

ヒト幹細胞臨床研究実施計画の概要

研究課題名	顎骨良性腫瘍、顎骨腫瘍類似疾患を対象とした自己骨髄培養細胞由来再生培養骨の有用性を検証する研究
申請年月日	平成21年8月31日
実施施設及び研究責任者	実施施設：奈良県立医科大学 研究責任者：桐田 忠昭
対象疾患	顎骨良性腫瘍、腫瘍類似疾患
ヒト幹細胞の種類	骨髄由来間葉系細胞
実施期間及び対象症例数	登録期間 承認後5年間 培養骨移植群 10 症例、自家骨移植群 10 症例
治療研究の概要	本研究は、自家骨移植が必要な比較的規模の大きな顎骨疾患に対して、患者自身の骨髄細胞から分離・培養して得られた骨芽細胞とセラミックを複合化することにより得られる培養骨移植法が自家骨移植法の代替法となり得るか検討する。
その他（外国での状況等）	奈良県立医科大学整形外科学講座では、大腿骨壊死に対して自己骨髄培養細胞の臨床研究が行われた。ドイツでは Pradel らが、骨髄培養細胞の顎骨疾患へ応用した。ともに、数例の症例報告がみられる段階にとどまる。
新規性について	本研究は顎骨疾患への応用に関して、骨髄由来間葉系細胞と人工骨を用いることに新規性が認められる。

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

臨床研究の名称	顎骨良性腫瘍、顎骨腫瘍類似疾患を対象とした自己骨髄培養細胞由来再生培養骨の有用性を検証する研究
研究機関	
名称	奈良県立医科大学
所在地	〒634-8522 奈良県橿原市四条町840番地
電話番号	(0744)22-3051
FAX番号	(0744)29-8876
研究機関の長	
役職	奈良県立医科大学学長
氏名	吉岡 章 印
研究責任者	
所属	奈良県立医科大学 口腔外科学講座
役職	教授
氏名	桐田 忠昭 印
連絡先	Tel/Fax Tel:0744-29-8875 /Fax:0744-29-8875
	E-mail oralsurg@narmed-u.ac.jp
最終学歴	昭和62年 3月 奈良県立医科大学大学院医学研究科 修了 (昭和62年 奈良県立医科大学助手 平成2年 服部記念病院 口腔外科 医長 平成3年 奈良県立医科大学助手 平成6年 奈良県立医科大学講師 平成11年 奈良県立医科大学助教授 平成14年 奈良県立医科大学教授)
専攻科目	口腔外科
その他の研究者	別紙1参照
共同研究機関(該当する場合のみ記載してください)	
名称	独立行政法人産業技術総合研究所 セルエンジニアリング研究部門 組織・再生工学研究グループ
所在地	〒661-0974 兵庫県尼崎市若王寺3-11-46
電話番号	06-6494-7807
FAX番号	06-6494-7861
共同研究機関の長(該当する場合のみ記載してください)	

