

先天性心疾患の心臓手術および組織採取に関する研究

研究分担者 佐野俊二 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科教授

研究要旨

単心室循環を呈する機能的単心室症は比較的稀な先天性心疾患であるが、ここ20数年来の外科的手術法の進歩により、臨床的に大きく注目されてきたが、術後長期予後はまだ満足できる内容でなく、成人した症例におけるQOLも重要な問題である。近年提唱されたこれらの臨床的課題に対し、心臓血管外科側からの早期の手術法や術後管理法の改良とともに、細胞治療を取り入れた再生医療法と組み合わせることで、実質的な長期での手術成功症例の増加を目指す。

A. 研究目的

機能的単心室症は単心室循環を呈し、左右どちらかの流入路の血流障害を伴い、しばしば流出路の形態異常と肺動脈や大動脈レベルでの閉塞を合併する。1940年代にB-Tシャント（第1期）が考案され、肺動脈流出路閉鎖に対する肺動脈血流が部分的に確保できるようになった。1950年代になるとGlenn手術（第2期）が考案され、上大静脈と肺動脈吻合による肺血流の確保が安定化してきたが、静脈血と動脈血の混入により、体血流は依然と低酸素状態であった。1970年代に入るとFontan手術（第3期）が取り入れられ、すべての循環静脈血が直接肺動脈内に流入することで酸素化不良の問題が改善した。

しかしながら、機能的単心室症の心室機能は経時的に低下していくものであり、心筋細胞微小構

造の変化、低酸素状態、3度にわたる開心術などがその原因と考えられている。また、拡張障害が初期の心不全の原因と考えられ、実質心筋細胞の線維化がその進行過程を司っている。早期の心臓手術は心室の容量負荷軽減につながり、心筋細胞障害の緩和とよい循環動態で第3期手術に移行できる点で、幼若期での心臓手術が勧められているものの、長期的には心収縮能や運動耐用能の改善にまでつながらないという報告が多い。

Fontan術後の肺血流や体血流変化は第3期術後の長期予後を規定する重要な因子の一つである。肺血流量は心室拡張末期圧、肺血管抵抗、人工血管の抵抗などに依存し、単心室循環にとって適性の前負荷は良好な体循環につながる重要な指標である。このため、第3期手術後急性期にみられる静脈圧の上昇は、胸水や腹水の貯留、心拍出量の

減少として現れ、10年単位での長期的観測では肝硬変門脈線維化、蛋白漏出性腸症を合併し、細胞間マトリックスの破壊から重篤な炎症疾患を併発する。

学童期における機能的単心室症症例においても様々な問題は存在し、心機能異常以外にも、呼吸機能、学習能力、神経発達障害、認識障害、追視能力、言語発達や注意力の低下など様々な問題が明らかとなっている。幼少時での無酸素条件での運動耐用能は通常人の約65%と言われ、成人とともにさらに低下すると報告されている。

外科的治療後の維持管理法として、beta-遮断薬、ACE、アルドステロン拮抗薬が使われている。最近ではホスホジエステラーゼ5阻害薬、エンドセリン拮抗薬の投与がFontan術後の運動耐用能を改善することが示唆され現在臨床治験中である。しかしながら、現在までのところ、単心室循環の術後長期予後を促進させる新たな治療法はとして、機械的な体循環の維持管理法以外は見当たらない。機能的単心室症に対する幹細胞自家移植による自己再生能を促す本臨床研究は、幼少期から年長期にかけての心機能改善を含めた臨床的予後への影響を検証することで、難治性心疾患に対する新たな治療法を開発する。

B. 研究方法

目標症例数

第2相臨床試験の目標症例数は34例とする。

第2相臨床試験の主要エンドポイントである有効性を検証するために必要な症例数を目標症例数とする。目標症例数は試験適格症例で患者の同意を得られた症例のうち、心臓組織採取が適切に行われかつ、単離した心臓幹細胞が使用試験細胞基準に適合し、全プロトコル治療が遂行された症例とする。

保存血より血清の採取

移植術日の前日までに、岡山県血液赤十字センターより手術時に使用する保存血の入手を依頼し、手術当日、岡山大学病院・中央手術部において血清採取を行う。

心臓手術時に人工心肺の回路にprimingする前の自己血を20mlの採取し、10mlの血清を分離する。採取した血清は岡山大学病院・探索的医薬品開発室の冷凍保管庫において-20℃で冷凍保存する。

心臓組織採取

細胞移植予定日の3週前の週に、心臓手術のため、岡山大学病院・心臓血管外科に入院する。岡山大学病院・中央手術部において、試験担当医師によって、手術中に100~250mgの右心房心臓組織を採取する。

細胞培養施設への運搬

採取した心臓組織は、滅菌された培養液の入った容器に入れ、速やかに試験細胞作成者により探索的医薬品開発室へ運搬される。運搬時の温度は常温(20~25℃)とする。

解析方法

主要エンドポイント

評価項目としてプロトコル治療による治療効果を、手術前と術後3ヶ月の時点において以下の基準において評価し比較検討する。

心室駆出率：心エコー図法によるsimpson法、心室造影と心臓MRIに基づいて算出。

統計的解析方法としては、治療前後の改善をpaired t-test、2群間の心機能に関する改善度の絶

対値は2 sample t-testを用いてそれぞれ検定を行う。

副次エンドポイント

1) 評価項目としてプロトコル治療による治療効果を、手術前と術後1年目の時点において以下の基準において評価し比較検討する。

心室駆出率：心エコー図法によるsimpson法、心室造影と心臓MRIに基づいて算出。

統計的解析方法としては、治療前後の改善をpaired t-test、2群間の心機能に関する改善度の絶対値は2 sample t-testを用いてそれぞれ検定を行う。

2) 評価項目としてプロトコル治療による治療効果を、手術前と術後3ヶ月、1年の時点において以下の基準において評価し、比較検討する。

臨床症状:チアノーゼ症状、蛋白漏出性腸症。

房室弁逆流：心エコー図法、心室造影。

心不全症状：BNP値。

心機能評価：心臓カテーテル検査による心室拡張末期圧、心室収縮末期圧、肺動脈圧、肺動脈圧格差、肺血管抵抗値の計測。

心筋重量：心臓MRI検査にて算出。

統計的解析方法としては、治療前後の改善をpaired t-test、2群間の心機能に関する改善度の絶対値は2 sample t-testを用いてそれぞれ検定を行う。

