

第17回日本再生医療学会総会

パシフィコ横浜
平成30年3月21-23日

シンポジウム19

NIHS企画：再生医療分野における品質・安全性評価法の最前線

In vitro エンドトキシン規格値の設定

国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部



Division of
medical
Devices

薮島 由二
haishima@nihs.go.jp

第17回日本再生医療学会総会

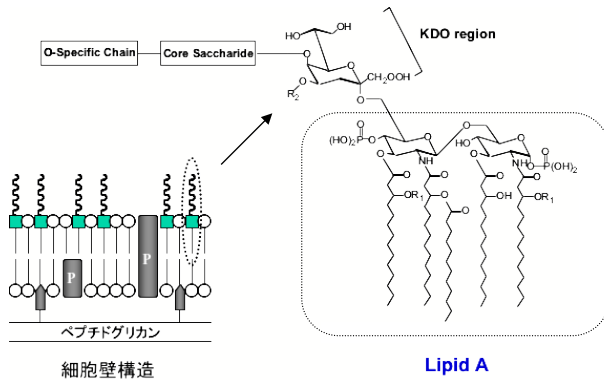
筆頭発表者のCOI開示

筆頭発表者氏名：薮島由二

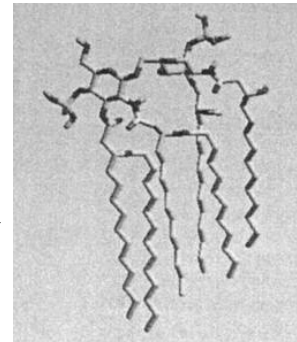
演題発表に関連し、
開示すべきCOI関係にある企業等はありません。

エンドキシン (Lipopolysaccharide, LPS) とは？

局在部位と化学構造



三次元構造



E.coli lipid A

生物活性

生体レベル

発熱性, 致死毒性, ショック, トランス, 局所・全身シュワルツマン活性, 低血糖, 血清鉄減少反応, アジュバント活性, トロンボプラスチン産生, 抗腫瘍活性, 放射線障害防御能 アジュバント活性, 網内系殺菌力亢進, 骨髄反応

細胞レベル

マクロファージ活性化能
 ・サイトカイン産生
 ・ケモカイン産生
 ・貧食作用亢進
 マイトジェン活性
 細胞毒性

分子レベル

リムルス活性
 補体活性化能

エンドキシン規格値: 医薬品 vs 再生医療等製品

日本薬局方 — 注射剤のエンドキシン規格値の算出式 —

$$\text{エンドキシン規格値} = K/M$$

K: 発熱を誘起するといわれる体重 1 kg 当たりの
 エンドキシン量 (EU/kg)

M: 体重 1 kg 当たり 1 時間以内に投与する最大
 量 (mL/kg, mg/kg, U/kg, etc)

投与経路による区分 K (EU/kg)

静脈内	5.0
静脈内(放射性)	2.5
脊髄腔内	0.2

再生医療等製品の品質及び安全性の確保に関する指針

- 平成20年2月8日付薬食発第0208003号厚生労働省医薬食品局長通知
 「ヒト(自己)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」
- 平成20年9月12日付薬食発第0912006号厚生労働省医薬食品局長通知
 「ヒト(同種)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」

第2章: 製造方法/第3.最終製品の品質管理/(7)エンドキシン試験(抜粋)

規格値は必ずしも実測値によらず、日本薬局方等で示されている最終製品の1回投与量を基にした安全域を考慮して設定すればよい。

- ・ワーストケースを想定した概念(医療機器も同様)
 - ・日局の規格値は生体レベルの発熱誘導能に基づいて設定されている
 - ・再生医療等製品の場合、細胞への直接影響も考慮する必要がある?
 - ・プロセスバリデーションにおける方法論は適切か?(測定対象・回収法等)

エンドキシン等 (TLRアゴニスト) の細胞影響 (文献紹介)

論文報告	細胞種	アゴニスト	結果
Kadono et al. Infect Immun, 1999	ラット胎児頭蓋冠細胞 (骨芽前駆細胞)	P. gingivalis LPS	<ul style="list-style-type: none"> 増殖活性に影響しない 100ng/ml以上でALP活性及びCa産生を抑制
Yang et al. Phytother Res, 2002	ヒト皮膚繊維芽細胞 ヒト包皮ケラチノサイト	E. coli LPS	<ul style="list-style-type: none"> 50ng/ml以上で増殖活性を増強する
Cho et al. Stem Cells, 2006	脂肪組織由来 ヒト幹細胞	TLRs リガンド	<ul style="list-style-type: none"> CpGDNA以外は増殖活性に影響しない LPS, PGNは骨分化を促進し、CpGDNAは抑制する Poly(I:C)はLPS, PGNの作用を相乗的に増強する
Fisher et al. Blood, 2007	骨髄由来ヒト幹細胞	Pam3Cys	<ul style="list-style-type: none"> IL-6産生とNF-κB転写を促進する 増殖活性を増強する 骨分化、軟骨分化、脂肪組織分化を抑制する

Pam3Cys: TLR2, Poly(I:C): TLR3, エンドキシン: TLR4, CpG DNA: TLR9, PGN: Nocth Signaling



