

研究成果

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（H17.4～）
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
<p>研究の概要、新規性及び目標</p> <p>① 研究の概要</p> <p>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回以上繰り返す洗浄方法で行ってきた。このような処理方法は開放系の操作となるため、微生物が混入する可能性を排除できない。</p> <p>本研究では、このよう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工程内にヘモネティクスセルウオッシャーACP215（以下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GMPに準拠したセルプロセッシングデバイスとしての無菌細胞洗浄装置を開発する。</p> <p>② 研究の独自性・新規性</p> <p>Ex vivo 増幅臍帯血細胞（以下 ex vivo 増幅細胞）の臨床試験に向けた細胞製剤の調整（細胞洗浄並びに最終製品のパッキングの自動化）が出来れば、これまで開放系遠心分離操作でしか出来なかった一連の細胞洗浄処理工程が無菌閉鎖系で自動化することが可能となる。既にACP215には赤血球洗浄用（275ml ボウル）とリンパ球細胞用（200ml ボウル）の無菌閉鎖系洗浄回路が用意されているが、新たに ex vivo 増幅細胞用（70ml ボウル）としての無菌閉鎖系回路の開発が望まれた。</p> <p>③ 研究の目標（数値目標等をあげ、具体的に）</p> <p>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。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。</p>
<p>研究の進め方及び進捗状況（目標と対比して）</p> <p>臍帯血中に含まれるCD34陽性細胞を12日間、SCF,FL,TPO,IL-6/sIL-6R fusion protein,で培養して増幅した。約600mlの細胞浮遊液を0.5%加生理食塩水にて洗浄を行い、最終製剤として0.5%生理食塩水100mlに浮遊させた細胞製剤液を投与剤形である輸血バッグに加工させる工程で行った。基礎的検討から得られたデータおよび洗浄プログラムをもとに、造血幹細胞 ex vivo 増幅の臨床試験に向けた細胞製剤の調整の最終工程にACP215による洗浄を行い、実製造レベルでの大量の細胞を処理できるかどうか検証を行う。実製造試験における細胞のviability、細胞回収率、回収率80%以上、viability 90%以上の洗浄効率を達成できるかどうか検証する。</p>
<p>主な成果</p> <p>具体的な成果内容：ACP215 はもともと洗浄赤血球製造のため医療承認（承認番号：21300BZY00239000）された医療機器である。今後再生医療においては、GMPによる細胞治療製剤の製造最終工程にあたる洗浄、パッキング作業は必須であり、自動化装置の開発が待たれる。細胞治療製剤の最終製品としては細胞の生存率、有害なサイトカインや培養液の除去、そして洗浄によって細胞がロスすることがあってはならない。ACP215は遠心ボウル内で遠心力により細胞を保持しながら上清のみを閉鎖系で無菌接合された洗浄液と置換することにより、細胞の洗浄を行う装置である。本研究においては、活性化リンパ球で求めた洗浄条件を用いて、比重や大きさ、接着性の異なる培養造血幹細胞の洗浄を行えるかどうか検討を行った結果。細胞の回収率は</p>

79.2%,viability は 95.4%,SCF を Elisa 法によって定量したサイトカイン除去率は 99.8%となり洗浄プログラムを決定することができた。また洗浄後の造血幹細胞の CD34 陽性率、コロニー形成能は損なわれなかった。これにより造血幹細胞の洗浄工程をこれまでの開放系遠心分離操作から無菌閉鎖系に変更することが出来、しかも最終製品のパッキングも自動化することに成功した。これらの基礎的検討から得られた洗浄プログラムを造血幹細胞の ex vivo 増幅培養に組み込み、実製造試験を行った。試験の結果、細胞の回収率 80%以上、細胞の生存率 90%以上という目標値をクリアすることができた。

特許件数： 0

論文数： 0

口頭発表件数： 0

研究成果に関する評価

1 国内外における水準との対比

セルプロセッシングにおける細胞の洗浄工程は、これまで遠心チューブに分注した細胞を遠心分離する方法がとられ、当然開放系の操作が必要であった。洗浄効果においてサイトカイン除去能 99%以上、生細胞率 90%以上、回収率 80%以上のスペックで、洗浄後任意のバッファーに置換した形でパッキングまでできる機種は他に例がない。

2 実用化に向けた波及効果

細胞治療製剤の洗浄、最終製品のパッキングは手間がかかりまた、出荷時無菌試験後に開放系の操作が加わるため、閉鎖系でしかも自動で洗浄、パッキングできる機械は非常に有用である。

セルプロセッシング関連デバイスとしては、類をみず波及効果は高いと考えられる。

残された課題と対応方針について

1) 回収率の改善

2) 付着性細胞の洗浄効果の検討

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系細胞の洗浄条件を決定し、プログラム化する。

3) 操作マニュアル、標準作業手順書の作成

4) 凍結細胞の解凍洗浄

現在の移植医療においては、臍帯血、自家骨髄などを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る。また今後細胞治療製剤は凍結製品として使用される機会が増えることが予想される。細胞凍結には有害な DMSO などを用い、また解凍直後は細胞が非常に脆弱であり、破壊されやすい。これらの有害物質の除去を行う目的で本機種を用いて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を行う。

	J S T 負担分 (千円)							地域負担分 (千円)							合計	
	H12	H13	H14	H15	H16	H17	小 計	H12	H13	H14	H15	H16	H17	小 計		
人件費						0	0							0	0	0
設備費							0							0	0	0
その他研究費 (消耗品費、 材料費等)						3,500	3,500							0	0	3,500
旅費						0	0							0	0	0
その他						0	0							0	0	0
小 計						0	0							0	0	0

代表的な設備名と仕様 [既存 (事業開始前) の設備含む]

J S T 負担による設備：なし

地域負担による設備：細胞洗浄装置