

Usefulness of Agarose Mold as a Storage Container for Three-Dimensional Tissue-Engineered Cartilage

Yoshiyuki Mori¹, Sanshiro Kanazawa^{2,3}, Makoto Watanabe^{2,3}, Hideyuki Suenaga¹, Kazumi Okubo^{1*}, Satoru Nagata⁴, Yuko Fujihara^{2,3}, Tsuyoshi Takato^{1,2}, Kazuto Hoshi^{1,2,3}

¹Department of Sensory and Motor System Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan;

²Department of Cartilage & Bone Regeneration (Fujisoft), Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan;

³Division of Tissue Engineering, The University of Tokyo Hospital, Tokyo, Japan; ⁴NAGATA Microtia and Reconstructive Plastic Surgery Clinic, Saitama, Japan.

Email: *pochi-tyk@umin.net

Received July 4th, 2013; revised August 1st, 2013; accepted August 10th, 2013

Copyright © 2013 Yoshiyuki Mori *et al.* This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT

The efficiency of substance exchange may be decreased when the thickness and volume of such a tissue-engineered cartilage that is composed of cultured cells and porous scaffold increase. Moreover, during the transport of this construct with complicated shapes, excessive and focal mechanical loading may cause deformation. The establishment of incubation and transport methods is necessary for the three-dimensional tissue-engineered cartilage. Therefore, we investigated the preparation of an agarose mold with a concavity similar to the shape of 3-dimensional tissue-engineered cartilage to prevent excessive and focal concentration of stress, while avoiding interference with substance exchange as much as possible. Firstly, we investigated the preparation at 1% - 4% agarose concentrations. Since the mechanical strength was insufficient at 1%, 2% was regarded as appropriate. Using 2% agarose, we prepared a mold with a 5 × 5 × 5 mm concavity to accommodate tissue-engineered cartilage (5 × 5 × 5 mm mixture of 1.5 × 10⁷ cells and collagen gel), and stored the regenerative cartilage in it for 2 and 24 hours. On comparison with storage in a plastic mold with the same shape in which substance exchanged from side and bottom was impossible, although no significant differences were noted in the number or viability of cells after 2 hours, these were markedly reduced in the plastic mold after 24 hours. It was confirmed that favorable cell numbers and viability were maintained by immediately retaining the regenerative cartilage in the culture medium in the agarose mold and keeping the temperature at 37°C. Since this agarose mold also buffers against mechanical forces loaded on the three-dimensional regenerative tissue, it may be useful as a container for storage and transport of large-sized three-dimensional regenerative tissue.

Keywords: Tissue Engineering; Cartilage; Container; Storage; Transport

1. Introduction

Research and development of regenerative medicine are progressing for various organs [1]. The clinical application of cartilage regenerative medicine has particularly progressed, and a treatment method for cartilage defects involving injecting a gelatinous mixture or a cell suspension has already been clinically applied [2,3]. However, its application is limited to local articular defects or silicon removal after cosmetic surgery of the nose. We introduced a porous material of scaffold and succeeded in the development of tissue-engineered cartilage with a three-dimensional shape and mechanical strength [4,5]. Briefly, we regenerate cartilage with atelocollagen hy-

drogel and a PLLA porous scaffold used as a composite scaffold and apply it for treatment of nasal deformation in patients with cleft lip and palate [6]. The thickness, length, and width of this regenerated cartilage were 3 mm, 5 cm, and 6 mm, respectively, making it larger than previous regenerative cartilage. For this large-sized regenerative tissue prepared with the porous material, techniques of incubation containing cells with a higher density in the end-product and its transport to an operation theater are necessary. However, the efficiency of substance exchange is quite low in such a large-sized regenerative tissue, and central necrosis occurs [7]. In addition, a shape that fits specific regenerative tissue should be given to the storage container because such a construct prepared with a porous material has a complex

*Corresponding author.

shape simulating the human body.

Thus, we focused on agarose, which is used for general biological experiments. Agarose can be readily obtained, sterilized, and purchased cheaply, being very advantageous. Agarose is a plant-derived glycoprotein, and once it is gelled, it has very low adhesiveness to mammalian cells and very little biological influence on the regenerative tissue [8,9].

As it is used as a matrix of electrophoresis, substance diffusibility is favorable, which is advantageous for the storage and culture of regenerative tissue containing abundant cells. In addition, since its gelation properties are marked, the liquid phase can be converted to the gel phase without changing the shape by temperature adjustment during culture and transport, which enables the preparation of a mold with a concavity fitting the shape of regenerative tissue. Mechanical forces loaded on regenerative tissue can be dispersed and reduced using this concave mold. We decided to prepare a mold for regenerative tissue using agarose with the various advantages described above, and use it for culture and transport. In the present study, to investigate the actual usefulness of this agarose mold for the culture and transport of regenerative tissue, we optimized the agarose mold, actually used it for the culture of tissue-engineered cartilage under various conditions, and evaluated the cell properties in the regenerative cartilage. An agarose concentration providing sufficient mechanical strength while allowing smooth substance exchange was established, and agarose molds were prepared at this concentration and used for the culture and storage of regenerative cartilage. The behavior of chondrocytes contained in the regenerative cartilage was evaluated, and the usefulness of the agarose mold was finally investigated.

2. Materials and Methods

2.1. Preparation of Agarose Mold

Agarose (Takara Bio, Otsu, Japan) was used. Agarose was mixed with MEM at a concentration of 1% - 4%, dissolved at 121°C, and agarose fragments with a 15-mm diameter and 5-mm height were prepared at room temperature. To prepare agarose molds, 6 mL of autoclaved agarose solution was added to a 6-well plate (BD, Carlsbad, USA) to create 5 × 5 × 5-mm concavities. For comparison, 5 × 5 × 5-mm plastic molds (Simport, Beloil, Canada) were used.

