

令和 4 年 5 月 12 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03129

研究課題名(和文) 体性幹細胞の高密度培養と大量自家移植による骨軟骨再生技術の開発

研究課題名(英文) Osteochondral regeneration by autologous transplantation of abundant stem cells cultured high-densely

研究代表者

三角 一浩 (MISUMI, KAZUHIRO)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・教授

研究者番号：10291551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：馬の滑膜由来幹細胞(SMMSC)を最少継代(1継代：P1)で大量(10億個)に培養する技術の確立と、SMMSCの関節内投与試験の実施が本研究の目標であった。関節内骨折症例の手術時に採取した滑膜組織の有核細胞から、ポリエチレンタフレートフィラメント不織布を容れた全自動細胞培養装置を用いてSMMSCを分離・培養した。10～13日の培養によって平均1億個以上の初代(P0-)SMMSCが回収され、1継代により更に13～18倍に拡大された。10%の自己血清添加培地でも11～14日で1億個以上のP0-SMMSCが得られ、それら1億個を関節内に自家移植した臨床試験では、関節局所及び全身的な副作用はなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

継代培養を重ねることによる体性幹細胞としての機能劣化に伴って、滑膜由来幹細胞(SMMSC)に特徴的な軟骨分化能は消退していく。SMMSCによる治療の有効性を高めるために、継代数を最小限に止めて幹細胞としての品質を保持した細胞を十分数得る技術が必要であった。本研究では、細胞が接着する表面積が大きいポリエチレンタフレートフィラメント不織布を用いた馬のSMMSCの大量培養に成功した。これにより関節鏡手術時に採取した滑膜組織と自己血清を用いて分離培養した1億個の自己由来初代SMMSCを術後2週間で関節に自家移植する治療が可能となった。関節内骨折症例で移植後の安全性を確認し、実用化に向け大きく進展した。

研究成果の概要(英文)：The aims of this study were to establish a method to obtain a large amount (1 billion cells) of equine synovium derived stem cells (SMMSC) with the minimum passage (passage 1: P1), and to carry out the clinical trial with autologous implantation of SMMSC. Passage 0-SMMSC (P0-SMMSC) were isolated and cultured from nuclear cells of synovium that was collected during surgery in equine intra-articular fracture cases, by using an automatic cell culture device containing a non-woven fabric of polyethylene terephthalate filaments. An average over 100 million P0-SMMSC were isolated by culturing for 10 to 13 days, and then one passage culture successfully made to expand the P0-SMMSCs 13 to 18 times (1.3-1.8 billion P1-SMMSC). In a clinical trial of autologous implantation, more than 100 million P0-SMMSCs that were obtained in 11-14 days with 10% autologous serum-added medium were intraarticularly administered, no clinical side-effects were presented not only locally but also systemically.

研究分野：臨床獣医学

キーワード：幹細胞 軟骨 骨 関節症 再生医療

1. 研究開始当初の背景

これまで、間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells : MSC) の浮遊液や凝集塊を、モデル動物の膝関節に作出した骨軟骨欠損に自家移植することにより組織再生が進むことを明らかにした。しかしその結果には個体差があり、関節軟骨と軟骨下骨が高い再現性をもって再生するという結果に至らなかった (Yamasaki et.al. 2019)。その理由について、滑液/滑膜由来 MSC に特徴的な軟骨分化誘導に特異的な細胞外基質産生能が継代を重ねることによって消退していく現象を見出したこと (Murata et al. 2014) に基づいて、移植細胞の MSC としての数や性能の不均一さ、すなわち移植前に培養継代を重ねることによる MSC としての機能劣化による影響が大きいという仮説を立てた。そこで、MSC 治療の有効性を高めるためには、継代数を最小限に止め、MSC としての品質を保持したまま、治療が求める十分な細胞数を用意するための MSC の大量培養技術が必須と考えた。本研究では、大きな細胞接着面積を確保できるポリエチレンタフレート (PET) フィラメントの不織布による三次元高密度大量培養システムを用い、軟骨細胞分化能の高い滑膜由来間葉系幹細胞 (SMMSC) の培養条件を設定し、継代数を最小限に抑えた SMMSC の骨軟骨損傷に対する自家移植の安全性と有効性を検証した。

2. 研究の目的

PET 不織布による三次元高密度大量培養システムを用いた馬の SMMSC の培養方法を確立し、最小限の細胞継代によって SMMSC を十分数確保し移植すること、そしてその移植治療の骨軟骨再生効果を検証することを目的に、研究期間中に、以下の具体的目標を定めた。

