

表2. LPS (TLR4) 以外の TLR リガンドに対する MM6-CA8 細胞及び THP-1 細胞の応答性

リガンド	レセプター	LPS 含量 (EU/mg)	濃 度 ($\mu\text{g/ml}$)	IL-6 産生量 (pg/ml)	
				MM6-CA8	THP-1
大腸菌 乾燥菌体	TLR2, 2/1, 2/6, 4, 5, 9	159×10^3	0	34.0 ± 0.4	9.30 ± 3.8
			0.0001	44.0 ± 6.9	7.80 ± 5.3
			0.0005	44.5 ± 1.3	12.8 ± 4.5
			0.001	51.3 ± 3.5	14.2 ± 6.4
			0.005	280 ± 19	84.1 ± 13
			0.01	1513 ± 13	137 ± 87
			0.05	13575 ± 537	560 ± 4.5
			0.1	15675 ± 671	962 ± 228
			黄色ブドウ球菌 乾燥菌体	TLR2, 2/1, 2/6, 9	0.48
0.001	34.7 ± 0.7	8.10 ± 0.1			
0.005	40.6 ± 2.8	9.60 ± 0.7			
0.01	70.5 ± 0.6	11.1 ± 1.6			
0.05	78.6 ± 2.1	11.8 ± 2.4			
0.1	213 ± 7.1	12.8 ± 1.1			
0.5	600 ± 24	22.4 ± 1.1			
1	1355 ± 106	36.5 ± 12			
10	12500 ± 424	663 ± 164			
ペプチドグリカン	TLR2, Nod1	2.20	0	4.80 ± 0.1	9.30 ± 3.8
			0.001	1.20 ± 0.1	11.6 ± 3.5
			0.005	4.30 ± 2.6	15.2 ± 1.7
			0.01	13.2 ± 3.1	18.5 ± 1.0
			0.05	33.7 ± 3.6	33.8 ± 4.2
			0.1	113 ± 31	72.3 ± 26
			0.5	392 ± 363	224 ± 35
リポタイコ酸*	TLR2	18300	—	nt	nt
合成リポ蛋白質	TLR2/1	1.90	0	1.5 ± 0.5	7.20 ± 0.2
			0.1	468 ± 3.5	1395 ± 52
			1	6189 ± 69.6	nt
			10	23735 ± 516	2600 ± 149
Poly (I:C)	TLR3	0.04	0	20.0 ± 0.03	16.4 ± 3.7
			1	25.9 ± 0.13	nt
			10	29.5 ± 0.08	23.3 ± 4.8
			100	29.0 ± 0.15	>500
R837	TLR7	nd**	0	20.0 ± 0.03	16.4 ± 3.7
			0.1	21.7 ± 0.05	nt
			1	24.5 ± 0.15	nt
			10	22.7 ± 0.03	11.4 ± 4.5
大腸菌 DNA	TLR9	3.44	0	20.0 ± 0.03	16.4 ± 3.7
			0.1	27.2 ± 0.17	nt
			1	16.7 ± 0.02	nt
			10	17.7 ± 0.09	11.9 ± 2.5

*EndoTrap 精製標品. **nd, not detect. ***nt, not tested.

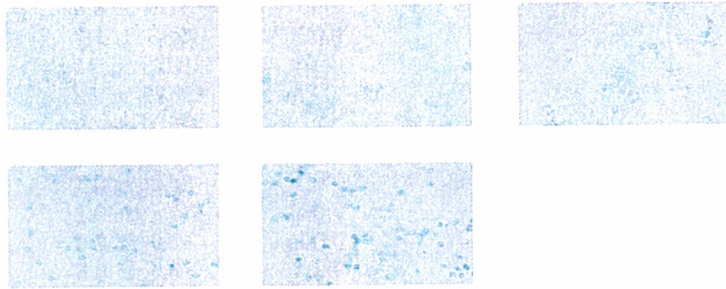


図1. 継代に伴う細胞形態と β -ガラクトシダーゼ染色性の変化

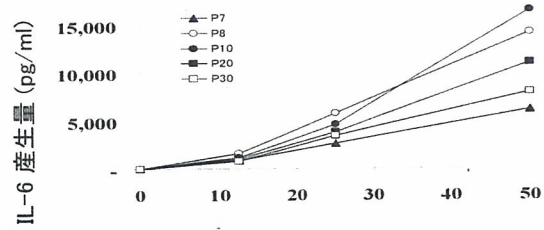


図2. 継代に伴う MM6-CA 細胞の LPS 応答性変化

表3. LPS 吸着材料(コラーゲン/HA 人工骨)からの LPS 回収方法

測定法	抽出法	希釈溶媒	LPS 実測値 (EU/mg)	LPS 回収率 (%)
エンドトキシシン 試験	精製コラゲナーゼ / 1 mM 塩酸法	H ₂ O	0.20 ± 0.01	0.07
		H ₂ O	5.6 ± 0.7	2.0
	0.01M 塩酸法	Tris Buffer	8.5 ± 0.4	3.0
		H ₂ O	23.1 ± 1.6	8.1
	0.1M 塩酸法	Tris Buffer	42.2 ± 0.8	14.8
		H ₂ O	41.1 ± 2.7	14.4
1M 塩酸法	Tris Buffer	75.3 ± 5.4	26.3	
	direct	—	68.0 ± 12	23.8
HCPT				

