

201409003B

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))  
総合研究報告書

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24-26年度 総合研究報告書  
(平成27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. 総合研究報告書

スペルミン加培養脂肪組織由来多系統前駆細胞試験物概要書

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

..... 3

## II. 分担研究報告書

再生医療等製品における工程由来不純物の安全性評価にかかる基本的考え方

近畿大学 薬学総合研究所 所長・特任教授 早川堯夫

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

..... 31

脂肪組織由来多系統前駆細胞シートの有効性検証

大阪大学大学院医学系研究科 心臓血管外科 特任准教授 宮川繁

..... 39

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表

..... 47

## IV. 研究成果の刊行物・別刷

..... 55

# I. 総合研究報告

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）  
総合研究報告書

スペルミン加培養脂肪組織由来多系統前駆細胞試験物概要書

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

研究要旨

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が存在する。これまで、これら重症心不全を対象疾患とし、経冠動脈的投与脂肪組織由来多系統前駆細胞を細胞医薬品として開発するため研究開発を実施してきた。本研究の到達点は治験届 package 構築であり、その概要版としてスペルミン加培養脂肪組織由来多系統前駆細胞試験物概要書を提示する。

A. 研究目的

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が存在する。これまで、これら重症心不全を対象疾患とし、経冠動脈的投与脂肪組織由来多系統前駆細胞を細胞医薬品として開発するため研究開発を実施してきた。本研究の到達点は治験届 package 構築であり、その概要版としてスペルミン加培養脂肪組織由来多系統前駆細胞試験物概要書を提示することを目的とする。

B. 研究方法

平成 24 年度から平成 26 年度までに実施した有効性試験、非臨床安全性試験、ならびに品質にかかる part を統合し、試験物概要書とする。

（倫理面への配慮）

1. 非臨床試験（研究）において遺伝子改変動物、プラスミドDNA あるいは遺伝子導入ウイルス等を用いる場合は、使用に際して遺伝子組み換え生物などの使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律、カルタヘナ条約等各種法令・告示・通知に基づき研究を実施する。
2. 動物操作に当たっては、（独）医薬基盤研究所の動物実験規定に従って行なう。
3. 臨床試験の実施にあつては、計画書（プロトコール）に関して医学倫理委員会での承認を受け、本人の書面による informed consent を取得した患者のみを対象とする。

C. 研究結果

「スペルミン加培養脂肪組織由来多系統前駆細胞試験物概要書」

1 物理的・化学的および薬剤学的性質

スペルミン加培養脂肪組織由来多系統前

駆細胞懸濁液（以下、本試験物）は、健常ドナー皮下脂肪組織から約100~200g採取した脂肪組織に含まれる脂肪組織由来多系統前駆細胞を、体外で培養して増殖させた後に、スペルミンを添加して追加培養し、STEM CELLBANKERにて細胞を懸濁し凍結したものであって、医療機関にて融解後に経冠動脈的に患者心臓の障害部位に投与するヒト（同種）由来再生医療等製品である。

本試験物は、被験者に対して経冠動脈的に障害された冠動脈領域に投与する細胞製剤である。本試験物の外観は、乳白色半透明の懸濁液であり、次に示すような性質を持つ。また、本試験物は、無菌試験、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験に適合する。

## 2 非臨床試験

### 2.1 薬理作用

#### 1) 効力を裏付ける試験

閉塞再灌流2段階法によるブタ慢性心不全モデルに、免疫抑制下にて本試験物を経冠動脈的に投与し、その心機能改善効果を検証した。

当該モデルブタのヒトへの外挿性（Root of Administration および transmission）を勘案して有効性用量を設定することを目指し、用量として0,  $1 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$  cells/kg の細胞製剤を経冠動脈的に投与し、細胞投与による有効性（心機能改善）を心臓超音波検査（心駆出率）にて検証、最適有効性用量が  $3 \times 10^5$ /kg であることを明らかとした。

異種細胞製剤投与には免疫抑制剤の影響を否定できない。そこで、ブタ皮下脂肪組織よりヒトと同等の方法でスペルミン加培養脂肪組織由来多系統前駆細胞を製造し、閉塞再灌流2段階法によるブタ慢性心不全モデルに、

自己由来および同種由来本試験物を  $3 \times 10^5$ /kg 経冠動脈的に投与し、その心機能改善効果を確認した。

以上の結果から、ブタ慢性心不全モデルにおいて、本試験物の経冠動脈的投与による左室収縮機能の改善が示されており、その効力は非臨床試験において示された。

#### 2) 副次的薬理試験

自己細胞を経冠動脈的に患者心臓の障害部位に投与するものであることから、本試験物を用いた副次的薬理試験は実施していない。

#### 3) 安全性薬理試験

本試験物を用いた安全性薬理試験は実施していない。海外では、心筋への注射による骨格筋芽細胞あるいは骨髄由来間葉系幹細胞投与の臨床試験が実施されているが、その試験において、重篤な心室性不整脈の発生による植え込み型除細動器（ICD）の装着例が報告されている。この重篤な心室性不整脈の発生と、骨格筋芽細胞あるいは骨髄由来間葉系幹細胞投与との因果関係は明らかとなっていないが、その関連性は完全には否定されておらず、細胞懸濁液投与による投与においても不整脈が発生するリスクが否定はできない。

ブタ慢性心不全モデルを用いた試験は細胞懸濁液投与による有効性確認が目的ではあるが、心電図検査による心室性期外収縮の解析を行い、本試験物投与による重篤な心室性不整脈の発生の可能性について検討した。すなわち、基礎状態、本試験物投与日、投与4週後、投与8週後、投与12週後に心電図データを取得し、心室性期外収縮の発生パターン及び発生頻度からLownの分類で分類し、細胞懸濁液投与群と対照群とで

比較した。Lownの分類はヒトの臨床で重篤な心室性不整脈の発生予測に用いられる分類法であり、Grade 3 以上で心室細動発生の危険度が高く、注意が必要とされる。

心筋の器質的な変化は、不整脈源となることが知られており、ヒトにおいても心筋梗塞発症後は心室性の不整脈の発生頻度が高いことが報告されている。しかしながら、ブタ由来の本試験物類似製剤投与群の投与後に心室性期外収縮は認められず、本試験物投与による心室性不整脈の危険性は低いと考えられた。

