

C. 検査・評価項目とスケジュール

1) 臨床評価

臨床評価基準として、Tegner-Lysholm Knee Scoring Scale、Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score での評価を術前、術後1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、1年で実施する。

2) 単純レントゲン写真

関節裂隙、軟骨下骨の状態、関節症の進行の有無を評価する。関節症の進行度はKellgren-Lawrence grading scale (※1)を用いて術前、術後1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、1年で実施して、客観的に評価する。

3) MRI 検査

経時的な軟骨の厚み、性状の変化を評価し、Nelson MRI Grading (※2)を用いて、術前、術後1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、1年で実施して、客観的に評価する。

4) 関節鏡

術後1年の時点での関節表面の軟骨性状（色調、硬さ、平滑性）、Outerbridge分類(※3)を評価する。また痛みや関節の腫脹などが生じた場合には適宜実施し軟骨の状態を評価する。

5) 超音響法検査

術後1年の時点での関節軟骨の粘弾性特性を定量的に評価するために、我々が独自に開発した機能診断装置により、関節鏡視下に移植部と周辺軟骨部の軟骨を評価する。本評価法は東海大学医学部臨床研究審査委員会承認下で、東海大学医学部附属病院で既に臨床応用されている機能評価法である。

6) 病理検査

関節鏡を行った際に再生組織の一部を生検し、Safranin-O 染色を行い、Modified Mankin Score(※4)を用いて客観的に組織学的評価を行う。

D. 軟骨細胞シート移植症例報告

Entry No.1

43歳男性

2011.12.21 移植施行

【術前評価】

Lysholm score : 36

KOOS score Total : 47.0

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade3

関節鏡 : grade3

【術後1ヶ月】

Lysholm score : 75

KOOS score Total : 67.9

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade3

【術後3ヶ月】

Lysholm score : 67

KOOS score Total : 76.2

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade2

【術後6ヶ月】

Lysholm score : 75

KOOS score Total : 86.3

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade2

【術後1年】

Lysholm score : 85

KOOS score Total : 79.8
単純レントゲン写真 : grade3
MRI 検査 : grade1
関節鏡 : grade1
光音響検査法 : ※表 1 参照
病理検査 : Mankin score : 1
→2013.01.07 臨床研究終了

Entry No.2

46 歳男性
2012.3.7 移植施行
【術前評価】
Lysholm score : 72
KOOS score Total : 58.3
単純レントゲン写真 : grade3
MRI 検査 : grade2
関節鏡 : grade4

【術後 1 ヶ月】

Lysholm score : 59
KOOS score Total : 60.7
単純レントゲン写真 : grade3
MRI 検査 : grade2
【術後 3 ヶ月】
Lysholm score : 88
KOOS score Total : 63.7
単純レントゲン写真 : grade3
MRI 検査 : grade2

【術後 6 ヶ月】

Lysholm score : 96
KOOS score Total : 78.0
単純レントゲン写真 : grade3
MRI 検査 : grade2

【術後 1 年】

Lysholm score : 85
KOOS score Total : 88.7
単純レントゲン写真 : grade3
MRI 検査 : grade1
関節鏡 : grade1
光音響検査法 : ※表 2 参照
病理検査 : Mankin score : 1
→2013.03.19 臨床研究終了

Entry No.3

48 歳女性
術前関節鏡評価にて軟骨損傷が
Outerbridge grade II で適応外のため逸脱

Entry No.4

52 歳男性
細胞数が基準細胞数に満たず逸脱

Entry No.5

31 歳男性
2012.12.19 移植施行
【術前評価】
Lysholm score : 58
KOOS score Total : 72.0
単純レントゲン写真 : grade3
MRI 検査 : grade2
関節鏡 : grade4

