

⑤ ハイブリプローブミックスを5 μL ずつ入れる

各 FITC 標識プローブおよび各 LcRed 標識プローブを各 0.02 pmol/ μL に調製する。

< A セットプローブの場合 >

HSV-1,2	FITC 標識プローブ*5	2 μL
HSV-1,2	LcRed640 標識プローブ	2 μL
VZV	FITC 標識プローブ	2 μL
VZV	LcRed640 標識プローブ	2 μL
B19	FITC 標識プローブ	2 μL
B19	LcRed640 標識プローブ	2 μL
HHV-6	FITC 標識プローブ	2 μL
HHV-6	LcRed705 標識プローブ	2 μL
CMV	FITC 標識プローブ	2 μL
CMV	LcRed705 標識プローブ	2 μL
BKV, JCV	FITC 標識プローブ	2 μL
BKV, JCV	LcRed705 標識プローブ	2 μL
β-Globin	FITC 標識プローブ	2 μL
β-Globin	LcRed640 標識プローブ	2 μL
Nuclease free water		972 μL
total		1,000 μL

\*5 各プローブは 100 pmol/ μL に調製したものをを用いる。

⑥ キャッピングツールを使用してキャピラリーに蓋をし、カローセルにセットする  
カローセルごと LightCycler 2.0 にセットし、PCR 反応を行う。

⑦ マルチプレックス PCR の実行

〈リアルタイム PCR 条件〉					TOTAL 40 分
			温度変化速度 (°C/s)	データ取得 タイミング	
熱変性	95 °C	2 分	20	Single	40 サイクル
↓					
熱変性	95 °C	2 秒	20	None	
アニーリング	58 °C	15 秒	20	None	
伸長反応	72 °C	15 秒	1	None	
↓					
冷却	40 °C	30 秒	20	None	

### 3. 融解曲線分析, 判定

① PCR 終了後、カローセルごと LightCycler 2.0 から取り出し、LC Carousel Centrifuge 2.0 で遠心し、PCR 反応液とハイブリプローブミックスを混合する

- ② カローセルを逆さにして暗所で1分静置する
- ③ 再びLightCycler 2.0にセットし、融解曲線分析を行う

＜融解曲線分析条件＞					TOTAL 10分
			温度変化速度 (°C/s)	データ取得 タイミング	
ハイブリダイズ	40°C	00秒 <sup>*6</sup>	20	None	} 3サイクル
熱変性	95°C	10秒	20	None	
↓					
熱変性	95°C	00秒	20	None	
ハイブリダイズ	40°C	20秒	4	None	
解離	80°C	00秒	0.2	Continuous	
↓					
冷却	40°C	10秒	20	None	

\*6 0秒は、設定温度に到達させることが目的である。

- ④ AnalysisでTm Callingを選択し、Color Compensation<sup>\*7</sup>をOnにする

SettingでManual Tmを選び、Tm値<sup>\*8</sup>を手動で確認し、チャンネルとTm値からウイルスの種類(図2A参照)を判定する。

- \*7 Color Compensationデータはあらかじめ取得しておかないと蛍光の漏れこみによりF2/F1, F3/F1の両方に同じピークが現れ判定を誤る恐れがある。
- \*8 サンプルの塩濃度が高いとTmも塩濃度に依存して変化するのでTm値全体が上がる。ICのピークを見て例えば1°C高ければ他のウイルスのピークも1~2°C高くなる。LightCycler 4.0のソフトで調節できる。

## 実験例

### 1. 2本のキャピラリーで合計12種類のウイルスを測定(図2)

A, Bセットで12種類のウイルスについて、図2Aに示されているTm値の差異によって明確に区別でき、検出・同定が可能になる。図2Aにウイルス種類別のTm値の目安を示す。このように、あらかじめポジティブコントロールで実際に検出するTm値を確認しておく必要がある。

もしネガティブコントロールが陽性になった場合はコンタミの可能性があるので、試薬をすべて変える。変えても検出する場合はPCRのアニーリング温度を最適化する。あるいは新しいプライマーに変更する。

セット	チャンネル	Target	Tm(°C)
A	640 (F2)	IC( $\beta$ -globin)	51
		HSV-1	56
		VZV	61
		B19	64
		HSV-2	69.5
	705 (F3)	HHV-6	53.5
		CMV	60
BKV		65	
B	640 (F2)	IC( $\beta$ -globin)	51
		EBV	64
	705 (F3)	HHV-7	56
		HHV-8	62.5
		HBV	66