#### 4) その他の薬理試験

本試験物を用いたその他の薬理試験は実施していない。

## 2.2 毒性試験

### 1) 一般安全性試験

健常ゲッチング・ミニブタを用いた一般安全性の評価では、体重換算量を超える本試験物量を健常ゲッチング・ミニブタに経冠動脈的に投与した。投与後、一般状態観察、体重測定を実施し、14日後に剖検し、血液検査、及び必要に応じて病理検査を行い、本試験物が全身に及ぼす一般安全性上の問題について評価した。本試験時の使用試験物はヘパリン加乳酸リングルに浮遊したものである。対照群は本試験質である細胞懸濁液を投与しないヘパリン加乳酸リングル同容量投与群とした。その結果、いずれの検査においても本試験物投与群特有の変化や安全性上意義のある変化は認められなかった。従って、本試験物の臨床使用時において、重篤な安全性上の懸念が発現するリスクはないと判断した。

### 2) 軟寒天コロニー形成確認試験

軟寒天コロニー形成確認試験では、被験物質として24時間スペルミン加浮遊培養する前のADMPCを用いた。その結果、陰性対照ではコロニー形成が認められず、陽性対照では陰性対照の細胞と陽性対照の細胞を1000:1の割合で混合し播種しても、コロニー形成が認められた。一方、被験物質はいずれのロットにおいてもコロニー形成は認められなかった。これらの結果から、本試験物の原材料である24時間スペルミン加浮遊培養する前のADMPCが足場非依存性の増殖を示す危険性はないものと類推した。

### 3) 核型分析試験

核型分析試験では、被験物質として24時間スペルミン加浮遊培養していないADMPCを用いた。規定の継代数を超えて培養した継代数8の細胞をCALとし、3ロットの細胞の染色体をギムザ染色し、100細胞の染色体数を計測した。比較対照として、継代数3の脂肪組織由来多系統前駆細胞（培養初期）の染色体を解析した。その結果、いずれのロットにおいても染色体数の最頻値は46本で正常細胞と一致していた。以上の結果から、本試験物の原材料である24時間スペルミン加浮遊培養する前のADMPCが腫瘍化するリスクは懸念すべきものではないと類推した。

## 2.3 体内動態試験

FDA organ panel（抗体製剤）に準じて試験物投与後6ヵ月後に30臓器の病理組織学的検索を行い、異常所見を認めなかった。ヒトDNAを特異的に検出するAlu-PCR変法により検索したところ、心臓では検出できるものの、心臓以外の臓器では検出できなかった。本試験物由来の細胞が心臓に生着し、心臓以外の臓器へは分布していないこ

とが示された。

本試験物の薬物代謝試験は実施していない。本試験物は患者の冠動脈に直接投与される。本試験物は投与されたその部位で作用を示すと考えている。本試験物は吸収・分布・排泄の経路を介して、その効果を発揮するものではないため、代謝試験は不要と判断した。また、健常ゲッチング・ミニブタを用いた一般安全性試験において、本試験物投与に起因する全身への影響は認められなかった。したがって、安全性の観点からも、本試験物が投与部位以外に作用し影響を及ぼす可能性はないと考え、薬物代謝試験の実施は不要と判断した。

### 3 臨床での使用成績

これまで国内及び海外において、同様あるいは同等の臨床試験・治験は報告されていない。皮下脂肪組織をコラーゲン分解酵素で単離後非培養のSVFであるADRC® (Adipose tissue-Derived Stromal Cell)をST上昇急性心筋梗塞患者に対して経冠動脈的に投与するとのclinical trialに関しては、Cytori Therapeutics社をSponsorとして実施されている (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00442806)。本申請における細胞製剤は培養工程を経たものであり、細胞培養工程を経ないADRC®とは異なるものである。

#### 1. 序文

##### 1.1. 試験物の化学名又は識別する記号等

識別する記号：スペルミン加培養脂肪組織由来多系統前駆細胞

##### 1.2. 活性成分（本質）

スペルミン加培養脂肪組織由来多系統前駆細胞

### 1.3. 薬理学上の分類と分類内での期待される位置付け

本試験物は、患者自身の腹部皮下脂肪組織からコラーゲン分解酵素にてStromal Vascular Fraction (以下SVF)を分離回収し、SVFから単離したのちに増殖させた脂肪組織由来多系統前駆細胞(ADMPC)を、スペルミン添加浮遊培養した細胞(スペルミン加培養脂肪組織由来多系統前駆細胞：s-ADMPC)を本質とする、ヒト（同種）由来再生医療等製品に該当する。本試験物は重症心筋症（虚血性心筋症（ICM））患者の心臓に投与することにより、心機能不全の進行を抑制あるいは改善することが期待される。

腹部皮下脂肪組織提供から本試験物の投与までの概略を以下に示す。

- ① 腹部皮下脂肪組織の提供  
脂肪吸引手術時に、医療廃棄物として廃棄される脂肪組織を約100~200g提供をうける。
- ② 搬送  
提供された脂肪組織は、専用容器でAMT-Cell Manufacturing Unit (以下CMUと略)へ搬送される。
- ③ 製造と品質管理  
CMUでは、搬送された組織から酵素処理によってStromal Vascular Fraction (SVF)を分離回収し、24時間後に脂肪組織由来多系統前駆細胞を単離培養し、スペルミンを添加して培養すると追加培養すると共に、これら工程にて品質管理を行う。
- ④ 投与  
医療機関内で解凍され、被験者に対し、本試験物を障害された冠動脈領域に経冠動脈的に投与される。

## 1.4. 本臨床研究実施の根拠

### 1.4.1. 対象疾患

虚血性心筋症（冠動脈慢性完全閉塞（CTO）例の冠動脈形成術時あるいは冠動脈形成術不応例）

### 1.4.2. 概念・定義・病因・病態

虚血性心筋症（ischemic cardiomyopathy; ICM）は、1970年 Burch により提案された概念であり、心筋梗塞などの重篤な冠動脈疾患に基づく左室機能不全が原因疾患である<sup>(11)</sup>。ICM は、1995年には WHO/ISFC より“冠動脈病変を有し、心収縮障害を伴う拡張型心筋症に類似した病態”と定義されている。虚血性心筋症の多くは多枝病変、左主幹部病変、再梗塞を背景とし、心筋の広範囲の虚血および梗塞により左室壁運動低下、拡大を認め、心機能は高度に低下しており心不全の病態を呈する。

