

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：閉鎖系・無菌細胞洗浄システムの構築

テマリーダー：（財）先端医療振興財団、主任研究員、伊藤 仁也

研究従事者：ヘモネティクスジャパン（株）、共同研究員、井田 卓見

ヘモネティクスジャパン（株）、共同研究員、相澤 猛

● 研究の概要

細胞を用いる細胞療法（再生医療）の基本整備の1つに細胞プロセッシング過程での細胞の品質管理、安全な細胞操作法の確立が挙げられる。

細胞プロセッシングには、細胞増幅に用いた培養液や薬剤（サイトカイン等）の洗浄操作があり、従来法では遠心チューブに細胞懸濁液を分注し、洗浄液を添加して遠心をかけ、上澄みを除去する操作を2回以上繰り返して洗浄してきた。このような処理方法は開放系の操作となるため、微生物が混入するリスクを排除できない。また、複数の遠心チューブを処理することから他の細胞が混入する可能性も排除できない。

本研究では、この様な開放系で行われていたこれまでの細胞プロセッシング過程内に ACP215 を導入し、培養バッグの細胞懸濁液と処理回路を無菌接続して処理する完全閉鎖型自動洗浄システムを開発し、その導入検討を行った。

その結果、ACP215 を用いて製造された細胞製剤の性状及び機能は、洗浄前と比較し同等であること、培養に添加された薬剤は、99%以上除去できることが判明した。この細胞プロセッシングの工程は GMP に準拠した処理が可能であることが確認された。

1. 研究の目標

Ex vivo 増幅細胞の洗浄回収工程を完全閉鎖型自動洗浄システムとして確立し、その最適化設定条件を検討し、回収された細胞の性状及び洗浄効率の有用性を評価する。

2. 実施内容

2-1) 使用する装置と回路

ACP215 による活性化リンパ球細胞（以下リンパ球細胞）の洗浄プロトコルは、既に 200ml 容量ボウル（以下 200ml ボウル）を使った回路を用いて無菌閉鎖型細胞洗浄装置システムとしての有用性が確認されている。ex vivo 増幅細胞を対象細胞とする再生医療では、製造される細胞容量を 100ml 以下にする必要があり、その最終容量は使用するボウル容量に依存することから 70ml 容量ボウル（以下 70ml ボウル）が装着された処理回路を選択した。

2-2) リンパ球細胞を用いた基礎検討

手法冷却遠心機（TOMY：LK-130）と ACP215 を用いてリンパ球細胞に対する最適な遠心回転数を検討した。

2-2-1) 用手法による遠心回転数と洗浄液組成の検討

最適な遠心回転数と洗浄液組成を選択するために、冷却遠心機の遠心回転数を 1000rpm~3000rpm の 500rpm 毎の 5 条件と洗浄液組成 (0.1%と 0.5%アルブミン加生食) の違う 2 条件を用いて処理したリンパ球細胞の回収率と Viability を検討した。測定は細胞をトリバンプルーで染色した後、目視によるカウントで行った。

2-2-2) ACP215 による遠心回転数と流速の検討

70ml ボウルに対するリンパ球細胞の最適遠心回転数と流速を選択するために、遠心回転数 3500, 4000, 4500rpm の 3 条件と流速 30, 50, 70ml/min の 3 条件を組み合わせ、処理したリンパ球細胞の回収率と Viability を検討した。

2-2-3) 遠心回転数と流速によるスピルアウトの検討

遠心回転数 3000, 3500, 4000, 4500rpm の 4 条件と流速 30, 50, 70ml/min の 3 条件を組み合わせ、前細胞数と細胞スピルアウト数の割合を比較検討した。

2-2-4) ACP215 で洗浄回収したリンパ球細胞の検討

これまでの 2-2-1) と 2-2-3) の結果から検討した設定条件 (遠心回転数 3000rpm、流速 30ml/min、希釈 2 回、希釈量 140ml×2 回、リンス量 100ml×3 回とリンス速度を 30, 40, 50, 60, 70ml/min に変えた設定) を用いて洗浄回収したリンパ球細胞の回収率、Viability、及び細胞機能を検討した。

