

201206006A

厚生労働科学研究費補助金
再生医療実用化研究事業

ヒト胚性幹細胞をドナー細胞とする再生医療の
汎用性向上のための基盤技術の創成

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 梅澤 明弘

平成25（2013）年4月

厚生労働科学研究費補助金
再生医療実用化研究事業

ヒト胚性幹細胞をドナー細胞とする再生医療の
汎用性向上のための基盤技術の創成

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 梅澤 明弘

平成25（2013）年4月

目 次

I. 総括研究報告書		
ヒト胚性幹細胞をドナー細胞とする再生医療の汎用性向上のための 基盤技術の創成	梅澤 明弘	3
II. 分担研究報告書		
1. 米国 FDA の再生医療分野におけるオーファン関連規制に関する 調査研究	佐藤 陽治	19
2. 霊長類 ES 細胞の多能性維持機構, 自己複製能に関する基盤研究	末盛 博文	28
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		31
VI. 研究成果の刊行物・別刷り		35
V. 参考資料		165

I. 総括研究報告書

ヒト胚性幹細胞をドナー細胞とする再生医療の汎用性向上のための 基盤技術の創成（H23-再生-一般-004）

研究代表者：梅澤 明弘

独立行政法人国立成育医療研究センター 生殖・細胞医療研究部長

研究要旨：細胞・組織加工医薬品等による再生医療は、ヒトの臓器や組織の確保が難しいわが国の医療状況下において強く期待されており、研究の進歩に伴う技術的な実現可能性の高まりとともに、医療としての実用化を望む声がますます強くなっている。その中で、わが国をあげて再生医療の実用化に向けた動きが急速に進められており、特にヒト由来の多能性幹細胞、すなわち間葉系幹細胞、胚性幹細胞（ES細胞）、人工多能性幹細胞（iPS細胞）について、近い将来に予想される製品の評価を円滑に進めるための準備を早期に行う必要がある。各種幹細胞の実用化のために必要な要件を開発初期から示すことは、これらをより迅速に実用化するために必須である。本研究では原材料及び製造関連物質、製造工程、加工した細胞の特性解析、最終製品の形態・包装、製造方法の恒常性及び妥当性、製造方法の変更、製造施設・設備の概要、感染性物質の安全性評価、最終製品の品質管理法、試験方法のバリデーション、規格及び試験方法の妥当性、試験に用いた検体の分析結果、細胞・組織加工医薬品の非臨床安全性試験、細胞・組織加工医薬品等の効力又は性能を裏付ける試験、細胞・組織加工医薬品等の体内動態、臨床試験に関して詳細に検討し、細胞医療の安全性及び有効性に関するデータの蓄積と周辺基盤技術を構築する。本年度は、再生医療早期実用化に資することを目的とし、乳児期に発症する重篤な先天性代謝異常症の一つであるムコリピドーシス II 型の治療薬として代表研究者が現在開発中のヒト ES 細胞製剤 ICES をモデルケースとして上記の観点に基づいて研究を実施した。

研究分担者

佐藤陽治（国立医薬品食品衛生研究所 室長）
末盛博文（京都大学 准教授）

A. 研究目的

細胞・組織加工医薬品等による再生医療は、ヒトの臓器や組織の確保が難しいわが国の医療状況下において強く期待されており、研究の進歩に伴う技術的な実現可能性の高まりとともに、医療としての実用化を望む声がますます強くなっている。その中で、わが国をあげて再生医療の実用化に向けた動きが急速に進められており、特にヒト由来の多能性幹細胞、すなわち間葉系幹細胞、胚性幹細胞（ES細胞）、人工多能性幹細胞（iPS細胞）について、近い将来に予想される製品の評価を円滑に進めるための準備を早期に行う必要がある。各種幹細胞

の実用化のために必要な要件を開発初期から示すことは、これらをより迅速に実用化するために必須である。「細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確認申請記載要領」（薬食審査発 0420 第 1 号、平成 22 年 4 月 20 日）をベースとし、本年度に通知された「ヒト ES 細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針（薬食発 0907 第 6 号、平成 24 年 9 月 7 日）」を参考にして、ES 細胞の安全性・有効性に関する検討を行う。具体的には原材料及び製造関連物質、製造工程、加工した細胞の特性解析、最終製品の形態・包装、製造方法の恒常性及び妥当性、製造方法の変更、製造施設・設備の概要、感染性物質の安全性評価、最終製品の品質管理法、試験方法のバリデーション、規格及び試験方法の妥当性、試験に用いた検体の分析結果、細胞・組織加工医薬品の非臨床安全性試験、細胞・組織加工医薬品等の効力又は性能

を裏付ける試験、細胞・組織加工医薬品等の体内動態、臨床試験に関して詳細に検討し、細胞医療の安全性及び有効性に関するデータの蓄積と周辺基盤技術を構築する。特に小児難治性疾患（特に先天性代謝異常症）に対する再生移植療法応用を視野に入れた早期実用化に資することを目的とする。

B. 研究方法

B-1 原材料及び製造関連物質、製造工程、加工した細胞の特性解析

臨床試験研究及び細胞・組織加工医薬品製造に提供できる新たなES細胞の培養を行う。特に、幹細胞を未分化状態に保つための維持培養に必須の要素について検討を行う。

B-2 細胞・組織加工医薬品の非臨床安全性試験

ヒトES細胞株に関して感染症について検査し、否定試験を行う。

B-3 ヒトES製剤の製造方法

ヒトES製剤の製造方法について検討を行う。

B-4 ES製剤の効力または性能

細胞及び動物等を用いて細胞・組織加工医薬品としての効力又は性能を裏付ける試験を行う。

(倫理面への配慮)

1. ES細胞に関する倫理

国立成育医療研究センターでは「ヒトES細胞の樹立及び分配に関する指針」（文部科学省告示第156号、平成21年8月21日）及び「ヒトES細胞の使用に関する指針」（文部科学省告示第157号、平成21年8月21日）に基づき、ヒトES細胞に関する医学研究が適性に行われるよう、ヒトES細胞研究倫理審査委員会が組織されている。ヒトES細胞研究に関する各種規程（「ヒトES細胞研究倫理審査委員会規程」、「ヒトES細胞樹立に関する規程」、「ヒトES細胞分配に関する規程」、「ヒトES細胞使用に関する規程」）も整備され、機関全体として生命倫理及び医の倫理に基づき適切に行う。

国立成育医療センターヒトES細胞研究倫理審査委員会：<http://www.ncchd.go.jp/essaibou/es.htm>

申請者らは、当該センターが定期的（年2回以上）に開催している生命倫理に関する講演を受講し、適切な生命倫理観をみにつけ常に配慮し研究を実施する。

国立成育医療研究センター（機関内番号ES倫2）
文部科学大臣確認番号：18 諸文科振第 832 号

2. ヒト細胞を用いることに対する倫理的配慮

本研究では、ヒト由来細胞および実験動物を用いた研究が予定されている。機関の外部委員を含めた倫理審査委員会において生命倫理、安全管理を厳重に審査する。倫理委員会の承認かつ実施施設の長の許可を得て、全ての研究を遂行する。国立成育医療センター研究所においては、ヒト間葉系細胞の培養に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている（国立成育医療研究センター受付番号 49、平成15年10月承認、受付番号55、平成16年11月追加承認、受付番号146、平成17年4月承認、受付番号156、平成17年7月承認、受付番号197、平成18年6月承認、受付番号201、237、238、平成19年6月承認）。また、それぞれの組織については倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想され、「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針」（厚生労働省告示第380号、平成22年11月1日全部改正）に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮する。なお、研究協力者に倫理専門家を加え、本研究遂行にあたって新たな倫理的問題が生じないように、常にモニタリングを行い、必要に応じて意見交換を行う予定である。

