

平成 20～22 年度厚生労働科学研究・再生医療実用化研究事業
再生医療・細胞医療製剤に汎用可能な新規微量高感度品質管理・
安全性検証システムの開発と製剤の規格化に関する研究
総合研究報告書

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、サイトカインや化学物質の放出、あるいは、細胞そのものが癌化や変異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。また生体そのものに及ぼす影響も考えられ、加工した細胞を *in vitro* での安全性試験のみで把握することは不可能である。

今回我々は、ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を *ex vivo* 増幅した造血幹細胞を NOD/SCID マウスに移植し、ヒト造血を長期にわたり再構築させる方法により、移植細胞がレシピエントの正常な細胞または組織に与える影響を検討すべく、移植後長期のマウス組織における病理組織学的検査を行った。また、移植細胞の *in vivo* における安全性を評価するため、移植後長期のマウス骨髄における生着ヒト血球の染色体解析を行った。

NOD/SCID マウスへのヒト造血細胞移植においては、好中球、単球、血小板、B 細胞が再構築されるが、赤血球系は赤芽球までの分化にとどまり、T 細胞への分化は起こらない。これにより、GVHD が回避され、ヒト血液細胞がマウス血液細胞と混合キメラ状態を長期間にわたり保つことができる。今回の移植後長期観察の結果、体重減少、脱毛といった外観の異常所見は認めず、病理組織学的にも炎症、変成、癌化を認めなかった。染色体解析においても G-band 分染法、m-FISH 法にて異常所見は確認されず、一定の安全性を評価しうる系と考えられ、異種間移植系を用いての治療用細胞製剤の安全性に関する前臨床試験として利用できると考えられた。

本移植法はしかし、ヒト細胞を受け入れさせるために全身放射線照射が必要となり、6ヶ月の間に感染や癌化(マウス胸腺腫)で死亡するマウスも少なくなかった。この問題を解決するため、非照射レジメンでもヒト細胞を受け入れ、長期間ヒト造血再構築を維持可能な方法を開発した。NOD/SCID マウスに anti-IL-2R β 鎖抗体(マウス TM β -1 抗体)を投与した(前処置)群は、TBI 2.2Gy+Asialo GM-1 抗体を 3 週間毎投与群より高いヒト細胞キメラを維持でき、感染に抵抗性で、生存率も高かった。ヒト細胞が *in vivo* で長期間分化していく過程を観察する安全性試験に適していると考えられた。

本研究ではさらに、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

再生医療・細胞治療最終製品に関しては“安全性及び効能を、技術的に可能かつ科学的に合理性のある範囲で、実験動物を用いえるかどうかを検証することを目的とした。さらにこの方法を長期アッセイに適した手法に改変することも試みた。具体的には anti-IL-2R β 鎖抗体であるマウス TM β -1 抗体を NOD/SCID マウスに投与する前処置を用いた移植系を開発し、これまで使用してきた抗 AsialoGM-1 抗体に代わり新たに TM β -1 抗体を用いて NOD/SCID Mouse へのヒト造血幹細胞再構築能の検証を行った。また同検体を用いて、染色体異常についての検証を、従来通りの karyotyping と SKY-FISH にて検討を行うことを目的とした。品質管理試験では必須である無菌試験については、自動化とバリデーションについて検討し、より簡便かつ感受性の高い方法を確立することを目的とした。

B. 研究方法

1. NOD/SCID マウスへの移植

移植細胞: 臍帯血由来 CD34 陽性細胞 $1E+04$ 個を SCF, FL, IL-6/sIL-6R 各 100ng/ml, TPO 10ng/ml 添加無血清培地 QBSF-60 (Quality Biological 社)にて 2 週間培養(37°C, 5%CO₂, humidity 95%)し得られた細胞 6~8 週齢の NOD/LtSz-Prkdcscid (NOD/SCID)マウスに移植した。移植前処置は 2.4Gy の全身放射線照射を行い、day0, 7, 14, 21 に抗アシアロ GM1 抗体を腹腔内投与した。

2. 解析

1) 移植後マウス組織の病理評価

移植後 21 週にマウスの剖検(増幅細胞移植マウス、対照マウス 各 n=1)を行い、脾、肝、肺、骨髓、腹大動脈、腎、膵、心、胸腺、リンパ節、

精巣、皮膚(背部)、脳、回盲部を摘出した。各臓器を 10%ホルマリンでの固定後、パラフィン切片による H-E 染色を行い、各組織において変性、炎症所見の有無の確認を行った。骨髓血におけるヒト血球キメラ率は、フローサイトメトリー法により、ヒト CD45、マウス CD45 抗体を用いて混合キメラ率を算定した。

2) 生着ヒト血球細胞の染色体検査

移植後 30 週のマウス骨髓血を採取し、サイトカインおよび 10%FCS 添加 α MEM 培地にて 24 時間培養することにより、分裂細胞を得、G-band 分染法、及び multi color-FISH(m-FISH)法にて解析を行った。

3. NOD/SCID マウスへの移植法の改良

NOD/SCID Mouse を用いた造血幹細胞移植における前処置の検討を下表の通りに行った。

Group	照射	抗体
Control	あり	なし
TM β -1Control	なし	移植当日、1回投与
TM β -1*1	あり	移植当日、1回投与
TM β -1*3	あり	移植当日と以後週 1 回、3回投与
抗 AsialoGM1	あり	移植当日と以後週 1 回、3回投与