### 1.4.3. 疫学

虚血性心筋症（ischemic cardiomyopathy; ICM）は、心筋梗塞などの重篤な冠動脈疾患に基づく左室機能不全が原因疾患であり<sup>5)</sup>、DCM 及び HCM とともに、心筋症の大部分を占めている<sup>6,8)</sup>。この ICM は、欧米では非常に多い疾患であるが<sup>7)</sup>、日本でも食生活をはじめとした生活習慣の欧米化とあいまって増加傾向にある<sup>8)</sup>。

### 1.4.4. 標準治療と予後

これまでの治療は、薬物治療とともに血行再建を行い、虚血に伴う可逆的な障害心筋の回復を図ることであった。これら心筋症の対症的治療法としてはジギタリス、利尿薬、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬、β 遮断

薬といった内科的治療が存在するが、それらも奏功しないほど重症化した場合には、もはや根治的治療法として心臓移植しかない<sup>(12, 13)</sup>。虚血性心疾患は、冠動脈の狭窄・閉塞による心筋虚血とそれに続発する心筋障害と心筋幹細胞の枯渇にある。近年、虚血性心筋症に対する心機能回復戦略として、細胞移植法が有用であることが報告されており、すでに自己骨格筋芽細胞あるいは自己心筋芽細胞による治療が開始されている。我が国においても、大阪大学医学部心臓血管外科の澤教授らのグループが、骨格筋芽細胞シート移植による心筋症治療の開発を試み、テルモ株式会社が自己骨格筋芽細胞シートにかかる企業治療を開始している。しかしながら、骨格筋芽細胞シート移植術は、いわゆるサイトカイン効果を期待したものであり、残存心筋細胞が少ない状態では治療効果が十分には期待できず、移植後心筋細胞へと分化・生着し、長期にわたって効果が期待できる細胞治療法の開発が求められている。

### 1.4.5. 併存疾患及び合併症

対象疾患に起因すると思われる併存疾患の主なものは、肺高血圧症と心室性不整脈である。肺高血圧症に関しては、適応であれば肺高血圧症治療薬、心室性不整脈に関してはその種類に応じた治療薬を投与する。

### 1.4.6. 対象疾患の設定根拠

頻回の心筋梗塞にて、心筋組織は線維化し、心筋組織を再構築する心筋幹細胞は枯渇し、虚血性心筋症としての病態が成立する。血流改善を目的として冠動脈形成術あるいは冠動脈完全閉塞の開通術が行われるが、残存心筋あるいは心筋幹細胞は少なく線維化しており、内科的治療法には十分に

は反応しない。骨格筋芽細胞のようにサイトカイン効果にて血管新生を期待する治療ではなく、心筋細胞として生着する本再生医療等製品は、線維化した心筋組織内へ心筋様細胞を供給することが期待される。

心筋再生修復を目的とする再生医療等製品の投与方法としては、本品の投与方法である細胞懸濁剤の経冠動脈的投与のみならず、心筋組織への直接注入や細胞シートとして心臓表面への貼付が想定される。心筋組織への直接注入法では、MAGIC Trialにて議論されているように心筋組織の障害による不整脈の発生が想定され、また菲薄化した心臓組織への注入による組織障害と心破裂のリスクも想定される。細胞シートとして心臓表面への貼付では、手術野の限界から心臓後面への貼付は困難である。本品の投与方法である細胞懸濁剤の経冠動脈的投与では、虚血性心筋症を惹起する心筋梗塞巣の血管支配領域に特異的に細胞製剤を供給することが可能であり、心破裂のリスクは想定されず、また投与貼付領域の制限はない。一方で、経血管的な投与であるため、細胞による微小梗塞発症リスクが完全には否定できていない。微小梗塞リスクは、細胞による疏血領域に心筋細胞が残存している場合には、残存心筋の虚血死滅が生じるためであり、細胞製剤投与領域に残存心筋が少なければ梗塞発症はリスク要因とならない。

本品が適応とするのは虚血性心筋症であり、用法は冠動脈慢性完全閉塞（CTO）例の冠動脈形成術時あるいは冠動脈形成術不応例である。冠動脈完全閉塞（CTO）例あるいは冠動脈形成術不応例で血管形成術後の血流改善でも心機能が十分に改善しないのは、残存心筋がないためである。残存心筋がないということは、経冠動脈的に本再生医療等製品（細胞製剤）を投与しても梗

塞を生じるリスクが少ないということである。

残存心筋が少ない領域に選択的に細胞製剤を投与できるというベネフィットから本品の適応症は虚血性心筋症とし、心筋梗塞発症リスク回避の観点から、本品の用法は冠動脈完全閉塞（CTO）例の冠動脈形成術時あるいは冠動脈形成術不応例と限定した。

#### 1.4.7. スペルミン加培養脂肪組織由来多系統前駆細胞懸濁液による治療

##### 1)動物を用いた試験系

本試験物投与による心機能改善については、ブタ慢性心筋梗塞モデルを用い、免疫抑制下にて経冠動脈的に細胞製剤を投与することとした。

有効性検証に関する中大動物重症心不全モデルの選定に関し、ア)動物種、イ)慢性心不全作出方法、ウ)製剤の投与経路に関する考察を行った。

##### ア)動物種

本申請においては、免疫抑制化ブタをモデル動物として採用した。中大動物として、犬、ブタないしは馬、ウシ、羊、山羊などが想定される。本申請においては、ヒト細胞を異種投与することから免疫抑制化を図る必要があり、馬、ウシ、羊、山羊を飼育する施設でクリーン度を維持して投与手技ならびに投与後の免疫抑制化飼育を継続することは、困難である。従って、免疫抑制化に伴う易感染性の観点から、クリーン度を保った手術室あるいは飼育室にての手技、飼育が可能な動物種は犬あるいはブタであると考えた。

ついで、得られるデータのヒトへの外挿性の観点から、心臓サイズがよりヒトに近い動物種であり、かつ入手が比較的容易である動物種としてブタを選択した。従前の

非臨床試験あるいは前臨床試験では、犬をモデル動物として多用されていたところであるが、近年ブタを用いる試験比率が増加している、という背景も考慮した。

いずれの動物種を用いるにあたって、ヒト細胞を投与するという異種投与であるという課題が残る。免疫抑制化のため、細胞投与 5 日前より連日 CyA の筋肉注射を行った。

