

20091804/A

厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業

自家培養口腔粘膜上皮シート移植
による角膜上皮再生治療法の
多施設共同臨床試験

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 西 田 幸 二

平成 22 (2010) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
医療技術実用化総合研究事業

自家培養口腔粘膜上皮シート移植
による角膜上皮再生治療法の
多施設共同臨床試験

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 西 田 幸 二

平成 22 (2010) 年 3 月

自家培養口腔粘膜上皮シート移植による角膜上皮再生治療法の
多施設共同臨床試験

区 分	氏 名	所 属	職 名
研究代表者	西田 幸二	東北大学大学院医学系研究科眼科学	教 授
研究分担者	大橋 裕一	愛媛大学大学院医学系研究科眼科学	教 授
	天野 史郎	東京大学医学部附属病院角膜移植部	准教授
	前田 直之	大阪大学大学院医学系研究科視覚情報制御学（トプコン） 寄付講座	教 授
	山口 拓洋	東京大学医学部附属病院臨床試験データ管理学	特任准教授
	嶋澤 るみ子	東北大学未来医工学治療開発センター	准教授

目 次

I. 総括研究報告

- 自家培養口腔粘膜上皮シート移植による角膜上皮再生治療法の
多施設共同臨床試験・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1
研究代表者 西田 幸二

II. 分担研究報告

1. 自家培養口腔粘膜上皮細胞シート移植による角膜上皮再生治療法の
多施設共同臨床研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・7
大橋 裕一
2. 角膜上皮幹細胞疲弊症に対する自家培養口腔粘膜上皮細胞シート移植による角膜上
皮再生治療法の多施設共同臨床試験・・・・・・・・・・・・・・・・・・13
天野 史郎
3. 難治性角結膜疾患に対する自家培養口腔粘膜上皮細胞シート移植による角膜上皮再
生治療法の多施設共同臨床試験・・・・・・・・・・・・・・・・・・16
前田 直之
4. 自家培養口腔粘膜上皮シート移植による角膜上皮再生治療法の
多施設共同臨床試験・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・20
山口 拓洋
5. 臨床試験のプロジェクトマネジメント ―多施設共同試験に向けた準備―・・・・23
嶋澤 るみ子

III. 知的財産に関する一覧表

1. 知的財産に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・25

IV. 研究班会議に関する報告書

1. 全体班会議
平成21年度第1回班会議プログラムおよび議事録・・・・・・・・・・26

V. 研究成果の刊行に関する一覧表

1. 雑誌および論文一覧・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・31

總 括 研 究 報 告

自家培養口腔粘膜上皮シート移植による角膜上皮再生治療法の多施設共同臨床試験

研究代表者 西田 幸二 東北大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

角膜疾患に対して現在角膜移植が実施されているが、わが国では献眼数は絶対的に少なく、また他家組織による拒絶反応のため、スティーブンスジョンソン症候群や眼類天疱瘡によって引き起こされる角膜上皮幹細胞疲弊症に対しては角膜移植が奏功しない。本研究では、少数例にて有効性及び安全性が確認されている自家培養口腔粘膜上皮細胞シート移植を多施設共同臨床試験として行い、その有効性及び安全性について検証を行う。

3年計画の1年目にあたる本年は、培養口腔粘膜上皮細胞シート移植を進めるための臨床プロトコルの作成、細胞プロセッシングセンターの準備およびバリデーション技術の確立、輸送容器の開発、各施設での倫理委員会への提出書類の準備を行った。

研究分担者

大橋裕一 愛媛大学大学院医学系研究科医学専攻高次機能制御部門・感覚機能医学講座・視機能外科学分野 教授

天野史郎 東京大学医学部附属病院角膜移植部、眼科学 准教授

前田直之 大阪大学大学院医学系研究科視覚情報制御学（トプコン）寄付講座、眼科学 教授

山口拓洋 東京大学医学部 准教授

嶋澤るみ子 東北大学未来医工学治療開発センター 准教授

的なドナー不足に陥っている。さらにスティーブンスジョンソン症候群や眼類天疱瘡などによって引き起こされる角膜上皮幹細胞疲弊症においては、他家由来角膜を用いた従来の角膜移植では拒絶反応が高率に起こるために奏功しない。

そこで我々は拒絶反応の生じない角膜再生治療法の開発を進めてきた。角膜上皮疾患に対してこれまで患者自身の角膜ないし口腔粘膜上皮の幹細胞を用いた培養上皮細胞シート移植の開発とその臨床応用に世界に先駆けて成功し、難治性角膜上皮疾患の根治的治療法の道を開いた（Nishida K et al. N Engl J Med 2004, Nishida K et al. Transplantation 2004）。これらの報告は新規性が高く、国際的にも非常に高い評価を受けてきたものである。次のステップとして本治療法を標準医療として普及させるために、多施設で臨床研究を行い、各施設間における臨床成績を評価・検討していくことが必

