

を用いた。洗浄臍帯血中の CD34 陽性細胞を CD34 試薬と反応させ、磁気標識した。細胞を Clini MACS 装置に供し、CD34 陽性細胞を分離した。

(3) CD34 陽性細胞の *ex vivo* 増幅培養

分離した CD34 陽性細胞の *ex vivo* 増幅培養は SCF、TPO、FP6、FL それぞれ 100ng/ml を含む QBSF-60 培地を用いて行った。培養は、ガス透過性のテフロン製バッグに細胞を充填して閉鎖的に実施し、CD34 陽性細胞数で約 10,000 個 / mL の濃度から開始した。1 バッグあたり、15 mL の培養液から開始し、4 日目に 2 倍、7 日目に 2 倍、更に 10 日目に 2 倍に拡張培養を行い、最終的に 120 mL の培養液量とした。1 回の製造で培養に使用するバッグの数は、分離された CD34 陽性細胞数に合わせて設定した。尚、第 2 期以降の試験製造においては、使用する QBSF-60 培地について所定の受入れ検査 (ロットチェ

ック、ボトルチェック)を実施し、決められた規格値を満たした培地のみを使用した。

(4) 増幅細胞の洗浄及び製品化

複数の培養バッグから培養液を 1 つの輸注用バッグに集め、自動細胞洗浄装置セルウォッシャー ACP215 を使用して余剰のサイトカインや培地成分を除去した。

最終的に 0.5% ヒト血清アルブミン含有生理食塩液 100 mL に懸濁し、輸注用バッグに充填して製品とした。

尚、培養に用いる原料は SCF、FL を除き医薬品グレードのものを用い、それぞれの原料は製品標準書に記載した規格に沿うものを用いた。

- ・臍帯血 (さい帯血バンクより提供)
- インフォームドコンセントのもとに母親から提供され、臍帯血提供機関(兵庫及び東海さい帯血バンク)及び先端医

療センターにおいて倫理審査が済んでいるものを用いた。

- ・ サイトカイン
 - ・ Recombinant Human Stem Cell Factor (R&D Systems, Inc.)
 - ・ Recombinant Human Flt-3 / Flk-2 ligand (R&D Systems, Inc.)
 - ・ KRN9000 (麒麟麦酒 (株))
 - ・ FP6 (麒麟麦酒 (株))
- ・ 無血清培地
 - QBSF-60 (QUALITY BIOLOGICAL, Inc.)
 - ・ ガス透過性培養バッグ VueLife™ (American Fluoroseal Corporation 社製)
 - ・ デキストラン 40 注射液 (テルモ (株))
 - ・ 献血アルブミン-Wf (三菱ウェルファーマ (株))
 - ・ 献血ヴェノグロブリン-IH ヨシトミ (三菱ウェルファーマ (株))
 - ・ 大塚生食注 (大塚製薬 (株))

また各製造工程において使用する器具類は事前にバリデーションを行った。更に、CPC 内での製造に係る作業担当者は、製造管理責任者により作業者として認定された者が行った。作業者の認定は規程の教育訓練を受け、無菌培地充填試験を行い、合格した者に対して行われた。

2) 判定

最終的な判定は、原材料の受け入れ試験をはじめ、以下の臍帯血、中間体、製品の試験検査及び環境衛生試験結果をもとに作業工程の検証を行った。

増幅用臍帯血品質規格、CD34 陽性画分の品質規格、培養 7 日目培養液の品質規格及び増幅 CD34 陽性細胞の製品企画はそれぞれ Table 1-4 の通りであり、各品質管理試験は標準作業手順書に従って実施された。

増幅用臍帯血の品質規格は、製造で必要となる最低限の原料を担保する目的で設定されている。解凍後の臍帯血を対象に受け入れ試験を実施し、製造に使用する CD34 陽性細胞数を最終確認した。また、感染症伝播防止の観点から、培養 7 日目培養液の工程内規格として無菌試験を設定した。また、CD34 陽性画分の品質規格は、安定な培養に必要な最低限の細胞数として設定した。

製品規格として、細胞生存率、無菌試験、エンドトキシン否定試験、ウイルス否定試験、マイコプラズマ否定試験を設定した。細胞生存率については、*ex vivo* 増幅 CD34 陽性細胞の 8 時間後の安定性試験結果が 80~90%の範囲内であったことから、70%以上を製品規格として設定した。無菌試験、エンドトキシン否定試験、ウイルス否定試験、マイコプラズマ否定試験は、感染症伝播防止の観点から実施し、また無菌試験は被験者への投与前に結果を得ることが困難なため、無菌性確認の補助的な試験としてエンドトキシン否定試験を加えた。May-Giemsa 染色では原材料となる臍帯血に異型細胞がモノクローナルに増殖していないことを確認した。なお、

参考試験として CD34 陽性細胞数の測定を実施するが、製品の効能、効果を示す指標として実施するものであり、規格値を設定しなかった。

3) 結果

(1) 環境モニタリング

製造バリデーションにおける操作、環境モニタリング及びサンプルの運搬は標準作業手順書に従って行われ、記録書への記載及び署名も適格であった。

測定対象となる微粒子の最小粒子径は $0.5\ \mu\text{m}$ とし、空気吸引量は $1\ \text{ft}^3 / \text{min}$ ($1\ \text{min}$) とした。

操作室及び安全キャビネット内の浮遊微粒子数は作業前後でほぼ同様か減少しており、操作環境が一定に保たれていることが確認された。また、操作室及び安全キャビネット内の浮遊微粒子数はいずれも基準値である $5,000\ \text{個} / \text{ft}^3$ 、 $50\ \text{個} / \text{ft}^3$ を大きく下回っていた。このことから空調管理は正常に行われており、清浄度が保たれた作業環境が維持できていることが確認された。

また、その他の環境モニタリング試験である浮遊菌、落下菌検査において菌の発育は認められなかった。付着菌検査において一部菌の発育が認められたが、EU の class100 における基準値 ($3\ \text{CFU} / 25\ \text{cm}^2$) を下回っており、清浄な環境が保たれていることが確認できた。

これらの環境モニタリングから、製造バリデーションの製造作業工程において清浄な環境が保たれていることが確認された。

(2) CD 34 陽性細胞数、細胞形態観察

臍帯血の品質規格である解凍後 CD 34 陽性細胞数は 6.0×10^5 個以上であり、全ての製造試験において規格値を満たしていた。また、Clini MACS での細胞分離後の CD 34 陽性細胞数の規格値は 1.2×10^5 個以上であり、全ての製造試験で規格値を満たしていた。

