

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

感染リスクの排除、同一性の確保、免疫反応、がん化等
の抑制及び培地等による有害作用の防止に関する研究

平成 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 土屋 利江

平成 18(2006 年)年 4 月

目次

I. 総括研究報告

感染リスクの排除、同一性の確保、免疫反応、がん化等の抑制及び培地等による有害作用の防止に関する研究.....	総-1
土屋 利江	

II. 分担研究報告

1.幹細胞を用いた細胞組織医療機器の安全性評価に関する研究 ーヒト間葉系幹細胞の癌化に対する危険性についてー.....	分-1
澤田 留美	
2. 組織工学用スキャホールドのエンドトキシン試験法の確立と感染リスクの排除.....	分-17
薮島 由二	
3. 間葉系幹細胞の均質性/同一性、および品質検査法の開発.....	分-31
加藤 幸夫	
4. 幹細胞の安全性に関する研究 (免疫反応、感染リスク、癌化リスク、培地の有害作用).....	分-33
辻 紘一郎	
5. 再生医療に用いる安全な細胞・培養技術の確立とその評価法 (染色体異常、DNA 損傷単一細胞除去による安全性確保技術).....	分-35
篠崎 尚史	
6. 細胞移植・組織移植におけるアロ応答に関するモニタリングと制御に関する研究.....	分-38
澤 芳樹	
7. 臍帯血間葉系細胞の骨、軟骨細胞への分化誘導とその評価に関する研究.....	分-40
高橋 恒夫	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷り

I 総括研究報告

厚生科学研究費補助金
(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)

平成 17 年度総括研究報告書

感染リスクの排除、同一性の確保、免疫反応、がん化等の抑制、
及び培地等による有害作用の防止に関する研究

主任研究者 土屋 利江 国立医薬品食品衛生研究所療品部 療品部長

研究要旨：

再生医療を広く臨床応用可能な医療に発展させるには、培養担体の感染リスクの排除、間葉系幹細胞の安全性、同一性の確保およびがん化、(アロにおける)免疫反応等の抑制といった様々な問題をクリアする必要がある。本研究ではこれらの検査法、評価法を確立すべく次の7課題について取り組み、以下の研究成果を得た。

1. 組織工学用スキャホールドのエンドトキシン試験法の確立と感染リスクの排除

現在市販されている三次元培養基材(スキャホールド)の微生物汚染状況を従来法により評価したと共に、同基材へのLPS吸着能に関して検討した。また、スキャホールドの微生物学的品質を評価するin vitro試験法(Human Cell Pyrogen Assay, HCPA)の開発を目指し、ヒト単球様MM6-CA8細胞に対する各種菌体成分の反応性を評価した。従来法により、市販スキャホールドに混在するエンドトキシン(lipopolysaccharide, LPS)、 β -グルカン類およびペプチドグリカンを定量した結果、微生物学的な品質はいずれの製品ともに大きな問題がないことが判明した。しかし、A社製骨再生用基材は非常に高いLPS吸着能を持つ可能性が唆され、今後、同製品やその他の類似製品からのLPS回収法に関して検討する必要がある。HCPAに関する予備的検討の結果、LPSや大腸菌乾燥菌体と同様、黄色ブドウ球菌乾燥菌体もMM6-CA8細胞に対する顕著なIL-6産生誘導能を示したことから、同測定法はグラム陽性細菌汚染の検出法としても有益であることが判明した。菌体成分含有シートを直接的にMM6-CA8細胞と共培養した際、菌体成分添加量に比例したIL-6産生が誘導された。また、大腸菌LPS含有コラーゲンシートからのLPS回収率は、いずれの添加量でもエンドトキシン試験の回収率を上回っていたことから、HCPAでは煩雑な前処理や抽出操作を行う必要がないことも明らかとなった。HCPAは、感度的にリムルス試験と大差がなく、種々の発熱性物質を探知できる利点を持つと共に、試料に対するヒト免疫担当細胞の応答性を指標としているため、スキャホールドをヒトに適用した際の生体反応を予測する方法として非常に有益であると思われる。今後、HCPAの有用性を確証するための総合的な研究を実施する。

2. 幹細胞を用いた細胞組織医療機器の安全性評価に関する研究

骨髄由来の間葉系幹細胞は、幅広い医療分野での利用が期待されている。骨髄間葉系幹細胞を用いた細胞組織医療機器の実現に向けての第一歩として、骨髄間葉系幹細胞の安全性評価が重要である。そこで本研究では、ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) の癌化の危険性について *in vivo* と *in vitro* の両系で検討した。まず、ヌードマウスを用いた細胞移植試験では hMSC をマウスの背部皮下へ 3×10^6 cells / mouse 移植し 16 週間観察したところ、腫瘍の形成は認められなかった。さらに、発癌イニシエーターである 3-methylcholanthrene 処理を施した hMSC についても同様の検討を行ったところ、hMSC を移植した場合と同様に、16 週間での腫瘍形成は認められなかった。以上の結果から、未分化の幹細胞を生体内に移植しても、ただちに癌化する可能性は低い事が示唆された。さらに、幹細胞の癌化の危険性について、*in vitro* の系で簡便に調べる方法を探るために、幹細胞 (hMSC) と腫瘍細胞 (HOS ; ヒト骨肉腫細胞、OUMS-27 ; ヒト軟骨肉腫細胞) におけるいくつかの遺伝子発現について比較検討した。c-myc、Wnt-5A、Oct-4、TGF β 1、TGF β 2、TGF β RI、TGF β RII、p53、p21、p16 の 10 遺伝子について調べたところ、幹細胞と腫瘍細胞間で mRNA 発現に有意な差が見られた遺伝子は TGF β RI、TGF β RII、p21、p16 であり、幹細胞の方が腫瘍細胞よりも発現レベルが高かったのは、TGF β RII と p21、反対に低かったのは TGF β RI であった。1 遺伝子は、幹細胞でのみその発現が認められ、腫瘍細胞では発現が認められなかった。さらに、hMSC の培養期間に依存してその発現レベルは上昇した。細胞周期制御因子である 1 遺伝子は、細胞増殖能という観点から幹細胞と腫瘍細胞との違いを示す指標の候補遺伝子の一つと考えられた。

3. 再生医療に用いる安全な細胞・培養技術の確立とその評価法

単一細胞の染色体 DNA 損傷、とくに 2 重鎖切断による DNA 断片化を高精度に観察するため、single cell pulse gel field electrophoresis (SCPFGE)を開発した。本法は位相を 90 度ずらした 2 組の電極を用い、直交電場を印加することにより長鎖 DNA を分離する。ヒト精子は極めて多様な DNA 断片化パターンを示した。SCPFGE 電気泳動像を指標として、DNA 断片化精子を分画、除去した。Percoll 沈降速度差遠心分離法、オプチデンツ沈降平衡法により精子を分画し、最終的に swim up 法により運動精子を分離すると、DNA 損傷比率は 1%以下に低下した。Single strand break (SSB)の観察には、アルカリ処理を行って DNA 2 重鎖を開裂させ、その後電気泳動をする方法 (コメント電気泳動法) が用いられてきたが、本条件では人工的に DNA 断片化が発生し、本法では精子 SSB の観察はできないことが示された。本研究では、SSB の定量的観察を目的としてヨーイングモーション電気泳動法を開発し、現在検出条件を詳細に検討している。

