

201308013A

厚生労働科学研究費補助金  
医療機器開発推進研究事業

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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山原研一

平成 26 (2014) 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

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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山原研一

平成 26 (2014) 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 . . . . . 7

「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 . . . . . 11

「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 . . . . . 15

「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 . . . . . 23

# 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・有効性を確認した、②PMDA 薬事戦略相談対面助言での医薬品ベースの単核球分離液に関する問題点指摘を受け、汎用単核球分離液 (Ficoll-Paque) への変更、及びそれに伴う問題点 (Ficoll-Paque 除去の必要性) 解決に向けた、共同研究企業とのデバイス開発推進を行った、③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、専門家との協議および改正薬事法等を含む情報収集を行った。今後、PMDA との協議を継続しながら、医療機器化しやすいデバイス開発を進め、目標である臨床開発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) 構築や煩雑な手技の問題により、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

における骨髓移植(骨髓採取 500ml 以上)用の骨髓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(採取骨髓量 20-50ml)には使用することができない。本研究開発は医療機器に関する早期・探索的臨床試験拠点である国立循環器病研究センター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髓単核球の第 I/IIa 相臨床試験の終了と安全性・有効性検証、共同研究企業とのデバイス開発、およびデバイスの早期医療機器承認を目指した体制整備・情報収集を推進した。

## B. 研究方法

本年度は、脳梗塞患者を対象とした自己骨髓単核球の第 I/IIa 相臨床試験の安全性・有効性検証、共同研究企業とのデバイス開発、およびデバイスの早期医療機器承認を目指した体制整備・情報収集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髓単核球移植の第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髓単核球移植の第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、予定症例数を終了し、安全性および有効性評価を行った(田口ら)。

### ②単核球分離デバイス本体の開発

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、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骨髓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髓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、であり、特別なスキルがなくても安全かつ簡易に骨髓単核球分画が単離出来る構造を目指した。

(山原、田口ら)。

### ③医薬品ベースの単核球分離液の検討

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を開発した。また、同比重遠心分離液を用い骨髓単核球を分離し、マウス脳梗塞モデルに移植することでその治療効果を検証した。(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幹細胞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。昨年度、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IIに該当する旨

の見解を得た。今年度は、その見解をもとに共同研究先企業とともに機器のデザイン開発をおこないつつ、臨床試験について検討を開始した(山本、山原ら)。

#### ⑤単核球分離デバイスの事業化に向けた研究

大規模な設備を必要とせずシンプルな器具と操作によって細胞治療を実施可能とする幹細胞分離デバイスは、製品化を伴って医療の均てん化に貢献するであろうと期待できる。デバイスの製品化に向けて、国内はもとより海外における特許などの動向と、競合となる可能性がある製品についての動向が、新しい製品を上市するにあたって把握しておくべきところである。本研究分担者らは、特に海外の特許動向と製品化状況を探査し、幹細胞分離デバイスの事業化の推進を図った。(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、倫理委員会および厚労省に報告を行った。安全性に関し、脳梗塞7日後と比し投与1ヵ月後におけるNIHSS悪化症例は、脳梗塞再発を発症した症例のみであり、その頻度は8.3%と、ヒストリカルコントロール群との比較では非劣性であった。有効性に関しては、脳梗塞7日後と細胞投与1ヵ月後におけるNIHSSの改善度は平均4.75点であり、ヒストリカルコ

ントロール群との比較では有意に良好であった(田口ら)。

#### ②単核球分離デバイス本体の開発

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(株)カネカと共に行った。具体的には、(1)周辺特許(特願2011-2843821号、特願2011-284382号)に基づいた試作品を作成し、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。

また、新たな特許技術(特願2012-117511)を元に、より低コストを目指したバック形状のデバイス開発を開始し、試作品作成およびその基礎検討を共同研究企業と行い、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(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。

更に、マウス脳梗塞モデルにおいて、医薬品ベース比重遠心分離液(Nycoprep)を用いた骨髄単核球を移植したところ、治療効果が得られなかったことから、同分離液開発は中止となった(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

