

be disseminated for in - depth review by the investigator steering committee and follow - up discussion at investigator meetings. It should also be submitted to FDA and each reviewing IRB annually, along with the general information in the attached 'Suggested Format for IDE Progress Reports' (Appendix V).

APPENDICES

- I. Federal Regulations
 - II. Glossary
 - III. Process Validation
 - IV. Sterilization
 - V. IDE Report Format
- PRELIMINARY DRAFT

END OF DOCUMENT

心筋シート等の有効性・安全性評価方法に関する
調査報告書

2006年2月23日
IBM ビジネスコンサルティングサービス株式会社

目次

I	はじめに	- 2 -
II	要素技術、当該製品、周辺技術の技術評価手法と基準	- 2 -
1	適応疾患の特定と心筋シート	- 2 -
	(1) 適応疾患	- 2 -
	(2) 既存の標準的治療方法・技術とその課題	- 3 -
	(3) 心筋シートとその要素技術	- 4 -
2	非臨床試験の設計	- 7 -
	(1) 有効性試験モデル・実験の設定	- 7 -
	(2) 安全性確認のための評価手法	- 9 -
	(3) GLP に準拠した試験プロセス	- 65 -
3	臨床研究の設計	
	(1) 患者選択基準	
	(2) 投与方法の標準化（術式の標準化）	
	(3) 効果判定	
	(4) 標準治療法の解析	
	(5) 患者数の設定・統計解析基準の設定	
	(6) 医療経済を基にした評価基準制度の導入	
III	製造環境、使用条件、運用体制、流通条件等の環境要件	
1	サンプル供給体制に関する条件設定	
	(1) CPC の整備条件	
	(2) 培養条件	
	(3) 製造システムのバリデーション	
	(4) 最終製品の形：安全性保証の方法、微生物非汚染保証	
	(5) 品質保障、安全性保障、活性保障各条件の保障基準設定	
	(6) 臨床試験を行うための成果・実験結果の解析方法	
2	トラッキングシステム構築に関する検討	
	(1) 観察期間・機関の構成	
	(2) 診断方法・検査方法の概念	
	(3) 情報収集・解析センターの機能概要	
IV	おわりに	
＜補足資料＞		
1.	再生医療に関する規格の調査	

I はじめに

近年、我が国の疾病構造は、がんと並んで生活習慣病に由来する循環器系の疾病・障害が増加している。これらは療養に長期を要し、身体機能や Quality of Life (QOL) を著しく低下させるとともに、患者の医療費負担や家族の介護負担の増加といった国民生活にとって重要な課題を生じさせている。これに対し、従来の医療では回復が期待できないような失われた身体機能の修復を目指して、細胞・組織工学による再生医療技術の研究が進んでいる。特に、NEDO プロジェクト「微細加工技術利用細胞組織製造技術の開発」においては、組織再生のための心筋・筋芽細胞シートによる心筋疾患の治療技術が開発されており、プロジェクト終了後には臨床研究等を経て実用化に進むことが見込まれている。

一般的に、医療技術の実用化には、どのように安全を確保するか、どのように有効性を評価するのかについて、研究開発者や利用者などの関係者間で事前に考え方や基準を共有しておくことが肝要となる。しかしながら、再生医療はこれまでの医療技術とは違う新しい概念の技術であり、安全性確保や有効性評価のために準拠すべき先例が乏しい状況にある。従って、再生医療のような新規の医療技術の実用化には、多面的な評価手法を十分な調査と議論を踏まえつつ事前に検討しておくことが重要となる。

以上のような背景に基づき、本報告書では、調査により得られた成果を今後のガイドラインやレギュレーションの検討に資することで、心筋・筋芽細胞シートによる心筋の再生医療の早期実用化を実現することを目的とし、同技術の安全性確保・有効性評価等のための考え方と基準作りの基礎資料の整理を行う。

以下、本報告書では、まず、心筋シートが適応される疾患の特定を行うとともに、心筋シートの要素技術について整理し、次に、非臨床試験の設計に関して、有効性及び安全性の確認のための評価手法、及び臨床試験の進め方について整理する。その後、サンプルの供給体制の条件、及びトラッキングシステムの構築方法について整理することとする。

II 要素技術、当該製品、周辺技術の技術評価手法と基準

1 適応疾患の特定と心筋シート

(1) 適応疾患

		グレード1 (軽~中度)		グレード2 (中度)		グレード3 (重度)	
組織	NYHA	I度	II度	III度		IV度	
		ACC/AHA	StageA 早期心不全の症状は見られない段階だが、リスク因子を持つ		StageB 早期心不全の症状は見られない段階だが、心臓の機能や形態に異常がある	StageC 器質的心疾患があり、息切れなどの心不全症状の経験もある患者	StageD 再発性心不全であることが明らかで、心臓移植を含む特別の治療が必要、または、ホスピスのような終末期ケアが適している患者
既存療法	治療方法	投薬療法	β遮断薬、ジゴキシン、抗凝固薬および抗血小板薬、アンジオテンシンII受容体拮抗薬、抗不整脈薬、アルドステロン拮抗薬	投薬療法	β遮断薬、ジゴキシン、抗凝固薬および抗血小板薬、アンジオテンシンII受容体拮抗薬、抗不整脈薬、アルドステロン拮抗薬	投薬療法	(β遮断薬治療は推奨できない)
		外科療法	除細動器の適用、...	外科療法	除細動器の適用、...	外科療法	
	課題					置換型治療 補助人工心臓 心臓移植 直接注入による細胞移植	
新療法	心筋シート適用可能性		△		△		○
	課題						