表4. Direct HCPT による創傷被覆剤の微生物学的安全性評価及び過去のサーベイ試験結果との相関性

原材料	製品名	過去のサーベイ試験結果										Direct HCPT***		
		エンドキシン試験 (EU/g)		ウサギ発熱試験** ($\Delta T_{max}, ^\circ C$)	HCPT with extracts**		試験重量 (mg)	IL-6 産生能 (pg/ml)	LPS換算値 (EU/g)	HCPT with extracts**		試験重量 (mg)	IL-6 産生能 (pg/ml)	LPS換算値 (EU/g)
		ガイドライン法	温水抽出 (50°C, 24 hr)		精製コラゲナーゼ / 塩酸法	ホモジナイズ法				抽出濃度 (mg/ml)	IL-6 産生能 (pg/ml)			
コラーゲン	アピテン	nd*	nd	604	-	nt***	34.5	nt	1.08	2.10 ± 0.99	3.80			
	インテグラン	1.32	3.70	18101	-	nt	22.7	nt	1.17	303 ± 32	431			
	ハリテン	nd	nd	1971	-	0.1	35.7	nt	1.22	5.90 ± 3.0	24.7			
	バイオブレン	nd	nd	nd	-	nt	33.3	nt	1.06	7.40 ± 0.42	38.0			
	ウレザックC	1.29	2.58	21.5	-	nt	33.3	nt	1.29	5.10 ± 0.99	19.1			
	テルダームス	nd	98.2	1014	-	1.05	41.7	16960±793	1.31	394 ± 34	449			
	テルブラグ	2.01	320	7083	-	1.68	33.3	9850±336	1.23	165 ± 14	311			
	ノバコール	0.63	12.6	3.77	-	nt	14.3	1.6±0.40	1.28	3.30 ± 0.71	9.64			
	アロアスク	20.6	22.0	37.9	-	nt	50.0	74.9±15	1.15	158 ± 16	328			
	アロアスクD	2.88	4.60	3.07	-	nt	50.0	nt	1.18	15.5 ± 14	81.4			
	インスタット	nd	1.80	nd	-	nt	11.1	nt	1.07	3.45 ± 0.92	12.5			
	アルギン酸	ソープサン	1168	2169	-	30308	1.06	25.0	1047±262	1.18	8725 ± 879	11673		
		アルゴダーム	152	894	-	12948	0.56	25.0	4640±1392	1.29	47023 ± 5739	59849		
カルトスタット		39.2	4440	-	848	1.15	25.0	9.5±3.0	1.27	28.3 ± 9.3	144			

* nd, not detect. ** 試料: 温水抽出液. *** nt, not tested. **** 試料濃度: 固形試料 1 mg/ml-培地

3. 幹細胞の同一性検査に関する研究

加藤 幸夫

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)
分担研究報告書

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

分担研究者 加藤 幸夫 広島大学大学院医歯薬学総合研究科教授

研究要旨：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、歯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）が存在した。また、母集団から分離した多数の MSC クローンでの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均質性を検査できるようになった。

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

昨年度に、多くの骨髄由来間葉系幹細胞のマーカー候補遺伝子を同定した。本年度は、これらのマーカーの候補遺伝子の、再生医療での有用性を、多数の骨髄由来間葉系幹細胞株を用いて検定／証明する。一方、数種類のマーカー遺伝子の発現レベルをクローン化した骨髄由来間葉系幹細胞で測定して、クローン間での遺伝子発現パターンを比較することにより、細胞集団の均質性を証明する方法を開発する。均質であれば、全てのクローンが同一の遺伝子発現パターンを示すはずである。骨髄由来間葉系幹細胞

の採取については、広島大学倫理委員会の規則に従い行う。すでに承認済みである。

C. 研究結果

多数の骨髄由来間葉系幹細胞株を用いてマーカーの有用性を証明した。腸骨、大腿骨、脛骨、歯槽骨由来のヒト骨髄由来間葉系幹細胞に共通して、ヒト繊維芽細胞よりも高レベルに発現しているマーカー遺伝子を多数同定した。またこれが、骨髄由来間葉系幹細胞移植による臨床研究で役立つことを明らかにした。また母集団より分離した多数の MSC コロニーでの各マーカーの発現レベルが殆ど同一であることを示して、母集団は単一の細胞（MSC）から成立している、つまり細胞集団の均質性を証明できた。

D. 考察

移植用細胞に目的以外の細胞が混入してもある程度有効かもしれないが、他細胞が混入していない細胞集団を移植することにより、治療方法自体および治療の有効性の評価をより明確に出来る。

