

Guidance for Industry

Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Starting Materials Used in the Production of Viral Vaccines for the Prevention and Treatment of Infectious Diseases

19. マスターウイルスシード(MASTER VIRUS SEED (MVS): 直接的あるいはワーキングウイルスシードを介するかのいずれかで採取される将来ワクチン製品となるものの全てから選択したワクチンウイルスのウイルスシード。
20. 発癌性(ONCOGENICITY): 細胞を不死化することができ、細胞に腫瘍形成能を与える特定の生物学的因子(ウイルスなど)または材料(核酸など)の特性。「発癌性」は、造腫瘍能と区別する(造腫瘍能を参照)。
21. 親ウイルス(PARENTAL VIRUS): 作製に必要な特性を有するウイルスシードを生成するための方法で操作されたウイルス。
22. WHO 技術報告書シリーズ 878, 1998
23. 親細胞バンク(PARENT CELL BANK): 採取したマスターセルバンクからの細胞で構成される複数のバイアル。親細胞は、希望する特性を有する細胞基質を得るために操作されている可能性がある。
24. 継代レベル(PASSAGE LEVEL): 初代細胞培養の樹立以降に、細胞が分割または再播種された回数。
25. 細胞集団倍加レベル(POPULATION DOUBLING LEVEL): 初代細胞培養の樹立以降に、細胞を二倍に増やす培養を行った回数。
26. 初代細胞(PRIMARY CELLS): 動物やヒトから採取した胚、組織または臓器の培養開始直後の細胞、および細胞懸濁液へホモジネート、細分化あるいは分離して直後の細胞。初代細胞は、培地で維持してもよいが、継代(分離)してはならない。
27. 純度(PURITY): 最終製品において、外来物質が比較的少なく、レシピエントに悪影響を与えない、あるいは製品に対して有害ではないこと。(21 CFR 600.3(r))
28. 適格性確認: その適性評価に基づく製造で、細胞基質の適合性を判定すること。
29. 造腫瘍能の(TUMORIGENIC): 動物(通常、同系宿主、免疫抑制同種宿主または免疫抑制異種宿主)へ接種した際に腫瘍を形成する場合、その細胞のタイプは

Guidance for Industry

Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Starting Materials Used in the Production of Viral Vaccines for the Prevention and Treatment of Infectious Diseases

造腫瘍能である。これら腫瘍は、注射部位または別の部位に生じる可能性があり、その他の部位へ転移する恐れもある。

30. 非造腫瘍能の(NON-TUMORIGENIC): 適当な動物モデルで腫瘍の形成が見られない場合、その細胞のタイプは非造腫瘍能である。
31. 腫瘍原性(TUMORIGENICITY): 腫瘍原性は、動物へ接種した際の不死化細胞による腫瘍形成のプロセスのことである(「造腫瘍能の」を参照)。腫瘍原性は、発癌性と区別する(発癌性を参照)。
32. 腫瘍原性試験(TUMORIGENICITY TESTING): 動物へ接種した際、不死化細胞が腫瘍原性を有しているかを判定するアッセイ/試験。
33. バリデーション(VALIDATION): バリデーションは、手順が意図した目的または使用に相当であるかの実証に基づいて、分析手順の性能特性を明確にするものである。プロセスバリデーションは、どの特性をもつプロセスが有効であるかの判定、およびそのプロセスが明確な特性をもって機能しているかの実証を行うものである。通常、バリデーションは、関連するICH ガイドラインにしたがって実施される。
34. ウイルスクリアランス(VIRAL CLEARANCE): ウイルス粒子の物理的除去および不活化によるウイルス感染の低減を組み合わせたもの。
35. ウイルスプレシード(VIRAL PRE-SEED): MVS由来のワクチンウイルスからなる複数のバイアル。
36. ウイルスシード(VIRUS SEED or VIRAL SEED): 単一の培養工程による採取、適当な保存容器へのアリコート、および適切な状況で保存した画一性をもって構成される生ウイルスの調整(クローンでは必要でない)。
37. ワーキングセルバンク(WORKING CELL BANK): 「製造業者のワーキングセルバンク(MWCB)」を参照。
38. ワーキングウイルスシード(WORKING VIRUS SEED (WVS)): 特定の条件下の、およびロット毎の製品細胞培養を開始するために使用するMVSからウイルスを増殖することにより採取したウイルスシード。

Guidance for Industry
Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Starting Materials
Used in the Production of Viral Vaccines for the Prevention and Treatment of Infectious Diseases

VII. 参考文献一覧

1. Points to Consider in the Characterization of Cell Lines Used to Produce Biologicals, July 12, 1993.
2. The International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance, *Q5A: Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin*, (63 FR 51074; September 24, 1998).
3. ICH Guidance, *Q5D: Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products*, (63 FR 50244; September 21, 1998).
4. Goffe, A.P., Hale J, and Gardner, P.S.: Poliomyelitis Vaccine, Letters to Editor. *Lancet* 1961; 1:612.
5. Garnick R.L., Raw Materials as a Source of Contamination in Large-Scale Cell Culture, *Dev Biol Stand.* 1998; 93:21-29.
6. ICH Guideline, *Q2A: Text on Validation of Analytical Procedures*, (60 FR 11260, March 1, 1995).
7. ICH Guideline, *Q2B: Validation of Analytical Procedures: Methodology*, (62 FR 27463, May 19, 1997).
8. U.S. Pharmacopoeia (USP) Chapter 1225, Reference 25, pp. 2256-59.
9. Rezapkin G.V., et al., Microevolution of Sabin 1 strain in vitro and genetic stability of oral poliovirus vaccine, *Virology.* 1994 202(1): 370-378.
10. Guidance for Industry: Source Animal, Product, Preclinical, and Clinical Issues Concerning the Use of Xenotransplantation Products in Humans, April 2003. (see also § 610.18(c)(1)(iii)).
11. European Pharmacopoeia, 4th Edition, Section 2.6.6.

