

別紙4

書籍

研究成果の刊行に関する一覧表

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
土屋利江	再生医療製品のギャップ結合細胞間連絡機能評価の重要性について	岡野光夫編	再生医療技術の最前線	CMC出版		印刷中	
土屋利江	ティッシュエンジニアリングとガイドライン	岡野光夫、田畑泰彦編	ティッシュエンジニアリング2007			印刷中	
土屋利江	再生医療の現状	土屋利江	再生医療品における幹細胞とバイオマテリアル=開発から臨床まで	培風館	東京	印刷中	
高橋恒夫、張曉紅、伊倉宏一	臍帯血と胎盤組織由来細胞を用いた再生医療の可能性	田原泰彦、岡野光夫(編)、日本組織工学会監修	ティッシュエンジニアリング2006	日本医学館	東京	2006	pp175-186

雑誌

発表者名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版
土屋利江、俵木登美子	スペシャル対談日本の医療機器の研究開発と制度の動向	バイオテクノロジージャーナル	3-4	198-203	2007
Nasreen Banu, Toshie Tsuchiya	Markedly different effects of hyaluronic acid and chondroitin sulfate-A on the differentiation of human articular chondrocytes in micromass and 3-D honeycomb rotation culture.	J. Biomed. Mater. Res.	80	257-267	2007
土屋利江	細胞組織医療機器開発総論	薬学雑誌			印刷中
澤田留美、伊藤友美、土屋利江	細胞組織利用医療機器に用いられる幹細胞の品質及び安全性評価について	薬学雑誌			印刷中
D.Y. Jung, Y.B. Kang, T. Tsuchiya, S. Tsutsumi	A novel non-destructive method for measuring elastic moduli of cultivated cartilage tissues	Key Engineering	342-343	853-856	2007
Tsutomu Nagira, Misao Nagahata-Ishiguro and Toshie Tsuchiya	Effects of sulfated hyaluronan on keratinocyte differentiation and Wnt and Notch gene expression.	Biomaterials	28	844-850	2007
山越葉子、中澤憲一、土屋利江	原子間力顕微鏡(AFM)による蛋白質のイメージング	日本臨床	2号	270-277	2007
Masato Tamai, Ryusuke Nakaoka, Kazuo Isama and Toshie Tsuchiya	Synthesis of novel β -tricalcium phosphate/hydroxyapatite biphasic calcium phosphate containing niobium ions and evaluation of osteogenic properties.	J. Artificial Organs.	10	22-28	2007
Saifuddin Ahmed, Toshie Tsuchiya	A mouse strain difference in tumorigenesis induced by biodegradable polymers	J. Biomed. Mater. Res.	79A	409-417	2006
Masato Tamai, Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya	Cytotoxicity of Various Calcium Phosphate Ceramics, Bioceramics	Key Material Eng	Vol.30	263-266	2006

Yuping Li, Tsutomu Nagira, Toshie Tsuchiya	The effect of hyaluronic acid on insulin secretion in HIT-T15 cells through the enhancement of gap junctional intercellular communication	Biomaterial	27	1437-1443	2006
Ahmed, S., Tsuchiya, T., Kariya, Y	Studies on the efficacy, safety and quality of the tissue engineered products: Enhancement of proliferation of human mesenchymal stem cells by the new polysaccharides	Animal Cell Technology	14	81-85	2006
Banu, N., Tsuchiya, T., Ahmed, S., Sawada, R.	Studies on the efficacy, safety and quality of the tissue engineered products: effects of a catalyst used in the synthesis of biodegradable polymer on the chondrogenesis of human articular cartilage	Animal Cell Technology	14	87-92	2006
Li, Y.P., Nagira, T., Tsuchiya, T.	Increase in the insulin secretion of HIT-T15 cells: Gap Junctional Intercellular Communications Enhanced by Hyaluronic Acid	Animal Cell Technology	14	263-269	2006
Sawada, R., Ito, T., Matsuda, Y., Tsuchiya, T.	Safety evaluation of tissue engineered medical devices using normal human mesenchymal stem cells	Animal Cell Technology	14	325-329	2006
Nakamura, N., Tsuchiya, T.	Effect of biodegradable polymer poly(L-LACTIC ACID) on the cellular function of human astrocytes	Animal Cell Technology	14	331-337	2006
盛英三、望月直樹、武田壮一、井上裕美、中村俊、土屋利江	ナノレベルイメージングによる分子構造と機能解析	日本臨床	64巻	358-364	2006
Sadami tsutsumi, Duck-Young JUNG, Yu-Bong KANG, Toshie Tsuchiya	A Novel Non -Destructive Method To Measure Elastic Mduli Of Cartilage Cell In Situ	IFMBE			in press
R. Sawada, T. Ito, and T. Tsuchiya	Changes in expression of genes related to cell proliferation in human mesenchymal stem cells during in vitro culture in comparison with cancer cells	J. Artif. Organs	9	179-184	2006
N. Bauu, T. Tsuchiya, and R. Sawada	Effects of a biodegradable polymer synthesized with inorganic tin on the chondrogenesis of human articular chondrocytes	J. Biomed. Mater. Res.	77A	84-89	2006
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
Umemura, T., Nishioka, K., Igarashi, 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
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.	Cytherapy	8(4)	343-53	2006
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
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)	1003-1007	2006

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)	800-807	2006
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、辻紘一郎、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
加藤幸夫、辻紘一郎	再生医療の潮流と歯科への応用	DENTAL DIAMOND	31(443)	70-73	2006
加藤幸夫、久保裕嗣、清水正和、五十嵐晃、辻紘一郎、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
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
Zhang X, Mitsuru A, Igura K, Takahashi K, Ichinose S, Yamaguchi S, Takahashi TA.	Mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta for cartilage tissue engineering.	Biochem Biophys Res Commun.	340	944-952	2006
Zhang X, Soda Y, Takahashi K, Mitsuru A, Bai Y, Ogia K, Satoh H, Yamaguchi S, Tani K, Tojo A, Takahashi TA.	Successful immortalization of mesenchymal progenitor cells derived from human placenta and the differentiation abilities of immortalized cells.	Biochem Biophys Res Commun.	351	853-859	2006

IV 研究成果の刊行物・別刷

臍帯血と胎盤組織由来細胞を用いた再生医療の可能性

ティッシュエンジニアリング 2006

高橋恒夫・張 曉紅・伊倉宏一*

Umbilical cord blood and placenta derived cells for regenerative medicine

骨髄の血管内皮前駆細胞や間葉系細胞を用いた再生医療が進められているなか、非自己(アロ)の細胞ソースとして臍帯血や胎盤の細胞が注目されている。臍帯血の造血幹細胞移植は近年急速に進み、移植成績からも将来は骨髄移植に置き換わると予測される。

臍帯血の使用は、倫理上の問題が少なく安全性が高いことから臍帯血中の細胞を活かした再生医療への期待が高い。骨髄と同じように臍帯血にも多能性細胞、血管内皮前駆細胞、間葉系幹細胞が存在する。

間葉系細胞は、骨、軟骨、脂肪や筋細胞、また神経細胞、肝臓・膵臓細胞へと分化することが知られ、*in vivo*での動物レベルでの移植実験においても損傷した機能が回復することが報告されている。実際に、ヒトの脊髄損傷やその他の疾患に対して臍帯血が移植された報告もあり、その成績が注目されている。アロ細胞としての臍帯血のレシピエントに対する免疫反応についてはさらなる研究が必要である。

研究機関に臍帯血を供与する“研究用幹細胞リソースバンク”がスタートしており、再生医療研究が進展していくことが期待される。

*Tsuneo A. Takahashi · Xiaohong Zhang · Koichi Igura**

Key words: 臍帯血, 胎盤, 間葉系細胞, 臍帯血バンク, 再生医療

再生医療において、ヒト胚性幹細胞(ES細胞)は究極の細胞として期待されている。しかし倫理面でのハードルは大きく、また、技術的な問題(マウスなどのフィーダー細胞の必要性、腫瘍の形成、無血清培地の開発など)を解決しなければならず、臨床応用が可能になるにはさらに時間を

要すると考えられる。一方、体性幹細胞は再生医療の細胞ソースとしてより使いやすいと考えられ、実際にいくつかの臨床試験がスタートしている。再生医療に用いられる細胞は対象疾患によってさまざまであるが、これまで患者の自己の細胞が主に使われてきた。なかでも多分化能を持つ間葉系細胞が期待され、間葉系細胞を多く含む骨髄がよく使われている。しかし、自己の骨髄細胞は症例によっては採取ができないこともあり、骨髄

