

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

先端技術を活用した医療機器の評価に関する研究

平成 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岡野 光夫

平成 19 (2007) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告 -----	1
先端技術を活用した医療機器の評価に関する研究 岡野光夫	
(資料)以下の日本語による翻訳文	
▪ “Inherent Risks Associated With Manufacture of Bioengineered Ocular Surface Tissue”	
▪ “COMMISSION DIRECTIVE 2006/86/EC of 24 October 2006”	
▪ “FDA Regulation of Stem-Cell-Based Therapies”	
▪ “Regulation of Somatic-Cell Therapy and Gene Therapy by the Food and Drug Administration”	
▪ “Guidance for Industry : Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Starting Materials Used in the Production of Viral Vaccines for the Prevention and Treatment of Infectious Diseases”	
II. 分担研究報告	
1. 先端技術を活用した医療機器の評価に関する研究 -----	127
土屋利江	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	138
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	139

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
総括研究報告書

先端技術を活用した医療機器の評価に関する研究

主任研究者 岡野 光夫
東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 所長・教授

研究要旨

近年、小規模ではあるがヒト臨床応用が開始されている細胞組織医療用具の有効性及び安全性の評価技術の確立を目指して、細胞組織医療用具に関する現状把握に関する調査研究、それらに対する評価に関する研究、細胞組織利用医療機器の承認申請マニュアルに関する研究、組織工學用材用の安全性研究を行った。特に今年度では、文献等の調査によりこれまでに施行された重症心不全患者心筋壁への自己細胞懸濁液の注射による心不全治療の臨床研究をサーヴェイし、問題点の洗い出しを行った。さらに、心不全と同様に自己細胞を用いた治療の臨床研究が世界的に進行している皮膚や角膜、口腔粘膜などの上皮組織について、移植組織のガン化の評価に用いるモデルとして想定されるマウス皮下移植に関する検討にも注力し、従来の腫瘍源性否定試験に対する改善点を提案した。これらの成果は、有効性の高い細胞組織医療用具が安全に供給される体制の構築に貢献するものと考えられる。

A. 研究目的

(1) 細胞組織医療用具に関する現状把握に関する調査研究

小規模ではあるがヒト臨床応用が開始されている細胞組織医療用具の有効性及び安全性の評価技術の確立を目指して、細胞組織医療用具に関する現状把握に関する調査研究を行う。

(2) 有害事象の原因となりうる細胞組織医療用具特異的問題に関する実験研究

有害事象の原因となりうると思われる細胞組織医療用具特異的問題に関して実験的研究により、その可能性を検討する。

B. 研究方法

(1) 細胞組織医療用具に関する現状把握に関する調査研究

PubMed (www.pubmed.gov)を用いた文献検索により、細胞組織医療用具(培養人工組織)のヒト臨床に関する報告を調査した。最終年度にあたる本年度においては、年々、大規模な臨床研究が増加している虚血性心疾患の治療を目的とした自己細胞移植に関して集中的に調査研究を行った。加えて、欧米における生物学的製剤製造の安全性ならびにヒト細胞の利用に関する指針などの翻訳も行った。

(2) 有害事象の原因となりうる細胞組織医療用具特異的問題に関する実験研究

心不全と同様に皮膚や角膜、口腔粘膜などの上皮組織についても自己細胞を用いた治療の臨床研究が世界的に進行している。特に、口腔粘膜上皮細胞は高い増殖能を有しており、さらに非侵襲的なバイオプシーにより入手可能であることから、自己細胞による上皮組織の再生医療にとって有効な細胞ソースとして期待されている。これまでに、培養自家口腔粘膜上皮シート移植により角膜上皮の再生、それに伴う視力回復効果が報告されている。さらに最近では、内視鏡的粘膜下層剥離術後における食道の炎症ならびに狭窄の防止策として口腔粘膜上皮シートの経内視鏡的な移植に関する有効性も示されている。このように治療に供する培養上皮細胞の確認すべき安全性の一つとして、移植組織のガン化があり、一般的にヌードマウス背部皮下移植による評価系が用いられている。しかし、これまでの経験から、無胸腺マウスであってもヒト細胞は免疫的に拒絶され、必ずしも適切な評価系ではないとの認識を得ている。また、上皮細胞を背部皮下という異所的部位へ移植することの妥当性も必ずしも明らかではない。これらの背景の下、本研究では、免疫拒絶の問題を回避し、純粋に移植組織のガン化の可能性を判断する評価系として、ラット自家口腔粘膜上皮シートの自家皮下移植モデルについて検討を行った。

図1に移植試験の概略を示す。Lewisラット(6週, 雄)の頬側口腔より直径4mmの口腔粘膜組織を採取し、抗生物質ならびに抗真菌剤を含むリン酸緩衝液で洗浄後、ディスパーゼIおよびトリプシンによる酵素処理を行うことで細胞懸濁液を調製した。次に、フィーダーレーヤーとなるマイトマイシンCの処理を施したNIH3T3細胞が培養されている温度応答性培養皿上に、口腔粘膜上皮細胞を播種し、培養

を行った。培養8日後にラット背部に作製した皮膚フラップ(4cm×4cm)上に口腔粘膜上皮シートを移植し、筋組織への癒着防止および生体における上皮環境を模倣するためにシリコーン膜により被覆処理を施した。その後、経時的に再生上皮の組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン(HE)染色ならびに免疫組織染色により構成細胞の状態を調べた。さらに、透過型電子顕微鏡により、移植した口腔粘膜上皮シートの微細構造についても観察を行った。

C. 研究結果

(1) 細胞組織医療用具に関する現状把握に関する調査研究

今年度における虚血性心疾患の治療を目的とした自己細胞移植に関する臨床報告例を表1に示す。論文9報の中で1報は長期予後の追跡調査の結果報告であった。

急性心筋梗塞に対する細胞移植に関しては、大半が経皮的冠動脈形成術(percutaneous coronary intervention: PCI)を施行した後に骨髄由来細胞を冠内注入する報告例であった。未分画の骨髄細胞を用いた冠内注入移植の場合は、移植後において短期的に左室駆出率の改善効果を示したが、長期的には効果が認められないとする報告がなされた¹。骨髄由来単核細胞移植の場合では、移植6ヶ月後の評価においても改善効果が見られなかった²。さらに、骨髄由来幹細胞と定義された分画の移植においても、梗塞サイズの減少や局所的な収縮機能の改善は認められたものの、左室機能全般の回復に至までの十分な効果は得られなかった³。これらの報告に対して、骨髄由来前駆細胞と定義された分画の移植に関する大規模スタディの結果では、移植4ヶ月後の評価において左室機能改善効果が示され⁴、骨髄由来細胞を用いた冠内移植の有効性に関して大きく二分する結果となった。

