

■ 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： )

その他（資料内容： )

その他（資料内容 )

## 目次

別紙1【その他の研究者】	7
<b>別紙2【臨床研究の目的・意義】</b>	13
<b>別紙3【臨床研究の対象疾患・選定理由】</b>	14
<b>別紙4【臨床研究に用いるヒト幹細胞、採取、調整、移植又は投与の方法】</b>	15
別紙5【安全性についての評価】	16
<b>別紙6【臨床研究の実施が可能であると判断した理由】</b>	17
<b>別紙7【臨床研究の実施計画】</b>	24
別紙8【被験者に関するインフォームドコンセント】	29
別紙9【被験者に対して重大な事態が生じた場合の対処方法】	32
<b>別紙10【その他必要な事項】</b>	35
添付書類1【研究者の略歴及び研究業績】	36
添付書類2【研究機関の基準に合致した研究機関の施設の状況】	36
添付書類3【臨床研究に用いるヒト幹細胞の品質に関する研究成果】	36
添付書類4【同様のヒト幹細胞研究に関する内外の研究状況】	36
添付書類5【臨床研究の概要を出来るだけ平易な用語を用いて記載した要旨】	39
添付書類6【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】	40
添付書類7【倫理審査委員会資料】	46
添付書類7【慶應義塾学内倫理委員会審査資料】	51

## 別紙2【臨床研究の目的・意義】

現在、欧米諸国と同様、我が国においても虚血性心不全をはじめとした重症心不全患者の数は増加の一途をたどっている。通常の内科的あるいは外科的治療で生命を維持することができなくなった場合の選択枝として、心臓移植および人工心臓治療がある。しかし、心臓移植が必要な重症心不全患者のほとんどは、移植ドナーが見つかる前に死亡しているのが現状であり、ドナー不足は万国共通の社会問題となっている。

その点を改善する目的で近年、細胞移植が注目されている。細胞移植とは、従来の臓器そのものを移植する臓器移植とは異なり、生体外で培養・分化誘導された細胞を目的の組織に直接注入するという細胞レベルでの臓器機能の補填を目指している。この方法は生体心移植と比較しても、自己細胞を用いるため免疫抑制剤を使用する必要が無く、長期にわたる免疫抑制剤の使用による合併症も生じない。

臨床研究で心筋に対する骨髄単核球細胞治療の安全性と有効性は確認されている（臨床研究の実施が可能であると判断した理由に記載）。また骨髄由来間葉系細胞を用いた細胞治療は少数例で有効性と安全性の報告があるが、いまだ確立された治療法ではない（臨床研究の実施が可能であると判断した理由に記載）。また、本邦での実績は数少ない。冠動脈の動脈硬化によって生じた冠動脈疾患で心筋が広範囲に壊死したか虚血に陥り、心機能の重篤な低下を来した患者を虚血性心疾患に伴う重症心不全患者と呼ぶ。当該疾患への既存の治療法は、冠動脈バイパス術あるいは左室形成術である。しかし同手術は、十分な残存心筋及びバイパス血管を接続可能な冠動脈（十分な口径が保たれ、かつ瀰漫性の病変ではない）が存在している事が適応条件である。この条件を満たさなくては、手術によって予想される自覚症状及び生存率改善の利得が、手術侵襲による不利益を上回る事が無いと判断される。すなわち適応外の患者は、心不全に起因する呼吸困難による重篤な苦痛を味わいながら、ただ死を待つしか無い。

この治療法の効果と安全性を本邦において確認し（パイロット研究に相当）、確立された手技とする必要がある。すなわち本研究のエンドポイントは当該治療法の安全性を検討するとともに、従来の外科的手術に付加的に治療を行う事によって、手術によって得られると予想される心機能改善効果に付加的な改善効果が認められるかどうかを、少数例で確認する事にある（当施設内ヒストリカルコントロールとの比較）。少数例で安全に治療が施行でき、十分付加的効果が予想出来れば、多数例でのプラセボを用いた盲検試験で有効性を検証する臨床試験を計画する。それにより、移植が行われなければ余命の無いと予想される、数多くの重症心不全患者の症状を緩和し寿命を延長することが出来る可能性がある。

### **別紙3【臨床研究の対象疾患・選定理由】**

冠動脈バイパス術及び左室形成術の適応患者は、冠動脈疾患に伴う重症心不全患者である。今回行われる自己骨髄間葉系幹細胞治療は、移植した幹細胞が心筋に分化し、心筋細胞を補填する事を期待して行われる。しかし同時に後述するごとく（臨床研究が実施可能であると判断した理由）、移植した細胞によって局所の血管新生を生じる事により虚血が改善する事と、移植した細胞から分泌される液性因子によって、局所のホスト心筋細胞の細胞死を防ぐ効果が証明されている。そのため冠動脈疾患に伴う重症心不全患者に対して、より高い治療効果が期待できる。

幹細胞を心筋に移植する際、心臓カテーテル操作によって、外科的手術には随伴せず、心臓内腔あるいは冠動脈内投与を行う方法があり、開胸して目視下に細胞を注入する方法と比較して、一見侵襲が少ない事が想定される。しかし、後述するごとく（臨床研究が実施可能であると判断した理由）、目視下に細胞を注入する方法が、細胞移植手技だけを考えた場合（心臓局所までのアプローチを除き）、最も確実で安全な手技であると考えられる。そのため本研究では、冠動脈バイパス手術及び左室形成術の心臓外科手術が予定されている患者に、手術中に目視にて細胞を直接心筋内へ注入する方法を対象とした。

