

## ■ 技術講座

## 脂肪組織由来間葉系幹細胞治療の実際 — 幹細胞および培養上清液投与 —

太田 裕貴<sup>1)</sup>, 香川 明美<sup>1)</sup>, 安藤 栞<sup>1)</sup>, 劉 効蘭<sup>1,2)</sup>, 前田 美穂<sup>1,3)</sup>

(WAARM Journal, 2020; 3: 43-50)

### はじめに

サンフィールドクリニックは2011年に開院後、再生医療専門クリニックとして1000例以上の症例を治療してきた。2016年に施行された再生医療等安全性確保法に基づき「動脈硬化症の進展予防を目的とした自己脂肪由来間葉系幹細胞治療」と「慢性疼痛緩和を目的とした自己脂肪由来間葉系幹細胞治療」の届出を行い、それぞれ2016年5月26日と2017年8月28日に承認後これらの治療を行なっている。

どちらの疾患に対しても、基本的には同じ手法で採取・培養・細胞投与を行なっており、安定した医療の提供が行われていると多方面からの評価を得ている。また、筋骨格系疼痛は腰、肩、膝関節など局所的であり、幹細胞培養上清液を疼痛部位のみに投与している。変形性膝関節症では培養上清液は幹細胞投与と同様な効果があることが知られている。その上、上清液には細胞成分が含まれておらず免疫反応が起こる心配がないことから他家の上清液が使用できる利点がある。

当院は、細胞培養加工施設 (Cell Processing Center; CPC) を隣接するロート製薬のCPC部門に委託し安心・安全な幹細胞の提供を行っている。

そこで今回我々は、当院における間葉系幹細胞治療の実際を時系列的に紹介するとともに Tips と Pitfalls を述べる。

### 1. 来院

日本はもとより、海外でも幹細胞治療に対する期

待は非常に高く、当院での治療を希望する方が世界各国から来院している。これら海外からの患者様と当院とを結ぶ役割を担っているのがエージェント制度である。具体的には来院予約や診療通訳、治療後フォローアップのサポートを行い、患者と医療者を繋ぐ重要な架け橋となっている。エージェント制度により患者も気兼ねなく疑問や質問を医師に相談でき、十分に納得した上で治療を受けられることとなる。

### 2. 診察・術前検査

当院は完全予約制で、患者の身体的状況を把握し、再生医療の現状と安全性・有効性を説明する時間を十分設けている。この事は、患者本人が理解・納得できるまで十分説明することとなり、医師との信頼関係がより一層構築される。来院したら問診票を確認し、さらに詳細な問診を行う。動脈硬化症や慢性疼痛は全身病であり、治療前の患者の身体的、精神的状態を把握することは治療効果を判定する上でも非常に重要な情報である。初めて来院する患者は、再生医療に対する過度な期待や誤った(偏った)情報を入手していることが多く、改めてしっかりと説明が必要である。

#### 【患者のスクリーニング基準】

問診・血液検査から成る。問診により年齢、性別、現病歴、既往歴、海外渡航歴、内服薬の有無、同意能力などを確認する。特に重要なのは既往歴、現在の内服薬である。既往歴は心血管病や糖尿病、担痛状態の有無を確認する。また、内服薬は抗凝固薬や

<sup>1)</sup> 医療法人社団 みき会 サンフィールドクリニック

<sup>2)</sup> 国際抗老化再生医療学会

<sup>3)</sup> 日本医科大学附属病院 小児科学講座

連絡先 太田裕貴・院長 (Hiroki Ohta, M.D., Ph.D) 医療法人社団 みき会 サンフィールドクリニック  
住所: 〒135-0061 東京都江東区青海 2-4-32 電話: 03-3599-3311 e-mail: hohta@sunfield-c.com

抗血小板薬、ステロイドなど一般的な外科小手術と同様のチェックを行う。特にインバウンドの患者は日本で販売されていない薬や詳細不明な薬を内服していることがあるので注意が必要である。

血液検査は主に感染症のチェックを行う。感染症検査項目は HIV, HCV 抗体, HBs 抗原, HBe 抗原, HTLV1 抗体, 梅毒, 単純ヘルペス, マイコプラズマ, パルボウイルス B19 に対して行い, 原則全て陰性でなければならない。また, 脂肪組織採取時の対応のため, 凝固検査 (APTT, PT) も実施する。

