

201306019B

厚生労働科学研究費補助金  
再生医療実用化研究事業

ライソゾーム病に対する細胞医薬品の開発にむけた  
Confidence-in-Mechanism (CIM) 取得のための基礎研究

平成24年度～平成25年度 総合研究報告書

研究代表者

(公財) 先端医療振興財団 再生医療実現拠点ネットワーク開発支援室

副部長 大倉華雪

平成26年3月

厚生労働科学研究費補助金  
再生医療実用化研究事業

ライソゾーム病に対する細胞医薬品の開発にむけた  
**Confidence-in-Mechanism (CIM) 取得のための基礎研究**

平成24年度～平成25年度 総合研究報告書

研究代表者

(公財) 先端医療振興財団 再生医療実現拠点ネットワーク開発支援室

副部長 大倉華雪

平成26年3月

## 目次

I. 総合研究報告書 ライソゾーム病に対する細胞医薬品の開発にむけた Confidence-in-Mechanism (CIM) 取得のための基礎研究」 研究代表者 大倉華雪 (公財) 先端医療振興財団 再生医療実現拠点ネットワーク開発支援室 副部長 .....	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	25
III. 研究成果の刊行物・別刷 .....	28

# I. 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）  
総合研究報告書

ライソゾーム病に対する細胞医薬品の開発にむけた  
Confidence-in-Mechanism (CIM) 取得のための基礎研究

大倉華雪

（公財）先端医療振興財団 再生医療実現拠点ネットワーク開発支援室 副部長

研究要旨

ライソゾーム病は、ライソゾーム加水分解酵素の先天性欠損により中間代謝産物がライソゾーム内に蓄積する症患者であり、根治的治療法はない。本研究事業では、脂肪組織由来多系統前駆細胞（Adipose tissue-derived Multi-lineage Progenitor Cells; ADMPC）を、難治性疾患であるライソゾーム病を適応とする再生医療等製品として臨床応用することを究極の目的としている。本事業において、ADMPC投与後に血中に $\beta$ ガラクトシダーゼを分泌、血中濃度が健常マウスの半分程度まで回復することを明らかとした。再生医療等製品であっても、医薬品と同様に有効性・安全性・品質が肝要である。本研究による成果と今後の展開展望につき、三要件ごとに考察を行いたい。

A. 研究目的

ライソゾーム病は、ライソゾーム加水分解酵素の先天性欠損により中間代謝産物がライソゾーム内に蓄積、骨変形、肝脾腫、知能障害など種々の症状を呈する症患者であり、根治的治療法はない。対症療法として酵素補充療法製剤が承認された疾患もあるが一部にすぎず、新規機序の医薬品の開発が待たれている。

本研究事業では、脂肪組織由来多系統前駆細胞（Adipose tissue-derived Multi-lineage Progenitor Cells; ADMPC）を、難治性疾患であるライソゾーム病を適応とする再生医療等製品として臨床応用することを究極の目的とした。

B. 研究方法

ライソゾーム病の一部疾患で製剤として確立している酵素補充療法は、多くのライソゾーム加水分解酵素が末端にマンノース6リン酸（M6P）と呼ばれるライソゾーム限局シグナルを有することを利用して、M6P受容体は広く細胞膜表面に存在し、細胞外に存在する加水分解酵素と結合、それを細胞内、さらにライソゾーム内に輸送する。酵素補充療法はこの輸送系を利用して、欠損している酵素を薬剤として体外から投与することにより、細胞内に欠損酵素を補充し、ライソゾーム内に蓄積している物質の分解を促進する方法である。

本研究にて開発を目指す細胞医薬品は、生体内に生着分化することで、欠乏酵素を

補充し続ける製剤と位置付けられる。従って、ADMPCが生体内で肝細胞に分化生着し、ライソゾーム加水分解酵素を持続的に分泌、全身の細胞組織に供給することを確認することで、ライソゾーム病に対する新規機序細胞医薬品として研究開発を進めることのConfidence-in-Mechanismが得られると想定、以下の計画を行った。

1) *in vitro*脂肪組織由来多系統前駆細胞のβガラクトシダーゼ発現の検討：

βガラクトシダーゼはマンノース6リン酸(M6P)を持ち、細胞のマンノース6リン酸受容体を介して細胞に保持されることから、M6Pあるいはmannosamineを過剰に添加して培養、その上清をβガラクトシダーゼ活性にて解析した。コントロール肝細胞とADMPCの双方で当該細胞は検出可能であり、M6PおよびM6P合成阻害剤であるmannosamineによるcompetitionにて培養上清への分泌を検討した。

2) ADMPCの間葉系幹細胞としての特性を用いた免疫抑制プロトコールの検討：

生着における免疫抑制剤の必要性を検証すべく、F344 Ratをレシピエントとし、ドナーとしてF344 Rat (syngeneic)、Lewis Rat (minor miss match)、ACI rat (major miss match) より採取したADMPCを移植し、拒絶にともなう組織学的変性について観察した。

3) ADMPCの再生肝細胞への分化生着の確認

ライソゾーム病モデルマウスへのADMPC投与により、当該細胞が肝内に生着し、肝細胞に分化することを確認する。具体的には、医薬基盤研究所生物資源バンクよりG

M1-ガングリオシドーシスモデルマウス(βガラクトシダーゼKOマウス)を入手し、経門脈的にADMPC投与を投与して肝細胞として分化生着を検証する。

GMI-ガングリオシドーシスモデルマウス(βガラクトシダーゼKOマウス)への細胞の投与は、下記により実施した。1%インフルラン吸入による麻酔下で、30G針(ニプロ株式会社)を取り付けた2.5 mL容のポリプロピレン製ディスポーザブル注射筒(テルモ株式会社)を用いて、開腹後経門脈的に注射針を刺入する。チューブ内の血液逆流が静脈血であることを確認後、投与検体を30秒程度で投与する。投与検体は、マウス由来脂肪組織由来多系統前駆細胞であり、経門脈的に1回投与した。1か月後に処置日と同様の方法にて深麻酔状態とする。深麻酔状態において開腹開胸し、心腔から採血を行った後腹部大動脈を切開し放血させ、安楽死させた。肝臓を摘出、組織学的に検証した。

