

明 細 書

発明の名称： 脂肪細胞を含む細胞製剤

技術分野

[0001] 本発明は、骨間接合部の疾患に起因する痛みの緩和、及び当該疾患の治療に有用な細胞製剤に関する。また、本発明は、変性したり損傷した筋肉の修復に有用な細胞製剤に関する。

背景技術

[0002] ヒトの軟部組織のボリュームを増大させる手段として、ヒアルロン酸注入、脂肪細胞の移植等が知られており、顔面のシワ除去、陥凹治療、乳房再建等の美容外科、形成外科等の分野で多用されている。しかしながら、ヒアルロン酸注入による治療は、容易である反面、注入されたヒアルロン酸が約半年で吸収されてしまうため効果の持続性に乏しいという問題がある。また、脂肪細胞の移植についても、移植後に生体内で脂肪細胞が壊死したり、吸収されてしまうことがある。そのため、再手術が必要となったり、場合によっては瘢痕を生じるという欠点が存在する。

[0003] これらの欠点を解消するため、脂肪幹細胞の移植が提案され、効率的に脂肪幹細胞を分離する方法が開発されている（例えば特許文献1及び2を参照）。脂肪幹細胞を移植することによって、移植後の細胞の定着率が改善され、軟部組織再生に一定の効果が認められている。しかしながら、このような方法で得られる脂肪幹細胞には不純物が含まれる場合があり、これが原因で移植後に脂肪細胞が壊死したり、しこり（石灰化）を生じる可能性があった。脂肪細胞は、一般的に脂肪吸引により得られるが、吸引された脂肪は、脂肪細胞や脂肪幹細胞の他に様々な不純物が含まれた混合物である。このような混合物から除去すべき不純物としては、血液（特に赤血球）、死活細胞、老化細胞等が挙げられる。これに対して、特許文献3に記載されるウェイトフィルターを装着したシリンジを用いて遠心分離にかけ、脂肪吸引により採取した脂肪細胞や脂肪幹細胞を含む混合物から石灰化や脂肪壊死の原因とな

る不純物を除去した、健全な濃縮脂肪細胞と脂肪幹細胞を含む細胞製剤（**C o n d e n s e d R i c h F a t : C R F**（登録商標））を注入する方法が提案されている。このような方法によれば、細胞の定着率が向上し、しこり等の問題も生じにくいため、広く受け入れられつつある。

[0004] このように、脂肪細胞及び脂肪幹細胞の分離及び濃縮について様々な技術が開発され、安全で定着性に優れた脂肪細胞及び脂肪幹細胞が提供されつつある。しかしながら、これまで脂肪細胞及び脂肪幹細胞の移植は、軟部組織の再生に適用されることがほとんどであり、例えば関節痛の緩和や関節内の組織再生に関するこれらの細胞の有効性については十分に検討されていなかった。また、脂肪細胞及び脂肪幹細胞を損傷された筋肉に投与することによって筋肉の修復がされることについても知られていなかった。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特表2005-519883号公報

特許文献2：特表2007-509601号公報

特許文献3：特表2007-533396号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、骨間接合部の疾患に起因する痛みの緩和、及び当該疾患の治療に有用な細胞製剤を提供することを主な目的とする。また、本発明は、損傷した筋肉の修復に有用な細胞製剤を提供することを他の目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者は、上記課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、関節痛を訴える患者に脂肪細胞を注入すると、早期に症状が緩和され且つその効果が持続することを見出した。更に、脂肪細胞と脂肪幹細胞とを組合わせて注入すると、前記関節痛の緩和に加え、関節内の骨組織や軟骨組織が効率よく再生されることを見出した。また、本発明者は、脂肪細胞及び中胚葉系幹細胞を含

む細胞製剤を筋肉損傷部位に投与することにより損傷した筋肉が修復されることを見出した。本発明は、これらの知見に基づいて更に研究を重ねた結果完成されたものである。

[0008] 即ち、本発明は、下記態様の細胞製剤、骨間接合部の疼痛緩和方法、骨間接合部の組織再生方法、筋肉修復方法等を提供する。

項 1. 脂肪細胞を含む、骨間接合部の疾患を治療するための細胞製剤。

項 2. 更に、中胚葉系幹細胞を含む、項 1 に記載の細胞製剤。

項 3. 前記中胚葉系幹細胞が脂肪幹細胞である、項 1 に記載の細胞製剤。

項 4. 脂肪細胞 1 個に対して中胚葉系幹細胞が 1 ～ 10 個含まれる、項 1 に記載の細胞製剤。

項 5. 前記脂肪細胞が γ 線照射された細胞である、項 1 に記載の細胞製剤。

項 6. 前記骨間接合部の疾患が、脊椎疾患、関節疾患、自己免疫疾患及び骨壊死症からなる群より選択されるいずれか 1 種である、項 1 に記載の細胞製剤。

項 7. 骨間接合部の疾患の治療剤の製造のための脂肪細胞を含む細胞製剤の使用。

項 8. 骨間接合部の疾患の治療に使用される脂肪細胞を含む細胞製剤。

項 9. 脂肪細胞を含む細胞製剤を、骨間接合部の疾患を有する患者の骨間接合部に投与する工程を含む、骨間接合部の疼痛を緩和する方法。

項 10. 脂肪細胞及び中胚葉系幹細胞を含む細胞製剤を、骨間接合部の疾患を有する患者の骨間接合部に投与する工程を含む、骨間接合部の組織再生方法。

項 11. 脂肪細胞及び中胚葉系幹細胞を含む、筋肉修復用細胞製剤。

項 12. 前記中胚葉系幹細胞が脂肪幹細胞である、項 11 に記載の細胞製剤。

項 13. 脂肪細胞 1 個に対して中胚葉系幹細胞が 1 ～ 10 個含まれる、項 11 に記載の細胞製剤。

項 14. 前記脂肪細胞が γ 線照射された細胞である、項 11 に記載の細胞製

剤。

項 1 5．筋肉修復用製剤の製造のための脂肪細胞及び中胚葉系幹細胞を含む細胞製剤の使用。

項 1 6．筋肉修復に使用される脂肪細胞及び中胚葉系幹細胞を含む細胞製剤。

項 1 7．脂肪細胞及び中胚葉系幹細胞を含む細胞製剤を、筋肉損傷を有する患者の筋肉損傷部位に投与する工程を含む、筋肉修復方法。

発明の効果

[0009] 本発明の脂肪細胞を含む細胞製剤によれば、脂肪細胞や脂肪細胞周辺に存在する E C M（細胞外基質）等によって関節等のすべりが改善されて関節痛を早期に緩和することができ、骨間接合部の疾患に起因する疼痛緩和に優れた効果を得ることができる。また、例えば、本発明の細胞製剤を椎間板等に注入することにより、クッションの役目を果たし、椎体の動きをよくする（改善する）効果を奏する。更に、本発明の細胞製剤による関節痛の緩和効果は、長期に亘って持続する。

[0010] また、脂肪細胞と中胚葉系幹細胞を含む本発明の細胞製剤によれば、脂肪細胞により骨間接合部の疾患に起因する疼痛が緩和され、その間に、中胚葉系幹細胞による骨組織、軟骨組織、軟部組織等の関節内の組織再生が促される。また、脂肪細胞と中胚葉系幹細胞を組合せて用いることにより、前述の疼痛が緩和されるのみならず、脂肪細胞のはたらきによって中胚葉系幹細胞が患部に保持され、中胚葉系幹細胞の生着効率及び組織再生効率がより一層促進されることから、脂肪細胞と中胚葉系幹細胞を含む本発明の細胞製剤は骨間接合部の疾患の治療に更に有効である。

