

AUTHOR QUERIES

AUTHOR PLEASE ANSWER ALL QUERIES

2

- Q: 11_Please verify that all supporting information (SI) citations are correct. Note, however, that the hyperlinks for SI citations will not work until the article is published online. In addition, SI that is not composed in the main SI PDF (appendices, datasets, movies, and “Other Supporting Information Files”) have not been changed from your originally submitted file and so are not included in this set of proofs. The proofs for any composed portion of your SI are included in this proof as subsequent pages following the last page of the main text. If you did not receive the proofs for your SI, please contact **PNAS_Specialist.djs@ com.sheridan**.
- Q: 12_S-nitrosoglutathione (GSNO) as meant for the definition of GSNO?
- Q: 13_down-regulation “occurred” in vivo, as meant? If not, please replace with the intended verb form.
- Q: 14_Per PNAS policy, the Materials and Methods section must contain at least three sentences. Please rewrite or add new text to meet this requirement.
-
-

Supporting Information

Nishida et al. 10.1073/pnas.1017640108

SI Materials and Methods

Materials, Recombinant Adenoviruses, and Culture of Cardiac Fibroblasts. Ang II was purchased from Peptide Institute. ATP, ADP, UTP, adenosine, L-NAME, D-NAME, suramin, PPADS, ET-1, bradykinin, LPS, U0126, PD98059, and anti-Flag M2 antibody were from Sigma. Cyclosporine A and 1400W were from Carbiochem. Rat IL-1 β was from Wako. Anti-p65, anti-GAPDH, anti- β -arrestin2, anti-NFATc1, horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antirabbit IgG and HRP-conjugated antimouse IgG antibodies were purchased from Santa Cruz. [¹²⁵I]Ang II and protein A sepharose beads were from Amersham. Anti-iNOS and anti-eNOS antibodies were from BD Biosciences. Anti-NFATc2 was from Affinity BioReagents. Anti-NFATc3 was from R&D Systems. Anti-NFATc4, anti-phospho-p65, and anti-I κ B α antibodies were from Cell Signaling. Fura2/AM was from Dojindo. Alexa Fluor 488 goat antirabbit antibody and Alexa Fluor 544 goat antimouse antibody were from Molecular Probes. Neutravidin was from Pierce. Collagenase, fucose 6, and anti-hemagglutinin (HA) antibody were from Roche. pNF- κ B-Luc, pNFAT-Luc, and pRL-SV40 were from Stratagene. Mouse p65 (WT, C38S, 8CS, and S468A), p50 (WT and C62S), and iNOS (full length and fragments) were generated by PCR and subcloned into pcDNA3 vector. Recombinant adenoviruses of control (LacZ), Cain, and NFAT-CA were produced as described previously (1). Stealth siRNA oligonucleotides for rat P2Y₂R (2), eNOS, iNOS, β -arrestin1 (mixture of RSS303546, RSS303547, and RSS303548), and β -arrestin2 (mixture of RSS352099, RSS352100, and RSS352101) were from Invitrogen. Sequences of stealth siRNA for eNOS and iNOS are described in Table S1. Cardiac myocytes and fibroblasts were prepared from ventricles of 1- to 2-d-old Sprague-Dawley rats, as described previously (1, 3). For knockdown, cardiac fibroblasts were transfected with 100 nM of siRNA for P2Y₂R, eNOS, or iNOS or 30 nM (10 nM each) of siRNAs for control (Invitrogen), β -arrestin1, or β -arrestin2, using lipofectamine 2000 (3).

Animals and TAC Surgery. All protocols using mice and rats were approved by the guidelines of Kyushu University. Mice with a homozygous deletion of the iNOS gene were purchased from The Jackson Laboratory. TAC surgery was performed on 6-wk-old male C57BL/6J mice (2). A miniosmotic pump (Alzet) filled with vehicle (saline), suramin, or 1400W was implanted intraperitoneally 3 d after TAC into 6-wk-old male C57BL/6J mice.

Measurement of NF- κ B-Luciferase and AT₁R-Luciferase Activity. A promoter region of rat AT₁R gene (accession no. S66402) was isolated by PCR using rat genomic DNA as a template, and the fragment was inserted upstream of a luciferase gene in the pGL3-Basic vector using KpnI/BglII sites. Subconfluent cardiac fibroblasts were serum-starved for 1 h, and then cells (3×10^5 cells) in 24-well plate were transiently cotransfected with 0.45 μ g pNF- κ B-Luc or pAT₁R-Luc and 0.05 μ g pRL-SV40 control plasmid, using fucose 6. Forty-eight hours after transfection, cells were treated with or without ATP (100 μ M) and then harvested with passive lysis buffer (Promega). Luciferase activity was measured with Dual-Luciferase reagents (Promega).

Measurement of Extracellular ATP Concentration and NO Production. Myocytes and fibroblasts (each 1×10^5 cells) plated on laminin-coated silicone rubber culture dishes (2.25 cm², STREX) were stretched by 20% with stretch system (STB-140-10, STREX). The determination of extracellular ATP concentration was per-

formed using ATP Bioluminescence Assay kit CLSII (Roche). Cardiac fibroblasts plated onto 24-well dish (3×10^5 cells/well) were transfected with iNOS or siRNA for eNOS or iNOS using lipofectamine 2000. Twenty-four hours after transfection, serum was removed for 24 h and then cells were treated with ATP (100 μ M) for 24 h. NO production was determined using Nitric Oxide Quantification kit (Active Motif).

Measurement of AT₁R and iNOS Expressions. Measurement of AT₁R binding was performed as described previously (4). Relative changes in expression of NOS proteins were quantitatively determined by Western blotting. GAPDH was measured as an internal control. Real-time RT-PCR was performed as described (3, 4). Sequences for PCR primers and Taqman probes were as follows; rat AT₁R (forward primer: 5'-ATTCCCCCAAAGGCCAAGT-3', reverse primer: 5'-TTATCCGAAGGCCGGTAA-GA-3', Taqman probe: 5'-FAM-TCAAGCCTGTCTACGAAAA-TGAGCACGC-TAMRA-3'), mouse AT₁R (Mm01166161_m1), mouse eNOS (Mm01164908_m1), mouse iNOS (Mm01309902_m1).

Quantification of Intracellular Ca²⁺ Concentration. [Ca²⁺]_i was measured by the method described previously (3, 4). Briefly, cells (5×10^4) were plated on 3×10 mm micro cover glass (Matsunami Glass) and loaded with 1 μ M fura-2/AM in the cultured medium at 37 °C for 30 min. Cells were washed with Hepes-buffered salt (HBS) solution containing 107 mM NaCl, 6 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 20 mM Hepes (pH 7.4) and 11.5 mM glucose, with or without 2 mM CaCl₂. Fluorescence images were recorded and analyzed with a video image analysis system (Aquacosmos; Hamamatsu Photonics).

S-Nitrosylation Biotin Switch Assay. The biotin switch assay was performed according to a previous report (5). HEK293 cells plated on 6-well dishes were transfected with iNOS and p65 using fucose6. Cardiac fibroblasts were treated with ATP (100 μ M) for 24 h with or without cyclosporine A (1 μ g/mL). Cells were harvested at 4 °C with RIPA buffer containing 150 mM NaCl, 1.0% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM Na₃VO₄, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/mL leupeptin, and 10 μ g/mL aprotinin. Mouse hearts were homogenized at 4 °C with HEN buffer [250 mM Hepes (pH 7.7), 1 mM EDTA, and 0.1 mM neocuproine] as described previously (6). After free thiols of p65 proteins were made unreactive by methylthiolation with methyl methanethiosulfonate (100 mM), nitrosothiols were selectively reduced with ascorbate (1 mM) to reform the thiol, which is then reacted with the thiol-modifying reagent biotin-HPDP (1.5 mM). After pulldown of biotin-labeled proteins with streptavidin beads, beads were washed six times with neutralization buffer containing 20 mM Hepes-NaOH (pH 7.7), 700 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 0.5% Triton X-100.