## 別紙4【臨床研究に用いるヒト幹細胞、採取、調整、移植又は投与の方法】

腸骨より15ccの骨髄液を採取、自己血清を用いて、培養増殖。4週間以内の培養で細胞数を30,000,000～100,000,000程度まで増殖させた後回収、生理食塩水細胞浮遊液を、心臓外科手術時に直視下に心筋内に直接注入する。

### 自己骨髄液採取

1. 骨髄採取場所は、無菌操作が可能な手術室かそれに準ずる場所（採血室）で施行する。患者の全身状態により病床からの移動が困難と主治医が判断した場合、集中治療室にて無菌的に施行する。
2. 患者を腹臥位とし、腸骨部分を露出する。  
人工補助循環装置、スワングアンツカテーテルが大腿部に装着されている場合は、チューブ類が閉塞しない様配慮する。
3. イソジン消毒を行う。
4. Cardinal health社 Illinois Bone Marrow Needle (DIN 1515x)を用いて、腸骨より骨髄液15ccを無菌的に採取する。

### 調整方法

調整方法は、添付した細胞手順書（添付資料1）に従う。

### 移植方法

1. 回収された細胞を生理食塩水にて4mLに浮遊させる
  2. 0.2mLづつを1mLのシリンジに吸引し合計20本の細胞浮遊液シリンジを作製し、27ゲージの針を装着し、混入した空気を取り除く
  3. 心臓外科手術中に直視下に心筋梗塞部および心筋梗塞周辺部に5mm以上の間隔を開けて、細胞浮遊液シリンジに装着した針を刺入
  4. 軽く陰圧をかけてバックフローを確かめ、心筋内に針の先端が刺入している事を確認する
  5. その後一カ所5～10秒で細胞を注入し、注入後も組織内圧が低下するまで10秒程度待つ針を抜く
- 3～5の操作を合計20回繰り返す

## 別紙5【安全性についての評価】

### 1 **臨床試験に用いる試料の安全性**

今回、細胞培養を担当する慶應義塾大学医学部では、自己骨髄と自己血清を用いて間葉系細胞の培養を安全に行える設備ならびに経験を有しており、すでに間葉系細胞の培養増殖に成功している（倫理委員会受付番号 49 平成 15 年 11 月 5 日承認）。また、間葉系細胞を用いた臨床応用（倫理委員会受付番号 145 平成 17 年 7 月 28 日承認）を行っていて、既に 2 例の患者の骨髄から間葉系細胞の培養増殖に成功している。培養は「細胞培養操作手順書（添付書類 1）」に則り、この培養期間中の真菌ならびにマイコプラズマによる汚染は認められていない。また、これらの患者培養細胞の同一患者への移植も行っており、感染の副作用をおこさず、良好な治療効果を得ている。

本研究では GMP 基準にのっとり、細胞培養を実行することによって細菌、真菌、ウイルスの感染を排除するよう配慮する。また本研究ではすべて自己細胞を用いるために、未知の病原体による感染の可能性はきわめて低くなるよう配慮している。また培養中の病原体の検査を移植直前にいき、予想外の病原体感染を極力抑える。

- 1.1 原料となるヒト幹細胞の受け入れ時に細胞の感染状況を確認し、記録する。
- 1.2 細胞調整はすべてクリーンルーム内で行い、閉鎖系培養器具を用いて、不慮の外來病原体の感染を防止する。
- 1.3 細胞培養中定期的に（1 週間毎）培地の一部を採取し、病原体の混入の有無を確認する。
- 1.4 本研究では、血清に自己血清を用いるために、不活化は必要なく、血清を介して感染を引き起こす種々のウイルス・プリオンによる汚染の可能性はない。
- 1.5 移植後にシリンジ内に残留した細胞浮遊液を（シリンジ 3 本）、保存培養し病原体の有無を確認する。

### 2 **臨床研究実施後の安全性確保**

- 2.1 本試験は安全性の評価を目的としている。そのため別紙 7【臨床研究の実施計画】内に詳細を記載した。
- 2.2 細胞移植後の被験者の安全確保は 別紙 7【臨床研究の実施計画】内 項目 8（検査項目）より項目 1 1（臨床試験の中止）までに記載した。
- 2.3 細胞移植後の細胞調整に関する安全確保に付いては、別紙 7【臨床研究の実施計画】内 項目 4（細胞の保存）に記載した。

## 別紙6【臨床研究の実施が可能であると判断した理由】

### 催不整脈作用

骨髄間葉系幹細胞から得られた心筋細胞は未熟で、in vitro 培養条件下で観察すると、誘導初期に限ってしばしば活動電位で再分極異常を認める場合がある(1, 2)。しかし、成熟するにつれて活動電位は成熟し、不安定な再分極現象は消失する(1, 2)。またヒト骨髄間葉系幹細胞はその心筋への分化誘導効率が現在の培養方法では少なくとも0.3%と低く(3)、再生した心筋細胞自体の量が圧倒的に少ない事が予想され、それらが強固にホスト心筋とギャップ結合を示す事から、再分極は電気緊張の現象によって早期に安定化すると予想出来る(1-2)。また一般的に培養で用いられる培養液は、血清が大量に混入している事が知られている。血清は血小板が脱顆粒して放出された多くの成長因子が含まれている事が知られており、これらが心筋細胞の電気生理学的特性を変化させている事が考えられる。我々の検証でも、血清無しの培養液で培養すると、活動電位静止膜電位が明瞭に深くなり、より成熟した心室筋様活動電位を呈する様になる(図1)。つまり in vitro で長期間培養した心筋細胞の電気生理学的特性から、移植した細胞の催不整脈性を議論する事は(4)危険であると思われる。また間葉系細胞の移植によって、ホスト側心筋に対して血管新生やアポトーシス抑制といった良好な反応が生じ(5-7)、ホスト心筋内の電氣的不均一性を解消する事により、総合的には不整脈を生じない方向に働く事が想像出来る。

