

な骨組織の再生像が得られ、変形も認められなかった。移植細胞の採取・培養過程において、実験中止に至るような事象の発生はなく、移植後も最長6ヶ月間の観察期間中に局所の炎症、腫脹、その他特筆すべき全身症状の発生は認められなかった。最終時点での剖検所見においても、移植部には異常所見は検出されなかった。

### 2.7. これまでのヒト幹細胞臨床研究と比較した新規性について

申請者らは以上の実験により、ヒト骨髓より採取したMSCを含む細胞群が成人ヒト血清を用いて分化能を有したまま培養することが可能であること、MSC移植を併用することで骨再生が著しく促進され、荷重骨であっても圧潰することなく、再生が生じることを確認した。前項2.5.に記載した濃縮骨髓液移植術と比較して下記の利点があると考えられる。

- 1.体外細胞培養工程により移植細胞数を均一化することで、細胞移植の効果を正確に判定できること
- 2.直視下に細胞移植操作を行うことで、確実に細胞を病巣部に供給できること。
- 3.人工骨移植を併用することで、骨再生の足場を供給できること
- 4.血管柄付骨移植術を併用することで、骨形成細胞の増殖に必要な血流及び骨組織の改変に必要な破骨細胞系の細胞を供給できること。

したがって、本研究はヒト幹細胞を用いた臨床研究として新規性が認められるものと考え、骨壊死病態の代表的なものである大腿骨頭無腐性壊死に対するMSCの移植を臨床試験として企画した。

## 3. 移植細胞・薬剤・医療材料情報

以下に本試験で用いる移植細胞及び使用薬剤に関する情報を示す。詳細は概要書を参照のこと。

### 3.1. 間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell, MSC)

#### 3.1.1. 概要

本研究で使用するMSCは、腸骨より採取した骨髓液より分離された有核細胞のうち、プラスチック基盤の培養皿でコロニーを形成して、付着増殖する細胞集団に含まれている細胞と定義する。特定の培養条件で、*in vitro*で骨、軟骨及び脂肪細胞の特質を発現する細胞に誘導可能な細胞である。骨髓機能が抑制されている場合を除けば、年齢、性差を特に問わず、平均12日の培養で骨髓液1mlあたり約 $1 \times 10^7$ 個まで増殖可能であり、牛胎仔血清および成人ヒト由来血清で培養可能である。培養後4週の時点までは骨、軟骨及び脂肪への分化能は維持されていることが確認されている。最低6ヶ月間は凍結保存可能であり、解凍後も90%以上の増殖能及び分化能は維持されている。培養細胞の単離、凍結、解凍、出荷時に細菌検査、真菌検査、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン測定を実施し、これらが5EU/kg/doseであることを保証し移植に用いる。(以上のデータは申請者らの研究に基づくもので、現在投稿準備中である。)

#### 3.1.2. 毒性

本研究で使用するMSCは、自家細胞であり、免疫学的な毒性は発生しない。培養工程を経ても、免疫原性には変化を認められていない。また培養液等の影響により、組織刺激性等の毒性を獲得したとの報告もない。長期培養工程(4ヶ月以上)を経ることにより、

形質転換する可能性が報告されているが<sup>25)</sup>、本試験での培養期間内に形質転換細胞が出現した報告はなく、これまで実際に移植細胞より腫瘍性病変が発生したとの報告はない。

### 3.1.3. 生体内動態

移植 MSC が移植後、どの程度の期間生存するのか、同等の分化能力をもつ MSC を娘細胞として産生するのか等の詳細な生体内動態は解明されていない。標識細胞を用いた動物実験では、経静脈的に投与された場合、骨髄を始め種々の組織内に生着し、個々の組織細胞に変化していることが報告されている<sup>26,27)</sup>。局所に投与された場合、骨、軟骨等の目的とする組織の形成に関与していることが報告されている<sup>24,28)</sup>。

### 3.1.4. 品質管理

骨髄細胞から分離された細胞が MSC の性質を有する細胞であることを確認するために、その指標として細胞の分化能、増殖能を確認する。分化能については、これまでに報告された分化誘導法に従い<sup>18)</sup>、軟骨、骨、脂肪への分化誘導し確認を行う。またプラスチックデイッシュへの付着能の判定を細胞分離後 2 週で CFU-F 測定<sup>21)</sup>により行う。増殖能の確認は分離後 3 週間の通常培養を行い、3 週の時点で規定細胞数に達しない場合に、分離した有核細胞が増殖能を有しない細胞であると判断する。また凍結保存後、解凍を行った際に 50%以上の生存が確認されない場合に凍結された細胞の生存能がないものと判断する。

培養過程における細胞の感染の有無を培養開始時、細胞凍結時、細胞解凍時、細胞出荷時に細菌培養、真菌培養、マイコプラズマ否定検査、エンドトキシン測定によりチェックする。

### 3.1.5. 品質保証

分化能（骨、軟骨、脂肪）、CFU-F については現在 MSC の標準値が設定されていないため、定性的結果で品質保証を行う。増殖能については培養開始 3 週の時点で規定細胞数に増殖した事で品質保証を行う。

移植に用いる細胞の安全性保証として核型解析及び免疫不全マウスへの接種に造腫瘍性解析を症例ごとに行う。ただし、いずれの解析もその結果は移植後に判明するため、上記無菌性検証試験の如く、出荷判定には用いない。またいずれも陽性所見と発癌リスクとの関連性を明確に示す既存の報告はなく、直ちにプロトコル治療中止に結びつける科学的根拠はないと考えられる。従って陽性所見が得られた場合は、結果を被験者に説明し、その上でプロトコル治療の継続・中止を協議するものとする。

## 3.2. 医療材料

### 3.2.1. 人工骨

**β-リン酸三カルシウム (商品名：Osferion、オスフェリオン、オリンパス工業)**

①概要：β-リン酸三カルシウムを材料とした人工骨補填材であり、壊死骨搔爬後の空隙に補填する。移植細胞を搔爬空間に均等に播種させるための足場となる。また骨再生の場も提供し、海綿骨再生に伴い、破骨細胞により吸収され自家骨組織に置換される。保険適応を受けた骨補填剤として、1999 年より販売が開始され、現在最も