プロトコル治療中止基準

- 1) 被験者が試験参加の同意を撤回した場合、あるいは試験継続の意思を表明できない意識障害や混迷状態に陥った場合。
- 2) 登録後に不適格症例であることが判明した

場合。

- 3) 心臓幹細胞採取において以下の合併症にて遂行不能の場合。

心臓組織採取不能例

心タンポナーデ

心室性不整脈(散発性の心室性期外収縮は除く)

心原性ショック

- 4) 心臓幹細胞培養工程において、培養21日までに必要細胞数($3.0 \times 10^6/\text{kg}$ 個)に達しない場合。
- 5) 培養開始時、細胞凍結時、及び細胞解凍時のエンドトキシン、細菌、真菌、マイコプラズマ検査、細胞上清ウイルス検査で陽性の場合。なお細胞移植後に上記検査結果が陽性と判定された場合は、被験者にその旨説明し、支持療法として創感染に対処する。
- 6) 試験治療待機期間及び、試験治療後の観察期間中に何らかの侵襲的治療(補助循環装置、心室再同期療法、心臓移植等)が必要とされた場合(術後回復期間中の集中治療室における一過性ペースメーカー埋め込み、補助循環装置の使用は除く)。
- 7) 細胞移植治療中に致死的合併症(心室細動含む)が発生した場合。
- 8) 死亡した場合。
- 9) その他試験担当医師が被験者の安全性確保及び自己決定権尊重のためにプロトコル治療の中止を判断した場合。

支持療法

以下の予想される有害事象に対して、適切な治療を行う。

- 1) 採血部の疼痛・皮下出血：局所圧迫及び消炎鎮痛外用剤の投与。
- 2) 採血後の貧血：鉄剤の投与。
- 3) 鼠径穿刺部の疼痛・皮下出血：局所圧迫及び消炎鎮痛外用剤の投与。
- 4) 鼠径穿刺後の後腹膜腔血腫、腰部皮下血腫：必要な場合はドレナージ。
- 5) 術中の不整脈（心室細動を含まない）：抗不整脈薬の投与。
- 6) 術中、術後回復期間における遷延性低血圧もしくは心原性ショック：昇圧剤、強心剤の投与、補助循環装置の使用。
- 7) 創感染（縦隔炎含む）：菌同定・抗生物質の投与、無効な場合は病巣洗浄・搔爬。
- 8) 全身麻酔に関連した有害事象：
 - アナフィラキシーショック：ステロイド剤等の投与。
 - 肝機能検査異常：肝庇護剤の投与。
 - 腎機能検査異常：輸液による電解質補正、重篤な場合は透析。

後療法

プロトコル治療後は一般的に難治性重症心不全患者に実施する標準治療を行う。つまり担当医が最善と判断する治療、すなわちリハビリテーション並びに合併症の防止を行い、特に制限を設けない。

臨床研究終了後の追跡調査

3年間の臨床研究終了後も通常の保険診療行為として被験者の追跡を、10年以上を目安として行う。被験者に病原体感染等の有害事象が生じた場合は、適切な医療措置を行うとともに、最終調製物に関する確認を行い、原因究明に努める。他の被験者の健康状態も確認し、被験者の安全性確保に努め

る。

予想される心臓手術に関する有害事象

- 1) 全身麻酔に関連する合併症
 - 極めて稀であるが、死亡等の重篤な有害事象の発生の可能性がある。
 - 肝機能異常：GOT、GPT、ALP、LDH上昇など。
 - 腎機能異常：血清クレアチニン上昇など。
- 2) 心臓手術に関連する合併症
 - 脳血管障害：脳梗塞、脳出血など。
 - 術後心不全。
 - 不整脈：心房細動、心室性不整脈等など。
 - 術後呼吸障害：術後無気肺、気胸、肺炎など。
 - 肝機能異常：GOT、GPT、ALP、LDH上昇など。
 - 腎機能異常：血清クレアチニン上昇、腎不全など。
 - 出血：創出血、心タンポナーデなど。
 - 感染症。
 - 薬物アレルギー。
 - 腸閉塞。
 - 死亡。

（倫理面への配慮）

ヒト心臓組織の心筋生検による採取は、岡山大学医学部の倫理委員会にて審査承認された臨床研究プロトコル（承認番号 766）に従順して行い、「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について」（平成10年厚生科学審議会答申）を遵守する。各関係者は臨床研究を遂行にあたり、「臨床研究に関する倫理指針」（平成20年厚生労働

省告示第 415 号) を遵守して行う。

臨床研究プロトコルは「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」(平成 22 年告示第 380 号) を遵守して作成し、外部審査委員を含めた体制で審査される。

臨床研究に参加する患者さんへのインフォームドコンセントを徹底して行い、危険性の説明と研究内容に関する理解を得る。同意書原本は説明文書と共にカルテに添付して岡山大学病院で保管する。同意の撤回が生じた場合は、同意撤回文書を独立データモニタリング委員会に提出する。

本臨床試験の実施に起因して有害事象が発生し、被験者に健康被害が生じた時には、独立データモニタリング委員会に報告する。すみやかに適切な治療を受けることが出来るように、責任研究者/分担医師と岡山大学病院が対応する。

試験責任/分担医師は臨床研究保険に加入し、万一、本臨床試験参加によって患者さんに健康被害が生じた場合に対応する。

有害事象発生時には、試験責任/分担医師は「重篤な有害事象発生時対応マニュアル」に沿って対応し、一次、二次と最終報告を行う。監査が行われる場合にすみやかに対応できるよう、原医療記録閲覧について患者説明を行う。

C. 研究結果

平成25年4月8日に承認されたヒト幹細胞臨床研究実施計画に基づき、機能的単心室症由来の小児心不全に対する心臓内幹細胞の冠動脈内自家移植による第2相臨床試験(PERSEUS試験: NCT01829750)の登録実施を開始した。平成25年

6月に第1症例目の心臓手術を実施、平成27年1月までに合計全34の適応症例に対し心臓手術の実施を終了した。平成26年度内に登録し、心臓手術し終えた全適応症例について、特記すべき外科的有害事象は認められなかった。

