

FIGURE 1. *In vitro* differentiation of AC133⁺ cells of cord blood into endothelial cells. **A**, expression of AC133 and CD34 cells in human cord blood and peripheral blood mononuclear cells was analyzed by staining with AC133-PE (vertical axis) and CD34-FITC (horizontal axis). The numbers in the flow cytometric dot plots indicates the percentage of each population \pm S.D. **B**, when AC133⁺ cells were cultured for 19 days in the presence of VEGF on FN-coated dishes, the appearance of CD31⁺ cells was analyzed. The upper panel shows the fluorescent photomicrograph of adhesion cells stained with FITC-conjugated

7.5), 1 mM EDTA, 5 mM EGTA, 10 mM MgCl₂, and 50 mM β -glycerophosphate, along with 1/100 (v/v) protease inhibitor mixture (Sigma) and 1/100 (v/v) phosphatase inhibitor mixture (Sigma). The cellular lysate of 5×10^5 cells/lane was subjected to Western blotting analysis.

Statistical Analysis—Statistical analysis was performed using the unpaired Student's *t* test, and the dose response of TPO was compared between the four groups by one-way analysis of variance and the Tukey test using Prism 4 software. Values of $p < 0.05$ were considered to indicate statistical significance. Each experiment was repeated three times, and the representative data are indicated.

RESULTS

We previously reported that during the *in vitro* differentiation of peripheral blood AC133⁺ cells into the endothelial cells, the expression of CD31 was the earliest marker among all of the tested markers (25). Moreover, by analyzing the ability of differentiation into endothelial cells, CD31^{bright} cells were shown to exhibit EPC character when compared with the CD31⁺ fraction. Since cord blood is a rich source of blood stem cells such as CD34⁺ and AC133⁺ cells, it is expected to be a useful source for CD31^{bright} cells. At first, we attempted to determine whether the CD31^{bright} fraction derived from cord blood AC133⁺ cells contained EPCs. As shown in Fig. 1A, the populations of AC133⁺ CD34⁻ cells, AC133⁻ CD34⁺ cells, and AC133⁺ CD34⁺ cells in cord blood were approximately four times greater than those in peripheral blood (Fig. 1A). After 5 days of cultivation of AC133⁺ cells on an FN-coated dish, adherent CD31-positive cells were observed (Fig. 1B, upper panel). Analysis of the fluorescence intensity of CD31-positive cells revealed that the average fluorescence intensity in CD31⁺ cells was highest on day 5 (Fig. 1B, lower panel), corresponding to the results of peripheral blood cells.

After 1 week of cultivation of AC133⁺ cells on a collagen type IV-coated dish, on which cells adhered more loosely when compared with the FN-coated dish, cells were collected and sorted into CD31⁺ and CD31^{bright} fractions, as shown in Fig. 1C, panel a, and both cell types were cultured on an FN-coated dish for 1 week after the sorting. The number of cells adhering and spreading was higher in the CD31^{bright} fraction (Fig. 1C, panel c) than in the CD31⁺ fraction (Fig. 1C, panel b), and these adhering cells are apparently KDR- (Fig. 1C, panel d) and eNOS-positive (Fig. 1C, panel e). The large areas of intense green fluorescence represent the colonies of CD31^{bright} cells. These data indicate that CD31^{bright} cells derived from AC133⁺ cells of both peripheral blood and cord blood are EPCs.

anti-CD31 antibody after a 5-day culture. Quantitation of the fluorescence intensity of 20 CD31-positive cells was analyzed as described under "Experimental Procedures." Columns and bars represent the means \pm S.D. from 20 cells (B, lower panel). C, the CD31-negative, positive, and bright cell populations prepared after 1-week cultivation of AC133⁺ cells are shown in a representative histogram stained with FITC-conjugated anti-CD31 antibody. The x axis represents the log fluorescence intensity of CD31-FITC, y axis relative cell number (panel a). Panels b and c show phase-contrast microscopic photographs of cultured CD31-positive and bright cells, respectively, subsequently cultured for 1 week after cell sorting. The bottom panels d and e show the fluorescent photomicrographs of adhesion cells from the CD31^{bright} fraction stained with anti-KDR antibody and anti-eNOS antibody, respectively. Scale bar, 100 μ m.

Ex Vivo Expansion of EPC by TPO

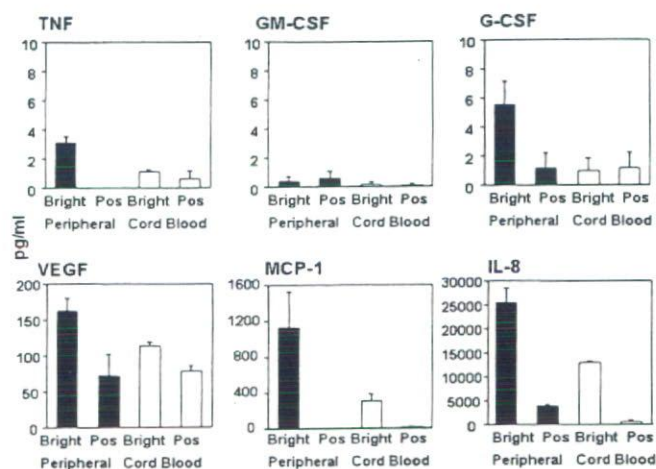


FIGURE 2. Various cytokines released from CD31⁺ cells and CD31^{bright} cells. Production of various cytokines from CD31⁺ cells and CD31^{bright} cells derived from AC133⁺ cells cultivated for 5 days was measured. Gray columns indicate the cytokine production by cells from peripheral blood and open columns from cord blood. Columns and bars represent the means \pm S.D. from three separate experiments. *TNF*, tumor necrosis factor; *Pos*, positive; *MCP-1*, monocyte chemoattractant protein-1.

Several reports have shown that EPCs produce cytokines (9, 26, 27), but the ability of CD31⁺ or CD31^{bright} cells derived from AC133⁺ cells to produce cytokines is not known. After cell sorting, quantitative analysis of cytokines released by CD31⁺ cells and CD31^{bright} cells was carried out at 5 days after the cultivation. As shown in Fig. 2, IL-8 was markedly produced by CD31^{bright} cells from both peripheral blood and cord blood when compared with CD31⁺ cells. The production of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) by CD31^{bright} cells was also higher than that of CD31⁺ cells. The production of VEGF was higher by CD31^{bright} cells than by CD31⁺ cells but not significantly. The production of all cytokines by CD31^{bright} cells from peripheral blood was higher than that from cord blood. Tumor necrosis factor- α , GM-CSF, and G-CSF were hardly produced by CD31^{bright} and CD31⁺ cells. These data indicate that CD31^{bright} cells derived from AC133⁺ cells have a strong ability to produce chemokines.

It has been reported that TPO and SCF are potent stimulators of multipotent cell proliferation (17, 19). Next, the effects of both growth factors on EPC growth and differentiation in our culture system were determined. After the addition of both TPO and SCF for 2 weeks, the expression of eNOS and KDR in adhered cells was analyzed (Fig. 3A). Fig. 3A clearly indicates that AC133⁺ cells from both peripheral blood and cord blood differentiate into eNOS⁺ and KDR⁺ cells more efficiently in the presence of the mixture of TPO, SCF, and VEGF than of VEGF alone. Flow cytometric analysis revealed that the ratio of CD31^{bright} CD14⁻ cells increased in the presence of the mixture of TPO, SCF, and VEGF when AC133⁺ cells were cultured on collagen type IV-coated dish for 1 week (Fig. 3B).

We next examined which growth factor is dominant in the induction and proliferation of CD31^{bright} cells. The total cell number of cultured AC133⁺ cells from both peripheral blood (Fig. 4A, upper panel) and cord blood (Fig. 4A, lower panel) significantly increased in the presence of TPO, SCF, or both growth factors when compared with that of VEGF alone during

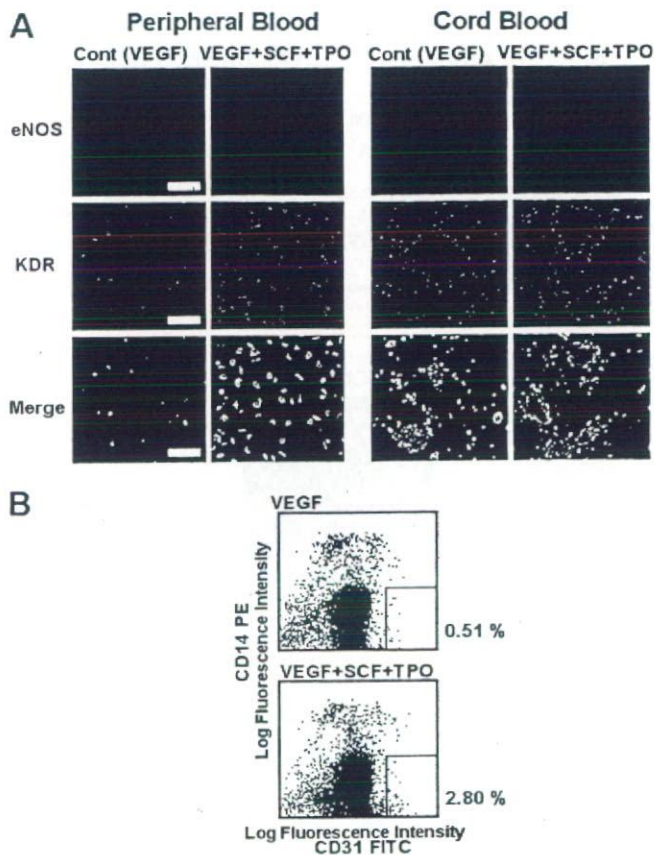


FIGURE 3. Increment of EPCs from AC133⁺ cells in the presence of TPO and SCF. A, AC133⁺ cells were differentiated for 2 weeks in the presence of either VEGF alone or the combination of TPO, SCF, and VEGF on an FN-coated dish. The upper and middle panels indicate the fluorescent photomicrographs of cells stained with anti-eNOS antibody and anti-KDR antibody, respectively. The bottom panels indicate the merged images of both antibodies. From the left side, control (Cont) and the mixture of peripheral blood, control, and the mixture of cord blood. Scale bar, 100 μ m. B, CD14 and CD31 expression in cultured AC133⁺ cells for 1 week was stained with CD14-PE (vertical axis) and CD31-FITC (horizontal axis). The upper panel indicates cells treated with VEGF alone, and the lower panel indicates cells treated with the mixture of VEGF, SCF, and TPO. The number on the right side of the flow cytometric dot blot indicates the percentage of the CD14⁻ CD31^{bright} population.

a 1-week period. As shown in Fig. 4B, however, the increment in the ratio of the CD31^{bright} cell population was observed only in the presence of TPO. The absolute number of CD31^{bright} cells, calculated by the total cell number and the ratio of the CD31^{bright} cell population, was markedly increased by TPO (Fig. 4C). In contrast, SCF induced the increase in total cell number to the same level as TPO (Fig. 4A), but it did not induce the increase in either the ratio of the CD31^{bright} cell population (Fig. 4B) or the number of CD31^{bright} cells (Fig. 4C). Next, we examined whether TPO and VEGF can synergistically affect the induction of CD31^{bright} cells during a 1-week cultivation. As shown in Fig. 4D, although VEGF had no effects on the total cell number (Fig. 4D, panel a), it increased the ratio of the CD31^{bright} cell population to 1.4-fold higher than that of the control (Fig. 4D, panel b), resulting in a slight increase in the number of CD31^{bright} cells (Fig. 4D, panel c). Thrombopoietin alone induced an increase in not only the total cell number (Fig. 4D, panel a) but also the ratio of the CD31^{bright} cell population (Fig. 4D, panel b), resulting in an \sim 24-fold increment of the absolute