Guidance for Industry
Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Starting Materials
Used in the Production of Viral Vaccines for the Prevention and Treatment of Infectious Diseases

12. **Transmissible Spongiform Encephalopathies Advisory Committee, October 25, 2001.**
13. **U.S. Pharmacopoeia, Chapter 61, Reference 25.**
14. **European Pharmacopoeia, 4th Edition, Test for Extraneous Agents Using Chicks, Section 2.6.6.**
15. **Khan, A.S., Muller, J., and Sears, J.F. 2001. Virus Research 79:39-45.**
16. **Bierley, et al., Dev. Biol. Stand., 1996.**
17. **Arnold et al., One-step fluorescent probe product-enhanced reverse transcriptase assay, Biotechniques 1998, 25: 98-106.**
18. **Maudru and Peden, Adaptation of the fluorogenic 5'-nuclease chemistry to a PCR-based reverse transcriptase assay. Biotechniques 1998, 25: 972-975.**
19. **Lovatt, et al., High throughput detection of retrovirus-associated reverse transcriptase using an improved fluorescent product enhanced reverse transcriptase assay and its comparison to conventional detection methods. J Virol Methods 1999, 82: 185-200.**
20. **Sears, J.F. and Khan, A.S., Single-tube fluorescent product-enhanced reverse transcriptase assay with Ampliwax (STF-PERT) for retrovirus quantitation. J Virol Methods 2003; 108(1):139-42.**
21. **Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use, February 28, 1997.**
22. **European Pharmacopoeia, 4th Edition, Section 2.6.4.**
23. **Leman, A.D., et al., "Diseases of the Swine", 1992, 7th Edition.**
24. **Barile, M.F. and Rottem, S., Mycoplasmas in Cell Culture, Rapid Diagnosis of Mycoplasmas, I. Kahane and A. Adoni (ed.) Plenum Press, New York, p.155-193, 1993.**

Guidance for Industry

Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Starting Materials Used in the Production of Viral Vaccines for the Prevention and Treatment of Infectious Diseases

25. Sordat, B., et al., Invasive Growth and Dissemination of Human Solid Tumors and Malignant Cell Lines Grafted Subcutaneously to Newborn Nude Mice, Proceedings of the Second International Workshop on Nude Mice p. 313-326, 1977.
26. Stacey, G.N., et al., Authentication of Animal Cell Cultures by Direct Visualization of Repetitive DNA, Aldolase Gene PCR and Isoenzyme Analysis, *Biologicals* 1997; 25:75-85.
27. Stacey, G.N., et al, DNA Fingerprinting Transforms the Art of Cell Authentication, *Nature*, 1992; 357:261-262.
28. Stacey, G.N., et al., The Quality Control of Cell Banks Using DNA Fingerprinting, *EXS*. 1991; 58:361-70.
29. Stacey G.N., Phillips, P., Quality Assurance for Cell Substrates, *Dev Biol Stand.* 1999; 98:141-51.
30. ICH Guidelines, *Q5B: Quality of Biotechnological Products: Analysis of the Expression Construct in Cells Used for Production of r-DNA Derived Protein Products*, (61 FR 7006, February 23, 1996).
31. World Health Organization (WHO) Technical Report. Series 878, 1998

Guidance for Industry

Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Starting Materials Used in the Production of Viral Vaccines for the Prevention and Treatment of Infectious Diseases

附属書1

表1. ウイルスワクチン作製に関する試験計画の一例。

様々なアッセイによる多段階試験は、製品の安全性を保証し、製品の品質を裏付けるために使用される。これは、ワクチン作製におけるすべての生物学的材料、特にウイルスシードおよび細胞基質などの初期成分に対する試験を含む。種々の試験段階は、外来性病原体検出の最大尤度および製品の品質への影響に基づいて選択する。これには、マスターセルバンクと対照細胞培養（特定の場合で）、およびワクチンバルクと最終プロダクトなどのハーベストならびに最終ウイルスシードが含まれる。ワクチン作製における製造条件のみでなく、細胞基質およびその他の生物学的材料に応じて、個々のケースを考慮した上で、さらに試験が追加される可能性がある。

表1:

ウイルスシード	
ハーベスト(回収)	滅菌
	マイコプラズマ/スピロプラズマ
	マイコバクテリア
	外観
	同一性
	力価/活動性
	感染価
	In vitro での外来性病原体試験
	In vivo での外来性病原体試験
	ウシウイルス(該当する場合)
	ブタウイルス(該当する場合)
	RT アッセイ
	特異的病原体試験
最終	滅菌
	同一性
	力価/活動性
	感染価
	弱毒化(該当する場合)
	表現型/核型の安定性(該当する場合)

Guidance for Industry
Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Starting Materials
Used in the Production of Viral Vaccines for the Prevention and Treatment of Infectious Diseases

対照細胞培養	観察
	血球吸着
	滅菌
	マイコプラズマ/スピロプラズマ
	RT アッセイ
	In vitro での外来性病原体試験
	In vivo での外来性病原体試験
	ウシウイルス(該当する場合)
	ブタウイルス(該当する場合)
	特異的病原体試験
	ALV(該当する場合)
	マイコバクテリア
細胞バンク (二倍体細胞株または連続細胞系):	
マスターセルバンク	同一性
	滅菌
	マイコプラズマ/スピロプラズマ
	In vivo での外来性病原体試験
	In vitro での外来性病原体試験
	TEM
	ウシウイルス(該当する場合)
	ブタウイルス(該当する場合)
	特異的病原体試験
	腫瘍原性(げっ歯類細胞を除く)
	発癌性(該当する場合)
	RT アッセイ
	ミコバクテリウム(該当する場合)
	抗体試験(該当する場合は MAP, HAP, RAP)
	レトロウイルスでのS+L-アッセイ(該当する場合)
ワクチンバンク:	滅菌
	マイコプラズマ/スピロプラズマ
	マイコバクテリア

Guidance for Industry
Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Starting Materials
Used in the Production of Viral Vaccines for the Prevention and Treatment of Infectious Diseases

	外観
	同一性
	カ価/活動性
	感染価
	In vitro(または対照細胞)での外来性病原体試験
	In vivo(または対照細胞)での外来性病原体試験
	ウシウイルス(または対照細胞)(該当する場合)
	ブタウイルス(または対照細胞)(該当する場合)
	RT アッセイ
	特異的病原体試験(該当する場合)
最終容器入り製品:	滅菌
	マイコプラズマ/スピロプラズマ
	エンドトキシン
	総合的安全性試験(21 CFR 610.11(g)による免除を受けていない場合)
	同一性
	外観
	残存細胞タンパク質濃度
	残存細胞 DNA 濃度
	カ価/活動性
	安定性
	残留血清、抗生物質、ベンゾナーゼ、補助製品(該当する場合)
	pH
	重量オスモル濃度

