

	生存率	70 %以上	① 87.50 % ② 94.61 % ③ 78.48 %	① 合格 ② 合格 ③ 合格
	湿重量	0.75 g以上	① 1.26 g ② 1.11 g ③ 1.09 g	① 合格 ② 合格 ③ 合格
製造工程7 (MSCの回収) 出荷後試験	培地の無菌試験 及びマイコプラズマ否定試験	無菌試験 陰性	① 陰性 ② 陰性 ③ 陰性	① 合格 ② 合格 ③ 合格
		マイコプラズマ試験 陰性	① 陰性 ② 陰性 ③ 陰性	① 陰性 ② 陰性 ③ 陰性
	輸送液の無菌試験 及びマイコプラズマ否定試験	無菌試験 陰性	① 陰性 ② 陰性 ③ 陰性	① 合格 ② 合格 ③ 合格
		マイコプラズマ試験 陰性	① 陰性 ② 陰性 ③ 陰性	① 合格 ② 合格 ③ 合格
	輸送液のエンドトキシン試験	日局法 (比濁法) 1.0 EU/mL以下	① 1.0 EU/mL 以下 ② 1.0 EU/mL 以下 ③ 1.0 EU/mL 以下	① 合格 ② 合格 ③ 合格
	細胞純度試験	MSC マーカー (CD13, CD44, CD73, CD90) の発現を確認 造血細胞系マーカー (CD11b, CD34, CD45) の発現を認めない	①～③ MSCマーカー陽性 造血細胞マーカー陰性	① 合格 ② 合格 ③ 合格

(①～③) : それぞれMB01-003, MB01-001, MB01-004株を示す)

非臨床研究を目的とした細胞バンクとしては、学内研究者からもMSCバンク利用の要望があるため、準備が整い次第、順次配布を開始する予定である。自己由来の細胞は、検体量の限界や品質のばらつき、細胞樹立に時間がかかるなどのデメリットが挙げられるが、あらかじめドナーの基準に適する患者より余剰組織を採取し、臨床研究にも対応できる高い品質で製造した細胞を常時大量にストックすることが可能になれば、将来的には同種細胞治療など再生医療技術に大きく貢献すると考えられる。

また今後は、バンキング細胞種についても、滑膜由来間葉系幹細胞のみならず、臍帯由来の幹細胞等についても検討し、同種移植等の再生医療分野における技術応用発展に

必要な細胞リソースの供給という観点から、学内外の研究者及び営利機関に対し広く提供していくことを視野に入れ、MSCバンクを整備、確立していきたいと考えている。

②gMSCの作成、品質管理、非臨床試験の実施

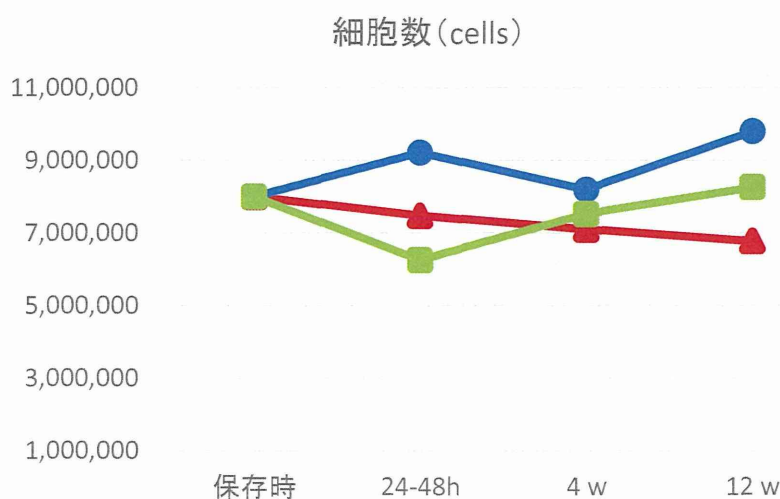
ウサギを用いた埋植予備試験を実施した結果、被験物質（gMSC）埋植により生じた変化は関節内の変化を除き、一過性であった。関節内の変化は滑膜主体であり、他の組織に影響は認められなかった。これらのことから、gMSC をウサギ膝関節腔内に埋植し、局所刺激性及び全身毒性を評価する本試験の実施は可能と判断した。今後、施設及び書類体制の整備が整った段階で、核型分析試験、軟寒天コロニー形成試験も含め、ウサギを用いた埋植試験（本試験）を行う事とした。埋植予備試験の実施方法や結果の詳細については、本報告書の別添資料として、添付した。

③滑膜MSCの安定性の検討・各種組織構成細胞への分化誘導の検討

a. 滑膜MSCの安定性の検討

長期凍結保存することにより細胞の品質が変化しないかを検討するため、一定期間保存した滑膜MSCを溶解して再培養し、細胞形態、細胞倍加時間、生細胞率、gMSC作成可能性等を評価した。

得られた3株の中間製品（P3）を融解した際の細胞数及び生存率を下記グラフに示す。（図2）12週保存までのデータを得て細胞数、生存率ともに著しい減少はみられていない。