【術後 1 ヶ月】

Lysholm score : 86
KOOS score Total : 72.6
単純レントゲン写真 : grade3
MRI 検査 : grade2

【術後 3 ヶ月】

Lysholm score : 81

KOOS score Total : 75.0

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade2

【術後 6 ヶ月】

Lysholm score : 78

KOOS score Total : 84.5

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade2

【術後 1 年】

Lysholm score : 95

KOOS score Total : 96.4

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade1

関節鏡 : grade1

光音響検査法 : ※解析中

病理検査 : Mankin score : 1

→2014/5 月臨床研究終了

Entry No.6

50 歳男性

2013.02.06 移植施行

【術前評価】

Lysholm score : 45

KOOS score Total : 29.2

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade2

関節鏡 : grade4

【術後 1 ヶ月】

Lysholm score : 39

KOOS score Total : 66.7

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade2

【術後 3 ヶ月】

Lysholm score : 81

KOOS score Total : 62.5

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade2

【術後 6 ヶ月】

Lysholm score : 94

KOOS score Total : 81

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade2

【術後 1 年】

Lysholm score : 99

KOOS score Total : 84.5

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade1

関節鏡 : grade2

光音響検査法 : ※解析中

病理検査 : Mankin score : 1

→2014/4 月臨床研究終了

Entry No.7

37 歳女性

剥離試験不適合で逸脱

Entry No.8

53 歳男性

2013.6.26 移植施行

【術前評価】

Lysholm score : 27

KOOS score Total : 42.1

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade2

関節鏡 : grade4

【術後 1 ヶ月】	単純レントゲン写真：grade3
Lysholm score：69	MRI 検査：grade2
KOOS score Total：54.2	【術後 6 ヶ月】
単純レントゲン写真：grade3	Lysholm score：93
MRI 検査：grade2	KOOS score Total：85.7
【術後 3 ヶ月】	単純レントゲン写真：grade3
Lysholm score：42	MRI 検査：grade2
KOOS score Total：64.3	
単純レントゲン写真：grade3	Entry No.10
MRI 検査：grade2	55 歳女性
【術後 6 ヶ月】	2013.9.12 移植施行
Lysholm score：57	【術前評価】
KOOS score Total：69.6	Lysholm score：52
単純レントゲン写真：grade3	KOOS score Total：54.2
MRI 検査：grade2	単純レントゲン写真：grade3
	MRI 検査：grade2
Entry No.9	関節鏡：grade3
59 歳女性	【術後 1 ヶ月】
2013.8.1 移植施行	Lysholm score：50
【術前評価】	KOOS score Total：67.9
Lysholm score：28	単純レントゲン写真：grade3
KOOS score Total：29.2	MRI 検査：grade2
単純レントゲン写真：grade3	【術後 3 ヶ月】
MRI 検査：grade2	Lysholm score：78
関節鏡：grade3	KOOS score Total：67.9
【術後 1 ヶ月】	単純レントゲン写真：grade3
Lysholm score：62	MRI 検査：grade2
KOOS score Total：70.7	【術後 6 ヶ月】
単純レントゲン写真：grade3	Lysholm score：67
MRI 検査：grade2	KOOS score Total：78
【術後 3 ヶ月】	単純レントゲン写真：grade3
Lysholm score：73	MRI 検査：grade2
KOOS score Total：75.6	

Entry No.11

54 歳男性

2013.11.21 移植施行

【術前評価】

Lysholm score : 60

KOOS score Total : 66.1

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade2

関節鏡 : grade3

【術後 1 ヶ月】

Lysholm score : 58

KOOS score Total : 54.3

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade2

【術後 3 ヶ月】

Lysholm score : 63

KOOS score Total : 67.3

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade2

E. 結果

以上、2014年3月31日までに11症例がエントリーし、8症例に軟骨細胞シート移植を施行した。第1～4例は移植術後1年が経過し、臨床研究を終了している。

F. 考察

これまでに移植後1年経過した4症例に関しては、術後1年後の臨床評価スコア(※表3,4参照)、単純レントゲン写真、MRI検査、関節鏡検査、病理検査において術前から軟骨変性の改善を認めている。また臨床研究中の重篤な有害事象の発生も認めず、

軟骨細胞シート移植による有効な関節軟骨再生効果が得られている。

今後は移植症例数をさらに追加し、軟骨細胞シート移植による関節治療効果の検討を進め、先進医療としての実現を目指す予定である。

G. 健康危害情報

本研究による健康危害情報はなかった。

H. 研究発表

1. 著書

なし

2. 論文発表

なし

I. 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

※1 Kellgren-Lawrence Grading Scale

Grade1 : doubtful narrowing of joint space and possible osteophytic lipping

Grade2 : definite osteophytes, definite narrowing of joint space

Grade3 : moderate multiple osteophytes, definite narrowing of joints space, some sclerosis and possible deformity of bone contour

Grade4 : large osteophytes, marked narrowing of joint space, severe sclerosis and definite deformity of bone contour

※2 Nelson の MRI 分類

Grade0 : normal

Grade1 : intact cartilage with signal change

Grade2 : high signal breach of cartilage

Grade3 : thin, high signal rim extending behind the osteochondral fragment indicating synovial fluid around the fragment

Grade4 : mixed or low signal loose body in the center of lesion or free within the joint

