

Fig.3a

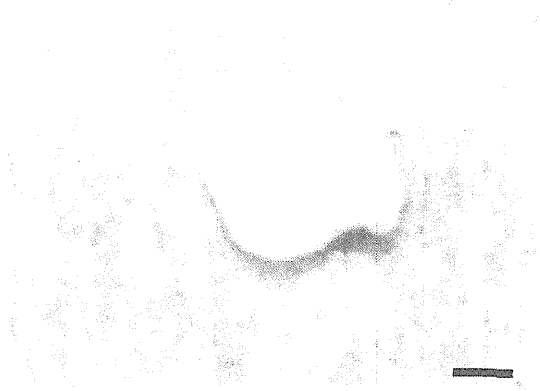


Fig.3b

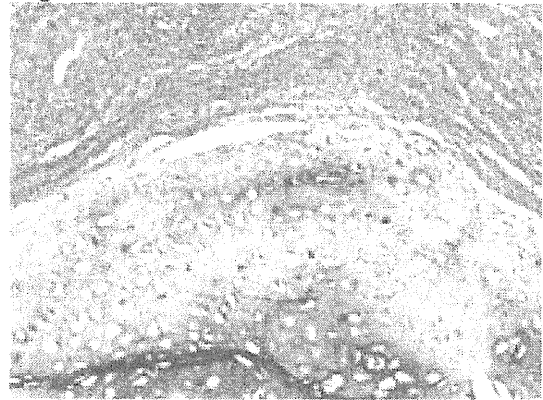


Fig.3c

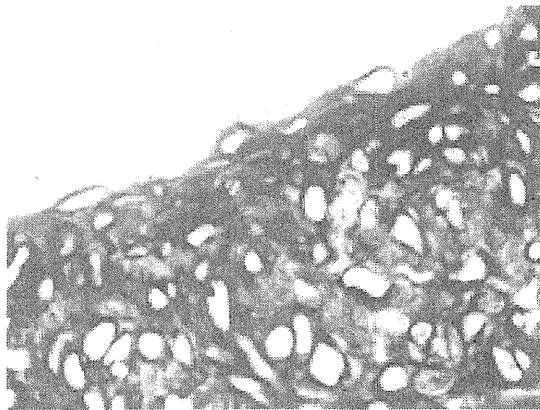


Fig.3d

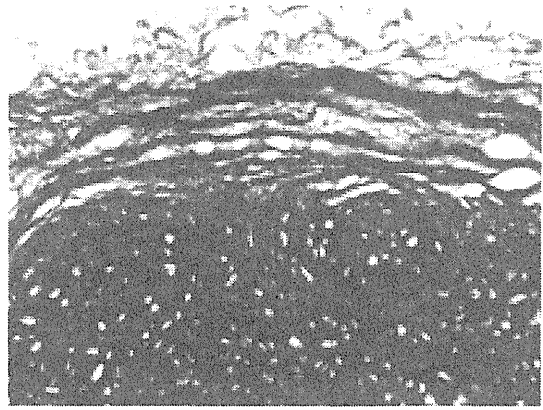


Fig.3e (Red : Collagen type I, Green : Collagen type II, Blue : Nucleus)

