

当該臨床研究に起因するかどうかを明らかにするため、最終製品を適切な期間保存するとともに、最終製品を移植又は投与する前の血清等の試料及び当該被験者に最終製品を移植又は投与する前後の記録を、総括報告書を提出した日から少なくとも10年間保存するものとする。ただし、最終製品が細胞・組織以外との複合体の場合には、最終段階のヒト幹細胞由来製品でもよい。

3 被験者に関する情報の把握

(1) 研究責任者は、被験者に病原体感染等の有害事象が起きた場合に当該情報を把握できるよう、また、最終製品に問題が生じた場合に被験者の健康状態等が把握できるよう、適切な措置をとるものとする。

<細則>

(1) に規定する目的のため、研究責任者は、移植又は投与されたヒト幹細胞等の内容、識別コード、調製番号等を、被験者のカルテ等の診療記録に記載することができる。

(2) 研究責任者は、(1)の措置を実施するため、被験者から必要な情報の提供や保存について協力を受けられるよう、あらかじめ、研究者等に対してあらかじめ指示をしておくものとする。

提言は、見え消し及び下線部のような追加記述及び軽微な表記整備以外は全面的に取り入れられた。

C-6 「第6章 雑則」

C-6-1 「第1 見直し」

<旧ヒト幹指針>の記載を維持し、以下のようにすることを提言した。

この指針は、科学技術の進歩、ヒト幹細胞の取扱いに関する社会的情勢の変化等を勘案して、必要に応じ、又は施行後5年を

目途として検討を加えた上で、見直しを行うものとする。その際には、医学、生命倫理等の専門的観点から、客観的かつ総合的な評価を行うために厚生科学審議会において審議の上、了承を得るものとする。

第2 施行期日

この指針は、平成22年11月1日から施行する。

第3 経過措置

この指針が施行される前に着手したヒト幹細胞臨床研究については、なお従前の例による。

提言は、全面的に取り入れられたが、下線部のような追加記述及び行政上の取り扱い事項が記載された。

D. 考察

本研究では、平成21年度から22年度にかけて、再生医療学会と協力し合い、ヒト幹細胞臨床研究と細胞・組織利用医薬品等の開発という2つの制度的環境の差を超えて共通化・標準化した、ヒト細胞・組織の適切な取り扱い基準、いわば共通のGTPの在り方を検討し、<旧ヒト幹指針>をベースにし、<別添1>と対比しつつ、その他の関連文書を参照し、ヒト幹細胞臨床研究で利用可能で、かつ薬事法下の治験においても妥当性を担保できるような内容のGTPの草案を作成し、折から<旧ヒト幹指針>の見直しを行っていた同委員会に提言として提出した。

本研究で作成したGTP案の内容の趣旨が「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に導入されれば、医師法下にて行われるヒト幹細胞臨床研究も自然に薬事法下の製品開発におけるGTPに準拠している

ことになると考えられる。平成 22 年 11 月 1 日に「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」の改訂版が施行された。この新ヒト幹指針と本研究からの提言を詳細に照合したところ、内容趣旨は全面的に取り入れられ、ほとんどの表記も新ヒト幹指針に反映されていることが判明した。本研究成果は、ヒト幹細胞臨床研究と治験・製品開発との間での障壁の低減に大きく貢献することができたと考えられる。さらに本年度は、これらを一層進めた研究展開として、新ヒト幹指針を包含し、1314 号別添 1 やその他の関連通知等をも包含し、すべての指針や通知に通底するミニマム・コンセンサス・パッケージ (MCP) GTP を作成する上での留意事項について検討、考察し、研究成果の中でも、項目毎に必要な応じてコメントしてきた。新ヒト幹指針については 1314 号別添 1 の内容の全てを包含している訳ではないが、(MCP) GTP のカバーの範囲内であればよいと考えている。

研究成果の項では記載しなかったが、事項の順番を変更した方が内容的に整理されることが考えられる箇所がまだ残っている。例えば<新ヒト幹指針>では「第 2 章 研究の体制等 第 1 研究の体制 7 研究機関の基準」に「(1) ヒト幹細胞又はヒト分化細胞の採取を行う研究機関」、「(2) 調製機関」、「(3) ヒト幹細胞等を移植又は投与する研究機関」がまとめて記載されているが、それぞれを「第 3 章 ヒト幹細胞の採取」、「第 4 章 ヒト幹細胞の調製段階における安全対策等」、「第 5 章 ヒト幹細胞の移植又は投与」の冒頭に移動した方が分かりやすい可能性があるため検討が必要と考えられる。

E. 結論

平成 21-22 年度の研究活動として、現行の薬事上の GTP に相当する 1314 号別添 1 や自己治験薬 GMP その他の関連通知等及び旧ヒト幹指針を参考に本研究で作成した (MCP) GTP 案を<新ヒト幹指針>に導入することを提言してきた。これにより、医師法下にて行われるヒト幹細胞臨床研究においても、<新ヒト幹指針>に従っていれば自ずと薬事法下での製品開発における GTP に準拠していることになると考えられる。平成 21-22 年度に「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」の見直し作業が行われたが、その際、同時並行的に進行していた本研究の成果が最大限参考に供され、本質部分の内容・趣旨は全て取り込まれた。ヒト幹細胞臨床研究と治験・製品開発との間での障壁の低減に大きく貢献することができたと考えられる。

一方、表記、フォーマット、解説等の細部において、<新ヒト幹指針>作成過程及び指針そのものから学習すべきこともあった。今後は、本質的な内容・趣旨において新ヒト幹指針、1314 号別添 1 やその他の関連通知等、全てに通底し、かつそれぞれの指針や通知の主要な留意事項を包含しているような (MCP) GTP を作成する必要がある。そのため、一層の活発な研究展開を図り、わが国の再生医療・細胞治療の実用化を推進する実用的ガイドライン／ガイダンスが早急に世に送り出されることが必要と考えられる。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

総括研究報告書（2）参照

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1. 特許取得 なし

H-2. 実用新案登録 なし

H-3. その他 特記事項なし

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

「再生医療実用化加速に資する評価基準ミニマム・コンセンサス・パッケージ策定に関する研究」

総括研究報告書（2）

再生医療評価基準ミニマム・コンセンサス・パッケージの策定に向けた
ヒト多能性幹細胞の標準化、新規細胞特性・品質評価技術開発、海外規制動向、
ケース別上乘せ方策を策定に関する研究

研究代表者：早川 堯夫 近畿大学薬学総合研究所・所長

研究要旨

再生医療評価基準ミニマム・コンセンサス・パッケージ（MCP）の策定に向けて、1) ヒト由来細胞・組織加工製品の先端的な原材料としてのヒト多能性幹細胞特にヒト ES 細胞に焦点をあて、国際的整合性も考慮しつつ、医療応用に資する ES 細胞の樹立・バンク化と各段階での検査 MCP 及び ES 細胞を合成系培養液と合成基質を用いて安定的に培養し、供給するシステムの MCP について検討を進めた。また 2) 独自に開発したアスパラギン結合型糖鎖の比較糖鎖プロファイリング法などが人工多能性細胞（iPS 細胞）等の細胞特性・品質評価法として有用であり、各種細胞に汎用できる評価パッケージの重要な新規技術要素となり得ることを示した。さらに、3) 欧米におけるヒト細胞・組織加工製品の規制の原則とされる「リスクベースアプローチ（Risk-Based Approach）」の考え方とその規制への適用について調査・検討を行った。これらの知見はヒト幹細胞臨床研究と治験・製品開発との間の規制障壁を低減するための評価基準ミニマム・コンセンサス・パッケージを策定する際の基盤的情報として重要と考えられる。4) 自己と同種細胞及び体性幹細胞、ES/iPS 細胞由来製品の種類・特性、適用法、適用部位、対象疾患に応じた品質・安全性試験、評価基準に関するケース別の MCP や上乘せ方策を策定する際、国際的整合性を含めリスクをベースにしたアプローチが適切と結論した。

