

## 無菌試験B

○BacT/ALERT 3D微生物培養システム及び寒天平板表面塗抹法を併用する。

○使用する培地の有効期限を確認し、有効なものを用いること。

(BacT/ALERT 専用ボトルの場合、培養終了予定日が、表示されている月の最終日を越えないものを用いる。平板培地は試験実施日が、使用期限内のものを用いる)

○平板培地は1回の試験につき未開封の培地各1包 (10枚) を使用する。

### (1) BacT/ALERT 専用培養ボトルへのサンプル播種

最終培地交換前サンプル(IV-1)および交換後サンプル(IV-2)を無菌試験A 手順 (1) と同様に培養ボトルに播種する。

(ただし1検体につきボトル3本に播種し(n=3)、ボトル名はIV-1a, IV-1b, IV-1c, IV-2a, IV-2b, IV-2cとする)

### (2) BacT/ALERT機器への設置、培養

無菌試験A 手順 (2) に従いボトルを機器に設置する。

(設置した翌日に培養中のボトルから培養液を一部採取し、平板培地に播種する)

### (3) 培養中のボトルの取り出し、平板培地播種

使用する平板培地は当日まで冷蔵庫に保管し、使用時に室温に戻す。(結露を解消するため、試験実施1時間程度前に包装を外して安全キャビネット内で静置する)

1サンプルにつき各培地3枚ずつ(n=3)、計 6 枚を使用する。

1. 安全キャビネット内に以下のものを準備する。
  - ・ 20 mLシリンジ
  - ・ 21 G注射針
  - ・ サインペン又はシール
  - ・ 15 mLチューブ
  - ・ トリプケースソイ寒天培地 6枚
  - ・ サブロー寒天培地 6枚
2. シャーレのフタにボトル名、日付、培地の種類を記載する。
3. 無菌試験A 手順（3）に従い、前日にBacT/ALERT機器に設置したボトルの培養状況を確認する。
4. IV-1の3本の内、取り出すボトルを1本選び(例: IV-1 c)、セル位置の確認をする。ラックを引き出し、選んだボトルを1本引き抜く。
5. ラックを閉める。
6. 取り出したボトルの周囲をエタノールでよく清拭した後、安全キャビネット内に入れる。
7. ボトルをよく振り、口のゴム部分をエタノールで清拭する。
8. 注射針を装着したシリンジで、ボトル内溶液を約 9 mL引き抜く。（かなり力が必要）
9. 内容液を15 mLチューブに回収する。チューブにはサンプル名を明記する。
10. 取り出したボトルはゴム部分を清拭し、BacT/ALERT機器の元のセルに戻す。他のボトルと共に残り 6 日間培養し、機器による判定を行う。
11. IV-2ボトルについても同様に（3）3～11）を繰り返す。
12. 回収した内容液は大きな浮遊物（活性炭など）を除くため、遠心する。（500×g、3 分間）。チューブをクリーンベンチ内へ持ち込む際には、エタノールで清拭する。
13. 平板培地への播種作業前に、作業用ゴム手袋を滅菌手袋に交換する。
14. 内容液の上清を 5 mLピペットを用いて 3 mL 吸引し、重ねた平板培地 3 枚に1 mL / plate滴下し、シャーレのフタを閉めてすぐに傾け、内容液を広げる。作業中の汚染を防ぐため、一度に播種する平板培地は 3 枚までとする。
15. 同様の操作を繰り返し1サンプルあたり 6 枚、合計 12 枚すべての培地に播種する。
16. 培地はフタをしたまましばらく安全キャビネット内に静置し、内容液を培地に染み込ませる。（すぐにインキュベータに入れる場合は、結露がない事を確認する）
17. 培地表面が乾燥した事を確認し、裏返して（フタが下になるようにして）重ね、インキュベータで7日間培養する。
  - ・ トリプケースソイ寒天培地 30℃

- ・ サブロー寒天培地 25℃

#### (4) 最終試験の判定(搬出日)

##### 4-1. 搬出前判定

平板培地播種後2日目か3日目が搬出日になるので、搬出日の朝に判定を行う。

1. 平板培地は蓋をしたまま観察する。
  - ・ すべての培地にコロニーが認められない時、陰性と判定する。
  - ・ 平板培地はいずれかの培地にコロニーが1つ以上認められた場合、陽性が疑われるため、要再試験と判断する。
2. 培養ボトルは平板培地播種に用いなかった2本について判定を行う。無菌試験A(4)に従い、ボトルグラフの目視による確認を行う。
  - ・ グラフの上昇が認められない場合、陰性と判定する。
  - ・ グラフの上昇が認められた場合、陽性が疑われるため、要再試験と判断する。
3. 平板培地の結果と培養ボトルの結果を合わせて搬出前判定を行う。
  - ・ すべて陰性の判定が出たとき、当該間葉系幹細胞を陰性と判定する。
  - ・ いずれか1つ以上で陽性が疑われるものがある場合は、品質管理責任者は各責任者に報告し、対応を協議する。