*Division of Cell Processing (CERES), The Institute of Medical Science, The University of Tokyo 東京大学医科学研究所細胞プロセッシングCERES寄附研究部門

中の間葉系細胞の数は年齢とともに低下することが知られている。アロ細胞が使用できるようになれば再生医療は大きく前進することが期待される。

胎盤と臍帯、また、臍帯血は医療廃棄物として処理されている。臍帯血は出産後に娩出される胎盤と臍帯を流れる血液であり、胎盤絨毛、羊膜、臍帯などそれぞれに間葉系細胞が存在する。これらの細胞についての研究の現況と、臍帯血や胎盤の細胞がどのような疾患に役立つことが期待されているのか、その概略を記す。

臍帯血

1. 臍帯血中の造血幹細胞

臍帯血には造血幹細胞、前駆細胞が多く含まれ、骨髄と同じように白血病を中心とする血液疾患に広く使われている¹⁾。わが国には全国11の臍帯血バンクが厚生労働省の補助金を受けて活動しており、全国で2万検体以上の臍帯血が血液製剤と同じレベルで検査をされ液体窒素下で凍結保存されている。臍帯血移植は、わが国ですでに2,300人以上の患者に移植されている²⁾。

臍帯血移植は初期には体重の軽い小児が対象であったが、最近は成人への移植が盛んに行われるようになり、骨髄に匹敵する移植成績が得られてきている³⁾。また、高齢層も対象に移植が行われており、移植成績もしだいに上がってきている。これはミニ移植といわれる、前処置(化学療法と放射線照射量)を軽くしてドナーとレシピエントの細胞が共存できるようにしたものである。臍帯血のなかの造血幹細胞は移植患者の体重当たり $2 \sim 2.7 \times 10^7 / \text{kg}$ とされる。最近は臍帯血の量を多くとる(細胞数が多い)ように採取施設で努力がつけられていることと、量が不足の場合は、HLA型が近い二つの臍帯血を移植する“複数臍帯血移植”が行われており、良好な成績が得られている⁴⁾。これまで試みられてきたなかでは、*ex vivo* 増幅は有効であるとの結果は得られていない。わが国では、京都大学の中畑教授のグループにより、可溶性IR-6 Rを添加した増幅液により増

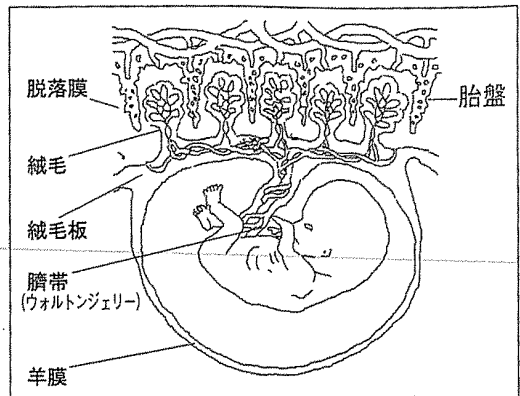


図1

ヒト胎盤は、胎児と母体由来の組織からなり、胎児由来の組織は主に絨毛板と絨毛、母体由来組織は脱落膜から構成される。

幅した臍帯血移植の臨床試験がはじまりつつあり期待が寄せられている⁵⁾。

臍帯血移植は確かな成果が上がる一方で、生着不全、感染症、血小板生着の遅れ、疾患によっては骨髄移植にくらべて劣るものもあり、また骨髄移植と同じくハイリスクの患者への移植成績はわるく、まだ改良すべき多くの課題を残している。

2. 臍帯血中の血管内皮前駆細胞

発生の初期に造血幹細胞と血管前駆細胞は起源を同じくし、ヘマンジオブラストから分化してきたと考えられており⁶⁾、造血幹細胞と同じくCD34抗原を、またCD133抗原を持つ。

Asaharaらは、成人の末梢血単核球成分から分離されたCD34陽性細胞が血管内皮成長因子などの培養下で血管内皮細胞に分化することを示した⁷⁾。血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cell: EPC)が血液中にあり、これまでの考えであった血管新生(angiogenesis)に対して血管再生に別の道があることを明らかにしてきた⁷⁾。冠動脈疾患や下肢虚血疾患(閉塞性動脈硬化症、バージャー病)などの重症虚血性疾患に対する血管再生療法、および冠動脈内ステント留置後術後の再狭窄予防を目的とした血管修復療法の臨床試験が開始され、下肢虚血への移植は高度先進医療とし

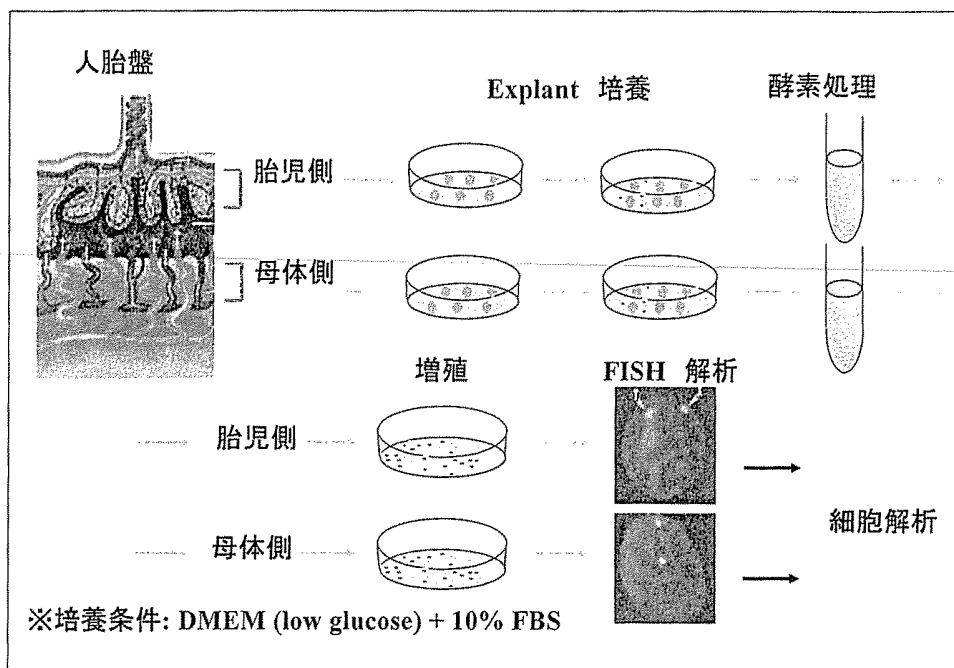


図2

母親からインフォームド・コンセントを得て、正期産に娩出された胎盤を用いた。胎児側絨毛からの間葉系細胞の単離は、臍帯と羊膜、絨毛板を除去したあと、絨毛から切り出した組織をメスで1~2mm²の小片にし、その組織を培養皿上に乗せて、培地を添加、植え付けた組織の周辺部から細胞をout-growthさせる培養法で行った。増殖させた細胞が、母親由来細胞を混入していないことを確かめるために、男子を出産した胎盤を用いて、FISH解析によりXY染色体を調べ、区別されていることを確認した。(Igura K et al, 2004¹⁰⁾より改変)

で行われている⁹⁾。

Muroharaらは、臍帯血のCD34陽性分画中にもEPCが含まれていることを明らかにし、臍帯血中のCD34陽性細胞を下肢結紮モデルマウスに臍帯血EPCを移植することにより、血流の回復を認めた⁹⁾。一方で、胎盤由来間葉系細胞においても同様な結果がみられており¹⁰⁾、血管再生は臍帯血や胎盤の有効利用の面で比較的早期に臨床応用が実現される可能性を持っている¹¹⁾。

3. 無制限体性幹細胞

ドイツのデュッセルドルフにあるハイネ大学の臍帯血バンクのWernetのグループは、Verfaillieら¹²⁾が骨髄で見いだした成人多能性細胞(MAPCs: multipotent adult progenitor cells)と同じ可能性を持つ細胞が臍帯血中に存在すること

を見だし、その細胞を無制限体性幹細胞(USSCs: unrestricted somatic stem cells)と名付けた¹³⁾。

この全能性細胞は、臍帯血の単核球のなかでCD45陰性で接着性を持つ細胞であり、約40%の臍帯血から得られた。ヒツジ胎児に移植することにより、造血細胞の20%が臍帯血由来であり、ヒトアルブミンの産生を認め、ラットへの移植では神経細胞に分化することから、胚葉の制限のない全能性に近い細胞と考えられる。また、この細胞は臍帯血CD34陽性細胞の増幅においてフィーダー細胞としての効果も示す¹⁴⁾。現在、USSCsの他のグループからの追試の報告が待たれるなかで、関連するグループはUSSCsをブタ心筋梗塞モデルに移植し、USSCs由来の血管新生と心筋の回復をみたとの報告がある¹⁵⁾。