研究分担者

佐藤 陽治
国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子細胞医薬部・第2室・室長

末盛 博文
京都大学・再生医学研究所・准教授

掛樋 一晃
近畿大学・薬学部・薬学総合研究所・教授

研究協力者

阿久津 英憲
（独）国立成育医療研究センター研究所
生殖・細胞医療研究部・室長

水口 裕之
大阪大学大学院薬学研究科
分子生物学分野・教授

澤 芳樹

大阪大学大学院医学研究科
外科学講座・心臓血管外科学・教授

西田 幸二

大阪大学大学院医学研究科
脳神経感覚器外科学講座・眼科学・教授

古江-楠田 美保

(独) 医薬基盤研究所
難病疾患資源研究部・培養資源研究室
研究室リーダー

高橋 政代

理化学研究所
発生・再生科学総合研究センター
網膜再生医療研究チームリーダー

梅澤 明弘

(独) 国立成育医療研究センター研究所
生殖医療研究部・部長

朝比 奈泉

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科
顎・口腔再生外科学分野 教授

A. 研究目的

細胞・組織加工薬品等による再生医療は、ヒトの臓器や組織の確保が難しいわが国の医療状況下において強く期待されており、研究の進歩に伴う技術的な実現可能性の高まりとともに、医療としての実用化を望む声がますます強くなっている。また、2007年11月の総合科学技術会議において、人工多能性幹細胞について意見交換が行われ、再生医療臨床研究の加速のための支援のあり方等を検討することが必要とされるなど、臨床研究やそれに繋がる産業開発研究を円滑に進めるため速やかな対応が期待されている。

本研究プロジェクトは、ヒト幹細胞臨床研究の推進から薬事上の確認申請、製造販売承認への切れ目のない展開を効率的、効果的、合理的に行い、再生医療実用化を加速する方策を策定することを目的とする。そのためには、現行の各種規制環境の中で個別に設定されている科学的方策や基準を共通のプラットフォームで取り扱えるようにすることがきわめて重要である。具体的には、ヒト幹細胞臨床研究であれ、産業開発であれ、例えば製造施設、製造工程、製品評価、製品管理面、倫理面、臨床適用面での留意事項、関連する評価基準、評価技術等について産・学・官が共通に参照でき、活用できる評価基準ミニマム・コンセンサス・パッケージを策定することである。また、再生医療では、多種多様で固有の特性を有するヒト幹細胞加工製品及び多様な疾患や患者が対象となるので、実用化加速方策には、ミニマム・コンセンサス・パッケージに加え、個別製品や治療毎に最も適切

な評価方策を共通化、標準化し、上乘せすべきものとして提示する必要がある。

そこで本年度は、医師法下にて行われるヒト幹細胞臨床研究と薬事法下での製品開発から製造販売承認という異なる規制環境で取り扱われる原材料たるヒト細胞・組織および加工した製品について、ヒトに初めて適用する(FIM)という観点から、制度を超えて適切な取り扱い基準を共通化・標準化した、いわば共通のGTP(Good Tissue Practice)を設定するとした場合、どのようなものが現実的かつ妥当であるか、という点に関する検討を行った(総括研究報告書(1))。

1998年にウィスコンシン大学のThomsonらによって多能性幹細胞であるヒトES細胞の樹立が報告されて以来、細胞治療など再生医療への応用の期待が世界的に高まる中、2010年10月ついにヒトES細胞を用いた第1相臨床試験が急性脊髄損傷に対して始まった。これは、米国Geron社を中心としたグループが、ヒトES細胞H1細胞株を原材料としたオリゴデンドロサイト前駆細胞株(GRNOPC1)を対象に亜急性期の胸部脊髄損傷患者の病辺部に移植する試験である

(<http://www.geron.com/patients/clinicaltrials/hESC.aspx>)。さらに、米国Advanced Cell Technology (ACT)社は、ヒトES細胞由来網膜色素上皮(RPE)細胞を若年性遺伝性黄斑ジストロフィー症(シュタルガルト病)と萎縮型加齢黄斑変性症の2疾患に対して第1/2相臨床試験のINDがFDAにより承認された

([http://advancedcell.com/act-stem-cell-related-research-pipeline/retinal-pigment-](http://advancedcell.com/act-stem-cell-related-research-pipeline/retinal-pigment)

epithelial-cell-program/)。国立成育医療研究センターでは、2010年11月にヒトES細胞樹立を報告した。期を一にしてES細胞やiPS細胞などの多機能性幹細胞をスコープに含めた「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」の改訂版が厚生労働省より施行された。難治疾患への細胞治療応用を見据え、ヒトES細胞を細胞知慮へ応用するための現状と課題をミニマム・コンセンサス・パッケージ策定へ向けた基盤とすべく検討していく必要性が高まってきた。そこで、1) ヒト由来細胞・組織加工製品の先端的な原材料材料としてのヒト多能性幹細胞、特にヒトES細胞に焦点をあて、樹立培養技術の現状をふまえて、臨床応用に資するための樹立・バンク化と各段階での検査・評価基準に関する研究及び細胞を安定的に培養し、供給するための技術開発に関する研究を行うとともに、解決すべき課題を明らかにし、評価基準ミニマム・コンセンサス・パッケージに包含すべき事項、さらには上乘せすべき評価方策を検討する(阿久津・末盛)。また2) 先端的糖鎖解析技術の細胞特性評価法としての汎用性ならびミニマム・コンセンサス・パッケージの中での評価技術要素としての有用性を検討する。すなわち、「再生医療」の実用化に向けては、製品の品質や安全性等を確保する上で、原材料としての細胞、中間製品としての細胞、最終製品としての特定の細胞、あるいは混在する可能性がある細胞の特性を把握し、細胞を確認・同定、識別し、細胞の品質を管理する方法論の確立は再生医療実用化に向けた急務である。再生医療における細胞の特性・品質の管理では、細胞表面上のタンパク質が分化あるいは未分化

マーカーとして専ら利用されている。一方、細胞表面の糖タンパク質糖鎖は糖鎖遺伝子の発現パターンの変動から、糖鎖構造が変化し、さらに細胞の分化度によっても変化することから分化あるいは未分化マーカーの策定の有力な標的として期待できる。しかしながら、細胞表面に発現する糖鎖は多種多様であり、糖鎖を分化あるいは未分化マーカーとして応用していくためには、細胞表面糖鎖の網羅解析から発現糖鎖プロファイルを明らかにし、未分化あるいは分化による発現糖鎖プロファイルの変動を明らかにしなければならない。以上のような背景の下、本年度の研究では、平成21年度、本研究課題において開発したアスパラギン結合型糖鎖の比較糖鎖プロファイリング法の細胞特性解析技術としての適用可能性について検討することを目的とする。具体的には、①薬剤による細胞の分化誘導の評価法として有用性を検証するとともに、②幾つかの人工多能性細胞(iPS細胞)の特性・品質解析法としての糖鎖プロファイリングの適用可能性の検討を目的とする。(掛樋)。