再生医療等製品であっても、医薬品と同様に有効性・安全性・品質が肝要である。難治性疾患であるライソゾーム病を適応とする再生医療等製品の臨床展開を射的に入れ、本研究による成果と今後の展開展望につき、三要件ごとに検証・考察を行いたい。

(倫理面への配慮)

1. 動物操作に当たっては、(公財)先端医療振興財団の動物実験規定に従って行なう。

## C.研究成果

平成24年度においては、生体内で分化生

着した脂肪組織由来多系統前駆細胞 (Adipose tissue-Derived Multi-lineage Progenitor Cell; ADMPC) 由来再生肝細胞がライソゾーム加水分解酵素を持続的に分泌、全身の細胞組織に供給することを機序とした根治的治療法に近い新規概念の細胞医薬品の開発を目指し、臨床試験を開始するための有効性にかかる基礎的知見を収集した。

1) *in vitro*脂肪組織由来多系統前駆細胞のβガラクトシダーゼ発現の検討:

βガラクトシダーゼはマンノース6リン酸 (M6P) を持ち、細胞のマンノース6リン酸受容体を介して細胞に保持されることから、M6Pあるいはmannosamineを過剰に添加して培養、その上清を解析した。コントロール肝細胞とADMPCの双方で当該細胞は検出可能であり、M6PおよびM6P合成阻害剤であるmannosamineによる濃度依存性competitionから当該酵素は培養上清に分泌されたと想定される。酵素分泌というMode of Action (MOA)が確認され、comparability assayを行うための外挿性確認の証左となった。

2) ADMPCの間葉系幹細胞としての特性を用いた免疫抑制プロトコールの検討:

生着における免疫抑制剤の必要性を検証すべく、3系統のラットを用いた。F344 Rat をレシピエントとし、ドナーとしてF344 Rat (syngeneic)、Lewis Rat (minor mismatch)、ACI rat (major mismatch) より採取したADMPCを移植した。移植後2カ月において、特に問題は起こっていない。

3) ADMPCの再生肝細胞への分化生着の確認:

平成24年度において、医薬基盤研究所生物資源バンクよりGM1-ガングリオシドーシスモデルマウス (βガラクトシダーゼKOマウス) を受精卵凍結融解後の産生仔での分譲をうけ、繁殖後mADMPCを移植した。

GM1-ガングリオシドーシスモデルマウス (βガラクトシダーゼKOマウス) の血清にはβガラクトシダーゼ活性をほぼ認めないが、mADMPCの経門脈的投与1か月後にて健常対象コントロールマウスの半分程度までβガラクトシダーゼ活性が改善しており、治療製剤としてのFeasibilityは確認された。

30匹のモデルマウスに対し、mADMPCを経門脈的に移植、3か月後に犠牲死させ全採血を行い、ライソゾーム内加水分解酵素の血中分泌の確認を行った。同時に、30匹のモデルマウスに対し、mADMPCを経尾静脈的に移植、3か月後に犠牲死させ、同様にライソゾーム内加水分解酵素の血中分泌の確認を行った。いずれの移植方法においても、ライソゾーム内加水分解酵素が血中に分泌していることが確認でき、野生型マウスに比べて約4割活性を維持していた。

しかし、モデルマウス繁殖過程で得られたヘテロ型マウスも同時に血清学的評価を行ったところ、ヘテロ型の活性は野生型に比べ約7割の活性があり、細胞移植群はヘテロ型の6割強の活性であり、臨床応用に際し、modificationを要する可能性も示唆された。

### (1) 有効性

ADMPCが、経門脈的投与によりライソゾーム病モデル動物であるGM1-ガングリオシドーシスマウスで欠損しているβガラク

トシダーゼを血中に発現させ、その効果持続期間が少なくとも3カ月持続することを明らかとした。GFP-mouse ADMPCを経門脈的した試験系では、投与後にGFP陽性細胞が肝内に生着、アルブミン陽性細胞へと分化することが確認された。これは被投与細胞が*in vivo*で肝細胞へと分化していることを示唆するものである。当初、肝実質から分泌されるサイトカインあるいはmiRNAを含むエクソソームによりADMPCは*in situ*で肝細胞へと分化すると想定、trans wellを用い、wellにヒト肝細胞（購入）と上層にADMPCを播種した*in vitro non-contact*試験を行った。しかしながら、trans wellによる*non-contact*の系では、ADMPCはアルブミン陽性を示さず、少なくともADMPCの肝細胞への誘導は、サイトカイン効果あるいはエクソソーム効果のみでは不十分であることが示唆された。そこで、native parenchymal cellsとの機能的コンタクトが必須であると想定、肝細胞とADMPCを共培養したところ、ADMPCはアルブミン陽性を示した。これは、ADMPCが*in situ*で肝細胞様に生着・分化するには、ADMPCと肝細胞の接触が必須であることが失される。実際、GFP-mouse ADMPCの肝内存在patternを観察すると、native parenchymal cellsと機能的コンタクトを有していた。

有効性用量設定試験を行ったところ、 $1.5 \times 10^6$ /kgの用量まではβガラクトシダーゼ血中濃度が上昇し、当該用量を超えるとβガラクトシダーゼ血中濃度が横ばいになることから、当該用量が至適用量であると推定された。また、3点以上の用量を設定した上で用量依存性があると言うことは、ADMPCが有効であることの強力な証左と

なる。これまでの再生医療等製品ではほとんど適切な用量設定試験が実施されていなかったが、ADMPCを用いる本再生医療等製品は適切な有効性用量試験がなされ、至適用量が設定しえた。

低分子化合物であれば、当該化合物が標的蛋白質に結合する、ないしは*in vitro*にて生理的作用を有することを確認することが1st stepであり、これをConfidence in Mechanism (CIM)の取得と定義する。本剤に関しては、生体内で肝細胞へと分化生着し、肝細胞としてhost肝細胞と同等に機能することがそのmechanismであるため、上記知見により、本剤はCIMを取得したと言える。

これらCIMを基盤とし、Stem cellが肝臓内で肝細胞へと分化誘導されていることから、“*in situ reprogramming*”との概念を提唱した。Terminal differentiated cellを*in vitro*にて多能性幹細胞化する“*reprogramming*”、遺伝子導入等で*in vitro*にて直接目的細胞へと分化させる“*direct reprogramming*”に加えて新しい概念であり、治療へは*in situ stem cell therapy*として展開することとなる。

