBS培地で反応を停止させ、数回Suspensionする。
8. 50mLチューブに回収後、フラスコ内に残っている細胞をFBS培地で回収する。
9. 全ての培養フラスコを上記の手順で処理し間葉系幹細胞を回収する。
10. 4 にて900rpm、5分間、遠心分離を行ない、上清を吸引除去する。
11. 沈殿した全細胞を50mLのPBSに懸濁する。
12. 4 にて900rpm、5分間、遠心分離を行ない、上清を吸引除去する。(洗浄1回目)
13. 沈殿した細胞を50mLのPBSに懸濁する。
14. 細胞浮遊液の一部をマイクロチューブに採取する。
15. Nucleo Counterにて死細胞数、全細胞数を測定し、生細胞数を計算する。移植に必要な量(患者体重(kg)×10<sup>6</sup>個以上)の細胞が確保できているか、生存率が80%以上であるか確認する。
16. 細胞浮遊液は4 にて900rpm、5分間、遠心分離を行ない、上清を吸引除去する。(洗浄2回目)
17.  $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$  cells/mLになるようにPBSを用いて細胞浮遊液を調製する。
18. 参考品等に必要な量の細胞浮遊液を別のチューブにとる。
19. 残りの移植用細胞浮遊液は4 にて900rpm、5分間、遠心分離を行ない、上清を吸引除去する。(洗浄3回目)
20. 新しいPBSを開封し、移植用間葉系幹細胞を10mLのPBSに懸濁する。
21. 清潔下、安全キャビネット内に滅菌シートを広げ、シート上に新しい50mLチューブとアシストチューブを取り出す。
22. アシストチューブを差し出し、別の作業者に移植用細胞浮遊液を入れてもらう。このとき、

元のチューブに残った細胞浮遊液は無菌試験A、エンドトキシン試験に出す。

23. 移植用間葉系幹細胞が入ったアシストチューブを50mLチューブに入れ二重包装にする。
24. 50mLチューブに症例IDと細胞数を記載し、チューブ立てに立てて細胞調製室外に搬出する。
25. 製造責任者は細胞保存室にてチューブに記載してある症例IDを患者医療機関IDに変換する。
26. 搬送専用クーラーボックス内へ温度記録計とともに梱包する。
27. 搬送専用クーラーボックスにも患者医療機関IDを記入して、居室へ運ぶ。
28. サプライ室薬品保冷库(冷蔵)に保存してあるTCプロテクター(動物由来成分不含の細胞凍結保護液)を必要本数細胞調製室へ持ち込み、18.で取り分けておいた細胞は凍結保存する。
29. 未使用のFBS培養培地と移植用間葉系幹細胞を懸濁させたPBSはクライオチューブに採取し参考品として保管する。

細胞数が必要量に満たない場合、 :細胞培養工程(2次培養)(1)から繰り返す。ただし、移植用間葉系幹細胞は、安全性を考慮して培養日数は1ヵ月以内で継代回数3回までとする。

### **:受渡工程**

1. 居室にて管理責任者または品質管理責任者が安全性試験の結果等を担当医師に説明し、担当医師は調製した細胞の品質と安全性を判断する。
2. 担当医師は搬送専用クーラーボックスの中身を確認し、島根大学附属病院まで間葉系幹細胞を搬送する。搬送中はクーラーボックス内の温度が10℃以上30℃未満で保たれるようにし、移植はCPCを出てから12時間以内に完了するようにする。

### **:細胞移植工程**

1. 担当医師は搬送専用クーラーボックスのまま、島根大学附属病院の病室に細胞浮遊液を持ち込む。この時、担当医師は温度記録計から記録を呼び出し、搬送中、搬送専用クーラーボックス内が10℃以上30℃未満に保たれていた事を確認する。

