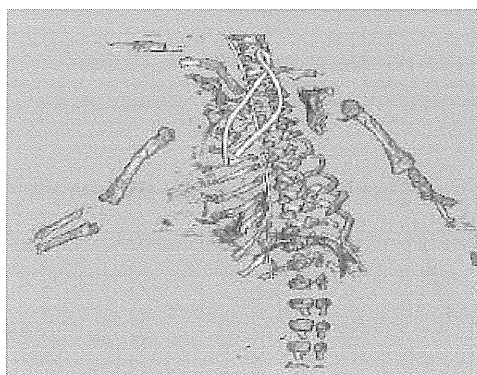


症例2 : 05 Male

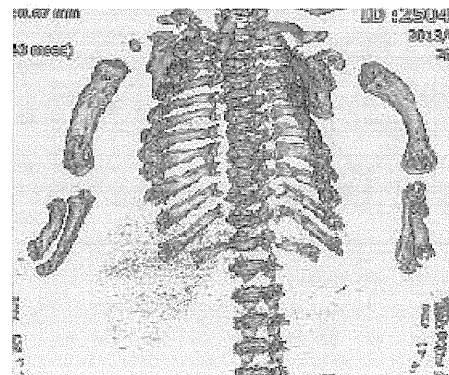
骨髄移植	
年齢	7か月
ドナー	母（保因者）
血液型	A→B
HLA	HLA 1 locus (B) mismatch
移植細胞数	CD34 $8.83 \times 10^6 / \text{Kg}$
間葉系幹細胞移植	
移植回数	9回
移植時期	7か月～2歳9か月
移植細胞数 ($10^6 / \text{kg}$)	平均 $1.8 \times 10^6 / \text{kg}$

