

討においては異なる組成の物を使用している(後述). 軟骨分化誘導培地を用い7日間培養を行った後, 別に用意した細胞を 5×10^4 cells/cm²に調整し, 上から播種し積層化した. 2層目を播種後, 1層目と同様に2日間は10% FBS(GIBCO), 1% Antibiotic Antimycotic Solution (SIGMA)を添加した D-MEM/F-12 medium (SIGMA)で培養を行い, その後軟骨分化誘導培地を用いて5日間培養を行った. この操作をもう一度繰り返し, 計3層に重層化した. なお, 細胞の培養はすべて, 気相条件を37°C, CO₂濃度5%に設定したインキュベーター内で行った.

5. 医薬品を用いた軟骨分化誘導培地の検討

前述の積層化により軟骨分化誘導をかけるに当たり, research useのものではなく, 臨床応用を念頭に入れて医薬品を用いた軟骨分化誘導培地の検討を行った. 培地の組成は1% Antibiotic Antimycotic Solution, Ascorbic Acid(ビタミンC注10% PB®; 日新製薬), Dexamethasone(デキサート注射液®; 富士製薬工業株式会社), basic Fibroblast Growth Factor (フィブロラストスプレー®; 科研製薬)を含有する D-MEM/F-12 medium (SIGMA)とした. 血清は検討条件により使用しないか, 10% FBS(GIBCO)を添加した.

6. 重症免疫不全マウスへの皮下移植

実験

積層化し軟骨分化誘導のかかっている細胞群を用いた. 実験に使用したマウスは6週齢の雌の重症免疫不全マウス(NOD/SCID)で, 三協ラボサービスより購入した. 実験動物の飼育は横浜市立大学医学部動物実験センターに委託した. また, 本大学の倫理審査を受け, 取り扱いに関してはそれに則り研究を行った.

分化させた各細胞は, セルスクレイパー(IWAKI)を用いて剥離した. 剥離した細胞は23 G注射針(テルモ)を装着した2.5 ml シリンジ(テルモ)その産生基質とともにシリンジに回収し, 背部の除毛を行った重症免疫不全マウス(NOD/SCID)の背部皮下に注入した.

7. 大動物(イヌ)への皮下移植実験

イヌにおいても積層化し軟骨分化誘導のかかっている細胞群を用いた. 皮下移植の際の周術期管理は, 抗菌薬や麻酔法などそれぞれ耳介採取時のものと同様に行った. 移植法としては, 麻酔下に背部皮下を剥離した後にポケットを作成し, その部位にシリンジに吸引してある細胞を直接注入した. ポケットと皮膚はそれぞれ縫合し, 閉鎖した. 皮下移植後3カ月で検体を摘出し組織学的に検討した.

C. 研究結果

1. 医薬品を用いた軟骨分化誘導培地の検討

方法に記したとおり, ヒト耳介軟骨膜より採取された軟骨膜細胞の分離

培養を試みた。ご供与頂いた組織は約 6x5mm 程度であった。拘縮耳と鼻翼欠損の症例においては成人であったものの軟骨膜細胞の分離が可能であった。それぞれ、10%FBS 含有培地で拡大培養したところ、良好な増殖が得られた。拡大培養したのち、積層化培養しながら医薬品を用いた培地で軟骨分化誘導をかけた。従来われわれが用いている軟骨分化誘導培地であれば、積層化をしながら培地交換を繰り返すと約 2-3 週間程度で培養上清の粘稠性が増すことが分かっている。これは定量化が難しいが、軟骨分化誘導の指標として考えている。医薬品を用いた培地で軟骨分化誘導したディッシュは 4 週間を過ぎても培養上清に変化は認めず、8 週程度かかった。

軟骨分化誘導をかけた細胞群を重症免疫不全マウス背部皮下へ移植し、4 カ月後に組織を回収した。回収した組織を組織学的に評価したところ、アルシアンブルーで青染される軟骨組織の再構築を認めた。軟骨組織周囲に