解凍後臍帯血の細胞形態を May-Giemsa 染色により観察した。分類の結果、用いた臍帯血は主として成熟好中球 (分節核球) 及びリンパ球から構成され、異型細胞のモノクローナルな増殖は認められなかった。

(3) 無菌試験 (中間品) (三菱化学ビーシーエル社への外部委託)

中間品として培養 7 日目の培養液を採取し、無菌試験を実施した。全ての製造試験において菌の発育は認められず、製造試験の無菌性が確認された。

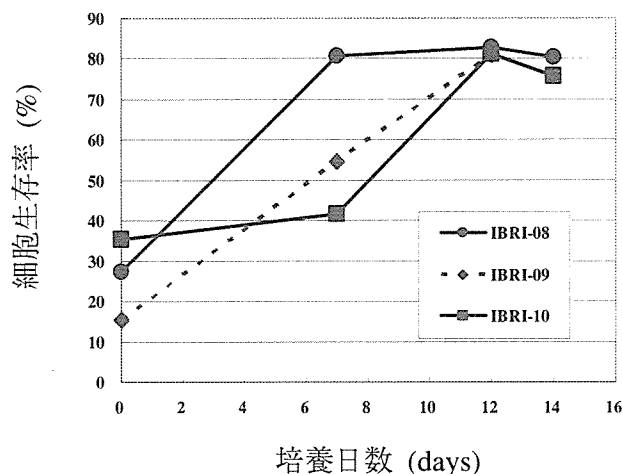
(4) 細胞生存率

Fig. 2 に培養細胞の生存率の推移を示した。培養開始時には生存率はいずれの製造試験も 40.0% 以下であったが、その後の拡張培養とともに上昇し、最終製品において IBRI-08 では 80.4%、IBRI-09 では 81.0%、IBRI-10 では 75.8% を示した。細胞生存率の規格値は 70% 以上であり全ての製造試験で上回っていた。

(5) 無菌試験 (最終製品) (三菱化学ビーシーエル社への外部委託)

最終製品における無菌性試験を実施した。全ての製造試験で菌の発育は認められず、最終製品の無菌性が確認された。

Fig. 2 培養細胞生存率の推移



(6) エンドトキシン否定試験 (三菱化学ビーシーエル社への外部委託)

エンドトキシン否定試験においては IBRI-08、IBRI-10 で検出限界未滿、IBRI-09 で 0.002 EU / mL であった (Table 9)。全ての検査は成立判定で適合しており、エンドトキシン否定試験として成立することを確認した。エンドトキシンの製品規格は 0.12 EU / mL 未滿であり、全ての製造試験において規格値を満たしていた。

(7) ウイルス否定試験 (三菱化学ビーシーエル社への外部委託)

各製造試験においてウイルス (PCR 法) 否定試験を行った。ウイルス試験は RNA ウイルス、DNA ウイルス及びヘルペスウイルスについて検査を行い、培養細胞及びその上清による PCR 反応阻害は認められなかった。

全ての製造試験サンプルにおいて HBV、HCV、HIV、HTLV、パルボウイルス B19、CMV は認められず、製品規格を満たしていた。

(8) マイコプラズマ否定試験 (三菱化学

ビーシーエル社への外部委託)

培養細胞及びその上清についてマイコプラズマ否定試験を行った。全ての製造試験において培養細胞、上清にマイコプラズマは検出せず、製品規格を満たしていた。

4) 考察

品質規格に基づいて臍帯血、中間体、製品の試験検査及び環境衛生試験結果から製造バリデーションの適合性判定を行った。その結果、操作は標準作業手順書に基づいて行われており、全ての規格試験において規格値を満たしたことが確認された。これより今回実施した計 3 回の製造バリデーションはいずれも得られた結果が目的とした通りであり、科学的に正しいものであることが証明された。さらに今後も *ex vivo* 増幅臍帯血の品質を担保するために、定期的な製造バリデーション試験を行う必要があると考えられた。

3. 「無血清培地の受け入れ試験」における検討

本製造に使用する原材料に関しては、受け入れの際に各々規定を設け、受け入れ試験を実施している。特に無血清培地に関しては、ロットごとの培地受け入れ試験 (ロットチェック)、及び使用するすべてのボトルにおける培地受け入れ試験 (ボトルチェック) を実施し、可能な限り安定した製造を行うための体制をとっている。

1) 実施方法

以下に我々が実施している無血清培地の受け入れ試験の概略を述べる。

<培地受け入れ試験 (ロットチェック)>

(1) 細胞調整方法

AutoMACSシステムを用いて臍帯血中のCD34陽性細胞を分離、液体窒素中に凍結保管する。培養直前に解凍し、その純度を確認する。

(2) 細胞培養方法

対象となるQBSF-60培地にサイトカインを添加し、SCF, FL, FP6を終濃度で各々100ng/ml、TPOを10ng/mlになるよう調整する。(1)で調整したCD34陽性細胞を各培地に浮遊させ、24wellプレートに細胞濃度 1×10^4 cells/1ml/wellで播種、37°C, 5%CO₂, 湿度95%で培養する。各培地triplicate、またコントロールとしてサイトカイン添加10%FBS MEM- α 培地での培養を行う。培養4日目に培地を添加、2倍希釈し培養を継続する。

(3) 細胞数測定方法

7日間培養後、細胞を回収し、トリパンブルー染色法にて各wellの生細胞数、死細胞数を測定する。細胞密度、生存率を算出し、各細胞、培地3wellの平均値から生細胞数増幅率を算出する。

(4) 判定規格値

細胞数増幅率 87倍以上

<培地受け入れ試験 (ボトルチェック)>

(1) Daudi細胞の継代培養方法

凍結保管してあるDaudi細胞を解凍後、10%FCS 添加 RPMI1640 培地 (SIGMA R0883)にて37°C, 5% CO₂, 湿度95%で培養する。2~ 10×10^5 cells/mlの範囲内で培養するために2~3日ごとの継代作業を行う。

(2) 細胞増殖判定法 (ATPアッセイ法)

継代培養4~16日間、直前の継代から2日培養後のDaudi細胞を用い、評価するQBSF-60培地に 1×10^3 cells/100 μ lの細胞密度で暴露する。96 well白色プレートにて37°C, 5% CO₂, 湿度95%で48時間培養後、CellTiter-Gro Luminescent Cell Viability Assay Kit (Promega G7571/2/3)による細胞増殖測定 (ATPアッセイ法)を行う。本システムは代謝活性のある細胞に由来するATPを定量することで培養中の生細胞数を決定するシステムである。尚測定は各培地triplicateにて、またnegative controlとして培地のみのwellを設定して行う。