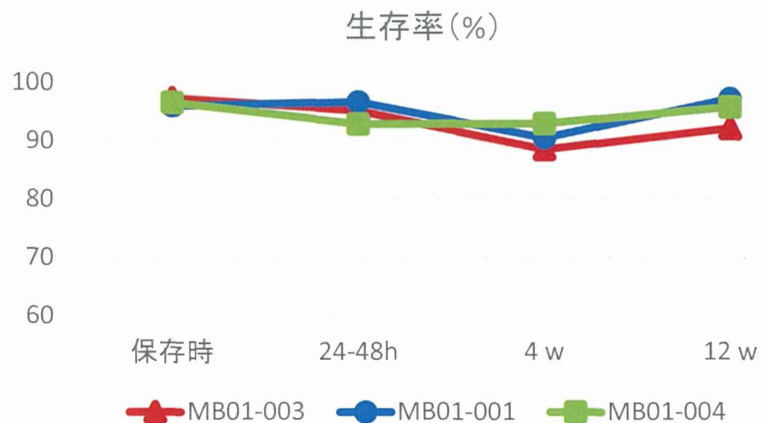


図2. 中間製品融解時データ

b. 各種組織構成細胞への分化誘導法の検討確立

骨芽細胞分化誘導無血清培地STK3を用いた骨芽細胞分化誘導は、21日後 Alizarin red染色で評価したところ、MB01-003, MB01-001, MB01-004株のいずれも良好な石灰化が確認され、骨基質産生が行われていることが確認された (図3)。一方、DMEM (血清なし) またはSTK2をベースに、従来法であるDexamethasone、Ascorbic acid、 β -glycerophosphateを利用した骨芽細胞分化誘導は、培養開始2週間後にALP染色出評価を行った。現在まで、ALP染色の定性評価までの結果が得られているが、それによると、DMEMに比べSTK2に骨分化誘導因子を添加した群のほうが、ALP活性が高い傾向があった。BMP-2の添加による骨分化促進効果は見られなかった (図4)。

脂肪分化誘導については、21日後にOil red染色によって評価したところ、3株とも陽性像が見られ、脂肪分化能が確認された (図3)。

軟骨分化能については、現在まで、g MSCを得てから、軟骨分化誘導を実施して評価中である。現在のところ、肉眼的には軟骨様の白色組織片がin vitroで得られており、この組織学的検討を進めている (図5)。