投与量: TM β -1 : 1mg / Mouse, 抗 Asialo GM-1 抗体: 0.02mg / Mouse

表 1: TM β -1 抗体の投与方法及び効果の検証
各 Group につき5匹の NOD/SCID Mouse に上記の前処置をおこない、臍帯血由来 CD34 陽性細胞 (Lot#H050326A / LONZA Cat#2C-101A)を 2×10^4 / Mouse、尾静脈注射で投与した。

移植後4週間ごとに末梢血と骨髓を採取し、以下の抗体を用いて表面抗原解析を行い、ヒト血球の再構築を経時的に観察した。

FCM 解析 : MouseCD45 / HumanCD45 / HumanCD3 / HumanCD19

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

標準菌を 30CFU/300 μ l 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、トリブ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。

(倫理面の配慮)

本研究で用いた臍帯血は 兵庫さい帯血バンクより研究用として供与を受けた。臍帯血の提供と研究内容は同バンクの倫理委員会、先端医療センターの倫理委員会の審査を受けた。供与された臍帯血は匿名化し、実験終了後はオードクレーブを行い適切に処理した。また動物を用いた実験については各種指針に従い、最低限の匹数と最低限の侵襲に留意して実施した。

C. 研究結果

1. NOD-SCID マウスへの移植:病理学的検討

Ex vivo 増幅臍帯血移植による NOD/SCID マウスへのヒト細胞の分布を病理学的に免疫染色および FACS によるヒト CD45 細胞の存在診断を行った。ヒト細胞は骨髄、脾臓、肝臓、リンパ節に分布していたが、一部肺、腸管のリンパ組織でヒト細胞が確認された。

1) 脾臓

濾胞構造は保たれ、赤脾髄、白脾髄とその中央部にある胚中心が確認された。ヒト細胞は脾洞とその周囲に多く認められ、胚中心を伴う濾胞中のリンパ球は主にマウスリンパ球であった。

2) 肝臓

肝小葉は大小不同なく、中心静脈周囲から Glisson 鞘ともにマウス肝細胞から成り、リンパ球の浸潤などの炎症所見、繊維化などの慢性的炎症所見は見られなかった。ヒト細胞は B 細胞が中心で血管洞内に分布するのみであった。

3) 肺

肺胞壁構造は保たれ、肺胞内への浸出液、炎症細胞浸潤も認めなかった。ヒト細胞は肺胞間に存在するリンパ節様構造の一部、および血管内に認められた。

4) 骨髄

細胞数は正形成で血管周医にヒト細胞の集簇が見られた。ヒト細胞は赤芽球、巨核球、顆粒球、リンパ球が認められ、細胞種による偏りは認めなかった。

5) 胸腺

多数の小葉から成り構造異常は認めなかった。皮質のマウスリンパ球が分布し、ヒト細胞は辺縁に限局していた。

6) リンパ節

皮質にはリンパ小節を単位として認め、その中心部である胚中心には特徴的な明瞭部が確認され構造異常は認めなかった。リンパ小葉はヒト、マウスリンパ球が混在するもののマウスリンパ球が主で、ヒトリンパ球は辺縁洞に多く分布した。

2. 生着ヒト血球細胞の染色体検査

1) G-band 分染法

分裂細胞から得られる染色体像はマウス、ヒト細胞で明らかに異なり、容易に鑑別されることがわかった。

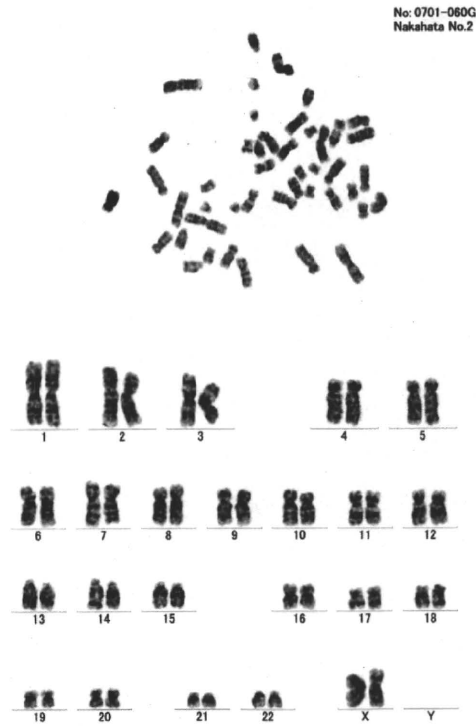


図 Nakahata 法による増幅後、マウス骨髄に生着したヒト血球における G-band 分染解析(分析バンドレベル; 300、観察細胞数; 30、核型; 46,XX)

分裂像が得られた観察細胞における核型異常は認められなかった。

2) m-FISH 法

間核期における細胞の観察は multi-color FISH 法を用いて転座、構造異常を解析した。いずれの分析細胞においても染色体の数、構造異常、転座、逆位なども認めず、正常核型であった。

