

- saccharides without removal of excess reagents, *Electrophoresis*, 2013, 34, 3198–3205 566)
9. Kinoshita M, Mitsui Y, Kako N, Yamada K, Hayakawa T, Kakehi K.: Common Glycoproteins Expressing Polylactosamine-Type Glycans on Matched Patient Primary and Metastatic Melanoma Cells Show Different Glycan Profiles. *J Proteome Res.* 2013 Dec 26. [Epub ahead of print] PMID: 24354860 [PubMed - as supplied by publisher].
 10. Moriyama H, Moriyama M, Isshi H, Ishihara S, Okura H, Ichinose A, Ozawa T, Matsuyama A and Hayakawa T.: Role of Notch signaling in the maintenance of human mesenchymal stem cells under hypoxic conditions. *STEM CELLS & DEV* (2014) in press.
 11. 森山博由, 森山麻里子, 早川堯夫. 『ヒト脂肪由来間葉系幹細胞における効率的かつ厳密に発現制御可能なレンチウイルス発現システムの構築』 Sept, 18, 2013. *BioMed circus*).
2. 学会発表
 - 【松山晃文】
 - 1. 再生医療が拓く明日へー研究者の想いと産業界への願いー・松山晃文・東西合同薬事法規（研究）委員会・6月21日
 - 2. 高度医療とトランスレーショナルリサーチの実際・松山晃文・東大CRC講習会・6月27日
 - 3. 再生医療についての行政の取り組み・松山晃文・最高裁 再生医療研究会・7月3日
 - 4. iPS 細胞を用いた再生医療の現状と展望・松山晃文・DDS学会・7月4日
 - 5. 再生医療研究と試薬・松山晃文・日本試薬協会講演会・7月9日
 - 6. 再生医療の動向・松山晃文・再生医療と法研究会・8月1日
 - 7. iPS 細胞で日本は21世紀の世界を切り拓く・松山晃文・経営道場・8月31日
 - 8. 再生医療の動向・松山晃文・厚労省全国薬務主管課長会議・9月20日
 - 9. 再生細胞治療と培地・松山晃文・FIRM講演会・9月26日
 - 10. 非臨床試験 package の提案・松山晃文・MCP 策定会議・10月4日
 - 11. "Development of Regenerative Medicinal Products—From Bench—"・松山晃文・DIA 日本年会・11月7日
 - 12. 臨床薬理に期待すること—再生医療一介の研究者として—・松山晃文・第34回臨床薬理学会学術総会・12月6日
 - 13. 再生医療の倫理と規制 (2)・松山晃文・東京大学生命倫理講習会・12月12日
 - 14. 臨床研究編臨床応用のためのiPS/ES/体性幹細胞の培養について・松山晃文・第10回医薬品RS

フォーラム・12月14日

15. 再生医療の動向・松山晃文・東京都薬事監視員協議会・1月29日
16. アカデミアによる開発戦略「再生医療法制定下の医療技術開発」・松山晃文・国立大学附属病院臨床研究推進会議 第2回総会シンポジウム・2月7日
17. 幹・前駆細胞の品質管理・松山晃文・3月4日
18. 再生医療とレギュラトリーサイエンスー品質管理の観点からー・松山晃文・第13回日本再生医療学会総会 ランチョンセミナー・3月4日
19. “Proposal of the preclinical safety study-pack age for the cell therapy products”・松山晃文・IABS-JST Joint symposium・3月7日
20. ヒト ES/iPS 細胞由来細胞製剤の品質管理・松山晃文・慶応義塾大学生命倫理講習会・3月26日

【早川堯夫】

1. 早川堯夫：再生医療製品・遺伝子治療薬等の品質評価の上での科学的妥当性とは. 第10回医薬品レギュラトリーサイエンスフォーラム (基調講演), 東京 (2013.12.12)
2. 木下充弘、三ツ井洋介、原沙也香、山田佳太、早川堯夫、掛樋一晃：ヒトメラノーマ細胞のグライコフォームフォーカストプロテオミクス, 2013年8月 第32回日本糖質学会年会 (2013.8.)
3. 神末和哉、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃：シーストレスインターフ

ェースを備えた CE-ESI-MS による糖タンパク質分析とその応用.

2013年11月 第33回キャピラリー電気泳動シンポジウム (2013.11.)

4. 木下充弘、鈴木茂生、早川堯夫、掛樋一晃：レーザー回折法を用いる Sub-visible 領域タンパク質凝集体の解析. 第134年回日本薬学会年会 (2014.3.)
5. 岩本裕貴、安井裕太郎、岩塚欣也、鈴木茂生、早川堯夫、掛樋一晃：ウサギ角膜上皮細胞の糖鎖生合成に対する外的物理的ストレスの影響 (2014.3.)
6. 桑原侑己、東江直樹、瀧川義浩、早川堯夫、角谷晃司：カンゾウ (*Glycyrrhiza glabra* L.) のフラボノイド系ポリフェノール配糖化酵素遺伝子の単離と解析日本農芸化学会 2013 年度大会 (仙台 口頭), 2013.3.
7. 森川敏生、二宮清文、李 雪征、西田枝里子、山下千裕、山田友視、松田久司、中村誠宏、吉川雅之、早川堯夫、村岡 修：デイジーフラワー (*Bellis perennis*, 花部) 成分の脂質代謝改善作用. 日本農芸化学会 2013 年度大会 (仙台), 2013.3.
8. 高森康暢、森川敏生、二宮清文、李 雪征、西田枝里子、松田久司、中村誠宏、吉川雅之、早川堯夫、村岡 修：デイジーフラワー (*Bellis perennis*, 花部) 成分のコラーゲン産生促進作用. 日本農芸化学会 2013 年度大会 (仙台), 2013.3.
9. 中西勇介、森川敏生、二宮清文、松田久司、中嶋聡一、三木尚子、宮下 優、吉川雅之、早川堯夫、村岡 修：漢薬 蠟梅花 (*Chimonanthus praecox*, 花部) の

