

平成 28 年度動物用再生医療等製品の安全性試験等開発事業  
事業報告書

平成 29 年 3 月

動物再生医療推進協議会

# 平成 28 年度動物用再生医療等製品の安全性試験等開発事業報告書

## 目 次

平成 28 年度動物用再生医療等製品の安全性試験等開発事業報告書・・・・・・・・・・ 1

### 別添 1

動物間葉系幹細胞の CD90 抗原特異的モノクローナル抗体を用いた再生医療等  
製品の品質試験法の確立(パイロットスタディ) 試験報告書・・・・・・・・・・ 4

### 別添 2

再生医療等製品の安全性評価における病原体の網羅的迅速遺伝子解析法の確立  
試験報告書・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 17

# 平成 28 年度動物用再生医療等製品の安全性試験等開発事業 事業報告書

動物再生医療推進協議会  
理事長 小沼 操

## 1. 事業目的

iPS 細胞などの多能性幹細胞の活用分野は、大きく再生医療分野と創薬応用になるといわれている。動物は人と異なり、試験動物として直接使用できるという利点があり、獣医療における先進的な応用が期待される。その中で、平成 26 年 11 月に施行された「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」では再生医療等製品というジャンルが新たに取り入れられ、その製造販売承認の取得が通常の医薬品より緩和されたことから、再生医療等製品が臨床現場へ提供されやすくなるものと考えられる。動物用再生医療等製品としては、がん療法に使用する製品や輸血用製品等の実用化が進められており、これらの製品の普及を図るためには、その特性を踏まえた安全性等の新たな基準作りが不可欠である。

そこで、動物用再生医療等製品の安全性等基準の作成に寄与するため、それらの製品に関する情報を広く収集し、品質及び安全性の確保に関する指針素案の作成を行う。動物用再生医療等製品の開発に必要な試験方法とその評価法を明示した指針が作成されることにより、試験実施方法の定型化、審査基準を明確にすることが可能となり、当該製品の申請者の負担軽減及び審査の迅速化が図られる。

## 2. 事業内容

学識経験者や再生医療の専門家から成る検討委員会を組織し、平成 26 年度及び平成 27 年度の本事業で作成されている「動物用再生医療等製品（同種由来）の品質及び安全性の確保に関する指針（素案）」において提示されている試験法のうち、プロトコルが確立されていない試験法について検討し、さらに当該試験法の実証試験を実施する。

### 1) 動物用再生医療等製品安全性試験等開発検討委員会の開催

再生医療に係る専門家からなる「動物用再生医療等製品安全性試験等開発検討委員会」を設置し、事業方針の決定、「動物細胞加工製品（同種由来）の品質及び安全性の確保に関する指針（素案）」に基づく試験法の検討及び実証試験の試験方法に関する検討を行う。

## 2) 実証試験の実施

ア) 動物間葉系幹細胞の CD90 抗原特異的モノクローナル抗体を用いた再生医療等製品の品質試験法の確立(パイロットスタディ)(担当:DS ファーマアニマルヘルス(株)、DS ファーマバイオメディカル(株)、(株)J-ARM、国立大学法人東京農工大学)

動物細胞加工製品の品質管理の項目には、「確認試験」、「細胞の純度試験」が含まれる。これらの試験には、細胞を特異的に認識する抗体が必要である。ヒトの間葉系幹細胞の場合には、多くの細胞表面特異抗原に対する抗体が市販され、品質試験に応用できることが実証されているが、イヌを含む多くの動物細胞では、それぞれの動物種の表面抗原を認識する特異抗体が殆どない。

本課題では、動物の幹細胞表面抗原を認識する特異抗体を用いて、品質試験法を確立することを目的とする。評価対象とする細胞は、イヌ間葉系幹細胞とする。

イ) 再生医療等製品の安全性評価における病原体の網羅的迅速遺伝子解析法の確立(担当:国立大学法人東京農工大学及び(株)ケーナインラボ)

他家または自己由来の血液や組織を原料として製造する再生医療等製品は、原料からの病原体の混入を防ぐことが重要な課題である。再生医療等製品への病原体の混入は、投与された被験動物の健康を害するだけでなく、製造作業員へ健康被害を及ぼす可能性もあることから、原料となる血液や組織、製造工程での混入、および最終製品での検査は、安全な再生医療等製品を製造、供給する上で必須である。

安全性評価が必要と想定される病原体は、投与された動物あるいは製造作業員に感染した場合、甚大な健康被害を及ぼすと想定されるウイルスや細菌等である。一方、個々の病原体の遺伝子検査法は確立されているが、それぞれに解析条件が異なるため、多種類の病原体の検出には時間とコストが掛かり、検査結果によって製造の可否を判断する場合に、大きな欠点となっている。

本課題では、まず再生医療等製品の原料、製造工程及び最終製品において、安全性を評価するため、検査を必要とする病原体を特定し、それらの病原体の遺伝子を一度に迅速に検出する方法を確立する。また、実検体を使った実施試験を実施し、現場への導入を検討する。

## 3. 事業成果

動物用再生医療等製品安全性試験等開発検討委員会を開催し、「動物細胞加工製品(同種由来)の品質及び安全性の確保に関する指針(素案)」において提示されている試験法のうち、プロトコルの確立がされていない試験法について検討して、さらに実証試験を実施した。具体的には、当会の会員である DS ファーマアニマルヘルス(株)、DS ファーマバイオメディカル(株)及び(株)J-ARM 並びに協同実施者である国立大学

法人東京農工大学が「動物間葉系幹細胞の CD90 抗原特異的モノクローナル抗体を用いた再生医療等製品の品質試験法の確立(パイロットスタディ)」を実施し、当会会員の(株)ケーナインラボ並びに協同実施者である国立大学法人東京農工大学が「再生医療等製品の安全性評価における病原体の網羅的迅速遺伝子解析法の確立」を実施した。

## 1) 検討委員会の開催

大学・研究機関等の学識経験者及び再生医療の専門家等から 6 名を選任し、「動物用再生医療等製品（同種由来）の品質及び安全性の確保に関する指針（素案）」に基づく試験法の検討及び実証試験の試験方法に関する検討のため、検討委員会を3回（第1回：平成28年6月28日、第2回：平成28年11月30日、第3回：平成29年3月15日）開催した。なお、検討事項並びに検討委員については以下のとおりである。

### [検討事項]

#### ・検討委員会

第1回：事業方針等の検討、実証試験計画の検討

第2回：実証試験実施状況の報告

第3回：実証試験結果の報告

### [検討委員]

犬丸 茂樹	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 企画管理部 企画連携室 専門員
小沼 操	国立大学法人北海道大学 名誉教授
笠嶋 快周	日本中央競馬会 競走馬総合研究所 臨床医学研究室 室長
佐藤 陽治	国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 部長
竹嶋 伸之輔	国立研究開発法人理化学研究所 分子ウイルス学特別研究ユニット 研究員
平山 紀夫	麻布大学 客員教授

## 2) 実証試験の実施

検討委員会での検討結果に基づき、「動物間葉系幹細胞の CD90 抗原特異的モノクローナル抗体を用いた再生医療等製品の品質試験法の確立(パイロットスタディ)」及び「再生医療等製品の安全性評価における病原体の網羅的迅速遺伝子解析法の確立」の2課題の実証試験を実施した。

それらの成果については、それぞれ別添1、別添2のとおり取りまとめた。

### 【試験名】

動物間葉系幹細胞の CD90 抗原特異的モノクローナル抗体を用いた再生医療等製品の品質試験法の確立(パイロットスタディ)