※3 Outerbridge-Brittberg

grade1 : 関節軟骨の軟化を認める

grade2 : 軟骨表面の羽毛立ち、浅い亀裂を認める

grade3 : 軟骨下骨の深さまでの軟骨損傷があるが、軟骨下骨の露出は認めない

grade4 : 軟骨下骨の露出を認める

※4 Mankin score system

I : 構造

a. 正常 : 0

b. 表面の不整 : 1

c. 表面の不整、パンヌス形成 : 2

d. 中間層までの亀裂 : 3

e. 深層までの亀裂 : 4

f. 石灰化層までの亀裂 : 5

g. 完全な破壊 : 6

II：細胞

- a. 正常：0
- b. びまん性の細胞数増加：1
- c. クローニング：2
- d. 細胞数減少：3

III：サフラニン-O 染色性

- a. 正常：0
- b. 軽度の低下：1
- c. 中等度の低下：2
- d. 重度の低下：3
- e. 染色性の消失：4

IV：Tidemark の状態

- a. 正常：0
- b. 血管の横断：0

総得点：0～14

軽度変性：1-3

中等度変性：4-7

重度変性：>7

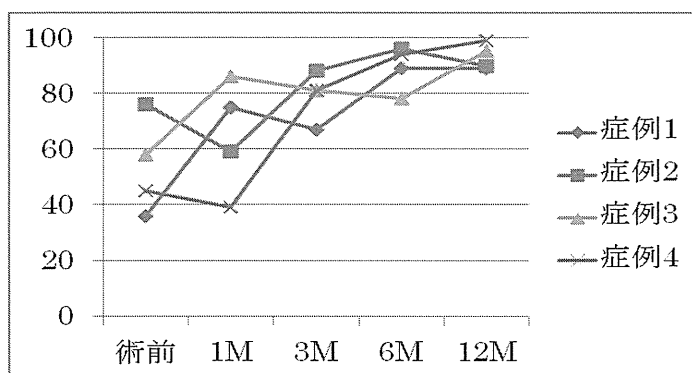
※表 1. 第 1 症例の超音響検査法評価結果

Day	手術前	12ヶ月
評価日	2011 12/21	2013 1/7
移植部	0.65	0.87
周辺軟骨部	1	1

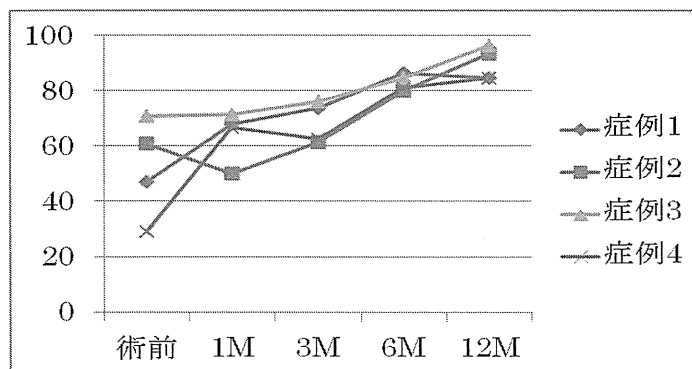
※表 2. 第 2 症例の超音響検査法評価結果

Day	手術前	12 ヶ月
評価日	2012 02/14	2013 3/8
移植部	0.60	1.06
周辺軟骨部	1	1

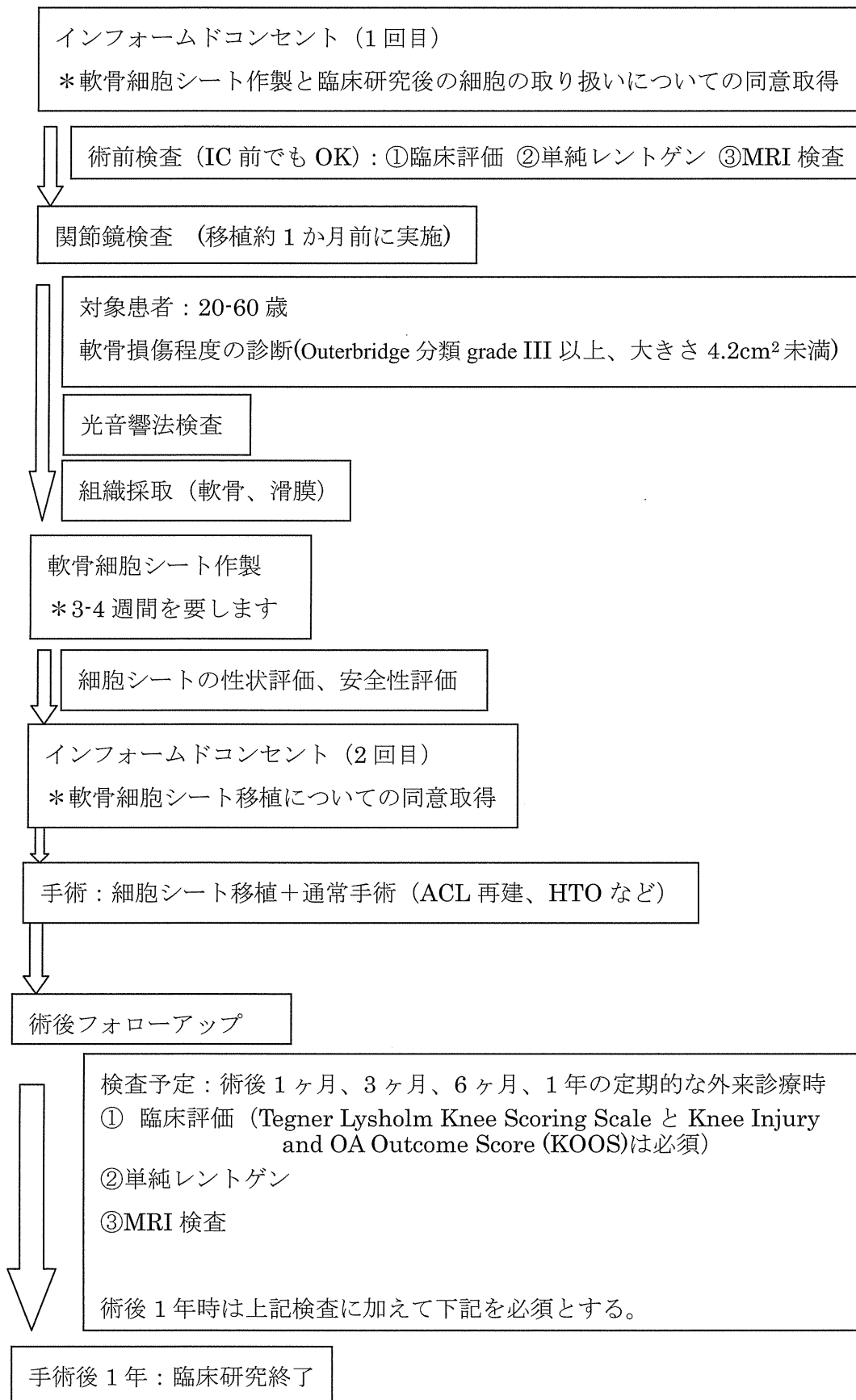
※表 3. 第 1~4 症例の Tegner-Lysholm Knee Scoring Scale 推移



※表 4. 第 1~4 症例の Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score 推移



※付記 「細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究」 研究実施の流れ



同種軟骨再生医療のための安全性評価

研究協力者	岡田 恵里	東海大学医学部外科学系整形外科学・特定研究員
研究分担者	加藤 俊一	東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学・教授
研究分担者	小林 広幸	東海大学医学部基盤診療学系臨床薬理学・教授
研究分担者	三上 礼子	東海大学医学部基盤診療学系臨床薬理学・講師
研究協力者	小林 美由希	東海大学医学部外科学系整形外科学・大学院生
研究協力者	横山 宗昂	東海大学医学部外科学系整形外科学・大学院生
研究協力者	河毛 知子	東海大学医学部外科学系整形外科学・研究員
研究協力者	渡部 綾子	東海大学医学部外科学系整形外科学・研究員
研究協力者	的場 亮	株式会社 DNA チップ研究所・代表取締役・社長
研究協力者	伊東 紀子	株式会社 DNA チップ研究所・研究開発部