3. 実験動物を用いることに対する倫理的配慮

実験動物を用いる研究については、国立成育医療研究センター動物実験指針に準拠して研究を実施する（承認番号2003-002,2005-003）。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と

相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

C. 研究結果

C-1 起源又は発見の経緯

ムコリピドーシス II 型は、ライソゾーム酵素の細胞内輸送に必須であるマンノース 6-リン酸(M6P)修飾酵素の欠損または活性低下によって 40 種類以上のライソゾーム酵素がライソゾームに正常に輸送されなくなる結果、多くのライソゾーム酵素の基質がライソゾーム内に蓄積し、多くは乳幼児期に死亡する非常に重篤な疾患である。患者の代謝障害に関連する全身性の機能低下を改善するためには、正常なライソゾーム酵素群が持続的に補給され続けることが必要であるが、現在確立された有効な治療法は存在しない。私共はヒト ES 細胞から形成される奇形腫がライソゾーム酵素の供給源として十分であることや安全性、安定性においてもムコリピドーシス II 型の治療に有効であるとの見通しを立て、本品の開発を進めている。

C-2 原材料及び製造関連物質、製造工程、加工した細胞の特性解析

既に、樹立されたヒト ES 細胞を用いた。臨床試験研究に提供する新たな ES 細胞の培養工程に関する検討を行った。ES 細胞、フィーダー細胞ならびに必須液性因子からなる閉鎖系培養ユニットの開発に着手し、特に培養に使用する試薬類、細胞剥離に使用する薬剤、細胞凍結に使用する薬剤についての洗い出しを行い、医薬品製造の原材料としての適格性を検討した。来年度以降に未分化度試験、細胞純度試験をパッケージとして行う予定である。

C-3 細胞・組織加工医薬品の非臨床安全性試験

ヒト ES 細胞株に関して感染症について検査し、否定試験を行った。細菌・真菌否定試験(好気性)、細菌・真菌否定試験(嫌気性)、糸状性真菌否定試験、エンドトキシン、マイコプラズマ否定試験、培養細胞ウイルス否定試験(HCV-RNA、HBV-DNA、パルボウイルス DNA、HTLV-1 プロウイルス DNA、HIV-1 プ

ロウイルス DNA) を行い、すべて陰性であった。

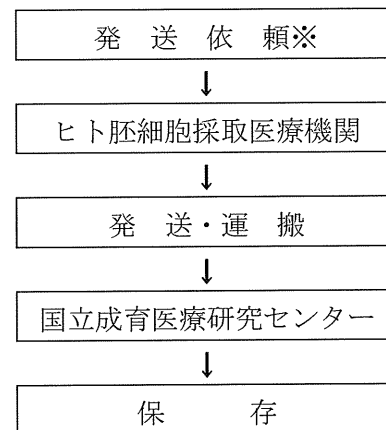
C-4 ICES の製造方法

C-4-1 原材料および製造関連物質

シード細胞は独立行政法人国立成育医療研究センターにて、ヒト胚から樹立された ES 細胞(SEES2)である。使用した胚は、体外受精による不妊治療において、母体に戻されず凍結保存されている胚のうち破棄されることが決定した余剰胚である。正常なヒト胚由来細胞から作製される ES 細胞は無限に増加する特性を有しているうえに、正常な機能を有する多様な細胞への分化能をもつ細胞である。また、均質な細胞集団として大量培養が可能であり、これをバンキングすることにより長期安定して供給することが可能となる。従って、ヒト ES 細胞をシード細胞とすれば、対象疾患の治療に必要な細胞の製造を大量かつ安定的に行うことが可能である。

C-3-2 胚細胞の保存方法

医療機関で採取されたヒト胚細胞を当研究センターが受領し、適切に保存するまでのフローを以下に示す。



※体外受精による不妊治療において、母体に戻されず凍結保存されている胚のうち破棄されることが決定した余剰胚がある旨の連絡が医療機関からくると、国立成育医療研究センターでは、倫理委員会の承認のもと、その入手を決定した場合には、当該細胞の発送依頼を文書にて行う。

C-4-3 目的とする細胞以外の原材料及び製造関連物質

目的とする細胞以外のすべての原材料及び製造関連物質は、表 1.の通りである。

表 1. 目的とする細胞以外のすべての原材料および製造関連物質の一覧

	原材料名・製造関連物質名	医薬品・試薬の区別	供給元	用途
培養に使用	DMEM+ GlutaMAX™-I	試薬	Life Technologies	フィーダー
	Foetal Bovine Serum	試薬	HyClone	フィーダー
	GultaMAX™I SupplementCTS™	試薬	Life Technologies	フィーダー SEES, ICES
	MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100x)	試薬	Life Technologies	フィーダー
	KnockOut™ DMEM	試薬	Life Technologies	SEES, ICES
	KnockOut™ Serum Replacement	試薬	Life Technologies	SEES, ICES
	ビルビン酸ナトリウム	試薬	Life Technologies	SEES, ICES
	Recombinant Human FGF-basic	試薬	Life Technologies	SEES, ICES
	PBS, Dulbeccos w/o Ca, Mg	試薬	Life Technologies	フィーダー、SEES, ICES
	Recombinant Trypsin, GMP Grade	試薬	Roche	フィーダー
細胞凍結用	TC プロテクター	試薬	DS ファーマバイオテック	フィーダー
	セルバンカー3	試薬	十慈フィールド	SEES, ICES
	Y27632 (ROCK 阻害剤)	試薬	和光純薬	SEES, ICES
基質	NMP コラーゲン PS (医療用コラーゲン)	試薬	ニッポンハム	SEES, ICES
	塩酸「ヤマゼン」	医薬品	山善製薬	SEES, ICES
	(局方)大塚注射用水	医薬品	大塚製薬	SEES, ICES

目的とする細胞以外のすべての原材料及び製造関連物質の資料整備状況は表 2. の通りである。

表 2. 目的とする細胞以外のすべての原材料及び製造関連物質の資料整備の状況

原材料名・製造関連物質名	医薬品・試薬の区別	動物由来原料の有無	COA	MS DS	COO
DMEM+ GlutaMAX™-I	試薬	無	○	○	—
Foetal Bovine Serum	試薬	有	○	○	—*
GultaMAX™I SupplementCTS™	試薬	無	○	○	○
MEM	試薬	無	○	○	○

原材料名・製造関連物質名	医薬品・試薬の区別	動物由来原料の有無	COA	MS DS	COO
Non-Essential Amino Acids Solution (100x)					
Knockout™ DMEM	試薬	無	○	○	
KnockOut™ Serum Replacement	試薬	有	○	○	○
ビルビン酸ナトリウム	試薬	無	○	○	—
Recombinant Human FGF-basic	試薬	無	○	○	○
PBS, Dulbeccos w/o Ca, Mg	試薬	無	○	○	—
Recombinant Trypsin, GMP Grade	試薬	無	入手予定	入手予定	入手予定
TC プロテクター	試薬	無	○	入手予定	—
セルバンカー3	試薬	無	入手予定	入手予定	—
Y-27632	試薬	無	○	○	入手予定
NMP コラーゲン PS (医療用コラーゲン)	試薬	有	○	○	入手予定
塩酸「ヤマゼン」	医薬品	無	—	—	—
(局方)大塚注射用水	医薬品	無	—	—	—

