

目次

1. 研究目的	1
2. 経緯	1
3. 対象疾患と適格基準	6
4. 試験物	9
5. 臨床研究実施計画	12
6. 主要評価項目及び副次評価項目	17
7. 観察・検査項目とスケジュール	19
8. 被験者の安全性の確保	22
9. 被験者毎の臨床研究中止の基準及び手順	24
10. 臨床研究実施計画書の遵守、逸脱又は変更	24
11. 臨床研究の終了又は中止及び中断	25
12. 同意取得	26
13. 登録	26
14. 症例報告書	27
15. 統計学的考察	28
16. 規範、法令、基準、指針等の遵守	30
17. 臨床研究の品質管理及び品質保証	30
18. 臨床研究の倫理的実施	31
19. 記録等の保存	32
20. 臨床研究総括報告書の作成	32
21. 臨床研究終了後の追跡調査の方法	32
22. 臨床研究費用並びに健康被害の補償	33
23. 臨床研究成果の帰属及び研究結果の公表に関するとり決め	33
24. 臨床研究実施体制	34
25. 文献	38
臨床研究実施計画書、症例報告書及び同意説明文書改訂履歴	39

1) 研究目的

辺縁性歯周炎患者を対象として、フラップ手術を施行する際に、自己脂肪組織由来の幹細胞を移植し、幹細胞移植術に基づく歯周組織再生療法の安全性、有効性及び実施可能性を評価することを目的とする。

2) 経緯

2.1. 対象疾患

従来の治療法では十分な歯周組織欠損の回復が見込めない辺縁性歯周炎

2.1.1. 概念・定義・病因・病態

辺縁性歯周炎は主に嫌気性グラム陰性桿菌からなる口腔内細菌の持続的感染により歯槽骨、歯根膜及びセメント質などの歯を支える組織（以下、歯周組織）に慢性炎症を生じ、その組織が破壊されていく疾患である。口腔内細菌は内毒素や酵素を産生して直接的に歯周組織破壊を惹き起こすだけでなく、宿主に炎症や免疫反応を誘発することにより間接的に歯周組織破壊も惹き起こす。辺縁性歯周炎の進行により歯周組織が失われた場合、従来の治療方法では歯周組織を再生させることは困難であり、最終的には抜歯に至ることとなる。事実、成人における永久歯抜歯の最大の原因は辺縁性歯周炎であることが報告されている¹⁾。

2.1.2. 疫学

歯は単に摂食（咀嚼）を担う器官というだけでなく、「生活の質」や「日常生活の活動能力」に影響を与える器官である。80歳の高齢者を対象とした疫学調査から、歯の喪失が少なく、よく噛めている者は生活の質及び活動能力が高く、運動・視聴覚機能に優れていることが報告されている²⁾。

Marshall-Dayらがボストンで1279人を対象として行った調査では、辺縁性歯周炎は18歳ごろまでは約5%と少なく、19~22歳で24%と増加し、23~26歳で69%と急激に増加を示し、60歳では約80%に歯槽骨の吸収が認められたと報告している³⁾。

厚生労働省及び日本歯科医師会では、歯の喪失が10歯以下であれば高齢者であっても食生活に大きな支障を生じないとされる研究に基づき、生涯にわたり20歯以上を保つことを目標とする「8020運動」*を提唱・推進している。しかしながら、最新の報告においても、20本以上の歯を有する者の割合は65歳から69歳で57.1%、80歳から84歳ではわずかに21.1%である⁴⁾。また平成17年度歯科疾患実態調査より、歯肉炎・歯石の沈着・4mm以上の歯周ポケットを有するなど歯肉に何らかの所見を認める者の割合は、40歳から44歳で84.6%、60歳から64歳で90.5%、80歳から84歳で95.5%であり、40歳以上では80%以上の者が辺縁性歯周炎あるいはその前段階である歯肉の炎症所見を有している。

* 「8020運動」：「80歳になっても自分の歯を20本以上保とう」をスローガンに日本医師会の提唱により平成12年8020推進財団が発足した。以来8020運動を国民運動に広げるため情報提供活動などを行っている。

2.1.3. 標準治療と予後

1) 辺縁性歯周炎の治療

辺縁性歯周炎の初期治療として、歯に付着した細菌集塊（プラーク）の除去、プラークが蓄積する環境の改善、患者へのブラッシングの指導や歯科医師による非侵襲的プラーク除去療法、などが行われている。これらの初期治療で改善が認められない場合に、歯周外科手術が行われる。歯周外科手術のうち、最も多く施行されているのがフラップ手術であり、保険診療として年間約4万件行われている⁵⁾。このフラップ手術は、歯肉弁を剥離して感染組織を露出させるため、辺縁性歯周炎の原因を明視下で確実に除去できる優れた治療法であるが、歯周組織が再生することは稀であり、露出した歯根には上皮が結合して治癒するため、結合が弱く、辺縁性歯周炎が再発しやすく、歯の喪失リスクの低減や咀嚼機能の向上については十分には期待できない。中高年者・後期高齢者の「口が支えるQOL」を維持・増進するためには、辺縁性歯周炎の治療法として、原因を除去するだけでなく歯周組織の再生をも期待する新しい治療法の確立が望まれている。

2) 現在行われている歯周組織再生療法

現在、日本で行われている歯周組織再生療法として、歯周組織の再生を誘導するGTR法（guided tissue regeneration、組織誘導再生）及び「エムドゲイン[®]ゲル」投与の2つがある。

GTR法は、組織誘導膜（scaffold）を用いて上皮の侵入を阻止することで歯周組織再生のスペースを確保し、組織再生を期待する術式である。しかしながら手技が難しく治療効果が術者の技量に左右されやすい等の理由で標準的治療法として確立されるに至っていない。

