

## 「細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究」の総括

研究分担者	三谷 玄弥	東海大学医学部外科学系整形外科学・講師
研究協力者	高垣 智紀	東海大学医学部外科学系整形外科学・講師
研究協力者	石原 美弥	防衛医科大学校医用工学講座医用工学・教授
研究協力者	谷 良樹	東海大学医学部外科学系整形外科学・大学院生
研究協力者	横山 宗昂	東海大学医学部外科学系整形外科学・大学院生
研究協力者	小林 美由希	東海大学医学部外科学系整形外科学・助教
研究分担者	小林 広幸	東海大学医学部基盤診療学系臨床薬理学・教授
研究分担者	三上 礼子	東海大学医学部基盤診療学系臨床薬理学・講師

研究要旨：本研究事業の目的は「自己軟骨細胞シートによる先進医療の実現」と「同種軟骨細胞シートによる再生医療を目指した臨床研究の実現」である。軟骨細胞シートによる再生医療は、厚生労働大臣通知により東海大学医学部付属病院においてヒト幹細胞臨床研究の実施が認められ、平成23年11月29日に第1例が実施された。その後、総症例数としては11症例エントリーし、8症例に積層化軟骨細胞シート移植を施行した。移植できなかった3症例の内訳は、2例が関節鏡にて選択基準に合致せず、1例が予定培養期間中に細胞シートの製造ができなかった症例である。移植術後の経過はいずれも良好である。全8症例が移植後1年を経過し、各種検査等で臨床評価を施行して平成26年12月12日に臨床研究を終了した。全8症例において、術後1年の臨床評価スコア、単純レントゲン検査、MRI検査、関節鏡検査、病理検査において、明らかに治療効果を認めている。臨床研究中に重篤な有害事象は生じず、軟骨細胞シート移植による安全で有効な関節軟骨の再生治療による効果が得られており、今後は先進医療としての実施を目指す。

### A. 研究目的

膝関節軟骨損傷患者を対象として、関節内組織より単離した細胞を、温度応答性培養皿を用いて培養、細胞シートを作製し、軟骨損傷が生じている部位へ移植する。この新規治療法の安全性をプライマリーエンドポイントとして客観的に評価する。また、各種の臨床的評価を実施して、効果に関するデータを収集する。

### B. 研究方法

#### 1. 症例数

総エントリー 11 例

移植実施 8 例

#### 2. 対象疾患

外傷または変性により生じた膝関節軟骨損傷

#### 3. 選択基準と除外基準

##### 1) 選択基準

以下の選択基準を全て満たし、かつ同意能力を有する患者を対象とする。

20歳から60歳までの性別を問わない患者

(外傷または変性により生じた)膝関節軟骨損傷を有するもの

関節鏡所見で軟骨損傷が Outerbridge 分類で Grade 以上のもの

膝関節大腿骨内顆または外顆部のいずれかに 1.0cm<sup>2</sup>以上 4.2cm<sup>2</sup>未満の軟骨欠損

を有し、従来骨髄刺激法やモザイクプラス  
ティなどが適応となる患者

## 2) 除外基準

下記の除外基準に1つでも当てはまる患者は対象としない。

患者や御家族への特別な配慮が必要となり倫理的に困難な場合

重大な合併症を有している場合

問題となるような感染症( HBV、HCV、  
HIV、HTLV、FTA-ABS 等の陽性を含む )  
を有している場合

以上より、「細胞シートによる関節治療  
を目指した臨床研究」の被験者としての確  
であると判断した患者に対して、時期を変  
えて2回の臨床研究に関するインフォーム  
ドコンセントが取れた場合に開始し、細胞  
シート作製のために軟骨および滑膜組織を  
採取した。

## 4. 細胞シート作製と移植

### 1) 組織の採取

対象患者に対して、術前関節鏡検査時と  
細胞シート移植時に、それぞれ事前に十分  
な時間をかけて患者本人と家族に対してイ  
ンフォームドコンセントを行い、合計2回  
の同意書を取得して本臨床研究を行う。関  
節鏡検査時に軟骨損傷程度を確認し、その  
際に細胞シート作製のために必要な、滑膜  
(1g以上)と大腿側関節面非荷重部の軟骨  
(1.5g以上)を採取する。