### 【実施担当者所属・氏名】

1. 東京農工大学農学部附属硬蛋白質利用研究施設 教授 新井 克彦
2. DSファーマアニマルヘルス㈱ 開発本部長 中井 正博  
(協力者：大日本住友製薬㈱ プロセス化学研究所長 佐々木 幹雄)
3. DSファーマバイオメディカル㈱ ビジネスディベロップメント部  
アライアンスグループ グループマネージャー 夏目 康弘
4. ㈱J-ARM 代表取締役社長 岡田 邦彦

### 【試験の目的】

動物細胞加工製品の品質及び安全性確保に関する指針(素案)では、再生医療等製品の最終製品の品質管理法として細胞の確認試験や純度試験が規定されている。しかしながらその具体的な試験法に関しては示されていない。現在、動物に広く使用される動物細胞加工製品の候補としては、間葉系幹細胞やリンパ球がある。リンパ球に関しては、細胞表面抗原が同定され、その特異性に関してはコンセンサスが得られており、試験実施が可能である。一方、動物の間葉系幹細胞に関しては、単一の幹細胞特異的な細胞表面抗原が特定されておらず、細胞表面抗原の組み合わせにおいてもコンセンサスが得られておらず、試験法の開発が必要である。そこで、本試験では、イヌ脂肪組織由来間葉系幹細胞の細胞表面抗原の候補と考えられている CD90 に着目し、CD90 に対するモノクローナル抗体を用いた品質試験法の確立を目指した。

### 【試験方法】

本事業では、農工大の抗 CD90 抗体クローンの特異性解析と並行して市販抗体を用いて CD90 のイヌ間葉系幹細胞(MSC)の細胞表面マーカーとしての有用性評価と品質試験法を検討した。

1. 農工大の抗 CD90 抗体クローンの特異性解析  
1-1. 抗イヌ・ウマ CD90 モノクローナル抗体の作製

以下の抗原ペプチドを TiterMax Gold adjuvant を用いてマウスに免疫し、ハイブリドーマを作製した。クローンは、ELISA 法及びイヌ MSC 細胞免疫染色により選択した。

抗原ペプチド：CANINE CD90;43-72 KLH-(C)ATTLPIQYEFMSMTREKKQHVIYGTGVGPEH

#### 1-2. クローンの培養と培養上清の調製

各クローンを 20% FBS/DMEM 培養し、培養上清を集め、硫酸沈殿により濃縮し、PBS で透析を行った。

#### 1-3. 大腸菌でのイヌ CD90 タンパク質の発現

図 1 の発現ベクター (pRSET) にイヌ CD90 全長 cDNA を組み込んだ後、大腸菌 (BL21(DE3)pLysS) を用いて、1 mM IPTG 存在下でイヌ CD90-His tag 融合タンパク質を発現させ、大腸菌ライセートを調製した。

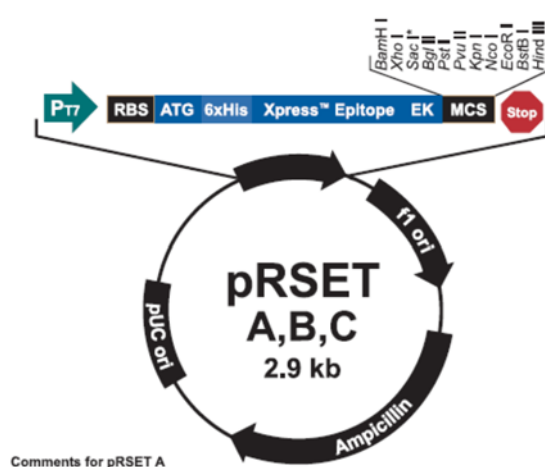


図 1. イヌ CD90 fusion protein 発現ベクター

#### 1-4. ウェスタンブロッティング

1-3 で調製した大腸菌ライセートについて SDS-PAGE (分離用ゲル濃度 12.5%) を行い、ニトロセルロース膜にトランスファーし、定法に従いウェスタンブロッティングを行った。2次抗体は、アルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG 抗体を用い、NBT/BCIP による発色法で検出した。

#### 1-5. 細胞免疫染色

チャンバースライドに播種した細胞を 4%パラホルムアルデヒド、室温、10 分で固定し、0.5%カゼイン、室温、1 時間でブロッキングした。クローンの培養上清 (×1) を 4°C、一晩反応させ、洗浄後、FITC 標識 2 次抗体 (含 1 μg/mL, DAPI) を室温、1 時間反応させた後、共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss LSM-710、対物×40) で観察した。

2. 市販抗体を用いた CD90 のイヌ間葉系幹細胞 (MSC) の細胞表面マーカーとしての有用性評価と品質試験法の検討

2-1. イヌ CD90 一過性発現 CHO 細胞の調製

図 2 の発現ベクターを構築し、CHO 細胞に定法に従って一過性に発現させた。

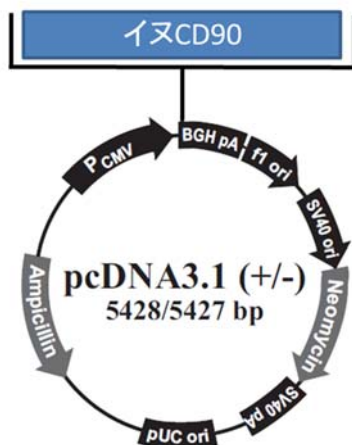


図 2. イヌ CD90 発現ベクター

2-2. ウェスタンブロッティング

CHO 細胞 (±イヌ CD90) 及びイヌ脂肪組織由来間葉系幹細胞を  $1 \times 10^6$ /mL になるよう  $2 \times$  Sample buffer を添加して細胞を溶解した後、1 mL シリンジで核酸等の高分子成分を破壊し、抽出タンパク質とした。各タンパク質 20  $\mu$ l 及び 10  $\mu$ l を SDS-PAGE で泳動後、ゲルから PVDF メンブレンへ転写 (1 時間 100 V, 4°C) し、定法に従いウェスタンブロッティングを行った。各 1 次抗体 (農工大クローン、市販抗体) を室温、静置で 1 時間反応させた。その後、TBS-Tween で 10 分、3 回洗浄し、2 次抗体 (ウサギ HRP 標識した抗マウス IgG、IgM など) を室温、静置で 1 時間反応させた。その後、TBS-Tween で 15 分 3 回洗浄し、Chemi-Lumi One Super (NAKARAI) にて発光反応を行い、LAS500 で検出した。

2-3. フローサイトメトリー解析(1) (結果・図 5、7 の方法)

EDTA 処理により細胞を剥がし、室温、遮光下 30 分で細胞のブロッキング (Blocking One, ナカライ) を行い、遠心、洗浄後細胞数を調整し、1 次抗体 (D 社製抗 CD90 抗体) を室温、遮光下 30 分反応させた。その後、遠心洗浄後、2 次抗体を室温、遮光下 30 分反応させ、遠心洗浄後、DPBS を 500  $\mu$ l 添加し細胞を懸濁、40  $\mu$ m メッシュで濾過した。FACS 解析は、ベイバイオサイエンス株式会社の JSAN で行った。

#### 2-4. フローサイトメトリー解析(2) (結果・表 2、4、図 8 の方法)

TrypLE 処理により細胞を剥がし、洗浄後、1 次抗体 (D 社製抗 CD90 抗体) を室温にて回転させながら 30 分間反応させた。洗浄後、2 次抗体を室温・遮光にて回転させながら 30 分間反応させた。洗浄後 GuavaPCA (Merck Millipore 社) にて前方散乱光と蛍光を測定した。抗体反応液および洗浄液は 0.1~0.2% FBS 添加 DPBS を使用した。