室温と平衡にしたプレートにATP標準濃度溶液(0, 1.0, 10, 100nM, 1.0 μ M)を設定し、添付文書に従い各wellに試薬を100 μ l/well添加、10分経過後にルミノメータLmax Pro (Molecular Devices)での測定を行う。

(3) 測定結果の解析

解析は付属のソフトSOFTmax Pro (Molecular Devices)にて行い、ATP標準溶液の蛍光強度をもとに検量線を作成し、各サンプルの蛍光強度よりATP値を算出する。

(4) 判定規格値

ATP値 154.4nM 以上

2) 事例

2006年3月27日 QBSF-60 培地 10本を、阪急交通社を通じ伊藤忠ケミカルフロンティア社より搬入、手順（手順書 B-F-112「QBSF-60 培地管理手順」）に従い目視による「受け入れ時製品確認」が行われた。製品は発注時の型番 Cat. No. 160-204-101 と同一のものであり、輸送に伴う培地の泡立ちは認めるものの明らかな色調変化等認めず、また未開封の状態にて4℃にて維持搬送されていたことから、いずれも合格品として搬入された。製造管理責任者より各々に対し管理番号 QB4-9~QB4-18 が付与され、CPC 内の冷蔵保管庫（管理番号 CPC-50-01）において4℃保管された。尚今回入荷した培地の lot No. は QB4-9~QB4-18 いずれも 2005年11月29日入荷分 QB4-1~QB4-8 と同様の No.714093 であり、製造元への試験成績書の請求、並びにロット試験（2005年12月19日に実施、合格を確認）は実施されなかった。

2006年6月7日製造管理責任者より品質管理責任者にQB4-9~QB4-13のボトル試験依頼があり、2006年6月8日手順書 B-F-208「培地試験」に従いCPCにおける培地サンプリング、培地搬出が実施され、2006年6月7日よりB-F-418「培地受け入れ試験（ボトルチェック）」に従いボトル試験が実施された。

3) 結果

(1) 培地受け入れ試験（ボトルチェック）

(1)-1 外観観察

外観観察を行ったところ色調変化は認められなかったが、QB4-10においてボトル底部に白色沈殿物が認められた。この沈殿物は攪拌によっても消失しなかった。また、QB4-15以外の他のボトルにおいても、微量ではあるが同様の沈殿物が確認された。

白色沈殿物が確認された QB4-10 をサンプリングし、96Well プレートに播種し、顕微鏡下での確認を行った。弱拡大では全体に線状、一部それらが屈曲したような異物が観察された。強拡大では、金属様の色調を呈した針状のものや、粒球状の異物が観察され、時にこれらが集簇している像が観察された。これらの異物に運動性はなく、静置により沈降した。また、QB4-4 の他、外観上微量の沈殿物が確認されたボトルではこのような異物は検鏡では確認されなかった。

QB4-4, QB4-10 における4℃保管時、並びに37℃加温時のpHについてpHメータ（MP225, METTLER TOLEDO）を用い測定した結果、QB4-4: pH7.11 (4℃), pH7.02 (37℃)、QB4-10: pH7.06 (4℃), pH6.91 (37℃)であり、いずれも製品の試験成績書に記載されている pH7.0±0.2 の範囲内であった。

(1)-2 Daudi細胞の継代培養

継代培養3日目のDaudi細胞（生存率

86.4%)をQB4-4及びQB4-10の混合培地に5, 24, 48時間暴露し、各々の生存率をトリパンブルー染色法により算出した。培養は96 wellプレートにて 1×10^4 /well/100 μ lの細胞密度、37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 湿度95%の条件下で行った。

QB4-10 のみの培地 QB4-10 %100 に暴露した場合、5 時間後には4.4%まで生存率が低下しており、以後回復することはなかった。またQB4-4 とQB4-10 を1:1の割合で混合した培地 QB4-10 %50 に暴露した場合、5 時間後 34.6%、24 時間後には11.8%、48 時間後には2.1%と漸減した。一方QB4-4 とQB4-10 を9:1の割合で混合した培地 QB4-10 %10、及びQB4-4 のみの培地 QB4-10 %0 に暴露した場合にはほとんど生存率に変化を認めなかったことから、QB4-10 の混合比率依存的に生存率が低下すると考えられた。

(1)-3 細胞増殖判定法 (ATP アッセイ法)

QB4-10, -14, -15, -17, 及び-18 を対象に1) 実施方法に記した方法 (ATP アッセイ法)による測定を行った。

QB4-10, -18 を除く3本はいずれもATP値 154.4 nM 以上であり規格を満たしていた。QB4-10はATP量が3.3 nMであり、細胞生存率が0.0%であった。また、QB4-18はATP値 103.4と規格値以下であり、48 時間暴露後の細胞生存率が79.1%と他のボトルと比較して明かに低下していた。

以上Daudi細胞の継代培養方法、細胞増殖判定法の結果から、2006年3月27日に搬

入したQBSF-60培地 (Lot No. 714093)において、10本中の少なくとも2本は、実製造での使用は不可能であると判断された。また不合格となったQB4-10及び-18は、強弱に差は認められるもののいずれも細胞毒性を有していることが示唆された。

(2)培地受け入れ試験 (ロットチェック)

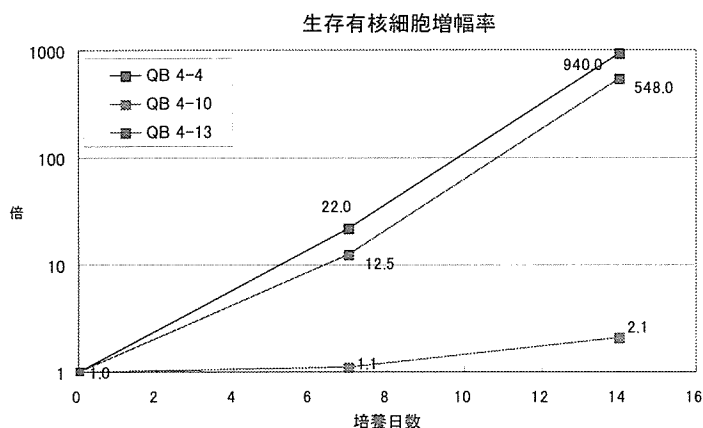
(2)-1 臍帯血 CD 34 陽性細胞の継代培養

今回の検討ではコントロールを10%FBS MEM- α 培地の代わりにQB4-4とし、さらに培養期間を7日目から実製造と同じ12日間に延長して検討を行った。期間延長に際しては、実製造と同様に7日目、10日目に2倍希釈を行った。

