

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 再生医療実用化研究事業
(英語) Research Project for Practical Application of Regenerative Medicine

研究開発課題名： (日本語) 自己皮膚由来培養線維芽細胞シートを用いた肺気漏閉鎖
(英語) Closure of lung air leakage by autologous cultured dermal fibroblast sheets

研究開発担当者 (日本語) 東京女子医科大学 医学部 第一外科学兼先端生命医科学研究所
教授 神崎正人

所属 役職 氏名： (英語) Department of Surgery I and Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, School of Medicine, Tokyo Women's Medical University, Professor, Masato Kanzaki.

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日
00

研究開発分担者 (日本語) 東京女子医科大学 先端生命医科学研究所
助教 高木亮

所属 役職 氏名： (英語) Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University, Assistant Professor, Ryo Takagi.

II. 成果の概要（総括研究報告）

本研究開発の目標は、自己皮膚由来線維芽細胞シートを用いた肺気漏閉鎖の臨床研究を実施し、移植安全性、および術中に生じた肺気漏に対する閉鎖効果の有無を確認することである。平成 28 年度は自己皮膚由来培養線維芽細胞シートを用いた肺気漏閉鎖を、選択基準を満たした多発性肺嚢胞症（識別番号 TWL101）、巨大肺嚢胞（識別番号 TWL102）の計 2 症例に対して実施した。

[TWL101]

・細胞シート製造期間：9 月 5 日～10 月 14 日 (39 日間)

・品質管理試験

試験項目	結果	判定
1. 無菌試験		
嫌気性細菌	陰性	合格
好気性細菌	陰性	合格
真菌	陰性	合格
2. マイコプラズマ培養試験	陰性	合格
3. マイコプラズマ LAMP 法試験	陰性	合格
4. エンドトキシン試験	0.002 EU/mL	合格
5. 細胞形態確認試験	異常なし	合格
6. 細胞シート剥離試験	剥離可能	合格
7. 細胞数試験	11×10^4 cells/cm ²	合格
8. 細胞生存率試験	99%	合格
9. 細胞純度試験 (ビメンチン陽性率)	99%	合格

・細胞シート移植日：10 月 14 日

・移植した細胞シート：6 枚

・胸腔ドレーン留置期間：4 日間

・入院期間：6 日間

多発性肺嚢胞症の切除後に空気漏れ試験を行い、肺気漏を認めた。支持膜を用いて自己皮膚由来培養線維芽細胞シートを回収し、分離肺換気下に細胞シートを貼付した。シートを重ねるように気漏部位にシートを 2 枚移植し、その後、両側換気、気道内圧 15cm 水柱で気漏の有無を確認し、気漏の閉鎖を確認した。

[TWL102]

・細胞シート製造期間：2 月 15 日～3 月 24 日 (37 日間)

・品質管理試験

試験項目	結果	判定
1. 無菌試験		
嫌気性細菌	陰性	合格
好気性細菌	陰性	合格
真菌	陰性	合格

2. マイコプラズマ培養試験	陰性	合格
3. マイコプラズマ LAMP 法試験	陰性	合格
4. エンドトキシン試験	0.005 EU/mL	合格
5. 細胞形態確認試験	異常なし	合格
6. 細胞シート剥離試験	剥離可能	合格
7. 細胞数試験	11×10^4 cells/cm ²	合格
8. 細胞生存率試験	98%	合格
9. 細胞純度試験(ビメンチン陽性率)	97%	合格

- ・細胞シート移植日：3月24日
- ・移植した細胞シート：8枚
- ・胸腔ドレーン留置期間：11日間
- ・入院期間：14日間

TWL101と同様に細胞シート移植を実施し、両側換気、気道内圧15cm水柱で気漏の有無を確認し、気漏の閉鎖を確認した。本症例は1秒量が1510mLと低下した症例であり、通常の手術で行なう肺部分切除による外科治療は術後の更なる肺機能低下が危惧されることから、健常肺組織の切除は最小限に留め、気漏部位へ細胞シートを貼付した。そのため、肺気漏は遷延したが、追加の処置を行うことなく、気漏は閉鎖し、胸腔ドレーン抜去に至った。細胞シート自身が保持する細胞外マトリックス等により細胞が再接着したことにより気漏が閉鎖できたと考えられ、術中肺気漏に対する自己皮膚由来培養線維芽細胞シートを用いた肺気漏閉鎖の有用性が示された。

Purpose of this clinical study is confirming safeness with transplantation of cultured autologous dermal fibroblast sheet for closure of the air leakage caused by pulmonary resection. Secondary end point is an evaluation the efficacy of fibroblast sheet to prevent the air leak after pulmonary surgery. In the last year, closure of lung air leakages by using autologous cultured dermal fibroblast sheets as sealants were performed for two patients with cystic lung disease who fit into no exclusion criterions and suffered from multiple bullae (trial subject ID: TWL101) or giant bulla (trial subject ID: TWL102).