再生医療・細胞治療での使用を目的として細胞や組織を加工した製品の開発も国内外で精力的に進められており、こうした再生医療・細胞治療製品が近い将来には数多く実用化されると見込まれてきたが、日本の現状をみると、2007年に重症熱傷治療用の培養皮膚製品が再生医療・細胞治療製品として初めて薬事承認されたものの、その後の新規製品の承認は続いていない。こうした国内実用化・産業化の停滞の原因の一つとして、日本と海外との規制環境の違いが挙げられている。そこで本研究では、欧米におけるヒト細胞・組織加工製品の規制

の原則とされる「リスクベースアプローチ (Risk-Based Approach)」の考え方とその規制への適用について調査・検討する。(佐藤)。

B. 研究方法

B-1 ヒト多能性幹細胞の品質・安全性 (1)

京都大学・再生医科学研究所では、ヒト胚の提供をうけてヒト ES 細胞の作成から培養、研究者への細胞株の分配を行うバンク事業に至るまでの行程を一貫して行っている。これらの確立されたプロセスについて、ヒト ES 細胞を中心に、まず臨床応用の初期段階において必要となるその品質や安全性の確保のための要件を、関連する法規・指針、最新の科学技術、国際的動向などをふまえて、標準化を目指した分析を行うと同時にその妥当性について検証を行い、必要であれば改良を行う。

臨床利用を目的としたヒト ES 細胞の Master Cell Bank (MCB)の構築を想定した場合、その評価基準策定は以下のようなステップに分割することができる。

1. ヒト胚の提供
2. ES 細胞株の樹立
3. 増殖と凍結保存、融解

およびこれらに加え適当な段階で細胞の品質評価を行うことになる (Fig. 1)。

それぞれの段階について、関連する指針等や技術的要件を分析・評価する。

(倫理面への配慮)

京都大学再生医科学研究所におけるヒト ES 細胞株の樹立研究と使用研究は、政府指針に沿った文部科学大臣からの確認をすでに受けている。本研究はこれらの研究に含

まれるものである。

B-2 ヒト多能性幹細胞の品質・安全性 (2)

国立成育医療研究センターでは、2010年11月にヒト ES 細胞樹立を報告し、再生医療応用へ向け細胞製造工程での課題が明白になりつつある。センターでの経験を踏まえ、難治疾患に対してヒト ES 細胞を用いた細胞治療実現に向け、細胞治療に用いる最終産物を作成するのに必要なヒト ES 細胞を確保するのに最小限必要な要件について検討する。

B-3 先端的糖鎖解析技術の細胞特性評価法としての汎用性ならびミニマム・コンセンサス・パッケージの中での評価技術要素としての有用性の検討

B-3-1 マウス P19 細胞の培養と分化誘導

マウス胚性腫瘍細胞 (P19) を 500 nM レチノイン酸を含む α MEM 培地を用いて 3 日間培養し凝集塊を形成させた。凝集塊を 0.25 %-Trypsin/1 mM-EDTA にて処理後回収し、5 分間遠心(800 rpm)し、PBS で細胞を洗浄後レチノイン酸を含まない α MEM 培地によりポリ-L-リジンコートディッシュ上に播種し、神経細胞へと分化誘導させた。

B-3-2 iPS 細胞の培養と回収

6 種類の iPS 細胞はマウスフィダー細胞 (MEF, Reprocell) を播種した培養ディッシュ上で培養した。サブコンフルエント状態の細胞を PBS で数回洗浄後、PBS/1 mM-EDTA を加え 37°C で 5 分間静置後、培養ディッシュ全体を水平方向に叩きながら、細胞が剥がれていることを確認し、細胞を 15mL チューブに回収した。5 分間遠心(800

rpm)し、細胞を回収した。

B-3-3 細胞糖タンパク質分画の調製

マウス培養癌細胞 (P19) および 6 種類の iPS 細胞は 1 M EDTA を含む PBS (50 mL) 中に懸濁し、2 M Thiourea および 5 M Urea 水溶液 (267 mL)、1 M DTT (16.7 mL) および Benzonase 溶液 (125 units) を加え室温で 30 分間インキュベートした。インキュベート後、12000 g、15 分間遠心分離後の上清を回収した。回収した上清に 5% 酢酸、5% 水、5% トリエチルアミンを含むアセトン溶液を加え、-20°C で 30 分間タンパク質を沈殿させたのち、12000 g、15 分間遠心分離した。得られた沈殿に 75% EtOH を加え、12000 g、15 分間遠心分離後の沈殿を細胞総タンパク質として糖鎖分析に用いた。

B-3-4 N-結合型糖鎖の遊離と蛍光標識

総タンパク質分画を SDS、2-メルカプトエタノール、NP-40 を 1% ずつ含むリン酸緩衝液 (pH 7.5、50 μ l) で懸濁した後、N-glycanase F (2 unit) を加え、37°C で 12 時間酵素反応を行った。反応後、冷エタノール (50 μ l) を加え 12000 g で 15 分間遠心分離し上清を濃縮乾固した。回収した試料に 2 アミノ安息香酸および NaBH₃CN をそれぞれ 3% 含む 2% ホウ酸/4% 酢酸ナトリウム/メタノール溶液を 100 μ l 加えて 80°C で 1 時間加温した。反応後 Sephadex LH-20 のゲルろ過クロマトグラフィーにより最初に溶出される蛍光性画分を回収し細胞膜タンパク質由来 N 結合型糖鎖とした。

B-3-5 セロトニンアフィニティークロマトグラフィーによる糖タンパク質糖鎖の分画

ポンプには JASCO PU-980 型、検出器には JASCO FP-920 型蛍光検出器を使用し、流速 0.5 mL/ min で分析した。カラムは LA-Serotonin (Japan Oil Mills, 4.6 x 150 mm) を用い、カラム温度は 25 °C とした。検出は励起波長(Ex) 350 nm、蛍光波長(Em) 425 nm により行った。移動相の溶液 A には水、溶液 B には 50 mM 酢酸アンモニウム水溶液を用いた。グラジエント条件は、試料注入後 2 分間溶出液 B 5% とし、溶出液 B が 37 分後に 75% となるように直線グラジエント溶出を行い、その後 10 分間で溶出液 B が 100% となるようにした。

B-3-6 キャピラリー電気泳動による N-結合型糖鎖の分析

装置には Beckman MDQ (Beckman Coulter) を用い、キャピラリーは DB-1 キャピラリー (内径 100 μ m、全長 40 cm)、緩衝液は 10% PEG70000 を含む 0.1 M トリスホウ酸緩衝液 (pH 8.3) を用いた。印加電圧は 25 kV、カラム温度は 25°C、試料注入は加圧法 (1 psi) により 5 秒間とした。また、検出はヘリウムカドミウムレーザー励起蛍光検出 (励起 325 nm、蛍光 405 nm) で行った。