- エンドキシン等の細胞影響は論文間に齟齬がある
- いずれも比較的高用量 (50ng/mL ~ 1,000ng/mL)

ヒト間葉系幹細胞の増殖能に対する影響

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC)

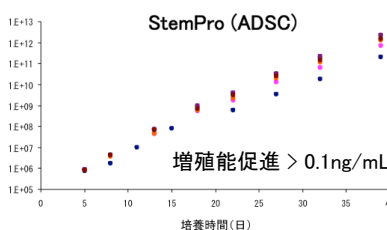
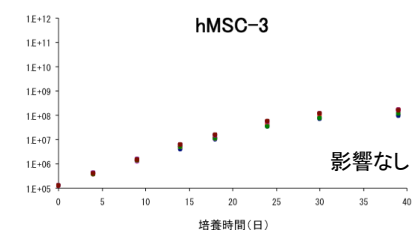
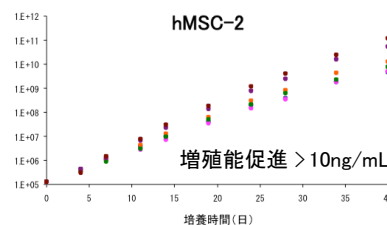
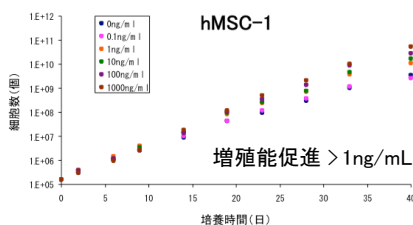
hMSC-1: #7F3914 21 years.M/B
hMSC-2: #7F3458 36 years.M/B
hMSC-3: #7F3753 43 years.M/C
増殖用培地: プレットキットMSCGM

ヒト脂肪組織由来幹細胞 (ADSC)

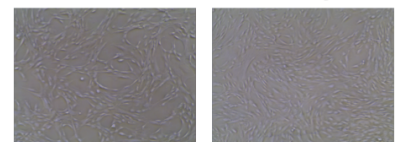
StemPro Human, Invitrogen
増殖用培地: MesenPRO RS medium kit

細胞培養

播種: 1.5×10^5 個
容器: 25 cm² フラスコ
培養: 1, 7, 14, 29, 43, 49 日間
LPS: 0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000 ng/mL
培地交換毎に用事添加

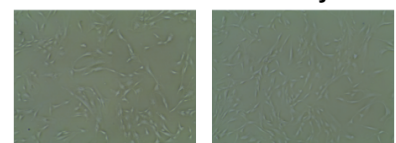


細胞形態: ADSC 27 day



対照 1,000 ng/ml

細胞形態: ADSC 35 day



対照 1,000 ng/ml

ヒト間葉系幹細胞増殖促進作用のメカニズム①

アポトーシス誘導蛋白質の変動

■:5倍以上, ■:2倍以上5倍未満, □:0.5倍以下0.2倍未満, □:0.2倍未満, ○:Cont. 非発現, - :Cont & Sample 非発現

Code	Protein ID	Name	Score	Peptide count	Expression ratio [LPS #]/[control]					
					3D	7D	14D	22D	36D	49D
F5AL	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1-like	129.3	7	0.37	1.10	0.82	1.47	0.77	0.19	
UN64B	Protein unc-84 homolog B	119.7	5	0.43	1.07	1.44	0.96	1.38	0.47	
F5A2	Eukaryotic translation initiation factor 5A-2	74.9	6	0.40	1.14	1.02	1.44	1.04	0.24	
PEF1	Pefin	102.9	4	0.36	1.09	0.94	0.96	0.79	0.62	
KPC8	Protein kinase C beta type	100.1	2	0.34	0.64	0.73	1.06	1.14	0.49	
SH32	Endophilin-A1	37.2	2	0.39	-	0.58	-	1.07	0.54	
SUG1	Suppressor of G2 allele of SKP1 homolog	56.9	4	0.48	0.86	0.64	1.37	0.49	0.18	
RTL1	Retrosposon-like protein 1	30.9	2	0.36	0.98	0.58	1.28	0.49	0.66	
PARVA	A beta-parvin	141.8	6	0.40	1.07	0.83	1.15	0.75	0.64	
AD13	ADP-ATP translocase 3	302.3	11	0.43	1.10	0.77	1.04	0.82	0.67	
CYFP2	Cytochrome c FMR1-interacting protein 2	72.9	2	0.28	1.08	1.08	1.00	1.57	0.80	
TANC2	Protein TANC2	34.1	2	0.33	0.87	0.47	0.95	0.34	0.57	
APAF	Apoptosis protease-activating factor 1	34.5	2	0.40	0.95	0.57	1.21	0.41	0.67	
G3P	Glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1395.0	30	0.38	1.10	1.06	1.12	1.09	0.38	
VATL	V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit	72.9	2	0.31	-	1.40	1.50	1.09	0.17	
BAX	Apoptosis regulator BAX	129.0	4	0.43	1.07	0.68	1.03	0.49	0.63	
RUVB1	RuvB-like 1	79.1	5	0.48	0.54	0.87	1.52	0.88	0.63	
RHOA	Transforming protein RhoA	89.2	8	0.45	1.01	0.81	1.24	0.68	0.45	
STK25	Serine/threonine-protein kinase 25	81.8	4	0.58	1.47	0.49	1.02	1.28	0.52	
MDM3	Regulator of microtubule dynamics protein 3	52.7	2	0.77	1.11	0.82	0.85	0.28	-	
AFM1	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	66.0	3	0.59	0.98	1.38	0.81	1.92	0.21	
PDG61	Programmed cell death 6-interacting protein	290.7	19	0.51	0.87	0.70	1.03	0.66	0.48	

