

- 40). Inui, K., Maeda, M., Sano, A., Fujioka, K., Yutani, Y., Sakawa, A., Yamano, Y., Kato, Y., Koike, T., (1998). Local application of basic fibroblast growth factor minipellet induces the healing of segmental bony defects in rabbits. *Calcif. Tissue Int.* 63, 490-495.
- 41). Yamada, K., Tabata, Y., Yamamoto, K., Miyamoto, S., Nagata, I., Kikuchi, H., Ikada, Y., (1997). Potential efficacy of basic fibroblast growth factor incorporated in biodegradable hydrogels for skull bone regeneration. *J. Neurosurg.* 86, 871-875.
- 42). Tabata, Y., Yamada, K., Hong, L., Miyamoto, S., Hashimoto, N., Ikada, Y., (1999). Skull bone regeneration in primates in response to basic fibroblast growth factor. *J. Neurosurg.* 91, 851-856.
- 43). Murakami, S., Takayama, S., Kitamura, M., (2003). Recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF) stimulates periodontal regeneration in class II furcation defects created in beagle dogs. *J. Periodontol. Res.* 38, 97-103.
- 44). Takayama, S., Murakami, S., Shimabukuro, Y., (2001). Periodontal regeneration by FGF-2 (bFGF) in primate models. *J. Dent. Res.* 80, 2075-2079.
- 45). Centrella, M., Massague, J., Canalis, E., (1986). Human platelet-derived transforming growth factor-beta stimulates parameters of bone growth in fetal rat calvariae. *Endocrinology* 119, 2306-2312.
- 46). Yang, E. Y., Moses, H. L., (1990). Transforming growth factor-beta 1-induced changes in cell migration, proliferation, and angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane. *J. Cell. Biol.* 111, 731-741.
- 47). Urist, M. R., (1965). Bone: formation by autoinduction. *Science* 150, 893-899.
- 48). Bessho, K., Tagawa, T., Murata, M., (1989). Purification of bone morphogenetic protein derived from bovine bone matrix. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165, 595-601.
- 49). Viljanen, V. V., Lindholm, T. S., (1996). List of references on demineralized bone matrix induced osteogenesis and research of bone morphogenetic proteins. *Biology, Biochemistry and Reconstructive Surgery*, Lindholm, T. S., ed R. G. Landes Co, Austin, 241-308
- 50). Higuchi, T., Kinoshita, A., Takahashi, K., Oda, S., Ishikawa, I., (1999). Bone regeneration by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in rat mandibular defects. An experimental model of defect filling. *J. Periodontol.* 70, 1026-1031.
- 51). Marukawa, E., Asahina, L., Oda, M., Seto, L., Alam, M., Enomoto, S., (2002). Functional reconstruction of the non-human primate mandible using recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Int. J. Oral. Maxillofac.*

- Surg. 31, 287-295.
- 52). Kusumoto, K., Bessho, K., Fujimura, K., Konishi, Y., Ogawa, Y., Iizuka, T., (1996). Self-regenerating bone implant: ectopic osteoinduction following intramuscular implantation of a combination of rhBMP-2, atelopeptide type I collagen and porous hydroxyapatite. *J. Craniomaxillofac. Surg.* 24, 360-365.
- 53). 榎本昭二、石川烈、四宮謙一、野田政樹：硬組織の再生医工学・長管骨の再生「生体模倣プロセスによる自己組織化を利用したアパタイト/コラーゲン複合体生体置換型人工骨材料の合成と応用」、日本学術振興会未来開拓事業学術推進事業「再生医工学」最終シンポジウム・プロジェクト研究概要（2002.1.11）
- 54). Kawasaki, K., Aihara, M., Honmo, J., Sakurai, S., Fujimaki, Y., Sakamoto, K., Fujimaki, E., Wozney, J. M., Yamaguchi, A., (1998). Effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on differentiation of cells isolated from human bone, muscle, and skin. *Bone* 23, 223-231.
- 55). Morotome, Y., Goseki-Sone, M., Ishikawa, I., et al (1998). Gene expression of growth and differentiation factors -5, -6, and -7 in developing bovine tooth at the root forming stage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244, 85-89.
- 56). Sena, K., Morotome, Y., Baba, O., Ishikawa, I. et al (2003). Expression of growth differentiation genes in the developing periodontium of rat molars. *J. Dent. Res.* 82, 166-171.
- 57). Mansukhani, A., Bellosta, P., Sahni, M., Basilico, C., (2000). Signaling by fibroblast growth factors (FGF) and fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-activating mutations blocks mineralization and induces apoptosis in osteoblasts. *J. Cell. Biol.* 149, 1297-1308.
- 58). Wang, J. S., Aspenberg, P., (1993). Basic fibroblast growth factor and bone induction in rats. *Acta. Orthop. Scand.* 64, 557-561.

## 調査報告（2）

### 骨

（担当：名古屋大学大学院医学系研究科頭頸部感覚器外科学講座 上田 実）

#### <骨細胞>

1. 臨床応用されうる細胞・組織医療用具の細胞ソース、作製法、移植法

臨床応用されうる細胞ソース：未分化間葉系幹細胞、骨細胞、ES細胞等

作成法：

未分化間葉系幹細胞；骨髓液より採取するのが一般的であるが、最近脂肪組織、末梢血、さい帯血より採取されたという報告を散見する。

骨細胞；海綿骨など骨組織より採取する。昔から行われている方法である。

ES細胞；ES細胞は、LIF (leukemia inhibitory factor) 非存在下で、細胞塊を作らせると胚様体 (embryoid body) と呼ばれる構造を形成し、誘導培地を用いることにより骨形成細胞の特徴を呈することは知られている。これらを、移植用細胞に用いる。

移植法：

ブロック型移植移植法；ハイドロキシアパタイトなどセラミックスに細胞を播種して ex vivo にて培養し移植に用いる。操作性、付形成に問題がある。

注入型による移植法；流動性マトリックスを用いた付形成、操作性を兼ね

備えた組織工学的的手法による新しい移植法。自己組織を応用することで、毒性、免疫原性の問題が回避でき、低侵襲にて行うことができる。

2. 臨床応用実現までの期間

国内では、当科において組織工学的手法を用いた骨組織再生法は倫理委員会を通り、すでに臨床応用されている。現在、5症例すべて概ね経過良好である。国外においては整形外科グループにより一部臨床応用されている。他の細胞ソースに関しては、その効果は勿論のこと、倫理的なハードルをクリアできれば、臨床応用可能と思われる。しかし、ES細胞についてはもう少し臨床応用までには時間がかかるものと思われる。

