

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

<p>他の医療機関への授与・販売</p>	<p>無</p>
<p>安全性についての評価</p>	<p>細胞の培養・調製を行う信州大学医学部附属病院先端細胞治療センターは、GMP に準拠した施設であり「汚染防止」、「人為的ミス防止」、「品質保証」を遵守している（添付書類【(別紙 4)信州大学医学部附属病院先端細胞治療センターが GMP に準拠している根拠】参照）。</p> <p>また、培養調製段階では形態観察、無菌試験、エンドトキシン試験、マイコプラズマ否定試験（PCR）を行い、感染症の否定や細胞の形態変化、生存率のチェックをおこなう。マイコプラズマの PCR 検査が陽性と判明した場合は培養法で生菌か否かを確認する。また移植に用いる細胞の安全性評価のため核型試験を症例毎に行う。</p> <p>無菌性を保証できない結果（無菌性試験およびマイコプラズマ試験結果が陽性と判定された場合）が、細胞出荷前に得られた際には、細胞出荷を取りやめ、原因究明のために細胞を保存すると共に、本臨床研究の中止を協議し、被験者の血液疾患の精査を行う。</p> <p>細胞出荷後に上記試験において陽性反応が得られた場合は、被験者にその旨を説明し同意に基づいた処理を行う。具体的には、至適な抗生物質投与等による感染症発生の予防あるいは移植部位の搔爬等の外科処置等を行う。</p> <p>被験者に対しては移植手術後には通常の手術の術後と同様に全身状態のチェックを綿密におこなうとともに、血液・生化学検査を術後 3・6 か月・1 年（以後 1 年毎）を目安におこない、感染症の有無などをチェックする。また単純エックス線撮影や CT エックス線撮影検査（臨床研究の実施計画（7）術後評価の項参照）などを通して移植部位に異常がないかどうかを確認する。</p>
<p>臨床研究の実施が可能であると判断した理由</p>	<p>現在まで報告された β-リン酸三カルシウム (βTCP) を骨髄間葉系細胞と共に移植する動物実験の結果から、移植した培養骨髄間葉系細胞が実際に <i>in vivo</i> において骨芽細胞に分化し骨形成が認められることが明らかとなっている^{7, 8)}。</p> <p>我々も、イヌ（ビーグル犬）の骨髄間質細胞を用いた骨再生に関する実験的研究を行っている。骨髄細胞を大腿骨骨幹部より採取し培養に供し、付着増殖した細胞群を未分化間葉系細胞として使用した。下顎両側小臼歯を各 3 本抜歯後 3 ヶ月経過した後、両側の下顎骨に骨欠損を形成し、同部にチタン製口腔インプラントを植立した。その際、インプラント周囲に β-リン酸三カルシウム (βTCP) 単独または骨髄由来の間葉系細胞を混合した β-リン酸三カルシウム (βTCP) を移植した。術後 84 日目において骨形成を観察した結果、β-リン酸三カルシウム (βTCP) 単独の移植インプラントにおいては、骨とインプラントの直接接触は一部に認められたのみで、その表面の広い範囲が結合組織によって覆われていた。一方、培養骨髄間葉系細胞を移植した群においては、β-リン酸三カルシウム (βTCP) 単独群と比較して、インプラント周囲における骨形成の亢進が</p>

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

有意に認められた（未発表）（別紙10）。

また、我々の研究グループの一員である脇谷らは、ウサギの膝関節骨軟骨欠損に骨髄間葉系細胞移植を行った結果を既に報告している⁹⁾。ウサギ骨髄間葉系細胞を移植した結果、トルイジンブルーに異染性をしめす硝子軟骨様組織の形成がみられるとともに、移植後2-4週の早期に骨欠損部が血行の豊富な新生骨で修復されることを組織学的に確認している。さらに、信州大学医学部整形外科では、若年者の肘関節部の骨軟骨障害に対して、自己の骨髄間葉系細胞を移植する治療を行い、上腕骨小頭部の骨欠損部は術後8週までに大部分が修復されることをエックス線写真で確認している。