[0011] また、脂肪細胞と中胚葉系幹細胞を含む本発明の細胞製剤は、筋肉の変性や手術による筋肉の切除によって損傷された筋肉に対して優れた修復効果を有する。また、当該細胞製剤によれば筋肉損傷による痛みを早期に緩和することができるため、患者の Q O L（Q u a l i t y o f L i f e）の向上にも寄与するものである。

[0012] 従来、脂肪幹細胞等の中胚葉系幹細胞を培養して組織修復する方法が採用される場合には、培養等の過程で汚染（コンタミネーション）される可能性があり、移植後に感染症を引き起こすおそれもあった。しかしながら、本発明の細胞製剤に含まれる脂肪細胞及び中胚葉系幹細胞は、細胞培養の工程を経ることなく吸引脂肪等から直接的に分離、濃縮することが可能であるため、外気と接触することなく調製され得る。従って、感染症等の心配もない。また、本発明の細胞製剤は、通常、骨間接合部の疾患の治療又は筋肉の修復を要する患者本人から採取された脂肪細胞及び中胚葉系幹細胞を用いて調製されるため、免疫拒絶反応の問題のない安全性の高いものである。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]図1（a）は細胞製剤を投与する前の被験者Aの左膝関節を示すX線写真であり、図1（b）は細胞製剤の投与から約1か月後の被験者Aの左膝関節を示すX線写真である。

[図2]図2（a）は細胞製剤を投与する前の被験者Bの左右膝関節を示すX線写真であり、図2（b）は細胞製剤の投与から約1か月後の被験者Bの左右膝関節を示すX線写真である。

[図3]図3は、細胞製剤を投与することによって骨組織の再生が促され、骨壊死が改善、消失したことを示すMR画像の代表例である。

発明を実施するための形態

[0014] 1. 細胞製剤

本発明は、以下の骨間接合部の疾患を治療するための細胞製剤、及び筋肉修復用細胞製剤を提供する。以下、各細胞製剤について詳述する。

[0015] (1-1)骨間接合部の疾患を治療するための細胞製剤

本発明は、脂肪細胞を含むことを特徴とする、骨間接合部の疾患を治療するための細胞製剤を提供する。

[0016] 脂肪細胞（f a t c e l l）とは、脂肪を合成、貯蔵、放出する機能を有し、脂肪組織を形成する細胞である。また、脂肪細胞は、完全に分化しているため細胞分裂を起こさない。脂肪細胞には、白色脂肪細胞及び褐色脂肪

細胞が存在するが、本発明においてはこれらのいずれを用いてもよく、両者の混合物を使用してもよい。本発明において脂肪細胞の由来は特に限定されないが、例えば、哺乳類の脂肪細胞、好ましくは霊長類の脂肪細胞、更に好ましくはヒト脂肪細胞を使用する。本発明において、脂肪細胞としては、脂肪細胞のみを単独で使用することもできるが、脂肪細胞周辺に存在する細胞外基質（*extracellular matrix*：ECM）と脂肪細胞の混合物を使用してもよい。具体的には、本発明では、脂肪細胞として、採取された脂肪組織をそのまま使用してもよく、また採取された脂肪組織から細胞外基質を取り除いたものを使用してもよい。

[0017] 脂肪細胞は、脂肪組織から採取される。脂肪組織の採取方法としては、特に限定されず、従来公知の方法から適宜選択され得るが、例えば脂肪吸引、脂肪切除、除脂術等が挙げられる。比較的容易且つ低侵襲であることから、脂肪吸引による採取が好ましい。採取された脂肪から脂肪細胞を得る方法としては、特に限定されないが、好ましくは下記2. 細胞製剤の調製方法に記載される方法が挙げられる。

[0018] また、本発明の骨間接合部の疾患を治療するための細胞製剤は、更に中胚葉系幹細胞を含んでいてもよい。中胚葉系幹細胞を更に含むことにより、骨間接合部における組織再生が促され、本発明の細胞製剤による治療効果がより一層高められる。

[0019] 本発明の細胞製剤に使用される中胚葉系幹細胞は、主に、骨、軟骨、心筋、脂肪等の中胚葉系の組織に属する細胞に分化する中間幹細胞を指す。中胚葉系幹細胞の由来は特に限定されないが、例えば、哺乳類の中胚葉系幹細胞、好ましくは霊長類の中胚葉系幹細胞、更に好ましくはヒト中胚葉系幹細胞を使用する。

[0020] 中胚葉系幹細胞として具体的には、脂肪幹細胞、骨髄幹細胞、造血幹細胞等が例示され、これらの幹細胞は従来公知の方法に従って細胞の種類に応じて各組織から得ることができる。

[0021] 本発明において、中胚葉系幹細胞として好ましくは脂肪幹細胞が例示され

る。脂肪幹細胞は、脂肪組織から採取することができる。脂肪幹細胞の供給源となる脂肪組織は、前述の脂肪細胞と同様、脂肪吸引、脂肪切除、除脂術等のいずれかの方法により採取することができるが、脂肪幹細胞の流出や損傷を防ぎ、より安全に採取できるという観点から、好ましくは脂肪吸引である。また、採取された脂肪から脂肪幹細胞を得る方法として好ましくは、下記 2. 細胞製剤の調製方法に記載される方法が挙げられる。

[0022] 本発明の細胞製剤が中胚葉系幹細胞を含む場合、脂肪細胞と中胚葉系幹細胞が混在した状態のものを使用することが好ましい。本発明の細胞製剤が中胚葉系幹細胞を含む場合、細胞製剤中の中胚葉系幹細胞の含有量としては、骨間接合部の疾患の治療効果が得られる範囲であれば特に限定されず、中胚葉系幹細胞の含有量が多いほどより一層優れた治療効果が得られると考えられるが、例えば、脂肪細胞 1 個に対して中胚葉系幹細胞が、少なくとも 1 個以上、好ましくは 5 個以上、より好ましくは 1 ～ 10 個、更に好ましくは 5 ～ 10 個が挙げられる。また、工程 (1 c) 及び (2 c) を含む下記方法 (c) により調製された細胞製剤の場合、当該細胞製剤 1 mL あたりに含まれる中胚葉系幹細胞の数が、通常 10 万個以上、好ましくは 15 万個以上、更に好ましくは 15 ～ 20 万個が挙げられる。

[0023] 本発明の細胞製剤において、自家移植を目的として、自己由来の脂肪細胞（及び中胚葉系幹細胞）を使用することにより、早期の症状改善に加えて、免疫拒絶反応を回避することもできる。但し、本発明の細胞製剤を、他人由来の脂肪細胞（及び中胚葉系幹細胞）を用いて調製することを制限するものではない。他人由来の細胞を使用する場合は、移植前に他人から採取した脂肪細胞（脂肪細胞周辺に存在する細胞外基質（ECM）を含む）に対し、例えば γ 線照射等の抗原性を除去するための処理を行うことが好ましい。中胚葉系幹細胞は通常免疫原性を有さない細胞であるが、必要に応じて、前記処理に供したものを使用してもよい。

[0024] 本発明の細胞製剤の好適な一例として、脂肪細胞と脂肪幹細胞を含むものが挙げられる。通常、脂肪組織には、脂肪細胞と脂肪幹細胞が含まれている

。そのため、脂肪細胞と脂肪幹細胞を含む細胞製剤としては、採取された脂肪組織をそのまま使用してもよく、また、採取された脂肪組織から不純物（例えば、脂肪採取の際に注入される麻酔液（所謂チューメセント液）、老化した脂肪細胞、血液、組織液等）を除去したもの、採取された脂肪組織から不純物と一部の脂肪細胞を除去したもの等を使用してもよい。当該細胞製剤の調製方法の好適な例としては、後述する方法（a）～（c）が挙げられる。

