

(別紙様式)

## 生物多様性影響評価書

(区分：遺伝子治療臨床研究)

### I 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

#### 1 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

本遺伝子治療に用いる遺伝子組換え生物（以下、「CGT\_hLCAT RV」という。）のもとになったウイルスはモロニーマウス白血病ウイルス (Moloney murine leukemia virus: MoMLV) である。

レトロウイルスは逆転写酵素を持ち一本鎖RNAを遺伝子として持つRNAウイルスの総称であるが、MoMLVはそのレトロウイルス科のガンマレトロウイルス属 (C-タイプウイルス) に所属するマウス白血病ウイルスであり、病原性の高いウイルス株としてSarcoma 37 細胞から単離されたエクトロピック (同種指向性) レトロウイルスである (文献1、2)。MoMLV は発がん遺伝子を持たず、マウスの年齢及び系統にかかわらず感染し、長期間感染したマウスのほぼすべてがリンパ性白血病を発症することが報告されている。

MoMLV はマウスやラット等のげっ歯類にのみ感染し、ヒトを含む他の動物に対する感染性や病原性の報告はない (文献3)。

文献1 : Moloney JB. Biological studies on a lymphoid-leukemia virus extracted from sarcoma 37. I. Origin and introductory investigations. J Natl Cancer Inst., 24:933-951, 1960.

文献2 : ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>

文献3 : Coffin JM, Hughes S, Varmus HE ed., Retroviruses, pp14, 478-502, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1997)

#### 2 使用等の歴史及び現状

レトロウイルスは、遺伝子治療用の遺伝子導入ベクターとしてもっとも早くから開発改良が加えられてきており、現在までに試みられた遺伝子治療臨床プロトコルのうちの21.3% (336/1579 プロトコル; 2009年12月現在) でレトロウイルスベクターが使用されている (文献4)。その中でも、MoMLVは遺伝子導入ベクターとして広く用いられており、わが国で最初に行われた遺伝子治療でもMoMLV由来のベクターが使用された (文献5)。米国では、2000年から2009年 (11月23日現在) の間にレトロウイルスを用いた87のプロトコルがRecombinant Advisory Committeeに申請されたが、僅かな例外を除き、すべてが*ex vivo*での遺伝子導入の系である。血球系細胞への導入プロトコルが多くを占めるが、非血球系細胞への導入手法としても用いられている (文献6)。

文献4 : <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical>

文献5 : Otsu, M., et al.: American Society of Gene Therapy, 8th Annual Meeting (2005)

文献6 : Human Gene Transfer Protocols (Last updated: 11-23-09)

[http://oba.od.nih.gov/rdna/adverse\\_event\\_oba.html](http://oba.od.nih.gov/rdna/adverse_event_oba.html)

### 3 生理・生態学的特性

#### (1) 基本的特性 (文献7)

MoMLV は直径約 100 nm の球形ウイルスであり、ウイルスゲノムを内包するコアとそれを取り囲むエンベロープ (外被) からなる。コアは主としてカプシド蛋白質 (CA) により構築されており、その中に 2 分子の RNA ゲノムを有する。そのほか、逆転写酵素 (RT)、インテグラーゼ (IN)、プロテアーゼ (PR)、核酸結合蛋白質 (NC) もコア内部に存在する。コアの周囲にはウイルス産生細胞の細胞膜に由来する脂質二重膜のエンベロープが存在する。エンベロープとコアの間にはマトリックス蛋白質 (MA) が存在する。エンベロープには膜貫通蛋白質 (TM) が突き刺さっており、それに表面蛋白質 (SU) が弱く結合している。SU と TM の複合体はウイルス粒子のエンベロープ上で多量体を形成する。

#### (2) 生息又は生育可能な環境の条件

他のウイルスと同様に、MoMLV は宿主細胞に感染した場合にのみ増殖が可能である (I-3-(4)「繁殖又は増殖の様式」参照)。レトロウイルスは比較的不安定なウイルスであり、体液中、培地中等の限られた環境中でしか感染性を保持できない。なお、ショ糖とゼラチンを添加して凍結乾燥を行うと安定に保存できるとの報告がある (文献8)。

#### (3) 捕食性又は寄生性

MoMLV はマウス及びラットの細胞に感染した後、そのゲノムが逆転写酵素により DNA に逆転写され、プロウイルスとして細胞の染色体に組み込まれる。宿主細胞が増殖分裂する時には、染色体の一部として同時に複製され、娘細胞へと受け継がれて行く。MoMLV は他の生物を捕食することはない。

#### (4) 繁殖又は増殖の様式

レトロウイルスはキャリアーである動物の血液中や体液中に存在し、他の個体がそれに接触することにより感染する。レトロウイルスが細胞に感染し増殖するときは、1) 吸着、2) 侵入、3) 逆転写、4) 宿主染色体への組込み、5) RNA 合成、6) 蛋白質合成、7) アセンブリ、8) 出芽といった各段階を経る。一方、レトロウイルスのゲノム配列が細胞の染色体中にプロウイルスとして組み込まれている場合には、細胞分裂時に同時に複製されて娘細胞へ分配されるが、生殖系細胞に導入された場合には動物の繁殖によって子孫に受け継がれることになる。

野生型 MoMLV がヒト細胞に感染することはない。ヒト細胞に感染可能なエンベロープ蛋白質 (env 蛋白質) [例えば、4070A アンフトロピック env 蛋白質、gibbon ape leukemia virus (GaLV) env 蛋白質] を持つ MoMLV を人為的に作製した場合にはヒト、サル、イヌ、ネコ、ミンク、ウサギ、ニワトリ、ウシ及びハムスター細胞への感染が可能である。

(5) 病原性 (文献 9)

MoMLV の病原性に関して、下記のことが報告されている。

- 1) MoMLV は、マウスに悪性腫瘍を含む多様な疾患を発生させる。マウスで起こる疾病・病態としては、白血病、リンパ腫、貧血、免疫不全、腫瘍及び神経変性がある。
- 2) レトロウイルスはランダムに宿主染色体に挿入されるため、細胞機能に重要な遺伝子を活性化又は不活化し、がん性の変化をもたらす危険性がある。レトロウイルスベクターを用いた X-SCID 治療の遺伝子治療で、がん遺伝子である LMO-2 の近傍にレトロウイルスが組み込まれたために LMO-2 蛋白質の異常発現を招き、それが 3 年後に白血病を発症する原因の一つとなったことを示唆する報告が出されている (文献 10)。
- 3) 内在性ウイルスとの組換えにより増殖性レトロウイルス (replication competent retrovirus : RCR) が出現する可能性がある。
- 4) MoMLV はマウスやラットにのみ感染するので、ヒトに対する感染性及び病原性はない。
- 5) 感染により宿主細胞が破壊されることはない。

(6) 有害物質の産生性

MoMLV が有害物質を産生することはない。また、MoMLV に感染したことにより細胞が有害物質の産生能を獲得するとの報告はない。

(7) その他の情報

MoMLV の不活化条件

MoMLV についての詳細な不活化条件の報告はないが、同じレトロウイルス科に属するヒト免疫不全ウイルス (HIV) の滅菌、消毒法を以下にあげる。

- ① 121°C、20 分間の蒸気滅菌
- ② 170°C、2 時間の乾熱滅菌
- ③ 20~30 分間の煮沸消毒
- ③ 有効塩素濃度 0.1~1.0% の次亜塩素酸ナトリウム
- ④ 70% エタノール又は 70% イソプロピルアルコール
- ⑤ 3.5~4% ホルマリン
- ⑥ 2% グルタラル (以上文献 11)

- ⑦ 10%及び1%ポピドンヨード液 (文献12)
- ⑧ 0.3%過酸化水素水 (文献13)

紫外線及び熱による液体中の MoMLV 及び HIV の不活化を比較した研究によると (文献14)、MoMLV を 1/10 まで不活化するのに必要な紫外線照射量 ( $D_{10}$ ) は 2,800 erg/mm<sup>2</sup> であり、熱処理時間 ( $T_{10}$ ) は 50°Cでは 50 秒、55°Cでは 20 秒、70°Cでは 8 秒である。したがって、55°C、2 分間又は 70°C、50 秒間の熱処理により、MoMLV の感染価を 1/10<sup>6</sup> に低下させることができると考えられる。また、50°Cにおける  $T_{10}$  が 80~90 秒であるとの報告もある (文献15)。

マウス由来のウイルス産生細胞により産生されたレトロウイルスベクターが仮にヒト体内に侵入したとしても、ヒト血清 (補体) により速やかに不活化される (文献16)。抗  $\alpha$ -galactosyl 自然抗体を有する旧世界ザル (文献17) の体内に侵入したときにも同様のメカニズムにより不活化される (文献18) と考えられる。

- 文献7 : 遺伝子治療開発研究ハンドブック (1999) 第3章、第2節、1.1 レトロウイルスの増殖サイクル (p.322)
- 文献8 : Levy JA and Fieldsteel AH. Freeze-drying is an effective method for preserving infectious type C retroviruses. *J Virol Methods* 5:165-171, 1982.
- 文献9 : 遺伝子治療開発研究ハンドブック (1999) 第6章、第2節、1. ウイルスベクターの安全性 (p.627)
- 文献10 : Hacein-Bay-Abina S, et al. LM02-associated clonal T cell roliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1 *Science* 302:415-419, 2003
- 文献11 : 日本ウイルス学会. ウイルス研究におけるバイオセーフティ指針. *ウイルス* 43:199-232, 1993.
- 文献12 : 加藤真吾、平石佳之、富永恵子、他. プラーク法を用いた各種消毒剤による HIV-1 不活化の検討. *基礎と臨床* 30:3615-3620, 1996.
- 文献13 : Martin LS, McDougal JS, and Loskoski SL. Disinfection and inactivation of the human T lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus. *J Infect Dis* 152:400-403, 1985.
- 文献14 : Yoshikura H. Thermostability of human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) ina liquid matrix is far higher than of an ecotropic murine leukemia virus. *Jpn J Cancer Res* 80:1-5, 1989.
- 文献15 : Yoshikura H. Ultraviolet sensivity of helper function of murine leukemia virus. *Arch Biochem Biophys* 154:76-83, 1973.
- 文献16 : Takeuchi Y, Cosset FL, Lachmann PJ, Okada H, Weiss RA, and Collins MK. Type C retrovirus inactivation by human complement is determined by both the viral genome and the producer cell. *J Virol* 68:8001-8007, 1994.
- 文献17 : Galili Uri, Tanemura M. Significance of  $\alpha$ -Gal (Gal  $\alpha$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4GlcNAc-R) Epitopes and  $\alpha$  1,3 Galactosyltransferase in Xenotransplantation. *Trends Glycosci Glycotechnol* 11:317-327, 1999.
- 文献18 : Rother RP, Fodor WL, Springhorn JP, et al. A novel mechanism of retrovirus inactivation in human

serum mediated by anti- $\alpha$ -galactosyl natural antibody. J Exp Med 182:1345-1355, 1995.

## II 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

### 1 供与核酸に関する情報

#### (1) 構成及び構成要素の由来

CGT\_hLCAT RV を構成するおもな供与核酸は、hLCAT (lecithin-cholesterol acyltransferase) 遺伝子、パッケージングシグナル( $\Psi$ )、5'-long terminal repeat (5' LTR)、3' LTR である。以下にその構造概略図を示す。元となった野生型ウイルス、MoMLV と異なるところは、ウイルスの自立増殖に必要な遺伝子、*gag*、*pol* 及び *env* がすべて除かれ、その部分に hLCAT 遺伝子が挿入されたことである。CGT\_hLCAT RV の全塩基配列及び蛋白質をコードする部分についてはそのアミノ酸配列を※別紙 1 及び 2 に示す。

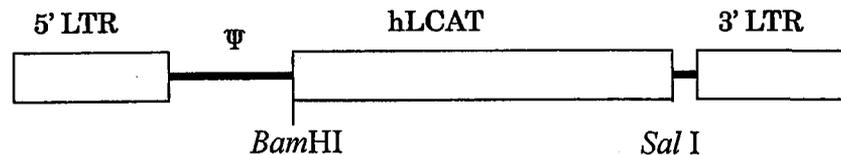


図 1. CGT\_hLCAT RV 遺伝子の構造概略図

#### 1) hLCAT 遺伝子

hLCAT 遺伝子はヒト型 LCAT をコードする遺伝子であり、hLCAT は 1986 年に、Mclean らによりクローニングされた。N 末端に 24 アミノ酸のシグナルペプチドを持つ、全長 440 アミノ酸よりなる分泌型蛋白質をコードしている。

ここでは hLCAT 遺伝子をヒト肝がん細胞株 HepG2 の cDNA ライブラリーより、PCR 法によってクローニングした。hLCAT 遺伝子 (cDNA 配列) には、C 末端のグルタミン酸とストップコドンに重なった形でポリ A 付加シグナル (AATAAA) がコードされているため、ストップコドンを TAA より TGA に改変して導入遺伝子内のポリ A 付加シグナルを除き、また、蛋白質合成の効率を上げるために開始コドン上流に Kozak 配列 (CCGCCACC) を挿入したものをを用いている。

#### 2) パッケージングシグナル ( $\Psi$ )

マウス MoMLV 由来のレトロウイルスパッケージングのための配列である。

#### 3) 5' LTR 及び 3' LTR

マウス MoMLV 由来のエンハンサー・プロモーター配列である。

## (2) 構成要素の機能

### 1) hLCAT 遺伝子 (cDNA 配列)

hLCAT 遺伝子 (cDNA 配列) は上流の 5' LTR のエンハンサー・プロモーター機能により転写されて LCAT を発現する。LCAT は翻訳後に糖鎖が付加され、シグナルペプチドが切断された後、416 アミノ酸からなる分子量約 63,000 の糖蛋白質として細胞外へ分泌される。LCAT は遊離コレステロールにレシチンの脂肪酸を転移してコレステロールエステルを生成するコレステロールエステル化酵素であり、血中の HDL (High Density Lipoprotein) 上で作用し、コレステロールの逆転送 (各組織より肝臓へ) を亢進させる。被験者脂肪組織より調製した前脂肪細胞に遺伝子導入後、同じ被験者の脂肪組織に自家移植して発現させることで、血中正常値の 10% の LCAT 活性を維持することを目標としている。

### 2) パッケージングシグナル ( $\Psi$ )

パッケージング細胞 (GP+envAM-12) において、CGT\_hLCAT RV を製造する際にウイルスゲノム RNA がウイルス粒子にパッケージングされるのに必要である。

### 3) 5' LTR 及び 3' LTR

5' LTR は hLCAT 発現に必要な強力な転写活性をもつエンハンサー・プロモーターである。また、5' LTR 及び 3' LTR とともに、ウイルスゲノムの細胞染色体への組み込みに必須である。

## 2 ベクターに関する情報

### (1) 名称及び由来

レトロウイルス産生用プラスミド (pCGThLCAT) の構築には、MoMLV 由来のレトロウイルスベクターである MFG ベクターを改良した pDON-AI (タカラバイオ株式会社) を使用した (図 2)。pCGThLCAT は以下の構築過程 (※別紙 3) を通じて得られた。

Step 1 : 1-(1)-1) に記載されている通り、ヒト肝がん細胞株の cDNA ライブラリーから hLCAT 遺伝子 (1.3kb) を調製した。

Step 2 : pDON-AI DNA ベクターのマルチクローニングサイト (MCS) の *Bam* HI 切断部位と *SaI* I 切断部位の間に、当該制限酵素配列を含むプライマーにより増幅させた hLCAT 遺伝子を挿入した。次に、蛋白質合成効率の向上のために開始コドン ATG 上流に Kozak 配列 (CGGCCACC) を挿入した。また、hLCAT 遺伝子ストップコドン近傍に存在する ポリ A 付加配列の AATAAA (TAA がストップコドン) を別のストップコドン TGA に改変

した。

Step 3 : 目的以外の有用な遺伝子の発現を避けるために、*Sal* I 切断部位から *Xho* I 切断部位までを切り出して、Minimal SV40 promoter 配列及び *Neo*<sup>R</sup> (ネオマイシン耐性遺伝子配列) を除去した。

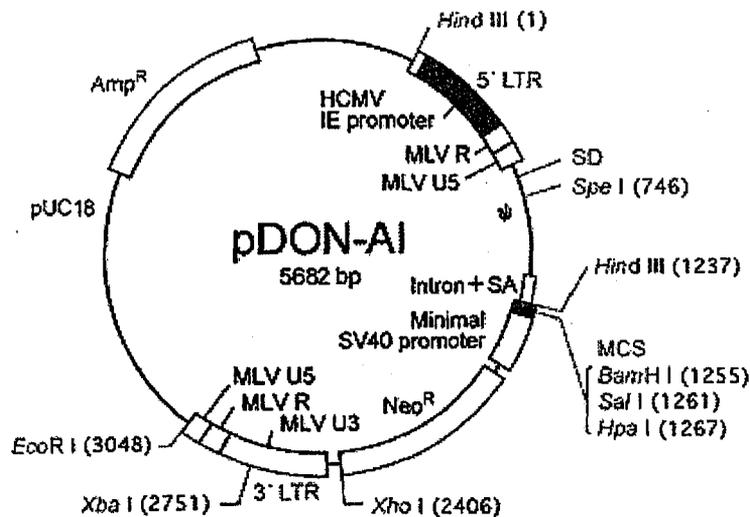


図 2 pDON-AI DNA ベクターの構造

## (2) 特性

このレトロウイルス産生用プラスミド (pCGThLCAT) は、基本的性質をベクター pDON-AI から受け継いでおり、LTR とパッケージングシグナル ( $\Psi$  配列) 以外の MoMLV 由来遺伝子 (*gag*, *pol*, *env*) を含まず、かつ 5' LTR の U3 領域がより強力なサイトメガロウイルス由来のプロモーターに置換されている (文献 19、20)。従って、このベクターの特徴は MoMLV の構造遺伝子を完全に除くことによって、パッケージング細胞中での相長的組換えによる増殖性ウイルスの出現を抑え、かつ導入遺伝子の発現効率を上げていることにある。

文献 19 : Yu SS, Kim J-M, and Kim S: High efficiency retroviral vectors that contain no viral coding sequences. *Gene Therapy* 7:797-804, 2000

文献 20 : Kim SH, Yu SS, Park JS, Robbins PD, An CS, and Kim S: Construction of Retroviral Vectors with Improved Safety, Gene Expression, and Versatility. *J Virology* 72:994-1004, 1998

### 3 遺伝子組換え生物等の調製方法

#### (1) 宿主内に移入された核酸全体の構成

CGT\_hLCAT RV のゲノムは1本鎖RNAであるが、DNA配列に変換したプロウイルス配列を示す。1-(1)で示したとおり、ゲノムの構成成分はhLCAT cDNA配列のほかは、パッケージングシグナル(Ψ)と5'LTR及び3'LTRである。

注) マスターセルバンクを作製する際にGP+envAM-12細胞にウイルスを感染させてアンフォトロピックhLCAT発現レトロウイルスを構築する過程で、宿主染色体に組み込まれる時に、逆転写酵素によりウイルスゲノム上の3'LTR配列が5'LTR領域へとコピー・置換されるため、5'LTR領域塩基配列はオリジナルベクターの3'LTR配列へと再変換され、レトロウイルス産生用プラスミド(pCGThLCAT)の配列とは異なっている。

#### (2) 宿主内に移入された核酸の移入方法

MoMLVの*gag-pol*遺伝子とエコトロピックエンベロップ遺伝子を発現するパッケージング細胞であるGP+E-86細胞に、レトロウイルス産生用プラスミド(pCGThLCAT)をハイグロマイシン耐性遺伝子と同時にトランスフェクションした。トランスフェクションにはLipofectamine 2000CD(ライフテクノロジーズジャパン株式会社)を用いた。Hygromycin B選択により薬剤耐性細胞プールを獲得し、この細胞の培養上清からhLCAT発現エコトロピックレトロウイルスベクターを回収した。

#### (3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

##### 1) パッケージング細胞株

CGT\_hLCAT RVの産生細胞株の作製に使用したパッケージング細胞株はGP+envAM-12(文献21、22)である。パッケージングに必要なウイルス遺伝子を2種類のプラスミド(*gag-pol*、及び*env*)により別々に導入した細胞株であるので、相同的組換えによる野生型・増殖性ウイルス(RCR)出現のリスクは極めて少ないと考えられている。

##### 2) ウイルス産生細胞株(MCB)の作製

hLCAT発現エコトロピックレトロウイルスベクターを、RetroNectin(タカラバイオ株式会社)を用いて、MoMLVの*gag-pol*遺伝子及びマウスウイルス4070A由来アンフォトロピックエンベロップ遺伝子を発現するGP+envAM-12細胞(マウス由来細胞)に感染させることで、ヒト細胞にも感染可能なアンフォトロピックレトロウイルスベクターを構築した。

感染させたGP+envAM-12細胞を96穴プレート50枚に限界希釈して播種し、ウイルス産生細胞のスクリーニングを行った。シングルクローンと考えられる201ウェルについてその上清をリアルタイムRT-PCRで分析し、陽性クローン9個を得た。この中か

ら最も高タイトーのウイルス産生株を1ライン (GP+envAM-12/CGThLCAT A\_17\_4) 選択し、hLCAT 発現アンフォトロピックレトロウイルスベクター産生細胞としてプレマスターセルバンク (pre-MCB) を作製した。pre-MCB より継代を3回実施し、マスターセルバンク MCB (CGT\_hLMC) の作製を行った。

マスターセルバンクは、タカラバイオ株式会社においてGMP製造されたものである。1バイアルにウイルスベクター産生細胞を  $4 \times 10^6$  個/mL 含み、液体窒素タンクにて保存されている。

以上のウイルスベクター調製からマスターセルバンク作製までの構築スキームを※別紙4に示す。

### 3) CGT\_hLCAT RV の最終製品の製造・輸送

遺伝子導入に使用する CGT\_hLCAT RV は、上記マスターセルバンク MCB (CGT\_hLMC) より、タカラバイオ株式会社においてGMP製造された。

マスターセルバンクからの CGT\_hLCAT RV (Lot. CRV07-2) の製造は次の方法にて行った。

- ① MCB (CGT\_hLMC Lot. CM06-1) より7本を融解して培養を開始した。
- ② 2回の継代培養後、セルスタック (10チャンバー6個および5チャンバー1個) でセミコンフルエントまで培養した。
- ③ 培養後、ウイルスハーベスト培地に交換し、24時間後に培地上清を回収した。
- ④ 回収後新たなウイルスハーベスト培地に交換し、次の24時間培養後に培地上清を回収し、同じ操作をさらにもう一度行い3回ウイルス液の回収をおこなった。
- ⑤ 回収した3回分のウイルス液をプールした後、無菌ろ過を行ってフローズバック (100 mL 用、50 mL 用) 及びクライオバイアル (4 mL 用) に分注して  $-80^{\circ}\text{C}$  にて凍結保存した。

凍結保存された CGT\_hLCAT RV は、品質試験の後、適切な拡散防止措置を執ってドライアイス詰めで、千葉大学医学部附属病院細胞調製室へ送られ、施錠可能な製剤保管室に設置した超低温フリーザーに保管される。

CGT\_hLCAT RV の品質試験項目・暫定規格及び参考実測値を※別紙5に示す。また、当該治療施設、細胞調製施設及び保管場所の地図ならびに細胞調製室の概略図を※別紙6、7及び8に示す。

文献 21 : Markowitz D, Goff S, and Bank A. Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. *Virology* 167:400-406, 1988.

文献 22 : Markowitz D, Goff S, and Bank A. A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes

#### 4 移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

移入した核酸は CGT\_hLCAT RV のゲノム RNA の一部として存在する。凍結保管中は安定であり、CGT\_hLCAT RV の生物学的性質が変化することはない。

CGT\_hLCAT RV が細胞に感染すると、移入した核酸を含むウイルスゲノム RNA は逆転写され、プロウイルスとして細胞染色体に組み込まれる。プロウイルスは細胞染色体の複製に伴って複製されるので、移入された核酸は細胞が活着しているかぎり安定に保持される。

LCAT 遺伝子は MoMLV の LTR により転写される。これらのプロモーターは持続的に機能するので、両遺伝子の発現は構成的である。

CGT\_hLCAT RV を製造する際に、パッケージング細胞内で CGT\_hLCAT RV のゲノムが細胞の *gag-pol* 及び *env* と相同組換えをおこして RCR が出現する可能性は否定できない。しかしながら、GP+envAM-12 細胞では *gag-pol* と *env* が独立して存在していることから、野生型の増殖性レトロウイルス (RCR) が出現するには複数回の組換えが同時に必要であること、また、CGT\_hLCAT RV のゲノムは *gag*、*pol*、*env* が完全に欠落しているため、相同的組換えに必要な元のウイルス由来配列はより少なくなっていることから、RCR 出現の確率は極めて低いと考えられる。

#### 5 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

##### (1) CGT\_hLCAT RV の検出方法

CGT\_hLCAT RV は野生型ウイルス MoMLV にはない hLCAT 遺伝子の cDNA 配列を持つので、LCAT 遺伝子のイントロン部分を挟む塩基配列をプライマーにして RT-PCR 法による CGT\_hLCAT RV の特異的検出が可能である。また検体中の含量も同様のプライマーを用いたリアルタイム RT-PCR 法により定量できる。

##### (2) CGT\_hLCAT RV により遺伝子導入された細胞の検出方法

細胞または組織から調製したゲノム DNA を鋳型に、上記 hLCAT 遺伝子のイントロン部分を挟む塩基配列をプライマーとして用いた PCR 法により、CGT\_hLCAT RV により遺伝子導入された細胞の特異的検出が可能である。ヒト細胞が本来持つ LCAT 遺伝子はイントロンを含むため、この cDNA 配列特異的検出法では検出されない。前項同様リアルタイム PCR による定量も可能である。

##### (3) RCR の検出方法

- ・ *Mus dunni* を用いた増幅法

Mus dunni 細胞に検体を添加し、5回の継代培養を行う。この培養上清を PG-4 細胞に接種し、S+L-アッセイを行う。この方法は増殖能を持つレトロウイルスを検出する方法であり、本遺伝子組換え生物に由来する RCR を特異的に検出するものではない。検出感度は 1RCR/assay であることを確認している。100 mL あたり 1 RCR が含まれる検体から 300 mL の被検試料をサンプリングして接種した場合、95%の確率で被検試料中に RCR が検出される。

・RT-PCR 法

被検試料から RNA を調製し、4070A env 遺伝子に特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った後、アガロースゲル電気泳動を行って増幅産物を検出する。本試験では、被検細胞  $10^4 \sim 10^5$  あたり 1 個の感染細胞の検出が可能である。

## 6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

宿主である MoMLV と CGT\_hLCAT RV の間には以下の相違点がある。

- (1) CGT\_hLCAT RV は *gag*、*pol* 及び *env* を欠損しているため、CGT\_hLCAT RV が感染した通常の細胞はウイルス粒子形成に必要な蛋白質を合成できない。したがって、CGT\_hLCAT RV は *gag*、*pol* 及び *env* を発現する細胞においてのみ増殖できる。
- (2) CGT\_hLCAT RV は LCAT 遺伝子を持つため、感染した細胞は LCAT を発現する。
- (3) MoMLV がマウス、ラット等のげっ歯類にだけ感染しうるのに対して、アンフォトロピック MLV 4070A はこれらのほか、ヒト、サル、イヌ、ネコ、ミンク、ウサギ、ニワトリ、ウシ及びハムスターの細胞にも感染すると報告されている（文献 23）。したがって、ウイルス粒子表面に 4070A 由来 env 蛋白質を持つ CGT\_hLCAT RV はマウス、ラット等に加えてヒト、サル、イヌ等、幅広い動物種の細胞に CGT\_hLCAT RV の核酸を伝達しうる。CGT\_hLCAT RV が自立的増殖能を欠いており、ヘルパー機能をもつ特殊な細胞においてしか増殖できない点と感染可能な生物種の範囲が異なる点を除いて、I-3「生理・生態学的特性」に記載した、宿主である MoMLV と本遺伝子組換え生物の分類学上の基本性質は同等であると考えられる。
- (4) 生物多様性に影響を及ぼす程度としては、CGT\_hLCAT RV はより広い生物種に感染可能になるが、増殖能を持たないことから、たとえ感染が成立しても生殖細胞に感染しない限り、その影響は感染した個体からさらに広がることはなく、野生型ウイルスよりも影響は小さいと考えられる。ただし、CGT\_hLCAT RV が相同的組換えにより自立的増殖能を獲得することがあれば、何らかの影響がでることも考えられる。

文献 23 : Miller AD. Cell-surface receptors for retroviruses and implications for gene transfer. Proc Natl Acad Sci USA 93:11407-11413, 1996.

### Ⅲ 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

#### 1 使用等の内容

治療施設におけるヒトの治療を目的とした使用、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為

#### 2 使用等の方法

治療施設の所在地 千葉県千葉市中央区亥鼻一丁目8番1号

治療施設の名称 千葉大学医学部附属病院

(1) CGT\_hLCAT RV溶液は、容器に密閉後、凍結状態で治療施設に輸送し、施設内のP2レベルの拡散防止措置を執ることのできる細胞調製室（以下「細胞調製室」という。）の施錠可能な前室に設置した冷凍庫に保管する。

(2) 凍結状態のCGT\_hLCAT RV溶液の溶解、希釈及び分注操作は、細胞調製室内の安全キャビネット内又は細胞調製室内で閉鎖系にて行う。被験者の前脂肪細胞へのCGT\_hLCAT RV導入操作、CGT\_hLCAT RV導入細胞の培養その他のCGT\_hLCAT RV希釈溶液及びCGT\_hLCAT RV導入細胞の取扱いも同様に細胞調製室内の安全キャビネット内又は細胞調製室内で閉鎖系にて行う。CGT\_hLCAT RV希釈溶液及びCGT\_hLCAT RV導入細胞の保管は、細胞調製室内の冷蔵庫、冷凍庫又は培養器にて行う。

なお、CGT\_hLCAT RV希釈溶液若しくはその凍結品又はCGT\_hLCAT RV導入細胞を開放系区域を通過して他のP2レベル区域に運搬する場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。

(3) CGT\_hLCAT RV溶液（希釈溶液を含む。以下同じ。）又はCGT\_hLCAT RV導入細胞を廃棄する際には、ウイルス不活化を行った後、千葉大学医学部附属病院で定められた医療廃棄物管理規程（以下「医療廃棄物管理規程」という。）に従い廃棄する。

(4) 細胞調製室内の安全キャビネット内でCGT\_hLCAT RV導入細胞懸濁液を注射器に充填し、それを二重に密閉した後、環境中への拡散防止措置を適切に執った個室（以下「個室」という。）に運搬する。

(5) 被験者に対するCGT\_hLCAT RV導入細胞の投与は、個室において、被験者の皮下脂肪組織内に注射移植する。

(6) 上記(5)で用いた、CGT\_hLCAT RV導入細胞に直接接触する注射針、注射器及びチューブ等の器具等並びに布及びガーゼ類等は使い捨てとし、使用后、ウイルスの不活化を行い、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。これらのウイルスの不活化を他の区域で行う場合には、二重に密閉し

た容器に入れて運搬する。

(7) 投与後3日まで、被験者を個室で管理し、検査等の理由で被験者が一時的に個室外の開放区域に出る場合には、マスク及びガウン着用等のウイルス漏出予防措置を義務付ける。

(8) 個室における管理期間中の被験者の排泄物は、投与翌日以降に行われる患者の血液を用いたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) にて自己増殖能を獲得したレトロウイルス (以下「RCR」という。) の存在が否定されるまで、ウイルスの不活化を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。

なお、臨床検体として使用する患者の血液及び尿の取扱いは、CGT\_hLCAT RV溶液及びCGT\_hLCAT RV導入細胞の取扱いに準じる。

(9) 個室における管理期間中、患者に対して侵襲的に使用した器具等並びに患者の血液、体液及び排泄物等に接触した器具等は、ウイルスの不活化を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄又は十分に洗浄する。これらのウイルスの不活化を他の区域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。

(10) 個室における被験者の管理を解除する前に、被験者の血清においてRCRが陰性であることを確認する。RCRが確認されたときは、個室における管理を継続する。

(11) 個室における管理解除後に被験者の血清からRCRが検出された場合は、直ちに被験者を上記個室における管理下に移し、上記(7)から(10)までと同様の措置を執る。

### 3 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方法

被験者へのCGT\_hLCAT RV導入細胞の投与後、別途規程のスケジュール (※別紙9) に従い被験者の血清を試料として、4070A *env* 遺伝子に対するPCR法又は血清の培養法による検査を実施する。また、RCR発現の有無につき被験者の臨床症状を観察する。

### 4 生物多様性影響が生じるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置

CGT\_hLCAT RVを用いた遺伝子導入細胞は、細胞調製室において、第一種使用規程に従い調製される。CGT\_hLCAT RVが細胞調製室の床等に漏出した場合には、直ちにペーパータオル、布等で拭き取る。拭き取った後は、消毒用エタノールを当該箇所が完全に覆われるまで噴霧して1分以上放置し、ペーパータオル、布等で拭き取ることによりCGT\_hLCAT RVを不活化する。当該ペーパータオル、布等は121℃、20分以上で高圧蒸気滅菌処理した後、廃棄する。以上により、CGT\_hLCAT RVが環境中に漏出して生物多様性影響が生じることはないと考えられる。

個室における管理解除後の被験者の血清のPCR法又は血清の培養法においてRCRが検出された場合には、第一種使用規程に従い被験者を直ちに個室における管理下に移すとともに、排泄物のウイルス不活化等、第一種使用規程に定められた措置を執る。

5 実験室等での使用又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果

マスターセルバンク MCB (CGT\_hLMC Lot. CM06-1) 及びそれらから作製された CGT\_hLCAT RV (Lot. CRV07-1及びCRV07-2) について Mus dunni 細胞を用いた増幅法による RCR 試験を実施した。その結果、すべて RCR 陰性であった (※別紙5)。CGT\_hLCAT RV 導入細胞を用いた以下の非臨床試験ではがん化は認められず、また毒性は極めて低いことが示唆された。

カニクイザルに、CGT\_hLCAT RV 導入サル前脂肪細胞を自家移植した非臨床試験において、全症例で自家移植 2ヵ月後の一般状態、体重、摂餌量、また行動観察、心電図、呼吸数等の薬理的異常所見、また剖検後の各臓器重量、血液学的変化、各臓器、組織の肉眼所見においても、異常は観察されなかった。

C57BL6Jマウスに、CGT\_hLCAT RV 導入マウス前脂肪細胞を同系マウス皮下に移植しそのがん化を検討したところ、一般状態、体重、摂餌量、移植部位の触診、また移植後約 7ヵ月及び1年後の剖検における臓器重量、血液学的検査、各臓器、組織の肉眼所見のいずれにも異常はなくがん化は認められなかった。また、遺伝子導入していないマウス前脂肪細胞投与マウスでもがん化は認められなかった。

健康成人から得たヒト前脂肪細胞に CGT\_hLCAT RV を導入し、6ヵ月間の継代培養後、軟寒天培地におけるコロニー形成能を検討した。CGT\_hLCAT RV 非導入ヒト前脂肪細胞を対照群、また HeLa 細胞を陽性対照群とした。HeLa 細胞ではコロニー形成を検出したが、CGT\_hLCAT RV 導入ならびに非導入ヒト前脂肪細胞のいずれも、コロニー形成能を獲得した細胞は観察されなかった。

