

サブテーマ名：CPC（細胞培養センター）を利用した血液・血管の再生研究

小テーマ名：ヒト造血幹細胞の培養バッグの開発、評価

テーマリーダー：京都大学、教授、中畑龍俊

研究従事者：(財)先端医療振興財団、特別研究員、槻木裕志

● 研究の概要

テーマリーダー中畑の開発したヒト造血幹細胞の体外増幅に対応し、臨床応用への無菌操作及び増幅培養に適した培養バッグの開発を行う。

1. フェーズI

(1) 研究の目標

細胞株の増殖が良好なバッグを作製する。

(2) 実施内容

ポリオレフィン製の培養バッグでKG-1細胞株の培養試験を行った(初期細胞密度; 2×10^5 cells/ml、培養液量;20ml、培地;10%FCS加RPMI培地)。

しかし細胞増殖が若干少なく、材質を検討し、良好な細胞増殖が得られるようになった。

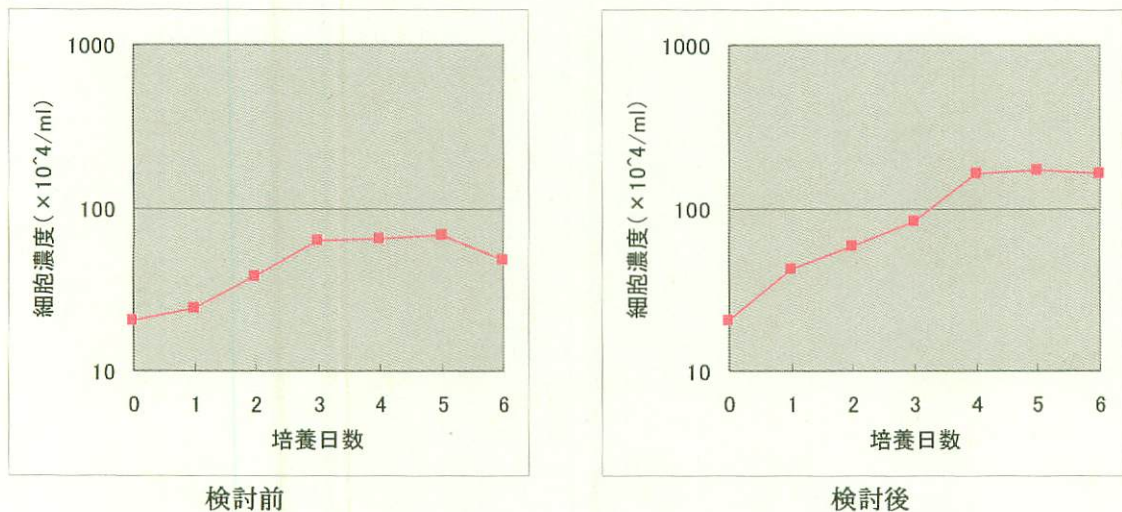


図1 細胞株の培養試験結果

(3) 成果

細胞株の増殖が良好な、ポリオレフィン製培養バッグを作製した。

2. フェーズII

(1) 研究の目標

ヒト造血幹細胞の培養増幅に適したバッグを開発する。

(2) 実施内容

ヒト臍帯血にヒドロキシエチルデンプンを加えて赤血球を沈降・除去した後、磁性ビーズを用いてCD34陽性細胞を標識、精製した。その細胞を用いて、各種培養バッグ(37mm×65mm)を用いた細胞培養試験を行った。SCF (Stem Cell Factor) 100ng/ml、TPO (Thrombopoietin) 100ng/ml、Flk2/Flt3 リガンド 100ng/ml、IL-6 と sIL-6R の融合タンパクである FP6 100ng/ml を添加した培養液 QBSF-60 (Quality Biological 社) を用い、5%CO₂、5%O₂、湿度95%の環境下で培養を行なった。培養開始7日後、12日後に上記培地で希釈を行い、7日後、12日後、14日後に血球計算盤で細胞数を計数すると共に、フローサイトメーターを用いてCD34陽性細胞の割合を測定した。CD34陽性細胞の初期濃度 1.0×10^4 cells/ml で培養を開始し、液量は5mlとした。海外で使用実績のある4-フッ化エチレン-6フッ化プロピレン共重合体(FEP)製の培養バッグ(American Fluoroseal 社)では、細胞数の増幅が、 27 ± 13 倍(7日後)、 155 ± 82 倍(12日後)、 247 ± 96 倍(14日後)であった。CD34陽性細胞の増幅倍率は、 16 ± 5 倍(7日後)、 30 ± 15 倍(12日後)、 27 ± 22 倍(14日後)であった。それに対し、試作したポリオレフィンバッグでは、細胞数の増幅が、 45 ± 37 倍(7日後)、 312 ± 205 倍(12日後)、 333 ± 18 倍(14日後)、CD34陽性細胞の増幅倍率は、 16 ± 12 倍(7日後)、 23 ± 17 倍(12日後)、 18 ± 21 倍(14日後)であった。ポリオレフィンバッグの内面にフッ素樹脂層を形成したポリエチレン・フッ素バッグでは、細胞数の増幅が、 57 ± 34 倍(7日後)、 488 ± 207 倍(12日後)、 591 ± 209 倍(14日後)、CD34陽性細胞の増幅倍率は、 17 ± 7 倍(7日後)、 38 ± 18 倍(12日後)、 34 ± 22 倍(14日後)であった。