[0025] また、本発明の細胞製剤には、必要に応じて従来公知の薬学的に許容される担体、賦形剤、消炎剤、鎮痛剤、免疫抑制剤等を添加することができる。

また、本発明の効果を損なわない範囲でコラーゲン、線維芽細胞、成長因子、増殖因子、サイトカイン等を添加してもよい。

[0026] また、例えばPRP（Platelet Rich Plasma：多血小板血漿）等の組織再生作用が知られている他の細胞製剤を、本発明の細胞製剤と併用してもよい。更に、PRPにロサルタン等のアンジオテンシンII受容体拮抗薬を添加することによって、より一層軟骨組織の再生効果が高められる。但し、組織再生効率が向上するという観点から、例えば軟骨組織の再生を期待する場合にはPRPからVEGF（血管内皮細胞増殖因子）を除去し、骨再生を期待する場合にはBMPs（骨形成タンパク質）を除去して使用することが好ましい。

[0027] 本発明の骨間接合部の疾患を治療するための細胞製剤は、骨間接合部の疾患に対して優れた治療効果を奏する。骨間接合部とは骨の連結部分を指し、軟骨又は軟骨と線維性結合組織の組み合わせによってつながる軟骨性連結、軟骨及び関節包を包む滑膜によってつながる滑膜性連結、及び線維性結合組織によりつながる線維性の連結が包含されるが、本発明においては特に、軟骨性連結及び滑膜性連結によってつながる可動性を有する部分を指す。骨間接合部として具体的には、脊椎関節、膝関節、足関節、足趾関節、股関節、手関節、肘関節、肩関節、手指関節、肩鎖関節、仙腸関節等が例示される。また、例えば膝関節の場合、靱帯、半月板等の軟部組織、脊椎関節の場合、ディスク（椎間板）等も前記骨間接合部に包含される。

[0028] また、骨間接合部の疾患とは、ヘルニア（脱出）、変形、変性、炎症等が挙げられ、具体的には、椎間板ヘルニア、変形性脊椎症等の脊椎疾患；変形性関節症（変形性股関節症、変形性膝関節症等を含む）、慢性関節症等の関節疾患；関節リウマチ等の自己免疫性疾患；膝関節特発性骨壊死症、大腿骨頭壊死症等の骨壊死症等が例示され、好ましくは椎間板ヘルニア、変形性関節症、慢性関節症、膝関節特発性骨壊死症、大腿骨頭壊死症が挙げられる。

[0029] 本発明の細胞製剤の投与量については、骨間接合部の疾患に対する治療効果が得られる範囲であれば特に限定されず、投与箇所の大ささ、疾患の部位、疾患の程度、患者の性別、体格等によって適宜設定され得るが、例えば、脂肪細胞数に換算して10万～400万個、好ましくは20万～200万個、更に好ましくは20万～100万個が挙げられる。例えば、工程（1c）及び（2c）を含む下記方法（c）で得られる細胞製剤を用いる場合、その投与量は0.5～20mL、好ましくは1～10mL、更に好ましくは1～5mLが挙げられる。また、例えば、膝関節に対しては、細胞製剤1～20mL、好ましくは1～10mL、更に好ましくは5～10mLを投与することができる。また、椎間板に対しては、細胞製剤0.5～20mL、好ましくは1～15mL、更に好ましくは1～2mLを投与することができる。

[0030] 投与方法としては、骨間接合部の疾患箇所（例えば、関節腔、椎間板（椎間円板）等）に、注射器、カニューレ等を使用して注入する方法が挙げられるが、これらに限定されない。また、注入の際、注射針やカニューレの先端で注入箇所を刺激することによって、より一層優れた治療効果が得られる。刺激の方法は特に限定されないが、例えば、先端が斜めにカットされたカニューレを、細胞製剤を注入する際、前後左右に回転させて注入部位を刺激する方法が挙げられる。

[0031] 本発明の細胞製剤をこれらの疾患を有する患者に投与する場合、必要に応じて公知の方法による処置を行った後に投与してもよい。例えば、椎間板ヘルニアの場合であれば脱出した椎間板を、PLDD（Percutaneous Laser Disc Decompression）等の従来公知

の方法で除去した後に、本発明の細胞製剤を投与（注入）することができる。本発明の細胞製剤に含まれる脂肪細胞の作用により、骨間接合部の疾患に起因する痛み（関節痛）が緩和され、更に、中胚葉系幹細胞を含む場合、当該細胞のはたらきによって骨間接合部における骨組織、軟骨組織、軟部組織等が再生される。

[0032] (1-2)筋肉修復用細胞製剤

本発明は、脂肪細胞及び中胚葉系幹細胞を含むことを特徴とする、筋肉損傷部位において筋肉を修復することが可能な細胞製剤を提供する。

[0033] 本発明の筋肉修復用細胞製剤において使用される脂肪細胞及び中胚葉系幹細胞、ならびに細胞製剤中の両者の含有量等については、前記「(1-1) 骨間接合部の疾患を治療するための細胞製剤」の欄に記載される通りである。また、本発明の筋肉修復用細胞製剤の好ましい態様として、脂肪細胞と、中胚葉系幹細胞である脂肪幹細胞とを含む細胞製剤が例示される。脂肪幹細胞を得る方法としては、例えば下記 2. 細胞製剤の調製方法に記載される方法が挙げられる。

[0034] また、筋肉修復用細胞製剤においても、脂肪細胞及び中胚葉系幹細胞の他、必要に応じて従来公知の薬学的に許容される担体、賦形剤、消炎剤、鎮痛剤、免疫抑制剤等を添加することができる。また、本発明の効果を損なわない範囲でコラーゲン、線維芽細胞、成長因子、増殖因子、サイトカイン等を添加してもよい。

[0035] また、本発明の効果を損なわない限り、例えば、PRP (Platelet Rich Plasma: 多血小板血漿) 等の組織再生作用が知られている他の細胞製剤を、本発明の細胞製剤と併用してもよい。但し、筋組織の再生効率をより一層高める観点から、トランスフォーミング増殖因子 $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) を除去して使用することが好ましい。

[0036] 本発明の筋肉修復用細胞製剤は、筋肉損傷部位に適用した場合に優れた筋肉修復効果を奏する。筋肉損傷には、筋肉変性、筋肉の線維化、筋線維の破壊や壊死、筋萎縮、筋麻痺、筋力低下等に加え、手術や外傷等により筋肉を

切除した場合も含まれる。また、本発明の細胞製剤が適用される筋肉の部位や種類は特に限定されないが、例えば、体幹筋（上肢又は下肢の筋肉、大胸筋を含む）等の骨格筋；膀胱括約筋等の平滑筋；心筋が挙げられる。例えば、上肢の筋肉の損傷部位に本発明の細胞製剤を投与することにより、筋肉損傷による痛みが早期に緩和され、更に筋肉が修復されることによって上肢のROM（Range of Motion：関節可動域）の拡大や運動機能の改善が実現される。また、膀胱括約筋の筋力低下や損傷等による尿失禁、頻尿等の排尿障害を呈する患者の膀胱括約筋に本発明の細胞製剤を投与することによって、膀胱括約筋の筋力を高めて尿失禁、尿漏れ等の問題を安全且つ容易に解消することができる。また、心筋梗塞、虚血再灌流障害、筋ジストロフィー（例えば、Duchenne筋肉ジストロフィー（DMD））、筋炎（ミオパチー）等の筋疾患を有する患者の筋肉損傷部位に対して適用することもできる。

[0037] また、筋肉損傷は痛みを伴うことが多いが、本発明の筋肉修復用細胞製剤を筋肉損傷部位に投与することによって、早期に痛みを緩和することができる。本発明の限定的な解釈を望むものではないが、このような疼痛緩和効果は、筋肉修復用細胞製剤に含まれる脂肪細胞によるものと考えられる。