CGT\_hLCAT RV 導入ヒト前脂肪細胞を Nude マウス皮下に移植しがん化を検討した。マウスの一般状態、体重、摂餌量、移植部位の触診に異常は確認されなかった。移植後約3ヵ月の剖検では、臓器重量、各臓器、組織の肉眼所見について、異常は認められなかった。

CGT\_hLCAT RV 導入細胞及び CGT\_hLCAT RV を用いた臨床使用経験は現在までのところない。

6 国外における使用等により得られた情報

CGT\_hLCAT RV 導入細胞及び CGT\_hLCAT RV を用いた使用経験は現在までのところない。

## IV 生物多様性影響評価

### 1 他の微生物を減少させる性質

#### (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

CGT\_hLCAT RV及びRCRはアンフォトロピックenv蛋白質を持つので、広範囲の動物に感染しうるが、微生物への感染性は知られていない。したがって、影響を受ける可能性のある微生物は特定されなかった。

#### (2) 影響の具体的内容の評価

(該当せず)

#### (3) 影響の生じやすさの評価

(該当せず)

#### (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

よって、他の微生物を減少させる性質について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

### 2 病原性

#### (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

CGT\_hLCAT RV及びRCRはアンフォトロピックenv蛋白質を持つので、患者体外に排出された場合には野生型アンフォトロピックMoMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) 4070Aと同様に、マウス、ラットのみならずヒト、サル等を含む広範囲の動物に感染しうる。したがってこれらの生物種はCGT\_hLCAT RVの核酸を伝達されることにより影響を受ける可能性がある。

#### (2) 影響の具体的内容の評価

CGT\_hLCAT RVはヒト、サル等の細胞への挿入変異によってがん化を誘発する可能性がある。マウス、ラットに対する病原性は宿主と同等であると考えられる。

CGT\_hLCAT RVからの発現産物であるLCATは、遊離型コレステロールをコレステロールエステルに変換する酵素として機能する。本反応は、末梢組織から肝臓へコレステロールを転送・異化排泄するコレステロール逆転送系の最初の段階を支配する。ヒトでのLCAT過剰症にともなう有害な臨床症状はなく、本遺伝子が発現することにより、CGT\_hLCAT RVがヒトに病原性を示す可能性は非常に低い。

### (3) 影響の生じやすさの評価

第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、CGT\_hLCAT RVが前脂肪細胞とともに被験者に投与されることによって、当該施設外に出る可能性は極めて低く、出たとしてもごく微量である。また、マウス由来のウイルス産生細胞により産生されたレトロウイルスベクターが仮にヒト体内に侵入したとしても、ヒト血清（補体）により速やかに不活化される（文献15）。さらに、*gag*、*pol*、*env* 遺伝子を完全に欠如したCGT\_hLCAT RVは増殖能を欠損しているため、通常の細胞に感染してもウイルス粒子を産生することはない。たとえ感染が成立しても生殖細胞に感染しない限り、その影響は感染した個体からさらに広がることはない。

一方、CGT\_hLCAT RVの製造工程中に出現したRCRが前脂肪細胞に混入して被験者に移植された場合には被験者体内でRCRが産生される可能性がある。しかし、CGT\_hLCAT RVはRCR出現の可能性が極めて低い第3世代のパッケージング細胞（GP+envAM-12細胞）を使用して製造されているうえに、CGT\_hLCAT RV及びCGT\_hLCAT RV導入細胞のRCR陰性を確認してから使用するので、被験者体内にRCRが侵入する可能性は極めて低い。また、RCR試験で検出されなかったRCRが万一被験者体内に侵入したとしても、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、RCRが環境中に放出される可能性は極めて低い。

### (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

よって、病原性について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

## 3 有害物質の産生性

### (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

CGT\_hLCAT RV及びRCRの有害物質の産生性は知られていない。したがって、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

### (2) 影響の具体的内容の評価

（該当せず）

### (3) 影響の生じやすさの評価

（該当せず）

### (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

よって、有害物質の産生性について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え

生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

#### 4 核酸を水平伝達する性質

##### (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

CGT\_hLCAT RV及びRCRはアンフォトロピックenv蛋白質を持つので、患者体外に排出された場合には野生型アンフォトロピックMoMLV4070Aと同様に、マウス、ラットのみならずヒト、サル等を含む広範囲の動物に感染しうる。したがってこれらの生物種はCGT\_hLCAT RVの核酸を伝達されることにより影響を受ける可能性がある。

##### (2) 影響の具体的内容の評価

CGT\_hLCAT RV又は遺伝子組換え生物等に該当するRCRによってこれらの遺伝子組換え生物の核酸が野生生物のゲノム中に組込まれる可能性がある。

##### (3) 影響の生じやすさの評価

第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、CGT\_hLCAT RVが前脂肪細胞とともに被験者に投与されることによって当該施設外に出たとしてもごく微量である。ごく微量の本遺伝子組換え生物によって野生動物に核酸が伝達される可能性は非常に低い。さらに、増殖能を持たないことから、たとえ感染が成立しても生殖細胞に感染しない限り、その影響は感染した個体からさらに広がることはない。

遺伝子組換え生物等に該当するRCRが多量に出現した場合には、血液、体液等を通じて他の個体にRCRが感染し、その核酸が伝達される可能性は否定できないが、RCR出現の可能性は極めて低い。

##### (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

よって、核酸を水平伝達する性質について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

#### 5 その他の性質

##### 核酸を垂直伝達する性質

CGT\_hLCAT RVが感染可能な野生動物等の生殖系細胞のゲノム中に組込まれて、核酸を垂直伝達する可能性は完全には否定できない。しかし、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、CGT\_hLCAT RVによりその核酸が野生動物に伝達さ

れる可能性は非常に低い。RCRが出現しないかぎり、CGT\_hLCAT RVの核酸が伝達される細胞はCGT\_hLCAT RVが最初に感染した細胞とその娘細胞に限られ、その細胞が生殖系細胞である確率は低い。また、RCRが出現する可能性は極めて低い。以上から、CGT\_hLCAT RV又はRCRの核酸が生殖細胞に伝達される可能性は極めて低い。よって、核酸を垂直伝達する性質について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

## V 総合的評価

CGT\_hLCAT RVが感染する動物種は4070Aアンフォトロピックenv蛋白質によって規定されるため、げっ歯類及びヒトを含む広範囲の動物であり、野生型アンフォトロピックMoMLV4070Aと同じである。自然界で植物及び微生物に感染することはないと考えられる。

第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、CGT\_hLCAT RVの環境中への拡散は極力抑えられており、拡散したとしても、その量は検出レベル以下であると推定される。CGT\_hLCAT RVにより導入されたhLCAT遺伝子が発現することにより、ヒトに病原性を示す可能性は非常に小さい。さらに、CGT\_hLCAT RVは増殖能を欠如しているため、MoMLVの感染等により*gag*、*pol* 及び*env* 遺伝子を発現している細胞に感染した場合を除いて増殖することはない。MoMLVに感染しているマウスにCGT\_hLCAT RVが感染すれば、MoMLVがヘルパーとなって増殖する可能性がある。しかしその場合でも、MoMLV は血液や体液を介してのみ感染するので、CGT\_hLCAT RVの感染が他個体に広がる可能性はほとんどない。ヘルパーを必要とするCGT\_hLCAT RVが野生型 MoMLV と同等に増殖することはないので、やがて環境中から消滅すると考えられる。

環境中でマウスに感染し、MoMLVゲノムとの相同組換えによってRCRが出現する可能性や、当該第一種使用によって極めて微量のCGT\_hLCAT RV由来RCRが環境中に放出される可能性は完全には否定できないが、RCRの感染性、増殖性、病原性及び核酸を水平伝達する性質はMoMLVと同等である。ヒトにMoMLVが感染しても病原性は報告されておらず、RCRがヒト体内に侵入しても、血清中の補体により急速に失活することを考慮すると、ヒト及び他の哺乳動物、植物並びに微生物に新たな影響を与えることはないと考えられる。

したがって、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、CGT\_hLCAT RVによる生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

## 遺伝子治療臨床研究実施計画に係る意見について

### 【 東京大学医科学研究所附属病院 】

課題名 : 進行性膠芽腫患者に対する増殖型遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス G47 $\Delta$ を用いた遺伝子治療（ウイルス療法）の臨床研究

#### 遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律に基づき申請のあった第一種使用規程に係る意見について

- 作業委員会の意見 . . . . . P. 1
- 遺伝子治療臨床研究に係る生物多様性影響評価に関する作業委員会 名簿 . . . . . P. 3
- 諮問・付議 . . . . . P. 5
- 第一種使用規程承認申請書 . . . . . P. 7
- 生物多様性影響評価書 . . . . . P. 11

平成 25 年 3 月 22 日

遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する  
法律に基づき申請のあった第一種使用規程に係る意見について

遺伝子治療臨床研究に係る生物多様性  
影響評価に関する作業委員会

委員長 小澤 敬也

遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律(平成  
15 年法律第 97 号)に基づき申請のあった下記の遺伝子組換え生物等の第一種使用規  
程について、本作業委員会の意見を別紙のとおりとりまとめたので報告いたします。

記

1. 大腸菌 LacZ 遺伝子を発現し、 $\gamma$ 34.5 遺伝子・ICP6 遺伝子・ $\alpha$ 47 遺伝子を不  
活化された制限増殖型遺伝子組換えヒト単純ヘルペスウイルス 1 型(G47 $\Delta$ )  
申請者：東京大学医科学研究所附属病院 病院長 今井 浩三  
申請日：平成 25 年 2 月 20 日

※本申請に係る第一種使用規程と同一内容の第一種使用規程が、平成 21 年 5 月 11 日に東京  
大学医学部附属病院に対して承認済みである。

## 【作業委員会の評価結果（東京大学医学部附属病院）】

1. 大腸菌 LacZ 遺伝子を発現し、 $\gamma$ 34.5 遺伝子・ICP6 遺伝子・ $\alpha$ 47 遺伝子を不活化された制限増殖型遺伝子組換えヒト単純ヘルペスウイルス 1 型(G47 $\Delta$ )
第一種使用等の内容：治療施設におけるヒトの治療を目的とした使用、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
申請者：東京大学医科学研究所附属病院 病院長 今井 浩三
(1) 生物多様性影響評価の結果について
① 他の微生物を減少させる性質 申請されている第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、G47 $\Delta$ の環境中への拡散は極力抑えられており、拡散したとしてもその量は微量と考えられる。 さらに、G47 $\Delta$ は制限増殖型であり、腫瘍細胞でのみウイルス複製が可能であることから、自然界では伝搬・複製することはない。 したがって、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、G47 $\Delta$ は環境中に拡散したとしても比較的早期に消滅すると考えられる。 G47 $\Delta$ が感染する動植物等の種類は野生型ヒト単純ヘルペスウイルス 1 型(HSV-1)と同等で、HSV-1 が微生物に感染するとの報告はない。大腸菌 LacZ 遺伝子を発現すること及び制限増殖型であること以外は、その他の特性についても G47 $\Delta$ は野生型 HSV-1 と同等と考えられ、G47 $\Delta$ が競合や有害物質の産生により他の微生物を減少させる性質はないと考えられる。 これらのことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、他の微生物を減少させる性質に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないとした申請者の結論は妥当であると判断した。
② 病原性 G47 $\Delta$ が感染する動植物等の種類は野生型 HSV-1 と同等で、ヒトを自然宿主とし、自然界で他の哺乳動物、植物及び微生物に感染するとの報告はない。さらに、腫瘍細胞でのみウイルス複製が可能であり、自然界では伝搬・複製し得ず、ヒト正常組織に対しても病原性はない。 一方、これまで欧米で遺伝子組換え HSV-1 が臨床試験に使用されているが、環境への悪影響及び野生型 HSV-1 を超える病原性を示したとする報告はない。G47 $\Delta$ が感染した腫瘍細胞では LacZ 遺伝子が一過性に発現するが、LacZ 遺伝子からの生成物である $\beta$ -ガラクトシダーゼが人体に対し毒性や病原性を有するという報告はない。 G47 $\Delta$ の遺伝子変異は HSV-1 ゲノム上の離れた 4 箇所（3つの遺伝子）に位置しているため、G47 $\Delta$ 由来の遺伝子組換え生物に該当する野生型復元 HSV-1 が自然に生じる可能性も無に等しい。 したがって、G47 $\Delta$ は野生型 HSV-1 を超える病原性は示さないと考えられる。 これらのことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、病原性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとした申請者の結論は妥当であると判断した。
③ 有害物質の産生性 G47 $\Delta$ の有害物質の産生性は知られておらず、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとした申請者の結論は妥当であると判断した。
④ 核酸を水平伝達する性質 G47 $\Delta$ の感染性は野生型 HSV-1 と同等で、自然界で感染する対象はヒトのみである。感受性のある一部のマウス、ラット、ハムスター、ウサギ、またはサルを用いた感染実験が報告されているが、G47 $\Delta$ は正常細胞でのウイルス複製能を失っているため、自然界では伝搬・複製することはない。 G47 $\Delta$ の投与を受けたヒトでは、腫瘍内に限局して複製した G47 $\Delta$ が生じるが、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、環境中への拡散は極力抑えられている。ヒトからヒトへ腫瘍細胞を介して直接水平伝達して複製することはほぼ不可能であると考えられる。 G47 $\Delta$ の遺伝子変異は HSV-1 ゲノム上の離れた 4 箇所（3つの遺伝子）に位置しているため、G47 $\Delta$ 由来の遺伝子組換え生物に該当する野生型復元 HSV-1 が自然に生じる可能性も無に等しい。 これらのことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、核酸を水平伝達する性質に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとした申請者の結論は妥当であると判断した。
(2) 生物多様性影響評価書を踏まえた結論 以上を踏まえ、G47 $\Delta$ を第一種使用規程に従って使用した場合に生物多様性影響が生ずるおそれはないとした生物多様性影響評価書の結論は妥当であると判断した。

厚生科学審議会科学技術部会  
 遺伝子治療臨床研究に係る  
 生物多様性影響評価に関する作業委員会 委員名簿

【 東京大学医科学研究所附属病院 】

「進行性膠芽腫患者に対する増殖型遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス  
 G47Δを用いた遺伝子治療（ウイルス療法）の臨床研究」

氏名	所属
いわさき かずひろ 岩崎 一弘	内閣府 政策統括官付参事官
おざわ けいや 小澤 敬也	自治医科大学 医学部教授
かんだ ただひと 神田 忠仁	(独)理化学研究所 新興・再興感染症研究ネットワーク推進センター 業務展開チーム チームリーダー
しまだ たかし 島田 隆	日本医科大学 医学部教授
はやかわ たかお 早川 堯夫	近畿大学 薬学総合研究所所長
やまぐち てるひで 山口 照英	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部研究員

○

厚科審第14号

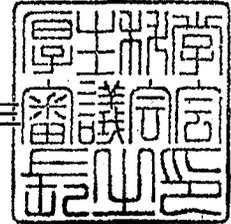
平成23年3月11日

科学技術部会部会長

永井 良三 殿

厚生科学審議会会長

永井 良三



遺伝子治療臨床研究に係る生物多様性影響評価について（付議）

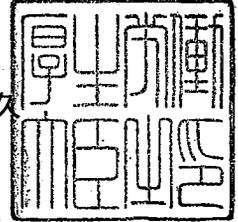
標記について、平成25年3月11日付厚生労働省発科0311第1号をもって厚生労働大臣より諮問があったので、厚生科学審議会運営規程第3条の規定に基づき、貴部会において審議方願いたい。

厚生労働省発科 0311 第 1 号  
平成 25 年 3 月 11 日

厚生科学審議会会長

永井 良三 殿

厚生労働大臣 田村 憲久



諮 問 書

遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（平成 15 年法律第 97 号）第 4 条第 1 項に基づく第一種使用規程等の主務大臣承認に関し、下記の遺伝子治療臨床研究について、厚生労働省設置法（平成 11 年法律第 97 号）第 8 条第 1 項第 1 号イの規定に基づき、貴会の意見を求めます。

記

1. 申請日 平成 25 年 2 月 20 日

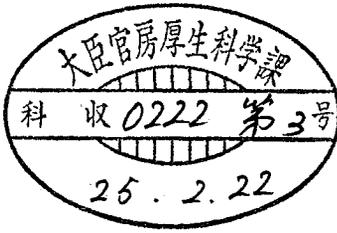
申請者 東京大学医科学研究所附属病院 病院長 今井 浩三

遺伝子治療臨床研究の名称

進行性膠芽腫患者に対する増殖型遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス G47Δ を用いた遺伝子治療（ウイルス療法）の臨床研究

遺伝子組換え生物等の名称

大腸菌 LacZ 遺伝子を発現し、 $\gamma$ 34.5 遺伝子・ICP6 遺伝子・ $\alpha$ 47 遺伝子を不活化された制限増殖型遺伝子組換えヒト単純ヘルペスウイルス 1 型（G47Δ）



第一種使用規程承認申請書

平成25年 2月20日

厚生労働大臣  
環境大臣

殿  
殿

申請者 氏名 東京大学医科学研究所附属病院

病院長 今井 浩

住所 東京都港区白金台4丁目6番1号



第一種使用規程について承認を受けたいので、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第4条第2項の規定により、次のとおり申請します。

<p>遺伝子組換え生物等の種類 の名称</p>	<p>大腸菌 LacZ 遺伝子を発現し、<math>\gamma</math>34.5 遺伝子・ICP6 遺伝子・<math>\alpha</math>47 遺伝子を不活化された制限増殖型遺伝子組換えヒト単純ヘルペスウイルス 1 型 (G47A)</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容</p>	<p>治療施設におけるヒトの治療を目的とした使用、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為。</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法</p>	<p>治療施設の所在地 東京都港区白金台4-6-1 治療施設の名称 東京大学医科学研究所附属病院</p> <p>(1) G47A溶液は、容器に密封後、凍結状態で治療施設に輸送し、施設内の実験室内の冷凍庫に保管する。</p> <p>(2)凍結状態のG47A溶液の融解、希釈及び分注操作は、P2レベルの実験室（以下「P2実験室」という。）の安全キャビネット内で行う。G47A希釈溶液の保管は、P2実験室内の保冷库または冷凍庫において行う。なお、G47A希釈溶液又はその凍結品を開放系区域を通して他の区域に運搬する場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。</p> <p>(3) G47A溶液（希釈溶液を含む）を廃棄する際には、ウイルス不活化（高圧蒸気滅菌処理又は70%イソプロパノール、70%から90%までのエタノール、0.2%次亜塩素酸ナトリウム、10%ポビドンヨード、0.1%から0.5%までのグルコン酸クロルヘキシジン及び0.05%から0.2%までの塩化ベンザルコニウムなどの消毒薬（以下「消毒薬」という。）処理による。以下同じ。）を行った後、東京大学医学部附属病院で定められた医療廃棄物管理規程（以下「医療廃棄物管理規程」という。）を準用し、それに従い廃棄する。</p> <p>(4) P2実験室内の安全キャビネット内でG47A希釈溶液を専用のシリンジに充填し、それを二重に密閉し、環境中への拡散防止措置を適切に執った手術室（以下手術室という）に運搬する。</p> <p>(5) 被験者に対するG47Aの投与は、手術室において、被験者の腫瘍内にG47Aの入った緩衝液（以下「G47A液」という。）を定位脳手術により注入することによって行う。被験者の頭蓋骨に開けた直径約12mmの骨穴から、定位手術装置に装着した専用の注入針を刺入し、用手的に遅い速度でG47A液を注入する。注入後は注入針をそのままの位置で数分間保持した後、遅い速度で抜去する。特に脳表からの抜去は慎重に行ない、G47A液の漏出およびエアロゾル化を防止する。G47A液を予定量全て投与後は速やかに閉創する。なお、頭部の周辺には布を二重に敷き詰める。</p> <p>(6) 被験者へのG47Aの投与終了後、被験者の創部を消毒薬にて消毒してガーゼ</p>

	<p>で覆い、さらに頭部をキャップで覆う。ウイルス漏出予防のためにマスクを着用した被験者を手術室から、環境中の拡散防止措置を適切に執った陽圧でない個室の病室（以後、個室という）に移送する。</p> <p>(7) 上記(5)及び(6)で用いたシリンジなどの器具並びに布及びガーゼ類は、ウイルスの不活化を行い、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。これらのウイルス不活化を他の区域で行なう場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。術後の当該手術室は床を消毒薬で拭き清掃する。なお手術室内の空気は換気により約5分間に一回（1時間に約12回）入れ替わる。</p> <p>(8) 投与後72時間まで、被験者を個室で管理する。検査等の目的で被験者が一時的に手術室及び個室から外の開放系区域に出る場合には、採血や排泄等を最小限に留め、マスク着用によるウイルス漏出予防措置を義務付ける。</p> <p>(9) 個室における管理期間中の被験者の排泄物は、ウイルス不活化を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。また、研究用検体として使用する被験者の血液及び尿の取り扱いは、G47Δ溶液の取扱いに準じる。</p> <p>(10) 個室における管理期間中、被験者に対して侵襲的に使用した器具等及び被験者の排泄物に接触した器具等は、ウイルスの不活化を行なった後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄または十分に洗浄する。これらのウイルス不活化を他の区域で行なう場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。</p> <p>(11) 個室における被験者の管理を解除する前に、被験者の血液、唾液及び尿中のG47Δが陰性であることを確認する。G47Δが確認されたときは、それが消失するまでの期間、個室における管理を継続する。</p> <p>(12) 個室における管理解除後に被験者の血液、唾液又は尿中からG47Δが検出された場合には、直ちに被験者を個室における管理下に移し、上記(8)から(10)までと同様の措置を執る。</p> <p>(13) G47Δ脳内投与後G47Δが脳病巣内に存在していると推定される期間内に、病状の悪化等により、G47Δ投与目的以外の開頭手術等を行う場合には、(5)から(12)と同様の措置を執る。</p>
--	---

# 生物多様性影響評価書

## I 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

### 1 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

単純ヘルペスウイルスはヘルペスウイルス科アルファヘルペスウイルス亜科に分類されている。これまでに分離されたウイルスは、I型(HSV-1)とII型(HSV-2)の二つであり(文献1)、G47Δは単純ヘルペスウイルスI型(HSV-1)から作製された(文献2)。

ヒトにおけるHSV-1の初感染は通常小児期に起こり、無症候性であることが多い。HSV-1に対する中和抗体の保有率は成人で7-8割程度である(文献1)。HSV-1の感染は種特異的であり、自然環境においては本来の宿主であるヒト以外での複製は報告されていない。実験室内では、一部の系統のマウス、ラット、ハムスター、ウサギ、またはサルには注射等による接種により感染させることができ、それらを用いてワクチンや遺伝子組換えHSV-1の安全性評価などの感染実験が報告されている(文献3-5)。

文献1 : Whitley, R. Herpes simplex viruses. In *Fields' Virology*, 4th edn, ed. Kaipe, D. M., Howley, P. M. ed. pp2461-2509, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2001).

文献2 : Todo, T. *et al.* Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHC class I presentation and tumor cell killing. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6396-6401 (2001).

文献3 : Lopez, C. Genetics of natural resistance to herpesvirus infections in mice. *Nature* 258: 152-153(1975)

文献4 : Barahona, H. *et al.*, The owl monkey (*Aotus trivirgatus*) as an animal model for viral diseases and oncologic studies. *Lab Anim Sci.* 6: 1104-1112 (1976).

文献5 : Deisboeck, T. S. *et al.* Development of a novel non-human primate model for preclinical gene vector safety studies. Determining the effects of intracerebral HSV-1 inoculation in the common marmoset: a comparative study. *Gene Ther.* 15: 1225-1233 (2003).

### 2 使用等の歴史及び現状

HSV-1を生ワクチンとして臨床に試みた報告としては、複製可能型遺伝子組換えHSV-1であるR7020が存在する(文献1、6、7)。また近年、米国および英国においてHSV-1に由来する種々の遺伝子組換えウイルスが、また国内において自然変異型の弱毒ウイルスが、悪性腫瘍に対するウイルス療法としてヒトに対し使用されている(文献8-13)。

文献6 : Cadoz, M. *et al.*, Phase 1 trial of R7020: A live attenuated recombinant herpes simplex (HSV) candidate vaccine. Presented at the 32nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Anaheim, CA, October 11-14, 1992

文献7 : Whitley, R. *et al.* Herpes simplex viruses: is a vaccine tenable? *J Clin Invest* 110: 145-151.2002.

文献8 : Markert, J. *et al.* Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. *Gene Ther* 7: 867-874 (2000).

文献9 : Rampling, R. *et al.* Toxicity evaluation of replication-competent herpes simplex virus (ICP 34.5

- null mutant 1716) in patients with recurrent malignant glioma. *Gene Ther* 7: 859-866 (2000).
- 文献 1 0 : Papanastassiou, V. *et al.* The potential for efficacy of the modified (ICP 34.5(-)) herpes simplex virus HSV1716 following intratumoural injection into human malignant glioma: a proof of principle study. *Gene Ther* 9: 398-406 (2002).
- 文献 1 1 : Harrow, S. *et al.* HSV1716 injection into the brain adjacent to tumour following surgical resection of high-grade glioma: safety data and long-term survival. *Gene Ther* 11: 1648-1658 (2004).
- 文献 1 2 : Fujimoto, Y. *et al.* Intratumoral injection of herpes simplex virus HF10 in recurrent head and neck squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol.* 126: 1115-1117 (2006).
- 文献 1 3 : Kimata, H. *et al.* Pilot study of oncolytic viral therapy using mutant herpes simplex virus (HF10) against recurrent metastatic breast cancer. *Ann Surg Oncol.* 13: 1078-1084 (2006).

### 3 生理・生態学的特性 (文献 1)

#### (1) 基本的特性

単純ヘルペスウイルスはエンベロープを有し、成熟粒子は100-150nmの大きさである。エンベロープの内側にテグメント、更にその内側にカプシドがあり、カプシド内にウイルスDNAが存在する。ゲノムは約152kbの2本鎖DNAである。

#### (2) 生育又は生育可能な環境の条件

ヒトに感染し、増殖する。培養細胞では、ヒトの細胞およびVero細胞などの哺乳動物由来の一部の細胞で効率よく増殖する。粘膜表面の直接の接触による感染を主な感染経路とし、外界および室温では不安定である。飛沫感染は起こらない。

#### (3) 捕食性又は寄生性

自然界では、ヒトでのみ増殖を伴う感染が起こる。

#### (4) 繁殖又は増殖の様式

HSV-1は、ヒトの粘膜表面（通常は口腔咽頭）への直接の接触により感染する。接触感染以外の感染形式はない。感染した局所で複製した後、神経末端から感覚神経節（しばしば三叉神経節）にウイルスは移送され、潜伏感染 (latency) を確立する。潜伏感染においてはウイルスの複製は行われず、別の宿主への感染性を有しない。潜伏感染から再活性化 (reactivation) が起きると、ウイルスは皮膚粘膜（通常は口唇）で顕在化し、水疱を形成する(文献 1 4)。潜伏感染の再燃などに際してウイルスはまれに脳炎を発症する。そのウイルス侵入経路については三叉神経説と嗅神経説がある (文献 1 5)。

#### (5) 病原性

HSV-1は口唇ヘルペスの原因ウイルスで、初期感染は一般に軽症あるいは無症状である。再活性化時に口唇に水疱を形成する。まれに、角膜炎や脳炎を起こす。ヘルペス脳炎の発生は日本の調査では年間100万人に2.9人 (文献 1 6)、欧米では年間20万人に1人 (文献 1 7、1 8) である。発癌性はない。免疫不全や新生児など特殊な条件下を除くと、HSV-1はウイ

ルス血症を生じることがなく、初期感染後全身に分布しない。

(6) 有害物質の産生性

HSV-1の感染で細胞内に産生される蛋白質等の毒性は報告されていない。

(7) その他の情報

HSV-1はエンベロープを有するウイルスで、エンベロープが破壊・変性すると容易に感染性を失う。宿主から離れると環境中では2時間で死滅する(文献19)。Biosafety上、消毒薬(chemical disinfectants)に対する感受性の点でlipid virusesに分類され、微生物の中で消毒薬に対する感受性が最も高い(文献14)。HSV-1を速やかに不活化する消毒薬(chemical disinfectants)は以下のものを含む: 70%イソプロパノール、70-90%エタノール、塩素系漂白剤(例えば0.2%次亜塩素酸ナトリウムなど)、ヨード溶液、グルタルアルデヒド、ホルマリン、10%ポビドンヨード、0.5~0.1% グルコン酸クロルヘキシジン、0.2~0.05% 塩化ベンザルコニウム、など(文献14、20-23)。物理的不活法(physical inactivation)として、HSV-1は56°C(30分間)の加熱や紫外線照射(15分間)、pH4以下で速やかに感染性を失う。

文献14 : Biosafety Manual: Lawrence Berkeley National Laboratory

([http://www.lbl.gov/ehs/biosafety/Biosafety\\_Manual/html/decontamination.shtml](http://www.lbl.gov/ehs/biosafety/Biosafety_Manual/html/decontamination.shtml)).

文献15 : Mori, I. *et al.* Olfactory transmission of neurotropic viruses. *J Neurovirol* 11: 129-137 (2005).

文献16 : Kamei, S. *et al.* Nationwide survey of the annual prevalence of viral and other neurological infections in Japanese inpatients. *Intern Med* 39: 894-900 (2000).

文献17 : Whitley, R. *et al.* Herpes simplex virus infections of the central nervous system: therapeutic and diagnostic considerations. *Clin Infect Dis* 20: 414-420 (1995)

文献18 : Wald, A. *et al.* Persistence in the population: epidemiology, transmission. In *Human Herpesviruses*. Arvin A. *et al.* eds., pp659-671, Cambridge University Press, Cambridge (2007)

文献19 : Assar, S. *et al.* Survival of Microorganisms in the Environment. In *Disinfection, Sterilization, and Preservation*. 5th edn Block S. ed., pp1221-1242, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2001)

文献20 : Croughan, W. *et al.* Comparative study of inactivation of herpes simplex virus types 1 and 2 by commonly used antiseptic agents. *J Clin Microbiol* 26: 213-215 (1988)

文献21 : Material safety data sheet- infectious substances: Public health agency of Canada (<http://www.phac-aspc.gc.ca/msds-ftss/msds80e.html>.)

文献22 : Centers for Disease Control and Prevention ed., Guideline for hand hygiene in health-care settings: Morbidity and mortality weekly report (MMWR) 51 (2002)

文献23 : 大久保 憲 監修、消毒薬テキスト 新版 : 協和企画 (2005)

## II 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

### 1 供与核酸に関する情報

#### (1) 構成及び構成要素の由来

大腸菌(略称 E.Coli) LacZ (3kb) cDNAを宿主に導入した(Gene bank Accession Number:V00296)。(供与核酸の全塩基配列及び対応するアミノ酸配列は別紙1、2参照)

#### (2) 構成要素の機能

導入されたLacZ遺伝子は宿主のICP6プロモーターにより発現される。LacZ遺伝子にコードされる大腸菌beta galactosidaseは基質X-galを加水分解し青色の沈殿物とする。形質転換した大腸菌や、ベクター感染細胞のマーカーとして用いられ、それらにX-galを加えて識別する方法は一般に広く用いられている。病原性や毒素産生性には関与していない。この供与核酸の導入によって、G47Δの感染性が野生型HSV-1から変わることはないと考えられる。なお、LacZ遺伝子の挿入により宿主のICP6遺伝子は不活化され、G47Δの複製を腫瘍細胞選択的とする機序の一つを担っている。

### 2 ベクターに関する情報

#### (1) 名称及び由来

G47Δは、HSV-1 F株由来の二重変異遺伝子組換えHSV-1 G207 (文献24) から、pIE12Δプラズミドを用いて相同遺伝子組換えで作製された。pIE12Δは、HSV-1のα47遺伝子を含むBamHI x フラグメントのうちBamHI-EcoRI の1818 bpを有するpIE12プラズミド (文献25) から、α47遺伝子領域の312 bp (BstEII-EcoNI) を欠失させたプラズミドである (文献2)。G47Δの構造の模式図は別紙3参照。

#### (2) 特性

pIE12ΔはAmpicillin 耐性遺伝子を有している。宿主にはpIE12Δの挿入外来遺伝子配列のみが移入され、薬剤耐性遺伝子などのベクター配列は移されない。

文献24 : Mineta, T. *et al.* Attenuated multi-mutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas. *Nat Med* 1: 938-943 (1995).

文献25 : Johnson, P. *et al.* Improved cell survival by the reduction of immediate-early gene expression in replication-defective mutants of herpes simplex virus type 1 but not by mutation of the virion host shutoff function. *J Virol* 68 : 6347-6362 (1994).

