

医療製剤のウイルス検出について、コンベンショナル PCR を用いたウイルスのスクリーニングや、RDV 法・次世代型シーケンサーを用いた網羅的解析法の手順が確立された(図1)。

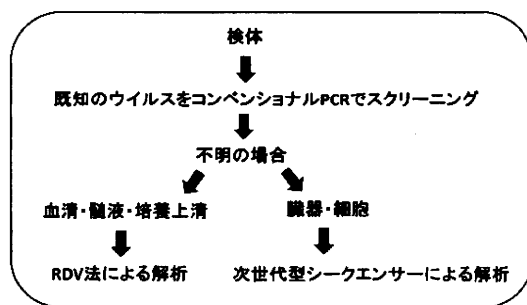


図1. 不明検体の感染症研究所におけるストラテジー

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Watanabe S, Maeda K, Suzuki K, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Shimoda H, Kato K, Yoshikawa Y, Morikawa S, Kurane I, Akashi H, **Mizutani T**. Identification of a novel betaherpesvirus in bats using a rapid determination system for viral RNA sequences (RDV) *Emerg. Infect. Dis.* **16**:986-988, 2010.
- Itagaki T, Abiko C, Ikeda T, Aoki Y, Seto J, Mizuta K, Ahiko T, Tsukagoshi H, Nagano M, Noda M, **Mizutani T**, Kimura H. Sequence and phylogenetic analysis of Scaffold cardiovirus from children with exudative tonsillitis in Yamagata, Japan. *Scandinavian J. Inect.Dis.* **42**:950-952, 2010.
- Watanabe S, Masangkay J S, Nagata N, Morikawa S, **Mizutani T**, Fukushi S, Alviola P, Omatsu T, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Fujii H, Tsuda S, Endoh M, Kato K, Tohya Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y, Akashi H. Bat Coronaviruses and Experimental Infection of Bats, the Philippines. *Emerg. Infect. Dis.* **16**:1217-1223, 2010.
- Tsukagoshi H, Masuda Y, **Mizutani T**, Mizuta K, Saitoh M, Morita Y, Nishina A, Kozawa K, Noda M, Ryo A, Kimura H. Sequence and phylogenetic analyses of Scaffold cardiovirus (SAFV) genotype 3 isolates from children with upper respiratory infection in Gunma, Japan. *Japanese J Infect Dis.* **63**:378-380, 2010.
- Watanabe S, **Mizutani T**, Sakai K, Iizuka I, Shiota T, Sayama Y, Tsuda S, Kato K, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S, Akashi H. Development of a method to detect viral RNA sequences from cultured cells by combining size fraction and a rapid determination system for viral RNA sequences (RDV). *J. Vet. Sci. Tech.* 2010. 1. 1000103 (open access)
- Isawa H, Kuwata R, Hoshino K, Tsuda Y, Sakai K, Watanabe S, Nishimura M, Satho T, Kataoka M, Nagata N, Hasegawa H, Bando H, Yano K, Sasaki T, Kobayashi M, **Mizutani T**, Sawabe K. Identification and molecular characterization of a new nonsegmented double-stranded RNA virus isolated from Culex mosquitoes in Japan. *Virus Res.* **255**:147-155, 2011.
- Sayama Y, Eshita Y, Yamao T, Nishimura M, Satho T, Srisawat R, Komalamisra N, Rongsriyam Y, Sakai K, Fukushi S, Saijo M, Oshitani H, Kurane I, Morikawa S, **Mizutani T**. Prevalence of Phasi Charoen Virus in Female Mosquitoes. *J. Parasitology and Vector Biology*. In press.
- Mizutani T**, Sayama Y, Nakanishi A, Ochiai H, Sakai K, Wakabayashi K, Tanaka N, Miura E, Oba M, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Ono S. Novel DNA virus isolated from samples showing endothelial cell necrosis in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Virology*. In press.
- 小田 新, 甘利昭一郎, 生田陽二, 内山健太郎, 吉田知広, 滝有希子, 大場邦弘, 野田絵理, 河野寿夫, **水谷哲也**:ダニの経口摂取によるアナフィラキシー(Oral Mite Anaphylaxis)の一家族例 日本小児救急医学会雑誌 in press.
- Mizutani T**. Signaling pathways of SARS-CoV in vitro and in vivo. In *Molecular Biology of the*

SARS-Coronavirus (Edited by Sunil K Lai)
Springer社 pp305-332,2010.

11. **水谷哲也**、木村博一:「ボカウイルス」臨床ウイルス学必携 羊土社 2010年12月刊行予定
12. **水谷哲也**:「コロナウイルス」臨床ウイルス学必携 羊土社 2010年12月刊行予定
13. **水谷哲也**:「網羅的遺伝子解析法」臨床ウイルス学必携 羊土社2010年12月刊行予定
14. **水谷哲也**:「未知・既知のウイルスの網羅的検査法」in 医薬品の品質管理とウイルス安全性 文光社 2011年6月刊行予定
15. **水谷哲也**:「レオウイルス」in 「広範囲血液・尿化学検査、免疫学的検査(3)(第7版)ーその数値をどう読むかー」日本臨床2010年増刊 pp410-413.
16. **水谷哲也**:「原因不明疾患における感染因子の網羅的解析 ー川崎病との関わりー」Progress in medicine ライフサイエンス社 30: 1883-1886, 2010.

17. **水谷哲也**:「エマージングウイルスと未同定のウイルスの探索」(特集:ウイルスの今日的意味)化学療法の領域 9月号予定 医薬ジャーナル社 vol.26 No.9, pp1747-1755, 2010.