研究要旨：我々は、ヒト幹細胞指針に則り、温度応答性培養皿を用いた積層化軟骨細胞シートによる自己軟骨細胞シート移植を実施し、現在までのところ重篤な有害事象は認めず、良好な術後経過である。将来的な普及を目指し、同種軟骨細胞シート移植を検討している。この細胞ソースとして多指症軟骨組織由来細胞を検討した。

自己軟骨細胞をシート化する際に確立した試験評価方法の Array Comparative Genomic Hybridization (aCGH)、G バンド分染法により、細胞ソースの確認及び培養により目的外の形質転換を起こしていないことを明らかにするため、通常の培養継代期間を超えて培養した細胞について安全性評価を実施した。この結果、多指症軟骨組織由来細胞は、試験評価方法を通じて安全性を判断することができた。

A. 研究目的

平成 23 年 10 月 3 日に厚生労働大臣通知（厚生労働省発医政 1003 第 3 号）により、ヒト幹細胞臨床研究の実施が認められ、自己細胞を使用した「細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究」を実施している。現在までに 11 例をエントリーし、8 症例に実施した。第 1-4 症例は移植後 1 年を経過し臨床研究を終了した。臨床研究中に重篤な有害事象の発生も認めず、軟骨細胞シート移植による安全で有効な関節治療効果が得られており、細胞シート移植による関節治療効果の検討を進めている。細胞シートの原料として、自己細胞は、関節軟骨組織の健常部と滑膜組織を採取し、採取量に制限があり、シート作製枚数やシート移植の

可能性の有無は事前に判断できない。また、対象として自己で 1 人、1 回程度の実施が可能である。今後、細胞シートによる関節治療の将来的な普及を目指すためには、自己細胞の課題を解決すべく、細胞の原料として同種細胞の可能性を検討することにした。同種細胞として、手術時に廃棄される多指症由来関節軟骨組織を採取することにより、シートを必要数作製可能となり、また、シートを移植前に試験的に作製するため、移植の有無が事前に判断できる。対象として複数人に複数回の実施が可能となる。

細胞シートの原料を同種細胞にすることにより、将来的な普及を目指し、同種細胞シート移植を念頭に自己の安全性評価で用いた試験方法に従い、同種細胞の安全性を

確認することを目的とした。薬食発法第0208003号第4章「細胞・組織加工医薬品等の非臨床試験」に係る項目「培養期間を超えて培養した細胞について、目的外の形質転換を起こしていないことを明らかにすること」を確認するため、通常の培養期間を超えて継代培養した細胞について微細ゲノム異常の探索、ゲノムコピー数異常、がん遺伝子、染色体異常の検出などの網羅的な解析により遺伝子異常を検出することが出来るとされている aCGH 解析を実施し、継代培養中の変化を評価した。また、細胞が保有している核型について異数性の検出や、転座、欠失等の染色体異常を検出することが出来るとされている G バンド分染法により染色体核型解析を実施し、細胞の変異と継代培養中の変化を評価した。

B. 研究方法

サンプル

国立成育医療研究センター研究所と東海大学との間で締結した細胞譲渡契約（研究名「関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現」）により、国立成育医療研究センター研究所から東海大学へ譲渡された多指症軟骨組織由来細胞を用いて本研究を実施した。

多指症の手術時に廃棄する指関節の軟骨組織を分離し、細切後培養して増殖した細胞を酵素処理により回収し、多指症軟骨組織由来細胞とした。検体 12 症例（平均年齢 1 歳 4 箇月）を用いて継代培養し、供試する細胞を調整した。（例 第 2 継代（P2））

細胞培養

培地：DMEM/F12 supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS; GIBCO, NY, USA) and 1% antibiotics-antimycotic (GIBCO, NY, USA) and 50 µg/ml ascorbic acid (Wako junyakukougyou Co. Japan)

培養条件：37 度、5% CO₂

播種数：0.5×10⁴cells/cm²

表 1 サンプル情報

No.	gender	age
1	M	0y11m
2	M	1y3m
3	F	0y11m
4	F	1y2m
5	F	0y11m
6	M	1y1m
7	F	0y11m
8	F	1y6m
9	F	1y0m
10	M	4y6m
11	F	1y1m
12	M	0y8m

（平均年齢：1y4m）

① aCGH 解析

上述の各 12 サンプルの細胞を継代培養して P2、P4、P6、P12 の細胞を調整し、DNA を抽出した。解析は、チップサイズ 8×60K、Moving Average10pt で実施して細胞培養中における細胞への影響の有無を確認するため、同一人物の細胞について P2 を標準試料とし、組み合わせを P2 と P4、P2 と P6、P2 と P12 それぞれについて解析を実施した。さらに、各組み合わせは蛍光

色素を入れ替えての dye swap 解析も実施することにより、データを再確認してデータの信頼性を高め、ゲノム DNA の変化がみられた領域数を数値として検知する。標準試料との差異を検出するアルゴリズムとして Aberration Detection Method-2 (ADM-2) Threshold 6、7、8、9、10 を用いて解析を行う。また、細胞培養中に顕微鏡下で細胞形態の観察を実施する。

② G バンド分染法

①と同様の細胞（12 サンプル）の細胞を継代培養して P1、P6、P12 の細胞を調整し、解析バンドレベル 300bp~400bp で、細胞分裂中期（M 期）のよく広がった細胞を用いて、評価基準であるヒト染色体に関する国際命名規約 (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature : ISCN) に従い、20 細胞を核型解析に用いて、細胞ソース由来の核型解析及び同一人物による各継代の核型解析結果を比較検討した。

