

B-6 統計

SVF 群と対照群の尿漏出圧の比較は、F 検定により分散の均一性を検定し、分散が均一な場合は t 検定、分散が均一でない場合は Welch 検定にて実施した。

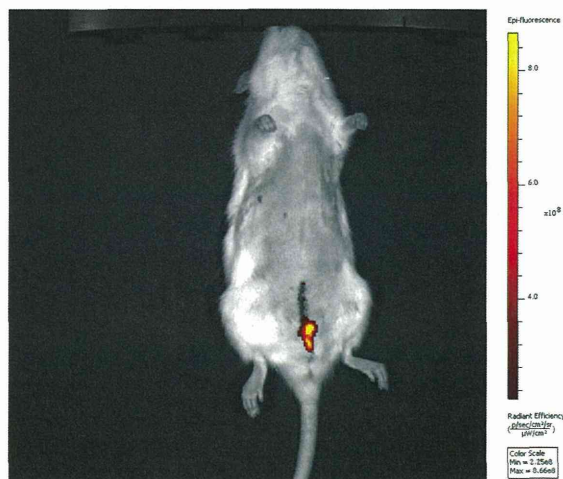
対照群と細胞投与群の尿漏出圧の比較は、Bartlett 検定により等分散性の検定を行い、等分散であった場合は Dunnett 検定、不等分散であった場合は Steel 検定にて実施した。

検定における有意水準は 1 及び 5% とした

C. 研究結果

C-1 : 細胞投与局所投与細胞動態

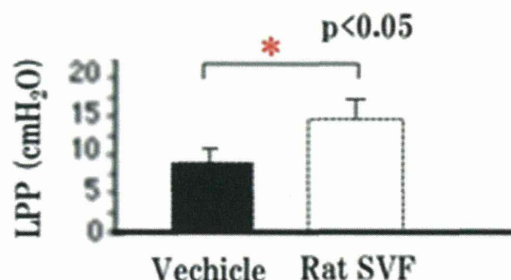
腹圧性ラットモデルの傍尿道周囲に、Dir でラベルした SVF を局所注入し、その全身の in vivo imaging を経時的に検索した。注入直後 6 時間後、1 日後、3 日後、7 日後共に Dir の集積は傍尿道周囲に限局し、多臓器（肺、肝臓、脾臓）の集積はなかった。また、同時に行った、HE 染色でも全身臓器の循環障害、腫瘍の発生はなかった。また、GFP ラットの SVF を傍尿道周囲局所投与後の GFP 免疫染色でも全身臓器の集積はなかった。



Dir ラベル傍尿道周囲注入後 7 日目

C-2 : SUI ラットモデルにおける LPP の比較

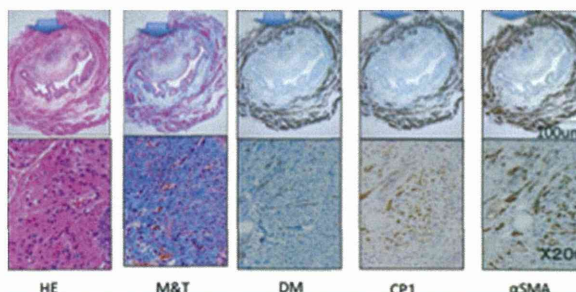
尿道から尿が漏れる時点の膀胱内圧を尿漏出圧として測定した。4 週間では Vehicle 群(n=6)の尿漏出圧は、SVF 注入群(n=6)に比べて有意に低かった。すなわち、SVF 注入群では尿道抵抗の増加が 4 週間後認められた。

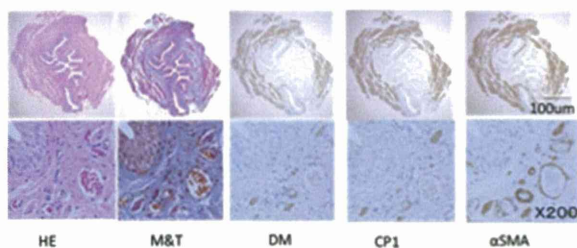


Transection of supine and pelvic nerves

C-3:SVF 傍尿道周囲注入の平滑筋原性免疫病理組織

SVF 注入部の bulking mass を HE、Masson Trichrome、 α -SMA (smooth muscle actin)、Desmin、Carponin-I、Ki67 にて免疫染色を行った。ASCs 注入部は α -SMA、Desmin、Carponin-I 陽性で、さらに最も特異性が高い平滑筋原性の免疫染色である MHC (myosin heavy-chain) による染色も陽性であり、ASCs の平滑筋への分化が示唆された。

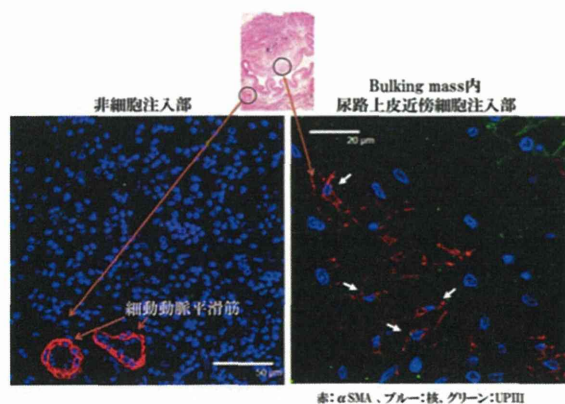




傍尿道断面におけるSVF投与後28日目筋原性免疫染色

C-4:SVF 傍尿道周囲注入の bulking mass 内の平滑筋原性細胞への分化

傍尿道断面の bulking mass におけるSVF投与後(28日目)筋原性多重免疫染色を行った。平滑筋の存在するはずのない、SVFを注入した bulking mass 内に平滑筋原性細胞(αSMA陽性細胞)を認めた。



傍尿道断面の bulking mass におけるSVF投与後28日目筋原性多重免疫染色(赤:SMA陽性細胞、青:細胞書く核、グリーン:尿路上皮(UPIII))

