

ヒト幹細胞臨床研究実施計画の概要

研究課題名	偽関節を対象とした自己骨髄培養細胞由来再生培養骨と骨芽細胞シート複合体の有用性を検証する研究
新規申請年月日	平成 25 年 8 月 20 日
実施施設及び研究責任者	奈良県立医科大学 川手 健次
対象疾患	遷延治癒骨折と偽関節
ヒト幹細胞の種類	自己骨髄間葉系細胞
実施期間及び対象症例数	厚生労働大臣意見発出日から 5年間 平成 年 月 日 まで 15 症例 (被験者群 症例 対照群 症例)
治療研究の概要	骨折後3ヶ月以上の保存的、外科的療法によっても治癒を得られない遷延治癒骨折と骨折後6ヶ月以上経過した偽関節を対象とする。まず骨髄を自己血清を用いて培養し、さらにβ-TCP顆粒（セラミック人工骨）の表面と孔内に骨髄間葉系幹細胞を培養し、骨芽細胞シートと混合して骨欠損部へ移植する。
その他（外国での状況等）	ヒト幹細胞臨床研究として培養骨髄間葉系幹細胞とβ-TCPを組み合わせた「大腿骨頭無腐性壊死患者に対する骨髄間葉系幹細胞を用いた骨再生医療の検討」、「月状骨無腐性壊死患者に対する骨髄間葉系幹細胞を用いた骨再生医療の検討」、「顎骨嚢胞摘出後の骨欠損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」が実施されているが、さらに改良が必要であるところ。β-TCPではなくPRP（Platelet-Rich Plasma）等の別の素材を用いた検討が始まっている。
新規性	培養細胞搭載人工骨と骨芽細胞シートを併用しているところ。

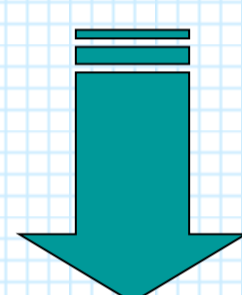


# 偽関節を対象とした自己骨髄培養細胞由来再生培養骨と骨芽細胞シート複合体の有用性を検証する研究

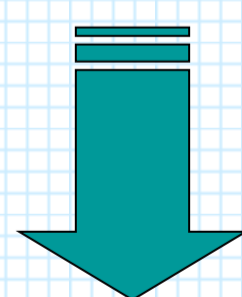
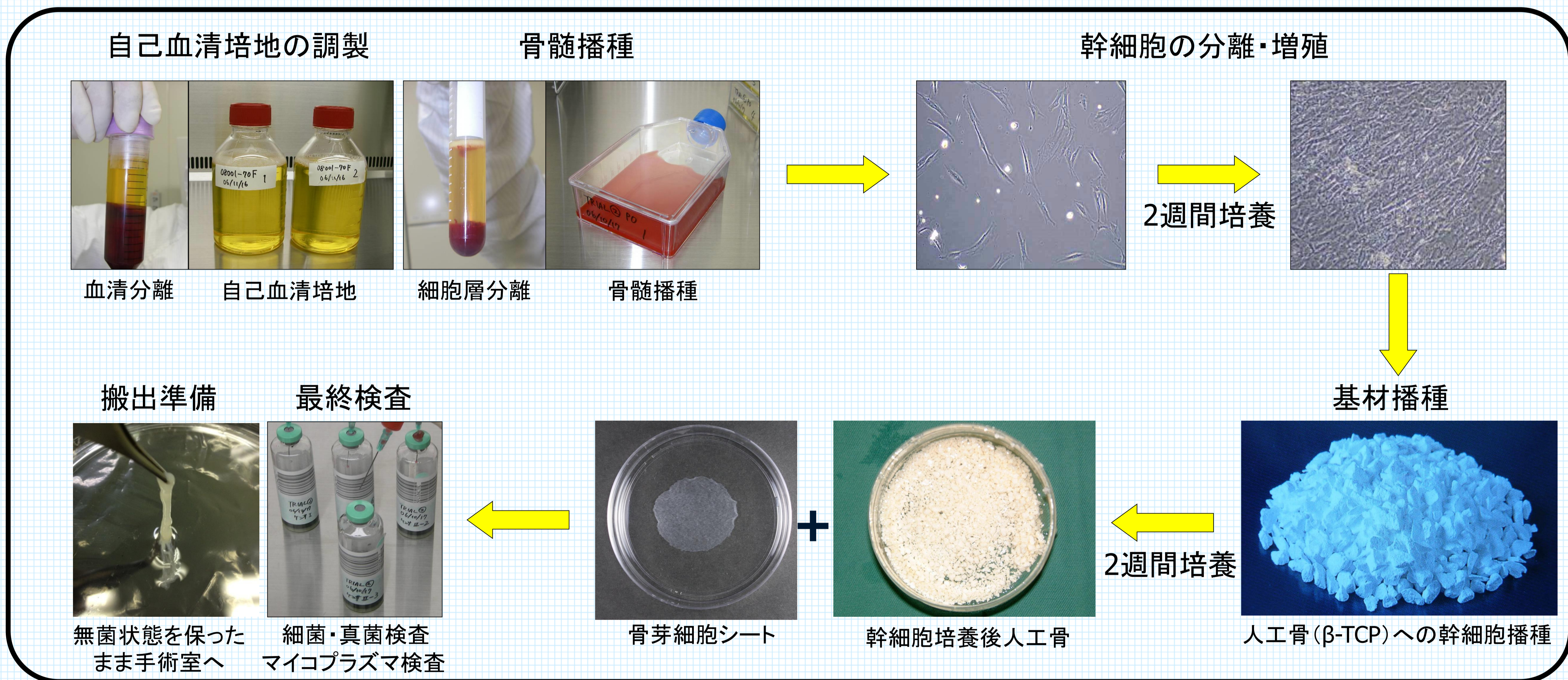
手術1カ月前に中央手術室で、局所麻酔下に骨盤から間葉系幹細胞を採取します(15cc)。同時に培養に使用する血液を400cc採取します。採取した間葉系幹細胞を2週間初期培養して増やし、β-TCP人工骨に播種しさらに2週間二次培養するとともに骨芽細胞シートを作製し偽関節に移植します。奈良医大CPC(Cell Processing Center)はクリーンルームの培養室を2室設け、それぞれの部屋に複数の培養器を備えています。安全に使用できる細胞医薬品としての品質を維持するため、GMP(Good Manufacturing Practice)並びにISO13485に準拠した管理体制を整えています。