C-4-4 ICES (及びセルバンク) の培養に使用する培地の組成

表 3. にヒト胚細胞及び ES 細胞の培養に使用する培地の組成を示す。

表 3. ヒト胚細胞 (及び ES 細胞) の培養に使用する培地の組成

成分名	分量	承認番号・規格等	供給元
KnockoutDMEM (基本培地)	80%	製品名 Knockout DMEM 規格は製造元規格による。	Life Technologies
KNOCKOUT™ Serum Replacement (血清代替物)	20%	製品名 Knockout Serum Replacement 規格は製造元規格による。	Life Technologies
ヒト bFGF (未分化維持因子)	10ng/ml	製品名 HU FGF BASIC FULL LENGTH 規格は製造元規格による。	Life Technologies
NEAA (非必須アミノ酸)	100µM	製品名 MEM 非必須アミノ酸溶液 規格は製造元規格による。	Life Technologies
ビルビン酸ナトリウム	1mM	製品名ビルビン酸ナトリウム溶液 100mM 液体 規格は製造元規格による。	Life Technologies

成分名	分量	承認番号・規格等	供給元
GlutaMAX™-I (安定型グルタミン代替品)	2mM	製品名 GULTAMAX I 200 mM 規格は製造元規格による。	Life Technologies

C-4-5 マウス胎児繊維芽細胞 (MEF) 及びフィーダー細胞の培養に使用する培地の組成

表 4. に MEF およびフィーダー細胞の培養に使用する培地の組成を示す。

表 4. MEF 及びフィーダー細胞の培養に使用する培地の組成

成分名	分量	承認番号・規格等	供給元
DMEM+ GlutaMAX™-I (基本培地)	90%	製品名 DMEM/F12 規格は製造元規格による。	Life Technologies
ウシ胎児血清 (血清)	10%	製品名 規格は製造元規格による。	Hyclone
NEAA (非必須アミノ酸)	100µM	製品名 MEM 非必須 アミノ酸溶液 規格は製造元規格による。	Life Technologies

C-4-6 原材料由来物質

残存する可能性がある原材料由来物質の種類は、以下のとおりである。

生物由来原料

- ・ KNOCKOUT™ Serum Replacement (KSR)
- ・ ウシ胎児血清
- ・ Recombinant human bFGF
- ・ 医療用コラーゲン

その他リスクレベルが高いと考えられる培地由来物質

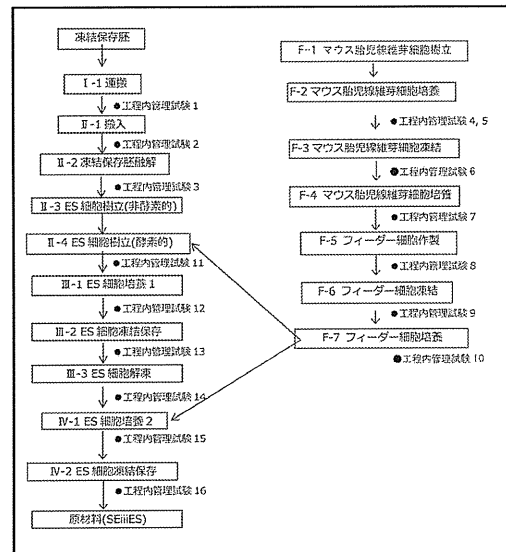
- ・ Recombinant Trypsin
- ・ セルバンカー3

リスクレベルが低いと考えられる培地由来物質

- ・ 無機塩類、糖質、アミノ酸、ビタミン類

C-4-7 原材料となる細胞の作製方法

以下に原材料となる細胞の作製のワークフローを示す。



I-1 凍結保存胚運搬工程

担当医師より第三者立ち会いのもと、凍結保存胚の入った輸送用凍結保存容器を受け取った作業者は、受領証明書に記載漏れが無いことを確認し必要事項を記載する。輸送用凍結保存容器は専用輸送ケースに静置する。適切な交通手段によって、温度-100℃以下で24時間以内に製造場所へ運搬する。

II-1 凍結保存胚搬入工程

(標準所要時間 10分)

第三者立ち会いのもと、輸送用凍結保存容器から凍結保存胚を液体窒素保存用タンク内に保存する。輸送用凍結保存容器から取り出したチューブの肉眼検査(凍結チューブ数、破損の有無、凍結液の性状)を実施する。凍結保存胚移送記録書に項目を記載する。

II-2 凍結保存胚融解工程

(標準所要時間 60分)

融解後の胚培養用プレートを準備し、CO₂ インキュベーター(37℃)に入れる。専用の凍結胚融解プロトコールに従い無菌的に行う(Cryotop Safety Thawing Kit)。全ての操作は、安全キャビネット内で行う。融解後回収した胚は胚培養用培地でCO₂ インキュベーター(37℃)内で適切な時期まで培養を行う。融解胚の性状を記載する。

II-3 ES 細胞樹立 (非酵素的) 工程

(標準所要時間 20~40 日間)

胚盤胞期まで発生した胚の内部細胞塊 (ICM) を選択的に採取し、放射線処理したマウス胎児線維芽細胞を播種した培養プレート上で ES 細胞培地下に CO₂ インキュベーター (37°C) 内で培養する。増殖してきた細胞塊を分離し新たな培養プレートで培養し細胞を増やす。その際、ES 細胞は細胞が集団を形成 (コロニー) し増殖するため、培養プレート内では複数の特徴的なコロニー群が観察される。

ステップ 1: 培養

II-3 の ICM を ES 細胞用培地 500 μ l を加えた IVF 4-well 培養プレート (以下、4-W プレートとする) に播種する。2 日目以降、毎日、各 4-W プレートの培地を ES 細胞用培地①300 培地で培地交換して、適度な大きさのコロニーに達するまで最長 14 日間培養する。

初代培養に必要な期間には個体差・サンプル差があるが、通常は初代培養開始後 7~10 日で 4-W プレート内で分離継代できる状態に達する。

4-W プレートを毎日観察することにより培養液に濁りが無いことを確認し、濁りが疑われた場合は直ちに顕微鏡下で微生物の確認を行い、「陽性」の場合には製造を中止することとする。

ステップ 2: 非酵素的継代

4-W プレート内の増殖した ICM を無菌的にガラスピペットで小片毎に分離し新たな 4-W プレートで培養する。コロニー数が 7 個/ウェル以上で 4-W プレートから 35mm プレートへ播種する。更に、良好なコロニーが 10 個/35mm プレート以上増殖する場合は、60mm プレートで培養する。増殖細胞塊を分離する全ての操作は、安全キャビネット内で行う。

II-4 ES 細胞樹立 (酵素的) 工程

(標準所要時間 30~60 日間)

35mm プレートまたは、60mm プレート内の

培地を除去し、各プレート内を PBS 液 2-4mL にて 2 度洗浄する。2.0PU (Protease Unit) /mL ディスパーゼ II 処理液を加えて 37°C で酵素処理を行う。位相差顕微鏡下で細胞が剥離し始めるのが観察された後に、ゆっくりピペット操作を行って ES 細胞様コロニー形成細胞を培養プレート底面から剥離し、細胞浮遊液を ES 細胞用培地 6-8mL の入った培養用チューブに回収する。細胞浮遊液を 800rpm、4 分間遠心後、沈渣に ES 細胞用培地 4mL を加えて細胞を浮遊し、新たなプレートで培養する。