D. 考察

本実験より、傍尿道に注入したSVFによる膨隆(bulking)効果を

認め、尿道抵抗を増加すること(尿道漏出圧の上昇)が示された。さらに、注入されたSVFが平滑筋細胞へ分化する可能性が示された。培養SVFは

HGF(hepatocyte growth factor)、VEGF(vascular endothelial growth factor)、TGF-β(transforming growth factor)、FGF(fibroblast growth factor)、GM-CSF(granulocyte/macrophage colony stimulating factor)、MCP-1(monocyte chemotactic protein-1)、SDF-1α(stromal cell-derived factor-1α)などの血管新生などに関わる様々なサイトカインを分泌することが報告されている。(Rehman J: Circulation 109:1292-8, 2004)、今回の実験でも尿道に注入されたSVFも生体内での4週間の期間を経て、上記再生サイトカインの分泌されることが推測された。傍尿道へのSVF注入は、膨隆効果(bulking effect)、SVFへの平滑筋への分化、そして推測されるサイトカイン分泌によるparacrine effect(血流増加など)により、括約筋機能を改善する可能性が示唆された。また、局所注入したSVFは全身集積することなくその細胞動態的安全性を確認した。

E. 結論

尿失禁ラットモデルに対する非培養脂肪組織由来再生(幹)細胞(SVF)投与は、膨隆効果(bulking effect)、SVFへの平滑筋への分化、そして推測されるサイトカイン分泌によるparacrine effect(血流増加など)により、括約筋機能を改善する可能性が示唆された。この局所細胞投与は、全身への集積はなく細胞動態的に安全であることを確認した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hirose Y., Murakami M., Hayashi Y., Osako Y., Yamamoto T., Gotoh M.,

Nakashima M: Augmentation of regenerative potential of mesenchymal stem cells by granulocyte-colony stimulating factor(G-CSF) induced mobilization. J. Stem Cell Res. Transplant. 1(2): 1006. 2014 Aug 8. [Epub ahead of print]

山本徳則、後藤百万：腹圧性尿失禁に対する経尿道的脂肪組織由来幹細胞注入治療：臨床再生医療と TR 研究. 臨床泌尿器科 68 (6) 389-396、2014

山本徳則、後藤百万 血流イメージング 総説、Jpn J Med Ultrasonics, 41(6): 811-818, 2014

2. 学会発表

山本 徳則、舟橋 康人、松川 宣久、後藤 百万 新技術:生きたヒト脂肪組織由来幹細胞を細胞材料とした Scaffold free 3D細胞プリンタを用いたヒト尿道再生と免疫不全ラットへの臓器移植、第102回日本泌尿器科学会総会、2015年4月

山本 徳則、舟橋 康人、松川 宣久、後藤 百万 腹圧性尿失禁臨床治療と脂肪組織由来幹細胞が作り出す局所微小再生環境 日本排尿機能学会、2014年9月

山本 徳則、舟橋 康人、松川 宣久、後藤 百万 日本の「学」発イノベーションの現状 脂肪組織由来幹細胞を用いた腹圧性尿失禁臨床研究 日本排尿機能学会、2014年9月

稲葉 はつみ、山本 徳則、大熊 相子、松原 宏紀、松本 祐之、松下 正、後藤

百万 腹圧性尿失禁に対する脂肪由来幹細胞傍尿道注入術の効果判定における造影超音波の1症例、日本超音波医学会、2014年11月

山本 徳則、舟橋 康人、松川 宣久、後藤 百万 腹圧性尿失禁症例に対する脂肪組織幹細胞尿道周囲注入療法が作り出す微小環境 第102回日本泌尿器科学会総会、2014年4月

山本 徳則、舟橋 康人、松川 宣久、後藤 百万 泌尿器科領域における幹細胞治療のフロンライン 脂肪組織由来幹細胞を用いた腹圧性尿失禁臨床研究 第102回日本泌尿器科学会総会、2014年9月

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

國料敏男、山本徳則、柴田玲、横山幸浩、金子博和、後藤百万、舟橋康人、松川宣久、室原豊明、金村則良

特許願人 名古屋大学 出願日平成26年7月17日特願2014-147173

間質性膀胱炎の治療

山本 徳則、広瀬雄二郎、鈴木 哲、舟橋康人、松川宣久、後藤百万、中島美砂子 特許願人 名古屋大学/岐阜大学

出願日平成26年6月24日特願

2014-129723

卵子活性化方法及びその用途

山本徳則、鈴木哲、松川宣久、舟橋康人、後藤百万、村瀬哲磨 特許願人 名古屋大学/岐阜大学

出願日平成26年6月24日特願2014-1209027

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金
(医療技術実用化総合研究事業 (早期探索的・国際水準臨床研究事業))
分担研究報告書

脂肪組織由来間質細胞を用いた腹圧性尿失禁に対する
効力を裏付ける非臨床試験の検討

研究分担者

清水 忍 名古屋大学医学部附属病院先端医療・臨床研究支援センター 病院講師
山本徳則 名古屋大学大学院医学系研究科泌尿器科学 准教授

研究要旨

腹圧性尿失禁モデルラットにおける皮下脂肪由来間質細胞 (SVF) の尿道粘膜下投与による尿漏出圧 (LPP) 及び平滑筋への分化の影響を確認する目的で実施した。

膀胱周囲及び尿道平滑筋を剥離し、モデルを作製 (投与) 後28日にLPPを確認し、また、尿道の病理学的評価により平滑筋への分化を確認した。SVFの投与量は 1×10^5 cell/body、 1×10^6 cell/body及び 1×10^7 cell/bodyとし、対照群と腹圧性尿失禁モデルの作製を行わないシャム群を設けた。また、投与用に調製したラット皮下脂肪由来間質細胞の一部を用い、フローサイトメトリーにより投与当日に表面マーカーの解析を行った。

シャム群のLPPは34.3mmHgで、対照群のLPPは23.4mmHgであり、有意なLPPの低下が認められ、モデルの作製は確認できた。しかし、SVF 1×10^5 cell/body、 1×10^6 cell/body及び 1×10^7 cell/body群と対照群との間に有意なLPPの差は認められなかった。一方、尿道の病理組織学的評価において、 α Smooth Muscle Actin (SMA) 及びCalponin I 染色による発現面積はSVF投与群でいずれも対照群より高値を示したが、Myosin Heavy Chain (MHC) 発現面積に各群の明らかな差は認められなかった。表面マーカーの解析では、CD44の陽性率は平均0.6%、CD31の陽性率は平均12.0%、CD45の陽性率は平均20.6%であった。

以上の結果から、本実験条件では、SVFの 1×10^5 cell/body以上の投与による尿道平滑筋の再生効果が認められたものの、 1×10^7 cells/bodyの投与量まで腹圧性尿失禁モデルの尿漏出時点の膀胱内圧に対して今回の実験条件下では有意なLPPの変化が認められなかった。ただし、実験終了後、脂肪採取からSVF投与まで約9時間もかかっていたことが判明したことから、細胞の活性が低下していたことが原因である可能性があると考えた。今後、適切な時間で処置を行ったSVFを投与し、LPP及び平滑筋分化に対する作用及び平滑筋分化に及ぼす作用を再度確認する必要があると考える。