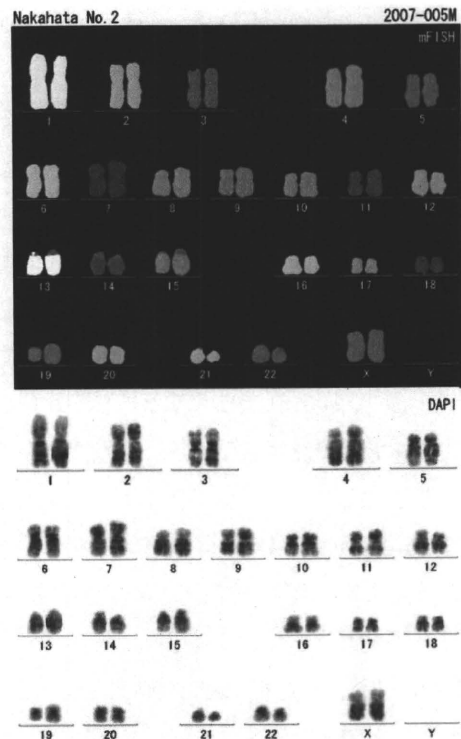


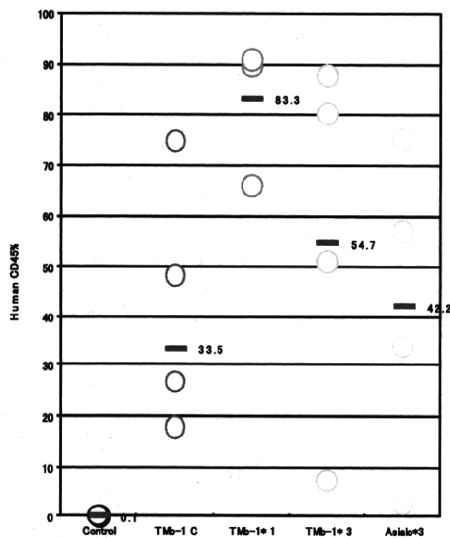
図 Nakahata 法による増幅後、マウス骨髄に生着したヒト血球における m-FISH 解析(観察細胞数; 10、核型; 46,XX)

3. 移植前処置の改変

移植細胞の 4 週後の骨髄ヒト細胞キメリズムを下のグラフに示した。TMβ-1 抗体投与群はこれまで行ってきた抗 Asialo GM-1 抗体を投与する群よりも高いキメリズムが得られ、NOG マウスに匹敵するぐらいのキメリズムであった。

また通常 NOD/SCID マウスに非照射で抗 Asialo GM-1 抗体のみの投与を前処置に移植を行うと拒絶されるが、TMβ-1 抗体投与でヒト細胞が生着した。

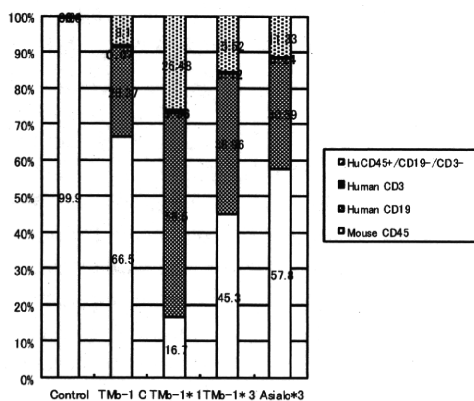
また TMβ-1 抗体投与例においては、いずれの群も移植後 6 ヶ月にわたりヒト細胞が維持され、拒絶を受けなかった。なお照射のみでいずれの抗体も投与しない Control 群は短期間で拒絶を受けた。



末梢血におけるヒト血液細胞は移植後 8 週目にピークを迎え、以降、緩やかに減少傾向を示した。生着においては TMβ-1*1 が最も高い生着を維持した。

全体の傾向として、12 週をピークにヒト血液細胞の減少傾向が認められた。生着においては TMβ-1*1 が最も生着に優れていた。TMβ-1*3、Asialo*3、TMβ-1C の生着は同様の傾向を示した。Control の生着は認められなかった。

移植後 12 週目のヒト血液細胞の分化は以下の通りであった。



マウス骨髄中に占めるヒト血液細胞の分化は B cell (CD19) が主でヒト血液中の 60% 程度を占めていた。T cell (CD3) は 1% 以下で、その他の血球が 30-40% を占めていた。

4. BacT/ALERT システムの検証

菌株名	検出時間(h)	
	BacT/ALERT システム	SCD 培養管
	無菌培養/生食	無菌培養/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>Reutermans aeruginosa</i>	17h / 18h	40h / 40h
6. <i>Sophylococcus aureus</i>	18h / 18h	48-64h / 48-64h

上記のように、検出株のうち *Candida Albicans* を除く 5 種で BacT/ALEART システムの方が短時間に検出できた。

D. 考察

NOD-SCID 移植系を用いた検討では、病理組織学的解析により *ex vivo* で増幅した細胞は長期にわたりマウス体内で分裂、増殖を行い、マウス血液細胞と混合キメラ状態にて生存していることが確認された。これにより、ヒト増幅臍帯血での体内動態や宿主臓器への影響を観察することが可能であった。

染色体解析はマウス染色体、ヒト染色体の鑑別は容易であり、癌化の推測などに汎用可能であると考えられた。本研究は異種間移植系を用いての、治療用細胞製剤の安全性に関する前臨床試験として利用できる系であると考えられた。

同様のシステムとして、NOG マウスがある。NOG マウスにおいては、短期の観察においては、ヒト細胞キメリズムが高く、少量の移植細胞

数でも生着できるが Isolator を利用して Clean な環境を維持しても半年後の生存率は 20%以下であった。感染のほかにも照射後は胸腺腫などの腫瘍の発症が高いことによると思われた。したがって、ヒト細胞治療による長期体内動態、安全性、造腫瘍性などを観察するには向いていないと考えられた。今回検討を行った抗 TM β -1 投与マウスは非照射にても安定した早期生着および長期にわたるヒト細胞の維持が確認され、特別な放射線装置がない施設においても安全性試験が行うことができ、有用な系と考えられた。