- (1) 関節内骨折等による馬の関節鏡手術症例から滑膜組織を採取して、最少継代 (1 継代) で 1×10^9 個以上の SMMSC を分離培養する方法を確立する。
- (2) 関節鏡視下手術で作出された骨軟骨欠損に自己由来の SMMSC を移植し、移植後の安全性と効果を評価する。

3. 研究の方法

(1) PET フィラメント不織布を用いた馬滑膜由来間葉系幹細胞の大量培養の検討

関節内骨折を発症したサラブレッド競走馬 (10 例) について関節鏡視下手術時に滑膜組織を採取した。滑膜組織は、重量 (mg) を測定して十分に組織鈇にて細断した後、0.1% コラゲナーゼを含む PBS により酵素処理を行なった。孔径 $70 \mu\text{m}$ のメンブレンで濾過し、遠心処理した後、沈渣を再懸濁して自動セルカウンターにて有核細胞数を計測した。滅菌処理した PET 不織布 350 ~ 800 枚を培養用ボトル型容器に入れ、10% 牛胎児血清 (FBS) と 1% 抗菌薬及び抗真菌薬を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) を加え、PET 不織布 1 枚あたり 1.0×10^4 個の有核細胞を播種し、三次元高密度大量培養システムで培養を開始した。

その後、培地中グルコース消費量と SMMSC 数との間の高い正の相関関係を示した予備実験の結果 (Figure 1) に基づき、培地中のグルコース濃度をモニタリングし、その消費量から培養中の SMMSC 数を推定した。培地の交換は 2~3 日に一度行い、グルコース消費量がプラトーに達する前で、 1.0×10^8 個の SMMSC 数が推定された時点で、培養を終了し不織布からの細胞剥離を行った。DMEM 培地を捨て、不織布が完全に浸かる量の細胞剥離酵素液を加え、不織布に接着した細胞を十分剥離させた。酵素液を回収し、DMEM 培地で不織布を再び洗浄した。回収した細胞懸濁液と培地を合わせて、遠心分離して上清を除去後、トリパンブルー染色液に懸濁し、自動セルカウンターを用いて総細胞数と生細胞数を測定した。

不織布への細胞の接着と剥離についても、予備実験によって確認した (Figure 2)。培養 3 日目と培養終了時に、SMMSC の不織布への接着を顕微鏡下にて観察した。不織布 1 枚を各 1.5ml チューブに入れ、PBS にて洗浄した後、4% パラホルムアルデヒドにより細胞を固定し、クリス

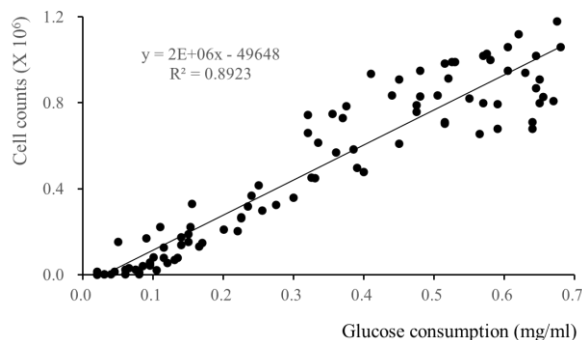


Figure 1. Correlation between cell counts and glucose consumption in medium.

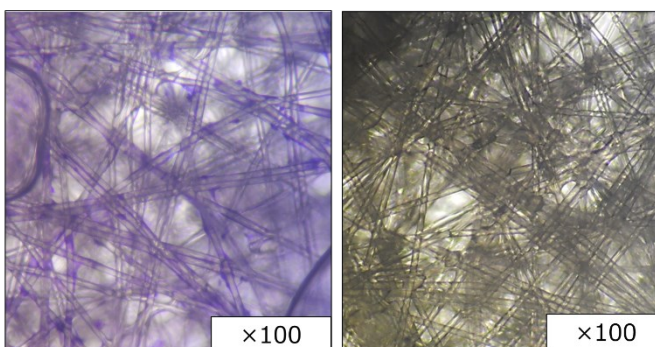


Figure 2. Microscopic images of SM-MSCs adhered to PET non-woven fabric (nuclear staining with Crystal Violet). Photomicrographs before (left) and after (right) the cell detachment on the 12th day of culture.