### 3 遺伝子組換え生物等の調製方法

#### (1) 宿主内に移入された核酸全体の構成

HSV-1のICP6領域にLacZ cDNAが挿入されている。これにより、ICP6プロモーターは供

与核酸を発現し、本来のICP6遺伝子は発現されない。また、宿主HSV-1の $\gamma$ 34.5遺伝子(1kb)の双方のコピーは欠失しており、また、 $\alpha$ 47遺伝子(312bp)も欠失している(別紙4参照)。

### (2) 宿主内に移入された核酸の移入方法

G47 $\Delta$ の親ウイルスであるG207は野生型HSV-1であるF株から2箇所の $\gamma$ 34.5遺伝子の双方(1kb)を削除し、ICP6遺伝子領域に大腸菌のLacZ遺伝子を挿入して作製された。G47 $\Delta$ は、G207からさらに $\alpha$ 47領域内の312bpを削除して作製された。pIE12 $\Delta$ は、pBluescript KSを基本骨格とし、BstEII-EcoNIの312 bpを欠失したHSV-1の $\alpha$ 47遺伝子を含有するフラグメントをインサートとして含むプラズミドである。G207のウイルスDNAとpIE12 $\Delta$ プラズミドDNAの共移入に伴うVero細胞内での相同組換えにより、遺伝子組換えHSV-1であるG47 $\Delta$ を得た(文献24、25 および別紙4)。

### (3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

G47 $\Delta$ はウイルス製造に頻用されるVero細胞を使って増殖させた。G47 $\Delta$ の臨床製剤は東京大学医科学研究所治療ベクター開発室で生産される。生産工程はセルバンクシステム及びウイルスバンクシステムを用い、米国cGMPに準じた標準作業手順(SOP)に基づき行う。製造は、東京大学医科学研究所・先端医療研究センター・先端がん治療分野(脳腫瘍外科)・教授・藤堂 具紀を責任者とし、東京大学医科学研究所先端がん治療分野(脳腫瘍外科)が行なう。WHO Veroマスターセルバンクからワーキングセルバンクを構築し、ウイルス製造には継代数の低い細胞を使用する。正しい変異を有することが確認されたG47 $\Delta$ から作製したマスターウイルスストックをVero細胞に感染させる。2日後、細胞を回収し、凍結融解操作で細胞内のG47 $\Delta$ を遊離させる。フィルターろ過により細胞成分を除去したのち、細胞由来のDNAおよびRNAを酵素処理する。高速遠心にてウイルスを沈殿させ、混入する核酸および蛋白を除去する。これを10% グリセリン加磷酸緩衝液(PBS)に再浮遊する(別紙5参照)。生産の4工程、すなわち、マスターセルバンク、精製前のウイルス回収液(バルクハーベスト)、精製後のウイルス、およびチューブに分注後の製剤において、英国BioReliance社に委託して品質試験を行う(品質試験項目に関しては別紙6参照)。東京大学医科学研究所治療ベクター開発室からは凍結した状態で東京大学医科学研究所附属病院へ搬送する。上述の品質試験の合格が確認された製剤の機関内での移動であり、受入れ試験は予定しない。

G47 $\Delta$ 製剤中に増殖型・非増殖型の各種ウイルスの混入がないことの品質試験を英国BioReliance社に委託して行なう。また、最終製剤中のG47 $\Delta$ 以外の組換えHSV-1の混入の有無については、LacZ挿入部位の外側に設計したプライマーを用いたPCRを行い、野生型に由来する長さのDNA断片が増幅されないことを検証する。

臨床製剤は東京大学医科学研究所治療ベクター開発室内の専用の冷凍庫に保管し、施錠のうえ管理する。(当該治療施設の地図は別紙7参照)。

ウイルスの調製に使用する細胞はWHO-Vero細胞を用いる。マスターセルバンク、ワーキングセルバンク、およびマスターウイルスシードストックは、東京大学医科学研究所治療ベクター開発室に保管されている。

#### 4 移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

移入した核酸はHSV-1の2本鎖DNAゲノムの一部として存在し、保管中は安定である。感染する動植物等の種類及び感染様式が保管中に変化することはない。

G47Δが細胞に感染すると、G47Δのゲノムは核内の染色体外に存在し、感受性を有する培養増殖細胞（例：ヒト神経芽細胞腫株SK-N-SH、ヒト膠芽腫細胞株U87MG、ヒト膠芽腫細胞株U373、ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞株SQ20B、およびアフリカミドリザル腎細胞株Vero）もしくはヒト体内では腫瘍細胞に限ってウイルス複製が起こる（「6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違」の項に詳述）。また、ウイルス複製の際に感染細胞内で一過性にLacZ蛋白質が発現される。

G47ΔはHSV-1ゲノムの互いに離れた4箇所（3つの遺伝子）に操作が加えられているため、組換えにより自然に野生型のHSV-1に復する可能性は無に等しい。万一3つの遺伝子のうち2箇所または1箇所のみの変異に復元したものが生じたとしても、ICP6またはγ34.5の少なくとも一方が不活化されていれば腫瘍選択的な複製は維持される。α47のみが不活化されたウイルスは宿主の免疫系に認識されやすく、宿主における複製能が低下する（II章6「宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違」参照）。いずれも、野生型に比し毒性や病原性の増加はない。

臨床製剤の生産は、1つのウイルスから得られたG47Δのロットを、十分量に増やしたVero細胞に一回感染させて回収することによって行われるため、ウイルスが継代されることはなく、従って重なるウイルス継代によってゲノムに変化が起こることはない。

#### 5 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

G47Δは野生型のHSV-1に存在しないLacZ遺伝子を含むので、挿入されたLacZ遺伝子と隣接するHSV-1のICP6遺伝子との境界部をPCRで増幅、定量する方法でG47Δを検出できる（文献26）。このときに用いるPCR反応では、試料1μl中に1-10コピーのG47Δ DNAがあれば検出することができる。また、感染細胞のX-gal染色を行なうことによっても、G47Δ（青色に染色）と野生型HSV-1（染色されない）を区別することができる。X-gal染色の感度は鋭敏であり、理論上は、細胞内に1 pfuのG47Δが存在すれば検出できる（文献27）。

PCR法による検出の信頼性については、同様の定量的PCR法を用いたウイルス検出法がすでにG207(二重変異遺伝子組換えHSV-1)の臨床試験で用いられており、信頼性が確立している（文献8、28）。

文献26：Todo, T. *et al.* Viral shedding and biodistribution of G207, a multimutated, conditionally replicating herpes simplex virus type 1, after intracerebral inoculation in aotus. *Mol Ther* 2: 588-595 (2000).

文献27：Carew, J. *et al.* Selective infection and cytolysis of human head and neck squamous cell carcinoma with sparing of normal mucosa by a cytotoxic herpes simplex virus type 1 (G207). *Hum Gene Ther.* 10: 1599-1606, 1999

文献 2 8 : DeBiasi, R. *et al.* Use of PCR for the diagnosis of herpes virus infections of the central nervous system. *J Clin Virol.* 25: S5-11 (2002)

## 6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

G47Δはウイルスゲノムに遺伝子操作が加えられた遺伝子組み換えHSV-1であり、ICP6、 $\gamma$ 34.5、 $\alpha$ 47の領域にコードされているウイルス蛋白質を発現できない。ICP6遺伝子(ribonucleotide reductase (RR)の大サブユニットをコードする) および $\gamma$ 34.5遺伝子はともに正常細胞でのウイルス複製に必要な遺伝子であり、これらを欠失したウイルスは腫瘍細胞でのみ複製が可能となる。

$\gamma$ 34.5はHSV-1の病原性に関連した遺伝子で、これを欠失させた変異株は正常細胞でのウイルス複製能が著しく減弱することが判明している(文献29)。正常細胞ではウイルス感染が起こると二本鎖RNA依存性プロテインキナーゼ(double stranded RNA-activated protein kinase: PKR)がリン酸化され、それが翻訳開始因子eIF-2aをリン酸化し、その結果ウイルス蛋白を含む細胞内での蛋白合成が遮断される。 $\gamma$ 34.5遺伝子産物はリン酸化PKRに拮抗してウイルス蛋白の合成を可能にするが、 $\gamma$ 34.5遺伝子欠失HSV-1は正常細胞では複製を行えない。しかし、正常細胞とは異なり、腫瘍細胞では普遍的にPKRのリン酸化が低いため、 $\gamma$ 34.5遺伝子欠失のHSV-1でも複製可能となると考えられている(文献30)。

RRはウイルスDNA合成に必要な酵素であるが、この遺伝子を不活化すると、ウイルスは非分裂細胞では複製できず、分裂が盛んでRR活性の上昇した細胞でのみウイルスの欠落酵素が補われてウイルス複製が可能となる(追加文献1)。

一方、 $\alpha$ 47遺伝子を欠失したウイルスは感染細胞でのtransporter associated with antigen presentation (TAP)に拮抗する機能を失うため、感染細胞のMHCクラスIの発現が維持され、免疫系による認識を促進する。同時にゲノム上で重複して位置するUL11遺伝子の発現を早めることで、 $\gamma$ 34.5欠失ウイルスの減弱した複製能力を腫瘍細胞において選択的に回復させる(文献2、24、31)。

ICP6領域には大腸菌LacZ cDNAが挿入されており、G47Δの感染した細胞内で一過性に発現される。

G47ΔはVero細胞で増殖させるが、この細胞においてG47Δの増殖力は親株(StrainF)に比較し低下しており、親株が $10^8$  pfu/mlのタイターまで増殖する条件下で、G47Δは $10^7$  pfu/mlのタイターにしか達しない(文献2)。

G47Δの感染性は野生型HSV-1と同じであり、ヒトを宿主とする。ヒトや動植物等への感染性、感染様式など、生物多様性に影響を与える性質は野生型HSV-1と同等であると考えられる。腫瘍細胞でのみウイルス複製が可能であることから、自然界では伝搬・複製し得ない。

文献 2 9 : Chou, J. *et al.* Mapping of herpes simplex virus-1 neurovirulence to  $\gamma$ 134.5, a gene nonessential for growth in culture. *Science* 250: 1262-1266 (1990)

文献 3 0 : Farassati, F. *et al.* Oncogenes in Ras signalling pathway dictate host-cell permissiveness to

herpes simplex virus 1. *Nat Cell Biol* 3: 745-750 (2001)

文献 3 1 : Cassady, K. *et al.* The second-site mutation in the herpes simplex virus recombinants lacking the  $\gamma_1$  34.5 genes precludes shutoff of protein synthesis by blocking the phosphorylation of eIF-2alpha. *J Virol.* 72: 7005-7011 (1998).

追加文献 1 : Goldstein, D.J. *et al.* Factor(s) present in herpes simplex virus type 1-infected cells can compensate for the loss of the large subunit of the viral ribonucleotide reductase: characterization of an ICP6 deletion mutant *Virology* 166: 41-51 (1988)

### III 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

#### 1 使用等の内容

治療施設におけるヒト遺伝子治療を目的とした使用、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為。

#### 2 使用等の方法

治療施設の所在地 東京都港区白金台四丁目6番1号  
治療施設の名称 東京大学医科学研究所附属病院

- (1) G47Δ溶液は、容器に密封後、凍結状態で治療施設に輸送し、施設内の実験室内の冷凍庫に保管する。
- (2) 凍結状態のG47Δ溶液の融解、希釈及び分注操作は、P2レベルの実験室（以下「P2実験室」という。）の安全キャビネット内で行う。G47Δ希釈溶液の保管は、P2実験室内の保冷库または冷凍庫において行う。なお、G47Δ希釈溶液又はその凍結品を開放系区域を通して他の区域に運搬する場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。
- (3) G47Δ溶液（希釈溶液を含む。）を廃棄する際には、ウイルス不活化（高圧蒸気滅菌処理又は70%イソプロパノール、70%から90%までのエタノール、0.2%次亜塩素酸ナトリウム、10%ポビドンヨード、0.1%から0.5%までのグルコン酸クロルヘキシジン及び0.05%から0.2%までの塩化ベンザルコニウムなどの消毒薬（以下「消毒薬」という。）処理による。以下同じ。）を行った後、東京大学医学部附属病院で定められた医療廃棄物管理規程（以下「医療廃棄物管理規程」という。）を準用し、それに従い廃棄する。
- (4) P2実験室内の安全キャビネット内でG47Δ希釈溶液を専用のシリンジに充填し、それを二重に密閉し、環境中への拡散防止措置を適切に執った手術室（以下手術室という。）に運搬する。
- (5) 被験者に対するG47Δの投与は、手術室において、被験者の腫瘍内にG47Δの入った緩衝液（以下「G47Δ液」という。）を定位脳手術により注入することによって行う。被験者の頭蓋骨に開けた直径約12mmの骨穴から、定位手術装置に装着した専用の注入針を刺入し、手動的に遅い速度でG47Δ液を注入する。注入後は注入針をそのままの位置で数分間保持した後、遅い速度で抜去する。特に脳表からの抜去は慎重に行ない、G47Δ液の漏出およびエアロゾル化を防止する。G47Δ液を予定量全て投与し注入針を抜去した後は速やかに閉創する。なお、頭部の周辺には布を二重に敷き詰める。
- (6) 被験者へのG47Δの投与終了後、被験者の創部を消毒薬にて消毒してガーゼで覆い、さらに頭部をキャップで覆う。ウイルス漏出予防のためにマスクを着用した被験者を手術室

から、環境中の拡散防止措置を適切に執った陽圧でない個室の病室（以後、個室という。）に移送する。

- (7) 上記(5)及び(6)で用いたシリンジなどの器具並びに布及びガーゼ類は、ウイルスの不活化を行い、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。これらのウイルス不活化を他の区域で行なう場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。術後の当該手術室は床を消毒薬で拭き清掃する。なお手術室内の空気は換気により約5分間に1回（1時間に約12回）入れ替わる。
- (8) 投与後72時間まで、被験者を個室内で管理する。検査等の目的で被験者が一時的に手術室及び個室から外の開放系区域に出る場合には、採血や排泄等を最小限に留め、マスク着用によるウイルス漏出予防措置を義務付ける。
- (9) 個室における管理期間中の被験者の排泄物は、ウイルス不活化を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。また、研究用検体として使用する被験者の血液及び尿の取り扱いは、G47Δ溶液の取扱いに準じる。
- (10) 個室における管理期間中、被験者に対して侵襲的に使用した器具等及び被験者の排泄物に接触した器具等は、ウイルスの不活化を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄または十分に洗浄する。これらのウイルス不活化を他の区域で行なう場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。
- (11) 個室における被験者の管理を解除する前に、被験者の血液、唾液及び尿中のG47Δが陰性であることを確認する。G47Δが確認されたときは、それが消失するまでの期間、個室における管理を継続する。
- (12) 個室における管理解除後に被験者の血液、唾液又は尿中からG47Δが検出された場合には、直ちに被験者を個室における管理下に移し、上記(8)から(10)までと同様の措置を執る。
- (13) G47Δ脳内投与後G47Δが脳病巣内に存在していると推定される期間内に、病状の悪化等により、G47Δ投与目的以外の開頭手術等を行う場合には、(5)から(12)と同様の措置を執る。

### 3 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方法

被験者への投与後、別途規定のスケジュールに従い被験者の血液、唾液、および尿のPCR法による検査を実施する。また、HSV-1感染症の発症の有無につき被験者の臨床症状を観察する。PCR法による検査結果が陽性の場合には、検出されたウイルスのゲノム構造を確認しG47Δ以外の組換えHSV-1の混在の有無を、また、感染性ウイルスの存在の有無を確認する。

### 4 生物多様性影響が生じるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置

遺伝子組換えウイルス投与後の被験者については、PCR法にて血液、唾液、および尿中の遺伝子組換えウイルスの存在の有無を確認し、陽性の場合にはそれが消失するまで追跡する。

#### 5 実験室等での使用又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果

HSV-1に感受性のあるサル (*Aotus nancymae*) に、G47Δを作製する基となったG207(二重変異を有する遺伝子組換えHSV-1)を脳内に定位的に投与した非臨床試験において、野生型HSV-1 (strain F) は $1 \times 10^3$  pfuで脳炎を生じ投与後5日で死亡させたが、G207は $10^9$  pfuでも毒性を示さなかった(文献26、32)。G207の脳内投与後( $3 \times 10^7$  pfu)、1, 3, 7, 10, 14, 21, 31日めに唾液、涙、膺分泌液を採取し、ウイルス排出の有無が検証されたが、いずれの検体からも感染性ウイルスおよびG207のDNAは検出されなかった(文献26)。G207の脳内投与1ヶ月後( $3 \times 10^7$  pfu) もしくは2年後( $10^9$  pfu) の解剖で採取した全身の組織検体からのPCRによるDNA残存の検索では、G207のDNAが中枢神経系(注入部位、同側の前頭葉、側頭葉、頭頂葉、脳幹、および対側の前頭葉)に限局して検出された(安全性試験の詳細は計画書添付資料5(2)12に記載)。BALB/cマウスにLD<sub>50</sub>量の野生型HSV-1の脳内投与を行い、生き延びてHSV-1の潜伏感染を確立したマウスに、G207( $1 \times 10^7$  pfu)を脳内投与しても潜在HSV-1の再活性化を誘発しなかった(文献33)。

文献32 : Hunter, W.D. *et al.* Attenuated, replication-competent herpes simplex virus type 1 mutant G207: safety evaluation of intracerebral injection in nonhuman primates. *J Virol* 73: 6319-6326 (1999).

文献33 : Sundaresan, P *et al.* Attenuated, replication-competent herpes simplex virus type 1 mutant G207: safety evaluation in mice. *J. Virol.* 74: 3832-3841 (2000).

#### 6 国外における使用等により得られた情報

米国アラバマ大学バーミングハム校とジョージタウン大学医療センターにおいて、再発神経腫瘍を対象とし、腫瘍治療用に開発された第二世代遺伝子組換えHSV-1のG207を用いて再発悪性グリオーマ患者21例を対象に米国で第I相臨床試験が行われた(1998年~2000年)(文献8)。G207は定位脳手術により脳腫瘍内に単回投与され、 $1 \times 10^6$  pfuから $3 \times 10^9$  pfuまで3例ずつ用量を増加した。ジョージタウン大学では通常の手術室を用いて他の患者と同様の扱いで手術が施行され、患者は通常の病室で管理された。G207投与後4日、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、1年の各時点で患者の唾液と血液が採取され、ウイルス排出の有無が検証されたが、いずれの検体からも感染性ウイルスおよびG207のDNAは検出されなかった。

$\gamma$ 34.5遺伝子のみを欠失した第一世代遺伝子組換えHSV-1の1716を用い、再発悪性グリオーマ患者9例を対象に英国で第I相臨床試験が行われた(文献9)。1716は定位脳手術により脳腫瘍内に単回投与され、 $10^3$  pfuから $10^5$  pfuまで3例ずつ用量を増加した。投与後2日目、6日目、その後4週後まで週1回、血清と口腔粘膜を採取しウイルス排出検査を行ったところ、感染性

のHSV-1はいずれの患者からも検出されなかった。またヘルペスウイルス感染症の皮膚症状も見られなかった。次に行われたproof of principle (POP)試験では、再発悪性グリオーマ12例に対して定位脳手術により $10^5$ pfuを脳腫瘍内に単回投与し、その4-9日後に腫瘍摘出を行ってウイルス複製の有無について解析した(文献10)。2例で、摘出腫瘍組織から感染性ウイルスが検出された。PCRでは10例の投与部位から1716のDNAが検出された。1例において、投与5日後(腫瘍摘出の翌日)の血清からHSV-1のDNAがPCRで検出され、その後速やかに陰性化した。他の11例では一度も血清中からHSV-1のDNAは検出されなかった。

## IV 生物多様性影響評価

### 1 他の微生物を減少させる性質

#### (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

G47Δの感染性は野生型HSV-1と同一と考えられ、微生物に感染するとの報告はない。また、G47Δは腫瘍細胞でのみウイルス複製が可能であることから、自然界では伝搬・複製し得ない。有害物質の産生もなく、競合や有害物質の産生により他の微生物を減少させることはないと考えられる。よって、影響を受ける可能性のある微生物は特定されなかった。

#### (2) 影響の具体的内容の評価

(該当せず。)

#### (3) 影響の生じやすさの評価

(該当せず。)

#### (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

よって、他の微生物を減少させる性質について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

### 2 病原性

#### (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

G47Δの感染性は野生型HSV-1と同一と考えられるので、自然宿主はヒトのみである。さらに、腫瘍細胞でのみウイルス複製が可能であることから、自然界では伝搬・複製し得ない。なお、実験室内で用いられる一部の系統のマウス、ラット、ハムスター、ウサギ、またはサルは感受性があり、注射等による接種によりG47Δを感染させることができる。

#### (2) 影響の具体的内容の評価

G47Δは投与されたヒトの腫瘍細胞に限局してウイルス複製を行い、ヒト正常組織に対しては病原性がない。欧米において遺伝子組換えHSV-1を用いたウイルス療法の臨床試験が複数完了した進行中であるが、重大な有害事象や死亡の報告はなく、環境への悪影響に関する報告もない(文献8-13)。G47Δにはウイルス複製を検出するために大腸菌LacZ遺伝子cDNAが挿入されており、G47Δが複製する腫瘍細胞に導入され、一過性に発現される。LacZ遺伝子からの生成物であるβ-ガラクトシダーゼは人体に対し毒性や病原性を有しない。LacZ遺伝子を発現する第二世代複製型遺伝子組換えHSV-1であるG207が第I相臨床試

験において人の脳内（脳腫瘍内）に投与されており、LacZ遺伝子生成物の安全性は示されている。G47Δに加えられた遺伝子変異はHSV-1ゲノム上の離れた4箇所（3つの遺伝子）に位置しているため、G47Δ由来の遺伝子組換え生物に該当する野生型復元HSV-1が自然に生じる可能性も無に等しい。

(3) 影響の生じやすさの評価

第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法による限り、G47Δの環境中への拡散は防止され、また自然界においてG47Δが伝搬・複製し得ないことから、G47Δが被験者以外に病原性を示す可能性は極めて低いと考えられる。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

よって、病原性について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

### 3 有害物質の産生性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

G47Δの有害物質の産生性は知られておらず、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

(該当せず。)

(3) 影響の生じやすさの評価

(該当せず。)

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

よって、有害物質の産生性について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

#### 4 核酸を水平伝達する性質

##### (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

G47Δの感染性は野生型HSV-1と同一と考えられるので、自然界で感染する対象はヒトのみである。実験室内では、感受性のある一部のマウス、ラット、ハムスター、ウサギ、またはサルには注射等による接種により感染させることができ、ワクチンや遺伝子組換えHSV-1の安全性評価に使用されている。

##### (2) 影響の具体的内容の評価

G47Δの投与を受けたヒトでは、腫瘍内に限局して複製したG47Δが生じるが、これは体外へ排泄される可能性は極めて低く、また腫瘍細胞以外でのウイルス複製能を有さず、これによる他の哺乳類への核酸の水平伝達は知られていない。

##### (3) 影響の生じやすさの評価

第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、G47Δの環境中への拡散は防止される。G47Δは正常細胞でのウイルス複製能を失っているため、自然界では繁殖し得ない。さらに、G47Δの自然界での感染対象は野生型HSV-1と同様にヒトに限られること、及びヒトからヒトへ腫瘍細胞を介して直接水平伝達して複製することはほぼ不可能であることを考慮すると、影響の生じやすさは極めて低いと考えられる。G47ΔはHSV-1ゲノム上の離れた4箇所（3つの遺伝子）に変異が加えられているため、G47Δ由来の遺伝子組換え生物に該当する野生型復元HSV-1が自然に生じる可能性も無に等しい。

##### (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

よって、核酸を水平伝達する性質について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

#### 5 その他の性質

なし。

## V 総合的評価

G47Δが感染する動植物等の種類は野生型HSV-1と同等で、ヒトを自然宿主とし、自然界で他のほ乳動物、植物及び微生物には感染したり拡散したりするという報告はない。

第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、G47Δの環境中への拡散は防止される。G47ΔによるLacZ遺伝子の一過性発現はヒトに病原性をもたないので、ヒトに対する影響はないと考えられる。

さらに、G47Δは腫瘍細胞に限って複製することが可能で、正常細胞でのウイルス複製能を失っているため、自然界で伝播し増えることができない。環境中の別個体のヒトの腫瘍細胞にG47Δが直接水平感染する可能性は極めて低く、G47Δが環境中に拡散する可能性は無に等しい。

G47ΔはHSV-1ゲノム上の離れた4箇所（3つの遺伝子）に変異が加えられているため、G47Δ由来の遺伝子組換え生物に該当する野生型復元HSV-1が自然に生じる可能性も無に等しい。

従って、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、G47Δによる生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

第 77 回 科学技術部会	資料 4
平成 25 年 4 月 18 日	

## 遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律に基づく第一種使用規程の審議について（案）

平成 25 年 4 月 18 日  
大臣官房厚生科学課

### 1. 現状と課題

- (1) 遺伝子治療臨床研究においてウイルスベクター等の遺伝子組み換え生物を使用しようとする者は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づき、第一種使用規程を定め、厚生労働大臣の承認を受ける必要がある。
- (2) 第一種使用規程の承認申請があった場合、厚生労働大臣は学識経験者の意見を聴いた上で承認の可否を判断することとされており、この学識経験者の意見を聴く場として、具体的には、「遺伝子治療臨床研究に係る生物多様性影響評価に関する作業委員会」（注）を開催して審議した上、その結果を科学技術部会に報告して審議が行われてきたところである。

注）当該委員会は、平成 25 年 4 月 1 日をもって遺伝子治療臨床研究作業委員会と統合し、現在は「遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会」となっている。以下では、従前の委員会及び統合後の新たな委員会を特に区別せず、「委員会」という。

- (3) 一方、遺伝子治療臨床研究の実施件数の増加に伴い、すでに承認を受けた第一種使用規程と類似の第一種使用規程の承認申請が行われる場合もあり、このような場合については、必ずしも委員会を招集して審議を行う必要がない場合もあると考えられる。

### 2. 対応（案）

- (1) 審議の効率化を図る観点から、申請された第一種使用規程の内容に応じて、委員会を持ち回りで開催（メール等の手段により委員の意見を集約する。）した上で、科学技術部会に報告できることとする。
- (2) 委員会を持ち回りで開催する場合としては、遺伝子組換え生物の種類や使用方法がすでに承認を受けた第一種使用規程と比べて新規性が乏しい等の場合であって、当該遺伝子組換え生物の使用による生物多様性影響評価についてメール等の手段により意見の集約が可能であると委員長が判断する場合とする。

### 3. 参考

- (1) 「遺伝子治療臨床研究に関する指針」においては、申請された遺伝子治療臨床研究実施計画について、有識者の意見を聴いた上で、遺伝子導入方法、対象疾患等に新規性がなく、その他個別の審査を必要とするような事項を含まないと判断される場合は、厚生科学審議会における審議を行わずに厚生労働大臣の意見を回答することができる」とされている。

#### 【参照】

- 遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（平成15年法律第97号）（抄）

（遺伝子組換え生物等の第一種使用等に係る第一種使用規程の承認）

第4条 遺伝子組換え生物等を作成し又は輸入して第一種使用等をしようとする者その他の遺伝子組換え生物等の第一種使用等をしようとする者は、遺伝子組換え生物等の種類ごとにその第一種使用等に関する規程（以下「第一種使用規程」という。）を定め、これにつき主務大臣の承認を受けなければならない。（後略）

- 4 主務大臣は、第一項の承認の申請があった場合には、主務省令で定めるところにより、当該申請に係る第一種使用規程について、生物多様性影響に関し専門の学識経験を有する者（以下「学識経験者」という。）の意見を聴かなければならない。

注）第一種使用等・・・遺伝子組み換え生物等の使用等のうち環境中への拡散防止措置を執らずに行う使用等のこと。

- 遺伝子治療臨床研究に関する指針（平成14年3月27日文科科学省・厚生労働省告示）

#### 第五章 厚生労働大臣の意見等

##### 第一 厚生労働大臣の意見

三 厚生労働大臣は、二に基づき意見を求められた場合において、複数の有識者の意見を踏まえ、当該遺伝子治療臨床研究が次に掲げる事項のいずれかに該当すると判断するときは、当該遺伝子治療臨床研究の医療上の有用性及び倫理性について厚生科学審議会の意見を聴くものとする。

1 疾病の治療のための遺伝子が組み込まれたDNA又はこれを含むウイルスその他の粒子であって、当該遺伝子を細胞内に導入する際に用いられる新規のもの又は新規の遺伝子投与方法を用いていること。

2 新規の疾病を対象としていること。

3 新規の遺伝子治療方法を用いていること（1又は2に該当するものを除く。）。

4 その他個別の審査を必要とするような事項を含んでいること。

四 厚生労働大臣は、三の規定による厚生科学審議会からの意見の聴取が必要ないと判断する場合には、意見を求められた日から三十日以内に、当該遺伝子治療臨床研究の実施に関し意見を述べるものとする。

## ヒト幹細胞臨床研究実施計画の申請について

【諮問・付議】	.....	P. 1
【申請書・概要・計画書】		
○ 大阪大学医学部附属病院		
小児重症心筋症に対する自己由来細胞シート移植による新たな治療法の開発		P. 3
○ 奈良県立医科大学		
関節鏡視下自己骨髄間葉系細胞移植による関節軟骨欠損修復		P. 20

厚科審第17号

平成25年3月26日

科学技術部会部会長

永井良三 殿

厚生科学審議会会長

永井良三



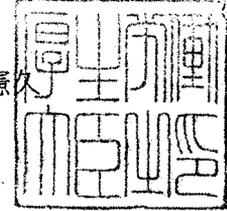
ヒト幹細胞臨床研究実施計画について（付議）

標記について、平成25年3月25日付け厚生労働省発医政0325第9号をもって厚生労働大臣より諮問があったので、厚生科学審議会運営規程第3条の規定に基づき、貴部会において審議方願いたい。

厚生労働省発医政 0325 第 9 号  
平成 25 年 3 月 25 日

厚生科学審議会会長  
永井 良三 殿

厚生労働大臣 田村 憲久



諮 問 書

下記のヒト幹細胞臨床研究実施計画について、その医療上の有用性及び倫理性に関し、厚生労働省設置法（平成11年法律第97号）第8条第1項イ及びヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針（平成22年厚生労働省告示第380号）の規定に基づき、貴会の意見を求めます。

記

1. 平成24年12月26日に大阪大学医学部附属病院、病院長から提出された「小児重症心筋症に対する自己由来細胞シート移植による新たな治療法の開発」計画
2. 平成25年3月6日に奈良県立医科大学、学長から提出された「関節鏡視下自己骨髄間葉系細胞移植による関節軟骨欠損修復」計画

ヒト幹細胞臨床研究実施計画申請書

平成 24 年 12 月 26 日

厚生労働大臣 殿

研究機関	所在地	〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-15	
	名称	大阪大学医学部附属病院	06-6879-6551 (電話番号) 06-6879-6549 (FAX 番号)
	研究機関の長 役職名・氏名	大阪大学医学部附属病院長	吉川 秀樹

下記のヒト幹細胞臨床研究について、別添のとおり実施計画書に対する意見を求めます。

記

ヒト幹細胞臨床研究の課題名	研究責任者の所属・職・氏名
小児重症心筋症に対する自己由来細胞シート移植による新たな治療法の開発	大阪大学大学院医学系研究科 外科学講座 心臓血管外科学 教授 澤 芳樹

ヒト幹細胞臨床研究実施計画の概要

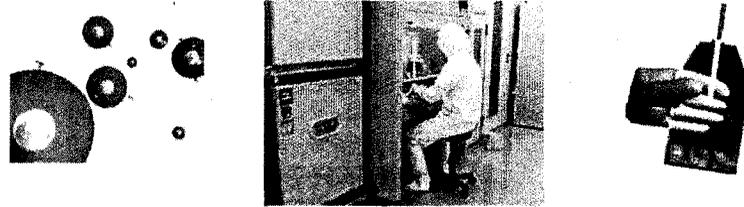
研究課題名	小児重症心筋症に対する自己由来細胞シート移植による新たな治療法の開発
申請年月日	平成24年12月26日
実施施設及び研究責任者	実施施設：大阪大学医学部附属病院 研究責任者：澤 芳樹
対象疾患	小児重症心筋症
ヒト幹細胞の種類	骨格筋筋芽細胞
実施期間及び対象症例数	5年間 目標症例数：15例
治療研究の概要	標準的心不全治療を行っても改善が認められない小児重症心筋症患者に対し、自己の腓腹筋から単離した筋芽細胞を、温度応答性培養皿を用いてシート化し、心臓外壁に移植する。
その他（外国での状況等）	申請者らは、小動物のみならずイヌやブタ心不全モデルに対して、筋芽細胞シート移植を行い有効性を確認している。またヒト成人の拡張型心筋症及び虚血型心筋症に対しても実施している（重症心筋症に対する自己由来細胞シート移植による新たな治療法の開発：大臣意見2009年7月30日発出）。さらにテルモにより成人虚血型心筋症に対し治験が開始されている。
新規性について	本研究は、小児心筋症に対し筋芽細胞シート移植を実施する点で新規性がある。

**骨格筋採取**



麻醉下に腓腹筋から骨格筋を3g以上採取

**細胞培養・単離**



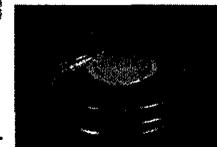
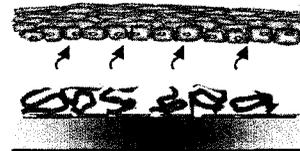
Cell Processing Center にて筋芽細胞を単離・培養

**筋芽細胞シート作成**

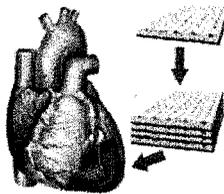
温度応答性培養皿への細胞播種



筋芽細胞シート化



**シート移植術**



全身麻醉下、開胸で心表面に筋芽細胞シートを移植

## ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

臨床研究の名称		小児重症心筋症に対する自己由来細胞シート移植による新たな治療法の開発		
研究機関				
	名称	大阪大学医学部附属病院		
	所在地	〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2		
	電話番号	06-6879-5111		
	FAX 番号	06-6879-5207		
研究機関の長				
	役職	病院長		
	氏名	吉川 秀樹 <span style="float: right;">印</span>		
研究責任者				
	所属	大阪大学大学院医学系研究科外科学臨床研究医学専攻 外科学講座心臓血管外科学		
	役職	教授		
	氏名	澤 芳樹 <span style="float: right;">印</span>		
	連絡先	Tel/Fax	Tel : 06-6879-3160 /Fax : 06-6879-3159	
		E-mail	sawa@surg1.med.osaka-u.ac.jp	
	最終学歴	大阪大学医学部		
	専攻科目	心臓血管外科		
その他の研究者		別紙 1 参照		
共同研究機関（該当する場合のみ記載してください）				
	名称			
	所在地	〒		
	電話番号			
	FAX 番号			
共同研究機関の長（該当する場合のみ記載してください）				
	役職			
	氏名			
臨床研究の目的・意義		小児重症心筋症患者を対象として、標準的心不全治療を行っても有症状の患者に対して、培養骨格筋芽細胞シート移植術に基づく再生療法の安全性を評価することを目的とする。主要評価項目は有害事象の観察(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。		

本臨床研究の意義は、小児重症心筋症患者を対象とした、筋芽細胞シート移植の安全性を明らかにし、心臓移植医療までのブリッジ治療の一つとして本移植術による治療法を確立することであり、小児領域における再生医療の基礎を築くことである。この治療法の確立により、移植までの待機期間が長期に及んだ場合でもより安全に過ごすことができるほか、LVAS装着及び心臓移植を回避出来る可能性があるものとする。

本臨床研究による治療法の確立により、小児重症心筋症患者の生活の質の向上、及び早期の社会生活への復帰の実現に大きく寄与することが期待される。

臨床研究の対象疾患

名称	小児重症心筋症
選定理由	<p>内科的治療が奏効しない小児重症心筋症患者の根治的治療法は、心臓移植しかない。しかし、小児重症心筋症患者の移植適応判定後の平均生存期間は7.5ヶ月と短い。</p> <p>本邦では、小児心臓移植ドナーが絶対的に不足しているため、移植待機期間の長期化が懸念される。その一方で、本邦での小児重症心筋症患者に対する移植までのブリッジ治療は確立されていないため、待機期間中の症状の悪化も懸念される。</p> <p>これらのことから、小児重症心筋症患者に対し、新規の治療方法を確立する必要がある。</p> <p>また、小児期の重症心筋症では、患者への負担を鑑み、通常心筋組織の生検を実施されることが少ない。そのため、病理学的診断により厳密に判断することが難しいと考え、今回の臨床研究では、臨床的診断による心筋症を対象疾患として設定した。ただし、本臨床研究に参加した被験者が、心臓移植や補助人工心臓装着術を受ける際には、臨床研究の評価をより厳密するため、組織採取に関する同意を得た上で、心筋組織を採取し、病理診断を行うこととする。</p>

被験者等の選定基準	<p>筋芽細胞シート移植術に必要な筋芽細胞は、患者自身の骨格筋から採取される。すなわち、本臨床研究における患者への介入は、この骨格筋採取行為から開始されていると考えられ、この骨格筋採取から筋芽細胞シート作成までの過程も評価の対象とする。本臨床研究では、この過程を明確にして症例登録を行い、筋芽細胞シート移植術の安全性の評価を行うために、以下の2段階の症例登録（骨格筋採取前の症例登録並びに筋芽細胞シート移植術実施前の症例登録）を行うこととする。</p>
-----------	--

