

では筋肉の炎症性細胞及び障害筋細胞が自ら増殖因子を供給するようになる。その注射針の癢痕の大きさはマウスでは左心室筋肉の1/8であるが、ヒトでは左心室筋肉のわずか1/200にしかすぎない。

10.15 血管新生増殖因子たん白質を用いた治療におけるリスクと何か

VEGFによる透過性の増加のような特異的な有害作用と、腫瘍の成長、糖尿病性網膜症の悪化、アテローム性動脈硬化のような血管新生に直接関連した有害作用は区別できる²²⁰⁾。VEGFの血管透過性を促進する活性は、ヒスタミンに比べて50000倍以上高い。他の可能性も除外できないが、この効果は内皮開窓の誘導によると考えられる¹⁶⁹⁾。

腫瘍成長と糖尿病性網膜症は血管新生と血管新生促進因子により起こることが多くの研究で示されている^{221,222)}。しかし、投与した増殖因子により腫瘍成長及び網膜症の悪化が実際に促進されるという知見はほとんどない。顕性腫瘍及び糖尿病性網膜症の患者は臨床試験において除外されており、また血管新生促進因子のたん白質あるいは遺伝子治療を現在受けている1000人以上の患者において、この二つの疾患の合併症の患者は見つかっていない。一方、VEGFの動脈硬化促進作用がアテローム性動脈硬化の前臨床モデルで試験されている。VEGFを投与するとプラークの形成が促進されるが²²³⁾、flt-1をブロックすると動脈硬化の形成が低下する⁵²⁾。これと一致して、TNP40あるいはエンドスタチンのような一般的な血管新生阻害剤により実験的アテローム性動脈硬化症が低下する²²⁴⁾。しかし、VEGF遺伝子治療の臨床試験ではVEGFの動脈硬化の形成促進作用を裏づけることができなかった¹²⁴⁾。同様に、アテローム性動脈硬化症の大動物モデルでは、FGF-2を冠動脈ステント移植しても作用が示されなかった²²⁵⁾。このような統一的な見解が得られない状況においては、血管新生促進作用を有する増殖因子による動脈硬化促進作用と臨床との関連の有無については判断できない。したがって、将来の臨床試験ではアテローム性動脈硬化症の進行を第一に注意する必要がある。

10.16 遺伝子治療におけるリスクとは何か

遺伝子治療の有害作用はデリバリーのプロセス及びベクターあるいは遺伝子産物そのものにより起き得る。遺伝子治療の最終目標の一つは選択肢のない

患者に適した治療法を提供することである。遺伝子治療ベクターのデリバリーは可能な限り非侵襲的でリスクが低い必要がある。したがって、外科的アプローチ及び長期間にわたる灌流の繰り返しは心筋の血管新生において臨床上適切なデリバリー戦略とは言いがたい。ウイルス及び非ウイルスを用いた遺伝子デリバリーでは*in vivo*投与の場合有害効果が起き得る可能性はより高くなる。高投与量の裸のDNAは壊死と炎症を起こすとの報告がある²²⁶⁾。ほとんどのウイルスは免疫反応を惹起し、その結果として一過性の体温上昇から敗血症ショックまで一連の臨床症状が起きる。宿主染色体にベクターが組み込まれる場合はガン遺伝子の活性化、正常な遺伝子発現の妨害、宿主染色体の変異促進が起きる可能性がある¹¹²⁾。

特に小動物を用いた侵襲的なアプローチでは、処置そのものにより心臓における血管新生が大きく影響を受け、血管新生分子の特異的な有害作用が見かけ上観察されない可能性がある。したがって、小動物を用いた試験結果から血管新生分子の大動物及びヒトにおける有害作用を予測することは困難である。また、小動物を用いた研究ではその後のフォローアップの期間は非常に短い。血管新生遺伝子治療では導入組織における過剰血管成長、いわゆる血管腫あるいは糸球体硬化形成が懸念される²²⁷⁾。しかし、過剰に成長した血管は消滅し、正常な血管が再構築される²²⁸⁾。遺伝子治療により増殖因子を標的組織以外にも発現させた場合、他の組織に対して腫瘍の成長促進、網膜症、関節炎のような有害作用が起きる可能性があるが、このような有害作用は組織特異的なプロモーターあるいは低酸素状態の条件で発現が促進されるようなベクターを用いることにより克服できる可能性もある。臨床上みられるVEGFの有害作用は血管透過性の亢進と浮腫であるが、そのことに起因する心膜液貯留という有害作用は用量が多すぎる場合に起きることが最近になって示された²¹⁴⁾。結局、可能性のある有害作用について総合的に評価するためには、大動物を用いた最適投与量及びベクターと遺伝子のそれぞれの組み合わせにおいてデリバリーの戦略を決める必要がある。

おわりに

血管新生療法に対するたん白質、遺伝子及び細胞

を用いたアプローチは、動物モデル及び初期の非盲検試験において良好な結果が得られた。そのため大規模二重盲検プラセボコントロール試験におけるポジティブな結果が大いに期待されたが、現在までのところ適切な規模の二重盲検試験において有効性を示す段階までは達していない。しかし、少なくとも血管新生療法の安全性については最近の臨床試験において大きな問題がないことが示されつつある。たん白質製剤による治療及び遺伝子治療において今後改良すべき主な点としては、適切な増殖因子やその組合せをたん白質あるいは遺伝子として標的組織に効率良く持続的にデリバリーすること、あるいは標的組織に対してのみ活性を示す医薬品を用いた体系的な治療を行うことなどが考えられる。細胞治療の場合は、最適な細胞の選択からデリバリーの方法、患者の選択、作用機構の解明などが今後改良すべき点と考えられる。一方、血管の再構成及び幹細胞の動員といった可能性のある治療標的の解明に血管発生、血管新生、動脈形成という血管新生“vasculogenesis”の概念が有効となっている。このような観点において、臨床評価あるいは特にこれに関連する基礎研究の成果を評価する際には、血管発生、血管新生、動脈形成を有効性の評価に織り込む必要がある。また、治療方法の選択については、基礎的な前臨床のデータに基づいて妥当性が示されていることが必要不可欠である。このように克服すべき課題は多いが、近い将来においてこの領域における研究が大きく進歩し、虚血性心臓病の新しい治療法が出現することを期待したい。

謝 辞

本研究の一部は厚生科学研究費補助金医薬品リスク評価研究事業（H17-医薬-015）として実施されたものである。

文 献

- 1) American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statics-2003 Update. American Heart Association.
- 2) Lowe, H. C., Oesterle, S. N., He, K. L., Macneill, B. D., Burkhoff, D.: *J Interv Cardiol*, **17**(2), 87-91 (2004).
- 3) Mukherjee, D., Comella, K., Bhatt, D. L., Roe, M. T., Patel, V., Ellis, S. G.: *Am Heart J*, **142**(1), 72-4 (2001).
- 4) Waltenberger, J., Lange, J., Kranz, A.: *Circulation*, **102**(2), 185-90 (2000).
- 5) Van Belle, E., Rivard, A., Chen, D., Silver, M., Bunting, S., Ferrara, N., Symes, J. F., Bauters, C., Isner, J. M.: *Circulation*, **96**(8), 2667-74 (1997).
- 6) Nakae, I., Fujita, M., Miwa, K., Hasegawa, K., Kihara, Y., Nohara, R., Miyamoto, S., Ueda, K., Tamaki, S., Sasayama, S.: *Heart Vessels*, **15**(4), 176-80 (2000).
- 7) Carmeliet, P.: *Nat Med*, **9**(6), 653-60 (2003).
- 8) Folkman, J.: *Nat Med*, **1**(1), 27-31 (1995).
- 9) Flamme, I., Risau, W.: *Development*, **116**(2), 435-9 (1992).
- 10) Shi, Q., Rafii, S., Wu, M. H., Wijelath, E. S., Yu, C., Ishida, A., Fujita, Y., Kothari, S., Mohle, R., Sauvage, L. R., Moore, M. A., Storb, R. F., Hammond, W. P.: *Blood*, **92**(2), 362-7 (1998).
- 11) Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G., Isner, J. M.: *Science*, **275**(5302), 964-7 (1997).
- 12) Asahara, T., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, C., Pastore, C., Silver, M., Kearne, M., Wagner, M., Isner, J. M.: *Circ Res*, **85**(3), 221-8 (1999).
- 13) Asahara, T., Kawamoto, A.: *Am J Physiol Cell Physiol*, **287**(3), C572-9 (2004).
- 14) Luttun, A., Carmeliet, P.: *Cardiovasc Res*, **58**(2), 378-89 (2003).
- 15) Gill, M., Dias, S., Hattori, K., Rivera, M. L., Hicklin, D., Witte, L., Girardi, L., Yurt, R., Himel, H., Rafii, S.: *Circ Res*, **88**(2), 167-74 (2001).
- 16) Shintani, S., Murohara, T., Ikeda, H., Ueno, T., Honma, T., Katoh, A., Sasaki, K., Shimada, T., Oike, Y., Imaizumi, T.: *Circulation*, **103**(23), 2776-9 (2001).
- 17) Ziegelhoeffer, T., Fernandez, B., Kostin, S., Heil, M., Voswinckel, R., Helisch, A., Schaper, W.: *Circ Res*, **94**(2), 230-8 (2004).
- 18) Peichev, M., Naiyer, A. J., Pereira, D., Zhu, Z., Lane, W. J., Williams, M., Oz, M. C., Hicklin, D. J., Witte, L., Moore, M. A., Rafii, S.: *Blood*, **95**(3), 952-8 (2000).
- 19) Jackson, K. A., Majka, S. M., Wang, H., Pocius, J., Hartley, C. J., Majesky, M. W., Entman, M. L., Michael, L. H., Hirschi, K.