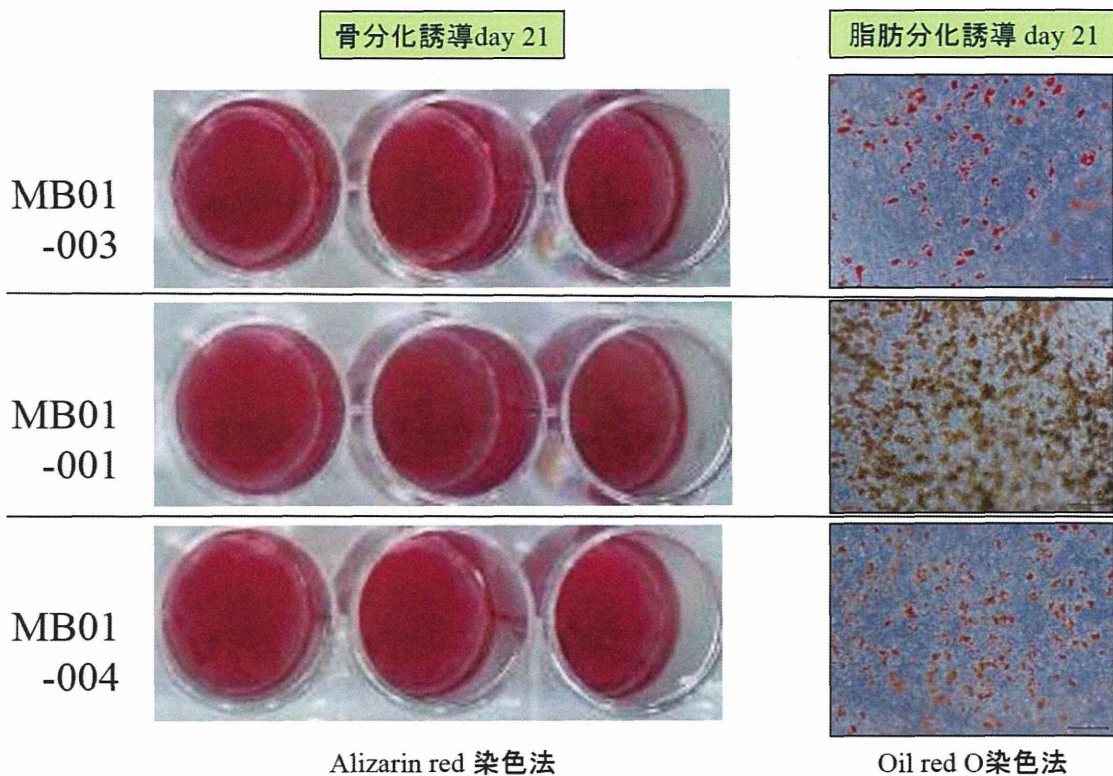


図3. 骨分化、脂肪分化後の染色像

培養21日目のアリザリンレッド染色およびオイルレッドO染色像。骨分化誘導は、無血清骨分化誘導培地STK3を用いた。

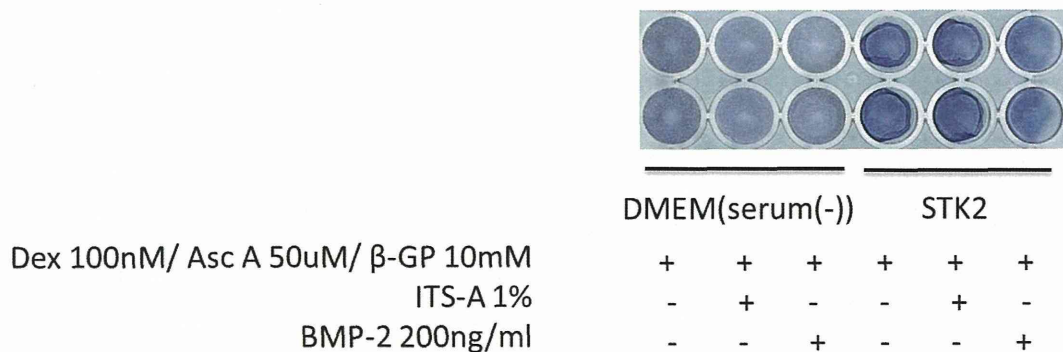
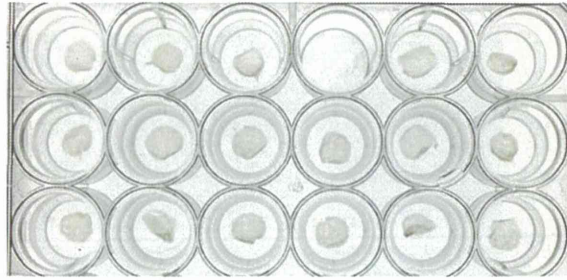


図4. デキサメサゾンによる骨芽細胞分化誘導

通常のDMEM（血清添加なし）またはMSC増殖用無血清培地STK2に骨分化誘導因子である Dexamethasone(wako) 100nM、Ascorbic acid (SIGMA) 50 μ M、 β -glycerophosphate(SIGMA) 10mMを添加した培地、さらにこれらに1%ITS-A (wako) またはBMP-2 (オステオファーマ) 200ng/mlを加えた培養系で骨芽細胞分化誘導を行い、ALP染色で定性評価を行った。いずれもALP陽性を示し、骨芽細胞分化誘導が見られていたが、STK2培地をベースに使用したものでALP活性が高い傾向が見られた。BMP-2を添加することの上乗せ効果は見られなかった。



BMP2 200ng/ml	+	-	+	+	+	+
TGFβ3 10ng/ml	-	+	+	+	+	+
BMP2単独による前培養日数	0	0	0	3	6	9

図5. 滑膜由来MSCから作成した g MSCの軟骨分化誘導

肉眼的には、マトリックスを豊富に有する組織が得られている。

5. まとめ

再生医療の実用化において、安全で高品質な細胞製剤を容易に入手して利用できる同種細胞製品に大きな期待がかかっているが、安全な細胞の調達、受入体制整備、安全なヒト幹細胞の大量培養技術や長期的な保存体制の確立などたくさんの課題も存在する。本研究では、PMDAとの相談で確立した「本品の原料である細胞ソース（滑膜細胞）の入手手続きと管理体制」をもとに非臨床試験実施するため、滑膜組織より樹立させたMSCのマスターセルバンクを構築した。

MSCは多様な分化能を有することが明らかとなっているだけでなく、移植片対宿主病（GVHD）などの免疫反応に対して抑制的に働くことなどから、様々な同種細胞治療への応用が期待されている。本研究で確立したバンクの滑膜MSCは、未来医療センターの臨床用細胞培養施設（CPC）を利用してGMP準拠レベルの品質で培養した細胞であり、トレーサビリティも確保しており、将来の臨床研究や治験、産業利用に向けた非臨床研究に提供できる。これらの細胞は、本研究の非臨床研究の結果から、高い品質を有していること、予備的ながら埋植試験で問題が無いこと、多分化能を有していることが示唆されており、多方面での産業化を目指した研究に資するものと考えられる。また、軟骨再生に関しては、本研究の結果をもとに、さらに必要な非臨床安全性試験等を追加すると同時に、GCTP準拠で治験用再生医療等製品の製造する体制の準備、治験プロトコルおよび体制の準備を行い、PMDAのマスターファイル登録を予定している臨床用無血清培地を用いて大量供給可能な世界初の同種間葉系幹細胞製剤の治験に向けて準備を進める。また、本研究で開発する高品質のMSCバンクはアカデミアにおける再生医療等の研究にも供することが可能であり、学内外への細胞の提供を行っていく。