- メラニン産生抑制活性成分. 日本農芸化学会 2013 年度大会(仙台), 2013.3.
10. 二宮清文, 高森康暢, 沖野健二, 王立波, 中村誠宏, 松田久司, 呉立軍, 早川堯夫, 吉川雅之, 村岡修, 森川敏生: エバーラストティングフラワー (*Helichrysum arenarium*, 花部) の機能性成分 (5) -含有フラボノイドのコラーゲン産生促進活性-. 日本薬学会第 133 年会 (横浜) 2013.3.
 11. 二宮清文, 松本友里恵, 柿原なみ子, 赤木淳二, 王立波, 中村誠宏, 松田久司, 呉立軍, 早川堯夫, 吉川雅之, 村岡修, 森川敏生: エバーラストティングフラワー (*Helichrysum arenarium*, 花部) の機能性成分 (6) -含有フラボノイドの DPP-4 阻害活性-. 日本薬学会第 133 年会 (横浜) 2013.3.
 12. 森川敏生, 中西勇介, 二宮清文, 沖野健二, 高森康暢, 松浦豪之, 早川堯夫, 吉川雅之, 村岡修: 漢薬 胡黄連 (*Picrorrhiza kurrooa*, 根茎) の機能性成分 (4) -含有フェニルエタノイドおよびイリドイドのコラーゲン産生促進活性-. 日本薬学会第 133 年会 (横浜) 2013.3.
 13. 森川敏生, 金敷辰之介, 二宮清文, 早川堯夫, 吉川雅之, 村岡修: タイ天然薬物 *Mimusops elengi* L. 花部の機能性成分 (1) -新規フェニルプロパノイド配糖体の化学構造-. 日本薬学会第 133 年会 (横浜) 2013.3.
 14. 八幡郁子, 西田枝里子, 松田久司, 畑裕基, 菅原かおる, 吉川雅之, 二宮清文, 村岡修, 早川堯夫, 森川敏生: メース (*Myristica fragrans*, 仮種皮) の脱顆粒抑制作用成分. 第 67 回日本栄養・食糧学会大会 (名古屋), 2013.5
 15. 森川敏生, 西田枝里子, 李雪征, 二宮清文, 松田久司, 山下千裕, 伊藤友紀, 中村誠宏, 村岡修, 早川堯夫, 吉川雅之: デイジーフラワー (*Bellis perennis*, 花部) の中性脂質上昇抑制作用成分. 第 67 回日本栄養・食糧学会大会 (名古屋), 2013.5.
 16. Toshio Morikawa, Mayumi Sueyoshi, Saowanee Chaipech, Hisashi Matsuda, Yukiko Nomura, Mikuko Yabe, Tomoko Matsumoto, Kiyofumi Ninomiya, Masayuki Yoshikawa, Yutana Pongpiriyadacha, Takao Hayakawa, Osamu Muraoka: Suppressive effects of prenylcoumarins from *Mammea siamensis* on iNOS synthase expression in RAW264.7 cells. 14th Tetrahedron Symposium, (Vienna, Austria), 2013.6.
 17. 萬瀬貴昭, 二宮清文, 酒井千恵, 西亮介, 村岡修, 早川堯夫, Chaipech Saowanee, 森川敏生: 紅豆蔻 (*Alpinia galanga*, 果実) 由来フェニルプロパノイド成分の中性脂肪代謝促進活性. 第 30 回和漢医薬学会大会 (金沢), 2013.08.
 18. 酒井千恵, 二宮清文, 中西勇介, 宮本陸平, 早川堯夫, 木下充弘, 掛樋一晃, 宮田信吾, 遠山正彌, 森川敏生: 川芎 (*Cnidium officinale*, 根茎) の脂肪代謝促進活性成分. 第 30 回和漢医薬学会大会 (金沢), 2013.08.
 19. 二宮清文, 萬瀬貴昭, 西亮介, 酒井千恵, Chaipech Saowanee, 早川堯夫, 村岡修, 森川敏生: 紅豆蔻 (*Alpinia galanga*, 果実) の機能性成分 (2) -新規フェニルプロパノイドおよびジテルペン成分

- の構造と中性脂肪代謝促進活性－. 日本生薬学会第 60 回年会（北海道），2013.9.
20. 二宮清文，八幡郁子，西田枝里子，尾関快天，早川堯夫，村岡 修，森川敏生：メース (*Myristica fragrans*, 仮種皮) の機能性成分 (3)－含有ネオリグナン成分の一酸化窒素産生抑制活性－. 日本生薬学会第 60 回年会(北海道)，2013.9.
 21. 森川敏生，金敷辰之介，牛尾名恵花，二宮清文，松田久司，松本朋子，一川怜史，袴田祐里，三宅史織，吉川雅之，早川堯夫，Chaipech Saowanee，村岡 修：タイ天然薬物 *Melodrum fruticosum* 花部の機能性成分 (2)－含有ブテノリド成分の一酸化窒素産生抑制活性－. 日本生薬学会第 60 回年会（北海道），2013.9.
 22. 二宮清文，中西勇介，木内恵理，赤木淳二，早川堯夫，村岡 修，森川敏生：漢薬 胡黄連 (*Picrorhiza kurroa*, 根茎) の機能性成分 (5)－含有フェニルエタノイド配当体のアルドース還元酵素新規阻害活性－. 日本生薬学会第 60 回年会（北海道），2013.9.
 23. 二宮清文，酒井千恵，中西勇介，宮本陸平，早川堯夫，木下充弘，掛樋一晃，宮田信吾，遠山正彌，森川敏生：川芎 (*Cnidium officinale*, 根茎) の機能性成分 (2)－含有フタリド成分の脂肪代謝促進活性－. 日本生薬学会第 60 回年会（北海道），2013.9.
 24. 二宮清文，居村克弥，坂本幸栄，十川慶太，早川堯夫，村岡 修，森川敏生：漢薬 女貞子 (*Ligustrum lucidum*, 果実) の機能性成分 (3)－含有トリテルペン成分のアロマターゼ阻害活性－. 日本生薬学会第 60 回年会（北海道），2013.9.
 25. 二宮清文，尾関快天，南野 享，早川堯夫，木下充弘，掛樋一晃，宮田信吾，遠山正彌，森川敏生：釣藤鈎の機能性成分 (1)－含有アルカロイドおよびトリテルペンの抗 TNF- α 活性成分－. 日本生薬学会第 60 回年会（北海道），2013.9.
 26. 森川敏生，末吉真弓，松本 拓，Saowanee Chaipech，二宮清文，松田久司，野村友起子，梅山美樹子，吉川雅之，向井秀仁，木曾良明，早川堯夫，村岡 修：タイ天然薬物 *Mammea siamensis* 由来プレニルクマリン mammeasin 類の iNOS 合成酵素発現抑制作用および好中球様細胞活性化抑制作用. 第 55 回天然有機化合物討論会（京都），2013.9.
 27. 森川敏生，萬瀬貴昭，二宮清文，西 亮介，酒井千恵，Chaipech Saowanee，早川堯夫，村岡 修：紅豆蔻 (*Alpinia galanga*, 果実) の中性脂肪代謝促進活性成分－. 第 57 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会（埼玉），2013.10.
 28. 森川敏生，金敷辰之介，二宮清文，牛尾名恵花，松田久司，松本朋子，一川怜史，袴田祐里，三宅史織，吉川雅之，早川堯夫，Chaipech Saowanee，村岡 修：タイ天然薬物 *Melodrum fruticosum* 花部の一酸化窒素産生抑制活性成分. 第 57 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会（埼玉），2013.10.
 29. 二宮清文，南野 享，尾関快天，早川堯夫，木下充弘，掛樋一晃，