また、今年度においても顆粒球コロニー刺激因子(granulocyte-colony stimulating factor: G-CSF)により動員した末梢血幹細胞(peripheral-blood stem cell:PBSC)の有効性に関する報告がなされた。具体的には、薬剤溶出ステントの留置により冠動脈再建が成功した急性および陳旧性心筋梗塞患者に対してアフェレーシスにより採取したPBCSの冠内注入を比較検討した試験であった⁵。急性心筋梗塞に対しては左室駆出率およびリモデリングの改善が見られたのに対し、陳旧性心筋梗塞では治療効果は認められないとするものであった。

慢性期における心筋梗塞に対しては、骨髄由来前駆細胞と血中前駆細胞との比較検討した試験例が報告され、血中前駆細胞では心機能改善効果が認められなかったのに対し、骨髄由来前駆細胞では中程度であるが左室駆出率の改善が示された⁶。さらに、今年度においては急性心筋梗塞に対して心機能改善が報告されている骨髄由来CD133陽性細胞を用いた試験例も報告され、心筋内注入のみでも左室駆出率の増加が示された⁷。さらに、骨格筋筋芽細胞移植と同様に冠動脈バイパス術(coronary artery bypass graft:CABG)による血行再建と併用して外心膜側から梗塞心筋組織内へ注入移植した例も報告され、左室駆室率ならびに血流の改善が認められている⁸。

一方、これまでの筋芽細胞移植に関する報告例は、対照群との比較試験でなく、加えてCABGを併用していたため、筋芽細胞移植による心機能改善効果を純粋に判断することは困難であった。そのことを受けて、今年度では小規模であるが対照群を設けたCABG併用の経外心的な筋芽細胞移植例が報告された⁹。術後1年において、左室駆室率の増加が、対照群では5%であったのに対し、移植群では19.6%と有意であった。しかし、2006年11月に開催された第79回米国心臓協会学術集会においてフラン

スのMenaschéらによって行われていた被験者へのCABG施行および植込み型除細動器の装着を義務付けた大規模スタディ(MAGIC: Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy)の成績が発表され、経外心的な筋芽細胞の心筋内注入移植には有意な心機能改善効果は認められないとする内容であった。筋芽細胞注入移植の有効性に関して、今後の検討が待たれる。

(2)有害事象の原因となりうる細胞組織医療用具特異的問題に関する実験研究

温度応答性培養皿を用いて作製したラット口腔粘膜上皮シートは2〜3層から成る重層構造を呈していた(図2-c)。これを皮下移植に供すると、移植1日後ではシート構造を維持しながら、ホストの結合組織と安定に接着しているのが観察された(図2-d)。この移植シート内ではデスモゾームおよびヘミデスモゾームが観察され(図3-a,b)、さらにシートの直下では未熟な基底膜の再生が認められた(図3-a,c)。移植3日後では強力な炎症反応とともに、移植した上皮細胞の著しい増殖ならびに重層化が観察された(図2-e)。この再生上皮は、基底層は立方状細胞、中間層は扁平状細胞、表層部はネイティブな口腔粘膜に類似した扁平・多角状細胞から構成されていた。移植7日後では15層にまで厚さが増加していたが、その後は再生上皮の厚さの減少が見られ、特に最表層では脱核した細胞も観察された(図2-g,h,i)。移植3週間後では、再生上皮の消失が確認された。

次に、皮下移植前後における口腔粘膜上皮シートの構成細胞に関する表現型の変化を調べるため、サイトケラチン(CK)およびp63、PNCA(proliferating cell nuclear antigen)の免疫組織染色を行った。各分子の発現プロファイルを表2に示す。

まず、非角質化扁平上皮細胞で発現する

CK4およびCK13に関しては、ネイティブな口腔粘膜上皮組織において中間層および表在層で発現が見られた。口腔粘膜上皮シートでの発現はとても弱いものであったが、移植後の再生上皮では基底層の上の領域で強い発現が認められた。一方、角質化扁平上皮細胞で発現するCK10に関しては、口腔粘膜上皮シートならびに再生上皮では認められなかった。また、上皮前駆細胞のマーカーであるCK14に関しては、口腔粘膜上皮シートで強い発現が認められた。移植3日後では再生上皮のすべての細胞層で発現していたが、移植5-14日後では基底層および下層部のみに限局した発現となっていた。

さらに、幹細胞の増殖能維持に重要であるp63の発現を調べると、ネイティブな口腔粘膜上皮組織では基底層で認められ、口腔粘膜上皮シートでもその発現が観察された。移植3日後の再生上皮では、発現増強が認められたが、その後の経過とともに発現が減少する傾向にあった。興味深いことに、移植14日後においてp63とCK14の発現が共局在することが明らかとなった。細胞内のDNA合成および細胞周期の進行に重要な核タンパク質であるPCNAに関しては、シートではとても弱い発現であったのに対し、移植3日後の再生上皮では強い発現となっていた。しかしながら、PCNAの発現に関しても陽性細胞の減少傾向が見られ、移植10日後では発現が全く認められなくなった。

D. 考察

(1) 細胞組織医療用具に関する現状把握に関する調査研究

これまでの虚血性心疾患に対する自己骨髄由来細胞移植には、Ficollなどを用いた密度勾配遠心法による分画により前駆細胞または幹細胞として定義された細胞集団が用いられてきた。治療効果としては、長期的に十分な心機能改

善効果が見られないとする報告が多く、従って移植後の短期的に見られる有意な改善効果はPCIによる回復が移植細胞により促進された結果であると考察される。その一方で、今年度においても、骨髄由来CD133陽性細胞の有効性が報告され、特定の細胞集団を選別することで、心機能改善効果が向上する可能性が示された。このことから、移植に供する細胞の最適化とそれを実行するための分画操作の導入は必要不可欠である。

筋芽細胞移植に関しては、MAGICの結果を詳細に分析し、移植プロトコルの見直しを含めた上で、その有効性についての再検討が必要であろう。

以上の現状を踏まえると、将来的には疾患のステージに対応した細胞種および移植プロトコルの選択が可能な細胞療法に発展することが望まれ、これらの実現には細胞分離技術や細胞移植をサポートする周辺技術の開発は、より重要になるものと考えられる。

