

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

「多施設ヒト幹細胞臨床研究による3次元再生皮下軟骨の有効性確認」

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高戸 毅

平成27（2015）年 5月

目 次

I. 総括研究報告		
「多施設ヒト幹細胞臨床研究による3次元再生皮下軟骨の有効性確認」	—————	3
高戸 毅		
II. 分担研究報告		
1. 「画像診断を用いた有用性解析」	—————	7
大友 邦		
2. 「3次元皮下再生軟骨の技術開発ならびに製造」	—————	9
星 和人		
3. 「臨床研究の企画・支援」	—————	11
荒川 義弘		
4. 「臨床研究申請の支援ならびに有効性評価に関する助言」	—————	12
鈴木 友人		
5. 「3次元皮下再生軟骨の臨床実施」	—————	13
岡崎 睦		
6. 「3次元皮下再生軟骨の臨床実施」	—————	15
飯野 光喜		
7. 「有効性評価技術の開発」	—————	16
新田 尚隆		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	—————	18
IV. 研究成果の刊行物・別刷	—————	20

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）  
 (総括・分担) 研究報告書

「多施設ヒト幹細胞臨床研究による3次元再生皮下軟骨の有効性確認」

研究代表者 高戸 毅 東京大学大学院医学系研究科 教授

**研究要旨** われわれは世界に先駆けて力学強度と3次元形態を有する3次元皮下再生軟骨を開発した。現在、東京大学医学部附属病院において、口唇口蓋裂の鼻変形患者に3次元皮下再生軟骨を移植するヒト幹細胞臨床研究を実施している。しかし臨床研究を通じて、治験実施に向けて有効性エビデンスを補強すること、多施設研究が未実施であること、製造プロセスと品質管理法が煩雑であることの3つ課題が明らかとなった。本研究ではこの3つの課題を解決し、3次元皮下再生軟骨の有効性を確立するとともに、東京医科歯科大学医学部附属病院、山形大学医学部附属病院と連携し多施設臨床研究を実施し、治験開始に資する臨床データを作成し、速やかに治験に移行させることを目的とする。

本年度の検討により、昨年度までの検討で用いていた動物実験用のMRI(2テスラ)と臨床機(1.5テスラ)において、T2, D値の値がほぼ同等となることが示され、動物実験で得られた値が、臨床においても指標となる値となることが示唆された。また、移植時破損を回避する再生軟骨投与機(アプリケーター)が十分な強度を有し、且つ安定した移植手技をサポートする有効なツールとなることが示された。

多施設での実施にむけて、再生軟骨の製造は富士ソフト社に委託することとし、再生軟骨の保存期間を14日間まで延長するような開発を行ってきた。そのような中で、平成26年11月25日に医薬品医療機器法(旧薬事法)や再生医療等の安全性の確保等に関する法律が施行されたことをうけ、長期保存型再生軟骨のfirst-in-human trialに関して今後の方向性を検討した。関係部署との話し合いの結果、多施設臨床研究は実施せず、東大病院単施設での医師主導治験にて安全性ならびに有効性を確認し、企業治験のデータ蓄積につなげることとなった。本プロジェクトで得られた知見をもとに治験プロトコルを作成し、平成27年3月19日に東大病院IRBにおいて研究課題「インプラント型自己細胞再生軟骨の安全性及び有効性を確認する臨床試験(医師主導治験)」にて審議を行い、平成27年3月25日に最終的な承認を受けた。平成27年3月31日にPMDAに治験計画届書を提出し、平成27年度から、東大病院にて医師主導治験を開始予定である。将来実施予定の企業治験と同じ評価指標及び評価方法で実施するため、データを有効に活用できると考えている。

研究分担者氏名・所属研究機関名・職名

大友 邦・東京大学・教授  
 星 和人・東京大学・特任准教授  
 荒川 義弘・東京大学・准教授  
 鈴木 友人・東京大学・特任講師  
 岡崎 睦・東京医科歯科大学・教授  
 飯野 光喜・山形大学・教授  
 新田 尚隆・(独)産業技術総合研究所・主任研究員

A. 研究目的

われわれは世界に先駆けて力学強度と3次元形態を有する3次元皮下再生軟骨を開発した。現在、東京大学医学部附属病院において、口唇口蓋裂の鼻変形患者に3次元皮下再生軟骨を移植するヒト幹細胞臨床研究を実施している。今回の臨床研究を通じて、治験実施に向けての3つ課題、有効性エビデンスを補強すること、多施設研究が未実施であること、製造プロセスと品質管理法が煩雑であることが明らかとなった。本研究では3つの課題を解決し、治験実施に資する臨床データを作成し、速やかに治験に移行することを目的としている。

B. 研究方法

1. 有効性評価法の確立

1-1) 3次元皮下再生軟骨の非侵襲的評価

昨年度までの検討で、再生軟骨をヌードラット皮下に移植し動物実験用MRI装置(Bruker社Biospec Avance, 2T)にてT1値、T2値、D値などを、高分解能X線装置(産総研にて試作、分解能40 $\mu$ m)にて吸収係数分布などを計測した。また、II型コラーゲン、GAGなどを定量解析し、組織学的評価と併せて相関係数を算出した。東大放射線科と得られたデータを解析し、再生軟骨成熟度の評価法として、MRI(D値、T2)を選定した。軟骨成熟時のT2値及びADC値は、それぞれ0.1s及び1.5x10<sup>-3</sup>mm<sup>2</sup>/sであったため、今年度はまずこれと等価な値を持つファントムを、超音波用ファントム(50x50x10mm、Young率100kPa)にGd造影剤(マグネビストTM, 20mL, 500mmol/L)を添加して作成した。ファントムの組成として、寒天やグリセリンの濃度を変えて力学特性、化学特性、長期安定性、安全性を検討した。Gd造影剤の添加量を決定するため、0, 0.5, 0.75, 0.85, 0.95, 1.05, 1.34, 1.62, 2, 2.5mmol/Lの10通りの濃度を変えたファントムを作成して、2施設3機種(東大:GE社Signa HDxt

3T、GE社Signa HDxt 1.5T、産総研：Bruker社 2T)のMRIでT2値及びADC値を測定して値の比較を行い、機種ごとの違いを評価した。また、神経毒を有するアクリルアミド濃度を測定し、安全性を確認した。

#### 1-2) 対照群(従来法)のデータ作成

臨床上の有効性評価には、従来の治療法との比較が不可欠である。そこで、昨年に引き続き、従来法の自家腸骨移植法を施行した患者に対し、現行のヒト幹細胞臨床研究での評価項目(有害事象の有無、血液検査、疾患関連QOL評価、生活活動度評価、顔面形態評価、など)を実施し、プロスペクティブに経過を追跡した。

### 2. 多施設臨床研究の実施

#### 2-1) 採取した軟骨組織および製造した再生軟骨の搬出入技術の確立と実証

再生軟骨製造機関と各医療機関との間で、採取した軟骨組織および製造した再生軟骨の搬出入を行う必要がある。われわれは、これまで富士ソフト社と共同で再生軟骨の長期保存方法を検討した(特許出願中、特願2011-263837)。この知見を参考に、昨年度までに、搬出入の温度条件、培養条件などを設定し、実際の移動をヒト由来やビーグル由来の耳介軟骨組織・再生軟骨を用いて模擬的に実施し、プロトコルの修正を行った。これらの結果を基に、多施設ヒト幹細胞臨床研究を実施する予定であった。しかし、再生医療に関わる法制度が整い、またPMDA薬事戦略相談により効率よく治験準備が出来るようになったため、長期保存型再生軟骨のfirst-in-human trialをヒト幹細胞臨床研究ではなく、医師主導治験として実施することとなった。

