

目次

1. 研究目的	1
2. 経緯	1
3. 対象疾患と適格基準	5
4. 試験物	7
5. 臨床研究実施計画	9
6. 主要評価項目及び副次評価項目	11
7. 観察・検査項目とスケジュール	13
8. 被験者の安全性の確保	17
9. 被験者毎の臨床研究中止の基準及び手順	20
10. 臨床研究実施計画書の遵守、逸脱又は変更	20
11. 臨床研究の終了又は中止及び中断	21
12. 同意取得	22
13. 登録	22
14. 症例報告書	23
15. 統計学的考察	24
16. 効果安全性評価委員会	25
17. 臨床研究の品質管理	26
18. 臨床研究の倫理的実施	26
19. 記録等の保存	27
20. 臨床研究総括報告書の作成	27
21. 臨床研究終了後の追跡調査の方法	27
22. 臨床研究費用並びに健康被害の補償	27
23. 臨床研究成果の帰属及び研究結果の公表に関するとり決め	27
24. 臨床研究実施体制	28
25. 文献	31

1. 研究目的

表皮水疱症（接合部型および栄養障害型）患者に対する家族ドナー由来骨髄間葉系幹細胞局所移植術に基づく再生療法の安全性、有効性を評価し、将来の全身性骨髄間葉系幹細胞移植術開発につなげるための基礎情報を収集する。

2. 経緯

2.1. 対象疾患

表皮水疱症（接合部型及び栄養障害型）

2.1.1. 概念・定義・病因・病態

表皮水疱症は、皮膚基底膜領域の接着関連分子の遺伝的機能不全により、日常生活の軽微な外力で水疱・潰瘍を形成する遺伝性水疱性皮膚疾患の総称である。水疱形成部位により単純型（表皮内水疱）、接合部型（表皮-基底膜間水疱）、栄養障害型（基底膜直下の真皮内水疱）の3病型に分類される。

単純型表皮水疱症は表皮基底細胞の細胞骨格タンパクであるケラチン5/14の遺伝子異常により発症し、表皮基底細胞が断裂して表皮内に水疱・びらんを形成する。生命予後は良好で、軽症型は経過と共に水疱形成部位が限局性となって軽快傾向を示すことも稀ではないが、重症型は全身皮膚の水疱形成が一生継続し、さらに手掌・足底に著明な角化を生じて著しいQOLの低下を来す。ケラチン5/14遺伝子異常による単純型は基本的に優性遺伝形式をとる。一方、表皮基底細胞底面の細胞膜上に局在し、表皮基底細胞と基底膜間の接着構造であるヘミデスマゾーム構成タンパクで、ケラチン5/14と結合するプレクチンやBP230の遺伝子異常では、極めて稀な劣性遺伝形式をとる単純型表皮水疱症を発症する。特にプレクチン遺伝子異常では、経過中に筋ジストロフィー症状を合併する。

接合部型表皮水疱症は、ヘミデスマゾーム構成膜貫通タンパクである $\alpha 6\beta 4$ インテグリン、XVII型コラーゲン（BP180）、基底膜構成タンパクであるラミニン332のいずれかの遺伝子異常により発症し、表皮-基底膜間が剥離して水疱、潰瘍を形成する。ラミニン332の欠損により発症するHerliz型は表皮水疱症の中でも最重症型であり、生後1年以内に殆どの症例が死亡する。 $\alpha 6\beta 4$ インテグリンの欠損では、全身の水疱・潰瘍形成に加えて胃の幽門閉鎖を合併し（幽門閉鎖型）、やはり致死性となることが少なくない。一方XVII型コラーゲン欠損による病型（non-Herliz型）は生命予後こそ良いものの、頭頂部脱毛、著明な歯のエナメル質形成不全を合併し、QOLは著しく低い。いずれの病型も劣性遺伝形式をとる。

栄養障害型表皮水疱症は、基底膜と真皮間の接着構造である係留線維を構成するVII型コラーゲンの遺伝子異常により発症する。基底膜直下で真皮内に水疱・潰瘍を形成し、治癒後の著明な癬痕形成と爪甲の変形・脱落を特徴とする。優性遺伝形式と劣性遺伝形式の両者があり、優性型は比較的軽症例が多く、劣性型は遺伝子変異の種類により軽症例から重症例まで臨床症状の幅が広い。最重症例では比較的早期に手指の棍棒状癒着、著明な食道狭窄、有棘細胞癌の合併を来し、生命予後が悪い事も少なくない。

上述した病型のうち、接合部型、栄養障害型は厚生労働省の指定する特定疾患である。

2.1.2. 疫学

1994年の厚生省稀少難治性皮膚疾患調査研究班の全国調査による表皮水疱症の推定患者数は500~640人である（接合部型：7%、栄養障害型：54%）。一方米国では国家水疱症登録制度があり、約2000人が登録されている。しかし、近年新たな表皮水疱症病型の存在が報告されつつあり、また10代以降に症状が顕在化する栄養障害型の特殊病型（痒疹型）も少なからず報告されており、日米共に、登録されていない症例が多数存在すると考えられる。

2.1.3. 標準治療と予後

表皮水疱症の根治的治療法は未だない。上述したように、症状の進行に伴い全身皮膚に水疱・潰瘍を形成して全身熱傷と同様の病態を呈する。重症接合部型では生後数ヵ月で殆どの症例が死亡し、重症劣性栄養障害型は手指の棍棒状癒着、食道狭窄、皮膚有棘細胞癌を高率に合併する極めて重篤かつ悲惨な遺伝性皮膚疾患である。本症に対する根治的治療法開発のための本臨床研究は、難病に苦しむ患者さんを救うために、喫緊の課題である。

2.1.4. 併存疾患及び合併症

表皮水疱症では広範囲に難治性皮膚潰瘍を常時形成しているため、潰瘍面の細菌感染症を高頻度に合併する。重症例では、敗血症に至ることも稀ではなく、致死性となることもある。また、全身広範囲の水疱・潰瘍に伴う皮膚の慢性炎症により、鉄欠乏性貧血が合併し、重症例の殆どがヘモグロビン10 g/dL以下の高度貧血である。また、重症栄養障害型表皮水疱症（VII型コラーゲン完全欠損）では食道狭窄症状がほぼ全例に合併し、固形食物の摂取が不能なため、重度の栄養障害を来す。さらに、30代~40代までに皮膚有棘細胞癌がほぼ必発し、切除しても他の部位に新生を繰り返すため高頻度に転移を生じ、生命予後を不良にしている。

2.1.5. 対象疾患の設定根拠

2.1.1.項及び2.1.3.項に示したように、接合部型および栄養障害型は厚生労働省特定疾患調査研究分野の範疇に含まれる難治性疾患の一つで、生下時より日常生活の極めて軽微な外力で全身皮膚に水疱、びらん、潰瘍が生じる遺伝性水疱性皮膚難病である。本疾患は根治的治療法が全く無く、新規治療法を開発することは医療における喫緊の課題であると考へ、対象疾患として設定した。

