

# 次世代ライフサイエンス技術開発プロジェクト

プロジェクトリーダー 石黒 斉

## 【基本構想】

本プロジェクトは、「感染症」、「未病」及び「再生・細胞医療」に関する評価サービスの提供による企業支援を推進していくとともに、新しい評価方法の提供に向けた研究開発を行っている。「感染症」に関しては、抗菌分野(JIS Z 2801)の ISO 17025 を取得している。これに基づいた高い品質の抗菌・抗ウイルス性能評価サービスにより、各種団体の認証マーク取得に必要な結果を提供しており、企業の研究開発を推進するような取り組みを行っている。更に、規格試験では対応できない抗菌・抗ウイルス材料や加工品について、それぞれに合わせた応用的な性能評価サービスを提案し、ニーズに合わせた性能評価サービスの提供を行っている。「未病」に関しては、食品成分の機能性を明らかとすることにより、各企業の製品の付加価値を高めるための機能性評価サービスを提供している。具体的には食品の成分分析や細胞に食品成分を作用させることによって起こる遺伝子発現の変動を明らかとすることで、食品成分の機能性評価を行っており、「ワンストップ型食品機能性評価サービス」として神奈川県未病ブランドの認定を受けている。「再生・細胞医療」に関しては、細胞の特性を理解し、品質を評価するサービスの提供に向けた取り組みを開始しており、2024 年度は間葉系間質細胞(MSC)のロット間における細胞集団と分化指向性の違いについて、明らかとしつつある。これらの成果を展開することで、目的とする細胞を評価するための新しい品質特性マーカーの探索が進んでおり、各企業の製品開発の品質評価基盤を構築することを検討している。

## 1. 2024 年度の研究目的

次世代ライフサイエンス技術開発プロジェクトは様々な取り組みを進めている。今年度は特に、以下について報告する。

### 1-1. 新しい抗菌・抗ウイルス材料の機能解析

二次元ナノマテリアルであるホウ化水素ナノシート(HB シート)は、ホウ素と水素の組成比が 1 : 1 のシート状の物質であり、担持した水素を常温・常圧において電気エネルギーのみで放出できることが見出されている。同じく、二次元ナノマテリアルグラフェンは様々な分野で応用されており、その機能の一つとして、抗菌・抗ウイルス作用を有することが知られている。このことから、HB シートもグラフェンと同様に抗菌・抗ウイルス作用を発揮する可能性が考えられ、本研究では各種微生物に対する HB シートの機能について検討を行った。

### 1-2. 新たな評価方法の提供に向けた取り組み(抗微生物)

我々は抗バイオフィルム性能評価試験方法である ISO4768 に基づいた評価サービスの提供を行っている。ISO4768 のバイオフィルムの付着状況の確認方法はバイオフィルムの構成成分すべてをクリスタルバイオレットで染色する方法となっており、バイオフィルム中の生菌数を測定する方法ではない。一方で、バイオフィルム中の生菌への影響について、バイオフィルム中の生菌数の測定に

より評価したい、といったニーズがある。本研究では、そのようなニーズに応えるために形成されたバイオフィルム中の生菌数を測定する評価方法の確立に向けて、試験片から生菌を効率的に回収するための検討を行った。

### 1-3. 新たな評価方法の提供に向けた取り組み(再生・細胞医療)

間葉系間質細胞(MSC)はその不均一性により、ロット間によって、その特性が異なっていることが知られている。再生細胞医療の現場において、MSC は様々な機能を発揮する一方で、その特性の違いが問題となっている。そのため、個々のロットによる違いを明らかとすることにより、そこに含まれる細胞の特性を解析することで、品質管理や評価方法の確立につながると考える。本研究では、ロットの違う MSC に対して一細胞 RNA 解析を行い、発現パターンと比較を行うことで、各ロットが持つ特性について検討を行った。

## 2. 2024 年度の研究成果

### 2-1. 新しい抗菌・抗ウイルス材料の機能解析

HB シートをガラス板に担持した試験片に対して、菌液やウイルス液を接種し、一定時間経過後、その生菌数やプラーク数を確認した。その結果、各種細菌やウイルスに対して、有効な抗菌・抗ウイルス性能が得られることが明らかとなった。ここでは、一例として SARS-CoV-

2を始めとしたウイルスに対する評価結果を図1に示す。グラフに示されるように各種ウイルスに対して、HBシートにウイルスが接触することで、有意なウイルスの不活化を認めた。特筆すべき点として、10分間の短い接触時間でウイルスの不活化を検出限界まで発揮出来ることが明らかとなった。今後は、製品への加工方法、安定性や安全性を含めた検討を続けていき、製品化へつなげることを期待している。

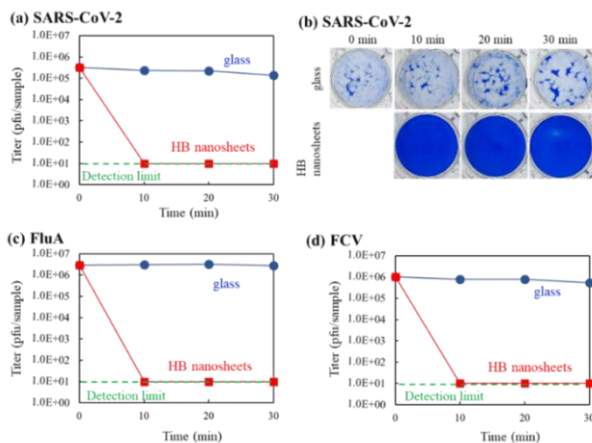


図1：HBシートによる抗ウイルス効果の例

## 2-2. 新たな評価方法の提供に向けた取り組み(抗微生物)

ISO4768は試験片をガラス板に接着させて、バイオフィームを形成する方法となっている。一方、形成されたバイオフィームから生菌を回収するためには、ガラス板から試験片を剥がして、生菌のみを回収する手法が必要である。本検討では、バイオフィーム内の生菌数を測定するために試験片を剥がす工程を簡便に行う方法として、磁石を応用した手法の開発と磁石がバイオフィーム形成に影響を及ぼすかについて、検討を行った。図2に示すように、磁石で試験片を固定用ガラス板に接着することで、各作業中に試験片がはがれることはなく、また試験片のみを回収する際には簡便に固定用ガラス板から剥がすことができた。また、回収した試験片に付着したバイオフィームに関しては、超音波処理洗浄を行うことで、きれいにバイオフィームを剥がすことが可能であり、生菌数の確認も確実に行うことが出来ていた。



図2：磁石を用いた試験片の固定

## 2-3. 新たな評価方法の提供に向けた取り組み(再生・細胞医療)

骨髄由来のMSCの4ロットについて、シングルセルRNA解析を行い、これらのデータをプロットした結果、細胞周期関連遺伝子を高発現する群とそれ以外の二つの群に分類できることが明らかとなった(図3)。