C. 結果

① aCGH 解析

P2 から P12 まで培養期間中の細胞形態に異常は認められなかった。各検体の組み合わせの解析では、Threshold 6、7、8、9、10 により $\text{Log}_2\text{Ratio}=0、1、2$ と検出され (表 2)、Threshold 6、7、8、9、10 のうち、Threshold 10 であるとすべて解析数値は $\text{Log}_2\text{Ratio}=0$ と検出された。また、dye swap 解析を実施すると $\text{Log}_2\text{Ratio}=1、2$ の値が 0 と検出さ

れた。(表 3)。

表 2 解析結果 (標準試料 : P2)

No.	P4	P6	P12
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	1
6	0	0	0
7	0	0	1
8	0	0	0
9	0	0	0
10	2	0	0
11	1	0	0
12	2	2	2

表 3 解析結果 (表 2 の dye swap)

No.	P4	P6	P12
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0

また、プローブ 10pt 毎に Moving Average (移動平均) の値を算出してライングラフ化し、染色体毎に染色体のコピー数異常の検出を基線からのずれとして可視化させて実施した。可視化した図 (図 1) より、細胞は、12 例とも P4、P6、P12 すべてにおいて、基線からのずれは正常とみなされる範囲であった。

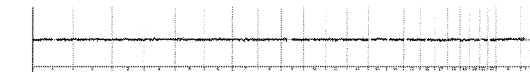


図 1-1 P2 vs.P4

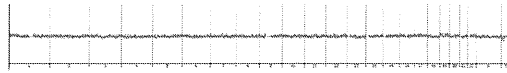


図 1-2 P4 vs.P2 dye swap



図 1-3 P4 vs.P2 over lap

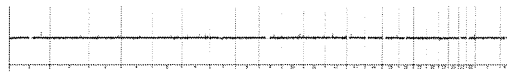


図 1-4 P2 vs.P6

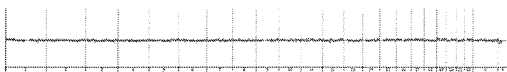


図 1-5 P6 vs.P2 dye swap

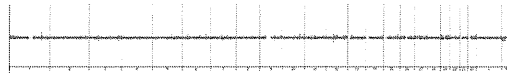


図 1-6 P6 vs.P2 over lap

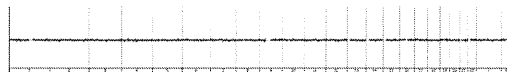


図 1-7 P2 vs.P12

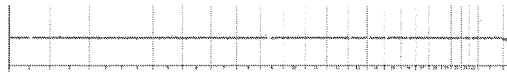


図 1-8 P12 vs.P2 dye swap



図 1-9 P12 vs.P2 over lap

図 1-1～図 1-9 Genome View

② G バンド分染法

解析結果は、各サンプル各継代数ともに ISCN の基準によると染色体異常と判断される細胞はなかった。構造変化が検出され

た細胞もあったが、一般的に認められる変異であるものは基準では正常とみなされるものであった（図 2、表 4）。

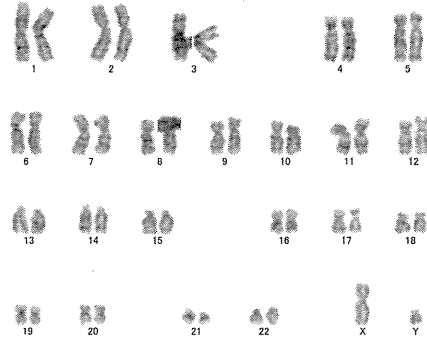


図 2 G バンド分染法 (P1)

表 4 核型分析結果

No.	P1		P6		P12	
	細胞	ISCN	細胞	ISCN	細胞	ISCN
1	正常核型[20]	正常	正常核型[19] 変異[1]	正常	正常核型[20]	正常
2	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常
3	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常
4	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常
5	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常
6	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常
7	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常
8	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常
9	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常
10	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常
11	正常核型[18] 変異[1] 変異[1]	正常	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常
12	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常	正常核型[19] 変異[1]	正常

D. 考察

通常用いる培養期間を超えて培養した細胞は、顕微鏡下において形態に異常は認められなかった。また、自己の場合は細胞培養の継代数が進むにつれて、細胞の増殖性の低下が認められたため、自己軟骨細胞は、過継代はシート化に適さないことが示唆されたが、同種細胞の場合は、細胞の増殖性の低下は認められなかった。

aCGH 解析により、少量の DNA から解析が可能であり、遺伝子の異常検知やがん関連遺伝子の異常を数値として得られる。そして、微細な変化を捉えることが可能なため、継代培養中における細胞への影響の有無は、同一人物の細胞の継代数の若いサンプルを標準試料として継代が進んだサンプルを解析することにより、継代培養中による明らかな遺伝子異常は認められなかったため、細胞への影響は認められないと考えられた。

G バンド分染法での染色体核型解析では、細胞ソース由来の染色体異常の有無を確認でき、また、継代培養した細胞についてもほかの変異は、培養過程で継続的に観察されることはなかったため、生体内で自然淘汰される可能性が高い変化であることが推察され、細胞に対する継代培養中による影響は認められないと考えられた。

また、染色体異常が保存される変異は認められなかった。

E. 結論

G バンド分染法により細胞ソース由来の染色体異常は認められなかった。

aCGH 解析、G バンド分染法により細胞培養中によるコピー数の異常は生じないことが確認された。

両解析により、多指症軟骨組織由来細胞は、試験法の一般的な基準においては、すべてのサンプルにおいて異常は認められなかった。

しかし、私どもが臨床研究として、細胞

ソースを採用する際の基準としては、より安全性を担保するために、aCGH 解析、G バンド分染法の両解析結果において、陽性ではないが、1 つでも変異がみとめられた場合は採用せず、陰性の結果のみであるサンプルを臨床研究の細胞ソースとして選択することにした。