A. 研究目的

研究代表者の後藤らは、皮下脂肪由来間質細胞 (Stromal Vascular Fraction: SVF) 1×10^6 個を尿失禁モデルラットの傍尿道部に投与することで、投与4週後の尿漏出圧 (Leak Point Pressure: LPP) の上昇効果を確認しており、また、病理組織検

査において、平滑筋に分化されていることを確認している。その非臨床試験で認められた効果を期待し、皮下脂肪組織を脂肪吸引法で採取後、採取した脂肪組織から細胞分離装置である Celution (Cytori Therapeutics, Inc.: サイトリ社) を用いて ADRCs を抽出し、経尿道内視鏡下に尿道

括約筋及び尿道粘膜下に ADRCs を投与すること（以下、本治療法）により、腹圧性尿失禁の治療を行うことを計画した。現在、腹圧性尿失禁患者（目標症例数 30 例）を対象に非盲検非対照試験が実施されている（平成 23 年 3 月 15 日承認：厚生労働省発医政 0315 第 3 号）（先行臨床試験）。その先行臨床試験成績（中間解析）で、本治療法の一定の有効性及び安全性が確認されているため（Int J Urol 19(7): 652-9, 2012 ; Int J Urol 21(3), 294-300, 2014）、新たな本治療法の実用化を目指し、細胞分離装置である Celution で分離した脂肪組織由来再生（幹）細胞（ADRCs）を用いた腹圧性尿失禁に対する開発を行っている。

医薬品医療機器総合機構（PMDA）における治験相談を利用し、治験開始の可否について、並びに試験デザインの確認を行った。その際に、ADRCs の平滑筋への分化を示唆した非臨床試験については、承認申請時までに適切な対照群の結果を提示できるように追加試験の実施を検討するよう指示された。そこで、皮下脂肪由来 SVF の尿道粘膜下投与による尿漏出圧（LPP）及び平滑筋への分化の影響を確認する目的で、かつ用量反応性の確認を行うこととした。

なお、SVF はコラゲナーゼ等のプロテアーゼによる酵素処理と遠心分離により脂肪組織から分離される。ADRCs もセルーションにより、酵素処理と遠心分離により脂肪組織から分離される細胞群であり、SVF と類似すると考えられるため、SVF を用いることとした。

B. 研究方法

本試験は、株式会社 LSI メディエンスに委託し、実施した。

1. SVF の調製

ラットをイソフルラン吸入にて麻酔後、両大腿の鼠蹊部から脂肪を採取し、コラゲナーゼを加え、インキュベートした。その後、遠心分離（1,300rpm、10 分間）

とリン酸緩衝生理食塩水（Phosphate Buffered Saline : PBS）による洗浄を数回繰り返した。細胞計算盤を用い、生細胞密度及び生細胞数を計測し、生細胞密度が 5×10^6 cell/body、 5×10^7 cell/body 及び 5×10^8 cells/mL となるように、細胞懸濁液を PBS で希釈し、投与液（20 μ L）を調製した。

2. 調製した SVF の表面マーカー解析

細胞の表面マーカー（CD31・CD44・CD45）の解析を、フローサイトメトリーシステムを用いて行った。測定細胞数は FSC/SSC のドットプロットでゲーティングした細胞を 10,000 個以上とした。

3. 腹圧性尿失禁モデルラットの作製及び投与

ラットをイソフルラン吸入にて麻酔後、塩酸ブプレノルフィンを筋肉内投与した。腹部を正中切開し、膀胱を露出させ、膀胱周囲及び尿道平滑筋を剥離した。

調製した投与液（溶媒（PBS）、SVF 5×10^6 cell/body、 5×10^7 cell/body 及び 5×10^8 cells/mL）を傍尿道部（尿道粘膜下）に投与し、切開部を縫合した。シャム群は腹部の切開と縫合のみ実施した。

4. 腹圧性尿失禁モデルラットの尿漏出圧の測定

腹圧性尿失禁モデル作製の手術後 28 日に、ウレタンを皮下投与することにより麻酔した。腹部を正中切開し、膀胱を露出させ、膀胱頂部を小切開しカニューレを挿入固定し、膀胱瘻を作製した。膀胱内に挿入したカニューレの他端を三方活栓に接続して、一方から生理食塩液を注入しながら、もう一方は圧トランスデューサーを介して圧力アンプにより膀胱内圧を連続記録した。尿が漏出した時点の膀胱内圧を LPP とした。

5. 尿道周囲の病理組織学的検査

尿漏出圧の測定終了後、麻酔下にて腹部大動脈を切断し、放血致死させた後、

尿道を摘出し、4%パラフォルムアルデヒド溶液に固定した。尿道について、定法に従ってパラフィン切片を作製し、病理学的評価 [HE 染色、 α -Smooth Muscle Actin (SMA)、calponin I 及び Myosin Heavy Chain (MHC)] を行った。

6. 統計

シャム群と対照群の尿漏出圧の比較は、F 検定により分散の均一性を検定し、分散が均一な場合は *t* 検定、分散が均一でない場合は Welch 検定にて実施した。対照群と細胞投与群の尿漏出圧の比較は、Bartlett 検定により等分散性の検定を行い、等分散であった場合は Dunnett 検定、不等分散であった場合は Steel 検定にて実施した。検定における有意水準は 1 及び 5%とした。尿道の病理組織学的検査結果及び細胞表面マーカー解析については統計学的処理を実施しなかった。

(倫理面への配慮)

本試験の実施に際し、「動物実験に関する指針 (試験研究センター)」に基づき、動物実験委員会審査及び試験研究センター長の承認 (承認番号: 2014-0654) を得た。

C. 研究結果

ラットの膀胱周囲及び尿道平滑筋を剥離した腹圧性尿失禁モデルラットの尿道粘膜下に皮下脂肪由来間質細胞を単回投与した。モデル作製手術 (投与) 後 28 日に麻酔下で膀胱内に生理食塩液を持続注入しながら膀胱内圧を連続測定し、尿が漏出した時点の膀胱内圧 (LPP) を指標として尿失禁改善効果を検討した。膀胱内圧測定後、尿道を摘出し、病理学的評価 [HE 染色、 α SMA、Calponin I 及び MHC] を行った。

