

201309012A

厚生労働科学研究費補助金  
(医療技術実用化総合研究事業(臨床研究・治験推進研究事業))  
総括研究報告書

重症心不全を対象とする  
脂肪組織由来多系統前駆細胞による  
心筋再生細胞医薬品の開発

平成25年度 総括・分担研究報告書  
(平成26年3月)

研究代表者  
大阪大学臨床医工学融合研究教育センター  
招聘教授 松山晃文

厚生労働科学研究費補助金  
(医療技術実用化総合研究事業(臨床研究・治験推進研究事業))  
総括研究報告書

重症心不全を対象とする  
脂肪組織由来多系統前駆細胞による  
心筋再生細胞医薬品の開発

平成25年度 総括・分担研究報告書  
(平成26年3月)

研究代表者  
大阪大学臨床医工学融合研究教育センター  
招聘教授 松山晃文

## 目次

### I. 総括研究報告書

「重症心不全を対象とする脂肪組織由来多系統前駆細胞による心筋再生細胞医薬品の開発」

研究代表者

松山晃文 大阪大学臨床医工学融合研究教育センター 招聘教授

..... 1

### II. 分担研究報告書

「ミニブタを用いた脂肪組織由来多系統前駆細胞を用いる再生医療等製品の単回投与急性毒性・安全性薬理併合試験」

松山晃文 大阪大学臨床医工学融合研究教育センター 招聘教授

宮川繁 大阪大学大学院医学系研究科 外科学講座 講師

..... 27

「再生医療等製品にかかる品質規格試験について—公表論文からの考察—」

早川堯夫 近畿大学 薬学総合研究所 所長・特任教授

松山晃文 大阪大学臨床医工学融合研究教育センター 招聘教授

..... 39

「再生医療等製品にかかる知財戦略について—特許出願公開情報を用いたcase study—」

松山晃文 大阪大学臨床医工学融合研究教育センター 招聘教授

..... 57

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

..... 71

### IV. 研究成果の刊行物・別刷

..... 79

# I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金  
(医療技術実用化総合研究事業(臨床研究・治験推進研究事業))  
総括研究報告書

重症心不全を対象とする脂肪組織由来多系統前駆細胞による心筋再生細胞医薬  
品の開発

研究代表者 松山晃文 大阪大学臨床医工学融合研究教育センター 招聘教授  
研究分担者 宮川繁 大阪大学大学院医学系研究科外科学講座 講師  
早川堯夫 近畿大学薬学総合研究所 所長・特任教授

研究要旨

わが国心不全による年間死亡数は約4万3千人であり、その多くが末期虚血性心疾患による。重篤な虚血性心疾患・心筋梗塞症例に選択される冠動脈バイパス術によっても、残存心筋細胞の枯渇により治療効果が得られない症例 (poor-responder) が存在する。そのため、サイトカイン効果による血管新生を期待した第1世代の再生医療を超えた、枯渇した心筋細胞を再生する第2世代の再生医療が待たれている。本研究において研究を進めている再生医療製品は、重症心不全を対象疾患とし、冠動脈バイパス術poor-responderに適用する自己由来細胞製剤である。研究は、①有効性確認試験、②頻回投与有効性蓄積試験、③Confidence-in -Mechanism検証、④安全性検証、⑤品質検証、⑥プロトコール関連文書作成、の6項目をWorking Breakdown Structure (WBS)として設定し、研究開発を進めることとした。平成25年度にあっては特に、①凍結保存細胞をon siteにて解凍し、非洗浄にて投与しても有効性の低下を認めないことを確認した。④安全性薬理一般毒性併合試験にて、凍結保存細胞をon siteにて解凍し、非洗浄にて投与しても、不整脈を含む安全性上の問題は生じないことを確認した。

