

201006016A

厚生労働科学研究費補助金
再生医療実用化研究事業

ヒト幹細胞を用いた臨床研究のエビデンス創出から
高度医療制度による実用化を目指した研究

平成 22 年度 総括研究報告書

研究代表者 坪田 一男

平成 23(2011)年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

ヒト幹細胞を用いた臨床研究のエビデンス創出から 高度医療制度による実用化を目指した研究 坪田一男	1
--	---

A. 研究目的	1
B. 研究方法	3
C. 研究結果	8
D. 考察	11
E. 結論	13
F. 健康危険情報	13
G. 研究発表	13
H. 知的財産権の出願・登録情報	13
I. 別紙	13
① 観察・検査・評価項目およびスケジュール	
1.1 観察・検査・評価項目	14
1.2 実施スケジュール	17
② 症例スコア1	18
③ 症例スコア2	19
④ 製品標準書	22
⑤ 作業手順書	38

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

総括研究報告書

ヒト幹細胞を用いた臨床研究のエビデンス創出から

高度医療制度による実用化を目指した研究

研究代表者 坪田一男 慶應義塾大学医学部眼科学教室教授

研究要旨:角膜輪部上皮幹細胞不全症の治療法に培養上皮シート移植があるが、従来はマウス線維芽細胞株がフィーダー細胞に用いられており、またロット管理も厳密になされていなかった。本研究では、眼科としては全国で始めてヒト幹細胞臨床研究指針の承認下(平成 21 年 1 月 21 日・厚生労働省発医政第 0191004 号)で、GMP 準拠のロット管理のもとヒト間葉系幹細胞をフィーダー細胞に用いて培養上皮シート移植を行った。培養開始時及び培養 1 週時に無菌検査、移植 1 日前に出荷判定、移植日に無菌検査を行った。テストラン含めて培養は 7 例行ったが、うち 1 例で無菌検査にてパルボウイルス B19 が検出され、移植を中止した。移植 2 例では移植前がそれぞれ矯正視力 0.07 及び矯正不能だったのに対し、移植後が矯正視力 1.0 及び 0.3 で改善を認めた。また研究を進める中で、高コストや試験結果のタイムラグ、ロット間の上皮成長のばらつきなどの問題が明らかになった。GMP 準拠の安全な再生医療の普及を目指すうえで今後解決すべき点が明らかになった点においても、本研究は意義が高かったと考えられる。

研究分担者氏名・所属研究機関名

及び所属研究機関における職名

坪田一男	慶應義塾大学医学部眼科	教授
榛村重人	慶應義塾大学医学部眼科	准教授

②研究の背景

角膜上皮移植術の対象となる疾患は、その目的により二つに大別される。一つは、健常な角膜上皮の供給による視力改善およびocular surfaceの安定を目的として行うもので、これに該当する疾患群は Stevens-Johnson 症候群(SJS)、眼類天疱瘡(OCP)、化学・熱による角膜腐食(角膜腐食)などの癒痕性角結膜疾患、および膠様滴状角膜ジストロフィ(GDLD)、Salzmann 角膜変性(SCD)などの上皮変性疾患である。もう一つは、原疾患の治療を目的として行うものであり、蚕食性角膜潰瘍を代表とする周辺部角膜潰瘍(周辺部潰瘍)、角結膜上皮腫瘍(腫瘍)、再発翼状片などである。

A. 研究目的

①研究目的

角膜上皮幹細胞不全を伴う重症眼表面疾患において、新規に開発した手法による培養角膜上皮シート移植の治療効果及び安全性を検討する。本研究の意義は、幹細胞不全による失明者の社会復帰を実現するために、従来の培養上皮シートで必要とされていた異種細胞や羊膜を用いない、より安全な再生技術を確立することである。

角膜上皮移植術には角膜上皮形成術 (keratoepithelioplasty)、輪部移植 (limbal transplantation)、および本研究において実施する培養上皮移植術の3術式があり、それぞれ適する対象疾患が異なる。角膜上皮形成術は、transient amplifying cell (TA cell) および分化細胞を角膜表層実質とともに移植する術式であり、また輪部移植は、角膜上皮幹細胞を含む輪部組織を移植する術式である。一方、培養上皮移植術は、角膜上皮幹細胞を含む角膜上皮細胞を角膜輪部組織より採取し、生体外で培養して上皮シートを作成させた後、これを眼表面に移植する術式である。

一般に、急性期の重症眼表面疾患、例えば Stevens-Johnson 症候群や重症角膜化学外傷などにおいては、全角膜上皮欠損とともに著しい炎症が生じ、しばしば遷延性上皮欠損の状態となる。強い炎症を伴う遷延性上皮欠損は、角膜融解から角膜穿孔、あるいは角膜感染症といった重篤な状態に至りやすく、臨床的に非常に危険であるため、本来は早期の角膜上皮移植による治療が望ましい。しかし従来の角膜上皮移植術である角膜上皮形成術や輪部移植では、角膜全体の上皮化を得るまでに術後 1-2 週間を要し、また急性期の遷延性上皮欠損に対して施行しても、上皮化が得られない、移植片が生着にくい、拒絶反応が生じやすいといった問題がある。このためこれらの疾患の急性期は上皮移植術の適応外とされているが、保存的治療のみでは結膜上皮が結合組織を伴って侵入し、瞼球癒着も進行するため、視力予後は著しく不良となる。

これに対して培養上皮移植術は、従来外科的治療の対象となり得なかった急性期のこれら重症眼表面疾患に対し、新しい外科的アプローチを提供する。具体的に、実際の培養上皮移植術は以下の手順で行われる。(1) まず角膜上を覆