- K., Goodell, M. A.: *J Clin Invest*, **107**(11), 1395-402 (2001).
- 20) Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W. C., Largaespada, D. A., Verfaillie, C. M.: *Nature*, **418**(6893), 41-9 (2002).
- 21) Reyes, M., Dudek, A., Jahagirdar, B., Koodie, L., Marker, P. H., Verfaillie, C. M.: *J Clin Invest*, **109**(3), 337-46 (2002).
- 22) Carmeliet, P.: *Nat Med*, **6**(4), 389-95 (2000).
- 23) Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., Semenza, G. L.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**(12), 5510-4 (1995).
- 24) Bruick, R. K., McKnight, S. L.: *Science*, **294**(5545), 1337-40 (2001).
- 25) Forsythe, J. A., Jiang, B. H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D., Semenza, G. L.: *Mol Cell Biol*, **16**(9), 4604-13 (1996).
- 26) Yamakawa, M., Liu, L. X., Date, T., Belanger, A. J., Vincent, K. A., Akita, G. Y., Kuriyama, T., Cheng, S. H., Gregory, R. J., Jiang, C.: *Circ Res*, **93**(7), 664-73 (2003).
- 27) Kelly, B. D., Hackett, S. F., Hirota, K., Oshima, Y., Cai, Z., Berg-Dixon, S., Rowan, A., Yan, Z., Campochiaro, P. A., Semenza, G. L.: *Circ Res*, **93**(11), 1074-81 (2003).
- 28) Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J.: *Nat Med*, **9**(6), 677-84 (2003).
- 29) Semenza, G. L.: *J Appl Physiol*, **88**(4), 1474-80 (2000).
- 30) Zhou, J., Schmid, T., Brune, B.: *Mol Biol Cell*, **14**(6), 2216-25 (2003).
- 31) Hellwig-Burgel, T., Rutkowski, K., Metzner, E., Fandrey, J., Jelkmann, W.: *Blood*, **94**(5), 1561-7 (1999).
- 32) Jung, Y. J., Isaacs, J. S., Lee, S., Trepel, J., Neckers, L.: *Faseb J*, **17**(14), 2115-7 (2003).
- 33) Gao, Y., Lecker, S., Post, M. J., Hietaranta, A. J., Li, J., Volk, R., Li, M., Sato, K., Saluja, A. K., Steer, M. L., Goldberg, A. L., Simons, M.: *J Clin Invest*, **106**(3), 439-48 (2000).
- 34) Isner, J. M., Kalka, C., Kawamoto, A., Asahara, T.: *Ann N Y Acad Sci*, **953**, 75-84 (2001).
- 35) Kinnaird, T., Stabile, E., Burnett, M. S., Lee, C. W., Barr, S., Fuchs, S., Epstein, S. E.: *Circ Res*, **94**(5), 678-85 (2004).
- 36) de Muinck, E. D., Simons, M.: *J Mol Cell Cardiol*, **36**(1), 25-32 (2004).
- 37) Helisch, A., Schaper, W.: *Microcirculation*, **10**(1), 83-97 (2003).
- 38) Schaper, W., Scholz, D.: *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **23**(7), 1143-51 (2003).
- 39) Kondoh, K., Koyama, H., Miyata, T., Takato, T., Hamada, H., Shigematsu, H.: *Cardiovasc Res*, **61**(1), 132-42 (2004).
- 40) Heil, M., Schaper, W.: *Circ Res*, **95**(5), 449-58 (2004).
- 41) Babiak, A., Schumm, A. M., Wangler, C., Loukas, M., Wu, J., Dombrowski, S., Matuschek, C., Kotzerke, J., Dehio, C., Waltenberger, J.: *Cardiovasc Res*, **61**(4), 789-95 (2004).
- 42) Lawson, N. D., Weinstein, B. M.: *Nat Rev Genet*, **3**(9), 674-82 (2002).
- 43) Ferrara, N., Gerber, H. P., LeCouter, J.: *Nat Med*, **9**(6), 669-76 (2003).
- 44) Poltorak, Z., Cohen, T., Sivan, R., Kandelis, Y., Spira, G., Vlodavsky, I., Keshet, E., Neufeld, G.: *J Biol Chem*, **272**(11), 7151-8 (1997).
- 45) Veikkola, T., Alitalo, K.: *Semin Cancer Biol*, **9**(3), 211-20 (1999).
- 46) Rissanen, T. T., Markkanen, J. E., Gruchala, M., Heikura, T., Puranen, A., Kettunen, M. I., Kholova, I., Kauppinen, R. A., Achen, M. G., Stacker, S. A., Alitalo, K., Yla-Herttuala, S.: *Circ Res*, **92**(10), 1098-106 (2003).
- 47) Matsumoto, T., Claesson-Welsh, L.: *Sci STKE*, **2001**(112), RE21 (2001).
- 48) Zachary, I., Glikli, G.: *Cardiovasc Res*, **49**(3), 568-81 (2001).
- 49) Ishida, A., Murray, J., Saito, Y., Kanthou, C., Benzakour, O., Shibuya, M., Wijelath, E. S.: *J Cell Physiol*, **188**(3), 359-68 (2001).
- 50) Poole, T. J., Finkelstein, E. B., Cox, C. M.: *Dev Dyn*, **220**(1), 1-17 (2001).
- 51) Lohela, M., Saariisto, A., Veikkola, T., Alitalo, K.: *Thromb Haemost*, **90**(2), 167-84 (2003).
- 52) Lutun, A., Tjwa, M., Moons, L., Wu, Y., Angelillo-Scherrer, A., Liao, F., Nagy, J. A., Hooper, A., Priller, J., De Klerck, B., Compennolle, V., Daci, E., Bohlen, P., Dewerchin, M., Herbert, J. M., Fava, R., Matthys, P., Carmeliet, G., Collen, D., Dvorak, H. F., Hicklin, D. J., Carmeliet, P.: *Nat Med*, **8**(8),

- 831-40 (2002).
- 53) Carmeliet, P., Ng, Y. S., Nuyens, D., Theilmeier, G., Brusselmans, K., Cornelissen, I., Ehler, E., Kakkar, V. V., Stalmans, I., Mattot, V., Perriard, J. C., Dewerchin, M., Flameng, W., Nagy, A., Lupu, F., Moons, L., Collen, D., D'Amore, P. A., Shima, D. T.: *Nat Med*, **5**(5), 495-502 (1999).
 - 54) Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X. F., Breitman, M. L., Schuh, A. C.: *Nature*, **376**(6535), 62-6 (1995).
 - 55) Fong, G. H., Zhang, L., Bryce, D. M., Peng, J.: *Development*, **126**(13), 3015-25 (1999).
 - 56) Dumont, D. J., Jussila, L., Taipale, J., Lymboussaki, A., Mustonen, T., Pajusola, K., Breitman, M., Alitalo, K.: *Science*, **282**(5390), 946-9 (1998).
 - 57) Auguste, P., Javerzat, S., Bikfalvi, A.: *Cell Tissue Res*, **314**(1), 157-66 (2003).
 - 58) Ornitz, D. M., Itoh, N.: *Genome Biol*, **2**(3), REVIEWS3005 (2001).
 - 59) Horowitz, A., Tkachenko, E., Simons, M.: *J Cell Biol*, **157**(4), 715-25 (2002).
 - 60) Powers, C. J., McLeskey, S. W., Wellstein, A.: *Endocr Relat Cancer*, **7**(3), 165-97 (2000).
 - 61) Khurana, R., Simons, M.: *Trends Cardiovasc Med*, **13**(3), 116-22 (2003).
 - 62) Rissanen, T. T., Markkanen, J. E., Arve, K., Rutanen, J., Kettunen, M. I., Vajanto, I., Jauhiainen, S., Cashion, L., Gruchala, M., Narvanen, O., Taipale, P., Kauppinen, R. A., Rubanyi, G. M., Yla-Herttuala, S.: *Faseb J*, **17**(1), 100-2 (2003).
 - 63) Bergsten, E., Uutela, M., Li, X., Pietras, K., Ostman, A., Heldin, C. H., Alitalo, K., Eriksson, U.: *Nat Cell Biol*, **3**(5), 512-6 (2001).
 - 64) Hirschi, K. K., Rohovsky, S. A., Beck, L. H., Smith, S. R., D'Amore, P. A.: *Circ Res*, **84**(3), 298-305 (1999).
 - 65) Cao, R., Brakenhielm, E., Pawliuk, R., Wariaro, D., Post, M. J., Wahlberg, E., Leboulch, P., Cao, Y.: *Nat Med*, **9**(5), 604-13 (2003).
 - 66) Martins, R. N., Chleboun, J. O., Sellers, P., Sleigh, M., Muir, J.: *Growth Factors*, **10**(4), 299-306 (1994).
 - 67) Lafleur, M. A., Handsley, M. M., Knauper, V., Murphy, G., Edwards, D. R.: *J Cell Sci*, **115**(Pt 17), 3427-38 (2002).
 - 68) Huang, S. P., Wu, M. S., Shun, C. T., Wang, H. P., Lin, M. T., Kuo, M. L., Lin, J. T.: *J Biomed Sci*, **11**(4), 517-27 (2004).
 - 69) Salcedo, R., Ponce, M. L., Young, H. A., Wasserman, K., Ward, J. M., Kleinman, H. K., Oppenheim, J. J., Murphy, W. J.: *Blood*, **96**(1), 34-40 (2000).
 - 70) Kollet, O., Shivtiel, S., Chen, Y. Q., Suriawinata, J., Thung, S. N., Dabeva, M. D., Kahn, J., Spiegel, A., Dar, A., Samira, S., Goichberg, P., Kalinkovich, A., Arenzana-Seisdedos, F., Nagler, A., Hardan, I., Revel, M., Shafritz, D. A., Lapidot, T.: *J Clin Invest*, **112**(2), 160-9 (2003).
 - 71) Grafte-Faure, S., Leveque, C., Ketata, E., Jean, P., Vasse, M., Soria, C., Vannier, J. P.: *Cytokine*, **12**(1), 1-7 (2000).
 - 72) Detmar, M., Brown, L. F., Schon, M. P., Elicker, B. M., Velasco, P., Richard, L., Fukumura, D., Monsky, W., Claffey, K. P., Jain, R. K.: *J Invest Dermatol*, **111**(1), 1-6 (1998).
 - 73) Min, J. K., Lee, Y. M., Kim, J. H., Kim, Y. M., Kim, S. W., Lee, S. Y., Gho, Y. S., Oh, G. T., Kwon, Y. G.: *Circ Res*, **96**(3), 300-7 (2005).
 - 74) Buschmann, I., Heil, M., Jost, M., Schaper, W.: *Microcirculation*, **10**(3-4), 371-9 (2003).
 - 75) Lobov, I. B., Brooks, P. C., Lang, R. A.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(17), 11205-10 (2002).
 - 76) Thurston, G., Rudge, J. S., Ioffe, E., Zhou, H., Ross, L., Croll, S. D., Glazer, N., Holash, J., McDonald, D. M., Yancopoulos, G. D.: *Nat Med*, **6**(4), 460-3 (2000).
 - 77) Suri, C., Jones, P. F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P. C., Davis, S., Sato, T. N., Yancopoulos, G. D.: *Cell*, **87**(7), 1171-80 (1996).
 - 78) Gamble, J. R., Drew, J., Trezise, L., Underwood, A., Parsons, M., Kasminkas, L., Rudge, J., Yancopoulos, G., Vadas, M. A.: *Circ Res*, **87**(7), 603-7 (2000).
 - 79) Hanahan, D.: *Science*, **277**(5322), 48-50 (1997).
 - 80) Chae, J. K., Kim, I., Lim, S. T., Chung, M. J., Kim, W. H., Kim, H. G., Ko, J. K., Koh, G. Y.: *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**(12), 2573-8 (2000).
 - 81) Siddiqui, A. J., Blomberg, P., Wardell, E., Hellgren, I., Eskandarpour, M., Islam, K. B.,

