

	<p>8) 虚血性心疾患、脳梗塞又は脳出血の既往があり Fontaine IV度に分類される透析施行中の患者</p> <p>9) 糖尿病増殖性網膜症（新福田分類 BI から BV）を合併する患者</p> <p>10) 悪性腫瘍を合併する、又は3年以内の既往である患者</p> <p>11) 血液検査の結果、白血球 4,000/μL 未満又は 10,000/μL 以上、血小板数が 50,000/μL 未満、AST(GOT)100 IU/L 以上、ALT(GPT)100 IU/L 以上のうち、いずれかに該当する患者</p> <p>12) 間質性肺炎の合併あるいは既往のある、又は間質性肺炎を起こす可能性のある薬剤を服薬中の患者</p> <p>13) 38℃以上の発熱を伴う感染症を合併する患者</p> <p>14) 脾腫が認められる患者</p> <p>15) 原疾患に起因しない他の要因による跛行症状、安静時疼痛、皮膚潰瘍及び壊疽を有する患者</p> <p>16) 下肢に重症の神経障害を有しており本臨床試験における評価が困難である患者</p> <p>17) コントロール困難な精神障害を合併する患者</p> <p>18) 甲状腺機能亢進症を合併あるいは既往のある患者</p> <p>19) 他の臨床試験に参加中の、又は以前に参加した臨床試験の終了から6ヶ月以上経過していない患者</p> <p>20) 妊婦、授乳婦、妊娠している可能性のある又は治療期終了時まで妊娠を計画している女性患者、あるいはパートナーの妊娠を希望する男性患者</p> <p>別紙6：臨床試験実施計画書；9.適格基準（16頁）参照</p>
臨床研究に用いるヒト幹細胞	
種類	G-CSF 動員自家末梢血単核球細胞
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. G-CSF 投与の手順</p> <p>1) フィルグラスチムを1回 200μg/m² (5μg/kg 相当)の用量で、1日1回4日間皮下注射する。</p> <p>2) フィルグラスチム投与中は連日血液学的検査を施行する。白血球数が 50,000/μL を超えた場合はフィルグラスチムを1日1回 100μg/m² (2.5μg/kg 相当)に減量し、75,000/μL を超えた場合はフィルグラスチム投与を中止する。</p> <p>3) 4あるいは5日目に血液成分分離装置を用いてアフエレンシスを行う。</p> <p>2. 血液処理量</p> <p>血液成分分離装置：米国 GAMBRO BCT 社製 COBE Spectra を用いて、血液処理量は患者体重当たり 100~200ml (体重 50kg の場合 5L~10L) とし、総血液処理量は 10L を上限とする。</p> <p>3. 採取の手順</p> <p>1) 採取に先立ち、十分な血流が維持できる静脈または血液透析用シャントから採血ラインと返血ラインを確保する。</p> <p>2) 採取中は医師と看護師が立ち会い、定期的に血圧と心電図をモニターしながら実施する。血管迷走神経反射、クエン酸中毒、不整脈、心虚血症状、穿刺部位の出血や血腫などの合併症に細心の注意を払う。</p> <p>3) 採取に伴って血小板数が減少するため、採取終了直後に血小板数を測定する。</p> <p>4) 採取終了後少なくとも30分間は採取施設内で安静を保ち、体調に問題がないことを確認する。</p> <p>4. 採取細胞の評価</p> <p>成分採血装置の回路より単核球液の入った採血パックを無菌的に取り出し、操作アダプターを採血パックに取り付け検体の一部を、シリンジで無菌的に採取し、血液検査と CD34 陽性細胞の定量用に提出する。</p> <p>有核細胞数を目算又は自動血球測定器で、CD34 陽性細胞陽性率をフローサイトメトリーで ISCT(International Society for Cellular Therapy) 法に準じた方法で測定し、産物量をもとに総有核細胞数と細胞分画、総 CD34 陽性細胞数を算出する。</p> <p>5. 移植方法</p> <p>細胞移植は手術室で麻酔の下で実施し、両下肢に病変がある場合は両下肢に、採取細胞全量を使用し細胞移植を実施する。</p> <p>移植予定部位</p>