#### イ) 慢性心不全作出方法

本申請においては、対象疾患が虚血性心疾患に伴う虚血性心筋症であるため、左冠動脈 2 回閉塞再開通して 4 週間後に心駆出率が、ヒトでの虚血性心筋症の基準を満たす 40%以下の慢性心不全モデルとした。具体的なモデル動物作出方を記載する。大腿動脈から経皮経管的に 6F のガイドカテーテルを左冠動脈入口部にかき、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 60 分バルーンング (閉塞再開通) を行った。1 週間後、ガイドワイヤーを左冠動脈前下降枝遠位部 (AHA 分類の#8) まで挿入し、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 90 分バルーンング (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。

#### ウ) 投与方法

本申請においては、経皮経管経冠動脈的な細胞製剤投与とすることとした。細胞製剤の投与方法としては、外科的に開胸し、細胞をシートあるいはパッチ状に投与する方法や直視下にて細胞懸濁液ないし細胞塊懸濁液を注射する方法がある。これらは外科的侵襲度が高いことは十分に考慮される

べきである。内科的に投与する場合、心腔内面から細胞懸濁液ないし細胞塊懸濁液を注射する方法、あるいは経冠動脈的に選択的に細胞懸濁液を投与する方法が想定される。心腔内面から細胞懸濁液ないし細胞塊懸濁液を注射する方法として、一例として NOGA システムがある。心筋細胞が枯渇している領域に細胞が投与されたことを確認できるという長所もあるが、一方で心筋が菲薄化している場合心破裂の可能性もあり、当該機器を用いた臨床研究で死亡例が認められている (神戸中央市民病院)。経冠動脈的に細胞懸濁液を投与する方法では、細胞の塞栓障害による健常心筋部位の障害の可能性を否定できない。従って、経冠動脈的に細胞懸濁液を投与する場合においては、細胞投与部位をいかに特異的に選定するかが特に安全性の観点から重要となる。

本試験物は、経皮経管経冠動脈的に投与するが、投与に際し血流が保たれていることが造影検査にて確認され、かつ心筋残存量が少ないことが核医学検査により確認されている部位に対し、カテーテルガイド下カテーテルを用いて選択的に投与するべきであり、モデル動物における投与も同等の手法によった。

#### 2) 有効性試験結果

心筋梗塞モデル作出 4 週間後、経皮経管経冠動脈#7 選択的に spermine 加培養 hADMPC を投与した。spermine 加培養 hADMPC はヘパリン加乳酸リンゲルに懸濁したものであって、ブタ体重あたり  $0, 1 \times 10^5, 3 \times 10^5, 1 \times 10^6, 3 \times 10^6 / \text{kg}$  ( $5 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ ) を有効性用量設定試験を兼ねて投与した。本試験物投与直前、投与後 4 週後、8 週後、12 週後に心臓超音波検査を行い、心駆出率 (EF%) の改善度 ( $\Delta \text{EF}$ ) をもって評価した。

3x10<sup>5</sup> cells/kgにおいて、ΔEFは最も改善を認め、当該細胞数 (/kg) を最適用量として設定した。

また、spermine 加培養 hADMPC 投与 12 週間後、被移植個体を犠牲死させ、被投与心臓を組織学的に検討したところ、ヒト alpha-cardiac actin、ヒト actinin の発現を認めた。これは spermine 加培養 hADMPC が、心筋内で心筋へと生着・分化していることを示唆するものである。

これら結果は、本試験物の対象患者の治療にむけた POC の取得を示唆するものである。

### 3)国内外における臨床試験・治験の状況

これまで国内及び海外において、同様あるいは同等の臨床試験・治験は報告されていない。

単離後無培養の脂肪組織由来細胞である hADSCをST上昇急性心筋梗塞患者に対して経冠動脈的に投与するとのclinical trialに関しては、Cytori Therapeutics社をSponsorとしてOngoingである (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00442806)。本申請における細胞製剤は培養工程を経たものであり、細胞培養工程を経ないhADSCとは異なるものである。

骨髄由来間葉系幹細胞移植は、癌や血液疾患に関するものが多数を占めたが、心疾患を対象としたものも実施されている。心筋幹細胞移植は、数は多くないがスポンサーがBioheart社、Mytogen社 (現在はAdvanced Cell Technology社が権利保有)、Genzyme社、Fina Biotech社と、ベンチャー企業の興味が高いことが伺える。その他の細胞による心疾患治療として、細胞製剤、造血幹細胞などによる臨床試験が実施されている。

### 1.4.8. 本臨床研究実施が可能であると判断した理由

本試験物は、冠動脈の支配状態がヒトに近似し側副血行路が発達しないため慢性心不全モデルに適したブタを用いた試験において、本試験物の冠動脈投与にて低下した左室収縮機能の改善作用を有し、その至適用量が明確にされ、致死性不整脈を含めた毒性を認めていない。

本細胞製剤は、経血管的な投与であるため細胞による微小梗塞発症リスクが完全には否定できない。微小梗塞リスクは、細胞による疏血領域に心筋細胞が残存している場合には、残存心筋の虚血死滅が生じるためであり、細胞製剤投与領域に残存心筋が少なければ梗塞発症はリスク要因とならない。健常ミニブタを用いた単回投与安全性試験にて、心筋組織が健常である個体に経冠動脈的に投与想定3倍量の細胞を投与しても、心筋障害を反映する血中心筋逸脱酵素値の上昇は認めず、投与予定細胞数での梗塞のリスクは最小化されていると考える。

### 1.5. 予期される予防的、治療的又は診断的適応

重症心筋症患者における低下した心機能の維持あるいは改善

### 1.6. 被験薬を評価する上で留意すべき全般的事項

#### (1) 重篤な不整脈の危険性について

これまでの多心疾患を対象とした臨床試験・治験において、リスクの程度の差はあれ、重篤な不整脈の発生が報告あるいは予測された試験計画とされている。以上より、不整脈の検査・観察を充分に行い、不整脈の診断、治療に関しては、注意深く観察す

