

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ー電気泳動により解析を行うと(Fig. 2)、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. 3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. 4)。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.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免的であり、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.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. 5 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.2.2 iPS 細胞の N-結合型糖鎖分析

今後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. 6 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. 7 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. 8)。

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ーダー

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。

D. まとめ

本研究では、糖鎖を指標とする細胞評価技術を、細胞の分化誘導評価技術への適用可否について検討するとともに、各種ヒト iPS 細胞の N-結合型糖鎖解析へと適用し、細胞特性解析技術としての適用可能性について基礎的検討を行った。

本研究により、細胞に発現する糖鎖は細胞の個性解析を行う上で有益な情報を与えることがわかった。これらの結果は、糖鎖プロファイルという観点から、各細胞の特性解析、同定・確認、細胞間の差異、品質管理、細胞の機能と細胞を構成する糖タンパク質の関係など、きわめて広範囲に応用できる可能性を示している。再生医療の実用化においては、製品の品質、安全性を確保する上で、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のある細胞の様々な特性を把握し、細胞の品質を管理することが重要である。細胞のアスパラギン結合型糖鎖プロファイルを分析する技術は、この目的を達成しうる可能性を持ち、再生医療実用化研究を推進するために細胞の糖鎖がマーカーとして有用であることは明らかである。今後、糖鎖を再生医療の実用化のために応用していくためには、様々な段階の細胞の発現糖鎖情報を蓄積しながら、糖鎖解析技術を共通のプラットフォームとし利用していくための方法論と評価基準の策定を進めていく必要がある。

E. 研究発表

1. 論文発表

Yamada K, Hyodo S, Kinoshita M, Hayakawa T, Kakchi K.

Hyphenated technique for releasing and MALDI MS analysis of O-glycans in mucin-type glycoprotein samples.

Anal Chem. 2010 82(17):7436-7443.

Kinoshita M, Kakoi N, Matsuno YK, Hayakawa T, Kakehi K.

Determination of sulfate ester content in sulfated oligo- and poly-saccharides by capillary electrophoresis with indirect UV detection.

Biomed Chromatogr. 2010

2. 学会発表

三ツ井洋輔、山田佳太、梶直孝、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃

グライコミクスによる癌細胞の個性解析とグライコプロテオミクスへの展開第 11 回 関西グライコサイエンスフォーラム、平成 22 年 5 月 15 日、大阪市立大学（大阪）

Y. Mitsui, Y. Tanaka, K. Yamada, S. Hara, M. Kinoshita, T. Hayakawa, K. Kakehi

Targeted glycoproteomics of polylysosamine-carrier proteins expressed on human histocytic lymphoma cells

The 25th International Carbohydrate Symposium、平成 22 年 8 月 4 日、幕張メッセ（千葉）

K. Yamada, K. Kamisue, S. Watanabe, M. Kinoshita, T. Hayakawa, K. Kakehi

A considerable amount of free glycans derived from glycoproteins are present in sera

The 25th International Carbohydrate Symposium、平成 22 年 8 月 4 日、幕張メッセ (千葉)

A. Nakanishi, M. Sato, M. Kinoshita, K. Kakehi, T. Hayakawa

Analysis of Characteristics of Cells using Glycans as Marker Molecules

The 25th International Carbohydrate Symposium、平成 22 年 8 月 4 日、幕張メッセ (千葉)

仲西暁良、佐藤葵、木下充弘、森山博由、早川堯夫、掛樋一晃

キャピラリー電気泳動を用いる糖鎖を指標とする細胞評価法 - 再生医療実用化に向けた基礎検討 - 第 30 回 キャピラリー電気泳動シンポジウム平成 22 年 11 月 17 日、長良川国際会議場 (岐阜)

仲西暁良、佐藤葵、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃

糖鎖を指標とする細胞の個性解析、第 33 回

日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、平成 22 年 12 月 9 日、神戸ポートアイランド (兵庫)

三ツ井洋輔、山田佳太、梶直孝、田中佑樹、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃

グライコプロテオミクスによるポリラクトサミン型糖鎖キャリアータンパク質の解析、学会名：第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、平成 22 年 12 月 9 日、神戸ポートアイランド(兵庫)

三ツ井洋輔、山田佳太、田中佑樹、梶直孝、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃癌特異的糖タンパク質のグライコプロテオーム解析、日本薬学会 第 131 年会、平成 23 年 3 月、ツインメッセ静岡 (静岡)

三ツ井洋輔、原沙弥香、山田佳太、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃、

ヒト胃癌細胞中の高フコシル化糖タンパク質の探索、日本薬学会 第 131 年会、平成 23 年 3 月、ツインメッセ静岡 (静岡)