[0038] 筋肉修復を目的として本発明の細胞製剤を使用する場合の投与量は、筋肉修復効果が得られる範囲であれば特に限定されず、投与箇所の大さ、疾患の部位、疾患の程度、患者の性別、体格等によって適宜設定され得る。例えば、損傷筋肉の単位容積10mLあたりの投与量としては、脂肪細胞数に換算して10～400万個、好ましくは20～200万個、更に好ましくは20～100万個が挙げられる。また、工程（1c）及び（2c）を含む下記方法（c）で得られる細胞製剤を用いる場合、例えば損傷筋肉の単位容積10mLあたり0.5～20mL、好ましくは1～10mL、更に好ましくは1～5mLが挙げられる。

[0039] 筋肉修復を目的として本発明の細胞製剤を使用する場合の投与方法は特に限定されず、従来公知の投与方法を採用することができ、例えば、筋肉損傷

部位に注射器、カニューレ等で注入する方法が挙げられる。

[0040] 2. 細胞製剤の調製方法

本発明においては、脂肪細胞を採取し、必要に応じて分離、濃縮を行い、本発明の細胞製剤として調製することができる。また、脂肪細胞と中胚葉系幹細胞を含む細胞製剤を調製する場合には、これらの細胞の混合物として採取したものを使用してもよく、それぞれの細胞を個別に採取し、その後、両者を混合して本発明の細胞製剤としてもよい。例えば、中胚葉系幹細胞が脂肪幹細胞である場合には、脂肪細胞と同じ組織から同時に調製でき簡便であるため、脂肪組織から脂肪細胞と脂肪幹細胞の混合物を得て、本発明の細胞製剤とすることが好ましい。また、より簡便には、これらの細胞を含む脂肪組織を使用してもよい。

[0041] 脂肪組織から本発明の細胞製剤を調製する場合、好ましい方法として、下記方法（a）～（c）が例示される。但し、脂肪以外の組織から本発明の細胞製剤を調製することを制限するものではなく、脂肪組織以外の組織（例えば、血液、骨髓液、筋等）から本発明の細胞製剤を調製する場合であっても下記方法に準じて、細胞の種類や性質を考慮し、適宜条件を設定して本発明の細胞製剤を調製することができる。以下、方法（a）～（c）についてそれぞれ詳述する。

[0042] 方法（a）

本発明の細胞製剤を調製する方法（a）は、（1 a）採取された脂肪から液体画分を除去し、細胞画分を得る工程を含む。

[0043] ここで、採取された脂肪とは、脂肪吸引、脂肪切除、除脂術等により脂肪組織から採取された、脂肪組織由来の細胞画分及び液体画分の混合物を指す。細胞画分には、脂肪細胞、脂肪幹細胞及び不純物（血球、死活細胞、老化細胞等）が含まれる。また、液体画分には、チュメセント液、細胞組織液等が含まれる。

[0044] 液体画分と細胞画分の分離は、簡便には、採取された脂肪を静置することによって細胞画分を沈降させて分離することができる。液体画分の除去方法

は特に限定されないが、例えば、デカンテーション、吸引等が挙げられる。
また、必要に応じて遠心分離、濾過等を行ってもよい。

[0045] 遠心分離及び濾過の条件は、脂肪細胞及び脂肪幹細胞を損傷せず、且つ不純物を除去できれば特に限定されないが、例えば、 $700 \sim 2500 \times g$ で1～15分間、好ましくは $2000 \sim 2200 \times g$ で5～10分間の条件が挙げられる。

[0046] また、濾過を行う場合であれば、採取された脂肪を、例えば $10 \sim 300 \mu m$ 、好ましくは $10 \sim 150 \mu m$ 、より好ましくは $10 \sim 100 \mu m$ 、更に好ましくは $15 \sim 20 \mu m$ の穴大きさを有する網目状フィルターを通過させることにより血液、組織液、脂肪を採取する箇所に投与された麻醉薬（チューメセント液）等を除去してフィルター上に脂肪細胞及び脂肪幹細胞の混合物を得ることができる。また、このような網目状フィルターを備えた容器に、採取された不純物を含む脂肪を充填し、遠心分離に供してもよい。

[0047] 斯して、液体画分が除去された、脂肪細胞（細胞外基質を含む）及び脂肪幹細胞を含む脂肪組織を得ることができ、これを本発明の細胞製剤として使用することができる。

[0048] 方法（b）

本発明の細胞製剤を調製する方法（b）は、下記工程を含むことを特徴とする。

（1 b）採取された脂肪から液体画分を除去し、細胞画分を得る工程；及び
（2 b）前記工程（1 b）で得られた細胞画分の少なくとも一部から脂肪細胞と脂肪幹細胞を分離する工程。

[0049] ここで、工程（1 b）は上記方法（1 a）に記載の通りである。工程（2 b）において、脂肪細胞を含む細胞製剤を調製する場合には、工程（1 b）において得られた細胞画分の全てを工程（2 b）の処理に供して、分離される脂肪細胞のみを使用することができる。また、脂肪細胞と脂肪幹細胞を含む細胞製剤を調製する場合には、工程（1 b）において得られた細胞画分の少なくとも一部、好ましくは半量から脂肪幹細胞を分離し、更にこれを工程

(1b) で得られた細胞画分に添加することによって、脂肪細胞と脂肪幹細胞を含む細胞製剤とすることができる。

[0050] ここで、脂肪幹細胞を分離する方法としては、例えば、特許文献1に記載の方法が挙げられる。より具体的には、細胞間の結合を分解することにより脂肪細胞と脂肪幹細胞を分離しやすくするために、細胞画分にタンパク質分解酵素を添加する。タンパク質分解酵素としては、コラゲナーゼ、トリプシン、リパーゼ等が例示され、これらから選択される1種を単独で使用してもよく、2種以上を組合せて使用することもできる。

[0051] 酵素処理された細胞画分から脂肪細胞と脂肪幹細胞を分離する方法としては、特に限定されず、従来公知の方法から適宜選択され得るが、例えば、遠心分離、濾過等が挙げられる。遠心分離の条件としては、脂肪細胞及び脂肪幹細胞を傷つけることなく分離できるものであれば特に限定されないが、例えば、100～500×gで1～20分、好ましくは100～300×gで5～10分間の条件が挙げられる。このような遠心分離に供することによって、脂肪幹細胞が沈殿物として得られ、上清中に脂肪細胞が濃縮される。また、濾過を行う場合であれば、細胞画分又はその懸濁液を10～100μm、好ましくは10～50μm、更に好ましくは15～20μmの穴大きさを有する網目状フィルターを通過させることによりフィルター上に脂肪幹細胞を得ることができ、濾液中に脂肪細胞を得ることができる。

[0052] 酵素処理された脂肪細胞及び脂肪幹細胞は、分離後、洗浄処理に供されることが好ましく、洗浄はリソ酸緩衝溶液(PBS)、生理食塩水、リンゲル液、デキストラン等により行うことができる。洗浄処理は、必要に応じて複数回繰り返してもよく、洗浄後に細胞を回収する際、必要に応じて遠心分離に供してもよい。遠心分離の条件としては前記の酵素処理された細胞画分から脂肪細胞と脂肪幹細胞を分離する際に採用される条件に従えばよい。

[0053] 本工程(2b)で分離される脂肪細胞を洗浄後、本発明の細胞製剤として使用することができる。本方法(b)で得られる脂肪細胞を用いて得られる本発明の細胞製剤は、骨間接合部の疾患に起因する痛みの緩和に優れた効果

を奏する。

[0054] 更に、本方法（b）は、前記工程（2 b）の後、前記工程（1 b）で得られた細胞画分と、工程（2 b）で得られた脂肪幹細胞とを混合する工程（3 b）を含んでもよい。本工程（3 b）では、工程（1 b）において得られた細胞画分と、工程（2 b）で得られた脂肪幹細胞を混合し、脂肪細胞及び脂肪幹細胞を含む細胞製剤を得ることができる。このようにして調製される細胞製剤は、脂肪幹細胞を高濃度で含み、骨間接合部の疾患に起因する痛みの緩和に有効であるのみならず、骨間接合部の組織再生に対して優れた効果を奏するものである。また、このような脂肪細胞及び脂肪幹細胞を含む細胞製剤は、損傷した筋肉に対して優れた筋肉修復効果を奏すると共に、筋肉損傷に起因する疼痛の緩和に対しても優れた効果を奏する。

