

# 実用化をめざしての再生医療技術開発

## —— 安全を担保したヒト細胞操作プロセス構築と臨床応用 ——

大串 始

近年、細胞を培養増殖・加工して種々の疾患治療に用いるという再生医療技術が注目されている。この技術を臨床応用するためには、これら培養プロセスの安全性のみならず用いる細胞の有用性の担保も必要である。これらプロセス構築にかかわる問題点を整理して解決し、実際の治療応用への展開に成功した。

### 1 緒言

近年のライフサイエンス技術の発展により、従来は根治治療が不可能であった疾患においても、革新的な治療を支える先進医療技術の応用が現実のものとなりつつある。臓器・組織移植以外の選択肢を持たなかった重篤な疾患においても、こうした先進医療技術による新規高度治療の可能性が具体化している。例えば、細胞を用いる再生医療による種々の難治性の疾患治療が試みられつつある。再生医療では、通常採取された細胞は培養による増殖・加工（分化）という過程を必要とする。この培養においては、当然のことながら、外部からの細菌、真菌、ウイルス等の感染があってはならない。さらに、感染の防御のみならず、増殖・分化操作を受けた細胞がその安全性や有効性を担保されていることも必須である。種々の細胞を用いての再生医療が想定されるが、ES細胞を用いた基礎研究から医療現場で既に用いられている患者自身の体細胞を用いての治療まで様々なリスク、実用化段階のものが存在している。さらに、最近では京都大学山中教授等により開発された人工万能細胞（iPS）が倫理的問題のあるES細胞に取って代わり応用される可能性が示唆されている。しかし、現段階ではES細胞やiPS細胞は移植によりテラトーマという腫瘍を形成し、その安全性は確立されておらず、治療に用いることはできない。以上の状況に鑑み、本論文は再生医療技術の開発とその技術利用における問題点を整理し、早期の臨床応用をふまえて、社会に受け入れ易い医療システムの構築、特に骨再生技術を確立したので、それにいたるアプローチならびに成果について記述する。

### 2 再生医療技術開発における課題

再生医療とは、細胞あるいは細胞由来の組織の移植により、病気や傷害などによって失われた臓器や組織の機能を修復・再生する医療と考えられる。他の既存の治療と異なり、ユニークな点は培養という工学的な技術により細胞を増殖・加工（分化）するプロセスが存在することである。このためには、用いる細胞の選択、培養工程プロセスの安全性確保が必要である。例えば、ヒト（哺乳類）の細胞を増殖するためには、細胞を種々のアミノ酸やビタミン等が含まれた液体の培地の中で培養を行う。しかし、このとき一個の細菌でも混入すると、細菌の増殖率はヒト細胞より数倍～数十倍高く、ヒト細胞が増殖したときには、それよりはるかに多くの細菌も増殖することとなり、この培養細胞の患者への移植により感染症が発生する。