#### 2-5. 脂肪組織由来の間葉系幹細胞の単離、培養方法及び保存方法：

岸上獣医科病院 (大阪市) において、獣医師法 (昭和二十四年六月一日法律第百八十六号、最終改正：平成二五年一月一三日法律第一〇三号) 及び動物の愛護及び管理に関する法律 (昭和四十八年十月一日法律第百五号、最終改正：平成二六年五月三〇日法律第四六号) を順守し、飼い主の同意の下、患犬より脂肪組織の提供を受けた。間葉系幹細胞の分離、培養及び保存は、J-ARM 社幹細胞培養キット (脂肪組織用) を用いた。

1~13 歳齢の患犬よりおもに鼠径部や腹部正中などから全身麻酔下で、脂肪組織を採取した。採取した脂肪組織から血管や筋等を取り除き、小片化した後、組織片をコラゲナーゼ溶液 (J-ARM 社製) で分散処理 (37°C、60 分間) した。分散された細胞は、遠心により回収、生理食塩水で洗浄を行い、間葉系幹細胞を含む間質血管細胞群 (SVF) を調整した。その後、SVF は、T75 フラスコに播種し、J-ARM 社製幹細胞単離培地で、約 5 日間 (3~7 日間)、静置培養 (37°C、5%CO<sub>2</sub>) し、間葉系幹細胞を単離した (P0)。細胞が 90~100%コンフルエントに達したらトリプシン溶液により細胞を剥離し、J-ARM 社製増殖培地で、約 7 日間 (6~7 日間)、継代培養した (P1)。細胞を剥離、回収し、J-ARM 社製細胞凍結保存液に懸濁し、クライオチューブに分注して常法に従い凍結保存した (1×10<sup>6</sup> 細胞/mL/クライオチューブ)。

#### 【結果】

##### 1. 農工大抗 CD90 抗体クローンの特異性解析

大腸菌で発現させたイヌ CD90-His tag 融合タンパク質を用いたウェスタンブロッティング解析において 1F11 クローンは、特異的な染色パターンを示した (図 3)。更に、イヌ間葉系幹細胞並びにイヌ乳腺腫瘍株を用いた細胞免疫染色の結果、1F11 クローンは、顆粒状のシグナルが観察され、特異的と考えられる染色パターンを示した (図 4)。

イヌ脂肪由来間葉系幹細胞を用いたフローサイトメトリー解析の結果、2G4 クローンでは、細胞ピークが 1 ケタ陽性側にシフトしたが、コントロールとのかい離が不十分であった (図 5)。現在のところ、品質試験に応用可能な特異性の高いクローンは、見出せていない。フローサイトメトリー解析の反応条件等を検討中である。

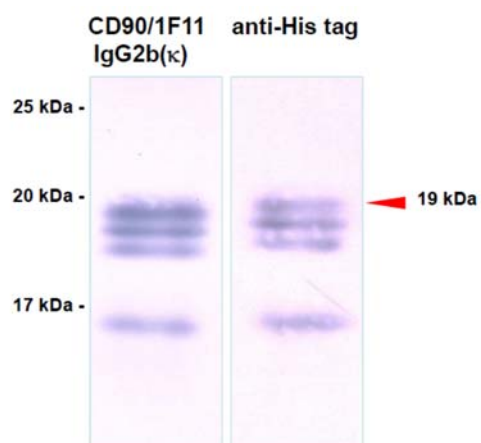
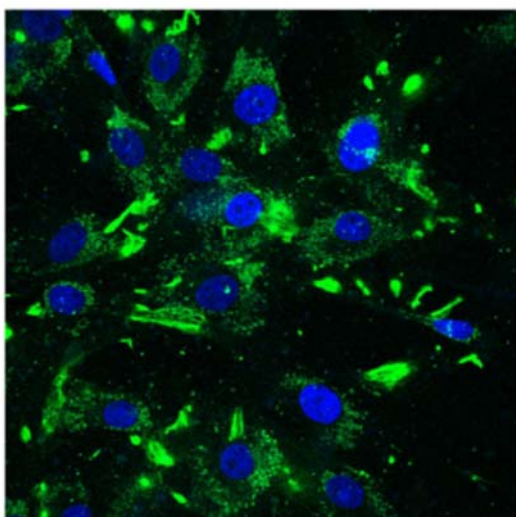


図 3. Western blotting (canine CD90 fusion protein)

Canine AMSC



Canine mammary tumor cell line

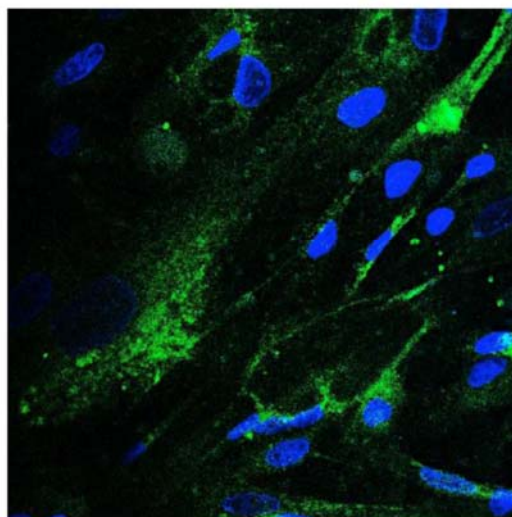


図 4. 細胞免疫染色 (1F11 クローン)

イヌASC細胞

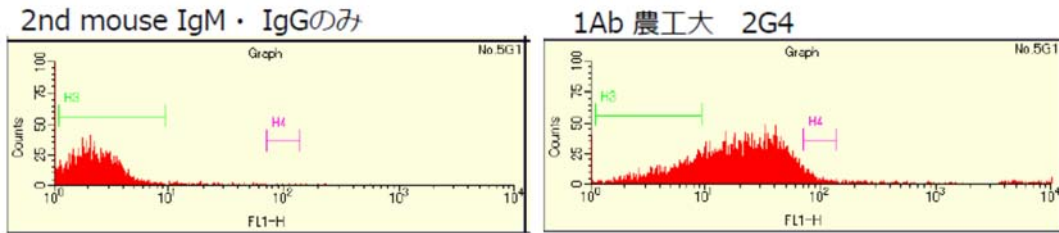


図5. 農工大クローン 2G4 のフローサイトメトリー解析

- 市販抗体を用いた CD90 のイヌ間葉系幹細胞 (MSC) の細胞表面マーカーとしての有用性評価と品質試験法を検討

イヌ CD90 を一過性に発現させた CHO 細胞並びにイヌ MSC を用いたウェスタンブローティングにより、イヌ MSC は、CD90 を発現していることが確認された。更に、農工大のクローン 1F11 はイヌ MSC の CD90 を認識することが確認された (図6)。但し、夾雑タンパク質との反応も高いので、ウェスタンブローティングの反応条件を検討する必要がある。