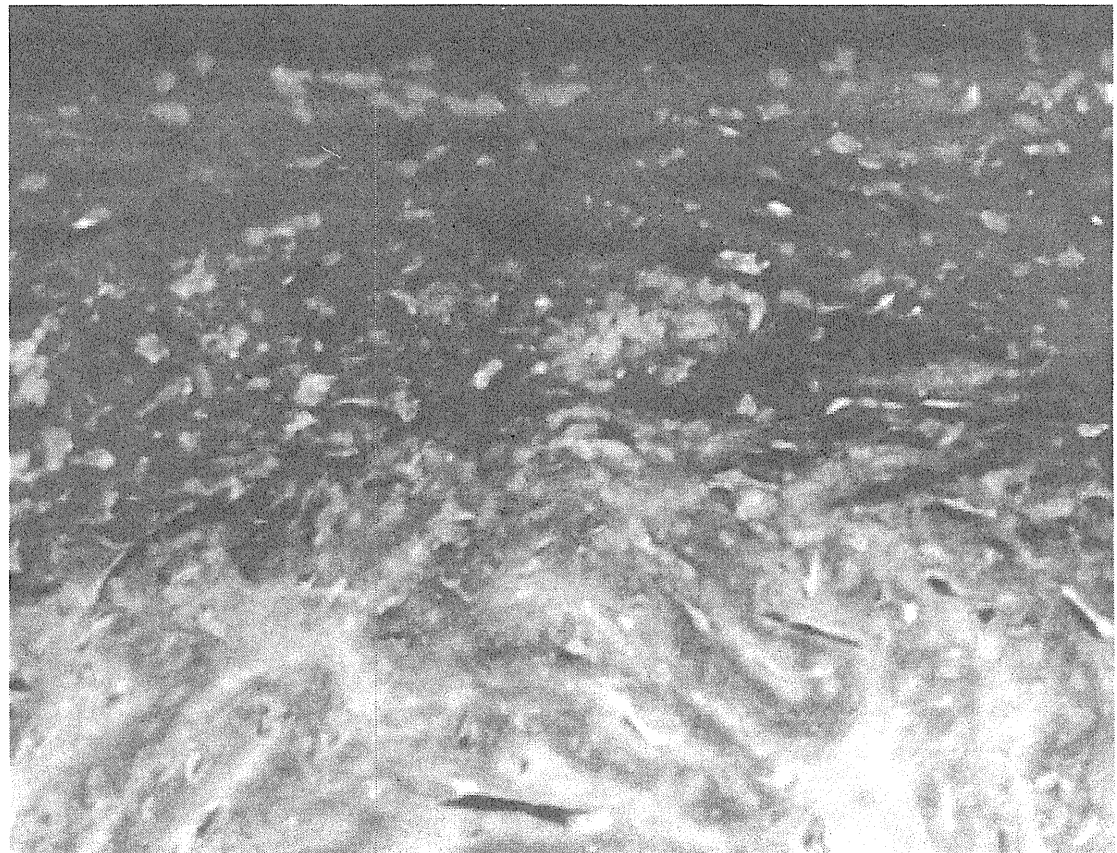


Fig.4a

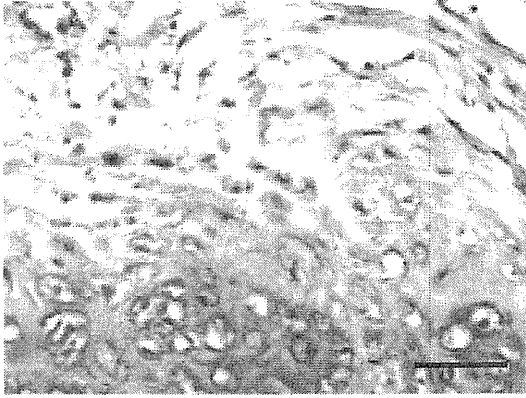


Fig.4b

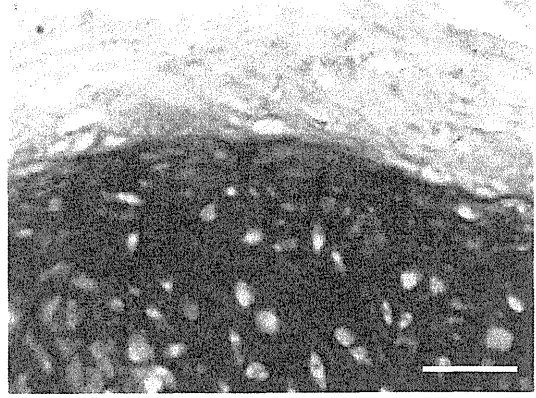


Fig.4c

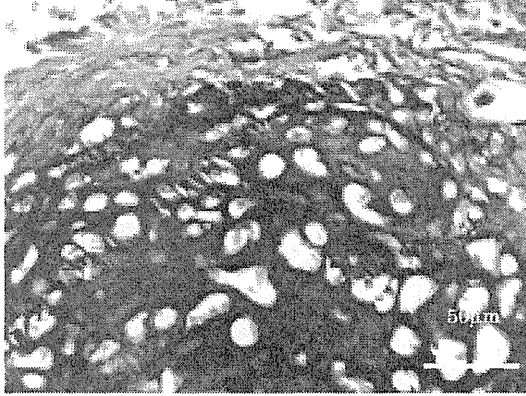


Fig.4d

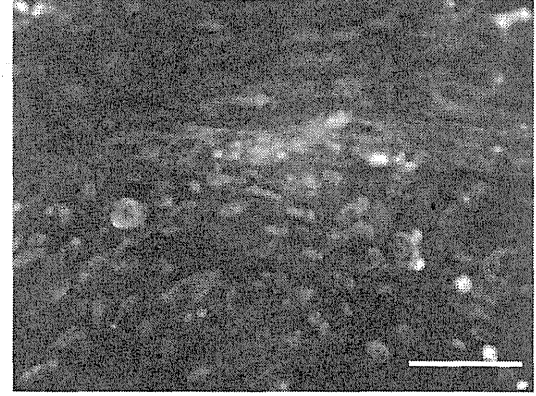
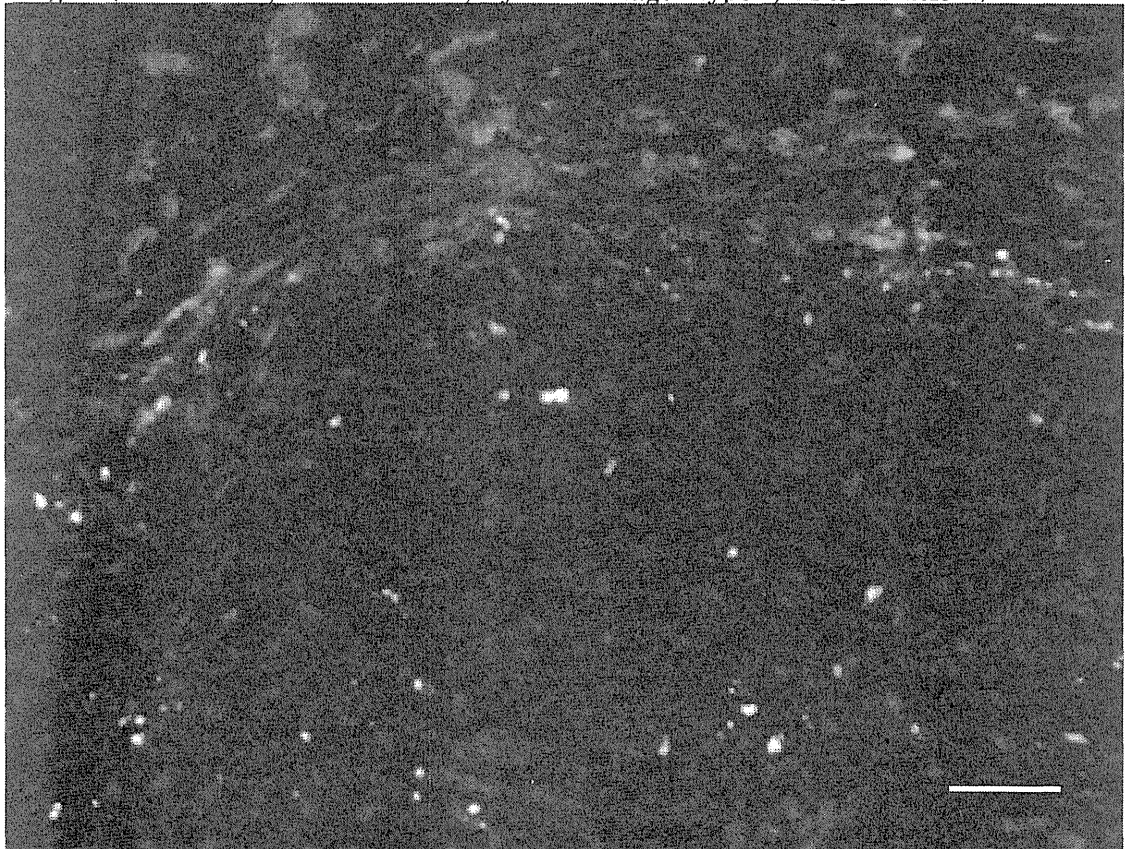


Fig.4e (Red : CD90, Green : CD44, Cyan : Collagen type I, Blue : Nucleus)



自己耳介由来軟骨前駆細胞を用いた再生医療の実施へ向けた  
GMP 準拠培養システム構築に関する研究

研究分担者

前川 二郎 横浜市立大学 形成外科学 教授

研究協力者

矢吹 雄一郎 横浜市立大学 形成外科学 医員

廣富 浩一 横浜市立大学 形成外科学 医員

鍵本 慎太郎 横浜市立大学 形成外科学 医員

研究要旨

我々は、院内に建設・設立された再生細胞治療センターにおいて、軟骨・軟骨膜由来細胞の培養技術を臨床応用することを目指している。それにあたり、Good Manufacturing Practice (以下 GMP) に準拠したプロトコールの作成とヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針に準じた研究計画書の作成が必要となる。そして現在、プロトコールの妥当性を示すための基礎実験とその文書化、研究計画書の作成を並行して行っている。

基礎実験としては、我々は最適な培養条件の検討を主に行っている。臨床研究においては非常に高い安全性が確保されなければならない。そのため、GMP グレードで製造された医薬品を液性因子として利用する手法を検証してきた。その際、培養期間が長期化してしまうことが問題となっていた。そこで、bFGF とインスリンを適正に用い、培養期間の短縮が可能となった。今後はそれによって作成した細胞群の組織再構築能を検証していく。

A. 研究目的

再生医学の概念は 1990 年代より広まり、その概念は定着して久しいと言える。しかしその一方で、現状で臨床応用に至っている技術はごく一部である。2009 年 11 月、本学附属病院は病院内に再生細胞治療センター (Cell Processing Center: 以下 CPC) を建設・設置を開始した。その後、2010 年 10 月頃より CPC 内の機材の試運転やシュミレーションテストなどを開始している。当院 CPC は同区画内に作業スペースを 2 ヲ所設計しており、それぞれ CP1 と CP2 としてい

る。CP1 にはクラス 100 の空気清浄度を保持できるアイソレーター (Cell Processing Work Station System; panasonic 社) を設置している。我々は、当 CPC とアイソレーターを利用し、軟骨・軟骨膜由来細胞の培養技術を臨床研究することを目指している。もちろん臨床研究を施行するためには非常に高い安全性が確保されなければならない、GMP に準拠したプロトコールの作成とヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針に準じた研究計画書の作成が必要となる。

