

---

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 ..... | 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 |
| <br>   |    |
| 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 |
| <br>   |    |
| Photo.1 ~ 8.....   | 24 |
| <br>   |    |
| 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 チセンタ 羽島研究所

試験責任者

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制剤(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、埋植の影響を認めしたが、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。