アポトーシス抑制蛋白質の変動

Code	Protein ID	Name	Score	Peptide count	Expression ratio [LPS #]/[control]					
					3D	7D	14D	22D	36D	49D
UBE2H	Ubiquitin-conjugating enzyme E2H	31.9	2	0.52	1.25	-	3.09	-	-	
TFP8	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8	103.5	2	0.85	1.88	2.22	0.91	1.96	0.84	

感染防御系蛋白質の変動

Code	Protein ID	Name (function)	Score	Peptide count	Expression ratio [LPS #]/[control]					
					3D	7D	14D	22D	36D	49D
UCRP	Interferon-induced 17 kDa protein D (up by antiviral activity during viral infections)	66.3	2	9.61	-	2.75	4.79	-	-	
SAS	Sialic acid synthase (acts as a negative regulator of the Toll-like and TLR receptor signaling pathways)	53.0	5	0.58	2.56	1.41	1.14	2.21	0.34	
FYN	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fyn (Promotes cell survival by phosphorylating AGAP2/PKFA and preventing its apoptotic cleavage)	25.7	2	-	2.17	-	-	-	-	
BAT3	Large proline-rich protein BAT3 (Plays a key role in various processes such as apoptosis)	64.9	2	0.60	1.34	1.25	3.18	1.74	0.67	
UBE2H	Ubiquitin-conjugating enzyme E2H (May mediate foam cell formation by the suppression of apoptosis)	31.9	2	0.52	1.25	-	3.09	-	-	

細胞サイクル関連蛋白質の変動

Code	Protein ID	Name (function)	Score	Peptide count	Expression ratio [LPS #]/[control]					
					3D	7D	14D	22D	36D	49D
FHL2	Four and a half LIM domains protein 2 (Negatively regulates the transcriptional repressor E4F1 and may function in cell growth)	43.2	3	5.21	0.77	0.63	1.02	0.50	0.79	
SODM	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial (Specifically promotes splicing of many cell-cycle and DNA-repair transcripts)	243.8	8	2.76	7.74	5.38	12.19	7.56	3.43	
FBL1	Fibronectin-like protein 1 (Regulates osteoblast proliferation and differentiation)	24.0	2	-	-	7.44	-	0.51	-	
MSK15	Magnesium-activated protein kinase kinase kinase 15 (Leads to apoptosis)	25.5	2	0.35	1.03	0.64	∞	-	-	
ERF3A	Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3A (Regulator of mammalian cell growth)	95.3	4	0.56	1.04	1.00	6.67	0.48	0.33	
NEDD8	NEDD8 (Plays an important role in cell cycle control)	104.7	2	0.08	1.43	4.07	1.08	5.79	0.08	
LAP4	Protein LAP4 (function in cell proliferation regulating progression from G1 to S phase and as a positive regulator of apoptosis)	32.9	2	-	0.08	0.65	0.40	13.42	0.00	
TES	Testin (Plays a role in the regulation of cell proliferation)	86.8	4	0.29	2.64	0.50	1.68	0.37	0.56	
GRDN	Girdin (Regulates DNA replication and cell proliferation)	38.3	2	0.32	3.62	0.42	1.58	1.26	1.94	
FYN	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fyn (Promotes cell survival by phosphorylating AGAP2/PKFA and preventing its apoptotic cleavage)	25.7	2	-	2.17	-	-	-	-	
UBP7	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7 (Involved in cell proliferation)	50.0	3	0.73	1.20	1.03	2.66	1.16	0.79	
HAP28	28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein (Enhances PDGFA-stimulated cell growth)	48.0	2	0.29	1.37	0.53	4.69	0.34	0.26	
REEP5	Receptor expression-enhancing protein 5 (Stress protein involved in the control of bacterial proliferation)	50.9	2	0.10	0.96	1.67	3.38	0.71	0.14	
AN32A	Acid leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A (Implicated in cell proliferation, differentiation, and apoptosis)	125.0	5	0.78	1.47	1.02	3.36	0.62	0.71	
ERF3B	Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3B (Plays a role in cell cycle progression)	95.3	3	0.76	1.04	1.23	4.11	0.76	0.33	
2ABD	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B delta isoform (Plays a key role in cell cycle)	69.5	2	0.33	0.99	1.65	0.51	2.14	0.43	
AKT1	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase (Mediates the antiapoptotic effects of BFGF)	71.4	3	0.67	1.00	1.06	0.43	3.78	0.70	
SFRS2	Splicing factor, arginine/serine-rich 2 (Involved in RNA processing in relation with cellular proliferation)	61.8	3	0.50	1.17	0.59	1.06	0.47	2.32	