全登録症例の内訳として、左心低形成症候群が15症例(移植群: 6例、非移植群8例)で、2期手術が8例(移植群: 4例、非移植群: 4例)、3期手術実施例が26症例(移植群: 13例、非移植群: 13例)であった。男児が占める割合は移植群で9例、非移植群で11例と差はなく、術前血中BNPの平均値もそれぞれ61.9 pg/mLと61.6 pg/mLと両群間で相違はなかった。

平成25年6月より登録開始後、適応基準を満たした全34の手術実施症例において、術後に遷延する心不全や致死性不整脈、重篤な肝機能障害や腎機能不全を併発した症例はなく、術後より開始となるプロトコル治療の前後を通じて、経過観察期間中におけるECMO装着症例や死亡症例も認められなかった。

D. 考察

登録された適応症例の全34症例から、心臓内幹細胞の分離培養に必要な余剰組織量である100mg~250mgの採取が充分臨床的に可能であった。また、従来の心臓手術実施症例に比べ、組織採取による心臓の解剖学的影響や術後心機能の回復度に相違はなかった。

機能的単心室症に対する2期もしくは3期の心臓シャント手術後より回復した症例は、充分経冠動脈的心臓内幹細胞移植療法を受けることが可能であり、平成27年度は、これらの全登録実施例の臨床経過について、詳細に追跡調査していく。

E. 結論

小児心不全に対する心臓内幹自家移植に必要な組織量を心臓手術中に採取することは臨床的に十分に可能で、従来の心臓シャント手術法に比べ、術後の心機能や転帰に影響を及ぼすことは認められなかった。実施予定症例設定数も統計学に基づいて算出されており、岡山大学病院におけるこれまでの手術実績の通り、研究期間内に充分予定症例数の実施登録を完遂できる計画内容であった。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Oozawa S, Akagi T, **Sano S** A New Hemostasis Tool after Percutaneous Angioplasty: The Hemcontm Pad Hemostasis Device. **J Vasc Med Surg**, 2:125 (e Published), 2014

Ishigami S, Ohtsuki S, Tarui S, Ousaka D, Eitoku T, Kondo M, Okuyama M, Kobayashi J, Baba K, Arai S, Kawabata T, Yoshizumi K, Tateishi A, Kuroko Y, Iwasaki T, Sato S, Kasahara S, **Sano S**, Oh H. Intracoronary Autologous Cardiac Progenitor Cell Transfer in Patients with Hypoplastic Left Heart Syndrome: The TICAP Prospective Phase 1 Controlled Trial. **Circ Res**. 2015;116:653-664.

Kobayashi J., **Sano S.**, Oh H. Epigenetic modification in congenital heart diseases by using stem cell technologies **Stem Cell Epigenetics** 2015; 2:1

Kobayashi J., Yoshida M., Tarui S., Hirata

M., Nagai Y., Kasahara S., Keiji K., Ito H., **Sano S.**, Oh H. Directed Differentiation of Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Identifies the Transcriptional Repression and Epigenetic Modification of NKX2-5, HAND1, and NOTCH1 in Hypoplastic Left Heart Syndrome. **PLOS One** 2014;9(7): e102796.

Tarui S., **Sano S.**, Oh H. Stem cell therapies in patients with single ventricle physiology. **Methodist Debaque Cardiovascular Journal**. 2014;10(2):77-81.

Yoshizumi K, Kasahara S, **Sano S** Anomalous right subclavian artery from pulmonary artery. **Asian Cardiovasc Thorac Ann** Epub ahead of print, 2014

Sano S, Fujii Y, Kasahara S, Kuroko Y, Tateishi A, Yoshizumi K, Arai S Repair of Ebstein's anomaly in neonates and small infants: impact of right ventricular exclusion and its indications. **Eur J Cardiothorac Surg**. 2014 Mar;45(3):549-55

Kijima Y, Akagi T, Nakagawa K, Taniguchi M, Ueoka A, Deguchi K, Toh N, Oe H, Kusano K, **Sano S**, Ito H Catheter closure of patent foramen ovale in patients with cryptogenic cardiovascular accidents: initial experiences in Japan **Cardiovasc Interv and Ther** 2014 Jan;29(1):11-7.

Takaya Y, Akagi T, Kijima Y, Nakagawa K, Taniguchi M, Ohtani H, **Sano S**, Ito H Transcatheter closure of right-to-left atrial shunt in patients with platypnea-orthodeoxia syndrome associated with aortic elongation **Cardiovasc Interv Ther** 29(3):221-5, 2014

Kijima Y, Akagi T, Nakagawa K,

Promphan W, Toh N, Nakamura K, **Sano S**, Ito H Cardiac erosion after catheter closure of atrial septal defect: Septal malalignment may be a novel risk factor for erosion **Journal Cardiology Case** 9:134-137, 2014

Sakurai S, Kuroko Y, Shimizu S, Kawada T, Akiyama T, Yamazaki T, Sugimachi M, **Sano S** Effects of intravenous cariporide on release of norepinephrine and myoglobin during myocardial ischemia/reperfusion in rabbits **Life Sciences** 114:102-106, 2014

樽井俊、王英正、**佐野俊二** 先天性心疾患外科手術における再生医療 循環器内科 75(1): 87-93, 2014

笠原真悟、**佐野俊二** 特集 左心低形成症候群に対する治療戦略 左心低形成症候群における段階的治療 - 最適な Fontan 手術をめざして - 胸部外科 南江堂, 67(4) 287-293

大澤 晋、正木久男、藤原寛康、柚木靖弘、**佐野俊二** 特発性上腕動静脈瘻の1例 脈管学 日本静脈学会, 25(3): pp346-349, 2014

佐野俊二 一枚のシェーマ 右室-肺動脈シャントを用いたNorwood手術変法 胸部外科 南江堂, 67(10): 914, 2014

坂野紀子、笠原真悟、荻野景観、篠崎洋二、**佐野俊二** 在宅医療での遠隔リアルタイムモニタリングシステム構築の試み; 5症例の経験 日本遠隔医療学会雑誌 日本遠隔医療学会, 10(1): pp52-57, 2014