本研究は、GMP に準拠し製造された医薬

品を液性因子として利用し、より安全性の高い培養法を確立することを目標のひとつとしている。軟骨細胞、軟骨前駆細胞の培養においては様々な液性因子や血清を用いた報告がある。我々が確立してきた培養法においても同様である。しかし、臨床研究にあたって、添加する液性因子の種類を最小限とし培養工程の手技を少しでも簡略化することで、安全性を高めようと考えている。液性因子の枯渇により、培養期間が長期化することは望ましくない。添加する液性因子の最適化が本研究の目的の一つである。

それに関連して、添加する血清も検討すべき点の一つと考えている。現時点ではウシ胎児血清を用いた培養法を採用しているが、長期的に考えると自家血清や無血清の培養法が望ましい。そこで、自家血清を用いた培養法の確立も目指している。

## B. 研究方法

### 1. ヒト耳介軟骨組織からの軟骨膜、軟骨組織の分離

横浜市立大学附属病院倫理委員会より承認を得て、小耳症患者より手術の際に余剰となる残存耳介弾性軟骨を供与頂き研究を遂行した。提供されたヒト耳介弾性軟骨は、軟骨膜組織、軟骨組織の間を実体顕微鏡下で鈍的に剥離した。

### 2. ヒト耳介軟骨膜細胞、軟骨細胞の初代培養および継代操作

実体顕微鏡下で軟骨膜部・軟骨実質部の2層に分離された組織を、剪刀やメスを用いて細切した。その後、0.2% Collagenase type II(SIGMA)に懸濁・振蕩し、基質を分解し細胞を分離した。各組織の細胞懸濁液は100  $\mu\text{m}$  の Cell Strainer(BD Falcon)で濾過し、遠心分離(1500 rpm, 4°C, 5 min)した。

上清を除去後、血清(濃度や種類は検討条件による)、1% Antibiotic Antimycotic Solution(SIGMA)を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium and Ham's F-12 Medium(SIGMA; 以下 D-MEM/F-12)で洗浄し、遠心分離(1500 rpm, 4°C, 5 min)を行った。この操作は2回繰り返して行った。各細胞は、35 mm イージーグリップ細胞培養ディッシュ(FALCON)に播種した。細胞は気相条件を37°C, CO<sub>2</sub>濃度5%に設定したインキュベーター内で培養を行った。

細胞の継代は、0.2% Collagenase type II (Worthington)を含有する D-MEM/F-12(SIGMA)を用いて行った。培地を除去したディッシュに上記の0.2% Collagenase 溶液を注入し、インキュベーター内で20~30分静置し、1% Antibiotic Antimycotic Solution(SIGMA)を添加した D-MEM/F-12(SIGMA)を加え、ピペティングし細胞を回収した。回収した細胞は遠心分離(1500 rpm, 4°C, 5 min)を行い、洗浄を行った後、ディッシュに播種し再び培養した。尚、播種濃度は1200 cells/cm<sup>2</sup>の密度としコンフルエントに達した際に同様に継代をするという操作を繰り返した。

### 3. 軟骨分化誘導と積層化培養

耳介軟骨膜細胞、軟骨細胞の軟骨分化誘導は分化誘導培地を用いることに加え、積層化培養によって強く分化誘導を行った。

軟骨細胞はin vitroにおける二次元培養により軟骨基質を産生する形質を失いやすいことが知られており、単層の細胞と三次元組織で形質に大きな差がある。成熟軟骨細胞はももとの形質である Collagen II 産生能を培養4継代後には失うという報告がされている。そのため、ゲルによる包埋培養やスキャフォールドを用いた三次元での培養・軟

骨分化誘導が試みられている。そこで本研究においても細胞を3層に積層化して培養・軟骨分化誘導を行った。各細胞を  $2.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> に調整し細胞培養ディッシュ (FALCON) に播種した。播種後2日間、10% 各種血清(種類は検討条件による)、1% Antibiotic Antimycotic Solution(SIGMA) を添加した D-MEM/F-12(SIGMA) で培養し、細胞の接着を促した後、軟骨分化誘導培地を用いて5日間培養した。

軟骨分化誘導培地は、1% Antibiotic Antimycotic Solution, L-ascorbic acid 2-phosphate(WAKO), Dexamethasone(SIGMA), Insuline Growth Factor I(SIGMA), basic Fibroblast Growth Factor(科研製薬) を含有する D-MEM/F-12(SIGMA) とし、血清は用いなかった。

軟骨分化誘導培地を用い7日間培養を行った後、別に用意した細胞を  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> に調整し、上から播種し積層化した。2層目を播種後、1層目と同様に2日間は10%各種血清(種類は検討条件による)、1% Antibiotic Antimycotic Solution(SIGMA) を添加した D-MEM/F-12(SIGMA) で培養を行い、その後軟骨分化誘導培地を用いて5日間培養を行った。この操作をもう一度繰り返し、計3層に重層化した。なお、細胞の培養はすべて、気相条件を 37°C, CO<sub>2</sub> 濃度 5% に設定したインキュベーター内で行った。

#### 4. 医薬品を用いた培養法の確立と、添加液性因子の最適化

前述の既に確立した培養法と異なり、臨床研究を念頭に入れて医薬品を用いた培地の検討を行った。

##### 4-1. 増殖培地における bFGF 含有濃度の検討

拡大培養に用いる増殖培地の組成は 10% の FBS と D-MEM/F-12(SIGMA) とした。それに Basic Fibroblast Growth Factor (フィブラストスプレー®; 科研製薬) の投与量によって条件を分け比較検討した。以前より確立してきた培養法においては、分化誘導培地において bFGF を 10 ng/ml 使用し、増殖培地においては bFGF を添加していなかった。本研究においては、10 ng/ml 前後で濃度条件を振って検討した。まず、1000 cells/cm<sup>2</sup> で 35 mm ディッシュへ播種し、拡大培養を 10 日間施行した。その後、Collagenase 処理し、それぞれの細胞数をカウントした。

##### 4-2. 分化培地におけるインスリンの検討

軟骨分化誘導を行う分化培地は、1% Antibiotic Antimycotic Solution, Ascorbic Acid(ビタミン C 注 10%PB®; 日新製薬), Dexamethasone(デキサート注射液®; 富士製薬工業株式会社), Basic Fibroblast Growth Factor(フィブラストスプレー®; 科研製薬) を含有する D-MEM/F-12(SIGMA) とした。それにインスリン(ヒューマリン R®; 日本イーライリリー) の添加の有無で比較検討した。

#### 5. 自家血清の調製

横浜市立大学附属病院倫理委員会より承認を得て耳介弾性軟骨を供与いただいた同一患者から血液を採取した。

まず当院では術前にスクリーニングとして全例血液検査を行っている。その際の血液検査所見において貧血傾向の有無を確認した。貧血傾向の無い症例のみ血清作成目的の採血を施行した。血液は全例、空腹時朝の血液を採取した。具体的には、まずは耳介形成術の麻酔導入の際に確保した末梢静脈路から採取を試みた。その末梢静脈路から十分採