4. 臍帯血中の間葉系幹細胞

間葉系細胞は中胚葉系の細胞であり，骨，軟骨，脂肪細胞に分化する．また神経細胞など胚葉の枠を越えて細胞が分化することが知られている．骨髄の間葉系細胞は成人から容易に採取でき，再生医療ではこの間葉系細胞の分化能を生かした治療が期待されている．臍帯血に間葉系幹細胞が存在するかこれまで議論はあったが，最近では存在を確認する報告が多く，30～40%の臍帯血ユニットから得られる^{16, 17)}．

臍帯血中の間葉系細胞は骨髄にくらべて存在頻度が低く，分娩から単核細胞分離までの時間，臍帯血の量により採取頻度に影響することが報告されている．分離された間葉系細胞は典型的な分化能を示すが，筆者らの観察では特に軟骨への分化誘導がしやすく，ペレット法による培養では軟骨細胞の成長は骨髄よりも早い結果を得ている(未発表データ)．

臍帯血から間葉系細胞を確実に，かつ効率よく集める技術の開発が必要と考える．

胎盤組織

臍帯血のなかの間葉系細胞の存在頻度が少ないことから，胎盤，臍帯，羊膜といった臍帯血以外の細胞組織も注目されている(図1)．

1. 胎盤絨毛由来間葉系細胞

筆者らは，正期産に娩出された胎盤の胎児側絨毛部からout-growth法で間葉系細胞を分離した¹⁸⁾．胎児側を選んだのは，臍帯血バンクには新生児のHLA型を含めて移植に必要なデータがすべて保管されているからであり，母親に関するデータは新生児よりは完全ではないからである．母親由来細胞を混入していないことを確かめるために，男子を出産した胎盤絨毛由来細胞を増殖させ，FISH解析によりXY染色体を調べ，胎児側細胞が分離増幅していることを確認した(図2)．

単離した細胞は線維芽細胞様の形態を示し，この細胞を増幅させてFACSで細胞表面を解析した．CD44, CD90, CD73, CD105, HLA class 1を

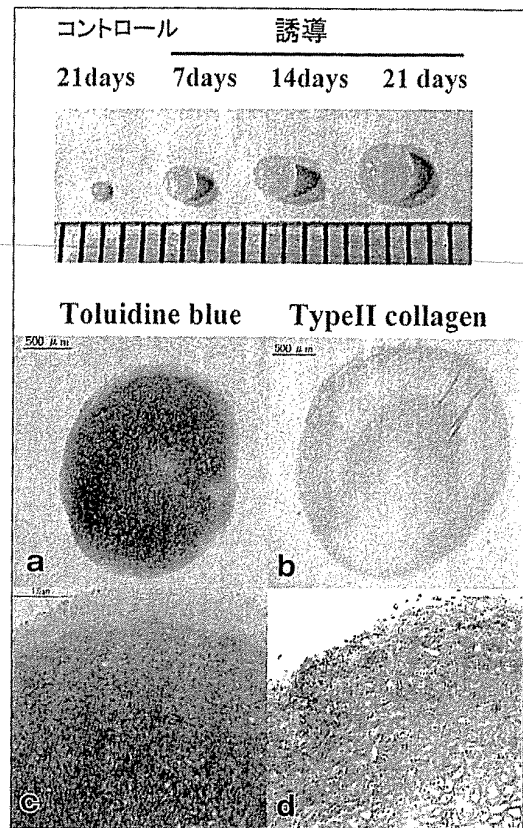


図3

*In vitro*での軟骨誘導はペレット培養法で軟骨誘導培地により3週間誘導の間，ペレットの大きさと重量の増大が確認された(上図)．トルイジンブルー染色では酸性粘液多糖類が赤紫色に，軟骨特異的マーカーであるII型コラーゲンの免疫染色では茶色に陽性であった(下図a～d)．(Zhang X et al., 2006²⁰⁾より改変)

発現していた．一方，CD31, CD34, CD133, CD45, TIE-II, HLA class 2は発現していなかった．*In vitro*でこのような細胞は誘導培養条件で，骨，軟骨，脂肪，さらに神経系細胞へ分化することが明らかにされた^{18, 19)}．ペレット法で軟骨細胞に誘導すると半透明な軟骨が形成された(図3)．さらに，コラーゲンスポンジに包埋して誘導培地において2週間培養，ヌードラットの膝関節の骨軟骨欠損部位に移植したところ，欠損部位を補填した²⁰⁾(図4)．

胎盤絨毛由来間葉系細胞はまた遺伝子導入がし

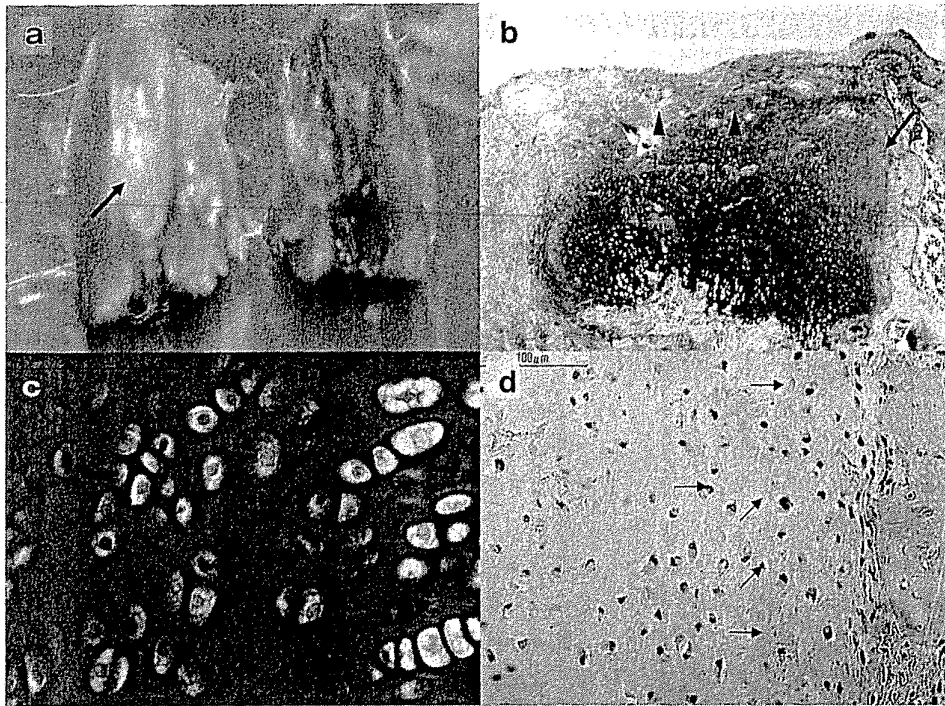


図4

*In vivo*における軟骨細胞への分化能を検討するため、細胞をコラーゲンスポンジに包埋し、誘導培地において2週間培養したあと、膝関節における骨軟骨欠損モデルをヌードラットで作製し移植実験を行った。移植後6週目に摘出し、欠損部に白く、円滑な軟骨様組織を形成した。

一方、移植されていない欠損部はそのままであった(a)。形成された組織はトルイジンブルー染色が陽性であり(b)(矢頭はコラーゲンスポンジのファイバー、矢印は移植片とラット骨の境界を示す)、特に、欠損の下部に強度なトルイジンブルー染色および円形な軟骨細胞を示して、硝子軟骨の形成を示唆された(c)。ヒト特異的 β 2-ミクログロブリンの免疫染色を用いてヒト由来細胞を証明した(d)。(Zhang X et al, 2006²⁹⁾より改変)

やすく²⁴⁾、VEGFなどのサイトカインを多く放出し、マウスの下肢虚血モデルにおいて胎盤間葉系細胞を移植すると血流の回復に効果を示すことが明らかにされている¹⁰⁾。

2. 臍帯

臍帯の結合組織であるウォルトンゼリー(Wharton Jelly)に間葉系細胞が存在し、神経細胞、グリア細胞に分化し²⁵⁾、また心筋細胞に分化することが報告され²⁶⁾、間葉系細胞の新しい供給源として期待されている。

臍帯の血管部位からも間葉系細胞が分離しうることが報告されている²⁴⁾。

3. 羊膜

ヒト羊膜は上皮細胞層とその下部に存在する羊膜間葉系細胞からなる。上皮細胞はドーパミンを産生し、パーキンソンモデルラットの脳内に移植することにより、一過性の臨床的治療効果が得られている²⁵⁾。培養上皮細胞を糖尿病マウスに移植することによりインスリン産生細胞に分化し、血糖値を下げることができ²⁶⁾、また、上皮細胞と下層の間葉系細胞を移植すると、肝細胞に分化することが知られている²⁷⁾。さらに、この細胞は、心筋細胞に分化することも報告されている²⁸⁾。また、羊膜細胞は、角膜の支持やES細胞のフィーダー細胞としての利用が報告されている。