- Sylven, C.: *Biochem Biophys Res Commun*, **310**(3), 1002-9 (2003).
- 82) Shyu, K. G., Manor, O., Magner, M., Yancopoulos, G. D., Isner, J. M.: *Circulation*, **98**(19), 2081-7 (1998).
- 83) Goumans, M. J., Zwijsen, A., van Rooijen, M. A., Huylebroeck, D., Roelen, B. A., Mummery, C. L.: *Development*, **126**(16), 3473-83 (1999).
- 84) Lee, E. W., Michalkiewicz, M., Kitlinska, J., Kalezic, I., Switalska, H., Yoo, P., Sangkharat, A., Ji, H., Li, L., Michalkiewicz, T., Ljubisavljevic, M., Johansson, H., Grant, D. S., Zukowska, Z.: *J Clin Invest*, **111**(12), 1853-62 (2003).
- 85) Emanuelli, C., Salis, M. B., Pinna, A., Graiani, G., Manni, L., Madeddu, P.: *Circulation*, **106**(17), 2257-62 (2002).
- 86) Schultz, A., Lavie, L., Hochberg, I., Beyar, R., Stone, T., Skorecki, K., Lavie, P., Roguin, A., Levy, A. P.: *Circulation*, **100**(5), 547-52 (1999).
- 87) Rivard, A., Berthou-Soulie, L., Principe, N., Kearney, M., Curry, C., Branellec, D., Semenza, G. L., Isner, J. M.: *J Biol Chem*, **275**(38), 29643-7 (2000).
- 88) Morishita, R., Nakamura, S., Hayashi, S., Taniyama, Y., Moriguchi, A., Nagano, T., Taiji, M., Noguchi, H., Takeshita, S., Matsumoto, K., Nakamura, T., Higaki, J., Ogihara, T.: *Hypertension*, **33**(6), 1379-84 (1999).
- 89) Ono, K., Matsumori, A., Shioi, T., Furukawa, Y., Sasayama, S.: *Circulation*, **95**(11), 2552-8 (1997).
- 90) Nakano, N., Morishita, R., Moriguchi, A., Nakamura, Y., Hayashi, S. I., Aoki, M., Kida, I., Matsumoto, K., Nakamura, T., Higaki, J., Ogihara, T.: *Hypertension*, **32**(3), 444-51 (1998).
- 91) Onimaru, M., Yonemitsu, Y., Tanii, M., Nakagawa, K., Masaki, I., Okano, S., Ishibashi, H., Shirasuna, K., Hasegawa, M., Sueishi, K.: *Circ Res*, **91**(10), 923-30 (2002).
- 92) Seko, Y., Fukuda, S., Nagai, R.: *Clin Sci (Lond)*, **106**(5), 439-42 (2004).
- 93) Edelberg, J. M., Lee, S. H., Kaur, M., Tang, L., Feirt, N. M., McCabe, S., Bramwell, O., Wong, S. C., Hong, M. K.: *Circulation*, **105**(5), 608-13 (2002).
- 94) Simons, M., Ware, J. A.: *Nat Rev Drug Discov*, **2**(11), 863-71 (2003).
- 95) Couffinhal, T., Silver, M., Kearney, M., Sullivan, A., Witzensbichler, B., Magner, M., Annex, B., Peters, K., Isner, J. M.: *Circulation*, **99**(24), 3188-98 (1999).
- 96) Dor, Y., Djonov, V., Abramovitch, R., Itin, A., Fishman, G. I., Carmeliet, P., Goelman, G., Keshet, E.: *Embo J*, **21**(8), 1939-47 (2002).
- 97) Schumacher, B., Pecher, P., von Specht, B. U., Stegmann, T.: *Circulation*, **97**(7), 645-50 (1998).
- 98) Laham, R. J., Sellke, F. W., Edelman, E. R., Pearlman, J. D., Ware, J. A., Brown, D. L., Gold, J. P., Simons, M.: *Circulation*, **100**(18), 1865-71 (1999).
- 99) Ruel, M., Laham, R. J., Parker, J. A., Post, M. J., Ware, J. A., Simons, M., Sellke, F. W.: *J Thorac Cardiovasc Surg*, **124**(1), 28-34 (2002).
- 100) Unger, E. F., Goncalves, L., Epstein, S. E., Chew, E. Y., Trapnell, C. B., Cannon, R. O., 3rd, Quyyumi, A. A.: *Am J Cardiol*, **85**(12), 1414-9 (2000).
- 101) Laham, R. J., Chronos, N. A., Pike, M., Leimbach, M. E., Udelson, J. E., Pearlman, J. D., Pettigrew, R. I., Whitehouse, M. J., Yoshizawa, C., Simons, M.: *J Am Coll Cardiol*, **36**(7), 2132-9 (2000).
- 102) Udelson, J. E., Dilsizian, V., Laham, R. J., Chronos, N., Vansant, J., Blais, M., Galt, J. R., Pike, M., Yoshizawa, C., Simons, M.: *Circulation*, **102**(14), 1605-10 (2000).
- 103) Simons, M., Annex, B. H., Laham, R. J., Kleiman, N., Henry, T., Dauerman, H., Udelson, J. E., Gervino, E. V., Pike, M., Whitehouse, M. J., Moon, T., Chronos, N. A.: *Circulation*, **105**(7), 788-93 (2002).
- 104) Rana, J. S., Mannam, A., Donnell-Fink, L., Gervino, E. V., Sellke, F. W., Laham, R. J.: *Am J Cardiol*, **95**(12), 1456-9 (2005).
- 105) Hendel, R. C., Henry, T. D., Rocha-Singh, K., Isner, J. M., Kereiakes, D. J., Giordano, F. J., Simons, M., Bonow, R. O.: *Circulation*, **101**(2), 118-21 (2000).
- 106) Henry, T. D., Rocha-Singh, K., Isner, J. M., Kereiakes, D. J., Giordano, F. J., Simons, M., Losordo, D. W., Hendel, R. C., Bonow, R. O., Eppler, S. M., Zioncheck, T. F., Holmgren,

- E. B., McCluskey, E. R.: *Am Heart J*, **142**(5), 872-80 (2001).
- 107) Henry, T. D., Annex, B. H., McKendall, G. R., Azrin, M. A., Lopez, J. J., Giordano, F. J., Shah, P. K., Willerson, J. T., Benza, R. L., Berman, D. S., Gibson, C. M., Bajamonde, A., Rundle, A. C., Fine, J., McCluskey, E. R.: *Circulation*, **107**(10), 1359-65 (2003).
- 108) Seiler, C., Pohl, T., Wustmann, K., Hutter, D., Nicolet, P. A., Windecker, S., Eberli, F. R., Meier, B.: *Circulation*, **104**(17), 2012-7 (2001).
- 109) Kang, H. J., Kim, H. S., Zhang, S. Y., Park, K. W., Cho, H. J., Koo, B. K., Kim, Y. J., Soo Lee, D., Sohn, D. W., Han, K. S., Oh, B. H., Lee, M. M., Park, Y. B.: *Lancet*, **363**(9411), 751-6 (2004).
- 110) Matsubara, H.: *Lancet*, **363**(9411), 746-7 (2004).
- 111) van Royen, N., Schirmer, S. H., Atasever, B., Behrens, C. Y., Ubbink, D., Buschmann, E. E., Voskuil, M., Bot, P., Hofer, I., Schlingemann, R. O., Biemond, B. J., Tijssen, J. G., Bode, C., Schaper, W., Oskam, J., Legemate, D. A., Piek, J. J., Buschmann, I.: *Circulation*, **112**(7), 1040-6 (2005).
- 112) Yla-Herttuala, S., Alitalo, K.: *Nat Med*, **9**(6), 694-701 (2003).
- 113) Simons, M., Post, M. J.: *Therapeutic angiogenesis*. Lippincot. New York (2002).
- 114) Wright, M. J., Wightman, L. M., Latchman, D. S., Marber, M. S.: *Gene Ther*, **8**(24), 1833-9 (2001).
- 115) Wright, M. J., Wightman, L. M., Lilley, C., de Alwis, M., Hart, S. L., Miller, A., Coffin, R. S., Thrasher, A., Latchman, D. S., Marber, M. S.: *Basic Res Cardiol*, **96**(3), 227-36 (2001).
- 116) Losordo, D. W., Vale, P. R., Symes, J. F., Dunnington, C. H., Esakof, D. D., Maysky, M., Ashare, A. B., Lathi, K., Isner, J. M.: *Circulation*, **98**(25), 2800-4 (1998).
- 117) Symes, J. F., Losordo, D. W., Vale, P. R., Lathi, K. G., Esakof, D. D., Mayskiy, M., Isner, J. M.: *Ann Thorac Surg*, **68**(3), 830-6; discussion 836-7 (1999).
- 118) Vale, P. R., Losordo, D. W., Milliken, C. E., Maysky, M., Esakof, D. D., Symes, J. F., Isner, J. M.: *Circulation*, **102**(9), 965-74 (2000).
- 119) Vale, P. R., Losordo, D. W., Milliken, C. E., McDonald, M. C., Gravelin, L. M., Curry, C. M., Esakof, D. D., Maysky, M., Symes, J. F., Isner, J. M.: *Circulation*, **103**(17), 2138-43 (2001).
- 120) Losordo, D. W., Vale, P. R., Hendel, R. C., Milliken, C. E., Fortuin, F. D., Cummings, N., Schatz, R. A., Asahara, T., Isner, J. M., Kuntz, R. E.: *Circulation*, **105**(17), 2012-8 (2002).
- 121) Fortuin, F. D., Vale, P., Losordo, D. W., Symes, J., DeLaria, G. A., Tyner, J. J., Schaer, G. L., March, R., Snell, R. J., Henry, T. D., Van Camp, J., Lopez, J. J., Richenbacher, W., Isner, J. M., Schatz, R. A.: *Am J Cardiol*, **92**(4), 436-9 (2003).
- 122) Rosengart, T. K., Lee, L. Y., Patel, S. R., Sanborn, T. A., Parikh, M., Bergman, G. W., Hachamovitch, R., Szulc, M., Kligfield, P. D., Okin, P. M., Hahn, R. T., Devereux, R. B., Post, M. R., Hackett, N. R., Foster, T., Grasso, T. M., Lesser, M. L., Isom, O. W., Crystal, R. G.: *Circulation*, **100**(5), 468-74 (1999).
- 123) Stewart, D. J., Hilton, J. D., Arnold, J. M., Gregoire, J., Rivard, A., Archer, S. L., Charbonneau, F., Cohen, E., Curtis, M., Buller, C. E., Mendelsohn, F. O., Dib, N., Page, P., Ducas, J., Plante, S., Sullivan, J., Macko, J., Rasmussen, C., Kessler, P. D., Rasmussen, H. S.: *Gene Ther*, 1-9 (2006).
- 124) Hedman, M., Hartikainen, J., Syvanne, M., Stjernvall, J., Hedman, A., Kivela, A., Vaninen, E., Mussalo, H., Kauppila, E., Simula, S., Narvanen, O., Rantala, A., Peuhkurinen, K., Nieminen, M. S., Laakso, M., Yla-Herttuala, S.: *Circulation*, **107**(21), 2677-83 (2003).
- 125) Kastrup, J., Jorgensen, E., Ruck, A., Tagil, K., Glogar, D., Ruzyllo, W., Botker, H. E., Dudek, D., Drvota, V., Hesse, B., Thuesen, L., Blomberg, P., Gyongyosi, M., Sylven, C.: *J Am Coll Cardiol*, **45**(7), 982-8 (2005).
- 126) Kalka, C., Tehrani, H., Laudenberg, B., Vale, P. R., Isner, J. M., Asahara, T., Symes, J. F.: *Ann Thorac Surg*, **70**(3), 829-34 (2000).
- 127) Grines, C. L., Watkins, M. W., Helmer, G., Penny, W., Brinker, J., Marmur, J. D., West, A., Rade, J. J., Marrott, P., Hammond, H. K.,