A. 研究目的

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; ADMP) を、重症心不全を適応とする再

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。

B. 研究方法

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う。

(倫理面への配慮)  
該当せず

## C.研究成果

### (1) 有効性

2段階塞栓・再還流法にて8週齢のブタを用いて重症心筋梗塞モデルを作製した。具体的には、大腿動脈から経皮経管的に6Fのガイドカテテルを左冠動脈入口部にかかけ、そこからガイドワイヤーを第1対角枝(AHA分類の#9)に挿入し、ガイド下にてバルーンング(閉塞再開通)でプレコンディショニングを行った。1週間後、ガイドワイヤーを左冠動脈前下降枝(AHA分類の#6~#8)に挿入し、左冠動脈回旋枝分岐部直下の左前下降枝(AHA分類の#6)にてバルーンング(閉塞再開通)を行い、心筋虚血流域を得た。その4週間後(最初の閉塞再開通からは5週間後)に心臓超音波検査にて心駆出率が40%以下の個体を重症心不全モデルとして試験に供することとした。

2回目の塞栓・再還流から4週間後に、TC protector (DSファーマ社製)にて凍結あるいは非凍結の細胞製剤を $3 \times 10^5$ 個/体重kgをカテテルにて経冠動脈投与し、凍結・非凍結にて有効性に差を認めるか検証した。

初回投与直前、投与後1カ月、2か月、3か月にて心臓超音波(エコー)にて、左心駆出率(%EF)を計測し、EFの推移を示すとともに、投与直前値との差を $\Delta EF$ (%)を観察した。なお、免疫抑制化のため、細胞投与5日前より犠牲死させるまで連日シクロスポリンの筋肉注射を行った。その結果、凍結・非凍結で心機能および心機能回復に差を認めず、本製剤はロット構成による大量生産が可能で、凍結状態での出荷も可能であることが示しえた。今後、凍結細胞のexpireを検証する必要がある。

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、生体内で心筋細胞へと分化生着し、心筋細胞としてhost心筋組織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。そのために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まっ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るべ

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だろう。

## 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・病的変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か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か月の観察、マウスないしはハムスターでは18ヶ月～24か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る。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らると思えず、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っては、その投与方法によれば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・梗塞の可能性があることから血液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っては、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・効果によって様々である。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・項目の設定を左右する。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、ムコ多糖症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か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ADMP C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 にあっては、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。

#### 本再生医療製品での非臨床安全性試験の実施

単回投与安全性試験および安全性薬理試験に関し、併合試験として実施することとした。ミニブタにヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞

(hADMPC) を用いる心筋再生医療製品（以下心筋再生医療製品）を単回冠動脈内投与した場合の影響を観察した。心筋再生医療製品の  $1.0 \times 10^6$  cell/kg を麻酔下ミニブタの冠動脈内に投与し、投与後14日間の観察期間中に一般状態観察、体重測

定、摂餌量測定を実施した。観察期間終了日に剖検し、心臓、肺、腎臓及び肝臓を摘出、心臓及び肺の病理組織学的検査を実施した。対照群として媒体投与群及び無投与対照群を設けた。

麻酔下での血圧及び心電図検査で、心筋再生医療製品群で投与後QT時間及び補正QTの各項目が延長傾向にあった。当試験では吸入麻酔薬としてQT延長作用が報告されているイソフルランを使用している。また媒体群及び無投与対照群でも同様にQT時間及び補正QTの延長が認められたため、この変化は麻酔の影響であると判断した。

心筋再生医療製品の投与後、血液学的検査で投与前に比べて投与後1日に白血球数の増加、白血球分類における好中球比率の高値及びリンパ球比率の低値を示した。また血液生化学的検査でクレアチニンキナーゼが高値を示した。これらの変化のうち、白血球数及び白血球分類に見られた変化は投与準備として大腿動脈を露出させ、シースカテーテルを留置する処置を施した動物に普通に見られる反応であり、無投与対照群でも認められていること、投与後14日には投与前と同程度に回復したことから、被験物質による影響ではないと判断した。また当試験では冠動脈投与を実施しており、投与操作そのものによって心筋及び骨格筋に多く含まれるクレアチニンキナーゼが逸脱酵素として血中に放出されたことが考え

られたため、クレアチニンキナーゼの高値は被験物質による影響ではないと判断した。その他、一般状態観察、体重、摂餌量測定、覚醒下での心電図検査及び呼吸機能検査で被験物質の投与に起因する変化は認められなかった。

