

Figure 6. Tissue-engineered cartilage generated by human auricular chondrocytes with various passage numbers (passages 3–8) and subcutaneously transplanted into nude mice for 2 months. A: Histological images. The areas of dense metachromasia decreased according to the increase in the passage number. Bar = 1 mm. B: Biological measurement. The amount of COL2 and proteoglycan decreased when the passage number increased. All values are presented as mean plus standard deviation. Statistics were assessed using Student's *t*-test ($*p < 0.01$ vs. P3). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

constructs using human chondrocytes of passage 3 (corresponding to a 10^3 -fold increase in cell number), passage 5 (10^5 -fold increase), and passage 8 (10^8), the areas of cartilage regeneration showing dense metachromasia decreased in accordance with the increase in the passage number [Fig. 6(A)]. The biological measurements of COL2 and proteoglycan also decreased in inverse proportion to the passage numbers, whereas both COL2 and proteoglycan significantly decreased in passage 8 when compared with passage 3 [Fig. 6(B)].

As for the cell density in the constructs, the areas of cartilage regeneration gradually improved in accordance with the increase in cell density [Fig. 7(A)], corresponding to the results of the biological measurements of COL2 and proteoglycan [Fig. 7(B)]. Constructs using more than 5×10^8 cells/mL in cell density were hardly realized due to the limitation of the sizes in the chondrocytes. Fragments of PLLA were observed in the constructs of all cell densities examined [Fig. 7(A, arrows)], implying that polymer remnants were still present even at 2 months after transplantation.

DISCUSSION

The atelocollagen gel is a promising material for cartilage tissue engineering because it possesses adequate visco-elasticity and exhibits good chondrocyte compatibility.⁷ Atelocollagen is prepared by

treatment with protease, showing low immunogenicity, and is usually used as a medical device for the treatment of tissue defects.¹⁹ The atelocollagen solution forms a firm gel at 37°C with neutral pH, the conditions of which correspond to those suitable for maintaining live mammalian cells. When chondrocytes were embedded within this kind of hydrogel in a 3D environment, the gene expressions of cartilage matrices and their production were significantly up-regulated, when compared with those of a 2D culture (Fig. 2). The promotive effects of the 3D culture on cell differentiation have been reported in various kinds of cells,^{10–12} and such effects were prominently noted in the chondrocytes. The chondrocytes in native cartilage are surrounded by abundant extracellular matrices in all directions and are isolated in their own lacunae. It implies that chondrocytes are constantly exposed to cell-matrix interactions and, in contrast, that they maintain cell solitariness under physiological conditions. The 3D environment of the atelocollagen gel possibly represents these situations to the cultured chondrocytes through the enhancement of cell-matrix interactions

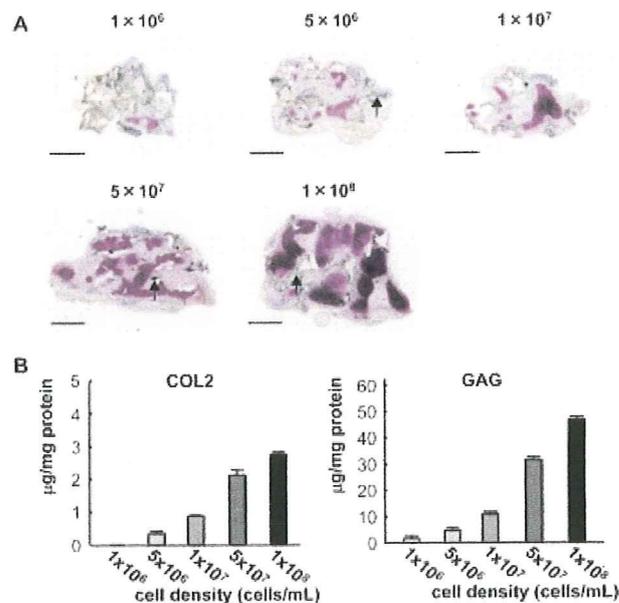


Figure 7. Tissue-engineered cartilage generated by human auricular chondrocytes with various cell densities (1×10^6 to 1×10^8 cells/mL) and subcutaneously transplanted into nude mice for 2 months. A: Histological images. Wider areas of dense metachromasia were observed in the higher cell density groups. Note that remnants of PLLA were observed as indicated by arrows. Bar = 1 mm. B: Biological measurement. Accumulation of COL2 and proteoglycans increased according to the increase in cell density. All values are presented as mean plus standard deviation. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

or even 3D distribution of the cells within the hydrogel.

Although the biological hydrogel functions provide suitable 3D conditions for the cells, it may interfere with substance transfers necessary for cell metabolism and survival. However, the atelocollagen gel shows a good diffusion of nutrients or growth factors, providing a suitable 3D environment for the maintenance of chondrocyte activity. This gel is known to consist of an interconnected network, which possesses mesh estimated to be several tens of nanometers in size.²⁰ The gel of 0.35% bovine collagen showed a matrix mesh size of 57.7 nm.²¹ Such a mesh appears to permit the free diffusion of nutrients. The glucose diffusion coefficient within the collagen gel of ~0.2% was measured to be $1.3 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, a value between an aqueous solution ($9.2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) and a biological matrix (islet of Langerhans, $3.8 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$).²² Practically, the three-dimensional (3D) culture of a 0.3% of collagen gel maintained human chondrocyte proliferation under repeated passage to realize a 1000-fold increase in the cell number at passage 3.²³ However, a lower expression and accumulation of cartilage matrices were observed in the tissue-engineered cartilage pellets made of 3% atelocollagen gel [Fig. 2(B)]. This suggested that such a high concentration of the atelocollagen gel may interfere with the diffusion of nutrients or growth factors for the chondrocytes. Too low a concentration gel could hardly retain either the chondrocytes or accumulation of matrices within the construct. Therefore, we recommended a concentration of around 1% for tissue-engineered cartilage.