タルバイオレッド溶液を添加して細胞の核染色を行なった。このようにして、培養期間中は細胞接着を確認し、培養終了時には、細胞剥離後の不織布に細胞が残存していないことを確認した。

10 例中 8 例から得られた初代 SMMSC (P0-SMMSC) を 1 継代して拡大培養を実施した。それぞれの P0-SMMSC について PET 不織布 30 枚と培地 30m L を加えた 50ml ファルコンチューブを 2 本用意し、PET 不織布 1 枚あたりの播種密度が 3.0×10^4 個/枚と 5.0×10^4 個/枚となるように細胞を播種した。培地中のグルコース濃度を測定し、細胞によるグルコース消費量をモニタリングし、グルコース消費がプラトーに達することを予見する前をセミコンフルエントと判断し、細胞の剥離処理を行い、1 継代 SMMSC (P1-SMMSC) を得た。

回収した P0 及び P1-SMMSC の幹細胞としての性質を確認するためにフローサイトメトリー法により細胞表面抗原 (CD44、90、105、31、45) の発現パターンを解析した。加えて、SMMSC の多分化能 (骨・軟骨・脂肪細胞分化能) の評価を行った。

(2) PET フィラメント不織布を用いた馬滑膜由来間葉系幹細胞の大量培養の検討 — 自己血清添加培地による培養法の検討 —

実験 1 では細胞培養に基礎培地に牛胎児血清 (FBS) を加えていた。培養細胞を移植する上で、培地に含まれる異種タンパクは免疫応答を惹起させる可能性や、病原体の混入のリスクを有していることが危惧されるため、実験 2 では、馬の自己血清 (AS) 添加培地を用いて検討した。関節内骨折を発症したサラブレッド競走馬 (10 例) について関節鏡視下手術時に滑膜組織と血液を採取した。血液は 90 分間常温で静置した後、3,000rpm にて 15 分間遠心させ血清を分離した。分離した血清は使用するまで冷凍保存した。採取した滑膜組織は有核細胞の分離まで乳酸リンゲル液にて冷蔵保存した。滑膜組織は重量を測定し、0.1% コラゲナーゼを含む PBS で酵素処理を行なった。メンブレンで濾過して遠心処理の後、沈渣を再懸濁して自動セルカウンターにて生細胞数を測定した。オートクレーブにて滅菌処理した PET 不織布 450 枚を培養容器に入れ、10% 自己血清、1% 抗菌剤及び抗真菌剤を加えた DMEM に浸した。滑膜組織から遊離された有核細胞 4.5×10^6 個を容器に入れ (不織布 1 枚当たりの播種細胞数は 10×10^4 個)、自動培養を開始した。DMEM 中のグルコース消費量から SMMSC の数を推定し、 1.0×10^8 個以上の P0-SMMSC に達したと推定された時点で培養終了し、不織布から細胞を剥離した。DMEM を捨て、細胞剥離酵素液を入れて酵素反応させた後に回収し遠心分離によって上清を除去し、沈渣中の細胞数を測定した。実験 1 と同様に、細胞表面抗原パターンと、骨・軟骨・脂肪細胞分化能を評価した。

(3) PET フィラメント不織布を用いた馬滑膜由来間葉系幹細胞の大量培養の検討 — 組織採取から培養開始までの時間経過の違いが幹細胞の分離培養に与える影響の検討 —

他施設で診断治療される関節疾患症例への細胞治療試験の実施を前提に、組織採取から培養開始までの輸送による時間経過の違いが幹細胞の分離・培養に与える影響について検討した。馬の関節内骨折症例 (20 例) を、滑膜を採取してから 6 時間以内に細胞分離を開始した群 (対照群; n=11) と、冷蔵輸送を伴い 5~7 日後に開始した群 (輸送群; n=9) に分けた。滑膜組織は、重量を測定して酵素処理後に有核細胞数を計数した。PET 不織布 1 枚あたり 1.0×10^4 個の有核細胞を播種し、自動大量培養装置にて培養した。培養液中のグルコース消費量を監視しながら、セミコンフルエント時の P0-SMMSC の数を算定して増殖能を評価した。

(4) 馬の関節内骨折症例における滑膜由来間葉系幹細胞の自家移植

関節鏡手術時に採取した馬の滑膜組織と自己血清を用いて分離培養した 1 億個の自己由来 P0-SMMSC を術創癒合が完成する術後 2 週間で関節内に自家移植する治療プログラム『関節疾患馬の自己由来 SMMSC による手術フォローアップ治療プログラム (Figure 3)』を設定し、自然発症例における安全性試験を実施した。

