

細胞治療・再生治療開発への挑戦

ヒト細胞を組み込んだ日本初の再生医療製品の開発

株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング
井 家 益 和

2010/12/22 細胞育成学連続講演会 2010 (京都大学)

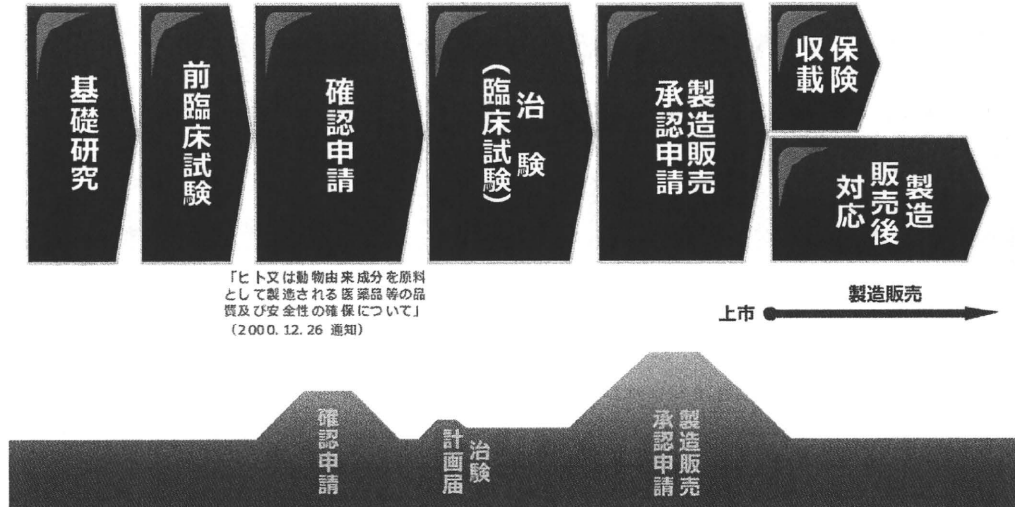
日本における法規制

ガイドライン	施行	概 要
ヒト（同種）由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について	2008/9/12 薬食発第0912006号	1314号通知の見直し (同種由来細胞について)
ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の製造管理・品質管理の考え方について	2008/3/27 薬食監麻発第0327025号	自家細胞・組織利用製品等の特性を踏まえた製造管理・品質管理の実施に関する留意点について
ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針	2008/2/8 薬食発第0208003号	1314号通知の見直し (自己由来細胞について)
生物由来原料基準	2003/5/20 厚生労働省告示第210号	生物由来製品または特定生物由来製品を使用する場合の基準
薬事法施行規則の一部改正（細胞組織医薬品及び細胞組織医療用具に関する取り扱いについて）	2001/3/28 医薬発第266号	品質及び安全性を確保するための薬事法の改訂、製造施設に関するGMP関連省令等の一部改正
ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について	2000/12/26 医薬発第1314号	品質・安全性及び細胞・組織の取扱い上の科学的・倫理的妥当性の確保に関する基本方針 [改訂に伴い指針は廃止]
ウシ等由来物を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について	2000/12/12 医薬発第1226号	ウシ等由来物を原料として製造される医薬品等の安全性確保のための指針（狂牛病対策）
細胞・組織を利用した医療用具又は医薬品の品質及び安全性の確保について	1999/7/30 医薬発第906号	治験実施前に必要な品質・安全性の確認 「確認申請」

2010/12/22 細胞育成学連続講演会 2010 (京都大学)

再生医療における薬事承認プロセス

- ❖ 薬事法の下では、ヒト細胞・組織利用製品ならびに遺伝子治療用医薬品の製造販売承認を取得するためには、治験の前に確認申請に適合する必要がある。



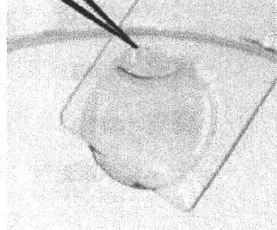
2010/12/22 細胞育成学連続講演会 2010 (京都大学)

日本における再生医療の関連製品（確認申請適合）

製品・開発名	分類	治験確認適合	製造承認申請
樹状細胞による癌免疫療法	医薬品	2001/10	中断
自家培養表皮	医療機器	2002/03	2007/10/29 製造販売承認
HGF 遺伝子治療による 末梢性血管疾患治療	医薬品	2003/10	製造販売承認申請 審査中
自家培養軟骨	医療機器	2004/02	製造販売承認申請 審査中
骨格筋芽細胞による 心筋症治療	医薬品	2006/04	治験計画届 準備中
骨髄由来同種間葉系幹細胞による造血幹細胞移植 時の移植片対宿主病 (GVHD) 抑制	医薬品	2007/05	Phase I / II
HSV-TK 遺伝子治療による 再発白血病治療	医薬品	2007/09	Phase I
FGF 遺伝子治療による 重症下肢虚血を伴う末梢動脈閉塞性疾患治療	医薬品	2007/11	Phase II
複合型自家培養皮膚	医療機器	2007/12	中断
同種培養角膜上皮細胞シートによる 角膜上皮幹細胞症治療	医療機器	2009/06	治験計画届 準備中

2010/12/22 細胞育成学連続講演会 2010 (京都大学)

再生医療製品事業

	自家培養表皮 ジェイス	自家培養軟骨	自家培養角膜上皮
開発製品 外観			
開発 研究者	(米) ハーバード大学 Howard Green 教授	広島大学 越智 光夫 教授	(伊) モデナ&レッジョ・エミリア大学 Michele De Luca 教授 Graziella Pellegrini 教授
適応疾患 (想定疾患)	重症熱傷	外傷性軟骨欠損症 離断性骨軟骨炎	化学傷・熱傷 スティーブンス・ジョンソン症候群 眼類天疱瘡・角膜感染症 再発翼状片
進捗状況	製造承認：2007/10 保険収載：2009/1	製造販売承認申請の審査中	確認申請の審査中

2010/12/22 細胞育成学連続講演会 2010 (京都大学)

自家培養表皮「ジェイス®」

ジェイス®の位置づけ

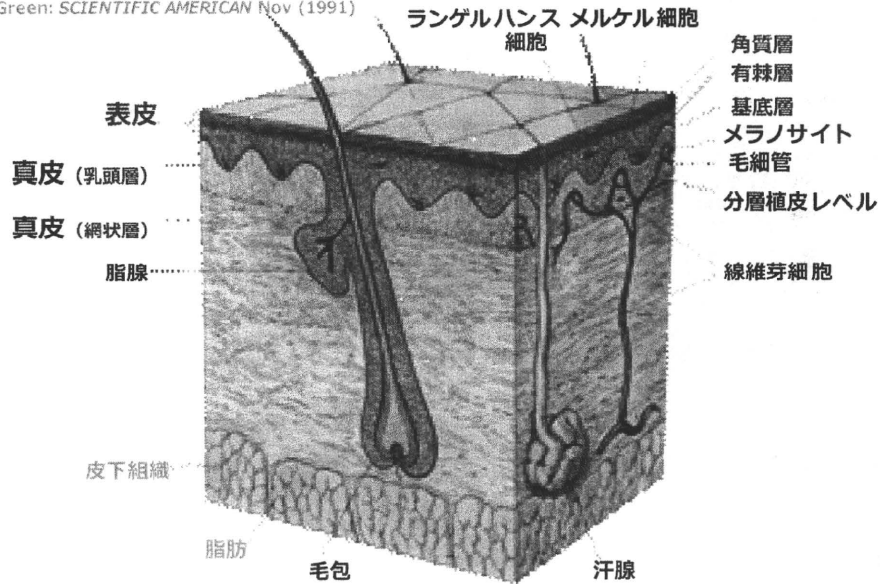
- ・ ヒト組織・細胞を組み込んだ日本初の再生医療製品 (厚生労働省の承認品)
- ・ 自家培養表皮：自家のヒト組織細胞を組み込んだ再生医療製品
 - 患者自身の皮膚から単離した細胞を培養して表皮細胞シートを作製
- ・ 3T3-J2細胞をフィーダーとして作製するGreen型自家培養表皮



2010/12/22 細胞育成学連続講演会 2010 (京都大学)

皮膚の構造

H.Green: SCIENTIFIC AMERICAN Nov (1991)



皮膚：平均 1.6 m²，約 3 kg，厚さ 1.5～4 mm（皮下組織入れて体重の 16%，約 10 kg）

2010/12/22 細胞育成学連続講演会 2010 (京都大学)

Green 型自家培養表皮の歴史

1975 年：Howard Green 教授（現 ハーバード大学医学部）らは、マウス 3T3 細胞とヒト表皮細胞を共培養すると、ヒト表皮細胞が良好に増殖することを発見

- Rheinwald JG, Green H : Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6 : 331-344 (1975)
- Green H : Cyclic AMP in relation to proliferation of the epidermal cell: a new view. *Cell* 15 : 801-811 (1978)