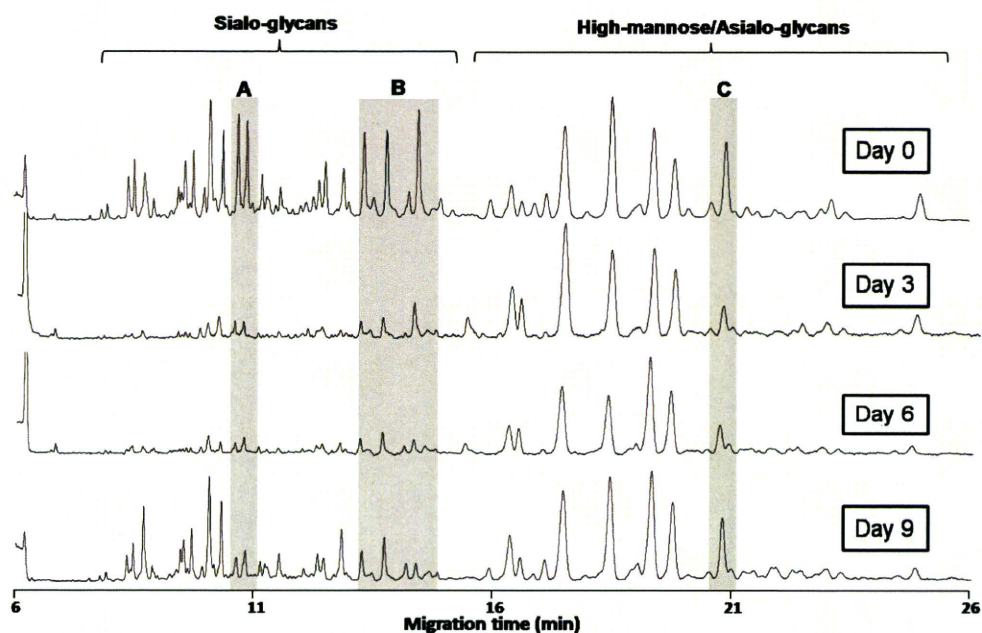


Fig. 1. Capillary electrophoresis of N-glycans in mouse P19 cells differentiated with retinoic acid. Analytical condition Capillary, DB-1 (40 cm x 100 μ m.i.d). Running buffer, 100 mM Tris-borate buffer (pH 8.3) containing 5 % polyethylene glycol (PEG 70000). Applied voltage, 25 kV. Injection, pressure method (1.0 psi, 10 sec). Temperature, 25 $^{\circ}$ C. Detection, He-Cd laser induced fluorescent detection (Ex: 325 nm, Em: 405 nm).

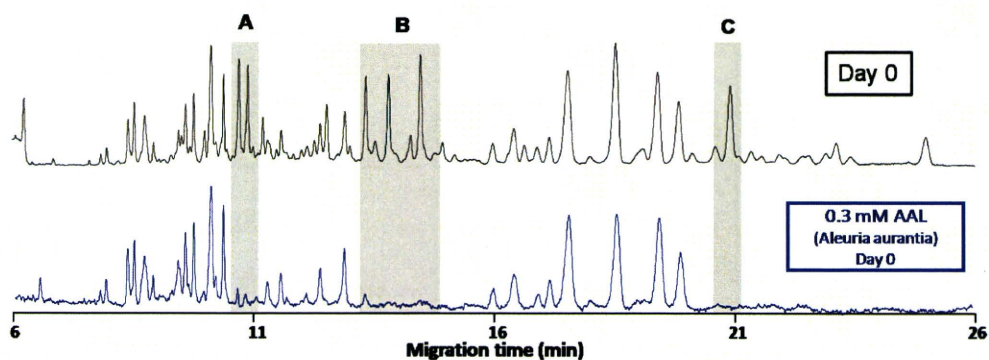


Fig. 2. Capillary affinity electrophoresis of N-glycans in ten cancer cell lines. Analytical condition Capillary, DB-1 (40 cm x 100 μ m.i.d). Running buffer, 100 mM Tris-borate buffer (pH 8.3) containing 5 % polyethylene glycol (PEG 70000) with or without 0.3 mM AAL. Applied voltage, 25 kV. Injection, pressure method (1.0 psi, 10 sec). Temperature, 25 $^{\circ}$ C. Detection, He-Cd laser induced fluorescent detection (Ex: 325 nm, Em: 405 nm).

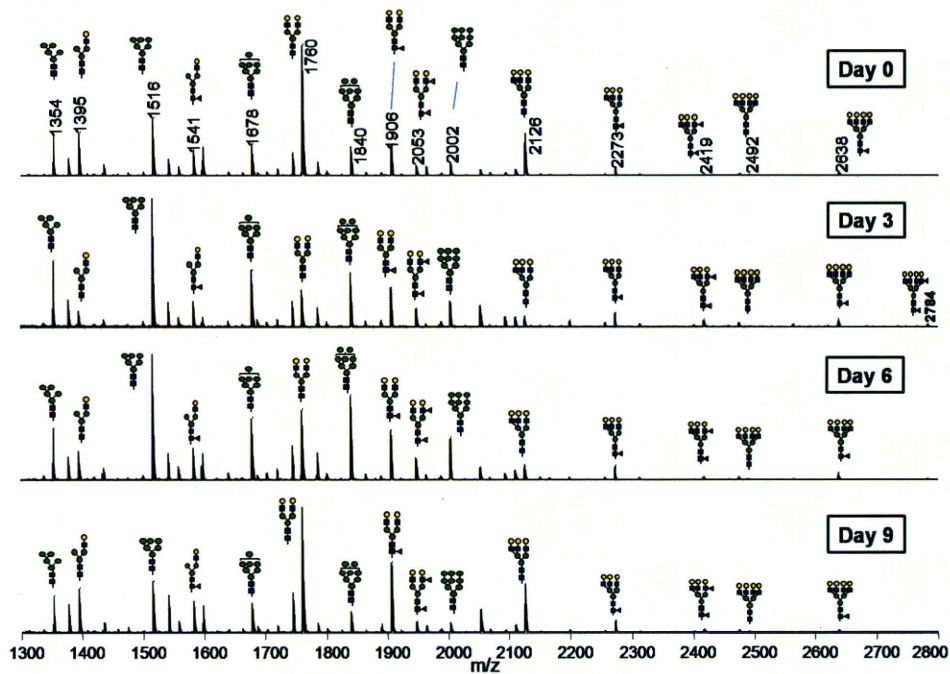


Fig. 3. MALDI-TOF MS analysis of N-glycans in P19 cell after differentiation with retinoic acid. Analytical conditions: apparatus, AXIMA resonance; polarity, negative ion mode; matrix, 2, 5-dihydroxybenzoic acid.

