

ポスター展示 一覧

1	イヌおよびネコ間葉系幹細胞の分離とグルタチオン量のモニタリングによる品質評価	三谷 康介/ 株式会社 J-ARM	P15
2	結核菌抗原を「人工ネオアンティジェン」として提示したエクソソームによる腫瘍治療効果の検討	杉浦喜久弥 ¹⁾ 、小山義之 ^{1) 2)} 、伊藤智子 ^{1) 2)} 、長谷川綾 ¹⁾ 、大内若菜 ¹⁾ 、江里口正純 ²⁾ 、稲葉俊夫 ¹⁾ (1) 大阪府立大学 2) 結核予防会新山手病院	P16
3	犬の多血小板血漿 (PRP) の調製法の違いによる性状比較	柴田博人/日本大学	P17
4	犬の骨髄間質細胞由来ニューロン様細胞の軸索伸展能および液性因子の発現解析	枝村一弥/日本大学	P18
5	イヌ骨髄由来間葉系幹細胞から肝細胞様細胞へのダイレクトリプログラミング	新田 卓/麻布大学	P19
6	犬皮下脂肪由来間葉系幹細胞(cADSC)の静脈内点滴投与における安全性の検討	新田 卓/麻布大学	P20
7	犬におけるセルザイク投与安全性試験	松永 拓也/麻布大学	P21
8	犬の乾性角結膜炎における間葉系幹細胞を用いた治療法についての検討	鳥居こず恵/セルトラスト・アニマル・セラピューティクス	P22
9	間葉系幹細胞療法の併用による犬の突発性慢性角膜上皮欠損の改善の1例	小山 亮/ こやま動物病院 (長野)	P23
10	標準治療と並行して間葉系幹細胞治療を行ったリンパ球形質細胞性鼻炎疑いのミニチュア・ダックスフンドの一例	増山浩一/ あおぞら動物病院 (長野)	P24
11	間葉系幹細胞療法の併用による犬の慢性肝疾患の改善の1例	杉本太一/ さくら動物病院 (長野)	P25
12	犬の糖尿病性角膜潰瘍に対して間葉系幹細胞療法を適用した1例	空純子/ さくら動物病院 (長野)	P26
13	混合型肝細胞癌の不完全摘出後に活性化リンパ球療法のみを行った一例	鈴木克洋/ つるまき動物病院	P27
14	肛門嚢腺癌および前立腺癌を併発した犬に対して樹状細胞療法および活性化リンパ球療法を実施した1例	楯 啓吾/ ハート動物病院 (神奈川)	P28
15	獣医再生医療での動物看護とバイタルモニタリング評価	小金沢綾/ さくら動物病院 (長野)	P29
16	動物病院での間葉系幹細胞の筋肉内投与に関する検討	横関健昭/ さくら動物病院 (長野)	P30
17	当院での液体窒素細胞凍結保管の運用 - 実務、感じた利点と苦労を交えて -	鈴木望由/ ミズノ動物クリニック	P31

① イヌおよびネコ間葉系幹細胞の分離と グルタチオン量のモニタリングによる品質評価

○三谷康介¹、伊藤有紀¹、竹根幸生¹、Jiwoong Shin²、Eui Man Jeong³、Heun-Soo Kang²、
In-Gyu Kim³、稲葉俊夫^{1,4}、鳩谷晋吾⁴、杉浦喜久弥⁴

¹ 株式会社 J-ARM (大阪)

² ソウル国立大学医学部がん研究所 Cell2in (韓国ソウル) .

³ ソウル国立大学医学部生化学・分子生物学講座 (韓国ソウル) .

⁴ 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科先端病態解析学領域 (泉佐野)

【目的】 再生医療は多くの難治性疾患において失われた細胞の補充に有効な方法として期待されている。しかしながら、多能性幹細胞を適応するには腫瘍形成のリスクのような多くの課題がある。これらの理由から、近年、獣医療において間葉系幹細胞 (MSC) が臨床研究に用いられている。一方、治療の有効性を評価する際に基本となる細胞治療における品質管理方法は未だ見当たらない。MSC のコア機能は細胞内酸化還元状態によって厳密に調節されている。グルタチオン (GSH) は抗酸化剤および酸化還元レギュレータとして機能する最も豊富な非タンパク質性のチオールである。本研究では、イヌおよびネコ脂肪組織由来 MSC (ADSC) に対して GSH 動態の定量による品質管理の評価を試みた。

【方法】 J-ARM 社製の脂肪由来幹細胞培養キットを用い、イヌ 3 頭およびネコ 1 頭から ADSC を採取した。細胞表面マーカーをフローサイトメトリーにて解析した。細胞分化能 (骨形成および脂肪生成) をミネラル基質の沈着に von Kossa 染色、および脂肪滴に oil Red O 染色を用いて調べた。ADSC の継代培養に関連してミトコンドリア GSH のイメージングおよびコロニー形成単位線維芽細胞 (CFU-F) アッセイを行った。GSH を介した抗酸化能の測定に、Cell2in 社製の GSH プロブ、FreSHtracer™ を用いて GSH の平均値 (GM) およびグルタチオンの不均一性 (GH) の二つのパラメータを開発した。GM は細胞集団における細胞内 GSH の平均値である。GH は集団の平均に関連して GSH の変動範囲を表している。