B-3-7 MALDI-TOF MS

装置には AXIMA-Resonance (Shimadzu 製) を用い、リニア/ポジティブイオンモードにより測定した。試料は DHB/メタノール溶液と等量混合し試料プレート上で風乾させた。

B-3-8 iPS 細胞のシアル酸分析

細胞より回収したアスパラギン結合型糖鎖混合物の凍結乾燥物に水に 10 μ L と 0.2 M HCl (10 μ L) を加え、80 °C で 40 分間加水分解を行った。加水分解後、室温まで冷却後、

0.7 M DMB 試薬(80 μ L)加え、50 $^{\circ}$ C で 150 分間誘導体化反応を行った。反応後、10 μ L を HPLC に注入し、シアル酸分析を行った。ポンプには JASCO PU-980 型、検出器には JASCO FP-920 型蛍光検出器を使用し、流速は 0.9 ml/min とした。カラムは逆相分配 (ODS)カラム(COSMOSIL 5C18-AR-II; 4.6 x 150 mm)を用い、検出波長は励起波長 375 nm、蛍光波長 448 nm とした。溶出は 2%MeCN/14%MeOH 溶液を用い、アイソクラティック溶出にて行った。

B-4 欧米における細胞・組織加工製品規制の原則

米国のヒト細胞、組織または細胞・組織利用製品 (HCT/P) に関しては米国食品医薬品局 (FDA) の生物製剤評価研究センター (CBER) および医療機器放射線保健センター (CDRH) の職員、EU の先端医療製品 (ATMP) に関しては欧州医薬品庁 (EMA) の先端医療委員会 (CAT) の委員・事務局員および EU 加盟各国の規制当局者 (英国 MHRA, 独国 PEI, 仏国 AFSSAPS, 伊国 ISS/AIFA) に聞き取り調査を行った。これと同時に各種メディア中の公開情報の収集を行った。

(倫理面への配慮)

ヒト由来の生体試料を用いる場合は、試料提供者に一切不利益、危険性が伴わないように配慮し、人権擁護を含めたインフォームドコンセントのもとに採取された試料を使用するとともに、研究目的を含め、研究内容の倫理的、科学的妥当性について適正な倫理委員会等による審査・承認を得た上で研究を実施した。

C. 研究結果

C-1 ヒト多能性幹細胞 (ヒト ES 細胞) の臨床応用における課題(1)

C-1-1 ヒト胚の提供に関わる問題点

ヒト胚の提供に関わる諸問題については、昨年度の報告の通り、ES 細胞作成の「原材料」となるヒト胚に関してはヒト由来組織の利用という観点からの倫理的問題と、安全性確保にかんする技術上の問題の二つについて適切な基準を設定する必要がある。このような観点から昨年度は

- ・指針上の問題点
- ・インフォームド・コンセント (IC) に関わる問題
- ・凍結胚の安全性に関する問題
- ・匿名化に関する問題

の、4 つの問題について分析を行い、結果をまとめている。

これを採録しつつ、平成 22 年 11 月のヒト幹指針改訂版との関係について言及する。

C-1-1-1 指針上の問題点

ヒト ES 細胞の作成はこれまで文科省指針である「ヒト胚性幹細胞の樹立及び分配に関する指針」により行われている。臨床研究に用いるヒト ES 細胞の作成も原則としてこの文科省指針と同様の基準で行うことが妥当であると考えられる。文科省指針はこれに基づき作成された ES 細胞を医療に利用することを禁じるものではないが、基本的に基礎研究を想定した指針になっており、たとえば細胞株の分配は ES 細胞の使用研究指針 (文科省) に従い届け出のあった研究計画に対してのみ可能とされている。臨床研究を実施する研究機関は文科省指針に従いすでにヒト ES 細胞研究を行っ

ている場合がほとんどであると考えられるため、文科省指針に基づき作成された細胞株であっても、臨床利用が不可能とするわけでは必ずしもないと言える。いずれにせよ基礎から臨床に至るまで細胞株を途切れることなく使用できる環境を整備することが、ES細胞の臨床利用に必要不可欠である。そのためには、これまでに作成されている細胞株に関しても、それ自体、あるいはそれに由来する中間段階の製品や最終製品の安全性に関わる適切な管理基準を定めたいうで臨床利用を可能とすべきである。

C-1-1-2 インフォームド・コンセント (IC)に関する問題

凍結胚の提供の同意を得るために必要となる説明内容は文科省指針に規定されており、基本的には同様の説明がなされれば問題ないと考えられる。説明の際に臨床目的や医薬品製造などへの利用が将来的に想定されることが説明文書等に記載されていれば、同意書の項目として「臨床利用に同意」を設定する必要性はないと考えられる。

C-1-1-3 凍結胚の安全性に関する問題

凍結胚の提供者は体性幹細胞の臨床利用などで想定されるドナーとは本質的に異なり、その病歴はES細胞の安全性に直接影響する感染症や遺伝性疾患等を除いては必ずしも必要不可欠なものではない。また、不妊治療の患者は通常HCV,HIVなどの感染についてスクリーニングされており、凍結胚のこれらのウイルスによる汚染の可能性は相当に低いと言える。その一方で、凍結胚の提供の手続きは不妊治療終了後に開始されるため、求められる検査項目等を完

全に満たしていないケースもあり得る。

上記に加え不妊治療で用いられる手技は医療機関ごとにまちまちであり、また例えば用いた薬品類のロットなどの記録が不完全である場合も予想される。

これらを考慮して、凍結胚については品質管理基準をあらかじめ一律にかつ厳格に設定することは適切でなく、個々の事例について合理的に判断されるべきである。

C-1-1-4 匿名化に関する問題

ドナーと提供された組織の連結可能性が求められる理由のうち大きなものとして、提供後にドナーが何らかの疾患を発病した場合に、レシピエントへの対応が必要となる場合が想定されていることがある。たとえば、遺伝性疾患を発病したような場合が挙げられるだろう。しかしながらES細胞の場合はドナーと胚は遺伝的には親子関係にあり、連結可能とする必要性はほとんど存在しない。よってドナーとES細胞の連結情報を保持する必要性は乏しい。

C-1-1-5 ヒト幹指針改訂版との関係

平成22年11月に「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針(以下、ヒト幹指針)」が改正され、ES/iPS細胞の臨床研究への道筋がつけられたことになる。しかしながら、ES細胞の樹立・利用に関しては別途定めることとされている。

主な問題点は上記ですでに分析のとおりであるが、匿名化に関しては、臨床研究に用いられる試料については連結可能匿名化が原則とされており、文科省指針との整合性をとることが困難である。

連結情報が必要とされる局面はES細胞

の臨床利用においてはほとんど考えられないことは C-1-1-4 項に記載したとおりであるが、連結可能匿名化とする場合においては提供者の不安の軽減などについて適切な対応がとられる必要がある。