##### 4-2. 最終試験(搬出前)の陽性判定時の処置

陽性と判定した場合、当該間葉系幹細胞を不適合品とし、各責任者と担当医師で対応を協議する。

#### 4-3. 搬出準備

1. 品質管理責任者の指示を得て、BacT/ALERTのボトルグラフをプリントアウトする（培養ボトルはそのまま培養を続行する）。平板培地はTriplicateの内、1セット（4枚）をインキュベータから取り出す。残りの培地については最終判定日までそのまま培養を続行する。
2. 取り出した培地とプリントしたボトルグラフを担当医師に見せ、結果を説明する。

#### 4-4. 最終試験の再試験および再判定

品質管理責任者から指示があった場合、再試験を行う。

再試験前には試薬の使用期限、操作マニュアルのチェックおよび試験機器の稼動状況のチェックを行う。

1. 再試験のためのサンプルを培養担当者より受け取り、手順（1）～（3）に従いボトルへの播種および平板培地播種を行う。
2. 手順4-1に従い最終判定を行う。
  - ・ 再試験ですべて陰性の判定が出た場合は、最終試験を陰性と判断する（試験終了）。
  - ・ 再試験でもどれか1つ以上陽性が疑われるものがある場合は、搬出前判定と同様に関係者で協議を行う。

#### （5）. 陽性判定時の処置

陽性と判定した場合、当該間葉系幹細胞を不適合品とし、各責任者と担当医師で対応を協議する。

#### （6）引渡し後の最終試験判定

製品引渡し後も培養を続けていた平板培地および培養ボトルについて、平板培地の培養7日目に最終判定を行うこととする（培養ボトルは培養8日目にあたる）。

手順（4）と同様に、判定と処理を行う。

- ・ 引渡し後の判定ですべて陰性の判定が出た場合は、最終試験を適合とする。

・ 引渡し後の判定でどれか 1 つ以上で陽性が疑われる場合、搬出前判定と同様に関係者で協議を行う。

#### (7) 平板培地の写真撮影

1. BacT/ALERT のボトルグラフをプリントアウトする。平板培地 (8 枚) はインキュベータから取り出して、写真撮影を行う。
2. 培養 7 日目に判定を行った後の平板培地をデスクに並べる。(種類ごとに並べて 8 枚全てが 1 枚の写真に収まるようにする)
3. シャーレのフタを取りデジタルカメラで上から撮影する。

#### マイコプラズマ否定試験

○市販 の“Venor GeM Mycoplasma Detection Kit for conventional PCR” (minerva biolabs, 一段 PCR 法) を用いる。

○使用する市販の試薬、キットは、全てロット番号と使用期限を確認する。作業はすべてゴム手袋を着用して行う。

#### (1) DNA回収

細胞溶解および DNA 抽出には PUREGENE Cell and Tissue DNA Isolation Kit (QIAGEN) を用いる。

1. 培養担当者より検体細胞培養プレート (6 well) を受け取る。
2. プレートから上清を除去し、Cell Lysis solution 300  $\mu$ l ずつ 2 well に添加する。
3. セルスクレーパーで細胞を掻きとり、ピペッティングによりしっかりと懸濁する。1.5 ml チューブ 2 本に分けて回収し (1 well 分/tube)、1 本を DNA 抽出用として以下に用いる。残りの 1 本は再試験に備えるため、試験結果の確認および判定が終わるまで冷蔵庫で保管する。
4. RNase A solution 1.5  $\mu$ l を添加し、よく混合した後、37°C、30 min インキュベートする。
5. 室温に戻した後、Protein PPT Solution 100  $\mu$ l を添加する。
6. 白濁するまで激しく vortex する。

7. 15,000 rpm、3 min、4℃にて遠心し、上清を新しい 1.5 ml チューブに移す。
  8. 2-propanol 300  $\mu$ l を加え、ゆっくりと約 50 回転倒混和する。DNA が見えてくることを確認する。
  9. 15,000 rpm、3 min、4℃にて遠心を行う。
  10. ペレットを確認しながら上清を除去し、70%エタノール 300  $\mu$ l を添加する。
  11. 15,000 rpm、1 min、4℃にて遠心を行う。
  12. 上清を全て除去する。
  13. ペレットを乾燥させる。
  14. 注射用水 15 - 30  $\mu$ l に溶解し、DNA サンプルとする。溶解する注射用水量は、ペレットの大きさと判断する。
- 以下に使用する水は全て同一ロットの注射用水とする。