図1 重症度別標準治療法、条件および課題

(⇒現在調査整理中：対象患者像の設定として、身体活動への影響や制限を受ける心疾患患者を整理するために、心疾患の重症度による分類を行い、心筋シートの対象範囲の設定を行う予定。)

(2) 既存の標準的治療方法・技術とその課題

心筋細胞は出生後分裂能を失うため、心筋梗塞などによる心筋細胞数の減少は心筋の収縮力低下をもたらし、心不全へと移行する(虚血性重症心不全)。重症心筋梗塞などを中心とする虚血性重症心疾患では、心筋細胞が機能不全に陥り、線維芽細胞の増殖、間質の線維化が進行し、心不全を呈するようになるが、ここで消失した心筋細胞は再生不可能である。このような患者に対しては、従来から大きく①内科的療法(投薬治療)、②外科的療法、③その他(置換型治療)の3つの治療方法が提示されていた(澤：医学の歩み)。

①は、β遮断薬、ジゴキシン、抗凝固薬および抗血小板薬、アンジオテンシンII受容体

拮抗薬、抗不整脈薬、アルドステロン拮抗薬等を利用した投薬療法である。②は、冠動脈形成術（PTCA）、冠動脈バイパス術、左心室形成手術などの外科療法である。③は、人工心臓、心臓移植を利用する治療である。このような治療法に対して、体外で再生した心筋細胞を心不全部に移植し、不全心と電氣的・物理的に結合させ、機能的、組織的に、不全心を再生させることにより、心機能を回復させる手法が近年開発されている。

（⇒現在整理中：診療ガイドラインやプロトコールを基に整理する予定。）

(3)心筋シートとその要素技術

[1] 心筋シート概要

近年、骨格筋に由来する細胞を、細胞移植に用いる研究が行われている。骨格筋に存在する筋芽細胞からなる衛星細胞は、骨格筋が障害を受けたとき、分裂、分化を開始し、障害を受けた部分の筋肉を補填する働きがある。このように、筋芽細胞には幹細胞の様な性質を持つため、その筋芽細胞（自己筋芽細胞）を心筋梗塞巣に移植する試みがなされている。実際に、心筋梗塞患者に対して、自己骨格筋より分離培養した筋芽細胞を移植する臨床試験が行われており、その有用性も報告されている。重度の心筋梗塞の場合は、心不全が進行するようになるが、心筋細胞はほとんど細胞分裂を起こさないため、心筋細胞が損傷すると、細胞数は減少していく。このような患者に対して、細胞の移植を行うことには、ある程度の有用性が考えられるが、直接心筋内注入による細胞移植法では、移植細胞の70～80%が失われて、その効果が十分に発揮できない場合があることや、不整脈等の副作用が発生する場合があること、大量かつ安全な細胞減の確保の困難さ、などの課題が残っている。特に、拡張型心筋症や虚血性心筋症などの重症心不全に対する治療の一選択肢として様々な細胞移植の研究が行われているが、直接心筋内注入などによる細胞移植法では、心臓全体への移植が困難であるという点から、筋芽細胞シートを利用した細胞移植が研究されている。

[2] 心筋・筋芽細胞関連技術

再生医療に用いられる細胞供給源には、既に分化している細胞に由来する細胞を用いる場合（幹細胞に比べて採取しやすい利点があるが、最終分化を遂げているため、増殖能力に乏しく、医療応用に耐えうる細胞数の確保が困難。）と、骨髄などに含まれる幹細胞を用いる場合とがある（幹細胞は、培養系での増幅が比較的容易であるため、多量の細胞を確保しやすい）。細胞には、胚性幹細胞と体性幹細胞が存在する。体性幹細胞は、患者自身から摘出使用することが可能であり、利用しやすい細胞である。

幹細胞や前駆細胞を利用する細胞移植は、ドナーとホストの関係から、患者自身の細胞

を用いる自家移植(同種自己細胞移植)、他人の細胞を用いる同種移植(同種他家細胞移植)、動物の細胞を用いる異種移植、に分けることができる。自家細胞の場合、患者自身の細胞であるため、安全性は高いが、細胞を得るために自己組織から採取するため、侵襲や取得可能な細胞数に限界がある。同種細胞は、組織適合性抗原によって引き起こされる急逝・慢性の拒絶反応が起こりうる。完全な拒絶を防ぐためには、遺伝子的な操作や免疫抑制剤の使用が必要となる。

特に、幹細胞生物学の発展により、胚性幹細胞(ES細胞)や骨髄間質細胞からの心筋細胞の分化誘導が可能となっており、心筋細胞を対外で培養、増殖させて、不全心筋部に注入する治療法の研究が進んでいる。この心筋細胞移植は、動物モデルに対しては、移植された心筋細胞がホスト心筋に正着し、ホスト心筋細胞との間にギャップジャンクションが形成され、低下した心機能を回復する可能性が示されている。

細胞ソースとしては、ES細胞を利用した心筋細胞の分化誘導が有効ではあるが、ヒトES細胞の利用に対しては倫理的な議論が多く、臨床への応用が困難であると言える。そこで、骨髄間質細胞からの心筋細胞を分化誘導する場合や、骨格筋組織内の筋芽細胞を利用する場合が研究されている¹。

自家骨格筋芽細胞は、分裂能を有するため、ホストの心臓においても増殖し、心筋細胞とともに収縮しうる細胞数を増やす可能性がある。また、ドナーの負担が少なく、比較的多くの細胞を得ることができ、拒絶反応がなく、倫理的問題も少ない²。