【結果】 イヌおよびネコ培養細胞は CD44 および CD90 陽性を示し、CD14 および CD45 陰性を示した。分化誘導後、これらの細胞は骨形成および脂肪生成表現型を示した。イヌおよびネコ ADSC は継代するにつれて GM の低下および GH の上昇を示した。さらに、予想通りにこれらの GSH パラメータは自己複製能 (CFU-F) と十分に相関していた。これらの結果は、イヌおよびネコ脂肪組織から ADSC を調整する際に、GSH パラメータ (GM, GH) が幹細胞の品質モニタリングに用い得ることを示唆している。

【結論】 以上の結果から、ADSC 機能の維持には高レベルのグルタチオンが必要であり、グルタチオンの動態および不均一性をモニタリングすることで細胞の品質把握を向上できることが明らかになった。

②結核菌抗原を「人工ネオアンティジェン」として提示した エクソソームによる腫瘍治療効果の検討

杉浦喜久弥¹⁾、小山義之¹⁾²⁾、伊藤智子¹⁾²⁾、長谷川綾¹⁾、大内若菜¹⁾、江里口正純²⁾、稲葉俊夫¹⁾

1) 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科獣医学専攻

2) 公益財団法人 結核予防会 新山手病院 臨床医用工学研究室

【はじめに】

腫瘍関連抗原には正常組織にも存在する「共通抗原」と、がん細胞の遺伝子異常に由来するがん特有の「ネオアンティジェン」の二種類がある。共通抗原は一般に免疫原性は低く、あるいはすでに免疫寛容の状態にあり、免疫応答を惹起する能力は弱い。一方、ネオアンティジェンは免疫誘導能力が高く、抗体療法などの免疫治療は腫瘍細胞がネオアンティジェンを持つ場合にのみ高い治療効果を表すことが近年明らかになって、ネオアンティジェンのガン免疫治療における重要性が注目されている。しかし、治療に有効なネオアンティジェンを持つ患者の割合は低く（～30%）、これを持たない腫瘍細胞に対する効果的な治療法の開発が望まれている。

【方法】

我々は、ネオアンティジェンを持たない腫瘍に対する新たな免疫治療システムとして、抗原性の高い結核菌抗原である ESAT-6 の遺伝子を生体の腫瘍細胞に導入して「人工ネオアンティジェン」として発現させることにより、高い腫瘍増殖効果を得ることに成功した。本研究では、ESAT-6 遺伝子を導入した培養腫瘍細胞が分泌した、表面に ESAT-6 を持ったエクソソームを用いた腫瘍抑制効果および抗腫瘍免疫を誘導するメカニズムを検討した。

【結果】

ESAT-6 遺伝子導入腫瘍細胞の培養から回収したエクソソーム（ESAT-6 エクソソーム）をマウス生体内に成長させた同腫瘍内に直接注射することによって成長を有意に抑制することができた。さらに、ESAT-6 エクソソームで処理した樹状細胞（DC）を注入することによっても顕著な抗腫瘍活性が認められた。この ESAT-6 エクソソームを作用させた DC では、CD80、CD86、IL-12 の発現が向上し、活性化されていることが確認された。これらの効果は ESAT-6 を持たないエクソソーム（Naïve エクソソーム）には見られなかった。

【結論】

以上のように、「人工ネオアンティジェン」提示エクソソームによる本治療法は腫瘍細胞の抗原性の低さを克服する新しいタイプのガンワクチンとして期待される。

③犬の多血小板血漿（PRP）の調製法の違いによる性状比較

○柴田博人^{1,2}、深谷信太郎²、枝村一弥²

¹中郷どうぶつ病院、²日本大学獣医外科研究室

【はじめに】

多血小板血漿（Platelet-Rich Plasma: PRP）は、獣医学領域においても再生医療の有用なツールのひとつとして注目されている。PRPは、調製方法によって血小板や白血球の濃度が異なり、Leukocyte-Rich PRP（LR-PRP）、Leukocyte-Poor PRP（LP-PRP）、Pure PRP（PR-PRP）に分類される。しかし、犬においては、PRPとして一括りにされていることが多く、各々の性状を比較した報告は少ない。そこで、本研究では、PRPの調製法の違いによる性状の差異を検討したので報告する。

【材料および方法】

本研究は、健常ビーグル犬（n=5）の末梢血を用いて検討を行った。本研究は、日本大学動物実験委員会の承認を受けて実施した。LR-PRPは、スピッツ管を使用しDouble spin法にて調製した（LR-PRP群）。LP-PRPは、BDバキュティナ®採血管を使用しSingle spin法にて調製した（LP-PRP群）。さらに、獣医学領域で既に臨床応用されている自己調製血清（ACP）をArthrex ACP® Double-Syringe Systemにて調製した（ACP群）。本研究では、全血を対照群として、赤血球、白血球、血小板、蛋白の濃度を比較した。さらに、各々の調製物からtotal RNAを抽出し、real time PCR法にて、PDGF-A、PDGF-B、VEGF-A、VEGF-Bの発現量を定量的に比較した。