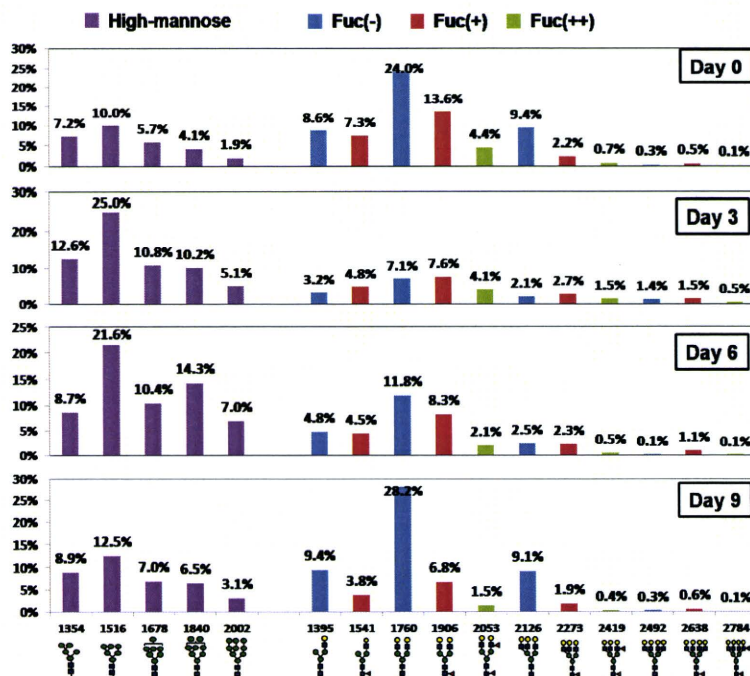


Fig. 4. Relative amounts of N-glycans observed in P19 cells.

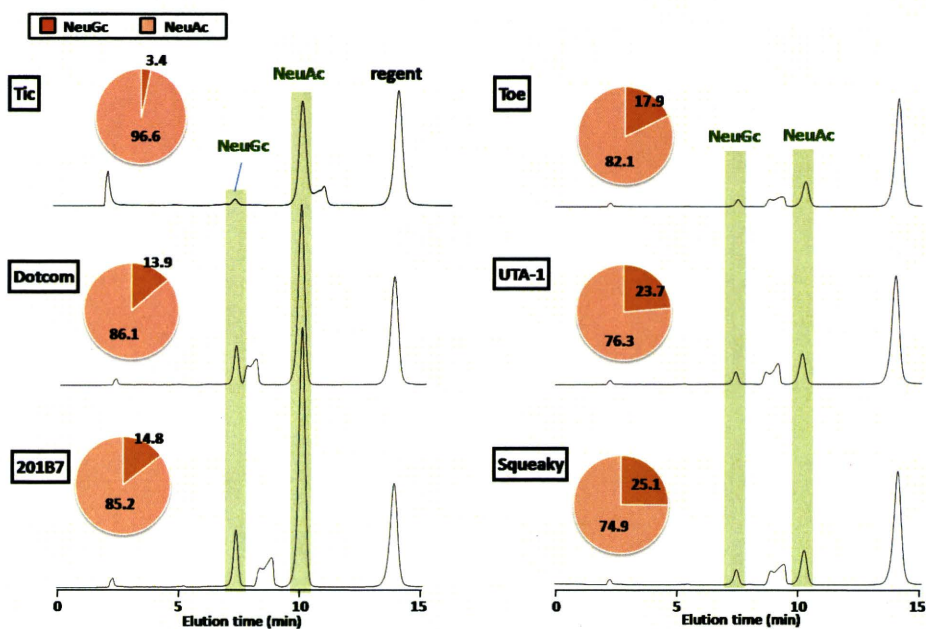


Fig. 5. Analysis of Sialic Acids in six iPS cells. Analytical condition: column, COSMOSIL 5C18-II (4.6 x 250 mm); flow rate, 0.9 mL/min; eluent, 2% Acetonitrile/14% Methanol in water; elution conditions: isocratic elution.