ることとした。

(2) 感染性物質に対する安全性について

本試験物の製造工程中で使用している牛胎児血清に関しては感染症の伝播を防止するための安全対策が講じられている。しかしながら、生物由来原料を原材料としていることに由来する感染症伝播のリスクを完全に排除することができないことを被験者に対して説明し、その理解を得る。また、本試験実施医療機関において本試験物の使用の記録を20年間保存する。

(3) 品質に関する試験について

治験責任者または治験分担者は、投与後に不適合の項目があること等が判明した場合には、本試験物を投与した被験者の観察を十分に行い、薬剤（抗生剤等）投与等の適切な処置を行う。

参考文献

- 1) 第50回厚生科学審議会科学技術部会議事録 資料3-2.  
<http://www.mhlw.go.jp/za/0810/d08/d08.txt>
- 2) Richardson P, McKenna W, Bristow M, et al.: Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation* 1996, 93:841-842
- 3) Miura K, Nakagawa H, Morikawa Y et al.: Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy in Japan: results from a nationwide survey. *Heart* 2002, 87:126-130
- 4) Matsumori A, Furukawa Y, Hasegawa K et al.: Epidemiologic and clinical

characteristics of cardiomyopathies in Japan: results from nationwide surveys. *Circ J* 2002, 66:323-336

- 5) Burch GE, Tsui CY, Harb JM : Ischemic cardiomyopathy. *Am Heart J* 1972, 83:340-350
- 6) 土居 義典 他：循環器病の診断と治療に関するガイドライン（2006年度合同研究班報告）肥大型心筋症の診療に関するガイドライン（2007年改訂版）
- 7) 北畠 颯 他：循環器病の診断と治療に関するガイドライン（2004年度合同研究班報告）虚血性心疾患の一次予防ガイドライン（2006年改訂版）
- 8) 平成 16 年 厚生労働省 人口動態統計特殊報告 心疾患－脳血管疾患死亡統計の概況
- 9) 北畠 颯 他：心筋症 診断の手引きとその解説. 厚生労働省難治性疾患克服研究事業 特発性心筋症調査研究班 2005, pp37-50
- 10) 松崎 益徳 他：循環器病の診断と治療に関するガイドライン（2004年度合同研究班報告）慢性心不全治療ガイドライン（2005年改訂版）. *Circ J* 2005, 66: suppl IV: 1351-141

## 2. 物理的・化学的及び薬剤学的性質並びに製剤組成

### 2.1. 物理的・化学的性質

本試験物の本質は細胞であるため、本項は該当しない。

### 2.2. 生物学的性質

2.2.1. スペルミン加培養脂肪組織由来多系統前駆細胞懸濁凍結液（本試験物）の出荷判定規格

### 2.2.1.1. 出荷判定規格及び試験方法

#### 2.2.1.2. 試験方法

##### 1)性状

Countessによる撮影結果により凝集のない事を確認、記録保存のために写真撮影を行なうことを規格として設定した。

##### 2)定量

Countessにて生存細胞数を測定する。その結果を全体量に換算して細胞数を定量する。

##### 3)確認試験

本試験物は、投与後に心臓組織内で心筋細胞へと分化生着することが求められることから、スペルミン加培養にて発現・増強することを規格として設定した。

##### 4)純度

現在の技術で幹細胞の確認する方法は表面マーカーの特異性を計る方法が有力である。剥離した細胞の表面マーカーを染色し、Flowcytometryにて陽性細胞が各々70%以上であることを規格として設定した。

##### 5)Viability

剥離した細胞をトリパンプルーにて染色しCountessにて測定、70%以上のViabilityがあることを規格として設定した。

#### 2.2.2. 組織、細胞、製剤の保存

採取した脂肪組織の一部	10年間
凍結保存細胞製剤	10年間

### 2.3. 薬剤学的性質並びに製剤組成

#### 2.3.1. 薬剤学的性質

本試験物は、外観は白色の細胞懸濁であり、次に示すような性質を持つ。無菌試験、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験に適合する。基準及び試験方法は下表のとおりである。

#### 2.3.2. 製造関連物質の安全性評価

被験者に投与した際に安全性と有効性に影響する可能性が考えられる製造関連物質について議論する。

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、品質及び安全性の面からみて望ましくない物質等として議論すべきは、抗生物質（ゲンタマイシンおよびアムホテリシンB）、スペルミン、ウシ胎児血清である。

ゲンタマイシンおよびアムホテリシンBについては、初期培養までは使用しているが、後期培養以降は使用していない。

ゲンタマイシンの臨床での一日使用量は80-100mgとされ、製造工程で使用されたゲンタマイシンが希釈されずに全量が細胞製剤に残留していても安全性上懸念は生じないと考える。アムホテリシンBの一日使用量は0.25~0.5mg/kgであり、製造工程で使用されたアムホテリシンBが希釈されずに全量が細胞製剤に残留していても安全性上大きな懸念は生じないと考える。しかしながら、ゲンタマイシン硫酸塩、アムホテリシンBとも、アレルギー反応の惹起を完全には否定できないため、これらの抗生物質に対して過敏症の既往歴がない患者のみを本品の

適用対象とする。

スペルミンは、 $1 \times 10^5$  cells/mLの細胞濃度でスペルミン加培養される。至適投与細胞用量は $3 \times 10^5$  cells/kgであることから、全量が洗浄されず残留していたと仮定しても、経冠動脈的に投与された後に血行循環にて速やかに希釈されと想定され、安全性が懸念される量ではない。

牛胎児血清に検しては、残留量を測定するために牛血清アルブミン (Bovien Serum Albumin; BSA) を指標とし、試験検体を用いてELISAにより残留濃度を測定し、今後評価する。また、牛胎児由来血清を製造工程で用いていることは説明同意文書で説明してICを取得するとともに、アレルギーのないことを問診にて確認する。

牛胎児血清、上皮成長因子、抗生物質 (ゲンタマイシン硫酸塩、アムホテリシンB) 及びスペルミン以外の成分については、その一般的な用法・用量に比べ製造での使用量が少ないこと、製造の初期工程のみの使用であること、以降の工程で洗浄・置換操作を繰り返し行うことから、最終的に本試験物への残存量は極めて少ないと考えられる。