**【被験者一次症例登録時の適格基準】**

本臨床研究への一次症例登録時に、以下の一次症例登録選択基準のすべての項目を満たし、一次症例登録除外基準のいずれの項目にもあてはまらない患者を被験者とする。

**【一次症例登録選択基準】**

以下に挙げたすべての項目を満たす患者を対象とする。

- 1) スクリーニング時の年齢が18歳以下の患者
- 2) 臨床的に重症心筋症と診断されている患者
- 3) 標準的心不全治療によっても改善が認められないNew York Heart Association (NYHA) III度以上(又は6歳以下の小児はRoss心機能分類III度以上)の心不全が持続しており、薬物治療が無効な重度の心不全を有している患者
- 4) スクリーニング時に心臓超音波検査で左室駆出率が35%以下の患者
- 5) 患者の代諾者および患者(16歳未満の場合は代諾者のみ)の文書によるインフォームド・コンセントが得られている患者

**【一次症例登録除外基準】**

- 1) 筋変性疾患を有している患者
- 2) 活動性の感染症を有する患者
- 3) 登録前5年以内に悪性腫瘍を有している患者
- 4) HIV、HBV、HCV、HTLV 陽性である患者
- 5) 機能的単心室の患者
- 6) 拘束型心筋症の患者
- 7) 不可逆性の肝腎機能障害を有している患者
- 8) 高度精神神経障害や染色体異常を有している患者
- 9) 高度の肺高血圧を有している患者
- 10) その他、研究責任者の判断により本臨床研究への参加が不適当と考えられる患者

**【被験者二次症例登録時の適格基準】**

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あてはまらない被験者を二次症例登録する。

**【二次症例登録選択基準】**

- 1) 一次症例登録が完了している患者
- 2) 筋芽細胞シート移植術に対する、代諾者および患者(16歳未

	<p>満の場合は代諾者のみ) の文書によるインフォームド・コンセントが得られている患者</p> <p>【二次症例登録除外基準】</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 自己細胞由来の筋芽細胞シート作製完了後の本臨床研究への参加継続を拒否した患者</li> <li>2) 筋芽細胞シート移植術のリスクとなるような原疾患の急速な増悪を認める患者</li> <li>3) 筋芽細胞シート移植術のリスクとなるような臓器不全が進行している患者</li> <li>4) その他、研究責任者の判断により、本臨床研究への参加継続が不相当と考えられる患者</li> </ol>
--	---

臨床研究に用いるヒト幹細胞	
種類	骨格筋筋芽細胞
由来	自己・非自己・株化細胞 生体由来・死体由来
採取、調製、移植又は投与の方法	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 外科手術の立案 一次症例登録完了後に、症例に応じて筋芽細胞シート移植術までに必要な外科手術（先天性心疾患手術、僧帽弁形成術、三尖弁形成術、両心室ペースングリード装着術、メイズ手術、及びカテーテル治療など）の計画を立てる（外科手術を計画しないことも可能である）。</li> <li>2) 自己骨格筋からの筋芽細胞の採取 一次症例登録完了後に、手術室において、全身麻酔にて腓腹筋より、骨格筋3g以上を採取する。</li> <li>3) 自己骨格筋から採取した筋芽細胞の培養 採取した骨格筋を保存溶液に浸漬し、大阪大学医学部附属病院未来医療開発部未来医療センターの細胞分離培養システム（Cell Processing Center : CPC）に搬送し、同施設にて筋芽細胞を単離し、移植細胞数に達するまで、3-4週間程度の継代培養を行う。筋芽細胞が移植細胞数に達したら凍結保存液にて-150℃で凍結保存する。筋芽細胞凍結時に培養上清の細菌、マイコプラズマ、エンドトキシンのチェックを行う。なお、筋芽細胞凍結時に実施計画書「7.2.2. 規格」に規定された品質を満たさない場合には、「2) 自己骨格筋からの筋芽細胞の採取」を再度実施する。2回実施しても「7.2.2. 規格」に規定された品質を満たさない場合には実施計画書「12.1. 被験者毎の中止基準」に従う。</li> <li>4) 筋芽細胞シートの作製</li> </ol>

		<p>筋芽細胞解凍後、温度応答性培養皿に播種する。培養終了後、温度応答性培養皿内で細胞シートが剥離していることを確認後、出荷判定を行う。その後、筋芽細胞シートを手術室へ搬入する。なお、筋芽細胞シートの作製時に実施計画書「7.2.2.規格」に規定された品質を満たさない場合もしくは筋芽細胞シートの剥離が確認できない場合には、「2) 自己骨格筋からの筋芽細胞の採取」を再度実施する。2回実施しても実施計画書「7.2.2.規格」に規定された品質を満たさない場合には実施計画書「12.1. 被験者毎の中止基準」に従う。</p> <p>5) 筋芽細胞シート移植術</p> <p>筋芽細胞シート移植術は、左側開胸又は胸骨正中切開にて筋芽細胞シート移植を行う。筋芽細胞シート移植術と他の必要な外科手術を同時に行う場合は、先に他の外科手術を行い、その後、同術野より筋芽細胞シートを移植する。移植後は、フィブリン糊を噴霧して、筋芽細胞シートを固定する。体重換算をすることにより総細胞数<math>6 \times 10^6</math> cells/kg以上のシートを移植する。</p> <p>なお、これまでの臨床研究の結果から、懸念される重篤な不整脈の発生予測及びリスク低減のために、移植後は入院することとし、継続的な観察と速やかな対応が行える環境とする。</p>
	調製（加工）工程	有・無
	非自己由来材料使用	有・無 動物種（ウシ）
	複数機関での実施	有・無
	他の医療機関への授与・販売	有・無
安全性についての評価	<p>一次症例登録後から、研究参加期間終了までに生じたあらゆる有害事象を観察する（有害事象名、持続期間、重症度、重篤度、処置、転帰、プロトコル治療との因果関係）</p>	
臨床研究の実施が可能であると判断した理由	<p>我々は、心筋細胞へのリモデリング抑制を伴う心機能改善治療法として、細胞移植治療を開発してきた。温度応答性培養皿を用いた細胞シート工学の技術により、細胞間接合を保持した細胞シート作成技術の心筋再生治療への応用を試みてきた。温度応答性培養皿を用いて筋芽細胞シートを作成し、ラット心筋梗塞モデル、DCMハムスターならびにイヌDCM様モデルを用いた大動物前臨床研究を行い、心機能改善効果を示すことを明らかにした。そして、これらの研究結果に基づき、成人LVAS装着患者に対する自己由来筋芽細胞シート移植術、成人LVAS未装着拡張型心筋症患者、虚血性心筋症患者を対象に、自己由来筋芽細胞シート移植術という新たな心不全治療を試みており、その安全性と有効性</p>	

	<p>が確立されつつある。</p> <p>また、我々は、幼若ミニブタと成獣ミニブタの筋芽細胞シートの特性を比較した。その結果、筋芽細胞シートの基本的な特性(性状、生存率、純度等)に幼若ミニブタと成獣ミニブタでは相違は認められなかった。しかし、幼若ミニブタの筋芽細胞シートは、成獣の筋芽細胞シートに比べて、分化能が高く、生存期間が長いことが示唆され、放出されるサイトカイン量も多いことが示唆された。したがって、人間においても、成人と比べて、小児に対する治療効果の方がより良い事が予想される。</p> <p>さらに、小児の骨格筋は、成人の骨格筋よりも、効率よく筋芽細胞を単離できる。</p> <p>これらの前臨床研究及び臨床研究の結果から、小児期重症心筋症患者に対しても筋芽細胞シートを用いた細胞移植治療が可能であると判断した。</p> <p>なお、本臨床研究では、小児期の患者から自己骨格筋を採取することを鑑み、成長障害を起こす可能性が少ない腓腹筋より採取することとした。</p>
臨床研究の実施計画	<p><b>デザインの型</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 単施設</li> <li>2) 試験の相：探索的臨床研究</li> <li>3) デザインの型：単群</li> <li>4) 対照：非対照</li> <li>5) ランダム化：無</li> <li>6) 遮蔽化：無</li> </ol> <p><b>目標登録被験者数・被験者登録期間・研究実施期間</b></p> <p>目標登録被験者数：二次症例登録被験者として、15例</p> <p>被験者登録期間：4年（本実施計画書が承認され、病院長の実施許可が通知された日を研究開始とし、それから4年間、被験者一次症例登録を受理する）</p> <p>研究実施期間：5年（本実施計画書が承認され、病院長の実施許可が通知された日を研究開始とし、それから5年以内に最終被験者の研究参加を終了する）</p> <p><b>プロトコル治療の定義</b></p> <p>本臨床研究におけるプロトコル治療とは、「自己骨格筋からの筋芽細胞の採取」（全身麻酔による下肢腓腹筋採取）開始から「培養骨格筋筋芽細胞シート移植術」完遂までとする。</p>

一次症例登録後、90日以内にプロトコル治療を開始する。

#### 方法

「採取、調製、移植又は投与の方法」参照。

#### 併用治療

##### 1) 併用薬／治療

心不全治療薬剤に関しては、本臨床研究の被験者の安全性確保のため、プロトコル治療終了後も術前に服用していた以下の薬剤の服用を継続する。

- (1)  $\beta$ 遮断薬
- (2) ACE阻害薬
- (3) 利尿薬
- (4) 抗不整脈薬
- (5) その他の心不全治療薬

##### 2) 外科手術

一次症例登録完了後に症例に応じて立案した、筋芽細胞シート移植術までに必要な外科手術（先天性心疾患手術、僧帽弁形成術、三尖弁形成術、両心室ペーシングリード装着術、メイズ手術、及びカテーテル治療など）については、併用を可能とする。

#### 支持治療

##### 1) 致死性不整脈出現の場合

プロトコル治療中に致死性不整脈が検出された場合にはニフェカレントなどの抗不整脈薬等の適切な薬物治療を行う。治療抵抗性である場合には可能な場合植込み型除細動器（Implantable Cardioverter Defibrillator; ICD）を装着する。

#### 後治療

プロトコル治療終了後又はプロトコル治療中止後、被験者に致死性不整脈が検出された場合には「併用治療」及び「支持治療」と同様に適切な薬物治療を行う。当該不整脈が治療抵抗性である場合には可能な場合植込み型除細動器（ICD）を装着する。

#### 登録被験者の研究参加期間

被験者の研究参加期間は、一次症例登録日から移植後第24週の検





		<p>さらに、「有害事象手順書」に従い、病院長は、本臨床研究に関連する予期しない重篤な有害事象及び不具合等が発生した場合には、それに対する対応の状況と結果を公表し、厚生労働大臣に逐次報告する。研究期間のみならず研究終了後の追跡調査において重篤な有害事象や不具合が明らかになった場合も厚生労働大臣への報告を行う。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。</p>
臨床研究終了後の追跡調査の方法		<p>研究責任者は、研究終了後も有効性及び安全性の確保の観点から、定期的な経過観察のための診察等により、適当な期間の追跡調査を実施するとともに、必要に応じて、適切な措置を講ずるよう努める。</p> <p>研究責任者は、追跡調査の結果、重大な事態が認められた場合には、その結果について病院長に報告する。</p> <p>なお、臨床研究終了後の定期的外来診療で得られた追跡調査のデータは、解析には含めない。</p>
臨床研究に伴う補償		
	補償の有無	有 <input checked="" type="radio"/> 無
	補償が有る場合、その内容	<p>本臨床研究は補償保険が設定できないため、適切な補償保険への加入は不可能である。本臨床研究の実施に起因して有害事象又は不具合が発生し、被験者に健康被害が生じた場合は、適切な治療その他必要な措置を受けることができるように研究責任者及び大阪大学医学部附属病院が誠意を持って対応する。</p> <p>なお、研究責任者及び実施医療機関は、当該臨床研究において一切の金銭的利益を受けず、臨床研究の実施も研究費によってまかなわれている。そのため、生じた健康被害における医療費・医療手当の支給が困難であり、提供される治療等には、健康保険を適用し、その他の補償は行わない。</p>
個人情報保護の方法		
	連結可能匿名化の方法	<p>被験者（代諾者）の同意取得後はデータ管理、製造管理など、症例の取り扱いにおいては全て連結可能匿名化された被験者識別コード又は登録番号により管理され、匿名化コードと氏名の対照表及び氏名記載同意書は施錠可能な書類保管庫に厳重に保管する。</p>
	その他	<p>公表に際しては被験者の名前が直接公表されないことがない等、被験者の個人情報の保護については十分に配慮する。</p>
その他必要な事項 (細則を確認してください)		<p>① 当該研究に係る研究資金の調達方法</p> <p>本臨床研究に関して、外部からの資金提供はない。本臨床研究に関連する経費は大阪大学大学院医学系研究科心臓血管外科学講座</p>

	への研究費など自己調達した資金を使用する。
	② 既に実施されているヒト幹細胞臨床研究と比較して新規性が認められる事項
	<p>本臨床研究の新規性は、培養筋芽細胞シートの移植対象を小児重症心筋症患者に拡大することである。</p> <p>研究責任者らは、すでに成人の LVAS 非装着の重症心筋症 (DCM 及び ICM) 患者に対する筋芽細胞シート移植のヒト幹細胞臨床研究 (以下、「現行臨床研究」とする) を実施中*である。現行臨床研究は、安全性の評価を目的として実施している。</p> <p>小児期の重症心筋症に対しては、臓器提供の機会がきわめて少ないことによる心臓移植待機期間の長期化、及び心臓移植までのブリッジ治療としての補助人工心臓治療の未整備等の問題がある。これらの問題を解決するには、小児重症心筋症患者に対し、心臓移植までの待機期間を長期間より安全に過ごしてもらうことを目的に、新規の治療方法を確立する必要がある。研究責任者らは、現行臨床研究を小児重症心筋症患者に応用することで、小児重症心筋症患者に対する新規治療開発につながると考え、本臨床研究を計画した。</p> <p>なお、本臨床研究と現行臨床研究との間で、培養筋芽細胞シートの作製・移植手順に違いはない。</p> <p>*: 厚生労働省「ヒト幹指針への適合性が承認され我が国で実施されているヒト幹細胞臨床研究の一覧」の 15 番</p>

備考 1 各用紙の大きさは、日本工業規格 A4 とすること。

備考 2 本様式中に書ききれない場合は、適宜別紙を使用し、本様式に「別紙〇参照」と記載すること。

添付書類 (添付した書類にチェックを入れること)

- 研究者の略歴及び研究業績
- 研究機関の基準に合致した研究機関の施設の状況
- 臨床研究に用いるヒト幹細胞の品質等に関する研究成果
- 同様のヒト幹細胞臨床研究に関する内外の研究状況
- 臨床研究の概要をできる限り平易な用語を用いて記載した要旨
- インフォームド・コンセントにおける説明文書及び同意文書様式
- その他 (資料内容: 院内承認実施計画書 )
- その他 (資料内容: 症例報告書様式 )
- その他 (資料内容: アセント文書 )
- その他 (資料内容: ヒト幹細胞臨床研究審査委員会関連資料 )
- その他 (資料内容: 参考文献 )

臨床研究の概要をできる限り平易な用語を用いて記載した要旨

#### 【本研究の概要】

心筋症は、心筋の線維化が進行し心臓の収縮機能が低下する疾患群である。小児心筋症の原因には、拡張型心筋症（DCM）、肥大型心筋症（HCM）などの特発性心筋症、川崎病や冠動脈起始異常による虚血性心筋症（ICM）、先天的な形態異常に伴って起こる心筋症などがあげられる。いずれの疾患も、心筋の線維化が進み、病気の進行とともに治療に抵抗性となり、全身の臓器不全が進行する。標準的な内科的、外科的治療が無効な場合には、心臓移植を検討する。しかし、臓器提供の不足や、小児患者に対する補助人工心臓が未開発な点などが大きな問題となっている。

本研究の目的は、心臓移植しか治療法のない小児重症心筋症に対して、培養骨格筋筋芽細胞シート移植術に基づく再生医療の安全性を評価することである。

#### 【本研究の背景】

2010年7月改正臓器移植法案施行後、小児からの脳死下臓器提供が可能となり、日本での小児心臓移植が可能となった。小児慢性特定疾患治療研究事業で調査した小児心筋症患者は485人（平成22年度）である。その中で、心臓移植を考慮する患者は現在30~40人程度であるが、毎年その数は増加傾向にある。

小児重症心筋症の対照治療法としては、利尿剤、 $\beta$ 遮断薬、アンギオテンシン変換酵素阻害剤といった内科的治療が存在する。先天性形態異常を伴った心筋症には、外科的手術を行うことで心負荷を軽減させるといった治療を行う。しかし、これらの標準的治療法でも十分に奏効せず、心筋の線維化が進み心機能が低下する患者には、心臓移植しか根治的治療法がない。しかし、我が国では小児患者からの臓器提供の数は極めて少なく、移植待機期間は欧米と比べてもはるかに長期間になると予想される。移植待機期間中に心機能が増悪すれば補助人工心臓装着を余儀なくされるが、我が国では、体格の小さな患者に対して使用できる補助人工心臓がなく、また、大人用の補助人工心臓が装着可能な患者においても、感染症や脳血管合併症などの多くの問題を抱えている。

我々は、自己の骨格筋から単離した筋芽細胞を、温度応答性培養皿を使用してシート化し、心機能の落ちた心臓表面に移植することにより心機能改善を目指す新たな治療法を開発してきた。ラット心筋梗塞モデル、DCMハムスターならびに、イヌDCM様モデルに対する動物実験でも、温度応答性培養皿を用いて作成した筋芽細胞シートは心機能改善効果を示すことが明らかとなった。このような前臨床研究の結果に基づき、我々はDCMならびにICM患者を対象とした筋芽細胞シート移植の2つの臨床研究及び1つの治験を行った。現在までに合計16例の患者にシート移植術を施行し、この治療法は、安全かつ有効な治療法であるという結果が得られつつある。

【本研究の目的と意義】

本研究の意義は、これまで成人に適応してきた再生医療を小児患者へも適応拡大して、小児重症心筋症患者と対象とした自己細胞由来の筋芽細胞シート移植術の安全性を明らかにし、小児領域における新たな再生利用の確立の礎を築くことにある。

この治療法により、最終的には小児重症心筋症患者の生活の質の向上に大きく寄与することが期待される。

【対象疾患・目標症例数】

小児重症心筋症：15例

【評価項目】

主要評価項目：安全性評価：有害事象の有無、種類、重症度、安全度、発現頻度及び発現期間

副次評価項目：左心室機能の経時変化

培養骨格筋筋芽細胞シート移植術の完遂の可否

PedsQLTM を利用した被験者の QOL 評価

【観察スケジュール】

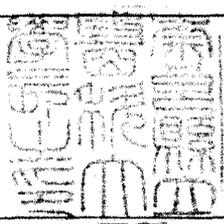
観察・検査・評価日	スクリーニング	一次症例登録	骨格筋採取前	骨格筋採取	筋芽細胞シート移植前	二次症例登録前検査	二次症例登録	筋芽細胞シート移植	筋芽細胞シート移植後					中止時
									移植直後	2週	4週	12週	24週	
実施許容範囲	一次症例登録前4週以内		一次症例登録後4週以内		移植前3週以内	二次症例登録前平日1日以内				±6日	±1週	±4週		
被験者背景	○													
臨床症状の観察	バイタルサイン		○		○	○			○	○	○	○	○	○
	身長		○										○	
	臨床症状	○		○		○			○	○	○	○	○	○
	身体所見			○		○			○	○	○	○	○	○
PedsQL™			○		○						○		○	○
血液検査	血液学的検査*		○		○	○			○	○	○	○	○	○
	生化学検査*		○		○	○			○	○	○	○	○	○

	ウイルス検査	○													
十二誘導心電図			○		○				○	○	○	○	○		
ホルター心電図			○								○		○		
心臓超音波検査		○	○		○	○				○	○	○	○	○	○
胸部 X 線	CTR		○						○	○	○	○	○	○	○
心臓カテーテル検査			○											○	
6 分間歩行 (可能な限り実施)					○									○	○
有害事象															→
併用治療															→

ヒト幹細胞臨床研究実施計画申請書

平成 25 年 3 月 6 日

厚生労働大臣 殿

研究機関	所在地	〒634-8522 奈良県橿原市四条町 840 番地
	名称	奈良県立医科大学
	研究機関の長 役職名・氏名	学長 吉 岡 章 

下記のヒト幹細胞臨床研究について、別添のとおり実施計画書に対する意見を求めます。

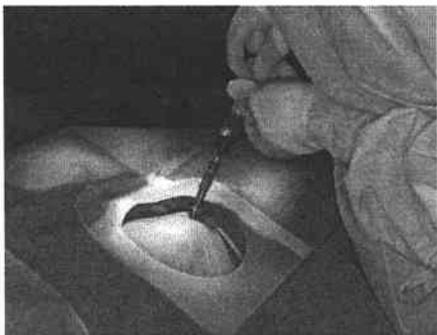
記

ヒト幹細胞臨床研究の課題名	研究責任者の所属・職・氏名
関節鏡視下自己骨髄間葉系細胞移植による関節軟骨欠損修復	整形外科学講座 教授 田 中 康 仁

### ヒト幹細胞臨床研究実施計画の概要

研究課題名	関節鏡視下自己骨髄間葉系細胞移植による関節軟骨欠損修復
申請年月日	平成25年3月6日
実施施設及び研究責任者	実施施設：奈良県立医科大学 研究責任者：田中 康仁
対象疾患	外傷性あるいは離断性骨軟骨炎による膝関節軟骨損傷
ヒト幹細胞の種類	自己骨髄間葉系細胞
実施期間及び対象症例数	病院長の実施許可通知から3年間は被験者登録期間とし、5年間は研究実施期間とする。対象症例数は細胞移植群40例、対照群40例。
治療研究の概要	有効性の評価を行う。腸骨より骨髄液を採取し、骨髄間葉系細胞を培養する。必要細胞数まで増やしたら、細胞浮遊液としてヒアルロン酸を加えて、関節内に移植する。
その他（外国での状況等）	米国 Genzyme Biosurgery 社は、1997年、自家軟骨細胞培養・移植法を開発し、FDAの認可を受け商品化した（Carticel®）が、従来の治療法を超える有用性は示せていない。我が国では広島大学がアテロコラーゲンゲルの中で自家軟骨細胞を三次元培養し、軟骨様組織を得て優れた成績を残している。信州大学、東海大学、大阪大学からの臨床研究に大臣意見が発出されている。
新規性について	関節鏡視下に投与するところに新規性がある。

病院施設



麻酔下に腸骨から  
骨髓液30mlを採取



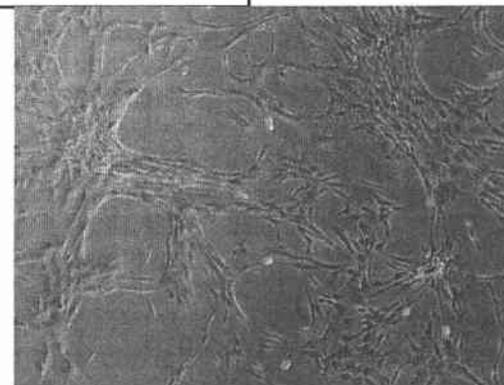
自己末梢血

輸送

細胞培養施設

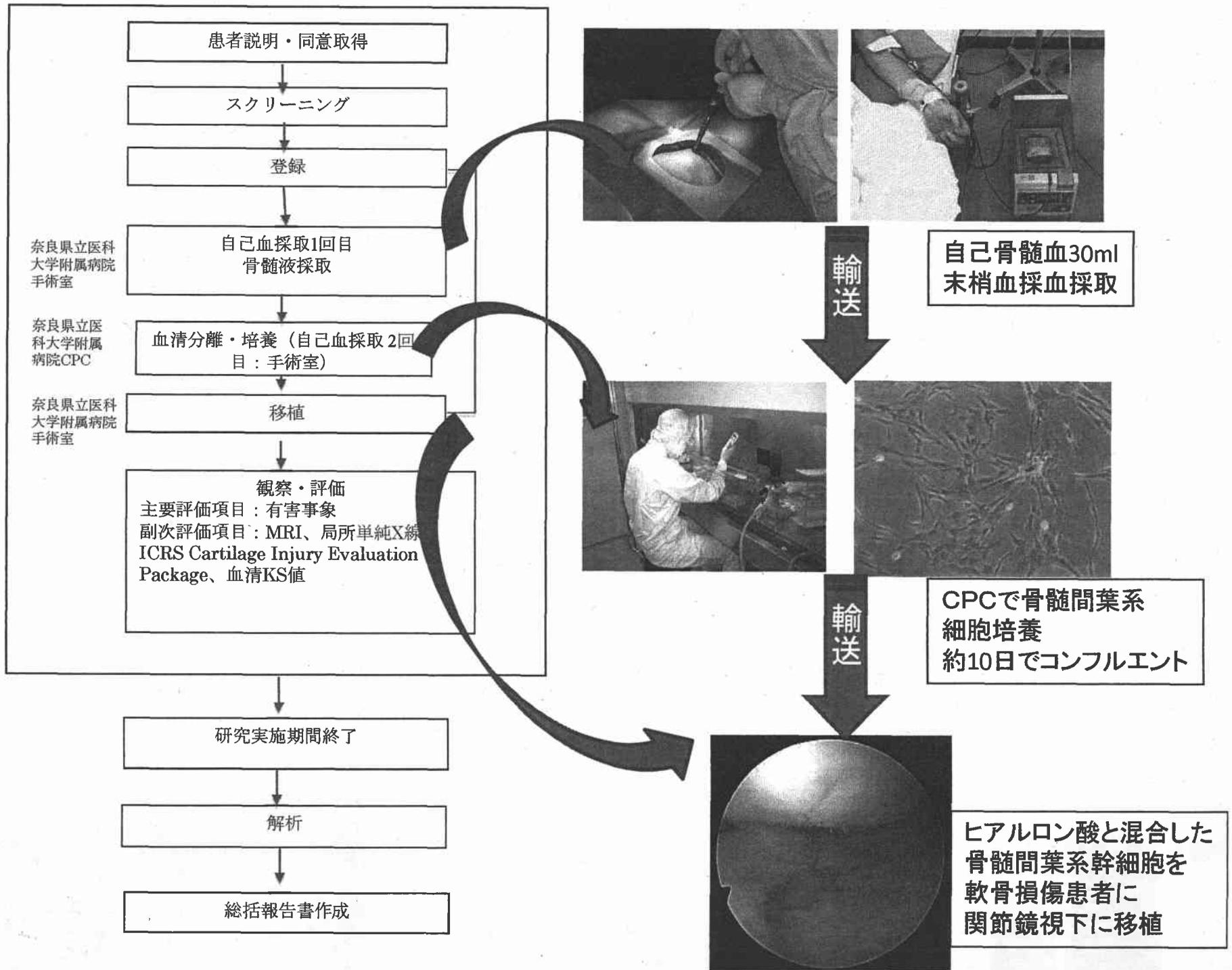


CPCで細胞培養



輸送

軟骨損傷患者に関節鏡視下に移植



## ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

臨床研究の名称		関節鏡視下自己骨髄間葉系細胞移植による関節軟骨欠損修復		
研究機関				
	名称	奈良県立医科大学		
	所在地	〒634-8521 奈良県橿原市四条町 840 番地		
	電話番号	0744-22-3051		
	FAX 番号	0744-25-6449		
研究機関の長				
	役職	学長		
	氏名	吉 岡 章		
研究責任者				
	所属	奈良県立医科大学 整形外科		
	役職	教授		
	氏名	田 中 康 仁		
	連絡先	Tel/Fax	Tel : 0744-22-3051/Fax : 0744-25-6449	
		E-mail	yatanaka@naramed-u.ac.jp	
	最終学歴	昭和59年3月 奈良県立医科大学医学部卒業		
専攻科目	整形外科学			
その他の研究者		別紙1参照		
共同研究機関（該当する場合のみ記載してください）				
	名称	広島大学		
	所在地	〒734-8553 広島市南区霞一丁目2番3号		
	電話番号	082-257-5233		
	FAX 番号	082-257-5615		
共同研究機関の長（該当する場合のみ記載してください）				
	役職	学長		
	氏名	浅 原 利 正		
臨床研究の目的・意義		本臨床研究の目的は、関節鏡下に、骨髄刺激法と自己骨髄間葉系細胞移植を併用した新たな関節軟骨欠損修復法の長期（48週）の安全性と有効性を、標準的治療である骨髄刺激療法単独と比較し、有効性において優れており、安全性において非劣性であると推定可能であるか否かを明らかにすることである。		

臨床研究の対象疾患		
	名称	外傷性損傷あるいは離断性骨軟骨炎に起因する膝関節軟骨損傷
	選定理由	一般的に膝関節軟骨損傷として、外傷性軟骨損傷、離断性骨軟骨炎、及び変形性関節症による損傷があげられるが、本臨床研究では外傷性損傷と離断性骨軟骨炎を対象とする。離断性骨軟骨炎は、詳細不明であるが小外傷の繰り返しが原因と考えられ、基本的に外傷性軟骨損傷の病態と大きく異なるためである。
被験者等の選定基準		<p>以下に挙げた全ての項目を満たす患者を選択する。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 対象疾患に対して骨髄刺激法の施行が予定されている患者</li> <li>2) MRIで関節軟骨の50%以上の損傷が認められる患者 (International Cartilage Repair Society (ICRS) articular cartilage injury classification (別添資料①) グレード3以上に相当)</li> <li>3) MRIで損傷面積が2cm<sup>2</sup>以上と診断された患者</li> <li>4) 同意取得時年齢が16歳以上、70歳以下の患者。ただし、中間評価が終了するまでは20歳未満の患者は登録しないこととする。</li> <li>5) 本人の文書による同意が得られている患者</li> <li>6) 本人が未成年の場合、本人に加え、法定代理人(代諾者)の文書による同意が得られている患者</li> </ol>
臨床研究に用いるヒト幹細胞		
	種類	自己培養骨髄間葉系細胞
	由来	自己・非自己・株化細胞 <del>生体由来</del> ・死体由来
	採取、調製、移植又は投与の方法	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 採取 奈良県立医科大学附属病院手術室で定められた手順書に従って約 30mL の自己骨髄液の採取を行い、直ちに血液搬送用クーラーボックスに保存して奈良県立医科大学セルプロセッシングセンター(CPC)に搬送する。</li> <li>2) 調整 奈良県立医科大学 CPC の使用に関する教育訓練を受けた臨床研究実施担当者が、CPC の試験物調製支援担当者と共に、施設で定められた手順書に従い、細胞及び血清の調製を行う。培養液に15%自己血清を加える。運び込まれた骨髄液約 30mL に培養液を加え T-75 フラスコで培養する。3日ごとに培養液を交換する、約3日後に接着細胞が出現する。赤血球等の非接着細胞は培養液交換の時に除去される。約10日後、培養細胞がサブコンフルエントに達したところで継代培養して、T-75 フラスコに播種する。約10日後、細胞がほぼコンフルエントに達したところで細胞を剥離、遠心分離し、自己血清を加え細胞浮遊液を作成しそこにヒアルロン酸を</li> </ol>

	<p>加え攪拌する。</p> <p>3) 移植方法</p> <p>2)で得られた試料を奈良県立医科大学へ搬送する。手術室で関節鏡手術を施行し軟骨欠損部を確認、同部に骨髄刺激法を施行する。試験物を関節内に注入し、創部を縫合し手術を終了する(標準治療群では、骨髄刺激法の施行のみ)。</p>
調製(加工)工程	㊦・無
非自己由来材料使用	有・㊦ 動物種( )
複数機関での実施	㊦・無
他の医療機関への授与・販売	有・㊦
安全性についての評価	<p>安全性の面に関しては、厚生労働省「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」の施行以前に我々が行った臨床研究で、培養骨髄細胞を搭載した人工足関節置換術を100例以上施行したが、有害事象を認めず、安全であると判断した。</p>
臨床研究の実施が可能であると判断した理由	<p>自己骨髄間葉系細胞移植により、関節軟骨修復が促進されることが、前臨床試験で明らかになっている。臨床的には、共同研究者の脇谷らが厚生労働省の「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」の施行以前に行った自己骨髄間葉系細胞移植に関する2つの臨床研究により、移植に伴う有害事象が認められなかったのと同様に、関節軟骨欠損修復が促進される可能性が明らかになっている。しかし従来の方法では、関節切開により関節を展開して自己骨髄間葉系細胞移植するために、手術侵襲が大きい。臨床的に、より一般的な治療法として確立することを目指すにあたっては、手術侵襲の小さい方法により移植が行われることが望ましい。</p> <p>関節鏡手術により関節軟骨欠損部を確認し同部に標準治療の一つである骨髄刺激法を施行し、同時に自己骨髄間葉系細胞を移植する今回のプロトコル治療は、我々がこれまでに行った2つの臨床研究におけるプロトコル治療と比較して、患者に与える侵襲が小さい(骨髄液採取、末梢血約400mL採血、及び関節内注射の侵襲のみ)。また、ラットの実験系でも、自己骨髄間葉系細胞関節内注入+骨髄刺激により、正常軟骨とほぼ同様の修復軟骨が得られ、組織学的スコアにおいても、骨髄刺激単独と比較して、有意な再生が得られている。以上のようなことから、臨床研究で実施が可能であると判断した。</p>

臨床研究の実施計画	<p>1. 自己末梢血液採取（細胞移植群のみ）</p> <p>プロトコル治療実施研究機関で約400mLの自己末梢血液採取を行い奈良県立医科大学セルプロッシングセンター（以下CPC）に輸送する。必要に応じて、1回目の自己血採取の1週間後（細胞培養開始後）にも、同様の手順で2回目の自己血採取並びに奈良県立医科大学CPCへの輸送を行う。</p> <p>2. 骨髄液の採取（細胞移植群のみ）</p> <p>奈良県立医科大学附属病院で定められた手順書に従って約30mLの自己骨髄液の採取を行い、直ちに血液搬送用クーラーボックスに保存してCPCに搬送する。温度変化はクーラーボックスに設置された温度センサーでチェックして記録する。</p> <p>3. 細胞、血清の調製（細胞移植群のみ）</p> <p>奈良県立医科大学CPCの使用に関する教育訓練を受けた臨床研究実施担当者が、CPCの試験物調製支援担当者と共同にて、施設で定められた手順書に従い、細胞及び血清の調製を行う。培養液に15%自己血清を加える。</p> <p>運び込まれた骨髄液約30mLに培養液を加えT-75フラスコで培養する。3日ごとに培養液を交換する、約3日後に接着細胞が出現する。赤血球等の非接着細胞は培養液交換の時に除去される。約10日後、培養細胞がサブコンフルエントに達したところで継代培養して、T-75フラスコに播種する。約10日後、細胞がほぼコンフルエントに達したところで細胞を剥離、遠心分離し、自己血清を加え細胞浮遊液を作成しそこにヒアルロン酸を加え攪拌する。</p> <p>4. 試験物の搬送（細胞移植群のみ）</p> <p>調製済みの試験物を搬送用クーラーボックスに入れて奈良県立医科大学CPCから手術室へ搬送する。温度変化はクーラーボックスに設置された温度センサーでチェックして記録する。</p> <p>5. 骨髄刺激法、及び骨髄間葉系細胞の移植手術（入院）</p> <p>搬送された細胞の品質管理成績をチェックし、定められた標準作業手順書に従って調製された細胞であることを確認する。関節鏡手術を施行し関節軟骨欠損部を確認、同部に骨髄刺激法を施行する。試験物を関節内に注入し、創部を縫合し手術を終了する（標準治療群では、骨髄刺激法の施行のみ）。術後は抗菌薬を投与して感染予防を行なう。</p>
被験者等に関するインフォームド・コンセント	
手続き	<p>研究責任者又は研究分担者は、本臨床研究への参加候補となる被験者本人に対して、同意説明文書を提供・使用し、口頭で十分な説明を行った後、本臨床研究への参加の同意を文書で取得する。なお、</p>

