

201014009A

厚生労働科学研究費補助金

(医療技術実用化総合研究事業 (臨床研究基盤整備推進研究事業))

再生医療実用化を促進するセルプロセッシングセンター

運用のための人材育成プロジェクト

(H21- 臨研 (教育) - 一般 - 009)

平成22年度 研究成果報告書

研究代表者 前 川 平

平成23 (2011) 年5月

厚生労働科学研究費補助金

(医療技術実用化総合研究事業 (臨床研究基盤整備推進研究事業))

再生医療実用化を促進するセルプロセッシングセンター
運用のための人材育成プロジェクト
(H21・臨研 (教育) - 一般 - 009)

平成22年度 研究成果報告書

研究代表者 前 川 平
(京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部)

はじめに

移植に用いられるヒト由来の細胞や組織の調整や培養などは、GMP (Good Manufacturing Practice) に準拠した品質管理と製造管理を行い、安全性の確保と品質の維持に努めなければならない。そのためには専用の施設 (Cell Processing Center ; CPC) の設置が不可欠となるが、探索的臨床試験や第 I 相臨床試験などでは各開発段階に応じた基準を設け適切な運用を行うことが必要である。「ヒト幹細胞を用いる臨床指針」などのルール制定やCPC設立、その運用システムなどの基盤整備は着実に進んでいる。しかしながらCPCを実際に運用する、あるいはCPCを管理運営できる人材の教育システムは現在全く存在せず、個々の施設で独自のルールで教育訓練を行う、あるいはこれすらも行っていない施設すら存在するのが現状である。このことは高品質で安全なセルプロセッシングを要求される再生医療を推進する際の大きな足かせになっている。医薬品と同等の高品質なセルプロセッシングを達成するためにはGood Manufacturing Practice (GMP) はもちろんのことであるが、セルプロセッシングそのものも医療行為に直結するGood Clinical Practice (GCP) の知識を併せ持つ事が必要である。

本研究課題ではこれらの人材をどのようにして育成すれば良いか等について、京都大学医学部人間科学専攻の学部学生や大学院学生を教育対象として、細胞プロセッシングやGMP、品質管理に必要な種々の検査方法と信頼性を担保するためのバリデーション等に関する系統講義や、実習を実施することにより、具体的な教育システムのプロトタイプを示すことを目的とした。

本研究課題を通じて、わが国における細胞治療・再生治療開発を発展させてゆくためには、種々の規制やCPCに代表されるソフトやハードのシステムのみでなく、GMP準拠細胞プロセッシングを実施し、CPCを運用してゆく知識と経験をもった人材の育成が喫緊の課題であることを理解していただければと思われる。

本研究は平成21年度から3年間にわたり計画されているものであり、本報告書はその中間報告に相当すると考えられる。本報告書が関係者の参考になれば幸いである。

平成23年5月 主任研究者 前川 平

目 次

I. 研究組織	1
II. 総括研究報告	
前川 平	
「再生医療実用化を促進するセルプロセッシングセンター 運用のための人材育成プロジェクトに関する研究」	2
III. 分担研究報告	
1. 青山朋樹	
「間葉系幹細胞の搬送システム標準化のための研究」	8
2. 高桑徹也	
「関節軟骨最表面の組織学的研究」	12
3. 伊吹謙太郎	
「セルプロセッシングにおける微生物感染経路と品質管理に関する研究」	18
4. 笠井泰成	
「セルプロセッシングにおける人材育成と運営管理に関する研究」	21
5. 川真田伸	
「GMP,GCP 教育、CPC 運用教育・実習に関する研究」	24
IV. 細胞培養士育成学コース系講義プログラム関連資料	26
1. 細胞育成学連続講演会プログラム・講義風景	
2. 細胞育成学総論 資料	
3. 細胞育成学実践論 資料	
V. 研究成果の刊行に関する一覧表	
VI. 研究成果の刊行物・印刷物	

I. 研究組織

主任研究者

前川 平 (京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部 教授)

分担研究者

高桑 徹也 (京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻・教授)

青山 朋樹 (京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻・准教授)

伊吹 謙太郎 (京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻・准教授)

笠井 泰成 (京都大学医学部附属病院分子細胞治療センター・主任技師)

川真田 伸 (先端医療振興財団・先端医療センター研究所・グループリーダー)

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
総括研究報告書

再生医療実用化を促進するセルプロセッシングセンター運用のための
人材育成プロジェクトに関する研究

主任研究者 前川 平 京都大学医学部附属病院

研究要旨

再生医療や細胞治療の開発において、治療用細胞の品質を保証し患者の安全性を確保することは重要な項目である。そのためには、細胞（セル）プロセッシングを行う際の適切な管理が必要であり、細胞プロセッシングセンター(CPC、Cell Processing Center)における管理面や構造機能面での基準策定と作業に携わる人材の育成が不可欠である。平成 21 年度からの 2 年間、スーパー特区の利点を活用すべく、その援助を受けて本研究で実施した学内公開講座や実習では、参加した学部学生や大学院生だけでなく、関連する臨床研究開発者からも大きな反響が得られた。加えて、新しい医療技術の開発と共に、細胞や組織の品質評価に関わる新たな技術の開発も行った。平成 23 年度はさらに実習を充実させ、人材育成を進めていくために必要な環境の整備を行い、より充実した教育指導を実施したい。本研究は特定の CPC だけでなく、全国各地の細胞治療・再生治療開発を行う施設で活躍できる人材の育成を目指し、ひいてはわが国の先端的細胞治療・再生治療の開発に資すると思われる。

