

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-158498

(P2017-158498A)

(43) 公開日 平成29年9月14日(2017.9.14)

(51) Int.Cl.

A O 1 K 67/027 (2006.01)

F I

A O 1 K 67/027

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願2016-47371 (P2016-47371)
(22) 出願日 平成28年3月10日 (2016.3.10)(71) 出願人 000173809
一般財団法人電力中央研究所
東京都千代田区大手町1丁目6番1号
(74) 代理人 100107515
弁理士 廣田 浩一
(74) 代理人 100107733
弁理士 流 良広
(74) 代理人 100115347
弁理士 松田 奈緒子
(74) 代理人 100163038
弁理士 山下 武志
(72) 発明者 高橋 正行
千葉県我孫子市我孫子1646 一般財団
法人電力中央研究所 環境科学研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 大腿骨髄腔への注入方法、血液再構築モデル動物の作製方法、及びこれらに用いる穿刺補助器具

(57) 【要約】

【課題】 より簡便で、かつ高確率により大腿骨髄腔に注入することができる方法の提供。

【解決手段】 非ヒト動物の大腿骨髄腔に対して略垂直に穿刺針を穿刺し、前記穿刺針を介して、液体を前記大腿骨髄腔に注入する大腿骨髄腔への注入方法である。前記穿刺針の穿刺部位が、大腿骨体、内側顆部、及び外側顆部から選択される少なくとも1種である態様、前記非ヒト動物が、非ヒト免疫不全動物である態様、前記液体が、細胞及び薬剤の少なくともいずれかである態様などが好ましい。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

非ヒト動物の大腿骨髓腔に対して略垂直に穿刺針を穿刺し、前記穿刺針を介して、液体を前記大腿骨髓腔に注入することを特徴とする大腿骨髓腔への注入方法。

【請求項 2】

前記穿刺針の穿刺部位が、大腿骨体、内側顆部、及び外側顆部から選択される少なくとも 1 種である請求項 1 に記載の大腿骨髓腔への注入方法。

【請求項 3】

前記非ヒト動物が、非ヒト免疫不全動物である請求項 1 から 2 のいずれかに記載の大腿骨髓腔への注入方法。

【請求項 4】

前記液体が、細胞及び薬剤の少なくともいずれかである請求項 1 から 3 のいずれかに記載の大腿骨髓腔への注入方法。

【請求項 5】

前記細胞の注入濃度が、 5×10^5 個/mL 以上 5×10^8 個/mL 以下である請求項 4 に記載の大腿骨髓腔への注入方法。

【請求項 6】

請求項 1 から 5 のいずれかに記載の大腿骨髓腔への注入方法に用いられる穿刺器具の穿刺針の基端に取り付ける穿刺補助器具であって、

大腿骨への前記穿刺針の穿刺深さを調節することを特徴とする穿刺補助器具。

【請求項 7】

前記穿刺深さが、2 mm 以上 5 mm 以下である請求項 6 に記載の穿刺補助器具。

【請求項 8】

非ヒト免疫不全動物における大腿骨髓腔に対して略垂直に穿刺針を穿刺し、前記穿刺針を介して、ヒト造血幹細胞を、大腿骨髓腔に注入して移植させ、血液再構築モデル動物を作製することを特徴とする血液再構築モデル動物の作製方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、大腿骨髓腔への注入方法、血液再構築モデル動物の作製方法、及びこれらに用いる穿刺補助器具に関する。

【背景技術】

【0002】

医療・創薬・毒性評価等、多岐に亘る分野の研究において、免疫不全マウスにヒト造血幹細胞を移植し、血液再構築マウスを作製することが行われている。

【0003】

前記ヒト造血幹細胞の移植する部位としては、静脈や骨髓等が有効であることが知られている。また、前記移植においては、静脈に移植するよりも骨髓に移植する方が、血液再構築マウス作製効率が 1.5 倍以上高いことが知られている（例えば、非特許文献 1 参照）。そのため、静脈に移植するよりも高い効率において血液の再構築ができる骨髓への移植が望まれている。

しかし、ヒト造血前駆細胞の骨髓への移植は、手技に熟練を要することから、成功率高く移植操作を実施することは難しいとされている。また、それによる、高価な細胞と高価な免疫不全マウスとの浪費も問題とされている。そのため、ヒト造血幹細胞を移植する部位として、静脈が多く選択されている。

【0004】

ここで、骨髓における移植部位としては、脛骨、大腿骨などが知られている。しかし、前記大腿骨は、分厚い筋肉に覆われているため移植が困難であるという問題がある。

そこで、前記脛骨は、外観から骨の角度（方向）を認識しやすく、固定が容易であることから、関節部から脛骨の近位端に、シリンジ針を穿刺して、造血幹細胞を脛骨に移植す

10

20

30

40

50

ることが提案されている（例えば、特許文献 1 及び非特許文献 2 参照）。

しかし、前記脛骨は、髓腔が非常に狭いことから、シリンジ針の先を挿入できる空間が狭く、移植時のシリンジ針の角度や力加減の調節が非常に困難であるという問題がある。

そのため、静脈移植より血液再構築マウス作製効率が高い骨髓移植において、より簡便で、かつ高確率に骨髓腔に注入する方法が望まれている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献 1】特開 2014 - 140336 号公報