骨CT

6か月（移植前）

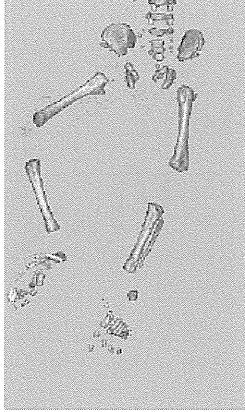


2歳（移植後）

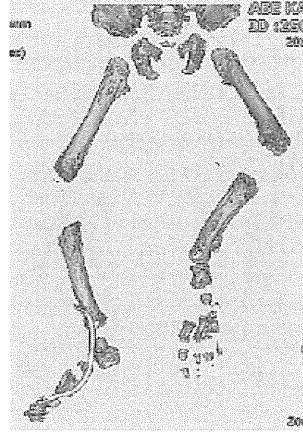


骨CT

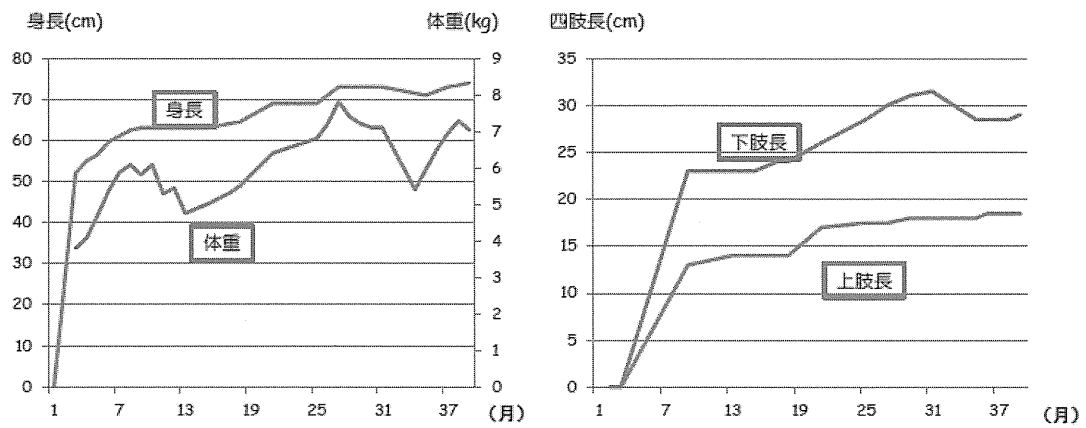
6か月（移植前）



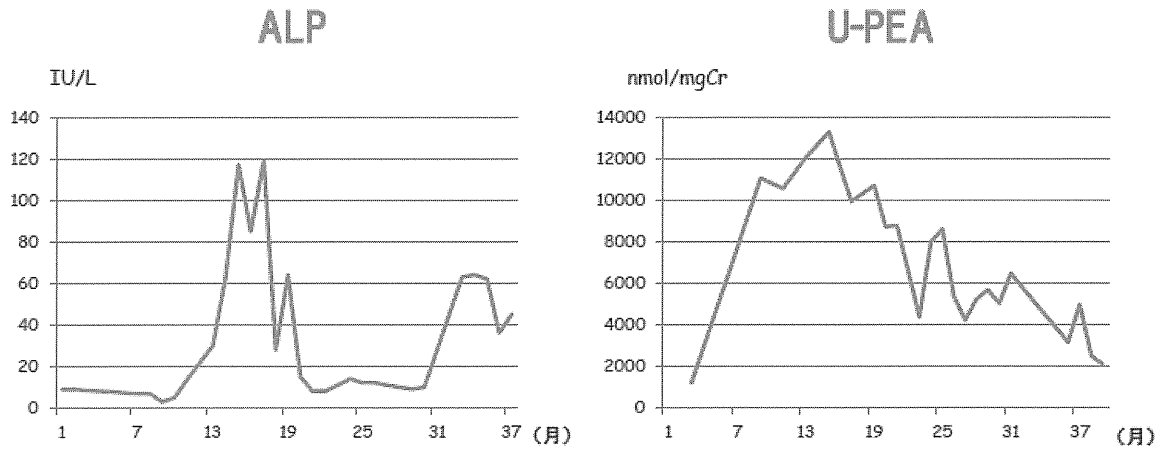
2歳（移植後）



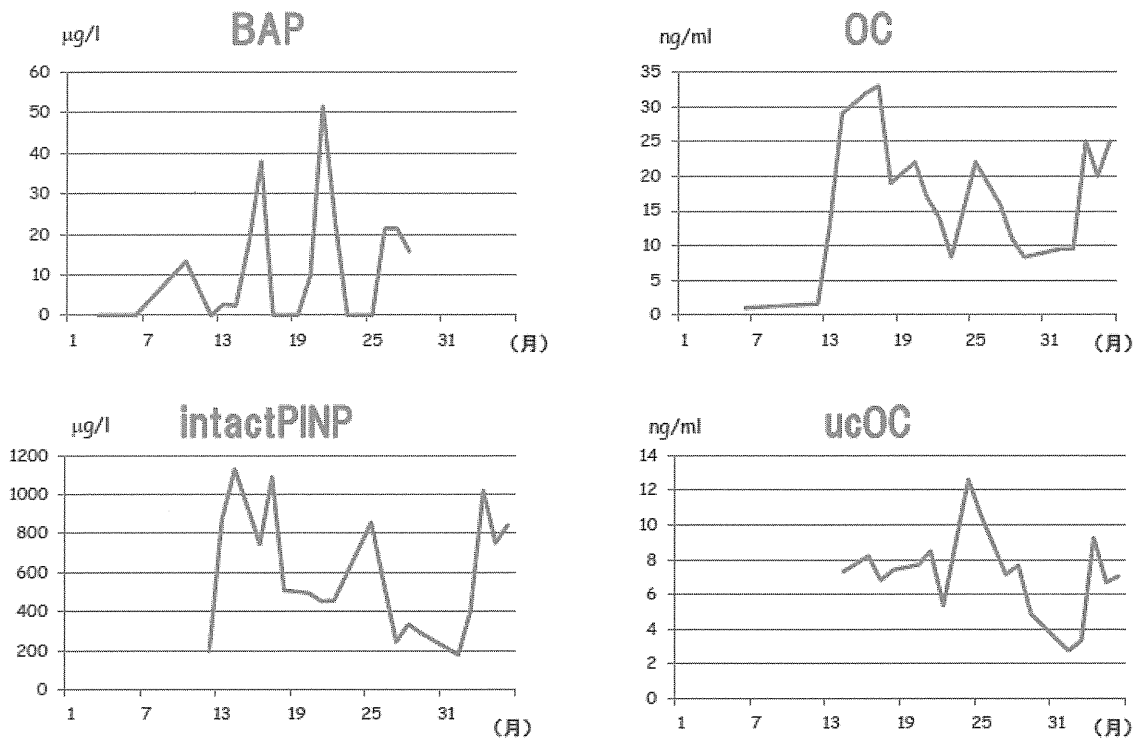
身長・体重・上肢長・下肢長



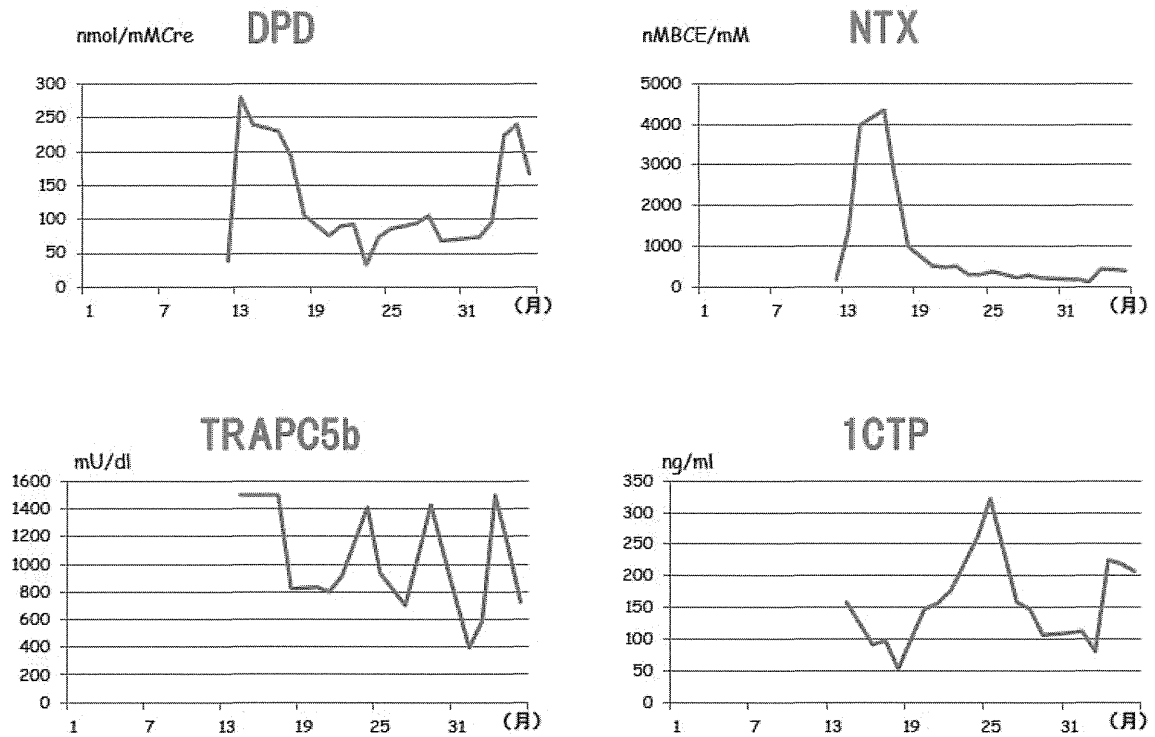
ALP・U-PEA



骨形成マーカー