Regarding the specificities of the porous scaffolds, a sufficient compression strength and Young's modulus are prerequisites for mechanical support of the atelocollagen gel when it is transplanted *in vivo*. The collagen sponge is a very soft material allowing the chondrocyte/atelocollagen mixture to gradually permeate into the collagen sponge by repeated manual compression and recovery. However, the stiffness of such an animal-derived material seemed too low to maintain size and 3D shape during *in vivo* transplantation. However, the porous body made of a biodegradable polymer, PLLA, possessed sufficient mechanical strength. The present data suggested that porous scaffolds with ~80 g of compression strength and 10 MPa of Young's modulus appeared to sufficiently maintain size and 3D shape for 2 months in the subcutaneous areas of the nude mouse back. When the viscous material of the chondrocyte/atelocollagen mixture is administered into inelastic PLLA, a sufficient pore size in the porous scaffold is needed. The pore sizes of the present PLLA scaffolds were ~1 mm (Fig. 1), which allowed viscous chondrocyte/atelocollagen mixture to infiltrate into the

center of the scaffold and retain the mixture as much as the elastic collagen sponge material (Fig. 3).

The histological findings of the constructs using chondrocytes, atelocollagen, and porous PLLA after a 2-month implantation exhibited maturation of the tissue-engineered cartilage, while the porous scaffold of PLLA still remained without any significant degradation (Fig. 7). Maturation of the tissue-engineered cartilage increases its mechanical strength, as the tissue is sufficiently firm due to the abundant extracellular matrices, in which the chondrocytes in the engineered tissues produce. Therefore, it is ideal that the porous scaffold should be degraded during maturation of the tissue-engineered cartilage. Biodegradation of the scaffold would be synchronized to the speed of cartilage regeneration. However, the half-life of PLLA is as long as 1 year.²⁴ The long-term life of the porous bodies may be rather harmful because it may impair the regenerated cartilage or the adjacent host tissues. To obtain the tissue-engineered cartilage of higher quality and safety, faster biodegradability of the polymers used for the porous scaffolds should be considered.

Moreover, we examined the chondrocyte conditions, including the cell densities and passage numbers for *in vivo* cartilage regeneration using porous PLLA and atelocollagen. Various cell densities (2×10^6 to 1.25×10^8) were evaluated for cartilage tissue engineering using the scaffold system in combination with hydrogels and porous bodies.^{13-15,25-33} However, the optimal cell density for human chondrocytes has not been sufficiently examined. We examined the relation between the density of human chondrocytes and *in vivo* cartilage regeneration. As a result, the highest cell density of 10^8 cells/mL was found to be the most effective for increasing the quality of the tissue-engineered cartilage. As the concentration of the atelocollagen solution could not be more than 3% due to its high viscosity, and as the average size of human auricular chondrocytes in the cell suspension was $\sim 8.5 \times 8.5 \times 8.5 \mu\text{m}^3$ (nearly equal to 0.6×10^{-8} mL) according to the data of this study, we could not prepare a chondrocyte/atelocollagen mixture with a cell density higher than the final density of 10^8 cells/mL in the 1% atelocollagen gel.

Thus, with a combination of the atelocollagen gel and the PLLA porous scaffold, we could prepare a hybrid scaffold with effective retainment of administered cells, good biocompatibility for the chondrocytes, and sufficient mechanical strength, which correspond to the material design of the scaffold for tissue-engineered cartilage. If an implant-type tissue-engineered cartilage with greater firmness and a 3D structure is made with this hybrid scaffold under the conditions determined in this study, it can be used for large cartilage defects that are not sur-

rounded by intact cartilage or that are located in sites suffering from severe mechanical loading, which are often observed in the final stage of osteoarthritis or various craniofacial anomalies. More detailed studies of the structure and composition of biodegradable polymers for porous scaffolds would improve the quality and safety of tissue-engineered cartilage.

We thank Dr. Yoshiro Takano (Tokyo Medical and Dental University), Dr. Toru Ogasawara (The University of Tokyo), Mr. Takashi Nakamoto, Mr. Motoki Yagi, and Mr. Kenji Matsuzawa for their useful discussions and technical support.

