

201212025A

厚生労働科学研究費補助金  
医療機器開発推進研究事業（医療機器開発  
（ナノテクノロジー等）総合推進研究事業）

骨髄単核球を用いた細胞治療の一般普及を目指した  
簡便且つ細胞調製施設が不要な幹細胞分離デバイス  
の開発

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山原 研一

平成 25 (2013) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金  
医療機器開発推進研究事業（医療機器開発  
（ナノテクノロジー等）総合推進研究事業）

骨髄単核球を用いた細胞治療の一般普及を目指した  
簡便且つ細胞調製施設が不要な幹細胞分離デバイス  
の開発

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山原 研一

平成 25 (2013) 年 3 月

# 目 次

---

## I. 総括研究報告書

「骨髄単核球を用いた細胞治療の一般普及を目指した簡便且つ細胞調製施設が不要な幹細胞分離デバイスの開発」 山原 研一 .....	1
--	---

## II. 分担研究報告書

「簡便且つ細胞調製施設が不要な幹細胞分離デバイスの開発」 山原 研一 .....	9
「脳梗塞患者を対象にした自己骨髄単核球移植の第 1/2a 相臨床試験」 田口 明彦、長束 一行 .....	13
「幹細胞分離デバイスの医療機器としての早期認可推進に関する研究」 山本 晴子 .....	17
「幹細胞分離デバイスの事業化に向けた研究」 赤川 英毅、妙中 義之 .....	19

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	21
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....	25
-----------------------	----

# I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金医療機器開発推進研究事業  
(医療機器開発 (ナノテクノロジー等) 総合推進研究事業)

総括研究報告書

「骨髄単核球を用いた細胞治療の一般普及を目指した簡便且つ細胞調製施設が不要な  
幹細胞分離デバイスの開発」

研究代表者 名前 山原 研一 所属 国立循環器病研究センター

研究要旨：骨髄細胞移植をより一般的な医療とするために、セルプロセッシングセンター (CPC) が不要で低コストな、また一般の医療従事者でも操作が簡易な単核球分離デバイスの開発を目指した活動展開を行った。結果、①本デバイスの対象疾患候補である脳梗塞患者における骨髄単核球移植の臨床試験(phase I/IIa)において、その安全性を確認した、②単核球分離デバイス開発が国立循環器病研究センターにおいて早期・探索的臨床試験拠点の支援シーズに採択された、③単核球分離デバイス本体の周辺特許出願及び試作品作成を共同研究企業と共に行った、④医薬品ベースの単核球分離液の作成に成功した、⑤単核球分離デバイスの医療機器としての早期承認促進を目指し、PMDA 薬事戦略相談の対面助言を受けた。特に PMDA 対面助言をうけ、単核球分離デバイス開発の方向性がより明確なものとなり、今後のデバイス製品化に向けた活動をより活発に展開していきたい。

A. 研究目的

我々は、2001年より四肢虚血患者に対して自己骨髄単核球細胞を用いた細胞治療を行い、その著明な効果を明らかにし、2009年より厚生労働省ヒト幹細胞指針に基づく承認を経て、脳梗塞患者に対する自己骨髄単核球移植による臨床試験を実施した。また、同様の手法を用いた細胞治療は、心筋梗塞患者において有効であることが、欧米における二重盲検試験やメタアナリシスでも明らかにされているが、日本同様、セルプロセッシングセンター (CPC) 構築や煩雑手技の問題により、骨髄単核球移植による細胞治療は一般的な医療としては普及していないのが現状である。

そこで本研究では、このような問題点を

解消するため、安全かつ確実な、特殊な手技や知識を必要としない完全閉鎖系の単核球分離デバイスを開発し、普及させることをその目的とする。我々は、これまでに細胞治療実施のため、プロトコール作成・ヒト幹指針の承認・CPC 運用管理・インフォームドコンセント取得・CPC での細胞分離調整など、再生医療の実施に必要な不可欠な非常に多くの事項を経験・実践してきた。本デバイスの作成には、これら実際の臨床試験での経験や知識を全て反映させ、国立医薬品食品衛生研究所スーパー特区対応部門や薬事承認審査経験のある分担研究者と共同で、本デバイスの速やかな医療機器承認及び一般普及を目指す。

単核球分離装置に関しては、白血病患者

における骨髄移植(骨髄採取 500ml 以上)用の骨髄単核球分離装置が存在するが、目的や容量が異なり、心疾患や脳血管障害の治療(採取骨髄量 20-50ml)には使用することができない。本研究開発はスーパー特区における成果として、可及的速やかな本デバイスの製品化を目指し、今年度は、脳梗塞患者を対象とした自己骨髄単核球による細胞治療、提携企業と共同でデバイス本体や単核球分離液の開発、およびデバイスの早期医療機器承認を目指した PMDA との交渉を推進した。

## B. 研究方法

本年度は、単核球分離デバイス開発に向けた環境整備、試作品作成とその医療機器承認に向けた活動として下記のことを行った。

### ①脳梗塞患者を対象にした自己骨髄単核球移植の第1/2a相臨床試験

急性期重症心原性脳塞栓症患者を対象に自己骨髄単核球移植の第1/2a相臨床試験を、施設倫理委員会及びヒト幹指針に基づく厚生労働審議会の承認を受け、実施し、予定症例数のエントリーを終了した(田口ら)。

### ②単核球分離デバイス本体の周辺特許出願及び試作品作成

全ての医療従事者が取扱可能な、簡便・安全・確実な単核球分離デバイスの作成を目指し、周辺特許の出願、および、共同研究企業と共に試作品の仕様設計および作成を行った(山原、田口ら)。

### ③医薬品ベースの単核球分離液の作成

急性心筋梗塞患者に対する臨床試験で使用されている単核球分離液は、市販の Ficoll-Paque や Lymphoprep 等の比重遠心

分離液である。これらは GMP や ISO 準拠で製造されているが、医薬品として認可されたものではなく、工程において分離液を除去しなければならない。そこで、市販比重遠心分離液の組成を参考に造影剤をベースとした、分離液除去不要の、静脈内投与が認められている医薬品のみからなる比重遠心分離液の作成を目指した(山原ら)。

### ④単核球分離デバイスの医療機器としての早期承認促進を目指した研究

共同研究を行っている医療機器企業とともに試作した単核球分離デバイスについて、1) 医療機器のクラス分類の検討、2) 臨床評価の必要性の有無、3) 前記の2項目を踏まえた上で、臨床試験の実施の必要性および必要な場合はその計画について検討した。国立医薬品食品衛生機構や(財)医療機器センター等の専門家のアドバイスを頂きながら検討を重ね、医薬品医療機器総合機構(PMDA)の薬事戦略相談においてクラス分類等についての相談を行った(山本、山原ら)。

### ⑤PMDA との協議を踏まえた単核球分離デバイスの開発展開

上記の PMDA 薬事戦略相談事前面談を踏まえ、今後の単核球分離デバイス開発に関し、計画の練り直しを行った(山原、田口ら)。

### ⑥単核球分離デバイスの事業化に向けた研究

新しい治療コンセプトのデバイスは、既存あるいは後発となる医療機器に比して製品化までのロードマップを描くのが難しい。そこで、研究分担者が開発した医療機器に関する知的財産を評価する指標を本単核球分離デバイスに適用することによって、このデバイスについて知的財産の観点から価値・特徴を

把握するとともに、当該指標のブラッシュアップにつなげることを目的とした（赤川ら）。

### C. 研究結果

#### ①脳梗塞患者を対象にした自己骨髄単核球移植の第1/2a相臨床試験

平成24年度に予定していた12症例全てのエントリーが終了した。現在、それらのfollow upを実施中である。細胞治療症例における有害事象に関しては、1症例で脳梗塞再発が観察された。独立症例検討委員会（委員長：大阪大学医学部付属病院山本准教授）の判断では、細胞治療との因果関係は不明で、厚労省に報告後、症例のエントリーを再開した。有効性に関しては予想される予後より著明に改善した症例なども多数存在し、全症例の6か月後のFollow upが終了した時点で、統計家による最終解析を実施する予定である（田口ら）。

#### ②単核球分離デバイス本体の周辺特許出願及び試作品作成

単核球分離デバイス本体の周辺特許出願及び試作品作成を共同研究企業である大塚製薬工場と共に行った。具体的には、(1)汎用品を用いたデバイス試作品を基本特許（特願2010-175056号）に基づき作成し、目的とする単核球が採取できることを確認した（山原、田口ら）。

#### ③医薬品ベースの単核球分離液の作成

市販比重遠心分離液の組成を参考に造影剤をベースとした、静脈内投与が認められている医薬品のみからなる比重遠心分離液の作成を行った。作成した比重遠心分離液と臨床試験において最も使用されているFicoll-Paqueの両者を用い、市販ヒト骨髄

から単核球を分離し、得られた細胞数、死細胞割合、FACSによる表面抗原マーカー解析を行った。結果、構成される血球成分組成に差が見られたことから、細胞治療の際、医薬品ベースの単核球分離液では従来のFicoll-Paqueのデータとは異なる臨床試験結果が得られる可能性が示唆された（山原ら）

#### ④単核球分離デバイスの医療機器としての早期承認促進を目指した研究

本デバイス開発に関しては、国立循環器病研究センターにおいて、早期・探索的臨床試験拠点（医療機器／脳・心血管分野）の支援シーズに選ばれた。国立医薬品食品衛生機構のアドバイザーの指導を受けつつ、共同研究を行っている医療機器企業の意向も考慮に入れながらクラス分類について検討を行った。類似の効果を持つ医療機器の検討等から、クラスIIに該当すると考えられたため、その旨を確認することをPMDAの薬事戦略相談の主要目的として相談に赴いた。PMDAとは、クラスIIに該当するという点で意見の合致をみた。一方、当該デバイスを用いて分離された単核球を用いた脳梗塞の治療が有用な治療として確立しているとは言いがたいとの判断が示され、分離された単核球の臨床的有用性を何らかの形で検証する必要があるという見解がPMDAより示された。また、現在CPCで分離している単核球と、当該デバイスを用いて分離された単核球との性質の類似性も示される必要があるとのことであつた。また、当該デバイスに用いられる材質の生物学的安全性の説明が必要であることと、分離液の扱い（医療機器の付属品として扱うかどうか、等）の検討が必要であることも明らかとなった（山本ら）。

#### ⑤PMDAとの協議を踏まえた単核球分離デバ

## イスの開発展開

上記④に記載の PMDA との協議を踏まえ、解決可能な単核球分離デバイスを開発するため、新たな発想に基づくデバイスの作成を目指した。結果、新規特許を出願し(特願 2012-117511)、①従来の Ficoll-Paque を用い、②閉鎖系を維持しつつ、③ Ficoll-Paque を洗浄除去可能な、新たな発想に基づくデバイス作成を、新たな共同研究企業(カネカ)と共に開始した(山原、田口ら)

## ⑥単核球分離デバイスの事業化に向けた研究

開発を進めている本デバイスがどの状況に想定されるかを、研究分担者赤川らが開発した医療機器に関する知的財産を評価する指標に適用した。結果、特許性については、進歩性、発明の技術的性格において高い評価を得た。また、社会性については、治療効果、有用性、均てん化などについて評価が高いものとなった(赤川ら)。

## 考察

本年度は、単核球分離デバイス開発に向けた環境整備、試作品作成とその医療機器承認に向けた活動を展開した。我々が単核球分離デバイスを用いた治療目標としている脳梗塞症例において、自己骨髄単核球移植の安全性を確認し、将来のデバイスを用いた治療応用に道筋がついた。デバイス本体の開発は、共同研究企業と共に、周辺特許取得を含め精力的に行った。同時に、本デバイスの早期の医療機器承認を目指し、PMDA 薬事戦略相談に諮り、各種問題点の洗い出しを行った。PMDA との協議を早期から行ったことは、今後の本デバイス開発

に非常に有用であったと考えており、PMDA との対面助言では、(1)本デバイスの医療機器認可には臨床的有用性を示す必要性がある、(2)本デバイスのクラス分類はクラス II、(3)医薬品ベースの単核球分離液分離液を用いるには、既承認医薬品の新規適応取得をする必要がある、との指摘を受けた。そこで、これら指摘を解決可能な単核球分離デバイスを開発するため、新たな発想に基づくデバイス作成を考案した。結果、新規特許を出願すると共に、新たな企業パートナー(カネカ)と共同研究契約を結び、来年度以降の本研究にその新しい内容を反映させていくことにしている。

## E. 結論

本年度の活動により、特に PMDA 側との協議により、単核球分離デバイス開発の方向性がより明確となった。本研究にて開発された単核球分離デバイスを用いることで、①全国の全ての地域で、②全ての心筋梗塞患者および脳梗塞患者を対象に、③安全な最先端医療を、④低コストで、提供することが可能になると考えており、今後、分担研究者と共に精力的にデバイス開発を行っていきたい。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Tsuda H, Yamahara K, Otani K, Okumi M, Yazawa K, Kaimori JY, Taguchi A, Kangawa K, Ikeda T, Takahara S, Isaka Y. Transplantation of allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells protect against ischemia-reperfusion-induced acute kidney



- injury. *Cell Transplant*. 2013 *in press*.
2. Ohshima M, Yamahara K, Ishikane S, Harada K, Tsuda H, Otani K, Taguchi A, Miyazato M, Katsuragi S, Yoshimatsu J, Kodama M, Kangawa K, Ikeda T. Systemic transplantation of allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells suppresses Th1 and Th17 T cell responses in experimental autoimmune myocarditis. *J Mol Cell Cardiol*. 2012 Sep; 53(3):420-8.
  3. Kikuchi-Taura A, Taguchi A, Kanda T, Inoue T, Kasahara Y, Hirose H, Sato I, Matsuyama T, Nakagomi T, Yamahara K, Stern D, Ogawa H, Soma T. Human umbilical cord provides a significant source of unexpanded mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2012 Apr; 14(4):441-50.
  4. Nakagomi T, Molnár Z, Taguchi A, Nakano-Doi A, Lu S, Kasahara Y, Nakagomi N, Matsuyama T. Leptomeningeal-Derived Doublecortin-Expressing Cells in Poststroke Brain. *Stem Cells*. 2012;21(13):2350-4
  5. Tanaka H, Takafuji K, Taguchi A, Wiriyasermkul P, Ohgaki R, Nagamori S, Suh Pann-Ghill, Kanai Y. Linkage of N-cadherin to Multiple Cytoskeletal Elements Revealed by a Proteomic Approach in Hippocampal Neurons. *Neurochemistry International*. 2012;61(2):240-250
  6. Hirose H, Kato H, Kikuchi-Taura A, Soma T, Taguchi A. Mouse ES cells maintained in different pluripotency-promoting conditions differ in their neural differentiation propensity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*. 2012 ;48(3):143-8
  7. Takata M, Nakagomi T, Kashiwamura S, Nakano-Doi A, Saino O, Nakagomi N, Okamura H, Mimura O, Taguchi A, Matsuyama T. Glucocorticoid-induced TNF receptor-triggered T cells are key modulators for survival/death of neural stem/progenitor cells induced by ischemic stroke. *Cell Death Differ*. 2012;19(5):756-67
  8. Ohshima M, Tsuji M, Taguchi A, Kasahara T, Ikeda T. Cerebral blood flow during reperfusion predicts later brain damage in a mouse and a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Experimental Neurology*. 2012;233(1):481-9.
  9. Uemura M, Kasahara Y, Nagatsuka K, Taguchi A. Cell-based therapy to promote angiogenesis in the brain following ischemic damage. *Current Vascular Pharmacology*. 2012;10(3):285-8
  10. Kasahara Y, Nakagomi T, Matsuyama T, Stern D; Taguchi A. Cilostazol Reduces the Risk of Hemorrhagic Infarction after Administration of Tissue Plasminogen Activator in a Murine Stroke Model. *Stroke*. 2012; 43(2):499-506.
  11. Tsuji M, Taguchi A, Ohshima M, Kasahara Y, Ikeda T. Progesterone and allopregnanolone exacerbate hypoxic-ischemic brain injury in immature

- rats. *Experimental Neurology*. 2012;233(1):214-20
12. 田口 明彦. 認知症と AGE/RAGE 経路. *医学のあゆみ* 2012;244(8):671-673
  13. 田口 明彦. 脳卒中に対する再生医療の現状とその未来像. *Schneller*. 2012;82:13-15.
  14. 辻 雅弘、笠原 由紀子、田口 明彦. 脳血管障害患者に対する細胞治療とその将来. *老年医学の展望* 2012; in press
  15. 猪原 匡史、田口 明彦. 脳梗塞と体性幹細胞. *Bio Clinica*. 2012; 27:36-40.
  16. 猪原 匡史、田口 明彦.  $\beta$ -アミロイドの血管周囲リンパ排水路を介したクリアランス細胞工学. 2012;10:1113-18.
  17. 猪原 匡史、笠原 由紀子、田口 明彦. 細胞移植療法による神経機能回復 分子脳血管病. 2012;3:57-63.
  18. 上村昌寛、笠原 由紀子、猪原 匡史、田口 明彦. 血管再生を介したアルツハイマー型認知症治療の可能性. *Cardiovascular Frontier*. 2012;3:233-37
2. 学会発表（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）  
なし
1. K. Yamahara, M. Ohshima, K. Ishikane, K. Harada, H. Tsuda, K. Otani, A. Taguchi, M. Kodama, K. Kangawa, T. Ikeda. Systemic administration of allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells suppressed Th1 and Th17 T-cell immunity in experimental autoimmune myocarditis. *European Society of Cardiology Congress 2012. European Heart Journal ( 2012 ) 33 ( Abstract Supplement ), 431. 2012.8.27*
  2. Kenichi Yamahara, Makiko Ohshima, Ken Ishikane, Kazuhiko Harada, Hidetoshi Tsuda, Kentaro Otani, Makoto Kodama, Kenji Kangawa, and Tomoaki Ikeda. Systemic Administration of Allogenic Fetal Membrane-derived MSC Ameliorates Experimental Autoimmune Myocarditis via Suppression of Th1/Th17 Immunity. *American Heart Association 2012 Scientific Sessions. Circulation. 2012; 126:A18331. 2012.11.5*
  3. Taguchi A, Kasahara Y, Matsuyama T, Nagatsuka K. CELL-BASED THERAPY FOR PATIENTS AFTER CARDIOGENIC CEREBRAL EMBOLISM. *Heart & Brain Conference 2012.*
  4. Taguchi A, Kasahara Y, Matsuyama T, Nagatsuka K. ANTIPLATELET AGENTS DID NOT INCREASE THE RISK OF TISSUE PLASMINOGEN ACTIVATOR INDUCED CEREBRAL HEMORRHAGE IN A MURINE STROKE MODEL. *Heart & Brain Conference 2012.*
  5. E. Akagawa, T. Ohya, E. Tatsumi, H. Nakada, K. Ootou, K. Nishi, S. Hasegawa and Y. Taenaka, Development of guideline for evaluation of intellectual properties created in the study of medical devices, 20<sup>th</sup> Congress of the International Society for Rotary Blood Pumps (2012, 9, 20-22, Istanbul).
  6. 田口 明彦. 心原性脳塞栓症患者に対する自己骨髄単核球移植治療とその発展. 第38回日本脳卒中学会. 2013.3.21
  7. 田口 明彦. 幹細胞療法の可能性—臨床

- 経験を通じて. 第 12 回日本再生医療学会総会.2013.3.21
8. 田口 明彦.脳卒中患者に対する自己骨髄単核球を用いた細胞治療とその発展. 第 24 回日本脳循環代謝学会総会 2012.11.8
9. 田口 明彦.第 1 回 Small Vessel Disease Conference.2012.7.12
10. 田口 明彦.脳血管障害患者に対する再生医療の現状とその未来像. 第 11 回日本再生医療学会 2012.6.13
11. 田口 明彦.第 37 回日本脳卒中学会 2012.4.26
12. 田口 明彦.第 8 回 TOP フォーラム.2012.2.11
13. 日本知財学会第 10 回年次学術研究発表会 (2012, 12, 8-9, 大阪), 医療分野の研究成果を対象とした知的財産を評価する指標の策定および実効性を検証する手法の提案. 大屋知子, 赤川英毅, 巽英介, 中田はる佳, 大藤康一郎, 西謙一, 長谷川周平, 妙中義之.
14. 第 50 回日本人工臓器学会大会 (2012, 11, 22-24, 福岡), 医療機器の開発において創出される知的財産を評価する指標の策定. 赤川英毅, 大屋知子, 巽英介, 中田はる佳, 大藤康一郎, 西謙一, 長谷川周平, 妙中義之.
15. 4) 産学連携学会第10回大会 (2012, 6, 14- 15, 高知), 臨床ニーズのある医療機器が製品化されない現状を解決するしくみの構築—研究資金獲得から薬事を考慮した事業化への道程—. 大屋知子, 赤川英毅.
- (予定を含む。)
1. 特許取得
1. 「細胞分離バック及び細胞分離方法」特願 2012-117511 号
2. 「細胞分離装置及び遠心分離方法」特願 2011-284381 号
3. 「細胞分離装置」特願 2011-284382 号
4. 「単核球分離管、単核球分離システム、単核球分離方法、単核球、及び、体内投与薬剤」特願 2010-175056 号、PCT/JP2011/004427
2. 実用新案登録  
なし
- 3.その他  
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

## II. 分担研究報告書

## 簡便且つ細胞調製施設が不要な幹細胞分離デバイスの開発

研究代表者 国立循環器病研究センター 再生医療部 室長 山原 研一

### 研究要旨

中規模病院レベルで実現可能な単核球分離デバイスの開発・製品化を目指した研究を行った。則ち、1) 完全閉鎖系の、2) 操作が容易な、3) 生体に安全な細胞分離液を用いた、4) 治療効果に優れた単核球分離デバイスを完成させることを目指した。結果、今年度の PMDA 薬事戦略相談対面助言において指摘された細胞分離液に関する問題点を踏まえ、新規特許申請と別企業との新たな共同研究を開始した。

### 共同研究者

田口明彦 先端医療振興財団 先端医療センター  
再生医療研究部 部長

### A. 研究目的

自己骨髄単核球を用いた細胞治療は、四肢虚血や急性心筋梗塞患者におけるメタアナリシスにて、その有用性が示されている。しかし、自己骨髄単核球は比重遠心により分離する必要があるため、厳密な管理が必要とされる細胞調製施設(CPC)において、細胞調整のための知識を備えた技術者が行わなければならない。細胞治療にかかる莫大なコスト、作業の煩雑さを考えると、一般病院レベルでの細胞治療の施行はハードルが高い。そこで、骨髄単核球移植をより一般的な医療とするためには、CPCが不要で低コスト、更には一般の医療従事者でも操作が簡易な単核球分離デバイスの開発に着手した。

### B. 研究方法

#### ①単核球分離デバイス本体の周辺特許出願及び試作品作成

全ての医療従事者が取扱可能な、簡便・安全・確実な単核球分離デバイスの作成を目指し、周辺特許の出願、および、共同研究企業と共に試作品の仕様設計および作成を行った。デバイスに求められる要件として、①一般的な遠心機にて完全閉鎖系で細胞処理が可能、②骨髄単核球の分離方法は、心筋梗塞に対する臨床試験で有効性が示され

ている方法と同じ比重遠心分離法、③比重遠心分離液層への骨髄液の重層および比重遠心後の単核球層の採取が簡単に可能、④比重遠心後の細胞は、洗浄処理なくそのまま血管内に投与可能、であり、特別なスキルがなくても安全かつ簡易に骨髄単核球分画が単離出来る構造を目指した。

#### ②医薬品ベースの単核球分離液の作成

急性心筋梗塞患者に対する臨床試験で使用されている単核球分離液は、市販の Ficoll-Paque や Lymphoprep 等の比重遠心分離液である。これらは GMP や ISO 準拠で製造されているが、医薬品として認可されたものではなく、工程において分離液を除去しなければならない。そこで、市販比重遠心分離液の組成を参考に造影剤をベースとした、分離液除去不要の、静脈内投与が認められている医薬品のみからなる比重遠心分離液の作成を目指した。

#### ③PMDA との協議を踏まえた単核球分離デバイスの開発展開

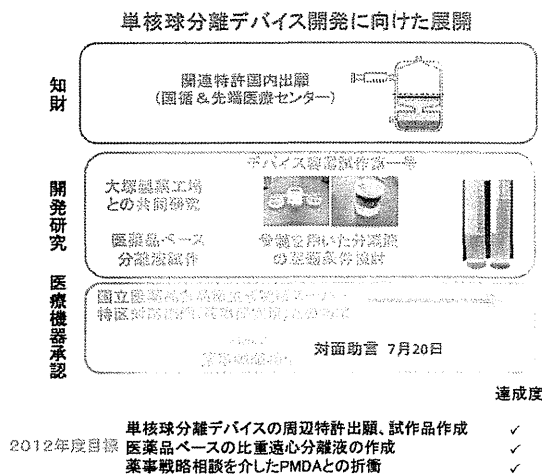
単核球分離デバイスに関する基本特許は平成 23 年に出願し、提携企業との間で共同研究契約を結んだ上でデバイス開発に着手している。また、当センターを代表研究機関とするスーパー特区のネットワークを活用し、国立医薬品食品衛生研究所スーパー特区対応部門の担当者や、薬事承認審査経験のある研究分担者山本らと共同で、PMDA 薬事戦略相談事前面談を平成 23 年 10 月から開始している。これまでの事前面談において、本デバイスが医療機器としての要件を満たすためのい

くつかの課題 (デバイスの構造、単核球分離液の取扱等) が明らかとなっており、共同研究企業と共に課題を解決しながら、PMDA の事前面談、対面助言を受ける予定である。

(倫理面への配慮)

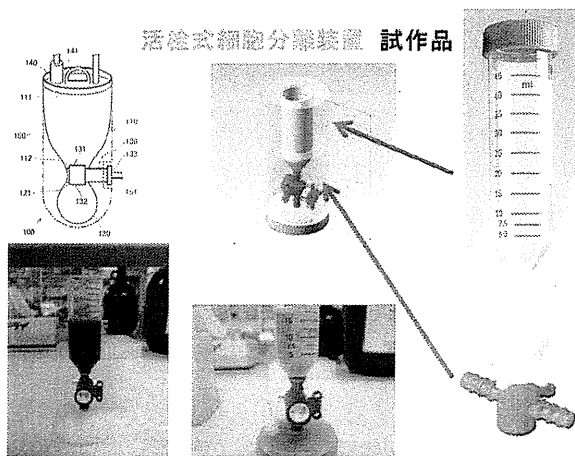
ヒト骨髄を用いた研究は、「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、当センターの倫理委員会の審査により承認を得て実施した。

C. 研究結果 (図1)



①単核球分離デバイス本体の周辺特許出願及び試作品作成

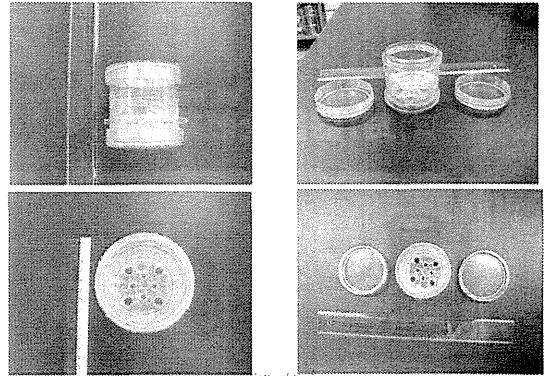
単核球分離デバイス本体の周辺特許出願及び試作品作成を共同研究企業である大塚製薬工場と共に行った。具体的には、(1)汎用品を用いたデバイス試作品を基本特許 (特願 2010-175056号) に基づき作成し、目的とする単核球が採取できることを確認した (図2)。



(2)共同出願した周辺特許 (特願 2011-2843821号、特願 2011-284382号) に基づいた試作品を共同研究企業が主体となり作成し、単核球採取に関し基本的な構造に問題がないことを確認した(図3)。

資料④採択後から現在までの研究成果

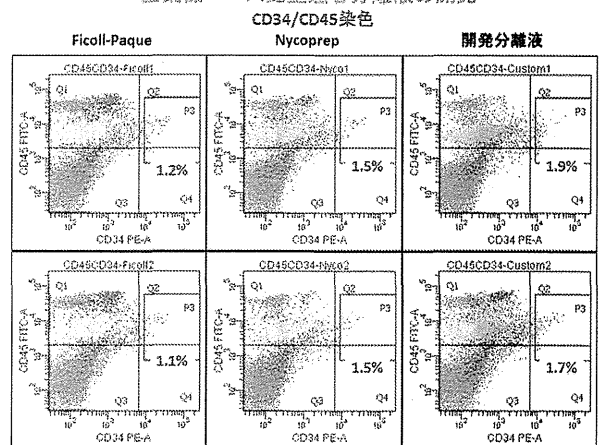
単核球分離器: 試作



②医薬品ベースの単核球分離液の作成

市販比重遠心分離液の組成を参考に造影剤をベースとした、静脈内投与が認められている医薬品のみからなる比重遠心分離液の作成を行った。作成した比重遠心分離液と臨床試験において最も使用されている Ficoll-Paque の両者を用い、市販ヒト骨髄から単核球を分離し、得られた細胞数、死細胞割合、FACS による表面抗原マーカー解析を行った。結果、構成される血球成分組成に差が見られたことから、細胞治療の際、医薬品ベースの単核球分離液では従来の Ficoll-Paque のデータとは異なる臨床試験結果が得られる可能性が示唆された(図3)。

医薬品ベース比重遠心分離液の開発



③PMDA との協議を踏まえた単核球分離デバイスの開発展開

PMDA 薬事戦略相談の対面助言が平成 24 年 7 月 20 日に行われた。結果、(1) 本デバイスのクラス分類はクラス II、(2) 本デバイスの医療機器認可には臨床的有用性を示す必要がある、(3) 医薬品ベースの単核球分離液分離液を用いるには、既承認医薬品の新規適応取得をする必要がある、との指摘を受けた。

そこで、これら(2)および(3)の指摘を解決可能な単核球分離デバイスを開発するため、新たな発想に基づくデバイスの作成を目指した。結果、新規特許を出願し(特願 2012-117511)、①従来の Ficoll-Paque を用い、②閉鎖系を維持しつつ、③ Ficoll-Paque を洗浄除去可能な、新たな発想に基づくデバイス作成を、新たな共同研究企業(カネカ)と共に開始した。

#### D. 考察

今年度の PMDA 薬事戦略相談対面助言を受け、研究計画を大幅に変更した。特に、②の医薬品ベースの単核球分離液の作成に関しては、対面助言において、既承認医薬品の新規適応取得をする必要性を指摘されたが、その具体化には高コストが予想された。また、研究結果に記載したように、作成した医薬品ベースの単核球分離液により得られる単核球は、臨床試験において汎用されている Ficoll-Paque により得られるそれと比較し、細胞組成が異なることが明らかとなり、細胞治療により得られる結果が両者で異なる可能性が示唆された。そこで、開発する単核球分離デバイスは Ficoll-Paque を用いることを前提に、しかしながら、当初のコンセプト通りの簡便かつ細胞調製施設が不要になるよう、Ficoll-Paque を容易に洗浄除去可能なシステムを組み込むこととし、更により安価となるよう、固形容器ではなくバッグ形状とし、現在、新たな企業パートナー(カネカ)と共同開発を進めている。

#### E. 結論

本研究の目的である、簡便かつ細胞調製施設が

不要な単核球分離デバイスの開発を進めた。PMDA との協議によって、様々な問題点が明らかとなり、今後のデバイス作成に大いに参考となった。今後とも PMDA 側と協議を進め、完成度の高いデバイス開発を進めていきたい。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Tsuda H, Yamahara K, Otani K, Okumi M, Yazawa K, Kaimori JY, Taguchi A, Kangawa K, Ikeda T, Takahara S, Isaka Y. Transplantation of allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells protect against ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury. *Cell Transplant*. 2013 *in press*.
2. Ohshima M, Yamahara K, Ishikane S, Harada K, Tsuda H, Otani K, Taguchi A, Miyazato M, Katsuragi S, Yoshimatsu J, Kodama M, Kangawa K, Ikeda T. Systemic transplantation of allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells suppresses Th1 and Th17 T cell responses in experimental autoimmune myocarditis. *J Mol Cell Cardiol*. 2012 Sep;53(3):420-8.
3. Kikuchi-Taura A, Taguchi A, Kanda T, Inoue T, Kasahara Y, Hirose H, Sato I, Matsuyama T, Nakagomi T, Yamahara K, Stern D, Ogawa H, Soma T. Human umbilical cord provides a significant source of unexpanded mesenchymal stromal cells. *Cytherapy*. 2012 Apr;14(4):441-50.

##### 学会発表

1. K. Yamahara, M. Ohshima, K. Ishikane, K. Harada, H. Tsuda, K. Otani, A. Taguchi, M.

Kodama, K. Kangawa, T. Ikeda. Systemic administration of allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells suppressed Th1 and Th17 T-cell immunity in experimental autoimmune myocarditis. European Society of Cardiology Congress 2012. European Heart Journal ( 2012 ) 33 ( Abstract Supplement ), 431. 2012.8.27

2. Kenichi Yamahara, Makiko Ohshima, Ken Ishikane, Kazuhiko Harada, Hidetoshi Tsuda, Kentaro Otani, Makoto Kodama, Kenji Kangawa, and Tomoaki Ikeda. Systemic Administration of Allogenic Fetal Membrane-derived MSC Ameliorates Experimental Autoimmune Myocarditis via Suppression of Th1/Th17 Immunity. American Heart Association 2012 Scientific Sessions. Circulation. 2012;126:A18331. 2012.11.5

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

##### 1. 特許取得

1. 「細胞分離バック及び細胞分離方法」特願 2012-117511 号
2. 「細胞分離装置及び遠心分離方法」特願 2011-284381 号
3. 「細胞分離装置」特願 2011-284382 号
4. 「単核球分離管、単核球分離システム、単核球分離方法、単核球、及び、体内投与薬剤」特願 2010-175056 号、PCT/JP2011/004427

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし



## 脳梗塞患者を対象にした自己骨髄単核球移植の第 1/2a 相臨床試験

研究分担者 先端医療振興財団 先端医療センター 再生医療研究部 部長 田口明彦  
国立循環器病研究センター 脳神経内科 部長 長束 一行

### 研究要旨

自己骨髄単核球細胞を用いた治療法は、心筋虚血の分野では欧州での多くの臨床試験でその有用性が証明されつつある。本研究では脳梗塞患者を対象に自己骨髄単核球移植の臨床試験を実施し、その安全性および有効性の検証を行っている。

#### A. 研究目的

自己骨髄単核球細胞を用いた治療法は、心筋虚血の分野では欧州での多くの臨床試験でその有用性が証明されつつあり、脳虚血の分野においても我々の研究グループだけでなく米国などで臨床試験が開始され、その安全性が示されつつある。本研究は急性期重症心原性脳塞栓症患者を対象に自己骨髄単核球移植の第 1/2a 相臨床試験を実施し、その安全性および有効性を証明することを目的としている。

#### B. 研究方法

臨床試験の概要は以下の通りである。なお本臨床試験は施設倫理委員会及びヒト幹指針に基づく厚生労働審議会の承認を受け実施している。

##### 主なエントリークライテリア：

- ①心原性脳塞栓症。
- ②20 歳以上 75 歳以下。
- ③発症後 7 日目の時点で NIHSS が 10 点以上。
- ④来院時に比し、発症 7 日後の NIHSS 改善度が 5 点以下。

エントリー症例は全て重症の心原性脳塞栓症症例で、かつ脳梗塞 1 週間後においても神経機能回復が十分でない患者群を対象としている。国立循環器病研究センターにおける過去の臨床データより、これらのエントリークライテリアに合致する患者群は、ほとんど内頸動脈閉塞や中大脳動脈起始部の閉塞による脳梗塞であり、その予後は極めて悪く、また脳梗塞に伴う合併症が高頻度に起こることが明らか

かになっているが、今回の臨床試験においてこれらの最重症患者群における安全性を検証・確認することを主目的としている。

##### 細胞治療プロトコールの概略：

- ①脳梗塞発症 7 日-10 日目に、局所麻酔下で骨髄細胞の採取 [低用量群は 25ml、高用量群は 50ml]
- ②国立循環器病センターあるいは先端医療センターセルプロセッシングセンターにて、比重遠心法を用いて単核球分画の分離
- ③静脈内に 5 分間で全量投与

本プロトコールは非常にシンプルな手技で構成されており、本臨床試験において、その安全性およびある程度以上の有効性を示すことができれば、多くの病院・施設でも実施可能であると考えている。

##### プライマリエンドポイント：

- ①脳梗塞 7 日後と比し投与 1 ヶ月後における NIHSS 悪化症例の頻度(安全性)
- ②脳梗塞 7 日後と細胞投与 1 ヶ月後における NIHSS の改善度(有効性)

比較対照群としては国立循環器病研究センター脳卒中内科データベースに含まれる症例で、本臨床試験の適格基準に合致する患者群を Historical Control として用いる。

(倫理面への配慮)

申請者らが現在実施中の脳梗塞患者に対する細胞治療プロトコールはヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針や臨床研究に関する倫理指針等、全ての厚生労働省の指針に準拠しており、国立循環器

病研究センター・先端医療振興財団倫理委員会およびヒト幹指針に基づく厚生科学審議会の承認を経て実施している。

#### C. 研究結果

平成24年度に予定していた12症例全てのエントリーが終了している。現在、それらの follow up を実施中である。細胞治療症例における有害事象に関しては、1症例で脳梗塞再発が観察された。独立症例検討委員会(委員長：大阪大学医学部附属病院山本准教授)の判断では、細胞治療との因果関係は不明で、厚労省に報告後、症例のエントリーを再開した。有効性に関しては予想される予後より著明に改善した症例なども多数存在し、全症例の6か月後の Follow up が終了した時点で、統計家による最終解析を実施する予定である。

#### D. 考察

現在のところ、脳梗塞患者に対する自己骨髄単核球を用いた細胞治療は安全でかつ有効性を示すデータが示されつつある。本研究を継続することにより、脳梗塞患者に対する新規治療法開発が促進されると考えている。

#### E. 結論

我が国における要介護者および寝たきり者の第一位はいずれも脳卒中であり、本研究を継続して実施することにより、要介護者数および介護費用の抑制が達成されると考えている。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Ohshima M, Yamahara K, Ishikane S, Harada K, Tsuda H, Otani K, Taguchi A, Miyazato M, Katsuragi S, Yoshimatsu J, Kodama M, Kangawa K, Ikeda T. Systemic transplantation of allogenic fetal

membrane-derived mesenchymal stem cells suppresses Th1 and Th17 T cell responses in experimental autoimmune myocarditis. *J Mol Cell Cardiol.* 2012; 53(3):420-8

2. Nakagomi T, Molnár Z, Taguchi A, Nakano-Doi A, Lu S, Kasahara Y, Nakagomi N, Matsuyama T. Leptomeningeal-Derived Doublecortin-Expressing Cells in Poststroke Brain. *Stem Cells.* 2012;21(13):2350-4

3. Tanaka H, Takafuji K, Taguchi A, Wiriyasermkul P, Ohgaki R, Nagamori S, Suh Pann-Ghill, Kanai Y. Linkage of N-cadherin to Multiple Cytoskeletal Elements Revealed by a Proteomic Approach in Hippocampal Neurons. *Neurochemistry International.* 2012; 61(2):240-250

4. Kikuchi-Taura A, Taguchi A, Kanda T, Inoue T, Kasahara Y, Hirose H, Sato I, Matsuyama T, Nakagomi T, Yamahara K, Stern D, Ogawa H, Soma T. Human umbilical cord provides a significant source of unexpanded mesenchymal stem cells. *Cytherapy* 2012;14(4):441-50

5. Hirose H, Kato H, Kikuchi-Taura A, Soma T, Taguchi A. Mouse ES cells maintained in different pluripotency-promoting conditions differ in their neural differentiation propensity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal.* 2012 ;48(3):143-8

6. Takata M, Nakagomi T, Kashiwamura S, Nakano-Doi A, Saino O, Nakagomi N, Okamura H, Mimura O, Taguchi A, Matsuyama T. Glucocorticoid-induced TNF receptor-triggered T cells are key modulators for survival/death of neural stem/progenitor cells induced by ischemic stroke. *Cell Death Differ.* 2012;19(5):756-67

7. Ohshima M, Tsuji M, Taguchi A, Kasahara T, Ikeda T. Cerebral blood flow during reperfusion predicts later brain damage in a mouse and a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Experimental Neurology.* 2012;233(1):481-9.

8. Uemura M, Kasahara Y, Nagatsuka K, Taguchi A.

Cell-based therapy to promote angiogenesis in the brain following ischemic damage. *Current Vascular Pharmacology* .2012;10(3):285-8

9. Kasahara Y, Nakagomi T, Matsuyama T, Stern D; Taguchi A. Cilostazol Reduces the Risk of Hemorrhagic Infarction after Administration of Tissue Plasminogen Activator in a Murine Stroke Model. *Stroke* . 2012;43(2):499-506.

10. Tsuji M, Taguchi A, Ohshima M, Kasahara Y, Ikeda T. Progesterone and allopregnanolone exacerbate hypoxic-ischemic brain injury in immature rats. *Experimental Neurology*. 2012; 233(1):214-20

11. 田口 明彦. 認知症と AGE/RAGE 経路. *医学のあゆみ* 2012;244(8):671-673

12. 田口 明彦. 脳卒中に対する再生医療の現状とその未来像 *Schneller*.2012;82:13-15.

13. 辻 雅弘、笠原 由紀子、田口 明彦. 脳血管障害患者に対する細胞治療とその将来. *老年医学の展望* 2012;in press

14. 猪原 匡史、田口 明彦. 脳梗塞と体性幹細胞. *Bio Clinica*. 2012; 27:36-40.

15. 猪原 匡史、田口 明彦.  $\beta$ -アミロイドの血管周囲リンパ排水路を介したクリアランス細胞工学.2012;10:1113-18.

16. 猪原 匡史、笠原 由紀子、田口 明彦. 細胞移植療法による神経機能回復 分子脳血管病.2012;3:57-63.

17. 上村昌寛、笠原 由紀子、猪原 匡史、田口 明彦. 血管再生を介したアルツハイマー型認知症治療の可能性. *Cardiovascular Frontier*.2012;3:233-37

#### 学会発表

1. Taguchi A, Kasahara Y, Matsuyama T, Nagatsuka K. CELL-BASED THERAPY FOR PATIENTS AFTER CARDIOGENIC CEREBRAL EMBOLISM. Heart & Brain Conference 2012.
2. Taguchi A, Kasahara Y, Matsuyama T, Nagatsuka K. ANTIPLATELET AGENTS DID NOT INCREASE THE RISK OF TISSUE PLASMINOGEN

ACTIVATOR INDUCED CEREBRAL HEMORRHAGE IN A MURINE STROKE MODEL. Heart & Brain Conference 2012.

3. 田口 明彦. 心原性脳塞栓症患者に対する自己骨髄単核球移植治療とその発展. 第 38 回日本脳卒中学会. 2013.3.21
4. 田口 明彦. 幹細胞療法の可能性—臨床経験を通じて. 第 12 回日本再生医療学会総会. 2013.3.21
5. 田口 明彦. 脳卒中患者に対する自己骨髄単核球を用いた細胞治療とその発展. 第 24 回日本脳循環代謝学会総会 2012.11.8
6. 田口 明彦. 第 1 回 Small Vessel Disease Conference. 2012.7.12
7. 田口 明彦. 脳血管障害患者に対する再生医療の現状とその未来像. 第 11 回日本再生医療学会 2012.6.13
8. 田口 明彦. 第 37 回日本脳卒中学会 2012.4.26
9. 田口 明彦. 第 8 回 TOP フォーラム. 2012.2.11

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 「間質流改善薬」特願 2012-135906, 2012 年 申請者: 財団法人先端医療振興財団 発明者: 猪原 匡史、眞木 崇洲、田口 明彦
2. 「細胞分離バック及び細胞分離方法」特願 2012-117511, 2012 年 申請者: 財団法人先端医療振興財団 発明者: 山原 研一、田口 明彦
3. 「脳梗塞後うつ病モデル動物及びその使用並びにうつ状態に対する被検薬物及び移植細胞の有効性のスクリーニング方法」特願 2012-053456, 2012 年 申請者: 財団法人先端医療振興財団 発明者: 松山 知弘、土江 伸誉、田口 明彦
4. 「脳梗塞後運動機能障害モデル動物及びその使用並びに運動機能回復に対する新規治療法の有効性のスクリーニング方法」特願 2012-040102, 2012 年 申請者: 財団法人先端医療振興財団 発明者: 田口 明彦、笠原 由紀子、松山 知弘
5. 「神経幹細胞の調製法」特許第 4905719 号, 2012

厚生労働科学研究費補助金医療機器開発推進研究事業  
(医療機器開発(ナノテクノロジー等)総合推進研究事業)  
分担研究報告書

年 申請者：ヒューマンサイエンス財団 発明  
者：松山 知弘、田口 明彦、芳川 浩男