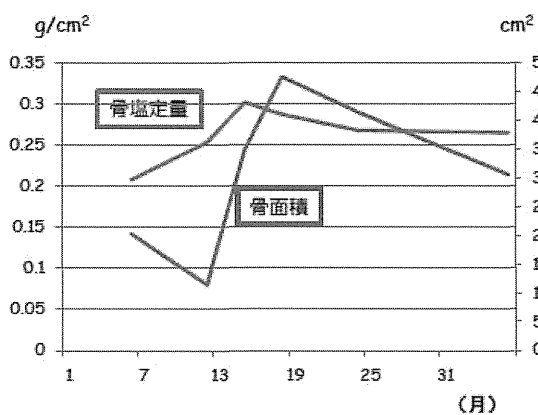


骨吸収マーカー

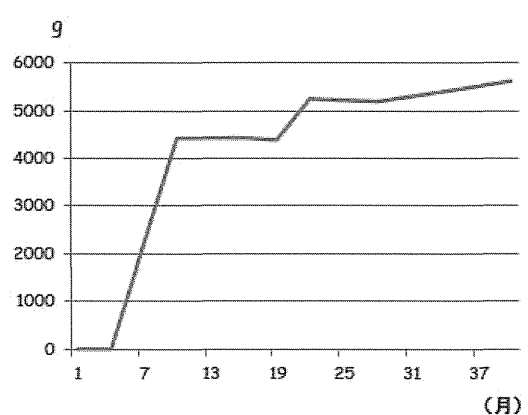


骨塩定量・筋肉量

骨塩定量・骨面積



筋肉量



2症例のまとめ

		症例 1	症例 2
移植回数	BM	1	1
	MSC	5	9
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	
Secondary endpoints			
臨床症状	呼吸機能	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	石灰化の回復	
重篤な合併症	BMT	甲状腺機能低下症	
	MSCT	なし	

