

201406005B

別添1

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24年度～26年度 総合研究報告書

研究代表者 高戸 毅

平成27(2015)年 5月

目 次

I.	総合研究報告 「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」に関する研究 高戸 毅	-----	3
II.	研究成果の刊行に関する一覧表	-----	9
III.	研究成果の刊行物・別刷	-----	14

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
（総合）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」に関する研究

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している。

有効性評価法の確立のため、ヌードラットへ移植した再生軟骨組織を超音波、MRI、CTなどを用いて非侵襲的に計測し、その後組織学的、生化学的解析を行った。両者の相関から再生軟骨組織の成熟度を測定する評価項目として、MRI(T2, D値)を選択した。動物実験用のMRI(2テスラ)と臨床機(1.5テスラ)において、同一ファントムを測定した際にT2, D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。

われわれは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た。富士ソフト社のCPCを利用してインプラント型再生軟骨の作製を作製し、東京医科歯科大学、山形大学においてヌードラットへ移植した。組織学的、生化学的に良好な軟骨再生が観察され、長期保存型再生軟骨組織と、他施設への搬送技術が有効であることが示され、安定した再生軟骨移植が可能であることが示された。

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・准教授
荒川 義弘・東京大学・准教授
小室 美子・東京大学・特任講師
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

有効性評価法を確立するため、実験的にヒト3次元皮下再生軟骨を作製した。移植組織としては、線維芽細胞や細胞生存性が低下した軟骨細胞の混入を想定し、①100%ヒト耳介軟骨細胞、②ヒト耳介軟骨細胞：線維芽細胞=10:90、③ヒト耳介軟骨細胞：線維芽細胞=1:99、④100%線維芽細胞、⑤100% 55°C処理ヒト耳介軟骨細胞をそれぞれ 5×10^7 cells /mLで1%アトロコラーゲンに懸濁し、PLLA足場素材 (5 mm x 3 mm x 50 mm) へ播種した。ヌードラット背部皮下へ移植後、2週と8週でヌードラットを産総研に搬送し、超音波、CT、MRI、血流測定などを用いて再生軟骨組織の力学的、生化学的特性を非侵襲的に評価した。その後、ヌードラットから再生軟骨組織を摘出し、トルイジンブルー染色やHE染色などによる組織学的評価、ならびにGAGやCOL2 ELISAなどによる生化学的評価を行った。両者の相関から再生軟骨組織の成熟度を測定する評価項目として、MRI (T2, D値) を選択した。成熟した再生軟骨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 HDxt3T, 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

臨床上的有効性評価には、従来の治療法との比較が不可欠である。そこで、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

再生軟骨組織を、現行のヒト幹細胞臨床研究に則って作製し、富士ソフト社と東京大学が共同開発した再生軟骨の長期保存方法 (特願2011-263837) で保管した。その後、東京大学や治験における製造場所となる富士ソフト社から東京医科歯科大学および山形大学にヒト再生軟骨組織を輸送し、ヌードラットの背部皮下へ移植した。再生軟骨組織の保管期間による影響を検討するため、再生軟骨作製後、保管容器に入れて速やかに輸送、移植する群と、2週間保管

した後、輸送、移植する群とで比較を行った。移植後8週に再生軟骨組織を摘出し、組織学的、生化学的に評価した。

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、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に拡張する必要があるため、ソフトのバージョンアップとシステム開発を行い、実証実験を行った。

3. 製造プロセス・品質管理の簡略化

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。

3-2) 製造検査の効率化

現在の製造プロトコールでは1例あたり、無菌試験、マイコプラズマ否定試験 (培養法・DNA染色法) などに多額の検査費用がかかっている。本年度は、これらの試験を培養液の濁度やマイコプラズマPCRなどので一部代替えし、検査費用の低減をはかるための科学的検証を行った。東京大学医学部附属病院で行った自主臨床研究の3症例で回収した培養上清を用いて、iNtRON e-Myco Mycoplasma PCR Detection KitでPCRを行い、アガロース電気泳動を行った。

4. 改定版ヒト幹細胞臨床研究の申請書作成

治療実施機関を東京大学医学部附属病院口腔外科、東京医科歯科大学医学部附属病院形成外科、山形大学医学部附属病院口腔外科に拡張したヒト幹細胞臨床研究を予定し、申請書などの準備を進めてきた。しかし、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、厚労省、PMDA、産業化を希望している富士ソフト社と協議し、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。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。

(倫理面への配慮)

本研究の動物実験プロトコールに関しては、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。

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

100%ヒト耳介軟骨細胞を使用した移植組織では、移植後2週から8週にかけて成熟が進行した。一方、線維芽細胞が混入している再生軟骨では、ほとんど軟骨再生が認められなかった。熱処理を行って細胞生存性を低下させた細胞を用いた再生軟骨組織では、軟骨基質の蓄積は認められたものの、その程度は低かった(図1)。ELISAやGAGなどの生化学的評価においても、同様の傾向が観察された。TB面積、GAG、COL2 ELISAなどの軟骨基質蓄積のマーカーは、産総研で行った超音波、CT、MRI、血流測定のうち、MRI(T2、D値)と高い正の相関を示すことが明らかとなった(図2)。

図1. 再生軟骨組織における軟骨基質の蓄積

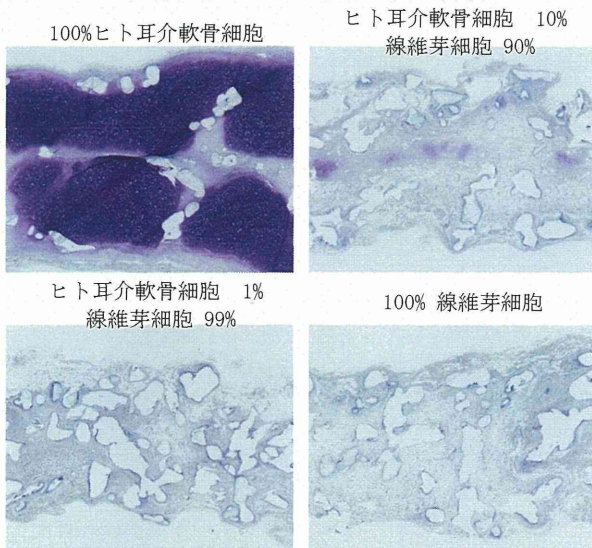
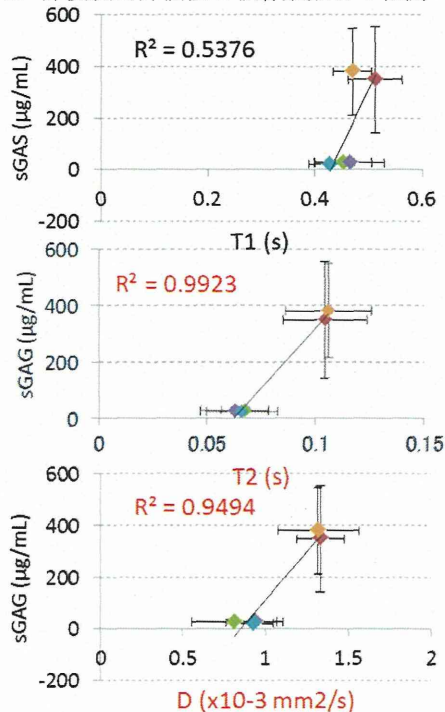