(2) 有害事象の原因となりうる細胞組織医療用具特異的問題に関する実験研究

これまでに皮膚創傷へ移植した上皮細胞グラフトに関する長期追跡調査により、移植した自己上皮細胞が20年以上生存できることが報告されている。しかしながら、皮下移植した口腔粘膜上皮細胞は移植後1週間以内では活発な増殖を示したものの、その再生上皮は時間とともに縮退し、移植3週間後には消失してしまった。これまでの移植組織の消失に関する報告例では免疫拒絶を原因とする考察がなされているため、本研究ではそれらを考慮して、自己移植モデルを採用したにも関わらず、結果として移植細胞の1ヶ月以上の生存を実現することはできなかった。これらの結果は、培養上皮組織の異所的な移植は、必ずしも幹細胞を長期に維持しないことを示している。また、こ

これらの要因としては、血管ネットワーク非存在下での皮下組織内肝細胞移植では2週間は生存できないとする報告からも、不十分な血管新生が大きく影響していたものと考えられる。さらに、上皮組織は通常に空气中に暴露されていることから、酸素供給が制限された皮下環境下では生存には不適であったとも考えられる。

よって、培養上皮組織の腫瘍源性否定試験ではこれらを十分に考慮した評価系を用いる必要があると考えられる。

E. 結論

(1) 細胞組織医療用具に関する現状把握に関する調査研究

昨年度までと比べ、虚血性心疾患に対する自己細胞移植試験の被験者数は増加傾向にあり、それに伴い確実に臨床データは蓄積されていることから、実用化もそう遠くないものと期待される。しかしながら、未だにこの細胞移植による心不全の治療効果に関するメカニズムは十分に解明されておらず、安全性を担保する立場からも十分な実証的研究は必要である。そのためにも、更なる臨床結果の長期フォローアップは極めて重要と考えられる。

(2) 有害事象の原因となりうる細胞組織医療用具特異的問題に関する実験研究

培養上皮組織のガン化に関して、従来から行われているげっ歯類を用いた皮下移植試験で評価する場合には、事前に栄養や酸素を供給する毛細血管網を誘導するなどの工夫が必要ではないかと考えられる。

(参考文献)

1. Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, et al. "Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrow transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial", *Circulation*, 113, 1287-1294 (2006)
2. Lunde K, Solheim S, Aakuhus S, et al. "Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction", *N. Engl. J. Med.*, 355, 1199-1209 (2006)
3. Janssens S, Dubois C, Bogaert J, et al. "Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial", *Lancet*, 367, 113-121 (2006)
4. Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, et al. "Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction", *N. Engl. J. Med.*, 355, 1210-1221 (2006)
5. Kang HJ, Lee HY, Na SH, et al. "Differential effect of intracoronary infusion of mobilized peripheral blood stem cells by granulocyte colony-stimulating factor on left ventricular function and remodeling in patients with acute myocardial infarction versus old myocardial infarction: the MAGIC Cell-3-DES randomized, controlled trial", *Circulation*, 114, 1145-1151 (2006)
6. Assmus B, Honold J, Schächinger V, et al. "Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction", *N. Engl. J. Med.*, 355, 1222-1232 (2006)
7. Klein HM, Ghodsizad A, Marktanner R, et al. "Intramyocardial implantation of CD133⁺ stem cells improved cardiac function without bypass surgery", *Heart*

- Surg. Forum, 10, E66-E69 (2007)
8. Stamm C, Kleine HD, Choi YH, et al.
“Intramyocardial delivery of CD133⁺ bone marrow cells and coronary artery bypass grafting for chronic ischemic heart disease: safety and efficacy studies”, J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 133, 717-725 (2007)
 9. Gavira JJ, Herreros J, Perez A, et al.
“Autologous skeletal myoblast transplantation in patients with nonacute myocardial infarction: 1-year follow-up”, J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 131, 799-804 (2006)

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

1. 第6回日本再生医療学会総会 2007.3.13-14 横浜 江上美芽, “世界に貢献する再生医療の実用化に向けた学会の新たな役割”, プログラム・抄録, 6 (2007)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 虚血性心疾患に対する自家細胞移植の臨床試験