今回培養に用いたCD 34陽性細胞の純度は91.0%であった。培養7日目におけるQB4-4, -10, -13いずれの培地での細胞増殖率は、各々22.0倍、1.1倍、12.5倍と規格値87倍以下であり、ロットチェック不合格となった (Fig. 3)。QB4-4, -13においては培養期間を延長することにより、コントロールと同程度増殖することが確認されたが、QB4-10においては増殖が全く得られなかった。またQB4-4, -13においては培養期間中90%前後の細胞生存率を維持していたのに対し、QB4-10においては、培養7日目以降生細胞を認めなかった。

以上の結果から、QB4-10は臍帯血CD34陽性細胞に対しても細胞毒性を有していることが確認された。

Fig. 3 生存有核細胞増殖率



さらにQB4-4 (2005年11月29日搬入)、4-10、-13、及び-17 (2003年3月27日搬入)の lot No.は2005年12月19日に実施したロット試験により、合格が確認されたNo.714093であったが、今回再度行ったロット試験ではその搬入日にかかわらず、いずれのボトルも不合格となった。No.714093の使用期限は2007年5月までであるが、約6ヶ月の間に培地が劣化した可能性も否定できず、今後は我々が確立したロットチェック方法だけでなく、製造元であるQuality Biological社がロット毎に実施しているCD34陽性細胞を用いた増殖確認試験と同様の方法でも検討する必要があると考えられた。

(2)-2 無菌試験 (三菱化学ビーシーエル社への外部委託)

検鏡にて確認された異物が、細菌または真菌由来の菌体成分である可能性も否定できないことから、2006年6月27日にQB4-4、QB4-10(ボトル静置時サンプリング)、2006年6月29日にQB4-10(ボトル攪拌後サンプリング)、QB4-14、-15、-17、-18よりサンプリングを行い、無菌試験、

マイコプラズマ試験、エンドトキシン定量、及び β -D-グルカン定量を三菱化学ビーシーエル社に依頼した。CPCにおける培地サンプリング及び培地搬出は、手順書B-F-208「培地試験」に従い実施した。

QB4-10の他いずれのボトルからも細菌及び真菌は検出されず、培地は無菌状態であり、ATPアッセイ結果と併せ、培地に混入していた異物は無機質な物質であると考えられた。

4) 考察

今回、受け入れ試験(ボトルチェック、ロットチェック)により培養に不適格な培地の除外が行われ、本法は無血清培地の品質チェックを行う上で有用な方法であることが確認された。

今後輸送中の温度管理、沈殿物の成分解析、及び培地劣化の要因についての検討を行い、より安全な原材料の受け入れ体制に活用していく必要があると考えられた。

C. まとめと今後の展望

GMPに準拠した細胞プロセッシングを行う上で、安全かつ可能な限り均一な製品を製造することは極めて重要な課題である。今回、我々が開発した閉鎖系無血清培養方法、品質管理方法、環境モニタリング、及び整備した文書体系の運用の適正を検証する製造バリデーションを行うと共に、製造に使用する原材料の品質管理試験についての検討を行った。

製造バリデーションの結果より、我々の確立した全作業工程が GMP に準拠した細胞プロセッシング法として適切であることが証明された。また「無血清培地の受け入れ試験」では、不適格培地の除外が確実に行われたことから、その有用性が示された。

これらの検証をうけ、今後は臨床研究を推進させると同時に、我々が開発した細胞プロセッシング法を普及、発展させるための研究活動を継続する予定である。

D. 健康危険情報

特筆すべき事項なし

E. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

鹿村真之, 伊藤仁也, 清水則夫

「免疫不全マウスを用いた活性化 CD4-DLI 後の経時的 T 細胞の性質と動態に関する検討」第 29 回日本造血細胞移植学会総会 (2006, 2 16, 福岡)

H. 特許

特筆すべき事項なし

分担研究報告書

1. GMP および GTP に準拠した培養法の確立

1-2 探索的臨床試験に求められる GMP 準拠細胞プロセッシング

分担研究者：前川 平
（京都大学輸血細胞治療部 教授）

研究要旨

ヒト細胞をもちいる新規治療法の開発は、通常の錠剤などとは異なった側面を持っており、そのために治療法としての開発過程において試行錯誤が続き、申請手続きにも長い期間が消費されているのがわが国の現状である。平成 18 年 9 月「ヒト幹細胞を用いた臨床研究に関する指針」が施行され、これらの調整機関は治験薬 GMP レベルの水準にあることが要求されている。治験薬 GMP の設備構造などハードの基準は、医薬品 GMP に比べ一部の施設については要求事項が緩和されている。これは医薬品と異なり、治験薬の製造においては、製造ロット数が少ないことや、治験の進行に伴い製造施設や設備が異なってゆくことに対する配慮がなされているからである。すなわち、治験薬 GMP では、後述する stepwise approach がハード面において考慮されている。我々は、細胞プロセッシングに特化した GMP で、かつ stepwise approach の考え方を取り入れ、ハードのみならずソフトも含めたコンセプトを institutional GMP (iGMP) として提唱してきた。

一方、2006 年 1 月 FDA は探索的 IND 臨床試験に関するガイドラインを最終報告すると同時に、早期フェーズ I（探索的臨床試験）でもちいる IND の GMP 製造に関するガイドライン草案を公表した。本研究では、この早期フェーズ I の GMP 製造ガイドラインの邦訳を試みた。その結果、本ガイドラインはわれわれが従来から提唱してきた開発段階に応じた GMP、いわゆる iGMP の必要性和相通ずるものと考えられることが明らかとなった。

A. 研究目的

細胞治療とは、輸血、造血幹細胞移植、細胞免疫療法などのヒト細胞を輸注、移植することにより行う治療法の総称である。再生治療や遺伝子治療の多くも、幹細胞を増幅させたり、分化させ機能を強化したりといった加工を受けた細胞を疾病の治療に用いようとするものである。この意味で、多くの再生治療や遺伝子治療も細胞治療として包括される。こういった細胞治療に関する探索的臨床試験研究（トランスレーショナル・リサーチ、TR）の多くは、大学などで実施されることが多く、当然、科学のおよび倫理的に高い水準と透明性、そして信頼性が要求される。科学性は Evidence-Based Medicine で求められるものであり、倫理性は GCP (Good Clinical Practice：医薬品の臨床試験の実施基準)、および ICH (日米欧医薬品規制ハーモナイゼーション国際会議)で担保される。信頼性はこれらを遵守することで保証される。