単純型は加齢と共に症状が軽快する症例が多いため、骨髄間葉系幹細胞移植の安全性評価を主目的とする今回の臨床研究からは除外した。

2.2. 試験物名及びその概要

2.2.1. 試験物名

「骨髄間葉系幹細胞」

2.2.2. 試験物の概要

- 1) 細胞総数：1.0×10⁷個以上
- 2) 純度：CD105⁺、CD34⁻ 細胞として50%以上
- 3) 細胞生存率：トリパンブルー陰性細胞 70%以上
- 4) 感染症検査（移植3日前）
 - (1) 無菌試験：陰性
 - (2) マイコプラズマ否定試験：陰性
 - (3) エンドトキシン試験:1.0EU/mL未満

2.2.3. これまでの非臨床試験、臨床研究の結果の要約

- 1) 非臨床試験（一部のデータは論文投稿中）

以下に示した非臨床試験の結果、骨髄内 Lin⁻/PDGFRα⁺/c-kit⁻ 間葉系幹細胞は造血幹細胞とは独立して骨髄内に間葉系幹細胞として存在し、表皮水疱症における皮膚損傷に応答して骨髄内から流血中へと動員され、表皮剥離部で角化細胞へと分化して表皮再生に寄与していることが明らかとなった。

- (1) マウスモデルを用いた骨髄由来細胞による表皮水疱症皮膚再生機序の検討
VII型コラーゲンが完全欠損する重症栄養障害型表皮水疱症モデルマウスの胎仔

末梢循環血液中に GFP マウスの骨髄細胞を移植し、表皮水疱症剥離表皮の再生機序を検討した結果、循環血液中に移植した骨髄細胞は移植部皮膚に遊走し、皮膚線維芽細胞へと分化して皮膚基底膜部に欠損していた VII 型コラーゲンを供給して皮膚病態および生命予後を改善することが示された (Chino and Tamai et al, AJP2008)¹⁾。

次いで、生後の VII 型コラーゲン欠損マウス皮膚における骨髄細胞移植の治療効果の評価、および治療効果を発揮する骨髄内細胞分画を明らかにする目的で、致死量の放射線を照射し、GFP マウスの骨髄を移植したマウスの背部に、栄養障害型表皮水疱症モデルマウス (VII 型コラーゲンノックマウス) の皮膚を移植し、表皮水疱症剥離表皮の再生機序を検討した。その結果、以下に示した結果が得られた (Tamai et al, 投稿中)。

- ① 皮膚移植 4 週後に蛍光実体顕微鏡を用いて植皮部皮膚を観察した結果、移植部皮膚領域に限定して極めて強い GFP 緑色蛍光の集積が観察された。GFP 陽性骨髄由来細胞の皮膚内局在は、真皮血管周囲及び再生表皮内に多数存在することが確認された。
 - ② 皮膚組織切片を抗表皮細胞特異的ケラチン 5 抗体で蛍光免疫染色し、共焦点レーザーで観察した結果、ケラチン 5 陽性表皮角化細胞であることが確認された。さらに、植皮部皮膚から回収した表皮細胞の培養により骨髄由来表皮角化細胞の存在が確認され、これらの結果から、移植骨髄間葉系幹細胞は、表皮水疱症皮膚再生時に骨髄由来表皮細胞を供給していることが認められた。
 - ③ 植皮部皮膚由来表皮細胞のフローサイトメトリー解析により、移植後 4 週目の表皮水疱症マウス皮膚内に、約 10%前後の骨髄由来表皮角化細胞の存在が認められた。
 - ④ GFP 陽性骨髄由来角化細胞が存在する植皮部皮膚基底膜領域を免疫組織学的に検討した結果、VII 型コラーゲンと GFP 陽性骨髄由来角化細胞の局在はほぼ一致し、骨髄由来角化細胞によって欠損した VII 型コラーゲンが供給されていることが確認された。
- (2) マウスモデルを用いた骨髄由来表皮細胞の骨髄内起源探索
- 表皮水疱症皮膚を生理食塩水に 24 時間浸して得た浸出液をシリコンチューブに充填し、GFP 骨髄移植マウス背部皮下に移植した。移植後 7 週にシリコンチューブを回収し、チューブ内溶液中に動員された GFP 陽性骨髄由来細胞の有無及び動員された細胞の性質を検討した結果、以下に示した結果が得られ、骨髄内 PDGFR α 陽性細胞が骨髄由来表皮細胞の起源であることが確認された。
- ① 回収したシリコンチューブ内に多数の GFP 陽性骨髄由来細胞の存在が確認された。また、チューブ内の骨髄由来細胞を培養した結果、ほぼすべての付着系細胞は GFP 陽性骨髄由来細胞であることが確認された。
 - ② 移植チューブより回収した GFP 陽性骨髄由来付着細胞の培養上清中に新生マウス皮膚抽出液を添加した結果、GFP 陽性/ケラチン 5 陽性細胞の出現が確認され、表皮角化細胞への分化能を有する骨髄由来表皮前駆細胞がチューブ内に動員されていることが認められた。
 - ③ チューブ内に動員された分画をフローサイトメトリーで検討した結果、チューブ内細胞の約 20%が間葉系幹細胞のマーカーである PDGFR α 陽性骨髄由来細胞である事が認められた。一方、骨髄内では PDGFR α 陽性細胞は 0.1%未満であった。このことから、チューブ内の骨髄由来表皮前駆細胞が骨髄間葉系幹細胞由来であることが示唆された。
 - ④ PDGFR α 陽性/GFP 陽性骨髄細胞と PDGFR α 陰性/GFP 陰性骨髄細胞のキメラ骨髄細胞を移植した P+G+/P-G-骨髄移植マウスを作成し、その背部に表皮水疱症マウス皮膚を移植した結果、再生した表皮内に GFP 陽性表皮細胞が多数存在することが示された。

(3) マウスを用いた骨髄内 PDGFR α 陽性細胞の性質検討

PDGFR α 遺伝子のプロモーター下流にヒストン H2B 遺伝子と GFP 遺伝子の融合遺伝子 (H2B-GFP) をノックインした PDGFR α -H2BGFP マウスから骨髄細胞を採取し、核内 GFP 陽性細胞の性質についてフローサイトメトリーにより解析した。また、骨髄内 PDGFR α 陽性細胞を培養し、間葉系細胞への分化能を検討した。

その結果、骨髄内 PDGFR α 陽性細胞は、血球系分化マーカーである Lineage および未分化造血幹細胞マーカーである c-kit がいずれも陰性で、造血系細胞ではないことが示された。また、骨髄内 PDGFR α 陽性細胞を培養した結果、骨髄内 PDGFR α 陽性細胞は骨芽細胞や脂肪細胞への分化能を有することが明らかとなり、間葉系幹細胞としての性質を有することが示された。

さらに、表皮細胞分化誘導培地で培養を行った結果、ケラチン 5 陽性細胞の出現が確認され、骨髄内 PDGFR α 陽性細胞は、間葉系のみならず外胚葉由来である表皮角化細胞へと分化し得る、多能性幹細胞であることが示唆された。