18. 池 郁生、Franck Bourgad、大沢一貴、高木利一、佐藤 浩、森川 茂、酒井宏治、**水谷哲也**、西條政幸、倉根一郎、滝本一広、山田靖子、Jean Jaubert、Marion Berard、中田初美、平岩典子、目加田和之、高倉 彰、伊藤豊志雄、小幡裕一、吉木淳、Xavier Montaguteli:「輸入マウスに感染していたリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス」「獣医畜産新報」文永堂出版 Vol.63, No.3. 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

厚生労働科学研究補助金 再生医療実用化研究事業
分担研究報告書

細胞治療製剤の無菌試験の判定自動化の試みとバリデーション

研究分担者 伊藤仁也 先端医療センター細胞管理室 室長
(現 神鋼病院細胞治療室 室長)

研究要旨

再生医療、細胞治療などの生物製剤の中でも加工した生きた細胞を用いる治療は、ヒト生体内における細胞の動態、寿命、サイトカインや chemical mediator の放出、あるいは、細胞そのものが癌化や変成を起こすなど予測しきれない安全性の問題が生じる可能性がある。昨年までの研究は主に前臨床試験として、細胞治療製剤の効果の検証、細胞の体内動態の予測、癌化や炎症誘発性など in vivo での安全性の予測のために、免疫不全マウスを用いて実際に用いるヒト細胞治療製剤を投与して調べてきた。

今年度は、臨床試験の場で行う実際の規格試験のうち無菌試験を取り上げ、局方による方法のバリデーションを行い、また自動化の試みとして BacT/ALERT システム(BIOMERIEUX 社)を用いて標準菌の検出を局方の方法と比較した。その結果、無菌試験において、Bacillus 属はアルブミン加生理食塩水中では温度、接種までの時間に影響を受け、菌を接種しても増殖しないことがわかり、接種法や搬送(検査を外注し、別の場所で行う場合には Bacillus は検出できない可能性がある)に注意を要することが明らかになった。

また、BacT/ALERT システムでは、培地など溶媒による阻害反応はなく、Candida Albicans を除く標準菌において短時間で検出できた。

A. 研究目的

我々は、これまで細胞治療製剤の効果と安全性を調べる試験系として、臍帯血由来造血幹細胞(CD34 陽性細胞)から加工した細胞治療製剤を例にとり、免疫不全マウスに移植し、マウス体内でのヒト造血再構築能を解析することにより、製剤の安全性、有効性の評価を行ってきた。いわばこれらの研究は細胞治療製剤の前臨床試験における安全性の予測試験に属するが、本年度は実際の臨床試験中の規格試験では必須である無菌試験について自動化とバリデーションを行ったので報告する。

実際の臨床試験における最終製品である細胞の無菌試験は局方によるメンブランフィルター法か直接法が推奨され、迅速性、客観性が求められるが、多くの場合、細菌培養に時間がかかるため、後付の試験となってしまう欠点がある。さらには細胞治療製剤の最終製品は細胞数は微量であり、無菌試験に大量の細胞を採取するわけにはいかず、ほとんどの場合、希釈検体や培養液を用いている。この場合には培地に抗生剤が添加されていることが多く、実際には菌が存在しても無菌試験では増菌せず判定も目視で行うため、ヒューマンエラーが発生

し、見落としが起こることもありうる。今回、臨床の場で応用されている、BacT/ALERT システム (BIOMERIEUX 社) と局方の方法を比較した。

B. 研究計画・方法

1) Ex vivo 増幅臍帯血移植における無菌試験バリデーショ

以下の標準菌を用いて受け入れ試験・中間試験・出荷試験・搬送において検討した。

| | 菌株名 | 製品番号 | 識別 |
|---|---|-------|------|
| 1 | <i>Aspergillus niger</i> (NCPF*2275) | 56022 | Asp |
| 2 | <i>Bacillus subtilis</i> (NCTC**10400) | 56024 | Bac |
| 3 | <i>Candida albicans</i> (NCPF*3179) | 56026 | Can |
| 4 | <i>Clostridium sporogenes</i> (NCTC**12935) | 56029 | Clo |
| 5 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NCTC**12924) | 56040 | Pseu |
| 6 | <i>Staphylococcus aureus</i> (NCTC**10788) | 56045 | Sta |

Fig1: 移植後キメリズム(PB)

試験法は局方の方法に準拠するが接種量は培地 9ml に対し接種量は 100μl とした。無菌試験用培地は好気性培養ではソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地

嫌気性培養ではチオグルコール酸培地を用いた。接種する菌数は 100CFU/100μl となるよう調整した。

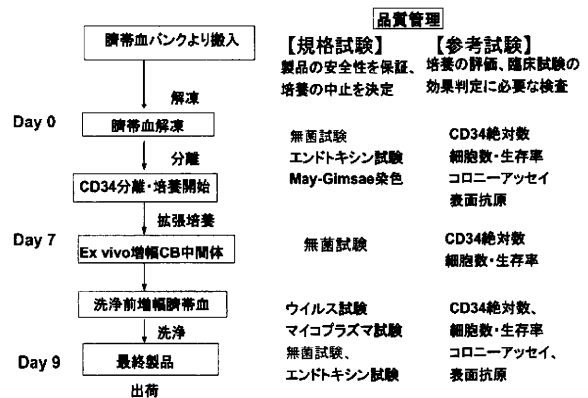
2) BacT/ALERT システム(BIOMERIEUX 社) のバリデーショ

上記標準菌を 30CFU/300μl になるよう調整し、培養液(抗生物質無添加、リポソーム添加無血清培地)と生理食塩水を 37 度で培養し、トリプケースソイブイオン(SCD ブイオン/ TSB-T による局方に定められた直接法による方法と比較し、添加回収を求めた。

C. 研究結果

1) Ex vivo 増幅臍帯血移植における無菌試験バリデーショ

Ex vivo増幅臍帯血製造における品質管理



上図は Ex vivo 増幅臍帯血製造過程における規格試験の行程表であるが、受け入れ試験では臍帯血バンクから搬送される細胞のため、DMSO などの阻害物質が混入している。中間体試験では QBSF60 という市販の培地を用いているが、組成が公表されていないため、阻害物質の有無などわからない。出荷試験は 0.5% アルブミン加生食である。また搬送のバリデーショも行なった。

| | 菌株名 | 受け入れ 試験 | 中間 試験 | 出荷 試験 | 搬送 試験 |
|---|-------------------------------|------------|----------|----------|----------|
| 1 | <i>Aspergillus niger</i> | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 2 | <i>Bacillus subtilis</i> | ○ | ○ | ○ | 阻害 |
| 3 | <i>Candida albicans</i> | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 4 | <i>Clostridium sporogenes</i> | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 5 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 6 | <i>Staphylococcus aureus</i> | ○ | ○ | ○ | ○ |