Immunoprecipitation and Western Blotting. Forty-eight hours after transfection with p65 (WT or C38S) and HA-tagged iNOS, HEK293 cells were lysed with RIPA buffer. Cardiac fibroblasts were treated with ATP (100 μ M) for 24 h with or without cyclosporine A (1 μ g/mL). HA-tagged iNOS (for HEK293) or native p65 (for cardiac fibroblasts) was immunoprecipitated in RIPA buffer with 2 μ L of anti-HA antibody or anti-p65 antibody rotating 2 h at 4 °C. Twenty microliters of protein A-agarose beads were then added to the samples, and rocked for a further 2 h at 4 °C. Flag-tagged iNOS fragments were immunoprecipitated with 20 μ L bed volume of anti-flag-M2 agarose rotating 2 h at 4 °C. The immune complexes were washed five times with RIPA

buffer, and resuspended in 80 μL of SDS sample buffer. Twenty micrograms of cell lysates (lysate) or 20 μL of immunoprecipitated protein samples (IP) were loaded and detected by antibodies: p65 (dilution rate: 1/2,000), phospho-p65 (1/1,000), iNOS (1/1,000), eNOS (1/1,000), HRP-conjugated anti-Flag-M2 (1/20,000), GAPDH (1/2,000), I κ B α (1/2,000), and β -arrestin2 (1/2,000). The dilution rate of second antibodies was 1/20,000. We visualized the reactive bands by the enhanced chemiluminescence method (Perkin-Elmer). The optical density of the film was scanned and measured with Scion Image software.

Confocal Visualization of NF- κ B p65 Subunit and iNOS Proteins. Cells (1×10^5) plated on glass-bottom 35-mm dishes were treated with ATP (100 μM) or IL-1 β (1 ng/mL) for 24 h and then fixed by

10% formaldehyde neutral buffer solution. Localizations of p65 and iNOS proteins were visualized by immunostaining with anti-p65 and anti-iNOS antibodies (1/500), and Alexa Fluor goat antibodies (1/1,000). Fluorescence images were measured at an excitation wavelength of 488 nm and 546 nm with a Laser Scanning Confocal Imaging system (Olympus; FV-10i).

Statistical Analysis. The results are presented as mean \pm SEM from at least three independent experiments. The representative data of time course experiments were plotted from one of three similar experiments that performed with more than 20 cells. Statistical comparisons were made with two-tailed Student's *t* test or one-way analysis of variance followed by the Student-Newman-Keuls procedure, with significance imparted at *P* values < 0.05 .

- Nishida M, et al. (2000) G α_i and G α_o are target proteins of reactive oxygen species. *Nature* 408:492–495.
- Nishida M, et al. (2008) P2Y6 receptor-Gal α 12/13 signalling in cardiomyocytes triggers pressure overload-induced cardiac fibrosis. *EMBO J* 27:3104–3115.
- Nishida M, et al. (2007) Gal α 12/13-mediated up-regulation of TRPC6 negatively regulates endothelin-1-induced cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis through nuclear factor of activated T cells activation. *J Biol Chem* 282: 23117–23128.
- Nishida M, et al. (2010) Pertussis toxin up-regulates angiotensin type 1 receptors through Toll-like receptor 4-mediated Rac activation. *J Biol Chem* 285:15268–15277.
- Jaffrey SR, Snyder SH (2001) The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. *Sci STKE* 2001:p11.
- Whalen EJ, et al. (2007) Regulation of β -adrenergic receptor signaling by S-nitrosylation of G-protein-coupled receptor kinase 2. *Cell* 129:511–522.

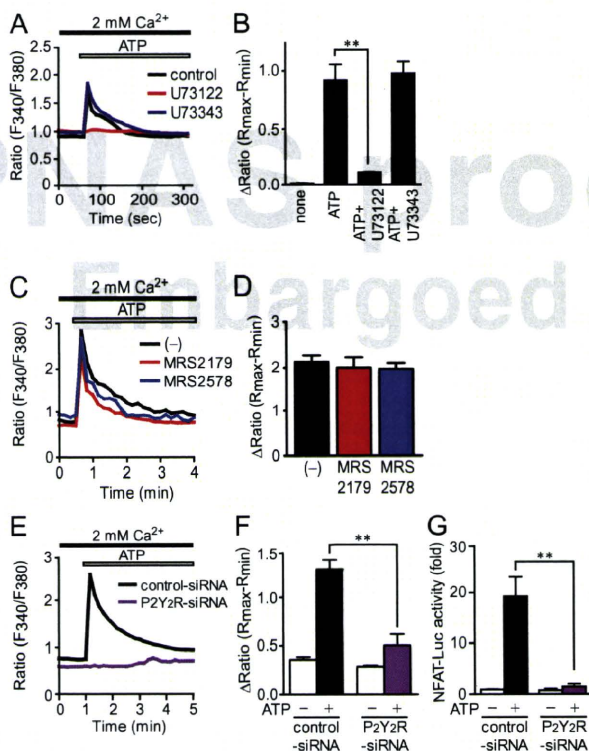


Fig. 51. P2Y₂R mediates ATP-induced Ca²⁺ response in rat cardiac fibroblasts. (A) Time courses of ATP-induced Ca²⁺ responses in the presence or absence of PLC inhibitor (U73122) and its inactive analog (U73343). (B) Peak increases in [Ca²⁺]_i induced by ATP (1 μM). (C and E) Time courses of ATP-induced Ca²⁺ responses in cardiac fibroblasts in the presence or absence of antagonist for P2Y₁R (MRS2179) or P2Y₆R (MRS2578), and siRNA for P2Y₂R. (D and F) Peak increases in [Ca²⁺]_i induced by ATP (1 μM). Cells were treated with 1 μM of U73122, U73343, MRS2179, or MRS2578 for 30 min before the addition of ATP (*n* = 64–96 cells). (G) Effects of P2Y₂R siRNA on ATP-induced NFAT activation. Cells were treated with ATP (100 μM) for 6 h (*n* = 6). ***P* < 0.01.

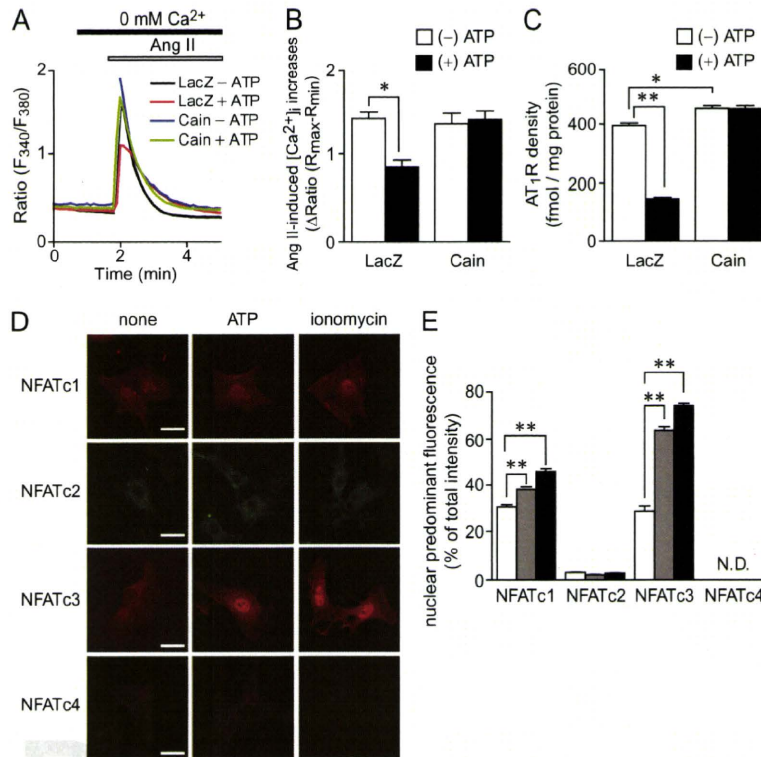


Fig. S2. Requirement of activation of calcineurin-NFAT signaling pathway in the ATP-induced AT₁R down-regulation. (A and B) Effect of Cain on the ATP-induced suppression of AT₁R-induced Ca²⁺ response. Time courses (A) and peak increases (B) of Ca²⁺ responses induced by Ang II (100 nM) in LacZ- and Cain-expressing cardiac fibroblasts with or without ATP. Cells were pretreated with ATP (100 μM) for 24 h before the addition of Ang II (*n* = 33–42). (C) Effect of Cain on the suppression of AT₁R expression levels induced by ATP (*n* = 4). (D) Confocal images of the localization of NFAT isoforms (c1–c4) in cardiac fibroblasts. Cells were treated with ATP (100 μM) or ionomycin (1 μM) for 2 h. (E) Proportions of nuclear accumulation of NFAT isoforms induced by ATP (*n* = 43–54). (Scale bars, 30 μm.) **P* < 0.05, ***P* < 0.01.

