厚生労働科学研究費補助金
（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業）
分担研究報告書

医療機器に関する国際標準化（23KC5001）

脱細胞化生体組織を活用して再生医療の補完機能を果たす医療機器に関する研究

研究分担者	野村祐介	国立医薬品食品衛生研究所　医療機器部　室長
研究協力者	加藤玲子	国立医薬品食品衛生研究所　医療機器部　主任研究官
研究協力者	岡本悠佑	国立医薬品食品衛生研究所　医療機器部　研究員
研究協力者	長谷川千恵	国立医薬品食品衛生研究所　医療機器部　期間業務職員
研究協力者	岸田晶夫	東京医科歯科大学　生体材料工学研究所　教授
研究協力者	酒井崇匡	東京大学大学院　工学系研究科　教授
研究協力者	鄭　雄一	東京大学大学院　工学系研究科　教授
研究協力者	藤澤彩乃	東京大学大学院　工学系研究科　特任講師
研究協力者	増井公祐	ジェリクル株式会社　代表取締役 CEO
研究協力者	鎌田宏幸	ジェリクル株式会社　CTO

研究要旨：

日本における再生医療は iPS 細胞等を利用した再生医療等製品が中心に考えられているが，欧米における再生医療戦略の多くは，医用材料と増殖因子（タンパク質）を組み合わせたものが検討されている．当該戦略においては増殖因子の安定性，材料の生体適合性及び機能性の向上等の課題がある．それ故，表面に機能性分子コート等の処理を施した脱細胞化組織やゲル素材等の開発が国際的にも進められている．一方で，その特性を踏まえた国際標準としての評価法が存在していないため，日本発製品の上市遅延の要因ともなっている．また，現在の評価法は従来の人工材料（合成高分子，金属，セラミック等）を対象として開発・整備されてきた経緯から，生体由来材料である脱細胞化組織には適していない場合があるため，適切な評価法の開発・改良が必要である．

本研究では当該革新的材料を的確に評価することを目指し，品質，安全性及び有効性に係る試験法構築を目指した．

A. 研究の背景・目的

日本では iPS 細胞をはじめとした細胞を利用した再生医療への期待が高まっているが，その実用化までには課題が存在する．欧米における再生医療戦略の多くは，人工材料と増殖因子（タンパク質）を組み合わせたものであるが，増殖因子の安定性，材料の生体適合性及び機能性の向上等の課題がある．これらの課題解決を目指し，表面にペプチドコート等の処理を施し機能性等を向上させた脱細胞化組織やゲル素材等の開発が促進されているが，その特性を踏まえた国際標準としての評価法が存在していないため，日本発製品の上市遅延の要因となっている．また，

人工材料を対象とした従来の生物学的安全性（生安性）試験は脱細胞化組織に不適であることが確認されており，適切な評価法の開発が求められている．各種評価法を開発し国際標準化を推進することは，日本発の脱細胞化組織機器の世界展開を促進する上で重要な施策となる．また，当該製品は再生医療を目的とした細胞との併用も有用であり，国際的に再生医療の主軸となりうることから，本評価法開発は，再生医療分野における国際的な優位性獲得にも役立つ．

本研究では当該革新的材料の特性や品質を的確に評価する試験法開発を目的とした．

B. 研究方法

B-1. 脱細胞化組織の調製

[試験方法]

1. 試薬・試液及び検体試料

1.1 試薬

- 塩化ナトリウム：特級（富士フイルム和光純薬株式会社製）
- 水酸化ナトリウム：和光特級（富士フイルム和光純薬株式会社製）
- DNase：DNase I, Grade II, bovine pancreas 由来（Roche 社製）
- RNase：bovine pancreas 由来（Roche 社製）
- 塩化マグネシウム六水和物：和光一級（富士フイルム和光純薬株式会社製）
- ペニシリン/ストレプトマイシン混合溶液：10,000 U/mL（Thermo Fisher Scientific 社製）
- ゲンタマイシン：（Biomedal Life Science 社製）
- トリス塩基：（シグマ・アルドリッチ社製）
- トリス塩酸：1M Tris-HCl（pH7.5）（ニッポン・ジーン社製）
- EDTA･2Na：（同仁化学研究所製）
- 寒天：特級（富士フイルム和光純薬株式会社製）
- ウシ血清アルブミン（BSA）：（シグマ・アルドリッチ社製）
- トリプシン：porcine pancreas 由来（Thermo Fisher Scientific 社製）
- クエン酸：和光特級（富士フイルム和光純薬株式会社製）
- クエン酸ナトリウム三ナトリウム二水和物：アミノ酸自動分析用（富士フイルム和光純薬株式会社製）
- エタノール：JIS special grade, 純度≧99.5%（シグマ・アルドリッチ社製）
- 生理食塩水：日本薬局方生理食塩液（光製薬株式会社製）
- PBS:Phosphate Buffered Salts Tablets（タカラバイオ社製）
- イソジン液：10 w/v%ポピドンヨード溶液（塩野義製薬株式会社製）
- ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）：生化学用（富士フイルム和光純薬株式会社製）
- デオキシコール酸ナトリウム（SDC）：生化学用（富士フイルム和光純薬株式会社製）

1.2 試液

- DNase及び塩化マグネシウム含有生理食塩水：塩化マグネシウム六水和物 10.16 g を生理食塩水 900mL で溶解し， DNase 200mg，ペニシリン/ストレプトマイシン混合溶液を 10 mL 加え，生理食塩水で 1L に定容した．0.22μm フィルターで濾過をし，調製液は使用時まで冷蔵保存（4℃以下）した．
- 80 vol%エタノール含有生理食塩水：生理食塩水 200mL にエタノール 800 mL を加え，0.22 μm フィルター濾過した．調製液は使用時まで冷蔵保存（4℃以下）した．
- ペニシリン/ストレプトマイシン含有ク

エン酸緩衝液:クエン酸三ナトリウム二水和物 14.7 g 及び塩化ナトリウム 9.0 g をそれぞれ秤量し，超純水 800 mL に溶解した．0.1 M クエン酸溶液を加え，pH 7.4 に調製した．ペニシリン/ストレプトマイシン混合溶液を 10 mL 加え，超純水を加えて 1 L に定容した後， 0.22 μm フィルター濾過した．調製液は使用時まで冷蔵保存（4℃以下）した．