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

役職	独立行政法人産業技術総合研究所理事長
氏名	野間口 有
臨床研究の目的・意義	顎骨の良性腫瘍や腫瘍類似疾患の治療法として、摘出術、病巣搔爬術等がある。手術後には、顎骨内に大きな骨欠損が生じ、修復治療にはかなりの時間を要することから口腔顔貌の変形のみならず口腔の機能障害をきたす。このため従来から患者の健常部から採取した自家骨またはセラミックなどの人工骨を移植骨として用いていた。自家骨を用いる場合、採取量に限りがあるだけでなく、健常部に侵襲を与えるため、術後採骨部の感染、神経麻痺などの合併症が起こる可能性があり、その代替法の開発が望まれている。人工骨を移植骨として用いる方法では、大きな骨欠損には適用は難しく、またセラミック等の人工材料自体に骨形成能力がないため、人工材料と周囲の骨組織が結合するのに長期間を要する。本研究の目的は、患者自身の骨髄細胞から分離・培養して得られた骨芽細胞とセラミックを複合化することにより得られる、骨形成能を有する骨移植材料(培養骨)が自家骨移植法の代替法となりうるのかを検討する非劣勢試験である。具体的には、培養骨移植群と自家骨移植群を画像上比較し、形態的および機能的な再建に対する培養骨移植の有効性の検証を行う。本治療法が確立できれば、自家骨移植を回避することができ、患者に与える恩恵は大なるものである。
臨床研究の対象疾患	
名称	顎骨良性腫瘍、腫瘍類似疾患
選定理由	顎骨内には、さまざまな良性腫瘍や腫瘍類似疾患が生じる。これらは良性であっても、摘出・搔爬後、比較的大きな骨欠損を生じる。本研究では、顎骨内に骨欠損を生じる疾患のうち、比較的欠損が大きく、顎顔面の形態異常や咀嚼・発音機能障害を生じやすく、2次的な顎骨骨折の危険性を有する上記疾患を選定した。腫瘍および腫瘍類似疾患のうち悪性腫瘍は、病変自体のコントロールが難しいため除外した。
被験者等の選定基準	対象は奈良県立医科大学附属病院歯科口腔外科を受診した上記疾患を有する患者で、骨欠損に対し自家骨移植が必要と判断された患者とする。単独でインフォームド・コンセントを与えることが困難な者は被験者とししない。対象年齢は、20歳以上70歳未満とする。症例数は実験群(培養骨移植群)10例、対象群(自家骨移植群)10例とし、研究期間は承認後5年間とする。患者の各群への振り分け方法は、実験群・対象群及び本研究に参加しない場合のそれぞれについて患者に説明を行い、患者自らが研究に参加するか否か、研究に参加の場合はいずれの群に参加するかを決定する。実験群及び対象群については、各々10例に達した時点で各群への受け入れを中止する。また、実験群・対象群ともに10例に達した時点で本研究は終了する。
臨床研究に用いるヒト幹細胞	
種類	骨髄由来間葉系細胞
由来	自己・非自己・株化細胞 生体由来・死体由来

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

採取、調製、移植又は投与の方法	<p>患者の腸骨から10数mlの骨髄を骨髓針を用いて採取し、ヘパリンを添加したPBS(Phosphate buffered saline)を含む滅菌試験管に加える。採取は医師と連携の上、主治医が中央手術室あるいは口腔外科外来手術室で行う。麻酔はキシロカインを用いた局所麻酔を使用する。自己血清を培養に用いるので、骨髓採取日、もしくはそれ以前に約400mlの患者血液を中央手術室あるいは口腔外科外来手術室で採取して血清を分離する。主治医が産業技術総合研究所内セルプロセッシングセンターにて、産業技術総合研究所のスタッフの監督のもと、培養操作を行う。なお、セルプロセッシングセンターは、より高度な細胞処理を行うことを考慮され、平成20年度に産業技術総合研究所内に新たに構築されている。本セルプロセッシングセンターにおいて試験培養をおこない、従来通りヒト間葉系幹細胞の増殖や骨芽細胞への分化に問題がない事を確認している(添付書類:新規CPCでの試験的培養)。産業技術総合研究所における作業においては主治医がその責任を負う。製造指示記録書に培養を担当した主治医名およびスタッフ名を記載する。培養は20μg/mL硫酸ゲンタマイシンと15%自己血清を含んでいる液体培地(α-MEM: GIBCO カタログ番号12571)に採取した骨髄を混和し、T-75 フラスコを用いて炭酸ガス培養器(5%CO₂, 37°C)内で行う。骨髄2mlに対して20mlの培地を加える。フラスコ底面に接着した細胞を約14日間増殖させる。これは骨髄細胞に含まれる間葉系細胞の増殖である。この増殖した細胞を動物由来成分不含のトリプシン様酵素(TrypLE Select: GIBCO カタログ番号12563)を用いてフラスコより剥離して、再度フラスコ内で培養することで必要細胞数を確保する。その後、剥離した細胞を人工骨と混和して上記培養条件下に培養を行う。用いる人工骨は、オスフェリオン(規格:A1, A2, A3, A4, G1-1, G1-5, G2-1, G2-5, G3-2, G3-5, G4-2, G4-5, 60G2-2, 60G2-5, 60G3-2, 60G3-5, 60G4-2, 60G4-5 医療機器承認番号:21800BZZ10045000号 製造販売元:オリンパス テルモ バイオマテリアル株式会社)で、ガンマ線照射により滅菌済みである。上記培養時に70μM アスכולビン酸、10mM βグリセロリン酸、100nM デキサメタゾン培地中に添加する。この条件下で培養することにより間葉系細胞は約2週間で骨芽細胞へ分化する。この培養操作により骨芽細胞・骨基質を含む人工骨(再生培養骨)が作製可能である。これらの再生培養骨を奈良県立医科大学附属病院中央手術室で、骨欠損部に生理食塩水もしくはPBSで3回洗浄後に移植する。細胞調整方法の詳細に関しては、(添付書類:培養手順)を参照願います。</p>
調製(加工)行程	(有)・無
非自己由来材料使用	(有)・無 動物種(ブタ)
複数機関での実施	(有)・無
他の医療機関への授与・販売	有・(無)