血できないと判断した際は、即時その部位からの採血は中止し、全身麻酔導入後大腿動脈を 23G 針で穿刺し採血した。その際は血腫などの合併症を回避すべく十分圧迫止血した。止血が確認されたのちもガーゼとテープで軽度圧迫固定しながら術中に複数回穿刺部を直接観察し、確認した。また、採血量は体重に対し 1.0 ml/kg を越える採血は行わないようにした。

採取された血液は、本学先端医科学研究センターヒト組織プロセッシング室で処理した。まず、30 min 静置し、その後遠心分離 (2500 rpm, 4°C, 10 min) を行った。上清を分注し、血清とした。得られた血清は恒温槽を用いて 56°C の状態で 20 分間静置し、非動化した。その後、0.22  $\mu\text{m}$  フィルター (FALCON) で濾過し、4°C で保存した。

当院では小耳症において患側 1 耳に対し、耳介形成術と耳介挙上術の 2 期的な再建術を施行している。そのため、前述の方法に則り、条件を満たせば 2 回採血を施行した。

#### (倫理面への配慮)

前述検体の供与に関して、当院の倫理委員会の承認を得て施行した。また、患者へは目的と方法、および想定される合併症とその対処法を説明し、文章による同意を得た。さらに倫理面へ配慮し、研究への参加は個

人の意思を尊重した。得られたデータに関しても ID や氏名などの個人情報を含めず匿名化して行った。

## C. 研究成果

### 1. 医薬品を用いた培養法の確立と、添加液性因子の最適化

#### 1-1. 増殖培地における bFGF 含有濃度の検討

bFGF 含有濃度 50 ng/ml の培地において細胞数は最大となった (Fig.1)。ただし、定性的に観察すると細胞は小型化し、細胞質が減少するなど、形状の変化を認めた (Fig.2)。

#### 1-2. 分化培地におけるインスリンの検討

インスリンの使用によって、培養上清は速やかに粘稠性を生じた。

### 2. 自家血清含有培地による軟骨膜細胞の初代培養

まず、術前採血などで貧血傾向を認める症例は無く、2012 年度に手術施行した 8 症例中 7 症例において同意いただき検体を供与頂いた (Table.1)。ほぼ同一条件で採取し、同一手順で生成した血清にも関わらず、白濁したものや赤みがあったものなど認めた。

Fig.1 bFGF 含有濃度と播種後 10 日目における細胞数の検討

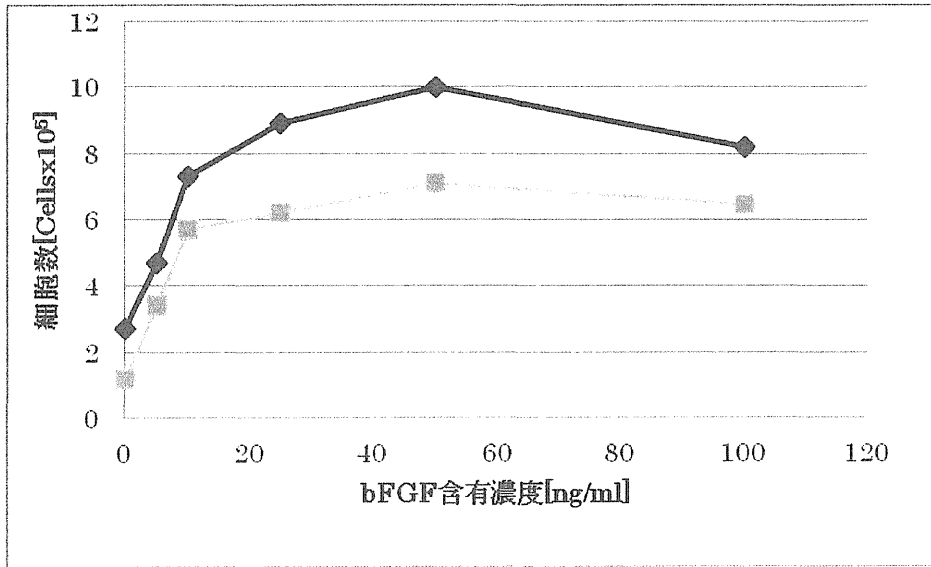
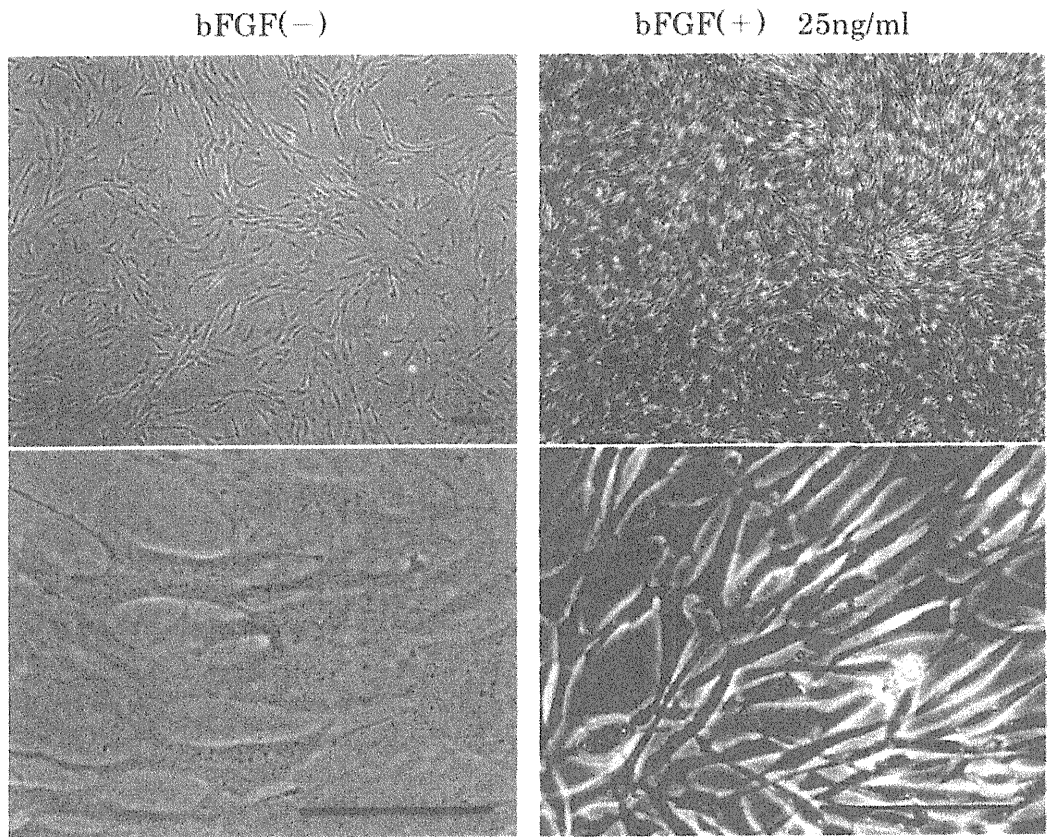


Fig.2 bFGF の添加による細胞数と形状の変化



Bars, 250 $\mu$ m

Table.1 平成 24 年 検体リスト, および血清生成量

No.	年齢	性	疾患	耳介形成術施行時		耳介挙上手術施行時	
				採血量[ml]	血清生成量[ml]	採血量[ml]	血清生成量[ml]
1	8	M	小耳症	30	12.5	40	21
2	10	F	小耳症	40	18	35	18
3	11	F	TCS*	40	22	40	22
4	10	M	小耳症	40	22	40	18
5	9	M	小耳症	40	20	—	—
6	9	F	小耳症	35	14	40	19
7	13	F	小耳症	40	20	40	21