以上の実験結果は、骨髄由来の間葉系幹細胞の移植方法を臨床応用するための臨床研究の実施が可能であることを支持する大きな理由となると考えている。また、大阪大学のグループは、ヒトの良性骨腫瘍手術後の欠損部に培養骨髄間葉系細胞付加人工骨を移植する臨床応用を報告している¹⁰⁾。

最近、テヘラン大学（イラン）の研究グループが、ヒト自己骨髄細胞をβ-リン酸三カルシウム（βTCP）とヒドロキシアパタイトをキャリアとして上顎洞に移植することにより、2-3ヶ月で新生骨の形成が認められたという治療結果を発表した¹¹⁾。以上のように、ヒト培養自己骨髄間葉系細胞移植術は、侵襲が大きく採取量が制限される自家骨移植に代わる有効な骨増生方法になり得ると考えている。

さらに、本臨床研究を遂行する上で必要な環境として、GMP準拠した信州大学医学部附属病院先端細胞治療センター（CPC）を随時利用可能な点から、本臨床研究は十分に実施可能であると考える。

（文献）

- 7) Cancedda R, et al. : A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and clinical practice. *Biomaterials* 28 : 4240-4250, 2007.
- 8) Jafarian M, et al. : Marrow-derived mesenchymal stem cells-directed bone regeneration in the dog mandible: a comparison between biphasic calcium phosphate and natural bone mineral. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol Endod* 105 : e14-e24, 2008.
- 9) Wakitani S, et al. : Mesenchymal cell-based repair of large, full thickness defect of articular cartilage. *J Bone Joint Surg* 76-A : 579-592, 1994.
- 10) 藤本哲穂 他 : 骨腫瘍に対する骨再生治療. *腎と骨代謝*. 19 : 341-348, 2006.
- 11) Shayesteh YS, et al. : Sinus augmentation using human mesenchymal stem cells loaded into β-tricalcium phosphate/hydroxyapatite scaffold. *Oral Surg Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol Endod* 106 : 203-209, 2008.

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

<p>臨床研究の実施計画</p>	<p>口腔機能の回復や審美障害の回復のために口腔インプラント埋入のための骨増生が必要である症例を対象とする。</p> <p>(1) インフォームド・コンセント</p> <p>説明文書(別紙2)で説明し、同意を得た上で同意文書(別紙3)に署名をいただく。</p> <p>(2) 骨髄血および末梢血液採取</p> <p>外来小手術室で医師および歯科医師(口腔外科専門医)が共同して行なう。患者にベッド上で仰臥位をとらせ、1%キシロカイン(約10ml)にて後上腸骨棘部位を局所麻酔する。骨髄穿刺針(シャーマンのハーベスト針)を用いて、穿刺針の内筒に取り付けた10mlシリンジ(ヘパリン処理)にて、3mlずつ骨髄液を採取(合計9-15ml)する。骨髄液は直ちにヘパリンPBSアシストチューブに移し、しっかり蓋をした後転倒混和する。その後、穿刺針を抜き圧迫止血する。</p> <p>骨髄穿刺の止血中に、肘静脈に三方活栓を取り付けた自己血採取針を刺入し、三方活栓に取り付けた50mlシリンジで静脈血を吸引する。吸引した血液は清潔操作のまま50mlファルコンチューブに移し、合計400mlの末梢血液の採取を行う。</p> <p>さらに、多血小板血漿(PRP)の調製のために、9mlの末梢血液を採取して、ACD-A液(生物学的製剤基準血液保存液A液)1mlを入れた15mlファルコンチューブに移す。</p> <p>(3) 骨髄血および末梢血液の移送</p> <p>採取した骨髄液と血液は、直ちに滅菌カストを入れた細胞等搬送容器に保存して(24°C±2°C)、信州大学医学部附属病院先端細胞治療センター(CPC)に移送する。移送交通手段は車内温度25°Cとした本学公用車とする。</p> <p>CPCまでの搬送時間は35-40分である。温度変化は細胞等搬送容器に設置された温度センサーでチェックして記録する。</p> <p>細胞の移送およびその後の調製については、歯科医師によって行われる。</p> <p>(4) 細胞、血清および多血小板血漿(PRP)の調製</p> <p>CPCの使用に関する教育訓練を受けた松本歯科大学CPC担当者が信州大学医学部附属病院先端細胞治療センター担当者と共に、細胞、血清および多血小板血漿(PRP)の調製を行う。</p> <p>末梢血液から調製した多血小板血漿(PRP)は、信州大学CPC内の細胞保管室(-80°C冷凍庫)に保存する。その後、最終製品(細胞)の搬送時に、専用搬送容器にて最終製品と共に室温保存し、PRPは自然解凍しながら搬送する。</p> <p>(5) 調製細胞および多血小板血漿(PRP)の移送</p> <p>調製細胞および多血小板血漿(PRP)を、滅菌カストを入れた細胞等搬送容器に保存して(24°C±2°C)、信州大学医学部病院先端細胞治療センター(CPC)から松本歯科大学病院に移送する。移送交通手段は車内温度25°Cとした本学大学公用車とする。温度変化は細胞等搬送容器に設置された温度センサーでチェックして記録する。</p>
------------------	---