厚生科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
分担研究報告書

先端技術を活用した医療機器の評価に関する研究

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

研究要旨

(1)骨芽細胞を用いたセラミックス・スキャホールドの力学特性の評価

多孔性セラミックスキャホールド(Hydroxyapatite:HA, β -Tri Calcium Phosphate: β -TCP 等)を用いて正常ヒト骨芽細胞の各種培養工程と力学特性に及ぼす影響について調べた。はじめに、骨芽細胞の物理的な播種方法を含む4つ方法を選択し、播種後スキャホールド内部を含めた細胞の分布状態及び増殖等を比較した。

播種方法として一般的な方法(G1)と遠心力(G2)、高密度(G3)、真空力(G4)の4種の播種方法を比較した。細胞分布の可視化と増殖度の確認のため、培養物切断面のギムザ染色と、培養物のMTT法を用いた評価を行った。

圧縮試験を行って多孔性セラミックス・スキャホールドの力学特性変化を観察した。4つの播種方法の中で、高密度(G3)、真空力(G4)を用いた播種方法がスキャホールドの表面や内部まで骨芽細胞が均一に分布し、増殖していた。更に、細胞を播種してから4週間後では、真空方法(G4)による細胞播種効果が一番高いことが明らかになった。

機械的特性の変化について調べた結果、スキャホールド単独の細胞培養液への浸漬では、浸漬前に比べ圧縮応力を20-30%減少させた。しかしながら、G3とG4の場合、骨芽細胞がスキャホールドのポア内部に浸入接着し、均一に分布・増殖することによって、機械的強度の減少が抑制された。本研究では、高密度の細胞懸濁液を用いて、真空力を用いた細胞播種方法が、最も効率の良い細胞播種方法であることを示した。スキャホールド内部に細胞が播種、かつ、均一に分布し、細胞が増殖および分化した培養物では、細胞なしの培養前のスキャホールド、不均一な播種法および播種効率の低い方法に比べて、圧縮応力とヤング率が増加することを明らかにした。3次元培養物においては、培養工程の適切性を示す方法として、力学的特性変化を測定する方法が有用な指標となることを明らかにした。

(2)細胞組織を利用した医療機器のガイダンス案について

骨再生、軟骨再生、角膜再生、歯科領域の再生(歯層骨再生、歯周組織再生)に関する各専門家からなる研究班により、細胞組織を利用した医療機器の第一次ガイダンス案の検討を行った。

A. 研究目的

(1)骨芽細胞を用いたセラミックスキャホールドの力学特性の評価

多種多様な組織・臓器・器官の再生治療に有力なシート工学技術の進展に伴い、わが国発の組織工学技術を用いた再生医療が急速に進展している。骨欠損の再生治療においては、合成ポリマー、セラミックス、メタル等の医用材料から様々なスキャホールドが開発され、臨床現場で使われている。この中でハイドロキシアパタイト(HA)及びリン酸三カルシウム(TCP)のようなセラミックス材料は比較的高い圧縮強度と生体適合性がある等から、骨欠損の再生治療で使用されている生体材料の一つである。さらに、ソースとして比較的入手しやすい間葉系幹細胞を用いて作製した培養骨を骨再生医療に使用する研究が活発になっている。例えば、ヒトの間葉系幹細胞から誘導した骨芽細胞を播種した多孔性スキャホールドは、初期にスキャホールドに早い骨組織を誘導し、スキャホールドの内部には、血管形成が生じることにより、骨欠損治療に有用であると考えられている^{1,2}。

このような背景から、細胞を用いた多孔性セラミックス・スキャホールドによる骨欠損の再生治療効果を示すためには、1)細胞をスキャホールドの内部まで到達する細胞播種方法及び 2)荷重を支えるスキャホールドの機械的な強度が重要なキーポイントとなる。

様々な生体材料で作製された多孔性スキャホールドの内部まで細胞を播種するには、通常の播種方法では困難であった。最近、散布(perfusion)、低圧(low-pressure)及びバイオリアクターシステム等の物理的な播種方法を駆使して、ポリマー系で作製された多孔性スキャホールドの内部まで細胞を入れたことに成功した報告が出されている³⁻⁶。しかしながら、高孔隙率(75%以上)および材質が疎水性の特性を持つ多孔性セラミックスキャホールドの場合、細胞液中に沈むことは困難である。したがって、バイオセ

ラミックスキャホールドの中に均一に幹細胞(MSC)あるいはヒト骨芽細胞を播種することが困難であった。しかし、複雑に三次元(3D)構築された多孔性セラミックスキャホールドにおいては、典型的な材料空間特性をもち、細胞播種の後、スキャホールド内部での細胞の形態や分化状態を確認することが出来ないのが現実である。また、スキャホールド内部の細胞と細胞分化により発現した産物の回収が困難であり、したがって正確な測定が通常では、容易ではない。

バイオセラミックス・スキャホールドの力学的特性は、大きい骨欠損部位の再生治療のためには、骨欠損部への体重負荷による耐強度特性の評価が重要なキーポイントとなる⁷⁻¹⁰。セラミックス・スキャホールドの置換(implantation)の後、セラミックス材料は、日常活動で体重を支援するために十分な機械的な強さが必要である。従来の研究ではドライ状態の多孔性セラミックス・スキャホールドの機械的性質又は動物に埋植後、摘出して測定した機械的特性に関する報告が多いが、*in vitro* で培養液や細胞増殖などが材料や力学的な特性に及ぼす影響については正確に試験・評価されていない。

本研究では多孔性セラミックスキャホールドの内部まで均一に骨芽細胞を播種する方法を検討した。*in vitro* 細胞播種工程を工夫し、培養液、細胞分化がバイオセラミックス・スキャホールドの力学的特性に及ぼす影響について評価した。