3. 臓器あるいは加工法に特異的な安全性確認事項、評価方法

我が国では、ヒト細胞・組織を用いた研究や医薬品・医療用具の開発およびその品質、安全性および科学的・倫理的妥当性の確保のための重要な通知として、平成12年12月26日付の厚生省医薬安全局長通知「ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全確保について(医薬発第1314号)」が通知化され、

その中に「細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方」「ヒト由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」が示された。さらに、平成 13 年 3 月 28 日付けで「細胞組織医薬品及び細胞組織医療用具に関する基準」も開示されている(厚生労働省告示第 101 号)。

それによると臨床応用するためには製品が体内に入っても安全でなければならない。すなわち、無菌であることが必須条件である。完成品を滅菌処理することはできないので、原料の無菌性を確保し、培養行程を出来る限り無菌的に行うことが必要であると思われる。原料である細胞は病原菌(細菌、真菌)、マイコプラズマ、ウイルス汚染のないことを検査により確認する必要がある。培養操作においてもフラスコ、ピペットなどの培養器具は滅菌済みのディスポーザブル製品を使用し、そのような製品がない道具においては乾熱、もしくは蒸気滅菌を施し用いている。

培養は理想的にはGMP基準に沿う形で行われることが望ましいとされる。現在確固とした基準がない中で、動線、また常に必要な清浄度が維持されているかどうかを確認する必要があると思われる。培養操作は安全キャビネット内で行い、培養細胞への汚染あるいは逆に培養細胞から培養作業従事者への感染を防ぐ必要もある。複数の提供者からの細胞を培養するときは病原菌のコンタミネーションだけでなく、他の人由来の細胞とのクロスコンタミネーションの危険性も考えなくてはならない。また、培養過程において複数の細胞・組織提供者からの細胞・組織を同一室内で同時に取扱わない。

さらに、未分化な骨髄細胞もしくはES細胞を移植した場合は、他の細胞、もしくは teratoma 等に分化しないかどうか詳細な検討を要するものと思われる。

#### 4. 臓器あるいは加工法に特異的な有効性評価方法

未分化間葉系幹細胞の特定は現在いろいろな見解があるが、一般的にはCD34 など造血幹細胞に特異的抗体はnegative にチャージするなどいくつかの抗体を用いて分離同定することが可能となってきたが、確固とした抗体が定まってないのが現状である。評価基準となるにはもうしばらく検討を要するものと思われる。また、骨芽細胞への分化および骨形成細胞としての活性は、その細胞膜に豊富な alkaline phosphatase (ALP) 活性、osteocalcin (オステオカルシン) あるいは bone Gla protein (BGP) と呼ばれる)、type I collagen、osteopontin、osteonectin などの産生を蛋白レベルおよび遺伝子、RNA レベルで検索することにより確認、定量することができる。われわれは定量的 RT-PCR 法を用いての定量を試みており今後利用可能と思われる。また in vivo における反応は再生された組織に対して組織学的評価も加味するものとする。

#### 5. 臨床応用後の評価方法・評価期間

臨床応用後の評価方法として、レントゲン評価：骨形成能、形成状態を CT、オルソパントモグラフ、デンタル写真(アルミスケールの応用)を用いて、

期間は移植後 1-2 ヶ月は頻回に精査し、以後、半年、1、2、3 年後に評価を行う。

#### 6. 臨床応用後に発生しうる危険性・問題点

臨床応用後に発生しうる危険性、問題点を列挙する。

1. 細胞培養の際、牛血清を使用するため、未知のウイルス等への感染。
2. 大量の細胞数を必要とするため、細胞数をかせぐのに、時間がかかり、急性疾患に対応できない。
3. 大量の細胞数を要するため、コストが割高になる可能性がある。

ES 細胞に対しては

1. 倫理面で問題が残る。
2. 腫瘍 (teratoma 等) に分化する可能性がある。
3. 細胞数に限りがあり、増幅できない。

## 調査報告 (3)

### 骨

(担当：独立行政法人産業技術総合研究所  
ティッシュエンジニアリング研究センター 大串 始)

#### 緒言

ヒト培養細胞を用いての再生医療が世界各国で行われ、米国ではこの目的での細胞販売もおこなわれている。すなわち、再生医療の基盤技術である組織工学(ティッシュエンジニアリング)技術を用いての医療産業が興りつつある。日本においても、現在皮膚や軟骨再生に関して、厚生労働省への治験確認申請手続きをおこなっている企業が出始めている。また、骨や角膜あるいは神経細胞の再生においても、基本技術は確立されつつあるところである。

このような現況において、再生に用いられる培養細胞あるいは組織の機能評価ならびに標準化をおこない、これら培養細胞・組織が損傷部位の再生において期待される結果をひきおこす保証が必須である。世界の流れとしても、アメリカの ASTM (American standard for testing materials) はこの再生医療を目的とする組織工学(ティッシュエンジニアリング)における培養担体材料を中心とした標準化作業をおこないつつあり、さらに ISO (International organization of standardization) の中にもこの分野における標準化グループ(TC150, WG11, Tissue engineering working group) が立ち上がりつつある。以上の動向を考慮した場合、日本においてもこれら ASTM や ISO に対応するような再生医療を考慮した培養プロセスの妥当性確認(バリデーション)を確立する必要があると思われる。本報告

では骨再生の為の培養細胞の評価、ならびに我々が取り組んでいる培養過程における安全性について言及する。

#### 細胞評価について

培養細胞を用いての骨再生医療には大きく分けて2つのセルソースが期待できる、一つは骨髄由来の未分化間葉系細胞であり [1, 2]、もう一つはこの間葉系細胞をさらに骨形成能を有する骨芽細胞へ分化させた分化細胞である [3, 4]。前者の間葉系細胞は培養皿底面に接着する細胞であり CD34 等の種々血球系細胞マーカーが陰性であるが、間葉系細胞に特異的なマーカーが同定されていず、現時点ではこの細胞の評価は困難である。一方、骨芽細胞に特異的なマーカーは比較的多く知られていて、これらのマーカーやこの骨芽細胞が生産する細胞外基質の特徴を調べることによっても骨芽細胞の評価は可能である。

ここで、骨髄細胞による培養条件下の骨芽細胞の増殖、およびその骨芽細胞による骨形成につき述べる [5, 6]。骨髄細胞を採取し培養皿におく、最初の培地交換は2日後におこない、その後は一週間に3回おこなう。採取数回の培地交換は慎重におこない、浮遊系の細胞を除去して付着性の細胞が培養皿よりはがれないようにおこなう。約10日から2週間でこの付着性の細胞はコンフルエントにまで増殖する。ここで、トリプシン処理をおこない、培養皿よりはがした付着性の細胞をさらに