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

(6) 間葉系幹細胞の移植手術

搬送された細胞の品質管理成績をチェックし、GMP 基準下で調製された細胞及び多血小板血漿であることを確認する。移植の際、上顎洞底挙上術では、上顎洞粘膜下に移植床を形成する。歯槽堤形成術では、骨欠損部に粘膜骨膜弁を作製して移植床を形成する。

骨補填のために、必要量のβ-リン酸三カルシウム（オスフェリオン®）（通常 1-3g）、多血小板血漿（PRP）（通常 1-3ml）および CPC にて培養した骨髄間葉系幹細胞（通常 $0.5-1 \times 10^7$ cells）を混合する。必要に応じて、注射用塩化カルシウムを滴下することでゲル化させ、移植ペレットを調製する。移植ペレットを移植床に充填した後、粘膜骨膜弁を復位して縫合する。術後は抗菌薬を投与して感染予防を行う。

(7) 術後評価

1) 臨床症状や局所所見を術後 1 週、1・3・6 か月・1 年、経過観察し、二次手術（インプラント体の植立など）が可能かどうかを検討する。二次手術後も術後 1 週、1・3・6 か月・1 年、経過観察し、その後は 1 年毎に評価を行う。

2) CT エックス線検査およびパノラマエックス線検査により、下記に示す経時的な骨の形態、性状、密度の変化を評価する（術後 3 および 6 か月で撮影。術後 5 年まで 1 年毎に撮影する）。

[上顎洞底挙上術（サイナスリフト）症例]

① 残存歯の状態と顎骨内病変の存在の有無

② 歯槽骨の高径(mm)：基準線（上顎前歯部は鼻腔底、上顎臼歯部は上顎底、下顎前歯部はオトガイ孔間線、下顎臼歯部は下顎管）から歯槽頂までの距離

③ 断面積 (cm^2)：多断面再構成 (Multiplanar reconstruction：MPR) による断面積の測定

④ 骨密度 (HFU)：Simplant によるハンスフィールド値 (HFU) の測定

⑤ 顎洞容積と骨容積 (cm^3)：OsiriX による上顎洞容積と骨容積を測定する。

[歯槽堤形成術症例]

① 残存歯の状態と顎骨内病変の存在の有無

② 骨頂から骨底部までの骨の高さ

③ 下顎骨の高さ

④ 骨の幅

⑤ 骨密度 (HFU)：Simplant によるハンスフィールド値 (HFU) の測定

3) 3DXCT エックス線検査：骨増生手術後に、二次手術でインプラント体を植立する場合、経過が長い残根、内骨腫、歯根尖の位置など CT エックス線では細部まで描出できないものについては歯科用 CT (3DXCT) エックス線検査を術前と術後に行なう。