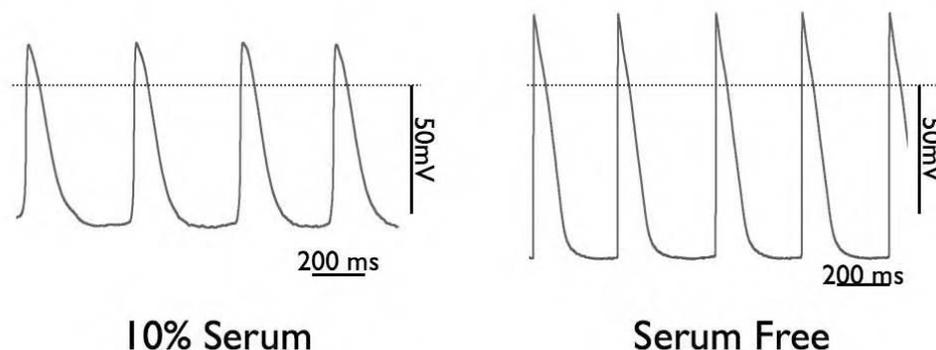
過去の臨床実施例では、症例数は少ないが、骨髄間葉系幹細胞移植で、催不整脈性の報告は無い。(8)

### 腫瘍形成性

ヒト骨髄間葉系幹細胞を免疫不全動物に移植した際に、移植局所に腫瘍形成性の報告は無い(3)。ただし、今回我々が用いる骨髄間葉系幹細胞は、培養に自己(ヒト)血清を用いるため、正確には同一とは言えない。そこで我々は2006年12月に免疫不全マウス(Nude mouse)に今回用いる骨髄間葉系幹細胞と同じ方法で培養した細胞の、皮下移植を行い、経過を観察しているが2007年3月現在も腫瘍形成を認めていない。今後も経過を観察する予定である。

また臨床患者においては、定期的に心臓画像検査(MRI, CT)を用いて腫瘍形成性の有無を慎重に経過観察してゆく。

(図1)



### Serumに長期間暴露された培養再生心筋細胞は決してin situ の電気生理学的特性を反映しない

ヒト骨髄間葉系幹細胞から誘導した心筋細胞、左は一般的に培養で用いられる 10%血清を含む培養液で培養した際に記録される活動電位、右は血清を取り除いた、培養液で観察される再生心筋細胞からの活動電位。

#### **心臓になる可能性のある細胞**

再生医療の細胞ソースとして多くの候補がある。しかし、拒絶反応や未知の病原体による感染の危険性が無い自己細胞で、心臓になる事が証明されている細胞ソースは間葉系幹細胞しか無い(3, 9)。そのため自己から簡単に採取出来る骨髄間葉系幹細胞を治療に選択した。

#### **心筋再生以外の良好な影響**

骨髄間葉系幹細胞は、血管増殖因子や周囲の細胞に対して液性因子を分泌する事によって保護的な働きをする事が知られている(5-7)。そのため、たとえ移植した細胞が心臓にならなくても、ホストの心筋に対して、血行を改善するあるいはアポトーシスを抑制する事によって、心機能改善効果が期待出来る

#### **動物実験**

骨髄間葉系幹細胞を、心筋梗塞モデルに移植する事によって、心機能の改善が動物実験レベルで数多く証明されている。特にヒト心臓と同等の大きさを有しているブタ(10)で、移植によって心機能改善が見られた。

#### **国内外での臨床研究**

##### *骨髄単球細胞の臨床研究*

主に造血幹細胞が主と考えられる、骨髄由来単球細胞の細胞治療は、国内外で数多く行われ、安全性と良好な結果が既に報告されている(11-18)。しかし造血幹細胞は基礎研究結果から、心臓に分化する可能性が無い事、それと心筋梗塞部位局所に長期間

とどまる細胞数がきわめて少ない事が報告されている(19-20)。また治療に必要な細胞数を得るために、大量の骨髄液採取が必要で、その患者への侵襲が大きい事も問題である。しかし、骨髄の間葉系幹細胞と比べて細胞の大きさが小さく、毛細血管レベルでの塞栓症状を生じにくいのでは無いかと考えられている(21)。そのため骨髄間葉系幹細胞では、単球細胞で行われている細胞移植法とは異なった方法が選択されるべきである(後述)。

#### 骨格筋芽細胞の臨床研究

心筋を補充するために、自己骨格筋芽細胞を移植する試みが、海外では既に行われている(22)。骨格筋芽細胞はほぼ無限に増殖し、ある程度の心機能改善効果が有ると報告されているが、高い確率で、心室性不整脈を生じるとされ(23)、我々の基礎研究においても、骨格筋芽細胞特有の電気生理学的特性が催不整脈作用を生じた可能性が示唆され、必ずしも全ての細胞治療に共通の副作用では無い事が科学的データから考えられる(24)。本治療では、今回我々が選択した、心臓外科手術時に目視下に細胞を注入する方法が選択され、その細胞移植手技のみだけに焦点を当てると、大きな合併症も無い事が証明されている(22, 23)。