4. 間葉系幹細胞の均質性/同一性、および品質検査法の開発

移植用間葉系幹細胞の品質検査のために、DNA microarray および Real time RT-PCR を用いて、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞に選択的に発現している多数のマーカー遺伝子を同定した。これらのマーカー遺伝子には、腸骨、大腿骨、脛骨、齒槽骨由来の間葉系幹細胞で共通して高レベルに発現しているもの (共通マーカー) と、齒槽骨由来の間葉系幹細胞でのみ、ある

いは歯槽骨以外の間葉系幹細胞でのみ高レベルに発現しているもの(部位特異的マーカー)が存在した。これらの間葉系幹細胞マーカー遺伝子の発現レベルを測定することにより、移植用間葉系幹細胞の品質検査を簡便にかつ正確に行えるようになった。しかもこの検査法は、歯周病に対する細胞治療の臨床研究でも有効であった。

5. 幹細胞の安全性に関する研究

間葉系幹細胞を用いた再生医療の安全性に関する研究を行った。広島大学病院にて実施中の歯周病患者 10 人での安全性検査(血液検査、血清検査、培養液検査、培養細胞検査)を通して、臨床研究における安全性検査ガイドライン案を作成した。

6. 臍帯血間葉系細胞の骨、軟骨細胞への分化誘導とその評価に関する研究

骨、軟骨の再生において骨髄の間葉系細胞を用いての臨床研究がすすんでおり再生医療の細胞ソースとして注目されているが、その採取は患者への負担があり、遺伝性疾患を持っていたり、年齢が高い場合には採取や細胞の分化増殖能が保証されず、自己の骨髄由来間葉系細胞を用いることは難しい。非自己細胞が移植可能になれば適応は飛躍的に拡大すると考えられる。最近、臍帯血に多分化能を有する細胞が存在することが多く報告されている。我々は臍帯血由来間葉系細胞が骨、軟骨の再生医療に有用な細胞ソースとして可能性を検討する。

7. 細胞移植・組織移植におけるアロ応答に関するモニタリングと制御に関する研究

心臓移植患者を対象に、移植待機中と移植後の抗 HLA 抗体 (PRA 値) を測定し、移植後の拒絶反応を含めた臨床的パラメータとの関係を検討した。同種細胞移植による再生医療を安全かつ効果的に試行するには、アロ免疫応答のモニタリングと制御が必要となる事が示唆された。

分担研究者

土屋 利江 国立医薬品食品衛生研究所
療品部 部長

齋島 由二 国立医薬品食品衛生研究所
療品部 室長

澤田 留美 国立医薬品食品衛生研究所
療品部 主任研究員

篠崎 尚史 東京歯科大学市川総合病院
角膜センター センター長

加藤 幸夫 広島大学大学院医歯薬学
総合研究科 教授

辻 紘一郎 (株) ツーセル/広島大学
口腔生化 講師

高橋 恒夫 東京大学医科学研究所

細胞プロセッシング研究部門 客員教授

澤 芳樹 大阪大学大学院医学系研究科
外科学講座 教授

A. 研究目的

再生医療の発展に必要な種々の検査法、評価法の開発を目的とする。具体的には、以下の 7 課題について取り組む。

1. 組織工学用スキャホールドのエンドトキシン試験法の確立と感染リスクの排除

組織工学を基礎とする細胞を用いた再生医療技術の発展には、培養細胞の効果的な利用技術と高度な分化機能を示す細胞を大量に獲得するための足場となる培養担体

(スキャホールド)の開発が必須である。高度先端医療として期待が高まる再生医療工学で必要となるスキャホールドとしては、コラーゲンなどの天然由来材料のほか、生分解性材料を含めた合成高分子やセラミックスなど様々な担体が考案されている。スキャホールドの機能については開発段階において活発な基礎研究が成されているが、その品質は十分に評価されていないのが現状である。

グラム陰性細菌の表層抗原であるエンドトキシン (LPS) は極微量で発熱や炎症反応を惹起する強力な生理活性物質であり、組織工学製品の安全性を評価する上で重要な感染因子の 1 つとなる。天然材料から構成されるスキャホールドには、その起源上、LPS を初めとした様々な菌体成分が混入している可能性が高いことに加え、合成高分子や無機材料の LPS 汚染は未知な部分が多い。また、細胞培養時に使用する血清に含まれる LPS の材料への吸着性については全く検討されていない。

医用材料の発熱原性を評価する手法として、現在、ウサギ発熱試験とエンドトキシン試験を利用することができる。ウサギ発熱試験は発熱性物質によって誘導される生体発熱反応の真の強度を測定する *in vivo* 試験法であり、基本的に全ての発熱性物質の検出に利用できる反面、動物を使用する点と検出感度が比較的低い欠点を持っている。エンドトキシン試験は、カプトガニ血清中に存在する凝固系蛋白質のゲル化をマーカーとして、LPS を高感度で検出する *in vitro* 試験法であり、手軽に測定できるメリットがある反面、LPS 以外の発熱性物質を検出できない欠点を持っている。

現在、動物愛護の観点から、動物を利用した幾つかの試験法は *in vitro* 代替法に移行される方向にある。ウサギを使用する発熱性物質試験に関しても欧州を中心にヒト末梢血細胞またはヒト由来のライン化細胞を利用した新しい評価法 (Human Cell Pyrogen Assay, HCPA) の開発が進められている。HCPA の利点と欠点を表 1 に示した。エンドトキシン試験において検出される発熱性物質は LPS のみであるのに対し、HCPA では TNF α 、IL-1b、IL-6 などの内因性発熱物質を介して発熱を惹起する全ての発熱性物質を検出できる利点がある。この評価法では、発熱性物質により活性化されたマクロファージや単球細胞から遊離される炎症性サイトカインを発熱指標として定量的に測定するため、検出感度も比較的高い。HCPA においては、ヒト末梢血細胞とライン化細胞を使用することができる。末梢血は発熱性物質と反応する全ての血中成分を通常の生理学的比率で含んでいる利点があるが、その安全性、品質管理、供給面での問題が課題となる。一方、ヒト由来マクロファージ様 THP-1 ライン化細胞やヒト由来単球様 MM6 ライン化細胞の場合、供給面や安全性に関する障壁はないが、試験に供するまでに数週間の培養期間が必要であると共に、継代による性状変化や発熱性物質に対する反応性の変化などを確認する必要がある欠点を持っている。

HCPA は医薬品に混入する発熱性物質の検出を行うことを主目的としているが、医療機器への応用も十分可能であり、現在までに、アルギン酸塩 (マイクロカプセル基材)、リン酸カルシウム (bone replacement)、血液透析膜やエアフィルターなどへの応用

例が報告されている。過去、我々の研究グループも天然医用材料から製造された創傷被覆剤に含まれる発熱性物質の検出に HCPA を応用し、エンドトキシン試験、ウサギ発熱試験との相関性について検討した。同研究では、エンドトキシン試験とウサギ発熱試験が陽性である一方、HCPA が陰性となる製品の存在を明らかにしており、HCPA がヒトに対する現実的な安全性を評価する上で非常に有用であることを見出している。