### 3. 動脈硬化治療対象者の選定方法

対象患者は下記, 選択基準 (表 1) に合致し, 除外基準 (表 2) に抵触しない者とする。

表 1 <選択基準>

1. 下記①～③の選択基準より動脈硬化性病変を有すると判断される者, また, 二親等以内の血縁者に動脈硬化性疾患を有する者が 2 名以上いる者, 遺伝子検査で動脈硬化の素因が高いと判断された者
  - ①脈波伝播速度 (PWV)  $\geq 1400$  (cm/s) もしくは CAVI (足関節上腕血圧比)  $\geq 8.0$
  - ②ABI 検査 (足関節上腕血圧比)  $\leq 0.9$
  - ③頸動脈エコー: 頸動脈 (総頸動脈, 内頸動脈) にプラーク (IMT  $\geq 1.1$ ) を有する
2. 18 歳以上の方
3. 脂肪採取に十分耐えられる体力及び健康状態を維持されている方
4. 正常な同意能力を有する方
5. 本治療に関する同意説明文書を患者に渡し, 十分な説明を行い, 患者本人の自由意思による同意を文書で得られた方
6. 問診, 検査等により担当医師が適格性を認めた方

表 2 <除外基準>

1. 治療中及び治療後に, 継続して病院に来院できない場合
2. 治療の同意が得られない場合
3. 20g の脂肪採取ができない場合
4. 感染症が確認された場合 (感染症採血スクリーニング基準に基づく)
5. 感染症危険情報 (外務省・厚生労働省・世界保健機関 (WHO)) が発出中の海外地域に渡航し帰国後 4 週間経過していない場合
6. 不特定の性的接触を行った経験のある方
7. 麻薬, 覚せい剤を使用した経験のある方
8. 妊娠中の方
9. 脂肪採取時に抗凝固療法の薬剤を中断できない方, および, 脂肪採取時に使用する局所麻酔または消炎鎮痛剤, 抗生物質等にアレルギー歴のある方
10. 敗血症, 出血傾向または感染症が現れるリスクが高い血液疾患の合併症または疑いのある方
11. その他医師が適さないと判断した場合

### 4. 慢性疼痛治療対象者の選定方法

対象患者は下記, 選択基準 (表 3) すべてに該当し, 除外基準 (表 4) に 1 つでも該当する方は除外とする。

### 5. 脂肪採取

採取方法は, 吸引法またはブロック法で行なっている。患者の状態を考慮し担当医師が決定する。施設内の手術室は (清浄度クラス II) で, 清潔環境下 (無菌操作) で手術を施行。局所麻酔として, 直接麻酔 (リドカイン) + 浸潤麻酔 (リドカイン + エピネフリン + アミカシン) を併用する。採取量は 20g 以上を目安とする。採取器具は脂肪組織採取用カ

表 3 <選択基準>

1. 3 カ月以上続く慢性疼痛がある方
2. 18 歳以上の方
3. 脂肪採取に十分耐えられる体力及び健康状態を維持されている方
4. 正常な同意能力を有する方
5. 本治療に関する同意説明文書を患者に渡し, 十分な説明を行い, 患者本人の自由意志による同意を文書で得られる方
6. 問診, 検査等により担当医師が適格性を認めた方

表 4 <除外基準>

1. 治療中及び治療後に継続して病院に来院できないことが明らかな方
2. 疼痛の原因が心因性のみの方
3. 本治療に関する理解と同意が得られない方
4. 不特定の相手との性的接触を行った方
5. 4 の該当者との性的接触をした方
6. 感染症が確認された場合 (感染症採血スクリーニング基準に基づく)
7. 感染症危険情報 (外務省・厚生労働省・世界保健機関 (WHO)) が発出中の海外地域に渡航し帰国後 4 週間経過していない場合
8. 妊娠中の方
9. 脂肪採取時に抗凝固療法の薬剤を中断できない方, および, 脂肪採取時に使用する局所麻酔または消炎鎮痛剤, 抗生物質等にアレルギー歴のある方
10. 敗血症, 出血傾向または感染症が現れるリスクが高い血液疾患の合併症または疑いのある方
11. 20g 以上の皮下脂肪を採取することが出来ないと担当医師が判断した方
12. その他, 担当医師が不適と判断した場合