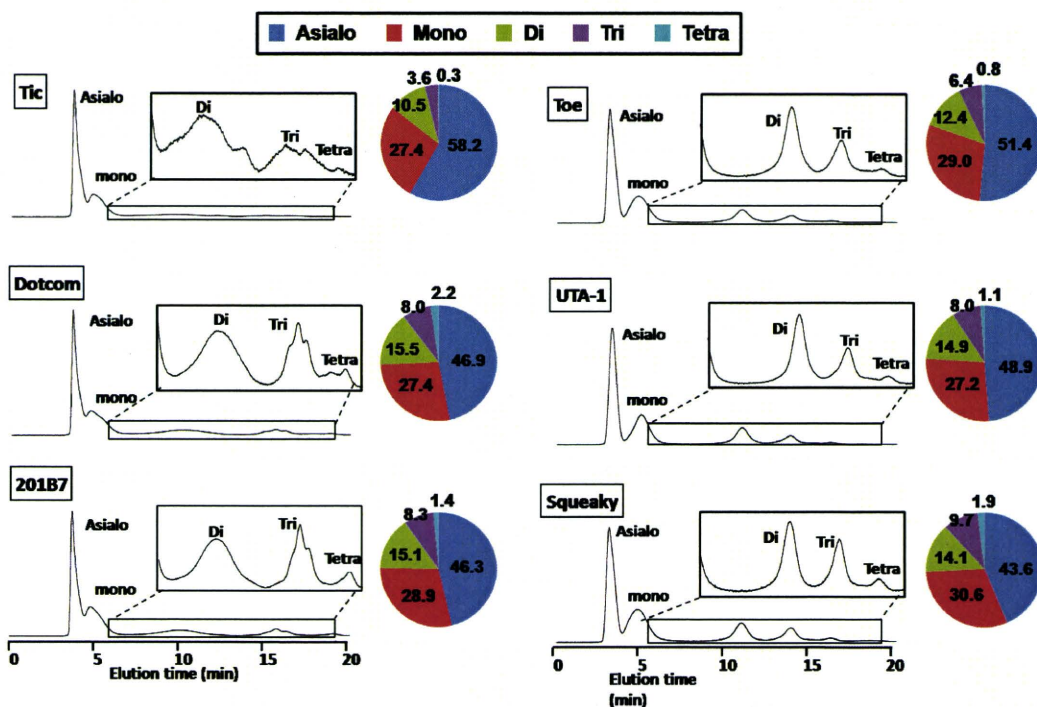


Fig. 6. Serotonin-affinity chromatography of N-glycans in six iPS cells. Analytical conditions; column, LA-serotonin (4.6 x 150 mm). flow rate, 0.5 mL/min. eluent; solvent A, water. solvent B, 50 mM Ammonium acetate in water. gradient conditions, a linear gradient (5-40 % solvent B) from

2 to 20 min and 1 M NaCl from 20 to 45 min.

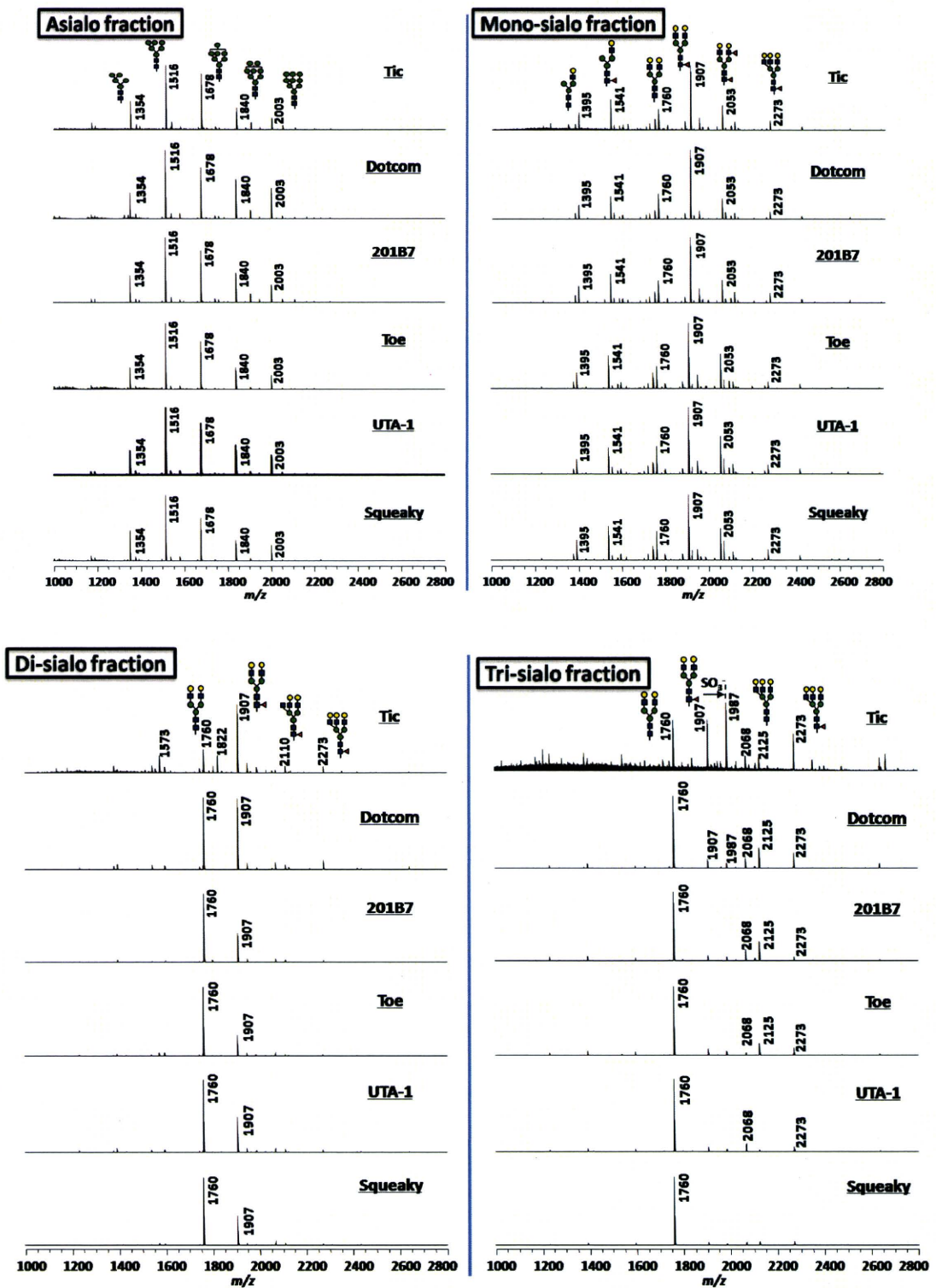


Fig. 7. MALDI-TOF MS analysis of N-glycans in six iPS cells. Analytical conditions were the same as in Fig. 3.