臍帯血による再生の可能性

1. 骨、軟骨細胞

骨・軟骨再生医療の標的となる疾患は数多く存在する。すなわち変形性関節症、外傷や腫瘍切除後の骨、軟骨の欠損、先天性の変形、奇形などである。骨、軟骨の欠損に対して現在行われているのは自己組織移植である。しかし、移植できる組織の量には限界がある。骨髄由来間葉系細胞は再生医療の細胞ソースとして最も注目されているが、骨髄採取はドナーや患者本人への負担があり、また患者が遺伝性疾患を持っていた場合、年齢が高い場合には自己の骨髄由来間葉系細胞を用いることは困難である^{29,30)}。

臍帯血に骨、軟骨細胞へ分化しうる間葉系細胞が存在することは数多く報告されている^{31~36)}。骨に関しては誘導培養条件でALP活性が上昇、石灰化が起こり、ヌードマウスの骨折モデルに足場を組み合わせて移植後、骨折癒合が促進された¹⁹⁾。軟骨はmicromass誘導培養法により、軟骨特異的細胞外基質II型コラーゲンとプロテオグリカンが検出された。足場と組み合わせて2週間誘導培養後、ヌードマウスの皮下に移植すると、大量の軟骨基質が合成されることが示された¹⁹⁾。

筆者らは、これまで白血病治療を主な目的とした臍帯血バンクを構築してきたが、そのシステムを活かして臍帯血由来間葉系細胞の単離・増殖・分化能の検討を行った。In vivoでの軟骨形成は確認されたが、骨形成に関しては現在解析中である。軟骨細胞への分化に関しては、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より大量の軟骨基質を合成することから、骨、軟骨細胞再生のアロ細胞ソースとして期待される。

2. 心筋細胞

心臓は心筋梗塞、心筋炎、心筋症などにより障害が起こるが、骨格筋、肝臓、皮膚などとは異なり、組織を再生することができないために機能が低下して心不全へと移行する。わが国においては生活習慣の欧米化によって心筋梗塞が増えている。心臓移植の提供者が得られにくく治療例が増

えにくい現在、自己骨髄中の幹細胞による心筋細胞の分化誘導が試みられている。マウス成体の骨髄細胞から自動収縮能を持つ心筋様細胞を*in vitro*にて誘導したことが報告された³⁷⁾。自己骨髄細胞を培養移植し、scar内に移植細胞由来のトロポニンI陽性の心筋様細胞、および新生血管の一部を形成する内皮細胞が確認され、移植群はコントロール群にくらべ心機能は高値を示した³⁸⁾。

心筋梗塞患者において、自己骨格筋より分離培養した筋芽細胞移植を開心術中に施行した有用性が報告されつつある^{39~41)}。温度感受性培養皿を用いて筋芽細胞シートを作製し、心筋梗塞ラットモデルに移植し心機能の改善、生存率の向上がみられたことが報告されている⁴²⁾。しかし、自己筋芽細胞あるいは骨髄由来細胞の移植は患者の負担になり、細胞品質、緊急時対応の困難などいくつかの問題が存在する。臍帯血由来間葉系細胞から心筋細胞への分化誘導の報告は現時点ではまだ少ないが、上述のUSSCsを*in vivo*にてヒツジの子宮内に移植、産まれたヒツジの心臓にヒト由来細胞が存在していることが報告されていること¹⁹⁾、そしてブタへの移植結果からも¹⁵⁾、臍帯血由来細胞の筋梗塞治療への応用が期待される。

3. 肝細胞

臍帯血由来間葉系細胞は、*in vitro*において細胞誘導培地にて2週間培養後、小型円型細胞と変化、アルブミンmRNAの発現は経時的に増加し、肝細胞関連マーカー α -fetoprotein、cytokeratin-18、tyrosine aminotransferase、glutamine synthetaseが培養後2~3週間発現していることが示され、免疫染色とWestern blotでも確認された。

さらに分化した臍帯血由来細胞は、LDLを取り込む能力を持つことから、機能的肝細胞であることも示された^{34,39,42~46)}。In vivoにおいて、NOD/SCIDマウスに一過性の肝障害を与え、尾静脈あるいは門静脈より臍帯血由来細胞を直接あるいは分化誘導し入れた。

その結果、移植4週間後、ヒト肝細胞特異

(human hepatocyte specific antigen : HAS) とヒトアルブミンの両方で陽性に染色された細胞が認められた。また長期的に臍帯血由来細胞は肝細胞として生着していることが示された。さらに、マウス血清中にはヒトアルブミンが検出された⁶¹⁾。

以上の結果から、臍帯血由来細胞には肝細胞へ分化しうる細胞が存在することが示唆され、移植可能な肝細胞供給源として期待が持たれる。

しかしながら、臍帯血中のどの細胞分画が肝細胞になりうるのか、移植された細胞は肝全体の何割程度で置換、肝障害をサポートができるのか、不明の点が多く残されている。また、骨髄由来細胞について肝臓に移植後細胞融合 (cell fusion) である報告がなされており、その評価がさまざまであることから⁴⁸⁻⁵⁰⁾、今後も慎重な検討が必要である。

4. 臍帯血由来細胞からの膵臓細胞への分化誘導

*In vitro*において誘導分化した細胞にヒトインスリン産生がみられるとの報告は多いが⁵¹⁾、最近、Yoshidaらは、生後48時間以内のNOD/SCIDマウスへ臍帯血の単核球を移植、移植後1~2カ月後に0.65%の存在確率で膵臓部位にヒトインスリンを産生している臍帯血由来細胞が存在することを報告している⁵²⁾。FISH解析により、このアルブミン産生細胞はfusionによるものとfusionではないものの、両方のタイプの細胞が存在することを報告している。

5. 臍帯血由来間葉系細胞から神経系細胞への分化誘導

臍帯血から神経系細胞に分化する細胞が存在すれば、パーキンソン病や脊髄損傷などの難治性神経系疾患の治療として、基本的には細胞確保のためにドナーにならば侵襲を加えることなく、自己細胞移植に準じる安全性の確保された細胞治療が実現できるものとして期待されている。近年、臍帯血には神経系細胞に分化しうる細胞が存在することが報告されている^{13,34,53-61)}。しかし、結果的には神経系マーカーを発現する細胞が存在するこ

とは示されているが、ニューロンやグリア、シュワン細胞特異的な分化誘導法や、サブタイプ別のニューロンへの分化誘導法など、機能的な解析を含めた詳細な検討はほとんどなされていない。また、臍帯血から単離した細胞の違いや培養条件などの違いにより、どのような特徴を持つ細胞が神経系に分化するかなど明らかにされていない。とりわけ注目されている細胞として間葉系細胞がその候補の一つである。

臍帯血由来間葉系細胞から神経系細胞に分化誘導することが報告されてきてはいるが^{13,16,34,58,66)}、主に間葉系細胞から神経系細胞への分化誘導については骨髄由来間葉系細胞を用いて検討されており、ドーパミン産生ニューロン⁶²⁾や感覚ニューロン⁶³⁾、シュワン細胞⁶⁴⁾に特異的な分化誘導法が確立されている。また、骨髄のMAPCsからも神経系の細胞に分化誘導することが報告されているが⁶⁵⁻⁶⁷⁾、臍帯血に存在するか否か明らかではない。一方、神経系に分化誘導する前の間葉系細胞で、すでに神経系マーカーを発現している間葉系細胞も存在することが報告されてきており⁶⁸⁻⁷²⁾、臍帯血同様に骨髄でもどのような間葉系細胞が神経系細胞に分化誘導するか明らかにされておらず、細胞生物学的な詳細な検討が必要とされる。

最近、臨床治験として韓国の研究グループから、脊髄損傷患者に臍帯血由来幹細胞を損傷部位に移植し、その後3週間後で歩行補助器具を使用し歩行可能になったことが報告された⁷³⁾。移植した臍帯血由来幹細胞には間葉系細胞を含めたさまざまな細胞が含まれており、どのようなメカニズムで損傷が軽減したのかは明らかにされていないが、難治性神経系疾患への臍帯血の利用に大きな期待が持たれる。