2.2. Isolation and Analysis of Chondrocytes

After obtaining informed consent, the perichondrium was detached from about 2 - 3 g of residual auricular cartilage surgically excised from a microtia patient. The cartilage was cut into 1-mm³ pieces using a scalpel and incubated in 0.15% collagenase solution at 37°C for 24 hours with

shaking in a thermostat [10]. The lysate was filtered through a cell strainer with a pore size of 100 μm to remove residues, and then centrifuged at 500 × g for 5 minutes to isolate human chondrocytes. The isolated chondrocytes were seeded in a collagen type I-coat plastic tissue culture dish at a density of 2500 cells/cm², and cultured in chondrocyte growth medium (DMEM/F-12 containing 5% human serum, 100 ng/mL FGF-2, and 5 μg/mL insulin) [11,12] in a 37°C /5% CO₂ incubator. The medium was changed twice a week. Cells were treated with trypsin-EDTA solution and passaged before reaching confluence. After 2 passages, cells were collected and subjected to experiments.

Human auricular chondrocytes and 3% atelocollagen gel (KOKEN, Tokyo, Japan) were mixed, adjusting the cell concentration to 1.0 × 10⁸ cells/ml and gel concentration to 1% as regenerative cartilage [4,13].

2.3. Evaluation Method

The mechanical strength was measured using Venustron (Axiom, Fukushima, Japan). Under computer control, the motor-driven sensor unit automatically presses down on the surface of the materials and provides an indentation force and a decrease in the resonant frequency. The resonant frequency of the sensor was set to 50 Hz, while the maximum depth of indentation was 1 mm. Young's modulus can be calculated by the indentation force and the decrease in the resonant frequency, based on the principles previously reported [14,15]. It was measured 5 times, and the mean and standard deviation were calculated. For measurements of the cell properties, the sample was treated with 8 mL of 0.3% collagenase at 37°C until collagen was digested (about 60 minutes), and the numbers of viable and dead cells, as well as cell viability, were determined using NucleoCounter (Chemometec, Gydevang, Denmark) [16].

3. Results

Firstly, the agarose concentration to prepare agarose molds was evaluated. One to four percent agarose gel was prepared, and the mechanical strength was measured. Young's modulus of agarose gel increased in a concentration-dependent manner, but the strength of 1% agarose gel was less than 100 kPa and insufficient to retain the external shape. The strength of a 2% or higher agarose gel exceeded 200 kPa and could retain the external shape (Figure 1). Considering that a low concentration is advantageous for substance diffusion, we adopted a 2% agarose concentration for agarose molds.

Agarose molds to retain regenerative cartilage were prepared using 2% agarose gel. In order to evaluate the usefulness of this agarose mold, we made the regenerative cartilage consisting of cultured chondrocytes (1.5 ×

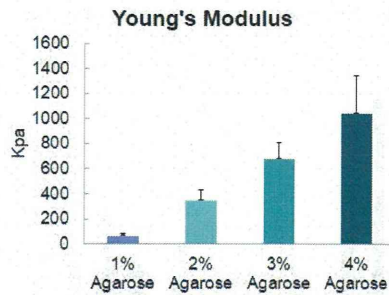


Figure 1. Mechanical strength of agarose. The strength of agarose gel increased in a concentration-dependent manner.

10^7 cells) and atelocollagen (150 μ L): in the agarose mold in a humid bath (Figure 2, Group A), in the agarose mold and combined with medium (Figure 2, Group B), or in a plastic mold with no substance permeability in a humid bath (Figure 2, Group C) at 37°C for 2 hours. When the mechanical strength of the regenerative cartilage was measured, Young's modulus was about 20 kPa in Groups A and B, but less than 10 kPa in Group C (Figure 2 Young's modulus). On the other hand, the indentation force was about 2 g in all groups, showing no marked difference among the groups (Figure 2 Pressure), nor was there a marked decrease in the resonant frequency (Figure 2 Tactile).

The numbers of chondrocytes and the cell viability of the regenerative cartilages were measured. The number of administered cells was 1.5×10^7 cells. The total number of cells after 2-hour storage at 37°C was approximately 1.3×10^7 cells in all groups, showing no marked difference. The numbers of dead and viable cells and the cell viability were 6×10^5 , 1.2×10^7 , and approximately 95%, respectively, in all groups, showing no significant differences among the groups (Figure 3).

In each group, the molds were stored for another 22 hours in a humid bath at 37°C (Figure 4, Group H), combined with medium and stored at 37°C (Figure 4, Group M), or in a humid bath at 4°C (Figure 4, Group L). The total number of cells markedly decreased in the groups both contained in the plastic mold and stored at 37°C. The number of viable cells and the cell viability were lower in the groups contained in the plastic mold under all conditions. In the group contained in the agarose mold and combined with medium (Figure 4, Group B), the number of cells and the cell viability were still relatively favorable after 24 hours. In the group contained in the agarose mold and stored at 4°C (Figure 4, Group AL) and the group in the agarose mold, combined with medium, and stored at 37°C (Figure 4, Group B), approximately 80% of administered cells were retained after 24 hours, and the cell viability was higher than 90%, suggesting that these may be used as favorable storage conditions.

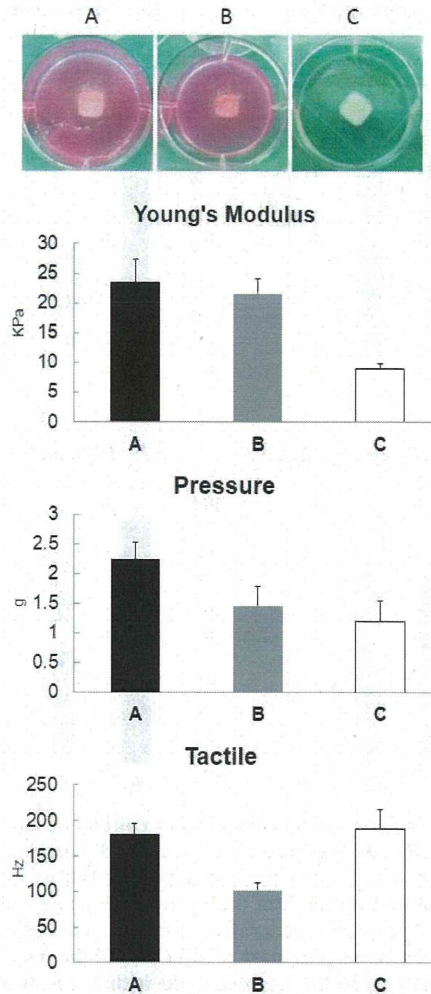


Figure 2. Mechanical strength of regenerated cartilage prepared using the agarose mold. Cultured human chondrocytes (1.5×10^7 cells) were mixed with 150 μ L of 1% atelocollagen and placed in the agarose (A, B) and plastic (C) molds to prepare regenerative cartilage. The regenerative cartilages prepared at 37°C for 2 hours: in the agarose mold (A), in the agarose mold with 2 mL of MEM (B), and in a plastic mold with no substance permeability (C), were compared. Young's modulus was calculated by indentation force (Pressure) and a decrease in resonant frequency (Tactile).

4. Discussion

In the present study, the agarose mold was used as a container to preserve and store regenerative tissue with an about 5-mm thickness in which cells were present at a high density (10^8 /mL). It was suggested that substance exchange can be maintained for 24 hours in the agarose mold, and cell viability in the tissue can be retained. In addition, the agarose mold stably holds the tissue-engineered constructs and buffers physical impacts, which are very advantageous for the transport of vulnerable

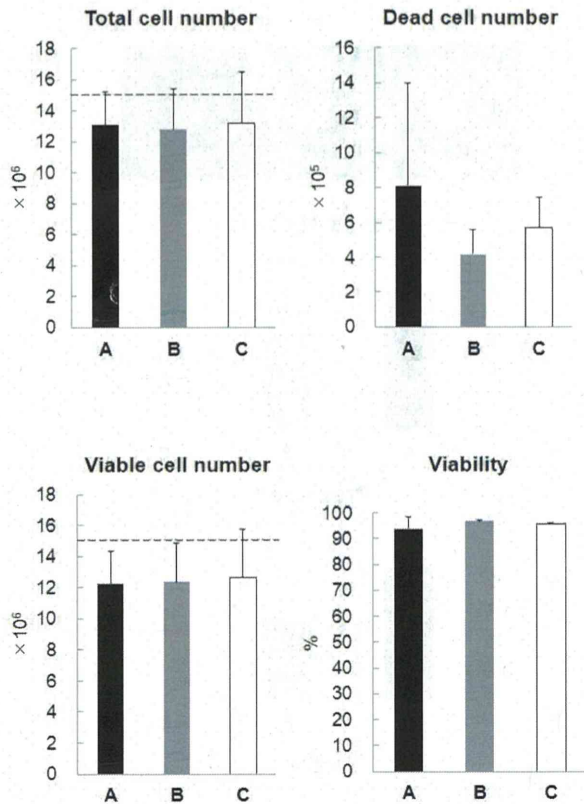


Figure 3. Cell properties after 2-hour culture of cartilage prepared using the agarose mold. Cultured human chondrocytes (1.5×10^7 cells) were mixed with 150 μ L of 1% atelocollagen and placed into the agarose (A, B) and plastic (C) molds to prepare regenerative cartilage. The regenerative cartilages were prepared at 37°C for 2 hours in the agarose mold (A), in the agarose mold with 2 mL of MEM (B), and in a plastic mold with no substance permeability (C). After 2 hours, the cells were treated with collagenase and collected, and the number and viability of cells were evaluated.

regenerative tissue before transplantation. Actually, it is becoming increasingly successful as a culture and transport container for the end-products of three-dimensional tissue-engineered cartilage tissue (5 cm \times 6 mm \times 3 mm) for delivery to operating theater (**Figure 5**) [6].

Regenerative tissue culture methods include the simple placement of tissue in a vessel with some culture medium. This method does not require a specific device and can be readily prepared, but the tissue may be damaged on contacting the vessel. Moreover, excessive shear stress may be loaded by the culture medium and negatively influence cells. Since the regenerative tissue before transplantation is very unstable, this method may be inappropriate.

Methods to overcome these problems have been proposed as the floating culture of regenerative tissue. It was reported that the large-sized tissue-engineered constructs were cultured, using rotating wall vessel (RWV) [17].

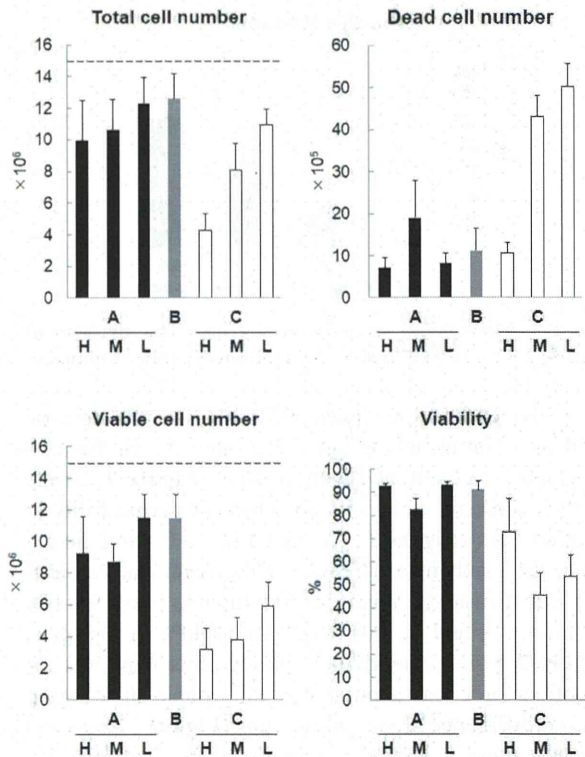


Figure 4. Cell properties after 24-hour culture of cartilage prepared using the agarose mold. Cultured human chondrocytes (1.5×10^7 cells) were mixed with 150 μ L of 1% atelocollagen and placed into the agarose (A, B) and plastic (C) molds to prepare regenerative cartilage. The regenerative cartilages were prepared at 37°C for 2 hours in the agarose mold (A), in the agarose mold with 2 mL of MEM (B), and in a plastic mold with no substance permeability (C). In each group, the cartilage was retained in the mold for another 22 hours in a 37°C humid bath (H), with 2 mL of MEM at 37°C (M), or in a 4°C humid bath (L). The cells were treated with collagenase and collected, and the number and viability of cells were evaluated.



Figure 5. An agarose mold used for clinical application. Cartilage was regenerated for clinical application using the 2% agarose mold [6].

When the RWV was used to culture the mesenchymal stem cells, favorable results of cartilage regeneration have been found [18]. However, the floating culture requires specific devices, a problem remains with regard to transport, and, basically, only rounded shapes, such as spherical and circular shapes, can be used because mechanical forces can be spread out. Gyrotory culture was also reported [19], but, similarly, tissue can be cultured only in rounded shapes. Thus, it is difficult to prepare tissue-engineered cartilage fitting the shape required, and these methods may be inapplicable.

Retention in medium with a mesh or cage is also considered. When tissue is fixed using a mesh or cage, mechanical stress may be concentrated on a specific region of a line or a point, and change the shape during transport or culture. Thus, fixation in culture medium using a mesh or cage may be basically difficult. As the mesh or cage may be processed adjusting it to the shape of regenerated tissue, it must be custom-made for individual cases, which is economically inefficient.

Thus, we investigated a material through which nutrition and oxygen are readily exchanged, such as hydrogel, with marked gelation properties, high mechanical strength, and flexibility to readily change shape, and prepared a hydrogel mold. For the material of hydrogel, we considered that with favorable substance exchangeability and minimum influence on tissue. There are various types of hydrogel [13], but we focused on agarose because it has marked gelation properties and weak cell-adhesive properties and toxicity [9].

Agarose is comprised of D-galactose bound at C1 and C3 and 3,6-unhydro-L-galactose bound at C1 and C4. These 2 types of sugar alternately bond, forming a repeat bonding neutral polysaccharide [9]. Agar was another choice. Agar is prepared by extracting mucilage from Rhodophyceae, mainly seaweeds of Gelidiaceae and Gracilaria, and removing water. The main components of agar are polysaccharides, and it is used as a material for agarose production. Agar for microbial culture matrix is also available, but it contains seaweed-derived minerals, crude proteins, and other contaminants, in addition to saccharides [8]. Thus, purer agarose is more readily used for regenerative medicine requiring strict quality control. This may be advantageous to retain regenerative medicine products.

In the plastic mold, no nutrient or oxygen may have diffused and waste may have accumulated, reducing viability. Substances can diffuse through the agarose mold, which may be very advantageous in structures for regenerative medicine containing cells at a high density. The causes of cell death include dryness, in addition to the inhibition of diffusion. Cells are very sensitive to dryness, and extracellular matrix-detached cells are readily exposed to dryness. When culture medium was added im-

mediately after placing the tissue-engineered constructs, the cell viability was very high, although the survival rate was rather low when culture medium was added later. For atelocollagen mixed with cells as a base material of tissue regeneration, an acidic product was used [20]. The addition of a large volume of neural-buffered culture medium immediately after mixing cells with atelocollagen may have buffered the pH of atelocollagen and promoted cell survival. When the agarose mold was used with no culture medium, cell viability was superior in the tissue stored at 4°C to that at 37°C, suggesting that a low temperature was advantageous to maintain humidity, preventing drying.

Regenerative medicine products to be introduced in medical care in the future will probably become larger and more complex, and therefore, culture and transport methods for these large regenerative tissues are essential for the generalization and advancement of regenerative medicine. We are actually using the mold for culture and storage of 5 cm × 6 mm × 3-mm dome-shaped tissue-engineered cartilage prepared with a porous material and atelocollagen [6]. It is necessary to develop a culture container with a higher substance exchange efficiency by accumulating experience and clinical data.

5. Conclusion

The agarose mold seemed useful as a container for storage and transport of large-sized three-dimensional regenerative tissue. Because this kind of mold is available for both culture and transport of the large regenerative tissues, it will contribute to for the generalization and advancement of regenerative medicine.

6. Acknowledgements

We thank Ms. Yuko Motoki and Mr. Tomoaki Sakamoto for technical support. This work was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (MEXT, No. 24390451, 24593050, and 25670847) and from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (MHLW, No. H24-Saisei-Ippan-005), and Research and Development Programs for Self-maturing Device from the New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO).

REFERENCES

- [1] J. A. Baddour, K. Sousounis and P. A. Tsonis, "Organ Repair and Regeneration: An Overview," *Birth Defects Research C: Embryo Today*, Vol. 96, No. 1, 2012, pp. 1-29. doi:10.1002/bdrc.21006
- [2] M. Ochi, Y. Uchio, K. Kawasaki, S. Wakitani and J. Iwasa, "Transplantation of Cartilage-Like Tissue Made by Tissue Engineering in the Treatment of Cartilage Defects

- of the Knee," *The Journal of Bone & Joint Surgery British*, Vol. 84, No. 4, 2002, pp. 571-578.
[doi:10.1302/0301-620X.84B4.11947](https://doi.org/10.1302/0301-620X.84B4.11947)
- [3] H. Yanaga, K. Yanaga, K. Imai, M. Koga, C. Soejima and K. Ohmori, "Clinical Application of Cultured Autologous Human Auricular Chondrocytes with Autologous Serum for Craniofacial or Nasal Augmentation and Repair," *Plastic and Reconstructive Surgery*, Vol. 117, 2006, pp. 2019-2030.
- [4] H. Yamaoka, Y. Tanaka, S. Nishizawa, Y. Asawa, T. Takato and K. Hoshi, "The Application of Atelocollagen Gel in Combination with Porous Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering and Its Suitable Conditions," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol. 93, 2010, pp. 123-132.
- [5] Y. Tanaka, H. Yamaoka, S. Nishizawa, S. Nagata, T. Ogasawara, Y. Asawa, Y. Fujihara, T. Takato and K. Hoshi, "The Optimization of Porous Polymeric Scaffolds for Chondrocyte/Atelocollagen Based Tissue-Engineered Cartilage," *Biomaterials*, Vol. 31, No. 16, 2010, pp. 4506-4516. [doi:10.1016/j.biomaterials.2010.02.028](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.02.028)
- [6] K. Hoshi, Y. Fujihara, Y. Asawa, S. Nishizawa, S. Kanazawa, T. Sakamoto, M. Watanabe, T. Ogasawara, H. Saijo and T. Takato, "Recent Trends of Cartilage Regenerative Medicine and Its Application to the Oral and Maxillofacial Surgery," *Oral Science International*, Vol. 10, No. 1, 2013, pp. 15-19. [doi:10.1016/S1348-8643\(12\)00049-3](https://doi.org/10.1016/S1348-8643(12)00049-3)
- [7] S. Sekiya, T. Shimizu and T. Okano, "Vascularization in 3D Tissue Using Cell Sheet Technology," *Regenerative Medicine*, Vol. 8, No. 3, 2013, pp. 371-377. [doi:10.2217/rme.13.16](https://doi.org/10.2217/rme.13.16)
- [8] D. A. Rees, "Structure, Conformation, and Mechanism in the Formation of Polysaccharide Gels and Networks," *Advances in Carbohydrate Chemistry & Biochemistry*, Vol. 24, 1969, pp. 267-332. [doi:10.1016/S0065-2318\(08\)60352-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2318(08)60352-2)
- [9] S. Arnott, A. Fulmer, W. E. Scott, I. C. Dea, R. Moorhouse and D. A. Rees, "The Agarose Double Helix and Its Function in Agarose Gel Structure," *Journal of Molecular Biology*, Vol. 90, No. 2, 1974, pp. 269-284. [doi:10.1016/0022-2836\(74\)90372-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(74)90372-6)
- [10] K. Yonenaga, S. Nishizawa, Y. Fujihara, Y. Asawa, S. Kanazawa, S. Nagata, T. Takato and K. Hoshi, "The Optimal Conditions of Chondrocyte Isolation and Its Seeding in the Preparation for Cartilage Tissue Engineering," *Tissue Engineering Part C: Methods*, Vol. 16, No. 6, 2010, pp. 1461-1469. [doi:10.1089/ten.tec.2009.0597](https://doi.org/10.1089/ten.tec.2009.0597)
- [11] Y. Tanaka, T. Ogasawara, Y. Asawa, H. Yamaoka, S. Nishizawa, Y. Mori, T. Takato and K. Hoshi, "Growth Factor Contents of Autologous Human Sera Prepared by Different Production Methods and Their Biological Effects on Chondrocytes," *Cell Biology International*, Vol. 32, 2008, pp. 505-514. [doi:10.1016/j.cellbi.2007.12.012](https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2007.12.012)
- [12] T. Takahashi, T. Ogasawara, J. Kishimoto, G. Liu, H. Asato, T. Nakatsuka, E. Uchinuma, K. Nakamura, H. Kawaguchi, T. Takato and K. Hoshi, "Synergistic Effects of FGF-2 with Insulin or IGF-I on the Proliferation of Human Auricular Chondrocytes," *Cell Transplant*, Vol. 14, No. 9, 2005, pp. 683-693. [doi:10.3727/000000005783982675](https://doi.org/10.3727/000000005783982675)
- [13] H. Yamaoka, H. Asato, T. Ogasawara, S. Nishizawa, T. Takahashi, T. Nakatsuka, I. Koshima, K. Nakamura, H. Kawaguchi, U. I. Chung, T. Takato and K. Hoshi, "Cartilage Tissue Engineering Using Human Auricular Chondrocytes Embedded in Different Hydrogel Materials," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol. 78, No. 1, 2006, pp. 1-11. [doi:10.1002/jbm.a.30655](https://doi.org/10.1002/jbm.a.30655)
- [14] R. Aoyagi and T. Yoshida, "Frequency Equations of an Ultrasonic Vibrator for the Elastic Sensor Using a Contact Impedance Method," *Japanese Journal of Applied Physics*, Vol. 5B, 2004, pp. 3204-3209. [doi:10.1143/JJAP.43.3204](https://doi.org/10.1143/JJAP.43.3204)
- [15] Y. Kang, J. Yang, S. Khan, L. Anissian and G. A. Ameer, "A New Biodegradable Polyester Elastomer for Cartilage Tissue Engineering," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol. 77, No. 2, 2006, pp. 331-339. [doi:10.1002/jbm.a.30607](https://doi.org/10.1002/jbm.a.30607)
- [16] K. Yonenaga, S. Nishizawa, M. Akizawa, Y. Asawa, Y. Fujihara, T. Takato and K. Hoshi, "Utility of NucleoCounter for the Chondrocyte Count in the Collagenase Digest of Human Native Cartilage," *Cytotechnology*, Vol. 62, 2010, pp. 539-545. [doi:10.1007/s10616-010-9304-y](https://doi.org/10.1007/s10616-010-9304-y)
- [17] Y. Ohyabu, N. Kida, H. Kojima, T. Taguchi, J. Tanaka and T. Umemura, "Cartilaginous Tissue Formation from Bone Marrow Cells Using Rotating Wall Vessel (RWV) Bioreactor," *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 95, No. 5, 2006, pp. 1003-1008. [doi:10.1002/bit.20892](https://doi.org/10.1002/bit.20892)
- [18] S. Sakai, H. Mishima, T. Ishii, H. Akaogi, T. Yoshioka, Y. Ohyabu, F. Chang, N. Ochiai and T. Umemura, "Rotating Three-Dimensional Dynamic Culture of Adult Human Bone Marrow-Derived Cells for Tissue Engineering of Hyaline Cartilage," *Journal of Orthopaedic Research*, Vol. 27, No. 4, 2009, pp. 517-521. [doi:10.1002/jor.20566](https://doi.org/10.1002/jor.20566)
- [19] K. S. Furukawa, H. Suenaga, K. Toita, A. Numata, J. Tanaka, T. Ushida, Y. Sakai and T. Tateishi, "Rapid and Large-Scale Formation of Chondrocyte Aggregates by Rotational Culture," *Cell Transplant*, Vol. 12, 2003, pp. 475-479.
- [20] C. Cohen, "Optical Rotation and Helical Polypeptide Chain Configuration in Collagen and Gelatin," *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, Vol. 1, No. 1, 1955, pp. 203-214. [doi:10.1083/jcb.1.3.203](https://doi.org/10.1083/jcb.1.3.203)

フォーラム

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—

松本和彦^{*1} 荒川義弘^{*2} 小池竜司^{*3} 中村哲也^{*4}
花岡英紀^{*5} 本間真人^{*6} 吉澤弘久^{*7}

大学病院臨床試験アライアンス共同 IRB 推進検討作業班

1. はじめに

本稿においては「IRB (Institutional Review Board)」を一般的な治験審査委員会を指す用語として使用し、「共同 IRB 等」の定義は、「治験等の効率化に関する報告書」(平成 23 年 6 月 30 日医政研発 0630 第 1 号)¹⁾どおり、「他の治験実施医療機関の長からの依頼により審査を行うことができる IRB, 複数の治験実施医療機関の長が共同で設置する共同 IRB を含む。」とする。

改正 GCP (2008 年 2 月 29 日) の 2008 年 4 月からの施行により, 実施医療機関ごとの IRB 設置原則が廃止され共同 IRB 等への審査依頼が可能となった²⁾. これまで大学病院では地域の治験ネットワークを構築している場合などで他施設の治験審査を受け入れることはあっても, 自施設の治験審査を, 自施設と関連のない他施設の IRB に申請した経験はほとんどなかった. しかし, 今回の改正 GCP の施行により, 大学病院などにおいても, 共同 IRB 等の活用について検討する段階にきている. 大学病院が共同 IRB 等を活用するためには, 病院執行部の意見が重要であり, 最終的にその承認が必要となる. そのため大学病院間の治験ネットワークで共同 IRB 等の体制を構築するには, すべての大学病院の運営方針, 経営方針にそった体制を構築しなければならない. その一方で, 治験依頼者の立場からは共同 IRB 等の活用に特段の懸念事項 (デメリット) は想定されないとの報告²⁾があり, 体制が GCP に則っていれば, 治験依頼者からの反発を受けることはないと考えられる.

大学病院臨床試験アライアンス (UHCT アライアンス) は「世界の新薬を日本の患者により早く供給すべ

く, 治験を含む臨床試験にて高い実績を有する大学病院が連携・協力関係を結び, 安全かつ効率的な臨床試験の実施体制を整備して国際共同試験を実施することを目的³⁾として 2006 年 4 月にスタートした. 群馬大学医学部附属病院, 信州大学医学部附属病院, 千葉大学医学部附属病院, 筑波大学附属病院, 東京医科歯科大学医学部附属病院, 東京大学医学部附属病院, 新潟大学医歯学総合病院の 7 つの大学病院が現在加盟している (2013 年 4 月から山梨大学医学部附属病院が加盟). 本アライアンスの実務を遂行するために各加盟大学病院より数名の推進員で構成される推進室を置き, 毎月 TV 会議にて定例会議が行われている. 推進室事務局は東京大学医学部附属病院臨床研究支援センター内に設置されている. アライアンスでは, その目的の実現に向け「本アライアンスの活動および実績の国内外への発信」, 「国際共同治験の誘致と進捗管理」, 「安全かつ効率的な臨床試験の実施体制の整備」, 「臨床試験の研究者に対する教育・支援および実務者の研修・交流」, 「国民や臨床試験参加者への啓発活動」, 「加盟大学病院・協力者相互の啓発活動」, 「その他本アライアンスの目的を達成するために必要な事業」の 7 つの事業を行っている. 具体的な活動は, 渉外・プロジェクト推進委員会, 国際化対応委員会, 広報委員会, 研修者教育・研修委員会, 臨床試験コーディネーター (CRC) 連絡協議会の 5 つの委員会と安全性情報作業班, 品質保証導入検討作業班, 共同 IRB 推進検討作業班の 3 つの作業班により, それぞれ担当校 (総会で決定) を中心に実施されている. その進捗状況は担当校から定例の推進室会議に報告され, 作業班は推進室会

Key words : UHCT Alliance, centralized IRB, local IRB, university hospitals, GCP

^{*1} 信州大学医学部附属病院臨床試験センター ^{*2} 東京大学医学部附属病院臨床研究支援センター ^{*3} 東京医科歯科大学医学部附属病院臨床試験管理センター ^{*4} 群馬大学医学部附属病院臨床試験部 ^{*5} 千葉大学医学部附属病院臨床試験部

^{*6} 筑波大学附属病院臨床研究推進・支援センター ^{*7} 新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センターちけんセンター部門

別刷請求先: 松本和彦 信州大学医学部附属病院臨床試験センター 〒390-8621 松本市旭 3-1-1

E-mail : climatsu@shinshu-u.ac.jp

(投稿受付 2012 年 9 月 19 日, 第 2 稿受付 2013 年 1 月 4 日, 掲載決定 2013 年 1 月 14 日)

議での意見を参考にしながら、更なる事業の推進に努めている。このように、本アライアンスは、単に大学病院間の治験ネットワークの機能を果たしているだけでなく、加盟7大学が大学病院の個々の枠にとらわれずに臨床研究・治験の体制整備を進め、本邦での臨床研究・治験の推進に向けての新たな方向性を示すことを目指している。このような方針のもと本アライアンスでは加盟7大学間で共同IRB等の設置は可能であるか否かの議論が起こり、2009年4月から「安全かつ効率的な臨床試験の実施体制の整備事業」のひとつとして共同IRB推進検討作業班が活動を開始した。本作業班はすべての加盟大学病院から選出された数名ずつの委員からなり、信州大学医学部附属病院が担当校となった。

共同IRB等を導入するメリットとしては、①審査内容が適切（臨床薬理・臨床試験の専門家による審査、各分野の専門家を治験ごとに招聘が可能）、②治験実施施設のマンパワー、時間、経費の節約、③治験依頼者の業務の軽減、など⁴⁾、デメリットとしては、①各施設独自の考え方を表せない、②各施設の審査レベルの向上を図れない、③治験担当医の教育の場が失われる、④各施設の適格性を判断することは困難である、⑤IRBショッピングの危惧が生じる、などが挙げられている⁵⁾。本作業班では、①自施設でのIRBの審査と同程度、あるいはそれ以上の被験者の安全を担保する、②各大学病院の治験事務局・IRB事務局業務負担の軽減は共同IRB等に期待されるメリットではあるが、体制構築初期の段階では、各施設での多少の仕事量の増大はやむを得ない、として検討が行われている。本アライアンスでは加盟大学病院は7施設であり、ひとつの治験に参加する大学病院は3~5施設となることが多い。このような少数の施設の参加しか見込めないアライアンス治験において共同IRB等を実施しても治験依頼者の負担軽減の効果は少なく、共同IRB等の体制を構築する意義については検討当初から問題点として挙げられた。また、15年以上前から中央IRB(central IRB: CIRB)が提唱されている^{6,7)}米国でもCIRBは限定された数であり⁸⁾、CIRBに対する反発も生じている⁹⁾。CIRB組織の歴史や特徴、構成する委員などそれぞれ個々にかなり質的に異なることなどがその要因とされる⁹⁾。2003年の88大学医学部への調査では76%がCIRBを使った経験がなく、73%は施設IRBで効率的に審査が行われており、CIRBを使用する理由がないとしている¹⁰⁾。本邦でも大学病院間における共同IRB等の体制は構築されておらず、実現可能な共同

IRB体制について検討してみることは今後の大学病院IRBの在り方を考えるうえで大変重要であると考えられる。

本アライアンス加盟の千葉大学医学部附属病院、新潟大学医歯学総合病院、信州大学医学部附属病院の3大学病院が参加している、ひとつの医師主導治験では、千葉大学医学部附属病院IRBを共同IRBとする3大学間の共同IRBの体制が構築され、2010年7月からIRB審議を開始している¹¹⁾。これは大学病院間で実施された本邦初の共同IRB等の体制であり、アライアンス共同IRB推進検討作業班で検討してきた共同IRB等の体制案を基に構築されている。この3大学間の共同IRB体制からアライアンス共同IRB等の体制案の課題が浮き彫りになると考えられる。

本稿では、まず2009年のUHCTアライアンス-EFPIA Japan共同欧州施設訪問で得られた欧州各国の倫理審査委員会体制について概説し、次にアライアンスで検討している共同IRB体制とアライアンス加盟3大学間で現在実施中の共同IRB体制(医師主導治験)について紹介し、最後にアライアンス共同IRB体制案の課題についてとりあげる。アライアンスの共同IRB体制案は既存の大学病院IRBを共同IRBとし、共同IRBは治験ごとに7大学病院間で持ち回りとする体制であり、これまで各大学病院で築きあげてきたIRBの質の更なる向上が期待できるという利点があり、今まで提唱されている共同IRB体制と大きく異なる。

体制を構築するための、ひとつひとつの検討事項は、本邦における大学病院間の共同IRB等の体制を構築する際に各施設で必ず検討しなければならない課題である。

2. UHCTアライアンス-EFPIA Japan共同欧州施設訪問

2009年10月28日から11月6日までUHCTアライアンスと欧州製薬団体連合会日本技術委員会(EFPIA Japan)との共同で、欧州各国の大学病院、臨床研究支援センター、規制当局、製薬会社などを訪問し、欧州各国の臨床試験の基本的枠組や多施設・多国間共同臨床試験への取り組み等につき聴取する機会を得た¹²⁾。

欧州のEuropean Union(EU)では、これまでの多施設共同試験やグローバル開発における煩雑な手続き、整合性のない審査、小児の臨床試験の停滞などの問題から、2001年5月にThe Directive 2001/20/EC(EU

臨床試験指令)が制定された。これは、販売承認目的である治験に限らず、あらゆる臨床試験に適用されており、加盟各国はこの指令に従い各国の規制を整備し、2004年5月までにその施行を求められた。各国は国情に応じて法的規制を整備し、それぞれ新しい倫理審査体制を構築している¹³⁾。EU臨床試験指令は、臨床試験の開始の際に、①倫理委員会の承認と規制当局の許可が必要である、②国際共同試験の倫理委員会審査は一国につき一つの意見とする、③申請後から倫理委員会の意見、規制当局の許可、までの日数はいずれも60日以内である、④倫理委員会の補足情報要求、規制当局が許可しない場合の変更プロトコル再申請はどちらも1回限りである、との倫理審査体制の原則を示した¹⁴⁾。そのためEU加盟国では倫理委員会の審査は「一国一意見の原則」に従い、それぞれ倫理審査委員会の体制が施行されている。また、EU非加盟国のスイスも独自の倫理審査委員会の体制を構築している。これらの体制は今回のアライアンス内における共同IRB等の体制を検討するにあたり大いに参考となっている。

1) EU加盟国 (英国, フランス, ドイツ)

英国の医療は、国民保健サービス(NHS: National Health Service)の体制であり、地域機関病院とプライマリケアを行う家庭医(GP: General Practitioner)でそのほとんどが運営されている。倫理委員会はNHSの行政的領域ごとの病院内あるいは大学に設置されており、2007年4月に発足したNational Research Ethics Service(NRES)がNHSの倫理委員会を統括している。NHSの多施設で臨床試験を行う場合、治験調整医師は臨床試験支援を行うResearch & Development Office(R&D Office)と連携し、NRESに申請する。NRESは臨床試験プロトコル、調整医師などを考慮し、倫理審査を行うMain Research Ethics Committee(MREC)を決定する。MRECへの申請が受理された後に調整医師は各施設の責任医師に施設情報の審査をそれぞれのLocal RECに申請するよう依頼する。MRECの判断で、施設状況の審査を省略することもある。MRECの意見が英国全体の倫理審査意見となる(一国一意見の原則)。

フランスでは国内を7つの地域に分割し、40の被験者保護委員会(CPP: Comité de Protection des Personnes)を制定し、国内すべての臨床試験の倫理審査を行っている。臨床試験は参加施設に関する固有の情報を含めひとつのCPPに申請して承認を得る体制である。

ドイツでは州医師会が運営する21の倫理委員会(EC: Ethics Committee)と大学のECがあり、およそ50のECが国内に存在する。治験調整医師が所属する地域・大学の審査委員会がPrimary ECとしてプロトコル審査を、他の倫理委員会がLocal ECとして施設固有事項の審査をする。そのため、ひとつの倫理委員会は臨床試験によりPrimary ECにもLocal ECにもなり得る。

2) EU非加盟国 (スイス)

スイスでは施設固有の事項も含め、州ごとに設置されている倫理審査委員会で審査される(26の州があるが複数の州の共同で設立された場合もありスイス国内での総数は19である)。EU加盟国と異なり「一国一意見の原則」がないので、州を越えて臨床試験が行われる場合には州ごとに倫理委員会で審査される。そのため、それぞれの州の倫理委員会で結論が異なることもある。

本邦と異なり、欧州では、治験のみではなくすべての臨床試験が倫理委員会に申請されるので、申請数はかなりの数に上ると予想される。しかし、EU加盟国では原則として、ひとつの試験あたりひとつの審査であり、審議件数の増加はかなり抑制される。このことで、EU加盟各国では少数の倫理委員会がそれぞれ国内のすべての倫理審査を対応することが可能である。「一国一意見の原則」がないEU非加盟国のスイスでも州ごとに設置された少数の倫理審査委員会で国内のすべての臨床試験をカバーしている。少数の倫理審査委員会で国内の臨床試験をすべて審査できるという事実から、欧州の地域ごとの共同倫理審査体制は効率化の点においては非常に優れたものと思われる。実際どのように審議がなされているか大変興味深い。

施設固有事項の審査に関しては、共同の倫理審査委員会で審査をする国、他の倫理審査委員会を活用する国など、その体制は国により異なっていた。米国のCIRBにおいて施設固有の問題点を審議することについては難しい状況であり¹⁵⁾、共同IRB等における施設固有事項の審査は重要な検討課題と思われる。また、米国のCIRBは施設IRBでの審査のように試験責任医師との公式・非公式な相談・指導ができず相互の信頼関係が築けない、施設IRBより被験者保護の意識が薄いなど⁹⁾の問題点も挙げられており、これらについても検討が必要と思われる。

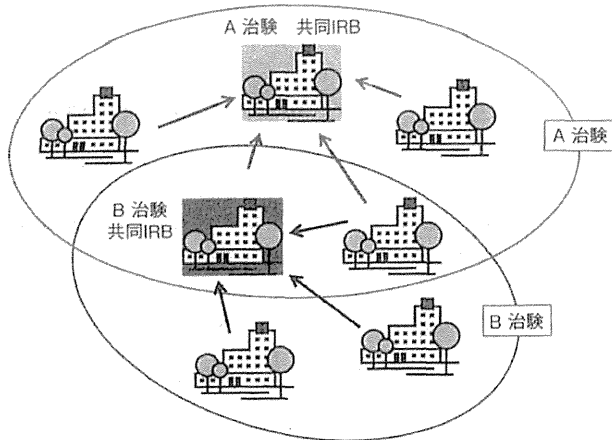


Fig.1 共同IRB担当大学病院持ち回り制
治験ごとに参加病院の中から共同IRB担当大学病院を決める。

3. UHCT アライアンス共同IRB体制案

2008年4月から改正されたGCPが施行され、本邦では共同IRB等を推進しようとする機運が高まってきたように感じる。しかし、日本製薬工業協会の加盟会社を対象としたアンケート調査¹⁵⁾では共同IRB等を利用した施設の割合は、2009年度(治験実施計画書71件)は26.1%(490/1,875医療機関)、2010年度(96件)は30.8%(787/2,552医療機関)、2011年度(118件)は27.0%(843/3,165医療機関)と変化なく、国公立・私立大学病院に限ると2009年度1.1%(4/369医療機関)、2010年度1.0%(4/420医療機関)、2011年度1.0%(6/607医療機関)となり、大学病院では利用がほとんど進んでいない現状である。

すでに述べたように、共同IRB等の体制の構築を考えるうえで、被験者の安全が担保されることが最も重要であり、構築過程においては、大学病院治験・IRB事務局業務のある程度の負担増はやむを得ないものと考えた(治験依頼者業務と大学病院の治験事務局・IRB事務局業務の軽減が図れることが最終目標であり、あまりにも膨大な治験・IRB事務局の業務負担はいずれ維持できなくなる可能性も大きい)。本アライアンス共同IRB等の案はまだ最終結論に至っていないが、これまでの議論と現時点での共同IRB案を紹介する。

1) 共同IRBの持ち回り制

「新たにIRBを構築するのではなく、既存の大学病院IRBを共同IRBとし、加盟大学病院の持ち回りとする。共同IRB担当大学病院は、治験に参加する大学病院の中から治験ごとに決める」(Fig.1)

各大学からの委員が、ある場所に一堂に会してIRBを開催する共同IRBは加盟7大学病院が関東・信越の広い地域に離れているという地理的・時間的な問題により、月1回以上の頻度で開催することは厳しい状況であるとされた。次いで、各加盟大学病院をつなぐTV会議システムでの共同IRB体制案について検討したが、会議の臨場感、会場の雰囲気などを共有できないとのTV会議の本質的な問題、さらに現TV会議システムでみられるような音声の途絶、映像の乱れなどの技術的な問題などにより、今すぐに取り入れることはできないと考えた。このような検討から7大学病院から委員を選出し、7大学共同で設置する共同IRBは現時点では困難との結論に至った。

既存の大学病院を共同IRBとする場合、ひとつの大学病院IRBが共同IRBの役割を担う案(共同IRBの固定化)がまず考えられた。共同IRBの持ち回りに比べ、各大学の治験推進事務局業務の負担は少ない(治験ごとの共同IRB担当大学持ち回りでは共同IRBの開催日が大学により異なっており、資料提出時期、提出先が治験ごとに変わる、また共同IRB担当大学病院と審査を委託する大学病院間の契約が発生した場合には治験ごとに契約の提携をしなければならない、などの理由で業務が大変煩雑となる)。しかし、アライアンスは「7大学が互いに対等な立場」ということを前提で設立された経緯もあり、ひとつの大学病院に業務が集中することは①加盟大学病院内で立場の上下関係が生じる危惧がある、②各大学病院の業務量が不公平となる、③加盟各大学の治験審査、治験・IRB事務局業務などでのレベルの向上が期待できない、などの理由で承認されなかった。持ち回り案では各大学病院の立場は対等であり、各大学病院IRBは共同IRBの役割を担うことでレベルの向上も見込まれ、現状では実施の可能性が高い体制と考える。しかし、大学病院IRBを共同IRBとした共同IRB持ち回り案では治験事務局、IRB事務局ともに、治験件数の増加に伴い非常に煩雑な業務となる恐れは否定できない。

2) 共同プロトコル説明会

「共同プロトコル説明会は共同IRB担当大学が担当し、これまでどおり継続して実施する」

現状ではアライアンス治験参加大学はTV会議システムを用いての共同プロトコル説明会(事前ヒアリング)を開催している。共同IRB体制でも共同プロトコル説明会は継続して実施し、担当校は共同IRB担当校が務める。共同プロトコル説明会では治験を適正に行うために問題点の抽出が効率的に行われており、本