

臨床研究に用いるヒト幹細胞

採取、調整、移植又は投与の方法

○骨髓液の採取

術中全身麻酔下に腸骨から経皮的ないしは経術野的に骨髓液を 20～50ml 採取し骨髓間葉系幹細胞を分離する。

○骨髓液の処理（骨髓間葉系幹細胞の誘導）

別紙 5（細胞処理保存手順工程書）、別紙 14-4（髓核製品標準書）参照

5%デキストラン（Dextran200, 00、和光純薬、Cat.No. 043-2261）を溶解した生食水とペリ加骨髓液を等量混和し、室温で静置する。赤血球の沈降が確認されたら上層の白血球層を採り、1800 回転 5 分間遠心する。沈殿した白血球分画は生食水で 2 回洗浄後、全ての細胞を 5ml の 10%自己血清添加 DMEM/F12 培地に浮遊させ（抗生物質の添加なし）、100mm 培養皿に播き、髓核細胞と同様の条件で 1～2 時間前培養する。付着細胞が確認され始めたら、非付着細胞は他の培養皿に移し 4 日間培養する。元の培養皿には 5ml の同培地を加え、同様に 4 日間培養する。

（補足説明）元の培養皿に付着したもの、および 2 時間後に非付着細胞を他の培養皿に移してそれぞれ 4 日間の培養後に付着、増殖したものを合わせて骨髓間葉系幹細胞としている。骨髓間葉系幹細胞を含む骨髓白血球分画の分離は、安全性の観点から臍帯血バンクにて用いられている方法であるデキストラン法によって行われている。この方法は混入する赤血球の割合が高く、混入した赤血球は 4 日間の培養期間に共存する形となる。一方、骨髓間葉系幹細胞の大部分は培養開始数時間にて培養皿に付着するため、赤血球を含む非付着細胞は最初の培養皿から除去される。したがって最初の培養皿の赤血球の混入が少ない状態にて培養を開始されるものが主たる骨髓間葉系幹細胞の源となり、2 番目の培養皿に移されその状態にて 4 日間の培養を行い誘導される骨髓間葉系幹細胞は少ないが、その有効利用を図るため、両者を合わせて髓核の共培養に供している。

○髓核細胞と骨髓間葉系幹細胞の共培養

別紙 5（細胞処理保存手順工程書）、別紙 14-4（髓核製品標準書）参照

4 日間の培養後誘導された骨髓間葉系幹細胞、および髓核細胞はその培養皿の培地を捨て生食水にて 1 回洗浄する。その後室温に戻したトリプシにて分散を行う。トリプシによる分散は必要最小時間で行うように心がけ、顕微鏡下にて分散状況を随時確認する。分散後は速やかに患者血清 1ml を加えトリプシ作用を中和し、1800 回転で 5 分間遠心する。その後骨髓間葉系幹細胞、および髓核細胞は 10%自己血清添加 DMEM/F12 培地に浮遊し細胞数を数え

る。

6well カルチャーインサートの裏面に骨髄間葉系幹細胞を 3 万個播き、約 3 時間前培養して細胞を接着させる。次にインサートの表面に同数の髄核細胞を播き、6 穴カルチャープレートにて 3 日間培養する。

共培養終了後の髄核細胞をセルスクレパーを用いて剥がし、細胞密度などの性状を判断し、細胞数をカウントし、移植の適否を検討する。

○活性化髄核細胞の変性椎間板への移植

活性化髄核細胞を生理的食塩水に浮遊させ滅菌ビンに注入後、付属病院手術室に移送する。(生理食塩水 500 μ l 中に 1×10^6 個以上を含有している)。この移植手術は、局所麻酔下、レントゲン透視下に以下に述べる特殊な器具(経皮的椎間板摘出術において通常に使用される土方式経皮的椎間板摘出術器具の椎間板造影針、26 ゲージあるいは 28 ゲージ)を用いて経皮的手技により実施される。局所麻酔下、レントゲン透視下に麻酔科専門医師の管理のもと経皮的に実施されるために、椎間板髄核空内に活性化髄核細胞を正確に安全に挿入することが可能である。

臨床研究の実施が可能であると判断した理由

東海大学医学部外科学系整形外科学では椎間板変性の進行を抑制するための研究を 1994 年から継続している。すなわち椎間板髄核細胞が椎間板全体の変性抑制に大きな役割を担っているという仮説をたて、小型動物(ウイスター系ラット、日本白色家兎、ニュージーランド白色家兎)に作成された実験的椎間板変性モデルに対して、同一固体あるいは同種の椎間板髄核を移植するという実験系を作成し検討したところ、その後の椎間板変性の進行が明らかに遅延すること(椎間板高低下の抑制、線維輪構造の破綻の抑制など)が判明した^{6, 9, 10, 26})。髄核細胞が椎間板変性を抑制する事実は、小型動物(日本白色家兎、ニュージーランド白色家兎)、大型動物(ビーグル犬)を用いた髄核細胞と線維輪細胞を共培養した際に、線維輪細胞の細胞数が増加し、1細胞あたりの細胞活性(DNA活性、プロテオグリカン活性)も著しく亢進したことによっても証明され、髄核細胞の持つ大きな役割が示された^{9, 13, 18, 19, 20, 26})。