## (2) 安全性

安全性の確保について、規制対応の観点から考察したい。

### 非臨床試験

非臨床試験とは

*in vitro*研究により再生細胞治療における（幹）細胞と分化誘導培養法が決定される。続いて、その分化培養法により得られる細胞調整物・細胞医薬品等候補について、ヒトに投与して開発を進める価値があるか否かを判断することが必要となる。そのため実施する試験が非臨床試験である。低分



子化合物で求められる具体的な項目と試験内容を参考までに示す(表1)。非臨床試験は、毒性試験(一般毒性試験、特殊毒性試験)、薬理試験(薬効薬理試験、安全性薬理試験)、薬物動態試験、製剤学的試験、その他に大別されている。低分子化合物と再生細胞治療製剤とはその挙動や特性に差異があることは十二分に認識されるが、低分子化合物で用いられてきた非臨床試験packageは、再生細胞治療製剤での非臨床試験packageを組み立てるのに、大いに役に立つ。

非臨床試験では、主として実験動物を用い、開発候補再生細胞治療剤の有効性、安全性などを評価することとなる。非臨床試験は、臨床試験の実施の可否を判断するために重要な試験と位置づけられようが、臨床試験をより効率的に行うため、サロゲートマーカーの拾い上げ等を含む情報収集も目的となる。ヒト幹細胞臨床研究やあるいは臨床試験(治験)の実施中に予期せぬ有害事象等が発生した場合、非臨床試験にさかのぼって原因究明が行われるかもしれない。毒性試験のすべてと安全性薬理試験の一部はGLP省令を遵守して行われるが、ヒト幹細胞臨床研究の開始時、あるいは治験開始時にすべての試験がGLP省令下で行われていなければならないわけではない。

## 毒性試験

### 毒性試験の目的

毒性試験の主な目的は、開発候補の再生細胞治療製剤によって、どのような毒性がどの臓器・組織に現れるのかを明らかにすることによって、再生細胞治療製剤の安全性を評価することにある。毒性は、主作用に基づき薬理作用の延長上にある毒性と、

再生細胞治療製剤の特性によって薬理作用とは関係なく起こる毒性とがある。たとえば、心筋再生細胞治療製剤の主作用が心筋梗塞後の線維退縮である場合、その延長として心筋破裂が起これば前者であるし、心筋への投与後に骨化が起これば不整脈を認めれば、これは後者であるといえる。一般的に前者は予測が可能であるが、後者は多くの場合予測困難であり、重大な転帰に至るかもしれない。被験者に不利益を与えるべきでないというGCPの精神から考えても、重要な試験である。実際、治験薬GMPはGCP省令に規定されている。

### 一般毒性試験と再生細胞治療製剤

一般毒性試験は、単回投与毒性試験と反復投与毒性試験に分けられる。低分子化合物では実施が義務付けられており、再生細胞治療製剤でも必須と考える。単回投与毒性(急性毒性試験)は、被験物質を1回投与した時に観察される毒性を明らかにする試験であり、低分子化合物であれば観察期間14日間、必要に応じて解剖し、肉眼的な異常や病理組織的検査を実施することとなっている。再生細胞治療製剤の場合、そのものを毒性試験で用いるか、あるいは試験動物種の類似製剤を用いるべきなのか、議論がある。製剤そのものの毒性を評価するわけであるから、免疫不全・免疫抑制動物にヒト由来製剤を投与すべきと考えるが、試験動物種の類似製剤にての毒性試験を否定するものではない。いかにロジックを構築するかに尽きると考える。一般毒性試験では、低分子化合物と異なり致死量を求めることは困難である。本来単回投与毒性試験は、誤って薬物が大量投与された場合の

毒性発現を明らかにし、反復投与時の用量を設定することが目的とされている。本細胞製剤は医師が定めた細胞数等用量を投与するため、誤大量投与の事態は想定されない。従って、臨床時用量を超える、技術的に投与可能な最大投与量で評価しようと考えている。そのため、安全性用量設定試験により技術的に投与可能な最大投与量を設定すべきであり、その際に臓器障害性についての基礎データを収集し、GLP 下で実施する単回投与毒性試験に反映させるべきである。反復投与毒性試験（亜急性毒性試験、慢性毒性試験）は、被験物質を反復投与した時に観察される毒性を明らかにする試験であり、その本質は蓄積毒性を観察する試験である。この試験の結果をもとに最大無毒性量を算出し、臨床試験を計画する際に反映させることとなっている。再生細胞治療製剤では反復投与毒性試験は実施の必要はないと考えられる。なんとなれば、単回投与であっても生着すれば長期にわたり暴露された状態となるからである。ただし、頻回投与する場合には反復投与毒性試験も必要となると思われる。

再生細胞治療製剤の毒性評価項目をどのように設定すべきか、という議論が当然ある。一般毒性試験項目に加え細胞投与による組織傷害性は minimum consensus として想起されるが、投与する細胞調整物により case-by-case で additional に組み立てる必要がある。

#### 特殊毒性試験と再生細胞治療製剤

低分子化合物にかかる特殊毒性試験では、がん原性試験、抗原性試験、遺伝毒性試験、生殖・発生毒性試験、その他必要に応じて

局所刺激試験、依存性試験、光毒性試験などが実施される。がん原性試験は、低分子化合物では①遺伝毒性試験の成績から、がん原性が懸念される場合、②ヒトにがん原性を引き起こすおそれが前もって示される場合、③構造活性相関から遺伝毒性またはがん原性が示唆される場合、④反復投与毒性試験において前腫瘍性変化等が認められる場合、⑤親化合物または代謝物が長期間組織に停滞し局所の組織変化・病的变化を引き起こす場合、に実施されることとなっており、臨床使用で6カ月以上投与される場合も必須である。ラットでは24ヶ月～30カ月の観察、マウスないしはハムスターでは18ヶ月～24カ月の観察が求められる。抗原性試験は、モルモットに、化合物と化合物+タンパク質結合体反復投与し感作させ、感作後2～3週間後に上記を投与し、アレルギーの可能性を検討するものである。