E. 結論

間葉系幹細胞のマーカーが移植用細胞を検査するために有用であることが判明した。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujimoto, K., Hamaguchi, H., Hashiba, T., Nakamura, T., Kawamoto, T., Sato, F., Noshiro, M., Uk, B., Suardita, K., and Kato, Y. Transcriptional repression by the basic helix-loop-helix protein Dec2: multiple mechanism through E-box elements. *International Journal of Molecular Medicine*, in press.
2. Ozaki, Y., Nishimura, M., Sekiya, K., Suehiro, F., Kanawa, M., Nikawa, H., Hamada, T., Kato, Y. Comprehensive analysis of chemotactic factors for bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, in press.
3. Kawamoto, T., Noshiro, M., Furukawa, M., Honda, K.K., Nakashima, A., Ueshima, T., Usui, E., Katsura, Y., Fujimoto, K., Honma, S., Honma, K., Hamada, T., Kato, Y. Effects of fasting and re-feeding on the expression of Dec1, Per1, and other clock-related genes. *Journal of Biochemistry*, 140(3), in press.
4. Hasegawa N, Kawaguchi H, Hirachi A, Takeda K, Mizuno N, Nishimura M, Koike C, Tsuji K, Iba H, Kato Y, Kurihara H. Behavior of transplanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in periodontal defects. *J Periodontol*.77(6):1003-7,2006.
5. Iwata, T., Kawamoto, T., Sasabe, E., Miyazaki, K., Fujimoto, K., Noshiro, M., Kurihara, H., Kato, Y. Effects of overexpression of basic helix-loop-helix transcription factor Dec1 on osteogenic and adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *European Journal of Cell Biology*, 85,423-431,2006.
6. Umemura, T., Nishioka, K., Igashi, A., Kato, Y., Ochi, M., Chayama, K., Yoshizumi, M., Higashi, Y. Autologous bone marrow mononuclear cell implantation induces angiogenesis and bone regeneration in a patient with compartment syndrome. *Circulation Journal* 70, 1362-1364, 2006.
7. Kayakabe, M., Tsutsumi, S., Watanabe, H., Kato, Y., Takagishi, K. Transplantation of autologous rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells expanded in Vitro with FGF into joint defect with hyaluronic acid sponge. *Cytotherapy*, 8(4),343-353,2006.
8. 加藤幸夫、五十嵐晃、金輪真佐美 ヒト細胞材料最新活用法 ヒト間葉系幹細胞 (MSC) バイオテクノロジージャーナル,6(6),693-696,2006.
9. 加藤幸夫、加家壁正知、Pan Haiou、五十嵐晃、堤真一、松原全宏、河本健、辻絃一郎、中村耕三、高岸憲二 軟骨修復に用いられる間葉系幹細胞の基本的性質 関節外科 25 巻 4 月増刊号 63-69,2006.
10. 加藤幸夫、辻絃一郎 再生医療の潮流と歯科への応用 DENTAL DIAMOND 31(443),70-73,2006.
11. 加藤幸夫、久保裕嗣、清水正和、五十嵐晃、辻絃一郎、河本健、中島歩 間葉系幹細胞の基礎 (2)間葉系幹細胞の性質腎と骨代謝,19(4),307-312,2006.

2. 学会発表

1. 清水正和、河本健、阪恵美、五十嵐晃、金輪真佐美、山中克之、西村正宏、辻絃一郎、加藤幸夫 間葉系幹細胞システムにおける基本的デザインの追求 第19回日本軟骨代謝学会 2006年3月3日-4日 横浜市
2. 坂井裕大、瀬越和美、坂井将典、山中克之、関谷健裕、西村正宏、加藤幸夫、辻絃一郎 顎骨から穿刺法を用いて確実に間葉系幹細胞を採取する方法の検討 第5回日本再生医療学会総会 2006年3月8日-9日 岡山市
3. 五十嵐晃、河本健、邵金昌、金輪真佐美、吉橋久男、清水正和、原真依子、栗原英見、東幸仁、杉山勝、河野博隆、中村耕三、辻絃一郎、加藤幸夫 各種の骨髄より分離した間葉系幹細胞の共通マーカー

一遺伝子；線維芽細胞との比較 第5回
日本再生医療学会総会 2006年3月8
日-9日 岡山市

4. 坂井裕大、瀬越和美、金輪真佐美、久保裕嗣、清水正和、五十嵐晃、河本健、辻紘一郎、加藤幸夫 間葉系幹細胞 (MSC) と線維芽細胞 (FB) のマトリックス分解系 (MMP/TIMP) : 炎症刺激応答の検討 第16回中国・四国骨代謝研究会 平成18年7月1日 岡山市
5. 瀬越和美、五十嵐晃、清水正和、原真依子、東幸仁、栗原英見、金輪真佐美、河本健、辻紘一郎、加藤幸夫 間葉系幹細胞の蛋白マーカー ~サイトカイン定量によるアプローチ~ 第16回中国・四国骨代謝研究会 平成18年7月1日 岡山市
6. 清水正和、河本健、五十嵐晃、金輪真佐美、西村正宏、辻紘一郎、加藤幸夫 間葉系幹細胞システムにおける基本的デザインの追究 第24回日本骨代謝学会 平成18年7月6-8日 東京都
7. 金輪真佐美、五十嵐晃、瀬越和美、辻紘一郎、加藤幸夫 ヒト骨髄間葉系幹細胞の軟骨分化能は年齢とともに低下する 第24回日本骨代謝学会 平成18年7月6-8日 東京都

3. 招待講演

1. 加藤幸夫 間葉系幹細胞による再生医療：幹細胞としての特異的遺伝子発現と臨床応用 第7回鹿児島骨代謝研究会 2006年2月2日 鹿児島市
2. 加藤幸夫 ヒト骨髄間葉系幹細胞のシステムデザインと臨床応用 関西広域クラスター再生医療シンポジウム「骨軟骨を標的とした再生医療開発の現状：基礎と臨床」2006年6月16日 神戸市
3. 加藤幸夫、辻紘一郎 歯周組織と骨/軟骨の細胞治療に用いる間葉系幹細胞の培養法と性質 日本歯科技工学会 2006年9月17-18日 広島市