[0055] 方法（c）

本発明の細胞製剤を調製する方法（c）は下記：

（1 c）採取された脂肪から液体画分を除去し、細胞画分を得る工程；ならびに

（2 c）前記工程（1 c）で得られた細胞画分から不純物を除去し、脂肪細胞及び脂肪幹細胞の濃縮物を得る工程、を含む。

[0056] ここで、工程（1 c）については、上記方法（1 a）に記載の通りである。工程（2 c）においては、細胞画分から不純物を除去して濃縮する。不純物除去及び濃縮の方法としては特に限定されず、従来公知の方法から適宜選択され得るが、簡便には、例えば特許文献3に記載されるウェイトフィルターを備えたシリンジを使用することにより、壊れた脂肪細胞から遊離したフリーオイル、死活細胞、老化細胞等の不純物が除去され、健全な脂肪細胞及び脂肪幹細胞の濃縮物が得られる。このようなシリンジは商業的に入手可能であり、具体的にはL I P O M A X - S C用に製造されたシリンジ（M e d i k a n C o r p . 製，韓国 ソウル）が例示される。

[0057] より具体的には、内部にフィルターが備えられたシリンジ中に採取された脂肪を充填し、遠心分離によって脂肪を液体画分と細胞画分に分離し、更に

フィルターによって、フリーオイル（排液オイル）が分離される。ここで分離される液体画分は、工程（1 c）において完全に分離されずに細胞画分中に混在していたものである。即ち、シリンジ中に、上層にフリーオイル、中間層に脂肪細胞及び脂肪幹細胞の濃縮物ならびに下層に液体画分が分離され、中間層以外を廃棄することによって健全な脂肪細胞及び脂肪幹細胞の濃縮物を得ることができ、これを本発明の細胞製剤として使用することができる。このようにして得られる細胞製剤は、健全な脂肪細胞と脂肪幹細胞が選択、濃縮されていることから、移植後の壊死、石灰化等を生じにくく、骨間接合部の疾患の症状の緩和及び治療、並びに損傷した筋肉の修復及び筋肉損傷による疼痛の緩和に一層有用である。

[0058] 前記脂肪を液体画分と細胞画分に分離するための遠心分離の条件としては、脂肪細胞及び脂肪幹細胞を損傷することなく、且つ不純物と脂肪細胞及び脂肪幹細胞が分離され得る条件であれば特に限定されないが、例えば、 $700 \sim 2500 \times g$ で $1 \sim 15$ 分間、好ましくは $2000 \sim 2200 \times g$ で $5 \sim 10$ 分間の条件が挙げられる。

[0059] また、フィルターの穴大きさは、脂肪細胞及び脂肪幹細胞が通過せず、且つ不純物が通過できる程度であれば特に限定されないが、例えば $10 \sim 300 \mu m$ 、好ましくは $10 \sim 150 \mu m$ 、より好ましくは $10 \sim 100 \mu m$ 、更に好ましくは $15 \sim 20 \mu m$ である。

[0060] また、本方法（c）は、工程（2 c）で得られた濃縮物の少なくとも一部から脂肪細胞と脂肪幹細胞を分離し、得られた脂肪幹細胞を、更に前記工程（2 c）で得られた濃縮物に混合する工程（3 c'）を含んでもよい。脂肪幹細胞の分離の方法は、上記方法（b）の工程（2 b）について記載される通りである。本工程（3 c'）において、タンパク質分解酵素を用いて脂肪幹細胞を分離した場合、工程（2 c）で得られた濃縮物 $1 cc$ あたり通常約 70 万個以上、好ましくは約 150 万個以上、更に好ましくは約 200 万個以上の脂肪幹細胞を得ることができる。本工程（3 c'）を経て調製される細胞製剤は、健全な脂肪細胞が選択、濃縮されていることに加え、脂肪幹細胞

胞をさらに高濃度で含むことから、骨間接合部の疾患の治療、及び損傷した筋肉の修復に対してより一層優れた治療効果を奏するものである。

[0061] また、本工程（3 c'）で分離される脂肪細胞を、洗浄後、本発明の細胞製剤として使用することができる。ここで得られる脂肪細胞は、健全な脂肪細胞が選択、濃縮されているため、骨間接合部の疾患や筋肉損傷に起因する痛みの緩和により一層優れた効果を奏するものである。

[0062] また、本方法（c）は、前記工程（2 c）の後、得られた濃縮物中の脂肪細胞を微細化し、微細化された脂肪細胞及び脂肪幹細胞を混合物として分離する工程（3 c''）を含んでもよい。脂肪細胞を微細化は、当該技術分野において通常採用される方法により行うことができ、特に限定されないが、例えば、必要に応じてドリル等によって脂肪細胞をカッティングした後、微細化された脂肪細胞と脂肪幹細胞の混合物を分離する。分離方法としては、前記遠心分離の条件を採用することができる。本工程（3 c''）を行う際、前記工程（2 c）の後、濃縮物をシリンジに充填したまま、脂肪細胞の微細化および遠心分離に供してもよい。遠心分離後、シリンジ中にフリーオイルと、微細化された脂肪細胞及び脂肪幹細胞の混合物とが分離されるため、フリーオイルを廃棄し、微細化された脂肪細胞及び脂肪幹細胞の混合物を得ることができる。

[0063] このような分離工程を経ることにより微細な脂肪細胞と脂肪幹細胞を高濃度で含有する細胞製剤を調製することができる。ここで、微細な脂肪細胞とは、26～30ゲージ、好ましくは18～30ゲージの注射針を通過できる程度の大きさを有する脂肪細胞を指す。本工程（3 c''）において、脂肪細胞を微細化する処理を少なくとも1回、好ましくは1～数回、より好ましくは1～2回行うことができる。脂肪細胞を微細化することによって、細胞製剤の単位容積あたりの脂肪幹細胞の濃度を高くすることができ、骨間接合部の疾患や筋肉損傷に由来する疼痛の緩和効果、骨間接合部内の組織再生効果、及び筋肉修復効果がより一層顕著に発揮される。

[0064] また、工程（3 c''）で得られた微細化された脂肪細胞と脂肪幹細胞の

混合物の少なくとも一部から脂肪幹細胞を分離し、得られた脂肪幹細胞を前記工程（２ｃ）で得られた濃縮物に混合する工程（４ｃ'）を含んでもよい。脂肪幹細胞の分離の方法は、上記方法（ｂ）の工程（２ｂ）について記載される通りである。

[0065] 本工程（４ｃ'）で脂肪幹細胞が分離されて得られる脂肪細胞を、洗浄後、本発明の脂肪細胞を含む細胞製剤として使用することができる。洗浄は、前述の脂肪幹細胞に対して行う洗浄処理と同様の方法によって行うことができる。ここで得られる脂肪細胞は、健全な微細化された脂肪細胞が選択、濃縮されているため、骨間接合部の疾患や筋肉損傷に起因する痛みの緩和に更に顕著に優れた効果を奏するものである。

[0066] 本方法（ｃ）において、特許文献３に記載されるシリンジを使用することにより、細胞を外気に接触させることなく全ての工程を実施することができる。例えば、特許文献３に記載されるシリンジにカニューレ等を装着して脂肪吸引により採取された脂肪を充填し、そのまま不純物の除去及び濃縮処理等に供し、細胞製剤を得ることができる。その後、細胞製剤を投与する際も、シリンジから直接、細胞製剤を注入するためのシリンジに移し、患部に投与することができるため、汚染等の問題のない安全性の高い細胞製剤とすることができる。簡便には、本方法（ｃ）を商業的に入手可能なキットを使用してもよい。そのようなキットとしては、具体的には、LIPOMAX-SC（MEDIKAN Corp. 製）等が例示される。