A: 研究目的

細胞治療とは、再生医療や遺伝子治療、細胞免疫療法などヒト由来の細胞や組織を利用して行われる治療方法の総称であり、Cell Processing Center（細胞プロセッシングセンター、以下 CPC）は、その細胞治療を実施する際に患者へ移植される細胞や組織の調製や加工を行うための専用の施設である。細胞を培養して増殖させたり、遺伝子導入を行ったりする、いわゆる **more than minimally manipulated** の範疇に属する細胞プロセッシングを行う場合、よく整備され管理された CPC を稼働させ運営することは必須の条件である。

わが国でも様々な細胞や iPS 細胞 (induced pluripotent stem cell) を利用し

た細胞治療の基礎研究が盛んに進められており、既に医療用具として承認を受けた再生医療製品もある。しかし、基礎研究の成果を速やかに臨床応用するためには、関連する法令の改訂やインフラストラクチャーの整備、そして CPC の管理や細胞プロセッシングを行える人材の育成など多くの課題が山積している。なかでも人材の育成は喫緊の課題である。

したがって本研究ではこれらの人材をどのようにして育成すれば良いか等について、京都大学医学部人間科学専攻の学部学生や大学院学生を教育対象として、細胞プロセッシングや GMP、品質管理に必要な種々の検査方法と信頼性を担保するためのバリデーション等に関する系統講義や、

実習を実施することにより、具体的な教育システムのプロトタイプを示すことを目的とした。

B：研究方法

セルプロセッシングを伴う再生医療は既に多くの領域で臨床応用が開始され、その有効性も報告されてきている。その安全性を担保するための「ヒト幹細胞を用いる臨床指針」などのルール制定やCPCの設立、その運用システムなどの基盤整備は着実に進んでいる。しかしながらCPCを実際に運用する、あるいはCPCを管理運営できる人材の教育システムはわが国には現在まったく存在せず、個々の施設で独自のルールで教育訓練を行う、あるいはこれすらも行っていない施設すら存在するのが現状である。このことは高品質で安全なセルプロセッシングを要求される再生医療を推進する際の大きな足かせになっている。医薬品と同等の高品質なセルプロセッシングを達成するためにはGood Manufacturing Practice(GMP)はもちろんのことであるが、セルプロセッシングそのものも医療行為に直結するGood Clinical Practice(GCP)の知識を併せ持つ必要がある。また、再生医療が発展するにあたり細胞調製施設と細胞治療施設が多施設にわたる可能性があり、細胞搬送をシステム化する必要があり、細胞搬送システムの構築も合わせて開発を試みた。

以上のことを鑑み、本研究課題では、従来医学、細胞生物学教育コースに加えて、GMPおよびGCP教育プログラムを通して、安全で高品質なセルプロセッシング作業に精通した、再生医療の現場で即戦力となる

人材を育成し、再生医療を推進・加速するために、以下のような研究方法を用いた。

- i) GMP および GCP に関する系統講義および実習の実施とその教材の作成
- ii) 治療用細胞の作製に不可欠である品質管理に必要な種々の検査方法の構築（マイコプラズマ検出検査、ウイルス検出検査、組織学的検査法等）とそのバリデーション方法の確立
- iii) 作製した治療用細胞製剤を無菌的に安全に搬送し、搬送途中の安全性を確保するため、医政発03330第2号に遵守した搬送システムを構築し、細胞搬送容器の開発に着手した。

C：研究結果

- i) 平成22年9月29日から平成23年1月19日まで計14回にわたる公開講座（細胞育成学連続講演会「細胞治療・再生治療開発への挑戦」）を開催し、GMPに準拠したCPCの運営管理や学内で実施されている臨床研究の詳細、についての講義、さらに臨床開発、治験の実施に必要な薬事に関する講義、加えて民間のベンチャー会社から再生医療製品の開発経緯の講義などが行われた。公開講座には、修士課程の学生だけでなく、学部生や学内の各研究室からも聴講者が参加した。また今年度からは、細胞培養やその品質管理に関する実習も実施し、8名の学生が参加した。
- ii) GMP に関しては、厚生労働省から出されている指針などを基準に、CPCの「施設基準」と「運用管理基準」の草案をそれぞれ策定した。現在、これらの草案に沿ってCPCの相互監査や自己点検が適

切に行えるシステムの構築について検討を進めており、最終年度である平成 23 年度における主要な研究テーマであると考えられる。

- iii) CPC の運営および治療用細胞の作製に関して品質と安全性が担保されているかどうかを検討するためには、CPC の相互査察が必要である。現在、京都大学には附属病院 CPC の分子細胞治療センター（CCMT, Center for Cell and Molecular Therapy）と iPS 細胞研究所 CPC の FiT(Facility for iPS Cell Therapy) が存在しており、まずこの両施設間での相互査察を手始めに、相互査察基準の作成に着手した。
- iv) マイコプラズマ検出検査に関して、PCR 法（ロッシュ）で得られた検査結果と日本薬局方で規定されている DNA 染色法でのマイコプラズマ検出結果を比較し、同等の検査であることを確認した。また、C 型肝炎ウイルス(HCV)の迅速かつ高感度な遺伝子検出系の構築を開発した。
- v) ヒト由来細胞の搬送を目的とした専用の容器の開発を開始した。移植用の組織や細胞を搬送する際には、組織や細胞の無菌性を担保し、一定の温度を保ちながら安全に輸送することが求められる。開発中の容器は、これらの機能を有する専用の搬送容器であり、無菌性試験や衝撃吸収試験なども実施し実用化に向け継続的に開発を進めている。

D：考察

- i) 平成 21 年度より開始した人材育成プロジェクトに関心を持つ学生や研究者の参加があった。平成 22 年度は実務に即

した実習を行い、GMP に準拠した CPC の管理運営の一部を実際に体験し、参加した学生からも多くの反響があった。次年度の平成 23 年度は講義や実習の内容に則した教材や資料などを充実させ、高いレベルでの細胞プロセッシングに特化した人材の育成を進めていきたい。