#### 骨髄間葉系幹細胞の臨床研究

国内外で既に臨床試験が行われている。論文化されている部分についてはChen(8)のみである。しかし、海外では既に大規模臨床試験が進行しており、詳細は未公開では有るが、安全で良好な成績を得ている事が示されている(26)。また本邦でも、国立循環器病センターで、既に8例で施行され、左室駆出率で23.9%から27.8%に改善を認めた事が報告されている。また特に大きな有害事象も出ていない事が、循環器病研究委託事業 16公-6 班会議(2007年1月20日)にて報告があった。しかし移植方法は心内膜側からのカテーテルによる治療で、細胞数を増加させた際に、生じる合併症のリスクは無視できないと想像出来る。当該施設で申請する臨床試験は、あくまでも心臓外科手術に付加する形で行われ、心臓外科手術の治療成績、術後心機能改善増強効果を狙う物で、それによる心臓外科手術適応の拡大を目指す点が異なる。

### **直視下による細胞移植を選択する理由**

間葉系細胞の直径は、骨髄造血幹細胞に比べて大きく、そのまま冠動脈内投与を行うと、毛細血管レベルで閉塞し、多発性小動脈梗塞を生じる(21)。心内膜側からのカテーテルベースでの細胞移植(16)も、手技による侵襲が少ないが、ブラインドで細胞を心筋内に注入するため、心筋内に針先端が入っているかどうかを目視で確認する事が出来ず、針を抜去した後に間葉系細胞が心腔内に逆流して、全身に骨髄間葉系幹細胞が散布され

る可能性がある。これらの細胞は各臓器の毛細血管レベルで塞栓を生じ(21)、臨床上問題となるような脳梗塞等の塞栓症状を生じる可能性が否定出来ない。細胞注入を最も安全にそして確実にを行う方法は目視下に心筋を確認しながら局所に注入する方法で、そのためには開胸手術が必要と考え、血行再建術や左室形成術を行う際に同時に移植する方法を選択した。また細胞の局所への注入が目視下に確実に行われ、失われる可能性が低いことから、その治療効果も高い可能性が予想出来る。

(文献)

- 1、三好俊一郎, 小川聡, 板橋裕史, 福田恵一, 谷本耕司郎, 古田晃, 竹田征治, 梅澤明弘, 清水達也, 岡野光夫 心筋再生と電気現象 再生医療における不整脈心電図 24(suppl 3); 15-28, 2004
- 2、S Miyoshi, Y Ikegami, Y Itabashi, A Furuta, A Umezawa, S Ogawa Cardiac cell therapy and arrhythmias, Circulation Journal In press
- 3、Takeda Y, Mori T, Imabayashi H, Kiyono T, Gojo S, Miyoshi S, Hida N, Ita M, Segawa K, Ogawa S, Sakamoto M, Nakamura S, Umezawa A. Can the life span of human marrow stromal cells be prolonged by bmi-1, E6, E7, and/or telomerase without affecting cardiomyogenic differentiation? J Gene Med. 6(8); 833-45, 2004
- 4、Zhang YM, Hartzell C, Narlow M, Dudley SC. Stem cell-derived cardiomyocytes demonstrate arrhythmic potential Circulation 106; 1294-1299, 2002
- 5、Gojo S, Gojo N, Takeda Y, Mori T, Abe H, Kyo S, Hata J, Umezawa A. In vivo cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells. Experimental cell research 288; 51-59, 2003.
- 6、Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms Circulation 109; 1543-1549, 2004
- 7、Gnecchi M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morello F, Mu H, Melo LG, Pratt RE, Ingwall JS, Dzau VJ. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. FASEB J 20; 661-669, 2006
- 8、Chen S, Fang W, Ye F, Liu Y, Qian J, Shan S, Zhang J, Chunhua RZ, Liao L, Lin S, Sun J. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients

- with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 94: 92-95, 2004
- 9、 Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A and Ogawa S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*; **103**: 697-705, 1999
- 10、 Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, Pittenger MF and Martin BJ. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg*; **73**: 1919-1925; discussion 1926, 2002
- 11、 Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G and Wernet P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*; **106**: 1913-1918, 2002
- 12、 Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grunwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S and Zeiher AM. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*; **106**: 3009-3017, 2002
- 13、 Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A and Drexler H. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet*; **364**: 141-148, 2004
- 14、 Fernandez-Aviles F, San Roman JA, Garcia-Frade J, Fernandez ME, Penarrubia MJ, de la Fuente L, Gomez-Bueno M, Cantalapiedra A, Fernandez J, Gutierrez O, Sanchez PL, Hernandez C, Sanz R, Garcia-Sancho J and Sanchez A. Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction. *Circ Res*; **95**: 742-748, 2004
- 15、 Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schumichen C, Nienaber CA, Freund M and Steinhoff G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet*; **361**: 45-46, 2003
- 16、 Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Mesquita CT, Rossi MI, Carvalho AC, Dutra HS, Dohmann HJ, Silva GV, Belem L, Vivacqua R, Rangel FO, Esporcatta R, Geng YJ, Vaughn WK, Assad JA, Mesquita ET and Willerson JT. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe,