さらに、細胞浮遊液毎無菌試験を行った。培地は RPMI,QBSF60,0.5%アルブミン加生理食塩水のいずれも本法で阻害を受けなかった。また培地 10ml+サンプル 100μl の条件でも検出された。

検体搬送、あるいは保存検体での無菌試験の結果、4℃8時間保存後の検体では *Bacillus* は全く増えず、14 日以上培養しても検出できなかった。また2時間冷所保存で同様な実験を行っても *Bacillus* に関して検出できず、直後

の無菌試験用培地への接種が必須であることがわかった。

2) BacT/ALERT システム(BIOMERIEUX 社)のバリデーション

D. 考察

下図は同時に行った NOG マウスにおけるヒト細胞移植系での生存曲線である。移植前処検出株のうち *Candida Albicans* を除く4種で BacT/ALEART システムの方が短時間に検出できた。

| 菌株名 | 検出時間(h) | |
|---------------------------------|-------------------------------|------------------------|
| | BacT/ALERT システム 無血清培地 / 生食 | SCD試験管培地 無血清培地 / 生食 |
| 1 <i>Aspergillus niger</i> | 43h / 43h | 48~64h / 48~64h |
| 2 <i>Bacillus subtilis</i> | <15h / <15h | 40h / 40h |
| 3 <i>Candida albicans</i> | 95~110h / 95h | 48~64h / 48~64h |
| 4 <i>Clostridium sporogenes</i> | 検出せず | 検出せず |
| 5 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 17h / 18h | 40h / 40h |
| 6 <i>Staphylococcus aureus</i> | 18h / 18h | 48~64h / 48~64h |

E. 結論

細胞治療剤の無菌試験は局方に記載された方法が推奨されているが、接種する volume, 培地への抗生剤の添加などの問題があり、そのまま局方の方法を当てはめるのは難しい。

局方に定められた無菌試験をアレンジし、実際に行っている Ex vivo 増幅 臍帯血移植の無菌試験に応用すべく、バリデーションを行ったところ、4℃で2時間以上保存した検体を試験した場合には *Bacillus* は検出できなくなった。

BacT/ALERT システムは細菌、真菌が増殖する時に産生される CO₂ を発色モニターで検知するシステムであり、判定を自動化できる利点の他に感度の上でも局方による SCD 培地接

種法を上回った。

ただし *Candida Albicans* については、SCD 培地接種法の方が早期に検出できた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tabata S, Mori M, Nagai Y, Hashimoto H, Arima H, Nagano S, Takiuchi Y, Inoue D, Kimura T, Shimoji S, Yanagita S, **Ito K**, Matsushita A, Nagai K, Takahashi T, Successful allogenic bone marrow transplantation for Diamond-Blackfan Anemia complicated by severe cardiac dysfunction due to transfusion-induced hemochromatosis *Internal Medicine*. 49:453-456, 2010.

2. 永井謙一、橋本尚子、**伊藤仁也**、松下章子、下地園子、木村隆治、井上大地、森美奈子、永井雄也、田淵淑江、柳田宗之、高橋隆幸:非血縁子通津伊移植後の再発に対する臍帯血移植後に、第1ドナーリンパ球による移植片対白血病効果が認められたTリンパ芽球性リンパ腫 臨床血液 第51巻,第6号 別冊,2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

その他

本研究に用いた TM β -1 抗体は兵庫医療大学の田中稔之教授より、また NOD/SCID マウ

スは日本チャールスリバー株式会社より供与を受けた。ここに深謝いたします。

厚生労働科学研究補助金 再生医療実用化研究事業
分担研究報告書

マイコプラズマ抗原刺激によるヒト骨膜細胞への影響

研究分担者 中田 光 新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター 教授
研究協力者 元井奈都紀 新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター 特任助教
梶 雅美 新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター 技術補佐員
関根 優 新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター 技術補佐員
藤本陽子 新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター 技術補佐員
布施一郎 新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター 准教授

研究要旨

新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センターでは、平成 19 年より細胞プロセッシング室を稼働し、院内で行われている自家培養骨膜シート、培養口腔粘膜シート移植による再生医療をサポートしている。細胞シートの安全評価のために、multiplex PCR 法により、18 種類のウイルス・マイコプラズマの検出を行っている。シート移植の際、口腔内のマイコプラズマが細胞に対してどのような影響を及ぼすのかは、明らかにされていない。そこで口腔内の常在菌として知られている *M.salivarium* および *M.oralis* などの死菌やそのリポペプチドを培養細胞に加え、細胞に与える影響を調べた。

A. 研究目的

培養細胞シートに潜在感染している病原体の頻度を明らかにし、特にマイコプラズマについては、細胞の活性化を指標に影響を調べる。

前回、新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター細胞プロセッシング室で製造している 43 検体の培養骨膜と、16 検体の培養口腔粘膜に潜在している 18 種類のウイルスとマイコプラズマについて multiplex PCR を用いてハイスループットに検出し、一部定量を行った。その結果、ウイルスについては Parvovirus, HHV6 がそれぞれ培養前に 3 検体と 1 検体、

培養後にそれぞれ 1 検体ずつ検出された。マイコプラズマについては培養前に 13 検体で検出された。検出されたマイコプラズマは *M.salivarium* が 5 検体、*M.faucium* が 7 検体、*M.oralis* が 1 検体であった。

これら multiplex PCR の結果から、特に口腔内の常在菌として知られる *M.salivarium* と *M.oralis* が培養細胞にどのような影響を与えるか調べるため、死菌を培養骨膜細胞に加え、Toll like receptor 2(TLR2)とその下流に存在するシグナルタンパク質の修飾変化に注目し、解析を行った(Fig.1)。