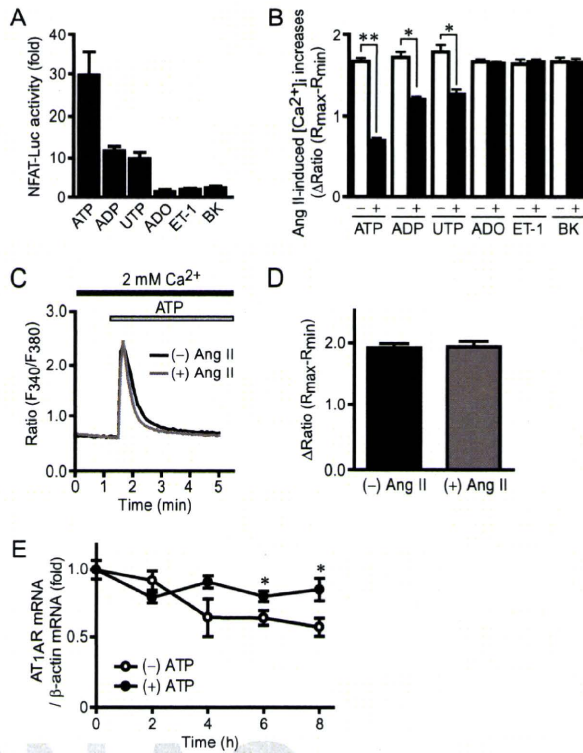


Fig. 53. Specific suppression of AT₁R signaling by ATP in rat cardiac fibroblasts. (A) Increases in NFAT activity induced by G_β protein-coupled receptor agonists. Cells were treated with ATP (100 μM), ADP (100 μM), UTP (100 μM), adenosine (ADO, 100 μM), endothelin-1 (ET-1, 100 nM), or bradylinin (BK, 1 μM) for 6 h (n = 3). (B) Peak increases in [Ca²⁺]_i induced by Ang II (100 nM) in cardiac fibroblasts pretreated with or without ATP (100 μM) for 24 h. (C and D) Time courses (C) and peak increases (D) of Ca²⁺ responses induced by ATP in cardiac fibroblasts pretreated with or without Ang II (1 μM) for 24 h (n = 55–87). (E) Effects of ATP on AT₁R mRNA stability in rat cardiac fibroblasts. Cells were treated with actinomycin D (5 μg/mL) for 10 min before the addition of ATP (100 μM) (n = 6). *P < 0.05, **P < 0.01.

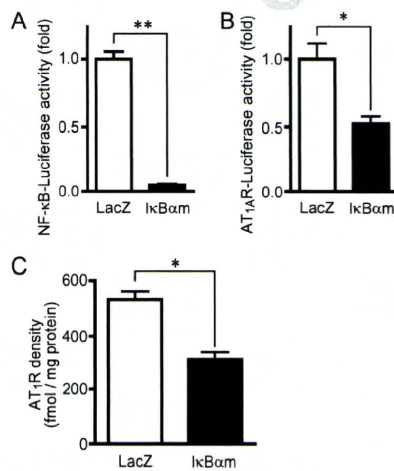


Fig. 54. Involvement of NF-κB in basal AT₁R transcription. (A and B) Effect of IκBαm on basal NF-κB activity and AT₁R transcription rate. (C) Effect of IκBαm on AT₁R protein expression in rat cardiac fibroblasts (n = 3–5). *P < 0.05.

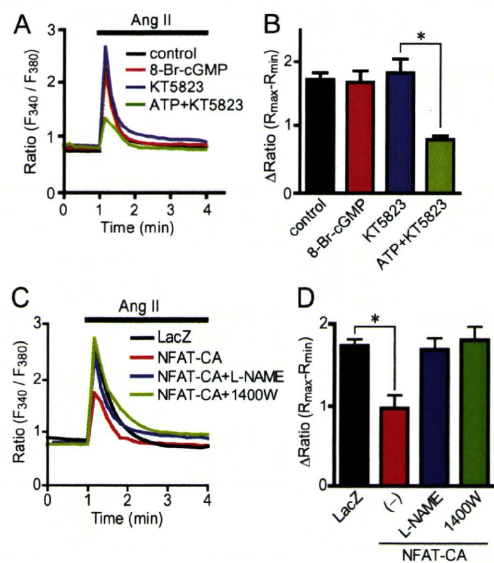


Fig. S5. NFAT-dependent NO production mediated ATP-induced suppression of AT₁R signaling. (A and B) Time courses (A) and peak increases (B) of Ca²⁺ responses induced by Ang II (100 nM) in cardiac fibroblasts pretreated with 8-Br-cGMP (30 μM) or ATP (100 μM) with or without KT5823 (0.5 μM) for 24 h. (C and D) Time courses (C) and peak increases (D) of Ca²⁺ responses induced by Ang II (100 nM) in LacZ- and NFAT-CA-expressing cardiac fibroblasts. Cells were treated with L-NAME (100 μM) or 1400W (10 μM) for 24 h before the addition of Ang II (n = 46–79). *P < 0.05.

PNAS proof
Embargoed

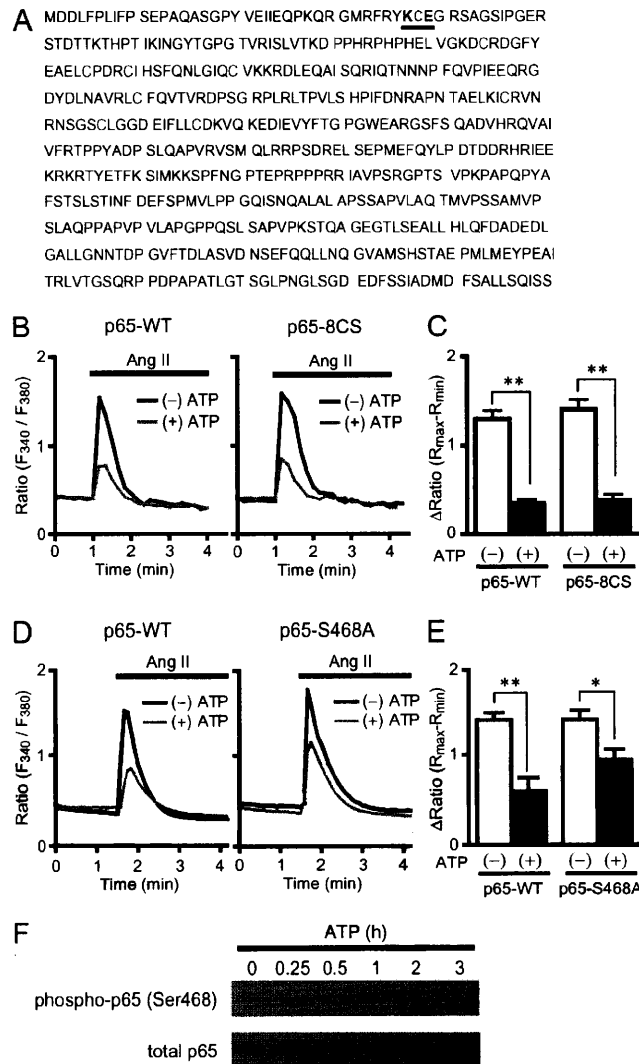


Fig. S6. Requirement of Cys38 in ATP-induced suppression of AT₁R signaling in rat cardiac fibroblasts. (A) Amino acid sequence of p65 subunit. Cys38 is shown in blue, and other Cys residues are shown in red. Substitution of Ser for other 8 Cys residues of p65 (p65-8CS) were generated. (B) Time courses of Ang II-induced Ca²⁺ responses in p65-WT and p65-8CS-expressing cardiac fibroblasts. Cells were pretreated with ATP (100 μM) for 24 h. (C) Peak changes in [Ca²⁺]_i induced by Ang II (100 nM). (D and E) Time courses (D) and peak increases (E) of Ca²⁺ responses induced by Ang II in Ca²⁺-free HBS solution in p65-WT- and p65-S468A-expressing fibroblasts (*n* = 32–55). (F) Time courses of changes in phosphorylation of p65 at Ser468 induced by ATP (100 μM) (*n* = 3). **P* < 0.05, ***P* < 0.01.

