

201114021A

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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 西 田 幸 二

平成 24 (2012) 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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 西 田 幸 二

平成 24 (2012) 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	大阪大学大学院医学系研究科脳神経感覚器外科学（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	東京大学医学系研究科・眼科学	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
	布施 昇男	東北大学東北メディカルメガバンク機構ゲノム解析部門	教 授
	山口 拓洋	東北大学大学院医学系研究科医学統計学分野	教 授
	嶋澤 るみ子	長崎大学大学院医薬薬学総合研究科生命医科学講座	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・・・・・・・・・・・・・・・・・・10  
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・13  
前田 直之
4. 角膜上皮幹細胞疲弊症患者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  
布施 昇男
5. 臨床試験のデータ管理、プロトコール作成・・・・・・・・・・・・・・・・・・20  
山口 拓洋
6. 臨床試験のプロジェクトマネジメント ―セルプロセッシングセンター作業手順書  
の改訂―・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・22  
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 23 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

# 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

研究代表者 西田 幸二 大阪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3年目にあたる本年は、大阪大学および東北大学においてヒト幹細胞指針への適合性について厚生労働大臣より承認を得たうえで、臨床研究を開始して良好な治療成績を得ている。さらに東京大学および愛媛大学においては倫理審査委員会の承認を得て、厚生労働省へ申請書類を提出し、ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会における倫理審査が開始された。大阪大学においては高度医療申請を行った。また、多施設共同臨床試験を行うために必要となる、口腔粘膜組織及び培養細胞シートの航空機による輸送技術の開発を行った。

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 東京大学医学系研究科眼科学 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

布施昇男 東北大学 東北メディカルメगाバ  
ンク機構 ゲノム解析部門 教授

山口拓洋 東北大学大学院医学系研究科 医  
学統計学 教授

嶋澤るみ子 長崎大学大学院医薬薬学総合研  
究科生命医科学講座 准教授

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を開発を進めてきた。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ていくために、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。

3年計画の3年目に当たる本年は、大阪大学および東北大学においてヒト幹細胞指針への適合性について厚生労働大臣より承認を得たうえで、臨床研究を開始して良好な治療成績を得ている。さらに東京大学および愛媛大学においては倫理審査委員会の承認を得て、厚生労働省へ申請書類を提出して倫理審査を進めた。また口腔粘膜組織及び培養細胞シート輸送技術の航空機による輸送技術開発を行った。

## B. 研究方法

### 各施設での学内倫理審査、ヒト幹細胞指針および高度医療への書類提出：

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審査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」への適合性について厚生労働大臣の承認を得る必要がある。そこで本年度においては昨年度まで

にヒト幹細胞指針への適合性について承認を得ている大阪大学、東北大学に加えて、東京大学および愛媛大学において各大学での倫理審査とそれに引き続いて厚生労働省への書類提出を行った。加えて大阪大学においては「自己培養口腔粘膜上皮細胞シート移植」を高度医療への申請を行った。

### 臨床試験の実施：

大阪大学および東北大学においては本年度から臨床研究を開始した。両大学においては、自施設のCPCにおいて試験物である自家培養口腔粘膜上皮細胞シートを調製することから、臨床試験開始前コールドランを行った。

大阪大学および東北大学においては2例の患者から臨床研究参加について文書を用いて説明し、同意を得た。その後、患者から口腔粘膜組織を採取してCPCにおいて培養し、自家培養口腔粘膜上皮細胞シートを作製した。患者への投与前には品質検査を行って、あらかじめ定めた基準を満たす培養口腔粘膜上皮細胞シートが作製できていることを確認した上で、培養口腔粘膜上皮細胞シート移植を行った。

### 細胞シートおよび組織輸送技術の開発：

採取した組織や作製した培養細胞シートを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技術を開発する必要がある。日立製作所と共同で培養口腔粘膜上皮細胞シートおよび口腔粘膜組織を航空機を用いて輸送できる専用の輸送容器を開発した。培養口腔粘膜上皮細胞シートの輸送についてだが、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

においても 32℃以上での保温が望ましいと考えられた。そこで輸送容器内の蓄熱材は融点 36℃の n-エICOSAN を用いることとした。また組織輸送には心臓や腎臓、角膜など臓器移植の場合の輸送条件を参考にして 4℃程度が望ましいと考えられたことから、蓄熱材は融点 6℃のテトラデカンを用いることとした。さらに培養細胞シートおよび組織の最大輸送時間を 12 時間と設定した。輸送用液については、昨年度までの検討をもとに HBSS をベースとした輸送用液を用いた。

(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

#### 各施設での学内倫理審査、ヒト幹細胞指針および高度医療への書類提出：

大阪大学および東北大学の臨床研究に関しては昨年度までにヒト幹指針への適合性について承認を得ていた。本年度は東京大学および愛媛大学における学内倫理審査を受け、承認を得た。また大阪大学においても細胞調製を行うことから、学内での倫理審査を受けて、承認を得た。さらに東京大学、愛媛大学が主体となるヒト幹細胞臨床試験について、厚生労働省へ書類提出して申請を行い、倫理審査が開始された。さらに高度医療制度への申請を行い、審査が開始されている。

#### 臨床試験の実施：

大阪大学および東北大学で行ったコールドランにおいては、出荷判定基準をすべて満たす培養口腔粘膜上皮細胞シートを作製することが確認された。

大阪大学においては眼類天疱瘡および特発性角膜上皮幹細胞疲弊症の 2 例の患者治療を行った。患者由来口腔粘膜組織を手術室にて採取し、大阪大学医学部附属病院未来医療センターCPCへ持ち込んで、培養口腔粘膜上皮細胞シートを作製した。患者角膜表面の結膜組織を剥離除去した後に、培養細胞シート移植を行った。術後の経過についてだが、主要評価項目である 1 年後の結膜化がなく、かつ上皮欠損の無い面積の grading は 2 例ともに術前 0 であったが、術後 3 ヶ月の時点で 5 と改善している。また視力は 2 例とも術前 0.01 であったが、術後 3 ヶ月で 0.15 および 0.08p と回復した。角膜混濁は 2 例ともに術前 grade2 であったが、術後 3 ヶ月の時点で 0 および 1 と改善した。角膜血管新生は 2 例ともに術前 grade3 であったが、術後 3 ヶ月で 0 および 2 と改善した。

次に東北大学でもアルカリ腐食およびステューブンスジョンソン症候群の 2 例に対して、東北大学未来医工学治療開発センターCPCにおいて調製した培養口腔粘膜上皮細胞シートを用いたシート移植を行った。

術後 3 か月の時点で主要評価項目である結膜化がなく、かつ上皮欠損の無い面積の grading は 2 例ともに 0 であったのに対して、術後 3 ヶ月の時点で 2 例ともに 5 へ上昇している。また矯正視力は 2 例ともに術前 0.01 であったが、術後 3 ヶ月の時点で、0.04 および 0.02 へと回復した。角膜混濁は 2 例とも Grade2 から Grade1 へ

と回復した。角膜血管新生は両症例とも術前・術後ともに Grade3 であった。

このように現時点において実施した4例において、主要評価項目である上皮化については著明な改善を認め、副次評価項目（有効性）についてもおおむね良好な治療成績である。

また安全性評価項目として、腫瘍性増殖や眼内炎、角膜感染症をはじめとした重大な有害事象は認めていない。

#### 細胞シートおよび組織輸送技術の開発：

日立製作所と共同開発で、口腔粘膜組織及び培養上皮細胞シート用の航空機での輸送が可能な輸送容器を開発した。輸送容器の基本性能として、融点36°Cのn-エイコサンを用いた場合に外気温  $21 \leq T(^{\circ}\text{C}) \leq 25$  下で内気温  $34 \leq T(^{\circ}\text{C}) \leq 37$  を  $68.6 \pm 3.8$  時間維持できること、外気温  $3 \leq T(^{\circ}\text{C}) \leq 5$  下で内気温  $34 \leq T(^{\circ}\text{C}) \leq 37$  を  $24.1 \pm 1.2$  時間維持できることを確認した。融点6°Cのテトラデカンを用いた場合には、外気温  $16 \leq T(^{\circ}\text{C}) \leq 20$  下で内気温  $6 \leq T(^{\circ}\text{C}) \leq 8$  を  $61.7 \pm 3.6$  時間維持できることを確認した。また気圧保持性能については外気圧  $650 \leq P(\text{hPa}) \leq 700$  下で内気圧  $975 \leq P(\text{hPa}) \leq 1025$  を24時間維持できることを確認した。また無菌性保持性能として包装容器内部の無菌性を外部への細菌（*Bacillus subtilis*）（ $1.2 \times 10^5$  CFU/ml）塗布条件下で維持できることを確認した。

まずウサギ口腔粘膜組織の空輸試験を行った。輸送後の組織中の細胞形態が正常であること、輸送後組織中の基底部には幹細胞マーカーである p63 陽性細胞が存在することを確認した。さらに輸送したウサギ口腔粘膜組織を用いて培養上皮細胞シートの作製が可能であり、K3/76、p63、ZO-1の発現を確認することができた。これらの

ことから、輸送した組織を用いた細胞シートの作製が可能であると考えられた。

次にヒト口腔粘膜上皮細胞シートはCPCから出荷した日のうちに移植に用いることとし、12時間以内での移植を想定している。そこで、本輸送容器を用いて培養ヒト口腔粘膜上皮細胞シートの空輸試験を行った。なお空港での保安検査ではX線照射による細胞への影響を回避するために事前に細胞輸送を航空会社へ申請し、X線を回避した。まず輸送中の輸送容器内外の温度および圧変化であるが、容器外の温度変化に関わらず、輸送容器内は安定して32°C以上の温度を保持していた。また気圧変化についても上空で気圧低下に関わらず、輸送容器内の気圧は輸送工程全体を通して1000hPa以上を維持していた。次に輸送前後において細胞シートの評価を行った。まず位相差顕微鏡によって輸送前後の細胞シートに含まれる細胞の形態を評価したところ、細胞形態に変化がないことが確認できた。さらに20°C30分の低温処理によって輸送前および後の細胞シートはシート状の剥離が可能であった。細胞シート中の生細胞率、上皮細胞純度も輸送前後において同等であった。免疫染色での評価では、輸送前後の細胞でK3/76（分化マーカー）、p63（幹細胞マーカー）、ZO-1（タイトジャンクション関連蛋白）、MUC16（眼表面特異的膜貫通型ムチン）の発現のパターンは同様であった。以上の結果より、航空機を用いて輸送した細胞シートは出荷後12時間以内であれば、移植に用いることができると考えられた。

#### D. 考察

大阪大学および東北大学においては、おのおの2例の患者に対して臨床研究を開始して、良好な治療成績を得ている。東京大学および愛媛大学に

においては学内倫理審査で承認を得て、厚生労働省の審査会において倫理審査が開始された。さらに細胞シートおよび組織輸送技術の開発を行ったことから、臨床試験実施施設と細胞調製施設が分かれた臨床試験を行う準備が整ったと考えられた。

## E. 結論

3年計画の3年目にあたる本年は、大阪大学および東北大学においてヒト幹細胞指針への適合性について厚生労働大臣より承認を得たうえで、臨床研究を開始して良好な治療成績を得ている。さらに東京大学および愛媛大学においては倫理審査委員会の承認を得て、厚生労働省へ申請書類を提出し、ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会における倫理審査が開始された。また大阪大学から高度医療への申請を行った。多施設共同臨床試験を行うために必要となる、口腔粘膜組織及び培養細胞シートの航空機による輸送技術の開発を行った。

今後は、これらの成果をもとにして、患者の経過観察およびさらに患者リクルート・手術を行い、本治療法の有効性および安全性について検証する予定としている。さらに高度医療評価制度をつうじて、薬事法による申請等につながる科学的評価可能なデータ収集の迅速化を図る。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Watanabe R, Hayashi R, Kimura Y, Tanaka Y, Kageyama T, Hara S, Tabata Y, Nishida K. A Novel Gelatin Hydrogel Carrier Sheet for Corneal Endothelial Transplantation. *Tissue Eng Part A*. 2011 Sep;17(17-18):2213-9.

- 2) Matsusaki M, Amekawa R, Matsumoto M, Tanaka Y, Kubota A, Nishida K, Akashi M. Physical and specific crosslinking of collagen fibers by supramolecular nanogelators. *Adv Mater*. 2011 Jul 12;23(26):2957-61.
- 3) Takagi R, Yamato M, Murakami D, Kondo M, Yang J, Ohki T, Nishida K, Kohno C, Okano T. Preparation of keratinocyte culture medium for the clinical applications of regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med*. 2011 Apr;5(4):e63-73.

### 2. 学会発表

- 1) 西田幸二、病態から考える角膜疾患の診療、第20回霧島眼科研鑽会、宮田眼科病院、宮崎、2011年5月21日
- 2) 西田幸二、Application of stem cell technology to corneal diseases、The 10th Qingdao International Symposium of Ophthalmology、インターコンチネンタル青島、中国、2011年5月28日
- 3) 西田幸二、オキユラーサーフェスの角化メカニズム、第5回箱根ドライアイクラブ、ヒルトン小田原リゾート&スパ、神奈川、2011年6月24日
- 4) 西田幸二、再生医療の現状と未来、大阪府女医会総会、ホテルグランビア大阪、大阪、2011年6月26日
- 5) 西田幸二、角膜手術の進歩、お茶の水眼科先進医療セミナー、東京医科歯科大学、東京、2011年7月1日
- 6) 西田幸二、眼表面上皮幹細胞異常、3i角

- 膜塾、ウェスティン都ホテル京都、京都、  
2011年8月6日
- 7) 西田幸二、角膜移植の基本、全層角膜移植、3i 角膜塾、ウェスティン都ホテル京都、京都、2011年8月6日
- 8) 西田幸二、角膜パーツ移植、3i 角膜塾、ウェスティン都ホテル京都、京都、2011年8月6日
- 9) 西田幸二、角膜関連疾患編、第65回日本臨床眼科学会 モーニングセミナー、東京国際フォーラム、東京、2011年10月9日
- 10) 西田幸二、角膜再生医療、大阪眼科手術の会、スイスホテル南海大阪、大阪、2011年11月19日
- 11) 西田幸二、17th Annual Meeting of Kyoto Cornea Club、ウェスティン都ホテル京都、京都、2011年12月2-3日
- 12) 西田幸二、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、文部科学省「橋渡し研究支援推進プログラム」 橋渡し研究ネットワーク構築事業シンポジウム-ACT westによる西日本橋渡し研究連携基盤構築一、大阪大学银杏会館、大阪、2012年1月16日
- 13) 西田幸二、角膜上皮細胞シートおよび角膜内皮細胞シートに関する評価指標、次世代医療機器ガイドライン・セミナー、日本教育会館、東京、2012年1月20日
- 14) 西田幸二、最先端医療融合イノベーションセンター事業などについて、関西イノベーション国際戦略総合特区・特別フォーラム、大阪赤十字会館、大阪、2012年1月25日
- 15) 西田幸二、iPS 細胞を用いた角膜再生治療法の開発、再生医療の実現化ハイウェイ 一般公開シンポジウム、東京国際フォーラム、東京、2012年3月4日
- 16) 西田幸二、角膜手術の未来、北九州眼科フォーラム、リーガロイヤルホテル小倉、福岡、2012年3月15日
- 17) 西田幸二、病態から考える角膜診療、兵庫県眼科フォーラム、神戸ポートピアホテル、兵庫、2012年3月17日
- 18) 西田幸二、角膜内皮疾患、眼科診療アップデートセミナー 2012、国立京都国際会館、京都、2012年3月18日
3. 新聞・テレビ等による報道  
なし
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
1. 特許取得
- 1) 特願 2011-156641. 原進、林竜平、景山智文、西田幸二・角膜内皮前駆細胞の単離・培養法. 国立大学法人大阪大学. 2011年7月15日
- 2) 特願 2011-179491. 野崎貴之、西田幸二、森圭祐、大家義則、林竜平・細胞輸送容器. 国立大学法人大阪大学. 2011年8月19日
- 3) 特願 2011-179492. 野崎貴之、西田幸二、森圭祐、大家義則、林竜平・包装容器およびそれを用いた試料観察方法. 国立大学法人大阪大学. 2011年8月19日
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

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共同臨床研究を行うための準備を進めた。具体的には、学内倫理審査委員会の承認を得た本研究を、ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会に諮るために厚生労働省へ書類を提出した。さらに、細胞シート輸送技術の開発を行った。

#### 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共同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準備として、学内倫理審査委員会の承認を得た本研究を、ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会に諮るために厚生労働省へ書類を提出した。また、細胞シート輸送技術の開発を行った。

（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する内容となるように留意する。

#### C. 研究結果

昨年度までに、共同研究者である西田、天野、前田、山口、嶋澤らと共同で臨床プロトコールの作成を行った。臨床プロトコールにおいて、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)

これらの成果をもとにして本年は愛媛大学の学内における倫理審査を受け、承認を得た。さらに本学倫理審査委員会の承認を得た本研究を、ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会に諮るために、厚生労働省へ必要書類を提出した。輸送容器については大阪大学とともに共同研究を行って開発した。培養ヒト口腔粘膜上皮細胞シートを用いて、大阪大学と愛媛大学の間で空輸試験を行った。輸送液は HBSS を用いた。

まず輸送中の輸送容器内外の温度および圧変化であるが、容器外の温度変化に関わらず、輸送容器内は安定して 34°C 以上の温度を保持している。また気圧変化についても上空で気圧低下に関わらず、輸送容器内の気圧は輸送期間全体を通して 1000hPa 以上を維持していた。

次に輸送前後において細胞シートの評価を行った。まず位相差顕微鏡によって輸送前後の細胞シートに含まれる細胞の形態を評価したところ、輸送の前後において細胞形態に変化がないことが確認した。さらに 20°C 30 分の低温処理によって輸送前および後の細胞シートはシート状の剥離が可能であった。細胞シート中の生細胞率をトリパンプルーで計測したところ、輸送前が 93.3%、輸送後が 85.5% であった。またシートに含まれる総細胞数は輸送前が  $7.5 \times 10^5$ 、輸送後が  $1.8 \times 10^6$  であった。

HE 染色では 2~3 層に重層化した細胞シートであった。免疫染色での評価では、輸送前後の細

胞で K3/76 (分化マーカー)、p63 (幹細胞マーカー)、ZO-1 (タイトジャンクション関連蛋白)、MUC16 (眼表面特異的膜貫通型ムチン) の発現のパターンは同様であった。

以上の結果より、大阪大学と愛媛大学の間で航空機を用いて細胞シートの輸送が可能であると考えられた。

#### D. 考察

輸送技術の開発を行い、学内倫理審査委員会の承認を得たことで、臨床試験を開始する手順を進めることができた。また、これらの準備をもとに、ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会に諮るための、厚生労働省へ必要書類の提出も行った。

#### E. 結論

本年度は、輸送技術の開発を行い、本研究についての学内倫理審査委員会の承認を得た。現在、ヒト幹細胞指針への適合性について厚生労働省にて審査中である。承認が得られた後は、いよいよ臨床試験を開始する予定である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Hara Y, Shiraishi A, Yamaguchi M, Uno T, Ohashi Y. Diagnosis and clinical course of epithelial ingrowth after Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty followed by in vivo confocal microscopy. *Clin Experiment Ophthalmol.* 39(7):710-2, 2011.
- 2) Zheng X, Sakai H, Goto T, Namiguchi K, Mizoue S, Shiraishi A, Sawaguchi S, Ohashi Y. Anterior segment optical coherence

tomography analysis of clinically unilateral pseudoexfoliation syndrome: evidence of bilateral involvement and morphologic factors related to asymmetry. Invest Ophthalmol Vis Sci. 29;52(8):5679-84, 2011.

- 3) Kamao T, Yamaguchi M, Kawasaki S, Mizoue S, Shiraishi A, Ohashi Y. Screening for dry eye with newly developed ocular surface thermographer. Am J Ophthalmol. 151(5):782-791, 2011.
- 4) Zhang Y, Kobayashi T, Hayashi Y, Yoshioka R, Shiraishi A, Shirasawa S, Higashiyama S, Ohashi Y. Important Role of Epiregulin in Inflammatory Responses During Corneal Epithelial Wound Healing. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012 Mar 16.