近年、動物実験ではあるが、心筋細胞移植により心不全を治療する方法が報告され注目をあびている。心筋細胞移植はこれまで胎仔あるいは新生仔の心筋細胞を用いて行われてきたが、ヒトへの応用を考えた場合ドナーとなる細胞の問題で行き詰まっていた。ところが、骨髄間質細胞中に含まれる間葉系未分化幹細胞を用いることにより心筋細胞が得られることが報告され、これまでの研究により、骨髄間質細胞由来の心筋細胞(CMG細胞)は自己拍動能を有し、胎仔期心室筋型の遺伝子表現型を示すこと、カテコラミンの $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 受容体を発現していることが明らかにされている。

また、心筋細胞のみの選別には後述のごとくミオシン軽鎖-2vのプロモーターを用いればFACSにより心筋細胞のみを選択的に集められることも明らかにされている。これらの実績を踏まえて、ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いた心筋細胞への分化誘導法の確立とヒト重症心不全症例への心筋細胞移植療法の実用化を目指す研究が進められている。

この研究開発では、ヒト骨髄細胞を用いた心筋細胞分化誘導法の確立と間葉系幹細胞から心筋幹細胞に分化する際の表面マーカーの探索、分化誘導因子の同定等が計画され、具体的には heterogeneous な骨髄細胞の中から心筋細胞に分化し得る間葉系幹細胞の単離法を開発すること、およびこれに必要な細胞表面マーカーの特定、脱メチル化以外に如何なるエピジェネティカルな操作を行うことが分化誘導に必要なものであるかの確認、心筋分化に必

¹ 清水、化学と生物(2002)49頁。

² 松浦・小室、IHD(2003)。

要な細胞増殖因子、サイトカインシグナルの特定、多分化能を持つ細胞から心筋細胞のみを単離する方法の確立、細胞移植を行う際の具体的手法の確立等を研究開発が目標とされている³。

[3] 培養及びシート関連技術

生体組織の構造を見直すと、種々の細胞がシートを形成し、これが層構造をなして組織が構成されていることがわかる。そこで、種々の細胞を培養して細胞シートを構築し、これらのシートを重ね合わせることで組織様構造を形成する、「細胞シート工学」による組織構築の検討が推進されている。通常の細胞培養では、培養した細胞を培養基材から脱着・回収するのにトリプシンなどのタンパク質分解酵素と EDTA などのキレート剤を併用して行われる。このとき細胞膜表面で機能を発現している膜タンパクも同時に傷害されるために、細胞組織が構築されたときに発現される機能がほとんどみられない、あるいは低下することがまま生起する。そこで、増殖した培養細胞を単層の組織として回収する手法が検討されている。このとき、酵素処理をすることなく細胞を脱着できる表面が必要となる。この目的のために、温度変化に応答して水中で溶解・不溶化変化を示すポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)(PIPAAm)を化学的に結合させた表面が考えられた。この表面は 37°C の培養温度で細胞が接着・増殖する一方、温度を 32°C 以下にすると増殖した細胞は単層シートのまま脱着・回収できる。このとき、脱着細胞の下面には培養液から、あるいは細胞自身が産生した細胞外マトリクス成分が存在し、これがあたかも「糊」のごとく作用するために、新しい基材にシートのまま再接着させることが可能である。この手法を用いれば、同種、異種機能を有する細胞シートに重層化させて細胞組織用構造を試験管内で形成でき、この組織は互いに協調して高い生理機能を発現することが明らかとなりつつある。東京女子医科大学と大阪大学との共同研究から心筋梗塞モデルの動物の心臓に、この手法で作製した重層化心筋細胞シートをあたかもセロハンテープを貼るかのごとく移植すると、心筋シートの持つ収縮性の結果、心機能が回復していることが確認された。また、皮膚移植にも応用可能で、倫理委員会の承認のもと、熱傷患者への表皮細胞シート移植が行われ、良好な回復を示していることが明らかとなりつつある。この手法は世界に先駆けて達成された手法であり、日本発の組織工学とそれを利用した治療システムが構築できることを示した好例である。

(⇒現在整理中：以上は「細胞シート工学」からのティッシュエンジニアリングのアプローチ」よりの抜粋。基本的な要素技術に関して整理する予定。)

³ 「細胞組織工学(ティッシュエンジニアリング)の研究開発」④骨髄間葉系幹細胞の分離と再生心筋細胞の開発」を参照。

【参考文献】

- ・ Jonathan Leor, Sharon Aboulafia-Etzion, et al. Cardiac Grafts : A New Approach to Repair the Infarcted Myocardium?
- ・ Survival and Function of Bioengineered Cardiac Grafts
- ・ W.-H. Zimmermann, K. Schneiderbanger, Tissue Engineering of a Differentiated Cardiac Muscle Construct
- ・ Tatsuya Shimizu, Fabrication of Pulsatile Cardiac Tissue Grafts Using a Novel 3-Dimensional Cell Sheet Manipulation Technique and Temperature-Responsive Cell Culture Surface
- ・ W.-H. Zimmermann, et al, Stem Cell Repair of Infarcted Myocardium: An Overview for Clinicians
- ・ 福田恵一「心不全の心筋再生療法」(「日本内科学会雑誌」、2005年) 283～289頁
- ・ 清水達也「組織工学による心筋再生」(「ICUとCCU」、2005年) 539～546頁
- ・ 清水達也、岡野光夫「心筋再生の現状と今後の展望」(「再生医療」4巻3号、2005年) 383～390頁
- ・ 清水達也「細胞シート工学による心筋組織再生技術」(「化学と生物」40巻1号、2002年) 48～52頁
- ・ 清水達也「細胞シート積層化による心筋組織再構築とその応用」(「Ischemic heart disease (IHD) frontier」4巻1号、2003年) 44～48頁
- ・ 清水達也＝岡野光夫「心筋再生の現状と今後の展望」
- ・ 松浦勝久＝小室一成「骨格筋芽細胞における心筋再生の展望」
- ・ 澤芳樹「心筋細胞シート移植による心不全治療」