この結果を踏まえて、より活性度の高い髄核を体外で作成するために骨髄間葉系幹細胞との共培養法を導入し、小型動物(日本白色家兎、ニュージーランド白色家兎)、大型動物(ビーグル犬)を用いた実験で、髄核細胞数の増加、1髄核細胞あたりの細胞活性の亢進がみられたが、体外での培養期間を可及的に短縮し感染や染色体異常などの出現を防ぎ、かつその活性化効率を高めるために骨髄間葉系幹細胞との細胞間接着を伴う共培養法を導入し、髄核細胞数の著しい増加、1髄核細胞あたりの細胞活性の著しい亢進を得ることができた(1細胞あたりのDNA活性は髄核細胞の単培養に比べ20倍、1髄核細胞あたりのプロテオグリカン活性は髄核細胞の単培養に比べて15倍の活性が得られた)^{15, 18, 19, 20})。同小型、大型動物に作成した実験的椎間板変性モデルに対して、自家骨髄間葉系幹細胞との細胞間接着を伴う共培養で活性化した自家髄核細胞を移植したところ、その後の椎間板変性過程の著しい抑制(椎間板高低下の抑制、線維輪構造の破綻の抑制、細胞外基質の良好な保持、MRI上の変性の抑制など)が観察された^{18, 19, 20})。

小型、大型の動物だけではなく、ヒトの椎間板髄核細胞もその患者の骨髄間葉系幹細胞との細胞間接着を伴う共培養によって細胞数の増加、1細胞あたりの細胞活性の著しい亢進を得ることが、2004年から本研究を実施するためにその前段階として継続されてきた『自家骨髄間葉系幹細胞を用いたヒト髄核細胞の活性化実験』(2004年度東海大学医の倫理委員会、臨床審査委員会承認)によって示された(1細胞あたりのDNA活性は髄核細胞の単培養に比べ細胞間接着を伴う共培養5日で5.1倍、1髄核細胞あたりのプロテオグリカン活性は髄核細胞の単培養に比べて細胞間接着を伴う共培養5日で4.8倍の活性が得られた)²⁷)。さらに本研究の培養条件下においては、ヒト自家骨髄間葉系幹細胞による自家髄核細胞の活

活性化によって、髄核細胞側に感染、染色体異常、腫瘍化（免疫不全マウスへの移植、6ヶ月以上の経過観察結果）などは一切認められていないことも示され、極めて安全な手法であると考えられた。

さらに東海大学医学部内にセルプロセッシングセンターが設置され、同施設内で細胞処理を行う技術職員の養成教育も修了し、臨床材料を体外で処理活性化して体内に戻す安全でレベルの極めて高いシステムが構築された。このセルプロセッシングセンター内で試行された髄核活性化の過程の中で、髄核細胞、骨髄細胞（MSC）の受け入れ時試験、培養5日目の髄核細胞、骨髄細胞（MSC）の工程管理試験、培養後8日目の最終製品（活性化髄核細胞）試験が計画通りに実施され、いずれも良好な結果であった。

また、髄核活性化直後に実施される固定隣接椎間板への同活性化髄核の移植術は、過去20年間に亘り継続してきた経皮的椎間板摘出術（自験例298例）のアプローチに従って、26あるいは28ゲージ針を用いて実施されるため、その手技の確実性、安全性は極めて高いと考えられる。

このような観点から、本臨床研究の実施が可能であると判断した。

臨床研究の実施計画

- (1) 原疾患（腰椎椎間板変性疾患）治療のための手術中（椎体間固定術）に細胞培養用に被験者の血清を採るため末梢血より約 50ml の採血を行い、血清成分を分離する。
- (2) 術中に治療として摘出された椎間板を、直ちに酵素処理して髓核細胞を分離する。
- (3) 術中に腸骨から経皮的ないしは経術野的に骨髓液を 20～50ml 採取し骨髓間葉系幹細胞を分離する。
- (4) 4 日間培養した髓核細胞を同じく 4 日間培養した骨髓間葉系幹細胞との細胞間接着を伴う共培養（3 日間）で活性化させる。共培養終了後の髓核細胞をセルスクレパーを用いて剥がし、細胞密度などの性状を判断し、細胞数をカウントし、移植の適否を検討する。
- (5) なお、さらに具体的な細胞処理の工程を、別紙 5（細胞処理保存手順工程書）、別紙 14-4（髓核製品標準書）に記載する。
- (6) この間、患者は原疾患の手術（椎体間固定術）後の加療に専念している。
- (7) 固定隣接部変性椎間板への活性化髓核の移植

