

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

臨床研究の名称	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のランダム化比較試験				
研究機関					
名称	市立函館病院				
所在地	〒041-8680 北海道函館市港町 1 丁目 10 番 1 号				
電話番号	0138-43-2000				
FAX 番号	0138-43-4426				
研究機関の長					
氏名	吉川修身				
役職	病院長				
研究責任者					
所属	心臓血管外科				
役職	心臓血管外科 科長				
氏名	森下清文				
連絡先	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 15%; border: none;">Tel/Fax</td> <td style="border: none;">Tel: 0138-43-2000 / Fax: 0138-43-4435</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">E-mail</td> <td style="border: none;">morishita@hospital.hakodate.hokkaido.jp</td> </tr> </table>	Tel/Fax	Tel: 0138-43-2000 / Fax: 0138-43-4435	E-mail	morishita@hospital.hakodate.hokkaido.jp
Tel/Fax	Tel: 0138-43-2000 / Fax: 0138-43-4435				
E-mail	morishita@hospital.hakodate.hokkaido.jp				
最終学歴	昭和 57 年 3 月 札幌医科大学				
専攻科目	心臓血管外科				
専門医・指導医資格	日本外科学会認定外科専門医・指導医、日本胸部外科学会指導医				
臨床経験歴	26 年				
細胞治療研究歴	1 年				
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					
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	<p>【目的】 既存の治療に抵抗性の末梢動脈疾患（慢性閉塞性動脈硬化症・バージャー病）患者を対象として、TASCII 及び日本脈管学会編「下肢閉塞性動脈硬化症の診断・治療指針Ⅱ」に準じて治療を行う推奨療法群あるいは推奨療法及び G-CSF 動員自家末梢血単核球細胞移植併用治療群のいずれかへ無作為に割り付け、この併用治療の有効性と安全性を、推奨療法との比較によって評価する。</p> <p>主要評価項目は、無増悪生存期間とする。また、副次評価項目は、Fontaine 分類及び Rutherford 分類の推移、生存期間、下肢温存期間、下肢温存生存期間、有害事象の発生頻度及びその内容と、プロトコル治療開始後 1, 6 ヶ月後及び 1 年後の潰瘍・壊疽のサイズ、下肢の虚血性疼痛の重症度、足関節上腕血圧比、足肢上腕血圧比、跛行出現距離及び最大歩行距離とする。尚、本臨床試験は 19 施設の参加が予定されている多施設臨床試験である。</p> <p>【意義】 下肢末梢血管障害に対しては一定の効果が期待される治療法が存在はするものの、日本脈管学会編「下肢閉塞性動脈硬化症の診断・治療指針Ⅱ」によると間歇性跛行の場合、患者の約 25%は臨床症状が悪化し、5～10%は慢性重症下肢虚血へ移行する。また、慢性重症下肢虚血の場合には 1 年後の転帰として、30%が下肢切断に、25%が死亡に至る。本邦においても、年間約 1 万人以上に下肢切断が行なわれているとも言われ、下肢切断は日常的 QOL を著しく低下させ、生への意欲も喪失させるため、救肢は社会的及び医学的に急務である。</p>				
臨床研究の対象疾患					
名称	末梢動脈疾患				
選定理由	近年、わが国においては一般人口における高齢化社会が急速に進行し、また生活習慣が欧米化した結果、下肢末梢血管障害、特に閉塞性動脈硬化症患者が増加している				