### 2) 細胞シート作製

#### 細胞の単離

採取した軟骨組織と滑膜組織をそれぞれ  
細切し、コラゲナーゼによる酵素処理を行  
い、細胞を単離、得られた細胞数を確認す  
る。

#### 共培養(単層細胞シート作製)

培地内に温度応答性インサートを介して  
軟骨細胞  $5 \times 10^4/cm^2$  および滑膜細胞  
 $1 \times 10^4/cm^2$  を播種し、軟骨細胞・滑膜細胞  
を共培養する。温度  $37 \pm 1$ 、炭酸ガス濃度  
 $5 \pm 1\%$ 、湿度  $95 \pm 5\%$  環境下にて培養する。

#### 積層化細胞シートの作製

共培養で作製した軟骨細胞シートを3枚  
に積層化する。これを繰り返し、必要数の  
積層シートを作製する。

### 3) 積層化細胞シート移植

作製された積層化軟骨細胞シート(最終  
製品)を対象患者に対して計画された予定  
手術時に軟骨損傷部へ移植する。軟骨損傷  
部の大きさに合わせて、複数枚を移植する  
事もある。軟骨損傷部が不良組織で充填さ  
れている場合はこれを切除して、病巣部を  
郭清した後、損傷部の直上に損傷部が覆わ  
れるように細胞シートを移植する。細胞シ  
ートを周辺組織へ縫合する操作は行わない。

## 5. 評価項目と評価基準

### 1) 主要評価項目

安全性：有害事象の発生の有無

## 2) 副次評価項目

有効性：術前、術後 1、3、6 ヶ月、1 年における臨床評価項目、単純レントゲン検査、MRI 検査並びに術後 1 年の時点での関節鏡、超音響法、病理検査による評価。

### 臨床評価

臨床評価基準として、Tegner-Lysholm Knee Scoring Scale、Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score での評価を術前、術後 1、3、6 ヶ月、1 年で実施する。

### 単純レントゲン検査

関節裂隙、軟骨下骨の状態、関節症の進行の有無を評価する。関節症の進行度は Kellgren-Lawrence grading scale ( 1) を用いて術前、術後 1、3、6 ヶ月、1 年で実施して、客観的に評価する。

### MRI 検査

経時的な軟骨の厚み、性状の変化を評価し、Nelson MRI Grading ( 2) を用いて、術前、術後 1、3、6 ヶ月、1 年で実施して、客観的に評価する。

### 関節鏡検査

術後 1 年の時点での関節表面の軟骨性状（色調、硬さ、平滑性）、Outerbridge 分類 ( 3) を評価する。また痛みや関節の腫脹などが生じた場合には適宜実施し軟骨の状態を評価する。

### 超音響法検査

術後 1 年の時点での関節軟骨の粘弾性特性を定量的に評価するために、我々が独自に開発した機能診断装置により、関節鏡視下に移植部と周辺軟骨部の軟骨を評価する。本評価法は東海大学医学部臨床研究審査委

員会承認下で、東海大学医学部附属病院で既に臨床応用されている機能評価法である。

### 病理検査

関節鏡を行った際に再生組織の一部を生検し、Safranin-O 染色を行い、Modified Mankin Score ( 4) を用いて客観的に組織学的評価を行う。

## C. 結果

[ 発生した有害事象 ]

なし

[ 安全性の評価 ]

積層化軟骨細胞シート移植を施行した 8 症例は、いずれも術後経過は良好であり、移植後 1 年を経過して臨床研究中有害事象は発生しなかった。

[ 有効性の評価 ]

軟骨細胞シート移植を施行した 8 症例は、術後 1 年の臨床評価スコア、単純レントゲン検査、MRI 検査、関節鏡検査、病理検査において、明らかに治療効果を認めている。

## D. 考察

移植後 1 年を経過した全 8 症例に関しては、術後 1 年後の臨床評価スコア、単純レントゲン検査、MRI 検査、関節鏡検査、病理検査において術前から軟骨変性の改善を認めている。また臨床研究中の重篤な有害事象は発生せず、軟骨細胞シート移植による有効な関節軟骨再生効果が得られている。

E. 結論

自己細胞を用いた軟骨細胞シートによるヒト幹細胞臨床研究は、厚生労働大臣通知により東海大学医学部附属病院において実施が認められ、臨床研究保険に加入後、平成 23 年 11 月 29 日に第 1 例目の移植を施行した。その後、総症例数としては 11 症例エントリーして、8 症例に軟骨細胞シート移植を施行した。移植できなかった 3 症例の内訳は、2 例が関節鏡にて選択基準 又は に合致せず、1 例が予定培養期間中に細胞シートの製造ができなかった症例である。移植術後の経過はいずれも良好である。全 8 症例が移植後 1 年を経過し、各種検査等で臨床評価を施行し、平成 26 年 12 月 12 日に臨床研究を終了した。全 8 症例において、術後 1 年の臨床評価スコア、単純レントゲン検査、MRI 検査、関節鏡検査、病理検査において、明らかに治療効果を認めている。臨床研究中に重篤な有害事象は発生せず、自己軟骨細胞シート移植による安全で有効な関節軟骨の再生治療による効果が得られており、今後は先進医療での実施を目指す。

F. 健康危害情報

本研究による健康危害情報はなかった。

G. 研究発表

1. 著書

なし

2. 論文発表

なし

H. 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

### 1 Kellgren-Lawrence Grading Scale

Grade1 : doubtful narrowing of joint space and possible osteophytic lipping

Grade2 : definite osteophytes, definite narrowing of joint space

Grade3 : moderate multiple osteophytes, definite narrowing of joints space, some sclerosis and possible deformity of bone contour

Grade4 : large osteophytes, marked narrowing of joint space, severe sclerosis and definite deformity of bone contour

### 2 Nelson の MRI 分類

Grade0 : normal

Grade1 : intact cartilage with signal change

Grade2 : high signal breach of cartilage

Grade3 : thin, high signal rim extending behind the osteochondral fragment indicating synovial fluid around the fragment

Grade4 : mixed or low signal loose body in the center of lesion or free within the joint

### 3 Outerbridge-Brittberg

grade1 : 関節軟骨の軟化を認める

grade2 : 軟骨表面の羽毛立ち、浅い亀裂を認める

grade3 : 軟骨下骨の深さまでの軟骨損傷があるが、軟骨下骨の露出は認めない

grade4 : 軟骨下骨の露出を認める

### 4 Mankin score system

: 構造

a. 正常 : 0

b. 表面の不整 : 1

c. 表面の不整、バンヌス形成 : 2

d. 中間層までの亀裂 : 3

e. 深層までの亀裂 : 4

f. 石灰化層までの亀裂 : 5

g. 完全な破壊 : 6

：細胞

- a. 正常：0
- b. びまん性の細胞数増加：1
- c. クローニング：2
- d. 細胞数減少：3

：サフラニン-O 染色性

- a. 正常：0
- b. 軽度の低下：1
- c. 中等度の低下：2
- d. 重度の低下：3
- e. 染色性の消失：4

：Tidemark の状態

- a. 正常：0
- b. 血管の横断：0

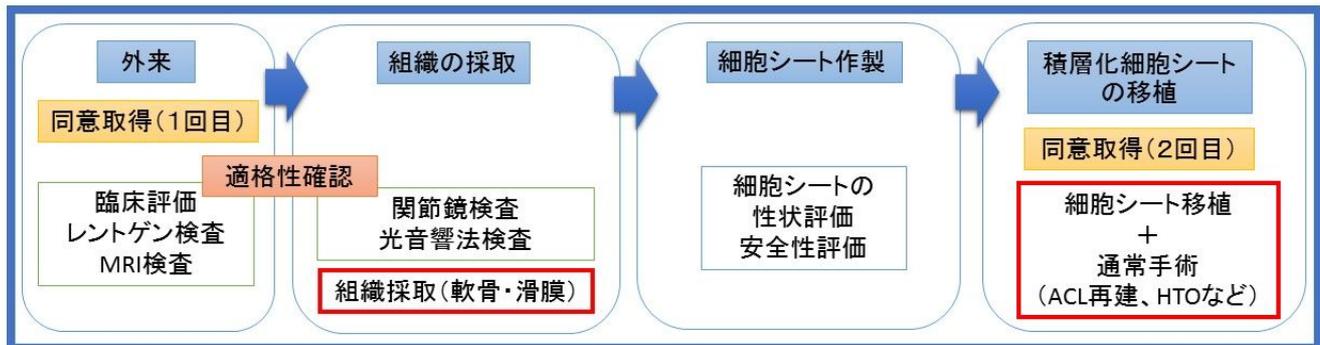
総得点：0～14

軽度変性：1-3

中等度変性：4-7

重度変性：> 7

## 「細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究」 研究実施の流れ



移植術後検査(定期的な外来診療時)

	1ヶ月後	3ヶ月後	6ヶ月後	1年後
臨床評価	○	○	○	○
単純レントゲン検査(下肢)	○	○	○	○
MRI検査	○	○	○	○
関節鏡検査				○
光音響法検査				○
病理検査				○

臨床研究終了