【結果】

今回調製した血漿は、いずれの群においても血小板が濃縮されており、PRPの定義に合致していた。LR-PRP群とLP-PRP群の血小板濃度は、対照群の2～3倍であり有意に高く濃縮していた。一方で、今回調製した血漿の中では、ACP群の血小板濃度が最も低い傾向が認められた。LR-PRP群の白血球濃度は、LP-PRP群とACP群に比べ有意に高い濃度であった。LP-PRP群とACP群においては赤血球がほとんど認められなかったが、LR-PRP群では赤血球が混入していた。蛋白濃度は、LP-PRP群が最も高く、その他の群では差がなかった。PDGF-A、PDGF-B、VEGF-A、VEGF-Bの発現量は、いずれもLR-PRP群が最も高かった。ACP群では、PDGF-A、PDGF-B、VEGF-Bの発現量が最も低かった。

【考察】

本研究では、PRPの調製方法により、白血球数、血小板数、蛋白濃度、サイトカイン発現量が異なることが明らかになった。今回調製したPRPの中では、LR-PRPの白血球濃度が最も多く、PDGFとVEGFの発現量が最も優れていた。LP-PRPは、血小板濃度と蛋白濃度が高いという特徴があった。ACPは最も簡便に調製できたが、血小板濃度が低く、PDGFとVEGFの発現量も低かった。今後は、他のサイトカインの発現量も検討することで、各々の特徴を明らかにしていきたい。

④犬の骨髄間質細胞由来ニューロン様細胞の 軸索伸展能および液性因子の発現解析

○ 枝村一弥、深谷信太郎、高橋佑輔、関真美子、浅野和之
日本大学獣医外科学研究室

【はじめに】

脊髄損傷の重症例においては、現在の医療技術を駆使しても完全な機能回復は困難であり、未だ画期的な治療法は確立していない。当研究室では、犬の骨髄間質細胞（BMSCs）を用いた脊髄再生医療の研究を展開しているが、その軸索伸展能や液性因子の発現に関して十分な評価ができていない。そこで、本研究では、BMSCs から分化誘導したニューロン様細胞の軸索伸展能や液性因子の発現について検討したので報告する。

【材料および方法】

最初に、ニューロン形態観察用チャンバー（Neuron Device）を用いて、BMSCs の軸索伸展能を評価した。BMSCs を細胞体分離側のウェルに播種し、*rc-bFGF* と *B27 supplement* を含む *Neurobasal-A medium* でニューロンへと分化誘導した。分化誘導 10 日目に、ニューロン様細胞の割合の算出、*real-time PCR* によるニューロンマーカーの発現解析、 Ca^{2+} イメージングによる機能解析を行った。次いで、チャンバー間に静水压をかけて軸索の伸展を試み、形態の観察と蛍光免疫染色を行うことで軸索伸展の程度を評価した。次いで、骨髄の単核球、BMSCs、分化誘導したニューロン様細胞から *total RNA* を抽出し、*real-time PCR* にて、*bFGF*、*HGF*、*NGF*、*BDNF* の発現量を比較した。

【結果】

BMSCs をニューロン分化誘導培地で培養したところ、ニューロン様の形態へと変化し、*NEFL*、*NEFH*、*MAP2* の発現量が増加していた。また、 Ca^{2+} イメージングにて、生理的な活動を有していることが確認できた。軸索の伸展を試みたところ、いずれの条件においても軸索の伸展は認められなかった。骨髄単核球と BMSCs を比較したところ、*bFGF*、*NGF*、*BDNF* の発現量が有意に増加していた。さらに、分化誘導後のニューロン様細胞は、分化誘導前に比べ、*bFGF*、*HGF*、*NGF* の発現が有意に増加していた。

【考察】

本研究の結果から、BMSCs 由来ニューロン様細胞は軸索伸展能を有していない可能性が示唆された。また、本研究では、骨髄の単核球より BMSCs の方が液性因子の mRNA の発現が高く、ニューロン様の細胞へと変化するにつれてさらに発現が高くなる傾向が認められた。これらの結果は、BMSCs による脊髄再生医療は細胞置換および軸索伸展が主たる目的ではなく、損傷部位に定着した細胞が生存および分化する過程で分泌される液性因子による再生効果（パラクライン効果）が主体であるというという仮説を一部支持するものであった。