- 細胞ペレットに細胞溶解液を添加
- Cold MeOH 精製
- 細胞溶解液に再溶解
- 還元、アルキル化、トリプシン消化
- 脱塩
- LC-MS/MS ショットガン解析
- Mascot/Sprot/i-RUBY 検索

ヒト間葉系幹細胞増殖促進作用のメカニズム②

細胞内SOD測定

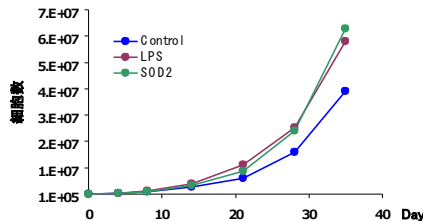
- 細胞 6×10^5 個
- PBS 洗浄後、ペレット化
- M-PER 細胞溶解液に溶解
- Human SOD1, 2 ELISA kit

Day	Control		LPS (+)	
	SOD1	SOD2	SOD1	SOD2
5	6.55	1.48	6.28	15.93
12	5.98	1.04	4.19	13.98
19	7.11	1.60	6.37	13.18
26	7.34	1.49	6.01	10.60

LPS添加→SOD2発現上昇

細胞培養

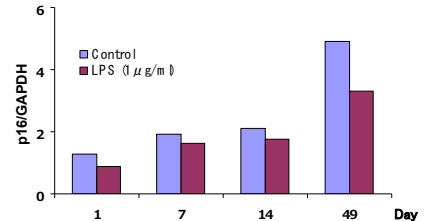
細胞: ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (21Y)
 培地: MSCGM 培地
 播種: 1.5×10^5 個
 容器: 25 cm² フラスコ
 培養: 1, 7, 14, 29, 43, 49 日間
 LPS: 1 μg/mL (+/-)
 SOD2: 90 μg/フラスコ (+/-)



増殖能: Control < LPS = SOD2 添加群

RT-PCR測定

対象遺伝子: p16
 Forward: 5' - CACTCACGCCCTAAGC -3'
 Reverse: 5' - GCAGTGTGACTCAAGAGAA -3'
 測定装置: Roche Light Cycler



LPS添加→p16発現低下(老化抑制)

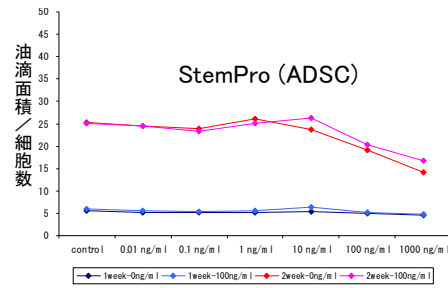
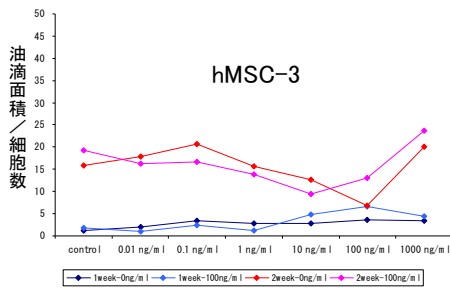
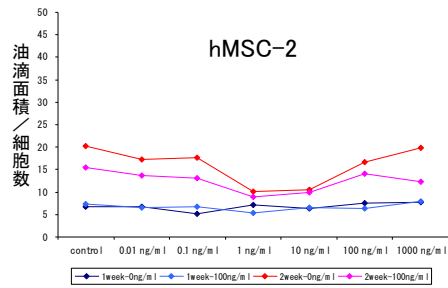
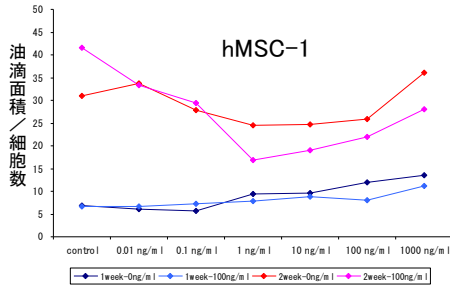
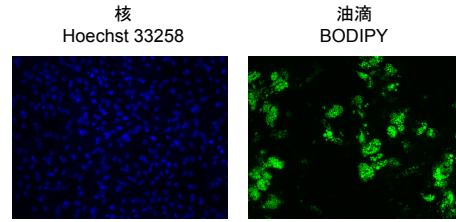
エンドキシンが示すhMSC等の増殖促進作用はエンドキシン刺激に対するストレス応答機構に由来する反応であり、少なくとも細胞内におけるSOD2の発現上昇及びアポトーシス抑制が密接に関与していることが示唆された。

Wang ZJ, et al., Lipopolysaccharides can protect mesenchymal stem cells (MSCs) from oxidative stress-induced apoptosis and enhance proliferation of MSCs via Toll-like receptor(TLR)-4 and PI3K/Akt. Cell Biol Int, 33: 665-74 (2009).