(2)細胞組織を利用した医療機器のガイドンス案について

骨再生と軟骨再生は、厚生科学労働科学研究、政策創薬等総合研究事業で、プロジェクト研究を行っており、それらの成果を基に、ガイドンス案を作成することを目的とする。

角膜シートは、日本発の再生医療技術であり、既に臨床研究も行われており、製品化も近いことからガイドンス案を作成する。

歯科領域においては、既に、臨床研究がおこ

なわれている歯槽骨再生と歯周組織再生について、調査研究を中心にガイドンス案を作成することを目的とした。

B. 研究方法

(1)骨芽細胞を用いたセラミックスキヤホールドの力学特性の評価

i)セラミックスキヤホールド

本研究では、2 つタイプ 1) β -TCP と 2) HA の多孔性セラミックスキヤホールドが使用した。この研究には、立方体スキヤホールド(5×5×5mm)を使用した。試験前に、Micro X-ray CT(20 μ m <)で断面を撮影し、スキヤホールドの気孔や気孔通路を確認した。多孔性セラミックスキヤホールド HA および β -TCP は焼結され、約 75～77%の高い気孔率を有しており、その穴は完全に連結している。平均気孔サイズはそれぞれ約 500 μ m および 200 μ m で、相互に連結するパスの直径は約 200 μ m であった。

ii)細胞培養方法

多孔性セラミックスキヤホールドに播種する骨芽細胞は、Cambrex Bio Science Walkersville 社の正常ヒト骨芽細胞(Normal Human Osteoblasts)を使用した。骨芽細胞の培養は、10%(v/v)の血清(Gibco, Rockville, MD)を含む α -MEM 培養液(Biowhittaker, Walkersville, MD)を使って 37°C、95%の空気および 5% CO₂ 下でインキュベーションした。細胞培養液は毎週 2 回交換した。

iii)細胞播種方法

培養液がスキヤホールドの機械特性に及ぼす影響を調べるため、スキヤホールドに 2mL の α -MEM を入れ、2、および、4 週間インキュベーションした。次に、スキヤホールドの機械的な強度に及ぼす細胞増殖や分化の影響を調べるために、まずスキヤホールドを 24-well plate に入れ、 2×10^5 cell/scaffold の骨芽細胞を播種した。対

照(Ref.)グループは、細胞なしで、培地にスキヤホールドだけ入れた群である。細胞播種の四通りの方法については、Group1、2、3、4 とした。具体的には以下の通りである(表 1 参考)。

Group1(G1):

2×10^5 cell/1mL/scaffold

Group2(G2):

2×10^5 cell/1mL/scaffold + 遠心

Group3(G3):

2×10^5 cell/50 μ L/scaffold

Group4(G4):

2×10^5 cell/50 μ L/scaffold + 真空

遠心力の効果を調べるために、Group2(G2)は、G1と同じ細胞播種をした後、180×g で 5 分間遠心した。Group3(G3)では、高密度の播種方法で、 2×10^5 cell/50 μ L/scaffold の細胞を播種した。Group4(G4)は、G3 と同じ細胞数を播種し、-1.8 MPa の真空力を掛けた。真空は 3 回繰り返した。4 通りの細胞播種が終わってから、細胞がスキヤホールドに付着するまでに 4 時間インキュベーションした。その後、セラミックスキヤホールドは培養するために、すべて再び 24-well plate に移し、培養を続けた。

iv)細胞増殖の測定方法

細胞の増殖を比較するため、TetraColor ONE(Seikagaku)を用いた MTT 法で測定した。各 well に 5%の TetraColor ONE を入れてから、インキュベータで 3 時間培養して吸光度を測定した。MTT 測定が終わった後、多孔性スキヤホールドを 95%のメタノールに 1 時間入れて、骨芽細胞を固定した。次に、5%ギムザ溶液で 20 分間染色した。そして、セラミックスキヤホールドを 1,500rpm で 0.13mm の厚さの diamond-cutter (Minitor)で切断し、断面を光学顕微鏡で観察した。

v) 圧縮試験方法

力学特性の変化を調べるため、圧縮試験は1 mm/min のクロスヘッド速度で試験装置 (AUTOGRAPH, SHIMAZU) を使って測定した。全 Group は5つの資料(n=5)を測定した。データはすべて50 msec でサンプリングした。機械的な特性の変化を比較するため、圧縮応力と Young's Modulus を計算した(p<0.05)。

(2) 細胞組織を利用した医療機器のガイドンズ案について

骨再生・軟骨再生については、政策創薬総合プロジェクト研究で行った研究班の組織と、関係学会の専門家等が加わって検討した。

角膜再生については、細胞シート工学を用いた角膜再生を活発に行っている研究者を中心とした組織でガイドンズ案を検討した。次回から、羊膜を使用した研究者の意見も加えて議論することとなった。

歯科領域については、各研究者が、独自の方法で再生医療を研究していることから、今年は、調査研究を主体とした。次回から、多くの歯科領域の研究者の意見を聞いてまとめる。

C. 研究結果

(1) 骨芽細胞を用いたセラミックスキヤホールドの力学特性の評価

i) 細胞分布の比較

4つの細胞播種の方法(G1-G4)において、骨芽細胞は β -TCPの多孔性のセラミック足場の表面に付着し、増殖した。しかしながら、スキヤホールドを染色して断面を切ってみたところ、G1とG2の播種方法では、細胞がスキヤホールド内部まで入らないことを確認した。G3とG4の場合、細胞が内部まで深く侵入し、増殖していることが確認された。特に真空力を用いたG4の播種方法においては骨芽細胞が中に入って、スキヤホールドの全面に均一分布されていることを確認した。

図1では、骨芽細胞を播種してから、1日と20日後の β -TCPスキヤホールドの断面写真で、細胞の付着状態を示してある。G1とG2の場合、20日後には表面の細胞がある程度スキヤホールドの中に侵入したことが観察された。G3とG4の播種方法では最初から中まで侵入し、20日後では細胞が良好に増殖し、collagen matrixが形成されていた事が確認された。さらに、真空力を使用したG4の場合、スキヤホールドの内部に細胞が全面にきれいに分布されていた。

ii) 細胞増殖の比較

4つの細胞播種方法による初期のcell-seeding効率を比較した場合、G1とG2の方法ではまいた細胞数の約20-30%であり、時間が経って3週間後には75%まで増加した。G3とG4の方法では、初期cell-seeding効率は約50%で、3週間後ではそれぞれ130%と150%まで上昇した(図2)。本研究の結果から、骨欠損の再生治療のため、普通の播種方法(G1)と遠心力(G2)を用いた方法では、高気孔率(75%以上)および疎水性の材質特性を持つ β -TCPセラミックスキヤホールドの内側に細胞を播種する有用な方法ではないと判断される。しかしなら、高密度の播種方法(G3)と真空力を使用した方法(G4)では、 β -TCP多孔性バイオセラミックス・スキヤホールドにおいて、初期cell-seeding効果を高め、細胞がスキヤホールドの内側全面で均一に分布され、細胞増殖や分化を亢進させる有用な方法と考えられる。

iii) 機械的な特性の比較

細胞なしの状況で培養液(α -MEM)が多孔性セラミックスキヤホールドの機械的特性に及ぼす影響について調べた結果、2週間後にドライ状態のスキヤホールドより、培養液に入れた β -TCPとHAスキヤホールドの圧縮応力とYoung's Modulusが20-30%減少した(図3)。4週間後には2週間後の圧縮応力とYoung's