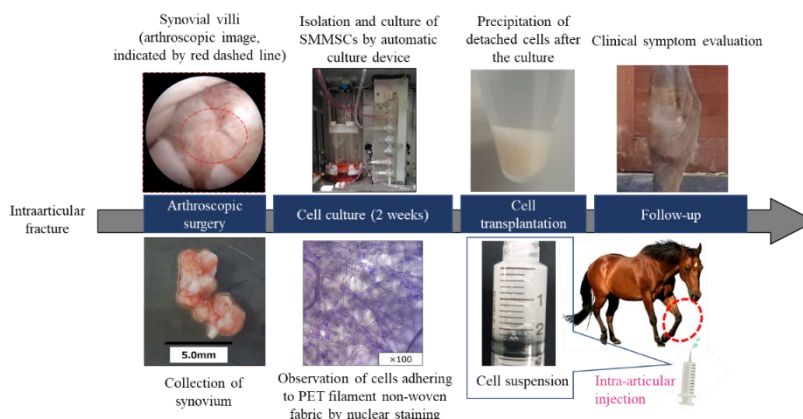


Figure 3. Treatment program with autologous synovial mesenchymal stem cell transplantation after arthroscopic surgery of intraarticular fracture.

右橈骨遠位及び中間

手根骨骨折を発症し、受傷後 12 日目に他施設で関節鏡手術を受けたサラブレッド競走馬症例の手術中に滑膜組織と自己血清を採取し、冷蔵輸送した。得られた滑膜組織の重量を測定して酵素処理によって有核細胞を回収後、PET 不織布 1 枚あたり 1.0×10^4 個の密度で播種し、10% 自己血清添加 DMEM 培地にて 14 日間培養した。細胞による培養液中のグルコース消費量を監視し、セミコンフルエント時に SMMSC を回収した。移植は、関節鏡手術後 17 日目に実施した。移植直前に不織布から SMMSC を剥離し、遠沈して培地除去し洗浄した細胞を 2 ml の生理食塩液に

再浮遊させ、当該馬の右側橈骨手根骨間関節に注射した。移植後 28 日間、局所の熱感・触診痛・腫脹を 3 段階で、跛行は AAEP 跛行グレードに準拠して評価した。

4. 研究成果

(1) PET フィラメント不織布を用いた馬滑膜由来間葉系幹細胞の大量培養の検討

手術によって得られた滑膜組織から分離培養された P0-SMMSC の結果を、Table 1 にまとめた。滑膜組織の重量は $396.4.8 \pm 245.2 \text{ mg}$ であり、酵素処理後には $6.4 \pm 1.8 \times 10^6$ 個の有核細胞（生細胞数）が回収された。このうち $3.5 \sim 7.5 \times 10^6$ 個の有核細胞を、PET 不織布 1 枚あたりに播種される細胞密度が 1.0×10^4 個になるように不織布の枚数を決めて培養を開始した。その結果、細胞播種後 11.4 ± 2.7 日間で $11.6 \pm 0.8 \times 10^7$ 個の SMMSC を得ることができた。

Figure 4 に示すように、得られた細胞は、フローサイトメトリー法において、CD90・44 陽性、CD31・45 陰性を示し、脂肪細胞、骨芽細胞、及び軟骨細胞への分化誘導により、それぞれに特異的な基質の産生を認めた。関節鏡視下手術によって得た馬の滑膜組織から、2 週間未満の培養期間を以て、 1.0×10^8 個以上の P0-SMMSC を得ることができた。

P0-SMMSC の拡大培養の結果を Table 2 に示した。P0-SMMSC を PET 不織布 1 枚あたり 3.0×10^4 /枚の密度で播種した場合、回収された P1-SMMSC の数と培養日数は、それぞれ $1.68 \pm 0.28 \times 10^7$ 個と 13.6 ± 1.1 日であった。

P0-SMMSC を 5.0×10^4 /枚の密度で播種した場合、 13.5 ± 1.0 日の培養で $1.94 \pm 0.44 \times 10^7$ 個の P1-SMMSC が得られた。いずれも、10 倍以上（13~18 倍）に拡大培養されたことから、 1×10^8 個以上の P0-SMMSC を用意した場合、最少継代（1 継代）することで、計算上 1×10^9 個以上の P1-SMMSC を得ることが可能となった。

Table 1. Isolation and massive culture of SMMSCs by using polyethylene terephthalate (PET) filament non-woven fabric in 10% fetal bovine serum (FBS) - added medium.