2) 臨床成績

骨髄間葉系幹細胞をヒト表皮水疱症患者皮膚へ移植した臨床研究は、チリの研究グループが報告した 2 症例のみである²⁾。以下にその概略を示した。

VII 型コラーゲン完全欠損 (COL7A1:c.7708delG/7708delG) の劣性栄養障害型表皮水疱症の女性 (25 歳) の慢性潰瘍部皮膚、及び背部の非潰瘍部皮膚に、非血縁成人健康人女性の骨髄から採取した間葉系幹細胞を移植した。具体的には、右膝下部の下腿前面に生じた慢性難治性潰瘍部位辺縁皮膚の 2 カ所に 0.5×10^6 個の遺伝的に無関係な健康女性の骨髄間葉系幹細胞 (CD73 陽性、CD90 陽性、CD105 陽性) を皮下移植し、同潰瘍の対照部位 2 カ所には、溶媒 (生理食塩水) を皮内投与した。移植 1 週後、移植部位では連続した真皮-表皮結合が認められ、免疫組織学検査で基底膜部位に免疫学的反応が認められた。一方、対照部位では水疱の形成が認められ、免疫組織化学検査で VII 型コラーゲンの産生は認められなかった。移植部位では、移植後 12 週ではほぼ治癒し、免疫蛍光染色により基底膜部位に VII 型コラーゲンが認められた。一方、対照部位に治癒促進効果は認められず、VII 型コラーゲンの産生も認められなかった。移植部位の表皮は真皮と強固に結合し、痒みや機械的応力による水疱形成はみられなかった。移植後 4 カ月以後に、移植部位に潰瘍再発が認められた。潰瘍の再発は移植した骨髄間葉系幹細胞の疲労によるものと考えられた。試験を通じて、重篤な有害事象はみられなかった。13 歳の VII 型コラーゲン完全欠損 (COL7A1:c.6527insC/6527insC) 男子においても 25 歳女性と同様の成績が得られた。

2 症例共に VII 型コラーゲン完全欠損を来す遺伝子変異であり、骨髄間葉系幹細胞移植後に免疫組織で確認された皮膚基底膜における VII 型コラーゲンは移植した骨髄間葉系幹細胞由来であると考えられた。しかし、2 症例共に骨髄間葉系幹細胞を移植した部位は 4 ヶ月後に水疱形成の再発を見た。

2.2.4. 臨床研究実施が可能であると判断した理由

研究責任者らの表皮水疱症モデルマウスを用いた試験で、移植された骨髄間葉系幹細胞が剥離表皮部に遊走し、皮膚構成細胞に分化して皮膚基底膜領域に欠損している接着分子 (コラーゲン VII) を補充することが確認された。また、表皮水疱症モデルマウスの皮膚潰瘍部に直接移植した骨髄間葉系幹細胞が、潰瘍治癒後も長期間移植部皮膚に生着していることが確認された。これらの試験から、骨髄間葉系幹細胞を表皮水疱症皮膚へと移植することにより治療効果が得られることが示唆された。

上述の研究責任者らの非臨床試験の結果をもとに、チリの研究グループにより栄養障害型表皮水疱症の成人患者 (2 症例) に骨髄間葉系幹細胞移植術が行われた。移植 7 日後に欠損していた VII 型コラーゲンが皮膚基底膜部にみられたこと、難治性潰瘍部の上皮化の促

進・治癒が認められたこと、治療効果は間葉系幹細胞移植4カ月後までは持続したことが確認されている。また、治療期間に重篤な有害事象はみられなかった。

一方、骨髄間葉系幹細胞は表皮細胞への分化能を持つことが知られている^{3, 4)}。そのため、表皮水疱症の潰瘍部に移植するドナー由来骨髄間葉系幹細胞が表皮細胞へと分化し、XVII型コラーゲンを産生することによって、接合部型表皮水疱症に対しても治療効果が期待される。よって、接合部型表皮水疱症の患者で本臨床研究への参加を希望する患者がいる場合には、その患者を対象とすることは妥当と考えられる。

以上の非臨床及び臨床知見より、表皮水疱症（接合部型および栄養障害型）に対する骨髄間葉系幹細胞移植は安全かつ有効に実施できるものと判断し、その安全性と有効性を検討するために本臨床研究を立案した。

2.3. 登録患者の予想される利益と不利益

2.3.1. 予想される利益

本臨床研究に於いては表皮水疱症（接合部型および栄養障害型）に対する骨髄間葉系幹細胞移植治療の安全性と有効性を評価するものである。本臨床研究における骨髄間葉系幹細胞移植の効果が登録患者に認められれば、これまで他の治療法では望めなかった治癒も可能となり、さらに疾患のために制限されていた患者のQOLが大きく改善されることとなる。

なお、本臨床研究に参加することにより被験者が報酬などの利益を受けることは一切無い。また、本臨床研究により生じる知的財産権は研究者に帰属するものとし、それにより被験者が治療効果以外に利益を受けることはない。以上、本臨床研究によって得られる治療効果以外に被験者が利益を受けることはない。

2.3.2. 予想される不利益

本研究における治療には、1日間又は2日間の入院を必要とし、その間の生活が制限されることとなる。また、「8.3.1. 予想される有害事象」に挙げる有害事象が生じる可能性があり、その場合には通院、入院などによる処置が必要となる場合がある。また、予期せぬ有害事象により障害が残ることや、死亡の可能性も完全には否定できない。

なお、本臨床研究における治療にかかる費用は校費によって行われ、被験者による負担は生じない。また、本臨床研究における治療が原因での有害事象が生じた場合の補償に関しては「22.3.健康被害の補償等」に定める。

2.4. 本研究の意義

本研究の意義は、表皮水疱症（接合部型および栄養障害型）を対象とした骨髄由来間葉系幹細胞局所移植術の安全性を明らかにし、将来の骨髄由来間葉系幹細胞全身移植術開発のための礎を築くことにある。骨髄由来間葉系幹細胞移植医療の確立により最終的には表皮水疱症（接合部型および栄養障害型）の生活の質の向上に大きく寄与することが期待される。

3. 対象疾患と適格基準

3.1. 対象疾患

・表皮水疱症（接合部型および栄養障害型）

3.2. 被験者登録時の適格基準

被験者登録時に以下の選択基準のすべての項目を満たし、除外基準のいずれの項目にも抵触しない被験者を適格とする。

3.2.1. 選択基準

- 1) 表皮水疱症（接合部型又は栄養障害型）と診断された患者
- 2) 20歳以上60歳未満の患者
- 3) 6週間以上持続する難治性潰瘍を有する患者
- 4) ドナーの適格基準に合致し、同意の得られている異性の親、又は異性の兄弟姉妹がいる患者
- 5) 患者本人の文書による同意が得られている患者

3.2.2. 選択基準の設定根拠

- 1) 非臨床試験の結果から、骨髄間葉系幹細胞は皮膚基底膜下では線維芽細胞へと分化し、基底膜上では表皮細胞へと分化することが示されたことから、基本的には単純型、接合部型、栄養障害型いずれの病型に対しても骨髄間葉系幹細胞移植が有効であることが予想される。しかし、単純型は比較的軽症例が多く、また加齢と共に症状が軽快傾向を示すこと、厚生労働省指定特定疾患研究対象として指定されているのは接合部型と栄養障害型であることから、接合部型及び栄養障害型の表皮水疱症を選択基準とした。
- 2) 本邦初の臨床研究であることから20歳以上と設定し、加齢の影響を除外するために60歳未満と設定した。
- 3) 自然治癒の見込めない潰瘍を骨髄間葉系幹細胞移植の対象とするため。
- 4) 移植した骨髄間葉系幹細胞の生着をXY染色体キメリズムにより検討するため、被験者は、異性の親、又は異性の兄弟姉妹から骨髄液の提供を受ける必要があるため。
- 5) 研究を理解し、研究期間を通して研究に協力できる患者を組み入れるため。