活性化髓核を生理的食塩水に浮遊させ滅菌ビンに注入後、付属病院手術室に移送する（生理食塩水 500 μ l 中に 1×10^6 個以上を含有している）。

この移植手術は、局所麻酔下、レントゲン透視下に以下に述べる特殊な器具（経皮的椎間板摘出術において通常に使用される土方式経皮的椎間板摘出術器具の椎間板造影針、26 ゲージあるいは 28 ゲージ）を用いて経皮的手技により実施される。局所麻酔下、レントゲン透視下に麻酔科専門医師の管理のもと経皮的に実施されるために、椎間板髓核腔内に活性化髓核細胞を正確に安全に挿入することが可能である。
- (8) 初回手術直前、活性化髓核細胞移植術直前、移植後 1、3、6、12、24、36 ヶ月後に定期的に MRI や単純 X 線像にて当該椎間の椎間板変性度を測定する。臨床症状は日本整形外科学会腰痛疾患判定基準を用いて、画像診断と同様の時期に判定し、画像診断所見と臨床症状を対比し検討する。活性化髓核移植日、移植後 1、2 週、1、3、6、12、24、36 ヶ月に血液学的検査、血液生化学検査を行う。
- (9) 評価項目・検査項目
 - 1) 理学的検査 日本整形外科学会腰痛疾患判定基準（自覚所見、他覚所見、ADL）を用いて点数化し、平林の改善率で評価するが、本研究における主目的は安全性確認とともに活性化髓核細胞の移植による画像上の変化を検討することであるので、臨床結果は参考所見とする。
 - 2) 画像診断 MRI にて当該椎間板の変性度を測定する。Pfirrmann 分類及び Mochida 分類で形状を評価する。また水分含量を digital 化システムで計測し参考値とする。単純 X 線立位中間位側面画像上で椎間高を計測（Mochida method）し、単純 X 線立位側

面動態画像で椎間不安定性を評価する。

3) 画像上の評価基準

経過観察時点での画像上判定は以下の6項目のうち

(a)+(c から f の各項目)、あるいは(b)+(c から f の各項目)を満たす例を画像上の有効群とする。

- a) MRI の Pfirrmann 分類 III が同分類の IV, V に進行せず、かつ新たな椎間板ヘルニア像の出現がない (活性化髄核細胞被移植椎間板に元々ヘルニア像がない場合)
- b) MRI の Mochida 分類 moderate が pronounced に進行せず、ヘルニアの形状に変化がない (活性化髄核細胞被移植椎間板に元々 contained 型ヘルニア像がある場合)
- c) 単純X線立位中間位側面画像で、椎間高が活性化髄核細胞移植前に比べ 2/3 以上に保たれている
- d) 単純X線立位側面動態画像で 15 度以内の椎間可動性
- e) 単純X線立位側面中間位画像で 5 度以内の後方開大
- f) 単純X線立位側面画像で前方、後方すべりなし

4) 血液学的検査

白血球数、好中球数、赤血球数、血小板数、ヘマトクリット、ヘモグロビン

5) 血液生化学検査

GOT (AST)、GPT (ALT)、LDH、総ビリルビン、直接ビリルビン、総蛋白、アルブミン、BUN、血清クレアチニン、CRP、CPK、電解質 (Na、K、CL)

被験者等に関するインフォームドコンセント 手続き

対象疾患の被験者（患者）に対し、主治医またはインフォームドコンセント担当医が同臨床研究の内容について十分な説明を行い、被験者がその利点、欠点を十分に理解した後に、被験者本人が治療法を選択し、同意をいただく。どのような場合においても本臨床研究における安全性確保を最優先とする。本研究への参加はあくまでも患者の自由意志であり、不参加の場合にもなんら不利益を得ないこと、また同意後の撤回も可能でありことも十分に説明する。

詳細は別紙 9（インフォームドコンセント説明事項）および別紙 18（インフォームドコンセントにおける説明文書および同意文書）に記す。

患者に対する説明においては、固定隣接椎間板にある程度以上の変性が出現し、さらに進行する可能性が高い場合には、本研究で提案する治療以外では椎体間固定術以外の代替治療が現時点ではないことを明記し、同時に今回の研究が安全性を確認することが主目的であり、固定隣接椎間板の変性抑制の可能性は、動物実験やヒトの細胞を用いた体外での基礎研究以外には予測できないことを記載する。

本研究の対象者は 20 歳以上 30 歳未満の成人であり、また安全性を第 1 目的とした研究であるので、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とはしない。したがって代諾者は必要ではないと考えられるが、本学の通常の手術前の説明（インフォームドコンセント）においては、家族などの同席を推奨しており、その場合には本人とともに同意の署名をいただいている。したがって本研究の新規性、内容の十分な理解のために被験者とともに家族が同席し同意の署名を追加することがある。

本研究は腰椎椎間板変性疾患に対する通常椎体間固定術の手術中に、その 1 週間後に実施される活性化髄核細胞移植術に必要とされる細胞、血液などが採取される。したがって、手術前の通常椎体間固定術に対する説明、インフォームドコンセント、同意書作成を初めに行い、その後に本臨床研究に関する説明、インフォームドコンセント、同意書作成を実施する。