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献 1】Yahata, T, et al. Blood, 101(8), 2905 - 2913 (2003)

【非特許文献 2】Pfeiffenberger, U, et al. Laboratory Animals, 49(2), 121-131 (2015)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、従来における前記諸問題を解決し、以下の目的を達成することを課題とする。即ち、本発明は、より簡便で、かつ高確率に大腿骨髓腔に注入することができる方法を

提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

前記課題を解決するための手段としては、以下のとおりである。即ち、本発明の大腿骨髓腔への注入方法は、非ヒト動物の大腿骨髓腔に対して略垂直に穿刺針を穿刺し、前記穿刺針を介して、液体を前記大腿骨髓腔に注入する。

【発明の効果】

【0009】

本発明によると、従来における前記諸問題を解決し、前記目的を達成することができ、より簡便で、かつ高確率に大腿骨髓腔に注入することができる方法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図 1】図 1 は、本発明の穿刺補助器具の一例を示す概略断面図である。

【図 2】図 2 は、実施例 1 における大腿骨髓腔からの液体の漏出の有無を確認した写真である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

(大腿骨髓腔への注入方法)

本発明の大腿骨髓腔への注入方法は、非ヒト動物の大腿骨髓腔に対して略垂直に穿刺針を穿刺し、前記穿刺針を介して、液体を前記大腿骨髓腔に注入する注入工程を含み、更に必要に応じてその他の工程を含む。

【0012】

本発明者らは、鋭意検討を重ねた結果、非ヒト動物における大腿骨への細胞等の液体の注入について、以下のことを知見した。

前記大腿骨は、脛骨と比較して、髓腔が広く、穿刺して、細胞等の液体を注入しやすいという点から有利である。

従来の大腿骨への細胞等の液体の注入方法としては、細胞の脛骨への移植と同様に、膝関節を 90° に折り曲げて固定し、膝蓋靭帯より少し上から、大腿骨に対して平行方向から、膝蓋面に穿刺針を挿入して、大腿骨髓腔に細胞を注入している。この場合、大腿骨を

10

20

30

40

50

覆う分厚い筋肉、靭帯等により、前記膝蓋面への穿刺角度の把握が困難であるため、目的とする位置に穿刺することができないという問題がある。

そこで、穿刺部位を、大腿骨髄腔に対して略垂直に穿刺針を穿刺することにより、大腿骨を安定に固定することができ、また、大腿骨髄腔に対して略垂直に穿刺針を穿刺する部位は、膝蓋面と比較して穿刺できる面積が広く、穿刺しやすいという利点があることを知見した。

【 0 0 1 3 】

< 穿刺 >

前記穿刺は、大腿骨髄腔に対して略垂直に行う。

前記大腿骨髄腔に対して略垂直とは、大腿骨の長手方向に対して略垂直であることを意味する。 10

前記略垂直とは、前記大腿骨への入射角が 0 ° 以上 3 0 ° 以下であることを意味する。

【 0 0 1 4 】

前記穿刺部位としては、大腿骨髄腔に対して、略垂直に穿刺針を穿刺することができれば特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、穿刺できる面積が大きく、及び固定がしやすい点から、例えば、大腿骨体、内側顆部、外側顆部などが挙げられる。これらの中でも、大腿骨体、内側顆部が好ましい。

【 0 0 1 5 】

前記穿刺を行う器具としては、先端の尖った中空の器具であれば特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、注射筒と穿刺針とを有する穿刺器具などが挙げられる。 20

前記穿刺針の内径としては、大腿骨に孔を開け、かつ液体を注入できれば特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、0 . 1 0 mm 以上 1 . 0 mm 以下が好ましく、0 . 1 2 mm 以上 0 . 3 mm 以下がより好ましい。

前記注射筒、及び穿刺針としては、市販品を用いることができ、前記市販品としては、例えば、テルモ株式会社製、株式会社夏目製作所製、ニプロ株式会社製、ベクトンディッキンソン・アンド・カンパニー社製などが挙げられる。

前記注射筒の市販品としては、例えば、商品名：テルモシリンジ（テルモ株式会社製）、商品名：ニプロシリンジ（ニプロ株式会社製）などが挙げられる。

前記穿刺針の市販品としては、例えば、商品名：テルモ注射針（テルモ株式会社製）、商品名：フローマックス（ニプロ株式会社製）などが挙げられる。 30

これらの中でも、BD プラスチパックTM 29G インスリン皮下投与用針付注射筒（ベクトンディッキンソン・アンド・カンパニー社製、注射針、注射筒一体型）が好ましい。

