平成 25 年 10 月 25 日

産業技術総合研究所から申請のあった
ヒト幹細胞臨床研究実施計画に係る意見について

ヒト幹細胞臨床研究に関する
審査委員会
委員長　永井良三

産業技術総合研究所から申請のあった下記のヒト幹細胞臨床研究実施計画について、本審査委員会で検討を行い、その結果を別紙のとおりとりまとめたので報告いたします。

記

１．重症末梢動脈疾患に対する自家間葉系幹細胞を用いた血管再生
申請者：独立行政法人産業技術総合研究所　理事長　中鉢　良治
申請日：平成 25 年４月 24 日

１．ヒト幹細胞臨床研究実施計画の概要

研究課題名	重症末梢動脈疾患に対する自家間葉系幹細胞を用いた血管再生
申請年月日	平成２５年４月２４日
実施施設及び 研究責任者	産業技術総合研究所 弓場　俊輔
対象疾患	重症末梢動脈疾患
ヒト幹細胞の種類	自家骨髄由来間葉系幹細胞
実施期間及び 対象症例数	２年間。５症例。
治療研究の概要	共同研究機関である大隈病院で採取された約２０ｍｌの患者骨髄を本研究所に搬送し、骨髄から間葉系幹細胞を培養増殖する。大隈病院に搬送し、患者下肢虚血部位に筋肉内注射にて移植する。
その他（外国での状況等）	２０１１年にＬｕ　Ｄ等は下肢虚血疾患患者に対して骨髄間葉系幹細胞あるいは骨髄単核球の局所投与による２重盲検無作為化比較試験を行い、前者の治療効果が高いことを報告している。また、本研究者らも間葉系幹細胞が骨髄単核球に比して血管再生能に優れていることを報告している。
新規性について	骨髄より培養された間葉系幹細胞を用いて血管再生を行う点に新規性がある。

２．ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会における審議概要（○）と主な変更内容（●）

０）審査回数
２回（平成 25 年５月、７月）

１）第１回審議
①開催日時：　平成 25 年５月 27 日（月）17:00～19:30
（第 26 回　ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会）

②議事概要
平成 25 年４月 24 日付けで独立行政法人産業技術総合研究所から申請のあったヒト幹細胞臨床研究実施計画（対象疾患：重症虚血肢）について、申請者からの提出資料を基に、指針への適合性に関する議論が行われた。
各委員からの疑義・確認事項については、事務局で整理の上申請者に確認を依頼することとし、その結果を基に再度検討することとした。

（本審査委員会からの主な疑義・確認事項）

２．品質・安全性について
○　マイコプラズマ否定試験は PCR 法のみを実施するとされているが、培養法も併用しては如何か。

- 「PCR のみで十分と考えています。マイコプラズマ否定試験においては移植前に結果判定が出る方法が必要です。培養法では試験期間が 2 週間と長期にわたるため、私どもでは迅速な PCR 法のみを採用しています。採用している方法は、検出感度がサンプルあたり数マイコプラズマを検出出来るレベルであり、特異性においても多くのマイコプラズマ種（マイコプラズマ 23 種、アコレプラズマ 1 種、ウレアプラズマ 1 種以上）を検出できることが証明されております。なお検出感度及び特異性の検証実験についても行っております。」との返答を得た。

○　マイコプラズマ否定試験の検出感度はどのくらいでしょうか。CFU/ml でご回答ください。

- 「我々の条件では 2-5 mycoplasma(CFU)/2.5ul(PCR サンプル量)です。単

純計算では 800 - 2000 CFU/ml になります。通常マイコプラズマが感染すると 105-108CFU/ml になりますので(McGarrity G. et al., 1982)、高感度な検出法と考えます。」との返答を得た。

○　産総研で培養された細胞を出荷する際の出荷判定基準の内容が不明である。

- 「エンドトキシン試験、無菌試験、マイコプラズマ否定試験、細胞生存率、移植細胞数を規定した。」との返答を得た。

２）第２回審議

①開催日時：　平成 25 年７月 31 日（水）16:00～18:00
（第 28 回　ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会）

②議事概要

平成 25 年４月 24 日付けで独立行政法人産業技術総合研究所から申請のあったヒト幹細胞臨床研究実施計画（対象疾患：重症虚血肢）について、申請者からの提出資料を基に、指針への適合性に関する議論が行われた。

各委員からの疑義・確認事項については、事務局で整理の上申請者に確認を依頼することとし、その結果を基に再度検討することとした。

（本審査委員会からの主な疑義・確認事項）

２．品質・安全性について

○　マイコプラズマ試験の感度についてです。EP 法に準拠して感度を議論するのであれば、EP 法の基準で考えるべきです。EP 法では細胞＋上静 1ml あたりの CFU で換算しております。その場合、培養法と同等の感度としては 10CFU/ml となりますが、本試験の感度と比較してご説明ください。

- 「細胞＋上清あたりで算出すると、培養フラスコあたりでの換算と同等と考えられ、この場合の本試験の感度は「細胞+上清の換算では 15-30CFU/ml」となります。これは培養法の代替として用いる場合の 10 CFU/ml と同程度の感度であり、DNA 染色法の代替とする場合の 100 CFU/ml を十分満たすものです。」との返答を得た。

○　当面記載されている培養上清での理論感度、及び細胞に接着していたマイコプラズマが全て回収されているという前提の基に実施されている試験の

感度を推定されることはやむを得ないと思っております。ただ培養上清については培養量が十分でないために 2.5ul しか試験に供することができないというのであれば、やむを得ないですが、試験量を多くすることにより感度が十分担保できる可能性があるように思われますので、今後被検量の再検討をしていただくようにお願いしたいと思います。