それでは、新薬の治験にもちいる薬（治験薬）は、いったいどのようにして製造されているのであろうか。市販され日常の医療に用いられている医薬品には医薬品 GMP (Good Manufacturing Practice：医薬品の製造管理および品質管理に関する基準)が、治験薬には治験薬 GMP が適応される。現在のわが国の規制の枠組みにおいて、薬事法の範疇外にあるトランスレーショナルリサーチ (Translational Research: TR) や医師主導型の臨床試験研究では「試験薬」としてあたらしい薬物

が用いられることになるが、これらの薬物の品質管理は医師の責任とされている。実験的色彩のつよい TR であるからこそ、治験薬と同等の品質が保証された薬物での試験を望むのは、先端医療の被験者である患者の立場からすれば当然の権利である（被験者保護の原則）。この試験薬を細胞と読み替えれば、臨床試験にもちいる細胞の加工（細胞プロセッシング）はどのようにして行われるべきか容易に推測されよう。

本研究は、わが国における細胞治療、再生治療などのヒト細胞を治療にもちいる先端医療開発を進めるために整備しなければならないインフラストラクチャーを、わが国でどのように構築すべきかについて、欧米での取り組みも参考にしながら、その道筋を示すことを目的とした。

B. 研究方法

分担研究者が、平成8年より取り組んできた細胞治療、遺伝子治療、再生治療などを開発する探索的臨床試験研究（トランスレーショナル・リサーチ）のインフラストラクチャーの構築に関する多くの経験をもとに、産官学の研究者やエンジニア、さらに海外の研究者との議論をまとめるかたちで研究を遂行した。また、細胞プロセッシングセンターである京都大学医学部附属病院輸血細胞治療部に隣接して設置された分子細胞治療センター (Center for Cell and Molecular Therapy)での経験をもとに、京都大学探索医療センター、大阪大学未来医療センター、および

神戸先端医療センターとの共同作業で、米国 FDA の早期フェーズ I (探索的臨床試験) でもちいる IND の GMP 製造に関するガイドライン草案の邦訳を試みた。

C. 研究結果

1. 細胞プロセッシングに必要な GMP とはどのようなものか

細胞治療や再生治療などヒト細胞を体外で分離培養操作し治療に用いる場合、安全性や臨床試験の信頼性を担保するため、その品質をどのようにして確保すればよいのであろうか。

平成 18 年 9 月 1 日に「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」が施行され、細胞調製機関は医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令(平成 9 年厚生省令第 28 号)第 17 条第 1 項に求められる水準に達していることが要求されている。この症例の該当箇所を見ると、「第十七条 治験依頼者は、治験薬の品質の確保のために必要な構造設備を備え、かつ、適切な製造管理及び品質管理の方法が採られている製造所において製造された治験薬を実施医療機関に交付しなければならない」とされているが、これは錠剤などの通常の治験薬を対象にした治験薬 GMP である。錠剤や血漿分画製剤と、治療に用いようとする細胞では、そのプロセッシング方法は大きく異なる。たとえば、GMP ではバリデーションと呼ばれる項目がきわめて重要であるが、その中に製造手順が意図した通りに実施可能か検証する Performance Qualification(PQ)がある。これ

に従えば、脾臓移植の場合ドナーから提供された脾臓組織を用いて練習することが義務づけられる訳であるが、倫理上許されないのは自明である。

それでは、医薬品 GMP と治験薬 GMP の相違点は何処にあるのだろうか。「治験薬 GMP 運用通知 (平成 9 年 5 月 20 日付薬監第 70 号)」ではその目的を 3 つあげている。治験薬の品質の均一性の保証、治験薬と市販後製品の同一性の保証、そして不良な治験薬から被験者を保護すること、である。治験薬 GMP の設備構造などハードの基準は、医薬品 GMP に比べ一部の施設については要求事項が緩和されている。これは医薬品と異なり、治験薬の製造においては、製造ロット数が少ないことや、治験の進行に伴い製造施設や設備が異なってゆくことに対する配慮がなされているからである。すなわち、治験薬 GMP では、後述する stepwise approach がハード面において考慮されている。我々は、細胞プロセッシングに特化した GMP で、かつ stepwise approach の考え方を取り入れ、ハードのみならずソフトも含めたコンセプトを institutional GMP (iGMP)として提唱してきた¹。iGMP と治験薬 GMP、医薬品 GMP の差異を表 1 にまとめたが、基本的に治験薬 GMP を踏襲

¹ Maekawa T.: Current good manufacturing practices (cGMP) controlled cell processing for the development of novel advanced cell and gene therapy. Education program book pp.43-48, 2003. The 65th Annual meeting of Japanese Society of Hematology and The 45th Annual meeting of Japanese Society of Clinical Hematology.

前川 平:先端医療開発に必要な GMP 準拠細胞プロセッシング- Institutional GMP 構築の必要性- . 臨床血液、45: 32-38, 2004.

している。すなわち、iGMP は、細胞プロセシングの特殊性、TR が主に行われる大学などの事情、TR の開発段階に伴う stepwise approach の必要性を考慮したものであるが、治験薬 GMP の細胞プロセシング版と考えている (図 1)。

2. 米国のシステム

米国における新薬や新規治療法を開発しようとする場合、わが国で言う「治験」であろうと、「臨床試験 (TR)」であろうと、すべからく IND (Investigational New Drug) として FDA に登録し、審査を受け承認を得ることが必要である。すなわち、米国ではどんな臨床試験や治験であっても FDA が把握して指導を行っており、この点「治験」として申請されたもの以外は、いわゆる「院内製剤」として特段把握もされず、また安全性も検証されず、薬事法の守備範囲外であるとして、医師の自主規制に任されている (悪く言えば、野放しになっている) わが国とは大きく事情が異なっている。

細胞治療、再生治療に関して米国 FDA は、ヒト細胞を用いた治療法の特殊性から、その作製(manipulation)において GMP と GTP(Good Tissue Practice)を遵守するように指導してきた。しかし、米国においてもほとんどの細胞治療や再生治療、また多くの TR は大学やベンチャー企業で行われており、製薬企業と同列に規制していたのでは開発のスピードが上がらないことが指摘されるなかで、FDA は柔軟な指導を行ってきた。今まで、この柔軟