References

1. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994;331:889–895.
2. Yanaga H, Yanaga K, Imai K, Koga M, Soejima C, Ohnori K. Clinical application of cultured autologous human auricular chondrocytes with autologous serum for craniofacial or nasal augmentation and repair. *Plast Reconstr Surg* 2006;117:2019–2030; discussion 2031–2032.
3. Marlovits S, Zeller P, Singer P, Resinger C, Vecsei V. Cartilage repair: Generations of autologous chondrocyte transplantation. *Eur J Radiol* 2006;57:24–31.
4. Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 1982;30:215–224.
5. Uchio Y, Ochi M, Matsusaki M, Kurioka H, Katsube K. Human chondrocyte proliferation and matrix synthesis cultured in Atelocollagen gel. *J Biomed Mater Res* 2000;50:138–143.
6. Malesud CJ, Stevenson S, Mehraban F, Papay RS, Purchio AF, Goldberg VM. The proteoglycan synthesis repertoire of rabbit chondrocytes maintained in type II collagen gels. *Osteoarthritis Cartilage* 1994;2:29–41.
7. Yamaoka H, Asato H, Ogasawara T, Nishizawa S, Takahashi T, Nakatsuka T, Koshima I, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung UI, Takato T, Hoshi K. Cartilage tissue engineering using human auricular chondrocytes embedded in different hydrogel materials. *J Biomed Mater Res A* 2006;78:1–11.
8. Ochi M, Uchio Y, Kawasaki K, Wakitani S, Iwasa J. Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee. *J Bone Joint Surg Br* 2002;84:571–578.
9. Liu G, Kawaguchi H, Ogasawara T, Asawa Y, Kishimoto J, Takahashi T, Chung UI, Yamaoka H, Asato H, Nakamura K, Takato T, Hoshi K. Optimal combination of soluble factors for tissue engineering of permanent cartilage from cultured human chondrocytes. *J Biol Chem* 2007;282:20407–20415.
10. Hosseinkhani H, Inatsugu Y, Hiraoka Y, Inoue S, Tabata Y. Perfusion culture enhances osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells in collagen sponge reinforced with poly(glycolic Acid) fiber. *Tissue Eng* 2005;11:1476–1488.
11. Hosseinkhani H, Hosseinkhani M, Tian F, Kobayashi H, Tabata Y. Ectopic bone formation in collagen sponge self-assembled peptide-amphiphile nanofibers hybrid scaffold in a perfusion culture bioreactor. *Biomaterials* 2006;27:5089–5098.
12. Hosseinkhani H, Hosseinkhani M, Gabrielson NP, Pack DW, Khademhosseini A, Kobayashi H. DNA nanoparticles encapsulated in 3D tissue-engineered scaffolds enhance osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A* 2008;85:47–60.
13. Ushida T, Furukawa K, Toita K, Tateishi T. Three-dimensional seeding of chondrocytes encapsulated in collagen gel into PLLA scaffolds. *Cell Transplant* 2002;11:489–494.
14. Hannouche D, Terai H, Fuchs JR, Terada S, Zand S, Nasser BA, Petite H, Sedel L, Vacanti JP. Engineering of implantable cartilaginous structures from bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 2007;13:87–99.
15. Terada S, Yoshimoto H, Fuchs JR, Sato M, Pomerantseva I, Selig MK, Hannouche D, Vacanti JP. Hydrogel optimization for cultured elastic chondrocytes seeded onto a polyglycolic acid scaffold. *J Biomed Mater Res A* 2005;75:907–916.
16. Takahashi T, Ogasawara T, Kishimoto J, Liu G, Asato H, Nakatsuka T, Uchinuma E, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung UI, Takato T, Hoshi K. Synergistic effects of FGF-2 with insulin or IGF-I on the proliferation of human auricular chondrocytes. *Cell Transplant* 2005;14:683–693.
17. Furukawa KS, Ushida T, Toita K, Sakai Y, Tateishi T. Hybrid of gel-cultured smooth muscle cells with PLLA sponge as a scaffold towards blood vessel regeneration. *Cell Transplant* 2002;11:475–480.
18. Aoyagi R, Yoshida T. Frequency equations of an ultrasonic vibrator for the elastic sensor using a contact impedance method. *Jpn J Appl Phys* 2004;43:3204–3209.
19. Sakai D, Mochida J, Yamamoto Y, Nomura T, Okuma M, Nishimura K, Nakai T, Ando K, Hotta T. Transplantation of mesenchymal stem cells embedded in Atelocollagen gel to the intervertebral disc: A potential therapeutic model for disc degeneration. *Biomaterials* 2003;24:3531–3541.
20. Wallace DG, Rosenblatt J. Collagen gel systems for sustained delivery and tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:1631–1649.
21. Rosenblatt J, Rhee W, Wallace D. The effect of collagen fiber size distribution on the release rate of proteins from collagen matrices by diffusion. *J Control Release* 1989;9:195–203.
22. Rong Z, Cheema U, Vadgama P. Needle enzyme electrode based glucose diffusive transport measurement in a collagen gel and validation of a simulation model. *Analyst* 2006;131:816–821.
23. Takahashi T, Ogasawara T, Asawa Y, Mori Y, Uchinuma E, Takato T, Hoshi K. Three-dimensional microenvironments retain chondrocyte phenotypes during proliferation culture. *Tissue Eng* 2007;13:1583–1592.
24. Suzuki M, Ikada Y. Biodegradable polymers in medicine. In: Reis R, Roman JS, editors. *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. New York: CRC Press; 2005. p 3–12.
25. Rotter N, Aigner J, Naumann A, Planck H, Hammer C, Burmester G, Sittlinger M. Cartilage reconstruction in head and neck surgery: Comparison of resorbable polymer scaffolds for tissue engineering of human septal cartilage. *J Biomed Mater Res* 1998;42:347–356.
26. Marijnissen WJ, van Osch GJ, Aigner J, Verwoerd-Verhoef HL, Verhaar JA. Tissue-engineered cartilage using serially passaged articular chondrocytes. Chondrocytes in alginate, combined in vivo with a synthetic (E210) or biologic biodegradable carrier (DBM). *Biomaterials* 2000;21:571–580.
27. Ameer GA, Mahmood TA, Langer R. A biodegradable composite scaffold for cell transplantation. *J Orthop Res* 2002;20:16–19.
28. Haisch A, Klaring S, Groger A, Gebert C, Sittlinger M. A tissue-engineering model for the manufacture of auricular-shaped cartilage implants. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2002;259:316–321.
29. Huttmacher DW, Ng KW, Kaps C, Sittlinger M, Klaring S. Elastic cartilage engineering using novel scaffold architecture.