1981 年：世界で初めて、重症熱傷に対する Green 型自家培養表皮の移植が報告（細胞を用いた再生医療による治療の最初）

- O'Connor NE, Gallico GG, Compton CC, Kehinde O, Green H : Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet* 1 (8211) : 75-78 (1981)



1984 年：BSA 97% 以上の男児 2 名を、腋窩に残った約 2 cm² の皮膚から培養した Green 型自家培養表皮で救命した報告

- Gallico GG III, O'Connor NE, Compton CC, Kehinde O, Green H : Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med* 311 : 448-51 (1984)



1985 年：日本で初めて、広範囲熱傷に対する Green 型自家培養表皮の移植が報告

- 熊谷潤夫, 仁科博道, 保坂登美子, 萩野洋一 : ヒト培養表皮移植に関する研究 ; 自家培養表皮移植による広範囲熱傷の治療. *日形成会誌* 5 : 463-474 (1985)



2010/12/22 細胞育成学連続講演会 2010 (京都大学)

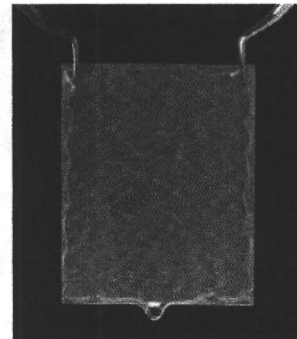
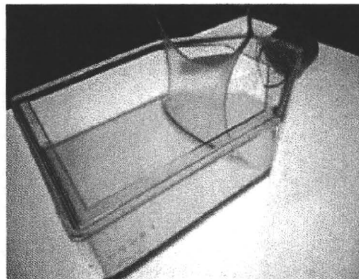
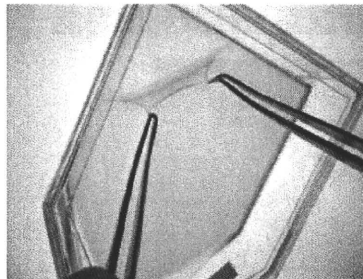
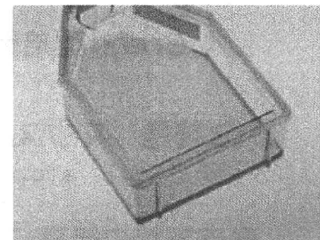
世界における培養皮膚製品の分類

培養表皮	<p>【自家表皮細胞 (Green型)】</p> <p>ジェイス Epicel®(米) HoloDerm®(韓)</p>  <p>CellActive®Skin(蘭) 【同種表皮細胞 (Green型)】 Kaloderm®(韓)</p>	<p>【自家表皮細胞 + マトリックス】</p> <p>Laserskin® BioSeed®-S(独) autograft(伊)</p> <p>【自家表皮細胞 懸濁液】 Keraheal®(韓) CellSpray®(英)</p>  <p>EpiDex®(瑞) AcuDress®(蘭)</p>
	培養真皮	<p>【同種線維芽細胞 + マトリックス】</p> <p>北里大(黒柳型) Dermagraft®(米)</p> 
培養皮膚		<p>【同種表皮細胞 + 同種線維芽細胞 + マトリックス】</p> <p>Apligraf®(米) OrCel®(米)</p> 

2010/12/22 細胞育成学連続講演会 2010 (京都大学)

Green型自家培養表皮

- ・ 3T3-J2細胞 (マウス胚由来) をフィーダー細胞として、ウシ胎児血清含有培地を用いてヒト表皮細胞を増殖させる培養法で製造する。
- ・ 表皮細胞のみでシート状となり、キャリアで懸架可能。



2010/12/22 細胞育成学連続講演会 2010 (京都大学)

Green 型自家培養表皮の開発のために

- ① 3T3-J2細胞のセルバンクの構築
- ② Green 型自家培養表皮の特性解析
- ③ 培養法の標準化
- ④ 安全性と有効性の規格の設定
- ⑤ 製品パッケージと輸送システムの開発
- ⑥ GMP 適合施設の建設

2010/12/22 細胞育成学連続講演会 2010 (京都大学)

① 3T3-J2 細胞のセルバンクの構築

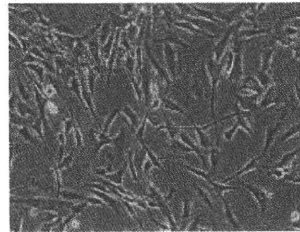
Green 型培養表皮の作製 : 3T3 細胞のフィーダーが必須

3T3 細胞 (マウス胚由来) : 1960 年代に Todaro と Green が樹立

■ TODARO GJ, GREEN H : *J Cell Biol* **17**, 299-313 (1963)

表皮細胞の培養に最も適した株 : 3T3-J2 細胞 (流通していない)

Howard Green 教授から 3T3-J2 細胞を株分け譲渡 : 商業利用可能



セルバンクを構築 : マスターセルバンクとワーキングセルバンク

2010/12/22 細胞育成学連続講演会 2010 (京都大学)

② Green型自家培養表皮の特性解析

代表的な特性解析試験

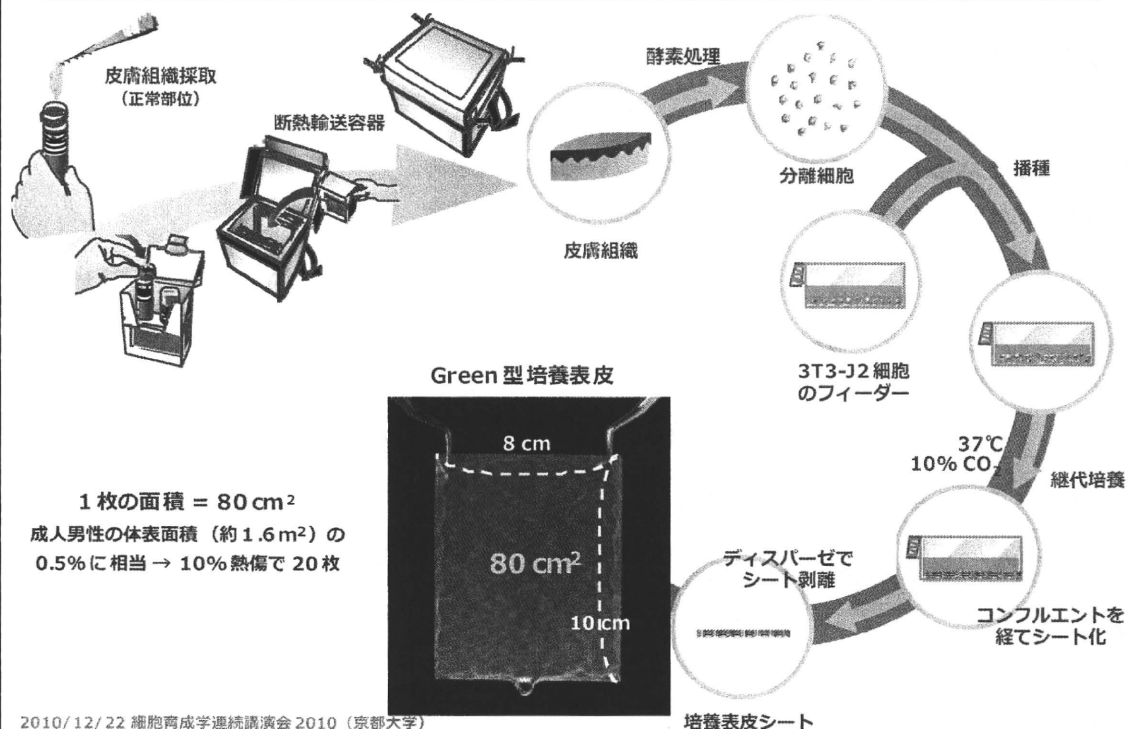
- ・ ヒト表皮細胞の連続継代試験
- ・ コロニー形成能試験
- ・ ヒト表皮細胞の含有量定量試験
- ・ 培養表皮に含まれる細胞種の定量試験
- ・ サイトカイン産生の定量試験
- ・ 3T3-J2細胞の残存数定量試験
- ・ 残留抗生物質の定量試験
- ・ 血清由来の残留ウシアルブミン定量試験
- ・ 残留培地添加物の定量試験
- ・ 培養表皮の外観及び形態確認試験
- ・ 剥離工程の洗浄効率確認試験
- ・ 細胞の凍結解凍確認試験
- ・ マイコプラズマ否定試験
- ・ 無菌試験
- ・ エンドトキシン定量試験
- ・ 培養表皮の強度試験
- ・ 培養表皮の保存温度設定試験
- ・ 培養表皮の保存安定性試験
- ・ 培養表皮の長期保存試験