本研究では、組織工学製品の上市化に寄与することを目的とし、我々の過去の研究成果を基礎として、HCPA を利用した各種スキャホールドの微生物学的安全性評価法の確立を目指す。従来の分析法では、材料からの菌体成分回収率を向上させる必要があるが、本法は固形物自体を試験材料として利用できる可能性が高く、生体へのスキャホールド適用時と類似した条件で試験を行うことが可能となり得る。また、前述のとおり、この試験法はウサギ発熱試験の代替法としてヨーロッパを中心に使用され始めており、将来、我が国にも導入される可能性があるため、その有効性を事前に評価しておくことにも大きな意義がある。平成 17 年度の本研究では、現在市販されているスキャホールドの微生物汚染状況を従来法により評価したと共に、材料への LPS 吸着能に関して検討した。また、スキャホールドの微生物学的品質を評価する *in vitro* 試験法として HCPA が利用可能であるか判断するため、ヒト単球様 MM6 細胞から誘導した LPS 高感受性株である MM6-CA8 細胞に対する各種菌体成分の反応性を評価した。

2. 幹細胞を用いた細胞組織医療機器の安全性評価に関する研究

幹細胞や人工素材を用いて、損傷を受けたり機能不全に陥ったりした細胞、組織、器官の再生または機能の回復を目指す「再生医療」が現在注目されている。

胚性幹細胞 (ES 細胞) は全能性を持つが受精卵を用いることから倫理的問題が大きいのに対し、成体幹細胞は ES 細胞のような倫理的問題がない。さらに実用的な面から、「再生医療」の研究分野の中で現在最も盛んに行われているのが「成体骨髄に存在する幹細胞を用いて (移植して) 組織の機能を再生させる方法の開発」であろう。

骨髄には間葉系幹細胞、造血幹細胞、血管内皮前駆細胞などが含まれている。中でも間葉系幹細胞は骨、軟骨、脂肪、筋肉へ分化可能な細胞として広く知られているが、さらに、神経細胞や肝細胞、心筋、皮膚など胚を越えた分化も報告されており、整形外科の分野のみならず動脈硬化症、心筋梗塞、肝硬変、糖尿病などの治療への応用も期待されている。骨髄間葉系幹細胞は採取も比較的容易で *in vitro* での培養技術も確立されているため、細胞組織医療機器の材料として最も実用に近いものの一つであろう。しかしその反面、幹細胞は多分化能と同時に自己複製能を持つ細胞であるため、正常細胞でありながら増殖能力を持つという点で癌細胞と共通の性質を持つともいえる。そのような背景の中、今年度に入って Rubio らにより脂肪組織由来のヒト間葉系幹細胞を長期間 (4~5 ヶ月) *in vitro* で培養すると自然に形質転換 (癌化) するという報告がなされた (Cancer Res 2005; 65(8): 3035-9)。このため、幹細胞を用いた細胞組織医療機器の実用化に向けて幹細胞の安全性評価法の早期確立が重要課題であると思

われる。特に細胞組織医療機器に利用するために生体内から取り出し *in vitro* で培養した幹細胞の安全性についての検討は大変重要であろう。

そこで本研究では、今年度、幹細胞の癌化の危険性について *in vivo* と *in vitro* の両系で検討する事にした。まず、*in vivo* の系として、未分化の幹細胞を生体に移植した場合に癌化等の変化が起こるかどうかを調べるために、ヌードマウスの皮下にヒト骨髄由来の間葉系幹細胞 (hMSC) を移植し、生体の環境下での腫瘍形成の有無について 16 週間観察した。さらに、*in vitro* の系で、細胞増殖という観点から幹細胞と腫瘍細胞の特性について調べ、癌化のキー遺伝子となりうる遺伝子の探索のために、それぞれの細胞におけるいくつかの遺伝子発現について比較検討した。現在、幹細胞を用いた細胞組織医療機器として、再生骨、再生軟骨をターゲットとした研究がさかんに行われており、その実用化が近いと考えられるため、本研究では、幹細胞と比較する腫瘍細胞として、ヒト骨肉腫由来細胞 (HOS) とヒト軟骨肉腫細胞 (OUMS-27) を選択した。本研究の最終目的としては、幹細胞におけるいくつかの (数個の) 遺伝子発現について調べることで、その安全性 (癌化の危険性) を評価できる系の確立を目指す。

3. 再生医療に用いる安全な細胞・培養技術の確立とその評価法

不妊治療は組織、細胞移植による再生医療の嚆矢であり、すでに本邦における出生数の 1-2% は不妊治療によるものである。不妊治療により出生した児の健全性保証が、重要な課題となっている。In vitro で受精、初期発生を行った胚の移植は本質的には染

色体の移植医療であり、われわれは配偶子 (卵、精子)、胚の DNA 非特異的構造異常 (DNA 2 重鎖切断、片側の開裂、塩基変異)、遺伝子などを多面的に解析する必要があると考えている。

近年、移植を目的とした組織培養が行われるようになり、これらの領域においても *in vitro* で増殖させた細胞の質の評価が不可欠であり、形態学的観察に加えて分子生物学的な機能評価が求められる。従来、DNA 評価は数百万個の細胞から抽出した DNA 標品の解析が中心であったが、移植細胞評価においては細胞 1 個の DNA を解析する必要がある。

4. 間葉系幹細胞の均質性/同一性、および品質検査法の開発

間葉系幹細胞は、骨、軟骨、脂肪、筋肉、神経へと分化させることができ、成人患者からも分離できる。しかし臨床効果を保証するには、移植用の培養細胞が幹細胞としての同一性 (均質性) と安全性を保持していることを検定する必要がある。そこで本研究では、再生能力が高くかつ均質な幹細胞を容易に安全に供給するためのプロトコールを 3 年間で確立し、さらにそれらに科学的根拠を与える。この研究は、将来的に我が国での再生医療の普及と発展に貢献することは確実である。

5. 幹細胞の安全性に関する研究

間葉系幹細胞を用いる再生医療では、間葉系幹細胞製品の安全性を評価する標準的な方法が求められている。そこで、本研究では、再生医療に用いる間葉系幹細胞の安全性を評価するために、基本的考え方、指針の要件を参考にして、また臨床研究や臨床治験に則するような時間的要件と培養方

法を考慮して、標準安全性検査の手順と方法を提案する。

6. 臍帯血間葉系細胞の骨、軟骨細胞への分化誘導とその評価に関する研究

骨・軟骨再生医療が必要な疾患は変形性関節症、外傷や腫瘍切除後の骨、軟骨の欠損、先天性の変形、奇形など数多く存在する。骨・軟骨の欠損に対して自己組織移植が現在行われているが、移植できる組織の量は制限があることから幹細胞の移植医療での有用性が注目されている。骨・軟骨の再生において骨髄の間葉系細胞を用いた臨床研究がすすんでおり再生医療の細胞ソースとしてもっとも注目されているが、その採取は患者への負担があり、遺伝性疾患を持っていたり、年齢が高い場合には採取や細胞の分化増殖能が保証されず、自己の骨髄由来間葉系細胞を用いることは難しい。非自己（アロ）細胞が移植可能になれば適応は飛躍的に拡大すると考えられる。臍帯血はドナーに負担やリスクが無く、血液製剤と同じレベルで安全性が高い、また臍帯血バンクにおいてH1Aが調べられたユニットが保存されており、アロの細胞ソースとして有力である。この臍帯血の中の細胞を再生医療に使用できるかを検討する。