【 0 0 1 6 】

< 注入 >

前記注入としては、液体を大腿骨髄腔に入れることができれば特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

前記注入としては、液体を充填した注射筒と、前記注射筒に穿刺針を取り付けた穿刺器具を用いることができる。 40

前記液体の注入としては、大腿骨を固定して、前記穿刺器具における穿刺針を、大腿骨表面に接触させ、前記穿刺針を押圧しながら、ゆっくりと左右に回転させることにより、大腿骨に穿刺針径の孔を形成し、形成した孔から穿刺針を大腿骨髄腔に挿入する。ここで、穿刺針が、大腿骨髄腔に挿入できていることは、注射筒から手を離れた時に、穿刺器具が転倒せず、直立するか否かで確認することができ、穿刺器具が直立する場合は、穿刺針が大腿骨髄腔に挿入できていると判断できる。次に、穿刺針が大腿骨髄腔に挿入された状態において、前記液体を大腿骨髄腔に注入することができる。

【 0 0 1 7 】

< < 液体 > >

前記液体としては、大腿骨髄腔に注入できるものであれば特に制限はなく、目的に応じ 50

て適宜選択することができ、例えば、細胞、薬剤、その他の溶液などが挙げられる。

【0018】

- 細胞 -

前記細胞としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ヒト造血幹細胞などが挙げられる。

【0019】

- - ヒト造血幹細胞 - -

前記ヒト造血幹細胞は、血球系細胞に分化可能な幹細胞である。

前記血球系細胞としては、例えば、リンパ球、単球、好中球、好酸球、好塩基球、赤血球、血小板などが挙げられる。

【0020】

浮遊状態における前記細胞の体積平均粒径としては、 $100\ \mu\text{m}$ 以下が好ましく、 $50\ \mu\text{m}$ 以下がより好ましい。

【0021】

なお、前記細胞の体積平均粒径は、下記の測定方法で測定することができる。

培地中に浮遊した浮遊細胞を回収した後、遠心分離、上清除去、分散により細胞懸濁液を得る。得られた細胞懸濁液から $10\ \mu\text{L}$ をエッペンドルフチューブに取り出し、 0.4% 質量%トリパンブルー染色液 $10\ \mu\text{L}$ を加えてピペティングを行って細胞を染色する。染色した細胞懸濁液から $10\ \mu\text{L}$ 取り出してPMA製プラスチックスライドに乗せ、自動セルカウンター（商品名：Countess Automated Cell Counter、invitrogen社製）を用いて測定することができる。なお、細胞数、細胞生存率も同様の測定方法により求めることができる。前記細胞は、浮遊状態であると、略球状の形状をとるため、体積平均粒径を測定することができる。

【0022】

前記ヒト造血幹細胞は、緩衝液等の液体により懸濁された懸濁液として注入することが好ましい。

【0023】

前記懸濁液中の細胞数としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、 5×10^5 個/mL以上 5×10^8 個/mL以下が好ましく、 5×10^5 個/mL以上 5×10^7 個/mL以下がより好ましい。

また、非ヒト動物がマウスである場合、注入する細胞数としては、 1×10^4 個/個体以上 1×10^6 個/個体以下が好ましく、 3×10^4 個/個体以上 6×10^4 個/個体以下が一般的である。

前記細胞数としては、前記体積平均粒径の測定方法と同様にして自動セルカウンター（商品名：Countess Automated Cell Counter、invitrogen社製）；血球計算盤などを用いて測定することができる。

【0024】

前記ヒト造血幹細胞の懸濁液の注入量としては、特に制限はなく、各非ヒト動物の大腿骨髓腔の大きさから適宜選択することができ、マウスにおいては、 $10\ \mu\text{L}$ 以上 $100\ \mu\text{L}$ 以下が好ましく、 $20\ \mu\text{L}$ 以上 $50\ \mu\text{L}$ 以下がより好ましく、ラットにおいては、 $10\ \mu\text{L}$ 以上 $100\ \mu\text{L}$ 以下が好ましく、 $20\ \mu\text{L}$ 以上 $60\ \mu\text{L}$ 以下がより好ましい。

【0025】

前記ヒト造血幹細胞としては、市販品を用いることができ、前記市販品としては、例えば、商品名：CD133⁺/Prominin-1造血幹細胞（ 1×10^5 個、Cellular Engineering Technologies社製）、商品名：CD34⁺造血幹細胞（ 1×10^5 個、Cellular Engineering Technologies社製）などが挙げられる。これらは、1種単独で使用してもよいし、2種以上を併用してもよい。

【0026】

[細胞懸濁液の調製]

10

20

30

40

50

前記細胞懸濁液は、前記細胞を培地中に懸濁することにより得ることができる。前記細胞懸濁液における細胞濃度は、例えば、自動セルカウンター（Countess Automated Cell Counter, Invitrogen社製）、血球計算盤などを用いて測定することができる。

前記培地としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、MEM（Carlsbad, CA, Invitrogen社製）培地（2質量%BSA含有）などが挙げられる。