## (2) DNA 定量

1. 測定の 30 分前に吸光光度計のスイッチを入れる。
2. 吸光値測定用サンプル (DNA サンプル 10 倍希釈液) を用意する。(DNA サンプル 2  $\mu$ l + 注射用水 18  $\mu$ l)
3. パソコンを立ち上げ Genespec-III(DNA)を起動させ、プリンタの電源を入れる。
4. 測定条件を入力する。
5. [編集]→
  - [測定条件編集] ・波長範囲：上限 300 nm、下限 220 nm
  - ・光路長：5mm
  - ・積算回数：32
  - [核酸条件編集] ・計算モード：dsDNA
  - ・希釈率：10
6. 10  $\mu$ l 測定用セルを注射用水で洗う。
7. セルに注射用水 10  $\mu$ l を入れてベースラインを測定する。
8. ベースラインが決定したら測定用 サンプルを 10  $\mu$ l 入れて測定する。
9. 複数のサンプルを測定するときはサンプルごとにシートを替える。
10. シートにサンプル名(検体 ID、培養時期)、コメント(試験担当者名)を入力する。
11. [保存]→[一括ファイル保存]で全てのシートを 1つのファイルとして保存する。
12. 波形をプリントアウトし、記録用紙の所定の欄に貼り付ける。
13. Genespec-IIIを終了し、吸光光度計の電源を切る。
14. 測定用サンプルを捨て、使用したセルは miliQ 水で洗浄して所定の位置に戻す。

### (3) 上清サンプルの準備

1. 冷蔵庫から最終検査用培養上清を取り出す。
2. 安全キャビネット内で、少量を クライオチューブに分注する。
3. 実験台で 0.2 ml チューブに 50  $\mu$ l を分注する。
4. PCR 機で 95°C、5 min 加熱し、5 秒間スピンドウンする。
5. Sample A として以下に用いる。

### (4) PCR

PCR には以下のキットを用いる。

- Venor GeM Mycoplasma detection kit for conventional PCR (minerva biolabs)
- Ampdirect Plus (島津製作所)
- Nova Taq Hot Start DNA Polymerase (EMD Biosciences)

1. DNA 定量で得られたデータに基づき、DNA サンプルを 100 ng/ $\mu$ l になるように注射用水で希釈し、Sample B として以下に用いる。
2. 冷凍保存の Venor GeM PCR キットのケースから、Ampdirect Plus (Buffer)、PCR grade water、Primer/Nucleotide Mix 及び Internal control DNA を取り出し、解凍する。
3. 8 連チューブを用意し、検体 ID と日付を記入する。
4. 下表に従い 1.5 ml チューブに (必要サンプル数+1) サンプル分の PCR Mixture を調整する。

	1 サンプル 分	6 サンプルで 試験を行う場 合
Ampdirect Plus	12.5 $\mu$ l	87.5 $\mu$ l
PCR grade water	4.87 $\mu$ l	34 $\mu$ l
Primer/Nucleotide Mix	2.5 $\mu$ l	17.5 $\mu$ l
Nova Taq *	0.13 $\mu$ l	1 $\mu$ l

合計	20 $\mu$ l	140 $\mu$ l
----	------------	-------------

\* Nova Taq (酵素)は混合直前まで冷凍庫で保管し、使用後は直ちに冷凍庫に戻す。

- よく混合した後、8 連チューブに 20  $\mu$ l ずつ添加する。
- 下記の表にしたがって Sample, Internal control DNA, Extra H<sub>2</sub>O (注射用水)を加える。
- \*添加時、内容液がチューブ外面に付着しないように注意する。交差汚染を防ぐため、残りのサンプル、試薬類は確実にキャップをして片付ける。マイコプラズマ DNA はコントロールとして使用しない。

Tube No.	1	2	3	4	5	6
Sample name	Negative control	Positive control	Sample A (培養上清)	3 + Internal control	Sample B (細胞 DNA)	5 + Internal control
PCR mixture	20	20	20	20	20	20
Sample	-	-	2.5	2.5	2.5	2.5
Internal Control DNA	-	2.5	-	2.5	-	2.5
Extra H <sub>2</sub> O	5	-	2.5	-	2.5	-
Total	25	25	25	25	25	25

- キャップを確実に閉めて混合し、スピンドウンする。
- 以下の条件で PCR を行う。

#### Thermal Profile

1 cycle	95°C for 10 min
39 cycles	94°C for 30 sec
	55°C for 30 sec
	72°C for 30 sec
cool down	15°C for $\infty$