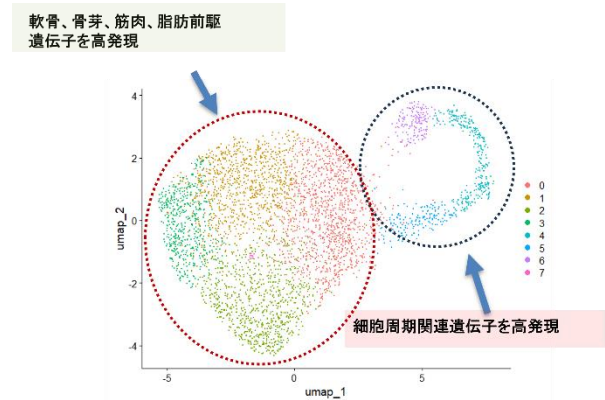


図3：シングルセル解析データの可視化

細胞周期関連遺伝子を高発現している集団を多く持つロットについて、その増殖能を確認したところ、細胞周期関連遺伝子の発現と細胞増殖能の相関性を認めることを確認しており、その他の分化指向性についても、それぞれの分化指向性に資する細胞集団を多く持つロットが実際に予想される分化指向性を示すことを明らかとした。

今後、更にシングルセル解析データ及びポテンシーアッセイのデータ等を蓄積していくことで、品質特性や有効性評価を確認する手法を確立し、企業支援に繋げていくことを目的に活動を続けていく予定である。

# 次世代ライフサイエンス評価事業の取り組み

## 次世代ライフサイエンス技術開発プロジェクト

永井 武、河野 掌、小林 慶一、石黒 斉

### 1.はじめに

次世代ライフサイエンス技術開発グループでは、ライフサイエンス分野における様々な性能評価サービスの提供や共同研究などを通じて、企業や大学等の研究開発の支援を行っている。具体的には、抗菌、抗ウイルス、抗カビ、抗バイオフィルム、防藻及び抗アレルギーなどの性能評価サービスを提供している。規格化されていない評価についても、既存の方法を応用するなどして、最適な評価法を提供できるように検討を重ねている。さらに、新しい性能評価試験方法の開発や国際標準化なども関係団体と協力しながら進めている。現在、新規の性能評価サービスとして再生細胞医療分野の性能評価サービスも開始する予定である。本稿では、抗菌・抗ウイルス分野での大学との共同研究の活動について報告する。

### 2.HB ナノシートの抗微生物効果についての研究

#### 2-1 背景

ホウ化水素ナノシート（HB シート）は、筑波大学の近藤剛弘教授らが発明した二次元ナノマテリアルであり(1)、これまで、水素キャリアとしてのエネルギー貯蔵や触媒などへの応用が報告されている。HB シートは、ホウ素と水素の組成比が1:1のシート状の物質であり、担持した水素を常温・常圧において電気エネルギーのみで放出できることを見出している。二次元ナノマテリアルの代表格であるグラフェンは、バイオメディカル分野を含む様々な分野で応用されており、一部のグラフェン化合物は、抗菌・抗ウイルス作用を有することが知られている。そのため、HB シートにも同様の機能を有する可能性があると考えられた。

一方、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）によるパンデミックによって、抗菌・抗ウイルス機能を有する製品が世界的にも注目され、近年その需要が増々高くなっている。しかしながら、これらの製品は、治療を目的とするものではなく、あくまで感染の拡大を防止する目的であるため、安価で意匠性も高く安全な製品であることが求められる。HB ナノシートは安全性も高く透明な物質であり、比較的安価に合成できることから、抗菌・抗ウイルス製品への応用にも適していると考えられた。そこで、HB シートの新たな機能として抗微生物機能に関する研究を、KISTEC、東京科学大学、筑波大学および高知工科大学と共同で行った。その結果、HB シートは、SARS-CoV-2を含む、様々なウイルスに対して高い抗ウイルス活性を有することが明らかになった。また、ウイルスばかりでなく、細菌やカビにも高い抗菌・抗カビ効果を有すること明らかになった(2)。

#### 2-2 方法

HB シート（東京科学大学より提供）をアセトニトリルに溶解し、ガラス板（2.5 cm × 2.5 cm）にコーティングしたものをHB シート加工品とした。また、コーティングしていないガラス板を無加工品とした。抗菌及び抗ウイルス試験の方法は、既存のJIS(3)及びISO(4)規格を参考にして行った。具体的には、ウイルス及び細菌懸濁液をHB シート加工品または無加工品（それぞれn=3）に50 µlを接種し、密着フィルムをかぶせ、25℃（抗ウイルス）または35℃（抗菌）で所定時間作用させた。そして、SCDLP培地1 mlでウイルスまたは細菌を回収し、段階希釈を行った後、ブラーク法（抗ウイルス）または混濁平板培養法（抗菌）によって感染価又は生菌数を測定し平均値を求めた。

試験に使用したウイルス及び細菌は、下記の通りである。

- SARS-CoV-2/Hu/Omicron/Kng/21-3301  
宿主細胞：VeroE6/TMPRSS2（JCRB1892）
- A型インフルエンザウイルス（A/Hong Kong/8/68株  
ATCC VR-1679） 宿主細胞：MDCK細胞（ATCC CCL-34）
- ネコカリシウイルス（F-9株、ATCC VR-782）  
宿主細胞：CRFK細胞（ATCC CCL-94）
- 黄色ブドウ球菌（NBRC12732）
- 大腸菌（NBRC3972）

細胞毒性試験は、上記の3種の宿主細胞に様々な濃度でHB シートを添加し4日間培養した後、細胞の生死をLDHアッセイによって測定した。

#### 2-3 結果

##### 2-3-1 HB シートの抗ウイルス効果

HB シートの抗ウイルス効果を検証するため、HB シート加工ガラス板（2 mg/sample）を用いて抗ウイルス試験を行った（図1）。その結果、SARS-CoV-2、A型インフルエンザウイルス（FluA）及びネコカリシウイルス（FCV）に対して、HB シートは10分の作用で、ウイルスの感染価が検出限界以下（4桁以上の減少）となった。この結果より、HB シートは、ウイルスに対して非常に高い抗ウイルス効果を有することが明らかとなった。

次に、ガラス板にコーティングするHB シートの量を減らし、同様に抗ウイルス試験を行った（図2）。その結果、SARS-CoV-2では、HB シートの量が450~50 µg/sampleに減らしても、ウイルスの感染価が検出限界となり、それ以下の濃度では、徐々に効果が減弱した。また、インフルエンザウイルスでは450 µg/sampleのHB シートの量で、ウ

イルスの感染価は検出限界以下であったが、それ以下の濃度では、濃度依存的に効果が減弱した。一方、ネコカリシウイルスに対しては、450  $\mu\text{g}/\text{sample}$  でも、ウイルス感染価の減少は、ほとんど見られなかった。この結果より、HBシートは、エンベロープを持たないネコカリシウイルスより、SARS-CoV-2 やインフルエンザウイルスのようなエンベロープを有するウイルスに対して、より強い抗ウイルス効果を発揮することが考えられる。

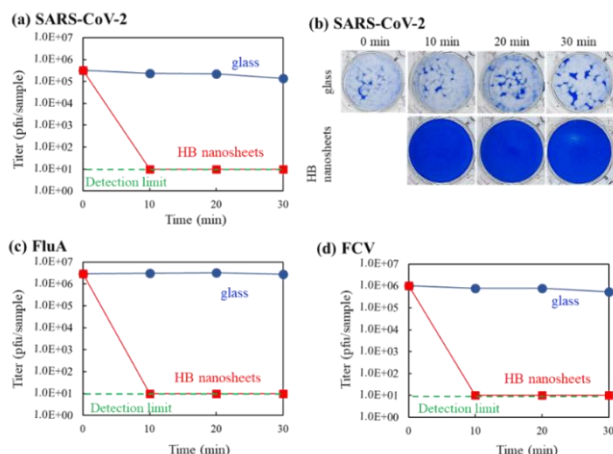


図1 HBシートの抗ウイルス効果

HBシート加工品 (2 mg/sample、赤) 及び無加工品 (青) を用いて、10~30 分間作用させたときの各ウイルスの感染価を示す。(a)はSARS-CoV-2の感染価のグラフを示し、その時のプラークの様子を(b)に示す。(c)及び(d)は、それぞれインフルエンザウイルスおよびネコカリシウイルスの感染価を示す。