2-3) ex vivo 増幅細胞を用いた検討

実際の再生医療で用いる ex vivo 増幅細胞を用いて以下の検討を行った。

2-3-1) 洗浄効率の検討

培地濃度を変えた 3 種類の検体 (細胞を含まない) を用いてリンス量、リンス速度による洗浄効率を検討した。洗浄効率は洗浄前後の培養液中のマイクロアルブミンを測定して、その除去率から求めた。

2-3-2) ex vivo 増幅細胞に対する遠心回転数と流速の検討

リンパ球細胞で行った細胞スピルアウト試験を ex vivo 増幅細胞でも行った。但し、遠心回転数 3000rpm と 3500rpm の 2 条件と流速 30ml/min と 40ml/min の 2 条件を組み合わせで検討した。

2-3-3) 最適化設定条件の検討

最適化設定条件を決定するために、3 水準に目標洗浄効率を定め、それぞれのレベルでシミュレーションし、試算した遠心負荷時間を比較して最適化設定条件を検討した。

2-3-4) 最適化設定値による検討

ex vivo 増幅細胞で割り出した最適化設定値で 2 検体の ex vivo 増幅細胞を洗浄回収し、その回収率、Viability、洗浄効率、細胞機能について検討した。

2-4) GMP 対応への検討

GMP とは製造管理及び品質管理に係わる、品質評価に関する管理規定である。使用される機器は医療機器の製造販売承認が必要であること、及び細胞プロセッシングの記録管理、工程管理、そして装置の操作性と安全面から検討を行った。

3. 成 果

3-1) 2-2-1) の検討の結果、冷却遠心機 (TOMY LK-130) によるリンパ球細胞の遠心回転による Viability は 740G 以上で急激に減少していた。洗浄液組成による Viability においては 1160G 以上になると 0.1%アルブミンの方が有意に低下していた。リンパ球細胞に対する遠心負荷は回収率と Viability から検討すると 420G 以下が望ましいことが分かった。また 420G 以下では洗浄液組成の違いによる有意差は認められなかった。

(Table 1)

3-2) 2-2-2) の検討の結果、遠心回転数が 3500rpm 以上になると遠心負荷 (G フォース) が強すぎて細胞破壊が極度に進行していることが推察され、十分な回収率は得られなかった。しかし破壊された細胞がスピルアウトして廃液バッグへ流出しているために洗浄後の Viability は高かった。(Table2) (Figure 1)

Table 1 ・機種 TOMY遠心器 LK-130

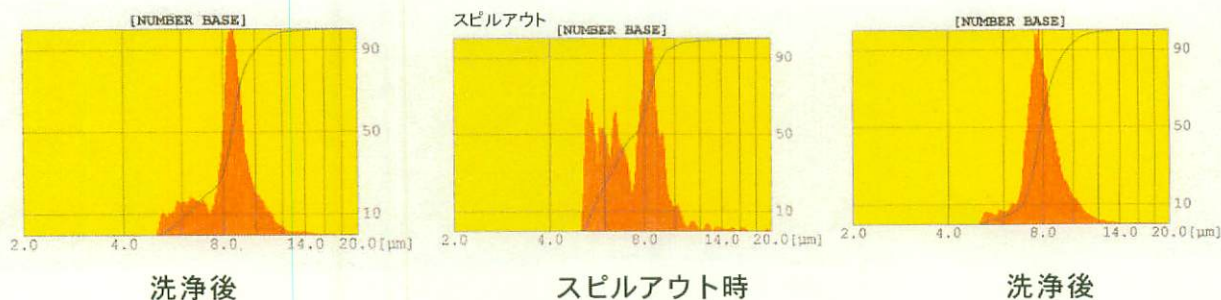
| 遠心G(回転数) | 0.1アルブミン溶液 | | 0.5アルブミン溶液 | |
|-------------|------------|-----------|------------|-----------|
| | 回収率 | Viability | 回収率 | Viability |
| G(rpm) | (%) | (%) | (%) | (%) |
| 190G(1000) | 81 | 92.3 | 80.1 | 86.3 |
| 420G(1500) | 99.4 | 90.5 | 99.4 | 94.3 |
| 740G(2000) | 73.4 | 73.2 | 87.0 | 76.4 |
| 1160G(2500) | 53.1 | 52.8 | 74.2 | 66.5 |
| 1670G(3000) | 40.2 | 46.3 | 63.8 | 63.4 |