報告者 (トライアル名)	細胞型	目的	移植方法	患者数	結果
Meyer et al. ¹⁾ (BOOST)	骨髄細胞	PCIを施行したST上昇型急性心筋梗塞患者に対する自家骨髄細胞移植による左室運動能の改善に関する試験 (n=34) (41-148) 2004) 至18ヶ月後の追跡調査により再評価。	ST上昇型急性心筋梗塞としてPCIを施行後、5日以内に冠内移植。	移植群: 30名 (PCI+HMC移植) 対照群: 30名 (PCI)	対照群において、左室運動能は9ヶ月後で0.7%、18ヶ月後では3.1%まで増加した。HMC移植群では、6ヶ月後で6.7%の増加であったが、18ヶ月後では6.9%でなくなった。両群間の差は移植後6ヶ月後には有意であったが、移植18ヶ月では有意差は認められなかった。
Lunde et al. ²⁾ (ASTAMI)	骨髄由来単核細胞	PCIを施行したST上昇型急性心筋梗塞患者に対して、自家単核細胞移植による左室運動能を改善するかを検討。	ST上昇型急性心筋梗塞としてPCIを施行後、移植平均6日で冠内注入。	移植群: 47名 (PCI+HMC移植) 対照群: 50名 (PCI+側注入)	自家単核細胞移植の冠内注入には、左室運動能を改善する効果は認められない。
Janssens et al. ³⁾	骨髄由来単核細胞 (BMSC)	PCIを施行したST上昇型急性心筋梗塞患者に対して、自家骨髄由来単核細胞移植による左室運動能を改善するかを検討。	ST上昇型急性心筋梗塞としてPCIを施行後、1日以内に冠内移植。	移植群: 33名 (PCI+BMSC移植) 対照群: 34名 (PCI)	適切な再灌流後の24時間以内でのBMSC冠内移植には、心筋梗塞後の左室運動能全般的に増加させる効果は認められなかった。しかしながら、移植後のリモデリングの抑制には効果的であった。
Schächinger et al. ⁴⁾ (REPAIR-AMI)	骨髄由来前駆細胞 (BMC)	ステントにより再灌流が成り立った急性心筋梗塞患者に対して骨髄由来前駆細胞の冠内注入が左室運動能を改善するかを検討。	ステントによる再灌流後3-7日以内にPCIを用いた冠内注入から注入。	移植群: 101名 対照群: 103名	BMCの冠内注入は急性心筋梗塞患者において左室運動能を改善する。
Assmus et al. ⁵⁾ (TOPCARE-CHD)	骨髄由来前駆細胞 (BMC) 血中前駆細胞 (CPC)	発症から3ヶ月以上経過した急性心筋梗塞患者に対して、骨髄由来前駆細胞注入が左室運動能を改善するかを検討。	発症から3ヶ月以上経過した急性心筋梗塞患者に、冠内注入して骨髄由来前駆細胞を注入する。	BMC移植群: 28名 CPC移植群: 23名 対照群: 23名	心筋梗塞後3ヶ月以上経過した急性心筋梗塞患者に、冠内注入した骨髄由来前駆細胞は、安全で有効であり、特に冠内移植により前駆細胞の冠内注入の効果が示された。
Stamm et al. ⁶⁾	CD133陽性骨髄細胞	CABGを施行した慢性虚血性心疾患患者に対して、CD133陽性骨髄細胞の冠内注入が心臓機能を改善するかを検討。	慢性期の虚血性心疾患に対して、冠内注入して冠内移植。	安全性試験: 移植群: 15名 (CABG+細胞移植) 有効性試験: 移植群: 20名 (CABG+細胞移植) 対照群: 20名 (CABG)	CABGと併用した前駆細胞移植の冠内注入は、安全で有効である。
Klein et al. ⁷⁾	CD133陽性骨髄細胞	左室運動能が22%以下の慢性期の虚血性心疾患患者に対してCD133陽性骨髄細胞の冠内注入が心臓機能を改善するかを検討。	慢性期の虚血性心疾患に対して、冠内注入して、冠内移植。	移植群: 10名	慢性期の虚血性心疾患に対して、冠内注入したCD133陽性骨髄細胞は、安全で有効であり、冠内注入により前駆細胞の冠内注入の効果が示された。
Kang et al. ⁸⁾ (MAGIC cell-3-DES)	G-CSF動員末梢血幹細胞	高リスク患者に対するDES留置による冠動脈狭窄患者に対してG-CSF投与によって動員された末梢血幹細胞の冠内注入が心臓機能を改善するかを検討。さらに、再狭窄の影響についても検討。	DES留置した患者に冠動脈狭窄患者に対して、冠内注入して移植。	急性心筋梗塞: 移植群: 25名 対照群: 25名 慢性心筋梗塞: 移植群: 16名 対照群: 16名	G-CSFにより動員された末梢血幹細胞の冠内注入は、急性心筋梗塞に対しては心臓機能の改善を示したが、慢性心筋梗塞に対しては効果が認められなかった。
Gavira et al. ⁹⁾	骨格筋幹細胞	CABGを施行した慢性期の心筋梗塞患者に対して自家骨格筋幹細胞の冠内注入が心臓機能を改善するかを検討。	慢性期の心筋梗塞に対して、CABG施行後に心臓機能により冠内注入して移植。	移植群: 12名 (CABG+細胞移植) 対照群: 14名 (CABG)	慢性期の心筋梗塞患者に対して自家骨格筋幹細胞の冠内注入は、安全で有効であり、冠内注入により前駆細胞の冠内注入の効果が示された。
Menasché et al. (MAGIC)	骨格筋幹細胞	CABGを施行した慢性期の心筋梗塞患者に対して自家骨格筋幹細胞の冠内注入が心臓機能を改善するかを検討。全患者に遠達型経路動脈を縫着。	CABG施行時に心臓機能により冠内注入して移植。	高細胞数移植群 (8 × 10 ⁶ cell/g): 30名 低細胞数移植群 (4 × 10 ⁶ cell/g): 33名 対照群: 34名	自家骨格筋幹細胞の冠内注入は、慢性心筋梗塞患者に対して自家骨格筋幹細胞の冠内注入は、安全で有効であり、冠内注入により前駆細胞の冠内注入の効果が示された。

CABG: coronary artery bypass grafting 冠動脈バイパス術, PCI: percutaneous coronary intervention 経皮的冠動脈形成術