は線維性の軟骨膜様組織を認めた。

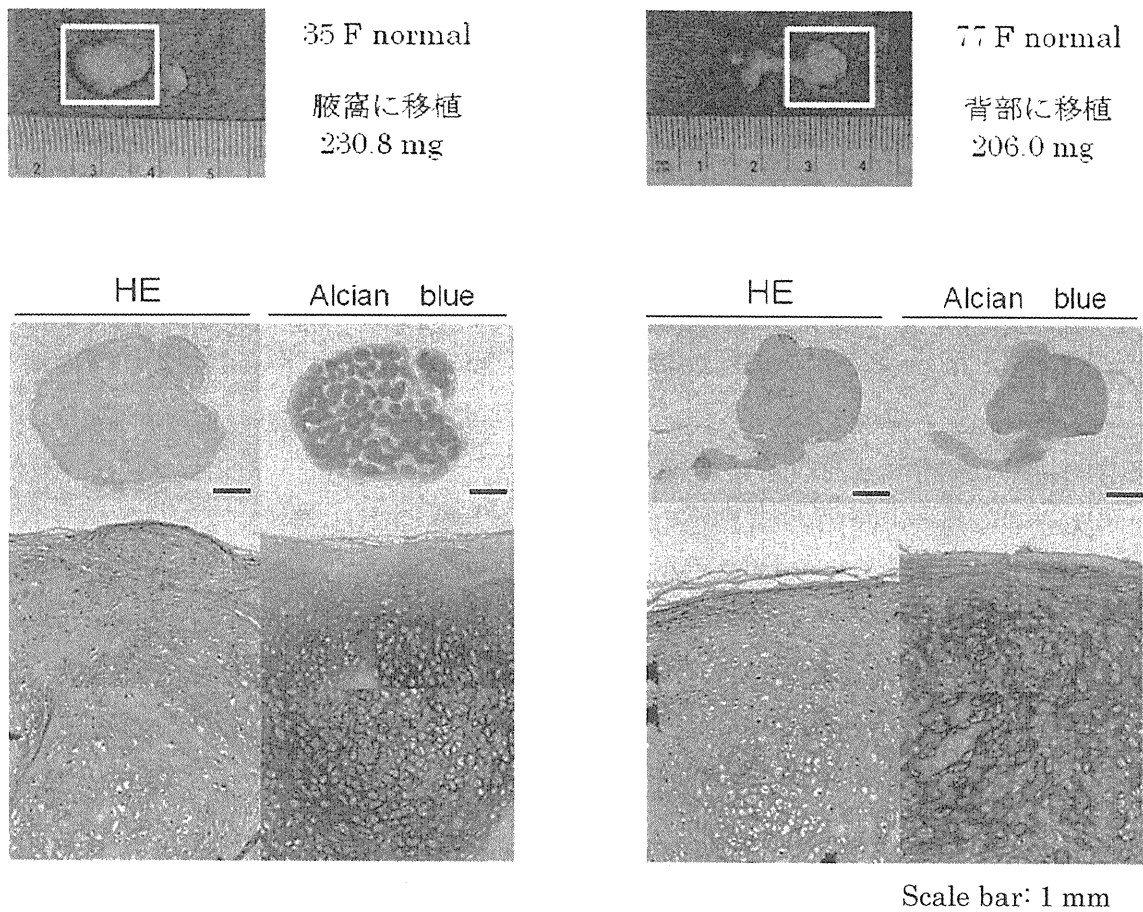
2. 大動物(イヌ)における実験

イヌの耳介から軟骨と軟骨膜を剥離した。部分的に癒着が強く剥離に難を要した部位もあったが、概ね良好に剥離された。検体より軟骨細胞、軟骨膜細胞を分離し、10%FBS 含有培地を用いて培養したところ、良好な増殖を認めた。拡大培養した後、軟骨分化誘導培地と積層化培養を併用し軟骨分化誘導をかけた。イヌの細胞群はヒト軟骨・軟骨膜細胞と異なり分化誘導をかけても培養上清の粘稠性は増さなかった。同一個体の背部皮下へ移植し、2 カ月後に検体を回収した。約 7mm 大の白色、やや不整な円盤状の固い組織を回収した。組織学的に解析したところ、アルシアンブルーで青染される軟骨様組織を認めた。また、その部位に一致してエラスチカ・ワン・ギーン染色で黒染されたため、再構築された組織は弾性軟骨であることがわかった。