ニューラ（吸引法）または電気メス（ブロック法）を用いる。

### 〈脂肪吸引採取〉

1. 皮膚切開の臍部分を中心に、腹部の消毒を広く入念に行う
2. 局所麻酔の後、臍部の左側の皮膚に約4~5mm切開を行う
3. 切開部から麻酔用カニューラを挿入し、腹部皮下に麻酔薬を注入する（適宜、麻酔薬の追加や鎮静剤の注射を追加する）
4. 麻酔が十分効くまで（3~5分）待つ
5. 切開部から腹部皮下へ脂肪採取用カニューラを挿入し、皮下脂肪を採取
6. 必要量の脂肪採取完了後、切開部を1針縫合し、手術終了

### 〈脂肪ブロック採取〉

1. 皮膚切開予定部分を中心に、腹部の消毒を広く入念に行う
2. 局所麻酔の後、皮膚に約1.5cmから2cmの切開を行う（適宜、麻酔薬の追加や鎮静剤の注射を追加する）
3. 切開部から鑷子で脂肪組織を把持し、メツツェンバウムで脂肪を切り取り採取する
4. 必要量の脂肪採取完了後、止血を十分確認した後、切開部を3~4針縫合し、手術終了

## 6. 脂肪採取術後

すぐに独歩にて帰宅可能であるが、術当日は安静を基本とし、飲酒・入浴（シャワーは可）、飛行機への搭乗は避けていただいている。創部の疼痛に対しては、念のためNSAIDsを処方し頓服としているが、これまで内服を要した患者はわずかであった。手術翌日には当院看護師より患者の全身状態及び、創部の状態、出血の有無を直接確認している。次回受診日までに何らかの異常が見られた場合は、速やかに受診または連絡するように伝えている。

## 7. 細胞培養

採取した脂肪組織は当院に附設するロート製薬CPCに即時直接手渡し、直ちに細胞培養が行える環境を整えている。具体的な培養方法は以下の通りである。

### 〈幹細胞培養〉

品質管理のため原材料受入試験（品質管理試験その①）を行った後、脂肪組織を酵素処理し分散溶解する。

ストレーナーを通して溶解出来なかった組織を除去した後に細胞を含む分画（Stromal Vascular Fraction：SVF）を遠心分離にて回収する。得られたSVFを脂肪組織由来間葉系幹細胞培養培地（専用品、ロート製薬、大阪、日本）に懸濁し、フラスコに播種、培養する。培養期間中は細胞の増殖を原則毎日観察しコンフルエント（約80~95%）に達したところで、酵素処理にて剥離し継代する。指定の細胞数に達するまで複数回継代を繰り返す。細胞を回収し凍結保存液と懸濁し、特定細胞加工物として凍結保存する。品質管理として回収した細胞の一部及び細胞懸濁液の上澄み液を用い試験（品質管理試験その②）を行う。試験に合格した特定細胞加工物のみが凍結された状態で当院へ出荷される。

#### 〈品質管理試験その①〉

・原材料受入試験

細胞培養加工施設に輸送されてきた脂肪組織の包装、シリンジ、異物の混入の有無を目視で観察し異常がないかをチェックする。微生物限度試験は組織分散溶解前に行うPBS洗浄液をソイビーン・カゼイン・ダイジェスト寒天培地及びサブロー・ブドウ糖寒天培地に播種し、それぞれ30~35℃で3~5日間、20~25℃で5~7日間培養後出現した菌のコロニー数をカウントする。

#### 〈品質管理試験その②〉

・特定細胞加工物試験

培養完了後回収した特定細胞加工物の一部を用いて、直接法による無菌試験および核酸増幅法によるマイコプラズマ試験を行う。無菌試験は14日間培養を行い判定する。また、細胞懸濁液の上澄み液を一部回収しカイネティック比濁法によるエンドトキシン試験を実施する。さらに、回収した特定細胞加工物の一部を凍結保存し、これを14日以上保存した後、解凍しトリパンブルー色素排除法にて生細胞数・死細胞数をカウントし、生存率が70%以上であることを確認する。