Ⅲ. 添付資料

gMSC のウサギ膝関節腔内埋植による埋植試験の予備試験

最終報告書

作成日 2015年2月19日

株式会社日本バイオリサーチセンター
羽島研究所

目次

	頁
1. 最終報告書作成者署名	4
2. 表題	5
3. 試験番号	5
4. 試験委託者	5
5. 試験施設	5
6. 試験目的	5
7. 遵守した動物の福祉に関する指針等	5
8. 試験責任者	5
9. 試験担当者（gMSC 生存率の測定）	5
10. 試験日程	6
11. 資料及び標本の保存	6
12. 予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかつたこと	6
13. 試験従事者及び業務分担	7
14. 要約	8
15. 材料及び方法	9
15.1 被験物質及び対照物質	9
15.1.1 被験物質 1	9
15.2 被験物質 2	9
15.3 対照物質	9
15.4 被験物質及び対照物質の調製	10
15.5 細胞数及び生存率の測定	10
15.6 試験系	10
15.6.1 動物種及び系統	10
15.6.2 動物入手日，性別，週齢，入手匹数，入手後 1 日の体重範囲	10
15.6.3 埋植時の週齢	10
15.6.4 供給源	10
15.6.5 検疫及び馴化	10
15.6.6 個体識別法	10
15.6.7 群分け法	11
15.6.8 環境条件及び飼育管理	11
15.6.9 飼料	11
15.6.10 飲料水	11
15.7 埋植	11
15.7.1 埋植部位及びその選択理由	11


15. 7. 2	埋植方法	11
15. 7. 2. 1	麻酔及び剪毛	11
15. 7. 2. 2	埋植	11
15. 7. 2. 3	埋植後の管理	12
15. 7. 2. 4	埋植量, 埋植時刻, 埋植回数及び埋植期間	12
15. 8	群構成	12
15. 9	観察及び検査項目	12
15. 9. 1	観察期間	12
15. 9. 2	一般状態観察	12
15. 9. 3	体重測定	12
15. 9. 4	摂餌量測定	12
15. 9. 5	剖検	13
15. 9. 6	病理組織学的検査	13
15. 10	統計学的方法	13
16.	試験成績	13
16. 1	一般状態	13
16. 2	体重	13
16. 3	摂餌量	13
16. 4	剖検	13
16. 5	病理組織学的検査	13
17.	考察	14
Table 1	Clinical signs in rabbits	15
Table 2	Body weights of rabbits	16
Table 3	Food consumption in rabbits	17
Table 4	Necropsy findings in rabbits	19
Table 5-1 and 5-2	Histopathological findings in rabbits 7 days after placement	20
Table 5-3 and 5-4	Histopathological findings in rabbits 29 days after placement	22
Photo.1~8	24
Attachment 1-1~1-3	「輸送後の gMSC 細胞生存率測定方法」	27

1. 最終報告書作成者署名

試験番号：011134P

表題：gMSC のウサギ膝関節腔内埋植による埋植試験の予備試験

株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所

試験責任者 加藤 英夫  2015年2月19日

2. 表題

gMSC のウサギ膝関節腔内埋植による埋植試験の予備試験

3. 試験番号

011134P

4. 試験委託者

株式会社ツーセル

〒734-8551 広島市南区霞1-2-3広島大学・霞総合研究棟306

TEL/FAX : 082-257-5749

委託担当者 : 長谷川 森一

5. 試験施設

株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所

〒501-6251 岐阜県羽島市福寿町間島六丁目104番地

TEL : 058-392-6222, FAX : 058-392-1284

6. 試験目的

gMSC のウサギ膝関節腔内埋植による埋植試験の実施に先立ち、その予備試験を行った。

7. 遵守した動物の福祉に関する指針等

厚生労働省通知 科発第0601001号（平成18年6月1日）「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」

「株式会社日本バイオリサーチセンター実験動物の管理および福祉に関する規定」（平成19年4月2日，平成26年5月1日改正）

「株式会社日本バイオリサーチセンターヒト由来試料を用いる実験に関する指針」（平成24年3月1日，平成26年1月6日改定）

当試験計画は、試験施設の動物実験委員会及びヒト由来試料実験倫理審査会で審査されたものである。

8. 試験責任者

加藤 英男

株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所

〒501-6251 岐阜県羽島市福寿町間島六丁目104番地

(E-mail : kato.hideo@nisshin.com, TEL : 058-392-6222, FAX : 058-392-1284)

9. 試験担当者 (gMSC 生存率の測定)

株式会社ツーセル

松本 昌也

10. 試験日程

試験開始日	2014年10月 3日
動物入手日	2014年10月 8日
gMSC 受領日	2014年10月27日
群分け日	2014年10月27日
埋植日	2014年10月28日
剖検日	
埋植後7日	2014年11月 4日
埋植後29日	2014年11月26日
病理組織所見最終化日	2015年 1月 9日
試験終了日	2015年 2月19日

11. 資料及び標本の保存

当試験において試験施設で発生するすべての資料及び標本は、株式会社日本バイオリサーチセンター羽島研究所の資料保存施設に最終報告書提出日より5年間保存する。その後の措置については、試験委託者と協議の上、決定する。