## 手術室

局所麻酔下に  
**骨髄穿刺**  
同時に末梢血採血  
400cc  
インフォームド  
コンセント  
感染症  
検査


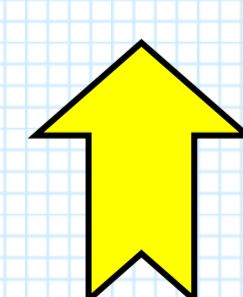



## Cell Processing Center



## 手術室

**幹細胞移植手術**

## 安全性試験


- ・一般細菌検査
- ・真菌検査
- ・エンドトキシン検査(ゲル化法)
- ・マイコプラズマ検査(PCR法)



ヒト幹細胞臨床研究実施計画申請書

平成25年8月20日

厚生労働大臣 殿

研究機関	所在地	〒634-8522 奈良県立橿原市四条町 840 番地
	名称	奈良県立医科大学
	研究機関の長 役職名・氏名	学長 吉岡 章 

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
偽関節を対象とした自己骨髄培養細胞由来再生培養骨と骨芽細胞シート複合体の有用性を検証する研究	人工関節・骨軟骨再生医学講座 教授 川手 健次

## ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

臨床研究の名称		偽関節を対象とした自己骨髄培養細胞由来再生培養骨と骨芽細胞シート複合体の有用性を検証する研究		
研究機関				
	名称	公立大学法人 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 (内 2341, 2324)		
	FAX 番号	0744-25-6449		
研究機関の長				
	役職	学長		
	氏名	吉岡 章		
研究責任者				
	所属	人工関節・骨軟骨再生医学講座		
	役職	教授		
	氏名	川手 健次		
	連絡先	Tel/Fax	Tel : 0744-22-3051 (内 2341) /Fax : 0744-25-6449	
		E-mail	kkawate@narmed-u.ac.jp	
	最終学歴	昭和大学 医学部		
	専攻科目	整形外科		
その他の研究者		別紙 1,2,3 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			
	所在地	〒		
	電話番号			
	FAX 番号			
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			
	氏名			
臨床研究の目的・意義		偽関節の治療には超音波などの保存療法のほか、自家骨を移植する外科的療法があるが、健康部位に欠損を作ること、量が限られること、治療期間の長期化という問題点がある。これを解決するために当研究機関では骨髄間葉系幹細胞と人工骨の複合体を用いた方法を実施してきたが、さらなる旺盛な骨形成と人工骨間の結合を期待して骨芽細胞シートを付加する方法を開発した。恩恵は大なるものと思われる。		