## 8. 再生医療（幹細胞・培養上清液投与）

- 1). 投与開始前の患者の確認を行う。

診察等にて患者が点滴治療可能な状態であることを確認し、点滴治療開始前に必ずバイタルサインのチェックを行う。

2). 調製を行う。調製は無菌的操作で行う。

①ラクテック注 (250 mL 袋) を用意する。

②凍結保存された自家脂肪組織由来間葉系幹細胞を融解させる。凍結保存から取り出した後すぐに融解できるよう事前に恒温槽等を準備する。細胞が凍結保存されたチューブを凍結容器から取り出し、37℃ (±1℃) で予め準備した恒温槽に入れ速やかに融解させる。氷塊が5 mm 以下になった時点 (融解開始から2~3分後が目安) で恒温槽からチューブを完全に取出し、時々チューブをタッピングし、上下転倒混和させながら完全に溶かす。完全に溶けた状態で37℃の恒温槽に留置したままにしない。融解した細胞を直ちにラクテック注に混和し調製する。混和は、上下転倒混和をゆるやかにいき、懸濁が均一になるようにする。細胞を障害するような攪拌、懸濁操作を行わない。

3). 点滴治療 (自家脂肪組織由来間葉系幹細胞の投与) を行う。

2) で調製済みの自家脂肪組織由来間葉系幹細胞の入ったソフトバッグに赤血球輸血用フィルターラインを接続して、初回投与についてはより慎重に約40分かけて点滴静注する。点滴静注を開始してから、輸液バック内の細胞が沈殿しないように混和する。点滴静注を行っている間は、約10分ごとを目安に、患者のバイタルサインや末梢動脈血酸素飽和度 (SpO<sub>2</sub>) の変化、呼吸等の自覚症状変化 (息苦しい等)、その他血液逆流などの有害事象の発現に

留意し状態を観察する。(表5)

4). 再生医療を安全に行うために、細胞投与前から投与中及び終了後にかけて、患者の状態に異常がないか常に注意を払う。点滴静注終了後にも必ずバイタルサインのチェックを行い患者に異常がないことを確認し、点滴ラインを抜去する。

5). 治療プランによっては自家脂肪由来間葉系幹細胞投与に加え、自家脂肪由来間葉系幹細胞の培養に用いた培養上清液の投与も、患者の希望により行っている。培養上清液に関しては、約30mlを5%ブドウ糖注射液100mlに混注し、経静脈的に点滴投与を行う。また、慢性疼痛患者には原液を少量ずつ数カ所に分けて局所注射することも可能である。疼痛が激しい部位に局所注射することにより症状緩和が著明なケースも散見される。

## 8. フォローアップ検査

当院が提供している再生医療は「治療」として厚生労働省に承認されているものであるが、その有効性をより明らかにする責務も担っている。そのため細胞投与後に各種検査を行いその安全性と有効性を検証している。

患者は細胞投与前と投与後 (動脈硬化症の進展予防を目的とした自家脂肪由来間葉系幹細胞治療の場合は細胞投与から約1・3・6・12・18・24ヶ月後、慢性疼痛緩和を目的とした自家脂肪由来間葉系幹細胞治療の場合は細胞投与から約1・3・6・12ヶ月後)