12. 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと

- (1) 空調設備点検のため、動物飼育室の湿度が2014年11月19日の14時04分～46分の間、許容範囲（40.0～70.0%）を逸脱し、最高74.7%となった。湿度の逸脱幅は僅かであり、動物の一般状態に異常は認められなかったため、試験成績に及ぼす影響はないと判断した。
- (2) 埋植には、14G サーフロー留置針を用いる予定であったが、それよりも内径が小さい18G でも被験物質が通過することを確認した。そのため、18G を用いた方が刺入部位の物理的侵襲を小さくすることが可能であるため、18G サーフロー留置針を用いて埋植した。18G サーフロー留置針を用いて埋植したが、全例とも埋植に問題なかったため、試験成績に及ぼす影響はないと判断した。

13. 試験従事者及び業務分担

加藤 英男

(試験計画書の作成, 検体の埋植, 試験操作の確認, 最終報告書の作成)

田中 勝幸, 曾我 高臣, 杉本 真知子, 渡邊 誠

(一般状態観察, 体重測定, 摂餌量測定, 動物の一般飼育管理)

伊藤 格, 今井 順, 遠藤 克己

(剖検, 病理組織標本作製, 病理組織学的検査)

杉山 亘秀

(被験物質の管理)

松本 昌也 (株式会社ツーセル)

(gMSC 生存率の測定)

14. 要約

gMSC を4匹のウサギ左右膝関節腔内に埋植し、一般状態観察、体重測定、摂餌量測定を行い、膝関節の肉眼観察及び病理組織学的検査を行った。観察期間は、埋植後7日及び埋植後29日とした。対照としてヒアルロン酸ナトリウム架橋体製剤（サイビスク）を同様に投与した。gMSC 及び DiI-gMSC とも膝関節当たり0.25 g 投与した。また、gMSC の組織局在を目的に投与した DiI-gMSC（膝関節当たり0.25 g）の膝関節は、未染標本を作製し、試験委託者に送付した。

1. 一般状態、体重及び摂餌量では、対照群、gMSC 群及び DiI-gMSC 群とも、埋植の影響を認めたが、埋植後7日までには消失する一過性のものであった。

2. 膝関節の肉眼観察では、対照群、gMSC 群及び DiI-gMSC 群とも、異常は認められなかった。

3. 病理組織学的検査では、埋植後7日に対照群及び gMSC 群とも滑膜の増殖、滑膜の炎症細胞の浸潤が認められたが、gMSC 群の方が対照群よりも変化が強かった。その他、対照群で無構造の好塩基性遊離体が、gMSC 群で細胞性の好酸性遊離体が認められた。

以上、gMSC 埋植により生じた変化は、関節内の変化を除き、一過性であった。関節内の変化は、滑膜主体であり、他の組織に影響は認められなかった。これらのことから、gMSC をウサギ膝関節腔内に埋植し、局所刺激性及び全身毒性を評価する本試験の実施は可能と判断した。

15. 材料及び方法

15.1 被験物質及び対照物質

15.1.1 被験物質1

名称	: ヒト由来 gMSC (以下 gMSC)
ロット番号	: MB01-001-gMSC-141027
性状	: 乳黄色のゲル状3次元人工組織で異物を認めない。
輸送形態	: 注射筒に充填された被験物質は, 25L ポータブル冷温庫 (VS-404 (BK)) (設定温度: 11°C, 実測値: 9.5~14.7°C, 許容範囲: 8~15°C) に入れ, 試験施設に輸送された。
保管条件	: ポータブル冷温庫内 (設定温度: 11°C, 許容範囲: 8~15°C)
設定根拠 (保管)	: ツーセル社内データにおいて被験物質が8~15°C の範囲において少なくとも96時間まで, 生存率80%以上を保持していることを確認している事から上記温度を設定した。
保管場所	: ポータブル冷温庫は試験施設の G 棟2階実験室に保管
供給源	: 株式会社ツーセル

15.2 被験物質2

名称	: ヒト由来 gMSC (DiI 染色) (以下 DiI-gMSC)
ロット番号	: MB01-001-gMSC-141027
性状	: 橙赤色のゲル状3次元人工組織で異物を認めない。
使用期限	: 作製後72時間以内に使用
輸送形態	: 注射筒に充填された被験物質は, 25L ポータブル冷温庫 (VS-404 (BK)) (設定温度: 11°C, 実測値: 9.5~14.7°C, 許容範囲: 8~15°C) に入れ, 試験施設に輸送された。
保管条件	: ポータブル冷温庫内 (設定温度: 11°C, 許容範囲: 8~15°C) 設定根拠 (保管): ツーセル社内データにおいて被験物質が8~15°C の範囲において少なくとも96時間まで, 生存率80%以上を保持していることを確認している事から上記温度を設定した。
保管場所	: ポータブル冷温庫は試験施設の G 棟2階実験室に保管
供給源	: 株式会社ツーセル

15.3 対照物質

名称	: ヒアルロン酸ナトリウム架橋体制剤 (サイビスクディスポ®関節注 2 mL。以下サイビスク)
ロット番号	: R1213
性状	: 無色のゲルで異物を認めない。
pH	: 6.9~7.5
浸透圧比	: 1.05~1.15
使用期限	: 2015年3月
製造元	: genzyme
輸送形態	: 注射筒に充填された対照物質は, 25L ポータブル冷温庫 (VS-404 (BK)) (設定温度: 11°C, 実測値: 9.5~14.7°C, 許容範囲: 8~15°C) に入れ, 試験施設に輸送された。
保管条件	: ポータブル冷温庫内 (設定温度: 11°C, 許容範囲: 8~15°C)
設定根拠 (保管)	: 対照物質の保管温度範囲が室温である事から, 被験物質と同条件の温度で保存が可能な事から上記温度を設定した。