### 2.3.3. 感染性物質の安全性評価

感染性物質に対する安全性に影響を与える可能性が考えられる製造関連物質として、牛胎児血清、インスリン、EGF、トランスフェリン、コラーゲン分解酵素、抗生物質に含まれるアムホテリシンBに関し議論する。

インスリン、EGF、トランスフェリン、コラーゲナーゼ、アムホテリシンBは微生物由来である。インスリンは医薬品として既承認のものを原料として用いる。

EGF、トランスフェリンに関しては、製造の過程でanimal freeである。

アムホテリシンBは添加物としてウシ由来のデスオキシコール酸を含んでいるが、医薬品として既承認品であり、かつ最大残留想定量は臨床使用量を下回るため、リスクは著しく低いと考えられる。

動物種及び使用部位：牛胎児由来血液原料について：

当該牛胎児血清は、ウシ胎児の血液に由来する。Certificate of Analysis の Origin に記載の通り、BSE 発生の報告がない国を原産とする健康な動物に由来する原料を使用している。また、原料は当該政府に登録された屠畜場から入手しており、BSEに感染している動物由来の原料及びEC 規定中 (REGULATION (EC) No 999/2001 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 22 May 2001) の Annex V に記載される特定危険部位を原材料としていない。当該牛胎児血清は、妊娠雌牛を屠殺したのちに胎児を取り出し、閉鎖かつ無菌的に取り出した血液を原料として使用し、無菌的に製造されている)。無菌試験及びマイコプラズマ否定試験、米国連邦規則 9CFR113.53 に従ったウイルス試験を実施し、これら全ての試験に合格したものを使用する。さらに、ウイルス不活化を目的として 25-35kGy の  $\gamma$  線照射処理を実施している。

### 2.3.4. 安定性

本試験物3ロットについて、長期凍結保存による影響、解凍時、解凍後10時間保存後、24時間保存後に外観確認を行い、本試験物のバイアビリティ、フローサイトメトリー解析を実施する予定である。

## 3. 薬理、毒性、薬物動態及び薬物代謝

### 3.1. 薬理作用

#### 3.1.1. 効力を裏付ける試験

##### 1) モデル動物

ブタは、冠動脈の支配状況がヒトに近く、側副血行路が発達しにくいことから、心筋虚血による慢性心不全モデル用の動物として適している<sup>1)</sup>。このことから、箇月齢の雌の食肉ブタを用いて慢性心筋梗塞モデルを作製し、このモデル動物の冠動脈にヒトあるいはブタ自己本試験物を投与し心機能の改善効果を検討した。

ブタ慢性心筋梗塞モデルの作出方は、全身麻酔下にて大腿動脈から経皮経管的に 6F のガイドカテーテルを左冠動脈入口部にかけて、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 60 分バルーン閉塞 (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) にてバルーン閉塞 (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) ヒト本試験物のブタ慢性心筋梗塞モデルを用いた有効性用量設定試験

心筋梗塞モデル作出4週間後、経皮経管経冠動脈#7選択的に本試験物を投与した。ブタ体重あたり  $0, 1 \times 10^5, 3 \times 10^5, 1 \times 10^6, 3 \times 10^6$  /kg を、有効性試験と有効性用量設定試験を兼ねて投与した。なお、免疫抑制化のため、細胞投与5日前より連日CyAの筋肉注射を行った。

投与した細胞懸濁液の定着と有効性が確

認できる試験期間として投与後12週間を設定し、心臓超音波検査及び観察を実施した。

##### 3) ブタ自己・同種試験物のブタ慢性心筋梗塞モデルを用いた有効性確認試験

ブタ慢性心筋梗塞モデルに投与するブタ自己細胞懸濁液 ( $3.0 \times 10^5$  cells/kg) は、各個体の腹部皮下から2回目の冠動脈閉塞再開通時に同時に採取した脂肪組織を用いて、ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞懸濁液の調製方法に準じて調製した。

この動物を無作為に、ブタ自己試験物、ブタ同種試験物と対照群に振り分けた。投与した細胞懸濁液の定着と有効性が確認できる試験期間として投与後12週間を設定し、「2) ヒト本試験物のブタ慢性心筋梗塞モデルを用いた有効性用量設定試験」と同様に心臓超音波検査及び観察を実施した。本試験では、免疫抑制剤を用いていない。

当該試験において、ヒトおよびブタ自己・同種本試験物投与群で死亡例は認められず、一般状態、体重測定、血液検査、心電図検査、病理解剖学的検査、病理組織学的検査においても、投与に起因する全身状態に及ぼす悪影響は認められなかった。

心機能の改善効果に関しては、ヒト本試験物投与試験では、EF%は投与処置日の平均33.5%から投与12週間後には49.6%にまで回復した。対照群ではEF%はむしろ低下しており、少なくとも左室の収縮機能の改善は生じていないと判断した。(表3.1.1.1参照)。

ブタ自己・自己本試験物投与実験においても、EF%は投与処置日の平均34.5%から投与12週間後には51.5%にまで回復した。対照群ではEF%は投与前後でむしろ低下しており、少なくとも左室の収縮機能の改善は生じていないと判断した。

以上のように、今回用いた心不全モデルは心機能障害が認められたが、本試験物投与によって、低下した左室の収縮機能が改善することが明らかとなった。

表3.1.1.1 EF%値の測定結果 (平均値±標準誤差、単位；%)

群名	動物数	投与日(術前)	投与4週後	投与8週後	投与12週後
S-ADM PC 投与群	4	33.5±1.0	45.3±1.8	47.8±2.2	49.6±1.8
対照群	4	34.3±0.3	34.2±2.1	33.0±2.7	30.12±1.1
試験動物	8	33.9±0.6			

表3.1.1.2 EF%値の測定結果 (平均値±標準誤差、単位；%)

群名	動物数	投与日(術前)	投与4週後	投与8週後	投与12週後
ブタ自己細胞 投与群	3	34.5±1.6	46.2±1.1	50.0±0.9	51.5±1.8
ブタ同種細胞 投与群	4	35.6±1.4	47.7±0.6	50.4±1.4	53.0±1.5
対照群	2	36.9±2.0	37.8±0.2	35.5±0.5	31.5±2.4
試験動物	9	35.5±1.0			

