

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

「多施設ヒト幹細胞臨床研究による3次元再生皮下軟骨の有効性確認」

平成 2 5 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高戸 毅

平成 2 6 ( 2 0 1 4 ) 年 5 月

目 次

I . 総括研究報告		
「多施設ヒト幹細胞臨床研究による3次元再生皮下軟骨の有効性確認」	-----	3
高戸 毅		
II . 分担研究報告		
1 . 「画像診断を用いた有用性解析」	-----	7
大友 邦		
2 . 「3次元皮下再生軟骨の技術開発ならびに製造」	-----	8
星 和人		
3 . 「臨床研究の企画・支援」	-----	11
荒川 義弘		
4 . 「臨床研究申請の支援ならびに有効性評価に関する助言」	-----	12
小室 美子		
5 . 「3次元皮下再生軟骨の臨床実施」	-----	13
岡崎 睦		
6 . 「3次元皮下再生軟骨の臨床実施」	-----	15
飯野 光喜		
7 . 「有効性評価技術の開発」	-----	16
新田 尚隆		
III . 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	18
IV . 研究成果の刊行物・別刷	-----	20

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）  
 （総括・分担）研究報告書

「多施設ヒト幹細胞臨床研究による3次元再生皮下軟骨の有効性確認」

研究代表者 高戸 毅 東京大学大学院医学系研究科 教授

**研究要旨** われわれは世界に先駆けて力学強度と3次元形態を有する3次元皮下再生軟骨を開発した。現在、東京大学医学部附属病院において、口唇口蓋裂の鼻変形患者に3次元皮下再生軟骨を移植するヒト幹細胞臨床研究を実施している。しかし臨床研究を通じて、治験実施に向けて有効性エビデンスを補強すること、多施設研究が未実施であること、製造プロセスと品質管理法が複雑であることの3つ課題が明らかとなった。本研究ではこの3つの課題を解決し、3次元皮下再生軟骨の有効性を確立するとともに、東京医科歯科大学医学部附属病院、山形大学医学部附属病院と連携し多施設臨床研究を実施し、治験開始に資する臨床データを作成し、速やかに治験に移行させることを目的としている。

本年度は、昨年に引き続き有効性評価法を検討した。ヌードラットへ移植した再生軟骨組織を超音波、MRI、CTなどを用いて非侵襲的に計測し、その後、組織学的、生化学的解析を行った。再生軟骨組織の成熟度を測定する評価項目として、MRI(T2, D 値)を選択した。また、懸念される石灰化を検出するためには、モリブデンX線(マンモグラフィー)の併用が有用であることが示唆された。

再生医療推進法の成立に伴い、インプラント型再生軟骨の産業化においても、その製造を医療機関外に委託することが可能となる。そこで、インプラント型再生軟骨の治験における製造場所となる富士ソフト社のCPCを利用し、同施設におけるインプラント型再生軟骨の作製と、医療施設への組織搬出入技術を検討した。ヌードラットへの移植後の組織学的、生化学的評価において良好な軟骨再生が観察され、富士ソフト社におけるインプラント型再生軟骨組織の作製法と、東京医科歯科大学や山形大学への搬送技術が有効であることが示され、安定した再生軟骨移植が可能であることが示唆された。

また、インプラント型再生軟骨の多施設臨床研究の実施に向け、ヒト幹細胞臨床研究指針に則る審査の手続きをすすめた。

研究分担者氏名・所属研究機関名・職名

- 大友 邦・東京大学・教授
- 星 和人・東京大学・特任准教授
- 荒川 義弘・東京大学・准教授
- 小室 美子・東京大学・特任講師
- 岡崎 睦・東京医科歯科大学・教授
- 飯野 光喜・山形大学・教授
- 新田 尚隆・(独)産業技術総合研究所・主任研究員

A. 研究目的

われわれは世界に先駆けて力学強度と3次元形態を有する3次元皮下再生軟骨を開発した。現在、東京大学医学部附属病院において、口唇口蓋裂の鼻変形患者に3次元皮下再生軟骨を移植するヒト幹細胞臨床研究を実施している。今回の臨床研究を通じて、治験実施に向けての3つ課題、有効性エビデンスを補強すること、多施設研究が未実施であること、製造プロセスと品質管理法が複雑であること、が明らかとなった。本研究では3つの課題を解決し、治験実施に資する臨床データを作成し、速やかに治験に移行することを目的としている。そこで、現在実施中の

臨床研究に対して、有効性の評価項目を追加し、研究機関に同一のスーパー特区内の東京医科歯科大学と、関東から距離のある山形大学を加える改訂版ヒト幹細胞臨床研究実施し、同時に高度医療導入を図る。

B. 研究方法

- 1. 有効性評価法の確立
  - 1-1) 3次元皮下再生軟骨の非侵襲的評価
- 有効性評価法を確立するため、現在の製造法に則り、実験的にヒト3次元皮下再生軟骨を作製した。移植組織としては、線維芽細胞や細胞生存性が低下した軟骨細胞の混入を想定し、100%ヒト耳介軟骨細胞、ヒト耳介軟骨細胞：線維芽細胞=10:90、ヒト耳介軟骨細胞：線維芽細胞=1:99、100%線維芽細胞、100%55 処理ヒト耳介軟骨細胞をそれぞれ  $5 \times 10^7$  cells /mLで1%アテロコラーゲンに懸濁し、PLLA足場素材(5 mm x 3 mm x 50 mm)へ播種した。ヌードラット背部皮下へ移植後、2週と8週でヌードラットを産総研に搬送し、超音波、CT、MRI、血流測定などを用いて再生軟骨組織の力学的、生化学的特性を非侵襲的に評価した。その後、ヌードラットから再生軟骨組織を摘出し、トルイジンブルー染色

や HE 染色などによる組織学的評価、ならびに GAG や COL2 ELISA などによる生化学的評価を行った。さらに非侵襲測定値と組織学・生化学的評価結果との比較に基づき、臨床機を用いた測定プロトコルの作成を行った。

#### 1-2) 対照群(従来法)のデータ作成

臨床上の有効性評価には、従来の治療法との比較が不可欠である。そこで、昨年に引き続き、従来法の自家腸骨移植法を施行した患者に対し、現行のヒト幹細胞臨床研究での評価項目(有害事象の有無、血液検査、疾患関連QOL評価、生活活動度評価、顔面形態評価、など)を実施し、プロスペクティブに経過を追跡した。

#### 2. 多施設臨床研究の実施

##### 2-1) 採取した軟骨組織および製造した再生軟骨の搬出入技術の確立と実証

2013年4月26日に、再生医療推進法が成立した。インプラント型再生軟骨の産業化においても、その製造を医療機関外に委託することが可能となる。そこで、インプラント型再生軟骨の治験における製造場所となる富士ソフト社のCPCを利用し、同施設における作製と、医療施設間への組織搬出入技術を確立し、その有効性を検討した。再生軟骨組織は、現行のヒト幹細胞臨床研究に則って作製し、富士ソフト社と東京大学が共同開発した再生軟骨の長期保存方法(特願2011-263837)で保管した。その後、同施設から東京医科歯科大学および山形大学にヒト再生軟骨組織を輸送し、ヌードラットの背部皮下へ移植した。再生軟骨組織の保管期間による影響を検討するため、再生軟骨作製後、保管容器に入れて速やかに輸送、移植する群と、2週間保管した後、輸送、移植する群とで比較を行った。移植後8週に再生軟骨組織を摘出し、組織学的、生化学的に評価した。

