

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・分担研究報告書

研究代表者 関矢 一郎

平成26(2014)年 3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
研究分担者	宗田 大	東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 運動器外科学	教授
研究分担者	森尾 友宏	東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 発生発達病態学	准教授
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

目 次

I . 総括研究報告

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)

II . 分担研究報告

1 . 滑膜幹細胞による半月板・関節軟骨の治癒促進・再生…………… 17

分担研究者 宗田 大

(東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 運動器外科学 教授)

2 . 滑膜幹細胞による半月板・関節軟骨の治癒促進・再生…………… 20

分担研究者 森尾 友宏

(東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 発生発達病態学 准教授)

3 . 滑膜幹細胞による半月板・関節軟骨の治癒促進・再生…………… 22

分担研究者 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)

III . 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 29

IV . 研究成果の刊行物・別刷…………… 37

. 總括研究報告

**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**

「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。被験者の滑膜組織からヒトヘルペスウイルス 7 及びパルボウイルス B19 が検出されたが、培養中のウイルス増幅の可能性は否定された。半月板損傷は高齢の患者が多いのが現状であり、ウイルス感染の例も少なからずあると予想される。滑膜組織のウイルス感染の有無が滑膜幹細胞の増殖に影響するか否かを、我々が確立したウイルス・マイコプラズマ検査系で検出できるウイルス以外の可能性も含め、引き続き検討する。被験者の自己血清に関しては、採血に用いた血液バッグから溶出した可塑剤が細胞増殖を阻害した可能性は否定されたが、今回の 1 例目の結果を重く受け止め、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することを品質管理に追加することを検討している。

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 年度厚生労働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に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。

有効性の評価：

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(K00S 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ヌ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療促進」

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、 μg 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 -MEM 培地に FBS を 10% 添加した培地に播き替えて培養を続けた。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 $5.66 \mu\text{g}/\text{mL}$ 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 $2\sim 3 \mu\text{g}/\text{mL}$ 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 $5.66 \mu\text{g}/\text{mL}$ の結果と血清含有量 10% であることを考慮し、 $0.6 \mu\text{g}/\text{mL}$ を中心に $0.3, 0.6, 1.2 \mu\text{g}/\text{mL}$ の DEHP を滑膜幹細胞の培養系に添加し、細胞増殖が阻害されるか否かを調べた。その結果、いずれの濃度でも滑膜幹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 日目のウイルス・マイコプラズマ試験検体中に混入している外来微生物のシーケンス解析を予定している。

(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

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ヌードラットに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 1×10^5 cells/ μ 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 μ L/膝から算出される 8×10^6 cells/匹を設定していたが、細胞数が予定を下回り 2.56×10^6 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 2.86×10^5 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 2.86×10^5 cells/匹であったため、試験計画書設定の 8×10^6 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 2.86×10^5 cells/匹 (200 g) は、ヒト臨床で予定される投与量 (5×10^7 cells/50 kg) とほぼ同じであった。

D. 考察

これまでの検討の結果、培養不成立の原因として被験者の自己血清に問題があった可能性があるが、血清中の増殖阻害物質を特定することはできなかった。細胞に何らかのウイルスが感染していた可能性も、現時点では否定しきれない。自己血清と滑膜の両方の悪条件が重なり増殖が阻害された可能性も考えられる。

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、安全性の面で自己血清より劣っている。私たちは、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、約 30 例の滑膜幹細胞を患者の自己血清で培養した。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。しかし、今回の培養不成立の結果を重く受け止め、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、本番の培養に使用することを検討している。

今回の問題に直面し、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予定はあるが、本臨床研究においては、自己血清をできるだけ良い条件で使用したい。自己血清の分析の結果、血液成分分離バッグ「セルエイド」を用いて調製した血清には2~3 µg/mLのDEHPが検出され、非働化処理によって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DEHP濃度では細胞増殖を阻害するには至らなかったが、できるだけ安全な自己血清を使用するために、血清を非働化せずに使用する製造方法に変更することを検討している。

E . 結論

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培養に用いる品質管理体制を整えてから、臨床研究「半月板縫合後の滑膜幹細胞による治療促進」を再開する。

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

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

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. 11th International
Cartilage Repair Society annual meeting,
Izmir, Turkey, Sep 15-18 2013