患者説明や手術シミュレーションに有用と考えられる3Dプリンターの導入を検証した。唇顎口蓋裂の顎裂部変形について3Dプリンターを用いた分析を行った。患者CTデータから3得られたDICOMデータを、専用ソフト(アイプランツ・システムズ社製 Volume Extractor、MakerBot社製 MakerBot Desktop)により、3Dプリンターで出力可能な骨条件モデルデータに変換する。これを汎用型3Dプリンター(MakerBot社製 卓上型3DプリンタReplicator 2X)で実体模型として出力し、顎裂部の形態評価を行った。本体はABS樹脂、サポートは分解可能樹脂によって作成した。

#### 2-2) 多施設間でのトレーサビリティ構築

現行のヒト幹細胞臨床研究では、東京大学医学部附属病院内で採取から移植まで、使用するすべての容器にICタグをつけて一貫したトレーサビリティを実現している。多施設臨床研究を実施するにあたり、東京大学医学部附属病院内で運用されているトレーサビリティを、他病院に拡張する必要がある。今年度からは、昨年度までに構築したトレーサビリティを用いて、多施設ヒト幹細胞臨床研究を実施する予定であった。しかし、ヒト幹細胞臨床研究ではなく医師主導治験を実施することになったため、構築したトレーサビリティのシステムは、平成27年度から実施予定の治験に導入することとした。

### 3. 製造検査の効率化

#### 3-1) 再生軟骨アプリケーションの開発

現在のヒト幹細胞臨床研究では、移植時の破損に備え再生軟骨を2本作製することとなっているが、移植時破損を回避する再生軟骨投与機(アプリケーション)があれば非常に有用である。試作機について高温高圧滅菌の耐性テストを行うとともに、ヌードラットやビーグルでの自家3次元皮下再生軟骨移植実験を行い、アプリケーションの性能を確認した。

#### 4. 改定版ヒト幹細胞臨床研究の申請書作成

長期保存型再生軟骨のfirst-in-human trialをヒト幹細胞臨床研究ではなく医師主導治験として実施することとなった。厚生労働科学研究費委託費(再生医療実用化研究事業、研究代表者：高戸毅)にて、プロトコルの作成を進めた。

(倫理面への配慮)

本研究の動物実験プロトコルに関しては、国の「動物の保護及び管理に関する法律」及び東京大学、東京医科歯科大学、山形大学、(独)産業技術総合研究所の動物実験実施規則、動物実験実施マニュアルに従い、動物愛護の観点に十分留意して行った。

顎裂部変形の解析は、東京医科歯科大学医学部倫理委員会において承認(No 2032)された。研究に使用するDICOMデータ、実体模型は、匿名化番号(連結可能)を用いた管理を行っている。

### C. 研究結果

#### 1. 有効性評価法の確立

##### 1-1) 3次元皮下再生軟骨の非侵襲的評価

T2値はGd濃度の増加に応じて減少したが、ADC値の濃度依存性は小さかった。そのため、T2値が0.1sに一致するGd濃度として0.85mmol/Lを採用し、これを基準ファントムとして臨床機を用いた測定プロトコルを作成した。ファントム作製直後、産総研の2.0T機では、T2値は0.107s、ADC値は1.566x10<sup>-3</sup>mm<sup>2</sup>/sであった。東大の1.5T及び3.0T機では、T2値は0.090-0.098s、ADC値は1.49x10<sup>-3</sup>-1.68x10<sup>-3</sup>mm<sup>2</sup>/sであった。設計値からのずれはT2では-3.0-10.0%のずれ、ADC値では1.0-12.0%となるが、このずれは、測定温度が2℃異なっていたことに起因するとも考えられることから、測定時の温度管理の重要性が示唆された。機種による測定値に有意な差は見られなかった。安定性に関しては、冷蔵保存後6か月において、T2値は0.101s、ADC値は1.413x10<sup>-3</sup>mm<sup>2</sup>/sであり、いずれもほぼ同じ値が再現できた。アクリルアミドの安全性に関しては、ファントム内の含有濃度が最大1.1μg/gであった。

##### 1-2) 対照群(従来法)のデータ作成

昨年度に引き続き、自家腸骨移植法を施行した患者に対し、現行のヒト幹細胞臨床研究での評価項目(有害事象の有無、血液検査、疾患関連QOL評価、生活活動度評価、顔面形態評価、など)を実施した。

### 2. 多施設臨床研究の実施

#### 2-1) 採取した軟骨組織および製造した再生軟骨の搬出入技術の確立と実証

3Dプリンターを用いた分析において、6名の患者において、顎裂部の模型を作成した。臼歯間距離ではCT計測値と比べて1mm以内の測定誤差で作成されていた。顎裂距離を歯槽骨最尾側にて[モデル計測値]-

[CTでの計測値]で表現すると平均0.28mm(-0.2-0.9)であり、モデルでやや大きくなった。作成時間は平均4時間58分(2:22-7:59)であった。計測のためにはサポート樹脂をニッパーで除去、もしくはリモネン溶液で溶解させる必要があった。

#### 2-2) 多施設間でのトレーサビリティ構築

これまでに得られたトレーサビリティの知見は、平成27年度から東大病院で実施する医師主導治験、ならびにその後の富士ソフト社による企業治験で導入する予定である。

### 3. 製造検査の効率化

#### 3-1) 再生軟骨アプリケーションの開発

再生軟骨アプリケーションの素材、構造、物性を検討し、可能な限り再生軟骨の実寸に近いもの作製した。試作機について高温高圧滅菌の耐性テストをおこなったところ、明らかな変形や変色をみることなく、少なくとも数十回使用可能であった。ヌードラットやビーグル犬での3次元皮下再生軟骨移植実験において、試作品を導入したところ、再生軟骨を破損することなくスムーズな皮下への移植が可能であった。

#### 4. 改定版ヒト幹細胞臨床研究の申請書作成

長期保存型再生軟骨のfirst-in-human trialは、ヒト幹細胞臨床研究ではなく医師主導治験として実施することとなった。本プロジェクトのデータを基盤に、厚生労働科学研究費委託費(再生医療実用化研究事業、研究代表者:高戸毅)にて、プロトコルの作成を進め、平成27年3月19日に東京大学にてIRBを実施した。平成27年3月31日に治験届を提出し、平成27年度に東京大学医学部附属病院にて、医師主導治験を実施予定である(症例数2)。

### D. 考察

#### 1. 有効性評価法の確立

現在、東大病院で実施している3次元皮下再生軟骨の自主臨床研究は、安全性の確認を主目的としているが、治験実施にむけて有効性評価指標を確立することは必須である。しかし、軟骨の特徴である力学強度やII型コラーゲンやプロテオグリカン(GAG)の蓄積を生体内で評価する手法が確立されていないのが現状である。そのため、MRIなどを用いて非侵襲的に生化学的組成を評価できるようになれば、評価項目が明確になり効率的な治験実施が可能となる。本年度の検討により、昨年度までの検討で用いていた動物実験用のMRI(2テスラ)と臨床機(1.5テスラ)において、T2, D値の値がほぼ同等となることが示され、動物実験で得られた値が、臨床においても指標となる値となることが示唆された。ファントムは温まると拡散係数がかかるため、ファントムの保存は冷蔵庫密封で行い、撮影前日に常温に戻るのが妥当であると考えられた。

これらの研究成果は、平成27年度に東京大学で実施予定の医師主導治験において、探索的な副次的有効性評価項目としてプロトコルに組み込んだ。

#### 2. 多施設臨床研究の実施

臨床研究には出口を見据えた進め方が必要である。本プロジェクトに関しては、多施設ヒト幹細胞臨床研究を実施するよりも、医師主導治験を実施する方が、治験レベルのデータが蓄積するメリット