- tures in combination with a biomimetic cell carrier. *Biomaterials* 2003;24:4445–4458.
30. Ruszymah BH, Chua K, Latif MA, Hussein FN, Saim AB. Formation of in vivo tissue engineered human hyaline cartilage in the shape of a trachea with internal support. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2005;69:1489–1495.
 31. Lee CR, Grad S, Gorna K, Gogolewski S, Goessl A, Alini M. Fibrin-polyurethane composites for articular cartilage tissue engineering: A preliminary analysis. *Tissue Eng* 2005;11:1562–1573.
 32. Eyrich D, Wiese H, Maier G, Skodacek D, Appel B, Sarhan H, Tessmar J, Staudenmaier R, Wenzel MM, Goepferich A, Blunk T. In vitro and in vivo cartilage engineering using a combination of chondrocyte-seeded long-term stable fibrin gels and polycaprolactone-based polyurethane scaffolds. *Tissue Eng* 2007;13:2207–2218.
 33. Liao E, Yaszemski M, Krebsbach P, Hollister S. Tissue-engineered cartilage constructs using composite hyaluronic acid/collagen I hydrogels and designed poly(propylene fumarate) scaffolds. *Tissue Eng* 2007;13:537–550.

短期集中連載 欧州臨床試験の最前線〈1〉

～UHCT アライアンス-EFPIA Japan 共同欧州施設訪問から学ぶ～

はじめに

～ハイレベルの臨床研究基盤構築を目指して～

荒川 義弘*

昨秋、大学病院臨床試験アライアンス (UHCT アライアンス) と欧州製薬団体連合会 (EFPIA) との共同で、臨床試験をリードする欧州各国の大学病院、臨床研究支援センター、規制当局、製薬会社等を訪問し、臨床試験の基本的枠組や多施設・多国間共同臨床試験への取り組み等について聴取する機会を得た。

欧州では医薬品に係わるすべての介入試験に対し GCP (Good Clinical Practice) が適用されており、すべての臨床試験は規制当局と倫理委員会の承認がなければ開始することはできない。一方、欧州では日常診療の中に臨床研究が組み込まれており、それを支える幅広いスタッフの活躍があった。また、臨床研究の支援体制の整備と国内および国際間のネットワーク化も進められている。日本も国際標準を取り入れ、連携可能な体制の整備が望まれる。

大学病院臨床試験アライアンス (UHCT アライアンス)¹⁾は 2006 年 2 月に設立され、治験の実績が高く治験環境の改善に意欲の高い関東地区の 7 つの国立大学 (東京大学、信州大学、千葉大学、筑波大学、東京医科歯科大学、群馬大学、新潟大学) の臨床試験事務局の代表で構成されている。アライアンス内で手順の標準化・簡便化を図る一方、申請段階からスタッフの研修まで幅広く連携を行い、その活動を環境改善のパイオニアとして積極的に公表している。

アライアンスのミッションの 1 つは国際化、国際連携であり、今回の欧州訪問の目的は、日本での試験環境の改善を積極的にアピールするとともに、欧州での実際を直接見聞きし、日本での臨床試験の環境改善に資することである。

欧州製薬団体連合会 日本技術委員会 (EFPIA Japan) の方でも、治験の実施体制の現状と調和・

連携の動きについて、日本との違いを、その根底となる考え方も含めて聴取したいとの動きがあり、今回の共同訪問が実現した。

訪問した国、施設は表 1 の通りである。

欧州では、EU 臨床試験指令 (EU Clinical Trials Directive 2001/20/EC)²⁾ の 2004 年導入により域内の GCP (Good Clinical Practice) の調和が進められる一方、治験以外の臨床試験にも GCP が適用されるようになり、臨床試験の数は激減したと言われる³⁾。しかし、一方で最近では支援体制の整備やネットワーク化も急速に進められている。

今回の訪問では、こういった現状も含めて、あらかじめ 7 つの参加大学と EFPIA からの参加者にそれぞれの課題を持って調査していただくことになった。本連載は今回より 3 か月にわたり掲載していくが、執筆者が異なるため、各人の調査内

* 東京大学医学部附属病院臨床試験部・准教授 / 副部長 (あらかわ・よしひろ)

表1 大学病院臨床試験アライアンス (UHCT アライアンス)- 欧州製薬団体連合会 日本技術委員会 (EFPIA Japan) 共同欧州施設訪問での訪問施設
(期間: 2009年10月28日～11月6日)

欧州ではすべての臨床試験に GCP (Good Clinical Practice) が適用され, 各国の規制当局と地域ごとにおかれた倫理委員会の承認を得て試験の実施が可能となる。そのため, 欧州域内の規制要件の調和や多施設共同研究支援センターの整備が強力に進められている。オックスフォード大学 CTSU はグローバルな 1 万例規模のイベントスタディを自ら多数実施する施設である。また, 訪問した病院はそれぞれの国で臨床試験の実績の高い病院ばかりであり, 地域のネットワークを形成し, 多施設共同研究支援センターの機能も備えていることが多い。訪問した企業も欧州に本拠を置くビッグファーマであり, グローバルな視点で臨床試験を展開している。

<規制当局>

- ・フランス医薬品庁 (Agence française de sécurité sanitaire des Produits de Santé ; AFSSAPS)

<多施設共同試験支援センター>

- ・(イギリス) オックスフォード大学臨床試験支援ユニット (Clinical Trial Service Unit & Epidemiological Studies Unit ; CTSU)

<大学病院> (多施設共同試験支援センター機能を兼ね備える施設が多い)

- ・(スイス) チューリッヒ大学病院 (UniversitätsSpital Zürich)
- ・(スイス) バーゼル大学病院 (UniversitätsSpital Basel)
- ・(ドイツ) デュッセルドルフ大学病院 (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) 臨床研究コーディネーティングセンター (Koordinierungszentrum für Klinische Studien ; KKS)
- ・(ドイツ) シャリテールベルリン大学病院 (Charité - Universitätsmedizin Berlin) 臨床研究コーディネーティングセンター (Koordinierungszentrum für Klinische Studien ; KKS)

<公的病院>

- ・(イギリス・マンチェスター) クリスティ病院 (多施設共同試験支援センター機能を備えている)
- ・(フランス・パリ) ポンピドー病院 (Hôpital Européen Georges Pompidou ; HEGP)