		被験者本人が未成年の場合は、本人に加え、法定代理人（代諾者）に対しても同意説明文書を使用し、口頭で十分な説明を行った後、本人及び法定代理人の本臨床研究への参加の同意を文書で取得する。
説明事項		①臨床研究の目的 ②臨床研究の意義 ③同意が任意のものであり、同意しない場合も不利益をうけないこと ④参加した後でも、撤回がいつでも可能であり、その場合も不利益を受けないこと ⑤代諾者からの同意取得の必要性 ⑥治療の方法（研究対象者として選定された理由等） ⑦期待される結果及び起こりうる危険性・不都合 ⑧他の治療方法 ⑨個人情報への取扱い ⑩研究結果の提供 ⑪研究成果の公表 ⑫費用負担に関する事 ⑬臨床研究の資金源 ⑭知的財産権等の帰属 ⑮補償の有無 ⑯研究終了後の対応 ⑰試料(資料)の保存・保存期間及び使用方法 ⑱臨床研究の開示 ⑲問い合わせ先（研究機関名・研究者等の氏名、職名・連絡先等）
単独でインフォームド・コンセントを与えることが困難な者を被験者等とする臨床研究の場合		
	研究が必要不可欠である理由	
	代諾者の選定理由	
被験者等に対して重大な事態が生じた場合の対処方法		有害事象の発現に際しては、適切な処置を施し、被験者の安全の確保に留意し、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十分な医療措置を講じる。 当該参加研究機関の研究責任者は、症例報告書に有害事象名、発現日、程度、重篤か否か、経過及び本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、特に本臨床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、当該症例の担当医師は、本臨床研究において別途定められた「重篤な有害事象発生時の報告・対応

	手順書」(別添資料②)に従い、当該研究機関の研究責任者、研究機関の長及び関連部署、ならびに研究事務局(研究総括責任者、副総括責任者)に対し、発生を知った時点から72時間以内に一次報告を行い、7日以内に二次報告を行う。一次報告、二次報告、及びその他必要な報告を基に、効果安全性評価委員会が本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・勧告等を行い、また各研究機関の倫理審査委員会による意見などとも合わせ、必要に応じて臨床研究を中止等の対処を行う。
臨床研究終了後の追跡調査の方法	定期的に来院通院による診察、血液検査、レントゲン、MRI検査を行う。
臨床研究に伴う補償	
補償の有無	⑤・無
補償が有る場合、その内容	本臨床研究に起因する有害事象が発生した場合、研究責任者は医学上最善の処置を取る事により被験者の回復に努める。また、本臨床研究は臨床研究補償保険に加入しており、本研究の実施に起因して、過失によらず死亡または重篤な有害事象等の健康被害が生じた際には、その被害が被験者の責に帰すべき事由により引き起こされた等の免責事由に相当する場合を除いて、臨床研究補償保険によって補償される。
個人情報保護の方法	
連結可能匿名化の方法	<p>1) 被験者名簿の作成</p> <p>研究責任者、研究分担者又は研究協力者は、臨床研究参加に文書で同意を得た患者に対して、被験者識別コードを付与し、「被験者名簿」に記載する。研究責任者は被験者名簿を保管する。</p> <p>被験者識別コードは、プロトコル治療実施研究機関を特定する6桁の英数字、被験者を特定する3桁の数字から構成される。後者の3桁は同意を取得した患者に001番から順に番号を付与する。</p> <p>2) 症例登録票の作成</p> <p>研究責任者又は研究分担者は、患者背景及びスクリーニング結果に基づいて、登録時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該当しないことを確認し、「症例登録票」に必要事項をすべて記載する。</p> <p>3) 被験者の登録</p> <p>症例登録は、インターネット医学研究データセンター(UMIN)のweb登録システムにより行う。</p> <p>登録用webサイトURL: <a href="http://indice.umin.ac.jp">http://indice.umin.ac.jp</a></p> <p>マニュアルに従って必要事項を入力し、被験者を登録する。</p>

		<p>登録結果については、データセンターへもメールで送付され、登録状況についてはデータセンターでも確認する。</p> <p>4) 被験者の割付</p> <p>登録された各被験者の標準治療群、あるいは細胞移植群のいずれかへの割付は、症例登録とともに、インターネット医学研究データセンター(UMIN)において、関節軟骨の損傷面積(2cm<sup>2</sup>以上4cm<sup>2</sup>未満、4cm<sup>2</sup>以上)、施設、年齢(20歳未満、20歳~39歳、40歳以上)を割付調整因子とした最小化法により無作為に割り付けられる。各登録被験者の割付結果については、被験者を登録した研究者及びデータセンターに通知される。</p> <p>5) プロトコル治療の開始</p> <p>研究責任者又は研究分担者は、web登録システムからの登録の完了ならびに割り付けられた治療群に従って、登録後の必要な検査及び治療を開始する。</p> <p>研究責任者、研究分担者又は研究協力者は、「症例登録確認書」又は「登録における不適格連絡書」を保管し、「症例登録確認書」に記載された登録番号を被験者名簿に記載する。</p> <p>被験者の同意取得後はデータ管理、製造管理など、症例の取り扱いにおいては全て連結可能匿名化された被験者識別コード又は登録番号により管理され、匿名化コードと氏名の対照表及び氏名記載同意書は施錠可能な書類保管庫に厳重に保管する。また、公表に際しては被験者の名前が直接公表されないことがない等、被験者の個人情報保護については十分に配慮する。</p>
	その他	
<p>その他必要な事項 (細則を確認してください)</p>	<p>① 当該研究に係る研究資金の調達方法</p> <p>本臨床研究で、奈良県立医科大学附属病院にて登録された症例の臨床研究実施にかかる費用は、奈良県立医科大学附属病院が負担する。</p> <p>② 既に実施されているヒト幹細胞臨床研究と比較して新規性が認められる事項:骨髄細胞も用いることや鏡視下手術という最少侵襲で手術が行われることである。また他施設で検討を行うことで方法や効果が客観的に評価され、また再現性も同時に評価される。</p> <p>③ 本研究は共同研究体制で行われる。</p>	

備考1 各用紙の大きさは、日本工業規格 A4 とすること。

備考2 本様式中に書ききれない場合は、適宜別紙を使用し、本様式に「別紙○参照」と記載すること。

添付書類（添付した書類にチェックを入れること）

- 研究者の略歴及び研究業績
- 研究機関の基準に合致した研究機関の施設の状況
- 臨床研究に用いるヒト幹細胞の品質等に関する研究成果
- 同様のヒト幹細胞臨床研究に関する内外の研究状況
- 臨床研究の概要をできる限り平易な用語を用いて記載した要旨
- インフォームド・コンセントにおける説明文書及び同意文書様式
- その他01（資料内容：奈良医大ポンチ）
- その他02（資料内容：実施計画書）
- その他03（資料内容：試験物概要書）
- その他04（資料内容：ICRS 分類）
- その他05（資料内容：koos-english）
- その他06（資料内容：重篤な有害事象発生時の報告・対応マニュアル）
- その他07（資料内容：重篤な有害事象の報告書様式（1次報告・2次報告・最終報告））
- その他08（資料内容：症例報告書（1・2・3・4・5））
- その他09（資料内容：関節軟骨再生培養細胞製品標準書）
- その他10（資料内容：製造依頼受付に関する手順書）
- その他11（資料内容：骨髓液の採取および採血に関する手順書）
- その他12（資料内容：骨髓細胞培養培地の調製に関する手順書）
- その他13（資料内容：骨髄間葉系細胞の培養に関する手順書）
- その他14（資料内容：ヒアルロン酸の混合に関する手順書）
- その他15（資料内容：間葉系細胞の表面マーカー検索に関する手順書）
- その他16（資料内容：試験物の搬送・受渡に関する手順書）
- その他17（資料内容：Anti-Anti COA）
- その他18（資料内容：Invitogen TrypLE Select COA）
- その他19（資料内容：培地 COA）
- その他20（資料内容：医療安全管理指針）
- その他21（資料内容：医の倫理委員会要録）
- その他22（資料内容：医の倫理委員会規程）
- その他23（資料内容：アルツ関節注添付文書）
- その他24（資料内容：ノボヘパリン添付文書）
- その他25（資料内容：）

## 臨床研究の概要をできる限り平易な用語を用いて記載した要旨

### <本研究の概要>

関節軟骨損傷は、若年者のスポーツ障害として多くみられるが、数年程度の短期の経過では症状が出にくく、これまでは確実な修復方法がないこともあり、放置されることが多い疾患であった。しかし、最近では長期の経過で変形性関節症になる可能性が高いことが明らかになり、修復することが望まれる。

骨髄間葉系細胞移植の利点は細胞を採取し増殖させた状態で移植できる事、正常軟骨を傷つける必要性がない事、また、軟骨だけでなく軟骨下骨の修復も期待できる事から従来の方法に比してより良い骨軟骨修復を得られる可能性があるものと考えられる。しかし従来の方法は関節を大きく展開するために手術侵襲が大きいという問題がある。

本研究の目的は、より手術侵襲の小さい方法の開発を計画した。関節鏡視下に骨髄刺激法を施行し、同時に自己骨髄間葉系細胞移植を行い、その関節軟骨修復への有効性・安全性を評価する事である。

### <本研究の背景>

変形性膝関節症患者は、現在我が国に1000万人以上存在すると考えられ、今後の高齢化社会の進行とともにますます患者数の増加する重要な疾患である。近年、変形性関節症の多くは軟骨損傷に由来すると考えられるようになってきた。すなわち若年期のスポーツ障害などで軟骨損傷を生じた場合、10年程度の経過で変形性関節症になると考えられる。従って、関節軟骨損傷を修復する方法があれば、スポーツ障害の治療法となるのみならず変形性関節症患者を減らすことができ、有用である。

現在、我が国において、確実に関節軟骨損傷を修復する方法はない。従来、このような軟骨障害に対する手術方法としては骨髄刺激法が行われてきた。この方法は軟骨下骨を削り出血させることで骨髄中の間葉系細胞を動員し修復を得る方法である。骨髄刺激法は簡便な方法であるが、これにより再生されるのは線維軟骨（関節軟骨の本来の組織は硝子軟骨）である。そこで、近年は硝子軟骨による修復を目指して自家骨軟骨柱移植法であるモザイクプラスチック、あるいは自己の関節軟骨を採取して培養後に損傷軟骨部に移植する培養軟骨細胞移植法が行われるようになってきた。両方法とも正常軟骨組織を採取して移植するため新たな軟骨障害を惹起する可能性が生じるという矛盾がある。通常、軟骨の採取部位として利用される大腿骨遠位外側の関節面においても相応の膝関節圧がかかっていることが報告されている。さらに、モザイクプラスチックでは欠損部が大きいほど大量の骨軟骨柱を必要とし、対応できる欠損の大きさには限界がある。また、打ち込む骨軟骨柱の深さを一定にして関節表面の曲率を再現することの難しさ、骨軟骨柱の間隙は数年経過しても残存することが指摘されている。培養軟骨細胞移植法においては、移植した組織が

周囲の関節軟骨や軟骨下骨との間で強固に結合するかは不明である。

我が国において、いくつかの施設で細胞移植による関節軟骨修復の臨床研究が行われているが、一部組織での小さな研究である。

我々は14年前から自己骨髄間葉系細胞移植による関節軟骨欠損修復の臨床研究を開始し、これまでに45関節に移植し、良好な臨床成績がえられ、しかも局所の腫瘍形成や感染を認めず安全な方法であること報告した。しかしながら従来の方法では関節を切開するために手術侵襲が大きいと言う問題がある。そこで関節鏡で行える方法の開発を計画した。

#### <本研究の目的・意義>

本研究では、現在のところ確実な治療方法のない関節軟骨欠損修復の新しい治療方法、しかも手術侵襲の小さい関節鏡視下手術で行える方法を開発することである。

より高度な臨床研究を行うために、骨髄刺激法のみコントロール群を設定し比較する、非盲検、ランダム化、並行比較試験とした。この方法の有用性が明らかになれば、企業治療をへて保険収載される道が開けやすいと考える。

この方法で多くの関節軟骨欠損患者の治療が可能になれば、現在治療方法のない、スポーツ障害などの軟骨損傷患者にとって福音となるのみならず、将来の変形性関節症患者を減らすことが可能であり、本研究の意義はきわめて高いといえる。

#### <対象疾患・目標症例数>

外傷性損傷あるいは離断性骨軟骨炎に起因する膝関節軟骨損傷患者  
対照群40例、細胞移植群40例（参加全施設合計）

#### <主要評価項目>

IKDC subjective score のプロトコル治療前と治療 48 週後における改善度

#### <副次評価項目>

MRI、単純 X 線、Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score、血清ケラタン硫酸値  
本臨床研究において生じた有害事象の種類と重症度、発現頻度、発現期間、因果関係

#### <観察検査項目及びスケジュールの概要>

局所感染症状：局所感染症状の有無

局所皮膚症状局所皮膚症状：腫脹の有無、発赤の有無、疼痛の有無

血液学的、血液生化学的検査：血清KS値を含む

観察時期：スクリーニング、術前検査、手術1週後（±2日）、2週後（±2日）、4週後（±1週）、12週後（±1週）、24週後（±8週）、48週後（±8週）もしくは中止時

局所単純X線、MRI

観察時期：スクリーニング、6週後（±1週）、24週後（±8週）、48週後（±8週）もしくは中止時

IKDC subjective score (IKDC subjective knee evaluation form)

Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score : KOOS

観察時期：スクリーニング、2週後（±2日）、6週後（±1週）、12週後（±1週）、24週後（±8週）、48週後（±8週）もしくは中止時

## ヒト幹細胞臨床研究実施計画に係る意見について

### 【意見書・概要・申請書・計画書】

- 広島大学病院  
関節鏡視下自己骨髄間葉系細胞移植による関節軟骨欠損修復 P. 1
- 大阪市立大学大学院医学研究科  
関節鏡視下自己骨髄間葉系細胞移植による関節軟骨欠損修復 P. 38
- 大阪大学医学部附属病院  
関節鏡視下自己骨髄間葉系細胞移植による関節軟骨欠損修復 P. 66
- 兵庫医科大学  
関節鏡視下自己骨髄間葉系細胞移植による関節軟骨欠損修復 P. 80
- 近畿大学医学部  
関節鏡視下自己骨髄間葉系細胞移植による関節軟骨欠損修復 P. 106
- 大阪大学医学部附属病院  
小児重症心筋症に対する自己由来細胞シート移植による新たな治療法の開発 P. 136

平成 25 年 4 月 18 日

広島大学病院から申請のあった  
ヒト幹細胞臨床研究実施計画に係る意見について

ヒト幹細胞臨床研究に関する  
審査委員会

委員長 永井良三

広島大学病院から申請のあった下記のヒト幹細胞臨床研究実施計画について、本審査委員会で検討を行い、その結果を別紙のとおりとりまとめたので報告いたします。

記

1. 関節鏡視下自己骨髄間葉系細胞移植による関節軟骨欠損修復  
申請者：広島大学病院 病院長 茶山 一彰  
申請日：平成 25 年 1 月 21 日

## 1. ヒト幹細胞臨床研究実施計画の概要

研究課題名	関節鏡視下自己骨髄間葉系細胞移植による関節軟骨欠損修復
申請年月日	平成25年1月21日
実施施設及び研究責任者	実施施設：広島大学病院 研究責任者：越智光夫
対象疾患	外傷性あるいは離断性骨軟骨炎による膝関節軟骨損傷
ヒト幹細胞の種類	自己骨髄間葉系細胞
実施期間及び対象症例数	病院長の実施許可通知から3年間を被験者登録期間とし、5年間を研究実施期間とする。対象症例数は細胞移植群40例、対照群40例。
治療研究の概要	有効性の評価を行う。腸骨より骨髄液を採取し、骨髄間葉系細胞を培養する。必要細胞数まで増やしたら、細胞浮遊液としてヒアルロン酸を加えて、関節内に移植する。
その他（外国での状況等）	米国 Genzyme Biosurgery 社は、1997 年、自家軟骨細胞培養・移植法を開発し、FDA の認可を受け商品化した (Carticel®) が、従来の治療法を超える有用性は示せていない。我が国では広島大学がアテロコラーゲンゲルの中で自家軟骨細胞を三次元培養し、軟骨様組織を得て優れた成績を残している。信州大学、東海大学、大阪大学からの臨床研究に大臣意見が発出されている。
新規性について	関節鏡視下に投与するところに新規性がある。

## 2. ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会における審議概要 (○) と主な変更内容 (●)

### 0) 審査回数

1回 (平成 25 年 2 月)

### 1) 第 1 回審議

①開催日時： 平成 25 年 2 月 6 日 (水) 16:00~18:00

(第 24 回 ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会)

### ②議事概要

平成 25 年 1 月 21 日付けで広島大学病院から申請のあったヒト幹細胞臨床研究実施計画 (対象疾患：関節軟骨欠損) について、申請者からの提出資料を基に、指針への適合性に関する議論が行われた。

各委員からの疑義・確認事項については、事務局で整理の上申請者に確認を依頼することとし、その結果を基に再度検討することとした。

(本審査委員会からの主な疑義・確認事項)

#### 1. プロトコールについて

○ 培養に用いるために必要に応じて 400ml の採血を 2 度行うことになっています。安全性等の問題点について説明してください。

- 「患者本人から末梢血 200~400ml の採血を行う前に血液検査を行い、Hb 値 11.0 g/dl 以上でないと採血しないことにします。」との返答を得た。

#### 2. 品質・安全性について

○ 培養での継代は一回だけと推察されますが、その通りでしょうか？また培養の打ち切り条件を示してください。

- 「培養の継代は一回です。培養の打ち切り条件は以下の通りとします。」との返答を得た。

#### 4. 品質・安全性について

○ 入退室手順書には CPC のセキュリティーに関する記載がない。具体的にどのような方法で保安管理をされているのか。

- 「CPC のセキュリティーに関しては、「細胞療法室利用者登録手順書」に従って細胞療法室利用登録者リストに登録された者だけが、IC カードを使って細胞療法室のロックを解除して入室でき、入退室の情報は自動的に記録されるシステムになっています。「HC-F-002 2.1 入室準備」に上記について追記しました。」との返答を得た。

## 2) 第2回審議

①委員会の開催はなし

②議事概要

前回の審議における本審査委員会からの疑義に対し、広島大学病院の資料が適切に提出されたことを受けて、疑義を提出していただいていた委員との間で審議を行った結果、当該ヒト幹細胞臨床研究実施計画を了承した。

## 3. ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会の検討結果

広島大学病院からのヒト幹細胞臨床研究実施計画（対象疾患：関節軟骨欠損）に関して、ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会は、主として倫理的および安全性等にかかる観点から以上の通り論点整理を進め、本実施計画の内容が倫理的・科学的に妥当であると判断した。

次回以降の科学技術部会に報告する。

病院施設



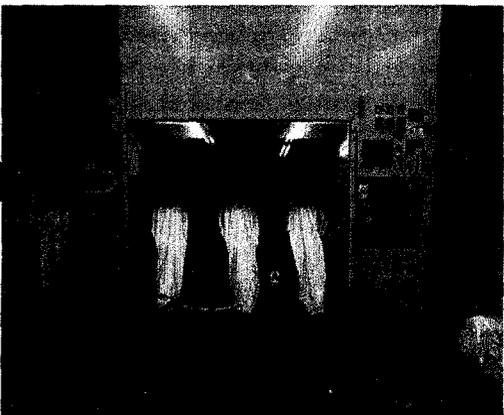
麻酔下に腸骨から  
骨髓液30mlを採取



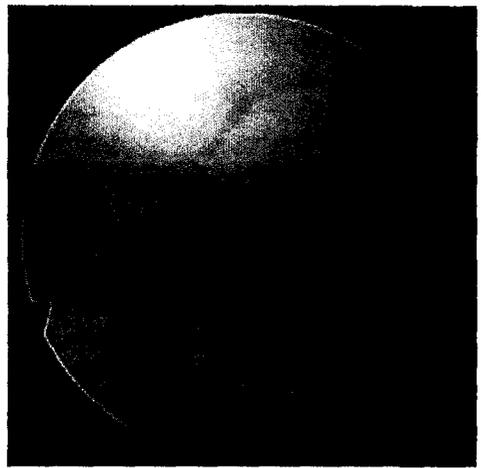
自己末梢血



細胞培養施設



CPCで細胞培養

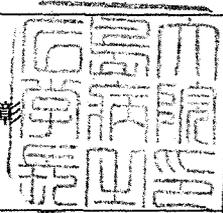


軟骨損傷患者に関節鏡視下に移植

ヒト幹細胞臨床研究実施計画申請書

平成25年 1月21日

厚生労働大臣 殿

研究機関	所在地	〒734-8551 広島県広島市南区霞1-2-3	
	名称	広島大学病院	082-257-1551 (電話番号) 082-257-5909 (FAX番号)
	研究機関の長 役職名・氏名	広島大学病院長	茶山 一彰 

下記のヒト幹細胞臨床研究について、別添のとおり実施計画書に対する意見を求めます。

記

ヒト幹細胞臨床研究の課題名	研究責任者の所属・職・氏名
関節鏡視下自己骨髄間葉系細胞移植による関節軟骨欠損修復	広島大学大学院医歯薬保健学研究院 整形外科学・教授・越智光夫

## ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

臨床研究の名称		関節鏡視下自己骨髄間葉系細胞移植による関節軟骨欠損修復		
研究機関				
	名称	広島大学病院		
	所在地	〒734-8551 広島県広島市南区霞 1-2-3		
	電話番号	082-257-1551		
	FAX 番号	082-257-5909		
研究機関の長				
	役職	病院長		
	氏名	茶山 一彰		
研究責任者				
	所属	広島大学大学院医歯薬保健学研究院 整形外科学		
	役職	教授		
	氏名	越智 光夫		
	連絡先	Tel/Fax	Tel : 082-257-5233 /Fax : 082-257-5234	
		E-mail	ochim@hiroshima-u.ac.jp	
	最終学歴	広島大学医学部医学科		
	専攻科目	整形外科学		
その他の研究者		別紙 1 参照		
共同研究機関（該当する場合のみ記載してください）				
	名称	大阪大学医学部附属病院 未来医療センター		
	所在地	〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-15		
	電話番号	06-6879-6551		
	FAX 番号	06-6879-6549		
共同研究機関の長（該当する場合のみ記載してください）				
	役職	センター長		
	氏名	吉峰 俊樹		
臨床研究の目的・意義		<p>本研究の目的：</p> <p>本臨床研究の目的は、関節鏡下に、骨髄刺激法と自己骨髄間葉系細胞移植を併用した新たな関節軟骨欠損修復法の長期（48 週）の安全性と有効性を、標準的治療である骨髄刺激療法単独と比較し、有効性において優れており、安全性において非劣性であると推定可能であるか否かを明らかにすることである。</p>		

	<p><b>本研究の意義：</b></p> <p>本臨床研究の意義は、膝関節軟骨欠損症患者を対象とした骨髄刺激法+自己骨髄間葉系細胞関節内注入法の安全性と、骨髄刺激法単独と比較した有効性を明らかにし、新たな再生医療の確立の礎を築くことにある。この治療法の確立により本治療法が先進医療（もしくは高度医療）として承認され、これまで有効な治療法が無かった本疾患に悩まされる患者全てに適応されることを目標とする。このことは最終的には膝関節軟骨欠損症病患者的の生活の質（QOL）の向上に大きく寄与することが期待される。</p>
臨床研究の対象疾患	
<p>名称</p> <p>選定理由</p>	<p>外傷性損傷あるいは離断性骨軟骨炎に起因する膝関節軟骨損傷</p> <p>一般的に膝関節軟骨損傷として、外傷性軟骨損傷、離断性骨軟骨炎、及び変形性関節症による損傷があげられるが、本臨床研究では外傷性損傷と離断性骨軟骨炎を対象とする。離断性骨軟骨炎は、詳細不明であるが小外傷の繰り返しが原因と考えられ、基本的に外傷性軟骨損傷の病態と大きく異ならないためである。変形性関節症では関節内の環境が変化している可能性があるために本臨床研究の対象からは除外する。</p>
被験者等の選定基準	<p><b>選択基準</b></p> <p>以下に挙げた全ての項目を満たす患者を選択する。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 対象疾患に対して骨髄刺激法の施行が予定されている患者</li> <li>2) MRIで関節軟骨の50%以上の損傷が認められる患者 (International Cartilage Repair Society (ICRS) articular cartilage injury classification (別添資料①) グレード3以上に相当)</li> <li>3) MRIで損傷面積が2cm<sup>2</sup>以上と診断された患者</li> <li>4) 同意取得時年齢が16歳以上、70歳以下の患者</li> <li>5) 本人の文書による同意が得られている患者</li> </ol> <p>本人が未成年の場合、本人に加え、法定代理人（代諾者）の文書による同意が得られている患者</p> <p><b>除外基準</b></p> <p>以下のいずれかの項目に該当する患者は、対象から除外する。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 本臨床研究への登録より2ヶ月以内に前十字靭帯、後十字靭帯いずれか、もしくは両方の靭帯再建術を施行された患者</li> <li>2) 活動性の癌を有する患者</li> <li>3) 妊娠中もしくは妊娠している可能性がある患者、又は授乳中</li> </ol>

	<p>の患者及び本臨床研究中に妊娠を希望する患者</p> <p>4) 感染症を有する患者 (HIV抗体、HBs抗原、HCV抗体、ATLA抗体のいずれかが陽性)</p> <p>5) 精神疾患を有する患者</p> <p>その他、本臨床研究への参加を研究責任者又は研究分担者が不適当と判断した患者</p>
臨床研究に用いるヒト幹細胞	
種類	自己骨髄間葉系細胞
由来	自己・非自己・株化細胞 生体由来・死体由来
採取、調製、移植又は投与の方法	<p>1.自己末梢血液採取 (細胞移植群のみ)</p> <p>プロトコル治療実施研究機関で約400mLの自己末梢血液採取を行い、血清を分離する。必要に応じて、1回目の自己血採取の1週間後 (細胞培養開始後) にも、同様の手順で2回目の自己血清採取を行う。</p> <p><u>ただし、自己血採取を行う前に血液検査を行い、Hb値が11.0 g/dl未満であった場合には自己血採取を中止する。</u></p> <p>2.骨髄液の (細胞移植群のみ)</p> <p>プロトコル治療実施研究機関で定められた手順書に従って約30mLの自己骨髄液の採取を行う。</p> <p>3.細胞、血清の調製 (細胞移植群のみ)</p> <p>プロトコル治療実施研究機関調製担当者が、施設で定められた手順書に従い、細胞および血清の調製を行う。培養液に15%自己血清を加える。骨髄液約30mLに培養液を加えT-75 フラスコで培養する。3日ごとに培養液を交換する、約3日後に接着細胞が出現する。赤血球等の非接着細胞は培養液交換の時に除去される。約10日後、培養細胞がサブコンフルエントに達したところで継代培養して、T-75 フラスコに播種する。約10日後、細胞がほぼコンフルエントに達したところで細胞を剥離、遠心分離し、自己血清を加え細胞浮遊液を作製し、そこにヒアルロン酸を加え攪拌する。</p> <p><u>培養の打ち切りは以下の手順で細胞数の変化を基準にして判断する。</u></p> <p><u>なお、細胞数のカウントは、作業者が視覚的に行う。</u></p> <p><u>細胞増殖の判断は、継代培養後に実施するものとする。</u></p> <p><u>また、細胞カウントは、同じ作業者が行うものとする。</u></p> <p>1) 継代の翌日にフラスコ底面の任意の6点の写真を撮り、画面内の細胞数をカウントして平均値をとる。</p> <p>2) その5日後にも同様に同じフラスコから6点の写真を撮って、</p>

	<p>平均値を測定する。</p> <p>3) 平均値が前回よりも 1.5 倍以上になっていなければ、増殖を停止していると判断して培養を中止する。</p> <p>但し、写真を撮る場所は底面の同じような場所にする。</p> <p>4. 骨髄刺激法、及び骨髄間葉系細胞の移植手術（入院）</p> <p>細胞の品質管理成績をチェックし、定められた標準作業手順書に従って調製された細胞であることを確認する。関節鏡手術を施行し関節軟骨欠損部を確認、同部に骨髄刺激法を施行する。試験物を関節内に注入し、創部を縫合し手術を終了する（標準治療群では、骨髄刺激法の施行のみ）。術後は抗菌薬を投与して感染予防を行なう。</p>
調製（加工）工程	有・無
非自己由来材料使用	有・無 動物種（ ）
複数機関での実施	有・無
他の医療機関への授与・販売	有・無
安全性についての評価	<p><b>安全性評価項目</b></p> <p>培養で得られた自己骨髄間葉系細胞の安全性を確保するため、出荷 3～5 日前の培養上清を検体とした無菌試験、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験を実施する。また出荷時には、細胞生存率、および FACS 解析による CD44、CD105 陽性細胞率を検査し、一部の細胞で無菌試験、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験を再度実施する。</p> <p><b>非臨床安全性試験</b></p> <p>1. 染色体検査</p> <p>これまでに大阪市立大学にて患者由来で通常の培養期間を超えた骨髄間葉系幹細胞の染色体検査を行い、染色体異常がないことを確認している。</p> <p>2. 生体内での造腫瘍性について</p> <p>これまでに大阪大学において、WHO の基準に則り、免疫不全マウスの皮下にヒト骨髄間葉系幹細胞を移植して 3 週、12 週で評価を行い、腫瘍形成がないことを確認している。</p>
臨床研究の実施が可能であると判断した理由	<p>自己骨髄間葉系細胞移植により、関節軟骨修復が促進されることが、前臨床試験で明らかになっている<sup>1-4)</sup>。臨床的には、厚生労働省の「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」の施行以前に行った自己骨髄間葉系細胞移植に関する2つの臨床研究により、移植に伴う有害事象が認められなかったのと同時に、関節軟骨欠損修復が促進される可能性が明らかになっている<sup>5, 6)</sup>。しかし、我々がこ</p>

れまで行った2つの臨床研究の方法は、関節切開により関節を展開して自己骨髄間葉系細胞移植するために、手術侵襲が大きい。臨床的に、より一般的な治療法として確立することを目指すにあたっては、手術侵襲の小さい方法により移植が行われることが望ましい。

関節鏡手術により関節軟骨欠損部を確認し同部に標準治療の一つである骨髄刺激法を施行し、同時に自己骨髄間葉系細胞を移植する今回のプロトコル治療は、我々がこれまでに行った2つの臨床研究におけるプロトコル治療と比較して、患者に与える侵襲が小さい（骨髄液採取、末梢血約400mL採血、及び関節内注射の侵襲のみ）。また、ラットの実験系でも、自己骨髄間葉系細胞関節内注入+骨髄刺激により、正常軟骨とほぼ同様の修復軟骨が得られ、組織学的スコアにおいても、骨髄刺激単独と比較して、有意な再生が得られている。以上のようなことから、臨床研究で実施が可能であると判断した。

関節軟骨損傷は、治療をせずに放置すると変形性関節症への進行が加速される。特に、未成年者は発症後の余命が長く、また活動性も高いために、関節軟骨損傷による変形性関節症進行への危険性が高いと考えられる。例えば、30歳前後で関節軟骨損傷から変形性膝関節症を発症した場合は、社会生活をしていく上で障害が大きくなると考えられる。その上、30歳前後の変形性膝関節症に対する治療法はほとんどないのが実情である。変形性関節症に対する人工関節置換術は、一般的には60歳以上が適応となる。そのため、未成年者の関節軟骨損傷は早いうちに修復しておくべきであり、治療の必要性は年齢が若いほど高いと考えられる。

また、スポーツ傷害としての関節軟骨損傷は、前十字靭帯患者の分布を参照すると、男女ともに10歳代後半に多いと考えられる。従って、比較対象の限られる本臨床研究において、10歳代後半を対象に含めることが症例集積の面からも重要である。

細胞治療を未成年者へ適用した際の安全性の面に関しては、厚生労働省「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」の施行以前に我々が行った臨床研究で、4例の未成年者への骨髄間葉系細胞移植を臨床研究として実施した経験があり（平均年齢13.5歳、平均経過期間5年）、これら実施症例全例において有害事象を認めていない。

一方、高齢者については人工関節置換術という確立された方法があるため、上限は70歳とした。

#### これまでに実施した前臨床試験、臨床試験及びその結果の要約

- 1) 家兎自己骨髄間葉系細胞移植による関節軟骨欠損修復

(Wakitani S, et al., 1994)

家兔の脛骨近位部より骨髓液を採取し、接着細胞を培養増殖した。家兔の膝関節大腿骨内顆荷重部に  $6 \times 3 \times 3$ mm の骨軟骨欠損を作成し、自己骨髓間葉系細胞  $1 \times 10^6$  個をコラーゲン・ゲルに包埋して欠損部に充填した。

移植 2 週間後、骨軟骨欠損部の全域がトルイジンブルー異染性の硝子軟骨様組織で埋められた。その後、骨髓側から軟骨細胞の肥大化、血管の侵入により骨に置換された。24 週間後には軟骨下骨は完全に修復され、関節腔に面した部分のみが修復軟骨として残った。その修復軟骨は周囲の正常軟骨と比べやや菲薄化していた。移植された細胞は移植部で軟骨に分化し、その後、骨髓に面した部分から肥大軟骨細胞化し吸収され、骨に置換された。関節腔に面した部分は、関節腔からの因子あるいは力学的要因により軟骨のまま維持されたと考えられる。家兔の実験系において骨髓間葉系細胞移植で骨軟骨欠損の修復が促進されることが明らかになったため、この方法をヒトの関節軟骨欠損の治療に応用した。

2) ラットにおける関節軟骨欠損の骨髓間葉系幹細胞による修復 (Nishimori M, et al., 2006)

ラットを用いて、自己骨髓間葉系細胞を関節内注入し、関節軟骨欠損修復を検討した。60匹のラットに  $2\text{mm} \times 2.5\text{mm}$  の骨軟骨欠損を作成した。4週間後、18匹をコントロール群としPBSのみ関節内注射した。18匹をdrilling群とし、4週間前に作成した欠損部に直径1mmのdrilling (骨髓刺激) を施行した。18匹を細胞移植群とし、drilling施行後にGFPラットから採取した  $1 \times 10^6$  個の骨髓間葉系細胞を移植した。残りの6匹は慢性欠損群とした。12週まで経過観察し、組織学的に比較した。細胞移植群の修復軟骨の表面はスムーズであり、外観は正常軟骨とほぼ同様であった。組織学的スコア評価においても、細胞移植群は他の2群に比較し有意に正常軟骨に近い組織による修復が得られた。また、細胞移植群では移植後4週までGFP陽性細胞が軟骨欠損部に確認された。