\*最終の保持温度は PCR 機の結露を防ぐため 15°Cとする。

- PCR が終了したら、PCR 産物は電気泳動を行うまで冷蔵庫で保存する。

#### (5) 電気泳動

- 以下の通り、サンプルを 2% agarose gel にロードし 100 V、1xTAE で 30 分程度泳動する。

Lane M . 100 bp Ladder Marker



Lane 1. Negative control

Lane 2. Positive control

Lane 3. Sample A

Lane 4. Sample A + Internal control

Lane 5. Sample B

Lane 6. Sample B + Internal control

2. EtBr で染色して UV 照射下で写真を撮る。

#### (6) 結果の確認

1. 電気泳動写真を見て、以下の試験成立基準を確認する。これら全てが満たされていない場合は試験が成立していないと判断し、PCR をやり直す。いずれの場合も、非特異的増幅、プライマーダイマーによるバンドは無視する。

- Lane 1 にバンドが認められない
- Lane 2 に 1 本 (191 bp 付近) のバンドが認められる。
- Lane 4, 6 に 1 本 (191 bp 付近) のバンドが認められる。

(lane 3, 5 で標的のバンド (265-278 bp) が認められた時は、この基準を満たさなくてよい)

\* 191 bp・・・Internal control DNA 増幅産物サイズ

○Lane2, 4, 6 にバンドが認められない場合は、サンプルに反応阻害物質が含まれている可能性があるので、当該サンプルを希釈して PCR をやり直す。培養上清サンプルは 5 倍に希釈し、加熱処理を行う。

○再測定の前には試薬の有効期限、操作手順及び試験機器の点検・校正状況の再確認を行う。PCR をやり直しても基準を満たさない場合は試験不成立として、品質管理責任者に状況を報告する。

## (7) 判定

手順(6)で基準を満たしたサンプルについて、以下の判定を行う。

試験に使用した機器に間違いはないか、点検・校正有効期限内であるか、試薬の品名・量・有効期限に問題はないかを確認の上、判定を行う。いずれの場合も、非特異的増幅、プライマーダイマーによるバンドは無視する。

- ・ Lane 3, 5 のいずれにもバンドが認められない場合、陰性と判断する。
- ・ Lane 3, 5 のいずれかで 265 – 278 bp 間にバンドが認められる場合、陽性と判断する。

## (8) 再試験および再判定

### 再試験 A

陽性または擬陽性の判定が出た場合は、品質管理責任者の指示を受け、以下の手順で再試験 A-1 および A-2 を行う。

#### 8 – 1.再試験 A-1 および A-2

1. 本試験で用いた DNA サンプルおよび上清サンプルを希釈し直した上で、手順(4)に従い PCR を行う (A-1)。
2. 手順(3)で保管しておいた細胞懸濁液を用いて再度サンプルを調製し、手順(4)に従い PCR を行う (A-2)。
3. 手順(6)、(7)に従い、A-1 および A-2 の判定を行う。
  - ・ どちらも陰性の場合、最終判定を陰性とする。
  - ・ どちらか、または両方で陽性の場合、状況を品質管理責任者に報告する。

### 再試験 B

再試験 A でも陽性または擬陽性の判定が出た場合は凍結保存細胞を融解し、以下の手順で再試験 B-1 および B-2 を行う。

## 8-2. 参考品からのサンプリング

1. 凍結保存しておいた細胞の参考品を 1 本 ( $5 \times 10^5$  cells/ml, 500  $\mu$ l) 融解する。
2. 融解した細胞懸濁液のうち、200  $\mu$ l は培地で洗浄した後、6 well plate の 1 well に播種し、培養を行い、再試験 B-2 (手順 8-4) に用いる。
3. 残りの 300  $\mu$ l の細胞懸濁液を用いて再試験 B-1 (手順 8-3) を行う。

## 8-3. 再試験 B-1

- 1 手順 8-2 で採取した細胞懸濁液 300  $\mu$ l から DNA を抽出、精製して、手順 (4) に従い PCR を行う。
- 2 再試験前には試薬の使用期限、操作マニュアルのチェックおよび試験機器の稼動状況のチェックを行う。
- 3 手順 (6)、(7) に従い判定を行う。
  - ・ 陰性の場合は手順 8-4 に進んで再試験を続行する。
  - ・ 陽性反応が認められた場合は当該間葉系幹細胞を不適合品とし、状況を品質管理責任者に報告する。