3.2.3. 除外基準

- 1) 重度の精神疾患を有する患者
- 2) アルコール中毒症を有する患者
- 3) 意識障害を有する患者
- 4) 皮膚以外の悪性腫瘍を有する患者（過去5年以内に既往がある患者を含む）
- 5) 妊娠又は妊娠している可能性のある患者
- 6) 糖尿病を合併している患者
- 7) その他、研究責任者が移植に適さないと判断した患者

3.2.4. 除外基準の設定根拠

- 1) 定められたスケジュールを遂行できないと考えられるため。
- 2) 潰瘍の治癒が不良で評価に影響があると考えられるため。
- 3) 本人からの同意取得ができないと考えられるため。
- 4) 本対象疾患では高率に皮膚癌を発症するため、悪性腫瘍を全部除外することは本臨床研究を実施する上で適当でないと考えられるが、他の悪性腫瘍を発症している場合には、そのための治療や予後の影響を受けることが考えられるため本治療スケジュールを遂行することが困難であると予想されるため。
- 5) 胎児への安全性が確立していないため。
- 6) 潰瘍の治癒が不良で評価に影響があると考えられるため。

3.3. ドナーの適格基準

被験者登録時に以下の選択基準のすべての項目を満たし、除外基準のいずれの項目にも抵触しないドナーを適格とする。

3.3.1. 選択基準

- 1) 20歳以上70歳未満である者
- 2) 被験者と性の異なる親、又は性の異なる兄弟姉妹である者
- 3) ドナー本人の文書による同意が得られている者

3.3.2. 選択基準の設定根拠

- 1) ドナーは倫理的観点から自らドナーになることの意味を表明できる成人であることが望ましく、一方、高齢者ドナーでは、採取後の骨髄回復が充分でない可能性があること、骨髄細胞の増殖力が弱くでは増殖培養により規定の細胞数が得られない可能性があることが考えられるため、20歳未満と70歳以上を除外した。
- 2) 移植した骨髄間葉系幹細胞の生着を XY 染色体キメリズムにより検討するため、ドナーと被験者は、性が異なることが必要のため。
- 3) ドナーの人権を尊重するため。

3.3.3. 除外基準

- 1) 血液疾患、または出血傾向を有する者
- 2) Hb 11.0g/dL 未満、または血小板 $5.0 \times 10^4 / \mu\text{L}$ 未満の者
- 3) 慢性難治性の感染症を有する者
- 4) 登録前6ヵ月以内にアルコール中毒症又は薬物依存症の既往を有する者
- 5) 悪性腫瘍を有する者（過去5年以内に既往がある者を含む）
- 6) 感染症（梅毒、HIV、HBV、HCV、HTLV、パルボウイルス B19 のいずれか）を有する者
- 7) 伝達性海綿状脳症及びその疑いのある者
- 8) その他、研究責任者が移植に適さないと判断した者

3.3.4. 除外基準の設定根拠

- 1) 適切な幹細胞が得られないと考えられるため。また、出血傾向を有する場合は、骨髄液採取に伴い出血傾向が増悪する、もしくは、採取部位の止血が得られない事が予想されるため。
- 2) 血清のための血液採取により病的貧血、出血傾向となる危険性が考えられるため。
- 3) 感染症の伝播が考えられるため。
- 4) 適切な幹細胞が得られないと考えられるため。
- 5) 正常でない幹細胞が含まれる可能性があると考えられるため。
- 6) 感染症の伝播が考えられるため。
- 7) 感染症の伝播が考えられるため。

4. 試験物

4.1. 試験物名

骨髄間葉系幹細胞

4.2. 成分・構造・特性・製造方法など

4.2.1. 規格

- 1) 細胞総数： 1.0×10^7 個以上
- 2) 純度：CD105⁺、CD34⁻ 細胞として50%以上
- 3) 細胞生存率：トリパンプルー陰性細胞 70%以上
- 4) 感染症検査（移植3日前）
 - (1) 無菌試験：陰性
 - (2) マイコプラズマ否定試験：陰性
 - (3) エンドトキシン試験:1.0EU/mL未満

4.2.2. 製造方法

- 1) ドナーからの血清の採取
 - (1) 大阪大学医学部附属病院輸血部において、ドナーの静脈より採血バッグにて約400mLの末梢血を採取する。なお、採血の際は体重とHbの値並びに患者の状態を考慮し、採血を実施する。
 - (2) 採血バッグごと遠心することにより血清を分離する。
 - (3) 血清は別の採血バッグに回収する。
 - (4) 採血バッグにラベルを貼付し、未来医療センターCell Processing Isolator (CPI) 調製室へ搬送する。
 - (5) その日の内に培養に使用する場合は保冷庫に保管する。その日の内に培養に使用しない場合は血清を採血バッグのままフリーザーに保存する。
- 2) ドナーからの骨髓液採取
 - (1) 大阪大学医学部附属病院手術室において、局所麻酔下、ドナー腸骨より骨髓穿刺針を用いて骨髓液採取を行う。
 - (2) 1回の吸引あたり約2~5mLの骨髓液を吸引し、滅菌採血管に回収する。合計約20mLの骨髓液を採取する。
 - (3) 滅菌チューブにラベルを貼付し、専用輸送容器（クーラーボックス）に入れて未来医療センターCPI調製室へ搬送する。
- 3) ドナー骨髓液から骨髓間葉系幹細胞の培養
未来医療センターCPI内で無菌的に処理する。
 - (1) ドナーの血清を室温に暖める。
 - (2) α MEM 500mLに抗生剤 (penicillin/streptomycin) とドナー血清88mLを混和し、培養用培地を調製する。
 - (3) ドナー骨髓液を培養用培地と混合し、培養フラスコに播種する。
 - (4) 培養開始3日以内に上清及び浮遊細胞を吸引除去し、2回の洗浄の後新たに培地を加える。
 - (5) 4日を超えない範囲で2~3回/週の間隔で(4)と同様の方法で培地交換を行う。
 - (6) Sub-confluentになった場合はトリプシン添加により細胞を剥離し、(3)と同様の方法により継代を行う。
 - (7) 継代時に細胞数を計測し、必要細胞数が得られないと判断される場合はもう一度継代を繰り返す。なお、培養期間は20日±10日間とする。
 - (8) 移植の3日前に、細胞培養上清を吸引し、その一部（10mL）を感染症検査のために品質管理責任者に提出する。
 - (9) 移植の前日までに被験者から5mLの血液を採取し、滅菌チューブで血清分離を行い、血清をフリーザーで保管する。移植の当日に、細胞培養上清を吸引し、その一部（10mL）を感染症検査のために品質管理責任者に提出すフラスコ1つを取り出し、試験移植のために細胞の一部（約100個分）を生理食塩水100 μ Lに懸濁し、注射筒に充填する。残りの細胞で細胞数、純度（fluorescence-activated cell sorter (FACS) 解析）、細胞生存率が規格規格を満たすことが確認された場合は試験移植を行う。尚、試験移植でアナフィラキシー反応が確認された場合は本移植を中止する。細胞が規格を満たし、試験移植で問題が生じていないことを確認した上で、残りのフラスコを取り出し、トリプシンで剥離した骨髓間葉系幹細胞を、PBSで2回洗浄し、 0.5×10^6 個/250 μ Lの濃度になるように、0.5%自己血清加生理食塩水に懸濁し、1mL注射筒に充填する。移植に必要な数の注射筒に充填する細胞濁液を充填したそれぞれの注射筒にラベルを貼付する。ジッパー付きのビニール袋に梱包し、ビニール袋にラベルを貼付する。