\*TCS : トリーチャーコリンズ症候群



## D. 考察

我々はすでに、臨床応用に適した GMP グレードの血清(ウシ血清)や液性因子(bFGF, Insulin, L-ascorbic Acid, Dexamethasone 等)を用いて、(1)ヒト軟骨幹・前駆細胞の拡大培養、(2)ヒト軟骨幹・前駆細胞の分化誘導、を行うことに複数の臨床検体を用いて成功している。本研究は、これらの培養工程を標準化し、至適条件を決定することを目的としている。培養期間の短縮を目標として、拡大培養期間においても bFGF を用いる手法を検討したところ、bFGF の添加で良好な細胞増殖が得られた。今後症例数を重ね、細胞倍加時間など算出し、定量的に比較検討する必要があると考えているが、その一方で高濃度の bFGF は非効率的な分化誘導をきたしている可能性がある。我々は基本的には、十分に拡大培養しその後に液性因子と積層化培養によって効率的に軟骨分化誘導する手順でプロトコールを作成している。そのため、増殖培地としては多量の bFGF を添加しない方針で検討している。また、軟骨膜由来細胞群には軟骨前駆細胞が含まれる。これらの細胞群を過剰に分化誘導することは、前駆細胞の未分化性を損なう可能性がある。したがって、この点を検証するためには FACS などで未分化な細胞の population を計測するなどの検討が必要になってくると考えている。

一方、我々の従来の方法では軟骨分化誘導に research use のサイトカインや添加物を使用している。具体的には、IGF-1、アスコルビン酸や bFGF を用いている。それらの製品はある程度の滅菌性は得られているものの、GMP に準拠した製造法で製造していないものや、準拠していてもその保証ができないものが多い。一方、通常我々が診療で使用している医薬品は GMP に準拠した

方法で製造されており、滅菌性が高いため使用する試薬としては安全性の確保が比較的容易であると考えられる。しかし、その一方で溶媒や pH 調製剤が含まれているため、単純に置換することは難しい可能性もある。現時点では医薬品を用いた培地においても、軟骨分化を誘導することは可能であり、重症免疫不全マウスへの移植において組織再構築能も確認された。しかし、その一方で分化誘導がかかる期間が従来法と比較し長期であることが問題と考えている。医薬品に置換していないサイトカイン、サプリメントとしては、Insulin Like Growth Factor などがあった。本研究において、IGF-1 をインスリンに置換して実験を実施した所、定量的な解析は施行できていないが、培養上清の粘稠性が大幅に上昇した。我々はグリコサミノグリカンを始めとした水溶性基質の一部がこの粘稠性をもたらしていると考えている。今後、mRNA の定量的解析や、産生された細胞基質蛋白の定量を施行予定である。引き続き 検体数、特に成人例における軟骨検体数を増加させることにより、十分な解析を施行したいと考えている。

一方、上記のような GMP グレードの医薬品による培養技術が、自家移植モデルにおいて有効であるか否かを、移植床の環境がヒトに近似するサルを対象として検証することも想定している(添付文書①)。これにより、ヒトでの検証をさらに支持する知見を得ることができることに加え、作成された GMP 準拠プロトコールの検証モデルとして非常に有用性が高いと考える。

また、将来的に維持培養に用いる血清をウシ由来から自家血清化を目指している。同意の得られた患者より自家血清を採取しているが、現時点で大きな有害事象は生じていない。手技も安定し、ほぼヘマトクリット

を差し引いた量の血清が回収できる (Table.1). 採血量に関しては、術前採血検査を参考にしながら決定しているが、40 ml 程度採血したところで貧血をきたした症例は現時点では認めていない。今後は、採取された血清を用いて、自家血清含有培地使用群と FBS 含有培地使用群に分け、(1)細胞増殖能、(2)軟骨分化能、(3)組織再構築能、(4)多分化能の比較検討を行い、その例数を重ねる。

現在作成段階にある GMP 準拠プロトコールにおいて予定している品質試験は工程内試験と最終製品試験に分けられる。前者は、プロトコール内において、次の作業手順に移行するにあたっての判断材料として行われる。具体的には、位相差顕微鏡による観察や細胞数計測などを検討している。一方最終製品試験は培養細胞やそれらが産生された基質がヒト生体内へ投与するのに妥当かどうかの判断材料として行われる。具体的には、各種感染症の否定試験と移植細胞と産生基質のバリデーションである。

谷口分担研究グループの結果によって、我々が策定した GMP グレードの安全性の高い細胞調製法によって、培養を行った細胞は、無菌試験やマイコプラズマ試験等によって各種感染症を否定することができた。一方、このようなコンタミネーションは主に細菌など微生物に関するものとは別に、クロスコンタミネーションの可能性を低減することも極めて重要な課題として挙げられる。なぜならば、直接的には評価が難しいからである。臨床研究を施行する際の適応/除外基準として血清感染症の有無を挙げている。ゆえに、血清感染症を有する個体由来の細胞群を培養することは想定すべきではない。つまり、培養上清を用いた血清感染症の試験では、明らかなウィルス自体の混入や感染の既往のある個体からの血清の混入といっ

た、いわばアイソレーター内では生じ難いコンタミネーションの否定しかできない。そのため、我々は臨床研究の初期段階としては、同一期間内に複数の個体を扱うことは想定していない。評価困難なコンタミネーションは、そのリスクを最大限に低減する必要がある。評価可能な項目と評価困難な項目を知り、後者に関してはプロトコールや環境試験などのソフト面とアイソレーターをはじめとしたハード面で対応していくことの重要性を再確認した。

その一方で、今回の検査結果によってアイソレーターを用いた培養法の高い滅菌性を実証することができた。一般的な培養においては、培地に抗菌薬を添加することが多い。しかし、抗菌薬を添加しなければコンタミネーションを起こしてしまうようなプロトコールでは臨床研究、少なくとも臨床応用は不可能と考える。そのため、我々が作成しているプロトコールにおいては抗菌薬の添加は予定していない。そして、そのプロトコールに準じて製造した培養細胞には微生物のコンタミネーションが無かったことが確認されている。実際に臨床研究する際には、この滅菌性を環境試験で評価しながら行うことになる。尚、各種試験は各部署の責任者による証明とその記録を保管する。

現在、アイソレーターなどハード面を運用、管理する文書は概ね完成している。その他、最終製品試験、工程内試験、環境試験に限らず、プロトコール自体の文書化を開始している(添付文書、製品標準書部分抜粋)。今後はバリデーション法など確立し、製品標準書と製造指図書、標準作業手順書、実施計画書を作成し厚生労働省へ申請していく。