この感染を防ぐために、厳重に管理された無菌空間内

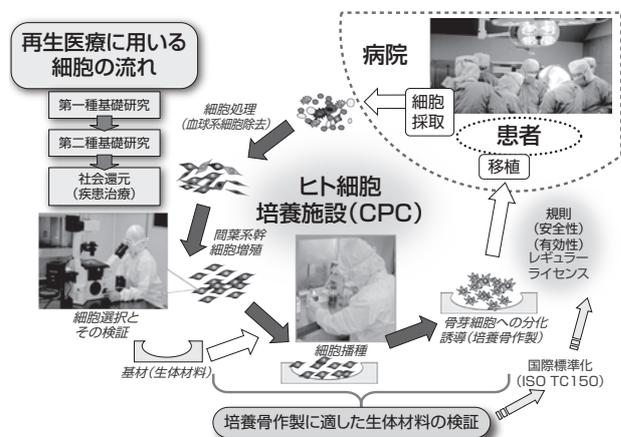


図1 患者細胞の培養から移植までの流れ

での培養環境、すなわちヒト細胞を専用に培養する施設（CPC：Cell Processing Center）を必要とする（図1）。このCPC内で細胞の増殖・加工作業を行うが、通常病院で採取された細胞は目的とする細胞以外に種々雑多の細胞を含む集団であり、その中から目的とする細胞を選択し増殖させなければならない。このためには、細胞選択技術開発をふまえて、その選択された細胞が増殖するかの検証も必要となる。さらに増殖した細胞は分化という加工プロセスを経て再生される組織・臓器に特異的な細胞へ転換される。この分化した細胞が果たしてその特異的な細胞としての機能を有しているのかの検証も必要となる。また、これらの操作された細胞を患者にそのまま移植する場合もあるが、多く（例えば我々が精力的に行っている骨・関節再生）は、細胞と生体材料とを複合化し、この複合体（ハイブリッド）が移植される。この場合、用いられる生体材料の安全性ならびに細胞に対する有用性、例えば細胞分化を支持する材料かの検証も必要である。さらに、これらの検証プロセスの規格化あるいは標準化により、より多くの患者に適応が可能となり、社会に認知される治療技術となる。

以上の点を整理すると次の4点に集約される。

- 1) ヒト細胞培養施設（CPC）の環境整備
- 2) 目的とする細胞の選択と増殖能検証
- 3) 細胞の分化検証（生体材料の検証）
- 4) 再生医療にかかわる標準化

### 3 再生医療の課題に対する我々の取り組み

#### 3.1 ヒト細胞培養施設の環境整備

図1に培養工程の模式図を示す。病院内で患者から細胞（骨髄）が採取される。この細胞は我々の細胞培養施設（CPC）へ搬送され、細胞の増殖が行われる。増殖された細胞そのものを移植される場合もあるが、さらなる分化過程を経て目的とする臓器・組織の構成細胞へ分化し、こ

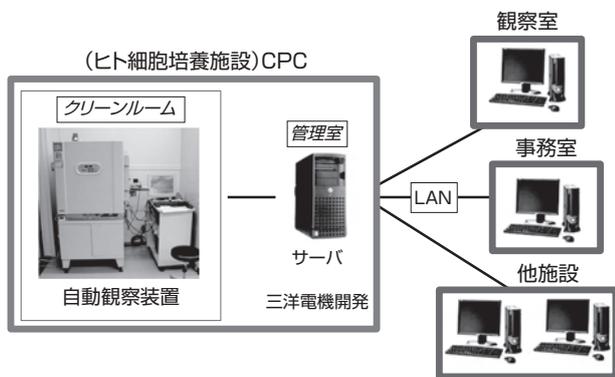


図2 ヒト培養施設の環境整備（細胞自動観察装置開発）

の分化細胞が再度病院に搬送され、病院で患者に移植される。通常、この分化過程は種々の生体材料上で行うことが多い<sup>[1]</sup>。

上述のように、これら細胞の増殖・分化の過程で細菌や真菌が混入する（コンタミネーション）と細胞も増えるが細菌も増えることになり、このような細胞は使用できない。また、細菌は通常的环境内に常在している。そこで、半導体工場のクリーンルームなどで使用されているHEPA（ヘパ）フィルターで微粒子を除去した空気をCPC内に送り込み、滅菌したキャビネットの中で細胞培養操作を行う。このように、ある程度物理的にCPC内に無菌環境域をつくることは可能であるが、我々ヒトの体内には種々の雑菌が内在していて、外部からでなくヒト（作業員）そのものが感染源となりうる。しかし、このCPC内における細胞の増殖・加工というプロセスには作業員が必要である。また、このようなプロセス以外にも、例えば細胞が予定通り増殖・分化しているかの確認のために、CPC内での顕微鏡を用いての細胞観察も必須である。このCPC内へのヒトの出入りを少なくするため、我々は三洋電機株式会社と一緒に細胞自動観察装置を開発した<sup>[2]</sup>。図2に見られるように、本装置を用いることで、LANを介した遠隔地から、ユーザが指定する任意の培養容器の任意の位置の画像を観察することができる。すなわち、CPC内に立ち入ることなく細胞の観察が可能であり、無菌環境を保つことができる。さらに、培養工程は厳重な品質管理手順の下に行われているが、培養細胞のデータを記録する作業も作業員の負担になっている。