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許出願

1. 加藤幸夫、邵金昌、桂由紀、辻紘一郎：
動物細胞を無血清培養するための培地

用添加剤、キット及びこれらの利用
(出願番号：特願2006-006706号、2006)
(出願人：独立行政法人科学技術振興機構、(株) ツーセル)

出願日：平成18年1月13日

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)

辻 紘一郎

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）
分担研究報告書

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

分担研究者 計 紘一郎 株式会社ソーセル／広島大学

研究要旨：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)

加藤教授（広島大学）と同一チームとして研究を推進する。すなわち、幹細胞の同一性検査と安全性検査との両研究を縦系、横系の関係で織りなす。間葉系幹細胞を再生医療に際し、臨床研究や臨床治験として実施する場合の標準安全性検査法（提案）として、マーカー遺伝子検査、細菌、ウイルス、マイコプラズマなどの検査の手順と方法を検証し、有用性を確認した。

A. 研究目的

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。間葉系幹細胞の臨床効果を保証するには、自家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ルを確立し、さらにそれらに科学的根拠を与える。

B. 研究方法

(倫理面への配慮)

歯周病を対象として、昨年度から本年度にかけて、間葉系幹細胞を用いた臨床研究（10症例）の安全性を評価した。尚、本臨床研究は広島大学歯学部病院倫理委員会の承認を受けている。

また、安全性検査を含む患者情報、臨床スケジュール、培養スケジュール、安全性検査結果を安全に管理する電子システムソフトを段階的に開発した。

C. 研究結果

骨髓採取を行った10症例の間葉系幹細胞の安全性を評価して、細菌、真菌、ウイルス、エンドトキシン、マイコプラズマに異常値は認められなかった。これまでの自家移植例で異常は認められなかった。

再生医療に用いる電子システムソフトを開発し、このソフトに臨床情報を入力したところ、臨床、培養スケジュールを円滑に遂行できたとともに、患者情報、試験データ記録の管理を安全にかつ簡便に行えた。

D. 考察

昨年度の臨床例のなかには、エンドトキシン高値の患者1例、培養した骨髓細胞患者由来と考えられるパルボ B19 ウィルスが検出された1例を確認した。両例の移植とともに、感染した細胞は用いなかったため、今回の移植後の経過観察からも、移植した細胞の安全性は評価できた。

電子システムソフトは、取り扱い、管理の規定策定が必要とされるが、今後患者への情報開示にも役立つと考えられる。

E. 結論

自家間葉系幹細胞の臨床例で安全性を評価できた。電子システムソフトを用いてデータ管理を安全にかつ簡便にできるようになった。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hasegawa N, Kawaguchi H, Hirachi A, Takeda K, Mizuno N, Nishimura M, Koike C, Tsuji K, Iba H, Kato Y, Kurihara H. Behavior of transplanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in periodontal defects. J Periodontol. 77(6):1003-7, 2006.
2. Xu WP, Mizuno N, Shiba H, Takeda K, Hasegawa N, Yoshimatsu S, Inui T, Ozeki Y, Niitani M, Kawaguchi H, Tsuji K, Kato Y, Kurihara H. Promotion of functioning of human periodontal ligament cells and human endothelial cells by nerve growth factor. J Periodontol: 77(5): 800-7, 2006.
3. 加藤幸夫、加家壁正知、Pan Haiou、五十嵐晃、堤真一、松原全宏、河本健、辻絃一郎、中村耕三、高岸憲二 軟骨修復に用いられる間葉系幹細胞の基本的性質 関節外科 25 巻 4 月増刊号 63-69, 2006.
4. 加藤幸夫、辻絃一郎 再生医療の潮流と歯科への応用 DENTAL DIAMOND 31(443), 70-73, 2006.
5. 加藤幸夫、久保裕嗣、清水正和、五十嵐晃、辻絃一郎、河本健、中島歩 間葉系幹細胞の基礎 (2) 間葉系幹細胞の性質腎と骨代謝, 19(4), 307-312, 2006.

2. 学会発表

1. 清水正和、河本健、阪恵美、五十嵐晃、金輪真佐美、山中克之、西村正宏、辻絃一郎、加藤幸夫 間葉系幹細胞システムにおける基本的デザインの追求 第 19 回日本軟骨代謝学会 2006 年 3 月 3 日-4 日 横浜市
2. 坂井裕大、瀬越和美、坂井将典、山中克之、関谷健裕、西村正宏、加藤幸夫、辻絃一郎 顎骨から穿刺法を用いて確実に間葉系幹細胞を採取する方法の検討 第 5 回日本再生医療学会総会 2006 年 3 月 8 日-9 日 岡山市
3. 五十嵐晃、河本健、邵金昌、金輪真佐美、吉橋久男、清水正和、原真依子、栗原英見、東幸仁、杉山勝、河野博隆、中村耕三、辻絃一郎、加藤幸夫 各種の骨髄よ