図2. 非侵襲的評価法と軟骨成熟との相関



軟骨成熟の目安として、T2値が0.1sに一致するGd濃度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ールを作成した。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 x10-3mm2/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1.49x10-3-1.68 x10-3mm2/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1.413 x10-3mm2/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

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。

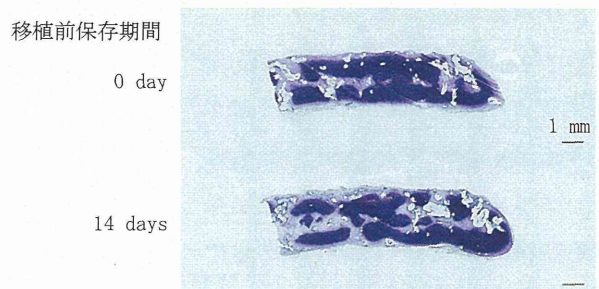
2. 多施設臨床研究の実施

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

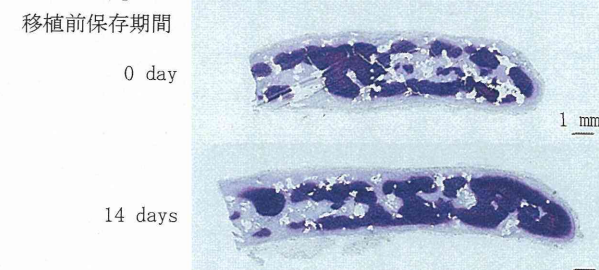
東京医科歯科大学および山形大学においてヌードラットへ移植し、移植後8週で回収した再生軟骨組織は、トルイジンブルー染色、HE染色において、良好な軟骨成熟が観察された。移植前の保管期間の違いによる明らかな差は観察されなかった(図3)。軟骨基質の定量評価を行うためのGlycosaminoglycans (GAGs)測定においても、培養期間の違いに関わらず、高い基質の蓄積が検出された。COL2 ELISAでも同様に、再生軟骨で高い値を示した。

図3. 再生軟骨組織のトルイジンブルー染色

[東京医科歯科大学]



[山形大学]



2-2) 多施設間でのトレーサビリティ構築

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、他施設でも使用できるようにソフトのバージョンアップを行い、実証実験を行った。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。

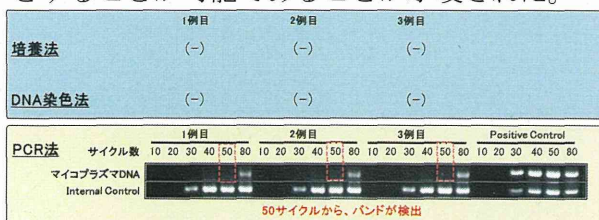
3. 製造プロセス・品質管理の簡略化

3-1) 再生軟骨アプリーケーターの開発

再生軟骨アプリーケーターの素材、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压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移植が可能であった。

3-2) 製造検査の効率化

軟骨細胞の培養上清を用いて、iNtRON e-MycO Mycoplasma PCR Detection Kit でPCRを行った。サンプルには、東京大学医学部附属病院で行った自主臨床研究の3症例で回収した最終培養上清を用いた。同サンプルは、自主臨床研究中のマイコプラズマ否定試験（培養法・DNA染色法）で、陰性であることが明らかとなっている。PCRのサイクル数を増加させていったところ、すべてのサンプルで50サイクルから僅かなバンドが検出された。したがって、Mycoplasma PCRのサイクル数40が陰性、サイクル数50以上が陽性となることを確認することにより、代替試験とすることが可能であることが示唆された。



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。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。

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、プロトコールの作成を進め、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。本プロジェクトの検討により、MRI(T2, D値)が再生軟骨組織の成熟度を反映する評価項目であることが示された。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す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ールに組み込んだ。

2. 多施設臨床研究の実施

富士ソフト社CPCで作製したインプラント型再生軟骨組織を、開発した保存容器で輸送し、東京医科歯科大学や山形大学でヌードラットの背部皮下へ移植した。搬送時間をあまり要さない東京医科歯科大学でも、関東から距離の離れた山形においても、移植された再生軟骨で良好な軟骨再生を認め、搬出入のプロセスが含まれても安定した再生軟骨移植が可能であることが示唆された。

臨床研究には出口を見据えた進め方が必要である。再生医療にかかわる法体系の変化により、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。

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。治験における導入を予定している。

現在の製造プロトコールでは1例あたり、無菌試験、マイコプラズマ否定試験（培養法・DNA染色法）などに約130万円の検査費用がかかっている。本プロジェクトの検討により、マイコプラズマ否定試験（培養法・DNA染色法）の代替として、Mycoplasma PCRが有効であることが示され、サイクル数40、50における検出が妥当であることが示唆された。

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ール作成に、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

インプラント型再生軟骨の有効性評価法を確立する一助として、ヌードラットに移植した再生軟骨組織を超音波診断装置による力学評価、MRI・CTによる生化学評価を、GAGやII型コラーゲンの定量解析、組織学的評価や石灰化の検討を行い、再生軟骨組織の成熟度を測定する評価項目として、T2、D値を選定した。これらの評価項目は、臨床機で撮影することが可能であった。また、治験において再生軟骨の作製場所となる富士ソフト社のCPCを利用した検討を行い、同施設におけるインプラント型再生軟骨の作製と、医療施設への組織搬出入技術が有効であることが示唆された。

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、治験プロトコー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. Yonenaga K, Nishizawa S, Fujihara Y, Asawa Y, Kanazawa S, Nagata S, Takato T, Hoshi K. Application of floating cells for improved harvest in human chondrocyte culture. *Biomed Res.* 2012;33(5):281-9.

2. 高戸 毅, 星 和人, 藤原夕子, 西條英人, 菅野勇樹, 大久保和美, 鄭 雄一, 森 良之. 顎顔面領域における骨軟骨再生医療の現状と展望. *頭頸部外科.* 22(2):121-124, 2012.

3. Goto M, Abe O, Kabasawa H, Takao H, Miyati T, Hayashi N, Kurosu T, Iwatsubo T, Yamashita F, Matsuda H, Inano S, Mori H, Kunimatsu A, Aoki S, Ino K, Yano K, Ohtomo K. Effects of image distortion correction on

voxel-based morphometry. *Magn Reson Med Sci.* 2012; 11(1): 27-34

4. Katsura M, Matsuda I, Akahane M, Sato J, Akai H, Yasaka K, Kunimatsu A, Ohtomo K. Model-based iterative reconstruction technique for radiation dose reduction in chest CT: comparison with the adaptive statistical iterative reconstruction technique. *Eur Radiol* 22(8):1613-23, 2012.