SVF の投与量は 1×10^5 cell/body、 1×10^6 cell/body 及び 1×10^7 cell/body とし、腹圧性尿失禁モデルの作製を行わないシャム群を設けた。シャム群と対照群には

細胞の投与は実施しなかった。投与用に調製した SVF の一部を用い、フローサイトメトリーにより表面マーカーの解析 (CD31・CD44・CD45) を行った。

1. 調製した SVF の表面マーカー解析

Figure 1 に示したように、表面マーカーの解析では、間葉系幹細胞マーカーの一つである CD44 の陽性率は、0.30%、1.33%及び 0.18%であり、平均 0.6%であった。血管内皮系細胞マーカーの CD31 の陽性率は 9.84%、19.14%及び 7.09%であり平均 12.0%であった。血球系細胞マーカーの CD45 の陽性率は 16.68%、26.27%及び 18.77%であり、平均 20.6%であった。

2. 腹圧性尿失禁モデルラットの尿漏出圧の測定

Table 1 に示したように、シャム群の LPP は 34.3mmHg で、対照群の LPP は 23.4mmHg であり、シャム群との間に有意な LPP の低下が認められ、尿道平滑筋の剥離による腹圧性尿失禁モデルラットの作製が確認された。本モデル動物に SVF を 1×10^5 cell/body、 1×10^6 cell/body 及び 1×10^7 cell/body 投与し、投与後 28 日の LPP はそれぞれ、24.3mmHg、27.8mmHg 及び 24.4mmHg であり、対照群との間に有意な差は認められず、用量依存性も認められなかった。

3. 尿道周囲の病理組織学的検査

尿道周囲の病理組織学的検査結果を Figure 2 に示した。

α SMA 染色による発現面積の平均値はシャム群で $63,690.4 \mu\text{m}^2$ 、対照群で $73,481.9 \mu\text{m}^2$ であった。SVF の 1×10^5 cell/body、 1×10^6 cell/body 及び 1×10^7 cell/body 投与群はそれぞれ、 $87,828.9 \mu\text{m}^2$ 、 $108,344.2 \mu\text{m}^2$ 及び $98,370.8 \mu\text{m}^2$ であった。

Calponin I 染色による発現面積の平均値はシャム群で $20,564.4 \mu\text{m}^2$ 、対照群で $16,704.7 \mu\text{m}^2$ であった。SVF の 1×10^5 cell/body、 1×10^6 cell/body 及び

1×10⁷cell/body 投与群はそれぞれ、23,602.7μm²、38,502.4μm² 及び 46,996.4μm² であった。

MHC 発現面積の平均値はシャム群で 20,036.6μm²、対照群で 28,022.9μm² であった。皮下脂肪由来間質細胞の 1×10⁵cell/body、1×10⁶cell/body 及び 1×10⁷cell/body 投与群はそれぞれ、31,667.8μm²、23,717.2μm² 及び 23,858.7μm² であった。

D. 考察

本邦は、超高齢化社会に突入し、QOL の向上が問われるため、仕事、家事、社会的活動等の日常生活の多くの領域で支障を及ぼす尿失禁に対する治療開発は、極めて重要かつ喫緊の課題であり、世界に先駆けた新規治療の開発を行う必要があると考えられる。そのような状況であるにも拘わらず、腹圧性尿失禁に対する医薬品の開発は、現在行われていないため(政策研ニュース, No.41:11-13, 2014)、新たな治療法の開発が望まれていると考えられる。

研究代表者の後藤ら、新たな再生材料として、2001 年に発見同定された多分化能を有する脂肪由来幹細胞に注目し、これまで非臨床試験及び臨床試験を実施し、実用化に向けた検討を行ってきた。実用化に向けた開発を戦略的に行うためには、規制当局である PMDA と議論しながら進めることが重要であることから、PMDA における治験相談を利用することとした。その際に、ADRCs の平滑筋への分化を示唆した非臨床試験については、承認申請時までに適切な対照群の結果を提示できるように追加試験の実施を検討するよう指示されたため、SVF の尿道粘膜下投与による LPP 及び平滑筋への分化の影響を確認し、かつ用量反応性の確認を行うこととした。

今回、腹圧性尿失禁モデルラット作製後 28 日の LPP の測定において、対照群はシャム群と比較して LPP の有意な低下

が認められたことから、腹圧性尿失禁モデルが作製されていることが確認された。しかし、本モデルラットの尿道粘膜下に SVF を単回投与し、投与後 28 日測定した LPP について、今回の実験条件下では対照群との有意な差は認められず、用量依存性も認められなかった。これは、SVF の表面マーカー解析で、CD44 はほとんど陽性を示さなかったため、間葉系細胞マーカーである CD44 の陽性率が低いことが関連している可能性が考えられた。一方で、病理組織学的検査では、αSMA 及び Calponin I 染色による発現面積は SVF 投与群でいずれも対照群より高値を示したが、MHC 発現面積に各群の明らかな差は認められなかったことから、SVF 投与による尿道平滑筋の再生効果が示唆される結果となった。しかし、この SVF 投与による尿道平滑筋の再生効果が、今回の実験条件下で尿道括約筋機能の指標となる LPP に反映しなかった。

この LPP への効果が認められなかった原因を検討したところ、脂肪採取から SVF 調製後、表面マーカー測定、並びに細胞の当該部位への投与までに約 9 時間を経過していたことが判明した。そのため、投与する細胞活性の低下が関与した可能性が考えられた。

今回は、製造販売承認申請までに必要なデータとして、PMDA から要求された追加試験の実施を行ったが、適切に実施ができなかった。現在、医師主導治験開始のための準備を進めており、平成 27 年 4 月にまずは名古屋大学で IRB に諮り、平成 27 年度第一四半期に初回治験届を提出する予定としている。今後、適切な時間で処置を行った SVF を投与し、LPP 及び平滑筋分化に対する作用及び平滑筋分化に及ぼす作用を、製造販売承認申請のために、再度確認する必要があると考ええる。

E. 結論

本実験条件では、皮下脂肪由来間質細

胞の $1 \times 10^5 \text{ cell/body}$ 以上の投与による尿道平滑筋の再生効果が認められたが、 $1 \times 10^7 \text{ cells/body}$ の投与量まで腹圧性尿失禁モデルの尿漏出時点の膀胱内圧に対して作用を示さないと考えられた。

ただし、今後、適切な時間で処置を行った SVF を投与し、LPP や平滑筋への分化に対する作用を確認する必要があると考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 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