C-1-2 ES 細胞株の樹立と培養に関する問題

C-1-2-1 胚培養と細胞株樹立

ES 細胞株の樹立、培養に関してはすでに様々な検討がなされており、選択可能な手技は比較的整備されてきている。

培養液に関しては、完全合成培地によるヒト ES 細胞の培養技術の進歩により、医療応用可能と考えられるレベルのものが市販品を含めて利用可能となっている。これらの報告のある培養液について、International Stem Cell Initiative による国際的な性能の比較研究が行われた。この研究では、世界的な研究をリードしている 4 箇所の研究機関が共同して合成系培養液の性能の比較を、同一の細胞株と各研究機関で樹立された細胞株を並行して培養することで、同一条件でどの培養液が幅広い細胞株に適用可能かどうかを比較検討した。すべての研究機関で H9 細胞を対照細胞として用い、5 種類の合成系培地 hESF9 (Cell Science & Technology Institute)、mTeSR1 (Stemcell Technologies)、StemPro hESC SFM (Invitrogen)、HESc-GRO (Millipore) の比較検討が行われた。10 継代後に細胞表面抗原の発現を指標に未分化状態の維持を解析した。この共同研究には我々が樹立したヒト ES 細胞 KhES-1, KhES-3 が用いられている。結果は、いずれの研究機関に置いても mTeSR1

と StemPro が比較的良好な結果を示しており、従来の我々の結果を支持するものとなっている。

これらの培養液が実際に臨床研究などのヒトへの ES 細胞の利用に適合するかどうかについては、さらなる検討が必要である。上記の 2 培養液には、BSA など動物由来の成分が含まれており、市販品についてはこれらが必ずしも BSE 非汚染国由来とは限定されていない。また動物由来成分をヒト由来蛋白質に置き換える試みもなされているが、日本においてヒト化培養液の利用は困難であると考えられる。いずれの場合においても品質管理上の観点からは、化学合成品やリコンビナントタンパクへの置き換えが好ましいと考えられ、さらなる研究開発が必要である。

培養液と異なり培養基質については、ヒト細胞を用いるものの他、多くでマウスガン細胞由来のマトリックスが使用されており、これらを原材料としての適合性の検討、代替物の開発などが必要である。我々はすでにリコンビナント ヒト ラミニン蛋白質を接着基質として利用可能であることを示しているが、ラミニンは巨大な蛋白質であるため生産・精製が困難で結果として一般的には非常に高価である。これに変わりうるものとして化学合成ポリマーやポリマーとペプチドの複合体を ES 細胞の接着基質として利用出来ることが報告されてきている。現状ではどれぐらい幅広い細胞株で利用できるか明らかでないが、今後はこれらの合成基質の利用が進むものと期待されている (Fig.2)。

C-1-2-2 感染性物質の混入の可能性

先に述べたように、培養環境を合成系にする努力は重ねられており、短期間の維持培養に関しては受容可能な性能を持つと考えられるものもある。しかし、細胞株の樹立や良好な維持培養には以前として、マウス繊維芽細胞のフィーダーの使用が好ましいと考えるものも多い。ES細胞の培養経歴のなかにマウスなどの異種細胞の接触や、動物由来成分に接した可能性が否定できない細胞株も多いと考えられる。したがって、このような細胞の利用を想定して、検査すべき項目を明瞭にすることが必要である。

C-2 ヒト多能性幹細胞の臨床応用における課題(2)

C-2-1 細胞治療に用いるヒトES細胞

ヒトES細胞は生殖補助医療の過程で治療に用いられなくなった胚(余剰胚)から樹立される。現在、本邦においては、ヒトES細胞樹立は、「ヒトES細胞の樹立及び分配に関する指針(文部科学省告示第八十六号)」に則って行われる。臨床研究に用いることを考慮した場合のインフォームド・コンセントを含めた倫理的手続きと安全性確保に関する技術的課題に関しては、「再生医療実用化加速に資する評価基準ミニマム・コンセンサス・パッケージ策定に関する研究」の平成21年度分担報告書(末盛博文:P70-)に詳しい。本研究報告では、胚盤胞からES細胞を樹立する過程を初期の細胞株化過程と拡大培養過程に分け、臨床研究応用を見据えた場合考慮しなければならない項目を明確していく。当センターでは、ヒトES細胞樹立研究を行っているが、初期の細胞株化過程とは、胚盤胞の内部細胞塊

から増殖を認めた細胞塊を非酵素的に分離・継代していく過程である。非酵素的に細胞継代を行うため、細胞を増やすことの確実性はあるが十分な細胞数を得ることはできない。細胞が一定数得られ、酵素的細胞継代によっても培養維持できるようになることを拡大培養過程としている。この過程で、出発原料としての各種検査を行い、細胞を増やし保存するマスターセルバンク化を行う。出発原料として特性解析は、未分化性や分化多能性のES細胞性質に関わる解析と染色体核型解析、細胞増殖性、細胞形態、そして細菌、真菌、ウイルス及びマイコプラズマ否定試験が行われる(Fig. 3)。フィーダー細胞を使用する場合はガイドラインを参考にして、その特性と微生物学的安全性を担保する必要がある。

C-2-2 ヒトES細胞の再生医療応用に必要な技術的要件

主に以下の4つが上げられる。①均一な細胞性質を保つ培養工程を確立することが必要で、培養過程で未分化状態が維持されている性質の保証が必要である。基本的なES細胞の特性解析に加え、それぞれが目的とする細胞または組織が十分に得られる分化誘導が可能なことを検定する必要がある。②細胞の品質基準と管理体制を整備する。細胞の品質検査としては、Fig. 4のような項目が検討される。ES細胞は多能性幹細胞であり、細胞が無尽蔵に得られる利点は同時に長期間の培養が必要である。③長期培養工程における細胞品質の管理と評価法の確立と④感染性因子混入リスクの管理である。

ES細胞の内在する特性として分化多能性が

あるが、細胞移植の際に懸念される腫瘍化の試験を出発原料の段階で行う意義があるか検討が必要である。分化誘導して得られる最終産物内に奇形腫形成能を有する細胞の混入の有無を確認することは重要であるが、出発原料としての段階で内在特性である造腫瘍性確認試験に意義を見出すことは難しい。ただし、ES細胞が移植対象になるような条件であれば、造腫瘍性試験として形成した奇形腫内に明らかな悪性組織の有無や移植したレシピエント免疫不全マウスの移植以外の組織や臓器に転移性を示す所見の有無等を行う必要がある。

C-2-3 ヒト ES 細胞を用いる臨床研究の課題

出発原料として特性解析した細胞株をマスターセルとし次の各段階へ応用する。細胞治療に用いる最終産物の有効性評価を含めた品質評価は各治療条件に対応した評価を行うが、この場合造腫瘍性試験は重要な項目となる。臨床研究を見据えたヒト ES 細胞の出発原料は、初期の細胞株化段階におくことで既存の細胞株をゼノフリー培養環境、フィーダーフリー培地や無血清培地などの特定の条件に適応させた細胞株を特性解析しマスターセルバンク化することが可能と考えられる。

十分な治療効果と安全性を担保した細胞治療にとって重要な課題は、治療に足る十分な細胞数を得ることであり、その細胞と細胞由来製品調整工程では品質管理と追跡可能性が確保され、各種の汚染を防いで良質な細胞を提供しなければならない。通常自己移植利用が多く保存を必要とするケースが極めて少ない組織幹細胞とは異なり、