5. Matsuda I, Akahane M, Sato J, Katsura M, Kiryu S, Yoshioka N, Kunimatsu A, Ino K, Ohtomo K. Precision of the measurement of CT numbers: comparison of dual-energy CT spectral imaging with fast kVp switching and conventional CT with phantoms. *Jpn J Radiol* 30(1): 34-9, 2012

6. Sato J, Akahane M, Inano S, Terasaki M, Akai H, Katsura M, Matsuda I, Kunimatsu A, Ohtomo K. Effect of radiation dose and adaptive statistical iterative reconstruction on image quality of pulmonary computed tomography. *Jpn J Radiol* 30(2): 146-53, 2012

7. Tomizawa N, Komatsu S, Akahane M, Torigoe R, Kiryu S, Ohtomo K. Relationship between beat to beat coronary artery motion and image quality in prospectively ECG-gated two heart beat 320-detector row coronary CT angiography. *Int J Cardiovasc Imaging* 28(1): 139-46, 2012

8. Tomizawa N, Nojo T, Akahane M, Torigoe R, Kiryu S, Ohtomo K. Adaptive Iterative Dose Reduction in coronary CT angiography using 320-row CT: assessment of radiation dose reduction and image quality. *J Cardiovasc Comput Tomogr* 6(5):318-24, 2012

9. Kurita M, Okazaki M, Kaminishi-Tanikawa A, Niikura M, Takushima A, Harii K. Differential expression of wound fibrotic factors between facial and trunk dermal fibroblasts. *Connect Tissue Res* 2012; 53: 349-54.

10. Aini H, Ochi H, Iwata M, Okawa A, Koga D, Okazaki M, Sano A, Asou Y. Procyandin B3 prevents articular cartilage degeneration and heterotopic cartilage formation in a mouse surgical osteoarthritis model. *PLoS One.* 2012; 7:e37728.

11. Nitta N, Misawa M, Homma K, Shiina T. Elasticity evaluation of regenerating cartilage sample based on laser Doppler measurement of ultrasonic particle velocity. *Jpn. J. Appl. Phys.* 2012;51(7):07GF15-1-8.

12. 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.

13. 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.

14. Matsuyama M, Fujihara Y, Inaki R, Nishizawa S, Nagata S, Takato T, Hoshi K: Evaluation of in vivo migration of chondrocytes from tissue-engineered cartilage that was subcutaneously transplanted in mouse model. Open J Regen Med. 2013;2(4):93-8.

15. Mori Y, Kanazawa S, Watanabe M, Suenaga H, Nagata S, Fujihara Y, Takato T, Hoshi K: Usefulness of agarose mold as a storage container for three-dimensional tissue-engineered cartilage. Mater Sci Appl. 2013;4(8):73-8.

16. 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.

17. 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

18. 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.

日本臨牀 (印刷中)

<学会発表>

1. Takato T. The Present and Future of Bone and Cartilage Regenerative Medicine in the Oral and Maxillofacial Area. 21st European Association of Cranio-Maxillofacial Surgery. 11-15 Sep 2012, Croatia.

2. 高戸毅: 骨・軟骨再生医療の現状と将来展望. 第22回日本歯科医学会総会 2012年11月10日 大阪

3. Takato T. Application of bone and cartilage regenerative medicine in oral and maxillofacial areas. 10th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery. 15-16 Nov 2012, Indonesia.

4. 高戸毅: 今後の臨床展開が期待される骨軟骨再生医療. 日本再生医療学会 エデュケーショナルセミナー 2013年2月26日 東京

5. 高戸毅: 軟骨再生医療の顎顔面領域への応用. 日本再生医療学会 ランチョンセミナー 2013年3月21日 東

6. 高戸毅: 骨・軟骨再生に関する基礎および臨床研究. 第67回NPO法人日本口腔科学学術集会 2013年5月22-24日 栃木県総合文化センター, 栃木

7. 高戸毅: あごの骨と軟骨の再生医療 歯科の明るい未来. 第29回医学生物学電子顕微鏡技術学会学術講演会 2013年6月7日-9日 神奈川歯科大学, 神奈川

8. Takato T: Nanotechnological Approach for Cartilage Regenerative Medicine. Frontiers in Nanomedicine and Imaging Symposium, June 21-22, 2013, Lausanne, Switzerland, Ecole Polytechnique Federale de Lausanne (EPFL)

9. 高戸毅: 学融合が拓く未来の医療. 疾患生命工学センター発足10周年記念シンポジウム 2013年9月24日-25日 東京大学伊藤国際学術研究センター, 東京

10. Takato T: Clinical application of bone and cartilage regenerative medicine. Seoul Symposium 2013, October 25, Seoul, Korea

11. 高戸毅: 新たな顎骨および軟骨再建技術の開発. 耳鼻咽喉科分野同窓会総会, 2013年12月1日 日本外国特派員協会 (プレスクラブ), 東京

12. Takato T, Saijo H, Fujihara Y, Hoshi K: Treatment of Cleft Lip Nasal Deformity-From Birth to Adult-. The Workshop for Medical and Dental Cooperation with Vietnam & Japan Hanoi, 23 November 2013, Vietnam

13. Takato T: Clinical application of regenerative medicine in oral and maxillofacial areas. The Workshop for Medical and Dental Cooperation with Japan and Vietnam, November 23-24, Hanoi, Vietnam

Takato T: Clinical application of cartilage regenerative medicine. Asia Forum for Aesthetic Surgery & Medicine [AFAS], March 29, 2014, COEX Grand Ballroom(1F), Seoul, Korea

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
Yonenaga K, Nishizawa S, Fujihara Y, Asawa Y, Kanazawa S, Nagata S, Takato T, Hoshi K.	Application of floating cells for improved harvest in human chondrocyte culture.	Biomed Res	3(5)	281-289	2012
高戸 毅, 星 和人, 藤原夕子, 西條英人, 菅野勇樹, 大久保和美, 鄭雄一, 森 良之.	顎顔面領域における骨軟骨再生医療の現状と展望.	頭頸部外科	22(2)	121-124	2012
Goto M, Abe O, Kabasawa H, Takao H, Miyati T, Hayashi N, Kurosu T, Iwatsubo T, Yamashita F, Matsuda H, Inano S, Mori H, Kunimatsu A, Aoki S, Ino K, Yano K, Ohtomo K.	Effects of image distortion correction on voxel-based morphometry.	Magn Reson Med Sci	11(1)	27-34	2012
Katsura M, Matsuda I, Akahane M, Sato J, Akai H, Yasaka K, Kunimatsu A, Ohtomo K.	Model-based iterative reconstruction technique for radiation dose reduction in chest CT: comparison with the adaptive statistical iterative reconstruction technique.	Eur Radiol	22(8)	1613-23	2012