佐野俊二 房室中隔欠損(心内膜床欠損)循環器心疾患最新の治療2014-2015 堀正二・永井良三編 南江堂, pp208-212, 2014

佐野俊二、笠原真悟、新井禎彦、岩崎達雄、

清水一好、戸田雄一郎、杉本健太郎、石井典子、川瀬宏和、森田 潔、伊藤英史 大動脈縮窄症・大動脈弓離断症に対する手術と体外循環法 心臓手術の実際Part3 許俊鋭・山田芳嗣・百瀬直樹編 学研メディカル秀潤社, pp283-292, 2014

佐野俊二 脳死判定 小児科研修ノート改訂第2版 永井良三・五十嵐隆・秋山千枝子・賀藤均・金子一成・田原卓浩・渡邊博 診断と治療社, III-4 PP202-206, 2014

笠原真悟、**佐野俊二** 先天性心疾患に対する遠隔医療の構築 月刊新医療 株式会社エム・イー振興協会, 41(10)146-149, 2014

2. 学会発表

Sano S Critical aortic stenosis in neonates and infants. 22th ASCVTS 2014, Istanbul

Sano S Individualizing Care for the Patient with Neonatal Ebstein's Malformation. 22th ASCVTS 2014, Istanbul

Sano S My worst case. 22th ASCVTS 2014, Istanbul

Sano S HLHS: state of the art World Congress of Cardiology 2014, Melbourne

Sano S Hypoplastic left heart syndrome and beyond XVIII Annual Scientific Session of Bourakovsky Scientific Center for Cardiovascular Surgery, Moscow

Sano S Evolving surgical strategies in UVH -What is the Appropriate Indications of Fontan Operation in Current Era?- 48th AEPC 2014, Helsinki

Sano S BT shunt or PDA stent - the ICU view? 48th AEPC 2014, Helsinki

Sano S Inflammatory diseases of the aorta: Role of Surgery World Society for Pediatric

and Congenital Heart Surgery 4th Scientific Meeting and Annual Business Meeting, San Paulo

Sano S The impact of the Norwood-Sano procedure in the clinical outcome of HLHS World Society for Pediatric and Congenital Heart Surgery 4th Scientific Meeting and Annual Business Meeting, San Paulo

Sano S Evaluation of the right ventricle as the systemic ventricle World Society for Pediatric and Congenital Heart Surgery 4th Scientific Meeting and Annual Business Meeting, San Paulo

Sano S Hypoplastic Left Heart Syndrome -Norwood, Sano and Beyond- 24th World Congress of Cardiothoracic Surgeons, Geneva

Sano S, Yamagishi M. Creation of a pulmonary valve and valve conduit- multi center study of Fan-shaped ePTFE Valve & ePTFE Conduit with Bulging Sinuses in Japan – 28th EACTS, Milan

Sano S The Options to treat the failing RV 48th AEPC 2014, Helsinki

Sano S Hypoplastic Arch and Coarctation 22th ASCVTS 2014, Istanbul

Sano S Biventricular Repair in PAIVS The 5th Congress of Asia Pacific Pediatric Cardiology and Cardiac Surgery, New Delhi, India

Sano S Surgical Strategy of c-TGA,DORV The 5th Congress of Asia Pacific Pediatric Cardiology and Cardiac Surgery, New Delhi, India

Sano S Congenital heart Surgery -Past, Present and Future- 24th Annual Congress

of the Association of Thoracic and Cardiovascular Surgeons of Asia, Hanoi

Sano S Specific techniques for atrioventricular valve repair in neonates and infants Advanced Course on the Mitral and Tricuspid Valve, Munich

佐野俊二 New Concept Hybrid Operating Room and Cardiac ICU 第16回日本成人先天性心疾患学会総会・学術集会ランチョンセミナー

佐野俊二 外科手術と新しい治療法 これからどうなる？市民公開講座 大人になった先天性心疾患：第2ステージのはじまり

⑳ **佐野俊二** 予防に繋がる再生医療 第4回予防医学指導士養成研修会

㉑ **佐野俊二** 小児心臓外科医を含めた岡山大学の研修への取り組み 第44回日本心臓血管外科学会学術総会

㉒ **佐野俊二** 左心低形成症候群(HLHS)に対するSano手術 第44回日本心臓血管外科学会学術総会

㉓ **佐野俊二** 日本と欧米の小児心臓外科の違い～我々はどこを目指すべきか～ 第49回聖マリア病院地域医療支援講演会

㉔ **佐野俊二** 成人における先天性心疾患の治療 釧路市医師会学術講演会

㉕ **佐野俊二** What We Have Achieved in Last 2 Decades-and Future!!～この20年で私たちが到達したこと・・・そして未来～ 第50回日本小児循環器学会総会・学術集会

㉖ **佐野俊二** Did Sano Shunt Improve Survival of HLHS?-What We Have Learned from 16 Year's Experience- 第50回日本小児循環器学会総会・学術集会

- ⑳ **佐野俊二** 迷走する専門医制度 三金会
- ㉑ **佐野俊二** 先天性心疾患治療の最前線 広島
心臓血管外科懇話会
- ㉒ **佐野俊二** 先天性心疾患治療の最前線 第 7
回先天性心疾患シンポジウムイン岡山
- ㉓ **佐野俊二** 成人先天性心臓疾患手術 高知医
療再生機構補助金講演会
- ㉔ **佐野俊二** 未来の治療：再生医療シミュレー
ション 高知医療再生機構補助金講演会
- ㉕ **佐野俊二** Hybrid Cardiovascular Suite:The
Operating Room of the Future 第 50 回日本
小児循環器学会総会・学術集会
- ㉖ **佐野俊二** 夢の扉を開く 釧路孝仁会講演会
- ㉗ **佐野俊二** 心臓血管外科治療の過去・現在・未
来 第 12 回北部循環器カンファレンス
- ㉘ **佐野俊二** 夢を追って 社会医療法人孝仁会、
札幌第一病院合併記念講演会
- ㉙ **佐野俊二** 心臓外科における国際貢献-ペト
ナムにおける試み- 第 2 回国際医療貢献フ
ォーラム
- H. 知的財産の出願・登録状況
1. 特許取得
該当なし。
 2. 実用新案登録
該当なし。
 3. その他
該当なし。