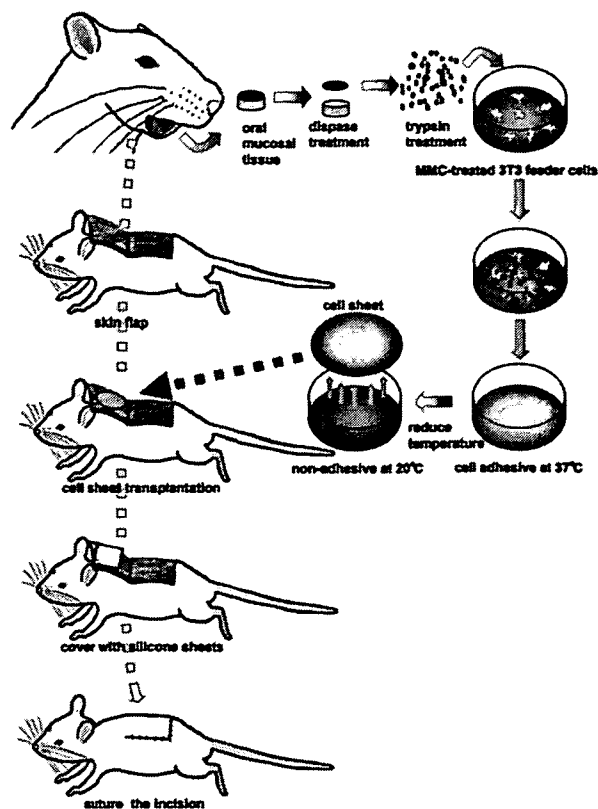


図1. ラット自家口腔粘膜上皮シートの自家皮下移植モデル

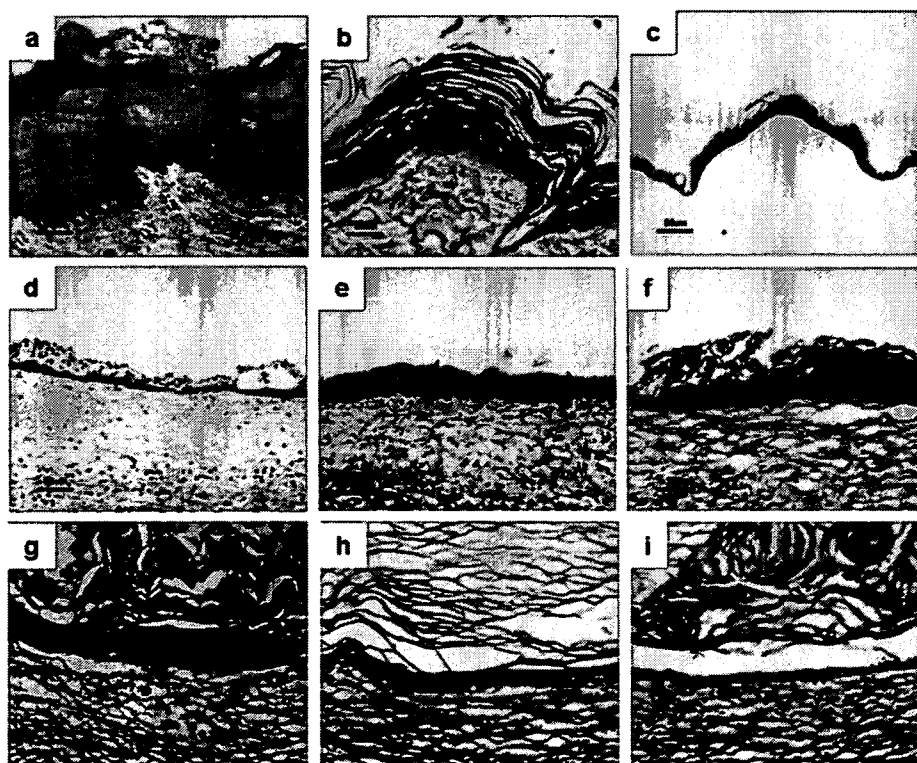


図2. 皮下移植後における再生上皮の形態に関する経時的変化
 a) 口腔粘膜組織, b) 皮膚組織, c) 口腔粘膜上皮シート
 皮下移植後: d) 1日, e) 2日, f) 5日, g) 7日, h) 10日, i) 14日

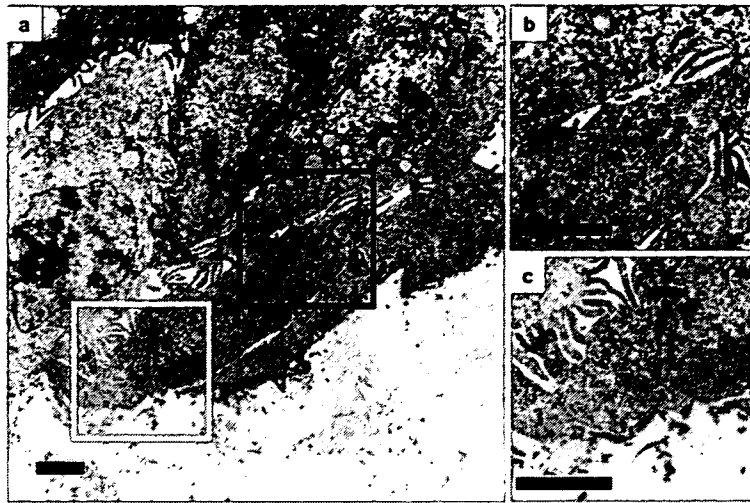


図3. 皮下移植1日後における口腔粘膜上皮シートの微細構造
 a) 移植口腔粘膜上皮シートと近傍の宿主組織, b) 細胞-細胞間接着: 黒枠の拡大,
 c) 未熟な基底膜: 白枠の拡大, (スケールバー: 2 μ m)

表2. 免疫組織染色による皮下移植前後の口腔粘膜上皮シートにおける
 サイトケラチン分子およびp63、PCNAの発現プロファイル

		CK4	CK13	CK10	CK14	p63	PCNA
Oral mucosal epithelium	S	+	+	-	-	+	+
	IM	+	+	-	-		
	B	-	-	-	+		
Skin epiderms	S	-	-	+	-	+	+
	IM	-	-	+	+		
	B	-	-	-	+		
Cell sheet	S	+	+	-	+	+	±
	IM	-	-	-	+		
	B	-	-	-	+		
Day 1	S	+	+	-	+	+	+
	IM	-	-	-	+		
	B	-	-	-	+		
Day 3	S	+	+	-	+	++	++
	IM	-	-	-	+		
	B	-	-	-	+		
Day 5	S	+	+	-	+	+	+
	IM	+	+	-	-		
	B	-	-	-	+		
Day 7	S	+	+	-	-	+	-
	IM	+	+	-	+		
	B	-	-	-	+		
Day 10	S	+	+	-	-	+	-
	IM	+	+	-	+		
	B	-	-	-	+		
Day 14	S	+	-	-	-	±	-
	IM	+	-	-	+		
	B	-	-	-	+		

(S: 表在層, IM: 中間層, B: 基底層)

生物工学による眼表面組織作製に内在するリスク

Ivan R. Schwab, MD; Nigel T. Johnson, BAppSc(Med&AppBiotech); Damien G. Harkin, PhD

目的: 生物工学による眼表面組織に関する潜在的な健康リスクを審査し、その他の組織での先例とするためのものである。

方法: 1996年7月1日から2005年6月30日までの期間に発表された生物工学による眼表面組織を用いたすべての治験の使用材料およびリスクアセスメント、リスク改善、有害事象、製造規格ならびに規制監督に関する記述について審査した。

結果: 研究的プロトコルの95%で、一つ以上の動物由来製品が使用され、重複する95%で一つ以上のヒトドナー組織が使用された。リスクを検討することにより、上記のような場合で有害性がある可能性は非常に低い。上記のような事象が起きる場合は、障害または死亡のリスクがあることは明らかであることが分かった。倫理的承認、患者の同意、およびドナーの血清試験結果の詳細が常に提供されることはなかった。リスクアセスメントまたは製造および臨床治療の規約に対するリファレンスは、作成されていなかった。

結論: 一定のリスクが生物工学による眼表面組織に関与しているものの、この新技術に関する研究報告では、現在もリスク管理および規制監督の問題は解決していない。

臨床的妥当性: リスクへの配慮および製造と臨床治療の規約は、技術の進歩に必須のものとなるだろう。我々は、これらの問題に対応する国際規格の導入を提案する。

バイオエンジニアリングおよび幹細胞研究における進歩は、医療業務での革命的変化を预示するものであるが、科学、倫理学および道徳について積極的な議論がなされている一方、多くの場合で複雑かつ研究に基づく製造プロトコルに内在するリスクの管理は、ほとんど検討されていない。現在の研究プロトコルは、動物および/またはヒトドナー組織の製品に依存しているため、レシピエントにおける異種間のマイクロキメリズムまたは伝染性海綿状脳症(TSE)に関連する病原体のような微生物、ウイルスあるいはその他の感染性病原体による汚染が原因となる感染を引き起こす可能性をもたらす¹⁻⁵。新たな細胞治療に関する特定のガイドラインが確立するまで、監督機関は、将来、製造業者となる業者が、患者の健康に対するリスクを最小限に抑える戦略を導入することを奨励する。これらの施策および種々の国際的な法的監督ならびに規制監督の経済的負担が、将来実施される治験による市場の法的規制および規制監督の緩和の後押しとなるかもしれない。これは、臨床試験にとってデメリットであり、世界規模の公衆衛生へ深刻なリスクを与える可能性がある。現在、社会の利益を侵害する可能性がある最新技術の特性が調査さ