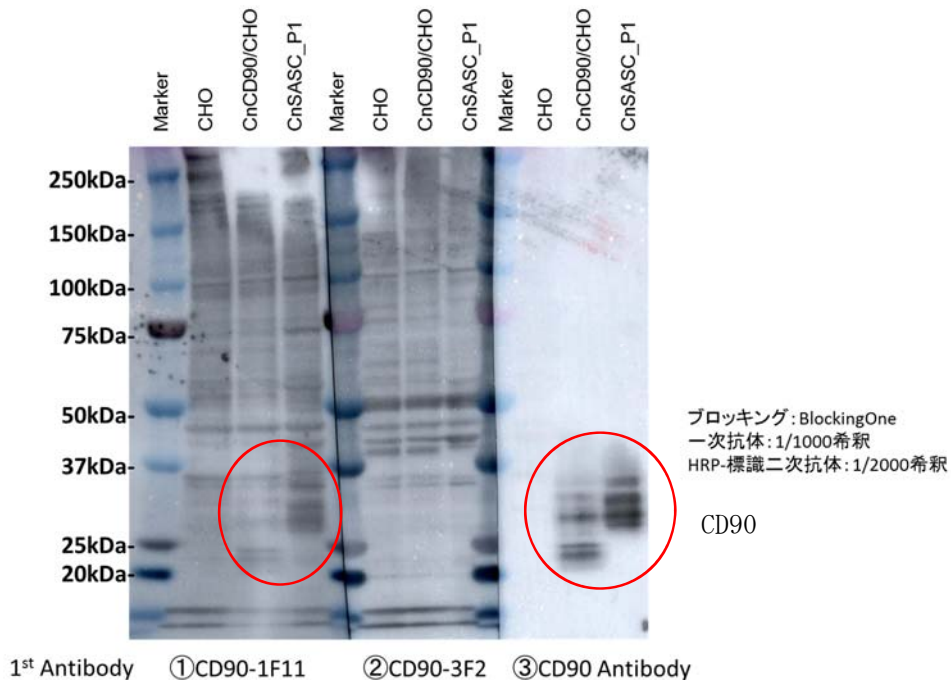


図6. ウェスタンブローティング (CHO、CD90-CHO、イヌ MSC (CnSASC))

①及び②：農工大抗体、③：A社製抗 CD90 抗体

表1の市販の抗CD90抗体(B~D社製)を用いたフローサイトメトリー解析を行った結果、C社製、及びD社製の抗CD90抗体がイヌMSCのフローサイトメトリーに利用可能であることが判明した(図7)。

表1 抗CD90抗体リスト

	メーカー名	備考
A	ABCAM	モノクロ
B	BD Pharmigen	モノクロ
C	R&D	ポリクロ
D	GNT/NOVUS	モノクロ

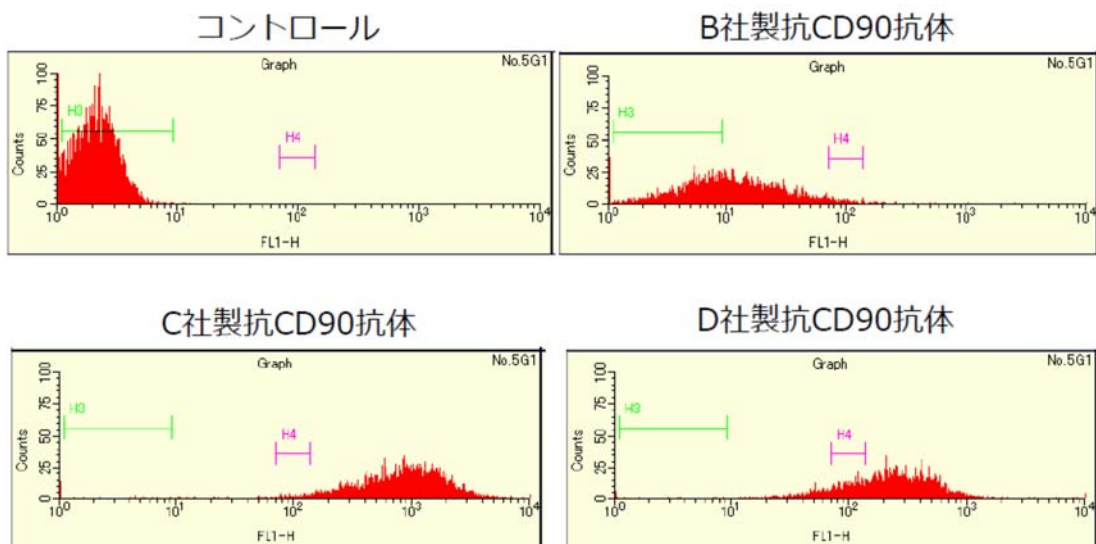


図7. イヌMSCを用いたフローサイトメトリー解析

D社製抗体を用いてフローサイトメトリーによる品質試験法の検討を行った。抗体の特異性を確認するために、イヌ脂肪組織由来間葉系幹細胞(CnSASC)及びvero細胞(アフリカミドリザルの腎臓上皮細胞株)を用いた。剥離方法としてTrypsin-EDTA、TrypLE、EDTAを検討し、またブロッキングの可否についても検討した。結果を表2に示す。検討した剥離方法は全て大きな問題なく検出できた。EDTAに関しては若干蛍光強度平均が低く、今回の蛍光設定値では陽性細胞率が89.6%と僅かに低い値となったが、ネガティブコントロール細胞の蛍光値とは分離しているため、蛍光設定値の調整によって同様の陽性細胞率に近づけることが可能と考えられる(表2-1 検討番号4'および6'参照)。またTrypsin-EDTAやTrypLEによる剥離に関して、10分間までの反応時間延長による

陽性細胞率への大きな影響が見られないことを確認した（表 2-2）。使用法がより容易であることも踏まえ以降の検討は TrypLE を使用した。ブロッキングに関し、TrypLE を用いた場合、工程の有無によって陽性細胞率に変動は無く（表 2-1 の 2 と 3 の比較、表 2-3 の 5 と 7 の比較）、ネガティブコントロールに関しても全く変化はないため（表 2-2 の 5 と 6 の比較、表 2-3 の 6 と 8 の比較）、以降の検討においては省略した。

表 2-1. 剥離剤およびブロッキングの検討結果

検討番号	細胞	細胞剥離剤	ブロッキング	抗体*	陽性細胞率(%)	全細胞蛍光平均	しきい値**	カウント数
1	CnSASC	Trypsin***	—	1, 2	99.3	511	30	2000
2	CnSASC	TrypLE	—	1, 2	99.6	305	30	2000
3	CnSASC	TrypLE	+	1, 2	99.3	238	30	2000
4	CnSASC	EDTA****	—	1, 2	89.6	101	30	2000
5	CnSASC	TrypLE	—	2	0.1	2	30	2000
6	CnSASC	EDTA	—	2	0.0	2	30	2000
4'	CnSASC	EDTA	—	1, 2	97.8	101	10	2000
6'	CnSASC	EDTA	—	2	0.3	2	10	2000

\*: 抗体について、「1,2」の場合、1次抗体の後2次抗体と反応。「2」の場合1次抗体は使用せず2次抗体と反応。

\*\*： 蛍光検出電圧 (PM1 Voltage) 350 におけるしきい値

\*\*\*: Trypsin: 2.5g/L-Trypsin/1mmol/L-EDTA 溶液 (ナカライテスク社)

\*\*\*\*: 2mM EDTA 溶液 (ナカライテスク社 500mM 溶液を希釈)

表 2-2. 剥離反応時間の検討結果

検討番号	細胞	細胞剥離条件*	ブロッキング	抗体	陽性細胞率(%)	全細胞蛍光平均	しきい値**	カウント数
1	CnSASC	Trypsin 5min	+	1, 2	99.3	482	10	2000
2	CnSASC	Trypsin 10min	+	1, 2	99.8	495	10	2000
3	CnSASC	TrypLE 5min	+	1, 2	99.5	248	10	2000
4	CnSASC	TrypLE 10min	+	1, 2	98.5	269	10	594***
5	Vero	TrypLE	+	1, 2	0.2	2	10	588***
6	Vero	TrypLE	—	1, 2	0.6	2	10	170***