7. 細胞移植・組織移植におけるアロ応答に関するモニタリングと制御に関する研究

細胞移植による「再生治療」の効果と安全性を向上させ、広く臨床応用可能な医療に発展させるには、治療用細胞の安定供給、質的保証や緊急時対応の面での問題を克服する必要がある。移植細胞源に同種細胞を使用する事が可能になれば、これらの問題が緩和され倫理的にも容認可能と考えられるが、アロ免疫応答による拒絶反応への対

処が必要になる。

本研究の最終目的は、同種細胞移植（骨格筋・骨髄細胞など）による循環器系疾患に対する再生医療に、如何なるアロ免疫応答モニタリングが必要で、どのような方法で拒絶反応制御が可能かを明らかにすることにある。17年（初年）度は、まず現行のアロ免疫応答モニタリングと心臓移植臨床経過の関係性を明らかにする。

B. 研究方法

1. 組織工學用スキャホールドのエンドトキシン試験法の確立と感染リスクの排除

本実験で使用したガラス製、金属製、テフロン製器具は使用前に250℃で2時間加熱処理を行った。また、プラスチック製器具はパイロジェンフリーの製品を使用した。

(1) スパイク用 LPS および菌体の調製

大腸菌 0111 株および黄色ブドウ球菌 209P 株を普通ブイヨン培地中、37℃、16 時間振とう培養後、培養液の pH を中性に調整し、100℃、10 分間加熱して殺菌した。同加熱死菌体を連続遠心分離により集菌し、蒸留水で 3 回洗浄した後、エタノール、アセトンおよびジエチルエーテルにより順次脱脂し、乾燥菌体とした。大腸菌 03 K2a, K2b:H3 ATCC 株由来 LPS は、同様の方法により調製した乾燥菌体からフェノール/水法により抽出し DNase/RNase 処理後、超遠心分離の反復により精製した。調製した大腸菌 03 K2a, K2b:H3 由来 LPS および大腸菌 0111 菌体の LPS 活性強度は、それぞれ 27.5 EU/ng および 0.159 EU/ng であった。

(2) 市販スキャホールド

本研究に使用した市販スキャホールドの性状を表 2 に示した。A 社製スキャホールドは同社から分与を受け、その他の製品は購入した。

(3) LPS 吸着能の評価

10% 牛胎児血清および 1% ペニシリンを含む α -MEM 培地に FITC 標識大腸菌 LPS (FITC-LPS, Sigma) を 1 mg/ml の濃度で溶解した。コラーゲン/HA 複合体から成る A 社製スキャホールドを同培地 5 ml に浸漬し、37°C で 1 時間緩やかに振とうした。培地からスキャホールドを取り出し、洗浄することなく FITC-LPS 非含有 α -MEM 培地 5 ml に移し、再度、37°C で 1 時間緩やかに振とうした。同操作を更に 2 回繰り返した後、各培地中に含まれる FITC 蛍光強度を測定した (Ex 520 nm, Em 495 nm)。検量線は 0.01 - 5 mg/ml の濃度範囲で作製した ($r=0.999$)。また、大腸菌 O3 株 LPS (1 mg/ml-PBS 緩衝液) を用いて同様の操作を行い、各処理を施したスキャホールドを凍結乾燥した後、無菌的に粉碎し、後述したコラーゲンからの LPS 回収法に従ってリムルス活性を測定した。

(4) LPS および菌体スパイク標品の調製

医用材料としては、ブタ皮膚由来アテロコラーゲン (Type I & Type III : 日本ハム製) と多孔性ハイドロキシアパタイト (HA, 東芝セラミックス製ネオボーン: 粒径 0.5-1.0 μ m, 孔径 150 nm) を使用した。同コラーゲンに種々の量の大腸菌 O3 株 LPS、大腸菌 O111 株乾燥菌体および黄色ブドウ球菌 209P 株乾燥菌体を添加し、凍結乾燥後、直径 1.6

cm、厚さ 1.5 mm の弱架橋化コラーゲンシートを調製した。また、同様の方法により、各種の菌体成分を含むコラーゲン/HA シート (重量比 3:5) を作製した。

(5) 菌体成分含量の測定

コラゲナーゼ (Sigma 社製 Type 1A-S) 溶液 1 ml (1 mg/ml in 5mM HEPES Buffer) を平衡化した Profos 社製 EndoTrap Blue ゲル 100 ml 入りの試験管に加え、4°C で 8 時間、ロータリーシェーカーを使用して緩やかに攪拌した後、同混合液の全量をもう 1 本の EndoTrap Blue ゲル 100 ml 入りの試験管に移した。引き続き、4°C で 16 時間、同様にインキュベーションした後、遠心して上清を採取し、精製コラゲナーゼ溶液とした。

LPS は第 14 改正日本薬局方「エンドトキシン試験法」に準拠し、カイネティック比色法により定量した。定量試薬としてエンドスペシー ES-50M (エンドトキシン特異的リムルス試薬: 生化学工業) を用い、標準品として日本薬局方標準エンドトキシン (JPSE, 大腸菌 O55:B5 株 LPS) を使用した。反応干渉因子試験も日本薬局方の記載に準じて行った。LPS 含量測定用試験原液は下記のように調製した。

コラーゲン材料は正確に重量を測定した後、1 ml の HEPES 緩衝液 (5 mM, pH 7.3) 中、37°C で 16 時間、精製コラゲナーゼにより消化した。処理液を塩酸性 (pH 3, 最終容量 2 ml) とし、氷冷下、10 分間超音波処理後、その遠心上清を原液として注射用蒸留水を用いて希釈系列を作製した。無機系材料は無菌的に粉碎した後、PEG 溶液 (0.4% polyethyleneglycol, 50mM EDTA, 1% Tween

20 : 使用時 100 倍希釈 : 生化学工業) により、室温下、1 時間緩やかに振とう抽出して、試験液を調製した。合成ポリマー材料は PEG 溶液中、ホモジナイザーにより破碎した後、室温下、1 時間緩やかに振とう抽出して、試験液を調製した。

β -グルカン類はファンギテック G テストTM (生化学工業) を用いて定量した。ペプチドグリカン は SLP 試薬 (和光純薬工業) を用いて定量した。 β -グルカンおよびペプチドグリカン含量測定用試験原液は、正確に秤量した各試料に 1mM KOH (1 ml) を加え、10 分間超音波処理後、100°C・15 分間加熱し、再度 10 分間超音波処理して調製した。