2. 50mLチューブから細胞浮遊液が入っているアシストチューブを取り出し、沈殿している細胞を攪拌し注射器で吸引する。
3. 経静脈的に間葉系幹細胞を投与する。
4. 担当医師は産業技術総合研究所に、温度記録計の入った搬送専用クーラーボックスを返却する。製造管理責任者は温度記録計から記録を呼び出し、搬送中、搬送専用クーラーボックス内が10 以上30 未満に保たれていた事を確認する。

## <間葉系幹細胞の安全性試験>

各試験で使用する試薬についての情報、作業の記録は、オリジナルデータを含め所定の記録様式を用い、文書として保管する。

### エンドトキシン試験

エンドトキシン試験は住化分析センターに委託する。（日本薬局方（ゲル化法）に準拠）

#### （１）委託

1. 培養担当者から試験サンプルを受け取る。委託する検体は、サンプリングした試験サンプルから安全キャビネット内で無菌的に必要量（2.5mL以上）を分取し、委託検体名を記載したアシストチューブに移したものとする。
2. 検体を委託する。
3. 報告書を受領する際は以下の内容を確認する。
  - ・ 分析・試験項目
  - ・ 検体名
  - ・ エンドトキシン濃度
  - ・ 委託先責任者、担当者印
4. 試験結果の受け入れ承認は品質管理責任者が行う。

#### （２）判定

承認された報告書のエンドトキシン濃度により、判定を行う。

- ・ エンドトキシン濃度が $<0.5$  EU/mLの時、陰性と判定する。（試験終了）

（\*日本薬局方における「生理食塩水」のエンドトキシン濃度は $<0.5$  EU/mL）

- ・  $0.5$  EU/mLを超える場合は陽性が疑われるため、要再試験と判断する。
- ・ 判定不能（試験無効など）の場合も、要再試験と判断する。

### ( 3 ) 再試験および再判定

要再試験と判断した場合は、品質管理責任者の指示を受け、再サンプリングの上、再試験を行う。

1. 製造管理責任者に報告の上、培養担当者に再サンプリングを依頼する。
2. 手順( 1 )に従い委託先に再試験の依頼を行う。委託検体名は再試験であることが明確なものにする。
3. 手順( 2 )に従い、試験結果の判定を行う。
  - ・ 再試験で陰性判定の場合は、当該間葉系幹細胞を陰性と判断する。
  - ・ 再試験でも陽性が疑われる場合は、ただちに状況を品質管理責任者に報告する。