<業界団体>

- ・(ベルギー・ブリュッセル) 欧州製薬団体連合会 (European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations ; EFPIA) 本部

<製薬企業>

- ・(イギリス・マンチェスター) Astra Zeneca 本社
- ・(スイス・バーゼル) Novartis Pharma 本社
- ・(ドイツ・ベルリン) Bayer Schering 本社

(筆者作成)

容をもとにそれぞれ報告する。そのため報告者間で多少重複する部分もあると思われるが, 意見聴取する人により感じ方も異なることもあり, あえて調整は行っていない。

文 献

- 1) 大学病院臨床試験アライアンス <http://plaza.umin.ac.jp/~UHCTA/index.html>
- 2) EU 臨床試験指令 DIRECTIVE 2001/20/EC OF
- 3) Hemminki A and Kellokumpu-Lehtine P-L. Harmful impact of EU clinical trials directive. *BMJ* **332** (7540) : 501-502, 2006.

THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 4 April 2001 - on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to the implementation of good clinical practice in the conduct of clinical trials on medicinal products for human use http://www.wctn.org.uk/downloads/EU_Directive/Directive.pdf

短期集中連載 欧州臨床試験の最前線〈2〉

～UHCT アライアンス-EFPIA Japan 共同欧州施設訪問から学ぶ～

欧州における国際連携の現状と 臨床試験の推進策

野崎 浩二*¹⁾・渡部 歌織*²⁾・荒川 義弘*³⁾

我々は2009年10月28日より11月6日までEU(欧州連合)臨床試験指令後の欧州における臨床試験への取り組みの実際を視察した。日本の臨床試験の環境改善および国際化に対応するべく、大学病院臨床試験アライアンス(UHCTアライアンス)と欧州製薬団体連合会日本技術委員会(EFPIA Japan)との共同により、欧州各国の大学病院、臨床研究支援センター、規制当局、製薬会社等を訪問し、臨床研究の基本的枠組や多施設・多国間共同臨床試験への取り組み等について聴取し、現状を調査した。

1. 欧州における臨床試験に対する 規制・域内調和

フランス医薬品庁(Agence française de sécurité sanitaire des Produits de Santé; AFSSAPS)¹⁾では、EU(欧州連合)のClinical Trials Facilitation Group(CTFG)²⁾(後述)の共同議長も務めるDr. Chantal Bélorgeyらから、欧州における臨床試験に対する規制・域内調和につき聴取した。そこで話をもとにEUでの臨床試験に対する規制と域内調和について述べる。

EU臨床試験指令(EU Clinical Trials Directive 2001/20/EC)³⁾が2001年5月に公布され、EUの加盟国すべてが2003年5月1日までにこの指令に従って各国の規制の整備を行い、2004年5月1日までに施行することとなった。この指令は、多施設共同試験を含む、ヒトを対象とし介入を伴うすべての臨床試験の実施におけるGCP(Good Clinical Practice)の履行に関する法令や規制の整備およびその履行について定めており、

製造販売承認取得を目的とする臨床試験に限らず、医薬品や遺伝子治療、細胞治療を対象とするあらゆる臨床試験(介入試験)に適用されている。

多施設共同試験や国際共同開発を推進する上では、倫理委員会の審査結果の不一致の場合の取り扱いや手続きの煩雑さ等が問題となる。EU臨床試験指令では、臨床試験の開始には倫理委員会(Ethics Committee)の承認と各国の規制当局(National Competent Authority; NCA)の許可(Clinical Trial Authorization; CTA)の両方を要すること、さらに複数の加盟国によって実施される国際共同試験の場合の倫理委員会審査は1国につき1つの意見(Single opinion)とすることが定められた。

またEUでは、臨床試験を登録するEudraCT⁴⁾と安全性情報を扱うEudraVigilance⁵⁾の2つの臨床試験データベースが定められ、書式や情報の共有による研究開発の推進および安全性の強化が図られている。EudraCTは、臨床試験に識別番号(unique identifier)を付与し、試験計画の申

*東京大学医学部附属病院臨床試験部 ¹⁾(のぎき・こうじ) ²⁾(わたなべ・かおり)

³⁾准教授/副部長(あらかわ・よしひろ)

請・変更・中止・終了の情報を管理する。研究者（または依頼者）は臨床試験を開始する際に EudraCT に登録し、識別番号を交付された後に当局と倫理委員会へ申請する。EudraVigilance は年次の安全性報告に加えて、予期しない重篤な有害反応 **SUSARs** (Suspected Unexpected Serious Adverse Reactions) の登録、評価を行うためのデータ処理および管理システムとして構築されている。

また、試験薬 (investigational medicinal products; **IMPs**) には、**GMP** (Good Manufacturing Practice) または **GMP** と同等の品質管理が要求される。

AFSSAPS では、臨床試験の (実施の) 許可から実施の段階に対して 30 人が働いており、そのうち 10 人が医師とのことである。

CTFG は、EU 臨床試験指令の各国での実施を調整するために EU の NCA のネットワークである Heads of Medicines Agency (**HMA**) によって 2004 年に設立された。CTFG は各国の NCA からの代表で構成され、会議には欧州医薬品庁 (European Medicines Agency; **EMA**) も会議に招聘される。**EMA** は販売承認 (Marketing Authorization) の審査を対象にするのに対し、CTFG は国際共同試験の申請や実施の段階で、各国での申請 (Clinical Trial Application; **CTA**) や変更などの手続きの調和を図り、試験の科学的評価を各国の NCA 間で共有し、申請許可の決定の調和を図るなどの活動を開始している。

なお、販売承認申請は、EU では各国の NCA に行う場合と **EMA** に行う場合がある。

さらに欧州製薬団体連合会 (European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations; **EFPIA**)⁶⁾ の本部 (Brussels, Belgium)