- ii) 再生医療や細胞治療に利用されるヒト由来の細胞や組織の品質を保証し安全性を担保するための CPC の施設基準や運用管理基準を設定する必要がある。我々はこのセルプロセッシングに特化した基準の草案を策定したが、この施設基準や運用基準の内容に沿って施設間で CPC の相互査察が実施できるような体制の構築する必要がある。
- iii) マイコプラズマ検査に関する簡易迅速法である PCR 法も日本薬局法で規定された DNA 染色法も等しく有効であることが証明できた。
- iv) 検討した HCV 遺伝子重検出系は迅速かつ高感度に HCV 遺伝子を増幅することおよび亜型の鑑別が可能であることが判明し、細胞治療に用いる細胞の品質管理上様々な微生物感染症に対する迅速かつ高感度検出系の確立は有用であると考えられる。
- v) 再生医療の促進のためには細胞調製施設および治療施設の安全性の担保が重要である。再生治療の開発が複数施設にわたる場合にはそれらの施設間をつなぐ搬送システムの安全性担保が必要であり、本研究で作製した搬送システムは新規のアイデアによるものである（特許出願中）。

E: 結論

再生医療や細胞治療において、その品質を保証し患者の安全性を確保することは最も重要なポイントであることは言うまでもない。そのためには、細胞プロセッシングを行う際の適切な管理が必要であり、CPC における管理面や構造機能面での基準策定と作業に携わる人材の育成が不可欠である。平成 21 年度からの 2 年間に学内で公開講座や実習を開催し、学生だけでなく関連する研究開発者からも大きな反響が得られた。また、新しい医療技術の開発と共に、細胞や組織の品質評価に関わる新たな技術の開発も不可欠である。平成 23 年度は、さらに実習を充実させるなど、人材育成を進めていくために必要な環境の整備を行い、より充実した教育指導を実施し、学内の CPC だけでなく、全国各地の細胞治療・再生治療開発を行う施設で活躍できる人材の育成を目指したい。

F: 健康危険情報

特記することなし。

G: 研究発表

1. 論文発表

1. Kawata E, Ashihara E, Nakagawa Y, Kiuchi T, Ogura M, Yao H, Sakai K, Tanaka R, Nagao R, Yokota A, Takeuchi M, Kimura S, Hirai H, Maekawa T: A combination of a DNA-chimera siRNA against PLK-1 and zoledronic acid suppresses the growth of malignant mesothelioma cells in vitro. *Cancer Lett* 294: 245-253, 2010.
2. Takeuchi M, Ashihara E, Yamazaki Y, Kimura S, Nakagawa Y, Tanaka R,

- Yao H, Nagao R, Hayashi Y, Hirai H, Maekawa T: Rakicidin A effectively induces apoptosis in hypoxia adapted Bcr-Abl positive leukemic cells. *Cancer Sci* 102 : 591-596, 2011.
3. Takeuchi M, Kimura S, Kuroda J, Ashihara E, Kawatani M, Osada H, Umezawa K, Yasui E, Imoto M, Tsuruo T, Yokota A, Tanaka T, Nagao R, Nakahata T, Fujiyama Y, Maekawa T: Glyoxalase-I induction during hypoxia adaptation in Bcr-Abl positive leukaemic cells. *Cell Death Diff* 17:1211-1220, 2010.
 4. Taniguchi K, Shimazaki C, Ochiai N, Maruya E, Akatsuka Y, Ashihara E, Maekawa T, Taniwaki M, Saji H: Modified ELISPOT assay may predict T-cell hyporesponsiveness to non-inherited maternal antigens. *Int J Lab Hematol*, 32(1PART.1):163-168,2010.
 5. Shoji T, Bando T, Fujinaga T, Chen F, Yurugi K, Maekawa T, Date H : ABO-incompatible living-donor lobar lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 30: 479-480, 2010.
 6. Ushiki T, Kizaka-Kondoh S, Ashihara E, Tanaka S, Masuko M, Hirai H, Kimura S, Aizawa Y, Maekawa T, Hiraoka M: Noninvasive tracking of donor cell homing by near-infrared fluorescence imaging shortly after bone marrow transplantation. *PLOS One*, 5:e11114, 1-12,2010.
 7. Sakai K, Kawata E, Ashihara E, Nakagawa Y, Yamauchi A, Yao Y, Nagao R, Tanaka R, Yokota A, Takeuchi T, Hirai H, Kimura S, Hirashima M, Yoshimura N, Maekawa T: Galectin-9 ameliorates acute Graft-versus-host disease through the

induction of T-cell apoptosis. *Eur J Immunol* 41:67-75, 2011.

8. Yamamoto A, Ashihara E, Nakagawa Y, Obayashi H, Ohta M, Hara H, Adachi T, Seno T, Kadoya M, Hamaguchi M, Ishino H, Kohno M, Maekawa T, Kawahito Y: Allograft inflammatory factor-1 is overexpressed and induces fibroblast chemotaxis in the skin of sclerodermatous GVHD in murine model.

Immunol Lett 135:144-150, 2011.

9. Tada N, Hinotsu S, Urushihara H, Kita, F, Kai S, Takahashi TA, Kato S, Takanashi M, Ito K, Sawai H, Maekawa T, Kosugi S, Kawakami K: The current status of umbilical cord blood collection in Japanese medical centers: survey of obstetricians.