昨年度は PMDA の薬事戦略相談を行い、当該医療機器がクラスⅡに該当するという事で意見の合致をみた。一方、当該医療機器を用いて分離された幹細胞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言いがたいとの判断が示され、分離された幹細胞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 で分離している骨髄単核球と、当該医療機器を用いて分離された骨髄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った。また、当該医療機器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。

薬事戦略相談の結果を受けて、臨床試験の計画の検討に入る予定であったが、共同研究企業が社内判断で開発を中断することになった。そのため、昨年度末より今年度にかけては、新たな共同研究企業の探索から契約作業をおこなった。その結果、新たな共同研究先企業が決定し、機器デザインの検討が開始された。

また、今年度は薬事法の改正と再生医療等安全性確保法の成立があり、これら両法が当該医療機器の開発の道筋に大きく影響することから、これら両法に関する情報収集を開始し、現在も継続して情報収集、分析中である(山本ら)。

## ⑤単核球分離デバイスの事業化に向けた研究

遠心分離など密度差を利用して単核白血球を分離・収集する特許や活栓で成分の混合・分離を図る海外の特許について検索した

結果、既に企業から出願されているものが複数認められた。

また、遠心分離器を使用して骨髄単核細胞を分離する装置としては Res-Q™ 60 BMC System (ThermoGenesis Corp.), MarrowStim™ Concentration System (Biomet Biologics Inc.) など、市場に供給されているものが確認できた。これら二つのデバイスについては、分離に伴う作業時間は15分程度であって、本研究費補助金事業において開発を進めている幹細胞分離デバイスとほぼ同等とみなせるものであるが、主に研究用として使用されていると想定された(赤川ら)。

## 考察

昨年度の 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、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、その具体化には治験の必要性が示唆され、高コストになると予想された。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。事実、マウス脳梗塞モデルにおいて検証を行ったところ、医薬品ベースの単核球分離液とほぼ同じ組成の Nycoprep にて得られた単核球では、治療効果が得られなかった。脳梗塞患者を対象にした骨髄単核球移植では、Ficoll-Paque を細胞分離液として用いていることもあり、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必要性がある。現在、共同研究企業（カネカ）と共に開発を進めており、来年度には上市レベルの試作品を完成させたいと考えている。

#### 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、現在、その解決に向けた開発を継続中である。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きたい。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Tsuji M, Taguchi A, Ohshima M, Kasahara Y, Sato Y, Tsuda H, Otani K, Yamahara K, Ihara M, Harada-Shiba M, Ikeda T, Matsuyama T. Effects of intravenous administration of umbilical cord blood CD34(+) cells in a mouse model of neonatal stroke. *Neuroscience*. 2014;263:148-58.
2. Kaneko M, Shintani Y, Narita T, Ikebe C, Tano N, Yamahara K, Fukushima S, Copen SR, Suzuki K. Extracellular high mobility group box 1 plays a role in the effect of bone marrow mononuclear cell transplantation for heart failure. *PLoS One*. 2013;8(10):e76908.
3. Kasahara Y, Ihara M, Nakagomi T, Momota Y, Stern DM, Matsuyama T, Taguchi A. A highly reproducible model of cerebral ischemia/reperfusion with extended survival in CB-17 mice. *Neurosci Res*. 2013;76(3):163-8.
4. Kasahara Y, Ihara M, Taguchi A. Experimental evidence and early translational steps using bone marrow derived stem cells after human stroke. *Front NeurolNeurosci*. 2013;32:69-75.
5. Tsuji M, Ohshima M, Taguchi A, Kasahara Y, Ikeda T, Matsuyama T. A novel reproducible model of neonatal stroke in mice: comparison with a hypoxia-ischemia model. *Experimental Neurology*. 2013; 247 (9):218-25.
6. Ihara M, Taguchi A, Maki T, Washida K, Tomimoto H. A Mouse Model of Chronic Cerebral Hypoperfusion Characterizing Features of Vascular Cognitive Impairment. *Methods in Molecular Biology*, 2014, (1135) 95-102.
7. Taguchi A, Kasahara Y, Matsuyama T. Letter by Taguchi et al Regarding Article, "Granulocyte Colony-Stimulating Factor in