- 宮田信吾, 遠山正彌, 森川敏生: 釣藤鈎の機能性成分(2)ー含有アルカロイドおよびトリテルペンの抗炎症作用ー. 第63回日本薬学会近畿支部総会・大会(京都), 2013.10.
30. 森川敏生, 二宮清文, Chaipech Saowanee, 三宅荘八郎, 坪山晃大, 早川堯夫, 村岡修: タイ天然薬物 *Kaempferia parviflora* 由来メトキシフラボノイド成分のメラニン産生抑制作用. 第5回食品薬学シンポジウム(京都), 2013.11.
31. 森川敏生, 二宮清文, Chaipech Saowanee, 三宅荘八郎, 坪山晃大, 早川堯夫, 村岡修: タイ天然薬物 *Kaempferia parviflora* 由来メトキシフラボノイド成分のメラニン産生抑制作用. 第5回食品薬学シンポジウム(京都), 2013.11.
32. 二宮清文, 奥村尚道, 村岡修, 許鳳鳴, 松田久司, 吉川雅之, 早川堯夫, 森川敏生: エジプト天然薬物 *Nigella sativa* の肝脂肪低減作用物質. 第31回メディシナルケミストリーシンポジウム(広島), 2013.11.
33. Hiroyuki Moriyama, Mariko Moriyama, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa. Role of Notch signaling in the maintenance of human mesenchymal stem cells under hypoxic conditions. The 7th Notch meeting. Feb. 14-15, 2013. National Institute of Genetics, Mishima.
34. Hiroyuki Moriyama, Mariko Moriyama, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa. 「脂肪組織由来体性幹細胞の製造方法」関西8私大新技術開発説明会, Mar, 1, 2013. JST本部本館ホール, 東京.
35. 森山麻里子, 宇田純輝, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. Notch シグナルが皮膚を正しく構築する仕組み. 皮膚の会(総会), Mar, 16-17, 下呂, 岐阜.
36. Hiroyuki Moriyama, Mariko Moriyama, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa. 低酸素暴露下における脂肪由来間葉系幹細胞の Notch シグナル亢進と解糖系調節機構の解明. Mar, 21-23, 2013. 第12回日本再生医療学会総会.
37. Moriyama Mariko, Moriyama Hiroyuki, Uda Junki, Matsuyama Akifumi, Osawa Masatake, Hayakawa Takao. INDISPENSABLE ROLES OF BNIP3, AN INDUCER OF AUTOPHAGY, IN BOTH DIFFERENTIATION AND MAINTENANCE OF EPIDERMAL KERATINOCYTES. May 8-11, 2013, 2013 International Investigative Dermatology Meeting, Edinburgh International Conference Center, Edinburgh, Scotland
38. Moriyama Hiroyuki, Moriyama Mariko, Ueda Ayaka, Nishibata Yusuke, Okura Hanayuki, Matsuyama Akifumi, Hayakawa Takao. ROLE OF NOTCH SIGNALING IN THE MAINTENANCE OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS UNDER HYPOXIC CONDITIONS. June 12-15, 2013, 11th ISSCR at BOSTON, U.S.A.
39. Moriyama Mariko, Moriyama Hiroyuki, Uda Junki, Matsuyama Akifumi, Osawa Masatake, Hayakawa Takao. INDISPENSABLE ROLES OF BNIP3, AN INDUCER OF AUTOPHAGY, IN BOTH DIFFERENTIATION AND MAINTENANCE OF EPIDERMAL KERATINOCYTES. June 12-15, 2013, 11th ISSCR at BOSTON, U.S.A.
40. Moriyama Hiroyuki, Moriyama Mariko, Ueda Ayaka, Nishibata Yusuke, Okura Hanayuki, Matsuyama