- chronic ischemic heart failure. *Circulation*; **107**: 2294-2302, 2003
- 17、 Tse HF, Kwong YL, Chan JK, Lo G, Ho CL and Lau CP. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet*; **361**: 47-49, 2003
- 18、 Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Tsutsumi Y, Ozono R, Masaki H, Mori Y, Iba O, Tateishi E, Kosaki A, Shintani S, Murohara T, Imaizumi T and Iwasaka T. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation*; **104**: 1046-1052, 2001
- 19、 Balsam L, Wagers A, Christensen J, Kofidis T, Weissman I and Robbins R. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature*; **428**: 668-673, 2004
- 20、 Murry C, Soonpaa M, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima H, Rubart M, Pasumarthi K, Virag J, Bartelmez S, Poppa V, Bradford G, Dowell J, Williams D and Field L. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*; **428**: 664-668, 2004
- 21、 Vulliamt PR, Greeley M, Halloran SM, MacDonald KA and Kittleson MD. Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet*; **363**: 783-784, 2004
- 22、 Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT and Marolleau JP. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet*; **357**: 279-280, 2001
- 23、 Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, Bel A, Sarateanu S, Scorsin M, Schwartz K, Bruneval P, Benbunan M, Marolleau JP and Duboc D. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol*; **41**: 1078-1083, 2003
- 24、 Itabashi Y, Miyoshi S, Yuasa S, Fujita J, Shimizu T, Okano T, Fukuda K and Ogawa S. Analysis of the electrophysiological properties and arrhythmias in directly contacted skeletal and cardiac muscle cell sheets. *Cardiovasc Res*; **67**: 561-570, 2005
- 25、 Chang MG, Tung L, Sekar RB, Chang CY, Cysyk J, Dong P, Marban E and Abraham

MR. Proarrhythmic potential of mesenchymal stem cell transplantation revealed in an in vitro coculture model. *Circulation*; **113**: 1832-1841, 2006

26、 Minguell JJ and Erices A. Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease. *Exp Biol Med (Maywood)*; **231**: 39-49, 2006

## 別紙 7 【臨床研究の実施計画】

### 1 臨床試験に用いる試料

#### 自己間葉系細胞

- 1.1 間葉系細胞は自己の骨髄液（15mL）と自己の血液（約 400～600mL）からの血清を用いて、接着系の細胞を培養することにより増殖する。自己細胞を用いるため免疫学的問題が無く、細胞移植時の拒絶反応を避けることができる。
- 1.2 用いる培地は DMEM で抗生物質（penicillin, streptomycin, Amphotericin-B）を添加し、他の成長因子は用いない。また、抗生物質は培地交換時に除去するため最終的には用いない。
- 1.3 この接着系の細胞が間葉系細胞としての性質を持つことは細胞表面抗原の分析により確認している。

### 2 臨床試験の計画

#### 2.1 臨床試験の対象

- 2.1.1 虚血性心疾患・心筋症により、呼吸困難・胸痛・下腿浮腫を呈し、従来の $\beta$ 阻害薬・ACE 阻害薬・アンギオテンシン阻害薬・Ca 拮抗薬・硝酸薬・利尿剤投与による治療下でも、左室駆出率 40%以下の重症心不全患者(NYHA3 度以上)
- 2.1.2 患者本人の意思および家族の十分な理解承諾が明示されていること。
- 2.1.3 患者本人から文書による同意が得られること。
- 2.1.4 原則として同意取得時の満年齢が 20 才以上 79 才以下であること。
- 2.1.5 術前の検査にて、付随して行う手術治療による効果が不十分となる可能性が高い症例（残存心筋が少ないと予想される場合、バイパス吻合先血管のびまん性動脈硬化）
- 2.1.6 心臓外科手術が予定されている患者

上記に対して、外部審査委員 1 名を含めた、当院呼吸循環器内科・心臓血管外科・血液内科による患者選定委員会を招集し、委員の同意を得られた症例を対象とする。

#### 2.2 除外基準として、以下の基準に 1 つでも該当する症例は除外する。

- 2.2.1 悪性腫瘍を有する患者（頭部造影 CT 検査あるいは MRI 検査、胸部・腹部造影 CT 検査、腹部エコー検査を施行する。患者の全身状態が許せば、上部消化管内視鏡、下部消化管内視鏡の施行が望ましい）

- 2.2.2 増殖糖尿病網膜症（未治療の増殖網膜症、中期・晩期増殖網膜症）を有するもの（治療終了例は除く。）
- 2.2.3 合併症により余命が数ヶ月以内と考えられる患者
- 2.2.4 過去数ヶ月以内にアルコールもしくは薬物依存性の既往がある患者
- 2.2.5 インフォームドコンセントを得られない患者
- 2.2.6 活動性の感染症を有する患者
- 2.2.7 妊婦または妊娠している可能性のある患者
- 2.2.8 培養中に使用する抗生物質に対してアレルギーの既往について、検査直前に確認を行い、当抗生物質に対してアレルギーのある患者
- 2.2.9 その他、担当医師が不相当と判断した患者

### 3 臨床試験の方法

#### 3.1 骨髄液と末梢血の採取

患者自身の骨髄 15mL を局所麻酔下に腸骨 1 カ所より採取し、ヘパリン入り PBS 溶液に混和する。また、自己末梢血 400～600mL を採血し、遠心管に入れる。