平成 23-25 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、外部評価委員会・当該臨床研究の発展に対する方策、
アンケート調査、成長発達評価 -

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

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。しかし、移植医療への説明不足と遠方での治療が臨床研究への参加を躊躇する原因となっていた。また、臨床研究に対する外部評価委員会を行うことで、現在のプロトコルを改善し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、また、現在の問題点に対する方策を明らかにすることができた。現治療では根治療法になり得ない可能性が高いため、細胞治療による根治療法を確立するために、間葉系幹細胞の細胞特性を向上させた（骨への遊走能、増殖能、免疫寛容効果に優れた）間葉系幹細胞の分離培養方法の確立および最適な間葉系幹細胞移植方法（骨髄移植、髄腔内投与、臍帯血移植および臍帯由来間葉系幹細胞移植など）の樹立を行う必要がある。臨床研究に参加して頂いた家族にアンケート調査を行うことで、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。遠城寺・乳幼児分析的発達検査表を用いて経時的に成長発達を評価した結果、運動精神発達は細胞治療により年齢相当ではないが徐々に伸びていることが明らかとなった。

研究協力者

大藪恵一（大阪大学大学院医学系研究科内科系臨床医学専攻情報統合医学小児科学・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）

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）

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）

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)

蓼沼拓(島根大学医学部附属病院リハビリテーション部)

鳥屋尾ゆう子(島根大学医学部附属病院リハビリテーション部)

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。また、外部評価委員会からの指摘を受けて、当該臨床研究の発展させる方策を検討した。

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。

さらに、当該臨床研究を行うことによって救命し骨の石灰化を改善することはできたが、その後の成長発達が健康な子どもたちと同じように進んでいくことが根治療法であるし、患者および家族の最も期待することである。したがって、当該臨床研究を行った患者さんの成長発達の評価を行った。

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・当該臨床研究の発展に対する方策

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、過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、ご助言、ご指摘を頂いた。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。各先生方だけでなく、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き、当該臨床研究を改善した。また、外部評価委員会から頂いたご指導・ご助言を、当該臨床研究の発展に活かすための方策を検討した。

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。

4. 成長発達評価

これまで臨床研究に参加して頂いた2名の患者さんの身体発育および精神発達に関して、遠城寺・乳幼児分析的発達検査表を用いて経時的に評価した。

（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

これまで延べ12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、8例、2例である。不参加あるいは検討中の10例中8例が治療開始基準を満たさなかつたり、経過中に死亡した。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（それぞれ5回、9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、間葉系幹細胞移植を行う回数、ドナーの負担、臨床研究が終了した後の治療の予定であった。

2. 外部評価委員会・当該臨床研究の発展に対する方策

1) 外部評価委員会からの指摘による当該臨床研究の改善点

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、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、ドナー由来細胞が石灰化の改善に寄与していることが明らかとなった。

③間葉系幹細胞の再投与の基準が不明確

2～4 か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。

④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。

2) 当該臨床研究の発展に対する方策

①最適な間葉系幹細胞移植方法の検討

骨髄の中にも間葉系幹細胞が存在するため、骨髄移植だけでも治療効果が得られる可能性が指摘された。また、ドナーの負担が大きい。さらに、現在のドナーはすべて保因者であるため、ALP 活性が低い。保因者は正常の骨構造を有しているが、*in vitro* では骨の石灰化能は正常健康人よりも低い。以上のことが、根治療法となり得ない問題点として挙げられる。

→骨髄移植を受けた患者の間葉系幹細胞は患者由来のままであることが報告されている。また、免疫抑制剤なしにはドナー由来間葉系幹細胞が生着することが困難であることも明らかとなっている。しかし、数%はドナー由来間葉系幹細胞が骨髄内に生着することも明らかになっている。さらに、我々は免疫抑制剤なしに同種間葉系幹細胞が生着しないことをラットの実験で明らかにした（Kotobuki, et al. 2008）。したがって、同種ラット骨髄を経静脈的に全身移植した後、異系ラット間葉系幹細胞を移植して、骨髄移植による効果を検討することとした。