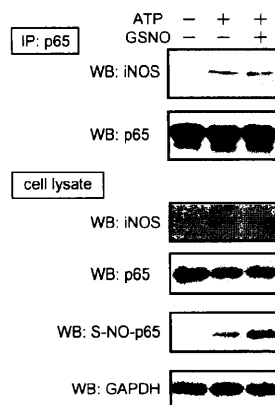


Fig. S7. Effects of excessive NO on the association of iNOS with p65. Cardiac fibroblasts were stimulated with ATP (100 μM) for 24 h. One of three cell-cultured dishes was exposed to excessive GSNO (1 mM) for 1 h, and then cell lysates were immunoprecipitated (IP) with anti-p65 antibody. Expression of iNOS, p65, and GAPDH proteins were determined by Western blotting (*n* = 3).

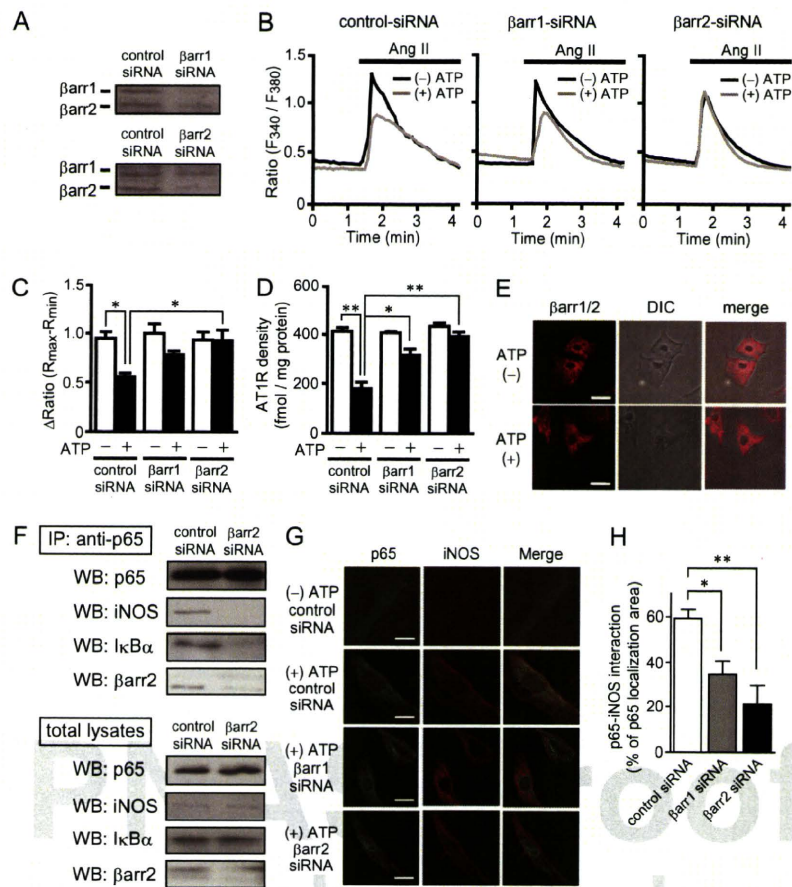


Fig. 58. Involvement of β -arrestin and $I\kappa B\alpha$ in the formation of iNOS-p65 signaling complex. (A) Knockdown of β -arrestin1 (β arr1) and β -arrestin2 (β arr2) proteins by the respective siRNAs in cardiac fibroblasts. (B and C) Effects of siRNAs for β arr1 and β arr2 on the ATP-induced suppression of AT_1R signaling. Time courses (B) and peak increases (C) of Ca^{2+} responses induced by Ang II in Ca^{2+} -free HBS solution. Cardiac fibroblasts were pretreated with ATP (100 μ M) for 24 h before the addition of Ang II (100 nM) ($n = 36$ –44). (D) Effects of siRNAs for β -arrestins on ATP-induced AT_1R down-regulation ($n = 4$). (E) Localization of β arr1/2 in cardiac fibroblasts pretreated with or without ATP (100 μ M) for 24 h. (F) Involvement of β arr2 on the formation of iNOS/ β arr2/ $I\kappa B\alpha$ /p65 quaternary complex. Native p65 proteins were immunoprecipitated with anti-p65 antibody from lysates of ATP-pretreated cardiac fibroblasts ($n = 3$). (G and H) Effects of siRNAs for β arr1 and β arr2 on the ATP-induced colocalization of iNOS with p65. (G) Localization of p65 and iNOS proteins induced by ATP (100 μ M) for 24 h in cardiac fibroblasts. (Scale bars, 10 μ m.) (H) Proportion of overlapping area of p65 with iNOS in control, β arr1-, and β arr2-knocked down cardiac fibroblasts ($n = 27$ –33). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

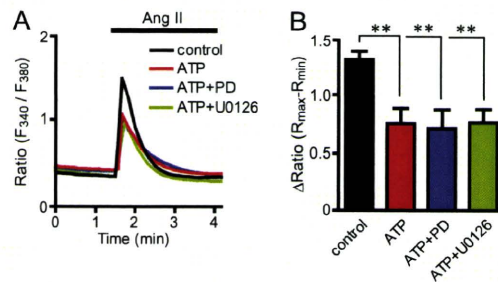


Fig. 59. Effects of MEK1 inhibitors on ATP-induced AT_1R down-regulation. (A and B) Time courses (A) and peak increases (B) of Ca^{2+} responses induced by Ang II (100 nM) in cardiac fibroblasts pretreated with U0126 (1 μ M) or PD98059 (PD; 3 μ M) and ATP (100 μ M) for 24 h ($n = 46$ –79). ** $P < 0.01$.

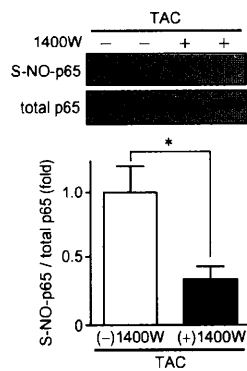


Fig. S10. Effects of 1400W on the S-nitrosylation of p65 induced by pressure overload. Three days after TAC, 1400W (20 mg/kg/d) was treated intraperitoneally for 28 d using an osmotic pump. Heart tissue lysates (160 μ g protein) were used for biotin switch assay ($n = 6$). * $P < 0.05$.

Table S1. Sequences of siRNAs

Target gene	Name		Sequence
eNOS (NM_021838)	si-control	Sense	5'-CAGUAAUUGCACAUCUACUCGAGUA-3'
		Antisense	5'-UACUCGAGUAGAUUGGCAAUUACUG-3'
	si-616	Sense	5'-CAGGAAAUGUUCACCUACAUCUGUAU-3'
		Antisense	5'-UACAGAUGUAGGUGAACAUUUCUG-3'
	si-626	Sense	5'-UCACCUACAUCUGUAACCACAUUAA-3'
		Antisense	5'-UUAAUGUGGUUACAGAUGUAGGUGA-3'
si-1199	Sense	5'-CAGUGGAAAUU AACGUGGCUGUGCU-3'	
	Antisense	5'-AGCACAGCCACGUUAAUUCACUG-3'	
iNOS (NM_0126118)	si-control	Sense	5'-CAGUGUCCUAGACUAUCCGGAAACA-3'
		Antisense	5'-UGUUUCCGGAUAGUCUAGGACACUG-3'
	si-374	Sense	5'-CAGAAUGUUCGAGAAUCCUGGACA-3'
		Antisense	5'-UGUCCAGGGAUUCUGGAACAUUCUG-3'
	si-855	Sense	5'-AGCAUAUCUGCAGACACAUACUUUA-3'
		Antisense	5'-UAAAGUAUGUGUCUGCAGAU AUGCU-3'
si-1118	Sense	5'-GGUCAAGAUCAGAGGUCUUUGAAA-3'	
	Antisense	5'-UUUCAAGACCUCUGGAUCUUGACC-3'	

AUTHOR QUERIES

AUTHOR PLEASE ANSWER ALL QUERIES

Q: 1_Please indicate whether the sequences have been deposited in GenBank or another publicly accessible database before your page proofs are returned. It is PNAS policy that the data be deposited **BEFORE** the paper can appear in print.