2 非臨床試験の設計

(1)有効性試験モデル・実験の設定

上述したように、心筋シートは、重症の心筋梗塞等の不全心部に対して移植され、失われた心機能を回復しようとする技術である。そのため、心筋シートが心疾患に対して有効であるといえるためには、筋芽細胞等から培養された心筋細胞やその組織が、生体内で心筋として機能するの否かを、前臨床段階で確認する必要がある。以下では、採取細胞から最終製品の心筋シートが形成されるまでのプロセスを分けることにより、各段階で必要な有効性評価の内容、手法、基準を検討する。

(⇒現在調査整理中)

[1] 採取細胞の有効性

採取細胞を対象に、培養に利用可能な細胞を選択することを目的として、細胞の分化能等を評価する手法と基準を説明する。

[2] 培養細胞の有効性

培養された細胞の機能や活性が保たれていることの確認を目的として、細胞活性、細胞分化状態、細胞数、細胞老化度、増殖能、純度、などを評価する手法と基準を説明する。

[3] 細胞シートの有効性

温度応答性培養皿上で培養し脱着された細胞シート単体を対象に、培養された細胞シートの機能の確認を目的として、細胞密度、電気的結合、細胞シートの拍動、細胞接着因子の状態等を評価する手法と基準を説明する。

[4] 重層化心筋細胞シートの有効性

重層化された心筋細胞シートを対象に、生体外での形態・機能の確保の確認を目的として、シート間での同期拍動、電気刺激の伝達、密な接着等を評価する手法と基準を説明する。

[5] 移植後の心筋細胞シートの有効性

最終的に移植された心筋シートを対象に、生体内での形態・機能の確保の確認を目的として、動物を用いた移植後の状態（血管の生成、ギャップジャンクションの形成、心筋様組織の再構築、拍動等）を評価する手法と基準を説明する。例えば、拍動の確認、拍動が維持される期間、収縮・拡張能の改善、線維化の抑制、心筋リモデリング抑制効果（心筋細胞のアポトーシスの抑制）、左室内径拡大抑制効果、壁厚菲薄化抑制効果、などを確認する必要がある。確認の手法としては、超音波検査による確認、グラフトのサイズ・厚さ・張力の確認、電気伝達速度の変化の測定などが考えられる。

【参考文献】

- ・ Jonathan Leor, Sharon Aboulafia-Etzion, et al. Cardiac Grafts : A New Approach to Repair the Infarcted Myocardium?
- ・ Survival and Function of Bioengineered Cardiac Grafts

- ・ W.-H. Zimmermann, K. Schneiderbanger, Tissue Engineering of a Differentiated Cardiac Muscle Construct
- ・ Tatsuya Shimizu, Fabrication of Pulsatile Cardiac Tissue Grafts Using a Novel 3-Dimensional Cell Sheet Manipulation Technique and Temperature-Responsive Cell Culture Surface
- ・ W.-H. Zimmermann, et al, Stem Cell Repair of Infarcted Myocardium: An Overview for Clinicians

(2) 安全性確認のための評価手法

[1] 概要

日本における薬事法を中心とした薬事規制では、人や動物由来の細胞・組織を、細胞工学や細胞治療技術を利用して加工製造される医療用具や医薬品に対しては、厚生労働省による通知に沿って、その品質や安全性を確保する必要がある。

ここで言う通知とは、「細胞・組織を利用した医療用具又は医薬品の品質及び安全性の確保について」（医薬発第906号平成11年7月30日、以下、「確認申請通知」と言う）と、「ヒト又は動物由来成分を原料として製造されている医薬品等の品質及び安全性確保について」（医薬発1314号平成12年2月26日）を指す。これらは、細胞組織を利用した医療用具等が、高度の新規性を保持することから過去の使用情報が少ないため、リスク予測が困難であり、特に感染性因子混入のリスクを避けるために、人を対象にする臨床試験・治験の前に、細胞組織を利用した医療用具等の品質と安全性を確認することを求めるために発せられている。

この通知のうち、前者は、製品の製造業者（輸入販売業者を含む。本節では以下同じ。）が厚生労働省に対して、治験計画を提出する前に行うべき治療用具等の安全性と品質に関する確認申請とそこで提出すべき資料項目を示した通知であり、後者は、その確認申請の資料項目の内容とその参考となる基準を示した通知であり、そこでは、「細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する考え方」（以下、「基本的考え方」と言う）及び、「ヒト由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」（以下、「指針」と言う）が提示されている。

心筋シートは、上述したように（上述する予定）、ヒトの筋芽細胞や心筋細胞を基に、組織工学の技術を利用して培養されたシート状の細胞を心疾患患者に移植する技術であり、人の細胞を利用していることから、この厚生労働省の通知等に従う必要性があると言える。以下では、それぞれの通知の内容とそれに付随する関係する指針や通知に基づき、心筋シート等の再生医療技術に基づく医療用具の安全性に関する試験法を述べる。

[2] 薬事法における規制・指針

通知による確認申請は、以下の医薬品、医療用具等を対象としている。

ヒト又は動物由来医薬品等の範囲は以下のとおりとする。ただし、生物学的製剤基準に記載されている血液製剤及び専ら人体に直接使用されないもの（体外診断用医薬品）等を除く。