- Akifumi, Hayakawa Takao. ROLE OF NOTCH SIGNALING IN THE MAINTENANCE OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS UNDER HYPOXIC CONDITIONS. June 13, 2013, CBRC, Harvard Medical School, Boston, U.S.A.
41. 野村昇吾, 森山麻里子, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. 「表皮分化過程における Forkhead box タンパク質の関与」 June 12-15, 2013, 第 4 回生命機能研究会, 滋賀.
 42. 曾根千晶, 森山麻里子, 大倉華雪, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. 「ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞 (hADMPc) を用いたインスリン産生細胞の作製」 June 12-15, 2013, 第 4 回生命機能研究会, 滋賀.
 43. 大森重成, 森山麻里子, 大倉華雪, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. 「ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞 (hADMPc) を用いた効率的なドパミン産生細胞作製」 June 12-15, 2013, 第 4 回生命機能研究会, 滋賀.
 44. 石原 慎, 森山麻里子, 大倉華雪, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. 「低酸素培養における Notch シグナルを介した解糖系調節機能の解明」 June 12-15, 2013, 第 4 回生命機能研究会, 滋賀.
 45. 森山麻里子, ○宇田純輝, 北川綾弓, 野村昇吾, 早川堯夫, 森山博由. Bcl-2 ファミリー分子 BNIP3 が表皮構築に及ぼす影響. 第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/12, 2013, 同志社女子大, 京都.
 46. 古谷圭史, 村上健太, 雨宮有佑, 北野亮介, 森山麻里子, 早川堯夫, 森山博由. バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床段階における指針について. 第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/12, 2013, 同志社女子大, 京都.
 47. 村上健太, 古谷圭史, 雨宮有佑, 北野亮介, 森山麻里子, 早川堯夫, 森山博由. ヒト幹細胞加工医薬品開発をめざしたヒト体性幹細胞樹立のための基準. 第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/12, 2013, 同志社女子大, 京都.
 48. 北川綾弓, 森山麻里子, 宇田純輝, 野村昇吾, 早川堯夫, 森山博由. Bcl-2 ファミリー分子 BNIP3 が表皮構築に及ぼす影響. 第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/12, 2013, 同志社女子大, 京都.
 49. Junki Uda, Mariko Moriyama, Hanayuki Okura, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa, Hiroyuki Moriyama. Indispensable roles of BNIP3, an inducer of autophagy, in both differentiation and maintenance of epidermal keratinocytes. The 35th annual meeting of the molecular biology society of Japan. Dec 3-6, Kobe, Japan.
 50. Hiroyuki Moriyama, Mariko Moriyama, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa. 低酸素暴露を介する脂肪由来間葉系幹細胞のドパミン産生細胞分化. Mar, 4-6, 2013. 第 13 回日本再生医療学会総会. 京都.
 51. Mariko Moriyama, Hiroyuki Moriyama, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa. 低酸素暴露下における脂肪由来間葉系幹細胞の Notch 進と解糖系調節機構の解明. Mar, 4-6, 2013. 第 13 回日本再生医療学会総会. 京都.
- G. 知的所有権の取得状況

- | | |
|--------------------------|-----------|
| 1. 特許取得 | 2. 実用新案取得 |
| 「心筋指向細胞」 | 該当なし |
| PCT 出願（平成 25 年 4 月 24 日） | |
| 出願人：大阪大学・理化学研究所・ | 3. その他 |
| （公財）先端医療振興財団 | 該当なし |
| 発明者：松山晃文・大倉華雪 | |

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金
(医療技術実用化総合研究事業(臨床研究・治験推進研究事業))
分担研究報告書

ミニブタを用いた脂肪組織由来多系統前駆細胞を用いる再生医療等製品の
単回投与急性毒性・安全性薬理併合試験

研究分担者

松山晃文 大阪大学臨床医工学融合研究教育センター 招聘教授
宮川繁 大阪大学大学院医学系研究科外科学講座 講師

研究要旨

ミニブタにヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞 (hADMPC) 由来再生医療等製品 (以下、被験物質) の単回冠動脈内投与した場合の影響を観察した。被験物質の臨床投与予定量の3倍用量を麻酔下ミニブタの冠動脈内に投与し、投与後14日間の観察期間中に一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、血圧検査、心電図検査、呼吸検査、血液学的検査及び血液生化学的検査を実施した。観察期間終了日に剖検し、心臓及び肺の病理組織学的検査を実施した。対照群として媒体投与群及び無投与対照群を設けた。

一般状態、体重、摂餌量、血圧検査、心電図検査、呼吸検査、血液学的検査、血液生化学的検査及び心臓、肺の病理組織学的検査の各検査で異常は認められなかった。

以上のように、ミニブタを用いた単回冠動脈内投与において hADMPC 由来再生医療等製品の臨床投与予定量の3倍用量の投与量では被験物質によると思われる影響は認められなかった。

A. 研究目的

ミニブタにヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞 (hADMPC) 由来再生医療等製品 (以下、被験物質) の冠動脈内投与した場合の影響を、一般状態、血液学的検査、血液生化学的検査、循環 (血圧及び心電図)、呼吸 (呼吸数)、

中枢 (行動) 及び病理組織学的検査を通して観察することを目的とする。

B. 研究方法

被験細胞:

ヒト脂肪組織をコラゲナーゼにて酵素処理し、遠心後に沈殿した細胞集団から赤血球を除外後、培養皿に播種。24時間後にEDTA溶液にて培養皿から解離した細胞のみをhADMPCとした。この間に、細胞保存液にて凍結する過程を含む。

細胞保存液で凍結された細胞は、容器をウォーターバスで37℃に加熱し、速やかに保存液を融解させた。保存液を15 mL容滅菌チューブに移し、冷却遠心機で遠心分離し、細胞をペレットとして回収し、培養皿に播種した。

hADMPCを剥離回収し、薬剤添加培養した細胞を回収し、hADMPC由来再生医療等製品(被験物質)とした。

回収した被験物質に必要な量の3.3%へパリン加リンゲル液を加えて、ペレットを懸濁させ、細胞懸濁液とした。調製後は、使用時までクーラーボックス内で保存し、調製後24時間までに使用した。

試験の概略:

試験系

動物種、系統及びその選択理由

動物種: ミニブタ

系統: Göttingen

選択理由: 薬理試験及び安全性試験で一般的に用いられている動物種で、その系統維持が明らかであり、集積データが揃っているため。

移行日、性、月齢及び移行頭数

2013年1月30日、雄、8ヵ月齢、5頭。

試験には2012年12月25日に入荷され、7日間の検疫及び29日間の馴化期間を経た動物を移行した。その間に体重測定を2回(動物入手日、検疫終了日)、及び一般状態の観察を毎日1回行い、異常の認められないことを確認した。

移行日の体重範囲

16.3~19.4 kg

供給源

エレガード社

馴化

移行した動物は群分けまでに7日間の馴化期間を設けた。この間に体重測定(電子天秤: PUA579-CS300/IND890-10 Desk、メトラード株式会社)を2回以上(動物移行日、馴化期間終了日)、摂餌量測定(電子天秤: PB5001、メトラード株式会社)及び一般状態の観察を毎日1回、血液学的検査、血液生化学的検査、心電図データの収集をそれぞれ1回行って馴化とした。

群分け法

馴化期間中の体重推移、摂餌量、一般状態に異常の見られないことを確認して使用した。群分けはコンピュータを用いて、群分け日の体重を層別に分けた後、無作為抽出法により各群の平均体重がほぼ等しくなるように行

った。なお群分け後の残余動物は継続飼育した。一般状態観察及び摂餌量測定を1日1回、体重測定を1週間に1回以上となるように実施し、試験動物の飼育期間終了時に当試験系から除外した。

個体識別法

動物の個体識別は、生産者番号（耳標の番号）を利用した。

各ケージには、馴化期間中は試験番号、入手年月日、性別、生産者番号及び馴化動物番号（M00001～M00005）を記入したラベルを、群分け以降は試験番号、群名称、生産者番号及び動物番号を記入し群毎に色分けしたラベルを取り付けた。

環境条件及び飼育管理

設定温度：23° C（許容範囲：20.0～28.0°C、実測値：21.0～23.1°C）、設定湿度：55%（許容範囲：30.0～80.0%、実測値：50.3～66.8%）、明暗各12時間（照明：6:00～18:00）、換気回数12回/時（フィルターを通した新鮮空気）に維持された飼育室（G棟1号室）で動物を飼育した。

動物は、ステンレス製ケージ（W：630 mm × D：1130 mm × H：740 mm、自動給水装置付き）を用い、個別飼育した。

ケージの洗浄及び給餌器の交換は毎日行った。

動物飼育室の清掃・消毒は毎日行った。

飼料

製造後5ヵ月以内の固型飼料を給餌器に入れ、1日1回400±4 gを午前中に給餌した。但し、投与当日は麻酔から覚醒した後に給餌した。使用した飼料のロットについて、飼料中の汚染物質濃度、細菌数及び栄養成分含量が試験施設の許容基準値に適合していることを確認した。

飲料水

自動給水装置を用いて上水道水を自由に摂取させた。飲料水中の汚染物質濃度及び細菌数をほぼ6ヵ月毎に分析し、試験施設の許容基準値に適合していることを確認した。

投 与

投与経路及びその選択理由

投与経路：冠動脈内

選択理由：予定臨床経路のため。

投与方法及びその選択理由

麻酔下にある動物の右大腿動脈から逆行性に冠動脈まで到達させたカテーテルに、ポリプロピレン製ディスプレイポータブル注射筒（テルモ株式会社）を取り付けて投与した。

選択理由：臨床的に通常行われる手法である。

投与液量、投与回数

投与液量：投与当日の体重値を元に0.5 mL/kgとした。

投与回数：1回/bodyとした。

群構成及び投与量

群構成

実験は媒体、無投与対照、被験物質投与に示す 3 群構成とした。

投与量設定の理由

臨床で予定されている最大投与量の 3 倍として設定した。

実験

使用試薬

動物に使用した。試薬、麻酔薬を以下に示した。

アトロピン硫酸塩 (アトロピン硫酸塩注®0.5 mg「タナベ」、田辺三菱製薬株式会社)

塩酸メデトミジン (ドルベネ注、共立製薬株式会社)

ミダゾラム (ドルミカム®注射液 10 mg、アステラス製薬株式会社)

塩酸アチパメゾール (アチパメ®注、共立製薬株式会社)

アンピシリンナトリウム (ビクシリン®注射用 1 g、Meiji Seika ファルマ株式会社)

注射用水 (株式会社大塚製薬工場)

イソフルラン (フォーレン®、アボットジャパン株式会社)

N₂O (昭和電工株式会社)

O₂ (株式会社大島商会)

ヘパリンナトリウム (ヘパリンナトリウム注「味の素」、味の素製薬株式会社)

生理食塩液 (株式会社大塚製薬工場またはテルモ株式会社)

シクロスポリン (サンディミュン点滴静注用 250mg、ノバルティスファーマ株式会社)

動物への免疫抑制剤の投与

被験物質はヒト由来細胞であり、当試験で実施したミニブタへの投与は異種移植となることから、移植免疫が生じることが考えられた。被験物質に対する動物の移植免疫を抑制するために、事前に免疫抑制剤を投与した。投与 7 日前から投与 14 日後 (剖検日) までシクロスポリンを 5 mg/kg/回 (投与液量 : 0.1 mL/kg/回、体重は直近の測定値を使用した)、1 回/日 (午前中) に頸背部筋肉内投与した。被験物質投与当日は麻酔前 60 分までに一回投与しておき、被験物質投与後には免疫抑制剤の投与は実施しなかった。

剖検当日は免疫抑制剤を投与してから麻酔を実施し、剖検した。

カテーテルの植え込み手術

採血用の静脈を確保するためのカテーテル植え込み手術を行った。

塩酸メデトミジン 0.05 mg/kg (投与液量 : 0.05 mL/kg) およびミダゾラム 0.5 mg/kg (投与液量 : 0.1 mL/kg) の頸背部筋肉内投与による導入麻酔後、吸入麻酔器 (Vigor21 DX、アコマ医科工業株式会社) を用いて N₂O : O₂ = 1 : 1 の混合ガス + 0.5 ~ 1.5% イソフルランの条件下で麻酔を維持した。採血用として前大静脈洞にカテーテル [メディカット LCV-UK キット、シングルルーメンタイプ、カテーテル外径 : 14G、日本コヴィディエン株式会社、筒内をヘパリン加生理食塩液 (約 10 unit/mL) で満たしたもの] を挿入、