また、ALP 遺伝子変異を認めず（ALP が正常）かつ HLA が一致したドナーからの造血幹細胞移植および間葉系幹細胞移植が臨床像の更なる改善に有効であると思われるため、上記条件を満たすドナーを臨床的にも倫理的にも得やすい、臍帯血移植および同一ドナーの臍帯由来間葉系幹細胞移植を検討することとした。

さらに、間葉系幹細胞を静脈内投与した場合、そのほとんどが肺の毛細血管でトラップされることが報告されている。したがって、間葉系幹細胞の homing を高めるために、骨髄内の直接投与（髄腔内投与）する方法での検討も必要である。

②間葉系幹細胞の生着率向上の必要性

間葉系幹細胞の骨への遊走が悪いこと、正

常の骨構造に到達していないことから、また、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ため、間葉系幹細胞移植の生着率を向上させる必要性を指摘された。

→我々が用いている間葉系幹細胞はドナー由来の骨髄から培養・増殖させた間葉系幹細胞である。培養した間葉系幹細胞はヘテロな集団であるため、すなわち、未分化な状態を維持しているものからある程度分化したものでさまざまである。また、現在は、間葉系幹細胞移植のたびにドナーから骨髄採取を行っているため、ドナーの負担も大きい。したがって、間葉系幹細胞の遊走能、増殖能および免疫寛容効果を高めることが必須である。

生体内の間葉系幹細胞は損傷した組織や、炎症部位、がん局所に遊走し、組織修復、抗炎症作用、がん免疫などに関わっていることが証明されている。また、培養することで新鮮な間葉系幹細胞の細胞特性が失われることが報告されている。したがって、未分化能を維持して、骨への遊走能が高くかつ、増殖能に優れた間葉系幹細胞の単離培養方法の確立を目指すこととした。

また、我々は正常な 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)。また、この疾患の iPS 細胞の樹立にも成功している。さらに、疾患モデルマウスにおいて、遺伝子改変した造血幹細胞移植の効果が示されている。したがって、遺伝子改変した患者由来間葉系幹細胞あるいは疾患特異的 iPS 細胞を遺伝子改変して誘導した間葉系幹細胞を用いて、自家遺伝子改変間葉系幹細胞移植の効果も検討することとした。

③ドナーの負担軽減の取り組み

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ため、ドナーの負担が大きい。これを改善するために、骨髄を培養増殖した間葉系幹細胞を凍結して、適切な時期に適切な量を投与することを検討する必要がある。しかし、骨髄からの間葉系幹細胞を継代するごとに、未熟性や増殖性が低下して、また、形質転換が起こることから、stemness を維持した間葉系幹細胞の培養方法を検討することとした。

④ALP の機能解析

同じ遺伝子変異を有する重症の患者でも骨の石灰化の程度が異なるため、また、骨の石灰化以外の他の症状（特に、肺と中枢神経系）を認めることが明らかとなったため、ALP の機能解析を行うよう指摘を受けた。→骨の石灰化に関して、患者由来間葉系幹細胞および骨芽細胞を用いて、健康人のそれらと遺伝子発現を比較したところ、骨分化や骨の石灰化に関与する遺伝子発現の差異がみられた。それらを参考にして、drug library screening を行って、骨の石灰化が改善する small molecule を同定することとした。また、患者由来の iPS 細胞を樹立することに成功したため、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。

3. アンケート調査

臨床研究に参加された理由として、「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」であった。

治療を受けて良かった点として、「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」、「通常の子どもを育てるよりも一つ一つの事が感動に満ちあふれている」というご意見を頂いた。

治療を受けて悪かった点として、「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」というご意見を頂いた。

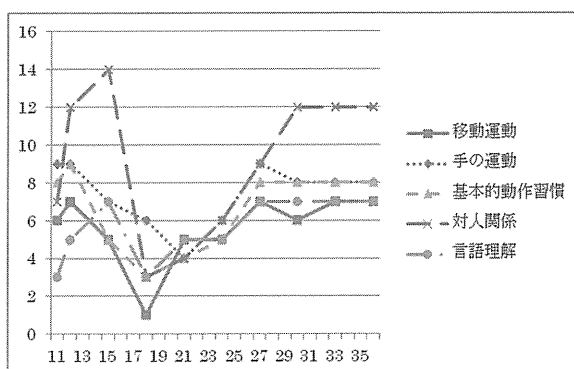
治療に期待することとして、「普通の子どものような暮らしができるようになってほしい」、「不自由なく生きていけるようになってほしい」というご意見を頂いた。