再生細胞治療製剤においては、がん原性試験では、投与細胞自体のがん化可能性をどのように評価するかが課題である。遺伝毒性試験は、他の細胞をがん化することがありうるのか、という疑問への答えがない。間葉系幹細胞のような体性幹細胞ではそのような報告はない。一方、iPS細胞をがん細胞と共培養するとがん幹細胞に変化したとの報告もあり、多能性幹細胞由来細胞調整物では検討が必要となろう。生殖発生毒性試験に関しては、そもそも投与細胞が生殖腺に影響を与えるとは思えず、生殖発生毒性を有するとは考えにくい。

いわゆる体性幹細胞の安全性の評価として、造腫瘍試験を実施しなければならないか否かには議論がある。従前、WHO-TRS878を援用して、 $1 \times 10^7$ /匹の被検細胞検体をヌ

ードマウス（免疫不全マウス）10匹に移植し、12週間（改定前）あるいは16週間（改定後）観察して皮下の腫瘍形成を観察するという試験系がある。本来、蛋白製剤などBiologics生産の品質管理のために策定された指針であり、2010年の改定でWHO-TRS878は細胞製剤そのものの試験には用いることができない旨、appendixに記載された。現状、国際的にみても造腫瘍試験の明確なガイドラインはない。

そこで我々は、局所にて形成された腫瘍が、臓器・組織に「毒性」を有するか観察する、という視点から慢性毒性試験あるいは体内動態試験（運命試験）との併合試験を提唱したい。

### 薬理試験

#### 安全性薬理試験

安全性薬理試験は、安全性薬理試験と薬効薬理試験からなる薬理試験の一つの柱である。一般薬理試験ともいわれ、生理機能に対して再生細胞治療製剤の望ましくない薬理的作用を明らかにすることである。安全性薬理試験は、コアバッテリー試験とフォローアップ試験、補足的安全性薬理試験よりなるが、1つの試験系のかなで併合的に観察することが可能である。

コアバッテリー試験は、生命維持を司る器官（コアバッテリー）である心血管系、呼吸系および中枢神経系の生理機能に対する望ましくない薬理作用を明らかにする試験である。心血管系では血圧、心拍数、心電図など、呼吸器系では呼吸数や1回喚起量やHb酸素飽和度といった呼吸機能、中枢神経系では運動量、行動変化、体温などについてそれぞれ評価するものである。再生細胞

治療製剤にあつては、その投与方法によつては製剤特有の薬理試験項目が求められる。たとえば、冠動脈に細胞浮遊液を投与する場合であれば、微小梗塞を惹起する可能性もあり、心拍出量や心室収縮性（壁運動性）を追加項目として観察すべきである。静脈から細胞を投与して脳血管障害を治療するという製剤であるなら、細胞の肺塞栓・梗塞の可能性のあることから血液pHの観察や、脳梗塞治療であることから行動薬理、学習、記憶など評価することが望ましい。これらは、コアバッテリー試験によって得られた結果から、さらに詳しく評価すべきであると判断した際に行われる試験で、フォローアップ試験と呼ばれる。可能な限りGLP省令にもとづいて実施されるべきとされるが、full-GLPが必須であるわけではない。再生細胞治療製剤にあつては、コアバッテリー試験にて予想される課題が一定程度予期できることから、フォローアップ試験を組み込み、併合試験として実施する組み立てが望ましいと考えている。コアバッテリー試験あるいは反復投与毒性試験で検討されていなかった器官・臓器系に対して、何か望ましくない作用が懸念される場合に実施されるのが補足的安全性薬理試験である。再生細胞治療製剤の場合、補足的安全性薬理試験について事前に薬事戦略相談にて議論しておくことが賢明であろう。

#### 薬効薬理試験

薬効薬理試験は、被験物質たる再生細胞治療製剤に期待される効能・効果を裏付けるための試験であるため、その方法は細胞調整物の目的とする効能・効果によつて様々である。動物個体のみならず、ヒトを

含む様々な種類の細胞を用い、薬理効果を裏付けるための試験である。一般毒性試験や安全性薬理試験では健常動物を用いるが、薬効薬理試験では病態モデル動物を用いることもある。多くの研究室で行われている実験と同じではないか、と感じられる。多くの研究者が日々おこなっている実験も、薬事申請にむけ信頼性保証がなされていれば薬効薬理試験と言ってよい。どのような作用機序で薬理効果を発揮するのかの検討は重要で、臨床試験におけるエンドポイントやそのためのサロゲートマーカー・項目の設定を左右しうる。加えて、有効性用量設定試験は、過剰な細胞製剤を被験者・患者に投与しないために避けて通れない試験である。有効性用量設定試験では、用量設定で線形成を担保すべきと考えられ、我々は最適と思われる用量の3分の1と3倍用量と対照非投与群の4群で有効性用量試験を実施している。一般的に標準偏差を算出するために3個体以上のデータが必要となるが、5サンプル以上でなければ標準偏差の信頼性確保できないとされ、加えて途中個体死も想定にいれ、各群5個体で実施している。用量設定の幅は、5倍ないし5分の1の幅を超えなければ線形成（連続性）は確保されているとしてよいだろう。ちなみに、安全性評価にあつては単回投与安全性用量設定試験にあつては、非線形性の担保（非連続性の確保）の観点から、有効性用量の10倍以上の用量で毒性発現がないことをげっ歯類にて確認したうえで、開発を進めることとしている。

げっ歯類・非げっ歯類を用いるのか、いかなる病態モデル動物を用いるのか、その評価項目はどうするのか、は肝要である。

たとえば、心疾患に対して冠動脈から投与する場合は、大きさの観点からげっ歯類では正当な評価は難しい。ブタなど大動物であればCT、MRIあるいは心臓超音波検査にて心機能を評価できる。薬効薬理試験で、その作用機序の解明も重要である。本再生医療等製品であるADMPCであれば、投与後肝実質内での肝細胞としての生着を観察する必要があるし、一方でサイトカイン効果が薬理作用であると想定されるなら、血管新生あるいは内因性幹細胞活性化の検討がなされるべきで、抗線維化作用が主体であるなら組織学的にMasson Trichrome染色あるいはSirius Red染色で線維化面積比率の比較等が必要となる。ADMPCの非臨床開発の困難な点は、ライソゾーム病のモデルとして採用したGM1ガングリオシドーシスは遺伝性疾患であり、 $\beta$ ガラクトシダーゼの欠損が病態であるため、サイトカイン効果でいくら肝細胞を再生しても血中 $\beta$ ガラクトシダーゼ濃度は上昇しない点である。ある意味、ごまかしのきかない試験系であるということでもある。非臨床試験によるこれら結果は、知財の観点からも重要であり、また非臨床試験結果からFirst-in-Man臨床試験への外挿性、つまりSurrogate markerの連続性の観点を念頭に入れるべきであろう。