ヒト間葉系幹細胞の脂肪細胞分化に対する影響

骨髄由来間葉系幹細胞：
 hMSC-1 #7F3914 21 years.M/B
 hMSC-2 #7F3458 36 years.M/B
 hMSC-3 #7F3753 43 years.M/C
 増殖用培地：プレートキットMSCGM
 脂肪細胞分化用培地：プレートキット脂肪細胞分化用培地

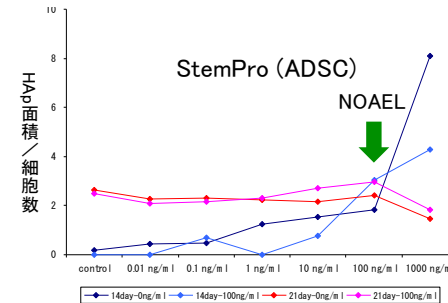
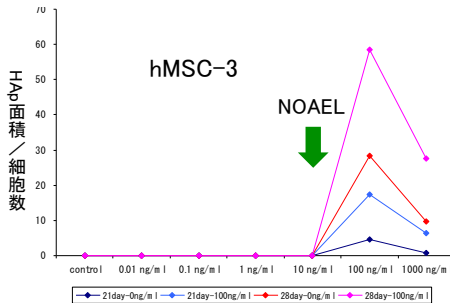
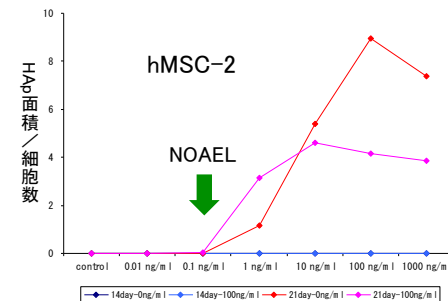
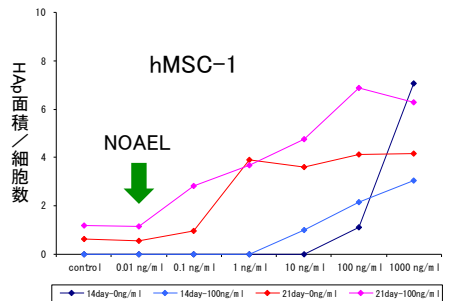
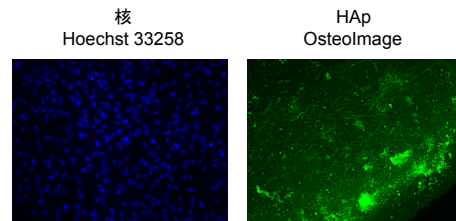
脂肪組織由来幹細胞：StemPro Human, Invitrogen
 増殖用培地：MesenPRO RS medium kit
 脂肪細胞分化用培地：StemPro A1007001 Kit



ヒト間葉系幹細胞の骨分化に対する影響

骨髄由来間葉系幹細胞：
 hMSC-1 #7F3914 21 years.M/B
 hMSC-2 #7F3458 36 years.M/B
 hMSC-3 #7F3753 43 years.M/C
 増殖用培地：プレートキットMSCGM
 骨芽細胞分化用培地：プレートキット骨芽細胞分化用培地

脂肪組織由来幹細胞：StemPro Human, Invitrogen
 増殖用培地：MesenPRO RS medium kit
 骨芽細胞分化用培地：StemPro A1007201 Kit



ヒト間葉系幹細胞骨分化促進作用のメカニズム

細胞培養

細胞: ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (21Y)
 培地: プレートキット骨芽細胞分化用培地
 播種: 7.75×10^4 個
 容器: 75 cm² フラスコ
 培養: 1, 2, 3 及び 4 日間 (LPS +/-)
 剥離: トリプシン消化
 洗浄: PBS (3 回)、ペレット化

蛋白質解析

- (1) ペレットに尿素系細胞溶解液を添加
- (2) Cold MeOH 精製
- (3) 細胞溶解液に再溶解
- (4) 還元、アルキル化、トリプシン消化
- (5) 脱塩
- (6) LC-MS/MS ショットガン解析
- (7) Mascot/Spot/i-RUBY 検索

LPS 添加群 vs 非添加群

培養開始1日目: TLR4, グルタミン酸受容体 (GRIK3, GRM3), ビタミンD情報伝達エンハンサー (SMRD1, SMHD1), Wnt/ β カテニン情報伝達コレプター (LRP6), 骨芽細胞分化制御因子 (CHD9, NO66), IGF 情報伝達制御因子 (PHF7), Type I プロコラーゲン活性化因子 (PCNA) 等のほか、主要なステロイド受容体及び感染制御関連蛋白質の発現上昇