があると考えた。医師主導治験に関しては、平成27年3月31日に治験届を提出しており、平成27年度は治験実施が開始することが見込まれる。

### 3. 製造検査の効率化

開発した再生軟骨のアプリケーションが十分な強度を有し、且つ安定した移植手技をサポートする有効なツールとなることが示された。治験にける導入を予定している。

### 4. 改定版ヒト幹細胞臨床研究の申請書作成

当初予定していたヒト幹細胞臨床研究は実施しないこととなったが、東京大学医学部附属病院で実施する医師主導治験、並びに富士ソフトが実施する企業治験におけるプロトコル作成に、本プロジェクトの知見を反映させることが出来た。

### E. 結論

これまで動物実験で使用してきた産総研のMRIと東大の臨床機MRIの値は、ほぼ同等となることから、動物実験の値を指標とすることが可能になると思われる。

再生軟骨の産業化への道筋を再評価し、多施設臨床研究ではなく医師主導治験を実施することとなった。本プロジェクトで得られた知見を、治験プロトコルに反映させることができた。

### F. 健康危機情報

特記事項なし。

### G. 研究発表

<論文発表>

1. Takato T, Mori Y, Fujihara Y, Asawa Y, Nishizawa S, Kanazawa S, Ogasawara T, Saijo T, Abe T, Abe M, Suenaga H, Kanno Y, Sugiyama S, Hoshi K: Preclinical and clinical research on bone and cartilage regenerative medicine in oral and maxillofacial region. Oral Sci Int. 2014;11(2):45-51.

2. Fujihara Y, Takato T, Hoshi K. Macrophage-inducing fasl on chondrocytes forms immune privilege in cartilage tissue engineering, enhancing in vivo regeneration. Stem Cells. 2014 May;32(5):1208-19.

3. 高戸毅, 藤原夕子, 星和人, 小笠原徹, 西條英人, 安部貴大, 阿部雅修, 末永英之, 菅野勇樹, 杉山円, 森良之: 顎顔面領域における骨・軟骨再生に関する基礎および臨床研究, 日本口腔科学会雑誌 63(2), 2014, 207-215

4. 高戸毅, 藤原夕子, 星和人: 歯科口腔外科と再生医療. 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 第86巻 第6号 2014年5月 450-456

5. 高戸毅, 藤原夕子, 星和人: 口唇口蓋裂鼻変形に対するインプラント型再生軟骨の開発. 日本臨床(印刷中)

<学会発表>

1. 松山真理子, 藤原夕子, 石橋牧子, 星和人, 高戸毅: 培養軟骨細胞中の軟骨再生前駆細胞における軟骨再生の検証. 第68回NPO法人日本口腔科学会学術大会 2014年5月7-9日 京王プラザホテル, 東京

2. 高戸毅：骨軟骨再生医療による顎顔面形態の再建. 第31回日本顎顔面補綴学会総会・学術大会（シンポジウム） 2014年6月21日 仙台市民会館, 宮城

3. 高戸毅：再生医療が拓く未来の医療. 鈴木歯科医院講演会 2014年7月5日, 秋田

4. 高戸毅：歯槽骨・顎骨および軟骨再生. 第42回教育研修会(2014年口腔四学会合同研修会) 2014年7月27日 大阪大学 楠葉学舎講堂, 大阪

5. 高戸毅：「口唇口蓋裂の治療 UP to Date」－口腔外科の立場から－. 第26回(一社)日本小児口腔外科学会総会 2014年11月8日 ホテルサンシャイン宇都宮, 栃木

6. Takato T, Fujihara Y, Hoshi K. Preclinical and clinical research on bone and cartilage regenerative medicine in oral and maxillofacial region. 7th World Congress on Preventive and Regenerative Medicine (7th WCPRM), November 4 - 7 2014, Taipei, Taiwan

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特に無し

2. 実用新案登録

特に無し

3. その他

特に無し

厚生労働科学研究費補助金 (再生医療実用化研究事業)  
(総括・分担) 研究報告書

「画像診断を用いた有用性解析」

研究分担者 大友 邦 東京大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨 研究は、「ヒト幹細胞臨床研究による3次元再生皮下軟骨の有効性確認」の一環として、画像診断、特にCT, MRIを用いた皮下軟骨の状態を評価するための撮像プロトコルの最適化を最終目的とし、本年度はMRIの様々な撮像法について、臨床的有用性を中心に検討した。

A. 研究目的

以下のMRI撮像法について、臨床的有用性を中心に検討した。

- Diffusion Kurtosis Imaging (DKI)
- Anisotropic and isotropic MPG for MR tractography
- 2D-FSE Based Multiple Flow Spoiled Non-contrast MRA
- Inversion Recovery Time Resolved Non-Contrast Enhanced MRA

B. 研究方法、結果と考察、結論

1. Observation of brain development in neonates/infants using Diffusional Kurtosis Imaging  
非ガウス分布を考慮した拡散強調画像解析であるDiffusion Kurtosis Imaging (DKI) を使用して、低出生体重児の修正月齢と拡散定量値との相関関係を検討。

既存の定量値 (FAやADC) よりもDKIの定量値の方が相関が高く、小児脳発達に対して感度の高い画像である可能性が示唆された。

2. Anisotropic and isotropic MPG comparison for better depiction of pyramidal tract in the patients

脳神経 (錐体路) の神経走行を描出する際に、従来のMPG (拡散計測方向) ではなく、錐体路の線維走行方向を考慮したMPGを用いて撮像した場合、どのような錐体路が描出されるか脳疾患患者に適応した。浮腫や腫瘍などにより正常構造とは大きく異なる神経走行となった場合は、従来法が描出が良く髄膜腫の場合や腫瘍から錐体路が遠い場合、つまり正常構造がある程度保たれている場合は、我々の開発したMPGの方が描出が優れていた。

3. 2D-FSE Based Multiple Flow Spoiled Non-contrast MRA of The Lower Extremities: Preliminary Experience

非造影による下肢血管の撮像法であるFBI法をより短時間に行う方法を考案し、その能力につい

てPAD患者を考案した方法はFBI法と比較し、狭窄または閉塞部位の検出に対して感度・特異度ともに良好な結果を得た。

4. Inversion Recovery Time Resolved Non-Contrast Enhanced MRA with Breath-Hold  
非造影による腹部動脈の多時相の撮像を1回の呼吸停止下にて行う方法を新たに開発し、その有用性について腎動脈を対象にして考察した。300msecの時間分解能で5時相の画像が取得可能であり、腎動脈瘤の描出にも成功した。しかし、現状では撮像範囲と空間分解能に制限があり、今後の課題である。

C. 健康危機情報

総括研究報告書参照。

D. 研究発表

<学会発表>

1. Gonoï W, Akai H, Hagiwara K, Akahane M, Hayashi N, Maeda E, Yoshikawa T, Yamakawa T, Tada M, Uno K, Ohtsu H, Koike K, Ohtomo K. Pancreas divisum as a predisposing factor for chronic and recurrent idiopathic pancreatitis: initial in vivo survey. The 15th Asian Oceania Congress of Radiology (AOCR 2014), September 24-28, 2014, Kobe, Japan.
2. Kamiya K, Kamagata K, Nishikori A, Irie R, Hori M, Miyajima M, Nakajima M, Mori H, Kunimatsu A, Arai H, Aoki S, Ohtomo K. Diffusional kurtosis imaging and cognitive disturbance in idiopathic normal pressure hydrocephalus. RSNA 2014 Annual Meeting. November 30-December 5, 2014, Chicago, USA

<論文発表>

1. Kamiya K, Hori M, Miyajima M, Nakajima M, Suzuki Y, Kamagata K, Suzuki M, Arai H, Ohtomo K, Aoki S. Axon diameter and intra-axonal volume fraction of the corticospinal tract in idiopathic normal pressure hydrocephalus measured by q-space imaging. PLoS One 9(8): e103842, August, 2014.
2. Katsura M, Suzuki Y, Hata J, Hori M, Sakaki H, Akai H, Mori H, Kunimatsu A, Masutani Y, Aoki S, Ohtomo, K. Non-gaussian diffusion-weighted imaging for assessing diurnal changes in intervertebral disc microstructure. J Magn Reson Imaging 40(5): 1208-14, November, 2014.
3. Nomura Y, Nemoto M, Masutani Y, Hanaoka S, Yoshikawa T, Miki S, Maeda E, Hayashi N, Yoshioka N, Ohtomo K. Reduction of false positives at vessel bifurcations in computerized detection of lung nodules. J Biomed Graph Comput 4(3): 36-46, July, 2014.

E. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
特に無し
2. 実用新案登録  
特に無し
3. その他  
特に無し



「3次元皮下再生軟骨の技術開発ならびに製造」

研究分担者 星 和人 東京大学大学院医学系研究科 特任准教授

**研究要旨** 本研究は、東京大学医学部附属病院で自主臨床研究を行っている3次元再生軟骨を産業化することを最終目標として、ヒト幹細胞多施設臨床研究により治験実施に資する臨床データを作成し、速やかに治験に移行させることを目的としていた。しかし、再生医療を取り巻く法整備のもと、関係当局と臨床応用の方向性を検討し、長期保存型再生軟骨のfirst-in-human trialをヒト幹細胞臨床研究ではなく医師主導治験として実施することとなった。本年度は、インプラント型再生軟骨の有効性評価法として選択したMRIに関して、ヌードラットで用いた装置と臨床機の測定値の比較を行った。

A. 研究目的

われわれは世界に先駆けて力学強度と3次元形態を有する3次元皮下再生軟骨を開発した。現在、東京大学医学部附属病院において、口唇口蓋裂の鼻変形患者にヒト幹細胞臨床研究を実施している(n=3)。しかし、臨床研究を通じて、治験実施に向けての3つ課題、すなわち、有効性エビデンスを補強すること、多施設研究が未実施であること、製造プロセスと品質管理法が煩雑であることが明らかとなった。

本研究ではこれら3つの課題を解決し、多施設自主臨床研究で治験実施に資する臨床データを作成し、速やかに治験に移行させることを目的としている。

B. 研究方法

1. 3次元皮下再生軟骨の非侵襲的評価

昨年度までの検討で、再生軟骨をヌードラット皮下に移植し動物実験用MRI装置 (Bruker社 Biospec Avance、2T) にてT1値、T2値、D値などを、高分解能X線装置 (産総研にて試作、分解能40 $\mu$ m) にて吸収係数分布などを計測した。また、II型コラーゲン、GAGなどを定量解析し、組織学的評価と併せて相関係数を算出した。東大放射線科と得られたデータを解析し、再生軟骨成熟度の評価法として、MRI (D値、T2) を選定した。今年度は臨床応用に向けて、まず、再生軟骨の成熟度を臨床機MRI (T2、D値) で評価する閾値を設定した。そのために、ヌードラットを用いた移植実験の生化学評価、組織学評価、MRI撮像の結果から、軟骨成熟の目安となるMRI撮像の閾値を算出した。実験機と臨床機では測定値が変わる可能性があるため、ヌードラットの測定に用いた実験機と東大病院の臨床機で、同一のファントムを測定し、両機の補正値を設定した。また、測定値の補正を確実なものにするため、患者と一緒に測定するファントムの導入も検討した。

2. 対照群(従来法)のデータ作成

臨床上有効性評価には、従来の治療法との比較が不可欠である。そこで、昨年に引き続き、従来法の自家腸骨移植法を施行した患者に対し、現行のヒト幹細胞臨床研究での評価項目(有害事象の有無、血液検査、疾患関連QOL評価、生活活動度評価、顔面形態評価、など)を実施し、プロスペクティブに経過を追跡した。

3. 再生軟骨アプリケーションの開発

移植時破損を回避する再生軟骨投与機(アプリケーション)の開発を試みた。試作機について高温高圧滅菌の耐性テストを行うとともに、ビーグルでの自家3次元皮下再生軟骨移植実験を行い、アプリケーションの性能を確認した。

4. 医師主導治験の申請書作成

長期保存型再生軟骨のfirst-in-human trialをヒト幹細胞臨床研究ではなく医師主導治験として実施することとなった。厚生労働科学研究費委託費(再生医療実用化研究事業、研究代表者:高戸毅)にて、プロトコルの作成を進めた。

C. 研究結果

1. 3次元皮下再生軟骨の非侵襲的評価

産総研で作製したファントムを、東大病院の臨床機で測定した。ファントム作製直後、産総研の2.0T機では、T2値は0.107s、ADC値は $1.566 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$ であったのに対し、東大の1.5T及び3.0T機では、T2値は0.090-0.098s、ADC値は $1.49 \times 10^{-3}$ - $1.68 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$ であった。

2. 対照群(従来法)のデータ作成

昨年度に引き続き、自家腸骨移植法を施行した患者に対し、現行のヒト幹細胞臨床研究での評価項目(有害事象の有無、血液検査、疾患関連QOL評価、生活活動度評価、顔面形態評価、など)を実施した。

3. 再生軟骨アプリケーションの開発

再生軟骨アプリケーションの素材、構造、物性を検討し、可能な限り再生軟骨の実寸に近いものを作

製した。試作機について高温高圧滅菌の耐性テストをおこなったところ、明らかな変形や変色をみることなく、少なくとも数十回使用可能であった。ビーグルでの自家3次元皮下再生軟骨移植実験において、試作品を導入したところ、再生軟骨を破損することなくスムーズな皮下への移植が可能であった。

#### 4. 医師主導治験の申請書作成

長期保存型再生軟骨のfirst-in-human trialを、ヒト幹細胞臨床研究ではなく医師主導治験として実施することとなった。厚生労働科学研究費委託費（再生医療実用化研究事業、研究代表者：高戸毅）にて、プロトコールの作成を進めた。

#### D. 考察

現在、東大病院で実施している3次元皮下再生軟骨の自主臨床研究は、安全性の確認を主目的としているが、治験実施にむけて有効性評価指標を確立することは必須である。しかし、軟骨の特徴である力学強度やII型コラーゲンやプロテオグリカン(GAG)の蓄積を生体内で評価する手法が確立されていないのが現状である。そのため、MRIなどを用いて非侵襲的に生化学的組成を評価できるようになれば、評価項目が明確になり効率的な治験実施が可能となる。本年度の検討により、昨年度までの検討で用いていた動物実験用のMRI(2テスラ)と臨床機(1.5テスラ)において、T2, D値の値がほぼ同等となることが示され、動物実験で得られた値が、臨床においても指標となる値となることが示唆された。ファントムは温まると拡散係数が変わるため、ファントムの保存は冷蔵庫密封で行い、撮影前日に常温に戻すのが妥当であることも示唆された。

また、再生軟骨アプリケーションが、移植操作を確実にする有効なツールとなることが示された。

#### E. 結論

長期保存を可能とした再生軟骨の臨床応用は、多施設自主臨床研究ではなく、東大単施設における治験で実施することとなった。これまで動物実験で使用してきた産総研のMRIと東大の臨床機MRIの値は、ほぼ同等となることから、動物実験の値を指標とすることが可能になると思われる。

#### F. 健康危機情報

総括研究報告書参照。

#### G. 研究発表

〈論文発表〉

1. Takato T, Mori Y, Fujihara Y, Asawa Y, Nishizawa S, Kanazawa S, Ogasawara T, Saijo H, Abe T, Abe M, Suenaga H, Kanno Y, Sugiyama S, Hoshi K: Preclinical and clinical research on bone and cartilage regenerative medicine in oral and maxillofacial region. Oral Sci Int. 2014;11(2):45-51.