##### 2-2) 多施設間でのトレーサビリティ構築

現行のヒト幹細胞臨床研究では、東京大学医学部附属病院内で採取から移植まで、使用するすべての容器にICタグをつけて一貫したトレーサビリティを実現している。多施設臨床研究を実施するにあたり、東京大学医学部附属病院内で運用されているトレーサビリティを、東京医科歯科大学医学部附属病院、山形大学医学部附属病院共有できるようなインターネット化を拡張し、実証実験を継続した。

(倫理面への配慮)

本研究の動物実験プロトコルに関しては、国の「動物の保護及び管理に関する法律」及び東京大学、東京医科歯科大学、山形大学、(独)産業技術総合研究所の動物実験実施規則、動物実験実施マニュアルに従い、動物愛護の観点に十分留意して行った。

#### 3. 製造検査の効率化

現在の製造プロトコルでは1例あたり、無菌試験、マイコプラズマ否定試験(培養法・DNA染色法)などに約130万円の検査費用がかかっている。本年度は、これらの試験を培養液の濁度やマイコプラズマPCRなどので一部代替えし、検査費用の低減をはかるための科学的検証を行った。東京大学医学部附属病院で行った自主臨床研究の3症例で回収した培養上清を用いて、iNtRON e-Myco Mycoplasma PCR Detection KitでPCRを行い、アガロース電気泳動を行った。

#### 4. 改定版ヒト幹細胞臨床研究の申請書作成

治療実施機関を東京大学医学部附属病院口腔外科、東京医科歯科大学医学部附属病院形成外科、山形大学医学部附属病院口腔外科に拡張したヒト幹細胞臨床研究の実施計画書について作成を進めた。

#### C. 研究結果

##### 1. 有効性評価法の確立

##### 1-1) 3次元皮下再生軟骨の非侵襲的評価

100%ヒト耳介軟骨細胞を使用した移植組織では、移植後2週から8週にかけて成熟が進行し、トルイジンブルー染色で広範なメタクロマジーが観察された。一方、線維芽細胞が混入している再生軟骨では、ほとんど軟骨再生が認められなかった。一方、TB面積、GAG、COL2 ELISAなどの軟骨基質蓄積のマーカーは、産総研で行った超音波、CT、MRI、血流測定のうち、MRI(T2、D値)と高い正の相関を示すことが明らかとなった。また、懸念される石灰化について、評価法として選出したD値に影響を与える可能性が危惧された。石灰化を検出する測定法の併用が必要であると考え、産総研と検討をおこなった。その結果、CT撮影では再生軟骨の石灰化は検出できなかったが、モリブデンX線管球を用いることにより、ヌードラットへ移植された再生軟骨組織の石灰化を撮像することが可能であることが明らかとなった。また、ファントムを用いて、臨床機種での撮像条件の検討を行った。モリブデンX線管球のスペクトルに近い臨床機種として、マンモグラフィーを選定した。

##### 1-2) 対照群(従来法)のデータ作成

昨年度に引き続き、自家腸骨移植法を施行した患者に対し、現行のヒト幹細胞臨床研究での評価項目(有害事象の有無、血液検査、疾患関連QOL評価、生活活動度評価、顔面形態評価、など)を実施した。

#### 2. 多施設臨床研究の実施

##### 2-1) 採取した軟骨組織および製造した再生軟骨の搬出入技術の確立と実証

富士ソフト社のCPCで作製し、東京医科歯科大学および山形大学においてヌードラットに移植された再生軟骨組織は、移植後8週で組織学的に、良好な軟骨成熟像を示した。移植前の保管期間の違いによる明らかな差は観察されなかった。

軟骨基質の定量評価を行うためのGlycosaminoglycans (GAGs)測定においても、培養期間の違いに関わらず、高い基質の蓄積が検出された。COL2 ELISAでも同様に、再生軟骨で高い値を示した。

##### 2-2) 多施設間でのトレーサビリティ構築

東京大学医学部附属病院内で運用されているトレーサビリティを、東京医科歯科大学医学部附属病院、山形大学医学部附属病院で共有できるようなインターネット化を拡張し、実証実験を行った。

#### 3. 製造検査の効率化

軟骨細胞の培養上清を用いて、iNtRON e-Myco Mycoplasma PCR Detection KitでPCRを行った。サンプルには、東京大学医学部附属病院で行った自主臨床研究の3症例で回収した最終培養上清を用いた。同サンプルは、自主臨床研究中のマイコプラズマ否定試験(培養法・DNA染色法)で、陰性であることが明らかとなっている。PCRのサイクル数を増加させてい

ったところ、すべてのサンプルで50サイクルから僅かなバンドが検出された。したがって、Mycoplasma PCR のサイクル数40が陰性、サイクル数50以上が陽性となることを確認することにより、代替試験とすることが可能であることが示唆された。

#### 4. 改定版ヒト幹細胞臨床研究の申請書作成

インプラント型再生軟骨の多施設臨床研究に向けて、臨床研究の専門家に相談をしながら、ヒト幹細胞臨床研究の申請書の改訂を検討した。本技術は、将来的には、富士ソフト社(東証一部、証券コード9749)に技術移転し、同社が治験実施、産業課を行う予定となっている。本プロジェクトにおいて、将来的な治験を見据えて、効率よくデータを収集することが出来るよう、平成25年1月11日に厚生労働省医政局研究開発振興課に相談した。その結果、治験を念頭に置いた多施設臨床研究を行うに当たり、インプラント型再生軟骨の製造場所としては東京大学医学部附属病院の細胞プロセッシングセンターの代替えとして、治験における製造場所となる富士ソフト社のCPCを用いることも可能である、とのアドバイスをいただいていた。そこで、改定版ヒト幹細胞臨床研究の申請書において富士ソフト社のCPCを再生軟骨組織の製造場所とする改訂を検討した。

#### D. 考察

##### 1. 有効性評価法の確立

現在、東京大学医学部附属病院で実施している3次元皮下再生軟骨の自主臨床研究は、安全性の確認を主目的としている。一方、治験の主目的の一つが有効性の実証であるため、治験実施にむけて有効性評価指標を確立することは必須である。しかし、軟骨の特徴である力学強度やII型コラーゲンやプロテオグリカン(GAG)の蓄積を生体内で評価する手法は確立されていないのが現状である。そのため、超音波で軟骨の生体内での力学強度を評価し、またCTやMRIで生化学的組成を評価できるようになれば、評価項目が明確になり効率的な治験実施が可能となると思われる。本年度の検討により、MRI(T2, D値)が再生軟骨組織の成熟度を反映する評価項目であることが示された。また、懸念される石灰化の検出として、マンモグラフィーの併用が有用であることも示唆された。

##### 2. 多施設臨床研究の実施

富士ソフト社CPCで、インプラント型再生軟骨組織を作製し、同施設から東京医科歯科大学や山形大学に輸送されたヒト再生軟骨組織を、ヌードラットの背部皮下へ移植し、企業と医療施設間での組織搬出入技術の確立をめざした。搬送時間をあまり要さない東京医科歯科大学でも、関東から距離の離れた山形においても、移植された再生軟骨で良好な軟骨再生を認めた。富士ソフト社におけるインプラント型再生軟骨組織の作製法と、東京医科歯科大学や山形大学への搬送技術が有効であることが示され、安定した再生軟骨移植が可能であることが示唆された。

##### 3. 製造検査の効率化

現在の製造プロトコールでは1例あたり、無菌試験、マイコプラズマ否定試験(培養法・DNA染色法)などに約130万円の検査費用がかかっている。本年度の検討により、マイコプラズマ否定試験(培養法・DNA染色法)の代替として、Mycoplasma PCRが有効である

ことが示され、サイクル数40、50における検出が妥当であることが示唆された。

#### 4. 改定版ヒト幹細胞臨床研究の申請書作成

改定版ヒト幹細胞臨床研究の申請書において、富士ソフト社のCPCを再生軟骨組織の製造場所とする改訂を検討した。将来的な治験を見据え、効率よくデータを収集出来ることが期待される。

#### E. 結論

インプラント型再生軟骨の有効性評価法を確立する一助として、ヌードラットに移植した再生軟骨組織を超音波診断装置による力学評価、MRI・CTによる生化学評価を、GAGやII型コラーゲンの定量解析、組織学的評価や石灰化の検討を行い、再生軟骨組織の成熟度を測定する評価項目として、T2, D値, モリブデンX線管球を選定した。これらの評価項目は、臨床機でのMRTおよびマンモグラフィーで撮影することが可能であった。

また、インプラント型再生軟骨の治験実施場所となる富士ソフト社のCPCを利用した検討を行い、同施設におけるインプラント型再生軟骨の作製と、医療施設への組織搬出入技術が有効であることが示唆された。

#### F. 健康危機情報

特記事項なし。

#### G. 研究発表

<論文発表>

1. Fujihara Y, Takato T, Hoshi K. Macrophage-inducing fasl on chondrocytes forms immune privilege in cartilage tissue engineering, enhancing in vivo regeneration. Stem Cells. (in press)
2. Takato T, Mori Y, Fujihara Y, Asawa Y, Nishizawa S, Kanazawa S, Ogasawara T, Saijo T, Abe T, Abe M, Suenaga H, Kanno Y, Sugiyama S, Hoshi K: Preclinical and clinical research on bone and cartilage regenerative medicine in oral and maxillofacial region. Oral Sci Int. (in press)
3. Matsuyama M, Fujihara Y, Inaki R, Nishizawa S, Nagata S, Takato T, Hoshi K: Evaluation of in vivo migration of chondrocytes from tissue-engineered cartilage that was subcutaneously transplanted in mouse model. Open J Regen Med. 2013;2(4):93-8.
4. Mori Y, Kanazawa S, Watanabe M, Suenaga H, Nagata S, Fujihara Y, Takato T, Hoshi K.: Usefulness of agarose mold as a storage container for three-dimensional tissue-engineered cartilage. Mater Sci Appl. 2013;4(8):73-8.
5. 高戸毅, 藤原夕子, 星和人, 小笠原徹, 西條英人, 安部貴大, 阿部雅修, 末永英之, 菅野勇樹, 杉山円, 森良之: 顎顔面領域における骨・軟骨再生に関する基礎および臨床研究, 日本口腔科学会雑誌 63(2), 2014, 207-215.

<学会発表>

1. 高戸毅：骨・軟骨再生に関する基礎および臨床研究. 第67回NPO 法人日本口腔科学学会 2013年5月22 - 24日 栃木県総合文化センター, 栃木
2. 高戸毅：あごの骨と軟骨の再生医療 歯科の明るい未来. 第29回医学生物学電子顕微鏡技術学会学術講演会 2013年6月7日 - 9日 神奈川歯科大学, 神奈川
3. Takato T : Nanotechnological Approach for Cartilage Regenerative Medicine. Frontiers in Nanomedicine and Imaging Symposium, June 21-22, 2013, Lausanne, Switzerland, Ecole Polytechnique Federale de Lausanne(EPFL)
4. 高戸毅:学融合が拓く未来の医療. 疾患生命工学センター発足 10周年記念シンポジウム 2013年9月24日 - 25日 東京大学伊藤国際学術研究センター, 東京
5. Takato T : Clinical application of bone and cartilage regenerative medicine. Seoul Symposium 2013, October 25, Seoul, Korea
6. 高戸毅：新たな顎骨および軟骨再建技術の開発. 耳鼻咽喉科分野同窓会総会, 2013年12月1日 日本外国特派員協会(プレスクラブ), 東京
7. Takato T, Saijo H, Fujihara Y, Hoshi K : Treatment of Cleft Lip Nasal Deformity-From Birth to Adult-. The Workshop for Medical and Dental Cooperation with Vietnam & Japan Hanoi, 23 November 2013, Vietnam
8. Takato T : Clinical application of regenerative medicine in oral and maxillofacial areas. The Workshop for Medical and Dental Cooperation with Japan and Vietnam, November 23-24, Hanoi, Vietnam
9. Takato T : Clinical application of cartilage regenerative medicine1. Asia Forum for Aesthetic Surgery & Medicine[AFAS], March 29, 2014, COEX Grand Ballroom(1F), Seoul, Korea

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
特に無し
2. 実用新案登録  
特に無し
3. その他  
特に無し

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）  
（総括・分担）研究報告書

「画像診断を用いた有用性解析」

研究分担者 大友 邦 東京大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨 本研究は、「ヒト幹細胞臨床研究による3次元再生皮下軟骨の有効性確認」の一環として、画像診断、特にCT, MRIを用いた皮下軟骨の状態を評価するための撮像プロトコルの最適化を最終目的とし、本年度は昨年度に引き続き逐次近似法を用いたCT画像再構成法の有用性の評価を中心に、昨年度作成したフローファントムを用いて局所血流評価のためのMRA (MR Angiography)の精度を高めるための研究を行った。

A. 研究目的

1. MBIRにより肺の結節性病変の検出能を維持したまま、ASIRより被曝量を低減することができるのか。

2. 局所血流評価のためのMRA (MR Angiography)の精度を高める。low prepはFlow-spoiled FBI のflow spoiled gradient (以下FSG) の印加量を決定するための予備撮像として臨床では用いられている。今回はFlow prepを2D-MRA法として利用するための基礎検討として、拡張期および収縮期の撮像に用いるFSGの印加量と模擬血管の描出能との関係について検討した。

B. 研究方法

1. 64列CT装置を用い、胸部のASIRによる低線量画像をMBIRを用いた超低線量画像を撮像。2名の放射線科医が84個の非石灰化結節について、検出能を比較検討した。

2. 使用装置はEXCELART Vantage 1.5T (東芝製)、フローファントム(フヨー製)。<BR> フローファントムを用いて拡張期相当、収縮期相当での血流速度を変化させて、Flow prepの撮像を行った。収縮期のFSGを-10から+35までの10種類の画像と拡張期のFSGを-10および0の画像でそれぞれ差分処理を行い、2D-MRA画像を作成し、模擬血管の描出能について検討した。

(倫理面への配慮)

データの収集、保管に関しては、東大病院の倫理規定に則り、情報管理にも十分配慮した。

D. 結果と考察

1. 低線量画像と比較して80%の被曝低減が達成されていた超低線量画像において、痒結節の検出感度には差は認められなかった。結節の性状をground-glass, partly solid, solidに分類して検討しても同様の結果を得る事ができた。

2. 拡張期のFSGを-10とすることで拡張期の血流が静止していない場合の描出が向上した。収縮期の血流が遅い場合、収縮期のFSGの印加量を大きくすることで描出が向上した。

E. 結論

1. MBIRにより、ground-glass opacity, partly solid, solidのいずれのタイプの肺結節性病変の検出能を維持したまま、ASIRより被曝量を80%まで低減することができることが明らかになった。

2. Flow prepの拡張期と収縮期のFSGの組み合わせを変えた差分画像を作成することで偽病変を低減した2D-MRA法として利用できる可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

総括研究報告書参照。

G. 研究発表

<論文発表>

Katsura M, Matsuda I, Akahane M, Yasaka K, Hanaoka S, Akai H, Sato J, Kunimatsu A, Ohtomo. Model-based iterative reconstruction technique for ultralow-dose chest CT: comparison of pulmonary nodule detectability with the adaptive statistical iterative reconstruction technique. Investigative Radiology. 48(4):206-212.2013

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特に無し

2. 実用新案登録

特に無し

3. その他

特に無し

「3次元皮下再生軟骨の技術開発ならびに製造」

研究分担者 星 和人 東京大学大学院医学系研究科 特任准教授

研究要旨 本研究は、東京大学医学部附属病院で自主臨床研究を行っている3次元再生軟骨を産業化することを最終目標として、治験実施に資する臨床データを作成し、速やかに治験に移行させることを目的としている。本年度は、インプラント型再生軟骨の有効性評価法を確立する一助として、昨年に引き続き、ヌードラットに移植した再生軟骨組織を超音波診断装置による力学評価、MRI・CTによる生化学評価と、GAGやII型コラーゲンの定量解析や組織学的評価を比較した。再生軟骨組織の成熟度を測定する評価項目として、MRI(T2, D値)を選択した。また、懸念される石灰化を検出するためには、モリブデンX線(マンモグラフィ)の併用が有用であることが示唆された。これらの比較に基づき、臨床機を用いた測定プロトコルの作成を行った。

A. 研究目的

われわれは世界に先駆けて力学強度と3次元形態を有する3次元皮下再生軟骨を開発した。現在、東京大学医学部附属病院において、口唇口蓋裂の鼻変形患者にヒト幹細胞臨床研究を実施している(n=3)。しかし、今回の臨床研究を通じて、治験実施に向けての3つ課題、すなわち、有効性エビデンスを補強すること、多施設研究が未実施であること、製造プロセスと品質管理法が煩雑であること、が明らかとなった。

本研究では3つの課題を解決し、治験実施に資する臨床データを作成し、速やかに治験に移行させることを目的としている。

B. 研究方法

1. 3次元皮下再生軟骨の非侵襲的評価法の検討

有効性評価法を確立するため、現在の製造法に則り、実験的にヒト3次元皮下再生軟骨を作製した。移植組織としては、線維芽細胞や細胞生存性が低下した軟骨細胞の混入を想定し、100%ヒト耳介軟骨細胞、ヒト耳介軟骨細胞:線維芽細胞=10:90、ヒト耳介軟骨細胞:線維芽細胞=1:99、100%線維芽細胞、100%55 処理ヒト耳介軟骨細胞をそれぞれ $5 \times 10^7$  cells /mLで1%アテロコラーゲンに懸濁し、PLLA足場素材(5 mm x 3 mm x 50 mm)へ播種した。ヌードラット背部皮下へ移植後、2週と8週でヌードラットを産総研に搬送し、超音波、CT、MRI、血流測定などを用いて再生軟骨組織の力学的、生化学的特性を非侵襲的に評価した。その後、ヌードラットから再生軟骨組織を摘出し、トルイジンブルー染色やHE染色などによる組織学的評価、ならびにGAGやCOL2 ELISAなどによる生化学的評価を行った。さらに非侵襲測定値と組織学・生化学的評価結果との比較に基づき、臨床機を用いた測定プロトコルの作成を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は、国の「動物の保護及び管理に関する法律」及び東京大学動物実験実施規則、東京大学動物実験実施マニュアルに従い、動物愛護の観点に十分留意して行った。

2. 対照群(従来法)のデータ作成

臨床上有効性評価には、従来の治療法との比較が不可欠である。そこで、昨年に引き続き、従来法の自家腸骨移植法を施行した患者に対し、現行のヒト幹細胞臨床研究での評価項目(有害事象の有無、血液検査、疾患関連QOL評価、生活活動度評価、顔面形態評価、など)を実施し、プロスペクティブに経過を追跡した。

3. 多施設間でのトレーサビリティ構築

現行のヒト幹細胞臨床研究では、東京大学医学部附属病院内で採取から移植まで、使用するすべての容器にICタグをつけて一貫したトレーサビリティを実現している。多施設臨床研究を実施するにあたり、東京大学医学部附属病院内で運用されているトレーサビリティを、東京医科歯科大学医学部附属病院、山形大学医学部附属病院で共有できるようにインターネット化を拡張し、実証実験を行った。

4. 製造検査の効率化

無菌試験、マイコプラズマ否定試験(培養法・DNA染色法)を、培養液マイコプラズマPCRで代替可能な科学的検証を行った。東京大学医学部附属病院で行った自主臨床研究の3症例で回収した培養上清を用いて、iNtRON e-Myco Mycoplasma PCR Detection KitでPCRを行い、アガロース電気泳動を行った。

5. 改定版ヒト幹細胞臨床研究の申請書作成

治療実施機関を東京大学医学部附属病院口腔外科、東京医科歯科大学医学部附属病院形成外科、山形大学医学部附属病院口腔外科に拡張したヒト幹細胞臨床研究の実施計画書について作成を進めた。



## C. 研究結果

### 1. 3次元皮下再生軟骨の非侵襲的評価法の検討

100%ヒト耳介軟骨細胞を使用した移植組織では、昨年と同様移植後2週から8週にかけて成熟が進行し、トルイジンブルー染色で広範なメタクロマジーが観察された。一方、線維芽細胞が混入している再生軟骨では、ほとんど軟骨再生が認められなかった。COL2 ELISAやGAGなどの生化学的評価においても、同様の傾向が観察された。

一方、TB面積、GAG、COL2 ELISAなどの軟骨基質蓄積のマーカーは、産総研で行った超音波、CT、MRI、血流測定のうち、MRI (T2、D値)と高い正の相関を示すことが明らかとなった。また、懸念される石灰化について、評価法として選出したD値に影響を与える可能性が危惧された。石灰化を検出する測定法の併用が必要であると考え、産総研と検討をおこなった。その結果、CT撮影では再生軟骨の石灰化は検出できなかったが、モリブデンX線管球を用いることにより、ヌードラットへ移植された再生軟骨組織の石灰化を撮像することが可能であることが明らかとなった。

ファントムを用いて、臨床機種での撮像条件の検討を行った。モリブデンX線管球のスペクトルに近い臨床機種として、マンモグラフィーを選定した。

### 2. 対照群(従来法)のデータ作成

昨年度に引き続き、自家腸骨移植法を施行した患者に対し、現行のヒト幹細胞臨床研究での評価項目(有害事象の有無、血液検査、疾患関連 QOL 評価、生活活動度評価、顔面形態評価、など)を実施した。

### 3. 多施設間でのトレーサビリティ構築

東京大学医学部附属病院内で運用されているトレーサビリティを、東京医科歯科大学医学部附属病院、山形大学医学部附属病院で共有できるようインターネット化を拡張し、実証実験を検討した。

### 4. 製造検査の効率化

ヒト耳介軟骨細胞の培養上清を用いて、iNtRON e-Myco Mycoplasma PCR Detection KitでPCRを行った。サンプルには、東京大学医学部附属病院で行った自主臨床研究の3症例で回収した最終培養上清(P2)を用いた。同サンプルは、自主臨床研究中のマイコプラズマ否定試験(培養法・DNA染色法)で、陰性であることが明らかとなっている。PCRのサイクル数を増加させていったところ、すべてのサンプルで50サイクルから僅かなバンドが検出された。したがって、Mycoplasma PCR のサイクル数40が陰性、サイクル数50以上が陽性となることを確認することにより、代替試験とすることが可能であることが示唆された。

### 5. 改定版ヒト幹細胞臨床研究の申請書作成

多施設のヒト幹細胞臨床研究の実施計画書について、上記検討で得られた知見を評価項目に追記し、作成を進めた。

## D. 考察

現在、東大病院で実施している3次元皮下再生軟骨の自主臨床研究は、安全性の確認を主目的としている。一方、治験の主目的の一つが有効性の実証であるため、治験実施にむけて有効性評価指標を確立することは必須である。しかし、軟骨の特徴である力学強度やII型コラーゲンやプロテオグリカン(GAG)の蓄積を生体内で評価する手法が確立されていないのが現状である。そのため、超音波、CT、MRI、血流測定などを用いて非侵襲的に生化学的組成を評価できるようになれば、評価項目が明確になり効率的な治験実施が可能となる。本年度の検討により、MRI (T2、D値)が再生軟骨組織の成熟度を反映する評価項目であることが示された。また、懸念される石灰化の検出として、マンモグラフィーの併用が有用であることも示唆された。

## E. 結論

インプラント型再生軟骨の有効性評価法を確立する一助として、ヌードラットに移植した再生軟骨組織を超音波診断装置による力学評価、MRI・CTによる生化学評価を、GAGやII型コラーゲンの定量解析や組織学的評価を行い、再生軟骨組織の成熟度を測定する評価項目として、T2、D値およびモリブデンX線管球を選定した。これらの評価項目は、臨床機のMRTおよびマンモグラフィーで撮影することが可能であった。

## F. 健康危機情報

総括研究報告書参照。

## G. 研究発表

### <論文発表>

1. Fujihara Y, Takato T, Hoshi K. Macrophage-inducing fasl on chondrocytes forms immune privilege in cartilage tissue engineering, enhancing in vivo regeneration. Stem Cells. (in press)
2. Takato T, Mori Y, Fujihara Y, Asawa Y, Nishizawa S, Kanazawa S, Ogasawara T, Saijo T, Abe T, Abe M, Suenaga H, Kanno Y, Sugiyama S, Hoshi K: Preclinical and clinical research on bone and cartilage regenerative medicine in oral and maxillofacial region. Oral Sci Int. (in press)
3. Matsuyama M, Fujihara Y, Inaki R, Nishizawa S, Nagata S, Takato T, Hoshi K: Evaluation of in vivo migration of chondrocytes from tissue-engineered cartilage that was subcutaneously transplanted in mouse model. Open J Regen Med. 2013;2(4):93-8.
4. Mori Y, Kanazawa S, Watanabe M, Suenaga H, Nagata S, Fujihara Y, Takato T, Hoshi K.: Usefulness of agarose mold as a storage container for three-dimensional tissue-engineered cartilage. Mater Sci Appl. 2013;4(8):73-8.

<学会発表>

1. 星 和人, 軟骨の再生・再建 - 軟骨の生態学的研究 -, 第 27 回日本軟骨代謝学会, 京都府医師会館, 京都, Mar. 1, 2014.
2. 星 和人, 生分解性ポリマーを用いた軟骨再生医療の研究開発, 第 30 回高分子研究会講座, 東京大学生産技術研究所, 東京, Dec. 26, 2013.
3. Kazuto Hoshi, Clinical Application of Tissue-engineered Cartilage in Craniofacial Areas, 21st International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery, Palau de Congressos de Catalunya Barcelona, Spain, Oct. 13, 2013.
4. 星 和人, 足場素材を用いた軟骨再生医療の新展開, 第 14 回再生医療の実用化に関するニーズ発表会, 神戸臨床研究情報センター, 神戸, Oct. 11, 2013.
5. Kazuto Hoshi, Cartilage Regeneration and Usefulness of Medication, International Cartilage Repair Society 2013, Swisshotel Gran Efes, Izmir, Turkey, Sep. 17, 2013.
6. Kazuto Hoshi, Optimal Combinations of Scaffolds and Growth Factors for Tissue Engineering of Cartilage, Osteoarthritis Research Society International World Congress, Marriott Philadelphia Downtown, Philadelphia, USA, Apr. 20, 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
特に無し
2. 実用新案登録  
特に無し
3. その他  
特に無し

「臨床研究の企画・支援」

研究分担者 荒川 義弘 東京大学大学院医学系研究科 准教授

研究要旨 本研究は、東大病院で行ってきた3次元再生軟骨の自主臨床研究を通じて明らかとなった課題を解決し、3次元再生軟骨の有効性を確立すると共に、多施設臨床研究を行い、速やかに治験に移行させることを目的としている。平成25年度は、多施設臨床研究に向けて、改訂版ヒト幹細胞臨床研究の申請を行うための支援を行った。

A. 研究目的

本研究は、3次元再生軟骨を産業化することを最終目標として、多施設臨床研究を行い、治験実施に資する臨床データを作成することを目的としている。

B. 研究方法

インプラント型再生軟骨の多施設臨床研究に向けて、現行のヒト幹細胞臨床研究の改訂項目と、多施設臨床研究における体制を検討した。

C. 研究結果

多施設臨床研究を実施するため、改訂版ヒト幹細胞臨床研究の申請を行うための体制を整えた。  
また、本技術は、将来的には、富士ソフト社(東証一部、証券コード9749)に技術移転し、同社が治験実施、産業化を行う予定となっている。本プロジェクトにおいて、将来的な治験を見据えて、効率よくデータを収集することが出来るよう、平成25年1月11日に厚生労働省医政局研究開発振興課に相談した。その結果、治験を念頭に置いた多施設臨床研究を行うに当たり、インプラント型再生軟骨の製造場所としては東京大学医学部附属病院の細胞プロセッシングセンターの代替えとして、治験における製造場所となる富士ソフト社のCPCを用いることも可能である、とのアドバイスをいただいていた。そこで、富士ソフト社CPCを製造場所とした場合の製造や搬出入方法について、薬事的な課題を検討した。また、臨床プロトコールにおける有効性の検討を行うための対照群について、検討を行った。

D. 考察

2013年4月26日に、再生医療推進法が成立した。今後、再生医療安全性確保法等と改正薬事法の成立によって、本格的に再生医療が推進していくことが期待されている。インプラント型再生軟骨の産業化においても、その製造を医療機関外に委託することが可能となるため、本プロジェクトにおいて富士ソフト社のCPCを利用し、企業と医療施設間での組織搬出入技術を確認し有効性を確認することは、有意義な知見になると考える。そのために必要な薬事的比較対照について、十分な議論を行った。

E. 結論

インプラント型再生軟骨の多施設臨床研究を実施に向けて、ヒト幹細胞臨床研究の改訂内容を検討した。引き続き、臨床研究の側面から、企画、支援を行う。

F. 健康危機情報

総括研究報告書参照。

G. 研究発表

<論文発表>

1. 松本和彦, 荒川義弘, 小池竜司, 中村哲也, 花岡英紀, 本間真人, 吉澤弘久: 大学病院間の共同IRB等の体制 - 臨床薬理44:207-215, 2013
2. Arakawa Y. Recent Progress and Challenges in Investigator-driven Clinical Development of Novel Drugs and Medical Devices at The University of Tokyo Hospital. YAKUGAKU ZASSHI 133:201-208, 2013
3. 荒川義弘, 山崎力: 東京大学医学部附属病院臨床研究支援センター: 早期・探索的臨床試験から市販後の臨床試験までのシームレスな支援体制. 医学のあゆみ244:1154-1160, 2013
4. 荒川義弘: アカデミア主導の臨床開発の拠点とネットワーク. 医学のあゆみ247: 472-477, 2013

<学会発表>

特に無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
特に無し
2. 実用新案登録  
特に無し
3. その他  
特に無し

「臨床研究申請の支援ならびに有効性評価に関する助言」

研究分担者 小室 美子 東京大学大学院医学系研究科 特任講師

研究要旨 本研究は、3次元再生軟骨の有効性を確立すると共に、多施設臨床研究を行い、速やかに治験に移行させることを目的としている。平成25年度には、多施設臨床研究に向けて、有効性評価の評価方法と評価項目に関する助言を行った。また、改訂版ヒト幹細胞臨床研究の申請を支援した。

A. 研究目的

本研究は、3次元再生軟骨を産業化することを最終目標として、多施設臨床研究を行って治験実施に資する臨床データを作成することを目的としている。

B. 研究方法

インプラント型再生軟骨の多施設臨床研究に向けて、有効性評価の評価方法と評価項目に関する助言を行った。また、改訂版ヒト幹細胞臨床研究の申請を支援した。

C. 研究結果

東京医科歯科大学、山形大学と共同で行う多施設臨床研究では、東京大学が単施設で実施している first in human trial 自主臨床研究での研究内容と比較し、組織の搬入のプロセスが新たに加わる。また、再生医療推進法の成立により、その製造を医療機関外に委託することが可能となる。そこで、富士ソフト社CPCを調整機関とした場合の資格条件についての検討を行った。加えて、医療機関との組織の搬入が加わった条件において、安全かつ有効に再生軟骨が移植できることを示すデータの項目について、検討を行った。

ヒト幹細胞臨床研究申請における組織の搬入に伴うプロトコル、および製品管理法の変更箇所を検討した。

D. 考察

富士ソフト社CPCから東京医科歯科大学や山形大学に輸送したヒト再生軟骨組織を移植し、組織の搬入に伴う影響を検討した。各施設とも、生化学的、組織学的に良好な軟骨再生を認めたことから、富士ソフト社CPCの調整機関としての妥当性や、組織搬入法の有効性が示されたものと考えられる。

再生医療推進法のもとで、製造場所を治験予定企業にすることにより、研究開発の効率が加速していくことが期待される。

E. 結論

インプラント型再生軟骨の多施設臨床研究を実施に向けて、有効性評価の助言を行い、ヒト幹細胞臨床研究の改訂内容を検討した。引き続き、臨床研究の側面から、臨床研究申請を支援する。

F. 健康危機情報

総括研究報告書参照。

G. 研究発表

<論文発表>  
特に無し

<学会発表>  
特に無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
特に無し
2. 実用新案登録  
特に無し
3. その他  
特に無し

「東京医科歯科大学での3次元皮下再生軟骨の臨床実施」

研究分担者 岡崎 睦 東京医科歯科大学大学院 教授

研究要旨 本研究は、東京大学医学部附属病院で自主臨床研究を行っている3次元再生軟骨に関して、治験実施に資する臨床データを蓄積することを目的としている。本年度は、インプラント型再生軟骨の治験における製造場所の候補となっている富士ソフト社のCPCを利用し、同施設から東京医科歯科大学に搬入された再生軟骨を実験動物へ移植し、有効性を確認した。

A. 研究目的

現在、東京大学医学部附属病院において、口唇口蓋裂の鼻変形患者に3次元皮下再生軟骨を移植するヒト幹細胞臨床研究が実施されている。本研究は、その3次元再生軟骨に関して、治験実施に資する臨床データを作成することを目的としている。そのために、先端医療開発特区「先進的外科系インプラントとしての3次元複合再生組織製品の早期普及を目指した開発拠点プロジェクト（研究代表者 高戸毅）」の参加機関である東京医科歯科大学と、遠隔地の医療機関である山形大学とが協力して多施設臨床研究を実施し、治験開始に資する臨床データを蓄積する。

B. 研究方法

2013年4月26日に、再生医療推進法が成立した。インプラント型再生軟骨の産業化においても、その製造を医療機関外に委託することが可能となる。そこで、インプラント型再生軟骨の治験における製造場所の候補となっている富士ソフト社のCPCを利用し、同社におけるインプラント型再生軟骨の作製と、医療施設間への組織搬出入技術を確認し、その有効性を検証することとした。富士ソフト社から東京医科歯科大学にヒト再生軟骨組織を輸送し、ヌードラットの背部皮下へ移植した。再生軟骨組織の保管期間による影響を検討するため、再生軟骨作製後、保管容器に入れて速やかに輸送、移植する群と、2週間保管した後、輸送、移植する群とで比較を行った。移植後8週に再生軟骨組織を摘出し、組織学的、生化学的に評価した。

（倫理面への配慮）

国の「動物の保護及び管理に関する法律」及び東京医科歯科大学の動物実験実施規則、動物実験実施マニュアルに従い、ヘルシンキ宣言に基づいて動物愛護の観点に十分留意して行った。

C. 研究結果

移植後8週で回収した再生軟骨組織の組織切片において、良好な軟骨成熟が確認された。軟骨基質の定量評価を行うためGlycosaminoglycans (GAGs)を測定したところ、培養期間の違いに関わらず、高い基質の蓄積が検出された。COL2 ELISAでも同様に、すべての再生軟骨で高い値を示した。また、インプラ

ント型再生軟骨の多施設臨床研究の実施に向け、ヒト幹細胞臨床研究指針に則る書類作成などの審査の手続きをすすめた。

D. 考察

富士ソフト社CPCから東京医科歯科大学に輸送されたヒト再生軟骨組織を、ヌードラットの背部皮下へ移植し、企業と医療施設間での組織搬出入技術の確立をめざした。富士ソフト社と東京医科歯科大学は、同じ都内にあり近距離であるため搬送時間はあまりかからない。しかし、移植された再生軟骨で良好な軟骨再生を認めたことから、富士ソフト社におけるインプラント型再生軟骨組織の作製法と、東京医科歯科大学への搬送技術が有効であることが示唆された。

E. 結論

東京医科歯科大学と富士ソフト社の間でも、開発した長期保存法と搬送法により安定した再生軟骨移植が可能であることが示された。

F. 健康危機情報

総括研究報告書参照。

G. 研究発表

<論文発表>

1. Rodotheou P, Wang W, Itoh S, Okazaki M, Takakuda K. Laser-perforated porous nonwoven chitosan nerve conduit. J Biomech Sci Eng 8(2), 139-151, 2013

<学会発表>

1. 脇村祐輝, 岡崎 睦, 森 弘樹, 植村法子. MDCT画像データによる脂肪組織の質的評価の検討. 第22回日本形成外科学会基礎学術集会. 新潟市, 2013年11月7日