- Engler, R. L.: *Circulation*, **105**(11), 1291-7 (2002).
- 128) Grines, C., Rubanyi, G. M., Kleiman, N. S., Marrott, P., Watkins, M. W.: *Am J Cardiol*, **92**(9B), 24N-31N (2003).
- 129) Morishita, R., Aoki, M., Hashiya, N., Makino, H., Yamasaki, K., Azuma, J., Sawa, Y., Matsuda, H., Kaneda, Y., Ogihara, T.: *Hypertension*, **44**(2), 203-9 (2004).
- 130) Kalka, C., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka-Moll, W. M., Silver, M., Kearney, M., Li, T., Isner, J. M., Asahara, T.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**(7), 3422-7 (2000).
- 131) Kawamoto, A., Gwon, H. C., Iwaguro, H., Yamaguchi, J. I., Uchida, S., Masuda, H., Silver, M., Ma, H., Kearney, M., Isner, J. M., Asahara, T.: *Circulation*, **103**(5), 634-7 (2001).
- 132) Kamihata, H., Matsubara, H., Nishiue, T., Fujiyama, S., Tsutsumi, Y., Ozono, R., Masaki, H., Mori, Y., Iba, O., Tateishi, E., Kosaki, A., Shintani, S., Murohara, T., Imaizumi, T., Iwasaka, T.: *Circulation*, **104**(9), 1046-52 (2001).
- 133) Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S. M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M., Leri, A., Anversa, P.: *Nature*, **410**(6829), 701-5 (2001).
- 134) Fuchs, S., Baffour, R., Zhou, Y. F., Shou, M., Pierre, A., Tio, F. O., Weissman, N. J., Leon, M. B., Epstein, S. E., Kornowski, R.: *J Am Coll Cardiol*, **37**(6), 1726-32 (2001).
- 135) Kobayashi, T., Hamano, K., Li, T. S., Katoh, T., Kobayashi, S., Matsuzaki, M., Esato, K.: *J Surg Res*, **89**(2), 189-95 (2000).
- 136) Kinnaird, T., Stabile, E., Burnett, M. S., Epstein, S. E.: *Circ Res*, **95**(4), 354-63 (2004).
- 137) Urbich, C., Dimmeler, S.: *Circ Res*, **95**(4), 343-53 (2004).
- 138) Yamaguchi, J., Kusano, K. F., Masuo, O., Kawamoto, A., Silver, M., Murasawa, S., Bosch-Marce, M., Masuda, H., Losordo, D. W., Isner, J. M., Asahara, T.: *Circulation*, **107**(9), 1322-8 (2003).
- 139) Hamano, K., Nishida, M., Hirata, K., Mikamo, A., Li, T. S., Harada, M., Miura, T., Matsuzaki, M., Esato, K.: *Jpn Circ J*, **65**(9), 845-7 (2001).
- 140) Stamm, C., Westphal, B., Kleine, H. D., Petzsch, M., Kittner, C., Klinge, H., Schumichen, C., Nienaber, C. A., Freund, M., Steinhoff, G.: *Lancet*, **361**(9351), 45-6 (2003).
- 141) Strauer, B. E., Brehm, M., Zeus, T., Kosterling, M., Hernandez, A., Sorg, R. V., Kogler, G., Wernet, P.: *Circulation*, **106**(15), 1913-8 (2002).
- 142) Tse, H. F., Kwong, Y. L., Chan, J. K., Lo, G., Ho, C. L., Lau, C. P.: *Lancet*, **361**(9351), 47-9 (2003).
- 143) Fuchs, S., Satler, L. F., Kornowski, R., Okubagzi, P., Weisz, G., Baffour, R., Waksman, R., Weissman, N. J., Cerqueira, M., Leon, M. B., Epstein, S. E.: *J Am Coll Cardiol*, **41**(10), 1721-4 (2003).
- 144) Perin, E. C., Dohmann, H. F., Borojevic, R., Silva, S. A., Sousa, A. L., Mesquita, C. T., Rossi, M. I., Carvalho, A. C., Dutra, H. S., Dohmann, H. J., Silva, G. V., Belem, L., Vivacqua, R., Rangel, F. O., Esporcatta, R., Geng, Y. J., Vaughn, W. K., Assad, J. A., Mesquita, E. T., Willerson, J. T.: *Circulation*, **107**(18), 2294-302 (2003).
- 145) Perin, E. C., Dohmann, H. F., Borojevic, R., Silva, S. A., Sousa, A. L., Silva, G. V., Mesquita, C. T., Belem, L., Vaughn, W. K., Rangel, F. O., Assad, J. A., Carvalho, A. C., Branco, R. V., Rossi, M. I., Dohmann, H. J., Willerson, J. T.: *Circulation*, **110**(11 Suppl 1), II213-8 (2004).
- 146) Fernandez-Aviles, F., San Roman, J. A., Garcia-Frade, J., Fernandez, M. E., Penarubia, M. J., de la Fuente, L., Gomez-Bueno, M., Cantalapiedra, A., Fernandez, J., Gutierrez, O., Sanchez, P. L., Hernandez, C., Sanz, R., Garcia-Sancho, J., Sanchez, A.: *Circ Res*, **95**(7), 742-8 (2004).
- 147) Assmus, B., Schachinger, V., Teupe, C., Britten, M., Lehmann, R., Dobert, N., Grunwald, F., Aicher, A., Urbich, C., Martin, H., Hoelzer, D., Dimmeler, S., Zeiher, A. M.: *Circulation*, **106**(24), 3009-17 (2002).
- 148) Schachinger, V., Assmus, B., Britten, M. B., Honold, J., Lehmann, R., Teupe, C., Abolmaali, N. D., Vogl, T. J., Hofmann, W. K., Martin, H., Dimmeler, S., Zeiher, A. M.: *J Am Coll Cardiol*, **44**(8), 1690-9 (2004).
- 149) Britten, M. B., Abolmaali, N. D., Assmus, B., Lehmann, R., Honold, J., Schmitt, J., Vogl, T. J., Martin, H., Schachinger, V., Dimmeler,

- S., Zeiher, A. M.: *Circulation*, **108**(18), 2212-8 (2003).
- 150) Wollert, K. C., Meyer, G. P., Lotz, J., Ringes-Lichtenberg, S., Lippolt, P., Breidenbach, C., Fichtner, S., Korte, T., Hornig, B., Messinger, D., Arseniev, L., Hertenstein, B., Ganser, A., Drexler, H.: *Lancet*, **364**(9429), 141-8 (2004).
- 151) Meyer, G. P., Wollert, K. C., Lotz, J., Steffens, J., Lippolt, P., Fichtner, S., Hecker, H., Schaefer, A., Arseniev, L., Hertenstein, B., Ganser, A., Drexler, H.: *Circulation*, **113**(10), 1287-94 (2006).
- 152) Heeschen, C., Lehmann, R., Honold, J., Assmus, B., Aicher, A., Walter, D. H., Martin, H., Zeiher, A. M., Dimmeler, S.: *Circulation*, **109**(13), 1615-22 (2004).
- 153) Tateno, K., Minamino, T., Toko, H., Akazawa, H., Shimizu, N., Takeda, S., Kunieda, T., Miyauchi, H., Oyama, T., Matsuura, K., Nishi, J., Kobayashi, Y., Nagai, T., Kuwabara, Y., Iwakura, Y., Nomura, F., Saito, Y., Komuro, I.: *Circ Res*, **98**(9), 1194-202 (2006).
- 154) Pearlman, J. D., Laham, R. J., Post, M., Leiner, T., Simons, M.: *Curr Pharm Des*, **8**(16), 1467-96 (2002).
- 155) Burkhoff, D., Jones, J. W., Becker, L. C.: *J Am Coll Cardiol*, **38**(4), 1033-9 (2001).
- 156) Barkhausen, J., Hunold, P., Jochims, M., Debatin, J. F.: *J Magn Reson Imaging*, **19**(6), 750-7 (2004).
- 157) Wilke, N. M., Zenovich, A. G., Jeroscher-Herold, M., Henry, T. D.: *Curr Interv Cardiol Rep*, **3**(3), 205-212 (2001).
- 158) Pepper, M. S., Mandriota, S. J., Jeltsch, M., Kumar, V., Alitalo, K.: *J Cell Physiol*, **177**(3), 439-52 (1998).
- 159) Thurston, G., Suri, C., Smith, K., McClain, J., Sato, T. N., Yancopoulos, G. D., McDonald, D. M.: *Science*, **286**(5449), 2511-4 (1999).
- 160) Lindahl, P., Johansson, B. R., Leveen, P., Betsholtz, C.: *Science*, **277**(5323), 242-5 (1997).
- 161) Milkiewicz, M., Pugh, C. W., Egginton, S.: *J Physiol*, **560**(Pt 1), 21-6 (2004).
- 162) Cooke, J. P.: *Atheroscler Suppl*, **4**(4), 53-60 (2003).
- 163) Murohara, T., Asahara, T., Silver, M., Bauters, C., Masuda, H., Kalka, C., Kearney, M., Chen, D., Symes, J. F., Fishman, M. C., Huang, P. L., Isner, J. M.: *J Clin Invest*, **101**(11), 2567-78 (1998).
- 164) Norrby, K.: *Int J Exp Pathol*, **81**(6), 423-7 (2000).
- 165) Powell, J. A., Mohamed, S. N., Kerr, J. S., Mousa, S. A.: *J Cell Biochem*, **80**(1), 104-14 (2000).
- 166) Fukumura, D., Gohongi, T., Kadambi, A., Izumi, Y., Ang, J., Yun, C. O., Buerk, D. G., Huang, P. L., Jain, R. K.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(5), 2604-9 (2001).
- 167) Babaei, S., Teichert-Kuliszewska, K., Zhang, Q., Jones, N., Dumont, D. J., Stewart, D. J.: *Am J Pathol*, **162**(6), 1927-36 (2003).
- 168) Benjamin, L. E., Golijanin, D., Itin, A., Pode, D., Keshet, E.: *J Clin Invest*, **103**(2), 159-65 (1999).
- 169) Eriksson, A., Cao, R., Roy, J., Tritsarlis, K., Wahlestedt, C., Dissing, S., Thyberg, J., Cao, Y.: *Circulation*, **107**(11), 1532-8 (2003).
- 170) Ehrbar, M., Djonov, V. G., Schnell, C., Tschanz, S. A., Martiny-Baron, G., Schenk, U., Wood, J., Burri, P. H., Hubbell, J. A., Zisch, A. H.: *Circ Res*, **94**(8), 1124-32 (2004).
- 171) Richardson, T. P., Peters, M. C., Ennett, A. B., Mooney, D. J.: *Nat Biotechnol*, **19**(11), 1029-34 (2001).
- 172) Gruchala, M., Roy, H., Bhardwaj, S., Yla-Herttuala, S.: *Curr Pharm Des*, **10**(4), 407-23 (2004).
- 173) Simons, M., Post, M.: *Angiogenesis*. Saunders. Philadelphia, 2003.
- 174) Post, M. J., Laham, R., Sellke, F. W., Simons, M.: *Cardiovasc Res*, **49**(3), 522-31 (2001).
- 175) Laham, R. J., Rezaee, M., Post, M., Sellke, F. W., Braeckman, R. A., Hung, D., Simons, M.: *Drug Metab Dispos*, **27**(7), 821-6 (1999).
- 176) von Degenfeld, G., Raake, P., Kupatt, C., Lebherz, C., Hinkel, R., Gildehaus, F. J., Munzing, W., Kranz, A., Waltenberger, J., Simoes, M., Schwaiger, M., Thein, E., Boekstegers, P.: *J Am Coll Cardiol*, **42**(6), 1120-8 (2003).
- 177) Laham, R. J., Post, M., Rezaee, M., Donnell-Fink, L., Wykrzykowska, J. J., Lee, S. U., Baim, D. S., Sellke, F. W.: *Drug Metab Dispos*, **33**(8), 1101-7 (2005).
- 178) Pelisek, J., Fuchs, A., Engelmann, M. G., Shimizu, M., Golda, A., Mekkaoui, C., Rol-