(表 1) 医薬品を用いた軟骨分化誘導培地の検証に用いた検体リスト

No.	年齢	性別	疾患名	移植細胞数 [$\times 10^6$ cells]	採取検体	
					サイズ [mm]	湿重量 [mg]
1	35	F	拘縮耳	7.4	22x9x6	268.4
				7.4	10x8x6	230.8
				14.8	22x13x2.5	204
				5.9	11x5x0.5	22.5
2	77	F	鼻翼変形	6.2	23x10x2	206
				6.2	17x7x2	111.9

(図1) 医薬品を用いた軟骨分化誘導培地で培養したヒト成人耳介軟骨膜細胞
 における組織再構築能の評価

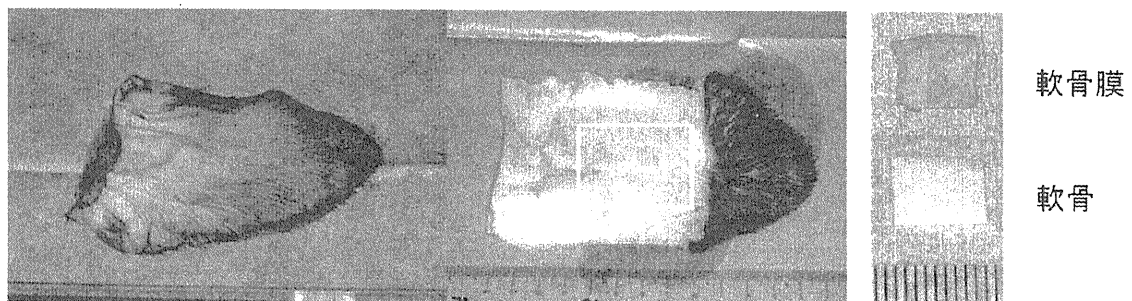


(図2) イヌ耳介から軟骨膜、軟骨組織の剥離

左：ビーグル犬の耳介

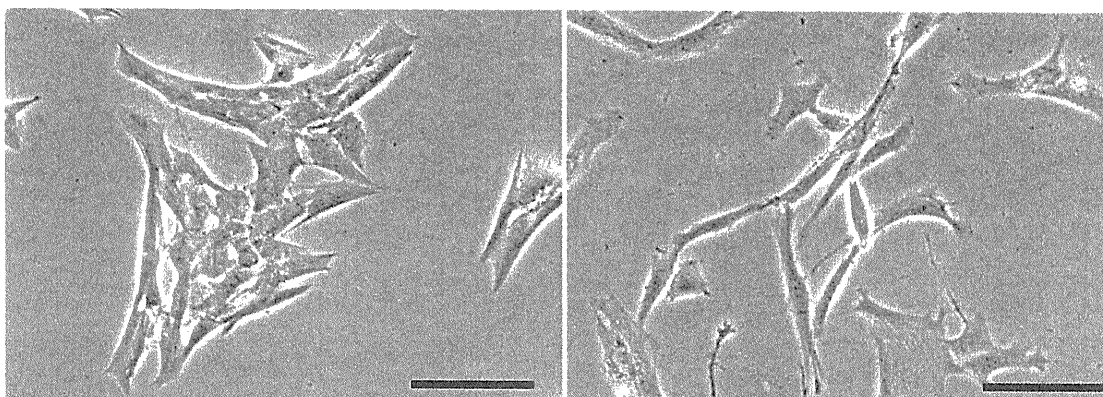
中央：耳介の皮膚および筋組織，周囲結合組織をトリミングした状態

右：剥離し回収した軟骨膜組織と軟骨組織(一部)



(図 2) イヌ耳介から分離された軟骨・軟骨膜細胞(初代培養開始 5 日目)