ヒト ES 細胞は基本的に特性解析により品質と各種感染性が否定された安全な未分化幹細胞のマスターセルバンク構築が重要である。バンク化する幹細胞は規格化された明確な基準に則って、目的の機能をもつ十分量の細胞を創出することも保障しなければならない。

国立成育医療研究センターでは、2010年11月にヒト ES 細胞樹立を報告した。これらの経験を踏まえ、難治疾患への細胞治療応用を見据え、ヒト ES 細胞を細胞知慮へ応用するための現状と課題をミニマム・コンセンサス・パッケージ策定へ向けた基盤となるべく検討していく。

C-3 先端的糖鎖解析技術の細胞特性評価法としての汎用性ならびミニマム・コンセンサス・パッケージの中での評価技術要素としての有用性の検討

C-3-1 マウス P19 細胞の分化誘導に伴う糖鎖の変化の解析

幹細胞の分化誘導に伴う糖鎖構造の変化については、血液型抗原糖鎖である LewisX がマウス ES 細胞に高発現し、胚体外内胚葉細胞や筋原細胞への分化に従い発現が抑えられること、また、糖脂質糖鎖である SSEA-3,4 は幹細胞の分化の進行に伴い急速に減少することなどが報告されている。このことから幹細胞の選別や分化度を評価する上で細胞の糖鎖は有効な指標となりうると考えられる。そこで、糖鎖を指標とした細胞評価技術について、分化誘導評価技術としての実行可能性について検証した。モデルとして、神経細胞へと分化するマウス胚性腫瘍細胞 P19 を用い、分化に伴う糖鎖の変化を追跡した。

マウス胚性腫瘍細胞 P19 を、レチノイン

酸(500 nM)を含む培養液中で分化誘導させた。3日後、形成した細胞凝集塊を回収し、細胞を分散させ、ポリ-L-リジンコートした細胞培養用ディッシュに播種した後、レチノイン酸を含まない培養液を中で9日間培養し神経細胞へと分化誘導させた。分析に用いる細胞は分化誘導開始後、0日目(初日)、3日目、6日目、9日目の細胞を用いた。糖鎖試料は各細胞から総タンパク質分画を抽出後、糖鎖を切り離し、2AAにて蛍光標識したものを分析用試料とし、キャピラリー電気泳動にて分析した。結果をFig.5に示す。

分析の結果、8~15分にシアロ糖鎖、15分以降にハイマンノース/アシアロ糖鎖によるピーク群が観察され、分化誘導後0~9日目でそれぞれ固有の糖鎖プロファイルを示すことが分かる。Day0で示す細胞(初日)では30種類以上の多様なシアロ糖鎖に由来するピーク群が観察された。一方、3日目、6日目の細胞では8~15分に観察されるシアロ糖鎖のピーク群が著しく減少し、分化過程ではシアリル化が減少する傾向が見られた。また、神経細胞に分化した9日目の細胞ではシアリル化が回復するものの、11、14、21分付近の主要ピーク群(A、BおよびCの領域)は9日目では初日に比べ減少していた。また、同じ試料について、レクチンを用いたキャピラリーアフィニティ電気泳動により解析を行うと(Fig. 6)、フコースに特異的に結合するAALを用いた場合、分化後の細胞で減少が観察されたA、BおよびCのピーク群が消失することから、P19では分化誘導によりフコシル化糖鎖が減少することがわかった。

次に、分化誘導開始から0、3、6、9日目の細胞由来N-結合型糖鎖をシアリダーゼ処理した後、MALDI-TOF MSにて解析した結果をFig. 7に示す。また、観察されたMSス

ペクトルから発現する糖鎖の相対比を算出した(Fig. 8)。キャピラリー電気泳動法の結果と同様に分化開始3、6日目の細胞では複合型糖鎖の発現量は相対的に低く、MALDI-TOF MSの結果からもハイマンノース型糖鎖(m/z 1354、m/z 1516、m/z 1678、m/z 1841、m/z 2003)が主要な糖鎖であった。また、2本鎖糖鎖構造を骨格に持つ糖鎖のみを比較すると、分化0日目ではm/z 1760のフコースが付加していない2本鎖糖鎖が全体の24.0%であったのに対し、分化9日目では28.2%と増加しており、逆に2本鎖糖鎖にフコースが1残基付加したm/z 1906やフコースが2残基付加したm/z 2053の糖鎖は分化0日目でそれぞれ13.6%、4.4%であったのが分化9日目では6.8%、4.4%と減少していることがわかった。

以上のように、マウス胚性腫瘍細胞P19はレチノイン酸による分化誘導により複合型糖鎖の相対比が著しく減少し、また未分化な細胞ほどフコシル化糖鎖の割合が多く、神経細胞への分化に伴いフコシル化の程度が減少することがわかった。

細胞のフコシル化は細胞間の接着やシグナル伝達に関与し、胚の発育に重要な役割を果たすことが報告されている。また、細胞のフコシル化は細胞の増殖能や分化能とも密接に関与することが知られており、各種幹細胞の評価においても注目すべき項目であり、糖鎖を指標とする細胞の評価が細胞の分化誘導の評価法として実行可能性を有すると言える。

C-3-2 人工多能性幹細胞 (iPS) の糖鎖解析

各種幹細胞を再生医療に応用するためには安全性の面で解決すべき問題点が残されている。例えば、培養の際に使用するフィ

ーダー細胞の混入や血清などの異種動物に由来する成分による細胞の特性変化が考えられる。Furue らは iPS 細胞の初期の培養に使用するウシ血清中の N-グリコシルノイラミン酸 (NeuGc) が細胞に取り込まれ、細胞表面に提示されることを報告している。このように各種幹細胞の培養工程では、糖タンパク質等の混入は不可避的であり、細胞の品質管理では、細胞の均一性だけでなく、製造工程に由来する不純物の有無の確認も重要な項目であることは言うまでもない。

iPS 細胞は、マウス胎児組織由来のフィーダー細胞(MEF)上、牛血清あるいは代替血清(KSR)と、塩基性線維芽細胞増殖因子(FGF-2)等を添加した培養液を用いて培養される。MEF についてはマウス由来の繊維芽細胞であり、ヒトには存在しない NeuGc を含む糖タンパク質を含み、培養過程でこれらの糖タンパク質あるいは糖鎖が細胞に混入する可能性がある。iPS 細胞をヒトに適用する場合、ヒト以外の動物種由来の混入物を確認し、その安全性を確保しなければならないが、現在のところそれらに対する有効な手段は提唱されていない。本項ではヒト iPS 細胞である Tic、Dotcom、201B7、Toe、UTA-1、Squeaky の 6 種類について、培養工程に由来する N-グリコシルノイラミン酸(NeuGc)の有無について明らかにするとともに、N-結合型糖鎖を解析した。

C-3-2-1 iPS 細胞のシアル酸分析

MEF 上、KSR を使用し培養した 6 種類の iPS 細胞中の糖鎖を塩酸加水分解しシアル酸を遊離させた後、1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene(DMB)で誘導体化し逆相 HPLC を用いてシアル酸