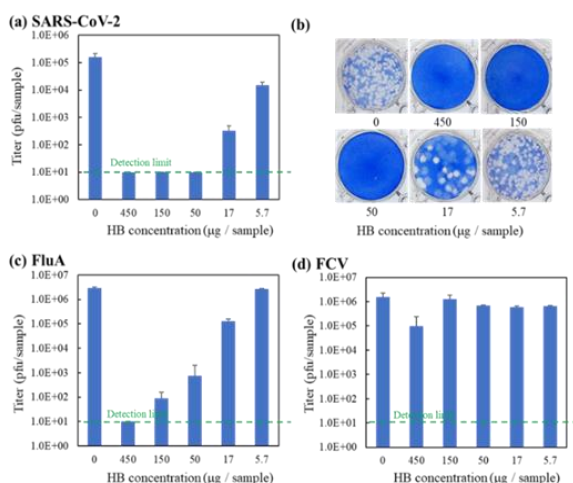


図2 HBシートの量と抗ウイルス効果

ガラス板に担持するHBシートの量を、450~5.7  $\mu\text{g}/\text{ガラス板}$ とし、10分間の作用時間で抗ウイルス試験を行った。(a)はSARS-CoV-2の感染価を示し、その時のプラークの様子を(b)に示す。(c)及び(d)は、それぞれインフルエンザウイルスおよびネコカリシウイルスの感染価を示す。

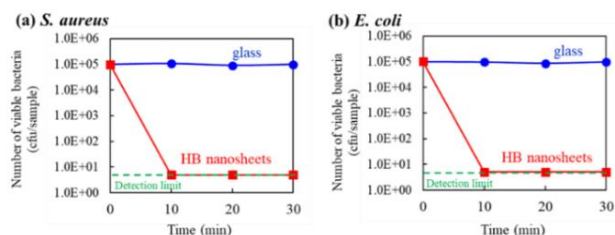


図3 HBシートの抗菌効果

HBシート加工品 (2 mg/sample、赤) 及び無加工品 (青) を用いて、10~30 分間作用させたときの各菌の生菌数を示す。(a)は黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*)、(b)は大腸菌 (*E. coli*) の生菌数を示す。

### 2-3-2 HBシートの抗菌効果

2-3-1と同様の条件で、黄色ブドウ球菌と大腸菌に対する抗菌試験を行った (図3)。その結果、ウイルスと同様、10分間の作用という非常に短い時間で、両菌ともに検出限界以下となった (4桁以上減少)。

次に、最小発育阻止濃度 (MIC) と最小殺菌濃度 (MBC) を測定するため、以下の実験を行った。MH培地を用いてHBシートの1/2段階希釈系列を作成し、そこに菌液を添加後、35°Cで24時間の攪拌培養を行った。その結果、MICとMBCの濃度はともに1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった (図4)。

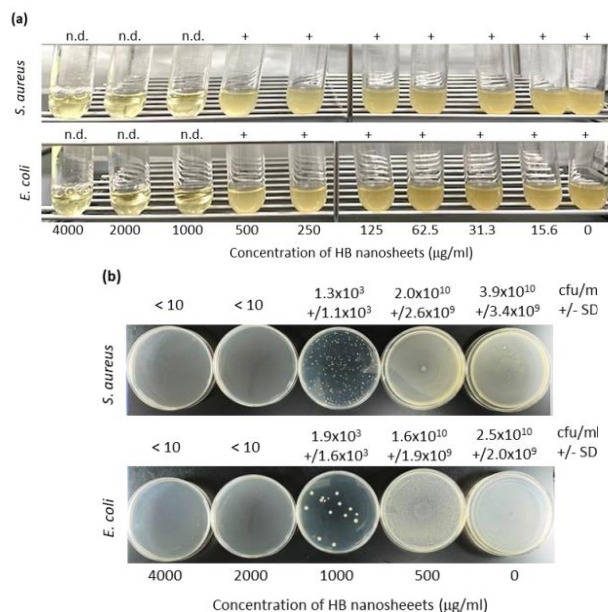


図4 HBシートのMIC及びMBCの測定

HBシートをMH培地に4000~15.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲で添加し、24時間培養した。(a)MICでは、培養後の菌の増殖を目視で判定した (n.d.: not determined、+: 増殖あり)。 (b)MBCでは、培養後の菌液0.1 mlを寒天培地に塗布し、菌の増殖をコロニーの有無で判定した。

### 2-3-3 HB シートの細胞に対する毒性試験

HB シートが細胞に対してどの程度毒性を有するのか、細胞毒性試験を行った（図 5）。対象とする細胞は、ウイルスで使用した宿主細胞を用いた。その結果、500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  という比較的高い濃度でも約 30% 程度の細胞毒性であったことから、細胞への毒性は低いと考えられる。

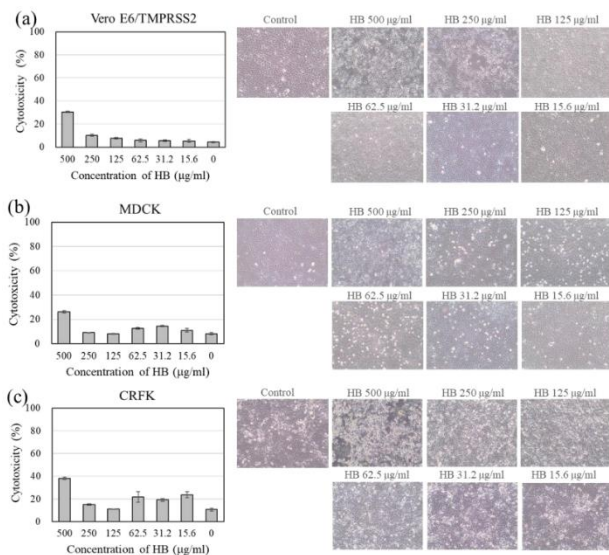


図 5 HB シートの細胞への毒性

各濃度の HB シートを細胞（96 ウェルプレート）に添加し、4 日間培養した。その後、LDH アッセイにより細胞毒性を評価した。

### 3.今後の展望

本研究では、HB シートに広域かつ高い抗微生物活性が有することを見出した。しかしながら、今後、抗菌・抗ウイルス製品に使用していくためには、耐久性や安定性、さらには適切な加工方法を検討していく必要がある。また、HB シートの抗菌・抗ウイルス効果のメカニズムについても、まだ不明な点があるため、詳細に解析する必要がある。このような検討を重ねることで、最適な加工方法を提案し、製品化へつながる支援を進めていく予定である。

### 【参考文献】

1. Hiroaki Nishino, Takeshi Fujita, Nguyen Thanh Cuong et al. Formation and Characterization of Hydrogen Boride Sheets Derived from MgB<sub>2</sub> by Cation Exchange. *J Am Chem Soc.* Oct 4;139(39):13761-13769 (2017)
2. Nagai T, Mauliana A, Kobayashi K, et al. Broad-spectrum antimicrobial effects of hydrogen boride nanosheets. *J Mater Chem B.* 2025 May 14;13(19):5723-5733 (2025)
3. JIS Z 2801 抗菌加工製品-抗菌性試験方法・抗菌効果
4. ISO 21702. Measurement of antiviral activity on plastics and other non-porous surfaces (2019)