な対応方針を文書にしたものはなかったが、2006 年 1 月 FDA は、低分子化合物、生物製剤などを問わず、このような探索的 IND 臨床試験を実施する際のガイドラインを最終決定すると同時に、早期フェーズ I で用いる IND の GMP 製造に関するガイドライン草案を公表した²。GMP を柔軟に解釈するための指針である。本草案で注目すべき点を表 2 にあげる。この考え方は、われわれが従来から提唱してきた開発段階に応じた GMP、すなわち iGMP の概念と相通じるものであり、アカデミアと企業とを問わず適応される。

D. 結論

わが国の現状は、遺伝子治療のガイドラインなどで当局への申請が義務づけられている治療法の開発以外は、各大学や研究所の倫理委員会で審査されるのみである。承認申請を目的としない臨床試験は薬事法の管轄外である。上述したように、「院内製剤」を用いた臨床試験で良好な結果が得られたとしても、承認申請の予定がなく、登録もされていない臨床試験の場合、総合機構で審査されることはなく、保険収載は不可能である。したがって、大学などで行われている臨床試験の成績をもとに、いざ承認申請を目的とした「治験」の段階に入ろうとしても、もう一度最初に戻って、安全性が検証さ

² Guidance for Industry, Investigators, and Reviewers- Exploratory IND Studies. (<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>)/ Guidance for Industry, INDs - Approaches to Complying with CGMP during Phase I (<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>)

れ、品質の確保された GMP グレードの治験薬を用いて前臨床試験からやり直さなければならぬ (図 2)。

わが国における「治験」は新薬承認申請のための資料収集を目的としているのに対し、米国の臨床試験は、開発と言うことをまず念頭に置き、ヒトに対して効果も安全性も未確認であるものを投与する行為を管理し、あたらしい治療法の開発を支援すると言う姿勢が大きく異なる。わが国では、治験の他に、「院内製剤」をもちいた「臨床研究」や「臨床試験」、「先進医療」、それに現在では先進医療に一本化された「高度先進医療」など、きわめて複雑なシステムが存在することに加えて、「薬事法」がもともと医薬品を管理するためにあり、あたらしい治療薬や治療方法の開発を目的として作られたものではないことが新規治療法開発の隘路となっている。さらに、先進医療は既承認の薬物しか用いてはならないとしており、未承認の薬物を使用した治療法は先進医療としては認められないという矛盾を抱えている。この出口のない迷路のような規制体系を整理し、シンプルで効率的なシステムを構築することが必要である。幸い、わが国には「医師主導型の治験」と言うトラックがあり、これをわが国独自の IND システムとして育て上げてゆくことが喫緊の課題である。

E. 健康危険情報

特記事項なし

F. 研究発表

1) 論文発表

1. Kimura, S., Maekawa, T.: Stem cell transplantation for Ph+ leukemias in the imatinib and post-imatinib eras. *In*, “Bone Marrow Transplantation: New Research.”(ed. By Davidson DF), Nova Science Publishers, Inc. review, pp.1-38, 2006.
2. Naito, H., Kimura, S., Nakaya, Y., Naruoka, H., Kimura, S., Ito, S., Wakayama, T., Maekawa, T. and Hirabayashi, K.: *In vivo* inhibitory effect of NS-187, a dual Bcr-Abl/Lyn tyrosine kinase inhibitor, on the proliferation of leukemic cells harbouring Abl kinase domain mutations. *Leuk Res*, 30(11):1443-1446, 2006.
3. Matsumoto, S., Okitsu, T., Iwanaga, Y., Noguchi, H., Nagata, H., Yonekawa, Y., Yamada, Y., Fukuda, K., Shibata, T., Kasai, Y., Maekawa, T., Wada, H., Nakamura, T., Tanaka, K.: Successful islet transplantation from non-heart-beating donor pancreata using modified Ricordi islet isolation method. *Transplantation*, 82(4):460-465, 2006.
4. Kimura, S., Ashihara, E., Maekawa, T.: New tyrosine kinase inhibitors in the treatment of chronic myeloid leukemia (review). *Curr Pharma. Biotech*, 7(5): 371-379, 2006.

5. Maekawa, T.: How to comply with cGMP during early phase of translational cell therapy at academia. *Clin Eval* 33(3):569-578, 2006.
6. Kimura, S., Niwa, T., Hirabayashi, K., Maekawa, T.: Development of NS-187, a potent and selective dual Bcr-Abl/Lyn tyrosine kinase inhibitor. *Cancer Chemo Pharmacol*, 58 Suppl 7:55-61, 2006.
7. Sato, K., Nogawa, M., Yuasa, T., Kimura, S., Segawa, H., Yokota, A., Maekawa, T.: A third generation bisphosphonate, minodronic acid (YM529), successfully prevented the growth of bladder cancer *in vitro* and *in vivo*. *Brit J Cancer*, 95 (10):1354-1361, 2006.
8. Yokota, A., Kimura, S., Masuda, S., Ashihara, E., Kuroda, J., Sato, K., Kamitsuji, Y., Kawata, E., Deguchi, Y., Urasaki, Y., Terui, Y., Ruthardt, M., Ueda, T., Hatake, K., Inui, K., and Maekawa, T.: INNO-406, a novel BCR-ABL/Lyn dual tyrosine kinase inhibitor, suppresses the growth of Ph⁺ leukemia cells in the central nervous system and cyclosporine A augments its *in vivo* activity. *Blood*, 109(1):306-314, 2007.
9. Horie, N., Murata, H., Kimura, S., Takeshita, H., Sakabe, T., Matsui, T., Maekawa, T., Kubo, T., Fushiki, S. : Combined effects of a third-generation bisphosphonate, zoledronic acid with other anti-cancer agents against osteosarcoma. *Brit J Cancer*, 96(2):255-261, 2007.
10. Horie, N., Murata, H., Nishigaki, T., Segawa, H., Yuasa, T., Kimura, S., Maekawa, T., Fushiki, S., Kubo, T. : The third-generation bisphosphonates inhibit tumor proliferation and induce apoptosis in murine osteosarcoma *in vitro*. (*Cancer Lett*, in press, 2006).
11. Ashihara, E., Tsuji, H., Sakashita, Y., Haga, H., Yurugi, K., Kimura, S., Egawa, H., Manabe, T., Uemoto, S., Maekawa, T.: Anti-donor antibody in patients receiving ABO-identical and HLA-mismatched living donor liver transplants: effect on survival (*Transplantation*, in press, 2006)
12. Kageyama, S., Iwaki, H., Inoue, H., Isono, T., Yuasa, T., Nogawa, M., Maekawa, T., Ueda, M., Kajita, Y., Ogawa, O., Toguchida, J., Yoshiki, T.: A novel tumor-related protein, C7orf24, identified by proteome differential display of bladder urothelial carcinoma. (*Proteomics*, in press, 2006)
13. Yurugi, K., Kimura, S., Ashihara, E., Tsuji, H., Kawata, E., Kamitsuji, Y., Hishida, R., Takegawa, R, Egawa, H., Maekawa, T.: Rapid and accurate measurement of anti-A/B IgG antibody in ABO-unmatched living donor liver transplantation by surface plasmon resonance. (*Transfusion Med*, in press, 2006).
14. Uchida, R., Ashihara, E., Sato, K.,