冠動脈内注入法による心臓内幹細胞の自家移植に関する研究

研究分担者 大月 審一 岡山大学病院教授

研究要旨

先天性心疾患に対する治療法として、従来の姑息的心臓手術以外に、最近では経皮的な心臓カテーテル法を用いたインターベンションにより、器質的な形態異常の修復が可能となり全身の血行動態の改善につながっている。特に、小児心臓疾患は多様性に富み、疾患別の解剖学的特徴を踏まえた治療戦略の選択が重要である。本研究では、これまでに臨床的治療法として未確立の心筋再生医療法が心臓手術後の心室機能改善に寄与するかについて、ランダム化された34症例を対象に冠動脈内注入法による心臓内幹細胞自家移植療法を実施することで、安全性と有効性を焦点に通常的心臓手術単独群と比較検証する。

A. 研究目的

機能的単心室症のうち、左心低形成症候群は重症度が高く、その解剖学的分類によって多彩であるが、潜在的に心予備能が低い症例が多く、様々な心臓カテーテル治療を併用することで心不全の発症を予防する治療戦略がとられている。

具体的には左心低形成症候群に合併する血行動態異常として、出生後からの動脈管の狭小化による肺血管抵抗の低下に伴う肺動脈と体循環バランスの破綻が起り、プロスタグランジン投与やステント留置による動脈管の開存維持が臨床上よく行われる治療法である。

また、出生直後よりチアノーゼが重度で血行動態が不安定な症例は心房中隔欠損口が小さいま

たは開存していない場合には、緊急外科的手術もしくはカテーテルによるステント留置で中隔壁の閉鎖を解除することで酸素化を図る。

左心低形成症候群に対して、通常は従来 of Norwood や Sano 手術を第1期手術として行うことが標準治療であるが、最近では上述のカテーテル治療を組み合わせたハイブリッド手術法が新しいオプション治療法として登場した。本疾患に対するハイブリッド手術法とは、新生児期に肺動脈絞扼術に加え、動脈管および心房中隔内にステントを留置するで、心臓カテーテルと心臓手術が同時に実施できるハイブリッド手術室で行う。このアプローチの優位性は現在検証中であるが、少なくとも最終手術に至るまでの期間に心房中隔、肺動脈や大動脈弓に対する追加の心臓カテーテル治療が

必要になることが多く、新生児期の入院期間が短いことが現在のところ明らかな利点である。いずれの初期治療法においても、集約的にはFontan第3期手術が必要であることに変わりなく、施設によっては新生児期にハイブリッド手術治療を行い、小児心臓移植実施まで待機する治療方針を選択している。

このように小児心臓病に対するカテーテル治療は有用で心臓手術に比べ低侵襲であることも大きな利点である。対象疾患は左心低形成症候群のみならず、大動脈弁狭窄、大動脈縮窄症、心室中隔欠損症、肺動脈や弁自身の器質的狭窄、冠動静脈ろう、肺動脈内における人工血管の閉塞に対するステント留置や逆流への肺動脈弁置換、各種血管奇形や側副血行路への塞栓術など広い領域で用いられる治療法である。

小児冠動脈病変に対するカテーテル治療は上記の疾患以外に川崎病などがあるが、医療技術的には、小児心疾患に対する冠動脈インターベンションは充分可能であると考えられる。本研究では、上記のステント留置術、コイル塞栓術、バルーン拡張術以外に、心臓内幹細胞の冠動脈注入法による心筋再生医療の安全性と有効性を検証することで、新たな小児心不全治療法の確立を目指す。

B. 研究方法

冠動脈造影

- 1) 試験治療として、全身麻酔下に4Fのシースを右下腿動脈より挿入する。
- 2) 術前診断に基づき、冠動脈造影を行い、機能的心室への支配冠動脈の走行及び瘤形成や器質的狭窄の有無を確認する。

冠動脈内への自己心臓内幹細胞移植

心臓幹細胞の適格基準を自己心臓内幹細胞に関する概要書に定められた手順にて評価、適応有りの症例において以後のプロトコル治療を行う。適応無しと判定された場合は、脱落と判定され、直ちにデータセンターに結果を報告する。

治療法：

- 1) カテーテル検査時には、初期にヘパリン急速飽和量(100 単位/kg)を投与する。
- 2) 移植する幹細胞の冠動脈内への接着及び浸透のため、perfusion balloon カテーテルを用いて移植する。
- 3) 自己心臓内幹細胞 3.0×10^5 個/kg を合計 3ml の 10%自己血清含む細胞用培養液に懸濁させる。
- 4) 低圧で膨らましたバルーンの中を通じて、幹細胞を注入する。
- 5) 冠動脈内注入は 1ml ずつ合計 3 回に分け、一回当たりの注入時間は 3 分とする。
- 6) それぞれの幹細胞注入後、3 分間の休止時間を置き、心筋虚血時間を最小限にする。

試験治療に対する補助治療及びモニタリング

- 1) 細胞移植時の冠動脈内注入する 30 分前にアンカロン注 150 を塩酸アミオダロンとして、10microgam/kg/min を容量型の持続注入ポンプ用いて、末梢静脈より投与する。
- 2) 術翌日より、アンカロンを 4mg/kg を 2 回/日で術後 7 日まで内服投与とする。
- 3) 細胞移植時に補助循環(人工心肺)は必ずしも必要とはしないが、致命的合併症の出現に備えて常に使用可能な状態に待機する。
- 4) 細胞移植時に収縮期血圧 80mmHg 以下の時

は投与を一時中断し、昇圧剤その他の開心術時に必要とされる補助療法で回復の後、投与を再開する。

試験スケジュール変更基準

1) 治療前

患者理由により手術が延期される場合
心臓内幹細胞精製過程の準備期間にて、
明らかな心不全の再発などにより、治療が必要となった場合(この場合、細胞は試験再開まで凍結保存とする)。

2) 治療後細胞移植後

明らかな心不全の再発などにより、治療が必要となった場合は、救命治療を最優先とし、心機能評価などの定期的評価はスキップ可能とする。

エンドトキシン、細菌、真菌、マイコプラズマ検査、細胞上清ウイルス検査で陽性の場合。なお細胞移植後に上記検査結果が陽性と判定された場合は、被験者にその旨説明し、支持療法として創感染に対処する。