A. 研究目的

視覚はQOLの維持に極めて重要である。角膜疾患のため重篤な視覚障害にいたって失明した患者に対して、現在角膜移植が実施されている。しかし現在の角膜移植は献眼に依存しており、その献眼数は絶対的に少ないため、慢性

要である。すなわち本事業の研究目的は、培養口腔粘膜上皮細胞シート移植法の多施設共同臨床研究を実施し、その有効性および安全性を検討することである。具体的には実施施設において患者から口腔粘膜上皮組織を単離し、これを細胞培養施設へ輸送する。培養施設のセルプロセッシングセンター（CPC）において細胞の単離、培養を行い、培養口腔粘膜上皮細胞シートを作製する。そして培養細胞シートを実施施設へ輸送して移植手術を行う。この研究を行うためには、出荷時の品質保証の試験、搬送時の温度、湿度、CO2管理、培養液を含めた輸送技術等の開発が必要である。本試験は準備期間、経過観察期間を合わせると4年間を要するが、本研究事業の機関である3年間で、多施設臨床試験の患者リクルートおよび手術までを終了する予定とする。

まず、3年計画の1年目に当たる本年は培養口腔粘膜上皮細胞シート移植を進めるための臨床プロトコールの作成、細胞プロセッシングセンターの準備およびバリデーション技術の確立、輸送容器の開発、各施設での倫理委員会への提出書類の準備を行った。

B.研究方法

臨床プロトコールの作成：

多施設臨床試験を行うにあたって、臨床プロトコールが必要となるが、作成にあたっては実際に臨床研究を担当する医師のみならず、生物統計家や、薬事法の専門家など多くの専門家が必要がある。そこで、共同研究者である大橋、天野、前田、嶋澤、山口と共同で臨床プロトコールの作成を行った。

セルプロセッシングセンターの準備：

移植用の培養上皮細胞シートはGMP準拠の管理下に調整することが必要である。そこで、CPCにおいて培養上皮細胞シートを作成するために必要な標準手順書（SOP）の準備、工程管理システムの準備などをおこなった。さらに実際に細胞培養を行うCPC作業者の教育訓練も行った。

細胞シートバリデーション技術の確立：

培養口腔粘膜上皮細胞シートを出荷する前には出荷時の品質保証の試験が必須である。そこで、細胞シート評価基準として次の項目を考え、検討を行った。まず我々の培養系では温度応答性培養皿を用いて培養していることから、培養上皮細胞シートの細胞シート剥離試験を行う。次に細胞シートを2等分し、半分をsingle cell suspensionとし、もう一方のシートに対し組織学的検討を行う。Single cellとしたものは、まず細胞数をカウントして細胞シートに含まれる総細胞数を数える。さらにflow cytometryを用いて、7'AADの色素排泄能による生細胞率およびpancytokeratin抗体による上皮細胞純度の検討を行う。組織学的検討については、HE染色、免疫染色によるp63(未分化マーカー)、K3/76(分化マーカー)、MUC16(眼表面特異的膜貫通型ムチン)、ZO-1(バリア機能)の評価を行った。対象となる上皮細胞シートとして、角膜および口腔粘膜上皮細胞シートをおのおの3ロットずつ使用した。また培養期間として、最適と考えられる15日に加えて10日および28日の細胞シートについて評価を行った。

輸送容器の開発：

作製した細胞シートを CPC から出荷して実施施設へ輸送する必要があるが、その際に必要となる輸送容器を開発する必要がある。本年度は輸送容器に必要とされる条件を列挙し、輸送容器の構造について検討を行った。

各施設での倫理委員会への提出書類の準備：

本臨床研究を開始するにあたり、まず各実施施設において倫理委員会へ申請を行い、その後「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に基づいて厚生労働大臣への申請書類提出を行う必要がある。本年度はまず倫理委員会への提出書類の準備をおこなった。

(倫理面への配慮)

「臨床研究に関する倫理指針（平成 20 年 7 月 31 日全部改正）」、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」、「ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の製造管理・品質管理の考え方について」「異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針」に基づく 3T3J2 株及び 3T3NIH 株をフィーダー細胞として利用する上皮系の再生医療への指針」などの関連指針や関連法規を遵守する内容となるように留意した。

C.研究結果

臨床研究のプロトコールの作成：

研究分担者である大橋、天野、前田、山口、嶋澤らと共同で下記の項目を含む臨床プロトコールを作成した。

0. 概要

1. 目的

2. 背景

3. 薬剤や器具等の情報

4. 本試験で用いる規準・定義

5. 選択規準

6. 登録

7. 治療計画

8. 観察・検査項目とスケジュール

9. 有害事象の評価と報告

10. データ収集

11. エンドポイント（評価項目）

12. 統計学的事項

13. 倫理的事項

14. 費用負担と補償

15. モニタリングと監査

16. プロトコールの内容変更

17. 試験の終了と早期中止

18. 記録の保存

19. 研究結果の帰属と発表

20. 研究組織

21. 文献

22. 付録

セルプロセッシングセンターの準備：

セルプロセッシングセンターにおいて使用する標準手順書（SOP）を作成した。さらに CPC 内で実際に作業する作業者の教育および訓練をおこなった。これらの成果によって GMP 準拠による培養上皮細胞シート作製が可能になると考えられた。