- land, P. H., Nikol, S.: *Endothelium*, **10**(4-5), 247-55 (2003).
- 179) Bhardwaj, S., Roy, H., Gruchala, M., Viita, H., Kholova, I., Kokina, I., Achen, M. G., Stacker, S. A., Hedman, M., Alitalo, K., Yla-Herttuala, S.: *Hum Gene Ther*, **14**(15), 1451-62 (2003).
- 180) Jiang, H., Zhang, T., Sun, X.: *J Surg Res*, **126**(1), 48-54 (2005).
- 181) Kornowski, R., Leon, M. B., Fuchs, S., Vodovotz, Y., Flynn, M. A., Gordon, D. A., Pierre, A., Kovesdi, I., Keiser, J. A., Epstein, S. E.: *J Am Coll Cardiol*, **35**(4), 1031-9 (2000).
- 182) Lederman, R. J., Guttman, M. A., Peters, D. C., Thompson, R. B., Sorger, J. M., Dick, A. J., Raman, V. K., McVeigh, E. R.: *Circulation*, **105**(11), 1282-4 (2002).
- 183) Askari, A., Unzek, S., Goldman, C. K., Ellis, S. G., Thomas, J. D., DiCorleto, P. E., Topol, E. J., Penn, M. S.: *J Am Coll Cardiol*, **43**(10), 1908-14 (2004).
- 184) Edelberg, J. M., Tang, L., Hattori, K., Lyden, D., Rafii, S.: *Circ Res*, **90**(10), E89-93 (2002).
- 185) Rafii, S., Lyden, D.: *Nat Med*, **9**(6), 702-12 (2003).
- 186) Tang, Y. L., Tang, Y., Zhang, Y. C., Qian, K., Shen, L., Phillips, M. I.: *J Am Coll Cardiol*, **46**(7), 1339-50 (2005).
- 187) Dzau, V. J., Gneccchi, M., Pachori, A. S.: *J Am Coll Cardiol*, **46**(7), 1351-3 (2005).
- 188) Mangi, A. A., Noiseux, N., Kong, D., He, H., Rezvani, M., Ingwall, J. S., Dzau, V. J.: *Nat Med*, **9**(9), 1195-201 (2003).
- 189) Gneccchi, M., He, H., Liang, O. D., Melo, L. G., Morello, F., Mu, H., Noiseux, N., Zhang, L., Pratt, R. E., Ingwall, J. S., Dzau, V. J.: *Nat Med*, **11**(4), 367-8 (2005).
- 190) Matsumoto, R., Omura, T., Yoshiyama, M., Hayashi, T., Inamoto, S., Koh, K. R., Ohta, K., Izumi, Y., Nakamura, Y., Akioka, K., Kitaura, Y., Takeuchi, K., Yoshikawa, J.: *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **25**(6), 1168-73 (2005).
- 191) Miyagawa, S., Sawa, Y., Taketani, S., Kawaguchi, N., Nakamura, T., Matsuura, N., Matsuda, H.: *Circulation*, **105**(21), 2556-61 (2002).
- 192) Moore, M. A., Hattori, K., Heissig, B., Shieh, J. H., Dias, S., Crystal, R. G., Rafii, S.: *Ann N Y Acad Sci*, **938**, 36-45; discussion 45-7 (2001).
- 193) Hattori, K., Dias, S., Heissig, B., Hackett, N. R., Lyden, D., Tatenos, M., Hicklin, D. J., Zhu, Z., Witte, L., Crystal, R. G., Moore, M. A., Rafii, S.: *J Exp Med*, **193**(9), 1005-14 (2001).
- 194) Norol, F., Merlet, P., Isnard, R., Sebillon, P., Bonnet, N., Cailliot, C., Carrion, C., Ribeiro, M., Charlotte, F., Pradeau, P., Mayol, J. F., Peinnequin, A., Drouet, M., Safsafi, K., Vernant, J. P., Herodin, F.: *Blood*, **102**(13), 4361-8 (2003).
- 195) Ohtsuka, M., Takano, H., Zou, Y., Toko, H., Akazawa, H., Qin, Y., Suzuki, M., Hasegawa, H., Nakaya, H., Komuro, I.: *Faseb J*, **18**(7), 851-3 (2004).
- 196) Takahashi, T., Kalka, C., Masuda, H., Chen, D., Silver, M., Kearney, M., Wagner, M., Isner, J. M., Asahara, T.: *Nat Med*, **5**(4), 434-8 (1999).
- 197) Maekawa, Y., Anzai, T., Yoshikawa, T., Sugano, Y., Mahara, K., Kohno, T., Takahashi, T., Ogawa, S.: *J Am Coll Cardiol*, **44**(7), 1510-20 (2004).
- 198) Lew, W. Y.: *J Am Coll Cardiol*, **44**(7), 1521-2 (2004).
- 199) Heeschen, C., Aicher, A., Lehmann, R., Fichtlscherer, S., Vasa, M., Urbich, C., Mildner-Rihm, C., Martin, H., Zeiher, A. M., Dimmeler, S.: *Blood*, **102**(4), 1340-6 (2003).
- 200) Bahlmann, F. H., De Groot, K., Spandau, J. M., Landry, A. L., Hertel, B., Duckert, T., Boehm, S. M., Menne, J., Haller, H., Fliser, D.: *Blood*, **103**(3), 921-6 (2004).
- 201) Llevadot, J., Murasawa, S., Kureishi, Y., Uchida, S., Masuda, H., Kawamoto, A., Walsh, K., Isner, J. M., Asahara, T.: *J Clin Invest*, **108**(3), 399-405 (2001).
- 202) Vasa, M., Fichtlscherer, S., Adler, K., Aicher, A., Martin, H., Zeiher, A. M., Dimmeler, S.: *Circulation*, **103**(24), 2885-90 (2001).
- 203) Dimmeler, S., Aicher, A., Vasa, M., Mildner-Rihm, C., Adler, K., Tiemann, M., Rutten, H., Fichtlscherer, S., Martin, H., Zeiher, A. M.: *J Clin Invest*, **108**(3), 391-7 (2001).
- 204) Assmus, B., Urbich, C., Aicher, A., Hofmann, W. K., Haendeler, J., Rossig, L., Spyridopoulos, I., Zeiher, A. M., Dimmeler, S.: *Circ Res*, **92**(9), 1049-55 (2003).

- 205) Strehlow, K., Werner, N., Berweiler, J., Link, A., Dirnagl, U., Priller, J., Laufs, K., Ghaeni, L., Milosevic, M., Bohm, M., Nickenig, G.: *Circulation*, **107**(24), 3059-65 (2003).
- 206) Iwakura, A., Luedemann, C., Shastry, S., Hanley, A., Kearney, M., Aikawa, R., Isner, J. M., Asahara, T., Losordo, D. W.: *Circulation*, **108**(25), 3115-21 (2003).
- 207) Aicher, A., Heesch, C., Mildner-Rihm, C., Urbich, C., Ihling, C., Technau-Ihling, K., Zeiher, A. M., Dimmeler, S.: *Nat Med*, **9**(11), 1370-6 (2003).
- 208) Sola, F., Gualandris, A., Belleri, M., Giuliani, R., Coltrini, D., Bastaki, M., Tosatti, M. P., Bonardi, F., Vecchi, A., Fioretti, F., Ciomei, M., Grandi, M., Mantovani, A., Presta, M.: *Angiogenesis*, **1**(1), 102-116 (1997).
- 209) Ozawa, C. R., Banfi, A., Glazer, N. L., Thurston, G., Springer, M. L., Kraft, P. E., McDonald, D. M., Blau, H. M.: *J Clin Invest*, **113**(4), 516-27 (2004).
- 210) Makino, Y., Cao, R., Svensson, K., Bertilsson, G., Asman, M., Tanaka, H., Cao, Y., Berkenstam, A., Poellinger, L.: *Nature*, **414**(6863), 550-4 (2001).
- 211) Panchal, V. R., Rehman, J., Nguyen, A. T., Brown, J. W., Turrentine, M. W., Mahomed, Y., March, K. L.: *J Am Coll Cardiol*, **43**(8), 1383-7 (2004).
- 212) Lin, T. N., Kim, G. M., Chen, J. J., Cheung, W. M., He, Y. Y., Hsu, C. Y.: *Stroke*, **34**(1), 177-86 (2003).
- 213) Zhang, Y. W., Su, Y., Volpert, O. V., Vande Woude, G. F.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(22), 12718-23 (2003).
- 214) Rutanen, J., Rissanen, T. T., Markkanen, J. E., Gruchala, M., Silvennoinen, P., Kivela, A., Hedman, A., Hedman, M., Heikura, T., Orden, M. R., Stacker, S. A., Achen, M. G., Hartikainen, J., Yla-Herttuala, S.: *Circulation*, **109**(8), 1029-35 (2004).
- 215) Wickham, T. J.: *Gene Ther*, **7**(2), 110-4 (2000).
- 216) Armeanu, S., Pelisek, J., Krausz, E., Fuchs, A., Groth, D., Curth, R., Keil, O., Quilici, J., Rolland, P. H., Reszka, R., Nikol, S.: *Mol Ther*, **1**(4), 366-75 (2000).
- 217) Gruchala, M., Bhardwaj, S., Pajusola, K., Roy, H., Rissanen, T. T., Kokina, I., Kholova, I., Markkanen, J. E., Rutanen, J., Heikura, T., Alitalo, K., Bueler, H., Yla-Herttuala, S.: *J Gene Med*, **6**(5), 545-54 (2004).
- 218) Jacobi, J., Tam, B. Y., Sundram, U., von Degenfeld, G., Blau, H. M., Kuo, C. J., Cooke, J. P.: *Gene Ther*, **11**(3), 302-9 (2004).
- 219) Liu, F., Song, Y., Liu, D.: *Gene Ther*, **6**(7), 1258-66 (1999).
- 220) Epstein, S. E., Kornowski, R., Fuchs, S., Dvorak, H. F.: *Circulation*, **104**(1), 115-9 (2001).
- 221) Folkman, J.: *Semin Oncol*, **29**(6 Suppl 16), 15-8 (2002).
- 222) Witmer, A. N., Vrensen, G. F., Van Noorden, C. J., Schlingemann, R. O.: *Prog Retin Eye Res*, **22**(1), 1-29 (2003).
- 223) Celletti, F. L., Waugh, J. M., Amabile, P. G., Brendolan, A., Hilfiker, P. R., Dake, M. D.: *Nat Med*, **7**(4), 425-9 (2001).
- 224) Moulton, K. S., Heller, E., Konerding, M. A., Flynn, E., Palinski, W., Folkman, J.: *Circulation*, **99**(13), 1726-32 (1999).
- 225) Post, M. J., Laham, R. J., Kuntz, R. E., Novicki, D., Simons, M.: *Clin Cardiol*, **25**(6), 271-8 (2002).
- 226) McMahon, J. M., Wells, K. E., Bamfo, J. E., Cartwright, M. A., Wells, D. J.: *Gene Ther*, **5**(9), 1283-90 (1998).
- 227) Schwarz, E. R., Speakman, M. T., Patterson, M., Hale, S. S., Isner, J. M., Kedes, L. H., Kloner, R. A.: *J Am Coll Cardiol*, **35**(5), 1323-30 (2000).
- 228) Dor, Y., Djonov, V., Keshet, E.: *Ann N Y Acad Sci*, **995**, 208-16 (2003).

細胞組織利用製品の品質確保

Quality ensurance of cell/tissue-based products

Keywords

品質確保
プロセス評価/検証
工程内管理試験
特性・品質解析
規格及び試験方法

福永 悟史¹⁾ 鹿野 真弓¹⁾ 田中 克平¹⁾
早川 堯夫²⁾

1) 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 生物系審査部
2) 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 顧問

Summary

To ensure quality of cell/tissue-based product and its consistency, it is essential to design a total control strategy that include raw material testing, process evaluation/validation, product characterization, in-process control, specifications, and adherence to GMP. Extensive product characterization should be performed to confirm the production of the desired product and to identify the product quality attributes (including product stability) that might relate to the effectiveness and safety. Verification of robustness of the process for consistent product manufacture is also essential. Process evaluation/validation together with in-process control and specification may compose crucial element to control the product quality so that it can assure the removal of adventitious agents including viruses and/or the limited level of impurities such as fetal bovine serum. Specification should be set properly taking into account the data of process evaluation/validation, product characterization/stability, in-process control, availability of relevant analytical methods as well as preclinical and clinical studies, where possible and appropriate. Raw material testing is also important to prevent contamination with infectious agents for cell/tissue-based products without infectious agent inactivation/removal steps.