【0027】

- - 薬剤 - -

前記薬剤としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、治療薬マニュアル2007（株式会社医学書院、2007年2月発行）など当業者に一般的なハンドブック等に記載の薬剤乃至製剤などが挙げられる。

前記薬剤としては、例えば、解熱・鎮痛・抗炎症薬、片頭痛治療薬、抗リウマチ薬、痛風・高尿酸血症治療薬、精神科用薬、神経科用薬、循環器用薬、アレルギー治療薬、呼吸器用薬、消化器用薬、糖尿病薬、ホルモン製剤、骨粗鬆症薬、骨代謝改善薬、ビタミン製剤、造血と血液凝固関係製剤、輸液・栄養製剤、電解質製剤、灌流用剤、中毒治療薬、抗菌剤、化学療法剤、抗真菌剤、化学療法剤、抗ウイルス薬、寄生虫・原虫用薬、抗癌剤、免疫抑制剤、インターフェロン・インターロイキン製剤、眼科用薬、耳鼻咽喉科用薬、口腔用薬、泌尿・生殖器用薬、痔治療薬、皮膚用薬、酵素製剤、生物学的製剤、ワクチン・トキソイド、生活改善薬、診断用薬、漢方薬などが挙げられる。

【0028】

前記精神科用薬としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、睡眠・鎮静薬、抗不安薬、抗神経病薬、抗うつ薬・気分安定薬・精神刺激薬などが挙げられる。

前記神経科用薬としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、抗てんかん薬、パーキンソン病/症候群治療薬、脳循環代謝改善薬、筋弛緩薬、自律神経系作用薬、抗めまい薬などが挙げられる。

前記循環器用薬としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、強心薬、抗狭心症薬、遮断薬、Ca拮抗薬、抗不整脈薬、利尿薬、降圧薬、末梢循環障害治療薬、高脂血症用薬、昇圧薬などが挙げられる。

前記呼吸器用薬としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、呼吸促進薬、気管支拡張薬・喘息治療薬、鎮咳薬、去痰薬などが挙げられる。

前記消化器用薬としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、消化性潰瘍治療薬、健胃・消化薬、下剤、止痢・整腸薬などが挙げられる。

前記ホルモン製剤としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、下垂体ホルモン製剤、副腎皮質ホルモン製剤、性ホルモン製剤などが挙げられる。

これらの中でも、バクロフェン（痙性麻痺の治療薬；髄腔内バクロフェン療法）、抗がん剤（例えば、白血病の治療薬等）を好適に用いることができる。

【0029】

- - その他の溶液 - -

前記その他の溶液としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、染色液などが挙げられる。前記染色液を大腿骨髄腔に注入することにより、大腿骨への注入が成功している場合は、非ヒト動物の体表が染色されるため、目視により注入の成功の有無を迅速に確認することができる。

前記染色液としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、エバンスブルー溶液、クマシーブリリアントブルー（CBB）溶液などが挙げられる。これらは、1種単独で使用してもよいし、2種以上を併用してもよい。

【0030】

< 非ヒト動物 >

10

20

30

40

50

前記非ヒト動物としては、ヒト以外であれば特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、非ヒト哺乳類、鳥類などが挙げられる。これらの中でも、非ヒト哺乳類が好ましい。

前記非ヒト哺乳類としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、イヌ、ネコ、ウサギ、ブタ、ウシ、サルなどが挙げられる。これらの中でも、マウス、ラット、ハムスター、モルモットが好ましく、マウス、ラットがより好ましく、マウスが特に好ましい。

また、非ヒト免疫不全動物を好適に用いることができる。

【0031】

<<非ヒト免疫不全動物>>

前記非ヒト免疫不全動物は、免疫不全であれば特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

前記免疫不全とは、免疫系が正常に機能しないことを意味する。

【0032】

前記非ヒト免疫不全動物としては、例えば、免疫不全マウスとして、ヌードマウス、S e v e f e C o m b i n e d I m m u n o D e f i c i e n c y (S C I D) マウス、N O D / S C I D マウス、n o n - o b e s e d i a b e t i c (N O D) マウス、N O D / S h i - s c i d - I L 2 R ^{n u 1 1} マウス (N O G マウス)、R a g 2 ^{n u 1 1} / I L 2 R ^{n u 1 1} マウス、N O D . C g - P r k d c s c i d I l 2 r g t m 1 W j 1 / S z J (N S G) マウス；免疫不全ラットとして、F S G ラット、S C I D ラットなどが挙げられる。

N O G マウス及び N S G マウスは、N O D / S h i J i c - s c i d マウス、又は N O D / S h i l t J - s c i d マウスに I L - 2 R K O 遺伝子を導入したマウスであり、T、B、NK細胞の欠失、補体活性の欠失、マクロファージ、樹状細胞の機能不全という多様な不全形質を持ち、異種細胞の生着性に極めて優れている。