2. Fujihara Y, Takato T, Hoshi K. Macrophage-inducing fasl on chondrocytes forms immune privilege in cartilage tissue engineering, enhancing in vivo regeneration. Stem Cells. 2014 May;32(5):1208-19.

3. 高戸毅, 藤原夕子, 星和人, 小笠原徹, 西條英人, 安部貴大, 阿部雅修, 末永英之, 菅野勇樹, 杉山円, 森良之: 顎顔面領域における骨・軟骨再生に関する基礎および臨床研究, 日本口腔科学会雑誌 63(2), 2014, 207-215

4. 高戸毅, 藤原夕子, 星和人: 歯科口腔外科と再生医療. 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 第86巻 第6号 2014年5月 450-456

5. 高戸毅, 藤原夕子, 星和人, 小笠原徹, 西條英人, 安部貴大, 阿部雅修, 末永英之, 菅野勇樹, 杉山円, 森良之: 顎顔面領域における骨・軟骨再生に関する基礎および臨床研究, 日本口腔科学会雑誌 第63巻2号, 2014, 207-215

6. 高戸毅, 藤原夕子, 星和人: 口唇口蓋裂鼻変形に対するインプラント型再生軟骨の開発. 日本臨床 (印刷中)

〈学会発表〉

1. Takato T, Fujihara Y, Hoshi K. Preclinical and clinical research on bone and cartilage regenerative medicine in oral and maxillofacial region. 7th World Congress on Preventive and Regenerative Medicine (7th WCPRM), November 4 - 7 2014, Taipei, Taiwan

2. Hoshi K. Three-dimensional tissue-engineered cartilage using biodegradable polymers. 2014 Cold Spring Harbor Meeting, November 7 2014, Suzhou China.

3. Hoshi K. Clinical application of implant-type tissue-engineered cartilage for cleft lip-nose deformity. The 5th Hosa Deftal Conference. November 14 2014, Viet-Nam.

4. 星 和人: 唇裂鼻変形に対するインプラント型再生軟骨臨床展開. 2014年5月30日 第38回日本口蓋裂学会総会・学術集会 札幌コンベンションセンター, 札幌

5. 星 和人: 足場素材を用いた軟骨再生医療の新展開. 2014年10月10日 第29回日本整形外科学会基礎学術集会 城山ホテル, 鹿児島

6. 星 和人: 足場素材を用いた軟骨再生医療の新展開. 2014年11月18日 第36回バイオマテリアル学会 タワーホール船堀, 東京

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
特に無し
2. 実用新案登録  
特に無し
3. その他  
特に無し

「臨床研究の企画・支援」

研究分担者 荒川 義弘 東京大学大学院医学系研究科 准教授

研究要旨 本研究は、東大病院で行ってきた3次元再生軟骨の自主臨床研究を通じて明らかとなった課題を解決し、3次元再生軟骨の有効性を確立すると共に、改良した長期保存型再生軟骨の多施設臨床研究を行うことを目的としていた。しかし、再生医療を取り巻く法整備のもと、研究代表者や関係当局と臨床応用の方向性を検討し、長期保存型再生軟骨のfirst-in-human trialをヒト幹細胞臨床研究ではなく医師主導治験として実施することとなった。本年度は、治験プロトコルの作成を支援した。

A. 研究目的

本研究は、3次元再生軟骨を産業化することを最終目標として多施設臨床研究を行い、治験実施に資する臨床データを作成することを目的としていた。しかし、再生医療に関わる法制度が整い、またPMDA薬事戦略相談により効率よく治験準備が出来るようになったため、再生軟骨の臨床応用の方向性を模索することとした。

B. 研究方法

多施設臨床研究で使用予定の再生軟骨は、現在東大病院で実施している自主臨床研究で使用している再生軟骨よりも保存期間が長く、また富士ソフト社に作製を依頼することとなっていた。そのような長期保存型再生軟骨のfirst-in-human trialに関して、現法整備のもと当初の予定どおり多施設臨床研究を実施するか、医師主導治験に方向転換してその後の企業治験にデータを生かすのか、どのようにすれば早期の薬事承認に繋がるのかという臨床応用の方向性を研究代表者や関係当局と検討した。

C. 研究結果

臨床応用の方向性としては、多施設臨床研究は実施せず、かわりに東大病院単施設での医師主導治験にて安全性ならびに有効性を確認し、企業治験のデータ蓄積につなげることとなった。

治験実施者と各関連部署で治験プロトコルの検討を行い、治験実施計画書の作成を支援した。治験のデザインは単施設、単群、非盲検試験とし、目標症例数は2例とした。その他、治験の登録や実施体制、被験者の同意取得や登録、検査・観察項目及び時期、統計解析、データの取扱い及び記録の保管 などについてアドバイスをし、治験実施計画書の取りまとめを行った。

平成27年3月19日に東大病院IRBにおいて研究課題「インプラント型自己細胞再生軟骨の安全性及び有効性を確認する臨床試験（医師主導治験）」にて審議を得た後、平成27年3月25日に最終的な承認を受け、平成27年3月31日にPMDAに治験計画届書を提出した。

D. 考察

臨床研究は出口を見据えた進め方が必要であり、本プロジェクトに関しては、多施設ヒト幹細胞臨床研究を実施するよりも、医師主導治験を実施する方が、治験レベルのデータが蓄積するメリットがあると考えた。医師主導治験に関しては、平成27年3月31日に治験届を提出しており、平成27年度は治験実施の開始が見込まれる。

E. 結論

再生軟骨の産業化への道筋を検討し、多施設臨床研究ではなく医師主導治験を実施することとなった。本プロジェクトで得られた知見は、そのまま治験プロトコルに活かすことができた。

F. 健康危機情報

総括研究報告書参照。

G. 研究発表

〈論文発表〉

1. Katsuyuki Ando, Hiroshi Ohtsu, Shunya Uchida, Shinya Kaname, Yoshihiro Arakawa, Toshiro Fujita, for the EVALUATE Study Group: Anti-albuminuric effect of the aldosterone blocker eplerenone in non-diabetic hypertensive patients with albuminuria: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. The Lancet Diabetes & Endocrinology Published Online, October 28, 2014.

2. 山田奈央子、玉見 康江、渡部 歌織、戸田智恵子、青木 敦、河原崎秀一、上田 哲也、山崎 力、荒川 義弘：治験開始前のサンプル検査データ提出における適切な同意取得方法の確立臨床薬理 46, 21-27 (2015)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
特に無し
2. 実用新案登録  
特に無し
3. その他  
特に無し

「臨床研究申請の支援ならびに有効性評価に関する助言」

研究分担者 鈴木 友人 東京大学大学院医学系研究科 特任講師

研究要旨 本研究は、3次元再生軟骨の有効性を確立すると共に、多施設臨床研究を行い、速やかに治験に移行させることを目的としていた。平成26年度には、今後実施予定の企業治験を見据え、多施設臨床研究から医師主導治験への方向転換を検討した。医師主導治験申請の支援を行った。

A. 研究目的

本研究は、3次元再生軟骨を産業化することを最終目標として、多施設臨床研究を行って治験実施に資する臨床データを作成することを目的としていた。再生医療を取り巻く法改正のもと、厚労省やPMDAなどと、今後の方向性を検討することとした。