はじめに

医薬品・医療機器の品質確保の究極の目的は、最終製品の有効性・安全性を物質面から恒常的に確保することである。確保すべき品質の範囲は、一般には非臨床試験および臨床試験で有効性・安全性が確認された製品の品質特性に基づき承認時に定められる。ここでいう品質特性とは、製品の品質を表すのに相応しいものとして選択された細胞(分子)特性や製品特性である。安定性も特性の一要素である。市販後に臨床現場からの有害事象の情報や製造実績を品質確保に反映させることもある(図1)。一方、細胞組織利用製品の確認申請では、その製品が品質特性、安全性面からみて臨床試験に入ることが妥当であるか、その恒常的製造が可能であるかについて説明が必要である。ここで認められた規格および試験方法を含む品質確保の在り方は非臨

Fukunaga, Satoshi¹⁾ / Shikano, Mayumi¹⁾ / Tanaka, Katsutoshi¹⁾ / Hayakawa, Takao²⁾

1) Office of Biologics, Pharmaceuticals and Medical Devices Agency

2) Senior Advisor, Pharmaceuticals and Medical Devices Agency

E-mail: fukunaga-satoshi@pmda.go.jp

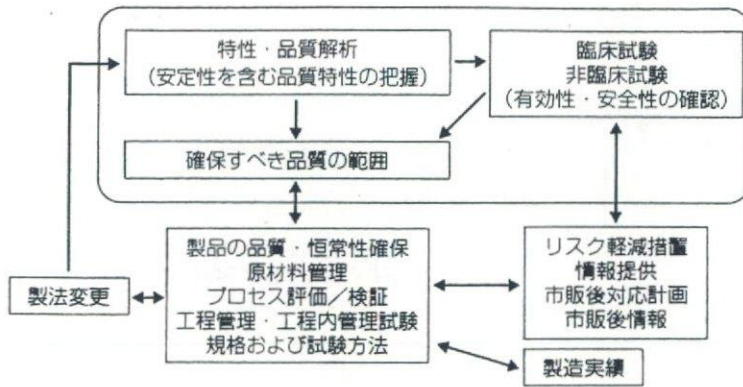


図1 品質確保関連要素

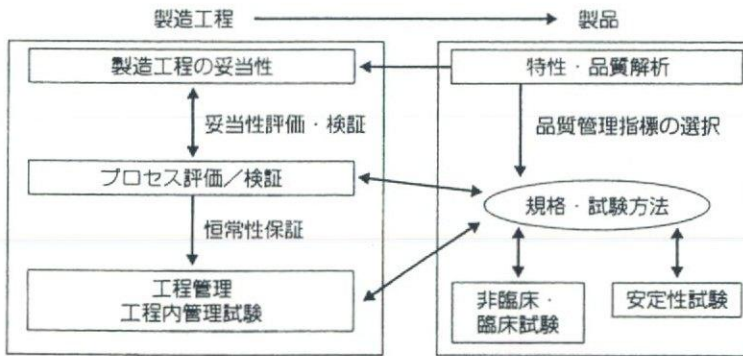


図2 品質確保の考え方

床試験までのデータに基づいた暫定的なもので、臨床試験の結果を受けてさらに適正なものとなる場合もある。

一般的な品質確保の考え方について

品質確保は一般的に次のように検討される(図2)。まず、目的とする製

品の特性・品質解析を行う。これを基に品質管理指標となる特性に着目し、規格及び試験方法として設定することを考慮する。また、製造工程が恒常的に一定の品質を有する製品を生産することを確認するために工程のプロセス評価/検証などを実施する。プロセス評価/検証を基に、それが品質確保上

必要あるいは合理的と考えられる場合には、適切な項目を選択し、製造工程の堅牢性を日常的に確認できるように工程管理または工程内管理試験を設定する。最終的な規格試験項目および規格値の設定にあたっては、製品の特性・品質解析結果や品質管理指標に係わる分析法の適切性はもとより、プロセス評価/検証、工程内管理試験との相互補完関係、製品の品質データ、安定性試験および非臨床試験、臨床試験の結果も踏まえて決定することになる。実際には、予備的な検討を含め試行錯誤を経て最適な品質管理の方策が確立されていくであろう。

細胞組織利用製品の品質確保面での特徴

品質確保を行う上での細胞組織利用製品の特徴として、①作用機序が不明で有効性・安全性を担保する品質指標を設定し難い場合がある、②技術的な限界から最終製品で適切な品質指標を確認できない場合がある、③原材料(細胞・組織など)、製造工程の変動が製品の品質に及ぼす影響が大きく、特に個体差がある自家由来製品の場合は、通常の医薬品・医療機器に比べ品質の変動が大きい、④不純物の除去工程の設定が困難、⑤感染性物質の不活化/除去工程の導入が困難な製品が多い、という点が挙げられる。確認申請や承認申請の際に、細胞組織利用製品は上記の特徴を理由に、はじめから品質確保の方策がほとんど検討されていないか、または不十分な製品が多い。

しかし、実用化を目指す以上、臨床に使用される製品のしかるべき範囲内の品質特性の把握や管理、品質の恒常性の確保は前提条件であるので、審査においては当該製品の特徴を踏まえた上で何をどのように検討したのか、必ず議論されることになる。以下、現時点での細胞組織利用製品の品質確保の考え方および留意点を解説したい。

細胞組織利用製品の品質 確保を適正かつ合理的に 行うための留意事項

細胞組織利用製品の品質確保も一般的な医薬品・医療機器と基本的な考え方は同じであるが、各製品によって製造方法や品質特性が非常に多様なため、その製品に応じた品質確保の方策を考慮すべきであろう。たとえば、品質確保の基本となるのは出荷前の最終製品の規格及び試験方法の実施であるが、細胞組織利用製品では、製造後、臨床使用されるまでの期間が短く、臨床使用の前に試験結果を確認できない場合も多い。無菌試験やマイコプラズマ否定試験のように最終製品で確認する必要があるが出荷に間に合わない場合には、とりあえず臨床使用に供しながら試験結果の確認ができ次第、適宜、しかるべき措置をとれるよう対応策を立てておくことになる。しかし、必ずしも最終製品での試験によるのではなく、むしろ原材料管理や製造工程の管理で対応するという方策も重要である。また、临床上の有効性・安全性に影響を及ぼすような品質変動を、最終

製品の規格で必ずしも確認できないのであれば、変動が有効性・安全性の観点から許容できるレベル内に収まるように製造工程を適切に設定し、管理する必要がある。規格などを満たすように製品を一貫した方法で製造するという観点からはGMP(米国では21CFR 1271サブパートDでcGTP: Good Tissue Practiceが示されている)が重要である。

1. 特性・品質解析

特性・品質解析は、目的とするものが得られたことの確認とともに、製品の特性を可能な限り明らかにすることを目的としている。目的産物の確認はとりもなおさず製造工程の妥当性を確認することを意味している。解析結果は後に規格及び試験方法や工程内管理試験に設定すべき品質管理指標の選択のための重要な基礎データを提供する。また、有効性・安全性と品質特性の関連性について検討するための基礎的データともなる。細胞組織利用製品の特性・品質解析の対象となる項目としては、たとえば、目的細胞の確認・純度(細胞表面抗原などの検出)、目的とする機能(細胞機能特性、生理活性物質産生能など)、細胞の増殖特性、細胞が腫瘍化する可能性、形態学的解析、目的細胞以外の混在する細胞の種類・量、ウシ胎仔血清等培地添加物やトリプシンなどの工程由来不純物の種類・量などが挙げられる。遺伝子改変細胞では、染色体に挿入された遺伝子の塩基配列、コピー数などについても

検討すべきであろう。例として挙げた項目は、通常、可能な限り検討すべきと考えられるものであり、検討しない場合はその妥当性を明らかにしておく必要がある。ただし、細胞組織利用製品は多様であることから製品ごとに行うべき試験は一律ではない。非臨床段階で作用機序が明確になっておらず有効性・安全性に関連した品質管理指標を設定しにくい製品の場合には、上記の項目に限らず特性・品質解析を行い、臨床試験の進行とともにより有効性・安全性に関連する可能性のある品質特性を探索するとともに、承認申請時に品質管理指標に盛り込むことも考慮すべきである。

なお、特性・品質解析の具体的な試験方法、特異性および検出感度、結果に対する考察、工程内試験や規格及び試験方法に用いるための品質管理指標の選択の妥当性について明らかにしておく必要がある。

2. 最終製品の規格及び試験方法の設定

最終製品の規格及び試験方法は、出荷に際して日常的に製品の品質を確認するための方策である。特性・品質解析結果に基づき、製造工程におけるプロセス評価/検証や工程内管理試験の設定との相互補完関係も考慮して、最終製品レベルで品質、有効性・安全性確保に関連すると考えられる品質管理指標を設定する。項目としては、細胞の純度、細胞数、細胞生存率、目的細胞・組織の特徴を示す表面マーカーや

特異的機能、不純物の種類・量などの設定が可能か検討する。無菌試験、マイコプラズマ否定試験およびエンドトキシン試験は基本的に設定する必要がある。検討の結果、最終製品における規格設定が不可能な場合あるいは合理的でない場合は、工程内管理試験などの製造工程中の管理によって適切な品質管理指標への適合性を確認することを検討する。確認申請時に有効性・安全性確保に関連する適切な規格及び試験方法の設定が困難な場合は、関連する可能性のある品質指標に着目してデータを収集し、臨床試験の結果を踏まえた将来的な規格試験の設定に備えることもある。確認申請では有効性について詳細な議論をすることはないが、可能な範囲で期待される有効性と関係があると予測されるある細胞機能特性に着目した暫定的な規格設定を行うことで、承認申請の際には有効性に関する品質指標と臨床データの関係をより明確にした形で規格及び試験方法を設定することも考慮されてよい。確認申請では、自社での特性・品質解析、プロセス評価/検証の結果や論文報告などの知見から、実施可能な試験や代替試験方法などを検討した過程を説明する必要がある。また、試験方法の妥当性や限界に関するデータの提出を求められる。

規格値あるいは判定基準は、原則として安定した製造の結果得られた製品のデータを基に決定する。必要に応じて非臨床試験、臨床試験(確認申請時は臨床研究や他での実施例がある場

合)、安定性試験の結果を反映させる。

3. 製造工程のプロセス評価/検証および工程内管理試験の設定

プロセス評価/検証は、選択された製造工程が継続的に一定の品質の製品を製造できるか否か、その能力および堅牢性という観点から、製造工程を評価/検証するために行われる。

プロセス評価/検証では、分化指標などの目的細胞の生物学的特性、不純物、感染性物質等の有効性・安全性に関連すると考えられる指標について、当該工程が所期の目的に合うプロセス能力や除去(クリアランス)能力をどの程度有するか、またその堅牢性はどうかなどについて評価/検証する。たとえば、細胞を分化させる工程や細胞純度を高める工程では、その工程の前と後の試料についてデータを取得し、細胞生存率が維持されたまま目的細胞の純度(細胞の種類構成およびその変化などを確認)に達するかについて評価する。不純物の除去工程が設定されている場合は、対象不純物がどの程度除去されるか、最終的に安全性上許容できるレベルになるかを確認する。ウイルス不活化/除去工程が設定されている場合は、ウイルスクリアランス試験を行う。製造工程の目的遂行能力や堅牢性の確認は、複数回の製造の評価/検証により行うことが望ましいが、マスターセルバンクからワーキングセルバンクへの培養、遺伝子の安定性、ウイルスクリアランスのように一度の試験で工程が評価/検証され