染色体に対する影響と造腫瘍性の否定

- ・ 核型分析試験
- ・ 軟寒天コロニー形成試験
- ・ ヌードマウスを用いた移植試験

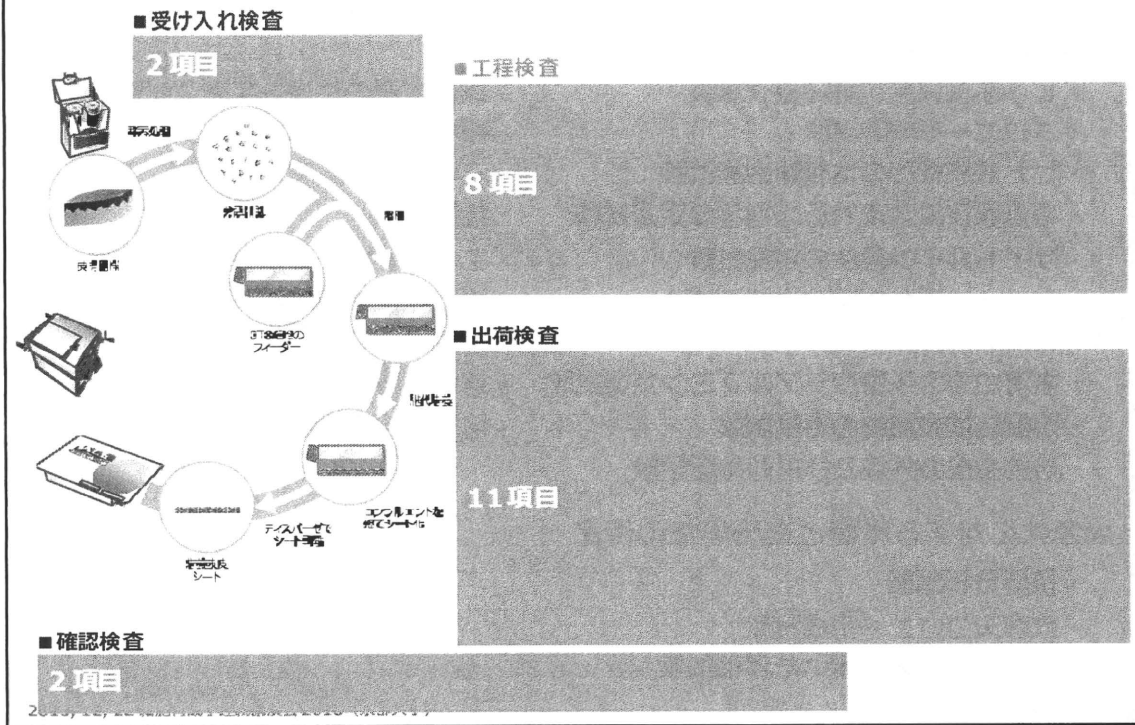
2010/12/22 細胞育成学連続講演会 2010 (京都大学)

③ 培養法の標準化



2010/12/22 細胞育成学連続講演会 2010 (京都大学)

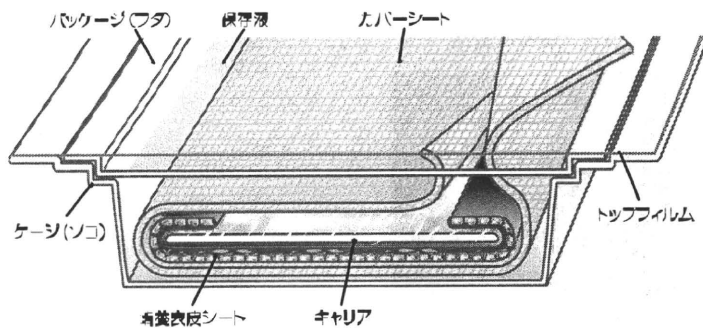
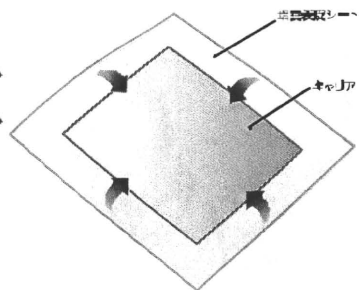
④ 安全性と有効性の規格の設定



⑤ 製品パッケージと輸送システムの開発

製品パッケージ

最終製品は非常に薄くて脆弱な生きた細胞シートであるため、キャリアとなる不織布に付着した状態でカバーシートに包み、保存液とともに1枚ずつ無菌的にパッケージする方法を開発



⑤ 製品パッケージと輸送システムの開発

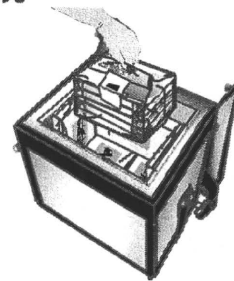
輸送システム

ヒト細胞・組織そのものが製品であるため、厳密な貯蔵条件と使用期間を設定

- ・ 貯蔵条件：10℃～25℃
- ・ 使用期限：パッケージから56時間

断熱輸送容器の開発

- ・ 10℃～25℃の温度を56時間以上担保できる断熱輸送容器を開発
- ・ 断熱輸送容器は、電気的な加温・冷却機能を持っていないが、過酷な条件下でもほぼ一定の温度が保たれる性能を有する
- ・ 断熱輸送容器に1箱に最大5製品まで梱包

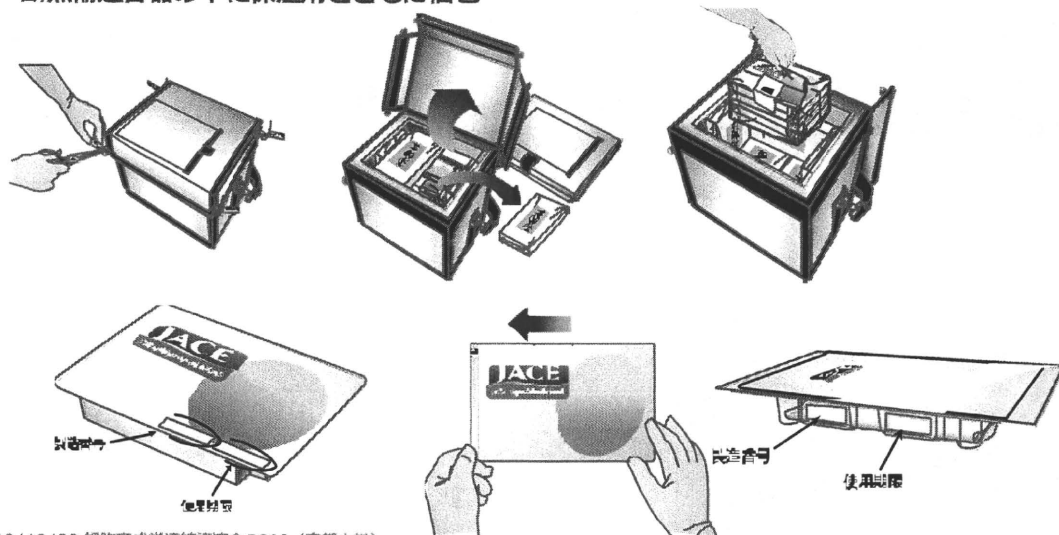


2010/12/22 細胞育成学連続講演会 2010 (京都大学)

⑤ 製品パッケージと輸送システムの開発

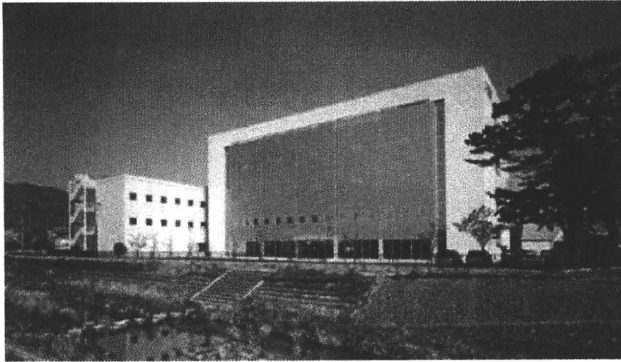
断熱輸送容器

- ・ 取り違い防止のため必ず封印して運搬 → 製品番号と使用期限を確認
- ・ 断熱輸送容器の中に保温剤とともに梱包

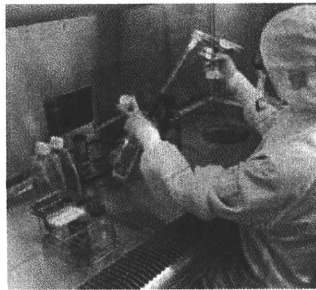


2010/12/22 細胞育成学連続講演会 2010 (京都大学)