## 8-4. 再試験 B-2

再試験 B-2 には手順 8-2 で培養を開始した参考品の細胞および再サンプリングした間葉系幹細胞の培養上清の計 2 サンプルを用いて試験を行う。

1. 製造管理責任者に報告の上、培養担当者に上清の再サンプリングを依頼する。
2. 2 回の培地交換を経た参考品の培養細胞を用いて、5-1 からの方法に従い DNA サンプルを作製する。
3. 手順 (4) に従い PCR を行う。再試験前には試薬の使用期限、操作マニュアルのチェックおよび試験機器の稼動状況のチェックを行う。
4. 手順 (6)、(7) に従い判定を行う。
  - ・ 陰性の場合、最終判定を陰性とする。ただし、再試験 B による判定であることを品質管理責任者に報告する。
  - ・ 陽性反応が認められた場合は当該間葉系幹細胞を不適合品とし、状況を品質管理責任者に報告する。

(9) .陽性判定時の処置

陽性と判定した場合、当該間葉系幹細胞を不適合品とし、各責任者と担当医師で対応を協議する。

分担研究報告書

**重症低ホスファターゼ症に対する骨髄移植併用同種間葉系幹細胞移植  
- 骨形成能の研究 -**

**研究分担者 大串 始（産業技術総合研究所健康工学研究部門 招聘研究員）**

**研究要旨**

低ホスファターゼ症患者に対する同種間葉系幹細胞の移植前の骨形成能の確認をおこなうとともに、移植後の患者のレントゲン像から四肢の骨端線部分での石灰化が確認できた。以上より、本疾患患者に対する同種幹細胞移植の有用性が示唆された。

**A. 研究目的**

低ホスファターゼ症患者は骨を作るのに必要なALPが生まれつき正常に働かないことにより、骨を作ることが障害される遺伝性疾患である。本計画では骨形成障害を改善するために、同種の間葉系幹細胞を患者に移植して骨形成能を付与することにある。しかし、その為には用いる間葉系幹細胞自身が骨形成能を有することと、同種間葉系幹細胞が移植後に

において骨形成能を示すことが重要である。以上の点をふまえて、分担研究者大串は、移植前の間葉系幹細胞の骨形成能と移植後における患者の骨形成を検討し、本研究の有用性を骨形成解析という側面から検討することを目的とする。

**B. 研究方法**

同種間葉系幹細胞(MSC)の移植前の骨形成能の検討においては、培養

条件下に増殖されたMSCを骨分化因子を含んでいる培地、もしくはコントロールとして分化因子を含まない培地で培養し、顕微鏡観察、ALP活性ならびにミネラル量（カルセインの蛍光強度）を測定した。

MSC移植後の患者の骨形成に関しては、島根大学に出張し、実際の患者のレントゲン像により検討をおこなった。

以下に移植前の同種MSCの骨形成解析方法の実際を記載する。

・MSCを基礎培地に浮遊し  $2 \times 10^4$  cells/1.5mL/well で 12well plate に播種する。

(この時の濃度は  $5000 \text{ cells/cm}^2$  となる)

・播種翌日（又は細胞接着後）、6 well を基礎培地に添加因子 3 種をそれぞれ 100 分の 1 ずつ加えた誘導培地（Dex(+)）に交換する。（コントロールとして残りの 6 well は  $\beta$ -GP のみ加えた培地（Dex(-)）に交換する。）

・Dex(+), Dex(-)各 6 well のうち、5 well に Calcein を 100 分の 1 加える。

・添加因子を加えた培地で週 2-3 回培地交換をおこない、2 週間培養する。

・イメージアナライザー（タイフーン）で蛍光強度を測定し、石灰化基質の定量を行う。

・DNA buffer を 0.5mL ずつ各 well へ添加し、細胞を回収する。

・回収した細胞を超音波破碎する。

・DNA 量を定量する。

・ALP 活性を測定する。

・DNA 1 $\mu$ g あたりの ALP 活性を計算する。

基礎培地：15%FBS/ $\alpha$ MEM (抗生物質+)

添加因子

・ $\beta$ -GP： $\beta$ -Glycerophosphate disodium salt (CALBIOCHEM: 35675)

作成法  $\beta$ -GP を精製水に 1M となるように溶解→ろ過滅菌

・Vit.C：L-アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム塩化水和物 (Wako: 013-12061)

作成法 Vit.C を PBS に 2.05mg/mL となるように溶解→ろ過滅菌

・Dex：Dexamethasone (SIGMA: D-8893)

作成法 1mg 入りの瓶に 1mL のエタノールを添加→24mL の PBS を添加→PBS でさらに 10 倍希釈→ろ過滅菌

・ Calcein (3,3'-Bis [N,N-bis (carboxyethyl) -aminomethyl fluorecein] : (Dojin:344-00431) 作成法 Calcein を PBS に 0.1mg/mL となるように溶解→ろ過滅菌