- |   |   |
|---|---|
| <p>Patients With Acute Ischemic Stroke: Results of the AX200 for Ischemic Stroke Trial". Stroke. 2014 ;45(1):e8.</p> <p>8. 田口 明彦 脳梗塞後の修復メカニズムと細胞治療 (Post-Stroke Repairing Mechanism and Cell Therapy) 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 脳循環代謝 24 巻 2号 Page 67-70 2013</p> <p>9. 田口 明彦 高齢者のための再生医療研究の現状と未来への展望 脳梗塞患者に対する再生医療の現状とその未来 日本老年医学会雑誌 50 巻 3 号 Page359-361 2013</p> | <p>2. 実用新案登録<br/>なし</p> <p>3.その他<br/>なし</p> |
|---|---|

2. 学会発表 (発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

なし

1. 山原 研一, 笠原 由紀子, 田口 明彦 比重遠心分離液の組成により変化する骨髄単核球分画 真の骨髄単核球とは? 第 17 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 (2013.11.23)
2. 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
3. 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

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

## 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

昨年度に引き続き、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の開発・製品化を目指した研究を行った。PMDA 薬事戦略相談対面助言において指摘された単核球分離液に関する問題点を踏まえ、①汎用単核球分離液(Ficoll-Paque)への変更とそれに伴う問題点(Ficoll-Paque 除去の必要性)解決、②新規申請した特許内容の具体化、に向けた開発を共同研究企業と共に行った。

### 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開発

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、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、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医薬品ベース単核球分離液の検討

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を開発した。また、同比重遠心分離液を用い骨髄単核球を分離し、マウス脳梗塞モデルに移植することでその治療効果を検証した。

#### ③単核球分離デバイスの医療機器承認を目指した活動展開

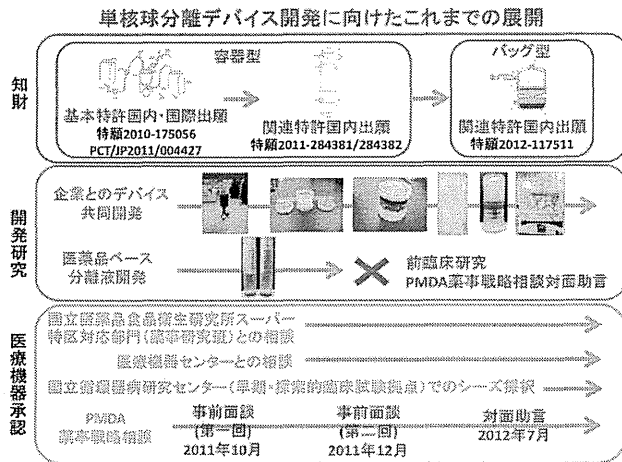
国立医薬品食品衛生研究所スーパー特区対応部門の担当者や、薬事承認審査経験のある研究分担者山本らと共同で、PMDA 薬事戦略相談を平成 23 年 10 月から開始している。これまでの事前面談や対面助言(平成 24 年 7 月 20 日)において、①本デバイスの医療機器認可には臨床的有用性を示す必要性があること、②医薬品ベースの幹細胞分離液を用いるには、既承認医薬品の新規適応

取得をする必要がある、との指摘を受けた。そこで、これら指摘を踏まえたデバイスの実用化を目指した活動を展開した。

(倫理面への配慮)

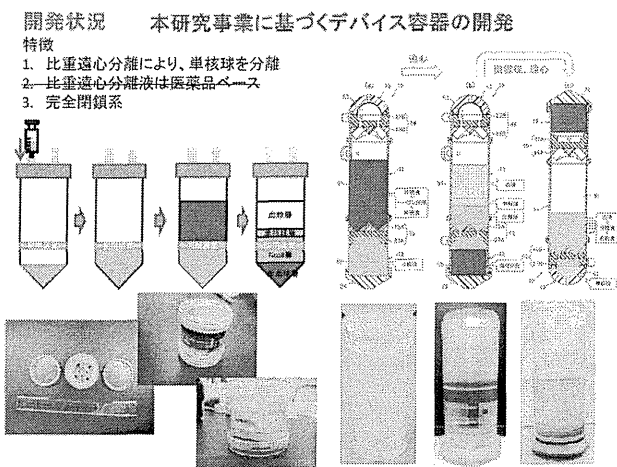
ヒト骨髄を用いた研究は、「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、当センターの倫理委員会の審査により承認を得て実施した。