アロ細胞移植における免疫反応

アロ細胞を用いる再生医療にとって鍵となるのは、免疫反応の回避あるいは抑制である。臍帯血移植は免疫反応が低いことが特徴であり、骨髄移植においてはHLAが完全一致であったとしても、急性の移植片対宿主病 (graft versus host

disease: GVHD)が発症する頻度は高く、一座不一致であってもその発症頻度と発症は重篤である⁷⁴⁾。

一方、臍帯血はGVHDの発症頻度は格段に低く、またその治療は可能である。基本的に移植される免疫担当細胞が成人の細胞にくらべて未熟であると考えられている。リンパ球混合培養での反応性は低く、サイトカインの産生が低く抑えられている。また、制御性Tリンパ球が骨髄にくらべて高頻度に存在することも理由として考えられるが、これには臍帯血の単球由来の樹状細胞(dendritic cell: DC)が制御性リンパ球を誘導するとの報告もある⁷⁵⁾。

一方、間葉系細胞は、それ自体が免疫抑制作用を持つことが知られている。間葉系細胞はMHC class 1陽性、MHC class 2は陰性であり、CD4T細胞の認識を避けることが出来る。また、effector T細胞を誘導に必要なCo-stimulatory分子(CD40, CD40L, CD80, CD86)も発現していない⁷⁶⁾。また間葉系細胞はDC成熟を妨げ、NK細胞、CD8、CD4陽性細胞の反応を抑制する。間葉系細胞は細胞接触を通してDCの成熟を妨げて、また、単核細胞から炎症因子IFN- γ 、IL-12、TNF- α の分泌を抑制する作用を持つ⁷⁶⁾。

● 臍帯血のヒトの臨床試験

これまで臍帯血を再生医療の視点から移植した例はまだまだ多くない。注目されたのは、前述した韓国のグループが行った脊髄損傷の患者への移植であろう⁷³⁾。このグループは脊髄損傷をはじめ、アルツハイマー症、パーキンソン氏病、進行性筋萎縮症、脳梗塞、糖尿病、肝硬変、心筋梗塞などのさまざまな疾患に臍帯血(増幅したCD34陰性細胞)を移植している。医学的な検証が充分なされ、成績が公表されていくことが強く望まれる。

● 研究用幹細胞バンク

臨床用の臍帯血の利用は日本さい帯血バンクネットワークが厚生労働省から補助金を受けてす

めており、多大な実績を上げてきている。

一方で、再生医療の視点からの臍帯血の利用は国内では基礎研究の段階であるが、この研究を推進するために、文部科学省は“再生医療の実現化プロジェクト”のサブテーマとして研究用幹細胞バンク整備領域を設け、“研究用幹細胞リソースバンク”を立ち上げた⁷⁷⁾。日本さい帯血バンクネットワークのなかで5バンクがこのプロジェクトに協力し、採取細胞数などの条件が臨床用に適合しなかった臍帯血検体について、感染症などの安全性を検査のうえ、理化学研究所バイオリソースセンター(理研 CELL BANK)を経由して国内の公的な研究機関に供給(無償、実費負担)するもので、2004年7月より供給をはじめた。これにより臍帯血を細胞ソースとした再生医療などの研究が国内で進むことが期待されている。

● おわりに

臍帯血バンクが整備されているなか、胎盤組織はいまだ医療廃棄物として処理されている。臍帯血バンクに保存される臍帯血が遺伝性疾患、感染症検査をクリアし、またHLA型が調べられたうえで保存されていることから、臍帯血の間葉系細胞や胎盤組織の間葉系細胞が臍帯血バンクのステムを活用することが出来れば、輸血に使われる血液製剤と同じレベル、すなわち最も安全性の高い再生医療のための細胞ソースとなりうる。臍帯血に含まれる細胞は、再生医療においてアロ細胞としては最も臨床に適した細胞である可能性が高い。

幹細胞の基礎研究、細胞プロセッシング、再生医療を視野に入れた臍帯血バンク、ティッシュエンジニアリングの各分野が協力し、臨床試験がやかに進められるような環境を整えていくことが要と考える。

文 献

- 1) Gluckman E, Rocha V: History of the clinical use of umbilical cord blood hematopoietic cell transplantation. *Cytotherapy* 2005, 7: 219-227.
- 2) 日本さい帯血バンクネットワーク: <http://www.cord.gr.jp>

- 3) Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P, Wagner JE, Zhang MJ, Champlin RE, Stevens C, Barker JN, Gale RP, Lazarus HM, Marks DI, van Rood JJ, Scaradavou A, Horowitz MM : Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med* 2004, 351 : 2265-2275.
- 4) Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, Blazar BR, McGlave PB, Miller JS, Verfaillie CM, Wagner JE : Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood* 2005, 105 : 1343-1347.
- 5) 伊藤仁也, 中畑龍俊 : *In vitro* 増幅造血幹細胞を用いた臍帯血移植. *実験医学* 2006, 24 : 154-165.
- 6) Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, Pollak K, Ferkowicz MJ, Gilley D, Yoder MC : Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human umbilical cord blood cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* 2004, 104 : 2752-2760.
- 7) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM : Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997, 275 : 964-967.
- 8) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T : Therapeutic angiogenesis using cell transplantation (TACT) study investigators. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells : a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 2002, 360 : 427-435.
- 9) Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, Onitsuka I, Matsui K, Imaizumi T : Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 2000, 105 : 1527-1536.
- 10) Nishishita T, Ouchi K, Zhang X, Inoue M, Inazawa T, Yoshiura K, Kuwabara K, Nakaoka T, Watanabe N, Igura K, Takahashi TA, Yamashita N : A potential pro-angiogenic cell therapy with human placenta-derived mesenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 325 : 24-31.
- 11) Zhang L, Yang R, Han ZC : Transplantation of umbilical cord blood-derived endothelial progenitor cells : a promising method of therapeutic revascularisation. *Euro J Hematol* 2006, 76 : 1-8.
- 12) Reyes M, Lund T, Lencic T, Auiar D, Koodie L, Verfaillie CM : Purification and *ex vivo* expansion of post natal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001, 98 : 2615-2625.
- 13) Kogler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Muschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Muller HW, Zanjani E, Wernet P : A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 2004, 200(2) : 123-135.
- 14) Kogler G, Radke TF, Lefort A, Sensken S, Fischer J, Sorg RV, Wernet P : Cytokine production and hematopoiesis supporting activity of cord blood - derived unrestricted somatic stem cells. *Exp Hematol* 2005, 33 : 573-583.
- 15) Kim BO, Tian H, Prasongsukarn K, Wu J, Angoulvant D, Wnendt S, Muhs A, Spitkovsky D, Li RK : Cell transplantation improves ventricular function after a myocardial infarction : a preclinical study of human unrestricted somatic stem cells in a porcine model. *Circulation* 2005, 112 : 96-104.
- 16) Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH : Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004, 103 : 1669-1675.
- 17) Bieback K, Kern S, Kluter H, Eichler H : Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 2004, 22 : 625-634.
- 18) Igura K, Zhang X, Takahashi, K, Mitsuru A, Yamaguchi S, Takahashi TA : Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytherapy* 2004, 6 : 1-11.
- 19) Takahashi, K, Igura K, Zhang X, Mitsuru A, Takahashi TA : Effects of osteogenic induction on mesenchymal cells from fetal and maternal parts of human placenta. *Cell Transplant* 2004, 13 : 337-341.
- 20) Zhang X, Mitsuru A, Igura K, Takahashi K, Ichinose S, Yamaguchi S, Takahashi TA : Mesenchymal progenitor cells derived from chorionic villi of human placenta for cartilage tissue engineering. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, 340 : 944-952.
- 21) Zhang X, Nakaoka T, Nishishita T, Watanabe N, Igura K, Shinomiya K, Takahashi TA, Yamashita N : Efficient adeno-associated virus-mediated gene expression in human placenta-derived mesenchymal cells. *Microbiol Immunol* 2003, 47 : 109-116.
- 22) Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM et al. : Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells* 2003, 21 : 50-60.
- 23) Wang HS, Hung SC, Peng ST, Hung CC, Wei HM, Guo YJ, Fu YS, Lai MC, Chen CC : Mesenchymal stem cells in the Wharton's Jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 2004, 22 : 1330-1337.
- 24) Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN : Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* 2003, 21 : 105-110.
- 25) Kakishita K, Elwan MA, Nakao N, Itakura T, Sakuragawa N : Human amniotic epithelial cells produce dopamine and survive after implantation into the striatum of a rat model of Parkinson's disease : a potential source of donor for transplantation therapy. *Exp Neurol* 2000, 165 : 27-34.
- 26) Wei JP, Zhang TS, Kawa S, Aizawa T, Ota M, Akaike T, Kato K, Konishi I, Nikaido T : Human amnion-isolated cells normalize blood glucose in streptozotocin-induced diabetic mice. *Cell Transplant* 2003, 12 : 545-552.