細胞シートバリデーション技術の確立：

角膜および口腔粘膜上皮細胞を用いて細胞シートの評価を行った。10 日間培養を行った細胞シートは細胞の増殖が不十分であり、低温処理後の細胞シートとしての回収が不可能であ

った。15日間および28日間培養を行ったシートに関しては、15日間培養したものは、きれいな細胞シートとして剥離できたのに対し、28日間培養したものは一部破損を伴った。総細胞数および生細胞率は15日間培養したものがおのおの 1×10^6 および93.2%であったのに対し、28日間培養したものは 5.1×10^5 および64.1%となり、細胞シートの質の低下がみられた。上皮細胞純度は同等であった。p63, K3/76の発現はどちらの細胞シートにも認められたが、MUC16, ZO-1の発現は、15日間培養したものに対し、28日間培養したものが弱かった。また、2週間程度培養した角膜および口腔粘膜上皮細胞シートをおのおの3ロットずつ評価すると、いずれも剥離は可能であり、総細胞数はおよそ 1.0×10^6 であった。また生細胞率および上皮細胞純度はおのおの80%以上および90%以上と高率であった。また、p63, K3/76, MUC16, ZO-1の発現が認められた。

輸送容器の開発：

われわれ培養系では温度応答性培養皿を用いており、32℃以下では培養皿表面が相転換して親水性となり、細胞シートが剥離することから、輸送中においても37℃での保温が望ましいと考えられる。さらにCPCから出荷して輸送し、手術日が翌日となる可能性も考えられることから、36時間以上培養細胞シートを保持可能な輸送容器を開発する必要がある。また輸送中には温度のみならず、飛行機での輸送も考えられるから気圧をモニタリングできるようなものとする必要がある。

多施設共同臨床研究の準備：

多施設共同臨床研究は東北大、大阪大、愛媛大、東京大の4施設において行うことが決定されており、本年度は多施設研究を行うに当たっての各施設における倫理委員会への提出書類の準備を行った。さらに各施設での倫理委員会への書類提出の後におこなう「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に従った申請のため、書類準備について行った。

D. 考察

臨床プロトコルの作成をおこない、臨床試験の準備をさらに進めることができた。また、CPCにおいて必要とされるSOPの準備、作業員の教育を行ったことから、細胞調整の準備を行うことができたと考えられた。また、細胞シートバリデーション技術を確立することができたので、これによって出荷前の細胞シートの評価を客観的に行うことができるようになった。輸送容器については、必要とされる輸送容器のデザインの概要が決定されたので、来年度には輸送容器を作製して、飛行機による細胞シートの輸送を行う予定としている。また、倫理委員会への提出書類の準備を進めており、承認を受け次第、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」への書類提出を行うこととした。

E. 結論

3年計画の1年目に当たる本年度は臨床プロトコルの作成、セルプロセッシングセンターの準備、細胞シートバリデーション技術の確立、輸送容器の開発、各施設の倫理委員会への書類提出の準備を行った。これらの成果をもとに来年度には各施設での倫理委員会での承認および「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」への書類提出を行うこととする。

F.研究発表

1. 論文発表

- 1) Oie Y, Hayashi R, Takagi R, Yamato M, Takayanagi H, Tano Y, Nishida K. A novel method of culturing human oral mucosal epithelial cell sheet using post-mitotic human dermal fibroblast feeder cells and modified keratinocyte culture medium for ocular surface reconstruction. Br J Ophthalmol 2010 in press.
- 2) Hayashi R, Yamato M, Takayanagi H, Oie Y, Kubota A, Hori Y, Okano T, Nishida K. Validation System of Tissue-Engineered Epithelial Cell Sheets for Corneal Regenerative Medicine. Tissue Eng Part C Methods. 2010 in press
- 3) Kusanagi R, Umemoto T, Yamato M, Matsuzaki Y, Nishida K, Kobayashi Y, Fukai F, Okano T. Nectin-3 expression is elevated in limbal epithelial side population cells with strongly expressed stem cell markers. Biochem Biophys Res Commun. 2009 13;389:274-8.
- 4) Soma T, Nishida K, Yamato M, Kosaka S, Yang J, Hayashi R, Sugiyama H, Maeda N, Okano T, Tano Y. Histological evaluation of mechanical epithelial separation in epithelial laser in situ keratomileusis. J Cataract Refract Surg. 2009 ;35:1251-9.
- 5) Kanayama S, Nishida K, Yamato M, Hayashi R, Maeda N, Okano T, Tano Y. Analysis of Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Secreted from Cultured Corneal and Oral Mucosal Epithelial Cell Sheets in Vitro, Br J

Ophthalmol. 2009;93:263-7.