「エムドゲイン[®]ゲル」投与は、歯の発生に関与するタンパク質を手術時に投与する方法である。中程度の歯周組織破壊を伴う症例に対しては効果を有するが、より大きな骨欠損を有する重度の歯周組織破壊を伴う症例に対しては、十分な歯周組織再生は期待できない。

3) 新たな歯周組織再生療法の検討状況

前述のGTR膜やエムドゲインゲル（エナメルマトリックスタンパク）を用いた歯周組織再生療法の臨床応用以外に、種々のサイトカインを用いた次世代型歯周組織再生療法の可能性が示唆されている。内在性の歯根膜組織由来幹細胞のもつ自己修復力をscaffoldやサイトカインなどで活性化することにより歯周組織再生を図るアプローチが

進められている一方、造血幹細胞、間葉系幹細胞、ES細胞（多能性幹細胞）をはじめとする幹細胞を移入する再生療法もまた注目を集めている。辺縁性歯周炎の中でも、中程度の歯周組織破壊を伴う症例に対しては、現在、研究が進められているサイトカイン療法⁹⁾等により対応が可能と考えられるが、より大きな骨欠損を有する重度の歯周組織破壊を伴う症例に対しては、骨芽細胞、セメント芽細胞、歯根膜細胞への多分化能を有する未分化間葉系幹細胞を移入する治療法の確立が期待されている。近年、生体内に豊富に存在する脂肪組織中に存在する間葉系幹細胞が、脂肪、骨、軟骨、筋肉などに分化することが明らかにされている。我々もヒト脂肪組織より単離した未分化間葉系幹細胞が歯の骨芽細胞lineageへの分化能（骨芽細胞、セメント芽細胞、歯根膜細胞への多分化能）を有していることを*in vitro*試験、*in vivo*（イヌ）で確認している。今後、脂肪組織由来間葉系幹細胞の歯周組織再生医学の分野における安全性、有用性の詳細な検討が必要である。

2.1.4. 対象疾患の設定根拠

現在の辺縁性歯周炎治療の原則は、原因であるデンタルプラークを歯根表面の壊死セメント質とともに機械的に除去することであるが、それだけでは辺縁性歯周炎の進行により失われた歯周組織の再生は達成できない。GTR法、エムドゲインゲルを用いた歯周組織再生療法が現在臨床応用されているが、それらは全て歯根膜に内在する「歯周組織幹細胞」を活用したものである。このような内在性歯根膜由来幹細胞の活用だけでは十分な再生量が期待することができず、重度な症例に対しては多分化能を有する間葉系幹細胞を移入する再生療法の確立が期待されている。

そこで今回、自己脂肪組織由来幹細胞移植術の歯周組織再生効果が期待できる辺縁性歯周炎を対象疾患と選定した。

2.2. 試験物名及びその概要

2.2.1. 試験物名

培養自己脂肪組織由来幹細胞

2.2.2. 試験物の概要

患者腹部皮下より採取した脂肪組織から単離した細胞を継代培養して得た幹細胞（移植に際してはフィブリンゲルに懸濁して使用する）

規格は以下の4項目とする。

- ①細胞数 36.7×10^6 個以上
- ②生存率 70%以上

③純度 CD45⁻ 70%以上、CD105⁺ 70%以上、CD166⁺ 70%以上

④感染症検査（解凍後のデータ）

- ・無菌試験 陰性
- ・マイコプラズマ否定試験 陰性
- ・エンドトキシン試験 1.0EU/mL未満

なお、最終製品の安全性を補完すべく、管理項目として、製造途中において下記項目の基準を満たすこととする。

<凍結前>

①細胞数 3×10^6 個以上

②生存率 70%以上

③純度 CD45⁻ 70%以上、CD105⁺ 70%以上、CD166⁺ 70%以上

④感染症検査

- ・無菌試験 陰性
- ・マイコプラズマ否定試験 陰性
- ・エンドトキシン試験 1.0EU/mL未満

<解凍後>

生存率 50%以上

2.2.3. これまでの前臨床研究、臨床研究及び臨床試験の結果の要約

1) ビーグル犬を用いた実験的歯周病モデルによる脂肪組織由来未分化間葉系幹細胞の歯周組織再生効果

(1) 方法

①分岐部歯周病モデル：

全身麻酔下、ビーグル犬(n=4n=5)の第四前臼歯頰側分岐部に頬舌径 3mm、高さ 5mm の人工的 2 級分岐部病変を作製し、シリコンを填入した。4 週後に、作成した左右両側の人工的骨欠損のうち一側を被験部位として、脂肪組織由来未分化間葉系幹細胞+フィブリンを移植した。一方、対照部位にはフィブリンのみを移植した。移植後 6 週目にマイクロ CT により歯周組織の断層撮影による歯槽骨再生の評価を行うとともに、屠殺し、組織切片を作成して組織学的に歯周組織再生効果を評価した。

②二壁性骨欠損歯周病モデル：

ビーグル犬(n=5)の左右両側の下顎第四前臼歯を抜歯し、約 3 ヶ月間の治癒期間を経た後に第一後臼歯の近心部の歯槽骨を削除し骨欠損を作製した。骨欠損の大きさは、頬舌径 3mm、近遠心径 5mm、高さ 4mm とした。作成した左右両側の人工的垂直性骨欠損のうち片側を被験部位として、脂肪組織由来未分化間葉系幹細胞+フィブリンを移植した。反対側の対照部位にはフィブリンのみを移植した。移植後の評価は、分岐部病変モデルと同様に行った。

(2)結果

分岐部歯周病モデル及び二壁性骨欠損歯周病モデルの両モデルにおいて、フィブリンのみを移植した対照側と比し、脂肪組織由来幹細胞+フィブリンの移植側では新生骨及び新生セメント質など歯周組織の著明な再生が認められた（別紙 1-5 差し替え）。本研究の結果は、脂肪組織由来幹細胞の移入による歯槽骨、歯根膜、セメント質を含む新規歯周組織再生の可能性を強く示唆するものである。また、至適足場材の選定として、フィブリンが候補の一つとなり得ることも明らかとなった。なお、安全性に問題は認められていない。

2) ヒト脂肪組織由来幹細胞の硬組織分化能の有効性の検討

(1)方法

ヒト脂肪組織由来幹細胞を石灰化誘導培地にて長期培養（28 日間）し、経時的にアルカリフォスファターゼ活性を測定し、アリザリン染色により石灰化ノジュール形成能を評価した。また、培養 7 日目、14 日目、21 日目、28 日目の各タイムポイントで培養幹細胞を回収し、硬組織分化マーカー遺伝子 Runx-2 および PLAP-1 mRNA の発現の解析により、硬組織分化能を評価した。

(2)結果

ヒト脂肪組織由来幹細胞を、硬組織誘導培地にて培養することにより、アルカリフォスファターゼ活性が上昇し、アリザリン染色法により石灰化の誘導が認められた（別紙 6）。さらに、その分化過程においては、Runx-2 および PLAP-1 mRNA の発現の上昇が認められた（別紙 7）。

3) ヒト脂肪組織由来幹細胞の安全性の検討

(1)方法

ヒト脂肪組織由来幹細胞を石灰化誘導培地にて長期培養（100 日間）し、幹細胞の増殖能を評価した。さらに染色体の形質転換の有無を検討するために、上記培養条件下にて継代培養を繰り返し、継代 4 代目と 14 代目にて染色体検査を行った。

(2)結果

ヒト脂肪組織由来幹細胞は増殖しなくなるまで継代数が進んでもその染色体に異常が認められないことが G-Band 法、SKY 法で確認された（別紙 8-9）。

2.2.4. 臨床研究実施が可能であると判断した理由

近年、組織幹細胞の1つとして脂肪組織中に存在する間葉系幹細胞が注目されている。皮下には脂肪組織は豊富に存在し、皮下脂肪組織からの脂肪組織採取は患者への侵襲が少なく、簡便かつ安全に行うことが可能である。すでに、*in vitro*においては、脂肪組織由来幹細胞が、脂肪、骨、軟骨、筋肉など中胚葉性の細胞へ分化することが報告されており、脂肪組織由来幹細胞が多分化能を有する細胞であることが明らかにされている。

研究責任者らは、ヒト皮下脂肪組織より単離した間葉系幹細胞が骨芽細胞、セメント芽細胞lineageへの分化能を有することを確認している。さらに、ビーグル犬を用いた根分岐部病変および2壁性骨欠損の歯周病モデルで、脂肪組織由来幹細胞移植による歯周組織の著明な再生を確認している。

また、増殖しなくなるまで長期培養を行うことによっても染色体に異常がないことを確認しており、腫瘍化のリスクについてもほぼないと思われる。

以上のことから、本臨床研究実施が可能であると判断した。

2.3. 登録患者の予想される利益と不利益

2.3.1. 予想される利益

本臨床研究においては従来の治療法では十分な歯周組織欠損の回復が見込めない辺縁性歯周炎に対して、自己脂肪組織由来幹細胞の移植術を行うことの安全性と有効性を検索するものである。本臨床研究における治療法の歯周組織の再生効果が認められれば、歯周炎の進行により欠損した歯周組織の再生により、抜歯をさけることができ、患者のQOLを著しく改善することが期待される。

なお、本臨床研究に参加することにより被験者が報酬などの利益を受けることは一切無い。また、本臨床研究により生じる知的財産権は研究者に帰属するものとし、それにより被験者が治療効果以外に利益を受けることはない。以上、被験者は本臨床研究によって期待される治療効果以外に利益を受けることはない。

2.3.2. 予想される不利益

6.1.3.項及び8.3.1.項に挙げる有害事象が生じる可能性があり、重篤な場合には通院、入院などによる処置が必要となる。また、予期せぬ有害事象により障害が残ることや、死亡の可能性も完全には否定できない。

なお、本臨床研究における治療にかかる費用は校費によって行われ、被験者による負担は生じないが、通常の診療にかかる費用は保険診療にてまかなわれる。

2.4. 本研究の意義

本研究の意義は、辺縁性歯周炎に対する自己脂肪組織由来幹細胞移植術の安全性を明らかにし、新たな再生医療の確立の礎を築くことにある。この治療法の確立により最終的には辺縁性歯周炎患者の生活の質の向上に大きく寄与することが期待される。

3) 対象疾患と適格基準

3.1. 対象疾患

従来の治療法では十分な歯周組織欠損の回復が見込めない辺縁性歯周炎

3.2. 適格基準

本研究への登録時に、以下の選択基準のすべての項目を満たし、除外基準のいずれの項目にもあてはまらない患者を被験者とする。

3.2.1. 選択基準

- 1) 初診時にプロービングデプス 7mm 以上の歯周ポケットが認められる患者
- 2) X線写真により、深さ 4mm 以上かつ幅 2mm 以上の垂直性骨欠損が歯間部（被験歯の近心または遠心のいずれかを含む位置）に認められる患者。
- 3) 被験者の選択に至る再評価において、初期治療内容が達成されている患者
- 4) 被験歯の動揺度が 2 度以下で、かつフラップ手術が適応と判断される角化歯肉が存在する患者。
- 5) 口腔衛生が確立しており、幹細胞移植術後も研究責任者又は分担者の指導に従った口腔清掃を行うことが可能であると研究責任者又は分担者が判断した患者。
- 6) 同意取得時に 20 歳以上の男女。
- 7) 本臨床研究の参加について文書により同意が得られている患者。