4) 骨性状検査：二次手術時に骨表面の色調・硬さ・移植したペレット上の骨膜の状態を評価する。

5) 病理組織検査：二次手術時に再生組織の一部を生検 (Biopsy)

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

	<p>し、HE 染色やトルイジンブルー染色等を行い、組織学的・形態計測学的評価を行う。</p> <p>(8)有害事象の評価と逸脱症例に対する対応</p> <p>本臨床研究との因果関係の有無に関わらず期間中に被験者に生じたあらゆる好ましくない、あるいは意図しない徴候、症状、または病気を有害事象と定義する。また臨床研究期間中に観察された有害事象のうち、以下のいずれかに相当するものは重篤な有害事象と定義する。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 死亡にいたるもの 2. 生命を脅かすもの 3. 治療のため入院または入院期間の延長が必要なもの 4. 永続的または顕著な障害／機能不全に陥るもの 5. 次世代に影響が及ぶと思われるもの <p>逸脱症例について下記の状況が生じた場合と定義する</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 被験者の不参加表明 2. 有害事象が生じたとき 3. 培養中の感染等培養過程での事故 <p>逸脱症例について、上記 2 の場合には起きた有害事象に対して速やかに適切な治療をおこなう。逸脱症例についてはすべて再度インフォームド・コンセントを行い、本臨床研究に従った研究を進めるか、一般的な治療法で治療を進めるかを確認する。</p> <p>(9) 余剰検体の使用について</p> <p>最終製品の今後の品質改善のために、基礎的研究に余剰検体を使用する場合がある。</p> <p>(10) ドライランの実行</p> <p>現在、SOP に従ったドライラン（2008 年 3 月より現在まで合計 5 回）を施行中である。ドライランとしては、当該臨床研究の方法(1)から(6)（βーリン酸三カルシウム、多血小板血漿および調製細胞をチューブ内で混合し、ゲル化までのプロセス）までを実施中である。</p> <p>(11) 二次手術（インプラント体の植立）について</p> <p>顎骨増生後の口腔インプラント体の植立やその後の補綴処置については、原則として松本歯科大学病院歯科診療部口腔外科および総合歯科診療科において、保険外診療として行い、費用は患者負担とする。</p>
<p>被験者等に関するインフォームド・コンセント</p>	
<p>手続</p>	<p>研究担当者は、本研究の被験者に対して、研究に係る同意説明文（別紙 2）を口頭と文書で説明する。被験者本人から同意を得ることが困難な場合は、本研究にご協力頂かないこととする。全ての項目について同意が得られた場合に限り、同意書（別紙 3）に本人による自筆署名をいただく。原本は研究責任者が保管し、そのコピーを被験者に渡す。</p>
<p>説明事項 (被験者の受ける利益と不利益を含む。)</p>	<p>説明事項は添付資料の「同意説明文」（別紙 2）、同意文書は添付資料の「同意書」（別紙 3）の通りである。</p>