	<p>血管造影で血流の途絶がある範囲を中心とした筋肉内（腓腹筋・前脛骨筋・足底部・足趾等）と、壊疽、潰瘍がある場合には、その周囲を移植予定部位とする。</p> <p>6. 消毒方法</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 移植予定部位をポビドンヨードで消毒する。 ・ 消毒は移植予定部位よりも十分に広く行う。 ・ 全周性に行い、指間は無消毒野が残らないよう十分に注意して行う。 ・ 壊死部がある場合には綿球を変え十分に消毒を行う。 ・ ポビドンヨードがアレルギー等で使用できない場合は塩化ベンザルコニウムなどを使用する。 <p>7. 細胞溶液の注入方法</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 1カ所の注入量は0.5mLを目安とし、採取された細胞溶液量より概算で何カ所注射できるかを検討し注入カ所数（目安として70～150カ所）を決定し、注入部位をマーキングする。 2) 採取液は均一に攪拌した上で、採取バックの操作アダプターからシリンジで無菌的に採取し、移植予定部位に、23～27G針を用いて筋注する。 3) 指腹、足底部の皮膚が厚い部位への注入は1回の注入溶液量を少なめに調節する。 <p>8. 細胞移植後の局所処置法</p> <p>移植部位をポビドンヨードで消毒する。注射部位から軽度出血があれば圧迫止血を行う。</p>
調製（加工）行程	×存 ・ ○無
非自己由来材料使用	×存 ・ ○無 動物種（——）
複数機関での実施	×存 ・ ○無
他の医療機関への授受・販売	×存 ・ ○無
安全性についての評価	<p>末梢血管再生治療研究会への参加6施設を対象に、2001年12月1日から2006年12月31日までの間に、重症下肢末梢血管障害の患者へG-CSF動員自家末梢血単核球細胞を移植した162症例のレトロスペクティブ調査（PAD-CT Retro）を行い、移植の治療成績及び有害事象の発現の種類/頻度を解析した。全症例から極めて予後不良のRutherford分類6群21例、Fontaine分類不能7例、糖尿病性壊疽4例及びSLE7例の計39例を除外した123例の解析結果から、予後因子はFontaine分類と壊疽有無と透析歴が有意に独立した因子として選択された。また、移植後1ヶ月以内の治療関連死亡は見られなかった。1年以内の死亡は15症例（12.2%）で、虚血性心疾患の既往がある透析患者が9例（60%）、脳血管障害の既往がある透析患者が2例（13%）含まれおり、死因は心不全4例、心筋梗塞3例、脳梗塞2例、肺炎2例、不整脈1例、胆嚢炎1例、呼吸不全1例、自殺1例であった（自家末梢血単核球細胞移植 概要書参照）。日本透析学会の統計データでは、2005年末には全透析患者は257,765症例、2006年の死亡患者数は24,034症例（9.3%）で、死亡原因は心不全24.9%、脳血管障害9.4%、感染症19.9%、悪性腫瘍9.2%、カリウム中毒/頓死5.1%、心筋梗塞4.4%、悪液質/尿毒症3.1%、慢性肝炎/肝硬変1.3%、腸閉塞1.1%、自殺/拒否0.9%、災害死0.7%、肺血栓/肺梗塞0.3%、脳症0.1%、その他9.5%、不明8.3%と報告されている。なお、本臨床試験の適格規準では、PAD-CT Retroの1年以内死亡例15例は全て不適格であった。また、全症例中、ASOで糖尿病を合併している93例の患者（既往歴平均20.8年）で、G-CSF動員自家末梢血単核球細胞移植治療に起因した重篤な有害事象は発生していない。</p> <p>その他、Huangら、Ishidaら、Hoshinoら、もほぼ同様にG-CSF動員による末梢血由来の単核球細胞を重症下肢虚血患者に移植し有用な結果を得たことを報告している。</p> <p>別紙4：自家末梢血単核球細胞移植概要書：2.4 患者情報、移植前検査所見、移植情報の要約（7～10頁）、2.5 エンドポイントの解析（11～17頁）、2.6 追加解析結果（18～24頁）参照 別紙6：臨床試験実施計画書；3.根拠と背景（6頁3～20行）参照</p>
臨床研究の実施が可能であると判断した理由	<p>最近再生医療の研究が盛んとなり、特に血管の再生研究が数多くなされ、既にいくつも臨床研究が実施され、その有効性が示唆されるものも出てきた。当初は血管内皮増殖因子（VEGF）や、線維芽細胞増殖因子（FGF）などの血管新生因子の利用が検討されたが、それらの因子そのものでは主に半減期が短いことから、それらを分泌させる遺伝子治療が考えられ、実際に臨床研究もなされている。</p>

Isner らは VEGF の遺伝子治療を, Morishita らは HGF の遺伝子治療を実施し, 一定の治療効果が認められたことを報告している。しかしながら現段階では, これらは対照群のない小規模な試験にとどまっており, また遺伝子治療という特殊性から試料調製の煩雑さと安全性への懸念が残る。

白血病を中心とした血液悪性腫瘍においては薬剤による化学療法あるいは全身放射線照射後に自家及び同種の造血幹細胞移植が普及しており現在では年間 17,000 件以上が実施されている。当初, 移植のための造血幹細胞を含む単核球細胞は全身麻酔及び自己血輸血が必要な骨髄からの採取であったが, 造血幹細胞を骨髄から末梢血に動員させることの出来る G-CSF が利用可能となると末梢血からの造血幹細胞を含む単核球細胞の採取が普及してきた。

