

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
分担研究報告書

「滑膜幹細胞による半月板・関節軟骨の治癒促進・再生」

研究分担者

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

研究要旨

滑膜幹細胞を使用した半月板・関節軟骨の治癒促進・再生の臨床研究の実施に際し、ウイルス・マイコプラズマ安全性を確保するため培養細胞の検査(ウイルス 17 種類とマイコプラズマ)を担当した。第 1 例目に組み入れられた被験者の血液と滑膜組織から HHV7 と parvoB19 が検出されたが(他のウイルスはすべて陰性)、培養 12 日目の細胞と培養液からはウイルスは検出されず、培養中のウイルス増幅の可能性は否定された。マイコプラズマはすべて陰性だった。

A. 研究目的

体性幹細胞加工医薬品等の製造においては、原材料となる組織・細胞の採取や培養の工程中に絶えず微生物汚染のリスクがあり、また最終製品からの微生物クリアランスや滅菌操作ができない特性があるため、微生物汚染の有無・程度を正しく評価し治療の安全性を確保することが重要である。我々はこれまでに、17 種のウイルス(各種指針に記載のウイルスや持続感染するウイルスを中心に選定)及び、日本・欧州・米国の 3 極薬局方のいずれかに記載されているマイコプラズマ 9 種類をすべて検出可能なマルチプレックス PCR 検査系を確立している。さらに、検出試薬の固相化法を確立し、分注機およびリアルタイム PCR 機と組み合わせたウイルス・マイコプラズマの自動検査システムの開発も進めている。本研究では、本学細胞治療センターで培養する

滑膜・培養滑膜由来間葉系幹細胞および患者血液のウイルス・マ

イコプラズマ検査を実施するとともに、滑膜由来間葉系幹細胞を使用する際の安全管理法の確立に資するデータを蓄積することを目的に研究を実施した。

B. 研究方法

1. 検査項目

DNA ウイルス： HSV1, HSV2, VZV, EBV, CMV, HHV6, HHV7, HHV8, BKV, JCV, ParvoB19, HBV (12 種類)

RNA ウイルス： HCV (1 種類)

レトロウイルス： HIV1, HIV2, HTLV1, HTLV2 (4 種類)

マイコプラズマ： 11 種類のプライマーと 5 種類のプライマーを使用したマルチプレックス PCR 法により、遺伝子配列から 142 種類のマイコプラズマ属の菌種が検出可能

と推定される。3極薬局方に記載の9種類を含む17種類のマイコプラズマ属の菌種を10cfu/mlの感度で検出可能なことを実証済み。

2. 検査検体

平成25年12月5日に第1例目として被験者として組み入れられた58歳男性の血液・滑膜組織・培養12日目の滑膜由来間葉系幹細胞と培養上清を検体として用いた。

3. 核酸抽出

DNA抽出：QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)を用い、血液・滑膜組織・培養12日目の滑膜由来間葉系幹細胞からDNAの抽出を行った。

RNA抽出：RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用い、血液・滑膜組織・培養12日目の滑膜由来間葉系幹細胞からRNA抽出を行った。当該キットは組織又はペレット状となった細胞からRNAを抽出するキットのため前処理が必要である。前処理として血液は、細胞成分と液体成分(血漿)を遠心分離し、細胞成分をさらに溶血処理後、白血球のみからRNAの抽出を行った。滑膜組織はホモジナイズ後、RNAの抽出を行った。培養12日目の滑膜由来間葉系幹細胞は、遠心操作により上清を除去し細胞分画からRNAの抽出を行った。

DNA/RNA同時抽出：QIAamp Min Elute Virus spin Kit (QIAGEN)を用い、培養12日目の滑膜由来間葉系幹細胞の培養上清及び血漿からDNA及びRNAを同時抽出した。

4. PCR条件

DNAウイルス：固相化DNAウイルスセットを用い、Hot Start化したThremo社のTaqによる20µlの反応系で、95 10秒、(95 5秒、60 30秒) x 45cycleのqPCR解析を行った。

RNAウイルス・レトロウイルス・マイコプラズマ：固相化DNA/RNAウイルス・マイコプラズマセットを用い、GeneWorld社のGenePlex OneStep qPCRによる20µlの反応系で、検出セット42 10分、95 1分、(95 5秒、60 30秒) x 45cycleのqRT-PCR解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、患者検体を用いた臨床研究であり、全体の研究は医学部倫理審査委員会の承認を得て行われている。分担する研究に関してもその中の一部として含有されている。

C: 結果

1. 患者血液の検査結果

・ウイルス：HHV7陽性 定量結果 6.7×10^1 copies/µg DNA (1.1×10^3 copies/ml)

他のウイルスはすべて陰性

・マイコプラズマ：陰性

2. 滑膜組織

・ウイルス：parvoB19陽性 定量結果 1.3×10^1 copies/µg DNA、HHV7陽性 定量結果 2.0×10^1 copies/µg DNA

他のウイルスはすべて陰性

・マイコプラズマ：陰性

3. 培養12日目の滑膜由来間葉系幹細胞

- ・ウイルス： すべて陰性
- ・マイコプラズマ： 陰性

4. 培養12日目の培養上清

- ・ウイルス： すべて陰性
- ・マイコプラズマ： すべて陰性

D: 考察

1. 培養前の検査により、患者血液から HHV7 が、滑膜組織から HHV7 と parvoB19 が検出された。HHV7 はほとんどの成人に潜伏感染しているウイルスであり、ウイルスゲノム DNA 量も少ないため病的状態ではないと考えられる。また、parvoB19 ウイルスも多く成人が既感染であり、持続感染していたウイルスが血中から検出されることがある。我々が行った 20 例のボランティアの血液・滑膜組織の検査でも parvoB19 ウイルスが最も高頻度に検出されており、今回検出されたウイルスゲノム量が少ないことから、やはり本被験者が病的な状況だったとは思われない。