#### 薬物動態試験・体内動態試験

薬物動態試験は、低分子化合物にあつてはその吸収、分布、代謝、排泄、（トキシコキネティクス試験）を評価する試験であり、ADME(T)試験と称される。薬物動態試験の結果を用いて、毒性試験や薬効薬理試験の結果を考察し、臨床試験の計画を立てる際の情報とする。GLP省令に従う必要は

なく、信頼性基準に従って実施される。

再生細胞治療製剤にあつては、薬物動態試験という項目はないが、一方で体内動態試験あるいは運命試験が課せられている（平成20年自己通知、同種通知）。体内動態試験が薬物動態試験のアナロジーであると想定し議論しよう。

体内動態試験では、どのような投与・移植経路により、被投与細胞等はどの臓器に分布するのか、それらが臓器障害性を惹起させていないのかを観察する。細胞製剤投与後、どの時期で分布を観察するかには議論があるところであるが、製剤毎の特性によりcase-by-caseでロジックを構築すればよいと考える。たとえば、サイトカイン効果を期待しているのであれば、細胞は長期間には生着しないので、投与後3カ月に観察すればよいかもしれない。一方で、本開発品目であるADMPCのように投与後に器官・臓器内での生着・機能を期待するものであれば、6か月の観察は必要であろう。当該試験は、試験系として1000万円を超える費用もかかるため、今後の課題である。

投与後の細胞の追跡が最大の課題となる。これまでは、インジウムをはじめとする放射性同位元素で細胞を標識して、各臓器の放射活性をもって分布としてきた。しかし、放射性同位元素による細胞標識による追跡では、生細胞が追跡できているとは言えず、また半減期が短いことにより、長期の追跡ができなかったという短所がある。ヒト由来細胞の体内動態であれば、抗HLA抗体による免疫組織学的検索、あるいは*in situ* FISH法による追跡も可能であり、我々はヒトに特異的に存在する繰り返し遺伝子配列である*Alu*配列に着目し、*Alu*-PCR法による検

出系を報告している。ついで、体内動態でどの臓器を観察するかという課題が残る。投与経路により検索臓器に差異はあるかもしれないが、血流が豊富な心臓、肝臓、腎臓、脳だけでは不十分である。我々は、抗体医薬の製造販売承認時CTDにて経験のあるOrgan Panelを参考に、30余臓器をリスト化し、肉眼的な腫瘍検索と組織学的な検索をする手法を報告している。間葉系幹細胞であれば、異所性の骨分化・軟骨分化・脂肪分化の有無を検証する必要があるため、骨分化についてはvon Kossa染色、軟骨分化についてはAlucian Blue染色、脂肪分化についてはHE染色による検討を加えることとしている。多能性幹細胞であれば、異所性奇形腫形成の有無を確認するのであればHE染色、未分化多能性幹細胞の残存を検証するのであれば免疫染色による検索を追加すればよいと考えている。

これら考察をもとに、試験計画を立案、施行した。経門脈的投与にかかる単回投与毒性試験の予備試験（non-GLP;用量設定試験）、経門脈的投与単回投与毒性試験（GLP）と安全性薬理コアバッテリー試験として安全性薬理中枢毒性試験と安全性薬理呼吸毒製試験が終了、有意な毒性を認めなかった（GLP）。

遺伝毒性試験にて細胞製剤としての開発に支障のある結果は認められず、造腫瘍試験（旧WHOガイドラインに則り実施）及び軟寒天コロニー形成試験（WHOガイドラインに則り実施）で足場依存造腫瘍性は否定された。癌原性試験は、長期観察試験を予備試験として実施し、投与後の肝臓内での腫瘍形成あるいは異所分化ともに認めていない。本製剤は、単回投与を前提としてデ

ザインしていること、およびADMPCにおいては、投与後肝細胞として生着機能することから、単回投与でも長期細胞に暴露された状態となり蓄積毒性を考慮する試験系である反復投与毒性試験は不要と考えている。

薬物動態試験に相当する試験として、体内動態試験（運命試験）がある。これまでの細胞の投与後体内動態は、細胞を放射性同位元素標識しその分布を追うものであったが、半減期による追跡期間の限界と特異度の観点から限界があった。そこで、我々は細胞投与後6カ月経過観察し、30余臓器をリストアップ、各々につき肉眼的所見、組織学的病理所見を確認したが、異所性生着および慢性毒性試験として病的所見を認めなかった。加えて、我々は*Alu*-PCR法をもちいるヒト由来細胞の非ヒト動物体内動態追跡が可能であることも見出した。

### (3) 品質

再生医療製品の品質管理と規制への対応として、考察したい。

#### 研究開発時における品質と有効性・安全性の関係

再生医療製品に限らず、医薬品等においては品質、有効性、安全性の3つが確保されて初めて製品として成立する。研究者あるいは医師にとって品質は製薬会社が医薬品あるいは治験薬を提供する治験や臨床試験ではあまり意識されないが、その品質保証は有効性と安全性検証の根幹である。治験に期待されるデータの信頼性の観点から述べれば、一定の品質が保証された「モノ」が投与されていることが、データの信頼性を保証する第一歩となるからである。

有効性と安全性は臨床試験でしか評価が

できないが（安全性の一部は非臨床試験で評価する）、品質は臨床試験前に評価が可能であるからこそ、品質の確保は重要である。試験物、あるいは製品の品質管理を行わなくてはならないのは、研究開発段階での品質の役割としてお被験者保護（患者保護）の観点（倫理的妥当性）からの品質確保のためであり、承認申請・製造販売に向けた品質の知識・データの取得の観点から、臨床試験の質を高め、結果を正当に評価するためでもある。