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（研究分担者：加藤俊一）

- 1) Okamoto Y, Nagatoshi Y, Kosaka Y, Kikuchi A, Kato S, Kigasawa H, Horikoshi Y, Oda M, Kaneda M, Mori T, Mugishima H, Tsuchida M, Taniguchi S, Kawano Y. Prospective pharmacokinetic study of intravenous busulfan in hematopoietic stem cell transplantation in 25 children. *Pediatr Transplant*. 2014 Feb 8. [Epub ahead of print]
- 2) Ohnishi H, Sasaki H, Nakamura Y, Kato S, Ando K, Narimatsu H, Tachibana K. Regulation of cell shape and adhesion by CD34. *Cell Adh Migr*. 2013 Sep 1;7(5):426-33. Epub 2013 Aug 5.
- 3) Tanaka J, Morishima Y, Takahashi Y, Yabe T, Oba K, Takahashi S, Taniguchi S, Ogawa H, Onishi Y, Miyamura K, Kanamori H, Aotsuka N, Kato K, Kato S, Atsuta Y, Kanda Y. Effects of KIR ligand incompatibility on

clinical outcomes of umbilical cord blood transplantation without ATG for acute leukemia in complete remission. *Blood Cancer J.* 2013 Nov 29;3:e164.

4) Kasahara M, Sakamoto S, Horikawa R, Koji U, Mizuta K, Shinkai M, Takahito Y, Taguchi T, Inomata Y, Uemoto S, Tatsuo K, Kato S. Living donor liver transplantation for pediatric patients with metabolic disorders: The Japanese multicenter registry. *Pediatr Transplant.* 2014 Feb;18(1):6-15. Epub 2013 Nov 28.

5) Masaoka N, Morooka M, Nakajima Y, Ogata H, Kodo H, Kato S. Study for the improvement of umbilical cord blood sampling using a new trial apparatus. *J Obstet Gynaecol Res.* 2014 Feb;40(2):405-9. Epub 2013 Nov 18

6) Kodera Y, Yamamoto K, Harada M, Morishima Y, Dohy H, Asano S, Ikeda Y, Nakahata T, Imamura M, Kawa K, Kato S, Tanimoto M, Kanda Y, Tanosaki R, Shiobara S, Kim SW, Nagafuji K, Hino M, Miyamura K, Suzuki R, Hamajima N, Fukushima M, Tamakoshi A; for the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation, Halter J, Schmitz N, Niederwieser D, Gratwohl A. PBSC collection from family donors in Japan: a prospective survey. *Bone Marrow Transplant.* 2014 Feb;49(2):195-200. Epub 2013 Sep 30.

7) 加藤俊一. 先天代謝異常症に対する造

血細胞移植療法の確立とガイドラインの作成に向けて. *内分泌・糖尿病・代謝内科*, 2013,37(5):567-577.

8) 加藤俊一. 小児造血細胞移植. *日本小児血液・がん学会雑誌*, 2013,50(3):297-310.

9) Muroi K, Miyamura K, Ohashi K, Murata M, Eto T, Kobayashi N, Taniguchi S, Imamura M, Ando K, Kato S, Mori T, Teshima T, Mori M, Ozawa K. Unrelated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells for steroid-refractory acute graft-versus-host disease: a phase I/II study. *Int J Hematol.* 2013 Aug;98(2):206-13. Epub 2013 Jul 17.

10) Morishima Y, Kawase T, Malkki M, Morishima S, Spellman S, Kashiwase K, Kato S, Cesbron A, Tiercy JM, Senitzer D, Velardi A, Petersdorf EW; International Histocompatibility Working Group in Hematopoietic Cell Transplantation. Significance of Ethnicity in the Risk of Acute Graft-versus-Host Disease and Leukemia Relapse after Unrelated Donor Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2013 Aug;19(8):1197-1203. Epub 2013 Jun 6.

2. 論文発表（研究分担者：小林広幸）

1) Ito M, Yoshikawa M, Ito K, Matsuda M, Jin XL, Takahashi S, Kobayashi H, Suzuki T. Antinociceptive effect of

intracerebroventricular administration of D-serine on formalin-induced pain. *J Anesth.* 2013 Sep 19. [Epub ahead of print]

2) Miura M, Yoshikawa M, Watanabe M, Takahashi S, Ajimi J, Ito K, Ito M, Kawaguchi M, Kobayashi H, Suzuki T. Increase in antinociceptive effect of [leu5]enkephalin after intrathecal administration of mixture of three peptidase inhibitors. *Tokai J Exp Clin Med.* 2013 Jul 20;38(2):62-70.

3) Moriya Y, Mizuma A, Uesugi T, Ohnuki Y, Nagata E, Takahashi W, Kobayashi H, Kawada H, Ando K, Takagi S, Takizawa S. Phase I study of intravenous low-dose granulocyte colony-stimulating factor in acute and subacute ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2013 Oct;22(7):1088-97.