培養開始2.3日目: BMP受容体 (BMR1A, BMP3B)は2又は3日目, エストロゲン受容体制御因子 (GREB1)は2日目

培養開始4日目: RUNX2エンハンサー (MINT)の発現上昇

hMSCとADSCの骨芽細胞分化はエンドトキシン刺激により促進されることが蛋白質レベルでも確認された。

Osteogenesis

Protein ID	Name	Score	Protein	1 day	2 day	3 day	4 day
ENPEP	Enterocyte and the related protein 2	31.97	1	1.15	1.40	1.01	0.24
ITIH2	ITIH2 (Protein tyrosine kinase 10)	25.22	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM10	ADAM10 (Disintegrin-like and metalloprotease 10)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM12	ADAM12 (Disintegrin-like and metalloprotease 12)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM17	ADAM17 (Disintegrin-like and metalloprotease 17)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM19	ADAM19 (Disintegrin-like and metalloprotease 19)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM20	ADAM20 (Disintegrin-like and metalloprotease 20)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM22	ADAM22 (Disintegrin-like and metalloprotease 22)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM23	ADAM23 (Disintegrin-like and metalloprotease 23)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM24	ADAM24 (Disintegrin-like and metalloprotease 24)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM25	ADAM25 (Disintegrin-like and metalloprotease 25)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM26	ADAM26 (Disintegrin-like and metalloprotease 26)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM27	ADAM27 (Disintegrin-like and metalloprotease 27)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM28	ADAM28 (Disintegrin-like and metalloprotease 28)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM29	ADAM29 (Disintegrin-like and metalloprotease 29)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM30	ADAM30 (Disintegrin-like and metalloprotease 30)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM31	ADAM31 (Disintegrin-like and metalloprotease 31)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM32	ADAM32 (Disintegrin-like and metalloprotease 32)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM33	ADAM33 (Disintegrin-like and metalloprotease 33)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM34	ADAM34 (Disintegrin-like and metalloprotease 34)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM35	ADAM35 (Disintegrin-like and metalloprotease 35)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM36	ADAM36 (Disintegrin-like and metalloprotease 36)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM37	ADAM37 (Disintegrin-like and metalloprotease 37)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM38	ADAM38 (Disintegrin-like and metalloprotease 38)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM39	ADAM39 (Disintegrin-like and metalloprotease 39)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM40	ADAM40 (Disintegrin-like and metalloprotease 40)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM41	ADAM41 (Disintegrin-like and metalloprotease 41)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM42	ADAM42 (Disintegrin-like and metalloprotease 42)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM43	ADAM43 (Disintegrin-like and metalloprotease 43)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM44	ADAM44 (Disintegrin-like and metalloprotease 44)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM45	ADAM45 (Disintegrin-like and metalloprotease 45)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM46	ADAM46 (Disintegrin-like and metalloprotease 46)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM47	ADAM47 (Disintegrin-like and metalloprotease 47)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM48	ADAM48 (Disintegrin-like and metalloprotease 48)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM49	ADAM49 (Disintegrin-like and metalloprotease 49)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM50	ADAM50 (Disintegrin-like and metalloprotease 50)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM51	ADAM51 (Disintegrin-like and metalloprotease 51)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM52	ADAM52 (Disintegrin-like and metalloprotease 52)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM53	ADAM53 (Disintegrin-like and metalloprotease 53)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM54	ADAM54 (Disintegrin-like and metalloprotease 54)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM55	ADAM55 (Disintegrin-like and metalloprotease 55)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM56	ADAM56 (Disintegrin-like and metalloprotease 56)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM57	ADAM57 (Disintegrin-like and metalloprotease 57)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM58	ADAM58 (Disintegrin-like and metalloprotease 58)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM59	ADAM59 (Disintegrin-like and metalloprotease 59)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM60	ADAM60 (Disintegrin-like and metalloprotease 60)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM61	ADAM61 (Disintegrin-like and metalloprotease 61)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM62	ADAM62 (Disintegrin-like and metalloprotease 62)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM63	ADAM63 (Disintegrin-like and metalloprotease 63)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM64	ADAM64 (Disintegrin-like and metalloprotease 64)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM65	ADAM65 (Disintegrin-like and metalloprotease 65)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM66	ADAM66 (Disintegrin-like and metalloprotease 66)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM67	ADAM67 (Disintegrin-like and metalloprotease 67)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM68	ADAM68 (Disintegrin-like and metalloprotease 68)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM69	ADAM69 (Disintegrin-like and metalloprotease 69)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM70	ADAM70 (Disintegrin-like and metalloprotease 70)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM71	ADAM71 (Disintegrin-like and metalloprotease 71)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM72	ADAM72 (Disintegrin-like and metalloprotease 72)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM73	ADAM73 (Disintegrin-like and metalloprotease 73)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM74	ADAM74 (Disintegrin-like and metalloprotease 74)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM75	ADAM75 (Disintegrin-like and metalloprotease 75)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM76	ADAM76 (Disintegrin-like and metalloprotease 76)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM77	ADAM77 (Disintegrin-like and metalloprotease 77)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM78	ADAM78 (Disintegrin-like and metalloprotease 78)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM79	ADAM79 (Disintegrin-like and metalloprotease 79)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM80	ADAM80 (Disintegrin-like and metalloprotease 80)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM81	ADAM81 (Disintegrin-like and metalloprotease 81)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM82	ADAM82 (Disintegrin-like and metalloprotease 82)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM83	ADAM83 (Disintegrin-like and metalloprotease 83)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM84	ADAM84 (Disintegrin-like and metalloprotease 84)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM85	ADAM85 (Disintegrin-like and metalloprotease 85)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM86	ADAM86 (Disintegrin-like and metalloprotease 86)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM87	ADAM87 (Disintegrin-like and metalloprotease 87)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM88	ADAM88 (Disintegrin-like and metalloprotease 88)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM89	ADAM89 (Disintegrin-like and metalloprotease 89)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM90	ADAM90 (Disintegrin-like and metalloprotease 90)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM91	ADAM91 (Disintegrin-like and metalloprotease 91)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM92	ADAM92 (Disintegrin-like and metalloprotease 92)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM93	ADAM93 (Disintegrin-like and metalloprotease 93)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM94	ADAM94 (Disintegrin-like and metalloprotease 94)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM95	ADAM95 (Disintegrin-like and metalloprotease 95)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM96	ADAM96 (Disintegrin-like and metalloprotease 96)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM97	ADAM97 (Disintegrin-like and metalloprotease 97)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM98	ADAM98 (Disintegrin-like and metalloprotease 98)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM99	ADAM99 (Disintegrin-like and metalloprotease 99)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20
ADAM100	ADAM100 (Disintegrin-like and metalloprotease 100)	25.14	1	0.22	0.40	0.20	0.20