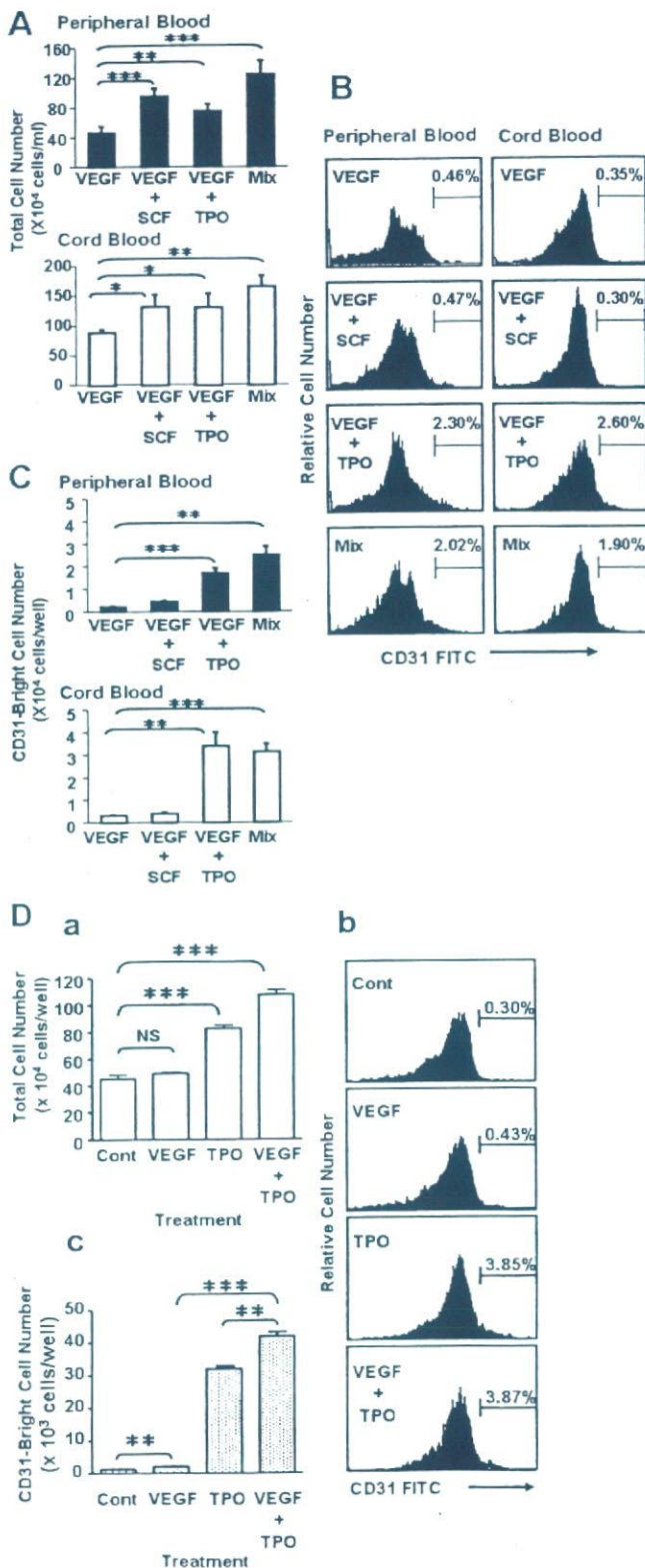


FIGURE 4. Stimulative effects of TPO on induction of CD31^{bright} cells. A, alteration of the cell number of cultivated AC133⁺ cells for 1 week in the combination of growth factors. Mix, VEGF + SCF + TPO. B, the flow cytometric histogram of AC133⁺-derived cells stained with FITC-labeled anti-CD31 antibody after a 1-week culture. The representing number in the flow cytometric histogram indicates the percentage of the CD31^{bright} cell population. The left panels are peripheral blood, and the right panels are cord blood. C, CD31^{bright}

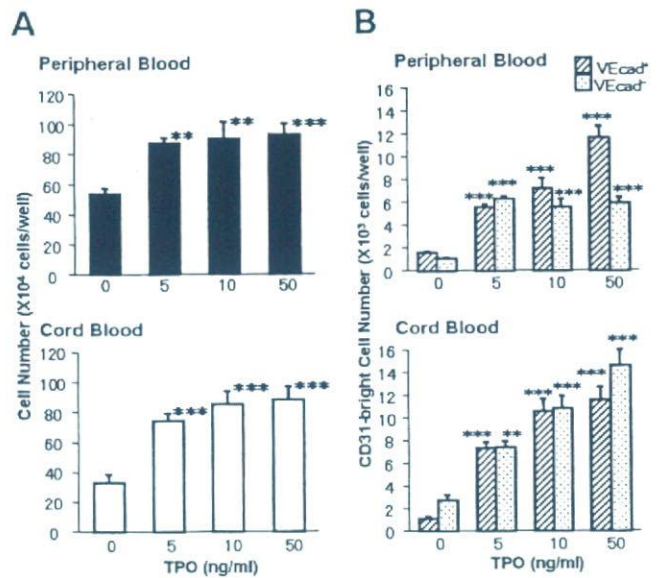


FIGURE 5. Dose-dependent effects of TPO on the induction of CD31^{bright} cells from AC133⁺ cells. AC133⁺ cells were treated with various concentrations of TPO for 1 week. The left panels (A) are the total cell number of cultured AC133⁺ cells from peripheral blood (upper panel) and cord blood (lower panel). The right panels (B) are the calculated CD31^{bright} cell number from peripheral blood (upper panel) and cord blood (lower panel). Columns and bars represent the means \pm S.D. (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$). Striped and dotted columns represent CD31^{bright}VEcad⁺ cells and CD31^{bright}VEcad⁻ cells, respectively.

number of CD31^{bright} cells when compared with the control (Fig. 4D, panel c). The concomitant treatment with both VEGF and TPO showed a synergic increase in the number of CD31^{bright} cells (Fig. 4D, panel c).

When AC133⁺ cells were cultured with various concentrations of TPO in the presence of constant concentrations of VEGF (50 ng/ml), the total cell number from both peripheral blood (Fig. 5A, upper panel) and cord blood (Fig. 5A, lower panel) significantly increased at 5 ng/ml of TPO when compared with the control, and there was no significant difference in the total cell number from 5 to 50 ng/ml of TPO. However, TPO increased the ratio of CD31^{bright} cells of flow cytometry dose-dependently as follows: control, 0.50%; 5 ng/ml, 1.36%; 10 ng, 1.42%; 50 ng/ml 1.90% in peripheral blood and control, 1.16%; 5 ng/ml, 1.99%; 10 ng, 2.51%; 50 ng/ml 2.96% in cord blood. TPO markedly induced the differentiation of AC133⁺ cells into CD31^{bright}VEcad⁺ cells in the case of both peripheral blood (Fig. 5B, upper panel) and cord blood (Fig. 5B, lower panel) in a dose-dependent manner. In the case of cord blood cells, differentiation into CD31^{bright}VEcad⁻ cells was also induced by TPO.

The effects of TPO on total cell number during 6-day culture of AC133⁺ cells were determined. Although the total cell num-

cells numbers were calculated by both the total cell number and the ratio of CD31^{bright} population. D, the effects of TPO alone on EPC differentiation derived from AC133⁺ cells of cord blood. The upper left panel (a) shows the total cell number after a 1-week culture, the right panels (b) show the flow cytometric histogram of AC133⁺-derived cells stained with FITC-labeled anti-CD31 antibody, and the lower left panel (c) shows the calculated CD31^{bright} cell number. Columns and bars represent the means \pm S.D. (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$). NS, not significant; Cont, control.

Ex Vivo Expansion of EPC by TPO

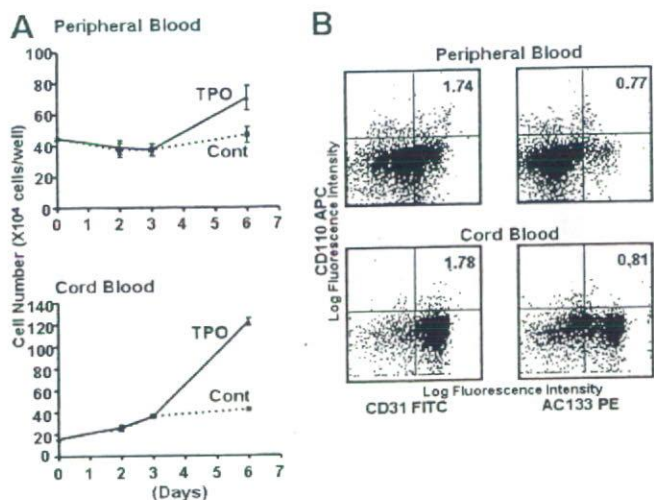


FIGURE 6. Time-course analysis of TPO-treated AC133⁺ cells and expression of TPO receptor (CD110). A, alteration of cell number was counted at 2, 3, and 6 days. Solid and dotted lines indicate TPO-treated cells and control ((Cont) VEGF alone) cells, respectively. The results represent mean \pm S.E. of triplicate wells. B, flow cytometric analysis of CD110 expression on AC133⁺ cells cultured for 3 days was carried out. The y axis represents the log fluorescence intensity of CD110-allophycocyanin (APC), and the x axis represents that of CD31-FITC (left panels) and AC133-PE (right panels). The number in the flow cytometric dot blot indicates the percentage of CD110⁺ CD31⁺ and CD110⁺ AC133⁺ populations, respectively. The upper panels are peripheral blood, and the lower panels are cord blood.

ber from AC133⁺ cells slightly and constantly increased from day 0 to day 6 in the absence of TPO, total cells markedly increased after the third day in the presence of TPO (Fig. 6A). Next, the alteration of TPO receptor (CD110) expression was analyzed during the cultivation of AC133⁺ cells. Although the percentages of both AC133⁺ CD110⁺ cells and CD31⁺ CD110⁺ cells were 0% just after magnetic cell sorting, 3 days after the cultivation, ~2% of CD31⁺ CD110⁺ cells (Fig. 6B, left panel) and 1% of AC133⁺ CD110⁺ cells (Fig. 6B, right panel) appeared from AC133⁺ cells in the peripheral blood and cord blood, respectively. These data indicate the possibility that sorted AC133⁺ cells may differentiate into AC133⁺ CD110⁺ cells and may subsequently proliferate and differentiate into EPCs in response to TPO.

It has been reported that TPO activates the PI3K/Akt pathway (28) or JAK/STAT pathway (20, 29, 30) in target cells. In addition, in the present study, TPO induced a marked proliferation of AC133⁺ cells after 3-day culture, and CD110 expression in cells cultured for 3 days from both cord blood and peripheral blood was also observed (Fig. 6, A and B). We then attempted to determine whether TPO activates Akt or STAT in AC133⁺ cells cultured for 3 days by analyzing the phosphorylation at Ser-473 of Akt or the phosphorylation at Tyr-705 of STAT3, which are the active forms of Akt or STAT3, respectively. As shown in Fig. 7A, phosphorylation at Ser-473 of Akt was stimulated by both VEGF and TPO at 15 min and was more markedly stimulated by concomitant treatment with VEGF and TPO than by a single treatment (Fig. 7A, top panel). Phosphorylation at Tyr-705 of STAT3 was observed only in the presence of TPO, and unlike in the phosphorylation at Ser-473 of Akt, an increased amount of phosphorylation was not observed in the concomitant presence of VEGF and TPO (Fig. 7A, third panel).