F1 : F1TC  
 F2 : LcRed 640  
 F3 : LcRed 705

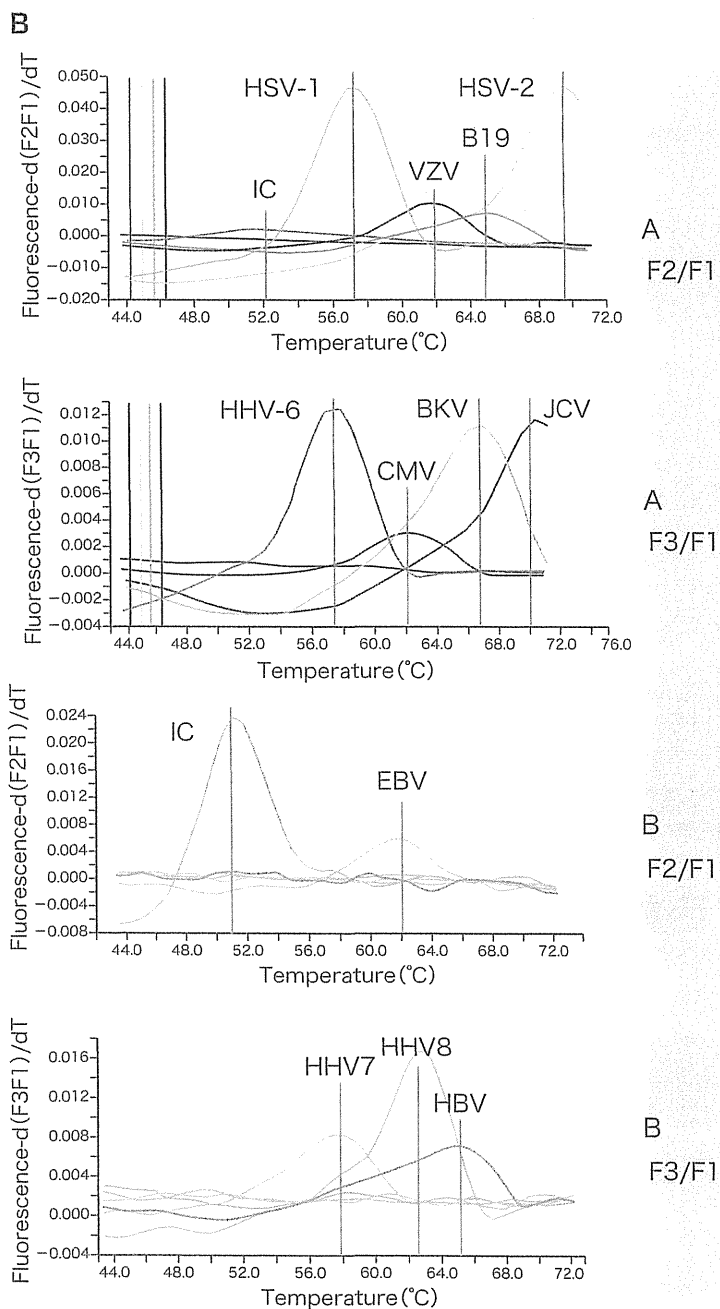


図2 標準DNAを用いたウイルスA, Bセット2本の検出結果

IC遺伝子を含め、ピークが何も検出されない場合は、サンプル抽出がうまくいっていない場合が想定される。

## 2. 構築されたウイルス検査系を使用した眼疾患検査への利用例

眼科疾患においてブドウ膜炎の原因の多くは自己免疫疾患とウイルス・細菌などによる感染症のいずれかで起こることが知られている。原因によって治療法が全く異なるため、原因を迅速に決定し適切な治療を行うことが患者QOLを確保するうえできわめて重要である。また採取できる眼科検体は微量であり、個別に多くの項目を測定するためには検体を薄める必要があり、検出感度が低下する。したがって、マルチプレックスPCRにより高感度かつ多項目の同時測定

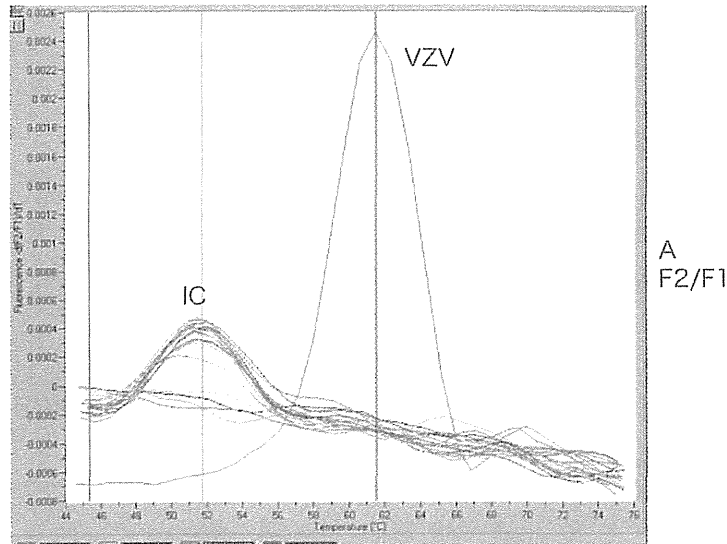


図3 複数の検体の1つからVZVが検出された例

を行うことが望ましい<sup>2)</sup>。

図3は複数サンプルを同時に測定した例で、1検体から水痘帯状疱疹ウイルス (varicella-zoster virus : VZV) が検出された。その他のサンプルからはIC ( $\beta$ -Globin) のみが検出され、ウイルス陰性であったことを示している。

## 固相化試薬とプレートタイプPCR装置を使用した網羅的検査系

プレートタイプPCR装置を使用した網羅的ウイルス検査系では、プローブをPCR反応後に加えることが難しいためマルチプレックスPCRの感度が低下してしまう懸念がある。予備的検討では、1つの反応場で行うPCR反応を3つ程度に抑えればプライマー・プローブの配列をそれほど吟味しなくても良好な結果を得られるとの結果が出ていた。しかし、多項目の検出を行おうとすると多数のウェルを使用する必要があるため、試薬のセットアップに長時間を要する欠点がある。本検査系では、あらかじめプライマー、プローブ、安定化剤等を固相化した試薬を準備することで、短時間で多くの項目を網羅的に検査することが可能となった。また、プローブをはじめから投入するため、半定量的結果を得ることが可能である。

### 準備

固相化ウイルス測定試薬 (固相化ストリップ)

日和見感染症セット (日本テクノサービス社)、DNA・RNAウイルス・マイコプラズマ定性試薬セット (日本テクノサービス社) など。プライマー・プローブ、安定材などが固相化されたもの (図4)。50コピーの検出をCt値40以下で行えるように調製されている。