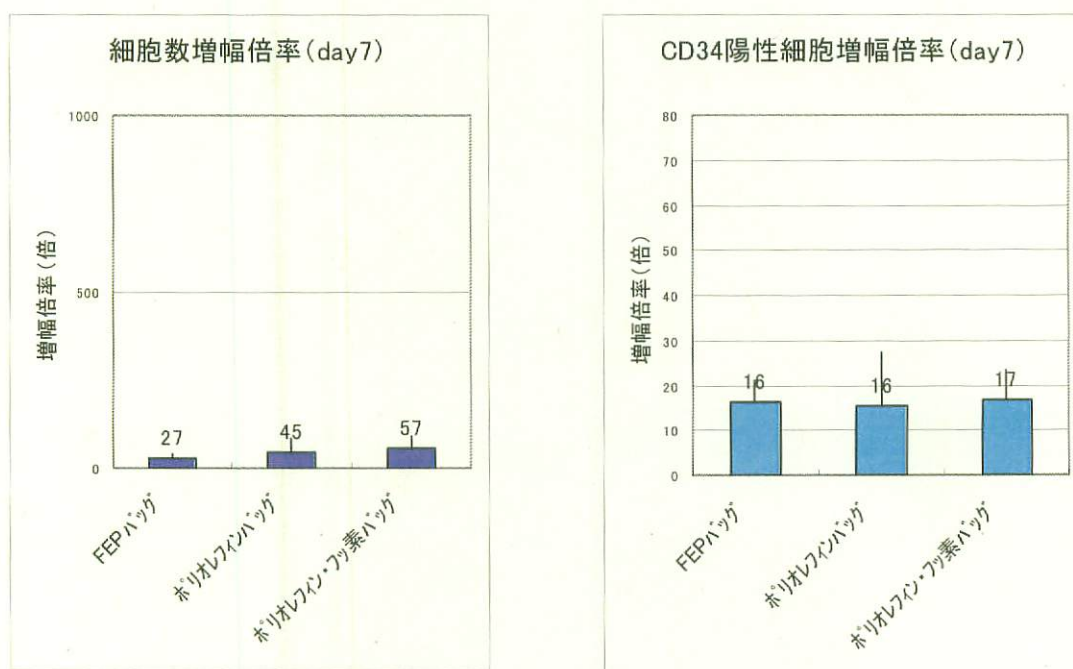


図2 臍帯血由来CD34陽性細胞を用いた培養試験(day7)