#### 3.2 細胞培養

- 3.2.1 血液より血清を分離して、血清入りの液体培地を調整する。用いる培地は DMEM で、抗生物質（penicillin, streptomycin, Amphotericin-B）を添加する。
- 3.2.2 細胞培養ディッシュに接着するヒト骨髄間葉系細胞を培養する。
- 3.2.3 間葉系細胞は自己の骨髄液（15ml）と自己の血液からの血清を用いて、接着系の細胞を培養することにより増殖させる。他の成長因子は用いない。
- 3.2.4 抗生物質は培養 3 回目継代後、1 回目の培地交換時に除去し、最終的には抗生物質は用いない。
- 3.2.5 間葉系細胞は培養期間中に真菌、細菌、ならびにマイコプラズマによる汚染がないことを確認する。
- 3.2.6 搬送当日にケミコンアキュターゼを用いて、細胞培養ディッシュからヒト骨髄間葉系細胞を剥離し、最終容量が 40mL になるように培養液を添加し、全量を 50mL フェルコンチューブに回収する。遠心機（H-26F、KOKUSAN 社）を用いて、細胞懸濁液を回転数 1800 rpm で 5 分間、室温で遠心分離した後、上清を除去し、細胞懸濁液を得る。
- 3.2.7 以上の培養操作は、クリーンルーム運転管理指針、細胞管理基準書、SOP 試験検査手順法（微生物限度試験法、マイコプラズマ）、細胞標準操作手順書に則り、無菌的に行う。

#### 4 細胞の保存

細胞移植後に感染症が起きた場合の原因検索のために、厚生労働省の指針に従い、採取した細胞および培養で得られた細胞の一部を10年間保存する。保存した細胞はその他の目的には一切使用しない。

#### 5 細胞移植

5.1 慶應義塾大学病院中央手術室において、前述の細胞懸濁液を針付きディスプレイポザブルシリンジ(1cc)に充填する。

5.2 患者に、原則として手術中、心筋内に局注するという形にて移植を行う。具体的には約  $3-10 \times 10^7$  の細胞/4mLPBS を心筋 20~30 カ所に分割して筋肉内に注入する。

#### 6 心筋誘導 in vitro アッセイ

6.1 移植に使用されなかった細胞の一部は、その後培養継続し基礎的研究に使用される。

6.2 培養中に薬剤付加を行い、その後インビトロ心筋誘導効率アッセイを行うことにより、薬剤投与による誘導率改善効果を判定する。今後そのデータをもとに本治療の効果増強させるための基礎的なデータとする。

#### 7 その他の治療法

原則的に既存の治療法は変更しない。担当医師が薬剤の変更もしくは追加が必要だと判断した時には、研究責任者への報告を行うこととする。

#### 8 検査項目

8.1 治療前、投与翌日、第1週目、2週目、1ヶ月後、2ヶ月後、6ヶ月後に評価を行う。

※以下の項目を検査する。

8.1.1 血圧、脈拍、体重

8.1.2 心電図、ホルター心電図、加算平均心電図、心臓超音波検査、胸部レントゲン

8.1.3 一般採血：血算、血液化学、炎症指標（CRP）

8.1.4 特殊採血：心血管作動性ホルモンの測定、BNP、動脈血液ガス

8.1.5 動脈血

8.1.6 トレッドミル検査（施行可能例のみ）

8.1.7 心臓MRI 検査・心プールシンチ

8.1.8 血管造影検査

8.1.9 眼底検査

8.1.10 CT 検査

週数	0	1	2	3	6	投与 翌日	7	8	10	14	30
同意書の提出	○										
血液（血清）の採取		○	○	○							
骨髄液の採取			○								
細胞移植					○						
QOL 評価表の記入	○										○
血圧	○		○		○	○	○	○	○	○	○
脈拍	○		○		○	○	○	○	○	○	○
体重	○						○		○		○
心電図	○		○		○	○	○	○	○	○	○
ホルター心電図 ・加算平均心電図	○							○			○
心臓超音波検査	○							○			○
胸部レントゲン	○				○	○	○	○	○	○	○
一般採血	○				○	○	○	○	○	○	○
特殊採血	○				○	○	○	○			○
動脈血液ガス	○				○	○					○
トレッドミル検査	○										○
心臓 MRI 検査 ・心プールシンチ	○								○	○	○
血管造影検査	○							○			
眼底検査	○								○		○
CT 検査	○									○	○

8.1.11 死亡例に対しては摘出心臓の病理学的検討を行う。

8.2 安全性の評価項目

8.2.1 血液生化学的検査：治療前、細胞移植翌日、第1週目、2週目、1ヶ月後、2ヶ月後、6ヶ月後に行う。また、必要時には随時検査を行う。

8.2.2 眼底検査：治療前、細胞移植1ヶ月後、6ヶ月後に行う。

8.2.3 CT 検査：治療前、細胞移植1ヶ月後、6ヶ月後に行う。

8.2.4 病理解剖：被験者死亡時には原因検索のために可能な限り病理解剖を行うことを、同意書、取得時に被験者および家族に対して説明する。

8.2.5 入院期間中データ蓄積機能付き連続心電図モニターを装着する

## 9 安全性の報告

9.1 安全性に関して1例ごとに実施症例の報告を倫理委員会行うこととする。

## 10 考えられる危険性

間葉系細胞の移植に際しては、移植された細胞は心筋細胞および血管細胞への分化を期待して移植されるが、他の細胞、例えば骨を作る骨芽細胞へ分化する可能性は完全には否定できない。また血管新生に伴い、検査で発見できなかった悪性腫瘍を悪化させる可能性、網膜症を発生または進行させる可能性が考えられる。また移植した細胞から不整脈が生じる可能性がある。