サンプルDNA 100 ng

リアルタイムPCR装置

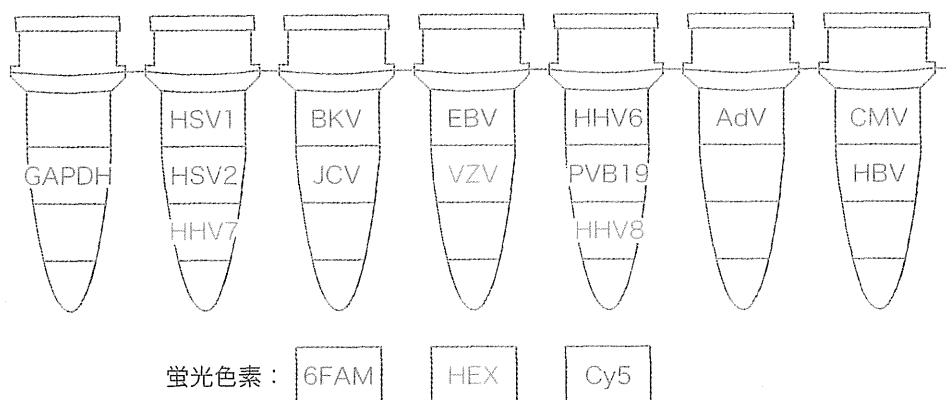


図4 固相化ウイルス測定試薬のイメージ

検出プローブの蛍光色素を組み合わせることで、1ウェルで1～3種類のウイルスを検出できる

LightCycler® 480 (ロシュ・ダイアグノスティックス社), CFX96 Touch™ リアルタイムPCR (バイオ・ラッド社), PikoRealリアルタイムPCR (サーモサイエンティフィック社) など。

- PCR 定量用 Buffer (#B002, 日本テクノサービス社)
- PCR 反応液定量用増幅酵素 (#T002, 日本テクノサービス社)  
詳細については日本テクノサービス株式会社へ直接問合せる。
- 標準 DNA

各検査項目に対応した標準DNA。検査対象のウイルスゲノムなどを取得することが困難である場合が多いため、一般的には、検査する際に増幅させる領域を含むDNA断片をPCRで増幅した産物や、その領域が挿入されたプラスミドを用いる。調製した標準DNAのコピー数は、DNAの濃度と断片の長さから、以下の式で計算する。

$$1 \text{ コピーの質量 (Y g)} = \frac{\text{DNA断片鎖長} \times 660 \text{ (1 bpの平均分子量)}}{6.02 \times 10^{23}}$$

$$\text{コピー数濃度} = \frac{\text{DNA溶液の濃度 (g/}\mu\text{L)}}{1 \text{ コピーの質量 (Y g)}}$$

- マイクロタイタープレート対応ミキサー
- 分注機

ウイルスの検査をするにあたって、人為的な間違いやコンタミネーションは結果に甚大な影響を及ぼす。また、一度に多くのサンプルを処理する場合は、その危険性が高くなる。このようなリスクを低減するため当研究室では、小型で安価な自動分注機 (Nadeshiko II : #BM-N002, ジーンワールド社) を共同開発・運用している。

## プロトコール

1反応分がチューブに固相化された日和見感染症セットの8連ストリップ (8連チューブ) を用いた場合の実験手順を以下に示す。なお、PCRは高感度であるため、コンタミネーションの影響を受けやすい。そのため、反応液を調製する場所は、クリーンに保つことが重要である。当研究室では、検査をする実験室とその他の実験室を別にし、さらにPCR反応液の調製はクリーンベンチ内で行うなど、コンタミネーションのリスクを減らす取り組みを行っている。

① 目的に応じたマルチプレックス検出系の選択

② 反応液の調製

以下の組成のリアルタイムPCR反応溶液を調製する\*1\*2。サンプルが多いときには分注機を用いる。

PCR 定量用 Buffer	9.8 μL
PCR 定量用増幅酵素	0.2 μL
サンプルDNA	300 ng
超純水	適量
Total	20 μL

- \*1 日和見感染症セットは7ウェルで13項目について検査するため、反応液の調製は7~8ウェル分を先に準備して、それを各ウェルに分注する。
- \*2 8連ストリップには、プライマー・プローブそして安定化材が固相化されている。そのため、反応液を加えたあとよくピペティング（5~10回程度）、あるいはプレートミキサーを使用しよく攪拌し均一化する必要がある。

③ リアルタイムPCR反応

以下の温度条件でPCR反応を行う。LightCycler® 480, CFX96 リアルタイム PCR, Piko-Real については、以下の条件で増幅検出できることを確認している。

ポリメラーゼの活性化	95°C	10秒	
↓			
熱変性	95°C	10秒	
アニーリング	60°C	30秒	

④ 実験データの解析

リアルタイムPCR反応後、解析装置付属の解析ソフトを用いて増幅曲線を確認し、ウイルスの陰陽判定を行う。

各種装置付属解析ソフトのアルゴリズムは、それぞれ独自のものを使用しているため、それぞれの手順書に従って解析する。ほとんどの解析ソフトが、増幅曲線からCt値を計算するための閾値やバックグラウンドを自動で設定する機能がついているので、これを利用し参考にしながらそれぞれの設定を行うこともできる。

また得られたCt値から、あらかじめ標準DNAを用いて検量線を作成しておくことで、半定量的な情報を得ることができる。

実験例

血液から抽出したDNAと日和見感染症セットを用いて、実際のウイルス検査の結果を図5に示す。本項で紹介したプロトコールを実際の血液サンプルでテストした結果、多くのサンプルから複数のウイルスが検出された。このように、網羅的な検査は、標的を絞った検査では見落とす可能性のあるウイルスを検出することができる大きなメリットである。