今後の不安について、「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」というご意見を頂いた。

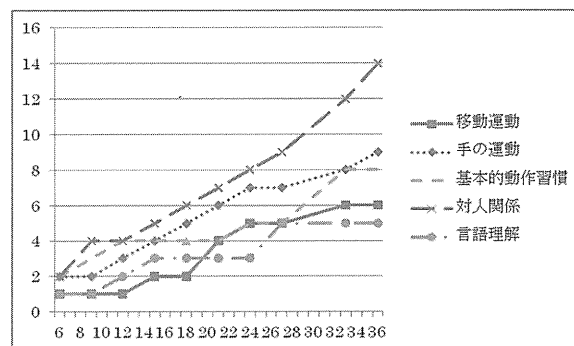
4. 成長発達評価

遠城寺・乳幼児分析的発達検査法を用いて、移動運動、手の運動、基本的動作習慣、対人関係、言語理解を 3 か月ごとに評価した。発語の評価は気管切開を行っているため未評価とした。

症例 1



症例 2



症例 1 は、原病による気管れん縮による低酸素性脳症が起こった 1 歳 6 か月にすべての評価項目で低下しているが、その後徐々に回復している。症例 2 は、移植前を状態から年齢を重ねるごとに徐々に発達指数は伸びているが、年齢相当までは到達していない。

D. 考察

1. 臨床研究のインフォームドコンセント

インフォームドコンセントにより、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。新規の症例への説明について、島根でしか治療を受けることができないこと、家族の、骨髄移植および間葉系幹細胞移植が負担の強い治療であるイメージが強いこと、治療期間が明らかでないこと、さらに根治療法になり得るかわからないことが、治療を受けることへの障害になっていると思われる。

2. 外部評価委員会・当該臨床研究の発展に対する方策

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くことで、当該臨床研究を改変することにより、科学的根

拠に基づいた臨床研究を行うことができた。また、これまでの臨床研究の成果と問題点から、臨床研究の目的は果たしているが、根治療法にはなり得ない可能性が高いことが明らかとなった。したがって、細胞治療による根治療法を確立するために、最適な間葉系幹細胞移植方法の確立、間葉系幹細胞の細胞特性の向上、特に、骨への遊走能・増殖能・免疫寛容効果に優れた間葉系幹細胞の分離培養方法の確立を行う必要があると思われた。

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と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。

4. 成長発達評価

2症例ともに、運動精神発達は年齢相当ではないが少しずつ伸びていることが明らかとなった。年齢に見合った発達が得られない原因として、現在の臨床研究での問題点である、正常の骨構造に到達できていないことが考えられる。また、骨以外の障害、特に中枢神経系障害への効果が不十分であることが推測される。しかし、重症低ホスファターゼ症の自然歴から考慮すると、運動精神発達が見られることは細胞治療効果であると思われた。

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、患者さんおよび家族に則した、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に外部評価委員会を行うことで、現在のプロトコルを改善し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、また、現在の問題点に対する方策が明らかになることができた。

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。

細胞治療の効果が運動精神発達面でも認められたが、正常なこどもの発達には到達できなかった。今後、この面からも、患者および家族が心から満足して幸せを感じることができる治療の確立が重要であると思われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(巻末に別記載)

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

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

- 疾患モデルマウスの治療研究および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

疾患モデルマウスを用いた動物実験を試みるとともに、同種間葉系幹細胞(MSC)の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、同疾患モデルマウスを用いた動物実験において臨床研究で得られた有効性を検証するとともに、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

1. 疾患モデルマウス

低ホスファターゼ症の原因遺伝子である組織非特異的ALP遺伝子に変異を導入したマウス(TNALP KOマウス)について、米国ジャクソン研究所にて凍結受精卵から個体復元を行い、当該遺伝子についてヘテロ接合体の個体(9週齢)を入手した(図1)。

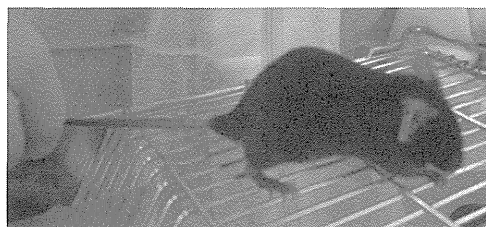


図1. TNALP KOマウス (ヘテロ接合体)