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

多指症軟骨組織由来細胞についての造腫瘍性否定試験

研究協力者	河毛 知子	東海大学医学部外科学系整形外科学・研究員
研究分担者	阿久津 英憲	国立成育医療研究センター研究所 生殖・細胞医療研究部 生殖技術研究室・室長
研究協力者	梅澤 明弘	国立成育医療研究センター研究所 生殖・細胞医療研究部・部長
研究分担者	小久保 舞美	東海大学医学部外科学系整形外科学・特定研究員
研究協力者	岡田 恵里	東海大学医学部外科学系整形外科学・特定研究員
研究協力者	豊田 恵利子	東海大学医学部外科学系整形外科学・奨励研究員

研究要旨：変形性関節症は軟骨が変性・消失し痛みや機能障害を引き起こす疾患である。現在軟骨欠損に対し、自己軟骨細胞を用いた移植が行われているが、術中に採取できる軟骨は少量であり、かつ侵襲なく採取することは難しい。軟骨は免疫抑制剤を必要としない数少ない臓器・組織の1つであり、同種での細胞ソースの確保は非常に重要である。

我々が同種細胞移植として検討している多指症軟骨組織由来の細胞は、手術時に廃棄する組織であるが、高い細胞増殖活性を有し、細胞ソースとして非常に期待できるものである。この多指症軟骨組織由来細胞を同種細胞移植の細胞ソースとして検討する為、造腫瘍性否定試験を実施した。

造腫瘍性とは、動物に移植された細胞集団が増殖することにより悪性または良性の腫瘍を形成する能力をいう。我々は、同種移植による造腫瘍性否定試験では、より重度な免疫不全を呈するNOGマウスを用いて検討をした。

A. 研究目的

我々は、温度応答性培養皿を用いた軟骨細胞と滑膜細胞の共培養法により作製した積層化軟骨細胞シートを軟骨損傷を有する患者へ移植し、当該細胞シートの安全性及び修復再生効果を確認している。しかし術中に成人の関節軟骨から採取できる軟骨組織は量・質共に個人差がある。軟骨細胞シートによる関節軟骨損傷の治療を安定して、多くの患者に適応する為には、自己細胞による治療では限界がある。このことにより、同種細胞を用いた同種軟骨細胞シート移植が必須であると考えられる。

このため同種細胞移植で用いる細胞ソースの確保は非常に重要である。国立成育医療研究センター研究所から譲渡を受けた多

指症軟骨組織由来細胞（以下、「PD細胞」と示す。）は優れた増殖性を持ち、かつ手術時に廃棄する組織であることから、採取にあたり、現在、自己細胞で実施している臨床研究と比較して、低侵襲でレシピエントにとって負担がかからないという特徴がある。

このように有用な細胞ソースとして期待される、PD細胞のin vivoにおける造腫瘍性を否定するために検討を行ったのでそれを報告する。

B. 研究方法

多指症軟骨細胞について

国立成育医療研究センター研究所と東海大学との間で締結した細胞譲渡契約（研究

名「関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現」により、国立成育医療研究センター研究所から東海大学へ譲渡された PD 細胞を用いて本研究を実施した。

手術時に廃棄される検体から軟骨組織を分離し、細切後培養皿上に増殖した細胞を酵素処理により回収した PD 細胞を造腫瘍性試験に用いた。

今回、同種移植の安全性の確認として、3 例の検体を使用し、評価した。

軟骨細胞の分離と培養

国立成育医療研究センター研究所から譲渡された PD 細胞を東海大学にて 0.5×10^4 cells/cm² で播種、DMEM/F12 supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS; GIBCO, NY, USA) and 1% antibiotics-antimycotic (GIBCO, NY, USA) and 50 µg/ml ascorbic acid (Wako junyakukougyou Corp. Japan)の培地を使用し培養した。全ての培養は 37 度、5% CO₂、95% O₂の条件下で行った。

移植には第 2 継代目の培養細胞を用いた。

1 週間順化後、イソフルラン吸引麻酔下にて、NOG マウス右腰部を約 1cm 切開し（図 1）、PD 細胞を 1 匹あたり 1×10^7 の 7 乗個になるようにペレット状態で皮下に移植する（図 2）。切開した皮膚を医療用クリップで留める（図 3）。Sham 群には切開のみを行い、同様にクリップで留める。

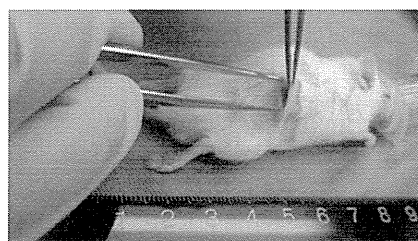


図 1 右腰部を約 1cm 切開

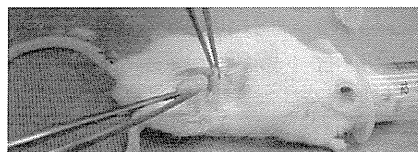


図 2 ペレット状態で皮下に移植

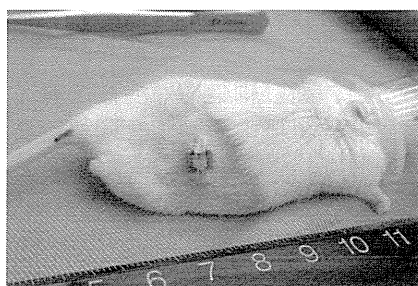


図 3 医療用クリップで留める

移植後は観察及び体重測定を継続的に実施した。移植後 3 週、12 週、24 週で病理解剖する。移植部位の皮下組織、血清を採取し、灌流後にリンパ節（腋窩・鼠径部）、肺（全葉）、脾臓、腎臓、肝臓、脳を採取する。

摘出した臓器を病理組織学的に観察し、移植部位は標本を作製し染色をして造腫瘍性を評価する。

NOG マウス（正式名：NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Sug/Jic、簡略名：NOD/Shi-scid, IL-2R⁰）は公益財団法人実験動物中央研究所により樹立された、極めて重度な複合型免疫不全を呈し、ヒト細胞の生着性が NOD-scid マウスと比

べて著しく高いことから、造腫瘍性細胞を検出する試験方法で用いられている実験モデル動物である。

C. 結果

PD細胞移植後24週までの体重の変化について示す（図4）。各群の体重の推移は大きな変化は認められなかった。また、移植直後は、移植部は膨隆しているが、どの群においても4～5週後には非移植部の皮膚と区別がつかない程度まで膨隆は縮小した（図5、6）。