頸部に固定して縫合した。カテーテルを背部に回し、粘着性布伸縮包帯（エラストポア、株式会社ニチバン）で全体を体に固定した。固定後に塩酸アチパメゾール 1 mg/kg（投与液量：0.2 mL/kg）を大腿部の筋肉内に投与して、動物を覚醒させた。

手術直後はカテーテル筒内をヘパリン加生理食塩液（約 200 unit/mL）で満たした。またアンピシリンナトリウム 1 g/5 mL/head を大腿部又は頸背部の筋肉内に投与した。

カテーテルの維持のために、1～3日に1回の頻度でカテーテル内の凝固を防ぐ目的でヘパリン加生理食塩液（約 200 unit/mL）にてヘパリンロックした。

長時間心電用レコーダの装着

バリカンにて胸部を広く刈毛した。長時間心電用データレコーダおよび粘着性電極を装着した。電極位置はチャンネル 1 (CH1) は M-X 誘導、チャンネル 2 (CH2) は R-L 誘導とした。測定装置に付属するモニターにて各誘導が正しく測定されていることを確認し、測定装置類を自着性布収縮包帯および粘着性布収縮包帯で体に固定した。

投与準備

動物にアトロピン硫酸塩 0.05 mg/kg（投与液量：0.1 mL/kg）を頸背部筋肉内に投与して約 10～30 分後、塩酸メデトミジン 0.05 mg/kg（投与液量：0.05 mL/kg）およびミダゾラ

ム 0.5 mg/kg（投与液量：0.1 mL/kg）を頸背部筋肉内に投与して導入麻酔とした。吸入麻酔器を用いて N₂O: O₂=1:1 の混合ガス+0.5～1.5%イソフルランの条件下で麻酔を維持しながら、気管カニューレ (PORTEX) を挿入した。気管挿管後は吸入麻酔器を用いて N₂O: O₂=1:1 の混合ガス+0.5～1.5%イソフルランの条件下で麻酔を維持し、また人工呼吸器を用いて 10～15mL/kg、18～22 回/分の条件で人工呼吸を実施した。

左大腿動脈を露出させ、シースカテーテルを挿入した。挿入したシースカテーテルの分岐を圧トランスデューサに接続し、歪み圧力用アンプ及び瞬時心拍計ユニットを介して、データ収集・解析システムに接続し、観血的血圧測定を実施した。

投与実験中の急激な心電図変化を観察するため、長時間心電用データレコーダの他に針電極を装着し、第 2 誘導心電図を生体電気用アンプ（を介して、データ収集・解析システムに接続し心電図の測定を行った。また耳、舌あるいは尾にパルスオキシメータを取り付け、ベッドサイドモニターに SpO₂ を導出、観察した。

上記処置を施した動物に、右大腿動脈に挿入したシースカテーテルから投与用カテーテルを挿入し、腹大動脈を経由して左冠動脈前下行枝まで到達させて被験物質を投与した。

観察及び検査項目
一般状態観察

一般状態は毎日 1 回、午前中に観察した。

行動撮影

投与日の動物覚醒後 4 時間、及び投与後 1 日の 10 時～22 時にビデオ撮影を行った。即ちビデオカメラ及びテレビモニターによって飼育ケージ内の映像を撮影した。撮影された映像は HDD-DVD レコーダーに一時保存し、撮影終了後に DVD-ROM に保存した。

体重測定

体重測定は投与前 7 日（投与日を 0 日とした）、投与前日、投与日、投与後 7 日及び剖検日に 1 回実施した。なお、体重測定時にはカテーテルや心電図データレコーダ、包帯等が取り付けられていたが、これら装着物の風袋は考慮しなかった。

摂餌量測定

毎日残餌の有無を確認し、残餌が認められた場合はその残量を測定した。残餌のない場合は摂餌量を 400 g とした。

血圧及び心電図データの収集及び解析

血圧及び心電図データの収集及び解析方法

投与当日の麻酔下での血圧及び心電図データの収集及び解析は、データ収集・解析システムにて実施した。収集した血圧データから、収縮期血圧（SBP、単位：mmHg）、拡張期血圧

（DBP、単位：mmHg）及び平均血圧（MBP、単位：mmHg）を、心電図データから、心拍数（HR、単位：beats/min）、PR 間隔（PR、単位：msec）、QRS 時間（QRS、単位：msec）、QT 間隔（QT、単位：msec）及び補正 QT（QTc）を解析した。なお、QTc は Fridericia の補正式（ $QTc = QT / RR^{1/3}$ ）を用いて算出した。

投与当日以外は心電図データの収集及び解析を長時間心電図データレコーダ及び解析システムを用いて実施した。収集した波形を確認し、致死性不整脈の発生を確認した。確認された致死性不整脈は 1 時間ごとの発生数及び種類を分類、集計した。

測定期間

血圧及び心電図データの収集は投与当日の投与前から投与後 60 分まで実施した。そのうち、投与前 10 分、投与終了後 10、20、30、40、50 及び 60 分の各時間の連続した 9 波形を解析ポイントとした。

投与当日以外の心電図データの収集は馴化期間中に 1 回（24 時間）、投与当日～投与後 1 日、投与後 2 日～3 日、6～7 日及び 13～14 日にかけて 24 時間連続測定した。

呼吸機能評価

呼吸数は、馴化期間中に 1 回、投与後 1、3 日、及び剖検日の各日に 1 回、飼育ケージ内で安静時の動物の呼吸数を目視下で計測し、1 分間の呼吸数を数えた。

血液学的検査

血液学的検査は、馴化期間中に1回、その後は投与後1日及び剖検日に1回実施した。検査当日の給餌前に動物に挿入されたカテーテルから血液2 mLを採取した。

検査にはEDTA・2Kコーティングチューブ（ベノジェクト®II 真空採血管、VP-DK052K05、テルモ株式会社）に採取した血液を用いた。なお、測定後の残余血液は廃棄した。