⑥ GMP 適合施設の建設

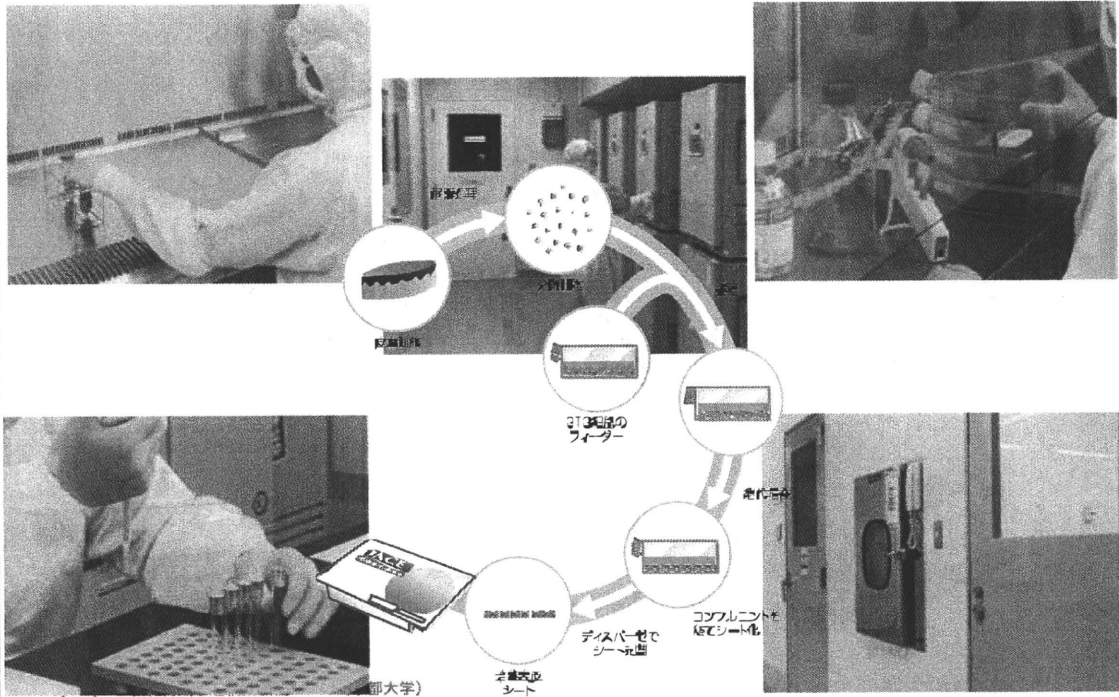


GMP に適合した製造施設 © J-TEC



2010/12/22 細胞育成学連続講演会 2010 (京都大学)

⑥ GMP 適合施設の建設



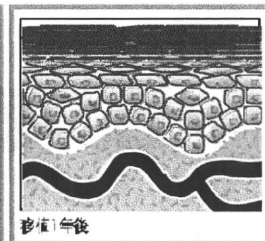
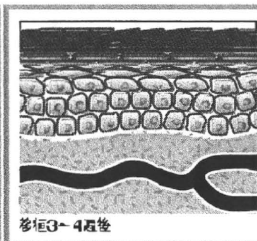
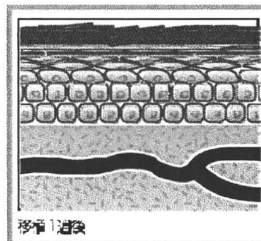
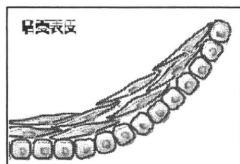
承認された自家培養表皮の適応症

自家植皮のための患皮面積が確保できない重篤な広範囲熱傷で、かつ、受傷面積として深達性Ⅱ度熱傷創及びⅢ度熱傷創の合計面積が体表面積の30%以上の熱傷を適応対象とする。

本品はⅢ度熱傷創において、再構築された真皮に適用し、創を閉鎖することを目的とする。真皮の再構築は原則として同種皮膚移植による。深達性Ⅱ度熱傷創への使用は、Ⅲ度熱傷と深達性Ⅱ度熱傷が混在し、分けて治療することが困難な場合に限る。

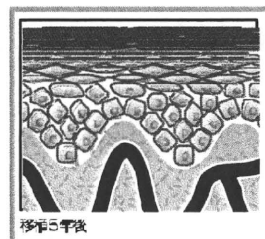
2010/12/22 細胞育成学連続講演会 2010 (京都大学)

Green型自家培養表皮の治癒経過



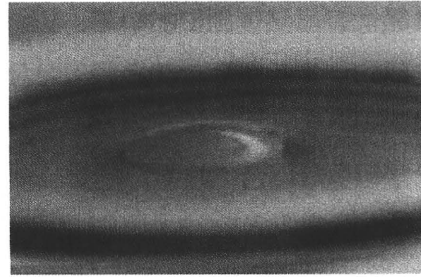
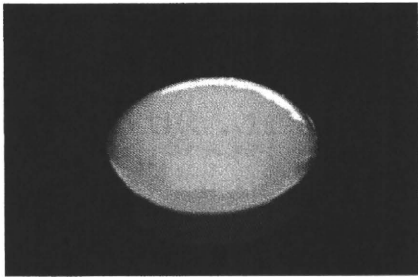
移植された自家培養表皮は、通常、1週間程度で生着する
その後、移植部の皮膚組織が組織学的に正常になるためには、
数ヶ月から1年以上かかることが知られている

- ・一般的に、自家培養表皮の移植後は、約1週で基底層から有棘層、顆粒層及び角質層に至る表皮の形態が認められる
- ・移植3～4週で基底膜が完成する
- ・移植してから1年後には真皮と表皮の境界に緩やかな波状の表皮突起が形成される
- ・2～5年以内に正常皮膚の形態に似た複雑な表皮突起が構築される



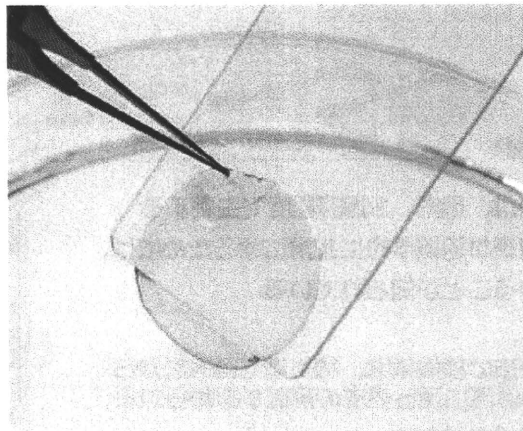
2010/12/22 細胞育成学連続講演会 2010 (京都大学)

培養軟骨の開発



2010/12/22 細胞育成学連続講演会 2010 (京都大学)

培養角膜上皮の開発



2010/12/22 細胞育成学連続講演会 2010 (京都大学)

〈教育セミナー〉

皮膚機能の新展開

再生医療製品として開発された自家培養表皮の有効性と安全性の評価

井家益和

Efficacy and Safety of First Tissue-Engineered Cellular Product,
Autologous Cultured Epidermis

Masukazu INOIE

Abstract

Regenerative medicine, which achieves a recovery of dysfunction of tissues and organs, might be the main stream of the medical care in this century. We had developed the first tissue-engineered cellular product, JACE[®], which received Japanese government approval in October 2007. This product is the autologous cultured epidermis using 3T3-J2 feeder layer system, known as Green's technique, and is grafted for serious burns. By isolating keratinocytes from a few cm² biopsy and culturing them, the keratinocyte sheets measuring about 10% of the body surface area can be produced in two weeks, or they cover the entire surface of body in 3-4 weeks. On the development of the autologous cultured epidermis product, the characteristics were investigated and lots of data relating to the safety and efficacy were collected. All type and amount of cells except keratinocyte were determined in the cultivation process. And the residual volume of bovine-serum albumin and feeder cells in keratinocyte sheet were analyzed for the selection of shipping inspections. Karyotype analysis, colony formation test in soft agar gels and transplantation test in nude mice were also performed to prove the absence of transform and tumorigenicity in the final product. To negate product contamination, the bacterial sterility, the endotoxin detection and the mycoplasma negative examination must be performed. In addition, several characteristics, including morphology and proliferative potential of keratinocytes must be evaluated. The 3T3-J2 cell banks are safely controlled and all raw agents and materials are inspected in GMP facilities. This cellular product has been covered by health insurance and is being followed up by post-marketing surveillance study since January 2009.

Key words: autologous cultured epidermis, JACE, feeder layer, cellular product, regenerative medicine.