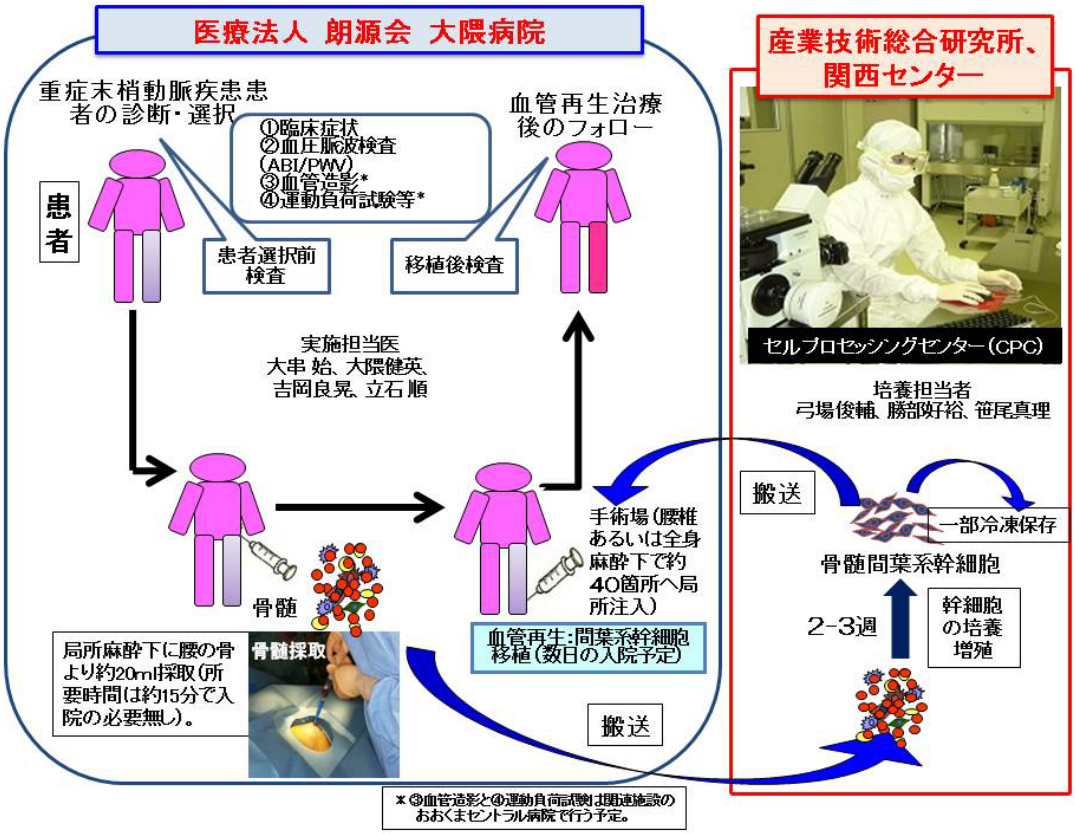
- 「貴重なコメントありがとうございました。いずれ局方 PCR 法が明示された際には、今回いただいたご意見を参考に、被検量を含め試験法の再検討を行います。」との返答を得た。現時点では局方マイコプラズマ試験としての PCR 法は代替的役割であるが、PCR 試験を判定試験として十すする場合の要件が明示された場合には感度等も可能な限り準拠するように求めることと、及び試料量の変更について今後検討を頂くということで回答を了解する。

３）第３回審議
①委員会の開催はなし
②議事概要
前回の審議における本審査委員会からの疑義に対し、独立行政法人産業技術総合研究所の資料が適切に提出されたことを受けて、疑義を提出していただいていた委員との間で審議を行った結果、当該ヒト幹細胞臨床研究実施計画を了承した。

３．ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会の検討結果

独立行政法人産業技術総合研究所からのヒト幹細胞臨床研究実施計画（対象疾患：重症虚血肢）に関して、ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会は、主として倫理的および安全性等にかかる観点から以上の通り論点整理を進め、本実施計画の内容が倫理的・科学的に妥当であると判断した。
次回以降の科学技術部会に報告する。

計画概要シェーマ



病院で末梢動脈疾患患者から本研究計画参加者（患者）の選択
→計画書の「選定基準」参照

↓

病院で局所麻酔下に約 20ml の骨髄を針で採取

↓

産総研で間葉系幹細胞の増殖ならびに一部の増殖細胞の保存
→計画書の「臨床研究に用いるヒト幹細胞」参照

↓

病院で腰椎あるいは全身麻酔下での患者の患肢への間葉系幹細胞の移植

↓

病院で移植後の患者のフォロー
→計画書の「臨床研究終了後の追跡調査の方法」参照

ヒト幹細胞臨床研究実施計画申請書

平成　25年　4月　24日

厚生労働大臣　殿

研究機関	所在地	東京都千代田区霞が関 1-3-1
	名称	独立行政法人産業技術総合研究所
	研究機関の長 役職名・氏名	独立行政法人　産業技術総合研究所 理事長　　中鉢 良治

下記のヒト幹細胞臨床研究について、別添のとおり実施計画書に対する意見を求めます。

記

ヒト幹細胞臨床研究の課題名	研究責任者の所属・職・氏名
重症末梢動脈疾患に対する自家間葉系幹細胞を用いた血管再生	産業技術総合研究所、健康工学研究部門 組織・再生工学研究グループ 研究グループ長 弓場俊輔