# 抗バイオフィーム性評価試験の拡張へ向けた検討

「次世代ライフサイエンス技術開発」プロジェクト

小林慶一、河野掌、永井武、石黒斉

## 1. はじめに

バイオフィームとは、細菌などの微生物やそれらが分泌する多糖類やタンパク質などの細胞外高分子物質（Extracellular Polymeric Substances: EPS）が集合して形成される膜状の構造体であり、台所、浴室・浴槽の内壁などでの「ぬめり」や歯の表面の歯垢（プラーク）など、身近な生活環境中でも観察される。菌がバイオフィームを形成すると、薬剤に対する耐性が上がり、汚染・感染源として問題となることもあり、バイオフィーム対策は近年注目されている。

バイオフィームについては多くの機関や研究グループにより、目的に応じた様々な手法で解析・評価が行われているが、KISTEC では 2023 年 7 月に制定・発行された ISO 4768 (Measurement method of anti-biofilm activity on plastic and other non-porous surfaces)<sup>1)</sup>を基にした抗バイオフィーム活性測定試験の評価サービスを提供している。ISO 4768 は、バイオフィームの「付着しにくさ」の評価方法を規定した初の標準規格で、クリスタルバイオレット（Crystal Violet: CV）による染色を利用した手法である。CV は図 1 に示すようなトリフェニルメタン系化合物で、EPS だけに限らず、バイオフィーム中の菌や周囲からバイオフィーム中に取り込まれた有機・無機物が持つマイナスイオンにも結合し、染色する。そのため、三次元的な立体構造を持ち、その構成も複雑なバイオフィーム全体を捉え、その付着のしにくさを評価するには適した方法と言える。

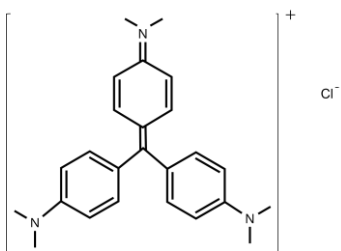


図 1 クリスタルバイオレット

一方、バイオフィーム中の生菌数にどれだけの影響を与えているかを評価したい、というニーズもある。しかし前述のとおり、CV は菌以外の EPS 等も染色し、また菌も生菌だけでなく死菌も染色するため、ISO 4768 に基づき得た CV 染色結果と生菌数を結びつけることは困難である。液剤の効果を評価するためにバイオフィーム内に存在する菌数の減少を評価する方法が米国試験材料協会の試験規格<sup>2)</sup>として存在しているが、当該規格ではバイオフィーム形成のために専用のリアクターを使用しており、初期環境整備がやや必要となる。

そこで本稿では、バイオフィーム中の生菌数評価を、ISO 4768 の手法をベースに形成させたバイオフィームで

簡便に行えないか検討した取り組みの一部を報告する。

## 2. 実験と結果

ISO 4768 による抗バイオフィーム性能評価試験の概要を図 2 に示す。ISO 4768 では、評価する試験片（30×30 mm）を 40×40 mm サイズのガラス板に貼り付け、この固定用ガラス板ごと試験片を滅菌された容器に入れ、そこへ 1/5 濃度の TSB（Trypticase Soy Broth）で培養した *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984（表皮ブドウ球菌）を菌濃度を調整して注ぎ、35℃、48 時間の静置培養でバイオフィームを形成させる。

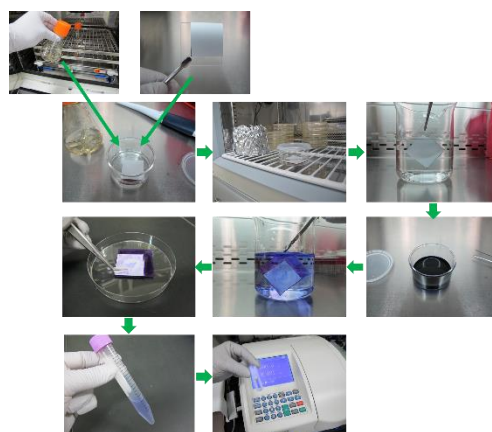


図 2 ISO 4768 による抗バイオフィーム性能評価試験概要

形成されたバイオフィームの定量までには試験片の洗浄のため純水や、染色のため CV 溶液に浸す工程があり、固定用のガラス板が丁度ピンセットでの摘み取り部分となり都合がよい。しかし、試験片上のバイオフィーム中の生菌数を計測するとなると、①固定用ガラスから試験片を剥がす、②試験片の表面には触れずに操作する、必要がある。①については試験片の固定が甘いと試験操作中で試験片が剥がれ落ちる恐れがあるが、逆に固定が強固過ぎると剥がすのが困難となる。また、ASTM 規格で規定されているバイオフィーム形成用リアクターのような装置が利用できれば別であるが、固定用ガラスが無いと②が困難であり、試験片の固定方法を工夫する必要があった。そこで、図 3 に示すように、固定用ガラス板と試験片の裏面それぞれに厚さ



図 3 磁石を用いた試験片の固定

1 mm 程度の磁石シートを貼り付けて試験片を固定用ガラス板に固定し、固定用ガラス板から試験片を剥がす際は試験片の縁を押し、磁石をスライドさせる方法を考案した。磁石を用いることで、試験片を水で洗浄する際に試験片が固定用ガラス板から剥がれ落ちることなくしっかり固定できている一方で、固定用ガラス板から試験片を剥がす際には簡単かつ試験片表面には触れることなく剥がすことが可能であった。

以下、磁石を用いた試験片の固定方法がバイオフィルム中の生菌数測定に適用可能かについて検討した結果の一部を記載する。

## (1) 磁石によるバイオフィルム形成量および菌の増殖への影響確認

まず、磁石が存在することによるバイオフィルム形成量および培養液中の菌（浮遊菌）の増殖への影響の有無を確認した。ISO 4768 に基づき接着テープで試験片を固定したものと、磁石で試験片を固定したものを用意し、各試験片（ $n=3$ ）上へのバイオフィルム形成量および培養液中の菌量を比較した。バイオフィルムの形成は ISO 4768 に規定される手順に沿って行った。試験片として  $30 \times 30$  mm サイズのガラス板を使用し、供試菌として *S. epidermidis* ATCC 3598 を使用した。バイオフィルムの形成量は ISO 4768 に基づき、0.1% CV 溶液に試験片を浸し、試験片上のバイオフィルムの染色により付着した CV 量を 590 nm の吸光度を測定することで評価した。図 4 に CV 染色後の試験片を示す。試験片裏面の磁石シートの写り込みにより、目視や写真では磁石により固定した試験片

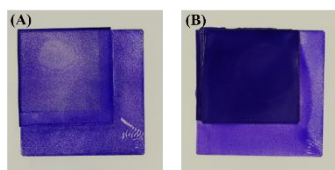


図 4 CV 染色後の試験片

A: 接着テープで固定, B: 磁石で固定

(図 4(B))の方が濃く染色されているように見えるが、表 1 に示した吸光度測定結果のとおり、実際に試験片上に付着した CV 量は接着テープで固定した場合 ( $OD_{590}=4.11$ ) と磁石で固定した場合 ( $OD_{590}=3.97$ ) との間に差は無かった。