4.3. 容器・包装・保存条件など

容器、包装は、前項の3)-(14)、(15)に示した。試験物は出荷まで冷蔵庫内(4℃)に保存する。

4.4. 交付・搬送

研究責任者または分担者は、上記試験物を出荷判定書とともに搬送用クーラーボックスにいれ、皮膚科処置室に搬送する。

4.5. 管理・保管

製品は搬送後速やかに使用する。皮膚科処置室においては研究責任者または分担者の監視下にて管理・保管する。

5. 臨床研究実施計画

5.1. デザインの型

主に安全性評価のための臨床研究

5.2. デザインの設定根拠

本臨床研究と同じ、ドナーの骨髄間葉系幹細胞移植による表皮水疱症の治療は、チリで2症例に実施されているのみであり、少数例を対象とした本邦で最初の臨床研究であり、その主要評価項目は安全性の評価である。従ってランダム化、遮蔽化(盲検化)、対照群は設定しない。

5.3. 目標登録患者数・患者登録期間

- 1) 目標症例数：6例
- 2) 患者登録期間：病院長による実施許可日から4年間

5.4. 目標登録患者数の集積可能性

本疾患は2.1.2.項に記載したように極めて希な遺伝性疾患である。しかしながら、研究責任者は、本院外来診療において年間約50名の患者を診療しており、それらの患者の内、少なくとも15~20例の患者は本研究の適応であると考え、今後新たな患者の出現や他院よりの紹介患者を考慮し、2年間で6症例を目標とすることは十分可能な人数と考える。

5.5. 治療計画

5.5.1. 治療の定義

本研究における治療とは、以下の5.5.2.項の方法に示す「1) 骨髄間葉系幹細胞の試験移植」から「2) 潰瘍部皮膚への骨髄間葉系幹細胞移植」完了までとする。

5.5.2. 方法

被験者は移植当日までに入院し、移植後1~2日間の入院を要する。

1) 骨髄間葉系幹細胞の試験移植

移植当日に骨髄間葉系幹細胞約100個分を生理食塩水100μLに懸濁し、被験者の前腕非潰瘍部の皮下に試験移植する。試験移植後1時間観察し、重篤なアレルギー症状を生じた場合は本試験を中止する。

2) 潰瘍部皮膚への骨髄間葉系幹細胞移植

難治性皮膚潰瘍(潰瘍部周囲の長さが20cm程度の潰瘍を移植対象基準とするが、適当なサイズの潰瘍がない場合はその大きさを問わない)を1カ所選択し、移植対

象潰瘍とする。移植対象潰瘍部の周囲に、2cm間隔で、1箇所につき 0.5×10^6 個/250 μ Lの培養骨髄間葉系幹細胞を皮下移植する。潰瘍周囲の長さが20cmの場合、移植細胞総数は、 5×10^6 個（10箇所 $\times 0.5 \times 10^6$ 個）となる。

5.5.3. 併用治療

移植前処置として、移植1時間前よりソル・コーテフ100mg、ポララミン5mgの点滴静脈注射を行う。

潰瘍部への局所治療は、創部の状況に応じて適宜必要な外用剤を選択する。創傷被覆材の使用についても、外用剤と同様に必要に応じて適宜選択して施行する。

そう痒、疼痛など皮膚潰瘍に併発する症状に対しては、抗アレルギー剤、抗ヒスタミン剤、鎮痛剤の全身投与を行う。

5.5.4. 支持治療

移植直後に重篤なアレルギー症状や発熱を生じた場合には、ソル・コーテフの静脈注射など適切な治療を行う。

臨床研究対象部位かどうかに関わらず、皮膚潰瘍部に明らかな感染症が併発した際には、外用を抗生剤含有軟膏に切り替えると共に、必要に応じて全身性に抗生剤を投与する。

5.5.5. 後治療

移植後の患部などに皮疹などアレルギー反応を生じた場合は、副腎皮質ステロイド製剤の塗布、抗アレルギー剤の投与など適切な治療を行う。

5.5.6. 治療計画の設定根拠

- 1) これまで未来医療センターCPC（Cell Processing Center）で実施された培養成績（先行する他の臨床研究）で、骨髄液1mLから得た細胞を約20日間継代培養することにより、 0.7×10^6 個~ 1.5×10^6 個の骨髄間葉系幹細胞増殖の成績が得られている（*未来医療センター内データ、未公表）。本研究では外周約20cmの潰瘍皮膚を移植対象の目安と考えているが、本研究の対象となる表皮水疱症患者（日本で300~400例）が非常に少なく、移植対象潰瘍皮膚の大きさを一律に規定することは困難であり、外周20cm以上の潰瘍皮膚も移植対象となりうる。そのため、総数 $1.0 \sim 2.0 \times 10^7$ 個の培養骨髄間葉系幹細胞が必要となる。このことから、骨髄液採取量は20mLとした。
- 2) 骨髄間葉系幹細胞は3代の継代以後は増殖能力が減衰することが知られている。そのため、培養は3代継代までとした。3代継代培養で必要とする細胞数が得られない場合は、その骨髄間葉系幹細胞の培養は中止する。
- 3) 骨髄間葉系幹細胞の投与経路は、潰瘍部皮下への局所注入による移植とした。研究責任者らによるマウスモデルを用いた潰瘍部皮下への培養骨髄間葉系幹細胞直接移植、及び南米チリで行われた栄養障害型表皮水疱症患者に対する他家骨髄間葉系幹細胞移植臨床研究により、潰瘍部皮下への骨髄細胞の直接移植に対する安全性・有効性の情報が得られている。一方、骨髄間葉系幹細胞の全身性投与による治療については、2010年8月に米国ミネソタ大学の小児の栄養障害型表皮水疱症患者に対する骨髄移植臨床研究の結果が報告されているが、治療効果は得られるものの、免疫抑制剤投与による二次感染で敗血症を併発して死亡した小児例の存在が明らかにされた⁵⁾。さらに、その後の私信ではあるが、新たに移植片対宿主病による死亡例が生じたという情報が得られている。表皮水疱症に対する骨髄間葉系幹細胞の全身性投与に関しては更なる安全性の検討が必要と判断し、潰瘍部皮下への局所投与を選択した。

- 4) 同種ドナーの細胞が皮下に投与されることにより重篤なアレルギー反応が起こる可能性は少ないと考えられるが、被験者の安全を考え、移植日に、移植に先立ち少量の骨髄間葉系幹細胞を試験移植し、アレルギー反応の有無を確認することとした。
- 5) Cognetらの報告によれば、潰瘍部周辺皮膚へ 0.5×10^6 個の骨髄間葉系幹細胞移植することにより、最長4カ月の皮膚潰瘍治療効果が得られている²⁾。本研究の目的は表皮水疱症潰瘍部皮膚への骨髄間葉系幹細胞移植の安全性を確認することを主目的、有効性確認を副次目的とする。このため、潰瘍部周囲の長さ約20cm（円形の場合は直径約7cm）の対象潰瘍部位として選び、潰瘍部皮膚に移植細胞が行き渡るには最低 5.0×10^6 個の骨髄間葉系幹細胞が必要であると考え、細胞数を設定した。
- 6) 全ての被験者で、潰瘍部周囲の長さ約20cm（円形の場合は直径約7cm）を対象潰瘍部位として選ぶことができない場合を想定し、それよりも大きい潰瘍部、小さい潰瘍部も移植対象潰瘍部位とした。骨髄間葉系幹細胞移植の安全性と効果を、治療後評価するために、1カ所への移植細胞数は 0.5×10^6 個と、移植間隔は2cmと一定にした。
- 7) 骨髄間葉系幹細胞は免疫寛容性が高く、さらに強い抗炎症・抗免疫作用を発揮することから移植後拒絶反応を抑制することが知られている⁶⁾。実際にCognetらの報告でも免疫抑制剤の投与無しに表皮水疱症患者皮膚に移植して長期間治療効果が得られている²⁾。一方、上記3)でも記したように、米国ミネソタ大学の小児の栄養障害型表皮水疱症患者に対する骨髄移植臨床研究では免疫抑制剤投与による感染症の併発で死亡例が報告されており、表皮水疱症治療に対する免疫抑制剤の投与は危険と言わざるを得ない。以上の理由により、本研究では免疫抑制剤を用いないこととした。

5.6. 登録患者の研究参加期間

- 1) 治療前観察期間（登録日から骨髄間葉系幹細胞移植前まで）：8週以内
- 2) 治療後観察期間（骨髄間葉系幹細胞移植術終了から最終検査終了まで）：48週

5.7. 臨床研究登録期間・臨床研究実施期間

臨床研究登録期間は、病院長の実施許可が通知された日から4年とする。

臨床研究実施期間は、病院長の実施許可が通知された日から全ての登録症例の臨床研究が終了又は中止する時点までの期間とし、臨床研究実施期間の目標は6年とする。

6. 主要評価項目及び副次評価項目

6.1. 主要評価項目

本研究における被験者及びドナーの有害事象の有無、種類、重症度、発現頻度及び発現期間とする。

6.2. 主要評価項目の設定根拠

HLA 一致親族からの骨髄移植は、白血病などに対する治療法として既に確立されているが、本研究はHLA 一致ドナーに限定していない。HLA の不一致は生着の確率には関わると考えられるが、近年、間葉系幹細胞の免疫寛容が立証され、HLA の不一致の場合、及び免疫抑制剤を使用しなくても移植組織内に長期生存する可能性が示され、安全に治療が行えると考えられる。また、本研究で行うドナー骨髄間葉系幹細胞の表皮水疱症患者への皮下移植の手法は、既にチリにおいて数例実施されており、重篤な有害事象は報告されていない。

しかし、本研究は性の異なる家族ドナーから採取した骨髄間葉系幹細胞をCPIで増殖培養し、被験者の皮下に移植する本邦初の試みであり、予期されない有害事象の可能性も考え

られることから、安全性の評価（有害事象の評価）を本研究の主要評価項目として設定した。

6.3. 副次評価項目

- 1) 移植潰瘍部位の評価
 - ① 潰瘍面積縮小程度（写真判定）
 - ② 潰瘍の性状
 - ③ 潰瘍部位細菌検査:潰瘍部位の細菌・真菌培養を行い、感染状況を評価する。
- 2) 移植潰瘍部位皮膚生検による組織学的検討
 - ① 水疱形成程度の組織学的検討（HE染色）
 - ② 移植骨髄間葉系幹細胞の組織学的生着状況（FISH性染色検査）
 - ③ VII型コラーゲン又はXVII型コラーゲン産生の有無と発現量（免疫蛍光染色、電顕的観察、RT-PCR）

6.4. 副次評価項目の設定根拠

- 1) 表皮水疱症では多くの場合、水疱形成部分の表皮が剥離し、潰瘍を形成する。骨髄間葉系幹細胞移植により、正常間葉系幹細胞が皮膚に生着し、皮膚線維芽細胞や表皮角化細胞へと分化することにより基底膜接着分子が供給されれば、表皮細胞の剥離機序が消失するため、潰瘍の上皮化が得られる。潰瘍は疼痛、感染の原因となり、本疾患の患者にとって最も深刻な症状である。従って、潰瘍部位の細菌感染状況、潰瘍面積縮小程度、潰瘍の性状は治療効果の適切な指標となる。
- 2) 移植を行った潰瘍部位において、真皮と基底膜の接着が回復しているかを確認するためには皮膚生検を行い、水疱形成の程度、移植細胞の生着状況、VII型コラーゲン又はXVII型コラーゲン産生の有無を組織学的に検討することが必要である。
- 3) 2.1.3.項に示したように、表皮水疱症の根治的治療法は未だない。また、表皮水疱症患者は生直後より全身皮膚の剥離を毎日繰り返すため、一部潰瘍への骨髄間葉系幹細胞移植のみではすべての潰瘍面への治療効果は期待できない。本研究は、骨髄間葉系幹細胞局所移植の有効性を評価するのみならず、将来の実施が予想される骨髄間葉系幹細胞全身性移植（経静脈投与）の妥当性についても新たな情報を提供することが期待される。

7. 観察・検査項目とスケジュール

7.1. 観察・検査スケジュール

7.1.1. 被験者の観察・検査スケジュール

観察・検査・ 評価日	スクリーニング	前観察	移植直後 (0日)	移植後						中止時
				1週	2週	4週	12週	24週	48週	
実施許容期間	8週以内	8週以内	+3日	±3日	±3日	±5日	±1週	±2週	±3週	
被験者背景	○									
臨床症状の観察	○	○*2	○	○	○	○	○	○	○	○
血液検査・尿検査	○	○*2	○	○		○			○	○
心電図		○	○						○	○
胸部 X 線検査		○	○						○	○
移植潰瘍部皮膚生検の組織学的検討*1		○			創閉鎖時*3	創閉鎖時*3	創閉鎖時*3	創閉鎖時*3	創閉鎖時*3	
有害事象										→
併用治療										→

*1：移植後の移植潰瘍部皮膚生検は、創が閉鎖した時点又は観察期間終了時に1回行う。但し、移植後12週に創閉鎖が見られない場合は、その時点での上皮化終了部位から生検を追加で実施する。

*2：実施許容範囲内であれば、スクリーニングの結果を代用することができる。

*3：創閉鎖時とは、潰瘍面の完全な上皮化を確認出来た時点とする。

7.1.2. ドナーの観察・検査スケジュール

観察・検査日	適格検査	骨髓液採取直後 (0日)	骨髓液採取 1週後
実施許容期間	被験者登録の 3週以内	+1日	±3日
ドナー背景	○		
臨床症状の観察	○	○	○
血液検査	○	○	○
有害事象			→
併用治療			→