保管場所 : ポータブル冷温庫は G 棟2階実験室に保管
供給源 : 株式会社ツーセル

15.4 被験物質及び対照物質の調製

被験物質として、試験委託者は細切した gMSC あるいは DiI-gMSC を注射筒1本あたりに 0.25 g 充填し、試験施設に送付された。被験物質1 (gMSC) は、埋植用被験物質に不具合が生じた場合に使用するために埋植予備用サンプルも送付された。M02203用の予備用サンプル (シリンジ No.33及び No.34) は使用したが、その他は使用せず、ポータブル冷温庫に入れ試験委託者に返却した。品質管理用の gMSC 及び DiI-gMSC も同梱された。これは細胞数及び生存率の測定に用いた。

対照物質として、試験委託者はサイビスクを注射筒1本あたりに0.25 g 充填し、試験施設に送付された。未使用の対照物質は、ポータブル冷温庫に入れ試験委託者に返却した。

15.5 細胞数及び生存率の測定

品質管理用の gMSC の一部を用いて、細胞数及び生存率を測定した。添付の測定方法 (輸送後の gMSC 細胞生存率測定に関する手順書に基づいて作成) (Attachment 1-1~1-3) に従い、試験委託者が実施した。測定サンプル1, 2及び3の細胞数は、それぞれ 10.9×10^6 cells, 11.7×10^6 cells, 8.1×10^6 cells であり、生存率はそれぞれ84.6%, 84.6%, 83.9%であった。

15.6 試験系

15.6.1 動物種及び系統

動物種 : ウサギ
系 統 : Kbl : NZW

15.6.2 動物入手日, 性別, 週齢, 入手匹数, 入手後1日の体重範囲

2014年10月8日, 雄, 6週齢, 11匹, 1.05~1.35 kg

15.6.3 埋植時の週齢

9週齢

15.6.4 供給源

北山ラベス株式会社

15.6.5 検疫及び馴化

入手した動物は5日間の検疫期間, その後, 14日間の馴化期間を設けた。この間に体重測定 (電子天秤 : SB12001, メトラー・トレド株式会社) を4回, 摂餌量測定及び一般状態の観察を毎日行って, それらの結果に異常のないことを確認後, 群分けに用いた。

15.6.6 個体識別法

動物は, 入手日に黒色油性インクを用いて試験番号を右耳介の内側に, 検疫・馴化動物番号 (下3桁) を左耳介の外側に記入して識別し, 群分け後は油性インクを用いて動物番号 (下3桁) を左耳介の内側に記入して識別した。

各ケージには, 検疫・馴化期間中は試験番号, 入手年月日, 検疫・馴化動物番号を記入したラベルを, 群分け後は試験番号, 群名称及び動物番号を記入し, 群ごとに色分けしたラベルを取り付けた。

15.6.7 群分け法

埋植の前日に、コンピュータ（IBUKI, 株式会社日本バイオリサーチセンター）を用いて体重を層別に分けたのち、無作為抽出法により各群の平均体重がほぼ等しくなるように群分けした。

群分け後の残余動物は、埋植日の埋植終了後に耳介静脈よりペントバルビタールナトリウム（40 mg/kg）を投与し、麻酔下で腹大動脈より放血して安楽死させた。

15.6.8 環境条件及び飼育管理

設定温度：23°C（実測値：21.7～24.3°C，許容範囲：20.0～26.0°C），設定湿度：55%（実測値：47.5～74.7%，許容範囲：40.0～70.0%），明暗各12時間（照明：午前6時～午後6時），換気回数12回／時（フィルターを通した新鮮空気）に維持された飼育室（G棟205号室，ただし検疫期間は201号室）で動物を飼育した。

動物はアルミニウム製懸垂式ケージ（W：350 × D：580 × H：350 mm，自動給水装置及び自動水洗装置付）を用い，個別飼育した。

ケージ及び給餌器の交換は2週に1回以上行った。動物飼育室の清掃・消毒は毎日行った。

15.6.9 飼料

製造後5箇月以内の固型飼料（LRC4，オリエンタル酵母工業株式会社）を130 g（許容範囲：127～133 g）給餌器に入れた。使用した飼料のロットについて，飼料中の汚染物質濃度，細菌数及び栄養成分含量が試験施設の許容基準に適合していることを確認した。