また、培養液中の菌の増殖への影響としては、バイオフィルム形成後の培養液を採取し、混濁平板培養にて生菌数を測定することで評価した。その結果を表 1 に示す。表 1 のとおり、培養液中の生菌数は試験片を接着テープで固定した場合 ( $3.7 \times 10^8$  cfu/mL) と磁石で固定した場合 ( $3.4 \times 10^8$  cfu/mL) は同程度であった。

表1 試験片固定方法による吸光度と菌量への影響確認

| 試験片固定方法 | 吸光度 $OD_{590}$<br>(—) | 菌量<br>( $\times 10^8$ cfu/ml) |
|---------|-----------------------|-------------------------------|
| 接着テープ   | $4.11 \pm 0.60$       | $3.7 \pm 1.1$                 |
| 磁石      | $3.97 \pm 0.33$       | $3.4 \pm 0.3$                 |

## (2) 試験片上からのバイオフィルム回収方法の検討

次に、磁石で固定した試験片上からのバイオフィルムの回収方法を検討した。バイオフィルムの回収方法はいくつかあるが、今回は超音波を利用した方法が適用可能かを検証した。前述の 2 (1)と同様に試験片上へバイオフィルムを形成させ、純水中で穏やかに洗浄した後に、図 3 に示したように試験片の縁を押し、スライドさせて固定用ガラス板から試験片を剥がし、新たな滅菌済み容器へ移した。そこへ生理食塩水 20 mL を加え、超音波洗浄器 (40 kHz) を利用して 5 分間超音波処理を行い、その後往復振盪 (90 rpm、2 分) でよく攪拌した。攪拌後、試験片を回収し、2 (1)と同様に 0.1% CV 溶液で染色し、吸光度により試験片上に残存するバイオフィルムを定量した。図 5 に超音波処理をした試験片

の CV 染色後の

様子を示す。図 5

に示すとおり、

超音波処理をし

た試験片は、超

音波処理をして

いない試験片と比

べると殆ど染色されなかった。また、試験片上の CV 量を吸光度で定量した結果を表 2 に示す。吸光度測定の結果からも、超音波処理をした試験片上には殆ど CV が付着していないことが確認された。

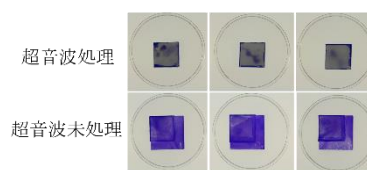


図 5 超音波処理後に CV 染色した試験片

表2 超音波処理の有無によるCV染色度合の比較

| 超音波処理 | 吸光度 $OD_{590}$<br>(—) | 比率<br>(%) |
|-------|-----------------------|-----------|
| 有り    | $0.15 \pm 0.06$       | 4.4       |
| 無し    | $3.48 \pm 0.05$       | 100       |

さらに、超音波処理後に往復振盪で攪拌したバイオフィルム回収液中の生菌数を混濁平板培養で測定した結果、コロニーは正常に形成され、算出された回収液中の生菌数は  $2.6 \times 10^8$  cfu/mL であった。

## 3. 考察及び今後の展望

磁石が存在することによるバイオフィルム形成量および培養液中の菌の増殖への影響については、2 (1)の結果のとおり、ISO 4768 に沿って接着テープで試験片を固定した場合と、磁石で試験片を固定した場合との間に吸光度を指標としたバイオフィルム形成量、培養液中の生菌数のどちらにも有意な差は無く、今回の試験系においては影響が無いことが示唆された。また、磁石をスライドさせることで固定用ガラス板から剥がした試験片上のバイオフィルムの回収方法については、2 (2)の結果のとおり超音波処理をしていない試験片に比べ、超音波処理をした試験片の吸光度は 95%以上減少していたため、本試験系では超音波処理が有効であることが示唆された。以上より、今回考案した磁石を用いた試験片の固定で、ISO 4768 の手法をベー

スに形成させたバイオフィーム中の簡便な生菌数評価に利用できる可能性が示唆された。

一方で、磁力の影響を受ける材質のサンプルや、供試菌が磁性細菌のような場合はバイオフィーム形成量および培養液中の菌の増殖への影響が懸念される。また、超音波処理についても周波数、強度や処理時間等の最適化や、菌種によってはバイオフィームの回収方法自体が超音波処理以外の方法が適している可能性もあり、今回考案した方法の適用範囲については更に検証が必要であると思われる。

今後も抗バイオフィーム性能評価試験に限らず、抗菌・抗ウイルス性能評価試験として請けられる範囲拡張のための試行や検証を進めていく予定である。

#### 【参考文献】

1. ISO 4768, Measurement method of anti-biofilm activity on plastic and other non-porous surfaces (2023)
2. ASTM E2871, Standard Test Method for Determining Disinfectant Efficacy Against Biofilm Grown in the CDC Biofilm Reactor Using the Single Tube Method (2021)



# 再生細胞等医療製品に関わる評価法の構築

次世代ライフサイエンス技術開発プロジェクト

河野 掌、永井 武、石黒 斉

## 1. はじめに

再生医療等製品は、従来治療法が存在しなかった疾患に対して有効であり、損傷した組織の機能を回復・再構築する能力を有することから、近年その市場は急速に拡大している。具体的には、培養皮膚や培養軟骨などの製品が治験段階に進んでおり、近年では iPS 細胞を用いた脊髄損傷の患者に対する臨床研究結果も報告されている。一方で、こうした細胞製品においては、品質管理や製品特性に関する基準は十分に確立されておらず、治療法としての有用性への期待が先行し、臨床現場で科学的根拠が不十分なまま使用される例もある。

このような状況は、安全性や有効性の確保に課題を残しており、製品の一貫性や再現性を担保する評価系の整備が課題となっている。本グループでは、抗菌、抗ウイルス、抗カビ、抗バイオフィルム及び防藻などの性能評価サービスに加え、再生・細胞医療関連評価サービスの提供にも取り組んでいる。本稿では、その一例として様々な細胞への分化能を有し、優れた免疫調整能、増殖因子分泌能を持つヒト間葉系間質細胞（MSC）を対象に、一細胞トランスクリプトーム解析（一細胞 RNA 解析）を用いて、その特性評価をしたので報告する。

## 2. MSC の有する分化能の評価法の開発について

### 2-1 はじめに

再生医療とは組織や臓器の欠損あるいは機能不全に対して、幹細胞を用いてその機能を回復・再構築することを目的とした医療である。幹細胞は大きく多能性幹細胞と体性幹細胞に分類され、前者の代表例が人工多能性幹（iPS）細胞、後者の代表例が間葉系間質細胞（MSC）である。iPS 細胞は、あらゆる細

胞に分化可能な多能性を持つ一方で、その作製には外来遺伝子の導入が必要であり、腫瘍化のリスクや倫理的・技術的な課題が指摘されており、臨床応用には依然として慎重な対応が求められる。一方、脂肪組織、靱帯、歯髄などの様々な組織に存在している MSC は自己複製能と限定的な分化能に加え、免疫調整作用や抗炎症作用、増殖因子の分泌能を備えている。これらの特性により、さまざまな疾患モデルにおいて組織修復や再生への寄与が報告されている。そのため、MSC はより安全かつ実用的な細胞医療製品の候補として、再生医療分野で注目を集めている。しかしながら、細胞製品全般に言える事ではあるが、細胞は不均一な集団であるため、ドナー由来や培養条件によって性質が大きく異なる。そのため、従来の単純な細胞表面分子の発現による方法ではなく、その品質や分化能を客観的かつ定量的に評価する手法の確立が重要な課題となっている。本研究では、MSC の持つ分化能（主に脂肪分化能、骨芽分化能、心筋などの筋肉分化能、軟骨分化能）や細胞増殖能をより詳細に解析するために、一細胞トランスクリプトーム解析技術を用いた新たな評価法を実施した。その方法の有用性について報告する。