[0067] 以上のいずれの方法によっても、本発明の細胞製剤を得ることができるが、好ましくは方法（ｂ）又は（ｃ）であり、より好ましくは方法（ｃ）、更に好ましくは方法（ｃ）の工程（３'）又は工程（４'）を経て調製される、微細化された脂肪細胞を含む細胞製剤であることが好ましい。方法（ｃ）の工程（４'）を経て得られる微細化された脂肪細胞を含む細胞製剤は、不純物が除去され、微細化された健全な脂肪細胞を高濃度で含有するものであり、骨間接合部の疾患の治療（特に痛みの緩和）に対して顕著な効果を奏する。方法（ｃ）の工程（３'）を経て得られる微細化された脂肪細胞

胞及び脂肪幹細胞を含む細胞製剤は、微細化された健全な脂肪細胞に加え、脂肪幹細胞を高濃度で含有する。このような細胞製剤は、骨間接合部の疾患の治療、及び筋肉修復に対して更に顕著に優れた効果を発揮することができる。

[0068] 3. 骨間接合部の疾患に起因する疼痛緩和方法

本発明は、脂肪細胞を含む細胞製剤を、骨間接合部の疾患を有する患者の骨間接合部に投与する工程を含むことを特徴とする、骨間接合部の疼痛を緩和する方法を提供する。

[0069] 本発明の疼痛を緩和する方法において使用される脂肪の採取方法、脂肪細胞の分離方法、細胞製剤の調製方法、患者への投与方法等については、前記「1. 細胞製剤」及び「2. 細胞製剤の調製方法」の欄に記載の通りである。本発明の疼痛を緩和する方法においては、治療的有効量の細胞製剤を、骨間接合部の疼痛の緩和を必要とする患者に投与する。投与形態は特に限定されず、疼痛緩和が期待される位置、範囲、患者の年齢等に応じて従来公知の方法から適宜選択することができる。

[0070] 4. 骨間接合部の組織再生方法

本発明は、脂肪細胞及び中胚葉系幹細胞を含む細胞製剤を、骨間接合部の疾患を有する患者の骨間接合部に投与する工程を含むことを特徴とする、骨間接合部の組織再生方法を提供する。

[0071] 本発明の組織再生方法において使用される脂肪の採取方法、中胚葉系幹細胞の分離方法、細胞製剤の調製方法、患者への投与方法等については、前記「1. 細胞製剤」及び「2. 細胞製剤の調製方法」の欄に記載の通りである。本発明の組織再生方法においては、治療的有効量の細胞製剤を、組織再生を必要とする患者に投与する。投与形態は特に限定されず、再生が期待される組織の種類、位置、範囲、患者の年齢等に応じて従来公知の方法から適宜選択することができる。

[0072] 5. 筋肉修復方法

本発明は、脂肪細胞及び中胚葉系幹細胞を含む細胞製剤を、筋肉損傷を有

する患者の筋肉損傷部位に投与する工程を含むことを特徴とする、筋肉修復方法を提供する。

[0073] 本発明の筋肉修復方法において使用される脂肪の採取方法、中胚葉系幹細胞の分離方法、細胞製剤の調製方法、患者への投与方法等については、前記「1. 細胞製剤」及び「2. 細胞製剤の調製方法」の欄に記載の通りである。本発明の筋肉修復方法においては、治療的有効量の細胞製剤を、筋肉修復を必要とする患者の筋肉損傷部位に投与する。投与形態は特に限定されず、筋肉修復が期待される位置、範囲、患者の年齢等に応じて従来公知の方法から適宜選択することができる。

[0074] 6. その他

本発明は、骨間接合部の疾患の治療剤の製造のための脂肪細胞を含む細胞製剤の使用、骨間接合部の疾患の治療に使用される脂肪細胞を含む細胞製剤を提供する。更に、本発明は、筋肉修復剤の製造のための脂肪細胞及び中胚葉系幹細胞を含む細胞製剤の使用、ならびに筋肉修復に使用される脂肪細胞及び中胚葉系幹細胞を含む細胞製剤を提供する。脂肪細胞、中胚葉系幹細胞、細胞製剤、骨間接合部の疾患、筋肉損傷等に関しては前述の通りである。

実施例

[0075] 細胞製剤の調製

細胞製剤の調製には、L I P O M A X - S C (M e d i k a n C o r p . 製, 韓国 ソウル) キットを使用した。本細胞製剤の調製工程においては、細胞を全く外気に触れさせることなく行うことが可能であった。具体的な方法は以下の通りである。

[0076] (i) シリンジ (L I P O M A X - S C 用に製造されたシリンジ: M e d i k a n C o r p . 製, 韓国 ソウル) を用いて、各被験者から脂肪吸引を行った。採取された脂肪を含むシリンジを約 10 分間室温 (約 25℃) で静置して細胞画分と液体画分に分離し、チューメセント液が含まれる液体画分を廃液した。残された細胞画分を、脂肪組織として試験例 2 に使用した。その後、シリンジを 2200 × g で 8 分間遠心分離にかけた。遠心分離により、上層

(フリーオイル)、中間層(脂肪細胞及び脂肪幹細胞)、下層(細胞組織液等の液体画分)の三層に分離した。その後、中間層のみをシリンジ内に残して上下層を廃棄することにより、脂肪細胞と脂肪幹細胞の濃縮物を得た。この濃縮物に対してジェリリング(Gel l i n g)処理を行い、比較的大きな脂肪細胞の微細化を行った。ジェリリング処理は、1～3回行った。ジェリリングには、ドリル(F i l l e r G e l l e r カッター: M E D I K A N 社製)を用い、脂肪細胞をカッティングして微細化し、更に2200×gで5分間遠心分離することにより、微細化された脂肪細胞と脂肪幹細胞を含む混合物を得た。斯して得られた混合物を、微細化された脂肪細胞と脂肪幹細胞を含む細胞製剤として下記試験例2～5において使用した。

[0077] (ii)次に脂肪幹細胞の抽出を行った。前記工程(i)で得られた脂肪細胞及び脂肪幹細胞の混合物に、当該混合物と同量のタンパク質分解酵素(商品名: コラゲナーゼ; W o r t h i n g t o n B i o c h e m i c a l C o r p . 製)の0.4%水溶液を添加し、穏やかに振とうし、その後38℃で45分間インキュベーションを行った。

[0078] (iii)インキュベーション後、200×gで5分間遠心分離を行い、上清を採取した。この上清には脂肪細胞が濃縮され、沈殿には脂肪幹細胞が濃縮されていた。

[0079] (iv)次に、工程(iii)で得られた沈殿(脂肪幹細胞の濃縮物)2～3mLに対し、デキストラン(大塚製薬(株)製)を約50mL添加し、穏やかに振とうした後、200×gで5分間遠心分離を行って上清を廃棄することにより、脂肪幹細胞の洗浄を行った。この操作を3回繰り返した。本工程により得られる脂肪幹細胞の濃縮物を、下記試験例1の比較対照群において使用した。また、工程(iii)で得られた脂肪細胞を含む上清を、同様の洗浄処理に供した後、脂肪細胞(及び細胞外基質)として下記試験例1において使用した。

[0080] なお、脂肪細胞及び脂肪幹細胞は各患者由来のものを使用したため、上述の操作を各患者について行った。

[0081] 試験例1. 変形性関節症に起因する疼痛緩和効果(1)