- ペニシリン/ストレプトマイシン含有生理食塩水:クリーンベンチ内で生理食塩水 990mL にペニシリン/ストレプトマイシン混合溶液 10mL を加えた．調製液は使用時まで冷蔵保存(4℃以下)した．
- 0.5 w/v% SDS 及び 0.5 w/v% SDC 混液：SDS 5.0 g 及び SDC 5.0 g をそれぞれ秤量し，超純水で 1 L に定容した後，0.22 μm フィルター濾過した．調製液は使用時まで冷蔵保存（4℃以下）した．
- ペニシリン/ストレプトマイシン含有 PBS 溶液：PBS 10 錠を超純水 990 mL に溶解した後，121℃で 20 分間オートクレーブ滅菌した．滅菌後，ペニシリン/ストレプトマイシン混合溶液を 10 mL 加えた．調製液は使用時まで冷蔵保存(4℃以下）した．
- 1 w/v% ゲンタマイシン含有生理食塩水：ゲンタマイシン 5.0 g を秤量し，生理食塩水 500 mL に溶解した後，0.22 μm フィルター濾過した．調製液は使用時まで冷蔵保存（4℃以下）した．
- EDTA 含有トリス緩衝液：EDTA･2Na 1.3 g 及びトリス塩基 1.57 g をそれぞれ秤量し，超純水 1.3L に定容した後，0.22 μm フィルター濾過した．調製液は使用時まで冷蔵保存（4℃以下）した．
- EDTA 含有 PBS 溶液：EDTA･2Na 100 g を秤量し， 超純水 800 mL に溶解した．撹拌後，1.0 M 水酸化ナトリウム水溶液を加え，pH 8.0 に調製した．この溶液に超純水を加えて 1 L に定容した後，0.22 μm フィルター濾過した．超純水 900mL に濾過後の 10 w/v% EDTA 溶液 100 mL，PBS 10 錠を加え，121℃で 20 分間オートクレーブ滅菌した．調製液は使用時まで冷蔵保存（4℃以下）した．
- 寒天及びトリプシン混液：寒天 5.0 g を秤量し，超純水 1L に加えた後，121℃で 20 分間オートクレーブ滅菌した．撹拌しながら室温まで降温した後，トリプシン 1.25 g を溶解した．調製液は使用時まで冷蔵保存（4℃以下）した．
- SDS 及び EDTA 含有トリス緩衝液:SDS 10 g， EDTA 1.0 g 及びトリス塩基 1.21 g をそれぞれ秤量し，超純水で溶解し 1 L に定容した後，0.22 μm フィルター濾過した．調製液は使用時まで冷蔵保存(4℃以下）した．
- DNase 及び RNase 含有トリス塩酸緩衝液：1 M トリス塩酸 50 mL，塩化マグネシウム六水和物 2.03 g， BSA 50 g，DNase 50,000 Units 及び RNase 1000 Units をそれぞれ秤量し，超純水で溶解し 1 L に定容した後，0.22 μm フィルター濾過した．調製液は使用時まで冷蔵保存（4℃以下）した．

1.3 検体試料

- 豚の血管：東京芝浦臓器株式会社より購入した大動脈組織を脱細胞化処理後，凍結乾燥した．

2. 装置

高圧処理装置：Dr. Chef （KOBELCO 社製）

3. 脱細胞化組織の調製

3.1 調製方法の概要

3.1.1 高静水圧処理（HHP 法）

豚大動脈より可能な限り脂肪を除いて得られた組織を気密パック内で生理食塩水に

浸漬させ，このパックを生理食塩水で満たしたパック内に入れた後，高圧印加（10,000 atm，30℃，昇圧 15 分，維持 10 分，減圧 15 分）した．処理後，DNase 及び塩化マグネシウム含有生理食塩水を加えて，4℃で振盪しながら 7 日間洗浄（隔日ごとに洗浄液を交換）を行った．更に，80 vol%エタノール含有生理食塩水により 3 日間 4℃で振盪した後，ペニシリン/ストレプトマイシン含有クエン酸緩衝液に置換して 3 日間 4℃で振盪した（1 日ごとに洗浄液を交換）．洗浄後，ペニシリン/ストレプトマイシン含有生理食塩水に浸漬した．

3.1.2 界面活性剤処理（SDS 法）

豚大動脈より可能な限り脂肪を除いた．得られた組織をイソジン液に浸漬し 4℃で 10 分間振盪した．生理食塩水に置換して 4℃で 10 分間振盪を 3 回繰り返した後，1 w/v% ゲンタマイシン含有生理食塩水に置換し 4℃で 16 時間振盪した（各洗浄工程の洗浄液はデキャンタで除去）．更に EDTA 含有トリス緩衝液に置換し，4℃で 24 時間振盪した．その後，EDTA 含有 PBS 溶液に置換し，37℃で 30 分振盪し，組織をアガロース及びトリプシン混液に浸漬し 37℃で 4 時間振盪した．再度 EDTA 含有 PBS 溶液に置換して 37℃で 30 分振盪後，SDS 及び EDTA 含有トリス緩衝液に置換し 4℃で 24 時間振盪した．ペニシリン/ストレプトマイシン含有 PBS 溶液に置換後，4℃で 16 時間振盪した後，37℃で 30 分振盪して温めた後，DNase 及び RNase 含有トリス塩酸緩衝液に置換し 37℃で 4 時間振盪した．振盪後，EDTA 含有 PBS 溶液に置換し，37℃で 3 日間振盪した（1 日ごとに洗浄液を交換）．

3.1.3 界面活性剤及び脂肪融解処理（SDSSDC 法）

豚大動脈より可能な限り脂肪を除いた．得られた組織をイソジン原液に浸漬し 4℃で 10 分間振盪した．生理食塩水で 3 回洗浄した後，0.5 w/v% SDS 及び 0.5 w/v% SDC 混液を加え，4℃で 24 時間振盪した．振盪後，ペニシリン/ストレプトマイシン含有 PBS に置換し 12 時間間隔で 6 回洗浄した．