う瘢痕、肉芽組織とともに結膜上の異常粘膜組織を除去し、(2) 次に結膜下組織の増殖を抑える目的で MMC 処理を行ない、(3) 最後に培養した角膜上皮シートを移植する。すなわち培養上皮移植術は、遷延性上皮欠損眼に対して幹細胞を含む上皮シートを一次的に患部全体へ供給する術式であり、移植後ごく早期の上皮化と上皮幹細胞の再供給を得ることができる。またこの特徴から、上皮幹細胞が疲弊し上皮細胞の供給が減少している慢性期においても、培養上皮移植術は有効であると考えられる。培養上皮シートの調製方法としては福田恵一 (慶応義塾大学医学部教授) らが開発したキャリアーを用いないファイブリンシートを用いる。福田らは、心筋細胞をファイブリンシート上に培養し、層状にこれを重ねることで心筋組織の作成に成功した。この研究成果を基に、坪田一男 (慶應義塾大学医学部眼科教授)、榛村重人 (慶應義塾大学医学部眼科准教授) らは、ウサギ輪部角膜上皮を、ファイブリンシート上でマウス 3T3 細胞によるフィーダー層と共培養し、さらに air-lift することによって、上皮シートの作成に成功した。この手法による上皮シートは、生体の角膜上皮と同様に重層化しており、輪部上皮をドナーとした場合、免疫組織化学的検討において角膜上皮特異的ケラチン (K3/K12) 陽性であった。加えてこれらの上皮シートは、コロニー形成能を有する未分化細胞を含んでいた。さらに、これらの上皮シートを外科的処理あるいは薬剤処理 (n-heptanol) による角膜上皮障害モデルウサギに移植したところ、縫合を行うことなく眼表面に生着し、長期にわたって角膜上皮を再構築することができた。これらの結果は、ファイブリン上で作成した上皮シートが輪部幹細胞不全の治療に有効であることを強く示唆している。

実地医療にこの術式を応用するにあたり、坪田、榛村らはさらに安全性を考慮し、フィーダー細胞としてマウス 3T3 細胞の代わりにヒト骨髄間

葉系幹細胞(MASC 細胞)を用いて上皮細胞シートを作成する技術を確立した。マウス由来の 3T3 細胞をフィーダー層として用いた培養上皮移植はすでにヒト角膜に対して行われているが、3T3 細胞由来と考えられる異種感染症発生の報告は全くないため、培養時の異種細胞併用に起因する感染症のリスクは一般に低いものと考えられる。しかし、ヒト由来 MASC 細胞を用いることで、研究被験者がマウス細胞由来の未知の感染症にさらされるリスクは完全に排除することができる。今回、米国において安全性が保証されている GMP 準拠のヒト MASC 細胞の使用が可能となったため、本研究ではこの細胞をフィーダー細胞として用いた。さらに、上皮細胞シート作成時に用いるウシ胎児血清については、狂牛病の発症していない地域(オーストラリア、ニュージーランド)産の血清を用いることでプリオン感染リスクを極力抑えて培養した。加えて本研究では GMP 準拠の上皮細胞シートを供給するため、クリーンルーム(一般には Cell processing center, CPC。本学の Keio vector processing center:KVPC を使用)内で標準作業書(SOP)に従い、GMP 品の無い一部例外を除いて GMP 準拠の物品を用いて培養を行った。安全性を担保するため培養1週ごとに3回微生物検査を行うと共に、出荷検査を行って合格品のみを出荷した。現在までにテストラン含めて7例の培養と3例の移植を行ったので、その結果および明らかとなった問題点を報告する。

③ 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

本研究は角膜上皮シート移植としては、フィーダーとして異種細胞である3T3細胞を用いない点、羊膜を用いない点で新規性が認められる。

B. 研究方法

① 本研究において実施する試験治療の内容

- (1) 同種(ドナー)角膜輪部からの上皮幹細胞採取
- (2) 培養角膜上皮シート作成
- (3) 角膜上皮シート移植術

なお、培養法を検討するため、CPC 外でも移植を目的としない上皮シート培養を行った。

② 研究デザイン

研究デザインは、単群無対照オープン試験とする。

③ 登録の手順

(1) 研究被験者の適格性確認

登録に先立って、試験実施担当医師は研究被験者候補について選択基準・除外基準の各項目を確認し、適格性を文書に記録する。

(2) 研究被験者の登録

同意を得た適格者の組み入れは、個人管理責任者の指導もとにコーディネーターが行う。

④ 臨床研究の対象疾患

スティーブンス・ジョンソン症候群、眼類天疱瘡、角膜化学傷/熱傷、膠様滴状角膜変性症、先天性無虹彩症を対象疾患とする。これらの疾患は、角膜上皮幹細胞不全に伴う角膜の異常上皮化を認めるため、幹細胞を含まない通常の角膜移植では治療できないためである。なお、角膜実質の障害が少ない症例では、角膜(実質)移植を伴わない上皮シート移植のみによって視力の向上が期待できる。

⑤ 被験者等の選定及び除外基準

(1) 選択基準:

- ・ 次の各疾患による角膜上皮幹細胞不全症と診断されていること。

I. スティーブンス・ジョンソン症候群

- II. 眼類天疱瘡
- III. 角膜化学傷/熱傷
- IV. 膠様滴状角膜ジストロフィ(GDL D)
- V. Salzmann 角膜変性(SCD)
- VI. 先天性無虹彩症
 - ・年齢20歳以上
 - ・涙液機能がシルマー試験にて5ミリ以上残存、かつ眼瞼構造が正常
 - ・患者本人による署名および日付の記載入りの同意文書を得ていること。

(2) 除外基準

・次のいずれかの条件に該当する者は除外する。

- I. 原因不明の角結膜疾患。
- II. 活動性の角膜感染症(細菌・真菌・ウイルスなど)を有する症例。手術前4週間以内に、眼表面から細菌あるいは真菌が検出された症例。
- III. 眼圧が亢進している症例。(ただし緑内障治療薬で眼圧がコントロールされている症例は除外基準とはしない。)
- IV. 血糖コントロール不良な糖尿病症例。
- V. 既往にシクロスポリンおよびステロイド剤に対する過敏症を有する症例。
- VI. 研究期間中に内眼手術を受ける予定の症例。
- VII. 妊婦および妊娠の可能性のある婦人。
- VIII. その他、合併症等のため本研究を実施するのに不相当と考えられる症例

⑥ 臨床研究に用いるヒト幹細胞

種類:角膜上皮幹細胞

方法:以下の方法で採取、調整、移植を行う。

- (1) 採取:同種(ドナー)強角膜切片から、角膜上皮幹細胞が含まるとされる輪部上皮細胞を採取し、培養用試料とする。なお、手術時期と幹細胞の鮮度を考慮

して、1人のドナーから患者1人分の上皮シートを作成する。なお、詳細は別紙⑤標準手順書に記載する。

- (2) 調整:細胞調整用のクリーンルーム(一般的には Cell Processing Center <CPC>。本学での固有名称は Keio Vector Processing Center <KVPC>)内で、標準作業書(SOP)及びその下位の指図記録書に従って調整を行う。なお、詳細は別紙⑤標準手順書に記載する。無菌的に組織を酵素処理して上皮細胞を分散させ、上皮の基質として市販の医薬品であるフィブリン糊上に播種して、コンフルエントになるまで培養する。同一ロットの上皮シートを2個以上作成し、うち1個を出荷判定時の破壊検査に用いる。出荷検査として以下の項目を行う。

- I. 性状試験:(ア)形態観察:敷石状であり、細胞欠損域を認めない。(イ)細胞層数測定:凍結切片で細胞の重層を認める。
- II. 定量試験:細胞密度測定:2000 個/mm²以上。
- III. 確認試験:ケラチン 3/12 の免疫染色によって陽性細胞を認める。
- IV. 微生物検査:以下の検査項目に対して陰性:細菌(好気性菌、嫌気性菌)、真菌、ウイルス(HCV、HBV、HIV、ヒトパルボウイルス B19、HTLV-1<ATLV>)、マイコプラズマ。エンドトキシンが25EU/mL以下。

実際には、判定までに時間がかかるために移植2日前に以上 I から III の試験を行う。また、微生物検査は速報値でも検査に1週間要するため、移植開始時の組織保存液および移植1

週前の培養液に対して検査を行う。出荷後に出荷時の培養液に対する微生物検査、及び残存するウシ血清濃度の測定を ELISA 法によって行う。

(3) 移植:

培養上皮シート移植術は慶應義塾大学病院中央手術部内手術室において実施する。本研究において、培養角膜シート移植術と中央表層角膜移植術との同時手術は認める。これは表層移植が術中の状態により全層移植に変更される場合を含むものとする。なお表層・全層角膜移植術を実施した場合、その理由と実施内容を症例報告書に記載する。

角膜上に侵入している瘢痕組織を角膜輪部より 2~3 ミリ外側にて切開し、患者角膜上を覆う病的角結膜をグレーフェ刃(ビーバーNo.52)等を用いて輪部部分も含めて完全除去して、健全な角膜と強膜を露出する。さらに全周の周辺結膜下を剥離したのち、テノン嚢を除去する。次に、周辺部の結膜下組織の増殖抑制を目的としてマイトマイシンC(MMC)処理を行う。具体的には 0.04%MMC を滲み込ませたマイクロスポンジを全周の結膜下に5分間留置し、ついで生理食塩水 300cc にて術野の洗浄を行う。この後、角膜表面に培養角膜上皮シートを密着させる。上皮シート周辺部は結膜にて被覆し、結膜を8-0シルク縫合糸にて固定する。術後には、上皮細胞の脱落を抑制するために治療用コンタクトレンズを装用する。

培養角膜上皮シート移植術の方法(手術時間、麻酔方法、術式、移植部位、縫合の方法、粘弾性物質の種類と使用量)、培養角膜シートの状態(ドナーの年齢、性別、全身既往および死因、死亡から眼球摘出までの時間、移植角膜片の保存方法)、術中合併症の有無を症例

報告書に記載する。

⑦ 併用療法

移植後の標準補助療法として、下記に定める拒絶反応予防、感染症予防および治療用コンタクトレンズ装用を行う。術後 12 週後までは原則として下記の内容を全て実施するものとし、変更を要する特別な事情が生じた場合のみ、その理由を症例報告書に記載した上で変更を認める。術後 13 週以降は、各症例の状況に応じて補助療法の変更は自由とするが、変更理由を明確に症例報告書に記載する。施行した補助療法の内容は全て症例報告書に記載する。

(1) 拒絶反応予防

拒絶反応の予防を目的として副腎皮質ステロイド剤と免疫抑制剤を局所および全身に投与する。具体的には、術後1日よりベタメサゾン(リンデロン®)2mg 点滴を3日間、続いて内服1mgを4週間を目安に投与する。また術当日および術後2日にメチルプレドニゾロン(ソルメドロール®)125mgの静脈内投与を行う。眼局所には0.1%ベタメサゾン点眼あるいは0.1%デキサメサゾン点眼を術後12週間行い、その後は適宜、低濃度ステロイド点眼(フルオロメトロン®など)に変更してもよい。

上記に加え、各疾患別の標準拒絶反応予防措置を以下に記す。

- I. Stevens-Johnson 症候群、熱・化学腐食、急性炎症を伴う遷延性上皮欠損症例: 術後1週にメチルプレドニゾロン(ソルメドロール®)125mgの静脈内投与を行う。さらに術後1日よりシクロスポリン(ネオオーラル®)内服を体重 1kg あたり 2~3mg/日で行い、血中濃度モニタリングを臨床検査によりトラフレベル(内服前血中濃度)を70~100ng/mlに維持する。
- II. 眼類天疱瘡: 術後1日よりシクロスポリン

(ネオール®)内服を体重 1kg あたり 2～3mg/日で行い、トラフレベル(内服前血中濃度)を 70～100ng/ml に維持する。さらに術後1日よりシクロfosファミド(エンドキサン®) (50mg) 1錠/日内服を行う。

(2) 感染症予防

術後の免疫抑制療法により易感染状態となるため、感染症の発症に注意する。特に Stevens-Johnson 症候群および眼類天疱瘡は、原疾患が易感染性を生じる上、さらに術後強力な免疫抑制を行うため、感染症を生じやすく、耐性菌の検出に至る症例が少なからずあると予想される。

このため、補助療法として手術翌日より抗菌薬(クラビット点眼® 4回/日、ベストロン点眼® 4回/日)の点眼を行う。静注または内服による抗菌薬の全身使用については特に規定しない。感染を疑う眼所見を認めた場合は、定められたスケジュール外でも結膜囊培養および治療用コンタクトレンズの培養を随時実施し、起因菌に対し薬剤感受性を考慮した適切な抗菌剤へ変更する。この場合、変更の理由と処方量、使用期間を症例報告書に記載する。

(3) 治療用コンタクトレンズ装用

移植シートからの上皮再生を促しシート上の角膜上皮の脱落を防ぐため、また涙液中の炎症細胞が眼表面に浸潤するのを遮断し拒絶反応を防止するため、治療用ソフトコンタクトレンズ(治療用 CL)を手術終了時より装着させる。約2～4週間毎に交換し、最低3ヵ月、可能であれば6ヵ月以上装着させる。ただし移植された上皮の状態を確認するため、術後2日にCLをはずしフルオレセイン染色にて観察する。治療用ソフトコンタクトレンズの種類および装用した期間を症例報告書に記載する。

併用療法まとめ

		op	1-2D	3D	1-4W	5-12W	13-24W
Systemic	メチルpredニゾロン	静注	125mg				
	ベタメタゾン	点滴		2mg			
	ベタメタゾン	内服			1mg		
	predニゾロン	内服				10-20mg	
	ミコフェノール酸モフェチ(シクロsporリン)	内服		1000mg			
	(シクロホsファミド)	内服		2-3mg/kg			
Topical	0.1%ベタメタゾン	点眼					
	0.05%シクロsporリン	点眼					
	抗腫薬	点眼					