ることもある。一方、不純物の除去などで試験結果がばらつく場合などでは評価/検証する回数を増やすことが望ましい場合もある。プロセス評価/検証で当該工程の目的遂行能力や堅牢性が確認されれば、それ以降、同一の製造工程を維持する限り、工程内管理試験や製品レベルでのルーチンの品質管理の対象とする必要がない場合もある。

評価/検証された製造工程の恒常性を製造時にルーチンとして確認する方策の一つとして、工程内管理試験がある。工程内管理試験は、製造工程において、最終製品に重大な影響を及ぼす段階、およびその他の製品の品質の恒常性を合理的に確認すべき(できる)段階で実施する。最終製品よりも中間製品で実施した方が適切な試験(たとえば最終製品では妨害物質があって検出できない場合、最終製品の試験では検出感度以下になる不純物をより上流の工程で検出する場合)は工程内管理試験として設定する。工程内管理試験として設定される試験は品目によって異なるが、たとえば、細胞の純度、細胞数、細胞生存率、目的細胞への中間的細胞製剤の特性、不純物の種類・量、感染性物質に対する試験が考えられる。

確認申請の事前審査において、プロセス評価/検証に関して、不純物の残存量、細胞の種類構成およびその変化などの検討を追加して実施するよう指導することが少なくない。また、たとえば不純物の残存量が許容できると

する根拠など、得られた結果に対する解釈も議論になる。プロセス評価/検証を行う際は、実施すべき試験を事前によく検討し、得られた結果の妥当性について十分に考察を行う必要がある。

なお、海外企業の製造技術を導入して自社で独自に製造する場合、プロセス評価/検証および工程内管理試験の設定、特性・品質解析は自社で実施する必要があり、その結果に対する考察は、確認申請および承認申請で製品の品質や製造工程の妥当性を裏付ける資料として求められる。

4. 原材料の管理

細胞組織利用製品は、細胞や組織はもとより血清や酵素など、生物由来原材料を使用するものが多い。それらについては生物由来原料基準への適合を確認する。ウシ由来原材料は米国など基準に適合しない原産国であってもリスク・ベネフィット評価の結果、医療上の有用性が優ると認められれば承認される場合もあるが、原則、原産国を速やかに切り替えるべきである。使用可能な原産国などの詳細は基準を参照されたい。また、供給元の発行する試験成績証明書を確認するほか、力価、純度の確認など、必要に応じて自社での受け入れ試験を設定する。フィーダー細胞やバンク化した他家由来細胞を原材料とする場合は、セルバンクについてICH(日・米・EU医薬品規制調和会議)品質ガイドラインQ5A、Q5Dに基づきウイルス安全性の確認

およびセルバンクの特性・品質解析を実施する。ICHガイドラインは国立医薬品食品衛生研究所のホームページに掲載されている(<http://www.nihs.go.jp/dig/ich/ichindex.html>)。異種動物由来細胞・組織を製造する場合は、平成14年7月9日医政研発第0709001号「異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針について」を基にドナースクリーニングなどを行う。また、フィーダー細胞に関しては、平成16年7月2日医政研発第0702001号「異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針」に基づく3T3 J2株及び3T3 NIH株をフィーダー細胞として利用する上皮系の再生医療への指針について」を基に品質管理を行う必要がある。

感染性物質の混入を防止するには、一般的に、原材料の管理、製造工程での不活化/除去、最終製品での試験の3段階で管理することが基本である。しかし、細胞組織利用製品では製造工程での不活化/除去があまり見込めず、また、最終製品での各種のウイルス試験の実施は非現実的であり、さらに無菌試験などについては臨床で使用するまでに試験結果が得られない製品が多いため、原材料の管理が非常に重要になる。原材料の管理としては、供給元での原料の管理(ドナースクリーニングの内容など)、供給元が実施した感染性物質否定試験結果の把握、ウイルスクリアランス試験の詳細把握が考えられる。

規格及び試験方法設定 にあたり注意すべき点

1. 品質の変動(ばらつき)

細胞組織利用製品は、最終製品の規格及び試験方法ならびに工程内管理試験の試験結果がばらつく場合がある。このような場合であっても、目的細胞の種類、純度、細胞生存率や本質的な特性が損なわれないことが基本であり、承認申請時には臨床試験の結果および製造実績からばらつきの許容範囲を見極めた上で規格値を設定する必要がある。確認申請の段階でも、一定の品質を有する製品を治験に供するという意味では、その時点で得られているデータに基づく規格値の設定は必要であるが、厳密な規格値の設定が難しい場合は、暫定規格値を設定することになる。暫定規格値はばらつきを見込んで比較的広い幅で設定されるが、治験後に臨床データに基づいて設定した新しい規格値から外れた製品を用いたデータは承認申請時に評価対象とならないことに注意する必要がある。なお、確認申請の際には暫定規格値を設定する理由について説明が必要である。

2. 不純物

不純物としては、工程由来不純物(ウシ胎仔血清、成長因子などの培地添加物や細胞処理に使用した酵素など)、目的細胞以外の混在細胞(原材料から混入した細胞、目的細胞以外に分化した細胞、フィーダー細胞など)がある。不純物となり得るものを想定

した上で、プロセス評価/検証で製造工程の除去能の評価を行うことや、特性・品質解析で最終製品に残存する量の評価を行うことにより、残存量が安全性上問題ないレベルであることを考察し、必要に応じて規格および試験方法を設定する。

3. 被験試料

原則として、特性・品質解析、プロセス評価/検証および規格設定のデータ(申請用データ)を取得する被験試料は、臨床使用される(予定の)製品と同じ原材料、製造方法で製造されたものを使用する。通常、患者の正常細胞・組織を利用する自家移植の場合は健康人由来細胞・組織を使用した基礎研究データを参考にしても差し支えない。しかし、患者や健康人からの細胞・組織入手が不可能で細胞・組織バンクなどからの代替のものを使用する場合には、最終製品の品質特性に大きな差異がなく、データを外挿可能であることを説明する必要がある。

製造方法変更について

臨床試験実施後に製造方法を変更する場合、変更の品質への影響を評価す

るためには、特性・品質解析により変更前後の最終製品の品質特性の比較を行うことが基本であるが、必要に応じて工程内管理試験、プロセス評価/検証を再度行う。その結果から、変更前後の品質の類似性が高いこと、もしくは品質特性が多少異なっても非臨床/臨床試験、市販後の情報など既存の情報を基に最終製品の有効性・安全性に影響がないことを示す。影響が否定できなければ、製造方法変更後の製品を用いて非臨床試験または臨床試験を実施し、有効性・安全性を確認する必要がある(図1)。製造販売承認取得後は、承認申請書記載事項に関しては基本的に一部変更承認申請が必要となる。その際、プロセス評価/検証や新たな工程内管理試験の設定が必要になる場合もある。開発中に製造方法を変更する場合は、製法変更後の製品について再度特性・品質解析を実施し、必要に応じてプロセス評価/検証も実施する。臨床データは製法変更後の製品について取得する。

動物試験で使用する製品の品質について

細胞組織利用製品の非臨床試験では、動物試験において動物由来の製品

を用いる場合がある。その際には、動物試験で用いた製品および臨床試験で用いた製品の品質特性の相違点を可能な範囲で確認し、非臨床試験の評価に影響を与え得る大きな相違点がないか説明する。

おわりに

細胞組織利用製品の品質確保のためには、製品の特性・品質解析、規格及び試験方法、製造工程のプロセス評価/検証、工程内管理試験の設定、原材料の管理を相互補完的に設定することが重要である。確認申請・承認申請にあたっては、特性・品質解析やプロセス評価/検証の結果の解釈、規格及び試験方法の対象となる品質管理指標の選択理由、規格値や判定基準の妥当性などについて、申請資料で明確にすることが、早期の確認・承認につながると考える。適宜、治験相談などを利用し、規制当局に相談することが望ましい。双方が協力して、有効で安全な製品を早く患者の皆様へ届けられるよう努力していきたい。

局方の国際調和と日本薬局方の今後の動向**

早川 堯夫*

本稿では、第十五改正告示、施行を間近に控えている中で、特に第十四改正日本薬局方から第十五改正日本薬局方に至る改正状況の概要及び日本薬局方の国際化にフォーカスを当てた動き、更に今後の動向について説明します。

1. 日本薬局方作成基本方針

第十四改正日本薬局方から第十五改正日本薬局方施行までの経緯を Table 1 に示します。第十五改正は Table 2 に示す日本薬局方作成基本方針を背景として作成されています。その基本方針とは、平成 13 年 11 月の薬食審答申で示されたもので、第十四改正日本薬局方公布後、医学・薬学の進歩に対応するため、日本薬局方の役割と性格、作成方針、基本方針達成のための第十五改正に向けての具体的な方策、施行時期、局方の組織に関する事項を定めたものです。それによりますと、日本薬局方の役割と性格について、これを端的に表すと、公的、公共、公開となります。すなわち、日本薬局方は、我が国の医薬品の品質を確保するために必要な公的基準を示すもので、医療上、重要とされた医薬品の品質等に関わる判断基準を明確にする役割を有すること、同時に関係者に広く活用されるべき公共の規格書としての性格を有すると共に、国民に医薬品に関する情報を公開し、説明責任を果たす役割を持つこと、更に医薬品の品質に関する薬事行政の円滑かつ効率的推進及び国際的整合性の維持・確保に資するものであると記載されています。

日本薬局方の作成方針として具体的に 5 本の柱が掲げられています。一つ目は保健医療上重要な医薬品の全面的収載による充実化、二つ目は必要に応じ

た速やかな部分改正及びそれによる行政の円滑な運用、三つ目は国際調和の推進、四つ目は日本薬局方改正に係る透明性の確保及び普及、五つ目は最新の分析法の積極的導入及び標準品の整備等の推進です。

2. 国際調和の推進

国際調和の推進については、前項で述べた 5 本の柱の 3 番目の項目以外にも随所に国際化が意識されています。

例えば基本方針達成のための具体的な対策 (Table 3) の中で、基本方針の 1 番目の保健医療上重要な医薬品の全面的収載による充実化においては、USP や EP での収載状況を考慮しながら局方収載を図ることとされています。

2 番目の必要に応じた速やかな部分改正及びそれによる行政の円滑な運用では、安全性に関わる情報が得られた場合や、後述する PDG (Pharmacopoeial Discussion Group: 日・米・欧の三薬局方で構成) において国際調和された場合は、従来の大改正や追補以外にも部分改正を実施することとされています。

3 番目の国際調和の推進はまさにそのもので、国際調和への積極的な取組み及び調和事項の速やかな局方への取込みを行い、逆に日本薬局方に規定されている試験方法等については、PDG 等の場を通じて国際化を図ることとしています。

4 番目の日本薬局方改正による透明性の確保及び普及においては、インターネット上での公開や、USP や EP の長所を積極的に日本薬局方に取込むための検討を行うことが示されています。

5 番目の最新の分析法の積極的導入及び標準品の

* 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 東京都千代田区霞が関 3-2-2 (〒100-0013)

** 当協会主催の「医薬品の品質確保をめぐる諸問題」(平成 18 年 2 月 17 日: 東京, 2 月 23 日: 大阪) における講演による。

Table 1 第十四改正日本薬局方から第十五改正薬局方へ

- 第十四改正：平成 13 年 4 月施行
- 同第一追補：平成 15 年 1 月施行
- 同第二追補：平成 17 年 1 月施行
- 第十五改正：平成 18 年 4 月施行（予定）