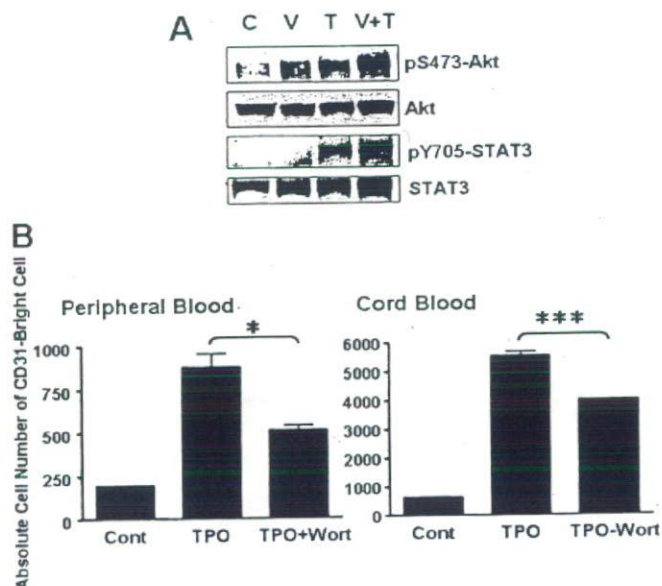


FIGURE 7. Analysis of TPO-induced signal transduction on AC133⁺ cells of cord blood. A, activation of Akt or STAT3 was analyzed by Western blotting with anti-phospho-specific Ser-473-Akt antibody (top panel) and reprobated with anti-Akt antibody (second panel), or with anti-phospho-specific Tyr-705-STAT3 antibody (third panel) and reprobated with anti-STAT3 antibody (lower panel) after stimulation by VEGF, TPO, or both VEGF and TPO for 15 min using 3-day-cultured AC133⁺ cells. C, control; V, VEGF; T, TPO. B, the effects of wortmannin on CD31^{bright} cell induction were investigated. The right panel shows peripheral blood, and the left panel shows cord blood. The y axis represents the CD31^{bright} cell number. Wort, 100 nM wortmannin. Columns and bars represent the means \pm S.E. (*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$). Cont, control.

On the other hand, there was no difference in the expression of Akt and STAT3 protein levels (Fig. 7A, second panel and bottom panel, respectively). The induction of CD31^{bright} cells was not perfectly but significantly inhibited by wortmannin, an inhibitor of PI3K, suggesting that the PI3K/Akt pathway plays an important role in TPO-induced EPC differentiation (Fig. 7B).

DISCUSSION

We have previously reported that CD31^{bright} cells derived from AC133⁺ cells in human peripheral blood are EPCs (25). In the present study, CD31^{bright} cells also appeared from AC133⁺ cells prepared from cord blood, which are a rich source of stem cells during the early period of cultivation (Fig. 1, A and B). When cells were separated in terms of CD31 expression (Fig. 1C), CD31^{bright} cells differentiated into KDR-positive and eNOS-positive adherent cells. These data indicate that CD31^{bright} cells derived from AC133⁺ cells in cord blood have some characteristics similar to those of EPCs in peripheral blood. Although these EPCs in both cord blood and peripheral blood could not form tube-like structure by themselves on Matrigel (data not shown), they secreted angiogenic growth factors (Fig. 2) such as VEGF, IL-8 (31, 32), and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) (33). It has been reported that there are at least two types of EPCs: early EPCs and late EPCs. Early EPCs are unable to form tube-like structures and secrete VEGF and IL-8 showing peak growth at 2–3 weeks (9, 26, 27). Late EPCs with the ability to proliferate and having a cobblestone shape appear late at 2–3 weeks, show exponential growth at 4–8 weeks, and have the ability to form tube-like structures

(26, 27, 34). Rehman *et al.* (9) have reported that EPCs derived from monocytes/macrophages do not proliferate but instead release potent proangiogenic growth factors. In many studies (9, 26, 27, 35–37), because the origin of early EPCs was CD14⁺ cells or was not precluded by monocytic cells, CD14 expression was still observed in the EPCs after cultivation. In our study, in which AC133⁺ cells were used as the origin of the EPCs, CD14 expression was not observed in CD31^{bright} cells induced by TPO (Fig. 3B). Although the CD31^{bright} cells identified as EPCs in this report and in a previous report did not correspond to their cells in terms of the origin of the cells or cell surface markers, these cells may be early EPCs that can release potent proangiogenic growth factors (Fig. 2). In any event, EPCs are thought to be a heterogeneous population, unlike late EPCs, which have a high ability to proliferate.

Circulating EPCs are up-regulated under physiological or pathological conditions and also by 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase inhibitors (14, 15) and cytokines such as erythropoietin (11–13) and G-CSF (10). In this report, we have revealed the possibility of marked expansion of EPCs *in vitro* by TPO. Brizzi *et al.* (20) have reported that TPO directly stimulates endothelial cell motility and neoangiogenesis. In the present study, TPO may have played a stimulatory role in the differentiation of EPCs from circulating stem cells.

Although both TPO and SCF have the same potency with regard to proliferation of AC133⁺ cells (Fig. 4A), TPO specifically induces an increase in the ratio of the CD31^{bright} cell population when compared with SCF (Fig. 4, B and C). To develop useful cell therapy products for severe ischemia, it has been considered desirable to establish the efficient expansion of EPCs *in vitro*. Thrombopoietin could increase CD31^{bright} cells (EPCs) even in the absence of VEGF. Kirito *et al.* (38) have reported that TPO enhances expression of VEGF in hematopoietic cells through induction of hypoxia-inducible factor 1 α . These observations suggest the possibility that the production of EPCs by TPO may be supported by VEGF produced by AC133⁺ cells. However, from the perspective that TPO and VEGF have synergistic effects on the induction of EPCs, TPO seems to induce EPCs through another signaling cascade.

Thrombopoietin is a major regulator of the proliferation, differentiation, and maturation of megakaryocytes (39, 40). The results from recent studies suggest that TPO can act not only as a lineage-specific hematopoietic growth factor but also can affect other hematopoietic cell types. For example, TPO alone does not induce proliferation of long term repopulating hematopoietic stem cells. However, in combination with SCF or IL-3, TPO has several synergistic effects on cell proliferation (19). Our results have revealed a new role of TPO in the production of EPCs.

In the process of differentiation of AC133⁺ cells into CD31^{bright} cells, both peripheral blood and cord blood appear to be very similar. AC133⁺ cells of cord blood, however, have a stronger ability to proliferate than those of peripheral blood (Fig. 6A). Moreover, TPO stimulates the induction of CD31^{bright}VEcad⁻ cells only from cord blood (Fig. 5B) at high concentrations. Hur *et al.* (26) have reported that VEcad⁻ EPCs are thought to be an early EPC. It is therefore thought that AC133⁺ cells of cord blood are more immature than those of peripheral blood.

Although the total cell number treated with TPO slightly increased in a dose-dependent manner (Fig. 5A), the CD31^{bright} cell number markedly increased as the TPO concentration increased (Fig. 5B). These data suggest the possibility that a higher concentration of TPO may be needed for CD31^{bright} cell induction from AC133⁺ cells.

When AC133⁺ cells were stimulated by TPO or VEGF, an increase in the phosphorylation of Akt at Ser-473 was observed. This increase was strongly enhanced by concomitant treatment with VEGF and TPO (Fig. 7A). The induction of CD31^{bright} cells by these growth factors (Fig. 4D) was consistent with the increase in the phosphorylation of Akt at Ser-473. TPO but not VEGF could also stimulate the phosphorylation of STAT3 at Tyr-705. We previously reported that the PI3K/p70 S6 kinase pathway and the JAK/STAT3 pathway were important for proliferation and differentiation, respectively, in neutrophilic differentiation (41, 42). Owing to the stimulation of both the PI3K/Akt and the JAK/STAT pathways, we postulated that TPO may be a stronger stimulator of EPC production than VEGF. As shown in Fig. 7B, however, wortmannin could not completely inhibit the induction of CD31^{bright} cells. Therefore, a pathway other than the PI3K/Akt pathway may also work for the proliferation and differentiation of EPCs.

The observation of unfavorable angiogenesis has recently been reported after transplantation of bone marrow mononuclear cells in patients with thromboangiitis obliterans (43). Moreover, transfer of both spleen cell-derived EPCs and bone marrow mononuclear cells accelerate atherosclerosis in apoE knockout mice, whereas EPC transfer reduces markers associated with plaque stability (44). These observations suggest that transplantation of differentiated cells from EPCs may be useful therapy as regenerative medicine.

In conclusion, we have demonstrated a new role of TPO in enhancing the differentiation of AC133⁺ cells into CD31^{bright} cells (EPCs) *in vitro*. These findings may contribute to further development of cell therapy for critical ischemia.

Acknowledgments—We thank Saitama Red Cross of Japan (Saitama, Japan) and Metro Tokyo Red Cross Cord Blood Bank (Tokyo, Japan) for their kind cooperation. We also thank Kirin-Amgen Inc. for their kind gift of recombinant TPO and recombinant SCF.

REFERENCES

- Asahara, T., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, C., Pastore, C., Silver, M., Kearne, M., Wagner, M., and Isner, J. M. (1999) *Circ. Res.* 85, 221–228
- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G., and Isner, J. M. (1997) *Science* 275, 964–967
- Asahara, T., Takahashi, T., Masuda, H., Kalka, C., Chen, D., Iwaguro, H., Inai, Y., Silver, M., and Isner, J. M. (1999) *EMBO J.* 18, 3964–3972
- 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., and Hammond, W. P. (1998) *Blood* 92, 362–367
- Takahashi, T., Kalka, C., Masuda, H., Chen, D., Silver, M., Kearney, M., Wagner, M., Isner, J. M., and Asahara, T. (1999) *Nat. Med.* 5, 434–438
- Nieda, M., Nicol, A., Denning-Kendall, P., Sweetenham, J., Bradley, B., and Hows, J. (1997) *Br. J. Haematol.* 98, 775–777
- Gill, M., Dias, S., Hattori, K., Rivera, M. L., Hicklin, D., Witte, L., Girardi, L., Yurt, R., Himel, H., and Rafii, S. (2001) *Circ. Res.* 88, 167–174
- Peichev, M., Naiyer, A. J., Pereira, D., Zhu, Z., Lane, W. J., Williams, M.,