被験者等に関するインフォームドコンセント

説明事項

- (1) 臨床研究とは
- (2) 臨床研究の目的 用語（椎間板、髄核、骨髄間葉系幹細胞など）の説明
- (3) 臨床研究に参加していただく対象患者様とその人数及び臨床研究参加期間
- (4) 臨床研究の方法
- (5) 予想される合併症、副作用
- (6) 臨床研究への参加の自由と参加の取りやめについて
- (7) 臨床研究が中止される場合
- (8) この臨床研究中の新しい情報について
- (9) 患者さんの人権・プライバシーの保護について
- (10) いただいた細胞の保存と今後の利用に関して
- (11) 研究から生じる知的財産権の所属
- (12) 臨床研究に関しての健康被害が発生した場合の治療及び補償について
- (13) 費用の負担に関して
- (14) この臨床研究を担当する医師の氏名・連絡先
- (15) 患者様の権利などに関する質問窓口

これらの項目は別紙 18（被験者への本臨床研究に関する説明、インフォームドコンセント、同意書項目）と対応する。

被験者に対して重大な事態が生じた場合の対処方法

有害事象取り扱い

1) 症状または疾患

治療中に発現した、あらゆる好ましくないあるいは意図しない徴候、症状または疾患は、有害事象として取り扱う。骨髄採取ならびに活性化髄核細胞移植術開始時点の合併症の程度が悪化した場合も、有害事象として取り扱う。なお、有効性評価指標の程度が悪化した場合は、有害事象として扱わない。

2) 他覚所見

臨床研究開始前検査値*と比較し、最終検査日までに、異常化(正常→異常、異常→さらに異常)を示した場合は、有害事象として取り扱う。また、臨床研究開始前検査値*が欠測しており、活性化髄核細胞移植後に異常値となった場合は、有害事象として取り扱う。ただし、欠測している場合は、同意取得日の30日前までの値を判断の参考値として利用する。*：同意取得後、観察期に実施された検査値(複数回実施されたものは、治療期開始時に近い値とする)

本研究実施計画書に規定された項目、規定されていない項目を問わず、有害事象とされたものについては、発現時、最大悪化時、転帰判定時及び関連性の判定に必要と考えられたデータについて症例報告書に記載する。

3) 有害事象の記録と調査

有害事象が発現した場合は、その症状または疾患、他覚所見の内容、発現日、程度、重篤度、処置の有無およびその内容、転帰およびその判定日、本臨床研究との関連性およびその理由を症例報告書の有害事象欄に記載する。なお、疾患名を記載する場合、その疾患に付随する症状は、有害事象として記載しない。

治療中に観察された症状または疾患、他覚所見において、有害事象が認められた場合は、本臨床研究との因果関係の有無に係わらず、原則として正常化または有害事象として促えないレベル(他覚所見については「各検査項目の取り扱い基準」を参照)に回復するまで追跡調査を行う。ただし、研究責任医師または分担医師が回復と判断した場合はその限りではない。その場合は回復と判断した根拠を症例報告書に記載するものとする。器質的な障害(脳梗塞・心筋梗塞など)で不可逆的な有害事象が認められた場合は、症状が安定または固定するまで追跡調査を行うこととする。

4) 有害事象の分類

有害事象の程度は、以下の基準で分類する。

①軽 度：患者の日常生活を損なわない程度

②中等度：患者の日常生活に支障があるが、我慢すれば活動が行える程度

③高度：患者の日常生活の遂行を大きく妨げる程度

有害事象の転帰は、以下の基準で分類する。

① 回復：正常化または有害事象として促えないレベルまでに回復した
もの

② 継続：その時点で回復に至っていないもの

③ 死亡：本治療と関連することが否定できないもの

④ 不明：他の原因で死亡したため、転帰が不明だったもの

5) 有害事象と本臨床研究との関連性の判定

本臨床研究との関連性は、被験者の状態、治療との時間関係、その他の要因による可能性等を勘案し、以下の関連性の判定基準に従い判定する。

①明らかに関連あり

②おそらく関連あり

③関連があるかもしれない

④関連なし

有害事象については、本臨床研究との関連性が①～③と判定されたものを本臨床研究との関連性が否定できない有害事象、本臨床研究との関連性が④と判定されたものを本細胞移植治療との関連性が否定できる有害事象とする。

6) 有害事象の患者、代諾者への報告

治療中に発生した有害事象に関しては直ちに患者、ならびに代諾者に報告、説明を行う。

7) 重篤な有害事象

治療中に、本臨床研究との因果関係の有無にかかわらず重篤な有害事象が発現した場合、研究責任医師または研究分担医師は、被験者に対して直ちに適切な処置を行う。また、研究責任医師は、速やかに病院長ならびに厚生労働大臣に報告しなければならない。

【重篤な有害事象】

①死亡

②死亡につながる恐れのある症例

③治療のために病院または診療所への入院または入院期間の延長が必要とされる症例

④障害

⑤障害につながる恐れのある症例

⑥①から⑤に掲げる症例に準じて重篤である症例

⑦ 後世代における先天性疾病または異常

8) 新たな情報の提供

本臨床研究実施者（臨床研究責任医師、臨床研究分担者、臨床研究協力者、学外の研究分担者）は安全性や有害事象に関する新たな情報を得た場合には、速やかに病院長に文

書で報告し、研究実施者内に周知させる。直ちに患者、および代諾者へ追加説明し、必要に応じて説明文書・同意文書の改定を行う。

臨床研究に伴う補償

保障がある場合、その内容

本臨床試験に起因して、被験者への健康被害の補償あるいは賠償責任が生じた場合は、東海大学医学部長、東海大学医学部附属病院長、臨床研究責任者は協議の上、その取り扱いを決定する。