Matsuda I, Akahane M, Sato J, Katsura M, Kiryu S, Yoshioka N, Kunimatsu A, Ino K, Ohtomo K.	Precision of the measurement of CT numbers: comparison of dual-energy CT spectral imaging with fast kVp switching and conventional CT with phantoms.	Jpn J Radiol	30(1)	34-39	2012
Sato J, Akahane M, Inano S, Terasaki M, Akai H, Katsura M, Matsuda I, Kunimatsu A, Ohtomo K.	Effect of radiation dose and adaptive statistical iterative reconstruction on image quality of pulmonary computed tomography.	Jpn J Radiol	30(2)	146-153	2012
Tomizawa N, Komatsu S, Akahane M, Torigoe R, Kiryu S, Ohtomo K.	Relationship between beat to beat coronary artery motion and image quality in prospectively ECG-gated two heart beat 320-detector row coronary CT angiography.	Int J Cardiovasc Imaging	28(1)	139-146	2012
Tomizawa N, Nojo T, Akahane M, Torigoe R, Kiryu S, Ohtomo K.	Adaptive Iterative Dose Reduction in coronary CT angiography using 320-row CT: assessment of radiation dose reduction and image quality.	J Cardiovasc Comput Tomogr	6(5)	318-324	2012
Kurita M, Okazaki M, Kaminishi-Tanikawa A, Miikura M, Takushima A, Harii K	Differential expression of wound fibrotic factors between facial and trunk dermal fibroblasts.	Connect Tissue Res	53	349-354	2012
Aini H, Ochi H, Iwata M, Okawa A, Koga D, Okazaki M, Sano A, Asou Y.	Procyanidin B3 prevents articular cartilage degeneration and heterotopic cartilage formation in a mouse surgical osteoarthritis model.	PLoS One	7	e37728	2012

新田 尚隆	Elasticity evaluation of regenerating cartilage sample based on laser Doppler measurement of ultrasonic particle velocity.	Jpn J Appl Phys	51(7)	07GF15-1-8	2012
Katsura M, Matsuda I, Akahane M, Yasaka K, Hanaoka S, Akai H, Sato J, Kunimatsu A, Ohtomo K.	Model-based iterative reconstructive technique for ultralow-dose chest CT: comparison of pulmonary nodule detectability with the adaptive statistical iterative reconstruction technique.	Investigative Radiol	48(4)	206-212	2013
Matsuyama M, Fujihara Y, Inaki R, Nishizawa S, Nagata S, Takato T, Hoshi K.	Evaluation of in vivo migration of chondrocytes from tissue-engineered cartilage that was subcutaneously transplanted in mouse model.	Open J Regenerative Meda	2(4)	93-98	2013
Mori Y, Kanazawa S, Watanabe M, Suenaga H, Nagata S, Fujihara Y, Takato T, Hoshi K.	Usefulness of agarose mold as a storage container for three-dimensional tissue-engineered cartilage.	Mater Sci Appl	4(8)	73-78	2013
松本和彦, 荒川義弘, 小池竜司, 中村哲也, 花岡英紀, 本間真人, 吉澤久.	大学病院間の共同IRB等の体制 - 大学病院臨床試験アライアンスにおける検討.	臨床薬理	44	207-215	2013
Arakawa Y.	Recent Progress and Challenges in Investigator-driven Clinical Development of Novel Drugs and Medical Devices at The University of Tokyo Hospital.	YAKUGAKU ZASSHI	133	201-208	2013
荒川義弘、山崎力.	東京大学医学部附属病院臨床研究支援センター: 早期・探索的臨床試験から市販後の臨床試験までのシームレスな支援体制.	医学のあゆみ	244	1154-1160	2013

荒川義弘.	アカデミア主導の臨床開発の拠点とネットワーク.	医学のあゆみ	247	472-477	2013
Rodotheou P, Wang W, Itoh S, Okazaki M, Takakuda K	Laser-perforated porous nonwoven chitosan nerve conduit.	J Biomed Sci Eng	8(2)	139-151	2013
Nitta N, Hyodo K, Misawa M, Hayashi K, Shirasaki Y, Homma K, Shiina T.	Calibration method in elasticity evaluation of regenerating cartilage based on ultrasonic particle velocity.	Jpn J Appl Phys	52(7)	07HF24-1-5	2013
Aoki T, Nitta N, Furukawa A.	Non-invasive speed of sound measurement in cartilage by use of combined magnetic resonance imaging and ultrasound: an initial study.	Radiol Phys Tech	6(2)	480-485	2013
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	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 Cell	32(5)	1208-19	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

Application of floating cells for improved harvest in human chondrocyte culture

Kazumichi YONENAGA^{1,2}, Satoru NISHIZAWA¹, Yuko FUJIHARA¹, Yukiyo ASAWA¹, Sanshiro KANAZAWA¹, Satoru NAGATA³, Tsuyoshi TAKATO², and Kazuto HOSHI¹

Departments of ¹Cartilage & Bone Regeneration (Fujisoft), and ²Sensory & Motor System, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Hongo 7-3-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan; ³Nagata Microtia and Reconstructive Plastic Surgery Clinic, Sasame-minamicho 22-1 Totsuka, Saitama 335-0035, Japan

(Received 22 June 2012; and accepted 30 July 2012)

ABSTRACT

Cell culture medium, which must be discarded during medium change, may contain many cells that do not attach to culture plates. In the present study, we focused on these floating cells and attempted to determine their usefulness for cartilage regeneration. We counted the number of floating cells discarded during medium change and compared the proliferation and differentiation between floating cells and their adherent counterparts. Chondrocyte monolayer culture at a density of 5×10^3 cells/cm² produced viable floating cells at a rate of $2.7\text{--}3.2 \times 10^3$ cells/cm² per primary culture. When only the floating cells from one dish were harvested and replated in another dish, the number of cells was 2.8×10^4 cells/cm² (approximately half confluency) on culture day 7. The number of cells was half of that obtained by culturing only adherent cells (5×10^4 cells/cm²). The floating and adherent cells showed similar proliferation and differentiation properties. The recovery of floating cells from the culture medium could provide an approximately 1.5-fold increase in cell number over conventional monolayer culture. Thus, the collection of floating cells may be regarded as a simple, easy, and reliable method to increase the cell harvest for chondrocytes.

Research on cartilage regeneration is relatively advanced compared with that on other tissues, and some protocols have already been applied in clinical settings. Autologous chondrocytes have been implanted in patients with focal cartilage defects in their joints since as early as the 1990s (4), and these cells have been used for nasal augmentation by injection into subcutaneous pockets (31). It is important for further progress in cartilage regeneration to increase the number of chondrocytes that can be harvested.

Physiologically, chondrocytes proliferate and mul-

tiply even when surrounded by solid extracellular matrix in all directions. Thus, cartilage expands by means of interstitial growth *in vivo* (2, 5). However, once chondrocytes are isolated from native tissue and begin to multiply in culture, they inevitably lose their ability to produce cartilaginous matrix components such as glycosaminoglycans (GAG) and type II collagen (COL2), and they begin to produce type I collagen (COL1) in a process termed dedifferentiation (3). The prevention of dedifferentiation in cultured chondrocytes and the redifferentiation of dedifferentiated cells are issues to be solved in the cytological fields (17).