グリセロリン酸、ビタミンC、Dex の存在のもとでシャーレ上あるいはセラミック上で2週間二次培養する。Dex 非存在下では細胞の形態は fibroblastic な形態を保ちミネラルの沈着は起こらない。しかし、Dex を加えることにより豊富な細胞外基質に取り囲まれた骨芽細胞様細胞が2次培養後約一週間で出現する(図1)。また、この細胞外基質には培養後10日ごろよりミネラルの沈着がおり、これは alizarin red S に染まることよりカルシウムが沈着していることが明らかであった。以上の所見は骨髄間葉系幹細胞が Dex の存在下に培養条件下に骨形成を示したことを示唆する。しかし、種々の細胞培養においてこのようなミネラルの沈着が起こることが知られ、この培養条件下でもこの現象が真の骨形成でなく単なるカルシウムと燐の沈着を示している可能性もある。

ここで、生体の骨の微細構造につき簡単に述べる。組織的に観察すると骨組織は他の組織と異なり細胞成分に乏しく、カルシウムと燐の結晶であるハイドロキシアパタイトを主成分とする細胞外基質の豊富な組織である。このハイドロキシアパタイトはランダムに存在するのではなく、コラーゲン繊維の上に存在する。また、他の組織と同様に多数の血管がこの硬組織にも存在する。細胞外細胞成分としては骨組織の中には骨小孔があり、その中に骨細胞 (Osteocyte) が存在する。骨組織の表面には骨形成を担っている骨芽細胞 (Osteoblast) が存在する。さらに部分的であるが、骨を吸収する細胞である破骨細胞が骨組織表面に存在して骨を吸収する場面も見られる。以上が簡単に述べた生体内での骨組織構造である。このような構造がはたして *in vitro* で再構築できるだろうか。残念ながら、*in vitro* で細胞培養によって機能を持った血管構造を構築するのは不可能でありこのような3次元構造をもった骨形成は困難である。しかし、

もし活性を有する骨芽細胞が存在し、この骨芽細胞によりコラーゲン産生とそのコラーゲンに生体内でみられるのと同様のハイドロキシアパタイトの沈着が生じれば、これは生物学的にみて生体で生じるのに匹敵する骨形成である。この点において大事なものは骨芽細胞の同定ならびにその活性であり、またアパタイトの物理的性質である。

骨芽細胞は比較的大きな球形から立方体の形態を有する細胞であり、その細胞膜には豊富な Alkaline phosphatase (ALP) 活性を有する。さらに osteocalcin (オステオカルシン) あるいは bone Gla protein (BGP) と呼ばれる  $\gamma$ -カルボキシルグルタミン酸を含んだ蛋白を産生する。このオステオカルシンの機能は不明な点が多いが、この蛋白は硬組織に特異的に存在し、他の組織ではほとんど見られず検出限界以下である事が多い。また、この骨芽細胞はとハイドロキシアパタイトをそのコラーゲン繊維に沈着させ骨形成を行うが、このアパタイトの結晶性は低く、炭酸イオンをその中に含むいわゆる carbonate containing apatite で biological apatite とも呼ばれる。すなわち、球形から立方体の形態の細胞が高い ALP 活性をしめし、オステオカルシンを産生、さらに biological apatite をコラーゲン繊維上に構築すれば、これは単なるカルシウムと燐の沈着でなく *in vitro* での骨形成である。

上記に述べたように、骨髄間葉系幹細胞を Dex 存在下に培養すると、約10日からミネラルの沈着がおり、また、骨芽細胞類似の形態を持つ細胞が出現した。この細胞成分を集め homogenizer で粉碎した後、細胞分画と RNA 分画を得た。この細胞分画は高い ALP 活性をしめし、RNA には osteocalcin mRNA が存在することがノーザンブロットにより判明した。さらに、ALP とこの osteocalcin mRNA の局在を ALP 染色と *in situ* ハイブリダイゼーションにより検出すると、これら

は以上のべた骨芽細胞様細胞に強く検出され(図1, 2)、これらの細胞群が骨芽細胞であることを示した。さらに走査電顕での観察により、コラーゲン繊維上にミネラルの沈着が起こっているのを観察でき、またこのミネラルはFTIRとX線解析により正常の骨のパターンと一致し、いわゆる biological apatite であった。しかし、Dex 非存在下ではこのような大型の細胞は出現しなく ALP 活性も低く、さらにオステオカルシンの mRNA は検出できなかった。以上のように、Dex が存在すると、骨髄間葉系幹細胞は *in vitro* の条件下に骨芽細胞へ細胞分化しさらに骨形成にまで進行したことを示した。しかも、このような骨形成が種々のセラミック上で可能であることも確認している。このセラミック上での骨形成は非常に重要で、次項に述べるように、このセラミックの基盤を用いることにより、容易に生体内へ移植することが可能であり [7] 骨再生医療材料として用いられる。

このように、ALP や osteocalcin 蛋白の定量、あるいはこれらの遺伝子発現を定量することにより、骨再生に用いられる細胞の機能評価が可能となる。さらに、定量的考察は困難であるが、X線解析や赤外分析により細胞外基質の特徴をとらえることは可能であることを示す。

#### 品質管理および安全性について

我が国では、平成 12 年 12 月 26 日付の厚生省医薬安全局長通知「ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全確保について(医薬発第 1314 号) が通知化され、その中に「細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方」「ヒト由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」が示された。さらに、平成 13 年 3 月 28 日付で「細胞組織医薬品及び細胞組織医療用具に関する基準」も開示されている(厚生労働省告示第 101 号)。

これらはヒト細胞・組織を用いた研究や医薬品・医療用具の開発に関するガイドラインであり、品質、安全性および科学的・倫理的妥当性の確保のための重要な通知である。我々の施設においてもこれらの指針にもとづいた独自の基本方針により骨再生医療用デバイスの作製を行っている。以下にこの方針の概略を記載する。

臨床応用するためには製品(培養処理した人工関節)が体内に入っても安全でなければならない。すなわち、無菌であることが必須条件である。完成したものをそのまま滅菌処理することはできないので、原料の無菌性を確保し、培養行程を出来る限り無菌的に行うことが必要である。原料である細胞は病原菌(細菌、真菌)、マイコプラズマ、ウイルスの汚染のないことを検査により確認する必要がある。我々は培地・添加因子はフィルター濾過による滅菌を行い、さらに、無菌性だけでなくエンドトキシンフリーであることも検証し、抗生物質も併用している。フラスコ、ピペットなどの培養器具は滅菌済みのディスポーザブル製品を使用し、そのような製品がない道具においては乾熱、もしくは蒸気滅菌を施し用いている。