個人情報保護の方法 連結可能匿名化の方法

○匿名化

個人情報の代わりに無作為に番号やアルファベットをつけることにより、個人情報との対応ができないようにする。被験者（患者）の全ての検体は

①「この臨床研究に関連する基礎研究用」のものは連結可能匿名化とし、研究責任者の持田讓治がその個人情報を管理する、②「この研究に直接関係しない将来の研究用」のものは連結不可能匿名化とし、匿名化が行われる。ゲノムが関係する可能性があるためその資料は本学医学部個人情報管理責任者、井之上逸郎によって管理される。③「この研究そのものの保管」については連結可能匿名化とする。その個人情報管理者は細胞処理責任者としての加藤俊一とする。

○開示

研究成果及び研究データや結果は共同研究機関や各学会にて開示される可能性があるが、開示するデータは個人を特定できないものにするよう適切な配慮を十分に行う。

○その他

試料の保存方法

余剰となった試料の保存は、細胞凍結保存液（セルバンカー）にて、 -196°C 液体窒素内に保存されるものとする。保存された被験者の試料については、別の研究に対しても利用可能かどうかは被験者に選択権があり、本研究実施前に説明・同意書にてその旨は決定するものとする。また被験者が後日、再利用について中止を求めた場合、直ちに試料は破棄される。

再利用が可能な期間は、原則として検体採取日から3年間とする。ただし、その期間内に他の研究に利用する際には、必ず学内所定の手続きを行い、新たな研究計画書を作成し、医の倫理委員会あるいは臨床研究審査委員会にて承認を得てから使用可能となる。3年経過後には、本学研究資源バンクに移管する。本学における細胞保存の管理上の基準から、3年経過後に本学研究資源バンクに移管するが、移植術を実施された患者さんの細胞を可及的長期にわたり保存し、特別な事象が長期的経過の中で生じた際の検討素材とすることが主目的である。したがって研究資源バンクに移管後も7年間（細胞採取後10年間）は連結可能な形で保存する。なおこの間に他の研究に利用する場合が生じた際には患者さんからの同意を得ることとする。

臨床研究責任者、臨床研究分担者の略歴と業績

○略歴 別紙 1 に記載済

○業績 本臨床研究と関連する発表論文を主に記載

- 1) Mochida J, Arima T. Percutaneous nucleotomy in lumbar disc herniation. A prospective study. Spine 18: 2063-2068, 1993
- 2) Mochida J, Toh E, Nishimura K, Nomura T, Arima T. Percutaneous nucleotomy in lumbar disc herniation. Patient selection and role in various treatment. Spine 18:2212-2217, 1993
- 3) Mochida J, Suzuki K, Chiba M, Toh E. An innovative method using Leeds-Keio artificial ligament in the degenerative lumbar spondylolisthesis. Orthop Trans (J Bone Joint Surg). 19:634-635, 1996
- 4) Mochida J, Nishimura K, Nomura T, Toh E, Chiba M. The importance of preserving disc structure in surgical approaches to lumbar disc herniation. Spine 21:1556-1563, 1996
- 5) Mochida J, Toh E, Suzuki K, Chiba M, Arima T. An innovative method using the Leeds-Keio artificial ligament in the unstable spine. Orthopedics 20:17-23, 1997
- 6) Nishimura K, Mochida J. Percutaneous reinsertion of the nucleus pulposus. An experimental study. Spine 23: 1531-1539, 1998
- 7) Suzuki K, Mochida J, Chiba M, Kikugawa H. Posterior stabilization of degenerative lumbar spondylolisthesis with a Leeds-Keio artificial ligament. A biomechanical analysis in a porcine vertebral model. Spine 24: 26-31, 1999
- 8) Mochida J, Suzuki K, Chiba M. How to stabilize a single level lesion of degenerative spondylolisthesis. Clin Orthop 368:126-134, 1999
- 9) Okuma M, Mochida J, Nishimura K, Sakabe K, Seiki K. Reinsertion of stimulated nucleus pulposus cells retards intervertebral disc degeneration: An in vitro and in vivo experimental study. J Orthop Res 18: 988-997, 2000
- 10) Nomura T, Mochida J, Okuma M, Nishimura K, Sakabe K. Nucleus pulposus allograft retards intervertebral disc degeneration. Clin Orthop 389: 94-101, 2001
- 11) Mochida J, Nishimura K, Okuma M, Nomura T, Toh E. Percutaneous nucleotomy in elite athletes. J Spinal Disord 14:159-164,2001
- 12) Mochida J, Toh E, Nomura T, Nishimura K. The risk and benefits of percutaneous nucleotomy for lumbar disc herniation. A 10-year longitudinal study. J Bone Joint Surg 83-B: 501-505,2001
- 13) Watanabe K, Mochida J, Nomura T, Okuma M, Sakabe K, Seiki K: Effect of reinsertion of activated nucleus pulposus on disc degeneration. An experimental study on various types of collagen in degenerative discs. Connective Tissue res 44:1-5, 2003