り分離した間葉系幹細胞の共通マーカー遺伝子; 線維芽細胞との比較 第 5 回日本再生医療学会総会 2006 年 3 月 8 日-9 日 岡山市

4. 坂井裕大、瀬越和美、金輪真佐美、久保裕嗣、清水正和、五十嵐晃、河本健、辻絃一郎、加藤幸夫 間葉系幹細胞 (MSC) と線維芽細胞 (FB) のマトリックス分解系 (MMP/TIMP): 炎症刺激応答の検討 第 16 回中国・四国骨代謝研究会 平成 18 年 7 月 1 日 岡山市
5. 瀬越和美、五十嵐晃、清水正和、原真依子、東幸仁、栗原英見、金輪真佐美、河本健、辻絃一郎、加藤幸夫 間葉系幹細胞の蛋白マーカー ~ サイトカイン定量によるアプローチ ~ 第 16 回中国・四国骨代謝研究会 平成 18 年 7 月 1 日 岡山市
6. 清水正和、河本健、五十嵐晃、金輪真佐美、西村正宏、辻絃一郎、加藤幸夫 間葉系幹細胞システムにおける基本的デザインの追究 第 24 回日本骨代謝学会 平成 18 年 7 月 6-8 日 東京都
7. 金輪真佐美、五十嵐晃、瀬越和美、辻絃一郎、加藤幸夫 ヒト骨髄間葉系幹細胞の軟骨分化能は年齢とともに低下する 第 24 回日本骨代謝学会 平成 18 年 7 月 6-8 日 東京都

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許出願

1. 加藤幸夫、邵金昌、桂由紀、辻絃一郎: 動物細胞を無血清培養するための培地用添加剤、キット及びこれらの利用 (出願番号: 特願 2006-006706 号、2006) (出願人: 独立行政法人科学技術振興機構、(株) ツーセル) 出願日: 平成 18 年 1 月 13 日
2. 加藤幸夫、金輪真佐美、辻絃一郎、五十嵐晃、久保裕嗣、坂井裕大: 病変間葉系幹細胞の検出マーカーの利用 出願番号: 特願 2006-281733 号、2006) (出願人: 広島大学 (株)、ツーセル) 出願日: 平成 18 年 10 月 16 日

3. 二川 浩樹、西村正宏、辻 紘一郎、
廣本 延枝、川端 涼子：新規抗菌性
ペプチド及び該抗菌性ペプチドを有
効成分とする無血清培地 出願番
号：特願 2006-142505 号(P043P02)、
2006) (出願人：独立行政法人科学技
術振興機構、広島大学、(株) ツーセ
ル) 出願日：平成 18 年 5 月 23 日

2. 実用新案登録

3. その他

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)

篠崎 尚史

「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）

分担研究者 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

研究協力者 兼子 智 東京歯科大学市川総合病院婦人科講師

研究要旨

再生医療における培養細胞の品質管理として、細菌、ウイルスの感染防止、もしくはそれらの除去がある。HIV 陽性男性の精液から Separable Fine Neck Tube (SFNT) を用いる Percoll 沈降速度差遠心分離法および swim up を用いて HIV 除去法を開発した。HIV 感染男性(夫)、非感染女性(妻)間における挙児希望に対し、夫精液から HIV ウィルス除去して体外受精-胚移植を行った。52 例 (73 精液標本) に本法を施行後、超高感度 nested-PCR 法により HIV-1・RNA ならびに proviral DNA 検出を行い、全例で HIV-1 陰性が確認された。20 例で妊娠が確認され、27 児が誕生した。母児共に感染例は無かった。前年の報告書に記載したオプチデント沈降平衡法を本法に組み合わせることで細菌除去、HIV 除去ともに DNA 損傷精子比率が低い、運動精子分画を得ることができた。

DNA の酸化的損傷回避の観点から、細胞操作、培養をできる限り低酸素環境下で行うことを目的としたシステムを開発した。昨年度から試作を行ってきたガス循環型クリーンベンチ、使い捨てカプセル型培養装置が実用段階に達し、試験運用を開始した。ガス循環型クリーンベンチはクリーンベンチを気密化して 5.0%CO₂-空気を維持、一部には低酸素環境 (5.0%CO₂、2.0%O₂、93%N₂) を設置、作業面は使い捨てプラスチックフィルムで覆い、感染性因子 (体液等) による機器汚染防止した。使い捨てカプセル型培養装置は容量 500ml の使い捨てプラスチック容器 (ボトル) を使用し、症例毎に 1 ボトルを使用してセキュリティの向上を図る。細胞、組織が高酸素に暴露される時間を最小限とするため、ボトルのフタを閉じると同時に無酸素ガス (5.0%CO₂、95%N₂) で容器内をパージし、その後混合ガス (5.0%CO₂、2.0%O₂、93%N₂) を少量通気して陽圧とし、ガス環境を維持した。

A. 研究目的

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。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。

本年度は 1. 細胞(精子)懸濁液からのウィルス (HIV) 除去法の確立、2. DNA の酸化的損傷回避の観点から細胞操作、培養をできる限り低酸素環境下で行うことを目的としたシステム

(ガス循環型クリーンベンチ、使い捨てカプセル型培養装置)を開発した。

1. 浮遊細胞懸濁液からのウィルス除去

再生医療における培養細胞の品質管理として、細菌、ウイルスの感染防止、もしくは感染細胞からそれらの除去がある。従来、浮遊細胞懸濁液からの細菌除去では遠心分離後に上清をスポイト等で吸引、除去したが、これではチューブ内壁に付着した細菌を含む不純物が流下して沈澱を再汚染する。

有効な抗ウィルス薬の開発に伴い AIDS 患者の予後は著しく改善されている。それに伴い HIV 陽性男性から挙児希望が寄せられるよ

うになった。われわれは除菌、除ウイルスを目的とした遠心分離用チューブ、Separable Fine Neck Tube (SFNT) を開発した。HIV 陽性男性の精液から SFNT を用いる Percoll 沈降速度差遠心分離法および swim up を用いた HIV 除去法の有用性を検討した。