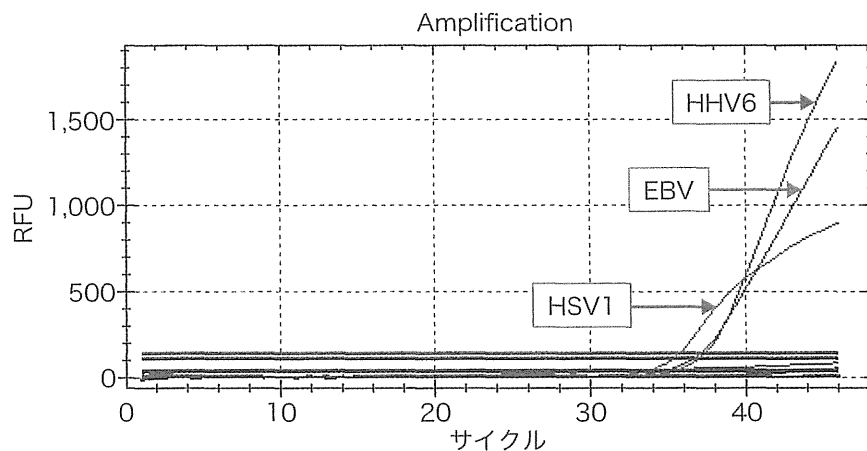


図5 日和見感染症セットを実際の血液サンプルを用いて解析した結果

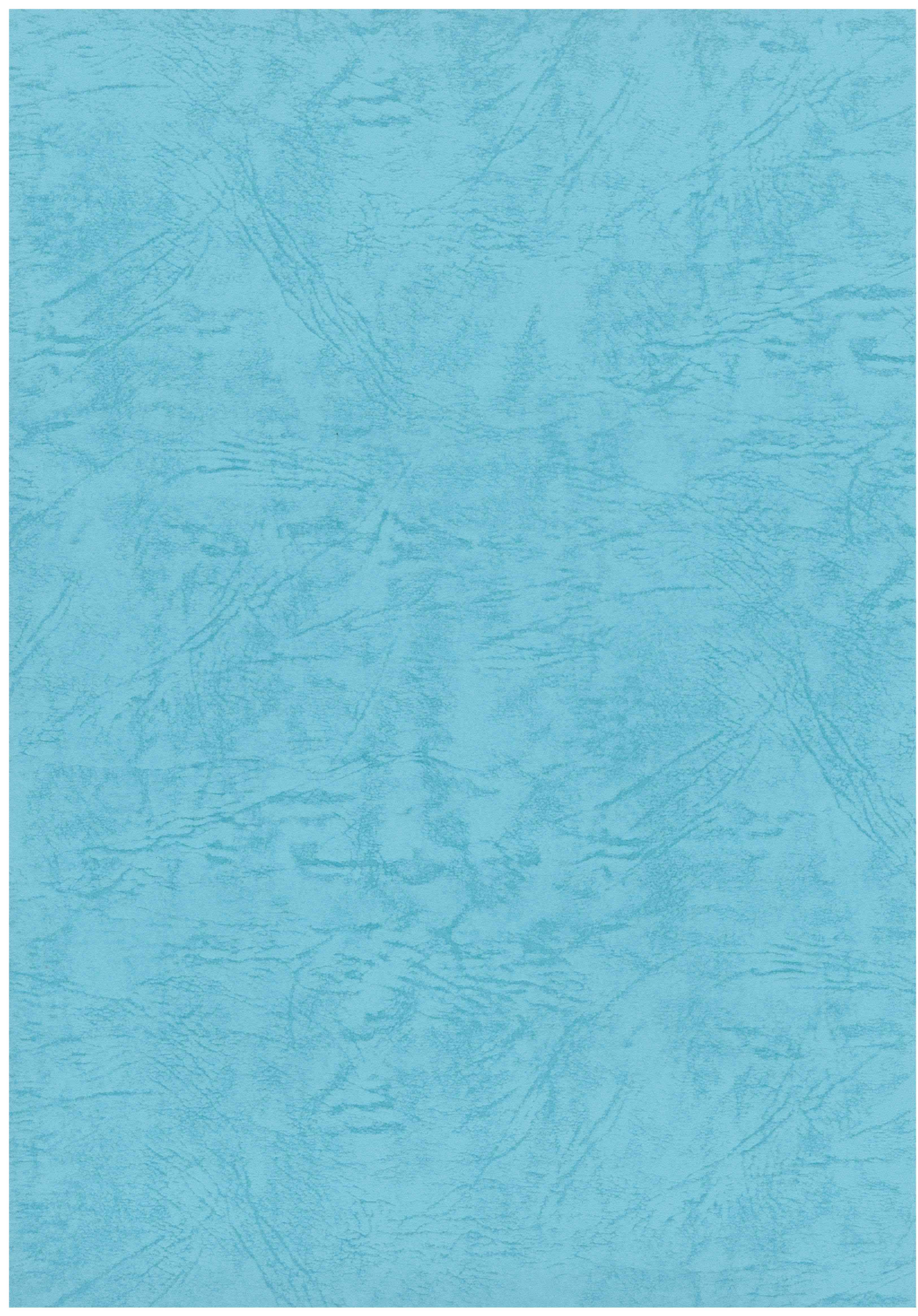
## おわりに

本項では当研究室で主にウイルスの検出を目的として開発したマルチプレックスPCR検出系を解説した。マルチプレックスPCR法による網羅的ウイルス検査は、ウイルス感染症が疑われる疾患の病因特定に有用な情報を与えることができるため、すでに多くの医療施設で利用されている。一方、iPS技術の登場により再生医療に対する注目度が高まっているが、ヒトには多くの病原体が持続感染しているため治療用細胞製剤の原材料には微生物汚染のリスクが避けられない。細胞製剤は滅菌操作をすることが不可能なため、安全に治療を行うためには微生物検査を徹底することが非常に重要であり、マルチプレックスPCRを応用した本検査法は細胞製剤の安全管理法として注目されている。また、本項で記したように、あらかじめ固相化試薬を準備しておけば、さまざまな遺伝子検査を簡便に実施することが可能になる。固相化ストリップの作製技術は日本テクノサービス社と共同開発した成果であり、必要な固相化ストリップの製造を委託することが可能である。本プロトコールに関する技術的な質問は、東京医科歯科大学難治疾患研究所ウイルス治療学 清水則夫 (nishivir@tmd.ac.jp) まで。