品質管理責任者はグループ長と各責任者に報告し、対応を協議する。

### ( 4 ) 陽性判定時の処置

陽性と判定した場合、当該間葉系幹細胞を不適合品とし、各責任者と担当医師で対応を協議する。

## **無菌試験(細菌・真菌検査)**

間葉系幹細胞の工程内試験及び調製試液の無菌試験の際は「無菌試験A」を、間葉系幹細胞の最終試験の際は「無菌試験B」を実施する。

無菌試験を行う際は、専用白衣(青色)を着用する。ディスポーザブルのゴム手袋を装着し、クリーンベンチ内に入る部位(手、腕)のエタノール消毒を行って検体を取り扱う。

## 無菌試験A

BacT/ALERT 3D微生物培養システムを利用する。

BacT/ALERT機器にサンプルを播種した専用培養ボトルを設置し、培養および判定は機器に負う。

使用する専用ボトルの有効期限を確認し、培養終了予定日が、表示されている月の最終日を越えないものを用いる。

### ( 1 ) BacT/ALERT専用培養ボトルへの検体サンプル播種

1. 培養担当者または試薬の調製者より受け取ったサンプルは試験開始まで室温で保管する。受け取り後は5時間以内に無菌試験を実施すること。
2. 安全キャビネット内にサンプル及び以下のものを準備する。すべて70%エタノールで清拭し、消毒してからキャビネット内に入れること。
  - ・ 5 mLシリンジ
  - ・ 21 G注射針
  - ・ サインペン
  - ・ BacT/ALERT FA培養ボトル(好気性菌用)サンプル1本につき1つずつ用意する。
3. ボトルに症例IDから年齢性別を除いたもの(以下、検体ID)、サンプル名、試験日を記入する。
4. ボトルから緑のキャップを取り去りゴム部分を70%エタノールで十分に清拭する。
5. シリンジに針を取り付け、サンプルを2 mL 吸引する。
6. ボトルのゴム部分に針を立てる。(陰圧によりサンプルが自動的に注入される。)
7. シリンジを引き抜き、注入部のゴムを70%エタノールで清拭する。
8. 使用したシリンジ・注射針等の鋭利な感染性廃棄物は安全キャビネット内に備え付けの専用箱に一時保管し、全ての作業終了後にプラスチック製の医療系廃棄物入れに捨てる。(安全のため、リキャップはせずにそのまま廃棄すること)
9. サンプルの残りはフタをしてパラフィルムで封をし、冷蔵庫で保存する。
10. ボトルはBacT/ALERT機器に設置し、培養を行う。

## ( 2 ) BacT/ALERT機器への設置、培養

ボトルの機器への設置、取り出しは必ず1本ずつ行うこと。

( 複数本同時に扱う場合は前のボトルの処理が終わってから次のボトルを取り扱う。 )

1. BacT/ALERTメイン画面からボトル設置ボタンを押し、設置モードへ切替える。
2. ボトルID入力: バーコードを読み取らせる、またはキーボードにて直接入力する。
3. 検体受付番号入力: ボトル名を登録する。ボトル名は[検体ID\_サンプル名\_試験日] ( 15文字まで ) とする。
4. ラックを引き出し、緑のランプが点灯しているセルにボトルを設置する。
5. 各ボトルについて2~4を繰り返す。
6. 全てのボトルを設置し終わったらラックを閉じる。
7. 最後にチェックボタンを押し、設置モードを終了する。
8. 7日間、35 ℃ で培養する。

## ( 3 ) ボトルグラフの表示と印刷

培養期間中いつでもボトルグラフの確認が出来る。

1. メイン画面中央のラック状況確認コマンドからボトルの設置位置を確認する。
2. メイン画面から画面右下の右矢印ボタンで、セットアップ画面に移動する。
3. パスワードを入力する。
4. ボトル編集ボタンを選択する。
5. 表示したいボトルのセル位置を指定する。
6. 画面右下のグラフボタンでボトルグラフを表示させる。
7. 画面右下の印刷ボタンを押し、結果をプリントアウトする。

## ( 4 ) 判定

試験後、使用した機器に間違いはないか、校正有効期限内であるか、試薬の品名・量・有効期限に問題はないかを確認の上、判定を行う。

<1次判定>



培養3日目に1次判定を行う。BacT/ALERT の画面に陽性判定表示が出ていないかを確認する。手順（3）に従いボトルグラフを表示し目視によるCO<sub>2</sub>量変動の確認を行う。

- ・ グラフの上昇が認められない場合、陰性と判定し、培養を続行する。
- ・ グラフの上昇が認められる場合、陽性が疑われるため、要再試験と判断する。

#### <最終判定>

1. 陰性のまま培養7日間が過ぎたボトルは、メイン画面に判定結果が表示される。（陰性の場合には陰性ボトルのボタンが青色に点灯し、陽性の場合には画面全体が黄色になり、陽性ボトルのボタンが点灯する。）
2. 機器の判定を参考に、以下の判定を行う。
  - ・ 機器の判定が陰性の場合、最終判定を陰性と判断する。（試験終了）
  - ・ 機器の判定が陽性の場合、要再試験と判断する。

#### （5）再試験および再判定

要再試験と判断した場合は、品質管理責任者の指示を受け、再サンプリングの上、再試験を行う。

1. 製造管理責任者に報告の上、培養担当者に再サンプリングを依頼する。
2. 再試験前には試薬の使用期限、操作マニュアルのチェックおよび試験機器の稼働状況のチェックを行う。
3. 再試験のためのサンプルを培養担当者より受け取り、手順（1）、（2）と同様に無菌試験を行う。ただし再試験では1サンプルにつきボトル2本に播種する(n=2)。
4. 手順（4）～（6）に従い判定と処理を行う。
  - ・ 再試験で2本とも陰性判定の場合、最終判定を陰性とする。（試験終了）
  - ・ 再試験でいずれか1本または2本とも陽性判定の場合、ただちに品質管理責任者に状況を報告する。品質管理責任者はグループ長と各責任者に報告し、対応を協議する。