Immune system

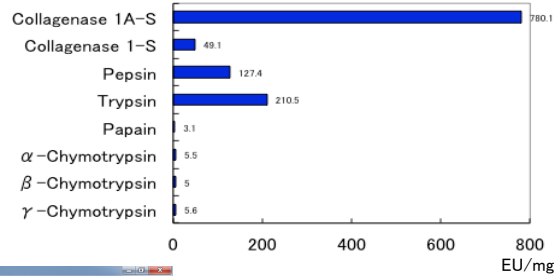
Protein ID	Name	Score	Protein	1 day	2 day	3 day	4 day
CD40	CD40 (TNF receptor superfamily member 5)	142.02	10	2.37	0.90	1.31	1.04
CD40L	CD40L (TNF receptor superfamily member 5L)	142.02	10	2.37	0.90	1.31	1.04
CD40IP	CD40IP (TNF receptor superfamily member 5IP)	142.02	10	2.37	0.90	1.31	1.04
CD40LG	CD40LG (TNF receptor superfamily member 5LG)	142.02	10	2.37	0.90	1.31	1.04
CD40LG2	CD40LG2 (TNF receptor superfamily member 5LG2)	142.02	10	2.37	0.90	1.31	1.04
CD40LG3	CD40LG3 (TNF receptor superfamily member 5LG3)	142.02	10	2.37	0.90	1.31	1.04
CD40LG4	CD40LG4 (TNF receptor superfamily member 5LG4)	142.02	10	2.37	0.90	1.31	1.04
CD40LG5	CD40LG5 (TNF receptor superfamily member 5LG5)	142.02	10	2.37	0.90	1.31	1.04
CD40LG6	CD40LG6 (TNF receptor superfamily member 5LG6)	142.02	10	2.37	0.90	1.31	1.04
CD40LG7	CD40LG7 (TNF receptor superfamily member 5LG7)	142.02	10	2.37	0.90	1.31	1.04
CD40LG8	CD40LG8 (TNF receptor superfamily member 5LG8)	142.02	10	2.37	0.90	1.31	1.04
CD40LG9	CD40LG9 (TNF receptor superfamily member 5LG9)	142.02	10	2.37	0.90	1.31	1.04
CD40LG10	CD40LG10 (TNF receptor superfamily member 5LG10)	142.02	10	2.37	0.90	1.31	1.04
CD40LG11	CD40LG11 (TNF receptor superfamily member 5LG11)	142.02	10	2.37	0.90	1.31	1.04
CD40LG12	CD40LG12 (TNF receptor superfamily member 5LG12)	142.02	10	2.37	0.90	1.31	1.04
CD40LG13	CD40LG13 (TNF receptor superfamily member 5LG13)	142.02	10	2.37	0.90	1.31	1.04
CD40LG14	CD40LG14 (TNF receptor superfamily member 5LG14)	142.02	10	2.37	0.90	1.31	1.04
CD40LG15	CD40LG15 (TNF receptor superfamily member 5LG15)	142.02	10	2.37	0.90	1.31	1.04
CD40LG16	CD40LG16 (TNF receptor superfamily member 5LG16)	142.02	10	2.37	0.90	1.31	1.04
CD40LG17	CD40LG17 (TNF receptor superfamily member 5LG17)	142.02	10	2.37	0.90	1.31	1.04
CD40LG18	CD40LG18 (TNF receptor superfamily member 5LG18)	142.02	10	2.37	0.90	1.31	1.04
CD40LG19	CD40LG19 (TNF receptor superfamily member 5LG19)	142.02	10	2.37	0.90	1.31	1.04
CD40LG20	CD40LG20 (TNF receptor superfamily member 5LG20)	142.02	10	2.37	0.90	1.31	1.04
CD40LG21	CD40LG21 (TNF receptor superfamily member 5LG21)	142.02	10	2.37	0.90	1.31	1.04
CD40LG22	CD40LG22 (TNF receptor superfamily member 5LG22)	142.02	10	2.37	0.90	1.31	1.04
CD40LG23	CD40LG23 (TNF receptor superfamily member 5LG23)	142.02	10	2.37	0.90	1.31	1.04
CD40LG24	CD40LG24 (TNF receptor superfamily member 5LG24)	142.02	10	2.37	0.90	1.31	1.04
CD40LG25	CD40LG25 (TNF receptor superfamily member 5LG25)	142.02	10	2.37	0.90	1.31	1.04
CD40							