- 14) Sakai D, Mochida J, Yamamoto Y, Nomura T, Okuma M, Nishimura K, Nakai T, Ando K, Hotta T. Transplantation of mesenchymal stem cells embedded in Atelocollagen gel to the intervertebral disc: a potential therapeutic model for disc degeneration. *Biomaterials* 24: 3531-3541, 2003
- 15) Yamamoto Y, Mochida J, Sakai D, Nakai T, Nishimura K, Kawada H, Hotta T. Upregulation of the viability of nucleus pulposus cells by bone marrow-derived stromal cells; significance of direct cell-to-cell contact in coculture system. *Spine* 29:1508-1514, 2004
- 16) 酒井 大輔、持田 讓治、山本 至宏、野村 武. 椎間板変性の分子メカニズムから治療へ 幹細胞を用いた細胞移植による椎間板再生. *日整会誌* 78: 929-933, 2004
- 17) Sakai D, Mochida J, Yamamoto Y, Toh E, Iwashina T, Miyazaki T, Inokuchi S, Ando K, Hotta T. Immortalization of human nucleus pulposus cells by recombinant SV 40 adenovirus vector: Establishment of a novel cell line for the study of human nucleus pulposus cells. *Spine* 29: 1515-1523, 2004
- 18) Mochida J. New strategies for disc repair; novel preclinical trials. *J Orthop Sci* 10: 112-118, 2005
- 19) 持田 讓治. 腰椎椎間板ヘルニア最前線 椎間板変性抑制のための再生医学的検討. *日整会誌* 79: 861-868, 2005
- 20) 持田 讓治. 椎間板再生研究の現況と展望. *日脊学誌* 16: 421-427, 2005
- 21) Sakai D, Mochida J, Iwashina T, Watanabe T, Nakai T, Ando K, Hotta T. Differentiation of mesenchymal stem cells transplanted to a rabbit degenerative disc model. potential and limitation for stem cell therapy in disc degeneration. *Spine* 30: 2379-2387, 2005
- 22) Iwashina T, Mochida J, Miyazaki T, Watanabe T, Iwabuchi S, Ando K, Hotta T, Sakai D. Low-intensity pulsed ultrasound stimulates cell proliferation and proteoglycan production in rabbit intervertebral disc cells cultured in alginate. *Biomaterials*. 27:354-61,2006
- 23) Sakai D, Mochida J, Iwashina T, Watanabe T, Suyama K, Ando K, Hotta T. Atelocollagen for culture of human nucleus pulposus cells forming nucleus pulposus-like tissue in vitro: influence on the proliferation and proteoglycan production of HNPSV-1 cells. *Biomaterials* 27:346-53,2006
- 24) Sakai D, Mochida J, Iwashina T, Hiyama A, Omi H, Imai M, Nakai T, Ando K, Hotta T. Regenerative effects of transplanting mesenchymal stem cells embedded in atelocollagen to the degenerated intervertebral disc. *Biomaterials* 27:335-45, 2006
- 25) Iwashina T, Mochida J, Sakai D. Feasibility of using a human nucleus pulposus cell line as a cell source in cell transplantation therapy for intervertebral disc degeneration. *Spine* 31, 1177-1186, 2006
- 26) An HS, Masuda K, Thonar E, Mochida J. Biologic Repair and Regeneration of the Intervertebral

- Disc. In Corbin TP, Connolly RJ, Yuan HA, Bao QB, Boden SD (eds): Emerging Spine Surgery Technologies Quality Medical Publishing, Inc., St. Louis, MO, 2006 pp. 161-177.
- 27) Watanabe T, Sakai D, Iwashina T, Mochida J. Activation of human nucleus pulposus cells with autologous mesenchymal stem cells-In vitro pre-clinical study for transplantation of activated nucleus pulposus cells-, presented at 51th annual meeting of Orthopaedic Research Society in USA, 2005
- 28) Kato S. Cord blood transplantation from sibling donors in Japan. Report of the national survey. *International Journal of Hematology* 67: 389-396, 1998
- 29) Kato S. Allogeneic hematopoietic transplantation of CD34+ selected cells from an HLA haplo-identical related donor. A long-term follow-up of 135 patients and a comparison of stem cell source between the bone marrow and the peripheral blood. *Bone Marrow Transplantation* 26: 1281-1290, 2000
- 30) Kobayashi H. The Pharmacokinetics and Safety of ABT-751, a Novel Orally Bioavailable Sulfonamide Antimitotic Agent: Results of A Phase I Study. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12: 2834-2840
- 31) Kobayashi H. Safety and Pharmacokinetic Study of RPI.4610 (ANGIOZYME), An Anti-VEGFR-1 Ribozyme, In Combination with Carboplatin and Paclitaxel in Patients with Advanced Solid Tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2005; 56(4): 329
- 32) Kobayashi H. Expression Level of MDR1 Message in Peripheral Blood Leukocytes from Healthy Adults: A Competitive Nucleic Acid Sequence-Based Amplification Assay for Its Determination. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2004; 42(10): 1098
- 33) Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone-marrow derived endothelial progenitor cells. *EMBOJ* 18: 3964-3972, 1999
- 34) Llavadot J, Murasawa S, Kureishi Y, Uchida S, Masuda H, Kawamoto A, Walsh K, Isner JM, Asahara T. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest* 108: 399-405, 2001
- 35) Matsumoto T, Kawamoto A, Kuroda R, Ishikawa M, Mifune Y, Iwasaki H, Miwa M, Horii M, Hayashi S, Oyamada A, Nishimura H, Murasawa S, Doita M, Kurosaka M, Asahara T. Therapeutic potential of vasculogenesis and osteogenesis promoted by peripheral blood CD34-positive cells for functional bone healing. *Am J Pathol* 169: 1440-1457, 2006
- 36) Ando K. Extensive generation of human CD34+hematopoietic stem cell from CD 34(-)Lin(-) cells in vitro. *Exp. Hem.* 28: 690-699, 2000
- 37) Ando K. Human CD34-hematopoietic stem cells: basic aspects and clinical relevance. *Int. J. Hematol.* 75: 370-375, 2002