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

臨床研究の名称			重症末梢動脈疾患に対する自家間葉系幹細胞を用いた血管再生
研究機関			
	名称		独立行政法人　産業技術総合研究所
	所在地		東京都千代田区霞が関 1-3-1
	電話番号		03-5501-0830
	FAX 番号		03-5501-0855
研究機関の長			
	役職		独立行政法人　産業技術総合研究所　理事長
	氏名		中鉢 良治　　印
研究責任者			
	所属		産業技術総合研究所健康工学研究部門　組織・再生工学研究グループ
	役職		研究グループ長
	氏名		弓場俊輔　　印
	連絡先	Tel/Fax	Tel：06-6494-7814　/　Fax：06-6491-5028
		E-mail	yuba-sns@aist.go.jp
	最終学歴		大阪大学大学院医学研究科博士課程
	専攻科目		分子病態学
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		医療法人 朗源会ウェルフェアグループ
	所在地		〒661-0953 兵庫県尼崎市東園田町 4 丁目 27-6
	電話番号		06-4960-6800
	FAX 番号		06-4960-6900
共同研究機関の長（該当する場合のみ記載してください）			
	役職		朗源会ウェルフェアグループ・理事長
	氏名		大隈義彦
臨床研究の目的・意義			近年、高齢化社会の到来とともに、動脈硬化にともなって末梢虚血が生じ、QOL を著しく低下させる症例が増えつつある。これに対する再生（血管再生）治療として骨髄由来単核球や G-CSF 動員末梢血単核球を用いることが報告されている。しかし、前者では多量の骨髄（約 600ml）の採取を必要とし、後者では長時間（4～5 時間）の分離作業を必要とし、いずれも患者への負担が大きい。間葉系幹細胞は骨や軟骨細胞のみならず種々の細胞へ分化することが数多く報告されている。我々は間葉系幹細胞が血管内皮細胞に分化するのみならず、血管再生に重要である VEGF(血管内皮増殖因

		子)等の因子を分泌することを報告している。本研究の目的は、間葉系幹細胞を末梢動脈疾患(PAD)患者の虚血下肢筋肉内へ移植し、下肢虚血改善効果および安全性を検討することである。間葉系幹細胞は局所麻酔下で採取される少量（約 20ml）の骨髄から培養増殖することが可能であるため、採取に関わる患者の負担を少なくすることが可能である。
臨床研究の対象疾患		
	名称	重症末梢動脈疾患
	選定理由	重症末梢動脈疾患患者は年間 100 万人あたり 500～1,000 人の患者が発生すると報告されている。これら疾患患者の下肢に皮膚潰瘍や壊死がみられ、救肢が困難なため下肢切断にいたる症例がある。これらに対する治療はまず薬物療法が試みられるが、無効の場合には外科的バイパス手術やステント手術が行われる。しかし、これら外科的治療に難渋する症例も多くみられ、新しい医療技術の開発が望まれる。バイパスやステント手術にかわる治療として再生医療技術が開発されつつあるが、現在この技術の為に用いられる細胞の採取は患者の負担が大きい。以上のため、本疾患患者に対して侵襲の少ない再生医療技術の確立が求められている。これらの経緯より本疾患を選定し、新規の再生医療技術の開発を試みる
被験者等の選定基準		[選択基準] 下記の選択基準を全て満たす患者を対象とする。 (1) 末梢動脈疾患(Peripheral Artery Disease:PAD)患者 (2) Fontaine 分類Ⅲ群およびⅣ群に属する患者(ABI＜0.6 を目安) (3) 血管形成術、バイパス手術の適応がない(狭窄部位がびまん性、あるいは末梢の細小動脈に存在し、血管形成術やバイパス術が不適当)患者、あるいはこれらの既存治療を受けたにもかかわらず上記 2)に該当する重症患者 (4) 同意取得時の年齢が 20 歳以上で、本人から文書による同意が得られている患者 [除外基準] 下記の除外基準に 1 つでも当てはまる患者は対象としない。 (1) Ｂ型肝炎(HBV)、Ｃ型肝炎(HCV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染症、成人Ｔ細胞白血病の患者 (2) 牛や豚由来蛋白に対する過敏症、副作用の既往を有する患者 (3) 心エコーで高度心機能低下を認める患者 (4) 悪性腫瘍を合併する患者 (5) リスクの高い網膜症を合併する患者 (6) 重症肝・腎障害の患者 (7) 間質性肺炎の患者 (8) 貧血や白血球増加等の血液疾患の患者 (9) 妊婦、授乳婦、妊娠している可能性のある患者、治療期終了時までに妊娠を計画している女性患者 (10) その他、研究責任者または研究者が本試験の対象として医学的根拠に基づき不適当と判断した患者
臨床研究に用いるヒト幹細胞		
	種類	骨髄由来間葉系幹細胞
	由来	(自己)・非自己・株化細胞　　(生体由来)・死体由来