⑤イヌ骨髓由来間葉系幹細胞から肝細胞様細胞への ダイレクトリプログラミング

○新田卓、草刈雄登、山田陽子、久末正晴
麻布大学小動物内科学研究室

【背景】

医薬品の市場撤退を回避するため、初代培養肝細胞により薬物誘発性肝障害を予測し、安全性の高い医薬品開発が試みられている。しかし初代培養肝細胞は薬物代謝機能の維持および安定供給が困難等の問題を抱えている。そこで我々は、新たな毒性評価系の供給ツールとして骨髓由来間葉系幹細胞(BMSCs)に着目した。本研究では、Hnf4 α とFoxa1 遺伝子導入によりマウス皮膚線維芽細胞から肝細胞様細胞を樹立したダイレクトリプログラミング法にて、骨髓由来間葉系幹細胞(BMSCs)から肝機能を有する細胞の樹立を目指す。

【材料と方法】

健常イヌの骨髓血から単核細胞を分離し、接着培養した細胞を BMSCs とした。BMSCs の性質は、フローサイトメトリーおよび骨芽細胞、軟骨細胞および脂肪細胞への分化能により評価した。レトロウイルスベクターを用い Foxa1 および Hnf4 α 遺伝子を BMSCs に導入し、遺伝子導入後 20 日まで培養を行った。肝細胞への分化度は、形態学的観察、PCR および免疫細胞化学により評価した。

【結果と考察】

フローサイトメトリー解析の結果、単離培養した BMSCs における CD29,CD44,CD90 の陽性率はそれぞれ 97.76%、97.76%、81.72%であった。さらに、骨芽細胞、軟骨細胞および脂肪細胞への分化能も確認された。Foxa1、Hnf4 α の遺伝子導入の結果、遺伝子導入後 day20 において円形～不定形の形態を示す細胞集団が出現した。細胞骨格である F-actin を蛍光染色した結果、遺伝子導入前の BMSC においては細胞質全体に繊維状に分布していたのに対し、Day20 において円形～不定形の形態を示す細胞は細胞膜直下に多く分布していた。定量的 PCR の結果、day0 に比べ day20 において Albumin および E-cadherin 遺伝子の発現量が増加した。また、免疫細胞化学では day0 に比べ day20 の細胞において Albumin および E-cadherin タンパク質の産生が確認された。

【結論】

骨髓から単離されたイヌ BMSCs から Albumin を発現する肝細胞様細胞へと分化することができた。

⑥犬皮下脂肪由来間葉系幹細胞(cADSC)の 静脈内点滴投与における安全性の検討

○新田卓¹⁾、野村早織¹⁾、久保雄昭²⁾、上原拓也³⁾、青木卓磨³⁾、久末正晴¹⁾

- 1) 麻布大学獣医学部獣医学科小動物内科学研究室
- 2) セルトラスト・アニマル・セラピューティクス株式会社
- 3) 麻布大学獣医学部獣医学科外科学第一研究室

【背景】

獣医領域では、犬皮下脂肪由来間葉系幹細胞(cADSC)治療において、そのクオリティは統一されておらず、投与する細胞の品質や安全性に関して十分に確認されていない。また、マウスでは ADSC の静脈内投与後に肺血栓塞栓症(PTE)のリスクがあることが報告されている。そのため本研究では犬における cADSC の静脈内投与後の PTE のリスクの判定を目的とした。

【材料および方法】

cADSC は、セルトラスト社が規定した犬皮下脂肪組織からの培養プロトコール、検査プロトコールに従い調製したものを使用した。健常ビーグル犬を各3頭ずつ、対照群・低用量群・適用量群の3群に分け、cADSC を静脈内点滴投与した。この3群に対して投与前から8週間後まで発咳の有無・全血生化学的検査・凝固系検査・血液ガス分析・X 線検査・心臓超音波検査・肺動脈圧測定の比較検討を実施した。

【結果】

本研究において3群間で PTE を示唆する臨床症状は確認されず、各検査項目においても PTE を示唆する所見見出されなかった。しかしながら、トロンビン・アンチトロンビンⅢ複合体(TAT)では投与直後に対照群(0.10ng/ml)と適用量群(2.10±0.92 ng/ml)で有意差が認められた(p<0.014)。病理組織学的検査では血栓形成は認められなかった。

【考察】

本研究では、cADSC の静脈内点滴投与において、個体によっては投与後に凝固系の活性化および線溶系の亢進が見られるものの、これは軽度かつ一過性であり cADSC の投与時において生命に影響を及ぼすリスクは限定的であることが示唆された。

⑦イヌにおける三次元細胞構造体（セルザイク）の 投与安全性試験

○松永拓也¹、新田卓¹、久末正晴¹、久保雄昭²

1) 麻布大学 小動物内科学研究室、2) セルトラスト・アニマル・セラピューティクス株式会社

動物由来成分を含まない独自の足場素材「リコンビナントペプチド (RCP)」を高度なエンジニアリング技術により加工して、マイクロサイズのペタロイド状微細片 (petaloid μ -piece) が開発されている。この素材は、セルザイクと呼ばれ骨折治療など、各種細胞治療において培養細胞と共に移植し細胞療法の治療成績を向上させる目的で今後利用できる可能性がある。しかしながら大型動物における安全性が実証されておらず、本研究ではセルザイクをイヌに移植しその安全性について検討する。

