

200500195A

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

再生医療の実用化のための安全性・効率性に関する基盤技術の整備

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 上田 実

平成18(2006)年 4月

目 次

I. 総括研究報告

再生医療の実用化のための安全性・効率性に関する基盤技術の整備 上田 実	1
--	---

II. 分担研究報告

1. 自動培養装置および安全性評価機能を備えた細胞供給システムの開発 各務 秀明	10
2. 画像処理技術を用いた培養細胞の動的評価法の開発 紀ノ岡 正博	14
3. 情報処理理論を用いた細胞培養の効率化 本多 裕之	17
4. 間葉系幹細胞の分化に関する分子生物学的, 細胞生物学的評価 木全 弘治	20
5. 自動培養装置の開発・LOH解析による培養細胞のがん化検出システムの開発 鈴木 力	22

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	25
---------------------	----

再生医療の実用化の安全性・効率性に関する基盤技術の整備

主任研究者 上田 実 名古屋大学大学院医学研究科頭頸部・感覚器外科学講座 教授

研究要旨

培養細胞を用いた初めての臨床例が報告されて以来約20年が経過し、臓器移植や人工材料による治療に代わる新たな医療として、培養細胞を用いた再生治療には大きな期待が寄せられている。治療対象や症例数はますます広がる傾向にあり、一部はすでに臨床研究から実用化の段階に達しているが、その反面安全性や製品の品質管理に関する基礎研究は必ずしも十分とはいえない。本研究は、再生医療に必要とされる培養細胞の安全性、品質の確保と培養過程の効率性に関する基盤技術の確立をめざすものである。ヒト患者細胞（線維芽細胞）の無血清培養では、基礎培地のみで細胞増殖は見られなかったのに対しE1DF培地等の無血清培地では10%FCS添加培地と比べ、約1.3-foldと同等以上の細胞増殖能を確認した。また、自己血清（5～20%自己血清）を用いた培養では濃度により影響されず、FCS10%添加培地とほぼ同等の細胞活性が得られた。培養細胞の安全性、安定性を確保するための評価方法については、動画細胞評価として細胞観察システムを構築し、ヒト角化細胞の挙動観察を行った。結果、2個の細胞が接した状態での回転運動は、通常酸素濃度（21%）に比べて極低酸素濃度（0.2%以下）では、寿命に伴って減少しないことが示され、動的評価技術での細胞寿命を非接触で評価できる可能性が示された。一方、現在行われている細胞の培養、管理には熟練と労力、そして特殊な施設が必要とされるため、自動培養装置や情報処理技術を応用した安全かつ効率的な細胞供給システムの開発を行った。

分担研究者

各務 秀明 名古屋大学医学部組織工学講座 助教授
紀ノ岡 正博 大阪大学大学院基礎工学研究科・化学工学領域 助教授
本多 裕之 名古屋大学大学院工学系研究科 バイオテクノロジー講座 生物プロセス工学グループ 教授
木全 弘治 愛知医科大学分子医科学研究所 教授
鈴木 力 株式会社日立メディコ技術研究所 主任技師

のできない課題と考えられる。

一方、臨床応用が進められる中で新たに理解されてきた問題もある。実際の臨床で対象となる患者はさまざまな背景を持ち、採取可能な細胞や組織も動物実験ほどには均一にすることができない。われわれが臨床で経験する細胞培養の過程でも、増殖能や、形態に個体差が見られることがあるが、これらの変化をどの程度許容できるのか、あるいはどのように評価すべきなのかといった報告はない。したがって、増殖能や形態に見られる差位と細胞生物学的な特徴、そして治療効果とを結びつける研究の必要性が痛感される。本申請では培養細胞の品質確保のためにこれら基礎的研究を行う。

現在行われている細胞培養操作は人手に頼っており、さらに安全性確保のために高額な施設と管理のための膨大な労力が必要とされている。そのため、再生医療は高額な医療とならざるを得ない現実があり、現在のシステムのままでは高額な医療費を負担することができる一部の患者のための医療となることが懸念される。しかしながら、将来は疾患によっては再生医療以外に治療方法がないといった場合も想定され、特殊な治療を除いては、より多くの患者が再生医療の恩恵を受けられるようにな

A. 研究目的

本研究の目的は、再生医療に必要とされる培養細胞の安全性、品質の確保と培養過程の効率性に関する基盤技術を確立することである。

再生医療の対象患者はますます増加しており、対象疾患もいわゆるlife threatening diseasesから日常的な疾患まで拡大されつつある。したがって、細胞を用いた治療に問題が発生した場合には、これまで以上の大きなインパクトを与えることが予想され、感染防止やがん化の検出など再生医療の安全性の確保は、まさに待つこと

るべきである。本研究では、安全性を確保しつつも効率的な培養方法の開発を行い、治療コストの削減を目指す。

本研究を通じて、安全性や品質管理において現時点で考え得る最良の手段を開発・提供することが目的である。本研究によって、今後細胞を用いた再生治療が幅広い臨床現場へ導入され、科学的な根拠を持った評価や品質管理が行われることが期待される。また、臨床から得られる情報と工学的情報処理技術とを統合することで、効率的培養システムが確立されるものと期待され、再生医療が多くの国民の健康に奉仕するものになるものになると考えている。

B. 研究方法

初めに、培養細胞の安全性に関する検討として無血清・自己血清を用いた培養の検討を行う。これまで、一部の無血清培地は、適切な培養表面条件との組み合わせで血清入り培地と同様の増殖を得られる可能性が示唆されている。しかしながら、実際の患者からの細胞を用いた場合の結果については情報は限られている。このため、患者からの初代培養の細胞を用いて、無血清培地における増殖能や細胞のキャラクターなどの基礎的検討を行う。また、安全性確保のためには、動物由来ではなく自己血清を用いた培養が重要な選択肢であるが、個体差が大きい自己血清を用いて、どの程度安定して細胞培養が可能かについては十分なデータがない。本研究では、同意の得られた再生症例では患者の自己血清を採取し、FBSとの比較を行う。

次に、培養細胞の機能や安全性を評価する上で、非接触形式で動的および静的に細胞を診断する技術の開発が重要な課題である。動的評価では、培養中の細胞を非破壊で評価することが可能であり、実用的な再生医療の提供の場に適している。本研究課題では、画像処理技術を用いた細胞モニタリング法を利用して、培養中に細胞の移動度、密度、増殖度、細胞面積、外部刺激に対する面積変化、回転運動等の画像情報から、エンドポイントとしての静的評価法・機能的評価の結果と対比させることで、培養細胞の分化度や機能異常を検知することを目標とする。

再生医療の治療用細胞において、安定した品質の細胞を供給することは非常に重要である。特に、「目的外の細胞への分化の可能性」は、細胞の品質を考える上で、重要な問題であり、効率的な分化方法の開発とともに、特に幹細胞からの分化メカニズムの解明は重要な課題である。基礎的検討として、分化に影響を及ぼす細胞外マトリクスの検討を実際の臨床応用を視野に入れて検討を行い、将来的には動的評価として検討した情報と、分子

生物学的、細胞生物学的、および移植による組織学的評価とを結びつけ、比較検討することによって培養細胞の分化を診断する方法の確立を目指す。

現在再生治療に用いる細胞は、ほとんどが手作業で培養されているが、ヒューマンエラーによる各種汚染の問題と、人の経験に頼った各種工程が産業化の障害となっている。このような非効率的な培養工程の課題を解決すべく、完全閉鎖系自動培養装置の開発を行うと共に、評価システムと情報処理技術を組み合わせた、統合的な安全で効率的な培養システムの構築を試みる。細胞培養の効率性向上のためには、現場の作業者の判断による曖昧かつ複雑な培養条件(培養期間・細胞播種濃度・作業工程の調製)を自動化する情報処理技術の開発として、情報処理多変量解析による培養条件の最適化と培養工程を管理するソフトウェアの開発とを行う。

(倫理面への配慮)

本研究におけるヒト組織の取り扱いについては、組織採取を行う場合、治療(手術時)に余剰となったものを利用することを原則に、該当患者に書面および口頭で十分に説明し同意を得た。さらにこれら説明文、同意書については名古屋大学倫理委員会にて承認されたものを用いた。また、採取したすべての組織については、患者プライバシーの保護のためドナー情報は秘密にて行うこととした。また、動物実験については名古屋大学動物実験指針に基づき、学内動物実験委員会にて承認された内容を遵守して行った。

C. 研究成果

1. 無血清・自己血清培養の臨床的基礎検討

無血清培地であるE1DFを用いて、初代培養および継代後の細胞について、DMEMおよび各種濃度の血清との組み合わせで増殖能を検討した。結果、患者の同意を得た採取したヒト細胞(線維芽細胞)の培養では、10%FCS添加DMEM培地に対し、基礎培地のみでの無血清培養では細胞増殖は見られなかったが、E1DF培地では皮膚・歯肉由来線維芽細胞共に(1.15~1.3-fold)と同等以上の増殖能を確認できた。E1DFに3%の血清を加えると、最も良い結果が得られた。即ち基礎培地内では不十分な成分を補給した無血清培養の臨床現場への導入の有効性が示唆された。

しかしながら、初代培養において十分な増殖能が得られないことを考慮すれば、直ちに現行の培地と置き換えることは困難であり、今後は初代培養を可能にするその他の無血清培地、および培養皿のコーティング等の組み合わせについて検討が必要である。