## E. 結論

我々は、当院に建設・設立された再生細胞治療センターにおいて、軟骨・軟骨膜由来細胞の培養技術を臨床応用することを目指している。それにあたり、GMPに準拠したプロトコールの作成と厚生労働省への申請、プロトコールの妥当性を示すための基礎実験を施行中である。現在、安全性の高いプロトコールを目標としているため、液性因子として医薬品を使用した培地の検証を行っており、bFGFとインスリンを用いて培養期間の大幅な短縮が可能となった。今後は、そのプロトコールに従って生成される中間産物と最終産物の評価法を検証・確立していく。また、中動物を用いて同様の検証を行うと同時に、個体差の検証や安全性の確認を行っていく。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Maegawa J, Yabuki Y, Tomoeda H, Hosono M, Yasumura K. Outcomes of lymphaticovenous side-to-end anastomosis in peripheral lymphedema. *J Vasc Surg*. 2012 Mar; 55(3): 753-60.
2. Maegawa J, Hosono M, Tomoeda H, Tosaki A, Kobayashi S, Iwai T. Net effect of lymphaticovenous anastomosis on volume reduction of peripheral lymphoedema after complex decongestive physiotherapy. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2012; 43: 602-608.
3. Maegawa J, Kobayashi S, Yabuki Y, Hirotsu K, Yasumura K, Iwai T. Blepharoplasty in senile blepharoptosis: preoperative measurements and design for skin excision. *Aesthet Surg J*. 2012 May 1;32(4): 441-6.
4. Iwai T, Aoki N, Yamashita Y, Omura S, Matsui Y, Maegawa J, Tohnai I. Endoscopic removal of bilateral supernumerary intranasal teeth. *J Oral Maxillofac Surg*. 2012 May; 70(5): 1030-4.
5. Yasumura K, Mikami T, Yabuki Y, Ooishi K, Hosono M, Yamamoto Y, Iwai T, Maegawa J. Transzygomatic Kirschner wire fixation for the treatment of blowout fracture. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2012; 65: 875-82.
6. Iwai T, Tohnai I, Yasumura K, Maegawa J. Role of 3-Dimensional CT Angiography for Vascular Assessment. *J Craniofac Surg*. 2012 Jul; 23(4): 1223-4.
7. Mikami T, Maegawa J, Kuroda M, Yamamoto Y, Yasumura K. Subacute phase treatment of subperiosteal hematoma of the orbit with epidural hematoma in the frontal cranial fossa: Case report. *BMC Ophthalmol*. 2012; 12: 18.
8. Iwai T, Izumi T, Inoue T, Maegawa J, Fuwa N, Mitsudo K, Tohnai I. Occipital artery arising from the anterior aspect of the internal carotid artery identified

by three-dimensional computed tomography angiography. *Iran J Radiol.* 2012 Jun; 9(2): 103-5.

9. Hata M, Koike I, Maegawa J, Kaneko A, Odagiri K, Kasuya T, Minagawa Y, Kaizu H, Mukai Y, Inoue T. Radiation therapy for primary carcinoma of the eyelid: tumor control and visual function. *Strahlenther Onkol.* 2012 Dec; 188(12): 1102-7.
10. Iwai T, Baba J, Murata S, Mitsudo K, Maegawa J, Nagahama K, Tohnai I. Warthin tumor arising from the minor salivary gland. *J Craniofac*

*Surg.* 2012 Sep; 23(5): e374-6.

## 2. 学会発表

1. 矢吹雄一郎, 小林 眞司, 水野満, 廣富 浩一, 安村 和則, 武部貴則, 前川二郎, 谷口英樹: ヒト耳介軟骨幹/前駆細胞における自家血清培養法の検証, 第 55 回日本形成外科学会・基礎学術集会, 福島, 2012, Oct

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

添付文書① 免疫動物種における軟骨幹前駆細胞の組織再構築能の検証(素案)

実験計画書

新規 変更・更

提出年月日 年 月 日 受付年月日 年 月 日 受付番号

研究課題	軟骨幹前駆細胞移植による弾性軟骨再構築の検討	研究番号	
------	------------------------	------	--

	氏名 (フリガナ)	所属	職	連絡先 (Tel)	e-mail address
動物実験責任者	前川 二郎 (マエガワ ジロウ)	形成外科	教授		

実験実施期間						
飼養保管施設及び実験室	保管施設 (部屋番号)	実験室				
	動物種	系統	実験使用予定匹数	繁殖の有無	入手先	総使用匹数
	サル	カニクイザル	9匹	無		9匹

特殊実験区分 (該当項目を全て <input checked="" type="checkbox"/> )	<input type="checkbox"/>	1. 感染実験 安全区分: <input type="checkbox"/> BSL1 <input type="checkbox"/> BSL2 <input type="checkbox"/> BSL3				
	<input type="checkbox"/>	2. 遺伝子組み換え動物使用実験 区分: <input type="checkbox"/> P1A <input type="checkbox"/> P2A <input type="checkbox"/> P3A				
	<input type="checkbox"/>	3. 放射線同位元素・放射線使用実験				
	<input type="checkbox"/>	4. 化学発癌・重金属実験				
動物実験の種類 (選択項目を <input checked="" type="checkbox"/> )	<input checked="" type="checkbox"/>	1. 試験・研究	動物実験を必要とする理由	<input checked="" type="checkbox"/>	1. 検討したが、動物実験に代わる手段がない。	
	<input type="checkbox"/>	2. 教育・訓練		<input type="checkbox"/>	2. 検討した代替手段の精度が不十分だった。	
	<input type="checkbox"/>	3. その他	(選択項目を <input checked="" type="checkbox"/> )	<input type="checkbox"/>	3. その他 ( )	

想定される苦痛のカテゴリー (選択項目を <input checked="" type="checkbox"/> )	<input type="checkbox"/>	B. 脊椎動物を用い、動物に対してほとんど、あるいはまったく不快感を与えないと思われる実験。
	<input checked="" type="checkbox"/>	C. 脊椎動物を用い、動物に対して軽度のストレスまたは痛み(短時間持続する)を伴うと思われる実験。
	<input type="checkbox"/>	D. 脊椎動物を用い、回避できない重度のストレスまたは痛み(長時間持続する)を伴うと思われる実験。
	<input type="checkbox"/>	E. 無麻酔下の脊椎動物に、耐えうる限界に近い、またはそれ以上の痛みを伴うと思われる実験。
	<input type="checkbox"/>	1. 短時間の保定・拘束および注射など、軽微な苦痛の範囲であり、特に処置を講ずる

添付文書①・2 免疫動物種における軟骨幹前駆細胞の組織再構築能の検証(素案)

