

厚生労働科学研究委託費（再生医療実用化研究事業）  
委託業務成果報告（業務項目）

**非臨床GLP試験・製造関連試験の開始**

担当責任者 中山 功一 佐賀大学医学部 臓器再生医工学講座 教授

**研究要旨**

臨床研究の実施と平行し、将来的にHDMACの治験を行うために必要な非臨床試験および製品の品質・製造関連試験を実施する。

**業務項目の担当責任者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名**

中山 功一  
佐賀大学医学部 臓器再生医工学講座 教授

**A . 研究目的**

臨床研究で使用する高密度スキャフォールドフリー脂肪由来幹細胞構造体（High Density Mesenchymal stem cell scaffold free Autologous Construct：以下、HDMAC）について、これまでの研究では家兎骨軟骨欠損モデルに自家移植した結果、組織学的に良好な骨軟骨の同時再生が得られ移植後 4 年以上経過後も滑らかな再生軟骨が維持されていることが分かっている。加えて、臨床研究開始に向け実施したミニブタでの脂肪由来幹細胞構造体での移植試験においても同様の結果が得られている。また、核型分析、腫瘍形成試験などの安全性試験、細胞の品質に関する試験についても実施した。

本製品について将来的な治験実施・薬事承認取得を目指すためには、これまで実施した試験では不足していたり、規制要件に応じていない手法での実施であったりするため、本事業内で必要な非臨床試験等を完了することを目指す。

**B . 研究方法**

非臨床GLP試験・製造関連試験の開始

(a) ミニブタ移植試験の実施

治験開始に向け必要なミニブタでの移植試験計画を立て、委託試験を開始する。

(b) 製品製造工程の最終化

治験で使用する細胞構造体製品の製造法、品質管理試験、規格等を検討し、PMDAとの協議も踏まえ最終化する。

(倫理面への配慮)

非臨床試験は動物実験等の実施に関する基本指針

を遵守して行う。

**C . 研究結果**

(a) ミニブタ移植試験の実施

治験開始に向け必要なミニブタでの移植試験計画を立て、委託試験を開始した。

適齢期のミニブタ確保、委託施設の空き状況から 2014 年 12 月に(株)日本バイオリサーチセンターと契約を締結。12 月末にミニブタ 2 頭を入手し、2015 年 1 月に試験を開始した。ミニブタから脂肪組織を採取し、HDMAC を作製後、ミニブタ 2 頭に HDMAC を移植した。現在、安全性を確認しながら、経過観察中である。

平行して将来の適応拡大を目指して、荷重部への移植および、欠損面積の拡大を試みた。

大腿骨内顆部の荷重面に従来と同じ直径 5 ミリの欠損部を作成し HDMAC を移植したところ、従来の非荷重面移植と同じプロトコールにも関わらず同等の軟骨・骨の同時再生が得られた。また、膝蓋骨滑車溝に、直径 5 ミリの欠損を連結した楕円状の欠損部に HDMAC 2 本を移植したブタでも円滑な関節面の再生が得られており連結部も非常にスムーズに再生されていることが確認できた。

加えて、本研究の基礎となった家兎を用いた骨軟骨同時再生のデータを集計し、論文化して公表した。また、骨軟骨再生に必要な分子メカニズムを生化学的に解析した。

(b) 製品製造工程の最終化

治験で使用する細胞構造体製品の製造法、品質管理試験について検討し、文書化を進め、最終案をとりまとめ中。PMDA との協議を踏まえ、最終化する予定である。

**D . 考察**

より広範囲の欠損領域へ適応範囲を拡大できる可能性も示唆されたが、薬事承認取得を目指す最終製品について、非臨床試験データを取得することを優先し、次年度以降の研究を進める必要がある。

## E . 結論

治験開始に向け、必要な非臨床安全性試験に着手できた。今後本事業期間内に十分なデータを取得するとともに、PMDAとの協議を続け、治験開始に必要な安全性および品質のデータを揃える。

## F . 健康危険情報

非臨床試験のため該当なし

## G . 研究発表

### 1. 論文発表

1) Simultaneous regeneration of full-thickness cartilage and subchondral bone defects in vivo using a three-dimensional scaffold-free autologous construct derived from high-density bone marrow-derived mesenchymal stem cells.  
Ishihara K, Nakayama K, Akieda S, Matsuda S, Iwamoto Y.  
*J Orthop Surg Res*. 2014 Oct 14;9(1):98.

2) Multipotency of equine mesenchymal stem cells derived from synovial fluid.  
Murata D, Miyakoshi D, Hatazoe T, Miura N, Tokunaga S, Fujiki M, Nakayama K, Misumi K.  
*The Veterinary Journal*, 2014 Oct, 202(1):53-61, 2014 Aug.4

3) A preliminary study of osteochondral regeneration using a scaffold-free 3-dimensional construct of porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells.  
Murata D, Tokunaga S, Tamura T, Kawaguchi H, Miyoshi N, Fujiki M, Nakayama K, Misumi K.  
*J Orthop Surg Res* 2015, 10:35

4) 細胞だけで立体的な構造体を作製する Scaffold-free 3D Biofabrication System の開発  
中山功一  
シーエムシー出版刊 Bio Industry Vol. 31(1) pp.20-27 Jan 2014

