

201408007B

厚生労働科学研究費補助金  
医療機器開発推進研究事業

骨髄単核球を用いた細胞治療の一般普及を目指した  
簡便且つ細胞調製施設が不要な幹細胞分離デバイス  
の開発

平成 24～26 年度 総合研究報告書

研究代表者 山原 研一

平成 27 (2015) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金  
医療機器開発推進研究事業

骨髄単核球を用いた細胞治療の一般普及を目指した  
簡便且つ細胞調製施設が不要な幹細胞分離デバイス  
の開発

平成 24～26 年度 総合研究報告書

研究代表者 山原 研一

平成 27 (2015) 年 3 月

# 目 次

---

## I. 総合研究報告書

「骨髄単核球を用いた細胞治療の一般普及を目指した簡便且つ細胞調製施設が不要な幹細胞分離デバイスの開発」

山原 研一 ..... 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 11

III. 研究成果の刊行物・別刷 ..... 15

# I. 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金医療機器開発推進研究事業  
(医療機器開発(ナノテクノロジー等)総合推進研究事業)  
総合研究報告書

「骨髄単核球を用いた細胞治療の一般普及を目指した簡便且つ細胞調製施設が不要な  
幹細胞分離デバイスの開発」

研究代表者 名前 山原 研一 所属 国立循環器病研究センター

研究要旨：骨髄細胞移植をより一般的な医療とするために、セルプロセッシングセンター(CPC)が不要で低コストな、また一般の医療従事者でも操作が簡易な単核球分離デバイスの開発を目指した活動展開を行った。結果、①本デバイスの対象疾患候補である脳梗塞患者における骨髄単核球移植の臨床試験(phase I/IIa)での安全性・有効性を確認し、先進医療 B への展開を検討、②PMDA 薬事戦略相談対面助言での医薬品ベースの単核球分離液に関する問題点指摘を受け、汎用単核球分離液(Ficoll-Paque)への変更、及びそれに伴う問題点(Ficoll-Paque 除去の必要性)解決に向けた、共同研究企業とのデバイス開発推進を行った、③単核球分離デバイスの医療機器としての早期承認促進を目指し、専門家との協議および医薬品医療機器等を含む情報収集を行った。今後、PMDA との協議を継続しながら、医療機器化しやすいデバイス開発を進め、目標である臨床開発に向けた活動をより活発に展開していきたい。

#### A. 研究目的

我々は、2001年より四肢虚血患者に対して自己骨髄単核球細胞を用いた細胞治療を行い、その著明な効果を明らかにし、2009年より厚生労働省ヒト幹細胞指針に基づく承認を経て、脳梗塞患者に対する自己骨髄単核球移植による臨床試験を実施した。また、同様の手法を用いた細胞治療は、心筋梗塞患者において有効であることが、欧米における二重盲検試験やメタアナリシスでも明らかにされているが、日本同様、セルプロセッシングセンター(CPC)構築や煩雑手技の問題により、骨髄単核球移植による細胞治療は一般的な医療としては普及していないのが現状である。

そこで本研究では、このような問題点を

解消するため、安全かつ確実な、特殊な手技や知識を必要としない完全閉鎖系の単核球分離デバイスを開発し、普及させることをその目的とする。我々は、これまでに細胞治療実施のため、プロトコール作成・ヒト幹指針の承認・CPC運用管理・インフォームドコンセント取得・CPCでの細胞分離調整など、再生医療の実施に必要な不可欠な非常に多くの事項を経験・実践してきた。本デバイスの作成には、これら実際の臨床試験での経験や知識を全て反映させ薬事承認審査経験のある分担研究者と共同で、本デバイスの速やかな医療機器承認及び一般普及を目指す。

単核球分離装置に関しては、白血病患者における骨髄移植(骨髄採取 500ml 以上)用

の骨髄単核球分離装置が存在するが、目的や容量が異なり、心疾患や脳血管障害の治療(採取骨髄量 20-50ml)には使用することができない。本研究開発は医療機器に関する早期・探索的臨床試験拠点である国立循環器病研究センターにおける成果として、可及的速やかな本デバイスの製品化を目指し、脳梗塞患者を対象とした自己骨髄単核球の第 I/IIa 相臨床試験の安全性・有効性検証、共同研究企業とのデバイス開発、およびデバイスの早期医療機器承認を目指した体制整備・情報収集を推進した。

## B. 研究方法

### ①脳梗塞患者を対象にした自己骨髄単核球移植の第1/2a相臨床試験

急性期重症心原性脳塞栓症患者を対象に自己骨髄単核球移植の第1/2a相臨床試験を、施設倫理委員会及びヒト幹指針に基づく厚生労働審議会の承認を受け、実施し、予定症例数を終了し、安全性および有効性評価を行った(田口ら)。

### ②単核球分離デバイス本体の開発

全ての医療従事者が取扱可能な、簡便・安全・確実な単核球分離デバイスの作成を目指し、共同研究企業と共に試作品の仕様設計および作成を行った。デバイスに求められる要件として、①一般的な遠心機にて完全閉鎖系で細胞処理が可能、②骨髄単核球の分離方法は、心筋梗塞に対する臨床試験で有効性が示されている方法と同じ比重遠心分離法、③比重遠心分離液層への骨髄液の重層および比重遠心後の単核球層の採取が簡単に可能、であり、特別なスキルがなくても安全かつ簡易に骨髄単核球分画が単離出来る構造を目指した。

(山原、田口、曾根ら)。

### ③医薬品ベースの単核球分離液の検討

急性心筋梗塞患者に対する臨床試験で使用されている単核球分離液は、市販の Ficoll-Paque や Lymphoprep 等の比重遠心分離液である。これらは GMP や ISO 準拠で製造されているが、医薬品として認可されたものではなく、工程において分離液を除去しなければならない。そこで、市販比重遠心分離液の組成を参考に造影剤をベースとした、分離液除去不要の、静脈内投与が認められている医薬品のみからなる比重遠心分離液を開発した。また、同比重遠心分離液を用い骨髄単核球を分離し、マウス脳梗塞モデルに移植することでその治療効果を検証した。(山原、田口ら)。

### ④単核球分離システムの開発

PMDA 薬事戦略相談対面助言における指摘を踏まえ、単核球分離デバイス開発に関し、分離液は細胞治療研究において汎用されている Ficoll-Paque とする、という内容に途中から研究変更した。特に Ficoll-Paque という医薬品ではない分離液を用いる必要性から、細胞の洗浄工程をデバイスに組み込む必要性が生じた。そこで、単核球分離デバイス以外に洗浄工程を組み込んだ単核球分離システムの開発を共同研究企業と共にを行った(山原、田口ら)。

### ⑤単核球分離デバイスの医療機器としての早期承認促進を目指した研究

共同研究を行っている医療機器企業とともに試作した幹細胞分離デバイスについて、1) 医療機器のクラス分類の検討、2) 臨床評価の必要性の有無、3) 前記の2項目を踏まえた上で、臨床試験の実施の必要性および必要な場合はその計画について検討した。国立医薬品

食品衛生機構や(財)医療機器センター等の専門家のアドバイスを頂きながら検討を重ね、医薬品医療機器総合機構(PMDA)の薬事戦略相談においてクラスⅡに該当する旨の見解を得た。今年度は、その見解をもとに共同研究先企業とともに機器のデザイン開発をおこないつつ、臨床試験について検討を開始した(山本、山原ら)。

#### ⑤単核球分離デバイスの事業化に向けた研究

大規模な設備を必要とせずにシンプルな器具と操作によって細胞治療を実施可能とする幹細胞分離デバイスは、製品化を伴って医療の均てん化に貢献するであろうと期待できる。デバイスの製品化に向けて、国内はもとより海外における特許などの動向と、競合となる可能性がある製品についての動向が、新しい製品を上市するにあたって把握しておくべきところである。そこで、特に海外の特許動向と製品化状況を探査し、単核球分離デバイスの事業化の推進を図った。(赤川、妙中ら)。

### C. 研究結果

#### ①脳梗塞患者を対象にした自己骨髄単核球移植の第1/2a相臨床試験

平成24年度に予定していた12症例全てのエントリーが終了した。現在、それらのfollow upを実施中である。細胞治療症例における有害事象に関しては、1症例で脳梗塞再発が観察された。独立症例検討委員会(委員長:大阪大学医学部附属病院山本准教授)の判断では、細胞治療との因果関係は不明で、倫理委員会および厚労省に報告を行った。安全性に関し、脳梗塞7日後と比し投与1ヵ月後におけるNIHSS悪化症例は、脳梗塞再発を発症した症例のみであり、その頻度は

8.3%と、ヒストリカルコントロール群との比較では非劣性であった。有効性に関しては、脳梗塞7日後と細胞投与1ヵ月後におけるNIHSSの改善度は平均4.75点であり、ヒストリカルコントロール群との比較では有意に良好であった。

更に、海外での発表データに加え、我々の実施した臨床試験データを基に、先進医療Bのプロトコル作成を行った。主なエントリー基準はi.虚血性脳梗塞患者、ii.年齢が20歳以上80歳以下、iii.発症2日目NIHSS(National Institute of Health Stroke Scale)の麻痺側上肢サブスコアが2点以上(脳梗塞発症日を0日目とする)、iv.発症前mRS(modified Rankin Scale)が0点、v.発症10日以内に治療可能である、である。また、有効性評価項目として、i.National Institutes of Health Stroke Scale(NIHSS)、評価日:脳梗塞発症2日後、14日後、6ヵ月後、ii.modified Rankin Scale(mRS)、評価日:脳梗塞発症14日後、6ヵ月後、iii.Barthel Index、評価日:脳梗塞発症14日後、6ヵ月後、iv.FIM、評価日:脳梗塞発症14日後、6ヵ月後、v.Fugl-Meyer Assessment、評価日:脳梗塞発症6ヵ月後、vi.最大歩行速度、評価日:脳梗塞発症6ヵ月後、である。また、探索的評価項目として、MRIによるi.Volumetry解析、ii.FA値、ADC値解析、iii.安静時機能的MRI解析、およびTMS(Transcranial magnetic stimulation)による錐体路評価を行う(田口ら)。

#### ②単核球分離デバイス本体の開発

単核球分離デバイス本体の周辺特許出願及び試作品作成を共同研究企業である(株)カネカと共に行った。具体的には、(1)周辺特許(特願2011-2843821号、特願2011-284382号)に基づいた試作品を作成

し、単核球採取に関し基本的な構造に問題がないことを確認した（山原、田口、曾根ら）。

また、新たな特許技術(特願 2012-117511)を元に、より低コストを目指したバック形状のデバイス開発を開始し、試作品作成およびその基礎検討を共同研究企業と行い、単核球採取に関し基本的な構造に問題がないことを確認した（山原、田口ら）。

### ③医薬品ベースの単核球分離液の作成

市販比重遠心分離液の組成を参考に造影剤をベースとした、静脈内投与が認められている医薬品のみからなる比重遠心分離液の作成を行った。作成した比重遠心分離液と臨床試験において最も使用されている Ficoll-Paque の両者を用い、市販ヒト骨髄から単核球を分離し、得られた細胞数、死細胞割合、FACS による表面抗原マーカー解析を行った。結果、構成される血球成分組成に差が見られたことから、細胞治療の際、医薬品ベースの単核球分離液では従来の Ficoll-Paque のデータとは異なる臨床試験結果が得られる可能性が示唆された。

更に、マウス脳梗塞モデルにおいて、医薬品ベース比重遠心分離液 (Nycoprep) を用いた骨髄単核球を移植したところ、治療効果が得られなかったことから、同分離液開発は中止となった（山原ら）。

### ④単核球分離システムの開発

単核球分離デバイスに加え、Ficoll-Paque という医薬品ではない分離液を用いる必要性から、単核球の洗浄工程を組み込んだ単核球分離システムの試作品作成を(株)カネカと共に行った。検討結果を踏まえ、新規特許(細胞分離デバイス及び細胞分離システム)を共同申請するに至

った(山原、田口ら)。

### ⑤単核球分離デバイスの医療機器としての早期承認促進を目指した研究

PMDA 薬事戦略相談にて、当該医療機器がクラスⅡに該当するという意見の合致をみた。一方、当該医療機器を用いて分離された幹細胞を用いた脳梗塞の治療が有用な治療として確立しているとは言いがたいとの判断が示され、分離された幹細胞の臨床的有用性を何らかの形で検証する必要があるという見解が PMDA より示された。また、現在 CPC で分離している骨髄単核球と、当該医療機器を用いて分離された骨髄単核球との性質の類似性も示される必要があるとのことであった。また、当該医療機器に用いられる材質の生物学的安全性の説明が必要であることと、分離液の扱い(医療機器の付属品として扱うかどうか、等)の検討が必要であることも明らかとなった。今後、単核球分離システムの仕様決定を行った後、PMDA 薬事戦略相談を再度受ける予定である(山本、山原ら)。

### ⑤単核球分離デバイスの事業化に向けた研究

遠心分離など密度差を利用して単核白血球を分離・収集する特許や活栓で成分の混合・分離を図る海外の特許について検索した結果、既に企業から出願されているものが複数認められた。

また、遠心分離器を使用して骨髄単核細胞を分離する装置としては Res-Q™ 60 BMC System (ThermoGenesis Corp.), MarrowStim™ Concentration System (Biomet Biologics Inc.) など、市場に供給されているものが確認できた。これら二つのデバイスについては、分離に伴う作業時間は15分程度であって、本研究費補助金事業において開発を進めている



幹細胞分離デバイスとほぼ同等とみなせるものであるが、主に研究用として使用されていると想定された（赤川、妙中ら）。

#### 考察

本研究では、PMDA 薬事戦略相談対面助言を踏まえ、研究計画を途中大幅に変更した。

特に、医薬品ベースの単核球分離液の作成に関しては、対面助言において、既承認医薬品の新規適応取得をする必要性を指摘されたが、その具体化には治験の必要性が示唆され、高コストになると予想された。また、研究結果に記載したように、作成した医薬品ベースの単核球分離液により得られる単核球は、臨床試験において汎用されている Ficoll-Paque により得られるそれと比較し、細胞組成が異なることが明らかとなり、細胞治療により得られる結果が両者で異なる可能性が示唆された。

事実、マウス脳梗塞モデルにおいて検証を行ったところ、医薬品ベースの単核球分離液とほぼ同じ組成の Nycoprep にて得られた単核球では、治療効果が得られなかった。

脳梗塞患者を対象にした骨髄単核球移植では、Ficoll-Paque を細胞分離液として用いていることもあり、開発する単核球分離デバイスは Ficoll-Paque を用いることを前提に、しかしながら、当初のコンセプト通りの簡便かつ細胞調製施設が不要になるよう、Ficoll-Paque を容易に洗浄除去可能なシステムを組み込む必要性が出てきた。

そこで、単核球分離デバイスに洗浄工程を含む単核球分離システムを、共同研究企業（カネカ）と共に開発を進めており、特

許出願を経て、来年度には上市レベルの試作品を完成させたいと考えている。

#### E. 結論

本研究の目的である、簡便かつ細胞調製施設が不要な単核球分離デバイスの開発を進めた。PMDA との協議によって、様々な問題点が明らかとなり、現在、その解決に向けた開発を共同研究企業と共に継続中である。本研究にて開発された単核球分離デバイス・システムを用いることで、①全国の全ての地域で、②全ての心筋梗塞患者および脳梗塞患者を対象に、③安全な最先端医療を、④低コストで、提供することが可能になると考えており、今後、分担研究者と共に精力的に開発を行っていききたい。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Ohshima M, Taguchi A, Tsuda H, Sato Y, Yamahara K, Harada-Shiba M, Miyazato M, Ikeda T, Iida H, Tsuji M. Intraperitoneal and intravenous deliveries are not comparable in terms of drug efficacy and cell distribution in neonatal mice with hypoxia-ischemia. *Brain Dev.* 2015 Apr;37(4):376-86.
2. Matsuoka K, Yasuno F, Taguchi A, Yamamoto A, Kajimoto K, Kazui H, Kudo T, Sekiyama A, Kitamura S, Kiuchi K, Kosaka J, Kishimoto T, Iida H, Nagatsuka K. Delayed atrophy in posterior cingulate cortex and apathy after stroke. *International Journal of Geriatric Psychiatry.* in press.

3. Yasuno F, Taguchi A, Yamamoto A, Kajimoto K, Kazui H, Sekiyama A, Matsuoka K, Kitamura S, Kiuchi K, Kosaka J, Kishimoto T, Iida H, Nagatsuka K. Microstructural abnormalities in white matter and their effect on depressive symptoms after stroke. *Psychiatry Res.* 2014;223(1):9-14.
4. Yasuno F, Taguchi A, Kikuchi-Taura A, Yamamoto A, Kazui H, Kudo T, Sekiyama A, Kajimoto K, Soma T, Kishimoto T, Iida H, Nagatsuka K, Matsuoka K, Kitamura S, Kiuchi K, Kosaka J. Possible Protective Effect of Regulatory T cells on White Matter Microstructural Abnormalities in Stroke Patients. *J Clin Cell Immunol* 2014 ;5(3):221-228.
5. Yasuno F, Taguchi A, Yamamoto A, Kajimoto K, Kazui H, Kudo T, Kikuchi-Taura A, Sekiyama A, Kishimoto T, Iida H, Nagatsuka K. Microstructural abnormality in white matter, regulatory T lymphocytes, and depressive symptoms after stroke. *Psychogeriatrics.* 2014 ;14(4):213-221
6. Tsuji M, Taguchi A, Ohshima M, Kasahara Y, Sato Y, Tsuda H, Otani K, Yamahara K, Ihara M, Harada-Shiba M, Ikeda T, Matsuyama T. Effects of intravenous administration of umbilical cord blood CD34(+) cells in a mouse model of neonatal stroke. *Neuroscience.* 2014;263:148-58.
7. Kaneko M, Shintani Y, Narita T, Ikebe C, Tano N, Yamahara K, Fukushima S, Coppen SR, Suzuki K. Extracellular high mobility group box 1 plays a role in the effect of bone marrow mononuclear cell transplantation for heart failure. *PLoS One.* 2013;8(10):e76908.
8. Kasahara Y, Ihara M, Nakagomi T, Momota Y, Stern DM, Matsuyama T, Taguchi A. A highly reproducible model of cerebral ischemia/reperfusion with extended survival in CB-17 mice. *Neurosci Res.* 2013;76(3):163-8.
9. Kasahara Y, Ihara M, Taguchi A. Experimental evidence and early translational steps using bone marrow derived stem cells after human stroke. *Front Neurol Neurosci.* 2013;32:69-75.
10. Tsuji M, Ohshima M, Taguchi A, Kasahara Y, Ikeda T, Matsuyama T. A novel reproducible model of neonatal stroke in mice: comparison with a hypoxia-ischemia model. *Experimental Neurology.* 2013; 247 (9):218-25.
11. Ihara M, Taguchi A, Maki T, Washida K, Tomimoto H. A Mouse Model of Chronic Cerebral Hypoperfusion Characterizing Features of Vascular Cognitive Impairment. *Methods in Molecular Biology,* 2014, (1135) 95-102.
12. Taguchi A, Kasahara Y, Matsuyama T. Letter by Taguchi et al Regarding

- Article, "Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Patients With Acute Ischemic Stroke: Results of the AX200 for Ischemic Stroke Trial". *Stroke*. 2014 ;45(1):e8.
13. Kikuchi-Taura A, Taguchi A, Kanda T, Inoue T, Kasahara Y, Hirose H, Sato I, Matsuyama T, Nakagomi T, Yamahara K, Stern D, Ogawa H, Soma T. Human umbilical cord provides a significant source of unexpanded mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2012 Apr; 14(4):441-50.
  14. Nakagomi T, Molnár Z, Taguchi A, Nakano-Doi A, Lu S, Kasahara Y, Nakagomi N, Matsuyama T. Leptomeningeal-Derived Doublecortin-Expressing Cells in Poststroke Brain. *Stem Cells*. 2012;21(13):2350-4.
  15. Takata M, Nakagomi T, Kashiwamura S, Nakano-Doi A, Saino O, Nakagomi N, Okamura H, Mimura O, Taguchi A, Matsuyama T. Glucocorticoid-induced TNF receptor-triggered T cells are key modulators for survival/death of neural stem/progenitor cells induced by ischemic stroke. *Cell Death Differ*. 2012;19(5):756-67
  16. Ohshima M, Tsuji M, Taguchi A, Kasahara T, Ikeda T. Cerebral blood flow during reperfusion predicts later brain damage in a mouse and a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Experimental Neurology*. 2012;233(1):481-9.
  17. Uemura M, Kasahara Y, Nagatsuka K, Taguchi A. Cell-based therapy to promote angiogenesis in the brain following ischemic damage. *Current Vascular Pharmacology*. 2012;10(3):285-8
  18. Kasahara Y, Nakagomi T, Matsuyama T, Stern D; Taguchi A. Cilostazol Reduces the Risk of Hemorrhagic Infarction after Administration of Tissue Plasminogen Activator in a Murine Stroke Model. *Stroke*. 2012; 43(2):499-506.
  19. Tsuji M, Taguchi A, Ohshima M, Kasahara Y, Ikeda T. Progesterone and allopregnanolone exacerbate hypoxic-ischemic brain injury in immature rats. *Experimental Neurology*. 2012;233(1):214-20.
  20. 田口 明彦 脳梗塞患者に対する再生医療開発 脳代謝循環 25 巻 2 号 Page 105-107 2014.
  21. 田口 明彦 【脳虚血の基礎と病態】細胞治療による脳梗塞再生医療 *Medical Science Digest* 41 巻 3 号 Page 111-114 2015
  22. 鈴木 育浩、前田光代、田口明彦 脳の科学 Up Date 脳梗塞患者に対する機能再生治療法の開発 脳 21 17 巻 3 号 Page 371-374 2014
  23. 田口明彦 笠原由紀子 前田光代 治療戦略を目指した研究 再生・移植基礎研究 骨髄由来単核球細胞を用いた再生医療 *日本臨床* 72 巻増刊 最新臨床脳卒中学 (上) Page 469-472 2014
  24. 田口明彦 山原研一 脳血管をターゲットにした再生医療による認知症治療戦略 *血管医学* 15 巻 1 号 Page 69-74

- 2014
25. 田口 明彦 心原性脳塞栓症患者に対する自己骨髄単核球移植治療とその発展 脳卒中 36 巻 2 号 Page 131-133 2014
  26. 田口 明彦 脳梗塞後の修復メカニズムと細胞治療 (Post-Stroke Repairing Mechanism and Cell Therapy) 脳卒中患者に対する自己骨髄単核球を用いた細胞治療とその発展 脳循環代謝 24 巻 2 号 Page 67-70 2013
  27. 田口 明彦 高齢者のための再生医療研究の現状と未来への展望 脳梗塞患者に対する再生医療の現状とその未来 日本老年医学会雑誌 50 巻 3 号 Page359-361 2013
  28. 田口 明彦. 脳卒中に対する再生医療の現状とその未来像 Schneller.2012;82:13-15.
  29. 辻 雅弘、笠原 由紀子、田口 明彦. 脳血管障害患者に対する細胞治療とその将来 . 老年医学の展望 2012;49(5):528-533.
  30. 猪原 匡史、田口 明彦. 脳梗塞と体性幹細胞.Bio Clinica. 2012; 27:36-40.
  31. 猪原 匡史、笠原 由紀子、田口 明彦. 細胞移植療法による神経機能回復 分子脳血管病.2012;3:57-63.
  32. 上村昌寛、笠原 由紀子、猪原 匡史、田口 明彦.血管再生を介したアルツハイマー型認知症治療の可能性.Cardiovascular Frontier.2012;3:233-37.
2. 学会発表 (発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)
1. E. Akagawa, E. Tatsumi, H. Nakada, K. Ootou, S. Hasegawa and Y. Taenaka, Development and implementation of evaluation tool for intellectual properties created in the study of medical devices. 41<sup>st</sup> European Society for Artificial Organs Congress (2014, 9, 17-20, Roma).
  2. 第 52 回日本人工臓器学会大会 (2014, 10, 17- 10,19, 札幌), アカデミアからみた医療機器開発での課題とアプローチ事例- 知的財産の評価指標を用いた公的機関の承継プロセスへの実装. 赤川英毅, 巽英介, 大藤康一郎, 長谷川周平, 中田はる佳, 岩田倫明, 妙中義之
  3. 山原 研一, 笠原 由紀子, 田口 明彦 比重遠心分離液の組成により変化する骨髄単核球分画 真の骨髄単核球とは? 第 17 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 (2013.11.23)
  4. 田口 明彦.心原性脳塞栓症患者に対する自己骨髄単核球移植治療とその発展. 第 38 回日本脳卒中学会.2013.3.21
  5. 田口 明彦.幹細胞療法の可能性—臨床経験を通じて. 第 12 回日本再生医療学会総会.2013.3.21
  6. Taguchi A, Kasahara Y, Matsuyama T, Nagatsuka K.CELL-BASED THERAPY FOR PATIENTS AFTER CARDIOGENIC CEREBRAL EMBOLISM.Heart & Brain Conference 2012.
  7. Taguchi A, Kasahara Y, Matsuyama T, Nagatsuka K. ANTIPLATELET AGENTS DID NOT INCREASE THE RISK OF TISSUE PLASMINOGEN ACTIVATOR INDUCED CEREBRAL HEMORRHAGE IN A MURINE STROKE MODEL.Heart & Brain Conference 2012.

8. E. Akagawa, T. Ohya, E. Tatsumi, H. Nakada, K. Ootou, K. Nishi, S. Hasegawa and Y. Taenaka, Development of guideline for evaluation of intellectual properties created in the study of medical devices, 20<sup>th</sup> Congress of the International Society for Rotary Blood Pumps (2012, 9, 20-22, Istanbul).
  9. 田口 明彦.心原性脳塞栓症患者に対する自己骨髄単核球移植治療とその発展. 第 38 回日本脳卒中学会.2013.3.21
  10. 田口 明彦.幹細胞療法の可能性－臨床経験を通じて. 第 12 回日本再生医療学会総会.2013.3.21
  11. 田口 明彦.脳卒中患者に対する自己骨髄単核球を用いた細胞治療とその発展. 第 24 回日本脳循環代謝学会総会 2012.11.8
  12. 田口 明彦.第 1 回 Small Vessel Disease Conference.2012.7.12
  13. 田口 明彦.脳血管障害患者に対する再生医療の現状とその未来像. 第 11 回日本再生医療学会 2012.6.13
  14. 田口 明彦.第 37 回日本脳卒中学会 2012.4.26
  15. 田口 明彦.第 8 回 TOP フォーラム.2012.2.11
  16. 第 50 回日本人工臓器学会大会 (2012, 11, 22-24, 福岡), 医療機器の開発において創出される知的財産を評価する指標の策定. 赤川英毅, 大屋知子, 巽英介, 中田はる佳, 大藤康一郎, 西謙一, 長谷川周平, 妙中義之.
1. 特許取得
    1. 「細胞分離バック及び細胞分離方法」特願 2012-117511 号
    2. 「細胞分離装置及び遠心分離方法」特願 2011-284381 号
    3. 「細胞分離装置」特願 2011-284382 号
    4. 「単核球分離管、単核球分離システム、単核球分離方法、単核球、及び、体内投与薬剤」特願 2010-175056 号、PCT/JP2011/004427
    5. 「細胞分離デバイス及び細胞分離システム」出願予定
  2. 実用新案登録  
なし
  - 3.その他  
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

## Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表

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
	該当なし						

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
Ohshima M, Taguchi A, Tsuda H, Sato Y, Yamahara K, Harada-Shiba M, Miyazato M, Ikeda T, Iida H, Tsuji M.	Intraperitoneal and intravenous deliveries are not comparable in terms of drug efficacy and cell distribution in neonatal mice with hypoxia-ischemia.	Brain Dev.	37	376-86	2015
Matsuoka K, Yasuno F, Taguchi A, Yamamoto A, Kajimoto K, Kazui H, Kudo T, Sekiyama A, Kitamura S, Kiuchi K, Kosaka J, Kishimoto T, Iida H, Nagatsuka K.	Delayed atrophy in posterior cingulate cortex and apathy after stroke.	International Journal of Geriatric Psychiatry			2015
Yasuno F, Taguchi A, Yamamoto A, Kajimoto K, Kazui H, Sekiyama A, Kitamura S, Kiuchi K, Kosaka J, Kishimoto T, Iida H, Nagatsuka K.	Microstructural abnormalities in white matter and the mirror effect on depressive symptoms after stroke.	Psychiatry Res.	223	9-14	2014
Yasuno F, Taguchi A, Kikuchi-Taura A, Yamamoto A, Kazui H, Kudo T, Sekiyama A, Kajimoto K, Soma T, Kishimoto T, Iida H, Nagatsuka K. Matsuoka K, Kitamura S, Kiuchi K, Kosaka J.	Possible Protective Effect of Regulatory T cells on White Matter Microstructural Abnormalities in Stroke Patients.	J Clin Cell Immunol	5	221-228	2014
Yasuno F, Taguchi A, Yamamoto A, Kajimoto K, Kazui H, Kudo T, Kikuchi-Taura A, Sekiyama A, Kishimoto T, Iida H, Nagatsuka K.	Microstructural abnormality in white matter, regulatory T lymphocytes, and depressive symptoms after stroke.	Psychogeriatrics.	14	213-221	2014

Tsuji M, Taguchi A, Ohshima M, Kasahara Y, Sato Y, Tsuda H, Otani K, Yamahara K, Ihara M, Harada-Shiba M, Ikeda T, Matsuyama	Effects of intravenous administration of umbilical cord blood CD34(+) cells in a mouse model of neonatal stroke.	Neuroscience.	263	148-58	2014
Kaneko M, Shintani Y, Narita T, Ikebe C, Tano N, Yamahara K, Fukushima S, Coppens SR, Suzuki K.	Extracellular high mobility group box 1 plays a role in the effect of bone marrow mononuclear cell transplantation for heart failure.	PLoS One.	8(10)	e76908	2013
Kasahara Y, Ihara M, Nakagomi T, Momota Y, Stern DM, Matsuyama T, Taguchi A.	A highly reproducible model of cerebral ischemia/reperfusion with extended survival in CB-17 mice.	Neurosci Res	76(3)	163-168	2013
Kasahara Y, Ihara M, Taguchi A.	Experimental evidence and early translational steps using bone marrow derived stem cells after human stroke.	Front Neurol Neurosci.	32	69-75	2013
Tsuji M, Ohshima M, Taguchi A, Kasahara Y, Ikeda T, Matsuyama T.	A novel reproducible model of neonatal stroke in mice: comparison with a hypoxia-ischemia model.	Experimental Neurology	247(9)	218-225	2013
Taguchi A, Kasahara Y, Matsuyama T.	Letter by Taguchi et al Regarding Article, "Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Patients With Acute Ischemic Stroke: Results of the AX200 for Ischemic Stroke Trial".	Stroke	45(1)	e8	2014
Kikuchi-Taura A, Taguchi A, Kanda T, Inoue T, Kasahara Y, Hirose H, Sato I, Matsuyama T, Nakagomi T, Yamahara K, Stern D, Ogawa H, Soma T.	Human umbilical cord provides a significant source of unexpanded mesenchymal stromal cells.	Cytotherapy.	14(4)	441-450	2012
Nakagomi T, Molnár Z, Taguchi A, Nakano-Doi A, Lu S, Kasahara Y, Nakagomi N, Matsuyama T.	Leptomeningeal-derived double cortin-expressing cells in poststroke brain	Stem Cells	21(13)	2350-2354	2012



Takata M, Nakagomi T, Kashiwamura S, Nakano-Doi A, Saino O, Nakagoyami N, Okamura H, Mimura O, Taguchi A, Matsuyama T.	Glucocorticoid-induced TNF receptor-triggered T cells are key modulators for survival/death of neural stem/progenitor cells induced by ischemic stroke.	Cell Death Differ	19(5)	756-767	2012
Ohshima M, Tsuji M, Taguchi A, Kasahara T, Ikeda T.	Cerebral blood flow during reperfusion predicts later brain damage in a mouse and a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy.	Experimental Neurology	233(1)	481-489	2012
Kasahara Y, Nakagomi T, Matsuyama T, Stern D, Taguchi A.	Cilostazol reduces the risk of hemorrhagic infarction after administration of tissue-type plasminogen activator in a murine stroke model.	Stroke	43(2)	499-506	2012
Tsuji M, Taguchi A, Ohshima M, Kasahara Y, Ikeda T.	Progesterone and allopregnanolone exacerbate hypoxic-ischemic brain injury in immature rats.	Experimental Neurology	233(1)	214-220	2012
田口 明彦	脳梗塞患者に対する再生医療開発	脳代謝循環	25(2)	105-107	2014
鈴木 育浩、前田光代、田口明彦	脳の科学Up Date 脳梗塞患者に対する機能再生治療法の開発	脳21	17(3)	371-374	2014
田口明彦 山原研一	脳血管をターゲットにした再生医療による認知症治療戦略	血管医学	15(1)	69-74	2014
田口 明彦	心原性脳塞栓症患者に対する自己骨髄単核球移植治療とその発展	脳卒中	36(2)	131-133	2014
田口 明彦	脳梗塞患者に対する再生医療の現状とその未来	日本老年医学会雑誌	50(3)	359-361	2013
猪原 匡史、笠原 由紀子、田口 明彦	細胞移植療法による神経機能回復	分子脳血管病	3	57-63	2012

### Ⅲ. 研究成果刊行物・別刷

Original article

# Intraperitoneal and intravenous deliveries are not comparable in terms of drug efficacy and cell distribution in neonatal mice with hypoxia–ischemia

Makiko Ohshima<sup>a</sup>, Akihiko Taguchi<sup>b</sup>, Hidetoshi Tsuda<sup>a</sup>, Yoshiaki Sato<sup>c</sup>, Kenichi Yamahara<sup>a</sup>, Mariko Harada-Shiba<sup>a</sup>, Mikiya Miyazato<sup>d</sup>, Tomoaki Ikeda<sup>e</sup>, Hidehiro Iida<sup>f</sup>, Masahiro Tsuji<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering, National Cerebral and Cardiovascular Center, Suita, Osaka, Japan

<sup>b</sup> Department of Regenerative Medicine Research, Institute of Biomedical Research Innovation, Kobe, Hyogo, Japan

<sup>c</sup> Division of Neonatology, Center for Maternal–Neonatal Care, Nagoya University Hospital, Nagoya, Aichi, Japan

<sup>d</sup> Department of Biochemistry, National Cerebral and Cardiovascular Center, Suita, Osaka, Japan

<sup>e</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, Mie University School of Medicine, Tsu, Mie, Japan

<sup>f</sup> Department of Investigative Radiology, National Cerebral and Cardiovascular Center, Suita, Osaka, Japan

Received 19 March 2014; received in revised form 23 June 2014; accepted 23 June 2014

## Abstract

**Background and purpose:** Most therapeutic agents are administered intravenously (IV) in clinical settings and intraperitoneally (IP) in preclinical studies with neonatal rodents; however, it remains unclear whether intraperitoneal (IP) injection is truly an acceptable alternative for intravenous (IV) injection in preclinical studies. The objective of our study is to clarify the differences in the therapeutic effects of drugs and in the distribution of infused cells after an IP or IV injection in animals with brain injury.

**Methods:** Dexamethasone or MK-801, an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist was administered either IP or IV in a mouse model of neonatal hypoxic–ischemic encephalopathy. Green fluorescent protein-expressing mesenchymal stem cells (MSCs) or mononuclear cells (MNCs) were injected IP or IV in the mouse model. Two hours and 24 h after the administration of the cells, we investigated the cell distributions by immunohistochemical staining. We also investigated distribution of IV administered MNCs labeled with 2-[<sup>18</sup>F]fluoro-2-deoxy-D-glucose in a juvenile primate, a macaque with stroke 1 h after the administration.

**Results:** IP and IV administration of dexamethasone attenuated the brain injury to a similar degree. IP administration of MK-801 attenuated brain injury, whereas IV administration of MK-801 did not. The IV group showed a significantly greater number of infused cells in the lungs and brains in the MSC cohort and in the spleen, liver, and lung in the MNC cohort compared to the IP group. In the macaque, MNCs were detected in the spleen and liver in large amounts, but not in the brain and lungs.

**Conclusions:** This study demonstrated that the administration route influences the effects of drugs and cell distribution. Therefore, a preclinical study may need to be performed using the optimal administration route used in a clinical setting.

© 2014 The Japanese Society of Child Neurology. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Cell transfusion; Dexamethasone; MK-801; Mesenchymal stem cell; Mononuclear cell; Intraperitoneal injection; Intravenous injection; Neonatal hypoxic–ischemic encephalopathy; Primate

\* Corresponding author. Address: Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering, National Cerebral and Cardiovascular Center, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan. Tel.: +81 6 6833 5012; fax: +81 6 6833 9865.

E-mail address: tsuji.masahiro.ri@ncvc.go.jp (M. Tsuji).

## 1. Introduction

Children with severe neonatal hypoxic–ischemic encephalopathy (HIE) typically die or develop lifelong neurological impairments [1]. No therapeutic method – except for hypothermia – is available to treat neonatal HIE [2,3]. When treating newborns with HIE in a clinical setting, the administration route for a therapeutic medication is generally intravenous (IV). Postnatal day 7–12 (P7–12) mouse or rat pups are widely used for animal models of neonatal HIE [4]. Although there are several reports on the techniques of IV injection in neonatal rodents [5–7], such studies are difficult to perform accurately because of the small size of the rodent pups. Therefore, most researchers using neonatal rodents choose the intraperitoneal (IP) route as an alternative to the IV route to administer an agent [8–14]. Examining the therapeutic effect of a drug using a administration route other than the expected in clinical settings raises the question whether preclinical evaluations of the agent in neonatal rodents accurately simulate the clinical use of the agent; therefore, investigating whether and how different delivery routes influence the therapeutic effects of agents for neonatal brain injury is very important.

Cell therapies have recently attracted much attention as a novel therapeutic strategy for treating neonatal HIE [15]. Among the several administration methods for cell transfusion, IV administration appears to have the lowest risk for clinical use in HIE. Most studies on cell therapies use IP injection rather than IV injection in neonatal rodents for technical reasons; however, fewer transplanted cells may be distributed in the brain when using the IP route compared to the IV route. When translating neonatal rodent data into clinical trials, the difference between the administration routes is more of a crucial issue for cell therapies than for small chemical compounds.

In this report, we introduce a precise and simple technique of IV injection via the femoral vein in P7–8 mice. The objectives of the study are to clarify whether the IP route is an appropriate administration route for agents in comparison to the IV route. We examined the influence of administration route by injecting the following substances of different sizes: dexamethasone and MK-801 (i.e., small chemical compounds) and mesenchymal stem cells (MSCs) and mononuclear cells (MNCs) (i.e., large substances) in a mouse model of neonatal HIE. Dexamethasone is a steroid hormone, has anti-inflammatory effects, and exerts neuroprotective effects against hypoxic–ischemic (HI) brain damage [16–18]. MK-801 is an N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist and exerts neuroprotective effects by blocking NMDA type glutamate receptors expressed in neurons [19,20]. MSCs are adhesive cells derived from culturing mesenchymal tissue such as bone marrow and adipose tissue and have the potential to differentiate into several cell

types such as muscle and bone [21–24]. The MNC fraction of bone marrow contains a variety of blood cells including hematopoietic stem cells [25]. Furthermore, to clarify whether different recipient animals show different distributions of infused cells, we examined the systemic distribution of intravenously (IV) transfused cells in a non-human primate, a macaque with ischemic brain injury.

## 2. Materials and methods

All experiments were performed in accordance with protocols approved by the Experimental Animal Care and Use Committee of the National Cerebral and Cardiovascular Center.

### 2.1. Hypoxia–ischemia procedure

HI was induced in eight-days-old (i.e., P8) CB17 mouse pups (CLEA Japan Inc., Tokyo, Japan) as previously described [26]. In brief, P8 CB17 mouse pups (with a body weight of  $4.5 \pm 0.1$  g) were anesthetized with isoflurane. The left carotid artery was permanently occluded, and after a one-hour recovery period, the pups were subjected to hypoxia (8% oxygen) for 30 min.

### 2.2. IV injection via the femoral vein

The materials included a 35 G needle (ReactSystem, Osaka, Japan), which has an outer diameter of 0.15 mm and an inner diameter of 0.1 mm, a 100- $\mu$ l Hamilton syringe, scissors, and forceps. Each mouse pup was anesthetized and was laid on its back. The limbs were immobilized with tape pasted to an operating board. The skin over the left femoral vein was incised from the inguinal region to 5 mm distal from the incision. The adipose tissue over the vessel was removed, and the femoral vein was exposed. Using the 35 G needle, we manually injected solutions under a stereoscopic microscope (Fig. 1). Intravascular administration was easily confirmed by observing the infused solution, which was transparent fluid in the red blood, flowing from the tip of the needle into the bloodstream. Extremely slow withdrawal of the needle caused no bleeding in approximately 30% of the pups. To stop the bleeding after needle withdrawal, a cotton swab was pressed onto the injection site immediately after pulling the needle from the vein, and ligating the vessel was unnecessary.

### 2.3. Drug administration

We used dexamethasone and MK-801, which are neuroprotectants [19,20,27,28]. The mouse pups were randomly assigned to one of three groups in each drug cohort. *The dexamethasone cohort:* according to reports showing its neuroprotective effects [16,26], dexamethasone