図3に本装置によって観察された細胞の24時間ごとの画像を示す。すべて、同一部位（定点）を観察している。

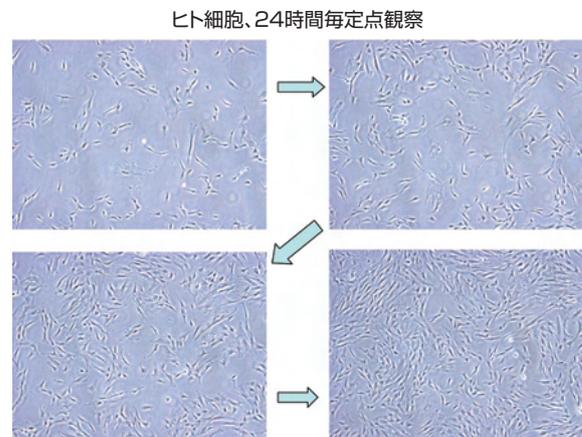


図3 細胞自動観察装置による定点観察（細胞観察機能付自動搬送インキュベータ）

時間が経過するごとに細胞数が増え、順調に細胞が増殖していることが分かる。このような細胞培養の微細領域を再現性をもって継時的に遠隔的に観察できる装置はこれまでになく、この装置の開発意義は大きい。また、本装置はこれらの観察結果を定期的に画像データとして記録することも可能である。以上、品質管理の精度の向上と作業員の負荷の低減の両方に貢献できる技術開発を行うことができた。より理想的には人手に頼らない細胞培養が望まれ、この点において、自動培養装置の開発も行っているが、紙面の関係上省略する。

### 3.2 目的とする細胞の選択技術（細胞増殖の検証）

さて、細胞の増殖過程は種々の再生医療において行われる最初のプロセスである。しかし、採取された細胞は種々雑多な細胞を含むのでその細胞集団より目的とする細胞の選択が必須である。例えば、我々は赤血球、白血球等の血球系細胞およびその他の細胞を含む新鮮骨髄から間葉系幹細胞を選択増殖することを行っている。具体的には培養皿に新鮮骨髄を播種し皿表面に接着する細胞を増殖・回収することで血球系の細胞を除去している。実際、このようにして回収された細胞集団は間葉系幹細胞に多く発現している種々のマーカー発現を呈する。しかし、この段階においても、種々の異なった増殖能をもつ細胞集団からなり均一ではない。すなわち、その時点で培養している間葉系幹細胞が予想通りに増殖するか判断は困難である。

我々はこれまでの臨床応用研究の過程で、培養中の間葉系幹細胞の核が薄くなり細胞形態が扁平になると、増殖速度が落ちることを経験してきた。そこで、この現象を定量的にとらえることにより、増殖能を予想することを考えた。具体的には、原子間力顕微鏡を用いて測定した間葉系幹細胞の厚みと細胞増殖活性の相関を検討し、増殖能の高い間葉系幹細胞は増殖能の低い細胞に比し、小型で細胞核部分での厚みが増加していることを見出した<sup>[3]</sup>。し

かし、この原子間力顕微鏡は非常に高価であり、また操作も困難で計測にも時間がかかる。そこで、間葉系幹細胞の核にあたる部分の細胞厚みと光学顕微鏡像による細胞（平面）形態から、培養中の細胞増殖活性度の評価が可能かどうかを検討し、これらの指標を用いて細胞増殖活性を評価する技術ならびに増殖活性を測定する装置の開発をオリンパス株式会社と共同で行った。具体的には、光学顕微鏡による細胞厚み計測法として、培養容器に接着した間葉系幹細胞の位相像を取得し、画像解析ソフトによる画像処理により細胞厚みならびに細胞面積に対応した数値情報を取得した。図4に見られるように、本装置により、培養中の間葉系幹細胞が3次元で表示され、その厚みも自動的に測定できる。本装置を使用することにより培養中の細胞の増殖能が非侵襲的に予測されることとなり、用いる細胞の増殖の検証が可能となる。すなわち、より有効性を担保できうる細胞培養のできる技術開発に成功した。なお、本装置は既存の光学顕微鏡と連動することが可能であり、すでに各病院や研究室に設置されている顕微鏡の付属機器となりえる。このように、我々が開発した機器は、コストパフォーマンスにすぐれ、将来汎用性をもって各所で使用されることが期待される。