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め、今後汎用可能な方法と考えられる。一方 Candida の検出には劣り注意が必要である。

D. 結論

NOD-SCID を用いた解析により、増殖臍帯血の生着や細胞の分化、分布を観察することができた。また染色体検査においても変異細胞を認めないことが明らかになった。さらに TM β -1 抗体にて前処置を行ったところ、従来の抗 AsialoGM-1 抗体より優れた生着促進効果が認められ、非照射においても長期にわたりヒト細胞を維持した。細胞治療剤の長期 in vivo 安全性試験に適していると考えられた。NOG-SCID マウスより有利な点もあり、今後汎用されるべき手法と考えている。

また BacT/ALERT システムの自動化・迅速細菌・真菌検出法としての有用性が確認された。

F. 健康危害情報

本研究による健康危害情報はなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tabata S, Shimoji S, Murase K, Takiuchi Y, Inoue D, Kimura T, Nagai Y, Mori M, Togami K, Kurata M, **Ito K**, Hashimoto H, Matsushita A, Nagai K, Takahashi T. Successful allogeneic bone marrow transplantation for myelodysplastic syndrome complicated by severe pulmonary alveolar proteinosis. *Int J Hematol*. 90:407-412. 2009.
2. Inoue D, Nagai Y, Kimura T, Shimoji S, Mori M, Togami K, Tabata S, Kurata M, Matsushita A, **Ito K**, Hashimoto H, Maruoka H, Yamashita E, Nagai K, Imai Y, Shirane H, Takahashi T. Refractory de novo myeloid sarcoma.: A case report and therapeutic strategy based on bone marrow minimal residual disease. *Int J Hematol*. 90:120-3. 2009.
3. Mori M, Togami K, Fujita H, Inoue D, Kimura T, Shimoji S, Nagai Y, Tabata S, Kurata M, **Ito K**, Hashimoto H, Matsushita A, Nagai K, Kaji S, Takahashi T. Successful allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelomonocytic leukemia complicated by refractory aortitis. *Bone Marrow Transplant*. 2009 Aug 31. Epub ahead of print.
4. 鹿村真之、**伊藤仁也**、大隈一興、関根暉彬:リンパ球活性化培養中の細胞表面抗原の経時的変化、*Biotherapy* 23, 257-262, 2009.
5. Oda M, Isoyama K, Ito E, Inoue M, Tsuchida M, **伊藤仁也**、中畑龍俊:体外増幅造血細胞移植、*医学のあゆみ*、Vol.229 No.9 786-792, 2009.
6. Tabata S, Minako 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 allogeneic bone marrow transplantation for Diamond-Blackfan Anemia complicated by severe cardiac dysfunction due to transfusion-induced hemochromatosis. *Internal Medicine*. 49: 453-456, 2010.
7. 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

該当なし

I. その他

本研究に用いた TMβ-1 抗体は兵庫医療大学の田中稔之教授より供与を受けた。ここに感謝いたします。

平成 20～22 年度厚生労働科学研究・再生医療実用化研究事業
再生医療・細胞医療製剤に汎用可能な新規微量高感度品質管理・
安全性検証システムの開発と製剤の規格化に関する研究
総合研究報告書

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 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
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
小神晴美 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
井上典子 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
渡辺真理 新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター 研究支援者
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では、平成12年頃から口腔粘膜培養シートの開発が始まり、ついで17年頃から培養骨膜シートの臨床応用が開始された。これらのプロジェクトをサポートする組織として生命科学医療センター輸血再生医療部門を立ち上げ、平成19年より細胞プロセッシング室を稼働している。医科歯科大学細胞治療センター清水准教授との共同研究により細胞シートの安全性評価のために、multiplex PCR 法により、18種のウイルス・マイコプラズマの検出を行っている。本研究では、平成20～22年度までに67検体の細胞シートより微生物をスクリーニングしたので、その結果を報告する。

A. 研究目的

歯科口腔関係の再生医療に用いる培養細胞シートの微生物潜在感染に関する情報は皆無に等しいため、本研究を通じて実態を明らかにしたい。

緒言:平成22年に改訂された「ヒト幹細胞を用いた臨床研究指針」によれば、かつて医薬発1314号で規定されたマイコプラズマに関する項目が削除された。しかし、こうした微生物の潜在的感染に関する条項を指針に入れるべき

かどうかについては、現実にはどの程度の頻度でヒト由来の細胞シートに微生物が検出されるのかという基礎データが必要である。特に21年度に始まった「再生医療の制度的枠組み検討会」で推進が答申された病院間の連携診療により、細胞加工製品の委託製造が病院間で可能となると、他院で製造された細胞加工製品に潜在感染する微生物をどのように検出し、どのように規制するかという問題が大きくなる。本研究班では、再生医療に汎用可能な品質

管理システム構築のため、微量・低価格かつ迅速な検査法を開発し、実際に新潟大学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培養骨膜、培養口腔粘膜に潜在感染している微生物を18種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、一部定量し、その出現頻度を検討した。

B. 研究方法

生命科学医療センター輸血再生医療部門細胞プロセッシング室に入荷された歯根膜組織、口腔粘膜組織、またそれらを培養して得られた培養細胞シートの培養前後の検体の一部を凍結、定期的に東京医科歯科大学に送付し、8種類のヘルペス属ウイルス、4種類のレトロウイルス、5種類の肝炎ウイルス、BKV、JCV、パルボウイルス B19、アデノウイルスウイルス、マイコプラズマのDNAを multiplex PCR を用いて10コピー/mgDNAの感度で、検出した。また、口腔内マイコプラズマ菌に関しては、感受性のある抗菌薬としてクラビット(レボフロキサシン)を服用させる群とさせない群に分け、マイコプラズマ DNA の検出頻度を比較する介入研究を2009年7月より実施した。以下にその概要を記載する。