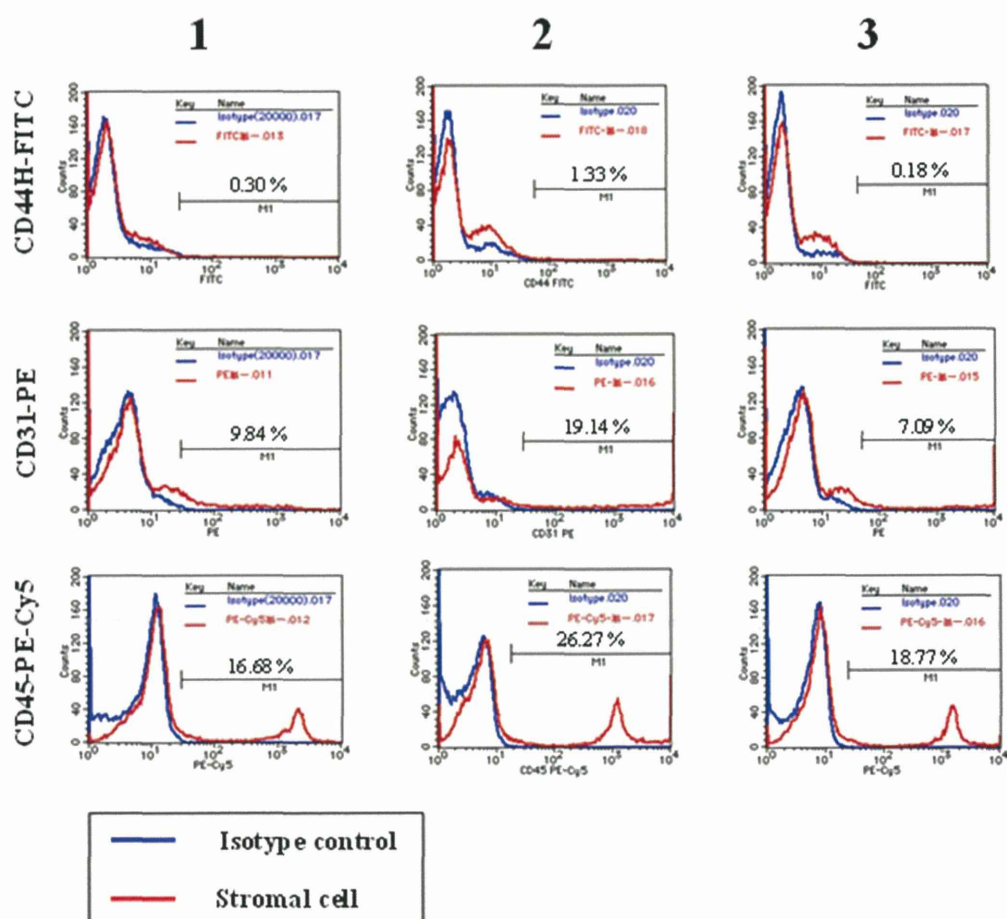


Figure 1 Results of analysis of cell surface markers

Table 1 Effect of Stromal cells on leak point pressure in stress urinary incontinence rats

Test group	Dose (cells/body)	n	Leak point pressure (mmHg)
Sham	0	5	34.3 ± 6.9
Control	0	5	23.4 ± 4.1 *
Stromal cells	1 × 10 ⁵	5	24.3 ± 3.1
	1 × 10 ⁶	5	27.8 ± 7.5
	1 × 10 ⁷	5	24.4 ± 2.1

The animals were not performed surgery of stress urinary incontinence in sham group.
Each value represents the mean ± S.D.