- 27) Takashima S, Ise H, Zhao P, Akaike T, Nikaido T : Human amniotic epithelial cells possess hepatocyte-like characteristics and functions. *Cell Structure Function* 2004, 29 : 73-84.
- 28) Zhao P, Ise H, Hongo M, Ota M, Konishi I, Nikaido T : Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes. *Transplantation* 2005, 79 : 528-535.
- 29) Rao MS, Mattson MP : Stem cells and aging : expanding the possibilities. *Mech. Aging Dev* 2001, 122 : 713-734.
- 30) Mueller SM, Glowacki J : Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *J Cellular Biochem* 2001, 82 : 583-590.
- 31) Bieback K, Kern S, Kluter H, Eichler H : Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 2004, 22 (4) : 625-634.
- 32) Lee MW, Yang MS, Park JS, Kim HC, Kim YJ, Choi J : Isolation of mesenchymal stem cell from cryopreserved human umbilical cord blood. *Int J Hematol* 2005, 81 (2) : 126-130.
- 33) Yang SE, Ha CW, Jung M, Jin HJ, Lee M, Song H, Choi S, Oh W, Yang YS : Mesenchymal stem/progenitor cells developed in culture from UC blood. *Cytotherapy* 2004, 6(5) : 476-486.
- 34) Jang YK, Jung DH, Jung MH, Kim DH, Yoo KE, Sung KW, Koo HH, Oh W, Yang YS, Yang SE : Mesenchymal stem cells feeder layer from human umbilical cord blood for *ex vivo* expanded growth and proliferation of hematopoietic progenitor cells. *Ann Hematol* 2006, 85 : 212-225.
- 35) Gang EJ, Hong SH, Jeong JA, Hwang SH, Kim SW, Yang IH, Ahn C, Han H, Kim H : *In vitro* mesenchymal potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 13 : 321(1) : 102-108.
- 36) Kim JW, Kim SY, Park SY, Kim YM, Kim JM, Lee MH, Ryu HM : Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord. *Ann Hematol* 2004, 83(12) : 733-738.
- 37) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S : Cardiomyocyte can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest* 1999, 103 : 697-705.
- 38) Tomita S, Li RK, Weisel RD, Mickle DAG, Kim EJ, Sakai T, Jia ZQ : Autologous transplantation of bone marrow cell improves damaged heart function. *Circulation* 1999, 100 : 247-256.
- 39) Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Adergel E, Pouzet B, Bel A, Sarateanu S, Scorsin M, Schwartz K, Bruneval P, Benbunan M, Marolleau JP, Duboc D : Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003, 41 : 1078-1083.
- 40) Herreros J, Prosper F, Perez A, Gavira JJ, Garcia-Velloso MJ, Barba J, Sanchez PL, Canizo C, Rabago G, Marti-Clement JM, Hernandez M, Lopez-Holgado N, Gozalez-Santos JM, Martin-Luengo C, Alegria E : Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in human : histological analysis of cell survival and differentiation. *J Am Coll Cardiol* 2003, 41 : 879-888.
- 41) Siminiak T, Kalawski R, Fiszer D, Jerzykowska O, Rzezniczak J, Rozwadowska N, Kurpisz M : Autologous skeletal myoblast transplantation for treatment of postinfarction myocardial injury : phase I clinical study with 12 months of follow-up. *Am Heart J* 2004, 148 : 531-537.
- 42) Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, Akutsu T, Setomaru T, Abe K, Kikuchi A, Umezumi M, Okano T : Fabrication of pulsatile tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res* 2002, 90 : 40-48.
- 43) Kang XO, Zang WJ, Bao LJ, Li DL, Song TS, Xu XL, Yu XJ : Fibroblast growth factor-4 and hepatocyte growth factor induce differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes. *World J Gastroenterol* 2005, 11 : 7461-7465.
- 44) Hong SH, Gang EJ, Jeong JA, Ahn C, Hwang SH, Yang IH, Park HK, Han H, Kim H : *In vitro* differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell into hepatocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 330 : 1153-1161.
- 45) Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK : *In vitro* hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004, 40(6) : 1275-1284.
- 46) Tanabe Y, Tajima F, Nakamura Y, Shibasaki E, Wakejima M, Shimomura T, Murai R, Murawaki Y, Hashiguchi K, Kanbe T, Saeki T, Ichiba M, Yoshida Y, Mitsunari M, Yoshida S, Miake J, Yamamoto Y, Nagata N, Harada T, Kurimasa A, Hisatome J, Terakawa N, Murawaki Y, Shiota G : Analyses to clarify rich fractions in hepatic progenitor cells from human umbilical cord blood and cell fusion. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 324 : 711-718.
- 47) Sharma AD, Cantz T, Richter R, Eckert K, Henschler R, Wilkens L, Jochheim-Richter A, Arseniev L, Ott M : Human cord blood stem cell generate human cytokeratin18-negative hepatocyte-like cells in injured mouse liver. *Am J Pathol* 2000, 167(2) : 555-564.
- 48) Nonome K, Li X, Takahara T, Kitazawa Y, Funeshima N, Yata Y, Xue F, Kanayama M, Shimizu E, Kuwae C, Saito S, Watanabe A, Sugiyama T : Human umbilical cord blood-derived cell differentiation into hepatocyte-like cells in the F₄ mediated liver injury model. *AJP-Gastrointestinal and liver physiology* 2005, 289 : 1091-1099.
- 49) 柿沼 晴 : ヒト臍帯血細胞の肝細胞への誘導と細胞植. *日本炎症・再生医学会雑誌* 2006, 26 : 44-48.
- 50) Willenbring H, Bailey AS, Foster M, Akkari Dorrel C, Olson S, Finegold M, Fleming W, Grompe M : Myelomonocytic cells are sufficient therapeutic cell fusion in liver. *Nat Med* 2004, 10