Ex Vivo Expansion of EPC by TPO

- Oz, M. C., Hicklin, D. J., Witte, L., Moore, M. A., and Rafii, S. (2000) *Blood* 95, 952–958
9. Rehman, J., Li, J., Orschell, C. M., and March, K. L. (2003) *Circulation* 107, 1164–1169
10. Kocher, A. A., Schuster, M. D., Szabolcs, M. J., Takuma, S., Burkhoff, D., Wang, J., Homma, S., Edwards, N. M., and Itescu, S. (2001) *Nat. Med.* 7, 430–436
11. Bahlmann, F. H., De Groot, K., Spandau, J. M., Landry, A. L., Hertel, B., Duckert, T., Boehm, S. M., Menne, J., Haller, H., and Fliser, D. (2004) *Blood* 103, 921–926
12. Bahlmann, F. H., DeGroot, K., Duckert, T., Niemczyk, E., Bahlmann, E., Boehm, S. M., Haller, H., and Fliser, D. (2003) *Kidney Int.* 64, 1648–1652
13. Heeschen, C., Aicher, A., Lehmann, R., Fichtlscherer, S., Vasa, M., Urbich, C., Mildner-Rihm, C., Martin, H., Zeiher, A. M., and Dimmeler, S. (2003) *Blood* 102, 1340–1346
14. Dimmeler, S., Aicher, A., Vasa, M., Mildner-Rihm, C., Adler, K., Tiemann, M., Rutten, H., Fichtlscherer, S., Martin, H., and Zeiher, A. M. (2001) *J. Clin. Invest.* 108, 391–397
15. Llevadot, J., Murasawa, S., Kureishi, Y., Uchida, S., Masuda, H., Kawamoto, A., Walsh, K., Isner, J. M., and Asahara, T. (2001) *J. Clin. Invest.* 108, 399–405
16. Kaushansky, K., Lok, S., Holly, R. D., Broudy, V. C., Lin, N., Bailey, M. C., Forstrom, J. W., Buddle, M. M., Oort, P. J., Hagen, F. S., Roth, G. J., Papayannopoulou, T., and Foster, D. C. (1994) *Nature* 369, 568–571
17. Fox, N., Priestley, G., Papayannopoulou, T., and Kaushansky, K. (2002) *J. Clin. Invest.* 110, 389–394
18. Kimura, S., Roberts, A. W., Metcalf, D., and Alexander, W. S. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 1195–1200
19. Sitnicka, E., Lin, N., Priestley, G. V., Fox, N., Broudy, V. C., Wolf, N. S., and Kaushansky, K. (1996) *Blood* 87, 4998–5005
20. Brizzi, M. F., Battaglia, E., Montrucchio, G., Dentelli, P., Del Sorbo, L., Garbarino, G., Pegoraro, L., and Camussi, G. (1999) *Circ. Res.* 84, 785–796
21. Kaushansky, K., Lin, N., Grossmann, A., Humes, J., Sprugel, K. H., and Broudy, V. C. (1996) *Exp. Hematol.* 24, 265–269
22. Broudy, V. C., Lin, N. L., and Kaushansky, K. (1995) *Blood* 85, 1719–1726
23. Kaushansky, K., Broudy, V. C., Grossmann, A., Humes, J., Lin, N., Ren, H. P., Bailey, M. C., Papayannopoulou, T., Forstrom, J. W., and Sprugel, K. H. (1995) *J. Clin. Invest.* 96, 1683–1687
24. Kobayashi, M., Laver, J. H., Kato, T., Miyazaki, H., and Ogawa, M. (1995) *Blood* 86, 2494–2499
25. Kanayasu-Toyoda, T., Yamaguchi, T., Oshizawa, T., and Hayakawa, T. (2003) *J. Cell. Physiol.* 195, 119–129
26. Hur, J., Yoon, C. H., Kim, H. S., Choi, J. H., Kang, H. J., Hwang, K. K., Oh, B. H., Lee, M. M., and Park, Y. B. (2004) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 288–293
27. Yoon, C. H., Hur, J., Park, K. W., Kim, J. H., Lee, C. S., Oh, I. Y., Kim, T. Y., Cho, H. J., Kang, H. J., Chae, I. H., Yang, H. K., Oh, B. H., Park, Y. B., and Kim, H. S. (2005) *Circulation* 112, 1618–1627
28. Miyakawa, Y., Rojnuckarin, P., Habib, T., and Kaushansky, K. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 2494–2502
29. Drachman, J. G., Sabath, D. F., Fox, N. E., and Kaushansky, K. (1997) *Blood* 89, 483–492
30. Kirito, K., Watanabe, T., Sawada, K., Endo, H., Ozawa, K., and Komatsu, N. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 8329–8337
31. Li, A., Dubey, S., Varney, M. L., Dave, B. J., and Singh, R. K. (2003) *J. Immunol.* 170, 3369–3376
32. Mizukami, Y., Jo, W. S., Duerr, E. M., Gala, M., Li, J., Zhang, X., Zimmer, M. A., Iliopoulos, O., Zukerberg, L. R., Kohgo, Y., Lynch, M. P., Rueda, B. R., and Chung, D. C. (2005) *Nat. Med.* 11, 992–997
33. Salcedo, R., Ponce, M. L., Young, H. A., Wasserman, K., Ward, J. M., Kleinman, H. K., Oppenheim, J. J., and Murphy, W. J. (2000) *Blood* 96, 34–40
34. Lin, Y., Weisdorf, D. J., Solovey, A., and Heibel, R. P. (2000) *J. Clin. Invest.* 105, 71–77
35. Assmus, B., Schachinger, V., Teupe, C., Britten, M., Lehmann, R., Dobert, N., Grunwald, F., Aicher, A., Urbich, C., Martin, H., Hoelzer, D., Dimmeler, S., and Zeiher, A. M. (2002) *Circulation* 106, 3009–3017
36. Kalka, C., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka-Moll, W. M., Silver, M., Kearney, M., Li, T., Isner, J. M., and Asahara, T. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 3422–3427
37. Kawamoto, A., Gwon, H. C., Iwaguro, H., Yamaguchi, J. I., Uchida, S., Masuda, H., Silver, M., Ma, H., Kearney, M., Isner, J. M., and Asahara, T. (2001) *Circulation* 103, 634–637
38. Kirito, K., Fox, N., Komatsu, N., and Kaushansky, K. (2005) *Blood* 105, 4258–4263
39. Kelemen, E., Cserhati, I., and Tanos, B. (1958) *Acta Haematol. (Basel)* 20, 350–355
40. Yamamoto, S. (1957) *Acta Haematol. Jpn.* 20, 163
41. Kanayasu-Toyoda, T., Yamaguchi, T., Uchida, E., and Hayakawa, T. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 25471–25480
42. Yamaguchi, T., Mukasa, T., Uchida, E., Kanayasu-Toyoda, T., and Hayakawa, T. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 15575–15581
43. Miyamoto, K., Nishigami, K., Nagaya, N., Akutsu, K., Chiku, M., Kamei, M., Soma, T., Miyata, S., Higashi, M., Tanaka, R., Nakatani, T., Nonogi, H., and Takeshita, S. (2006) *Circulation* 114, 2679–2684
44. George, J., Afek, A., Abashidze, A., Shmilovich, H., Deutsch, V., Kopolovich, J., Miller, H., and Keren, G. (2005) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 2636–2641

10 ヒト細胞治療薬の品質と安全性確保について

やまぐち てるひで
山口 照英

国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部

山口 照英
1976年神戸大学大学院理学研究科修士課程終了。同年東京都臨床医学総合研究所炎症研究室研究員、87年国立衛生試験所生物化学部主任研究、91年同第3室長、2002年国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部長、06年同生物薬品部長。
研究テーマはバイオ医薬品及び細胞治療薬の品質・安全性確保技術の開発。趣味は読書。

Key words :細胞治療薬, 薬事法, 細胞・組織加工医薬品, 品質と安全性

Abstract

再生医療・細胞治療の開発が急速に進んでいるが、臨床研究や高度先進医療としての開発に比較し薬事法の規制を受ける細胞治療薬の開発が遅れているといわれている。より再生医療・細胞治療を広く国民に提供して行くには、臨床研究等の成果を生かし薬事法の規制のもとに細胞組織加工医薬品等（細胞治療薬；医薬品や医療機器を含む）として開発することが望まれる。本稿では、細胞治療薬を適切に開発して行くために求められるウイルス等の感染因子に対する安全確保、製法の確立や恒常性の維持、品質管理のありかた等について概説した。

はじめに

発生学や幹細胞研究の飛躍的な進展に加え、種々の細胞への分化誘導や増幅法などの培養技術やバイオテクノロジー応用技術の進歩により、ヒトまたは動物の細胞や組織を培養、加工し、さまざまな疾患の治療に用いる細胞治療薬やそれを用いた医療技術の開発が進んでいる。さらに、これらの開発では治験や臨床研究といった異なるアプローチがとられており、医薬品・医療用具といった薬事法上の規制のかかる製品開発を目指す場合ばかりでなく、高度先進医療としての実用化を目指している場合もある。本稿では、特に薬事法の規制を受ける細胞

治療薬（細胞・組織加工医薬品等）の指針で求められている開発に当たっての要点を概説する。さらには各国の規制状況との比較を行い、実用化において特に注意を払うべき点について考察したい。

細胞治療薬は、極めて複雑な構造を持ち、かつ生きているというダイナミックな特性を併せ持つことから、従来の医薬品に適用されていた品質管理や、非臨床試験や臨床試験の必要事項は必ずしも適用出来るわけではない。さらに、生きた細胞を投与するために、これまでのバイオ医薬品等のように高度な精製やウイルス不活化・除去工程を適用することが困難であり、安全性に関して特別な配慮が必要とされる。厚生労働省からは、表1にあげたような細胞治療薬に関するいくつかの指針や基準が出されている。特に、平成12年に出された医薬発第1314号通知の別添1¹⁾、及び別添2²⁾は、ヒト細胞治療薬の規制の根幹をなす指針である。別添1は、細胞治療薬の製造に当たって、その採取行為から加工、製造における取り扱いや使用に当たっての基本的要件を示している。別添2は、ヒト由来細胞治療薬に焦点をあて、その品質・安全性・有効性確保のための要件をまとめたもので、承認申請のみならず治験前の確認申請で求められる資料についても明らかにされている。この確認申請の制度は、細胞治療薬については未知・未経験の要素が多いことから、その治験

Quality control and Safety of human cell therapy products : Teruhide Yamaguchi : National Institute of Health Sciences. Division of Biological Chemistry and Biologicals.

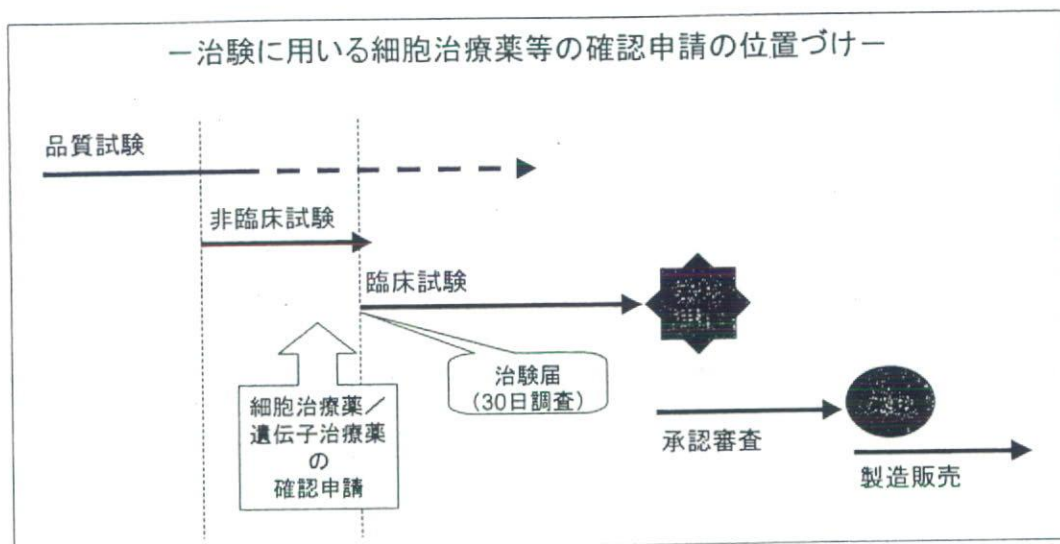


図1 薬事法に基づく先端医薬品の品質・安全性の確保

表1 我が国における細胞治療薬（再生医療）に関連する指針や通知

細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方 (医薬発第1314号 別添1)
ヒト由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針 (医薬発第1314号 別添2)
生物由来製品及び特定生物由来製品の指定並びに生物由来原料基準の制定等について (医薬発第052001号)
生物由来製品に関する感染症定期報告制度について (医薬発第051508号)