分析機関：オリエンタル酵母工業株式会社（細菌数及び栄養成分）及び Eurofins Scientific Analytics（汚染物質）

15.6.10 飲料水

水道水を飲料水として自動給水装置を用いて自由に摂取させた。

飲料水中の汚染物質濃度及び細菌数をほぼ6箇月ごとに分析し，分析値が試験施設の許容基準に適合していることを確認した。

分析機関：株式会社環境公害センター

15.7 埋植

15.7.1 埋植部位及びその選択理由

埋植部位：左右の膝関節腔内

選択理由：臨床適用経路に従った。

15.7.2 埋植方法

15.7.2.1 麻酔及び剪毛

動物を全身麻酔した。全身麻酔液 [ケタミン（塩酸ケタミンとして40 mg/kg，投与液量：0.8 mL/kg）とセラクター（塩酸キシラジンとして4 mg/kg，投与液量：0.2 mL/kg）の混液] を23G注射針（テルモ株式会社）を取り付けたポリプロピレン製ディスポーザブル注射筒（テルモ株式会社）を用いて，大腿部筋肉内に投与した。麻酔後，両膝とも広い範囲を剪毛（電気バリカン：ER807，パナソニック電気株式会社）した。切開予定部に局所麻酔薬（リドカイン塩酸塩，3 mL/body）を25G注射針（テルモ株式会社）を取り付けたポリプロピレン製ディスポーザブル注射筒（テルモ株式会社）を用いて，皮下投与した。

15.7.2.2 埋植

動物は仰臥位に保定し，左膝関節を屈曲させた。被毛を電気バリカンで剪毛後，ポビドンヨ

ード（イソジン液）及び70%アルコールで交互に各3回以上清拭し十分に消毒した。スカルペルを用いて関節外側皮膚を数 cm 程度切開し，外側側副靭帯に沿って筋層を切開後，関節包を露出させた。18G サーフロー留置針を関節包から関節腔内に刺入し，留置針内筒を外筒から抜き去り，外筒先端のみが関節腔内に留まるよう外筒を保持した。被験物質あるいは対照物質を充填した注射筒を外筒に連結し，注射筒の内筒を押し，内容物を関節腔内に押し出した。その後，留置針外筒を関節包から抜いた。6-0縫合糸で切開した筋層を縫合し，4-0縫合糸で皮膚を縫合した。皮膚切開部にイソジンゲルを塗布した。右膝も同様に実施した。

15.7.2.3 埋植後の管理

エンロフロキサシン（5 mg/kg，埋植液量0.2 mL/kg）を埋植日に注射針（テルモ株式会社）を取り付けたポリプロピレン製ディスプレイダブル注射筒（テルモ株式会社）を用いて頸背部に皮下投与した。切開部感染防止のため，エリザベスカラーを術後5日間装着した。

15.7.2.4 埋植量，埋植時刻，埋植回数及び埋植期間

埋植量：0.25 g/片膝とした。

埋植時刻：午前9時18分～午後0時10分

埋植回数：1回とした。

埋植期間：埋植後7日あるいは29日とした。

15.8 群構成

群	試験群	埋植物質	ラベルの色	動物数（動物番号）	
				埋植後7日剖検例 ¹⁾	埋植後29日剖検例 ²⁾
1	対照	サイビスク	白 色	2 (M01101, M01102)	2 (M01103, M01104)
2	gMSC	gMSC	青 色	2 (M02201, M02202)	2 (M02203, M02204)
3	DiI-gMSC	DiI-gMSC	赤 色	1 (M03301)	1 (M03302)

1) 2014年11月 4日に剖検

2) 2014年11月26日に剖検

15.9 観察及び検査項目

15.9.1 観察期間

観察期間は埋植後7日あるいは29日までとした。

15.9.2 一般状態観察

一般状態は毎日1回（埋植日は埋植前）観察した。

15.9.3 体重測定

体重測定は，埋植日（埋植前），その後1週間に1回及び埋植後29日に実施（電子天秤：SB12001，メトラー・トレド株式会社）した。

15.9.4 摂餌量測定

毎日1回給餌し，給餌翌日に残量を測定（電子天秤：SB12001，メトラー・トレド株式会社）して摂餌量を算出した。図表の対表示は残量の測定日とした。

15.9.5 剖検

観察期間終了日に、ペントバルビタールナトリウム (40 mg/kg) 麻酔下 (耳介静脈から静注) で腹大動脈から放血して安楽死させた後、左右の膝関節内を肉眼的に観察した。

15.9.6 病理組織学的検査

左右の膝関節 (大腿骨, 膝蓋骨を含む滑膜組織, 半月板を含む脛骨) は, 対照群及び gMSC 群では10 vol%中性緩衝ホルマリンに, DiI-gMSC 群では4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液に固定した。脱灰は50% K-CX (ギ酸・ホルマリン) を用いて行った。

対照群及び gMSC 群では, 常法に従ってパラフィン包埋後, HE 染色標本を作製し, 病理組織学的検査を行った。DiI-gMSC 群では, パラフィン包埋後, 薄切し, 未染の標本を3枚/膝作製し, 試験委託者に送付した。これに加えて, 対照群及び gMSC 群の未染標本 (3枚/膝) と DiI-gMSC 群の HE 染色標本を作製し, 試験委託者に送付した。

異常が認められた器官又は組織の代表例については, デジタルカメラで写真撮影を行った。切り出し後の器官・組織は, 10 vol%中性緩衝ホルマリンで保存した。

15.10 統計学的方法

使用しなかった。

16. 試験成績

16.1 一般状態

一般状態を Table 1に示した。

対照群の1例, gMSC 群の2例, DiI-gMSC 群の1例では, 埋植後1日から自発運動の低下がみられ, 最長で5日間継続した例も認められた。埋植後6日以降は, 全例とも異常は認められなかった。