左：軟骨細胞 右：軟骨膜細胞



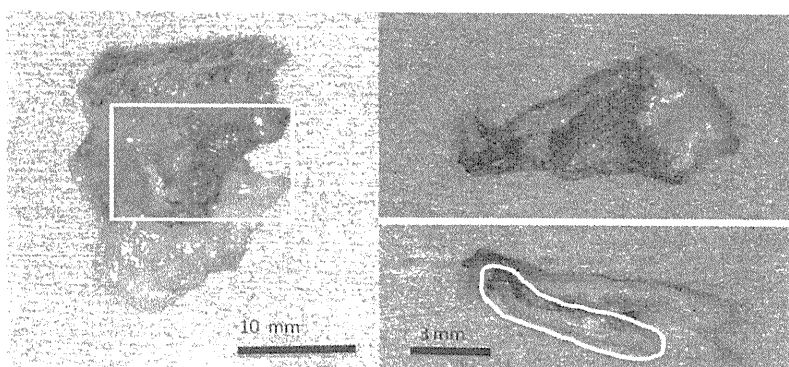
Scale bar: 100 μ m

(図 3) イヌ背部より回収した組織(マクロ像)

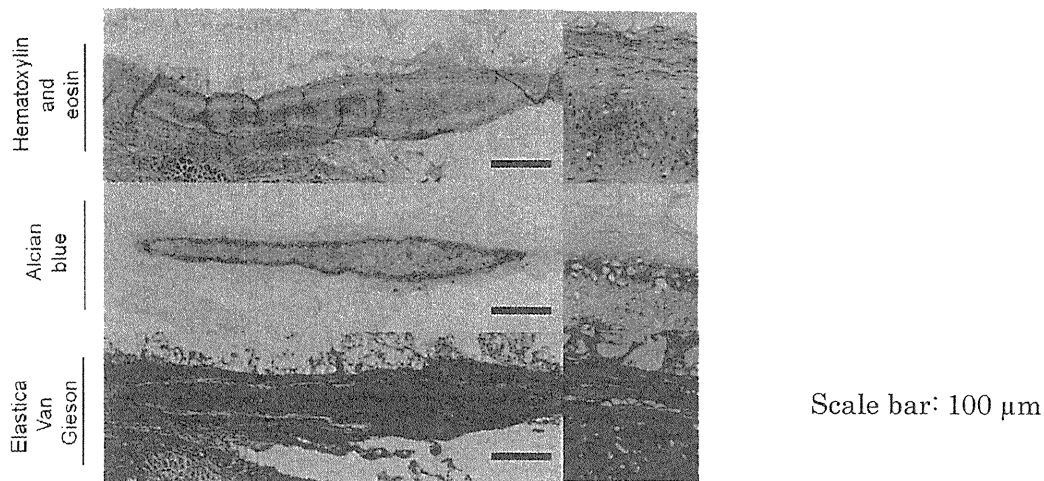
左：触診上固く触れた組織を皮膚を含めて切除し回収した。

右上：固く触知する部位のみトリミングした

右下：断面像



(図 4) イヌ背部より回収した組織の組織学的評価



D. 考察

再生医学の概念は 1990 年代より広まり、その概念は定着して久しいと言える。再生医学は、少ない侵襲で組織・細胞を採取し、増殖させ、相対的に高い治療効果を得る、というところに目標を置いて研究・検討が繰り返されている。その際に、増殖効率の高い細胞群として、各種幹細胞やそれに準じた細胞群が用いられることが多い。しかし、そういった細胞群を使用するにあたっては、高い倫理的配慮や計画性が必要となるため、厚生労働省から「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」(平成 18 年 7 月 3 日告示第 425 号, 平成 22 年 11 月 1 日改正第 380 号)が告示されており、それらを臨床応用するにあたってはこの指針に準ずるものでなければならない。そのため、高い安全性を確保できる環境整備とプロトコールがなければ幹細胞やそれに準じた細胞群を臨床応用することはできない。

本学付属病院は病院内に CPC を建設・設置した。当院 CPC は同区画内に作業スペースを 2 ヲ所設計しており、

それぞれ CP1 と CP2 としている。そして、CP1 にはクラス 100 の空気清浄度を保持できるアイソレーターを設置している。当アイソレーターは空気清浄度を高く保つ機能の他に、アイソレーター内を過酸化水素で燻蒸、殺菌することが可能であり、高い衛生度と滅菌性に優れている。しかも、検体採取する手術室は同一施設内であり、とくに中央手術室は同一の階層にあるため採取された検体の滅菌性が高いまま処理することが可能であると期待している。