以上のように、ミニブタを用いた単回冠動脈内投与において、有効性用量の3倍である心筋再生医療製品投与量では被験物質によると思われる影響は認められなかった。

これら健常ミニブタを用いる試験が病的状態での安全性・薬理を反映しているかに関し、以下のロジックを組み立てた。疾患モデルミニブタ（慢性心筋梗塞）であっても、心臓以外の臓器に関しては健常とみなせる。したがって、心臓以外の臓器での安全性、安全性薬理（中枢・呼吸）に関しては、健常ミニブタでの試験は受け入れ可能である。心臓に関し、安全性上の懸念事項は、細胞による塞栓・梗塞と、催不整脈である。慢性心筋梗塞モデルでは健常心筋組織が少ないため梗塞のリスクは低く、むしろ健常ミニブタのほうがリスクは高く、塞栓・梗塞による安全性上の懸念を検討するには、むしろ健常ミニブタのほうが望ましい。催不整脈作用については、梗塞モデルミニブタでの有効性試験時に得ている心電図モニターで不整脈が生じていないこととの契合した議論にて解決できる。これらロジックを説明したことで、PMDA 審査官から健常ミニブタで得られる結果でよいとの助

言を得ている。

細胞製剤投与後ブタ体内動態・慢性安全性併合試験として、ブタに経冠動脈的に細胞製剤を投与、6カ月経過観察を実施中。H25.9に犠牲死させた後、H24に考案したorgan panelに基づき、各臓器・組織の病理学的検討（安全性確認）と、PCR法を用いてのヒト由来細胞の残存を観察した。細胞製剤投与後ブタ体内動態・慢性安全性併合試験6カ月モデルとしてH25.9に体内動態（Alu-PCR）と安全性（病理学的）検証、3頭とも組織学上病的所見を認めず、投与ヒト細胞は、心臓では検出されるが心臓以外では30臓器すべてでヒト由来DNAを検出せず、投与細胞は心臓に局限して生着していることを明らかとした。

確立したげっ歯類（ヌードラット）での経冠動脈的細胞製剤投与試験系を用い、蛍光標識細胞製剤によるげっ歯類経冠動脈的投与後体内動態試験を実施した。細胞1000個が局所集積した場合までは検出可能であり、10000個とされている<sup>111</sup>Inより検出感度は高い。一方で、蛍光色素は3週間までしか追跡できなかった。

PMDAとの協議で、細胞投与後急性期体内動態（14日間まで）は蛍光標識細胞にて実施し、長期的にはPCR法による検出にて治験届に成績報告することとした。今後は、蛍光標識細胞製剤によるげっ歯類経冠動脈的投与後の蛍光強度と定量的PCR法との相関について検討する必要がある。

### (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。

#### 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ること」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る、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塞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。なんとなれば、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。ADMPC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 cl

ass IIの発現を認めないという品質指標も想定される。ADMPC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、確認試験での目的外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だきたい。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、局法に基づいて行うのが望ましい。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ぬのではなく、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。

これら議論と、分担研究報告書「再生医療等製品にかかる品質規格試験について—公表論文からの考察—」にて得られた成果の細胞規格試験packageの提案（下表）から、以下の項目を規格試験として設定することとした。

品質規格試験の柱 lesson from case study

Minimum consensus	無菌性関連試験	無菌試験 マイコプラズマ否定試験 エンドトキシン測定試験
	取り換え否定試験	DNA finger print (STR), 核型試験
生物学的同一性試験	不変性確認試験	CGH, 軟寒天コロニー形成試験 皮下造腫瘍試験 (WHO TRS-87B)
ウイルス否定試験 (感染性ウイルス否定試験)	<i>in vivo, in vitro / species</i>	
生物学的同等性試験 (biocompatibility, biocomparability) (注: この取扱に試験あり)		
安全性関連試験	未分化細胞混入否定試験	ES関連遺伝子・蛋白発現確認
有効性関連試験	分化誘導確認試験	目的細胞関連遺伝子・蛋白発現確認