剖検

投与日を0日として投与後14日に剖検を実施した。塩酸メデトミジン0.05 mg/kg（投与液量：0.05 mL/kg）およびミダゾラム0.5 mg/kg（投与液量：0.1 mL/kg）を頸背部筋肉内に投与して導入麻酔を行い、ペントバルビタールナトリウム5 mg/kgを耳介静脈内投与して深麻酔した後、頸動脈から放血致死させた。胸腔内臓器を肉眼的に観察した。

病理組織学的検査

剖検後、心臓、肺、肝臓及び腎臓を摘出し10 vol%中性緩衝ホルマリンで固定した。心臓及び肺は定法に従ってパラフィン包埋後、HE染色標本作製し、病理組織学的検査を行った。その他の臓器及び切り出し後の器官・組織は、10 vol%中性緩衝ホルマリンで保存した。

C. 研究成果

試験成績

一般状態

媒体群、無投与対照群、被験物質群ともに試験期間を通じて異常は認められなかった。

体重

媒体群、無投与対照群、被験物質群とも順調に推移した。

摂餌量

媒体群、無投与対照群、被験物質群とも与えられた餌を日々全量摂取した。

血圧及び心電図検査結果

麻酔下での血圧及び心電図検査結果

麻酔下での血圧検査では、収縮期血圧、拡張期血圧及び平均血圧の各項目で、媒体群、無投与対照群及び被験物質群の全例で投与前に比べて投与後に著明な変化は認められなかった。

麻酔下での心電図検査では、心拍数、PR間隔及びQRS時間の各項目で、媒体群、無投与対照群及び被験物質群の全例で投与前に比べて投与後に著明な変化は認められなかった。

QT間隔及び補正QTの各項目で、媒体群、無投与対照群及び被験物質群の全例で投与前に比べて投与後60分にかけて高値傾向を示した。

覚醒下での心電図検査結果

覚醒下での心電図検査では、投与前、投与当日～投与後1日、投与後2～3日、投与後6～7日、投与後13～14日

(剖検日)の各日で媒体群、無投与対照群、被験物質群の全例で不整脈は認められなかった。

呼吸機能検査

SpO₂、呼吸数ともに媒体群、無投与対照群、被験物質群の全例で投与前後で異常は認められなかった。

血液学的検査

血液学的検査では、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度及び網状赤血球比率の各項目で、媒体群、無投与対照群及び被験物質群の全例で投与前に比べて投与後に著明な変化は認められなかった。

無投与対照群及び被験物質群の全例で投与後1日に白血球数の増加、白血球分類における好中球比率の高値及びリンパ球比率の低値を示したが、その後回復した。

血液生化学的検査結果

血液生化学的検査では、AST、ALT、ALP、総コレステロール、総蛋白、尿素窒素、クレアチニン、総ビリルビン、ブドウ糖、カルシウム、ナトリウム、カリウム、及び塩素の各項目で、媒体群、無投与対照群及び被験物質群の全例で投与前に比べて投与後に著明な変化は認められなかった。

クレアチニンキナーゼの各項目では、媒体群、無投与対照群及び被験物質群の全例で投与前に比べて投与後1

日に高値を示したが、投与後14日には回復した。

病理組織学的検査結果

媒体群、無投与対照群、被験物質群ともに心臓で異常は認められなかった。

D. 考察

ミニブタに被験物質を単回冠動脈内投与した場合の影響を観察した。被験物質の臨床投与予定量の3倍用量を麻酔下ミニブタの冠動脈内に投与し、投与後14日間の観察期間中に一般状態観察、体重測定、摂餌量測定を実施した。観察期間終了日に剖検し、心臓、肺、腎臓及び肝臓を摘出、心臓及び肺の病理組織学的検査を実施した。対照群として媒体投与群及び無投与対照群を設けた。

麻酔下での血圧及び心電図検査で、被験物質群で投与後QT時間及び補正QTの各項目が延長傾向にあった。当試験では吸入麻酔薬としてQT延長作用が報告されているイソフルランを使用している。また媒体群及び無投与対照群でも同様にQT時間及び補正QTの延長が認められたため、この変化は麻酔の影響であると判断した。

被験物質の投与後、血液学的検査で投与前に比べて投与後1日に白血球数の増加、白血球分類における好中球比率の高値及びリンパ球比率の低値を示した。また血液生化学的検査でクレアチニンキナーゼが高値を

示した。これらの変化のうち、白血球数及び白血球分類に見られた変化は投与準備として大腿動脈を露出させ、シースカテーテルを留置する処置を施した動物に普通に見られる反応であり、無投与対照群でも認められていること、投与後 14 日には投与前と同程度に回復したことから、被験物質による影響ではないと判断した。また当試験では冠動脈投与を実施しており、投与操作そのものによって心筋及び骨格筋に多く含まれるクレアチニンキナーゼが逸脱酵素として血中に放出されたことが考えられたため、クレアチニンキナーゼの高値は被験物質による影響ではないと判断した。

その他、一般状態観察、体重、摂餌量測定、覚醒下での心電図検査及び呼吸機能検査で被験物質の投与に起因する変化は認められなかった。

E. 結論

以上のように、ミニブタを用いた単回冠動脈内投与において、被験物質の臨床投与予定量の 3 倍用量の投与量では被験物質によると思われる影響は認められなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsuyama A. Translational research in regenerative medicine: A translational gap. *Pharmaceuticals Policy and Law*. 2013;15:163-172.