### ◆参考文献

- 1) Ito, K. et al. : Intern. Med., 52 : 201-211, 2013
- 2) Sugita, S. et al. : Br. J. Ophthalmol., 92 : 928-932, 2008
- 3) 『医薬品の品質管理とウイルス安全性』(日本医薬品等ウイルス安全性研究会/編), 文光社, 2011







201306021A (2/2)

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

滑膜幹細胞による半月板・関節軟骨の治癒促進・再生

平成25年度 総括研究報告書  
(平成25年度繰越補助事業を含む)

2 / 2 冊

研究代表者 関矢 一郎

平成27(2015)年 2月

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

滑膜幹細胞による半月板・関節軟骨の治癒促進・再生

区分	氏名	所属	職名
研究代表者	関矢 一郎	東京医科歯科大学	教授

## 目 次

- I. 総括研究報告（平成25年度繰越補助事業を含む）  
滑膜幹細胞による半月板・関節軟骨の治癒促進・再生……………7  
研究代表者 関矢 一郎  
（東京医科歯科大学 再生医療研究センター 教授）

# I. 総括研究報告

(平成25年度繰越補助事業を含む)



厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）  
総括研究報告書  
（平成 25 年度繰越補助事業を含む）

「滑膜幹細胞による半月板・関節軟骨の治癒促進・再生」

研究代表者

関矢一郎 東京医科歯科大学・再生医療研究センター 教授

研究要旨

平成 25 年度は、半月板損傷に対する半月板修復術の治療成績を向上させるために、自家滑膜間葉系幹細胞移植術の安全性、効果及び実施可能性の評価目的とする臨床研究「半月板縫合後の滑膜幹細胞による治癒促進」を開始した。また、滑膜幹細胞の薬事承認を目指し、PMDA の薬事戦略相談を活用しながら、治験開始までに必要な GLP 準拠の急性毒性試験を実施した。

臨床研究の実施体制は、研究代表者の関矢、分担研究者の宗田が臨床を担当し、分担研究者の森尾が製造管理を、また、分担研究者の清水が滑膜幹細胞の品質管理を担当している。平成 25 年 12 月に 1 例目の被験者を組み入れ、半月板縫合術及び滑膜採取、滑膜幹細胞の培養を実施したが、滑膜幹細胞の増殖が悪く移植を中止した。培養不成立の原因を、原料の滑膜、自己血清の両面から検討した。滑膜に問題があった可能性としては、滑膜のウイルス感染の可能性を検討した。培養不成立となった被験者の滑膜からは、ごく僅かのパルボウイルス B19 とヒトヘルペスウイルス 7 が検出されたが、培養に伴いウイルスは検出されなくなり、培養中のウイルス増殖の可能性は否定された。私たちのウイルス検査のシステムでは検出できないウイルス感染の可能性も考えられたため、培養細胞 12 日目の細胞を次世代シーケンサーで解析したが、ウイルスの塩基配列は全く検出されなかった。自己血清に問題があった可能性としては、採血に用いた血液バッグから溶出した可塑剤フタル酸ジ (2 エチルヘキシル) (DEHP) が細胞増殖を阻害した可能性を検討した。培養不成立となった被験者の血清中には約  $6 \mu\text{g/mL}$  の DEHP が検出されたものの、その 100 倍量の DEHP を滑膜幹細胞の培養系に添加しても細胞の増殖は阻害されなかったことから、DEHP が細胞増殖阻害の原因である可能性も否定された。これらの検討の結果、培養不成立の原因を特定することはできなかったが、自己血清の細胞増殖性を他家の滑膜幹細胞を用いて滑膜採取前に調べ、細胞増殖性が担保されていることを確認してから滑膜採取に進むプロトコルに変更した。

滑膜幹細胞の培養は、過去に実施した軟骨再生の臨床研究や本臨床研究のリハーサルでは全く問題がなく、今回のケースは初めてのことであった。予想外の事由により平成 26 年 3 月末までに 5 例の細胞移植を完了することが困難になったため、細胞移植は平成 25

年度の繰越事業として平成 26 年度に実施した。細胞移植は順調に進み、平成 26 年 11 月に 5 例目の細胞移植を終了した。

#### 研究分担者

宗田 大 東京医科歯科大学・大学院・運動器外科 教授

森尾友宏 東京医科歯科大学・大学院・発生発達病態学分野 准教授

清水則夫 東京医科歯科大学・難治疾患研究所・ウイルス治療学 准教授

#### A. 研究目的

半月板損傷に対してわが国で唯一の温存手術は縫合術であるが、再断裂の可能性があり、必ずしも縫合術が積極的に行なわれている状況ではない。平成 24 年度厚労省社会医療診療行為別調査によると、半月板手術は年間に約 3 万件で、うち縫合術はわずか 8% のみであり 90% 以上が切除術であった。本臨床研究では、半月板損傷部の状態が悪くて現状では縫合術の適応にならない半月板損傷患者を対象とし、縫合術後に滑膜幹細胞を移植することにより、半月板損傷に対する半月板修復術の治療成績を向上させることを目的とする。半月板の消失・機能不全は、変形性膝関節症の原因となる。私たちの細胞治療により半月板を切除せず温存できれば、変形性膝関節症が原因の要介護を減らし、人工膝関節等の終末期高額医療に関わる医療費の軽減が見込まれる。

#### B. 研究方法

(1) 臨床研究「半月板縫合後の滑膜幹細胞による治療促進」

#### 治療計画：

膝半月板損傷の患者にまず半月板縫合術を行い、その際に滑膜組織を約 0.5 g 採取する。採取した滑膜から滑膜幹細胞を単離し、14 日間培養して滑膜幹細胞を増殖させる。14 日後に滑膜幹細胞を回収し、細胞の安全性を確認後、手術室にて移植する。移植は腰椎麻酔により下半身を麻酔後、関節鏡視下に、注射器を使用して細胞浮遊液を半月板縫合部に滴下、10 分間静置する。後治療は、従来の半月板修復術と同等とする。術後観察は、半月板縫合術を基準日とし、術後 4、6、12、24 週に、全身所見、臨床検査、局所症状の観察と評価、自覚症状のアンケート、画像検査を行う。