## 11 臨床試験の中止（エンドポイント）

11.1 以下の基準に合致する場合は直ちに臨床試験を中止する。

11.1.1 被験者から臨床試験への参加の辞退の申し出があった場合

11.1.2 臨床試験責任医師もしくは分担医師の判断による場合

11.1.2.1 有害事象が発現した場合

この場合は直ちに臨床試験を中断し、有害事象の治療にあたりると同時に、慶應義塾大学医学部倫理委員会に報告する。

11.1.2.2 臨床試験実施計画違反が明らかになった場合

## 12 被験者へのデータの開示

得られたデータは、被験者より希望があれば、本人のものに限って開示する。

## 13 臨床試験予定期間

承認から2年間

## 14 予定症例数

5例

## 別紙8【被験者に関するインフォームドコンセント】

### 1 説明文書の作成方法

- 1.1 臨床試験責任医師は被験者から臨床試験への参加の同意を得るために用いる説明文書を作成する。また、必要な場合には、これを改訂する。なお、説明文書の記載事項には2)に示す事項が含まれていなければならない。
- 1.2 作成または改訂された説明文書はその使用に先立ち、慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認を得ることとする。

### 2 説明文書記載事項（添付書類6を参照）

説明文書には以下の事項が含まれていることとする。

- 2.1 細胞移植の説明と研究のテーマ
- 2.2 研究目的
- 2.3 研究方法
- 2.4 不要となった細胞の処理
- 2.5 実施機関名ならびに実施責任者
- 2.6 同意頂けなかった場合、同意の撤回について
- 2.7 個人のプライバシーについて
- 2.8 患者さんへの危険性
- 2.9 費用負担について
- 2.10 研究から生じる知的財産権の帰属

### 3 被験者の利益および不利益

#### 3.1 利益

- 3.1.1 自己間葉系細胞を用いた細胞移植治療によって心機能が改善することで自覚症状およびQOLの改善が期待できる。
- 3.1.2 局所麻酔下で採取した少量の骨髄液から間葉系細胞を培養により得るため、既存の骨髄単核球移植と比較して、より非侵襲的に血管再生治療を受けることができる可能性がある。

#### 3.2 不利益

- 3.2.1 本研究は確立された研究方法ではないので本人にとっては研究協力である。
- 3.2.2 骨髄採取時に予想される有害事象：骨髄採取（局所麻酔を含む）および採血に伴い、合併症が発生する可能性がある
- 3.2.3 今回の対象は、通常に行われる骨髄採取法により骨髄液を採取する。採取にかかわる適応は担当医師の判断による。採取（局所麻酔を含む）に伴い、合併症が発生する可能性がある。ただし、本研究では細いディスプレイ針

を使用し、少量（15ml）の骨髄血を採取するため、合併症の発生率は下記と比べ相当低いと考えられる。

<骨髄移植時の骨髄採取の際の合併症>

- 3.2.3.1 採取部位の疼痛（採取48時間後）75.4%
- 3.2.3.2 採取部位の疼痛（採取3ヶ月後）8.8%
- 3.2.3.3 採取部位の異常（針を刺した部位の腫れ、出血、血腫）2.0%
- 3.2.3.4 採取針の破損（採取中に採取針が折れた場合）0.4%

（骨髄移植推進財団 1993年1月～2003年3月骨髄提供者のアンケート集計データによる）

ただし、手技中の疼痛により、虚血性心疾患が悪化する可能性がある。

- 3.2.4 他の細胞への分化の可能性： 移植された細胞の血管新生および心筋再生を期待して移植されるが、他の細胞、たとえば骨を作る骨芽細胞へ分化する可能性（今までの基礎研究では、このことが生じないことを確認されているが）は完全に否定できない。
- 3.2.5 血管新生による副作用： 血管新生を惹起する可能性がある。そのため、治療前検査で発見できなかった悪性腫瘍を悪化させる可能性、増殖性網膜症を発生または進行させる可能性が考えられる。
- 3.2.6 不整脈： 骨格筋芽細胞移植による心臓再生療法の臨床応用で致命的な不整脈が生じたことから、循環器領域での再生医療を行う際には、移植によって不整脈を生じる可能性が否定できない。しかし、動物実験においても、現在進行中の骨髄間葉系幹細胞による心臓細胞治療の中間報告においても、骨格筋芽細胞に比して不整脈発生の報告は無い。その理由は骨格筋がホスト心臓とギャップ結合を形成せず、電氣的に同期しないのと比べて、間葉系幹細胞から生じた再生心筋細胞はホスト心臓とギャップ結合を介した電氣的な結合をするために、周囲の心筋細胞との電気緊張的な作用により膜電位が安定化し不整脈を生じないものと推測される。しかし今後心筋誘導率の改善に伴って不整脈を生じる可能性が否定できず、嚴重な心電図モニター下にて治療を行い、致命的な不整脈を生じるようであればカテーテルアブレーションによる血管内不整脈治療、あるいは自動植え込み型徐細動器の植え込みが必要となる可能性がある。
- 3.2.7 採取した細胞が使用できなくなる可能性
- 3.2.8 培養期間の手術待機： 細胞を培養する期間に1ヶ月を要するために、その間手術待機が必要となる。その期間に全身状態が悪化する可能性が否定でき