このような背景の元, 別の面からのアプローチとして, Asahara らがヒトの CD34 陽性造血幹細胞中に血管内皮前駆細胞が存在し, これらを下肢虚血モデル動物に移植することにより, 血管が再生されることを明らかにしたことに端を発し, 造血幹細胞の傷害部位への移植に注目が集まってきた。そのような中で 2002 年, Matsubara らは重症下肢虚血患者へ骨髄由来の単核球移植を試みて, 臨床上有用性があることを報告している。骨髄由来単核球細胞には, 血管内皮前駆細胞 (CD34 陽性細胞) は数%しか含まれておらず, その他の細胞も同時に移植することの危険性も指摘されている。Matsubara らの報告以降, 国内外の数多くの施設で, 同様の手技による治療が試みられ, 本邦でもすでに 10 施設以上が先進医療の認定を受けている。現在まで懸念されているような骨髄由来単核球細胞移植に伴う副作用は報告されていない。

骨髄由来単核球細胞の危険性回避, 並びに効率的な血管再生を目指し, Inaba らや Asahara ら (データ未発表) は, G-CSF で動員された末梢血単核球から CD34 陽性細胞を単離・純化し, 慢性重症下肢虚血患者に移植し臨床効果が確認されている。末梢血単核球からの CD34 陽性細胞単離・純化には, 煩雑な操作及び費用がかかるためか, その後同様の治療研究を試みる施設は少ない。

一方, Kawamura らは CD34 陽性細胞を単離・純化することなく, G-CSF 動員による末梢血由来の単核球細胞を重症下肢虚血患者に移植することを試みた。その結果, 臨床効果を認め, 同時に G-CSF, アフェレシス, あるいは移植した細胞に由来すると考えられるような重篤な副作用は報告されていない。

次いで本臨床試験において造血幹細胞動員のための G-CSF の投与量及び投与期間の設定に至った背景について記す。

G-CSF (フィルグラスチム) は 1991 年の発売以降, 主に「がん化学療法による好中球減少症」を対象に世界中で用いられてきたが, 2000 年本邦において「造血幹細胞の末梢血中への動員」の効能・効果が追加され, がん患者あるいは健康人ドナーに $400\mu\text{g}/\text{m}^2$ ($10\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当) を 1 日 1 回又は 2 回に分割し, 5 日間連日又は末梢血幹細胞採取終了時まで連日皮下投与するという用量・用法で用いられてきた。また, Asahara らの報告以降, 造血幹細胞あるいはそれを含む単核球を用いて血管を再生させるという研究が盛んに行なわれ, 中には Minatoguchi らの様に単核球細胞を採取することなしに G-CSF による動員のみで心筋梗塞モデル動物の心血管再生を試み, 一定の効果を確めたという報告もなされた。その後, これらの成果を臨床に結び付けるべく心筋梗塞後の患者を初めとした心血管障害患者に, G-CSF を投与する臨床研究が幾つかなされた。

Hill らは彼らの臨床研究から G-CSF の $10\mu\text{g}/\text{kg}$ を 5 日間投与することにより, 重症心血管障害患者に心筋梗塞が引き起こされる可能性を指摘したが, 対照群の設定が無く患者群もリスクが高かったため, G-CSF と心筋梗塞発症の間に明確な因果関係は判らなかつた。また, Kang らは, 心筋梗塞発症後の患者に G-CSF の $10\mu\text{g}/\text{kg}$ を 4 日間投与し, 狭窄血管部にステントを挿置したところ, その後の観察でステント挿置部位に再狭窄が観察されたと報告している。ただし, その後 Kang らは G-CSF の投与量を $5\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与日数を 3 日間とし, さらに挿置するステントを通常の bare metal から, 薬剤が塗布された DES (Drug Eluting Stent) とすることで再狭窄は見られなくなると報告した。

さらに, Kuethe ら, Ince ら, Zohlhofer ら, Ripa ら, Jorgensen ら, Susuki らにより心筋梗塞を中心とした心疾患患者に, G-CSF を投与するという臨床研究が行なわれた。効果は各々の研究でまちまちの結果であったが, 安全性に関してはすべての臨床研究で G-CSF に起因するものと考えられる副作用は観察されず, これらすべての報告においては対象とした心疾患患者に対する G-CSF 投与は安全で認容性ありとしている。なお, これらの臨床研究の殆どで対照群が設定されており, また G-CSF の投与量は $10\mu\text{g}/\text{kg}$ がほとんどで, 投与期間は 4 から 7 日であった。また,