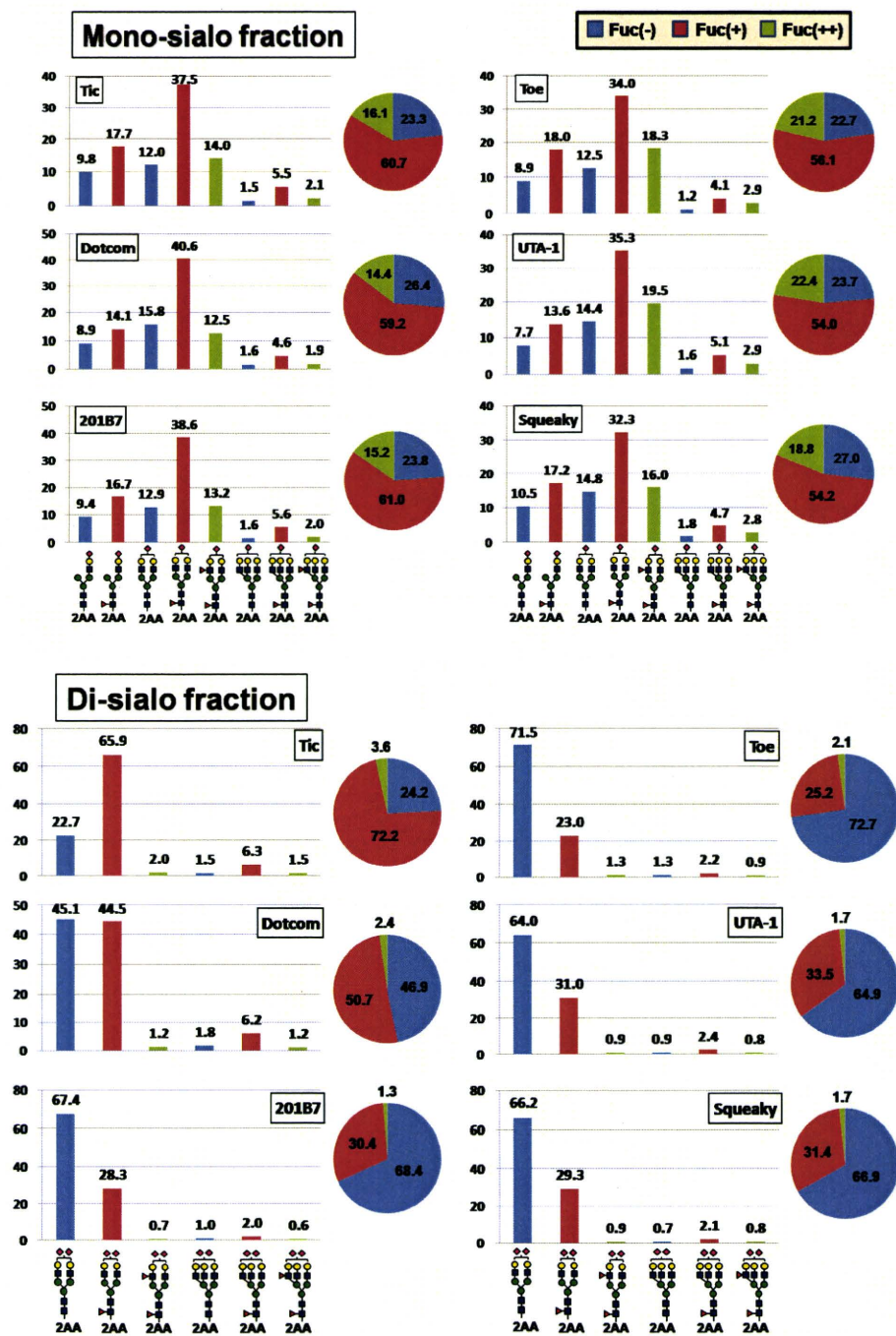


Fig. 8. Relative amounts of N-glycans observed in Mono-sialo and Di-sialo fractions in six iPS cells.

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」
分担研究報告書

海外におけるヒト細胞・組織加工製品の規制の原則に関する研究

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

研究要旨

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。2007年に日本の山中らと米国の Thomson らがそれぞれ樹立に成功したヒト人工多能性幹細胞（iPS細胞）も再生医療への応用が期待されている。しかし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した。

A. 研究目的

従来治療が困難であった疾病・損傷の新たな治療法として、再生医療・細胞治療には大きな期待が寄せられている。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。2007年に日本の山中らと米国の Thomson らがそれぞれ樹立に成功したヒト人工多能性幹細胞（iPS細胞）も再生医療への応用が期待されている。しかし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、欧米でのヒト細胞・組織加工製品の規制に関する彼らの考え方を調査した。

米国・EUともに、再生医療・細胞治療製品の規制の原則は「リスクベースアプローチ（Risk-Based Approach）」である。「リスクベースアプローチ」とは、対象となる各製品の性質に固有、かつその品質・安全性・有効性に関連するリスク要因を探り当てることをベースにし、その影響の度合いを科学的に評価することにより規制の方

針・内容を定めるアプローチ法である。再生医療・細胞治療製品はこの原則に基づき、かつ製品の多様性を踏まえ、細胞の由来(自家 vs.他家)あるいは使用目的(非商業的臨床試験 [大学病院等での介入的臨床研究] vs.商業的臨床試験 [製品開発を目的する治験])等の条件に関わらず、臨床試験開始も販売も品目ごとに、薬事関連法規に基づいた審査・承認の対象となっている。本研究では、欧米規制当局のガイドライン・ガイダンス等から、リスクベースアプローチの再生医療・細胞治療製品の規制への適用の具体的姿を明らかにした。

B. 研究方法

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)

本研究は動物・ヒト試料等を用いない調査型研究のため、国立医薬品食品衛生研究所の動物実験指針、研究倫理審査委員会規程等にある倫理面の審査・承認が必要とはならなかった。

C. 研究結果

C-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-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：

- (9) 血管を含んでいる 移植用のヒトの器官；
- (10) 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；
- (11) 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；

- (12) 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）；
- (13) HCT/P の製造に使用される補助的な製品；
- (14) ヒト以外の動物由来の細胞、組織、および器官；
- (15) 本章 809.3(a) 項に規定された体外診断薬；
- (16) 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-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、