臨床研究に用いるヒト幹細胞の品質に関する研究成果

○使用されるヒト骨髄由来間葉系幹細胞の同定と活性化後髄核細胞の安全性確認

本臨床研究で使用されるヒト幹細胞に関しては、2004年から本研究を実施するためにその前段階として継続されてきた『自家骨髄間葉系幹細胞を用いたヒト髄核細胞の活性化実験』（2004年度東海大学医の倫理委員会、臨床審査委員会承認）において十分に検討されており、腰椎椎間板変性疾患で手術を受ける患者から採取、調整した骨髄間葉系幹細胞である。採取後の4日間の培養、その後の髄核細胞との細胞間接着を伴う3日間の共培養において、感染、著しい細胞の変性、損傷像、髄核細胞側の染色体異常の出現、活性化した髄核細胞の免疫不全マウスへの移植時の腫瘍化などは一切認められていない。またCD29, CD44, CD73, CD105, CD166に陽性でCD14, CD34, CD45に陰性の細胞群として同定され、骨髄間葉系幹細胞としての性格を強く示している。さらにneural ganglioside GD2を測定することで解析も行っている。また数例で行われた可塑性に関する検索においても脂肪組織、軟骨組織などに誘導されることも証明された細胞群である。したがって、ヒト幹細胞としての特徴を有し、安全性が高い細胞であると判断した。

このような前提の下で、髄核細胞の活性化のためにヒト骨髄間葉系幹細胞を細胞間接着を伴う共培養に用いるが、ヒト骨髄間葉系幹細胞を生体に直接投与（移植）することはないことをここにあらためて記載する。

○活性化髄核細胞の品質に関する研究成果

患者へ投与する髄核細胞の増殖特性、生存率はSOPに記載されている通り、培養開始日、MSCとの共培養を開始する5日目そして培養終了日の8日目において測定している。実際の患者への投与を前提とした培養で得られた結果は、過去のin vitroでのシミュレーションにて実施された30例以上の臨床研究での結果と対比し評価解析する。

また、培養前後の髄核細胞の純度は国際的に髄核組織そのものの特性が十分には解明されていない現状があり、何を尺度として純度を測定するかが問題となっている。一方東海大学では、細胞表面マーカーによる髄核細胞の解析を継続しており、得られた結果をもとに簡便なセミソリッド培養系における髄核細胞の機能的な細胞集団の同定法の開発に成功している（結果の集積を待って公表予定）。さらにこれらの結果と対比させるべく簡便なマウスをもちいたin vivoアッセイ系の開発を行っている。これらin vitroおよびin vivoの測定系から細胞指標の評価が可能となり、実際の患者への投与を行った場合において、臨床有効性との相関も解析可能となると考えている。

尚、別紙 14-4 培養・活性化自己椎間板の製品標準書に従い、受け入れ試験、工程管理試験、最終製品試験を実施する。

同様のヒト幹細胞臨床応用に関する内外の研究成果

疾患や外傷で破綻した運動器の組織、細胞に対する再生研究において、他分野と同様にヒト幹細胞は注目されている。関節軟骨、血管、骨組織の再生のための基礎研究が展開されてきているが、椎間板再生に対して骨髄間葉系幹細胞に注目した研究は非常に少ない。

一方、椎間板固有の細胞である髄核細胞の役割に注目し、その活性化髄核細胞を細胞移植療法のソースとした研究は私たち研究チームによって国内外で初めて考案された。またその髄核細胞活性化のための feeding cell として骨髄間葉系幹細胞を選び、細胞間接着を伴う共培養法を確立し、その活性化髄核細胞の安全性を検証した研究は、東海大学医学部の私たちの研究チームが国内外ではじめてである。

今回の臨床研究とは別であるが、骨髄間葉系幹細胞そのものの可塑性を利用した椎間板再生研究においても東海大学医学部の私たちの研究チームがその基礎研究を考案し、発表を続けている。