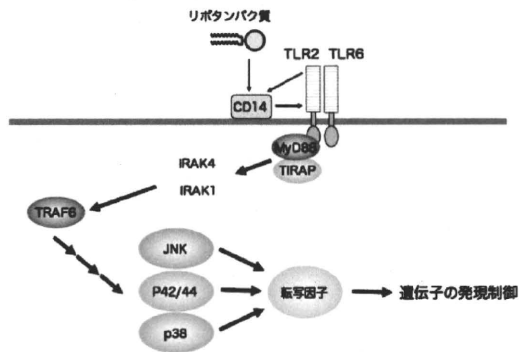


Fig.1 TLR2 下流のシグナル伝達経路

その結果、培養骨膜細胞が、細菌のリポタンパク質が反応する TLR2 を発現していることを確認した(Fig.2)。加えて、*M. orale* の死菌で刺激した場合、TLR2 下流のシグナルタンパク質である p38 および p42/44 にリン酸化が生じることがわかった (Fig.3,4)。

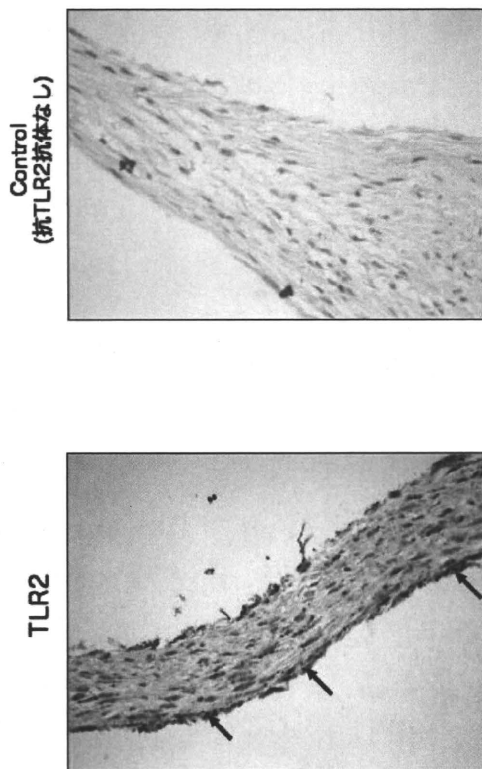


Fig.2 培養骨膜細胞における TLR2 の発現

培養骨膜細胞を抗 TLR2 抗体で免疫染色した。矢印で示された部分に TLR2 が発現していた。

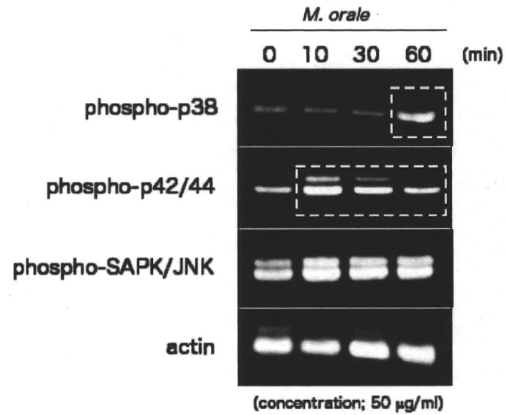


Fig.3 *M. orale* の死菌 で刺激した培養骨膜細胞における MAP kinase の活性化(1)

50 ug/ml の *M. orale* 死菌で 0 から 60 分間細胞を刺激した。p38 は刺激後 60 分、p42/44 は 10 分でリン酸化された(白色の点線で囲まれた部分)。

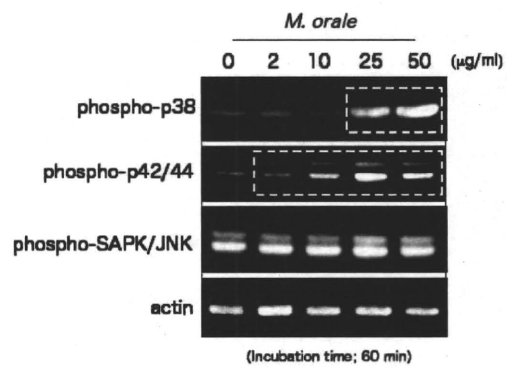


Fig.4 *M. orale* の死菌 で刺激した培養骨膜細胞における MAP kinase の活性化(2)

0 から 50 ug/ml の *M. orale* 死菌で 60 分間細胞を刺激した。p38 は 25 ug/ml、p42/44 は 2 ug/ml 以上の濃度でリン酸化が生じた(白色の点線で囲まれた部分)。

今回、我々は *M.salivarium* のリポタンパク質 LP44 のリポペプチド (FSL-1)で培養骨膜を刺激し、TLR2 下流のシグナルタンパク質 MAP kinase の修飾変化を調べた。さらに、シグナル下流で制御されている炎症性サイトカイン Interleukin-6 (IL-6)の産生量の変化や、その他タンパク質の mRNA の発現量変化を調べた。

B. 研究方法

培養骨膜細胞の培地に FSL-1 を 50 または 100 ng/ml になるよう加え、細胞への刺激を行った。TLR2 下流のシグナルタンパク質 p38、p42/44 および SAPK/JNK のリン酸化は、刺激後 0 から 60 分の間で回収された細胞をそれぞれのリン酸化抗体でウエスタンブロットし、調べた。IL-6 の産生量変化は、刺激後 18 時間後の細胞培地上清を回収し、IL-6 の ELISA を行うことで調べた。この実験において、各シグナルタンパク質の阻害剤(リン酸化 p38 の阻害剤; SB203580、リン酸化 p42/44 の阻害剤; U0126、リン酸化 SAPK/JNK の阻害剤; SP600125)を FSL-1 と共に培地に加え刺激した細胞培地上清も同時に回収し、測定を行った。続いて、FSL-1 刺激によって発現量に変化するタンパク質を調べるため、FSL-1 刺激前および刺激後 4 時間、12 時間の細胞から mRNA を精製し、DNA マイクロアレイを行った。

(倫理面への配慮)