#### ( 6 ) 陽性判定時の処置

陽性と判定した場合、当該間葉系幹細胞を不適合品とし、各責任者と担当医師で対応を協議する。

### **無菌試験B**

BacT/ALERT 3D微生物培養システム及び寒天平板表面塗抹法を併用する。

使用する培地の有効期限を確認し、有効なものを用いること。

( BacT/ALERT 専用ボトルの場合、培養終了予定日が、表示されている月の最終日を越えないものを用いる。平板培地は試験実施日が、使用期限内のものを用いる )

平板培地は1回の試験につき未開封の培地各1包 ( 10枚 ) を使用する。

#### ( 1 ) BacT/ALERT 専用培養ボトルへのサンプル播種

最終培地交換前サンプル( -1)および交換後サンプル( -2)を無菌試験A 手順 ( 1 ) と同様に培養ボトルに播種する。

( ただし1検体につきボトル3本に播種し(n=3)、ボトル名は -1a, -1b, -1c, -2a, -2b, -2cとする )

#### ( 2 ) BacT/ALERT機器への設置、培養

無菌試験A 手順 ( 2 ) に従いボトルを機器に設置する。

( 設置した翌日に培養中のボトルから培養液を一部採取し、平板培地に播種する )

### (3) 培養中のボトルの取り出し、平板培地播種

使用する平板培地は当日まで冷蔵庫に保管し、使用時に室温に戻す。(結露を解消するため、試験実施1時間程度前に包装を外して安全キャビネット内で静置する)

1サンプルにつき各培地3枚ずつ(n=3)、計6枚を使用する。

1. 安全キャビネット内に以下のものを準備する。
  - ・ 20 mLシリンジ
  - ・ 21 G注射針
  - ・ サインペン又はシール
  - ・ 15 mLチューブ
  - ・ トリプケースソイ寒天培地 6枚
  - ・ サブロー寒天培地 6枚
2. シャーレのフタにボトル名、日付、培地の種類を記載する。
3. 無菌試験A 手順(3)に従い、前日にBacT/ALERT機器に設置したボトルの培養状況を確認する。
4. -1の3本の内、取り出すボトルを1本選び(例: -1 c)、セル位置の確認をする。ラックを引き出し、選んだボトルを1本引き抜く。
5. ラックを閉める。
6. 取り出したボトルの周囲をエタノールでよく清拭した後、安全キャビネット内に入れる。
7. ボトルをよく振り、口のゴム部分をエタノールで清拭する。
8. 注射針を装着したシリンジで、ボトル内溶液を約9 mL引き抜く。(かなり力が必要)
9. 内容液を15 mLチューブに回収する。チューブにはサンプル名を明記する。
10. 取り出したボトルはゴム部分を清拭し、BacT/ALERT機器の元のセルに戻す。他のボトルと共に残り6日間培養し、機器による判定を行う。
11. -2ボトルについても同様に(3)3)~11)を繰り返す。
12. 回収した内容液は大きな浮遊物(活性炭など)を除くため、遠心する。(500×g、3分間)。チューブをクリーンベンチ内へ持ち込む際には、エタノールで清拭する。
13. 平板培地への播種作業前に、作業用ゴム手袋を滅菌手袋に交換する。
14. 内容液の上清を5 mLピペットを用いて3 mL吸引し、重ねた平板培地3枚に1

mL / plate滴下し、シャーレのフタを閉めてすぐに傾け、内容液を広げる。作業中の汚染を防ぐため、一度に播種する平板培地は 3 枚までとする。

15. 同様の操作を繰り返し1サンプルあたり 6 枚、合計 12 枚すべての培地に播種する。
16. 培地はフタをしたまましばらく安全キャビネット内に静置し、内容液を培地に染み込ませる。(すぐにインキュベータに入れる場合は、結露がない事を確認する)
17. 培地表面が乾燥した事を確認し、裏返して(フタが下になるようにして)重ね、インキュベータで7日間培養する。