を訪問した。**EFPIA** は **EMA** とも合同で定期的にワークショップを行い、臨床試験における当局の役割についても協議し、EU 各国における質の高い臨床試験の実施および普及に寄与している。

2. 各国における国内連携・各国の国内研究支援

1) フランス

パリおよびパリ郊外の 37 医療施設の集合体で、ヨーロッパ最大の病院連携システムであるパリ病院公共福祉協会 (**AP-HP**; Assistance Publique-Hôpitaux de Paris)⁷⁾ の一員である Hôpital Européen Georges Pompidou (**HEGP**) 病院⁸⁾ を訪問し、その病院連携システムについて聴取した。**AP-HP** の総従業員数は 90,000 人、取り扱う救急医療も全体で年間 100 万件に上る。

AP-HP に含まれる 37 病院の中には、治験を主に行うための施設 Centre d'Investigation Clinique (**CIC**) が 16 施設含まれている。臨床試験の倫理面の審査は被験者保護委員会 Comité de Protection des Personnes (**CPP**) と呼ばれる倫理委員会が行い、科学面の審査は Commission d'Experts Scientifique (**CES**) と呼ばれる組織内の諮問機関 (外部委員を含む) が行っていた。

国際的に見て治験の遅れが指摘されていたフランスでは、治験のスピードを上げるための取り組みが公的資金も導入されて効果的に行われていた。

2) イギリス

イギリスは保健省 (**DH**: Department of Health)⁹⁾ の管轄下に **NHS** (National Health Service)¹⁰⁾ や英国医薬品庁 (Medicines and Healthcare products Regulatory Agency; **MHRA**)¹¹⁾ がある。**NHS** は 4 カ所 (England, Scotland, Wales,

AFSSAPS : Agence française de sécurité sanitaire des Produits de Santé (フランス医薬品庁)

CTFG : Clinical Trials Facilitation Group, **GCP** : Good Clinical Practice

NCA : National Competent Authority (各国の規制当局), **CTA** : Clinical Trial Authorization

GMP : Good Manufacturing Practice, **EMA** : European Medicines Agency (欧州医薬品庁)

CTA : Clinical Trial Application (各国での申請)

EFPIA : European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations (欧州製薬団体連合会)

AP-HP : Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (パリ病院公共福祉協会), **NHS** : National Health Service

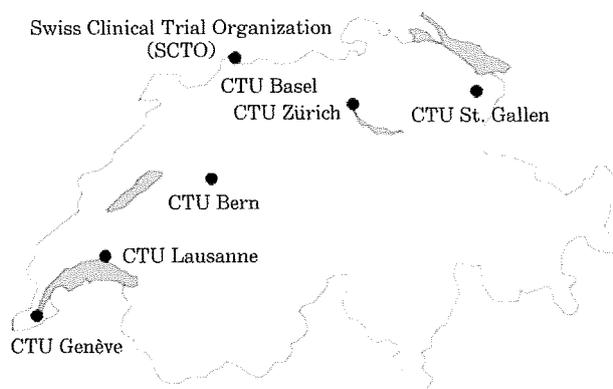


図1 スイス CTU ネットワーク

Baselに設置された Swiss Clinical Trial Organization (SCTO)を中心に、Basel, Zürich, St.Gallen, Bern, Lausanne, Genèveに設置された各 CTU (Clinical Trial Unit) がネットワークを形成している。

(文献 21 より一部改変)

Northern Ireland)に設置され、保健省から NHS を経由して、関連する各医療機関に予算が配分される。NHS にはさらに National Research Ethics Service (NRES)¹²¹や National Institute of Health Research (NIHR)¹²³などが置かれている。

臨床試験を開始するには EudraCT への登録を行い、MHRA に CTA の申請を行う。倫理審査と規制当局への申請は平行して行われ、両方の承認を受けて初めて実施可能となる。試験は保健省の管轄下の NHS 関連病院とプライマリ・ケアを担う家庭医 (General Practitioner ; GP) により実施される。

NHS 基金により臨床試験を行う施設の 1 つであるクリスティ病院¹⁴¹ (Manchester, UK) を訪問した。クリスティ病院は 1901 年に設立されたヨーロッパでも最大規模のがんセンターで、Manchester Cancer Research Centre (MCRC)¹⁵¹等を含む 14 の関連病院と協力して 35,000 件の外来化学療法を行い、500 件以上の臨床試験を実施している。また、クリスティ病院は地域における

臨床試験のネットワーク The Greater Manchester Comprehensive Local Research Network (CLRn)¹⁶¹の基幹病院として臨床試験の連携を進めている。イギリスにはこのような NIHR にサポートされる CLRn が 25 あり、(全体で) CCRN (The National Institute for Health Research (NIHR) Comprehensive Clinical Research Network) と呼ばれるネットワークを形成している。

イギリスにおける研究資金は NHS を経由する公的資金、企業からの資金、および Cancer Research UK などの寄付 (charities) の 3 つが大きな柱となっている。臨床試験を通じて病院としての実績を上げ、さらに企業からの依頼が集まることが病院の Certificate に働くことを "Preferred Center Status" と呼ぶ。クリスティ病院もそれを掲げる施設の 1 つである。

3) スイス

EU 域外であるスイスではチューリッヒ大学病院 (UniversitätsSpital Zürich)¹⁷¹およびパーゼル大学病院 (UniversitätsSpital Basel)¹⁸¹を訪問し

CLRn : The Greater Manchester Comprehensive Local Research Network

CCRN : The National Institute for Health Research (NIHR) Comprehensive Clinical Research Network

た。スイスでは FDHA (Federal Department of Home Affairs)¹⁹⁾ の管轄下の Swissmedic²⁰⁾ が当局として機能し、生物医学研究や医療機器を含む臨床試験の開始や、製造販売承認、研究報告や研究終了報告まで管理している。