3.2.2. 選択基準の設定根拠

- 1) 2008 年に作成された『歯周病の検査・診断・治療計画の指針』（日本歯周病学会編）の重度歯周炎の判断基準を参考にし、「初診時にプロービングデプス 7mm 以上の歯周ポケットが認められる患者」を明記した。
- 2) 2008 年に作成された『歯周病の検査・診断・治療計画の指針』（日本歯周病学会編）において、深さ 4mm 以上かつ幅 2mm 以上の垂直性骨欠損部は従来の歯周組織再生療法の選択基準にはならないことが記されているため、上記の選択基準を設定した。
- 3) フラップ手術の対象となる患者を組み入れるため設定した。
- 4) フラップ手術の対象となる患者を組み入れるため設定した。
- 5) 口腔衛生の状態が歯周組織の病態改善に大きな影響を及ぼすために設定した。
- 6) 患者自身に同意能力がある年齢として 20 歳以上を設定した。また、歯周病の患者が 20 歳頃から増加し、45~64 歳で平坦なピークに達し、その後は歯周病の進行した歯が抜歯されるため減少するが、歯科保存の重要性が謳われている近年の傾向より、65 歳以上の患者も歯周病治療に来院していることから、対象年齢に上限を設けないこととした。歯周炎は男女とも罹る疾患であることから性別は不問とした。
- 7) 研究を理解し、期間を通じて研究に協力できる患者を組み入れるため設定した。

3.2.3. 除外基準

- 1) 臨床的アタッチメントレベルの正確な測定に支障をきたす補綴物等が存在している患者。
- 2) 悪性腫瘍を合併している、またはその既往がある患者。
- 3) 登録前口腔内診断において、口腔内に悪性腫瘍、前癌病変またはそれらが疑われる所見のある患者。
- 4) ビスホスホネート系薬剤を使用したことがある患者、使用する予定のある患者。
- 5) 幹細胞移植術後 36 週以内に被験部位の評価に影響を及ぼす処置（外科的処置または被験歯の補綴処置や根管処置等）を行うことが必要な患者。
- 6) 妊娠中、授乳中、移植 36 週後までに妊娠を希望している、または妊娠の可能性がある患者（登録前妊娠検査により判断）。
- 7) 腎障害、肝障害、血液障害を合併している患者。
- 8) 登録前臨床検査でヘモグロビン A1c が 6.5%以上の患者。
- 9) 登録前臨床検査でヘモグロビンが 6.0g/dL 未満又は血小板が 5.0×10^4 /mL 未満の患者。
- 10) 活動性の感染症を有する患者。
- 11) 登録前 6 ヶ月以内にアルコール中毒症又は薬物依存症の既往を有する患者。
- 12) 精神疾患を合併、又は精神疾患の症状を呈している患者。
- 13) HCV 抗体、HBs 抗原、ATLA、HIV 抗体陽性の患者。
- 14) その他、研究責任者の判断により、当研究への参加が不適当と考えられる患者。

3.2.4. 除外基準の設定根拠

- 1) 有効性の評価に支障をきたすため設定した。
- 2) 転移による再発の可能性があるため設定した。
- 3) 幹細胞移植術を悪性腫瘍部位に行った場合増殖させる恐れがあることから、口腔内に悪性腫瘍やそれに類するものがないことを確実にするため設定した。
- 4) 侵襲的歯科処置によって顎骨壊死・顎骨骨髓炎を惹き起こす恐れがあるため設定した。
- 5) 手術部位の治癒に影響を与え、有効性及び安全性の評価に支障をきたす恐れがあるため設定した。
- 6) 妊娠中の幹細胞移植術に関する安全性及び乳児に対する安全性が確立されていないため設定した。
- 7) 安全性への配慮から設定した。
- 8) 手術部位の治癒に影響を与え、有効性及び安全性の評価に支障をきたす恐れがあるため設定した。
- 9) 自己血清採取を施行できない可能性があるため設定した。
- 10) 脂肪組織由来幹細胞培養中の作業者の安全を考慮し設定した。

- 11) 臨床研究の内容を理解し、正しい意思決定ができない可能性があるため設定した。
- 12) 臨床研究の内容を理解し、正しい意思決定ができない可能性があるため設定した。
- 13) 培養工程でのウィルスの増幅の危険性を完全には否定できないため設定した。
- 14) 除外基準 1)~12)で設定した理由以外で、研究の実施に影響のある患者を除くために設定した。

4) 試験物

4.1. 試験物名

培養自己脂肪組織由来幹細胞

4.2. 成分・製造方法など

1) 自己血清の採取

自己脂肪組織採取前30日以内に大阪大学医学部附属病院輸血部において自己血採取バッグに400mLの血液を採取・遠心分離し、血清成分を大阪大学歯学部附属病院CPC (Cell Processing Center) において凍結保存する。

2) 自己脂肪組織の採取

脂肪採取部位をイソジンポビドンヨード液で消毒した後、キシロカイン注射液を数回に分けて注射し局所麻酔を行う。患者腹部脂肪採取部位にメスで1cm程度の切り口を開け、脂肪吸引用シリンジにカニューレを装着する。シリンジ内に生理食塩液を約5cc入れ(削除)、創にカニューレを挿入する。シリンジを引き陰圧の状態にして固定し、皮下に針を巡らしながら脂肪組織を吸引する。吸引した脂肪組織は直ちに滅菌検査用コップ滅菌角型培地ボトルに移し替える。必要量の脂肪組織10~30mlが採取できるまでこの操作を1~数回繰り返す。脂肪採取終了後、切開部の消毒・縫合を行い、テガダームを貼付し、必要に応じレストンスポンジにて圧迫する。疼痛および感染症の予防のため鎮痛剤および抗生物質の内服投与を行う。

なお、腹部から十分な脂肪組織が採取できない場合は、大腿からの採取を追加する。

3) 自己脂肪組織由来幹細胞の単離、培養、凍結

大阪大学歯学部附属病院細胞CPC、閉鎖系細胞調製培養装置(セルプロセッシング・アイソレーター(CPI))内で脂肪組織を洗浄液にて洗浄し、脂肪組織21mLに対して0.25%コラゲナーゼ溶液42mLを加え、小型振盪器内にて37°C1時間振盪する。内容物をセルストレーナーにて濾過し、濾液を自己血清含有培地で懸濁し~~フラスコ~~培養ディッシュに播種する。24~48時間の培養後、~~フラスコ~~培養ディッシュ内の細胞を洗浄し、EDTA処理によって~~フラスコ~~壁培養ディッシュよりはがれた細胞を脂肪組織由来幹細胞として、40%自己血清含Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)培地に懸濁し、fibronectin coated dishに播種する。

培養14日後（±7日）に細胞をトリプシン処理によって回収する。回収した細胞が以下の管理項目を満たさない場合は、培養細胞を全て凍結保存し、2)自己脂肪組織の採取 から再度施行する。

凍結前 管理項目

- ① 細胞数 3.0×10^6 個以上
- ② 生存率 70%以上
- ③ 純度 CD45⁻ 70%以上、CD105⁺ 70%以上、CD166⁺ 70%以上

規格を満たした培養細胞は、 1.0×10^6 個/mLとなるように凍結保存液に懸濁し、1mLずつクライオチューブに分注して液体窒素保存庫に保管する。また、回収した細胞上清10mLを滅菌チューブに回収し、感染症検査を行う。

- ④ 感染症検査（凍結前のデータ）
 - ・無菌試験 陰性
 - ・マイコプラズマ否定試験 陰性
 - ・エンドトキシン試験 1.0EU/mL未満

4) 自己脂肪組織由来幹細胞の解凍

フラップ手術および移植術の310±2日前に、凍結保存された自己脂肪組織由来幹細胞を解凍し、40±5%自己血清含DMEM培地に懸濁し、fibronectin coated dishに播種する。

また、解凍した細胞の懸濁液より生存率を計測する。その後、10±2日間で二回の継代培養を行い、移植3日前に培養上清10mLを滅菌チューブに回収し、感染症検査を行う。規格を満たさない場合や感染症検査で妖精陽性となった場合は、培養細胞を全て凍結保存し、2)自己脂肪組織の採取 から再度繰り返す。

解凍後 管理項目

生存率 50%以上

~~また、回収した細胞洗浄液10mLを滅菌チューブに回収し、感染症検査を行う。~~

規格

感染症検査（解凍後のデータ）

- ・無菌試験 陰性
- ・マイコプラズマ否定試験 陰性
- ・エンドトキシン試験 1.0EU/mL未満

なお、2度の培養工程を経ても規格を満たす細胞が得られなかった場合や感染症検査で陽性になった場合は、被験者の臨床研究を中止する。

5) 自己脂肪組織由来幹細胞の回収、調製、出荷判定、出荷

4)の感染症検査を満たしている場合、試験物となる幹細胞をトリプシン処理によって回収し、その調製を行う。また、回収した細胞上清10mLを滅菌チューブに回収

し、感染症検査を行う。また、調製した細胞の懸濁液より細胞数、生存率、純度を計測する。

調製には生体組織接着剤ボルヒール®（医薬品、特定生物由来製品）を用いる。フィブリノゲン凍結乾燥粉末（バイアル1）をフィブリノゲン溶解液（バイアル2）全量で溶解し、A液とする。トロンビン凍結乾燥粉末（バイアル3）をトロンビン溶解液（バイアル4）全量で溶解し、B液とする。継代培養により得た脂肪組織由来幹細胞 3.067×10^6 個を400134μL PBSに懸濁した後、A液5013μLとB液5013μLに懸濁液をそれぞれ5067μLずつ均一に懸濁する。次いで、細胞を懸濁したA液とB液をクライオチューブに混合しフィブリンゲルを調製する。

調製した試験物にラベルを貼付し出荷する。

規格

- ①細胞数 36.7×10^6 個以上
- ②生存率 70%以上
- ③純度 CD45⁻ 70%以上、CD105⁺ 70%以上、CD166⁺ 70%以上
- ④感染症検査（解凍後のデータ）
 - ・無菌試験 陰性
 - ・マイコプラズマ否定試験 陰性
 - ・エンドトキシン試験 1.0EU/mL未満

4.3. 容器・包装・保存条件など

クライオチューブに入れた試験物200160μLを、被験者識別コードを記載したラベルを貼付したビニール袋に梱包する。ビニール袋は、大阪大学歯学部附属病院CPCのインキュベーター内で保存する。

4.4. 搬送・交付

製造担当者が大阪大学歯学部附属病院CPCから手術室までクーラーボックス（保冷剤入り）に入れて運搬する。手術室でカルテの同意書の被験者識別コードと試験物のラベルの被験者識別コードが一致していることを確認し、品質保証書とともに予め定められた受け取り担当者に手渡しする。

4.5. 管理・保管

試験物の受け取り担当者が受け取った後は速やかに使用する。

フィブリン懸濁から移植までは6時間以内とする。

5) 臨床研究実施計画

5.1. デザインの型

- 1) 研究の相：POC 試験（第 I 相）
- 2) デザインの型：単群.
- 3) 対照：無.
- 4) ランダム化：無.
- 5) 遮蔽化：無.

5.2. デザインの設定根拠

本研究はヒトへの世界初の試みであり、その主要評価項目は安全性の評価である。従ってランダム化、遮蔽化（盲検化）、比較対照群の設定は行わない。

5.3. 目標登録患者数・患者登録期間

- 1) 目標登録症例数：12 例
- 2) 登録期間：~~直近の大阪大学歯学部附属病院長の実施許可日から 2 年間~~平成 23 年 11 月 18 日から平成 26 年 11 月 17 日までの 3 年間

5.4. 目標登録患者数の集積可能性

2009年1月～6月に大阪大学歯学部附属病院にて行われた歯周外科手術を受けた患者数は62名であった。歯周外科手術の中で歯周組織再生療法をおこなっている患者数の割合を約10%と見積もり、年間の歯周組織再生療法実施人数は12名と推定できる。その中で本研究に同意が得られる割合を50%と仮定した場合、年間6名の被験者を集積できることから、目標登録症例数を12例、登録期間を~~直近の大阪大学歯学部附属病院長の実施許可日から2年間~~平成23年11月18日から平成26年11月17日までの3年間と設定した。

5.5. 治療計画

5.5.1. 治療の定義

本研究におけるプロトコル治療とは、以下の「5.5.2.-1) 試験物の生成（4.2.参照）」開始から「5.5.2.-4) 術野の縫合」完遂までとする。

5.5.2. 方法

- 1) 試験物の生成（4.2.参照）
- 2) 試験物の調製（4.2.参照）
- 3) 自己脂肪組織由来幹細胞の移植

継代培養した自己脂肪組織由来幹細胞の回収、出荷判定結果を確認した後、研究責任者又は分担者は、手術室に於いて自己脂肪組織由来幹細胞を移植する。歯肉溝切開を行

い、可及的に歯間乳頭を残存させた後、全層弁で歯肉骨膜弁を翻転し、スケーリング・ルートプレーニングを行う。キュレットはグレイシー型スケーラーを用いる。フィブリン懸濁物を患部歯槽骨欠損部の形態に合わせてスパーテルを用いて填入する。

4) 術野の縫合

縫合は、剥離させた歯肉が歯根に緊密に接するように行う。なお、フィブリン懸濁物の漏出が懸念されると判断される場合には、歯周包帯（非ユージノール系）を使用し、フィブリン懸濁物の漏出を防ぐようにする。

5.5.3. 併用治療

特になし。

5.5.4. 併用禁止薬剤及び併用禁止療法

ビスホスホネート系薬剤は臨床研究終了まで使用しないこととする。

被験部位（被験歯及び隣接歯）*（5.6.補足説明参照）に対して評価に影響を及ぼす処置（外科的処置または被験歯の補綴処置や根管処置等）は、臨床研究終了まで行わないこととする。

5.5.5. 支持治療

特になし。

5.5.6. 後治療

良好な口腔清掃状態を維持するために、口腔衛生指導、及び歯肉縁上、歯肉縁下のプラーク、歯石を機械的に除去する。

5.5.7. 治療計画の設定根拠

現在の歯周病治療の原則は、原因であるデンタルプラークを歯根表面の壊死セメント質とともに機械的に除去することであるが、それだけでは辺縁性歯周炎の進行により失われた歯周組織の再生は達成できない。GTR法、エムドゲインゲルを用いた歯周組織再生療法が現在臨床応用されているが、それらは全て歯根膜に内在する「歯周組織幹細胞」を活用したものである。このような内在性歯根膜由来幹細胞の活用だけでは十分な再生量が期待することができず、重度な症例に対しては多分化能を有する間葉系幹細胞を移入する再生療法の確立が期待されている。このような状況において、フィブリンゲル 1mL 160μLあたり培養脂肪組織由来間葉系幹細胞 $1.56.7 \times 10^6$ 個を、実験的歯周病モデル（ビーグル犬）に単回移植することにより、新生骨及び新生セメント質等の歯周組織の著明な再生効果が得られた。また、安全性にも問題は認められなかった。このことから、本治療計画においては、移植細胞として培養自己脂肪組織由来幹細胞をフィブリンゲルに

懸濁し、歯槽骨欠損部へ単回移植することで効果が期待できると考えた。移植細胞数は、ビーグル犬の実験データから $3.06.7 \times 10^6$ 個で十分であると考えられるため、細胞数を $3.06.7 \times 10^6$ に設定した。試験物を滞留させ、歯周組織欠損部のスペースメイキングを目的としてフィブリンを用いることとした。欠損部に注入できる容量としては $200.160 \mu\text{L}$ 程度と考えられるため、フィブリンの量を $200.160 \mu\text{L}$ と設定した。

また、安全性については移植する培養幹細胞は自己脂肪組織由来であり、培養過程で用いるトリプシン等もこれまで大阪大学未来医療センターにおける臨床研究プロジェクトでの細胞培養に用いられているものと同一であり、培養した幹細胞を懸濁するフィブリンも医薬品（特定生物由来製品）として承認されているものであり安全性に問題はないと考えられる。

5.6. 主要評価項目及び副次評価項目

5.6.1. 主要評価項目

本研究における有害事象の有無、種類、重症度、発現頻度及び発現期間とする。

5.6.2. 副次評価項目

1) 副次的評価項目

- (1) 移植 36 週後の新生歯槽骨の増加率（規格撮影された X 線写真を測定し得られる、移植前の欠損の深さに対する新生した歯槽骨の高さの比率を%で表した数値）及びその経時的変化
- (2) 移植 36 週後の臨床的アタッチメントの獲得量及びその経時的変化
- (3) 歯周組織検査値（プロービングデプス、歯肉出血指数、歯肉炎指数、歯の動揺度、プラーク指数、角化歯肉幅、辺縁歯肉の退縮量）の経時的変化

2) 副次的評価項目評価のための検査の定義と方法

(1) X線写真撮影方法と新生歯槽骨の増加率測定方法

① X線写真撮影方法

各被験者のX線撮影は、各撮影時の撮影位置の均一化を図るため、撮影インジケータを用いて規格撮影する。撮影用インジケータを口腔内に装着し安定を確認する。撮影中にインジケータが動かないように注意しながら撮影する。同一被験者のX線写真照射時間は、研究期間を通して一定とし、照射時間を診療録に記録する。

各 X 線写真については、像全体の大きさや角度に多少の誤差が生じると考えられるため、研究期間中不変であると考えられる AB を用いて、移植後の測定値を補正する。すなわち、移植後の各データは、移植前の実測 AB と移植後の実測 AB の比を用いて補正してから解析に利用する。

補正 AD = 移植後の実測 AD × (移植前の実測 AB / 移植後の実測 AB)

②新生歯槽骨の増加率測定方法

各被験者のX線写真を一括測定する。測定者は、「X線写真測定に関する標準業務手順書」に従い、以下の基準点よりX線写真上におけるAB、AC、ADの測定を行う。

なお、各測定値(mm)は小数点以下第2位までの値とする。

新生歯槽骨の高さ＝移植前のAD－移植後の補正AD

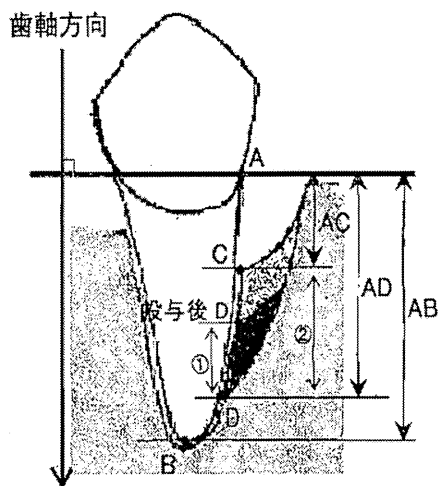
移植前の欠損深さ＝移植前のAD－移植前のAC

新生歯槽骨の増加率は下記のとおり、移植前の欠損深さに対する新生歯槽骨の高さの割合に100を乗じた値（小数点以下第3位を四捨五入）で表すこととする。

新生歯槽骨の増加率(%)

＝（新生歯槽骨の高さ／移植前の欠損深さ）×100

＝（（移植前のAD－移植後の補正AD）／（移植前のAD－移植前のAC））×100



[基準点]

(A)セメント－エナメル境（明瞭でない場合は修復物のマージンなどの位置とする）

(B)根尖部

(C)残存歯槽骨頂

(D)欠損底部

(2)臨床的アタッチメントレベル(CAL) 獲得量

評価統一のための基準（別添）に従い、セメント－エナメル境（困難な場合は、ステントや修復物マージン等）を基準点とし、被験者毎に作成したステントを用い、基準点から評価部位*の歯肉溝底までの距離をプローブで測定(mm)する。なお、評価部

位は歯間部の歯肉溝底の最も深い部分を選択し、また、基準点は最終測定時まで変更しない。

臨床的アタッチメントの獲得量＝移植前のCAL－移植後のCAL

(3) 歯周組織検査

① プロービングデプス(PPD)

CALの測定と同時に、評価部位の歯肉縁から歯肉溝底までの距離(mm)を測定する。

② 歯肉出血指数(BOP)

評価部位の歯肉溝に対して20～30gのプロービング圧による10秒後の出血の有無をチェックする。

③ 歯肉炎指数(GI)

評価部位を下記基準に従って評価する。

0: 正常歯肉

1: 軽度の炎症（色のわずかな変化やわずかな浮腫、プローブで触診しても出血しない）

2: 中等度の炎症（発赤、浮腫や潰瘍があり、プローブで触診すると出血する）

3: 高度の炎症（著しい発赤、浮腫や潰瘍があり、自然出血傾向があるもの）

④ 歯の動揺度

ピンセットで約250gの負荷を加えて歯の揺れ幅から、下記分類で評価する。

0(0度): 生理的動揺（0.2mm未満の動きで、ほとんど動くと感じない）

1(1度): 軽度の動揺（唇舌方向に0.2～1.0mm動く）

2(2度): 中等度の動揺（唇舌方向に1.0～2.0mm動き、近遠心方向にも動く）

3(3度): 高度の動揺（唇舌方向に2.0mm以上動き、垂直方向にも動く）

⑤ プラーク指数(PI)

評価部位を下記基準に従って評価する。

0: プラークが全くない

1: 肉眼ではプラークの付着が不明であるが、プローブで探ると付着がみられる

2: ポケット内や辺縁歯肉部に、少量～中等度のプラークがプローブを用いることなく肉眼で認められる

3: ポケット内や辺縁歯肉上に、多量のプラークが付着している

⑥ 角化歯肉幅

歯肉辺縁から歯肉歯槽粘膜境までの最短距離(mm)をプローブで測定する

⑦ 辺縁歯肉の退縮量(REC)の変化量

測定は行わず、CALの値からPPDの値を引いた値から解析時に算出する

辺縁歯肉の退縮量(REC)の変化量

＝（移植前の辺縁歯肉の退縮量）－（移植後の辺縁歯肉の退縮量）

＝（移植前のCAL－移植前のPPD）－（移植後のCAL－移植後のPPD）

* (補足説明)