当該試験で得られた心機能の改善メカニズムを検討するために、HE染色に加え、投与した細胞を検出するためのヒト特異的心筋アクチンの免疫染色と、線維化の程度を評価するためのマッソン・トリクロム染色およびシリウス・レッド染色を実施し、心臓を病理組織学的に精査した。梗塞領域に

ヒト特異的心筋アクチン陽性細胞が存在し、また梗塞周辺のブタ心筋領域においてもヒト特異的心筋アクチン陽性細胞が見出されたことから、経冠動脈的に投与された本試験物が、生体心臓内で心筋へと生着分化している所見が得られた。

### 3) 副次的薬理試験

本試験物の副次的薬理試験は実施していない。本試験物投与後6ヶ月での心臓以外の臓器でヒト由来DNAが検出できないことから、投与部位である心臓以外で薬理作用が生じる可能性は考え難い。

### 4) 安全性薬理試験

本試験物の安全性薬理試験は実施していない。一般安全性試験との併合試験にて心電図検査による心室性期外収縮の解析を行い、本試験物投与による重篤な心室性不整脈の発生の可能性について検討した。その結果、心室性期外収縮は本試験物の投与後に認められなかったことから、本試験物による心室性不整脈の危険性は低いと考えられた。

### 5) その他の薬理試験

本試験物を用いたその他の薬理試験は実施していない。

### 参考文献

- 1) Hughes GC, Post MJ, et al. Translational physiology: Porcine models of human coronary artery disease: implications for preclinical trials of therapeutic angiogenesis. J Appl Physiol. 2003; 94: 1689-701.
- 2) 杉本 恒明. 不整脈学. 南江堂,

## 3.2. 毒性

### 3.2.1. 要約

本試験物の安全性を担保するため、本試験物を健常ゲッチングン・ミニブタに経冠動脈的に投与し、その全身毒性の発現について検討した。本試験物は初回届においては単回投与として治験計画が立案されたものであり、単回過量投与の安全性は単回投与毒性試験で担保するため反復投与毒性試験は実施していない。なお、全身毒性試験は日本バイオリサーチ(株)で、薬事法施行規則第43条「申請資料の信頼性の基準」に従って実施されたものである。

*in vitro*の評価として、「平成24年食薬0907第3号」の記載「培養期間を超えて培養した細胞について、目的外の形質転換を起こしていないことを明らかにすること」を参考に、規定の継代回数（5継代）を超えて培養した第8継代の脂肪組織由来多系統前駆細胞をCALとして用い、軟寒天コロニー形成確認試験及び核型分析試験を実施した。軟寒天コロニー形成確認試験は、薬事法施行規則第43条「申請資料の信頼性の基準」に従って日本バイオリサーチ(株)にて実施し、核型分析試験は三菱化学メディエンス株式会社に委託して実施した。

一般的に、間葉系細胞では通常の培養過程においても染色体異常を生じうるが、免疫不全動物への投与で腫瘍を形成するという報告はなく、染色体異常が生じても実際の腫瘍化に至る確率は極めて低いと考えられていること<sup>5)</sup>、成人ドナーから得られる間葉系幹細胞は、腫瘍化することなく50回以上分裂する能力を有するという報告があること<sup>6)</sup>、特に脂肪組織のような間葉系細胞では、遺伝子等の導入なしではがん化や不死

化した報告はないこと<sup>5)</sup>、混入する可能性がある線維芽細胞に関しても、マウスやラットでは培養の過程で不死化能を獲得する場合もあるが<sup>7-9)</sup>、ヒト細胞では変異は起こらずに老化していくことが知られている<sup>10-13)</sup>。また、間葉系幹細胞の心臓への投与は、これまでに100例以上あるが、投与された細胞の腫瘍化についての報告は認めない<sup>14-17)</sup>。これらのことを総合的に考え合わせると、本細胞が腫瘍化するリスクは極めて低いと考えられ、造腫瘍性試験は実施していない。

また、本試験物が遺伝毒性や生殖発生毒性を有する可能性は考え難く、細胞が引き起こす遺伝毒性や生殖発生毒性を検出する試験系は存在しないため遺伝毒性試験や生殖発生毒性試験は実施していない。局所刺激性試験は、単回投与毒性試験において、投与部位の心筋組織状態を確認することが可能であるため実施していない。

### 3.2.2. 健常ゲッチングン・ミニブタを用いた一般安全性試験

本試験物の安全性を担保するための非臨床安全性試験の一環として、本試験物を健常ゲッチングン・ミニブタに経冠動脈的に投与し、その全身毒性の発現について評価した。

ミニブタに spermine 加培養ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞 (ADMPC) を単回冠動脈内投与した場合の影響を観察した。

spermine 加培養 ADMPC 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。対照群として細胞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、spermine 加培養 ADMPC 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。

spermine 加培養 ADMPC 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。

病理組織学的検査では、spermine 加培養 ADMPC 群で塞栓、繊維化、間質の浮腫、好中球の浸潤及び無気肺が認められた。しかし、媒体群及び無投与対照群でも無気肺や塞栓、好中球及びリンパ球の浸潤が認められた。当試験では頸静脈洞にカテーテルを留置し、カテーテルの維持のためヘパリン

ロックを実施していた。ヘパリンロックの際にはカテーテル内の古い血液を吸引してから新鮮なヘパリン加生理食塩液で充填していたが、カテーテル周囲に形成された血栓が吸引されきらずにカテーテルから遊離し、肺で塞栓や炎症反応及を起こしたものと考えられた。

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 spermine 加培養 hADMPC の

$1.0 \times 10^6$  cell/kg の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。

以上のことから、本試験条件下では、本試験物を健常ゲッチングン・ミニブタ冠動脈に投与したことによる毒性学的意義のある変化は検出されなかったと結論した。

### 3.2.3. 軟寒天コロニー形成確認試験

軟寒天コロニー形成確認試験は細胞の足場非依存性の増殖を検出するものであり、その細胞の生体内での造腫瘍性と高い相関性を有することが知られている<sup>3)</sup>。培養細胞が培養により悪性形質転換したかどうかを調べる方法として広く用いられている<sup>3)</sup>ことから、本試験物の悪性形質転換のリスクを検証するために、当該試験を実施した。

悪性形質転換のリスクは倍加回数によって増大すると考えられること、「平成24年食薬0907第3号」に「培養期間を超えて培養した細胞について、目的外の形質転換を起こしていないことを明らかにすること」と記載されていることを考慮し、本試験では、規定の継代回数5を超えて培養した継代数8