【0033】

前記非ヒト免疫不全動物の週齢としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、2週齢以上46週齢以下が好ましく、2週齢以上10週齢以下がより好ましく、4週齢以上8週齢以下が特に好ましい。

【0034】

(血液再構築モデル動物の作製方法)

本発明の血液再構築モデル動物の作製方法は、非ヒト免疫不全動物における大腿骨髓腔に対して略垂直に穿刺針を穿刺し、前記穿刺針を介して、ヒト造血幹細胞を、大腿骨髓腔に注入して移植させ、血液再構築モデル動物を作製する工程を含み、更に必要に応じてその他の工程を含む。

【0035】

前記穿刺、前記穿刺する穿刺部位、前記穿刺針、前記非ヒト免疫不全動物、及び前記ヒト造血幹細胞としては、本発明の大腿骨髓腔への注入方法における穿刺、穿刺する穿刺部位、穿刺針、非ヒト免疫不全動物、及びヒト造血幹細胞と同様のものを用いることができる。

【0036】

[血液再構築モデル動物の作製方法]

非ヒト免疫不全動物(例えば、N O G マウス等)を2週間の検疫、馴化期間を経た後、マウスを専用ホルダ内に半固定した状態において、X線を全身に照射(例えば、2.5 Gy)する。前記照射には、例えば、X線照射装置(装置名: M B R - 3 2 0 R、日立メデイク株式会社製)を用いて、管電圧: 3 0 0 k V、管電流: 1 0 m A、1.0 mm A l + 0.5 mm C u フィルターの条件下にて行う。X線管と照射台との間隔は、例えば、5 5 0 mm とする。

前記X線照射後、5時間以内に、大腿骨髓腔に細胞の移植を行うことが好ましい。

その後、シリンジを用いてヒト造血幹細胞を含む細胞懸濁液を、X線照射N O G マウス

10

20

30

40

50

の大腿骨髓腔内に注入して移植することにより血液再構築モデル動物の作製することができる。

【0037】

<血液再構築モデル動物>

前記血液再構築モデル動物は、非ヒト免疫不全動物にヒト造血幹細胞を移植することにより、前記非ヒト免疫不全動物の体内において、ヒト血液環境を構築したモデル動物である。前記血液再構築モデル動物を作製することにより、ヒト以外の動物において、ヒトに近い血液環境において各種試験等を行うことができる。

【0038】

[用途]

本発明の大腿骨髓腔への注入方法は、本発明の血液再構築モデル動物の作製方法に好適に使用することができる。

本発明の血液再構築モデル動物の作製方法により作製された血液再構築モデル動物は、HIV感染症、結核症、非結核性抗酸菌症、サイトメガロウイルス感染症、単純ヘルペス、帯状疱疹、B型肝炎、C型肝炎、進行性多巣白質脳症、悪性リンパ腫、血管炎等の疾患の研究に有効である。

【0039】

(穿刺補助器具)

前記穿刺補助器具は、本発明の大腿骨髓腔への注入方法、本発明の血液再構築モデル動物の作製方法に用いられる穿刺器具の穿刺針の基端に取り付ける穿刺補助器具であって、大腿骨への前記穿刺針の穿刺深さを調節し、更に必要に応じてその他の手段を有してなる。

前記穿刺補助器具の装着位置としては、例えば、穿刺針の基端などが挙げられる。

【0040】

前記穿刺補助器具としては、その形状、大きさ、構造、材質等については特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

【0041】

前記形状としては、例えば、三角柱、四角柱、五角柱等の多角柱；円柱状、テーパ状、逆テーパ状などが挙げられる。これらの中でも、円柱状が好ましい。

前記大きさとしては、前記穿刺補助器具の外径が、穿刺針が骨に対し過度に深く刺さり過ぎない（貫通防止）ことを防止する点から、穿刺の際、皮膚に引っかかるための十分な厚みがあることが好ましく、穿刺部位の視認性を向上する点から、厚すぎないことが好ましい。

前記穿刺補助器具の外径としては、テーパ状として先端部の外径が5mm以上9mm以下、かつ基端部の外径：6mm以上10mm以下が好ましく、円柱状として外径：2mm以上15mm以下が好ましく、4mm以上7mm以下がより好ましい。

前記穿刺補助器具の長手方向の長さとしては、特に制限はなく、目的に応じて適宜、穿刺針と穿刺深さとの関係から選択することができる。

【0042】

前記材質としては、例えば、有機材料、無機材料などが挙げられる。これらは、1種単独で使用してもよく、2種以上を併用してもよい。

前記有機材料としては、例えば、ポリエチレンテレフタレート（PET）、ポリスチレン（PS）、ポリカーボネート（PC）、トリアセチルセルロース（TAC）、ポリイミド（PI）、ナイロン（Ny）、低密度ポリエチレン（LDPE）、中密度ポリエチレン（MDPE）、塩化ビニル、塩化ビニリデン、ポリフェニレンサルファイド、ポリエーテルサルホン、ポリエチレンナフタレート、ポリプロピレン、ウレタンアクリレート等のアクリル系材料、ゴムなどが挙げられる。これらは、1種単独で使用してもよく、2種以上を併用してもよい。