### 3.3 細胞の分化の検証（生体材料と組み合わせる場合は材料上での分化の検証）

我々は再生医療技術開発の中で、特に骨再生に関する技術開発を行ってきた。具体的には細胞培養により間葉系幹細胞を骨形成能力のある骨芽細胞へと細胞分化させ、その骨芽細胞による骨基質を種々生体材料上で形成する（再生培養骨）<sup>[4][5]</sup> という手法を用いての骨再生である。この再生培養骨の作製には種々の生体材料が用いられる。特に、細胞を保持する多孔体の構造をもつ材料が有用である。しかし、その生体材料が果たして細胞を効率良く保持でき、さらに生体内で新生骨形成能を有するかの評価が必要である。そのため、再生培養骨に使用される生体材料の性状、物性と間葉系細胞の活性の比較検討を行い、生体内で骨新生を評価する手法の確立を目指した。また、この評価法を標準化すべく、細胞のソース（この場合はラット大腿骨骨髄）を一定とし、手順も一定にするべく検討を行っている。

具体的な手順を述べると、7週齢ラットの骨髄をプラスチック内で培養して間葉系幹細胞を増殖させ、細胞濃度が $1 \times 10^6$  cell/mlになるように調整する。使用する多孔体材料を培養プレートに並べ、調整した細胞懸濁液にて浸漬する。骨分化誘導培地を用いて、さらに2週間培養する。培養終了後骨分化した細胞（骨芽細胞）の検出はアルカリフォスターゼ染色によった。図5上図に見られるように、2種類

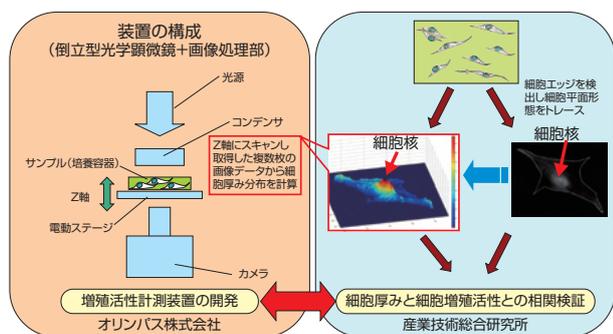


図4 細胞厚み計測装置開発（細胞増殖活性計測評価技術と計測装置開発）

の材料（多孔体の合成ハイドロキシアパタイトと珊瑚骨格由来のハイドロキシアパタイト）を比較すると、前者では材料表面の気孔にのみ骨分化が生じる。これに比し、後者では気孔の内部にまで細胞が生着し、骨分化も良好に生じていることが分かる。さらに、同系ラットへの移植を行った。図5下図に見られるように、珊瑚骨格由来の多孔体ハイドロキシアパタイトには多孔体の内部にまで新生骨（図では赤色に示される）が見られた。このように、in vitro の培養と in vivo の移植研究により、用いられる生体材料の骨分化能に関する検証がなされる。以上、骨再生医療に用いられる生体材料の有効性について事前に判定しうる評価技術を開発した。