いずれの測定も SK603 マイクロプレートリーダー (生化学工業) を使用して行った。

(6) IL-6 産生誘導活性の測定

試料としては、大腸菌 03 株 LPS、大腸菌 0111 株乾燥菌体、黄色ブドウ球菌 209P 株乾燥菌体および各菌体成分を含有したコラーゲンシートとコラーゲン/HA の他、ペプチドグリカン (BioChemika)、 β (1 \rightarrow 3)-D-グルカン (和光純薬)、黄色ブドウ球菌由来外毒素 TSST-1 (Sigma)、ネオボーンおよび市販スキャホールドを使用した。ペプチドグリカンおよび TSST-1 は EndoTrap Blue (バッチ法) により精製した。 β (1 \rightarrow 3)-D-グルカンは 0.3 M KOH に溶解後、1 mM KOH により希釈系列を作製した。

細胞としては、ヒトの単球様細胞株 Mono-Mac-6 からクローニングした LPS 高感度応答性の亜株 MM6-CA8 を用いた。同細胞を calcitriol (1,25-dihydroxy- vitamin D3; 10 ng/ml) により 72 時間刺激した後、 1×10^6 cells / 0.9 ml / well とするよ

うに 24-well プレートに分注し、試料を 0.1 ml または 1 mg 添加して 17 時間培養した。その後、培養上清中のインターロイキン 6 (IL-6) の濃度を市販の ELISA キット (R&D) を用いて測定した。

2. 幹細胞を用いた細胞組織医療機器の安全性評価に関する研究

1. ノードマウスへの間葉系幹細胞移植試験について

1) 細胞培養

ヒト間葉系幹細胞 : hMSC は Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (MSCGM) に Mesenchymal Cell Growth Supplement (MCGS) を加えた培地で培養した。hMSC は購入後 17 日間培養し増殖させた後ノードマウスへの移植に用いた。また移植直前の 3 日間、一部の細胞を、発癌イニシエーターである 3-methylcholanthrene (MC) を 0.1 μ g/mL 添加した培地で培養した。

ヒト子宮頸癌由来細胞 : HeLa S3 は Ham's F-12 Nutrient Mixture に 10% fetal bovine serum (FBS) を加えた培地で培養した。

2) ノードマウスへの細胞移植

2)-1. 動物

日本チャールズリバー(株)より購入した BALB/c AnNCrj-nu ノードマウス (雄性) 4 週齢のものを 24 匹用いた。

2)-2. *in vivo* における細胞移植試験

ノードマウスを 1 週間予備飼育後、以下の 4 群に分け、マウスの背部皮下に細胞 (3×10^6 cells / mouse) を移植し、移植部位の腫瘍形成について 16 週間観察した。a)

Control 群: PBS のみ皮下注射、b) hMSC 群: hMSC を移植、c) hMSC (MC)群: hMSC の培地中に移植 3 日前より MC を添加した細胞を移植、d) HeLa S3 群: ポジティブコントロールとしてヒト子宮頸癌由来の HeLa S3 細胞を移植。hMSC は購入後約 2 週間の *in vitro* 培養後に実験に供した。

2. 幹細胞 (hMSC) と腫瘍細胞 (HOS, OUMS-27) との遺伝子発現の比較

1) 細胞培養

ヒト間葉系幹細胞: hMSC は MSCGM に MCGS を加えた培地で培養した。

ヒト骨肉腫細胞: HOS (大日本住友製薬(株)) は minimum essential medium (MEM; Eagle) に 0.1mM non-essential amino acid (NEAA) と 10%FBS を加えた培地で培養した。

ヒト軟骨肉腫細胞: OUMS-27 は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; 日水製薬(株)) に 0.1mM NEAA と 10%FBS を加えた培地で培養した。

2) Total RNA の調製

hMSC、HOS、OUMS-27 から ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて total RNA を調製した。

3) Real time (RT) -PCR による mRNA 発現量の定量的解析

抽出した total RNA の cDNA への逆転写は First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) (Roche Diagnostics) を用いて行った。

そしてそれぞれの細胞中の *c-myc*、*Wnt-5A*、*Oct-4*、*TGFβ1*、*TGFβ2*、*TGFβRI*、*TGFβRII*、*p53*、*p21*、*p16* の mRNA 発現量について Real time (RT) -PCR 法にて検討した。

c-myc、*Wnt-5A*、*Oct-4*、*p21*、*p16* の mRNA 発現を測定するための PCR に用いたプライマー及びアニーリング温度は表 7 に示した。*c-myc*、*Wnt-5A*、*Oct-4* の PCR 反応は、95°C で 5 秒、それぞれのアニーリング温度で 10 秒、72°C で 12 秒を 40 サイクル行った。*p21* の PCR 反応は、95°C で 10 秒、60°C で 10 秒、72°C で 10 秒を 40 サイクル行った。*p16* の PCR 反応は、95°C で 10 秒、60°C で 10 秒、72°C で 6 秒を 40 サイクル行った。一方、*TGFβ1*、*TGFβ2*、*TGFβRI*、*TGFβRII* の mRNA 発現の検討のための PCR 反応はそれぞれライトサイクラー専用ヒト mRNA 定量プライマーセット (Search-LC) を用いて、PCR 条件もこのキットのプロトコールに従って行った。

Wnt-5A、*Oct-4* の PCR 反応は、SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time) (TaKaRa) を用い、それ以外のものの PCR 反応は、Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics) を用いて Roche Light Cycler (version 4.0) で行った。

3. 再生医療に用いる安全な細胞・培養技術の確立とその評価法

われわれはヒト精子を対象とし、個々の細胞における 2 重鎖切断 (DSB) に伴う DNA 損傷を定量的に観察するため、single cell pulse gel field electrophoresis (SCPFGE) を開発した。装置は位相を 90 度ずらした 2 組の電極を有し、3 秒インターバルで直交電場 (2.0V/cm、10 分間) を印加する。表面親水化処理したスライドガラス上に 100μg/ml のアフィニティクロマトグラフィ精製トリ

プシンを含むアガロースに懸濁した細胞 (30 万/ml) を滴下し、薄膜ゲルを作製した。これを界面活性剤、トリプシン溶液に浸漬して、細胞融解、核蛋白の除去を行った。

(倫理面への配慮)

検査に供した精液をインフォームドコンセントを得た後、研究に使用した。

4. 間葉系幹細胞の均質性/同一性、および品質検査法の開発

腸骨および歯槽骨からヒト間葉系幹細胞を分離して、FGF-2 存在下で数代にわたって培養して RNA を抽出した。均質性を検討するためには、ヒト間葉系幹細胞の母集団から 10-20 個のクローンを分離して RNA を抽出した。さらに繊維芽細胞からも RNA を抽出した。これらの RNA を DNA マイクロアレイにて解析して、マーカー遺伝子を同定した。またマーカー遺伝子の発現レベルを定量的 PCR で確認した。

5. 幹細胞の安全性に関する研究

広島大学病院で行われている臨床研究〈歯周病への自家間葉系幹細胞移植〉において、安全性を評価するための手順を決定し、この手順に従って、細菌、ウイルス、マイコプラズマ、エンドトキシンの検査を実施した。

(倫理面への配慮)

提供者に対するインフォームドコンセント、安全性検査結果の開示を行っている。試験情報の個人情報保護のために、試験データ管理を周知徹底している。試料等の取扱いについては提供者の同意を得た範