パーゼル大学では臨床試験を統括するコーディネーションセンター (Study Coordination Center; SCC) を中心として、臨床試験に関する教育や支援を行う臨床試験ユニット (CTU; Clinical Trial Unit) や医療画像解析センター (Medical Image Analysis Center; MIAC) と協力し、大規模な臨床研究を行っていた。臨床試験ユニット CTU は、Basel, Zürich, St. Gallen, Bern, Lausanne, Genève に設置され、パーゼルに設置された Swiss Clinical Trial Organization (SCTO)²¹⁾ を中心にこれらの CTUs が連携し、共通の教育プログラムや臨床試験データベース、および多施設共同試験のコーディネーションを行っている。(図 1)。

4) ドイツ

デュッセルドルフ大学病院 (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)²²⁾ およびシャリテールリン大学病院 (Charité-Universitätsmedizin Berlin)²³⁾ を訪問した。

各大学に併設されている KKS (Koordinierungszentren für Klinische Studien)²⁴⁾ では、研究者やスタッフ向けのトレーニングコースを用意し、GCP 教育を充実させている。またコンサルテーション、当局への報告の支援や、プロジェクト管理、e-CRF (電子的症例報告書) の提供、モニタリングや生物統計、データマネジメント等も支援している。

KKS は Berlin, Düsseldorf, Dresden, Essen, Freiburg, Halle, Heidelberg, Köln, Leipzig, Mainz, Marburg, Münster, München, Hannover, Regensburg の 15 カ所の KKS、および Heidelberg に設置されている SDGC (Studienzentrum der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie)²⁵⁾ の計 16 施設によるネットワークを形成している。(図 2)。

デュッセルドルフ大学の KKS は年間約 100 万ユーロで運営され、試験の内訳は医師主導の試験



図2 KKS ネットワーク

15 カ所 (Berlin, Düsseldorf, Dresden, Essen, Freiburg, Halle, Heidelberg, Köln, Leipzig, Mainz, Marburg, Münster, München, Hannover, Regensburg) の KKS (Koordinierungszentren für Klinische Studien) と、Heidelberg に設置されている SDGC (Studienzentrum der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie) の計 16 施設がネットワークを形成している。

(文献 24 より一部改変)

が 80%、企業主導の試験が 20% となっている。デュッセルドルフ大学やシャリテールリン大学病院の KKS では、研究者やスタッフ向けの教育プログラムも充実し、医師主導の試験の実施の支援や、データマネジメント、モニタリングおよび生物統計の支援も行っている。

シャリテ病院は 4 施設を合わせて 3,000 床以上を有し、設立 300 年の歴史を持つ。聴取した産婦人科では CRO (Contract Research Organization) も積極的に活用し、また患者の臨床試験へのエントリー率が 90% 以上と高く、その試験の内訳も医師主導の試験が 76%、企業主導の試験が 24%、また医師主導試験のうち Charité 主導の試験が 75%、他施設主導の試験が 25% となっていた。さらに単施設の試験が 56%、他施設との共同試験が 44% となっており、関連施設との共同試験にも力を入れていることがうかがえた。

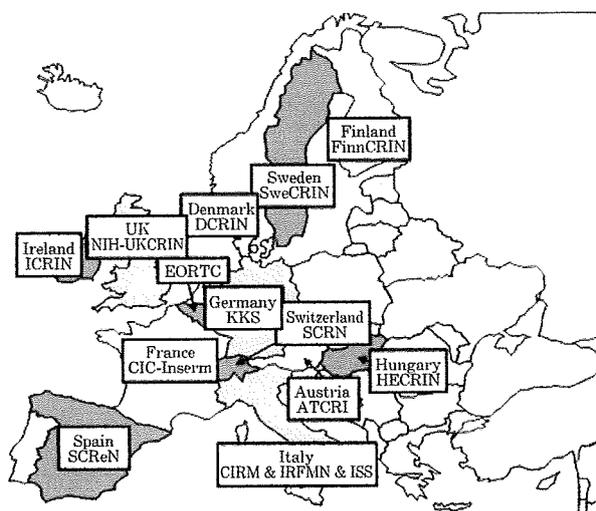


図3 ECRIN ネットワーク

ドイツのKKS (Koordinierungszentrum für Klinische Studien)、イギリスのUKCRN (United Kingdom Clinical Research Network) やフランスのNSERM (Institut National de la Santé de la Recherche Médicale) 等のネットワークおよびEORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer) 等が協調して、ヨーロッパの多くの国々を網羅する大規模な国際臨床試験ネットワーク ECRIN (European Clinical Research Infrastructures Network) の構築が進められている。

(文献 27 より一部改変)

3. 域内連携・国際連携

英国 Oxford 大学の CTSU (Clinical Trial Service Unit & Epidemiological Studies Unit)²⁶⁾ を訪問した。CTSU では SHARP (The Study of Heart and Renal Protection) Trial 等を含むアカデミア主導の大規模なイベントスタディが行われている。ここでは“Criteria for a good trial”とは“Ask an IMPORTANT question, and Answer it RELIABLY”であるということ念頭に、研究が行われていた。SHARP Trial では、中心となる International Coordinating Center (ICC) を Oxford 大学 CTSU 内に置き、研究全体の進行および統括を行うだけでなく、データ管理および

世界中の施設からのサンプルの収集も行っていった。この ICC の管理下に世界の 7 つの地域 (アジア太平洋地域、ノルディック、中央ヨーロッパ、西ヨーロッパ、米国、カナダ、中国) に Regional Coordinating Center (RCC) を置き、さらにその管理下に 380 の Local Clinical Center (LCC) を 18 各国に設定して大規模なグローバル試験を展開していた。各 LCC には“Laptop Data Entry System”と呼ぶデータ入力システムを導入し、各施設で臨床経過のデータを直接入力し、その電子データを原資料とし、ICC で SDV (Source Data Verification) ができるシステムを運用していた。