3) ミニブタモデルを用いた広範軟骨欠損に対する自己間葉系幹細胞移植療法 (Lee KB, et al., 2007)

軟骨欠損を作成したミニブタに対し、自己腸骨稜から採取した間葉系幹細胞 (MSC) を増殖培養し、欠損軟骨に移植し修復を

検討した。対照群としてヒアルロン酸注入群、生理食塩水注入群を設けた。肉眼所見は、MSC 移植群では、欠損部の著明な修復が認められた。修復組織はガラス軟骨様であり、周囲正常軟骨と一体化し、表面はなめらかで、十分な厚さを示した。ヒアルロン酸注入群では、欠損部はある程度、非ガラス軟骨により部分的に修復されたが、周囲との境界は明瞭で、表面が不均一であった。生理食塩水注入群では、欠損部の修復は認められなかった。MSC 移植群では、組織学的にも欠損軟骨の修復が認められた。CFDA-SE で標識した MSC を移植した結果、移植した MSC 細胞は新生軟骨に存在するのが確認された。Wakitani 組織学的評価指数を用いた組織学的 grading では、MSC 移植群、ヒアルロン酸注入群、生理食塩水注入群の 3 群間に有意差が認められた ( $p < 0.001$ , Kruskal-Wallis test)。

4) 骨髄由来間葉系幹細胞関節内注入後の損傷組織への移動性及び組織再生の検討 (Agung M, et al., 2006)

Green rat (GFP 遺伝子組み換え Sprague-Dawley (SD) ラット) の骨髄細胞を  $1 \times 10^6$  個、または  $1 \times 10^7$  個を、前十字靭帯切断、内顆軟骨欠損、及び内側半月板切除を作成した SD ラットの膝関節に注入し、損傷組織への移動性及び組織再生を検討した。注入後 4 週時点で、 $1 \times 10^6$  個注入群では GFP 陽性細胞は前十字靭帯切断部のみに認められたが、 $1 \times 10^7$  個注入群では前十字靭帯切断部のみならず、内顆軟骨欠損部及び内側半月板切除部にも GFP 陽性細胞が認められ、組織修復に寄与している像が認められた。このことから、関節内注射細胞数が多い方が、関節軟骨欠損修復が促進される可能性が示唆された。

5) ヒト自己骨髄間葉系細胞移植による膝蓋骨軟骨欠損修復 (Wakitani S, et al., 2004)

2 例の膝蓋骨軟骨欠損患者に対して自己骨髄間葉系細胞移植を行った。対象症例は 44 才男性と 26 才女性であった。手術の約 3 週間前に腸骨稜から骨髄液を採取し、接着細胞を増殖させた。軟骨欠損部の軟骨下骨を薄く削除 (abrasion) したのちに、ゲルに包埋した細胞を置き、その上を自己骨膜の cambium layer を移植細胞側にして縫合した。2 例とも術後 7-8 週で関節鏡を施行し修復組織の再生を確認し、臨床症状の改善は顕著であった。移植前は杖なしには歩行困難であったが、移植後 12 年と 10 年の現在、疼痛なく杖なし歩行はもちろん、走ることも可能であ

り、両患者とも非常に満足している。

6) ヒト自己骨髄間葉系細胞移植による変形性膝関節症関節軟骨欠損修復 (Wakitani S, et al., 2002)

変形性膝関節症患者の関節軟骨欠損修復を試みた。24例の内側型変形性膝関節症患者で高位脛骨骨切術の適応のある患者を対象とした。女性15例、男性9例、手術時年齢は49歳から70歳、平均63歳であった。チャンレー型創外固定を用いた高位脛骨骨切り術を行い、同時に12例に対しては自己骨髄未分化間葉系細胞移植を行い、12例に対しては細胞移植を行わずコントロール群とした。細胞移植群では、手術の約3週間前に本人の腸骨より骨髄液を採取し、接着細胞を増殖させた。高位脛骨骨切り術と同時に大腿骨内顆の軟骨欠損部の硬化した軟骨下骨をabrasionした後、培養した細胞を包埋したコラーゲン・ゲルを移植し、自己骨膜のcambium layerを移植細胞側にして縫合した。コントロール群では細胞のっていないコラーゲン・ゲルを入れる以外は同様の手術を施行した。術後3日目よりCPMを開始し、平均6.8週後に創外固定の抜去時、その後平均41.8週後のステイブル抜去時、関節鏡を施行し、修復組織の観察を行った。

非荷重位平均大腿脛骨角は術前の181度を術後170度に矯正した。臨床成績はHospital for Special Surgery knee-rating scaleで評価し、術前と術後約16カ月で比較した。細胞移植群は術前65.0点が術後81.3点に、コントロール群は術前66.3点が術後79.2点に、いずれも有意に改善したが、両群間で改善度に有意差はなかった。抜釘時、同意が得られた症例で関節鏡を施行し、鏡視下及び組織学的に修復組織を評価した。移植後6.7週では、修復組織を覆った骨膜は残存していたが、一部剥がれている症例もあった。その下の修復組織は白色で柔らかく、組織学的には一部に異染性を認めるのみであった。42週では骨膜組織は認められず、修復組織は6.7週より固いものの周辺の正常関節軟骨よりは柔らかく、また組織学的には異染性を全体に認め、一部硝子軟骨様であった。

<p>臨床研究の実施計画</p>	<p><b>試験デザイン</b></p> <p>標準治療を対照とする多施設共同、非盲検、無作為化、並行群デザインの早期探索試験である。</p> <p><b>目標登録被験者数、被験者登録期間</b></p> <p>目標登録被験者数：標準治療群 40例 細胞移植群 40例 計 80例 (中間評価は、細胞移植群5例登録後、6週間の観察終了時)</p> <p>被験者登録期間：3年（本実施計画が承認され、研究機関の長の実施許可が通知された日をそれぞれの参加研究機関の研究開始日とし、それから3年間、患者登録を受理する）</p> <p><b>評価項目</b></p> <p>主要評価項目：IKDC subjective scoreのプロトコル治療前と治療48週後における改善度</p> <p>副次評価項目：MRI、局所単純 X 線、Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS)、血清 KS 値、有害事象</p>
<p>被験者等に関するインフォームド・コンセント</p>	
<p>手続き</p>	<p>1) 被験者の選定及び適格性判定</p> <p>研究責任医師及び分担医師は、外傷性損傷あるいは離断性骨軟骨炎に起因する膝関節軟骨損傷を有する者を対象とし、「選択基準」及び「除外基準」に基づく検査を実施して、適格性を判定する。</p> <p>2) 同意取得</p> <p>スクリーニングを行う前に、研究責任者又は研究分担者は、本臨床研究への参加候補となる被験者本人に対して、同意説明文書を提供・使用し、口頭で十分な説明を行った後、本臨床研究への参加の同意を文書で取得する。なお、被験者本人が未成年の場合は、本人に加え、代諾者に対しても同意説明文書を使用し、口頭で十分な説明を行った後、本人及び代諾者の本臨床研究への参加の同意を文書で取得する。</p>
<p>説明事項</p>	<p>以下の項目について説明する。(別添「同意説明文書参照」)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. この臨床研究への参加について</li> <li>2. 臨床研究の目的、意義</li> <li>3. 臨床研究の実施機関</li> <li>4. この臨床研究に参加していただける方の基準</li> <li>5. この臨床研究に参加していただけない方の基準</li> </ol>

		6. 臨床研究の方法 7. 予想される利益 8. 予想される不利益 9. 臨床研究の費用について 10. 健康被害に対する補償等 11. プライバシーの保護 12. 連絡先および相談窓口
単独でインフォームド・コンセントを与えることが困難な者を被験者等とする臨床研究の場合		
	研究が必要不可欠である理由	<p>           関節軟骨損傷は、治療をせずに放置すると変形性関節症への進行が加速される。特に、未成年者は発症後の余命が長く、また活動性も高いために、関節軟骨損傷による変形性関節症進行への危険性が高いと考えられる。変形性関節症に対する人工関節置換術は一般的には60歳以上が適応で、30歳前後の変形性膝関節症に対する治療法はほとんどないのが実情である。そのため、未成年者の関節軟骨損傷は早いうちに修復しておくべきであり、治療の必要性は年齢が若いほど高いと考えられる。また、スポーツ傷害としての関節軟骨損傷は、前十字靭帯患者の分布を参照すると、男女ともに10歳代後半に多いと考えられる。従って、比較対象の限られる本臨床研究において、10歳代後半を対象に含めることが症例集積の面からも重要である。         </p> <p>           細胞治療を未成年者へ適用した際の安全性の面に関しては、厚生労働省「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」の施行以前に我々が行った臨床研究で、4例の未成年者への骨髄間葉系細胞移植を臨床研究として実施した経験があり（平均年齢13.5歳、平均経過期間5年）、これら実施症例全例において有害事象を認めていない。         </p>
	代諾者の選定理由	親権者
被験者等に対して重大な事態が生じた場合の対処方法	<b>有害事象について</b> 重篤な有害事象の定義 「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。	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 死亡</li> <li>2. 死亡につながる恐れのあるもの</li> <li>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</li> <li>4. 障害</li> <li>5. 障害につながるおそれのあるもの</li> <li>6. 1~5に準じて重篤なもの</li> <li>7. 後世代における先天性の疾病または異常</li> </ol>

#### 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は、「9. 観察・検査項目とスケジュール」に定めたスケジュールに基づき評価する。有害事象の重症度は NCI-Common Terminology Criteria for Adverse Events (NCI-CTC-AE Ver4.0 日本語版) に基づいて決定する。

#### 有害事象発現時の対応

有害事象の発現に際しては、適切な処置を施し、被験者の安全の確保に留意し、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十分な医療措置を講じる。

当該参加研究機関の研究責任者は、症例報告書に有害事象名、発現日、程度、重篤か否か、経過及び本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、特に本臨床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、当該症例の担当医師は、本臨床研究において別途定められた「重篤な有害事象発生時の報告・対応手順書」(別添資料②)に従い、当該研究機関の研究責任者、研究機関の長及び関連部署、ならびに研究事務局(研究総括責任者、副総括責任者)に対し、発生を知った時点から72時間以内に一次報告を行い、7日以内に二次報告を行う。一次報告、二次報告、及びその他必要な報告を基に、効果安全性評価委員会が本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・勧告等を行い、また各研究機関の倫理審査委員会による意見なども合わせ、必要に応じて臨床研究を中止等の対応を行う。

#### 予想される有害事象

- 1) 感染
- 2) 関節内出血
- 3) 癒着による可動域制限
- 4) 骨軟骨腫の発生
- 5) 歩行障害
- 6) 移植細胞の汚染

#### 有害事象への対応

- 1) 必要に応じて、抗生剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤にて治療を

行う。場合によっては関節鏡視下洗浄術を施行する。

- 2) 必要に応じて止血処置を行う
- 3) リハビリテーションで可動域訓練を行い、改善が得られなければ関節鏡視下癒着剥離術を行う。
- 4) 歩行障害等が生じる場合には、必要に応じて関節鏡視下切除術を施行する。
- 5) リハビリテーションを行う。
- 6) 移植細胞における無菌試験、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験で陽性結果が出た場合は、直ちに血液検査、関節液細菌培養検査、MRIを施行し、抗生物質を投与する。感染が確認されれば、感受性のある抗生物質の投与を行う。場合によっては関節鏡視下手術により、感染巣の搔爬、洗浄を行う。

### 重大な事態発生時の対応

#### 重大な事態の定義

重大な事態を以下に定義する。

- 1) 重篤な有害事象のうち、効果安全性評価委員会にて本臨床研究全体の継続に大きな影響を与えると判断された重篤な有害事象
- 2) 類似治療、その他の研究報告等から得られた新たな重大情報のうち、効果安全性評価委員会にて本臨床研究の継続に大きな影響を与えると判断された重大情報

#### 重大な事態の報告と対処

- 1) 対象となる被験者

重大な事態が発生した場合に、厚生労働大臣への報告対象となる症例は、該当する重大な事態が発生した全症例とする（全登録症例のうち、試験物の移植手術が未施行の症例は除く）。

- 2) 報告手順

「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に基づく。

- (1) 当該研究機関の研究責任者

効果安全性評価委員会にて重大な事態と判断された事象及び情報につき、当該研究機関の長及び総括責任者（事務局）に対して速やかに報告しなければならない。また、研究機関の長または総括責任者の指示を受ける前に、必要に応じ、本臨床研究の中止または暫定的な措置

	<p>を講ずることができる。</p> <p>(2) 総括責任者 各研究機関の研究責任者から重大な事態が報告された場合には、研究機関の長及びすべての研究責任者に対し速やかにその旨を報告しなければならない。 また、総括責任者は、研究機関の長の指示を受ける前に、必要に応じ、本臨床研究の中止又は暫定的な措置を講ずることができる。</p> <p>(3) 研究機関の長</p> <p>① 研究責任者から重大な事態が報告された場合には、その発生及び内容を速やかに厚生労働大臣に報告するとともに、原因の分析を含む対処方針について、速やかに倫理審査委員会の意見を聞き、当該研究責任者に対し、中止その他の必要な措置を講ずるよう指示しなければならない。なお、必要に応じ、倫理審査委員会の意見を聞く前に、研究機関の長は、当該研究責任者に対し、中止又は暫定的な措置を講ずるよう、指示することができる。</p> <p>② 研究機関の長は、①に掲げる必要な措置を講ずるよう指示した上で、当該臨床研究を実施する他のすべての研究機関の長に対して、重大な事態及び講じられた措置等について周知するとともに、本臨床研究に参加するすべての研究機関の長と共同で、倫理審査委員会の意見、原因の分析結果及び研究責任者に指示した措置の内容を、厚生労働大臣に報告する。</p> <p>③ ②に掲げる、中止その他の必要な措置が講じられた後、その結果を、本臨床研究に参加するすべての研究機関の長と共同で、厚生労働大臣に報告する。</p>	
臨床研究終了後の追跡調査の方法	研究終了後も定期的な外来受診を促す。定期的外来診療により合併症の有無、及び有効性について評価を行う。	
臨床研究に伴う補償		
	補償の有無	<p style="text-align: center;">(有)・無</p> <p>本臨床研究に起因する有害事象が発生した場合、研究責任者は医学上最善の処置を取ることにより被験者の回復に努める。また、本臨床研究は臨床研究補償保険に加入しており、本研究の実施に起因して、過失によらず死亡または重篤な有害事象等の健康被害が生じた際には、その被害が被験者の責に帰すべき事由により引き起こされた等の免責事由に相当する場合を除いて、臨床研究補償保険によ</p>
	補償が有る場合、その内容	

		って補償される。
個人情報保護の方法		
	連結可能匿名化の方法	被験者の同意取得後はデータ管理、製造管理など、症例の取り扱いにおいては全て連結可能匿名化された被験者識別コード又は登録番号により管理され、匿名化コードと氏名の対照表及び氏名記載同意書は施錠可能な書類保管庫に厳重に保管する。
	その他	
その他必要な事項 (細則を確認してください)	① 当該研究に係る研究資金の調達方法	
		本臨床研究で、広島大学にて登録された症例の臨床研究実施にかかる費用は運営費交付金および競争的研究資金を充てるものとする。
	② 既に行われているヒト幹細胞臨床研究と比較して新規性が認められる事項	本研究は骨髄間葉系幹細胞の関節注入による細胞移植治療であり、従来の細胞移植治療のように関節を展開せず、すべて関節鏡視下に治療を行うことから、低侵襲な細胞移植治療法である点において新規性がある。

備考1 各用紙の大きさは、日本工業規格 A4 とすること。

備考2 本様式中に書ききれない場合は、適宜別紙を使用し、本様式に「別紙〇参照」と記載すること。

添付書類（添付した書類にチェックを入れること）

- 研究者の略歴及び研究業績（別紙 1, 別紙 2）
- 研究機関の基準に合致した研究機関の施設の状況（別紙 3, 別添 2-5 施設運用に関する手順書, 別添 2-6 衛生管理に関する手順書）
- 臨床研究に用いるヒト幹細胞の品質等に関する研究成果（別紙 4）
- 同様のヒト幹細胞臨床研究に関する内外の研究状況（別紙 5）
- 臨床研究の概要をできる限り平易な用語を用いて記載した要旨（別紙 6）
- インフォームド・コンセントにおける説明文書及び同文書様式（別紙 7, 別紙 8, 別紙 9）
- その他（資料内容： 別添 1-1 研究実施計画書）
- その他（資料内容： 別添 2-2 製品標準書）
- その他（資料内容： 別添 2-3 試験物製造の手順書）
- その他（資料内容： 別添 2-4 使用する製剤類の品質保証書類）
- その他（資料内容： 別添資料① ICRS 分類）
- その他（資料内容： 別添資料② 重篤な有害事象発生時の報告・対応マニュアル）
- その他（資料内容： 別添 重篤な有害事象の報告書様式）
- その他（資料内容： 別添資料③ KOOS）

- その他（資料内容： 別添 症例報告書）

臨床研究の概要をできる限り平易な用語を用いて記載した要旨

#### <本研究の概要>

関節軟骨損傷は、若年者のスポーツ障害として多くみられるが、数年程度の短期の経過では症状が出にくく、これまでは確実な修復方法がないこともあり、放置されることが多い疾患であった。しかし、最近は長期の経過で変形性関節症になる可能性が高いことが明らかになり、修復することが望まれる。

骨髄間葉系細胞移植の利点は細胞を採取し増殖させた状態で移植できる事、正常軟骨を傷つける必要性がない事、また、軟骨だけでなく軟骨下骨の修復も期待できる事から従来の方法に比してより良い骨軟骨修復を得られる可能性があるものと考えられる。しかし従来の方法は関節を大きく展開するために手術侵襲が大きいという問題がある。

本研究では、より手術侵襲の小さい方法の開発を計画した。本研究の目的は、関節鏡視下に骨髄刺激法を施行し、同時に自己骨髄間葉系細胞移植を行い、その関節軟骨修復への有効性・安全性を評価する事である。

#### <本研究の背景>

変形性膝関節症患者は、現在我が国に1000万人以上存在すると考えられ、今後の高齢化社会の進行とともにますます患者数の増加する重要な疾患である。近年、変形性関節症の多くは軟骨損傷に由来すると考えられるようになってきた。すなわち若年期のスポーツ障害などで軟骨損傷を生じた場合、10年程度の経過で変形性関節症になると考えられる。従って、関節軟骨損傷を修復する方法があれば、スポーツ障害の治療法となるのみならず変形性関節症患者を減らすことができ、有用である。

現在、我が国において、確実に関節軟骨損傷を修復する方法はない。従来、このような軟骨障害に対する手術方法としては骨髄刺激法が行われてきた。この方法は軟骨下骨を削り出血させることで骨髄中の間葉系細胞を動員し修復を得る方法である。骨髄刺激法は簡便な方法であるが、これにより再生されるのは線維軟骨（関節軟骨の本来の組織は硝子軟骨）である。そこで、近年は硝子軟骨による修復を目指して自家骨軟骨柱移植法であるモザイクプラスチック、あるいは自己の関節軟骨を採取して培養後に損傷軟骨部に移植する培養軟骨細胞移植法が行われるようになってきた。両方法とも正常軟骨組織を採取して移植するため新たな軟骨障害を惹起する可能性が生じるという矛盾がある。通常、軟骨の採取部位として利用される大腿骨遠位外側の関節面においても相応の膝関節圧がかかっていることが報告されている。さらに、モザイクプラスチックでは欠損部が大きいほど大量の骨軟骨柱を必要とし、対応できる欠損の大きさには限界がある。また、打ち込む骨軟骨柱の深さを一定にして関節表面の曲率を再現することの難しさ、骨軟骨柱の間隙は数年経過しても残存することが指摘されている。培養軟骨細胞移植法においては、移植した組織が

周囲の関節軟骨や軟骨下骨との間で強固に結合するかは不明である。

我が国において、いくつかの施設で細胞移植による関節軟骨修復の臨床研究が行われているが、一部組織での小さな研究である。

我々は14年前から自己骨髄間葉系細胞移植による関節軟骨欠損修復の臨床研究を開始し、これまでに45関節に移植し、良好な臨床成績がえられ、しかも局所の腫瘍形成や感染を認めず安全な方法であること報告した。しかしながら従来の方法では関節を切開するために手術侵襲が大きいと言う問題がある。そこで関節鏡で行える方法の開発を計画した。

#### <本研究の目的・意義>

本研究では、現在のところ確実な治療方法のない関節軟骨欠損修復の新しい治療方法、しかも手術侵襲の小さい関節鏡視下手術で行える方法を開発することである。

より高度な臨床研究を行うために、骨髄刺激法のみをコントロール群を設定し比較する、非盲検、ランダム化、並行比較試験とした。この方法の有用性が明らかになれば、企業治療をへて保険収載される道が開けやすいと考える。

この方法で多くの関節軟骨欠損患者の治療が可能になれば、現在治療方法のない、スポーツ障害などの軟骨損傷患者にとって福音となるのみならず、将来の変形性関節症患者を減らすことが可能であり、本研究の意義はきわめて高いといえる。

#### <対象疾患・目標症例数>

外傷性損傷あるいは離断性骨軟骨炎に起因する膝関節軟骨損傷患者  
対照群40例、細胞移植群40例（参加全施設合計）

#### <主要評価項目>

IKDC subjective score のプロトコル治療前と治療 48 週後における改善度

#### <副次評価項目>

MRI、単純 X 線、Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score、血清ケラタン硫酸値  
本臨床研究において生じた有害事象の種類と重症度、発現頻度、発現期間、因果関係

#### <観察検査項目及びスケジュールの概要>

局所感染症状：局所感染症状の有無

局所皮膚症状局所皮膚症状：腫脹の有無、発赤の有無、疼痛の有無

血液学的、血液生化学的検査：血清KS値を含む

観察時期：スクリーニング、術前検査、手術1週後（±2日）、2週後（±2日）、4週後（±1週）、12週後（±1週）、24週後（±8週）、48週後（±8週）もしくは中止時

局所単純X線、MRI

観察時期：スクリーニング、6週後（±1週）、24週後（±8週）、48週後（±8週）もしくは中止時

IKDC subjective score (IKDC subjective knee evaluation form)

Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score : KOOS

観察時期：スクリーニング、2週後（±2日）、6週後（±1週）、12週後（±1週）、24週後（±8週）、48週後（±8週）もしくは中止時

# 患者さんへ

臨床研究課題名

**多施設共同臨床研究：**

**「関節鏡視下自己骨髄間葉系細胞移植による関節軟骨欠損修復」**

総括責任者 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 整形外科 教授 越智 光夫

副総括責任者 武庫川女子大学 健康・スポーツ科学部 教授 脇谷 滋之

研究責任者 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 整形外科 教授 越智 光夫

## **1. この臨床研究の目的・意義**

私たち医師は患者さんに最善の治療を提供するとともに、さらに優れた治療法の研究に取り組んでいます。臨床研究はそのために必要なもので、新しく開発された治療法が人の病気に対して有効かどうか、また安全かどうか、患者さんにご協力いただいて試験することをいいます。この臨床研究を行うことによって、新しい治療法の有効性が明らかになった場合は、将来あなたと同じ病気の患者さんの治療に大きく役立つこととなります。

軟骨は関節面において骨の表面を被い、骨にかかる衝撃を分散・吸収する役割があります。この関節軟骨が損傷されると、骨同士が擦れ合い摩擦が大きくなり、また衝撃が直接骨に伝わるため骨が損傷しやすく将来的には変形性関節症に移行し痛みが生じると考えられます。しかし、軟骨の修復力は非常に弱く、いったん損傷されると元の状態に戻ることはありません。軟骨を修復するために様々な手術治療が行われていますが現段階で軟骨を完全に修復する方法はありません。

このため私たちは関節軟骨を修復する新たな方法の一つとして骨髄間葉系細胞を用いることを考えました。骨髄間葉系細胞は、骨髄の中に存在する細胞の一種で、骨や軟骨、筋肉、脂肪等のもとなる細胞です。骨髄間葉系細胞は、骨髄より採取した血液から容易に分離でき、10日間の培養で約2000倍にも増えるため臨床応用に適し、いくつかの組織の再生に応用が試みられています。この細胞を手術によって関節軟骨欠損部に移植すると、軟骨修復が促進されることを、私たちは動物実験および患者さんに対する臨床研究によって明らかにしました。しかし、この方法は関節を切開して行う大きな手術が必要であるという欠点がありました。そこで今回、関節鏡を使った手術で自己骨髄間葉系細胞を移植する方法を開発しました。この関節鏡視下移植術は、従来の方法より小さな手術で済むため、よりよい機能回復が得られる可能性を、私たちは期待しています。今回の臨床研究は、関節鏡視下自己骨髄間葉系細胞移植という新しい方法を患者さんにはじめて応用するにあたり、その安全性と有効性の検討を目的としています。

なお、この臨床研究は、5つの研究機関で同じプロトコル治療（\*2 ページの「5.臨床研究におけるプロトコル治療の方法」を参照ください）で行う多施設共同臨床研究です。当院を含む全参加研究機関の患者さんのデータは、一括して集計されて、統計解析を行い、プロトコル治療の安全性と有効性の評価に用いられます。

## **2. 臨床研究への参加同意の任意性について**

この臨床研究の説明を担当医師から聞いた上で、臨床研究に参加するかどうかをあなたの自由な意思で⑨決めてください。たとえ参加されなくても今後の治療や診療に不利益になることはありません。⑩あなたの自由意思により同意書にご記名捺印またはご署名いただいた場合にのみプロトコル治療を行います。また、この臨床研究の実施中に新しい情報が得られたときには、必ずあなたにお知らせします。

### **3. 臨床研究への参加後の同意撤回の自由について**

この臨床研究に参加することに同意していただいたあとでも、プロトコル治療が開始されてからでも、あなたが同意の撤回をしたいときは、いつでも自由に撤回することができます。⑪さらに、試験物である細胞が移植された後に、プロトコル治療実施に対する同意のみを撤回し、可能な限り当初の観察スケジュールに従った観察・検査を継続することも可能です。また、撤回されてもそれにより不利益を受けることはなく⑫、現在行われている最善の治療を行います。なお、撤回される場合もできる限り、担当医と面談の上、その後の治療法などについて説明を受けるようにして下さい。

### **4. 代諾者からの同意取得の必要性について**

この臨床研究が対象とする関節軟骨欠損は若年者にも起こりやすい病気で、しかも若年者の方が、軟骨再生が有効と考えられておりますので、このような病気をもった若年者の方に対する適切な治療法が現在ないことから、未成年の方を対象に含んだ臨床研究を計画しました。

この臨床研究において16歳以上20歳未満の方が臨床研究へ参加される際には、患者さんご自身と代諾者の間で十分相談して、患者さんご自身が臨床研究の内容を十分理解していただいた上で、必ず患者さんご自身の同意による記名捺印、又は署名をいただきます。さらに、代諾者の方による記名捺印、又は署名もいただくこととなります。

### **5. 臨床研究におけるプロトコル治療の方法**

#### **臨床研究参加の条件**

関節軟骨欠損のため疼痛があり関節軟骨欠損を修復する必要があると判断され、この疾患に対する標準的な治療法である「骨髄刺激法」とよばれる関節鏡を用いた治療を行うことが適当と診断された人が対象です。臨床研究への参加に文書により同意され、さらにレントゲン、MRI、関節鏡などの検査が行われ、研究への適格性がある（臨床研究参加への条件を満たしている）と判断された場合に初めてプロトコル治療を受ける対象となります。

#### **2つのプロトコル治療群への振り分け**

この臨床研究では、登録された患者さんは、骨髄刺激法のみによる治療を行う方（「標準治療群」とします）と、骨髄刺激法にご自分の骨髄から取り出した細胞を移植する細胞移植を組み合わせる方（「細胞移植群」とします）の2つのプロトコル治療群に振り分けられます。その際、患者さんの振り分けは、研究への参加登録後、第3者である登録センターにおいて無作為に（ばらばらに、偶然に基づいて）行われます。したがって、個々の患者さんがどちらの群に振り分けられるかは、患者さんご本人のご希望により決定することはできず、また医師も、患者さんがどちらの群に振り分けられるかはわからないことを、あらかじめご了承ください。

## プロトコル治療の方法

### 【標準治療群の方に行われるプロトコル治療】

「標準治療群」に振り分けられた方は、「骨髄刺激法」による治療が行われます。この治療は関節鏡で軟骨が欠損した部分の軟骨下骨（軟骨の下の層にある骨）に傷をいれるというもので、関節軟骨欠損に対する治療としては、現在標準的に行われているものです。

### 【細胞治療群の方に行われるプロトコル治療】

「細胞移植群」に振り分けられた方は、手術の約 4 週間前に、手術室において、局所麻酔で骨盤の骨から患者さんご自身の骨髄液を 30mL、および末梢血を 400mL 採取します（末梢血からは血清を分離し骨髄細胞の培養に用います）。この骨髄液を細胞培養施設に運び、骨髄間葉系細胞を分離、培養し増殖させます。プロトコル治療を行うために必要な細胞数を得るため、細胞培養中に、必要に応じて末梢血の採取（400mL）をさらにもう 1 回、同様の手順で行う場合があります。

増殖・調製された軟骨に分化する能力を持つ細胞は、厳重な品質管理検査が行われます。調製の完了した細胞は回収され、細心の注意を払い、最終的には手術室に運ばれ、移植に用いられます。

手術室において、関節鏡で欠損部の軟骨下骨に傷をいれ（骨髄刺激法）、関節内に細胞を注入します。関節鏡視下手術ですので通常の関節手術にくらべて切開が小さいという利点があります。

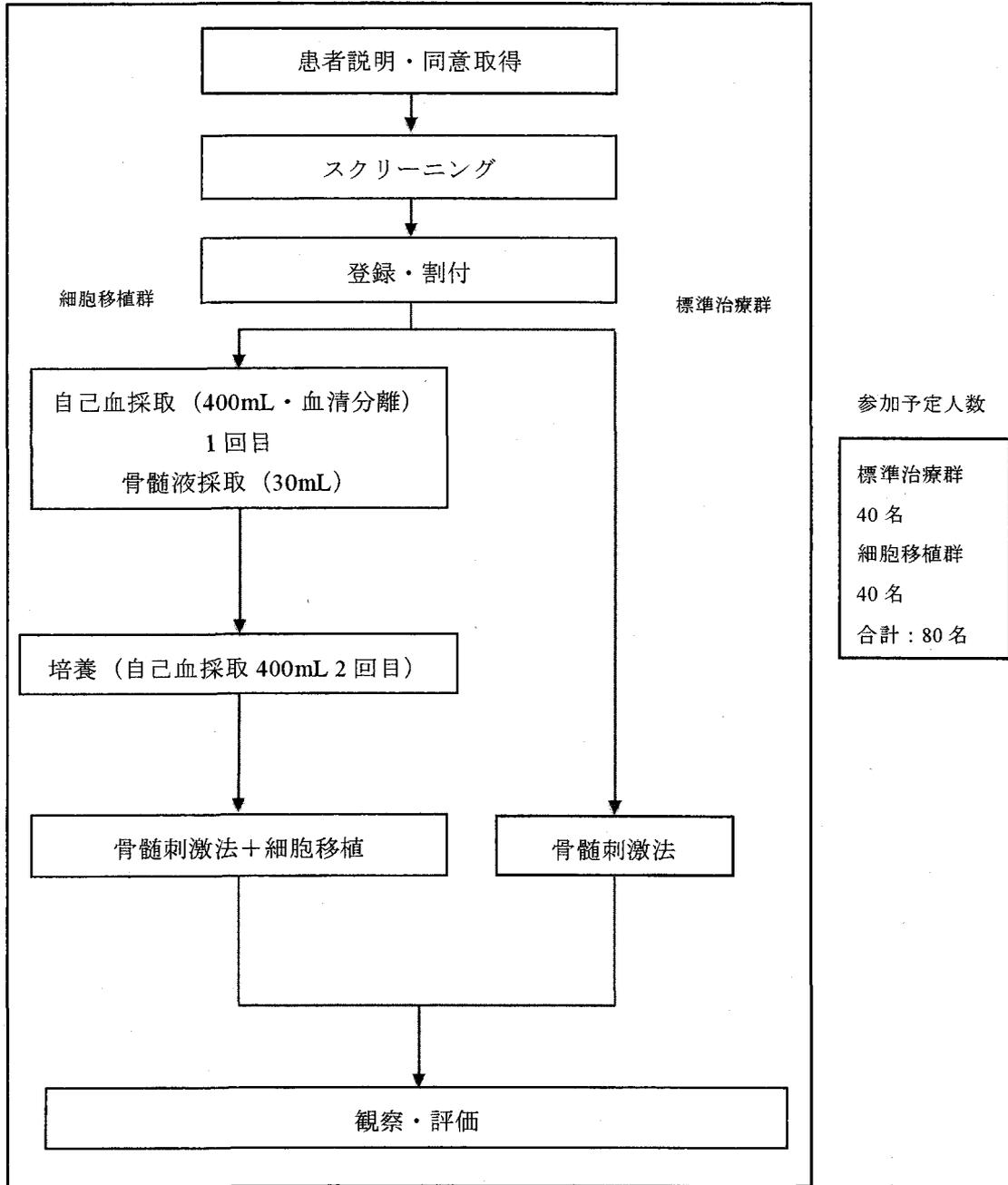
### 【プロトコル治療後（2つの治療群共通）】

「標準治療群」、「細胞移植群」いずれの方も、プロトコル治療を受けられた後は、手術直後から膝装具をあて安静にします。翌日、装具をはずし、両松葉杖を用いてプロトコル治療した膝に荷重がかからない歩行（完全免荷歩行）とします。持続的他動運動訓練を開始し、その後に退院となります。プロトコル治療後 3 週から 1/3 荷重、4 週から 1/2 荷重、6 週から全荷重とします。

### 【プロトコル治療の中間評価】

この臨床研究においては、2 つの群のプロトコル治療が、全参加研究機関でそれぞれ合計 40 名ずつ行われるまで登録を行います。しかし、「細胞移植群」で行われる細胞移植の方法は、この臨床研究で初めて患者さんに対して適用される方法のため、「細胞移植群」に 5 名の方が登録された時点で、いったん新たな患者さんの登録を中断します。そして、これらの方々をプロトコル治療から 6 週間観察し、安全上問題がないことを確認した後、患者さんの登録を再開することとしております。

# プロトコル治療の流れ



### 観察項目

有害な事からの記録、MRI、IKDC subjective score、血清KS値、全身・局所の臨床症状、一般血液検査、レントゲン検査

### 観察・検査スケジュール

観察・評価日		同意取得	スクリーニング	登録	骨髓液採取日	術前検査	0日	0日	1週後	2週後	4週後	6週後	12週後	24週後	48週後	中止時	
許容範囲			登録前4週以内		採取前	手術前4週以内	術前	術後	±2日		±1週			±8週			
同意取得		○															
登録				○													
患者さんの背景			○														
臨床症状	バイタルサイン		○		○		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
臨床症状	局所感染症状		○				○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
	局所皮膚症状		○				○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
臨床検査	血液		○			○			○	○	○		○	○	○	○	
	血清KS値*					○							○	○	○	○	
	尿		○			○											
	心電図		○			○											
画像診断	局所単純X線		○					○				○	○	○	○	○	
	MRI		○									○		○	○	○	
自覚評価 機能評価	IKDC subjective		○							○		○	○	○	○	○	
	KOOS		○							○		○	○	○	○	○	
有害な事から					→												
併用治療					→												