前記無機材料としては、例えば、ガラス、セラミックなどが挙げられる。これらは、1種単独で使用してもよく、2種以上を併用してもよい。

10

20

30

40

50

【0043】

前記穿刺補助器具としては、穿刺針を挿通できれば特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、前記穿刺補助器具が針基により係止されるタイプの場合は、その内径が穿刺針の外径と同等であることが好ましく、前記穿刺補助器具が針基又は注射筒と係合されるタイプの場合は、その内径が穿刺針の外径と同等又は大きいことが好ましい。

【0044】

前記穿刺針の穿刺深さとしては、大腿骨髄腔に穿刺針を挿入できれば特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、2 mm以上5 mm以下が好ましく、3 mm以上4 mm以下がより好ましい。前記穿刺深さが、2 mm以上であると、大腿骨髄腔に穿刺針を挿入することができ、5 mm以下であると、穿刺針が大腿骨を貫通することを防止できる。なお、前記穿刺針の穿刺深さは、非ヒト動物の種類によって適宜調節することが好ましい。

また、非ヒト動物がマウスである場合の前記穿刺針の穿刺深さとしては、2 mm以上3 mm以下が好ましい。

【0045】

<その他の手段>

前記その他の手段としては、例えば、脱離を防止するために穿刺針の基端部と係合する手段、穿刺深さを調節するための伸縮手段などが挙げられる。

【0046】

図1は、本発明の穿刺補助器具の一例を示す概略断面図である。図1において、本発明の穿刺補助器具1は、穿刺針2を挿通して、穿刺針2の基端に挿着され、針基3により係止される。穿刺補助器具1は、針基3、又は針基3が取り付けられている注射筒4と係合させてもよい。穿刺補助器具1を挿着することにより、穿刺針2の穿刺深さAを目的に応じて適宜調節することができる。

【実施例】

【0047】

以下、本発明の実施例を説明するが、本発明は、これらの実施例に何ら限定されるものではない。

【0048】

(大腿骨略垂直穿刺)

<実施例1>

4週齢のICRマウス(日本チャールズ・リバー株式会社より購入、以下、「マウス」とも称することがある)を用いた。

【0049】

ICRマウスは、入荷から1週間の検疫、及び馴化期間を経た後、実験に供試した。検疫、及び馴化期間では、外傷や脱毛の有無、運動性等の外見上の一般状態を観察した。ICRマウスは、HEPA(High Efficiency Particulate)フィルターで清浄化された空気を供給した飼育室(温度: 23 ± 2 、湿度: $50\% \pm 15\%$)にて、ポリカーボネート製の飼育ケージ(32 cm x 21 cm x 17 cm、トキワ科学器械株式会社製)内に3匹/飼育ケージにて飼育した。飼料は、マウス用固形飼料(CE-2、30 kGy照射滅菌、日本クレア株式会社製)を自由摂取させた。飲料水は、純水をオートクレーブ滅菌後、塩素及び塩酸の滴下によりpH3に調整したものをを用いた。床敷は、実験動物用床敷(クリーンチップ、日本クレア株式会社製)を用いた。飼育期間中は、飼育ケージ、飲料水、及び床敷を週2回交換した。飼料は週1回交換した。また、飼育照明は、タイマー付飼育照明を利用して、明期: 7時~19時、暗期: 19時~7時の明暗サイクルとした。

【0050】

マウス10匹を使用して、実験小動物用簡易吸入麻酔装置(装置名: TK-7、株式会社バイオマシナリー製、流量: 2 L/分間)を用いたイソフルラン(マイラン製薬株式会社製、導入麻酔濃度: 2.5質量%、維持麻酔濃度: 2質量%)にて吸入麻酔した。吸入

10

20

30

40

50

麻酔下のマウスに対して、以下のようにして大腿骨髄腔への液体の注入操作を行った。

- 大腿骨髄腔への液体の注入操作 -

B D プラスチパックTM 29G インスリン皮下投与用針付注射筒（ベクトンディッキンソン・アンド・カンパニー社製、注射針、注射筒一体型）を用いて、大腿骨体又は内側顆部に対して略垂直に穿刺針を穿刺後、注射筒内に充填した2質量%エバンスブルー溶液（和光純薬工業株式会社製）50μLを髄腔内に注入した。

【0051】

エバンスブルー溶液が髄腔より体内に注入された場合、即時にマウス体表が青色に染色されることを利用し、注入操作の成否を判定した。注入操作に失敗した場合は、他方の大腿骨への注入操作を実施し、マウス1匹に対し、最大2回の注入操作を実施した。術者は、マウス5匹を用いて手技を習練した後、マウスへの注入操作を実施した。その結果、注入操作15回中9回注入に成功した（成功率：60%）。