- Kimura, S., Kawata, E., Taniguchi, K., Okamoto, M., Shimura, K., Kiyono, Y., Shimazaki, C., Taniwaki, M., Maekawa, T.: $\gamma\delta$ T cells kill myeloma cells by sensing mevalonate metabolites and ICAM-1 molecules on cell surface. (Biochem Biophys Res Commun, in press, 2007)
15. 芦原英司、前川 平：結腸がん細胞に対する $V\gamma 9V\delta 2T$ 細胞の腫瘍細胞認識機構. 分子細胞治療、5(2): 98-100, 2006.
 16. 湯浅 健、野河正輝、木村晋也、前川 平：RNAi 創薬 — 膀胱癌. 遺伝子医学 MOOK (中村義一編)、メディカル ドゥ、東京、pp.100-105, 2006.
 17. 芦原英司、木村晋也、前川 平：siRNA のデリバリーシステム. 最新医学、61(6):1102-1109, 2006.
 18. 笠井泰成：GMP/GLP/GCP. 分子細胞治療、5(4): 374-375, 2006.
 19. 黒田純也、木村晋也、芦原英司、前川 平：ビスフォスフォネート製剤の抗腫瘍作用. 感染・炎症・免疫、36(2):152-155, 2006.
 20. 河田英里、木村晋也、芦原英司、前川 平：慢性骨髄性白血病に対する分子標的治療の現状と今後の展望. 血液フロンティア、16(9):1357-1370, 2006.
 21. 西川昭子、村山敏典、笠井泰成、前川 平、福島雅典：産業界、試験責任医師、および審査官のためのガイダンス—探索的 IND 試験— (邦訳). 臨床評価、33(3): 583-602, 2006.
 22. 江副幸子、村山敏典、西川昭子、笠井泰成、川真田伸、中村憲正、福島雅典、前川 平：産業界のためのガイダンス. INDs — 第 I 相試験における CGMP に準拠したアプローチ (邦訳). 臨床評価、33(3): 603-624, 2006.
 23. 前川 平：探索的臨床試験に求められる GMP 基準とは. 臨床評価、33(3): 625-627, 2006.
 24. 前川 平：アカデミア発 CGMP への挑戦・1—CPC 構造設備基準と探索臨床用 CGMP の普及に向けて. 臨床評価、33(3): 629-640, 2006.
 25. 芦原英司、前川 平：Polo-like kinase-1 を標的とした RNA 干渉による新しいがん分子標的治療法. がん分子標的治療、4(3):193-201, 2006.
 26. 万木紀美子、木村晋也、芦原英司、前川 平：輸血に伴うトラブルと対処法. 臨床研修プラクティス、3(12):53-65, 2006.
 27. 前川 平：「日本における抗がん剤の臨床開発」欧米からの周回遅れを挽回するために—学の見地から—：イマチニブ耐性 CML に対する新規 Bcr-Abl/Lyn チロシンキナーゼ阻害剤の開発を例にあげて. 第一回抗悪性腫瘍薬開発フォーラム、癌と化学療法、34(2):301-304, 2007.
 - 2) 学会発表 (細胞プロセッシング関係のみ)
 28. Maekawa, T.: How to comply with cGMP during early phase of

- translational cell therapy at academia.
- 1st Franco-Japanese Translational Research Initiative (Kyoto, Japan) (24th February, 2006)
29. Maekawa, T. : Intelligently controlled cell processing is mandatory for the development of novel advanced cell and gene therapy (Invited lecture). 2006 Yonsei International Symposium of Laboratory Medicine. (Eun-myeong Auditorium, Severance Hospital, Seoul, Korea) (8th June, 2006)
30. 前川 平 : わが国における細胞治療・再生治療の発展と細胞プロセッシングーその現状と問題点ー. (特別講演) 信州大学医学部附属病院先端医療センター開設記念講演会 平成 18 年 12 月 4 日(2006)
31. 前川 平 : わが国における細胞治療の発展と細胞プロセッシングー京都大学の挑戦ー. (特別講演) 第 1 回愛宕再生医療研究会 (東京、慈恵医大) 平成 19 年 1 月 13 日(2007)

表1：治験薬GMPと医薬品GMPの要求事項の相違点と iGMP の考え方

iGMP	治験薬GMP	医薬品GMP
同右（査察必要）	治験薬の製造に許可は不要	医薬品製造業の許可の要件
同右（iGMPの製造管理責任者は通常プロジェクト毎に異なり、常勤のものが行う）	品質管理者（製造管理者に相当）は薬剤師のほか、大学で薬学、医学、歯学、獣医学、理学又は工学を修め、必要な教育訓練を受けた者等でもよい。	製造管理者は薬剤師に限る。
同右（iGMPの品質管理責任者は人員面から各プロジェクトの兼務が基本になり、常勤のものが行う）	治験薬品質管理者は治験薬の品目ごとに置く。複数の治験薬についての兼務を妨げない。治験薬製造施設に常駐していなくてもよい。	製造管理者は製造所毎に置く。
同右	製造等の記録類の保管期間は、他の治験関係記録と同様の期間（5年間）。	製造等の記録類の保管期間は3年（生物10年、特生30年）
同右	他の試験検査機関等の利用は、治験薬品質管理者の判断に委ねられ、特に制限していない。	他の試験検査機関等の利用制限がある。
同右（細胞治療に特化したバリデーションが必須）	治験薬開発段階の目的に応じたバリデーションを実施すればよい。	多岐にわたるバリデーションが要求されている。
同右	委委託製造：治験薬の製造については許可は不要である。全部委託や再委託を妨げない。原薬等を含め、工程分断を妨げない。	委委託製造：委託側、受託側とも製造業の許可が必要。全部委託や再委託は認めない。原薬等の工程分断の禁止。
同右	製造施設：製造用水供給設備、試験検査設備については備えなくてもよい。	製造所：製造用水供給設備、試験検査設備が必要。
大学、研究所など	製薬企業、治験薬GMP製造受託会社	製薬企業