<p>動物の苦痛軽減、 排除の方法 (該当項目を全て■)</p>	<p><input type="checkbox"/> 必要はない。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 2. 科学上の目的を損なわない苦痛軽減措置は存在せず、処置できない。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 3. 麻酔薬・鎮痛剤等を使用する。(具体的薬剤名・投与量・投与経路を記入)： ・麻酔前処置：ミダゾラム(0.3 mg/kg, s.c.)，レペタン(0.01 mg/kg, i.v.)，ブピパカイン(0.25%, s.c.)，プロポフォール(0.5 mg～3.5 mg/kg, i.v.) ・麻酔処置：イソフルラン(0.1%～2%，気管挿管) ・術後鎮痛処置：レペタン(0.01 mg/kg, i.v.) ・感染予防処置：セファゾリン(10～30 mg/kg, i.v)</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 4. 動物が耐えがたい痛みを伴う場合、適切な時期に安楽死など人道的エンドポイントを考慮する。</p> <p>摂餌・摂水困難，苦悶の症状（自傷行動，異常な姿勢，呼吸障害，鳴き声など），回復の兆しが見られない長期の外見異常（下痢，出血，外陰部の汚れなど），急激な体重減少（数日間で 20%以上），腫瘍のサイズの著しい増大（体重の 10%以上）などで判断する。</p> <p>※平成 23 年度に共同研究者実施研究の 11-126 では術後 1 日のみ出血等が認められたが投薬を行い感染予防／疼痛管理を実施し，それ以降の長期の出血は認められなかった。同様の軟骨膜由来組織の移植はマウス及びイヌ（ビーグル）に対して行っているが，上記の様な耐え難い痛みや苦痛を訴える症状・兆候は認めず，移植部の腫瘍化も認めていない（移植より 3 ヶ月後に摘出し病理所見にて確認）。</p>
<p>安楽死の方法 (該当項目を全て■)</p>	<p><input type="checkbox"/> 1. 麻酔薬等の使用(具体的薬剤名・投与量・経路：ネブタール極量以上(60-120mg/kg)を急速静注)</p> <p><input type="checkbox"/> 2. 炭酸ガス</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 3. 中枢破壊(具体的に記入： 法, 理由 )</p> <p><input type="checkbox"/> 4. 安楽死させない(その理由： 実験施設に委託の為 )</p>
<p>動物の死体の処理 (選択項目を■)</p>	<p><input type="checkbox"/> 1. 大学内で焼却</p> <p><input type="checkbox"/> 2. 動物実験施設に委託</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 3. その他(具体的に記入： 実験施設に委託)</p>
<p>その他必要 または参考事項</p>	<p>(過去の動物実験計画書承認実績，学内の関連委員会への申請状況，動物実験に際して動物実験施設に持ち込む機器，飼養保管施設・実験室の承認状況などを記入する)</p> <p>ヒト軟骨細胞を用いた動物実験計画書承認実績あり。平成 22 年度受付番号：10-32，平成 23 年度受付番号：11-68</p> <p>イヌ軟骨細胞を用いた自家移植での実験計画書承認実績あり。平成 23 年度受付番号：11-126</p>

実験目的：

サル自家耳介軟骨膜/軟骨細胞の移植による軟骨再構築を検討する。

ヒトにおける自家耳介軟骨膜/軟骨細胞による組織欠損部（先天性および外傷性による）の治療を最終的な目的とした研究である。現在，対象疾患の組織欠損部の治療は侵襲の大きな肋軟骨や腸骨採取にて行われている。この研究によって少量採取した耳介軟骨膜・軟骨細胞から必要な大きさの軟骨を培養し使用することが可能になれば，患者の負担は劇的に軽減されると考えている。

実験の概要（研究計画と方法について，その概要を記入する）：

### 添付文書①-3 免疫動物種における軟骨幹前駆細胞の組織再構築能の検証(素案)

サルより採取した耳介軟骨膜/軟骨細胞を培養・分化誘導し、同個体のサル（頬部、背部、腹部）に移植することでヒト耳介軟骨再生モデルの臨床前試験を行う。コントロールとして骨髄由来間葉系幹細胞を採取し、移植を行う。本研究は、ヒト軟骨細胞の NOD/SCID マウスへの移植実験の発展的検証実験であり、マウスと比較してより大きく、移植床がヒトに近い組織構造と組織緊張を持つ動物で検証を行う、臨床前試験としての位置づけである。

実験方法（動物に加える処置、使用動物数の根拠を具体的に記入し、「想定される苦痛のカテゴリー」や「動物の苦痛軽減・排除方法」等と整合性を持たせる。）

マウスへのヒト軟骨細胞移植、イヌ（ビーグル種）への自家軟骨細胞移植実験をふまえた、ヒトへの臨床試験を行う前試験としての実験である。統計学的なデータ採取を目的としないため、軟骨構築の確認と腫瘍化の有無など安全性確認のための最少限として年度あたりの使用頭数を 3 とし、3 年間で合計 9 頭とした。

具体的な実験方法は以下のごとくである。

外科的処置では鎮痛を考慮し、実験動物への負担を最大限軽減させた麻酔処置を行う。詳細な麻酔プロトコルは以下の通りである。麻酔前処置：鎮静薬としてミダゾラム(0.3 mg/kg, s.c.)、鎮痛薬としてレペタン(0.01 mg/kg, i.v.)、局所鎮痛薬としてブピパカイン(0.25%, s.c.)、麻酔導入薬としてプロポフォール(0.5 mg～3.5 mg/kg, i.v.)。麻酔がかかったら、サルに気管挿管を行い、イソフルラン(0.1%～2%)で麻酔状態の維持を行う。軟骨膜及び軟骨を採取する耳介の皮膚及び皮下組織には、局所浸潤麻酔薬として 1%キシロカインの局所注射を左右各 5 ml ずつ行う。術後鎮痛処置としてレペタン(0.01 mg/kg, i.v.)、感染予防処置としてセファゾリン Na(10～30 mg/kg)静脈内投与を行う。

麻酔下で、サルより両側耳介軟骨を 20x10 mm 摘出し、摘出後の創に対して縫合処置を行う。摘出した耳介軟骨より軟骨細胞を分離する。同様に、骨髄由来間葉系幹細胞をコントロールとして骨髄穿刺針(14G)を使用し、腸骨より 5 ml 程度採取する。

採取した軟骨膜・軟骨細胞を横浜市立大学医学部の研究室に持ち帰り、細胞を培養・分化誘導させ(約 6～8 週間)たのち、実験施設へ搬送し、同個体のサルの皮下（頬部、背部、腹部）へ移植を行う。この時の麻酔は前述の軟骨採取時と同様に全身麻酔と局所麻酔を併用して行う。移植から約 3 ヶ月後に同様の麻酔下で検体の摘出を行う。摘出後のサルは実験施設の規定に則って、返却されるか他研究者へ譲渡される。

皮下移植（方法は次の 2 つ）：

- ①皮膚を切開し皮下へ細胞移植を行う。創部は縫合処置を行う。
- ②培養した細胞を、18G 針をつけたシリンジに移し皮下に注射移植する

検体の採取（移植から約 3 ヶ月後に摘出を行う。）：

移植部を皮膚切開して周囲の癒痕組織を含めて検体を摘出する。創部は縫合処置を行う。

採取した検体については、横浜市立大学医学部の研究室に持ち帰り、病理・免疫学的検査等にて軟骨細胞・基質の同定、軟骨形成量の算定、形態の確認、腫瘍化の有無の確認を行う。

# 軟骨・軟骨膜細胞療法 製品標準書

制定：2xxx年 mm 月 dd 日

承認	確認	作成

横浜市立大学附属病院

形成外科

Yokohama City University Hospital

Plastic and Reconstructive Surgery



## 添付文書②-2 製品標準書(抜粋)

### 諸言

自家軟骨・軟骨膜細胞の名称、剤型等は下記の通りである。

一般名称	軟骨・軟骨膜細胞
原材料摘出場所名	公立大学法人横浜市立大学附属病院
製剤処理場所名	公立大学法人横浜市立大学附属病院 細胞調製センター
剤型	軟骨・軟骨膜細胞群
投与経路	皮下に細胞群を直接注入し移植する
適応症	外傷性高度顔面変形、先天性顔面変形