- 744-748.
- 51) Pessoa A, Eletti B, Croera C, Savalli N, Diodovich C, Gribaldo L : Pancreas developing markers expressed on human mononucleated umbilical cord blood cells. *Biochem Biophys Research Commun* 2004, 323 : 315-322.
 - 52) Yoshida S, Ishikawa F, Kawano N, Shimoda K, Nagafuchi S, Shimoda S, Yasukawa M, Kanemaru T, Ishibashi H, Shultz LD, Harada M : Human cord blood-derived cells generate insulin-producing cells *in vivo*. *Stem Cells* 2005, 29 : 1409-1416.
 - 53) Sanchez-Ramos JR, Song S, Kamath SG, Zigova T, Willing A, Cardozo-Pelaez F, Stedeford T, Chopp M, Sanberg PR : Expression of neural markers in human umbilical cord blood. *Exp Neurol* 2001, 171 (1) : 109-115.
 - 54) Ha Y, Choi JU, Yoon DH, Yeon DS, Lee JJ, Kim HO, Cho YE : Neural phenotype expression of cultured human cord blood cells *in vitro*. *Neuroreport* 2001, 16 : 12(16) : 3523-3527.
 - 55) Goodwin HS, Bicknese AR, Chien SN, Bogucki BD, Quinn CO, Wall DA : Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood : expression of bone, fat, and neural markers. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001, 7(11) : 581-588.
 - 56) Buzanska L, Machaj EK, Zablocka B, Pojda Z, Domanska-Janik K : Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features *in vitro*. *J Cell Sci* 2002, 115 (Pt 10) : 2131-2138.
 - 57) Bicknese AR, Goodwin HS, Quinn CO, Henderson VC, Chien SN, Wall DA : Human umbilical cord blood cells can be induced to express markers for neurons and glia. *Cell Transplant* 2002, 11(3) : 261-264.
 - 58) Hou L, Cao H, Wang D, Wei G, Bai C, Zhang Y, Pei X : Induction of umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neuron-like cells *in vitro*. *Int J Hematol* 2003, 78(3) : 256-261.
 - 59) Jang YK, Park JJ, Lee MC, Yoon BH, Yang YS, Yang SE, Kim SU : Retinoic acid-mediated induction of neurons and glial cells from human umbilical cord-derived hematopoietic stem cells. *J Neurosci Res* 2004, 75(4) : 573-584.
 - 60) Jeong JA, Gang EJ, Hong SH, Hwang SH, Kim SW, Yang IH, Ahn C, Han H, Kim H : Rapid neural differentiation of human cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Neuroreport* 2004, 15 (11) : 1731-1734.
 - 61) Sun W, Buzanska L, Domanska-Janik K, Salvi RJ, Stachowiak MK : Voltage-sensitive and ligand-gated channels in differentiating neural stem-like cells derived from the nonhematopoietic fraction of human umbilical cord blood. *Stem Cells* 2005, 23 (7) : 931-945.
 - 62) Chen N, Hudson JE, Walczak P, Misiuta I, Garbuzova-Davis S, Jiang L, Sanchez-Ramos J, Sanberg PR, Zigova T, Willing AE : Human umbilical cord blood progenitors : the potential of these hematopoietic cells to become neural. *Stem Cells* 2005, 23(10) : 1560-1570.
 - 63) Buzanska L, Habich A, Jurga M, Sypecka J, Domanska-Janik K : Human cord blood-derived neural stem cell line-Possible implementation in studying neurotoxicity. *Toxicol in vitro*. 2005, 19(7) : 991-999.
 - 64) Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, Cho H, Matsumoto N, Itokazu Y, Tajima N, Yamada H, Sawada H, Ishikawa H, Mimura T, Kitada M, Suzuki Y, Ide C : Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest* 2004, 113(12) : 1701-1710.
 - 65) Kondo T, Johnson SA, Yoder MC, Romand R, Hashino E : Sonic hedgehog and retinoic acid synergistically promote sensory fate specification from bone marrow-derived pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102(13) : 4789-4794.
 - 66) Dezawa M, Takahashi I, Esaki M, Takano M, Sawada H : Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of *in vitro* differentiated bone-marrow stromal cells. *Eur J Neurosci* 2001, 14 (11) : 1771-1776.
 - 67) Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM : Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002, 418(6893) : 41-49.
 - 68) Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM : Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 2002, 30(8) : 896-904.
 - 69) Jiang Y, Henderson D, Blackstad M, Chen A, Miller RF, Verfaillie CM : Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 1 (Suppl 100) : 11854-11860.
 - 70) Wislet-Gendebien S, Leprince P, Moonen G, Rogister B : Regulation of neural markers nestin and GFAP expression by cultivated bone marrow stromal cells. *J Cell Sci* 2003, 116(Pt 16) : 3295-3302.
 - 71) Tondreau T, Lagneaux L, Dejenefte M, Massy M, Mortier C, Delforge A, Bron D : Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. *Differentiation* 2004, 72(7) : 319-326.
 - 72) Deng J, Petersen BE, Steindler DA, Jorgensen ML, Laywell ED : Mesenchymal stem cells spontaneously express neural proteins in culture, and are neurogenic after transplantation. *Stem Cells* 2005, (Epub ahead of print).
 - 73) Kang KS, Kim SW, Oh YH, Yu JW, Kim KY, Park HK, Song CH, Han H : A 37-year-old spinal cord-injured female patient, transplanted of multipotent stem cells from human UC blood, with improved sensory perception and mobility, both functionally and morphologically : a case study. *Cytotherapy* 2005, 7(4) : 368-373.
 - 74) Broxmeyer HE : Biology of cord blood cells and future prospects for enhanced clinical benefit. *Cytotherapy* 2005, 7 : 209-218.

- 75) Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC : Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 2003, 75 : 389-397.
- 76) Ryan JM, Barry FP, Murphy JM and Mahon BP :

Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflammation* 2005, 2 : 8.

- 77) 研究用幹細胞リソースバンク : <http://scb.ims.u-tokyo.ac.jp/>, 理研CELL BANK : <http://www.bcr.riken.jp/lab/cell/hcb/>

日本の医療機器の 研究開発と制度の動向



国立医薬品食品衛生研究所
療品部長
土屋利江氏



厚生労働省医薬食品局審査管理課
医療機器審査管理室長
俵木登美子氏

日本の技術力を礎に、新たな医療機器の研究開発が進められているが、そのシステムには様々な課題も指摘されている。開発の推進と審査の迅速化を目指し、平成17年に厚生労働省と経済産業省の共同で「次世代医療機器評価指標検討会/医療機器開発ガイドライン評価検討委員会」が設置された。評価指標の策定によって、医療機器の開発は今後どのように進むのか？ 再生医療をはじめとする新たな技術はどこまで実用化しているのか？ そこで本対談では、次世代医療機器検討会の審査ワーキンググループ事務局長を務める土屋利江氏と、厚生労働省で医療機器の承認申請の制度改革に従事される俵木登美子氏をお迎えし、日本の医療機器の動向をうかがった。（編集部 一戸敦子）

医療機器とは？

—医療機器の定義をお教えてください。

俵木 医療機器は安全性、有効性と品質を確保して提供されるよう、薬事法によって規制を受けています。基本的には医薬品と同じように目的で定義されており、疾病の診断・治療・予防のために使われるもの、または身体の構

造、機能に影響を与えるものが該当します。また、具体的に政令で1つ1つ種類が規定されていて、そこに該当するものが医療機器になるのです。それにはメスや救急絆創膏のようなものから、ペースメーカーや陽子線治療器のような大型の治療装置までが含まれることとなります。

—かなり幅広い範囲に渡っていますが、すべて同じような承認申請が行われているのですか？

俵木 医療機器はリスクに応じて国際的にクラス分類されています。世界的に医療機器の規制を整合しようとする会合（GHTF：Global Harmonization Task Force）が日米欧豪加の5極で行われ、その中でリスクに応じた医療機器の4分類が整合されました。我が国でも平成14年の薬事法改正で規制の中に取り込んでいます（図1）。

クラスIは非常にリスクの低いもので、企業自らが安全と品質を確認して市場に出すことができる自己認証となります。クラスIIはIよりややリスクがありますが、国の定めた基準をもと

国際分類	リスクによる医療機器の分類	リスク分類	販売規制	
			製造販売規制	製造販売規制
クラスⅠ	不具合が生じた場合でも、人体へのリスクが極めて低いと考えられるもの (例) 体外診断用機器、鋼製小物、X線フィルム、歯科技工用品	極めて低	一般医療機器	販売業の届出不要 ^{※1} 製造販売承認不要
クラスⅡ	不具合が生じた場合でも、人体へのリスクが比較的低いと考えられるもの (例) MRI、電子式血圧計、電子内視鏡、消化器用力ターテル、超音波診断装置、歯科用合金	低	管理医療機器	販売業の届出制 ^{※1} 登録機関による認証 ^{※2}
クラスⅢ	不具合が生じた場合、人体へのリスクが比較的高いと考えるもの (例) 透析器、人工骨、人工呼吸器、バルーンカテーテル	中・高	高度管理医療機器	販売業の許可制 製造販売に係る大臣承認
クラスⅣ	患者への侵襲性が高く、不具合が生じた場合、生命の危険に直結する恐れがあるもの (例) ペースメーカー、人工心臓弁、ステント			

図1 ●医療機器のクラス分類と安全対策

例示している製品は、国際分類を踏まえて分類。なお最終的にどこに分類されるかは、薬事・食品衛生審議会の意見を聴いて、厚生労働大臣が定める。このほか、医療機器には賃貸業があるが、薬事法上の規制は販売業同様であるため、この表では表記を省略。

※1) 特定保守管理医療機器については、管理医療機器及び一般医療機器に分類されるものであっても、販売業は許可制とする。※2) 厚生労働大臣が基準を定めて指定する管理医療機器に限る

に第三者認証機関で認証を取れば流通できるという仕組みになっています。クラスⅢとⅣは比較的风险が高くて、Ⅳはペースメーカーや人工心臓のような命に関わるようなものが入っており、後の多くのものがⅢに分類されています。このⅢとⅣについては、事前に申請して厚生労働大臣の承認を受ける必要があります。このように、クラスに応じて承認の重さや有効性・安全性の確認の重さが変わってくるのです。

一国際的な4分類は、5カ国で全て標準化されているのでしょうか？

俵木 EUは4分類を採用しています。制度自体は随分日本と違いますが、クラスⅠにあたる物に関しては日本と同じ自己認証となっています。さらに、日本のⅡ～Ⅳに当たる分類についても、全てが第三者認証です。米国はクラス分類が整合しておらず、クラスは3つに分けられています。

一世界の国々と方針を話し合う機会は多いのですか？

俵木 GHTFの会合が頻繁に持たれています。スタディグループ(SG)が幾つかあって、その会合も年に何回かのペースで開かれています。そこでクラス分類や、医療機器として具備すべき基本的な要件を整合したり、市販後の安全対策についても整合の文書が幾つもできています。各国は、新しく規制を作る際にここで整合されたものを取り込むように推奨されているのです。

一平成14年の薬事法改正で、大きく何が変わったのですか？

俵木 市販後の安全対策を充実しようというのが、この改正の大きな流れです。製造販売業者という責任を持った人の位置づけが行われて、その人が従わなければならない基準が明確に示されたのです。また医療機器では、クラス分類や第三者認証制度が導入され、