1. 緒 言

再生医療は、機能障害や機能不全に陥った組織や臓器を再生させることを目的とした医療テクノロジーであり、今世紀の医療において革新的な役割を担うことが期待されている。再生医療による治療には、必ずしも明確な定義はない。組織工学的手法を用いなくとも、ヒト細胞に関連する増殖因子や生分解性材料を広義の再生医療に含めることがある。しかし、本来の再生医療は、ヒト細胞を培養して組織工学的に作製した培養臓器を移植する治療といえる。その意味において、再生医療による世界で最初の臨床成果は、1981年に米国で報告された重症熱傷に対する Green 型自家培養表皮の移植である¹⁾。

Green らは、自身のテラトーマの研究をベースに、マウス 3T3 細胞をフィーダー細胞として用いてヒト表皮

細胞を選択的に増殖させる培養法を開発した^{2), 3)}。その手法を用いて患者自身の皮膚から分離した細胞を培養して作製した表皮細胞シートが Green 型自家培養表皮である。Green 型自家培養表皮の利点は、小さな皮膚組織から多量の面積の移植用の細胞シートを作製することができることにある。1984年には、体表面積の97%を受傷した小児2例の熱傷患者の腋窩に残った2cm²程度の皮膚片から、4,521cm²と6,831cm²の面積の表皮細胞シートを培養して移植し、救命に成功した症例が報告されたことによって、広範囲熱傷に対する Green 型自家培養表皮の有用性が広く認知された⁴⁾。

Green 型自家培養表皮は、米国では1998年から Epicel[®] が製品化されており、20年以上の歴史がある⁵⁾。また、いくつかの国における最初の再生医療製品として開発されているほか^{6), 7)}、先進的な医療機関で独自に培

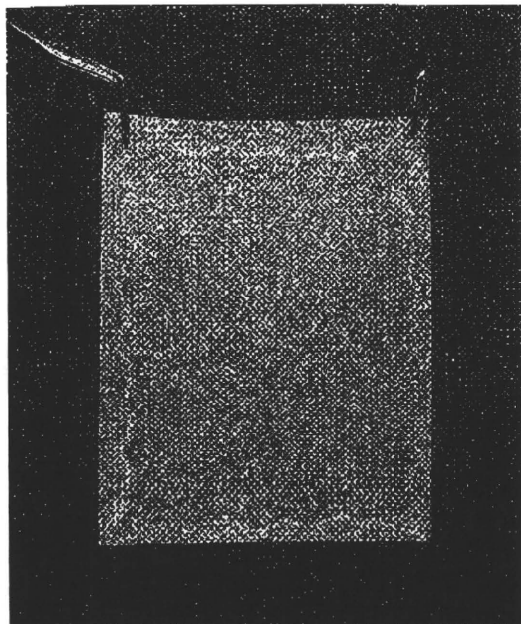


Fig. 1. 製品化された自家培養表皮。

養して使用されている。すなわち、Green型自家培養表皮は、世界中でこれまでに数千例の患者の治療に用いられている古典的な技術であり、その臨床的有用性は確立されていると考えられている。日本では2007年10月、ヒト細胞を組み込んだ最初の再生医療製品としてGreen型自家培養表皮ジェイス® (Fig. 1) が製造承認を取得した。

日本で開発されたこの製品は、フィーダー細胞として3T3-J2細胞を用い、ウシ胎児血清や増殖因子を含む培地で培養するオリジナルの製法に忠実なGreen型自家培養表皮である。製造では、患者自身の皮膚を原材料として、細胞増殖能が最大限維持されるよう最適化した条件で表皮細胞が培養される。最終製品は、培養フラスコからはく離れた細胞シートを無菌的にパッケージした状態で輸送され、医療現場で開封して取り出したものをそのまま移植できるような利便性も備えている。さらに、生きたヒト細胞・組織が製品であることから、安全に輸送するための新たな運搬システムも開発した。

現状では、この製品の対象疾患は重篤な広範囲熱傷に限定されるものの、2009年1月からは保険適用されており、公的な保険制度で使用できる世界でもまれな再生医療製品といえる。

2. 臨床的意義

体表を隙間なく覆っている皮膚が重症熱傷などの原因により広範囲に欠損すると、体温の維持や水分の保持といった生体のホメオスタシスに重大な支障をきたし、さらに重篤な感染の危険性も加わって生命予後が不良となる。欠損した皮膚は、表皮と真皮乳頭層が協調的に修復されることによって閉鎖されるが、その治癒速度は表皮の90%以上を構成する表皮細胞の増殖能に依存する。表皮細胞の増殖能は、真皮と接する表皮基底層に存在する

表皮幹細胞とその娘細胞である transient amplifying cell が原動力である。基底層の表皮細胞が増殖するに従って、有棘層、顆粒層と体外層に移動し、脱核とケラチン線維を内包する角化によって、物理的・化学的に強固な角質層を形成した後、体外に落屑する。

基底層に存在する表皮幹細胞の起源は、表皮から真皮に侵入している毛包のバルジ領域から供給されることが知られている⁸⁾。したがって、真皮がほぼ無傷のI度熱傷や、真皮が残存する浅達性II度熱傷のような軽度の熱傷創の場合は、保存的治療でも毛包から供給される表皮幹細胞によって速やかに表皮化される。しかし、真皮深部にまで損傷が及ぶ深達性II度熱傷や、真皮が消失したIII度熱傷の場合は、残存する毛包がないため自然治癒することはない。このような場合は、自家植皮によって皮膚の再建を行う必要がある。しかし、受傷面積が広範囲にわたる重症熱傷では、自家植皮のための患部部位が十分に確保できず、十分な治療を行うことが困難である。そのため、患者自身の皮膚小片から表皮細胞シートを多量に培養して移植すれば、救命に寄与することが期待される。

3. 自家培養表皮の性能

製品化されたGreen型自家培養表皮の対象疾患は、深達性II度熱傷創とIII度熱傷創の合計が体表面積の30%以上を占める重症熱傷患者に限定されている。医療機関からの連絡を起点として、採皮日、移植日、移植回数および移植枚数等の移植計画を策定し、その情報をもとに採皮面積が決定される。次いで皮膚組織採取セットが医療機関に届けられ、受傷部位から離れた箇所から採取した正常皮膚をチューブに入った組織保存液に浸漬させる。保存された皮膚は、専用の断熱輸送容器に封印され、製造施設に運ばれて細胞培養が開始される。

患者自身の数 cm^2 の皮膚組織から、酵素処理によって数百万個の細胞を単離することができる。回収した細胞を、放射線照射して作製された3T3-J2細胞のフィーダー細胞に播種し、ウシ胎児血清や増殖因子、抗生物質等を添加した培地で培養すると表皮細胞が選択的に増殖する。細胞数に応じて継代培養を行い、最短2週間程度培養すると体表の約10%、3~4週間の培養で体表全面をすべて覆う面積の表皮細胞シートを製造することができる (Fig. 2)。

Green型培養表皮は培地にウシ胎児血清を含む高 Ca^{2+} で培養されるため、表皮細胞の分化が進行する。しかし、それと同時にフィーダーと共培養することによって高い細胞増殖能が維持されることが大きな特長である。その結果、表皮細胞は播種直後から重層化した明確なコロニーを形成し、培養によって増殖して拡大したコロニーが連結し、創傷治癒に類似した経過でフラスコ培養面を覆い、コンフルエントに到達する。この培養法では、細胞増殖と同時に細胞間のデスモソーム結合が発達するため、*Bacillus polymyxa* が産生する中性プロテ

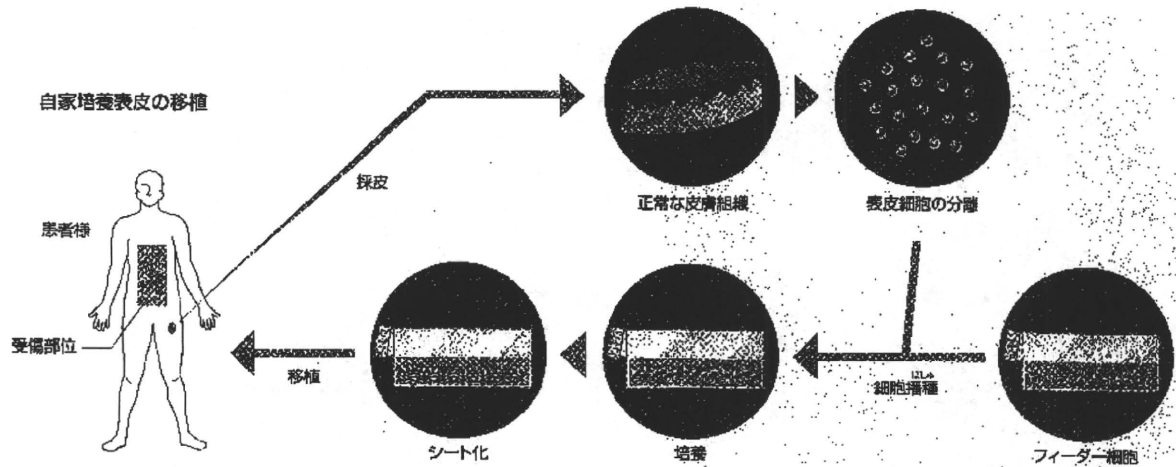
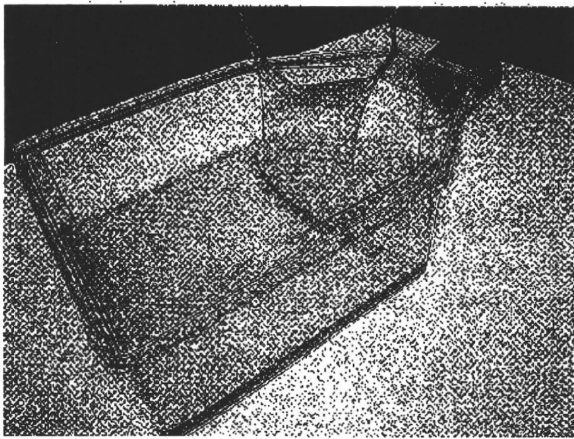
Fig. 2. ジェイス[®]の製造