(4) 併用禁止薬

- I. 非ステロイド系抗炎症点眼薬
- II. 抗がん剤
- III. 抗緑内障薬のうち上皮毒性の強い以下の点眼薬: マレイン酸チモロール(0.25ないし0.5%チモプトール®点眼液)、塩酸ベタキソロール(0.5%ベトプティック®)、イソプロピルウノストロン(レスキュラ®)
- IV. 防腐剤を含む人工涙液

(5) 併用可能薬

- ・眼圧上昇時につぎの順に投薬追加を可能とする
 - I. 2%ミケラン点眼液を追加する。
 - II. それでも眼圧が高値の場合には、炭酸脱水素酵素阻害剤を内服する。
 - III. キサラタン®点眼液を追加する。
 - IV. 2%ピロカルピン®点眼液を追加する。
- ・疼痛時、感冒に対する内服薬は主治医の判断で使用可能

⑧ 観察・検査・評価項目およびスケジュール項目が多いため本報告書の別紙①に添付する。

⑨ 評価内容および方法

- (1) 主要評価項目および評価指標
主要評価項目: 視力の回復の判定

を有効性の主要評価項目とし、視力の術前、臨床研究終了時の差を記録。有効性については、以上の主要な解析の他に、眼科的検査 A および B の各項目、および自覚症状の集計・解析を行う。安全性については、副作用、合併症、臨床検査値の異常変動などによって評価する。

主たる評価指標:視力

副次的評価指標:眼科的検査 A および B の各項目、および自覚症状

(2) 副次評価項目

前眼部写真による角膜の透明性、角膜上皮表現系の維持。

(3) 安全性の評価

培養角膜シート移植手術の臨床研究期間中における副作用の発現および臨床検査値の異常変動を考慮して、安全度を次の 4 段階で判定する。

(1)安全である(副作用なし、臨床検査値異常変動なし)

(2)ほぼ安全である(使用継続できる程度の副作用あるいは臨床検査値異常変動)

(3)安全性に問題あり(使用中止すべき程度の副作用あるいは臨床検査値異常変動)

(4)安全でない(他医療行為による治療を要する程度の副作用あるいは臨床検査値異常変動)

ただし、副作用や臨床検査値異常変動が移植手術と併用薬剤のいずれによるかが不明な場合は、移植手術によるものとみなして判定する。

⑩ 試験の安全性確保

(1) 試験治療の安全性を確保するための事項

I. 上皮幹細胞

ドナー由来上皮細胞はアメリカアイバンク協会 (EBAA) の安全基準に準拠した、感染症検査陰性 (HBV, HCV, HIV) 細胞のみを用いる。

II. 上皮細胞シート作成に用いる培養用血清

オーストラリア製ウシ血清 (SAFC Biosciences 社製、カタログ番号 12603C-500M、ロット番号 6M0030) を用いる。

III. 上皮細胞シート作成に用いるフィーダー細胞

GMP 対応した米国製の同種骨髄間葉系幹細胞 (MASC細胞、SanBio 社製) を用いる。

⑪ 研究被験者の安全性を確保するための事項

実施担当医師等は、研究被験者の試験参加中、必要かつ適切な観察・検査を行い、研究被験者の安全性確保に留意する。有害事象の発現に際しては、必要に応じて適切な処置を施し、研究被験者の安全性確保に留意しつつ、その原因究明に努める。試験実施計画書を遵守できない場合は本試験治療を終了するが、原則として可能な限り原因の追跡調査を実施する。

⑫ 研究実施計画書からの逸脱

(1) 緊急の事情による逸脱

試験責任医師および分担医師は、研究被験者の緊急の危険を回避するため、またはその他の医療上やむを得ない理由により研究実施計画書に従わなかった場合には、全てその事実を記録し、その旨およびその理由を記載した文書を直ちに倫理審査委員会および実施医療機関の長に提出する。

(2) その他の事情による逸脱

試験責任医師および分担医師は、試験責任医師が事前に倫理審査委員会の審査に基づく文書による承認を得ることなく、研究実施計画

書からの逸脱又は変更を行わない。但し、試験の事務的事項のみに関する変更である場合は、この限りではない。

⑬ 試験治療の中止基準とその手順

(1) 試験治療中止の基準

以下の場合には試験治療を中止し、可能な範囲で必要な観察・検査・評価を実施した上、症例報告書に中止の事実とその理由、経過説明を記載して終了とする。

- I. 上皮細胞シート作成用の十分な上皮細胞が入手できない場合。
- II. 何らかの理由により、移植に適切と考えられる上皮細胞シートが作成できない場合。
- III. 副作用、合併症が発現し、研究継続が困難と判断した場合
- IV. 重度の拒絶反応が発現し、研究継続が困難と判断した場合
- V. 研究被験者が協力の中止を希望した場合。

(2) 試験治療中止の手順

- I. 個々の研究被験者に対する試験治療の中止

・試験治療の中止手順

臨床研究を中止した場合には、中止した時点で原則として終了時に予定されている検査を行い、この時点で可能な限りの評価を行う。また、中止時期、中止理由を症例報告書に記入する。なお、重篤な副作用が発現した場合、臨床研究担当医師は当該施設の病院長、倫理審査委員会、臨床研究の総括医師に報告する。

・試験治療中止に至った研究被験者へのフォローアップ

研究協力の中止を希望した研究被験者、有

害事象の発生が疑われた研究被験者、その他何らかの理由により試験治療を中止した研究被験者に対しては、研究実施計画に定めた治療・検査・評価を行わず、医学的状況に応じて通常の適切な診療を行う。

II. 研究計画全体における試験治療中止の手順

・海外を含め、本研究実施計画に関連して内容の妥当性が否定された場合、妥当性に強い疑問が生じた場合、予期せぬ有害事象が認められた場合など、試験の実施が医学的または倫理的に不可能と判断された場合、研究実施責任者は速やかに適切な医学専門家と協議し、試験中止の事実およびその理由を実施医療機関の長、試験責任医師および分担医師に文書で報告する。

・また試験責任医師、試験分担医師または実施医療機関が本研究実施計画書に定めた事項に違反することにより、適正な研究実施が担保され得ない状況を生じた場合、倫理審査委員会は本研究の中止を決定し、研究被験者へ通知するとともにその健康被害を最小限とするための措置を速やかに講じるものとする。

⑭ 統計解析関連事項

本研究では統計学的解析を実施しない。

⑮ 試験実施期間

厚生労働大臣からの意見発出から2年間

C. 研究結果

① 概要:

本研究では、テストラン含めて7例の培養を行い、そのうち3例を移植用に培養した。このうち初期の1例では、上皮の細胞シートの状態が不良のため、培養を中止した。この際は作業手順書の見直しを行い、改良した手法を用いて移

植用上皮シートの培養を行った。また1例では、材料となるヒト角膜の保存液から PCR 法によってパルボウイルス B19 が検出されたため、培養を中止した。

② 移植前の上皮シート

ヒト角膜輪部から分離した上皮細胞を用いて、フィブリンゲル上で上皮シートを作成した。培養日数は、東京歯科大学市川総合病院での経験則から培養 2 週間とし、クリーンルーム内で GMP 準拠で行った。フィーダーとして用いる GMP 準拠のヒト骨髄間葉系幹細胞 (MASC, San Bio Inc 社) の解凍時における細胞数は $1.5 \pm 0.2 \times 10^6$ 個、生細胞率は $92.3 \pm 0.7\%$ (平均 \pm 分散、 $n=4$) だった。角膜ドナーの年齢は 59 ± 9.1 歳 ($n=7$)、死亡から摘出までの時間は 4:16~23:40、ドナー角膜から回収した上皮細胞数は $5.5 \pm 2.8 \times 10^5$ 個、生細胞率は $87.8 \pm 8.5\%$ だった。これらの細胞を用いて作成した上皮シートに対して、以下の出荷試験及び出荷後試験を行った。

(1) 性状試験

角膜上皮は重層扁平上皮であり、シートとして移植することから、敷石状形態であること、細胞欠損域がないこと、細胞が重層することを性状試験項目とした。敷石状形態および細胞欠損域の有無は移植 2 日前の形態観察によって、重層の有無は凍結切片の作成および染色を用いて確認した。7 例いずれの場合もほとんどの細胞は敷石状の形態をしめした(図 1B,C)が、培養初期(培養 3-5 日)では判別しづらかった(図 1A)。初期の培養では安全性に配慮して成長因子を EGF およびインスリンのみとしていたが、上皮の成長が 7-10 日で停止し、繊維芽細胞の増殖を認めた。この対策として、各種ホルモン(ヒドロコルチゾン、トリヨードチロニン、イソプロテレノール)の追加および血清のロット変

更によって、培養 3 例目からはほぼ細胞欠損域のない上皮シートを得ることができた。ただし、同一ロットの血清および成長因子を用いたにもかかわらず、毎回上皮シートの成長はばらつき、移植時には 100%コンフルエントになると見込まれるものの、移植 2 日前では細胞欠損域を認めることもあった。上皮細胞は基本的にインサートの中央に凝集しており、そこから周辺に向けて成長するため、同一インサート上でも上皮細胞がコンフルエントとなっている部位と上皮細胞がまったく無い部位の二極化が見られた。上皮細胞が無い部位では繊維芽細胞が認められる場合もあったが、初期の数を除き上皮細胞の進展に伴い繊維芽細胞は認められなくなった。上皮シートの細胞層数は、本研究のスケジュールである培養 2 週間では平均 2.1 ± 0.5 層 ($n=7$) であった(図 1E)。

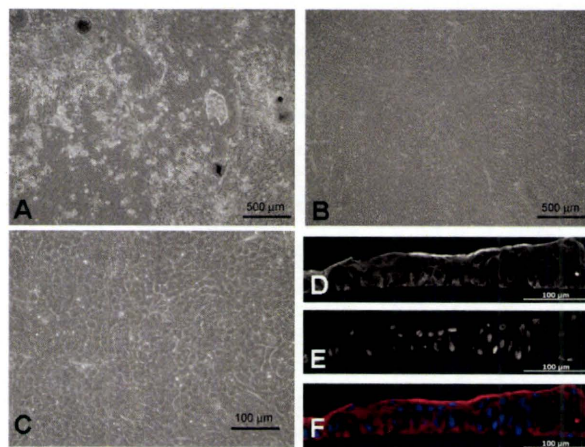


図1: 培養上皮シート。(A-C)位相差顕微鏡像、(D-F)凍結切片免疫染色像。(A)培養4日目、対物4倍。(B-F)培養12日目、(B)対物4倍、(C)対物20倍、(D)抗ケラチン3免疫染色、(E)核染色(DAPI)、(F):赤:抗ケラチン3、青:DAPI

(2) 定量試験

定量試験として、移植 2 日前に細胞密度測定を行った。倒立顕微鏡を用いて細胞シートを撮影し、 $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ の範囲に存在する細胞数から 1 平方 mm あたりの細胞密度を求めた。細胞密度は $3777 \pm 492 /\text{mm}^2$ ($n=5$) であった。

(3) 確認試験

上皮が角膜上皮であることを確認するため、凍結切片を作成し、角膜特異的ケラチンである K3 に対するモノクローナル抗体で免疫染色を行った。6 例いずれの場合においても、陽性対象である角膜上皮に対しては弱いものの、K3 抗体への染色性を示した(図 1D、F)。

(4) 生細胞率

細胞シートの細胞生存率を求めるため、移植 2 日前に凍結切片用に用意した破壊検査用サンプルの残りを酵素処理して分散させ、色素排除法によって生細胞率を求めた。生細胞率は $90.5\% \pm 4.6\%$ (n=6)であった。

(5) 微生物検査

ドナー角膜の細胞保存液、上皮培養 1 週目の培養上清、及び培養 2 週目(出荷時)の培養上清を回収し、微生物検査を行った。7 例各 3 回(1 例のみ培養中止のため 2 回)、計 20 回の検査を行った。このうち、1 例でドナー角膜の細胞保存液からヒトパルボウイルス B19 が検出されたため、直ちに上皮シートの培養を中止した。製品の無菌試験に関して、日本薬局方第 15 版では 14 日以上培養、期間中に数回、及び培養最終日に菌の発育の有無を判定となっている。しかしこれに厳密に従うと上皮シート移植後に無菌試験結果がでるため、無菌試験培養 4 日の時点における菌の発育の有無を用いて好気性菌、嫌気性菌、真菌の判定を行った。実際には報告を受け取るまでに 5.3 ± 0.6 日を要したが、少なくとも上皮培養 1 週目の微生物検査結果をもって出荷判定が可能となった。同様に、マイコプラズマ試験は培養試験では平均 29.6 日を要したため、PCR 法を用いて判定した。この場合、判定には 7.5 ± 3.9 日を要した。HCV, HBV, HIV-1, 及びヒトパルボウイルス B19 については PCR 法を用いてそれぞれ判定に 6.9 ± 2.0 日、 5.7 ± 2.1 日、 5.7 ± 2.1 日、及び 5.9

± 2.6 日を要したが、HTLV-1 については 15.1 ± 0.6 日を要した。

(6) 牛血清アルブミン濃度測定

培養に用いられる牛血清が上皮シートを介して研究被験者に持ち込まれることを防ぐため、移植直前に血清を含有しない培地を用いて洗浄を行った。このとき上皮シートに残存する牛血清濃度を推定するため、出荷時の上皮シート洗浄液における牛血清アルブミン量を ELISA 法を用いて定量した。牛血清アルブミン量はテストランで $0.65 \mu\text{g/mL}$ であり、その後洗浄方法を改良したところ、 $0.33 \pm 0.24 \mu\text{g/mL}$ (n=3)であった。なお、検査は受託検査としたが、結果が出るまでに 21.5 ± 3.42 日を要した。

③ 逸脱

テストラン 1 回目では 30 回、以後ランあたり 1 ~ 8 回、平均 3.6 回の逸脱があった。このうち培養中止にいたった例は 2 例あり、1 例は上皮細胞の増殖不良、もう 1 例はヒトパルボウイルス B19 の検出であった。

④ 浮遊菌、付着菌

作業中の安全キャビネット内における浮遊菌については、全ての検査(122 回)において検出されなかった。手指付着菌は 1 ラン辺り 1.25 ± 1.16 回(n=7)検出された。コロニー数は最初期のテストランで 1 回、1~5 コロニー検出されたが、手順の見直しの後は 1 回あたり 1.2 ± 0.4 コロニー(n=6)検出された。

⑤ 1 回の移植に要した費用

1 回の移植に要した費用は、17 回入室の場合、クリーンルームの維持費を除いて 173 万円であった。このうち、純粹に培養に要した費用は 17 万円であり、輸入角膜代約 25 万円(ドル建て)を加算しても 42 万円だった。輸入角膜代を除いた入院・手術関係費用は 64 万円であり、他に

人件費(見込み)14万円、検査費31万円、被服類等の費用が21万円であった。特に被服類は1回のクリーンルーム内作業あたり約2万円を要した。図2にグラフを示す。

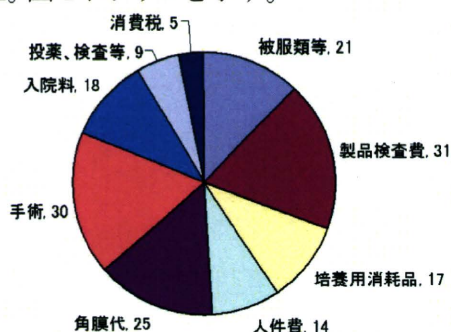


図2:1ランあたりの費用。人件費は見込みで産出。また、クリーンルームの維持費は除く。単位:万円。

⑥ 移植後の視力回復

有効性の主要評価項目である視力の回復については、移植1例目が術前 0.06 (0.07×+4.25)、術後1年で視力:0.9 (1.0×-1.00)、移植2例目が術前視力:0.04 (矯正不能)、術後6ヶ月で視力:(0.3×SCL)であり、いずれも改善を認めた(図3)。術後1週、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月と12ヶ月の臨床スコアについては、I.別紙①(症例1)とI.別紙②(症例2)を参照。

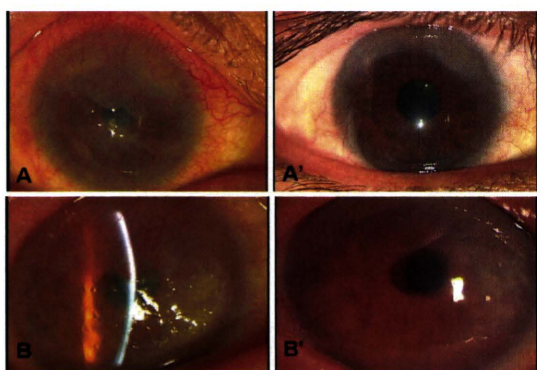


図3:前眼部所見
(A)1例目術前、(A')1例目術後1年、(B)2例目術前、(B')2例目術後6ヶ月

D. 考察

① 本研究では、クリーンルーム内で GMP 準拠の角膜上皮シートを培養し、2例の研究被験者に移植して視力の回復を認めた。こ

の角膜上皮シートは通常用いられるマウス線維芽細胞株 3T3 に変えてヒト間葉系幹細胞をフィーダー細胞に用いており、また医薬品であるフィブリン糊を基質とした。加えて、培養中3回行った安全性試験でも無菌性が確認され、また1例においては培養前のヒト角膜組織保存液がヒトパルボウイルス B19 の PCR 法に陽性だったため移植中止に至った。これらのことから、安全性に関しては従来法に比べて優れた角膜上皮シートを供給できたものと考えられる。

② GMP 準拠で品質および安全性が保証された細胞製品は、今後の再生医療の進展の上で患者の健康を保護するために重要である。一方、今回の研究によっていくつかの今後解決すべき点も見出すことができた。それは、原材料に GMP 準拠製品が無い場合がある、コストの高さ、微生物検査をはじめとした各種試験のタイムラグ、ばらつきをどのように吸収して均一な質の製品を定められた納期に出荷するか、といった問題である。

③ GMP 準拠製品が無い問題について:今回培養に用いた製品の中でも、EGF (epidermal growth factor) や tri-iodo-thyronine, aprotinin などはそもそも医薬品や GMP 準拠製品が供給されていない。この問題については、今後の各メーカーのラインナップの進展に伴い解決できると考えられる。ただし、必要な試薬が動物由来製品しかない場合は、異種感染の危険性を完全に排除することは難しい。これを解決するには、試薬の同種化(ヒト由来製品の利用、できれば病歴スクリーニング可能な国内ヒト由来製品)、あるいは非動物由来の代替品の開発などが望まれる。しかし、

特定分野のみでしか用いられないマイナーな試薬類、あるいは本研究に直接は関係ないものの、iPS 細胞から移植目的の細胞を誘導するのに必要であると新規に発見されるだろう試薬類については、今後もGMP 準拠製品が無いという問題は残るものと考えられる。また、こういった試薬類の多くはサイトカイン等で、必要量が微量、かつ質量あたりの価格が高く、また放射線照射やオートクレーブ滅菌で活性が消失するものであり、GMP 準拠で無いからといって、その試薬類をそのまま滅菌、あるいはエンドキシン測定を含む微生物検査に用いるのは現実的ではない。解決法としては、これらの試薬を混合して作成される培地に対して微生物検査を行うか、またはコスト削減を考慮して培養中の培養上清の微生物検査結果を流用する、といったことが考えられる。なお、本研究では後者で対応した。

- ④ コストについて:今回1回あたりの純粋な培養コストは17万円、培養出発材料であるヒト角膜組織を含めると42万円である。しかし、微生物検査のコストとして計3回の検査で31万円が必要とした。この価格は大量発注を見込んだ、ほぼ半額の特注価格であり、本来の定価は60万円近くに達する。安全性確保のための必要悪とはいえ、コストの高さは今後自費診療となった場合の患者さんの大きな負担となり、また保健医療になったとしても医療費圧迫の材料となりうる。また今回、1回クリーンルームに入室するたびに被服(1次更衣及び2次更衣)、浮遊菌・付着菌検査、滅菌用用品などで約2万円が必要となった。入室当たりのコストの高さは、後述の厳密な納期とあわせて培養日数の柔軟な増減を難しいものとするが、

これは後述する各ロットあたりの成長のばらつきの吸収を難しいものとする。入室あたりのコスト削減については、グローブボックスの使用などで更衣費用を軽減できるかもしれない。ただし、細胞分離に必須である遠心機、CO₂ インキュベーター、実体および倒立顕微鏡を一体化したグローブボックスなど、機器メーカーの今後の改良が待たれる。このように、微生物検査のコスト削減、および入室あたりのコスト削減は、今後解決すべき大きな課題と考えられる。

- ⑤ 各種検査結果のタイムラグについて:本研究では安全性に配慮して、培養開始前の角膜組織の保存液、培養1週間目の培養上清、最終製品(培養2週目)の培養上清に対して各種検査を行った。また、最終製品の出荷前に出荷検査を行った。しかし、微生物検査は結果が出るまでに平均5~7日を要した。この結果、培養2週目である出荷時には培養開始前および培養開始1週の結果を持って判定するしかなかった。また、HTLV-1など平均15日を要する検査や、同じく14日を要する無菌検査の正式な結果、及び出荷時に検体を採取する検査の結果は必ず出荷後となった。これは生きた細胞を用いた再生医療に必ずついて回る問題ではあり、将来的には生物活性を保ったままでの保存技術の開発が望まれる。もしこのような保存技術が開発されれば、最終製品に対する検査結果を待ってから移植を行うことができ、安全性の増加、検査回数の削減によるコスト軽減、そして後述するロットごとの成長のばらつきの吸収などが期待できると思われる。
- ⑥ ロット間のばらつきと厳密な納期について:本研究では管理された手法を用いて培養

上皮シートを作成したが、上皮の成長についてはばらつきがみられた。各ロット間でもっとも管理できないのは出発材料であるドナー角膜であり、個人差によるばらつきは必ずついてまわるため、解決にはばらつきを吸収できる手段が必要となろう。解決法として、成長が悪い場合には培養日数を延長するという手段も考えられるが、出荷日（手術日）は事前に決定されており、病院や研究被験者のスケジュールの都合上柔軟に変更し辛いため実施は困難である。また、複数のドナー角膜を培養し、最も良いロットの上皮シートを移植する、という解決法も考えられるが、それぞれについて購入、培養操作および安全性試験を必要とするためコストが増加する上、1 ロットでも微生物検査に陽性となると他ロットへの感染の可能性を排除しづらく、加えて順調に推移した場合でも移植以外のロットは廃棄されることになり、他の角膜移植待機患者の移植機会を奪うため倫理的にも容認しづらい。他の解決法としては、コストは多少増加するものの培養日数をはじめから長めに設定する、培養法を改良して多少のばらつきでも吸収できるようにする、あるいは前述のように最終製品の保存技術を開発して多少の培養日数のばらつきを保存期間で吸収できるようにする、などが考えられる。なお培養日数を長めに設定する場合は、逆に早期にコンフルエントになった場合でも長期間培養によって幹細胞性の維持やシートの剥がしやすさに影響が出ないことを確認する必要もある。いずれにせよ、今後の検討が必要である。

E. 結論

本研究では安全性に配慮したGMP準拠の角

膜上皮シートを作成し、移植2例で良好な結果を得た。また、実際に研究を進める中で、高コストや試験結果のタイムラグ、ロット間の上皮成長のばらつきなどの問題が明らかになった。将来的には生物活性を保ったままでの保存技術の開発や、GMP準拠の試薬類の充実、ロットあたりのばらつきを吸収できるような培養技術の開発などが必要と考えられる。GMP準拠の安全な再生医療の普及を目指すうえで今後解決すべき点が明らかになった点においても、本研究は意義があったと考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
特になし

2. 学会発表

榛村 重人 他. ヒト幹細胞臨床研究:培養角膜上皮シート移植の初期成績. 第10回 日本再生医療学会総会 2011.3.02 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

特になし。

I. 別紙

- ① 観察・検査・評価項目およびスケジュール
- ② 症例スコア 1
- ③ 症例スコア 2
- ④ 製品標準書:KVPC-PMFOPH-01
- ⑤ 作業手順書:KVPC-PMFOPH01-001 から-016、-021、-023 から-025、-028。なお、KVPC-PMFOPH01-017 から-020、-022、-26、-027 は欠番である。

I.別紙

① 観察・検査・評価項目およびスケジュール

1.1 観察・検査・評価項目

1.1.1 研究被験者背景

性別、生年月日、診断名、現病歴、合併症、既往歴、薬物アレルギーの有無、併用薬、妊娠の有無

1.1.2 自覚症状

	症 状	スコア
対 象 眼	異物感・痛み	0. なし 1. 軽度 2. 中程度 3. 重度
	乾燥感	0. なし 1. 軽度 2. 中程度 3. 重度
	眩しさ	0. なし 1. 軽度 2. 中程度 3. 重度
	目の疲れ	0. なし 1. 軽度 2. 中程度 3. 重度

手術による日常生活の改善

生活状態術前との比較	
室外行動(単独外出)	0. 著しく改善 1. 改善 2. 不変 3. 悪化 4. 著しく悪化
家事・入浴・着替え	0. 著しく改善 1. 改善 2. 不変 3. 悪化 4. 著しく悪化
視力を要する娯楽(読書など)	0. 著しく改善 1. 改善 2. 不変 3. 悪化 4. 著しく悪化
人の姿や顔の判別	0. 著しく改善 1. 改善 2. 不変 3. 悪化 4. 著しく悪化