Transfusion and Apheresis Science. (in press)

10. Kitawaki T, Kadowaki T, Fukunaga K, Kasai Y, Maekawa T, Ohmori K, Maekawa R, Takashige K, Nieda M, Yokokawa K, Itoh T, Shimizu A, Tada H, Kuzushima K, Ishikawa T, Uchiyama T: Phase I/IIa clinical trials of dendritic cell-based immunotherapy for acute myeloid leukemia in elderly patients using autologous apoptotic leukemic cells or a heteroclitic WT1 peptide as antigens.

Brit J Haematol. (in press)

11. Kitawaki T, Kadowaki N, Fukunaga K, Kasai Y, Maekawa T, Ohmori K, Itoh T, Shimizu A, Kuzushima K, Kondo T, Ishikawa T, Uchiyama T: Cross-priming of CD8(+) T cells in vivo by dendritic cells pulsed with autologous apoptotic leukemic cells in immunotherapy for elderly patients with acute myeloid leukemia. *Exp Hematol* 39 : 424-433, 2011.

12. Yamamichi J, Ojima T, Yurugi M, Iida M, Imamura T, Ashihara E, Kimura S, Maekawa T: Single-step, label-free quantification of antibody in human serum for clinical applications based on localized surface plasmon resonance. *Nanomedicine*, in press.

13. 村松裕子、木村晋也、一戸辰夫、芦原英司、石川隆之、前川 平、内山 卓：造血幹細胞移植における血縁ドナーのための専門外来。日本輸血・細胞治療学会雑誌 56(1):68-71, 2010.

14. 務中達也、叶井正樹、木村晋也、芦原英司、阿部浩久、庄司習一、前川 平：細胞解析チップ—生体内のがん細胞の挙動研究を目指して—。島津評論 66(3-4):141-149, 2010.

15. 芦原英司, 前川 平：悪性腫瘍に対する siRNA療法。

最新RNAと疾患研究2009. 第3章 RNA研究から臨床へ. 中村義一 編.

メディカルドゥ, 大阪: pp139-146, 2010.

2. 学会発表

1. 万木紀美子、芦原英司、菱田理恵、丹羽紀実、平位秀世、前川 平：骨髄移植 後、ドナー由来のHLA抗体により血小板輸血不能となった一例。第58回日本輸血・細胞治療学会総会（名古屋）平成22年5月 28日（2010）

2. 江川裕人、万木紀美子、菱田理恵、丹羽紀実、竹川良子、渡邊珠緒、辻博昭、平位秀世、芦原英司、前川 平、吉澤 淳、上本伸二：術前抗ドナー感作の問題点：肝移植とHLA抗体の臨床的意義。パネルディスカッション2「移植医療とHLA抗体／輸血療法。PD2-1」

第58回日本輸血・細胞治療学会総会（名古屋） 平成22年5月 28日（2010）

3. 前川 平：京都大学における生体肝移植時の輸血療法. パネルディスカッション 2「移植医療とHLA抗体／輸血療法. PD2-3」
第58回日本輸血・細胞治療学会総会（名古屋） 平成22年5月 28日（2010）

4. 藤原晴美、竹下明裕、渡邊弘子、押田眞知子、友田 豊、万木紀美子、星 順 隆、高橋孝喜、前川 平、大戸 斉：大学病院輸血部技師の教育への関与と重要性.
第58回日本輸血・細胞治療学会総会（名古屋） 平成22年5月 30日（2010）

H：知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得（分担研究者 青山朋樹ほか）
PCT/JP2009/003478：生体由来物用搬送装置

出願日：2009年7月23日出願公開

公開番号：W02010/013419

公開日：2010年2月14日

日本国出願番号

2010-522603

米国への移行提出済み

2. 実用新案特許

なし

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題：間葉系幹細胞の搬送システム標準化のための研究

分担研究者 青山朋樹 京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻 准教授

研究要旨

間葉系幹細胞は最も臨床応用が進んでいる体性幹細胞のひとつである。今後再生医療が発展、促進される際には細胞調製施設と細胞治療施設が複数にわたる事が想定され、そのためのシステム構築が必要である。本研究では細胞調製施設から細胞治療施設への細胞搬送システムを構築し、安全に再生医療が実施されるための技術基盤を構築する事を実施した。

A：研究目的

間葉系幹細胞は体性幹細胞の中で臨床応用が最も進んでいる幹細胞の一つである。今後再生医療が発展するにあたり細胞調製施設と細胞治療施設が多施設にわたる可能性があり、細胞搬送をシステム化する必要がある。本研究では細胞搬送システムを構築することを目的としている。

B：研究方法

医政発03330第2号に遵守した搬送システムを構築するために、細胞搬送容器の開発を行った。

また京都大学iPS細胞研究所から医学部附属病院へと細胞搬送するシステムを作成した。

C：研究結果

医政発0330第2号における「搬送」に求められる条件として温度、気圧、無菌性のバリデーションがあるが、これらの条件に関するバリデーション実験を行い、全

ての条件を満たす搬送容器の開発に成功した。

また「搬送」の体制について京都大学iPS細胞研究所から医学部附属病院への細胞搬送をシュミレーションし、搬送時間管理、搬送体制、教育体制に沿ったプロトコールを作成した。今後実際に細胞を用いた検証実験を行う予定である。

D：考察

再生医療の促進のためには細胞調製施設および治療施設の安全性の担保が極めて重要である。これらが複数施設にわたる場合にはそれらの施設間をつなぐ搬送システムの安全性担保が必要である。これまでも物流業界では再生医療における搬送システム構築に取り組んできたが、今回のシステム作成は医政発03330第2号に遵守した新しいものであるといえる。