#### 臨床試験段階から製造販売までの品質保証

再生医療製品の研究開発にあたって、臨床試験（治験）段階から製造販売までの品質保証の方策について述べる。試験物製造と非臨床試験をそれぞれの段階（相）に応じて品質管理・品質保証を行い、大学等研究機関あるいはベンチャー企業にあつては、企業主導の治験ができる状態にすることが目標となる。

当然のこととして、開発段階では製品の品質管理も試験・研究状態にある。品質に関しては、開発期間中を通して品質の一貫性が求められる。ここで言う「一貫性」とは、「違いがあっても良いが、どこが違うのかわかっている状態」ととらえればよい。開発後期である第Ⅲ相あるいは検証型治験においては市販品との「同等性」が要求される。「同等性」とは、「科学的に有意差が認められず、同等と判断しうる状態」ととらえればよい。承認審査では複数の臨床試験間での結果の再現性は重視される。特に低分子化合物医薬品にあつては、承認のためには2つ以上の無作為化比較試験で有効性が検証されることが望ましいとされ 試

験間で結果が安定して再現性があることが必要とされている。なかには、医師主導型治験1つで承認を受けているような申請もあるが、既に海外等の臨床試験で有効性が検証されている場合や、適応拡大である場合のみである。

### **医薬品品質の規制に関する考え方の変化**

2003年のICH（日米EU医薬品規制調和国際会議）は、品質についての考え方においてエポックメイキングであった。品質リスクマネジメントと科学を統合したアプローチを重視した、製品のライフサイクルを通して適用が可能な調和した医薬品品質システムを開発する（品質の作り込）という考え方であり、サイエンスベース・リスクベースのアプローチへのパラダイムシフトであると言える。ICHの品質ガイドラインにも変化が認められ、安定性試験を行う具体的な試験条件など具体的な試験法や規格設定を3極で調和させた内容をガイドライン化するという流れから、考え方や方法論などを具体的な数値的基準を持たない概念的な指針をガイドライン化するという流れになった。

この流れに沿って我が国でも薬事法が改正され（2005年施行）、品質保証の方向性が示されている。改正前は、適切な規格の設定に基づく品質管理に重点が置かれていたが、改正後には、開発段階から製造段階までを見通した品質保証体制の確立し、「製品ライフサイクル」に応じた継続的改善と柔軟な品質保証をおこなうこととなった。治験薬GMP（2008年改正）の基本的考え方としては、GCP省令にて「（略）本基準が医薬品開発の重要な期間に対して適応され

ることから、製品ライフサイクルを見据えた品質マネジメントの一環として活用することが望ましい」とされ、状況やリスクを考慮し、適切だと判断される要件を柔軟に運用することとなった。今後、平成26年の薬事法大改正（医薬品医療機器等法と名称変更）に伴い、規制動向を注視する必要がある。

### **CTD(Common Technical Document)**

CTD (Common Technical Document)とは、ICHで合意された承認申請資料の構成であり、医薬品に提供される。編集作業の重複を軽減するのが目的であり、あくまでも構成に関する取り決めであって内容まで共通化されているわけではない。品質に関しては、第2部の「品質概括資料」部分と第3部「品質に関する文書」が該当する。

### **規制当局が「品質」を評価するポイントと承認に必要な品質関連の資料**

申請から承認までに品質が評価されるのは2か所、承認審査とGMP調査である。承認審査ではチーム審査と信頼性調査が行われ、GMP調査では製造書への立ち入り調査が行われる。承認審査では、承認申請書に記載された「第2部品質に関する概括資料」を対象として審査され、CTD第3部は参照に使われる。GMP審査では、製造所の現地調査とともに製品標準書や作業手順書等が調査されることとなっている。承認申請書には、

提出年月日、提出者、担当者、名称（販売名）などの事項

成分及び分量又は本質

別紙規格

成分・分量・本質で別紙規格と

した有効成分・賦形剤などの規格を記載

成分ごとに「名称」「製造方法」

「貯蔵方法及び有効期間」「規格及び試験方法」を記載

製造方法

用法及び用量

効能又は効果

貯蔵方法及び有効期間

規格及び試験方法

製造所

備考

別紙（図表・数式など）

が記載される。今後、平成26年の薬事法大改正（医薬品医療機器等法と名称変更）に伴い、規制動向を注視する必要がある。特に、新たに発出される省令に再生医療等製品に特化して承認申請書に記載されるべき項目が提示されるはずである。

### 再生医療製品における品質の確保

#### 品質の確保のために

「品質」の定義は、ICH-Q6Aによれば、「原薬あるいは製剤の意図した用途への適切さのこと。同一性、含量、物質の純度のような特性を指すこともある。」とされる。承認段階での品質が保証されている状態を、平易に述べれば、「いつ・誰が・どこで・作っても、同じ品質のものをつくれる仕組みができていないこと」といえる。「同じ品質のもの」であることは、製造方法と最終製品の規格で管理・保証することとしており、主に承認審査で確認するものである。

「いつ・誰が・どこで」に関しては、何らかの制限を設けて管理する必要があり、主にGMP調査で確認することとなる。

研究開発時の品質確保にはGMPの手法がとられる。これは、通知、指針等に書かれている品質確保の方法はGMPの手法に基づいているからである。治験薬であれば、「治験薬の製造管理、品質管理等に関する基準」や平成24年のいわゆる5指針が挙げられ、その中でも第2章第3「最終製品の品質管理」の2「最終製品の品質管理法」に最終製品の品質に関する記載がある。

### 最終製品の品質管理項目

最終製品について、細胞数並びに生存率・確認試験・純度試験・細胞由来の目的外生理活性物質に関する試験・製造工程由来不純物試験・無菌試験・マイコプラズマ否定試験・エンドトキシン試験・効能試験・力価試験・力学的適合性試験といった一般的な品質管理項目及び試験を参考として、必要で適切な規格及び試験方法を設定し、その根拠を明らかにすることとなっている。

細胞数並びに生存率については、細胞の生存率が低いことによる有効性の減弱を阻止するという観点と、死滅細胞は血栓形成促進傾向にあること等による安全性の観点から議論される。細胞数として通知状は記載されているが、投与時に細胞懸濁液として投与する場合、その濃度についての評価が必須である。なんとなれば、細胞濃度が濃すぎると血栓症の危険性が上昇すると想定され、安全性と有効性を支える品質の担保として重要な評価項目となるからである。