C. 研究結果(図1)



①単核球分離デバイス本体の開発

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(株)カネカと共にを行った。具体的には、(1)周辺特許(特願2011-284381号、特願2011-284382号)に基づいた試作品を作成し、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2)。

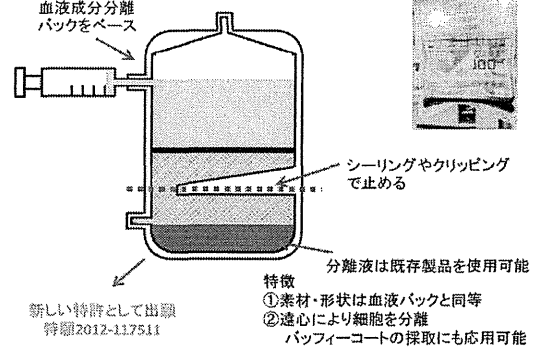


(2) 新たな特許技術(特願 2012-117511)を元に、より低コストを目指したバック形状のデバイス

開発を開始し、試作品作成およびその基礎検討を共同研究企業とを行い、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)。

開発状況 本研究事業に基づくデバイス容器の開発

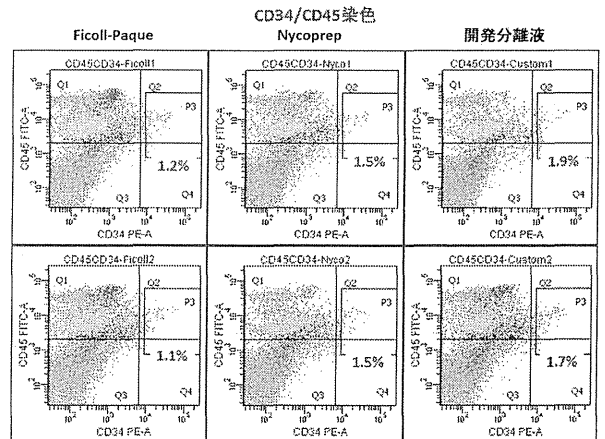
- 特徴  
 1. 比重遠心分離により、単核球を分離  
 2. 比重遠心分離液は医薬品ベース  
 3. 完全閉鎖系



②医薬品ベースの単核球分離液の作成

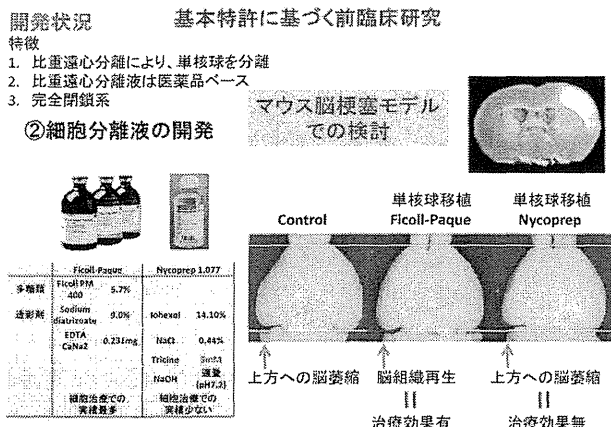
市販比重遠心分離液の組成を参考に造影剤をベースとした、静脈内投与が認められている医薬品のみからなる比重遠心分離液の作成を行った。作成した比重遠心分離液と臨床試験において最も使用されている Ficoll-Paque の両者を用い、市販ヒト骨髄から単核球を分離し、得られた細胞数、死細胞割合、FACS による表面抗原マーカー解析を行った。結果、構成される血球成分組成に差が見られたことから、細胞治療の際、医薬品ベースの単核球分離液では従来の Ficoll-Paque のデータとは異なる臨床試験結果が得られる可能性が示唆された(図3)。