\*: 特に記載しない場合、6~7分間程度 37°Cのインキュベーター内にて反応

\*\*： 蛍光検出電圧 (PM1 Voltage) 400 におけるしきい値

\*\*\*: 検討番号.4, 5, 6 は洗浄中に細胞が失われ低い値となった

表 2-3. 剥離酵素およびブロッキングの検討結果

検討番号	細胞*	細胞剥離 酵素	ブロッ キング	抗体	陽性細胞 率(%)	全細胞 蛍光平均	しきい 値**	カウント 数
1	CnSASC 80%	Trypsin	+	1, 2	76.5	534	30	2000
2	Vero 100%	Trypsin	+	1, 2	0.2	2	30	2000
3	CnSASC 80%	Trypsin	-	1, 2	84.3	460	30	2000
4	Vero 100%	Trypsin	-	1, 2	0.9	3	30	2000
5	CnSASC 80%	TrypLE	+	1, 2	80.8	294	30	2000
6	Vero 100%	TrypLE	+	1, 2	0.2	2	30	2000
7	CnSASC 80%	TrypLE	-	1, 2	81.8	214	30	2000
8	Vero 100%	TrypLE	-	1, 2	0.8	2	30	2000

\*: CnSASC 80%の場合、約 2 割の Vero 細胞を混合

\*\*： 蛍光検出電圧 (PM1 Voltage) 350 におけるしきい値

表3のイヌMSCに関してD社製抗体を用いたフローサイトメトリー解析を行った。その結果、全てのサンプルについてCD90陽性細胞率は99%以上であった(図8、表4)。犬種に関わらず、また骨髄由来MSCに関しても同様に本方法による測定が可能であった。本検討における犬種、由来組織、剥離方法によって陽性細胞の蛍光平均強度に若干差は観察されたが、陽性細胞率は安定してほぼ100%に近い値となった。

表3. イヌ間葉系幹細胞のリスト

脂肪由来間葉系幹細胞						
犬種	採取時の年齢	体重	性別	保存細胞数	解析時継代数	データNo.
ミニチュアダックスフンド	11才1ヵ月	4.5 kg	雄	$1 \times 10^6$	P3	1
トイプードル	1才11ヵ月	2.1 kg	雄	$1 \times 10^6$	P3	2
シーズー	12才6ヵ月	8.4 kg	雄	$1 \times 10^6$	P3	3
バーニーズマウンテン	4ヵ月	12.9 kg	雄	$1 \times 10^6$	P3	4
ジャーマンシェパード	10才8ヵ月	26.2 kg	雄	$1 \times 10^6$	P3	5
トイプードル	1才2ヵ月	2.7 kg	雄	$1 \times 10^6$	P3	6
トイプードル	2才9ヵ月	6.5 kg	雄	$1 \times 10^6$	P3	7
ミニチュアダックスフンド	4才9ヵ月	4.6 kg	雄	$1 \times 10^6$	P3	8
ボーダーコリー	11才1ヵ月	15.3kg	雄	$1 \times 10^6$	P3	9
ビーグル*	1才6ヵ月	14.1kg	雌	$5 \times 10^6$	P3	11
骨髄由来間葉系幹細胞						
犬種	採取時の年齢	体重	性別	保存細胞数	解析時継代数	データNo.
ビーグル*	1才6ヵ月	14.1kg	雌	$1 \times 10^6$	P2	10

\*: 同一個体のビーグル犬

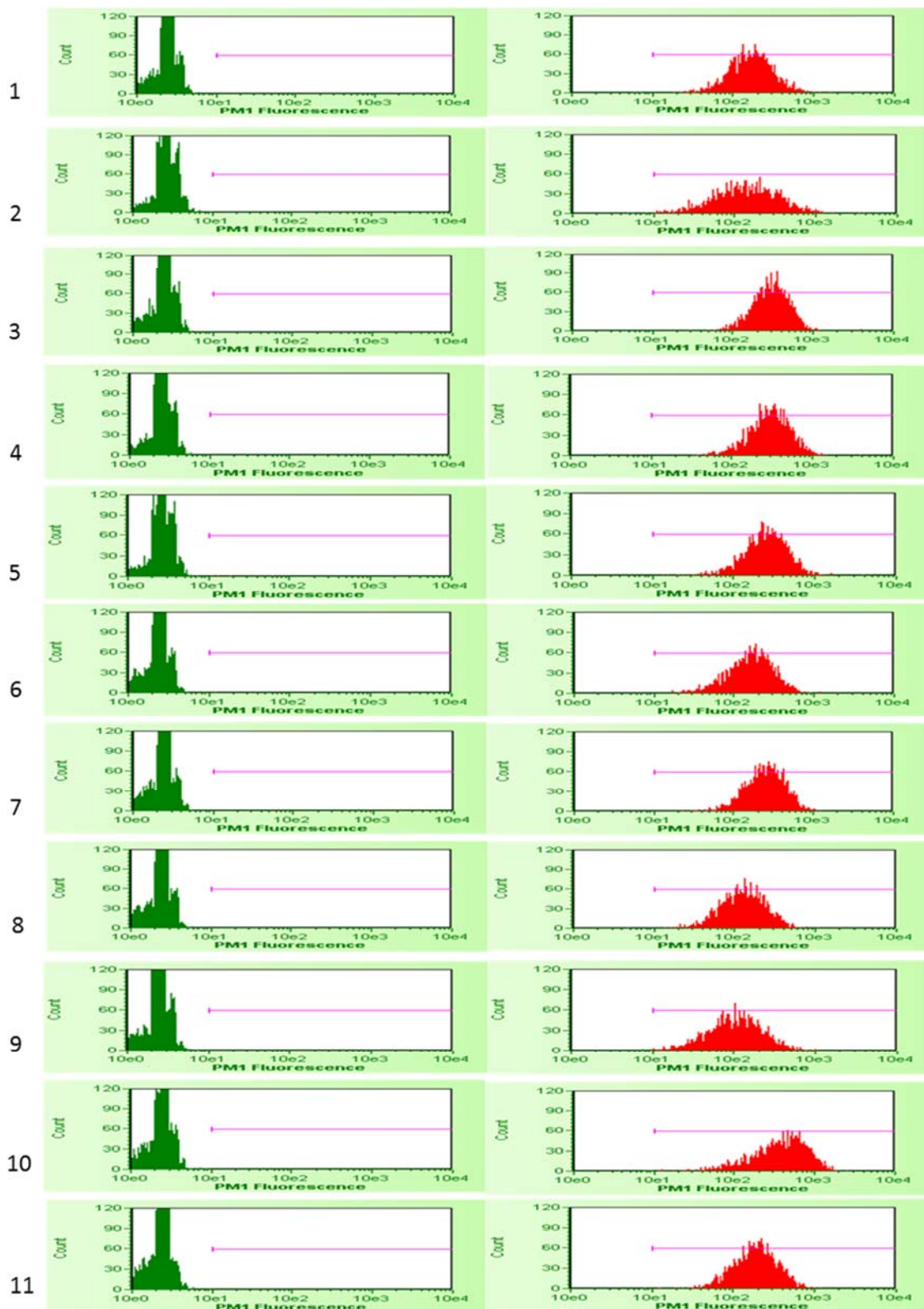


図8. イヌ MSC を用いたフローサイトメトリー解析  
 (1~11の番号は、表3のデータ No. に相当する。左図は2次抗体のみのコントロール)

表 4. 各種 MSC 測定結果

検討番号	細胞*	細胞剥離 酵素	ブロッ キング	抗体**	陽性細胞 率(%)	全細胞 蛍光平均	しきい 値***	カウント 数
1	1	TrypLE	—	2	0.2	2	10	3000
2	1	TrypLE	—	1, 2	99.8	207	10	3000
3	2	TrypLE	—	2	0.3	2	10	3000
4	2	TrypLE	—	1, 2	99.5	211	10	3000
5	3	TrypLE	—	2	0.0	2	10	3000
6	3	TrypLE	—	1, 2	99.9	340	10	3000
7	4	TrypLE	—	2	0.1	2	10	3000
8	4	TrypLE	—	1, 2	99.5	347	10	3000
9	5	TrypLE	—	2	0.6	3	10	3000
10	5	TrypLE	—	1, 2	99.7	304	10	3000
11	6	TrypLE	—	2	0.2	2	10	3000
12	6	TrypLE	—	1, 2	99.7	196	10	3000
13	7	TrypLE	—	2	0.2	2	10	3000
14	7	TrypLE	—	1, 2	99.7	290	10	3000
15	8	TrypLE	—	2	0.0	2	10	3000
16	8	TrypLE	—	1, 2	99.4	156	10	3000
17	9	TrypLE	—	2	0.1	2	10	3000
18	9	TrypLE	—	1, 2	99.4	142	10	3000
19	10	TrypLE	—	2	0.4	2	10	3000
20	10	TrypLE	—	1, 2	99.1	471	10	3000
21	11	TrypLE	—	2	0.2	2	10	3000
22	11	TrypLE	—	1, 2	99.5	223	10	3000

\*: 表 3 のデータ No.