[TWL101]

- ・Manufacturing the cell sheets : September 5th~October 14th, 2016 (39 days)
- ・Quality control tests

Inspection items	Results	Determination
1. Sterilization test		
Anaerobic bacterium	(-)	Pass
Aerobic bacterium	(-)	Pass
Fungus	(-)	Pass
2. Mycoplasma (culture)	(-)	Pass
3. Mycoplasma (LAMP method)	(-)	Pass
4. Endotoxin	0.002 EU/mL	Pass

5. Cellar morphology	Fibroblastic cells	Pass
6. Harvesting a cell sheet	Possible	Pass
7. Cell density of the sheet	11×10^4 cells/cm ²	Pass
8. Availability of the cells	99%	Pass
9. Ratio of vimentin positive cells	99%	Pass

- Surgery and transplantation of the cell sheets : October 14th, 2016
- Transplanted cell sheets : 6 sheets
- Placement of thoracic drain : 4 days
- Hospitalization : 6 days

Water seal test was performed after bullectomy, and air leak from the resection stump was confirmed by the presence of air bubbles upon submergence in physiological saline. After reducing the culture temperature to 20°C, autologous dermal fibroblast sheets were non-invasively harvested by using support membrane and were transplanted onto the air leak site under split ventilation. An autologous dermal fibroblast sheet was placed on the resection stump. After 5 minutes, support membrane was removed. For reinforcing air leak sealant, a second fibroblast sheet was transplanted over the first. The two cell sheets were transplanted onto each leakage site, and rewater seal test revealed stable closure of the air leak against up to 15 cm H₂O of airway pressure.

[TWL102]

- Manufacturing the cell sheets : February 15th~March 24th, 2017 (37 days)
- Quality control tests

Inspection items	Results	Determination
1. Sterilization test		
Anaerobic bacterium	(-)	Pass
Aerobic bacterium	(-)	Pass
Fungus	(-)	Pass
2. Mycoplasma (culture)	(-)	Pass
3. Mycoplasma (LAMP method)	(-)	Pass
4. Endotoxin	0.005 EU/mL	Pass
5. Cellar morphology	Fibroblastic cells	Pass
6. Harvesting a cell sheet	Possible	Pass
7. Cell density of the sheet	11×10^4 cells/cm ²	Pass
8. Availability of the cells	98%	Pass
9. Ratio of vimentin positive cells	97%	Pass

- Surgery and transplantation of the cell sheets : March 24th, 2017
- Transplanted cell sheets : 8 sheets
- Placement of thoracic drain : 11 days
- Hospitalization : 14 days

As well as TWL101, the fibroblast sheets were transplanted, and the closure of air leak was confirmed. In this case, forced expiratory volume (FEV) in 1 second was 1510 mL, and there is

a risk to decrease pulmonary function after surgery. Therefore, preservation of healthy lung tissue was minimally resected, and the fibroblast sheets were transplanted onto the air leak sites. Although the air leakage was prolonged, the leakage was closed and removed thoracic tube without any additional treatment such as pleurodesis. These results may suggest that the transplanted fibroblast adhere the wound site of air leak after the surgery by extracellular matrix or other adhesion molecules and availability of autologous dermal fibroblast sheet for closing lung air leak after lung surgery.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1 件、国際誌 件）

1. 神崎正人. 組織工学がもたらす新たな呼吸器外科治療. 未来医学, 2017, 30, 32-34.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 細胞シート治療臨床応用までの現状報告, 口演, 神崎正人, コクヨホール, 2016/9/10, 国内.
2. 自己皮膚由来培養線維芽細胞シートを用い肺気漏閉鎖を行った肺嚢胞症の 1 例, 口演, 神崎正人, 仙台国際センター, 2017/03/09, 国内.
3. 組織工学がもたらす新たな呼吸器外科治療, 口演, 神崎正人, 星陵会館, 2016/05/21, 国内.
4. 肺気漏防止を目的としたヒト皮膚由来線維芽細胞シーラントの製造方法の確立. ポスター, 高木亮, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/19, 国内
5. セルプロセッシングセンター内環境微生物モニタリングの結果とその動向. ポスター, 小久保舞美, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/17, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 自己皮膚由来培養線維芽細胞シートを用い肺気漏閉鎖, 神崎正人, 再生医療プログラム間連携のための情報交換会, 2016/05/30, 国内.

(4) 特許出願

なし。