本研究は新潟大学医学部倫理委員会の承認を受け、登録時に研究参加者に説明し、書面での同意を得て施行した。

C. 研究結果

1. FSL-1 刺激した培養骨膜細胞におけるシグナルタンパク質 MAP kinase の活性化

100 ng/ml FSL-1 により、骨膜細胞を刺激し、各 MAP kinase (p38、p42/44、SAPK/JNK)のリン酸化をウエスタンブロットで調べたところ、p38 は刺激後 10 分、p42/44 と SAPK/JNK は刺激後 30 分でリン酸化された (Fig.5 の点線部分)。

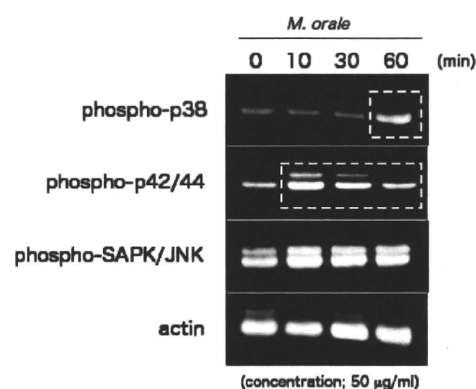


Fig.5 FSL-1 で刺激した培養骨膜細胞における MAP kinase の活性化

2. FSL-1 刺激した培養骨膜細胞における IL-6 の産生量の変化

50 ng/ml FSL-1 および各 MAP kinase 阻害剤を培地に加え骨膜細胞を刺激し、培地上清中の IL-6 産生量を ELISA で調べた。

FSL-1 のみで刺激した細胞の培地上清は、無刺激の培地上清よりも IL-6 の産生量が増加した。一方で FSL-1 と共に各 MAP kinase の阻害剤 (SB203580、U0126、SP600125)を加えた培地上清では、阻害剤の濃度が増加するにしたがって IL-6 の産生量が減少した (Fig.6A,B,C)。

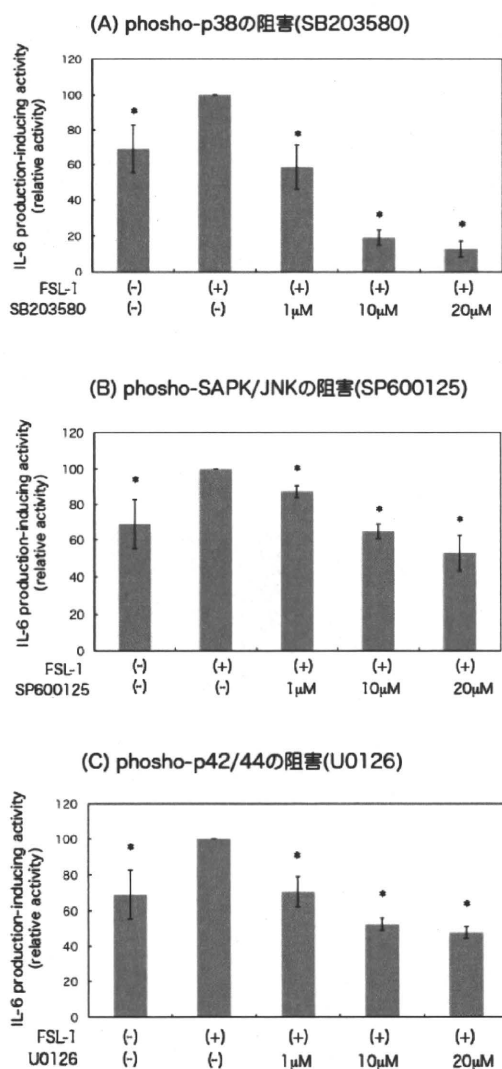


Fig.6 FSL-1 で刺激した培養骨膜細胞における IL-6 の産生

(A)SB203580 で p38 のリン酸化を阻害した実験。(B)SP600125 で SAPK/JNK のリン酸化を阻害した実験。(C)U0126 で p42/44 のリン酸化を阻害した実験。

(+)は FSL-1 が 50 ng/ml 含まれている培地で、1、10、20 μ M は培地に含まれる各 MAP kinase 阻害剤の濃度である。* $p < 0.05$

3. FSL-1 刺激した培養骨膜細胞における DNA マイクロアレイ解析

100 ng/ml FSL-1 で骨膜細胞を 4 および 12 時間刺激後、mRNA を精製し、DNA マイクロアレイ解析を行い、発現量に変化するタンパク質の遺伝子を調べた。刺激によって数百個の遺伝子発現量に変化しており、中でも IL-1 β や IL-6 などの炎症性サイトカインや CCL2 や CXCL1 などのケモカインの遺伝子発現量の増加がみられた。また分化・成長因子である PDGFA や FGF5、FGF18、BMP2 の発現量が増加し、PDGFD や FGF7、FGF9、FGF22、BMP4 の発現量が減少していた (Fig.7)。

★ サイトカイン

| | IL1B | IL6 | IL8 | IL16 | (倍) |
|------|------|-------|------|-------|-----|
| 4hr | 4.38 | 10.16 | >100 | -2.19 | |
| 12hr | - | - | 8.63 | - | |

★ ケモカイン

| | CCL2 | CCL16 | CCL17 | CCL20 | CXCL1 | CXCL2 | CXCL3 | CXCL6 | CXCL12 |
|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| 4hr | 4.55 | -6.64 | -3.91 | 8.22 | 25.37 | 5.28 | 14.17 | 2.16 | - |
| 12hr | - | -8.09 | -4.08 | - | 5.28 | 2.04 | 2.78 | - | 2.64 |

★ 分化・成長因子

| | PDGFD | PDGFA | FGF5 | FGF7 | FGF9 | FGF18 | FGF22 | BMP2 | BMP4 |
|------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|------|-------|
| 4hr | -5.37 | 2.16 | - | - | -4.22 | 2.88 | - | 7.05 | -2.46 |
| 12hr | - | - | 2.26 | -2.02 | -2.30 | - | -3.64 | - | - |