介入研究テーマ: 口腔内常在マイコプラズマ菌が培養骨膜細胞及び口腔粘膜細胞に対する影響に関する研究

1. 研究背景

培養口腔粘膜を用いた角膜再生や口腔癌の術後再建、歯根膜細胞を用いた歯槽骨の再生など、口腔組織を用いた再生医療が注目されている。申請者らは新潟大学歯学総合病院細胞プロセッシング室において、「培養骨膜移植による歯周病治療」と「培養口腔粘膜

移植による口腔癌の術後再建」の臨床試験を開始している。

臨床導入以前に、患者歯肉下骨表面から採取した骨膜を用いた培養骨膜シートの作成と、口腔粘膜上皮細胞を用いた培養複合口腔粘膜を作成する予備培養を行い、培養前の採取組織と培養後検体のマイコプラズマ感染を確認した。その結果、培養前の採取組織に高率にマイコプラズマ(*M.salivarium*, *M.faucium*, *M. orale*)が感染していることが判明した。マイコプラズマ感染11例中4例は、増殖せず培養中止となった。一方、良好な増殖がみられた7例全例で培養後陰性化した。

2. 研究目的

①抗菌剤の服薬により採取する口腔組織からマイコプラズマ菌を除菌できるかどうかを調べる。

②口腔内常在マイコプラズマ菌由来の菌抗原が培養細胞に与える影響を調べる。

3. 研究概要

患者に同意を得て組織採取前4日間にニューキノロン系抗菌剤(レボフロキサシン)を服用する群と服用しない群に分け、培養細胞からの培養前後のマイコプラズマ菌の検出率を調べ、除菌効果を検討する。また、菌が検出された細胞とされなかった細胞の間で、増殖速度、生細胞率、サイトカイン産生を比較する。また、培養細胞を菌体由来リポタンパクで刺激し、細胞に与える影響の閾値を測定する。

4. 研究プロトコール

(1) マイコプラズマの除菌

広域ペニシリンやマクロライド系抗菌剤の投与は臨床試験によりプラークの沈着や歯肉炎

に有効であることが証明されているが、マイコプラズマの除菌効果はこれまでに報告がない。口腔内常在菌であるマイコプラズマ菌 (*M.salivarium*, *M.faucium*, *M. orale*) について感受性があるのは、ニューキノロン剤のみであるが、*in vivo* の効果については、不明である。40症例の患者を対象に無作為に以下の2群に割り付ける。

第一群: 組織採取前4日間前連日1日3回定刻にレボフロキサシン(クラビット)を1錠ずつ服用する。15例を目標とする。

第二群: 組織採取前の服用は実施しない。25例を目標とする。

症例数設定の根拠: 予備的検討から、*Mycoplasma* 菌の検出は培養前の組織から40-60%の陽性率である。25例をコントロール群に組み入れると、10-15例の陽性検体が見込める。リステリン含嗽の脱落率を20%と予測している。

(2) *Mycoplasma* の検出

培養前の組織の一部は東京医科歯科大学細胞治療センターへ送付し、*realtime PCR*、*nested PCR* 法による検出と一部定量を行う。

初代培養の最初の培地替えに際し、培養上清を-80度で保存する。この上清中の *Mycoplasma* 特異抗原を *Myco Alert* (Takara Bio 社製) を用いて検出する。

Mycoplasma 菌陽性の定義: *realtime PCR*、*nested PCR* ともに陽性の場合陽性とする。

研究期間: 平成21年3月1日—平成23年3月31日

目標症例数: 40例

症例登録期間: 平成21年3月15日—平成22年3月31日

研究デザイン: ランダム化比較対照試験(オープン試験)

主要評価項目: レボフロキサシン投与群と非投与群で *Mycoplasma* 菌の検出率

副次的評価項目:

① *real time PCR*, *nested PCR*, *Myco Alert* 法による検出率の相違

5. 期待できる成果

口腔内組織を用いた再生医療を行うにあたり、口腔内常在菌であるマイコプラズマの感染が組織培養に及ぼす影響を明らかにすることは重要である。細胞採取前のリステリン含嗽により、マイコプラズマの除菌が可能となれば、マイコプラズマ感染を考慮せずに組織培養を行えることになり、再生医療の進歩に大きく貢献するものと考えられる。

(倫理面への配慮)

本研究は新潟大学医歯学総合病院治験審査委員会、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えて施行した。

C. 研究結果

1. 培養骨膜、培養口腔粘膜細胞からDNAを抽出した被験者は、それぞれ50人、18人あり、各病原体の検出頻度は表1、2のとおりであった。全体的な特徴としては、培養前に検出頻度は、62検体中24検体(38.7%)と高頻度であったのに対し、培養後の細胞シートからは、58検体中5検体(8.6%)とほとんどの検体で培養中に病原体は消失していた。頻度が高いのは、*Mycoplasma sp.* で、*M. salivarium*, *M. faucium*, *M. orale* の3菌種に加えて、主として家畜に検出される *M. hyorhinis* が検出された。*M. hyorhinis* については、骨膜培養シートの培養前には検出されず、培養後に2回連続して検出されたことから、製造工程あるいは、検体