B. 研究方法

インプラント型再生軟骨は、東大で実施した自主臨床研究の後から改良がなされ、多施設でも使用可能になるよう再生軟骨の保存期間が延長した。製造は富士ソフト社に委託予定であり、それに伴い搬出入のプロセスが含まれるようになる。また、平成26年11月25日に医薬品医療機器法（旧薬事法）や再生医療等の安全性の確保等に関する法律が施行されたことを受け、多施設臨床研究ではなく医師主導治験を実施する方が、薬事申請に有利かどうかを検討した。

C. 研究結果

研究代表者や厚労省、PMDA、産業化を希望している富士ソフト社の間での話し合いの結果、保存期間が延長した再生軟骨の臨床応用は、東大単施設での医師主導治験で実施することとなった。

平成26年12月26日にPMDAと事前面談を行い、医師主導治験と企業治験の位置づけについては、

- ・医師主導治験は、再生軟骨が問題なく移植できること及び安全性を確認すると同時に、有効性の評価指標及び評価方法を探索的に検討し、その有用性及び適切性を確認することを目的とする

- ・医師主導治験の症例数を2例とし、2例目が術後3ヶ月になった時点でデータモニタリング委員会を開催し、重篤な有害事象が認められていなければ、企業治験へ移行する

- ・企業治験の目的は安全性・有効性を確認することで問題ないとの見解が示された。

また、医師主導治験を企業治験と同じ評価指標及び評価方法で実施するのであれば、症例数設定、データモニタリング委員会の開催、説明同意文書等の妥当性について、別途、機構の対面助言を行う必要性は低いと考えられること、企業治験実施の際には先に実施する医師主導治験で得た情報を踏まえ、企業治験の実実施計画に反映する事項が無いか検討する必要性を助言いただいた。これらのPMDAの見解を受けて、作成したプロトコルを基に、平成27年3月19日に東京大学にてIRBを実施し、平成27年3月31日に

治験届を提出した。

D. 考察

多施設臨床研究は行わず、医師主導治験を実施することとなったが、将来実施予定の企業治験と同じ評価指標及び評価方法で実施するため、将来的にデータを有効に活用することができる。産業化に向けて、大きく前進したと考えている。

E. 結論

インプラント型再生軟骨の多施設臨床研究から医師主導治験への方向転換を検討し、治験申請の支援を行った。

F. 健康危機情報

総括研究報告書参照。

G. 研究発表

<学会発表>

1. 鈴木友人、長村文孝、藤堂具紀、小澤敬也、斉藤延人。「東京大学におけるアカデミア発シーズの支援体制の紹介」APO協議会第2回学術集会、2014年9月23-24日、北海道大学医学部学友会館フラテホール、札幌、北海道

2. 杉田 修、林 宏至、池田浩治、鈴木章史、鈴木友人、柄澤麻紀子、清水 忍、藤原忠美、遠藤佳代子、笠井宏委、村山敏典、須崎友紀、斎藤勝久、松山琴音、千葉 仁、内山麻希子、末吉 愛、清水 章。アカデミアにおける医師主導治験・臨床試験のプロジェクトマネジメント。APO協議会第2回学術集会、2014年9月23日-24日、北海道大学医学部学友会館 フラテホール、札幌、北海道。

3. 鈴木友人。橋渡し研究支援拠点としての東大病院TRセンターの取り組み。東京大学医学部附属病院先端医療シーズ開発フォーラム2015。2015年1月22日、伊藤国際学術研究センター、東京。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特に無し

2. 実用新案登録

特に無し

3. その他

特に無し

「東京医科歯科大学での3次元皮下再生軟骨の臨床実施」

研究分担者 岡崎 睦 東京医科歯科大学大学院 教授

研究要旨 本研究は、東京大学医学部附属病院で自主臨床研究を行っている3次元再生軟骨に関して、治験実施に資する臨床データを蓄積することを目的としている。本年度は3Dプリンターを用いた先天性顎顔面変形評価を行うことで、再生軟骨を移植する際のシミュレーションとして有用性を検証した。

A. 研究目的

現在、東京大学医学部附属病院において、口唇口蓋裂の鼻変形患者に3次元皮下再生軟骨を移植するヒト幹細胞臨床研究が実施されている。本研究は、その3次元再生軟骨に関して、治験実施に資する臨床データを作成するため、先端医療開発特区「先進的外科系インプラントとしての3次元複合再生組織製品の早期普及を目指した開発拠点プロジェクト (研究代表者 高戸 毅)」の参加機関である東京医科歯科大学として、唇顎口蓋裂の顎裂部変形について3Dプリンターを用いて分析を行うこととした。CTデータから3Dプリンターを用いて実体模型を作成し、シミュレーションとして有用性があるかを検討することとした。

B. 研究方法

形成・美容外科が唇顎口蓋裂に関する手術を行った患者のうち2014年12月までに骨移植を施行し、手術前検査としてCT撮影が行われた6例を対象とした。診療情報からCT画像をDICOMデータとして得る。解析用コンピュータにDICOMデータを入力し、専用ソフト (アイプランツ・システムズ社製 Volume Extractor, MakerBot社製 MakerBot Desktop) により、3Dプリンターで出力可能な骨条件モデルデータに変換する。これを汎用型3Dプリンター (MakerBot社製 卓上型3DプリンタReplicator 2X) で実体模型として出力し、顎裂部の形態評価を行う。本体はABS樹脂、サポートは分解可能樹脂によって作成した。一層あたり0.3mm厚とし、専用ソフトによって上顎に範囲を狭めて作成した。

(倫理面への配慮)

本研究は東京医科歯科大学医学部倫理委員会において承認 (No 2032) された。研究に使用するDICOMデータ、実体模型は、匿名化番号 (連結可能) を用いた管理を行い、研究終了後に破棄する。

C. 研究結果

6名の患者において、顎裂部の模型を作成した。臼歯間距離ではCT計測値と比べて1mm以内の測定誤差で作成されていた。顎裂距離を歯槽骨最尾側にて[モデル計測値]-[CTでの計測値]で表現すると平均0.28mm (-0.2-0.9) であり、モデルでやや大きくなった。作成時間は平均4時間58分 (2:22-7:59) であった。計測のためにはサポート樹脂をニッパーで除去、もし

くはリモネン溶液で溶解させる必要があった。

D. 考察

軟骨移植を行う場合に、移植母床の形態の検討は重要である。今回の結果から3Dプリンターによる顔面骨実体模型作成はシミュレーションに十分に耐えうるもので、有用であることが示唆された。今回は骨モデルのみ作成したが、ソフトウェアの条件を変えることで皮膚軟部組織のモデルも作成できるため、双方を作成することで、さらにイメージを掴みやすくすることが可能である。ランニングコストも安い。欠点としては設定を厚目にするると薄い骨を表現しきれないこと、作成時間が長く、サポート材の処理など取り扱いに煩雑さが残ることが挙げられる。

E. 結論

CTデータから3Dプリンターを用いて顔面骨実体模型を作成することはシミュレーションとして有用であることが示唆された。鼻骨など移植軟骨の母床形態を検討する上でも有用と思われる、手術前のシミュレーションとして有用であることが示唆された。

F. 健康危機情報

総括研究報告書参照。

G. 研究発表

<論文発表>

Yano T, Okazaki M, Yamaguchi K, Akita K. Anatomy of the middle temporal vein: implications for skull-base and craniofacial reconstruction using free flaps. *Plast Reconstr Surg* 134:92e-101e, 2014

<学会発表>

田中頭太郎, 岡崎 睦. Microfocus X線CT装置を用いたラット移植脂肪組織の画像評価. 第23回日本形成外科学会基礎学術集会. 松本市, 2014年10月9日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特に無し