再生医療・細胞治療の規制に関する国際動向

Regulation of Cell Therapy Products and Tissue Engineered Products in EU and USA

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

〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 Tel: 03-3700-1141 (代) Fax: 03-3707-6950

E-mail: yoji@nihs.go.jp

1 細胞・組織加工製品

治療法に乏しく、重篤・致命的ないしQOLを著しく損なう疾病・損傷に対する活路として、再生医療や細胞治療には非常に大きな期待が集まっている。これらの先進的な医療に用いることを目的として加工（培養・活性化・足場との複合化等）を施された細胞や組織、あるいは加工された細胞・組織を含む製品は「細胞・組織加工製品」（細胞・組織加工医薬品ないし細胞・組織加工医療機器）と呼ばれ、その開発は世界的にも熾烈な競争が展開している。ただし細胞・組織加工製品は、細胞という動的で複雑な成分を含むと同時に、その臨床応用に関して限られた経験と知識しか存在しないため、明確な科学的根拠に基づいた品質や安全性等の確保が課題となっており、比較的進んでいると言われる欧米においても、当局は実用化を促進するための試行を繰り返しながら規制の枠組みの整備を進めている。

2 規制の原則

欧米における細胞・組織加工製品の規制の原則は「リスクベースアプローチ」と呼ばれ、目的とする製品の性質に固有、かつその品質・安全性・有効性に関連するリスクの分析をベースにし、その影響の度合いを科学的に評価することにより規制や開発の方針・内容を定めるアプローチ方法が採られている。日本では、細胞・組織加工製品を医薬品・医療機器として開発するために薬事法に則って実施される「治験」と、細胞・組織加工製品を

用いた治療法の開発を目的として医療法・医師法のもとで行われる「臨床研究」という異なる規制の枠組みが存在するが、欧米ではリスクベースアプローチの原則に基づき、商業目的か非商業目的かに拘わらず、原則的には同一の規制がかかる。即ち、大学病院等による非商業目的の「臨床研究」においても国への臨床試験申請並びにICH-GCP準拠が要求される点で日本よりも厳しい制度となっている。それでも開発が進む理由としては、研究資金・臨床試験支援体制などが充実している他、規制当局等の専門家が開発早期から開発者と情報を共有し、製品の目的に沿った柔軟な対応が可能となっていることなどが挙げられる。

3 EUの規制

欧州連合（EU）では細胞・組織加工製品は、製品に含まれる細胞の作用様式に基づき体細胞治療薬（薬理的・免疫学的又は代謝的機能）または組織工学製品（ヒト組織の再生・修復又は置換）に分類される。従来、体細胞治療薬は遺伝子治療薬とともにATMP（advanced therapy medicinal product）という医薬品の一類型に分類されていたが、2008年12月の制度改正により組織工学製品もATMPとして医薬品の規制を受けることになった。これと同時に、ATMPの販売承認については加盟国における審査を経ずに欧州医薬品庁（EMA）による中央審査によって行われるようになっており、制度改正からこれまでに培養軟骨製品1品目がATMPとして販売承認を受けている。なお制度改正以前に販売承認を

受けた製品については、新審査方式での販売承認を再取得しなければ、遺伝子治療薬・体細胞治療薬の場合には2011年末、組織工学製品の場合には2012年末に販売承認が取り消されることになっている。EMAはEUの医薬品産業の強化に必要な新技術の開発支援に積極的な姿勢を示しており、開発者に対するATMPに関する科学的助言や、中小開発企業の非臨床・品質データの暫定認証を行ったりすると同時に、研究開発が進むiPS細胞等の多能性幹細胞を加工したATMPに関する特別な留意点をまとめた文書を公表するなどしている。なお、EMAはあくまで販売承認審査を行う機関であり、臨床試験の開始・実施に関する手続きは加盟国の管轄となっている。加盟各国の規制当局もそれぞれ独自に、商業目的・非商業目的に拘わらず臨床試験開始前の開発早期から相談を安価ないし無料で受け付けるなど、ATMPの開発支援に積極的である。

4 米国の規制

米国ではヒト細胞・組織を利用した製品および遺伝子治療薬はHCT/P (human cell, tissue, or cellular/tissue-based product) と総称される。中でも細胞に一定以上の加工を施したものや遺伝子治療薬などは、州を越えて流通させる場合には公衆衛生サービス法351条により食品医薬品局(FDA)の販売承認が必要とされ、351HCT/Pと呼ばれる。EUとは異なり、351HCT/Pはその主な作用様式が細胞・組織の生化学的・免疫学的又は代謝的機能に基づく場合には生物製剤、細胞・組織の物理的又は構造的機能の場合には医療機器としての規制を受ける。これまでに2品目が生物製剤、5品目が医療機器として販売承認を受けている。EU同様、製品化を目的とするかどうかに関わらず、351HCT/Pの臨床試験を行う場合には、FDAに申請して承認を得る必要がある。近年の351HCT/Pの臨床試験申請の過半数は大学などによる非商業目的(研究目的)のものであるが、FDAは、生物製剤でも医療機器でも、商業目的・非商業目的に拘わらず臨床試験の申請前に非公式な相談を無料で行うほか、各種の開発段階において相談制度を設けて351HCT/Pの開発を支援している

5 おわりに

欧米の細胞・組織加工製品の開発に関する環境は、資金面、インフラ面の他、上に挙げたように規制に関しても日本とは大きく異なっている部分がある。ただし、細胞・組織加工製品を効率的・効果的・合理的に実用化するためには、必要な技術的要件や方策を、出口である行政側がガイドラインや相談制度などを通じて開発早期から提示し、研究者・開発企業・規制側が認識を共有することが不可欠であることは共通である。我が国における先端医療の実用化促進や規制の国際協調のためにも彼らの規制および促進策は参考とすべきものと考えられる。

EUにおける細胞・組織加工製品の規制動向

佐藤 陽治^{*1, #}, 鈴木 和博^{*1}, 早川 堯夫^{*2}

EUにおける細胞・組織加工製品の規制動向

佐藤 陽治^{*1, #}, 鈴木 和博^{*1}, 早川 堯夫^{*2}

(受付:平成22年10月29日, 受理:平成22年12月27日)

Regulation of Cell/Tissue-Based Medicinal Products in the European Union

Yoji SATO^{*1, #}, Kazuhiro SUZUKI^{*1} and Takao HAYAKAWA^{*2}

はじめに

バイオテクノロジーや幹細胞学等の進展に伴い、再生医療・細胞治療などの先端医療でを使用することを目的として、培養・活性化等の加工が施された生細胞を含む医薬品・医療機器（細胞・組織加工製品）が国内外で数多く開発されつつあり、今まで治療が困難であった疾患や重度の損傷への高い効果が期待されている。これらの開発の勢いに呼応し、細胞・組織加工製品の品質及び安全性を確保するための行政施策・規制をいち早く整備することは、細胞・組織加工製品の実用化を促進して患者のもとにいち早く届けるという意味の上からも、製品の国際競争力確保の意味の上からも大きな課題である。また、製品の効率的な国際流通を視野に入れた場合、世界各国・各地域における承認審査での有効性・安全性・品質評価に関する考え方についての理解及び国際的協調が不可欠である。

欧州連合（EU）では、細胞・組織加工製品は体細胞治療薬（somatic cellular therapy products）又は組織工学製品（tissue engineered products）の範疇に分類されている。従来、体細胞治療薬は遺伝子治療薬とともに先端医療医薬品（ATMP, advanced therapy medicinal products）という医薬品の一類型に分類されていたが、2008年12月より組織工学製品もATMPとして規制を受けることになった。また、同時にATMPの審査に特化し

た先端医療委員会（CAT）が創設されるなど、積極的な開発支援策が取られている。本稿ではEUにおける、これらの新しい取り組みについて概説する。

1. ATMPの規制の枠組み

EUでは、ATMPは欧州医薬品庁（EMA, European Medicines Agency）が販売承認審査を担当する。2008年12月以前はATMPの範疇に含まれる製品は、遺伝子治療薬（gene therapy products）と体細胞治療薬のみで組織工学製品が含まれておらず^{1,2)}、また、これらの製品の販売承認審査における評価基準に関して、EU加盟国間で統一がとれていなかった点が問題とされてきた。なおEUでは、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が、組織工学製品については医薬品¹⁾に分類されるか、医療機器^{3,4)}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考え、その解決策として2007年、ATMPの販売承認規制を定めるRegulation (EC) No 1394/2007⁵⁾を定めた。Regulation (EC) No 1394/2007は、組織工学製品をATMPの範疇に加えること、及びATMPについては加盟国にお

*1 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)

Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kami-yoga, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan

*2 近畿大学薬学総合研究所 大阪府東大阪市小若江 3-4-1 (〒577-8502)

Pharmaceutical Research and Technology Institute, Kinki University, 3-4-1 Kowakae, Higashi-Osaka, Osaka 577-8502, Japan