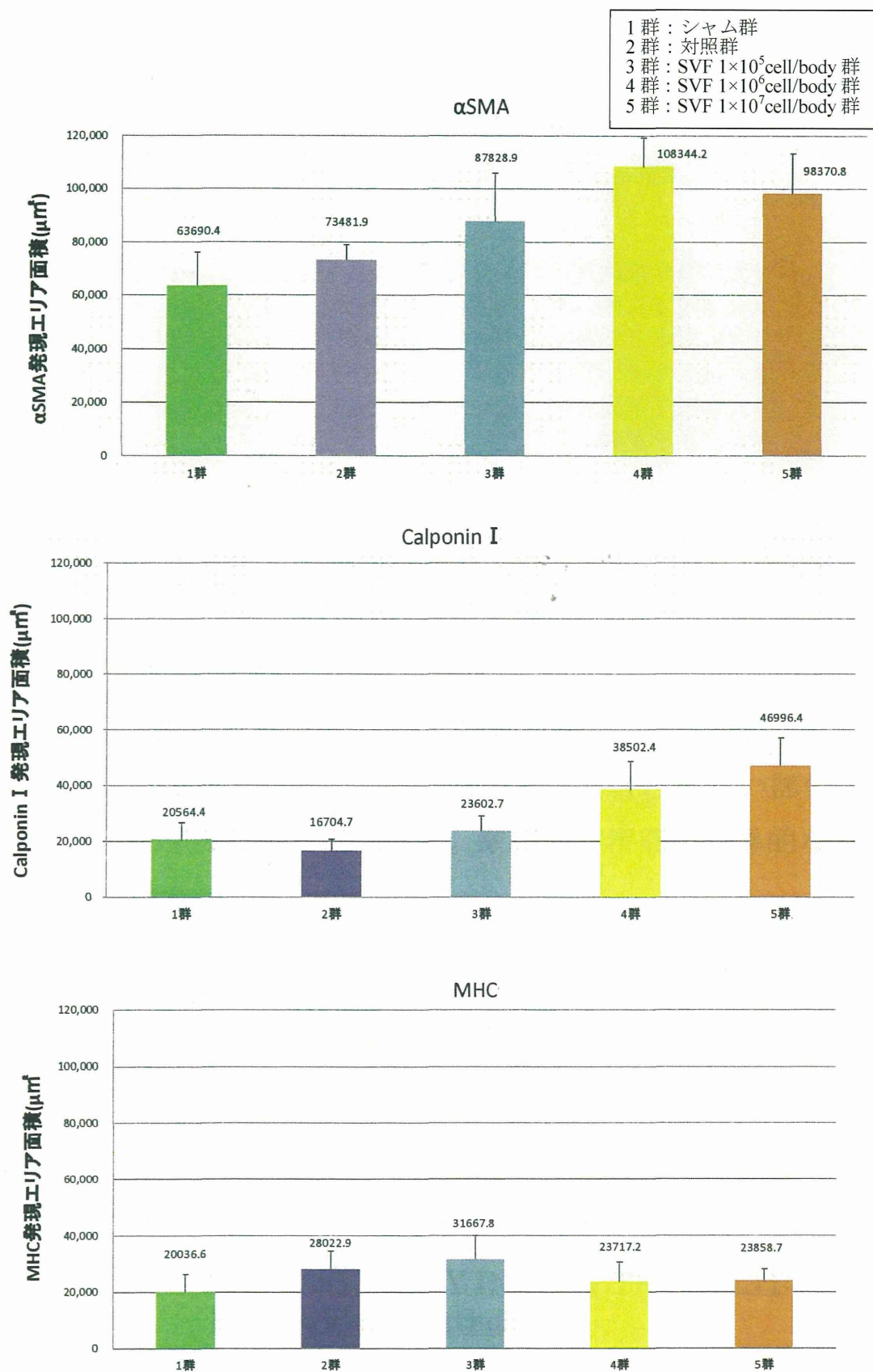


Figure 2 Results of histopathological examination

厚生労働科学研究費補助金
(医療技術実用化総合研究事業（早期探索的・国際水準臨床研究事業）)
分担研究報告書

多施設共同医師主導治験実施に向けての基盤整備

研究分担者

水野正明	名古屋大学医学部附属病院先端医療・臨床研究支援センター	病院教授
安藤昌彦	名古屋大学医学部附属病院先端医療・臨床研究支援センター	准教授
加藤勝義	名古屋大学医学部附属病院先端医療・臨床研究支援センター	講師
平川晃弘	名古屋大学医学部附属病院先端医療・臨床研究支援センター	講師
清水忍	名古屋大学医学部附属病院先端医療・臨床研究支援センター	病院講師
中山忍	名古屋大学医学部附属病院先端医療・臨床研究支援センター	薬剤師

研究要旨

名古屋大学医学部附属病院における新たな治療方法の提供を推進するにあたり、細胞分離装置であるCelutionで分離した脂肪組織由来再生（幹）細胞（ADRCs）を用いて男性腹圧性尿失禁患者を対象に、多施設共同医師主導治験の支援体制を提供するための整備を進めた。

まずは、腹圧性尿失禁を対象とした治験を実施するため、医薬品医療機器総合機構（PMDA）と治験実施の可否及び治験実施計画のデザインについて協議しながら、開発方針を決定した。作成した治験実施計画書（案）を基に、治験実施体制の構築を進め、平成27年度から多施設共同医師主導治験を実施する体制を概ね構築した。

A. 研究目的

人を対象にした臨床試験においては、安全性が十分担保された環境で実施する必要がある。その規範となるのが 1964 年に世界医師会総会で採択されたヘルシンキ宣言であり、この宣言はその後、数回の改訂が加わり、現在に至っている。ここでは、1) 科学的・倫理的に適正な配慮を記載した臨床試験実施計画書を作成すること、2) 倫理審査委員会での臨床試験計画の科学的・倫理的な適正さが承認されること、3) 被験者に、事前に説明文書を用いて臨床試験計画について十分に説明し、臨床試験への参加について自由意思による同意を文書で得ることが基本原則に掲げられている。この宣言に則り、我が国においては 1997 年に「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令（平成 9 年 3 月 27 日 厚生省令第 28 号）（ICH-GCP

省令）が発行され、国際基準に則った臨床試験の基盤が整備された。

一方、名古屋大学医学部附属病院は 2012 年度から文部科学省「橋渡し研究加速ネットワークプログラム」及び厚生労働省「臨床研究中核病院整備事業」にそれぞれ採択され、我が国における第一線の臨床研究実施施設を目指し、革新的な医薬品・医療機器の開発を行う事を目標としている。

本研究ではこの流れに沿って、研究代表者の後藤らにより開発された腹圧性尿失禁における新たな治療方法である脂肪組織由来再生（幹）細胞（Adipose Derived Regenerative Cells : ADRCs）を傍尿道部へ投与する治療方法の提供を推進するにあたり、ADRCs を分離する装置である Celution（Cytori Therapeutics Inc. : サイトリ社）の実用化に向けた開発を進めるた

めの支援体制の整備を進めることとした。

平成 24 年度に臨床試験を実施する上で、必要な臨床試験支援スタッフとして、プロジェクトマネージャー、企画立案担当、生物統計家、データーマネージャー、薬事担当からなる Design Build-up Team (DBT) を構成した。平成 25 年度に当該治療方法をどのように実用化に結びつけるのかについて、細胞分離装置の販売元であるサイトリ社を交え、今度の開発方針の検討も行った。その開発方針について、厚生労働省医政局研究開発振興課及び医薬食品局審査管理課の担当官と 2 回に亘り先進医療 B としての臨床試験の実施について相談したところ、実用化のためには細胞分離装置である Celution (治験 識別 記 号 Celution-SUI、以下単に Celution という) の治験を実施することが必要であるとの指導を受けた。

そのため、実用化を見据えた開発を進めるために研究代表者と協同し、医師主導治験を実施する準備を進めることとした。

B. 研究方法

1. PMDA との対面助言

保険診療で実施できる医療の提供を目指す開発方針の検討を行うため、研究代表者及び細胞分離装置の販売元であるサイトリ社を交え、医師主導治験の実施の可否及び治験デザインについて医薬品医療機器総合機構 (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency : PMDA) と薬事戦略相談 (対面助言) 又は医療機器治験相談 (対面助言) を行うこととした。

2. 多施設共同医師主導治験の準備

「ヘルシンキ宣言」(2013 年 10 月 フォルタレザ修正)、「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」(昭和 35 年 8 月 10 日 法律第 145 号) (医薬品医療機器等法) 及び「医療機器の臨床試験の実施の基準に関する省令(平成 17 年 3 月 23 日 厚生労働省令

第 36 号) (医療機器 GCP 省令) 等の各種関連省令・指針を参照し、支援体制の構築を進めた。

また、治験の実施体制の構築に向け、各業務の担当者を決定し、各種手順書の整備を進め、また、適切な医師主導治験の実施のために、医薬品開発業務受託機関 (Contract Research Organization : CRO) の選定、電子的臨床検査情報収集 (Electric Data Capture : EDC) システムの選定も行った。さらに、多施設共同で実施するために当該医師主導治験を適切に実施可能な施設の選定及びその連携体制の強化を行った。

(倫理面への配慮)