Control:98.2%(Viability)

Table 2 ・機種 ACP215

| 回転数 | 流速 | 時間 | 処理細胞数 | 回収率 | Viability | IL-2除去率 |
|------------|----------|-------|--------------|------|-----------|---------|
| G(rpm) | (ml/min) | (min) | x10e7 (cell) | (%) | (%) | (%) |
| 570G(3500) | 30 | 52 | 5.4 | 59.2 | 76.3 | 97.8 |
| | 50 | 34 | 5.4 | 52.2 | 84.0 | 98.0 |
| | 70 | 25 | 5.4 | 49.2 | 82.9 | 98.0 |
| 745G(4000) | 70 | 25 | 5.4 | 44.2 | 78.4 | 97.8 |
| 943G(4500) | 70 | 25 | 5.4 | 33.4 | 92.5 | 97.9 |

Figure 1



3-3) 2-2-3) の検討の結果、遠心回転数と流速の関係は遠心回転数が上がると細胞スピルアウトは少なくなり、流速が速くなれば細胞スピルアウトが増えていた。3000rpm と 30ml/min の組み合わせでも細胞スピルアウト割合は 0.7%と、スピルアウトによる回収率への影響はないと推察された。(Table3) (Table 4)

Table 3 ・機種 ACP215

| 回転数 | 細胞濃度 | 30ml/min | | 50ml/min | | 70ml/min | |
|------|-----------|----------|------|----------|------|----------|------|
| | | 濃度 | 割合 | 濃度 | 割合 | 濃度 | 割合 |
| rpm | x10e4 /ml | | | | | | |
| 3000 | 49.7 | 0.35 | 0.7% | 0.7 | 1.4% | 1.06 | 2.1% |
| 3000 | | 0.41 | 0.8% | 0.74 | 1.5% | 1.14 | 2.3% |
| 3000 | | | | | | | |

Table 4 ・機種 ACP215

| 回転数 | 細胞濃度 | 30ml/min | | 50ml/min | | 70ml/min | |
|------|-----------|----------|------|----------|------|----------|------|
| | | 濃度 | 割合 | 濃度 | 割合 | 濃度 | 割合 |
| rpm | x10e4 /ml | | | | | | |
| 3500 | 63.8 | 1.10 | 1.7% | 1.90 | 3.0% | 2.77 | 4.3% |
| 4000 | | 0.76 | 1.2% | 1.54 | 2.4% | 2.25 | 3.5% |
| 4500 | | 0.52 | 0.8% | 0.99 | 1.6% | 1.30 | 2.0% |

このことから70ml ボウルに対するACP215の遠心回転数と流

速はそれぞれ3000rpmと30ml/minの組み合わせで使用できることが示唆されたので、200ml ボウルの設定条件を参考に希釈回数2回、希釈量140ml, 140mlとリンス量100ml, 100ml, 100mlの設定でリンパ球細胞の洗浄を行った。その結果 Viability と洗浄効率はそれぞれ95.5%、99.7%と良好であった。(Table 5)

Table 5 機種: ACP215

| 使用ボウル | 遠心回転数 | 流速 | 処理細胞数 | 回収率 | Viability | IL-2除去率 |
|-------|-------|-------|---------------|------|-----------|---------|
| (ml) | rpm | (min) | x10e7 (cells) | (%) | (%) | (%) |
| 70 | 3000 | 30 | 14.9 | 77.3 | 95.5 | 99.7 |

3-4) 2-2-4)の検討の結果、回収率、Viability、IL-2の除去率は、それぞれ平均で83.2%、96.1%、99.0%であった。またこの結果からリンス速度の違いによる影響は見られなかった。(Table 6)
洗浄後の細胞機能は、走査電顕像による細胞骨格の変形や微絨毛の脱落を認めず洗浄による形態の変化は認められなかった (Figure 2)。