2. 実用新案登録

特に無し

3. その他

特に無し

「山形大学での3次元皮下再生軟骨の臨床実施」

研究分担者 飯野 光喜 山形大学医学部 教授

研究要旨 本研究は、東京大学医学部附属病院で自主臨床研究を行っている3次元再生軟骨に関して、治験実施に資する臨床データを蓄積することを目的としている。本年度は、インプラント型再生軟骨の移植に用いるアプリケーターの開発を行った。

A. 研究目的

東京大学医学部附属病院において、口唇口蓋裂の鼻変形患者に3次元皮下再生軟骨を移植するヒト幹細胞臨床研究が実施された。

本研究は、さらに改良がくわえられた3次元再生軟骨に関して、治験実施に資する臨床データを作成することを目的としている。

B. 研究方法

移植時破損を回避する再生軟骨投与機（アプリケーター）の検証を行った。試作機について高温高圧滅菌の耐性テストを行った。再生軟骨をアプリケーターに装填し、実際の挿入のシミュレーションを繰り返した。

（倫理面への配慮）

国の「動物の保護及び管理に関する法律」及び山形大学の動物実験実施規則、動物実験実施マニュアルに従い、ヘルシンキ宣言に基づいて動物愛護の観点に十分留意して行った。

C. 研究結果

試作のアプリケーターを高温高圧滅菌（121℃、20分）で滅菌を行った場合、使用した範囲においては明らかな変形は認められず、スムーズな内筒の動きを示した。また、アプリケーターを使用した場合、安定した挿入操作が可能であり、再生軟骨の破損は認めなかった。

D. 考察

ヒト再生軟骨組織を、アプリケーターに装填して挿入のシミュレーションを繰り返した。移植時にアプリケーターを使用した場合には、ピンセットで挿入する場合に比較し、再生軟骨にかかる負荷が少なくなる。破損の懸念が減少すると思われた。

E. 結論

再生軟骨を移植する際に、アプリケーターを用いることで、安定した再生軟骨移植が可能になることが示された。

F. 健康危機情報

総括研究報告書参照。

G. 研究発表

特記事項なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
特に無し
2. 実用新案登録  
特に無し
3. その他  
特に無し

「有効性評価技術の開発」

研究分担者 新田 尚隆 (独) 産業技術総合研究所 主任研究員

研究要旨 本研究は、東京大学医学部附属病院で自主臨床研究を行っている3次元再生軟骨を産業化することを最終目標として、治験実施に資する臨床データを作成し、速やかに治験に移行させることを目的としている。本年度は、臨床におけるインプラント型再生軟骨の有効性評価法を確立するために、ヌードラットに移植した再生軟骨組織のMRI測定におけるT2値及びADC値と等価な値を有するファントムを作成し、異なる機種での同一ファントムの測定値から、機種の違いによる補正係数を算出した。また、患者に移植した再生軟骨と当該ファントムを同時にMRI撮影することで、移植後の成熟度の指標を得た。

A. 研究目的

現在、東京大学医学部附属病院において、口唇口蓋裂の鼻変形患者に3次元皮下再生軟骨を移植するヒト幹細胞臨床研究が実施されている。本研究では、治験実施に向けて有効性エビデンスを補強して多施設研究を実施し、製造プロセスと品質管理法を整備し、治験実施に資する臨床データを作成することを目的としている。

B. 研究方法

臨床におけるインプラント型再生軟骨の有効性評価法を確立するため、昨年度、ヌードラットに移植後8週間経過後のヒト耳介軟骨細胞のコンストラクトをMRI測定した。その結果、軟骨基質産生と相関の高かったT2及びADCが再生軟骨の成熟度指標として妥当であるとの結論を得た。この際のT2値及びADC値は、それぞれ0.1s及び $1.5 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$ であったため、これと等価な値を持つファントムを、超音波用ファントム (50x50x10mm, Young率100kPa) にGd造影剤 (マグネビストTM, 20mL, 500mmol/L) を添加して作成した。ファントムの組成として、寒天やグリセリンの濃度を変えて力学特性、化学特性、長期安定性、安全性を検討した。Gd造影剤の添加量を決定するため、0, 0.5, 0.75, 0.85, 0.95, 1.05, 1.34, 1.62, 2, 2.5mmol/L の10通りの濃度を変えたファントムを作成して、2施設3機種 (東大: GE社Signa HDxt 3T, GE社Signa HDxt 1.5T, 産総研: Bruker社 2T) のMRIでT2値及びADC値を測定して値の比較を行い、機種ごとの違いを評価した。また、神経毒を有するアクリルアミド濃度を測定し、安全性を確認した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、国の「動物の保護及び管理に関する法律」及び (独) 産業技術総合研究所動物実験実施規則、(独) 産業技術総合研究所動物実験実施マニュアルに従い、動物愛護の観点に十分留意して行った。

C. 研究結果

T2値はGd濃度の増加に応じて減少したが、ADC値

の濃度依存性は小さかった。そのため、T2値が0.1sに一致するGd濃度として0.85mmol/Lを採用し、これを基準ファントムとして臨床機を用いた測定プロトコルを作成した。ファントム作製直後、産総研の2.0T機では、T2値は0.107s、ADC値は $1.566 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$ であった。東大の1.5T及び3.0T機では、T2値は0.090-0.098s、ADC値は $1.49 \times 10^{-3}$ - $1.68 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$ であった。設計値からのずれはT2では-3.0-10.0%のずれ、ADC値では1.0-12.0%となるが、このずれは、測定温度が2°C異なっていたことに起因するとも考えられることから、測定時の温度管理の重要性が示唆された。機種による測定値に有意な差は見られなかった。安定性に関しては、冷蔵保存後6か月において、T2値は0.101s、ADC値は $1.413 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$ であり、いずれもほぼ同じ値が再現できた。アクリルアミドの安全性に関しては、ファントム内の含有濃度が最大1.1 $\mu\text{g}/\text{g}$ であった。

D. 考察

MRI測定のT2値は、軟骨のコラーゲン基質や水分含有量と関連があり、ADC値は軟骨基質の密度と関連があると言われている。再生軟骨の成熟度指標として選択したT2値とADC値は、弾性率などの力学物性やGAGの産生量とも相関が高いことを裏付けるデータが今回のヌードマウスの実験で示されている。MRI臨床機測定においても、基準ファントムの設計値が再現されたことによって、T2値とADC値は成熟度指標として臨床的に利用できる可能性が示された。また、同一ファントムを同一プロトコルで測定した結果から、MRI機種間の違いが10%程度であることがわかった。しかしこれらはまだ少数の臨床機の結果であり、値そのものの妥当性については、今後の臨床データによって検証を進める必要がある。また、測定温度はADC値に大きな影響を与えるので、MRI撮影での温度条件を明示する必要がある。なお、神経毒性を有するアクリルアミドのファントム内含有量は、EUにおける飲料水用ポリアクリルアミド中の規制値以下 (100-25 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、WHO) であることから、ヒト治療部位と同時にMRI撮影しても害はないと考えられる。



#### E. 結論

臨床試験におけるインプラント型再生軟骨の有効性評価法を確立するため、ヌードラットに移植したヒト再生軟骨の T2 値及び ADC 値を再現するファントムを試作し、複数の MRI 臨床機でこれらの値が再現できることを確認した。また、機種間の測定値の違いは、今回作成したファントムを同時に撮影することによって、校正可能であることが確認できた。T2 値の温度依存性は小さいが、ADC 値は測定温度の影響を強く受けるので、測定条件を明示する必要がある。試作したファントムの組成は WHO 基準の範囲内で安全であり、長期的な物性の安定性を確認した。