上記工程(iv)で得られた脂肪細胞（細胞外基質を含む）を、変形性膝関節症を有する被験者に投与し、症状の変化を観察した。

被験者は女性2名（4症例（両被験者共に両膝関節に疾患あり）：平均年齢68.5歳）であった。脂肪は、各被験者の下腹部から採取されたものを使用した。脂肪採取量はそれぞれ102 mL、95 mLであった。採取された脂肪から上記細胞製剤の調製方法に従って脂肪細胞（細胞外基質を含む）を得て、各被験者の膝関節にそれぞれ7 mL注入した。また、変形性膝関節症を有する別の2名の被験者を比較対照群として、ヒアルロン酸（スベニール（中外製薬(株)製）：2.5 mL）、又は上記工程(iv)において得られた脂肪幹細胞7 mL（脂肪採取部位はいずれも下腹部；脂肪採取量は、それぞれ102 mL、95 mL）を膝関節に注入した。本試験例1においては、膝関節に注入を行う際、カニューレの先端を前後左右に回転させて注入部位を刺激する操作は行わなかった。

[0082] その結果、脂肪細胞を注入した被験者では、注入当日から膝関節痛が軽減され、その効果が約1か月に亘って持続した。また、ヒアルロン酸又は脂肪幹細胞を注入した被験者に比べると、膝関節痛の緩和効果が明らかに早期から発現され、痛みの緩和効果も顕著であった。

[0083] 試験例2. 変形性関節症に起因する疼痛緩和効果（2）

上記工程(i)で得られた脂肪組織を、変形性膝関節症を有する被験者に投与し、症状の変化を観察した。なお、被験者は女性3名（6症例（各被験者とも両膝関節に疾患あり）：平均年齢69.7歳）であった。脂肪は、各被験者の下腹部から採取されたものを使用した。脂肪採取量はそれぞれ95 mL、100 mL、105 mLであった。採取された脂肪から上記細胞製剤の調製方法の工程(i)に従って脂肪組織を得て、各被験者の膝関節にそれぞれ7 mL注入した。また、変形性膝関節症を有する別の1名の被験者を比較対照として、ヒアルロン酸（スベニール（中外製薬(株)製）：2.5 mL）を膝関節に注入した。本試験例2においては、膝関節に注入を行う際、カニューレの先端を前後左右に回転させて注入部位を刺激する操作は行わなかった。

[0084] その結果、脂肪組織を注入した被験者 3 名は、いずれもヒアルロン酸を注入した被験者よりも関節痛の緩和効果が早く出現し、その効果が 1 か月以上に亘って持続した。

[0085] 試験例 3. 変形性関節症に対する組織再生効果

変形性膝関節症の女性 9 名（14 症例：平均年齢 68.7 歳）に対して、上記工程(i)で調製された微細化された脂肪細胞及び脂肪幹細胞を含む細胞製剤（5～10 mL、脂肪幹細胞を約 75 万～200 万個を含む）を、先端が斜めにカットされたカニューレを用いて膝関節に注入した。疾患部位、脂肪吸引の具体的な部位、採取された脂肪の量、細胞製剤の注入量、カニューレの先端を前後左右に回転させることにより注入部位を刺激する操作の有無については下表 1 に示される。各被験者に対する処置、膝関節裂隙の計測結果、及び変形性膝関節症の X 線所見の評価基準となっている K e l l i g r e n & L a w r e n c e 分類による評価結果を下表 1 に要約する。

[0086]

[表1]

		被験者A		被験者B		被験者C		被験者D		被験者E		被験者F		被験者G		被験者H		被験者I	
変形性膝関節症		左		右	左	右		右	左	右		左	左		右	左	右		左
脂肪採取部位		下腹部		下腹部		下腹部		大腿部		下腹部		下腹部		下腹部		下腹部		大腿部	
脂肪採取量		50mL		82mL		90mL		80mL		94mL		76mL		76mL		96mL		102mL	
注入時にカニューレによる注入部位を刺激する操作の有無		+		+	+	+		++	++	+		+	+		+	－	－	+	+
細胞製剤の注入量		5mL		7mL	7mL	8ml		7mL	8mL	6mL		7mL	7mL	8mL		6mL	6mL	8mL	9mL
関節裂隙 (mm)	治療前	2	0	0	－		－	－	－	－	－	1. 6	0	*	*	2. 4	－		
	治療後	3. 3	2. 6	2. 6	－		－	－	－	－	3	1. 8	4. 4			－			
Kellgren& Lawrence 分類 (Grade)	治療後 日数	3週 間半	5週間		13 週間		12週間		7週間		11 週間		7週間半		8週間		2 週間		
	治療前	Ⅳ	Ⅳ	Ⅳ	Ⅱ		Ⅲ	Ⅳ	Ⅱ	Ⅱ	Ⅳ		Ⅲ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	－		
	治療後	Ⅱ	Ⅱ	Ⅱ	Ⅰ		Ⅱ	Ⅲ	Ⅰ	Ⅰ	Ⅱ		Ⅱ	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	－		

※表中、変形性膝関節症に関し、左は左膝、右は右膝に疾患があることを表す。

※表中、注入時にカニューレによる注入部位を刺激する操作の有無に関し、+は刺激有り、++は強い刺激有り、—は刺激無しを表す。

※表中、関節裂隙の大きさに関し、—は計測していないことを表し、*は治療前後で殆ど大きさが変化していないことを表す。

※表中、治療後日数は、Kellgren&Lawrence分類によるGradeが変化するまでの治療からの経過日数を指す。

※表中、Kellgren&Lawrence分類に関し、—は治療からの経過日数が少ないため評価していないことを示す。

[0087] また、K e l l i g r e n & L a w r e n c e 分類の具体的な評価項目及び評価基準は以下の通りである。

[表2]

Grade	関節裂隙狭小化	骨棘形成	硬化像	関節輪郭の変形
I	疑い	可能性あり	なし	なし
II	可能性あり	明確	なし	なし
III	明確	中程度	中程度	可能性あり
IV	中程度	著明	著明	明確

[0088] 代表例として下記被験者 A 及び B の膝関節の X 線写真を図 1 及び 2 に示す。

被験者 A

施術時年齢 7 2 歳 女性

既往症：変形性膝関節症（左膝）

細胞製剤 5 m L を左膝関節に注入した。細胞製剤の注入前及び注入から約 1 か月後に撮影した被験者 A の左膝関節外側関節裂隙の X 線写真を図 1 に示す。

[0089] 被験者 B

施術時年齢 6 0 歳 女性

既往症：変形性膝関節症（左右両膝）

細胞製剤それぞれ 7 m L ずつを左右の膝関節に注入した。細胞製剤の注入前及び注入から約 1 か月後に撮影した被験者 B の左右膝関節内側関節裂隙の X 線写真を図 2 に示す。

[0090] （結果）

治療当日～5 日以内（平均 2 日）で全被験者において膝関節の疼痛が顕著に改善し、その後も疼痛改善状態が持続していた。また、杖歩行をしていた 2 名は杖なしで歩行することができた。さらに、立ち上がり困難の 2 名は立ち上がり可能になり、全被験者で歩行が顕著に改善した。

[0091] 代表被験者 A 及び B の X 線写真所見によると、変形性関節症の改善及び関

節裂隙の拡大が示された。即ち、図1に示されるように、被験者Aの左膝関節は、治療前では関節裂隙が2.0mmであったところ（図1（a））、治療後約1か月で3.3mmまで拡大した（図1（b））。より具体的には、治療前ではKellgren & Lawrence分類のⅢであったところ、治療から約1か月でⅡまで症状が改善された。また、図2に示されるように、被験者Bの左右膝関節は、治療前では関節裂隙が0mmであったところ（図2（a））、治療後約1か月で2.6mmまで拡大した（図2（b））。より具体的には、治療前ではKellgren & Lawrence分類のⅢであったところ、治療から約1か月でⅡまで症状が改善された。