本実験では、イヌを用いてセルザイクの毒性および造腫瘍性といった側面から安全性を検討した。12頭のイヌを、3群（コントロール群、標準用量群、高用量群）に各4頭ずつ群分けした。セルザイク投与量は標準用量群で7000個（細胞数として 6×10^7 個）、高用量群で70000個（細胞数として 6×10^8 個）あり、液体培地にて5mLに希釈し乳腺へ注射した。観察時点は投与後24、48、72時間後および30、58日後とし、全血検査 (CBC)、生化学検査、CRP測定といった血液生化学的検査と一般状態観察、皮下結節体積の測定、病理組織検査を実施した。

標準用量群、高用量群について、白血球数 (WBC) と CRP 値の平均値はどちらも投与後24時間後に最高値となり、その後低下し正常範囲で維持された。セルザイク投与時には皮下に結節が認められたが、標準用量群では投与後24時間後が最大体積を示し、徐々に小さくなり、およそ4日目までは肉眼的に観察できた。30日後には全個体で結節は肉眼的に見られなくなっていた。一方、高用量群では30日後にも結節が肉眼的に観察できた個体が半数いた ($n=2/4$) が58日後には全個体で結節は消失した。この2群において、1頭ずつ病理解剖を行い組織学的に分析したところ、30日後では両群で軽度の炎症が認められ58日後では接種部位周囲に異物反応による肉芽腫性炎症、小動脈炎がみられた。

以上のように、イヌにセルザイクを皮下投与すると、投与部位では外見的には早期に消失するが、組織学的にはセルザイク様残留物が認められ、軽度の炎症や小動脈炎も生じる可能性がある。しかし、軽度の炎症は投与部位に局限し、全身性の反応は起こらないと考えられた。また、一般状態や血液生化学検査にも問題はなく、イヌへのセルザイク投与について高用量群においても副作用は局所の炎症反応のみに限定され生命および健康への影響は極めて少なく安全性について問題ないものと推察された。

⑧犬の乾性角結膜炎における間葉系幹細胞を用いた 治療法についての検討

○鳥居こず恵¹⁾ 森寿弘¹⁾ 久保雄昭¹⁾ 岩木義英¹⁾ 福田威¹⁾ 矢作茉奈¹⁾ 花野みなみ¹⁾
牛草貴博¹⁾ 河本光祐¹⁾ 横山篤司²⁾ 牧野快彦¹⁾

1) 動物再生医療センター病院/セルトラスト・アニマル・セラピューティクス株式会社

2) さくら動物病院

【はじめに】

近年、獣医療においても再生医療や細胞治療が注目されるようになってきたが、今後のさらなる発展のためには、診療データを蓄積していくことが必要である。そのためには、治療に使用する細胞の質や安全性を担保することが求められている。そこで、当院では、人の再生医療と同等の品質管理基準の下で、均質な細胞を安定して大量生産できる品質管理システムを構築した。

【方法】

本研究では、シクロスポリン眼軟膏などの標準治療に反応しない KCS 罹患犬 8 頭 (9 眼球) に対して、当院の品質管理システム下で培養し、安全性を確認した皮下脂肪由来の他家間葉系幹細胞 (cMSC) を涙腺と第三眼瞼腺 (瞬膜腺) へ投与し、難治性 KCS に対する cMSC 療法の有効性について検討した。細胞投与後シクロスポリン眼軟膏を休薬し、1 週間に 1 回の頻度で 4 回 (4 週間) 経過観察を行った。評価項目は STT、綿糸法、臨床症状 (充血、眼脂、角膜光沢) とした。

【結果】

細胞投与を行った 9 眼球中 7 眼球において STT 値、綿糸法、臨床症状のいずれかの評価項目において改善が認められた。特に、9 眼中 3 眼球では、すべての評価項目について改善した。さらに、これらの評価項目において統計解析を行った結果、STT 値では細胞投与後の最大効果時の値と投与前の値との間で有意な差が認められ、投与後 2~3 週で最大効果を示した。これらの結果より、KCS に対して細胞治療が効果を示すものと考えられた。さらに、効果の持続期間について検討したところ、最長で 6 か月間 STT 値や臨床症状の改善を維持した症例が確認された。なお、全症例において細胞投与後に有害事象の発生は認められなかった。

【考察】

犬の KCS の多くは涙腺の免疫介在性炎症に起因すると考えられていることから、今回の KCS に対する cMSC の効果は、涙腺の炎症鎮静と免疫調整により涙液の分泌障害を改善したものと考えられる。本研究結果は、標準治療に反応しない KCS 症例に対して、細胞治療が新たな治療の選択肢の一つとなる可能性を示すものである。今後も投与量や投与回数、適応となる症例について検討を重ね、獣医療における細胞治療の確立に向け、細胞の品質・安全性をベースとした治療効果の科学的エビデンスを構築していきたい。