		<p>とされている。下肢末梢血管障害は、間歇性跛行と慢性重症下肢虚血に大別される。前者は運動により必ず生じる筋肉のだるさや痛み、あるいはこむら返りといった下肢筋の不快な症状を訴え、これらは休憩により軽減する。一方、後者は典型的な慢性虚血性安静時疼痛や、潰瘍や壊疽などの虚血性皮膚病変を伴う。重症度分類である Fontaine 分類では間歇性跛行が Fontaine II, 慢性重症下肢虚血が Fontaine III 及び IV となる。</p> <p>日本脈管学会編「下肢閉塞性動脈硬化症の診断・治療指針 II」によると間歇性跛行に対しては運動療法が一定の効果が認められている。3ヶ月以上の間、監視下運動を実施した前向き試験では、トレッドミルにおける運動パフォーマンスの明らかな向上、及び運動時の痛みの軽減が見られている。しかしながら、多くの患者には例えば重症冠動脈疾患、筋骨格系の制限、神経学的障害等により運動の禁忌がある。さらに、運動施設まで遠い、居住区域では適切な運動プログラムが利用できない、あるいはかかる費用が高いという理由で、監視下運動療法に参加し得ない患者もいる。また、間歇性跛行に対する薬物療法に関しては、血管拡張、代謝及び抗血小板作用を持つホスホジエステラーゼ III 阻害剤であるシロスタゾールならびにセロトニンのタイプ 2 拮抗薬で、筋代謝を改善し、赤血球及び血小板の凝集を抑制するとされるナフチドロフリルが臨床的有用性についてエビデンスを有する医薬品とされている。シロスタゾールはランダム化プラセボ比較試験において QOL の向上を伴う無痛歩行距離ならびに最大歩行距離の延長を示した。ナフチドロフリルはプラセボと比較し、無痛歩行距離を 26% 延長した。また、最近の 3 つの試験において、ナフチドロフリルによるトレッドミルパフォーマンス及び QOL に対する効果が確認された。(ナフチドロフリルは本邦では未承認薬)</p> <p>同様に慢性重症下肢虚血に対する治療としては日本脈管学会編「下肢閉塞性動脈硬化症の診断・治療指針 II」によると、血行再建術が最適な治療とされている。しかしながら、重度の併存症を有する、あるいは閉塞性動脈硬化の部位や範囲によって血行再建術の対象とならない場合がある。腸骨動脈及び膝窩動脈の閉塞に対して血行再建術は有効であるが、膝窩動脈以下の動脈閉塞に対してのエビデンスは不十分である。また薬物療法に関しては、現在推奨される医薬品は存在しない。</p> <p>別紙 6：臨床試験実施計画書；3.根拠と背景（4 頁 14 行～5 頁 2 行）参照</p>
<p>被験者等の選定基準</p>		<p>登録時において、以下の選択規準をすべて満たし、除外規準のいずれにも該当しない症例を適格症例とする。</p> <p>選択規準</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 下肢血管造影にて閉塞あるいは狭窄が確認された、慢性閉塞性動脈硬化症又はバージャー病患者 2) Fontaine 重症度分類の II から IV かつ、より重症な一方の下肢が Rutherford 重症度分類の 3 から 5 群に分類される患者 3) 血管形成術や膝窩動脈までのバイパス手術の適応がない患者(狭窄部位がびまん性、あるいは末梢の細小動脈に存在しバイパス術や形成術の適用が不可能な重症患者)、あるいはこれらの既存治療を受けたにもかかわらずコントロール不良な患者 4) 非喫煙患者又は 1 ヶ月以上禁煙している患者 5) 同意取得時の年齢が 20 歳以上 75 歳以下で、本人から文書による同意が得られている患者 <p>除外規準</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 1 ヶ月以内に Fontaine 分類あるいは Rutherford 分類で重症度が増悪している病態進行性の患者 2) 大切断が予定されている患者 3) 血管形成術又はバイパス手術、他の外科的治療、もしくは LDL アフェレシスから 1 ヶ月以上経過していない患者 4) G-CSF 製剤及びアフェレシスに対する重篤な過敏症、副作用の既往を有する患者 5) コントロール不良な虚血性心疾患、心不全、不整脈を合併する患者 6) 頭蓋内外の主幹動脈に重度の狭窄性病変を有する患者 7) 心筋梗塞、脳梗塞、脳出血又は一過性脳虚血発作発症後 6 ヶ月未満の患者 8) 虚血性心疾患、脳梗塞又は脳出血の既往があり Fontaine IV 度に分類される透析施行中の患者

	<p>9) 糖尿病増殖性網膜症（新福田分類 BI から BV）を合併する患者</p> <p>10) 悪性腫瘍を合併する、又は 3 年以内の既往である患者</p> <p>11) 血液検査の結果、白血球 4,000/μL 未満又は 10,000/μL 以上、血小板数が 50,000/μL 未満、AST(GOT)100 IU/L 以上、ALT(GPT)100 IU/L 以上のうち、いずれかに該当する患者</p> <p>12) 間質性肺炎の合併あるいは既往のある、又は間質性肺炎を起こす可能性のある薬剤を服薬中の患者</p> <p>13) 38℃以上の発熱を伴う感染症を合併する患者</p> <p>14) 脾腫が認められる患者</p> <p>15) 原疾患に起因しない他の要因による跛行症状、安静時疼痛、皮膚潰瘍及び壊疽を有する患者</p> <p>16) 下肢に重症の神経障害を有しており本臨床試験における評価が困難である患者</p> <p>17) コントロール困難な精神障害を合併する患者</p> <p>18) 甲状腺機能亢進症を合併あるいは既往のある患者</p> <p>19) 他の臨床試験に参加中の、又は以前に参加した臨床試験の終了から 6 ヶ月以上経過していない患者</p> <p>20) 妊婦、授乳婦、妊娠している可能性のある又は治療期終了時までには妊娠を計画している女性患者、あるいはパートナーの妊娠を希望する男性患者</p> <p>別紙 6：臨床試験実施計画書；9.適格基準（16 頁）参照</p>
--	--