試薬・器具類のエントキシン汚染

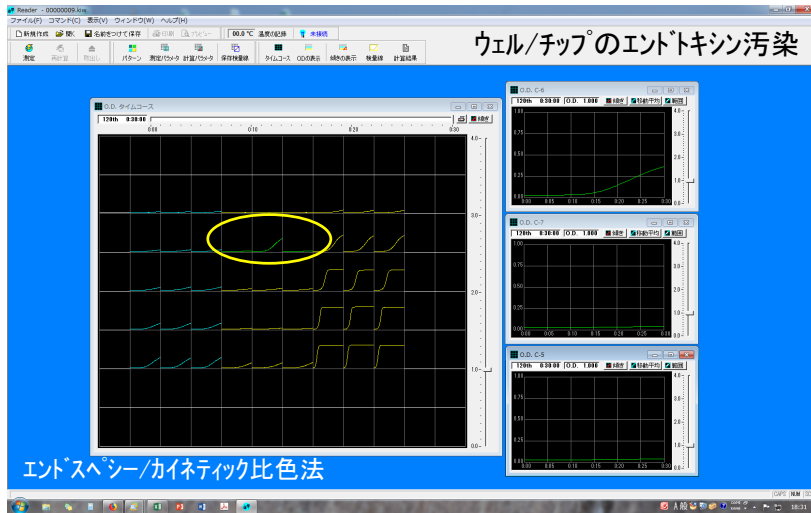
ウシ胎児血清 Lotチェック

番号	製造元	販売元	ロット	エンドキシン含量 EU/mL
#1	Hyclone	フナコシ	AXJ47554	N.D.
#2	Hyclone	フナコシ	AXE40802	N.D.
#3	SIGMA	ニチレイ	S.12H183	N.D.
#4	SIGMA	ニチレイ	S.12E183-A	8.588
#5	SAFC Biosciences	ニチレイ	S10J104	N.D.
#6	GIBCO	GIBCO	1256009	N.D.
#7	GIBCO	GIBCO	1221542	N.D.

市販プロテアーゼのエントキシン含量



ウェル/チップのエントキシン汚染



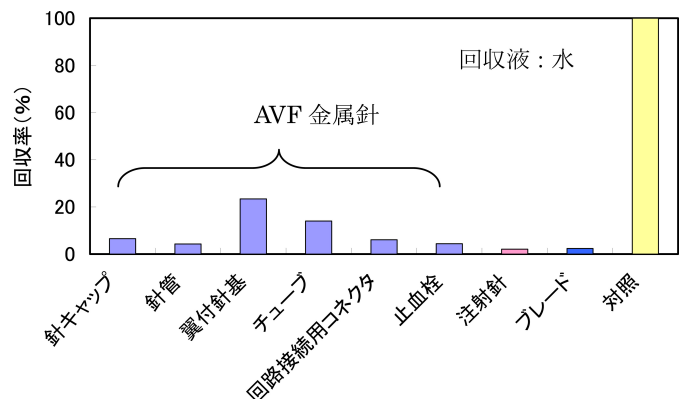
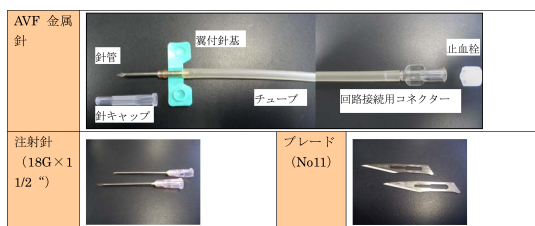
「エンドキシンフリー」の表示の有無に拘わらず、まずはエンドキシン汚染を疑い、使用する試薬・器具類を事前に評価！

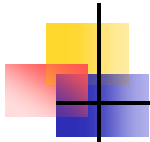
エンドキシン試験を行う際の留意点(回収率)

金属, セラミック, プラスチック, 天然医用材料

- (1) 乾燥に伴い、回収率が低下する。
- (2) 水では効率良く回収できない。
 - ・プラスチック ⇒ PEG抽出
 - ・金属, セラミック ⇒ EDTA抽出
 - ・コラーゲン ⇒ コラゲナーゼ/塩酸抽出
 - ・キチン, キトサン ⇒ 塩酸抽出

エンドキシン試験による添加回収試験





まとめ

ヒト間葉系幹細胞の増殖能と骨分化能

- ・0.1ng(1EU)/mL以上のエンドトキシンにより増強される
- ・遺伝子レベルでは、より低用量で変化している可能性が高い
- ・細胞の安全性・同等性を考慮した場合のエンドトキシン規格値は？

研究開発・製造工程における留意点

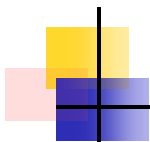
- ・プロセスバリデーションが重要
- ・試薬・器具類の「エンドトキシンフリー」表示を一概に信用しない
- ・最終製品、製造工程のエンドトキシン試験結果の解釈は要注意

関連論文

in vitro 増殖能: Nomura Y. et al., Regenerative Therapy, 7:45-51 (2017).

in vitro 分化能: Nomura Y. et al., Regenerative Therapy, 8:46-57 (2018).

in vivo 骨分化: Haishima Y. et al., J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 105:1514-1524 (2017).



終わりに

ご静聴ありがとうございました

国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部



Division of
medical
Devices

藪島 由二
haishima@nihs.go.jp