囲で行っている。

6. 臍帯血間葉系細胞の骨、軟骨細胞への分化誘導とその評価に関する研究

東京臍帯血バンクにて研究用と判断された臍帯血のインフォームドコンセントを得て使用した。臍帯血は通常の方法で採取した後、フィコールに重層し、遠心後分離した。単核球層を回収後シャーレにて DMEM+20%FBS+ 10^{-7} M dexamethsone の培養基で接着させ、3-4 週間後、形成されたコロニーを回収、DMEM+20%FBS 培養液で増殖させた。増殖させた細胞は骨・軟骨への分化能を検討した。骨細胞への誘導は dexamethsone, ascorbic acid 2-phosphate, β -glycerophosphate の存在下で誘導培養を 21 日間行い、コッサ染色で確認した。軟骨細胞への分化はペレット法を用いた。誘導因子 bone morphogenic protein-2, transforming growth factor- β 3 の存在下で 3 週間培養後、ペレットの paraffin 切片で toluidine blue 染色と軟骨特異的 type II collagen 免疫染色を行った。また、軟骨細胞へ誘導したペレットの大きさは骨髄由来間葉系細胞と比較した。

(倫理面への配慮)

研究に用いる臍帯血は、東京臍帯血バンクより細胞数などの面から移植用としては適さない臍帯血について、ドナーの同意を得た上で提供を受けている。なお、提供を受けるにあたっては、東京臍帯血バンクの倫理委員会の審査承認をうけている。

7. 細胞移植・組織移植におけるアロ応答に

関するモニタリングと制御に関する研究

31例の心臓移植適応患者から登録時とその後の経過中に血清を採取し、Panel Reactive Activity (PRA)の測定を行った。PRA値の推移と他の臨床的パラメーター（登録前治療、輸血歴、人工心臓装着の有無、心臓移植後の拒絶反応、血行動態など）の関係を検討した。血清は治療上必要な採血の余剰部分を使用し、総ての対象患者に、血清を含めた採取標本が研究目的に使用され得る事を含めた心臓移植に関するインフォームドコンセントが行われた。また、これら一連の心臓移植治療は大阪大学医学部倫理委員会の承認と第3者評価委員会の監視下に行われている。

C. 研究結果

1. 組織工学用スキャホールドのエンドトキシン試験法の確立と感染リスクの排除

(1) 菌体成分汚染サーベイ試験

本研究で使用した5種類の製品に含まれるLPS、 β -グルカンおよびペプチドグリカン量を従来法により測定した結果を表3に示した。C社製コラーゲン製品からは僅かにLPSが検出されたが、無機材料およびポリ乳酸により構成される製品からは、微生物汚染の指標であるこれら3種の菌体成分が検出されなかった。また、A社製スキャホールドからは極微量の β -グルカンが検出された。A社製製品にLPS汚染は認められなかったが、後述するように、同製品は非常に高いLPS吸着能を示す可能性が示唆された。

(2) LPS吸着能の評価

FITC-LPSを使用してコラーゲンとHAから構成されるA社製スキャホールドに対するLPS吸着能を評価し、その結果を図1に示した(FITC-LPS初濃度1mg/ml、培地量5ml)。スキャホールドを浸漬させた後の培地上清のFITC-LPS濃度は0.94mg/mlであったことから、同スキャホールドには0.3mgのFITC-LPSが含浸されたことが明らかとなった。FITC-LPS含有培地に浸漬したスキャホールドを通常の培地に移して洗浄操作を行った結果、同スキャホールドからはキャリアオーバー分を含めて0.85mgのFITC-LPSが回収された。同様に、2回目および3回目の洗浄では、それぞれ0.25mgおよび0.15mgのFITC-LPSが回収された。3回目抽出後の培地中に含まれるFITC-LPS濃度は0.03mg/mlであり、初濃度の3.0%に相当した。

FITC-LPSの代わりに大腸菌O3株LPSを使用して同様の実験を行い、スキャホールドに吸着したLPS量を精製コラゲナーゼ消化/塩酸法を併用したエンドトキシン試験により測定した結果、LPS含有PBS緩衝液(1mg/ml)に浸漬させたスキャホールドおよび1回から3回洗浄処理したスキャホールドともに、LPS活性が全く検出されなかった。

(3) 菌体成分に対するMM6-CA8細胞の応答性評価

3-1. 菌体成分

本実験で使用した各種菌体成分のLPS含量を表4に示した。 β (1 \rightarrow 3)-D-グルカンのLPS含量はリムルス試験の検出限界以下であった。また、黄色ブドウ球菌乾燥菌体のLPS含量は0.48EU/mg(1ngLPS=5EUとして96pg/mg相当)であった。一方、TSST-1とペプチドグリカンは、それぞれ74.9EU/mg

および 102 EU/mg の LPS を含んでおり、MM6-CA8 細胞に対する IL-6 産生誘導能を評価する上で支障を来す恐れがあったため、EndoTrap 処理による LPS 除去を試みた。その結果、両者の LPS 含量は、それぞれ 0.16 pg/ml (1 ng LPS = 5 EU として 32 pg/ml 相当) および検出限界以下まで低下した。

MM6-CA8 細胞に対する種々の菌体成分の IL-6 産生誘導能を評価し、その結果を図 2 に示した。いずれの菌体成分も混入している LPS の影響が観測されない濃度範囲において試験を実施した。JPSE と大腸菌 03 株 LPS は同細胞に対して極微量で IL-6 産生誘導能を示し、JPSE では 0.05 EU/ml (1 ng LPS = 5 EU として 10 pg/ml 相当)、大腸菌 03 株 LPS では 5 pg/ml 以上の濃度で用量依存的に IL-6 産生誘導能が上昇した。大腸菌 0111 株乾燥菌体および黄色ブドウ球菌乾燥菌体は 1 ng/ml または 10 ng/ml 以上の濃度範囲において用量依存的に IL-6 産生誘導能を示した。また、ペプチドグリカンにも IL-6 産生誘導能が認められたが、大腸菌 0111 株菌体や黄色ブドウ球菌菌体と比較して、その強度は劣っていた。一方、黄色ブドウ球菌が産生する外毒素の 1 つである TSST-1 は IL-6 産生誘導能を示さなかった。また、 β (1 \rightarrow 3)-D-グルカンには 100 ng/ml 以上の濃度で弱い IL-6 産生誘導能が認められた。

3-2. 菌体成分含有コラーゲンシート

種々の量の菌体成分を含むコラーゲンシート 1 mg を試料とし、抽出操作を行うことなく、直接、MM6-CA8 細胞と共培養した時の IL-6 産生量を評価した。表 5 に示したように、菌体成分を含まないコラーゲンシートによって誘導される IL-6 量はバックグラン

ド値 (7.5 pg/ml) を多少上回る程度であったが、コラーゲンに大腸菌 03 株 LPS、大腸菌 0111 株乾燥菌体および黄色ブドウ球菌乾燥菌体をスパイクしたシートでは、添加量に比例して IL-6 産生量が顕著に増加した。同様にコラーゲン/HA シートを試料とした場合も菌体成分の添加量に比例して IL-6 産生量が増加したが、コラーゲン/HA シート自体によっても 51.0 pg/ml の IL-6 が産生された。一方、コラーゲン/HA シートの HA 原材料であるネオボーン自体には、顕著な IL-6 産生誘導能が認められなかった。