注入操作を完了したマウスについて、麻酔から覚めたマウスの行動を確認したところ、液体注入前と比較して顕著な行動異常は認められなかった。

その後、前記マウスを頸椎脱臼による安楽死処置後、直剪刀（株式会社夏目製作所製）及び有鉤ピンセット（株式会社夏目製作所製）を用いて注入部位を切開し、注入溶液の漏れの有無について確認した。その結果、成功した9回中8回は穿刺部からの漏出なく溶液が注入されていることが確認できた（非漏出率：89%）。結果を下記表1及び図2に示す。図2に示すように、マウスの右足10において、液体の漏れが認められ、左足20において、液体の大腿骨髄腔への注入ができていることが分かる。なお、液体の注入が成功しなかった多くの場合において、液体が大腿骨髄腔外に入ることにより皮下の膨張が確認できた。

【0052】

（脛骨平行穿刺）

< 比較例1 >

実施例1において、大腿骨髄腔への液体の注入操作を以下に示す脛骨髄腔への液体の注入操作に変更した以外は、実施例1と同様にして、液体の注入の確認、注入溶液の漏れの有無の確認を行った。

- 脛骨髄腔への液体の注入操作 -

前記マウスの膝関節を90度に折り曲げた状態で固定した後、B D プラスチパックTM 29G インスリン皮下投与用針付注射筒（ベクトンディッキンソン・アンド・カンパニー社製、注射針、注射筒一体型）を用いて、脛骨体に平行に膝関節上方より近位端に対して穿刺針を穿刺後、注射筒内に充填した2質量%エバンスブルー溶液（和光純薬工業株式会社製）50μLを髄腔内に注入した。

【0053】

液体の注入の確認をしたところ、注入操作17回中8回注入に成功した（成功率：47%）。

注入操作を完了したマウスについて、麻酔から覚めたマウスの行動を確認したところ、液体注入前と比較して足を引きずるように歩くことが認められた。

注入溶液の漏れの有無について確認したところ、成功した8回中2回は穿刺部からの漏出なく溶液が注入されていることが確認できた（非漏出率：25%）。結果を下記表1に示す。

また、注入溶液の漏れのほとんどは、注射針の針先が脛骨を貫通し、穿刺部の真反対側に突き出したことによりできたピンホールから起こっていることが確認された。

【0054】

10

20

30

40

【表 1】

	成功回数	成功率 (%)	非漏出回数	非漏出率 (%)
実施例1	9回/15回	60	8回/9回	89
比較例1	8回/17回	47	2回/8回	25

10

【0055】

前記表1から、実施例1は、比較例1と比較して、高い成功率にて液体を髄腔内に注入することができることが分かる。成功率が高いことは、本発明の大腿骨髄腔への注入方法が、穿刺対象部の固定が容易であることに加え、標的部の面積が広いことから、容易に液体を注入することができるためであると考えられる。

特に、非漏出率については、実施例1は、比較例1と比較して顕著に高いことが分かる。これは、従来の方法においては、穿刺の角度と力加減を誤ることにより漏出の原因となるピンホールが空くためであると推測され、本発明においては、穿刺の角度と力加減を容易に調節することができ、ピンホールの発生を抑制できることが示唆された。

【0056】

実施例1及び比較例1においては、エバンスブルー溶液を用いることにより注入の成否、及び溶液の漏出の有無を容易に判別できた。しかし、細胞や薬剤等を注入する実験においては、注入の成否を判定することは可能な場合もあるものの、髄腔からの漏出の有無を判別することは不可能であり、また、その後の実験結果からも注入操作時の漏出を結論付けることは難しい。

そのため、非漏出率の高い本発明の大腿骨への注入方法は、簡便で、かつ信頼性が高く、さらに、短期での習熟も可能な有用な方法である。

また、膝蓋皿や膝蓋腱等を傷つける従来の注入方法と比較して、これらを傷つけることなく液体の注入が可能な本発明の大腿骨髄腔への注入方法は、動物愛護上も優れた手法である。

20

30

【0057】

(実施例2)

実施例1において、以下の条件に変更した以外は、実施例1と同様にして、液体の注入の確認、注入溶液の漏れの有無の確認を行った。

- 条件 -

匹数：5匹

術者：動物実験に精通している者：1名

：動物実験の経験が浅い者：1名

なお、動物実験に精通している者とは、動物実験に従事して10年以上の者を意味し、動物実験の経験が浅い者とは、動物実験に従事して1年未満の者を意味する。

40

なお、前記術者は、実施例1における術者とは異なる者である。

【0058】

マウス5匹を用いて、大腿骨髄腔に対して略垂直に穿刺針を穿刺し、液体の注入を確認した。動物実験に精通している者においては、注入操作8回中3回注入に成功した(成功率：38%)。注入溶液の漏れの有無について確認したところ、成功した3回中2回は穿刺部からの漏出なく溶液が注入されていることが確認できた(非漏出率：67%)。一方、動物実験の経験が浅い者においては、注入操作10回中2回注入に成功した(成功率：20%)。注入溶液の漏れの有無について確認したところ、成功した2回中1回は穿刺部からの漏出なく溶液が注入されていることが確認できた(非漏出率：50%)。