1.1.3 他覚的所見

1) 基本検査 A、B

① 基本検査 A

術前1週以内、術後 1 週、2 週、4 週、8 週、12 週、16 週、20 週、24 週に視力検査を実施する。

視力検査: 5メートル視力(裸眼、矯正、ピンホール)を測定する。

② 基本検査 B

術前 1 週以内、術後 1 週、4 週、12 週、24 週に視力検査、眼圧検査、眼表面の細菌培養検査を実施する。

視力検査: 近見視力(裸眼、矯正、ピンホール)を測定する。

眼圧測定: 非接触型眼圧計を用いて測定し、治療用 CL 装用下の測定でも代用可とする(その場合は、治療用 CL 装用下測定であることを調査票に記録する)。

細菌培養検査: 術前には下眼瞼結膜を綿棒で擦過し好気性培養を行う。術後は治療用

CLを培養検査に供する。

2) 眼科所見A、B、C

眼科所見 A

① 結膜所見

項目	スコア
結膜充血	0. なし 1. 軽度 2. 中等度 3. 重度 9. 検査不能
毛様充血	0. なし 1. 軽度 2. 中等度 3. 重度 9. 検査不能
角化	0. なし 1. あり 9. 検査不能
瞼球癒着	0. なし 1. 結膜囊短縮または Strand 形成 2. 角膜への癒着1/2 未満 3. 角膜 1/2 以上 9. 検査不能

② 角膜所見

項目	スコア
上皮欠損	0. なし 1. 1/4 未満 2. 1/4 以上1/2 未満 3. 1/2 以上 9. 検査不能
臨床的結膜進入	0. なし 1. 角膜 1/4 未満 2. 角膜 1/4 以上1/2 未満 3. 角膜 1/2 以上 9. 検査不能
角膜内血管侵入	0. なし 1. 軽度(周辺のみ) 2. 瞳孔縁にかかる 3. 瞳孔を覆う 9. 検査不能
角膜混濁	0. なし 1. 軽度(瞳孔・水晶体が見える) 2. 中程度(瞳孔見えるが水晶体の詳細不明) 9. 検査不能
角化	0. なしまたは結膜囊のみ 1. 角膜 1/4 未満 2. 角膜 1/4 以上1/2 未満 3. 角膜 1/2 以上 9. 検査不能
フルオレセイン染色	A() D()

眼科所見 B(異常があればコメントに記入)

項目	スコア
眼瞼所見:睫毛乱性	0. なし 1. 軽度 2. 中等度 3. 重度 9. 検査不能
涙液所見:涙液検査 (シルマーテスト)	mm
涙液所見:涙点閉鎖	0. なし 1. あり(上下の片方) 2. あり(上下の両方) 3. プラグまたは縫合後 9. 検査不能

眼科所見C

項目	スコア
前房所見	0.炎症なし 1. 軽度炎症あり 2. 中程度から高度炎症あり 3. 角膜混濁のため観察不可
虹彩所見	0. 異常なし 1. 虹彩前癒着あるいは後癒着あり<半周以下> 2. 虹彩前癒着あるいは後癒着あり<半周をこえる> 3. 角膜混濁のため視野検査不可
白内障	0. なしまたは軽度 1. 中程度軽度 2. 重度 3. 角膜混濁のため観察不可査不能
緑内障	0. なしまたは視野狭窄なし 1. 中心視野残存で視野狭窄あり 2. 中心視野欠損 3. 角膜混濁のため視野検査不可
網膜疾患	0. なしまたは視力へ影響乏しい 1. 網膜疾患が視力への影響 50%未満 2. 網膜疾患が視力への影響 50%以上 3. 角膜混濁のため眼底の詳細不明

1.1.4 臨床検査

1) 血液学的検査

赤血球数*、白血球数*、ヘモグロビン量*、ヘマトクリット値*、血小板数*、白血球分画*

2) 血液生化学的検査

血糖*、総コレステロール*、中性脂肪、総蛋白、アルブミン、A/G、尿素窒素*、尿酸*、クレアチニン*、総ビリルビン*、GOT*、GPT*、GTP、LDH*、ALP*、LAP、CPK、アミラーゼ*、Na*、K*、Cl*、Mg*

3) 尿検査

比重、pH、定性(糖*、蛋白*、潜血、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲン*)

1.1.5 その他の評価項目

1) 抜糸の日時と所見

2) 拒絶反応発症時には、所見、日時、どのような処置を行ったかについて記載する。

3) 眼圧上昇を生じた場合には、視野検査を行い所見とどのような処置を行ったか、その後の経緯について記載する。

4) 細菌あるいは真菌検出時には、どの部位から検出したか、検出時期、どのような処置を行ったかについて記載する。

I.別紙

①観察・検査・評価項目およびスケジュール

1.2 実施スケジュール

	移植前	術 2 日	1W	2W	4W	8W	12W	16W	20W	24W
基本検査 A	●		●	●	●	●	●	●	●	●
基本検査 B	●		●		●		●			●
眼科所見 A	●	●	(●)	●	●	●	●	●	●	●
眼科所見 B	●				●					●
眼科所見 C	●		(●)		(●)		(●)			●
自覚症状	●		●		●		●			●
生活の改善	●				●		●			●
臨床検査	●				●	(●)	●	(●)	(●)	●
薬剤使用状況	●	●	(●)	●	●	●	●	●	●	●
CL 使用状況		●	(●)	●	●	●	●	●	●	●
前眼部写真	●	●	(●)	●	●	●	●	●	●	●
培養	●				●		●			●

I.別紙

② 症例スコア 1

臨床スコア：症例 1

自覚症状スコア

	1W	1M	3M	6M	12M
異物感 痛み	1	1	0	0	0
乾燥感	0	0	0	0	0
眩しさ	0	0	0	0	0
眼精疲労	0	0	0	0	0
室外行動	2	2	2	1	1
家事・入 浴・着替え	2	2	2	2	2
娯楽	3	1	0	0	0
人の姿や 顔の判別	3	1	0	0	0

眼科所見 A

① 結膜所見

	1W	1M	3M	6M	12M
結膜充血	2	1	1	1	0
毛様充血	1	0	0	0	0
角化	0	0	0	0	0
瞼球癒着	0	0	0	0	0

② 角膜所見

	1W	1M	3M	6M	12M
上皮欠損	1	0	0	0	0
結膜進入	0	0	0	0	0
角膜血管進入	2	1	1	1	1
角膜混濁	1	1	1	1	1
角化	0	0	0	0	0