⑨間葉系幹細胞療法の併用による 犬の突発性慢性角膜上皮欠損の改善の 1 例

○小山亮¹、宮地すばる²、吉越千夏²、横山篤司²

1) こやま動物病院（長野県）、2) さくら動物病院／併設長野どうぶつ眼科センター（長野県）

【はじめに】

角膜損傷の治癒過程においては、血管新生とそれに続く角膜上皮化が必要不可欠であるため、損傷部分にいかにか新生血管を到達させるかが治療の重要なポイントのひとつとなるが、現行の標準治療では十分な血管新生が伴わずに治癒しないケースもあり、問題となる。

間葉系幹細胞（MSC）は体内に存在しており、血管新生促進作用を発揮するなど、組織修復に非常に優れた性質を有している。人医療では多くの難治性疾患に対して、培養増幅した MSC の投与による治療（MSC 療法）が実施され、標準治療では得られないような有望な治療結果が続々と示されてきている。

【症例】

症例（トイプードル 去勢雄 8 歳 体重 5.5kg）は左眼の不快感を主訴に来院された。定法に従い点眼療法を実施したが改善が認められず、1 ヶ月後には角膜上皮の剥離が認められ、突発性慢性角膜上皮欠損（SCCEDs）と診断された。

本症例では角膜格子状切開術を実施するとともに、角膜損傷部への効果的な血管新生と組織修復作用を期待して MSC 療法（3 回投与）をオプション療法として併用実施した。

【結果】

損傷部周囲からの角膜血管新生を認め、角膜上皮欠損は大きく改善した。

【考察】

標準療法のみでは治療が困難な角膜損傷に対して、MSC 療法併用が有用である可能性が示された。

⑩リンパ球形質細胞性鼻炎に対して 他家間葉系幹細胞治療を適用した 1 例

○増山浩一¹， 横関健昭²，横山篤司²

1) あおぞら動物病院、2) さくら動物病院／併設長野どうぶつ再生医療センター

【はじめに】

リンパ球形質細胞性鼻炎は、犬の非感染性鼻腔内炎症のほとんどを占めている。病態については未だ不明な部分が多いが、膿性鼻汁やくしゃみ、逆くしゃみなどの呼吸器症状が多く認められる。リンパ球や形質細胞などの鼻腔粘膜への浸潤を特徴とすることから自己免疫性に発症することが知られており、炎症を抑えることで症状の緩和が得られる。間葉系幹細胞（MSC）はその抗炎症作用や免疫調節作用から炎症性疾患に対する新たな治療法として注目されているが、リンパ球形質細胞性鼻炎に対して行った報告は未だない。

【症例】

症例は、ミニチュア・ダックスフント（8歳、去勢雄、6.5 kg）、1年前からくしゃみと逆くしゃみを主とした呼吸器症状、淡黄色粘性鼻汁（膿性鼻汁）を呈し、定期的に肺炎を繰り返すことから他院にて治療を行っていたが、2、3日前から症状が悪化したとの主訴にて当院を受診した。リンパ球形質細胞性鼻炎を疑い、エンロフロキサシン 5 mg/kg/SID、ジプロフィリン 10 mg/kg/BID、プレドニゾロン 0.5 mg/kg/BID、L-カルボシステイン 10 mg/kg/BID、ネブライジングにて治療を開始。状態の改善が認められたため、第 3 病日に退院した。経過は比較的良好であったが、呼吸症状と膿性鼻汁が完全には消失せず継続したため、標準療法に加え他家 MSC の静脈投与を 2 回行った。

【結果】

MSC の投与後、呼吸状態、鼻汁の性状、臨床症状共に改善が認められた。さらに治療後期においてはステロイドを減薬しつつ、寛解状態を長期間得ることが出来た。

【考察】

MSC の抗炎症作用により、ステロイドとは異なった作用点で炎症を抑えることが出来たと考えられる。また、自己免疫性疾患では一般的に T 細胞バランスに異常があることが知られているが、本症例では MSC 移植前後において、制御性 T 細胞比率が上昇していることが確認できた。このことから本症例においては、他家 MSC 療法による T 細胞バランスが改善したことで、ステロイドによる治療との併用により、症状をより安定化させることが出来たと考えられる。リンパ球形質細胞性鼻炎に対して MSC を投与することは、炎症および T 細胞のバランスを改善し、治療への反応性を向上させる効果があると思われる。

⑪間葉系幹細胞療法の併用による犬の慢性肝疾患の改善の1例

○杉本太一、藤本洋平、横関健昭、横山篤司

さくら動物病院

【はじめに】

間葉系幹細胞（MSC）療法は、MSC から分泌される抗炎症および組織修復/保護サイトカインのために様々な難治性疾患の新たな有望な治療法であると期待されている。マウスおよびヒトにおける多くの研究で MSC 療法によって肝臓の炎症や構造変性の改善が示されていることから、慢性肝疾患は MSC 療法の標的の1つであると考えられる。しかしながら、自然発症した犬の慢性肝疾患への MSC 療法の適用は報告されていない。