表5 投与時チェック表

投与前	投与中 (持続モニタリング)	投与後
<b>【入室時間】</b> :	<b>【細胞注入時間】</b> :	<b>【終了時間】</b> :
□体温: °C	□脈拍: 回/分 □血圧: / mmHg	□体温: °C
□血圧: / mmHg	□SAT: % □呼吸苦: 有・無	□血圧: / mmHg
□脈拍: 回/分	<b>【細胞投与開始10分後】</b>	□脈拍: 回/分
□SAT: %	□脈拍: 回/分 □血圧: / mmHg	□SAT: %
□血糖値: mg/dl	□SAT: % □呼吸苦: 有・無	□血糖値: mg/dl
□モニター:	<b>【細胞投与開始20分後】</b>	□モニター:
□自覚症状:	□脈拍: 回/分 □血圧: / mmHg	□自覚症状:
	□SAT: % □呼吸苦: 有・無	
<b>* 心電図モニター、SATモニター、血圧計装着</b>	<b>【細胞投与開始30分後】</b>	<b>* 投与後はラインキープのまま30分間安静として経過観察</b>
<b>持続モニタリング開始</b>	□脈拍: 回/分 □血圧: / mmHg	
<b>血圧は10分毎測定に設定</b>	□SAT: % □呼吸苦: 有・無	<b>【細胞投与終了10分後】</b>
	<b>【細胞投与開始40分後】</b>	□脈拍: 回/分 □血圧: / mmHg
<b>■ 静脈ライン確保</b>	□脈拍: 回/分 □血圧: / mmHg	□SAT: % □呼吸苦: 有・無
サーフロー G	□SAT: % □呼吸苦: 有・無	<b>【細胞投与終了20分後】</b>
挿入部位 (右・左 橈骨皮静脈)	<b>【細胞投与開始50分後】</b>	□脈拍: 回/分 □血圧: / mmHg
(右・左 肘正中皮静脈)	□脈拍: 回/分 □血圧: / mmHg	□SAT: % □呼吸苦: 有・無
(右・左 尺骨皮静脈)	□SAT: % □呼吸苦: 有・無	<b>【細胞投与終了30分後】</b>
(右・左 前腕)	<b>【細胞投与開始60分後】</b>	□脈拍: 回/分 □血圧: / mmHg
	□脈拍: 回/分 □血圧: / mmHg	□SAT: % □呼吸苦: 有・無
<b>■ 採血</b>	□SAT: % □呼吸苦: 有・無	□血糖値: mg/dl
	<b>【細胞滴下終了時間】</b> :	□投与後体調確認 (有 無)
<b>■ ラクテック250ml滴下開始</b>	□ラクテック20mlでフラッシュ	( 月 日 AM・PM )
		○携帯 ○自宅 ○メール ○AGT( )



総コレステロール, LDL- コレステロール, HDL- コレステロール, RLP- コレステロール, CRP

**痛みの評価**：最も痛む時, 最も痛まないとき, 全体の平均について, 痛みに関する次の項目を評価する。

日常生活への影響, 痛みのパターン, 痛みの強さ (Numerical Rating Scale; NRS), 痛みの部位, 痛みの性状について詳細に聴取する. (表 8・9)

慢性疼痛緩和を目的とした患者の評価において

表8 痛みの評価シート (例)

<b>痛みの評価シート</b>			
<b>患者氏名</b>	○○ ○○○	<b>記入日</b>	2019年 1 月 15日
		<b>記入者</b>	本人
<p>询问您的症状。/症状についてご質問します。</p> <p style="text-align: center;">请在出现症状的部位上划圈。/症状のある部分に○を付けて下さい。(痛みのある場所ごとに強さを確認)</p> <div style="text-align: center; margin: 10px 0;"> </div> <p><b>什么时候出现症状? /症状はどのようなときに現れますか</b></p> <p> <input type="checkbox"/> 早晨/朝                    <input type="checkbox"/> 中午/昼                    <input type="checkbox"/> 傍晚/夕方                    <input type="checkbox"/> 睡眠时/就寝中                    <input checked="" type="checkbox"/> 起床时/起床時                    <input type="checkbox"/> 没规律/不定期                    <input checked="" type="checkbox"/> 其他/その他             </p> <p><b>症状具有怎样的特征? /症状はどのような性質を持っていますか</b></p> <p> <input type="checkbox"/> 不间断地、一直持续着/絶え間なく、続いている  <input checked="" type="checkbox"/> 症状时有时无/症状が出たり消えたりしている  <input type="checkbox"/> 被日不同/日によって違う                      →什么时候感到疼痛? /いつ痛みますか?  <input type="checkbox"/> 渐渐地变严重了/徐々にひどくなってきている  <input type="checkbox"/> 有麻木/しびれがある  <input type="checkbox"/> 其他/その他:             </p> <p><b>有到日常生活的影响吗? /日常生活への影響はありますか</b></p> <p> <input type="checkbox"/> 无/無  <input checked="" type="checkbox"/> 在日常生活由于疼痛有障碍/痛みで日常生活に支障がある  <input checked="" type="checkbox"/> 晚上,并且由于疼痛醒/痛みで夜に目が覚める             </p>			

其他/その他 :

**疼痛悪化的要素/痛みの増悪因子は?** **疼痛轻快的要素/痛みの軽快因子は?**

移动身体/身体を動かしたとき  静穏/安静

天气坏/天气の悪いとき  保温/保温

不安以及担心/不安や心配  冷却/冷却

其他/その他 :  其他/その他 :

