

## 3T3 細胞の品質管理

**定義**

種細胞株：フィーダー細胞に用いる 3T3 細胞株。

マスター・セル・バンク：種細胞株を一定の培養条件下で最低限の継代数を経て増殖させ、複数のアンプルに分注したもの。

ワーキング・セル・バンク：マスター・セル・バンクの一個又は複数個のアンプルをプールして得た細胞浮遊液を一定条件下でさらに増殖させ、複数のアンプルに分注したもの。

**記録**

種細胞株の由来、継代歴等に関する情報、マスター・セル・バンクの調製・保存方法及びその管理方法、製造用細胞バンクの調製・保存方法及びその管理方法を記載した記録を保存すること。

**試験****A. マスター・セル・バンクの細胞に行う試験**

1. 細胞の同定試験（アイソザイムやゲノム分析など）によって種細胞と同一であることを確認する。
2. 細菌・カビ・マイコプラズマ否定試験を行う。
3. ウイルス否定試験を行う。
  - (1)MRC-5(human diploid lung cells)、Vero(African green monkey kidney cells)等のインジケーター細胞に細胞溶解液を接種し、CPE の出現を観察する。さらに chicken、guinea pig、rhesus monkey の赤血球の凝集試験、吸着試験を行う。
  - (2)adult および suckling mice、guinea pig に細胞溶解液を接種し、adult mice と guinea pig は 28 日後、suckling mice は 14 日後に安楽殺して臓器を回収する。臓器のホモジネートを再度 suckling mice に接種し、14 日間観察する。発育鶏卵の allantoic cavity に細胞溶解液を接種し、allantoic fluid の HA 試験（chicken、guinea pig、人 O 型赤血球）を行う。発育鶏卵の yolk sac に細胞溶解液を接種し 10 日観察する。必要に応じ、さらに yolk sac で passage を繰り返す。
  - (3)Xenotropic マウスレトロウイルスの有無を延長 S+L- focus assay（mink S<sup>+</sup>L<sup>-</sup> cells）で、Ecotropic マウスレトロウイルスの有無を延長 XC plaque assay（SC-1 細胞）で調べる。細胞を透過型電子顕微鏡で観察し、レトロウイルス様粒子の有無を観察する。細胞溶解液の逆転写酵素活性を測定する。
  - (4)その他の感染性微生物の否定試験を行う。細胞溶解液を mouse に接種する。血清ないし血漿の lactic dehydrogenase 活性を測定し、高ければ lactic dehydrogenase virus の感染を疑う。細胞溶解液を接種した mouse に Lymphocytic Choriomeningitis Virus(LCMV)を接種する。抗体が無ければ感染で死亡する。細胞溶解液を接種した mouse から 28 日後に血清を回収し ELISA、HI、IndirectFA で既知の齧歯類ウイルスに対する抗体の有無を調べる。対象となるウイルスは Ectromelia、GDVII、LCMV、Hantaan Virus、Minute Virus of Mice、Mouse adenovirus、Mouse Hepatitis Virus、Pneumonia Virus of Mice、Polioma Virus、Repvirus Type3、Epizootic Diarrhea of Infant Mice、Mouse Salivary Gland Virus(Mouse Cytomegalovirus)、K Virus、Mouse Thymic Virus、Sendai Virus。

(5)培養にウシ血清を使う場合は、ウシウイルスの否定試験を行う。bovine turbinate cell をインジケーター細胞とし、細胞溶解液を接種後、14 日間 CPE を観察する。CPE が出現したら、細胞を固定し IndirectFA によってウイルス抗原を調べる。対象は Bovine Viral Diarrhea Virus、Bovine Adenovirus Type3、Bovine Parvovirus、Infectious Bovine Rhinotracheal Virus、Bovine Parainfluenza Virus Type3。

4. 細胞に腫瘍原性の無いことを確認する。細胞を soft-agar medium で培養し、コロニー形成を調べる。

#### **B . ワーキングセルバンクの細胞に行う試験**

1. 細菌・カビ・マイコプラズマ否定試験を行う。
2. ウイルス否定試験のうち、上記 (1)及び(2)を行う。
3. 細胞に腫瘍原性の無いことを確認する。

#### **C . フィーダー細胞に行う試験**

1. レトロウイルス活性化の有無を調べるため、放射線照射や IudR、BudR 等で処理したフィーダー細胞について、ウイルス否定試験のうち、上記 (3)を行う。
2. 培養組織を取り外した後に、培養器に残存するフィーダー細胞の染色体数と腫瘍原性について（例えば寒天内コロニー形成能、単層増殖を維持しているかなど）検討する。