- (1) ヒト又は動物の細胞・組織から構成される医薬品等
- (2) ヒト又は動物の細胞・組織からの抽出物又は分泌物に由来する成分を含有する医薬品等
- (3) ヒト又は動物の尿等からの抽出物に由来する成分を含有する医薬品等
- (4) ヒト又は動物由来細胞に対して細胞培養、遺伝子組換え技術を応用して製造される医薬品等
- (5) 添加剤（製造過程の培地を含む。）として（1）～（4）の成分を用いて製造される医薬品等

また、確認申請においては、次の項目を記載することが求められている。

1. 起源又は発見の経緯及び外国における使用状況について
2. 製造方法の概要について
 - (1) 原材料となる細胞・組織の起源・由来、選択理由
 - (2) 原材料となる細胞・組織の特性と適格性（細胞・組織供与者の選択基準、適格性（病歴、健康状態、感染性微生物汚染チェック、免疫適合性）、細胞（組織）の純度と安定性及び確認方法、原材料細胞・組織供与者のトレーサビリティの保証手段、提供者の個体差が品質、安全性及び有効性に影響する可能性などには留意すること。）
 - (3) 細胞・組織の採取・保存・運搬について（採取の倫理的妥当性、インフォームドコンセント、プライバシー保護、採取した細胞組織の試験検査等には留意すること。）
 - (4) 遺伝子改変細胞及び遺伝子改変動物を樹立しようとする場合の原材料となる遺伝子ベクターウイルスなどについて
 - (5) 異種動物由来細胞・組織を製造しようとする場合の原材料となる動物について
 - (6) 細胞・組織以外の原材料について（当該原材料の品質・安全性、当該原材料と細胞組織との相互作用）
 - (7) 製造工程（特に、製造工程の適切な段階における感染性微生物等の検査方法、汚染防止のための管理体制及び採用した不活化・除去方法並びに工程評価に留意すること。）
 - (8) セルバンク作成、継代方法とその後の細胞の変化について（DNA 試験等を含む。）
3. 品質管理
 - (1) 投与ロット毎の原材料（セルバンクの管理、バッチ数等を含む。）の品質管理、製造工程の妥当性の検証と一定性の維持、各工程の中間製品の品質管理
 - (2) ロットを構成しない原体／製剤（製品）の品質管理法（規格、試験方法及び設定根拠）

<p>(3) ロット毎の製剤原体／製剤（製品）の品質管理法（規格、試験方法及び設定根拠）</p> <p>4. 安定性</p> <p>(1) 流通使用期間、使用形態を十分考慮（細胞・組織の生存率・力価等に基づき）し、適切に行われた安定性試験結果</p> <p>(2) 貯法及び有効期限</p> <p>(3) 安定性の限界の確認</p> <p>(4) 輸送、凍結・解凍等が及ぼす影響</p> <p>5. 前臨床試験（動物由来の同等品を用いた同種適用の系及びヒト由来の製品を用いた免疫寛容動物を利用する系等を用いる場合）</p> <p>(1) 安全性試験</p> <p>(2) 効力又は性能を裏付ける試験</p> <p>(3) 体内動態</p> <p>6. 前臨床試験等の内容の総括（リスク便益バランスに関する考察）</p> <p>(1) 現在の知見で細胞・組織利用医療用具等の安全性が確保されており、品質、安定性、安全性及び予想される有効性や性能の面から臨床試験を行うことの正当性。</p> <p>(2) 最終製剤（製品）の病原体及び感染性物質（以下「病原体等」という。）による 感染の危険性の否定に関すること。</p> <p>7. 細胞・組織利用医療用具等の製造施設及び設備</p> <p>8. 備考</p> <p>(1) 外国における臨床試験成績</p> <p>(2) 国内の治験計画</p> <p>(3) 細胞・組織利用医療用具等（治験用具等を含む。）を用いて治療を受けた患者の記録及び当該用具等の使用記録の保管管理計画</p>

医薬品・医療機器における感染リスクの評価に関して、2002年改正、2003年施行の薬事法上では、「生物由来製品」、「特定生物由来製品」という分類での規制区分が新設されている。この規制の枠組みは、従来の微生物の混入を否定し、かつ、製品特性を担保できる技術である滅菌除菌が行いがたい対象が多く、全ての安全性（感染リスク回避）を担保できるとは言いがたいため、新たな安全確保の要求事項が追加されているという趣旨である（再生・医療機器 p398～）。改正薬事法 2 条 5 項では、「生物由来製品」とは、人その他の生物に由来するもので原材料として製造される医薬品・医療機器等のうち、保健衛生上特別の注意を要するものとして、構成労働大臣が薬事・食品衛生審議会の意見を聴いて指定するものを言うこととされ、また、「特定生物由来製品」とは、生物由来製品のうち、販売し、賃貸し、又は授与した後において当該生物由来製品による保健衛生上の危害の発生又は拡大を防止するための措置を構ることが必要なものであって、構成労働大臣が薬事・食品衛生審議会の意見を聴いて指定するものをいう、とされている。（生物由来製品の具体例に

は、……。特定生物由来製品の具体例には、……。がある。) 心筋シートは、ヒトから得られた原材料を利用したものであり、その製品の特性から、これらの規制に対する配慮も安全性確保の一つとして必要になる。