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

	<ul style="list-style-type: none"> ① 研究の参加への任意性 ② 同意しないことにより不利益な対応を受けることがないこと ③ 同意後に随時同意を撤回できること ④ この研究への協力者として選ばれた理由 ⑤ 当該臨床研究の意義、目的、方法及び期間 ⑥ 当該研究を実施する機関名および研究担当者 ⑦ 期待される研究の利益及びこの研究への参加に伴い予期される危険または不快な状態、臨床研究終了後の対応 ⑧ この研究の計画及び方法についての資料の閲覧 ⑨ この研究の結果の他機関への提供 ⑩ 知的財産権の帰属 ⑪ この研究の成果の公表 ⑫ 研究のための費用 ⑬ 健康被害に対する補償 ⑭ この研究の倫理的な配慮 ⑮ 問い合わせ・苦情の連絡先
<p>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>	<p>(1) 局所麻酔に対する反応 穿刺の際の局所麻酔などの薬剤に過敏反応が生じた場合、血圧低下などが起こることがある。これらの合併症が出現した場合は、処置(補液、昇圧剤投与)を行なう。</p> <p>(2) 穿刺による疼痛 局所麻酔の刺入時と骨髄の吸引時に疼痛がみられることがある。しかし、これは数分間で消失する。</p> <p>(3) 骨髄穿刺による出血の可能性 穿刺部位に皮下血腫は若干みられるが重篤な危険は非常にまれである。多量の出血をみた場合には、血管を結紮また焼灼して止血する。</p> <p>(4) 自己血採血に伴う副反応の可能性 細胞培養に必要な自分の血液成分(自己血漿)を成分献血と同じように約 400ml 採血する。その際に血腫、血管迷走神経反射、血圧低下等が起こることがあるが、一般医療と同じように安静、補液などで対応する。</p> <p>(5) 検体の取り違えのリスク 個人情報保護のために培養細胞および保存される細胞検体については個人情報を削除して符号をつける。細胞と患者本人とを対応表により結び付けるが、同時期に複数症例を扱う場合、取り違え(自分のものでない細胞移植)の可能性もあると推測されるため、細胞検体の厳重な管理を行なう(細胞の管理は一人の患者あたり一つのインキュベーターを割り当てて行い、培養期間中は他の人の検体をその場所で扱わない)。</p> <p>(6) 感染の問題 自己細胞を培養して再び体内に戻すことから、輸血や他の臓器移植のように、他人の感染症に感染することはない。しかし、も</p>

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

	<p>とも体内に存在するか、培養工程における何らかの病原菌による汚染が生じる可能性は否定できない。その可能性を極力低くするために、医療用の細胞培養(加工)ができる信州大学部医学部付属先端細胞治療センター(CPC)のクリーンルームで培養する。無塵衣を着用した専門担当者が培養に従事し、感染症の有無など品質を検査する方法(無菌試験等の品質検査)が確立されている。</p> <p>(7)癌化の問題</p> <p>動物実験のほか、同様の方法で行なったヒト培養骨髄間葉系細胞の移植治療では、現在までに細胞の癌化が生じた報告はない。したがって、細胞の癌化の可能性は極めて低いと考えられるが、多分化能をもつ幹細胞を培養操作で増やすという操作の性格上、その可能性は否定できない。このため、移植後5年間定期的に患部の状況をチェックする。</p>
臨床研究終了後の追跡調査の方法	被験者に対しては治療効果の評価だけでなく治療による有害事象の有無のチェックを、臨床研究終了後もおおよそ1年毎に定期的におこなっていく。
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	<p>自己骨髄間葉系幹細胞を用いた骨増生法は、今までに行われている多血小板血漿およびβ-リン酸三カルシウムを用いた骨増生方法と同等の高い安全性が示されると考えられる。しかし、通常 of 外科治療で生じる感染や治療による何らかの生体反応が生じる可能性は残る。</p> <p>本臨床研究によって健康被害が生じた場合は、当方で補償する。その後本研究とは関わりを持たない原因による歯科治療が必要となった場合は、通常の診療費を被験者の負担とする。</p>
個人情報保護の方法	
連結可能匿名化の方法	<p>本研究では被験者の個人情報として、氏名、年齢、性別と傷病名の提供を受ける。検体、資料及び得られたデータ等(以下、「被験者情報」という)は、連結可能匿名化を行い、被験者の個人情報を保護する。これらの被験者情報は、研究責任者上松隆司が管理し、松本歯科大学口腔顎顔面外科学講座の施錠された書庫で厳重に保管する。漏洩等の問題が発生した場合には、研究等個人情報管理者と協力して速やかに問題解決に努めるとともに、学長に報告する。また、本研究終了後又は被験者から同意の撤回等があった場合は、被験者情報を研究等個人情報管理者と協議の上廃棄する。その際には、匿名化の状況を確認し、被験者情報が漏洩することのないように配慮する。</p>
その他	<p>当該臨床研究終了後の対応</p> <p>本研究で採取する検体及び資料等は、研究責任者上松隆司が松本歯科大学口腔顎顔面外科学講座で厳重に保管する。検体(骨髄由来の間葉系細胞および多血小板血漿(PRP))の保存は、-80℃冷凍庫保管の後、液体窒素の気相保管(-144℃)を10年間行う。また、</p>