れている。

生物学による眼表面組織の原点は、細胞形質転換の研究とその後に証明された *ex vivo* でヒト皮膚のケラチノサイト⁷の増殖を支持する細胞で3T3細胞(線維芽細胞の表現型)と呼ばれるマウス胚性細胞系を樹立した Todaro と Green⁶による独創的な研究への糸口となった。火傷患者への培養表皮シートの臨床応用は、1980年代初期から開始された⁸。これに関連して、火傷には深刻かつ治療不可能な性質があるため、様々な点におけるリスクが懸念されている。以降、角膜上皮を再生する幹細胞が、角膜輪部として知られる周辺縁内に存在することが証明されてからは、眼表面に対する同様の技術の適用が実現した⁹。にもかかわらず、皮膚とは異なる眼表面での生物学による組織の調製により、最適な材料および手順に関するコンセンサスがほとんど一致していない治験での治療が続けられている。所定の認可されたプロトコルを展開するには、患者の安全性に対する潜在的リスクについて、製造業者が評価および改善する必要がある。したがって、我々は、改善のための施策に伴う潜在的リスクを特定するために、眼表面に関する生体工学による組織の調製で使用する研究プロトコルの審査を行っている。その際、生物学による別のヒト細胞製品に関する新たなストラテジーに関連する課題を明示し、様々な管轄区域で公表された主要ガイダンスに注目している。

方法

我々は、1996年7月1日～2005年6月30日の期間に発表された眼表面の構築に関して、通常はマトリックスキャリアや基質を併用あるいは適用した *ex vivo* で増殖させた上皮幹細胞(仮定)を用いるヒトのトライアルで公表されたすべての報告を審査した。我々は、生物学による組織の調製での手順作成および記録された各段階に内在することが分かっているリスクについて審査した。これには、調製中に間接的または直接的に各グラフトに接触する全成分のソースおよび製品が含まれている。我々は、これらトライアルに関連する倫理的監督、リスク評価、およびリスク改善技術の記述に関する各出版物を審査した。リスクは、患者の健康またはより広範な社会に対して影響を与える可能性がある事象や結果として定義された。一部の例では、計測されなかった、あるいは起きなかったが、起こり得ないことであるとは考えられなかったため、このリスクが生じるかどうかは分からなかった。ヨーロッパ、米国、およびオーストラリアの当局で入手可能な生物学による組織の調整および臨床応用に関する現行の規制文書の有用性を審査した。

結果

患者合計275人に関する20件のヒトのトライアルまたは症例報告が、審査期間中に公表された¹⁰⁻²⁹。これらの研究で、*ex vivo* で増殖したと思われる角膜、結膜あるいは口腔粘膜上皮を *ocular surface* 疾患を管理するために使用した。19件の研究では、ウシ胎仔血清およびその他のウシ由来製品、トリプシン(ソースは記録されていないが、ブタと推定される)、コレラ毒素、ならびに放射線照射を受けた、またはマイトマイシン C の投与を受けたマウス3T3細胞などの動物由来製品を多様に組み合わせて使用した。角膜輪部上皮細胞、ヒトのトロンピンとフィブリノゲン、およ

び羊膜などヒトの他家構成要素が、19件の研究で使用された。ドナー血清試験結果の詳細は、四つの出版物で公表された。対側の眼表面細胞、口腔粘膜上皮、および血清などヒトの自家製品は、17件の研究で使用された。(表1) 残存する材料は、残りの詳細は分からないが薬剤が投与されている状況でのインスリン、抗生物質、およびヒドロコルチゾン(例外として、「消毒および治療を目的とした使用(GMPに基づく要求事項)」と表示される可能性が低い標準的研究材料が主である。グラフト調製中に使用する材料に関連する既知の潜在的リスクについてを、表2に記載する。一部のリスクは、その可能性が実証されていないが、類似した環境で起きている(例として、培養した皮膚グラフトなど)。この状況で、これらリスクを評価するべきである。致死状況における生体工学による皮膚の適用は、sight-saving または化粧品での手順よりも大きいリスクを受けられる可能性がある。

ex vivo での増殖を促進するために、11件の研究でマウスの3T3細胞が使用されたが、増殖の不活化に関する方法の詳細は完全ではない。また、4件の研究で、ガンマ線照射を使用した記載があったが、用量についての詳細はなかった。培養した皮膚のグラフトでの3T3繊維芽細胞層を処理するための現行のプラクティスでは、60Gy のガンマ線照射が使用されているが、その適用は規格化されていない³⁴。5件の研究で、2時間に4 μg/mL~4mg/mLの用量でのマイトマイシン C の使用の記述があったが、発表時に上限用量の誤植があったと思われる(すなわち、上限・下限のいずれも1ミリリッターにつきマイクログラムである。)。放射線照射またはマイトマイシン C のいずれかで処置した細胞を、「致死照射を施した」あるいは「増殖が停滞した」ものであると表示する。3件の研究で、3T3細胞のソースが記録されているが、マウスウイルス、微生物、または使用後の腫瘍形成性の可能性がある汚染に関して、3T3フィーダー細胞を in vitro で試験したエビデンスはない。

リスク改善についての明確な対応はなされていないが、内在する問題についてのエビデンスは複数ある。例えば、ある一つのプロトコルでは、オーストラリアおよびニュージーランドの群からのウシ胎仔血清のソーシングについて記載されており、ガイドラインに適合するプラクティスは、ウシ製品による TSE のリスクを管理する国立規制機関により発布される(表3)。記録されていないが、下垂体抽出物など使用されるその他のウシ製品もまた、地理的にリスクが低い国からの閉鎖群から採取されている。

この内の13項目には、倫理委員会または地域レベルでの施設内倫理委員会による承認に関する記述が含まれているが、16項目は、患者の同意の獲得について言及している。6件の研究には、ヘルシンキ宣言に関する記述が含まれる。GMP、GLP または現行の GCP や関連ガイドラインの国コードについて触れているプロトコルはなかった。製造および診療に関する国際コードはないことが知られているが、一定数の特定の問題に関するガイダンス文書は入手することができる(表3)。

Inherent Risks Associated With Manufacture of Bioengineered Ocular Surface Tissue