3.1.4 凍結融解処理

豚大動脈より可能な限り脂肪を除いた．当該組織を純水等の溶液に浸し，-80℃で保存，凍結した．凍結した溶液を室温で混和しながら解凍した．当該操作を 5,10,15 回繰り返した．処理後，DNase 及び塩化マグネシウム含有生理食塩水を加えて，4℃で振盪しながら 7 日間洗浄（隔日ごとに洗浄液を交換）を行った．更に，80 vol%エタノール含有生理食塩水により 3 日間 4℃で振盪した後，ペニシリン/ストレプトマイシン含有クエン酸緩衝液に置換して 3 日間 4℃で振盪した（1 日ごとに洗浄液を交換）．洗浄後，ペニシリン/ストレプトマイシン含有生理食塩水に浸漬した．

3.1.5 組織解析

凍結融解処理は新たな試みであったことから、当該組織を利用し、組織切片の作製及び、組織解析に供した．染色は HE を適用した．

[結果及び考察]

調製した検体は，試験に十分な量を準備することができた．凍結融解処理組織に関しては細胞残渣も除去できていることが，病理解析より明らかとなった（図 1）． 5 回よりも 15 回処理の方が細胞残渣除去効率が高いことが明らかとなった。

B-2. 超急性拒絶反応の原因となる残留 α-Gal 評価

1）中性糖分析

2) α-ガラクトシダーゼを用いた非還元末端ガラクトースの検出

［試験方法］

1. 試薬・試液及び検体試料

1.1 試薬

- D(+)-ガラクトース（Gal）: 和光特級（富士フイルム和光純薬株式会社製）
- D(+)-グルコース（Glc）: 和光特級（富士フイルム和光純薬株式会社製）
- D(-)-リボース（Rib）: 和光特級（富士フイルム和光純薬株式会社製）
- α-ガラクトシダーゼ：コーヒー豆由来, > 9 units/mg protein（シグマ・アルドリッチ社製）
- PNGase F : P0704L, P0705S (glycerol-free)（NEW ENGLAND BioLabs 製）
- ホウ酸 : 和光特級（富士フイルム和光純薬株式会社製）
- 水酸化ナトリウム : 和光特級（富士フイルム和光純薬株式会社製）

1.2 試液

- 混合標準溶液: Gal, Glc 及び Rib をそれぞれ 10 mg 精秤し，水で溶解して 1.0 mg/mL の濃度の溶液を調製した．各標準溶液を混合した後, 水により段階希釈し，5 μg/mL 及び 10 μg/mL の濃度を調製したものを混合標準溶液とした.
- マッキルベインクエン酸リン酸緩衝液（pH5.0）: 0.2M リン酸水素二ナトリウム水溶液 10.3 mL 及び 0.1M クエン酸水溶液 9.7 mL を混合し緩衝液を調製した.

1. 3. 検体試料

- 豚の血管：大動脈組織より可能な限り脂肪を除き，凍結乾燥後，ビーズ破砕機を用いて細切均質化した.

2. 測定条件

LC システム：Nexera 還元糖分析システム（SHIMADZU 社製）

分離モード：ホウ酸錯体陰イオン交換（Isocratic）

検出：ポストカラム蛍光検出 (Ex:331 nm, Em:383 nm)

カラム：TSKgel Sugar AXG (4.6 mmI.D. × 150 mm, 東ソー株式会社製)

カラム温度：70℃

溶離液 : A, 0.8M ホウ酸-水酸化ナトリウム水溶液 (pH 9.0)

反応液 : B, 0.5 w/v% 2-シアノアセタミド水溶液

C, 1.0M NaOH 水溶液

移動相流速：(A) 0.4 mL/min, (B,C) 各 0.2 mL/min

反応温度：120℃

3. 試験溶液の調製

3.1 調製方法の概要

3.1.1 PNGase F 処理

検体試料にリン酸緩衝液を加え, PNGase F を反応させた.

3.1.2 α-ガラクトシダーゼ処理

PNGase F 処理操作後の残留物にマッキルベインクエン酸リン酸緩衝液に溶解し，α-ガラクトシダーゼを反応させた.

3.1.3 抽出

酵素分解操作で得られた残留物にエタノールを加え, 遠心分離した後上清を回収した. 得られた上清を濃縮乾固した後, 水を加えたものを試験溶液とした.

4. 検出限界・定量限界の算出

分析機器の検出限界(IDL, instrumental detection limit)及び定量限界(IQL, instrumental quantification limit)は検量線法に基づき，下式を用いて算出した.

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^{n}\left(y_j - y_{jp}\right)^2}{n-2}}$$

RMSE：二乗平均誤差, root mean square error;
n：検量点;
y：各検量点濃度における実測値（面積値）； y_p：各検量点濃度における予測値（面積値）

$Y_{IDL} = i + (3 \times RMSE)$
$Y_{IQL} = i + (10 \times RMSE)$
$IDL = (Y_{IDL} - i) / m$
$IQL = (Y_{IQL} - i) / m$
Y_{IDL}：IDL における予測値； Y_{IQL}：IQL における予測値； i：検量線の切片； m：検量線の傾き

[結果及び考察]

脱細胞化組織における免疫拒絶反応を抑制するための処理工程の一つとしてα-ガラクトシダーゼ処理による α-Gal 抗原（Galα1-3Galβ1-4GlcNAc-）の除去が知られている．α-ガラクトシダーゼの主な対象基質として糖タンパク質（N-グリカン，Galα1-3Galβ1-4GlcNAc-R）があげられるが，脱細胞化組織に用いられる生物種及び組織部位によっては非還元末端ガラクトース構造を有するグロボトリアオシルセラミド（GL-3，Galα1-4Galβ1-4Glcβ1-1Cer）や血液型B型糖鎖等の糖脂質もα-ガラクトシダーゼの基質対象となりうる. 従って, 1）血液・細胞成分の残留，2）宿主体内及び処理工程における α-ガラクトシダーゼ活性低下は上記糖鎖による宿主へのリスクが懸念される．そこで，本研究では新規評価手法の候補として，α-ガラクトシダーゼ処理によって遊離する非還元末端ガラクトースの検出法の開発を検討した．また，PNGase F を用いて主要基質である α-Gal 抗原を有する N-グリカンの選択的な切り出し及びその除去効率について評価した．検出においては，HPLC によるポストカラム蛍光検出法を用いた結果，検量線は良好な直線性（$R^2 > 0.999$, 50-1000 ng/mL）を示し，Gal は ng/mg ｵｰﾀﾞｰで検出及び定量が可能であることが示唆された（図 2）．本測定手法を用いて，豚の血管組織検体より得られた PNGase F 処理溶液を測定した結果，α-ガラクトシダーゼ処理群において Gal を検出したことから, N-グリカン由来の非還元末端 Gal を選択的に検出することが可能であることが示唆された（図3）．更に，PNGase F の処理工程を繰り返すことで，Gal の減小が観測された．一方，PNGase F 処理溶液において未知ピークが検出されたが, 分析法の測定原理から酵素溶液中に含有されるグリセロール由来のピークであると推察された．