一方、自己血清による培養とFBSによる増殖能の差を

同一個体由来の線維芽細胞を用いて検討した。FBSと自己血清による増殖の差を3名の患者で比較した結果、10%の自己血清により、FBSと同等以上の増殖が得られることが明らかになった。しかし、同培養期間における同細胞の増殖率が、患者血清（28歳、30歳、33歳）による差として最大2.0倍異なることがわかり、このような個体差の影響による細胞調製工程の変動を制御するための工程最適化システムが臨床現場で重要であることが課題として再認識された。

2. 動的細胞評価法の検討

初めに、動画評価を実施するための細胞観察システムのハード（照射装置、ステージ）および取得ソフトを改良し、3つのT-フラスコ中の18点を5分毎に画像取得可能なシステムを構築した。このシステムを用いて、ヒト角化細胞の挙動観察（動的評価）を行ったところ、2個の細胞が接した状態での回転運動が観測された。この回転速度という細胞評価基準の妥当性を検討するため、通常酸素濃度（21%）と極低酸素濃度（0.2%以下）の条件下における角化細胞の回転速度を測定したところ、通常酸素濃度下では累積分裂回数の増加とともに回転速度が低下したが、極低酸素濃度下（悪環境）での培養では寿命に伴う回転速度の著しい低下は見られないことが確認された。回転速度を指標とする運動性評価が細胞活性評価の一つとして有効であることが示された。さらに、回転運動能力と細胞伸展能力の組み合わせ評価により、角化細胞の継代培養中に、細胞寿命を非襲撃的に評価可能であることを確認した。

従来の細胞評価は一部の細胞を観察し培養全体の代表値として扱う平均値比較（有意差判定）や単純相関評価であったがデータの差異を見出すことが困難であるという課題がまだ残っている。このため、今後は多重相関評価、抽出挙動評価、on-off評価を導入することによって品質予測の精度向上を目指す。また、しかし、本研究で示した回転速度計測は寿命予測に有効な動的評価手法であるが、さらなる精度向上と汎用性を得るために、今後は準静的評価手法による細胞運動評価を試みる。

3. 細胞分化に及ぼすマトリックスの基礎検討

再生医療の実用化のためには、培養細胞の分化を制御する技術の開発が重要である。間葉系幹細胞を用いた骨、軟骨の再生はすでに臨床応用されているが、実用化のためには、培養細胞の分化が安定して行われる必要がある。これには、細胞の分化を制御し、常に一定の細胞の性質が得られる仕組みを構築する必要がある。本年は、マトリックス成分が細胞の分化に与える影響について検討を行った。

BMPまたはdexamethasoneとPTHの添加により軟骨細胞へと分化する時、また軟骨分化には高細胞密度が必要であるが、これらの軟骨誘導条件では、かならず大型コンドロイチン硫酸プロテオグリカンであるPG-M/versicanの合成とマトリックスへの蓄積を伴うことを、つまり必須であることを、初めて明らかにした。

ついでPG-M/versicanの軟骨分化における重要性はその結合グリコサミノグリカンであるコンドロイチン硫酸鎖部分であることを、まず発現する4種類のスプライズドフォームをもつPG-M/versicanの中、結合コンドロイチン硫酸鎖本数の高い潜在能力を持つものが発現されていることから予測し、結合コンドロイチン硫酸鎖部分を特異的に消化分解すると軟骨分化程度の低下を招くこと、またコンドロイチン硫酸鎖の人工的合成イニシエターになり、従って本来のプロテオグリカン結合コンドロイチン硫酸鎖の結合量を抑制する β -キシロシドを培地に添加することにより、軟骨分化への抑制が観察されたことから、上記の予測、つまり結合コンドロイチン硫酸鎖部分が軟骨分化に必須であることを証明した。

さらに他の細胞外マトリックス分子の分布への影響の検討から、コンドロイチン硫酸鎖を持つPG-M/versicanはヒアルロン酸、フィブロネクチンなどのマトリックス分子と結合し複合体を形成して軟骨分化に有利に作用することも明らかにした。

4. 情報処理技術を用いた培養効率化の検討

培養状況の予測システム開発としては、H17年度は臨床におけるヒト細胞の挙動のデータ蓄積を中心に行った。これは培養状況予測の情報処理において、予測精度の高いモデルを構築するためには、データ数はより多い方が望ましいためである。これまで臨床研究で得た20例の患者（皮膚由来線維芽細胞 10例、歯肉由来線維芽細胞 10例）の培養細胞と条件、増殖、マーカー分子の発現、臨床成績などをデータベース化しており、現在も臨床研究の中で培養データを継続蓄積中である。今後は、これらの2日後、5日後の細胞数、細胞増加率を入力データとし、出力データを7日後細胞数としたデータセットを用いて、どのタイミングでどのような細胞播種密度で細胞の準備を行うかをシミュレーションするモデル構築を行う。

(i) 培養工程の管理システム：

培養効率化のためには、実際の細胞調製施設における細胞供給シミュレーションから作業者の工程・予定を情報処理的に管理する新たなシステムを構築することが重要であり、限られたスペースと人材を無駄なく活用することで、効率化を図るのみでなく、培養操作中に起こり

うるあらゆるヒューマンエラーを回避することが期待される。このため、細胞調製施設1室、作業員3名、医師1名という細胞治療体制を仮定し、各作業員がイントラネットで自分の作業内容を公開・確認し、これを作業責任者・医師が確認できる管理ソフトウェアをASP形式にて作成した。工程管理は、通常人の経験に基づいて管理者が行っており、人による自在な判断が必ず必要ではないかと当初は考えられた。しかしながら、細胞調製のプロトコルを「重要度」を設けてレベル分けし、日程をずらすことができる工程と日程をFixすべき工程とを分別して管理すること、最終調整量に応じてプロトコルを3パターンに分けてこれを選び分ける手法を導入することで、ヒト細胞の培養のような個体差の影響を大きく受ける調製工程を効率的に管理できることを確認した。結果として、人がスケジュール管理し、医師との疎通を頻繁に行わなくてはならなかった調製工程が大幅に簡易化され、作業効率の向上が確認された。さらに、各試薬の使用データおよび、作業員の履歴をバーコードデータ入出力により管理するソフトウェアを導入したことで、記録を確実に残す安全性の高い作業が達成され、作業の効率化が図られた。

5. 自動培養装置開発と評価

自動培養装置を用いた購入ヒト正常細胞の培養では、19日間の継代培養（自動培地交換3日間隔）を経て、1培養皿から 3.0×10^7 cellsを得ることができた。この細胞数は、例えば皮膚修復に用いる場合を想定すると、約1.5回分の数であるため、正常ヒト線維芽細胞を長時間全自動で培養できることが示された。さらに、この培養における細胞の形態は画像から正常であり、回収細胞の生存率も90.7%と非常に高いことが明らかとなった。

また、組織片からの初代培養を想定した培養装置を用いた初代培養では、偏りのある増殖ではあったが、 $1.82 \sim 2.3 \times 10^7$ cellsを2例のヒト線維芽細胞を歯肉片より回収できることを確認した。回収された初代培養細胞は、88%という生存率であり形態的にも、通常の手培養と同じような細胞を得られていた。

結果、本研究で開発された自動培養装置は線維芽細胞などの他種類の細胞を目的細胞数まで自動培養でき、人的作業を大幅に削減できることが確認された。今後は、培養した細胞の安全性評価を組み込むことで、さらに完成度の高いシステムを構築することが課題である。

6. 臨床研究の追跡調査について

名古屋大学における間葉系幹細胞による骨再生治療は約50症例を終えており、これまでの症例では現在ま

で重篤な副作用は認めていない。経過観察期間は最長で4年6ヶ月であった。

線維芽細胞の注入による皮膚再生治療では、15例中1例で発赤を認めたが、3日以内に自然消退した。それ以外の明らかな副作用は認めていない。経過観察期間は最長で9ヶ月である。

培養操作に関する問題として、ヒト線維芽細胞の培養において、45回培養中2回コンタミネーションの可能性があり、細胞を廃棄した。うち一回は細胞調製操作的に発生した菌による汚染と思われる。残る一回は、肉眼的には確認されていなかったがPCRによるマイコプラズマ検出により10個のフラスコの中で1個検出。検出結果的には擬陽性とも思われたが、大事をとって陽性サンプルは廃棄した。それ以外に培養中・培養後の検査にて異常は見られていない。

D. 考察

ヒト患者細胞（線維芽細胞）の無血清培養では、基礎培地のみで細胞増殖は見られなかったのに対しE1DF培地等の無血清培地では10%FCS添加培地と比べ、約1.3-foldと同等以上の細胞増殖能を確認した。また、自己血清（5～20%自己血清）を用いた培養では濃度により影響されず、FCS10%添加培地とほぼ同等の細胞活性が得られた。しかし、同期間における同一細胞の増殖率が、患者血清によって最大2倍もの差が生じることが明らかとなり、個体差の影響を考慮したシステムにおける課題が明らかとなった。しかしながら、自己血清を用いた培養は増殖の差はあれほとんどの患者で利用が可能であり、これは間葉系幹細胞および線維芽細胞双方とも同様であった。少なくとも無血清培地の安全性が確認されるまでは、自己血清を用いた培養のプロトコルは十分臨床に耐えられるものと考えられた。

動画細胞評価としては、細胞観察システムを構築し、ヒト角化細胞の挙動観察を行った。結果、2個の細胞が接した状態での回転運動は、通常酸素濃度（21%）に比べて極低酸素濃度（0.2%以下）では、寿命に伴って減少しないことが示され、動的評価技術での細胞寿命を非接触で評価できる可能性が示された。しかしながら、形態と機能を結びつけることで細胞の動的評価を行う研究は始まったばかりであり、蓄積されたデータも不十分である。今後本研究を続けることで、より有用な情報が提供できるものと考えている。