#### 安全性の評価：

本臨床研究の主要な目的は、滑膜幹細胞移植術の安全性の評価。主要評価項目である臨床研究中被験者に生じた有害事象の有無、重症度、重篤性、発現頻度、副次評価項目の自家滑膜間葉系幹細胞移植術の実施・完遂の可否、具体的には滑膜幹細胞の出荷承認書の品質管理項目および出荷判定で評価する。また、滑膜幹細胞移植の際、関節鏡視下で縫合部位を観察して炎症の有無等確認する。

#### 滑膜幹細胞移植の効果：

滑膜幹細胞移植の効果は、副次評価項目の患肢の自覚症状 (KOOS 及び NRS アンケー

ト) 及び医師の診断する局所症状 (局所観察、徒手検査、Lysholm スコア)、MRI 画像診断による半月板修復の程度 (Mink の分類に基づく半月板のグレード、評価、断裂形態)、X 線検査による関節裂隙の厚さで評価する。

#### 症例数 :

5 例

#### 組み入れ基準 :

以下の選択基準及び除外基準を満たす膝半月板損傷患者

##### [選択基準]

- 1) 横断裂、水平断裂、複合断裂、変性断裂等で、一般的に半月板切除術の適応となるような断裂形態の症例
- 2) る症例
- 3) 臨床症状に対し手術治療の適応がある症例
- 4) 半月板修復術が技術的に可能と考えられる症例
- 5) 臨床研究開始前の同意取得時に20歳以上
- 6) 文書での本臨床研究への参加の同意が得られた患者

##### [除外基準]

- 1) 文書での本臨床研究への参加の同意が得られない患者
- 2) 活動性の感染がある患者
- 3) ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1、HIV-2)、B 型肝炎ウイルス (HBV)、C型肝炎ウイルス (HCV)、成人T細胞白血病ウイルス (HTLV-1) のいずれかが陽性の患者

- 4) 活動性の悪性腫瘍を有する患者
- 5) 抗生物質に過敏な患者
- 6) 妊娠している、または授乳中の患者
- 7) 糖尿病がある患者
- 8) 全身状態が悪い患者
- 9) 担当医が本臨床研究への参加を不適当と判断した場合

#### (倫理面への配慮)

本臨床研究は介入研究であり、医学部倫理審査委員会の承認を得て実施している。また、ヒト幹細胞を用いる臨床研究として、厚生労働大臣の了承を得て行われている。「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」、及び本臨床研究実施計画書を遵守し、「医療機器GCP省令」に準拠して実施している。

#### (2) ノードラットを用いた滑膜幹細胞の急性全身毒性試験

滑膜幹細胞の薬事承認を目指し PMDA と事前面談を実施し、承認には GLP 準拠の安全性試験が必要であること確認した。「ヒト (自己) 体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」(平成 24 年 9 月 7 日付薬食発 0907 第 2 号)、「医療機器の製造販売承認申請に必要な生物学的安全性評価の基本的な考え方について」(平成 24 年 3 月 1 日付薬食機発 0301 第 20 号) で考慮すべき評価項目として挙げられている試験項目について検討し、急性全身毒性試験を計画した。動物種は、ヒトの細胞を投与しても拒絶反応の起こらない免疫不全動物で、臨床投与経路と同じく膝関節内に投与可能なノードラットを選択した。動物数、投与回数、試験期間、観察項目及

び検査項目は、医療機器の生物学的安全性試験法ガイダンスを参考に設定した。

## C. 研究結果

### (1) 臨床研究「半月板縫合後の滑膜幹細胞による治癒促進」

#### 製造・品質管理体制の整備

滑膜幹細胞の製造を行う本学細胞治療センターは ISO9001 を取得した施設であるが、環境整備や環境モニタリングの改善を実施し、整備された環境のもと問題のない手順にて製造が実施されている。品質管理に関しても、滑膜幹細胞製造の各工程において、ウイルス・マイコプラズマ検査、無菌試験、エンドトキシン試験、細胞数算定の工程内管理試験を実施し、安全性の確保された細胞のみ移植する体制を整備した。

#### 臨床研究の実施

平成 25 年 12 月 5 日に 1 例目の被験者を組み入れ、半月板縫合術、滑膜採取を行い、滑膜幹細胞の培養を開始した。滑膜組織搬入時のウイルス・マイコプラズマ検査において、ヒトヘルペスウイルス 7 及びパルボウイルス B19 が陽性であったが、被験者の除外基準のウイルス以外の場合は追試験でウイルスの定量試験を実施し、 $\mu\text{g}$  DNA 当たりのウイルス量が製造工程の進行に伴い増加していることが確認された場合は研究を中止するが、製造工程の進行に伴い減少する場合は製造を続行し、その後の処置は主治医の意向に従うという計画に従った。培養 12 日目に観察した際、細胞形態異常及び細胞増殖悪化を確認したた

め、本被験者の研究は移植前で中止した。

#### 培養不成立の原因解明

培養不成立の原因として、自己血清および滑膜に問題があった可能性を検討した。異常を確認した培養 12 日目の細胞を回収し、同じロットの  $\alpha$ -MEM 培地に FBS を 10% 添加した培地に播き替えて培養を続した。その結果、細胞は形態、増殖ともに通常の状態に戻ったことから、自己血清に問題があった可能性が示唆された。