・ DNA Buffer : 100mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA[pH 7.4]溶液

#### (倫理面への配慮)

移植されうる同種MSCを用いての骨形成能の解析については、本計画提案時の研究計画ならびに患者(家族)への説明文章にかかっている。さらに、患者に対しての移植後のレントゲン撮影等についても同様に記載され、倫理面での問題は無い。

### C. 研究結果

今回の患者(症例1)のMSCを上記の

方法により骨分化因子を添加して培養するも、石灰化は見られなかった。移植に用いられる同種MSCは図1のように骨分化因子を添加しないと石灰化はみられなかったが、添加することにより図2のように同種MSCは骨芽細胞へ分化して褐色の石灰化物の沈着を示した。

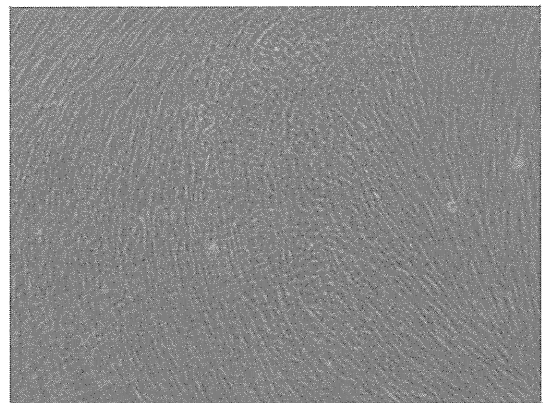


図 1 MSC 培養 (骨分化因子-)

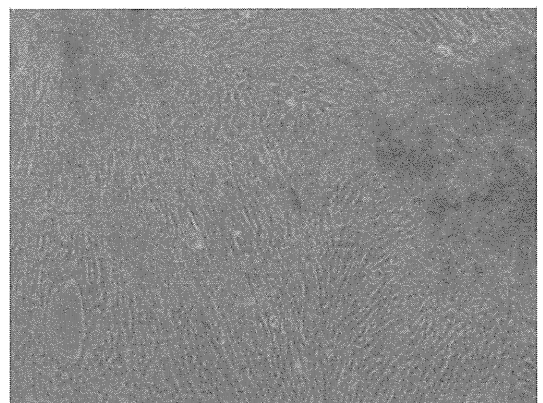


図 2 MSC 培養 (骨分化因子+)

以上のように、患者 MSC は骨分化因子を添加しても石灰化がみられなかったが、移植された同種 MSC は石灰化をしめた。なお、石灰化が生じない機序として、骨分化因子を添加しても患者 MSC は ALP 活性が低いことが考えられる。

そこで、骨分化因子を添加あるいは非添加で ALP 活性ならびにミネラルの沈着量の定量をおこなった。図 3、4 にみられるように、同種 MSC では骨分化因子の存在のもとに高い ALP 活性とミネラルの沈着をおこした。しかし、患者 MSC の ALP 活性とミネラル量は非常に低値のままであった。

なお、今回用いた同種の MSC は患者の両親からの MSC であり、保因者（ヘテロ）でもある。その為、健常人の MSC に比較して骨分化の差異を考慮する必要があり、今回の結果においては健常人のデータも入れた。図 3、4 にみられるように、同種 MSC は ALP 活性ならびにミネラル沈着は健常人に比較して

少し低値を示すも、明らかな有意差は無いとおもわれた。しかし、用いた同種 MSC の症例数が少なく、来年度においても症例数をふやして同様の研究をおこない健常人との比較をする必要がある。

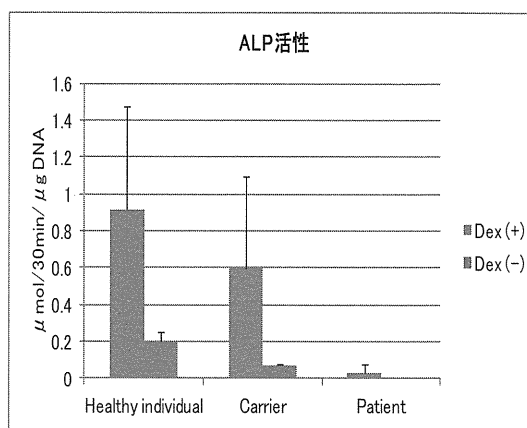


図 3 ALP 活性

骨分化因子(Dex)添加(+)あるいは非添加(-)