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

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

. 分担研究報告

**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

宗田大 東京医科歯科大学・大学院・運動器外科 教授

研究要旨

臨床研究「半月板縫合後の滑膜幹細胞による治癒促進」の実施にあたり、臨床を担当する医師として、滑膜幹細胞移植の有効性の評価項目を策定した。滑膜幹細胞の薬事申請も視野に入れ、既承認品目の自家培養軟骨「ジャック」と同じ指標で有効性を評価できるように評価項目を設定した。

A．研究目的

臨床研究「半月板縫合後の滑膜幹細胞による治癒促進」の実施にあたり、滑膜幹細胞移植の有効性の評価項目を策定した。

B．研究方法

滑膜幹細胞の薬事申請も視野に入れ、既承認品目の自家培養軟骨「ジャック」と同じ指標で有効性を評価できるように、評価項目を設定する。

（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する。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う。「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」に準拠して実施する。

C．研究結果

有効性の評価として下記の評価項目を

設定した。

経時的臨床症状項目：自己由来滑膜幹細胞移植術の効果を、自覚症状及び医師の局所症状の診断で評価する。術前と比較した、術後4週、6週、3ヶ月、6ヶ月時の Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS)、Numerical Rating Scale (NRS) の変化量を評価する。

MRI 画像診断による評価：3.0 テスラの MRI を用いて前観察、3ヶ月、6ヶ月時に評価する。

膝関節単純X線検査 による評価：前観察、3ヶ月、6ヶ月時に評価する。

D．考察

臨床評価項目として、医師立脚型主観的評価、患者立脚型主観的評価、身体所見、画像所見をバランスよく含めた。また既承認品目の自家培養軟骨「ジャック」と同じ指標で有効性を評価できるように、評価項目を設定した。

E . 結論

本臨床研究では、滑膜幹細胞の投与が半月板縫合後の治癒促進に有効であることを解析するための臨床評価項目を策定した。

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. 堀江雅史、宗田 大、関矢一郎 滑膜由来間葉系幹細胞を利用した半月板再生技術 **アンチエイジングシリーズ3 骨研究最前線** 207-215, 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**: 148-156, 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

2 . 学会発表

国際学会

1. Sekiya I, Muneta T. Arthroscopic transplantation of synovial MSCs for cartilage regeneration. 11th International Cartilage Repair Society annual meeting, Izmir, Turkey, Sep 15-18 2013
2. Ozeki N, Sekiya I, Tsuji K, Saito T, Muneta T. Weekly intra-articular injections of synovial mesenchymal stem cells delay cartilage degeneration through trophic factors in a rat osteoarthritis model. 11th International Cartilage Repair Society annual meeting, Izmir, Turkey, Sep 15-18 2013
3. Nakagawa Y, Sekiya I, Kondo S, Saito R, Yanagisawa K, Tabuchi T, Nagata T, Obara M, Okuaki T, Koga H, Tsuji K, Muneta T. Comparison of MRI T1rho mapping and histology for normal and torn menisci in a pig model. 11th International Cartilage Repair Society annual meeting,

Izmir, Turkey, Sep 15-18 2013

国内学会

1. 大関信武、関矢一郎、古賀英之、松多誠也、辻 邦和、齋藤知行、宗田 大 滑膜幹細胞投与はアキレス腱移植による半月板再建治癒を促進する 第 20 回お茶の水・膝スポーツ懇話会 東京 2013 年 6 月 27 日
2. 松倉 遊、関矢一郎、辻 邦和、宮武和正、山田 淳、Kahaer Abula、井上牧子、宗田 大 滑膜間葉系幹細胞の収量は滑膜炎の程度相関する：マウスモデルでの検討 第 32 回日本運動器移植・再生医学研究会 神戸 2013 年 9 月 28 日
3. 松多誠也、大関 信武、関矢 一郎、片桐洋樹、中川 祐介、宇土 美於、齋藤 龍佑、柳澤 克昭、辻 邦和、齋藤 知行、大川 淳、宗田 大 ラット前 2 分の 1 半月板切除モデルにおいて、滑膜幹細胞投与はアキレス腱移植による半月板再建治癒を促進する 第 32 回日本運動器移植・再生医学研究会 神戸 2013 年 9 月 28 日
4. 中川裕介、関矢一郎、近藤伸平、齋藤龍佑、柳澤克昭、松多誠也、初鹿大祐、古賀英之、辻 邦和、長田 剛、田淵隆、大川淳、宗田 大 ブタ正常半月板における MRI T1rho マッピングと組織所見の対応 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 幕張 2013 年 10 月 17-18 日
5. 中川裕介、関矢一郎、大関 信武、宇土 美於、齋藤 龍佑、柳澤克昭、松多誠也、松倉遊、片桐 洋樹、鈴木 志郎、市野瀬志津子、辻 邦和、堀江雅史、古賀英之、大川淳、宗田 大 骨髄間葉系幹細胞は In vitro ペレット培養系及び In vivo

- の軟骨欠損部の移植でルブリシンを発現した 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 幕張 2013 年 10 月 17-18 日
6. 松倉遊、関矢 一郎、辻 邦和、宮武 和正、山田 淳、Kahaer Abula、井上 牧子、大川 淳、宗田 大 滑膜間葉系幹細胞の収量は滑膜炎の程度相関する：マウスモデルでの検討 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 幕張 2013 年 10 月 17-18 日
 7. 松多誠也、大関 信武、関矢 一郎、片桐洋樹、中川 祐介、宇土 美於、齋藤 龍佑、柳澤 克昭、辻 邦和、齋藤 知行、大川 淳、宗田 大 滑膜幹細胞投与はアキレス腱移植による半月板再生を促進する 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 幕張 2013 年 10 月 17-18 日
 8. 中川裕介、関矢一郎、柳澤克昭、宗田 大 ブタ損傷半月板に対する MRI T1rho マッピングと組織学的評価 第 41 回日本関節病学会 名古屋 2013 年 11 月 2-3 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

**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

森尾友宏 東京医科歯科大学・大学院・発生発達病態学 准教授

研究要旨：

滑膜幹細胞による半月板・関節軟骨の治癒促進・再生に向けての臨床研究にあたり、製造管理の責任者として、細胞治療センターにおける環境整備や環境モニタリングの改善を実施した。その結果、整備された環境のもと、問題のない手順にての製造が実施されている。

A．研究目的

滑膜幹細胞による半月板・関節軟骨の治癒促進・再生に向けての臨床研究にあたり、製造責任者としての、細胞培養加工施設(細胞治療センター)における、環境モニタリング、環境整備、品質管理項目についての再検証を行う。現在のヒト幹細胞研究指針に沿った、また安心安全な再生医療を提供が可能な体制を構築し、臨床研究を実施することが本研究の目的である。

B．研究方法

再生医療・細胞治療における細胞加工施設の状況に応じた運用面、管理面での改善を行うために、各種方策を策定する。特に現在、再生医療等の安全性等に関する法案が成立し、省令及び通知が作成されようとする中、日本再生医療学会からは細胞培養加工施設に関する考え方が提出されている。これに沿った形でのハード面、ソフト面の対応を再考する。

(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．研究結果

1) 環境モニタリングの改善

東京医科歯科大学医学部附属病院細胞治療センターは2004年よりISO9001(現在2008)を取得した施設であるが、内部監査やマネジメントレビューの中で改善案が策定されている。昨年度からは室圧(差圧)の検証を定期的なモニタリング項目としていれている。本年は温度湿度モニタリングを開始した。さらに防虫防鼠対策を強化した。

2) 品質管理システムの改変

センターでは中間産物及び最終加工品についてはウイルス検査、平板培養、エンドトキシン検査を実施しているが、本年より

滑膜由来間葉系幹細胞については局方に準じたエンドトキシン検出系を導入した。

D . 考察

臨床研究が実施されようとする中、製造管理責任者として、適切な培養加工に当たることは重要である。特に設置から12年を経過する細胞治療センターでの培養は、施設や機器の維持に加えて、管理面、ソフト面での確実な対応が必要である。

E . 結論

臨床研究が実施されようとする中、環境モニタリングを含め、運用や管理面での不断の見直しを行い、安全・安心な製剤提供を試みた。

F . 健康危険情報

報告すべき健康被害、健康危険情報はない。

G . 研究発表

論文

1. Sugita S, Ogawa M, Shimizu N, **Morio T**, Ohguro N, Nakai K, Maruyama K, Nagata K, Takeda A, Usui Y, Sonoda K, Takeuchi M, Mochizuki M. Use of a comprehensive polymerase chain reaction system for diagnosis of ocular infectious diseases. *Ophthalmology*. **120**: 1761-8, 2013.
2. Unno J, Takagi M, Piao J, Sugimoto M, Honda F, Maeda D, Masutani M, Kiyono T, Watanabe F, **Morio T**,

Teraoka H, Mizutani S. Artemis-dependent DNA double-strand break formation at stalled replication forks. *Cancer Sci*. **104**: 703-10, 2013.

発表

1. **森尾友宏**：細胞培養加工施設基準についての取組み、**第13回日本再生医療学会（シンポジウム：産業化に向けた制度設計と展望）**、京都、2014年3月5日
2. **森尾友宏**：細胞調製施設の構造要件について、**PMDA 細胞組織加工製品専門部会**、東京、2013年12月24日
3. **森尾友宏**：免疫細胞培養ガイドライン（免疫治療関連6学会合同策定）について：医療機関・研究施設に求められる基準、**第5回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会**、名古屋、2013年8月24日

策定に関与したガイドライン、指針

1. 細胞調製に関する施設及び運用に対する考え方（再生医療学会）
2013年9月5日
2. 免疫細胞療法 細胞培養ガイドライン（免疫関連6学会合同） 2013年10月
3. ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針（改正案）
2013年9月30日（医政発0930第1号）

H . 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

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Thermo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 ウィ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 ウィ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

・ 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（研究代表者：関矢一郎）

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
関矢一郎	半月板損傷	篠塚昌述	スポーツ整形外科マニュアル	中外医学社	東京都	2013	165-72
関矢一郎	関節軟骨損傷	篠塚昌述	スポーツ整形外科マニュアル	中外医学社	東京都	2013	194-6
関矢一郎	変形性膝関節症	篠塚昌述	スポーツ整形外科マニュアル	中外医学社	東京都	2013	197-200
堀江雅史 宗田大 関矢一郎	滑膜由来間葉系幹細胞を利用した半月板再生技術		アンチエイジングシリーズ3 骨研究最前線	株式会社エヌ・ティ・エス	東京都	2013	207-15

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

国内雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	148-56	2013
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
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

研究成果の刊行に関する一覧表（研究分担者：宗田大）

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
堀江雅史 宗田大 関矢一郎	滑膜由来間葉系幹細胞を利用した半月板再生技術		骨研究最前線	株式会社 エヌ・ ティ・エス	東京都	2013	207-15

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
Matsukura Y, Muneta T , Tsuji K, Koga H, Sekiya I.	Mesenchymal stem cells in synovial fluid increase after meniscus injury.	<i>Clin Orthop Relat Res.</i>		Dec 13 Epub ahead of print	2013
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.	<i>Biochem Biophys Res Commun.</i>	453	603-9	2013
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.	<i>J Orthop Res.</i>	31	1354-9	2013

国内雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	148-56	2013
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
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

研究成果の刊行に関する一覧表（研究分担者：森尾友宏）

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
Sugita S, Ogawa M, Shimizu N, Morio T , Ohguro N, Nakai K, Maruyama K, Nagata K, Takeda A, Usui Y, Sonoda K, Takeuchi M, Mochizuki M.	Use of a comprehensive polymerase chain reaction system for diagnosis of ocular infectious diseases.	<i>Ophthalmology</i>	120	1761-8	2013
Unno J, Takagi M, Piao J, Sugimoto M, Honda F, Maeda D, Masutani M, Kiyono T, Watanabe F, Morio T , Teraoka H, Mizutani S.	Artemis-dependent DNA double-strand break formation at stalled replication forks.	<i>Cancer Sci.</i>	104	703-10	2013

研究成果の刊行に関する一覧表（研究分担者：清水則夫）

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
北條浩彦 清水則夫	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/ プローブの設計 手順 マルチブ レックスの場合	北條浩彦	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	羊土社	東京	2013	72-4
清水則夫 渡邊 健 外丸靖浩	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	北條浩彦	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	羊土社	東京	2013	192-202

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
Kobayashi Z, Akaza M, Numasawa Y, Ishihara S, Tomimitsu H, Nakamichi K, Saijo M, Morio T, Shimizu N , Sanjo N, Shintani S,	Failure of mefloquine therapy in progressive multifocal leukoencephalopathy: report of two Japanese patients without human immunodeficiency virus infection.	<i>J Neuro Sci.</i>	324	190-94	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.	<i>Blood</i>	121	4512-20	2013
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.	<i>Respiration</i>		Dec 7 Epub ahead of print	2013
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.	<i>Intern Med.</i>	52	201-11	2013