また、情報処理解析を用いた培養効率化のため、20名の患者細胞の経時的増殖・活性データを蓄積し、モデル化のため細胞活性・治療効果との対応を行っている。データ数が確保されれば、これまで細菌などの工業化に有

効であった手法が、ヒト細胞に応用可能であることが示されるものと考えている。

H17年度の本研究では、再生医療を実用化するための培養システム作りとして「培養条件の低コスト化」「非接触品質評価指標」「情報処理による培養効率化」のための基礎データを蓄積できた。今後は、各研究課題で得られた成果を相互に結びつけ、より総合的な効率化システムを構築することを課題とする。

E. 結論

今年度の各研究を通じて、再生医療実用化を一つのキーワードとして、品質・安全性の管理のための基礎検討を行った結果として、統合的なシステムのために核となる手法・装置・基準・技術を確立できたと考えられる。しかしながら、まだ各分担研究はその技術を相互に応用・活用できていない。このため、次年度の課題としては各研究で得られた成果を複合的に組み合わせた総合的研究を行い、汎用性が高く臨床現場のニーズを反映した細胞評価方法の検討と、低コスト化のための効率的培養システムの確立を目指す。

F. 健康危険情報

本研究において国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす事項は発生していない。

G. 研究発表

1. 論文発表：

M. Ueda, Y. Yamada, R. Ozawa, Y. Okazaki : Clinical Case Reports of Injectable Tissue-engineered Bone Applied for Alveolar Augmentation with Simultaneous Implant Placement, The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry 25 (2), 129-137, 2005

H. Maeda, T. Kasuga, M. Noagami, M. Ueda : Preparation of bonelike apatite composite for tissue engineering scaffold, Science and technology of Advanced Materials 3, 48-53, 2005

K. Ito, Y. Yamada, T. Nagasaka, S. Baba, M. Ueda : Osteogenic potential of injectable tissue-engineered bone: A comparison among autogeneous bone, bone substitute (Bio-oss), platelet-rich plasma, and tissue-engineered bone with respect to their mechanical properties and histological findings, 15, 64-72, 2005

K. Hamamura, Keiko. Furukawa, T. Hayashi, T. Hatto

ri, J. Nakano, H. Nakashima, T. Okada, H. Mizutani, H. Hattori, M. Ueda, T. Urano, K. O. Lloyd, Koichi Furukawa : Ganglioside GD3 promotes cell growth and invasion through p130Cas and paxillin in malignant melanoma cells, PNAS, 102 (31), 11041-11046, 2005

K. Hamamura, K. Tanahashi, K. Furukawa, T. Hattori, H. Hattori, H. Mizutani, M. Ueda, T. Urano, K. Furukawa : GM1 expression in H-ras-transformed NIH3T3 results in the suppression of cell proliferation inducing the partial transfer of activated H-ras from non-raft to raft fraction, International Journal of Oncology, 26, 897-904, 2005

H. MJ, Sumita Y, Ueda M : Histological and Immunohistochemical studies of tissue engineered odontogenesis, Arch Histol Cytol 68 (2), 89-101, 2005

M. Murata, M. Momose, K. Okuda, Y. Ninagawa, M. Ueda, H. Yoshie : Immunohistochemical Localization of Cytokeratin 19, Involucrin and Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) in Cultured Human Gingival Epithelial Sheets, International of the International Academy of Periodontology, 7/4, 129-134, 2005

A. Ito, K. Ino, M. Hayashida, T. Kobayashi, H. Matsumura, H. Kagami, M. Ueda, H. Honda: Novel Methodology for Fabrication of Tissue-Engineered Tubular Constructs Using Magnetite Nanoparticles and Magnetic Force : Tissue Engineering, 11, 2005

A. Ito, E. Hibino, C. Kobayashi, H. Terasaki, H. Kagami, M. Ueda, T. Kobayashi, H. Honda: Construction and Delivery of Tissue-Engineered Human Retinal Pigment Epithelial Cell Sheets, Using Magnetite Nanoparticles and Magnetic Force, Tissue Engineering, 11, 489-496, 2005

上田実:再生医療は歯科をどう変えるか- 第8回「再生医療とアンチエイジング」. 日本歯科評論 2:97-100, 2005

上田実:再生医療は歯科をどう変えるか- 第9回「再生医療と特許法」. 日本歯科評論 3:85-88, 2005

- 上田実:人体再生はどこまで可能になったか. Medical Science Digest 31:13-15, 2005
- 上田実:ティッシュエンジニアリングと産業化. 日本医学館 181-187, 2005
- 上田実:再生医療は歯科をどう変えるか- 第10回「再生医療の臨床応用に向けて」. 日本歯科評論 4:101-104, 2005
- 上田実:求められる歯科医療2. Dental Tribune Japan Edition 2:24, 2005
- 上田実:21世紀の歯科医療. 歯界展望特別号 58-62, 2005
- 上田実:実用化に向かう歯と歯槽骨の再生医療. 中・四国矯正歯科学会雑誌 17:1-7, 2005
- 上田実:総括. 日本再生医療学会雑誌 11:17, 2005
2. 学会発表:
- 2005 Novel biocare World Conference, U. S. A, 2005. 9. 6
Ueda M :Tissue Engineering and Its Therapeutic Use
- 1st International Symposium of Maxillofacial & Oral Regenerative Biology in OKAYAMA, Okayama Japan, 2005. 9. 17
Ueda M : Tissue Engineering and Anti-aging therapy
- TESI Annual Meeting, China, 2005. 10. 24
Ueda M : A Human Study of Injectable Bone Applied for Ridge Augmentation and Dental Implant
- 第3回再生歯科シンポジウム, 東京, 2005. 4. 3
上田実:再生医療とアンチエイジング
- 神奈川県保険医協会講演, 神奈川, 2005. 6. 12
上田実:再生医療~夢の治療から現実の治療へ
- 青森県歯科医師会南四支部学術講演会, 青森, 2005. 7. 9
上田実:再生医療と歯科の審美治療
- プラトンミーティング, 東京, 2005. 7. 24
上田実:インプラントと細胞を使った口腔の審美治療
- 8020財団フォーラム, 神奈川, 2005. 7. 31
上田実:よく噛んで脳と体を守る
- 2005バイोजパン, 横浜, 2005. 9. 8
上田実:歯科ではじまった骨の再生医療
- 日本口腔インプラント学会, 青森, 2005. 9. 18
上田実:細胞をつかった口腔の審美治療
アジアインプラント学会, 東京, 2005. 10. 9
上田実:再生医療とアンチエイジング
- 中部医学検査学会, 名古屋, 2005. 10. 22
上田実:再生医療の実用化に向けて
- 国際インプラントシンポジウム, 横浜, 2005. 10. 23
上田実:再生医療とアンチエイジング
- 日本癌治療学会, 名古屋, 2005. 10. 27
上田実:がん医療における再生医療
- テクノフェア, 名古屋, 2005. 11. 11
上田実:再生医療の実用化と産学連携
- 信越地区歯科医学大会, 新潟, 2005. 11. 13
上田実:高齢化社会と歯科の再生医療
- 波多野歯科15周年MAXIS記念講演, 埼玉, 2005. 11. 18
上田実:再生医療とアンチエイジング
- 耳鼻福島県地方部会, 福島, 2005. 11. 23
上田実:再生医療の実用化と課題
- 関東循環器再生医学会, 東京, 2005. 11. 26
上田実:実用化に向かう頭頸部の再生医療
- 再生医療研究会, 千葉, 2005. 12. 3
上田実:再生医療の臨床研究および普及への課題
- 奥羽大学歯学部同窓会, 福島, 2006. 2. 11
上田実:実用化に近い歯科の再生医療
- 千葉県歯科医学大会, 千葉, 2006. 2. 19
上田実:21世紀に求められる歯科医療
- GC友の会講演, 千葉, 2006. 2. 19
上田実:再生医療と歯科のアンチエイジング
- 日本歯科大学創立100周年記念大会, 東京, 2006.

2. 26

上田実：歯科の未来をひらく再生医療

第5回日本再生医療学会，岡山，2006. 3. 8

上田実：再生医療とアンチエイジング

〈分担研究者〉

(各務 秀明)

1. 論文発表：

Hibi H, Yamada Y, Kagami H, Ueda M. Distractin on osteogenesis assisted by tissue engineering in an irradiated mandible: a case report. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 21: 141-147, 2006.

Honda MJ, Shinohara Y, Sumita Y, Tonomura A, Kagami H, Ueda M. Performance of collagen sponge as a 3-D scaffold for tooth-tissue engineering. *Biomaterials.* 27: 3238-3248, 2006.

Honda MJ, Shinohara Y, Sumita Y, Tonomura A, Kagami H, Ueda M. Shear stress facilitates tissue-engineered odontogenesis. *Bone.* 2006 in press

Honda MJ, Ohara T, Sumita Y, Ogaeri T, Kagami H, Ueda M. Preliminary study of tissue-engineered odontogenesis in the canine jaw. *J Oral Maxillofac Surg.* 64: 283-289, 2006.

Ohno K, Hattori T, Kagami H, and Ueda M. Effects of Preceding Sialadenitis on Development of Autoimmunity against Salivary Gland. *Oral Diseases* in press.

Mase J, Mizuno H, Okada K, Sakai K, Mizuno D, Usami K, Kagami H, Ueda M. Cryopreservation of cultured periosteum: effect of different cryoprotectants and pre-incubation protocols on cell viability and osteogenic potential. *Cryobiology* in press.

Matsunuma H, Kagami H, Narita Y, Hata K-I, Ono Y, Ohshima S, and Ueda M. The potential of bone marrow-derived mononuclear cells for enhancing angiogenesis in ureteral acellular matrix. *Tissue Engineering* in press.