表2：FDAのphase 1 GMP指針で注目すべき点

1. 臨床開発の段階に応じたINDの品質管理が可能であることを明記したこと。
2. 多種類のプロジェクトを請け負う大学などのCPCの実情を考慮し、同一の施設で多種類のINDを製造することを容認していること。
3. 清掃の管理などを確実にすることで、異なるプロジェクトを同一の部屋で時間を変えれば可能であることを明記していること。
4. 治療用ヒト細胞の製造に関するバリデーションに柔軟性を持たせたこと。
5. 無菌検査結果が判明する前に、出荷しなければならない状況を容認していること。

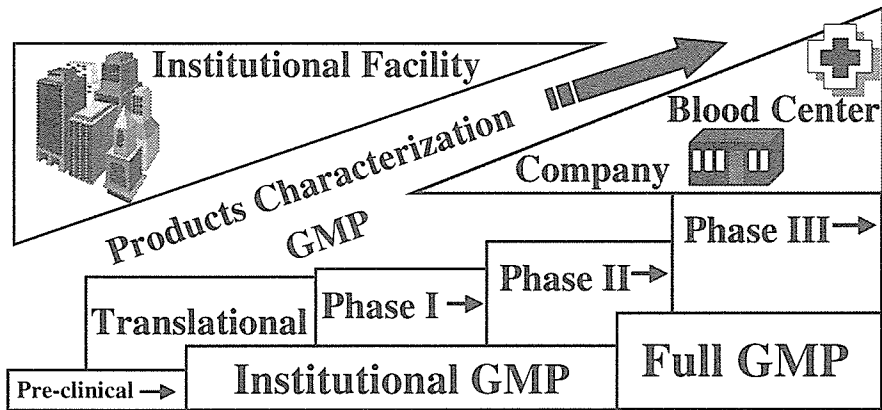
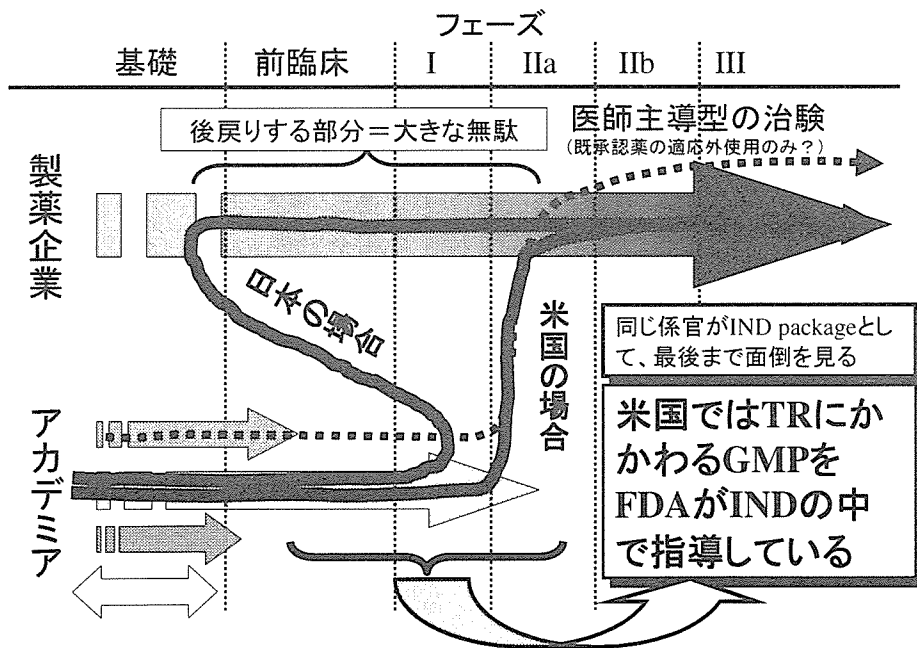


図1: 細胞治療・再生治療のTRや医師主導型治験に特化した GMP (institutional GMP: iGMP) の指導體制の構築(法令化するのではなく、指導體システムをつくる)が必要。iGMPの考え方は、i) 細胞と錠剤などのプロセッシングは異なる、ii) 大学などで少数例を対象に行う薬事法外のTRには、医薬品で要求されるfull GMPは必要ではない、iii) フェーズが進むにつれ、GMPのレベルを上げてゆくべきである(stepwise approach)、iv) 再生治療などのTRや医師主導型治験に用いる細胞も、被験者の安全を守るために品質を担保する必要がある。

図2: 臨床研究と治験システム—日米の比較—



分担研究報告書

2. 品質管理法の確立

2-1 NOG mouse を用いた品質管理

分担研究者：平家 俊男
(京都大学医学研究科発達小児科学助教授)

研究要旨

我々は既に臍帯血 CD34+細胞を我々の開発した免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} 移植し、末梢血、骨髄、脾臓、胸腺等におけるヒト血液細胞の出現を確認した。さらに、従来の免疫不全マウスでは認められないヒト T 細胞をも含むすべての系統への分化を確認した。また、sIL-6R を含むサイトカインの組み合わせを用いて増幅した細胞の幹細胞活性を、免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} を用いて検討した。その結果、ヒト造血細胞の出現、胸腺等においてはヒト T 細胞の出現を確認し、ヒト造血幹細胞活性を評価するモデル系としての妥当性を確認した。

近年、造血細胞のもつ分化可塑性が注目されている。今回我々は、ヒト臍帯血移植 NOD/SCID/ γ_c^{null} マウスを用いて、肝臓におけるヒト細胞の出現、分化、機能について検討を行った。Fas 抗体を用いた劇症肝炎モデル、CC14 を用いた慢性肝炎モデルのいずれにおいても、ヒト細胞由来肝細胞の出現を確認した。ヒトアルブミンの産生が免疫組織染色のみならず、血清中においても確認し、機能的にもヒト肝細胞が再生されていることを確認した。ヒト臍由来造血幹細胞を用いた肝細胞再生を目指す基盤技術開発に向けた検討を進めている。

一方、末梢血に出現する T 細胞分画に、CD4+CD25+ regulatory T cell が存在することを見出した。今後、安全で効果的な造血幹細胞移植医療確立のため、ヒト regulatory T cell の発生機構を明らかとし、造血幹細胞移植に伴う種々免疫反応に及ぼす影響についても考察する予定である。