Fig.7 FSL-1 で刺激した培養骨膜細胞におけるマイクロアレイ解析

各遺伝子の数値は、FSL-1 刺激前の骨膜細胞と刺激後(4 または 12 時間)の骨膜細胞の遺伝子発現量を比較した場合に何倍変化したかを示したものである。

D. 考察

FSL-1 刺激で培養骨膜細胞において炎症性サイトカインやケモカイン、分化・成長因子など多数の遺伝子の発現パターンが変化したことから、骨膜細胞の増殖や分化に影響を与える可能性が考えられる。今後、*M.salivarium* および *M. orale* の死菌で刺激を行い、リポペプチドと同様の反応がみられるのか、また細胞の増殖や分化に影響を与えるのか検討する必要がある。

E. 結論

M.salivarium のリポタンパク質 LP44 のリポペプチド FSL-1 は、培養骨膜細胞の TLR2 下流の MAP kinase を活性化させ、炎症性サイトカイン IL-6 の産生を増加させる。さらにその他の炎症性サイトカインやケモカイン、分化・成

長因子など多数の遺伝子の発現に影響を及ぼす。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Oda M, Toba K, Ozawa T, Kato K, Yanagawa T, Ikarashi N, Takayama T, Suzuki T, Hanawa H, Fuse I, **Nakata K**, Narita M, Takahashi M, Aizawa Y. Establishment of culturing system for ex-vivo expansion of angiogenic immature erythroid cells, and its application for treatment of patients with chronic severe lower limb ischemia. *Journal of Molecular and Cell Cardiology*. 49:347-353, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究補助金 再生医療実用化研究事業
分担研究報告書

細胞治療の有効性・毒性検証システムの開発に関する研究

研究分担者 吉江弘正 新潟大学大学院 医歯学総合研究科 摂食環境制御学講座
歯周診断 再建学分野 教授

研究要旨

本研究では、自家培養骨膜シートの安全な移植とそれによる歯槽骨の再生の研究を通じて、再生医療・細胞医療製剤に汎用可能な品質管理・安全検証システムの開発、製剤の規格化を検討した。それにより、骨膜シート培養基材としての多孔質 PLLA 膜の有用性や、培養骨膜シートの凍結保存液として 50%以上の FBS と 10%DMSO を含む Medium199 培地を使用した際の、高い骨膜シート再現性が認められた。

A. 研究目的

以下の3つの研究を並行して遂行することとした。

1. 培養骨膜シートの異常をサイトカイン産生からモニタリングする方法を開発するという目的から、人為的に癌化した骨膜シートを作成し、サイトカイン産生プロファイルに及ぼす影響を検討する。
2. 前年度の研究を継続発展させる目的から、培養骨膜シートを短期の培養期間でインテリジェント化する基材を開発する。
3. 現行の移植治療スケジュールでは、十分な大きさの骨膜シートを得るために 6 週間という長期間の培養が求められているが、このような移植治療日程に余裕を持たせるための培養骨膜凍結保存法を開発する。

B. 研究方法

1. 骨膜シートの癌化

直径 20mm 程度に成長した培養骨膜シートに対して、①発癌プロモーターである Phorbol ester (PMA)処理をおこなう、②紫外線のなか

でも組織・細胞に有害とされる PVC を照射する、③ γ 線照射などの方法で細胞の突然変異を誘発させる。癌化の可能性は、形態、細胞核の大きさ、増殖活性、リン酸化 p53 の蓄積などから判定する。これと並行して、培養骨膜シートの培養上清に放出されるサイトカインを抗体アレイや Bio-Plex などの方法で半網羅的に定量解析する。

2. 基材の開発

ポリ乳酸を原料として多孔質膜を作成し、培養骨膜の初期接着、接着因子の発現、増殖活性や分化誘導に対する応答性について、DNA microarray などの網羅的方法によって解析評価する。

3. 凍結保存法の開発

新鮮な採取骨膜片と様々な培養日数を経過した骨膜シートについて、ウシ胎児血清 (FBS) と DMSO の濃度を変えた凍結保存液中で一定期間 -75°C で凍結保存し、解凍後の増殖活性と分化誘導に対する応答性を比較検討し、最適な条件を明らかにする。

(倫理面への配慮)

培養骨膜の採取と本実験への使用に関しては、基本計画書を新潟大学歯学部倫理審査委員会に提出し、審査を経て承認された。実施にあたっては、骨膜組織提供者に対して書面と口頭にて内容を説明し同意を得た。また、研究データの保存管理には注意を払い、研究成果の発表に際しては個人名が特定されないように配慮することとした。

C. 研究結果

1. 骨膜シートの癌化

PMA 処理はアポトーシス細胞の出現もほとんどなく、ほかの指標からも癌化誘導に効果的であるという確証は得られなかった。ただし、サイトカイン産生活性については、調査対象としたサイトカインのほとんどについて、産生活性を優位に亢進させた。γ線照射については予定していた学内共同利用機器の使用が困難になったため、UVC 照射についてのみ実施した。アポトーシス細胞の出現も多いが、そこから生存した細胞については Flow cytometer によって核の肥大化などが確認され、現在、変異の可能性を確認するために分離凍結保存していた細胞について 8-Azaguanine 耐性試験を実施している。

2. 基材の開発

PLLA (poly-L-lactic acid)/dioxane 溶液を擬定常状態で凍結させることにより dioxane 結晶を一方向に成長させた後、凍結乾燥により構造を保持したまま dioxane を除去するという方法で作製した多孔質 PLLA 膜は、骨膜片の初期接着に有効であり、また継続的培養によって骨膜シート自体に integrin など接着因子群の発現を誘導するとともに、proteoglycan や collagen などの ECM の産生を更新する効果が

認められた。

3. 凍結保存法の開発

ある程度の大きさに達した骨膜シートを凍結保存することは、解凍後のシート状の再成長を考えると課題が残る。そこで、中心部の骨膜片部分だけ凍結保存用試料とした。採取直後の骨膜片には増殖している細胞が少ないため、2週間程度培養し、骨膜片とその周辺な増殖活性の高い細胞を出現させてから凍結操作に移すことが効果的であることを発見した。添加する DMSO は 10%前後で十分な効果があり、また FBS の濃度は 50%以上にすることで、骨膜に与えるダメージを最小限にすることができることが判明した。