の細胞をCALとし、3ロットを用いて被験物質を調製した。

試験はTremblay らの方法<sup>4)</sup>に従って実施した。被験物質は足場非依存性の増殖能を持たないと判断した。今回試験対象とした細胞は、既定の製造条件を超えて製造した本試験物（3ロット）である。この細胞で足場非依存性の増殖能が検出されなかったことは、本試験物の細胞が、そのような増殖能を有していないことを示すものと判断した。

### 3.2.4.核型分析試験

培養過程における脂肪組織由来多系統前駆細胞の染色体の変化の有無を調べるために、核型分析試験を実施した。

染色体レベルで遺伝子が増加するリスクは倍加回数により増大すると考えられること、「平成24年食薬0907第3号」に「培養期間を超えて培養した細胞について、目的外の形質転換を起こしていないことを明らかにすること」と記載されていることを考慮し、本試験では、規定の継代回数5を超えて培養した継代数8の細胞をCALとし、3ロットを対象として試験を実施した。

核型分析では分裂中期の細胞の染色体標本を必要とするため、CALを培養した後、トリプシン・EDTAを用いて細胞培養フラスコから細胞を剥離した。回収した細胞をカルノア固定した後、スライドガラス上に染色体標本作製し、ギムザ染色した。この標本から、分裂中期細胞を検索した。検索された分裂中期細胞のうち、染色体の極端な広がり又は凝集がなく、染色体の本数確認が可能な細胞について、染色体数の計測を実施した。また、上記の細胞のうち、染色体が46本の細胞については10細胞について、それ以外の染色体数を示した細胞につ

いては、全ての細胞について高解像度撮影による分析を実施した。分析は、正常ヒト染色体構成（染色体数：46 性染色体構成：XX又はXY）に比して差異があるか、

「ISCN2009」記載の「ヒト染色体Gバンドパターン模式図」に比して差異があるか、について確認した。核型判定は、「ISCN2009」の染色体核型表記法に基づいて実施した。

ギムザ染色標本を用いた各試料細胞の染色体数測定の結果は、いずれの試料についても最頻値は46本で正常細胞と一致しており、培養過程での変化は確認されなかった。また、各試料について、染色体数が46本であった10細胞及び染色体数に過不足を認めた細胞について高解像度撮影による分析

（染色体数、性染色体構成、及びGバンドパターンの確認）を実施したところ、培養過程における核型の変化は認められず、いずれの試料についても染色体異常は検出されなかった。規定の継代数を超えて培養した継代数8の細胞を超えて培養した細胞において、臨床使用上のリスクが懸念されるような核型の異常が検出されなかったことから、規定回数内の倍加を行った細胞から作製した本試験物の細胞の核型が、問題となるような変化を起こす可能性はないと判断した。

### 3.2.6. 毒性総括

健常ゲッチング・ミニブタを用いた全身毒性の評価では、本試験物を体重換算し、健常ゲッチング・ミニブタに冠動脈に投与した。投与後、一般状態観察、体重測定を実施し、14日後に剖検し、血液検査、及び必要に応じて病理検査を行い、本試験物が全身に及ぼす毒性学的変化について評価した。対照群は本試験質である細胞懸濁液を投与しないヘパリン加乳酸リンゲル同容

量投与群とした。その結果、いずれの検査においても脂肪組織由来多系統前駆細胞懸濁液投与群特有の変化や毒性学的意義のある変化は認められなかった。従って、本試験物の臨床使用時において、重篤な全身毒性が発現するリスクはないと判断した。

軟寒天コロニー形成確認試験の結果、陰性対照ではコロニー形成が認められず、陽性対照では陰性対照の細胞と陽性対照の細胞を1000:1の割合で混合し播種しても、コロニー形成が認められた。一方、被験物質はいずれのロットにおいてもコロニー形成は認められなかった。これらの結果から、本試験物の細胞が足場非依存性の増殖を示す危険性はないものと判断した。

核型分析試験では、規定の継代数を超えて培養した継代数8の細胞をCALとし、3ロットの細胞の染色体をギムザ染色し、100細胞の染色体数を計測した。比較対照として、継代数3の脂肪組織由来多系統前駆細胞（培養初期）の染色体を解析した。その結果、いずれのロットにおいても染色体数の最頻値は46本で正常細胞と一致していた。

以上、腫瘍化否定試験、軟寒天コロニー形成確認試験及び核型分析試験の結果から、本試験物の腫瘍化のリスクは懸念すべきものではないと判断した。

#### 参考文献

- 1) WHO Expert Committee on Biological Standardization 47th Report. WHO Technical Report Series No. 878. 1998. p. 41-3.
- 2) Machida K, Suemizu H, et al. Higher susceptibility of NOG mice to xenotransplanted tumors. *J Toxicol Sci.* 2009;34(1):123-7.
- 3) 小林茂保、早川 堯夫ら. バイオ

医薬品及び産生細胞の品質・安全性評価方法. 株式会社エル・アイ・シー; 1992. p. 88.

- 4) Tremblay JP, Roy B, et al. Human myoblast transplantation: a simple assay for tumorigenicity. *Neuromuscul Disord.* 1991;1(5):341-3.
- 5) 大串 始 監修. 再生医療に用いられる細胞・再生組織の評価と安全性. 株式会社シーエムシー出版; 2007. p. 11-4.
- 6) Peter KL. The regenerative heart. *Business Briefing: Pharmatech* 2002. 2002 Apr;65-71.
- 7) 日本組織培養学会 編. 組織培養の技術 基礎編. 第3版. 朝倉書店; 1999. p.107-9.
- 8) Macieira-Coelho A, Diatloff C, et al. Concept of fibroblast aging in vitro: implication for cell biology. *Gerontology.* 1977;23:290-305.
- 9) Todaro GJ, Green H, Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol.* 1963 May;17:299-313.
- 10) Hayflick L, Moorhead PS, The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961 Dec 25;585-621.
- 11) Nichols WW, Murphy DG, et al. Characterization of a new human diploid cell strain, IMR-90. *Science.* 1977 Apr 1;196(4285):60-3.
- 12) Holliday R, Huschtscha LI, et al. Testing the commitment theory of