・トリプケースソイ寒天培地 30

・サブロー寒天培地 25

#### ( 4 ) 最終試験の判定(搬出日)

##### 4 - 1 .搬出前判定

平板培地播種後2日目か3日目が搬出日になるので、搬出日の朝に判定を行う。

1. 平板培地は蓋をしたまま観察する。
  - ・ すべての培地にコロニーが認められない時、陰性と判定する。
  - ・ 平板培地はいずれかの培地にコロニーが1つ以上認められた場合、陽性が疑われるため、要再試験と判断する。
2. 培養ボトルは平板培地播種に用いなかった2本について判定を行う。無菌試験A ( 4 ) に従い、ボトルグラフの目視による確認を行う。
  - ・ グラフの上昇が認められない場合、陰性と判定する。
  - ・ グラフの上昇が認められた場合、陽性が疑われるため、要再試験と判断する。
3. 平板培地の結果と培養ボトルの結果を合わせて搬出前判定を行う。
  - ・ すべて陰性の判定が出たとき、当該間葉系幹細胞を陰性と判定する。
  - ・ いずれか 1 つ以上で陽性が疑われるものがある場合は、品質管理責任者は各責任者に報告し、対応を協議する。

#### 4 - 2 .最終試験（搬出前）の陽性判定時の処置

陽性と判定した場合、当該間葉系幹細胞を不適合品とし、各責任者と担当医師で対応を協議する。

#### 4 - 3 .搬出準備

1. 品質管理責任者の指示を得て、BacT/ALERTのボトルグラフをプリントアウトする（培養ボトルはそのまま培養を続行する）。平板培地はTriplicateの内、1セット（4枚）をインキュベータから取り出す。残りの培地については最終判定日までそのまま培養を続行する。
2. 取り出した培地とプリントしたボトルグラフを担当医師に見せ、結果を説明する。

#### 4 - 4 .最終試験の再試験および再判定

品質管理責任者から指示があった場合、再試験を行う。

再試験前には試薬の使用期限、操作マニュアルのチェックおよび試験機器の稼動状況のチェックを行う。

1. 再試験のためのサンプルを培養担当者より受け取り、手順（1）～（3）に従いボトルへの播種および平板培地播種を行う。
2. 手順4 - 1に従い最終判定を行う。
  - ・ 再試験ですべて陰性の判定が出た場合は、最終試験を陰性と判断する（試験終了）。
  - ・ 再試験でもどれか1つ以上陽性が疑われるものがある場合は、搬出前判定と同様に関係者で協議を行う。

#### （5）陽性判定時の処置

陽性と判定した場合、当該間葉系幹細胞を不適合品とし、各責任者と担当医師で対応を協議する。

#### (6) 引渡し後の最終試験判定

製品引渡し後も培養を続けていた平板培地および培養ボトルについて、平板培地の培養7日目に最終判定を行うこととする（培養ボトルは培養8日目にあたる）。

手順(4)と同様に、判定と処理を行う。

- ・ 引渡し後の判定ですべて陰性の判定が出た場合は、最終試験を適合とする。
- ・ 引渡し後の判定でどれか1つ以上で陽性が疑われる場合、搬出前判定と同様に関係者で協議を行う。

#### (7) 平板培地の写真撮影

1. BacT/ALERT のボトルグラフをプリントアウトする。平板培地（8枚）はインキュベータから取り出して、写真撮影を行う。
2. 培養7日目に判定を行った後の平板培地をデスクに並べる。
3. シャーレのフタを取りデジタルカメラで上から撮影する。

### **マイコプラズマ否定試験**

市販の“Venor GeM Mycoplasma Detection Kit for conventional PCR”（minerva biolabs, 一段 PCR 法）を用いる。