Fig. 3. フラスコからはく離された細胞皮シート。

アーゼであるディスパーゼを用いて、フラスコ培養面と表皮細胞の間のヘミデスモソーム結合を選択的に消化することによって、細胞シートとしてはく離することができる (Fig. 3)。

はく離した表皮細胞シートは非常に薄く、そのままでは取り扱いが困難である。そのため、医療用不織布ガーゼでできたキャリアの片面に細胞シートを付着させた状態で、さらに同様のガーゼでカバーし、保存液とともに無菌的にパッケージされている (Fig. 4)。

最終製品は、ウシ胎児血清や抗生物質等の培地成分を除去するために、出荷前に十分な洗浄工程が行われているため、医療現場では洗浄することなく直接患部に移植することができる。

Green 型培養表皮の細胞シートは薄いもののピンセットで掴むことが可能な弾力性を有しており、キャリアから移植床に移すことができる。移植操作では、キャリアとともに懸架した細胞シートを創面に接地する方向で置くと、培養表皮の基底層側が移植床と密着する。その後、キャリアに折り上げた細胞シートを広げ、キャリアを取り除いて細胞シートのみを創面に静置させる。移植後は、ワセリンガーゼ等で患部を覆って湿潤状態に保つと、移植された患者自身の細胞が増殖を開始し、正常な

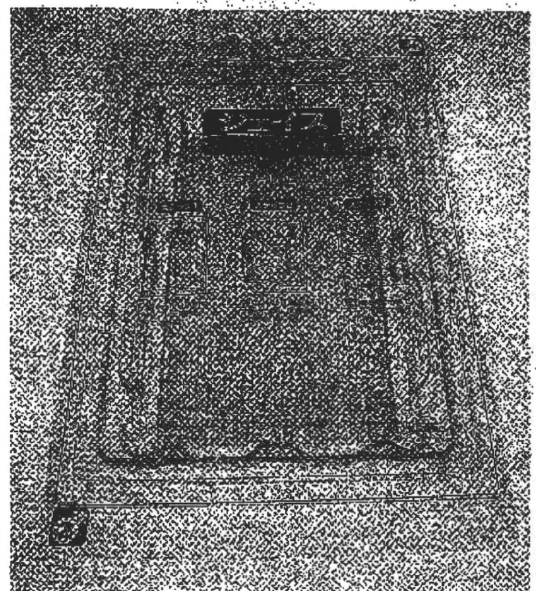


Fig. 4. 製品パッケージ。

表皮細胞の turn over に従って基底層から有棘層、顆粒層、角質層が形成され、免疫拒絶されことなく生着し創閉鎖に至る⁹⁾。

創の閉鎖に寄与するのは、重層化した細胞シート全体ではなく、あくまで細胞シートの基底層に存在する表皮幹細胞が主体と考えられる。したがって、細胞シート移植というより、幹細胞移植の表現に近い。したがって移植する表皮細胞シートは、生体の表皮のように細胞が厚く重層化している必要はなく、表皮幹細胞を運搬するための最低限の厚みで良い。仮に長期培養や気液界面培養を行えば、生体の表皮と同様の厚い角質層を有した表皮細胞シートを作製することも可能であるが、その場合、細胞が分化方向に進行して増殖能が著しく低下するため、好ましくない。Green 型培養表皮の性能には、製造工程における細胞培養の質が最も重要である。すなわち、製造工程では、毛包や表皮基底層に存在する表皮幹細胞を確実に回収し、分化・脱落させることなく、常に clonal conversion を確認した培養系を維持する必要がある。

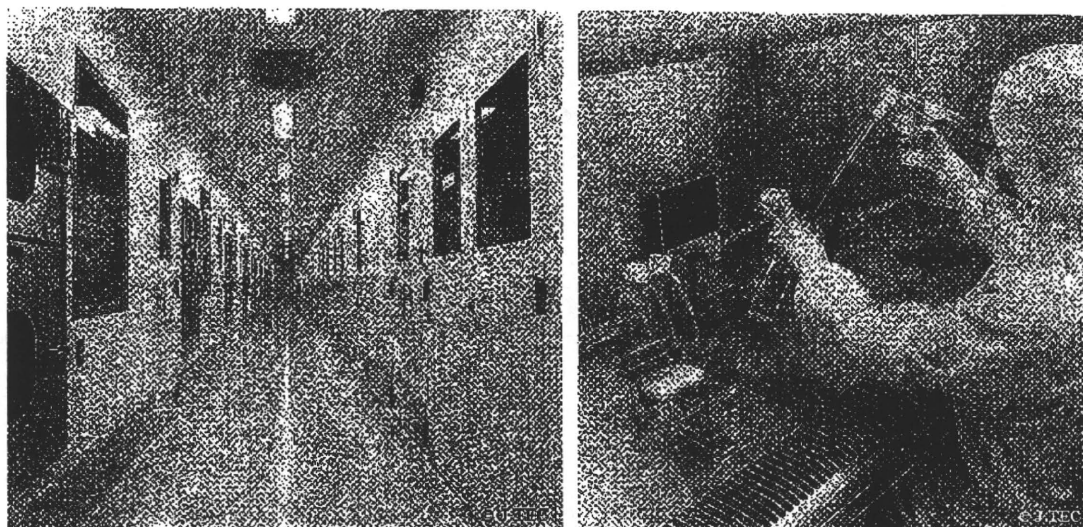


Fig. 5. 再生医療専用の製造施設。

Green型培養表皮の生着率は、対象となる移植床の状態に大きく影響する。一般的に、Green型自家培養表皮の生着率は、真皮が残存している創へ移植した場合は100%近いが、筋膜や脂肪層にはほとんど生着しないことが知られている。そこで、III度熱傷のような真皮の存在しない全層欠損では、あらかじめ屍体皮膚や新鮮同種皮膚を移植して、移植に必要な真皮層を構築しておく必要がある。同種移植によって創面の感染を抑制しつつ、移植2週間程度で免疫拒絶によって脱落する表層を薄く削除してできた真皮様組織の上に表皮細胞シートを移植すると、真皮が残存している創と同様に高い生着率を得ることができる^{10), 11)}。重症熱傷患者は免疫寛容状態であり、同種皮膚を移植しても2週間程度は拒絶反応による脱落がないため、その間にGreen型培養表皮を製造することができる。また、コラーゲンスポンジ等の人工真皮で治療した真皮様組織の上には、自家培養表皮が十分に生着しないとこれまで考えられてきたが^{12), 13)}、ドレーン孔タイプの人工真皮で構築した成熟した肉芽の上には比較的良好的な生着が認められている。

4. 製品開発

患者自身の細胞を用いた移植用の培養組織（臓器）を製品化するためには、細胞の特性を定量的に解析し、製品の有効性と安全性に関する厳密な出荷規格を設定することが求められる。それには、臓器の性能要件、安全性要件、それを確認する出荷項目、またそれを担保する規格値について、新たに策定し規制当局の承認を得る必要がある。それ以外にも、医療製品として常に安定供給するために、製造法の確立、利便性の高いパッケージの開発、製造施設の建設、また輸送のシステムの構築等を行った。

製品開発にあたり、開発者のGreenからフィーダー細胞として用いる3T3-J2細胞の分譲を受け、製造用のセルバンクを作製した。培養手技に関しては、イタリアのDe Lucaから品質評価を含めた技術移転を受けた¹⁴⁾。ま

た、年齢や採取部位等、由来の異なるヒト皮膚組織を原材料としても、すべての規格を満たす製品を安定して製造するために、複雑な培養操作を標準化した。

特性解析のための基礎研究や製造工程の標準化には、数多くの研究用ヒト皮膚組織を用いる必要がある。そのため、医療機関から外科手術で余剰となった150検体を超える廃棄皮膚を研究用に受け入れた。再生医療製品の開発には、基礎研究の段階から医療機関の協力が不可欠である。

製品の製造から品質管理、梱包、輸送までを集中的に行うために、再生医療専用の製造施設を建設した(Fig. 5)。そこでは無菌的な清潔環境を維持する陽圧管理と、ヒト組織をバイオハザードとして取り扱う陰圧管理を両立した環境が常に維持されている。その施設内でバリデーションされた機器を用いて、一定の品質の最終製品が継続的に製造できることを検証し、当局の査察を受け入れた結果、再生医療製品を製造できる日本初のGMP (Good Manufacturing Practice) 施設の適合を受けた。