培養は通常の手術室より清浄度の高いクラス 1000 のバイオリジカルクリーンルーム内で行っている。この部屋は浮遊菌、付着菌、落下菌の検査、パーティクルカウンターを用いての微粒子測定検査を定期的に行い、常に必要な清浄度が維持されているかどうかを確認している。クリーンルームに入るにはオートクレーブで滅菌されたつなぎのガウン、頭と顔をおおう頭巾、ゴーグル、滅菌手袋を着用しなければならない。培養操作は安全キャビネット内で行い、培養細胞への汚染あるいは逆に培養細胞から培養作業従事者への感染を防いでいる。複数の提供者からの細胞を培養するときは病原菌のコンタミネーションだけでなく、他の人由来



の細胞とのクロスコンタミネーションの危険性も考えなくてはならない。一人の患者に対し一つのCO<sub>2</sub>インキュベーターを定めて培養を行っている。また、培養過程において複数の細胞・組織提供者からの細胞・組織を同一室内で同時に取扱わない。

製品あるいは細胞そのものが臨床応用に適切であるかどうかの確認は、培養過程の各段階で病原菌、マイコプラズマ、エンドトキシンについて検査している。また、培養による *in vitro* 骨組織の品質（細胞評価）は顕微鏡による形態的観察や上記に述べたように生化学的検査などによりおこなっている（図3）。

#### 血清について

通常、細胞培養には牛胎児血清が使用されることが多い。このウシ血清には様々な増殖因子などが含まれており、安定した細胞の増殖、活性を得られるからである。しかし、狂牛病問題を考えた場合、できれば自己血清を使用するのが望ましい。我々の最近の経験により、幸い自己血清でも骨髄から間葉系細胞の増殖は可能であり、また間葉系細胞から骨芽細胞への分化も自己血清が有用であることが判明してきた。以上の結果より骨髄間葉系細胞を用いての骨再生医療に関しては、特別な理由が無い限り自己血清を用いるべきであろう。

#### まとめ

以上、骨再生における細胞の評価、特に間葉系細胞から骨芽細胞への分化における考察ならびに骨芽細胞が生産する細胞外基質の特質につき述べた。このような、細胞および細胞外基質の評価により、移植されうる細胞の品質が保証されると思われる。さらに、このような評価を標準化することにより、これら培養細胞・組織が損傷部位の再生において期待される結果を与えることを保証する培養プロセスの妥当性確認（バリデーション）がおこなわれる。また、これらのプロセスには安全性の

確立が必須条件である。現在、実際の骨再生医療をおこなっている施設は世界的にみてもほとんどなく、参考として我々の取り組みをここに紹介した。

#### 図の説明

##### 図1

Dexamethasone (Dex), Vitamice C, Glycerophosphate 存在下での骨髄間葉系幹細胞の培養。

培養により生じたミネラルの沈着はX線解析 (XRD) と赤外線分析 (FTIR) により biological apatite であることがわかり、ALP 染色と *in situ* hybridization により骨芽細胞であることが同定できる。これらの結果より、骨髄の培養により骨形成が生じたことが証明できる（文献5より改変）。

##### 図2

Dex の存在あるいは非存在下でのヒト骨髄間葉系幹細胞の培養。

Dex 存在下で高い ALP 活性と Osteocalcin mRNA が検出され、また星印にみられる細胞外基質が形成される。

##### 図3

骨再生におけるヒト骨髄間葉系細胞の増殖と骨芽細胞への分化過程。

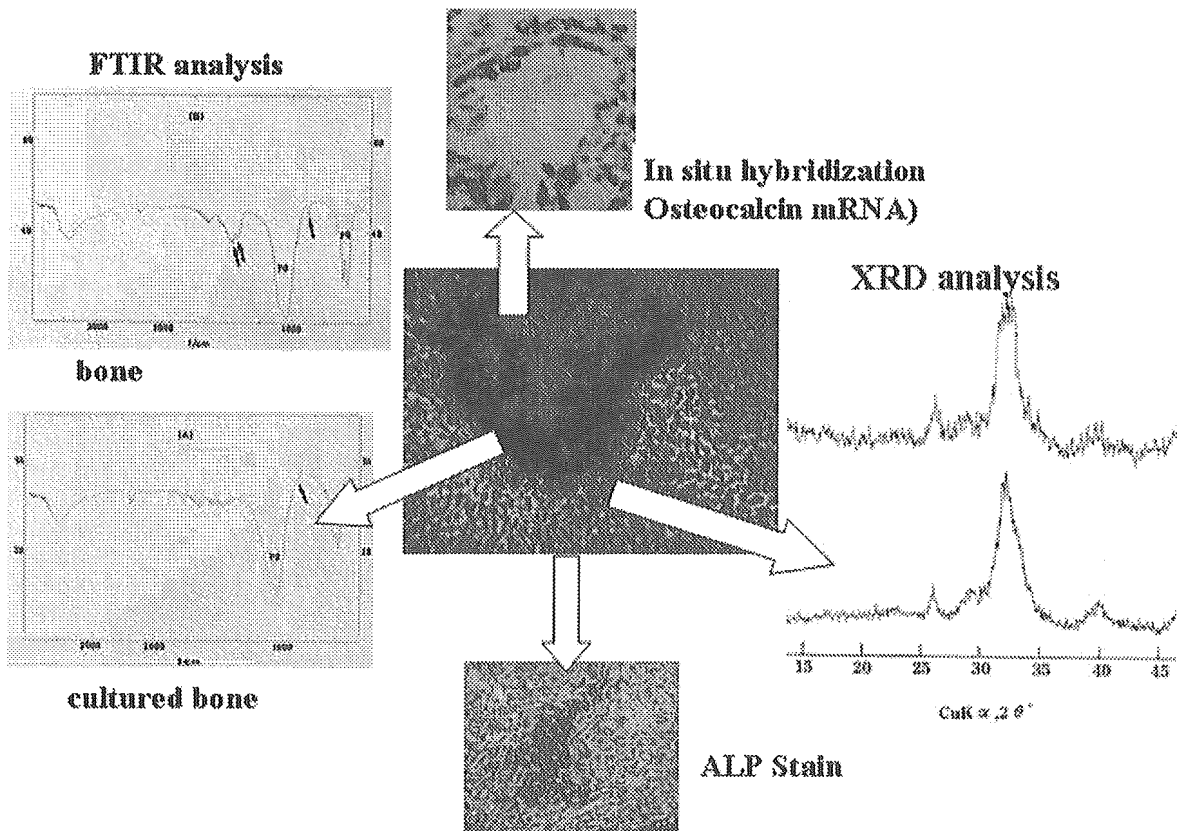
これらのプロセスに関しての我々の安全性対策の取り組み。

#### 参考文献

1. Ohgushi H, and Okumura M: Osteogenic ability of rat and human marrow cells in porous ceramics. :Acta Orthop. Scand., 61:431-434, 1990
2. Ohgushi H., Goldberg V.M., Calan A. I. : Repair of bone defects with marrow and porous ceramic. Acta Orhtop. Scand. 60, 334-339, 1989
3. Ohgushi H. Caplan A. I. : Stem Cell Technology and Bioceramics: From cell to gene engineering, J. Biomed Mat. Res 48 : 913-927, 1999
4. Ohgushi H. : Bioceramics, in McGraw-Hill Yearbook of Science &