確認試験とは、目的とする細胞・組織の形態学的特徴、生化学的指標、免疫学的指標、特徴的産生物質その他適切な遺伝型あるいは表現型のうち、重要細胞特性指標を選択して、目的とする細胞であることを確



認することである。「目的とする」細胞・組織であると強調されている通り、確認試験で不純物としての夾雑細胞については言及されていない。この点が、次項での純度試験との違いである。ただし、目的である細胞として単に間葉系幹細胞としての規格設定では十分とは言えない。なんとすれば、品質項目は、安全性と有効性を担保するために確認する項目であるからである。ADM PCであれば、紡錘状 (spindle shape) の付着細胞であり、免疫学的にはCD44/CD90/CD105等が陽性で、CD45等が陰性として定義されよう。また、MHC class IIの発現を認めないという品質指標も想定される。ADM PCは効能として肝細胞としての生着が期待される。これまでの経験から、GATA-4が検出されない脂肪組織由来細胞 (SVFあるいはASC、ないしはADSCといわれる細胞群) は経門脈的に投与後肝細胞として分化生着しないことから、「GATA-4陽性」も品質評価項目としてあげられる。従って、確認試験には、細胞そのものを同定するための指標 (CD44陽性等) と、が安全性の観点から期待される指標 (MHC class II陰性等)、有効性を期待させる指標 (GATA-4陽性) が検討されるべきである。

細胞の純度試験では、目的細胞以外の未分化細胞、異常増殖細胞、形質転換細胞の有無や混入細胞の有無等の細胞の純度について、目的とする細胞・組織の由来、培養条件等の製造工程、中間製品の品質管理等を勘案し、試験項目、試験方法及び判定基準を示すこととなっている。特に多能性幹細胞由来細胞製剤にあつては、分化抵抗性多能性幹細胞の残存が議論されることとなり、その残存比率の評価法と規格値の設定

が必須である。低分子化合物での純度試験と異なり、すべての目的以外の細胞を同定することは困難であり、目的細胞以外の細胞による毒性の発揮などを非臨床安全性試験で検証したうえで、marginをかけたうえでの規格値設定とならざるを得ない。非臨床試験でのワーストケースを活用し、最も不純物比率が高い細胞製剤で、かつ投与用量に非線形性をもたせた過剰用量にて得られた毒性試験でも安全性が確認することが現実的である。

細胞由来の目的外生理活性物質に関する試験は、確認試験での目的生理活性物質評価と相対するものである。もし、細胞由来の各種目的外生理活性物質のうち、製品中での存在量如何で患者に安全性上の重大な影響を及ぼす可能性が明らかに想定される場合には、適切な許容量限度試験を設定することとなっている。「明らかに想定される」という通知上の記載に行間を読んでいたきたい。細胞特性によってはこれら試験が求められることとなるが、非臨床試験で毒性が発揮されなければ検討する必要はないのではないかと考えている。

製造工程由来不純物試験については、通知に記載の通り、原材料に存在するか又は製造過程で非細胞成分、培地成分、資材、試薬等に由来し、製品中に混入物、残留物、又は新たな生成物、分解物等として存在する可能性があるもので、かつ、品質及び安全性の面からみて望ましくない物質等については、当該物質の除去に関するプロセス評価や当該物質に対する工程内管理試験の結果を考慮してその存在を否定するか、又は適切な試験を設定して存在許容量を規定することとなっている。また、試験対象物

質の選定及び規格値の設定に当たっては、設定の妥当性について明らかにすることが求められている。「品質及び安全性の面からみて望ましくない物質等」については評価されることとなっている。この記載の通り、品質及び安全性の面からみて望ましくないと考えられない物質等については、出荷時の品質規格として設定する必要はない。医薬品等を細胞製造工程で使用し、その残存が想定される場合であっても、使用した資材のすべてが最終製品に残存していると過程しても（全く洗浄除去されていないと仮定しても）、1回臨床投与量よりも少ない場合には、議論したうえで品質規格として設定しないという考えもある。

無菌試験・マイコプラズマ否定試験およびエンドトキシン試験にあつては、局法に基づいて行のが望ましい。ただし、局法と同等であると確認された試験法であれば、局法でなくとも品質管理に用いることが可能である。局法でなければならないのではなく、局法であれば試験方法についての議論が不要で、審査期間の短縮が期待されるということである。

効能試験・力価試験・力学的適合性試験については、細胞製剤の特性を考慮したうえでいずれかを選択すればよいとされている。たとえば、胚性幹細胞から肝細胞を再生して投与し、低アルブミン血症の改善を期待する場合、アルブミンを産生分泌する程度を品質管理項目とすればよい。ライソゾーム病を適応とする本再生医療等製品（ADMPC）にあつては、細胞・組織から分泌される特定の生理活性物質の分泌が当該ヒト体性幹細胞加工医薬品等の効能又は効果の本質である場合に該当し、その目的とし

ている必要な効果を発揮することを示すために、当該生理活性物質であるβガラクトシダーゼに関する検査項目及び規格を設定することが力価試験として品質管理項目となる。再生軟骨細胞組織のように力学的強度をその製品特性として期待される場合には、適用部位を考慮した力学的適合性及び耐久性を確認するための規格を設定することとなる。加重部位への投与が期待される製品にあつては、より厳格な品質管理が求められる。

### 品質の作り込みとしてのGMP

GMPとは、Good Manufacturing Practiceであり製造管理および品質管理に関する基準である。GMPでは、従業員、原材料、設備、製造、製品、試験、文書、廃棄物等の責務、取り扱い、実施方法等を定めている。

GMPの3原則は、

1. 間違い防止・・・人為的な誤りを最小限にする
  2. 汚染防止・・・汚染・品質低下を防止する
  3. 品質保証システム・・・高い品質を保証するシステムを設計する
- であり、実行して記録に残すことが辞意要である。

GMPではハードウェアとソフトウェアの両立が必要で、ハードとしての施設・設備・機器と、ソフトとしての文書・製造・試験方法・清掃・組織・教育訓練を両輪として初めて成り立つ品質保証システムであると言える。