	採取、調製、移植又は投与の方法	患者腸骨から骨髄針を用いて局所麻酔下に約 20ml の骨髄を採取する。採取された骨髄を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。採取は大隈病院の手術室で担当医師（病院研究者）が行う。採取された骨髄は産業技術総合研究所内セルプロセッシングセンター（CPC）に搬送され培養操作を行う。なお、作業環境に関してはクリーンルームタイプの CPC の他に、今後より一層の無菌性向上、作業者の安全性向上等を考慮しアイソレータの導入も検討するが、今回の計画では CPC での培養をおこなう。 20μg/mL 硫酸ゲンタマイシンと 15%牛胎児血清を含んでいる液体培地(α-MEM：GIBCO)に採取した骨髄を混和し、培養容器を用いて炭酸ガス培養器（5%CO2、37℃）内で 10 日前後、培養を行う。その間、培養容器底面に間葉系幹細胞が接着し細胞が増殖する。移植に必要な細胞数を得るために、培養細胞をプロテアーゼ(トリプシンに代わる動物由来成分不含の細胞解離剤：TrypLE Select：GIBCO）を用いて培養容器より剥がし、あらたな培養容器で継代培養（2 次培養）する。培養期間および継代回数は安全性を考え、1 ヶ月以内で継代回数 3 回までとする。その後、細胞を剥離して PBS で懸濁し細胞数および生存率を測定を行なう。細胞生存率が 80%以上あり目標移植必要細胞数（$1x10^8$ 個以上）が確保できていれば、細胞を新たな PBS に $2.5 x 10^6$ cells/ml に懸濁して滅菌試験管に移し、搬送用クーラーボックスに入れて大隈病院に搬送される。なお、目標細胞数以下でも $1x10^7$ 個以上であれば、患者と再度話合いのうえ移植をおこなうかあるいは中止するか決定する。 手術場にて患者に腰椎麻酔あるいは全身麻酔を施し、患肢虚血部位約 40 ヶ所（2.5cm 間隔にマーキング）に懸濁された細胞懸濁液を 25G 針にて 0.5ml ずつ筋肉内注射する。両下肢に病変がみられる場合は、より重症の下肢を対象とする。皮膚欠損ならびに潰瘍を形成している場合には、注射により感染を起こす可能性もあり、これらの部位の表面に細胞懸濁液を塗布($1ml/10cm^2$)して、湿潤環境を保つ。 なお、一回の移植で臨床効果が有る程度得られるも十分でない場合あるいは反対側の下肢にも移植が有効と期待される場合は複数回にわたり移植する。再度の移植が行われる場合には、再度の骨髄採取または初回培養で得られた凍結保存細胞を使用する。凍結保存細胞は、1 次あるいは 2 次培養において患者への初回投与量に必要な細胞数を十分に上回ると想定されるとき、細胞の一部を凍結保存したものとする。具体的には、プロテアーゼで剥がした細胞懸濁液を遠心分離して上清を除去する。回収した細胞に無血清培地 10ml を添加懸濁し再度遠心して上清を除去する。回収した細胞 $1×10^6$cells あたり 1ml の無血清培地と 1ml のヒト血清アルブミン添加 CP-1 を添加してフリーザーで凍結する。再移植時は、この凍結保存細胞を解凍して生存率を測定後に初回培養と同様の操作をおこない必要細胞数まで増殖させる。なお、細胞生存率と必要細胞数の基準は初回培養とおなじであり、凍結期間（最大 1 年間）を除く培養期間は最長 1 ヶ月、総継代回数は 3 回までとする。
	調製（加工）工程	(有)・無
	非自己由来材料使用	(有)・無 動物種(ウシ血清，ブタ由来ヘパリン)

		ヒト由来（ヒト血清アルブミン）：凍結保存で使用
	複数機関での実施	有・無
	他の医療機関への授与・販売	有・無
安全性についての評価		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。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（10～30℃）に保たれていることを確認する。なお、本方法にて搬送した骨髄の安全性および有効性はすでに確認されている。培養に用いる牛胎児血清は牛海綿状脳症の発生していない地域原産（ニュージーランドあるいはオーストラリア）で放射線照射処理されたものを使用する。培養に使用する液体培地は、0.22μm フィルターによりフィルター滅菌を行った後、無菌試験、エンドトキシン試験を行う。骨髄は培養開始時に無菌試験を行い、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、無菌試験を行う。さらに最終培地交換時に培養上清および細胞の一部より、無菌試験、マイコプラズマ否定試験を行い、汚染の最終確認を行う。移植手術予定日にはこれらの試験結果を踏まえて、病院研究責任者がその使用の可否を判断する。各試験で汚染が確認された場合は、細胞培養を中止する。移植手術に用いる細胞は手術当日に回収し、回収された細胞の一部は無菌試験、エンドトキシン試験を行う。移植細胞の搬送にはクーラーボックスを使用し一定の温度（10～30℃）に保たれ、５時間以内に大隈病院手術場に搬入移植する。 現在までに産業技術総合研究所は、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、すべての症例で無菌試験の最終判定は陰性と考えられ術後感染症等の問題は発生していない。また、骨髄の搬送方法は全ての症例で本法と同様の手法を用いており、安全性と有効性が確認されている。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）と液体培地の牛胎児血清だけである。ヘパリンは日本薬局方のものを採用し安全性を確保する。牛胎児血清は牛海綿状脳症との関連が危惧されているが、これまで牛胎児血清を含んでいる液体培地で培養された間葉系幹細胞を投与された患者において、牛海綿状脳症の発症は報告されていない。また、牛海綿状脳症の発生していない地域（ニュージーランドあるいはオーストラリア）の血清で、放射線処理済みのものを使用することなど、可能な限りの対処を行う。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）を採用する。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を採用する。また移植細胞は、剥離後 PBS で複数回洗浄されるため、薬剤の残留は著減する。使用した細胞、液体培地などは、その一部を骨髄採取後５年間後証品として冷凍保存する。 また、十分な細胞が１次あるいは２次培養で十分な細胞数が得られた場合には同一患者への再度の投与を考えて、冷凍保存を行う場合がある。この場合には広く造血幹細胞の凍結保存に利用され安全性が報告されている CP-1（極東製薬工業 KK）を用いる。CP-1 は生食を含む Dimethyl sulfoxide（DMSO）と Hydroxyl ethyl starch