[3] 安全性評価のための試験法

1) 概要

①日本における状況

ここで提示されている項目の各内容については、基本的考え方と指針により補完されており、確認申請通知の各項目に対応している。指針では、確認申請通知の各項目の内容を示してはいるが、その具体的な基準までは提示されていない。ただし、「2. 製造方法の概要についての(6)細胞・組織以外の原材料について(当該原材料の品質・安全性、当該原材料と細胞組織との相互作用)」に対応している、「第2章 製造方法 第6 細胞・組織以外の原材料について 1 細胞・組織以外の原材料について」においては、必要な試験法として、「医療用具の製造(輸入)承認申請に必要な生物学的安全性試験の基本的考え方について」(医薬審発第0213001号平成15年2月13日)を参照することが示されている。この生物学的安全性の基本的考え方の通知では、厚生労働省より参考資料として、厚生科学研究の「医療用具の有効性、安全性評価手法に関する国際ハーモナイゼーション研究」研究班が作成した「医療機器の生物学的安全性評価のための試験法について」が提示されており、具体的な試験法として、細胞毒性試験、感作性試験、遺伝毒性試験、埋植試験、刺激性試験、全身毒性試験(急性毒性試験、亜急性毒性試験、慢性毒性試験、発熱性試験)、血液適合性試験、が挙げられている。また、「医療用具及び医用材料の基礎的な生物学的試験のガイドライン」(薬機第99号1995年。以下、「生物学的試験ガイドライン」とする。)においても、同様な試験が提示されており、日本においては、生物学的な安全性確保の試験を実施する際には、おおよそここに掲げられた試験を考慮する必要がある。

もっとも、これらの試験法は、医療機器や医療用具全てに対して必須というものではなく、当該医療用具が身体とどのような関係で使用されるのか、どの程度の期間使用されるのかにより、確保すべき生物学的な安全性は異なる。下表は、生物学的試験ガイドラインで掲げられた、接触部位と接触期間に応じた、各種試験の選択基準である。この選択基準は、後述するISO10993やASTMを参考に作成されているが、それらの国際規格や海外の国内規格とは若干異なる点もある。

表 接触部位・接触期間別生物学的試験

医療用具の分類	接触部位	接触期間	生物学的試験															
			細胞毒性	感作性	刺激性/皮内	急性全身毒性	亜急性毒性	遺伝毒性	発熱性試験	埋植試験	血液適合性	慢性毒性	発がん性	生殖/発生毒性	生分解性			
非接触用具																		
表面接触用具	皮膚	A	○	○	○													
		B	○	○	○													
		C	○	○	○													
	粘膜	A	○	○	○													
		B	○	○	○													
		C	○	○	○			○	○									
	損傷表面	A	○	○	○													
		B	○	○	○													
		C	○	○	○			○	○									
体内と体外を連結する用具	血液流路間接的	A	○	○	○	○					○		○					
		B	○	○	○	○					○		○					
		C	○	○	○	○	○	○	○		○		○		○			
	組織/骨	A	○	○	○													
		B	○	○							○							
		C	○	○							○				○			
	循環血液	A	○	○	○	○					○		○					
		B	○	○	○	○					○		○					
		C	○	○	○	○	○	○	○		○		○		○		○	
体内植込み用具	組織/骨	A	○	○	○													
		B	○	○						○		○						
		C	○	○						○		○		○		○		
	血液	A	○	○	○	○					○		○		○			
		B	○	○	○	○					○		○		○			
		C	○	○	○	○	○	○	○		○		○		○		○	

A: 一時的接触(24時間以内)
 B: 短・中期的接触 (1~29日)
 C: 長期的接触(30日以上)

通常、医療材料に対する前臨床試験は、使用部位、試用期間により確認すべき試験項目は異なる。一次的な試験としては、細胞毒性試験、感作性試験、刺激性・皮内反応試験、急性全身毒性試験、亜急性毒性試験、遺伝毒性試験、発熱性試験、埋植試験、血液適合性試験、があり、補足的な二次的評価の試験として、慢性毒性試験、発癌性試験、生殖・発生毒性試験、生分解性試験がある。組織工学用の医療材料では、通常の試験以外にいくつかの試験が付加される。特に、分化影響や腫瘍化などは考慮すべき項目となる。分化指標が確立しているものとしては、key molecule の定量的評価が製品化の上で重要となる。免疫染色像や電気泳動によるバンド像のみでは定性的であり、製品化のためには不十分である。個別製品について、key molecule を少量のサンプルで迅速に定量的に評価する方法を確立することが、製品の出荷判定において必要なポイントとなる。腫瘍化の試験としては、軟寒天コロニー形成試験のみでなく、ヌードマウス移植試験を実施する必要がある⁴。

この表を参考にすると、心筋シートは、体内植込み用具の組織・骨のC(長期的接触)に該当することになる。このうち、細胞毒性試験は、他の細胞に対する傷害や阻害作用(細胞毒性)の有無を確認する試験であり、心筋シートの移植により、生体内の心臓細胞に与える傷害の可能性を評価するために実施する必要がある。また、遺伝毒性試験は、体細胞におけるDNA損傷(遺伝毒性)の有無を確認するための試験であり、移植される心筋シ-

⁴ 土屋、再生医療、vol3

トが、他の体細胞の DNA 損傷を引き起こす可能性を評価するために実施する必要がある。この 2 種類の毒性以外に、長期間使用することにより、運動機能低下、呼吸困難、腹腔刺激、虚脱、下痢などを引き起こす可能性を確認するための慢性毒性試験や、原材料に由来するエンドトキシン、非エンドトキシン性の発熱性物質の存在有無を確認する試験も必要となる。同時に、感作性試験により、心筋シートから遊離してくる化学物質による遅延型アレルギーの発現因子を発見することも必要である。さらに、生体内に埋め込む医療機器・医療材料の局所的な影響を評価する試験である埋植試験があり、心筋シートを移植する場合に、周辺組織に与える影響を組織学的に判断する。これらの試験の他、血栓、血液凝固、血小板などの点から血液適合性を評価する試験や、皮膚等への刺激性を試験することも必要となる。