To prevent excessive dedifferentiation, a sufficient number of chondrocytes should be obtained to permit minimal multiplication of cells because an increase in the number of cell passages performed reduces the capacity of the chondrocytes for differentiation or cartilage regeneration *in vivo* (6, 30).

Address correspondence to: Kazuto Hoshi, M.D., Ph.D. Department of Cartilage & Bone Regeneration (Fujisoft), Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Hongo 7-3-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan
Tel: +81-3-3815-5411 (ext. 37386), Fax: +81-3-5800-9891
E-mail: pochi-ky@umin.net

Long-term culture with repeated passaging also increases the risk of bacterial infection or cross-contamination of cells from other donors. Shortening the culture period may benefit patients by reducing the therapy period, thereby improving quality of life and health (8).

We attempted to improve the efficacy of collagenase digestion for chondrocyte isolation from cartilage and to harvest the maximum possible number of viable cells (34). With this method, we successfully obtained 1×10^7 viable cells/g from the tissue, which was approximately 10-fold higher than the value previously reported (1×10^6 cells/g) (15). We seeded cells at a low cell density (5,000 cells/cm²), which improved the efficacy of cell expansion and suggests that the actual gain would be increased by more than 1 order of magnitude. However, we often observed cells that did not adhere to culture plates and continued to float over a certain time period after cell seeding. In general, we changed the culture medium every 2 or 3 days (23, 24), at which time these floating cells were generally discarded.

We reasoned that if adequate space is provided for the attachment of cells, the cells floating within the medium may effectively adhere to the plate and begin to proliferate. Thus, in the present study, we focused on the non-adherent cells in the cell culture medium. We examined the characteristics of these floating cells and discuss the possibility of using them in clinical applications.

MATERIALS AND METHODS

Cell isolation and monolayer culture. All procedures were approved by the Ethics Committee of the University of Tokyo Hospital (ethics permission number 622). Remnant auricular cartilage from 3 microtia patients was obtained during surgery in compliance with the Helsinki Principles. The chondrocytes were isolated by digestion with 0.3% collagenase over 24 h (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan). The primary auricular chondrocytes were seeded in 35-mm collagen type I-coated plastic culture dishes ($n = 36$) at a density of 5×10^3 cells/cm² and cultured in 2 mL of Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 (DMEM/F12) containing 5% human serum supplemented with fibroblast growth factor-2 (100 ng/mL) and insulin (5 μ g/mL) as previously described (10, 22).

We divided the 36 dishes into 3 groups ($n = 12$ per group). The media were changed at different times (day 1, 2, or 3 of culture) in each group. Floating cells, which are usually discarded, were

collected from the media (Fig. 1). The samples from each day were further divided into 2 subgroups: centrifugation and non-centrifugation. In the centrifugation group ($430 \times g$ for 5 min), the supernatants were discarded before seeding. The cells were counted using a NucleoCounter (ChemoMetec, Allerod, Denmark) (35). In contrast, the entire cell suspension was used for seeding in the non-centrifugation group. The cells obtained from 1, 2, or 3 dishes of primary cultures were combined into another, separate dish. Floating cells were cultured in a monolayer and then harvested at day 7, at which time the adherent cells had also reached confluence. Harvested cells were divided into three groups: adherent cells only (A), floating cells only (F), and mixed cell culture, in which the numbers of adherent and floating cells were equal (F + A) (Fig. 1). These cells were reseeded at a density of 2.5×10^3 cells/cm² and then incubated for 1 week, at which time the gene expression of type I collagen α I chain (COL1A1) and type II collagen α I chain (COL2A1) was evaluated. We used trypsin-EDTA solution to lift the cells during subculturing.

Pellet culture. For the pellet culture, cultured chondrocytes were suspended in 0.8% atelocollagen solution (Kawaken Fine Chemicals, Tokyo, Japan) at a density of 10^7 cells/mL. The atelocollagen pellets were cultured in DMEM/F12 medium with soluble factors for 3 weeks. We used recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2, kindly provided by Astellas Pharma, Tokyo, Japan), rh-insulin (MP Biomedicals, Irvine, CA), and L-3, 3', 5-triiodothyronine (T3, EMD Bioscience). The dosage of each factor was determined to be 200 ng/mL BMP-2, 5 μ g/mL insulin, and 100 nmol/L T3 on the basis of our and other previous reports (7, 9, 11, 12, 14, 16, 18, 21, 28, 36).

Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction analysis. Total RNA was isolated from the chondrocytes with ISOGEN (Wako Pure Chemical Industries) according to the manufacturer's protocol. Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 1 μ g of total RNA using the Superscript II reverse transcriptase kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). The cDNA of the target genes, including the PCR amplicon sequences, was amplified by PCR and used as standard templates after linearization. A QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen, Hilden, Germany) was used, and SYBR Green PCR amplification and real-time fluorescence detection were performed with the ABI 7700 sequence detection