F-1 マウス胎児線維芽細胞(MEF)樹立工程

妊娠マウスより、13 日齢胎仔を剖出する。実体顕微鏡下でハサミ、ピンセットを用いて胎仔の頭部および内臓を切除する。残りの組織を新しい Dish に移し、Recombinant trypsin 処理液を胚 2 胚/500 μ L 加えて、37°C で酵素処理を行う。大部分が懸濁状態になった後に MEF 培地を 5 倍希釈以上となるように加えて培養用チューブに回収する。細胞浮遊液を 800rpm、4 分間遠心後、沈渣に MEF 培地を加えて細胞を浮遊し、4 胚/30mL/150mm プレートとなるように播種する。CO₂ インキュベーター内で培養する。

F-2 マウス胎児線維芽細胞(MEF)培養工程

インキュベーターのプレートを取り出して、位相差顕微鏡下で観察する。プレート表面の少なくとも 90% が細胞の層で覆われている場合は、継代作業に進む。90% 未満の場合は、細胞が成長するまで数日待つ。1 日おきに培地を吸引し、新鮮な MEF 培地と交換する。

継代作業: MEF 培地を吸引後、PBS で一度洗浄する。Recombinant trypsin 処理液を 5mL/150mm プレート加えて、37°C で酵素処理を行う。位相差顕微鏡下で細胞の剥離が観察された後に、MEF 培地を等量加え、ゆっくりピペット操作を行って MEF を培養プレート底面から剥離し、培養用チューブに回収する。細胞浮遊液を 800rpm、4 分間遠心後、沈渣に MEF 培地を加えて細胞を浮遊し、150mm プレート

に元の 1:5 の比率で播種する。

細胞が成長するまで数日待つ。1 日おきに培地を吸引し、新鮮な MEF 培地と交換する。プレート表面の少なくとも 90%が細胞の層で覆われている場合は、凍結作業に進む。

F-3 マウス胎児線維芽細胞凍結工程

MEF 培地を吸引後、PBS で一度洗浄する。Recombinant trypsin 処理液を 5mL/150mm プレート加えて、37°Cで酵素処理を行う。位相差顕微鏡下で細胞の剥離が観察された後に、MEF 培地を加え、ゆっくりピペット操作を行って MEF を培養プレート底面から剥離し、培養用チューブに回収する。細胞浮遊液を 800rpm、4 分間遠心後、沈渣に MEF 培地を加えて細胞を浮遊し、細胞数及び生存率を決定する。細胞浮遊液を 800rpm、4 分間遠心後、沈渣に TC プロテクターを 4×10^6 cells/mL となるように加え、凍結保存用チューブに 1.0mL ずつ分注する。

分注した凍結保存用チューブを細胞凍結用コンテナ(バイセル)に入れて-80°Cの超低温保冷庫で凍結する。翌日、-80°Cに凍結された上記凍結保存チューブを液体窒素保存用タンク内に保存する。

F-4 マウス胎児線維芽細胞(MEF)培養工程

液体窒素保存用タンク内から F-3 で保存した凍結保存チューブを取り出し、37°Cの恒温槽内にて急速解凍する。解凍した細胞浮遊液を培養用チューブに集め、細胞浮遊液の 10 倍量の MEF 培地を加える。この細胞浮遊液を 800rpm、4 分間遠心後、沈渣に MEF 培地を 20mL/凍結チューブ 2 本となるように加えて細胞を浮遊し、150mm プレートに 20mL ずつ播種する。細胞が成長するまで数日待つ。1 日おきに培地を吸引し、新鮮な MEF 培地と交換する。プレート表面の少なくとも 90%が細胞の層で覆われている場合は、継代作業に進む。

継代作業：MEF 培地を吸引後、PBS で一度洗浄する。Recombinant trypsin 処理液を 5mL/150mm プレート加えて、37°Cで酵素処理を行う。位相差顕微鏡下で細胞の剥離が観察さ

れた後に、MEF 培地を等量加え、ゆっくりピペット操作を行って MEF を培養プレート底面から剥離し、培養用チューブに回収する。細胞浮遊液を 800rpm、4 分間遠心後、沈渣に MEF 培地を加えて細胞を浮遊し、150mm プレートに元の 1:5 の比率で播種する。

細胞が成長するまで数日待つ。1 日おきに培地を吸引し、新鮮な MEF 培地と交換する。プレート表面の少なくとも 90%が細胞の層で覆われている場合は、X 線照射処理に進む。

F-5 フィーダー細胞調製工程

MEF 培地を吸引後、PBS で一度洗浄する。Recombinant trypsin 処理液を 5mL/150mm プレート加えて、37°Cで酵素処理を行う。位相差顕微鏡下で細胞の剥離が観察された後に、MEF 培地を等量加え、ゆっくりピペット操作を行って MEF を培養プレート底面から剥離し、培養用チューブに回収する。細胞浮遊液を 800rpm、4 分間遠心後、沈渣に MEF 培地を加えて細胞を浮遊する。丸底チューブに細胞を移し、ふたをする。丸底チューブをビーカーに移動し、30Gy の X 線処理を行う。

F-6 フィーダー細胞凍結工程

30Gy の X 線処理が終了したのち、細胞数及び生存率を決定する。細胞浮遊液を 800rpm、4 分間遠心後、沈渣に TC プロテクターを 4×10^6 cells/mL となるように加え、凍結保存用チューブに 1.0mL ずつ分注する。

分注した凍結保存用チューブを細胞凍結用コンテナ(バイセル)に入れて-80°Cの超低温保冷庫で凍結する。翌日、-80°Cに凍結された上記凍結保存チューブを液体窒素保存用タンク内に保存する。

F-7 フィーダー細胞培養工程

ES 細胞を解凍する前日にフィーダー細胞培養工程を行う。100mm プレートをコラーゲン溶液で満たし、1 時間コートする。コート後、風乾し、PBS で 2 回洗う。液体窒素保存用タンク内から F-6 で保存した凍結保存チューブを

取り出し、37℃の恒温槽内にて急速解凍する。解凍した細胞浮遊液を培養用チューブに集め、細胞浮遊液の10倍量のMEF培地を加える。この細胞浮遊液を800rpm、4分間遠心後、沈渣にMEF培地10mLを加えて細胞を浮遊し、100mmプレートに播種する。翌日、工程内管理試験1を行う。

III-1 ES 細胞培養工程

60mmプレート内の培地を除去し、各プレート内をPBS液2-4mLにて2度洗浄する。2.0PU (Protease Unit) /mL ディスパーゼII処理液を加えて37℃で酵素処理を行う。

上記酵素処理後、ゆっくりピペット操作し、ES細胞コロニーを分散する。コロニーが分散されたディスパーゼ浮遊液にES細胞用培地10mLを加えて酵素反応を停止する。細胞浮遊液を800rpm、4分間遠心後、沈渣にES細胞用培地を加えて細胞を再浮遊し、新たなプレートへ播種する。

なお、細胞の遠心・洗浄操作は常温(15~25℃)で行う(以下、同様)。培養フラスコを毎日観察することにより培養液に濁りがないことを確認し、濁りが疑われた場合は直ちに顕微鏡下で微生物の確認を行い、「陽性」の場合には製造を中止することとする。