\*\* : 抗体について、「1,2」の場合、1次抗体の後2次抗体と反応。「2」の場合1次抗体は使用せず2次抗体と反応。

\*\*\*: 蛍光検出電圧 (PM1 Voltage) 370 におけるしきい値

## 【まとめ】

1. イヌ CD90 を認識するマウス・モノクローナル抗体（クローン名；CD90-1F11、IgG2b  $\kappa$ -light chain）を作製した。
2. 本抗体はイヌ脂肪由来間葉系幹細胞上に存在する CD90 を免疫細胞化学的に検出した。
3. 本抗体はイヌ脂肪由来間葉系幹細胞で発現する CD90 蛋白質を認識した。
4. 本抗体は大腸菌並びに哺乳動物細胞で発現させた組換えイヌ CD90 蛋白質を認識した。
5. 本抗体はイヌ脂肪由来間葉系幹細胞で発現する CD90 を検出できるモノクローナル抗体であると考えられる。
6. イヌ脂肪由来間葉系幹細胞を用いたフローサイトメトリー解析に応用可能な特異性の高いクローンは、まだ見出せていない。
7. 市販抗体を用いた多犬種由来イヌ MSC のフローサイトメトリー解析の結果、CD90/Thy1 は、イヌ間葉系幹細胞のポジティブマーカーとしての可能性があり、イヌ間葉系幹細胞を用いた再生医療等製品の品質試験（確認試験、純度試験）に応用可能であることが判明した。
8. 市販抗体を用いた検討により、イヌ間葉系幹細胞製品の品質試験に応用可能なフローサイトメトリー解析法を確立することができた。

## 課題：

1. モノクローナル抗体（CD90-1F11）がフローサイトメトリー等、他の検出システムで使用可能かどうか、各システムでの抗体の特異性を確認し、その上で、抗体精製および抗体への直接蛍光標識を行い、品質試験への応用を検討する必要がある。
2. 最終製品がトリプシン処理後の細胞懸濁液である場合には、培養せずにそのままフローサイトメトリー解析が可能か検討する必要がある。

### 【試験名】

再生医療等製品の安全性評価における病原体の網羅的迅速遺伝子解析法の確立

### 【実施担当者所属・氏名】

東京農工大学農学部附属国際家畜感染症防疫研究教育センター教授 水谷哲也

研究協力：共同獣医学科教授 町田登

感染症センター講師 大松勉

感染症センター技能補佐員 布村由香

感染症センター博士課程学生 土赤忍

株式会社ケーナインラボ代表取締役 山口智宏

### 【試験の目的】

他家または自己由来の血液や組織を原料として製造する再生医療等製品は、原料からの病原体の混入を防ぐことが重要な課題である。再生医療等製品への病原体の混入は、投与された被験動物の健康を害するものであり、原料となる血液や組織、製造工程での混入、および最終製品での検査は、安全な再生医療等製品を製造、供給する上で必須である。

安全性評価が必要と想定される病原体は、投与された動物あるいは製造作業者に感染した場合、甚大な健康被害を及ぼすと想定されるウィルスや細菌等である。また、想定される数種類の病原体を迅速に網羅的に検出することで、検査の効率化を図る。

現在、個々の病原体の遺伝子検査法は確立されているが、それぞれに解析条件が異なるため、多種類の病原体の検出には時間とコストが掛かり、検査結果によって製造の可否を判断する場合に、大きな欠点となる。

我々は、まず再生医療等製品の原料、製造工程及び最終製品において、安全性を評価するため、検査を必要とする病原体を特定し、それら数種類の病原体の遺伝子を一度に迅速に解析する方法を確立することとした。また、実検体を使った実証試験を実施し、現場への導入を合わせて検討した。

### 【試験方法】

再生医療等製品の製造に係るドナー血液または組織の安全性、製造工程での病原体の混入、最終製品の品質および安全性の評価を目的として、次の手順で

試験を実施した。

- ① 薬機法および動物の再生医療等製品安全性評価委員会のガイドラインを参考に、検出対象となる病原体（細菌やウイルス）を選定し、現場での重要度に応じて第1優先グループと第2優先グループに振り分けた。重要度の選定の基準は、ワクチン対象ウイルス、対象動物への感染リスクの高い病原体、および飼い主等ヒトへの感染のリスクの高い病原体（人獣共通）とした。本年度は第1優先グループについて実施した。
- ② それぞれの病原体の遺伝子解析系を確立した。具体的には、リアルタイム RT-PCR 用のプライマー及び TaqMan プローブをデザイン、さらに、検出感度を検定し、合成 DNA や分離病原微生物を 10 から 100 コピーまで検出できるシステムを確立した。
- ③ 複数の病原体を同時に網羅的に解析できる検出系を構築した（主に TaqMan のシステムを採用しているのでひとつのチューブもしくはウェルでひとつの病原体を検出するシステムとした）。具体的には、検体処理および抽出方法、遺伝子増幅、検出方法および高感度（10 から 100 コピーまで一度に検出）のシステムを構築した。
- ④ 構築した検査方法を、臨床の実検体で検証した。

試験は下記のように分担し実施した。（実施施設および責任者）

- ①～③：東京農工大学農学部附属国際家畜感染症防疫研究教育センター、教授 水谷哲也 研究協力 町田登、大松勉、布村由香、土赤忍
- ④：株式会社ケーナインラボ、代表取締役 山口智宏

## 【結果】

本事業において選定された第1優先グループを図1に示した。各病原体について株間で共通のゲノム塩基配列を検索し、プライマーとプローブを設計した。用いたプローブの種類を図1に示した。設計した領域について合成DNAを作成し、検出感度を検討したところ10から100コピーのDNAを検出できた(図1)。以下、本システムをDemca-PCR (Detection of microbes from canine samples using realtime-PCR) と呼ぶ。

図1. 第1優先グループのDemca-PCRシステム

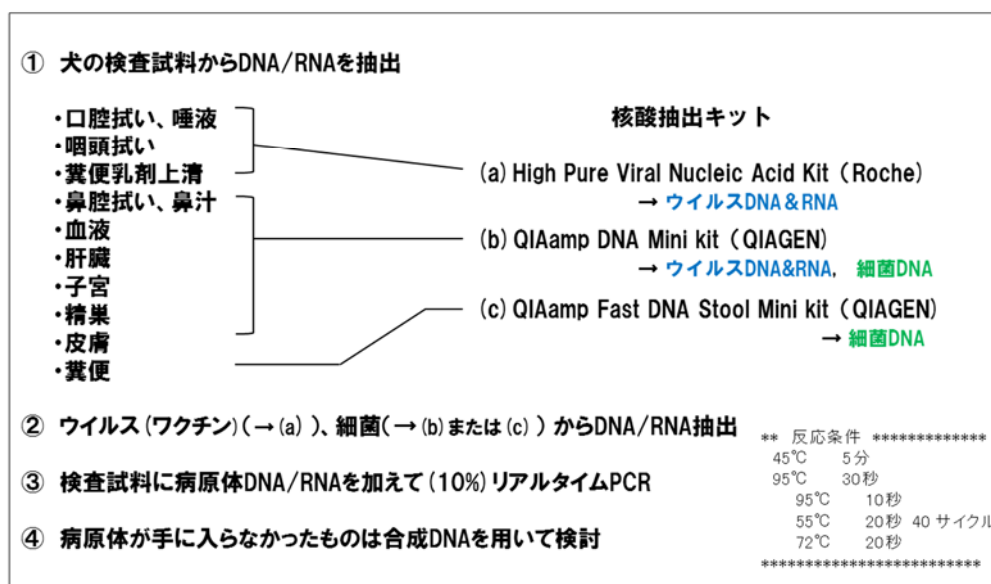
No.	病原体種類	核酸	検出できる合成DNAのコピー数	プローブ
1	狂犬病ウイルス	(-)ssRNA	10	56FAM-ZEN-31ABkFQ
2	犬ジステンパーウイルス(CDV)	(-)ssRNA	100	FAM/TEMRA
3	犬パルボウイルスII型 (CPV-2)	ssDNA	10	FAM/BBQ
4	犬アデノウイルスI型(犬伝染性肝炎) (CAV-1)	dsDNA	100	FAM/TEMRA
5	犬アデノウイルスII型(犬伝染性喉頭気管炎) (CAV-2)	dsDNA	10	FAM/TEMRA
6	犬パラインフルエンザウイルス (kennel coughの主要病原体)	(-)ssRNA	10	FAM/TEMRA
7	犬ヘルペスウイルスI型 (CaHV-1)	dsDNA	100	FAM/BHA1
8	犬コロナウイルス	(+)ssRNA	10	FAM/TEMRA
9	犬パピローマウイルス(犬ウイルス性乳頭腫症)	dsDNA	10	56FAM-ZEN-31ABkFQ
10	レプトスピラ	DNA	10	56FAM-ZEN-31ABkFQ
11	ブルセラ	DNA	10	56FAM-ZEN-31ABkFQ
12	ボレリア(ライム病)	DNA	10	56FAM-ZEN-31ABkFQ
13	カンピロバクター	DNA	10	56FAM-ZEN-31ABkFQ
14	サルモネラ	DNA	10	56FAM-ZEN-31ABkFQ
15	ボルデテラ	DNA	10	FAM/TEMRA
16	バスタツレラ	DNA	10	FAM/TEMRA
17	非定型型抗酸菌 (Tuberculosis IS6110)	DNA	10	56FAM-ZEN-31ABkFQ
18	非定型型抗酸菌 (MAC 16s rRNA)	DNA	10	56FAM-ZEN-31ABkFQ

実証試験は各病原体が感染すると考えられる臓器を動物再生医療推進協議会から分与いただき、PCR反応時に臓器から抽出したDNAやRNAを添加してDemca-PCRを実施した(図2)。最初に病原体(数種類を除く)について、この条件でもう一度合成DNAを用いた実証試験を実施した。やや感度が落ちたケースも見られた(図3)。

次にケーナインラボで保存されている陽性検体を中心に実証試験をおこなった。入手できないものについては、市販の生ウイルスワクチンや細菌分離株などを用いた(一部の検体は岐阜大学伊藤先生から分与された)。その結果、生ウイルスワクチンや細菌分離株などでは良好な成績が得られたが、ケーナインラボの検体ではパルボウイルスとレプトスピラではほぼ結果が一致していた一方で、ジステンパーウイルスについてはDemca-PCRではすべて陰性となった

(図4、5、6)。また、ブルセラについても再検討が必要かもしれない。これらの結果から本事業の目的はほぼ達成されたが、一部の病原体についてはさらに検討する必要がある。

## 図2. 実証試験の材料と方法



※ 今回は、これまで当研究室で行っていた方法を参考に抽出キットを選定したが、今後、糞便以外の検体からの抽出にはQIAamp DNA Mini Kit に統一できると考えられる。

## 図3. 合成DNAを用いた実証試験の結果

No.	病原体名称	検査試料	DNA量/RNA量 ng/μl	検出できる合成DNA コピー数
1	狂犬病ウイルス	唾液・口腔拭い	0.34 / -	100
3	犬パルボウイルスII型	糞便上清	0.48 / 15.3	10~100
4	犬アデノウイルスI型(犬伝染性肝炎)	肝臓	23.9 / 74.0	100
7	犬ヘルペスウイルスI型	子宮	53.0 / 19.0	100
8	犬コロナウイルス	糞便上清	0.48 / 15.3	100~1000
9	犬パピローマウイルス(犬ウイルス性乳頭腫症)	皮膚	31.1 / 7.8	10
10	レプトスピラ	血液	2.84 / 2.20	100
11	ブルセラ	精巢	51.0 / 85.0	NCの値が高い
12	ボレリア(ライム病)	皮膚	31.1 / 7.8	100
13	カンピロバクター	糞便	0.87 / -	100
17	非定型型抗酸菌(Tuberculosis)	皮膚	31.1 / 7.8	1000
18	非定型型抗酸菌(Mac 16s rRNA)	皮膚	31.1 / 7.8	100

NCの値が高い。

### 図3. 合成DNAを用いた実証試験の結果(続き)

☆検査試料にスバイクしたときに検出できるコピー数を調べた

	実験No	DNA コピー数/反応						検出コピー数	参考
		10000	1000	100	10	1	NC		PCR効率 (検体/水) (理論値 1)
狂犬病ウイルス	1		30.61	34.71	36.72			100	1.13/1.56
	2		30.61	34.76					
犬パルボウイルスⅡ型 (CPV-2)	1		30.56	34.18	36.33			10~100	1.17/0.81
	2		30.21	33.32		36.49			
	3	36.9	31.47	34.17	37.25				
犬アデノウイルスⅠ型(犬伝染性肝炎)	1			30.66				100	1.07/3.48
	2		27.9	31.48	-				
	3		26.84	30.85	32.95				
犬ヘルペスウイルス型 (CaHV-1)	1		31.25	34.89				100	1.11/0.97
	2		31.51	35.15	37.19				
犬コロナウイルス	1		33.19	36.21				100~1000	8.067/1.75
	2	29.71	33.28						
	3	26.04	29.84	34.28					
犬パピローマウイルス(犬ウイルス性乳腺腫瘍)	1		28.82	31.78	34.18			10	1.20/0.86
	2		28.65	31.02	35.08				
	3		29.84	33.02	35.59				
レプトスピラ	1		31.22	35.28				100	0.80/1.13
	2		30.7	34.46					
ブルセラ	1			28.75	29.91		30.89	?	6.28/ -
	2	30.8	33.46	33.81					
	3		31.51	31.8	33.32				
ボリリア(ライム病)	1		34.1	38.21				100	1.090/1.64
	2		35.51	37.65					
カンピロバクター	1		32.8	37.18				100	1.950/ -
	2		33.14	35.59	37.23				
非定型抗酸菌(Tuberculosis)	1		31.03					1000	- /13.55
	2		29.52						
非定型抗酸菌(Mbc 16s rRNA)	1		29.21	32.04	33.42	33.38	33.47	100	2.01/10.89
	2		30.23	33.32	34.38	34.23	34.17		