英国 Manchester 大学クリスティー病院やこの Oxford 大学 CTSU は、国際的な関連施設と協調

して大規模共同試験を行うコーディネーティングセンターとして機能し、企業との契約関係のもとでアカデミアが主導する大規模な臨床研究を実施していた。

ドイツのデュッセルドルフ大学ではヨーロッパの大半の国々を網羅する臨床試験ネットワーク (European Clinical Research Infrastructures Network; ECRIN)²⁷⁾ について聴取する機会があった。ドイツのKKSネットワークやイギリスのUKCRN (United Kingdom Clinical Research Network)、さらにフランスのNSERM (Institut National de la Santé de la Recherche Médicale) などによる各国ごとのネットワークを結び、さらにがん治療に関する臨床研究ネットワークEORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer) とも協調して、ヨーロッパの国々の多くを網羅する大規模な臨床試験ネットワークとしての構築が進められていた。(図3)。

4. おわりに

欧州においては、多くの国とそれぞれの国の言語、分化、法律があり、EUの中で臨床試験に限らずさまざまな枠組みで調和が進められてきた。EU臨床試験指令により臨床試験における規制の標準化を図る一方、国内およびEU域内の連携・ネットワーク化が急速に進みつつある。日本でもネットワーク化が一部で進められているが、治験以外の臨床試験においては、制度的な問題もあり、支援体制のレベルの差は歴然である。

欧州においては、すべての介入試験に対しGCPが適用され、規制当局と倫理委員会の両方の承認がなければ開始することができない。倫理審査では試験のデザイン、インフォームド・コンセント、施設要件が審査され、規制当局では試験薬・試験機器の品質・安全性、被験者の適格基準等安全に係わる事項が審査され、両者の役割分担ができていく。

一方、日本では治験以外では未承認の化合物の臨床試験を法規制の対象とはしておらず、また審査する倫理委員会の質や数も十分に把握されていない状況である。研究者主導による臨床試験の体

制整備が進まないまま、承認申請目的の治験のみに厳格な規制が集中している。医師主導の自主臨床試験については、各実施施設により自主的にGCPに準拠する形で実施されているケースも少なくない。これに対して、欧州では医薬品に係わるすべての介入試験に対しGCPが適用されており、臨床研究の国内および国際間のネットワーク化も進んでいた。日本もグローバル化に向けて世界標準への速やかな対応およびそのための支援体制の整備が望まれる。

文 献

- 1) フランス医薬品庁 AFSSAPS (Agence française de sécurité sanitaire des Produits de Santé) <http://www.afssaps.fr/>
- 2) CTFG (Clinical Trials Facilitation Group) <http://www.hma.eu/77.html>
- 3) EU臨床試験指令 DIRECTIVE 2001/20/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 4 April 2001 - on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to the implementation of good clinical practice in the conduct of clinical trials on medicinal products for human use http://www.wctn.org.uk/downloads/EU_Directive/Directive.pdf
- 4) EudraCT <https://eudract.emea.europa.eu/>
- 5) EudraVigilance <http://eudravigilance.emea.europa.eu/highres.htm>
- 6) 欧州製薬団体連合会 EFPIA (European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations) <http://www.efpia.org/>
- 7) パリ病院公共福祉協会 AP-HP (Assistance publique-Hôpitaux de Paris) <http://www.aphp.fr/>
- 8) Pompidou 病院 HEGP (Hôpital Européen Georges Pompidou) <http://www.hegp.fr/>
- 9) イギリス保健省 DH (Department of Health) <http://www.dh.gov.uk/en/index.htm>
- 10) NHS (National Health Service) <http://www.nhs.uk/Pages/HomePage.aspx>
- 11) MHRA (Medicines and Healthcare products Regulatory Agency) <http://www.mhra.gov.uk/index.htm>
- 12) National Research Ethics Service (NRES) <http://www.nres.npsf.nhs.uk/>

- [//www.nres.npsa.nhs.uk/](http://www.nres.npsa.nhs.uk/)
- 13) National Institute for Health Research (NIHR) <http://www.nihr.ac.uk/>
- 14) The Christie Hospital <http://www.christie.nhs.uk/>
- 15) Manchester Cancer Research Centre (MCRC) <http://www.mcrc.manchester.ac.uk/>
- 16) The Greater Manchester Comprehensive Local Research Network (CLRN) <http://www.ukcrn.org.uk/index/networks/comprehensive/clrns/manchester.html>
- 17) Zürich 大学病院 (UniversitätsSpital Zürich) <http://www.usz.ch/>
- 18) Basel 大学病院 (UniversitätsSpital Basel) <http://www.unispital-basel.ch/>
- 19) FDHA (Federal Department of Home Affairs) <http://www.edi.admin.ch/>
- 20) Swissmedic <http://www.swissmedic.ch/>
- 21) Swiss Clinical Trial Organization (SCTO) <http://www.scto.ch/en/CTU-Network.html>
- 22) Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf <http://www.uni-duesseldorf.de/>
- 23) Charité-Universitätsmedizin Berlin <http://www.charite.de/>
- 24) KKS (Koordinierungszentren für Klinische Studien) <http://kks-netzwerk.de/>
- 25) SDGC (Studienzentrum der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie) <http://www.sdgc.de>
- 26) CTSU (Clinical Trial Service Unit & Epidemiological Studies Unit) <https://www.ctsui.org/>
- 27) ECRIN (European Clinical Research Infrastructures Network) <http://www.ecrin.org/>