\*血清KS値：軟骨損傷や変形性関節症の程度を示す指標

## 参加予定期間

この臨床研究に参加される患者さん、お一人お一人の観察期間は、手術後48週間とします。ただし、観察期間終了後も患者さんは広島大学病院にて定期的に病状を観察します。

## この臨床研究に参加できる方（選択基準）

以下に挙げたすべての項目を満たす患者さんは、この臨床研究に参加することができます。

- 1) 関節軟骨を損傷し、この疾患の標準的な治療法である「骨髄刺激法」により治療することが適当であると診断された患者さん
- 2) MRIで関節軟骨の50%以上の深さの損傷が認められる患者さん（International Cartilage Repair Society (ICRS) articular cartilage injury classification グレード3以上に相当）
- 3) MRIで損傷面積が2cm<sup>2</sup>以上と診断された患者さん
- 4) 年齢が16歳以上、70歳以下の患者さん。ただし、プロトコル治療の中間評価が終わるまでは、20歳未満の患者さんは登録しないこととします。
- 5) 患者さん本人の文書による同意が得られている患者さん
- 6) 患者さん本人が未成年の場合は、患者さん本人と代諾者の方の文書による同意が得られている患者さん

## この臨床研究に参加できない方（除外基準）

以下のいずれかの項目に該当する患者さんは、この臨床研究に参加することはできません。

- 1) この臨床研究へ参加する2ヶ月以内に前十字靭帯、後十字靭帯、あるいはその両方の靭帯再建術を受けられた患者さん
- 2) 活動性の癌を有する患者さん
- 3) 妊娠中又は妊娠が予想される患者さん、又は授乳中の患者さん及びこの臨床研究に参加されている間に妊娠を希望する患者さん
- 4) 感染症を有する患者さん（HIV抗体、HBs抗原、HCV抗体、ATLA抗体のいずれかが陽性）
- 5) 精神疾患を有する患者さん
- 6) その他、この臨床研究への参加を責任者又は分担者が不相当と判断した患者さん

## 参加予定人数

全研究機関合計 80名

うち標準治療群 40名、細胞移植群 40名

## 臨床研究参加の中止・中断について

患者さんが以下のいずれかの項目に当てはまった場合は、患者さんの臨床研究への参加を中止又は中断します。

- 1) 骨髄細胞から培養を2回行い、2回とも培養細胞の基準を満たさなかった場合
- 2) 上記1)の他に、プロトコル治療が実施できなくなった場合
- 3) 患者さんより臨床研究への参加に対する同意撤回の申し出があった場合
- 4) 有害な事からの発生を認め、研究責任者が患者さんの臨床研究への参加の継続が困難と判

断した場合

- 5) 研究に参加された後に、患者さんがこの臨床研究に参加できる基準を満たしていなかったことが判明した場合
- 6) その他、研究責任者又は研究分担者が、臨床研究への参加の中止を適切と判断した場合
- 7) 患者さんの体調の変化などにより一時的に臨床研究の継続が不可能であると判断した場合、患者さんの臨床研究を中断し、回復を待って、可能であれば再開します。

### **併用薬・併用療法または併用禁止薬・併用禁止療法について**

患者さんが半月板損傷を合併している場合については、プロトコル治療前、もしくは同時、いずれの時期にも半月板損傷に対する治療を行うことが可能であるものとします。

## **6. プロトコル治療の考えられる効果と危険性・不都合**

### **考えられる治療効果**

この臨床研究における骨髄刺激法は約半世紀前に開発された方法ですが、関節軟骨欠損の修復を促進させる効果があります。保険適用も認められており、関節軟骨修復の最も標準的な治療法となっています。特殊な装置や高度の技術を用いずに実施することができますが、修復される組織が本来の関節軟骨の組織である硝子軟骨ではなく、線維軟骨という組織で修復されます。

一方、この臨床研究における自己骨髄間葉系細胞移植法を受けられた場合、その効果として、より本来の関節軟骨の組織に近い硝子軟骨による修復が期待されます。それに伴い、疾患により制限された日常生活動作が骨髄刺激法と比較して、より改善されることが予想されます。

### **考えられる危険性と不都合**

プロトコル治療には、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ります。しかし、その入院は従来からある関節鏡視下骨髄刺激法のみを受ける場合と同じで、患者さんにとって特に大きな不利益とはなりません。

重大な有害な事がらとして感染症や修復軟骨の剥離が、その他の有害な事がらとして局所の出血や採取部位の痛みなどが考えられ、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ります。

## **7. 他の治療方法について**

プロトコル治療以外で、現在ある方法は自己骨軟骨柱移植法、自己軟骨細胞移植などです。自己骨軟骨柱移植法あるいは自己軟骨細胞移植法は、自分の正常軟骨から一部組織を採取して、関節軟骨欠損に移植します。関節軟骨本来の硝子軟骨で修復されますが、小さいとはいえ採取したところに軟骨欠損を作ってしまうます。

## **8. 個人情報保護**

臨床研究の結果は、今後新しい一般的な治療法として国などの許可を得るために使用されたり、医学雑誌などに発表されたりすることがありますが、その際に患者さんのお名前や身元な

どが明らかになるようなことはありませんし、患者さんや患者さんのご家族の個人情報に外部に漏れる心配は一切ありません。

また、あなたがプロトコル治療に参加されることを承諾されますと、治療の内容や結果について確認するために、審査委員会（臨床研究の実施に関して決定する委員会）の人などが、あなたのカルテ等の内容を見ることについても御了承いただいたこととなります。これらの人達は、法律上の守秘義務があり、あなたやあなたのご家族の個人情報が外部に漏れる心配は一切ありません。

## 9. 臨床研究結果の開示・公表

この臨床研究では、その性格上研究結果（効果と危険性や不都合）が直接患者さんの利益・不利益と関わっています。従って患者さんのプロトコル治療の結果から得られた種々の情報に関しては、患者さん本人や代諾者の方に対し説明します<sup>⑨</sup>が、第三者からの要求に対して患者さんから得られた情報を開示することはありません。<sup>⑩</sup>ただし、臨床研究の結果得られた成果は医学上貴重な知見ですので、研究に参加された方々の個人情報が明らかにならないようにしたうえで、学会、学術雑誌、データベース上で公開されたり、他の機関に結果を提供する場合があります<sup>⑪</sup>。その際に、患者さんのお名前や身元などが明らかになるようなことはありませんし、患者さんや患者さんのご家族の個人情報が外部に漏れる心配は一切ありません。

## 10. 臨床研究実施にあたっての費用について

参加された患者さんの研究にかかる費用は、広島大学病院が負担し、あなたがこの臨床研究にご参加いただくことによってあなたの負担が増えることはありません。

なお、交通費や謝礼金などの支給はありません。

## 11. 臨床研究の資金源について

この臨床研究は公的研究費その他の競争的研究資金等、研究責任者のもつ資金により実施されます。

## 12. 臨床研究から生じる知的財産権について

この臨床研究の結果として生じる知的財産権や著作権は、臨床研究に参加された患者さんではなく、広島大学と研究チームに属して臨床研究を行う者の所有となります。

## 13. 臨床研究組織と研究期間について

この臨床研究は多施設共同研究として、以下のような研究体制で行われます。

○参加予定研究機関

### 1) プロトコル治療実施研究機関

広島大学病院、大阪市立大学大学院医学研究科、兵庫医科大学、近畿大学医学部、豊見城中央病院

### 2) その他の参加研究機関

大阪大学医学部附属病院（患者さんから得られたデータのマネジメント／大阪市立大学大学院医学研究科、兵庫医科大学において用いられる試験物の調製）

あなたが、この臨床研究に参加される場合には、広島大学病院にて参加手続きをいたしますので、広島大学病院整形外科による研究チームが、広島大学病院においてプロトコル治療を行います。チームメンバーは必要に応じ増減することがあります。

なお、この臨床研究は、当院において研究実施の承認が得られてから3年間、患者さんの参加を受け付けます。

#### **14. 健康被害が発生した場合の補償について**

この治療が原因であなたが何か異常を感じた場合は、速やかに担当医師にご連絡下さい。最善の治療を行います。この臨床研究における治療が原因で、医療上あなたにとって好ましくない事が生じた場合の補償に関しては、責任をもって適切な治療にあたります。この際には、日常の治療の場合と同様に、あなたの主治医の属する医療機関において検査及び治療を行うことになり、別途補償制度はありません。また、障害、死亡など深刻な事態に対する特別な補償制度もありませんが、病院の規則に則り誠実に対処します。

#### **15. 臨床研究期間終了後の対応**

臨床研究期間が終了した後もなるべく通院を続けていただき、副作用などが起こっていないかについて観察を続けます。また、体調の不良などの場合はご連絡下さい。

他の医療機関を受診した場合、たとえ今回の治療とは関係のない病気で受診したとしてもこのプロトコル治療を広島大学病院で受けたことをその病院の主治医にお伝えしてください。

#### **16. 試料の保存について**

今回の治療に使った細胞やあなたの血液などの試料は、将来万が一有害な事態が起こったときなどに原因を調べるため、研究終了後20年間は広島大学病院あるいは大阪大学医学部附属病院未来医療センター内の保存施設に保存されます。これらの試料は他の目的に使われることはありません。また、試料保存期間の終了後は広島大学病院あるいは大阪大学医学部附属病院で定められた処理要項に従って適切に廃棄処分されます。保存試料そのものにあなたのお名前は記載されておりませんし、これらの試料は全て個人を特定できないような記号を使って取り扱われます。試料からあなたの情報が漏れることはありませんし、お名前と試料との対照表は鍵のかかる書庫に厳重に保管されます。

#### **17. 参加に伴い守っていただきたい事項**

- ①この臨床研究への参加中は、治療スケジュールに沿って来院してください。
- ②他の医師にかかるときは、この臨床研究に参加している旨を伝えてください。

#### **18. 臨床研究の開示**

この臨床研究の詳細については以下のホームページ内に公表しており、いつでも自由に見ることができます。

医学情報 大学病院医療情報ネットワーク (UMIN) 内の UMIN 臨床試験登録システム  
(<http://www.umin.ac.jp/ctr/index-j.htm>)

## 19. 担当医師への連絡

この臨床研究について、心配なことや、わからないこと、何か異常を感じられた時は、いつでも遠慮なく担当医師に申し出てください。

[担当医師]

広島大学病院 整形外科 越智光夫

広島大学病院 整形外科 安達伸生

広島大学病院 整形外科 中佐智幸

[相談窓口]

広島大学病院 再生医療部 亀井直輔 082-257-5470 (整形外科外来)

[緊急連絡先]

広島大学大学院整形外科学： 082-257-5233

同意を撤回される場合も上記担当医師に連絡して下さい。

## 同意書

広島大学病院整形外科 越智光夫 殿

研究題目 : 関節鏡視下自己骨髄間葉系細胞移植による関節軟骨欠損修復

私は、上記研究題目における研究に (研究対象者氏名) が参加するにあたり、担当医から以下の項目について、説明文書および口頭にて説明を受け、私の自由意思による参加の中止が可能であることを含め理解しましたので、この研究に参加することに同意します。

私は、本研究の説明を受け理解した項目について、□の中にレを記入しました。

- 1. この臨床研究の目的・意義
- 2. 臨床研究への参加同意の任意性について
- 3. 臨床研究への参加後の同意撤回の自由について
- 4. 代諾者からの同意取得の必要性について
- 5. 臨床研究におけるプロトコル治療の方法
- 6. プロトコル治療の考えられる効果と危険性・不都合
- 7. 他の治療方法について       8. 個人情報の保護
- 9. 臨床研究結果の開示・公表       10. 臨床研究実施にあたっての費用について
- 11. 臨床研究の資金源について       12. 臨床研究から生じる知的財産権について
- 13. 臨床研究組織と研究期間について       14. 健康被害が発生した場合の補償について
- 15. 臨床研究期間終了後の対応
- 16. 試料の保存について
- 17. 参加に伴い守っていただきたい事項       18. 臨床研究の開示
- 19. 担当医師への連絡

本人署名 : \_\_\_\_\_ (印)

署名年月日 : 西暦 年 月 日

代諾者署名 (続柄) : \_\_\_\_\_ ( ) (印)

私は担当医として、今回の研究について上記の項目を説明し、インフォームドコンセントが得られたことを認めます。

担当医署名 : \_\_\_\_\_ (印)

署名年月日 : 西暦 年 月 日

同席者署名 : \_\_\_\_\_

(複数署名可) \_\_\_\_\_

## 同意書

広島大学病院整形外科 越智光夫 殿

研究題目 : 関節鏡視下自己骨髄間葉系細胞移植による関節軟骨欠損修復

私は、上記研究題目における研究に(研究対象者氏名) \_\_\_\_\_ が参加するにあたり、担当医から以下の項目について、説明文書および口頭にて説明を受け、骨髄液の採取を受けることに同意します。

私は、本研究の説明を受け理解した項目について、□の中にレを記入しました。

- ①骨髄液採取の目的
- ②同意が任意のものであり、同意しない場合も不利益をうけないこと
- ③代諾者からの同意取得の必要性
- ④骨髄液採取の方法
- ⑤骨髄液採取での期待される結果及び起こりうる危険性・不都合
- ⑥個人情報の取扱い
- ⑦試料(資料)の保存・保存期間及び使用方法
- ⑧問い合わせ先(研究機関名・研究者等の氏名、職名・連絡先等)

本人署名 : \_\_\_\_\_ (印)

署名年月日 : 西暦 年 月 日

代諾者署名(続柄) : \_\_\_\_\_ ( ) (印)

私は担当医として、今回の研究について上記の項目を説明し、インフォームドコンセントが得られたことを認めます。

担当医署名 : \_\_\_\_\_ (印)

署名年月日 : 西暦 年 月 日

同席者署名 : \_\_\_\_\_

(複数署名可) \_\_\_\_\_

\*本研究は、広島大学ヒト幹細胞臨床研究倫理審査委員会の承認を受けた後に実施するものです。

## 同意書

広島大学病院整形外科 越智光夫 殿

研究題目 : 関節鏡視下自己骨髄間葉系細胞移植による関節軟骨欠損修復

私は、上記研究題目における研究に(研究対象者氏名)が参加するにあたり、担当医から以下の項目について、説明文書および口頭にて説明を受け、骨髄間葉系幹細胞移植に同意します。

私は、本研究の説明を受け理解した項目について、□の中にレを記入しました。

- ①骨髄間葉系幹細胞移植の目的
- ②同意が任意のものであり、同意しない場合も不利益をうけないこと
- ③代諾者からの同意取得の必要性
- ④細胞移植の方法
- ⑤細胞移植で期待される結果及び起こりうる危険性・不都合
- ⑥個人情報の取扱い
- ⑦試料(資料)の保存・保存期間及び使用方法
- ⑧問い合わせ先(研究機関名・研究者等の氏名、職名・連絡先等)

本人署名 : \_\_\_\_\_ (印)

署名年月日 : 西暦 年 月 日

代諾者署名(続柄) : \_\_\_\_\_ ( ) (印)

私は担当医として、今回の研究について上記の項目を説明し、インフォームドコンセントが得られたことを認めます。

担当医署名 : \_\_\_\_\_ (印)

署名年月日 : 西暦 年 月 日

同席者署名 : \_\_\_\_\_

(複数署名可) \_\_\_\_\_

\*本研究は、広島大学ヒト幹細胞臨床研究倫理審査委員会の承認を受けた後に実施するものです。

平成 25 年 4 月 18 日

大阪市立大学大学院医学研究科から申請のあった  
ヒト幹細胞臨床研究実施計画に係る意見について

ヒト幹細胞臨床研究に関する  
審査委員会

委員長 永井良三

大阪市立大学大学院医学研究科から申請のあった下記のヒト幹細胞臨床研究  
実施計画について、本審査委員会で検討を行い、その結果を別紙のとおりとり  
まとめたので報告いたします。

記

1. 関節鏡視下自己骨髄間葉系細胞移植による関節軟骨欠損修復  
申請者：大阪市立大学大学院医学研究科 研究科長 石河修  
申請日：平成 24 年 1 月 26 日

## 1. ヒト幹細胞臨床研究実施計画の概要

研究課題名	関節鏡視下自己骨髄間葉系細胞移植による関節軟骨欠損修復
申請年月日	平成24年1月26日
実施施設及び研究責任者	実施施設：大阪市立大学大学院医学研究科 研究責任者：石川 修
対象疾患	外傷性あるいは離断性骨軟骨炎による膝関節軟骨損傷
ヒト幹細胞の種類	自己骨髄間葉系細胞
実施期間及び対象症例数	病院長の実施許可通知から3年間を被験者登録期間とし、5年間を研究実施期間とする。対象症例数は細胞移植群40例、対照群40例。
治療研究の概要	有効性の評価を行う。腸骨より骨髄液を採取し、大阪大学CPCにて骨髄間葉系細胞を培養する。必要細胞数まで増やしたら、細胞浮遊液としてヒアルロン酸を加えて、関節内に移植する。
その他（外国での状況等）	米国 Genzyme Biosurgery 社は、1997年、自家軟骨細胞培養・移植法を開発し、FDAの認可を受け商品化した（Carticel®）が、従来の治療法を超える有用性は示せていない。我が国では広島大学がアテロコラーゲンゲルの中で自家軟骨細胞を三次元培養し、軟骨様組織を得て優れた成績を残している。信州大学、東海大学、大阪大学からの臨床研究に大臣意見が発出されている。
新規性について	関節鏡視下に投与するところに新規性がある。

## 2. ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会における審議概要 (○) と主な変更内容 (●)

### 0) 審査回数

2回 (平成 24 年 2 月、平成 25 年 2 月)

### 1) 第 1 回審議

①開催日時： 平成 24 年 2 月 29 日 (水) 15:30~18:00

(第 19 回 ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会)

### ②議事概要

平成 24 年 1 月 26 日付けで大阪市立大学大学院医学研究科から申請のあったヒト幹細胞臨床研究実施計画 (対象疾患：関節軟骨欠損) について、申請者からの提出資料を基に、指針への適合性に関する議論が行われた。

各委員からの疑義・確認事項については、事務局で整理の上申請者に確認を依頼することとし、その結果を基に再度検討することとした。

(本審査委員会からの主な疑義・確認事項)

### 1. プロトコールについて

○ 「MRI の損傷面積  $2\text{ cm}^2$  以上」の損傷の定義を明示ください、また  $2\text{ cm}^2$  以上とする根拠をご説明下さい。

- 「MRI の矢状断と冠状断像から 2 次元画像を想定し、その面積が  $2\text{ cm}^2$  以上とします。本来ならどのような関節軟骨損傷も修復すべきと考えます。現在の一般的認識では  $2\text{ cm}^2$  以下の軟骨損傷はマイクロフラクチャー法で治癒する可能性が高いとされております。本研究ではマイクロフラクチャー法をコントロールとして比較しますので、 $2\text{ cm}^2$  以下は除外いたしました。」との返答を得た。

○ 投与にあたってヒアルロン酸を添加する意味を説明してください。

- 「我々の以前報告ではコラーゲングルに包埋し欠損部に骨膜で縫い付けておりましたが手術侵襲が大きいため、今回、手術侵襲の小さい方法の開発めざし、ヒアルロン酸に包埋して注入する方法を選択しました。動物実験で、ヒアルロン酸単独より、ヒアルロン酸+細胞移植群の方が修復

が良いと報告があり、参考にしました。」との返答を得た。

- 対象年齢ですが、70歳までとしていただいておりますが、人工関節は60歳以上に適応であるならば、今回の臨床研究の対象者は60歳未満になるのではないのでしょうか。
- 「60歳代でも変形性関節症では無く小さな軟骨損傷で人工関節置換術の適応のない患者さんがおられます(年齢60才以上+軟骨欠損=人工関節、ではないと思います)。そのような患者さんには軟骨修復術が必要であると考えます。」との返答を得た。

## 2) 第2回審議

- ①開催日時： 平成25年2月6日(水) 16:00~18:30  
(第24回 ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会)

### ②議事概要

平成24年1月26日付けで大阪市立大学大学院医学研究科から申請のあったヒト幹細胞臨床研究実施計画(対象疾患: 関節軟骨欠損)について、申請者からの提出資料を基に、指針への適合性に関する議論が行われた。

各委員からの疑義・確認事項については、事務局で整理の上申請者に確認を依頼することとし、その結果を基に再度検討することとした。

(本審査委員会からの主な疑義・確認事項)

1. プロトコールについて
  - 語句の定義のなかの変形性関節症について「その多くは若年期の軟骨損傷に由来すると考えられる」については一般的な記載とは異なります。「若年期の軟骨損傷」との関係は「若年期の軟骨損傷はその原因の1つになると考えられている」という表現が妥当ではないのでしょうか。
  - 「この表記に修正します。」との返答を得た。
2. 品質・安全性について
  - 前臨床研究で中大動物における検討を行っていますか。

- 「ビーグル犬でのデータを示しました。」との返答を得た。

### 3) 第3回審議

①委員会の開催はなし

②議事概要

前回の審議における本審査委員会からの疑義に対し、大阪市立大学大学院医学研究科の資料が適切に提出されたことを受けて、疑義を提出していただいた委員との間で審議を行った結果、当該ヒト幹細胞臨床研究実施計画を了承した。

### 3. ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会の検討結果

大阪市立大学大学院医学研究科からのヒト幹細胞臨床研究実施計画（対象疾患：関節軟骨欠損）に関して、ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会は、主として倫理的および安全性等にかかる観点から以上の通り論点整理を進め、本実施計画の内容が倫理的・科学的に妥当であると判断した。

次回以降の科学技術部会に報告する。

病院施設



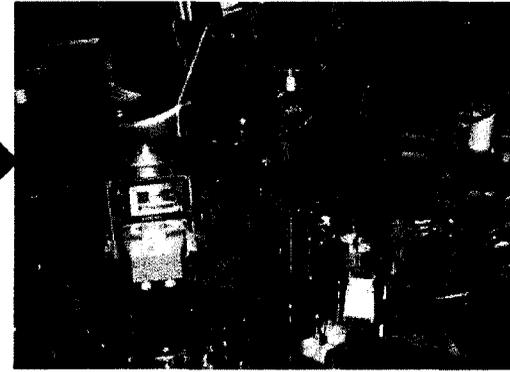
麻酔下に腸骨から  
骨髓液30mlを採取



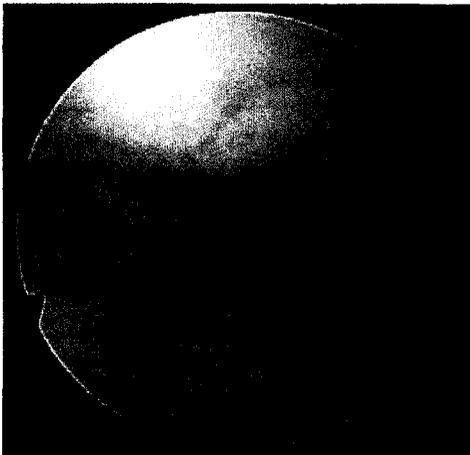
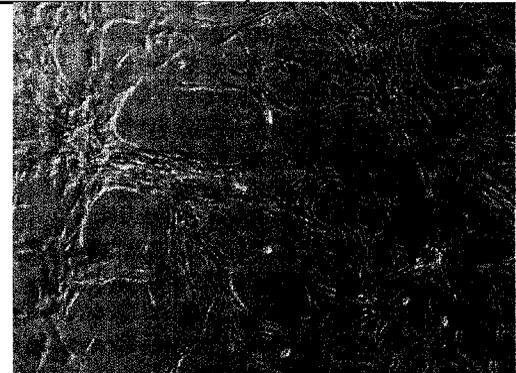
自己末梢血



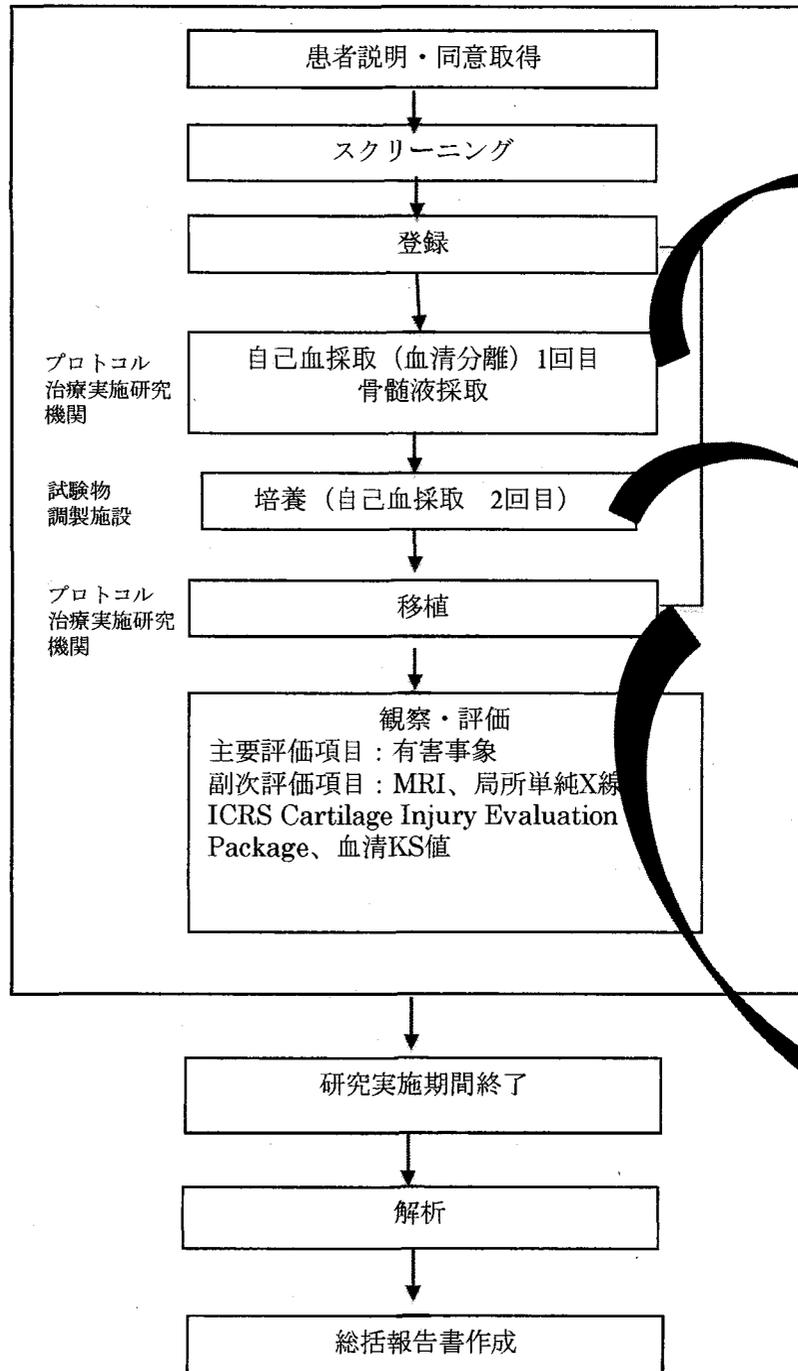
細胞培養施設



CPCで細胞培養

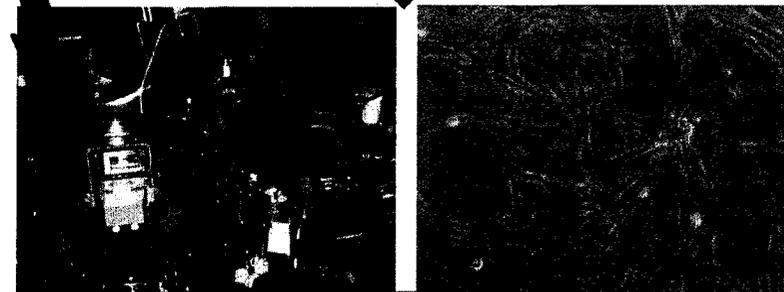


軟骨損傷患者に関節鏡視下に移植



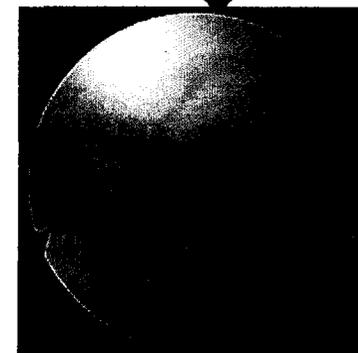
自己骨髓血30ml  
末梢血採血採取

輸送



CPCで骨髓間葉系  
細胞培養  
約10日でコンフルエント

輸送



ヒアルロン酸と混合した  
骨髓間葉系幹細胞を  
軟骨損傷患者に  
関節鏡視下に移植

ヒト幹細胞臨床研究実施計画申請書

平成 24 年 1 月 26 日

厚生労働大臣 殿

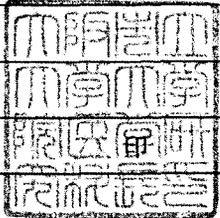
研究機関	所在地	〒545-8585 大阪市阿倍野区旭町 1-4-3	
	名称	大阪市立大学大学院医学研究科	06-6645-2811 (電話番号)
	研究機関の長 役職名・氏名	大阪市立大学大学院医学研究科長	石河 修 

下記のヒト幹細胞臨床研究について、別添のとおり実施計画書に対する意見を求めます。

記

ヒト幹細胞臨床研究の課題名	研究責任者の所属・職・氏名
関節鏡視下自己骨髄間葉系細胞移植による関節軟骨欠損修復	整形外科・講師・橋本祐介

# ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

臨床研究の名称	関節鏡視下自己骨髄間葉系細胞移植による関節軟骨欠損修復		
研究機関			
名称	大阪市立大学大学院医学研究科		
所在地	〒545-8585 大阪府大阪市阿倍野区旭町1-4-3		
電話番号	06-6645-2811		
FAX番号	06-6636-3463		
研究機関の長			
役職	医学研究科長		
氏名	石河 修		
			
研究責任者			
所属	大阪市立大学大学院医学研究科 整形外科		
役職	講師		
氏名	橋本 祐介		
連絡先	Tel/Fax	Tel: 06 - 6645 - 3651 /Fax: 06 - 6646 - 6260	
	E-mail	m1375526@med.osaka-cu.ac.jp	
最終学歴	大阪市立大学大学院医科学研究科		
専攻科目	整形外科学		
その他の研究者	別紙1参照		
共同研究機関(該当する場合のみ記載してください)			
名称	大阪大学		
所在地	〒 565-0871 大阪府吹田市山田丘2-15		
電話番号	06-6879-6551		
FAX番号	06-6879-6549		
共同研究機関の長(該当する場合のみ記載してください)			
役職	病院長		
氏名	福澤 正洋		

# ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

臨床研究の目的・意義	<p>本研究では、現在のところ確実な治療方法のない関節軟骨欠損修復の新しい治療方法、しかも手術侵襲の小さい関節鏡視下手術で行える方法を開発することである。</p> <p>より高度な臨床研究を行うために、骨髄刺激法のみコントロール群を設定し比較する、非盲検、ランダム化、並行比較試験とした。この方法の有用性が明らかになれば、企業治験をへて保険収載される道が開けやすいと考える。</p> <p>この方法で多くの関節軟骨欠損患者の治療が可能になれば、現在治療方法のない、スポーツ障害などの軟骨損傷患者にとって福音となるのみならず、将来の変形性関節症患者を減らすことが可能であり、本研究の意義はきわめて高いといえる。</p>
臨床研究の対象疾患	
名称	外傷性損傷あるいは離断性骨軟骨炎に起因する膝関節軟骨損傷
選定理由	一般的に膝関節軟骨損傷として、外傷性軟骨損傷、離断性骨軟骨炎、及び変形性関節症による損傷があげられるが、本臨床研究では外傷性損傷と離断性骨軟骨炎を対象とする。離断性骨軟骨炎は、詳細不明であるが小外傷の繰り返しと原因と考えられ、基本的に外傷性軟骨損傷の病態と大きく異なるためである。
被験者等の選定基準	<p>以下に挙げた全ての項目を満たす患者を選択する。</p> <p>1) 対象疾患に対して骨髄刺激法の施行が予定されている患者</p> <p>2) MRIで関節軟骨の50%以上の損傷が認められる患者 (International Cartilage Repair Society (ICRS) articular cartilage injury classification (別添資料①) グレード3以上に相当)</p> <p>3) MRIで損傷面積が2cm<sup>2</sup>以上と診断された患者</p> <p>4) 同意取得時年齢が16歳以上、70歳以下の患者。ただし、中間評価が終了するまでは20歳未満の患者は登録しないこととする。</p> <p>5) 本人の文書による同意が得られている患者</p> <p>6) 本人が未成年の場合、本人に加え、法定代理人(代諾者)の文書による同意が得られている患者</p>
臨床研究に用いるヒト幹細胞	
種類	骨髄間葉系細胞
由来	<input checked="" type="radio"/> 自己・非自己・株化細胞 <input checked="" type="radio"/> 生体由来・死体由来
採取、調製、移植又は 投与の方法	<p>1) 患者本人からの血清採取・・・自己骨髄間葉系細胞培養に用いるためあらかじめ本人から血液400ml採取し、培養液に15%自己血清を加える。場合によっては細胞培養の経過でもう一度400ml採血し、血清を採取する。</p> <p>2) 患者からの骨髄液採取・・・患者本人から局所麻酔により腸骨より骨髄液約30ml採取する。</p> <p>3) 自己骨髄液から間葉系細胞の培養・・・未来医療センターセルプロセッシングアイソレーターにおいて、調整培養を行う。自己血清含αMEM培養液中で付着細胞を一回携帯にて必要細胞数に達するまで培養する。</p> <p>4) 関節内への自己骨髄間葉系細胞移植・・・細胞がほぼコンフルエントに達したところで細胞を剥離、遠心分離し、自己血清を加え細胞浮遊液を作成しそこにヒアルロン酸を加え攪拌し、移植する。</p>
調製(加工)行程	<input checked="" type="radio"/> 有 <input type="radio"/> 無
非自己由来材料使用	<input checked="" type="radio"/> 有・ <input type="radio"/> 無      動物種(      )
複数機関での実施	<input checked="" type="radio"/> 有 <input type="radio"/> 無

# ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

他の医療機関への授与・販売	有・無
安全性についての評価	被験者の血清、骨髓血採取さらに移植後から研究終了までの期間で被験者におきた有害事象の種類とその頻度、重症度、重篤度、発現期間などを評価する。有害事象は臨床症状の有無、血液検査、X線にて評価する。
臨床研究の実施が可能であると判断した理由	<p>自己骨髓間葉系細胞移植により、関節軟骨修復が促進されることが、前臨床試験で明らかになっている。臨床的には、厚生労働省の「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」の施行以前に行った自己骨髓間葉系細胞移植に関する2つの臨床研究により、移植に伴う有害事象が認められなかったのと同時に、関節軟骨欠損修復が促進される可能性が明らかになっている。しかし、我々がこれまで行った2つの臨床研究の方法は、関節切開により関節を展開して自己骨髓間葉系細胞移植するために、手術侵襲が大きい。臨床的に、より一般的な治療法として確立することを目指すにあたっては、手術侵襲の小さい方法により移植が行われることが望ましい。</p> <p>関節鏡手術により関節軟骨欠損部を確認し同部に標準治療の一つである骨髓刺激法を施行し、同時に自己骨髓間葉系細胞を移植する今回のプロトコル治療は、我々がこれまでに行った2つの臨床研究におけるプロトコル治療と比較して、患者に与える侵襲が小さい(骨髓液採取、末梢血約400mL採血、及び関節内注射の侵襲のみ)。また、ラットおよびビーグル犬の実験系でも、自己骨髓間葉系細胞関節内注入+骨髓刺激により、正常軟骨とほぼ同様の修復軟骨が得られ、組織学的スコアにおいても、骨髓刺激単独と比較して、有意な再生が得られている。以上のようなことから、臨床研究で実施が可能であると判断した。</p>
臨床研究の実施計画	<p><b>I. デザインの型</b> 標準治療を対照とする多施設共同、非盲検、無作為化、並行群デザインの早期探索試験である。</p> <p><b>II. 目標登録患者数。患者登録期間</b> 1) 目標症例数: 細胞移植群40例、対照群40例(全参加施設合計) 2) 患者登録期間: 病院長による実施許可日から3年間</p> <p><b>III. 治療の定義</b> 本研究における治療とは、「1) 骨髓液採取」から「2) 関節内への骨髓間葉系細胞注入手術」完了までとする。</p> <p><b>IV. 治療の方法</b> 1) 被験者は移植前日までに入院し、2-3日間の入院にて治療を行う。 2) 関節鏡視下骨髓刺激法と自己骨髓間葉系細胞移植</p> <p><b>V. 併用療法</b> 半月板損傷については、プロトコル治療前、もしくは同時、いずれの時期にも治療を行うことが可能であるものとする。</p> <p><b>VI. 指示療法</b> 支持治療は特に指定しない。</p> <p><b>VII. 後療法</b> 骨髓間葉系細胞の移植手術後にリハビリテーションを行う。 1) 術直後から膝装具をあて安静とする。 2) 翌日、装具をはずし、両松葉杖にて患肢を完全免荷歩行とする。CPM訓練開始し、退院する。 3) 術後3週から1/3荷重、4週から1/2荷重、6週から全荷重とする。</p> <p><b>VIII. 主要評価項目</b> IKDC subjective scoreのプロトコル治療前と治療48週後における改善度</p>







臨床研究の概要をできる限り平易な用語を用いて記載した要旨

#### <本研究の概要>

関節軟骨損傷は、若年者のスポーツ障害として多くみられるが、数年程度の短期の経過では症状が出にくく、これまでは確実な修復方法がないこともあり、放置されることが多い疾患であった。しかし、最近は長期の経過で変形性関節症になる可能性が高いことが明らかになり、修復することが望まれる。

骨髄間葉系細胞移植の利点は細胞を採取し増殖させた状態で移植できる事、正常軟骨を傷つける必要性がない事、また、軟骨だけでなく軟骨下骨の修復も期待できる事から従来の方法に比してより良い骨軟骨修復を得られる可能性があるものと考えられる。しかし従来の方法は関節を大きく展開するために手術侵襲が大きいという問題がある。

本研究の目的は、より手術侵襲の小さい方法の開発を計画した。関節鏡視下に骨髄刺激法を施行し、同時に自己骨髄間葉系細胞移植を行い、その関節軟骨修復への有効性・安全性を評価する事である。

#### <本研究の背景>

変形性膝関節症患者は、現在我が国に1000万人以上存在すると考えられ、今後の高齢化社会の進行とともにますます患者数の増加する重要な疾患である。近年、変形性関節症の多くは軟骨損傷に由来すると考えられるようになってきた。すなわち若年期のスポーツ障害などで軟骨損傷を生じた場合、10年程度の経過で変形性関節症になると考えられる。従って、関節軟骨損傷を修復する方法があれば、スポーツ障害の治療法となるのみならず変形性関節症患者を減らすことができ、有用である。

現在、我が国において、確実に関節軟骨損傷を修復する方法はない。従来、このような軟骨障害に対する手術方法としては骨髄刺激法が行われてきた。この方法は軟骨下骨を削り出血させることで骨髄中の間葉系細胞を動員し修復を得る方法である。骨髄刺激法は簡便な方法であるが、これにより再生されるのは線維軟骨（関節軟骨の本来の組織は硝子軟骨）である。そこで、近年は硝子軟骨による修復を目指して自家骨軟骨柱移植法であるモザイクプラスチック、あるいは自己の関節軟骨を採取して培養後に損傷軟骨部に移植する培養軟骨細胞移植法が行われるようになってきた。両方法とも正常軟骨組織を採取して移植するため新たな軟骨障害を惹起する可能性が生じるという矛盾がある。通常、軟骨の採取部位として利用される大腿骨遠位外側の関節面においても相応の膝関節圧がかかっていることが報告されている。さらに、モザイクプラスチックでは欠損部が大きいほど大量の骨軟骨柱を必要とし、対応できる欠損の大きさには限界がある。また、打ち込む骨軟骨柱の深さを一定にして関節表面の曲率を再現することの難しさ、骨軟骨柱の間隙は数年経過しても残存することが指摘されている。培養軟骨細胞移植法においては、移植した組織が

周囲の関節軟骨や軟骨下骨との間で強固に結合するかは不明である。

我が国において、いくつかの施設で細胞移植による関節軟骨修復の臨床研究が行われているが、一部組織での小さな研究である。

我々は14年前から自己骨髄間葉系細胞移植による関節軟骨欠損修復の臨床研究を開始し、これまでに45関節に移植し、良好な臨床成績がえられ、しかも局所の腫瘍形成や感染を認めず安全な方法であること報告した。しかしながら従来の方法では関節を切開するために手術侵襲が大きいのという問題がある。そこで関節鏡で行える方法の開発を計画した。

#### <本研究の目的・意義>

本研究では、現在のところ確実な治療方法のない関節軟骨欠損修復の新しい治療方法、しかも手術侵襲の小さい関節鏡視下手術で行える方法を開発することである。

より高度な臨床研究を行うために、骨髄刺激法のみコントロール群を設定し比較する、非盲検、ランダム化、並行比較試験とした。この方法の有用性が明らかになれば、企業治療をへて保険収載される道が開けやすいと考える。

この方法で多くの関節軟骨欠損患者の治療が可能になれば、現在治療方法のない、スポーツ障害などの軟骨損傷患者にとって福音となるのみならず、将来の変形性関節症患者を減らすことが可能であり、本研究の意義はきわめて高いといえる。

#### <対象疾患・目標症例数>

外傷性損傷あるいは離断性骨軟骨炎に起因する膝関節軟骨損傷患者  
対照群40例、細胞移植群40例（参加全施設合計）

#### <主要評価項目>

IKDC subjective score のプロトコル治療前と治療 48 週後における改善度

#### <副次評価項目>

MRI、単純 X 線、Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score、血清ケラタン硫酸値  
本臨床研究において生じた有害事象の種類と重症度、発現頻度、発現期間、因果関係

#### <観察検査項目及びスケジュールの概要>

局所感染症状：局所感染症状の有無

局所皮膚症状局所皮膚症状：腫脹の有無、発赤の有無、疼痛の有無

血液学的、血液生化学的検査：血清KS値を含む

観察時期：スクリーニング、術前検査、手術1週後（±2日）、2週後（±2日）、4週後（±1週）、12週後（±1週）、24週後（±8週）、48週後（±8週）もしくは中止時

局所単純X線、MRI

観察時期：スクリーニング、6週後（±1週）、24週後（±8週）、48週後（±8週）もしくは中止時

**IKDC subjective score (IKDC subjective knee evaluation form)**

**Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score : KOOS**

観察時期：スクリーニング、2週後（±2日）、6週後（±1週）、12週後（±1週）、24週後（±8週）、48週後（±8週）もしくは中止時

# 患者さんへ

臨床研究課題名

**多施設共同臨床研究：**

**「関節鏡視下自己骨髄間葉系細胞移植による関節軟骨欠損修復」**

総括責任者 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 整形外科 教授 越智 光夫

副総括責任者 武庫川女子大学 健康・スポーツ科学部 教授 脇谷 滋之

研究責任者

大阪市立大学大学院医学研究科 整形外科 橋本 祐介（プロトコル治療実施機関）

大阪大学医学部附属病院未来医療センター 澤 芳樹（試験物調製施設）

## 1. はじめに

私たち医師は患者さんに最善の治療を提供するとともに、さらに優れた治療法の研究に取り組んでいます。臨床研究はそのために必要なもので、新しく開発された治療法が人の病気に対して有効かどうか、また安全かどうか、患者さんにご協力いただいて試験することをいいます。この臨床研究を行うことによって、新しい治療法の有効性が明らかになった場合は、将来あなたと同じ病気の患者さんの治療に大きく役立つこととなります。

## 2. この臨床研究の目的・意義<sup>①②</sup>

軟骨は関節面において骨の表面を被い、骨にかかる衝撃を分散・吸収する役割があります。この関節軟骨が損傷されると、骨同士が擦れ合い摩擦が大きくなり、また衝撃が直接骨に伝わるため骨が損傷しやすく将来的には変形性関節症に移行し痛みが生じると考えられます。しかし、軟骨の修復力は非常に弱く、いったん損傷されると元の状態に戻ることはありません。軟骨を修復するために様々な手術治療が行われていますが現段階で軟骨を完全に修復する方法はありません。

このため私たちは関節軟骨を修復する新たな方法の一つとして骨髄間葉系細胞を用いることを考えました。骨髄間葉系細胞は、骨髄の中に存在する細胞の一種で、骨や軟骨、筋肉、脂肪等の組織に分化する能力を持っています。骨髄間葉系細胞は、骨髄より採取した血液から容易に分離でき、10日間の培養で約2000倍にも増えるため臨床応用に適し、いくつかの組織の再生に応用が試みられています。この細胞を手術によって関節軟骨欠損部に移植すると、軟骨修復が促進されることを、私たちは動物実験および患者さんに対する臨床研究によって明らかにしました。しかし、この方法は関節を切開して行うため手術侵襲が大きいという欠点がありました。今回、関節鏡視下で自己骨髄間葉系細胞を移植する方法を開発しました。この関節鏡視下移植術は、従来の手術による方法より侵襲が小さく、よりよい機能回復が得られる可能性を、私たちは期待しています。今回の臨床研究は、関節鏡視下自己骨髄間葉系細胞移植という新しい方法を患者さんにはじめて応用するにあたり、その安全性と有効性の検討を目的としています。

なお、この臨床研究は、5つの研究機関で同じプロトコル治療（\*2 ページの「5.臨床研究におけるプロトコル治療の方法」を参照ください）で行う多施設共同臨床研究です。当院を含む

全参加研究機関の患者さんのデータは、一括して集計されて、統計解析を行い、プロトコル治療の安全性と有効性の評価に用いられます。

### **3. 臨床研究への参加同意の任意性と同意撤回の自由について**<sup>③④</sup>

この臨床研究の説明を担当医師から聞いた上で、臨床研究に参加するかどうかをあなたの自由な意思で<sup>③</sup>決めてください。たとえ参加されなくても今後の治療や診療に不利益になることはありません。<sup>④</sup>あなたの自由意思により同意書にご記名捺印またはご署名いただいた場合にのみプロトコル治療を行います。また、この臨床研究の実施中に新しい情報が得られたときには、必ずあなたにお知らせします。

そして、この臨床研究に参加することに同意していただいたあとでも、プロトコル治療が開始されてからでも、あなたが同意の撤回をしたいときは、いつでも自由に撤回することができます。<sup>④</sup>さらに、試験物である細胞が移植された後に、プロトコル治療実施に対する同意のみを撤回し、可能な限り当初の観察スケジュールに従った観察・検査を継続することも可能です。また、撤回されてもそれにより不利益を受けることはなく<sup>④</sup>、現在行われている最善の治療を行います。なお、撤回される場合もできる限り、担当医と面談の上、その後の治療法などについて説明を受けるようにして下さい。

### **4. 代諾者からの同意取得の必要性について**<sup>⑤</sup>

この臨床研究が対象とする関節軟骨欠損は若年者にも起こりやすい病気で、しかも若年の方が、軟骨再生が有効と考えられておりますので、このような病気をもった若年者の方に対する適切な治療法が現在ないことから、未成年の方を対象に含んだ臨床研究を計画しました。

この臨床研究において16歳以上20歳未満の方が臨床研究へ参加される際には、患者さんご自身と代諾者の間で十分相談して、患者さんご自身が臨床研究の内容を十分理解していただいた上で、必ず患者さんご自身の同意による記名捺印、又は署名をいただきます。さらに、代諾者の方による記名捺印、又は署名もいただくこととなります。

### **5. 臨床研究におけるプロトコル治療の方法**<sup>⑥</sup>

#### **臨床研究参加の条件**

関節軟骨欠損のため疼痛があり関節軟骨欠損を修復する必要があると判断され、この疾患に対する標準的な治療法である「骨髄刺激法」とよばれる関節鏡を用いた治療を行うことが適当と診断された人が対象です。臨床研究への参加に文書により同意され、さらにレントゲン、MRI、関節鏡などの検査が行われ、研究への適格性がある（臨床研究参加への条件を満たしている）と判断された場合に初めてプロトコル治療を受ける対象となります。

#### **2つのプロトコル治療群への振り分け**

この臨床研究では、登録された患者さんは、骨髄刺激法のみによる治療を行う方（「標準治療群」とします）と、骨髄刺激法にご自分の骨髄から取り出した細胞を移植する細胞移植を組み合わせる方（「細胞移植群」とします）の2つのプロトコル治療群に振り分けられます。その際、患者さんの振り分けは、研究への参加登録後、第3者である登録センターにおいて無作為に（ばらばらに、偶然に基づいて）行われます。したがって、個々の患者さんが

どちらの群に振り分けられるかは、患者さんご本人のご希望により決定することはできず、また医師も、患者さんがどちらの群に振り分けられるかはわからないことを、あらかじめご了承ください。

## プロトコル治療の方法

### 【標準治療群の方に行われるプロトコル治療】

「標準治療群」に振り分けられた方は、「骨髄刺激法」による治療が行われます。この治療は関節鏡で欠損部の軟骨下骨に傷をいれるというもので、関節軟骨欠損に対する治療としては、現在標準的に行われているものです。

### 【細胞治療群の方に行われるプロトコル治療】

「細胞移植群」に振り分けられた方は、手術の約 4 週間前に、大阪市立大学医学部附属病院の手術室において、局所麻酔で骨盤の骨から患者さんご自身の骨髄液を 30mL、および末梢血を 400mL 採取します（末梢血からは血清を分離し骨髄細胞の培養に用います）。この骨髄液を大阪大学医学部附属病院未来医療センターの移植用細胞培養施設に運び、骨髄間葉系細胞を分離、培養し増殖させます。プロトコル治療を行うために必要な細胞数を得るため、細胞培養中に、必要に応じて末梢血の採取（400mL）をさらにもう 1 回、同様の手順で行う場合があります。

増殖・調製された軟骨に分化する能力を持つ細胞は、大阪大学医学部附属病院未来医療センターで厳重な品質管理検査が行われます。調製の完了した細胞は回収され、細心の注意を払い、最終的には大阪市立大学医学部附属病院に運ばれ、移植に用いられます。

大阪市立大学医学部附属病院手術室において、関節鏡で欠損部の軟骨下骨に傷をいれ（骨髄刺激法）、関節内に細胞を注入します。関節鏡視下手術ですので通常の間節手術にくらべて切開が小さいという利点があります。

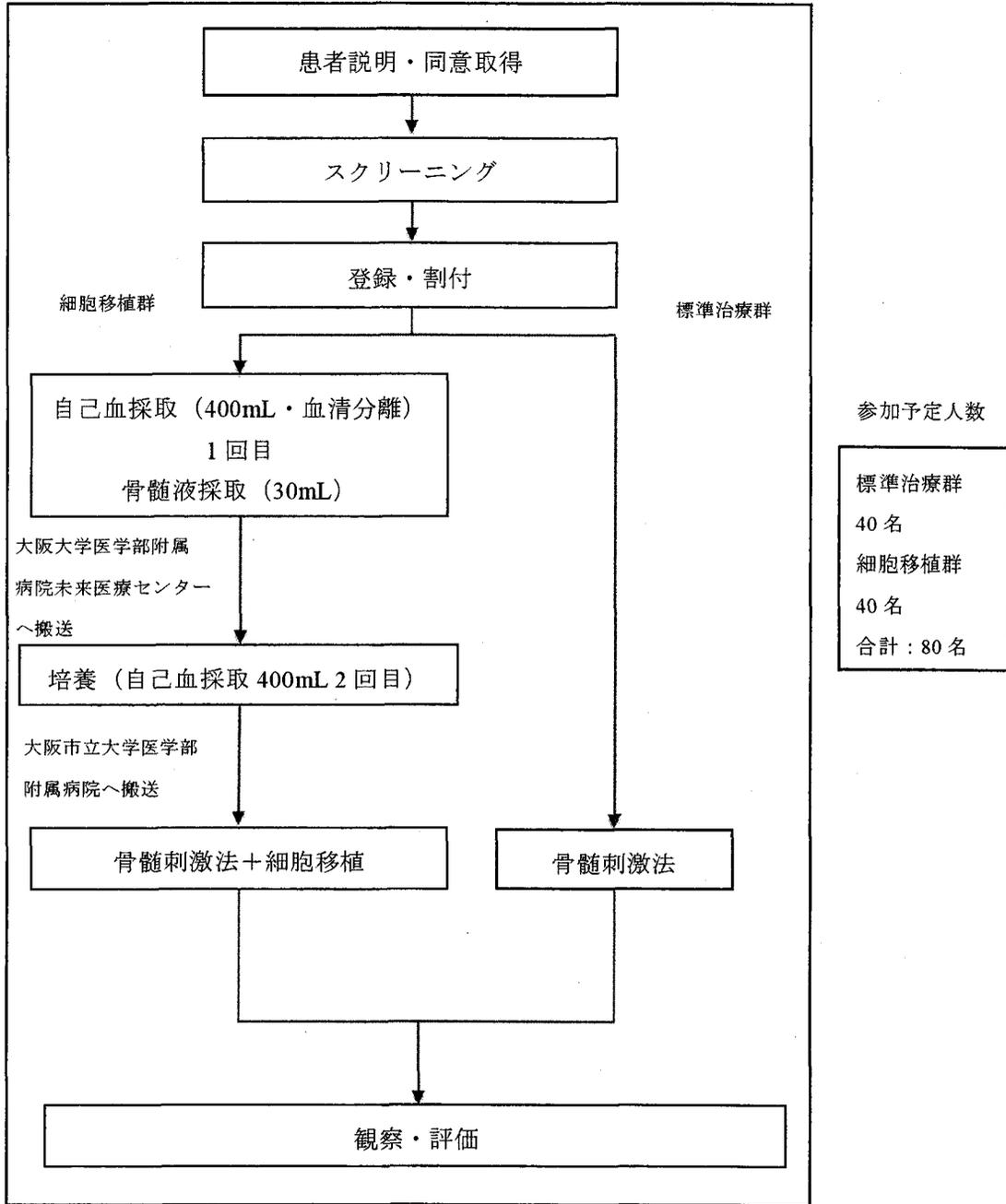
### 【プロトコル治療後（2つの治療群共通）】

「標準治療群」、「細胞移植群」いずれの方も、プロトコル治療を受けられた後は、手術直後から膝装具をあて安静にします。翌日、装具をはずし、両松葉杖を用いてプロトコル治療した膝に荷重がかからない歩行（完全免荷歩行）とします。持続的他動運動訓練を開始し、その後に退院となります。プロトコル治療後 3 週から 1/3 荷重、4 週から 1/2 荷重、6 週から全荷重とします。

### 【プロトコル治療の中間評価】

この臨床研究においては、2 つの群のプロトコル治療が、全参加研究機関でそれぞれ合計 40 名ずつ行われるまで登録を行います。しかし、「細胞移植群」で行われる細胞移植の方法は、この臨床研究で初めて患者さんに対して適用される方法のため、「細胞移植群」に 5 名の方が登録された時点で、いったん新たな患者さんの登録を中断します。そして、これらの方々をプロトコル治療から 6 週間観察し、安全上問題がないことを確認した後、患者さんの登録を再開することとしております。

プロトコル治療の流れ



### 観察項目

有害な事からの記録、MRI、IKDC subjective score、血清KS値、全身・局所の臨床症状、一般血液検査、レントゲン検査

### 観察・検査スケジュール

観察・評価日		同意取得	スクリーニング	登録	骨髓液採取日	術前検査	0日	0日	1週後	2週後	4週後	6週後	12週後	24週後	48週後	中止時
許容範囲			登録前 4週以内		採取前	手術前 4週以内	術前	術後	±2日		±1週			±8週		
同意取得		○														
登録				○												
患者さんの背景			○													
臨床症状	バイタルサイン		○		○		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
臨床症状	局所感染症状		○				○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	局所皮膚症状		○				○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
臨床検査	血液		○			○			○	○	○		○	○	○	○
	血清KS値*					○							○	○	○	○
	尿		○			○										
	心電図		○			○										
画像診断	局所単純X線		○					○				○	○	○	○	○
	MRI		○									○		○	○	○
自覚評価 機能評価	IKDC subjective		○							○		○	○	○	○	○
	KOOS		○							○		○	○	○	○	○
有害な事から					→											
併用治療					→											

\*血清KS値：軟骨損傷や変形性関節症の程度を示す指標

## 参加予定期間

この臨床研究に参加される患者さん、お一人お一人の観察期間は、手術後48週間とします。ただし、観察期間終了後も患者さんは大阪市立大学病院にて定期的に病状を観察します。

## この臨床研究に参加できる方（選択基準）

以下に挙げたすべての項目を満たす患者さんは、この臨床研究に参加することができます。

- 1) 関節軟骨欠損に罹患し、この疾患の標準的な治療法である「骨髄刺激法」により治療することが適当であると診断された患者さん
- 2) MRIで関節軟骨の50%以上の損傷が認められる患者さん（International Cartilage Repair Society (ICRS) articular cartilage injury classificationグレード3以上に相当）
- 3) MRIで損傷面積が2cm<sup>2</sup>以上と診断された患者さん
- 4) 年齢が16歳以上、70歳以下の患者さん。ただし、プロトコル治療の中間評価が終わるまでは、20歳未満の患者さんは登録しないこととします。
- 5) 患者さん本人の文書による同意が得られている患者さん
- 6) 患者さん本人が未成年の場合は、患者さん本人と代諾者の方の文書による同意が得られている患者さん

## この臨床研究に参加できない方（除外基準）

以下のいずれかの項目に該当する患者さんは、この臨床研究に参加することはできません。

- 1) この臨床研究へ参加する2ヶ月以内に前十字靭帯、後十字靭帯、あるいはその両方の靭帯再建術を受けられた患者さん
- 2) 活動性の重複癌を有する患者さん
- 3) 妊娠中又は妊娠が予想される患者さん、又は授乳中の患者さん及びこの臨床研究に参加されている間に妊娠を希望する患者さん
- 4) 感染症を有する患者さん（HIV抗体、HBs抗原、HCV抗体、ATLA抗体のいずれかが陽性）
- 5) 精神疾患を有する患者さん
- 6) その他、この臨床研究への参加を責任者又は分担者が不相当と判断した患者さん

## 参加予定人数

全研究機関合計 80名

うち標準治療群 40名、細胞移植群 40名

## 臨床研究参加の中止・中断について

患者さんが以下のいずれかの項目に当てはまった場合は、患者さんの臨床研究への参加を中止又は中断します。

- 1) 骨髄細胞から培養を2回行い、2回とも培養細胞の基準を満たさなかった場合
- 2) 上記1)の他に、プロトコル治療が実施できなくなった場合
- 3) 患者さんより臨床研究への参加に対する同意撤回の申し出があった場合
- 4) 有害な事からの発生を認め、研究責任者が患者さんの臨床研究への参加の継続が困難と判

断した場合

- 5) 研究に参加された後に、患者さんがこの臨床研究に参加できる基準を満たしていなかったことが判明した場合
- 6) その他、研究責任者又は研究分担者が、臨床研究への参加の中止を適切と判断した場合
- 7) 患者さんの体調の変化などにより一時的に臨床研究の継続が不可能であると判断した場合、患者さんの臨床研究を中断し、回復を待って、可能であれば再開します。

### **併用薬・併用療法または併用禁止薬・併用禁止療法について**

患者さんが半月板損傷を合併している場合については、プロトコル治療前、もしくは同時、いずれの時期にも半月板損傷に対する治療を行うことが可能であるものとします。

## **6. プロトコル治療の考えられる効果と危険性・不都合**

### **考えられる治療効果**

この臨床研究における骨髄刺激法は約半世紀前に開発された方法ですが、関節軟骨欠損の修復を促進させる効果があります。保険適用も認められており、関節軟骨修復の最も標準的な治療法となっています。特殊な装置や高度の技術を用いずに実施することができますが、修復される組織が本来の関節軟骨の組織である硝子軟骨ではなく、線維軟骨という組織で修復されます。

一方、この臨床研究における自己骨髄間葉系細胞移植法を受けられた場合、その効果として、より本来の関節軟骨の組織に近い硝子軟骨による修復が期待されます。それに伴い、疾患により制限された日常生活動作が骨髄刺激法と比較して、より改善されることが予想されます。

### **考えられる危険性と不都合**

プロトコル治療には、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ります。しかし、その入院は従来からある関節鏡視下骨髄刺激法のみを受ける場合と同じで、患者さんにとって特に大きな不利益とはなりません。

重大な有害な事象として感染症や修復軟骨の剥離が、その他の有害な事象として局所の出血や採取部位の痛みなどが考えられ、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ります。

## **7. 他の治療方法について**

プロトコル治療以外で、現在ある方法は自己骨軟骨柱移植法、自己軟骨細胞移植などです。自己骨軟骨柱移植法あるいは自己軟骨細胞移植法は、自分の正常軟骨から一部組織を採取して、関節軟骨欠損に移植します。関節軟骨本来の硝子軟骨で修復されますが、小さいとはいえ採取したところに軟骨欠損を作ってしまいます。

## **8. 個人情報保護**

臨床研究の結果は、今後新しい一般的な治療法として国などの許可を得るために使用されたり、医学雑誌などに発表されたりすることがありますが、その際に患者さんのお名前や身元な

どが明らかになるようなことはありませんし、患者さんや患者さんのご家族の個人情報に外部に漏れる心配は一切ありません。

また、あなたがプロトコル治療に参加されることを承諾されますと、治療の内容や結果について確認するために、審査委員会（臨床研究の実施に関して決定する委員会）の人などが、あなたのカルテ等の内容を見ることについても御了承いただいたことになります。これらの人達は、法律上の守秘義務があり、あなたやあなたのご家族の個人情報が外部に漏れる心配は一切ありません。

## 9. 臨床研究結果の開示・公表<sup>⑨⑩⑪</sup>

この臨床研究では、その性格上研究結果（効果と危険性や不都合）が直接患者さんの利益・不利益と関わっています。従って患者さんのプロトコル治療の結果から得られた種々の情報に関しては、患者さん本人や代諾者の方に対し説明します<sup>⑨</sup>が、第三者からの要求に対して患者さんから得られた情報を開示することはありません<sup>⑩⑪</sup>。ただし、臨床研究の結果得られた成果は医学上貴重な知見ですので、研究に参加された方々の個人情報が明らかにならないようにしたうえで、学会、学術雑誌、データベース上で公開されたり、他の機関に結果を提供する場合があります<sup>⑩</sup>。その際に、患者さんのお名前や身元などが明らかになるようなことはありませんし、患者さんや患者さんのご家族の個人情報に外部に漏れる心配は一切ありません。

## 10. 臨床研究実施にあたっての費用について<sup>⑫</sup>

大阪市立大学において参加された患者さんの研究にかかる費用は、大阪市立大学医学部附属病院および大阪市立大学医学部整形外科学教室が負担し、あなたがこの臨床研究にご参加いただくことによってあなたの負担が増えることはありません。

なお、交通費や謝礼金などの支給はありません。

## 11. 臨床研究の資金源について<sup>⑬</sup>

この臨床研究は公的研究費その他の競争的研究資金等、研究責任者のもつ資金により実施されます。

## 12. 臨床研究から生じる知的財産権について<sup>⑭</sup>

この臨床研究の結果として生じる知的財産権や著作権は、臨床研究に参加された患者さんではなく、大阪市立大学と研究チームに属して臨床研究を行う者の所有となります。

## 13. 臨床研究組織と研究期間について

この臨床研究は多施設共同研究として、以下のような研究体制で行われます。

○参加予定研究機関

1) プロトコル治療実施研究機関

大阪市立大学大学院医学研究科、兵庫医科大学、近畿大学医学部 広島大学病院、豊見城中央病院

2) その他の参加研究機関

大阪大学医学部附属病院（患者さんから得られたデータのマネジメント／大阪市立大学大学

院医学研究科、兵庫医科大学において用いられる試験物の調製)

あなたが、この臨床研究に参加される場合には、大阪市立大学大学院医学研究科にて参加手続きをいたしますので、大阪市立大学大学院医学研究科整形外科による研究チームが、大阪市立大学医学部附属病院においてプロトコル治療を行います。チームメンバーは必要に応じ増減することがあります。

また、採取されたあなたの骨髄液の調製は、大阪大学医学部附属病院（未来医療センター）が担当します。したがって、あなたの骨髄液と末梢血（血清）は、大阪市立大学大学院医学研究科で採取された後、大阪大学医学部附属病院に搬送され、細胞の培養・調製が行われ、それらが完了した後に、再び大阪市立大学大学院医学研究科へと運搬され、移植されます。

なお、この臨床研究は、当院において研究実施の承認が得られてから3年間、患者さんの参加を受け付けます。

#### **14. 健康被害が発生した場合の補償について**<sup>⑩</sup>

この治療が原因であなたが何か異常を感じた場合は、速やかに担当医師にご連絡下さい。最善の治療を行います。

「補償」とは、臨床研究で起こった健康被害や不具合などの被害に対して医療費又は治療やその他必要な措置を受ける費用をこの研究グループが負担することです。研究グループや大阪市立大学大学院医学研究科の過失による場合に発生する「賠償」とは異なります。

この臨床研究は保険会社が提供する補償保険に加入しております。この臨床研究による治療が原因で健康被害が起こった場合の補償制度は、別紙の内容です。

#### **15. 臨床研究期間終了後の対応**<sup>⑩</sup>

臨床研究期間が終了した後もなるべく通院を続けていただき、副作用などが起こっていないかについて観察を続けます。また、体調の不良などの場合はご連絡下さい。

他の医療機関を受診した場合、たとえ今回の治療とは関係のない病気で受診したとしてもこのプロトコル治療を大阪市立大学で受けたことをその病院の主治医にお伝えしてください。

#### **16. 試料の保存について**<sup>⑩</sup>

今回の治療に使った細胞やあなたの血液などの試料は、将来万が一有害な事態が起こったときなどに原因を調べるため、研究終了後20年間は大阪市立大学大学院医学研究科および大阪大学医学部附属病院未来医療センター内の保存施設に保存されます。これらの試料は他の目的に使われることはありません。また、試料保存期間の終了後は大阪市立大学大学院医学研究科あるいは大阪大学医学部附属病院で定められた処理要項に従って適切に廃棄処分されます。保存試料そのものにあなたのお名前は記載されておりませんし、これらの試料は全て個人を特定できないような記号を使って取り扱われます。試料からあなたの情報が漏れることはありませんし、お名前と試料との対照表は鍵のかかる書庫に厳重に保管されます。

#### **17. 参加に伴い守っていただきたい事項**

- ①この臨床研究への参加中は、治療スケジュールに沿って来院してください。
- ②他の医師にかかるときは、この臨床研究に参加している旨を伝えてください。

## 18. 臨床研究の開示<sup>⑩</sup>

この臨床研究の詳細については以下のホームページ内に公表しており、いつでも自由に見ることができます。

医学情報 大学病院医療情報ネットワーク (UMIN) 内の UMIN 臨床試験登録システム  
(<http://www.umin.ac.jp/ctr/index-j.htm>)

## 19. 担当医師への連絡<sup>⑩</sup>

この臨床研究について、心配なことや、わからないこと、何か異常を感じられた時は、いつでも遠慮なく担当医師に申し出てください。

研究機関 大阪市立大学大学院医学研究科  
研究責任者 整形外科講師・橋本祐介  
担当医師 職・氏名  
担当医師 職・氏名  
連絡先電話番号 06-6645-3851  
(時間外緊急連絡先) 06-6645-3851

同意を撤回される場合も上記担当医師に連絡して下さい。

## 同意書

大阪市立大学大学院医学研究科長 殿

研究題目 : 関節鏡視下自己骨髄間葉系細胞移植による関節軟骨欠損修復

私は、上記研究題目における研究に (研究対象者氏名) が参加するにあたり、担当医から以下の項目について、説明文書および口頭にて説明を受け、私の自由意思による参加の中止が可能であることを含め理解しましたので、この研究に参加することに同意します。

私は、本研究の説明を受け理解した項目について、□の中にレを記入しました。

- |  |                                    |
|--|------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> ①臨床研究の目的                              | <input type="checkbox"/> ②臨床研究の意義  |
| <input type="checkbox"/> ③同意が任意のものであり、同意しない場合も不利益をうけないこと       |                                    |
| <input type="checkbox"/> ④参加した後でも、撤回がいつでも可能であり、その場合も不利益を受けないこと |                                    |
| <input type="checkbox"/> ⑤代諾者からの同意取得の必要性                       |                                    |
| <input type="checkbox"/> ⑥治療の方法（研究対象者として選定された理由 等）             |                                    |
| <input type="checkbox"/> ⑦期待される結果及び起こりうる危険性・不都合                |                                    |
| <input type="checkbox"/> ⑧他の治療方法                               | <input type="checkbox"/> ⑨個人情報の取扱い |
| <input type="checkbox"/> ⑩研究結果の提供                              | <input type="checkbox"/> ⑪研究成果の公表  |
| <input type="checkbox"/> ⑫費用負担に関すること                           | <input type="checkbox"/> ⑬臨床研究の資金源 |
| <input type="checkbox"/> ⑭知的財産権等の帰属                            | <input type="checkbox"/> ⑮補償の有無    |
| <input type="checkbox"/> ⑯研究終了後の対応                             |                                    |
| <input type="checkbox"/> ⑰試料(資料)の保存・保存期間及び使用方法                 |                                    |
| <input type="checkbox"/> ⑱臨床研究の開示                              |                                    |
| <input type="checkbox"/> ⑲問い合わせ先（研究機関名・研究者等の氏名、職名・連絡先 等）       |                                    |

本人署名 : \_\_\_\_\_ (印)

署名年月日 : 西暦 年 月 日

代諾者署名（続柄） : \_\_\_\_\_ ( ) (印)

立会人署名（続柄） : \_\_\_\_\_ ( ) (印)

私は担当医として、今回の研究について上記の項目を説明し、インフォームドコンセントが得られたことを認めます。

担当医署名 : \_\_\_\_\_ (印)

署名年月日 : 西暦 年 月 日

同席者署名 : \_\_\_\_\_

(複数署名可) \_\_\_\_\_