責任著者 Corresponding author

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。

2. Regulation (EC) No 1394/2007 の概要

2.1 ATMP の定義

ATMPは、遺伝子治療薬、体細胞治療薬、又は組織工学製品と定義される。ここでの「体細胞治療薬」の定義は、「生物学的医薬品 (biological medicinal product) のうち、(a) 意図する臨床上的用途に適うように生物学的性質、生理学的機能又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・組織を含む製品又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・組織を含む製品又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、免疫学的又は代謝的作用を通じて疾患の治療、予防又は診断を行うという観点に適用特性を有するもの、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⁶⁾。一方、「組織工学製品」は「工学処理された細胞・組織を含む製品又はこれらから成る製品で、ヒト組織の再生、修復又は置換を行うという観点に適用特性を有するもの、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⁹⁾。ここでの、「工学処理された細胞・組織」とは、「意図する再生、修復又は置換に適用するように生物学的性質、生理学的機能又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 (Table 1)。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 (文献5のAnnex I参照)。

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。

2.2 ATMP に対する規制

2.2.1 基本原則：リスクベースアプローチ

EUではATMPの販売承認に関する規制の原則として、リスクベースアプローチ (risk-based approach) が採られている (文献6のAnnex I Part IV参照)。リスクベースアプローチとは、審査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の分析をベースにし、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・内容を定めるという方法である。リスクベースアプローチは、日米欧医薬品規制調和会議 (ICH) で2005年に合意された品質リスクマネジメント・ガイダンス (Q9) でも採用されており、今日では医薬品規制・開発の原則として比較的一般的なものとなっている。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、非細胞成分及び臨床における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、医療従事者又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。したがって、こうした製品の開発計画及び審査要件は、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⁷⁾。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) は当該ATMPのリスクを十分に制限・制御できる能力を備えているべきだと考えており、また、非臨床試

Table 1 EUにおける「体細胞治療薬」と「組織工学製品」の定義

	体細胞治療薬	組織工学製品
1. 使用目的	製品に含まれる細胞・組織の薬理的、免疫学的又は代謝的作用を通じた疾患の治療、予防又は診断	ヒト組織の再生、修復又は置換
2. 以下のいずれかに該当する細胞・組織を含む (又はそうした細胞・組織で構成される)		
・実質的加工*	使用目的に適用するように生物学的性質、生理学的機能又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	
・細胞・組織の機能	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	

* 実質的加工に含まれない加工の具体例については文献5のAnnex I参照

験及び臨床試験でも、同定されたリスク要因について深く検討すべきだとしている⁸⁾。

(なお著者は、ここでいうリスクとは、所期の目標に対する「不適切性」、「不都合性」、「不合理性」、「非効率性」、「不確実性」などを意味していると解釈している。各ATMPの開発、製造、試験、審査、使用などの各過程や局面において、大小あるいは上位下位のさまざまな目標があり、アプローチがあるが、すべてが患者のためという最終目的につながっているとの本質を常に認識・理解した上で、リスクアセスメント、コミュニケーション、コントロール、レビューなどを実施していくことが肝要である)。

2.2.2 製品の品質・安全性・有効性に関する規制

ATMPは医薬品の一類型であり、従来の医薬品に関する様々な規制が適用される。つまり、市場で流通させるためには販売承認が必要であり、そのためには製品の品質・安全性・有効性を明示することと同時に、市販後の監視・調査が要求される。ATMPの製造に用いる細胞の提供・採取・検査はEUのGood Tissue Practice (GTP)⁹⁻¹¹⁾に従う必要があり、品質管理に関しては、EUのGood Manufacturing Practice (GMP)¹²⁾に従う必要がある。なお、現在EMAはATMP向けの新しいGMPについても検討中である¹³⁾。更に、ATMPと医療機器との複合製品の場合には、医療機器関連規制¹⁴⁾に従うとともに、承認申請時には製品の物理的特性、機能様式及び設計方法に関して明らかにする必要がある。また、製品の特性概要・ラベリング・パッケージングの記載に関してはDirective 2001/83/EC¹⁾の要件に従うが、ATMPでは特に、ドナーの匿名性を尊重しつつも、細胞ないし組織の由来について、患者の知る権利に十分に即するようなものとなっている必要がある。

従来の医薬品・医療機器とは異なり多くのATMPは患者の体の一部となる。したがって、ATMPの有効性・副作用に関するフォローアップ及びリスクマネージメントをECは非常に重要視しており、申請者にはフォローアップ、市販後調査の詳細についての説明、またリスクマネージメント計画が求められる。ATMPの市販後フォローアップ及びリスクマネージメントに関してはEMAから詳細な指針が出されている¹⁴⁾。また、ATMPの承認を受けた者は、その製品を使用する医療施設とともに、血液細胞以外の細胞・組織に関する規制⁹⁾ないし血液細胞に関する規制¹⁵⁾、及び個人情報保護に関する規制¹⁶⁾に従い、患者・製品及び原材料のトレーサビリティを確保するシステムを構築・運用しなければならない。ATMPのトレーサビリティに関する詳細な指針については、現在検討中である。

3. ATMPの臨床試験

EUにおけるATMPの臨床試験は、日本における「治験 vs. 臨床研究」に相当する区分は存在せず、大学等における非商業目的の臨床研究に相当する試験であっても、すべて日本の治験に相当する規制が適用される。臨床試験(治験)後にEU域内で流通させる場合にはEMAによる中央審査が必要となる。ただし、EMAはあくまでも薬事承認審査を行う機関であり、治験の開始・実施に関する手続きはすべて加盟国の管轄となっている。すなわち、EMAは臨床試験には一切関与できない。

臨床試験に関しては、ICHの基準に従ったEUのGood Clinical Practice (GCP)¹⁷⁾を順守することが必要であるが、Regulation (EC) No 1394/2007施行後のATMPの臨床試験に関しては、これに加え、現在策定中のATMP向けGCPに従う必要があるとされる。その詳細についてはトレーサビリティの確保等に関する留意点等がドラフト版¹⁸⁾から垣間見ることができる。

治験に関する裁量がEU加盟各国に属することから、同一の治験届を各国に提出しても結論が国によって異なる恐れがある。逆に、加盟各国の規制や倫理基準に対応できるよう、治験届の内容に国別の修正を余儀なくされる可能性がある。こうした状況は、治験の科学的な価値を下げることになると危惧される。また、すべてのEU加盟国において治験参加者は等しく保護されるべきであるのが前提であることから、各国民の理解も得られにくくなってしまふ。治験に関するハーモナイゼーションについてはEMAではなく、Heads of Medicines Agency (HMA)の臨床試験推進グループで議論されており、ガイダンス¹⁹⁾を示す等の活動がなされている。

4. 相談制度・販売承認審査

4.1 相談制度

EMAは科学助言ワーキングパーティー (SAWP, Scientific Advice Working Party)を通じて医薬品の製品開発に関する科学的助言やプロトコル支援を開発者に提供している。ATMPの開発者は中小のベンチャー企業等 (SME, Small and Medium-sized Enterprise)が多いことから、現在EMAでは、SMEがATMPについての科学的助言を必要とする場合、通常の手数料の90%割引で相談に応じている。相談者がSMEで、対象となるATMPが公衆衛生上の特別な利益となることが証明できる場合には、更なる割引が考慮される。なお、それ以外の開発者でも対象品目がATMPならば通常の65%割引で相談に応じている。また、オーファン医薬品の場

合のプロトコール支援は無料である。

ATMPに関する場合には、SAWPを通じた相談以外に、より非公式な制度として技術革新タスクフォース(ITF, Innovation Task Force)との相談も利用可能である。ITFはEMA内の多部署から成るグループで、法律・ガイドライン等が未整備な先端的治療・技術に関して規制面での問題点を議論することを目的としている。したがって、既存のガイドラインではカバーしきれないケースの多いATMPのような新規の製品については、開発者から規制面での疑問点をITFに投げかけることができる。この制度はITFから助言を受けるというよりもむしろ意見交換の意味合いが強い。ITFとの相談は無料であるが論議内容の法的拘束力はない。

更にこれらの制度とは別に、EMAの先端医療委員会(CAT, Committee for Advanced Therapies)は、開発者の品目がATMPに該当するか否かの助言を無料で行うとともに、SMEの非臨床試験・品質試験のデータの科学性に関する暫定認証を無料でやっている(後述)。