2. 本被験者の滑膜組織から得た細胞は培養 8 日目までは順調に増殖したが、12 日目に観察したところ細胞の形態が正常培養時に見られる紡錘状を呈しておらず細胞密度も疎らであることが確認され、細胞移植は中止された。しかし結果に示すように培養前に少量検出された HHV7 と parvoB19 も培養 12 日目には陰性化していたことから、今回の細胞の形態変化と細胞密度が疎となった原因とは考えにくい。

3. 今回測定した 18 種類の微生物が細胞

増殖不良の原因とは考えにくく、また無菌検査やエンドトキシン検査でも陰性だったため、微生物汚染が原因とは考えにくい。培地の濁り等は全くなかったことを考え合わせると細菌・真菌が原因とは考えられないが、検査対象ウイルス以外のウイルスが感染・増殖し細胞の形態や増殖に影響を与えた可能性は否定できない。

4. 上記のように何らかのウイルスが増殖した可能性があるため、現在次世代シーケンサーを使用した解析を進めている。実際には、培養 12 日目の培養細胞・上清から核酸を抽出し、得られたシーケンズデータに含まれるヒトゲノム配列と相同性を持たないシーケンズデータと既知のウイルスとのホモロジーサーチを行いウイルスが原因か否か検討する計画で作業を進めている。

E: 結論

滑膜幹細胞を使用した半月板・関節軟骨の治癒促進・再生の臨床研究を行う際のウイルス 17 種類と・マイコプラズマの試験を担当した。被験者の血液と滑膜組織から HHV7 と parvoB19 が検出されたが（他のウイルスはすべて陰性）、培養 12 日目の細胞と培養液からはウイルスは検出されず、培養中のウイルス増幅の可能性は否定された。マイコプラズマはすべて陰性だった。

F: 健康危険情報

なし

G . 研究発表

論文発表

- 1) Kobayashi Z, Akaza M, Numasawa Y, Ishihara S, Tomimitsu H, Nakamichi K, Saijo M, Morio T, Shimizu N, Sanjo N, Shintani S, Mizusawa H. Failure of mefloquine therapy in progressive multifocal leukoencephalopathy: Report of two Japanese patients without human immunodeficiency virus infection. *J Neuro Sci.* **324**: 190–4, 2013
- 2) Yan J, Ng SB, Tay JL, Lin B, Koh TL, Tan J, Selvarajan V, Liu SC, Bi C, Wang S, Choo SN, Shimizu N, Huang G, Yu Q, Chng WJ. EZH2 overexpression in natural killer/T-cell lymphoma confers growth advantage independently of histone methyltransferase activity. *Blood* **121**: 4512-20, 2013
- 3) Tachikawa R, Tomii K, Seo R, Nagata K, Otsuka K, Nakagawa A, Otsuka K, Hashimoto H, Watanabe K, Shimizu N. Detection of Herpes Viruses by Multiplex and Real-Time Polymerase Chain Reaction in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Patients with Acute Lung Injury or Acute Respiratory Distress Syndrome. *Respiration* Dec 7, 2013 [Epub ahead of print]
- 4) Ito K, Shimizu N, Watanabe K, Saito T, Yoshioka Y, Sakane E, Tsunemine H, Akasaka H, Kodaka T, Takahashi T. Analysis of viral infection by multiplex

polymerase Chain reaction assays in patients with liver dysfunction. *Intern Med.* **52**: 201-11, 2013

著書

- 1) 北條浩彦、清水則夫(分担執筆) . 原理からよくわかるリアルタイム PCR 完全実験ガイド 最強のステップ UP シリーズ . 北條浩彦編 「基本編 - 原理と基本知識 - リアルタイム PCR を使った解析の基本 10 プライマー / プロブの設計手順 マルチプレックスの場合」 p72-74 羊土社 , 2013
- 2) 清水則夫、渡邊健、外丸靖浩(分担執筆) . 原理からよくわかるリアルタイム PCR 完全実験ガイド 最強のステップ UP シリーズ . 北條浩彦編 「実践編 - プロトコールを中心に - 章 遺伝子量解析 15 ウイルス感染症を診断する ウイルスゲノムの定性的検査と定量的検査」 p192-202 羊土社 , 2013

国内学会発表

- 1) 今留謙一, 松田剛, 川野布由子, 千葉佑規乃, 新井文子, 中澤温子, 伊藤守, 清水則夫, 藤原成悦
難治性 EB ウイルス関連 T/NK リンパ増殖性疾患モデルマウスを用いた新規治療薬 3 剤の評価研究 日本ウイルス学会 11 月 神戸
- 2) 清水則夫 再生医療におけるウイルス・マイコプラズマ安全性検査系の開発 第 14 回日本医薬品等ウイルス安

全性研究会 9月 東京

- 3) 外丸靖浩, 渡邊 健, 高橋秀行,
清水則夫 再生医療の安全性検査系の
構築とその自動化に関する試み 第
13回 再生医療学会 3月 京都
- 4) 高橋秀行, 外丸靖浩, 渡邊 健,
清水則夫 マルチプレックスqPCR法
による新規マイコプラズマ検査法の開
発 第13回 再生医療学会 3月 京
都
- 5) 渡邊 健, 外丸靖浩, 高橋秀行,
清水則夫 再生医療の安全性検査性
に関連するウイルス18種類の迅速・高感
度な検査系の開発 第13回 再生医療
学会 3月 京都

国際学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし