

## 2. 概要

臨床研究登録 ID : UMIN000002671
目的： 従来の方法では治療困難できわめて近い将来において下肢切断術が免れられない下肢末梢性血管疾患（慢性閉塞性動脈硬化症、バージャー病）患者を対象として、塩基性線維芽細胞増殖因子（Basic Fibroblast Growth Factor : bFGF）徐放化ゼラチンハイドロゲル細粒の安全性および臨床効果を評価する。
技術の内容： [先進性] 近年、糖尿病患者や高齢者の増加に伴い動脈硬化を原因とする下肢の閉塞性動脈硬化症が増加しており、血行改善薬などの内科的治療や下肢の血管拡張術・血栓除去術、動脈血栓除去術、血管移植術、バイパス移植術などの外科的治療はその治療に大きく貢献している。しかし、閉塞性動脈硬化症やバージャー病のために下肢切断を余儀なくされる患者も多く、現存の治療法が十分であるとは言い難い。 近年、新たな治療法として、虚血部周辺組織からの血管新生及び側副血行の発達を促し虚血組織の血流を確保するという血管新生療法が注目されている。この治療法には主として血管新生タンパクを投与する「タンパク治療」、血管新生タンパクを発現する遺伝子を投与する「遺伝子治療」、血管新生を促す細胞を移植する「細胞移植治療」があるが、「タンパク治療」は血管新生タンパクを全身へ大量・反復投与を必要とすることによる副作用、「遺伝子治療」には安全性に対する懸念や遺伝情報の発現コントロールが十分ではないという問題、「細胞移植治療」には移植細胞採取の侵襲性、手技的煩雑さ、倫理問題、高額な費用などの問題が存在していることから、新たな方策の開発が求められている。 そこで本治療は「タンパク治療」の問題点であった全身への大量反復投与による副作用を解決すべく、ドラッグデリバリーシステムである生体吸収材料（ゼラチンハイドロゲル）を開発し、血管新生タンパクを十分かつ必要期間及び必要部位に作用させることを可能とした。このゼラチンハイドロゲルは血管新生タンパクの生理活性を保ったままで固定化包含できること、また血管新生タンパクを含んだゼラチンハイドロゲルが生体内で分解される期間を調整できることから、1回の局所投与にて、必要部位における血管新生タンパクの濃度維持が可能である。また、「遺伝子治療」や「細胞移植治療」と比較し、患者投与までの手技が非常に簡便であり低コストであることも特徴である。  [概要] トラフェルミン（bFGF）を生理食塩水で溶解し、濾過滅菌後にゼラチンハイドロゲルに浸潤させ、注射剤を用時調製した。 腰椎麻酔下で、この bFGF 徐放化ゼラチンハイドロゲル 1 mL ずつを虚血下肢腓腹筋に 40 箇所（計 40 mL bFGF として計 200 µg）注射した。
患者数 ①計画時：10 例 ②終了時：最大の解析対象集団（FAS）10 例、安全性解析対象集団 10 例 【②/③：約 0.0025%、②/④：約 0.03~0.05%】 ③日本国内における当該疾病患者数：推定約 40 万人（患者数の根拠：末梢閉塞性動脈疾患の治療ガイドライン及び血管炎症候群の診療ガイドライン） ④日本国内における当該技術の対象となる患者数：推定約 2~3 万人 [患者数の根拠：Trans-Atlantic Inter-Society Consensus II (TASC II) (J Vasc Surg. 2007 Jan;45 Suppl S:S5-67.)、末梢閉塞性動脈疾患の治療ガイドライン及び血管炎症候群の診療ガイドライン] ⑤考察：登録期間 15 か月間で、総紹介患者数 78 名のうち下肢末梢性血管疾患（慢性閉塞性動脈硬化症、バージャー病）を有する患者は 62 名であった。そのうち重症下肢虚血患者は 34 名であり、最終的に 10 名が登録された。15 か月間の登録期間中に総紹介患者のうち 13%（10/78 名）が治療適応であった。

診断及び主要な組入れ基準：

[対象疾患]

下肢末梢性血管疾患（慢性閉塞性動脈硬化症、バージャー病）

[選択基準]

- (1) 下肢末梢性血管疾患（慢性閉塞性動脈硬化症又はバージャー病）と診断されている。
- (2) 対象側について、以下すべてを満たす下肢末梢性血管疾患である。
  - ・ 下肢虚血による潰瘍、限局性の壊疽、安静時疼痛のいずれかの症状がある。
  - ・ Rutherford 慢性虚血肢臨床分類の 4 群～5 群と判定される。
  - ・ 骨・腱の露出した深部潰瘍又は広範な壊疽のいずれも認めない。
- (3) あらゆる内科的治療〔血管拡張剤、抗血小板剤、経皮的血管形成術（PTA）〕又は外科的治療（バイパス血行再建術など）を施行した後も、臨床症状の改善が得られない患者である。
- (4) 治療開始 4 週間以内に下肢大切断（足関節以上）を受ける可能性がないと判断される。
- (5) 登録時の年齢が 20 歳以上 80 歳未満である。
- (6) 骨髄、肝機能が保持されている。（登録前 4 週間以内の最新の検査）
  - ・ ヘモグロビン量  $\geq 10.0$  g/dL
  - ・ 血小板数  $\geq 7.0$  万/ $\mu$ L
  - ・ GOT/AST  $\leq 100$  IU/L
  - ・ GPT/ALT  $\leq 100$  IU/L
- (7) 試験参加について、患者本人から文書による同意が得られている。

[除外基準]

- (1) 下肢血行再建術（外科的バイパス術、PTA）後 3 か月以内である。
- (2) 冠動脈バイパス術（CABG）又は経皮的冠動脈形成術（PCI）施行後 3 か月以内である。
- (3) 以下の薬剤を投与中で、症状悪化の可能性のために中止することが困難である。
  - ・ アプロスタジル（リプル®、パルクス®など）
  - ・ アプロスタジルアルファデクス（プロスタンディン®など）
  - ・ アルガトロバン（ノバスタン®、スロンノン®など）ただし、試験治療開始（bFGF 含有ゼラチンハイドロゲル細粒の投与）1 週間前から、本試験の観察期間（bFGF 含有ゼラチンハイドロゲル細粒の投与後 24 週まで）終了まで中止可能と判断できる場合は登録可とする。
- (4) 以下のいずれかの合併症を有する。
  - ・ コントロール不良な虚血性心疾患・心不全・不整脈
  - ・ 臨床的に問題となる感染症（蜂窩織炎・骨髄炎を含む）
  - ・ コントロール不良の糖尿病患者（HbA1c > 10%）
  - ・ 余命が 1 年以内と考えられる合併症
- (5) 以下のいずれかの既往を有する。
  - ・ 過去 6 か月以内に発症した心筋梗塞・脳梗塞・脳出血・一過性脳虚血発作
  - ・ 重度の薬剤アレルギー
  - ・ 過去 1 年以内に治療を要するアルコール依存又は薬物依存を認めた
- (6) 現在、慢性腎不全により維持透析中である。
- (7) 糖尿病性網膜症（増殖前糖尿病性網膜症又は増殖糖尿病性網膜症）で治療中である。ただし、bFGF 含有ゼラチンハイドロゲル細粒の投与までに糖尿病性網膜症の治療が終了予定の患者については、眼科医が本試験の参加に問題がないと判断した場合は、登録可とする。
- (8) ゼラチンハイドロゲル細粒の皮内反応が陽性である。
- (9) 過去、以下の臨床試験・治験に参加している。
  - ・ bFGF に関する試験
  - ・ 遺伝子治療に関する試験
- (10) 活動性の悪性腫瘍（無病期間が 3 年以内の悪性腫瘍）を有する。ただし、carcinoma in situ

(上皮内癌) や粘膜内癌は活動性の悪性腫瘍に含めない。悪性腫瘍による難治性潰瘍の可能性のある患者については、事前に生検などにより投与部位に悪性腫瘍のないことを確認すること。

(11)喫煙者である、又は禁煙期間が1か月未満である。

(12)妊娠中又は妊娠の可能性のある女性。妊娠を希望している女性。授乳中である女性。パートナーの妊娠を希望する男性。

(13)その他、研究責任者又は担当医師が本試験を安全に実施するのに不相当と判断した患者。

実施計画（スケジュール）：

bFGF 及び凍結乾燥ゼラチンハイドロゲル細粒より調製した bFGF 含有ゼラチンハイドロゲル細粒を、腰椎麻酔下で虚血下肢腓腹筋約 40 箇所（計 40 mL bFGF として 200 µg）に筋肉内注射する。

試験スケジュール

検査・観察・評価項目	時期	登録前	投与前	投与後（観察期間） （投与日=Day0とする）									
				D 1	D 2	D 3	1 W	2 W	4 W	8 W	12 W	24 W	
患者背景		○ <sup>1</sup>											
体重		△	○ <sup>3</sup>	←	←	△	→	→					
身長		△	○ <sup>3</sup>										
疾患評価	Rutherford 慢性虚血肢臨床分類	○ <sup>1</sup>	○ <sup>3</sup>	△	△	△	△	△	○	△	△	○	
	潰瘍の深達度		○ <sup>3</sup>						○				○
	経皮的酸素分圧		○ <sup>3</sup>						○				○
	上肢・下肢・足趾血圧		○ <sup>3</sup>						○				○
	虚血性潰瘍の面積		○ <sup>3</sup>						○				○
	チアノーゼ		○ <sup>3</sup>						○				○
	6分間歩行距離		○ <sup>3</sup>						○				○
	安静時疼痛		○ <sup>3</sup>						○				○
検査	血液・生化学・CRP	○ <sup>1</sup>	△	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	HbA1c	○ <sup>1</sup>	△	←	←	△	→	→					
	心電図、心エコー、胸 XP	○ <sup>1</sup>	△	←	←	△	→	→					
	冠動脈造影	○ <sup>2</sup>											
	ゼラチンハイドロゲル細粒皮内反応	○ <sup>1</sup>											
	血中 bFGF 濃度			○ <sup>4</sup>		○ <sup>5</sup>	○ <sup>6</sup>	○ <sup>7</sup>					
安全性評価	有害事象			○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	術中・術後合併症			○	○	○	○	○	○	○	←	△	→

- <sup>1</sup> 登録前 4 週以内
- <sup>2</sup> 登録前 6 か月以内
- <sup>3</sup> 投与 2 週間～投与前日
- <sup>4</sup> 試験薬投与後 24 時間
- <sup>5</sup> 試験薬投与後 72 時間
- <sup>6</sup> 試験薬投与後 1 週
- <sup>7</sup> 試験薬投与後 2 週
- △ 必要に応じて

## 評価基準

### 〔主要評価項目〕

安全性評価基準：有害事象及び副作用の発生

有効性評価基準：経皮的酸素分圧 ( $TcO_2$ ) の上昇（主たる仮説検定は、投与前と投与後 4 週の  $TcO_2$  の差とし、有意水準 5% の片側対応のある t 検定を行った）

### 〔副次評価項目〕

安全性評価基準：該当なし

有効性評価基準：上肢下肢血圧比 (ABI)、上肢足趾血圧比 (TBI)、虚血性潰瘍の面積、6 分間歩行距離（投与前と投与後 4 週又は投与後 24 週の差に関して、有意水準 5% の片側対応のある t 検定を行った）  
チアノーゼ、Rutherford 慢性虚血肢臨床分類、疼痛スケールによる安静時疼痛（投与前に比べ投与後に 1 段階でも改善が見られた割合とその 95% 信頼区間を求めた）

## 結果の要約

### 安全性の評価結果：

安全性の解析対象集団 10 例において、有害事象の発生割合は 50% (5/10 例)、副作用の発生割合は 30% (3/10 例) であった。複数の患者で見られた有害事象は、アラニンアミノトランスフェラーゼ増加及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ増加（各 30%、3 例）であった。いずれの有害事象も試験薬との因果関係は不明であり、副作用と判断された。その他の有害事象は 1 例のみの発生であった。

重症度別の有害事象では、重度の有害事象はなく、中等度の有害事象は 1 例（視床出血、蜂巣炎）のみであった。

副作用は、3 例（3 例ともアラニンアミノトランスフェラーゼ増加及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ増加：試験薬との因果関係は不明）に発生した。

重篤な有害事象は 1 例に 2 件発生したが、いずれも試験薬との因果関係は否定された。

試験薬の投与中止に至るような有害事象は、観察されなかった。

### 有効性の評価結果：

有効性の解析対象集団である FAS 10 例において、有効性の主要評価項目である試験薬投与前後の  $TcO_2$  の差の平均値は、投与後 4 週では 14.4 mmHg ( $p < 0.01$ ) ( $TcO_2$  の平均値は投与前 28.4 mmHg から 42.8 mmHg に上昇)、投与後 24 週では 17.9 mmHg ( $p < 0.01$ ) ( $TcO_2$  の平均値は投与前 28.4 mmHg から 46.2 mmHg に上昇) であり、有意に上昇した。

副次評価項目では、試験薬投与前後の ABI の差の平均値は、投与後 4 週が -0.01、投与後 24 週が 0.03 であり、有意な変化は見られなかった。試験薬投与前後の TBI の差の平均値は、投与後 4 週が 0.04、投与後 24 週が -0.03 であり、有意な変化は見られなかった。試験薬投与前後の虚血性潰瘍の面積の差の平均値は、投与後 4 週が -32.9 mm<sup>2</sup>、投与後 24 週が -290.4 mm<sup>2</sup> であり、投与前と比べ減少したものの、その差は有意ではなかった。試験薬投与前後の 6 分間歩行距離の差の平均値は、投与後 4 週が 80.7 m ( $p < 0.01$ )、投与後 24 週が 62.2 m ( $p = 0.02$ ) であり、有意に増加した。試験薬投与前に比べ投与後にチアノーゼが改善した患者は、投与後 4 週が 5 例 (50%、95% 信頼区間 18.7~81.3%)、投与後 24 週が 7 例 (70%、95% 信頼区間 34.8~93.3%) であり、有意な改善が認められた。試験薬投与前に比べ投与後に Rutherford 慢性虚血肢臨床分類による臨床症状が改善した患者は、投与後 4 週が 6 例 (60%、95% 信頼区間 26.2~87.8%)、投与後 24 週が 6 例 (60%、95% 信頼区間 26.2~87.8%) であり、有意な改善が認められた。試験薬投与前に比べ投与後に疼痛スケールによる安静時疼痛が改善した患者は、投与後 4 週が 5 例 (50%、95% 信頼区間 18.7~81.3%)、投与後 24 週が 5 例 (50%、95% 信頼区間 18.7~81.3%) であり、有意な改善が認められた。

発生した有害事象：

有害事象

	重篤				非重篤				合計			
	軽度	中等度	重度	合計	軽度	中等度	重度	合計	軽度	中等度	重度	合計
視床出血	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1
皮膚潰瘍	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1
蜂巣炎	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1
腎性貧血	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1
アラニンアミノトランスフェラーゼ増加	0	0	0	0	3	0	0	3	3	0	0	3
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ増加	0	0	0	0	3	0	0	3	3	0	0	3
血中クレアチンホスホキナーゼ増加	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1
血中クレアチニン増加	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1
C-反応性蛋白増加	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1

副作用

	重篤				非重篤				合計			
	軽度	中等度	重度	合計	軽度	中等度	重度	合計	軽度	中等度	重度	合計
アラニンアミノトランスフェラーゼ増加	0	0	0	0	3	0	0	3	3	0	0	3
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ増加	0	0	0	0	3	0	0	3	3	0	0	3

結論：

以上の結果から、bFGF 徐放化ゼラチンハイドロゲル細粒は、下肢末梢性血管疾患患者に対して虚血組織の血流を確保し、有効であることが示された。また、発生した有害事象はほとんどが軽度であり、重篤な副作用もなかったことから、安全性にも問題はないと考えられた。

報告書作成日：2013年 2月12日

## II. 分担研究報告

# 生体内吸収性高分子担体と細胞増殖因子を用いた 難治性虚血性疾患に対する新しい再生医療の開発： オーダーメイド医療の実現に向けた検討

所 属 京都大学再生医科学研究所 生体材料学  
分担研究者 田畑 泰彦

## 研究要旨

末期虚血性心疾患の再生誘導治療法の確立を目的に、形状の異なるゼラチンハイドロゲルを作製し、その分解性を評価した。その結果、*in vivo*におけるハイドロゲルの分解性は、その形状に影響することがわかった。これは、細粒状ハイドロゲルとシート状ハイドロゲルとでは、比表面積が異なるため、より比表面積の小さいシート状ハイドロゲルが、比表面積の大きい細粒状ハイドロゲルよりも遅く分解したと考えられる。一方、埋入したシート状ハイドロゲルとその周辺組織には、観察期間内では、発赤、および腫脹が認められなかったことから、シート状ハイドロゲルは、強い炎症反応を惹起しないと考えられる。

## A. 研究目的

われわれは、これまでに細粒状のゼラチンハイドロゲルから、細胞増殖因子を徐放化することによって、重傷下肢虚血性疾患に対する血管新生療法の先進医療を行ってきた。本研究の目的は、治験薬 GMP に準じて製剤化したゼラチンハイドロゲル徐放技術を、末期虚血性心疾患へ応用するために、ゼラチンハイドロゲルの形状が有効性に与える影響について調べることである。そこで、本研究では、治験薬 GMP に準じて製剤化した細粒状ならびにシート状ゼラチンハイドロゲルをマウス背部皮下に埋入することによって、*in vivo*における形状が異なるハイドロゲルの分解性について評価した。

## B. 研究方法

### 〈シート状ゼラチンハイドロゲルの作製〉

治験薬 GMP に準じた施設において、シート状のゼラチンハイドロゲルを作製した。すなわち、豚皮由来酸性ゼラチン（等電点 5.0）水溶液へグルタルアルデヒドを加えた後、4•にて 12 時間静置することによって化学架橋したゼラチンハイドロゲルを作製した。得られたハイドロゲルをグリシン水溶液（100 mM）で 37•にて 1 時間処理し、未反応のアルデヒド基を不活化した。蒸留水にて 3 回洗浄後、凍結乾燥することでシート状ゼラチンハイドロゲルを得た。一方、細粒状ゼラチンハイドロゲルは、これまでと同様に、治験薬 GMP に準じて作製した。

### 〈*in vivo*におけるシート状ゼラチンハイドロゲルの分解性の評価〉

細粒状ゼラチンハイドロゲルならびにシー



ト状ゼラチンハイドロゲルの *in vivo* における分解性を評価するために、放射性同位元素で標識したハイドロゲルを作製した。すなわち、Bolton-Hunter 試薬 ( [<sup>125</sup>I]Iodo-*p*-hydroxyphenylpropionic acid *N*-hydroxysuccinimide ester) を凍結乾燥したハイドロゲルに含浸させ、4•にて12時間反応後、蒸留水中4•にて6時間ハイドロゲルを洗浄した。同様に10回洗浄することにより、ハイドロゲルから未反応のBolton-Hunter試薬を除去した。得られた<sup>125</sup>I標識ハイドロゲルを ddY マウスの背部皮下に埋入後、経時的にハイドロゲルを摘出し、ガンマカウンターを用いてハイドロゲルの放射活性を測定することにより、*in vivo* におけるハイドロゲルの残存率を評価した。

### C. 研究結果

図1は、マウス背部皮下における形状の異なるハイドロゲルの残存率を示す。図から明らかなように、シート状ゼラチンハイドロゲルは、埋入1日後では約65%が残存していることがわかった。その後、経時的に分解され、埋入56日後には2%が残存していた。一方、細粒状ハイドロゲルは、埋入1日後では約40%が残存していたものの、シート状ハイドロゲルよりも早く分解した。さらに、埋入したシート状ゼラチンハイドロゲルを観察したところ、ハイドロゲルは分解とともに小さくなり、放射活性から算出した残存率と同じ傾向を示した(図2)。また、ハイドロゲルを埋入した周辺組織を肉眼的に観察したところ、

発赤、および腫脹は認められなかった。

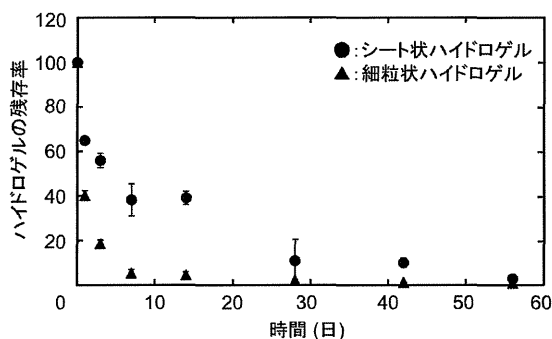


図1 マウス背部皮下におけるゼラチンハイドロゲル分解の評価

マウス背部皮下におけるシート状ゼラチンハイドロゲルと細粒状ゼラチンハイドロゲルの残存率。埋入前の<sup>125</sup>Iの放射線量を100%とし、埋入後1、3、7、14、28、42、および56日に残存する<sup>125</sup>Iの割合を示す。(●)シート状ゼラチンハイドロゲル、(▲)細粒状ゼラチンハイドロゲル。

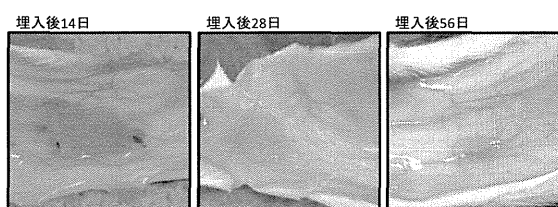


図2 シート状埋入したゼラチンハイドロゲルの肉眼的観察

マウス背部皮下に埋入したシート状ゼラチンハイドロゲルの時間経過に伴う形状変化。(左)埋入後14日、(中央)埋入後28日、(右)埋入後56日。

### D. 考察

本研究では、細粒状ゼラチンハイドロゲルとシート状ゼラチンハイドロゲルとの *in vivo* における分解性ならびに埋入したシート状ハ

イドロゲル近傍の組織を肉眼的に評価した。その結果、*in vivo*におけるハイドロゲルの分解性は、その形状に影響することがわかった。これは、細粒状ハイドロゲルとシート状ハイドロゲルとでは、比表面積が異なるため、より比表面積の小さいシート状ハイドロゲルが、比表面積の大きい細粒状ハイドロゲルよりも遅く分解したと考えられる。

細粒状ゼラチンハイドロゲルとシート状ゼラチンハイドロゲルとでは、分解速度は異なるものの、いずれも *in vivo*において分解されることがわかった。これまでに、われわれは、ハイドロゲルの化学架橋の条件を変化させることにより、*in vivo*における分解性の異なるハイドロゲルの作製に成功している。また、ハイドロゲルの分解性によって細胞増殖因子の徐放性ならびに徐放化細胞増殖因子の生物活性が変化することを見いだしている。このため、シート状ゼラチンハイドロゲルの化学架橋の条件を変化させることにより、細粒状ゼラチンハイドロゲルと同じ分解性をもつハイドロゲルを作製することができると考えられる。

一方、埋入したシート状ハイドロゲルとその周辺組織には、観察期間内では、発赤、および腫脹が認められなかったことから、シート状ハイドロゲルは、強い炎症反応を惹起しないと考えられる。

## E. 結論

本研究により、末期虚血性心疾患の再生誘導治療に用いるシート状ゼラチンハイドロゲ

ルの生体内での分解挙動を明らかにすることができた。さらに、シート状ゼラチンハイドロゲルが、重度の炎症応答を惹起しないことを示した。

## F. 研究発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

# 生体内吸収性高分子担体と細胞増殖因子を用いた 難治性虚血性疾患に対する新しい再生医療の開発： オーダーメイド医療の実現に向けた検討

所 属 京都大学医学部附属病院探索医療センター  
分担研究者 清水 章

## 研究要旨

難治性虚血性疾患の新たなオーダーメイド治療法として、生体吸収性の高分子担体であるゼラチンハイドロゲルと細胞増殖因子である塩基性繊維芽細胞増殖因子の組み合わせによる再生医療を開発、実用化するため、難治性下肢虚血に対する高度医療評価制度の下での臨床試験（第3項先進医療）の実施、結果の取り纏めの支援を行った。更にこの方法を虚血性心疾患に応用するための臨床試験の実施に向け、試験計画の立案・設計、非臨床データの収集に対する支援を行った。

## A. 研究目的

難治性虚血性疾患に対して、生体吸収性の高分子担体と細胞増殖因子を用いた新たな再生医療を開発することにより、同疾患に対する、オーダーメイド医療の実現に向けた検討を行う。このために行う臨床試験の準備、実施、結果の取り纏めなどについて、これを実施する医師・研究者に必要な支援を行い、試験の円滑な実施と結果の取り纏めを目指す。

## B. 研究方法

医学部附属病院の研究者などが、難治性下肢虚血患者を対象とし、高度医療評価制度の下での臨床試験を実施と結果の取り纏めについて実践的支援を行うとともに、虚血性心疾患を対象とした臨床試験を開始するために必要な支援活動を行う。

（倫理面への配慮）

上記の臨床試験（難治性下肢虚血を対象とする第3項先進医療）の申請・実施に必要な倫理審査を受け、承認された。実施に際しても必要な報告などを行った。

## C. 研究結果

難治性下肢虚血に対する高度医療評価制度の下での臨床試験の実施にあたり、プロジェクトの全体を見渡すプロジェクトマネージメントを

行い、試験が完遂したことを受け、結果取り纏めの支援を行った。この試験の結果を虚血性心疾患にも応用し、新たな臨床試験を開始するため、試験計画の立案ならびに安全性等必要となる非臨床データの取得を支援した。

## D. 考察

新規・先端医療の開発・実用化における、試験の立案・遂行・取り纏めのノウハウを得ることができ、支援活動の重要性を再認識した。

## E. 結論

臨床試験の基盤を形成し、完遂を促進することならびに的確な成果の取り纏めを行うには、十分なノウハウを持ってこれを支援することが不可欠であるが、本研究によりその実をあげることができた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Sakata-Goto T, Takahashi K, Kiso H, Huang B, Tsukamoto H, Takemoto M, Hayashi T, Sugai M, Nakamura T, Yokota Y, Shimizu A, Slavkin H, Bessho K. Id2 controls chondrogenesis acting downstream of BMP signaling during maxillary morphogenesis. Bone 2012

50(1) 69-78.

2. Nambu, Y. Hayashi, T. Jang K.J. Aoki K. Mano H. Nakano K. Osato M. Takahashi K. Itoh K. Teramukai S. Komori T. Fujita J. Ito Y. Shimizu A. Sugai M. In situ differentiation of CD8 $\alpha\alpha$  T cells from CD4 T cells in peripheral lymphoid tissues. Scientific Reports 2012 2 642.
3. Morimoto N. Ito T. Takemoto S. Katakami M. Kanda N. Tada H. Tanaka S. Teramukai T. Kawai K. Nakamura Y. Kasai Y. Yokode M. Maekawa T. Shimizu A. Suzuki, S. An exploratory clinical study on the safety and efficacy of an autologous fibroblast-seeded artificial skin cultured with animal product-free medium in patients with diabetic foot ulcers. International Wound Journal, 2012 doi: 10.1111/j.1742-481X.2012.01064.x.

2. 学会発表  
なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし

# 生体内吸収性高分子担体と細胞増殖因子を用いた 難治性虚血性疾患に対する新しい再生医療の開発： オーダーメイド医療の実現に向けた検討

所 属 京都大学医学部附属病院探索医療センター  
探索医療臨床部  
分担研究者 横出 正之

## 研究要旨

標記研究の一環として、第3項先進医療(現 先進医療 B)「生体内吸収性高分子担体を用いた塩基性線維芽細胞増殖因子による血管新生療法」の実施にあたり、被験者組み入れを促進する方策を探求するための研究を進め、その過程で登録除外に至る理由を解析して、本医療技術の一般化のための課題を整理することができた。

## 6) 先進医療に関する診療科ホームページの掲

### A. 研究目的

臨床試験の完遂の裏側には、試験登録に至らなかった多くの被験者候補が存在し、その数は目標症例数の数倍～10倍近くに及ぶことが常である。本研究の目的は、京都大学医学部附属病院単施設による第3項先進医療「生体内吸収性高分子担体を用いた塩基性線維芽細胞増殖因子による血管新生療法」の実施にあたり、被験者組み入れを促進する手法を探求するとともに、最終的に不適格となった候補患者が登録除外に至った理由を明らかにすることである。

### B. 研究方法

上記目的達成のために、当部(臨床試験管理医師と臨床研究コーディネーター)は、臨床試験支援部門として、被験者リクルート進捗会議を合計12回開催し、以下の諸項目について、試験責任医師(診療科)・プロジェクトマネージャーを含めて検討を重ねた。

- 1) 候補患者および除外患者(いずれも匿名)情報の共有、被験者候補数の現状と傾向について
- 2) 個別の被験者候補の適格性について
- 3) 適格基準等 プロトコルの変更について
- 4) 被験者募集状況のまとめとその効果について
- 5) 先進医療の完遂可能性と試験期間延長の必要性について

## 載内容について

### (倫理面への配慮)

世界医師会ヘルシンキ宣言、薬事法、臨床研究に関する倫理指針、第3項先進医療に関する諸通知等を遵守して、本研究を遂行した。

### C. 研究結果

高度医療臨床試験の目標症例数は10名であったが、そのために要した総スクリーニング患者数は78名で、うち64名が除外となった(4名は試験終了時点で待機中であった)。この64名が不適格となった理由について、被験者リクルート進捗会議で得た情報に基づいて、臨床研究計画書の適格基準(選択基準、除外基準)に沿って以下のように分類した。

#### 選択基準に抵触 43名

- 1) 臨床試験の対象となる疾患(下肢末梢性血管疾患)以外の疾患。13名(外傷2名を含む)
- 2) 臨床試験の対象とする重症度を満たさない。  
・より軽症 7名  
・より重症 2名
- 3) 既存の血行再建術で臨床症状の改善が見込まれる。4名
- 4) 対象とする年齢を越えている。6名

- 5) 骨髄、肝機能が保持されていない。貧血 1 名、肝不全 1 名  
 6) 患者本人が臨床試験を希望しない。 3 名、問い合わせのみで受診しない。 6 名

#### 除外基準に抵触 21 名

- 1) 下肢血行再建術後 3 か月以内である。 1 名  
 2) 経皮的冠動脈形成術施行後 3 か月以内である。 1 名  
 3) 以下のいずれかの合併症を有する。  
 ・ コントロール不良な心不全 1 名  
 ・ 臨床的に問題となる感染症 1 名  
 ・ コントロール不良の糖尿病患者 1 名  
 4) 以下の既往を有する。  
 ・ 過去 6 か月以内に発症した脳梗塞 2 名  
 5) 現在、慢性腎不全により維持透析中である。 7 名  
 6) 糖尿病性網膜症で治療中である。 1 名  
 7) 過去、遺伝子治療に関する試験に参加している。 1 名  
 8) 活動性の悪性腫瘍を有する。 3 名  
 9) その他、研究責任者または担当医師が本試験を安全に実施するのに不相当と判断した患者 腹部大動脈瘤 1 名 未保険 1 名

#### D. 考察

本試験（京都大学医学部附属病院単施設による第 3 項先進医療「生体内吸収性高分子担体を用いた塩基性線維芽細胞増殖因子による血管新生療法」）の実施計画立案段階で、本試験に先立ち、行われた臨床試験<sup>1)</sup>の実施の際の被験者組み入れ状況、除外患者の背景と、本試験で予想される組み入れ患者数と登録期間について検討を行った。

先行試験での対象は、閉塞性動脈硬化症、パージャー病、糖尿病性下肢壊疽の患者で Fontaine 分類 III, IV 度に相当し、かつ内科的・外科的な血行再建の適応のない患者であった。低心機能、重症糖尿病、治療の必要な糖尿病性網膜症、担癌患者、およびゼラチン皮内反応要請患者は除外された。先行試験では腎機能による除外基準を設けなかった。

先行試験登録期間であった 2004-2005（約 2 年間）において、候補患者数は 49 名（透析 9 例、非透析 Cre2mg/dl 以下 23 例、非透析 Cre2mg/dl 以上 4 例、不明 13 例）のうち、組み入れ患者は 7 名（透析 2 例、非透析 Cre2mg/dl

以下 5 例）であり、組み入れ割合は 14.3 % (7/49)であった。組み入れ患者から、透析患者を除外すると、10.2% (5/49)の組み入れ割合となった。

除外された 42 例の要因として多い順に：1) 合併症の存在または全身状態不良、2) 従来の外科・内科療法が可能、3) 症状が軽い (Fontaine II 度)、4) 高位狭窄、5) 薬物中毒または非協力的などが挙げられる一方、ほとんどの患者は血管新生治療を希望しての来院であり、不同意による除外はなかった。

これら先行研究の被験者組み入れと除外理由の検討から、本試験計画書立案時に、当院での単施設での臨床試験実施に際して目標症例数 10 例の被験者組み入れを行うのであれば、1 年間の試験期間は困難であり、最低 2 年は必要と見積もった。当初本試験の試験期間は 2010 年 9 月から 2012 年 7 月まで（約 2 年）、登録期間は 2010 年 9 月から 2011 年 12 月まで（1 年 4 ヶ月）として実施を開始したが、2011 年 8 月時点の被験者組み入れ状況から判断し、1 年間試験期間を延長し、試験期間を 2010 年 9 月から 2013 年 7 月まで（約 3 年）、登録期間を 2010 年 9 月から 2012 年 12 月まで（2 年 4 ヶ月）と変更した。最終的には、2010 年 9 月から 2012 年 2 月までの 1 年 6 ヶ月で 10 例の目標症例数の登録を達成できた。総スクリーニング患者数に対する登録割合は 12.8% (10/78)であった。

下肢末梢性血管疾患では 62 歳以上の 56.4% に冠動脈疾患、33.3% に脳血管疾患が合併しており、20.5% は 3 疾患すべてを有するとの報告もあり<sup>2)</sup>、当該疾患を対象とした臨床試験における組み入れ困難について過去にも報告がある<sup>3,4)</sup>。臨床試験で組み入れが困難な理由として患者の特性として、機能的困難、高齢者、合併症が多いことによることが挙げられる。

今回実施した本試験での被験者組み入れと除外理由の検討より、以下の点が考察された。

1. 対象疾患(閉塞性動脈硬化症またはパージャー病)以外の疾患を持つ患者が 13 名紹介されており、四肢の難治性潰瘍等で苦しみながらも満足のいく診断・治療を受けられていない患者が多いことが推察される。

2. 今回の臨床試験では対象とならない 80 歳を越える患者が 6 名紹介されており、人口の高齢化や加齢が動脈硬化の最大の危険因子であることを考えると、今後は超高齢者への対応も必要となる。

3. 先行研究の結果をふまえて除外とした維持透析患者が7名紹介されており、彼らに対しては本医療技術以外のアプローチの開発が望まれる。

4. 末梢性血管疾患など高齢者に発症し、他の動脈硬化性疾患を合併することが多い疾患を対象とする臨床試験立案に際しては被験者見積もりと試験期間の検討が重要であることが確認された。

## E. 結論

以上の分担研究を通じて、「生体内吸収性高分子担体と細胞増殖因子を用いた難治性虚血性疾患に対する新しい再生医療の開発」に寄与することができた。この成果を、今後、下肢末梢性血管疾患以外を対象とする臨床試験の実施支援に役立てたい。

## 参考文献

- 1) Marui et al. A novel approach to therapeutic angiogenesis for patients with critical limb ischemia by sustained release of basic fibroblast growth factor using biodegradable gelatin hydrogel: an initial report of the phase I-IIa study. *Circ J* 2007;71:1181-6.
- 2) Aronow WS et al. Prevalence of coexistence of coronary artery disease, peripheral arterial disease, and atherothrombotic brain infarction in men and women > or = 62 years of age. *Am J Cardiol.* 1994;74:64-5.
- 3) McDermott et al. Recruiting participants with peripheral arterial disease for clinical trials: experience from the Study to Improve Leg Circulation (SILC). *J Vasc Surg.* 2009;49:653-9.e4.
- 4) Hobbs et al. The Exercise vs Angioplasty in Claudication Trial (EXACT): reasons for recruitment failure and the implications for research into and treatment of intermittent claudication. *J Vasc Surg* 2006;44:432-3.

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Yamamoto K, Yamanaka K, Hatano E, Sumi E, Ishii T, Taura K, Iguchi K, Teramukai S, Yokode M, Uemoto S, Fukushima M. An eClinical trial system for cancer that integrates with clinical pathways and

electronic medical records. *Clin Trials.*2012;9(4):408-417.

2. Morimoto N, Yoshimura K, Niimi M, Ito T, Tada H, Teramukai S, Murayama T, Toyooka C, Takemoto S, Kawai K, Yokode M, Shimizu A, Suzuki S. An exploratory clinical trial for combination wound therapy with a novel medical matrix and fibroblast growth factor in patients with chronic skin ulcers: a study protocol. *Am J Transl Res.* 2012; 4(1):52-59.
3. Horie T, Baba O, Kuwabara Y, Chujo Y, Watanabe S, Kinoshita M, Horiguchi M, Nakamura T, Chonabayashi K, Hishizawa M, Hasegawa K, Kume N, Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33 Deficiency Reduces the Progression of Atherosclerotic Plaque in ApoE(-/-) Mice. *J Am Heart Assoc.* 2012; 1(6):e003376.
4. Yamamoto K, Sumi E, Yamazaki T, Asai K, Yamori M, Teramukai S, Bessho K, Yokode M, Fukushima M. A pragmatic method for electronic medical record-based observational studies: developing an electronic medical records retrieval system for clinical research. *BMJ Open.* 2012;2(6). doi:pii: e001622.
5. 村山 敏典, 西村 浩美, 南 学, 横出 正之. 自主臨床試験の健康被害補償に関する検討. *臨床薬理*(0388-1601)43 巻 Suppl. PageS233(2012.10)

## 2. 学会発表

### 国際会議

なし

### 国内会議

1. 横出 正之. 生活習慣病関連学会ガイドライン検証 日本動脈硬化学会「動脈硬化性疾患予防ガイドライン」改訂の方向性. 日本第1回高血圧学会臨床高血圧フォーラム. Page84 平成24年5月12-13, 大阪.
2. 堀江 貴裕, 馬場 理, 尾野 亘, 渡邊 真, 木下 美菜子, 桑原 康秀, 中條 克真, 横出 正之, 北 徹, 木村 剛. マイクロRNA-33欠損は動脈硬化形成を抑制する. 第49回日本臨床分子医学会学術総会. Page75 平成24年4月13-14, 京都.

3. 横出 正之. 動脈硬化性疾患の包括的管理. 第 44 回日本動脈硬化学会総会. Page122 平成 24 年 7 月 19-20, 福岡.
4. 尾野 亘, 堀江 貴裕, 馬場 理, 久米 典昭, 横出 正之, 北 徹, 木村 剛. 動脈硬化性疾患の臨床と病理 臨床と病理の接点をさぐる microRNA-33 の動脈硬化形成における役割の検討. 第 44 回日本動脈硬化学会総会. Page138 平成 24 年 7 月 19-20, 福岡.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

芦田 昇, 横出 正之.

米国特許出願 出願番号: 61/721, 321

出願日: 2012.11.1

発明の名称 "Invention and Usage of Non-human Animal Model for Fibrosis"

出願人: 京都大学 (承継)、UCSD

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし



# 生体内吸収性高分子担体と細胞増殖因子を用いた 難治性虚血性疾患に対する新しい再生医療の開発： オーダーメイド医療の実現に向けた検討

所 属 京都大学大学院医学研究科  
研究分担者 川上 浩司

所 属 京都大学医学部附属病院探索医療センター  
研究分担者 手良向 聡

## 研究要旨

医師主導治験および高度医療評試験のモニタリング手法と、外部委託の有無による違いを探索的に検討した。施設訪問を必須としない試験では、予期できない問題に対処が後手となる可能性が示唆された。このため、サンプリング施設訪問モニタリングの併用、中央モニタリングは内部で実施して施設訪問モニタリングのみを外部委託すること等について考慮する必要がある。

### A. 研究目的

京都大学探索医療センターでは、原則として監査を除き全て学内での実施を基本として臨床試験を支援してきた。しかし、試験数の急激な増大に対応するため、今後より多くの試験の支援が可能となることを目標とし、医師主導治験や高度医療評価制度下で実施する臨床試験について、一部外部委託する試みを始めた。京都大学探索医療センターで支援した医師主導治験および高度医療評価制度下の臨床試験（以下、高度医療試験）におけるモニタリング手法と、外部委託の有無による違いについて探索的に検討する。

### B. 研究方法

#### 【対象】

京都大学医学部附属病院探索医療センターで支援し、2009年4月～2012年3月開始の医師主導治験3試験と高度医療試験3試験、計6試験。

#### 【方法】

・手順書や報告書等のデータを用いた後向き調査を行い、手順書からモニタリング項目、担当者、責任者、プロセス等を、報告書から実施業務の項目、方法、発生した問題点やコメント等を抽出した。

・抽出されたデータを、親和図法、マトリクス図法を用いて、中央モニタリングと施設訪問モニタリングに分けて、外部委託の有無や業務内容、結果、問題点について比較し、それぞれの利点、欠点を分析する。

（倫理面への配慮）

本研究のためのデータ利用に際し、被験者情報および試験識別情報は削除した。

### C. 研究結果

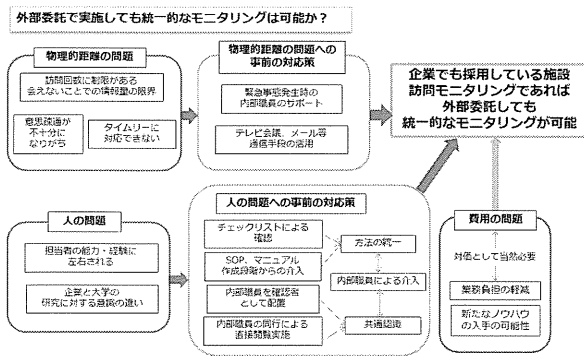
3 治験は施設訪問モニタリングを必須とした。

2 治験は正規と派遣職員の2人体制であり、1 治験は外部委託（実質2人）を主としたが、学内からも業務確認目的で正規職員1人が加わった。高度医療試験の3試験は中央モニタリングを基本とし、問題発生時のみ施設訪問モニタリングを計画した。中央モニタリングはデータマネージャーが実施し、施設訪問モニターは正規職員1人であった。

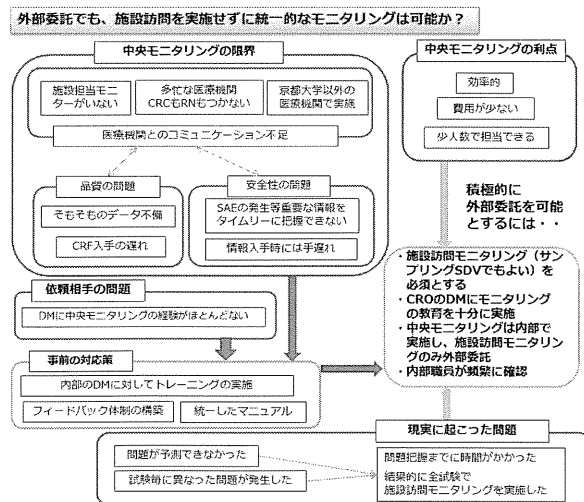
手順書で規定したモニタリング事項、CRF（Case Report Form：症例報告書）提出までのプロセス等を比較した結果、中央モニタリングは計画段階で業務量が少なかった。

高度医療試験では、中央モニタリング手順書は3試験共通で、半年に1回の頻度で定期報告されていたが、3試験中2試験で安全性の問題が認められ、各2回の施設訪問モニタリ

ングを実施された。「SAE (Serious Adverse Event : 重篤な有害事象) 関連の情報について、原資料への記載不十分」等の比較的重要な問題が指摘され、すべてが事後的な指摘となっており、中央モニタリングでは発見が極めて困難な事項であった。施設訪問モニタリングでは、外部委託の有無に関わらず、報告書の内容や報告された問題に大きな違いはなかった。



物理的距離の問題、人の問題はあっても、いずれも内部職員の介入という事前対策を行うことで、企業でも採用している施設訪問モニタリングであれば外部委託しても統一的なモニタリングは可能であると考えられる。



しかし、施設訪問を実施しない場合、中央モニタリングの限界や、予測不能な問題や試験毎に異なる問題を把握する困難さが加わることで、現実に中央モニタリングの利点以上の問題点が発生したと考える。この解決策として、サンプリングでもよいので最初から施設訪問モニタリングを併用すること、委託先DM (Data Manager : データマネージャー) へ中央モニタリング教育を事前に十分に行うこと、中央モニタリングは内部で実施して施設訪問モニタリングのみを外部委託すること等

が考えられる。

#### D. 考察

- 施設訪問モニタリングを実施する試験では、モニタリングを外部委託しても、モニタリング報告書の数等に多少の違いはあるものの、内容に大きな違いは見られなかった。
- 手順書の作成、モニタリング方法やその内容について内部職員が確認を行えば、事前対策により外部委託でも統一的な施設訪問モニタリングは可能であると考えられる。
- 中央モニタリングは施設訪問モニタリングと比べ、計画段階で予測される業務量が少なく効率という利点があるが、問題点をタイムリーに把握しにくいという欠点がある。実際の試験でも、統一マニュアルがあったにもかかわらず、予測できない問題や試験毎で異なった問題が発生し、結果的に全試験で施設訪問モニタリングを要した。特に中央モニタリングを外部委託した試験では、問題の把握までに時間がかかった。このため、対応が遅れる可能性が高くなると考えられる。

#### E. 結論

施設訪問を伴うモニタリングであれば、外部委託であっても共通の計画と内部確認により、統一的なモニタリングが実施できる。施設訪問を必須としない試験では、特に中央モニタリングを外部委託した場合、予期できない問題に対し対応が後手となる可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表 なし

##### 2. 学会発表

- 新美三由紀、多田春江、榎本佳代子、東未来、上山華栄、伊藤達也、池田隆文、川上浩司. 医師主導治験と高度医療評価制度下の臨床試験におけるモニタリング. 第33回日本臨床薬理学会学術総会 (ポスター) 沖縄県 2012. 11. 30
- 上山華栄、多田春江、榎本佳代子、池田隆文、杉江知治、戸井正和、川上浩司. 先進医療制度下の臨床試験へのサンプリング施設訪問モニタリングの導入. 日本臨床試験研究会第4回学術集会総会 (ポスター) 北海道 2013. 2. 7

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

# 生体内吸収性高分子担体と細胞増殖因子を用いた 難治性虚血性疾患に対する新しい再生医療の開発： オーダーメイド医療の実現に向けた検討

所 属 京都大学医学部附属病院 薬剤部  
分担研究者 松原 和夫

## 研究要旨

治験薬GMP基準に従って生体吸収性高分子担体凍結乾燥ゼラチンハイドロゲルシートを製造し、品質試験を実施した。さらに製造した試験薬を用いて、他の研究分担者らが分解性試験や安全制試験を実施した。製造した凍結乾燥ゼラチンハイドロゲルシートは非臨床試験や前臨床試験の試験薬と同等であることが明らかとなり、計画中の臨床試験での使用が可能であると判断された。

## A. 研究目的

これまでに研究代表者及び分担者のグループでは、下肢虚血性疾患に対して、生体吸収性高分子担体（細粒）を用いた高度医療を実施してきた。虚血性心疾患へ生体吸収性高分子担体を用いた臨床研究を実施するにあたり、生体吸収性高分子担体（シート）の製造方法を確立し、安全性を担保することが必要である。

本年度は、昨年度制定した「治験薬に関する文書（臨床研究用）」に基づいて凍結乾燥ゼラチンハイドロゲルシートの製造を行い、臨床試験用試験薬の性能及び安全性の試験を実施する。

## B. 研究方法

1. 製造：「治験薬の製造管理、品質管理等に関する基準（治験薬GMP）第27. 治験薬に関する文書」に従って、ゼラチンハイドロゲルシート製造・品質試験等に関する「治験薬に関する文書（安全性試験用）」を作成し、凍結乾燥ゼラチンハイドロゲルシートを作製した。製造は臨床試験用試験薬と同様に治験薬GMP管理を行う特殊無菌製剤室で製造部門担当者ならびに品質部門担当者によって行った。

2. 品質試験：第十六改正日本薬局方 4.01 エンドトキシン試験法および 4.06 無菌試験法に従って、製造したゼラチンハイドロゲルシートの試験を実施した。また、性能の検査については分担研究者田畑が *in vitro* およびマウスにおける分解性試験を実施した。さらに、製造した凍結乾燥ゼラチンハイドロゲルシートを用いて、ウサギもしくはイヌにおける分解性試験ならびに安全性試験を分担研究者丸井が実施した。

（倫理面への配慮）

分担者松原の実施した研究において、倫理面で問題となる内容は含まれていない。

## C. 研究結果

2011年12月6日制定の治験薬に関する文書に従い、凍結乾燥ゼラチンハイドロゲルシートを4ロット（#120312、#120416、#120821、#120910）作製した。製造工程ならびに無菌室の環境モニタリングについては、品質部門の監査により問題がないことが確認された。

先の2ロットについては製造者の教育訓練を兼ねて行った。後半2ロットについては、