- 15) 試験治療待機期間及び、試験治療後の観察期間中に何らかの侵襲的治療(補助循環装置、心室再同期療法、心臓移植等)が必要とされた場合(術後回復期間中の集中治療室における一過性ペースメーカー埋め込み、補助循環装置の使用は除く)。
- 16) 細胞移植治療中に致死的合併症(心室細動含む)が発生した場合。
- 17) 死亡した場合。
- 18) その他試験担当医師が被験者の安全性確保及び自己決定権尊重のためにプロトコル治療の中止を判断した場合。

プロトコル治療中止基準

- 10) 被験者が試験参加の同意を撤回した場合、あるいは試験継続の意思を表明できない意識障害や混迷状態に陥った場合。
- 11) 登録後に不適格症例であることが判明した場合。
- 12) 心臓幹細胞採取において以下の合併症にて遂行不能の場合。
心臓組織採取不能例
心タンポナーデ
心室性不整脈(散発性の心室性期外収縮は除く)
心原性ショック
- 13) 心臓幹細胞培養工程において、培養 21 日までに必要細胞数($3.0 \times 10^6/\text{kg}$ 個)に達しない場合。
- 14) 培養開始時、細胞凍結時、及び細胞解凍時の

支持療法

以下の予想される有害事象に対して、適切な治療を行う。

- 1) 採血部の疼痛・皮下出血：局所圧迫及び消炎鎮痛外用剤の投与。
- 2) 採血後の貧血：鉄剤の投与。
- 3) 鼠径穿刺部の疼痛・皮下出血：局所圧迫及び消炎鎮痛外用剤の投与。
- 4) 鼠径穿刺後の後腹膜腔血腫、腰部皮下血腫：必要な場合はドレナージ。
- 5) 術中の不整脈(心室細動を含まない)：抗不整脈薬の投与。
- 6) 術中、術後回復期間においての遷延性低血圧もしくは心原性ショック：昇圧剤、強心剤の投与、補助循環装置の使用。
- 7) 創感染(縦隔炎含む)：菌同定・抗生物質

の投与、無効な場合は病巣洗浄・搔爬。

8) 全身麻酔に関連した有害事象：

アナフィラキシーショック：ステロイド剤等の投与。

肝機能検査異常：肝庇護剤の投与。

腎機能検査異常：輸液による電解質補正、重篤な場合は透析。

併用禁止薬

被験者において、試験前、試験期間中において併用禁止とする薬剤は特に規定しないが以下に挙げる薬剤は、心臓手術前後 1 週間の休薬が望ましい。

パナルジン、プレタール等の抗血小板薬
バイアスピリン

後療法

プロトコル治療後は一般的に難治性重症心不全患者に実施する標準治療を行う。つまり担当医が最善と判断する治療、すなわちリハビリテーション並びに合併症の防止を行い、特に制限を設けない。

予想される有害事象

心臓カテーテル検査に関連した有害事象、合併症

- 1) 鼠径穿刺部の疼痛、出血。
- 2) 局所麻酔薬によるアレルギー反応。
- 3) 術後の止血不良による穿刺部の血腫。
- 4) 極めて稀ではあるが術後穿刺部出血による後腹膜血腫。
- 5) 極めて稀ではあるが穿刺部の感染。

造影・心内圧検査による有害事象

- 1) 造影剤アレルギー。
- 2) 極めて稀ではあるが、カテーテル操作による心室、血管の穿孔。

- 3) 検査後の心タンポナーデ。
- 4) 房室ブロック（脚ブロックを含む）。
- 5) 心室性不整脈。
- 6) 極めて稀ではあるが死亡。
- 7) 感染症。

冠動脈内への幹細胞注入に関する有害事象

- 1) 培養上清中に細菌が検出され、同一の細菌により術部感染が発生した場合。
- 2) 細胞移植部からの腫瘍発生(間葉系幹細胞を体外で培養したのち、ヒトに投与した臨床試験はいくつか報告されているが、現在のところ腫瘍発生はない)。
- 3) 細胞移植時、冠動脈内注入する際に生じる心室性不整脈（前臨床試験ブタ全 70 頭への心筋局注に際し、初期の 1 例目においてのみ穿刺関連の心室性不整脈の発生を認めたと、穿刺前のアミオダロン前投薬によるプロトコル改変治療後は、心室性不整脈の発生は一例も認めていない）。

幹移植術後の心室性不整脈への対応について

これまでに報告された骨髄幹細胞の冠動脈内注入による臨床試験では、小児及び成人心不全を含め、致死性不整脈の発生は報告されていない。

一方、本研究で用いられる心臓内幹細胞については、心臓幹細胞自体の再生機序、gap-junction 蛋白を介したホスト心筋との電氣的融合の形成、前臨床試験での不整脈監視試験の結果からは、その心室性不整脈の発生の危険性は低いと思われる。また、最近報告された大型動物用いた類似の心臓内幹細胞移植の冠動脈注入法による前臨床試験においても、致死性不整脈の発生は認められていない。さらに、TICAP 第 1 相臨床試験ならびに成人

虚血性心不全を対象にした SCPIO や CADUCEUS 臨床試験のように、冠動脈注入法による不整脈惹起の報告もないことから、本第 2 相臨床試験において致死性不整脈の発生の可能性は低いと考えられる。

また、従来報告されている骨格筋芽細胞移植による催不整脈作用（心室性不整脈）と同様の不整脈発生の危険性に関して、日本循環器学会の不整脈治療のガイドラインに則り、標準的抗不整脈治療を行う。この抗不整脈治療に対して抵抗性の致死性不整脈の発生を認めた場合は、埋め込み型除細動器の移植適応ガイドラインに則り、適応とされる症例には埋め込み型除細動器の移植を行う。

有害事象の報告と対応

報告義務のある有害事象

報告義務のある有害事象は、初回の心臓カテーテル検査から幹細胞移植手術後 1 年の間に発生したものとす。

報告・対応手順

試験責任 / 分担医師は、一次報告(72 時間以内)、二次報告 (7 日以内)、詳細調査報告、最終報告を行う。

対応手順

主任研究者、研究事務局および独立データモニタリング委員は、一次報告後の対応、二次報告後の対応、独立データモニタリング委員会による評価・勧告、対策の決定、最終報告後の対応を行う。