本臨床研究で使用した血液バッグ「セルエイド」には、可塑剤としてフタル酸ジ(2エチルヘキシル) (DEHP) が含まれていたため、溶出した DEHP が細胞増殖を阻害した可能性を検討した。ガスクロマトグラフィー質量分析法による血清中 DEHP の定量を、ボゾリサーチ株式会社への委託試験として実施した。その結果、1 例目の被験者の血清中には  $5.66 \mu\text{g/mL}$  の DEHP が検出された。比較のために準備したボランティアの血清にも  $2\sim 3 \mu\text{g/mL}$  の DEHP が検出されたが、血清の非働化処理によって DEHP 溶出量が約 2 倍に増加することがわかった。

血清中の DEHP が増殖阻害の原因物質であるかを確認するために、血清中の DEHP 濃度  $5.66 \mu\text{g/mL}$  の結果と血清含有量 10% から培地中の DEHP 濃度を約  $0.6 \mu\text{g/mL}$  と算出し、その 1000 倍量まで滑膜幹細胞の培養系に添加して、細胞増殖が阻害されるか否かを調べた。その結果、100 倍量の DEHP を滑膜幹細胞の培養系に添加しても細胞の増殖は阻害されなかった。

自己血清に何らかの問題があったとすれば、本被験者以外の滑膜幹細胞でも増殖が阻害されるであろうと考え、研究室保管



のヒト滑膜幹細胞を本被験者の自己血清を含む培地で培養し、増殖が阻害されるか否かを調べた。複数の保管滑膜幹細胞で検討したが、すべての細胞において、細胞形態および細胞増殖異常は認められなかった。

培養不成立の原因として、被験者の滑膜に問題があった可能性を検討した。本被験者の滑膜はヒトヘルペスウイルス7とパルボウイルス B19 が陽性であったが、培養に伴いウイルスの定量値は低下していた。従って、パルボウイルス B19 とヒトヘルペスウイルス7陽性の滑膜であったことが、滑膜幹細胞培養不成立の原因とは考えにくかった。しかし、私たちのウイルス・マイコプラズマ検査システムでは検出できない微生物に感染していたため、細胞の増殖が抑制された可能性も考えられるため、保存してある培養 12 日目の細胞から DNA を抽出し、次世代シーケンサーにかけ、外来微生物のシーケンスを解析した。その結果、ウイルスやマイコプラズマの配列は何も検出されなかった。

### 繰越で実施した細胞移植

これまで自己血清の品質管理としては、ウイルス・マイコプラズマ検査で血清の安全性を確認し使用していた。しかし、滑膜幹細胞の培養不成立を受けて、自己血清の細胞増殖性を他家の滑膜幹細胞を用いて滑膜採取前に調べ、細胞増殖性が担保されていることを確認してから滑膜採取に進むプロトコルに変更した。

平成 26 年 8 月に再開 1 例目の被験者に細胞移植を実施した。移植は順調に進み、11 月には 5 例目の被験者に移植を終了し

た。

### (2) ノードラットを用いた滑膜幹細胞の急性全身毒性試験

GLP 認証を取得している株式会社日本バイオリサーチセンターへの委託試験として実施した。

滑膜由来間葉幹細胞の安全性に関する非臨床試験の一環として、ヒト滑膜由来間葉幹細胞を雄ノードラットに 1 回関節内投与し、その毒性について検討した。

滑膜由来間葉幹細胞の投与量は、細胞懸濁液として調製可能な上限濃度である  $1 \times 10^5$  cells/ $\mu$ L と、関節腔内組織を物理的圧迫しないと考えられる上限液量である 40  $\mu$ L/膝から算出される  $8 \times 10^6$  cells/匹を設定していたが、細胞数が予定を下回り  $2.56 \times 10^6$  cells しか回収できなかったため、当試験の投与量は、得られた細胞全てを用いて 5 匹分投与できる  $2.86 \times 10^5$  cells/匹とした。対照として、滑膜由来間葉幹細胞を懸濁しているバッファを同液量投与する群を設けた。

投与日の一般状態は、群分け前、投与直後及び投与後 4 時間に、その後は 24 時間、48 時間及び 72 時間に、ISO10993-11: 2006, Annex C Table C.1 の項目について観察した。体重は、投与日の投与前、投与後 24 時間、48 時間及び 72 時間に測定した。全例について各観察期間終了時に、4%ペントバルビタールナトリウムの腹腔内投与 (40 mg/kg) 麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検した。

ヒト滑膜由来間葉幹細胞の投与により、一般状態、体重推移及び剖検とも異常は認められず、急性全身毒性の判定基準からは、

ヒト滑膜由来間葉幹細胞に急性全身毒性はないものと判定された。しかしながら、実際の投与量は  $2.86 \times 10^5$  cells/匹であったため、試験計画書設定の  $8 \times 10^6$  cells/匹を下回り試験の評価目的を満たさないため、ヒト滑膜由来間葉幹細胞の急性全身毒性について、評価しないこととした。なお、実際の投与量は  $2.86 \times 10^5$  cells/匹 (200 g) は、ヒト臨床で予定される投与量 ( $5 \times 10^7$  cells/50 kg) とほぼ同じであった。

#### D. 考察

細胞増殖パターンは、被験者の組織の質や血清中の成長因子などに依存し、個体差が大きいことが知られている。滑膜幹細胞はウシ胎児血清 (FBS) を含む培地でもよく増殖し、FBSの方が一定の品質を確保しやすい。しかし、FBSでは滑膜幹細胞にウシ由来の物質が残存する可能性があり、安全性の面では自己血清の方が優れていると考えられる。また、私たちはこれまでの基礎研究で、滑膜幹細胞はFBSよりも自己血清で効率よく増殖することを報告している。膝軟骨損傷を対象とする過去に実施した臨床研究においても患者の自己血清で培養し、いずれも問題なく増殖し、自己血清は安全性および品質の面で問題ないと判断し、自己血清を用いる培養を採用した。

今回のような培養不成立の問題に直面し、将来的には血清の個体差に左右されない無血清培地の使用も検討する余地はあるが、本臨床研究においては、自己血清の細胞増殖性が担保されていることを、患者