現在, Tissue Engineering を基礎とした培養再生軟骨や間葉系幹細胞を用いた椎間板再生の研究がなされており, それぞれ臨床応用されつつある。そして, 培養再生軟骨は先天性頭蓋顎顔面奇形や外傷性高度顔面変形などへの臨床応用も期待されている。従来, 小耳症などの先天性組織欠損や外傷性陥凹変形に対し, 耳介形成術に代表されるような肋軟骨による再建術や腸骨や筋膜, 真皮脂肪組織などの移植がなされてきた。しかし, 再建材料を得るためには組織採取を必要とし, 時としてその侵襲の強さが問題となる。また, 再建された組織の長期形態維持性が不安定であることや組織採取量に制限があることなどが克服しがたい臨床的課題であった。

こういった問題を解決するべく, 軟骨細胞へ分化しうる幹細胞に関する研究が広く行われている。われわれは, ヒト耳介軟骨膜細胞中に軟骨幹/前駆細胞を同定し, その臨床応用を目指している。軟骨幹/前駆細胞を用いることの利点は大きく分けて2点挙げられる。まず一つ目として, 軟骨膜の再構築にある。われわれの先行実験では軟骨膜細胞の移植実験において, 軟骨細胞のみのもものと比較すると Collagen type I で染色される軟骨膜様組織が再構築されており, その部位に軟骨幹/前駆細胞が再分布していることが分かっている。臨床的には軟骨膜を含めた自家軟骨移植の方が軟骨膜を含めないものより長期形態維持能が高いと言われており, 軟骨幹/前駆細胞が含まれる軟骨膜様組織も同様であると期待している。二つ目の利点としては, 軟骨以外への分化の可能性にある。間葉系幹細胞や脂肪組織幹細胞は以前より軟骨分化を含めた多分化能が報告されており, 特に間葉系幹細胞は椎間板再生や関節軟骨再構築に関して臨床応用が試みられている。しかしその一方で, 多分化能のために予期せぬ骨分化や脂肪分化をきたす可能性と危険性は回避できない。その一方, 軟骨幹/前駆細胞は多分化能がわれわれの先行研究で確認されているものの, 間葉系幹細胞などからはいわゆる下流の細胞であり, 軟骨分化へある程度特化していると想像される。そのため, その他の幹細胞を用いる場合と比べると骨分化や脂肪分化の可能性より低く, より安全であると想定している。

## 添付文書②-3 製品標準書(抜粋)

### 2.3.S 原葉

#### 2.3.S.1 一般情報

##### 2.3.S.1.1 名称

1. INN 該当なし
2. 化学名 該当なし
3. 会社または研究所コード  
公立大学法人横浜市立大学附属病院
4. 一般名称(JAN)  
一般名称  
(日本名) 該当なし (英名)  
化学名または本質  
(日本名) 自家軟骨・軟骨膜由来細胞  
(英名) autologous perichondrocyte / chondrocyte
5. CAS 登録番号  
該当する CAS 番号なし

##### 2.3.S.1.2 構造

自家軟骨・軟骨膜から分離した細胞からなる軟骨・軟骨膜細胞群である。

1. 化学構造 自家由来の間葉系細胞群であり、化学構造での表現は適さない。
2. 分子式 自家由来の間葉系細胞群であり、分子式での表現は適さない。
3. 質量 自家由来の細胞群であり、細胞数としては〇〇～〇〇個である。  
基質は\*\*\*～\*\*\* $\mu\text{g}$ 程度含有している。  
ドナー固有の特性があり、総質量は一定ではない。

##### 2.3.S.1.3 一般特性

生体外において、軟骨分化誘導がかかった軟骨由来細胞群は軟骨基質産生を行う。同様に、その細胞群を生体内へ移植後も軟骨基質を産生し、弾性軟骨組織を再構築する。

一方、軟骨膜由来細胞群には高い増殖能と多分化能を有する間葉系幹細胞が含まれている。生体外で軟骨分化誘導をかけた軟骨膜由来細胞は軟骨由来細胞と同様に生体内外で軟骨基質産生を行い、生体内では軟骨膜を伴った弾性軟骨組織を再構築する。

1. 性状 自家耳介軟骨、軟骨膜由来の細胞群を拡大培養したもの。
2. 構造 自家軟骨・軟骨膜由来の細胞群  
細胞数：  
その他の細胞成分：約 0%

## 添付文書②-4 製品標準書(抜粋)

### 2.3.S.4. 原薬の管理

#### 2.3.S.4.1 規格および試験法

##### 最終製品試験

最終製品の品質試験は下記表のとおりとする。

一部の試験を外部委託するが、委託先である\*\*\*社は、本大学に実績がある臨床検査会社であり、医薬品試験部門を所有している。無菌検査、マイコプラズマ検査、エンドトキシン検査等の GMP グレードの試験の実績は十分であり、かつ査察等および成績証明書・試験管理記録書等を精査して、その信頼性を担保している。

表：最終製品試験

試験項目	試験方法	規格
無菌試験	培養法 (JP16)	否定されること
マイコプラズマ試験	PCR 法または DNA 染色法	否定されること
エンドトキシン試験	ゲル化法 (JP16)	***EU
グリコサミノグリカン 測定試験	比色定量法	1.0~1.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上

本製品は、完成時に即投与となるため、日数のかかる試験は事前にサンプリングして試験を実施する。

無菌試験は 2 週間前に試験を開始する。その他の試験は日数に余裕をもってサンプリング及び試験を実施する。なお出荷前の製品も無菌試験を実施し、その試験結果を製品のバッチレコードに添付しておく。

##### 工程内試験

工程内試験は、細胞数の計測、位相差顕微鏡による細胞の観察、および表面抗原の確認である。表面抗原の観察は分化培養で行われ、分化しているかどうかの評価が行われる。顕微鏡（細胞観察モジュール）による観察での判断はベテラン作業員によってダブルチェックで行われバリデーションは取れているが、結果に疑義がある場合は製造管理責任者および品質管理責任者と協議の上その結果を評価する。評価前に次工程に進んではならない。

工程内試験の内容を下記表にまとめた。

添付文書②-5 製品標準書(抜粋)

表：工程内試験

試験項目	工程	試験方法	規格
細胞数計測	継代培養工程など	細胞観察モジュール 下での数取器による 目視計測	必要細胞数（生細胞） が確認できること
細胞観察	増殖培養工程、 分化培養工程、 積層化培養工程、 など	細胞観察モジュール による観察	●細胞が生着していること。 ●異物の混入がないこと。 ●コンフルーエント率の確認
分化の確認	分化培養工程	FACS 法 (表面抗原測定)	M 細胞の場合、 ●CD44 が陽性 ●CD90 が陽性 C 細胞の場合 ●CD44 が陰性 ●CD90 が陰性

環境試験

作業時の無菌環境を担保する環境試験は以下の通り実施する。

詳細については、衛生管理基準書および関連 SOP を参照のこと。

規格値はすべて調製作業中の値である。

A,C は日本薬局方（JP16）に記載されている清浄度のグレードである。

表：環境試験

	試験項目	試験法	規格
A	落下菌測定	培養法	JP16 : CFU < 1
	付着菌測定		
	0.5µm 粒子測定	光学測定	JP16 : 100 個/Feet <sup>3</sup> 以下
C	浮遊菌測定	培養法	JP16 : CFU < 100
	付着菌測定		JP16 : CFU < 25
	0.5µm 粒子測定	光学測定	JP16 : 100,000 個/Feet <sup>3</sup> 以下