	（HES）との混合液であり、使用時にヒト血清アルブミン液を最終濃度 4%となるように添加する。
臨床研究の実施が可能であると判断した理由	1. 上記「安全性についての評価」に記載のように、移植に用いられる骨髄間葉系幹細胞は、対照疾患は異なるものの、今回の計画と同様に調製されて多数の症例に用いられているが特に重篤な副作用はみられない。 2. 我々は骨髄間葉系幹細胞が血管内皮細胞へ分化し得るとともに血管再生に必要な VEGF 等の因子を分泌することを報告している。 3. 今回の計画と同様に調製された患者由来間葉系幹細胞を国立循環器病センターの永谷憲歳先生とともに心不全の患者8例の心筋内に移植したが、重篤な副作用はみられず心機能が改善された。 4. 永谷憲歳等は、今回の計画の動物モデルとなるラットの下肢虚血モデルにおいて、骨髄間葉系幹細胞が骨髄単核球より血管再生能力が高いことを報告している。 5. Lu D 等は下肢の虚血疾患患者に対して骨髄間葉系幹細胞あるいは骨髄単核の局所投与の double blind の randomized study をおこない、骨髄間葉系幹細胞が骨髄単核球より治癒効果が高いことを報告している。
臨床研究の実施計画	要約： 既存の治療に抵抗性を示す重症末梢動脈疾患患者に対して、患者から骨髄を大隈病院で採取し、採取骨髄を産業技術総合研究所に搬送して間葉系幹細胞を培養増殖する。培養期間は約 3 週間である。増殖させた間葉系幹細胞は再度病院に搬送され、腰椎麻酔あるいは全身麻酔下に患者患肢虚血部位に移植される。実施予定期間は計画承認後から 2 年間で 5 症例を目標とする。 なお、本研究期間中、病院研究者と産業技術総合研究所尼崎支所の研究者は定期的に会議を持つ。特に、培養期間中は少なくとも週に 1 回は本研究総括責任者の大串が研究所を訪問し、産総研研究者から培養状況につき報告を受ける。また、培養開始前に大串は研究所に出向き匿名化された患者の状態等につき産総研研究者と討議するとともに登録情報を共有する。移植後においては、研究終了まで月に 1 回は大串が研究所において患者の状況を報告する。 詳細は添付資料参照
被験者等に関するインフォームド・コンセント	
手続き	担当医（病院研究者）は患者本人と必要に応じて親族への添付の説明文に沿って内容を説明する。説明を行った後に、内容の理解を確認した上で，添付書類の同意書を用いて、説明医師と、説明を受けた患者が日付を記載し、署名する。同意文書は 2 部複写し、1 部は患者に手渡し、1 部は病院研究責任者が保管する。原本はカルテに保管する。なお、同意書は患者登録前に説明する「①計画全体に対する同意書」、骨髄採取前に説明する「②骨髄採取に対する同意書」、そして細胞移植前に説明する「③細胞移植に対する同意書」の 3 通である。
説明事項	1.本研究の目的、意義 2.本研究の方法と実施機関

		3.予想される効果及び危険性とその対処方法 4.治療に関わる費用負担 5.健康被害に対する補償 6.他の治療法の有無及びその方法 7.同意にあたって（同意撤回の権利） 8.個人情報の保護と成果の公表 9.知的所有権 10.細胞の管理保存 **11.本治療の中止・中断** 12.問い合わせ・苦情の受付先
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。
	代諾者の選定理由	
被験者等に対して重大な事態が生じた場合の対処方法		病院研究責任者は、本臨床研究によって起因すると考えられる有害事象について重大な事態であるかを判断し、重大と判断した事象については研究機関の長（朗源会理事長ならびに産業技術総合研究所理事長）にすみやかに報告する。また、これらの報告とともに、必要に応じて本臨床試験の中止ならびに暫定的な処置を講じる。医療研究機関の長（朗源会理事長）はすみやかに重大な事態が発生したことならびにその内容を厚生労働大臣に報告する。医療研究機関の長はすみやかに倫理委員会等の意見を聞き、研究責任者に対し、中止その他の必要な処置を講じるように指示を与える。また、倫理委員会の意見ならびに以上の処置について厚生労働大臣に報告する。
臨床研究終了後の追跡調査の方法		細胞移植終了後も5年間は定期的に局所ならびに全身状態を評価する。移植後1日、7日、1ヶ月、6ヶ月、1年で血液検査（末梢血、生化学、炎症反応）ならびに疼痛スケール（Visual Analog Scale:VAS）や潰瘍を持つ症例では最大潰瘍の長径サイズ等の計測をおこなう。血流評価法として移植後7日、1ヶ月と6ヶ月ごとに圧脈波検査(ABI/PWV)と運動負荷試験(トレッドミルを用いた歩行)をおこない、移植後1年で血管造影検査、悪性腫瘍検索、腹部・胸部CT等をおこなう。
臨床研究に伴う補償		
	補償の有無	（有）・無
	補償が有る場合、その内容	本臨床試験実施に起因して有害事象が発生し被験者に健康被害が生じた時は、被験者が適切な治療その他必要な措置を受けることができるように、実施医療機関、研究責任者および担当医が対応する。なお、実施医療機関は本再生治療による被験者の健康被害への対応として医師賠償責任保険に加入しており、医師・医療研究機関に法的責任が無い場合にも備え臨床研究保険にも加入する。
個人情報保護の方法		
	連結可能匿名化の方法	研究責任者の責任のもと、氏名、生年月日、住所などの個人を特定