III-2 ES 細胞凍結保存工程

回収

60mmプレート内の細胞密度がほぼ飽和状態に達したら、II-4と同様に細胞の酵素処理を行い、沈渣にES細胞用培地を加えて細胞を浮遊し、細胞数及び生存率を決定する。

凍結 (標準所要時間 30-60分)

60mmプレートから回収したES細胞に凍結保存培地を加え、細胞浮遊液を調製後、4℃の凍結保存培地で混合する。この際、 $1.0\sim 2.0 \times 10^6$ 個/mLの濃度になるように細胞浮遊液を調製する。

混合した細胞浮遊液を凍結保存用チューブに1.0mLずつ分注する。

分注した凍結保存用チューブを細胞凍結用コンテナ(バイセル)に入れて-80℃の超低温保冷庫で凍結する。翌日、-80℃に凍結された上記凍結保存チューブを液体窒素保存用タンク内に保存する。

III-3 ES 細胞解凍工程

解凍 (標準所要時間 2時間)

液体窒素保存用タンク内からIV-2で保存した凍結保存チューブを取り出し、37℃の恒温水槽内にて急速解凍する。解凍した細胞浮遊液を培養用チューブに集め、細胞浮遊液と等量のES細胞用培地を加える。この細胞浮遊液を800rpm、4分間遠心後、沈渣にES細胞用培地5mLを加えて細胞を浮遊する。

IV-1 培養

(標準所要時間 18~24日間)

III-3で調製したES細胞浮遊液を60mmプレートに各5mL播種して37℃、5%CO₂、95%air下にて、60mmプレート内の細胞密度がほぼ飽和状態($2.0\sim 3.0 \times 10^6$ 個/60mmプレート)に達するまで培養する。

培養フラスコを毎日観察することにより培養液に濁りがないことを確認し、濁りが疑われた場合は直ちに顕微鏡下で微生物の確認を行い、「陽性」の場合には製造を中止することとする。

培地交換は毎日行う。

継代

継代は7-10日に一度実施する。

IV-2 ES 細胞凍結保存工程

回収

60mmプレート内の細胞密度がほぼ飽和状態に達したら、II-4と同様に細胞の酵素処理を行い、沈渣にES細胞用培地を加えて細胞を浮遊し、細胞数及び生存率を決定する。

凍結 (標準所要時間 30-60分)

60mmプレートから回収したES細胞に凍結

保存培地を加え、細胞浮遊液を調製後、4℃の凍結保存培地で混合する。この際、 $1.0\sim 2.0 \times 10^6$ 個/mL の濃度になるように細胞浮遊液を調製する。

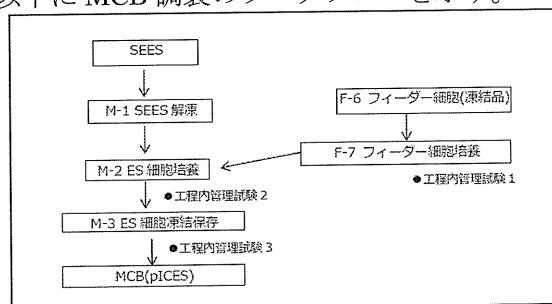
混合した細胞浮遊液を凍結保存用チューブに 1.0mL ずつ分注する。

分注した凍結保存用チューブを細胞凍結用コンテナ(バイセル)に入れて-80℃の超低温保冷庫で凍結する。翌日、-80℃に凍結された上記凍結保存チューブを液体窒素保存用タンク内に保存する。

C-3-8 MCB の作製方法

MCB はシード細胞となる SEES2 (ヒト ES 細胞) を培養後に得られる均一な細胞ストックである。

以下に MCB 調製のワークフローを示す。



M-1 原材料細胞解凍工程

解凍 (標準所要時間 30 分)

液体窒素保存用タンク内から SEES 凍結保存チューブを取り出し、37℃の恒温槽内にて急速解凍する。解凍した細胞浮遊液を培養用チューブに集め、細胞浮遊液の 10 倍量の ES 細胞用培地を加える。この細胞浮遊液を 800rpm、4 分間遠心後、沈渣に ES 細胞用培地を 10mL 加えて細胞を浮遊する。

M-2 培養工程

(標準所要時間 18~24 日間)

F-7 で準備したフィーダー入り 100mm プレートの培地を吸引する。M-1 で調製した ES 細胞浮遊液を加え、100mm プレートに 10mL 播種して 37℃、5%CO₂、95%air 下にて、100mm プレート内の細胞密度がほぼ飽和状態 (1×10^7 個/100mm プレート) に達するまで培養する。

培地交換は毎日行う。継代は 7 日~10 日ごとに実施する。

継代

継代は週一回実施する。MCB から起算して、40 倍以上に増殖するまで継代培養を繰り返す。

M-3 MCB 細胞凍結保存工程

回収の 1 時間以上前に Y27632 を 10μM となるよう培養液に加える。

回収

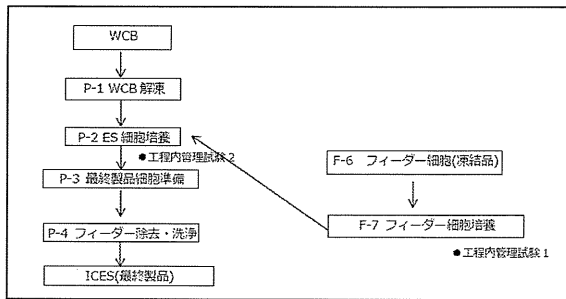
100mm プレート内の細胞密度がほぼ飽和状態に達したら、プレート内の培地を除去し、各プレート内を PBS 液 2-4mL にて 2 度洗浄する。Recombinant trypsin 処理液を加えて 37℃で酵素処理を行う。位相差顕微鏡下で細胞が剥離し始めるのが観察された後に、ゆっくりピペット操作を行って ES 細胞様コロニー形成細胞を培養プレート底面から剥離し、細胞浮遊液を ES 細胞用培地の入った培養用チューブに回収する。細胞浮遊液を 800rpm、4 分間遠心後、沈渣に ES 細胞用培地を加えて細胞を浮遊し、細胞数及び生存率を決定する。

凍結(標準所要時間 30-60 分)

100mm プレートから回収した ES 細胞にセルバンカー3 を加え、細胞浮遊液を調製後、4℃のセルバンカー3 で混合する。この際、 $1.0\sim 2.0 \times 10^6$ 個/mL の濃度になるように細胞浮遊液を調製する。混合した細胞浮遊液を凍結保存用チューブに 1.0mL ずつ分注する。分注した凍結保存用チューブを細胞凍結用コンテナ(バイセル)に入れて-80℃の超低温保冷庫で凍結する。翌日、-80℃に凍結された上記凍結保存チューブを液体窒素保存用タンク内に保存する。これを MCB とする。

C-3-9 WCB の作製方法

WCB は MCB である pICES(ヒト ES 細胞)を培養後に得られる均一な細胞ストックである。以下に WCB 調製のワークフローを示す。



W-1 MCB 細胞解凍工程

解凍 (標準所要時間 30 分)