- 6) Hori Y, Nakazawa T, Maeda N, Sakamoto M, Yokokura S, Kubota A, Inoue T, Nishida K, Tano Y. Susceptibility comparisons of normal preoperative conjunctival bacteria to fluoroquinolones. Journal of Cataract & Refractive Surgery. 35: 475-479 2009

2. 学会発表

- 1) 西田幸二、トランスレーショナルリサーチにおける産学連携の動き、第113回日本眼科学会総会、東京国際フォーラム、東京、2009年4月17日
- 2) 西田幸二、眼科領域における再生医療の現状と将来、日本組織培養学会第82回大会、獨協大学、栃木
- 3) Nishida K. Ocular surface reconstruction with regenerative medicine. The 5th international meeting for advanced cataract and refractive surgery (IMACRS). Seoul St. Mary's Hospital. Seoul
- 4) 西田幸二、角膜再生医療の現状と将来、日本人類遺伝学会第54回大会、グランドプリンスホテル高輪、東京
- 5) 西田幸二、角膜の再生医療、第192回がんセミナー、宮城県がんセンター、宮城
- 6) 西田幸二、角膜の再生医療、昭和大学歯学部ハイテクリサーチセンタープロジェクト整備事業 研究成果発表会、昭和大学歯科病院、東京
- 7) 西田幸二、眼の再生、第9回日本再生医療学会、広島国際会議場、広島、2010年3月19日
- 8) 大家義則、林竜平、高木亮、大和雅之、高柳泰、西田幸二、ヒト線維芽細胞および新

規培地による口腔粘膜上皮細胞シートの作製法、第34回角膜カンファレンス、仙台国際センター、仙台、2010年2月11日

9) 田中佑治、久保田享、Thomas Duncan, 松崎典弥、Andrew J. Quantock, 八木直人、明石満、西田幸二、角膜実質代価物の作製を目指した光透過性架橋コラーゲンゲルの線維構造と機能の制御、第9回再生医療学会、広島国際会議場、広島、2010年3月19日

10) 大家義則、林竜平、高木亮、大和雅之、高柳泰、西田幸二、ヒト線維芽細胞および医薬品を用いた培地による口腔粘膜上皮細胞シートの新規作製法、第9回再生医療学会、広島国際会議場、広島、2010年3月18日

11) Y. Tanaka, A. Kubota, A. J. Quantock, M. Yamato, K. Takehana, M. Akashi, K. Nishida, Light Transmissive Aligned Collagen Hydrogel for Tissue Rngineering of Corneal Stroma, The 9th Corneal Conference, Cardiff University, Wales, July 15th 2009.

12) S. Dong, Y. Tanaka, A. Kubota, K. Nishida, Differentiation of MSC into keratocyte, The 14th congress of Chinese ophthalmological society, September 4th 2009.

13) 西田幸二、角膜の再生医療、第115回日本解剖学会総会・学術集会、岩手県水産会館、岩手、2010年3月30日

3. 新聞・テレビ等による報道

4. 元気！健康！フェア in とうほく：角

膜再生治療、一定の効果 河北新報
2009年12月24日

5. 医療機器産業を東北に：TR 朝日新聞
2009年4月23日

6. 皮下に「第2の肝臓」作製で機能改善
角膜上皮の再生医療「標準的医療へ発展
させる段階」 Japan Medicine 2009年
3月30日

7. 本人の細胞から上皮と内皮 角膜再生
研究を本格化 河北新報 2009年1月
19日

8. 角膜移植 高まる技術 パーツで利用
治療法広がる 朝日新聞 2009年1月
18日

9. 角膜再生研究 加速へ 工学分野から
も研究者参加 読売新聞 2009年1月4
日

G.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 特願 2009-287890・西田幸二、田中佑治、
久保田享・皮膚真皮透明化による角膜移植
材料調整法・国立大学法人東北大学・2009
年12月18日出願

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分 担 研 究 報 告

自家培養口腔粘膜上皮細胞シート移植による 角膜上皮再生治療法の多施設共同臨床研究

研究分担者 大橋 裕一 愛媛大学

研究要旨

難治性角結膜上皮疾患（スティーブンスージョンソン症候群、眼類天疱瘡、無虹彩症などによる角膜上皮幹細胞疲弊症）に対する自家培養口腔粘膜上皮細胞シート移植の多施設臨床研究を行うにあたり、必要とされる臨床プロトコルの作成、輸送容器の開発、倫理委員会への提出書類の準備を行った。

A. 研究目的

難治性角結膜上皮疾患であるスティーブンスージョンソン症候群、眼類天疱瘡、無虹彩症による角膜上皮幹細胞疲弊症は従来の角膜移植による治療成績が極めて悪く、新たな根治療法の開発が望まれる。自家培養口腔粘膜上皮細胞シート移植は、これらの疾患に対する自家細胞源を用いた画期的な治療法として報告され、極めて良好な治療成績を収めている。本研究では、この治療法を多施設臨床研究として行い、さらなる検証を行うこととする。