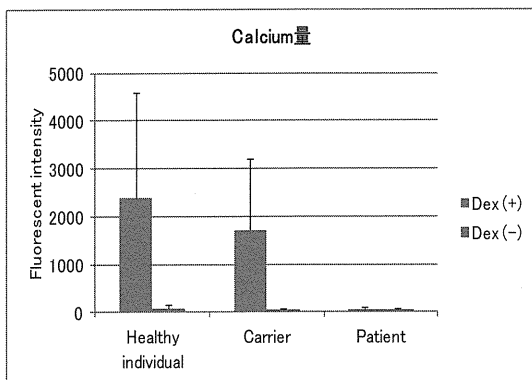


図 4 ミネラル量

骨分化因子(Dex)添加(+)あるいは非添加(-)

移植前の患者のレントゲン (図 5) と移植後のレントゲン像 (図 6) を比較したところ、移植前には上腕ならびに下肢の関節部分においてくる病様の変化 (赤丸) がみられたが、移植後においては図 5, 6 にみられるように、関節近くの骨端線に移植前にみられなかった石灰化 (赤丸) がみられ、移植による骨形成の促進が示唆された。

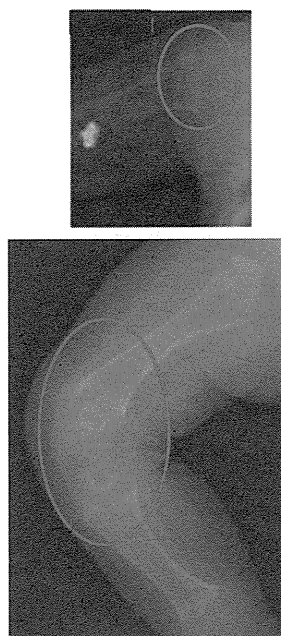


図 5 症例 1 の骨髄・MSC 移植前の XP

上図は上肢、下図は下肢の XP

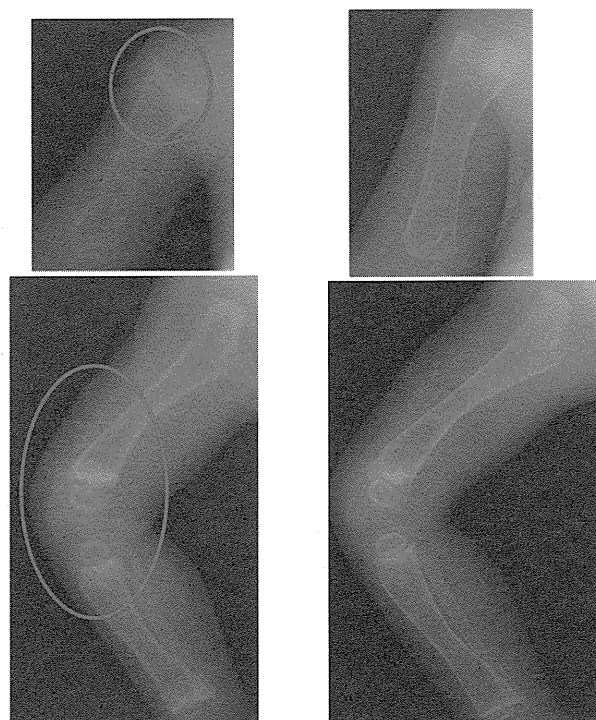


図 6 症例 1 の骨髄・MSC 移植後の XP

左図は移植後 4 ヶ月、右図は 10 ヶ月

上図は上肢、下図は下肢の XP

#### D. 考察

今年度の研究において、骨形成の検討方法の確認ならびにその有用性が実証でき、用いる同種MSCの骨形成能の評価ができた。しかし、今年度では用いた同種MSCの症例数が少なかった。来年度においても症例数をふやして同様の研究をおこない、用いる同種のMSCが有意差をもって健常人と同等の骨形成能を有するかの比較をおこなう必要がある。

#### E. 結論

移植に用いた同種MSCは培養研究により、骨分化能を有し石灰化と引き起こすことが確認できた。また、移植された患者のレントゲン像から患者の骨形成能が高まっていることも類推できた。以上の骨形成解析から同種MSCを

もちいての本疾患治療の有用性がしめされたと思われるが、症例数が少なく来年度においては例数をふやして引きつづきの解析を必要とする。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Ohnishi H, Oda Y, **Ohgushi H**. Human Mesenchymal Stem Cells and iPS Cells (Preparation Methods) "Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells: Lineage-Specific Differentiation Protocols", Chapter14. Springer Protocols Handbook, 2011
2. Kato T, Hattori K, Deguchi T, Katsube Y, Matsumoto T, **Ohgushi H**, Numabe Y. Osteogenic potential of rat stromal cells derived from periodontal ligament. J Tissue Eng Regen Med.