を開始する前に一定の品質・安全性を担保することを目的として、厚生労働大臣にその確認を求めるとされているものである（図1）。確認申請は、治験の申請前に行われ、その段階で必要とされるデータはあくまでも安全に治験を実施するに足る品質・安全性が確保されているかを確認するためのものである。このような確認申請は、他には遺伝子治療薬にのみ適用されている制度である。

第1314号については現在見直し作業が進行中であり、指針をヒト自己由来細胞製品とヒト同種由来細胞製品に分ける予定である。それぞれの指針については、今後の議論を通じて変更される可能性があり、本稿ではこれまでの指針に

沿った概説を行うと共に、必要に応じて現時点で示されている改正案についても触れていくことにする。

1. ヒト由来細胞治療薬関連指針の概要

1) ヒト由来細胞を用いた細胞・組織加工医薬品等の定義

細胞治療に用いる細胞・組織加工医薬品等とは、ヒトあるいは動物由来の細胞・組織を加工した医薬品又は医療用具と定義される。本稿では前述したように、細胞・組織加工医薬品等を細胞治療薬と略す。前記した通知や指針は、細胞治療に用いる医薬品や医療用具を企業が開発しようとする場合を対象としており、細胞治療の臨床研究については対象外とされている。

2) 「指針」の対象とする範囲

「指針」等の対象とする範囲として、輸血用血液製剤、移植医療としての骨髄移植、臍帯血移植、ヒト皮膚や骨等を直接利用する医療行為は含まれていない。また細胞・組織の加工としては、*in vitro*での増殖、薬剤処理による細胞の活性化あるいは生物学的特性の改変、遺伝子工

学的改変を指し、単なる遠心操作等の細胞・組織の分離や抗生物質処理及びガンマ線等の滅菌、冷凍、解凍は含まれない。欧米では、我が国で移植医療として分類される製品についても細胞治療薬として規制がかけられており、この点が大きな違いである。日米欧の細胞治療薬（細胞治療製品）の規制の違いについては、表2を参照されたい。

3) 細胞治療薬等の品質や安全性面での問題点

「指針」の安全性面で最も重視されている点はウイルス等の感染症伝播をいかに防止するかである。細胞治療に用いる細胞は滅菌や高度な精製といった処理ができないため、原材料や製造に用いられる試薬や血清等へのウイルス等の混入を如何に防止するかが最重要課題となる。また、製品に感染因子が混入した場合、患者ばかりでなく患者の家族や医療従事者等へも感染が広がる危険性があり、公衆衛生の観点も含め十分な対策が求められる。この点は、欧米のガイドラインとも共通している点であり、細胞治療薬の基本的要件である。

しかし、ウイルス試験にも検出限界があり、また未知のウイルスの存在も考えられるため、ウイルスの潜在を前提とした対策が求められる。原材料となる細胞・組織に関する記録や最終製品の製造記録や試験及び検査記録の保存、可能であれば採取した細胞・組織の一部を保管することが求められている。これは、将来患者に当該製品が原因と推定されるような感染症が発症した場合の原因解明を可能とするための措置である。また、製品が生物由来原料基準に基づき、特定生物由来製品や生物由来製品の指定を受けた場合には、それぞれの指定に応じた上乘せ的安全対策が必要となる。

2. 指針等で求められる細胞治療薬の要件

1) 基原または発見の経緯及び外国等における使用状況

細胞治療薬の開発の経緯やその特徴などにつ

いて明らかにすることが求められる。また、外国等での使用状況についても明らかにする必要がある。一方、ヒト由来細胞を用いた細胞治療薬の開発では、先行して実施された国内での臨床研究の技術移転をうけているケースも多くあり、技術移転を受けた臨床研究の実施状況についての情報も提供されなければならない。

2) 原材料となる細胞・組織の由来と選択基準

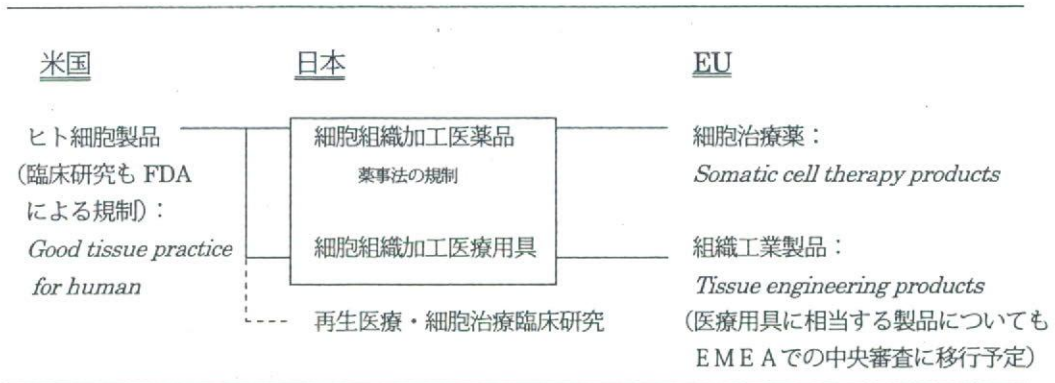
第1314号指針では、原材料として用いられる細胞・組織が自己由来であるか非自己であるかを明確にすることが求められるが、改正予定の指針では自己と同種とに分けられる予定である。細胞・組織の入手方法及びその生物学的特徴について説明し、細胞・組織を選択した理由を明らかにする必要がある。原材料となる細胞・組織の特性と適格性について、形態学的特徴、増殖特性、生化学的指標、免疫学的特徴、特徴となる細胞由来産生物質等、遺伝型や表現型から適切な指標を選択して解析し、明らかにすることが求められる。

特にHBV, HCV, HIV, HTLVや、必要に応じてバルボウイルスB19, サイトメガロウイルスやEBウイルスについて血清学的試験や核酸増幅法等の検査を行う必要がある。さらに、細菌や真菌等の試験が必要となる。また、問診や病歴等も考慮した上で、ドナーとしての適格性を評価する必要がある。この場合、ヒト同種由来細胞製品のみならず、ヒト自己由来細胞製品についても、製造工程での作業従事者の安全性、他の製品に対する交差汚染防止の観点から、ウイルス等の必要な試験の実施を考慮することが求められる。ウイルス等の検査においては、PCR等を用いても検出出来ないウインドウ期の存在があることから、適切な時期に再検査を行うことが推奨されている。

3) 採取行為及び利用の妥当性

細胞・組織採取時のドナーに対する説明及び同意の内容を明らかにし、細胞の採取部位、採取方法が科学的及び倫理的に適切であることを

表2 細胞治療製品の規制の枠組み 一日米欧比較



示す必要がある。また、ドナーに対して細胞・組織の利用目的、個人情報の保護、その他採取に関する事項について理解を得るよう文書を用いて十分に説明し、自由意志に基く同意を文書によって得ることが必要である。さらに、採取施設において細胞・組織の採取の倫理及び科学的観点からの十分な審議が行える倫理委員会を設置することが求められる。

原材料となる細胞・組織について、安全性確保上必要な情報が確認できるようにドナーに関する記録が整備、保管されていることが必要である。これらの記録の保管は、製造記録とともに製品の最終有効期限より少なくとも10年間とされている。この期間については、遅発性感染症に関する新たな情報の蓄積によって今後再検討が必要とされている。また、治療の成否の検証や患者等が感染症を発症した場合等の原因究明のために、採取した細胞・組織の一部等の適当な試料を、適切な期間保存することが推奨されている。

4) 製造方法

①原材料等

細胞治療薬の製造に際しては、製品がロットを構成する場合には、原材料、最終製品、必要に応じて中間段階の製品についてロットごとに品質管理法を設定する必要がある。ロットを構

成しない場合は、各製品の使用目的や使用方法に適合する品質規格、出荷基準等を設定しなければならない。

①-1) 細胞培養方法

製造工程で細胞培養を行う場合は、培地の組成、培養条件、培養期間、収率等を具体的に記載することが求められている。使用する材料は、医薬品又は医薬品原料に匹敵する基準で品質管理されているものを用いる必要がある。全ての成分を含む培地成分に関しては、ロットごとの無菌性試験を実施するとともに、目的とする培養に適合していることを確認するための性能試験を実施することが必要である。

血清は、必須でなければ使用しないことが望ましく、使用が避けられない場合には、血清からの感染因子の混入・伝播の防止策を設ける必要がある。特にウシ血清を用いる場合には、i) 血清の由来を明確にし、ii) 牛海綿状脳症の発症地域以外の血清を用いること、iii) ウイルス等の感染因子に関して適切な否定試験を行ったものを用いること、iv) 潜在的なウイルスのリスクを避けるための放射線処理等の安全対策を実施するとともに、使用した血清の一部を保管しておくことが求められる。大学等での臨床研究では多くの場合自己血清が使用されているが、技術移転を受けて開発されてきた製品では、多くの場合ウシ血清が用いられることが多い。これは、ヒト血清では開発企

業がその製品の恒常性、一定の品質を担保することが困難であったためと推察される。もちろんウシ血清の使用は必須でなければ使用しないことが求められるが、やむを得ない場合にはその臨床上の有用性等も考慮して判断されることになる。ヨーロッパ医薬品庁 (EMEA) の細胞治療薬の指針ではヒト血清を用いる場合には自己由来血清を用いるべきとされており、またウシ血清を用いる場合には、我が国の同様の要件が求められている³⁾。

抗生物質については極力使用を避けるべきであるが、やむを得ず使用する場合には最終製品での残存性を極力低減化する使用方法を考えるべきである。他の培地成分や添加される試薬等についても、最終製品での残存性を考慮し、生体に悪影響を及ぼさないものを選択することが求められる。

フィーダー細胞として異種細胞を用いる場合には、「異種移植に関する指針」⁴⁾等を参考に安全性を確保することが必要となる。その際、セルバンクシステムを確立し、マスターセルバンク(MCB)で徹底的な安全性評価を行うと共に、条件を超えて製造された細胞についても安全性を評価し、フィーダー細胞として製造に用いる期間における、安全性やその機能の担保を行っておくことが求められる。

②-2) 非細胞成分と組み合わせる場合

細胞成分とともに最終製品の一部として用いられる原材料(シートやマトリックス、医療材料等)に関しては、品質・安全性に関する適切な情報を提供することが求められる。必要な試験については、「医療用具の製造(輸入)承認申請に必要な生物学的試験の基本的考え方について」(医薬審発第0213001号)⁵⁾等を参照し、試験結果を示すと共に当該原材料を使用することの妥当性を示すことが必要となる。妥当性の提示に当たっては、文献からの知見、情報を合理的に活用することが可能である。

また目的とする細胞との相互作用について明らかにすることが求められる。特に、基材との相互作用により、臨床適応に必要な細胞の機能や増殖性、安定性に悪影響を及ぼすことがない

かを明らかにしておく必要がある。

③-3) 細胞に遺伝子工学的改変を加える場合

細胞に遺伝子工学的改変を加える場合は、①目的遺伝子の由来、②入手方法、③クローニング法、④細胞バンク作成法や管理法、更新法、⑤目的遺伝子の構造、⑥導入遺伝子の性質、⑦目的遺伝子産物の構造、⑧遺伝子構成体の作製手順、原材料、性質、⑨遺伝子構成体の構造や特性、⑩ベクターや遺伝子構成体を作製するための細胞やウイルスのバンク化、バンクの管理法について明らかにすることが求められる。