臨床研究終了後の追跡調査

3年間の臨床研究終了後も通常の保険診療行為として被験者の追跡を、10年以上を目安として行う。

被験者に病原体感染等の有害事象が生じた場合は、適切な医療措置を行うとともに、最終調製物に関する確認を行い、原因究明に努める。他の被験者の健康状態も確認し、被験者の安全性確保に努める。

観察・検査・報告項目とスケジュール

心臓カテーテル検査当日（細胞移植日）

- 1) 身体所見： 体重、血圧、脈拍数
- 2) 冠動脈造影： 主要冠動脈の有意狭窄の検証
- 3) 心機能： 心内圧測定、心血管造影
- 4) 心電図
- 5) 24 時間心電図モニター監視（術後から術後 1 週目まで）

心臓カテーテル検査翌日（細胞移植後）

- 1) 身体所見： 体重、血圧、脈拍数
- 2) 血液学的検査：白血球数、好中球数、赤血球数、ヘマトクリット、ヘモグロビン、血小板
- 3) 生化学検査
GOT(AST)、GPT(ALT)、LDH、総ビリルビン、直接ビリルビン、総タンパク、アルブミン、血清クレアチニン、BUN、電解質(Na、K、Cl)、CRP、CPK、CPK-MB、BS
- 4) 心電図
- 5) 胸部 X 線検査： 胸部前後撮影
- 6) 24 時間心電図モニター監視： 致死性・非致死性不整脈の検証

細胞移植後 1 週目

- 1) 身体所見： 体重、血圧、脈拍数
- 2) 血液学的検査：白血球数、好中球数、赤血球数、ヘマトクリット、ヘモグロビン、血小板
- 3) 生化学検査

- GOT(AST)、GPT(ALT)、LDH、総ビリルビン、直接ビリルビン、総タンパク、アルブミン、血清クレアチニン、BUN、電解質(Na、K、Cl)、CRP、CPK、CPK-MB、BS、BNP
- 4) 凝固系：PT、APTT、D-dimer
 - 5) 24時間心電図モニター監視：致死性・非致死性不整脈の検証
 - 6) 心電図
 - 7) 胸部 X 線検査：胸部前後撮影
 - 8) 臨床症状：心不全、チアノーゼ
- 2) 心電図
 - 3) 胸部 X 線検査：胸部前後撮影
 - 4) 心機能：心エコー図法、心内圧測定、心血管造影、心臓 MRI
 - 5) 24時間ホルター心電図：致死性・非致死性不整脈の検証
 - 6) 臨床症状：心不全、チアノーゼ
 - 7) 血液学的検査：白血球数、好中球数、赤血球数、ヘマトクリット、ヘモグロビン、血小板
 - 8) 生化学検査

GOT(AST)、GPT(ALT)、LDH、総ビリルビン、直接ビリルビン、総タンパク、アルブミン、血清クレアチニン、BUN、電解質(Na、K、Cl)、CRP、CPK、CPK-MB、BS
BNP、CEA、CA19-9

細胞移植後 3 ヶ月目 (エンドポイント判定)

- 1) 身体所見：体重、血圧、脈拍数
- 2) 心電図
- 3) 胸部 X 線検査：胸部前後撮影
- 4) 心機能：心エコー図法、心内圧測定、心血管造影、心臓 MRI
- 5) 24時間ホルター心電図：致死性・非致死性不整脈の検証
- 6) 臨床症状：心不全、チアノーゼ
- 7) 血液学的検査：白血球数、好中球数、赤血球数、ヘマトクリット、ヘモグロビン、血小板
- 8) 生化学検査

GOT(AST)、GPT(ALT)、LDH、総ビリルビン、直接ビリルビン、総タンパク、アルブミン、血清クレアチニン、BUN、電解質(Na、K、Cl)、CRP、CPK、CPK-MB、BS

BNP、CEA、CA19-9

- 9) 凝固系：PT、APTT、D-dimer

術後1年目(プロトコル治療終了)/試験中止時

- 1) 身体所見：体重、血圧、脈拍数

(倫理面への配慮)

遵守すべき諸規則

本研究に携わるすべての者は、ヒトを対象とする全ての医学研究が準拠すべき「世界医師会ヘルシンキ宣言」(1964年第18回世界医師会ヘルシンキ総会で起草、2004年10月第56回東京総会で最新改訂)や「臨床研究に関する倫理指針」(平成15年7月30日厚生労働省公布、改正：平成16年厚生労働省告示第459号)の内容を遵守し、更に「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」(平成18年7月3日厚生労働省公布)の内容に準じて施行する。

説明と同意(インフォームド・コンセント)

試験責任/分担医師は、被験者が試験に参加する前、心臓組織の採取前及び細胞移植手術前に、それぞれ説明文書を用いて十分説明し、試験への参加について自由意思による同意を本人から文書と

して得る。文書による同意を得る際には、説明医師ならびに被験者が説明文書の内容を十分理解した上で、同意書（様式）に各自日付を記入し、記名捺印または署名する。試験責任/分担医師は、記名捺印または署名した同意書の写しを説明文書と共に被験者に交付し同意書原本は説明文書と共にカルテに添付して当該医療機関で保管する。

説明文書に重大な改訂があった場合、説明医師は試験参加中の被験者に対して改訂後の説明文書を用いて再度説明し、試験参加の継続について自由意思による同意を本人から文書として得る。

試験参加中の被験者が同意の撤回を申し出た場合、試験責任/分担医師はその旨をカルテに記載し、記録を残す。被験者は同意を撤回する場合、試験責任者に対し同意撤回文書の交付を要求し、必要事項を記入した後に、提出する。試験責任医師は同意撤回文書を独立データモニタリング委員会に提出報告する。独立データモニタリング委員会は同意撤回手続きが正しく行われたことを確認、担当の試験責任医師にこれを通知する。試験責任医師は被験者に通知し、同意撤回手続きが完了する。同時に試験責任医師は登録・データセンターに試験中止報告書を提出する。

個人情報保護

個人情報の保護については、岡山大学に適用される法令、条例等を遵守する。試験に係わる関係者は、ヒト幹細胞臨床研究を行う上で知り得た被験者等に関する個人情報を正当な理由なく漏らしてはならないものとする。職を退いた後も同様とする。