液体窒素保存用タンク内から MCB 凍結保存チューブを取り出し、37℃の恒温槽内にて急速解凍する。解凍した細胞浮遊液を培養用チューブに集め、細胞浮遊液の 10 倍量の ES 細胞用培地を加える。この細胞浮遊液を 800rpm、4 分間遠心後、沈渣に ES 細胞用培地を 10mL 加えて細胞を浮遊する。

W-2 培養工程

(標準所要時間 18~24 日間)

F-7 で準備したフィーダー入り 100mm プレートの培地を吸引する。W-1 で調製した ES 細胞浮遊液を加え、100mm プレートに 10mL 播種して 37℃、5%CO₂、95%air 下にて、100mm プレート内の細胞密度がほぼ飽和状態 (1 x 10⁷ 個/100mm プレート) に達するまで培養する。培地交換は毎日行う。継代は 7 日~10 日ごとに実施する。

W-3 WCB 細胞凍結保存工程

回収の 1 時間以上前に Y27632 を 10μM とするよう培養液に加える。

回収

100mm プレート内の細胞密度がほぼ飽和状態に達したら、プレート内の培地を除去し、各プレート内を PBS 液 2-4mL にて 2 度洗浄する。Recombinant trypsin 処理液を加えて 37℃で酵素処理を行う。位相差顕微鏡下で細胞が剥離し始めるのが観察された後に、ゆっくりピペット操作を行って ES 細胞様コロニー形成細胞を培養プレート底面から剥離し、細胞浮遊液を ES

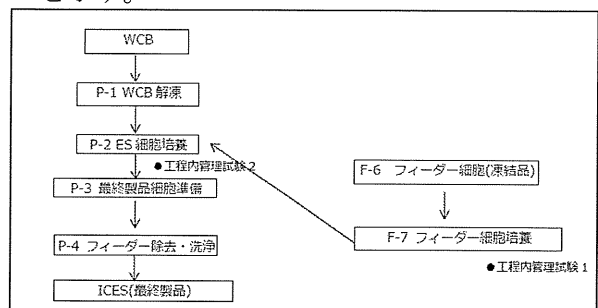
細胞用培地の入った培養用チューブに回収する。細胞浮遊液を 800rpm、4 分間遠心後、沈渣に ES 細胞用培地を加えて細胞を浮遊し、細胞数及び生存率を決定する。

凍結(標準所要時間 30-60 分)

100mm プレートから回収した ES 細胞にセルバンカー3 を加え、細胞浮遊液を調製後、4℃のセルバンカー3 で混合する。この際、1.0~2.0 x 10⁶ 個/mL の濃度になるように細胞浮遊液を調製する。混合した細胞浮遊液を凍結保存用チューブに 1.0mL ずつ分注する。分注した凍結保存用チューブを細胞凍結用コンテナ(バイセル)に入れて -80℃の超低温保冷庫で凍結する。翌日、-80℃に凍結された上記凍結保存チューブを液体窒素保存用タンク内に保存する。これを WCB とする。

C-4-10 最終製品の作製方法

WCB から最終製品 (ICES) までの製造フローを示す。



以下に ICES(最終製品)の詳細な作製方法を示す。

F-7 フィーダー細胞培養工程

ES 細胞を解凍する前日にフィーダー細胞培養工程を行う。100mm プレートをコラーゲン溶液で満たし、1 時間コートする。コート後、風乾し、PBS で 2 回洗う。液体窒素保存用タンク内から F-6 で保存した凍結保存チューブを取り出し、37℃の恒温槽内にて急速解凍する。解凍した細胞浮遊液を培養用チューブに集め、細胞浮遊液の 10 倍量の MEF 培地を加える。この細胞浮遊液を 800rpm、4 分間遠心後、沈渣に MEF 培地を 10mL/1 x 10⁶ cells 加えて細胞を

浮遊し、100mm プレートに 10mL ずつ播種する。翌日、工程内管理試験 1 を行う。

P-1WCB 細胞解凍工程

解凍 (標準所要時間 30 分)

液体窒素保存用タンク内から WCB 凍結保存チューブを取り出し、37°Cの恒温槽内にて急速解凍する。解凍した細胞浮遊液を培養用チューブに集め、細胞浮遊液の 10 倍量の ES 細胞用培地を加える。この細胞浮遊液を 800rpm、4 分間遠心後、沈渣に ES 細胞用培地を 10mL 加えて細胞を浮遊する。

P-2 培養工程 (標準所要時間 18~24 日間)

F-7 で準備したフィーダー入り 100mm プレートの培地を吸引する。P-1 で調製した ES 細胞浮遊液を加え、100mm プレートに 10mL 播種して 37°C、5%CO₂、95%air 下にて、100mm プレート内の細胞密度がほぼ飽和状態 (1x10⁷ 個/100mm プレート) に達するまで培養する。培地交換は毎日行う。培養フラスコを毎日観察することにより培養液に濁りが無いことを確認し、濁りが疑われた場合は直ちに顕微鏡下で微生物の確認を行い、「陽性」の場合には製造を中止することとする。

継代

継代は 7 日~10 日ごとに実施する。

P-3 最終製品細胞準備工程

回収

60mm プレート内の細胞密度がほぼ飽和状態に達したら、プレート内の培地を除去し、各プレート内を PBS 液 2-4mL にて 2 度洗浄する。Recombinant trypsin 処理液を加えて 37°C で酵素処理を行う。位相差顕微鏡下で細胞が剥離し始めるのが観察された後に、ゆっくりピペット操作を行って ES 細胞様コロニー形成細胞を培養プレート底面から剥離し、細胞浮遊液を ES 細胞用培地の入った培養用チューブに回収する。細胞浮遊液を 800rpm、4 分間遠心後、沈渣に ES 細胞用培地を加えて細胞を浮遊し、細胞数及び生存率を決定する。

細胞数及び生存率を決定する。

P-4 フィーダー除去・洗浄工程

P-3 で調製した細胞浮遊液をコラーゲンコートプレートに播種し、15 分間程度インキュベートし、フィーダーをプレートに接着させる。上清を培養用チューブに回収する。細胞浮遊液を 800rpm、4 分間遠心後、沈渣に生理食塩水を加えて細胞を浮遊する。これを ICES(最終製品)とする。

C-5 工程内管理試験の設定

表 2.2.3 工程内管理試験の一覧表(案)

工程	試験項目	試験検体	試験方法	規格・判定基準
フィーダー調製				
1	目視・顕微鏡観察	樹立中の MEF 細胞	目視・顕微鏡観察	目視・顕微鏡下で明らかに異物や微生物が認められないこと
2	目視・顕微鏡観察	培養中の MEF 細胞	目視・顕微鏡観察	①目視・顕微鏡下で明らかに異物や微生物が認められないこと②線維芽細胞の形態を示す細胞が多数を占めていること
3	目視・顕微鏡観察	MCB から解凍・培養中の MEF 細胞	目視・顕微鏡観察	①目視・顕微鏡下で明らかに異物や微生物が認められないこと②線維芽細胞の形態を示す細胞が多数を占めていること
4	X 線処理確認	X 線照射機	目視	X 線照射機に 30Gy 照射されたことが表示されていること
工程	試験項目	試験検体	試験方法	規格・判定基準
MCB 調製				
1	目視・顕微鏡観察	培養中のフィーダー細胞	目視・顕微鏡観察	①目視・顕微鏡下で明らかに異物や微生物が認められないこと②線維芽細胞の形態を示す細胞が多数を占めていること
2	目視・顕微鏡観察	フィーダー上で培養中の ES 細胞	目視・顕微鏡観察	①目視・顕微鏡下で明らかに異物や微生物が認められないこと②扁平状のコロニーを形成する細胞群がいること
3	細胞数測定	MCB 調製用に回収した ES 細胞	細胞数測定機 ViCELL で測定する	①細胞数が 6 × 10 ⁷ 細胞以上 ②細胞生存率が 50% 以上
工程	試験項目	試験検体	試験方法	規格・判定基準