また臨床応用に際して、取扱う細胞自体やその生成物を最終産物として体内に注入・移植することになるが、その最終産物自体の安全性も高く保たなければならない。そのためには GMP に準拠した基準のもと全ての行程を管理しなければならない。つまり、製造管理として培養行程、品質管理として原料や資材から製品の保管、試験行程などの管理を行い、それを明記するプロトコールと手順書の作成しなければならない。

そのため、安全性の高いプロトコール

ルを作成し、その妥当性を証明することが現時点で必要と考えている。そこで、現在われわれは培地に添加するサイトカインやサプリメントを医薬品に置換することで安全性を高めようとしている。また、ヒト以外の動物における検証法の確立し、プロトコールの妥当性の評価を行うことを計画している。

われわれの従来の方法では軟骨分化誘導に research use のサイトカインや添加物を使用している。具体的にはアスコルビン酸や bFGF(詳細は研究方法 4. 参照)を用いている。それらの製品はある程度の滅菌性は得られているものの、GMP に準拠した製造法で製造していないものや、準拠していてもその保証ができないものが多い。そこで、通常われわれが診療で使用している医薬品は GMP に準拠した方法で製造されており、滅菌性が高い。しかし、その一方で溶媒や pH 調製剤が含まれているため、単純に置換することは難しいと考えている。現時点では医薬品を用いた培地においても、軟骨分化を誘導することは可能であり、重症免疫不全マウスへの移植において組織再構築能も確認した。しかし、その一方で分化誘導がかかる期間が従来法と比較し長期であることが問題と考えている。医薬品に置換していないサイトカイン、サプリメントとしては、insuline like growth factor などである。今後はインスリンなどの添加を試みるとともに、それらの適正濃度の評価が必要であろう。

また、重症免疫不全マウスへの皮下移植実験で得られた組織も更なる評価が必要だと考えている。結果で示したとおり、それぞれ軟骨組織の再構築は認めるものの、顆粒状であったり、軟骨膜様組織が菲薄であったりする。おそらくこれは軟骨膜細胞の影響と予想している。軟骨膜細胞が軟骨膜を再構築する機能に個体によるバラつきや年齢による変化があるかもしれない。再構築される組織は治療効果に直結するため、今後も検討を要する。

今回、大動物実験においても組織の再構築を確認することができた。今までは、組織再構築能は重症免疫不全マウスにおいて評価していた。しかし、免疫機能が再構築される組織の性状や大きさを左右することは容易に想像される。実際にヒトへの臨床応用する際にも、免疫が存在する環境への移植、または投与となる。そのため、免疫が及ぼす影響は評価しなければならない。今回の結果により、イヌにおいて自家耳介弾性軟骨由来の軟骨膜細胞を移植することで均一な弾性軟骨の再構築が得られることが確認された。しかし、今回は従来重症免疫不全マウスへ移植している細胞量と同等かそれよりも多い量をイヌ背部皮下へ投与しているにもかかわらず、再構築された組織は小さいものであった。その原因としては、免疫の有無が関与している可能性は否定できない。しかし、その一方でイヌ耳介軟骨・軟骨膜細胞の特性解析も不十分であることが判明した。具体的には、軟骨分

化を誘導しても培養上清の粘稠性が変化しないことなどが今回わかった。原因としては、動物種が異なるため、添加したサイトカインやサプリメントが適正に働いていない可能性を予想している。

今後は移植細胞量と再構築される軟骨組織量の相関関係や新規足場材料の検討も必要と考えている。しかし、現段階ではイヌにおける大動物実験では定量的な変化まで検証するには不確実であると考えている。そのため、大動物実験に限らず、様々な手法を組み合わせ総合的に判断していくしかないと考えている。