試験責任医師および試験分担医師は、症例登録票および症例報告書等を当該機関外に提供する際には、連結可能匿名化を行うために新たに被験

者識別コードを付し、それを用いる。医療機関外の者が、被験者を特定できる情報（氏名・住所・電話番号など）は記載しない。

登録・データセンターが医療機関へ照会する際の被験者の特定は、試験責任医師および試験分担医師が管理する被験者識別コードまたは登録・データセンターが発行した登録番号を用いて行う。主任研究者等が試験で得られた情報を公表する際には、被験者が特定できないよう十分配慮する。

健康被害に対する補償

本臨床試験の実施に起因して有害事象が発生し、被験者に健康被害が生じた時には、すみやかに適切な治療その他最善の措置を受けることが出来るように、主任研究者、試験分担医師と岡山大学病院が対応する。

C. 研究結果

2013年6月から本第2相臨床研究の開始以降、2015年3月10日までに、ランダム化により割振りされた細胞移植群全17症例と非移植群のうち3か月目の評価検査を終了しかつ救済移植を希望された全17症例の合計34症例に対して、患者さん由来の心臓内幹細胞の冠動脈内注入を実施した。移植細胞数はプロトコル通り体重kgあたり30万個の幹細胞を3等分し、右冠動脈、左前下行枝ならびに回旋枝内に選択的に合計3mLとなるように注入した。うち、解剖学的に低形成の冠動脈を示した5症例においては選択的注入を断念し残りの2本の冠動脈内にそれぞれ1.5mLずつ注入した。

一回当たりの冠動脈内注入時間は0.5～1.5分であったが、5分以上の休止期間をはさみ、全予定細胞数をそれぞれ冠動脈内に移植できた。右冠動脈起始部注入時に一過性の洞性徐脈を8症例に

認め、バルーンによる1分以上の冠動脈閉塞の際には、ほぼ全症例において心電図上一過性のST-T変化と血圧の低下を観察した。これらの事象はバルーン deflationにより速やかに基本調律やカテーテル前の心電図に回復し、血管拡張剤などの持続的後療法を必要とする有害事象の発生は認めなかった。

また、プロトコル治療に則り不整脈予防のため、カテーテル後のアンカロン内服を全症例に実施しているが、うち3症例はアンカロンによる陰性変時作用により、1度の房室ブロックを術後2日目から検出し、同症例のアンカロン中止により速やかに房室ブロックの改善を認めた。また、1症例においては心臓手術後より投与開始されたワーファリンと移植手術中の抗凝固療法（ヘパリン）により、心臓カテーテル後一過性の脳内出血と脊椎内出血を認めたが、抗凝固療法中止により回復した。全症例において細胞注入に伴う催不整脈作用を認めず、冠動脈穿孔や術後心タンポナーデ、感染症やアレルギーの合併も観察されなかった。

D. 考察

冠動脈注入法による心臓内幹細胞移植法は、安全で、これまでに経験した全34症例において、心臓関連の重篤な有害事象の発生は認められなかった。有効性検証は現在症例登録実施中であるが、細胞移植群に割り付けとなり、これまで移植した17症例のうち、3か月目の評価カテーテル検査を終了した12症例に関しては、解析終了した非移植群の16症例に比べ、心室造影による心駆出率評価に有意な改善を認めた($p=0.005$)。今後、細胞移植群に割り当てられた全17症例の3か月目の心機能検査を詳細に継続検証し、また、非移植群に割

り付けられながら希望により救済移植を受けた全17症例の3ヶ月目における心機能評価と比較検討することで、カテーテル治療の安全性に加え、細胞治療の臨床的有効性についてより詳細に検討していく。

E. 結論

冠動脈内注入法による心臓内幹細胞移植は、技術的に実施可能で安全である。本臨床研究開始2年度以内に全予定症例数の34人に移植できたことにより、研究計画3年目以降から、細胞移植群および非移植群の間における臨床経過の相違を長期にわたって追跡可能となり、造腫瘍作用の解析を含め、臨床治験に向けた細胞移植における安全性及び有効性に関する臨床的エビデンス構築の推進に今後も継続して邁進していく。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ishigami S, **Ohtsuki S**, Tarui S, Ousaka D, Eitoku T, Kondo M, Okuyama M, Kobayashi J, Baba K, Arai S, Kawabata T, Yoshizumi K, Tateishi A, Kuroko Y, Iwasaki T, Sato S, Kasahara S, Sano S, Oh H. Intracoronary Autologous Cardiac Progenitor Cell Transfer in Patients with Hypoplastic Left Heart Syndrome: The TICAP Prospective Phase 1 Controlled Trial. *Circ Res.* 2015;116:653-664. Mutations of NOTCH3 in childhood pulmonary arterial hypertension. Chida A, Shintani M, Matsushita Y, Sato H, Eitoku

T, Nakayama T, Furutani Y, Hayama E, Kawamura Y, Inai K, **Ohtsuki S**, Saji T, Nonoyama S, Nakanishi T. **Mol Genet Genomic Med.** 2014 May;2(3):229-39
Stenting for pulmonary artery stenosis complicated by univentricular physiology: subanalysis of JPIC stent survey. Fujii T, Tomita H, **Ohtsuki S**, Kobayashi T, Ono Y, Yazaki S, Kim SH, Nakanishi T. **J Cardiol.** 2014 Oct;64(4):324-7
Baba, K., Kondo, M., Eitoku, T., Kurita, Y., Shigemitsu, Yuusuke., Fukushima, Yuusuke., Hirai, Kenta., **Ohtsuki, S.**: Hydrogel expanded coils for vascular occlusion in congenital heart disease. **Catheter Cardiovasc Interv** 2014; 83:12231.
栗田佳彦, **大月書一**: I-P-046 カプセル内視鏡によるフォンタン手術後蛋白漏出性胃腸症の治療効果判定について. 日本小児循環器学

会雑誌 30(suppl): 5281-5282, 2014.

2. 学会発表

Baba, K., **Ohtsuki, S.** : Hydrogel expandable coils for vascular occlusion in congenital heart disease. **Pediatric and adult interventional cardiac symposium**, Chicago, 2014

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。