2. 使い捨て可能な低酸素培養システムの構築

再生医療における組織培養は体内環境を生理的に再現することが理想であるが、現状では哺乳動物株化細胞の継代培養に用いられる基本的な手法が採られる場合が多い。我々は低酸素培養が可能な使い捨て培養システムを開発した。

生殖補助医療における配偶子操作は、基本的には高酸素環境下（空気、5.0% CO₂ - 空気等）で行われてきた。我々はアルブミン添加培養液中、精子を 5.0% CO₂ - 空気下で培養すると精子核 DNA 損傷 (TUNEL 法による観察) が経時的に増加し、低酸素環境下でこれを抑制できることを認めた。再生医療における培養過程では、光学顕微鏡レベルにおける観察とともに分子生物学的評価が不可欠であり、我々は DNA 保護の観点から、配偶子操作、培養をできる限り低酸素環境下で行うことを目的としたシステムの開発を企画した。昨年度から試作を行ってきたガス循環型クリーンベンチ、使い捨てカプセル型培養装置が実用段階に達し、試験運用を開始した。

B. 研究方法

SFNT は底部を強く絞った形状をしたガラス製遠心分離チューブであり、その狭部にカッタインを有している。遠心後、本法では沈

澱が 10 μl 程度に濃縮され、さらにカッタインでチューブを折切することにより、沈澱を汚染することなく回収できる。方法を図 1 に模式的に示した。

1. ガス循環型クリーンベンチ

クリーンベンチはヘパフィルター濾過した空気を流入させて無菌環境を提供するが、基本的に空気中での操作となる。我々は、1. クリーンベンチを気密化、ガスセンサーにより 5.0%CO₂-空気を維持、チャンバー内の一部には低酸素環境 (5.0%CO₂、2.0%O₂、93%N₂) を設置、2. チャンバー内雰囲気はヘパフィルターを用いて繰り返し濾過、3. 温度センサーによりチャンバー内雰囲気および床面を 37°C に保持、4. 作業面は使い捨てプラスチックフィルムで覆い、感染性因子 (体液等) による機器汚染防止、5. 加湿機能付加、6. デジタルカメラによる画像記録、電子カルテへの記載等を可能とした。図 2 に試作機を示した。

2. 使い捨てカプセル型培養装置

従来型 CO₂ インキュベーターは、株化細胞の長期継代培養用に設計され、培養液交換時以外は扉を開かないことが使用の前提となっている。また連続使用で真菌汚染の危険性が高いが、汚染防除は困難な場合が多い。CO₂ インキュベーターの機能は培養液の温度、pH 平衡維持であり、頻繁に扉を開閉すると内部雰囲気は大気と置換する。ガスセンサーにより pCO₂ は早期に復帰するが、pO₂ の低下は困難である場合が多い。至適 pO₂ は培養対象となる細胞毎に異なるが、多くは低 pO₂ 下で増殖率が高いことが知られている。活性酸素傷害を考慮すると、低酸素培養が可能であり、特に pO₂ を速やかに復帰できるシステムが望まれる。

臨床培養においては、同一インキュベーター内で複数症例の培養を行うことによる感染の危険性、取り違い等のセキュリティ低下等が問題となる。上述した観点から我々は、使い捨て培養装置を開発した。図3に概要を示した。培養槽内にはアルミドライブロックを設置して温度制御し、ここに着脱可能な容量500mlの使い捨てプラスチック容器（ボトル）を16個設置した。ボトル内には予め調整した混合ガス（5.0%CO₂、2.0%O₂、93%N₂）を少量通気して陽圧とし、容器のフタを閉じると同時に無酸素ガス（5.0%CO₂、95%N₂）で容器内をパージして2.0%O₂とした後、混合ガスに切り換えた。これによりCO₂センサーは不要となり、センサー劣化によるガス濃度の誤差を考慮する必要がなくなるとともに組織が高酸素に暴露される時間を最小限とすることができた。症例毎に1ボトルを使用し、セキュリティの向上を図り、ボトルは使い捨てとした。図3

通常の培養系は細胞が接する液体を培養液と定義するが、本システムではボトル内に細胞培養液と同一のガス緩衝系を有する補助培養液を220ml入れ、環境全体がガス緩衝系を構成するとともに補助培養液自体が蓄熱することにより温度の変動を最小限とした。われわれは外部標準として、補助培養液のpH、温度を常時モニターすることにより精度管理をしている。

（倫理面への配慮）

検査に供した精液はインフォームドコンセントを得た後、研究に使用した。

C. 研究結果

われわれはHIV感染男性（夫）、非感染女性（妻）間における挙児希望に対し、夫精液からHIVウィルスを除去して体外受精-胚移植を行

った。52例（73精液標本）に本法を施行後、超高感度nested-PCR法によりHIV-1 RNAならびにproviral DNA検出を行い、全例でHIV-1陰性が確認された。20例で妊娠が確認され、27児が誕生した。母児共に感染例は無かった。

D. 考察

浮遊細胞の細菌除去、HIV除去に関しては、本法が汎用できる。さらにヒト精子においては、前年の報告書に記載したオプチデント沈降平衡法、上述したPercoll沈降速度差遠心法、swim up法を組み合わせることにより、細菌除去、HIV除去ともにDNA損傷精子比率が低い、運動精子分画を得ることができた。