Case No	Culture medium additive	Weight of synovium (mg)	Nuclear cell counts from synovium (x 10 ⁶)	Nuclear cell counts seeded to PET (x 10 ⁶)	Pieces of PET	Nuclear cell counts per piece of PET (x 10 ⁷)	Cell counts after PET culture (x 10 ⁷)	Culture period (days)
1	FBS	1048	4.0	4.0	400	1.0	12.1	10
2	FBS	334	7.7	4.2	420	1.0	11.7	12
3	FBS	187	3.5	3.5	350	1.0	8.2	12
4	FBS	484	9.1	4.2	420	1.0	13.5	12
5	FBS	402	8.3	8.0	800	1.0	10.7	11
6	FBS	373	6.1	6.1	611	1.0	15.0	11
7	FBS	316	6.5	6.5	652	1.0	7.4	12
8	FBS	302	7.5	7.5	753	1.0	14.3	13
9	FBS	320	5.2	5.0	500	1.0	8.2	12
10	FBS	198	5.9	5.0	500	1.0	13.1	11
Average		396.4	6.4	5.4	539.6	1.0	11.4	11.6
SD		245.2	1.8	1.6	157.1	0.0	2.7	0.8

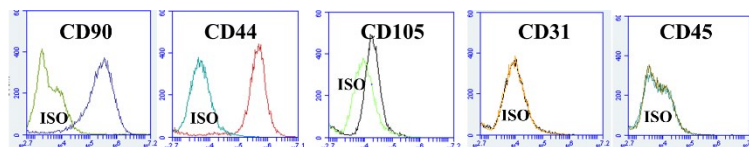


Figure 4-1. SMMSCs showed positive to CD90, 44, and 105, but negative to CD31 and 45. ISO indicates isotype controls



Figure 4-2. Production of substrates specific for bone, cartilage, and fat differentiation of SMMSCs.

Table 2. Culture for expansion of SMMSCs by using polyethylene terephthalate (PET) filament non-woven fabric in 10% fetal bovine serum (FBS) - added medium.

Case No	3.0 x 10 ⁴ P0-SMMSC seeded per piece of PET				5.0 x 10 ⁴ P0-SMMSC seeded per piece of PET			
	Pieces of PET	P0-SMMSC counts seeded on PET (x 10 ⁴)	P1-SMMSC counts after PET culture (x 10 ⁷)	Culture period (days)	Pieces of PET	P0-SMMSC counts seeded on PET (x 10 ⁴)	P1-SMMSC counts after PET culture (x 10 ⁷)	Culture period (days)
1	30	0.09	1.23	15	30	0.15	1.44	15
2	30	0.09	2.1	15	30	0.15	2.82	14
3	30	0.09	1.82	14	30	0.15	1.3	14
4	30	0.09	1.82	12	30	0.15	2.15	12
5	30	0.09	1.97	12	30	0.15	1.89	12
6	30	0.09	1.33	14	30	0.15	2.11	14
7	30	0.09	1.58	14	30	0.15	1.96	14
8	30	0.09	1.57	13	30	0.15	1.86	13
Average	30	0.09	1.68	13.6	30	0.15	1.94	13.5
SD			0.28	1.1			0.44	1.0

P0: passage zero, P1: passage one

Table 3. Isolation and massive culture of SMMSCs by using non-woven fabrics of polyethylene terephthalate (PET) filaments in 10% auto-serum (AS) added medium.

Case No	Culture medium additive	Weight of synovium (mg)	Nuclear cell counts from synovium (x 10 ⁶)	Nuclear cell counts seeded to PET (x 10 ⁶)	Pieces of PET	Nuclear cell counts per piece of PET (x 10 ⁷)	Cell counts after PET culture (x 10 ⁷)	Culture period (days)
11	AS	494	5.8	4.8	480	1.0	11.0	11
12	AS	436	9.7	5	500	1.0	12.2	13
13	AS	445	14.5	5	500	1.0	10.2	14
14	AS	390	6.5	4.5	450	1.0	8.3	11
15	AS	380	5.5	4.5	450	1.0	10.9	13
16	AS	444	12.9	4.5	450	1.0	12.6	13
17	AS	879	8.9	4.5	450	1.0	12.5	14
18	AS	1033	29.7	4.5	450	1.0	12.1	14
19	AS	258	8.5	5	500	1.0	6.7	11
20	AS	440	9.0	4.5	450	1.0	8.0	14
Average		519.9	11.1	4.7	468.0	1.0	10.4	12.8
SD		241.0	7.1	0.2	23.9	0.0	2.1	1.3