Table 6 回転数:419G(3000rpm)・機種: ACP215

| 処理量 | リンス流速 | 処理細胞数 | 回収率 | Viability | IL-2除去率 |
|------|-------|---------------|------|-----------|---------|
| (ml) | (min) | x10e7 (cells) | (%) | (%) | (%) |
| 500 | 30 | 16.8 | 89.8 | 93.8 | 99.3 |
| 500 | 40 | 19.6 | 66.1 | 92.6 | 98.5 |
| 500 | 50 | 16.3 | 84.7 | 97.1 | 99.3 |
| 500 | 60 | 14.2 | 95.1 | 98.1 | 99.4 |
| 500 | 70 | 16.0 | 80.1 | 99.1 | 98.8 |
| Ave | | | 83.2 | 96.1 | 99.1 |

リンパ球の機能は PHA に対するリンパ球幼若化反応、LAK 活性化においては洗浄前後で差は認めなかった。

(Figure 3, Figure 4)

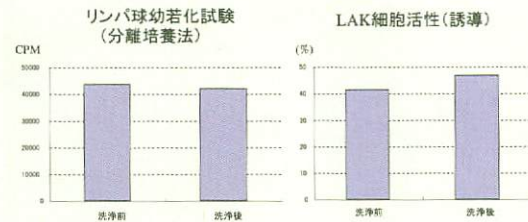


Figure 3

Figure 4

洗浄後長期(2W)に渡るIL-2による増殖反応でも、洗浄条件による影響は認められなかった。(Figure 5)

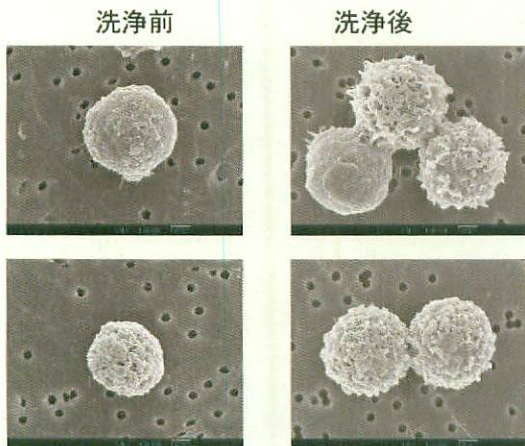


Figure 2

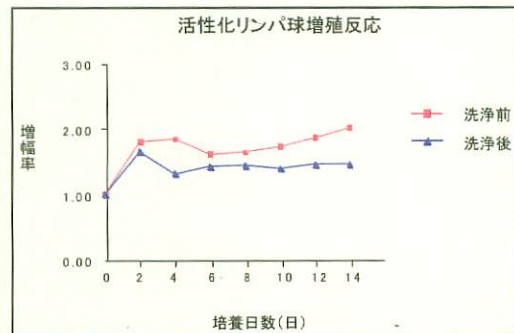


Figure 5

3-4) 2-3-1)の検討の結果、従来の200ml ボウルではリンス量を増やしても、洗浄効率は上がらなかった。70ml ボウルでは、ボウル構造の違いからリンス量を増やすほど、そして検体濃度が薄くなるほど洗浄効率は向上していた。しかし、リンス速度を速くしても洗浄効率への影響は見られなかった。(Table 7)

Table 7

| 洗浄効率 (除去率) 培地濃度1% | | | |
|----------------------|--------|-------|-------|
| リンス速度 | リンス量ml | | |
| | 50 | 100 | 150 |
| 70ml/min | 59.5% | 73.4% | 82.2% |
| 50ml/min | 57.7% | 77.0% | 82.5% |
| 30ml/min | 55.9% | 79.1% | 90.9% |
| 平均 | 57.7% | 76.5% | 85.2% |

| 培地濃度30% | | | |
|----------|--------|-------|-------|
| リンス速度 | リンス量ml | | |
| | 50 | 100 | 150 |
| 70ml/min | 47.0% | 56.8% | 61.2% |
| 50ml/min | 47.3% | 55.4% | 59.7% |
| 30ml/min | 47.0% | 54.3% | 60.1% |
| 平均 | 47.1% | 55.5% | 60.3% |