使用する市販の試薬、キットは、全てロット番号と使用期限を確認する。作業はすべてゴム手袋を着用して行う。

## ( 1 ) DNA回収

細胞溶解および DNA 抽出には PUREGENE Cell and Tissue DNA Isolation Kit (QIAGEN)を用いる。

1. 培養担当者より検体細胞培養プレート (6 well) を受け取る。
2. プレートから上清を除去し、Cell Lysis solution 300  $\mu$ l ずつ 2 well に添加する。
3. セルスクレーパーで細胞を掻きとり、ピペティングによりしっかりと懸濁する。1.5 ml チューブ 2 本に分けて回収し( 1 well 分/tube )、1 本を DNA 抽出用として以下に用いる。残りの 1 本は再試験に備えるため、試験結果の確認および判定が終わるまで冷蔵庫で保管する。
4. RNase A solution 1.5  $\mu$ l を添加し、よく混合した後、37  $^{\circ}$ C、30 min インキュベートする。
5. 室温に戻した後、Protein PPT Solution 100  $\mu$ l を添加する。
6. 白濁するまで激しく vortex する。
7. 15,000 rpm、3 min、4  $^{\circ}$ C にて遠心し、上清を新しい 1.5 ml チューブに移す。
8. 2-propanol 300  $\mu$ l を加え、ゆっくりと約 50 回転倒混和する。DNA が見えてくることを確認する。
9. 15,000 rpm、3 min、4  $^{\circ}$ C にて遠心を行う。
10. ペレットを確認しながら上清を除去し、70%エタノール 300  $\mu$ l を添加する。
11. 15,000 rpm、1 min、4  $^{\circ}$ C にて遠心を行う。
12. 上清を全て除去する。
13. ペレットを乾燥させる。
14. 注射用水 15 - 30  $\mu$ l に溶解し、DNA サンプルとする。溶解する注射水の量は、ペレットの大きさで判断する。  
以下に使用する水は全て同一ロットの注射用水とする。

## ( 2 ) DNA 定量

1. 測定の 30 分前に吸光光度計のスイッチを入れる。
2. 吸光値測定用サンプル (DNA サンプル 10 倍希釈液) を用意する。(DNA サンプル 2  $\mu$ l + 注射用水 18  $\mu$ l)
3. パソコンを立ち上げ Genespec (DNA) を起動させ、プリンタの電源を入れる。
4. 測定条件を入力する。
5. [編集]→

[測定条件編集] ・波長範囲：上限 300 nm、下限 220 nm

・光路長: 5mm

・積算回数：32

[核酸条件編集] ・計算モード：dsDNA

・希釈率：10

6. 10 µl 測定用セルを注射用水で洗う。
7. セルに注射用水 10 µl を入れてベースラインを測定する。
8. ベースラインが決定したら測定用 サンプルを 10 µl 入れて測定する。
9. 複数のサンプルを測定するときはサンプルごとにシートを替える。
10. シートにサンプル名(検体 ID、培養時期)、コメント(試験担当者名)を入力する。
11. [保存]→[一括ファイル保存]で全てのシートを 1 つのファイルとして保存する。
12. 波形をプリントアウトし、記録用紙の所定の欄に貼り付ける。
13. Genespec を終了し、吸光光度計の電源を切る。
14. 測定用サンプルを捨て、使用したセルは MQ 水で洗浄して所定の位置に戻す。

### ( 3 ) 上清サンプルの準備

1. 冷蔵庫から最終検査用培養上清を取り出す。
2. 安全キャビネット内で、少量を クライオチューブに分注する。
3. 実験台で 0.2 ml チューブに 50 µl を分注する。
4. PCR 機で 95 °C、5 min 加熱し、5 秒間スピンドウンする。
5. Sample A として以下に用いる。

### ( 4 ) PCR

PCR には以下のキットを用いる。

- ・ Venor GeM Mycoplasma detection kit for conventional PCR (minerva biolabs)
- ・ Ampdirect Plus (島津製作所)
- ・ Nova Taq Hot Start DNA Polymerase (EMD Biosciences)