---

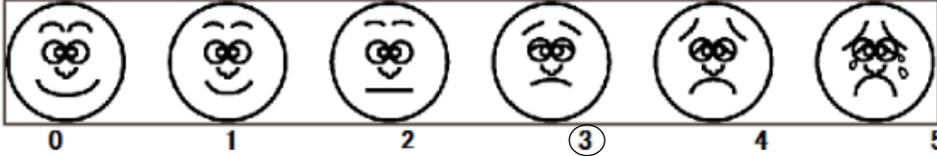
如果以数字来表达症状的程度, 是多少? 请在下面的数字上划圈。  
/その症状の程度を数字で表すと、どのぐらいですか。下の数字のところに○を付けてください。

完全没有/全くない 最严重/最も激しい

在最强大的时候 / 一番強いとき 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

在最弱的时候 / 一番弱いとき 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

1日的平均的强度 / 一日の平均 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



0 1 2 3 4 5

---

该症状是从什么时候开始的? /この症状はいつからありますか。

从 2017 年/年 冬 月/月 ころから

どんなきっかけで痛みが出ましたか? **重いものを持ち上げた際に腰痛出現**

痛みが出る前と後で、働き方やプライベートでの生活習慣に変化はありましたか? **重いものを持たないようになった、鍼灸院へ通うようになった**

日常生活での習慣(仕事、家事、趣味、運動、姿勢など)

生活スタイル / ここ数ヶ月ぐらい 6 8 10 12 14 16 18 20 22 0 2 4

仕事のスタイル・姿勢・イスなど **起床** **仕事(デスクワーク)** **入浴** **就寝**

**朝食** **昼食** **夕食**

家事や家族趣味・運動 **体操** **鍼灸院へ(1~2回/週)**

---

什么正针对疼痛去吗? 服用药, 热的, 按摩。/痛みに対して何か行っていますか? 内服、温める、マッサージなど  
\*包括维生素、营养剂和保健品。/※ビタミン、栄養剤、サプリメントも含まれます。

否/いいえ  是/はい \*携带药物或“用药手册”的患者, 请出示/お薬、もしくは「お薬手帳」を持っている方は、見せてください。

	什么正实施/実施していること	方法/方法
①	マッサージ	鍼灸院へ週に1~2回通っている
②	温電法	毎日、湿布を貼付
③	鎮痛剤内服	痛みが我慢できない時に内服

表9 スコアリング表 (例)

<疼痛評価表> ID ○○×× 年齢 50 歳  
既往歴 なし 痛みの部位 腰

治療ステージ	IC	投与①	1FU	投与②	投与③	ポイント
日付	0000/00/00	0000/00/00	0000/00/00	0000/00/00	0000/00/00	
NRS (1番強い時)	7	7	5	5	3	1
フェイススケール	3	3		2	2	1
SF36	問7	3		2	2	1
	問8	1		2	2	-1
患者からの主観的データ	動作時に痛み出現		痛みは少し軽減した	夜間眠れるようになった		1
医療者が収集した客観的データ	腰にコルセットをつけている				湿布やコルセットは使用していない	1
患者家族や周囲の発言	イライラしていることが多い		表情が明るくなった		笑顔が増えた	1

は、疼痛の変化を患者からヒアリング (表8) し、上記のスコアリング表 (表9) を用いてスコアリング化し評価している。疼痛評価表の各項目において、自覚症状や客観的データが改善している場合はポイントを加算、悪化している場合は減算して合計をスコアリングし評価する。患者本人の自覚症状の変化はもとより、客観的な視点や第三者の情報も重要であり評価項目の1つとしている。

また、フォローアップ検査時期に来院が難しい場合は、電話やメールで患者本人へ疼痛や体調の確認を行っている。インバウンドの患者の場合は、エージェントを介しフォローのヒアリングを行っているが、なかなか返答が得られにくいこともありヒアリングが困難な場合も多く今後の課題と考える。

## 最後に

無症状のうちに進行する動脈硬化症は早期の治療介入が困難である。その原因として、動脈硬化症の初期症状を客観的に評価する評価方法がいまだ確立されていないことが挙げられる。また、慢性疼痛においてはその医学的メカニズムが解明されていないことから、治療介入が困難とされている症例もある。このような現代社会においても治療介入が困難な疾患に対し、我々は今回一つの評価システムを構築した。今後、これらのシステムを活用し間葉系幹細胞治療の有効性と安全性を検証し質の高いエビデンスを世界に発信していきたい。