E：結論

細胞搬送システムの構築を行い、その最

も基礎となる搬送容器のバリデーション
を行い、有効であることが示された。

F：健康危険情報

なし

G：研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. 論文発表

1. Ito K, Aoyama T, Fukiage K, Otsuka S, Furu M, Jin Y, Nasu A, Ueda M, Kasai Y, Ashihara E, Kimura S, Maekawa T, Kobayashi A, Yoshida S, Niwa H, Otsuka T, Nakamura T, Toguchida J: A novel method to isolate mesenchymal stem cells from bone marrow in a closed system using a device made by non-woven fabric. *Tissue Eng Part C Methods*. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010 Feb;16(1):81-91.
2. Jin Y, Kato T, Furu M, Nasu A, Kajita Y, Mitsui H, Ueda M, Aoyama T, Nakayama T, Nakamura T, Toguchida J: Mesenchymal stem cells cultured under hypoxia escape from senescence via down-regulation of p16 and extracellular signal regulated kinase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Jan 15;391(3):1471-6.
3. Jin Y, Shima Y, Furu M, Aoyama T, Nakamata T, Nakayama T, Nakamura T, Toguchida J: Absence of Oncogenic Mutations of RAS Family Genes in Soft Tissue Sarcomas of 100 Japanese Patients. *Anticancer Res*. 2010 Jan;30(1):245-51.
4. Aoyama T, Okamoto T, Fukiage K, Otsuka S, Furu M, Ito K, Jin Y, Ueda M, Nagayama S, Nakayama T, Nakamura T, Toguchida J: Histone modifiers, YY1 and p300, regulate the expression of cartilage-specific gene, chondromodulin-I, in mesenchymal stem cells. *J Biol Chem*. 2010 Sep24 ; 285 (39) : 29842-50.
5. 中村孝志 (分担執筆: 青山朋樹). 臨床医学の展望 整形外科学 日本医事新報 4478:78-79, 2010.
6. 青山朋樹 変形性股関節症に対する再生治療. *Medical Rehabilitation* 123:65-9, 2010.
7. 青山朋樹、笠井泰成、上田路子、前川 平、中村孝志、戸口田淳也. 大腿骨頭無腐性壊死症に対する自己骨髄間葉系幹細胞を用いた臨床試験：細胞調製の安全性管理体制に関して. *再生医療* 9 : 25-31, 2010.
9. Ota M, Neo M, Aoyama T, Ishizaki T, Fujibayashi S, Takemoto M, Nakayama T, Nakamura T.: Impact of the O-C2 angle on the oropharyngeal space in normal subjects. *Spine*. 2010 In Press.
10. Yamada M, Tanaka B, Nagai K, Aoyama T, Ichihashi N.: Trail-Walking Exercise and Fall Risk Factors in Community-Dwelling Older Adults: Preliminary Results of a Randomized Controlled Trial. *J Am*

GeriatrSoc.2010 Oct;58(10):1946-51.

11. Yamada M, Tanaka H, Mori S, Nagai K, Uemura K, Tanaka B, Aoyama T, Ichihashi N.: Fallers choose an early transfer gaze strategy during obstacle avoidance under dual-task condition. Aging Clin Exp Res. 2010, Sep 9. [Epub ahead of print]
12. Yamada M, Aoyama T, Tanaka B, Nagai K, Ichihashi N.: Seated stepping exercise under a dual-task condition improves ambulatory function with a secondary task: a randomized controlled trial. Aging Clin Exp Res. 2010 Oct 27. [Epub ahead of print]
13. Yamada M, Aoyama T, Arai H, Nagai K, Tanaka B, Uemura K, Mori S, Ichihashi N.: Dual-task walk is a reliable predictor of falls in robust elderly adults. J Am Geriatr Soc. 2011 Jan;59(1):163-4.

2. 学会発表

1. 青山朋樹、前川平、中村孝志、戸口田淳也。骨髄間葉系幹細胞を用いた骨壊死の治療。第1回 京大病院 iPS 細胞・再生医学研究会。2010. 1. 15. 京都市
2. 青山朋樹、中村孝志、戸口田淳也。間葉系幹細胞を用いた臨床応用（シンポジウム）。第9回 日本再生医療学会総会。2010. 3. 18-19. 広島市
3. 青山朋樹。再生医療を促進する基盤作り—人材育成と機器開発—。第1回 TRC 定例報告会。2010. 3. 27. 京都市
4. 青山朋樹、戸口田淳也。PGE2 受容体特異的作動薬を用いた関節軟骨再生。シンポジウム 第28回日本骨代謝学会学術集会。2010. 7. 21-23. 東京都
5. 青山朋樹、戸口田淳也。間葉系幹細胞を用いた難治性骨壊死疾患に対する臨床試験。第17回 組織工学・再生医学ワークショップ。2010. 9. 18. 神戸市
6. 青山朋樹、中村孝志、前川平、戸口田淳也。間葉系幹細胞を用いた骨壊死治療。第25回 日本整形外科学会基礎学術集会。パネルディスカッション 2010. 10. 14. 京都市
7. 三井裕人、青山朋樹、布留守敏、伊藤錦哉、笠原崇、早川和男、小林恭介、丸山隆幸、金治敏也、杉原光、藤村心成、大塚隆信、中村孝志、戸口田淳也。ウサギ変形性膝関節症モデルを用いたプロスタグランジン E2 EP2 受容体特異的作動薬の検証。第25回 日本整形外科学会基礎学術集会。2010. 10. 14. 京都市
8. 那須輝、加藤友久、玉置さくら、早川和男、三井裕人、青山朋樹、大塚隆信、中村孝志、戸口田淳也。同一ドナーの異なる組織から樹立した iPS 細胞の比較検討。第25回 日本整形外科学会基礎学術集会。2010. 10. 15. 京都市
9. 青山朋樹、中村孝志、前川平、戸口田淳也。難治性骨壊死疾患に対する間葉系幹細胞を用いた臨床試験。第31回 日本臨床薬理学会年会。2010. 12. 1. 京都市
10. 田中武一、山田実、永井宏達、青山朋樹。高齢者の年齢別による歩行変動～65-98歳までの地域在住高齢者270名を対象とした横断研究～。第12回