から滑膜を採取する前に確認してから使用することにした。自己血清の品質管理試験を強化して再開した臨床研究では、培養はすべて順調に進み問題は起こらなかったが、今後、自己血清の細胞増殖性に問題がある場合もありうる。そのような場合にはFBSも使用できるように、FBSを含む培地で培養し回収した細胞懸濁液に残存するFBS量を知る必要がある。

私たちは自己血清を調製するのに、血液成分分離バッグ「セルエイド」を使用した。このバッグは血小板を活性化するビーズを含み、完全閉鎖系で増殖因子を多く含む血清を調製できるメリットがあるため採用した。自己血清の分析の結果、「セルエイド」を用いて調製した血清には  $2 \sim 3 \mu\text{g/mL}$  のDEHPが検出され、非働化处理によってDEHPの溶出量が約2倍に増加することがわかった。滑膜幹細胞の培養系にDEHPを添加する実験から、今回検出された濃度の100倍量でも細胞増殖を阻害するには至らなかったが、本バッグで調製した血清を非働化する必要がある場合は、DEHPを含まない別の容器に移してから非働化した方が安全であろう。また、私たちは採血バッグを振盪する時間を使用説明書に従い室温30分としているが、この振盪はビーズによる血小板の活性化の目的で行う操作であるので、血清中の増殖因子を増やすためには、振盪時間や温度、血清に分離する前の保存時間など、検討の余地があることが示唆された。

#### E. 結論

細胞の増殖が途中で悪化したため、平成

25年度1例目被験者の細胞移植は中止した。培養不成立の原因を特定することはできなかったが、自己血清の細胞増殖性が担保されていることを培養前に確認してから滑膜を採取するプロトコルに変更し、臨床研究を再開した。平成25年度の繰越補助事業として、平成26年8月～11月にかけて5例の被験者に滑膜幹細胞を移植した。移植は順調に進み、平成26年度の継続補助事業で術後の経過を観察している。

#### F. 健康危険情報

報告すべき健康被害、健康危険情報は無い。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### 国際誌

1. Matsukura Y, Muneta T, Tsuji K, Koga H, Sekiya I. Mesenchymal stem cells in synovial fluid increase after meniscus injury. *Clin Orthop Relat Res*. Dec 13 2013 Epub ahead of print
2. Katagiri H, Muneta T, Tsuji K, Horie M, Koga H, Ozeki N, Kobayashi E, Sekiya I. Transplantation of aggregates of synovial mesenchymal stem cells regenerates meniscus more effectively in a rat massive meniscal defect. *Biochem Biophys Res Commun*. **453**: 603-9, 2013
3. Hatsushika D, Muneta T, Horie M, Koga H, Tsuji K, Sekiya I. Intraarticular injection of synovial stem cells promotes meniscal regeneration in a rabbit massive meniscal defect model. *J Orthop Res*. **31**: 1354-9,

2013

###### 著書

1. 関矢一郎 半月板損傷 **スポーツ整形外科マニュアル** 165-72, 2013
2. 関矢一郎 関節軟骨損傷 **スポーツ整形外科マニュアル** 194-6, 2013
3. 関矢一郎 変形性膝関節症 **スポーツ整形外科マニュアル** 197-200, 2013

###### 国内雑誌

1. 堀江雅史, 宗田 大, 関矢一郎 滑膜由来間葉系幹細胞による膝半月板再生炎症と免疫 **21**: 58-66, 2013
2. 堀江雅史, 宗田 大, 関矢一郎 滑膜由来間葉系幹細胞を用いた半月板再生の基礎と臨床への展望 **整形・災害外科** **56**: 593-601, 2013
3. 関矢一郎, 初鹿大祐, 宗田大 半月板治療の限界と将来展望; 滑膜幹細胞による半月板再生 **Monthly Book Orthopaedics** **26**: 73-9, 2013
4. 関矢一郎 Save the meniscus **整形外科** **65**: 9, 2014

##### 2. 学会発表 (研究代表者分)

###### 国際学会

1. Sekiya I, Muneta T. Arthroscopic transplantation of synovial MSCs for cartilage regeneration. 11<sup>th</sup> International Cartilage Repair Society annual meeting, Izmir, Turkey, Sep 15-18 2013

###### 国内講演

1. 関矢一郎, 宗田 大 滑膜由来の間葉系幹細胞を用いた関節軟骨再生・変形性膝

関節症に対する私たちの取り組み 第  
57 回日本リウマチ学会総会・学術集会  
京都 2013 年 3 月 20 日

2. 関矢一郎、宗田 大 滑膜間葉系幹細胞  
を用いる軟骨再生医療の実際:特に安全  
性の観点から 第 86 回日本整形外科学  
会総会 広島 2013 年 5 月 23 日
3. 関矢一郎 滑膜幹細胞による軟骨・半月  
板再生 第 4 回関節治療研究会 東京  
2013 年 5 月 29 日
4. 関矢一郎、宗田 大 滑膜幹細胞による  
軟骨・半月板再生:基礎から臨床まで現  
状と展望 第 5 回日本関節鏡・膝・スポ  
ーツ整形外科学会 札幌 2013 年 6 月  
20-22 日
5. 関矢一郎、宗田 大 滑膜幹細胞による  
半月板治癒促進 第 5 回日本関節鏡・  
膝・スポーツ整形外科学会 札幌 2013  
年 6 月 20-22 日
6. 関矢一郎 滑膜幹細胞による軟骨・半月  
板再生 第 26 回日本臨床整形外科学会  
静岡 2013 年 7 月 14 日
7. 関矢一郎 滑膜幹細胞による軟骨・半月  
板再生医療の開発 山梨運動器再生セ  
ミナー 山梨 2013 年 9 月 12 日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

該当無し

##### 2. 実用新案登録

該当無し

##### 3. その他

該当無し