Modulus と比べ、同等か、若干減少した。

図 4 では、骨芽細胞の増殖や分化が β -TCP 多孔性セラミックス・スキャホールドの機械的な特性に及ぼす影響について、比較した結果を示した。スキャホールドを細胞なしの培養液に入れてから、圧縮応力と Young's Modulus が時間経過とともに減少した。しかしながら、細胞を播種したスキャホールドの場合、ドライ状態のスキャホールドの圧縮応力と Young's Modulus に近接した。特に、真空力を用いて細胞を播種した G4 の場合、圧縮応力と Young's Modulus がドライ状態のスキャホールドより、明らかに増加した (図 4)。

(2) 細胞組織を利用した医療機器のガイダンス案について

骨再生については、定量的な臨床評価と骨再生を適用する対象患者の範囲に関する事項が重要である。

軟骨再生については、材料の選定、動物モデル実験、対象患者の年齢が重要である。

角膜再生については、作製した上皮角膜シート の機能評価が重要である。

必要な機能としては、幹細胞が残っていること、バリア機能があることが最低限求められる。

歯槽骨再生では、整形外科での骨再生のガイダンスを部分的に使用できること。特に、臨床評価において歯科特有の評価方法を記載する必要がある。

歯周組織再生では、症状が軽い場合には、材料とサイトカインとのコンビネーションで治療が可能であること。中程度以上に悪い症例においては、細胞組織利用製品で治療することが適切である。

D. 考察

(1) 骨芽細胞を用いたセラミックスキャホールドの力学特性の評価

現在、細胞分化技術の進歩とともに、三次元

セラミックス・スキャホールドに Stem Cell やヒト骨芽細胞を用いて、厳しい大きい骨欠損の再生治療に使用する動きが活発に行っている。このような細胞を用いたバイオセラミックス・スキャホールドの成功的な治療のためには、必ず解決されないといけない課題がいろいろある。特に①セラミックス・スキャホールドへの細胞播種の方法と②患者の日常生活で起こる体重を支持する機械的な強度を持つことが大事である。このため、本研究では、骨芽細胞を用いたバイオセラミックスキャホールドを作製するために必要な細胞播種方法と機械的強度変化について調べた。

まず、細胞播種の方法について、普通の方法と高密度を用いた細胞播種方法、及び物理的な方法(遠心力、真空力)の 2 つを含めて 4 種の細胞播種の方法を選択した。高気孔率(75% >)を持つ多孔性セラミックス・スキャホールドの場合、軽すぎて細胞培養液中に沈まないため、細胞をまく前に、すべての多孔性セラミックス・スキャホールドを遠心し、培養液中になじませる必要があった。遠心力はポリマーで作製されたスキャホールドにおいては有用な細胞播種方法として報告されているが^{4,6}、多孔性セラミックス・スキャホールドを用いた本研究の結果では普通の細胞播種方法とは差がなかった(図 2, G1, G2)。このような結果は、大きい気孔を持つ多孔性セラミックスキャホールド場合、遠心力は細胞をスキャホールドの表面には残すが、中までに通過させ、スキャホールドの内側の穴に付着させるのは難しいと考えられる。高密度の細胞播種方法では、培養液とともに細胞が多孔性セラミックスキャホールドの内部にまで入ったが、均一に分布されなかった。しかしながら、この播種方法の上、真空力を掛けた場合、骨芽細胞が多孔性セラミックスキャホールドの内部まで入り、真空力で細胞がスキャホールドの全面に均一に分布され、増殖したことが観察された。今後の研究では細胞の播種方法において、細胞の分化(ALP)やそれによる Ca の沈着等を調べる必要性がある。

人体に使用されているインプラントは部位によって、要求される機械的な強度が異なる。実際に臨床の場で使用されるセラミックス・スキャホールドの場合、海面骨の圧縮応力は3-10 MPaであり、Young's Modulusは500-1,500 MPaである。皮質骨では、圧縮応力150 - 200 MPaとYoung's Modulusが1,500 - 2,000 MPaを考慮して作製されている。Uemuraらは β -TCPセラミックスキャホールドを動物に12週間埋植した後、圧縮応力を測定した結果、埋植前に比べて、2倍以上増加したことを報告した⁵。しかしながら、セラミックス・スキャホールドを骨欠損部位に入れて、初期 bone ingrowth の失敗による筋組織に capsulation されると強度が落ちる可能性も考えられる。

細胞を用いたバイオセラミックスキャホールドを作製するための *in vitro* 評価が機械的な特性に及ぼす影響について検討した報告が少ない⁷。本研究の結果でも、 β -TCPとHAセラミックス・スキャホールドを細胞なしの培養液に2-4週間入れた後、機械的な特性が20%以上減少した。このような結果は、培養液がapatiteの粒子間に入って結合力を弱めることに起因していると考えられる。しかしながら、効率の良い細胞播種方法によるスキャホールド内部での細胞増殖や分化充進は、スキャホールドの強度低下を防ぎ、強度を増加させる可能性を示すことが出来た。

(2)細胞組織を利用した医療機器のガイドンス案について

骨再生では、比較的軽い症例では、人工骨での治療、あるいは、BMP含有人工骨による治療が適切である。皮質骨も破損した重症例において、細胞組織利用した医療機器による治療効果があると考えられる。

軟骨再生では、MRI診断が、非侵襲的診断法として期待できる。コラーゲン繊維の配列を評価できる方法を開発することにより、硝子軟骨と繊維軟骨を区別できる可能性が示唆された。