2. 田中顕太郎, 岡崎 睦. Microfocus X線CT装置を用いたラット移植筋組織の画像評価 ~ 第一報 ~. 第22回日本形成外科学会基礎学術集会. 新潟市, 2013年11月8日82.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特に無し

2. 実用新案登録

特に無し

3. その他

特に無し

「山形大学での3次元皮下再生軟骨の臨床実施」

研究分担者 飯野 光喜 山形大学医学部 教授

研究要旨 本研究は、東京大学医学部附属病院で自主臨床研究を行っている3次元再生軟骨に関して、治験実施に資する臨床データを蓄積することを目的としている。本年度は、インプラント型再生軟骨の治験における製造場所の候補となっている富士ソフト社のCPCから山形大学に搬入された再生軟骨を実験動物へ移植し、組織搬出入技術を検討した。

A. 研究目的

現在、東京大学医学部附属病院において、口唇口蓋裂の鼻変形患者に3次元皮下再生軟骨を移植するヒト幹細胞臨床研究が実施されている。

本研究は、その3次元再生軟骨に関して、治験実施に資する臨床データを作成することを目的としている。そのために、先端医療開発特区「先進的外科系インプラントとしての3次元複合再生組織製品の早期普及を目指した開発拠点プロジェクト（研究代表者 高戸 毅）」の参加機関である東京医科歯科大学と、遠隔地の医療機関である山形大学とが協力して多施設臨床研究を実施し、治験開始に資する臨床データを蓄積する。

B. 研究方法

再生医療推進法の成立に伴い、インプラント型再生軟骨の産業化においても、その製造を医療機関外に委託することが可能となる。そこで、インプラント型再生軟骨の治験実施を希望している富士ソフト社のCPCを利用し、同施設におけるインプラント型再生軟骨の作製と、医療施設間への組織搬出入技術を検証した。富士ソフト社から山形大学に再生軟骨組織を輸送し、ヌードラットの背部皮下へ移植した。再生軟骨組織の保管期間による影響を検討するため、再生軟骨作製後、保管容器に入れて速やかに輸送・移植する群と、2週間振とう培養した後、輸送・移植する群とで比較を行った。移植後8週に再生軟骨組織を摘出し、組織学的、生化学的に評価した。

（倫理面への配慮）

国の「動物の保護及び管理に関する法律」及び山形大学の動物実験実施規則、動物実験実施マニュアルに従い、ヘルシンキ宣言に基づいて動物愛護の観点に十分留意して行った。

C. 研究結果

移植後8週で回収した再生軟骨組織のトルイジンブルー染色において、広範なメタクロマジーが観察された。HE染色においても、良好な軟骨成熟が確認された。移植前の保管期間の違いによる明らかな軟骨成熟の差は観察されなかった。インプラント型再生軟骨のCOL2 ELISAやGAG測定でも同様に、良好な軟骨成熟を示す高い値が示された。また、インプラント型再生軟骨の多施設臨床研究の実施に向け、ヒト幹細胞臨床研究指針に則る書類作成などの審査の手

続きをすすめた。

D. 考察

富士ソフト社CPCで作製したヒト再生軟骨組織を、山形大学に輸送し、ヌードラットの背部皮下へ移植した。移植後8週で、広範な軟骨成熟が観察された。また、移植前の保管期間による影響は認められなかった。以上から、富士ソフト社におけるインプラント型再生軟骨組織の作製と、関東から距離の離れた山形への搬送技術が、有効であることが示唆された。

E. 結論

東京大学医学部附属病院、東京医科歯科大学医学部附属病院、山形大学医学部附属病院における多施設臨床研究の実施に向けて、製造を医療機関外に委託する場合を想定し、ヌードラットを用いた移植実験を行った。関東から距離のある山形大学においても、安定した再生軟骨移植が可能であることが、示された。

F. 健康危機情報

総括研究報告書参照。

G. 研究発表

<学会発表>

1. 飯野光喜：顎顔面領域の外傷について．平成25年度山形県歯科口腔外科学術講演会，山形市：2013年6月
2. 飯野光喜：口唇裂口蓋裂の診断と治療．平成25年度上市市医科歯科合同研修会，上市市：2013年9月
3. 遊佐和之，飯野光喜：新規生体材料および骨再生療法の開発．第12回山形歯科インプラント研究会(YAID)ミーティング，山形；2013年12月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
特に無し
2. 実用新案登録  
特に無し
3. その他

「有効性評価技術の開発」

研究分担者 新田 尚隆（独）産業技術総合研究所 主任研究員

研究要旨 本研究は、東京大学医学部附属病院で自主臨床研究を行っている3次元再生軟骨を産業化することを最終目標として、治験実施に資する臨床データを作成し、速やかに治験に移行させることを目的としている。本年度は、インプラント型再生軟骨の有効性評価法を確立するために、ヌードラットに移植した再生軟骨組織に対して超音波による力学評価、MRI・透過X線による生化学評価、GAGやII型コラーゲンの定量解析や組織学的評価を継続した。その結果、平均音速、T2、D値、X線吸収係数を用いて再生軟骨の成熟度を多面的に評価できることが示唆され、中でもT2、D値は軟骨基質産生、X線吸収係数は石灰化有無の評価指標として有用であった。

A. 研究目的

現在、東京大学医学部附属病院において、口唇口蓋裂の鼻変形患者に3次元皮下再生軟骨を移植するヒト幹細胞臨床研究が実施されている。本研究では、治験実施に向けて有効性エビデンスを補強して多施設研究を実施し、製造プロセスと品質管理法を整備し、治験実施に資する臨床データを作成することを目的としている。

B. 研究方法

有効性評価法を確立するため、現在の製造法に則って実験的に作製したヒト3次元皮下再生軟骨に対し、非侵襲評価法の検討を継続した。移植組織としては、線維芽細胞や細胞生存性が低下した軟骨細胞の混入を想定し、100%ヒト耳介軟骨細胞、ヒト耳介軟骨細胞：線維芽細胞 = 10:90、ヒト耳介軟骨細胞：線維芽細胞 = 1:99、100%線維芽細胞、100%55 処理ヒト耳介軟骨細胞をそれぞれ  $5 \times 10^4$  cells/mL で1%アテロコラーゲンに懸濁し、PLLA足場素材（5 mm x 3 mm x 50 mm）へ播種した。ヌードラット背部皮下へ移植後、2週と8週でヌードラットを産総研に搬送し、超音波、透過X線、MRI、(近)赤外線等を用いて、再生軟骨組織の力学的、生化学的特性の非侵襲評価を行った。その後、ヌードラットから再生軟骨組織を摘出し、ex vivo 測定を行って各非侵襲測定値の正誤確認を行うとともに、力学試験、トルイジンブルー（TB）染色やHE染色などによる組織学的評価、ならびにGAGやCOL2ELISAなどによる生化学的評価を行った。さらに非侵襲測定値と組織学・生化学的評価結果との比較に基づき、臨床機を用いた測定プロトコルの作成と、再生軟骨の合否判定基準に関する検討を行った。

（倫理面への配慮）

動物実験は、国の「動物の保護及び管理に関する法律」及び（独）産業技術総合研究所動物実験実施規則、（独）産業技術総合研究所動物実験実施マニュアルに従い、動物愛護の観点に十分留意して行った。