ついで、GMPではルールを決めることが肝心である。膨大な文書量であるため、Great Mountains of Paperと揶揄される所以で

ある。ルールを決めることとは、それを基準書、標準書、手順書などといった文書体系に落とし込む作業であり、ルールを決め（文書化）、ルール通りに実行し（記録化）、チェックし（評価・検討）、改善する（ルール見直し）というサイクルで品質として作りこんでいく作業に他ならない。

ここで、サイクルを回して品質を作りこむと述べた。これは、品質がいわば螺旋状に向上していくことを意味し、換言すればGMP管理の程度には強弱があつて良いということを示す。製造のGMPは開発段階や工程の重要度に応じて使い分けることとすれば、第Ⅰ相試験では「SOPがあり、記録を保存する」で十分だが、第Ⅱ相試験では「SOPがあり、工程、作業、設備が評価され、記録を確認し、保存する」ことが求められる。第Ⅲ相になれば、製造販売承認後と同等性が求められるため、「SOPがあり、工程、作業のバリデーションが実施・記録され、品質保証部門がその記録を承認し、保存する」こととなろう。いずれにせよ、GMP管理には手順書を作り、記録を残すのが基本である。SOP (Standard Operation Procedure: 標準作業手順書)は、あらゆる作業に策定が求められる文書である。通常発生しない作業（規格外になったものの処理等）にも必要で、実行しない作業（再測定は不可等）には実行しないことを明記されなければならない。作業を勝手に変えないことは、品質管理上必須であり、SOPを改善したいあるいは変更したい際には変更管理を行う必要がある。SOP通りに作業できないとき（逸脱）は逸脱管理が求められ、改善・変更は手順を踏んでおこなうこととなり、変更管理・逸脱管理にも手順を決めなけれ

ばならない。SOPに求められる要素は、それがどのような作業であれ、わかりやすく、必要なことはすべて書かれていること。作業ごとにかつすべての作業に存在しすぐ見ることができ、そして最新であることである。これらを念頭に、SOP文書体系の構築をされたい。

### 再生医療製品におけるGMP

品質管理の手段として、承認申請で審査される品質と、GMPにて評価される品質がある。後者については、平成24年のいわゆる5指針の第2章「製造方法」の第1および第2に記載があると考えると理解しやすい。原材料及び製造関連物質については、原材料となるヒト細胞・組織と、目的とする細胞・組織以外の原材料及び製造関連物質とに分けられる。前者が受け入れから出荷まで一貫して存在するものであつて、後者がそこに振りかけられ洗浄されるというイメージが理解しやすい。GMP上は、原材料等の受け入れ管理に該当するものである。

原材料となるヒト細胞・組織については、起源及び由来、選択理由、原材料となる細胞・組織の特性と適格性に関しては、出発原材料となる細胞について、文献的な考察を交えつつ、申請者らの研究成果を踏まえ議論すればよい。次いで、原材料として用いられる細胞・組織について、その生物学的構造・機能の特徴を、適切な指標から適宜選択して示し、当該細胞・組織を原材料として選択した理由を説明することと通知にはある。起源及び由来、選択理由、原材料となる細胞・組織の特性と適格性については、出発細胞・組織そのものに重点がおかれた記載となるべきであり、原材料とし

て用いられる細胞・組織について、当該細胞・組織を原材料として選択した理由を説明することとは、例えば分化誘導における優位性などex vivoでの細胞特性や、細胞製剤投与後の活性などに重点が置かれている

自己由来細胞製剤でない場合には、ドナーに関する記録については、原材料となる細胞・組織について、安全性を確保するために必要な情報が確認できるよう、整備、保管されていることが求められている。感染症の伝播のリスクの低減が求められるので、いわゆるGTP通知である平成12年医薬発第1314号別添1を参照とすべきであり、加えて、通知には記載はないが平成15年厚生労働省告示第210号（生物由来原料基準）への適合性についても念頭に入れる必要がある。本開発再生医療等製品はこれに該当する。

細胞・組織の採取・保存・運搬について、採取者及び採取医療機関等の適格性については、ドナーの安全性・倫理性の確保に加え、採取された細胞組織へのcontaminationの否定が念頭に入れられた規定である。原材料となる細胞・組織の採取者及び採取医療機関等に求めるべき技術的要件について、明らかにすることとは、採取者が医師であり、望ましくは該当領域の専門医など十分な修練を積んでいる事、採取機関が医療機関に限定されておりcontaminationの危険性を低減できる施設を有することを示す必要がある。

目的とする細胞・組織以外の原材料及び製造関連物質とは、培地であったりサイトカインであったり、場合によってはフィーダー細胞もこれに該当する。目的とする細胞・組織以外の原材料及び製造関連物質を

明らかにし、その適格性を示すとともに、必要に応じて規格を設定し、適切な品質管理を行うことが必要であると記載されている。受け入れ規格の設定と受け入れ試験が製造の場では行われることとなる。生物由来製品又は特定生物由来製品を原材料として使用する場合は、「生物由来原料基準」(平成15年厚生労働省告示第210号)をはじめとする関連法令及び通知を遵守することとなっている。同告示は薬事法第42条に基づく告示であるため、生物製剤基準とともに薬事法第42条基準ともいわれ、これに合致しない資材を用いている場合には、製造販売承認を取得できない。治験に入る前に、十分に検討すべきである。

製造工程の項には、受け入れ検査、細菌、真菌及びウイルス等の不活化・除去、組織の細切、細胞の分離、特定細胞の単離等、最終製品の構成要素となる細胞の作成、細胞株の樹立と使用、細胞のバンク化、製造工程中の取り違い及びクロスコンタミネーション防止対策の各章項目がある。これらは、GMPとして管理される品質に深く関係し、すべてSOPに記載され管理されるべき項目である。

承認申請書の記載事項はすなわち承認事項となるため、申請書の製造方法欄に操作条件などの具体的な管理値やパラメーターを記載してしまうと逸脱が薬事法違反になってしまうため、承認申請書と製品標準書（GMP）の違いには、配慮が必要である。承認までの品質確保の要素を示した（図3）。申請書には製造工程の一連の操作手順のうち品質の恒常性確保の為に必要な事項を選択して記述すべきで、申請書には「目標値/設定値」を記載し、実際の管理範囲は製品