4.2 ATMPの中央審査

EU内の国境を越えたATMPの流通に関しては、EMAがECからの委任を受けて一括して承認審査を行っており、そこで品質・安全性・有効性に関する科学的評価が行われている。EMA内でヒト向けの医薬品の販売承認審査を行うのは、ヒト用医薬品委員会(CHMP; Committee for Human Medicinal Products)であるが、ATMPについては従来の医薬品・医療機器よりも専門的かつ多分野にわたる評価を要することから、CHMPの下部諮問組織として先端医療委員会(CAT)が2008年12月末に設置され、CATでの品質・有効性・安全性の評価意見書案をもとにしてCHMPが承認審査を行い、CHMPが作成した評価意見書をもとにしてECが承認の判断をする、という体制が取られている。ATMPの品質・安全性・有効性確保に関する要件・評価をEU内で調和させ、直接的で迅速な流通を図る目的から、ATMPはEU加盟国内での審査を経ることなく、直接CATでの評価を受けることになった。

4.3 経過措置

2008年12月30日以前にEU内で流通が承認されたATMPに関しては、経過措置が取られる。組織工学製品ではないATMPの場合には3年の移行期間(2008年12月31日~2011年12月30日)、組織工学製品である場合には、4年の移行期間(2008年12月31日~2012年12月30日)が与えられており、それまでにATMPとしての再承認を受ける必要がある。期間内に再承認を受けな

い場合には、EU市場での承認は取り消される。

4.4 先端医療委員会(CAT)の構成と任務

4.4.1 構成

先端医療委員会(CAT)は、EU加盟国から各1名(副委員各1名)、患者団体から2名(副委員2名)、臨床医が2名(副委員2名)の、正副合計66名で構成され、会議は毎月1回開催される。患者団体及び臨床医の代表者としての委員はECが選定する。現在は、患者団体としてEGAN(欧州遺伝病連帯ネットワーク European Genetic Alliances' Network)及びEurordi(欧州希少疾病機構 European Organisation for Rare Diseases)、臨床医の代表者としてESGCT(欧州遺伝子細胞治療学会 European Society of Gene and Cell Therapy)及びEBMT(欧州血液骨髄移植グループ European Group for Blood and Marrow Transplantation)のメンバーがCATに参加している。なお、CHMPとの連携の必要性から、加盟国代表の委員うち5名はCHMPの委員である必要がある。

ATMPの評価において必要な学問領域としては、医療機器・組織工学・遺伝子治療・細胞治療・バイオテクノロジー・外科学・ファーマコビジランス・リスクマネジメント及び倫理学が挙げられており、委員会全体に必要な領域がカバーできるようにアレンジされている。その内訳は、遺伝子治療専門家が19%、細胞治療専門家が21%、組織工学の専門家が17%、バイオテクノロジー専門家が24%、倫理学専門家が8%、ファーマコビジランス専門家が5%、医療機器専門家5%、外科学専門家1%となっている。

4.4.2 CATの任務

CATの任務には、①ATMPの科学的評価、②ATMP該当性に関する助言、③SMEのATMP品質・非臨床データの暫定認証、④SAWPへの協力、そのほか、ATMP以外の製品についてのCHMPとの相談、及びECへの助言などがある。

4.4.2.1 ATMPの科学的評価

CATの任務の中でも主要なのは、ATMPの科学的評価である。個別のATMPについて、CATは品質・安全性・有効性に関する科学的評価結果を意見書案としてCHMPに提出する。評価意見書案の提出は、正式な承認申請日から数えて約200作業日以内に行う。なお、CHMPは正式な承認申請日から数えて210作業日以内に承認に関する評価意見書を確定する。なお、これら作業日には土日祝日を含む。また、CATの質問事項リストが出された時から申請者がこれに回答するまでの間は作業日に勘定しない。ATMPが医療機器との複合製品

の場合には、CATは医療機器認証機関との情報交換も行う。

4.4.2.2 ATMP 該当性に関する助言

CATは特定の品目がATMPに該当するか否かについて、科学的な基準に基づいた検討・判断を行う。製品の分類に関する助言要請は、治験届や承認申請の有無に係らず随時受け付けられており、手数料もかからない。正式な助言要請から60日以内で回答されることになっている。CATの回答は、製品の内容・治療対象・CATによる検討結果について、秘匿事項を除いた後に公開される。また、ATMPのファーマコビジランス及びリスクマネジメントシステムの計画及び実施に関しても、承認申請者・承認取得者からの要請に応じて助言を行う。

4.4.2.3 SMEのATMP品質・非臨床データの暫定認証

中小ベンチャー企業等(SME)はATMPの品質・非臨床データに関し、CATによる科学的評価に基づく暫定認証を受けることができる。暫定認証の審査は治験開始・承認申請の有無に係らず、SMEから申請があった場合に随時行われる。あくまで品質・非臨床データの科学的評価の結果のみを認証するものであって、治験届や承認申請とは独立したものとみなされている。すなわち、認証書は法的には治験届や承認申請の際に提出すべきデータの代用として使うことはできない。ただしECとしては、同じデータを用いて将来、治験あるいは承認の申請が行われる際には、申請の評価が行いやすくなることも期待している。

4.4.2.4 SAWPへの協力

CATはSAWPに協力することにより、ATMPの科学的助言にも関与している。ただし、CATのSAWPへの関わり方の詳細については試行錯誤が続いている。

4.5 ATMP承認審査におけるEMA各組織の役割

4.5.1 CATとCHMPの共同作業

従来の医薬品の場合はCATに諮問されることなく、CHMPラポーターとCHMP副ラポーターがそれぞれ専門家チームを構成して評価し、その評価結果をCHMPで議論する。結論がCHMPで了承されると、それを受けたECが承認をすることになる。一方、ATMPの評価はCATラポーターとCHMPコーディネーター及び品質・安全性・有効性の各専門家からなるチームと、CAT副ラポーターとCHMP副コーディネーター及び品質・安全性・有効性の各専門家からなるチームの2チームで行う。2チームが作成した評価レポートをCHMPのメンバー1名とCATのメンバー1名以上が査読し、その結果をCATの全体会議で議論する。CATは議論した内容を評価意見書案としてCHMPに提出する。CHMPは評価

意見書案をもとに承認審査を行って評価意見書を作成し、更にこれをもとにECが承認の可否を判断する。

4.5.2 CATの役割

先述のようにCATはATMPの科学的評価を行うことになっているが、具体的作業としては、ATMPの評価に関して質問事項のリスト、解決すべき問題点のリスト、及び評価意見書案の内容を議論する。また、必要となれば会議中にEMAのワーキングパーティーメンバー等の外部専門家にもスライドと電話でのプレゼンテーションをさせ、議論を行う。CAT正副ラポーターは、CATの全体会議における評価の過程・議論をコーディネートするとともに、評価レポート、質問事項リスト、問題点リスト等の作成を担当し、またEMAのワーキングパーティーメンバー等の外部専門家との相談の必要性があるかどうかの判断を行う。

4.5.3 CHMPの役割

CHMPはATMPの評価を行う2チームの任命を行うとともに、CATの評価意見書案をもとにした評価意見書を作成する。また、CATでの評価過程でコメントを加えることもできる。全体会議で主なATMPについての科学的意見や議論について情報を共有し、必要であれば審査期間(正式な承認申請日から数えて210日作業日)の最後に問題点リストの作成及び口頭での説明の機会設定を行うことができる。

CHMP正副コーディネーターは、CATの上部組織であるCHMPとCATとの間の情報のパイプ役となるとともに、CHMPにおいてCATの意見についての討議・採択を担当する。また、審査期間中にEMAのワーキングパーティーメンバー等の外部専門家との相談の必要性があるかどうかの判断を行う。

4.5.4 EMA事務局の役割

EMAはCATの評価意見書案及びCHMPの評価意見書がそれぞれ決められた期間内に作成されることをチェックすると同時に、CAT及びCHMPの評価の透明性を確保する。CAT事務局は、CAT正副ラポーターの評価レポートの科学的面及び規制の面での整合性を確保すると同時に、CHMPでの最終承認を受けるための評価意見書案の準備を行う。更に、CAT事務局はATMPの評価や回収に関する情報収集・提供を行う。

5. 市販後安全対策

Regulation (EC) No 1394/2007には、ATMP市販後における安全対策として、トレーサビリティの確保と市販後における安全性監視(ファーマコビジランス)が挙げられている。ATMPのドナー・原材料・製品・製造工程

及び患者のトレーサビリティの確保は従来の関連 Directive に従うことになるが、先述のように、現在 ATMP に特化した指針についても検討中である。

ファーマコビジランスについては、ATMP に特化した指針¹⁰ が出され、2008年12月末より発効している。EUでは従来、ファーマコビジランスはファーマコビジランスシステムとリスクマネジメントシステムとで構成されているが、このATMP向け指針では有効性フォローアップシステムの構築が要求されている点が特徴的である。また、リスクマネジメントの実施に当たってのATMPに特有のリスクの例、ファーマコビジランスの実施における注意点、リスクを最小化するための方策なども示されている。