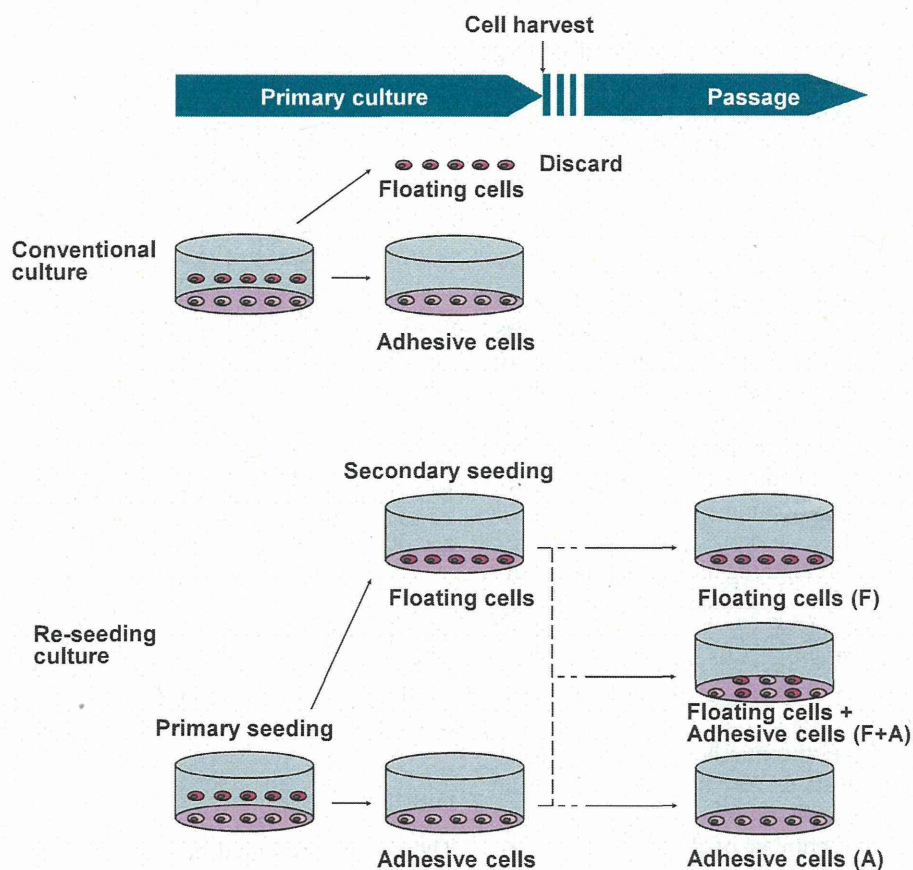


Fig. 1 Experimental design. (Upper) In conventional culture, we discarded the floating cells. (Lower) In this experiment, floating cells were collected from the media for reseeded culture. On day 7 of culture, we subcultured the cells under three conditions: only floating cells (F), both floating cells and adherent cells (F + A), and only adherent cells (A).

system. All reactions were run in quadruplicate. The sequences of the primers were 5'-CTCCTCGCTTTCCTTCTCT-3' and 5'-GTGCTAAAGGTGCCAATGGT-3' for COL1A1; 5'-GAGTCAAGGGTGATCGTGGT-3' and 5'-CACCTTGGTCTCCAGAAGGA-3' for COL2A1; and 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA-3' and 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3' for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).

GAG measurement. The sulfated GAG content was measured using an Alcian blue binding assay (Wieslab AB, Lund, Sweden). After digestion of the chondrocyte-containing atelocollagen pellet in 0.3% collagenase for 1 h at 37°C, the cell debris and insoluble material were removed by centrifugation at 6,000 × g for 30 min. GAG in the supernatant was precipitated using Alcian blue solution, and the sediments were redissolved in 4 mol/L GuHCl-33% propanol solution by centrifugation at 6,000 × g for

15 min. The spectrophotometric absorbance of the mixture was measured at 600 nm.

Enzyme-linked immunosorbent assay for COL1 and COL2. Collagen protein levels in the pellets were quantified by an enzyme-linked immunosorbent assay using a human type 1 and type 2 collagen detection kit (Chondrex, Redmond, WA). The pellets were dissolved in 10 mg/mL pepsin and 0.05 M acetic acid at 4°C for 48 h and then incubated in 1 mg/mL pancreatic elastase, 0.1 mmol/L Tris, 0.02 mol/L NaCl, and 5 mmol/L CaCl₂ (pH 7.8–8.0) at 4°C overnight. The samples were centrifuged at 9,100 × g for 5 min to remove the residue. The collagen proteins were bound by polyclonal anti-human COL1 or COL2 antibodies (Chondrex) and detected by biotinylated secondary antibodies and streptavidin peroxidase. *o*-Phenylenediamine and H₂O₂ were added to the mixture, and the spectrophotometric absorbance of the mixture was measured at 490 nm.

Histology. The regenerated cartilage was fixed with 4% paraformaldehyde, embedded in optimal cutting temperature (OCT) compound (Sakura, Tokyo, Japan), and cryosectioned into 10- μ m-thick slices. The sections were stained with toluidine blue O.

RESULTS

Viable floating cells from day 1, 2, or 3 of culture were harvested in amounts ranging from 2.7×10^3 to 3.2×10^3 cells/cm², with no significant differences observed among the groups. The floating cells were counted constantly regardless of the harvested period within 3 days (Fig. 2). We harvested the floating cells on day 1, 2, or 3 and transferred them to new dishes with or without centrifugation (Fig. 3). Regardless of whether the floating cells were removed from the primary culture on day 1, 2, or 3, the number of adherent cells remaining in the primary cultures on day 7 was almost identical (approximately 5×10^4 cells/cm²) in each group (Fig. 3 and Fig. 4A). For the reseeded of floating cells, centrifugation before seeding appeared to improve cell adhesion and proliferation (Fig. 3).

On day 7 of culture, the number of floating cells harvested from one dish on day 1 and reseeded on one culture dish reached approximately 2.8×10^4 cells/cm², whereas the number of floating cells combined from two dishes reached 4.2×10^4 cells/cm², and that from three dishes reached 4.8×10^4 cells/cm². These values were similar when the floating cells were harvested and reseeded on day 2, but they clearly decreased and were below the limit of detection for counting when the cells were harvested and reseeded on day 3 of culture (Fig. 4B). Thus, the number of cells reached a maximum when the cells harvested from one original dish on day 1 of culture were reseeded onto a new dish (Fig. 4C).

We next examined the properties of the regenerated cartilage containing floating cells and/or adherent cells (Fig. 5). Chondrocytes were embedded in 0.8% atelocollagen gel at a density of 10^7 cells/mL. We used RT-PCR to examine the expression of COL1A1 and COL2A1 in cultured human auricular chondrocytes embedded in these three-dimensional matrices after 1 week. No significant differences were observed among groups containing floating cells and adherent cells in different ratios (Fig. 5). At 3 weeks, the sizes of the pellets were almost identical in all of the groups (Fig. 6A, *Upper*), and histological analyses using toluidine blue O staining revealed similar accumulation of proteoglycan (Fig. 6A, *Lower*). The levels of COL2 and GAG, both of which

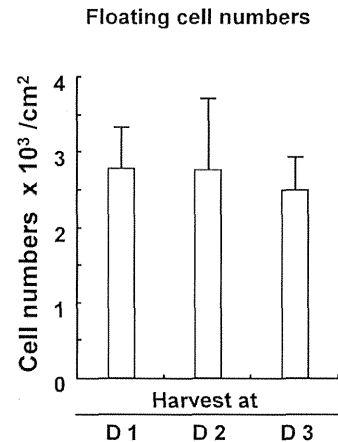


Fig. 2 The number of viable floating cells on day 1, 2, or 3 of culture before reseeded was not significantly different. All values are presented as the mean and standard deviation of three samples per group.

are specific components of cartilaginous tissues, were equivalent in regenerated cartilage produced by floating cells and adherent cells, and the levels of COL1 were comparable across groups (Fig. 6B).

DISCUSSION

The results presented here indicate that the proliferation capacity of floating cells is the same as that of adherent cells. We postulate that the initially non-adherent cells represent the population of cells that did not have adequate space to adhere in primary cultures. Cells may also become less adherent during cell division (19). During this period, some cells detach from the culture dishes, possibly becoming floating cells. The floating cells may be continuously produced, even after primary culture.