Technology (The McGraw-Hill Co., New York), pp24-27, 2002

5. Ohgushi H, Dohi Y, Katuda T., Tamai S., Tabata S., Suwa Y. : In vitro bone formation by rat marrow cell culture, J. Biomed. Mat. Res 32:333-340, 1996
6. Ohgushi H, Dohi Y, Yoshikawa T., Tamai, Tabata S., Okunaga K. Shibuya T. : Osteogenic differentiation of cultured marrow stromal stem cells on the surface of bioactive glass ceramics, J. Biomed. Mat. Res 32:341-348, 1996
7. Yoshikawa T, Ohgushi H, Tamai S: Immediate bone forming capability of prefabricated osteogenic hydroxyapatite, J. Biomed. Mat. Res 32:481-492, 1996



☒ 1

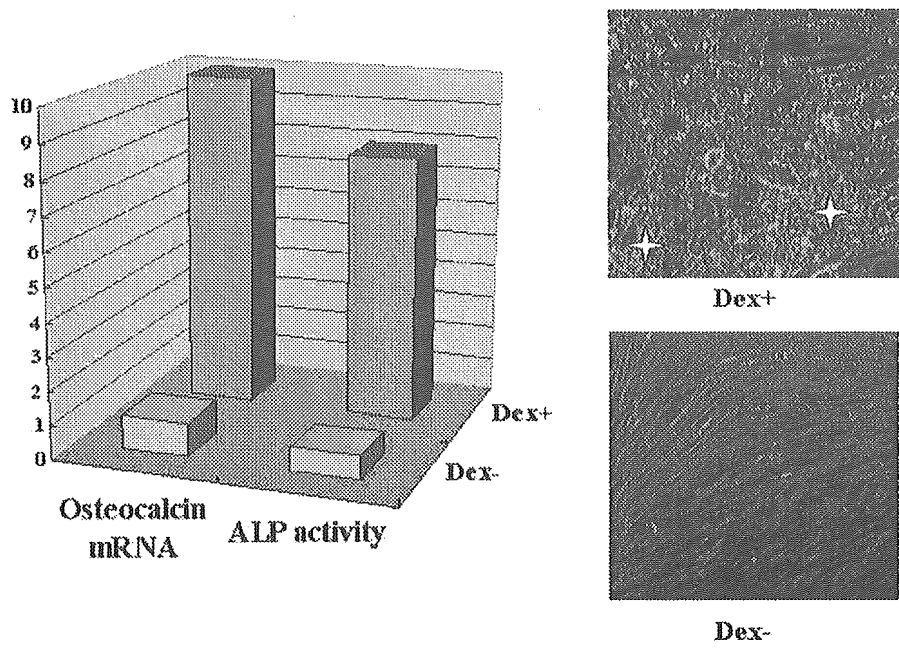


図 2

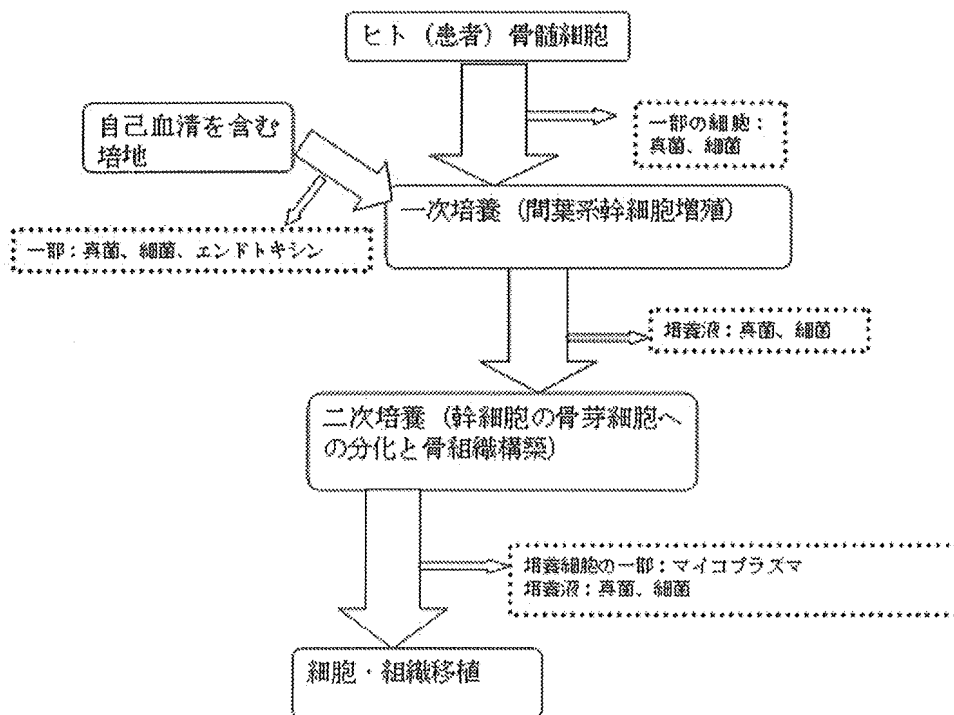


図 3

## 調査報告（４）

### 気管

（担当：聖マリアンナ医科大学形成外科 熊谷 憲夫）

#### 1. 臨床応用されうる細胞・組織医療用具の細胞ソース、作製法、移植法

##### 1) 気管上皮細胞

レシピエントよりの内視鏡下組織片採取。その後常法に従って培養。再生気管内腔にフィブリン糊を用いて塗沫により気管内腔への上皮組織の導入。一定期間の培養を経て移植。

##### 2) 線維芽細胞

レシピエントより一部採皮。その後常法に従って培養。一定期間の培養後、ゼラチン、コラーゲンデバイスでラップ、フィブリンデバイスによる塗沫、または気管 Scaffold への直接導入。一定期間の培養を経て移植。

##### 3) 気道平滑筋細胞

レシピエントよりの内視鏡下組織片採取。その後常法に従って培養。再生気管肉様膜上にフィブリン糊を用いて塗沫により導入。一定期間の培養を経て移植。

##### 4) 気管軟骨

レシピエントよりの内視鏡下組織片採取。その後常法に従って培養。気管軟骨 Scaffold にフィブリン糊を用いて導入。一定期間の培養を経て移植。

具体的には、平成 14 年神奈川県高

度技術支援財団助成研究 RSP 事業「ティッシュエンジニアリングによる組織再生の基礎的、臨床的研究」における「気管移植片の調整方法、気管移植片および凍結乾燥マトリックス片」（発明者；井上 肇、塚田久嗣、長田博昭、熊谷憲夫）聖マリアンナ医科大学、科学技術振興事業団共同特許出願に要約される。