### 3.4 再生医療にかかわる標準化

上述のように、再生医療においては、採種した細胞や培養増殖した細胞、さらに分化させた細胞が適切なものであることを確認するとともに培養プロセスの効率化を常に検証する必要がある。また、再生医療の産業化を考慮した場合、用いる細胞の安全性や有効性などの評価方法や基準の確立は必須である。標準化された細胞の評価方法を用いることにより評価結果の基準がつけられることとなり、安全性や有効性の判断が容易となる。すなわち、この標準化によりプロセスの効率化を進める上での指標が明確となり、再生医療製品作製のための計画立案、遂行が容易となる。3.3 節に記述のように、例えば我々は骨再生医療に用いられる生体材料の評価方法を確立しつつある。そこで、その評価法の国際標準化を視野に入れている。国際標準化機構（International Organization for Standardization：ISO）では、現在約 230 の専門委員会（Technical Committee：TC）が積極的な活動を展開し、その中で医療機器に関しては TC150（外科用インプラント：Implants for Surgery）が担当している。その

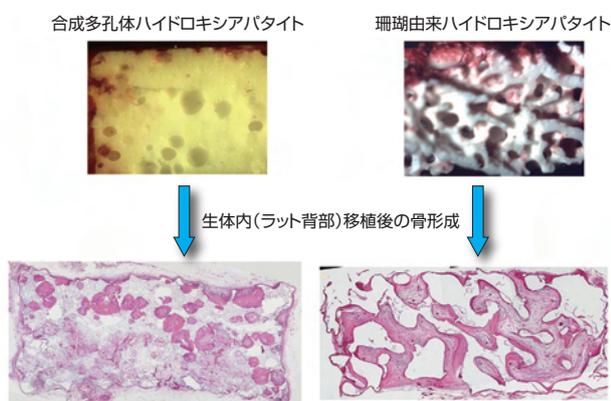


図5 生体材料の検証（間葉系幹細胞播種後の骨芽細胞存在部位）

TC150 はさらに分科会（Subcommittee：SC）や作業部会（Working Group：WG）に分かれ、各国の専門家により、議論が進められている。再生医療分野では、WG11（Tissue Engineered Implants）において、再生医療技術に関する規格案が審議され、2007年1月には SC7（Tissue Engineered Medical Products）への“昇格”が承認された。我々は規格案「ラット間葉系細胞を用いた多孔性材料内における生体内骨形成評価法」（提案名称：In vivo bone formation in porous materials using rat mesenchymal cell - Standardization to evaluate bone forming ability of biomaterials）を提出し、我が国発の再生医療技術の規格化に向け活動を開始している。図5にその規格案により行なわれた材料内での骨形成を示す。

## 4 再生医療技術を利用した臨床応用

再生医療における課題を克服すべく種々の技術開発を企業の方々とともに進めてきた。その結果として、世界に先駆けて再生培養骨が形成された人工関節を変形性関節症患者者に移植することができた。最初の症例は既に約6年経過し、総数は50例を超えている。まだまだ短期的ではあるが、炎症反応や感染等の副作用も生じず、人工関節の有害事象である移植部での“ゆるみ”もなく良好な結果を保っている<sup>[6]</sup>。また、関節症患者のみならず、骨腫瘍<sup>[7]</sup>等にも再生培養骨が移植されている。（株）富士経済の調査によると日本における関節症患者数は約80万人でそのうち2万人が再生医療の対象患者であると推定されている。このように、我々の技術は多数の患者に適用される可能性がある。さらに、間葉系幹細胞が血管内皮や心筋細胞へも分化しうることを確認し<sup>[8]</sup>、国立循環器病センターとともに心再生への臨床応用も開始した。このように、患者自身の組織を犠牲にすることなく、最小限の侵襲（骨髄穿刺）により採取された、患者自身の細胞（骨髄細胞）を利用することにより、骨・関節疾患のみならず心不全等の治療技術の開発に成功した。この心不全の推定患者数は160万人である。今後、骨髄由来間葉系幹細胞の様々な組織構成細胞への分化能力を利用してさらに幅広い組織・臓器再生における臨床応用が期待できる。