B. 研究方法

自家培養口腔粘膜上皮シート移植による角膜上皮再生治療法の多施設共同臨床試験を行うために、臨床プロトコルの作成、輸送容器の開発および倫理委員会への提出書類の準備を行った。

（倫理面への配慮）

研究プロトコル作成及び試験の実施に

あたっては、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」（平成 18 年 7 月 3 日厚生労働省告示第 425 号）、「異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針」に基づく 3T3J2 株及び 3T3NIH 株をフィーダー細胞として利用する上皮系の再生医療への指針」（平成 16 年 7 月 2 日医政研発第 0702001 号）、「臨床研究に関する倫理指針」（平成 20 年 7 月 31 日厚生労働省告示第 415 号）「臨床研究に関する倫理指針（平成 20 年 7 月 31 日全部改正）」などの関連指針や関連法規を遵守する内容となるように留意する。

C. 研究結果

臨床プロトコルについては、共同研究者である西田、天野、前田、山口、嶋澤らと共同で作成を行った。主要エンドポイントは角膜中央部の上皮化とした。さらに副次エンドポイントとしては視力、角膜混濁、角膜血管新生とした。角膜混濁、角膜血管新生の評価には、Sotozono らの grading を参考とした。

(Sotozono et al. New grading system for the evaluation of chronic ocular manifestations in patients with stevens-johnson syndrome. *Ophthalmology* 2007; 114: 1294-1302)

次に輸送容器の開発については、輸送容器に必要とされる仕様について検討を行った。培養装置は 37℃で保たれる必要があると考えられた。愛媛への輸送には飛行機を用いることが想定されることから、気圧変化、振動への対応に加えて、輸送時間についても考慮する必要があると考えられた。CPC から朝出荷した場合においても、愛媛への到着は夕方もしくは夜になることが考えられ、そのような場合には手術が翌日行われることが想定された。よって輸送容器での輸送時間は上限を 36 時間とすることが適切ではないかと考えられた。

さらに倫理委員会への提出書類の準備を行った。本学倫理委員会の承認を得たのちにヒト幹細胞指針への書類提出予定としている。

D. 考察

臨床プロトコールの作成を行ったことから、臨床研究の準備を進めることができた。輸送容器の開発についても、必要とされる仕様について決定することができた。さらに、倫理委員会への提出書類についてもその準備を進めた。

E. 結論

本年は臨床プロトコールの準備、輸送容器の開発、倫理委員会提出書類の作成をおこなった。これらの成果をもとに来年度にはヒト幹細胞指針への書類を提出し、再来年からの臨

床試験開始を目指す。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Goto T, Zheng X, Gibbon L, Ohashi Y. Cosmetic Product Migration Onto the Ocular Surface: Exacerbation of Migration After Eyedrop Instillation. *Cornea*.2010 Feb 17. [Epub ahead of print]
- 2) Mitani A, Shiraishi A, Uno T, Miyamoto H, Hara Y, Yamaguchi M, Ohashi Y. In vivo and in vitro investigations of fungal keratitis caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *J Ocul Pharmacol Ther.* 25 (6) : 563-5, 2009
- 3) Hara Y, Shiraishi A, Ohashi Y. Hypoxia-altered signaling pathways of toll-like receptor 4 (TLR4) in human corneal epithelial cells. *Mol Vis.* 2;15:2515-20,2009.
- 4) Shiraishi A, Kobayashi T, Hara Y, Yamaguchi M, Uno T, Ohashi Y. Rapid detection of *Acanthamoeba* cysts in frozen sections of corneal scrapings with *Fungiflora* Y. *Br J Ophthalmol.* 93 (12) : 1563-5, 2009.
- 5) Noda E, Yamanishi S, Shiraishi A, Ohashi Y. Cataract surgery under infliximab therapy in a patient with Behçet's disease. *J Ocul Pharmacol Ther.* 25 (5) : 467-70, 2009.
- 6) Kobayashi T, Yoshioka R, Shiraishi A, Ohashi Y. New technique for culturing corneal epithelial cells of normal mice. *Mol Vis.* 14;15 : 1589-93, 2009.
- 7) Kawasaki S, Mizoue S, Yamaguchi M, Shiraishi A, Zheng X, Hayashi Y, Ohashi Y.