7. 臨床応用実現までの期間  
おおよそ 5 年を予定

8. 臓器あるいは加工法に特異的な安全性確認事項、評価方法  
scaffold 作成過程における膠原線維（コラーゲンなど）の動物種の問題。細胞培養過程における特異的物質（ウシ胎児血清、下垂体抽出エキス、各種増殖因子）。Scaffold 原料に関する危険性について、膠原線維はレシピエント自身の材料を使う事で回避。または、ウシ以外の膠原線維抽出物質の利用（ブタ、トリ、魚類）により回避可能。培養に関する各種培養特異物質についてはヒト由来 Recombinant 因子の利用によって回避可能。細胞培養用の培地に関しては、遺伝子組み換えヒト由来増殖因子の利用と無血清化培地の利用で回

避可能。また先般問題のウシ由来プリオン汚染物質の回避については、アルカリ処理が特に有効であるとの報告より、接着因子や scaffold の材料としてアルカリ処理によるゼラチンを用いた Scaffold 作成により、今後問題が解決されると考える。現況、プリオン汚染に関してはトレーサビリティの充実によって対応する以外に方法は無いが、出願人工業技術院長昭和 60 年出願（平 4-25797）動物細胞培養組成物の製造法（発明者：笹井清二郎、梅本 貞則、藤本忠信）および出願人日本製薬株式会社平成 9 年特許出願（特開平 11-49611）プリオン不活化方法（発明者：梶原 康生、松尾宇人）の実用化による対応が現実的と考えられる。

#### 9. 臓器あるいは加工法に特異的な有効性評価方法

本分担に関しては、平成 14 年神奈川県高度技術支援財団助成研究 RSP 事業「ティッシュエンジニアリングによる組織再生の基礎的、臨床的研究」における培養された細胞の、生存性増殖性評価法の利用。（報告書提出期限平成 15 年 3 月 15 日）

#### 10. 臨床応用後の評価方法・評価期間

本分担に関して、内視鏡下目視観察による気管内腔の狭窄の有無。不良肉芽の増生の有無により判定。判定期間は、おおむね 2 年を想定。仮に不良肉芽増生による気管狭窄が観察された際には、用手法による内視鏡下アブレーションにより、呼吸管理が可能。

#### 11. 臨床応用後に発生しうる危険性・問題点

植埋気管の機能不全による気管狭窄。気管上皮再生遅延による喀痰核出不全。気管脱落。

気管脱落に関しては、唯一実用化された Neville 型人工気管のような生体低親和性素材の利用によって頻発していたが、現状この問題は生体への低親和性素材の利用にある事が判明し、現在生体親和性素材の利用によりほぼ解決。

一方、気管狭窄に関しては、scaffold の遺残期間によって解決可能であり、生体留置性の高い素材を用いる事で（架橋強度と架橋率）、生体吸収時間の調節を今後計る事で回避可能と考えられる。気管上皮再生遅延による喀痰喀出不全による気道閉塞は、ヒトの場合、繊毛運動機能改善ならびに喀痰粘稠低下性去痰薬の使用と咳嗽性喀出で回避出来ると考えられる。

聖マリアンナ医科大学で展開中の気管再生に関する研究概要を述べた。一方、京都大学再生医科学研究所では、マーレックスメッシュにスパイラルステント（ポリプロステント）を巻き付けた気管軟骨に相当するものの周囲にコラーゲンスポンジを付加し、これを動物に移植し好結果を得ている。気管上皮は気管切断端の両端から伸び、最終的に人工気管内が気管上皮で覆われているのを確認している。現在、臨床応用のため倫理委員会にかけられているとの報告である。

## 調査報告（5）

### 心筋・骨格筋・間葉系細胞・心臓弁

（担当：大阪大学大学院医学系研究科臓器制御外科 澤 芳樹）

#### <心筋・骨格筋・間葉系細胞>

1. 臨床応用されうる細胞・組織医療用具の細胞ソース、作製法、移植法  
臨床応用されうる細胞ソース：

筋芽細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞、骨髄単核球、血管内皮前駆細胞、ES細胞等

作成法：

筋芽細胞；大腿筋より筋肉組織を採取し、コラゲナーゼにて、筋芽細胞を単離

平滑筋細胞；血管を採取し、コラゲナーゼにて、平滑筋細胞を単離。

線維芽細胞；皮膚を採取し、コラゲナーゼにて、線維芽細胞を単離。

骨髄単核球；骨髄より骨髄細胞を採取し、遠心法にて単核球を採取。

血管内皮前駆細胞；末梢血より、血管内皮前駆細胞を採取。

ES細胞；ES細胞は、LIF (leukemia inhibitory factor) 非存在下で、細胞塊を作らせると胚様体 (embryoid body) と呼ばれる構造を形成し、1週間ほどで自律拍動する心筋細胞のクラスターが観察できるようになる。これを、移植用細胞に用いる。

移植法：needle injection；現在、筋芽細胞の細胞移植にて臨床にて行われている移植法。簡便ではあるが、移

植細胞の生着性に乏しい。

組織移植；単離したバラバラの細胞を、*vitro*にて組織化し、この組織を移植する方法。素材によっては、極めて生体適合性が良好であり、移植効率の向上が期待できる。

2. 臨床応用実現までの期間

国内では、血管新生効果を期待して、骨髄細胞単核球移植が、虚血性心疾患及び、閉塞性動脈硬化症を対象に行われている。国外では、虚血性心疾患を対象に、心筋再生を期待して、needle injection法による筋芽細胞移植が行われており、不整脈等を認める症例が若干認められるものの、概ね良好な結果である。

筋芽細胞移植は、国外において実施されており、アメリカFDAにて認可されたプロトコールが存在するため、needle injection法で行えば、1年で臨床応用されるものと思われる。また、組織移植（筋芽細胞シート移植等）は、2-3年後で臨床応用可能と考えられる。他の細胞ソースに関しては、その効果は勿論のこと、倫理的なハードルをクリアできれば、同時期で臨床応用可能と思われる。