16.2 体重

体重を Table 2に示した。

gMSC 群の1例では, 埋植日に比べて埋植後7日に体重減少が認められた。その他の例では, 順調な体重推移を示した。

16.3 摂餌量

摂餌量を Table 3に示した。

対照群, gMSC 群, DiI-gMSC 群では, 埋植日に比べて埋植後1日に全例とも摂餌量が減少した。その後, 各群とも埋植後2日から摂餌量が増加する例がみられ, 埋植後7日までには全例とも埋植日の摂餌量まで復した。

16.4 剖検

剖検所見を Table 4に示した。

対照群, gMSC 群, DiI-gMSC 群では, 全例とも膝関節を含めて異常は認められなかった。

16.5 病理組織学的検査

病理組織学的検査を Table 5-1~5-4, Photo 1~8に示した。

【埋植後7日剖検例】

対照群では, 滑膜の増殖 (±), 滑膜の炎症細胞の浸潤 (±), 無構造の好塩基性遊離体 (±) が2例の左右膝関節で認められた。

gMSC 群では, 滑膜の増殖 (+), 滑膜の炎症細胞 (リンパ球主体) の浸潤 (+~2+), 細胞

性の好酸性遊離体 (+) が2例の左右膝関節で認められた。さらに、滑液中の炎症細胞の浸潤 (±~+) が1例の左右膝関節及び1例の右膝関節に認められた。

【埋植後29日剖検例】

対照群では、滑膜の増殖 (±~+)、滑膜の炎症細胞 (1例のみ顆粒球主体) の浸潤 (±~+)、無構造の好塩基性遊離体 (±) が2例の左右膝関節で認められた。

gMSC 群では、滑膜の増殖 (±~+)、滑膜の炎症細胞 (リンパ球主体) の浸潤 (+)、細胞性の好酸性遊離体 (±~+) が2例の左右膝関節で認められた。さらに、滑液中の炎症細胞の浸潤 (±) が2例の右膝関節に認められた。

17. 考察

gMSC のウサギ膝関節腔内埋植による埋植試験の実施に先立ち、その予備試験を行った。

対照群、gMSC 群とも、一般状態、体重及び摂餌量で埋植に起因すると考えられる影響を認めたが、埋植後7日までは消失する一過性のものであった。なお、埋植による影響の他、エリザベスカラーの5日間装着に起因するストレスも加わった可能性が考えられた。エリザベスカラーの装着は、動物の行動を抑制することや摂餌量の減少をきたす。しかしながら、エリザベスカラーは、ウサギが皮膚切開部の縫合糸を噛み切り、切開部が開き感染することの防止を目的に装着した。エリザベスカラーの装着の影響は、当試験での程度であれば、試験評価上、許容できると判断している。なお、これらの影響に gMSC 群と対照群の間に顕著な差はなかった。

病理組織学的検査では、対照群の埋植後7日に滑膜の増殖及び滑膜の炎症細胞の浸潤がごく軽度 (±) に認められた。これに対して、gMSC 群でも滑膜の増殖 (+)、滑膜の炎症細胞の浸潤 (+~2+) が認められたが、gMSC 群の方が変化は強かった。さらに、gMSC 群では、滑液中にも炎症細胞の浸潤が認められたことは、滑膜の炎症反応が強かったことを裏打していると考えられた。その他に、対照群で無構造の好塩基性遊離体がみられたのに対し、gMSC 群で細胞性の好酸性遊離体が認められた。無構造の好塩基性遊離体は、正常動物の関節内に認められる構造体ではないため、投与物質であるサイビスクに起因するものと考えられた。好酸性遊離体は、細胞性であるため、残存した gMSC に由来するものか、gMSC の処理過程で生じた関節構成組織に由来する遊離体のいずれかと考えられたが、それを明確にすることはできなかった。gMSC 群の滑膜に浸潤した炎症細胞は、リンパ球主体であったことから、滑膜の反応は局所刺激性反応ではなく、異種細胞に対する免疫反応と考えられた。埋植後7日に対する埋植後29日の変化において、埋植後7日では滑膜の増殖 (+)、滑膜の炎症細胞の浸潤 (+~2+)、細胞性の好酸性遊離体 (+)、滑液中の炎症細胞の浸潤 (±~+) であったのに対し、埋植後29日では滑膜の増殖 (±~+)、滑膜の炎症細胞の浸潤 (+)、細胞性の好酸性遊離体 (±~+)、滑液中の炎症細胞の浸潤 (±) となり、これら炎症反応にはいずれも回復傾向が認められた。よって、埋植後29日では、対照群及び gMSC 群とも滑膜の炎症性変化は認められたものの、炎症の進行はなかったことから、回復性の確認時期は、これ以降 (埋植後4週) の時点が望ましいと考えられた。

以上、gMSC 埋植により生じた変化は、関節内の変化を除き、一過性であった。関節内の変化は、滑膜主体であり、他の組織に影響は認められなかった。これらのことから、gMSC をウサギ膝関節腔内に埋植し、局所刺激性及び全身毒性を評価する本試験の実施は可能と判断した。