With centrifugation before reseeded, *i.e.*, before the medium change, the cells strongly adhered to the plates and began to proliferate, as shown in Fig. 3. This may have been caused by some collagenase remaining in the medium of the primary culture when the washing step performed after enzymatic digestion was not sufficient. High concentrations and long incubation periods with collagenase are cytotoxic, as shown in a previous study (34). Another explanation for our observation is that a shortage of nutrition or growth factors may have occurred because of the decrease in the number of medium changes, which may have reduced the cell viability and adhesion of the chondrocytes. Therefore, although frequent medium changes with centrifugation may increase the risk of cell loss during

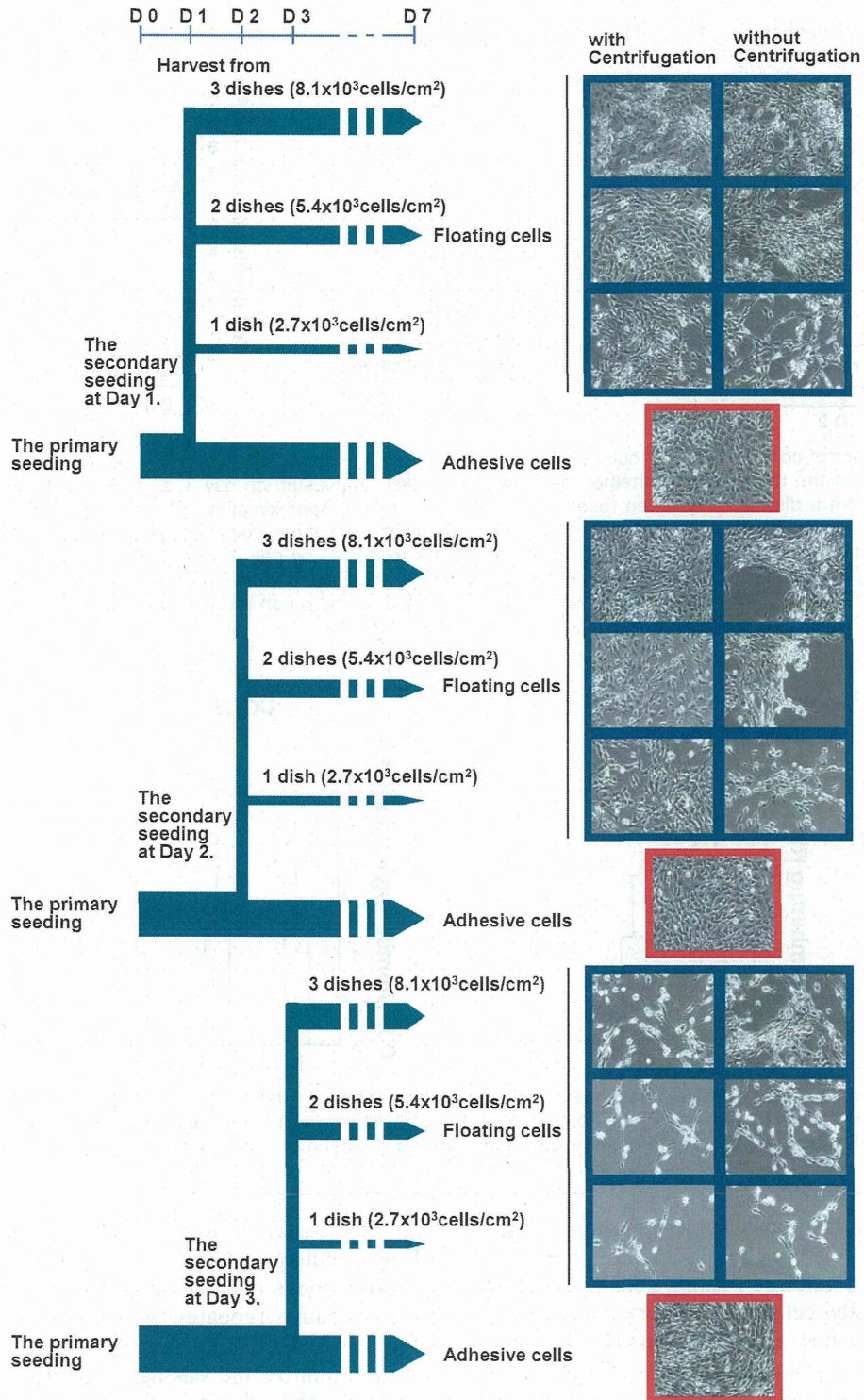


Fig. 3 Phase-contrast images obtained upon reseeded of floating cells. The floating cells harvested from 1, 2, or 3 dishes were plated on a new dish with or without centrifugation. Regardless of whether floating cells were removed from the primary culture on day 1, 2, or 3, the number of adherent cells remaining in the primary culture dish on day 7 was almost identical across groups (red squares). Centrifugation before reseeded improved the adhesion and proliferation of floating cells (blue square).

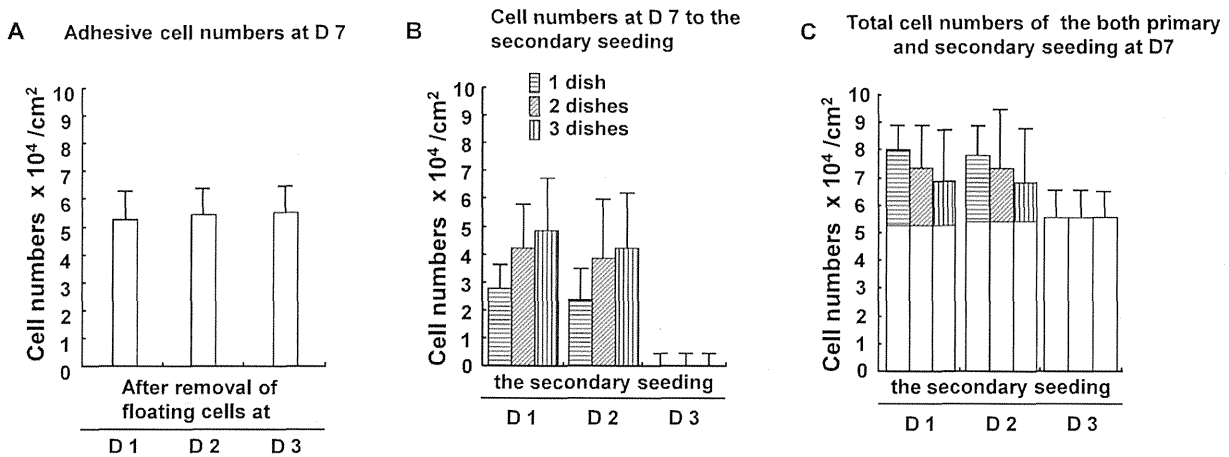


Fig. 4 The number of cells on day 7 of culture. (A) The conventionally cultured chondrocytes reached a density of approximately 5×10^4 cells/cm² regardless of whether the floating cells were harvested on day 1, 2, or 3 of culture. (B) On day 7 of culture, cells from a dish that had been reseeded on day 1 numbered approximately 2.8×10^4 cells/cm², cells combined from two dishes numbered 4.2×10^4 cells/cm², and cells combined from three dishes numbered 4.8×10^4 cells/cm²; the numbers were similar for cells reseeded on day 2. However, cells reseeded on day 3 were markedly reduced in number on day 7 of culture. (C) The maximum number of cells was recovered when the floating cells obtained from one dish on day 1 of culture were reseeded on one new dish. All values are presented as the mean and standard deviation of three samples per group.