5) 細胞だけで立体的な構造体を作製するバイオリピッドプロトタイピングシステムの開発  
川勝美穂、大嶋利之、田中麻衣、中山功一  
遺伝子医学MOOK別冊 pp. 190-194 Feb, 2014

6) バイオ3Dプリンティング技術を用いた立体的細胞構造体の作製  
川勝 美穂、大嶋 利之、中山 功一  
一般社団法人 日本印刷学会 日本印刷学会誌 Vol.51 pp.18-22, 2014

### 2. 学会発表

#### a) 国際学会発表

1) Iwasaki R, Oshima t, Kawakatsu M, Tanaka M, Nakayama K.  
Three dimensional construct fabrication and mechanical pressure culture enhance.  
ICJR Pan Pacific Orthopaedic Congress 2014.7.16-18, Kona, HI, USA

2) Oshima T, Iwasaki R, Kawakatsu M, Tanaka M, Nakayama K.  
In vitro fabrication of scaffold-free meniscus-like constructs using bio-3D Printer.  
ICJR Pan Pacific Orthopaedic Congress 2014.7.16-18, Kona, HI, USA

3) Nakayama K  
A New Approach for 3D Tissue & Organ Fabrication Inspired from Orthopedic Surgery.  
The 5th meeting of Asian Cellular Therapy Organization 2014.11. 10-12, Osaka

4) Nakayama K  
A new approach for 3D tissue & organ fabrication inspired from Orthopedic Surgery.  
The 1st International Conference & Exhibition for Nanopia 2014.11.13-14, Pusan, Korea

#### b) 国内学会発表

1) 中山功一  
バイオ3Dプリンターを用いた臓器の再生とその応用について  
日本安全性薬理研究会 2014.2.14, 東京

2) 中山功一  
スフェロイド積層型Scaffold freeバイオ3Dプリンターの開発とその応用について  
第13回日本再生医療学会総会 2014.3.6, 京都

3) 大嶋利之、川勝美穂、田中麻衣、岩崎倫士、松田秀一、中山功一  
バイオ3Dプリンターを用いた半月板様構造体作製の細胞種の探索  
第13回日本再生医療学会総会 2014.3, 京都

4) 川勝美穂、大嶋利之、田中麻衣、岩崎倫士、松田秀一、中山功一  
バイオ3Dプリンターを用いて作製した半月板様構造体の強度増強に関する検討  
第13回日本再生医療学会総会 2014.3, 京都

5) 中山功一

骨折の治療から着想したあたらしい再生医療とバイオ3Dプリンターの開発について  
日本組織培養学会 第87回大会(東京)  
2014.5.29-31, 東京

6) 中山功一  
骨折の治療から着想したあたらしい再生医療とバイオ3Dプリンターの開発について  
応用物理学会・有機分子バイオエレクトロニクス分科会 2014.7.12, 東京

7) 中山功一  
骨折の治療から着想したあたらしい再生医療とバイオ3Dプリンターの開発について  
第52回日本人工臓器学会大会 2014.10.17-19, 北海道

8) 中山功一  
骨折の治療から着想したあたらしい再生医療とバイオ3Dプリンターの開発について  
日本実験動物代替法学会 第27回大会  
2014.12.5-7, 横浜

9) 大嶋利之、川勝美穂、田中麻衣、村田大紀、三角一浩、松田秀一、中山功一  
強度測定装置を用いた細胞構造体の力学的症状の解析  
第14回日本再生医療学会総会 2015.03.19-21, 横浜

10) 大嶋利之、中野正貴、村田大紀、三角一浩、中山功一  
3Dプリンタを用いた靭帯様の細胞構造体の作製  
第14回日本再生医療学会総会 2015.03.19-21, 横浜

11) 松林久美香、川勝美穂、伊藤学、森田茂樹、中山功一  
細胞構造体連結による臨床利用可能な血管様細胞構造体の作製  
第14回日本再生医療学会総会 2015.03.19-21, 横浜

## 1. 特許取得

No.	特許番号・出願番号	発明の名称	特許権者・出願人	出願国
1	特許第4122280号	組織ブラグの製造方法	九州大学	日本
2	PCT/JP 2007/075343	細胞移植用器具	岩本幸英、中山功一、日本メディカルマテリアル(株)	米、欧、日、中、印
3	特許公開2008-20726	深さ調整用ドリル	日本メディカルマテリアル(株)、九州大学	日本
4	PCT/JP 2008/056826	細胞の立体構造体の製造方法	九州大学	米、欧、日、中、印など10カ国
5	特願2011-023848	移植用ガイドおよび移植用器具	佐賀大学 中山功一	国内出願に続き、PCT出願予定
6	特願2011-030043	細胞塊の培養システム	佐賀大学 中山功一、下戸健	国内出願に続き、PCT出願予定
7	特願2011-140111	細胞の立体構造体製造装置	佐賀大学、サイフューズ、澁谷工業 中山功一、米田健二、坂本匡弘、越田一朗、所村正晴、深村功	国内出願に続き、PCT出願予定
8	特願2015-023228	細胞培養用治具	永田昌博、高橋洋一、中山功一、口石幸治、田村忠士	国内出願に続き、PCT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