Gal とのピーク分離は良好であるが，内部標準物質として添加した Rib の測定への影響が懸念されるため, 本手法の適用に際してはグリセロールフリーの PNGase F の使用が望ましい．

次に, 脱細胞化組織における抗原除去工程, 洗浄工程並びに細胞を用いた安全性試験を想定し，リン酸緩衝液（PB）の他，リン酸緩衝生理食塩水（PBS）及び最小必須培地（MEM）を用いて同様の分析を実施し，N-グリカン由来非還元末端 Gal の検出を検討した．PNGase F 及び α-ガラクトシダーゼ処理を含む工程の中で Rib の回収率は良好な成績を示したことから，Gal，Glc 等の単糖類は処理工程及び分析操作の影響を受けることがなく検出が可能であることが示唆された．また，Gal の定量に関して 3 種の溶媒を比較した結果, いずれの溶媒においても遊離単糖類としての Gal（α-ガラクトシダーゼ未処理群）の影響を受けず，N-グリカン由来の非還元末端 Gal（α-ガラクトシダーゼ処理群）の測定が可能であった．一方，遊離 Glc は処理溶液中に検出されたが, 処理工程を繰り返

すことで除去された. しかしながら, MEM は溶媒自体に過剰の Glc が含まれており, 夾雑ピークとして Gal の測定のバックグラウンドに影響したため, 精製処理の追加を要することが示唆された．以上の結果より，PB 及び PBS を用いた PNGase F 処理において Gal の検出及び定量が可能であり，非還元末端 Gal 並びに N-グリカンの減少効率（抗原除去効率）が評価可能であることが示唆された.

次に，脱細胞化組織における α-Gal の残留を評価するため，未処理組織及び HHP 処理組織の比較を行った（図 4）．PNGase F 及び α-ガラクトシダーゼ未処理群（Method A）において遊離 Gal 及び Glc は脱細胞化処理・未処理検体ともに不検出または定量下限未満であった．一方，α-ガラクトシダーゼ処理群（Method B）では Gal 及び Glc が検出され，脱細胞化処理により減少する結果が得られた．Method B では組織（細胞表面）上の糖鎖に直接 α-ガラクトシダーゼ処理を行うため，酵素基質となりうる細胞表面発現糖鎖（糖脂質を含む）に由来する非還元末端 Gal が検出され，HHP 処理による細胞数の減少に伴い Gal 含量が減少したと推察された．Method C では PNGase F 処理により N-グリカンを選択的に抽出し，α-Gal 抗原（Galα1-3Galβ1-4GlcNAc-）に由来する非還元末端 Gal の検出が可能であった．以上の結果より，本分析法の適用により，脱細胞化効率の評価（Method B）及び α-Gal 抗原の検出（Method C）に有用であることが示唆された．一方，Method C において脱細胞化処理の有無で Gal 含量に明確な差は認められなかったことより, 細胞表面発現型の他，遊離型 N-グリカンの残留が懸念されたため, より詳細な検討を要することが示唆された.

昨年度実施した脱細胞化組織の国際標準化動向調査において, 超急性拒絶反応の原因となる α-Gal は今後の課題として注目されている. 評価法として代表的な手法は ELISA であるが，特異性，親和性に優れた抗体が必要となり，現状では感度等の問題がある．本研究で開発した評価法は，構造的に安定な Gal を検出する手法であり, 検体の濃縮が期待できるため，ELISA に比べて高感度で α-Gal 抗原を検出できる可能性を有する. 今後は定量分析に向けて精製操作, グラジエント溶出による測定時間の短縮及びピーク分離等の改善を行い, また脱細胞化処理に関連する糖類の探索及び特異的な検出法の開発を推進する.

B-3. プロテオーム解析による脱細胞化指標ペプチド候補の探索

[試験方法]

1. 試薬・試液及び検体試料

1.1. 試薬

- アセトニトリル：LC 用（シグマ・アルドリッチ社製）
- エタノール：LC 用（関東化学株式会社製）
- 蒸留水：LC 用（関東化学株式会社製）
- 塩化ナトリウム：残留農薬・PCB 試験用（富士フイルム和光純薬株式会社製）
- ギ酸：LC-MS 用（富士フイルム和光純薬株式会社製）
- Protein Extraction Reagent Type 2：C-0606-4BTL（シグマ・アルドリッチ社製）
- 蛋白質アッセイキット：Pierce 660 nm Protein Assay（シグマ・アルドリッチ社製）
- 炭酸水素アンモニウム：和光一級（富士フイルム和光純薬株式会社製）
- トリブチルホスフィン：T7567-10VL（シグマ・アルドリッチ社製）

- ヨードアセトアミド：A3221-10VL（シグマ・アルドリッチ社製）

1.2. 検体試料

- 豚の血管：大動脈組織より可能な限り脂肪を除き，凍結乾燥後，ビーズ破砕機を用いて細切均質化した.

2. 装置

MS 装置：Synapt-XS（Waters 社製）

LC 装置：ACQUITY UPLC M-class Series（Water 社製）

データ処理（ｿﾌﾄｳｪｱ）：MassLynx, Progenesis QI for proteomics（Waters 社製）

3. 測定条件

3.1 LC-QTOFMS 条件

LC 条件

カラム：nanoEase M/Z HSS C18 T3（内径 75 μm，長さ 100 mm，粒子径 1.8 μm，Waters 社製）

移動相流速：0.4 μL/min

注入量：1 μL

カラム温度：40℃

移動相 A 液：0.1 vol%ギ酸

B 液：0.1 vol%ギ酸アセトニトリル溶液

グラジエント条件：

時間（分）	A 液（%）	B 液（%）
0.0	99	1
45.0	60	40
47.0	15	85
49.0	15	85
50.0	99	1
60.0	99	1

MS 条件

測定モード：Data Dependent Acquisition (DDA)

スキャンモード：sensitivity mode

イオン化モード：ESI（＋）

キャピラリー電圧：3000 V

脱溶媒温度：250℃

脱溶媒ガス流量：600 L/hr

コーンガス流量：50 L/hr

コーン電圧：30 V

コリジョン電圧：4 eV (Trap), 2 eV (Transfer)

イオンソース温度：80℃

スキャン範囲：50-2000 *m/z*

4. 試験溶液の調製

4.1 調製方法の概要

4.1.1 タンパク抽出

検体試料に Protein Extraction Reagent Type 2 を添加反応した後, 遠心し上清を回収した. 得られた溶液を比色定量法によりタンパク質濃度を測定した.

4.1.2 還元アルキル化

抽出操作により得られたタンパク質溶液にトリブチルホスフィンを加えて室温で反応させた後, ヨードアセトアミドを加えて室温で反応させた.

4.1.3 トリプシン処理

還元アルキル化タンパク質溶液に Trypsin Enhancer 及び Trypsin を添加し，炭酸水素アンモニウム水溶液で調製した後, 緩やかに撹拌及び遠心し，酵素反応を行った. 反応を停止し, アセトニトリル溶液により調製したものを試験溶液とした.

[結果及び考察]

脱細胞化組織調製法として物理処理（超音波，加圧，凍結融解等），化学処理（界面活性剤等），酵素処理（トリプシン, DNase, α-ガラクトシダーゼ等）が用いられる. しかしながら, トリプシンを用いた酵素処理によるタンパク質分解に対し, 上述する物理処理及び化

学処理を施した脱細胞化組織におけるタンパク質の組成及び残留については不明瞭である. そこで, 本研究では HHP 処理及び SDS 処理に供した脱細胞化組織についてプロテオーム解析を行った.

タンパク質の基原（細胞，組織及び病原菌等）の同定は，種の特定や細胞・病原菌の残留評価に繋がる. 更に, これらタンパク質（ペプチド断片）は，十分な水準における検出且つ量的変動の追跡が可能な場合, 評価指標となりうる．そこで，HHP 及び SDS 処理検体において減少傾向にあったタンパク質（ペプチド断片）を選出した. エタノール及び凍結保存された未処理組織検体と比較してペプチド断片が減少傾向にあったタンパク質は 24 種同定された．Actin や Vimentin 等の細胞, 細胞膜及び骨格筋の維持に関与する普遍的なタンパク質をはじめ，Hemoglobin や Serum albumin といった循環器系血管組織に起因するタンパク質が検出された. 哺乳類の（脱核した）赤血球や血小板は無核細胞（両生類，鳥類は有核）なので，関連タンパク質は豚組織を用いた脱細胞化組織において血球系細胞除去効率の評価指標になりうる. また，HHP 処理及び SDS 処理において，細胞外マトリックス構成成分であるコラーゲンと結合し繊維形成に関与するプロテオグリカンの Fibromodulin も共通して減少傾向を示した. 以上のタンパク質群は，細胞除去や組織状態の評価における指標タンパク質として有用であると推察された. 一方, Flagellin B 及び Large T antigen 等のタンパク質は無菌状態の評価に有用であると示唆された. 今回はデータベースに基づいた普遍的なタンパク質群の選定であったが，今後は種，組織及び脱細胞化手法別に特異的なタンパク質群の推定することが望ましい. 一方，染色法を用いた病理解析及び核酸定量等の評価が困難な場合, 本手法のような化学分析を用いた代替法は将来的に有用な評価手法となりうる.

B-4. TTC 除外規定不純物（N-ニトロソ化合物）の網羅的検出法

[試験方法]

1. 試薬

- N-ニトロソ化合物標準品

2. 装置

MS 装置：X500R QTOF（AB SCIEX 社製）

LC 装置：Nexera LC-30 HPLC system（Shimadzu 社製）

3. 測定条件

3.1 LC-QTOFMS 条件

LC 条件

カラム：Inert Sustain C18（内径 2.1 mm，長さ 150 mm, 粒子径 1.8 µm, GL Sciences 社製）

移動相流速：0.2 mL/min

注入量：1 µL

カラム温度：40℃

移動相　A 液：0.1 vol%ギ酸

B 液：0.1 vol%ギ酸アセトニトリル溶液

グラジエント条件：

時間（分）	A 液（%）	B 液（%）
0.0	80	20
3.0	80	20
8.0	5	95
15.0	5	95
18.0	80	20
20.0	80	20

MS 条件

測定モード: Data Independent Acquisition (DIA, SWATH®)

イオン化モード：ESI（＋）

スプレー電圧：5500 V

イオンソース温度：400℃

イオンソースガス：60 psi
カーテンガス：30 psi
CAD ガス：7
コーンガス流量：50 L/hr
DP 電圧：60 V
コリジョン電圧：35V (定量), 55V (定性)

[結果及び考察]

医療機器関連の ISO の動向を見る限り, 化学分析を利用した生安性評価は国際標準になりつつある. 材料メーカが全情報を開示しないことから, 医用材料に含まれる化合物の網羅的な同定, 定量は事実上不可能であり, 毒性学的懸念の閾値（TTC）の概念を導入した分析が検討されている. 脱細胞化組織も全組成の評価は非常に困難であることから, TTC の概念は将来的に利用される可能性が高い. TTC の概念は, まず除外規定化合物である, N-ニトロソ化合物, アゾキシ化合物, ステロイド類, アフラトキシン類, ダイオキシン類を検出することが前提である. 当該化合物の化学分析による検出法は, 当部でも開発が進められており, 本分析法により N-ニトロソ化合物標準品において高感度な検出が可能であった. また, 本分析法は未知化合物を含む網羅的分析法としての有用性が高い（特許出願準備中）. しかしながら, 多種多様な医用材料及び適用方法（埋植等）により暴露経路における毒性に関する知見や評価法については未整備の状態にある. 現時点で脱細胞化組織は, 新規性の高い材料であることから, 化学分析を利用した評価を実施するには時期尚早であるが, 将来的には動物実験削減につながる分析による評価が基本となる可能性もあることから, 引き続きデータを収集し, その必要性についても議論を進めて行く必要がある.

B-5. 脱細胞化組織の DNA 残量評価法

1）残留 DNA 量の評価

[試験方法]

1. 試験検体

本試験では MQ 水を利用して凍結融解を繰り返した検体の DNA 残量を評価した.

2. 試薬

- プロテイナーゼ K（AmBion ＃AM2546）
- コラゲナーゼ P （Roche #11213857001）
- NucleoSpin Tissure(MACHEREY-NAGEL#740952.250)
- Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kits and dsDNA Reagents（Invitrogen #P11495）

3. 装置

- NanoDrop2000c（Thermo Scientific）

4. 試験

残留 DNA の評価は NucleoSpin Tissure を用いて, マニュアルに従い処理, DNA を回収した. 回収液は Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kits and dsDNA Reagents を利用して, 二重鎖 DNA（dsDNA）のみを特異的に定量した.

[結果及び考察]

脱細胞化の品質に係る規格は現時点では整備されていないが, 残留する dsDNA 量が国際的にコンセンサスの得られている評価項目として挙げられている. 本研究ではモデル材料として凍結融解処理した検体を作製した. 当該材料に関して残留 DNA を指標に脱細胞化の検証を実施した. 凍結融解を繰り返した検体は 5 回処理でも十分に脱細胞化処理できていることが判明した.

一方で, これら回収量が適切な量であるかの判定はできないことが判明した. DNA の定

量までに多くの工程を経ていることから,精製操作の段階で多くの DNA を失っている可能性も残されている．したがって，このような残留物の評価においては添加回収試験を同時に実施する必要がある．また，条件検討もしっかりと行い,科学的根拠を持って説明できるデータ取得が重要であると言える．

B-6.革新的医用材料の機能性評価

[試験方法]

1. 材料

- RNAApt 及び RNAApt 変異体

2. 機能性評価

2.1 標的分子捕捉能評価

- BIAcore を利用した，RNAApt 及び RNAApt 変異体と標的分子の分子間相互作用解析から，材料の機能を評価した．

[結果及び考察]

革新的な医用材料の機能評価はin vivo試験が有用ではあるが,革新的医用材料は複合的な作用により,有効性を示すことが多いため,動物実験だけでは詳細な機構が不明である．本研究ではBIAcoreを利用した，分子間相互作用解析を実施した．BIAcoreを利用した試験の結果，RNAApt では標的分子に強い結合能を示したが，RNAApt 変異体では結合能が低下した．BIAcoreを利用した試験系では,固定化したAptと流路に標的分子が存在するのみであるため,特定の分子間の相互作用のみを評価することが可能であり,RNAApt変異体では機能を発揮せず，RNAの構造が機能に重要であることが判明した(図5)．当該試験を実施することで,詳細な情報を取得でき，動物実験や臨床試験の削減につながる．

B-7. 脱細胞化組織における生物学的安全性評価の課題抽出

1) 残留SDSの細胞への影響評価

[試験方法]

1. 材料

芝浦臓器よりブタ大動脈を購入し,以下の検体を作製した．

1)SDS処理脱細胞化組織

2)SDSSDC処理脱細胞化組織

検体は凍結乾燥後，ビーズ破砕機を用いて細切均質化した．

2. 試薬

- SDS 定量キット（integrale #SR-5010）
- MEM10（10%牛胎児血清（FBS）

3. 調製及び抽出

培養表皮モデルを使用した皮膚刺激性試験は，細胞毒性を指標にすることにより，皮膚刺激性発症の初期過程である表皮細胞層の障害を検出する試験法である．当該刺激性試験での評価を前提に,事前検討として細胞毒性試験（コロニーアッセイ）を実施したと共に，抽出されたSDS量について評価した．

乾燥試料に培養液 MEM10 で振とう抽出し,100%抽出液として使用した．100%抽出液を最高濃度とし,MEM10 で希釈した溶液を調製した．24 well-plateの各ウェルにV79を50個ずつ播種し、一晩培養した後,培養液を取り除き,上記操作で作製した各試験液を添加し6日間培養した．各試験液を除き，PBSで洗浄後メタノールにて固定し,ギムザ染色,観察・コロニー形成能を評価した．

SDSの定量はキットのマニュアルに従い実施した．

[結果及び考察]

SDSSDC 処理組織においては，25%希釈以下でコントロールと同等のコロニー数であったがそれ以上ではコロニーは形成されなかった．また、SDS 処理組織においては 12.5%希釈まではコロニーが形成されなかった．

細胞毒性試験に用いた抽出溶液の SDS 量はいずれも低濃度であり，再構築ヒト表皮（RhE）モデルは，当該濃度よりも高濃度の SDS で刺激性有りと判定されることから，コロニーアッセイはそれよりも感度が高いと推測された．過去の結果から，脱細胞化組織への SDS 吸着は非常に強固であり，通常の抽出では吸着化合物を評価することができないと共に，酵素処理で組織を溶解することで，SDS 回収量が著しく向上することが判明している．SDS がすべて抽出された場合，強陽性を示すと考えられ，これまでの試験手法では正確に評価できないことが示唆された．したがって，脱細胞化組織をはじめとした生体由来材料を生安性試験で評価する際や化学的特性評価を実施する際には，添加回収試験を実施し，抽出条件が適しているか科学的根拠を示す必要がある．今後はより多くのデータを収集し，生安性ガイダンス改定を目指す．

B-8. 脱細胞化組織におけるエクソソーム評価

[試験方法]

1. 材料

芝浦臓器よりブタ大動脈を購入し，以下の検体を作製した．

1)未処理脱細胞化組織
2)HHP 処理脱細胞化組織
3)SDS 処理脱細胞化組織

検体は凍結乾燥後，ビーズ破砕機を用いて細切均質化した．

2. 調製及び抽出

試料に滅菌水を加え，振盪後，遠心分離を行い，液体を取り除いた．コラゲナーゼ等の処理した．処理溶液からエクソソームを回収すると共に，RNA を精製した．エクソソーム溶液は NANOSIGHT，RNA は次世代シーケンサーによって解析した．

[結果及び考察]

NANOSIGHT の解析結果より，未処理及び脱細胞化処理群のいずれにおいてもエクソソームの粒子径，粒子数を評価できた．また，脱細胞化処理後でもエクソソームが検出できたことから，脱細胞化組織を利用した医療機器においては，動物由来エクソソームが人体に移行する可能性が示唆された．

次世代シーケンサーの解析では，ヒトデータベースを利用してアノテーションを実施した．その結果，多数の miRNA がヒットした．したがって，脱細胞化組織機器を利用した場合，組織由来の miRNA が機能を発現する可能性を示した．これらエクソソームが人体に及ぼす影響は未知ではあるが，現時点で国際的にエクソソームが悪影響を及ぼした報告はないことから，重大な影響はないと思われるものの，今後より多くのデータを取得し，慎重に評価を進めることが重要であると考えられる．

C. 結論

本研究では脱細胞化組織をはじめとした革新的材料の特性や品質を的確に評価する試験法構築を目指し，「超急性拒絶反応の原因となる残留 α-Gal 評価」，「プロテオーム解析による脱細胞化指標ペプチド候補の探索」，「TTC 除外規定不純物（N-ニトロソ化合物）の網羅的検出法」，「脱細胞化組織の DNA 残量評価法」，「革新的医用材料の機能性評価」，

「脱細胞化組織における生物学的安全性評価の課題抽出」の評価法を開発したと共に「脱細胞化組織におけるエクソソーム評価」を実施した．当該材料は，再生医療にも利用可能であり，日本発の当該医療機器開発と国際展開を促進するためには，品質，安全性を評価する手法の開発と国際標準化がまずます重要となってくる．国際標準獲得には評価法の再現性，妥当性評価及び査読を受けた論文化が必須となると共に，標準化までの期間に技術を確保するための特許出願も戦略として重要である．今後は，国内の大学，メーカ関係者と議論・情報共有し，評価法開発を加速化させると共に，開発した評価法等の妥当性評価，特許取得，論文発表等を進める．

D. 研究発表

1. 次世代医療機器・再生医療等製品評価指標作成事業（厚生労働省），令和 5 度脱細胞化組織利用機器審査 WG 報告書
2. 脱細胞化組織を利用した医療機器の評価指標作成事業，野村祐介，加藤玲子，長谷川千恵，山本栄一，第 61 回日本人工臓器学会大会，2023/11/11，国内，口頭．
3. 医療機器分野における Extractables と Leachables の安全性評価，野村祐介，第 50 回日本毒性学会学術年会，2023/6/19，国内，口頭
4. 化学分析を利用した動物実験代替法，岡本悠佑，第 36 回動物実験代替法学会シンポジウム，2023/11/28，国内，口頭