- (4) 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
- (5) 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
- (6) 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。

- F) 感染症の伝搬をいかに防ぐことができ
るか？
- G) 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？
- H) 臨床上の安全性や有効性をどう確認す
るか？
- I) 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？
- J) 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以下
の取扱いとなる。

C-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
つてのみ規制される：

- (5) HCT/P の加工が最小限 (minimal manipulation) の場合（下注）；
- (6) 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；
- (7) 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
- (8) 以下の何れかに該当する場合：
 - 3) 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
 - 4) 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月)

361HCT/Pと351HCT/Pとの区分はあまり明確ではなく、同じ細胞製品であっても用途・適用によって361HCT/Pにも351HCT/Pにもなることがある。例えば、自己由来の最低限の処理のみ施された骨髄幹細胞は、造血系再構築に用いられる(相同使用, homologous use)のならば361HCT/Pとなり、心臓の修復に適用される(非相同使用, non-homologous use)のならば351HCT/Pとなる。

351HCT/Pは、安全性と有効性を臨床試験によって示さなければならない製品であり、販売前審査によって規制される。我が国の定義(薬食発第0208003号(平成20年2月8日)、薬食発第0912006号(平成20年9月12日))による細胞・組織加工医薬品ならびに細胞・組織加工医療機器は、米国の解釈では“more than minimal manipulation”を施されていることになり、351HCT/Pの範疇に属する。351HCT/Pはその主作用の様式によって生物製剤(または医薬品)または医療機器として規制される(21CFR1271.20)。351HCT/Pの中でも

医薬品、医療機器に分類されるものはそれぞれ drug HCT/P、device HCT/P と呼ばれている。なお、drug HCT/P というカテゴリーは医薬品に分類されるものが出現する可能性を否定しないという意味で存在しており、実際に drug HCT/P に分類されている販売承認済み 351HCT/P は今のところ存在しない。

351HCT/P に対しては公衆衛生サービス法 (PHS Act) および食品医薬品化粧品法 (FD&C Act) に基づき、以下のような事項が要求される：

- (1) 市販前に承認取得
- (2) 承認前の査察および承認後の定期査察 (GMP 査察、GCP 査察等)
- (3) 21 CFR 中の適用すべき項目、例えば：
 - 1) 第 25 項 (環境影響評価)；
 - 2) 第 50 項 (インフォームドコンセント →GCP)；
 - 3) 第 54 項 (費用の開示→GCP)；
 - 4) 第 56 項 (施設内倫理委員会による審査→GCP)；
 - 5) 第 201/202 項 (ラベリングと宣伝)
 - 6) 第 207 項 (医薬品製造者の登録および市場流通医薬品のリスティング)
 - 7) 第 210/211 項 (cGMP) (FD&C Act)
 - 8) 第 312 項 (IND)、第 314 項 (NDA)、
 - 9) 第 600~680 項 (生物製剤関連, 生物製剤 GMP) (PHS Act)
 - 10) 第 807 項 (医療機器製造者・輸入者の登録および医療機器のリスティング)
 - 11) 第 812 項 (IDE)
 - 12) 第 814 項 サブパート A-E (PMA)、H (HDE)
 - 13) 第 820 項 (QSR=医療機器用 GMP)

- 14) 第 1271 項(HCT/P 関連) : 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) (ただし臨床試験中は B を除外)
- (4)FDA ガイダンス
- 1) Guidance on the Preparation of Investigational New Drug Products (Human and Animal) (1991 年)
 - 2) FDA Notification: Proposed Regulatory Approach Regarding Cellular and Tissue-Based Products (1997 年 3 月, 62 FR 9721) ("risk-based approach")
 - 3) Guidance on PMA Interactive Procedures for Day-100 Meetings and Subsequent Deficiencies –for Use by CDRH and Industry (1998 年 2 月)
 - 4) Guidance for Industry: Guidance for Human Somatic Cell Therapy and Gene Therapy (1998 年 3 月)
 - 5) Early Collaboration Meetings Under the FDA Modernization Act (FDAMA); Final Guidance for Industry and for CDRH Staff (2001 年 2 月)
 - 6) Guidance for Industry: Special Protocol Assessment (2002 年 5 月)
 - 7) Guidance for Industry: Source Animal, Product, Preclinical, and Clinical Issues Concerning the Use of Xenotransplantation Products in Humans (2003 年 4 月)
 - 8) Guidance for Industry Independent Consultants for Biotechnology Clinical Trial Protocols (2004 年 8 月)
 - 9) Guidance for Industry: Regulation of Human Cells, Tissues, and Cellular and Tissue-Based Products (HCT/Ps)-Small Entity Compliance Guide (2007 年 8 月)
 - 10) Guidance for Industry: Eligibility Determination for Donors of Human Cells, Tissues, and Cellular and Tissue-Based Products (HCT/Ps) (2007 年 8 月)
 - 11) Guidance for Industry: Certain Human Cells, Tissues, and Cellular and Tissue-Based Products (HCT/Ps) Recovered from Donors Who Were Tested for Communicable Diseases Using Pooled Specimens or Diagnostic Tests (2008 年 4 月)
 - 12) Guidance for FDA Reviewers and Sponsors: Content and Review of Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Somatic Cell Therapy Investigational New Drug Applications (INDs) (2008 年 4 月)
…再生医療、癌ワクチン等に用いられる細胞製剤に関して、規制側 (FDA 審査官) 及び開発者 (大学や企業) 双方に対しての基本的な安全性評価の考え方
 - 13) Guidance for Industry: CGMP for Phase 1 Investigational Drugs (2008 年 7 月)
- ただしこれらの例に限定されているわけ