- Evaluation of filtering bleb function by thermography.
Br J Ophthalmol. 93 (10) :1331-6, 2009
- 8) Hara Y, Shiraishi A, Kobayashi T, Kadota Y, Shirakata Y, Hashimoto K, Ohashi Y. Alteration of TLR3 pathways by glucocorticoids may be responsible for immunosusceptibility of human corneal epithelial cells to viral infections. Mol Vis. 15:937-48, 2009.
- 9) Suzuki T, Ikewaki J, Iwata H, Ohashi Y, Ichinose A.
The first two Japanese cases of severe type I congenital plasminogen deficiency with liginous conjunctivitis: successful treatment with direct thrombin inhibitor and fresh plasma. Am J Hematol. 84 (6) : 363-5, 2009.
- 10) Kawasaki S, Suzuki T, Yamaguchi M, Tasaka Y, Shiraishi A, Uno T, Sadamoto M, Minami N, Naganobu K, Ohashi Y. Disruption of the posterior chamber-anterior hyaloid membrane barrier during phacoemulsification and aspiration as revealed by contrast-enhanced magnetic resonance imaging. Arch Ophthalmol. 127(4) : 465-70, 2009.
- 11) Kamao T, Miyazaki T, Soga Y, Komori H, Terada M, Ohashi Y, Nose M. Genetic dissociation of dacryoadenitis and sialadenitis in a Sjogren's syndrome mouse model with common and different susceptibility gene loci. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009 50 (7) : 3257-65, 2009.
- 12) 兵頭涼子, 林康人, 溝上志朗, 川崎史朗, 吉川啓司, 大橋裕一
圧力センサーによる緑内障点眼薬の点眼のしやすさの評価
あたらしい眼科, 27 (1) : 99-104, 2010.
- 13) 野田恵理子, 山口昌彦, 白石敦, 宇野敏彦, 大橋裕一
流行性角結膜炎を契機に発症したと考えられるドライアイの3症例
あたらしい眼科, 26 (12) : 1671-1677, 2009.
- 14) 渡邊潔, 糸井素純, 梶田雅義, 大橋裕一, 植田喜一, 宇津見義一, 高野繁, 吉田博, 伊藤信一, 三宅謙作, 佐野研, 大瀧守彦, 大橋敏夫, 溝口隆久, 早川豪一, 岡野憲二, 田中英成, 日本コンタクトレンズ協議会
インターネットによるコンタクトレンズ眼障害アンケート調査の集計結果報告 (平成20年度)
日本の眼科, 80 (12) : 1615-1621, 2009.
- 15) 鈴木崇, 白石敦, 宇野敏彦, 江口秀一郎, 勝海修, 望月清文, 井上康, 岡宮史武,
宮田和典, 大橋裕一
洗面所における微生物汚染調査
あたらしい眼科, 26 (10) : 1387-1391, 2009.
- 16) 宮永将, 子島良平, 宮井尊史, 加賀谷文絵, 宮田和典, 大橋裕一, 浅利誠志
白内障手術の周術期における結膜嚢内常在菌叢 フルオロキノロン点眼薬による滅菌化と感受性変化
臨床眼科, 63(10) : 1659-1666, 2009.
- 17) 木村由衣, 宇野敏彦, 山口昌彦, 原祐子, 島村一郎, 鈴木崇, 山西茂喜, 大橋裕一
愛媛大学眼科における細菌性角膜炎症例の検討
あたらしい眼科, 26 (6) : 833-837, 2009.
- 18) 鎌尾知行, 溝上志朗, 川崎史朗, 大橋裕一
副腎皮質刺激ホルモン療法における眼圧の経時変化を観察し得た West 症候群の2例
日本眼科学会雑誌, 113(5) : 601-605, 2009.
- 19) 白石敦, 山西茂喜, 山本康明, 山口昌彦, 大橋裕一
ドライアイ症状患者における lid-wiper epitheliopathy の発現頻度
日本眼科学会雑誌, 113(5) : 596-600, 2009.