医薬品ベース比重遠心分離液の開発



更に、マウス脳梗塞モデルにおいて、医薬品ベース比重遠心分離液(Nycoprep)を用いた骨髄単核球を移植したところ、治療効果が得られなかつ

たことから (図4)、同分離液開発は中止となった。



### ③単核球分離デバイスの医療機器承認を目指した活動展開

PMDA 薬事戦略相談対面助言における指摘、および上記結果を踏まえ、単核球分離デバイス開発に関し、①幹細胞分離以外にも使用可能な汎用性を持たせる、②幹細胞分離液は細胞治療研究において汎用されている Ficoll-Paque とする、という内容に研究内容を変更した。特に Ficoll-Paque という医薬品ではない分離液を用いる必要性から、細胞の洗浄工程をデバイスに組み込む必要性が生じ、現在その試作品作成を繰り返している段階である。今後、仕様決定を行った後、PMDA 薬事戦略相談対面助言を再度受ける予定である。

### D. 考察

昨年度の 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、その具体化には治験の必要性が示唆され、高コストになると予想された。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。事実、マ

ウス脳梗塞モデルにおいて検証を行ったところ、医薬品ベースの単核球分離液とほぼ同じ組成の Nycoprep にて得られた単核球では、治療効果が得られなかった。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必要性が生じている。現在、共同研究企業 (カネカ) と共に開発を進めており、来年度には上市レベルの試作品を完成させたいと考えている。

### E. 結論

本研究の目的である、簡便且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、現在、その解決に向けた開発を継続中である。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. Tsuji M, Taguchi A, Ohshima M, Kasahara Y, Sato Y, Tsuda H, Otani K, Yamahara K, Ihara M, Harada-Shiba M, Ikeda T, Matsuyama T. Effects of intravenous administration of umbilical cord blood CD34(+) cells in a mouse model of neonatal stroke. *Neuroscience*. 2014;263:148-58.
2. Kaneko M, Shintani Y, Narita T, Ikebe C, Tano N, Yamahara K, Fukushima S, Coppens SR, Suzuki K. Extracellular high mobility group box 1 plays a role in the effect of bone marrow mononuclear cell transplantation for heart failure. *PLoS One*. 2013;8(10):e76908.

## 学会発表

1. 山原 研一, 笠原 由紀子, 田口 明彦 比重遠心  
分離液の組成により変化する骨髄単核球分画  
真の骨髄単核球とは? 第17回日本心血管内分  
泌代謝学会学術総会 (2013.11.23)

## 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. 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 長東 一行

### 研究要旨

自己骨髄単核球細胞を用いた治療法は、四肢虚血などの虚血性疾患においては既にその臨床試験的な有用性が証明されている。本研究では脳梗塞患者を対象に自己骨髄単核球移植の第 1/2a 相臨床試験を実施し、その安全性および有効性の検証を行った。

### A. 研究目的

脳血管障害は我が国における要介護者の原因疾患の第一位であるが、tPA 治療や血栓除去術の Therapeutic time window は発症数時間以内であり、その後の治療法はリハビリテーション以外には全く存在していない。脳梗塞患者に対する自己骨髄単核球細胞を用いた亜急性期における細胞治療は、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/有効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た。

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

(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



予定していた全 12 症例の全ての経過 follow を終了した。

#### 1. 重篤な有害事象

下記の有害事象が各一症例存在した

①慢性期に敗血症発症

②細胞治療前後に脳梗塞再発

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)の検討では、敗血症に関しては細胞治療との因果関係なし、脳梗塞再発に関しては因果関係不明との結論であった。再発症例に関しては倫理委員会および厚労省に報告を行った。

#### 2. 安全性のプライマリエンドポイント

脳梗塞 7 日後と比し投与1ヵ月後における NIHSS 悪化症例は、脳梗塞再発を発症した症例のみであり、その頻度は 8.3%であった。ヒストリカルコントロール群との比較では非劣性であることが示された。

#### 3. 有効性のプライマリエンドポイント

脳梗塞 7 日後と細胞投与1ヵ月後における NIHSS の改善度は平均 4.75 点であり、ヒストリカルコントロール群との比較では有意に良好であることが示された。

#### D. 考察

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であること示されたと我々は考えている。本治療法を普及するためには、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が非常に重要であると考えている。