臨床研究の対象疾患		
	名称	偽関節
	選定理由	偽関節は難治性疾患で頻回の手術を要するものや、大きな欠損をと もなうものがあり旺盛な骨形成能と骨補填を必要とする。東日本大 震災のような災害後にも、相当数の偽関節の発生が予想される。
被験者等の選定基準		骨折後3ヶ月以上の保存的、外科的療法によっても治癒を得られな い遷延治癒骨折と骨折後6ヶ月以上経過した偽関節を対象とする。 20歳以下でも保護者の同意が得られた偽関節も対象とする。
臨床研究に用いるヒト幹細胞		
	種類	骨髄間葉系幹細胞
	由来	<input checked="" type="checkbox"/> 自己・非自己・株化細胞 <input checked="" type="checkbox"/> 生体由来・死体由来
	採取、調製、移植又は 投与の方法	局所麻酔下に腸骨稜から15ccを採取する。ただし中学生以下は全 身麻酔下に採取する。2週間の初期培養、播種、2週間の2次培養、 を行い（別紙参照）、培養細胞搭載人工骨と骨芽細胞シートを混合 し移植する。
	調製（加工）工程	<input checked="" type="checkbox"/> 有・無
	非自己由来材料使用	有・ <input checked="" type="checkbox"/> 無 動物種（ ）
	複数機関での実施	有・ <input checked="" type="checkbox"/> 無
	他の医療機関への授与・販売	有・ <input checked="" type="checkbox"/> 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・ 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、病院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0.22μm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う。培養過程において 培養操作時の汚染に対して、無菌試験を行う。さらに最終培地交換 時に培養上清より、無菌試験、マイコプラズマ否定試験、エンドト キシン試験を行い、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。 マイコプラズマ否定試験は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。培養開始時に作成する調整培地について行ったエンドトキシン試験は、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、エンドトキシン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、奈良県立医科大学附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（上記検査での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。

現在までに奈良県立医科大学病院では 20 症例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を採用し安全性を確保する。液体培地（ $\alpha$ -MEM：GIBCO カタログ番号 12571）はフィルター滅菌処理済のものを採用する。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、 $\beta$ グリセロリン酸、デキサメタゾン は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を採用する。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附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。
臨床研究の実施が可能であると判断した理由		当研究機関は 2001 年以来産業技術総合研究所と共同で、間葉系幹細胞培養を行い、52 症例に人工足関節の固着性の向上や骨腫瘍や骨壊死に対する培養細胞搭載人工骨移植を行ってきた。2006 年からは当研究機関内に CPC (セルプロセッシングセンター) を開設し、同様の間葉系幹細胞培養による再生医療を 20 症例に行ってきた。それらの症例では骨形成がみられ感染が生じたことは 1 例もなかった。現在はヒト幹細胞指針を遵守し臨床研究は自粛しているが、技術、設備ともになんら問題なく臨床研究の実施が可能であると思われる。
臨床研究の実施計画		<p><u>研究期間及び対象症例数</u></p> <p>対象は奈良県立医科大学附属病院整形外科受診した遷延治癒骨折と偽関節を対象とする。未成年者の場合は保護者の同意が得られた症例とする。対象年齢は制限なく症例数は承認後 5 年間で 15 例とし、2 年の追跡期間を考慮し研究期間は承認後 7 年間とする。</p> <p><u>移植後の追跡調査の方法</u></p> <p>移植が終了し、退院後も本院整形外科外来にて術後 2 年間は定期的に局所、並びに全身状態を観察するとともに、術後 3 ヶ月、6 ヶ月、12 ヶ月目、以後 3 ヶ月ごとに追跡調査する。</p> <p>骨癒合の評価は最低二方向によるエックス線撮影で行い臨床研究実施者と放射線科医師で骨癒合を判断する。骨癒合の判断が難しい場合は CT 撮影と MRI 撮影を行い、本方法の有効性をみる。</p>
被験者等に関するインフォームド・コンセント		
	手続き	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・コンセントを与える。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、手術時に同意書にて同意の確認を行う（別紙同意書参照）。
	説明事項	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 個人情報の保護の方法 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・苦情の受付先について詳細に説明する。⑨特許の帰属先⑩倫理委員会の種類⑪臨床研究実施期間、実施者の氏名及び職名
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	臨床研究以前に行われたあらゆる保存的、外科的治療法によっても骨癒合が得られない偽関節症例に本法は有用であることを明らかにすることによって今後の再生医療発展が期待できるため。
	代諾者の選定理由	被験者自身の意思決定が不可能な症例では親、親のいない被験者では近親者、近親者がいない場合は保護する者を代諾者とする。
被験者等に対して重大な事態が生じた場合の対処方法		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、本学の医療安全管理指針に基いて対処する。
臨床研究終了後の追跡調査の方法		移植が終了し、退院後も本院整形外科外来にて術後2年間は3か月に1回、定期的に局所並びに全身状態を観察する。その後必要に応じてエックス線撮影もしくはCT撮影、MR撮影を行い移植部位の状態を評価する。
臨床研究に伴う補償		
	補償の有無	<input checked="" type="checkbox"/> 有・無
	補償が有る場合、その内容	臨床研究無過失補償保険 三井住友海上見積もり：賠償責任保険支払限度額1名1億円、1事故・期間中3億円、死亡2000万円、後遺障害最高3000万円など
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。また、本研究終了後には連結不可能匿名化を行う。
	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 本研究に係る術前検査、骨髄穿刺及び細胞培養に掛かる費用は、奈良県立医科大学人工関節・骨軟骨再生医学講座および整形外科教室がすべて負担する。 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