医療機器の販売についても見直しが行われました。リスクが高いものについては許可を受けなければ販売ができない、販売管理者は講習を受けた者でなければいけない、といったルールになったのです。

一研究開発に触れたものはありますか？

俵木 薬事法に基づく承認を受けるために企業が行う試験、つまり治験に加えて医師主導治験が導入されましたが、研究者が行う研究開発については特に今回の改正ではあまり関わっていないと思います。ただ、いま日本で臨床研究や治験がなかなか進みにくいという指摘があり、それは医療機器だけではなく医薬品の世界でも問題となっていて、治験活性化のための検討が進められています。3カ年計画で行われてきた取り組みが今年度で終わるので、次の5カ年計画の策定が現在検討されているところです^{※1}。

医療機器の研究開発の現状

一承認申請の制度的なお話を伺ってきましたが、その前段階である研究開発の現状をお教えてください。

土屋 今まで医療機器は外国製品が多く利用されてきました。例えばペースメーカーは、日本の企業でも技術はありながら製品としては持っていない。それが何故なのかをよく考えなければなりません。日本の医療機器業界は、比較的小さな企業が多いと思います。医療機器の場合、例えば人工心臓などは様々なテクノロジーが必要で、しかも

※1: 厚生労働省ホームページ参照
<http://www.mhlw.go.jp/>

(次ページへ続く)



その開発スピードは非常に早く改良も早い。つまりリスクの高い治療器になればなるほど開発にお金がかかるし人材がいる、というところで不利な状況があったのです。

ところが最近、日本人に最適な小型の人工心臓が生まれてきました。2社で現実にできており、1つは国内で治療が行われている状況です。それから、日本は材料の分野で強いですね。特に、人工骨の材料であるハイドロキシアパタイトや β TCPなどのセラミックスの分野は非常に強くて、これらは今後再生医療でも人工骨の良い足場になると思います。また、東京女子医科大学の岡野光夫先生が心筋再生用の細胞シートを開発しましたが、細胞の機能維持や分化には細胞外マトリクスが重要で、細胞間連絡機能を担うコネキシンやカドヘリン等の接着分子が重要な役割を担っております。岡野先生が開発されたシート上の細胞ではコネキシン等の発現が上昇しており、細胞自身の再生にも非常に重要な材料となります。循環器系の医療機器は人の命に直結しますから、他の治療法がない場合

はその医療機器を使わなくてはいけないので、リスクに対してベネフィットは明確です。そういう意味で、日本の技術を活かせる転換期を迎えていると思います。

細胞組織と再生医療の位置づけ

—細胞や材料は、医療機器の位置づけに含まれているのでしょうか？

依木 細胞組織を使ったものは、医療機器の中でも一番リスクの高いレベルⅣに分類されています。例えば、皮膚のような外界とのバリアになる物理的な目的が主たるもの、つまりそれ自体が薬理作用を発揮して効果を達成するようなものでないものに関しては、医療機器に該当すると見なされています。一方で、全身を巡るような細胞を取り出して戻す場合には医薬品になるかもしれませんし、細胞自身から出てくる生理活性成分の効果が目的とされる細胞群は医薬品となるかもしれません。医薬品と医療機器のどちらになったとしても有効性・安全性の評価のポイントは同じです。いずれにしてもリスクの高いところに分類されていて、

それは世界でも統一されたルールとなっています。

土屋 医療機器か医薬品かは、企業の方も気にしていますが、私自身の考えでは、骨や軟骨などの生体材料は今の段階では医療機器ではないかと思っています。一方で、細胞治療のように血液系の細胞を遊離細胞として戻すのは明確に医薬品だと思います。

依木 再生医療は大きな期待を持たれていますが、世界的に見ても、評価の指標が確立しているような分野ではありませんし、国際的にもプロダクトの承認を受けたものはあまり多くありません。米国でも臨床研究は盛んに行われていますが、ファイナルなプロダクトとして承認を受けて流通に乗っているものはまだ少数です。FDAでも慎重に審査が行われている段階です。

2006年12月25日、総合科学技術会議において「科学技術の振興及び成長の社会への還元に向けた制度改革について」と題したレポートが出されました。その中で研究の出口は医薬品や医療機器が患者さんの手に届くことで、研究を活性化するために薬事法審査や承認、あるいは治験といった連の開発の流れをどうすべきかという議論がなされました。その中に、薬品・医療機器の審査をもっと迅速していこうという話もありました。再生医療も議論になっていました。再生医療については、安全性の評価基準をもっと明確にしていくべきだと指摘を受け、そういった基準・指針明確化を進めていかなければならないと思っています。

再生医療の実用化に向けた研究開発とは？

—再生医療の実用化に向けて、日本で現在どのような研究開発が進められているのでしょうか？

土屋 再生医療の実用化に関しては、大阪大学の吉川秀樹先生、東北大学の西田幸二先生らと一緒にガイドラインを作成しています。2007年2月16日に財団法人ヒューマンサイエンス振興財団の主催で「幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化」という成果発表会を行います。これは、企業とアカデミック研究者、臨床医と工学系研究者、そして国立医薬品食品衛生研究所が共同で行っているもので、研究成果に合わせてガイドラインづくりを進めているのです。現在、角膜や軟骨、骨や歯科領域で検討を開始しています。ヒューマンサイエンスでは心筋再生も研究テーマでしたが、後ほどお話しする次世代医療機器の再生医療分野に選ばれ、この事業で評価指標を作成しています(図2)。臨床評価の場合、定量的にどの程度良かったかを示さないと、リスクが高かった時にどちらを取るべきか判断がつかません。リスクに対してベネフィットが勝ることから認可が下されるので、定量的な判断基準を作ろうとしているのです。

じつは、今まで米国や海外で数万例使われている軟骨細胞が、治験までは良い評価だったのですが、市販後3年経って北欧で統計的に調べたら、従来の治療法と何ら有意差がなかったという結果が出ました。お金をかけても治療効果が明確でなく、患者さんも医師も使いたがらない。そんな結果となら

ないように、治療効果が確かなものをつくる必要があります。そこで我々は最近、担体に細胞を入れるだけで培養せず埋植する再生医療を臨床に繋げようとしています。この方法は非侵襲的ですし、色々手を加える必要もないので低コストです。このように機能性のある材料が開発され、リスク&ベネフィットで有効性が明確になって、承認後に本当に売れるものが出来てくる必要があるのです。

やはり、材料がないと再生医療は進まないと思います。幹細胞だけ培養すれば良いと思っている方も多いかもしれませんが、実際細胞はシャーレの上で培養しています。そのシャーレは材料なのです。細胞にとってはシャーレに接触していることは異常な状況で、さらに異常な酸素濃度で育てられるために、ストレスがかかって老化します。するとコネクシンが下がり、細胞老化が起こります。ここで材料に生体の基質に近いものを用いれば、幹細胞の老化を遅くすることができると思います。コネクシン機能を促進するような材料を用いれば、接触した細胞の分化を促進しますし、有用なサイトカイン

が出てくる可能性もあります。また、再生医療を進める上で、用いる幹細胞自体の安全性が問題になってきますが、その指標を厚生労働科学研究費の再生医療事業で検討しており、コネクシンなどの遺伝子が候補マーカーになるのではないかと私は思っています。

安全性評価の指標

—それらのマーカーを用いて、今後安全性の基準が作られていくのでしょうか？

俵木 平成12年に「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」が出され、細胞組織を利用した製品の安全性と品質についての指針が示されました。その内容はほとんどFDAのガイドラインと同様で、科学的に確認すべき事項が定められています。例えば、使用する細胞の由来、ドナーの感染状態、培養液の原材料、製造工程での品質管理、製品の出荷にあたってのエンドトキシンの確認、といった項目が網羅的に示されています。しかしながらそれをどういう方法でどこまで確認するか細かに書いてあるわけではありませんので、現在この指針をもう少し噛み砕いてチ

国立医薬品食品衛生研究所療品部長 土屋利江 (Toshie Tsuchiya)

1988年国立医薬品食品衛生研究所療品部室長、医療材料の生体適合性試験法開発、細胞組織医療機器(再生医療品)等の基盤的研究。2000年同研究所療品部長、医療機器・再生医療品のガイドライン作成と医療材料開発等。産官学連携プロジェクト研究を行い、先頭を行く医療機器開発の推進に努めている。

厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室長 俵木登美子 (Tomiko Tawaragi)

1981年東京大学薬学部卒業。同年厚生省入省。2001年医薬品医療機器審査センター審査第四部審査管理官。2003年医薬食品局安全対策課安全使用推進室長。2004年環境省総合環境政策局環境保健部企画課保健業務室長。2006年厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室長。

(次ページへ続く)