臨床研究に用いるヒト幹細胞

種類	G-CSF 動員自家末梢血単核球細胞
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	<p>1. G-CSF投与の手順</p> <p>1) フィルグラスチムを 1 回 200μg/m² (5μg/kg 相当)の用量で、1 日 1 回 4 日間皮下注射する。</p> <p>2) フィルグラスチム投与中は連日血液学的検査を施行する。白血球数が 50,000/μl を超えた場合はフィルグラスチムを 1 日 1 回 100μg/m² (2.5μg/kg 相当)に減量し、75,000/μl を超えた場合はフィルグラスチム投与を中止する。</p> <p>3) 4 あるいは 5 日目に血液成分分離装置を用いてアフエレーシスを行う。</p> <p>2. 血液処理量</p> <p>血液成分分離装置：独国フレゼニウス社製 COM.TEC204 を用いて、血液処理量は患者体重当たり 100~200ml (体重 50kg の場合 5L~10L) とし、総血液処理量は 10L を上限とする。</p> <p>3. 採取の手順</p> <p>1) 採取に先立ち、十分な血流が維持できる静脈または血液透析用シャントから採血ラインと返血ラインを確保する。</p> <p>2) 採取中は医師と看護師が立ち会い、定期的に血圧と心電図をモニターしながら実施する。血管迷走神経反射、クエン酸中毒、不整脈、心虚血症状、穿刺部位の出血や血腫などの合併症に細心の注意を払う。</p> <p>3) 採取に伴って血小板数が減少するため、採取終了直後に血小板数を測定する。</p> <p>4) 採取終了後少なくとも 30 分間は採取施設内で安静を保ち、体調に問題がないことを確認する。</p> <p>4. 採取細胞の評価</p> <p>成分採血装置の回路より単核球液の入った採血パックを無菌的に取り出し、操作アダプターを採血パックに取り付け検体の一部を、シリンジで無菌的に採取し、血液検査と CD34 陽性細胞の定量用に提出する。</p> <p>有核細胞数を目算又は自動血球測定器で、CD34 陽性細胞陽性率をフローサイトメトリーで ISCT(International Society for Cellular Therapy) 法に準じた方法で測定し、産物量をもとに総有核細胞数と細胞分画、総 CD34 陽性細胞数を算出する。</p> <p>5. 移植方法</p> <p>細胞移植は手術室で麻酔の下で実施し、両下肢に病変がある場合は両下肢に、採取細胞全量を使用し細胞移植を実施する。</p> <p>移植予定部位</p> <p>血管造影で血流の途絶がある範囲を中心とした筋肉内（腓腹筋・前脛骨筋・足底部・足趾等）と、壊疽、潰瘍がある場合には、その周囲を移植予定部位とする。</p>