Tatebe M, Nakamura R, Kagami H, Okada K, Ueda M. Differentiation of transplanted mesenchymal st

em cells in a large osteochondral defect in rabbit. *Cytototherapy* 7, 520-530, 2005.

Ito A, Ino K, Hayashida M, Kobayashi T, Matsunuma H, Kagami H, Ueda M, Honda H. Novel methodology for fabrication of tissue-engineered tubular constructs using magnetite nanoparticles and magnetic force. *Tissue Eng.* 11, 53-61, 2005.

Kobayashi C, Kagami H, Kito K, Ishikawa K, Ebisawa K, Ueda M, Terasaki H. Selective and Efficient Culturing of Retinal Pigment Epithelial Cells Using a Feeder Layer. *Cytototherapy* 7, 427-37, 2005.

Michael A Hale, Kagami H, Ling Shi, Holland Andrew M, Elsasser Hans-Peter, PhD; Hammer Robert E, Raymond J. MacDonald. The homeodomain protein PDX1 is required at mid-pancreatic development for the formation of the exocrine pancreas. *Dev Biol.* 286, 225-37, 2005.

Honda MJ, Sumita Y, Kagami H, Ueda M. Histological and immunohistochemical studies of tissue engineered odontogenesis. *Arch Histol Cytol* 68, 89-101, 2005.

Ito A, Hibino E, Kobayashi C, Terasaki H, Kagami H, Ueda M, Kobayashi T, Honda H. Construction and delivery of tissue-engineered human retinal pigment epithelial cell sheets, using magnetite nanoparticles and magnetic force. *Tissue Eng.* 11, 489-96, 2005.

Kito K, Kagami H, Kobayashi C, Ueda M, Terasaki H. Effects of cryopreservation on histology and viability of cultured corneal epithelial cell sheets in rabbit. *Cornea* 24, 735-41, 2005.

Seko K, Kagami H, Senga K, Ozeki K, Mizutani H, Ueda M. Effects of Ovariectomy and estrogen replacement on rat oral mucosa. *Maturitas* 50, 44-51, 2005.

山田陽一、各務秀明、上田実 幹細胞を応用した歯周組織再生 「再生歯科のテクニックとサイエンス—歯周・審美・インプラント—」 第1編 歯周組織・再生 吉江弘正/宮本泰和編 クインテッセンス出版株式会社、2005

各務秀明 唾液による健康づくり—明日からの臨床に取り組み— Part 3 唾液のはたらき 12. 唾液腺の再生医療は可能か? 日本歯科評論 増刊2 005 株式会社ヒョーロンパブリシャーズ 201-208, 2005

各務秀明, 杉戸孝行, 上田実 増殖因子および培養細胞を用いた唾液腺の再生 口腔科誌 54(2): 211-215, 2005

本田雅規, 小原孝之, 住田吉慶, 各務秀明, 魚返拓利, 上田実 歯の再生—イヌ下顎骨への歯胚細胞移植 「再生医療」 4(1): 85-89, 2005

各務秀明, 渡辺真紀, 外村明子, 安藤由典, 本田雅規, 上田実 歯および歯胚由来細胞を用いた再生医療とその可能性 「再生医療」 4(1): 79-83, 2005

2. 学会発表:

各務秀明, 上田実

臨床応用の進む歯科の再生医療

第41回日本界面医学会学術研究会 11/5/2005

(紀ノ岡正博)

1. 論文発表:

Norihiko Hata, Yuka Agatahama, Masahiro Kino-oka, and Masahito Taya: "Relations between Individual Cellular Motions and Proliferative Potentials in Successive Cultures of Human Keratinocytes", Cytotechnology, Vol. 47, No. 1-3, pp. 127 - 131 (2005)

紀ノ岡正博, 田谷正仁: "移植を前提とした組織培養工程における細胞評価", 医工学治療, Vol. 17, No. 4, pp. 203-206 (2005)

2. 学会発表: なし

(本多裕之)

1. 論文発表:

Tomokatu Hongo, Mariko Kajikawa, Seichi Ishida, Shogo Ozawa, Yoichi Ishikawa, Takeshi Kobayashi and Hiroyuki Honda: Three-dimensional high density culture of HepG2 cells in a 5-ml radial-flow bioreactor for construction of artificial liver, Journal of Bioscience and Bioengineering, 99(3), 237-244 (2005)

Ryuji Kato, Hideo Nakano, Hiroyuki Konishi, Katsuya

Kato, Yuichi Koga, Tsuneo Yamane, Takeshi Kobayashi and Hiroyuki Honda: Novel strategy for protein exploration High-throughput screening assisted with fuzzy neural network, Journal of Molecular Biology, 351, 683-692 (2005)

Hiro Takahashi and Hiroyuki Honda: A new reliable cancer diagnosis method using boosted fuzzy classifier with SWEEP operator method, Journal of Chemical Engineering of Japan, 38, 763-773 (2005)

Akira Ito, Eri Hibino, Hiroyuki Honda Chiaki Kobayashi, Hiroko Terasaki, Hideaki Kagami, Minoru Ueda and Takeshi Kobayashi: Construction and delivery of tissue-engineering human retinal pigment epithelial cell sheets using magnetite nanoparticles and magnetic force, Tissue Engineering, 11(3/4), 489-496 (2005)

Akira Ito, Kousuke Ino, Masao Hayashida, Takeshi Kobayashi, Hiroshi Matsumura, Hideaki Kagami, Minoru Ueda and Hiroyuki Honda: A novel methodology for fabrication of tissue-engineered tubular constructs using magnetite nanoparticles and magnetic force, Tissue Engineering, 11(9/10), 1553-1561 (2005)

Akira Ito, Eri Hibino, Kazunori Shimizu, Takeshi Kobayashi, Yoichi Yamada, Hideharu Hibi and Minoru Ueda and Hiroyuki Honda, Magnetic force-based mesenchymal stem cell expansion using antibody-conjugated magnetoliposomes, Journal of Biomedical Materials Research: Part B-Applied Biomaterials, 75(2), 320-327 (2005)

2. 学会発表: なし

(木全弘治)

1. 論文発表:

N. Kamiya, H. Watanabe, H. Habuchi, H. Takagi, T. Shinomura, K. Shimizu, K. Kimata. Versican/PG-M Regulates Chondrogenesis as an Extracellular Matrix Molecule Crucial for Mesenchymal Condensation. J Biol Chem 2006;281:2390-400.

Y. Inoue, M. Yoneda, J. Zhao, O. Miyaishi, A. Ohno-Jinno, T. Kataoka, Z. Isogai, K. Kimata, M. Iwaki, M. Zako. Molecular cloning and characterization of chick sparcn. J Biol Chem 2006.

澤井崇博, 板野直樹, 木全弘治. マウス初代軟骨細胞におけるbone morphogenetic protein-2のヒアルロン酸合成酵素発現制御. 愛知医科大学医学会雑誌 2005;33:1-6.

2. 学会発表:

渡邊裕規, 塩生真史, 木全弘治, 木村友厚, 渡辺秀人. Splicing factor 3bはBMPR-1Aに結合し骨軟骨分化を抑制する. 第19回日本軟骨代謝学会. 横浜, 2006. 3. 4.

坂井顕一郎, 木全弘治, 佐藤隆, 後藤雅式, 成松久, 四宮謙一, 渡辺秀人. 軟骨におけるコンドロイチン硫酸合成酵素群の解析. 第19回日本軟骨代謝学会. 横浜, 2006. 3. 4.

3. 著書:

蛭沢克己, 木全弘治, 渡辺秀人. プロテオグリカン. ティッシュエンジニアリング2005. 日本医学館, 2005:25-30. (日本組織工学会編集)

卓麗聖, 木全弘治. 第1編 糖鎖を科学する 第1章 糖鎖のしくみ 第3節プロテオグリカン 1 ヒアルロン酸の構造と機能. 糖鎖科学の新展開. NTS, 2005:40-47.

渡辺秀人, 木全弘治. 3. 糖鎖遺伝子研究 1. 糖転移酵素 1. 17 コンドロイチン硫酸合成関連遺伝子群. 未来を拓く糖鎖科学. 金芳堂, 2005:172-174.

板野直樹, 木全弘治. 3. 糖鎖遺伝子研究 1 糖転移酵素 1. 19 ヒアルロン酸合成酵素. 未来を拓く糖鎖科学. 金芳堂, 2005:176-177.

木全弘治. 4. 糖鎖機能解析 7 再生医療・移植 7.1 組織再生におけるプロテオグリカン. 未来を拓く糖鎖科学. 金芳堂, 2005:303-309.

羽瀨弘子, 木全弘治. 4. 糖鎖機能解析 9 発生・分化・形態形成 9.6 形態形成におけるヘパラン硫酸プロテオグリカンの機能. 未来を拓く糖鎖科学. 金芳堂, 2005:339-432.

(鈴木力)

1. 論文発表: なし

2. 学会発表:

R. Kato, K. Okada, T. Suzuki, Y. Komori, H. Tachikui, D. Iejima, H. Kagami, M. Ueda: Development of Fully-Automated Cell Culture System Adopted to

Adhesive Cells for Clinical Usage, 8th Tissue Engineering Society International (TESI), Shanghai, China, October, 2005.

加藤竜司, 岡田邦彦, 各務秀明, 上田実
再生医療実用化に向けた線維芽細胞自動培養装置の開発, 再生医療学会, 東京, 2006年3月

加藤竜司, 岡田邦彦, 各務秀明, 上田実
再生医療の産業化を目指した細胞自動培養装置の開発, 化学工学会, 東京, 2005年9月

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許出願

- ・特願2005-306471 組織形成用複合材料およびその製造方法, 上田実, 各務秀明, 岡田邦彦, 水野裕和, 宇佐見一公
- ・特願2005-298161 移植材料及び骨質改善剤, 上田実, 各務秀明, 山田陽一, 岡田邦彦, 上嶋伸知, 八島明弘, 高後友之
- ・特願2005-102404 細胞の増殖又は分化方法
- ・特願2005-203999 細胞の播種方法
- ・特願2005-222886 ヒト歯胚細胞の判別及び選択方法
- ・特願2005-045417 象牙質再生用組成物の製造方法, 株式会社日立メディコ/名古屋大学, 安藤由典, 外村明子, 各務秀明, 上田実
- ・特願2005-102404 培養上清を用いた細胞培養技術, 株式会社日立メディコ/名古屋大学, 家島大輔, 小原孝之, 安藤由典, 外村明子, 各務秀明, 上田実
- ・特願2005-143443 骨組織形成用細胞の調整方法、及び骨組織形成用細胞の利用, 名古屋大学/オステオジェネシス株式会社, 上田実, 山田陽一, 島伸行
- ・特願2005-190374 皮膚組織改善剤, 名古屋大学, 蛭沢克己, 上田実, 各務秀明, 岡田邦彦, 加藤竜司, マズリム・アブドゥル
- ・特願2006-000075 移植のための組織組成物, 東京大学, 上田実
- ・特願2006-008521 自動培養装置
- ・出願準備中 自動培養装置

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

自動培養装置および安全性評価機能を備えた細胞供給システムの開発

分担研究者 各務 秀明 名古屋大学医学部組織工学講座 助教授

研究要旨

培養細胞を用いた再生治療には大きな期待が寄せられているが、その反面安全性や製品の品質管理に関する基礎研究は必ずしも十分とはいえない。本研究では、再生医療に必要とされる培養細胞の安全性、品質の確保と培養過程の効率性に関する基盤技術の確立の一環として、無血清培地および自己血清培地を用いた培養システムの開発と、自動培養システムの開発を行うものである。第1の課題である安全性については、培養過程における感染と、培養細胞自体の安全性、安定性の問題が重要である。特に近年動物由来の成分を用いる危険性が指摘されており、本研究課題では無血清培地あるいは自己血清を用いた培養方法の確立を目指す。一方、現在行われている細胞の培養、管理には熟練と労力、そして特殊な施設が必要とされる。本研究では、自動培養装置を応用した培養システムの構築により、安全性の確保と効率的な培養の両立をはかり、治療コストの削減を達成する。平成17年度には、第1に市販の無血清培地を用いて、FBSによる通常培地との比較を行った。第2にヒト線維芽細胞を用いて、ヒト自己血清とFBSによる増殖能の差に関するデータの採取を行った。第3に自動培養装置のプロトタイプを用いて、培養増殖効率の検討と、得られた細胞の機能やフェノタイプの比較により、通常の手作業による培養細胞との差異について検討を行った。

A. 研究目的

本研究の目的は、再生医療に必要とされる培養細胞の安全性、品質の確保と培養過程の効率性に関する基盤技術を確立することである。

再生医療の対象患者はますます増加しており、対象疾患もいわゆるlife threatening diseasesから日常的な疾患まで拡大されつつある。したがって、細胞を用いた治療に問題が発生した場合には、これまで以上の大きなインパクトを与えることが予想され、感染防止やがん化の検出など再生医療の安全性の確保は、まさに待つことのできない課題と考えられる。本研究では、安全性確保のひとつの方法として、血清に関する検討を行う。細胞培養には通常牛由来の血清が用いられている。しかしながら、近年BSEなど動物由来の血清の利用に対する懸念があり、BSEの発症のない地域から血清を調達するなどの工夫がなされているが、完全に危険を除去できるわけではないために改善が望まれている。そのための方法としては、血清を用いない培地である無血清培地、特に動物由来の製剤をまったく用いない培地も開発されている。しかしながら、安定性や安全性の検証が十分ではないために、現在実際の臨床にはあまり使われていない。本研究課題では、これら無血清培地の可能性について検証を行う。一方、動物由来の材料を避ける方法の一つとして、自己血清を用いた細胞培養が行われている。この方法では、動物由来のウイルスなどの感染の可能性は否定できるが、血清の成分にばらつきが予想されるために、どの

程度安定して培養することができるかが問題である。本研究課題では、自己血清によるヒト細胞の培養を行い、牛血清との比較を行うことで自己血清による培養の安定性を検討する。

現在再生治療に用いる細胞は、ほとんどが手作業で培養されているが、ヒューマンエラーによるコンタミネーションなどの問題がある。また、技術者の勘にたよる部分が多く、産業化の障害となっている。将来細胞による治療が普及するためには、手作業によるコストの上昇を抑える工夫とヒューマンエラーをいかに抑えるかが重要である。これまでにわれわれは自動培養装置を用いた細胞供給システムの開発に取り組んで着たが、実際に自動培養装置を用いたヒト細胞の実績は少なく、その品質や安全性管理に関する基礎的データが不足していた。本研究課題では、自動培養装置のプロトタイプを作成し、この装置を用いたヒト細胞の培養と培養された細胞に関する検討、および自動培養装置を組み込んだ培養システムの構築を目指すものとする。

B. 研究方法

1) 無血清培地、および自己血清を用いた培養システムの開発

現在上市されている無血清培養用培地にて、患者由来の線維芽細胞を用いて細胞増殖能の検討を行った。FBSとの比較、および少量の血清を添加することでの影響を、初代培養、およびPI以降の細胞について検討した。一方、同意の得られた皮膚再生治療の症例では、自己血清を採

取し、FCSとの増殖能の比較を行った。

2) 自動培養システムの開発

現在再生治療に用いる細胞は、ほとんどが手作業で培養されているが、ヒューマンエラーによるコンタミネーションなどの問題がある。また、技術者の勘にたよる部分が多く、産業化の障害となっている。安藤らは、完全閉鎖系の自動培養装置の開発を行っており、動的評価システムや情報処理理論と組み合わせることにより、安全で効率的な細胞培養システムの構築を行う。

(倫理面への配慮)

ヒトの組織採取を行う場合、治療時に余剰となったものを利用することを原則に、該当患者に書面および口頭で十分に説明し同意を得た。さらにこれら説明文、同意書については名古屋大学倫理委員会にて承認されたものを用いた。また、採取したすべての組織については、プライバシーの保護のためドナー情報は秘密にて行うこととした。

C. 研究結果

無血清培地であるEIDFを用いて、初代培養および継代後の細胞について、DMEMおよび各種濃度の血清との組み合わせで増殖能を検討した。しかしながら、ヒト線維芽細胞を用いた実験では、初代培養時には無血清培地にて増殖が得られなかったため、継代後の細胞について、従来培地との増殖能の比較を行った(図1)。

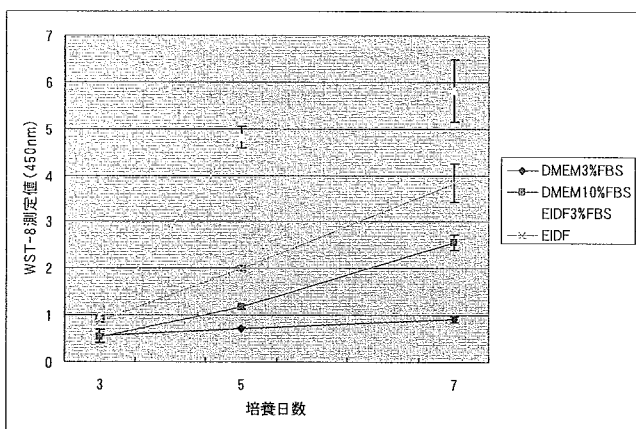


図1. DMEMとEIDFの比較。継代後のヒト線維芽細胞では、EIDFの方が高い増殖能を示した。

図1に示すように、ヒト線維芽細胞においては、無血清培地でも通常の培地であるDMEM+血清と同様、あるいはそれ以上の増殖が得られ、EIDFに3%の血清を加えると、最も良い結果が得られた。

しかしながら、初代培養において十分な増殖能が得られないことを考慮すれば、直ちに現行の培地と置き換えることは困難であり、今後は初代培養を可能にするその他の無血清培地、および培養皿のコーティング等の組み合わせについて検討が必要である。

一方、自己血清による培養とFBSによる増殖能の差を同一個体由来の線維芽細胞を用いて検討した(図2)。

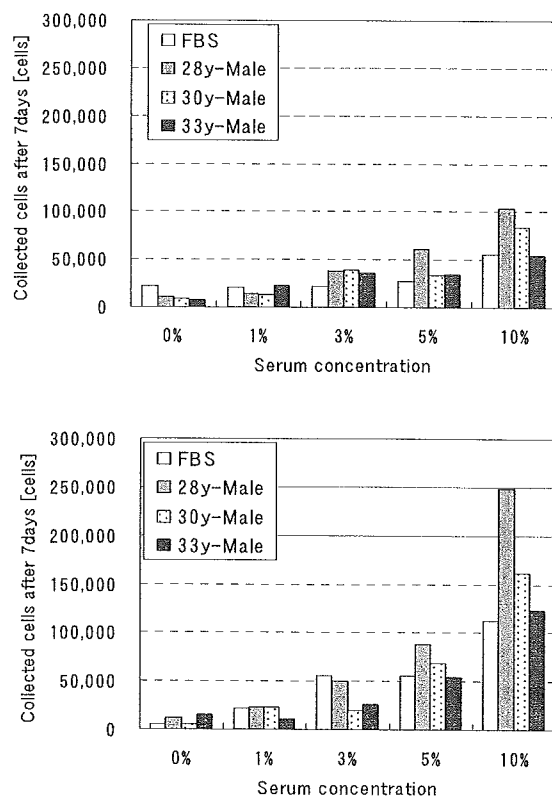


図2. 自己血清とFBSによる線維芽細胞の増殖能の比較。FBSと自己血清による増殖の差を3名の患者で比較した。10%の自己血清により、FBSと同等の増殖が得られることが明らかになった。播種濃度(2.0 x 10⁴ cells in 12-well plate)

5 x 10 mm大の組織からの培養では、通常4から6週で0.5~1.5 x 10⁷個の細胞が得られている。実際15例で自己血清にて培養を行い、FBS同様の細胞増殖が得られることが明らかになった。

次に、プロトタイプとなる自動培養装置を用いて、患者からの細胞(線維芽細胞)を用いて通常の培養操作と増殖能の比較を行った(図3)。

結果、下記の表1に示すように、通常の手による培養と同等以上の細胞増殖を得ることが可能であった。また、ヒト細胞を用いて継代操作、および初代培養時の条件の設定を行い、培養操作の初めから細胞回収時まで、人手を要しない細胞培養が可能であることが示された。得られた細胞の性状については今後詳細な検討を行う予定である。

表1. 自動培養装置による細胞増殖と従来法の比較。自動培養装置により、初代培養からP2まで、手作業による培養操作と同等以上の細胞増殖が得られた。

Cell Type		Human gingival fibroblast (from tissue: 26y Male)	Human gingival fibroblast (from tissue: 22y Female)
Medium		D-MEM (Sigma) + 10% FBS + 2% Antibiotic Antimycotic	D-MEM (Sigma) + 10% FBS + 2% Antibiotic Antimycotic
Frequency of medium change		Every 7 days	Every 7 days
1st seeding	Cell culture period	32 days	35 days
	Seeding cell number	Uncountable (3 pieces of treated tissue: 2mm x 2mm)	Uncountable (3 pieces of treated tissue: 2mm x 2mm)
	Collected cell number	1.82×10^7 cells	2.3×10^7 cells
	Collected cell viability	88.0%	88.0%
2nd seeding	Cell culture period	7 days	7 days
	Seeding cell number	1.82×10^7 cells	1.82×10^7 cells
	Collected cell number	2.95×10^7 cells	5.0×10^7 cells
	Collected cell viability	82.3%	93.0%

D. 考察

無血清培地による検討では、初代培養を除き、無血清培地でも十分な増殖を得られることが明らかになった。しかしながら、実際に臨床で用いる場合には、感染の危険を除くためには初代培養から無血清で培養することが好ましい。この点が今後の課題と考えられた。さらに、

無血清培地に含まれる成分についても、完全に動物由来のものを排除することは現状では困難である。今後培地供給メーカーの協力のもと、より安全な培地の検討を行っていきたい。

自己血清については、MSCなどについて有用性の報告がある。これまで、ヒト細胞に関してはMSCおよび線維芽細胞での培養実績はあったが、実際にFBSとの比較や異なる血清濃度の影響について詳細に検討されてはいなかった。今回の検討により、自己血清による培養の有用性を示すことができた。しかしながら、個々の患者間のばらつきは明らかであり、今後さらなる検討が必要である。

自動培養装置を含めた培養操作の自動化は、安全性の確保とともにコスト削減のためにも必要な研究である。特に、安全性確保のための基準では作業者による確認作業が多く、ヒューマンエラーやコストの増加につながる可能性がある。今回実際のヒト細胞を用いて、培養経過中にほぼ人手を加えない形で安定培養が可能であることが示された。培養細胞を安定して供給する上で、自動培養装置を用いた培養システムの構築は有用と考えられた。

E. 結論

培養細胞の安全で効率的な供給システムの開発は、再生医療の実用化を進める上で臨床的研究とともに車の両輪をなす重要な課題である。安全な培地、培養方法、評価方法のそれぞれについて、今後も研究を重ねることが重要である。初年度の研究では、自己血清、自動培養装置など研究課題のそれぞれについて一定の評価を行うことが可能であった。今後はデータ数を増やしながら、細胞培養条件の検討や形態と機能との関連など、より詳細な検討を行うことで、新たな細胞供給システムの確立が可能になるものと期待している。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hibi H, Yamada Y, Kagami H, Ueda M. Distracti on osteogenesis assisted by tissue engineering in an irradiated mandible: a case report. Int J Oral Maxillofac Implants. 21: 141-147, 2006.

Honda MJ, Shinohara Y, Sumita Y, Tonomura A, Kagami H, Ueda M. Performance of collagen sponge as a 3-D scaffold for tooth-tissue engineering. Biomaterials. 27: 3238-3248, 2006.

Honda MJ, Shinohara Y, Sumita Y, Tonomura A, Kagami H, Ueda M. Shear stress facilitates tissue-engineered odontogenesis. Bone. 2006 in press

Honda MJ, Ohara T, Sumita Y, Ogaeri T, Kagami H, Ueda M. Preliminary study of tissue-engineered odontogenesis in the canine jaw. J Oral Maxillofac Surg. 64: 283-289, 2006.

Ohno K, Hattori T, Kagami H, and Ueda M. Effects of Preceding Sialadenitis on Development of Autoimmunity against Salivary Gland. Oral Diseases in press.

Mase J, Mizuno H, Okada K, Sakai K, Mizuno D, Usami K, Kagami H, Ueda M. Cryopreservation of cultured periosteum: effect of different cryoprotectants and pre-incubation protocols on cell viability and osteogenic potential. Cryobiology in press.

Matsunuma H, Kagami H, Narita Y, Hata K-I, Ono Y, Ohshima S, and Ueda M. The potential of bone marrow-derived mononuclear cells for enhancing angiogenesis in ureteral acellular matrix. Tissue Engineering in press.

Tatebe M, Nakamura R, Kagami H, Okada K, Ueda M.

Differentiation of transplanted mesenchymal stem cells in a large osteochondral defect in rabbit. Cytotherapy 7, 520-530, 2005.

Ito A, Ino K, Hayashida M, Kobayashi T, Ma

tsunuma H, Kagami H, Ueda M, Honda H. Novel methodology for fabrication of tissue-engineered tubular constructs using magnetite nanoparticles and magnetic force. *Tissue Eng.* 11, 53-61, 2005.

Kobayashi C, Kagami H, Kito K, Ishikawa K, Ebisawa K, Ueda M, Terasaki H. Selective and Efficient Culturing of Retinal Pigment Epithelial Cells Using a Feeder Layer. *Cytherapy* 7, 427-37, 2005.

Michael A Hale, Kagami H, Ling Shi, Holland Andrew M, Elsasser Hans-Peter, PhD; Hammer Robert E, Raymond J. MacDonald. The homeodomain protein PDX1 is required at mid-pancreatic development for the formation of the exocrine pancreas. *Dev Biol.* 286, 225-37, 2005.

Honda MJ, Sumita Y, Kagami H, Ueda M. Histological and immunohistochemical studies of tissue engineered odontogenesis. *Arch Histol Cytol* 68, 89-101, 2005.

Ito A, Hibino E, Kobayashi C, Terasaki H, Kagami H, Ueda M, Kobayashi T, Honda H. Construction and delivery of tissue-engineered human retinal pigment epithelial cell sheets, using magnetite nanoparticles and magnetic force. *Tissue Eng.* 11, 489-96, 2005.

Kito K, Kagami H, Kobayashi C, Ueda M, Terasaki H. Effects of cryopreservation on histology and viability of cultured corneal epithelial cell sheets in rabbit. *Cornea* 24, 735-41, 2005.

Seko K, Kagami H, Senga K, Ozeki K, Mizutani H, Ueda M. Effects of Ovariectomy and estrogen replacement on rat oral mucosa. *Maturitas* 50,

44-51, 2005.

山田陽一、各務秀明、上田 実 幹細胞を応用した歯周組織再生 「再生歯科のテクニックとサイエンス—歯周・審美・インプラント—」 第1編 歯周組織・再生 吉江弘正/宮本泰和編 クインテッセンス出版株式会社、2005

各務秀明 唾液による健康づくり—明日からの臨床に取り組む— Part 3 唾液のはたらき 12. 唾液腺の再生医療は可能か? 日本歯科評論 増刊2005 株式会社ヒョーロンパブリシャーズ 201-208, 2005

各務秀明, 杉戸孝行, 上田実 増殖因子および培養細胞を用いた唾液腺の再生 口科誌 54(2): 211-215, 2005

本田雅規, 小原孝之, 住田吉慶, 各務秀明, 魚返拓利, 上田実 歯の再生—イヌ下顎骨への歯胚細胞移植 「再生医療」 4(1): 85-89, 2005

各務秀明, 渡辺真紀, 外村明子, 安藤由典, 本田雅規, 上田実 歯および歯胚由来細胞を用いた再生医療とその可能性 「再生医療」 4(1): 79-83, 2005

2. 学会発表

各務秀明、上田実
臨床応用の進む歯科の再生医療
第41回日本界面医学会学術研究会 11/5/2005

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
特願2005-190374 皮膚組織改善剤
特願2006-008521 自動培養装置
出願準備中 自動培養装置

画像処理技術を用いた培養細胞の動的評価法の開発

分担研究者 紀ノ岡正博 大阪大学大学院基礎工学研究科 化学工学領域 助教授

研究要旨

本研究では、再生医療の実用化における細胞の品質管理において重要である「細胞評価技術」の確立を目指して研究を行った。現在の再生医療に用いる細胞の評価は、人の経験に基づいて経時的なポイントにおける細胞を顕微鏡観察により行われているが、このような作業は人の感覚に依存しすぎており安定した品質管理体制とは言えない。培養中の細胞運動は、細胞の一時的画像の評価に比べて細胞を評価するための情報をより多く含んでいると考えられるため、本研究ではこのような動的変化・準動的変化をモニタリングするための細胞観察システムの開発とその情報と細胞品質との解析を行うことによって、非襲撃的細胞評価基準の探索を行った。我々が構築した細胞観察システムを用いたヒト角化細胞の動的観察からは、二つの細胞が接した状態になったときに回転運動をすることが確認され、このような挙動は細胞の培養環境（酸素濃度）を反映して細胞寿命と相互関係を示すことが示された。結果、細胞の動的情報（回転速度）を用いて細胞寿命を予測できる可能性が示唆された。今後はさらに汎用性の高い評価方法の検討を行う。

A. 研究目的

単層増殖時においては、培養容器底面からの細胞観察は、迅速かつ簡易で最も有効な培養状況の把握手段である。図1に示すように、静止画 (snapshot) のようにある特定の時間において観察する方法 (end-point observation) は、簡易かつ安価で一般的な顕微鏡などの装置で行うことができる (静的評価, static evaluation)。その結果、汎用性が高く、多くの研究や生産の現場で、日々熟練オペレータが、細胞形態を顕微鏡下で観察し、培養環境の状況把握に努めている。しかし、容器内全体での細胞形態の集団的観察となるため、いわゆる平衡論的な情報のみが取得可能である。一方、培養面への接着を伴う足場依存性細胞において、細胞運動は培養環境を把握する上で重要な評価要素である。個々の細胞の動画 (movie) のような経時的観察 (time-lapse observation) は、より高質な情報が得られ、速度論的な解析を行うことができるが、装置、操作が煩雑になり汎用性に乏しい (動的評価, dynamic evaluation)。また、培養面の修飾により、細胞

の一部を強く培養面に固定することで、細胞の移動は、若干制限されるものの、細胞の退縮が阻止されて伸展のみとなり、移動が時間積分され細胞形態が変化する。そこで、細胞を一時的に培養条件とは異なる状態に曝すことで評価する方法により、動的評価の特徴を兼ね備えた静的観察、“準静的評価” (‘quasi-static evaluation’) を実現した。

これらの3種の方法の特徴を活かした非襲撃的細胞評価手法を、メカニズム解明と汎用性の両面から検討を行う。特に、平成17年度は、データ取得・取得方法の指針構築、動的評価における細胞観察システムの改良、汎用性を行った。

B. 研究方法

1) データ取得・取得方法の指針構築

画像観察システムの改良ならびに臨床研究に用いられているヒト細胞 (株化されていない細胞) での観察データの取得ならびに解析についての指針を構築することで、データの信頼性を目指した。

2) 動的評価法

既存の細胞観察システムの性能を、ハード (画像取得装置)、ソフト (画像取得プログラミング) の改良により向上させ、より詳細な画像データの取得を目指す。また、動的手法の汎用性を目指し、角化細胞の寿命評価を細胞ペアーの回転速度測定により実施した。

(倫理面への配慮)

本研究では、患者由来のヒト細胞を利用することが無いため、倫理的問題は生じないことが明かであった。

C. 研究結果

1) データ取得・取得方法

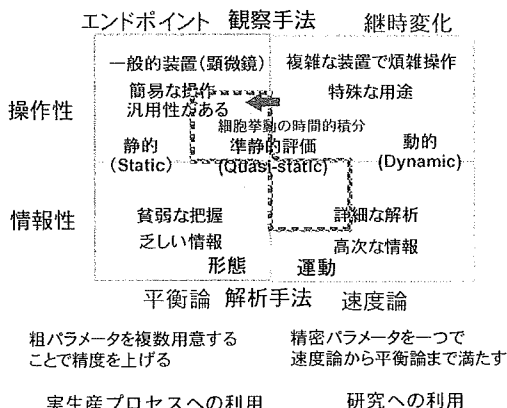


図1 細胞観察手法

動画評価を実施するための細胞観察システムのハード

(照射装置、ステージ) および取得ソフトを改良し、3つのT-ラスコ中の18点を5分毎に画像取得可能なシステムを構築した。本システムによりより詳細なデータ取得可能とした。また、得られたデータの解析方法について、細胞培養の特徴を考慮した方法論を構築した(「考察」参照)

2) 動的評価法

ラスコ内で多点観察が可能な細胞観察装置にて、ヒト角化細胞の挙動観察(動的評価)を行い、2個の細胞が接した状態になると回転運動を行うことがわかった。2個の細胞の回転速度を評価した(抽出挙動評価)。回転速度による細胞挙動評価の有効性を確認するため、通常酸素濃度(21%)と極低酸素濃度(0.2%以下)の条件下における角化細胞の継代培養実験を実施した。通常酸素濃度下で培養した場合は、数回の継代培養において累積分裂回数 $PD=6.8$ で細胞の増殖が停止し寿命に達するのに対し、極低酸素濃度では増殖速度の著しい低下もなく増殖が続き、 $PD=14.5$ まで達した。このとき、各酸素濃度下で培養したときの細胞挙動を把握するために、回転速度を測定したところ、通常酸素濃度下では累積分裂回数の増加とともに、回転速度が低下したが、極低酸素濃度下での培養では、寿命に伴う回転速度の著しい低下は見られなかった。以上の結果より、回転速度を指標とする運動性評価は、細胞活性評価の一つとして有効であることが示された。さらに、回転運動能力と細胞伸展能力の組み合わせ評価により、角化細胞の継代培養中に、細胞寿命を非襲撃的に評価可能であることを確認した。

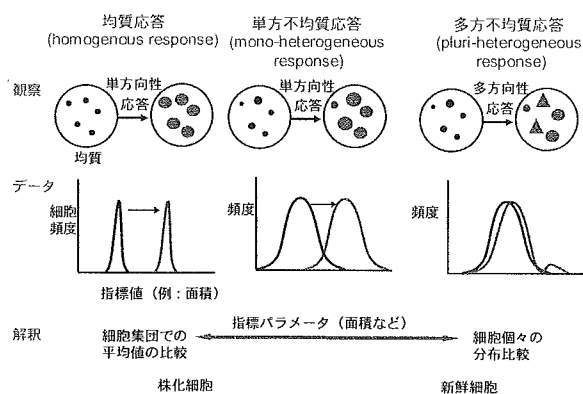


図2 不均質を考慮したデータ取得方法

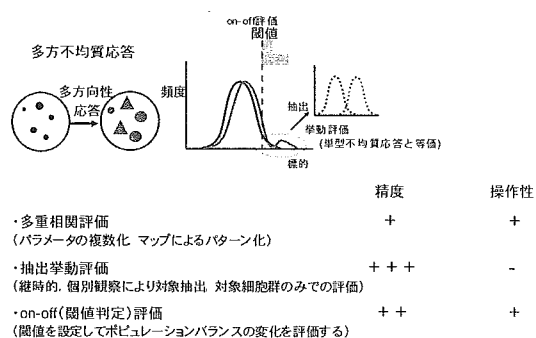


図3 多方不均質応答におけるデータ解析

D. 考察

培養中の細胞挙動を実際に観察するにあたって、培養系の不均質性および不均一性を考慮した情報取得が必要となる。従来の物質生産などを目的としたセルライン(株化細胞)を用いた細胞培養における評価では、図2に示すように、集団細胞を均質として捉え、かつ培養環境も均一状態であると考え、刺激などの変数に対し、単方向へ応答(“均質応答”)する。その結果、その一部の細胞を観察し培養全体の代表値として、平均値比較(有意差判定)や単純相関評価を行ってきた。しかし、組織培養のために採取された細胞(新鮮細胞)では、増殖や分化、細胞年齢などの複数の現象が絡み合って生じる。よって、単方向性応答でも不均質な応答(“単方不均質応答”)を示し、分散の大きな平均値比較で解釈することとなる。さらに、分化の方向性が複数存在する場合には、多方向を示す応答(“多方不均質応答”)であると考えられ、個々の単方不均質応答の統合の結果、平均値比較(有意差判定)や単純相関評価ではデータの差異を見出すことが困難である。一般には、多方不均質応答に対し、蛍光試薬による染色(標的化)にて有用データを絞って(情報抽出)から解析を行うことで、よりデータの精度を高めている。無染色での細胞評価でも、標的化、情報抽出は不可欠で、従来の有意差判定や単純相関評価のみならず、図3に示すように、多重相関評価、抽出挙動評価、on-off評価などの処方により精度向上を目指す。これらの手法は、精度や操作性の点で特徴があり、用途に応じた選択が必要であることが考えられた。本研究で示した、細胞ペアの回転速度測定による細胞評価方法は、寿命予測に有効なパラメータの一つであると考えられる。

E. 結論

画像取得により得られたデータ解析の手法を整理することができ、特に、本年度は、動的観察での抽出挙動評価を試験し、角化細胞培養における細胞ペアの回転速度計測により細胞寿命を予測することができた。しかし、回転速度計測は動的評価手法によるため、精度は高いが汎用性に欠ける。今後は、より汎用性の高い準静的評価手法により細胞運動評価を試みる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Norihiko Hata, Yuka Agatahama, Masahiro Kino-oka, and Masahito Taya: “Relations between Individual Cellular Motions and Proliferative Potentials in Successive Cultures of Human Keratinocytes”, Cytotechnology, Vol. 47, No. 1-3, pp. 127 - 131 (2005)