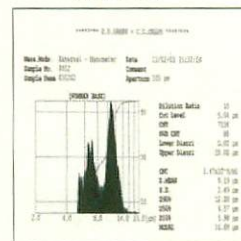
| 培地濃度100% | | | |
|----------|--------|-------|-------|
| リンス速度 | リンス量ml | | |
| | 50 | 100 | 150 |
| 70ml/min | 43.6% | 55.6% | 58.2% |
| 50ml/min | 44.0% | 53.7% | 66.3% |
| 30ml/min | 42.5% | 52.2% | 56.4% |
| 平均 | 43.3% | 53.8% | 60.3% |

3-5) 2-3-2)の検討の結果、3000rpm より 3500rpm のスピルアウト%が低値を示すものの細胞スピルアウトは 10%と高値の結果であった。3000rpm では一部逆転データもあり、リンパ球細胞と比べても高値であった。(Table 8)
しかし検体サンプルの Viability は 84.9%低く、死細胞の比率が高いことが推察された。よってスピルアウト細胞は死細胞が流出したと考えられた。その傾向は細胞数測定装置の図からも推察された。(Figure 6)

Table 8 細胞スピルアウト%

| 遠心回転数 | 流速 | |
|---------|----------|----------|
| | 30ml/min | 40ml/min |
| 3000rpm | 10.1% | 9.9% |
| | 14.9% | 9.5% |
| | 17.1% | 11.9% |
| 3500rpm | 10.1% | 12.3% |
| | 9.3% | 8.5% |
| 3500rpm | 6.8% | 6.3% |

洗浄前



スピルアウト時

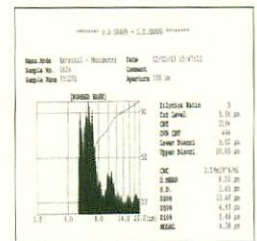


Figure 6

3-6) 2-3-3)の検討の結果、70ml ボウルに対する ACP215 の設定パラメーターである遠心回転数、流速、リンス速度はそれぞれ 3000rpm、30ml/min、50ml/min とし、最終目標とする洗浄効率を3水準に仮定してシミュレーションした。高い洗浄効率において、2回希釈と3回希釈を比較すると、3回希釈の方が遠心負荷時間は短かった。(Table 9)

Table 9

| 目標洗浄効率 | 99.80% | | 99.65% | | 99.50% | |
|---------|--------|------|--------|------|--------|------|
| 処理液の重量 | 300 | 300 | 300 | 300 | 300 | 300 |
| 希釈回数 | 2 | 3 | 2 | 3 | 2 | 3 |
| 遠心回転数 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 |
| リンス量 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| 再リンス量#1 | 150 | 100 | 100 | 50 | 100 | 50 |
| 再リンス量#2 | 150 | 100 | 150 | 50 | 150 | 50 |
| 再リンス量#3 | 0 | 150 | 0 | 150 | 0 | 50 |
| 希釈量#1 | 260 | 70 | 210 | 70 | 140 | 100 |
| 希釈量#2 | 210 | 70 | 140 | 70 | 140 | 100 |
| 希釈量#3 | 0 | 70 | 0 | 70 | 0 | 70 |

| 処理時間 | | | | | | |
|--------|------|------|------|------|------|------|
| 遠心負荷時間 | 37.3 | 32.0 | 32.3 | 30.0 | 30.0 | 30.0 |

3-7) 2-3-4)の検討の結果、最適化設定値を決定した。

(Table 10) その設定条件を用いて ex vivo 増幅細胞

を洗浄回収された細胞の回収率は、それぞれ 87.8%, 72.5%, 77.4%であった。Viability はそれぞれ 94.9%, 95.2%, 96.0%であった。洗浄効率(SCF サイトカインの除去率)は 99.76%と 99.8%であった。

(Table 11)