3-3. 市販スキャホールド

使用する細胞数と試料重量の相関性や判定に使用するマーカー検索など、反応系の最適化に関する実験は行っていないが、予備的に C 社製コラーゲン製品を試料として、IL-6 産生誘導能を指標とした HCPA を適用した。その結果、同スキャホールド (1 mg) は MM6-CA8 細胞から 14.1 pg/ml (IL-6 産生バックグラウンド 4.8 pg/ml) の IL-6 産生を誘導した。

2. 幹細胞を用いた細胞組織医療機器の安全性評価に関する研究

1. ノードマウスへの間葉系幹細胞移植試験について

マウスの成長に対して、hMSC, HeLa S3 の移植による影響は見られなかった (図 3)。マウスの背部皮下にそれぞれの細胞 (3 \times 10⁶ cells / mouse) を移植して 1 週間後に、HeLa S3 群では全てのノードマウス (6/6) に腫瘍形成が認められたが、hMSC 群または hMSC (MC) 群では腫瘍形成は認められ

なかった。(図4)

さらに16週間後でもhMSC群、hMSC(MC)群両群とも腫瘍形成は観察されなかった(図5、表8)。

2. 幹細胞(hMSC)と腫瘍細胞(HOS, OUMS-27)との遺伝子発現の比較

c-mycのmRNA発現については、骨肉腫由来細胞であるHOSでの発現が、幹細胞であるhMSCと軟骨肉腫由来細胞であるOUMS-27に比べて有意に低かった(図6)。Wnt-5AはOUMS-27での発現が、hMSC、HOSに比べて有意に高かった(図7)。Oct-4は、3細胞間でそのmRNA発現に有意な差は認められなかった(図8)。TGFβ1は、OUMS-27での発現が、hMSCに比べて有意に高かったが、HOSとhMSC間では有意な差はなかった(図9A)。TGFβ2は、OUMS-27での発現が、hMSC、HOSに比べて有意に高かった(図9B)。TGFβRIは、そのmRNA発現がOUMS-27>HOS>hMSCの順で有意に高かった(図10A)。TGFβRIIは、hMSCでの発現が、HOS、OUMS-27に比べて有意に高かった(図10B)。p53は、HOSでの発現が、hMSC、OUMS-27に比べて有意に高かった(図11)。p21は、hMSCでの発現が、HOS、OUMS-27に比べて有意に高かった(図12)。p16は、hMSCではそのmRNA発現が認められたが、HOS、OUMS-27では発現が認められなかった(図13)。さらに、hMSCの培養期間によるp16のmRNA発現の変化について検討したところ、培養期間に依存してその発現は有意に上昇した(図14)。

3. 再生医療に用いる安全な細胞・培養技術の確立とその評価法

SCPFGEにより泳動を行うと、1.連続するDNAファイバーが原点から伸展する、2.DNAファイバーの先に断片化DNA、3.鎖長が異なるDNA断片が展開する、4.原点が消失し、高度断片のみを認める、など多様な像が得られた。これまで報告されたアルカリコメット法によるDNA断片化研究は、粒子状の断片化DNA像の有無でDNA損傷を判定していた。一般的にDNAはアルカリ条件に安定であるとされてきたが、本研究で取り扱う1000万baseレベルのDNAは酸、アルカリに脆弱であり、その取り扱いに関しては、pH、活性酸素等に十分な注意が必要であることが明らかになった。この結果は、汎用されるアルカリコメット法がDNA断片化研究には不適であることを示唆しており、さらに定量性の高い検出法の開発を続ける必要がある。

上述したSCPFGEにより射精精液を観察すると、DNA断片化像を呈する精子の比率は20-70%程度であった。本研究で開発した方法を指標としてDNA損傷精子の排除を試みた。Percollを密度勾配担体とする沈降速度差遠心分離法で精子を分離した後、オプチデンツを担体とする沈降平衡法を行うと、精子は2峰性に分布した。上層のDNA損傷比率は1%以下に低下したが、下層ではほとんどがDNA高度断片化像を示した。この結果はDNA損傷に伴い、細胞性状、特に密度が変化することが明らかとなった。上層の精子分画は運動率が高く、先体反応誘起能が高かった。さらに電顕による形態観察の結果、超微形態も良好であった。

ヒト精子核DNAにおけるsingle strand break(SSB)観察の基礎的検討として、単一

細胞の DNA fiber をできるだけ伸展する、fiber 中の nick を検出する方法を検討した。新たにヨーイングモーション電気泳動法を開発し、位相を 120 度づつずらして 3 回泳動することにより各 DNA fiber を 0.5-1.0mm 程度伸展させることができた。DNA ポリメラーゼ - FITC-dATP を用いる nick translation 変法により DNA fiber 中の nick 部位を検出できた。大腸菌 (DNA base 数: 約 430 万 base) をマーカーとして、伸展ヒト精子 DNA 鎖長を推定したところ、最長のもので 1000 万 base 程度の連続した DNA fiber が得られた。(図 15)

4. 間葉系幹細胞の均質性/同一性、および品質検査法の開発

幹細胞の均質性 (同一性) を確保する培養方法をすでに開発した。また歯周病への自家間葉系幹細胞移植の有効性を実験的に明らかにして報告し、広島大学病院での臨床研究を開始した。さらに、幹細胞のマーカー遺伝子および蛋白を同定して報告した (Ishii et al., BBRC 2005) (2 種類の特許)。マーカー遺伝子については、骨の種類に関わらず、骨髄由来間葉系幹細胞に共通なマーカー遺伝子を多数同定した。

5. 幹細胞の安全性に関する研究

骨髄採取を行った 9 症例の間葉系幹細胞の安全性を評価した。歯周病への自家間葉系幹細胞移植における①登録前 (血液) 検査、②自己血清検査、③培養液検査、④培養細胞検査の結果は、10 人の患者さんのうち 1 人の培養液検査でエンドトキシン値が

高値 (520000 EU/L) に検出された。しかし、同一試料の細菌検査結果は陰性であった。ウイルス検査に関して、登録前 (血液) 検査と培養細胞検査でウイルスは検出されなかった。

6. 臍帯血間葉系細胞の骨、軟骨細胞への分化誘導とその評価に関する研究

培養後コロニーを形成する間葉系細胞の回収率は、採取後の臍帯血をフィコール分離するまでの時間 (>5 hr) と容量 (<50ml) に影響を受けた。得られた細胞の表面マーカーは骨髄間葉系細胞と同じく、また胎盤由来間葉系細胞とも差がなかった。コッサ染色の結果、calcium の沈殿を確認されて骨細胞への分化が確認された。軟骨細胞に関して 3 週間培養後、ペレットは白くまた大きくなり、透明度を増した。paraffin 切片で toluidine blue 染色と type II collagen 免疫染色が陽性であった。臍帯血由来間葉系細胞は骨髄由来間葉系細胞と比較して多量の軟骨基質を合成することを示された。臍帯血由来間葉系細胞は骨、軟骨細胞への分化誘導の in vivo での詳細をさらに検討する必要がある。