2.学会発表

- 1) 上甲武志、原祐子、白石敦、大橋裕一
長期間良好な視力を維持できた進行性網膜外層壊死の1例
第46回日本眼感染症学会 7/10-7/12, 2009.
- 2) 川崎史朗、白石敦、山口昌彦、宇野敏彦、大橋裕一
サーモグラフィーによる角膜感染症の炎症所見の検討
第46回日本眼感染症学会 7/10-7/12, 2009.
- 3) 三谷亜里沙、白石敦、原祐子、山口昌彦、宇野敏彦、大橋裕一
Colletotrichum gloeosporioides による真菌性角膜炎の1例
第46回日本眼感染症学会 7/10-7/12, 2009.
- 4) 竹澤由起、山口昌彦、原祐子、白石敦、宇野敏彦、大橋裕一
共焦点顕微鏡(HRT2-RCM)の所見が有用であった難治性角膜炎の1例
第46回日本眼感染症学会 7/10-7/12, 2009.
- 5) ギボン・リンジー、水戸毅、足利清香、小池哲央、上村秀人、白石敦、大橋裕一
塩酸ポリヘキサニドの抗アカントアメーバ作用に対する緩衝剤の影響
第52回日本コンタクトレンズ学会 7/10-7/12, 2009.
- 6) 水戸毅、白石敦、ギボン・リンジー、大橋裕一
アカントアメーバのシスト日齢のMPSへの感受性におよぼす影響
第52回日本コンタクトレンズ学会 7/10-7/12, 2009.
- 7) 白石敦、鄭曉東、山本康明、原祐子、大橋裕一
共焦点顕微鏡(HRT2-RCM)による角膜内皮ジストロフィーの診断
第63回日本臨床眼科学会 10/9-10/11, 2009.
- 8) 坂根由梨、山口昌彦、伊藤淳也、中野慎介、田坂嘉孝、白石敦、片岡永、大橋裕一
Ocular Surface Thermographerによるコンタクトレンズ装用時のドライアイ評価
第63回日本臨床眼科学会 10/9-10/11, 2009.
- 9) 原祐子、竹澤由起、白石敦、鄭曉東、山本康明、山口昌彦、宇野敏彦、大橋裕一
DSAEK後にepithelial ingrowthを発症した1例
第63回日本臨床眼科学会 10/9-10/11, 2009.
- 10) 原祐子、三谷亜里沙、溝上志朗、白石敦、山口昌彦、宇野敏彦、鄭曉東、山本康明、大橋裕一
メソトレキセート眼内注入が奏功したDSAEK後epithelial ingrowthの1例
第33回日本眼科手術学会 1/22-24, 2010.
- 11) 川崎史朗、溝上志朗、大橋裕一
サーモグラフィーと前眼部 Optical Coherence Tomographyによる機能評価を試みたOverhanging blebの1例
第33回日本眼科手術学会 1/22-24, 2010.
- 12) 宇田高広、田坂嘉孝、川崎史朗、水戸毅、

鈴木崇、宇野敏彦、大橋裕一

白内障手術破囊例における抗菌薬前房内
投与の有効性～腸球菌眼内炎モデルでの
実証～

第 33 回日本眼科手術学会 1/22-24,2010.

13) 竹澤由起、上甲武志、溝上志朗、宇田高
広、別所建一郎、大橋裕一

Pit-macular 症候群の病態評価に 3 次元光
干渉断層計 (3D-OCT) が有用であった 1
例

第 33 回日本眼科手術学会 1/22-24,2010.

14) 三谷亜里沙、別所建一郎、上甲武志、田
坂嘉孝、宇田高広、大橋裕一

網膜色素洗淨の脈絡膜新生血管に対する
ベバシズマブの長期経過

第 33 回日本眼科手術学会 1/22-24,2010.

15) 山口昌彦、坂根由梨、松田久美子、野田
恵理子、宇野敏彦、鄭曉東、山本康明、
原祐子、白石敦、大橋裕一

涙点プラグ初回挿入例での Punctal plug,
Superflex plug, Super eagle plug の

有用性

第 34 回角膜カンファランス・第 25 回日
本角膜移植学会 2/11-13,2010.

16) 小林剛、白石敦、楊旅軍、白方裕司、橋
本公二、大橋裕一

凍結保存細胞によるヒト培養角膜上皮シ
ートの作製

第 34 回角膜カンファランス・第 25 回日
本角膜移植学会 2/11-13,2010.

17) 白石敦、鄭曉東、山本康明、原祐子、大
橋裕一

家族性に認められた Posterior Corneal
Vesicle (PCV) の HRT2-RCM 像

第 34 回角膜カンファランス・第 25 回日

本角膜移植学会 2/11-13,2010.

18) 張媛、白石敦、小林剛、吉岡龍治、林康
人、大橋裕一

角膜上皮創傷治癒機転における
epiregulin の役割の検討

第 34 回角膜カンファランス・第 25 回日
本角膜移植学会 2/11-13,2010.

19) 木村由依、木村亘、木村徹、宇野敏彦、
白石敦、大橋裕一

臨床経過の異なる角膜蜂刺症の 2 例

第 34 回角膜カンファランス・第 25 回日
本角膜移植学会 2/11-13,2010.

20) 鄭曉東、白石敦、原祐子、山本康明、大
橋裕一

Pseudoexfoliation endotheliopathy と班が得
られる水疱性角膜症の 1 例

第 34 回角膜カンファランス・第 25 回日
本角膜移植学会 2/11-13,2010.

21) 木村格、岡本茂樹、白石敦、大橋裕一

LASIK 眼における角膜内ランゲルハンス
細胞動態

第 34 回角膜カンファランス・第 25 回日
本角膜移植学会 2/11-13,2010.

22) 山本康明、三谷亜里沙、白石敦、山口昌
彦、原祐子、宇野敏彦、鄭曉東、大橋裕一

高速度カメラによる瞬目時眼球後退の定
量

第 34 回角膜カンファランス・第 25 回日
本角膜移植学会 2/11-13,2010.

23) 原祐子、白石敦、宇野敏彦、山口昌彦、
鄭曉東、山本康明、大橋裕一

発症基盤の異なる epithelial ingrowth 3 症
例の HRT2-RCM 所見

第 34 回角膜カンファランス・第 25 回日
本角膜移植学会 2/11-13,2010.