表1. 生物工学による ocular surface 組織の作製に使用される成分

分類	成分	研究数()内はその割合(%)
ヒト自家製品	輪部上皮	11(55)
	結膜上皮	3(15)
	口腔粘膜	2(10)
	血清	1(5)
ヒト他家製品	羊膜	16(80)
	輪部上皮	9(45)
	フィブリン組織接着剤	1(5)
動物製品 (ex vivo で適用)	ウシ胎仔血清	14(70)
	トリプシン	10(50)
	(特定はされていないがブタと思われるもの)	
	マウス胚性 3T3 細胞	11(55)
	マイトマイシン C による増殖停止	5(25)
	ガンマ線照射による増殖停止	4(20)
	不明	2(10)
	ウシ下垂体エキス	2(10)
	ウシアプロチニン	1(5)
	(フィブリン組織接着剤成分)	
	ウシインスリン	1(5)
	ウシコラーゲン(コラーゲンシールド)	1(5)
	細菌微生物製品 (ex vivo で適用)	コレラ毒性
ディスパーゼ		7(35)
サーモリシン		1(5)
抗生物質/抗真菌剤 (ex vivo で適用)	ペニシリン	8(40)
	ストレプトマイシン	8(40)
	アンホテリシン B	6(30)
	ゲンタマイシン	4(20)
	ネオマイシン	2(10)
	オフロキサシン	1(5)
増殖因子 (ex vivo で適用)	上皮増殖因子	10(50)
	インスリン	10(50)

Inherent Risks Associated With Manufacture of Bioengineered Ocular Surface Tissue

	トリヨードサイロニン(甲状腺ホルモン)	1(5)	
培養培地	一般培地		
	ダルベッコ変法イーグル培地	14(70)	
	ハム F12 培地	11(55)	
	スペシャリスト市販培地		
	ケラチノサイト増殖培地 (BioWhittaker, Waldersville, Md)	2(10)	
	特定ケラチノサイト培地 (Amniotech, San Francisco, Calif)	1(5)	
	Medium 165 (Kurabo, Osaka, Japan)	1(5)	
	添加剤(詳細不明)を追加した Meium 154	1(5)	
	ケラチノサイト増殖培地 (Cascade Biologics, Inc, Portland, Ore)	1(5)	
	その他	ヒドロコルチゾン	9(45)
		EDTA	9(45)
リン酸緩衝食塩水		7(35)	
ジメチルスルホキシド		6(30)	
グリセロール		3(15)	
グルタミン		3(15)	
トランスフェリン		3(15)	
ニトロセルローズ		2(10)	
アデニン		2(10)	
セレン		2(10)	
Poly (<i>N</i> -isopropyl-acrylamide)		1(5)	
ワセリンガーゼ		1(5)	
アンモニウム塩		1(5)	
ハンクス平衡塩類溶液		1(5)	

Inherent Risks Associated With Manufacture of Bioengineered Ocular Surface Tissue

表2. 移植のための Ex vivo での生物工学による組織作製で用いるプロトコルに関連するリスクファクター*			
結果	ソース (原因)	事象 (結果)	割合 (分かれば)
移植不全			
一次性	汚染	炎症反応	植皮で 50%と様々である ⁵
二次性	外来抗原	免疫応答	植皮で 50%と様々である ⁵
機能低下	局所的炎症、感染、または腫瘍	臓器障害	植皮で 50%と様々である ⁵
視力低下			
失明			
眼球および/または容貌の損失			
癌			
	癌遺伝子の活性化	転換	
	組換え	培養細胞	ポリオウイルスにおける SV40 (割合に関しては議論を呼んでいる ²⁰)
	関連増殖因子	フィーダー細胞 (3T3 細胞など)	不明
		移植部位にある宿主組織	不明
ヒトの疾患の感染 (HIV など)			
	ヒトドナーの汚染した材料	全身性感染	米国の組織ドナー ⁴ : HIV は 55,000 人に 1 人; HCV は 34,000 人に 1 人; HTLV は 128,000 人 に 1 人; 角膜組織 ²² に関して、GJD は 100 万人に 1 人以上である。
死亡			
	外来抗原による汚染	アナフィラキシー	ウシでは 200 万人に 1 人 ^{21,22}
		全身性感染	TSE は、100 万人に 1.5 人
		全身性癌	「癌」の列を参照
異種人獣共通伝染病			
既知のもの			
	動物由来材料の汚染		不明
患者			
		ヒトの障害および/または 死亡	
社会			
		汎発流行	
緊急事態			
	培養皮膚移植片での異種マイクロメリズムは 50% ⁵		不明
患者			
社会			

略語: CJD クロイツフェルト-ヤコブ病; HCV-C 型肝炎; HIV ヒト免疫不全ウイルス; HTLV ヒト T リンパ細胞ウイルス; SV40 シミアンウイルス 40; TSE 伝染性海綿状脳症。

*結果は、ocular surface 組織においてのものである。割合は、データが入ってきた組織に関するものである(皮膚など)。

Inherent Risks Associated With Manufacture of Bioengineered Ocular Surface Tissue

表 3. 生物工学による組織片に関する規制およびガイダンス	
機関	特記事項または情報トピック
ハーモナイゼーションに関する国際会議	
生物工学的/生物学的製品の品質に関するガイドライン: 生物工学的/生物学的製品の作製で使用する細胞基質の起源および特性 (Q5D, 1997)	細胞バンクの同一性および純度; 細胞核学および腫瘍形成性に関する試験
ヒトまたは動物起源の細胞系由来の生物工学的製品のウイルス安全性評価 (Q5A, 1997)	ウイルス特性
EMEA	
医学および獣医学での製品を介した動物海綿状脳症の病原体に感染するリスクを最小限に抑えるためのガイダンスの覚書 (EMEA/410/01 第 2 版)	獣脂由来製品などの TSE ガイダンス
保健省薬品医薬品行政局 (オーストラリア)	
医薬製品の製造に関する基準、附属書 2 (2002 年)	医療での QSP に基づいた一部の細胞をベースにした製品の獲得
製造に関する基準、ヒトの血液および組織 (2000 年)	他家または自家の製品に関する QSP
TSE のリスクを最少化するための治療用品に関する追加要求事項 (2004 年)	ウシ海綿状脳症に関する TSE ガイダンスおよび地理的リスク
食品医薬品局 (米国)	
21 CFR 1270 ³⁵ (移植を目的としたヒト組織)	ドナーの選択および試験
22 CFR 1270 ³⁶ (ヒトの細胞、組織、および細胞や組織をベースにした製品)	ドナーの適格性および優れた組織プラクティス
22 CFR 610 ³⁷ (一般生物製品規格)	一般的な安全性、滅菌、およびマイコプラズマのアッセイおよびその他の関連する課題
企業向けガイダンス: ヒトにおける異種移植製品の使用に関するソースとなる動物、製品、前臨床、および臨床の問題 (2003 年 CBER)	
生物製剤の製造に使用する細胞ラインの特性評価における留意点 (1993 年 CBER)	細胞バンク、腫瘍形成性、およびウイルス特性評価の同一性および純度

略語: CBER, Centre for Biologics Evaluation and Research; EMEA, European Medicines Evaluation Agency; QSP, quality system principles; TSE, transmissible spongiform encephalopathy