1. DNA 定量で得られたデータに基づき、DNA サンプルを 100 ng/µl になるように注射用水で希釈し、Sample B として以下に用いる。
2. 冷凍保存の Venor GeM PCR キットのケースから、Ampdirect Plus (Buffer)、PCR grade water、Primer/Nucleotide Mix 及び Internal control DNA を取り出し、解凍する。
3. 8 連チューブを用意し、検体 ID と日付を記入する。
4. 下表に従い 1.5 ml チューブに (必要サンプル数 + 1) サンプル分の PCR Mixture



を調整する。

	1 サンプル分	6 サンプルで 試験を行う場合
Ampdirect Plus	12.5 µl	87.5 µl
PCR grade water	4.87 µl	34 µl
Primer/Nucleotide Mix	2.5 µl	17.5 µl
Nova Taq *	0.13 µl	1 µl
合計	20 µl	140 µl

\* Nova Taq (酵素)は混合直前まで冷凍庫で保管し、使用後は直ちに冷凍庫に戻す。

5. よく混合した後、8 連チューブに 20 µl ずつ添加する。
6. 下記の表にしたがって Sample , Internal control DNA , Extra H<sub>2</sub>O (注射用水)を加える。
7. \*添加時、内容液がチューブ外面に付着しないように注意する。交差汚染を防ぐため、残りのサンプル、試薬類は確実にキャップをして片付ける。マイコプラズマ DNA はコントロールとして使用しない。

Tube No.	1	2	3	4	5	6
Sample name	Negative control	Positive control	Sample A (培養上清)	3 + Internal control	Sample B (細胞 DNA)	5 + Internal control
PCR mixture	20	20	20	20	20	20
Sample	-	-	2.5	2.5	2.5	2.5
Internal Control DNA	-	2.5	-	2.5	-	2.5
Extra H <sub>2</sub> O	5	-	2.5	-	2.5	-
Total	25	25	25	25	25	25

8. キャップを確実に閉めて混合し、スピンドウンする。
9. 以下の条件で PCR を行う。

### Thermal Profile

1 cycle	95 for 10 min
39 cycles	94 for 30 sec
	55 for 30 sec
	72 for 30 sec
cool down	15 for

\* 最終の保持温度は PCR 機の結露を防ぐため 15 とする。

10. PCR が終了したら、PCR 産物は電気泳動を行うまで冷蔵庫で保存する。

#### ( 5 ) 電気泳動

1. 以下の通り、サンプルを 2% agarose gel にロードし 100 V、1×TAE で 30 分程度泳動する。

Lane M . 100 bp Ladder Marker

Lane 1. Negative control

Lane 2. Positive control

Lane 3. Sample A

Lane 4. Sample A + Internal control

Lane 5. Sample B

Lane 6. Sample B + Internal control

2. EtBr で染色して UV 照射下で写真を撮る。

#### ( 6 ) 結果の確認

1. 電気泳動写真を見て、以下の試験成立基準を確認する。これら全てが満たされていない場合は試験が成立していないと判断し、PCR をやり直す。いずれの場合も、非特異的増幅、プライマーダイマーによるバンドは無視する。

・ Lane 1 にバンドが認められない

・ Lane 2 に 1 本 ( 191 bp 付近 ) のバンドが認められる。

・ Lane 4, 6 に 1 本 ( 191 bp 付近 ) のバンドが認められる。

(lane 3, 5 で標的のバンド (265-278 bp) が認められた時は、この基準を満たさなくてよい)

\* 191 bp・・・Internal control DNA 増幅産物サイズ

Lane2, 4, 6 にバンドが認められない場合は、サンプルに反応阻害物質が含まれている可能性があるので、当該サンプルを希釈して PCR をやり直す。培養上清サンプルは 5 倍に希釈し、加熱処理を行う。