検査中の混入が疑われる。これを除くと *Mycoplasma* は培養後の検体からは検出されておらず、菌は培養中に排除されるか、あるいは最初から、死菌の DNA を検出していた可能性もある。

2. スクリーニングした14種のウイルス DNA については、Parvo virus, HBV, VZV, CMV, HHV6 が検出された。培養前も後も検出された検体は、Parvo virus- 1, HBV-1, HHV6- 1 であった。

注目すべきは、HBV であろう。これまで、ヒト骨膜細胞で HBV が増殖するという知見はなく、本当だとすれば、血液細胞や肝細胞以外にも HBV が潜伏し、増殖しうることになる。因みに本院では、血清の感染症スクリーニングにより、HBs 抗原陽性の患者は対象から除外している。HBV-DNA が陽性だった2検体の患者は、HBs 陰性であったが、HBs 抗体陰性であった。今後、このような患者検体をどのように扱うかは重要なポイントであろう。

表1 14種ウイルス DNA の検出結果

検査項目	結果		備考
	培養前 (62検 体)	培養後 (58検 体)	
HSV1	0	0	
HSV2	0	0	
VZV	1	0	検出限界以下
CMV	1	0	検出限界以下
BK virus	0	0	
JC virus	0	0	
Parvo virus B19	3	1	1)start : 8.9E+02/ μ gDNA、 end : 1.9E+02/ μ gDNA 2)start : 5.9E+05/ μ gDNA 3)start : 2.8E+04/ μ gDNA
EBV	2	0	1)5.3 \times 10copy/ugDNA 2)検出限界以下
HHV6	1	1	start : 3.50E +06 copy/ μ gDNA end : 1.60E +07 copy/ μ gDNA
HHV7	0	0	
HHV8	0	0	
HBV	2	1	start : 1.8E +02/ μ gDNA
ADV	0	0	
Mycoplasma	14	2 ^{注1}	<i>Mycoplasma</i> 同定結果参照

表2 Mycoplasma 同定結果

菌種	陽性検体数
<i>M.salivarium</i>	5
<i>M.faucium</i>	7
<i>M. orale</i>	1
<i>M. hyorhinitis</i> ^{#1}	2

注1:検出2回とも骨膜培養前からは検出されず、培養後の細胞シートから検出されている。肥育豚の呼吸器系や関節液から頻繁に分離される菌で、上記3菌種とことなり、口腔内の常在菌ではないことから、培養シート製造過程か、検査過程のDNA混入が疑われる。

3. レボフロキサシンによる採取骨膜の除菌効果について

試験は、終了しておらず、途中経過であるが、以下の結果を得ている。目標症例数 A 群25例、B 群 15 例で現在、A 群は21例実施、B 群は7例実施した。

A 群:骨膜採取日1週間前よりリスステリン含嗽＋ブラッシングの強化を実施

B 群:A 群の処置に加えて3日前の朝からレボフロキサシン100mg錠を1日3回、採取当日の朝まで服用

試験以前(2008. 8. 26まで)の結果

29検体中6検体陽性(いずれも培養前の検出結果)

A 群 21検体中 4検体陽性

B 群 7検体中 1検体陽性

χ^2 二乗検定で有意差は $p=0.77$ で有意とは言えない。

D. 考察

Mycoplasma については、培養後の検体は、ほとんどの検体で陰性で、DNA レベルで痕跡程度に検出されたのが *M. hyorhinitis* を除いて2検体あったが、マイコアラートでいずれも陰性であったため、生菌である可能性は低い。今

回培養後に検出された Parvo virus, HHV6, HBV については、移植を受けた患者の予後を追跡して行きたい。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shojima J, Tanaka G, Keicho N, Tamiya G, Ando S, Oka A, Inoue Y, Suzuki K, Sakatani M, Okada M, Kobayashi N, Toyota E, Kudo K, Kajiki A, Nagai H, Kurashima A, Oketani N, Hayakawa H, Takemura T, **Nakata K**, Ito H, Morita T, Matsushita I, Hijikata M, Sakurada S, Sasazuki T, Inoko H. Identification of MICA as a susceptibility gene for pulmonary Mycobacterium avium complex infection. *J Infect Dis.* 199: 1707-1715, 2009.

2. Uchida K, **Nakata K**, Suzuki T, Luisetti M, Watanabe Koch D, Stevens CA, Beck DC, Denson LA, Carey B, Keicho N, Krischer JP, Trapnell BC. GM-CSF Autoantibodies and Myeloid Cell Immune Functions in Healthy Individuals. *Blood.* 113: 2547-2556, 2009.

3. Hata M, Takahara S, Tsuzaki H, Ishii Y, **Nakata K**, Akagawa KS, Satoh K. Expression of Th2-skewed pathology mediators in monocyte-derived type 2 of dendritic cells (DC2). *Immunol Lett.* 126:29-36. 2009.

4. 田澤立之、中田 光:肺胞蛋白症 基礎から臨床まで、*呼吸と循環*、57: 1147-1154,2009.

5. Ishii H, Trapnell BC, Tazawa R, Inoue Y, Akira M, Kogure Y, Tomii K, Takada T, Hojo M, Ichiwata T, Goto H, **Nakata K**. Comparative study of high-resolution CT findings between autoimmune and secondary pulmonary alveolar proteinosis. *Chest*.136 : 1348-1355,2009.