日本健康支援学会. 2011. 2. 18-20. 福岡市

11. 永井宏達、山田実、青山朋樹、坪山直生、田中武一. 二重課題に着目した新たなポピュレーションアプローチ「Step+」の開発. 第12回日本健康支援学会. 2011. 2. 18-20. 福岡市
12. 山田実、青山朋樹、永井宏達、田中武一. 1年間のレジスタンストレーニングの筋量及び身体機能に対する改善効果～虚弱高齢者と非虚弱高齢者のトレーナビリティの比較～. 第12回日本健康支援学会. 2011. 2. 18-20. 福岡市

H: 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

PCT/JP2009/003478: 生体由来物用搬送装置

出願日: 2009年7月23日出願公開

公開番号: W02010/013419

公開日: 2010年2月14日

日本国出願番号

2010-522603

米国への移行提出済み

2. 実用新案特許

なし

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題：関節軟骨最表面の組織学的研究

分担研究者 高桑徹也 京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻 教授

研究要旨

軟骨は関節を形成する大切な組織で、その損傷や変性は痛み、可動域の低下、関節の拘縮などを引き起こし、日常生活に大きな影響をもたらす。高齢化がすすみ、関節痛を煩う人口は増加しており有効な治療法が望まれている。この軟骨損傷や変性に対する治療法として軟骨再生がある。本研究では、その基础研究として、これまであまり着目されていない関節軟骨の最表層について、光学顕微鏡及び透過型電子顕微鏡を用いて、構造と構成成分を組織学的に検討した。PAS染色、bestのカルミン染色及び collagen typeIII、fibronectinの免疫染色施行し光学顕微鏡を用いて観察したところ、染色パターンから、関節軟骨最表層には、それらの成分を含む少なくとも2つ以上の層状構造が存在することが考えられた。一方、電子顕微鏡では、最表層には高輝度層が観察された。光学顕微鏡でみられた層構造と電子顕微鏡でみられた高輝度層との異同を知るために、collagen typeIII、fibronectinについての免疫電顕等により、詳細にその分布領域を調べる必要があと考えられた。血管の存在しない軟骨組織において、最表層に期待される機能のひとつに半透過膜的機能が考えられる、腎基底膜では半透過膜的機能の存在がよく知られたおり、今後は、両者を比較する形で、collagen typeIVや laminin、nidogen、perlecanの軟骨最表層での局在や分布を検討していく予定である。

A: 研究目的

関節軟骨はその基質にII型コラーゲンやヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸などのプロテオグリカン豊富に含み、これらの物質と水分とから与えられる潤滑性は身体の運動において重要な役割を担っている[1]。関節軟骨は一般的にその形態学的特徴から表層・中層・深層の3層に分類されているが、1951年、MacConnailらによつて、関節腔に面した最表面に表層とは異なる特徴を有した層がさらに存在することが指摘された。



Fig.1 膝蓋面

1995年 Teshimaらは、ヒトの関節軟骨最表層は光学顕微鏡下で4-8 μ m程の厚さであり、方向性をもったコラーゲン細線維が独立した膜様構造をとって下層とゆるく結合したものであることを示した[2]。しかしながら、最表層を構成する基質成分や機能に関しては未だ解明されていない。本研究では、光学顕微鏡及び透過型電子顕微鏡を用いて、関節軟骨の最表層について、その構造と構成成分を組織学的な面から検討した。

B: 研究方法

ウサギおよびブタの膝関節軟骨を本研究では用いた。

I. 光学顕微鏡観察

ウサギ膝関節軟骨パラフィン標本、ブタ膝関節軟骨凍結標本に特殊染色(PAS染色、bestのカルミン染色)、免疫染色(collagen

typeI, collagen typeIII, fibronectin)を施し評価を行った[3, 4]。

◆組織標本の準備

ウサギ正常膝関節パラフィン標本は研究室所有のものから、膝蓋面の標本10個体分を用いた。ブタ膝関節凍結標本では、生後6カ月、屠殺後3日のブタ4個体の正常膝関節膝蓋面(Fig.1)から5mm径の関節軟骨プラグを採取した。組織片はPBS洗浄後、軟骨下骨を切除してOCT包埋剤で包埋した。液体窒素を用いて凍結させ、非脱灰・非固定の凍結標本を作成した。

PAS 染色、bestのカルミン染色切片は6 μ m厚に薄切した。凍結切片はカルノア液を用いて後固定し、乾燥させた。PAS 染色は0.5%過ヨウ素酸水溶液で5分間反応後、Shiff試薬(15分間)、亜硫酸水(3分×3回)で発色させた。核染にはヘマトキシリンを用いた。bestのカルミン染色の操作は、病理組織染色ハンドブックのプロトコルに従った[5]。ポジティブコントロールとしてラットの肝臓及び腎臓から凍結標本を作製し、同様に染色した。

◆免疫染色-パラフィン標本

切片は6 μ m厚で薄切した。脱パラフィン、PBS洗浄後、0.3% H_2O_2 溶液を用いて内因性ペルオキシダーゼ処理を行った。6.25mg/ml hyaluronidase を40分間反応させ抗原賦活化、2% goat serumで60分間ブロッキング処理した。一次抗体として抗-collagen typeI, collagen typeIII、IgG(第一ファインケミカル)、細胞質fibronectin (cFn)(clone DH1 (BIOHIT))は、1:100で希釈して4 $^{\circ}$ C、一晚反応させた。二次抗体(ビオチン付加抗-mice IgG(H+L)(VECTOR))を1:100で30分反応させた後、増幅反応をVecterstain ABC kit (VECTOR)、発色反応を