医師主導治験実施のために、医薬品医療機器等法、医療機器 GCP 省令、その他各種関連省令・指針に基づいた体制を構築するよう整備を進めた。

C. 研究結果

1. PMDA との対面助言

平成 25 年度に実施した厚生労働省との相談を踏まえ、Celution で分離した ADRCs を用いた腹圧性尿失禁患者に対する治験を実施する方針を固め、平成 25 年度に 2 回実施した PMDA との薬事戦略相談 (事前面談) も踏まえ、まずは治験実施の可否について、PMDA との薬事戦略相談を行うこととした。

治験実施の可否についての薬事戦略相談 (対面助言) に向けた情報を整理するため、これまで実施した効力を裏付ける非臨床試験やサイトリ社が保有する Celution で分離された ADRCs の特性や非臨床試験成績を精査した。その情報は、平成 26 年 5 月 21 日に PMDA の薬事戦略相談 (事前面談) において検討され、平成 26 年 7 月 10 日に薬事戦略相談 (対面助言) (第機戦 P56 号) が実施された。当該薬事戦略相談においては、医師主導治験の実施の可否について相談を行ったが、PMDA からは大きな異論はなく、治験を実施する上で必要な非臨床試験の充

足性については、特段の問題はない旨の回答が得られた。

そのため、現在、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針(「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針の改正等について」(平成22年11月1日 医政発1101第6号))に則り実施している(平成23年3月15日承認:厚生労働省発医政0315第3号)非盲検非対照試験(目標症例数30例)を踏まえ、試験計画骨子(案)を作成し、試験デザインの妥当性を説明するための根拠を検討した。その根拠を基に、平成26年10月10日に医療機器対面助言(治験相談)のための事前面談を実施し、相談事項の確認が行われた。平成26年11月25日に実施された医療機器治験相談(対面助言)(第機P1048号)では、①主な組入れ基準について、②主要評価項目について、③評価期間について、④対照群の設定について、⑤症例数設定根拠について、の5項目について相談を実施したところ、PMDAからは大きな異論はなく、主な試験デザインについて、了解が得られた。

そこで、PMDAとの議論を踏まえた治験実施計画書(案)の作成をさらに進め、また、並行して説明文書・同意文書(案)、治験機器概要書(案)の整備を行うこととした。

2. 多施設共同医師主導治験の準備

Celutionや分離したADRCsの情報を共有するため、平成24年度にサイトリ社と守秘義務契約を締結していた。治験を実施するに際して、分離装置であるCelutionにかかる情報提供や機器やその付属品の提供も含め、サイトリ社とInvestigator Initiated Research Agreement及びLoaner Agreementの締結を行い、医師主導治験の実施に向けて連携の強化を行った。ADRCsの分離装置であるCelution、ADRCs分離の際に必要な消耗品であるディスポーザブルセット及び酵素であるセレースの治験機器概要書の提供を受けた。

また、治験の実施体制については、治験実施準備に向け、名古屋大学医学部附属病院先端医療・臨床研究支援センターを中心に各業務担当の決定を行った。リソース等を勘案し、一部の業務については、CROの支援を依頼することとし、CROの選定を行い、契約を行った。また、治験データ収集のためのEDCシステムの選定を進めた。

治験調整事務局(以下、事務局)である先端医療・臨床研究支援センターでは、平成25年度に作成した治験実施に必要な各種手順書の雛形を基に、実施する医師主導治験固有の手順書の作成を進め、以下の手順書を作成した(添付資料1～13)。また、付随する各種マニュアルや様式等の作成も進め、評価に用いる排尿日誌とQOLアンケートを作成した(添付資料14及び15)。

- ①医師主導治験の準備及び管理に関する手順書(添付資料1)
- ②治験実施計画書及び症例報告書の見本の作成に関する手順書(添付資料2)
- ③治験機器概要書作成に関する手順書(添付資料3)
- ④説明同意文書作成に関する手順書(添付資料4)
- ⑤記録の保存に関する手順書(添付資料5)
- ⑥治験調整医師への業務委嘱に関する手順書(添付資料6)
- ⑦治験調整医師の業務に関する手順書(添付資料7)
- ⑧被験者の健康被害補償に関する手順書(添付資料8)
- ⑨治験機器の管理に関する手順書(添付資料9)
- ⑩品質管理に関する手順書(添付資料10)
- ⑪安全性情報の取扱いに関する手順書(添付資料11)
- ⑫モニタリングの実施に関する手順書(添付資料12)
- ⑬監査の実施に関する手順書(添付資料13)

13)

事務局では、実施計画書、説明文書・同意文書、治験機器概要書、上記に示した手順書の共有も含め、患者の組入れ状況や安全性情報の共有を目的に Web サイトを立ち上げた (https://www.c-ctd.co.jp/project_ADRCS/)。

多施設共同で医師主導治験を実施するため、医療機器 GCP 省令、治験実施計画書に従い、治験が遂行できるかについて、事務局の担当やモニターが施設を訪問し、責任医師や施設としての適切性を確認し、金沢大学、信州大学、獨協医科大学の 3 施設を分担機関として、選定した。選定した実施医療機関の治験責任医師、治験分担医師、治験協力者、サイトリ社、CRO を含め、平成 27 年 3 月 15 日にキックオフミーティングを実施し、治験遂行に向けた認識の共有を図った（添付資料 16）。

なお、市販されている注射針のうち、内視鏡下で傍尿道部に薬液等を注入できる注射針は存在していなかったが、株式会社八光と協力し、平成 27 年 3 月に「NUU デバイス」として届出を行った。

D. 考察

実用化を目指し、新たな治療方法の提供を推進するにあたり、信頼性の高い臨床試験成績を創出するため、ICH-GCP に基づいた臨床試験の支援体制を提供するための整備を進めることは、文部科学省・厚生労働省の「臨床研究・治験活性化 5 か年計画 2012」（平成 24 年 3 月 30 日）においても求められている。名古屋大学医学部附属病院は、2012 年度から文部科学省「橋渡し研究加速ネットワークプログラム」及び厚生労働省「臨床研究中核病院整備事業」にそれぞれ採択され、質の高い臨床研究を実施できる体制の整備を、病院長を中心に、先端医療・臨床研究支援センターにおいて、進めている。この方針は、平成 27 年度から、「革新的医療技術創出プロジェクト」として、日