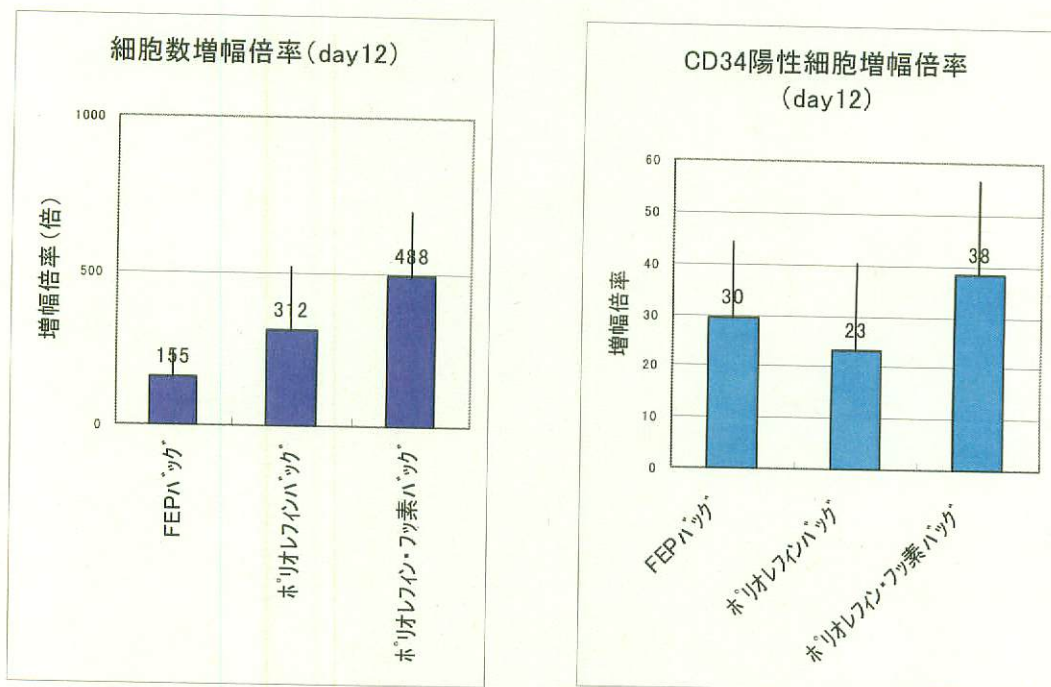


図3 臍帯血由来 CD34 陽性細胞を用いた培養試験 (day12)

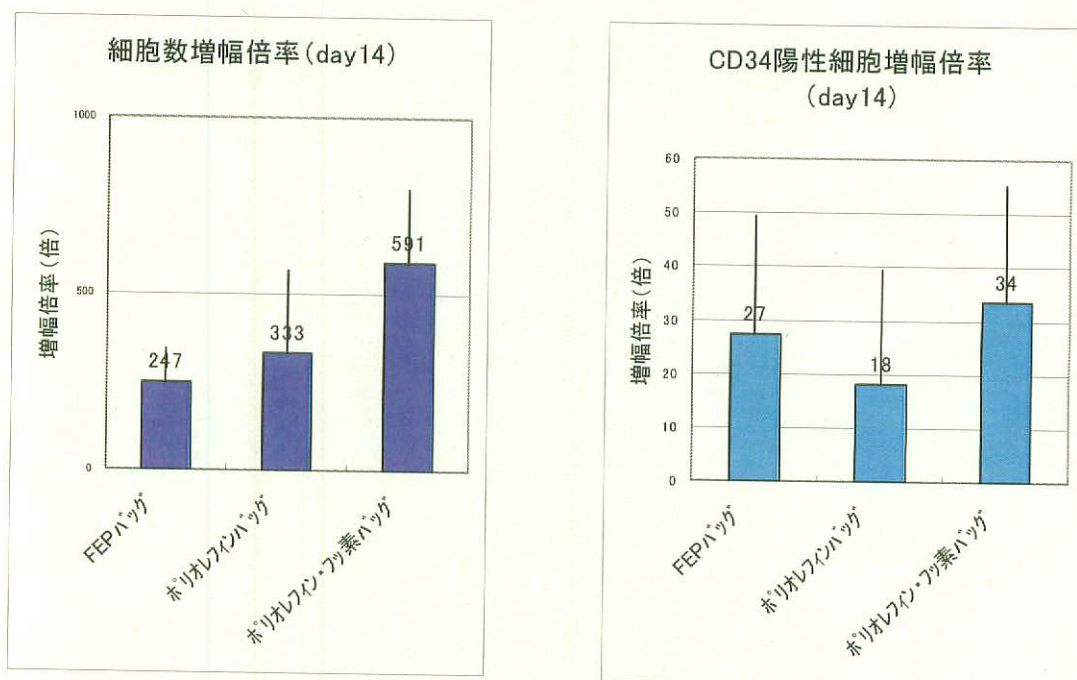


図4 臍帯血由来 CD34 陽性細胞を用いた培養試験 (day14)

海外で使用実績のある FEP バッグと比較して、ポリオレフィンバッグでは、細胞数の増幅は大きいものの、CD34 陽性細胞の増幅は小さく、造血幹細胞の培養増幅には余り適さないことが示唆された。それに対し、ポリオレフィン・フッ素バッグを用いたところ、細胞数の増幅が大きく、CD34 陽性細胞の増幅も同等以上であった。よって、ポリエチレン・フッ素バッグが造血幹細胞の培養増幅に適する可能性が大きいと考えられる。

(3) 成 果

小容量 (5ml) での臍帯血由来 CD3 4 陽性細胞の培養で良好な結果を示す、ポリオレフィン・フッ素バッグを開発した。

3. 今後の展望

小容量での培養試験結果が良好であったので、一般使用容量 (120ml) での培養試験を実施し、実用化を検討する。