ImmPACT DAB Peroxidase Substrate Kit (VECTOR)を用いて行った。核染はヘマトキシリンで行った。一次抗体反応を行わなかった切片をネガティブコントロールとした。

◆免疫染色-凍結標本

切片はクリオスタットを用いて $6\mu\text{m}$ 厚に薄切した後、4%PFA溶液を用いて後固定し、乾燥させた。PBS 洗浄後、3.0%H₂O₂溶液を用いて内因性ペルオキシダーゼ処理を行った。6.25mg/ml hyaluronidase を30分間反応させ抗原賦活化、5% goat serumを用いて4°C、一晚ブロッキング処理した。

前述した抗collagen type I, collagen type III, fibronectin 抗体をそれぞれ1:200、1:100、1:100に希釈して4°C、一晚反応させた。二次抗体を1:150で30分間反応させ、以後の増幅反応・発色操作はパラフィン切片染色時と同様に行った。

II. 電子顕微鏡観察

2個体の生後6カ月、屠殺後3日のブタ正常膝関節内側顆から5mm径の関節軟骨プラグを採取した。組織片はPBS洗浄後、2%グルタルアルデヒド及び4%PFAを含む固定液を滴下しながら氷上で1-2mm角に細切した。細切した組織片を固定液に浸し4°C、一晚前固定した。0.1Mシヨ糖加0.1M PBを用いて洗浄後、1%オスミウム酸後固定、脱水、エポキシ樹脂包埋を、自動包埋機を用いて行った。ウルトラミクロトームを用いて準超薄切で観察部位を特定した後、ダイヤモンドナイフで組織を70-90nm厚に超薄切した。酢酸ウラニルと鉛の二重染色を施し、透過型電子顕微鏡で観察した。

C: 研究結果

I. 光学顕微鏡観察

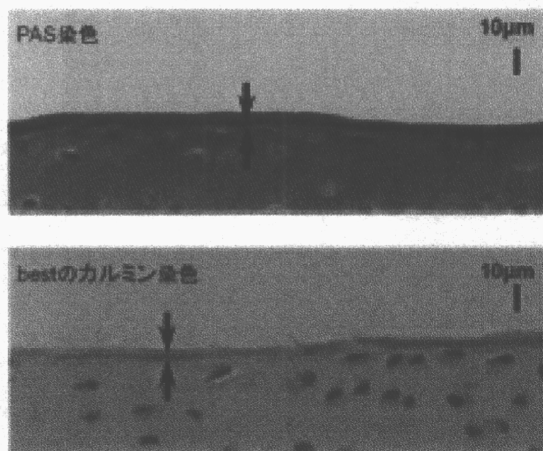


Fig.2 PAS 染色、best のカルミン染色
矢印は濃染される陽性部位を示す

PAS染色では、軟骨基質全体が赤紫色に染まり陽性を示すが、関節最表面から数 μm 程度の領域が帯状に強い陽性となった。その帯状陽性領域は二層に区別され、下層領域は特に染色性が強く、ライン状の陽性部位下層領域は特に染色性が強く、ライン状の陽性部位が観察された (Fig.2)。

bestのカルミン染色では軟骨基質はごく淡い赤色に染色されたが、関節最表面から数 μm ほどの部位に、赤色に染色されたライン状の陽性部位が観察された。また、PAS染色とは異なり陽性部位より関節面側の領域では赤色の陽性反応はみられなかった (Fig.2)。免疫染色で、collagen type Iは関節最表面から表層に及ぶ範囲まで、比較的広く分布が見られた。collagen type IIIでは、関節最表面から数 μm ほどの部位にライン状の陽性部位が観察された。Fibronectinでも、collagen type IIIと同様の染色パターンが得られた (Fig.3)。

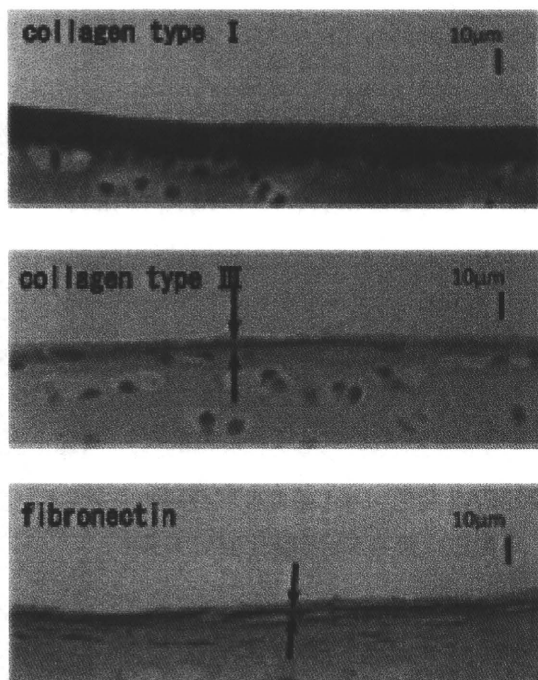


Fig.3 免疫染色

矢印は濃染される陽性部位を示す

II. 電子顕微鏡観察

電子顕微鏡観察ではいくつかの層構造が観察できた。関節最表面には電子密度が濃い黒色層、一般的にsurface coatや、surface laminaと呼ばれる層が存在する(Fig.4 A,B)[6,7]。