3. 臓器あるいは加工法に特異的な安全性確認事項、評価方法  
現行で行われている筋芽細胞移植の場合、若干症例に不整脈の報告が認められる。よって、安全性の確認事項としては、移植した筋芽細胞、もしくは針による障害組織の癒痕が不整脈を誘発しないかどうか、検討を要するものと思われる。その評価方法としては、大動物において、ホルター心電計を装着し、致死性の不整脈が誘発されていないかどうか確認することと、移植部位に異所性電位が発生していないかどうか検討を要するものと思われる。また、筋芽細胞の場合、分化しても、骨格筋もしくは、心筋細胞であるため、特に問題とする必要はないと思われるが、未分化な骨髄細胞もしくはES細胞を移植した場合は、移植した場合が、骨細胞、脂肪細胞、もしくは teratoma 等に分化しないかどうか詳細な検討を要するものと思われる。

#### 4. 臓器あるいは加工法に特異的な有効性評価方法

重症心不全における細胞移植法の有効性の評価方法としては、心臓超音波による機能評価、CT、MRI 等による心筋組織評価、ホルター心電図による不整脈評価を行う。

5. 臨床応用後の評価方法・評価期間  
臨床応用後の評価方法として、以下の点を考えている。

1) 心機能評価：心臓超音波法。期間は、移植後 1-2 ヶ月は頻回に精査し、以後、半年、1、2、3 年後に評価を行う。

2) 組織評価：CT、MRI、心臓超音波 Tissue doppler 法による心筋組織性状評価。骨細胞、脂肪細胞等への分化のチェック。期間は、移植後、1 ヶ月に一回 3 ヶ月間行い、以後半年、1 年、2 年、3 年と評価を行う。

3) 不整脈評価：細胞移植後 2 ヶ月間定期的にホルター心電計を装着する。以後、半年、1、2 年後に、不整脈の評価を行う。

4) その他：肝機能、腎機能評価。血液検査により、各種主要臓器の機能評価を行う。移植後 1 ヶ月は頻回に、以後半年、1、2 年の単位で行う。

#### 6. 臨床応用後に発生しうる危険性・問題点

臨床応用後に発生しうる危険性、問題点を列挙する。

筋芽細胞移植；

- 1) 致死性不整脈の発生
- 2) 細胞培養の際、牛血清を使用するため、未知のウイルス等への感染。
- 3) 大量の細胞数を必要とするため、細胞数をかせぐのに、時間がかかり、急性疾患に対応できない。
- 4) 大量の細胞数を要するため、コストが割高になる可能性がある。

骨髄単核球移植；

1) 心収縮を阻害するような細胞(骨細胞、脂肪細胞等)に分化する可能性あり。

2) 細胞を採取し、単核球にするのに時間がかかり、急性疾患に対応できない。

ES 細胞；

1) 倫理面での問題

2) 心収縮を阻害するような細胞、腫瘍(teratoma 等)に分化する可能性がある。

3) 細胞数を稼げない。

## <心臓弁>

### 1-1. 臨床応用されうる組織医療用具の作成法

①生体分解性高分子を用いた心臓弁  
生体分解性高分子(polylactic acid, polyglycolic acid, poly-caprolactone 等, およびこれらを組み合わせた組成)を心臓弁状の鑄型に注入し, 加工作成する。

②脱細胞化生体弁  
同種凍結保存弁あるいは異種(ブタなど)の動脈弁を界面活性剤等で処理することにより抗原となりうる細胞を除去し, 脱細胞化生体弁を作成する。

### 1-2. 臨床応用されうる細胞ソース

①自己血管壁細胞  
自己の表在静脈を採取し, 血管壁細胞である血管内皮細胞および平滑筋細

胞を単離培養後に scaffold に播種する。

### ②自己骨髄細胞

骨髄穿刺によりえられる自己骨髄細胞をそのまま, あるいは培養後に scaffold に播種する。

### ③血管内皮前駆細胞

血液中の CD34 陽性細胞を磁気ビーズなどを用いて回収し, 培養後に scaffold に播種する。

## 1-3. 組織医療用具の移植法

自己細胞播種後, さらに培養後あるいは細胞播種なしで, 大動脈弁位あるいは肺動脈弁位に弁置換として移植する。

## 2. 臨床応用実現までの期間

生体分解性高分子を用いた心臓弁は, 東京女子医大でその一部を血管補填用パッチとして臨床応用している。また, 脱細胞化生体弁は欧米で臨床応用され始めている。今後, 本邦で心臓弁として臨床応用されるには2~5年を要すると推測される。

## 3. 臓器あるいは加工法に特異的な安全性確認事項, 評価方法

### ①無菌であること

scaffold 作成過程あるいは細胞培養過程において, 適切な滅菌あるいは無菌操作を行うことにより contamination を防がねばならない。



各過程において細菌培養検査が必要。  
②生体有害物質の残留がないこと  
scaffold 作成過程において有機溶媒、界面活性剤等の生体有害物質を使用するため、それらの残留がないことを確認。使用物質の生化学的定量検査を行う。

#### 4. 臓器あるいは加工法に特異的な有効性評価

##### ①組織再生の評価

組織学的評価およびタンパク分析。

##### ②免疫反応の評価

組織学的評価および免疫反応物質定量。

##### ③石灰沈着の評価

組織学的評価および原子吸光度計を用いた組織内カルシウム定量。

##### ④耐久性の評価

Mechanical testing および Accelerated wear testing による組織耐久性の評価。

##### ⑤弁機能評価

大動物実験において心臓超音波検査で弁機能の評価。

#### 5. 臨床応用後の評価方法・評価期間

心臓超音波検査および心臓カテーテル検査にて定期的に弁機能および心機能を評価。

自己細胞による組織再生(自己化)をコンセプトとしており、半永久的に使

用可能な心臓弁を目標とする。そのため現在使用されている生体弁の耐久期間(10~15年)を超える評価が必要。

#### 6. 臨床応用後に発生しうる危険性・問題点

##### ①弁機能不全

免疫反応あるいは組織再生不良、石灰沈着等による弁尖部の劣化とそれに伴う弁機能不全。

##### ②弁サイズの不マッチ

細胞培養播種を要する場合、準備した弁と実際に使用すべきサイズに不マッチを生じる可能性がある。また小児例に使用する場合、体の成長に伴う弁の相対的狭小化が解決できる(弁組織成長の可能性のある)ものを開発する必要がある。

##### ③未知の感染症

同種あるいは異種生体弁を材料とする場合、未知の感染症の危険性は否定できない。

## 調査報告（6）

### 角膜・網膜

（担当：東京歯科大学市川総合病院・角膜センター長 篠崎 尚史）

#### 1. 臨床応用されうる細胞・組織医療用具の細胞ソース、作製法、移植法

角膜における細胞・組織由来医療用具の分野で研究が進められている方向性については、角膜上皮を修復するもの、角膜上皮細胞の基底膜であるポーマン膜と上皮細胞を修復するもの、角膜上皮+実質を修復するもの、角膜内皮細胞を修復するもの、全層角膜を修復するものに大別される。