		できる情報を取り除き、代わりに新たな登録番号をつけ、個人を特定できなくする。患者に関する情報は病院研究責任者の下で、書類・データーベース等について厳重に保管する。
	その他	研究結果の公表に際しては、個人情報保護法に則り、個人情報の保護に十分配慮する。公表されうる個人に関する情報としては年齢、疾患名、性別のみである。
その他必要な事項 （細則を確認してください）		① 当該研究に係る研究資金の調達方法
		骨髄採取ならびに間葉系幹細胞移植にかかる費用は、朗源会ウェルフェアグループが負担する。採取された骨髄の培養による間葉系幹細胞増殖にかかる費用は産業技術総合研究所　健康工学研究部門、組織・再生工学研究グループが負担する。
		② 既に実施されているヒト幹細胞臨床研究と比較して 新規性が認められる事項
		現在ヒト幹細胞指針にもとづいて実施されている「末梢動脈疾患患者に対する G-CSF 動員自家末梢血単核球細胞移植治療」においては、アフェレーシスというステップのうえ末梢血から細胞を分離して用いられる。すなわち、今回の対象とする骨髄ではなく末梢血であり、さらに細胞分離に数時間という時間を要し、細胞分離に対する患者への負担は大きい。また、「慢性重症下肢虚血患者に対する自家末梢血 CD34 陽性細胞移植による下肢血管再生治療」においては同様に末梢血の細胞が対照であり、さらに CD34 陽性細胞をもちいる。この方法はやはりアフェレーシスというステップを必要とし、さらに磁気細胞分離装置を必要とする。さらに、我々が今回対象とする間葉系幹細胞は CD34 が陰性であり、用いる細胞の特質が全くことなる。なお、骨髄由来間葉系幹細胞を用いての血管再生技術は本研究計画総括研究責任者である大串の特許化技術で、今回の計画はこの技術の臨床応用研究である。

備考１　各用紙の大きさは、日本工業規格Ａ４とすること。

備考２　本様式中に書ききれない場合は、適宜別紙を使用し、本様式に「別紙○参照」と記載すること。

添付書類（添付した書類にチェックを入れること）

- ✔ 研究者一覧（別紙①）
- ✔ 研究者の略歴及び研究業績（別紙②）
- ✔ 研究機関の基準に合致した研究機関の施設の状況（別紙③）、本施設の状況等は産総研に関するものであり、病院施設に関する事項は病院からの計画書に含まれる。
- ✔ 臨床研究実施計画（概要版）（別紙④）
- ✔ 標準作業手順書 - 骨髄採取、培養、移植、安全性試験 -（別紙⑤）
- ✔ 原材料の試験成績書（別紙⑥）
- ✔ 臨床研究に用いるヒト幹細胞の品質等に関する研究成果（別紙⑦）
- ✔ 同様のヒト幹細胞臨床研究に関する内外の研究状況（別紙⑧）
- ✔ 臨床研究の概要をできる限り平易な用語を用いて記載した要旨（別紙⑨）

- ✔ インフォームド・コンセントにおける説明文書及び同意文書様式（別紙⑩）
- ✔ 倫理委員会関係資料（別紙⑪）、これは産総研倫理委員会に関するものであり、病院施設倫理委員会の資料は病院からの計画書に含まれる。
- ✔ UMIN 登録受け付け（別紙⑫）
- ✔ 搬送に関する資料（別紙⑬）
- ✔ 凍結細胞の性質についての検討（別紙⑭）
- ✔ CPC での培養結果（別紙⑮）
- ✔ その他（資料内容：別紙⑦に関する３つの文献、別紙⑦-a、別紙⑦-b、別紙⑦-c）
- ✔ その他（資料内容：別紙⑧に関する３つの文献、別紙⑧-a、別紙⑧-b、別紙⑧-c）
- ✔ その他（資料内容：別紙⑪に関する倫理委員名簿:別紙⑪-a、倫理委員会提出計画:別紙⑪-b、委員会議事録:別紙⑪-c、審査結果通知書:別紙⑪-d）

別紙⑨

「臨床研究の概要を出来る限り平易な用語を用いて記載した要旨」

目的と意義

動脈の中でも主に手足に血液を届ける動脈は「末梢動脈」と言われます。この動脈の内側（内腔） にコレステロールがたまったりして血管の内部が狭くなることで血液の流れが悪くなり、手足に血行不良が起こり、しびれや痛み、悪化すると皮膚の一部に欠損（潰瘍）ができたり、ひどい場合には皮膚の組織や細胞が死んでしまう（壊死）こともあります。種々の病因によりこれらの病状が現れますが、最近ではこのような疾患をまとめて末梢動脈疾患と呼ぶようになりました。重症末梢動脈疾患患者は年間 100 万人あたり 500～1,000 人の患者が発生すると報告されています。この疾患に対する治療として、種々の血管拡張薬等のクスリの投与やクスリだけでは治癒しない場合には、人工の血管等をもちいる手術や動脈の内腔を広げる為の器具（風船のような器具を用いるバルーンや金属や高分子の筒状の器具を用いるステント）を使用して動脈を広げることがあります。

しかし、これらの一般化されている治療を受けられても治療効果が無く、あるいはこれらの治療の対象にならず、手足に痛みや潰瘍が生じる患者様もおられます。最近、細胞を用いて障害を受けた種々の組織を再生するという再生医療技術が開発されつつあります。ヒトの骨の中の細胞（**骨髄**）には血管になりうる源の細胞が存在します。我々は骨髄に含まれる**間葉系幹細胞**という細胞が血管の再生に必要な物質を産生することや、この間葉系幹細胞を移植することにより、新たな血管を誘導するという研究結果を数多く報告してきました。今回、これらの経験を踏まえて、患者様から少量の骨髄（約 20ml）を採取して、採取された骨髄から間葉系幹細胞を**産業技術総合研究所**で**細胞培養**操作により増やして、この増えた細胞を患者様の足に注射器で注入（移植）する再生治療を計画しました。この再生治療により、新たな血管が足に再生されて難治性の下肢の疼痛や壊死を治すことが期待されます。