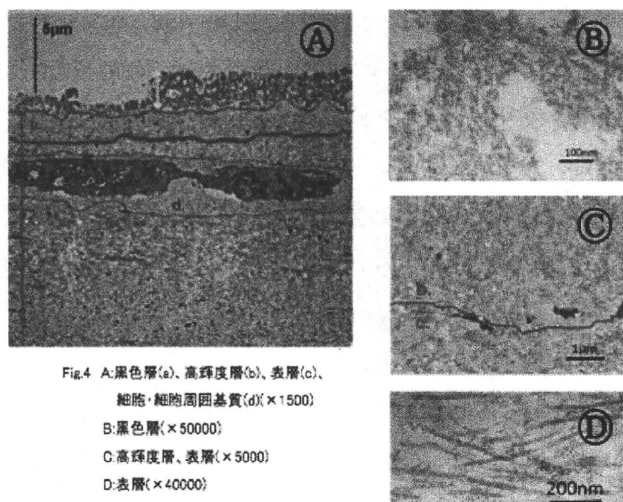


Fig.4 A:黒色層(a)、高輝度層(b)、表層(c)、
細胞・細胞周囲基質(d)(×1500)
B:黒色層(×50000)
C:高輝度層、表層(×5000)
D:表層(×40000)

その下には高輝度に観察される層が存在

する(Fig.4 A)。この高輝度層は細い線維性物質を多く含んでいることが観察された(Fig.4 C)。軟骨基質を構成する太いコラーゲン線維はそれ以下の層で観察された。表層ではコラーゲン線維は関節面に水平方向となるように方向性をもって存在している(Fig.4 A,D)。以上のことから、最表層は黒色層と高輝度層の2層の層構造によって構成されていることが示唆された。

D: 考察

PAS染色、bestのカルミン染色及び collagen type III、fibronectinの免疫染色で観察された染色パターンから、関節軟骨最表面には、それらの成分を含む少なくとも2つ以上の層状構造が存在することが考えられる。これらの層構造は、電子顕微鏡で観察された高輝度層との相違性が次の検討課題になる。collagen type III、fibronectinについては、今後より詳細にその分布領域を調べる必要があると考えられる。また、今研究により、関節軟骨最表層の構成成分はPAS染色陽性であることが明らかとなった。PAS染色陽性となる生体内部位として基底膜がよく知られている。血管の存在しない軟骨組織において、最表層に期待される生理機能のひとつに半透過膜的機能がある。基底膜が半透過膜的機能をもつことは腎基底膜で明らかにされている。また、関節軟骨の表層部位に基底膜の構成成分である collagen type IVや laminin, nidogen, perlecan が存在していることが報告されており[8]、関節軟骨の表層部位は、基底膜と同様の構造、生理学的機能を持つ可能性もある。つまり、最表層は、滑液から選択的に軟骨細胞へ栄養・情報伝達を行い、軟骨代謝のバランス維持に重要な役割を果たしている

可能性である。これらの物質の最表層での局在や分布はまだ示されておらず、今後検討していく価値がある。今後、これらのごことを検討していく方向性として以下の3つが考えられる。

生化学的検討:軟骨最表面が物理的に剥離できることを利用して、剥離した組織から構成成分を生化学的に解析し、半透過膜機能に關与するタンパク質や糖鎖の存在を検討する。

組織学的検討:免疫電顕で電子顕微鏡下で目的の物質の局在を知ることが可能である。これは構成成分の構造や機能への影響を検討する上で重要な情報であると考えられる。

細胞生物学的検討:最表層には軟骨細胞は存在しないため、表層に存在する細胞が最表層の基質を産生している可能性がある。そこで、表層の細胞を採取して初代培養を行いその細胞特性を解析する。

E: 結論

光学顕微鏡及び透過型電子顕微鏡を用いて関節軟骨の最表層について、その構造と構成成分を組織学的な面から検討した。関節軟骨最表面には、少なくとも2つ以上の層状構造が存在することが考えられた。軟骨最表層は、腎基底膜にみられるような半透過膜的機能が考えられる。基底膜の構成成分である collagen typeIV や laminin、nidogen、perlecan の軟骨最表層での局在や分布を今後検討していく予定である。

参考文献

1. 妻木範行 他: 軟骨分化と軟骨細胞: 骨と軟骨のバイオロジー: 金原出版: 2002
2. Teshima R et al.: Structure of the most

superficial layer of articular cartilage: J Bone Joint Surg Br: 1995: 77-B: 460-4

3. Teshima R et al.: Immunohistochemical collagen analysis of the most superficial layer in adult articular cartilage: J Orthop Sci: 2004: 9: 270-273

4. Nishida K et al.: Immunohistochemical demonstration of fibronectin in the most superficial layer of normal rabbit articular cartilage: Ann Rheum Dis: 1995: 54: 995-998

5. 高橋清之 他: 病理組織染色ハンドブック: 医学書院: 1999: p.32

6. Orford C. R. et al: Ultrastructural histochemistry of the surface lamina of normal articular cartilage: Histochemical Journal: 1985: 17: 223-233

7. Weiss C et al.: An ultrastructural study of normal young adult human articular cartilage: J Bone Joint Surg Am: 1968: 50: 663-674

8. Alexander J. Kvist et al.: The major basement membrane components localize to the chondrocyte pericellular matrix- A cartilage basement membrane equivalent?: Matrix Biology: 2008: 27: 22-33

F: 健康危険情報

なし

G: 研究発表

1. 論文発表

1. Tsuruyama T et al, MLV integration induces the formation of transcription factor complexes on palindromic sequences in the Stat5a gene during the development of pre-B lymphomagenesis, Am J Pathol, in press

2. 塩田浩平、山田重人、土屋真衣子、中島 崇、高桑徹也、他; マイクロイメージング法を用