WCB 調製				
1	目視・顕微鏡観察	培養中のフィーダー細胞	目視・顕微鏡観察	①目視・顕微鏡下で明らかに異物や微生物が認められないこと②線維芽細胞の形態を示す細胞が多数を占めていること
2	目視・顕微鏡観察	フィーダー上で培養中のES細胞	目視・顕微鏡観察	①目視・顕微鏡下で明らかに異物や微生物が認められないこと②扁平状のコロニーを形成する細胞群がいること
3	細胞数測定	WCB 調製用に回収したES細胞	細胞数測定機 ViCELL で測定する	①細胞数が 6×10^7 細胞以上 ②細胞生存率が50%以上
工程	試験項目	試験検体	試験方法	規格・判定基準
最終製品調製				
1	目視・顕微鏡観察	培養中のフィーダー細胞	目視・顕微鏡観察	①目視・顕微鏡下で明らかに異物や微生物が認められないこと②線維芽細胞の形態を示す細胞が多数を占めていること
2	目視・顕微鏡観察	フィーダー上で培養中のES細胞	目視・顕微鏡観察	①目視・顕微鏡下で明らかに異物や微生物が認められないこと②扁平状のコロニーを形成する細胞群がいること
		以下検討中		

C-6 特性解析及び品質試験項目の設定

医薬審第 329 号 (ICH Q5A)・医薬審第 873 号 (ICH Q5D)・「生物由来原料基準」・「同種指針」を基に、フィーダー細胞、セルバンク、最終製品の安全性、品質にかかわる試験についての項目設定を行った。以下に概略を示す。

C-6-1 フィーダー細胞の品質試験項目(案)

安全性試験および純度試験

- 無菌試験
- マイコプラズマ否定試験
- マウスウイルス試験
- 感染性試験
- 逆転写酵素活性試験
- 電子顕微鏡観察
- in vitro 試験
- in vivo 試験
- 抗体産生試験 (マウス)

性能試験

位相差顕微鏡形態観察

C-6-2 pICES MCB 及び CAL の品質試験項目(案)

- 無菌試験
- マイコプラズマ否定試験
- ヒトウイルス試験
- DNA fingerprinting(STR)
- マウスウイルス試験
- 逆転写酵素活性試験
- 感染性試験
- 電子顕微鏡観察
- in vitro 試験
- in vivo 試験
- 抗体産生試験
- 特性解析
- 形態/増殖観察
- 奇形腫形成試験
- その他

C-6-2 ICES 最終製品の出荷判定試験(案)

- 生菌数限度試験(出荷前判定)
- 無菌試験(出荷後最終確認)
- マイコプラズマ否定試験
- 細胞数・生存率試験
- エンドトキシン試験
- 形態/増殖観察
- 未分化細胞定量試験

D. 考察

再生医療における細胞の供給源として、胚性幹細胞 (ES 細胞)、組織幹細胞、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) があげられる。これらの原料細胞は、従来まで同じ指針のもとで運用されてきたが、細胞性状が多岐に渡るため、個別の指針として運用することが現実的であるという提言がなされ、平成 24 年 9 月 7 日付けで其々「ヒト (自己) 体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」(平成 24 年 9 月 7 日薬食発 0907 第 2 号)、「ヒト (同種) 体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」(平成 24 年 9 月 7 日薬食発 0907 第 3

号)、「ヒト(自己) iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」(平成24年9月7日薬食発0907第4号)「ヒト(同種) iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」(平成24年9月7日薬食発0907第5号)、及び「ヒトES細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」(平成24年9月7日薬食発0907第6号)の五つの指針で個別に運用されることとなった。本研究は其中でES細胞に特化して研究を推進する。ES細胞はその増殖能、多分化能より、将来的に期待されており、最適のドナー細胞の選択肢となりつつある。また、人工多能性幹細胞の臨床応用を先導することができる再生医療技術となりうる。ヒトES細胞をはじめとする未分化性の非常に高いヒト細胞は、再生医療での重要な細胞ソースとなるばかりでなくその培養システムでは発生分化研究等のヒト発生メカニズム探求や創薬開発研究の基盤となる。新しい指針の下で、より安全性の高い再生医療基盤をいち早く社会へ提示することの意義は大きい。

E. 結論

現在までに国内で2施設がES細胞の樹立機関として認定されている(京都大学、国立成育医療研究センター)。しかしながら臨床応用を開始するまでは多くの基盤研究ならびに細胞の整備が必要となる。本研究に用いるES細胞は、主任研究者である梅澤(樹立責任者18諸文科振第832号平成19年3月5日)らが、樹立初期から「ヒトES細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針案」を意識した、樹立・培養を進行させており、その、初期培養された細胞が蓄積されている。さらにこれらの細胞を用いた神経、心筋、肝臓、骨を構築する研究が進行している。このES細胞を用いた再生医療が現実味を帯びてきており、再生医療・細胞移植の最適の対象になっている。ES細胞自体を生体内マイクロデバイスとして利用する新たな治療戦略を現実するために必要なステップとして、1) 原材料及び製造関連物質の明確化(体外受精胚の起源・選択理由の明示、

ドナー選択の倫理的妥当性、培養方法、培養材料の明示等)、2) 製造工程の明確化、3) 最終製品の品質管理法の確立がある。このような世界的な状況の中で、ヒトES細胞の維持および可塑性の分子基盤を明確にすることを目指し、その評価・検証システムの元にES細胞の提供までを視野に入れた「ヒト胚性幹細胞をドナー細胞とする再生医療の汎用性向上のための基盤技術開発」は再生医療促進にとって必要不可欠なものであり、速やかな確立が必要である。

F. 研究発表(以降23年度のままです)

1. 論文発表

Nishio M, Yoneshiro T, Nakahara M, Suzuki S, Saeki K, Hasegawa M, Kawai Y, Akutsu H, Umezawa A, Yasuda K, Tobe K, Yuo A, Kubota K, Saito M, Saeki K. Production of functional classical brown adipocytes from human pluripotent stem cells using specific hemopoietin cocktail without gene transfer. *Cell Metab.* 16(3):394-406, 2012.

Higuchi A, Ling QD, Hsu ST, Umezawa A. Biomimetic cell culture proteins as extracellular matrices for stem cell differentiation. *Chem Rev.* 112(8):4507-4540, 2012.

Sugawara T, Nishino K, Umezawa A, Akutsu H. Investigating cellular identity and manipulating cell fate using induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 3(2):8, 2012.