本製品の貯蔵温度は10~25℃と厳密である。また、製品の有効期限はパッケージが完了してから56時間と非常に短いため、医療機関に速やかに輸送する運搬手段を構築する必要があった。輸送容器を通常の交通機関に載せるには、電気をを用いた能動的な温度制御ができない。そのため軽量真空断熱パネルと保温剤を使用して、過酷な条件下でもほぼ一定の温度が保たれる特殊な断熱輸送容器を新たに開発した。製品の輸送については、飛行機輸送も含めて運搬業者と特別に契約して経路を確保した。

5. 有効性と安全性の評価

製品の有効性と安全性を評価するために、Table 1に示す試験を特性解析として行った。目的細胞である表皮細胞の純度を工程で追跡するとともに、最終製品に必要な生細胞数を規定した。また、原材料である皮膚由来の不純物として表皮細胞以外の混在細胞を解析すると

ともに、製造工程に由来する不純物として培地添加物、抗生物質、フィーダー細胞やウシ胎児血清等の残留量を定量した。

開発した製品には、特性解析に基づいた製品規格が設定されている (Table 2)。特性解析や製品規格に関する試験に関しては、日本薬局方に掲載されている場合はその試験法に従い、製品特有の試験の場合には添加回収試験、特異性や直線性、範囲、真度、精度、検出限界などのバリデーション試験を行い、科学的妥当性を有した試験系を確立した。

細胞培養工程における染色体への影響や造腫瘍性の否定に関しては、Table 3 に示す三つの試験を行って安全

性を評価した。

また、培養工程で用いる 3T3-J2 細胞は、構築したセルバンクについて、ガイドラインに従った試験を行った^{15), 16)} (Table 4)。3T3-J2 細胞はマウス由来であることから異種移植に関する指針に従い、調製したフィーダー細胞について、レトロウイルス否定試験を行うとともに¹⁷⁾、別途フィーダー細胞の生存期間を測定した。

培養工程で使用するウシ胎児血清については、ウシ由来物を使用する際の安全性を定めたガイドラインに従った検査を行った¹⁸⁾。さらに、トレーサビリティの確認のために血清の製造施設を現地査察するとともに、未知のウイルスのリスクを想定してγ線照射した血清を、ロットチェックしたうえで使用している。

製造工程では、ウシ由来血清、マウス由来 3T3-J2 細胞、ブタ由来トリプシンといった異種由来物を用いているため、アレルギーの観点から、移植後のアナフィラキシー反応に注意して使用することが義務づけられている。

Table 1. 代表的な特性解析試験。

・連続継代試験	・洗浄効率確認試験
・コロニー形成能試験	・細胞凍結解凍確認試験
・表皮細胞含有量定量試験	・マイコプラズマ否定試験
・含有細胞種定量試験	・無菌試験
・サイトカイン産生定量試験	・エンドトキシン定量試験
・フィーダー細胞残存定量試験	・強度試験
・残留抗生物質定量試験	・保存温度設定試験
・残留ウシ胎児血清定量試験	・保存安定性試験
・残留培地添加物定量試験	・長期保存試験
・外観および細胞形態確認試験	

Table 3. 染色体への影響や造腫瘍性の否定に関する試験。

・核型分析試験
・軟寒天コロニー形成試験
・ヌードマウスを用いた移植試験

Table 2. 製品規格の概要。

【受け入れ検査】	【出荷検査】
・組織運搬状況の確認検査	・生歯効試験
・皮膚組織の外観検査	・マイコプラズマ否定試験
【工程検査】	・外観検査
・3T3-J2 細胞の形態観察	・エンドトキシン試験
・フィーダー細胞の形態観察	・生細胞密度確認試験
・表皮細胞の形態観察	・生細胞率確認試験
・細胞増殖能の確認試験	・ウシ血清アルブミン残留量確認試験
・解凍播種時の生細胞率確認試験	・フィーダー細胞残存率確認試験
・剥離・洗浄作業における物性検査	・表皮細胞含有率確認試験
	・物性試験
	【確認検査】
	・マイコプラズマ否定試験
	・無菌試験

Table 4. 3T3-J2 細胞のセルバンクで実施した試験。

	マスターセルバンク	ワーキングセルバンク	CAL*	フィーダー細胞
・アイソザイム分析	○	○	—	—
・核型分析	○	—	○	○
・軟寒天コロニー形成試験	○	—	○	—
・無菌試験	○	○	○	—
・マイコプラズマ否定試験	○	○	○	—
・ウイルス試験				
感染性試験：延長 S ⁻ L ⁻ アッセイ	○	—	○	○
：延長 XC プラークアッセイ	○	—	○	○
電子顕微鏡観察	○	—	○	○
逆転写酵素活性試験	○	—	○	○
Vero 細胞等を用いた <i>in vitro</i> 試験	○	—	○	—
モルモット、ニワトリ受精卵等を用いた <i>in vivo</i> 試験	○	—	○	—
マウス抗体産生試験	○	—	—	—
ウシ由来送ウイルス試験	○	—	—	—

*CAL: 設定した継代回数を超えて培養した継代数の細胞

6. 同種培養表皮への展開

再生医療製品には、患者自身の細胞を用いる自家と、他人の細胞を用いる同種がある。自家と同種は混同されることも多いが、この二つは全く異なったコンセプトを持った製品開発が必要である。

今回開発した製品は患者自身の細胞を原材料とした自家培養表皮であるが、他人の細胞を用いれば同種培養表皮が製造できる。同種培養表皮は永久生着しないものの^{19), 20)}、表皮細胞が分泌する TGF α 、VEGF、IL-6 などの生理活性物質による創傷治癒効果が期待でき、II 度熱傷や癬瘡、採皮創などに対する有用性が報告されている²¹⁾。同種培養表皮の有効性は、同種の細胞が産生する増殖因子に依存し、免疫拒絶によって脱落するまでの間、創傷治癒を促進させることにある。したがって、優れた細胞増殖能やサイトカイン等の産生能を期待して、セルソースとして新生児の包皮が用いられることが多い。

自家細胞を用いる製品は自己完結的で新たな感染のリスクがないため、原則としてドナースクリーニングは必要ではない。それに対して、同種細胞を原材料とする場合は、不特定多数の患者に使用されることから、安全性確保に留意する必要がある。同種細胞のセルソースが未知の感染症を有していた場合には、必ず感染が伝播するため、TSE（伝染性海綿状脳症）等の異種のリスクを上回る可能性も否定できない。この点から、同種細胞を用いた再生医療製品の实用化には、自家細胞を用いた製品よりも高いハードルが存在する。

7. 白斑への応用

Green 型自家培養表皮は、重症熱傷以外にも癬瘡や潰瘍、採皮創、白斑、母斑など多様な皮膚疾患に有効であることが知られている^{22)~25)}。重症熱傷を対象とした本製品は、製造工程で表皮細胞の増殖速度に合わせた継代培養を行うため、メラノサイトがほとんど含まれていない。しかし、毛包のバルジ下領域付近にはメラノサイト幹細胞が存在していることから²⁶⁾、メラノサイトを維持した Green 型自家培養表皮の作製も可能であり、白斑に

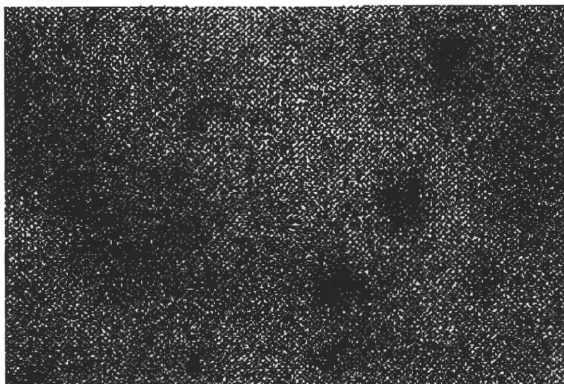


Fig. 6. メラノサイトを維持した Green 型培養表皮の顕微鏡像。

対する優れた臨床成績が報告されている^{27), 28)}。すでに我々は、正常皮膚に近い密度でメラノサイトを維持した Green 型自家培養表皮の製造法について標準化を完了しており (Fig. 6)、白斑を対象とした製品開発に着手している。

メラノサイトを維持した Green 型自家培養表皮は、進行性ではない尋常性白斑や、部分的なメラノサイト欠損が先天性に発生する限局性白皮症（斑症）が良い適応となる。患部の表皮をレーザーで蒸散させてから、メラノサイトを含む表皮細胞シートを移植すると、1回の治療で広範囲の患部を治療することができる^{29)~31)}。