D. 考察

1. 骨膜シートの癌化

現在並行して増殖活性を著しく亢進させた培養骨膜シートについて、ヌードマウスに移植し腫瘍形成能を確認しているところであるが、確実な検出系の確立への糸口を継続して広く探っていく必要がある。

2. 基材の開発

近年の基材開発については、素材自体よりも表面処理法や修飾法に視点が移っている。今回試作した多孔質 PLLA 膜表面に直径 30-50 μm 程度の気孔開口部を有しており、それが有効な topography として骨膜片の保持に貢献したものと思われる。さらに、内部の気孔構造が遊走した骨膜細胞の重層化にとって好ましいものであることも判明した。

3. 凍結保存法の開発

市販の凍結保存液 (TC protector[®], DS Pharma, Osaka, Japan) についても比較検証したが、50%以上の FBS と 10%DMSO を含む Medium199 培地での保存においてより再現性

が高いことが分かった。細胞治療に使用するという観点からは動物成分を排除する方向でさらに検討していく必要があるが、凍結保存した骨膜シートにおいても通常の方法で作製された骨膜シートと同程度の機能性が保証されることが判明したことは、治療スケジュールに柔軟性を持たせることができるだけでなく、検体の搬送が求められる将来の再生医療病院間連携において、あらたな可能性を示すことができた。

E. 結論

ヒト培養骨膜シートに関しては治療が先行しているが、基本的な生物学的特徴などについては不明な点も多く残されている。本プロジェクトはそこにいくつかの重要な知見を加えることができた。すなわち、変異や異常を早期に検出するという観点から、また長期間の培養によって変異誘導される可能性を最小限にするという観点から検討を行ったわけであるが、上述の結果以外にも骨膜シートは分散培養した細胞に比較して変異誘導を受けにくいことや、この背景にある防御システムが適当な3次元培養環境を提供することによってさらに強化される可能性があることも示唆することができた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawase T, Yamanaka K, Suda Y, Kaneko T, Okuda K, Kogami H, Nakayama H, Nagata M, Wolff LF, Yoshie H. Collagen-coated poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) film: A promising scaffold for cultured periosteal sheets. *J Periodontol.* **81**(11):1653-1662, 2010.

2. Kawase T, Okuda K, Kogami H, Nakayama H, Nagata M, Sato T, Wolff LF, Yoshie H. Human periosteum-derived cells combined with superporous hydroxyapatite blocks used as an osteogenic bone substitute for periodontal regenerative therapy: Animal implantation study using nude mice. *J Periodontol.* **81**(3):420-427, 2010.
3. Kawase T, Okuda K, Kogami H, Nakayama H, Nagata M, Yoshie H. Osteogenic activity of human periosteal sheets cultured on salmon collagen-coated ePTFE meshes. *J Mater Sci Mater Med.* **21**(2):731-739, 2010.

2. 学会発表

国内学会発表

1. 奥田一博、川瀬知之、梶 昌美、中田 光、吉江弘正: 培養骨膜シートを用いた歯周組織再生療法の3年予後、第10回日本再生医療学会、2011年3月1日-2日、東京
2. 吉江 弘正、奥田 一博、川瀬知之、永田昌毅、中田 光: 骨膜シートによる歯周組織・顎骨の再生療法、シンポジウム「歯科領域の再生医療?」、第10回日本再生医療学会、2011年3月1日-2日、東京 再生医療 10(supple): in press.
3. 中島 悠、川瀬知之、奥田一博、吉江弘正: 多血小板フィブリン(PRF)の創傷治癒に及ぼす効果、第53回秋季日本歯周病学会学術大会、2010年9月19日、高松
4. 奥田一博、川瀬知之、小神浩幸、永田昌毅、吉江弘正: 膜片採取から移植治療用培養骨膜シート形成に至る過程での細胞動態の分析、第53回春季日本歯周病学会学術大会、2010年5月13日-15日、盛岡

国際学会発表

1. Okuda K, Yoshie H, Kawase T, Kogami H, Nakayama H, Nagata M, Takagi R. Clinical and histologic evaluation of tissue-engineered cultured periosteum application for bone regeneration. The 96th Annual Meeting of the American Academy of Periodontology. Oct.30-Nov.2,2010, Honolulu, HI, USA.
2. Kawase T, Nakayama H, Okuda K, Kogami H, Nagata M, Wolff LF, Yoshie H.

Non-invasive evaluation of the osteogenic activity of alveolar bone-derived human periosteal sheets in animal implantation models by in vivo near-infrared (NIR) fluorescence optical imaging. The 96th Annual Meeting of the American Academy of Periodontology. Oct.30-Nov.2,2010, Honolulu, HI, USA.

3. Kawase T, Tanaka T, Nishimoto T, Okuda K, Nagata M, Burns DM, Yoshie H. A porous poly(L-lactic acid) membrane designed for culturing human periosteal sheets as an osteogenic grafting material. Tissue Engineering and Regenerative

Medicine International Society-Asia Pacific Regional Meeting (TERMIS-AP) 2010. Sep.15-17,2010, Sydney, Australia.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

| 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 |
|---------------|---|-------------------------------|--|---------------|-----|----------------------|-----------|
| 加藤俊一 | | 加藤俊一 | よくわかる造血細胞移植コーディネーター | 医薬ジャーナル社 | | 2010 | |
| 加藤俊一 | | 加藤俊一 矢部普正 東海大学造血細胞移植チーム | よくわかる小児の造血細胞移植 | 医薬ジャーナル社 | | 2010 | |
| 水谷哲也, 木村博一 | 「ボカウイルス」 臨床ウイルス学必携 | | | 羊土社 | | 2010年 12月刊 行予定 | |
| 水谷哲也 | 「コロナウイルス」 臨床ウイルス学必携 | | | 羊土社 | | 2010年 12月刊 行予定 | |
| 水谷哲也 | 「網羅的遺伝子解析法」 臨床ウイルス学必携 | | | 羊土社 | | 2010年 12月刊 行予定 | |
| 水谷哲也 | 「未知・既知のウイルスの網羅的検査法」in 医薬品の品質管理と ウイルス安全性 | | | 文光社 | | 2011年 6月刊行 予定 | |
| Mizutani T | Signaling pathways of SARS-CoV in vitro and in vivo. In Molecular Biology of the SARS-Coronavirus | Sunil K Lai | | Springer 社 | | 2010 | 305-332 |
| 水谷哲也 | 「原因不明疾患における感染因子の網羅的解析－川崎病との関わり－」 Progress in medicine | | Progress in medicine Vol.30 No.7 | ライフサイエンス社 | | 2010 | 1883-1886 |
| 水谷哲也 | 「エマージングウイルスと未同定のウイルスの探索」(特集:ウイルスの今日的意味) | | 化学療法の領域 Vol.26 No.9 | 医薬ジャーナル社 | | 2010 | 1747-55 |

| | | | | | | | |
|------|---|--|------|-----------|--|------|---------|
| 水谷哲也 | 「レオウイルス」in「広 範囲 血液・尿化学検 査、免疫学的検査(3) (第7版)ーその数値を どう読むかー」 | | 日本臨床 | 日本臨床 社 | | 2010 | 410-413 |
|------|---|--|------|-----------|--|------|---------|

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 |
|--|--|--------------------------|-----|-----------|------|
| Asai E, Wada T, Sakakibara Y, Toga A, Toma T, Shimizu T, Imai K, Nonoyama S, Morio T , Kamachi Y, Ohara O, Yachie A. | Analysis of mutations and recombination activity in RAG-deficient patient. | <i>Clin. Immunol.</i> | 138 | 172-177 | 2011 |
| Takagi M, Shinoda K, Piao J, Mitsuiki N, Takagi M, Matsuda K, Muramatsu H, Doisaki S, Nagasawa M, Morio T , Kasahara Y, Koike K, Kojima S, Takao A, Mizutani S. | Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome Like Disease With Somatic KRAS Mutation. | <i>Blood</i> | 117 | 2887-2890 | 2011 |
| Shin MJ, Shim JH, Lee JY, Chae WJ, Lee HK, Morio T , Park JH, Chang EJ, Lee SK. | Qualitative and quantitative differences in the intensity of Fas-mediated intracellular signals determine life and death in T cells. | <i>Int J. Hematol.</i> | 92 | 262-270 | 2010 |
| Seki M, Kimura H, Mori A, Shimada A, Yamada Y, Maruyama K, Hayashi Y, Agematsu K, Morio T , Yachie A, Kato M. | Prominent eosinophilia but less eosinophil activation in a patient with Omenn syndrome. | <i>Pediatr. Int.</i> | 52 | e196-199 | 2010 |
| Inoue H, Takada H, Kusuda T, Goto T, Ochiai M, Kinjo T, Muneuchi J, Takahata Y, Takahashi N, Morio T , Kosaki K, Hara T. | Successful cord blood transplantation for a CHARGE syndrome with CHD7 mutation showing DiGeorge sequence including hypoparathyroidism. | <i>Eur. J. Paediatr.</i> | 169 | 839-844 | 2010 |
| Okamoto K, Iwai Y, Ohhara M, Yamamoto M, Morio T , Aoki K, Ohya K, Jetten AM, Akira S, Muta T, Takayanagi H. | I κ B regulates TH17 development by cooperating with ROR nuclear receptors. | <i>Nature.</i> | 464 | 1381-1385 | 2010 |

| | | | | | |
|---|--|-----------------------|-----|-----------|------|
| Ibert MH, Bittner TC, Nonoyama S, Notarangelo LD, Burns S, Imai K, Espanol T, Fasth A, Pellier I, Strauss G, Morio T , Gathmann B, Noordzij JG, Fillat C, Hoenig M, Nathrath M, Meindl A, Pagel P, Wintergerst U, Fischer A, Thrasher AJ, Belohradsky BH, Ochs HD. | X-linked thrombocytopenia (XLT) due to WAS mutations: Clinical characteristics, long-term outcome, and treatment options. | <i>Blood.</i> | 115 | 3231-3238 | 2010 |
| Sugita S, Shimizu N , Watanabe K, Katayama M, Horie S, Ogawa M, Sugimoto Y and Mochizuki M | Diagnosis of bacterial endophthalmitis by broad-range quantitative PCR. | <i>Br J Haematol.</i> | 95 | 345-349 | 2011 |
| Nagasawa M, Ogawa K., Nagata K., Shimizu N. | Serum granulysin as a possible biomarker of NK cell neoplasm | <i>Br J Haematol.</i> | 148 | 812-814 | 2010 |
| Zhang Y, Ohyashiki JH, Shimizu N , Ohyashiki K. | Aberrant expression of NK cell receptors in Epstein-Barr virus-positive gammadelta T-cell lymphoproliferative disorders. | <i>Hematology.</i> | 15 | 43-47 | 2010 |
| Kariya Y, Hamatake M, Urano E, Yoshiyama H, Shimizu N , Komano J. | Dominant-negative derivative of EBNA1 represses EBNA1-mediated transforming gene expression of Epstein-Barr virus infection independent of rapid loss of viral genome. | <i>Cancer Sci.</i> | 101 | 876-881 | 2010 |
| Iwata S, Wada K, Tobita S, Gotoh K, Ito Y, Demachi-Okamura A, Shimizu N , Nishiyama Y, Kimura H. | Quantitative Analysis of Epstein-Barr Virus (EBV)-Related Gene Expression in Patients with Chronic Active EBV Infection. | <i>J Gen Virol.</i> | 91 | 42-50 | 2010 |
| Yamanaka Y, Tagawa H, Takahashi N, Watanabe A, Guo Y-M, Iwamoto K, Yamashita J, Saitoh H, Kameoka Y, Shimizu N , Ichinohasama R, Sawada K. | Aberrant overexpression of microRNAs activate AKT signaling via down-regulation of tumor suppressors in natural killer-cell lymphoma/leukemia. | <i>Blood.</i> | 114 | 3265-3275 | 2010 |