#### 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、要介護者数および介護費用の抑制には、新規治療法開発およびその普及促進に関する研究の継続が必要不可欠であると考えている。

#### F. 健康危険情報

上記有害事象報告参照。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kasahara Y, Ihara M, Nakagomi T, Momota Y, Stern DM, Matsuyama T, Taguchi A. A highly reproducible model of cerebral ischemia/reperfusion with extended survival in CB-17 mice. *Neurosci Res*. 2013;76(3):163-8.
2. Ihara M, Taguchi A, Maki T, Washida K, Tomimoto H A Mouse Model of Chronic Cerebral Hypoperfusion Characterizing Features of Vascular Cognitive Impairment *Methods in Molecular Biology*, 2014, (1135) 95-102
3. Taguchi A, Kasahara Y, Matsuyama T. Letter by Taguchi et al Regarding Article, "Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Patients With Acute Ischemic Stroke: Results of the AX200 for Ischemic Stroke Trial". *Stroke*. 2014 ;45(1):e8.
4. Tsuji M, Taguchi A, Ohshima M, Kasahara Y ,Saito Y, Tsuda Y, Otani K, Yamahara K, Ihara M, Harada-Shiba M, Ikeda T, Matsuyama T. Effects of intravenous administration of umbilical cord blood CD34+ cells in a mouse model of neonatal stroke. *Neuro Science* in press
5. Kasahara Y, Ihara M, Taguchi A. Experimental evidence and early translational steps using bone marrow derived stem cells after human stroke. *Front NeurolNeurosci*. 2013;32:69-75
6. Tsuji M, Ohshima M, Taguchi A, Kasahara Y, Ikeda T, Matsuyama T. A novel reproducible model of neonatal stroke in mice: comparison with a hypoxia-ischemia model. *Experimental Neurology*. 2013;247(9):218-25
7. 田口 明彦 脳梗塞後の修復メカニズムと細胞治

療 (Post-Stroke Repairing Mechanism and Cell  
Therapy) 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 脳循環代謝 24  
巻 2号 Page 67-70 2013

8. 田口 明彦 高齢者のための再生医療 研究の現  
状と未来への展望 脳梗塞患者に対する再生医  
療の現状とその未来 日本老年医学会雑誌 50  
巻 3号 Page359-361 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）  
特記すべきことなし

## 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

研究分担者 山本 晴子 国立循環器病研究センター 先進医療・治験推進部 部長

### 研究要旨

現在、幹細胞を用いた細胞治療は、特定機能病院を中心としてごく少数の患者を対象に実施されているのみである。この原因の主なものとして、現状では細胞の分離、培養過程を細胞調整施設（CPC）で行わなければならない、CPCとその稼働体制が構築されたごく少数の施設でのみ対応が可能であり、一般診療への普及は困難である。我々は、CPCなしで細胞分離が可能で、完全閉鎖系で操作が容易、かつ生体に安全な分離液を用いた分離デバイスの開発を開始するとともに、医療機器として早期認可を可能とするための研究を開始した。昨年度は専門家のアドバイス等を受けた上でPMDAの薬事戦略相談を実施し、クラス分類や臨床開発の道筋について一定の見解を得たが、一方で強度上研究企業の変更に迫られた。今年度は薬事法の改正と再生医療等安全性確保法の成立があり、デバイスの開発プロセスに大きな影響を与えることが考えられるため、これら2法について、情報を収集し、今後発出される省令および通知を更に詳細に検討する必要があるに出てきた。来年度には臨床開発のプロセスを決定していく予定である。

### A. 研究目的

現在、幹細胞を用いた細胞治療は、特定機能病院を中心としてごく少数の患者を対象に実施されているのみである。この原因の主なものとして、現状では細胞の分離、培養過程を細胞調整施設（CPC）で行わなければならない、CPCとその稼働体制が構築されたごく少数の施設でのみ対応が可能であり、一般診療への普及は困難である。我々が臨床試験として実施している急性期脳梗塞患者に帯する骨髄間葉系幹細胞による治療は、分離液を用いて幹細胞を分離、洗浄するだけのプロセスであるため、完全閉鎖系で操作が容易、かつ生体に安全な分離液を用いた分離デバイスがあれば、CPCは必ずしも必要でなくなる。そこで、この条件を満たす分離デバイスの開発を開始するとともに、医療機器として早期認可を可能とするための研究を実施した。