### Minimum Consensus:

- 細胞数
- 細胞濃度
- 細胞生存率
- 無菌試験
- マイコプラズマ否定試験
- エンドトキシン測定試験

### 生物学的同一性試験:

- CGH
- 軟寒天コロニー形成試験
- 免疫不全マウス皮下移植造腫瘍試験

### ウイルス否定試験:

自己体性幹細胞由来製剤のため非該

### 生物学的同等性試験:

*Nkx2.5*および*Isl-1*陽性

## D. 考察

### 1. 有効性検証:

冠動脈形成術・冠動脈バイパス術 poor-responder の重症心不全の病態を反映した  
ブタ心筋梗塞モデルを用い、凍結保存細胞製剤を解凍後非洗浄にて投与しても、有効性 (EF) は低下せず、本細胞製剤の長期保存可能性を示唆する結果を得た。

## 2. 安全性検証:

安全性試験 (毒性試験) の実施を目指し、単回投与毒性試験 (安全性薬理併合試験) を実施した。洗浄細胞製剤および非洗浄細胞製剤のいずれでも有効性用量の3倍量の投与で不整脈など安全性上の懸念すべき事象は発生せず、本細胞製剤はヒト幹細胞臨床研究あるいは治験開始にむけ安全性は克服したといえる。

## 3. 品質 (製造) 検証:

薬事法第42条基準である生物由来原料基準に適合しない Life Technologies 社の KnockOut Serum Replacement の代替品を見出し、売血由来のトランスフェリンも遺伝子組み換えへの変更の目途がたち、verification の実施にむけた検討を開始している。

## 4. プロトコール関連文書作成:

薬食審査発0420第1号治験通知を参考に、治験届関連文書作成を開始した。具体的には、治験薬概要書、治験計画書、製品標準書、標準手順書、製造指図書・記録書および三管理基準書の作成を行い、製品標準書、標準手順書、製造指図書・記録書のドラフトは完成した。

## E. 結論

薬事法第42条基準適合の後の修正、治験届に記載する治験実施責任医師の確定は課題であるが、平成26年度中のヒト幹細胞臨床研究ないし治験の開始が十分射程に入っている。

## F. 研究発表

1. 論文発表

【松山晃文】

1. Matsuyama A. Translational research in regenerative medicine: A translational gap. *Pharmaceuticals Policy and Law*. 2013;15:163-172.
2. Shudo Y, Miyagawa S, Okura H, Fukushima S, Saito A, Kawaguchi N, Matsuura N, Shimizu T, Okano T, Matsuyama A, Sawa Y. Addition of mesenchymal stem cells enhances the therapeutic effects of skeletal myoblast cell-sheet transplantation in a rat ischemic cardiomyopathy model. *Tissue Eng, part A*. 2013 Oct 29.
3. Okura H, Soeda M, Miyagawa S, Sawa Y, Ichinose A, Matsuyama A. *in situ* reprogrammed spermine treated adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells improve left ventricular dysfunction in a swine chronic myocardial infarction model. *Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Congress on Coronary Artery Disease*. 2013. 39-42.
4. Okura H, Soeda M, Morita M, Ichinose A, Matsuyama A. Transplantation of human adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells but not adipose tissue-derived stromal/stem cells reduces serum cholesterol in hyperlipidemic Watanabe rabbits. *Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Congress on Coronary Artery Disease*. 2013. 51-54.
5. Okura H, Soeda M, Morita M, Ichinose A, Matsuyama A. Transplantation of adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells reduces serum cholesterol in hyperlipidemic Watanabe rabbits. *Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Congress on Coronary Artery Disease*. 2013. 51-46.
6. Moriyama H, Moriyama M, Sawaragi K, Okura H, Ichinose A, Matsuyama A, Hayakawa T. Tightly regulated and homogeneous transgene expression in human adipose-derived mesenchymal stem cells by lentivirus with tet-off system. *PLoS One*. 2013 Jun 12;8(6):e66274.
7. Kawase R, Ohama T, Matsuyama A, Matsuwaki T, Okada T, Yamashita T, Yuasa-Kawase M, Nakaoka H, Nakatani K, Inagaki M, Tsubakio-Yamamoto K, Masuda D, Nakagawa-Toyama Y, Nishida M, Ohmoto Y, Nishihara M, Komuro I, Yamashita S. Deletion of progranulin exacerbates atherosclerosis in ApoE knockout mice. *Cardiovasc Res*. 2013 Oct 1;100(1):125-33.
8. Yuasa-Kawase M, Masuda D, Yamashita T, Kawase R, Nakaoka H, Inagaki M, Nakatani K, Tsubakio-Yamamoto K, Ohama T, Matsuyama A, Nishida M, Ishigami M, Kawamoto T, Komuro I, Yamashita S. Patients with CD36 Deficiency Are Associated with Enhanced Atherosclerotic Cardiovascular Diseases. *J Atheroscler Thromb*. 2013;20(5):514-5.
9. 大倉華雪・松山晃文 細胞医療での申請にあたっての注意点—品質の観点から— 先進医療 NAVIGATOR II 再生医療・がん領域の実用化への TOPICS 2014. pp5-8
10. 松山晃文 再生医療とレギュラトリーサイエンス -早期実現に向けて合理的な理解を- ヒューマンサイエンス 2013: (7).28-31
11. 松山晃文 再生医療の規制と今後の動向 リーガルマインド 2013:337.36-102