	<p>前出の重症下肢虚血患者に対する臨床研究では、Inabaら、Kawamuraら、Hoshinoら、はG-CSFを5μg/kgで4日間投与することで、またAsaharaら(データ未発表)、Huangら、Ishidaらは10μg/kgで5日間投与することで、造血幹細胞の末梢血への動員を行っていた。</p> <p>一方、幹細胞動員に用いられるG-CSF(フィルグラスチム)の投与量・投与期間は通常400μg/m²(10μg/kg相当)を5日間(4~6日間)であるが、Tanakaらが実施した10名の健康人ドナーにおける、フィルグラスチムの投与量と造血幹細胞動員効果及び認容性を検討した臨床研究においては、動員効果と認容性の面から200μg/m²(5μg/kg相当)を5日間皮下投与することが至適であると結論している。</p> <p>本臨床試験におけるG-CSF(フィルグラスチム)の投与量・投与期間を決定するにあたり、上記Inabaら、Kawamuraら、Hoshinoらの臨床研究において200μg/m²(5μg/kg相当)の用量で有効性並びに安全性が確認されたことと併せて末梢血管再生治療研究会のPAD-Retro調査及び全般的な安全性を考慮した結果、本臨床試験において造血幹細胞を動員するためのG-CSF(フィルグラスチム)投与量・投与期間を、200μg/m²(5μg/kg相当)4日間とした。</p> <p>以上の状況から、下肢末梢血管障害に対する単核球細胞移植はその細胞の由来に依らず臨床効果が期待されるが、明確に計画されランダム化された大規模な試験が存在しないため、効果と安全性を明確に示唆するまでには至っておらず、移植細胞由来毎に治療法を比較した試験が存在しないため、臨床効果及び安全性の比較をすることはできない。また、病態から考えると、病態が進行してこれらの治療法を持ってしても、治療効果が期待できなくなる前に、これらの治療が実施されることが望まれるが、病態が軽症~中等症の患者に対してリスクとベネフィットは未だ明らかになっていない。</p> <p>これらを鑑み、軽症~中等症を含み、かつ単核球細胞移植の効果が得られにくいと考える病態進行性の症例を除いた患者(具体的には、下肢血管造影にて閉塞あるいは狭窄が確認された、慢性閉塞性動脈硬化症・パージャヤー病患者で、Fontaine重症度分類のII・III・IV、かつ、より重症な一方の下肢がRutherford重症度分類の分類の3・4群又は5群に属する患者)を対象に、TASCII及び日本脈管学会編「下肢閉塞性動脈硬化症の診断・治療指針II」に準じて行われる「推奨療法」あるいは、「推奨療法及びG-CSF動員による末梢血から採取した自家末梢血単核球細胞移植治療」のいずれかをランダムに割り付け、この併用治療が推奨療法に比べて優越した有効性を示し、かつ同等の安全性を有することを検証することとした。</p> <p>別紙6：臨床試験実施計画書；3.根拠と背景(5頁9行~6頁1行、6頁20行~7頁)参照</p>
臨床研究の実施計画	<p>本臨床試験は、末梢血管再生治療研究会主導による、「末梢動脈疾患患者に対するG-CSF動員自家末梢血単核球細胞移植治療のランダム化比較試験」に参加することにより北野病院で実施されるものである。内容は、既存の治療に抵抗性の末梢動脈疾患(慢性閉塞性動脈硬化症・パージャヤー病)患者で、上記選択基準・除外基準に合致する患者を対象として、TASCII及び日本脈管学会編「下肢閉塞性動脈硬化症の診断・治療指針II」に準じて治療を行う推奨療法群あるいは推奨療法及びG-CSF動員自家末梢血単核球細胞移植併用治療群のいずれかをランダムに割り付け、この併用治療の有効性と安全性を、推奨療法との比較によって評価する。全体のプロトコルで144例(推奨療法群72例、推奨療法+細胞移植治療群72例)が目標症例数であり、このうちの一部(約10例)を担当する。試験期間は2009年1月~2012年1月で、プロトコル治療は登録から1年間、最終症例登録後1年後には一斉調査を行なう。</p> <p>別紙6：試験実施計画書参照</p>
被験者等に関するインフォームド・コンセント	<p>試験責任医師又は試験分担医師は、被験者が本臨床試験に参加する前に、被験者に対して説明・同意文書を用いて十分に口頭で詳しく説明し、本臨床試験の参加について自由意思による同意を被験者から文書により得るものとする。</p> <p>試験責任医師又は試験分担医師は、同意を得る前に被験者が質問をする機会と、本臨床試験に参加するか否かを判断するのに十分な時間を与えるものとする。その際、試験責任医師又は試験分担医師、又は補足説明者としての本臨床試験協力者は、全ての質問に対して被験者が満足するように答えるものとする。</p> <p>同意文書には、説明を行った試験責任医師又は試験分担医師及び被験者が各自日</p>