②製造工程

原材料の細胞・組織等の受け入れから最終製品製造における加工の方法(製造工程)の概要を示すと共に、各工程での処理の内容、工程管理、品質管理について詳細な説明が求められる。

細胞の加工

細胞・組織の受け入れのために必要な試験を実施するとともに、受け入れ基準を設定しておく必要がある。採取した細胞塊や組織等について、必要且つ可能であればポビドンヨード液等を用いた除菌・不活化を実施することが求められる。当然このような操作は採取した細胞塊や組織の表面に付着した細菌や真菌、ウイルス等の不活化、除去の処理にのみ適用可能である。

細胞の培養を行う場合には培地の組成、培養条件、培養期間、収率等を明らかにする必要がある。

細胞のバンク化を行う場合には、医薬品製造に用いられる細胞基材に関するICH Q5Dガイドライン⁶⁾を参照することが求められる。

さらに採取した細胞の取り違い防止策やクロスコンタミネーションの防止策を明らかにし、その妥当性を説明することが求められる。患者に感染症が発症した場合の原因究明の一助にするために、採取した細胞・組織の一部を適切な期間保存しておくことを考慮すべきである。

③加工した細胞の特性解析

工程評価の一環として、加工した細胞の変化を調べておくことが求められる。このために、形態学的特徴、増殖特性、生化学的指標、免疫

学的指標、細胞の特性に関連する細胞由来産生物質などの指標から、適切なものを選び解析することが必要である。また培養期間中に望ましくない特性の変化が起きていないことを確認するために、規定された培養期間を超えて培養された細胞について試験を行い、目的としない望ましくない細胞の変化が起きないことを確認しておくことが必要となる。

培養期間や加工の程度に応じて、細胞の形質転換の可能性について評価しておくことが必要となる。しかし非常に短期間の培養であれば核型分析の必要性は低いと考えられる。また、細胞治療薬の大きな懸念として造腫瘍性があるが、そのリスクが高い場合には、ヌードマウスを用いた造腫瘍性試験等の実施も考慮すべきである。しかし、増殖能の変化、サイトカインや増殖因子に対する応答性等、その他の適切な試験も考慮し、科学的に合理的な試験を実施することが望ましい。例えば、FDAも一律に細胞治療薬について造腫瘍性試験を求めてはおらず、そのリスクの高い場合にのみヌードマウスを用いた試験が必要になるとされている。

④製造方法の恒常性

細胞治療薬の製造方法の恒常性を示すために、製造工程を通じて、加工した製品の細胞生存率や製品の有効性や安全性の面から求められる表現型や遺伝型の適切な指標、機能特性、目的とする細胞の含有率等が本質的に損なわれないことを評価しておくことが必要である。このために、複数の検体（ロット）を用いた試験を実施することが必要である。どの程度のロットを用いるのかは、培養工程等、どのような加工を行うか、あるいは確認申請のステージか承認申請かどうかによっても異なる。

5) 最終製品の品質管理

細胞治療薬の品質管理には、①最終製品等の規格及び試験方法の設定、②適用ロット毎の原材料の品質管理、③製造工程の妥当性の検証と一定性の維持、④各工程の中間製品の品質管理を適正に行い、品質管理全体からみたその妥当

性を明らかにする必要がある。

最終製品については、表3に示したような品質管理項目及び試験を参考として、適切な規格・試験方法を設定することが必要となるが、ロットを構成しない場合には、個別製品が品質管理の対象となる。ロットを構成する場合には、個別の製品ではなく各ロットが品質管理の対象となる。例えば、自己由来細胞製品であっても、製造後、複数のアンプルに分注して凍結し、繰り返し投与する製品では、凍結した全アンプルが一つのロットを構成することになる。

確認試験では、目的とする細胞の生化学的特徴、免疫学的特徴、目的細胞の産生する物質などの指標から、適切なものを選択して設定することが必要となる。

細胞の純度試験としては、目的細胞以外の異常増殖細胞の出現、形質転換細胞の有無や混入細胞の有無等の細胞の純度について試験を行い規格を設定することが求められる。

製造工程由来不純物試験として、原材料に存在するが、又は製造過程で非細胞・組織成分、培地成分、資材、試薬などに由来し、製品中に混入物、残留物、あるいは新たな生成物、分解物等として存在する可能性があるもので、かつ品質、安全性面からみて望ましくない物質等について、適切な試験を実施し、規格を設定することが必要となる。例えば、ウシ胎児血清由来タンパク質、増殖因子、あるいは抗生物質など、必要に応じて最終製品への存在許容量を設定しておく必要がある。

無菌試験及びマイコプラズマ否定試験については、適切な検体を用いてあらかじめ試験を行い、全例において無菌性を確認しておくことが必要である。また、無菌性試験の結果が患者への投与後になる場合も無菌性試験を実施し、万が一投与後に無菌性が否定された場合の対処法について設定しておくことが必要である。エンドトキシン試験では、規格値は必ずしも実測値によらず、日本薬局方で示されている最終製品の1回投与量をもとにした安全域を考慮して設定すればよい。製造工程中で使用する生物由来

原料などを考慮して、最終製品等について必要なウイルスの試験を実施する必要がある場合もある。また、製造工程中、潜在しているウイルスが増幅する可能性がある場合には、中間製品、最終製品等でウイルスの存在を試験する必要もある。

それぞれ臨床使用目的に応じた細胞の効能試験を実施する必要がある場合もある。例えば、幹細胞等を用いて特定の細胞への機能分化を期待する場合には、その分化能を試験し、規格を設定する必要があると考えられる。また、遺伝子改変細胞であれば改変によってもたらされた特定タンパク質の発現について規格を設定することが求められる。

細胞から分泌される特性の生理活性物質がその効能である場合には、力価試験としてその生理活性物質の発現量に関する規格・試験法を設定することが必要となる。

確認申請の段階では、全ての規格が設定出来ることはまれであり、その後の臨床開発を通じて適切な規格が設定されていくものと考えられる。従って、いくつかの試験項目については少数の検体で得られた試験結果に基づいて暫定基準を設けておくことで対応可能な場合がある。

6) 安定性

製剤化した細胞治療薬や重要な中間工程製品について、保存や流通期間を考慮した安定性試験を実施する必要がある。試験では、細胞の生存率、力価等の適切な項目を選び、試験を実施することが求められる。その結果に基づいて、貯法や有効期間を設定することが必要である。また凍結保存を行う場合には、凍結操作による、生存率や増殖能、力価等への影響を確認することが必要となる。

7) 細胞治療薬の非臨床安全性試験

細胞治療薬の非臨床安全性試験として、可能であれば、科学的合理性のある範囲で動物を用いた試験、あるいは *in vitro* での試験を実施することが求められる。

ヒト由来細胞治療薬の試験用検体は貴重で限りがあり、又、異種細胞であるヒト細胞を動物に投与して得られる結果の有用性については限りがあると考えられることから、動物細胞を用いた製品モデルを作製し適切な実験動物に適用する試験系が、科学的合理性がある場合も考えられる。またこのような試験によって、より有用な知見が得られると考えられる場合には、試験の実施を考慮することが望ましい。場合によっては動物細胞を用いる試験系も考慮し、以上のようなアプローチにより試験を行なった際には、その妥当性を明らかにすることが必要である。

8) 細胞治療薬の効能または性能を裏付ける試験

一般的に種の壁があるため、動物を用いてヒト由来細胞治療薬の効能や性能を裏付ける試験を実施することにはその解釈も含めて困難が伴う。このために、モデル動物の相同細胞を用いた評価系やヌードマウスに当該ヒト細胞を投与するなどの様々な工夫が試みられている。しかし、モデル動物での反応性がヒトと同じであるとは限らず、モデル動物を用いた試験が必ずしも適切な評価系とは言えないことも多い。従って、技術的に可能かつ科学的に合理性のある範囲で、実験動物、細胞等を用いて、適切に設計された試験により、細胞治療薬の機能発現、作用持続性、医薬品・医療機器として期待される効果を検討することが望ましい。また、既に確立された適当な動物由来細胞・組織製品モデルや疾患モデル動物がある場合には、それを用いて治療効果を検討することが必要となる。また、必要に応じて、文献や知見等により合理的に細胞治療薬の効力又は性能が他の治療法に比較して勝れていることが期待できる場合には、臨床開発の初期段階として詳細な動物実験等は必要とされない可能性もある。

特に開発に当たって参照可能な臨床研究の成果があり、効能または性能を裏付ける情報が得られる場合には、モデル動物を用いた試験の必

表3 最終製品の品質管理項目及び試験

1) 回収率並びに生存率
2) 確認試験
3) 細胞の純度試験
4) 細胞由来の目的外生理活性物質に関する試験
5) 製造工程由来不純物試験
6) 無菌試験及びマイコプラズマ否定試験
7) エンドトキシン試験
8) ウイルス等の試験
9) 効能試験
10) 力価試験
11) 力学的適合性試験

要性はより低くなると考えられる。この場合にも、臨床研究の成果を参照することの妥当性を説明することが必要となる。

9) 臨床試験

治験に当たっては、①対象疾患、②対象とする被験者及び被験者から除外すべき患者の考え方、③細胞・組織加工医薬品等の適用を含め、被験者に対して行われる治療内容、④既存の治療法との比較を踏まえた臨床試験実施の妥当性、⑤現在得られている情報から想定されるリスクやベネフィットを含め、被験者への説明事項等を明確にしておくことが求められる。

おわりに

近年、非常に多岐にわたる細胞治療薬の開発が進められているが、未だ承認に至った製品はない。平成19年に「ヒト培養表皮」が医療機器・体外診断薬部会で承認され、近いうちに我が国初の細胞治療薬が市場に出されることになると考えられる。しかし、現状では次々に製品が市場に提供されるという状況ではなく、現在の開発スピードから類推して、多くの細胞治療薬が市場に出てくるのはもう少し先になるのではと推察される。このような状況を受け、細胞

治療薬の適正な開発を推進するという立場から、現在第1314号の改定が進められて評価基準がよりわかりやすく、かつ臨床開発初期、すなわち確認申請の段階に必要な要素等が明確にされる予定である。そのヒト自己由来細胞に関する指針案は既に公開されている。

参考文献

- 1) 細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方：厚生労働省医薬局長通知医薬発第266号、平成13年3月28日
- 2) ヒト由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針：厚生労働省医薬局長通知医薬発第1314号、平成12年12月26日
- 3) GUIDELINE ON HUMAN CELL-BASED MEDICINAL PRODUCTS ; EMEA/CHMP/410869/2006, 11 January 2007
- 4) “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3T3J2株及び3T3NIH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：医政局研究開発振興課長通知、医政研発第0702001号、平成16年7月7日
- 5) 医療用具の製造（輸入）承認申請に必要な生物学的試験の基本的考え方について：医薬局審査管理課長通知、医薬審発第0213001号、平成15年2月13日
- 6) 生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析：医薬審第873号、平成12年7月14日

<BIO Information>

第17回日本耳科学会

日本耳科学会は下記日程で
学術総会を開催します。

- 会 期：2007年10月18日(水)～20日(土)
会 場：福岡市・福岡国際会議場
会 長：小宗 静男（九州大学大学院医学
研究院 耳鼻咽喉科学分野）

連絡先：九州大学：TEL (092) 642-5668
／FAX (092) 642-5685

※バックナンバーを会場で販売予定です。
お立ち寄り下さい。

細胞組織利用医薬品・医療機器の安全性とその有用性評価

山口照英,^{*,a} 土屋利江^b

Safety and Efficacy of Cell/Tissue Medical Products

Teruhide YAMAGUCHI^{*,a} and Toshie TSUCHIYA^b^aDivision of Biological Chemistry and Biologicals, and ^bDivision of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