(2) PET フィラメント不織布を用いた馬滑膜由来間葉系幹細胞の大量培養の検討 — 自己血清添加培地による培養法の検討 —

10%自己血清 (AS) 添加培地による P0-SMMSC の分離培養 (Table 3、前頁) では、滑膜組織の重量は 519.9 ± 241.0 mg であり、 $11.1 \pm 7.1 \times 10^6$ 個の有核細胞 (生細胞数) が存在した。450~500 枚の PET 不織布を用いて、1 枚当たり 1.0×10^4 個となるように細胞を播種して培養を開始した。その結果、培養後 12.8 ± 1.3 日で $10.4 \pm 2.1 \times 10^7$ 個の細胞が回収され、それらは、実験 1 と同様、フローサイトメトリー法において、CD90・44 陽性、CD31・45 陰性を示し、脂肪細胞、骨芽細胞、及び軟骨細胞への分化誘導により、それぞれに特異的な基質の産生を認めた。自己血清添加培地においても、2 週間未満の培養期間で 1.0×10^8 個以上の P0-SMMSC を得たことから、細胞治療に十分数の自己由来幹細胞を確保できることが明らかとなった。

(3) PET フィラメント不織布を用いた馬滑膜由来間葉系幹細胞の大量培養の検討 — 組織採取から培養開始までの時間経過の違いが幹細胞の分離培養に与える影響の検討 —

Table 4 に示すように、PET に播種された有核細胞数は、対照群 ($4.3 \pm 0.3 \times 10^6$ 個) よりも輸送群 ($5.7 \pm 1.2 \times 10^6$ 個) の方が多かったが、PET 不織布 1 枚あたりの細胞密度は 1.0×10^4 個と、一致させて培養開始した。セミコンフルエントまでの培養期間は、輸送群及び対照群で、それぞれ 11.3 ± 1.9 と 10.6 ± 2.8 日、また剥離回

Table 4. The effects of transportation on the isolation and massive culture of SMMSCs by using non-woven fabrics of polyethylene terephthalate (PET) filaments.

Case No	Culture medium additive	Transport / control	Nuclear cell counts seeded to PET (x 10 ⁶)	Pieces of PET	Nuclear cell counts per piece of PET (x 10 ³)	Cell counts after PET culture (x 10 ⁷)	Culture period (days)
1	FBS	Transport	4.0	400	1.0	12.1	10
2	FBS	Transport	4.2	420	1.0	11.7	12
3	FBS	Transport	3.5	340	1.0	8.2	12
4	FBS	Transport	4.2	420	1.0	13.5	12
14	AS	Transport	4.5	450	1.0	8.3	11
15	AS	Transport	4.5	450	1.0	10.9	13
16	AS	Transport	4.5	450	1.0	12.6	13
17	AS	Transport	4.5	450	1.0	12.5	14
18	AS	Transport	4.5	450	1.0	12.1	14
Average			4.3	425.6	1.0	11.3	12.3
SD			0.3	37.1	0.0	1.9	1.3
11	AS	Control	4.8	480	1.0	11.0	11
12	AS	Control	5	500	1.0	12.2	13
13	AS	Control	5	500	1.0	10.2	14
5	FBS	Control	8.0	800	1.0	10.7	11
6	FBS	Control	6.1	611	1.0	15.0	11
7	FBS	Control	6.5	652	1.0	7.4	12
8	FBS	Control	7.5	753	1.0	14.3	13
9	FBS	Control	5.0	500	1.0	8.2	12
10	FBS	Control	5.0	500	1.0	13.1	11
19	AS	Control	5	500	1.0	6.7	11
20	AS	Control	4.5	450	1.0	8.0	14
Average			5.7	567.8	1.0	10.6	12.1
SD			1.2	119.1	0.0	2.8	1.2