12. 松山晃文 再生医療の早期実現化と国際展開に向けた研究開発支援 再生医療 2013;12(2).133-134.
  13. 松山晃文：「再生医療とレギュラトリーサイエンス -早期実現にむけて合理的な理解を-」 ヒューマンサイエンス 2013: (7).28-31.
  14. 松山晃文：「再生医療の規制と今後の動向」 リーガルマインド 2013:337.36-102.
- 【早川堯夫】
1. Moriyama M, Moriyama, Uda J, Matsuyama A, Osawa M and Hayakawa T.: BNIP3 Plays Crucial Roles in the Differentiation and Maintenance of Epidermal Keratinocytes. J Invest Dermatol. 2014 134(6): 1627-35.
  2. Moriyama H, Moriyama M, Sawaragi K, Okura H, Ichinose A, Matsuyama A, Hayakawa T.: Tightly regulated and homogeneous transgene expression in human adipose-derived mesenchymal stem cells by lentivirus with tet-off system. PLoS One. 2013 Jun 12;8(6):e66274.
  3. Takayama K, Nagamoto Y, Mimura N, Tashiro K, Sakurai F, Tachibana M, Hayakawa T, Kawabata K, Mizuguchi H.: Long-Term Self-Renewal of Human ES/iPS-Derived Hepatoblast-like Cells on Human Laminin 111-Coated Dishes. Stem Cell Reports. 2013 Oct 3;1(4):322-335.PMID: 24319667 [PubMed - as supplied by publisher]
  4. Takayama K, Kawabata K, Nagamoto Y, Inamura M, Ohashi K, Okuno H, Yamaguchi T, Tashiro K, Sakurai F, Hayakawa T, Okano T, Furue MK, Mizuguchi H.: CCAAT/enhancer binding protein-mediated regulation of TGFβ receptor 2 expression determines the hepatoblast fate decision. Development. 2013 Nov 27. [Epub ahead of print]
  5. Takayama K, Kawabata K, Nagamoto Y, Kishimoto K, Tashiro K, Sakurai F, Tachibana M, Kanda K, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H.: 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. Biomaterials. 2013 Feb;34(7):1781-9.X
  6. Kinoshita M, Nakatsuji Y, Suzuki S, Hayakawa T, Kakehi K.: Quality assurance of monoclonal antibody pharmaceuticals based on their charge variants using microchip isoelectric focusing method. J Chromatogr A. 2013 Sep 27;1309:76-83.
  7. Iwatsuka K, Watanabe S, Kinoshita M, Kamisue K, Yamada K, Hayakawa T, Suzuki T, Kakehi K.: Free glycans derived from glycoproteins present in human sera. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2013 Jun 1;928:16-21.
  8. Yodoshi M, Iikeda N, Yamaguchi N, Nagata M, Nishida N, Kakehi K, Hayakawa T, Suzuki S.: A novel condition for capillary electrophoretic analysis of reductively aminated