### 2-2 MSC の一細胞解析

LONZA 社より購入した 4 ロットの骨髄由来 MSC (BM-MSC) を、同社指定の専用培地を用いて培養をした。細胞は 5,000 cells/cm<sup>2</sup> の濃度で播種し、90% のコンフルエント状態に達した時点で継代を実施した。継代数が 5 に達した時点での細胞を用いて、10x Genomics 社の Chromium Single Cell Gene Expression Flex Kits を使用し、各ロットあたり約 4,000 細胞を目安にシングルセル RNA 解析を実施した。得られたデータは、Cell Ranger により一細胞毎の遺伝子発現マトリクスを生成し、R パッケージ Seurat を用いて次元削減（UMAP）およ

び可視化を行った。その結果、細胞集団は大きく 2 つに分かれた。一方は細胞周期関連遺伝子を高発現する集団、もう一方は間葉系前駆細胞としての特徴を示す集団である。後者は主に 軟骨、骨芽、筋肉、脂肪前駆細胞に関連する遺伝子群の高発現を特徴とした。

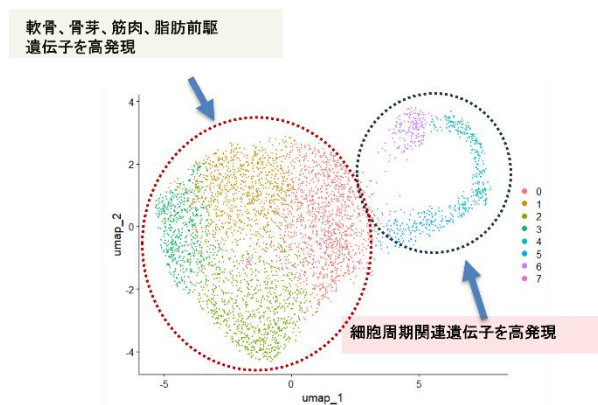
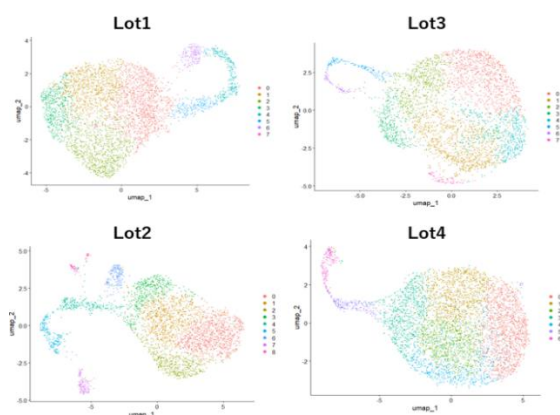


図1 一細胞 RNAseq data の UMAP による可視化結果

上記の解析を、4 つの BM-MSC ロットすべてに対して実施した結果が以下である。



Lot2 を除く Lot1, 3, 4 については、UMAP 上で類似した細胞群構成を示していた。一方 Lot2 は他のロットと異なる分布を示し、特徴的な挙動を示した。また、Lot3 および Lot4 においては、細胞周期関連遺伝子を高発現する細胞群に属する細胞の割合が、Lot1 や Lot2 と比較して少ない傾向が見られた。

4 ロットのデータに対して、R パッケージ Harmony を用いてバッチ効果の補正を行い、統合解析を実施した。その結果、各ロットの細胞はバッチ間のばらつきが抑えられた状態で統合され、図 1 で得られた結果と同様に、

細胞周期関連遺伝子高発現集団と間葉系前駆細胞集団に大別される形でクラスタリングされた。

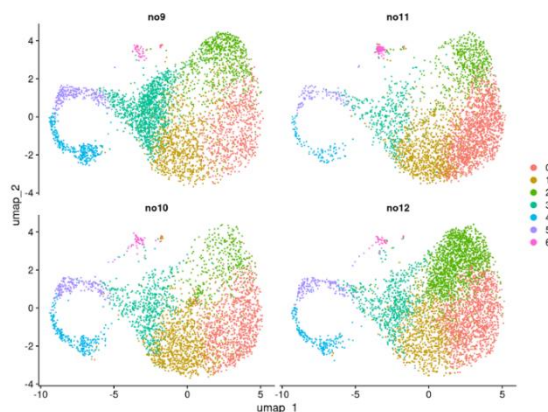


図2 4 ロットについてのバッチ効果補正後の UMAP

## 2-3 細胞増殖能の検討

細胞周期関連遺伝子を高発現する集団に属する細胞数の割合は、各ロットの細胞増殖能を反映している可能性があるかと仮定し、その検証のための実験を実施した。具体的には、各ロットについて 6 ウェルプレートに同量の細胞数を播種し、3 日後、5 日後、7 日後の各時点において細胞数を定量的に測定した。その結果を図 3 に示した。予想通り、Lot1 において最も高い細胞増殖能が認められた。

この結果は、シングルセル解析において Lot1 が細胞周期関連遺伝子を高発現する細胞群の割合が高かったことと一致しており、本指標が細胞増殖能の目安として機能する可能性を示唆している。

### 細胞増殖能試験

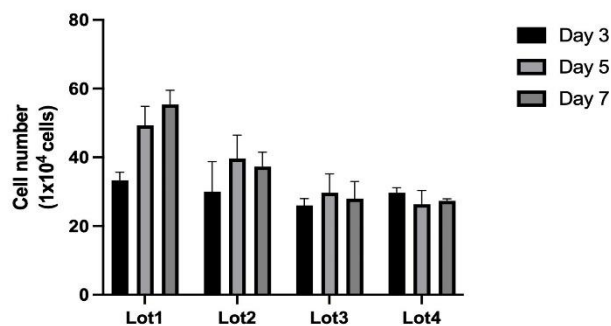


図3 4 ロットについての細胞増殖能試験結果

## 2-4 分化能の検討

Lot1 および Lot4 では、クラスター2 および 3 に属する細胞の割合が低く、一方で Lot2 および Lot3 では、クラスター 0 および 1 の割合が高い傾向が見られた。この観察結果をもとに、各クラスターの割合は分化能を反映している可能性があると仮定し、各ロットにおける脂肪、骨芽、軟骨への分化能を評価する実験を実施した。

### 2-4-1 脂肪分化能の評価

6 ウェルプレートに各ロット、等しい細胞数を播種し、100% のコンフルエント状態に達した時点で、脂肪分化誘導培地と脂肪分化メンテナンス培地を用いて培養に切り替えた。その後 18 日間培養し、脂肪細胞の蓄積を AdipoRed アッセイ試薬を用いて検出した。蛍光強度を測定し、相対蛍光強度として脂肪分化能を評価した。予期した通り、Lot1 および Lot4 は高い脂肪分化能を示し、Lot2 及び Lot3 においては脂肪滴の形成は確認されなかった。