再生医療において移植を目的とした初代細胞の臨床培養は分化誘導を伴うことも多く、従来の株化細胞の継代培養に比してより厳密な細胞群、組織の品質管理、それを構成する個々の細胞の品質管理が必要となる。さらに感染防御を始めとする新しい観点が不可欠である。われわれは個々の細胞におけるDNA構造正常性の評価法を確立し、これらを指標として培養過程（in vitro）におけるDNA損傷を最小限とする培養条件を確立する必要があると考えている。その施策として、培養環境の低酸素化、活性酸素制御を目的とした培養装置、培養液の最適化を検討している。

E. 結論

平成17、18年度における研究は、移植を目的とした培養細胞の品質管理に関する検討を行った。ヒト精子を用いて、感染性因子の除去ならびにDNA損傷精子の排除、さらにin vitroにおける細胞の取扱、培養においてDNA保護を指向した低酸素培養システムの構築を

試みた。臨床的には感染症患者由来の組織、細胞を培養する機会も考えられ、感染因子の除去ならびに使い捨て培養システムの開発が望まれる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kato S, Hanabusa H, Kaneko S, Takakuwa K, Suzuki M, Kuji N, Jinno M, Tanaka R, Kojima K, Iwashita M, Yoshimura Y, Tanaka K., Complete removal of HIV-1 RNA and proviral DNA from semen by the swim-up method: assisted reproduction technique using spermatozoa free from HIV-1. AIDS, 20:967-973, 2006

2. 学会発表

1. 黒田優佳子 1、兼子智 2、石川博通 2、丸茂健 2、高松潔 2、運動精子の回収率向上を目的とした swim side allay の開発、1. 黒田インターナショナルメディカルプロダクション、2. 東京歯科大学 市川総合病院 リプロダクションセンター、日本生殖医学会雑誌 51: 298, 2006

2. 郡山純子 1、兼子智 2、中川博之 2、宮地系典 2、谷垣伸治 2、岡崎雅子 2、吉田丈児 2、郡山 智 1、石川博通 2、丸茂健 2、高松潔 2、ヒト精子核に見いだされる DNA 断片のパターン解析、1. 医療法人石塚産婦人科、2. 東京歯科大学 市川総合病院 リプロダクションセンター、日本生殖医学会雑誌 51: 299, 2006

3. 兼子智 1、中川博之 1、宮地系典 1、谷垣伸治 1、岡崎雅子 1、石川博通 1、吉田丈児 1、丸茂健 1、高松潔 1、斉藤 優 2、配偶子の quality control - ICSI における穿刺精子の選択、1. 東京歯科大学市川総合病院リプロダクションセンター、2. 平塚市民病院産婦人科、日本生殖医学会雑誌 51: 298, 2006

4. 鈴木美奈 1、竹山智 1、加島克則 1、田中憲一 1、花房秀次 1、兼子智 2、加藤真吾 3、HIV 感染男性—非感染女性における swim up 変法を用いた体外受精臨床成績について、1. 新潟大学医学部産婦人科、2. 荻窪病院血液科、3. 東京歯科大学市川総合病院産婦人科、4. 慶応義塾大学医学部微生物、第 24 回日本受精着床学会総会・学術講演会抄録集, p26

5. 兼子智 1、郡山純子 2、中川博之 1、富永英一郎 1、岸郁子 1、北岡芳久 1、谷垣伸治 1、斉藤優 3、高松潔 1、ヒト精子核 DNA 中の giga、mega、kilo-base level 断片の分別観察、1. 東京歯科大学市川総合病院リプロダクションセンター、2. 石塚産婦人科、3. 平塚市民病院産婦人科
日本産科婦人科学会雑誌, 58、214、2006