8. その他の再生医療の開発と課題

日本では、最初に Green 型自家培養表皮が製品化されたが、次いで、自家培養軟骨や自家培養角膜上皮が開発途中にある。

表皮細胞は高い増殖能を有するものの、表皮の厚さは 0.2 mm 程度であり、栄養や酸素の供給は真皮毛細血管からの拡散に依存している。また、軟骨は比較的耐久性が高いものの、軟骨細胞の増殖能が低いため、加齢による疲弊や外傷性欠損が発生すると自然治癒しない。軟骨組織は、まばらに存在する細胞が産生する堅牢なマトリックスで構成されており、血管系が存在しない。角膜は細胞増殖能の高い角膜上皮細胞で覆われて透明性を維持しているが、何らかの原因で角膜上皮幹細胞が障害されて血管を伴った結膜上皮細胞が進入すると、角膜移植を行っても視力は回復しない。角膜組織にも血管はなく、涙液や角膜と結膜の境界の輪部といわれる部位の毛細血管から栄養が供給され、酸素は外気中から直接取り入れることができる。

すなわち、表皮、軟骨や角膜には、血管系が存在しない組織という共通点があり、再生医療による製品化に適しているといえる。今後、組織工学の進歩によって血管系を有した大型の培養臓器の開発が望まれる。

9. おわりに

世界では、Green 型培養表皮の新たな展開として、先天性表皮水疱症患者の原因タンパク質であるラミニン 332 遺伝子を表皮細胞に導入して移植する試みがすでに始まっている^{32), 33)}。再生医療は、将来的に遺伝子治療と密接に連携して進歩するものと期待されている。

一方、日本では、Green 型培養表皮製品の使用は重篤な広範囲熱傷患者に限定されたうえ、保険制度の中で使用するには枚数制限が設けられている。さらに、使用した全症例について市販後調査が義務づけられており、製品の有用性が厳密に再評価されている段階である。

参考文献

- 1) O'Connor, N. E., Mulliken, J. B., Banks-Schlegel, S., Kchinde, O., Green, H.: Grafting of burns with cultured

- epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet* 1(8211): 75-78, 1981.
- 2) Rheinwald, J. G., Green, H.: Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*, 6: 331-343, 1975.
 - 3) Green, H., Kchinde, O., Thomas, J.: Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76: 5665-5668, 1979.
 - 4) Gallico, G. G. 3rd, O'Connor, N. E., Compton, C. C., Kchinde, O., Green, H.: Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N. Engl. J. Med.*, 311: 448-451, 1984.
 - 5) Odessey, R.: Addendum: multicenter experience with cultured epidermal autograft for treatment of burns. *J. Burn. Care Rehabil.*, 13: 174-180, 1992.
 - 6) 井家益和, 大須賀俊裕: 人工皮膚. *人工臓器*, 32: 224-227, 2003.
 - 7) 井家益和, 大須賀俊裕: 皮膚再生医療の最前線. *老年医学*, 41: 1785-1790, 2003.
 - 8) Oshima, H., Rochat, A., Kedzia, C., Kobayashi, K., Barrandon, Y.: Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell*, 104: 233-245, 2001.
 - 9) Green, H.: Cultured cells for the treatment of disease. *Sci. Am.*, 265: 96-102, 1991.
 - 10) Cuono, C., Langdon, R., McGuire, J.: Use of cultured epidermal autografts and dermal allografts as skin replacement after burn injury. *Lancet*, 1(8490): 1123-1124, 1986.
 - 11) Cuono, C. B., Langdon, R., Birchall, N., Bartelbort, S., McGuire, J.: Composite autologous-allogeneic skin replacement: Development and clinical application. *Plast. Reconstr. Surg.*, 80: 626-637, 1987.
 - 12) 鳥山和宏, 斎藤 望, 鳥居修平, 皇賢一郎, 上田 実: われわれの培養表皮移植の現状: 培養表皮の生着と移植床. *日本災害医学会誌*, 43: 111-117, 1995.
 - 13) 熊谷憲夫, 大島秀雄: 培養表皮の臨床応用. *外科診療*, 37: 67-71, 1995.
 - 14) De Luca, M., Albanese, E., Bondanza, S., Megna, M., Ugozzoli, L., Molina, F., Cancedda, R., Santi, P. L., Bormioli, M., Stella, M., et al.: Multicentre experience in the treatment of burns with autologous and allogeneic cultured epithelium, fresh or preserved in a frozen state. *Burns*, 15: 303-309, 1989.
 - 15) 厚生省医薬安全局審査管理課長通知: 「ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価」について. 平成12年2月22日 医薬審第329号
 - 16) 厚生省医薬安全局審査管理課長通知: 「生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)製造用細胞基材の由来, 調製および特性解析」について. 平成12年7月14日 医薬審第873号
 - 17) 厚生労働省医政局研究開発振興課長通知: 「異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針」に基づく3T3J2および3T3NIH株をフィーダー細胞として利用する上皮系の再生医療への指針について. 平成16年7月2日 医政研発第0702001号
 - 18) 厚生省医薬安全局長通知: ウシ等由来物を原料として製造される医薬品等の品質および安全性確保について. 平成12年12月12日 医薬発第1226号
 - 19) Burt, A. M., Pallett, C. D., Sloane, J. P., O'Hare, M. J., Schafner, K. F., Yardeni, P., Eldad, A., Clarke, J. A., Gusterson, B. A.: Survival of cultured allografts in patients with burns assessed with probe specific for Y chromosome. *BMJ*, 298: 915-917, 1989.
 - 20) Brain, A., Purkis, P., Coates, P., Hackett, M., Navsaria, H., Leigh, I.: Survival of cultured allogeneic keratinocytes transplanted to deep dermal bed assessed with probe specific for Y chromosome. *BMJ*, 298: 917-919, 1989.
 - 21) Yanaga, H., Udoh, Y., Yamauchi, T., Yamamoto, M., Kiyokawa, K., Inoue, Y., Tai, Y.: Cryopreserved cultured epidermal allografts achieved early closure of wounds and reduced scar formation in deep partial-thickness burn wounds (DDB) and split-thickness skin donor sites of pediatric patients. *Burns*, 27: 689-698, 2001.
 - 22) 熊谷憲夫: 創傷治療における培養表皮の利用. *医学のあゆみ*, 200: 243-246, 2002.
 - 23) 片平次郎, 副島 孝, 磯野伸雄, 仲沢弘明, 佐々木健司, 野崎幹弘: 自家培養表皮移植の臨床成績: 当科における培養表皮移植の臨床成績. *形成外科*, 43: 547-555, 2000.
 - 24) 矢永博子: 皮膚の組織工学の現状と未来 21世紀への課題; 生着率の向上. *医学のあゆみ*, 196: 351-355, 2001.
 - 25) Ueda, M., Sumi, Y., Mizuno, H., Hata, K.: Clinical results of cultured epithelial grafting delivered by bio-skin bank system-the Nagoya experiences. *Mater. Sci. Eng.*, C6: 211-219, 1998.
 - 26) Nishimura, E. K., Jordan, S. A., Oshima, H., Yoshida, H., Osawa, M., Moriyama, M., Jackson, I. J., Barrandon, Y., Miyachi, Y., Nishikawa, S.: Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature*, 416: 854-860, 2002.
 - 27) Kumagai, N., Uchikoshi, T.: Treatment of extensive hypomelanosis with autologous cultured epithelium. *Ann. Plast. Surg.*, 39: 68-73, 1997.
 - 28) Guerra, L., Capurro, S., Melchi, F., Primavera, G., Bondanza, S., Cancedda, R., Luci, A., De Luca, M., Pellegrini, G.: Treatment of "stable" vitiligo by Timedsurgery and transplantation of cultured epidermal autografts. *Arch. Dermatol.*, 136: 1380-1389, 2000.
 - 29) Guerra, L., Primavera, G., Raskovic, D., Pellegrini, G., Golisano, O., Bondanza, S., Paterna, P., Sonogo, G., Gobello, T., Atzori, F., Piazza, P., Luci, A., De Luca, M.: Erbium: YAG laser and cultured epidermis in the surgical therapy of stable vitiligo. *Arch. Dermatol.*, 139: 1303-1310, 2003.
 - 30) Toriyama, K., Kamei, Y., Kazeto, T., Yasue, T., Suga, Y., Inoue, M., Tomita, Y., Torii, S.: Combination of short-pulsed CO₂ laser resurfacing and cultured epidermal sheet autografting in the treatment of vitiligo: A preliminary report. *Ann. Plast. Surg.*, 53: 178-180, 2004.
 - 31) 鳥山和宏: 培養表皮移植による白癩治療. *再生医療と美容* (上田 実編), 南山堂, 東京, 2007, pp. 53-61.
 - 32) Ferrari, S., Pellegrini, G., Matsui, T., Mavilio, F., De Luca, M.: Gene therapy in combination with tissue engineering to treat epidermolysis bullosa. *Experi. Opin. Biol. Ther.*, 6: 367-378, 2006.
 - 33) Mavilio, F., Pellegrini, G., Ferrari, S., Di Nunzio, F., Di Iorio, E., Recchia, A., Maruggi, G., Ferrari, G., Provasi, E., Bonini, C., Capurro, S., Conti, A., Magnoni, C., Giannetti, A., De Luca, M.: Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells. *Nat. Med.*, 12: 1397-1402, 2006.