の分子種の解析を行った。結果を Fig. 9 に示す。

結果、全細胞のいずれにおいても約 7 分に NeuAc が主要なシアル酸分子種として観察された。また、いずれの細胞にも約 10 分に NeuGc が観察された。各細胞における NeuAc と NeuGc の相対比を比較すると、Tic、Dotcom、201B7、Toe、UTA-1、Squeaky で総シアル酸含量の 3.4 %、13.9 %、14.8 %、17.9 %、23.7 %、25.1 %が NeuGc であった。ヒトでは NeuGc を合成する NeuAc 水酸化酵素は不活化されており、ヒトでの発現は認められない。そのため、6 種類の iPS 細胞で確認された NeuGc は MEF に由来すると考えられた。ヒト培養細胞内の NeuGc について、Martin らはヒト ES 細胞をセルソーターを用いてフィーダー細胞を除いた細胞について、FACS によりシアル酸分析を行い、MEF 由来の NeuGc あるいは NeuGc を含む糖タンパク質が細胞に取り込まれた後、細胞表面に提示されることを報告している。今回解析した 6 種類の iPS 細胞については、いずれもフィーダーの除去等の iPS 細胞の純化を行っておらず、得られた結果はフィーダー細胞の混入が強く影響していると考えられた。

C-3-2-2 iPS 細胞の N-結合型糖鎖分析

今後も数多く樹立されることが予想される iPS 細胞株については、起源となる細胞種の違いや、同一細胞であっても細胞自体の特性が異なることが想定され、iPS 細胞としての標準化が必要になると考えられる。文部科学省も「iPS 細胞研究ロードマップ」において iPS 細胞の実用化へ向けて、早急に対応すべき重要な課題としてその標準化を挙げている。一般に標準化とは「多様化、複雑化、無秩序化する事柄を単純化、秩

序化すること」であり、規格や基準を設けて常に同じ結果が得られるようにすることにある。特に、iPS 細胞の場合には同等の性質を有する細胞を作成し使用することが求められ、細胞の培養法、分化方法だけでなく、保存や管理方法とそれらを評価する方法と基準を早急に整備する必要がある。

細胞の複合糖質糖鎖は遺伝子やタンパク質などと同様に細胞の性質変化等に応答しその発現パターンが変化するため、細胞標準化のための指標としても有用であると考えられる。そこで、6 種類の iPS 細胞の N-結合型糖鎖について解析を行い、iPS 細胞に共通に発現が認められる糖鎖と細胞固有の糖鎖発現の有無について調査した。6 種類の iPS 細胞の N-結合型糖鎖をシアル酸残基数に基づきセロトニンアフィニティークロマトグラフィーで分画した結果を Fig. 10 に示す。また、各分画中の糖鎖をシアリダーゼ処理しアシアロ糖鎖としたものを MALDI-TOF MS にて分析し、細胞間で比較した結果を Fig. 11 に示す。

6 種類の iPS はいずれもアシアロ/ハイマンノース型糖鎖分画を 43.6~58.2% 含み、MALDI-TOF MS による分析から、 m/z 1354、1516、1678、1840、2003 を示すマンノース 5、6、7、8、9 残基からなるハイマンノース型糖鎖が主要な糖鎖であった。モノシアロ糖鎖分画については 27.2~30.6% 含み、すべての細胞で 2 本鎖糖鎖にフコースが 1 残基修飾した m/z 1907 の糖鎖が最も含量の高い成分として観察され、この糖鎖にさらにフコースが 1 残基付加した m/z 2053 の糖鎖も観察された。ジシアロ分画は 10.5~15.5% 含み、MALDI-TOF MS の結果からは 2 本鎖糖鎖の m/z 1760 と、フコースが 1 残基付加した m/z 1907 の糖鎖が主要ピークとして観察されたが、Tic にのみ m/z 1573、

m/z 1822 のピークが観察され、これらのピークについては構造を同定することができなかった。同様にトリシアロ分画については 3.6~9.7% 含み、Tic 以外の 5 種類の細胞では m/z 1760 の 2 本鎖糖鎖が主要ピークとして観察され、Tic では 2 本鎖糖鎖にフコースが 1 残基付加した m/z 1907 や、この糖鎖に硫酸基が付加したと考えられる m/z 1987 のピークが観察された。テトラシアロ分画については 0.3~2.2% 含み、Tic については 0.3% と含量が低く、MALDI-TOF MS では糖鎖のシグナルを検出することができなかったが、Tic 以外の 5 種類の細胞では m/z 1760 の 2 本鎖糖鎖が主要ピークとして観察された。またトリシアロ分画についてはシアリダーゼ処理をおこなったにも関わらず m/z 2068 の 2 本鎖糖鎖に NeuGc が 1 残基付加したと考えられるピークも観察された。

以上、6 種類の細胞から 73 種類の N-結合型糖鎖を確認できた。観察された糖鎖はハイマンノース型糖鎖、複合型 2 本鎖、複合型 3 本鎖糖鎖および複合型糖鎖にフコースが 1 あるいは 2 残基付加した糖鎖が主要な糖鎖であった。また、トリシアロ分画において 6 種類の細胞(Tic のテトラシアロ分画を除く)では m/z 1760 の複合型 2 本鎖糖鎖にシアル酸が 3 残基あるいは 4 残基付加したと考えられる糖鎖の存在が確認された。複合型 2 本鎖糖鎖にシアル酸が 3 残基あるいは 4 残基付加した糖鎖は、マウスやラットなどのげっ歯類においては観察されているが、ヒトでは通常観察されない糖鎖であるため、マウス胎児由来フィーダー細胞から混入した糖タンパク質由来であると考えられた。次に、6 種類の細胞で観察される糖鎖のうち、MALDI-TOF MS の結果を元にモノシアロ分画、ジシアロ分画に観察される

糖鎖についてフコースの修飾率を比較した (Fig. 12)。

モノシアロ分画ではいずれの細胞でもフコースによる修飾率は高く、特にフコースを1残基持つ糖鎖は全ての細胞で50%以上であった。また、フコースを2残基持つジフコシル糖鎖も14%以上を占め、iPS細胞は種類にかかわらず、フコースによる修飾率が高いことがわかった。ジシアロ分画では、モノフコシル化糖鎖がTic細胞で72%、Dotcom細胞で50%と高い値を示したものの、他の4細胞では35%以下とモノシアロ分画の場合と比べて低い値であった。6種類の細胞のうち、201B7、Toe、UTA-1、Squeakyについてはマウス細胞由来と考えられる糖鎖が観察されていることから、ジシアロ分画におけるフコースによる修飾率が低いという結果は、マウス細胞の混入による結果であると考えられた。以上の結果、iPS細胞はハイマンノース型糖鎖、複合型2本鎖、複合型3本鎖糖鎖を共通の糖鎖として持つことと、複合型糖鎖はフコースが1あるいは2残基付加したフコシル化糖鎖を発現することが共通の特徴であった。一方、今回用いたiPS細胞は全てマウスフィダー細胞上で培養されたものであり、マウス細胞の混入によると考えられる糖鎖も観察された。

C-4 欧米における細胞・組織加工製品規制の原則

C-4-1 米国の規制アプローチ

日本における細胞・組織利用医薬品および医療機器は、米国では「ヒト細胞、組織または細胞・組織利用製品」(HCT/P)という製品の範疇に含まれており、治験(商業的臨床試験)や販売承認に限らず製品開発を目的としない臨床研究(非商業的臨床試