## 5 考察（残された課題）

さて、以上のように我々は再生医療に用いられる種々の技術を開発し、その結果として骨再生をはじめとして、様々な疾患の患者に対して応用、すなわち臨床研究を行ってきた。しかし、数多くの患者にその恩恵を与えるには、企業がこれらの医療応用に対して取り組みを行うことが必須である。そのためには、これらの研究が治験（ちけん）

clinical trial) というプロセスを経て、最終的に培養された細胞が厚生労働省の許認可の下、再生医療製品として販売される必要がある。例えばアメリカの Genzyme 社は米国食品医薬品局 (FDA) の認可の下、1 万例以上の患者に対して増殖軟骨細胞を製品として販売している。我が国では、広島大学の越智教授により、軟骨培養をコラーゲンゲルの中で 3 次元培養を行い、この軟骨・コラーゲンゲルの複合体を用いての軟骨再生技術が開発された。この技術はジャパン・ティッシュ・エンジニアリング (JTEC) に移転され、治験がほぼ終了状態にあるもののまだ製品としては出回っていない。この点に比し、JTEC が軟骨再生を開始するのとはほぼ同時期に韓国の SEWON Cellontech 社が軟骨再生事業にとりかかり、すでに韓国食品医薬品局 (KFDA) の認可の下 3,000 名近くの患者に適用している。

また、軟骨再生よりさらに歴史の古い皮膚再生においては、既に諸外国で複数の製品が出回っている。しかし、日本においては JTEC がつい最近再生医療製品として承認を受けた段階である。このように、この再生医療分野においては諸外国に比し日本の産業化の遅れは明白である。すなわち、許認可に対する日本のスピードの遅さは明白な事実である。今後、再生医療の産業化を推進するためには、再生医療製品の安全と有効性の科学的根拠の確立に行政側からの取り組みも必要とされるであろう。

現在、日本の医療制度は、事業段階においては薬事法で規制する仕組みになっており、例えば、医薬品や医療機器を販売するには、上述の薬事法で定めるところの治験というプロセスを経る必要がある。また、この薬事法はその性格上、不特定多数に対しての製造販売を念頭においた法体系となっている。しかし、我々が行っている再生医療、すなわち患者から細胞を分離、培養増殖して同一患者にその培養細胞を移植する医療は、患者自身の細胞（自己細胞）を利用する再生医療技術である。すなわち、特定の個人対象の医療であり、不特定多数を対象とした薬事法にはなじまない可能性がある。さらに、この再生医療技術においては、医師が患者から細胞の採取を行う必要性があり、必然的に細胞を治療目的で患者に移植するかなり以前より、医師と患者の間には一対一の対応が成り立ち、自己細胞を用いる再生医療のリスクとベネフィットの説明・許諾がなされ得る。このように、自己細胞を用いる再生医療は他家細胞を用いての治療技術とは明らかに異なるものであり、この医療技術に関しては、新たな認定体制の検討も必要であろう<sup>[9]</sup>。このように、再生医療という新しい技術革新に関しては、既存の考え方にとらわれない新しい体系構築も考えるべきと思われる。

## 謝辞

本論文はセルエンジニアリング研究部門の組織・再生工学研究グループの皆様の協力の下になされ、中でも国際標準に関しては廣瀬志弘研究員の精力的な活動が不可欠であった。細胞自動観察装置の開発は新機械システム普及促進事業“幹細胞の培養状態自動観察システム開発”の支援をうけ三洋電機株式会社と共同での開発で、バイオメディカ事業部の原田 雅樹氏、ヒューマンエコロジ研究所の山本 宏氏のご協力に感謝する。また、細胞厚み計測装置に関しては健康安心プログラム“再生医療の早期実用化を目指した再生評価技術開発”の一環として、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) からの委託をうけてオリンパス株式会社との共同での研究であり、医療新事業プロジェクトの福田 宏氏のご協力に感謝する。