6. Kawase T, Okuda K, Kogami H, Nakayama H, Nagata M, **Nakata K**, Yoshie H. Characterization of human cultured periosteal sheets expressing bone-forming potential: *in vitro* and *in vivo* animal studies. *J Tissue Eng Regen Med*. 3:218-219, 2009.

7. Tazawa R, Trapnell BC, Inoue Y, Arai T, Takada T, Nasuhara Y, Hizawa N, Kasahara Y, Tatsumi K, Hojo M, Ishii H, Yokoba M, Tanaka N, Yamaguchi E, Eda R, Tsuchihashi Y, Morimoto K, Akira M, Terada M, Otsuka J, Ebina M, Kaneko C, Nukiwa T, Krischer JP, Akazawa K, **Nakata K**. Inhaled granulocyte/macrophage-colony stimulating factor as therapy of pulmonary alveolar proteinosis. *Am. J. Respir. Med. Crit. Care.*: 181: 1345-1354, 2010.

8. Oda M , Toba K, Ozawa T, Kato K, Yanagawa Takao, 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.

9. 中田 光:病院における培養細胞治療のインフラ整備と課題 ザ・クインテッセンス 27:62-63

2. 学会発表 国内学会発表

1. 中田 光、瀧澤淳:口腔内骨膜を用いた組織培養におけるマイコプラズマ菌の検出、第7回日本再生医療学会総会、名古屋、2008年3月13日-14日

E. 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

平成 20～22 年度厚生労働科学研究・再生医療実用化研究事業
再生医療・細胞医療製剤に汎用可能な新規微量高感度品質管理・
安全性検証システムの開発と製剤の規格化に関する研究
総合研究報告書

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、骨膜シートの細胞異常や癌化の危険性の減少を意図した培養期間の短縮化や、凍結による最適な骨膜シート保存法を示した。

A. 研究目的

本研究の究極の目的は、自家培養骨膜シートを安全に移植し歯槽骨の再生につなげることである。そのために大別して以下の 3 つの研究目的をたて研究を遂行した。

1. 培養骨膜シートの異常をサイトカイン産生活性から検出する技術の開発
2. 細胞変異の可能性を最小限に抑えるための骨膜シート培養期間の短縮
3. 培養骨膜シートの病院間搬送に求められる凍結保存法の開発

B. 研究方法

1. サイトカインのモニタリング

予備実験として、通常の条件で培養した骨膜シートおよび骨芽細胞への分化誘導処理を施した骨膜シートが産生するサイトカインについて、ドナー別に 10 枚程度調査し共通となるプロファイルの特徴を把握した。つぎに本実験においては、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、②紫外線のなかでも組織・細胞に有害とされる UVC 照射、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。また、癌化することによって増加するであろう glucose 消費は培地中の glucose 量を定量することにより検証した。

2. 培養期間の短縮化

(1)増殖因子や PRP (platelet-rich plasma)をサプリメントとして培地に添加することにより骨膜細胞の増殖を促進させる方法と、(2)基材上で培養することにより骨膜シートの安定化と重層化を促進する方法について検討した。前者については、ヒト PRP のほか bFGF, TGF β 1, EGF, IGF-I などを添加濃度、時期、期間、組

み合わせなどの条件をかえ、骨膜シートの直径を増殖の指標として検討した。後者については、サケコラーゲンをコートした市販の ePTFE 製メッシュのほか、PLGA 製の GC メンブレン、研究協力者から提供された LCL フィルム、多孔質 PLLA 膜、キトサンスポンジなどについて、細胞重層化や ALP 活性を指標として検討した。また、DNA microarray による発現遺伝子の網羅的解析も実施した。

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. サイトカインのモニタリング

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. 培養期間の短縮化

培養開始初期に PRP を添加することは、そこに含まれる fibrin の効果もあって骨膜の接着を促進し、その結果細胞遊走を促進するという結果が得られた。しかし、同時に培地全体をゲル化しある程度の大きさに成長した骨膜シートを一塊として剥離させる危険性も増加させることから、細胞遊走が確認された時点で、bFGF 添加に切り替え、さらに培養期間終盤には dexamthasone などの分化誘導因子の添加に切り替えることによって、十分な大きさを持ち、かつ骨形成活性が亢進した骨膜シートを 3 週間程度で作製することが可能であることを証明した。一方、基材と組み合わせる方法に関しては、少なくとも $50\mu\text{m}$ 程度の気孔構造を有する基材については、特別な表面処理等を施す必要がなく骨膜の初期接着を改善できた。培養日数に関しても、初期接着を改善する基材の使用によって、有意に短縮化できた。また、コラーゲンなどの RGD モチーフを有するタンパクなどで表面をコーティングすることによって、骨膜の安定性はさらに向上させることが可能であり、またそのコラーゲンへの石灰化物沈着も促進されることから、「骨原生移植体」としてのインテリジェント化が副次的に可能となった。

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。また、これは重要な知見と思われるが、増殖活性を持たせてから凍結保存した骨膜は、解凍時に新鮮な骨膜片よりも圧倒的に早く成長し、移植に供することができる大きさにすることができた。

D. 考察

1. サイトカインのモニタリング

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. 培養期間の短縮化

現在継続中の無血清培地での骨膜培養試験において、市販の増殖因子をサプリメントとする合成培地のいくつかにおいて、骨膜の成長および細胞重層化が顕著に促進化されるというデータを得ている。すなわち、その増殖細胞の主体が幹細胞か未分化な骨芽細胞系細胞か同定するに至っていないが、増殖因子のカクテルを最適化することによって培養期間を短縮することができることが明確になった。通常培地の 20 倍以上のコストとその安全性など、解決さなければならぬ課題が残されている。

一方、基材については、その表面微細構造によって、増殖因子などのサプリメントの助けを得なくとも骨膜の安定化を通して細胞重層化

だけでなく骨形成活性の亢進なども可能であることを示すことができた。今後は、ここで得たデータをもとにさらに最適な基材開発を推進し、骨膜培養に際して増殖因子と最適条件で組み合わせることによって、増殖因子添加単独によるコスト上昇を有意に抑制できるものと期待する。

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. Yamamiya K, Okuda K, Kawase T, Wolff LF, **Yoshie H**. Tissue-engineered cultured periosteum used with platelet-rich plasma and hydroxyapatite in treating human osseous defects. *J Periodontol* 79:811-818, 2008.