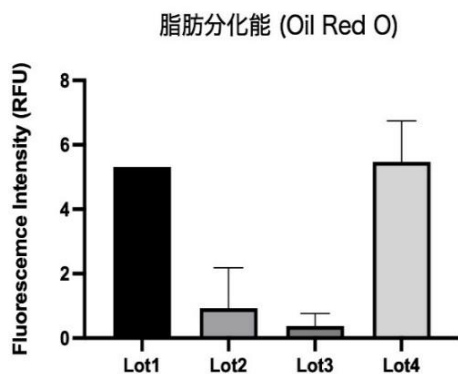


図4 4ロットについての脂肪分化能試験結果

### 2-4-2 軟骨分化能の評価

15ml チューブに各ロット、250,000 細胞を播種し遠心処理により細胞をペレット状にした。その後、TGF- $\beta$  を含む軟骨分化培地中で培養を行い、スフェロイドを形成させた。20 日間の培養後、Alcian Blue 染色キットを用いて軟骨細胞を染色し、色素を溶出させ 溶出液に対して波長 620nm で吸光度を測定し、軟骨分化の指標とした。Lot3 において高い分化能を有している事が示された。

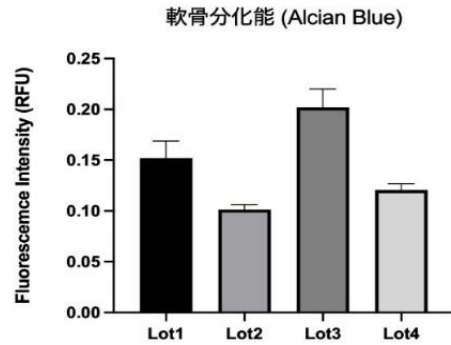


図5 4ロットについての軟骨分化能試験結果

### 2-4-3 骨芽分化能の評価

コラーゲンコート済みの 6 ウェルプレートに、各ロットから 30,000 細胞を播種した。24 時間後に骨芽分化用培地に交換し、28 日間にわたって分化誘導を行った。その後、OsteoImage Mineralization Assay を用いて骨芽細胞を蛍光染色し、励起波長 485nm/蛍光波長 520nm で測定を行い、相対蛍光強度として骨芽分化能を評価した。

Lot4 において高い骨芽分化能が観察できた。

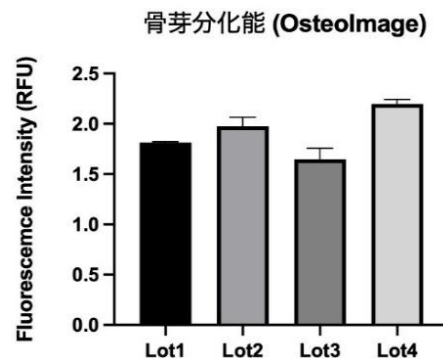


図6 4ロットについての骨芽分化能試験結果

上記の結果より、各クラスターにおける細胞の割合値と分化能の間に相関がある事が明らかとなった。各クラスターに特異的に発現している遺伝子群は、Clariom<sup>TM</sup> S マイクロアレイを用いてバルクレベルでロット間の発現パターンを確認・比較した所、シングルセル解析の結果と整合する発現傾向が確認された。

次に、BM-MS C における遺伝子発現制御の全体像を把握するため R パッケージ hdWGCNA (共発現遺伝子ネットワー

ク解析)を実施し、モジュール解析を行った。その結果、予想通り、細胞周期関連遺伝子高発現モジュール、脂肪・骨芽前駆関連遺伝子高発現モジュール、EMT(上皮間葉転換)関連遺伝子高発現モジュールとに分かれており、上記結果を支持していた。

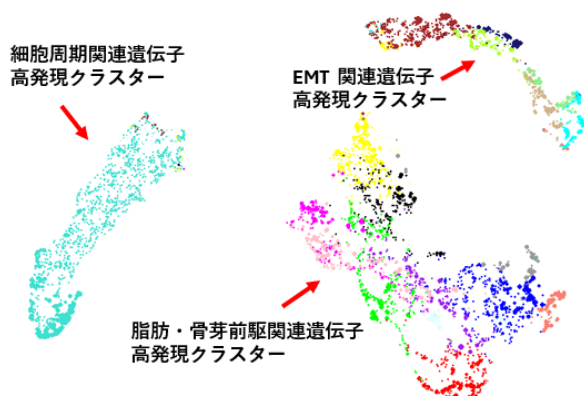


図7 共発現解析ネットワーク解析の結果

これらのモジュール構造は、シングルセル解析および分化能評価結果とも一致しており、BM-MSC の多様性の解釈を支持する知見となった。

## 2-5 老化細胞の検出

疑似時間解析を実施した結果、細胞状態の進行に伴う遺伝子発現の変化を疑似時間上で捉える事ができた。特に、既知の老化関連遺伝子については、疑似時間の後期において発現の上昇が確認された。これまでの実験結果と合わせて考察すると、細胞増殖能が低いロットでは、老化関連遺伝子の発現が高いと推定した。そこで、 $\beta$ -Gal 活性を GFP 蛍光染色により可視化し、各ロットにおける老化細胞の割合を評価した。

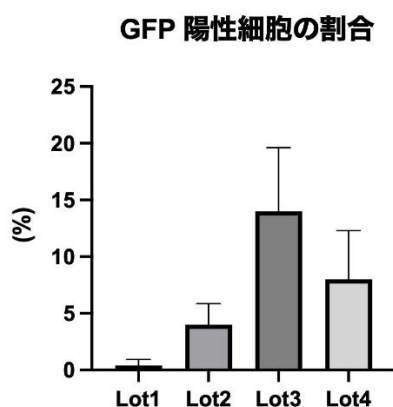


図8 4ロットにおける GFP 陽性細胞の割合

細胞増殖能が低いと評価された Lot3 および Lot4 においては、老化細胞の割合が高く、品質としては不適合なものであると判断される可能性がある。

## 3. まとめ及び今後の展開

本研究では、LONZA 社より提供された4ロットの BM-MSC に対して、一細胞 RNA 解析の結果と、実際の細胞増殖能、老化指標、分化能に関する包括的な評価を実施した。その結果、一細胞 RNA 解析結果を実施する事で細胞の品質特性を捉える事が可能な事を示した。又、詳細な解析を行う事で新しい有用な評価指標を得られる事を示した。現在展開している本評価サービスを安定的に提供できるように努めていく。

さらに、来年度からは厚生労働省 創薬クラスター事業がスタートとなる。KISTEC では、公設のオープンラボ機能を新設する。本評価法に限らず、様々な評価法(ポテンシーアッセイ)が実施可能な研究環境を整備し、実用化・産業化を支援する基盤として展開していく予定である。

## 【参考文献】

1. Miura T, Kouno T, Takano M, et al. Single-Cell RNA-Seq Reveals LRRC75A-Expressing Cell Population Involved in VEGF Secretion of Multipotent Mesenchymal Stroma/Stem Cells Under Ischemia. *Stem Cells Transl Med* 15;12(6):379-390, 2023.
2. Gao Y, Chi Y, Chen Y, et al. Multi-omics analysis of human mesenchymal stem cells shows cell aging that alters immunomodulatory activity through the downregulation of PD-L1. *Nature communications* 14, Article number: 4373 (2023)