	<p>6. 消毒方法</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 移植予定部位をポビドンヨードで消毒する。 ・ 消毒は移植予定部位よりも十分に広く行う。 ・ 全周性に行い、指間は無消毒野が残らないよう十分に注意して行う。 ・ 壊死部がある場合には綿球を変え十分に消毒を行う。 ・ ポビドンヨードがアレルギー等で使用できない場合は塩化ベンザルコニウムなどを使用する。 <p>7. 細胞溶液の注入方法</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 1カ所の注入量は0.5mLを目安とし、採取された細胞溶液量より概算で何カ所注射できるかを検討し注入カ所数（目安として70～150カ所）を決定し、注入部位をマーキングする。 2) 採取液は均一に攪拌した上で、採取バックの操作アダプターからシリンジで無菌的に採取し、移植予定部位に、23G針を用いて筋注する。 3) 指腹、足底部の皮膚が厚い部位への注入は1回の注入溶液量を少なめに調節する。 <p>8. 細胞移植後の局所処置法</p> <p>移植部位をポビドンヨードで消毒する。注射部位から軽度出血があれば圧迫止血を行う。</p>
調製（加工）行程	× 有 ・ ○無
非自己由来材料使用	× 有 ・ ○無 動物種（<u> </u>）
複数機関での実施	× 有 ・ ○無
他の医療機関への授受・販売	× 有 ・ ○無
安全性についての評価	<p>末梢血管再生治療研究会への参加6施設を対象に、2001年12月1日から2006年12月31日までの間に、重症下肢末梢血管障害の患者へG-CSF動員自家末梢血単核球細胞を移植した162症例のレトロスペクティブ調査（PAD-CT Retro）を行い、移植の治療成績及び有害事象の発現の種類/頻度を解析した。全症例から極めて予後不良のRutherford分類6群21例、Fontaine分類不能7例、糖尿病性壊疽4例及びSLE7例の計39例を除外した123例の解析結果から、予後因子はFontaine分類と壊疽有無と透析歴が有意に独立した因子として選択された。また、移植後1ヶ月以内の治療関連死亡は見られなかった。1年以内の死亡は15症例（12.2%）で、虚血性心疾患の既往がある透析患者が9例（60%）、脳血管障害の既往がある透析患者が2例（13%）含まれおり、死因は心不全4例、心筋梗塞3例、脳梗塞2例、肺炎2例、不整脈1例、胆嚢炎1例、呼吸不全1例、自殺1例であった（自家末梢血単核球細胞移植 概要書参照）。日本透析学会の統計データでは、2005年末には全透析患者は257,765症例、2006年の死亡患者数は24,034症例（9.3%）で、死亡原因は心不全24.9%、脳血管障害9.4%、感染症19.9%、悪性腫瘍9.2%、カリウム中毒/頓死5.1%、心筋梗塞4.4%、悪液質/尿毒症3.1%、慢性肝炎/肝硬変1.3%、腸閉塞1.1%、自殺/拒否0.9%、災害死0.7%、肺血栓/肺梗塞0.3%、脳症0.1%、その他9.5%、不明8.3%と報告されている。なお、本臨床試験の適格規準では、PAD-CT Retroの1年以内死亡例15例は全て不適格であった。また、全症例中、ASOで糖尿病を合併している93例の患者（既往歴平均20.8年）で、G-CSF動員自家末梢血単核球細胞移植治療に起因した重篤な有害事象は発生していない。</p> <p>その他、Huangら、Ishidaら、Hoshinoら、もほぼ同様にG-CSF動員による末梢血由来の単核球細胞を重症下肢虚血患者に移植し有用な結果を得たことを報告している。</p> <p>別紙4：自家末梢血単核球細胞移植概要書：2.4患者情報、移植前検査所見、移植情報の要約（7～10頁）、2.5エンドポイントの解析（11～17頁）、2.6追加解析結果（18～24頁）参照 別紙6：臨床試験実施計画書；3.根拠と背景（6頁3～20行）参照</p>
臨床研究の実施が可能であると判断した理由	<p>最近再生医療の研究が盛んとなり、特に血管の再生研究が数多くなされ、既にいくつも臨床研究が実施され、その有効性が示唆されるものも出てきた。当初は血管内皮増殖因子（VEGF）や、線維芽細胞増殖因子（FGF）などの血管新生因子の利用が検討されたが、それらの因子そのものでは主に半減期が短いことから、それらを分泌させる遺伝子治療が考えられ、実際に臨床研究もなされている。</p> <p>IsnerらはVEGFの遺伝子治療を、MorishitaらはHGFの遺伝子治療を実施し、一定の治療効果が認められたことを報告している。しかしながら現段階では、これら</p>

は対照群のない小規模な試験にとどまっております、また遺伝子治療という特殊性から試料調製の煩雑さと安全性への懸念が残る。

白血病を中心とした血液悪性腫瘍においては薬剤による化学療法あるいは全身放射線照射後に自家及び同種の造血幹細胞移植が普及しており現在では年間 17,000 件以上が実施されている。当初、移植のための造血幹細胞を含む単核球細胞は全身麻酔及び自己血輸血が必要な骨髄からの採取であったが、造血幹細胞を骨髄から末梢血に動員させることの出来る G-CSF が利用可能となると末梢血からの造血幹細胞を含む単核球細胞の採取が普及してきた。