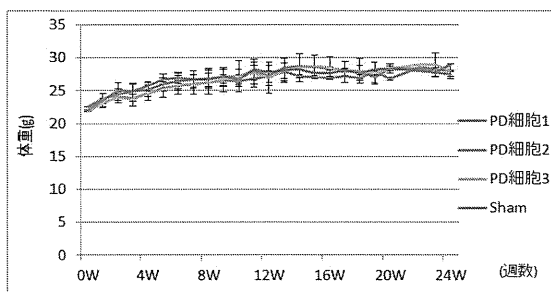


図4 体重の推移



図5 移植後1週間外観

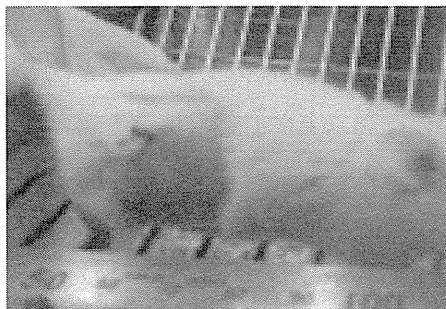


図6 移植後5週間外観

PD細胞移植後3週及び12週、24週で、剖検し、移植部位の皮膚を摘出した。移植後3週では中央に移植した細胞塊が認められるが（図7）、移植後12週では移植した細胞塊は縮小し、軟骨基質を染めるSafranin-O染色でも染色される箇所は少なく（図8）、継時的に分解されていくことが示唆された。

観察倍率を120倍まで上げて、HE染色により観察したが、目立った異常は認められなかった（図9）。

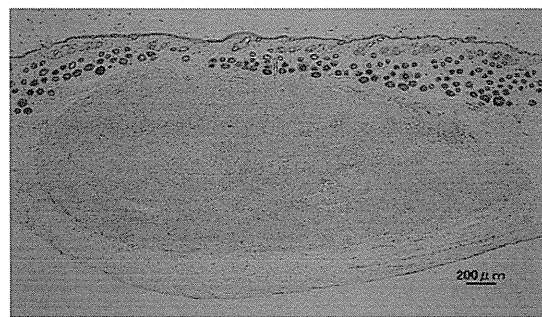


図7 移植後3週 Safranin-O染色



図8 移植後12週 Safranin-O染色

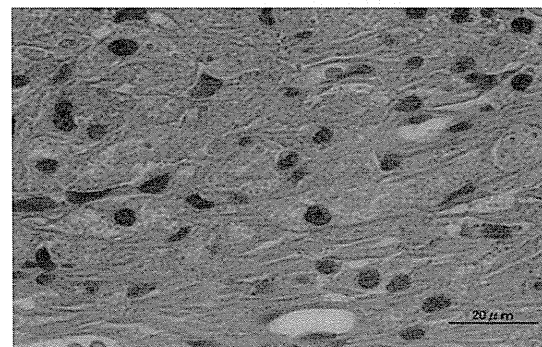


図9 移植後12週 HE染色

D. 考察

本研究では、腫瘍性否定試験の国際的なガイドラインとなっているWHOのTRS 878(Requirements for Use of Animal Cells as in vitro Substrates for the Production of Biologicals” in WHO Expert Committee on Biological Standardization, 47th Report (1998) (technical report series number 878)に準じて試験を行った。

一般的に細胞・組織加工製品の原材料となるヒト幹細胞は大きく2種に分けられる。一つは我々が用いているヒト体細胞、ヒト体性幹細胞であり、もう一つは胚性幹細胞(ES細胞)や人工多能性幹細胞(iPS細胞)である。

ES細胞やiPS細胞を移植した場合、残存していた未分化幹細胞が腫瘍形成しうる為に問題となる。造腫瘍性と未分化能の密接な関連を考慮した場合、我々が用いている軟骨細胞は間葉系幹細胞ではあるが、最終分化した細胞であると考えられる。

このことから、スタートの段階から懸念されるヒト幹細胞の造腫瘍性としてはリスクが低いことが分かる。

もう一つ造腫瘍性は検討するにあたり、考慮しなければならない点として、最終製品を作製するために行われる調整段階がある。

我々の研究では、組織からの単離、酵素処理、凍結保存、培養という人為的操作が該当する。細胞をシート状に回収する温度応答性培養皿を用いることについては、温

度応答性培養皿はGMPに則った製造工程で生産が行われており、医療機器に準拠した品質が保証されていること、温度応答性培養皿の製造を行っているセルシード社が海外で実施した治験で用いたものと同じ製品であり、欧州医薬品庁(EMA)が求める基材の安全性については十分検討されていることから、造腫瘍性に影響を及ぼすものとは考え難い。このことから、本研究で用いた検体は、最終製品を作製するまでの調整(組織からの単離、酵素処理、凍結保存、培養)を経たものを模した検体といえるであろう。

本研究は、細胞の調整という人為的操作により、細胞が造腫瘍性を獲得していないか、検討することを主目的としてTRS 878を準じて、造腫瘍性を確認したものである。

PD細胞を用いた同種移植の最終製品を免疫不全動物モデルに移植したが、移植した細胞の異常な増殖は確認されず、代謝され、分解されたと考えられる。

多指症は様々な合併症を持つことが多く、絶対的な原因はわかっていない。In vitro試験で染色体や遺伝子の異常の有無を確認しているが、それも移植された側の患者へ影響があるのか絶対的な確認は不可能である。このことから、in vivo試験である、本研究で細胞の異常増殖が否定されたことは、造腫瘍性の確認以上に有益な情報を得たと示唆される。

E. 結論

我々が同種細胞移植として検討している