分担者研究機関の動物施設にて、この個体と野生型 BL6 との交配を開始し、ヘテロ接合体個体の繁殖を行った。また、繁殖で得た個体について、解析手法の確認として、軟 X 線写真撮影、 μ CT、下肢全体の DXA（骨密度）測定を株式会社クレハ分析センターに、血清 ALP の測定をオリエンタル酵母株式会社に依頼した。さらに、患者同様、新生仔は、未処置では致死性であるため、ピリドキサル（ビタミン B6）投与の細胞移植前の生存維持にかかる処置についても実験手技を確立した。一方、移植するマウス MSC は、定法に従って 8 週齢マウス大腿骨内腔より採取し、培養を行うとともに、対照として市販のマウス MSC（DS ファーマ社製 C57BL/6 由来 [passage 6]）も入手して培養した(図 2)。

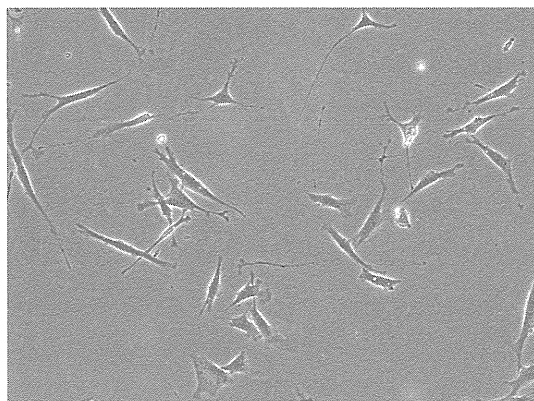


図2. 市販MSC（C57BL/6由来）

2. 間葉系幹細胞培養（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 MSC の培養を行った。搬送中は 10～30℃を保つようにした。培養は 20 μ g/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 MSC 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 MSC 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

1. 疾患モデルマウス

ヘテロ接合体♂ 5匹と野生型♀ 10匹の交配を行い、既報通り、メンデルの法則に従ってヘテロ接合体が得られた。また、試験的にヘテロ接合体同士の交配から、疾患モデルになりうるホモ接合体も死産ながら得られた。これら個体の骨形成に

ついで形態学的解析では、ホモ接合体のみならず、ヘテロ接合体にも異常が疑われた。血清 ALP 値についても、ホモ接合体の検体は得られなかったが、ヘテロ接合体の ALP 値が野生型に比べ、有意に低かった。

移植用のマウス MSC については、培養直後から血球系細胞 (CD45+, TER119+) が混入 (図 3) し、磁気ビーズによる分離 (図 4) も試みたが、残存血球系細胞も増殖した。

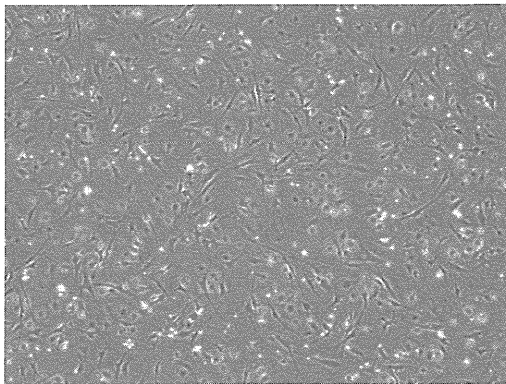


図 3. 磁気ビーズ分離前の MSC 培養

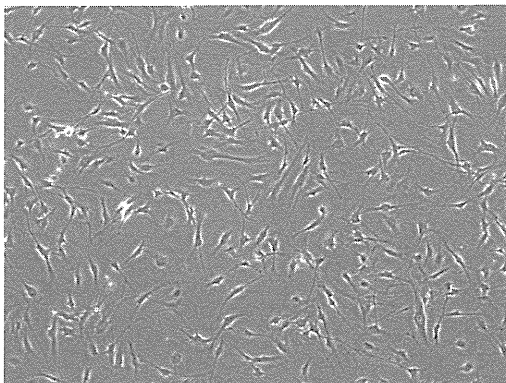


図 4. 磁気ビーズ分離直後の MSC 培養

2. 間葉系幹細胞培養

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 (図 5)。15~35mL の骨髄を 2~3 週間かけて培養し、いずれの場合も体重 (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。無菌検査、マイコプラズマ検査、エンドトキシン検査等の安全性試験結果はすべて異常なかった。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。