験)に対してもFDAが生物製剤または医療機器として規制を行っている。

C-4-1-1 「ヒト細胞、組織または細胞・組織利用製品」HCT/Pの定義

連邦規則集第21編第1271.3(d)項、21CFR1271.3(d)による「ヒト細胞、組織または細胞・組織利用製品」HCT/Pの定義は以下の通り。

HCT/Pとは、ヒト細胞または組織を含む、またはヒト細胞または組織から成る品物であり、ヒト患者に対して埋植、移植、注入または導入することを目的としたものである。HCT/Pの例としては、骨、靭帯、皮膚、硬膜、心臓弁、角膜、末梢血および臍帯血由来造血幹/前駆細胞、自己への使用の目的で加工された軟骨細胞、上皮系細胞を合成マトリクス上に乗せたもの、精液またはその他の生殖組織が含まれるが、これらに限定されるものではない。以下のものはHCT/Pとは見なされない：

- (1) 血管を含んでいる移植用のヒトの器官；
- (2) 本章第607項および207項にそれぞれリストすべき全血または血液成分または血液製剤；
- (3) ミルク、コラーゲンおよび細胞因子のような、人体より分泌または抽出された製品。ただし、精液はHCT/Pとみなされる；
- (4) 自己への使用の目的で最小限の加工が施された骨髄で、他の物と複合体化していないもの(ただし、水、クリスタロイド(結晶性物質)、滅菌剤、保存剤、または保管剤については、添加することによって骨髄に関して新たな臨床上の安全の上での懸念を生じないならば

この限りではない)；

- (5) HCT/P の製造に使用される補助的な製品；
- (6) ヒト以外の動物由来の細胞、組織、および器官；
- (7) 本章 809.3(a) 項に規定された体外診断薬；
- (8) 血管のうち、42 CFR 121.2 に規定される臓器移植用臓器とともに回収され、かつ「臓器移植専用」とのラベルのあるもの；

HCT/P であるヒト細胞・組織利用製品は、公衆衛生サービス法の側面からさらに 2 種類に大別される。すなわち公衆衛生サービス法第 361 条に基づく「ヒト組織」(361HCT/P)と公衆衛生サービス法第 351 条に基づく「ヒト細胞治療薬および遺伝子治療薬」(351HCT/P)がある。HCT/P のうち、21CFR1271.10(a)の要件(IV 項参照)すべてに該当する場合には 361HCT/P に該当し、そうでない場合には 351HCT/P に該当する。前者の 361HCT/P は「ヒト組織」とも呼ばれ、販売承認申請が必要なく、査察によって規制される。361HCT/P は 21CFR1271 のサブパート A(HCT/P 関連語句定義等)、B (登録とリスティング)、C (ドナーの適格性)、D (cGTP, current good tissue practice (現段階において良いと考えられる組織の取扱い方の基準)) に加え、E (追加要求事項: 報告とラベリング)、F (査察と強制執行) に従うことが必要となる。一方で後者は生物製剤または医療機器として品目毎の承認が必要とされる。

C-4-1-2 HCT/P の規制における基本原則：リスクベースアプローチ

HCT/P の規制について、FDA は “Proposed Approach to Regulation of Cellular and Tissue-Based Products”(Docket No. 97N-0068 [Federal Register Vol.62(42), Pages 9721-9722, March 4, 1997], 1997 年 2 月)の中に考え方を示している。これはそれまでばらばらであった HCT/P の規制を一つにまとめ、従来の製品の規制と新しい製品の規制とを統合したアプローチを提示することを意図している。97N-0068 の枠組みでは大きく分けて 3 つの課題、すなわち、

- (1) AIDS や肝炎のような感染症の可能性のある汚染された組織を無意識に使用することの防止
- (2) 組織を汚染または損傷するような不適切な取り扱いや加工の防止
- (3) 高度な加工を施した組織、本来の機能とは異なる機能を目的として使用される組織、細胞・組織以外の構成要素と複合化された組織、ないし代謝機能を目的として使用される組織の臨床上の安全性および有効性の明示

に焦点を当てて規制が実施される。

HCT/P の種類およびその適用は幅広く、一つの規制の枠組みがすべての HCT/P に対して適切とはなり得ない。類似した製品を同様に、かつ製品の差に基づいて適切に区別した規制が行えるような、包括的な枠組みを確立するために、FDA は製品の使用に関する基本的な公衆衛生上の懸念事項およびそれに付随する規制上の考え方をまとめている。公衆衛生上の懸念事項としては以下の 5 つが挙げられている。

- A) 感染症の伝搬をいかに防ぐことができるか？

- B) 例えば、安全でないもしくは有効でない製品をもたらす恐れのある汚染を防ぐため、あるいは、意図したように製品が機能するために製品の質と機能を維持するためには、どのような工程管理が必要か？
- C) 臨床上の安全性や有効性をどう確認するか？
- D) 製品の適切な使用のためにはどのような表示が必要か、どのような宣伝が許容されるか？
- E) 細胞・組織企業のモニタリングや彼らとのコミュニケーションに関して、FDA はどうするのが最善なのか？

FDA はこれらの懸念事項を念頭に、各懸念事項に関する相対的なリスクによって、細胞・組織とその使用を区別しており、それによって FDA は各懸念事項に適切な監視レベルを付与することが可能となっている。したがって、細胞・組織はリスクと FDA 審査における必要性にもとづいて、重層的に規制されることになる（＝リスクベースアプローチ）。それを具体的にしたもののが以下の取扱いとなる。

C-4-1-3 361HCT/P と 351HCT/P

361HCT/P の判定基準は以下の通り。

HCT/P は、以下の全ての判定基準に適合する場合は、公衆衛生サービス法（PHS Act）第 361 条、および 21CFR1271.10 (a) によってのみ規制される：

- (1) HCT/P の加工が 最小限 (minimal manipulation) の場合（下注）；
- (2) HCT/P が、細胞・組織の採取部位と同等な部位への適用（homologous use）にのみ限定される場合で、そのことが

- 表示、宣伝等に反映されていること；
- (3) 製造工程に他の物質（水、クリスタロイド、滅菌剤、保存剤、または保管剤を除く）と細胞または組織との複合体化が含まれず、かつ水、クリスタロイド、滅菌剤、保存剤、または保管剤の添加によって当該 HCT/P に関して新たな臨床上の安全の上での懸念を生じない場合で；なおかつ
 - (4) 以下の何れかに該当する場合：
 - 1) HCT/P に全身的な作用がなく、その主たる機能として生細胞の代謝活性に依存することがない場合；または
 - 2) HCT/P に全身的な影響がある、またはその主たる機能として生細胞の代謝活性に依存することがある場合で：なおかつ
 - i) 自己への使用を目的とする場合；
 - ii) 一親等または二親等の血縁関係の同種のための使用である場合；または
 - iii) 生殖目的の使用である場合。

注：最低限の処理（Minimal Manipulation）の要件（21CFR1271.3(f)）

- (1) 構造のある組織については、再建、修復または置換における当該組織の有用性に関して組織本来の特性に変化を与えるものではないこと；また、
 - (2) 細胞ないし構造のない組織については、細胞または組織の本来の生物学的特性に変化を与えるものではないこと
- （Guidance for Industry and FDA Staff: Minimal Manipulation of Structural Tissue Jurisdictional Update, 2006 年 9