近年、バイオテクノロジー応用技術の進歩や再生医学・幹細胞研究の飛躍的な進展により、ヒト又は動物の細胞や組織を培養、加工し、様々な疾患の治療に用いる細胞治療の開発が急速に進んでいる。このように細胞そのものを治療薬として用いることができれば、ガン、再生不良性貧血、心筋梗塞など致死的な疾患ばかりでなく、糖尿病やパーキンソン病等の重篤な慢性疾患に対して極めて有効な治療法になる可能性が高い。

厚生労働省では、この細胞治療・再生医療に用いられる細胞組織利用医薬品・医療機器（細胞・組織利用医薬品等）の安全性及び品質の確保のために必要な基本的要件を明らかにするため、平成12年、「細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方」、及び「ヒト由来細胞・組織利用医薬品等の品質及び安全性確保に関する指針」（以下「指針」と略す）を策定した。前者は、細胞組織利用医薬品等の品質及び安全性確保、並びに細胞・組織の採取からその取り扱いに関する科学的妥当性及び倫理的妥当性を確保するために遵守すべき基本的原則をまとめたものである。後者の指針は、前者の通知に基づき、ヒト由来の細胞・組織を加工した製品について、治験前の品質・安全性確認を含めた細胞・組織利用医薬品等の製造者が厚生労働省に提出しなければならない資料の内容について明らかにしたものである。細胞を用いた製品を医薬品や医療機器として開発しようとする企業は、その品質・安全性・有効性を担保するためにこれらの指針に従っ

てデータを作成し、確認申請や承認申請時に提出する必要がある。

一方、大学や医療機関等で細胞を用いて医師が直接治療を行う医療行為やその臨床研究は、薬事法上の規制を受けることはなかった。しかし、細胞治療・再生医療のような未知・未経験の要素の多い革新的医療にあっては、その品質や安全性を担保するために新たなガイドラインが必要とされ、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」が、平成18年7月に出された。この中で、用いる細胞については、その品質・安全性確保のための方策については上述した細胞・組織利用医薬品等に関する指針を準用するように求めており、薬事法上の規制を受けない臨床研究においても、治療に用いる細胞について同等の品質・安全性を担保することが大きな特徴である。

細胞組織利用医薬品・医療機器の開発は日米欧の先進国のみならず、ASEAN諸国や他の地域でも活発に行われており、世界レベルで開発競争が繰り広げられている。残念ながら日本で承認された細胞組織利用医薬品・医療機器はまだないが、欧米では既に培養皮膚や培養軟骨など、いくつかの製品が販売されている。一方、わが国においても、複数の製品が確認申請を受け治験に入っており、臨床研究を含めると200を超える細胞治療・再生医療の開発が行われている。このような細胞治療・再生医療の適切な開発を促進するためには、ウイルス等の安全性の確保や細胞組織利用医薬品がどのような機構で臨床効果を発揮しているのか明確にすることなど、いくつかの課題がある。

今回の誌上シンポジウムでは、細胞治療・再生医療に用いられる細胞組織利用医薬品・医療機器の安

国立医薬品食品衛生研究所、^a生物薬品部、^b療品部
(〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1)

*e-mail: yamaguch@nihs.go.jp

日本薬学会第126年会シンポジウムS4序文

全性や有用性確保にはどのような視点が必要かについて、4人の専門家に紙上発表をして頂くことにした。具体的事例として、「血管内皮前駆細胞を用いた治療」について浅原孝之先生に、「軟骨再生の現状と将来」として脇谷滋之先生に、また、「細胞組織医療機器に利用される幹細胞の品質及び安全性評価」として、間葉系幹細胞について品質・安全面から澤田留美先生にお願いし、最後にレギュラトリーな観点から「細胞組織医療機器開発総論」を土屋利江が担当した。

血管再生治療に関しては、血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell; EPC) を用いた再生医療を取り上げて頂いた。成人末梢血中に EPC が発見されて以来、胎生期のみ認められるとされていた血管発生 (vasculogenesis) という現象が成人期においても同様に認められ、局所で EPC が増殖・分化し血管新生に係わっていることが明らかになった。さらに、冠動脈疾患や下肢虚血疾患 (パージャー病や閉塞性動脈硬化症など) を含む重症虚血性疾患患者に対して、自己 EPC を虚血部位に移植するという血管再生療法の臨床試験が実施されており、良好な成績が報告されつつある。一方、老化や糖尿病に代表される基礎疾患により患者の EPC 量及び質が低下し、移植後に十分な治療効果が期待できないという問題点も抱えている。そこで、成体での血管形成のメカニズム及び EPC の特性を生かした現行の EPC 移植治療について将来的展望を含めて概説して頂いた。

軟骨再生に関しては、世界中で企業開発品として 1 万例以上の再生医療が実施されているにも関わらず、いまだにその有効性については論争中であり、広く認められる結論が得られていない。その要因として、1) 関節軟骨欠損による臨床症状あるいは自然経過が明らかにされていないため手術適応基準があいまいであり、どのような患者に再生医療を実施すべきかコンセンサスが得られていないこと、及び 2) 再生医療による軟骨修復の評価方法が確立されていない、さらに 3) 企業開発品は、細胞浮遊液を骨膜で覆った欠損部へ移植したのみで細胞の固定性

が不十分、培養で細胞を増殖する過程で脱分化を生じることなどが挙げられる。本誌上シンポジウム原稿では、関節軟骨再生の現状と、将来、軟骨修復が再生医療として標準的な治療となるために必要な要素について解説して頂いた。

多分化能を持つ幹細胞であり近年再生医療へのソースとして注目を集めている間葉系幹細胞について、その増殖能と形質変化について取り上げて頂いた。間葉系幹細胞は長期に渡る培養で、老化を起こした細胞からがん化した細胞が出現すると報告され、大きな議論を巻き起こしている。これに対して否定的な論文もあり、結論は得られていないが、間葉系幹細胞を治療に用いる際には、このような点にも注意を払う必要がある。この間葉系幹細胞の培養中に起こる遺伝子発現レベルの変化についての解析結果を含め概説して頂いた。

従来の治療法では、なし得ない先端治療として、安全で有効性が高くかつ非侵襲的な治療法が望まれている。細胞・組織利用医療機器は、材料を有効活用して、目的とする部位への適切な固定・機能・適切な強度維持などが可能となる。また、わが国発の再生医療材料技術として、最近、シート工学 (開発者: 東京女子医科大学 岡野光夫教授) が注目されている。シート工学技術により、得られた細胞シートの機能が優れており、心筋再生、角膜再生、歯根膜再生など、様々な組織での動物実験や臨床研究が開始され、成功例が報道されている。しかし、一方では、材料の安全性評価や、試験系が不十分なため、研究が活発に行われ、学会発表や紙上発表が行われているにも関わらず、有効性が期待されるほど高くなく、その結果、リスク・ベネフィットやコスト面等から、産業化されておらず、途中で開発を断念された再生医療品もある。これまでの研究から、開発の阻害要因となった具体例について、概説し、開発への近道となるためのポイントについて概説した。最後に再生医療品の開発と審査の迅速化のために平成 17 年度からスタートした次世代医療機器評価指標作成事業 (再生医療分野) を紹介した。

日米 EU 医薬品規制調和国際会議 遺伝子治療専門家グループの活動と 遺伝子治療薬の規制における国際動向

特集 臨床応用が迫る遺伝子治療の動向と国産技術の開発

山口照英*¹⁾, 内田恵理子*²⁾

Quality control and safety of human cell therapy products

ICH gene therapy discussion group has been expected to exchange information with the following objectives: monitoring emerging scientific issues, developing new ways of communication to ensure that the outcomes of ICH are well understood and widely disseminated, proactively setting out principles that may have a beneficial impact on harmonizing regulation of gene therapy products. The group has been discussing and published the concept papers about reference materials for gene therapy vectors, virus/vector shedding, evaluation of risk of X-SCID gene therapy, oncolytic virus products, and risk of germline integration of gene therapy products.

ICH 遺伝子治療専門家グループは、遺伝子治療薬をめぐる科学的な諸問題に柔軟に対処するために、専門家グループ会議や公開ワークショップなどを通じて得られた議論の成果を広く公開するとともに、新たな知見が得られた場合に迅速に対応していくというスタンスで活動を行っている。これまで議論が行われてきた国際標準品、ウイルスベクターの排出、X-SCID 遺伝子治療における白血病発症とリスク評価、腫瘍溶解性ウイルス製品の品質・安全性確保、“生殖細胞への遺伝子治療用ベクターの意図しない組み込みリスクに対応するための基本的考え方” などについて紹介する。

Teruhide Yamaguchi*¹⁾, Eriko Uchida*²⁾

key words: gene therapy, ICH, oncolytic virus, viral shedding, insertional mutagenesis

日米 EU 医薬品規制調和国際会議(ICH)は、日米 EU 間の医薬品の承認申請に関わる規制を調和し、申請に必要なさまざまなデータなどの作成における不必要な重複を避け、グローバルな医薬品開発の促進と、よりよい医薬品を一刻も早く患者のもとに届けることを目的として活動を行っている。ICH は、1990年4月、日本・アメリカ・ヨーロッパの各医薬品規制当局と業界団体の6極により発足した。それ以来、ICH 運営委員会(ICH-SC)は毎年2~3回の会合をつづけており、さらに ICH 国際会議も2~3年に1回程度の頻度で開催されている。

この間、ICH 発足以来、50を超えるガイドラインが合意(調和)され、調和ガイドラインが各地域で

施行されてきている(http://www.pmda.go.jp/ich/ich_index.html)。新医薬品の品質・有効性・安全性の評価に関わる技術的なガイドラインだけでなく、承認申請資料の形式、市販後安全体制などについても議論がされてきている。また、カナダ、スイス、WHO などの他の機関もオブザーバーとして議論に参加するようになってきている。

遺伝子治療専門家会議(Gene Therapy Discussion Group: GT-DG)は、2002年の ICH ワシントン会議にて正式に発足した作業部会である。それ以前は、バイオテクノロジー医薬品専門家会議および Ad hoc な GT-DG として議論を重ねてきた。GT-DG では、周辺技術を含め急激に進歩する遺伝子治療薬をめぐる科学的な諸問題に柔軟に対処するために、公開ワークショップの開催や ICH ホームページなどを通じて得られた議論の成果を広く公開するとともに、新たな知見が得られた場合に迅速に対応していくというスタンスで活動を行っている。これ

*¹⁾ Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部

*²⁾ Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部

表1 ICH 遺伝子治療専門家会議で採り上げられた主なトピック

- ・患者からの遺伝子治療用ベクターやウイルスの体外排出
- ・遺伝子治療薬に含まれる増殖性ウイルスの検出とその手法 (RCA or RCR)
- ・遺伝子治療薬のためのウイルス参照品(アデノウイルス5型)
- ・生殖細胞への遺伝子治療用ベクターの意図しない組み込みリスクに対応するための基本的考え方
- ・遺伝子治療用ベクターによる挿入変異の評価
- ・腫瘍溶解性ウイルス(ワークショップ)
- ・遺伝子治療を受けた患者の長期フォローアップ(FDA ガイドライン案)
- ・遺伝子治療用レンチウイルスベクター(EMEA ガイドライン案)

表2 ICH 遺伝子治療公開ワークショップ(2002年)のテーマ

- ・アデノウイルス5型国際参照品[EU2]の確立状況
- ・他のベクター用の国際標準品の開発および有用性
- ・アデノウイルスベクターの体外排出
- ・レンチウイルスベクター