また洗浄前後のコロニー形成能においても有意差はなかった。

Table 10

最適設定パラメーター値

| 項目 | 設定値 | 項目 | 設定値 |
|-----------|------|------------|-----|
| 処理量 | **** | 再リンス量(#2) | 150 |
| ボウルサイズ | 70 | 再リンス量(#3) | 150 |
| エンシンスピード | 3000 | 再リンス速度(#1) | 70 |
| 希釈回数 | 3 | 再リンス速度(#2) | 70 |
| リンス量 | 50 | 再リンス速度(#3) | 70 |
| リンス速度 | 70 | ソリューションデレイ | 5 |
| 希釈量 (#1) | 100 | 濃縮速度 | 30 |
| 希釈量 (#2) | 100 | 再濃縮速度 | 30 |
| 希釈量 (#3) | 40 | 洗浄回数 | 1 |
| 希釈速度(#1) | 200 | 洗浄量 (#1) | 20 |
| 希釈速度(#2) | 200 | 洗浄速度(#1) | 100 |
| 希釈速度(#3) | 200 | 保存液の添加 | 0 |
| 再リンス量(#1) | 100 | ボウル流出速度 | 100 |

Table 11

洗浄前

| No | 細胞数 x10E6 | SCF濃度 pg/ml | Viability |
|----|--------------|----------------|-----------|
| 1 | 11.56 | 10931.4 | 97.50% |
| 2 | 7.66 | 6254.8 | 95.50% |
| 3 | 0.77 | ----- | 95.50% |

洗浄後

| | | | |
|---|-------|-------|-------|
| 1 | 10.15 | 17.86 | 94.9% |
| 2 | 5.55 | 14.75 | 95.2% |
| 3 | 0.59 | ----- | 96.0% |

| | 細胞 回収率 | 洗浄効率 SCF |
|---|-----------|-------------|
| 1 | 87.8% | 99.80% |
| 2 | 72.5% | 99.76% |
| 3 | 77.4% | ----- |

3-8) 2-4)の検討の結果、ACP215 は既に医療機器として承認 (承認番号: 21300BZY00239000) された製品であること、細胞プロセッシング終了後毎に処理情報を印刷 (印字内容は、装置 No、実施日、検体 No、処理時間、処理条件、最終製品量 実施者名等) できること等、管理記録及び操作上の面からも簡便であり GMP に準拠した処理が可能である。

3-9) 考察

再生医療に用いる ex vivo 増幅細胞を 70ml ボウルで処理するときの ACP215 の遠心回転数は 3000rpm、流速は 30ml/min に設定することが回収率、Viability の検討から最適であること、また洗浄効率では希釈回数を 3 回とし、希釈量はそれぞれ 100ml、100ml、40ml に、リンス量はサイクル後半に多く設定する方がより高い洗浄効率が得られることからそれぞれ 50ml、100ml、150ml、150ml が最適設定値であることが示唆された。

3-10) 結論

本研究では 70ml ボウルを用いて ex vivo 増幅細胞を ACP215 で処理する時の最適化設定値を開発した。開発された設定条件を用いて洗浄回収した ex vivo 増幅細胞の回収率は 79.2%と若干低値であったが、Viability は 95.4%と目標数値を達成していた。また洗浄効率も 99.8%と目標値を達成していた。コロニー形成能は洗浄前後で有意差は認められなかった。回収率についての更なる改善検討が必要であるものの、この最適化設定値を用いて製造された細胞は正常な細胞機能を保持しており、洗浄による細胞性状への傷害は認められなかった。完全閉鎖型自動洗浄システムとしての装置取り扱いも非常に簡便であり、GMP に準拠した記録管理ならびに品質管理上の安全性も確保できた。

4. 今後の展望

培養活性化リンパ球、造血幹細胞などの浮遊細胞に関しては、細胞機能を失うことなしに安全にサイトカインなどの培養副産物を取り除くことができた。

今後は、チューブに付着し、回収率が低下する可能性のある樹状細胞など、付着性細胞の洗浄効果を検討して、洗浄条件を決定しプログラム化を図りたい。また、現在移植医療に用いられる細胞治療製剤には臍帯血や自家骨髄などあり、それらは移植まで液体窒素下で凍結保存し解凍して輸注を行うことが一般的であり、使用される機会は増えることが予想される。細胞凍結には有害な DMSO などが含まれていること、そして解凍直後は細胞が非常に脆弱であり、破壊されやすいなど幾つかの問題点も抱えている。これら問題を解決するために、本機種を用いた解凍洗浄を行うプログラムおよび解凍専用洗浄液の開発についても検討したい。