7.2. 観察・検査項目

7.2.1. 被験者の観察・検査項目

- 1) 被験者背景
 - (1) 観察時期
スクリーニング
 - (2) 観察項目
生年月日、性別、身長、体重、診断名、診断日、既往歴、合併症、妊娠の有無

- 2) 臨床症状の観察
 - (1) 観察時期
スクリーニング、前観察、移植直後、移植後1週、2週、4週、12週、24週、48週、中止時
 - (2) 方法および注意点
平静状態で観察する。
 - (3) 観察項目
 - ① バイタルサイン
 - a) 血圧（収縮期、拡張期）
 - b) 脈拍
 - c) 体温
 - ② 身体所見
 - a) 呼吸音聴診
 - b) 心音聴診
 - c) 腹部触診
 - ③ 移植潰瘍部位の観察・評価
 - a) 潰瘍面積（写真判定）：潰瘍面から90度の位置にデジタルカメラを設置し移植部を撮影する。得られたデジタル画像を用いて潰瘍面積、外周を計測し、潰瘍の縮小の程度を評価する。
 - b) 潰瘍の性状：出血の有無、か皮の形成を目視で評価する。
 - c) 潰瘍部位細菌検査：潰瘍部位の細菌・真菌培養を行い、感染の有無とその種類を評価する。

- 3) 血液検査・尿検査
 - (1) 検査時期
スクリーニング、前観察、移植直後、移植後1週、4週、48週、中止時
 - (2) 方法および注意点
原則として大阪大学医学部附属病院臨床検査部にて測定をおこなう。
 - (3) 検査項目
 - ① 血液学的検査
赤血球、ヘモグロビン値、白血球数、血小板数、白血球分画
 - ② 遺伝学的検査
HLA 検索（A、B、DR ローカス）（前観察のみ）
 - ③ 生化学的検査
血清電解質（Na、K、Cl）、BUN、クレアチニン、総蛋白、アルブミン、総ビリルビン、抱合型ビリルビン、AST（GOT）、ALT（GPT）、アルカリフォスファターゼ、CRP
 - ④ 尿検査
尿蛋白（定性）、尿糖（定性）、潜血、ケトン、pH、沈査

4) 心電図

(1) 検査時期

前観察、移植直後、移植後 48 週、中止時

(2) 方法および注意点

平静状態で、ベッド上に仰臥位の状態で、心電図を計測する。

(3) 評価

異常の有無

5) 胸部 X 線検査

(1) 検査時期

前観察、移植直後、移植後 48 週、中止時

(2) 方法および注意点

検査技師が胸部 X 線正面画像を撮影する。立位で撮影することを原則とするが、被験者の状態によって立位が困難な場合は、仰臥位での撮影も可とする。

(3) 評価

肺野異常陰影の有無

6) 移植潰瘍部皮膚生検による組織学的検討

(1) 検査時期

前観察、創閉鎖時（移植後 2 週以降）又は観察期間終了時（但し、移植後 12 週に創閉鎖が見られない場合には、その時点での上皮化終了部位から生検を追加で実施する）

(2) 方法

移植後の生検においては局所麻酔下に移植部位から潰瘍面中央方向内側 1cm 以内の位置で、直径 6mm のパンチバイオプシーにて真皮に到達するように生検を行う。生検で得た皮膚を 4 片に分割し、3 片は「(3)評価」の項に示した検査項目に使用する。残りの 1 片はブロックのまま凍結保存とする。

(3) 評価

- ① 水疱形成程度の組織学的検討（HE 染色）：1 片をホルマリン固定し、6 μ m の薄片とし、スライドガラスに固定した後、ヘマトキシリン染色液に 10 秒間浸漬する。乾燥後、光学顕微鏡で観察し、真皮・基底膜剥離部位の長さや真皮・基底膜部位の長さをそれぞれ計測して水疱形成程度を定量的に評価する。
- ② 移植骨髄間葉系幹細胞の組織学的生着状況（FISH 性染色体検査）：FISH 法で性染色体キメリズム（XY/XX 染色体の区別）を検索する。XY 染色体 centromeric region に対する α -satellite probe を用いる。スライドに probe をマウントし、73 $^{\circ}$ C で熱変性した後、37 $^{\circ}$ C で 16 時間 hybridize する。洗浄後スライドは更に DAPI で染色し、デジタル蛍光顕微鏡でスキャンし、XY 染色体と XX 染色体の比を測定（男性被験者は XX/XY、女性被験者は XY/XX）する。
- ③ VII 型コラーゲン又は XVII 型コラーゲン産生の有無と発現量（免疫蛍光染色、電顕的観察、RT-PCR）
 - a) 免疫蛍光染色：VII 型コラーゲン又は XVII 型コラーゲンの再生及び基底膜部への沈着程度を免疫染色により検討する。具体的には、得られた蛍光染色像のデジタル画像を用いて基底膜部における蛍光パターン及び蛍光強度を骨髄間葉系幹細胞移植前後で比較検討する。蛍光パターン及び蛍光強度は以下の基準で評価する。
 - ・発現が確認されない
 - ・基底膜上に断続的に発現
 - ・基底膜上に弱く連続的に発現

- ・ 基底膜上に強く連続的に発現
- b) 電顕的観察：VII 型コラーゲン又は XVII 型コラーゲンにより形成される基底膜部接着構造である係留線維（VII 型コラーゲン）やヘミデスモゾーム（XVII 型コラーゲン）の形成程度を電顕的に検討する。具体的には、得られた電顕画像を基に、基底膜部の単位長さあたりの係留線維数あるいはヘミデスモゾーム数を計測し、係留線維はその形成程度と併せて骨髄間葉幹細胞移植前後で比較検討する。係留線維の形成程度は以下の基準で評価する。
 - ・ 係留線維の形成が確認されない
 - ・ 幼弱な係留線維をわずかに形成
 - ・ 幼弱な係留線維を数多く形成
 - ・ 成熟した係留線維を形成
- c) VII 型コラーゲン又は XVII 型コラーゲンの定量：皮膚片から RNA を抽出し、RT-PCR 法により VII 型コラーゲン又は XVII 型コラーゲンの発現を定量し、欠損基底膜分子の発現程度を評価する。具体的には、VII 型コラーゲンまたは XVII 型コラーゲン mRNA 発現量（GAPDH 発現量に対する相対値、総 VII 型コラーゲン（または XVII 型コラーゲン） mRNA 発現量に対する父親由来および母親由来変異 mRNA 発現量の相対値）を real-time PCR により測定し、骨髄間葉系幹細胞移植前後で比較検討する。但し、遺伝子変異が同定されていない症例では GAPDH 発現量に対する相対値のみ測定する。

7) 有害事象

(1) 観察項目

治療を開始してから研究参加終了まで、被験者に起きた有害事象を記録する。

8) 併用治療

(1) 観察項目

臨床研究参加期間にわたって、被験者に行われた併用治療を記録する。

7.2.2. ドナーの観察・検査項目

1) ドナー背景

(1) 観察時期

適格検査

(2) 観察項目

生年月日、性別、身長、体重、既往歴、現在罹患している疾患

2) 臨床症状の観察

(1) 検査時期

適格検査、骨髄液採取直後、1 週後

(2) 方法および注意点

全身症状など非特異的変化にも留意する。

(3) 観察項目

① バイタルサイン

a) 血圧（収縮期、拡張期）

b) 脈拍

c) 体温

② 身体所見

a) 呼吸音聴診

b) 心音聴診

- c) 腹部触診
- 3) 血液検査
 - (1) 検査時期
適格検査、骨髄液採取直後、1 週後
 - (2) 方法および留意点
原則として大阪大学医学部附属病院臨床検査部において検査を行う。
 - (3) 検査項目
 - ① 血液学的検査
赤血球数、ヘモグロビン、白血球数、血小板数、白血球分画
 - ② 遺伝学的検査
HLA 検索 (A、B、DR ローカス) (適格検査のみ)
 - ③ 生化学的検査
血清電解質 (Na、K、Cl)、クレアチニン、総蛋白、アルブミン、総ビリルビン、AST、ALT、CRP
 - ④ 感染症検査
梅毒、HIV、HBV、HCV、HTLV、パルボウイルス B19 (適格検査のみ)
- 4) 有害事象
 - (1) 観察項目
血清を採取してから骨髄液採取1週後の観察までに、ドナーに起きた有害事象を記録する。
- 5) 併用治療
 - (1) 観察項目
骨髄液を採取してから骨髄液採取 1 週後の観察までに、ドナーに行われた併用治療を記録する。

8. 被験者の安全性の確保

8.1. 基本的事項

被験者及びドナーの安全性を確保するために、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」の規定に基づき以下の条項を定める。

- 1) 研究期間全体及び研究終了後における安全対策
 - (1) 研究責任者又は分担者は、被験者及びドナーの選択基準及び除外基準を遵守する。
 - (2) 被験者が本研究の研究責任者と分担者以外の医師の治療を受ける場合には、本研究に参加していること及び本研究の内容を当該医師に通知するように被験者に説明する。また、研究責任者又は研究分担者は、必要時には当該医師に臨床研究に関する情報を提供する。
 - (3) 本研究終了後も出来る限り長期にわたって診察を行い、有害事象の発現の有無について注意を払う。
 - (4) 被験者が健康状態の異常を感じた場合には直ちに研究責任者又は分担者に連絡するよう指導する。
 - (5) 研究責任者又は分担者は、被験者又はドナーに有害事象が生じ、治療が必要であると認めるときは、その旨を当該被験者又はドナーに伝え、適切な医療を提供する。

2) 採取段階における安全対策

(1) ドナーの安全

- ① 採取術前のドナーの全身状態を把握し、採取術による危険性を最小限にするよう努力する。危険と考えられる場合は採取術を中止又は延期するなどドナーの安全性を最優先とする。
- ② 採取後のドナーの状態を十分観察し、有害事象の有無について把握する。有害事象が生じた場合は、速やかに対処する。

(2) 被験者の安全

- ① ドナースクリーニングにより細胞提供者としての適格性を確認する。
- ② 骨髄液の採取に当たっては、採取の過程における微生物等の汚染を防ぐために必要な措置を講じる。
- ③ 搬送容器については清浄度の保証があるもの、外部から微生物侵入の危険性のないものを選択する。

3) 培養段階における安全対策

- (1) ヒト幹細胞を扱う作業区域及び器材については無菌状態を確保し、定期的な保守、点検等により、その清浄度を保つように努めるとともに、その記録を作成し保存する。
- (2) 取違え又は細菌、真菌、ウイルス等の伝播の危険性を避けるため、複数の提供者からのヒト幹細胞を同時に同一区域内で扱わない。
- (3) 細菌、真菌、ウイルス等による汚染の危険性を排除する。
 - ① 提供者のスクリーニング記録の確認
 - ② 調製工程における汚染防止
 - ③ 調製の各段階での試験及び検査
 - ④ 妥当性の確認された方法による不活化及び除去の導入

4) 移植段階における安全対策

- (1) ドナーのスクリーニング、最終調製物の試験及び検査の結果、調製番号、ロット番号その他の情報を管理する。
- (2) 被験者について、将来新たに病原体等に感染した場合に、その原因が当該臨床研究に起因するかどうかを明らかにするため、最終調製物を適切な期間保存するとともに、当該被験者に骨髄間葉系幹細胞を移植する前後の記録を、総括報告書を提出した日から少なくとも20年間保存するものとする。
- (3) 被験者に病原体感染等の有害事象が起きた場合に当該情報を把握できるよう、また、最終調製物に問題が生じた場合に被験者の健康状態等が把握できるよう、適切な措置をとるものとする。また、この措置を実施するため、被験者から必要な情報の提供や保存について協力を受けられるよう、研究者等に対してあらかじめ指示しておくものとする。

8.2. 有害事象の定義

「有害事象」とは、被験者が治療を開始してから研究参加終了まで、及びドナーが骨髄液を採取してから骨髄液採取 1 週後の観察までに起きる、あらゆる好ましくない又は意図しない徴候（一般臨床検査値の異常変動を含む）、症状、または病気のことであり、プロトコル治療との因果関係の有無は問わない。プロトコル治療前に存在していた症状の臨床的に有意な悪化もまた有害事象である。頻度や程度に於いて臨床的異議がないと考えられる生理的変動は有害事象として考えない。

重篤な有害事象とは症状の程度に関わらず、以下の基準に従って、重篤か否かを判定する。

①死亡

- ②死亡につながる恐れのあるもの
- ③治療のために入院または入院期間の延長が必要とされるもの
- ④障害
- ⑤障害につながるおそれのあるもの
- ⑥①～⑤に準じて重篤なもの
- ⑦後世代における先天性の疾病または異常

8.3. 有害事象の評価

臨床研究の実施中に観察された有害事象の重症度は Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTC-AE Ver4.0 日本語版 2011年12月17日版) に基づいて決定する。

8.4. 有害事象発現時の対応

有害事象の発現に際しては、適切な救急処置を施し、被験者の安全の確保に留意し、必要に応じて専門医師による診断を受けることにより原因究明に努める。被験者の臨床研究参加中及びその後を通じて、臨床上問題となる臨床研究に関連した重大な有害事象に対して必要に応じて十分な医療措置を講じる。

研究責任者は症例報告書に種類、発現日、程度、重篤か否か、経過及び臨床研究との因果関係等を記載する。また、発生した有害事象、特に本研究との因果関係が否定できない事象については、可能な限り追跡調査を行う。

重篤な有害事象が認められた場合は大阪大学医学部附属病院「ヒト幹細胞を用いる臨床研究における有害事象への対応に関する手順書」(以下「有害事象手順書」と記す。)に従い病院長に報告し、当該臨床研究との因果関係や臨床研究継続の可否などの審議を受け、必要と認めた場合は臨床研究を中止する。さらに、「有害事象手順書」に従い、研究との因果関係が認められ厚生労働大臣への報告の必要があると認められた場合、病院長は厚生労働大臣に報告する。研究期間のみならず研究終了後の追跡調査において「重大な出来事」が明らかになった場合も厚生労働大臣への報告を行う。

8.5. 予想される有害事象とその対応

8.5.1. 予想される有害事象

- 1) ドナーの予想される有害事象
 - (1) 骨髄炎 (骨髄感染症)
 - (2) 血腫
 - (3) 血球減少
 - (4) 敗血症
 - (5) 穿刺針の遺留
 - (6) 穿刺部位の疼痛
 - (7) 麻酔によるアナフィラキシーショック
- 2) 被験者の予想される有害事象
 - (1) 感染症
 - (2) アナフィラキシーショック
 - (3) 皮疹
 - (4) 発熱

8.5.2. 有害事象への対処

- 1) ドナーに予想される有害事象への対処
 - (1) 抗生物質の投与などにより対処する。