症例	移植時期	年齢	移植時期	年齢
2	月	14	月	7
		15		8
1	月	16	月	9
		17		10
		18		11
		19		12
		20		1
		21		2
		22		3
		23		4
		24		5
		25		6
		26		7
		27		8
0	月	28	月	9
		29		10
		30		11
		31		12
		32		1
		33		2
		34		3
		35		4
		36		5
		37		6
		38		7
1	月	39	月	8
		40		9
		41		10
		42		11
		43		12
		44		1
		45		2
		46		3
				4
				5
				6
	7			
	8			
	9			
	10			
	11			
	12			
	1			
	2			
	3			
	4			
	5			
	6			
	7			
	8			
	9			
	10			
	11			

図 5. CPC スケジュール

D. 考察

1. 疾患モデルマウスを用いた動物実験

ヘテロ接合体同士の交配で得られた個体は、同腹仔 3 匹で、予備的に加えた形

態学的解析・血清学的解析結果については個体差の可能性が排除できない。

また、これまでに予備的に得たホモ接合体は全個体死産であり、親の育児放棄による哺乳障害もその原因の一つとして考えられる。

また、大腿骨から新鮮採取した骨髄細胞からの MSC 分離は、ヒトやラットの MSC のような接着性の差異、さらに磁気ビーズによる血球系細胞の選別を利用していても困難であり、さらなる培養法の改善が求められる。

2. 間葉系幹細胞培養

1 例目は 5 回、2 例目は 9 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。

細胞の搬送は当初、陸路で行っていたが、実施期間の途中から空路で行うことになった。空路の場合は通常 X 線検査を受けなければならないが、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 線検査の免除を受けることが可能となった。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

疾患モデルマウスである、TNALP KOマウスのホモ接合体個体は生直後からその維持は困難を極め、治療モデル確立に至らなかった。移植用マウス MSC についても、ラットで可能な通常分離方法では血球系細胞の分離が難しく、分離方法のさらなる改善が求められる。

本研究計画実施期間全体で、安全性が担保された移植用間葉系幹細胞を計 11 回、島根大学へ供出できた。しかしながら、ヒト幹細胞臨床研究の計画どおりドナーより毎回新鮮骨髄を採取し培養した回数は頻回に及んだ。そのため、原料である骨髄細胞数、その後の細胞増殖率等が毎回同一ではなく、品質の管理は決して簡単なことではなかった。何よりも採取にかかるドナーの負担が大きいことから、今後は凍結細胞の利用をぜひとも考慮すべきである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(巻末に別記載)

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

<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示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

た培養スケジュールを再検討する。

○ 上記手順の操作を、細胞が増殖するまで週3回繰り返し行う。

(3) 間葉系幹細胞の回収

1. TrypLE Select (動物由来成分不含のトリプシン様酵素)をサブライ室薬品保冷庫(冷蔵)から必要本数持ちこむ。
2. ×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。
3. フラスコの培養上清の一部をチューブに採取し無菌試験Aに出す。
4. 残りの培養上清は吸引除去する。
5. PBSにて洗浄する。
6. TrypLE Selectを75cm²フラスコに2mL添加し、インキュベーター内で3分間反応させる。3分間で接着細胞が剥離しない場合、反応時間を延長する(15分以内)。
7. FBS培地で反応を停止させ、数回Suspensionする。
8. 50mLチューブに回収後、フラスコ内に残っている細胞をFBS培地で回収する。
9. 全ての培養フラスコを上記の手順で処理し間葉系幹細胞を回収する。
10. 回収した細胞浮遊液の一部をマイクロチューブに採取する。
11. Nucleo Counterにて死細胞数、全細胞数を測定し、生細胞数を計算する。
12. 回収した細胞浮遊液は4℃にて900rpm、5分間、遠心分離を行ない、培養上清を吸引除去する。
13. 5×10⁵cells/mLにResuspensionする。
14. 継代に必要な細胞浮遊液(5×10⁵cells/75cm²)を50mLチューブにとる。

VII:細胞培養工程(2次培養)

(1) 間葉系幹細胞のフラスコへの播種

1. 播種する75cm²フラスコに症例ID、作業日、継代数を記載する。
2. 培養スケジュールと培養培地残量より10～13mLの範囲でフラスコあたりの培地量を決定する。
3. 継代用細胞浮遊液の入った50mLチューブにFBS培地を加える。