【症例】

犬（ジャック・ラッセル・テリア、6歳齢、去勢雄、体重 6.7 kg）は2歳時より肝臓マーカー値の軽度上昇があった。4歳時に重度の胆嚢炎のために胆嚢摘出術を受けたが、この際の肝臓生検の組織病理検査で肝細胞壊死、ビリルビン沈着、炎症性細胞浸潤を伴う微小肉芽形成が明らかになり、慢性肝炎と診断された。ウルソデオキシコール酸（30 mg/kg/日）および肝臓サプリメントからなる一般的な支持治療を処方したが、肝臓マーカー値は1年間で徐々に上昇した。犬の一般状態に明確な不調は現れていなかったが、その肝臓状態の持続もしくは悪化は、慢性肝炎の終末期への進行につながる可能性が考えられた。

MSC（自家または他家の脂肪組織由来または臍帯由来 MSC）の静脈投与の併用治療を行ったところ、肝臓マーカー値は部分的に低下した（MSC 療法実施前 ALT 1601 U/L、ALP 613 U/L → MSC 療法実施1ヵ月後 ALT 約 600 U/L、ALP 約 400 U/L）。引き続き定期的に MSC 投与を継続したが、肝臓マーカー値のそれ以上の改善は認められなかった。一方で肝臓マーカー値の上昇も起こらず、犬は良好に維持された。1年後、犬は肝線維症/肝硬変への病態進行と推測される門脈圧亢進症を発症した。対症治療、支持療法、MSC 療法、プレドニゾン（0.7 mg/kg/日）の処方で症状は1ヵ月で解消した。支持療法、定期的 MSC 療法、プレドニゾンを継続したところ、肝臓マーカー値は基準値近くまで低下し、長期安定した。15ヵ月後の肝臓の病理検査において、以前認められていた病変は観察されなかった。

【考察】

犬の慢性肝炎に対して、一般的な治療と MSC 療法の併用が病態の改善に貢献した可能性がある。ただし、本発表はケースレポートであり、MSC 療法の詳細な有効性に関しては不明である。

⑫犬の糖尿病性角膜潰瘍に対して 間葉系幹細胞療法を適用した 1 例

○空純子、横山篤司

さくら動物病院

【はじめに】

犬の糖尿病はインスリンの不足による持続的な高血糖を示す内分泌疾患である。犬の糖尿病は自己免疫疾患であるヒトの 1 型糖尿病に病態が類似していると考えられてきた。しかし、ヒトの 1 型糖尿病は若齢で発症するのに対して、犬の糖尿病は中年齢での発症が多い。近年の報告では、犬の糖尿病はヒトの成人潜在性自己免疫型糖尿病に相当すると考えられてきている。成人潜在性自己免疫型糖尿病は、ヒトの 1 型糖尿病と同様に自己免疫疾患である。初期は 2 型糖尿病のように食事療法のみでコントロールしているが、徐々にインスリン分泌が低下し 1 型糖尿病と同様な病態になる。また、犬の糖尿病では膵炎やその他の炎症性疾患などを基礎疾患として持つことも少なくない。今回、糖尿病と診断され、その後両眼に角膜潰瘍を併発した犬に対して他家の脂肪由来間葉系幹細胞（ADSC）を投与したので、その結果を報告する。

【症例・経過】

パグ、去勢雄、9 歳、体重 11.7 kg。3 ヶ月前に他院にて糖尿病と診断された。数日前から物にぶつかり、見えていなさそうとの主訴で当院に来院した。両眼については成熟白内障と診断し、血糖値は 170 mg/dl、尿糖陽性、膵臓における多発性結節状構造が確認された。第 11 病日（初診日を第 1 病日とする）には血糖値は 444 mg/dl であり、レギュラーインスリン（レベミル）を 5U, BID での投与を開始した。第 10 病日で両眼白内障の手術を実施し、その後も血糖値の上昇は続いたが、眼については手術後良好であった。第 23 病日に右眼の角膜潰瘍にて来院し、抗生剤および自家血清の点眼治療を開始した。また、インスリンは 7U, BID での投与に変更した。第 68 病日において角膜潰瘍の改善が見られなかったため、瞼板縫合を実施した。第 83 病日からはおよそ 1 週間に 1 回の ADSC を静脈投与した。ADSC 投与の回数を重ねるうちに角膜潰瘍は完治し、インスリン投与量も漸減することができた。第 1307 病日で右心不全を呈し死亡するまでは血糖値コントロールは良好であった。

【考察】

糖尿病および糖尿病性角膜潰瘍を発症した犬に対して、ADSC 併用療法が自己免疫性を抑制し、 β 細胞の攻撃を防御した可能性、および角膜の組織修復を促進した可能性が推察される。

⑬当院での液体窒素細胞凍結保管の運用

－ 実務、感じた利点と苦勞を交えて －

○鈴木望由¹、須郷貴行¹、石井麻里子¹、横山篤司²、水野浩茂¹

¹ミズノ動物クリニック、²さくら動物病院

獣医再生医療での脂肪組織由来幹細胞を用いた治療は自家療法が基本であるが、最近では動物病院での実施において利便性の高い凍結他家療法が普及してきている。この療法においては幹細胞の超低温での凍結保管を行うが、動物病院では-80℃フリーザーで細胞の凍結を行い、同じフリーザー内（-80℃）で保管する方法が簡便であり主流となっている。