【0059】

50

(実施例3)

実施例2において、以下の穿刺補助器具を使用した以外は、実施例2と同様にして、液体の注入の確認、注入溶液の漏れの有無の確認を行った。

- 穿刺補助器具 -

- ・形状：テーパ状

先端部の内径：4.13mm、外径：5.94mm

基端部の内径：4.96mm、外径：6.49mm

- ・材質：ポリプロピレン(PP)

- ・穿刺深さ：2.8mm±0.1mm

【0060】

10

液体の注入の確認をしたところ、動物実験に精通している者においては、注入操作8回中5回注入に成功した(成功率：63%)。注入溶液の漏れの有無について確認したところ、成功した5回中5回は穿刺部からの漏出なく溶液が注入されていることが確認できた(非漏出率：100%)。一方、動物実験の経験が浅い者においては、注入操作7回中5回注入に成功した(成功率：71%)。注入溶液の漏れの有無について確認したところ、成功した5回中4回は穿刺部からの漏出なく溶液が注入されていることが確認された(非漏出率：80%)。

【0061】

【表2】

20

	穿刺補助器具の有無	術者	成功回数	成功率(%)	非漏出回数	非漏出率(%)
実施例2	無	動物実験に精通している者	3回/8回	38	2回/3回	67
		動物実験の経験が浅い者	2回/10回	20	1回/2回	50
実施例3	有	動物実験に精通している者	5回/8回	63	5回/5回	100
		動物実験の経験が浅い者	5回/7回	71	4回/5回	80

30

【0062】

2名の術者とも、穿刺補助器具なしでの大腿骨髄腔内への溶液注入は高い確率において実施できなかったが、穿刺補助器具を使用することにより成功率は顕著に向上し、非漏出率も高かった。穿刺補助器具を使用することにより注射針の穿刺深さが調整され、これにより注射針の大腿骨の貫通が抑止されたと考えられる。穿刺の際の力加減を習得前の術者にも高い成功率での髄腔内溶液注入を可能にする穿刺補助器具は、非常に有用である。

【0063】

本発明の態様としては、例えば、以下の通りである。

40

<1> 非ヒト動物の大腿骨髄腔に対して略垂直に穿刺針を穿刺し、前記穿刺針を介して、液体を前記大腿骨髄腔に注入することを特徴とする大腿骨髄腔への注入方法である。

<2> 穿刺針の穿刺部位が、大腿骨体、内側顆部、及び外側顆部から選択される少なくとも1種である前記<1>に記載の大腿骨髄腔への注入方法である。

<3> 前記非ヒト動物が、非ヒト免疫不全動物である前記<1>から<2>のいずれかに記載の大腿骨髄腔への注入方法である。

<4> 前記液体が、細胞及び薬剤の少なくともいずれかである前記<1>から<3>のいずれかに記載の大腿骨髄腔への注入方法である。

<5> 前記細胞の注入濃度が、 5×10^5 個/mL以上 5×10^8 個/mL以下である前記<1>から<4>のいずれかに記載の大腿骨髄腔への注入方法である。

50

< 6 > 前記< 1 >から< 5 >のいずれかに記載の大腿骨髓腔への注入方法に用いられる穿刺器具の穿刺針の基端に取り付ける穿刺補助器具であって、

大腿骨への前記穿刺針の穿刺深さを調節することを特徴とする穿刺補助器具である。

< 7 > 前記穿刺深さが、2 mm以上5 mm以下である前記< 6 >に記載の穿刺補助器具である。

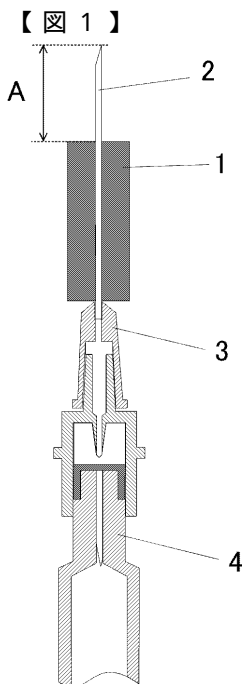
< 8 > 非ヒト免疫不全動物における大腿骨髓腔に対して略垂直に穿刺針を穿刺し、前記穿刺針を介して、ヒト造血幹細胞を、大腿骨髓腔に注入して移植させ、血液再構築モデル動物を作製することを特徴とする血液再構築モデル動物の作製方法である。

【符号の説明】

【0064】

- 1 穿刺補助器具
- 2 穿刺針
- 3 針基
- 4 注射筒
- A 穿刺深さ
- 10 右足
- 20 左足

10



フロントページの続き

(72)発明者 三谷 高司

千葉県我孫子市我孫子 1 6 4 6 一般財団法人電力中央研究所 環境科学研究所内