ない。

3.2.9 細胞治療自体が手術成績を悪化させる可能性は明らかでない

## 別紙9【被験者に対して重大な事態が生じた場合の対処方法】

### 1 有害事象

#### 1.1 有害事象が発現した場合の対応

- 1.1.1 被験者に有害事象が発生した場合、速やかに臨床研究を停止し、慶應義塾大学医学部倫理委員会に報告する。
- 1.1.2 またその有害事象に対して治療が必要であると臨床試験実施責任医師または分担医師が判断した場合、被験者に対して最善の治療・処置を行うものとする。
- 1.1.3 さらに、もとの状態に回復するまで追跡調査を行う。なお、臨床検査値、血圧および脈拍については、臨床試験実施責任医師または分担医師が臨床的に意味のある異常と判断したものを有害事象として取り扱う。

#### 1.2 有害事象に関する用語の定義

- 1.2.1 有害事象とは、細胞移植治療を遂行する際に発現するあらゆる好ましくない事象（臨床検査値異常を含む）であり、間葉系細胞移植との因果関係は問わない。
- 1.2.2 有害事象のうち、間葉系細胞移植との因果関係が否定できないもの（間葉系細胞移植との因果関係で「否定できない」と判定されたもの）を副作用として取り扱う。
- 1.2.3 有害事象のうち、次のいずれかに該当するものを重篤な有害事象と定義する。
  - 1.2.3.1 死亡
  - 1.2.3.2 治療のために病院または診療所への入院または入院期間の延長が必要
  - 1.2.3.3 障害（日常生活に支障をきたす程度の機能不全の発現）
  - 1.2.3.4 死亡につながるおそれ
  - 1.2.3.5 障害につながるおそれ
  - 1.2.3.6 上記に準じて重篤
  - 1.2.3.7 後世代における先天性の病気または異常
- 1.2.4 重篤な有害事象に該当するもの以外で、次のいずれかに該当するものを、重要な有害事象と定義する。
  - 1.2.4.1 著しい臨床検査値の異常変動
  - 1.2.4.2 臨床試験の中止に至った事象
  - 1.2.4.3 間葉系細胞移植との因果関係：間葉系細胞移植との因果関係を以下の2分類で判定する。

1.2.4.3.1 因果関係なし

有害事象の発現理由が明確で、間葉系細胞移植との因果関係が否定できる場合。

1.2.4.3.2 因果関係を否定できない

有害事象の発現理由が明確でなく、間葉系細胞移植との因果関係が否定できない、もしくは発現理由が間葉系細胞移植によるものと判断できる場合。

1.3 有害事象の程度

以下のように分類し、記入する。

1.3.1 軽 度：通常、一過性で被験者の日常生活を損なわない程度（正常な活動は可能である）

1.3.2 中等度：被験者の日常生活を損なわない、十分な不快感を与える程度（活動に不快感を伴う）

1.3.3 高 度：被験者の日常生活の遂行を完全に不可能にする程度（正常な活動が困難である）

1.4 重篤な有害事象が発現した場合の対応

臨床試験実施場所である慶應義塾大学病院のスタッフは、臨床試験実施責任医師、研究機関の長への迅速な報告とともに両者の責任と判断により暫定的処置（必要に応じた治療、他の研究参加患者への注意喚起、研究の中止など）をおこなう。すなわち

1.4.1 臨床試験実施場所である慶應義塾大学病院のスタッフは、適宜そのサポートにあたるものとする。

1.4.2 臨床試験責任医師は、重篤な有害事象について報告書を用いて実施機関の長、慶應義塾大学医学部倫理委員会委員長にその情報を速やかに報告し、委員長は緊急倫理委員会を招集し対応を行う。

1.4.3 前項と同時に、厚生労働大臣への報告を行って意見をもとめる。

1.5 重篤な有害事象の発現が予想される局面の準備

臨床試験実施場所である慶應義塾大学病院のスタッフは、その臨床試験を行う際に、重篤な有害事象が出現する可能性がある局面で、その有害事象に備えて十分な準備を整えておく必要がある。例えば

1.5.1 臨床試験実施責任医師は、骨髄採取や細胞移植の時に発症する可能性のある有害事象に備え、人工呼吸装置やエピネフィリン、ノルエピネフィリンを含む緊急用薬剤を手元に備えておく。

- 1.5.2 術後の心電図モニターで血行動態が不安定となるような心室頻拍や心拍数 170 を越える 6 連発を越える単形性心室頻拍や、心拍数 150 を越える 3 連発を越える多形性心室頻拍が出現するようであれば、速やかに循環器内科不整脈専門グループと連携をとり対応を行う。また術後退院までの期間に自動植え込み型除細動器を挿入する。

## 別紙 10【その他必要な事項】

### 1 当該研究に係る研究資金の調達方法

今回の研究に必要な費用を、競争的研究費（厚生労働省科研費・文部科学省科研費・財団法人心臓財団研究助成金）から調達する。

### 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

本研究は安全性の評価を目的としている。当該研究によって他施設で既に実施されている臨床研究と比較して新規性はない。当該研究での新規性は、当該施設において自己骨髄間葉系幹細胞を、心臓に移植するという行為であり、その一連の操作の安全性を確かめる事が今回の研究の目的である。また本研究によって安全性を評価した後、次の新規性の高い臨床研究を準備しており、そちらにおいて有効性を評価する研究を進めてゆく。すなわち、

2.1 左室形成術に自己骨髄間葉系幹細胞を用いる。

2.2 ex vivo において骨髄間葉系幹細胞の心筋分化効率を薬剤添加培養によって増大させた後心臓に移植する事で、骨髄間葉系細胞移植治療効果を期待する。