## 2.学会発表

- 1) 鄭 暁東、浪口孝治、五藤智子、溝上志朗、白石 敦、酒井 寛、澤口昭一、大橋裕一 . 片眼性偽落屑症候群における前眼部 OCT : 非対称病態に関与するリスクファクターの検討. 第 115 回日本眼科学会総会 (東京) 5/12-5/15, 2011.
- 2) 鄭 暁東、浪口孝治、永原國宏、五藤智子、溝上志朗、原 祐子、鈴木 崇、山口昌彦、宇野敏彦、白石 敦、大橋裕一. 偽落屑症候群における白内障術後角膜内皮細胞形態の変化. 第 65 回日本臨床眼科学会 (東京) 10/7-10/10, 2011.
- 3) 島崎 潤、前田直之、坪田一男、稗田 牧、西田幸二、村上 晶、大橋裕一. ペルーシド角膜辺縁変性の全国調査に見る臨床像の特徴. 第 65 回日本臨床眼科学会 (東京) 10/7-10/10,

2011.

- 4) 坂根由梨、宇野敏彦、鈴木 崇、鄭 暁東、原 祐子、山口昌彦、白石 敦、大橋裕一. 周辺部角膜潰瘍に対する外科的治療成績. 第 65 回日本臨床眼科学会 (東京) 10/7-10/10, 2011.

## 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3年目に当たる本年度は、共同研究者と協力して、学内倫理審査委員会の承認を得た本研究をヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会に諮るための厚生労働省への書類提出および細胞シート輸送技術の開発を行った。

#### 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

昨年度までに共同研究者と協力して、臨床プロトコルの作成を行っていた。本年度においては、まず学内倫理審査委員会に諮り、承認を得たため、続いてヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会に諮るために厚生労働省へ書類を提出した。これ

についても、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。

また本研究は東京大学で採取した組織を大阪大学へ輸送し、大阪大学で調製した細胞シートを東京大学へ輸送するステップが含まれることから、大阪大学から東京大学への培養口腔粘膜上皮細胞シートの空輸試験を行った。

（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した。

### C. 研究結果

本学の倫理審査委員会の承認を得たため、厚生労働省に対し「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」への適合性について審査に諮るため、書類提出を行った。必要とされる書類の中には細胞輸送に係わる標準手順書も含まれ、それらについて手順を共同研究者と議論した。

培養ヒト口腔粘膜上皮細胞シートを用いて、大阪大学と東京大学の間で空輸試験を行った。輸送容器は大阪大学と共同研究によって作成したものを、輸送液は HBSS を用いた。

まず輸送中の輸送容器内外の温度および圧変化であるが、容器外の温度変化に関わらず、輸送容器内は安定して 34°C 以上の温度を保持していた。また気圧変化についても上空で気圧低下に関わらず、輸送容器内の気圧は輸送期間全体を通して 1000hPa 以上を維持していた。

次に輸送前後において細胞シートの評価を行った。まず位相差顕微鏡によって輸送前後の細胞シートに含まれる細胞の形態を評価したところ、輸送の前後において細胞形態に変化がないことが確認できた。さらに 20°C 30 分の低温処理によって輸送前および後の細胞シートはシート状の剥離が可能であった。細胞シート中の生細胞率をトリパンプルーを用いて計測したところ、輸送前が 86.0%、輸送後が 94.7% であった。またシートに含まれる総細胞数は輸送前が  $9.3 \times 10^5$ 、輸送後が  $1.5 \times 10^6$  であった。

HE 染色では 2~3 層に重層化した細胞シートであることが確認できた。免疫染色での評価では、輸送前後の細胞で K3/76 (分化マーカー)、p63 (幹細胞マーカー)、ZO-1 (タイトジャンクション関連蛋白)、MUC16 (眼表面特異的膜貫通型ムチン) の発現のパターンは同様であった。

以上の結果より、大阪大学と東京大学の間で航空機を用いて細胞シートの輸送が可能であると考えられた。

### D. 考察

昨年度までに用意した臨床プロトコール等の必要書類に加えて、ヒト幹細胞指針への提出書類および輸送に関連した標準手順書の作成をすすめた。また、輸送技術の開発を行った。

### E. 結論

本年度は学内倫理審査委員会において本研究の承認を得、次の手順として厚生労働省へヒト幹細胞指針への適合性を審査に諮るため書類を提出した。また、細胞シート輸送技術の開発を行った。今後は、ヒト幹指針への適合性について承認を得たうえで、臨床研究を開始する予定である。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Hayashida A, Amano S, Park PW. Syndecan-1 promotes Staphylococcus aureus corneal infection by counteracting neutrophil-mediated host defense. *J Biol Chem* 286:3288-3297, 2011
- 2) Tomlinson A, Bron AJ, Korb DR, Amano S, Paugh JR, Pearce EI, Yee R, Yokoi N, Arita R, Dogru M. The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the diagnosis subcommittee. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:2006-2049, 2011
- 3) Higa A, Sakai H, Sawaguchi S, Iwase A, Tomidokoro A, Amano S, Araie M. Prevalence and risk factors for cornea guttata in a population-based study in a southwestern island of Japan. *The*

Kumejima study. Arch Ophthalmol  
129:332-336, 2011

- 4) Mori Y, Miyai T, Kagaya F, Nagai N,  
Osakabe Y, Miyata K, Amano S.  
Intraoperative mydriasis by intracameral  
injection of mydriatic eye drops: in vivo  
efficacy and in vitro safety studies. Clin  
Experiment Ophthalmol 39:456-461, 2011
- 5) Usui T, Tomidokoro A, Mishima K, Mataka  
N, Mayama C, Honda N, Amano S, Araie M.  
Identification of Schlemm's canal and its  
surrounding tissues by anterior segment  
fourier domain optical coherence  
tomography. Invest Ophthalmol Vis Sci  
52:6934-6939, 2011
- 6) Hatou S, Shimmura S, Shimazaki J, Usui  
T, Amano S, Yokogawa H, Kobayashi A,  
Zheng X, Shiraishi A, Ohashi Y, Inatomi T,  
Tsubota K. Mathematical projection model  
of visual loss due to fuchs corneal dystrophy.  
Invest Ophthalmol Vis Sci 52:7888-7893,  
2011

## 2. 学会発表

- 1) 島 伸之、木本 美和、山口 昌大、天野 史  
郎、山上 聡. アスコルビン酸-2 リン酸  
(Asc-2P) を用いたヒト角膜内皮細胞の培養.  
角膜カンファレンス 2012. 2012年2月
- 2) 横尾 誠一、高田 哲生、山上 聡、原口 和  
敏、天野 史郎. 無血清・無フィーダー培養に  
対応した新規温度応答性培養皿による角膜上  
皮シート. 角膜カンファレンス 2012. 2012  
年2月
- 3) 愛新覚羅 維、三村 達哉、臼井 智彦、山  
上 聡、天野 史郎. 両眼性角膜輪部上皮機能

不全に対する自家培養結膜上皮シート移植の  
1 症例. 角膜カンファレンス 2012. 2012年2  
月

## 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

## 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

研究分担者 前田 直之 大阪大学

### 研究要旨

自家培養口腔粘膜上皮細胞シート移植は、これまでに極めて難治であり治療が困難であった難治性角結膜疾患に対する新規治療法として報告され、良好な治療成績を収めている。本研究においては、この治療法による多施設共同臨床試験を行って、その有効性、安全性についてさらなる評価を行うこととする。3年計画の3年目に当たる本年度は、ヒト幹細胞指針への適合性について厚生労働大臣より承認を得たうえで、本学において臨床研究を開始し、良好な治療成績を得ている。また細胞シート輸送技術の開発を行い、航空機による細胞シートの輸送が可能となった。

#### A. 研究目的

アルカリ腐蝕、Stevens-Johnson 症候群、眼類天疱瘡などの難治性角結膜疾患に対して、これまで有効な治療法がなかった。献眼による角膜移植のみが行われてきたが、拒絶反応のため長期予後は極めて不良であることが知られている。この疾患に対しては自家培養口腔粘膜上皮細胞シート移植が行われ、良好な長期予後が報告されている。本研究においては、この治療の多施設共同臨床試験を行い、培養口腔粘膜上皮シート移植の有効性と安全性について、さらなる検証を行うことを目的とする。

#### B. 研究方法

昨年度までに、本研究の臨床プロトコールの作成を西田、大橋、天野、山口、嶋澤と行った。これは Primary endpoint, secondary endpoint、予想される有害事象などの項目を含むものである。

本年度はヒト幹細胞指針への適合性について厚生労働大臣より承認を得たうえで、臨床研究を開始した。本学においては2名の患者から研究参加への同意を得た。

また細胞シートを培養機関から、実施機関へと輸送する必要があることから、輸送装置についての開発も行い、東北大学との間で細胞シートの輸送研究を行った。

（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