②国際規格、地域規格、各国内規格における状況（補足資料参照）

ここで、国際規格、地域規格、国内規格における再生医療に関する規定を概観する。再生医療に関する製品の国際標準化を図る組織としては、ISO（国際標準化機構）の TC194、同じく ISO の TC150・WG11 があり、また、米国の民間の国内規格である ASTM（American Society for Testing and Materials）の F04 セクション内に、Tissue Engineered Medical Products（TEMPS）のグループがある。これらの活動の基、現在運用されている規格としては、ISO10993 や、ASTM の各種規格が存在する。その他、欧州 CEN の EN 規格とそれを受けた加盟国の国内規格や日本の JIS 規格でも生物学的安全性に関する規格が検討されているが、基本的には、ISO10993 の内容を採用して規格化している。

(a) ISO における関連規格

ISO においては医療機器に関する TC や SC のうち、再生医療に関わる規格や基準を検討している TC としては、TC194 及び TC150 がある。TC194 は医療機器等の生物学的評価が検討されており、TC150 では外科用インプラントが検討の対象となっており、その WG11 において、再生医療に関する内容を取り扱っている。

表 TC194(医療機器等の生物学的評価)⁵

Committee	Title
TC 194/WG 1	Systematic approach to biological evaluation and terminology
TC 194/WG 2	Degradation aspects related to biological testing
TC 194/WG 3	Animal protection aspects
TC 194/WG 4	Clinical investigations of medical devices in humans
TC 194/WG 5	Cytotoxicity
TC 194/WG 6	Mutagenicity, cancerogenicity and reproductive toxicity
TC 194/WG 7	Systemic toxicity
TC 194/WG 8	Irritation, sensitization
TC 194/WG 9	Effects on blood
TC 194/WG 10	Implantation
TC 194/WG 11	Allowable limits for leachable substances
TC 194/WG 12	Sample preparation and reference materials
TC 194/WG 13	Toxicokinetic study
TC 194/WG 14	Material characterization
TC 194/WG 15	Strategic approach to biological assessment

表 TC150(外科用インプラント)⁶

Committee	Title
TC 150/WG 7	Fundamental standards
TC 150/WG 8	Breast implants
TC 150/WG 10	Data on implanted and retrieved devices
TC 150/WG 11	Tissue engineered implants
TC 150/SC 1	Materials
TC 150/SC 2	Cardiovascular implants and extracorporeal systems
TC 150/SC 3	Neurosurgical implants
TC 150/SC 4	Bone and joint replacements
TC 150/SC 5	Osteosynthesis and spinal devices
TC 150/SC 6	Active implants

ISO の再生医療に関連する規格としては、医療機器等の生物学的評価を取り扱っている TC194 の検討によって制定された ISO10993 がある。ISO10993 では、医療機器や医療材料に対する生物学的な安全性を評価するための試験法について定められており、下表の項目が含まれている。

⁵ ISO ウェブサイト参照。

⁶ ISO ウェブサイト参照。

表 4 ISO10993 Biological evaluation of medical devices⁷

ISO 10993-1:2003	Evaluation and testing
ISO 10993-2:1992	Animal welfare requirements
ISO 10993-3:2003	Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity
ISO 10993-4:2002	Selection of tests for interactions with blood
ISO 10993-5:1999	Tests for in vitro cytotoxicity
ISO 10993-6:1994	Tests for local effects after implantation
ISO 10993-7:1995	Ethylene oxide sterilization residuals
ISO 10993-9:1999	Framework for identification and quantification of potential degradation
ISO 10993-10:2002	Tests for irritation and delayed-type hypersensitivity
ISO 10993-11:1993	Tests for systemic toxicity
ISO 10993-12:2002	Sample preparation and reference materials (available in English only)
ISO 10993-13:1998	Identification and quantification of degradation products from polymeric
ISO 10993-14:2001	Identification and quantification of degradation products from ceramics
ISO 10993-15:2000	Identification and quantification of degradation products from metals
ISO 10993-16:1997	Toxicokinetic study design for degradation products and leachables
ISO 10993-17:2002	Establishment of allowable limits for leachable substances
ISO 10993-18	Chemical characterization of materials

2) 細胞毒性試験

①目的

細胞毒性試験は、医療機器や医療用具の利用によって生じる、他の細胞に対する傷害作用や阻害作用（細胞毒性）の有無を確認する試験である。細胞毒性は、対象となる細胞に対する化学物質による直接的、間接的な作用により引き起こされる。心筋細胞シートの利用においては、移植された心筋細胞（シート）が既存の心臓細胞に与える傷害の可能性を評価するために、この試験を実施する必要があると言える。

②試験法の類型

細胞毒性試験は、細胞レベルで試験結果を明らかにしようとするものであり、近年では、細胞培養を用いた試験法が、感度、経済性、効率性の観点から、in vivo の試験より優れているとして、動物実験の代替的試験法として採用されている。細胞毒性試験は、一般的には、医療用具又は材料からの抽出液を試験し、その結果から医療用具又は材料の細胞毒性を評価する方法であり、実行可能な材料では、直接接触法によるコロニー形成阻害試験も併せて行われる。直接接触法は、材料からの溶出物の影響と材料界面上の細胞反応とを重ねて評価する方法であり、その結果は、補足する知見として毒性評価の参考とする。