角膜上皮細胞のみを修復する上皮細胞シートは、片眼性の疾患では、健常眼の幹細胞を用いて治療可能であるが (Auto-graft)、症例数も多い両眼性の疾患ではドナー角膜輪部からの培養 (Living related, もしくは Allo-graft) による方法が用いられる。作成は環境可溶性の材料をディッシュにコートした上に細胞培養して、アプリケーションとなるシートを培養細胞上に付着させて、細胞シートを環境変化により剥離して、角膜表面に付着させる方法を取る。内皮細胞シートも同様の方法で作成されるが、現時点での内皮細胞の培養は、通常、分裂、増殖しないヒト角膜内皮細胞を、フィーダーセルを使用して培養、増殖させる方法と動物血清培地で培養させる方法が取られている。

上皮細胞と基底膜を構築する場合には、代替基底膜と細胞という、二つのリソースを必要とする。まず、基底膜として想定されるものは、(1) 帝王切開時に提供していただく羊膜と、(2) バイオポリマーを用いた人工基底膜が挙げられる。また、角膜再生に用いる細胞ソースとして考えられるのは、(1) ドナーより分離した上皮、および内皮とその幹細胞、(2) 本人、および親族より分離した上皮幹細胞、(3) ES細胞を分化誘導させた上皮、および内皮。(1) および(2) についてはすでに臨床実績があるため、今後は幹細胞の分離培養が目標となっている。現状では、幹細胞を、ドナー角膜輪部をレンテイクルとして移植しているが、上記の代用基底膜上に培養して、上皮を構築した後に移植する方法での、上皮修復医療用具が臨床段階に入っている。

現状での角膜上皮細胞、および角膜内皮細胞ソースは、Auto、ならびに Living-related 以外の場合においては、臓器の移植に関する法律により角膜移植に用いられる眼球の焼却が義務付けられているため、主に米国から輸入されるアイバンクアイから得られる細胞が利用されている。羊膜は研

究機関の産婦人科の協力を得て、IC後に帝王切開時の胎盤の提供を受ける。また、口腔粘膜については、現状での採取は患者自身から採取されており、微生物学的コンタミネーションが検査される。将来的に企業化される場合には、口腔粘膜においても Allo の採取が計画されている。Allo 細胞、組織の提供に際して行われる検査項目は以下の組織提供に準じたものとなっている。

#### ドナーの適応基準

特定の疾患又は状態にドナーが該当する場合には、ヒト組織を採取あるいは利用してはならない。また、ドナーに対する詳細な視診、触診を可能な限り行い、問診を行う。あわせて診療録の確認を行うこと。

また、問診、検査等の項目及びその方法については、感染症に関する新たな知見及び学問・技術の進歩に鑑み、その方法について随時見直しを行うこと。(なお、基準の見直し、移植に係る感染症情報の収集、評価等について、関係学会等の専門家による協力・参画が望まれる。) 以下のごとき疾患により死亡した者、或いは原因不明のままの死亡した者からの組織採取を禁止する。と、されている。

#### 〈組織提供者の除外項目〉

- ・原因不明の死亡
- ・敗血症あるいは全身性感染症

・Creutzfeld-Jakob 病(変異型を含む)とその疑い (別記 1 参照)

・悪性腫瘍 (原発性脳腫瘍や固型癌などで手術後 5 年を経過し、完治したと判断される者では組織採取医の判断に委ねる)

・白血病、悪性リンパ腫などの血液腫瘍

・重篤な代謝・内分泌疾患、血液疾患や膠原病などの自己免疫疾患

・梅毒検査陽性、TPHA

・B 型肝炎 (HBV)

・C 型肝炎 (HCV)

・ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染症

・成人 T 細胞白血病 (ATLA, HTLV)

・パルボウイルス B19 感染症 (別記 2 参照)

・西 (ウエスト) ナイルウイルス感染症 (別記 3 参照)

・その他各組織特有の採取除外条件に合致する者

上記感染症を問診及び検査 (血清学的試験や核酸増幅法等) により否定すること。また、サイトメガロウイルス感染及び EB ウイルス感染については必要に応じて検査により否定すること。

(別記 1)

2001 年 6 月以後、変異型 Creutzfeld-Jakob 病 (vCJD) の感染可能性を除外するため、新たな事実の発見や規制の変更が行われるまで以下

の既往を有するドナーからの組織提供を受けないものとする。

(1) CJD の症状である痴呆や原因不明の中枢神経症状を有するもの

(2) 血縁者に CJD および類縁疾患と診断された人がいる

(3) 人由来成長ホルモンの注射を受けたことがある

(4) 角膜移植を受けたことがある

(5) 硬膜移植を伴う脳外科手術を受けたことがある

(6) 海外渡航歴の把握を努め、当分の間の予防措置として1980年以降、英国、アイルランド、スイス、スペイン、ドイツ、フランス、ポルトガル、オランダ、ベルギー、イタリアなどのヨーロッパ諸国に通算6ヵ月以上の滞在歴を有する者からの提供を見合わせる

(別記2)

旧厚生省医薬安全局通知ではパルボウイルス B19 が肝炎や HIV と同列に並べられ「否定すること」とあるが、幼時期感染の高い疾患であるため、陽性と判断する基準（凝集法、PCR 法）が必要と考えられる。また、本ウイルスは赤血球に親和性が高く、組織中にどの程度存在するのかよく分っていない。

(別記3)

CDC（米国疾病対策センター）はウエストナイルウイルスが輸血や臓器移

植によって感染すると報告した。これに伴い、2002年11月以後当面の間、組織提供前、1ヶ月以内の米国等のウエストナイル熱流行地への渡航歴がある場合には注意深く問診を行うこととする。

以上が、組織採取に関する使用禁忌である。

作成法：

現在、進行しているグループにより wet な状態で使用される場合と、凍結乾燥される場合に分けられる。Wet で羊膜を使用しているグループでは、羊膜から羊膜上皮を物理的に除去した後、安全キャビネット中にて 3T3 細胞をフィーダー細胞として、ディッシュ上に上皮側を上向きにして置く。5 分間エアードライした後、4  $\mu$ g/ml のマイトマイシン C 中で 2 時間培養後、海外ドナー角膜の角膜輪部から角膜上皮幹細胞、もしくは Progenitor 細胞の存在する角膜上皮細胞を Polycarbonate Basement Culture 上に置かれた羊膜上に培養し、血清培地（SHEM）中にて、CO<sub>2</sub> 培養を 3～4 週間行う。角膜上皮細胞がコンフルエントになった状態で、安全キャビネット内で倒立顕微鏡により細胞の形状ならびにコンフルエンシーが確認される。培養液が細菌検査用に採取され、新規の培養液（無血清 SHEM）が添加された後、ディッシュから剥離される。