### B. 研究方法

共同研究を行っている医療機器企業とともに試作した幹細胞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。昨年度、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Ⅱに該当する旨の見解を得た。今年度は、その見解をもとに共同研究先企業とともに機器のデザイン開発をおこないつつ、臨床試験について検討を開始した。

### (倫理面への配慮)

今年度については、臨床試験計画策定はおこなわず、倫理面への配慮を必要とする研究に該当しなかった。

### C. 研究結果

昨年度はPMDAの薬事戦略相談を行い、当該医療機器がクラスⅡに該当するという意見の合致を見た。一方、当該医療機器を用いて分離された幹細胞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、分離された幹細胞の臨床的有用性を何らかの形で検証する必要がある

あるという見解が PMDA より示された。また、現在CPCで分離している幹細胞と、当該医療機器を用いて分離された幹細胞との性質の類似性も示される必要があるとのことであった。また、当該医療機器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。

薬事戦略相談の結果を受けて、臨床試験の計画の検討に入る予定であったが、共同研究企業が社内判断で開発を中断することになった。そのため、昨年度末より今年度にかけては、新たな共同研究企業の探索から契約作業をおこなった。その結果、新たな共同研究先企業が決定し、機器デザインの検討が開始された。

これらの活動と並行して、医療機器を使用せずにCPCで分離した幹細胞を用いた急性期脳梗塞患者を対象とした臨床試験（既遂）のデータのとりまとめ及び解析作業をおこなった。こちらについては、主たる研究者が現在論文準備中である。また、今年度は薬事法の改正と再生医療等安全性確保法の成立があり、これら両法が当該医療機器の開発の道筋に大きく影響することから、これら両法に関する情報収集を開始し、現在も継続して情報収集、分析中である。

#### D. 考察

医療機器の認可は薬事法及び関連法令に基づいて行われているが、現状では関連法令が医薬品の許認可と類似の内容であり、医療機器の特徴が必ずしも正しく反映されていないという問題点が指摘されている。我々の開発している医療機器は、従来CPCで行われている細胞分離手技を簡便な医療機器で行うことで、CPCの使用可能な施設でしか実施できない治療行為をほぼ国内全地域に普及させることのできる画期的なコンセプトの医療機器である。操作が簡便で使用毎に遣い捨てるという性質から、機器自体は単純な構造であり、販売予想価格も非常に低いと考えている。そのこと自体は認可後の当該機器の普及に大きく寄与すると思われるが、逆に開発コストを低く抑えなければ採算性がなく、企業に導出することが困難という問題を抱えている。昨年度は、採算性の見込みが立ちにくく共同

研究企業が開発を中断するという事象が起こった。これには、当該機器で分離した細胞の臨床的有用性まで臨床試験で確認するようとの PMDA における薬事戦略相談の結果も影響している可能性が考えられた。我々の開発している細胞分離デバイスは、CPCで行われる細胞分離手技をより簡便な手技に変換することを目的としているのであり、分離された生産物の臨床的有用性の検討のレベルは、自ずと医薬品とは異なつてしかるべきと考えている。そのため、医師主導治験や先進医療等の制度を利用した臨床評価の方法について検討を続ける。また、今年度は薬事法の改正と再生医療等安全性確保法の成立があり、細胞分離デバイスの開発プロセスに大きな影響を与えることが考えられるため、これら2法について、情報を収集し、今後発出される省令および通知を更に詳細に検討する必要があると出てきている。いずれにせよ、当該医療機器の開発には、過剰なコストはかけずに採算性を担保するという課題を検討し続ける所存である。

#### E. 結論

昨年度は開発中の医療機器のクラス分類が明らかになった。また、現行薬事法および関連法規制では、当該デバイスの最終産物である分離細胞の臨床的有用性の検討までが求められることも判明したため、共同研究企業の変更にも迫られた。今年度は薬事法の改正と再生医療等安全性確保法の成立があり、細胞分離デバイスの開発プロセスに大きな影響を与えることが考えられるため、これら2法について、情報を収集し、今後発出される省令および通知を更に詳細に検討する必要があると新たに出た。来年度は、これら2法の関連初通知等を収集、分析しつつ、当該機器の臨床開発の道筋について検討をおこなう予定である。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）