このような背景の元、別の面からのアプローチとして、Asahara らがヒトの CD34 陽性造血幹細胞中に血管内皮前駆細胞が存在し、これらを下肢虚血モデル動物に移植することにより、血管が再生されることを明らかにしたことに端を発し、造血幹細胞の傷害部位への移植に注目が集まってきた。そのような中で 2002 年、Matsubara らは重症下肢虚血患者へ骨髄由来の単核球移植を試みて、臨床上有用性があることを報告している。骨髄由来単核球細胞には、血管内皮前駆細胞 (CD34 陽性細胞) は数%しか含まれておらず、その他の細胞も同時に移植することの危険性も指摘されている。Matsubara らの報告以降、国内外の数多くの施設で、同様の手技による治療が試みられ、本邦でもすでに 10 施設以上が先進医療の認定を受けている。現在まで懸念されているような骨髄由来単核球細胞移植に伴う副作用は報告されていない。

骨髄由来単核球細胞の危険性回避、並びに効率的な血管再生を目指し、Inaba らや Asahara ら (データ未発表) は、G-CSF で動員された末梢血単核球から CD34 陽性細胞を単離・純化し、慢性重症下肢虚血患者に移植し臨床効果が確認されている。末梢血単核球からの CD34 陽性細胞単離・純化には、煩雑な操作及び費用がかかるためか、その後同様の治療研究を試みる施設は少ない。

一方、Kawamura らは CD34 陽性細胞を単離・純化することなく、G-CSF 動員による末梢血由来の単核球細胞を重症下肢虚血患者に移植することを試みた。その結果、臨床効果を認め、同時に G-CSF、アフエレンシス、あるいは移植した細胞に由来すると考えられるような重篤な副作用は報告されていない。

次いで本臨床試験において造血幹細胞動員のための G-CSF の投与量及び投与期間の設定に至った背景について記す。

G-CSF (フィルグラスチム) は 1991 年の発売以降、主に「がん化学療法による好中球減少症」を対象に世界中で用いられてきたが、2000 年本邦において「造血幹細胞の末梢血中への動員」の効能・効果が追加され、がん患者あるいは健康人ドナーに $400\mu\text{g}/\text{m}^2$ ($10\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当) を 1 日 1 回又は 2 回に分割し、5 日間連日又は末梢血幹細胞採取終了時まで連日皮下投与するという用量・用法で用いられてきた。また、Asahara らの報告以降、造血幹細胞あるいはそれを含む単核球を用いて血管を再生させるという研究が盛んに行なわれ、中には Minatoguchi らの様に単核球細胞を採取することなしに G-CSF による動員のみで心筋梗塞モデル動物の心血管再生を試み、一定の効果を確かめたという報告もなされた。その後、これらの成果を臨床に結び付けるべく心筋梗塞後の患者を初めとした心血管障害患者に、G-CSF を投与する臨床研究が幾つかなされた。

Hill らは彼らの臨床研究から G-CSF の $10\mu\text{g}/\text{kg}$ を 5 日間投与することにより、重症心血管障害患者に心筋梗塞が引き起こされる可能性を指摘したが、対照群の設定が無く患者群もリスクが高かったため、G-CSF と心筋梗塞発症の間に明確な因果関係は判らなかつた。また、Kang らは、心筋梗塞発症後の患者に G-CSF の $10\mu\text{g}/\text{kg}$ を 4 日間投与し、狭窄血管部にステントを挿置したところ、その後の観察でステント挿置部位に再狭窄が観察されたと報告している。ただし、その後 Kang らは G-CSF の投与量を $5\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与日数を 3 日間とし、さらに挿置するステントを通常の bare metal から、薬剤が塗布された DES (Drug Eluting Stent) とすることで再狭窄は見られなくなると報告した。

さらに、Kuethel ら、Ince ら、Zohlhofer ら、Ripa ら、Jorgensen ら、Susuki らにより心筋梗塞を中心とした心疾患患者に、G-CSF を投与するという臨床研究が行なわれた。効果は各々の研究でまちまちの結果であったが、安全性に関してはすべての臨床研究で G-CSF に起因するものと考えられる副作用は観察されず、これらすべての報告においては対象とした心疾患患者に対する G-CSF 投与は安全で認容性ありとしている。なお、これらの臨床研究の殆どで対照群が設定されており、また G-CSF の投与量は $10\mu\text{g}/\text{kg}$ がほとんどで、投与期間は 4 から 7 日であった。また、前出の重症下肢虚血患者に対する臨床研究では、Inaba ら、Kawamura ら、Hoshino ら、は G-CSF を $5\mu\text{g}/\text{kg}$ で 4 日間投与することで、また Asahara ら (データ未発表)、