H. 知的財産権の出願・登録取得状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案特許

なし

3. その他

なし

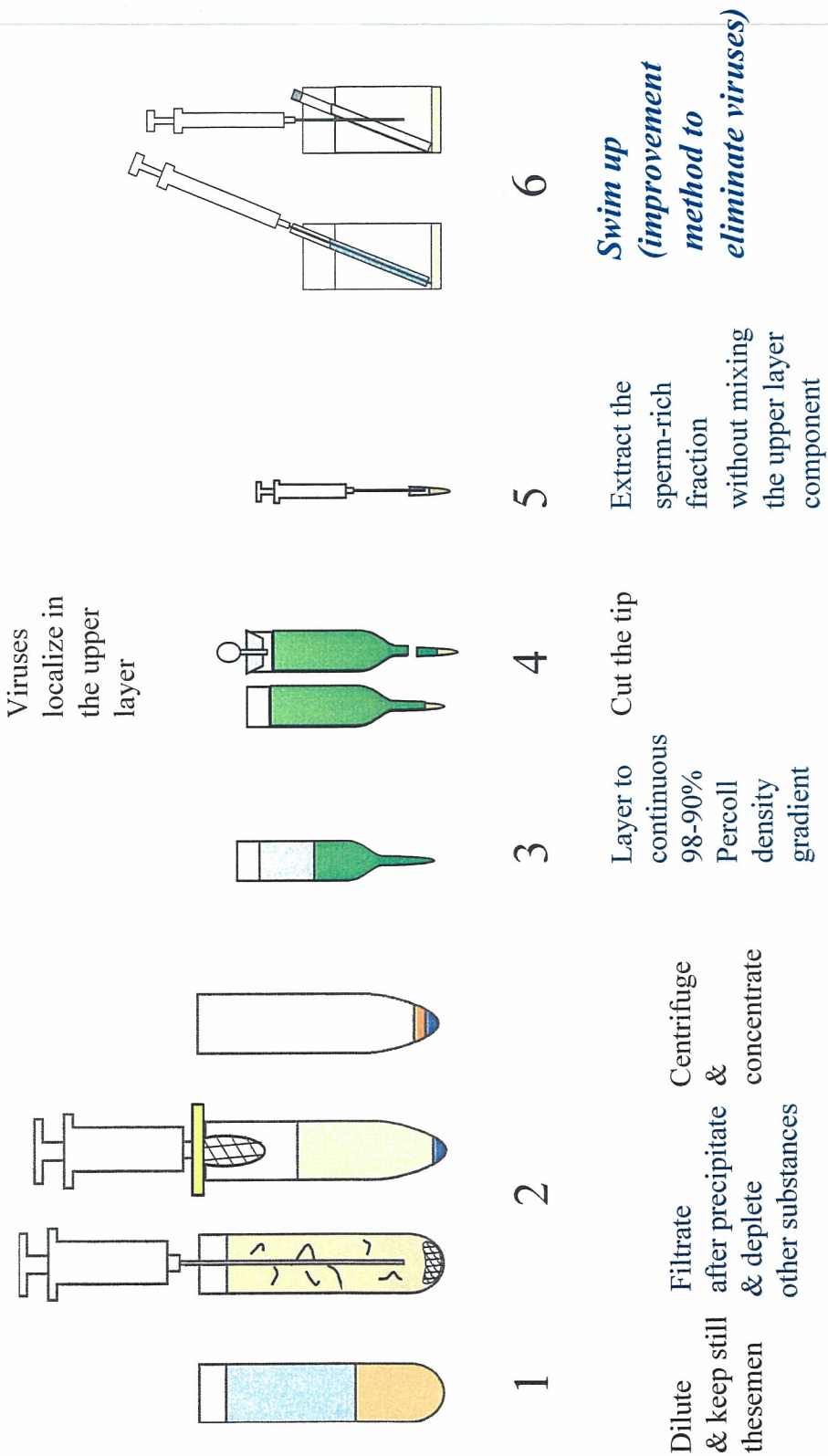
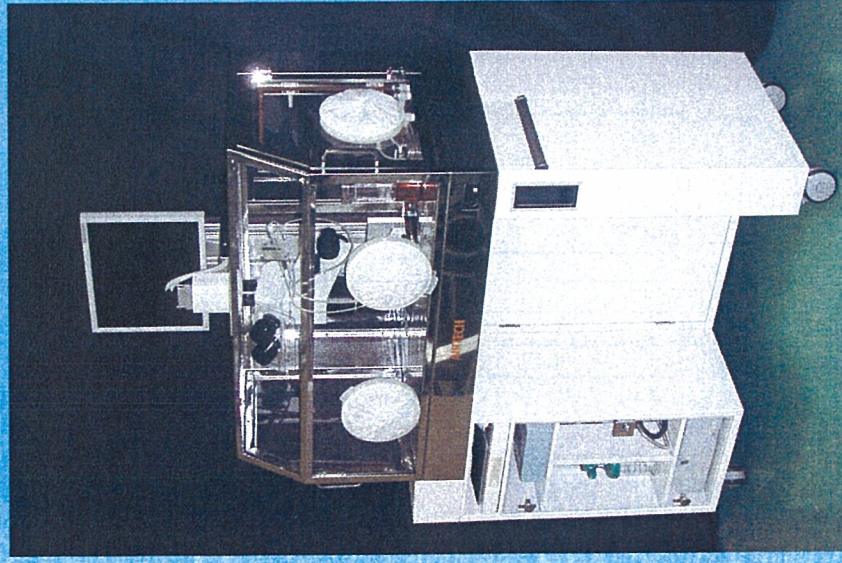
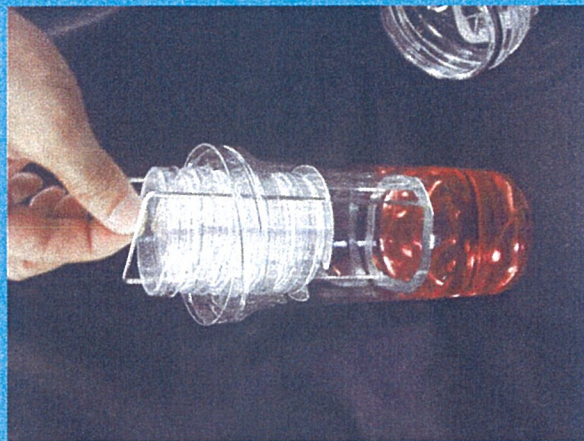


図2



- 高潔浄度（仕様：ISOクラス100以下） 運転開始から3分後、 $0.5\mu\text{m}$ 粒子が70個/CF/min、庫内の方又は150回濾過/hr
- 作業エリアを**感染防止フィルム**で覆う
- 記録システム（電子カルテ対応）
- 作業面温度 37.0°C 、 CO_2 濃度5.0%コントロール
- 局所的に無酸素、2.0% O_2 濃度環境設置



培養ボトル

培養槽