*ここに記載したガイダンスは、各機関のこれらトピックに関する意見をすべて示したものではない。

*オーストラリアなどその他の規制当局が導入している可能性がある。

論評

生体工学による眼表面組織を用いた治療を受けた患者に関して発表された報告は、1997年に始まり¹⁰、それには我々が有する二つの機関(I.R.S および D.G.H)による業務が含まれる^{11, 13, 24}。調査環境で報告される製造規格は、主要な市場でのプロトコルの認可で要求される規格と異なるものでもよい。我々は、個々の患者およびこの初期技術に関与する広大な社会に対する潜在的な健康リスクを審査している。国際化プロセスおよび再生医療が進歩かつ成長するにつれて、上記のような検討もまた、営業生産における多くのその他の組織および臓器に対して適切であるかもしれない。

マウス3T3フィーダー層による影響として、異種マイクロキメリズム⁵、異種抗原性⁵、および製造中のウイルス¹やプリオン因子³⁸による潜在的な汚染などが知られている。3T3フィーダー層による潜在的なリスクがあることは、今日まで記録されていないが、異種移植または胚性幹細胞の研究など別の分野で同様のリスクがあることから、その可能性は依然としてある。共に DNA に影響するガンマ線照射およびマイトマイシン C で考え得る変異促進性効果を特に考慮すると、外来性人畜共通伝染病^{39, 40}、細胞融合⁴¹、および腫瘍形成性⁴²の可能性は、論理的にまだ残っている。動物からヒトへの感染に関する歴史的な前例は多くあり⁴³⁻⁴⁵、免疫抑制された同種異系グラフトを受け取る患者で、このような結果となる可能性が比較的高い。さらに、認識されていない未知のウイルス性病原体が、マウス細胞内に存在している可能性がある。上記のような暴露の良い例に、1955年～1962年に起きたポリオウイルスのシミアンウイルス40による汚染がある³⁰。そのウイルスは、1960年にのみ認識されたもので、ワクチンを受けた患者がガンに罹患するリスクを増加している可能性がある³⁰。

病原体がヒトのゲノムに適応するならば、すべての外来性人畜共通伝染病は、レシピエントおよびより広範な未知の人間社会にとって、潜在的に生命を脅かすものとなる。マウスのゲノムは、内在性のレトロウイルス配列をコード化する⁴⁶。レトロウイルスは、宿主のゲノム DNA と融合し、全子孫へ伝播させることが分かっている。ケラチノサイトの *ex vivo* での増殖では、上記のような外来性人畜共通伝染病は報告されていないが、そのような感染は、比較的広範な社会のみでなく個人のレシピエントに対しても悲惨な結果をもたらす。系統分析によると、ヒト内在性レトロウイルス配列は、マウス白血病ウイルス属と近い関係にあることが分かっている⁴⁷。ネコモデルにおいて、内在性レトロウイルス配列を発現する細胞の外来性感染による組み換えにより、新種の病原性株が生成されるというエビデンスがある⁴⁸。重要なことは、ヒトの疾患としてのエビデンスをもつマウスウイルスが多く存在することである^{49, 50}。審査したプロトコルの半分以上が、正常な免疫防御機能を持たない状態のマウス3T3細胞と患者細胞との共培養に関与するものであれば、懸念されるパラダイムに該当する。遠隔リスクであると思われる場合、現在、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)は、外来性人畜共通伝染病⁵¹であると信じられており、正に医原性のものであると考えられている⁵²。異種マイクロキメリズムは、少なくとも皮膚のケラチノサイトグラフトを受けた患者の半分で見られ⁵、

これら細胞は、最低でも8年間は生存し続けることが分かっている⁵³。本来、3T3細胞系は、発癌性の評価および試験で樹立されたものであるため、および一部の3T3細胞系で接触阻止現象が失われているため⁵⁴、これら細胞のソーシングが重要となっている。したがって、一部のグループでは、培養システムにおける3T3細胞の使用を避けるよう奨励している。しかしながら、3T3細胞が存在する状態あるいは存在しない状態で樹立した培養の相対効果は不明である。

現在分かっている3T3の増殖を不活化する方法(必ずしも記録されているわけではない)には、コバルト60またはその他のガンマソースへの暴露による放射線照射が含まれる。使用した線量(皮膚培養プロトコルに基づいた60 Gy)は、細胞に対して即致命的⁵⁵なものでも抗菌⁵⁶するものでもない。さらに、コバルト60のインストゥルメンテーション、およびその較正、プロセスバリデーション、線量のマッピング、放射線壊変の補償に関して、直接的な研究者は知識をほとんど、あるいは全く有していない可能性がある。実際、あらゆる研究での用量の検証については、記録されていない。放射線照射の代わりにマイトマイシンCによる処理が使用されているが、この処理法による細胞の致死率や抗菌効果に関しては、あまり分かっていない。3T3細胞の使用に関連したリスクの改善には、細菌およびウイルスによる汚染または造腫瘍能の試験が含まれる。マウスからヒトの3T3細胞への代替も検討し、あらゆる支持細胞が存在しない状態で細胞増殖を促進するメカニズムを、研究のプライオリティとして重視する。

ウシ製品により TSE に感染する確率変数は、100万人中1.5人にのぼる³³。多くの研究者が、地理的にリスクが低い国(オーストラリアおよびニュージーランドなど)にいる閉鎖群からのウシ製品を使用したため、さらにリスクが低減されたと我々は考えているが、入手可能な公開されているプロトコルでの詳細がほとんどない。さらに、プールされているドナーの血漿(細胞の増殖とデリバリーのための基質として検査される)から作製した一部の市販のフィブリン組織接着剤には、ウシのアプロチニン(フィブリン溶解を低減する)が含まれており、前述のように、細菌やプリオンによる汚染のリスクを高める。実際に、パルボウイルスによる汚染が報告されている⁵⁷。また、精製されたウシのアプロチニン自体がアレルギー源となり、約200万人に1人の割合で致命的なアナフィラキシーの原因となることが分かっている^{31, 32}。研究試薬におけるウシ製品の使用に対して行われた広範な研究により、いくつかの予期せぬ所見が明らかとなった。例えば、ある種のウシ血清(ウシの血清アルブミンなど)が、患者の細胞を低温貯蔵するための培地における安定剤または3T3のストックの汚染物質として、組換えて精製した増殖因子の製剤に存在する可能性がある。一部の培養プラスチックも、牛脂由来のステアリン酸塩で作られているが、プロセッシングの厳密性から、一部のガイダンス文書(表3)ではリスクは低いと見なされている。しかし、これにより臨床使用にあわせた研究材料の作製について慎重に調査する必要があることが明らかとなった。レメディエーションには、ウシ製品に関したヒトの自家物質が含まれるが、その他の代替物も研究の対象とする。