角膜再生では、牛胎児血清は使用せず、自己血清の使用による感染リスクの排除を行っている。また、幹細胞の培養において、マウス由来3T3細胞からなるフィーダーは使用せず、自己細胞をフィーダー細胞として幹細胞を培養できる方法を開発し、感染リスクと発ガンリスクをさけられる技術開発を行っている。

歯槽骨と歯周組織再生は、成功すれば、多くの患者を見込める可能性がある。安全安心低コスト化が普及させる上で重要であると考えられる。

E. 結論

(1)骨芽細胞を用いたセラミックスキャホールドの力学特性の評価

高密度に基づいて、真空力を使用した細胞播種の方法(G4)は、 β -TCP多孔性バイオセラミックスキャホールドにおいて初期 cell-seeding 効果を高め、細胞がスキャホールドの内側全面で均一に分布され、増殖や分化を進める有用な方法と考えられる。さらに、この細胞の増殖や分化は多孔性セラミックスキャホールドの初期強度を維持・増加させられると思われる。

(2)細胞組織を利用した医療機器のガイドンス案について

骨再生、軟骨再生、角膜再生、歯槽骨再生、歯周組織再生について、第1次ガイドンス案を作成した。

しかし、歯科領域は、今回は、調査主体となる。

ガイドンス案は、4月中に冊子を作成するが、第1次ガイドンス案としての位置づけであり、来年度以降、精査し、慎重に最終案を作成する必要がある。

(参考文献)

1. Burg KJL, Porter S, Kellam JF, : Biomaterial developments for bone tissue

- engineering. *Biomaterials*, 21: 2347-2359 (2001)
2. Mastrogiacomo M, Scaglione S, Martinetti R, Dolcini L, Beltrame F, Cancedda R, Quarto R, : Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials*, 27 : 3230-3237 (2006)
 3. Vunjak-Novakovic G, Obradovic B, Martin I, Bursac PM, Langer R, Freed LE, : Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biotechnol. Prog.*, 14 : 193-202 (1998)
 4. Yang TH, Miyoshi H, Ohshima N, : Novel cell immobilization method utilizing centrifugal force to achieve high-density hepatocyte culture in porous scaffold. *J Biomed Mater*, 55 : 379-386 (2001)
 5. Uemura T, Dong J, Wang Y, Kojima H, Saito T, Iejima Daisuke, Kikuchi M, Tanaka J, Takeishi T, : Transplantation of cultured bone cells using combinations of scaffolds and culture techniques. *Biomaterials*, 24 : 2277-2286 (2003)
 6. Solchaga LA, Tognana E, Penick K, Baskaran H, Goldberg VM, Caplan AI, Welter JF, : A rapid seeding technique for the assemble of large cell/scaffold composite construct. *Tissue Engineering*, 12 (7) : 1851-1863 (2006)
 7. Vuola J, Taurio R, Goransson H, Asko-Seljavaara S, : Compressive strength of calcium carbonate and hydroxyapatite implants after bone-marrow-induced osteogenesis. *Biomaterials*, 19 : 223-227 (1998)
 8. Tamai N, Myoui A, Tomita T, Nakase T, Tanaka J, Ochi T, Yoshikawa H, : Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction in vivo. *J Biomed Mater Res*, 59 : 110-117 (2002)
 9. Dong J, Uemura T, Kikuchi M, Tanaka J, Tateishi T, : Long-term durability of porous hydroxyapatite with low-pressure system to support osteogenesis of mesenchymal stem cells. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 12 : 203-209 (2002)
 10. Yang Y, Magnay JL, Cooling L, Haj AJE, Development of a 'mechano-active' scaffold for tissue engineering. *Biomaterials*, 23 : 2119-2126 (2002)
- G. 研究発表**
- 論文発表
1. Jung DY, Kang YB, Tsuchiya T, Tsutsumi S, "A novel non-destructive method for measuring elastic moduli of cultivated cartilage tissues", *Key Engineering Materials*, 342-343, 853-856 (2007)
- 学会発表
1. 第 6 回日本再生医療学会総会 2007.3. 横浜 鄭 徳泳, 玉井将人, 迫田秀行, 土屋利江, "ヒト正常骨芽細胞存在・非存在下での3次元バイオセラミックスキャホールの生体力学評価"
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
- なし

表1 骨芽細胞の播種方法

Groups	NHOsts Cell Seeding Methods
Ref.	1 ml medium + Scaffolds
Group 1	1 ml medium + 2×10^5 cells + Scaffolds
Group 2	1 ml medium + 2×10^5 cells + Scaffolds → centrifuge (180 g)
Group 3	50 μ l medium + 2×10^5 cells + Scaffolds
Group 4	50 μ l medium + 2×10^5 cells + Scaffolds → vacuum (-1.8 MPa)