	<p>ベータ TCP を使用した培養細胞搭載人工骨の研究はヒト幹細胞臨床研究として他施設で行われており、それ以前に当院では先行して行ってきたが、人工骨間の間隙やドナー骨母床と人工骨との間隙を埋めないことには、人工骨どうしが癒合することは困難で、また骨に置き換わるまでに相当な時間を要する。その点で培養細胞搭載人工骨と骨芽細胞シートを併用した当該研究は新規性が認められる。また骨欠損が小さい症例では骨芽細胞シートの注射注入も可能である。</p>
--	---

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）

- 研究者の略歴及び研究業績
- 研究機関の基準に合致した研究機関の施設の状況
- 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
- 同様のヒト幹細胞臨床研究に関する内外の研究状況
- 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
- 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
- その他（資料内容：医療安全管理指針）
- その他（資料内容：臨床研究計画書）
- その他（資料内容：培養手順）
- その他（資料内容：医の倫理委員会要録・規定・委員名簿）

## 「偽関節を対象とした自己骨髄培養細胞由来再生培養骨と骨芽細胞シート複合体の有用性を検証する研究」臨床研究の要旨

奈良県立医科大学 人工関節・骨軟骨再生医学講座

川手健次

奈良県立医科大学 整形外科学教室

田中康仁、面川庄平、朴木寛弥、上松耕太、  
上羽智之、清水隆昌、稲垣有佐、倉 知彦

奈良県立医科大学 健康政策医学教室

赤羽 学

奈良県立医科大学 口腔外科学教室

桐田 忠昭、柳生 貴裕、上山 善弘

偽関節は骨欠損をとまなうことと骨を作る能力が劣っていることから、その部へ骨に置き換わる人工骨である  $\beta$ -TCP の表面と孔内に骨髄間葉系幹細胞を培養したものと、骨芽細胞シートを混合して移植するのが本臨床研究の骨子である。骨髄間葉系幹細胞は偽関節をきたした患者の腸骨から局所麻酔剤下に 10 数 ml の骨髄を骨髄針を用いて採取する。同一患者の血清を培養に用いるので、骨髄採取日、もしくはそれ以前に約 400ml の患者血液を中央手術室で採取する。

この自己血清を含んでいる液体培地の中に採取した骨髄を混和してフラスコ内で培養する。固着する細胞は約 14 日でフラスコ底面全体をほぼ覆い尽くすように増殖する。この増殖した細胞をフラスコより剥離して、剥離した細胞を多孔体の  $\beta$ -TCP と混和して二次培養をおこなう。骨髄細胞は約 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  $\beta$ -TCP が作製可能となる。一方で二次培養時にグリセロリン酸を加えずに、20.5  $\mu$ g/ml アスコルビン酸、100nM デキサメタゾンのみを培地中に投与すると、骨基質を含まない骨芽



細胞群がシート状になりプレート底面に形成され、これを剥がすことによって骨芽細胞シートを得ることができる。このシートで同時に作製した骨芽細胞・骨基質を含む  $\beta$ -TCP を包むことや、 $\beta$ -TCP 顆粒の間隙をのり状に埋めることができるため、非常に効率的かつ旺盛な骨形成を得ることができる。これらの  $\beta$ -TCP と骨芽細胞シート複合体を骨欠損部に移植し、その後の骨形成をエックス線写真、CT、MRI で観察する。この臨床研究は 5 年間で 15 症例を対象とする。