再測定の前には試薬の有効期限、操作手順及び試験機器の点検・校正状況の再確認を行う。PCR をやり直しても基準を満たさない場合は試験不成立として、品質管理責任者に状況を報告する。

#### ( 7 ) 判定

手順 ( 6 ) で基準を満たしたサンプルについて、以下の判定を行う。

試験に使用した機器に間違いはないか、点検・校正有効期限内であるか、試薬の品名・量・有効期限に問題はないかを確認の上、判定を行う。いずれの場合も、非特異的増幅、プライマーダイマーによるバンドは無視する。

- ・ Lane 3, 5 のいずれにもバンドが認められない場合、陰性と判断する。
- ・ Lane 3, 5 のいずれかで 265 – 278 bp 間にバンドが認められる場合、陽性と判断する。

#### ( 8 ) 再試験および再判定

##### **再試験 A**

陽性または擬陽性の判定が出た場合は、品質管理責任者の指示を受け、以下の手順で再試験 A-1 および A-2 を行う。

#### 8 - 1.再試験 A-1 および A-2

1. 本試験で用いた DNA サンプルおよび上清サンプルを希釈し直した上で、手順（４）に従い PCR を行う（A-1）。
2. 手順（３）で保管しておいた細胞懸濁液を用いて再度サンプルを調製し、手順（４）に従い PCR を行う（A-2）。
3. 手順（６）、（７）に従い、A-1 および A-2 の判定を行う。
  - ・どちらも陰性の場合、最終判定を陰性とする。
  - ・どちらか、または両方で陽性の場合、状況を品質管理責任者に報告する。

#### 再試験 B

再試験 A でも陽性または擬陽性の判定が出た場合は凍結保存細胞を融解し、以下の手順で再試験 B-1 および B-2 を行う。

#### 8 - 2.参考品からのサンプリング

1. 凍結保存しておいた細胞の参考品を 1 本（ $5 \times 10^5$  cells/ml, 500  $\mu$ l）融解する。
2. 融解した細胞懸濁液のうち、200  $\mu$ l は培地で洗浄した後、6 well plate の 1 well に播種し、培養を行い、再試験 B-2（手順 8 - 4）に用いる。
3. 残りの 300  $\mu$ l の細胞懸濁液を用いて再試験 B-1（手順 8 - 3）を行う。

#### 8 - 3.再試験 B-1

- 1 手順 8 - 2 で採取した細胞懸濁液 300  $\mu$ l から DNA を抽出、精製して、手順（４）に従い PCR を行う。
- 2 再試験前には試薬の使用期限、操作マニュアルのチェックおよび試験機器の稼働状況のチェックを行う。
- 3 手順（６）、（７）に従い判定を行う。
  - ・ 陰性場合は手順 8 - 4 に進んで再試験を続行する。
  - ・ 陽性反応が認められた場合は当該間葉系幹細胞を不適合品とし、状況を品質管

理責任者に報告する。

#### 8 - 4 .再試験 B-2

再試験 B-2 には手順 8 - 2 で培養を開始した参考品の細胞および再サンプリングした間葉系幹細胞の培養上清の計 2 サンプルを用いて試験を行う。

1. 製造管理責任者に報告の上、培養担当者に上清の再サンプリングを依頼する。
2. 2 回の培地交換を経た参考品の培養細胞を用いて、5-1 からの方法に従い DNA サンプルを作製する。
3. 手順(4)に従い PCR を行う。再試験前には試薬の使用期限、操作マニュアルのチェックおよび試験機器の稼動状況のチェックを行う。
4. 手順(6)、(7)に従い判定を行う。
  - ・ 陰性の場合、最終判定を陰性とする。ただし、再試験 B による判定であることを品質管理責任者に報告する。
  - ・ 陽性反応が認められた場合は当該間葉系幹細胞を不適合品とし、状況を品質管理責任者に報告する。

#### (9) .陽性判定時の処置

陽性と判定した場合、当該間葉系幹細胞を不適合品とし、各責任者と担当医師で対応を協議する。