#### F. 健康危機情報

総括研究報告書参照。

#### G. 研究発表

##### <論文発表>

1. Misawa M, Nitta N, Shirasaki Y, Hayashi K, Kosaka R, Hyodo K, Numano T, Homma K, Kuribayashi S, Fujihara Y, and Hoshi K, Characteristic X-ray Absorptiometry Applied to the Assessment of Tissue-Engineered Cartilage Development, J Xray Sci Technol (in press) 2015

##### <学会発表>

1. 三澤雅樹他：インプラント型再生軟骨の非侵襲評価。つくば医工連携フォーラム 2015。2015 年 1 月 23 日 つくば。
2. M.Misawa et al., Non-invasive Evaluation of Tissue-Engineered Cartilage Development, 1st Asian University Symposium on Biomedical Engineering, 2014 年 12 月 15 日 Taipei.
3. 新田尚隆他：MR-US 音速測定法を用いた再生軟骨の非侵襲評価。第 42 回日本磁気共鳴医学会大会。2014 年 9 月 18 日 京都。
4. 新田尚隆他：超音波と MRI を用いた非侵襲音速測定 — 再生軟骨評価への適用。第 53 回日本生体医工学会大会。2014 年 6 月 26 日 仙台。
5. 新田尚隆他：超音波と MRI を用いたマルチモダリティ法による再生軟骨の非侵襲音速測定。第 87 回日本超音波医学会学術集会。2014 年 5 月 9 日 横浜。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
特に無し
2. 実用新案登録  
特に無し
3. その他  
特に無し

## 研究成果の刊行に関する一覧表

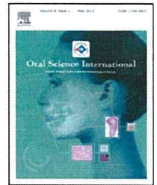
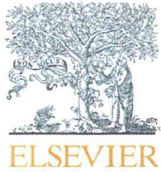
## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takato T, Mori Y, Fujihara Y, Asawa Y, Nishizawa S, Kanazawa S, Ogasawara T, Saijo T, Abe T, Abe M, Suenaga H, Kanno Y, Sugiyama S, Hoshi K.	Preclinical and clinical research on bone and cartilage regenerative medicine in oral and maxilla-facial region.	Oral Sci Int	11(2)	45-51	2014
Fujihara Y, Takato T, Hoshi K.	Macrophage-inducing fasl on chondrocytes forms immune privilege in cartilage tissue engineering, enhancing in vivo regeneration.	Stem Cells	32(5)	1208-1219	2014
高戸 毅, 藤原夕子, 星 和人, 小笠原 徹, 西條英人, 安部 貴大, 阿部雅修, 末永英之, 菅野勇樹, 杉山 円, 森 良之.	顎顔面領域における骨・軟骨再生に関する基礎および臨床研究.	日本口腔科学会雑誌	63(2)	207-215	2014
高戸 毅, 藤原夕子, 星 和人.	歯科口腔外科と再生医療.	耳鼻咽喉科・頭頸部外科	86(6)	450-456	2014
高戸 毅, 藤原夕子, 星 和人.	口唇口蓋裂鼻変形に対するインプラント型再生軟骨の開発.	日本臨床			印刷中
Kamiya K, Hori M, Miyajima, Nakajima M, Suzuki Y, Kamagata K, Suzuki M, Arai H, Ohtomo K, Aoki S.	Axon diameter and intra-axonal volume fraction of the corticospinal tract in idiopathic normal pressure hydrocephalus measured by q-space imaging.	PLoS One	9(8)	e103842	2014

Katsura M, Suzuki Y, Hata J, Hori M, Sakaki H, Akai H, Mori H, Kunimatsu A, Masutani Y, Aoki S, Ohtomo K.	Non-gaussian diffusion-weighted imaging for assessing diurnal changes in intervertebral disc microstructure.	J Magn Reson Imaging	40(5)	1208-1214	2014
Nomura Y, Nemoto M, Masutani Y, Hanaoka S, Yoshikawa T, Miki S, Maeda E, Hayashi N, Yoshioka N, Ohtomo K.	Reduction of false positives at vessel bifurcations in computerized detection of lung nodules.	J Biomed Graph Comput	4(3)	36-46	2014
山田奈央子、 玉見康江、 渡部歌織、 戸田智恵子、 青木敦、 河原崎秀一、 上田哲也、山崎力、 荒川義弘。	治験開始前のサンプル検 査データ提出における適 切な同意取得方法の確 立。	臨床薬理	46	21-27	2014
Yano T, Okazaki M, Yamaguchi K, Akita K.	Anatomy of the middle temporal vein: implications for skull-base and craniofacial reconstruction using free flaps.	Plast Reconstr Surg	134	92e-101e	2014



Expanded View

## Preclinical and clinical research on bone and cartilage regenerative medicine in oral and maxillofacial region<sup>☆</sup>



Tsuyoshi Takato<sup>a</sup>, Yoshiyuki Mori<sup>a,\*</sup>, Yuko Fujihara<sup>a,b</sup>, Yukiyo Asawa<sup>b</sup>, Satoru Nishizawa<sup>b</sup>, Sanshiro Kanazawa<sup>a,b</sup>, Toru Ogasawara<sup>a</sup>, Hideto Saijo<sup>a</sup>, Takahiro Abe<sup>a</sup>, Masanobu Abe<sup>a</sup>, Hideyuki Suenaga<sup>a</sup>, Yuki Kanno<sup>a</sup>, Madoka Sugiyama<sup>a</sup>, Kazuto Hoshi<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Department of Oral and Maxillofacial Surgery, The University of Tokyo Hospital, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan

<sup>b</sup> Department of Cartilage & Bone Regeneration (Fujisoft), Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 7 February 2014

Received in revised form 3 April 2014

Accepted 9 April 2014

#### Keywords:

Bone and cartilage regenerative medicine

Oral and maxillofacial region

CT-Bone

Implant-type tissue-engineered cartilage

### ABSTRACT

Recently, there have been remarkable advances in regenerative medicine, and almost all disorders of the oral and maxillofacial region could be research targets of regenerative medicine. Meanwhile, treatment in this region has been well established using biomaterials, prostheses, and microsurgery. Therefore, to surpass such a conventional approach as an alternative, regenerative medicine should take an approach of being less invasive and/or more effective. In this report, we present our preclinical and clinical research on bone and cartilage regenerative medicine in the oral and maxillofacial region.

Regarding bone regenerative medicine, we have tried to develop artificial bone that would maximize bone formation at the transplanted site, but would subsequently be replaced by autologous bone. We have made custom-made artificial bone (CT-Bone) using alpha-tricalcium phosphate ( $\alpha$ -TCP) particles and an ink-jet printer, and have conducted clinical research and trials on 30 patients.

To develop tissue-engineered cartilage with proper three-dimensional (3D) morphological form and mechanical strength, we have optimized the culture medium of chondrocytes and the scaffold. Following a preclinical study confirming efficacy and safety, we have conducted clinical research in three patients with nasal deformity associated with cleft lip and palate, and are now starting multicenter clinical research.

© 2014 Japanese Stomatological Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

### Contents

1. Introduction .....	46
2. In situ tissue engineering in maxillofacial region .....	46
3. Preclinical research on bone regenerative medicine .....	46
4. Clinical application of custom-made artificial bone .....	47
5. Research background of cartilage regenerative medicine .....	47
6. Preclinical research on cartilage regenerative medicine .....	48
7. Clinical application of implant-type tissue-engineered cartilage .....	49
8. Development of implant-type regenerated cartilage .....	50
Acknowledgments .....	50
References .....	50

<sup>☆</sup> This article has previously been published in *Journal of the Japanese Stomatological Society* 2014;63:207 [1].

\* Corresponding author. Tel.: +81 3 5800 8669; fax: +81 3 5800 6832.

E-mail address: [MORI-ORA@h.u-tokyo.ac.jp](mailto:MORI-ORA@h.u-tokyo.ac.jp) (Y. Mori).