## キーワード

再生医療、細胞培養、細胞分化、生体材料、国際標準

## 参考文献

- [1] H. Ohgushi and A.I. Caplan: Stem cell technology and bioceramics: From cell to gene engineering, *J. Biomed Mater. Res.*, 48(6),913-27(1999).
- [2] H. Yamamoto, M. Harada, A. Michida, M. Houjou, Y. Yokoi, A. Sakaguchi, H. Ohgushi, A. Ohshima, and S. Tsutsumi: Development of cell culture system equipped with automated observation function, *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, 2(3),127-137 (2007).
- [3] Y. Katsube, M. Hirose, C. Nakamura and H. Ohgushi: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 368(2),256-260(2008).
- [4] H. Ohgushi, Y. Dohi, T. Katuda, et. al: In vitro bone formation by rat marrow cell culture, *J. Biomed Mat. Res.*, 32,333-40(1996).
- [5] Y. Tohma, Y. Tanaka, H. Ohgushi, et. al: Early bone in-growth ability of alumina ceramic implants loaded with tissue-engineered bone, *J. Orthop Res.*, 24,595-6037(2006).
- [6] H. Ohgushi, N. Kotobuki, H. Funaoka, et. al: Tissue engineered ceramic artificial joint-ex vivo osteogenic differentiation of patient mesenchymal cells on total ankle joints for treatment of osteoarthritis, *Biomaterials*, 26(22),4654-61(2005).
- [7] T. Morishita, T. Honoki, H. Ohgushi, et. al: Tissue engineering approach to the treatment of bone tumors: three cases of cultured bone grafts derived from patients mesenchymal stem cells, *Artif. Organs*, 30(2),115-8(2006).
- [8] N. Nagaya, K. Kangawa, T. Itoh, et. al: Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy, *Circulation*, 112,1128-1135(2005).
- [9] 自己細胞再生治療法ワーキンググループ編：“自己細胞再生治療法”法制化の考え方, ティッシュエンジニアリング 313-326, 日本医学館,(2007).

(受付日 2008.4.14, 改訂受理日 2008.6.2)

---

## 執筆者略歴

大串 始（おおぐし はじめ）

1976年奈良県立医科大学卒業、1980年同大学院（生化学）で医学博士。整形外科医として数カ所の病院勤務、1985-1987年米国 Case Western Reserve UniversityでResearch Associateとして勤務。帰国後、臨床応用を目指して細胞を用いた骨再生研究に従事。2001年1月産業技術融合領域研究所入所（主任研究官）、同年4月産業技術総合研究所研究チーム長、2006年セルエンジニアリング研究部門主幹研究員。

---

## 査読者との議論

### 議論1 間葉系幹細胞利用技術の必要性

質問（栗山 博）

患者由来の間葉系幹細胞を用いる必要性を緒言の中で簡潔に述べておくことが必要と思われます。合わせてiPS細胞の危険性について、なぜなのか具体的に示しておくことも大切に思われます。（なぜ有名なiPS細胞ではいけないのかという素朴な疑問への質問として）

回答（大串 始）

本文緒言のところにiPS細胞は移植によりテラトーマという腫瘍を

形成することを挿入しました。

### 議論2 骨・軟骨治療の重要性

質問（栗山 博）

4. において、本技術の適用対象である骨・軟骨の再生が必要な症例の数ほどの程度あるか、また国内外の需要予測などを記載してはどうでしょうか。さらにこうした医療技術の適用が期待される他の症例と患者数も記載すると、本技術開発の有用性がより明らかになると思いますがいかがでしょうか。（患者数を表で示すことも検討してはいかがでしょうか。）

また、[6]の文献に記載されているのかもしれませんが、骨・軟骨治療に関して実際の症例数、治療結果はどうかをここで示してはどうでしょうか。

回答（大串 始）

関節症の患者数と再生医療が適応となる予想患者数を本文に挿入しました。また、心不全の患者総数も挿入しました。実際我々が行った関節症の再生医療数は50数例ですので、50例を超す患者に適応したと記入しました。なお、治療結果の詳細について述べると字数が超えますし、本題と少し離れるかと思いますので人工関節の有害事象である移植部での“ゆるみ”もなく良好な結果を保っていると記入しました。