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

<p>安全性についての評価</p>	<p>各培養段階において、安全性検査を実施する。培養のための骨髄・血液採取に用いる容器・その他の機材は全て滅菌されたものを使用し、無菌操作を心がける。特に骨髄は滅菌処理が出来ないため、滅菌チューブを二重梱包し、産業技術総合研究所内セルプロセッシングセンターに搬送する。搬送にあたっては、保冷剤を入れた運搬用クーラーボックスを用いる。1つのクーラーボックスで、複数の症例の骨髄を運搬することはない。運搬中、ボックス内は、ほぼ一定の温度(20~25℃)に保たれていること、およびこれまでに本方法にて搬送した骨髄を培養しても、症例に必要な細胞数が得られていることより、本方法で搬送した骨髄の安全性および有効性を確認している。自己血より採取した自己血清は液体培地調整後0.22umフィルターによりフィルター滅菌を行った後、細菌・真菌検査、エンドキシン検査を行う。骨髄は培養開始時に細菌・真菌検査を行い、搬送時の汚染を否定する。培養過程において培養操作時の汚染を否定するため、細菌・真菌検査を行う。さらに最終培地交換時に培養上清より、細菌・真菌検査、マイコプラズマ検査を行い、汚染の最終確認を行う。移植手術予定日にはこれらの検査結果を踏まえて、主治医がその使用の可否を判断する。マイコプラズマ試験はPCR法を用いるため、サンプリング後約1日で結果が得られる。エンドキシン試験は、培養開始時に作成する調整培地について行っており、培養終了時までには結果が得られる。両試験で汚染が確認された場合は、移植手術を中止する。無菌試験は培養開始時、継代時、最終培地交換時、最終産物において行っており、培養開始時、継代時については手術前に結果が得られる。培養開始時、継代時の無菌試験で汚染が確認された場合は、移植手術を中止する。最終培地交換時、最終産物の無菌試験については最終判定を待たず手術に用いることになるが、手術日の仮報告で陽性と判断されなければ、移植手術を行う。最終判定にて陽性と判断された場合は、奈良県立医科大学付属病院 医療安全管理指針に則って、病院長および医療安全管理委員会委員長に報告するとともに、できるだけ早い段階で患者への説明の機会を設定する。患者の安全確保を最優先し、必要な検査(血液検査等)および治療(陽性菌に対するスペクトルを有する抗生物質の投与等)を行う。</p> <p>現在までに産総研は、大学病院または国立研究機関と共同で80 症例以上の自己骨髄由来間葉系細胞培養及び移植を行っているが、すべての症例で細菌、真菌検査の最終判定は陰性であり、術後感染症等の問題は発生していない。また、無菌試験の結果に関わらず、術後5年間は定期的に局所、並びに全身状態を観察する。動物由来成分を含有する試薬は骨髄採取に用いるヘパリン(ブタ)だけである。ヘパリンは日本薬局方のもので採用し安全性を確保する。液体培地(α-MEM: GIBCO カタログ番号12571)はフィルター滅菌処理済のものを使用する。細胞剥離剤は動物由来成分を含まない、トリプシン様酵素(TrypLE Select: GIBCO カタログ番号12563)を採用する。添加因子であるアスコルビン酸、βグリセロリン酸、デキサメタゾン(全て分析用グレード)を用い、フィルター滅菌処理後に使用する。液体培地に添加する抗菌剤である硫酸ゲンタマイシンは日本薬局方のもので採用する。その使用にあたっては、事前に硫酸ゲンタマイシンに対する過敏症の既往がないことを確認する。また、移植直前に最終培養産物は、培地を破棄し、滅菌生理食塩水もしくはPBSで3回洗浄されるため、薬剤の残留は低減する。最終培養産物は、専用容器に入れ、3時間以内に奈良県立医科大学付属病院手術場に搬入する。使用した細胞、血清、人工骨は、その一部を後証品として冷凍保存する。臨床有効性との相関性についての解析、および生存率ならびに細胞活性を測るため、3次培養時に移植用とは別に細胞培養を行い、手術日にイメージアナライザーを用いたカルシウム定量測定、ALP定量測定を行う。また、再生培養骨の一部にて、Alizarin Red S染色、Alkaline phosphate染色、ヌードラットへの皮下移植を行う。</p>
-------------------	--