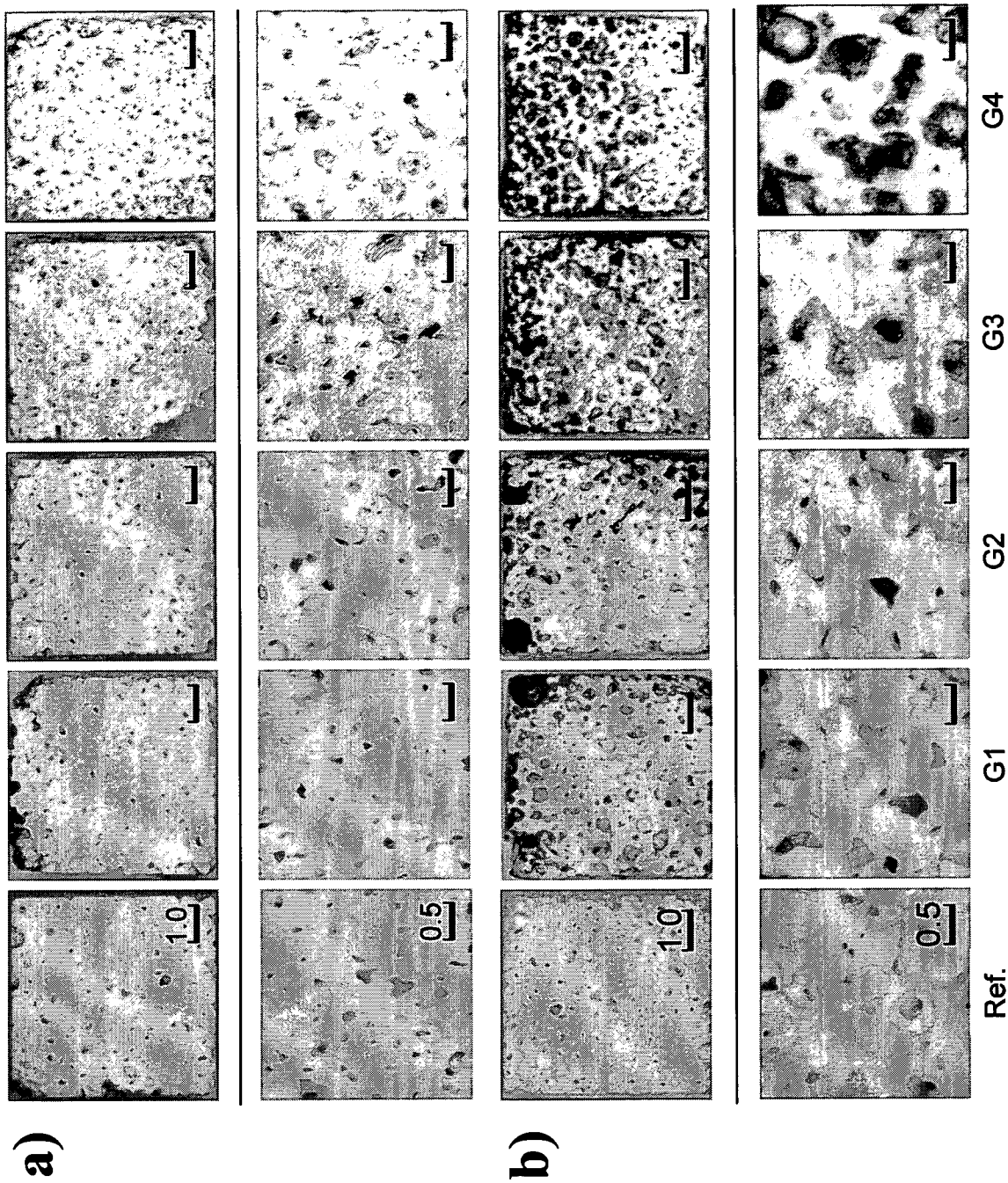


図1. 骨芽細胞の播種後、Group 1-4において β -TCPバイオセラミックスキャポールの断面
a)1日後、b)21日後

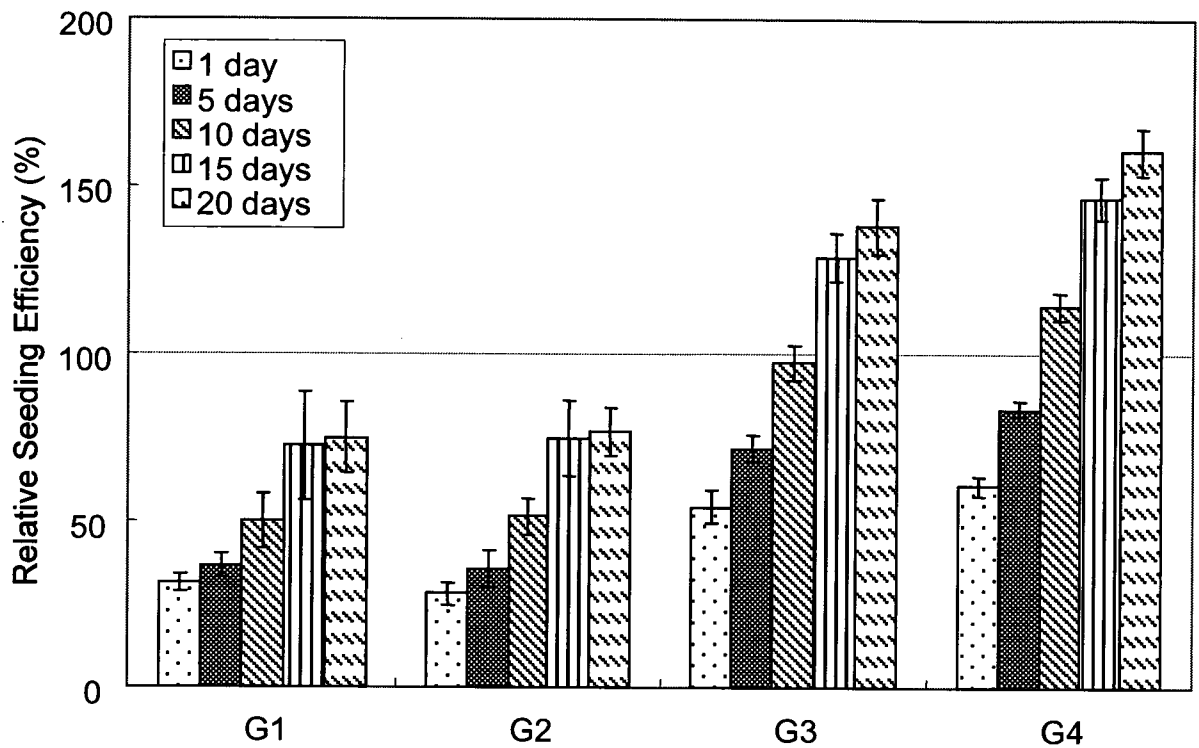


図2. 骨芽細胞の4つの播種方法によるCell-seeding効果の比較

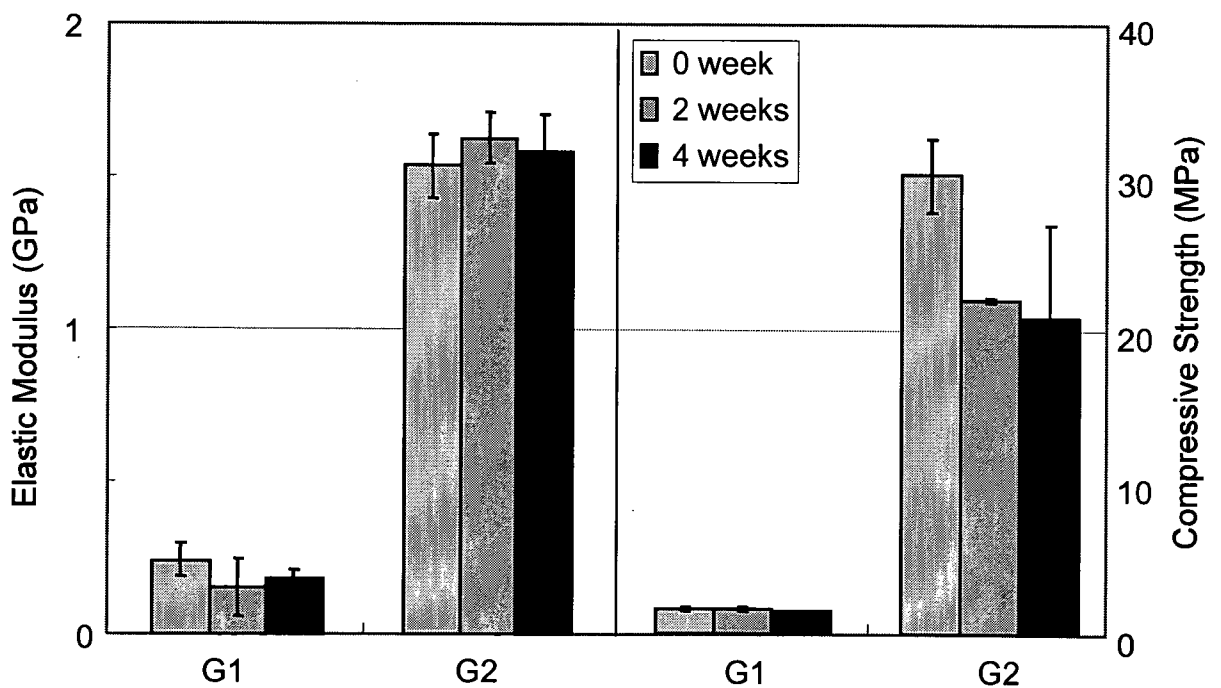


図3. 培養液がバイオセラミックスキャホールドの機械的特性に及ぼす影響の比較

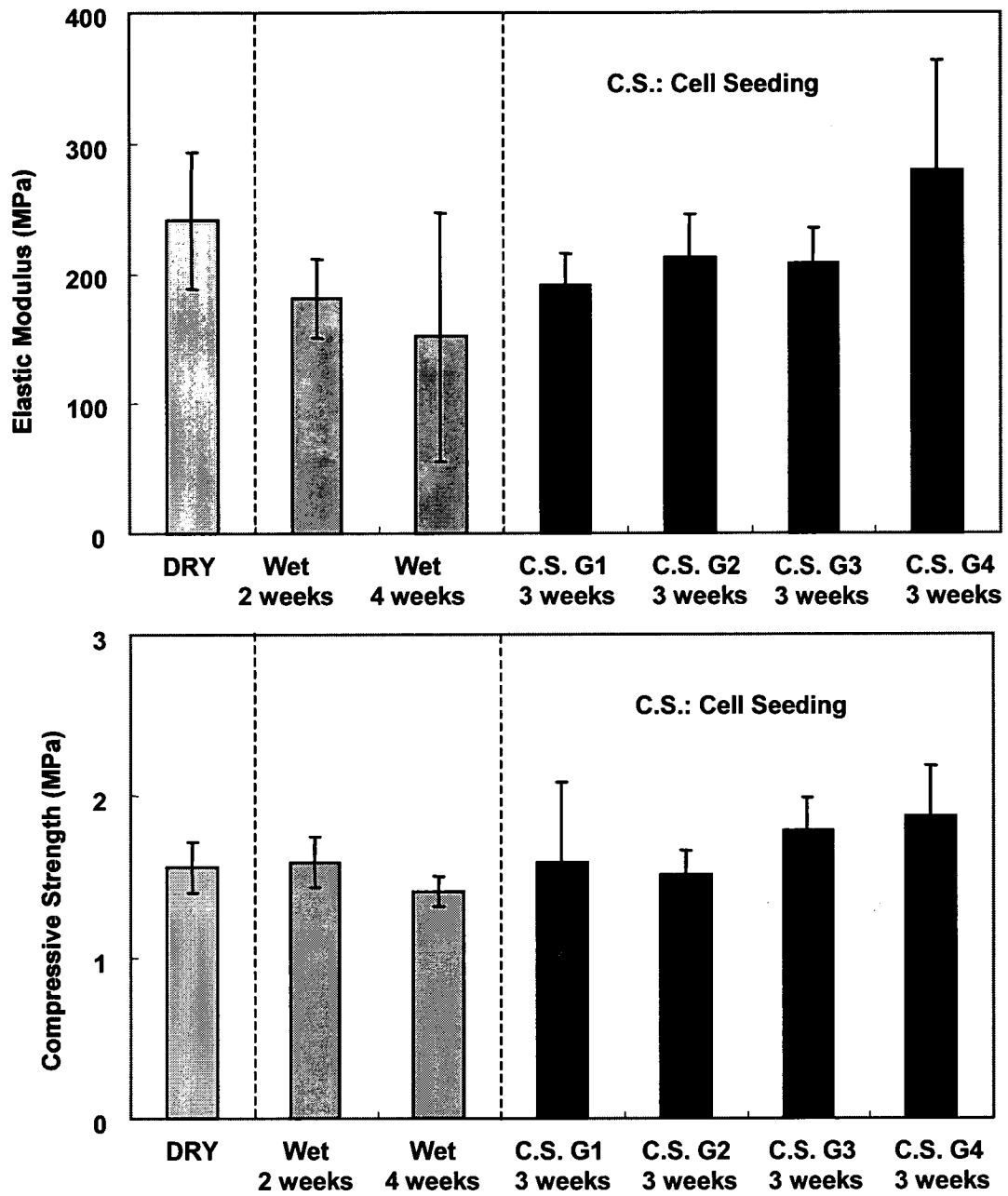


図4. 細胞増殖がバイオセラミックスキャホールドの機械的特性に及ぼす影響の比較

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
DY. Jung, YB. Kang, T. Tsuchiya, S. Tsutsumi	A novel non-destructive method for measuring elastic moduli of cultivated cartilage tissues.	Key Engineering Materials	342-343	853- 856	2007