# 業績

## 【原著論文】

1. Kiribayashi R, Nakane R, Sunada K, Mochizuki Y, Isobe T, Nagai T, Ishiguro H, Nakajima A. Antiviral and antibacterial activities of yttria-stabilized zirconia. *Materials Letters*. 367: 136658, 2024.
2. Nishitani T, Hirokawa T, Ishiguro H, Ito T. Mechanism of Antibacterial Property of Micro Scale Rough Surface Formed by Fine-Particle Bombarding. *Science and Technology of Advanced Materials*. 25: 2376522, 2024.
3. Abe K, Sunada K, Mochizuki Y, Isobe T, Nagai T, Ishiguro H, Nakajima A. Antibacterial and antiviral activities of transparent PVA coating films prepared by mixing solutions containing leaked ions from rare earth iodates. *Journal of Coatings Technology and Research*. 22: 471-480, 2025.
4. Abe K, Sunada K, Mochizuki Y, Isobe T, Nagai T, Ishiguro H, Nakajima A. Effects of UV illumination on organic dye decomposition activity and antibacterial and antiviral activities of rare earth iodates. *Journal of Materials Science*. 59: 17558-17572, 2024.
5. Matsushita Y, Inoue G, Ogawa N, Ishiguro H, Sunada K, Ishibashi K, Kojima H, Shimizu T, Shingubara S, Ito T. Antibacterial properties of resin nanostructures coated with SiO<sub>2</sub> thin films. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 250:114560, 2025.

## 【口頭発表】

1. Ishiguro H. Proposal to change of existing standards and new test method. TC206/WG9. 2024 年 7 月 4 日. (オンライン).
2. Ishiguro H. Determination of antiviral activity by photocatalytic materials. The 22<sup>nd</sup> Northeast Asia Standards Cooperation Forum. 2024 年 7 月 15 日. 韓国(ソウル).
3. Ishiguro H. Test for antiviral activity using animal virus. ISO TC206/WG9. 2024 年 9 月 26 日. フランス(サンドニ).
4. Ishiguro H. Progress report for the standardization of antivirus activity by photocatalytic materials. Committee of Asian Standardization for Photocatalytic Materials and Products 2023. 2024 年 10 月 21 日. 台湾(台北). (招待)
5. イットリア(YSZ)の抗菌・抗ウイルス活性. 桐林龍寿, 中根 陸, 砂田 香矢乃, 望月 泰英, 磯部 敏宏, 永井 武, 石黒 斉, 中島 章. 日本防菌防黴学会 第 51 回年次大会. 2024 年 9 月 18 日. (東京)
6. 石黒 斉, 永井 武, 小林 慶一, 河野 掌. 再生・細胞医療の産業化に向けた神奈川県立産業技術総合研究所の取組について. 2024 年 10 月 9-11 日. BioJapan/再生医療 JAPAN/healthTECH JAPAN. (神奈川)
7. 伊藤 昌可, 河野 掌, 佐藤 陽治, 三浦 巧, 高野 慈美, 河合 純. 間葉系幹細胞のクラスターリングと機能的な細

- 胞叢集団の特定. 2024 年 10 月 9-11 日. BioJapan/再生医療 JAPAN/healthTECH JAPAN. (神奈川)
8. 永井 武. 抗菌抗ウイルスの評価系と最新の標準化について. 光触媒ミュージアム会館 20 周年記念 光触媒フォーラム「さらに、光触媒」. 2024 年 11 月 12 日. (神奈川)
9. 石黒 斉. 酸化チタンの安全性について. 光触媒工業会管理責任者講習会. 2024 年 10 月 29 日. (オンライン)
10. 宮崎 孝太郎, 小林 慶一, 永井 武, 石黒 斉, 望月 泰英, 磯部 敏宏, 中島 章. 3d 金属を含む各種複合酸化物の作製とその抗ウイルス活性. 2024 年度色材研究発表会. 2024 年 10 月 30 日. (東京) 優秀ポスター賞
11. 小川 奈々子, 小林 慶一, 永井 武, 石黒 斉, 望月 泰英, 磯部 敏宏, 中島 章. 遷移金属酸化物を担持した (Ce<sub>0.8</sub>, M<sub>0.2</sub>) O<sub>2-δ</sub> (M=Y, Gd, (Zr), Bi) の作製とその有機物分解活性および抗ウイルス活性. 2024 年度色材研究発表会. 2024 年 10 月 30 日. (東京)
12. 亀井 飛鳥. 未病から取り組むウェルネス向上. Cutting-edge Bio-seminar 9/ ワンヘルス&ウェルネスに向けた新たなアプローチ. 2024 年 11 月 20 日. (オンライン) (主催: (一財) バイオインダストリー協会) JBA
13. 甘利 奈菜実, 亀井 飛鳥, 石黒 斉, 菅原 亨. TDP-43 の変異で生じる神経細胞の遺伝子発現変動. 第 47 回日本分子生物学会年会. 2024 年 11 月 26-29 日. (オンライン 及び福岡)
14. 桐林 龍寿, 中根 陸, 宮崎 孝太郎, 砂田 香矢乃, 望月 泰英, 磯部 敏宏, 永井 武, 石黒 斉, 中島 章. Sn 系複合酸化物の抗菌・抗ウイルス活性およびそのメカニズム. 第 63 回セラミックス基礎科学討論会. 2025 年 1 月 9 日. (新潟)
15. 桐林 龍寿, 中根 陸, 望月 泰英, 磯部 敏宏, 中島 章, 砂田 香矢乃, 永井 武, 石黒 斉. 第一原理計算による Cu 系酸化物の抗菌・抗ウイルス活性機構調査. 日本セラミックス協会 2025 年年会. 3 月 5-7 日. (静岡)
16. 小川 奈々子, 望月 泰英, 磯部 敏宏, 中島 章, 小林 慶一, 永井 武, 石黒 斉. 遷移金属酸化物を担持した (Ce<sub>0.8</sub>, M<sub>0.2</sub>) O<sub>2-δ</sub> (M=Bi, Zr, Gd, Y) の暗所と可視光下における有機物分解活性および抗ウイルス活性. 日本セラミックス協会 2025 年年会. 3 月 5-7 日. (静岡)
17. 河野 掌, 永井 武, 小林 慶一, 河合 純, 石黒 斉. 一細胞トランスクリプトーム解析で評価する細胞の品質- MSC の品質評価-. 第 24 回日本再生医療学会総会. 2025 年 3 月 21 日. (横浜)
18. 三浦 巧, 高野 慈美, 河野 掌, 草川 森士, 黒田 拓也, 平井 孝昌, 西村 仁孝, 山元 智史, 石黒 斉, 澤田 留美, 石井 明子, 佐藤 陽治, 安田 智. 細胞外小胞 (EV) 製剤製造用細胞基材の品質特性の探索に関する研究. 第



24 回日本再生医療学会総会. 2025 年 3 月 21 日.(横浜)

19.永井 武, 小林 慶一, 河野 掌, 石黒 斉. 第 24 回日本再生医療学会総会. 最新技術紹介コーナー. 第 24 回日本再生医療学会総会. 2025 年 3 月 20-22 日.(横浜)

20.永井 武. 抗菌・抗ウイルス効果と物質・材料 – 抗菌・抗ウイルス物質・材料とその評価法、および応用 (II) – 光触媒. KISTEC 抗菌セミナー. 2025 年 2 月 26 日. (オンライン)

21.河野 掌, 石黒 斉, 永井 武, 小林 慶一. 再生医療等加工製品に対する品質特性評価の提供に向けた取り組み. キングスカイフロンタサイエンスフォーラム. 2025 年 3 月 14 日. (川崎)

#### 【特許】

(1)国内特許出願 2 件