ATMPは生きている細胞・組織を含む。したがって、患者への投与後、長期間の間には細胞・組織の性質に変化が生じる可能性があり、これと同時にATMPとしての有効性にも変化が生じ得る。一方、そうした変化が患者にどのような影響をもたらすか、という点については販売承認前には十分には理解し得ない。ATMPに対する患者の免疫応答性及び反復投与による免疫獲得等も、有効性・安全性に影響する可能性がある。また、ATMPの投与の様式（手術時の患者の状態・前処理、手術及び手術後の処置などまで含む）によっても有効性・安全性は変わり得る。更に、ATMPは作用期間が限定的なものから終生埋植され続けるものまで様々である。これらの理由から、ATMPに関しては有効性のフォローアップが重視されることになる。

ATMPの市販後安全対策の課題としては、構築したファーマコビジランスシステム、リスクマネジメントシステム及び有効性フォローアップシステムに関する不透明性が挙げられている。すなわち、データが非公開で、要旨のみが公開されることになっており、新たなATMPの開発促進・安全性確保の上で問題視されている。また、データの保管及びトレーサビリティシステムの担い手が承認申請者である点も、そのままではよいのかという議論がある。

6. 例外規定—ホスピタルエグゼンプション—

ATMPの中央審査の原則の例外として、Regulation (EC) No 1394/2007のArticle 28には、①特定の患者向けの特注品の処方箋に従って、②固有の品質基準に基づき、③非反復的に製造され、④医療従事者の職務責任の下、⑤同一加盟国内で、⑥単一病院において使用されるという条件すべてを満たす場合には中央審査とはならない、という規定がある。これをホスピタルエグゼンプシ

ョン（病院特例、Hospital Exemption）と言う。ただし、ホスピタルエグゼンプションに該当する品目の場合も、生産国において製造工程と品質に関する承認を受ける必要があり、またファーマコビジランス実施とトレーサビリティの確保が必要となる。特に自己由来細胞を用いたATMPの場合、患者ごとのオーダーメイドであることから「非反復的生産」と考えがちだが、通常EUでは、一定の標準化された製造工程で工業的（産業的）に製造される場合には、自己細胞を原材料としても患者ごとに互いに別個の製品とはならず、反復的製造と見なされる²⁰。これは製造工程中にあるリスクが多く製品・患者に拡散するのを防ぐためである。

おわりに

ATMPは目覚ましい進展を見せ、EUでも次々と新たな開発品が出現しているが、細胞・組織・遺伝子といった、これまでにない複雑な構成成分を含むと同時に、その臨床応用に関しては非常に限られた経験と知識しか存在せず、明確な科学的根拠に基づいた品質や安全性等の確保が課題であった。これを克服するための取り組みとしてRegulation (EC) No 1394/2007が発出されたが、その取り組みの中にもまだ問題点が多い。例えば、中小ベンチャー企業向けのATMP品質・非臨床データの暫定認証は、臨床試験審査や販売承認審査とは正式な法的繋がりががないため、その意義付け、位置付けはまだ明確ではない。開発の早い段階で暫定認証が行われてもデータ自体が最終的な製品の規格と乖離したものとなりかねず、逆に遅ければ大企業への技術移転等が進まない。適切なタイミングについての判断もまだ難しい。また、ATMPに関するホスピタルエグゼンプションの要件中の単語の解釈の違いから、EU地域内でも特定の先端治療が受けられる国と受けられない国が生じ、実施国に患者が集中する、いわゆる「医療難民」が発生することが危惧され、CATでも「非反復的」「単一の病院」などの単語の定義についてハーモナイゼーションの必要性が説かれている。ATMP向けのGCPやGMP及びトレーサビリティに関する詳細な指針等もまだ確定されていない。

こうした問題はあるものの、EUの規制当局は、ATMPに対して品質や安全性等の確保及びリスクベネフィットのバランスを図りつつ、実用化を促進するために試行錯誤をいくつも繰り返しながら、着実に規制の枠組み作りを進めている。既に2009年6月には培養軟骨製品が、新たな審査体制の下での初のATMP品目として販売承認を受けているが、即座にCATはその審査経験をもとに、培養軟骨製品の承認審査における留意点をまとめた

文書²¹⁾を公表している。また、研究開発が進むiPS細胞等の多能性幹細胞に由来するATMPに関する特別な留意点をまとめた文書²²⁾を公表するなど、EUの医薬品産業の強化に必要な新技術の開発支援に積極的な姿勢を示している。

細胞・組織加工製品を医薬品か医療機器かに分類するのではなく、ATMPという医薬品カテゴリーに括って特別な規制をかける、というEUの非常に大胆な取り組みは、従来の医薬品・医療機器の二分法に拘泥されずに先端医療製品そのものと率直に向き合いつつ品質・安全性・有効性の評価を行うことができる可能性を持っている。あらゆる医療製品や医療技術が究極的には患者あるいは将来、患者になりうる人々のために制度上も最も効果的、合理的なアプローチをとるという視点で考えれば、むしろ必然的な帰結であるかも知れない。我が国における先端医療の実用化促進施策、及び規制の国際協調のためにも参考とすべきものと考えられる。

文 献

- 1) Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use.
- 2) Commission Directive 2003/63/EC of 25 June 2003 amending Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council on the Community code relating to medicinal products for human use.
- 3) Council Directive 93/42/EEC of 14 June 1993 concerning medical devices.
- 4) Council Directive 90/385/EEC of 20 June 1990 on the approximation of the laws of the Member States relating to active implantable medical devices.
- 5) Regulation (EC) No 1394/2007 of the European Parliament and of the Council of 13 November 2007 on advanced therapy medicinal products and amending Directive 2001/83/EC and Regulation (EC) No 726/2004.
- 6) Commission Directive 2009/120/EC of 14 September 2009 amending Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council on the Community code relating to medicinal products for human use as regards advanced therapy medicinal products.
- 7) EMA: Guideline on human cell-based medicinal products EMEA/CHMP/410869/2006.
- 8) EMA: Concept paper on the development of a guideline on the risk-based approach according to annex I, part IV of directive 2001/83/EC applied to advanced therapy medicinal products EMA/CHMP/CPWP/708420/2009.
- 9) Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 on setting standards of quality and safety for the donation, procurement, testing, processing, preservation, storage and distribution of human tissues and cells.
- 10) Commission Directive 2006/17/EC of 8 February 2006 implementing Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council as regards certain technical requirements for the donation, procurement and testing of human tissues and cells.
- 11) Commission Directive 2006/86/EC of 24 October 2006 implementing Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council as regards traceability requirements, notification of serious adverse reactions and events and certain technical requirements for the coding, processing, preservation, storage and distribution of human tissues and cells.
- 12) Commission Directive 2003/94/EC of 8 October 2003 laying down the principles and guidelines of good manufacturing practice in respect of medicinal products for human use and investigational medicinal products for human use.
- 13) EMA: GMP for advanced therapy medicinal products: status EMEA/INS/GMP/372447/2008.
- 14) EMA: Guideline on safety and efficacy follow-up-risk management of advanced therapy medicinal products EMEA/149995/2008.
- 15) Directive 2002/98/EC of the European Parliament and of the Council of 27 January 2003 setting standards of quality and safety for the collection, testing, processing, storage and distribution of human blood and blood components and amending Directive 2001/83/EC.
- 16) Directive 95/46/EC of the European Parliament and of the Council of 24 October 1995 on the protection of individuals with regard to the processing of personal data and on the free movement of such data.
- 17) 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.
- 18) European Commission: Detailed guidelines on good clinical practice specific to advanced therapy medicinal products ENTR/F/2/SF/dn D (2009) 35810 (3 December 2009).
- 19) Heads of Medicines Agencies: Guidance document for a Voluntary Harmonisation Procedure (VHP) for the assessment of multinational Clinical Trial Applications CTFG//VHP/2010/Rev1.
- 20) European Commission: Consultation paper: Human tissue engineering and beyond: proposal for a community regulatory framework on advanced therapies (4 May 2005).
- 21) EMA: Reflection paper on in-vitro cultured chondrocyte containing products for cartilage repair of the knee CAT/CPWP/568181/2009.
- 22) EMA: Reflection paper on stem cell-based medicinal products (draft) CAT/571134/09.