整備等の促進では、USP や EP に収載され、かつ JP に未収載である試験法の積極的な取込み、あるいは国際調和が終了した試験法の取込み、更に医薬品各条では INN（国際的一般名称）と一元的な命名法の確立を図ること等が示されています。

3. 薬局方の制定における厚生労働省と総合機構との役割分担

第十四改正日本薬局方施行後、第十五改正日本薬局方施行に至る間に医薬品医療機器総合機構（総合機構）が発足しました。局方の制定における厚生労働省と総合機構は、Table 4 に示す役割分担がなされています。厚生労働省は薬事・食品衛生審議会を中心として、薬局方作成基本方針の決定、収載候補品目の決定、薬局方原案の審議・採択、告示、英文版の作成を担い、総合機構は、厚生労働省からの方針を受け、19 の局方委員会で医薬品各条や試験法等の原案について実質的な審議を行い、合わせて局

方の国際調和についての実務を担当することとなっています（Fig. 1）。

4. 日本薬局方原案作成の流れ

日本薬局法の原案作成の流れを Fig. 2 に示します。日本薬局方部会（局方部会）と厚生労働省審査管理課は局方作成基本方針の決定及び収載候補品目の決定を行います。それを受けて、総合機構は製薬企業等の協力を得ながら、企業原案、事務局原案の作成を経て専門家から構成される 19 の原案検討委員会で実質的な議論を行い、局方原案を作成します。それを審査管理課に報告し、局方部会、薬事分科会、薬事・食品衛生審議会を経た後、大臣に答申し、告示、施行といった流れとなっています。

5. 第十五改正日本薬局方について

5.1 作成の経緯

第十五改正日本薬局方施行に至る経緯は、Table 5 に示すように、第十四改正日本薬局方施行後、科学技術の進展と国際調和に対応するため審議を継続し、第一・第二追補を経て施行という運びです。

具体的には平成 12 年から 14 年にかけての審議終了分が第一追補、平成 14 年から 15 年にかけての審議終了分が第二追補、平成 16 年から 17 年 8 月にかけての審議終了分が第十五改正としてまとめられて

Table 2 日本薬局方作成基本方針

（平成 13 年 11 月薬食審答申）

第十四改正日本薬局方公布後、医学・薬学の進歩に対応するため、日本薬局方の役割と性格、作成方針、基本方針達成のための第十五改正に向けての具体的な方策、施行時期、日本薬局方の組織に関する事項を内容とする作成基本方針を定めた

- 役割と性格：公的、公共、公開
 - ・ 日本薬局方は、その時点での学問・技術の進歩と医療需要に応じて、わが国の医薬品の品質を確保するために必要な公的基準を示すものであり、医薬品全般の品質を総合的に保証するための規格及び試験方法の標準を示すとともに医療上重要とされた医薬品の品質等に係る判断基準を明確にする役割を有する
 - ・ 日本薬局方は、その作成に当たって、多くの医薬品関係者の知識と経験が結集されており、関係者に広く活用されるべき公共の規格書としての性格を有するとともに、国民に医薬品に関する情報を公開し、説明責任を果たす役割をもつ。
 - ・ さらに医薬品の品質に関する薬事行政の円滑かつ効率的推進及び国際的整合性の維持・確保に資するものである。
- 日本薬局方作成方針「5本の柱」
 - ・ 保健医療上重要な医薬品の全般的収載による充実化
 - ・ 必要に応じた速やかな部分改正及びそれによる行政の円滑な運用
 - ・ 国際調和の推進（欧州薬局方：EP 及び米国薬局方：USP と）
 - ・ 日本薬局方改正に係る透明性の確保及び日本薬局方の普及
 - ・ 最新の分析法の積極的導入及び標準品の整備等の推進

Table 3 基本方針達成のための具体的な方策

1. 保険医療上重要な医薬品の全面的収載による充実化
 - 1) 日本薬局方への収載意義及び基準の明確化
 - ・具体的な収載規則の検討 (USP, EP での収載状況も考慮材料)
 - ・保健医療上重要な医薬品は市販後可及的速やかな収載を目指す
 - 2) 日本薬局方の構成の見直し
 - ・第一部・第二部の分類, 収載品目の構成等の検討
 - 3) 医薬品に係る他の規格集との関係の見直しを検討
 - 4) 日本薬局方外医薬品規格, 医薬品添加物規格等の他の規格集の有効活用
2. 必要に応じた速やかな部分改正, それによる行政の円滑な運用
 - 1) 医薬品の安全性に係る情報が得られた場合や薬局方検討会議 (PDG) 等における国際調和がなされた場合等には, 従来の大改正や追補以外にも部分改正を実施
 - 2) 参考情報については, その改正手続きが比較的容易であるため, その有効活用を推進
3. 国際調和の推進
 - 1) 国際調和への積極的な取組み及び調和事項の速やかな日本薬局方への取込み
 - 2) 日本薬局方に規定されている試験方法等について, PDG 等の場を通じた国際化
 - 3) 国際化への対応の一環として, 国際社会での評価を高めるための方途の検討
 - 4) 特に医薬品添加物及び一般試験法の国際調和の推進
4. 日本薬局方改正に係る透明性の確保及び日本薬局方の普及
 - 1) 日本薬局方より効果的な普及方法の策定
 - 2) インターネット上での公開
 - 3) 分かりやすい日本薬局方の策定 (分かりやすい文言等の考案)
 - 4) USP, EP の長所を積極的に日本薬局方に取り込むための検討
 - 5) 参考情報, 付録, 索引等の充実・拡充
5. 最新の分析法の積極的導入及び標準品の整備等の促進
 - 1) 通則の改正
 - 2) 製剤総則の改正 (新技術や医療需要に対応)
 - 3) 一般試験法の改正
 - ①無菌試験法等の生物試験法の改正
 - ②USP, EP 等他の薬局方に収載され, かつ, 日本薬局方に未収載である試験法の積極的な取込み
 - ③国際調和が終了した試験法の取込み
 - ④一般試験法等の分類, 付番体制の技術的な見直し
 - 4) 医薬品各条の整備 (①局方, JAN, INN での医薬品名称の一元的な命名法の確立, ②最新の分析法の積極的導入, ③試料量の低減化, ④試験項目の合理的設定, ⑤有害試薬の可及的排除, ⑥溶出試験規格の収載推進, ⑦動物を使用しない試験法の検討, ⑧先端技術応用医薬品に対応した医薬品各条設定の検討)
 - 5) 標準品の整備 (①日本薬局方標準品の充実, ②日本薬局方の各委員会における標準品の考え方等の調整・整備)
 - 6) その他の留意事項 (①参考情報の有効活用, ②日本薬局方全般における表記の整備)

います。そして、局方部会での審議、薬食審での報告・審議の後、厚生労働大臣へ答申し、平成 18 年 3 月末に第十五改正日本薬局方が告示され、4 月 1 日施行の予定になっています (平成 18 年 4 月 1 日施行済)。

第十四改正日本薬局方施行後、第十五改正が施行されるまで、第一追補、第二追補、第十五改正の 3 回それぞれに約 160 名の専門家が従事し、延べ約 1500 時間の審議が行われました (Table 6)。

6. 第十四改正日本薬局方第一追補、第二追補について

第十四改正日本薬局方第一追補、第二追補は、日局十五に向けた日本薬局方作成基本方針を受けた一種のマイルストーンですので、以下に概略を説明します。

6.1 第一追補について

第一追補については、Table 7 に示すように通則で改正が 2 項目、製剤総則で改正が 1 項目、一般試

Table 4 薬局方の制定における厚生労働省と総合機構との役割分担

- 厚生労働省（薬事食品衛生審議会）
 - 薬局方作成基本方針の決定
 - 薬局方収載候補品目の決定
 - 機構の作成した薬局方原案の審議・採択、告示
 - 薬局方の英文版作成
 - ※薬局方に関する審査方針等の決定
- 総合機構（局方原案審議委員会）
 - 厚生労働省からの方針を受け、19の局方委員会で、各条や試験法などの原案について実質的な審議を行う。薬局方の国際調和についても、実務を担当する。

験法で新規が2項目、改正が3項目ありました。医薬品各条の第一部では新規が31品目ありました。これは基本方針に則って他の基準から移行されたものが多く、特に日抗基から24品目移行されたことが大きく反映されています。第一部の改正は163品目、削除は8品目ありました。第二部は新規15品目、改正46品目、削除3品目となっています。

一般試験法の改正3項目の中の「強熱残分試験法」はPDG国際調和関連項目として扱われ、第二追補、あるいは日局十五においても改正が続けられ、より完全調和に近づいています。

参考情報では、新規が3項目、改正が2項目あり、このうち「SDSポリアクリルアミド電気泳動法」が

PDG国際調和関連項目です。

6.2 第二追補について

第二追補の概要をTable 8に示します。一般試験法は新規が1項目、改正が6項目、医薬品各条は第一部で新規が27品目、改正が53品目、削除が1品目あり、第二部では新規が12品目、改正が22品目、削除が9品目ありました。更に生薬総則は改正が1項目ありました。

6.2.1 一般試験法について

一般試験法の内訳をカテゴリ一別にTable 9に示します。

生物試験法のうち「エンドトキシン試験法」と「発熱性物質試験法」については、国際化を視野に置いた改正が行われました。また、「無菌試験法」は、PDG国際調和案を受けて全面的に改正されましたが、それぞれの国での歴史が長く、様々な背景があるため、なお11項目が不整合のまま部分調和の段階に留まっています。引き続き更なる調和に向けてすり合わせが続いています。

理化学試験法では「核磁気共鳴スペクトル測定法」と「強熱残分試験法」が改正されました。「強熱残分試験法」は更に国際調和が進み、日局十五で完全調和に近づきました。

物性試験法は、新規の「粉体の粒子密度測定法」があります。これはPDG国際調和に挙げられてい

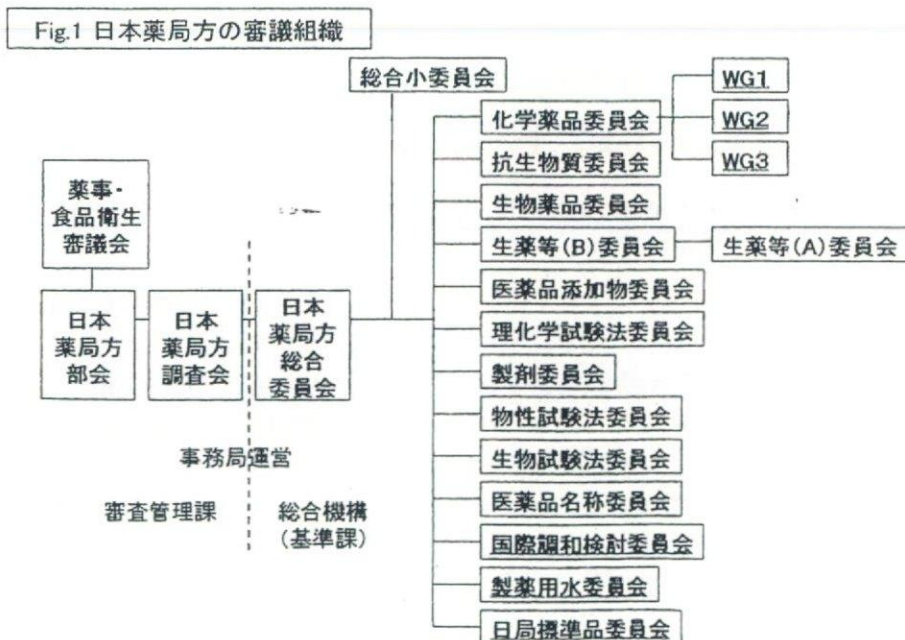


Fig. 1 日本薬局方の審議組織