収された細胞数は、それぞれ 12.3 ± 1.3 と $12.1 \pm 1.2 \times 10^7$ 個であり、両群間に有意差は認められなかった。いずれの群においても回収細胞は CD90・44 陽性、CD31・45 は陰性を示し、分化誘導後の細胞にそれぞれ特異的な基質産生を認めた。このように、採取から培養開始までの 5~7 日間にわたって冷蔵保存された滑膜組織においても、新鮮組織と同程度に P0-SMMSC が分離培養できることが明らかとなった。

(4) 馬の関節内骨折症例における滑膜由来間葉系幹細胞の自家移植

関節鏡手術で採取し冷蔵輸送された当該症例の滑膜組織は 1,294mg であり、酵素処理後の有核細胞数 (生細胞数) は 1.21×10^7 個であった。そのうち 5.0×10^6 個を PET 不織布 500 枚に播種し、培養期間は 14 日間で、回収された P0-SMMSC は 11.0×10^7 個 (1.1 億個) であった。移植直前に回収し、遠沈後に生理食塩液に浮遊させた細胞 (Figure 3) を関節内に自家移植して 28 日間観察した。

Table 5 に示すように、細胞移植後も観察期間を通じて軽度な熱感が持続した。移植時に中度であった触診痛は、移植後 2~5 日目まで一旦軽減されたが 6~11 日目まで中度となり 12 日目以降軽度に維持された。また移植時に重度であった腫脹は移植後 5~28 日目まで中度となった。移植時にグレード 1 であった跛行は 5 日目以降グレード 0 で推移した。屈曲痛は 19 日目に消失した。移植後の外貌評価 (3、4、7、13、28 日目に撮影) と X 線検査 (13、28 日目撮影) では、所見の著変を認めなかった。

『関節疾患馬の自己由来 SMMSC による手術フォローアップ治療プログラム (Figure 3)』に従い、自然発症例における移植治療の安全性試験を実施したところ、P0-SMMSC 自家移植後の局所及び全身的な副反応を認めなかった。

Table 5. Clinical course of the joint after transplanted autologous P0-SMMSCs in a horse case of naturally-occurred articular fracture.

	Heat				Palpation pain				Swelling				Lameness			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Day1	1	2	3	1												
Day2	1	1	3	1												
Day3	1	1	3	1												
Day4	1	1	3	1												
Day5	1	1	2	0												
Day6	1	2	2	0												
Day7	1	2	2	0												
Day8	1	2	2	0												
Day9	1	2	2	0												
Day10	1	2	2	0												
Day11	1	2	2	0												
Day12	1	1	2	0												
Day13	1	1	2	0												
Day14	1	1	2	0												
Day15	1	1	2	0												
Day16	1	1	2	0												
Day17	1	1	2	0												
Day18	1	1	2	0												
Day19	1	0	2	0												
Day20	1	0	2	0												
Day21	1	0	2	0												
Day22	1	0	2	0												
Day23	1	0	2	0												
Day24	1	0	2	0												
Day25	1	0	2	0												
Day26	1	0	2	0												
Day27	1	0	2	0												
Day28	1	0	2	0												

Heat, palpation pain, swelling were scored as 0 (none), 1 (mild), 2 (moderate), and 3 (severe). Lameness was evaluated by AAEP lameness grade system.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藏元智英、畠添孝、石川慎吾、内門浩美、帆保誠二、三角一浩
2. 発表標題 ポリエチレンテレフタレート（PET）フィラメント不織布を用いた馬滑膜由来間葉系幹細胞の大量培養の検討
3. 学会等名 第163回 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藏元智英、畠添孝、帆保誠二、千葉俊明、米須学美、栗本慎二郎、徳重裕貴、飯森麻衣、三角一浩
2. 発表標題 ポリエチレンテレフタレート（PET）不織布を用いた馬の滑膜由来間葉系幹細胞の三次元培養 - 組織採取から培養開始までの時間経過の違いが幹細胞の分離培養に与える影響 -
3. 学会等名 第164回 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藏元智英、畠添 孝、帆保誠二、三角一浩、飯森麻衣、徳重裕貴、栗本慎二郎
2. 発表標題 関節鏡手術後に滑膜由来間葉系幹細胞を自家移植した馬の症例
3. 学会等名 SHCカンファレンス2021
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	藏元 智英 (KURAMOTO TOMOHIDE) (80813154)	鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・助教 (17701)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	畠添 孝 (HATAZOE TAKASHI) (90776874)	鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・准教授 (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関