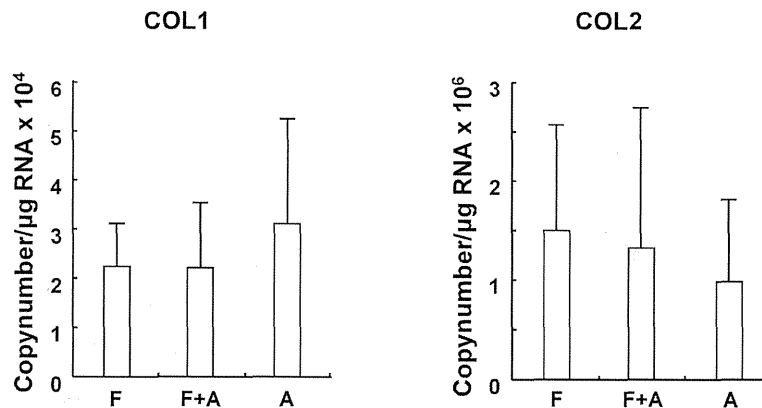


Fig. 5 COL1A1 and COL2A1 mRNA levels measured by real-time RT-PCR after 1 week of pellet culture did not significantly differ among pellets consisting of only floating cells (F), both floating cells and adherent cells (F + A), and only adherent cells (A). All values are presented as the mean and standard deviation of three samples per group.

cell passaging, a medium change is required before the reseeded of floating cells.

The number of cultured floating cells prominently decreased when the cells were harvested and reseeded on day 3 of culture (Fig. 4B), possibly because a culture time of only 4 days was insufficient. Thus, we could not accurately count the cells using the NucleoCounter (35).

The COL2 evaluated in this study is a specific cartilage component. COL2 forms fibrils that permit cartilage to entrap proteoglycan aggregates and im-

part tensile strength to the tissue. Aggrecan is a cartilage-specific proteoglycan whose levels are elevated in cartilaginous regions where COL2 is also present (27). Because repeated passaging decreased the COL2 level and cell proliferation (26), it is preferable to minimize the passaging of the cells to preserve their physiological function.

Every laboratory engaged in the research and development of biomedical applications utilizes various unique protocols to provide three-dimensional structures (13, 20, 25). Future directions include the

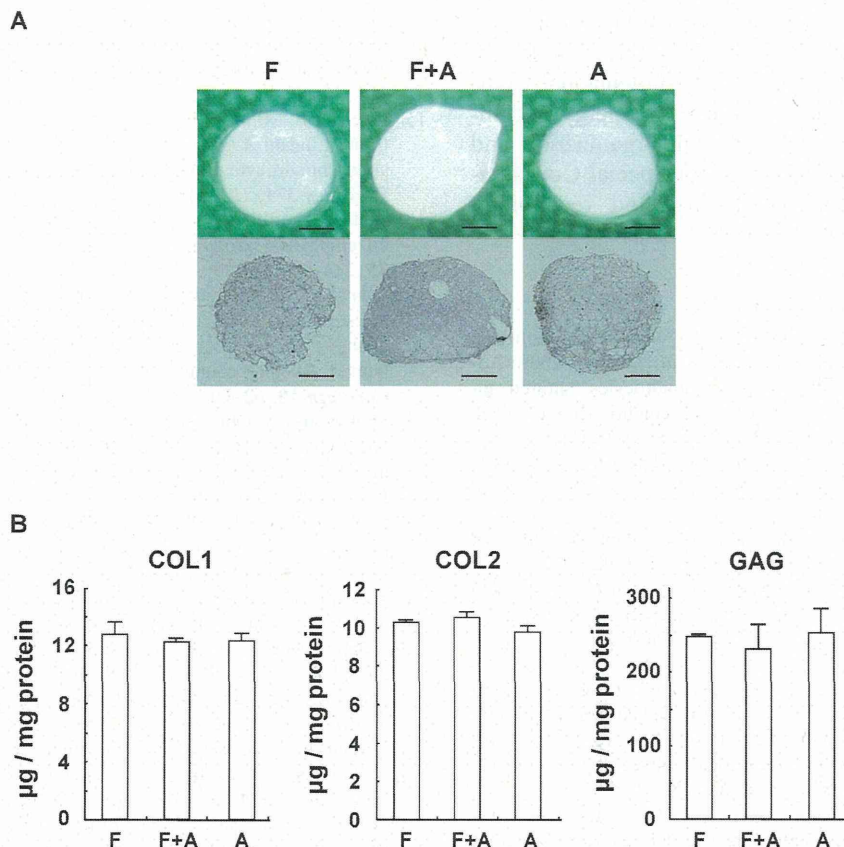


Fig. 6 Histological and biochemical analyses of regenerated cartilage pellets. (A) Macroscopic (Upper) and histological findings with toluidine blue O staining (Lower) after 3 weeks of pellet culture. Scale bars, 1 mm. (B) COL1, COL2, and GAG protein levels after 3 weeks of pellet culture. No significant differences were observed between the three groups, *i.e.*, floating cells only (F), both floating cells and adherent cells (F + A), and adherent cells only (A). All values are presented as the mean and standard deviation of three samples per group.

manufacture of regenerated cartilage with a three-dimensional structure and a size of $5 \times 0.5 \times 0.5 \text{ cm}^3$ for the correction of congenital nasal deformities (1). At least 1×10^8 cells will be necessary for the production of regenerated cartilage of this size. Based on the results of a previous report regarding the concentration of collagenase required for digestion and the cell density at seeding, we consistently collected 1×10^6 cells from approximately 0.1 g of biopsied cartilage (34). When we seeded these cells at a density of 3,000–10,000 cells/cm², we obtained over 1×10^7 cells at the end of the primary culture and reached the goal of over 1×10^8 cells on the subsequent passage. If the floating cells are recovered from culture, an approximately 1.5-fold increase in the cell number can be achieved. Thus, the volume of biopsied tissue (for example, original weight 0.1 g) can be decreased by one-third (0.067 g), and the application of this novel method may reduce

the surgical invasiveness of the biopsy and the physical strain on patients (22, 29, 31, 32).

Minimal invasiveness is one of the major goals of biomedical techniques, and our method may increase the advantages of this approach (33). Moreover, if this culture method can be used not only for primary cultures but also for subcultures, it may permit large quantities of cultured cells to be obtained in a short time. This method could be applied to various cell culture systems and may be commonly used as a key biomedical technique.

Acknowledgements

We thank Mr. Takashi Nakamoto, Ms. Miki Akizawa, Mr. Motoki Yagi, Mr. Tomoaki Sakamoto, and Mr. Makoto Watanabe for technical support. This work was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture,