

シンポジウム3

再生医療・細胞治療で使用される細胞の増幅に添加する 血小板溶解液(Platelet lysate)の調製方法と評価の検討

若本志乃舞¹⁾, 藤原満博¹⁾, 名村喜一郎¹⁾, 本間稚広¹⁾, 山本 哲²⁾, 紀野修一¹⁾, 卑禮一秀¹⁾
(日本赤十字社北海道ブロック血液センター¹⁾, 北海道赤十字血液センター²⁾)

はじめに

血小板由来の成長因子を含むplatelet lysate (PL) は、再生医療・細胞治療で使用される mesenchymal stem cell (MSC) の ex vivo 増幅に添加する異種由来成分不含のヒト由来サプリメントとして有用である¹⁾。PLの原料に期限切れ血小板製剤 (Platelet concentrate : PC) を使用できるため、献血血液の有効利用につながる。本稿では、1. PLの概説と、2. 期限切れアフェレーシスPCから調製したPLの性状に関する我々の検討結果について述べる。

1. PLの製造の現状と市販品およびPLで増幅したMSCを使用した治験について

PLの製造工程は、(1) PC中の血小板の凍結融解、(2)融解した複数のPCのpool、(3)遠心による細胞片の除去、(4)遠心上清のフィルター処理、(5)分注と凍結保管、である。(1)の融解後のPCや(3)の上清に対し、Fibrinogen (Fbg) 除去を行う方法もある。これは、PLを添加した培地が凝固するのを防ぐために行われる。Fbg除去をしないPLは、使用時に培地にヘパリンを添加する。欧米ではGMP-gradeのPLが製造され、市販品もあるが、原料はアフェレーシス由来PC、全血由来PC、置換PC、病原体不活化PCと、施設によって異なる。また、(1)～(5)の工程の条件、Fbg除去操作の有無、品質試験項目、試験方法および出荷基準についてはいまだ標準化されていない^{1), 2)}。しかし、13施設のPLの製造の現状をまとめた報告²⁾において、PCのpool数/lotは20-48ドナー、PLの保存安定性は細胞増幅能や成長因子濃度で評価し、-20℃保存で2年、とする施設が多いこと、Fbg除去は6/13の施設が行っていること、また、品質試験の必須項目は共通していること等が示され、血液センターの規模でのPLの製造において検討すべきことは絞られてきたと考えられ

る。

PLの市販品について、現在までに我々は12社の製品を把握している。このうち、6社の製品は研究用試薬として日本で購入できる。Fbg除去の有無の両方または片方の製品を販売している会社、あらかじめ製品にヘパリンまたはヘパリン代替物を添加し、細胞培養時のヘパリン添加を不要とした製品を販売している会社がある。

治験および臨床研究の情報のデータベースによると、PLで増幅したMSCは、骨髄移植後のステロイド抵抗性患者におけるGVHD治療、クローン病、造血幹細胞移植時のMSC共移植、大腿骨頭壞死、Non-option虚血肢、腰部椎間板変性症、劣性栄養障害性表皮水泡症への細胞治療に使用されている。この他に北海道大学脳神経外科では急性脳梗塞の治療にPLで培養した自家MSCを移植する治験が行われている。

2. 期限切れPCのPLの原料としての有用性に関する検討

PLの細胞増幅能を担う成長因子の濃度および安定性に原料PCの血小板濃度やPLの保存期間が影響すると考えられる。本邦の期限切れPCの5割以上を占める10単位PCは、15, 20単位PCよりも血小板濃度が低いため、血小板由来の成長因子濃度も低いと推測される。そこで、期限切れの10単位PCのみをpoolしてPLを調製し、-20℃で凍結保存して1, 6、および12カ月にMSCの増幅能と成長因子(PDGF-BB)の濃度を測定し、保存性能を評価した。PLの性能として、細胞増幅能はサプリメントに汎用されているFBS (Fetal bovine serum)と同等かそれ以上であることが望まれるため、FBSのMSC増幅能を比較対象とした。

1, 6、および12カ月のいずれの凍結保存期間においても、PLの細胞増幅能はFBSよりも高かった。したがって、10単位由来PCは、PLの原料

として有用と考えられた。また、細胞増幅能およびPDGF-BB濃度は、凍結保存12カ月まで低下することなく維持されていた。国際細胞治療学会が提案するヒトMSCを定義するための基準³⁾において、細胞表面マーカーはCD73, CD90, CD105が陽性、CD11bまたはCD14, CD19またはCD79 α , CD34, CD45, HLA-DRが陰性であること、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞への分化能を有することを必要最低条件としている。12カ月間凍結保存したPLで培養したMSCは比較対照のFBSで培養したMSCと同様に上記の条件を満たしていた。今後、凍結保存2年におけるPLの安定性を確認する必要があるが、前述の文献報告²⁾で、PLの品質

評価について正式なバリデーションを行っていない施設(2/13施設)ではPLの使用期限を−20°C以下または−30°C以下の保存で12カ月としている。したがって我々が現在までに取得しているPLの凍結保存12カ月の結果においても、十分な性能を有するPLを調製できているといえる。

おわりに

我々の検討結果から、期限切れPCはPLの原料として有用と考えられた。今後、PL製造を事業化するためには、より大きな規模でPLを製造するための製造方法やPLのquality control試験項目、出荷基準の確立が必要である。

参考文献

- 1) Burnouf T, et al. (2016) : Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials*, 76: 371-387.
- 2) Strunk D, et al. (2016) : International Forum on GMP-grade human platelet lysate for cell propagation. *Vox Sang.* 113: e1-e25
- 3) Dominici M, et al. (2006) : Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cyotherapy*, 8: 315-317.