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

臨床研究の実施が可能であると判断した理由	<p>本研究と同様の自己骨髄培養細胞、培養方法およびスキャホールド(β-TCP)を用いた培養骨研究を含む、多くの基礎研究のもと、すでに整形外科領域の骨疾患に対し、人工骨と自己骨髄培養細胞を用いた骨再生医療が、産業技術総合研究所と奈良医科大学整形外科との臨床研究として行われています(別紙:同様のヒト幹細胞臨床研究に関する内外の研究状況①、④)。そして症例数、観察期間は限定的ではありますが、感染や異物反応などの副作用は認められず、また一定の有効性が認められたと報告されており、本臨床研究とは対象部位が異なるものの、骨再生という観点からは差異はなく、安全性および有効性の根拠となりうると考えます。自己骨髄培養細胞の顎骨疾患への応用はドイツ(別紙:同様のヒト幹細胞臨床研究に関する内外の研究状況②)、日本では名古屋大学付属病院歯科口腔外科(別紙:同様のヒト幹細胞臨床研究に関する内外の研究状況③)ですで行われており、副作用は認められず、顎骨疾患においても自己骨髄培養細胞を用いた再生医療の有効性が認められたと報告されています。これらと今回の計画とは細胞の由来、スキャホールドの相違等ではありますが、培養条件や用いる試薬に基本的に差異はなく、自己骨髄培養細胞を顎骨疾患に移植することの有効性と安全性の根拠となりうると考えます。(添付書類:内外の研究との比較リスト)また、我々はラットの顎骨モデルを用いた研究(添付書類:前臨床試験)を行っております。移植8週後の組織評価において人工骨(オスフェリオン)移植では骨癒合はみられないにも関わらず、オスフェリオンを用いた再生培養骨移植では骨癒合が認められており、顎骨領域における人工骨移植の無効性および再生培養骨移植の有効性を確認しています。</p>
臨床研究の実施計画	別紙参照(実施計画審査申請書および臨床研究計画書)
被験者等に関するインフォームド・コンセント	
手続	<p>下記説明事項について、インフォームド・コンセントにおける説明文書(添付書類:説明文書)を用いて十分に説明し、理解を得た上で、文書によるインフォームド・コンセントを受ける。なお、本臨床研究の実施に際しては、臨床研究に入るとき、骨髄採取時、再生培養骨の移植時の計3回、文書にて同意の確認を行う(添付書類:同意書1、同意書2、同意書3)。</p>
説明事項	<p>①当該臨床研究の目的、意義及び方法 ②当該研究を実施する機関名 ③他の治療法の有無、内容、当該治療法により予期される効果及び危険並びにそれらの治療法との比較 ④被験者となることを拒否することは自由であること、及び自己骨髄培養細胞の移植に同意しない場合であっても、何ら不利益を受けることはなく、また従来の治療が継続されること。⑤被験者となるべき者が自己骨髄培養細胞の移植に同意した後であっても、いつでも同意を撤回できること ⑥無償による提供であること ⑦健康被害に対する補償の有無 ⑧-1個人情報保護の方法 ⑧-2研究成果が匿名化の上公表されること ⑧-3問い合わせ・苦情の受付先</p>
単独でインフォームド・コンセントを与えることが困難な者を被験者等とする臨床研究の場合	
研究が必要不可欠である理由	単独でインフォームド・コンセントを与えることが困難な者は被験者としない。
代諾者の選定方針	
被験者等に対して重大な事態が生じた場合の対処方法	<p>まず患者に生じた有害事象を最小限にとどめるため、患者の安全確保を最優先し、必要な治療を行う。さらに研究機関の長に速やかに報告し、対処方針を仰ぐとともに、本学の医療安全管理指針(別紙)に基づいて対処する。</p>