臨床研究の概要を平易な言葉で記載した要旨

(1) 研究の目的

本研究の目的は、腰椎椎間板変性の抑制あるいは椎間板再生に対する細胞移植療法の安全性と有効性を検証することである。広範かつ複雑な病態を含む腰椎椎間板変性疾患の中から、変性増悪が見込まれ、治療に難渋し、新たな治療法開発が強く望まれる病態をその対象として選択した。すなわち、腰椎椎間板変性疾患（腰椎椎間板ヘルニア、腰椎分離症、腰椎椎間板症）に対して椎体間固定術が行われる患者を対象に、自家骨髄間葉系幹細胞によって活性化された自家髄核細胞を変性進行が予測される固定隣接椎間板（固定術を必要としないがすでに画像上の変性変化がある段階まで進行している場合）へ移植し、その椎間板変性過程を抑制、あるいは椎間板の再生を試み、画像上、臨床上的安全性、有効性を評価することである。

(2) 研究の必要趣旨

腰椎椎間板変性疾患（腰椎椎間板ヘルニア、腰椎分離症、腰椎椎間板症）で変性した当該椎間の固定手術後の隣接椎間板の変性進行によって、腰痛や腰部の giving way (不安定感) がしばしば出現する。この状態の解決のために更に手術的治療が加えられることがあり、多くの場合には変性が進行した新たな隣接椎間板にさらに固定術が加えられる結果となる。脊椎には体重の支持と神経のコンテナ、関節機構の 3 つの働きがあるが、腰椎部における連続した複数の椎間の固定術による関節機構の破綻は、大きな可動性が要求される腰椎部、特に中下部腰椎部では著しい日常生活動作の障害を引き起こすことが多く、患者側にも医療側にも大きな問題となっている。椎間可動性を温存できる治療法の必要性が近年、強く求められている。

(3) 本研究発案の経過

この状態に対する新しい治療法として、自家活性化髄核細胞の再挿入を行うことで椎間板の変性進行を抑制する方法が東海大学医学部において考案され、様々な実験、研究がなされてきた。自家活性化髄核細胞の変性椎間板内への移植術の発想は以下の事実から生まれた。すなわち

- 1) 椎間板内組織は血行に乏しく、特に中心部の髄核内ではより血行が乏しく、低酸素分圧の環境である。
- 2) このような中で髄核細胞が生存し、ある年代まで椎間板内の代謝の制御や加齢変化を抑制する働きがあることが最近の多くの研究から示されてきている。
- 3) 椎間板の加齢変化以上の変性が促進した場合には、他の運動器組織と同様にその

変性の時間的抑制あるいは再生のために、細胞移植療法、遺伝子療法、サイトカインや成長因子の注入療法などが考えられる。

- 4) その中で椎間板変性の中期例では細胞移植療法の効果が高いと考えられ、また自家細胞を用いることが安全性を考える上で最良である。
- 5) 一方、血行が乏しく、低酸素分圧の環境に耐えうる細胞を選択する必要がある、髄核腔内に元々存在している髄核細胞を活性化して移植することが最も有効であり、また生物学的にも適当であると考えた。
- 6) 細胞数が少なく、1細胞あたりの細胞活性が低い髄核細胞を活性化する feeding cell を種々検討した結果、自家骨髄間葉系幹細胞を用いることが最も有効であることが判明した。
- 7) さらに小型動物、大型動物ならびにヒトにおいて、骨髄間葉系幹細胞との細胞間接着を伴う共培養によって髄核細胞の活性を著しく高めることが可能であるとの研究結果を得た。また、この方法で活性化された髄核細胞の変性椎間板動物モデル（小型および大型動物）への移植により、その後の椎間板変性の抑制が可能であることが示された。

この結果を踏まえて、椎体間固定手術時に摘出した椎間板髄核細胞を自家骨髄間葉系幹細胞との細胞間接着を伴う共培養で活性化し、活性化終了直後に固定隣接椎間の変性椎間板内に移植し、本法の安全性を確認するとともにその後の椎間板変性の抑制、あるいは椎間板再生を評価することが本研究の目的である。

(4) 被験者の選定基準

下記の選定基準を全て満たす患者を対象とする。

- 1) 年齢 20歳以上30歳未満 性別を問わない
- 2) 腰椎椎間板変性疾患（腰椎椎間板ヘルニア、腰椎分離症、腰椎椎間板症）のうち腰椎椎体間固定術（前方固定術、後方進入後方除圧＋椎体間固定術）が適応される症例
- 3) 上記対象疾患、適応術式の内、移植対象となる下記変性椎間板を有する例が適応となる。

すなわち、腰椎椎間板ヘルニア、腰椎分離症、腰椎椎間板症で椎体間固定術を行った際に、その隣接椎間板が固定術を必要としないがすでに画像上の変性変化がある段階まで進行している場合である。すなわち画像上はその固定隣接椎間板が以下の4つの基準を満たす例である。

- ① MRIでPfirrmann分類（椎間板ヘルニア例以外で使用）でIII、あるいはMochida分類（contained型椎間板ヘルニア例で使用）でmoderateの変性像