### 図4. 生ウイルスワクチンを用いた実証試験の結果

No.	病原体名称	検査試料	ワクチン株	検出の可否	試料中の夾雑物質の影響(水との比較)	
					検出できる希釈率	PCR効率 (試料/水)
脳内接種マウスの脳より抽出したRNA(岐阜大学より)						
1	狂犬病ウイルス	唾液・口腔拭い	狂犬病弱毒CVS株	○		10%含液の比較で差は無し (RNA原液:19.17)(10%試料:22.22)(10%水:22.29)
デュラムーン MX6 (ゾエティス・ジャパン)						
2	犬ジステンパーウイルス	糞便	サル腎継代細胞培養弱毒ジステンパーウイルス オンドーステポート株(乾燥・生)	○	同じ	元の濃度が低かったので十分な希釈段階がとれなかった。
3	犬パルボウイルスⅡ型	糞便	犬腎継代細胞培養弱毒犬パルボウイルス FD2001株(乾燥・生)	○	同じ	0.942/0.909
5	犬アデノウイルスⅡ型	咽頭拭い	犬腎継代細胞培養弱毒犬アデノウイルス(2型) V-197株(乾燥・生)	○	同じ	1.008/1.005
6	犬パラインフルエンザウイルス	咽頭拭い	犬腎継代細胞培養弱毒犬パラインフルエンザウ イルス91880株(乾燥・生)	○	同じ	0.875/0.901
8	犬コロナウイルス	糞便	猫腎継代細胞培養犬コロナウイルスTN-449株 (液状不活化)	○	同じ	C <sub>a</sub> 値が低い

図4. 生ウイルスワクチンを用いた実証試験の結果(続き)

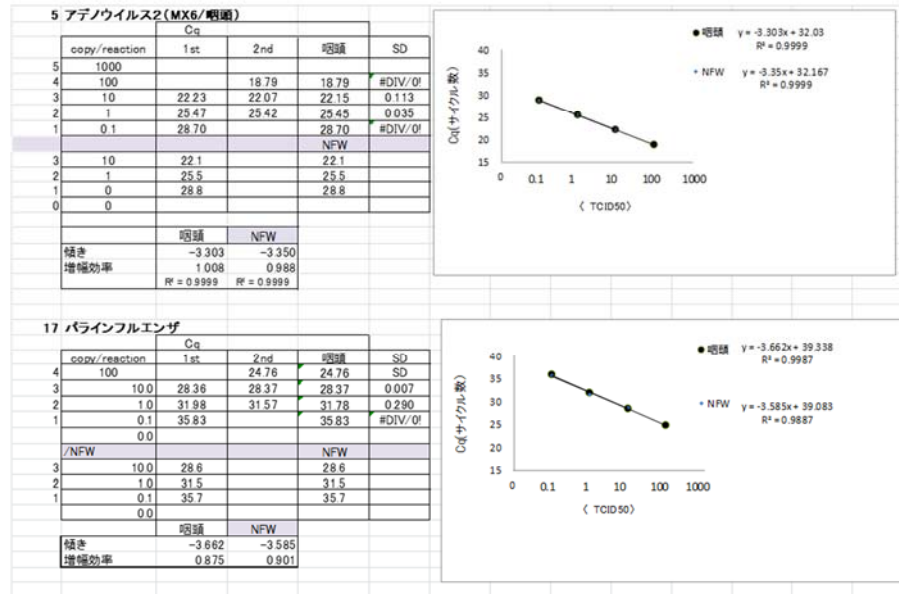
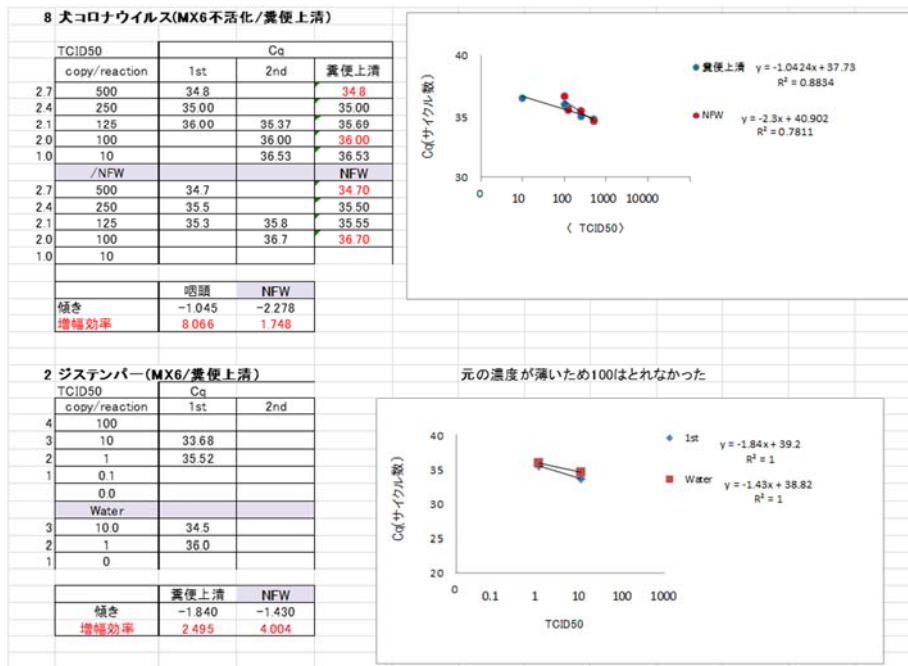


図4. 生ウイルスワクチンを用いた実証試験の結果(続き)



## 図5. 細菌分離株を用いた実証試験の結果

動物医薬品検査所所有 家畜衛生菌株を使用

No.	病原体名称	検査試料	菌株	検出の可否	検出できる濃度 (CFU/μl)
14	サルモネラ	糞便	Salmonella Typhimurium (BBS4502 L-719株)	○	10
15	ボルデテラ	鼻汁	Bordetella bronchiseptica (BSB2001 B-1株)	○	100
16	パスツレラ	鼻汁	Pasteurella multocida (BSP0304 TS-8株)	○	1

サイクル数	実験No	CFU/reaction			
		100	10	1	0.1
サルモネラ	1	31.61	34.19	-	/
	2	31.27	35.10	-	
ボルデテラ	1	36.80	-	-	/
	2	33.73	37.03	-	
パスツレラ	1	23.83	27.57	31.07	34.44
	2	24.06	27.60	30.87	

## 図6. ケーナインラボの検体を用いた実証試験の結果

ジステンパーウイルス

検体番号	種類	判定 (Cq値)
272-1	血液	-
272-2	糞便	-

パルボウイルス

検体番号	種類	判定 (Cq値)
29	糞便	+ (7.34)
32	糞便	+ (12.01)
45	血液	+ (18.73)
228	血液	+ (32.35)
230	血液	+ (30.71)
241	糞便	+ (31.57)
302	糞便	+ (30.90)
303	糞便	+ (17.71)

図6. ケーナインラボの検体を用いた実証試験の結果(続き)

レプトスピラ

検体番号	種類	判定 (Cq値)
105-1	血液	+
105-2	尿	+
107	血液	+
115.-1	血液	+
150	血液	± (-/35.58/35.27)
160-1	血液	± (-/-/35.52)
183-1	血液	+
185	血液	+
188	血液	+
195-1	血液	+
204	血液	+
331	血液	+
343	血液	+
372-1	血液	+
372-2	尿	+
379	血液	+
383	血液	+

【まとめ】

本事業では犬に感染する 18 種類の病原微生物（ウイルス、細菌）についてリアルタイム PCR（Demca-PCR）を構築し、10 から 100 コピー（一部で 1000 コピー）の検出感度が得られた。しかし、一部の病原体については再構築を行う必要がある。