10:798-805, 2011

3. Yokoi M, Hattori K, Narikawa K, **Ohgushi H**, Tadokoro M, Hoshi K, Takato T, Myoui A, Nanno K, Kato Y, Kanawa M, Sugawara K, Kobo T, Ushida T. Feasibility and limitations of the round robin test for assessment of in vitro chondrogenesis evaluation protocol in a tissue-engineered medical product. *J Tissue Eng Regen Med*. 2011 Aug 2. doi: 10.1002/term.460.
4. Ohnishi H, Oda Y, Aoki T, Tadokoro M, Katsube Y, **Ohgushi H**, Hattori K, Yuba S. A comparative study of induced pluripotent stem cells generated from frozen, stocked bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2011 Jun 27. doi: 10.1002/term.428.
5. Tadokoro M, Matsushima A, Kotobuki N, Hirose M, Kimura Y, Tabata Y, Hattori K, **Ohgushi H**. Bone morphogenetic protein-2 in biodegradable gelatin and  $\beta$ -tricalcium phosphate sponges enhances the in vivo bone-forming capability of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2011 May 5. doi: 10.1002/term.427.
6. Saito S, Morita K, Kohara A, Masui T, Sasao M, **Ohgushi H**, Hirano T. Use of BAC array CGH for evaluation of chromosomal stability of clinically used

human mesenchymal stem cells and of cancer cell lines. *Hum Cell*. 24:2-8, 2011

7. Oliveira JM, Sousa RA, Malafaya PB, Silva SS, Kotobuki N, Hirose M, **Ohgushi H**, Mano JF, Reis RL. In vivo study of dendronlike nanoparticles for stem cells "tune-up": from nano to tissues. *Nanomedicine*. 7: 914-924, 2011
8. Tohma Y, Dohi Y, **Ohgushi H**, Tadokoro M, Akahane M, Tanaka Y. Osteogenic activity of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) seeded on irradiated allogenic bone. *J Tissue Eng Regen Med*. 2011 Feb 15. doi: 10.1002/term.401.
9. Kato T, Hattori K, Deguchi T, Katsube Y, Matsumoto T, **Ohgushi H**, Numabe Y. Osteogenic potential of rat stromal cells derived from periodontal ligament. *J Tissue Eng Regen Med*. 2011 Jan 12.
10. Hagiwara Y, Hattori K, Aoki T, **Ohgushi H**, Ito H. Autofluorescence assessment of extracellular matrices of a cartilage-like tissue construct using a fluorescent image analyser. *J Tissue Eng Regen Med*. 5:163-8, 2011
11. Matsumoto T, Hattori K, Matsushima A, Tadokoro M, Yagyuu T, Kodama M, Sato J, **Ohgushi H**. Osteogenic potential of mesenchymal stem cells on expanded polytetrafluoroethylene coated with both a poly-amino-acid urethane copolymer and

collagen. Tissue Eng Part A. 17:171-180, 2011

12. Wakitani S, Okabe T, Horibe S, Mitsuoka T, Saito M, Koyama T, Nawata M, Tensho K, Kato H, Uematsu K, Kuroda R, Kurosaka M, Yoshiya S, Hattori K,

**Ohgushi H.** Safety of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for cartilage repair in 41 patients with 45 joints followed for up to 11 years and 5 months. J Tissue Eng Regen Med. 5:146-150, 2011

13. 大串始 骨・関節の再生医療リハビリテーション医学 49号 6頁～7頁、2011

14. 大串始 ナノテクノロジー・材料分野 科学技術・研究開発の国際比較 2011年版、62-63頁、2011

15. 大串始、有馬靖佳、竹谷健 間葉系幹細胞研究（臨床研究からみた同種間葉系幹細胞移植）日本臨床（平成23年12月号 特集：幹細胞治療）Vol. 69, 2121-2127, 2011

16. 大串始 骨再生医療 あいみつく Vol. 32, 49-53, 2011

## 2. 学会発表

1. 大串始 第13回なにわ整形外科研究会 「整形外科における再生医療

2. 大串始 大阪市立大学重点研究「バイオインターフェース先端マテリアルの創生」第一回シンポジウム；バイオマテリアル上での幹細胞の増殖と分化

3. 大串始 第17回青森県骨軟骨シンポジウム「骨・関節の再生テクノロジー一体性幹細胞を用いての臨床から iPS細胞まで）」

4. 大串始 第29回骨代謝学会 meet the expert 骨再生医療の現況と展望

5. 大串始 第57回教育ゼミナール講演（骨粗鬆症財団主催）幹細胞を用いた骨再生医療

6. 大串始 技術情報協会主催 「実用化に向けた骨・関節領域における再生医療の現況と展望」研修会（12/21 招待