本医療研究開発機構の下で進められていく。

本研究課題においては、腹圧性尿失禁を対象に、細胞分離装置である Celution の製造販売承認申請を目指し、サイトリ社と協同し、医師主導治験を実施することを目的としている。これまで、医師主導治験を支援するために、DBT を組織し、厚生労働省や PMDA と相談し、開発方針を確認しながら、開発を進めてきた。このように規制当局と議論しながら開発を進めることで、今後得られる研究成果を国民に広め、恒常的に提供できる体制も構築することができると考えられる。

これまで、医師主導治験開始のための準備を進めており、今後、多施設共同研究を実施するための適切な多施設共同医師主導治験を実施する体制がほぼ構築できたと考える。今後、治験実施計画書、説明文書・同意文書、ADRCs のデータをまとめた治験機器概要書を固定に向け進め、平成 27 年 4 月に名古屋大学で治験審査委員会 (Institutional Review Board: IRB) に諮り、平成 27 年度第一四半期に初回治験届を提出する予定としている。その他に必要なマニュアル、様式も順次整え、総ての施設で共通した認識で治験が実施できるよう準備を進めていく。

本邦は、超高齢化社会に突入し、QOL の向上が問われるため、仕事、家事、社会的活動等の日常生活の多くの領域で支障を及ぼす腹圧性尿失禁に対する治療開発は、極めて重要かつ喫緊の課題であり、世界に先駆けた新規治療の開発を行う必要があると考えられる。しかし、腹圧性尿失禁に対する医薬品の開発は、現在行われていないため（政策研ニュース、No.41：11-13, 2014）、ADRCs を用いた本治療方法の開発には、非常に意義があると考えられる。

E. 結論

今回、新たな治療方法の提供を推進するにあたり、信頼性の高い臨床試験成績

を創出するため、医療機器 GCP 省令に基づいた臨床試験の支援体制を提供するための整備を進め、DBT を組織した。厚生労働省や PMDA との議論を踏まえ、開発方針を決定し、多施設共同医師主導治験の実施医療機関を確定し連携体制も整えたことにより、適切な体制構築が概ね完了した。

今後、本研究課題について質の高い臨床試験成績が得られるよう、医療機器 GCP に準じ、適切な臨床試験が実施できるよう進めていくこととする。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 構造並びに機能再生を目指す脂肪組織由来幹細胞治療の開発－腹圧性尿失禁に対する構造再生医療の開発－.文部科学省・厚生労働省 革新的医療技術創出拠点プロジェクト 平成 26 年度成果報告会

G. 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

医師主導治験の準備及び管理に関する手順書

治験課題名

男性腹圧性尿失禁に対する非培養自己ヒト皮下脂肪組織由来再生（幹）

細胞の傍尿道注入治療の有効性及び安全性を検討する

多施設共同非盲検非対照試験

治験実施計画書番号

CAMCR-005

治験調整医師

名古屋大学医学部附属病院 泌尿器科

教授 後藤 百万

第 1.0 版 作成日 2015 年 2 月 24 日

1. 目的及び適用範囲

本手順書は、自ら治験を実施する者が、医師主導治験の準備及び管理を適切に行うための手順を定めるものである。

医師主導治験において、複数の自ら治験を実施する者が同一の治験実施計画書に基づいて治験を実施する、いわゆる多施設共同治験を実施する場合は、自ら治験を実施する者は多施設間の調整に係る業務を治験調整医師に委嘱することができる（医療機器の臨床試験の実施の基準に関する省令（以下、「GCP」と本治験に関する全ての手順書を通じていう）第 37 条）。

この治験調整医師は、多施設共同治験に参加する自ら治験を実施する者からの委嘱を受けてから調整業務を行うことになるが、医師主導治験の計画作成及び実施体制の構築の流れからすると、この時点では治験に参加する自ら治験を実施する者は確定していない状況である。

このため、本治験では、治験調整医師として自ら治験を実施する者からの委嘱を受ける前段階ではあるが、当該治験を立案した医師が後の治験調整医師に就任する前提で、便宜上、治験調整医師の名義で治験に必要な手順書を作成するものとする。

2. 医師主導治験の準備及び管理

自ら治験を実施する者及び治験調整医師（以下、「自ら治験を実施する者等」）は、医師主導治験の準備及び管理にあたり、GCP 及びこれに関連する厚生労働省及び医薬品医療機器総合機構の通知を遵守する。

また、自ら治験を実施する者等は、治験に必要な文書の作成にあたり、必要な資料又は情報の提供について、治験機器提供者と協議し、契約を締結するなど必要な措置を講じる。

3. 手順書の作成又は改訂手順

- (1) 自ら治験を実施する者等は、GCP 第 16 条に規定された手順書その他必要な手順書を作成する。手順書の版番号は、案として第 0.1 版より開始し、内容を固定した初版の版番号を第 1.0 版とする。作成日は、自ら治験を実施する者等が作成した日とする。
- (2) 手順書を改訂する場合は、原則として、第 1.0 版以降は、1.0 ずつ繰り上げ、版番号を更新することとする（例：第 1.0 版→第 2.0 版）。作成日は、自ら治験を実施する者等が作成した日とする。
- (3) 手順書の軽微な変更（治験実施の手順に影響を与えない変更）の場合、版番号は 0.1 ずつ繰り上げて更新する（例：第 1.0 版→第 1.1 版）。作成日は、自ら治験を実施する者等が作成した日とする。
- (4) 実施医療機関において、例えば治験審査委員会の審議の結果、語句・表現等の修正など等、他の実施医療機関に影響しない変更が生じた場合は、版番号の末尾に、別途定める実施医療機関固有番号を付与する（例：第 1.0 版に対する実施医療機関（固有番号 2）での実施医療機関固有の変更の場合、第 1.0.2 版となる）。作成日は、当該実施医療機関の自ら治験を実施する者が作成した日とする。

4. 資料等の保存

自ら治験を実施する者等は、別途定める「記録の保存に関する手順書」に従い手順書を保存する。

5. 改訂履歴

版番号	作成日・改訂日	改訂理由／内容
第 0.0 版	2015 年 1 月 30 日	ドラフト作成
第 1.0 版	2015 年 2 月 24 日	新規作成

治験実施計画書及び症例報告書の見本の作成に関する手順書

治験課題名

男性腹圧性尿失禁に対する非培養自己ヒト皮下脂肪組織由来再生

(幹) 細胞の傍尿道注入治療の有効性及び安全性を検討する

多施設共同非盲検非対照試験

治験実施計画書番号

CAMCR-005

治験調整医師

名古屋大学医学部附属病院 泌尿器科

教授 後藤 百万

第 1.0 版 作成日 2015 年 2 月 24 日