紀ノ岡正博、田谷正仁：“移植を前提とした組織培養工程における細胞評価”、医工学治療、Vol. 17, No. 4, pp. 203-206 (2005)

2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

情報処理理論を用いた細胞培養の効率化

分担研究者 本多裕之 名古屋大学大学院工学系研究科
バイオテクノロジー講座 生物プロセス工学グループ 教授

研究要旨

本研究では、再生医療実用化のため、細胞培養という人間の感に頼った作業工程を効率化するための情報処理技術の確立を行った。現在、再生医療に用いられる細胞は、作業者の感や経験に依存した調製工程で作製されており、通常の工業的大量生産製品に比べて非常に非効率的でありコストが高い。このような問題は、現在の再生医療の産業化における最大の課題であり、より安全かつ安定な細胞調製を行うためには、これらの作業工程における情報処理理論の導入が必要不可欠であると考えられる。本年度の本研究では、培養工程を効率化させるため、ヒト皮膚・歯肉由来の線維芽細胞の培養データから将来的な細胞収率を予測・ルール化するモデル構築をめざし、自己血清培養における経時的な増殖データとタンパク生産能（コラーゲン産生）のデータを20例蓄積した。これらは、30例になった段階で予測モデル構築に興じる予定である。更に、臨床の細胞調製現場からの要求を受け、作業工程をチェック・管理するためのソフトウェア開発を行い、作業記録の管理・試薬の管理・工程のミス削減するシステム構築を行った。特に、現場の作業者が長時間を要して行っていた培養工程調製を、重要度のレベル分けをすることによって、自動的に調整できるシステムを開発した。

A. 研究目的

本研究の目的は、再生医療を実用化するために必要である「効率的な培養」を可能にするため、これまで工業的な生産管理に応用されてきている情報処理を用いた支援技術を、医療の臨床現場に密着した形で開発することである。

近年、再生医療の対象患者はますます増加しており、その適応範囲は致死的な疾患から日常的な疾患まで拡大されつつある。しかし、この新しい医療を享受出来る患者の数は僅かではない。これは治療技術の確立以外に、セルプロセッシングの技術が成熟していないことが一因と考えられる。再生医療のための細胞調製という工程はテーラーメイドであり、通常の工業的大量生産のストラテジーを応用することは難しい。これは現在、多くの企業が再生医療に興味を示しているにも関わらず実用化が進まない原因の一つでもある。このため、再生医療の治療用細胞の安定供給と安全性維持のための技術の開発は、より多くの医療施設で、多くの患者に現在の技術を提供するために必須である。

現在、多くの再生医療研究は治療法開発を目的としており、実用化や産業化に必要な、生産プロセスの効率化に関する基礎研究は少ない。動物細胞の大量培養の研究は、これまでの工学的な物質生産の観点からは多く行われて来たが、細胞そのものを医療用に用いる観点での細胞供給システムの開発は、ほとんど行われていない。結果として、再生医療を提供する施設では、GMP準拠の設備、熟練技術者の多数雇用など、コストがかかる方法で安全性を担保する以外には方法がないのが現状である。

また、幾つかの企業による自動化等の検討は、工業的な生産を目的とした価格や構造となっており、現在再生医療の臨床応用が行われている現場や医師の現状から離れてしまっている。

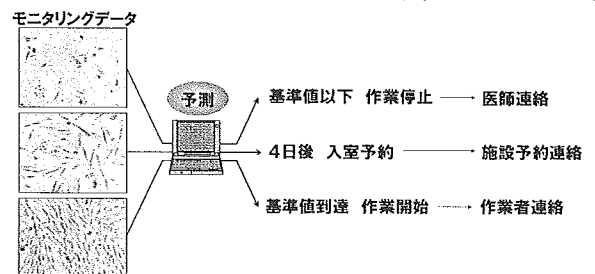
本研究では、実際の医療と細胞調製を行う臨床現場からのニーズを反映させた、再生医療生産プロセスの効率化のためのシステム開発を行った。

B. 研究方法

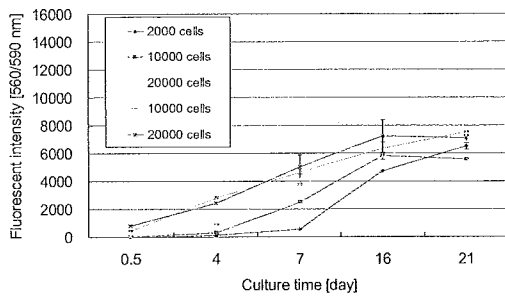
本研究では、効率的な培養を支援するシステムとして (i) 培養状況の予測システム、(ii) 培養工程の管理システムの2つの開発を試みた。

(i) 培養状況の予測システム：

培養予測のためのモデル構築には、少なくとも30個以上の培養データ（入力・出力データセット）が必要であるため、臨床研究において同意を得た患者20名の細胞を用いて各種細胞播種密度での経時的細胞増殖データ、および、コラーゲン産生データを蓄積した。各データはCASY（細胞数計測装置）とSirol Collagen Assay Kitを用いて測定し、モデル構築のための入力データとした。



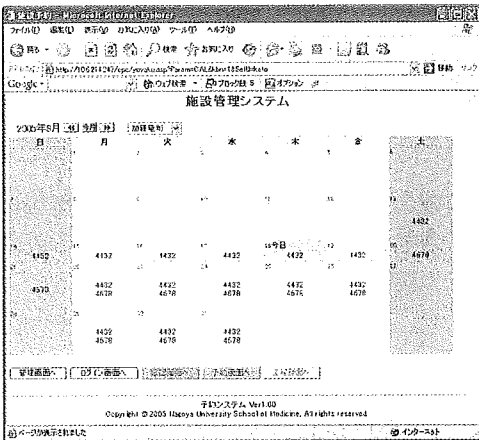
(図1) 培養状況予測のイメージ図



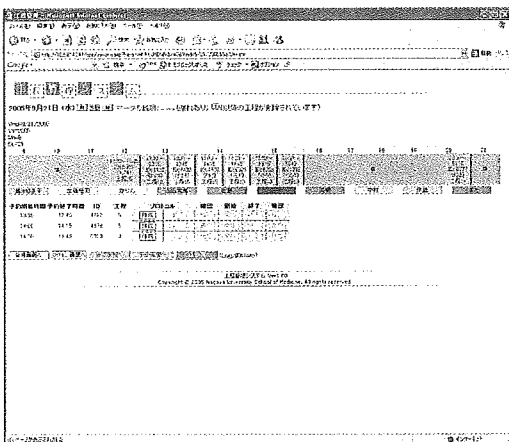
(図2) 経時的細胞増殖データ (播種濃度別)

(i) 培養工程の管理システム：

ASP形式にてイントラネット型のソフトウェアプログラムを作製。データ入力はPCからイントラネットで行い、データ出力として各画面に工程予約状況を表示させた。また、C言語プログラミングにて在庫管理・工程チェック・記録機能をもつソフトウェアプログラムを作製。データ入力は、バーコードリーダーとキーボードを介して行い、データ出力として在庫管理画面表示、工程のミスのチェック機能を搭載した。



(図1) 工程管理ソフト画面1 (工程予約)



(図2) 工程管理ソフト画面2 (作業分配)

(倫理面への配慮)

ヒトの組織採取を行う場合、治療時に余剰となったも

のを利用することを原則に、該当患者に書面および口頭で十分に説明し同意を得た。さらにこれら説明文、同意書については名古屋大学倫理委員会にて承認されたものを用いた。また、採取したすべての組織については、プライバシーの保護のためドナー情報は秘密に行うこととした。

C. 研究結果

(i) 培養状況の予測システム：

予測精度の高いモデルを構築するためには、データ数はより多い方が望ましい。このため、臨床研究で得た20例の患者(皮膚由来線維芽細胞 10例、歯肉由来線維芽細胞 10例)に加えて、現在も臨床研究の中で継続的培養データを継続蓄積中である。今後は、これらの2日後、5日後の細胞数、細胞増加率を入力データとし、出力データを7日後細胞数としたデータセットを用いて、どのタイミングでどのような細胞播種密度で細胞の準備を行うかをシミュレーションするモデル構築を行う。モデル構築の準備段階として、生物データの一例として酵素データをサンプルに用いたモデル構築と解析工程の確立を行い、生物データ解析のための準備を整えた。

(ii) 培養工程の管理システム：

培養効率化のためには、実際の細胞調製施設における細胞供給シミュレーションから作業者の工程・予定を情報処理的に管理する有効性が強く臨床現場から求められた。このため、細胞調製施設1室、作業員3名、医師1名という細胞治療体制を仮定(図5)し、各作業員がイントラネットで自分の作業内容を公開・確認し、これを作業責任者・医師が確認できる管理ソフトウェアをASP形式にて作成した。工程管理は、通常人の経験に基づいて管理者が行っており、人による自在な判断が必ず必要ではないかと当初は考えられた。しかしながら、細胞調製のプロトコルを「重要度」を設けてレベル分けし、日程をずらすことができる工程と日程をFixすべき工程とを分別して管理すること、最終調整量に応じてプロトコルを3パターンに分けてこれを選び分ける手法を導入することで、ヒト細胞の培養のような個体差の影響を大きく受ける調製工程を効率的に管理できることを確認した。結果として、人がスケジュール管理し、医師との疎通を頻繁に行わなくてはならなかった調製工程が大幅に簡易化され、作業効率の向上が確認された。さらに、各試薬の使用データおよび、作業員の履歴をバーコードデータ入出力により管理するソフトウェアを導入したことで、記録を確実に残す安全性の高い作業が達成され、作業の効率化が図られた。今後は、これを連続的に稼働することで、現実的な作業効率に関する数値データを取得する。