[0092] 本試験例3の結果より、変形性膝関節症を有する被験者の膝関節に、微細化された脂肪細胞及び脂肪幹細胞を含む細胞製剤を注入することによって、膝関節内の組織再生が促されたことが示された。これに対して、上記試験例1の比較対照群として脂肪幹細胞が注入された被験者についてのX線写真の所見では、組織再生は認められるものの、組織再生の進行速度や症状の改善は、被験者A及びBに比べ明らかに遅かった。

[0093] 試験例4. 骨壊死に対する組織再生効果

変形性膝関節症に加え、骨壊死を合併していた試験例3の被験者A、B及びJの3名に対し、上記工程（i）で調製された微細化された脂肪細胞及び脂肪幹細胞を含む細胞製剤（5～10mL脂肪幹細胞を約75～200万個を含む）を、骨壊死部位に注入した。被験者Jに関し、疾患部位、脂肪吸引の具体的な部位、採取された脂肪の量、細胞製剤の注入量について下表3に示す。また、被験者Aの膝関節MR画像を代表例として図3に示す。

[0094]

[表3]

		被験者 J	
変形性膝関節症		右	左
脂肪採取部位		下腹部、両大腿部	
脂肪採取量		212 mL	
注入時にカニューレによる注入部位を刺激する操作の有無		+	+
細胞製剤の注入量		10 mL	9 mL
治療前の骨壊死像の有無		有り	有り
Kellgren & Lawrence 分類 (Grade)	治療後 日数	12 週間	12 週間
	治療前	I V	I V
	治療後	I I I	I I I

[0095] いずれの被験者においても、細胞製剤を関節内に注入直後～2日以内に歩行困難、疼痛等の症状が著しく改善された。また、被験者 J について、表 3 に示されるように治療前では K e l l g r e n & L a w r e n c e 分類の I V であったところ、治療から約3か月で I I I まで症状が改善された。更に、被験者 A の膝関節の M R 画像（図 3）に示されるように、関節内に細胞製剤を注入後 1 か月において骨壊死像の著しい改善が認められ、3 か月後には骨壊死が消失していた。被験者 A 及び B の膝関節についての M R 画像を撮影したところ、いずれの被験者でも細胞製剤を注入後 1 か月～3 か月で骨壊死像及び骨浮腫像の改善又は消失が見られた。

[0096] 試験例 5. 筋肉修復効果

大腿四頭筋損傷、上腕三角筋損傷又は大胸筋損傷を有する被験者（男性 4 名：平均年齢 37.8 歳、女性 20 名：平均年齢 33.8 歳）に対し、上記工程（i）で調製された微細化された脂肪細胞及び脂肪幹細胞を含む細胞製剤（10～50 mL、脂肪幹細胞を約 400～2000 万個を含む）を、筋肉を損傷している部位に注入した。細胞製剤の調製には、被験者の下腹部又は大腿部から採取された脂肪（脂肪採取量：50～200 mL）を使用した。

[0097] 細胞製剤を注入後の筋肉損傷に起因する痛みの改善については、注入後か

ら殆ど痛みを感じることがない（８名：女性）、注入後からあまり痛みを感じることがない（４名：男性）、注入後１日で痛みが消失した（１０名：女性）、注入後２～３日で痛みが消失した（２名：女性）となった。即ち、脂肪細胞及び脂肪幹細胞を含む細胞製剤の注入により、早期から筋肉損傷による痛みが改善されることが示された。

[0098] また、細胞製剤を注入後３週間～１か月以内に全ての被験者において、上肢の関節可動域（ROM：Range of Motion）が拡大され、運動機能の改善が認められた。即ち、筋肉損傷部位に前記細胞製剤を投与することにより筋肉が修復されることが示された。

[0099] ３．まとめ

以上より、脂肪細胞を変形性膝関節症の患者の患部に注入すると、骨間接合部の疾患に起因する痛みを早期に緩和することができ、しかもその効果が長期に亘って持続することが示された（試験例１）。また、脂肪組織を注入した場合には、試験例１と同様に早期に痛みが緩和され、その効果の持続がより一層長期に亘って持続した（試験例２）。更に、微細化された脂肪細胞及び中胚葉系幹細胞（脂肪幹細胞）を高濃度で含む細胞製剤を患部に注入することにより、前述の疼痛緩和効果に加えて、患部組織の再生が促された（試験例３）。しかも、脂肪幹細胞のみを注入した場合（試験例１の比較対照群）と、微細化された脂肪細胞及び脂肪幹細胞を含む細胞製剤を注入した場合（試験例３）を比較すると、微細化された脂肪細胞及び脂肪幹細胞を含む細胞製剤を注入した場合には、組織再生効果が相乗的に高められた。また、微細化された脂肪細胞及び脂肪幹細胞を含む細胞製剤を骨壊死部位（試験例４）に注入すると、壊死していた部分の骨組織の再生が認められた。更に、脂肪細胞及び中胚葉系幹細胞を筋肉損傷部位に投与することにより筋肉が修復されることが示された（試験例５）。脂肪細胞と、脂肪幹細胞のような中胚葉系幹細胞とを組合せて用いると、脂肪細胞（細胞外基質を含む）のはたらしによって、中胚葉系幹細胞が患部に保持され、中胚葉系幹細胞の生着効率や組織再生効率が高められると考えられる。

[0100] 以上の試験例より、本発明の細胞製剤は骨間接合部の疾患の治療、及び筋肉修復に優れた効果を奏することが示された。

請求の範囲

- [請求項1] 脂肪細胞を含む、骨間接合部の疾患を治療するための細胞製剤。
- [請求項2] 更に、中胚葉系幹細胞を含む、請求項1に記載の細胞製剤。
- [請求項3] 前記中胚葉系幹細胞が脂肪幹細胞である、請求項1に記載の細胞製剤。
- [請求項4] 脂肪細胞1個に対して中胚葉系幹細胞が1～10個含まれる、請求項1に記載の細胞製剤。
- [請求項5] 前記脂肪細胞が γ 線照射された細胞である、請求項1に記載の細胞製剤。
- [請求項6] 前記骨間接合部の疾患が、脊椎疾患、関節疾患、自己免疫疾患及び骨壊死症からなる群より選択されるいずれか1種である、請求項1に記載の細胞製剤。
- [請求項7] 骨間接合部の疾患の治療剤の製造のための脂肪細胞を含む細胞製剤の使用。
- [請求項8] 骨間接合部の疾患の治療に使用される脂肪細胞を含む細胞製剤。
- [請求項9] 脂肪細胞を含む細胞製剤を、骨間接合部の疾患を有する患者の骨間接合部に投与する工程を含む、骨間接合部の疼痛を緩和する方法。
- [請求項10] 脂肪細胞及び中胚葉系幹細胞を含む細胞製剤を、骨間接合部の疾患を有する患者の骨間接合部に投与する工程を含む、骨間接合部の組織再生方法。
- [請求項11] 脂肪細胞及び中胚葉系幹細胞を含む、筋肉修復用細胞製剤。
- [請求項12] 前記中胚葉系幹細胞が脂肪幹細胞である、請求項11に記載の細胞製剤。
- [請求項13] 脂肪細胞1個に対して中胚葉系幹細胞が1～10個含まれる、請求項11に記載の細胞製剤。
- [請求項14] 前記脂肪細胞が γ 線照射された細胞である、請求項11に記載の細胞製剤。
- [請求項15] 筋肉修復用製剤の製造のための脂肪細胞及び中胚葉系幹細胞を含む細

胞製剤の使用。

- [請求項16] 筋肉修復に使用される脂肪細胞及び中胚葉系幹細胞を含む細胞製剤。
- [請求項17] 脂肪細胞及び中胚葉系幹細胞を含む細胞製剤を、筋肉損傷を有する患者の筋肉損傷部位に投与する工程を含む、筋肉修復方法。