ではない。

当該 351HCT/P が生物製剤、医療機器(医薬品に該当するものはこれまでのところなし)のいずれに分類されるかにより適切な項目を取捨選択する。21CFR1271 の要求事項が 21CFR210/211 またが 21CFR820 の規制と矛盾するような場合、すなわち HCT/P の規制が cGMP や QSR と矛盾するような場合には、一般的な要求事項よりも、その製品により具体的に適合する要求事項の方に従わなければならない。通常は、生物製剤としての 351HCT/P は cGMP、cGTP に従って製造し、IND 申請(研究用新規医薬品申請: Investigational New Drug Application)の後に臨床試験を行い、BLA(生物製剤承認申請: Biologics License Application)を通じて販売承認を得ることになり、医療機器としての HCT/P の場合には QSR と cGTP に従い製造した製品について、IDE 申請の後に臨床試験を行い、PMA を通じて販売承認を得る。また医薬品としての HCT/P の場合、cGMP と cGTP に従い製造した製品について、IND 申請の後に臨床試験を行い、NDA を通じて販売承認を得ることになる。なお、cGMP と cGTP とが矛盾するような場合においては、より一般的な要求事項よりも、その製品に具体的に適合する要求事項の方に従わなければならない。

C-2 EU の規制アプローチ

EU では、医薬品 (Medicinal Products) は各国承認を除き EMA が審査を担当し、医療機器に関しては、いずれかの加盟国より認定された民間の第三者認証機関の認証を受ければ EU 内の国境を越えた流通が可

能となっており、国による審査は行われていない。EU では従来、遺伝子治療医薬品 (gene therapy products) および体細胞治療医薬品 (somatic cell therapy products) は、医薬品の中でも「先端医療医薬品」(ATMP; advanced therapy medicinal products) と分類されてきた (The Medical Products Directive 2001/83/EC&2003/63/EC)。しかし、これらの製品の承認審査における評価基準は EU 加盟国間で統一がとれていなかった点で問題とされてきた。また、再生医療に用いるための組織工学製品 (TEP; tissue-engineered products) については、医薬品 (Directive 2001/83/EC) に分類されるか、医療機器 (Directive 93/42/EEC または 90/385/EEC) に分類されるか、その判断は加盟国によりまちまちであった。

欧州委員会 (EC) はこれらの問題を、EU 内で国境を越えた製品の流通を展開する際の大きな障壁であると捉え、2007 年にその解決策として、ATMP の販売承認規制を定める Regulation (EC) No 1394/2007 を制定した。Regulation (EC) No 1394/2007 は、組織工学製品を ATMP の範疇に加えること、および ATMP については加盟国における承認審査を経ずに初めから EMA で中央審査を行うことなどを主な柱とし、2008 年 12 月より施行されるに至っている。

C-2-1 「先端医療医薬品」ATMP の定義

ATMP は、遺伝子治療薬、体細胞治療薬、または組織工学製品と定義される。ここで「体細胞治療薬」の定義は、「生物学的医薬品 (biological medicinal product) のうち、(a) 意図する臨床上的の用途に適うように

生物学的性質、生理学的機能または構造上の特性を変化させる実質的加工 (substantial manipulation) を施された細胞・組織を含む製品またはこれらから成る製品、ないしはドナーの体内での本来の機能と同じ機能を患者の体内でも果たすことを意図して利用するのではない細胞・組織を含む製品またはこれらから成る製品で、(b) 製品に含まれる細胞・組織の薬理的、免疫学的または代謝的作用を通じて疾患の治療、予防または診断を行うという観点に適う特性を有するもの、あるいはその観点からヒトに適用ないし投与されるもの」とされている。一方、「組織工学製品」は「工学処理された細胞・組織を含む製品またはこれらから成る製品で、ヒト組織の再生、修復または置換を行うという観点に適う特性を有するもの、あるいはその観点からヒトに適用ないし投与されるもの」を指す。ここでの、「工学処理された細胞・組織」とは、「意図する再生、修復または置換に適うように生物学的性質、生理学的機能または構造上の特性を変化させる実質的加工を施された細胞・組織、ないしはドナーの体内での本来の機能と同じ機能を患者の体内でも果たすことを意図して利用するのではない細胞・組織」を指す。なお、「実質的加工ではない加工」の例としては、切断、研磨、成形、遠心分離、抗生剤・抗菌剤溶液への浸漬、殺菌・消毒・滅菌、放射線照射、細胞の分離・濃縮・精製、濾過、凍結乾燥、凍結、冷凍保存、ガラス化が挙げられている。

従来、ある特定の組織工学製品が医薬品に該当するのか、医療機器に該当するのかという判断に EU 加盟国間で差が生じやす

かったことの大きな原因は、製品分類における「主要作用様式の原則」(primary mode of action rule) にあった。そこで Regulation (EC) No 1394/2007 では、たとえ医療機器としての側面が主要作用様式であったとしても、組織工学製品の場合には、生きた細胞・組織を含むか否かという条件を優先し、医薬品の一種である ATMP に分類することとなっている。

C-2-2 ATMP の規制における基本原則：リスクベースアプローチ

EMA は、ATMP の販売承認申請に関する規制の原則として、Directive 2001/83/EC Annex I Part IV に基づき、リスクベースアプローチを採っている。ATMP のリスクは、細胞の生物学的特性と由来、製造工程、ベクターの生物学的特性、タンパク質発現の様式、非細胞成分および臨床における ATMP の具体的な使用方法に大きく左右される。細胞を利用した製品については、その多様性の高さゆえに、患者、医療従事者または公衆衛生に対するリスクの度合いも製品ごとに非常に異なってくる。従って、こうした製品の開発計画および審査要件は、多様な因子を加味したリスクベースアプローチによってケースバイケースで調節する必要があると EMA は考えている (EMEA/CHMP/410869/2006)。同時に EMA は、ATMP の製造工程 (製造工程内での検査や最終製品の検査を含む) には当該 ATMP のリスクを十分に制限・制御できる能力が備わっているべきだと考えており、また、非臨床試験および臨床試験も、同定されたリスク要因について深く追究するものであるべきだとしている