C. 研究結果

非侵襲的力学評価では、移植後2週及び8週の再生軟骨に対し、超音波診断装置とMRIを併用して非侵襲的に平均音速を算出した結果、昨年度と同様、～群では軟骨細胞の混入率低下に伴う平均音速の上昇が見られ、群の平均音速は群と同程度となった。同部位の摘出再生軟骨に対して圧縮試験を実施したところ、弾性率と平均音速は正の相関を示し、平均音速-弾性率の換算(校正)係数が得られた。一方、平均音速は、組織学的評価におけるTB染色面積や生化学的評価におけるGAG、COL2とは負の相関を示した。このことから再生軟骨内の足場素材残留量が多くなると平均音速が高くなることが示唆された。

非侵襲的生化学評価では、MRIでT1、T2、D値を計測した結果、昨年度と同様、～群では軟骨細胞の混入率低下に伴うT1、T2値の短縮及びD値の低下が見られ、群のT1、T2、D値は群と同程度となった。これらをTB面積、GAG、COL2と比較したところ、T2及びD値が高い正の相関を示した。またX線の線吸収係数を計測した結果、～群では軟骨細胞の混入率低下に伴う線吸収係数の減少が見られ、群は群と同程度となった。線吸収係数とTB、GAG、COL2各値との相関は低かったが、再生軟骨内に生じた石灰化の検出には有用であった。

上記の非侵襲測定値と組織学・生化学的評価結果との比較に基づき、軟骨基質産生と相関の高かったT2、D値、石灰化の検出能を有するX線吸収係数をそれぞれ臨床機で測定するためのプロトコル作成を行った。さらに軟骨基質産生と相関の高かったT2、D値を用い、判別分析に基づく再生軟骨の合否判定基準を作成した。群を合格群、それ以外を不合格群とし、TB、GAG、COL2の閾値に基づき決定したT2、Dの重回帰式を用いて判別を行った結果、約96%の判別の中率が得られた。



#### D. 考察

軟骨の特徴である力学強度やII型コラーゲンやプロテオグリカン(GAG)の蓄積を生体内で評価する手法が確立されていないのが現状である。そのため、超音波で再生軟骨内での力学強度を評価し、またMRIやX線で生化学的組成を評価できるようになれば、評価項目が明確になり効率的な治験実施が可能となる。本年度の検討により、平均音速、T2、D値、X線吸収係数を用いることで、移植後の軟骨成熟度を多面的に評価できることが示唆された。中でもT2、D値は軟骨基質産生量と高い相関を示し、またX線吸収係数は石灰化の検出が可能であったことから、それぞれ臨床での評価指標として有用であると考えられた。

#### E. 結論

インプラント型再生軟骨の有効性評価法を確立するため、ヌードラットに移植した再生軟骨組織に対して超音波による力学評価、MRI・透過X線による生化学的評価、GAGやII型コラーゲンの定量解析ならびに組織学的評価を行った。相関解析を通じ、有効性評価指標としては平均音速、T2、D値、X線吸収係数が有用であると示唆されたが、中でもT2、D値及びX線吸収係数が臨床での評価指標として有用と考えられた。今後は、評価指標値の臨床における適用方法等を検討する。

#### F. 健康危機情報

総括研究報告書参照。

#### G. 研究発表

##### <論文発表>

1. Nitta N, Hyodo K, Misawa M, Hayashi K, Shirasaki Y, Homma K, Shiina T. Calibration method in elasticity evaluation of regenerating cartilage based on ultrasonic particle velocity. Jpn J Appl Phys 2013;52(7):07HF24-1-5.
2. Aoki T, Nitta N, Furukawa A. Non-invasive speed of sound measurement in cartilage by use of combined magnetic resonance imaging and ultrasound: an initial study. Radiol Phys Tech 2013;6(2):480-485.

##### <学会発表>

1. Nitta N et al. Direct measurement of speed of sound in cartilage in situ using ultrasound and magnetic resonance images. 35th Int Conf of IEEE Eng Med Biol Soc. 2013年7月6日 大阪.
2. 新田尚隆他：超音波とMRIの画像計測に基づく軟骨音速の非侵襲評価法。第32回日本医用画像工学会大会。2013年8月2日 東京。
3. 新田尚隆他：Improvement of In Vivo Measurement of Speed of Sound in Cartilage. 第34回超音波エレクトロニクスの基礎と応用に関するシンポジウム。2013年11月22日 京都。

4. 新田尚隆他：超音波粒子速度のレーザー計測に基づく再生軟骨片弾性率測定装置の開発。日本超音波医学会平成25年度第4回光超音波画像研究会。2014年1月28日 つくば。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
特に無し
2. 実用新案登録  
特に無し
3. その他  
特に無し

## 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
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
Fujihara Y, Takato T, Hoshi K	Macrophage-inducing factor on chondrocytes forms immune privilege in cartilage tissue engineering, enhancing in vivo regeneration	Stem Cells		in press	
Takato T, Mori Y, Fujihara Y, Asawara Y, Nishizawa S, Kanazawa S, Ogasawara T, Saijo T, Abe T, Abe M, Sugiyama H, Kanno Y, Sugiyama S, Hoshi K	Preclinical and clinical research on bone and cartilage regeneration in regenerative medicine in oral and maxillofacial region	Oral Sci Int		in press	
Katsura M, Matsuda I, Akahane M, Yasaka K, Hanaoka S, Akai H, Sato J, Kunimatsu A, Ohtomo	Model-based iterative reconstruction technique for ultralow-dose chest CT: comparison of pulmonary nodule detectability with the adaptive statistical iterative reconstruction technique	Investigative Radiology	48(4)	206-212	2013
Matsuyama M, Fujihara Y, Inaki R, Nishizawa S, Nagata S, Takato T, Hoshi K	Usefulness of agarose mold as a storage container for three-dimensional tissue-engineered cartilage	Mater Sci Appl	2(4)	93-98	2013
Mori Y, Kanazawa S, Watanabe M, Sugiyama H, Nagata S, Fujihara Y, Takato T, Hoshi K	Usefulness of agarose mold as a storage container for three-dimensional tissue-engineered cartilage	Mater Sci Appl	4(8)	73-78	2013

松本和彦, 荒川義弘, 小池竜司, 中村哲也, 花岡英紀, 本間真人, 吉澤弘久	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	臨床薬理	44	207-215	2013
Arakawa Y.	Recent Progress and Challenges in Investigator-driven Clinical Development of Novel Drugs and Medical Devices at The University of Tokyo Hospital	YAKUGAKU ZASSHI	133	201-208	2013
荒川義弘, 山崎力	東京大学医学部附属病院臨床研究支援センター: 早期・探索的臨床試験から市販後の臨床試験までのシームレスな支援体制	医学のあゆみ	244	1154-1160	2013
荒川義弘	アカデミア主導の臨床開発の拠点とネットワーク	医学のあゆみ	247	472-477	2013
Rodotheou P, Wang W, Itoh S, Okazaki M, Takakuda K	Laser-perforated porous nonwoven chitosan nerve conduit	J Biomech Sci Eng	8(2)	139-151	2013
Nitta N, Hyodo K, Misawa M, Hayashi K, Shirasaki Y, Homma K, Shiina T	Calibration method in elasticity evaluation of regenerating cartilage based on ultrasonic particle velocity	Jpn J Appl Phys	52(7)	07HF24-1-5	2013
Aoki T, Nitta N, Furukawa A	Non-invasive speed of sound measurement in cartilage by use of combined magnetic resonance imaging and ultrasound: an initial study	Radiol Phys Technol	6(2)	480-485	2013