E. 結論

われわれは、本学付属病院内に建設・設立された再生細胞治療センターにおいて、軟骨・軟骨膜由来細胞の培養技術を臨床応用することを目指している。それにあたり、GMPに準拠したプロトコルの作成と厚生労働省への申請、プロトコルの妥当性を示すための基礎実験を施行中である。現在、安全性を高めるために医薬品を用いた培地の検証を行っている。また、そういったプロトコルの評価方法を確立するため、イヌを用いた大動物実験を行っている。今後は培養期間の短縮を図るとともに、大動物においても、より安定的に評価できる方法を検証していきたい。

F. 健康危険情報

総括研究報告書に記載の通り。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅲ. 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

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
Shinji Kobayashi, Takanori Takebe, Midori Inui, Sayaka Iwai, Hiroomi Kan, Yun-wen Zheng, Jiro Maegawa, Hideki Taniguchi.	Reconstruction of human elastic cartilage by a CD44+CD90+stem cell in the ear perichondrium.	Proc Natl Acad Sci USA	108 (35)	14479-14484	2011
Shinji Kobayashi, Takeshi Nishiouri, Jiro Maegawa, Takashi Hirakawa, Toshihiko Fukawa.	A novel craniofacial osteogenesis distraction system enabling control of distraction distance and vector for the treatment of syndromic craniosynostosis	J Craniofac Surgery	23(2)	422-425	2012
Shinji Kobayashi, Takanori Takebe, Mitsuru Mizuno, Jiro Maegawa, Hideki Taniguchi.	Presence of cartilage stem/progenitor cells in adult mice auricular perichondrium	PLoS ONE	6(10)	e26393	2011
Shinji Kobayashi, J Maegawa.	Ear elevation using two-tiered costal cartilage on the same side as the reconstructed framework.	J Craniofac Surg	22(5)	1796-9	2011
Shinji Kobayashi, Mari Tanaka, Yukie Ohashi, Yukichi Tanaka, Jiro Maegawa.	Functional reconstruction of epignathus with cleft palate using part of a mature teratoma.	The Cleft Palate-Craniofacial J			in press

Takanori Takebe, Shinji Kobayashi, Hiroomi Kan, Hiromu Suzuki, Mitsuru Mizuno, Yuichiro Yabuki, Takuro Adegawa, Tomohiko Yoshioka, Junzo Tanaka, Jiro Maegawa, Hideki Taniguchi.	Human elastic cartilage engineering from cartilage progenitor cells using rotating wall vessel bioreactor.	Transplantation Proceedings	44(4)	1158-61	2012
Kurosawa K, Masuno M, Kuroki Y.	Trends in occurrence of twin births in Japan.	Am J Med Genet Part A	158A	75-77	2012
Kurosawa K, Tanoshima-Takei M, Yamamoto T, Ishikawa H, Masuno M, Tanaka Y, Yamanaka M.	Sirenomelia with a de novo balanced translocation 46,X,t(X;16) (p11.2;p12.3).	Cong Anom			in press
Adachi M, Soned A, Asakura Y, Muroya K, Yamagami Y, Hirahara F.	Mass Screening of Newborns for Congenital Hypothyroidism of Central Origin by Free Thyroxine Measurement of Blood Samples on Filter Paper.	European Journal of Endocrinology			in press
小林眞司、谷口 英樹	軟骨再生医療：こど もの心をいやす医療 に向けて	BIO INDUSTRY	18(11)	32-37	2011

書籍

発表者氏名	論文タイトル名	書籍名	出版社名	ページ	出版年
伊藤進	クルーゾン症候群	症候群ハンド ブック	中山書店	97	2011
黒澤健司	確定診断とその進め 方	遺伝子医学 MOOK別冊「 遺伝カウンセ リングハンド ブック」	メディカ ルドウ	58-9	2011

黒澤健司	先天奇形症候群、 Dysmorphology	遺伝子医学 MOOK別冊 「遺伝カウンセ リングハン ドブック」	メディカ ルドウ	76-9	2011
黒澤健司	予想外の結果が得ら れた場合：次世代シ ークエンス	遺伝子医学 MOOK別冊 「遺伝カウンセ リングハン ドブック」	メディカ ルドウ	345-7	2011
谷口英樹	臨床応用に向けた幹 細胞操作法開発にお ける現状と課題 Frontiers in Gastroenterology	メディカルレ ビュー社	16(1)	62-71	2011