被験者等の選定基準

下記の選択基準を全て満たす患者を対象とします。

(1) 末梢動脈疾患患者
(2) Fontaine 分類Ⅲ群およびⅣ群に属する患者(ABI＜0.6 を目安)
(3) 血管形成術（バルーンやステント等を用いての血管拡張手術)、バイパス手術（人工血管等を用いて動脈の回り道すなわちバイパスをつくる手術）の適応がない患者、あるいはこれらの既存治療を受けたにもかかわらず上記 2)に該当する重症患者
(4) 同意取得時の年齢が 20 歳以上で、本人から文書による同意が得られている患者

Fontaine 分類

Fontaine Ⅰ度（もっとも軽症）
下肢の冷感や色調の変化
FontaineⅡ度
間歇性跛行（かんけつせいはこう）数十から数百ｍ歩くと痛みのため歩行継続不可能になる症状。
FontaineⅢ度
安静時疼痛
FontaineⅣ度（もっとも重症）
下肢の壊死、皮膚潰瘍。

ABI

ABI:Ankle(足) brachial(上腕) index (指標)。ABI とは下肢と上肢の血圧の比であり、正常では下肢が下にあり下肢の方が血圧が高い（ABI ＞ 1)。

除外基準

下記の除外基準に１つでも当てはまる患者は対象としません。

(1) Ｂ型肝炎(HBV)、Ｃ型肝炎(HCV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染症、成人Ｔ細胞白血病の患者
(2) 牛や豚由来蛋白に対する過敏症、副作用の既往を有する患者
(3) 心エコーで高度心機能低下を認める患者
(4) 悪性腫瘍を合併する患者
(5) リスクの高い網膜症を合併する患者
(6) 重症肝・腎障害の患者
(7) 間質性肺炎の患者
(8) 貧血や白血球増加等の血液疾患の患者
(9) 妊婦、授乳婦、妊娠している可能性のある患者、治療期終了時までに妊娠を計画している女性患者
(10) その他、研究責任者または研究者が本試験の対象として医学的根拠に基づき不適当と判断した患者

治療期間と予定人数

実施予定期間は計画承認後から 2 年間で 5 症例を目標

実際の治療（臨床研究の流れ）

患者様からの細胞採取とその後の細胞培養ならびに培養細胞の移植

最初に大隈病院の患者から上記の基準を満たす患者を選択します。選択された患者の同意が得られれば、患者の腰の近くの骨（腸骨）から針を用いて局所麻酔下に約 20ｍｌの骨の中に存在する細胞（**骨髄**）を採取します。採取は大隈病院の手術室で担当医師が行います。採取された骨髄は**産業技術総合研究所**内セルプロセッシングセンター（**CPC**）に搬送され、**細胞培養**操作により**間葉系幹細胞**を増やします。培養期間は 1 ヶ月以内で、細胞を培養器から剥離して、さらに別の培養器にいれて細胞を増やす操作（継代）の回数は 3 回までとします。その後、細胞を剥離して細胞生存率が 80%以上あり目標移植必要細胞数（$1x10^8$ 個以上）が確保できていれば、細胞を試験管に移し、搬送用クーラーボックスに入れて大隈病院に搬送されます。なお、目標細胞数以下でも $1x10^7$ 個以上であれば、患者と再度話合いのうえ移植をおこなうかあるいは中止するか決定します。

手術場にて患者に腰椎麻酔あるいは全身麻酔を施し、患肢虚血部位約 40 ヶ所（2.5cm 間隔にマーキング）に懸濁された細胞懸濁液を 0.5ml ずつ筋肉内注射します。両下肢に病変がみられる場合は、より重症の下肢を対象とします。皮膚欠損ならびに潰瘍を形成している場合には、これらの部位の表面に細胞懸濁液を塗布($1ml/10cm^2$)します。

なお、一回の移植で臨床効果が有る程度得られるも十分でない場合、あるいは反対側の下肢にも移植が有効と期待される場合は複数回にわたり移植します。再度の移植が行われる場合には、再度の骨髄採取または初回培養で得られた冷凍保存されている凍結保存細胞を使用します。凍結保存細胞は解凍して生存率を測定後に初回培養と同様の操作をおこない必要細胞数まで増殖させます。なお、細胞生存率と必要細胞数の基準は初回培養とおなじで、凍結期間（最大１年間）を除く培養期間は最長１ヶ月、総継代回数は 3 回までとします。

追跡調査の方法

細胞移植終了後も 5 年間は定期的に局所ならびに全身状態を評価します。移植後 1 日、7 日、1 ヶ月、6 ヶ月、1 年で血液検査（末梢血、生化学、炎症反応）ならびに疼痛の度合いや潰瘍を持つ症例では最大潰瘍の長径サイズ等の計測をおこないます。血流評価法として移植後 7 日、1 ヶ月と 6 ヶ月ごとに圧脈波検査(**ABI/PWV**)と運動負荷試験（屋内のベルトコ