評価部位及び被験部位の定義

- ①評価部位は、X線写真等から3mm以上の垂直性骨欠損が存在すると診断され、かつ、プローブによる触診によりポケット最深部と判断された、歯間部の1点を「評価部位」と定義する。また、培養自己脂肪組織由来幹細胞は評価部位に移植する。なお、評価部位の属する歯を「被験歯」と呼ぶ。
- ②被験歯及び隣接歯（両隣の歯）を被験部位とし、この部位の観察により局所の安全性を評価する。

5.7. 登録患者の研究参加期間

研究参加期間は、登録から自己脂肪組織由来幹細胞移植後の最終の観察終了または研究の中止までとする。

5.8. 臨床研究登録期間・臨床研究実施期間

臨床研究登録期間は、直近の大阪大学歯学部附属病院長の実施許可を受けた日から2年間平成23年11月18日から平成26年11月17日までの3年間、臨床研究実施期間は、大阪大学歯学部附属病院長の実施許可を受けたときから全ての登録症例の臨床研究が終了又は中止した時点までの期間とする。臨床研究実施期間の目標は6年間とする。

5.9. 中間評価

1例目の12週後までの安全性に関するデータが収集された時点で中間評価を行う。中間評価の間は被験者の新たな登録は行わない。中間評価の結果、安全性に疑義が生じた場合には「11.2. 研究全体の中止・中断の基準及び手順」に従って、本研究を中止・中断する。

6) 主要評価項目及び副次評価項目

6.1. 主要評価項目

本研究における有害事象の有無、種類、重症度、発現頻度及び発現期間とする。

6.1.1. 有害事象の定義

有害事象とは、本研究との因果関係の有無に関わらず、本研究中に生じた全ての随伴症状及び臨床検査値異常変動を示す。

重篤な有害事象とは症状の程度に関わらず、以下の基準に従って、重篤か否かを判定する。

- ①死亡
- ②死亡につながる恐れのあるもの
- ③入院または治療のために入院期間の延長が必要とされるもの
- ④障害
- ⑤障害につながるおそれのあるもの
- ⑥後世代における先天性の疾病または異常

6.1.2. 有害事象の評価

本研究の実施中に観察された有害事象の重症度の評価は、「7.観察・検査項目とスケジュール」に定めたスケジュールに基づき、~~NCI-Common Terminology Criteria for Adverse Events (NCI-CTC-AE Ver4.0 日本語版)~~に示された6段階で評価する。平成23年1月17日厚生労働省医薬食品局審査管理課発令の「新医薬品の総審査期間短縮に向けた申請に係るCTDのフォーマット」を参考にし、下記の3段階で評価する。

Grade 0 正常

有害事象が観察されない、または検査値が正常範囲

Grade 1 軽度の有害事象

軽度；治療を要さない；症状がない画像所見異常/検査値異常

Grade 2 中等度の有害事象

最低限の治療/局所的治療/非侵襲的治療を要する

Grade 3 高度の有害事象

入院や侵襲的治療/IVR/輸血/治療的内視鏡/手術などを要する顕著な症状を有する

Grade 4 生命を脅かす、または活動不能/動作不能となる有害事象

急性で生命を脅かす代謝性/心血管系の合併症など。集中治療や緊急処置（緊急IVR/治療的内視鏡/手術など）を要する。

Grade 5 有害事象による死亡

1. 軽度

特に処置を必要としないもしくは医療材料、医薬部外品による処置を必要とするが、研究の継続が可能な程度

2. 中等度

医薬品による処置を必要とするが、研究の継続は可能な程度

3. 高度

研究の中止が必要な程度

6.2. 主要評価項目の設定根拠

ビーグル犬を用いた前臨床試験で本治療法の有効性、安全性が確認されているが、ヒトへの適用は初めてであることから、安全性の確認を主要評価項目として設定した。

6.3. 副次評価項目

- (1) 移植 36 週後の新生歯槽骨の増加率（規格撮影された X 線写真を測定し得られる、移植前の欠損の深さに対する新生した歯槽骨の高さの比率を%で表した数値）及びその経時的変化
- (2) 移植 36 週後の臨床的アタッチメントの獲得量及びその経時的変化
- (3) 歯周組織検査値（プロービングデプス、歯肉出血指数、歯肉炎指数、歯の動揺度、プラーク指数、角化歯肉幅、辺縁歯肉の退縮量）の経時的変化

6.4. 副次評価項目の設定根拠

1)副次評価項目の設定根拠

(1)移植36週後の新生歯槽骨の増加率及びその経時的変化

歯周組織の再生には、「歯槽骨の再生」が不可欠であるため、新生歯槽骨の増加率及びその経時的変化を副次評価項目の評価指標として設定した。なお、新生歯槽骨増加率は、アメリカ歯周病学会のコンセンサスレポート⁷⁾を参考にし、移植前の骨欠損の深さを基準にした場合、どの程度のパーセンテージで骨が改善するかを評価する。

(2) 移植36週後の臨床的アタッチメントの獲得量及びその経時的変化

歯周組織の再生には、(1)の新生歯槽骨の増加に加え、新付着の獲得が不可欠であるため、臨床的アタッチメントの獲得量（ポケット内や口腔内に露出した根面への歯肉の付着（線維性付着と上皮性付着））及びその経時的変化を副次評価項目の評価指標として設定した。

(3)歯周組織検査値の経時的変化

歯周組織の炎症の程度が、本研究の目的に関連した補足的な評価項目であることから、炎症の程度の指標となるプロービングデプス、歯肉出血指数、歯肉炎指数、歯の動揺度、プラーク指数、角化歯肉幅、辺縁歯肉の退縮量、及びその経時的変化を副次評価項目の評価指標として設定した。

7) 観察・検査項目とスケジュール

研究責任者及び分担者が、被験者の状態により検査をおこなうこと自体に危険が伴うと判断したときは、当該検査の中止や延期等を考慮する。

7.1. 観察・検査スケジュール