表3 ヒトアデノウイルス5型国際参照品(ATCC, VR-1516)

- ・アデノウイルス粒子数: 5.8×10^{11} particles/mL
- ・感染価: 7×10^{10} NAS Infectious units/mL
- ・宿主細胞 HEK 293 由来 DNA 量: $< 3 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ of total DNA
- ・宿主細胞 HEK 293 由来蛋白質量: 18ng/mL
- ・残存 BSA 量: $< 0.5 \text{ng/mL}$
- ・遊離ヘキソン: 1.16 $\mu\text{g/mL}$, 2.0 $\mu\text{g}/10^{12}$ viral particles
- ・エンドトキシン: $< 0.15 \text{EU/mL}$
- ・A 260nm/A 280nm 比(0.1% (w/v) SDS 存在下): 1.37

まで GT-DG で採り上げられた話題について表1にあげたが、遺伝子治療薬の品質や安全性などに関する非常に多岐にわたる科学的課題について議論を行ってきた。

本稿では、ICH GT-DG で議論された遺伝子治療薬の品質・安全性などに関するいくつかの課題を採り上げ、それぞれの議論でのポイントを紹介するとともに、議論を通じて明らかにされた規制当局としての最新のスタンスについて紹介する。また、EU 医薬品庁(EMEA)から出されたレンチウイルスベクターに関するガイドラインや、遺伝子治療を受けた患者の長期フォローアップに関する米国食品医薬品局(FDA)のガイドラインについても議論を行ってきた。ICH で議論を行ったこれらの各極ガイドラインについても概説する。

ICH GT-DG の活動

2001年5月の東京でのICH-SCにおいて、急速に進展している遺伝子治療用医薬品の品質・安全性の確保に関しては、これらの製品の規制に重大な影響を及ぼす可能性のある新しい科学的知見に関連する情報について、ICH 各極間での情報の交換・共有を積極的に継続して行く必要があることが明記された。

ICH-SCでの議論を受け、GT-DGの正式なスタートを飾るものとしてICH 後援の第1回遺伝子治療ワークショップが2002年にワシントンで開催された。本公開ワークショップで扱ったトピックは表2のとおりであり、遺伝子治療に関する最新の話題が採り上げられた。その後、ICH 会議やICH 本会議に合わせて会合を持つとともに、e-mailなどを通じて常に情報交換を行い、遺伝子治療薬の安全性や品質などに関する最新の問題点について議論を継続してきている。これらの成果については、ICH ホームページや国立医薬品食品衛生研究所のホームページに掲載している。

ICH GT-DGでの各課題ごとの議論についてそれぞれ概略を述べる。

1. 国際参照品

アメリカでオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症患者が、アデノウイルスベクターの大量投与による異常免疫反応により死亡¹⁾したことを受け、その安全性を確保するためには正確な投与量を測定することが重要であり、異なる施設での臨床研究に用いるアデノウイルスベクターのウイルス粒子数、プラーク形成単位、感染単位の相互比較を可能にするための参照品や標準品の設定が必要とされた。

そこで、アデノウイルス参照品作製のための国際委員会が発足し、2002年8月にアデノウイルス5型国際参照品が確立され、ATCCより公開された(ATCC, VR-1516, 表3)。本参照品を使用することによって、異なる施設・研究で測定されたウイルス粒子数および力価のデータ同士を科学的に比較することが可能となった^{2,3)}。

これまで、多施設間で出されている毒性データな

どに関しては、用いられているベクターの投与量・コピー数などの基準がないため、相互に比較できなかった。しかし、本参照品を用いることにより得られたデータをまとめて再検討することによって、用量依存的な毒性のような安全性に関する情報の相関関係を明らかに出来るようになり、また遺伝子治療用アデノウイルスベクターの製品中に含まれる増殖性アデノウイルス(RCA)の真の定量値を求めることが可能となると期待されている。現在、アデノウイルスを用いた多くの製品の品質やRCAの評価に本参照品が用いられている。

ICH GT-DGでは、このアデノウイルス参照品の品質や安定性などに関する議論を行い、上記目的に有用であること、また長期にわたる安定性についても問題がないことなどを確認した。

2. ウイルスベクターの体内からの排出

2002年の遺伝子治療公開ワークショップでは、アデノウイルスベクターを投与した患者からのベクターの体外排出について、測定法を含め、安全性の観点から議論が行われた。現在までのところ、ウイルスベクターの体外への排出に伴う安全性上の問題は確認されていないとされている。しかし、より高い感染価を持つベクターの開発や指向性の改良など、今後もアデノウイルスベクターの開発は進むと想定され、環境への影響や広く公衆衛生の観点からその安全性を評価しておくことは重要と考えられる。このために、アデノウイルスベクターの体内からの排出をモニターする期間、タイミングについても十分に考慮する必要があること、特に投与量・投与経路を考慮して試験の間隔を設定する必要があることが示された。

アデノウイルスベクターのみならず、体外排出のリスクが想定されるベクターがつぎつぎと開発中であり、患者家族や医療従事者などへの伝播のリスクや公衆衛生の観点からの安全性確保が大きな課題とされている⁴⁾。そこでGT-DGでは、排出リスクの高いベクターやウイルスの体内からの排出に関して、2007年10月にヨーロッパ遺伝子治療学会との共催でICHワークショップを開催することになっている。今後、このワークショップでの議論を踏ま

えて、遺伝子治療用ベクターやウイルスの排出に関するICH見解の作成や、ガイドライン化についても検討を行っていくことになっている。

なお、ICH見解とは、ガイドラインのように各規制当局への拘束力はないものの、現時点の科学的な見解をICHとしてまとめたものである。遺伝子治療用ベクターやウイルスの排出に関するICH見解の作成に当たっては、特に治療用ベクターなどが患者以外の第3者に暴露される危険性について言及する予定となっている。

3. レンチウイルスベクター

レンチウイルスベクターは、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)に代表されるレンチウイルスを改変してつくられるベクターである。他のレトロウイルスベクター、特にガンマレトロウイルスに由来するベクターと異なり、レンチウイルスベクターは非分裂細胞、たとえば幹細胞、リンパ球、樹状細胞、神経細胞などに遺伝子導入可能である。したがって、*ex vivo* 遺伝子導入に加えて *in vivo* での遺伝子導入にも有用であるとされている。さらに、レンチウイルスベクターは、他のレトロウイルスベクターにくらべて遺伝子サイレンシングの頻度が低いいため長期間遺伝子発現が期待され、慢性疾患に対する *in vivo* 臨床管理の手段としても用いることが可能と考えられる。

レンチウイルスベクターに関する特別のリスクはまだ知られていないものの、レンチウイルスベクターは、特にその開発の主な焦点の一つがヒトの重篤な病原体であるHIVに由来するものであることから、ガンマレトロウイルスベクターと比較して、より一層、品質・有効性・安全性の問題が重要視されている。

2002年に開催されたワークショップでは、レンチウイルスベクターの安全性や品質に関する議論が行われた。特に、① レンチウイルスベクター中に含まれる増殖性レンチウイルス(RCL)に対する試験・検査の実施法、② 挿入変異の可能性・検出法、③ 生殖細胞への挿入の可能性、について議論された。レンチウイルスベクター中のRCLの検出においては、適切な陽性対照を置いて実施すべきで

あること、およびRCLに関する試験・検査の一つとしてRCLにenv配列が含まれていないことを確認しなければならないこと、の2点を推奨することとされた。また、レンチウイルスベクターの体内動態、染色体への挿入および生殖細胞系列への伝達を調べるための適切なモデル動物を用いたアッセイ系を開発することが推奨された。

その後EUより、“レンチウイルスベクターの開発と製造に関する指針”案が提案され、ICHの共通のガイドラインとしては取り扱わないものの、EUの指針案についての論議がGT-DGでもつづけられた。各極から出された意見を採り入れた改正案が示され(表4)、2005年に正式にCPMPガイドラインとして発出された⁵⁾。

4. X-SCID 遺伝子治療における白血病発症とリスク評価

フランスでX1連鎖重症複合免疫不全症(X-SCID)の遺伝子治療を受けた患児2例に白血病発症が⁶⁾したことを受けて、2004年のワシントン会議ではフランスでの最新情報と各極の対応が報告され、そのリスク評価を実施した。このリスク評価の前提として、X-SCIDおよびアデノシンデアミナーゼ欠損症(ADA/SCID)の遺伝子治療臨床試験から、SCIDに対する遺伝子治療の臨床的有用性が確認された。

このような有用性を前提として、SCIDの遺伝子治療における一般的リスク要因とリスクベネフィットに基づくX-SCID遺伝子治療の実施の是非について議論を行った。その結果、①患者の年齢、②細胞に組み込まれた遺伝子治療用ベクターのコピー数、③投与量、④遺伝子導入細胞の種類に応じた相対的リスクが一般的リスク要因であるとされた。

このようなリスク要因を考慮したうえで、現時点でのX-SCIDの治療の第1選択肢としては骨髄移植を考慮すべきこと、さらに骨髄移植が失敗に終わった場合や適切なドナーがない場合、リスクベネフィットの観点から現行のベクターを用いた遺伝子治療を選択するのもやむをえないとされた。

患者の年齢に関しては、当初の2例の白血病発症患児は投与時に生後6カ月未満であったことから、

表4 レンチウイルスベクターの開発と製造に関する指針の項目

- | |
|--------------------------------------|
| 1. 序 |
| 2. もとになるレンチウイルスの性質とレンチウイルスベクター開発への影響 |
| 3. レンチウイルスベクターの設計 |
| 4. レンチウイルスベクターの製造方法 |
| 5. レンチウイルスベクターの特性解析と品質管理試験 |
| 5.1 遺伝子導入活性 |
| - 遺伝子組み込み能 |
| - 導入遺伝子の機能 |
| 5.2 レンチウイルスベクターの粒子数測定 |
| 5.3 増殖性レンチウイルス(RCL)否定試験 |
| 6. がん原性 |

6カ月以内の患児ではリスクが高いとされた。しかし、その後、3例目の白血病発症が確認され、3例目の患児の投与時の年齢が9カ月であったことから見直しが必要となっている。しかし、年齢(月齢)の低い患児ほどリスクが高いと想定されていることには間違いないであろう。

また、細胞に組み込まれた遺伝子治療用ベクターのコピー数・染色体挿入頻度が大きなリスク要因とされ、細胞当たり平均1を超えること、すなわち1個の細胞に複数のベクターが挿入されることを出来るかぎり避けるべきとされた。また、投与量、すなわち患者に投与した遺伝子導入細胞の総数が多いほどリスクが高いとされた。

さらに、遺伝子導入細胞の種類に応じた相対的リスクは、選択的優位性を持つと予想される幹細胞(すなわち、他の幹細胞にくらべて増殖能が高い幹細胞)、幹細胞、T細胞または他のすでに分化した細胞の順にリスクが高いとされた。

染色体へのベクター挿入による発がんのリスクを評価するためのいくつかの新しい技術が開発中であり、現在用いられているこれらの技術は、まだ十分にバリデーションはされていないものの、遺伝子治療臨床研究においても有用な手法であるとされた。特に、LAM-PCR(linear amplification mediated PCR: 片方向増幅を介するポリメラーゼ連鎖反応)法⁷⁻⁹⁾が広く用いられており、またその改良法の開発も進められているが、LAM-PCR法はまだバリデーションされていない技術であることから、複数の試験による確認が必要とされた。特に、LAM-PCR法において検出される主要なバンドは、疾患の過程