Nakamura N, Saeki K, Mitsumoto M, Matsuyama S, Nishio M, Saeki K, Hasegawa M, Miyagawa Y, Ohkita H, Kiyokawa N, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Yuo A. Feeder-free and serum-free production of hepatocytes, cholangiocytes, and their proliferating progenitors from human pluripotent stem cells: application to liver-specific functional and cytotoxic assays. *Cell Reprogram.* 14(2):171-185, 2012.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 取得特許 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

II. 分担研究報告書

「ヒト胚性幹細胞をドナー細胞とする再生医療の汎用性向上のための基盤技術の創成」
分担研究報告書

米国 FDA の再生医療分野におけるオーファン関連規制に関する調査研究

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・部長

研究要旨：再生医療に用いられる細胞・組織加工医薬品等は米国では 351HCT/P という製品の範疇に属する。細胞・組織加工医薬品等は、滅菌・精製などの処理が不可能なために感染症の伝播等の危険性を完全には排除し得ないおそれがあること、生きた細胞を含み極めて動的な特性を持つ先端的製品であって、品質や安全性の確保に未知・未経験の要素が多い。従って、重篤・致命的または QOL を著しく損ない、かつ他に治療方法がないような、小児難治性疾患等の稀少疾病・難病を適用対象として開発される場合が多くなる。本分担研究では、重篤・致命的または重度の衰弱をもたらす稀少疾病・難病に対する医薬品等（細胞・組織加工製品も含む）の迅速な実用化を目的とした、様々な米国の制度について調査するとともに、稀少疾患・難病に対する細胞・組織加工製品の早期実用化に関する最近の FDA の動向について調査した。

研究協力者： 村岡 ひとみ 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部・研究員

A. 研究目的

小児難治性疾患の中には、未だ有効な治療法もなく医療保護を小児期のみならず成人に至っても受けなければならない疾患が多く存在する。本研究課題ではヒト ES 細胞から疾患起因細胞へ分化誘導する研究を応用し、このような小児難治性疾患に対する画期的な治療法としての細胞移植治療の実現を目指している。小児難治性疾患の多くは稀少疾患であり、企業が開発に参入しづらいことから、その多くに対してこれまで有効な治療法が存在しなかった。また、こうした小児難治性疾患に対して従来の医薬品開発のアプローチでは限界があったことが治療法に乏しい現状の原因とも言える。そうした事情から、小児難治性疾患治療法開発においては、再生医療をはじめとする先端的医療への期待は大きい。

再生医療に用いられる細胞・組織加工医薬品等は米国では 351HCT/P という製品の範疇に属する。細胞・組織加工医薬品等は、滅菌・精製などの処理が不可能なために感染症の伝播等の危険性を完全には排除し得ないおそれがあること、生きた細胞を含み極めて動的な特性を持つ先端的製品であって、品質や安全性の確保に未知・未経験の要素が多い。従って、上の段落で述べたのと逆方向の理由から、重篤・致命的または QOL を著しく損ない、かつ他に治療方法がないような小児難治性疾患等の稀少疾病・難病を適用対象として開発される場合が

多くなる。本分担研究では、重篤・致命的または重度の衰弱をもたらす稀少疾病・難病に対する医薬品等（細胞・組織加工製品も含む）の迅速な実用化を目的とした、様々な米国の制度について調査するとともに、稀少疾患・難病に対する細胞・組織加工製品の早期実用化に関する最近の FDA の動向について調査した。

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）の Steven Bauer 博士ならびに国際生物製剤標準化連合（IABS）／WHO 細胞基材研究班 John C. Petricciani 博士（元 FDA-CBER 長）ら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 ヒト細胞、組織または細胞・組織利用製品（HCT/P）

日本で「細胞・組織利用医薬品等」¹、「細胞組織製品」²、または「細胞調製品」³と呼ばれ

るものは、米国では「ヒト細胞、組織または細胞・組織利用製品」(HCT/P: human cells, tissues or cell/tissue-based product)という製品の範疇に含まれており、治験に限らず製品開発を目的としない臨床研究に対してもFDAが規制を行っている。HCT/P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」と定義されている(21CFR1271.3(d): 連邦規則集第21編第1271.3(d)項)。HCT/Pは、公衆衛生サービス法(PHS Act: Public Health and Service Act)の側面からさらに2種類に大別される。すなわちPHS Act第361条に基づく「ヒト組織」(361HCT/P)と第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)の要件すべて(表1)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。361HCT/Pは、販売承認申請が不要で、査察によって規制される。351HCT/Pのうち生細胞を含む製品は、日本における「細胞・組織加工医薬品等」^{4,5}に相当し、米国内での臨床使用に際し、生物製剤または医療機器として品目毎に治験届および販売に関するFDAの承認が必要とされる。ある特定のHCT/Pが生物製剤、医療機器のどちらの範疇に属するかは作用の主様式(PMOA: Primary Mode of Action)に従って決定される。すなわち、細胞・組織の生化学的機能・免疫学的機能・代謝機能が主な作用様式となるならば生物製剤となり、逆に物理的・構造的機能が主な作用様式となるならば医療機器に分類される⁶。2012年7月現在、FDAから販売承認を得ている351HCT/Pは表2の通りである。

C-2 351HCT/Pの臨床試験・販売承認審査

治験(商業目的)か臨床研究(非商業目的)かに拘わらず、販売未承認の351HCT/Pの臨床試験を行う場合には、FDAに申請を行わなければならない。日米EU医薬品規制調和国際会議ICHのGCP(Good Clinical Practice)に基づいた米国GCP(21CFR50,56)を順守する必要がある。FDAでは生物製剤に分類される製品はCBER(Center for Biologics Evaluation and Research)の所管となり、医療機器に分類される製品はCDRH(Center for Devices and Radiological Health)の所管となるが、医療機器と分類される351HCT/Pに関しては、CBERとCDRHが連携して相談・審査にあたっている。

生物製剤としての351HCT/Pの場合は、cGMP(Current Good Manufacturing Products)とcGTP(Current Good Tissue Practice)に従って製造し、研究用新薬IND(Investigational New Drug)申請の後に臨床試験を行い、生物製剤承認申請BLA(Biologics License Application)を通じて販売承認を得ることになる。一方、医療機器としての351HCT/Pの場合には、医療機器用のGMPであるQSR(Quality Systems Regulation)とcGTPに従い製造した製品について、研究用機器特例IDE(Investigational Device Exemption)申請の後に臨床試験を行い、市販前承認PMA(Premarket Approval)を通じて販売承認を得る。

C-3 迅速承認制度

351HCT/Pに限らず、重篤な疾病を対象とした新規の医薬品、生物製剤および医療機器の迅速な上市を達成することを目的として、通常の販売承認審査以外に様々な審査制度を用意している。

C-3-1 医薬品・生物製剤

i. Fast Track Drug Development Program (ファースト・トラック制度)

重篤ないし致命的な疾病の治療薬で、かつアンメット・ニーズを充足することのできる可能性の高い製品の開発を促進し、審査を迅速に行うためのプログラム。「連邦食品医薬品化粧品法」(FD&C Act: Federal Food, Drug, and Cosmetics Act)のSection 506(21 U.S.C. 356)に基づく。IND前から開発段階のいずれの時点でもファースト・トラックの指定は請求できる。ファースト・トラックの指定を受けると、FDAとの相談のためのミーティングを優先的に持つことができる。また、申請資料を一括して提出するのではなく、分割して、試験結果が得られ次第提出できる。FDAは全データが揃わなくとも試験結果が提出され次第順次審査を行う。また、サロゲート・エンドポイント(簡便もしくは短期間に観察可能で、本来のエンドポイントを合理的に推測することが可能な評価項目)のデータに基づく評価を採用できることなども利点である。⁸

ii. Accelerated Drug Approval Program (加速承認制度)

FD&C Act Section 506, 21 CFR 314 (新薬承認申請) および 21 CFR 601