この細胞毒性試験には、材料の抽出液を利用する方法と、材料と細胞との直接接触による方法、間接接触による方法の、主に 3 種類に分けることができる。直接接触による方法

⁷ ISO ウェブサイト参照。

には、細胞の上に材料を載せる方法と、材料の上に細胞を播種する方法とがある。間接接触による方法には、細胞と材料の間に寒天やフィルタなどを介して試験を行う方法がある。

抽出液を用いた細胞毒性試験は、一般的に行われる方法であり、細胞密度や判定方法により、検出する感度や精度が異なる。例えば、細胞形態変化の肉眼観察による主観的な方法や、細胞毒性強度の結果指標として3～5段階に分けたスコアを利用する方法などがある。他方、直接接触法による試験のうち、細胞の上に材料を載せる方法は、材料の物理的な主になどによる細胞の障害が伴う可能性があり、材料の上に細胞を播種する方法は、細胞が付着しにくい材料の場合には、細胞毒性を評価しにくい、などの欠点がある。しかし、材料からの溶出成分と細胞とが即時に反応するため、不安定な化合物の毒性を検知するには優れており、細胞毒性の検出感度は一般的に高いと考えられている(ガイド解説 26 頁)。さらに、間接接触法の場合は、寒天重層法やミリポアフィルター重層法がある。観点は、脂溶性の化合物は拡散しにくく、検出感度が低い。フィルタ法も寒天法と同程度かそれ以下の検出感度である。判定法は、スコア表示であり、半定量的である。溶出成分の多い材料や細胞毒性の強い材料について判別する方法としては有用であるが、細胞毒性の検出感度は低く、眼粘膜刺激を示す材料でも検出されないことがある。

③各種規格における試験法

そこで採用されている細胞毒性試験に関する試験法の特徴を述べると、ISO10993-5 (Biological evaluation of medical devices Part5:Tests for in vitro cytotoxicity) では、抽出法(コロニー法、サブコンフルエント法(MEM Elution 法))、直接接触法、間接接触法(寒天重層法、フィルター拡散法)が含まれている。ASTM の F895-84(2001)(Standard Test Method for Agar Diffusion Cell Culture Screening for Cytotoxicity) では、間接接触法(L929 細胞を用いた寒天重層法)を採用している。さらに米国薬局方の USP(29NF24)では、抽出法、直接接触法、間接接触法(L929 細胞を用いた寒天重層法)を採用している。(参考: 英国 BS5736Part10 では、L929、MRC-5、Vero 細胞を用いた、抽出法を採用している。コンフルエントな状態に生育している細胞に抽出液を加えて試験し、判定は、細胞をギムザ染色液で染色後観察し、細胞毒性の程度を細胞死の面積に基づく 5 段階のスコア表示で示す。オーストラリアの AS2696-1984 では、Vero 細胞を使用し、抽出液について試験する方法を採用している。顕微鏡観察による細胞の形態変化か、又は、ニュートラルレッド染色法によるいずれかの方法で細胞毒性の程度を判定する。フランスの NFS90-702 では、L929 細胞を使用した、直接接触法と抽出法の 2 種類の方法を採用し、判定は、顕微鏡観察による形態変化とニュートラルレッド染色による方法を用いており、細胞毒性の程度を定性的評価とスコア表示による半定量的評価の 2 種類の方法で判別している⁸。また、

⁸ ガイド解説 36 頁

日本においては、JIS の T 6001 (2005) で、歯科用医療機器の生体適合性の前臨床評価（歯科材料の試験方法）として、間接接触法（寒天拡散法、フィルタ拡散法、象牙質バリヤ法）による細胞毒性試験が規定されている。）

④ 具体的試験手法とその評価基準

(a) 抽出液を用いた細胞毒性試験

a) 概要

この試験は、最終製品や原材料など（以下、試験試料とする）から抽出した抽出液の細胞毒性を、細胞を用いて確認する試験であり、主に、試験試料を血清添加培地で抽出し、播種した細胞に添加し、培養後のコロニー形成能を評価する方法が用いられる。生物学的試験ガイドラインでは、細胞の増殖によって形成されるコロニーの数を指標とするコロニー形成試験が推奨されている。コロニー法とは、一般的には、種々の濃度に段階希釈された抽出液と新鮮培地でのコロニー形成率を比較し、新鮮培地でのコロニーの数を 50% 阻害する抽出液濃度（IC50）から、抽出液中の細胞毒性の強度を示す方法である。コロニー法は細胞濃度が低いため一般的に感度が高く、また、抽出液の IC50 から細胞毒性の強度を数量的に示すことが可能となる⁹。

b) 手順

抽出液を用いる場合のコロニー法の具体的な手順は、生物学的試験ガイドライン及び ISO では次に掲げるように説明されている。これらの内容を比較すると、細胞数では、生物学的試験ガイドラインでは 40～200 細胞に対して、ISO10993 では 50～100 万細胞とされ、抽出の割合では、5cm² / ml 又は 1g/10ml に対して、厚さ 0.5mm 以上の場合は 6cm²/1ml など（下図参照）、培養期間は、6～11 日間に対して 24～72 時間、対照材料は、生物学的試験ガイドラインでは、0.1%ZDEC と 0.25%ZDBC を用いている。このように、両者の手順を見ると、その具体的数値に差が見られる。

（厚労省ガイドライン）

8. 対照材料

8.1 陰性材料

陰性材料は、10.項に記載された方法に従って、抽出液を調製し試験した時、細胞毒性反応が全く認められない材料である。検定済みの陰性材料を使用する。

抽出液を用いた細胞毒性試験で使用する陰性材料：

⁹ ガイド 1.目的