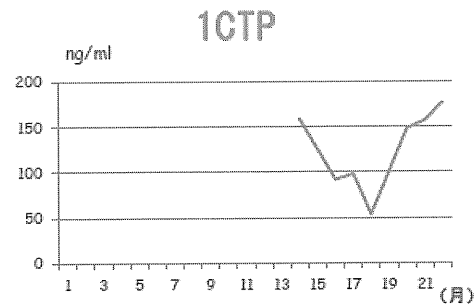
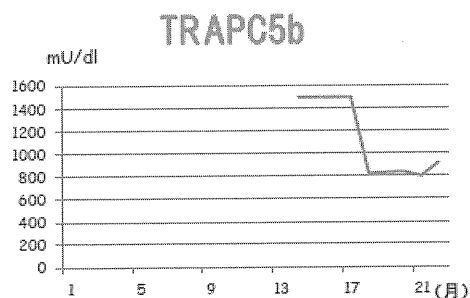
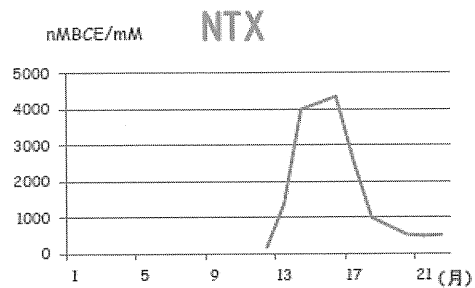
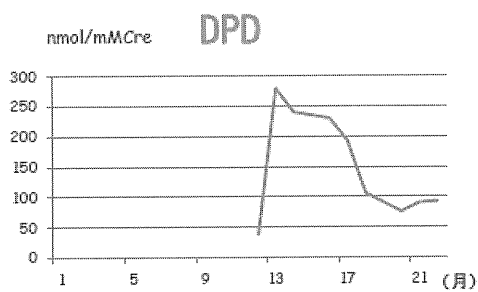


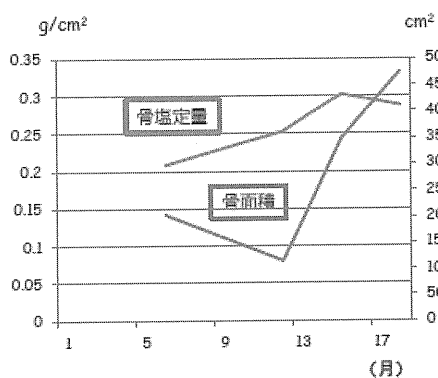
骨吸収マーカー



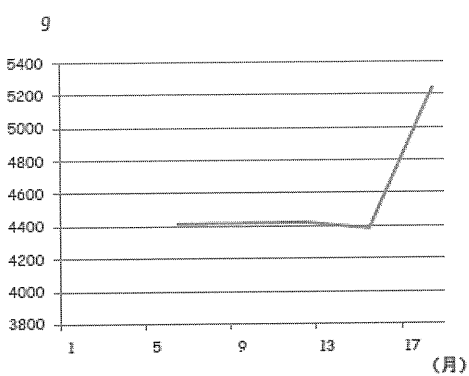
21

骨塩定量・筋肉量

骨塩定量・骨面積

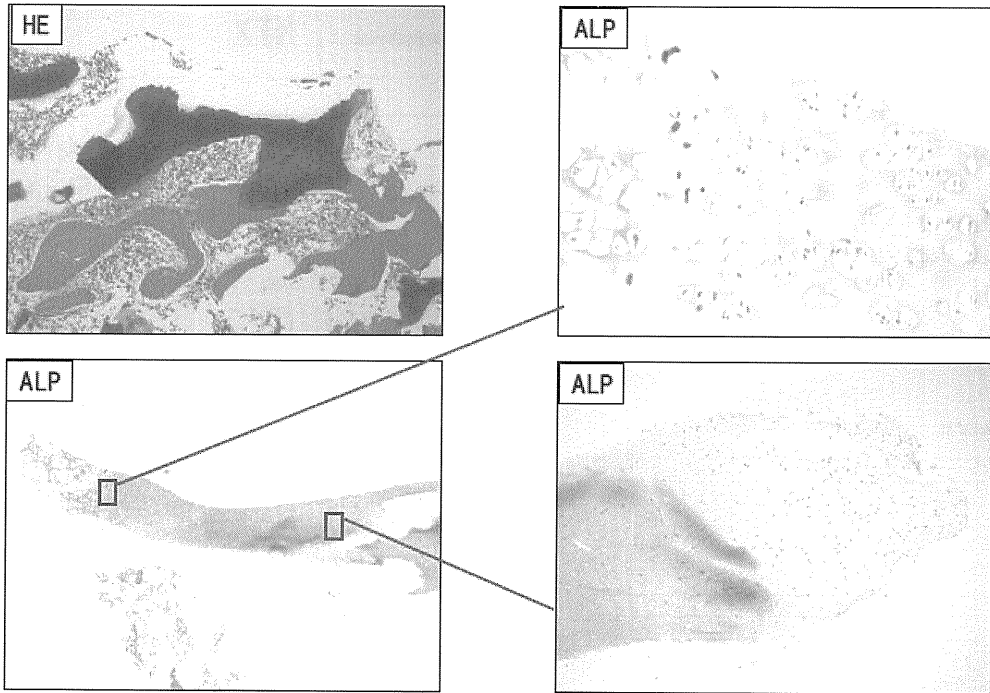


筋肉量



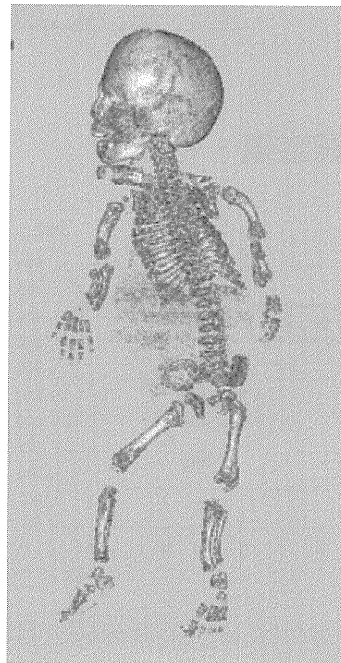
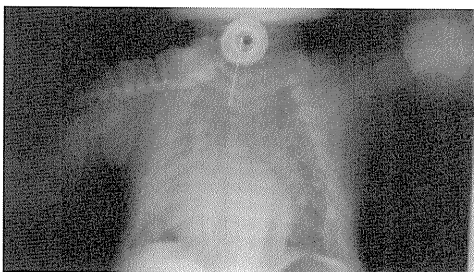
22

病理



2歳0 か月現在

人工呼吸器管理中
頸定土、寝返りOK
身長 73cm、体重 7.6kg
骨塩定量 0.287 g/cm²



これまでの臨床研究のまとめ

		症例 1	症例 2
移植回数	BM	1	1
	MSC	5	7
ドナーの生着	骨髄	10%	100%
	MSC	+(3歳5か月)	+(1歳9か月)
Primary endpoint			
3年生存率		clear	2歳まで生存
Secondary endpoints			
臨床症状	呼吸機能	改善（呼吸器離脱可）	改善
	発育発達	歩行訓練	頸定、寝返り
	難聴		回復
骨の石灰化の評価	画像検査		改善
	骨型ALP	変化なし	上昇
	病理所見	石灰化の改善およびALP陽性細胞を認める	
重得な有害事象	BMT	甲状腺機能低下症	急性GVHD
	MSCT	なし	なし

平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

分担研究報告書

重症低ホスファターゼ症に対する骨髄移植併用同種間葉系幹細胞移植

- インフォームドコンセントおよび外部評価委員会 -

研究分担者 山口清次（島根大学医学部小児科・教授）

研究要旨

昨年同様、致死的で治療法のない、重症低ホスファターゼ症に対して、当該臨床研究を正確に理解して頂いた上で同意してもらうために、複数回説明し、かつ、同じ病気の疾患を持つご家族との話し合いの場を設けることにより、ご家族が臨床研究への参加を適切に判断できていると思われた。また、当該研究を適切かつ順調に遂行するために外部評価委員会を開催した結果、昨年指摘を受けた目的と評価に関しては改善点がみられるものの、間葉系幹細胞移植の投与方法ならびに培養した間葉系幹細胞の細胞特性、骨以外の症状への効果などについての指摘を受け、今後の臨床研究および細胞治療の向上に関わる基礎研究を遂行できると思われた。さらに、臨床研究に参加して頂いた家族にアンケート調査を行ったところ、患者の目線からこの臨床研究を評価されることによって、真の意味で目指すべき当該臨床研究の目標が明らかとなった。

研究協力者

	杉本利嗣（島根大学医学部内科第一・教授）
	鈴宮淳司（島根大学医学部附属病院腫瘍センター・教授）
大藪恵一（大阪大学大学院医学系研究科内科系	一・教授）
臨床医学専攻情報統合医学小児科学・教授）	服部耕治（甲南女子大学看護リハビリテーション学部理学療法学科・教授）
加藤俊一（東海大学医学部基盤診療学系再生医	
療科学・教授）	室月淳（宮城県立こども病院産科・部長）

矢田昭子（島根大学医学部看護学科臨床看護学
講座小児看護学・准教授）

竹谷健（島根大学医学部附属病院輸血部・講師）

A. 研究目的

致死的で治療法のない先天性疾患は、それぞれの疾患単位では頻度は少ないが、その病気を持った患者およびその家族だけでなく、医療従事者の医療的、経済的および心理的な負担は計り知れない。重症低ホスファターゼ症も、現時点では確立した治療法がなく、致死的な経過をとる疾患である。この病気に対して、我々は当該臨床研究を行っている。この臨床研究も確立した治療ではないが、インフォームドコンセントの対応によっては、患者および家族に過度の期待を与えたり、不必要な負担をかけることが予想される。したがって、患者および家族が、この臨床研究を出来る限り正確に理解して頂いた上で同意してもらうために、下記の方法でインフォームドコンセントを行った。

当該臨床研究は、確立した治療ではないため、小児医療、整形外科医療、移植医療、骨代謝、再生医療、周産期医療、致死性疾患に対する臨床研究および倫理的配慮などの多岐にわたる分野において、それぞれの専門性が求められる。当該臨床研究を進めるにあたり、それぞ

れの担当者を配置して体制を整えている。しかし、各専門に対する知識および対応に関しては、我々の体制だけでは十分とは言えない。したがって、それぞれの分野の専門家から当該臨床研究をより適切に行うことができるよう指導を受けるために、外部評価委員会を開催した。

さらに、臨床研究を行っていく過程で、治療を受けた患者さんおよびご家族が抱く、病気の理解、治療への期待度と問題点を共有することにより、さらなる臨床研究の発展が望まれる。したがって、本治療を受けたあるいは受けている患者さんのご家族の病気の理解度、この臨床研究に望むこと、問題点などを明らかにするためにアンケート調査を行った。

B. 研究方法

1. 臨床研究のインフォームドコンセント

まず、本疾患であることが判明し、当該臨床研究について参加の意思がある、あるいは内容を聞きたい旨の連絡があった場合、ホームページ

(<http://www.med.shimane-u.ac.jp/pediatrics/2-2/2-2.html>) からダウンロードして頂いた当該臨床研究の計画書ならびに患者説明書を、ご両親および担当の医療従事者に内容を確認頂く。内容を確認後、詳細な当該臨床研究の説明

を希望された場合、患者さんの入院しておられる医療機関に出向いて、ご家族および医療従事者に直接説明をさせて頂く。その際、患者さんへの治療の説明だけでなく、この時点では不明であるが骨髄提供者に対する説明も行う。この説明の後、ご家族から参加の意思がある場合、患者さんが治療開始基準を満たしており、入院中の医療機関から島根大学医学部附属病院まで移動することが可能なことを確認した後、ご家族に島根大学医学部附属病院までお越し頂き、当該臨床研究について説明させて頂く。さらに、この治療を受けている、あるいは受けた患者さんおよびご家族の同意が得られた場合、医療従事者がいない状態でご家族同士の話し合いの場を設ける。これらの段階を踏んだ上で、当該臨床研究への参加の同意を確認した。また、実際に骨髄移植を行う前に、再度説明して同意を確認した。なお、同意が得られ治療を開始した後、間葉系幹細胞を移植することに説明を行い、同意を得ることとした。

2. 外部評価委員会

当該臨床研究を適切かつ順調に遂行するために、また、重篤な有害事象や予期せぬトラブルが生じた場合ご助言を頂くために、それぞれの専門分野の第一人者に外部評価委員にな

って頂き、年度末に外部評価委員会を開催し、これまでの臨床研究の遂行状況を説明して、ご助言、ご指摘を頂き、その上で次年度への当該臨床研究へ活かすこととした。外部評価委員（専門分野）として、大藪恵一先生（小児医療、低ホスファターゼ症および骨代謝）、加藤俊一先生（小児医療および移植医療）、杉本利嗣先生（骨代謝）、鈴宮淳司先生（移植医療および臨床研究）、服部耕治先生（再生医療および整形外科医療）、室月淳先生（周産期医療）、矢田昭子先生（小児致死性疾患に対する倫理）、計7名の先生方に就任して頂いた。今年度はその分野の専門的な先生方からご指導・ご助言をいただくために、各外部評価委員会の先生方の施設あるいは研究班、医療チームの先生方、スタッフも参加していただき、それぞれの専門的な観点からご教示頂いた。

3. アンケート調査

これまで臨床研究に参加して頂いた2名の患者さんのご家族（述べ5名）にアンケート調査（資料1）を無記名で行った。具体的な質問項目として、低ホスファターゼ症の印象、臨床研究を受けた理由、臨床研究の利点と問題点、この治療を継続する不安などである。

(倫理面への配慮)

当該臨床研究は、臨床研究に関する倫理指針に従い、島根大学医の倫理委員会の承認を得た後行っている。

C. 研究結果

1. 臨床研究のインフォームドコンセント

これまで述べ 10 例の患者さんのご家族へインフォームドコンセントを行った。現時点で、臨床研究に参加、不参加、検討中がそれぞれ、2 例、4 例、4 例である。不参加あるいは検討中の 8 例中 6 例が治療開始基準を満たせなかったり、状態が不安定であった。臨床研究を開始している 2 例については、骨髄移植を 1 回、間葉系幹細胞移植を複数回 (5 回および 8 回) 行っている。そのたびに臨床研究の説明を行い、同意を得た後、治療を行っている。なお、説明の際、ご家族からの質問が多かった内容として、治療の効果のゴールおよび間葉系幹細胞移植を行う回数であった。

2. 外部評価委員会

外部評価委員会は 6 回行った (宮城県立こども病院、大阪大学、東海大学、甲南女子大学、島根大学 2 回)。当該臨床研究の概要および今年度の成果報告についての資料を作成して、外

部評価委員会でその資料を用いて説明した後、外部評価委員からの質問、意見を頂き、それぞれに対する対応を明らかにした。

1) 昨年度の指摘された点について

①臨床研究の目的および評価が不明瞭

本臨床研究の主目的として、低酸素性脳障害を合併せずに 3 年間生存することとした。また、副目的として、臨床症状の改善度 (呼吸機能、発育・発達、身長体重、四肢の長さなど)、骨の石灰化 (血液検査、レントゲン、骨塩定量など) の改善度、有害事象の評価とした。副目的である、骨の石灰化の評価の生化学的評価に関して、ALP、骨型 ALP だけでなく、骨形成マーカー (オステオカルシン、PINP など)、骨吸収マーカー (NTX、デオキシピリノジンなど) を測定することとした。目的および評価方法を具体的に明示したことは一定の評価を受け、外部評価委員の先生方からこの臨床研究の改善点により突っ込んだご意見が頂けた。

②症状が改善している客観的データがない

キメリズム解析を造血細胞だけでなく間葉系幹細胞についても行うこととした。また、骨の石灰化の評価を経時的に多くの方法 (レントゲン、CT、骨塩定量、病理標本) で行った。さらに、ドナーの細胞の生着の評価として、骨生検の ALP 染色を追加すること、異性間 FISH

などでドナー細胞を検出することなどを検討した。その結果、臨床症状だけでなく石灰化の改善が明らかとなっただけでなく、ドナーの細胞が生着していることが証明できたことから、ドナーの細胞が上記の改善に関与していることが明らかとなった。

③細胞治療の改善する方法が必要

骨への直接的な間葉系幹細胞あるいは骨芽細胞の投与、骨髄移植をせずに間葉系幹細胞のみの投与、胎児への細胞治療についての可能性について、間葉系幹細胞が骨への homing する効率を上げる方法および間葉系幹細胞が骨芽細胞に分化を促進する方法について検討した。その結果、特に間葉系幹細胞を骨芽細胞に分化させる薬剤を特定することができ、現在、再現性を評価している。

④間葉系幹細胞の再投与の基準が不明確

2～4 カ月で臨床的および骨の石灰化の評価（上述した副目的）が改善しない場合、間葉系幹細胞を再投与することとしたところ、再投与がより客観的に行うことができるようになった。

⑤同胞がドナーになった時の対応

臨床研究実施計画書に同胞がドナーになった時に対応を明示した。今年度は同胞がドナーになることはなかったため、その対応を行うこ

とはなかった。

2) 今年度に指摘された点およびそれに対する改善点

①胎児治療への取り組み

出生時には病態が完成しており、その時点で治療しても手遅れになることがあること、免疫原性が低いために移植した細胞が生着しやすいこと、卵円孔が開存していることから移植した間葉系幹細胞が肺にトラップされずに骨へ移行する割合が増える可能性が高いことなどから、胎児治療への取り組みについて指摘があった。

→治療を早期に行った方が良いので胎児治療も念頭におく必要があるが、妊娠早期から免疫原性が認められること、細胞治療の効果が得られるためにはある程度の妊娠期間を有する必要があるため、大動物のモデルを作成する必要があることなどから、今後の検討課題ではあるが本事業中に取り組むには課題が多いと思われる。

②骨髄移植の効果

骨髄の中にも間葉系幹細胞が存在するため、骨髄移植だけでの治療効果と判断できないのかというご意見があった。

→骨髄移植だけでは間葉系幹細胞が患者由来のみであることから、間葉系幹細胞移植は必

須と思われる。

③間葉系幹細胞移植

間葉系幹細胞移植の複数回移植の必要性和投与方法（骨髄内投与）、ドナー細胞が長期間生着（生存）の評価を行うことの重要性、間葉系幹細胞移植の有害事象についてご指摘があった。

→間葉系幹細胞を静脈内投与した場合、骨への遊走能が悪いため、複数回移植することで骨髄へ homing する細胞数を増やすことを行っているが、骨髄への直接投与も検討する必要がある。

しかし、病初期は骨が脆弱なため手技的に骨髄への細胞投与は困難であり、静脈内投与で骨の石灰化を改善した後骨髄内への直接投与が望ましいと思われたため、今後の臨床研究の経過をみながら、投与方法の見直しを行うこととした。また、培養した間葉系幹細胞の細胞特性の向上も引き続き検討していくこととした。文献上は、同種間葉系幹細胞の生存期間は最大 6 ヶ月で、通常 1~2 ヶ月で消失するため、同じドナーからの骨髄移植を併用することによりドナー細胞が長期間生存することを期待できる。今後、定期的にキメリズム解析を行い、ドナー細胞の生存を確認することとした。また、間葉系幹細胞の有害事象はこれまでは認めていないが、移植回数を増やすことで明らかになる可

能性があるため、今後も注意深く follow していくこととした。

同種間葉系幹細胞移植より、正常な ALP 遺伝子を挿入した自家の間葉系幹細胞移植の可能性についてご意見があった。

→正常な ALP 遺伝子を導入した患者の間葉系幹細胞をラットに移植して、骨が再生することを明らかにしている（Katsube Y, et al. Gene Ther, 2010）ため、同種間葉系幹細胞移植の効果と問題点を明らかにして、遺伝子改変細胞治療について検討することとした。

④疾患に関して

骨の石灰化以外の他の症状（特に、肺と中枢神経系）とこの疾患の関連について

→骨だけではなく中枢神経や肺にも ALP が発現していること、疫学調査で骨以外の症状を認める患者が多いことから、ALP 活性が低いことにより直接的あるいは間接的に呼吸や中枢神経の障害をもたらしていると思われる。したがって、患者由来の iPS 細胞を樹立して骨以外の組織に分化させて、それぞれの機能をみることで明らかにすることとした。

血清 ALP が上昇していないがオステオカルシンは上昇しており、骨の石灰化が改善している矛盾についての指摘があった。

→間葉系幹細胞が骨髄の中で生着しているが、

その数が非常に少ないため、局所（骨）での石灰化の改善には寄与しているが、血清 ALP が上昇する値まで ALP を産生する細胞が生着していないと考えている。また、血清中のオステオカルシンは上昇しており、骨芽細胞が増えている可能性はあるが、組織学的に ALP 陽性骨芽細胞が少ないことは矛盾した結果である。さらに、この疾患は同じ遺伝子変異を有する重症型でも骨の石灰化の程度にかなりばらつきがあるため、ALP 以外にも骨の石灰化を規定する因子が存在することが示唆される。したがって、患者、保因者、健康人の間葉系幹細胞および骨芽細胞の詳細な解析を継続して行い、骨の石灰化の機序を検討していくこととした。

筋骨関連という考えがあるが、逆に骨が石灰化して二次的に筋肉が増強する以外に、骨が産生する何らかの因子が筋肉の発達を促している可能性についてご意見があった。

→このご指摘について全く検討していなかったため、骨が筋肉の発達を促進する因子があるのか、骨芽細胞と筋細胞を同時に培養して検討することとした。

⑤ドナーの負担

現在の臨床研究では、間葉系幹細胞を移植するごとにドナーから骨髄を採取することになっているが、凍結した間葉系幹細胞を用いる可

能性についてご指摘があった。

→凍結した間葉系幹細胞の機能について、十分にエビデンスを積み重ねているため、今後の臨床研究に導入していくこととした。

3. アンケート調査

1) 病名を告知された時

・初めて聞く病名で、重症と言われ頭が真っ白になった。

2) 臨床研究に参加された理由

・少しでも先があるならと思い決意した。この治療を受けることによって後々同じ疾患の親や子ども達に少しでも希望がもてるよう、治療法が確立できればと思った。

・命を失うことはありえず、可能性として生きることができるにはこれしかないと思ったから。

3) 治療を受けて良かった点

・呼吸が楽になった。
・笑顔が見れる。家に帰ることができた。
・移植をする度に目に見えて手足が伸び肋骨が大きくなり健康な子どもに近づいている。
・通常の子どもの育てるよりも一つ一つの事が感動に満ちあふれている。

4) 治療を受けて悪かった点

・骨髄移植の合併症（GVHD など）、原病の合

併症（けいれん、気道閉塞など）、薬の副作用がなかった。

- ・脳症を回避できなかった。
- ・長期の入院で付き添いをするため家族全員が我慢を強いられる。
- ・自宅から遠い。

5) 今後の治療

期待すること

- ・普通の子どものような暮らしができるようになってほしい。
- ・不自由なく生きていけるようになってほしい。
- ・難病指定される

不安なこと

- ・いつまで治療が続くのか。
- ・身体は本当に大きくなるのか。呼吸器ははずせるのか。
- ・どれくらい生きられるのか。

6) この治療を他の患者さんに勧めることができるか

回答者（5名） Yes 5名 No 0名

理由

- ・治療を受けて状態が良くなったから。
- ・子どもの将来に希望が持てるから。
- ・治療を受けて現在とても幸せだから。
- ・他に治療法がないから。

D. 考察

1. 臨床研究のインフォームドコンセント

これまで 10 例に説明して、インフォームドコンセントを行った。我々が説明を行うに当たって、特に目的、効果、危険性について複数回説明することにより、また、臨床研究を行っている家族との話し合いの場を設けることにより、臨床研究に参加するかどうかを適切に判断する時の一助になっていると思われる。しかし、骨髄移植の危険性、どこまで改善するのか、間葉系幹細胞移植を行う回数についての質問について、今後の臨床研究のデータも加味して、説明していく予定である。

2. 外部評価委員会

当該臨床研究を適切かつ順調に遂行するために、外部評価委員会を開催して、各専門分野の先生方からご助言を頂いた。我々の計画を大きく変更する指摘はなかったが、胎児治療の可能性、間葉系幹細胞移植の投与方法と有害事象、骨の石灰化およびそれ以外の症状の機序、凍結した間葉系幹細胞を移植に利用することについての指摘があり、これらに関して、上述した対応を取ることとした。その結果、来年度の臨床研究が、来年度よりも科学的根拠に基づいた臨床研究を行うことができ、今後の細胞治療の

向上に関わる基礎研究が遂行できると思われた。

3. アンケート調査

当該臨床研究を受けた当事者のご家族にアンケート調査を行うことによって、治療を受けた側からこの治療についての評価を頂いた。一定の評価をいただいたが、この臨床研究の目標が3年生存率であるが、元気で健康な子どもの状態まで改善したい思いが強いことが改めてわかった。したがって、臨床研究が終了しても、継続的に真摯に follow up していく体制を構築する必要があると思われた。

E. 結論

致死的で治療法のない先天性疾患の治療研究を行う際のインフォームドコンセントの対応について、今後も症例数を重ねてことで家族により則した、適切な判断ができる説明を行うことができることが示唆された。

臨床研究が始まった後でも、他分野に関わる臨床研究においては、外部評価委員会を行うことで、さらに適切にかつ科学的根拠に基づいた臨床研究が行うことができると思われた。

アンケート調査をすることで、患者の目線か

らこの臨床研究を評価されることによって、真の意味で目指すべき当該臨床研究の目標が明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許所得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

資料1

家族へのアンケート調査

平成 24 年 11 月 1 日

文責 竹谷 杉原 藤原 山口

低フォスタファーゼ症の治療は確立していません。現在骨髄移植併用同種間葉系幹細胞移植を受けていただいておりますが、今後さらなるより良い治療を行うにあたりアンケートへのご協力をお願いいたします。

1. 低フォスタファーゼ症と告知を受けた際、病気に対する印象、その時のお気持ちをお聞かせ下さい。(間葉系幹細胞移植による治療を知る前)

2. 間葉系幹細胞移植による治療を受ようと思った理由をお聞かせ下さい。

3. 実際に間葉系幹細胞移植を受けて良かった点、悪かった点をお聞かせ下さい。

・良かった点

・悪かった点

4. この治療を継続していくにあたり、今後治療に期待すること、不安なことをお聞かせ下さい。

・期待すること

- ・不安なこと

5. 同じ疾患の他患者様がおられた際、この治療法を勧めることができますか。

はい ・ いいえ

- ・ その理由をお聞かせ下さい。

ご協力ありがとうございました。

重症低ホスファターゼ症に対する骨髄移植併用同種間葉系幹細胞移植

- 間葉系幹細胞培養増殖 -

研究分担者 弓場俊輔(産業技術総合研究所健康工学研究部門研究グループ長)

研究要旨

同種間葉系幹細胞(MSC)の培養増殖をセルプロセッシングセンターにて行い、品質を保証した細胞を低ホスファターゼ症患者に対する移植用として供給した。

A. 研究目的

低ホスファターゼ症患者は骨を作るのに必要なALPが生まれつき正常に働かないことにより、骨を作ることが障害される遺伝性疾患である。本計画では骨形成障害を改善するために、同種MSCを患者に移植して骨形成能を付与することにある。そこで、分担研究者、弓場は同種MSCをセルプロセッシングセンターにて培養し、品質を保証した細胞を代表研究者に供給することで臨床研究を遂行する。

B. 研究方法（詳細は、資料1）

島根大学で採取された骨髄を産総研に搬送し、セルプロセッシングセンターで骨髄由来間葉系細胞の培養を行った。搬送中は10～30℃を保つようにした。培養は20μg/mL硫酸ゲンタマイシンと15%牛胎児血清を含んでいる液体培地(α-MEM)に採取した骨髄を混和し、培養容器を用いて炭酸ガス培養器(5%CO₂、37℃)内で行った。移植に必要な細胞数を得るために、培養容器底面に接着し増

殖した間葉系細胞をプロテアーゼを用いて培養容器より剥がし、新たな培養容器で継代培養（2次培養）した。培養期間および継代回数は安全性を考え、1ヶ月以内で継代回数3回（4次培養）までとした。移植当日に間葉系幹細胞を剥離し、10mLのPBSに浮遊させた状態で島根大学へ搬送した。また移植細胞の安全性は、まず骨髄採取に先立ちドナーのウイルス試験を行い、培養中の無菌試験、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験で確認した。

（倫理面への配慮）

移植・骨髄採取のたびに島根大にて患者・ドナーへの説明を行い、同意を得た上で行った。

C. 研究結果

2例の患者に対する間葉系幹細胞移植用の細胞培養を行った(症例1:1回、症例2:3回(H25年1月末現在))。(図1) 20~35mLの骨髄を2~3週間かけて培養

し、何れの場合も体重(kg)あたり 1×10^6 細胞以上、細胞生存率80%以上という規定の細胞を調製できた。無菌試験、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験等の安全性試験結果はすべて異常なかった。骨髄および間葉系幹細胞の搬送も規定の温度を保って搬送でき、問題は起こらなかった。なお、搬送はすべて航空機を利用して行った。また培養した間葉系幹細胞は、骨分化能を有していることが確認できた。

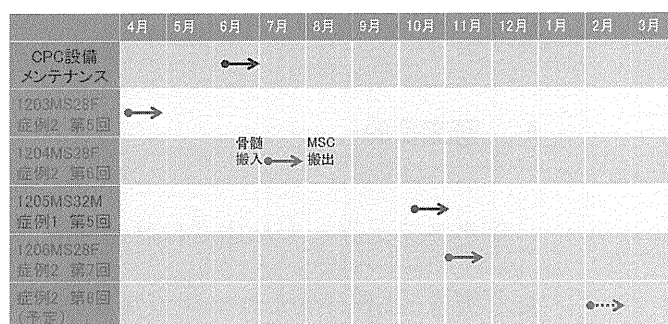


図1. 平成24年度 培養スケジュール

D. 考察

計4回、移植用間葉系幹細胞の培養を行ったが、有害事象は発生しなかった。培養した間葉系幹細胞は骨分化能を有し

ており、患者の骨の石灰化が改善していることから、移植細胞が臨床症状の改善に寄与している可能性が示された。

現在のところ細胞の搬送は陸路または空路で行っている。空路の場合は通常 X 線検査を受けなければならないが、昨年度航空会社に申請し、国土交通省から特別に許可を得た上で X 線検査なしでの搬送を行っている。ただし搭乗毎に申請が必要で、許可が下りるまで約 10 日を要する。さらに搭乗便も指定されるため、次便に変更することさえ不可能であり、急な予定変更に対応出来ない。今後、医療界全体で細胞等の航空機搬送の枠組みが必要であると考えられる。

E. 結論

安全性が担保された移植用間葉系幹細胞を計4回、島根大学へ供出できた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表：

1. Ohnishi H, Oda Y, Aoki T, Tadokoro M, Katsube Y, Ohgushi H, Hattori K, Yuba S. A comparative study of induced pluripotent stem cells generated from frozen, stocked bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. J Tissue Eng Regen Med 2012; 6:261-71.

2. Shimizu Y, Kihara T, Haghparast SM, Yuba S, Miyake J. Simple display system of mechanical properties of cells and their dispersion. PLoS One 2012; 7:e34305.

2. 学会発表：なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

資料 1

<骨髄提供者の細胞培養>

I : 依頼受付工程

1. 島根大学附属病院は骨髄提供者名を患者医療機関IDに変換し、産業技術総合研究所に培養を依頼する。
2. 産業技術総合研究所は、患者および骨髄提供者がインフォームドコンセントを受け、研究に同意している事を確認する。また、感染症検査の結果が陰性であること等を確認し、島根大学附属病院に受け入れの可否を連絡する。
3. 産業技術総合研究所では患者医療機関IDを更に症例IDに置き換え、当研究所内での作業には症例IDを用いる。

II : 運搬容器発送工程

1. 産業技術総合研究所は搬送専用のクーラーボックスを準備し島根大学附属病院に送る。
2. 清拭した搬送専用クーラーボックスに患者医療機関IDを記入し、以下の物品を入れておく。

- ・ 温度記録計
- ・ 50mLチューブで二重包装されたアシストチューブ入りヘパリン/PBS溶液
- ・ チューブラック
- ・ ヘパリンナトリウム注射液
- ・ 保冷剤

- 保冷剤は島根大学附属病院で骨髄採取当日まで凍結しておく。

III : 骨髄採取工程

1. 担当医師は搬送専用クーラーボックスを、島根大学附属病院の手術室や無菌室等の骨髓採取場所へ持ち込む。
2. 骨髓提供者の自家骨髓を所定のチューブに採取する。担当医師が必要に応じて、骨髓採取時にヘパリンナトリウム注射液を用いる。
3. あらかじめ凍結しておいた保冷剤を搬送専用のクーラーボックスに入れ、担当医師は産業技術総合研究所まで骨髓を搬送する。搬送中はクーラーボックス内の温度が10℃以上30℃未満で保たれるようにし、骨髓採取から12時間以内に産業技術総合研究所CPCに搬入するようにする。

IV:受入工程

1. 産業技術総合研究所の居室において、グループ長もしくは管理責任者が骨髓の状態等の確認をする。
 2. 産業技術総合研究所まで骨髓を搬送した担当医師は、骨髓採取時間や骨髓に関する報告を行う。
 3. 製造管理責任者は骨髓採取から12時間以内にCPCへ搬入できることを確認する。同様に温度記録計より搬送中、骨髓が10℃以上30℃未満に保たれていたことも確認する。
- 以降は産業技術総合研究所CPC細胞調製室での作業
 - 産業技術総合研究所CPC細胞調製室へは、決められた手順に従い入室する。
 - CPC細胞調製室に持ち込む試薬、消耗品についての情報、各工程の作業記録は製造指図記録書に記録する。

V:FBS(牛胎児血清)培地調製工程

FBS培地の調製

1. 分注し凍結保存されているFBSを骨髓採取日の前日にサプライ室薬品保冷库(冷凍)から必要本数取り出し細胞調製室薬品保冷库(冷蔵)に移し解凍する。
2. 硫酸ゲンタマイシン(40mg/mL)1mLをPBS7mLで希釈し5mg/mLの濃度に調製する。
3. α -MEM 500mLに解凍したFBS 88mLと希釈したゲンタマイシン2.4mLを添加する。
4. ボトルトップフィルター 150mL 0.22 μ mで吸引濾過する。

5. 同様の手順で必要量を調製する。
 6. 調製後のFBS培地を一部採取して持ち出し、無菌試験Aおよびエンドトキシン試験を行う。
- 培養に用いる FBS は牛海綿状脳症の発生していない地域原産で放射線照射処理されたものを使用する。

VI: 細胞培養工程 (1次培養)

(1) 骨髄の播種

1. 骨髄を採取したアシストチューブは4℃にて900rpm、10分間、遠心分離を行う。ただし、分離が悪ければ追加で遠心分離する。
2. 遠心分離後の骨髄は、下層から赤血球層、有核細胞層 (buffy coat)、血漿の3層に分離されるので確認する。
3. 注意深く血漿を吸引除去する。
4. 新しい50mLチューブに残った赤血球層と有核細胞層をプールする。
5. 骨髄を搬送してきたアシストチューブにPBSを添加して、無菌試験Aを行う。
6. 75cm²フラスコ当たりの分注量 (骨髄+培地) が15mLとなるように、FBS培地をプールした赤血球層と有核細胞層に追加する。
7. フラスコに症例ID、作業日、継代数を記載する。
8. フラスコに骨髄を播種する。
9. 37℃、CO₂濃度5%のインキュベータにフラスコを収納し培養する。

(2) 間葉系幹細胞の増殖

1. 目視にて培養フラスコを観察し、凝固・血餅塊の有無、血球成分の残り具合等を調べる。
2. 培養上清を吸引除去する。
3. FBS培地は13mL/Flaskで、出来るだけゆっくり注ぐ。培地量の不足が予想される場合、製造管理責任者と協議の上、10mL/Flaskとするなど調整する。
4. ×40、×100の位相差顕微鏡像をデジタルカメラで撮影しスマートメディアにJPEG形式で保存する。
5. 細胞増殖の状態、細胞集団の状態を適宜製造管理責任者に伝え、継代の時期等を含め