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

	<p>臨床データについては、20年間厳重に保管する。 廃棄する際には、研究等個人情報管理者と協力して行う。</p>
<p>その他必要な事項</p>	<p><u>＜本臨床研究にかかる研究資金の調達方法＞</u></p> <p>この研究にかかる費用は、文部科学省、日本学術振興会、新エネルギー産業技術総合開発機構（NEDO）からの研究助成金や松本歯科大学病院および研究責任者・研究分担者の学内研究費によって負担される。この研究の成果により特許権等の知的財産権が生じた場合には、その権利は研究機関である松本歯科大学と共同研究機関に帰属する。共同研究機関は、NEDOプロジェクトの研究機関であり、研究機関の役割は明確化されている。</p> <p><u>＜既に行わ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＞</u></p> <p>患者自身の骨髄間葉系幹細胞を用いた骨・軟骨の再生療法に関しては、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（大串 始グループ長）によって、細胞培養技術が確立され、臨床応用が始まっている。すなわち、人工足関節や骨腫瘍搔爬後の欠損部に対する再生培養骨の応用、培養骨髄間葉系細胞移植による軟骨・心筋・血管再生療法などである。また、産業技術総合研究所の研究の流れを汲んで、大阪大学や奈良県立医科大学においては、骨腫瘍への再生培養骨移植の臨床応用が行われている。信州大学では、軟骨欠損修復への応用がなされている。さらに、奈良県立医科大学においては、培養骨髄間葉系細胞を用いた人工足関節置換術や大腿骨頭壊死の骨温存手術への臨床応用が行われている他、顎骨部位の腫瘍、骨髄炎、骨折などに対する培養骨芽細胞移植が計画されている。</p> <p>一方、名古屋大学大学院医学系研究科の上田 実教授のグループは、患者由来の骨髄細胞を培養し骨芽細胞に分化誘導させ、これらの細胞を歯槽骨欠損部位に移植する治療を既に行っている（別紙 6 参照）。</p> <p>その他、広島大学歯学部および新潟大学歯学部においても、培養細胞を用いた歯周組織再生療法の臨床研究が行われている。</p> <p>最近、テヘラン大学（イラン）の研究グループは、ヒト自己骨髄細胞を、β-リン酸三カルシウム（βTCP）をキャリアとして上顎洞に移植することにより、2-3ヶ月で新生骨の形成が認められたという治療結果（6症例）を発表している（別紙 6 参照）。</p> <p>本研究は、培養細胞を PRP と共に βTCP 単独キャリアで移植し、歯科用 CT(3DXCT)などで詳しく骨増生を評価する点で、新規性が認められる。また、CPC (Cell Processing Center) を有さない施設（本学）が近隣の CPC（信州大学先端細胞治療センター）を利用することにより、細胞移植治療を可能とさせる点でも新規性が認められる。ほぼ同様の臨床応用は既に上記のように行われているが、歯槽骨増生治療に関しての需要は大変高く、今後さらに注目されていくことは確実である。</p>

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

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「別紙〇参照」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（別紙1）
- 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2 および別紙3）
- 研究機関の基準に合致した研究機関の施設の状況（別紙4）
 - GMP 施設基準バリデーションマスタープラン（VMP、三洋電機からの文書）
- 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5）
- 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6）
- その他（資料内容：製品基準書・標準書・工程順管理文書・CPC 機械・設備一覧）（別紙7）
- 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8）
- 松本歯科大学研究等倫理規定、松本歯科大学研究等倫理審査委員会内規・名簿・審査の過程および結果、信州大学医学部医倫理委員会名簿および審査結果（別紙9）
- 基礎実験の概要：イヌの骨髄間質細胞を用いた骨再生に関する実験的研究（別紙10）