(EMA/CHMP/CPWP/708420/2009)。

C-2-3 リスクベースアプローチのガイドライン化に関する動き

Directive 2001/83/EC Annex I Part IV や EMEA/CHMP/410869/2006EMA には ATMP の規制におけるリスクベースアプローチの必要性が示されてはいるが、リスクベースアプローチの適用やその成果の製品開発における解釈についての詳細なガイドダンスは未だ存在しておらず、また関係者である申請者、規制当局者や患者にとって、リスクベースアプローチという考え方は未だなじみが薄い。こうしたことから、EMA は ATMP 開発におけるリスクベースアプローチに関するガイドライン作成の必要性とその内容のあり方に関するコンセプトペーパー (Concept Paper on the Development of a Guideline on the Risk-based Approach According to Annex I, Part IV of Dir. 2001/83/EC applied to Advanced Therapy Medicinal Products, EMA/CHMP/CPWP/708420/2009) を明らかにしている。このコンセプトペーパーは、平成 23 年 3 月の時点ではまだドラフト版であるが、その中に彼らの考え方を伺うことができる。

C-2-4

EMA/CHMP/CPWP/708420/2009

C-2-4-1 リスクおよびリスク要因の例

ATMP の使用には幾つかのリスクがあると考えられ、そのリスクは ATMP の品質、生物活性、投与行為などに関連するリスク要因とリンクしている。従って、特定の ATMP を患者に使用するという行為全体のリスクについて結論を導き出すためには、

各個のリスク要因について検討されなければならない。ATMP の中でも細胞・組織加工製品のリスク要因としては、

- 使用する細胞 (細胞の由来、細胞の種類と分化状態を含む)
- 製造工程の全ての側面 (加工行為を含む)
- 非細胞成分
- 具体的な適用方法 (投与方法、使用期間を含む)

などが考えられ、これらのリスク要因等が引き起こすリスクとしては、

- 標的細胞ないしエフェクター細胞となることによる不必要な免疫応答の惹起
- 使用する細胞の遺伝的不安定性ないし造腫瘍性
- 非細胞成分の不要な免疫反応、炎症反応、中毒反応
- 製品の意図しない生物応答

などが挙げられる。

また、遺伝子治療薬のリスク要因には、

- ベクターの染色体挿入の可能性とその程度
- ベクター／遺伝子の潜伏性／再活性化の能力
- 潜伏性を解除して再活性化を惹起するようなウイルスの補完により、意図しないベクターの複製が起こり、遺伝子が移動性を獲得する可能性
- ベクターの複製不能性ないし複製能
- 遺伝子組換えないし遺伝子再組み合わせの可能性
- 宿主の遺伝子発現の変化
- 導入遺伝子の発現とその期間
- 体内動態
- 漏出および伝染の可能性

などが考えられ、これらのリスク要因等が引き起こすリスクとしては、

- 不必要な免疫応答
 - 造腫瘍性
 - 感染
 - 製品の意図しない生物応答
- などが挙げられる。

C-2-4-2 ガイドラインの目的

EMA/CHMP/CPWP/708420/2009 で構想されているガイドラインの趣旨は、販売承認申請書類においてATMPのリスクをどう同定し記述したらよいかという方法を提示することにある。異なるリスクを厳格に分類するシステムを提示することを意図しているのではなく、むしろ、様々なリスクプロファイルを持った幾つかの実例（例えば、同種または異種由来の遺伝子組換え幹細胞製品や局所投与で使用する自己由来分化細胞製品など）に基づいてコンセプトを例示することにある。

リスクベースアプローチは以下のような基本的ステップで適用すべきと考えられる。

3) ATMP のリスク同定

ATMP の販売承認を申請する者には、その ATMP の品質、安全性、有効性に関するリスクの同定と評価を行うための体系的プロセスを考案することが求められる。製品のリスクは上に例示したような個別のリスク要因に基づいていなければならない。リスク評価の結論については、各リスク要因を実証する科学的データに基づき、徹底的にその妥当性を示す必要がある。

4) 販売申請書類中のデータの程度についての評価

ATMP のリスクの同定と評価に基づき、販売承認申請で必要となる品質、非臨床および臨床データの程度の妥当性を示す必要がある。また販売申請書類において、その手段に関する概要の説明がなされる必要がある。データの程度については、Dir. 2001/83/EC Annex I Part IV に記載されている ATMP の技術要件を考慮しなければならない。製品のリスクによっては必要に応じ、特定の章について強調したり追加データにより補完したりすることもあり得るし、製品のリスクに基づいて適切に妥当性が示されれば限られた範囲を示すだけで済むこともあり得る。

これらのリスクを処理するには、最小化活動と製品ライフサイクルの中での実施措置（監視）が必要である。

EMA/CHMP/CPWP/708420/2009 が構想するガイドラインにあるアプローチ方法によって申請者は、工程管理、規格設定、非臨床データおよび臨床データの必要条件などに関し、十分な ATMP 開発戦略を立てることが可能となると考えられる。これに関しては、様々なリスクプロファイルを持った幾つかの製品の実例での説明もなされる予定だとのことである。

販売承認申請書類では、リスクベースアプローチは、品質、非臨床及び臨床に関する情報の概要に関する補足文書として、コモン・テクニカル・ドキュメント（CTD）のモジュール 2 に挿入することになる。EMA/CHMP/CPWP/708420/2009 が構想するガイドラインでは、リスクベースアプローチに関する章の記述方法に関するガイダンスを申請者向けに用意することになっ