しかしながら、-80℃は幹細胞の長期凍結保管において完全な超低温ではなく、同温度での幹細胞の保管は徐々に凍結幹細胞の劣化（解凍時の生細胞率の低下）を引き起こす。このことは凍結保存細胞に保管期限（およそ6ヵ月）があることを意味し、凍結幹細胞の製造と消費のマネジメントに非常に苦勞する。また、患者に投与する解凍幹細胞の死細胞が増えることは投与時の効果低減やリスクにつながる。液体窒素（-196℃）での細胞の保管は劣化を引き起こさず、半永久的に保管できることが知られている。このような理由から、当院では製造した他家幹細胞を液体窒素保管容器（-196℃）で長期保管するシステム（最大1620本のクライオバイアルを貯蔵可能）を導入した。

本発表では、動物病院での液体窒素細胞凍結保管システムの構築と運用について、当院での設置および運用コスト、管理、凍結細胞の解凍後生細胞率、利点、苦勞点について紹介する。一部を紹介すると、再生医療チームの中で、管理表を作成した。液体窒素の残量管理は週一回のペースで行い、残量が既定の量を下回り次第、補充する。液体窒素の補充は4週間に1回の頻度であり、その補充費用（ランニングコスト）は、およそ1万円であった。液体窒素保管システムで保管した凍結細胞の劣化は見られなかった。

当院での液体窒素細胞凍結保管システムの導入初期は慣れない部分もあったが、現在は失敗経験を活かし、チームで団結して液体窒素の管理に取り組み、スムーズに運用が進んでおり、有用性やランニングコストに満足している。本発表が液体窒素細胞凍結保存システムを考慮している施設の参考になれば幸いである。

⑭肛門囊腺癌に前立腺癌を併発した犬に対して 樹状細胞療法および活性化リンパ球療法を実施した 1 例

○楯 啓吾, 山根 悠太郎, 綱島 文果, 伊藤 卓巳

ハート動物病院

【はじめに】

犬の肛門囊腺癌や前立腺癌は根治的手術が難しく、また化学療法などの有効な補助療法についても報告は乏しい。本症例は肛門囊腺癌に前立腺癌が併発した犬に対して樹状細胞療法（以下 DC）および活性化リンパ球療法（以下 CAT）を実施し、生存期間の延長と QOL の向上を認めた為、その概要を報告する。

【症例】

ミニチュア・ダックスフンド、13 歳、去勢雄。血尿及び活動性の低下を主訴に来院。肛門左側および尿道前立腺部から膀胱にかけて腫瘍を確認。それぞれ外科的治療と細胞診、各種検査を行い、肛門囊腺癌と前立腺癌と診断。その後、免疫細胞療法を希望。

【治療・経過】

第 68 病日より DC+CAT を開始。基礎疾患に対する内科治療は継続したが、化学療法などの補助療法は実施せず。治療中に腫瘍の縮小は認められなかったが、良好な QOL を維持。その後第 155 病日までに計 6 回実施。しかし、CT 検査を実施したところ、腫瘍の浸潤と肺などへの遠隔転移を確認。ご家族の希望により、ピロキシカムと CAT との併用に変更。第 188 病日より CAT を 7 回実施。しかし、その後、第 276 病日に死亡した。

【考察】

肛門囊腺癌は犬に多く認められ、中高齢での発生が多い。急速に増大し、潰瘍化することも多く、リンパ節への転移が多く認められる。外科的切除は化学療法と比較して有効との報告がある。犬の前立腺癌は、高齢の雄（去勢）犬で診断されることが多く、診断時に付属リンパ節、肺、骨にしばしば転移を認めることが多い。無治療の場合、診断後の生存期間は数週間から 1-2 ヶ月で、現在までに様々な外科療法、化学療法、放射線療法などが実施されてきたが、効果が認められないことが多いとされている。肛門囊腺癌と前立腺癌は挙動が異なるが、共に根治手術が困難であり化学療法に対して反応が乏しいことを踏まえ、免疫細胞療法による QOL の維持を目的として治療を実施した。本症例では遠隔転移を認めた症例としては、生存期間の延長と良好な QOL を維持することができた。また、免疫細胞療法を行っている間は、一般状態の改善も認められた。しかし、CAT 及び DC では腫瘍の完全寛解には至らず、治療を継続していくうちに腫瘍の増殖を認めた。本症例のように、動物に対する負担や QOL、ご家族に対する満足度を含め判断した場合、治療の選択肢として手応えを感じた。今後、投与細胞の質や投与経路の検証などを実施することにより、免疫細胞療法の効果を定量化する必要がある。今後、肛門囊腺癌および前立腺癌に対する治療の選択肢の一助となれば幸いである。