2. Shudo Y, Miyagawa S, Okura H, Fukushima S, Saito A, Kawaguchi N, Matsuura N, Shimizu T, Okano T, Matsuyama A, Sawa Y. Addition of mesenchymal stem cells enhances the therapeutic effects of skeletal myoblast cell-sheet transplantation in a rat ischemic cardiomyopathy model. *Tissue Eng, part A*. 2013 Oct 29.
3. Okura H, Soeda M, Miyagawa S, Sawa Y, Ichinose A, Matsuyama A. *in situ* reprogrammed spermine treated adipose –tissue-derived multi-lineage progenitor cells improve left ventricular dysfunction in a swine chronic myocardial infarction model. *Proceedings of the 10th International Congress on Coronary Artery Disease*. 2013. 39-42.
4. Okura H, Soeda M, Morita M, Ichinose A, Matsuyama A. Transplantation of human adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells but not adipose tissue-derived stromal/stem cells reduces serum cholesterol in hyperlipidemic Watanabe rabbits. *Proceedings of the 10th International Congress on Coronary Artery Disease*. 2013. 51-54.
5. Okura H, Soeda M, Morita M, Ichinose A, Matsuyama A. Transplantation of adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells reduces serum cholesterol in hyperlipidemic Watanabe rabbits. *Proceedings of the 10th International Congress on Coronary Artery Disease*. 2013. 51-46.
6. Moriyama H, Moriyama M, Sawaragi K, Okura H, Ichinose A, Matsuyama A, Hayakawa T. Tightly regulated and homogeneous transgene expression in human adipose-derived mesenchymal stem

- cells by lentivirus with tet-off system. PLoS One. 2013 Jun 12;8(6):e66274.
7. Kawase R, Ohama T, Matsuyama A, Matsuwaki T, Okada T, Yamashita T, Yuasa-Kawase M, Nakaoka H, Nakatani K, Inagaki M, Tsubakio-Yamamoto K, Masuda D, Nakagawa-Toyama Y, Nishida M, Ohmoto Y, Nishihara M, Komuro I, Yamashita S. Deletion of progranulin exacerbates atherosclerosis in ApoE knockout mice. *Cardiovasc Res.* 2013 Oct 1;100(1):125-33.
 8. Yuasa-Kawase M, Masuda D, Yamashita T, Kawase R, Nakaoka H, Inagaki M, Nakatani K, Tsubakio-Yamamoto K, Ohama T, Matsuyama A, Nishida M, Ishigami M, Kawamoto T, Komuro I, Yamashita S. Patients with CD36 Deficiency Are Associated with Enhanced Atherosclerotic Cardiovascular Diseases. *J Atheroscler Thromb.* 2013;20(5):514-5.
 9. 大倉華雪・松山晃文 細胞医療での申請にあたっての注意点—品質の観点から— 先進医療 NAVIGATOR II 再生医療・がん領域の実用化への TOPICS 2014. pp5-8
 10. 松山晃文 再生医療とレギュラトリーサイエンス -早期実現にむけて合理的な理解を-」 *ヒューマンサイエンス* 2013: (7).28-31
 11. 松山晃文 再生医療の規制と今後の動向 リーガルマインド 2013:337.36-102
 12. 松山晃文 再生医療の早期実現化と国際展開に向けた研究開発支援 再生医療 2013:12(2).133-134.
 13. 松山晃文：「再生医療とレギュラトリーサイエンス -早期実現にむけて合理的な理解を-」 *ヒューマンサイエンス* 2013: (7).28-31.
 14. 松山晃文：「再生医療の規制と今後の動向」 *リーガルマインド* 2013:337.36-102.
2. 学会発表
 1. 再生医療が拓く明日へ—研究者の想いと産業界への願い—・松山晃文・東西合同薬事法規（研究）委員会・6月21日
 2. 高度医療とトランスレーショナルリサーチの実際・松山晃文・東大CRC講習会・6月27日
 3. 再生医療についての行政の取り組み・松山晃文・最高裁 再生医療研究会・7月3日
 4. iPS 細胞を用いた再生医療の現状と展望・松山晃文・DDS 学会・7月4日
 5. 再生医療研究と試薬・松山晃文・日本試薬協会講演会・7月9日
 6. 再生医療の動向・松山晃文・再生医療と法研究会・8月1日
 7. iPS 細胞で日本は21世紀の世界を切り拓く・松山晃文・経営道場・8月31日
 8. 再生医療の動向・松山晃文・厚生省全国薬務主管課長会議・9月20日
 9. 再生細胞治療と培地・松山晃文・FIRM 講演会・9月26日
 10. 非臨床試験 package の提案・松山晃文・MCP 策定会議・10月4日
 11. "Development of Regenerative Medicinal Products—From Bench—"・松山晃文・DIA 日本年会・11月7日
 12. 臨床薬理に期待すること—再生医

- 療一介の研究者として—・松山晃文・第 34 回臨床薬理学会学術総会・12月6日
13. 再生医療の倫理と規制 (2)・松山晃文・東京大学生命倫理講習会・12月12日
14. 臨床研究編臨床応用のためのiPS/ES/体性幹細胞の培養について・松山晃文・第10回医薬品RSフォーラム・12月14日
15. 再生医療の動向・松山晃文・東京都薬事監視員協議会・1月29日
16. アカデミアによる開発戦略「再生医療法制定下の医療技術開発」・松山晃文・国立大学附属病院臨床研究推進会議 第2回総会シンポジウム・2月7日
17. 幹・前駆細胞の品質管理・松山晃文・3月4日
18. 再生医療とレギュラトリーサイエンス—品質管理の観点から—・松山晃文・第13回日本再生医療学会総会 ランチョンセミナー・3月4日
19. “Proposal of the preclinical safety study-pack age for the cell therapy products”・松山晃文・IABS-JST Joint symposium・3月7日
20. ヒト ES/iPS 細胞由来細胞製剤の品質管理・松山晃文・慶応義塾大学生命倫理講習会・3月26日

PCT 出願 (平成 25 年 4 月 24 日)
出願人：大阪大学・理化学研究所・
(公財) 先端医療振興財団
発明者：松山晃文・大倉華雪

2. 実用新案取得
該当なし
3. その他
該当なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
「心筋指向細胞」