ンベア状の踏み台すなわちトレッドミルを用いた歩行）をおこない、移植後１年で**血管造影検査**、悪性腫瘍検索、腹部・胸部 CT 等をおこないます。

用語の解説

骨髄：骨の内部に存在する柔らかい組織で、その中には赤血球をはじめ種々の細胞が存在します。また、間葉系幹細胞も少数ながら存在します。

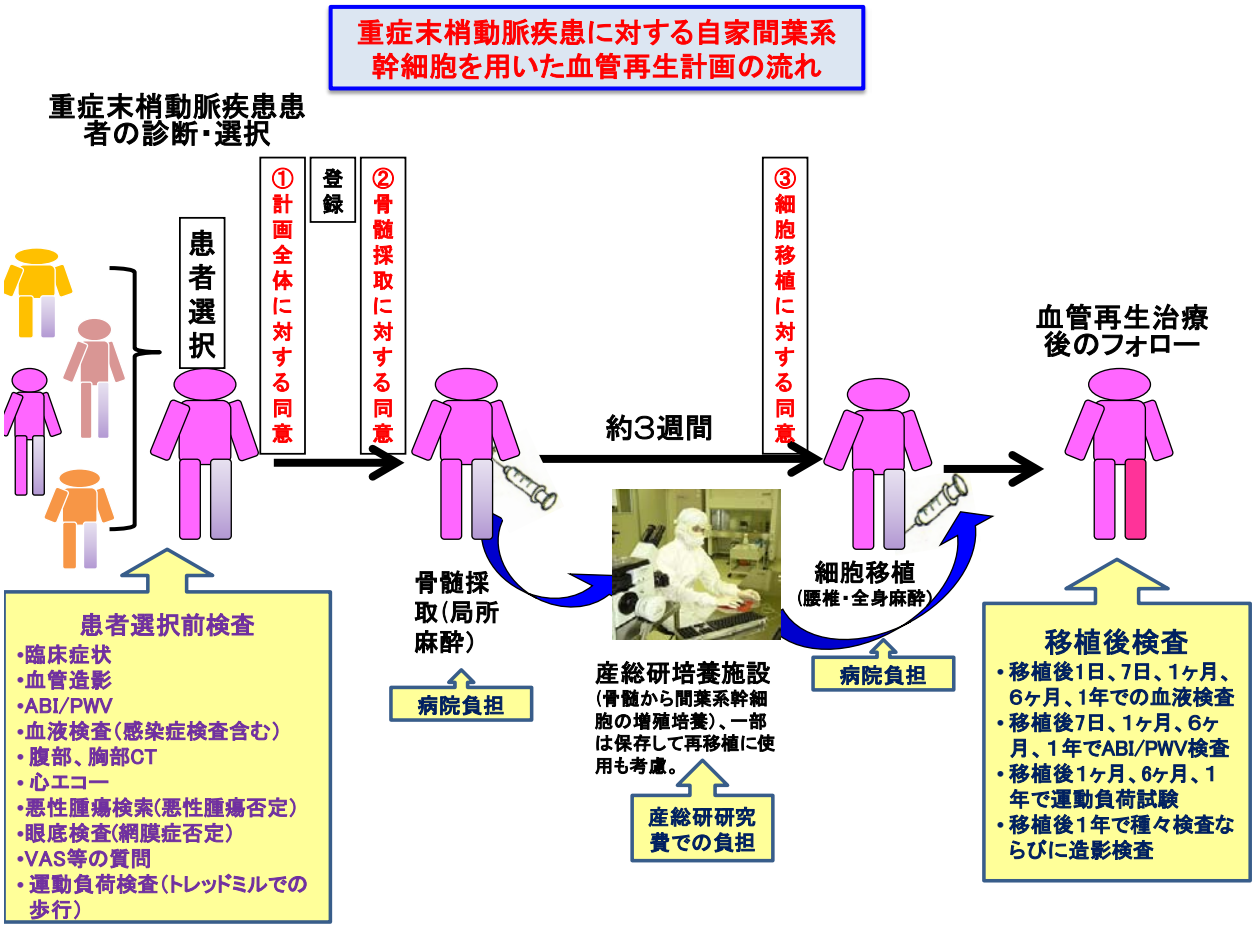
産業技術総合研究所：産業技術分野におけるさまざまな研究開発を総合的に行う経済産業省所管の研究組織で全国各地に存在します。関西には、関西センターとして池田市と尼崎市の2箇所に研究所があり、後者にヒト細胞の培養をおこなうセルプロセッシングセンター(CPC)があります。

間葉系幹細胞：我々の体に存在する細胞で軟骨、筋肉、血管細胞等の種々の細胞へなる能力をもっています。

細胞培養：体から細胞を分離し、体外で増殖して、細胞の機能を維持することです。通常、細胞は栄養素の含まれる液体のなかで一定の温度下で増殖します。

ABI/PWV 検査：手足の動脈の狭窄の度合いを測るために、上腕と足の血圧比(ABI)や、血管の拍動（脈波）のスピード(PWV)を測定する検査で非侵襲的な検査です。

血管造影検査：血管内にレントゲンにうつる液体（造影剤）を注射して、通常のレントゲンあるいはCT 撮影をおこなうことで、血管（特に、本計画では足の血管）を検出し、狭窄がおこっているかの診断を行う検査です。



pg. 4

臨床研究のながれ

	患者選択時	登録時	骨髄採取時 数日前～当日	細胞移植時 数日前～当日	移植後 1 日	移植後 7 日	移植後 1ヶ月	移植後 6 ヶ月	移植後 1 年
同意取得		○（説明）	○（採取）	○（移植）					
診察（臨床症状）	○	○	○	○	○	○	○	○	○
血管造影検査	○								○
ABI/PWV	○					○	○	○	○
血液検査	○				○	○	○	○	○
腹部・胸部 CT	○								○
心エコー	○								○
悪性腫瘍検索（血液マーカー検査、必要に応じて頭部 MRI、腹部エコー等）	○								○
眼底検査	○							○	
質問票（VAS 等）	○	○		○	○	○	○	○	○
運動負荷検査	○						○	○	○
有害事象の確認			○	○	○	○	○	○	○