24)平岡恵里、竹澤由起、白石敦、宮本仁志、
大橋裕一

ハードコンタクトレンズ装用者における
保存ケースの細菌汚染調査

第 34 回角膜カンファランス・第 25 回日
本角膜移植学会 2/11-13,2010.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含
む）

1.特許取得

特になし

2.実用新案登録

特になし

3.その他

特になし

角膜上皮幹細胞疲弊症に対する自家培養口腔粘膜上皮細胞シート移植による角膜上皮再生治療法の多施設共同臨床試験

研究分担者 天野 史郎 東京大学

研究要旨

本研究では自家培養口腔粘膜上皮細胞シート移植による角膜上皮再生治療法の多施設共同臨床試験を行うこととしている。3年計画の1年目に当たる本年度は共同研究者と協力して、臨床プロトコールの作成、輸送容器の開発、倫理委員会提出書類の準備を行った。

A.研究目的

従来の角膜移植が功奏しない、角膜上皮疾患（Steven-Johnson 症候群や眼類天疱瘡）に対しては、自家角膜および培養口腔粘膜上皮細胞シート移植の有効性が報告されている。また、本疾患の大多数が両眼性であることから、口腔粘膜上皮細胞を細胞源とした、自家培養口腔粘膜上皮細胞シート移植は両眼性疾患の根治療法として期待されているものである。しかしながら、現在までの報告は、いずれも単施設における少数例の研究の成果である。そこで本研究においては、自家培養口腔粘膜上皮細胞シート移植の多施設共同臨床試験を行い、本治療法の検証をさらに進めることを目的とする。

B.研究方法

本年度においては、臨床プロトコールの作成をまず行った。これについては、共同研究者である西田、大橋、前田、山口、嶋澤らと協力して行った。また、培養施設のセルプロ

セシングセンターにおいて培養した細胞上皮シートは各実施施設へ輸送して移植に用いる予定としている。そこで、培養細胞シートの輸送容器が必要となるが、これについての開発を進めた。また、本学における倫理委員会への提出書類の準備を行った。

（倫理面への配慮）

研究プロトコール作成及び試験の実施にあたっては、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」（平成18年7月3日厚生労働省告示第425号）、「異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針」に基づく3T3J2株及び3T3NIH株をフィーダー細胞として利用する上皮系の再生医療への指針」（平成16年7月2日医政研発第0702001号）、「臨床研究に関する倫理指針」（平成20年7月31日厚生労働省告示第415号）「臨床研究に関する倫理指針（平成20年7月31日全部改正）」などの関連指針や関連法規を遵

守る内容となるように留意した。

C.研究結果

臨床プロトコルを、共同研究者である西田、天野、前田、山口、嶋澤と作成した。主要エンドポイントとしては、角膜中央部の上皮化とすることとした。これは、視力を主要エンドポイントとすることも考えられるが、適応となるような角膜上皮幹細胞疲弊症患者においては、角膜実質に混濁を伴う場合があることから、エンドポイントとするのには不適であると考えられるからである。さらに、副次エンドポイントとして視力、角膜混濁、角膜血管新生とした。予測される有害事象には角膜角化、結膜充血、研究癒着、眼通、異物感、流涙、羞明、角膜感染症、眼内炎、点状表層角膜症、角膜上皮欠損をあげた。

輸送容器の開発については、共同研究者の西田、大橋、前田らと共に培養上皮細胞シートの輸送容器に必要とされるスペックについて検討を行った。本研究においては、温度応答性培養皿を用いることから 37℃での輸送が適切ではないかと考えられた。さらに、新幹線や飛行機での輸送中の温度、気圧のモニタリングが必要であり、輸送中の輸送液についても検討を行う必要があると考えられた。

さらに本学の倫理委員会への書類提出の準備を行った。倫理委員会の承認を得たのちに「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」への申請を行う予定としている。

D.考察

臨床プロトコルの作成には、臨床研究を行う眼科医のみならず薬事法専門家や生物

統計家の参画が必須と考えられる。今回はこれら専門家の意見を十分に聞きプロトコル作成を行った。また、輸送容器の作製についてその概要について検討を行った。また、倫理委員会への提出書類についてもその準備を進めた。

E.結果

本年は臨床プロトコル、輸送容器、倫理委員会への書類提出の準備を行った。さらに来年度には倫理委員会への書類提出及びヒト幹細胞指針への書類を提出する予定としている。

F.研究発表

1.論文発表

- 1) Hayashi T, Yamagami S, Tanaka K, Yokoo S, Usui T, Amano S, Mizuki N. Immunological mechanisms of corneal allografts reconstituted from cultured allogeneic endothelial cells in an immune-privileged site. Invest Ophthalmol Vis Sci 50:3151-3158, 2009
- 2) Honda N, Mimura T, Usui T, Amano S. Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty using cultured corneal endothelial cells in a rabbit model. Arch Ophthalmol 127:1321-1326, 2009

2.学会発表

なし

G.知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1.特許取得

特になし