2. Okuda K, Yamamiya K, Kawase T, Mizuno H, Ueda M, **Yoshie H**. Treatment of human infrabony periodontal defects by grafting human cultured periosteum sheets combined with platelet-rich plasma and porous hydroxyapatite granules: case series. *J Int Acad Periodontol* 11(3):206-213, 2009.

3. **吉江弘正**、奥田一博、川瀬知之.: 歯肉細胞シート・骨膜シートを用いた歯周再生治療. 日本口腔外科学会雑誌 55(9):432-439, 2009.

4. 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.

5. 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.

6. 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.(昨年の報告書にオンライン出版で記載あり)

2. 学会発表

1. 山宮かの子、奥田一博、**川瀬知之**、畠賢一郎、Larry F. Wolf、**吉江弘正**: 養骨膜シート + 多血小板血漿 + 多孔性ハイドロキシアパタイト顆粒の歯周骨内欠損に及ぼす効果—臨床比較研究: 12 か月予後、第 128 回日本歯科保存学会春季学術大会、2008 年 6 月 5 日-6 日、新潟

2. Kawase T, Okuda K, Kogami H, Nagata M, Nakata K, **Yoshie H**. Evidence to support the clinical application of cultured human periodontal sheets: Evaluation of its bone-forming potential. The 94th Annual Meeting of the American Academy of Periodontology. Sep.6-9,2008,Seattle,WA, USA.

3. **川瀬知之**、奥田一博、**小神浩幸**、永田昌毅、**吉江弘正**、児玉 亮: ゲン特殊コートした ePTFE メッシュを用いたヒト骨膜シートの 3 次元培養、第 51 回日本歯周病学会秋季学術大会、2008 年 10 月 18 日-19 日、四日

4. 奥田一博、山宮かの子、川瀬知之、畠賢一郎、**吉江弘正**: 培養骨膜シート + 多血小板血漿 + 多孔性ハイドロキシアパタイト顆粒の歯周骨内欠損に及ぼす効果—臨床比較研究: 1 年予後、第 21 回日本歯科医学会総会、2008 年 11 月 14 日-16 日、横浜

5. 布施一郎、川瀬知之、川嶋香代子、梶 昌美、小神晴美、瀧澤 淳、中田 光、奥田一博、**吉江弘正**: 診療室設置型簡易細胞プロセッシングキャビネット作成の試みと無菌環境に関する検証、第 8 回日本再生医療学会総会、2009 年 3 月 5 日-6 日、東京

6. **川瀬知之**、**中山 均**、**小神浩幸**、奥田一博、**吉江弘正**、ハイドロキシアパタイト多孔体を足場にした培養骨による異所性骨形成—非侵襲的近赤外蛍光イメージング評価法の可能性—、第 52 回日本歯周病学会春季学術大会、2009 年 5 月 14 日-16 日、岡山

7. Okuda K, **Yoshie H**, Kawase T, Kogami H, Nakayama H, Nagata M. The human cultured periosteal sheet for periodontal regeneration: A salmon collagen-coated mesh, a functional potent scaffold, to upregulate the osteogenic potential. The 95th Annual Meeting of the American Academy of Periodontology. Sep.12-15,2009,Boston,USA.

8. 永田昌毅、川瀬知之、吉江弘正、奥田一博、中田 光、高木律男:インプラント症例を対象とした培養自家骨膜による歯槽骨再生、第52回日本歯周病学会秋季学術大会、2009年10月11日、宮崎

9. 中山 均、川瀬知之、小神浩幸、奥田一博、吉江弘正:異所性骨形成モデルにおける NIR (近赤外線)検査の応用の試み、第9回日本再生医療学会、2010年3月18日-19日、広島

10.奥田一博、川瀬知之、山中克之、須田洋子、金子 正、小神浩幸、中山 均、永田昌毅、吉江弘正:ポリ乳酸カプロラクトン重合体フィルムのヒト骨膜シート培養・移植への応用、第9回日本再生医療学会、2010年3月18日-19日、広島

11.奥田一博、川瀬知之、小神浩幸、永田昌毅、吉江弘正:骨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

12.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.

13.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

14.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.

15.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.

16.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

17.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.

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ト	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	
加藤俊一	日本移植学会の倫理指針	高橋公太	腎移植のすべて	メジカルビュー社	東京	2009	506-509
加藤俊一	移植造血幹細胞のソース（骨髄移植・末梢血幹細胞移植・臍帯血移植について）		Annual Review2009 血液	中外医学社	東京	2009	28-35
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 6月刊 行予定	
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	
水谷哲也	「コロナウイルス」臨床ウイルス学必携			羊土社		2010	
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	
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	305-32
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	東京	2010	1883-1886