7. 細胞移植・組織移植におけるアロ応答に関するモニタリングと制御に関する研究

1. 心移植登録時、3 例の PRA 陽性患者を認めた。全例に血小板輸血歴があり、2 例は左心補助人工心臓装着後の患者であった。

2. PRA 陽性 2 例に心臓移植を行った。ともに移植直前の対ドナー直接クロスマッチ

試験は陰性であった。1例のPRA値は登録中に低下したが、他例は低下不十分で、シクロフォスファミドとIVIgによるPRA抑制治療を行った。両例ともに心移植後に液性拒絶反応が強く疑われ、血行動態の悪化を見た。液性拒絶反応の臨床的治療において、ドナー抗体の検出と生検材料の免疫組織検査が有用であった。

D. 考察

1. LPSはグラム陰性細菌細胞壁表層に局在するリポ多糖体である。グラム陰性細菌は、水中（河川水および海水）、大気中、土壌中に広く分布している。それ故、天然由来医用材料は、原料自体がグラム陰性細菌により汚染されている可能性があると共に、その製造工程中での混入により、最終製品が同細菌により汚染されることも考えられる。細菌自体は各種の滅菌処理により殺滅或いは除去することができるが、菌体成分であるLPSは通例の滅菌条件では分解を受けず、その除去も困難である。我々は、過去に実施した市販創傷被覆剤の微生物汚染サーベイ試験において、アルギン酸製品およびコラーゲン製品の幾つかに相当量の菌体成分汚染があることを見出している。そこで、現在市販されている組織工学用スキャホールドの微生物汚染状況を従来法により評価した結果、無機製品および合成ポリマー製品からはLPS、 β -グルカン類、ペプチドグリカンが検出されず、微生物学的な品質に問題ないことが明らかになった。また、C社製コラーゲン製品からは極微量のLPSが検出されたが、単位重量当たりの検出量は大きな問題となり得ないことが判明した。A社

製スキャホールドからは微量の β -グルカンが検出された。通常、 β -グルカン汚染が認められる製品にはLPS汚染も観察されるが、同製品からLPSが検出されなかったことは非常に興味深い結果である。

患者由来の自己血清を用いて細胞培養を行う場合は感染リスク因子による汚染の問題を考慮する必要はないが、その他の場合は培養時に使用する血清の品質を確保する必要があると共に、スキャホールド上で細胞を培養する場合はスキャホールド自体への感染リスク因子の吸着挙動も評価しておく必要がある。FITC標識LPSを使用してA社製スキャホールドへのLPS吸着能を評価した結果、浸漬後3回洗浄した培地上清へのLPS溶出量はキャリーオーバー分を含めて初濃度の3%程度であった。しかし、大腸菌O3株LPSを含むPBS緩衝液に浸漬後、洗浄および凍結乾燥した各試料からはLPS活性が全く検出されなかった。精製コラーゲナーゼ消化/塩酸法を併用したエンドトキシン試験ではコラーゲナーゼに残存するLPS活性がバックグラウンドとして検出されるが、これらの試料のエンドトキシン試験では同バックグラウンドも検出されなかった。前処理として実施した精製コラーゲナーゼ消化中の反応液のpHは中性であり、LPSが処理中に分解する可能性が否定されたことから、A社製スキャホールドに含浸させた高濃度のLPSが検出不能となった要因として、同製品が非常に高いLPS吸着能を持つことが示唆された。A社製スキャホールドは未焼成のHAを構成成分として含むため、蛋白質を初めとした様々な物質を吸着すると共に、マグネシウムイオンやリン酸イオンなどの交換能を持つことが推測される。一方、LPSは

血清学的抗原性を決定する多糖部分および生物活性を担うリポド A 部分にリン酸基を有するため、HA に吸着される可能性がある。先に実施した従来法による菌体成分汚染サーベイ試験において、A 社製スキャホールドから LPS が検出されなかった原因も HA の吸着能が関与している可能性が強く示唆された。このように、市販製品の中には LPS 吸着性を持つ可能性が示唆される製品が存在するため、初期培養に使用する培地中に含まれる LPS 量は正確に把握しておく必要がある。今回の実験では、コラーゲン/HA から構成される A 社製骨再生用スキャホールドについて検討したが、次年度以降、その他の製品の LPS 吸着能についても検討する。また、A 社製スキャホールドは従来法により LPS 含量を測定することが不可能であり、同製品やその他の類似製品の品質を評価するためには新しい分析法の開発が必須となる。この点についても、HCPA の応用可能性に期待が持たれる。

HCPA 自体は、LPS を初めとした様々な生理活性物質の生物学的性状を評価する一手法として、基礎研究レベルで古くから使用されており、既に確立された測定法である。最近、ヨーロッパを中心にウサギ発熱試験の代替法として利用されているヒト全血細胞を使用した Whole Blood Test (WBT) は HCPA の応用例の 1 つである。WBT を行う場合、ヒト全血細胞の安全性、個体による反応性の相違、安定供給などが問題であったが、近年、商品名 PyroCheck という測定キットが市販されるに至り、これらの諸問題は解消された。

MM6-CA8 細胞に対する LPS、 β (1 \rightarrow 3)-D-グルカンおよびペプチドグリカンの IL-6 産

生誘導能は過去の報告とほぼ一致していた。グラム陰性細菌である大腸菌 0111 株乾燥菌体は勿論のこと、グラム陽性細菌である黄色ブドウ球菌乾燥菌体も顕著な IL-6 産生誘導能を示したことから、HCPA はグラム陽性細菌汚染の検出法としても有益であることが判明した。また、菌体成分をスパイクしたシートを直接的に MM6-CA8 細胞と共培養した際、菌体成分添加量に比例した IL-6 産生誘導能が観察されたのは興味深い結果である。コラーゲン/HA シートの IL-6 産生バックグラウンドが若干高い結果が得られたが、HA の原材料であるネオボーン顆粒自体は顕著な IL-6 産生誘導能を示さなかったことから、この現象は円柱状の凍結乾燥品からシートを切り出す際に発生した HA 顆粒の微粉末を MM6-CA8 細胞が貪食したこと由来するものと思われる。

エンドトキシン試験および HCPA における大腸菌 03 株 LPS をスパイクしたコラーゲンシートからの LPS 活性回収率を表 6 に示した。エンドトキシン試験用の試料は、同シートを精製コラゲナーゼにより 37°C、16 時間消化し、塩酸により pH 3 に調製後、4°C で 10 分間超音波処理した溶液を原液として希釈系列を作製した。一方、HCPA では前述したように前処理を行うことなく、同シート 1 mg を 24 ウェルプレートに直接採取し、同ウェル中で MM6-CA8 細胞を培養した。精製コラゲナーゼ消化/塩酸法¹⁴⁾は、コラーゲン製品からの LPS 回収法として過去に我々が開発した方法であり、従来のガイドライン法と比較して LPS 回収率が飛躍的に改善されている。しかし、IL-6/LPS 検量線 (5-100 pg/ml, $r=0.989$) に基づいて HCPA によって得られた LPS 回収率は、いずれの