E. 知的財産権の出願・登録状況

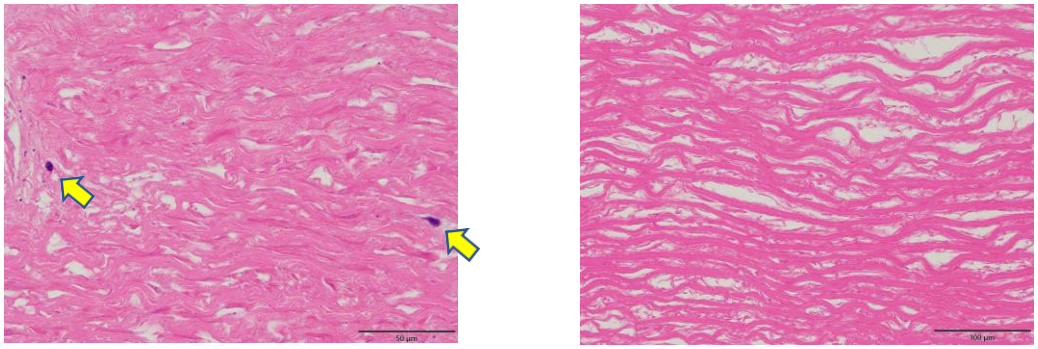
（予定を含む．）

１．特許取得

特願　核酸アプタマー及び当該核酸アプタマーを含む骨再生誘導材

２．実用新案登録

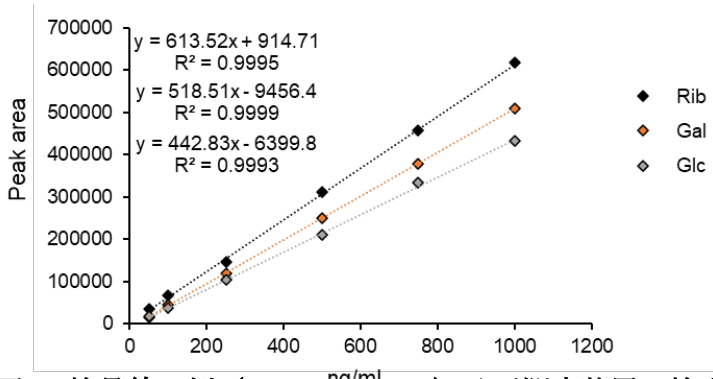
３．その他



5 回　凍結融解　　15 回　凍結融解

図 1. 凍結融解後の組織切片

黄色矢印: 細胞残渣



	IDL (ng/mg)	IQL (ng/mg)
Rib	5.6	18.6
Gal	1.8	6.1
Glc	6.5	21.8

図 2. 検量線の例（50-1000 ng/mL）及び測定装置の検出（定量）限界

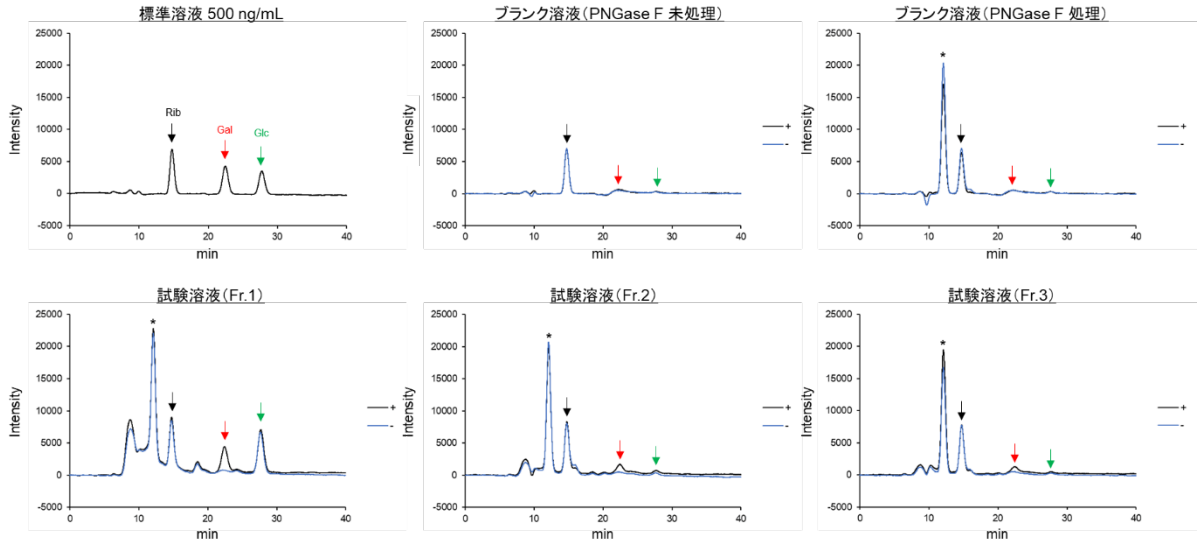


図 3. PNGase F 処理溶液のクロマトグラム

Rib: ﾘﾎﾞｰｽ、Gal: ｶﾞﾗｸﾄｰｽ、Glc: ｸﾞﾙｺｰｽ、*: 未知ピーク

+: α-ガラクトシダーゼ処理、-: α-ガラクトシダーゼ未処理

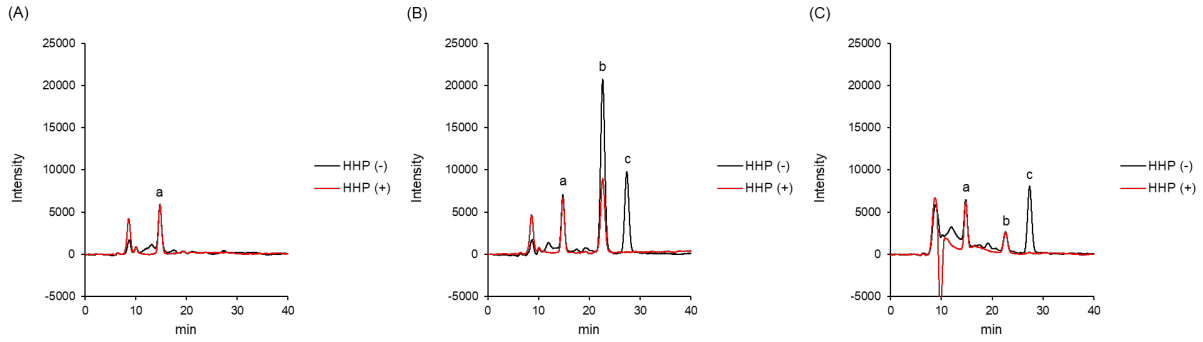


図 4. 脱細胞化処理（HHP 処理）における α-Gal の残留比較

(A): PNGaseF 及び α-ｶﾞﾗｸﾄｼﾀﾞｰｾﾞ未処理組織

(B): α-ｶﾞﾗｸﾄｼﾀﾞｰｾﾞ処理組織

(C): PNGaseF 及び α-ｶﾞﾗｸﾄｼﾀﾞｰｾﾞ処理組織

HHP(-): HHP 未処理組織

HHP(+): HHP 処理脱細胞化組織

a: ﾘﾎﾞｰｽ、b: ｶﾞﾗｸﾄｰｽ、c: ｸﾞﾙｺｰｽ

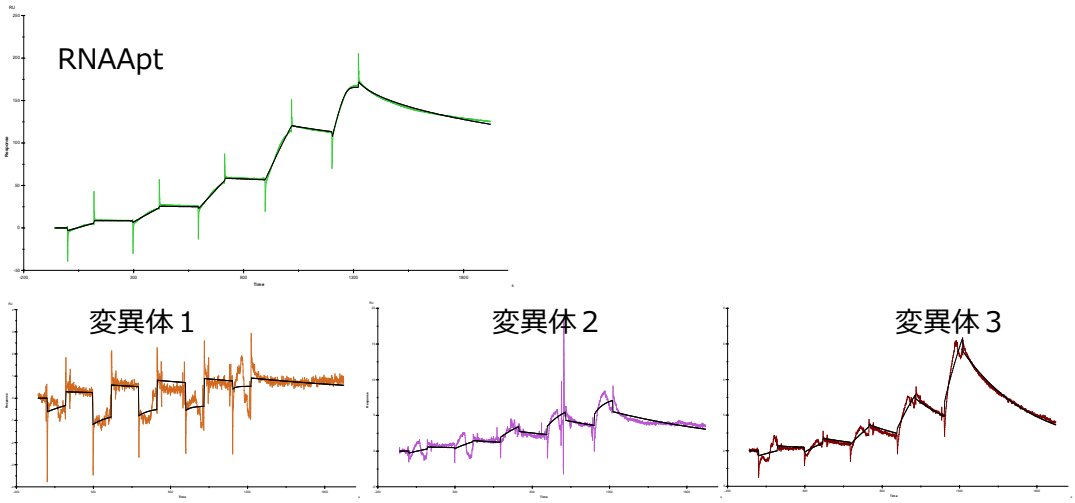


図 5. RNAApt 変異体と標的タンパク質の相互作用解析